

<特集「臨床免疫学の進歩」>

免疫寛容の誘導

山崎 真裕*

京都府立医科大学大学院医学研究科内分泌・代謝内科学

Immunotolerance Induction

Masahiro Yamazaki

Department of Endocrinology and Metabolism

Kyoto Prefectural University of Medicine

Graduate School of Medical Science

抄 録

現在、臓器移植は心臓、肝臓、肺、膵臓など、様々な臓器で行われており、今まで根治不可能な難病と考えられていた疾病の治療法として重要な位置を占める。移植臓器の生着率も、免疫抑制剤の改良、臓器保存の改良、手術技術の向上などにより順調に上がってきている。しかし、もともとの病気からの解放は、移植医療により可能となったが、終生免疫抑制剤を内服しなければならないことには変わりはない。周知の通り、免疫抑制剤の副作用として感染症、悪性新生物があり、移植後のQOLの低下にもつながる。その問題点を解決する方法として、古くから研究がすすめられているのがドナー特異的移植免疫寛容導入 (donor-specific tolerance induction) である。ドナーに対してだけ免疫寛容を導き、ドナー臓器を生着させ、その後の治療を一切必要としない理想的な治療を目標として研究は続けられているが、臨床応用できる方法は開発されていないのが現状である。

ここでは、免疫寛容導入の一般的な概念と、現在の基礎研究から臨床への応用へ向けての問題点、また自己免疫疾患である1型糖尿病の治療としての膵島移植での免疫寛容導入における特徴的な問題点、今後の展望などを解説する。

キーワード：DST, 抗CD154抗体, ドナー特異的免疫寛容導入, Donor-specific tolerance induction, 1型糖尿病, 膵島移植.

Abstract

Organ transplantations are currently performed in various fields, such as heart, liver, lung, pancreas and so on. This therapy occupies important position for the treatment of diseases that we had thought lethal so far. Although the graft survival time is getting longer by the improvement of immunosuppressive drugs, agents for organ preservation and techniques of surgery, patients still suffer from side effects of lifelong general immunosuppressive agents, such as malignant neoplasm, infectious diseases, that lead to decrease in quality of life. Transplantation tolerance is researched to solve these problems, but the mechanisms of tolerance induction have been unclear yet.

Here is the general concept of transplantation tolerance induction, especially using co-stimulation

平成23年 6月25日受付

*連絡先 山崎真裕 〒602-8566 京都市上京区河原町通広小路上ル梶井町465番地
masahiro@koto.kpu-m.ac.jp

blockade, and the problems for clinical application from the research in rodents. And more, I explain the characteristic islet transplantation for type 1 diabetes mellitus, and current issues when the treatment using co-stimulation blockade applies to this disease which is caused by autoimmunity.

Key Words: DST, Anti-CD154 mAb, Donor-specific tolerance induction, Type 1 diabetes, Islet transplantation.

Introduction

移植医療は現在、様々な疾病、例えば、特発性拡張型心筋症に対する心臓移植、肺高血圧症に対する肺移植、肝硬変・劇症肝炎における肝移植、不安定型1型糖尿病に対する膵臓・膵島移植、腎不全に対する腎移植など、において唯一の根治可能な治療として重要な地位を占める医療となってきている。昨年まで我が国においては、脳死での移植は本人の同意の確認ができなければ臓器提供をすることでできず臓器移植の数は限られていたが、2010年7月17日に臓器移植法の改正があり、本人の同意が確認できなくとも、生前の考えのもと家族の同意があれば、脳死患者からの臓器摘出が可能となった。今後、移植臓器不足の問題は徐々にではあるが解消していくと考えられる。もう一つの問題点として、臓器移植を受けたレシピエントは、移植を受ける原因となった疾病からは解放されるが、移植された臓器はHLAミスマッチの同種異系であり、臓器の機能を維持するために終生にわたる免疫抑制剤の内服による“general immune suppression”が必要であり、副作用による感染症の恐れや、悪性新生物の発生などの不安と一生つきあっていく必要があることがあげられる。

