

表2. 大腸粘膜菌叢の投与薬剤間での比較

Bacterial group	KM/MTZ経口投与(n=12)		CMZ静注(n=6)	
	No. of bacteria(log ₁₀) Mean±SD	frequency (%)	No. of bacteria(log ₁₀) Mean±SD	frequency (%)
Total aerobes	3.69±1.54	75.0	3.42±0.89	83.3
Enterococcus	2.36±0.64	33.3	2.34±0.58	33.3
Streptococcus	2.85±1.98	25.0	2.53±0.63	50.0
Enterobacteriaceae	2.38±1.10	16.7	2.53±0.83	33.3
Bacillus	2.08±0.19	16.7	<2.00	0.0
Corynebacterium	2.03±0.09	8.3	<2.00	0.0
Staphylococcus	<2.00	0.0	2.83±0.84	83.3*
Gram-negative bacilli	2.03±0.09	8.3	2.20±0.49	16.7
Gram-negative cocci	<2.00	0.0	2.47±0.72	33.3
Total anaerobes	2.59±0.68	50.0	3.83±0.44*	100*
Bacteroidaceae	2.25±0.48	25.0	3.72±0.40*	100*
Actinomyces	2.18±0.43	16.7	2.35±0.86	16.7
Clostridium	2.24±0.59	16.7	<2.00	0.0
Peptococcaceae	2.05±0.17	8.3	<2.00	0.0
Bifidobacterium	<2.00	0.0	2.19±0.47	16.7
Total bacterial counts	3.97±1.44	83.3	4.09±0.40	100.0

* p<0.05, t test

は菌数のみが有意に低かった。一方Cefmetazole投与群では*Clostridium*, *Peptococcaceae*の検出率および菌数が、*Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*では菌数のみが有意に低かった。

投与薬剤間での科・属レベルでの比較を表2に示す。kanamycin/metronidazole投与群における嫌気性菌、*Bacteroidaceae*の検出率および菌数がcefmetazole投与群よりも有意に低く、*Staphylococcus*の検出率が有意に高かった。

抗菌薬非投与群から検出された菌種を表3に、kanamycin/metronidazole投与群から検出された菌種を表4に、

表3. 抗菌薬非投与群の大腸粘膜から検出された菌種

Rank	Species	No. of bacteria(log ₁₀) frequency(%)		Rank	Species	No. of bacteria(log ₁₀) frequency(%)	
		Mean±SD	(n=46)			Mean±SD	(n=46)
1	<i>Escherichia coli</i>	2.94±1.39	47.8	32	<i>Streptococcus mitis</i>	2.17±0.83	4.3
2	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	3.37±1.97	39.1	33	<i>Peptostreptococcus</i> spp.	2.16±0.83	4.3
3	<i>Bacteroides ovatus</i>	3.06±1.86	30.4	34	<i>Eubacterium</i> spp.	2.15±0.70	4.3
4	<i>Bacteroides vulgatus</i>	3.04±1.84	30.4	35	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.13±0.64	4.3
5	<i>Bacteroides fragilis</i>	2.83±1.54	28.3	36	<i>Peptostreptococcus assaccharolyticus</i>	2.12±0.57	4.3
6	<i>Bacteroides distasonis</i>	2.69±1.42	26.1	37	<i>Hafnia alvei</i>	2.04±0.19	4.3
7	<i>Enterococcus faecium</i>	2.66±1.47	21.7	38	<i>Proteus mirabilis</i>	2.03±0.20	4.3
8	<i>Streptococcus milleri</i> group	2.46±1.08	21.7	39	<i>Clostridium ramosum</i>	2.02±0.12	4.3
9	<i>Clostridium innocuum</i>	2.56±1.36	19.6	40	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	2.02±0.10	4.3
10	<i>Streptococcus sanguis</i> group	2.43±1.05	19.6	41	<i>Eubacterium lentum</i>	2.11±0.72	2.2
11	Coagulate-negative <i>Staphylococcus</i>	2.20±0.53	19.6	42	<i>Veillonella</i> spp.	2.09±0.63	2.2
12	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.46±1.16	17.4	43	<i>Bacteroides caccae</i>	2.08±0.56	2.2
13	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.30±0.99	13.0	44	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2.08±0.55	2.2
14	<i>Bacteroides fragilis</i> group	2.43±1.32	10.9	45	<i>Streptococcus salivarius</i> group	2.08±0.55	2.2
15	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2.15±0.58	10.9	46	<i>Fusobacterium</i> spp.	2.08±0.52	2.2
16	<i>Clostridium perfringens</i>	2.30±1.01	8.7	47	<i>Clostridium subterminale</i>	2.06±0.43	2.2
17	<i>Clostridium</i> spp.	2.29±1.06	8.7	48	<i>Bacteroides loesche</i>	2.06±0.41	2.2
18	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.25±1.01	8.7	49	<i>Peptostreptococcus productus</i>	2.06±0.41	2.2
19	<i>Citrobacter freundii</i>	2.22±0.72	8.7	50	<i>Porphyromonas melaninogenica</i>	2.05±0.34	2.2
20	<i>Streptococcus</i> Group G	2.21±0.71	8.7	51	<i>Klebsiella ozonae</i>	2.04±0.27	2.2
21	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	2.19±0.82	8.7	52	<i>Clostridium tertium</i>	2.03±0.24	2.2
22	<i>Streptococcus agalactiae</i>	2.15±0.53	8.7	53	<i>Clostridium limosum</i>	2.03±0.21	2.2
23	<i>Bacteroides uniformis</i>	2.29±1.13	6.5	54	<i>Morganella morganii</i>	2.03±0.19	2.2
24	<i>Streptococcus</i> sp.	2.22±1.00	6.5	55	<i>Clostridium diversus</i>	2.02±0.13	2.2
25	<i>Fusobacterium varium</i>	2.22±0.87	6.5	56	<i>Fusobacterium mortiferum</i>	2.02±0.13	2.2
26	<i>Bacteroides capillosus</i>	2.20±0.77	6.5	57	<i>Lactococcus lactis</i>	2.02±0.12	2.2
27	<i>Bacteroides</i> spp.	2.09±0.49	6.5	58	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2.02±0.12	2.2
28	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.05±0.22	6.5	59	<i>Proteus vulgaris</i>	2.01±0.09	2.2
29	<i>Veillonella parvula</i>	2.21±0.99	4.3	60	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2.01±0.09	2.2
30	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> 2	2.19±0.89	4.3	61	<i>Enterobacter aerogenes</i>	2.01±0.08	2.2
31	<i>Peptostreptococcus magnus</i>	2.18±0.85	4.3	62	<i>Peptostreptococcus lacrimalis</i>	2.01±0.04	2.2

表4. Kanamycin / metronidazole 投与群から検出された菌種

	No. of bacteria(log ₁₀) frequency(%)	
	Mean±SD	(n=12)
1	<i>Enterococcus faecium</i>	2.43±0.80 25.0
2	<i>Bacillus</i> spp.	2.10±0.20 25.0
3	<i>Escherichia coli</i>	2.35±1.05 16.7
4	<i>Clostridium perfringens</i>	2.23±0.55 16.7
5	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	2.18±0.43 16.7
6	<i>Actinomyces israelii</i>	2.18±0.43 16.7
7	<i>Enterococcus</i> sp.	2.08±0.19 16.7
8	<i>Gemella haemolyans</i>	2.28±0.95 8.3
9	<i>Aerococcus viridans</i> 2	2.22±0.75 8.3
10	<i>Enterococcus durans</i>	2.12±0.43 8.3
11	<i>Bacteroides uniformis</i>	2.10±0.33 8.3
12	<i>Prevotella ruminicola brevis</i>	2.08±0.29 8.3
13	<i>Bacteroides vulgatus</i>	2.08±0.26 8.3
14	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2.07±0.23 8.3
15	<i>Leuconostoc</i> spp.	2.07±0.23 8.3
16	<i>Bacteroides ovatus</i>	2.07±0.23 8.3
17	<i>Bacteroides capillosus</i>	2.05±0.17 8.3
18	<i>Peptostreptococcus</i> sp.	2.05±0.17 8.3
19	<i>Lactococcus lactis cremoris</i>	2.03±0.09 8.3
20	Gram-negative bacilli	2.03±0.09 8.3

表5. Cefmetazole 投与群から検出された菌種

	No. of bacteria(log ₁₀) frequency(%)	
	Mean±SD	(n=6)
1	<i>Bacteroides vulgatus</i>	2.97±1.08 50.0
2	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	2.92±1.02 50.0
3	<i>Escherichia coli</i>	2.53±0.83 33.3
4	Gram-positive cocci	2.47±0.72 33.3
5	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> 2	2.36±0.56 33.3
6	<i>Staphylococcus aureus</i>	2.35±0.54 33.3
7	<i>Gemella haemolyans</i>	2.29±0.48 33.3
8	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2.38±0.94 16.7
9	<i>Actinomyces israelii</i>	2.35±0.86 16.7
10	<i>Bacteroides eggerthii</i>	2.28±0.88 16.7
11	<i>Streptococcus oralis</i>	2.24±0.58 16.7
12	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.24±0.58 16.7
13	<i>Bacteroides gracilis</i>	2.23±0.56 16.7
14	<i>Bacteroides ovatus</i>	2.21±0.51 16.7
15	Gram-negative bacilli	2.20±0.49 16.7
16	<i>Bacteroides ureolyticus</i>	2.18±0.44 16.7
17	<i>Bacteroides distasonis</i>	2.15±0.37 16.7
18	<i>Streptococcus sanguis</i>	2.10±0.24 16.7
19	<i>Enterococcus durans</i>	2.10±0.24 16.7
20	<i>Bacteroides fragilis</i>	2.10±0.24 16.7
21	<i>Prevotella ruminicola ruminicola</i>	2.10±0.24 16.7
22	<i>Prevotella ruminicola brevis</i>	2.10±0.24 16.7
23	<i>Staphylococcus cohnii</i>	2.05±0.12 16.7
24	<i>Staphylococcus xylosum</i>	2.05±0.12 16.7

cefmetazole投与群から検出された菌種を表5にそれぞれ示す。抗菌薬非投与群およびcefmetazole投与群では偏性嫌気性菌が優勢であったのに対してkanamycin/metronidazole投与群では好気性および通性嫌気性菌が優勢であった。これは嫌気性菌に対するmetronidazoleの効果によるものと考えられた。

[考察・結論]

大腸手術時の感染性合併症を予防するためには原因菌を出来る限り排除することが重要である。実際に抗菌薬を投与した症例で糞便中の細菌数および術後感染症の発生数が減少したという報告もある³⁾。今回抗菌薬を投与した症例について、粘膜上の細菌の菌数や検出率が減少した。また1検体当たりの検出菌種数は、抗菌薬非投与群で5.6菌種、kanamycin/metronidazole投与群で2.4菌種、cefmetazole投与群で5.5菌種であり、抗菌薬非投与群とkanamycin/metronidazole投与群、cefmetazole投与群とkanamycin/metronidazole投与

群のあいだで有意差が認められた。

胃疾患と細菌、特に*Helicobacter pylori*との関わりは最近多くの報告があるが、下部消化管特に炎症性腸疾患と細菌との関わりについての報告は少ない。我々は今後、炎症性腸疾患患者の粘膜細菌叢について検討する予定であり、今回の研究は、そのための基礎的知見になると考えられた。

[参考文献]

- 1) 岡村 孝, 千田俊雄, 岡村 登: プロジェクト研究 大腸粘膜上の細菌叢の検討—菌種から— 厚生省特定疾患難治性炎症性腸管障害調査研究班, 平成8年度研究報告書 (班長・下山 孝) 1997,30-33.
- 2) 光岡知足: 腸内細菌叢の検査手技 感染症誌 1971; 45:406.
- 3) 岡村 孝, 井上敏直, 中谷林太郎, 千田俊雄ら: 抗菌剤による大腸手術前処置の検討 大腸肛門誌 1984; 37:267-272.

