

D. 考察

IL-8は好中球遊走、活性化を起こす因子であり、炎症の場においてその持続と進展に重要な役割を担っている。IL-8は単球やマクロファージ、線維芽細胞、血管内皮細胞以外にも腸管上皮細胞からも分泌されている。また、IL-8がIBD患者の腸管において好中球を遊走させる重要な因子であることが報告されている。今回、LCT、MCTにより腸管上皮から分泌されるIL-8がどのような影響を受けるのかを検討したところ、腸管上皮細胞においてはLCFAの添加はIL-8の産生を増加させ、NF- κ Bの活性化を増強した。MCFAにもこの作用はあるもののLCFAに比べて炎症増強作用は弱いという結果が得られた。また、IBDの活動性と粘膜におけるNF- κ Bの活性化が関係するという報告もある。こうしたことから、クローン病の経腸栄養療法においてMCTがLCTに比べて炎症惹起作用が少ない分、より有用であると考えられる。

疾病や切除によって小腸の正常粘膜の少ない患者に対して、LCT含有からMCT含有の栄養剤に変更することで、腸管内への電解質の漏出が抑制されて下痢が改善されるという報告もされている。この現象LCTがMCTに比べて消化吸収されにくいことによるものと考えられる。さらに、中鎖脂肪酸については極めて親水性であるため、大腸でも効率よく吸収されることにもよるのであろう。以上より小腸吸収面積の減少したクローン病においても中鎖脂肪酸は有効なエネルギー源となると思われる。

さらに、これまで栄養素の腸管上皮細胞における免疫学的機能の制御機構については明らかにされていなかったが、我々の教室では最近、腸管上皮においてTNF- α によって誘導されたNF- κ B、AP-1の活性化が短鎖脂肪酸により抑制され、さらにINF- γ によって誘導されたJAK-STAT系の活性化も抑制することを報告している。今回得られた知見と合わせると脂肪酸による免疫学的な反応はその脂肪酸のC鎖長と関連があると思われる。炎症惹起作用はC鎖長が長いほど強く起こるようである。

今回我々はMCFAとLCFAの炎症惹起作用について検討したところ、MCFA、LCFAは共に腸管上皮細胞においてIL-1 β 、TNF- α によって惹起された炎症を増強し、その効果はLCFAにおいて強かった。MCFAとLCFAにおけるこのような炎症増強作用についての違いを我々は初めて報告した。これらの結果よりクローン病

患者の栄養療法においてMCT含有経腸栄養剤がLCT含有経腸栄養剤よりも有効であることと考えられる。

E. 参考文献

- 1) Tragonone A, Valpiani D, Miglio F, et al: Dietary habits as risk factors for inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995;7:47-51.
- 2) O'Sullivan MA, O'Morain CA: Nutritional therapy in Crohn's disease. *Inflammatory bowel disease* 1998;4:45-53.
- 3) O'Morain C, Segal AW, Levi AJ: Elemental diet as primary treatment of acute Crohn's disease. *BMJ* 1984;288:1859-1862.
- 4) Seidman EG, Bouthillier L, Weber AM, et al: Elemental diet versus prednisone as primary treatment of Crohn's disease. *Gastroenterology* 1986;90:A1625.
- 5) Middleton SJ, Rucker JT, Kirby GA, et al: Long-chain triglycerides reduce the efficacy of enteral feeds in patients with active Crohn's disease. *Clin Nutr* 1995;14:229-236.
- 6) Khoshoo V, Reifen R, Neuman MG, et al: Effect of low- and high-fat, peptide-based diets on body composition and disease activity in adolescents with active Crohn's disease. *JPEN* 1996;20:401-405.
- 7) Tsujikawa T, Ohta N, Nakamura T, et al: Medium-chain triglycerides modulate ileitis induced by trinitrobenzene sulfonic acid. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14:1166-1172.
- 8) Andoh A, Fujiyama Y, Bamba T, et al: Counter-regulatory effect of sodium butyrate on tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)-induced complement C3 and factor B biosynthesis in human intestinal epithelial cells. *Clin Exp Immunol* 1999;118:23-29.
- 9) Johnston JM, Borgstrom B. The intestinal absorption and metabolism of micellar solutions of lipids. *Biochim Biophys Acta* 1964;84:412-423.
- 10) McDermott RP, Sanderson IR, Reinecker: The central role of chemokines (chemotactic cytokine) in the immunopathogenesis of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 1998;4:54-67.
- 11) Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J: Activation of nuclear factor kappa B in inflammatory bowel disease. *Gut* 1998;42:477-484.