それらの問題点を克服するために、以前から研究が続けられているのが、移植免疫寛容導入である。短期間の治療でドナー臓器に対してのみ免疫寛容にし、感染症や悪性腫瘍などに対する免疫力に影響を与えることなく、移植臓器に対しては免疫反応を起こさずに、健康人と同じような生活を送れることが究極の目標となる。

現時点で、人に対して臨床応用されているものはないが、マウス¹⁾やnon-human primates²⁾については様々な研究がおこなわれており、実

用化に向け全世界で精力的に実験が続けられている。

ここでは、免疫寛容導入の基本的な考え方、実際にわれわれの研究室で行われているマウスでの研究、さらには現状での実用化に向けた取り組みなどを紹介しながら、1型糖尿病の治療である膵島移植での問題点などを含めて、今後の展望を述べたい。

Immune tolerance

移植免疫寛容とは、免疫抑制をされていない状態でレシピエント内のドナー臓器がその臓器の機能を維持しながら存在している状態であるが、体内での免疫反応状態で大きく2つに分けられる。一つは“clinical tolerance”（臨床的寛容）であり、もうひとつは“immunological tolerance”（免疫学的寛容）である。この二つは外面的には同じ状態であるが、生体内では大きな違いが存在する。臨床的寛容とは生体内にドナー臓器を攻撃する細胞群は存在するが、regulatory T cellや抑制性サイトカイン、その他のさまざまな働きにより、その攻撃が抑えられており、ドナー臓器がレシピエントの内部で機能が維持できている状態をさす。それに対して免疫学的寛容とは、レシピエントの生体内で、免疫学的にも完全にドナー臓器を攻撃する細胞群が存在しない、つまりは自己と判断されている状態である。

臨床的寛容は、そういった意味で不安定であり、少しの免疫学的なバランスの崩れでドナー臓器への攻撃が再活性化され、一気に移植臓器の拒絶へとつながる。

T cell activation

移植臓器に対する生体内の攻撃で重要な役割を果たしているのが、donor-specific cytotoxic

T cells (CTLs) である。非自己に対しての T cell の活性化は、実際にはもう少し複雑ではあるが、簡単に述べると、移植臓器に出会った樹状細胞などの antigen presenting cells (APCs) が、細胞内で処理したドナー蛋白の一部を MHC 上に antigen を MHC-antigen 複合体として提示する。その複合体に特異的な donor-specific T cell 上の T cell receptor (TLR) と結合することが T cell activation のスタートとなる (signal 1)。その結合により T cell から APC 上の CD40 と結合する CD40 ligand (CD154) が表出される。CD40-CD154 の結合が co-stimulation である。co-stimulation により APC 上に CD80/86 が表出され CTL 上の CD28 と結合することで、完全な T cell activation がおこる (signal 2)。その完全な活性化により、さまざまな炎症性サイトカインの放出がおこり、炎症反応の連鎖的な反応がおこる。(Fig. 1A)

Co-stimulation blockade

T cell activation を利用する方法での移植免疫寛容導入がある。これは、活性化の過程の signal 1 がおこったのち signal 2 が完了するまでのどの段階であれ結合を阻害することで donor-specific CTL の活性化は不完全となり anergy/apoptosis に陥ることを利用している。阻害方法として主に研究されているのは、CD80/86 に特異的に結合し signal 2 を阻害する CTLA4-Ig と、CD40 ligand である CD154 に特異的に結合し co-stimulation を阻害する antiCD154 monoclonal antibody (mAb) がある (Fig. 1B)。それを応用しマウスで寛容導入を行う治療スケジュールとしては、移植当日を day 0 とし、antigen として donor spleen cell を day-7 に静脈内投与を行い (donor-specific transfusion: DST)、anti-CD154 mAb を day-7、-4、0、4 に腹腔内投与することで、CD40-CD154 の co-stimulation を阻害。APC からの CD80/86 の表出を抑え、step 2 を起こさないことで donor-specific CTL を apoptosis に導き、レシピエント内でのドナーへの攻撃細胞を消滅させる (Fig. 2)。