Influence of antimicrobial agents on the mucosa-associated microflora of the human large intestine.

Okamura Noboru (Tokyo Medical and Dental University, School of Allied Health Sciences)
Kobayashi Kumiko (Tokyo Medical and Dental University, School of Allied Health Sciences)
Chida Toshio (Tokyo Medical and Dental University, School of Allied Health Sciences)
Okamura Takashi (Tokyo Metropolitan Otsuka Hospital, Department of Surgery)

[Purpose] We examined the effects of antimicrobial treatment on the mucosa-associated microbial flora of the human large intestine using the surgical specimens treated with antimicrobial agents orally administered before, or intravenously administered during surgery. [Method] Mucosal specimens of surgically-resected human large intestines, the parts of which were considered not affected with the disease, were homogenized and were cultured both aerobically and anaerobically on selective and nonselective agar plates. The patients were either administered kanamycin (1g)/metronidazole (500mg) orally before surgery or cefmetazole (1g) during surgery. The colonies grown on each plate were counted and identified to the species level. [Results] The number of the total bacteria, total aerobic bacteria, and total anaerobic bacteria were significantly much lower in the specimens treated with antimicrobial agents than those without antimicrobial treatment. The number and detection frequency of bacteria of the family *Bacteroidaceae* were significantly higher in the group treated with kanamycin and metronidazole than those treated with cefmetazole. The most predominant species in the group treated with kanamycin and metronidazole were species of the family *Bacteroidaceae*, while those in the group treated with cefmetazole were those of the facultative anaerobic bacteria, such as *Enterococcus spp.* [Conclusion] A decrease in composition and number of bacteria in the mucosa-associated microflora of the human large intestine were observed in the specimens treated with antimicrobial agents when compared with those of the controls.

血清自己抗体からみた日本における潰瘍性大腸炎の特徴

日比紀文* 福井一人* 高石官均*
 一松 収* 江崎俊彦* 金井隆典*
 岩男 泰* 渡辺 守* 坂牧純夫**
 新津洋司郎** 杉村一仁*** 朝倉 均***
 松本譽之**** 牧山和也***** 石黒 陽*****
 棟方昭博***** 澤田康史***** 下山 孝*****

要 旨: [目的]潰瘍性大腸炎での血清自己抗体の発現頻度ならびに病型との関連について多施設症例において検討し、本邦での免疫学的特徴を追究した。 [方法]7施設合計154症例の潰瘍性大腸炎患者の血清を用い、抗ムチン抗体、抗トロポミオシン抗体、抗好中球細胞質抗体(p-ANCA)の3種の血清抗体測定を施行し調べ得た範囲での各患者の病型、罹患範囲との相関を検討した。 [結果]今回測定した全症例血清の抗体別陽性率は抗ムチン抗体11.8%、p-ANCA38.3%、抗トロポミオシン抗体30.8%であった。病型別分類での各抗体陽性率は、慢性持続型で15.0%、35.0%、15.8%、再燃緩解型で16.4%、41.8%、31.0%、初回発作型では2.3%、33.3%、45.7%であった。初回発作型において抗トロポミオシン抗体が陽性率が高く、他の病型ではp-ANCAの陽性率が最も高値であった。罹患範囲別では全大腸炎型において他の病型と比較しp-ANCAの陽性率が高かった。

KEYWORD: 潰瘍性大腸炎, 血清自己抗体, 抗ムチン抗体, p-ANCA, 抗トロポミオシン抗体

[目 的]

潰瘍性大腸炎患者血清で認められる各種自己抗体を、多施設の症例において同時に測定し、臨床像と対比する事により、本疾患の日本における血清学的特徴を明らかにする。今回は主として病型別、罹患範囲別での対比につき検討した。

[対 象]

対象は検体提供施設である札幌医科大学、新潟大学医学部、大阪市立大学医学部、兵庫医科大学、長崎大学医学部、弘前大学医学部、慶応義塾大学医学部の計7施設より集められた潰瘍性大腸炎患者154例である。

患者背景は以下の通りである。1.性別 男74人、女80人、2.病型 慢性持続型40例、再燃緩解型67例、初回発作型45例、不明2例、3.罹患範囲 全大腸炎型35例、左側結腸炎型7例、直腸炎型4例(判明 計46例)。

[血清自己抗体]

今回は抗ムチン抗体、抗好中球細胞質抗体(p-ANCA)、抗トロポミオシン抗体の3種類の血清自己抗体を測定し、そのスペクトラムを検討した。患者血清は一度慶応義塾大学医学部に集められた後分注され、各測定施設に送られた。

測定は抗ムチン抗体を慶応義塾大学医学部、p-ANCAを新潟大学医学部、抗トロポミオシン抗体を札幌医科大学が各々担当した。測定検体数は抗ムチン抗体153検体、p-ANCA154検体、抗トロポミオシン抗体133検体であった。

抗ムチン抗体は精製ヒトムチンを抗原としたELISA

* 慶応義塾大学医学部、内科
 ** 札幌医科大学、第四内科
 *** 新潟大学医学部、第三内科
 **** 大阪市立大学医学部、第三内科
 ***** 長崎大学医学部、光学医療診療部
 ***** 弘前大学医学部、第一内科
 ***** 兵庫医科大学、第四内科

法、p-ANCAはBinding site社のANCA detection kitを用いた蛍光抗体法、抗トロポミオシン抗体はヒトトロポミオシンのアミノ酸配列の一部をペプチド抗原としたELISA法を用いて測定を行った。

【結 果】

1. いずれかの抗体が陽性であったのは94人(全体の61.0%)で、全て陰性だったのは60人(39.0%)であった。陽性者のうち1抗体のみが陽性であったのが73人(47.4%)、2抗体陽性が19人(12.3%)、3抗体全てが陽性であったのは2人(1.3%)であった。

2. 各抗体別の測定数に対する陽性率は、抗ムチン抗体11.8%(153人中18人)、p-ANCA38.3%(154人中59人)、抗トロポミオシン抗体30.8%(133人中41人)であった。

3. 3種類の抗体間で相関関係が存在するか、2×2クロス集計表を作成し、 χ^2 乗独立性検定ならびにFisherの直接確率計算法を用い検定を行ったが、いずれも危険値20%以下で有意な相関は認められなかった。各病型別にも集計を行い、同様な検定を行ったが、いずれも相関を認めなかった。

4. 各病型においての抗体陽性率では、慢性持続型では35.0%、再燃緩解型では41.8%とp-ANCAの陽性率が最も高かった。一方、初回発作型では抗トロポミオシン抗体が45.7%と最も高値を示した(表1)。

また、抗体別でみると、抗ムチン抗体は慢性持続型(15.0%)と再燃緩解型(16.4%)がほぼ同率で、初回発作型が2.3%と陽性率が低かった。p-ANCAは各病型で同程度認められ、抗トロポミオシン抗体は慢性持続型15.8%、再燃緩解型31.0%、初回発作型45.7%と異なる結果となった。

5. 罹患範囲別の陽性率で、全大腸炎型ではp-ANCA陽性率が40.0%(35例中14例)と最も高かった。症例数は少ないものの左側結腸炎型で57.1%(7例中4例)、直腸炎型で50%(4例中2例)と抗トロポミオシン抗体の陽性率が最も高値を認めた(表2)。

表1. 病型と各抗体の陽性率

	抗ムチン抗体陽性	p-ANCA陽性	抗トロポミオシン抗体陽性
慢性持続型 40例中	6例 15.0%	14例 35.0%	6例 15.8%
再燃緩解型 67例中	11例 16.4%	28例 41.8%	18例 31.0%
初回発作型 45例中	1例 2.3%	15例 33.3%	16例 45.7%
152例中	18例 11.9%	57例 37.5%	40例 31.0%
病型不明 2例中	0例 0.0%	2例 100.0%	1例 50.0%
総計 154例中	18例 11.8%	59例 38.3%	41例 30.8%

【ま と め】

潰瘍性大腸炎患者血清に認められる自己抗体としてはBrobergerらが抗大腸抗体について報告¹⁾して以来さまざまな自己抗体が報告され、病因には直接関係ないものも含まれていると考えられている。われわれは潰瘍性大腸炎患者血清中に高率に大腸上皮と反応する自己抗体が存在し²⁾、antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) 機序により大腸病変局所において粘膜障害に直接関与していることを示してきた³⁾。潰瘍性大腸炎の病態に関与する自己抗原としては200kD以上のムチン⁴⁾、40kDの蛋白抗原(tropomyosin)⁵⁾の報告があり、今回測定に用いることとした。一方、p-ANCAは病因との直接の関連はないと考えられているが、治療抵抗性の左側潰瘍性大腸炎において、治療反応群に比較して高率に認められるとの報告があり⁶⁾、予後の予測に応用できる可能性が示唆されている。

血清自己抗体の陽性率は潰瘍性大腸炎の活動性や治療の有無と相関しないとされており⁷⁾、今回は対象の活動性についてとらわれず、主として病型との相関を検討した。初回発作型では抗トロポミオシン抗体が他に比して高率で、慢性持続型や再燃緩解型ではp-ANCAが比較的高率にみられた。各種抗体と臨床像との関連性が認められたことから、本疾患の病態解明及び予後判定に有用である可能性が示唆された。

今後はさらに患者背景を分析していくとともに、同一症例においての抗体価の推移を検討していく必要があると考えられた。さらに、組織学的変化との対比を行うことも重要になると思われる。

【参考文献】

- 1) Broberger O, Perlmann P: Autoantibodies in human ulcerative colitis. J Exp Med 1959;110: 657-674.
- 2) Hibi T, et al: Anti-colon antibody and lymphocytophilic antibody in ulcerative colitis. Clin Exp Immunol 1982;49:75-80.