厚生科学研究費補助金特定疾患対策研究事業
 「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究」班
 分担研究報告書

クローン病治療における n-3 系脂肪酸投与の意義

分担研究者 福田 能啓 兵庫医科大学 第四内科 講師

研究要旨:[目的]クローン病は成分栄養剤による栄養療法により緩解維持が可能である。しかし、食事摂取を開始すると再燃することが少なくないので、再燃のリスクの少ない食事内容を構築することが必要である。抗炎症作用が期待されるn-3系脂肪酸の経口投与を行い、臨床効果を検討した。[方法]在宅経腸栄養療法施行中の大腸・小腸型クローン病60例を無作為に魚油群、シソ油群、対照群の3群にわけ、魚油群には魚油6g/dayをシソ油群にはシソ油6g/dayをそれぞれ12週間投与した。治療前後で病勢指標・炎症指標・栄養指標を比較した。[結果]血清CRP値が魚油群でシソ油群や対照群に比べて有意に低下し、魚油の抗炎症作用が示された。[総括]クローン病の栄養療法にはn-3系脂肪酸の併用は有用であった。αリノレン酸に比してエイコサペンタエン酸やドコサヘキサエン酸などの長鎖不飽和脂肪酸含量の多い魚油の抗炎症作用は有意であった。

共同研究者

下山 孝, 奥井 雅憲, 小坂 正,
 馬場 裕子, 田村 和民, 里見 匡迪

所属 兵庫医科大学 第四内科

A. 研究目的

クローン病は成分栄養剤による栄養療法により長期にわたる緩解維持が可能である。しかし、食事摂取を開始すると再燃することが少なくない。食事摂取は患者の quality of life と密接に関連しており、再燃のリスクの少ない食事内容を確立し、献立を作り上げることは急務である。抗炎症作用が期待されるn-3系脂肪酸の経口投与による臨床効果には一定の見解が得られていない。そこで、n-3系脂肪酸を経口投与し臨床効果を行い、検討した。

B. 研究方法

在宅成分経腸栄養療法施行中の大腸・小腸型クローン病60例を無作為に魚油群、シソ油群、対照群の3群にわけ、魚油群には魚油6g/dayをシソ油群にはシソ油6g/dayをそれぞれ12週間投与した。対照群には治療開始前の栄養療法を継続した。魚油やシソ油は経腸栄養剤に混じて経鼻チューブから投与した。治療期間中には成分栄養剤の投与量や摂取する食事内容および量を変えないように指導した。治療前後で病勢指標 (Crohn's disease activity index:CDAI)・炎症指標 (血清CRP値)・栄養指標 (血清アルブミン濃度)を3群間で比較した。本研究への参加は自由意志とし、研究の内容を十分説明し、informed consentを得た。

C. 研究結果

魚油群20例、シソ油群20例、対照群20例は全例が12週間の治療期間、副作用なく治療を遂行できた。魚油群、シソ油群、対照群それぞれの平均年齢は28.5±9.9歳、28.3±8.1歳、27.5±8.9歳であり、理想体重1kgあたりの一日の成分栄養剤の投与量はそれぞれ、28.7±12.5kcal、28.9±10.2kcal、29.4±11.2kcalであった。開始時の血清CRP値は、魚油群、シソ油群、対照群でそれぞれ、0.68±0.39mg/dl、0.61±0.31mg/dl、0.58±0.29mg/dlであった。治療前の3群のCDAIは101から108であり差をみとめなかった。12週後には、魚油群、シソ油群、対照群でそれぞれ、83.4、98、98.9となり魚油群で低下が有意であった (p<0.05) (図1)。血清CRP値の平均値は、魚油群では0.64mg/dlから0.38mg/dlに低下し (p<0.05)、シソ油群の0.61mg/dlから0.63mg/dl、対照群の0.55mg/dlから0.62mg/dlに比して有意な改善が得られた(図2)。血清アルブミン濃度の変動は3群間で差がみられなかった (図3)。