Mechanisms of tolerance induction using co-stimulation blockade

実際にマウスにおいては、上記の DST+anti-CD154 mAb の治療で、permanent な移植心臓³⁾、移植膵島⁴⁾ の生着をみることができ、また長期に渡る移植皮膚の生着が可能となる⁵⁾。ただ、そのメカニズムに関しては、さまざまな研究がおこなわれているにも関わらず、まだまだ不明な点が多い。生着において、IFN- γ の必要性⁶⁾ や、co-stimulation blockade による donor-specific T cell のアポトーシス⁷⁾、CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell の重要性⁸⁾、IL-4 や IL-10 などといった抑制性のサイトカインの働き⁹⁾ などが、これまでの研究で明らかにされてきている。また免疫寛容導入時の LCMV 感染が cross reactivity の観点から donor reactive T cell の活性化を導き、移植片の脱落につながることも示され¹⁰⁾、実際に臨床応用するにあたって寛容導入時のレシピエントの clean room への隔離の重要性や、レシピエントのそれまでの生活歴の中での感染症の既往歴などの影響が示唆されている。

Co-stimulation blockade を用いた免疫寛容導入は、将来確実に臨床での有用性が期待されるが、そのためには、すべてのメカニズムを明らかにすることが必要なのは間違いない。

Peripheral tolerance と Central tolerance

もう一つの免疫寛容の分類として、“peripheral tolerance” と “central tolerance” という分類がある。日本語で表記するなら「末梢性免疫寛容」と「中枢性免疫寛容」になろう。人体の免疫が正常に働く要因として、自己と非自己の区別が重要な部分を占める。骨髄細胞から作られる幼若な CD4⁺CD8⁺ 両陽性細胞はいったん胸腺にリクルートされる。そして胸腺内での自己抗原と出会うことで positive selection/negative selection により、自己の抗原に反応する幼若な T cell は apoptosis に陥り、その生体内では存在しなくなる。様々な理由でそれが破綻し自己の臓器への攻撃を始めることで、膠原病、甲状腺疾