表2. 罹患範囲別抗体陽性率

	抗ムチン抗体	p-ANCA	抗トロポミオシン抗体
全大腸炎型(35例中)	4例(11.4%)	14例(40.0%)	10例(28.6%)
左側結腸炎型(7例中)	2例(28.6%)	0例(0.0%)	4例(57.1%)
直腸炎型(4例中)	0例(0.0%)	0例(0.0%)	2例(50.0%)

- 3) 相磯貞和:潰瘍性大腸炎の大腸粘膜破壊に関する免疫学的検討-ADCC機序の関与について-. 日本消化器病学会雑誌 1981;78:2330-2336.
- 4) 大原 信:潰瘍性大腸炎における抗大腸杯細胞抗体の追究. 慶應医学 1993;70:867-876.
- 5) Takahashi F, et al: Isolation and characterization of a colonic autoantigen specifically recognized by colon tissue-bound immunoglobulin G from idiopathic ulcerative colitis. J Clin Invest 1985;76:311-318.
- 6) Sandborn WJ, et al: Association of antineutrophil cytoplasmic antibodies with resistance to treatment of left-sided ulcerative colitis;results of a pilot study. Mayo Clin Proc 1996;71:431-436.
- 7) Ruemmele FM, et al: Diagnostic accuracy of serological assays in pediatric Inflammatory Bowel Disease. Gastroenterology 1998;115: 822-829.

The characteristics of Japanese ulcerative colitis from the point of view of autoantibodies in sera.

Hibi Toshifumi (Keio University School of Medicine, Department of Internal Medicine)
 Fukui Kazuto (Keio University School of Medicine, Department of Internal Medicine)
 Takaishi Hiromasa (Keio University School of Medicine, Department of Internal Medicine)
 Hitotsumatsu Osamu (Keio University School of Medicine, Department of Internal Medicine)
 Ezaki Toshihiko (Keio University School of Medicine, Department of Internal Medicine)
 Kanai Takanori (Keio University School of Medicine, Department of Internal Medicine)
 Iwao Yasushi (Keio University School of Medicine, Department of Internal Medicine)
 Watanabe Mamoru (Keio University School of Medicine, Department of Internal Medicine)
 Sakamaki Nobuo (Sapporo Medical University, The Fourth Department of Internal Medicine)
 Niitsu Youshirou (Sapporo Medical University, The Fourth Department of Internal Medicine)
 Sugimura Kazuhito (Niigata University School of Medicine, The Third Department of Internal Medicine)
 Asakura Hitoshi (Niigata University School of Medicine, The Third Department of Internal Medicine)
 Matsumoto Takayuki (Osaka City University School of Medicine, Department of Medicine)
 Makiyama Kazuya (Nagasaki University School of Medicine, Department of Endoscopy)
 Ishiguro Yoh (Hiroasaki University School of Medicine, The first Department of Internal Medicine)
 Munakata Akihiro (Hiroasaki University School of Medicine, The first Department of Internal Medicine)
 Sawada Koji (Hyogo College of medicine, Department of Internal Medicine IV)
 Shimoyama Takashi (Hyogo College of medicine, Department of Internal Medicine IV)

[Aim] We investigated the relationship between frequencies of various autoantibodies and disease types in ulcerative colitis patients, to assess the immunological characteristics of ulcerative colitis in Japan. [Methods] Antibody titers of three types of autoantibodies, anti-tropomyosin antibody, anti-mucin antibody, and anti-neutrophil antibody (p-ANCA) were measured in 157 cases of ulcerative colitis from seven hospitals, and the relationship between frequency of various autoantibodies and disease types in ulcerative colitis patients were investigated. [Results] The frequencies of anti-mucin antibody, p-ANCA and anti-tropomyosin antibody were 11.8%, 38.3%, and 30.8% respectively. In regard to frequencies of each autoantibody in relation to the clinical features, the frequencies of anti-mucin antibody, p-ANCA and anti-tropomyosin antibody were 15.0%, 35.0%, and 15.8% in sera from chronic continuous type, those of anti-mucin antibody, p-ANCA and anti-tropomyosin antibody were 16.4%, 41.8%, and 31.0% in sera from relapsing type, and those of anti-mucin antibody, p-ANCA and anti-tropomyosin antibody were 2.3%, 33.3%, and 45.7% in sera from one attack only type. The frequencies of p-ANCA were relatively high in total colitis type, as compared with proctitis and left-sided colitis types.

潰瘍性大腸炎活性化血小板による 多核白血球活性酸素産生能に与える影響

杉村 一仁* 鈴木 恒治* 長谷川 勝彦*
吉田 研* 本間 照* 成澤 林太郎*
朝倉 均*

要 旨: [目的]潰瘍性大腸炎(UC)に対する白血球除去療法的作用機序を検討する上で末梢血血小板の除去に注目し、UC末梢血活性化血小板の増加を確認するとともにその多核白血球活性酸素産生能に与える影響を検討した。 [方法]活性化血小板は蛍光抗体を用いたFACS解析を用いて検討した。 UC末梢血血小板の多核白血球機能に与える影響は、正常人より分離された多核白血球によるPMA刺激下の活性酸素産生能をルミノール化学発光法を用いて計測した。 [結果]UC患者末梢血において活性化血小板は有意に増加していた。 UC活性化血小板は正常人より分離された血小板に比し正常多核白血球の活性酸素産生能を有意に増加した。 またこの増加は主に血小板表面に表出されたP-selectinを介して誘導されているものであった。 [総括] UC患者における末梢血血小板の増加は、多核白血球による活性酸素産生能を介してUCの拡大や遷延化に関与している可能性が示唆された。 これらの血小板の除去は、白血球除去療法的作用機序の一つとなっている可能性が示唆された。

KEYWORD: 潰瘍性大腸炎, 活性化血小板, 多核白血球, 白血球除去療法, 機序, 活性酸素産生能, 治療

【はじめに】

近年不織ポリエステルフィルターによる、UC末梢血白血球除去療法(LCAP)の緩解導入における有効性が明らかとなっているが、その作用機序は未だ不明である。LCAP法および酢酸セルロースビーズカラムによる顆粒球・単球除去療法(GCAP)による当科における治療施行例の集積に伴い、臨床検査成績の再検討を行ったところLCAPでは翌日の末梢血白血球成分中血小板数が有意に減少していることが明らかとなった。このためLCAPの潰瘍性大腸炎に対する治療機序の一因として、近年炎症惹起細胞のひとつとして認識されるようになっている血小板の除去による可能性に思い至った。

潰瘍性大腸炎の一つの組織学的特徴として腸管微小血管閉塞による虚血性変化が認められること、その病態に血管炎の関与が示唆されること、潰瘍性大腸炎の合併症に塞栓症が多いこと、血小板数と病態にある程度相関がみられること等を考慮し¹⁻⁵⁾、潰瘍性大腸炎の病態に局所で活性化された血小板が深く関与していると考えられる。さらに、本症は罹患範囲が血行支配に一致することが多

く、また多くの症例で抗多核白血球細胞質抗体(ANCA)が検出されており、活性化血小板と多核白血球の相互反応による局所的血管炎の機序が関与しているものと推察される⁶⁾。このため我々はUC末梢血におけるP-selectin陽性活性化血小板の増加を確認するとともに、UC末梢血活性化血小板の多核白血球の活性酸素産生能に与える影響を検討した。

【対象と方法】

活動期潰瘍性大腸炎患者9例、非活動期患者6例より末梢血を採取した。潰瘍性大腸炎は厚生省の診断基準によって診断した。また17名の同様の年齢の健常対照より末梢血を採取し、対照群として設定した。

末梢血は19ゲージ針を用い3.8%クエン酸を加え採取された。活性化血小板は、採血された血液中2mlを用い0.5%パラフォルムアルデヒドで固定後、CD42b CD62Pにて染色されFACS解析が行われた。また陽性コントロールとして0.5U/mlトロンビンによる活性化血小板を用いた^{7,8)}。血小板は、室温で赤血球のデキストラン沈殿後上清より比重遠心法を用いて収集され、培養液で洗浄後位相差顕微鏡にて白血球混入の無いことを確認の

*新潟大学医学部、第三内科

上実験に使用された。多核白血球は血小板分離時の沈渣より短時間の低張液による赤血球除去法を用い収集され、メイ・ギムザ染色と位相差顕微鏡により血小板とリンパ球の混入が無いことを確認の上使用された。またトリパンブルー染色による生存率は99%以上であった。

多核白血球活性酸素産生能は、96穴平底プレートに 1×10^5 個の多核白血球をHBSSにサスペンドし、20ng/mlのPMA刺激下に50mmol/lのルミノールを加え自動光分析機によって、毎分0.1秒間の化学発光値が240分間記録された。血小板の多核白血球活性酸素産生能への影響を調べるため、健常および潰瘍性大腸炎患者より分離された血小板が 1×10^5 個加えられ同様に検討

された。陽性コントロールとしてトロンビン刺激を受けた血小板が加えられ、抑制実験としてCD62P (P-selectin) が加えられ同様の検討がなされた。

Table 1. Surface expression of Platelet P-selectin in Patients with UC, Healthy Controls, and Thrombin Activated Platelet

	n	P-selectin positive platelet (%)
NC	16	4.7 (11.9-1.6)
UC		
inactive	9	12.9 (29.5-5.3)a
active	6	7.3 (27.6-2.3)
thrombin	8	25.0 (80.2-9.7)b

Data are expressed as median (range).

a P < 0.05 as compared with NC, b P < 0.01 as compared with NC.