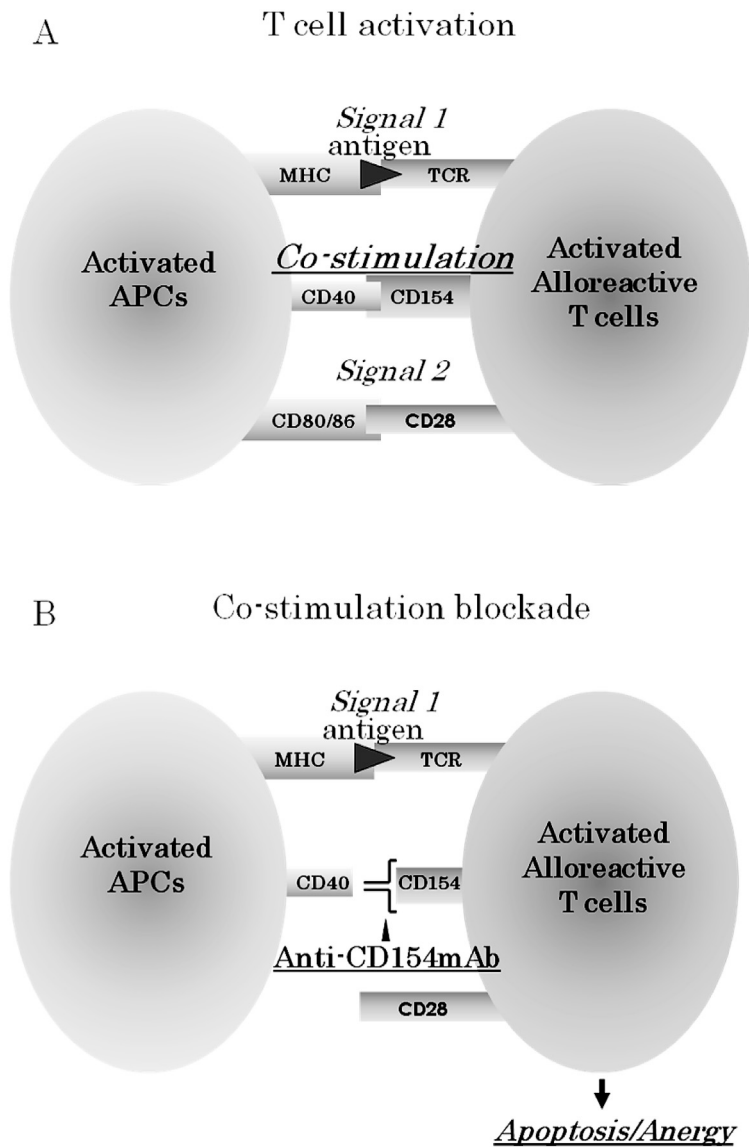


Fig. 1. Panel A, normal T cell activation
Panel B, co-stimulation blockade

患，1型糖尿病などの自己免疫性疾患の発症につながる。

Peripheral tolerance は，その胸腺内での selection がおこった後に末梢血中に出てきた成熟リンパ球に対する tolerance であり，生体内にドナーに対する cytotoxicity は存在するが，regulatory T cell や抑制性サイトカインの働き，

donor-specific T cell が apoptosis ではなく抗原に対して anergy になることで tolerance 状態になっている。つまりドナー臓器は免疫学的に非自己である。それに対して central tolerance とは胸腺内でドナーに対する selection がおこなわれ，成熟した donor-specific T cell が末梢血中には出てこない状態であり，ドナー臓器は自己と

Treatment schedule

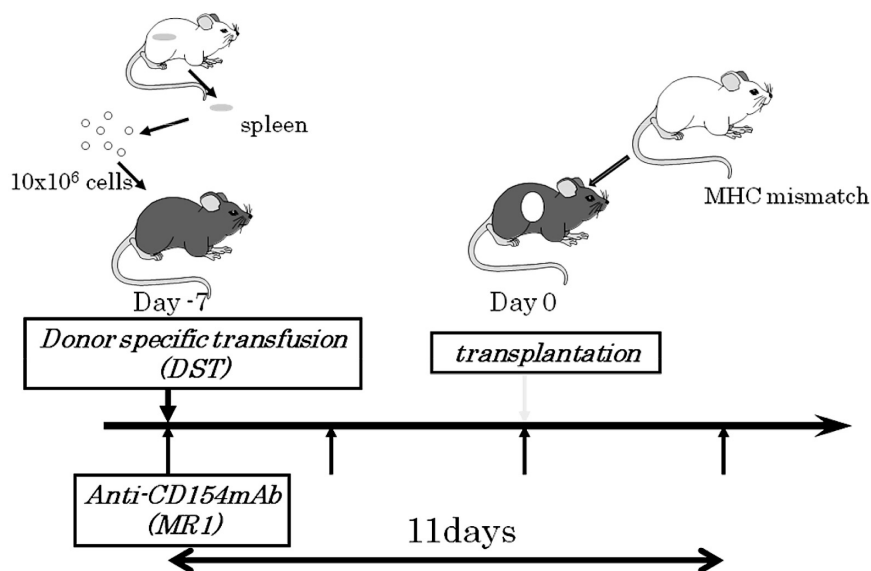


Fig. 2. Treatment schedule of tolerance induction using co-stimulation blockade

認識され攻撃をうけず生着する。実験的には、生後間もないマウスの胸腺を摘出したうえでドナー臓器を移植すること¹¹⁾や、また骨髄移植により血液学的キメラを作成することで central tolerance は誘導される¹²⁾。人間においても、疾患に対する治療で骨髄移植や末梢血幹細胞移植を受けた患者において、同じドナーからの臓器の生着をみる事が可能である。

Tolerance induction using co-stimulation blockade and central tolerance

血液学的キメラが donor-specific な central tolerance を誘導し、ドナー特異的な移植免疫寛容が導入できることは分かっているが、血液学的キメラは graft versus host disease (GVHD) が必発で、レシピエントの生存にも関わり、前処置としての全身への放射線照射、抗癌剤の投与、また終生にわたる強力な免疫抑制剤の内服によるコントロールが必要であり、疾患の治療としては行われているが、臓器移植のための骨髄移植は臨床では行われていない。そこで我々

のグループは、co-stimulation blockade を用いた寛容導入を用いてマウスに MHC 完全 mismatch の骨髄移植を行い血液学的キメラの作成を行った。C57BL/6 (H2b) を recipient として DST + anti-CD154 mAb による治療を行い BALB/c (H2d) の骨髄を 50×10^6 個移植した場合、1% 程度のドナー由来細胞が末梢血にほぼ permanent に存在し (Table 1)、さらに GVHD の兆候もなく、BALB/c の皮膚の permanent の生着を認めた¹²⁾ (Fig. 3)。その免疫寛容は donor-specific であり、third party である C3H/HeJ (H2k) の皮膚は短期間で拒絶される¹²⁾。それは、recipient/donor combination を変えても同様の結果であり、DST + anti-CD154 mAb が GVHD の恐れなく血液学的キメラを作成でき、ドナー特異的に移植臓器の permanent な生着に有用な治療であることを示している。

1 型糖尿病における問題点

1 型糖尿病は劇症型、slow progressive insulin dependent diabetes meritus (SPIDDM) などがあるが、膵β細胞に対する抗体が、なんらかの

Table 1. Frequency and level in recipient mice treated with tolerance induction 8 weeks after simultaneous bone marrow transfusion and skin transplantation from MHC-mismatched donor mice.

Group	Recipient	Donor	BM cells	Frequency(%)	% of
				of chimerism	chimerism
1	C57BL/6	BALB/c	50x10 ⁶	11/12(91.7)	1.07±0.68
2	C57BL/6	BALB/c	-	0/9(0)	<0.10
3	BALB/c	C57BL/6	50x10 ⁶	8/10(80.0)	5.79±2.64
4	BALB/c	C57BL/6	-	0/10(0)	<0.10

allo-skin graft survival time on mice receiving
simultaneous BMT and skin grafting
(C57BL/6 on BALB/c)

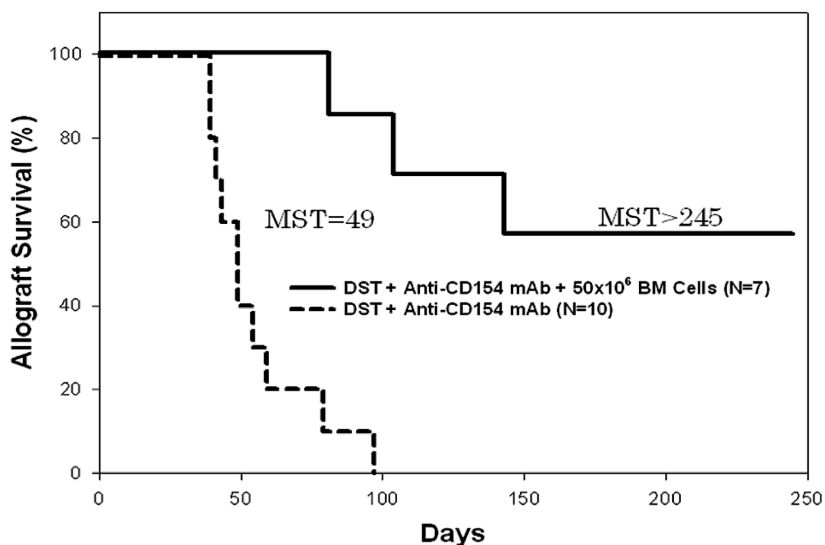


Fig. 3. Skin graft median survival time (MHC) on recipient C57BL/6 treated with tolerance induction before simultaneous BALB/c bone marrow transfusion and skin transplantation.