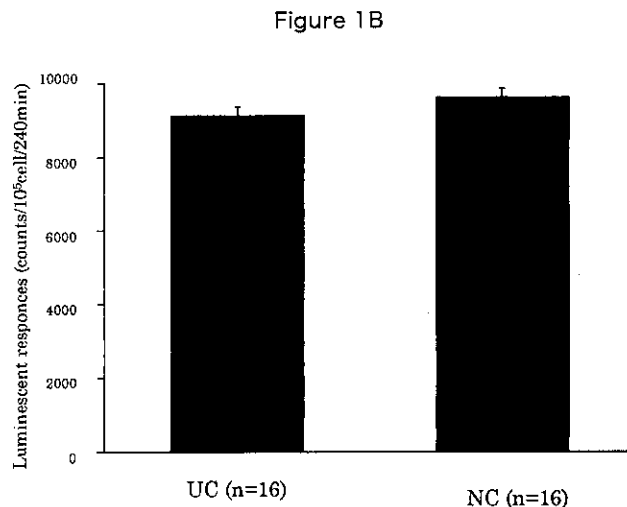
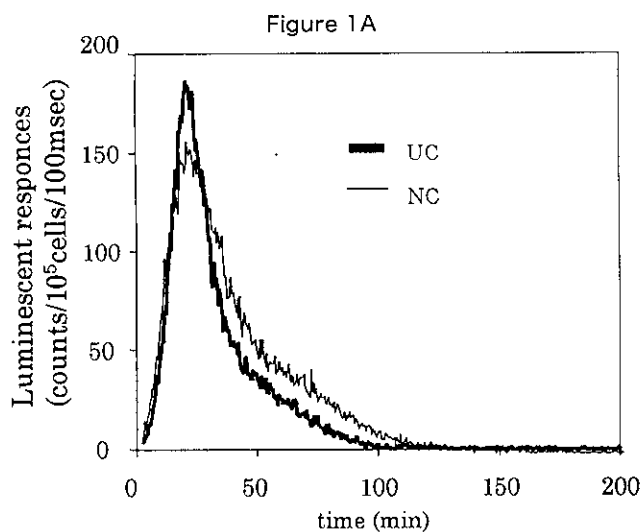


Figure 1A. Typical LCL curve of PMNC obtained from the patients with UC and NC stimulated by PMA.

Figure 1B. The ROM production by PMNC obtained from NC and the patients with UC. There are no significant differences between two groups. Each value represents mean \pm SEM from ten samples.

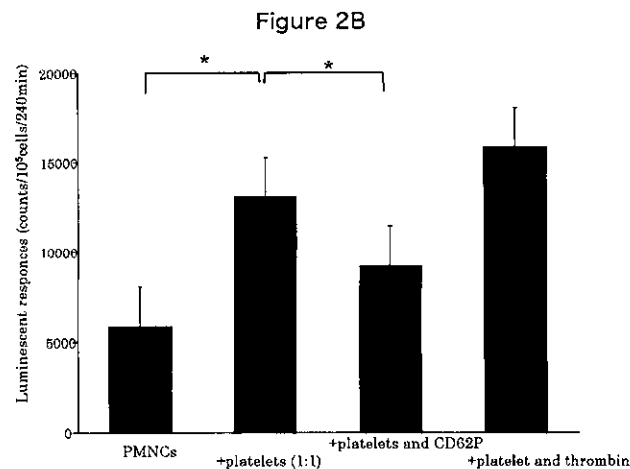
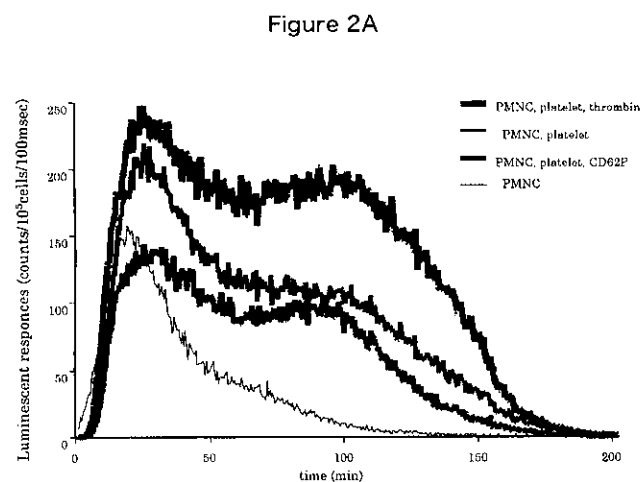


Figure 2A. Typical LCL curve of PMNC from NC only and PMNC from NC with same number of autologous platelets.

Figure 2B. Influences of platelets upon the ROM production by PMNC from NC. Platelets enhanced the ROM production by PMNC significantly at PMNC/platelets ratio of 1/1. Each value represents mean \pm SEM from seven samples. *P < 0.05 as compared with PMNC only group; **P < 0.05 as compared with PMNC with platelets group.

【結 果】

1. 活性化血小板

表2に示すように活動期潰瘍性大腸炎患者において、P-selectin陽性活性化血小板は健常人に比し有意に増加していた。トロンピン刺激による陽性コントロール血小板は、炎症性腸疾患患者・健常人の双方に比べP-selectin陽性血小板率は有意に増加していた(表1)。

2. 多核白血球による活性酸素産生能

血小板混入のない条件下での多核白血球によるPMA刺激ルミノール化学発光(LCL)値は、健常と潰瘍性大腸炎患者で有意な差を認めなかった。LCLパターンはPMA添加に伴う急激な発光値の増加後、徐々に発光値の低下を示す単相の反応が認められた(図1)。

3. 血小板による多核白血球活性酸素産生能への影響

血小板の多核白血球活性酸素産生能の影響を検討するために、健常血小板およびトロンピン活性化血小板を健常多核白血球に加えLCL値への影響を検討した。図2に示すように、血小板はLCL反応のピーク値を増加させ、さらにそれに続く定常反応部分を形成することによって多核白血球の活性酸素産生能を増加させることが判明した。ピーク部分に相当する部分は細胞外活性酸素産生にともなうものとして、また平坦反応部分は細胞内活性酸素産生にともなう発光と理解された⁹⁾。また、トロンピン活性化血小板は、非活性化血小板に比して有意に高いLCL値を示した。この増強は平坦反応部の増強によるものであった。さらにこの反応は、P-selectin抗体によって有意に抑制された(図2)。

4. 潰瘍性大腸炎患者血小板による多核白血球活性酸素産生能への影響

潰瘍性大腸炎患者由来活性化血小板の多核白血球LCL反応への影響を検討したところ、潰瘍性大腸炎患者由来血小板は、健常血小板に比して有意にそのLCL値を増加させた(表2)。これは主に平坦反応部の増加によるものであった(図3)。

【考 察】

活性化血小板は、炎症惹起物質を放出し多核白血球とP-selectinを介して反応し、積極的に炎症反応の形成に関与していることが明らかとなってきている。このような血小板と好中球の相互作用はARDS・心筋梗塞・動脈硬化症等で認められている¹⁰⁻¹²⁾。さらに実験動物においても、血小板と多核白血球の相互反応の阻害は、免疫複合体によって誘導される実験的糸球体腎炎を改善させることが報告されている¹³⁾。

潰瘍性大腸炎においてもこのような相互反応が潰瘍性

大腸炎の病態に関与する可能性が考えられる。我々はこの検討において、炎症性腸疾患患者の末梢血において活性化血小板が増加していることと、これらの活性化血小板がP-selectinを介して多核白血球の活性酸素産生能を増強することを明らかとした。

近年の研究は、白血球の血管内皮との接着こそが、腸管の慢性的な組織障害と密接に関与すると考えられる粘膜内への白血球浸潤量を規定する因子であることを明らかとしている¹⁴⁾。血小板はこの機序に密接に関与していることが報告されるようになった¹⁵⁾。これらの事実は、潰瘍性大腸炎末梢血中に存在するP-selectin陽性活性化血小板が血管内皮障害を通じて、組織への白血球浸潤を増加させていることを示唆している。

また一方で、現在までに潰瘍性大腸炎末梢血中の多核白血球による活性酸素産生能に関しては多くの報告がなされているが、一定の見解を認めていない。血小板の好中球活性酸素産生能へ与える影響は徐々に報告が増加しているが、その全貌はまだ明らかではない。血小板は多核白血球活性酸素産生能へ与える影響は、その比率によって異なっていることが報告されている。我々の今回の検討は、全体としてNaumらの報告に一致するものであった。潰瘍性大腸炎における多核白血球の活性酸素産生能は、我々の検討ではHaydekらの報告と同様に健常と変化を認めず¹⁶⁾、今後炎症性腸疾患の末梢血白血球機

Table 2. Influence of Each UC and NC Platelet upon the ROM Production by Indicator PMNC.

	(PMNC + platelets) / PMNC ratio
Indicator PMNC + NC platelets	2.22 (1.49-3.05)
Indicator PMNC + UC platelets	2.61 (1.66-3.51) a

Date are expressed as median (range) from eight experiments.

a: P < 0.05 as compared with NC platelets.

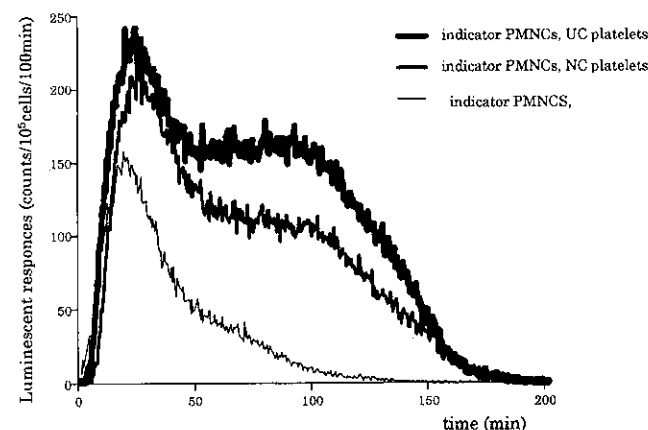


Figure 3. Typical LCL curve of indicator PMNC from a normal volunteer only and indicator PMNC with platelets from UC or NC.

能を考える際には検体中の血小板混入を厳密に検討する必要性があると考えられた。

結論として潰瘍性大腸炎における末梢血多核白血球の活性酸素産生能は変化しておらず、むしろ活性化血小板こそが、その白血球との相互反応を通じて炎症性腸疾患の病変形成に密接に関与していると考えられた。またこの活性化血小板の除去が、LCAPによる急性期緩解導入療法の有効性の機序となっている可能性が考えられた。

【文 献】

- 1) Talbot RW, Heppel J, Dozois RR, Beart RW: Vascular complications of inflammatory bowel disease. *Mayo Clin Proc* 1986;61:140-145.
- 2) Allan RN, Keighley MRB, Alexander-Williams J, Rhodes JM, Hanauer SB, Fazio VW, editors: Inflammatory bowel disease. 3rd ed. New York: Churchill Livingstone; 1997,101-105.
- 3) Lam A, Borda LT, Inwood MJ, Thompson S: Coagulation studies in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gastroenterology* 1975;68:245-251.
- 4) Edwards RL, Levine JB, Green R, Duffy M, Mathews E, Brande W, Rickels FR: Activation of blood coagulation in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1987;92:329-337.
- 5) Webberley MJ, Hart MT, Melikian V: Thromboembolism in inflammatory bowel disease: role of platelets. *Gut* 1993;34:247-251.
- 6) Nagata K., Tsuji T, Todoroki T, Katagiri Y, Tanoue K, Yamazaki H, Hanai N, Irimura T: Activated platelets induce superoxide anion release by monocytes and neutrophils through P-selectin (CD62P). *J Immunol* 1993;151:3267-3273.
- 7) Watson SP, Authi KS: Platelets. A practical approach. Oxford: IRL PRESS, 1996.
- 8) Ault KA, Mitchell J: Analysis of platelets by flow cytometry. *Methods in Cell Biology* 1994;42:275-294.
- 9) Albrecht D, Jungi TW: Luminol-enhanced chemiluminescence induced in peripheral blood-derived human phagocytes: obligatory requirement of myeloperoxidase exocytosis by monocytes. *J Leuko Biol* 1993;54:300-306.
- 10) Heffner JE, Sahn SA, Repine JE: The role of platelets in the adult respiratory distress syndrome. Culprits or bystanders? *Am Rev Respir Dis* 1987;135:482-492.
- 11) Siminak T, Flores NA, Sheridan DJ: Neutrophil interactions with endothelium and platelets: possible role in the development of cardiovascular injury. *Eur Heart J* 1995;16:160-170.
- 12) Packham MA, Mustard JF: The role of platelets in the development and complications of atherosclerosis. *Semin Hematol* 1986;23:8-26.
- 13) Wu X, Helfrich MH, Horton AM, Feigen LP, Lefkowitz JB: Fibrinogen mediates platelet-polymerphonuclear leukocyte cooperation during immune-complex glomerulonephritis in rats. *J Clin Invest* 1994;94:928-936.
- 14) Panes J, Granger DN: Leukocyte-endothelial cell interaction: molecular mechanisms and implications in gastrointestinal disease. *Gastroenterology* 1998;114:1066-1090.
- 15) Kurose I, Granger DN, Evans DJ, Evans DG, Graham DY, Miyasaka M, Anderson DC, Wolf RE, Cepinskas G, Kvietys PR: *Helicobacter pylori*-induced microvascular protein leakage in rats: role of neutrophils, mast cells, and platelets. *Gastroenterology* 1994;107:70-79.
- 16) Haydek JM, Keshavarzian A: Circulating neutrophils from patients with ulcerative colitis have a normal respiratory burst. *Inflammation* 1995;19:701-715.

Activated platelets in ulcerative colitis enhance the production of reactive oxygen metabolites by polymorphonuclear cells.

Sugimura Kazuhito (Niigata University School of Medicine, Department of Internal Medicine III)
Suzuki Koji (Niigata University School of Medicine, Department of Internal Medicine III)
Hasegawa Katsuhiko (Niigata University School of Medicine, Department of Internal Medicine III)
Yoshida Ken (Niigata University School of Medicine, Department of Internal Medicine III)
Honma terasu (Niigata University School of Medicine, Department of Internal Medicine III)
Narisawa Rintarou (Niigata University School of Medicine, Department of Internal Medicine III)
Asakura Hitoshi (Niigata University School of Medicine, Department of Internal Medicine III)

[Aims] Although the increase of activated platelets in inflammatory bowel disease (IBD) was reported, its modulator roles on inflammatory cells are still unclear. In this study, we evaluated the influence of platelets from ulcerative colitis (UC) upon the production of the reactive oxygen metabolites (ROM) by polymorphonuclear cells (PMNC), using luminol-enhanced chemiluminescence (LCL). [Methods] Activated platelets were assessed using flow cytometry. PMNCs were stimulated by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) with/without autologous platelets, anti-P-selectin monoclonal antibody (MAb) and thrombin. PMNC from a normal volunteer as indicator cells were also stimulated by heterologous platelets from UC and normal controls (NC) respectively. All LCL signals were registered every 60 seconds up to 240 minutes. [Results] P-selectin positive activated platelets were significantly increased in IBD. Platelets enhanced the ROM production by PMNC and anti-P-selectin MAb inhibited this enhancement. ROM production by PMNC was not significantly different between UC and NC regardless of platelet-PMNC interaction. Platelets from UC showed higher increasing effect on ROM production by indicator PMNC than platelets from NC. [Conclusions] Activated platelets were increased in UC, and enhanced ROM production by PMNC through P-selectin. This phenomenon might participate in the development of UC.

クローン病患者血中抗ブタアミラーゼ抗体 —ELISAによる研究—

戸澤辰雄* 下山 孝** 馬場裕子**

要 旨： [目的] クローン病 (CD) に特徴的に検出される抗ブタアミラーゼ (PPA) 抗体を定量的に評価する。そのため ELISA による検出法を開発した。 [方法] PPA を固相し、その PPA に結合する血中抗体をペルオキシダーゼ標識プロテイン A で検出した。70 例の CD 患者、58 例の潰瘍性大腸炎 (UC) 患者、55 例の他疾患患者、30 例の健常者を対象にした。 [結果] CD 患者群の PPA 抗体価は他の 3 群のそれよりも有意に高値であった ($p < 0.01$)。上昇したレベルの抗体をもつ頻度は CD が 31.4%、UC が 3.4%、他疾患では 7.3%、健常者では全くなかった。22 例の CD 患者に対する抗体レベルの推移の成績は、その期間に病気の再燃を繰り返した群では高レベルを持続したが、緩解を維持した群では、一貫して、カットオフ値以下のレベルであるか、または比較的低いレベルを示し、しかも漸減した。 [総括] ELISA による成績は抗 PPA 抗体が CD に特徴的に出現することを追認した。抗体レベルの程度が病勢を反映した。これは抗 PPA 抗体が CD の病因に関与することを推定させる。

KEYWORD： クローン病、潰瘍性大腸炎、食餌蛋白、食餌抗原、ブタアミラーゼ抗体

【はじめに】

炎症性腸疾患 (IBD)：潰瘍性大腸炎 (UC) とクローン病 (CD) の患者血中に種々の食餌蛋白に対する抗体が高レベル、高頻度で存在する早期の成績は、食餌蛋白を IBD の病因として考えさせたが、これらの抗体の存在は二次的な現象であると考えられるに至っている。しかし、高蛋白、高脂肪摂取を基にする西欧型食事の普及と CD 患者数の増加の直線的関係、および成分栄養療法が活動期の CD に有効である成績は、今でも、少なくとも CD の病因に食餌成分の関与を強く思わせる。我々はブタアミラーゼ (PPA) に対する抗体が CD 患者に特異的といえる可能性を有して存在することを発見した。この抗体は PPA の特異酵素活性を失活させる性状と失活させない性状を有する 2 種のタイプがあり、両者は、例外を除き、同一個体中に検出される。これらの抗体は人アミラーゼとは反応しない。そして、抗体の免疫グロブリンは、しばしば IgA 抗体を伴う、IgG 抗体であることが判明している。血中に存在するこの抗体はこれらの性状を基に検出できるが、それらの方法は、多少の技術を必要とし、多数サンプル処理に適しないことに加え、正確に抗体レベルを評価できない難点があった。そこで、それらを解決

する ELISA による IgG 抗体検出法を開発し、それから得た成績をここに報告する。

【対象と方法】

1) CD 患者 70 例 (年齢; 平均 (SD) 30.3 (8.9)), UC 患者 58 例 (31.3 (10.5)), その他の種々な疾患患者 55 例 (44.4 (15.6)), 健常者 30 例 (30.1 (9.2)) からの血清を用いた。22 例の CD 患者からの保存血清を用いた。
2) ELISA、PPA を固相した 96 穴マイクロプレートを作成し、1 穴あたり 80 倍希釈血清を反応させ、PPA に結合した抗体をペルオキシダーゼ標識プロテイン A を用いて検出した。その ELISA 値 (抗体価) は 492/630nm の吸光度で表現し、トリプルサンプルから得た値の平均値を抗体価とした。

【結 果】

1) ELISA の正確度

ウサギ抗 PPA 抗体の濃度と ELISA 値の間の直線性は吸光度 2.0 以下で認められた。同様の関係は抗体陽性患者血清の希釈率と ELISA 値間に見られた。患者サンプルを用いたアッセイ内同時再現性 (n:3) の CV 値は 3% 以下、アッセイ間では CV 値 6% 以下であった。

2) 抗体のレベルと出現頻度

各症例ごとの抗体価を図 1 に示す。抗体価の平均 (SD)

* 兵庫医科大学、中央臨床検査部

** 同、第四内科

はCD群が0.29 (0.24), UC群が0.09 (0.12), 対照疾患群が0.12 (0.16), 健常者群が0.11 (0.04)であった。CD群の抗体価は他の3群より有意に高かった(それぞれ, $p < 0.01$)が, 他の3群間には差がなかった。健常者群の抗体価の平均+2SD値, 0.19をカットオフ値に設定した場合, 抗体の陽性頻度はCD群が31.4%, UC群が3.4%, 対象疾患群が7.3%, 健常者群は0%であった。CD群の頻度は他の3群よりも有意に高率であった(対UC群 $p < 0.0001$, 対対照疾患群 $p < 0.01$, 対健常者群 $p < 0.001$)(図1)。

3) CDの病型別(穿孔型と非穿孔型)の抗体レベル出現頻度

CD患者70例は23例が穿孔型, 残り47例が非穿孔型であった。その2群間に抗体のレベルの差も頻度の差もなかった(表1)。

4) 抗体レベルの推移

22例のCD患者の過去, 最短9か月から最長39か月間の抗体の推移を図2に示す。8例はカットオフ値以下の値(陰性)を持続した。1例は陰性から一過性の陽性となり, その後陰性を持続した。1例は陰性持続後に陽性化した。4例は0.19以下以上の値(陽性値)から陰性化し, その

中の2例が陰性値を持続し, 他の2例が一過性に陽性値を示した後, 陰性を持続した。8例は, 経過中にレベルの変動があるが, 高い陽性レベルを維持していた。なお, 対照疾患患者の1例は持続して陽性であった(図2)。

これらの22例のCD患者を, 再燃を年に2回以上繰り返した再燃群(7例)と, この期間を通して緩解していた緩解群(15例)の比較では, 前群では, 2例を除き, レベルの変動はあるが, 高い抗体レベルを維持した。その例外の2例の中の1例は最近の悪化時に陽転化した。後群では, 陰性を持続するか, または陽性でも比較的低いレベルをもち, そのレベルも経過とともに漸減した。