原因で作られるようになり、膵β細胞数の減少とともにインスリン分泌量が減少、枯渇し外からのインスリン自己注射なしでは生存が不可能になる病態である。ある一定以上インスリン分泌がなくなると、4～5回のインスリン自己注

射やインスリンポンプ、カーボカウントでの食事制限などで懸命に血糖コントロールの安定化の努力をしても、頻回の低血糖、高血糖に悩まされ、膵臓・膵島移植が唯一の治療法となる。1型糖尿病に対する移植医療の特殊性は、臓器・

組織移植が必要となる疾患の中で唯一自己免疫性疾患であること、一般的な移植での免疫抑制療法として使用されるステロイドが、血糖上昇の副作用、膵 β 細胞への直接的な毒性で使用できないことである。膵島移植に関しての免疫抑制法の検討が行われた結果、2000年にカナダのエドモントンでShapiloらがステロイドを使用しない免疫抑制法を確立し、32例の1型糖尿病患者に膵島移植を行い全員の膵島生着を成功させた¹³⁾。これはエドモントン・プロトールとして世界的に広まり、現在まで500例近い膵島移植が行われた。わが国でも2004年に京都大学で松本先生を中心に、膵島の保存液やプロトコルの改良した方法で生体からの移植を含め17例が行われた。しかし、長期の経過観察で、このエドモントン・プロトコルを使用しても、やはり終生、免疫抑制剤の内服が必要であり副作用の不安からは逃れられないこと、また2~3年すると移植膵島の数が減少し血糖コントロールが可能なインスリン分泌は保てなくなり、血糖の不安定さは移植前より改善されるものの、再度インスリン自己注射が必要となることなどが分かってきている。たとえ、インスリン自己注射から解放されても、免疫抑制剤内服を終生必要とすることには変わりはない。

また、1型糖尿病の患者に、一卵性双生児からの膵臓移植を行っても拒絶されることが昔から知られている。この現象の原因として1型糖尿病患者の体内に存在する、膵 β 細胞に特異的な auto-reactive memory T cell の存在があげられる。実際に1型糖尿病のモデルマウスである non-obese diabetic mouse (NOD) では、DST+anti-CD154 mAb による治療は移植片の生着期間を延ばさない¹⁴⁾。NOD に関しては、さまざまな免疫学的異常が分かっており、auto-reactive memory T cell のみによる拒絶ではないことは分かっているが、ひとつの拒絶のメカニズムであることは間違いない。non-lethal radiation 後のNODはDST+anti-CD154 mAbによる治療で血液学的キメラも作成でき、移植片の生着もみられる¹⁵⁾。

自己免疫性疾患である1型糖尿病への膵島移

植は、naïve な donor-specific T cell の tolerance induction だけでなく、すでに体内に存在する膵 β 細胞に対する auto-reactive memory T cell の tolerance induction も必要である。現時点では有用な方法はみつかっておらず、今後の重要な研究課題となるとともに、臨床応用への大きな壁となる可能性が高い。しかしそれを乗り越えることができれば、1型糖尿病であってもインスリン自己注射から解放されるとともに、免疫抑制剤なしで移植膵島が生着し、合併症の進行の恐れがなく健康な方と同様の生活を営むことができるようになるのである。