【考 察】

約10年前に報告された, CD患者に特徴的に存在するパン酵母(*Saccharomyces cerevisiae*; SC)¹⁾は, CDに及ぼす影響は明確になっていないが, UCをCDから区別する初めての指標として注目されている(CD対UCに対する感度64%, 特異度77%²⁾)。その抗体の免疫源は酵母細胞膜表面のマンノペントースであることが明らかにされたが, 翻せば, これは, マンナン多糖体は酵母を始めとする有機体の膜成分であり, 人体においても, 糖蛋白として存在するために, 免疫源が酵母以外のものである可能性をも意味する²⁾。今回のPPA抗体の免疫源は, 人以外の他動物アミラーゼの交叉反応性の実験が残っているが, 現時点ではPPAそのものと推定している。PPAまたはPPA抗体のCDに及ぼす影響は, 未だにも判っていないが, 摂食されたPPA自体が病因となる可能性は乏しく, むしろPPA抗体がCDに病因ないしは増悪因子としての関与を推定させる。CD患者中のPPA抗体が存在する頻度はSC抗体よりも著しく低いが, 少なくとも, UC患者と健常者に対する特異性はSC抗体よりも高い。CD患者の臨床所見に関するPPA抗体の定性的な評価か

表1 クロウン病症例の血清抗ブタアミラーゼ抗体
血清抗アミラーゼ抗体価(cutoff値:0.19)

	Case no.	Titer mean(SD)	Positivity Case (%)
総症例	70	0.29(0.42)	22(31.4)
穿孔型(瘻孔・膿瘍)	23	0.28(0.44)	6(26.1)
非穿孔型(狭窄・出血)	47	0.29(0.41)	17(36.2)

図1 クロウン病症例の血清抗ブタアミラーゼ抗体価

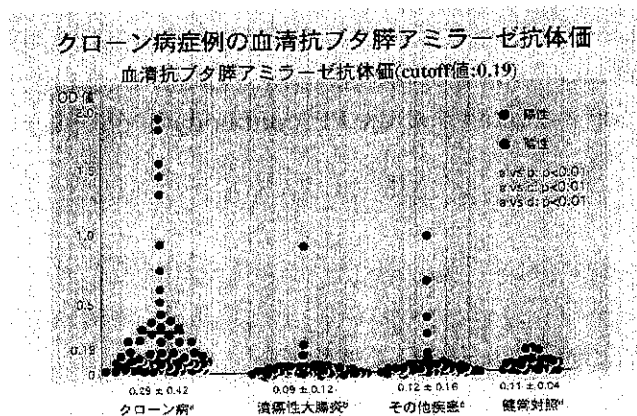
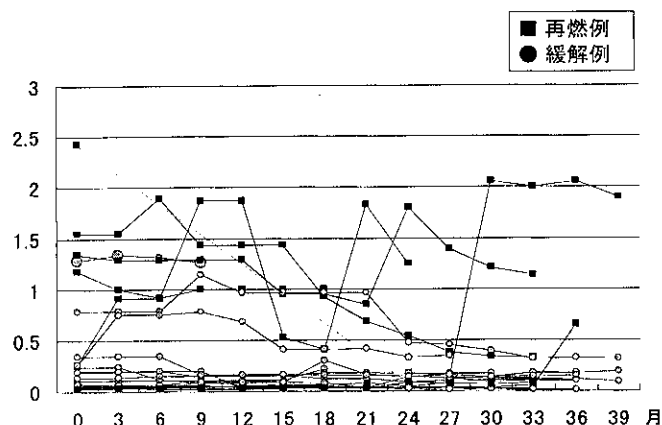


図2 クロウン病症例の血清抗ブタアミラーゼ抗体価の経時的変動



らは、性差、年齢、病勢、手術歴などに対し、抗体陽性例と陰性例の間には差を見いだせなかったが、今回の抗体レベルの推移の成績は、少数例の解析ではあるが、病勢と抗体レベルの関連性を示した。今後、抗体レベルから改めて臨床成績を解析する必要がある。一方、比較的 low レベルであるが、無視できない頻度でこの抗体が対照患者群で検出された事実は病因としての可能性を薄める。それらの陽性症例の詳細な分析がある。それよりも、何故、70%のCD患者にPPA抗体を検出しないのか？は興味を湧かせる。CDの病態にある腸管の透過性の変化³⁾だけからでは、この解答は考えられない:CD患者に一樣に透過性の変化があるならば、CD患者にもっと高率にこの抗体が出現してもよい。今後、PPA抗体とCDの病態との関連の研究が急がれる。現時点でも、時として臨床的には難しいことがあるが、CDとUCを鑑別するマーカーとしての有用性はある。

[参考文献]

- 1) Main J, McKenzie H, Yeaman GR, Kerr MR, Robson D, Pennington CR, Parrat D: Antibody to *Saccharomyces cerevisiae* (baker's yeast) in Crohn's disease. *BMJ* 1988;297:1105-1106.
- 2) Sendid B, Colombel JF, Faille C, Fruit J, Cortot A, Lucidarme D, Camus D, Poulain D: Specific antibody response to oligomannosidic epitopes in Crohn's disease. *Clin Diag Lab Immunol* 1996;3:219-226.
- 3) Hollander D, Vadheim CM, Brettholz E, Petersen M, Delahunty T, Rotter J: Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor. *Ann Intern Med* 1986;105,883-885.

Circulating antibody against porcine pancreatic amylase in patients with Crohn's disease: A study by ELISA.

Tozawa Tatsuo (Hyogo College of Medicine, Department of Clinical Laboratories)

Shimoyama Takashi (Hyogo College of Medicine, Department of Internal Medicine IV)

Bamba Hiroko (Hyogo College of Medicine, Department of Internal Medicine IV)

[Purpose] From the view point of antibody level, clinical significance of the antibody against porcine pancreatic amylase(PPA) had been detected characteristically in Crohn's disease(CD) was evaluated. [Method] An ELISA for detection of the antibody were developed. Microplates were coated with PPA. Serum samples were assayed in triplicate. Binding the antibody was detected with protein A linked to peroxidase by using O-phenildiamine and H₂O₂ as substrate. Serum samples were obtained from 70 patients with CD, 58 patients with ulcerative colitis(UC), 55 patients with the other diseases and 30 healthy subjects. [Results] Levels of the PPA antibody in CD patients were significantly higher than in UC patients, in patients with the other disease or in normal controls ($p < 0.01$). Increased antibody levels beyond mean+2SD obtained from normal subjects were found in 31% of CD patients, in 3% of UC patients, in 7% of the other disease patients. In general, higher levels of the antibody were usually found in patients with recurrent CD whereas relatively high or low levels were persistently in patients with stable CD. [Conclusions] The ELISA confirmed the previous finding of the characteristic occurrence of the antibody to PPA in CD patients. The present study indicated that the PPA antibody might play a role of the pathogenesis of CD.

炎症性腸疾患における血清anti *Saccharomyces cerevisiae* antibody測定の意義

松本 譽之* 押谷 伸英* 羽藤 文彦**
 神野 良男* 澤 禎徳* 原 順一*
 中村 志郎* 北野 厚生***

要 旨： [目的] 炎症性腸疾患における血清anti *Saccharomyces cerevisiae* antibody (ASCA)について検討した。 [方法] 潰瘍性大腸炎，クローン病，腸管ベーチェット病，非特異性多発性小腸潰瘍症，および健常人血清におけるASCAについてパン酵母 (*S. cerevisiae*) より抽出した抗原を固相化したELISA法にて測定した。 [結果] 潰瘍性大腸炎およびクローン病において血清ASCA値の有意な上昇がみられた。腸型ベーチェット病ではASCAは高値であった。非特異性多発性小腸潰瘍症ではASCAの上昇はみられなかった。ASCAと，性別，年齢，活動度，罹患部位，および栄養療法の有無との関連はみられなかった。 [結論] 潰瘍性大腸炎およびクローン病において *Saccharomyces cerevisiae* が病態に関与している可能性が認められた。

KEYWORD： 炎症性腸疾患，クローン病，*Saccharomyces cerevisiae*, baker's yeast

【はじめに】

クローン病および潰瘍性大腸炎は難治性的特発性炎症性腸疾患である。その病因は不明であるが，免疫学的応答の異常な状態に基づく局所の炎症性傷害として理解される。その病態に関しては食餌性抗原との関連が指摘されているが，近年クローン病血清において食餌抗原である酵母に対するanti *Saccharomyces cerevisiae* antibody (ASCA) が上昇していることが報告され¹⁻⁵⁾，鑑別診断や病因論的に注目されている。そこで，当科にて通院加療中の炎症性腸疾患患者血清中のASCAを測定し，臨床的背景との関連の有無に関して検討した。

【対象と方法】

クローン病19例 (平均年齢31歳；男性9例，女性10例)，潰瘍性大腸炎18例 (平均年齢35歳；男性7例，女性11例)，腸管ベーチェット病1例 (16歳，男性)，非特異性多発性小腸潰瘍症1例 (32歳，女性)，および健常人

7例 (平均年齢32歳；男性5例，女性2例) より血清を分離した。クローン病においては11例が活動期で8例が非活動期であり，小腸型3例，小腸大腸型8例，大腸型8例であった。栄養量は11例で行われていた。潰瘍性大腸炎では，活動期6例，非活動期12例であり，左側大腸炎型12例，全大腸炎型6例であった。Baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) より加熱抽出した抗原を96穴microtiter plateに固相化し，ペルオキシダーゼ結合抗ヒトIgG抗体を用いたELISA法にて測定し，binding index (BI) = {A492 (test serum) - A492 (background)} / {A492 (reference negative) - A492 (background)} にて検討した。

【結 果】

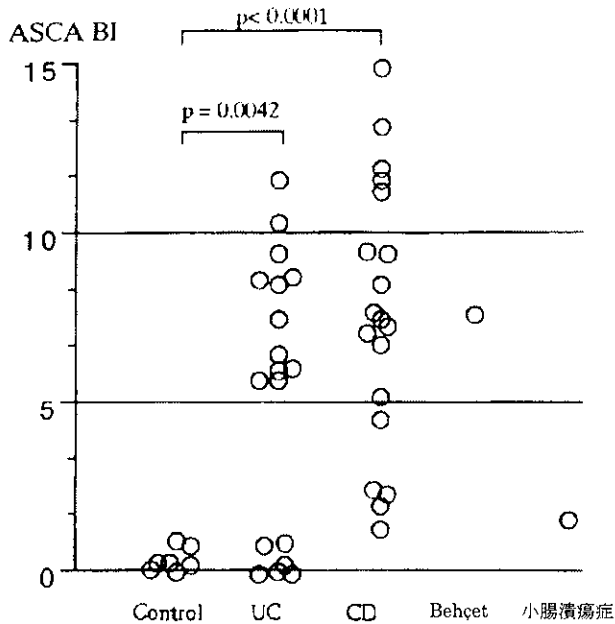
ASCAのBIの平均値はクローン病において7.68，潰瘍性大腸炎において5.43，健常人において0.44であり，腸管ベーチェット病では7.70，非特異性多発性小腸潰瘍症では1.64であった (図)。ASCAのBIは潰瘍性大腸炎およびクローン病において健常人と比較し有意に高値であり，ことにクローン病でより高い傾向にあった。ASCA BIと性別，年齢には関連はなく，各疾患の活動度

* 大阪市立大学医学部，第三内科

** 同，第二生理

*** 住吉市民病院，内科

図 炎症性腸疾患における血清IgG ASCA binding index



とも関連は認められなかった。また、潰瘍性大腸炎の罹患範囲別にも差はみられなかった。クローン病小腸、小腸大腸、大腸型においてASCAに差はなく、栄養量法の有無とASCAにも差はみられなかった。

[考察・結論]

1988年 Mainら¹⁾によりクローン病患者血清においてパン酵母である*Saccharomyces cerevisiae*に対するIgGおよびIgA抗体価の上昇が報告されて以来、本症における抗体陽性率と診断率との関係が注目されてきた。IgG ASCAに比べて、IgA ASCAのほうがクローン病に対する特異性が高いとの報告が多いが^{2,3)}感度の面ではIgGが優れているようである。しかし、クローン病と潰瘍性大腸炎やチェリアック病との鑑別に関しては、*Saccharomyces cerevisiae*の菌株によるASCAの反応性の差に基づいていると考えられる^{3,4)}。ASCAの陽性率と臨床的背景に関してみると、小腸病変を有する例においてASCA陽性率が高いとの報告が多い^{3,5)}。今回、我々の検討では性別、年齢、活動度、罹患範囲とASCAとの関連はみられなかったが、菌株による差も考慮すべきであると考えられる。*Saccharomyces cerevisiae*はパン酵母およびビール酵母として広く存在しており、ASCAとして認識される抗原は酵母のマンノースからなる多糖体であり、加熱処理に対して安定である。非活動期クローン病患者に対する酵母制限食の検討では、パン、ケーキ、バター、チーズ、フルーツ、フルーツを含んだ食品、酢、ソース、茸類、ジャム、砂糖、小麦粉などを制限する厳

しい食事制限により緩解維持につながる可能性が報告されており⁶⁾、今後の治療面における有用性が期待される。

[参考文献]

- 1) Main J, McKenzie H, Yeaman GR, et al: Antibody to *Saccharomyces cerevisiae* (bakers' yeast) in Crohn's disease. *BMJ* 1988;297:1105-1106.
- 2) Barnes RMR, Allan S, Taylor-Robinson CH, et al: Serum antibodies reactive with *Saccharomyces cerevisiae* in inflammatory bowel disease: is IgA antibody a marker for Crohn's disease? *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1990;92:9-15.
- 3) Giaffer MH, Clark A, Holdsworth CD: Antibodies to *Saccharomyces cerevisiae* in patients with Crohn's disease and their possible pathogenic importance. *Gut* 1992;33:1071-1075.
- 4) McKenzie H, Parratt D, Main J, et al: Antigenic heterogeneity of strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* recognised by serum antibodies from patients with Crohn's disease. *FEMS Microbiol Immunol* 1992;89:219-224.
- 5) Quinton J-F, Sendid B, Reumaux D, et al: Anti-*Saccharomyces cerevisiae* mannan antibodies combined with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease: prevalence and diagnostic role. *Gut* 1998;42:788-791.
- 6) Barclay GR, McKenzie H, Pennington J, et al: The effect of dietary yeast on the activity of stable chronic Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 1992;27:196-200.

Anti *Saccharomyces cerevisiae* antibody in inflammatory bowel disease.

Matsumoto Takayuki (Osaka City University Medical School, Department of Medicine III)

Oshitani Nobuhide (Osaka City University Medical School, Department of Medicine III)

Hato Fumihiko (Osaka City University Medical School, Department of Physiology II)

Jinno Yoshio (Osaka City University Medical School, Department of Medicine III)

Sawa Yoshinori (Osaka City University Medical School, Department of Medicine III)

Hara Junichi (Osaka City University Medical School, Department of Medicine III)

Nakamura Shiro (Osaka City University Medical School, Department of Medicine III)

Kitano Atsuo (Sumiyoshi Municipal Hospital, Department of Medicine)

[Purpose] We analysed serum anti *Saccharomyces cerevisiae* antibody (ASCA) titers in inflammatory bowel disease. [Method] Sera were obtained from patients with Crohn's disease, ulcerative colitis, intestinal Behcet's disease, nonspecific multiple ulcers of the small intestine, and healthy volunteers. Serum ASCA was measured using ELISA method. [Result] ASCA titers were significantly increased in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis compared with healthy controls. Significant differences were not found between males and females, age, activity of the disease, extent of the disease, and receiving or not receiving dietary therapy. [Conclusion] *Saccharomyces cerevisiae* might be involved in the pathogenesis of inflammatory bowel disease.

クローン病腸管局所における $\gamma\delta$ T細胞の解析

棟方 昭博* 石黒 陽* 山形 和史*
金沢 洋*

要 旨: [目的] $\gamma\delta$ T細胞は上皮のMHC-class I related antigenを認識することや, TCR alpha chain knock out mouseから得られた知見から, 粘膜免疫における重要な役割を担っていることが明らかとされてきた。しかし, 外来抗原を含めたりガンドや各familyの局在と機能, さらにCD病態における役割などは不明であり, 病態との関連について明らかにすることを目的とした。[方法] 病変部大腸腸管全層よりtRNAを抽出後, cDNAを合成し, PCRにて増幅した。得られた産物をsingle strand conformation polymorphism (SSCP) 法で検討した。健常対象5例, CD5例について各20本ずつ, 計100本ずつのクローンを得, CDR3領域についてアミノ酸の配列を決定した。一部の症例については, 抗 $V\delta 1$, $V\delta 2$ 抗体と, 抗IL-2R抗体 (CD25), CD8 (Dako) との2重染色を施行した。[結果] $V\delta 1$ T細胞のTCR遺伝子の再構成は, 健常, CDともoligoclonalであった。 $V\delta 2$ T細胞は健常対象ではoligoclonalであったのに対し, CDではpolyclonalであった。潰瘍辺縁に沿って深部まで存在し, CD25陽性細胞が多く認められたが, CD45ROの発現は低かった。健常対象ではJoining regionにおいて $J\delta 1$ が使用され, $J\delta 3$ の使用は認められなかったが, CD腸管では $J\delta 3$ を使用したクローンが認められた。[結語] 以上より, これらのvariantな $V\delta 2$ T細胞がCDの病態に関与していることが示唆された。

KEYWORD: $\gamma\delta$ T細胞, Crohn's disease, RT-PCR-SSCP

【はじめに】

$\gamma\delta$ T細胞はTCR alpha chain knock out mouseや, そのリガンドの同定, proliferation assayなどから, 粘膜免疫における重要な役割を担っていることが明らかとされてきた。しかし, 外来抗原を含めたりガンドや各familyの局在と機能, さらにCD病態における役割などは不明である。

【目 的】

各familyごとのTCR遺伝子再構成, 局在および活性化機序を踏まえながら, CD病態との関連について明らかにすることを目的とした。

【方 法】

病変部大腸腸管全層よりtRNAを抽出後, cDNAを合成し, $V\delta 1$, $V\delta 2$ 各primerと $C\delta$ primerのsetを用いてPCRにて増幅した。得られた産物を非変性ポリアク

リルアミドゲルに泳動後, ナイロンメンブランにtransferし, 発色法にてバンドを検出した。健常対象5例, CD5例について各20本ずつ, 計100本ずつのクローンを得, CDR3領域についてアミノ酸の配列を決定した。一部の症例については, 抗 $V\delta 1$, $V\delta 2$ 抗体と, 抗IL-2R抗体 (CD25), CD8 (Dako) との2重染色を施行した。

【結 果】

$V\delta 1$ T細胞のTCR遺伝子の再構成は, 健常, CDともoligoclonalであった。Intra epithelial regionに多く存在し, CD25陽性細胞は少なく, CD45RO陽性細胞多数であった。

$V\delta 2$ T細胞はそのTCR遺伝子再構成は健常対象ではoligoclonalであったのに対し, CDではpolyclonalであった。CD腸管局所において潰瘍辺縁に沿って深部まで存在し, CD25陽性細胞が多く認められたが, CD45ROの発現は低かった。

末梢血では疎水性アミノ酸であるバリン, ロイシン,

* 弘前大学医学部, 第一内科

イソロイシンで90%以上占められるコドン97において、CD由来のクローンは多種類のアミノ酸に置換されていた (Figure 1).

健常対象ではJoining regionにおいてJ δ 1が使用され、J δ 3の使用は認められなかったが、CD腸管ではJ δ 3を使用したクローンが認められた (Figure 2).