Conclusion

移植医療を囲む環境は、法律の問題や、海外との宗教観の違いなど、わが国の場合まだまだ解決しなければならない問題も多い。しかし、実際に移植医療は行われており、昨年の移植医療法の改正により今後も今まで以上に移植患者の増加が見込まれる。さまざまな努力により生着率の改善は目覚ましい。免疫抑制剤の改良もそれに寄与しているのは間違いない。しかし、現時点では肝移植後の特異な状態を除き、終生の免疫抑制剤の内服は必要であり、その副作用の不安は一生付きまとう。移植免疫寛容導入は移植される患者のQOLを考えた場合、その不安からの解放は重要な問題であり、免疫寛容導入、それもドナー特異的な免疫寛容導入が強く望まれる。免疫学の進歩も目覚ましいものがあり、移植臓器の拒絶に重要な細胞の種類や活性化のメカニズムなどの研究も進んでいる。それらの研究の進歩とともに、免疫寛容導入法の進歩、改良も期待される。また1型糖尿病は何度もいうように自己免疫疾患であり、auto-immunity に打ち勝つ治療法の開発は、必ず必要になってくる。われわれの研究では、regulatory T cell の働きが、その部分にも重要な役割を果たしている可能性を示唆しており¹²⁾、研究の発展が期待される。また、DST+anti-CD154 mAb の治療で寛容導入されない memory T cell の活性化機序の詳細な検討が進めば、マウスのように pathogen free な状態ではない我々人間の体内に

存在する様々な memory T cell の cross reactivity による拒絶の回避, auto-reactive memory T cell の抑制法の確立につながり, 移植医療だけではなく, 膠原病などの自己免疫性疾患の治療法への応用なども期待される。

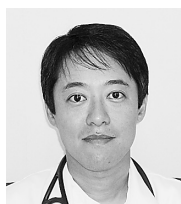
まだまだメカニズムに不明な点は多いが, この分野での今後の研究が発展により, いずれは, 臨床応用され免疫抑制剤を使用しない移植医療を実現したい。

文 献

- 1) Markees TG, Phillips NE, Noelle RJ, Shultz LD, Mordes JP, Greiner DL, Rossini AA. Prolonged survival of mouse skin allografts in recipients treated with donor splenocytes and antibody to CD40 ligand. *Transplantation* 1997; 64: 329-335.
- 2) Xu H, Elster EA, Blair PJ, Burkly LC, Tadaki DK, Harlan DM, Kirk AD. Effects of combined treatment with CD25- and CD154-specific monoclonal antibodies in non-human primate allotransplantation. *Am J Transplant* 2003; 3: 1350-1354.
- 3) Lu L, Li W, Fu F, Chambers FG, Qian S, Fung JJ, Thomson AW. Blockade of the CD40-CD40 ligand pathway potentiates the capacity of donor-derived dendritic cell progenitors to induce long-term cardiac allograft survival. *Transplantation* 1997; 64: 1808-1815.
- 4) Parker DC, Greiner DL, Phillips NE, Appel MC, Steele AW, Durie FH, Noelle RJ, Mordes JP, Rossini AA. Survival of mouse pancreatic islet allografts in recipients treated with allogeneic small lymphocytes and antibody to CD40 ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 9560-9564.
- 5) Markees T, Phillips N, Gordon E, Noelle RJ, Mordes JP, Greiner DL, Rossini AA. Improved skin allograft tolerance induced by treatment with donor splenocytes and an extended course of anti-CD154 monoclonal antibody. *Transplant Proc* 1998; 30: 2444-2446.
- 6) Markees TG, Phillips NE, Gordon EJ, Noelle RJ, Shultz LD, Mordes JP, Greiner DL, Rossini AA. Long-term survival of skin allografts induced by donor splenocytes and anti-CD154 antibody in thymectomized mice requires CD4(+) T cells, interferon-gamma, and CTLA4. *J Clin Invest* 1998; 101: 2446-2455.
- 7) Turgeon NA, Banuelos SJ, Shultz LD, Lyons BL, Iwakoshi N, Greiner DL, Mordes JP, Rossini AA, Appel MC. Alloimmune injury and rejection of human skin grafts on human peripheral blood lymphocyte-reconstituted non-obese diabetic severe combined immunodeficient beta2-microglobulin-null mice. *Exp Biol Med* 2003; 228: 1096-1104.
- 8) Yamazaki M, Pearson T, Brehm MA, Miller DM, Mangada JA, Markees TG, Shultz LD, Mordes JP, Rossini AA, Greiner DL. Different mechanisms control peripheral and central tolerance in hematopoietic chimeric mice. *Am J Transplant* 2007; 7: 1710-1721.
- 9) Van Gool SW, Vermeiren J, Rafiq K, Lorr K, de Boer M, Ceuppens JL. Blocking CD40-CD154 and CD80/CD86-CD28 interactions during primary allogeneic stimulation results in T cell anergy and high IL-10 production. *Eur J Immunol* 1999; 29: 2367-2375.
- 10) Welsh RM, Markees TG, Woda BA, Daniels KA, Brehm MA, Mordes JP, Greiner DL, Rossini AA. Virus-induced abrogation of transplantation tolerance induced by donor-specific transfusion and anti-CD154 antibody. *J Virol* 2000; 74: 2210-2218.
- 11) Markees TG, Phillips NE, Gordon EJ, Noelle RJ, Shultz LD, Mordes JP, Greiner DL, Rossini AA. Long-term survival of skin allografts induced by donor splenocytes and anti-CD154 antibody in thymectomized mice requires CD4(+) T cells, interferon-gamma, and CTLA4. *J Clin Invest* 1998; 101: 2446-2455.
- 12) Seung E, Mordes JP, Rossini AA, Greiner DL. Hematopoietic chimerism and central tolerance created by peripheral-tolerance induction without myeloablative conditioning. *J Clin Invest* 2003; 112: 795-808.
- 12) Yamazaki M, Pearson T, Brehm MA, Miller DM, Mangada JA, Markees TG, Shultz LD, Mordes JP, Rossini AA, Greiner DL. Different mechanisms control peripheral and central tolerance in hematopoietic chimeric mice. *Am J Transplant* 2007; 7: 1710-1721.
- 13) Ryan EA, Lakey JR, Rajotte RV, Korbitt GS, Kin T, Imes S, Rabinovitch A, Elliott JF, Bigam D, Kneteman NM, Warnock GL, Larsen I, Shapiro AM. Clinical

- outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol. *Diabetes* 2001; 50: 710-719.
- 14) Markees TG, Serreze DV, Phillips NE, Sorli CH, Gordon EJ, Shultz LD, Noelle RJ, Woda BA, Greiner DL, Mordes JP, Rossini AA. NOD mice have a generalized defect in their response to transplantation tolerance induction. *Diabetes* 1999; 48: 967-974.
- 15) Seung E, Iwakoshi N, Woda BA, Markees TG, Mordes JP, Rossini AA, Greiner DL. Allogeneic hematopoietic chimerism in mice treated with sublethal myeloablation and anti-CD154 antibody: absence of graft-versus-host disease, induction of skin allograft tolerance, and prevention of recurrent autoimmunity in islet-allografted NOD/Lt mice. *Blood* 2000; 15: 2175-2182.

著者プロフィール



山崎 真裕 Masahiro Yamazaki

所属・職：京都府立医科大学大学院医学研究科内分泌代謝内科学・学内講師

略歴：1996年3月 愛媛大学医学部 卒業

1996年4月 京都府立医科大学 第一内科 研修医

1998年4月 明治鍼灸大学附属病院 内科 助手

1999年4月 大阪鉄道病院 血液内分泌内科 医員

2001年4月 京都府立医科大学大学院医学研究科

2003年6月～2006年3月

University of Massachusetts Medical School Diabetes Division
研究員

2006年4月 京都八幡病院 内科医員

2009年4月 京都府立医科大学大学院医学研究科 助教

2011年4月～現職

専門分野：糖尿病，移植免疫（臍島移植）

主な業績：1. Yamazaki M, Pearson T, Brehm MA, Miller DM, Mangada JA, Markees TG, Shultz LD, Mordes JP, Rossini AA, Greiner DL. Different mechanisms control peripheral and central tolerance in hematopoietic chimeric mice. *American Journal of Transplantation* 2007; 7: 1710-1721.

2. Yamazaki M. Low serum testosterone concentration is a predictor of the progression of carotid atherosclerosis in men with type 2 diabetes. *京都府立医科大学雑誌* 2007; Vol.116, No.5: 329-336.