これらのクローンはいずれもgenom上には存在しない N regionの付加が認められ (Figure 2), 抗原認識に関与していることが示唆された。

[考 察]

V δ 1, V δ 2T細胞のTCR遺伝子再構成の検討から、健常の状態においてはoligoclonalであることから、 γ δ T細胞は恒常的に発現している何らかの抗原を認識している可能性が示唆された。実際、MHC class I chain related genes (MIC) familyのうちMICAおよびMICBがリガンドとなることが明らかとされ¹⁾、しかもこれらの5'側のプロモーターには熱ショックエレメントが存在していることが明らかとされている²⁾。このことから、炎症や、感染などにより、熱ショック蛋白が発現すると、結果としてMICAの発現が高まり、 γ δ T細胞の活性化が起きることも推測可能である。NKRがその閾値を規定しているという報告もある³⁾が、 γ δ T細胞の活性化機序とその役割、ならびに恒常的に如何なる状態なのかは今後の更なる検討が必要である。また、これらの細胞はおもにV δ 1T細胞であることも報告されている²⁾。今回の我々の検討ではV δ 1T細胞が主にintra epithelial regionに局在していた点で一致していたが、CD腸管におけるその質的な差異は検出できなかった。しかし、Intra

epithelial regionを潰瘍という局面で捉えることは極めて困難であり、我々は全例手術標本を用い、潰瘍と肉眼的健常部にまたがるように切り出し、検討しているが、更なる検討を要すると考えられた。一方V δ 2T細胞はCDにおいてpolyclonalであり、健常対象とはその数や、表面マーカーの点からも異なっていた。特に過去の報告により明らかにされている⁴⁾、疎水性アミノ酸のconservativeな領域であるコドン97が健常ではみられないprolineやserineに置き換わっていた。また、今回の我々の検討で健常では認められなかったV δ 2J δ 3-TCR鎖が、CDで5%程度認められた。conservativeなTCR chainをinvariantとすると、variantなV δ 2TCR鎖を発現した細胞がCD局所に存在していたことになる。また、polyclonalという点に関して、Carena-Iら⁵⁾は興味深い報告をしている。即ち、V γ 9/V δ 2T細胞はそのリガンド自体の性質の変化ではなく、T細胞の状態により活性化もしくは抑制がおきるとし、 $\alpha\beta$ -T細胞の場合はリガンドに特異的なクローンのみが刺激により活性化もしくは抑制されるのに対して、V γ 9/V δ 2-T細胞はpolyclonalな細胞集団が活性化/抑制されるというものである。即ち、これらのV δ 2T細胞はある特定のリガンドに対してcross-reactiveな認識が可能であることを示唆するもので、今回の検討で得られた成績も、CD25の発現と考え併せると、抗原刺激によりpolyclonalな活性化がCDの局所で起きていることが示唆される。これらのなかにはvariantなクローンも含まれており、これらの細胞の標的と機能、さらにその出現の機序、頻度について今後明らかにすることが、CDの病態解明に必要であると考えられた。

Figure 1. Amino acid frequency at position 97 of TCR δ -chain

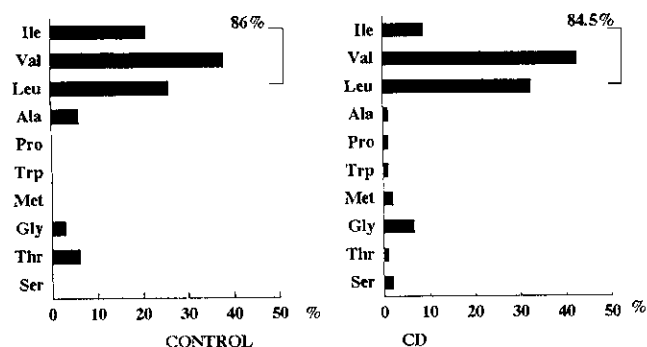


Figure 2. Variant V δ 2J δ 3 TCR δ -chains detected in CD

V δ 2	N1	D δ 2	N3	D δ 3	N4	J δ 3	
ctgtgacacc		ccttctctac		actgggggatacag		ctctctgggacaccgga	
ccctgtgacac	agga			ggg	tttcg	ctctctgggacaccgga	
ccctgtgacacc	gggtgttg	tac		gata	g	ctctctgggacaccgga	
ccctgtgacacc				ciggsgg	gcag	ctctctgggacaccgga	
ccctgtgacacc	g	ccttcc	caac		gatac	ggcacag	ctctctgggacaccgga
V δ 2		J δ 3					
DT		SWDTR					
DTGGFR		SWDTR					
DTGLLYDS		SWDTR					
DTAFPTMRHS		SWDTR				4.5% in CD v.s. 0% in controls	
DTLGGS		SWDTR					

Figure 2. Variant V δ 2J δ 3 TCR δ -chains detected in CD

[文 献]

- 1) Groh V, Steinle A, Bauer S, Spies T: Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science*. 1998;279:1737-1740.
- 2) Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M, Spies T: Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:12445-12450.
- 3) Carena I, Shamshev A, Donda A, Colonna M, Libero GD.: Major histocompatibility complex class I molecules modulate activation threshold and early signaling of T cell antigen receptor-gamma/delta stimulated by nonpeptidic ligands. *J Exp Med*. 1997;186:1769-1774.
- 4) Davodeau F, Peyrat MA, Hallet MM, Houde I, Vie H, Bonneville M: Peripheral selection of antigen receptor junctional features in a major human gamma delta subset. *Eur J Immunol*. 1993;23:804-808.
- 5) Burk MR, Carena I, Donda A, Mariani F, Mori L, De Libero G: Functional inactivation in the whole population of human V gamma 9/V delta 2 T lymphocytes induced by a nonpeptidic antagonist. *J Exp Med*. 1997;185:91-97.

Accumulation of multiple V δ 2 T cells in the intestinal mucosa from Crohn's disease(CD) patients.

Munakata A. (Hirosaki University School of Medicine, First Department of Internal Medicine)
Ishiguro Y. (Hirosaki University School of Medicine, First Department of Internal Medicine)
Yamagata K. (Hirosaki University School of Medicine, First Department of Internal Medicine)
Kanazawa H. (Hirosaki University School of Medicine, First Department of Internal Medicine)

[Background and aim] γ δ T cells have been shown to play an important role in the regulation of mucosal immune system, but the relationship between these cells and the pathogenesis of CD has been still obscure. In the present study, we have analyzed γ δ T cells to characterize antigenic immune response in the intestinal mucosa of CD. [Methods] Total RNA was extracted from surgically resected intestinal mucosa of patients with CD and controls. TCRV δ cDNA was PCR amplified using V δ sense primers(V δ 1, V δ 2) and Cd δ antisense primer. The PCR products were analyzed by single strand conformation polymorphism(SSCP) and sequenced to know the TCRV δ clonotype. Monoclonal antibodies (mAbs)(anti V δ 1 mAb, anti V δ 2 mAb (IMMUNOTECH), UCHL1, and antiIL-2RmAb(DAKO)) were used for immunohistochemical study. [Results] 1) V δ 1 T cells were predominant in the intraepithelial region. Most of them were IL-2R negative and UCHL-1 positive, and clonotypes of TCRV δ 1 were shown to be oligoclonal in all groups. 2) In CD, IL-2R positive V δ 2 T cells were increased in the lamina propria, and UCHL-1 positive V δ 2 T cells were rare. The TCRV δ 2 transcripts developed as a smear after SSCP analysis in contrast to distinct bands detected in controls. Variant TCRV δ 2 J δ 3 chains were detected in only CD. [Conclusions] From these findings, we conclude that accumulation of multiple V δ 2 T cell clonotypes including variant types may be involved in the pathogenesis of CD.

潰瘍性大腸炎患者の大腸粘膜固有層リンパ球より樹立した 細胞傷害性Tリンパ球に関する研究

砂川 隆* 金城 福則* 与那嶺 吉正*
齋藤 厚* 渡辺 守** 日比紀文**

要旨: [目的] 潰瘍性大腸炎 (UC) 患者大腸粘膜固有層リンパ球 (LPL) 中に存在する大腸上皮細胞に対するCTLを検討した。 [方法] 大腸上皮細胞株(WiDr, CW2およびACM), 食道上皮細胞株(KE4)および赤白血病細胞株(K562)を標的細胞として用い, HLA-A locusの一致する大腸上皮細胞株WiDrの持続的刺激によりUC患者LPLよりCTL lineを樹立し, effector細胞として使用した。このCTL lineについて表面抗原および細胞傷害活性を検討した。 [結果] 1) LPLから樹立したT cell lineのフェノタイプはほとんどがTCR $\alpha\beta$ 陽性, CD3陽性, CD16陰性でCD8陽性が52%, CD4陽性が46%であった。 2) 樹立したT cell lineはHLA-A抗原の一致する大腸上皮細胞株に対して高い細胞傷害活性(68%)を示した。 3) HLA-A抗原の一致する食道上皮細胞株と一致しない大腸上皮細胞株およびK562に対しては細胞傷害活性は示さなかった。 4) CTL lineの細胞傷害活性は抗CD3, CD8およびMHC class I抗体により抑制され, 抗CD4およびMHC class II抗体では抑制されなかった。 [考按] 今回, UC患者LPLよりMHC class I拘束性に大腸上皮細胞株を傷害するCTL line樹立に成功した。今後, CTLが認識する大腸上皮細胞上の抗原epitopeを同定することは本症の発症機序解明に有用と考えられる。

KEYWORD: Ulcerative colitis, Cytotoxic T lymphocyte, HLA class I, 大腸上皮細胞

[はじめに]

潰瘍性大腸炎(UC)は大腸上皮細胞が選択的に傷害される疾患であり, その機序の一つに細胞傷害性Tリンパ球(CTL)の関与が示唆されている。これまでに我々はUC患者の末梢血リンパ球(PBL)より大腸上皮細胞に特異的なCTL lineおよびcloneを樹立し, 報告してきたが, 今回, 新たに1例のUC患者の大腸粘膜固有層リンパ球(LPL)より大腸上皮細胞株に対するCTL lineを樹立し, その性状の解析を行った。

[材料と方法]

LPLの分離: 活動期UC患者YK(全大腸炎型)の手術検体からDispase Iおよびcollagenase IIを用いた酵素法にてLPLを分離した。UC患者YKのHLAはHLA-A24/-, B59/61, Cw1/-であった。

CTL lineの樹立: 分離したLPLをIL-2 (100U/ml) お

よびIL-4 (100U/ml) の存在下, 週1回, HLA-A locus (A24) の一致した大腸上皮細胞株WiDr (HLA-A24, A32) で持続的に刺激するという方法を用いてLPLのcell line化を行った。培養液は75%RPMI, 20%FCS, 5%condition medium (PBLをPHAおよびPMAで刺激して得られた培養上清), rIL-2 (100U/ml) およびIL-4 (100U/ml) を含むmediumを使用し, 3~5日に1回, その半量を交換した。また, 週1回, 放射線処理した大腸上皮細胞株WiDrとfeederとしてallogeneic PBLを加えて, 培養した。

細胞傷害活性: 標的細胞として大腸上皮細胞株WiDr, CW2 (HLA-A26, A33), ACM (HLA-A2, 11), 食道癌細胞株KE4 (HLA-A24, A26), NK細胞に感受性の高い赤白血病細胞株K562を用いた。培養8週間後に樹立したT cell lineの大腸上皮細胞株, 食道癌細胞株およびK562に対する細胞傷害活性を⁵¹Cr release assayを用いて検討した。Effector/Target ratio (E/T ratio) は20とした。また, CTL lineの細胞傷害活性がどのpopulationを介するか調べるため, 抗HLA class I,

* 琉球大学医学部, 第一内科

** 慶應義塾大学医学部, 内科