図1 在宅成分栄養療法中のクローン病症例への脂肪投与 - CDAIの変動 -

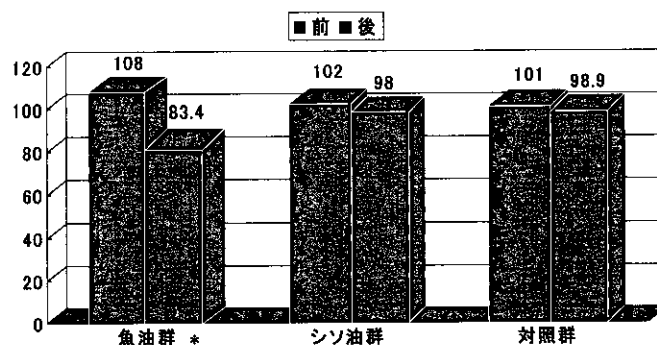


図2 在宅成分栄養療法中のクローン病症例への脂肪投与
—血清CRP値の変動—

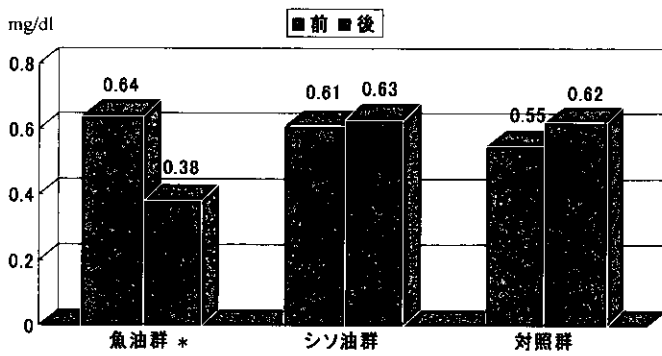
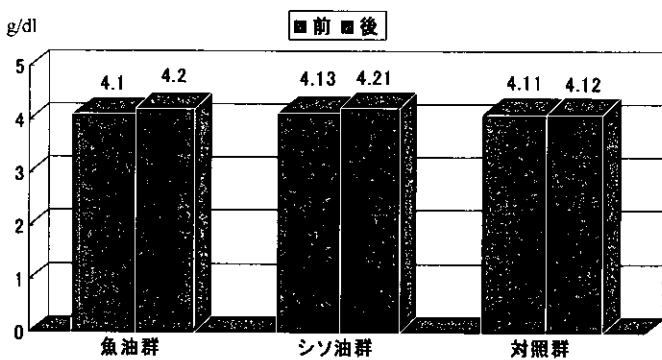


図3 在宅成分栄養療法中のクローン病症例への脂肪投与
—血清アルブミン値の変動—



D. 考察

炎症性腸疾患に対してn-3系脂肪酸が有効であるとする報告と¹⁻⁴⁾、期待する効果は得られないとする報告があり⁵⁻⁷⁾、評価は定まっていない。今回、prospectiveなrandomised trialを行い、n-3系多価不飽和脂肪酸投与により炎症所見の改善傾向が証明された。さらに、n-3系脂肪酸のなかでもαリノレン酸と比較してエイコサペン

タエン酸やドコサヘキサエン酸を含む魚油の方が炎症反応をより有意に抑制することが示された。クローン病の栄養療法にはn-3系脂肪酸の併用は有用であり、とくにエイコサペンタエン酸やドコサヘキサエン酸などの長鎖不飽和脂肪酸含量の多い魚油の抗炎症作用は有意であったことより、クローン病患者の食事指導内容に魚油の含まれる食品を加えることは妥当性があると結論された。

E. 参考文献

- 1) Vilaseca J, Sales A, Guarner F, Rodriguez R, Martinez M, Malagelada JR: Dietary fish oil reduces progression of chronic inflammatory lesions in rat model of granulomatous colitis. *Gut* 1990;31:539-544.
- 2) Ikehata A, Hiwatashi N, Kinouchi Y, Yamazaki H, Kumagai Y, Ito K, Kayaba Y, Toyota: Effects of intravenously infused eicosapentaenoic acid on the leukotriene generation in patients with active Crohn's disease. *Am J Clin Nutr* 1992;56:938-942.
- 3) Shoda R, Matsueda K, Yamato S, Umeda N: Therapeutic efficacy of n-3 polyunsaturated fatty acid in experiment Crohn's disease. *J Gastroenterol* 1995;Suppl 8:98-101.
- 4) Belluzzi A, Brignola C, Campieri M, Pera A, Boschi S, Miglioli M: Effect of an enteric-coated fish-oil preparation on relapses in Crohn's disease. *N Engl J Med* 1996;13:1557-1560.
- 5) Lorenz R, Weber PC, Szimnau P, Heldwein W, Strasser T, Loeschke K: *J Intern Med Suppl* 1989;225:225-232.
- 6) Chawla A, Karl PI, Fisher SE: Effect of n-3 polyunsaturated fatty acid supplemented diet on neutrophil-mediated ileal permeability and neutrophil function in the rat. *J Am Coll Nutr* 1995;14:258-263.
- 7) Lorenz-Meyer H, Bauer P, Nicolay C, Schulz B, Purrmann J, Fleig WE, Scheurlen C, Koop I, Pudiel V, Carr L: Omega-3 fatty acids and low carbohydrate diet for maintenance of remission in Crohn's disease, A randomized controlled multicenter trial 1996

厚生科学研究費補助金特定疾患対策研究事業
「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究」班
分担研究報告書

phosphatidylcholine hydroperoxide 測定による
潰瘍性大腸炎における脂質過酸化の検討

分担研究者 佐々木 巖 東北大学大学院 医学系研究科 外科病態学 生体調節外科 教授

研究要旨：[背景と目的] 特定の分子種の脂質過酸化物を測定する化学発光-高速液体クロマトグラフィー (CL-HPLC) 法を用いて、細胞膜を構成する主要リン脂質で活性酸素により過酸化を受ける標的分子である可能性が高い phosphatidylcholine (PC) の過酸化物 PCOOH の潰瘍性大腸炎患者血清濃度を測定した。[方法] 重症潰瘍性大腸炎手術例4例の術前血清中 PCOOH を CL-HPLC 法により測定した。対照には健康成人血清 (4例) を用いた。測定結果の対数を mean ± SD で表し、Fisher 検定により危険率 0.05% 以下を有意とした。[結果] 炎症性腸疾患患者血清 PCOOH は対照群に比べ有意に高値を示した。[考察] 潰瘍性大腸炎患者血清中には大量の過酸化脂質が産生されていることが明らかとなった。

共同研究者

増子 毅, 舟山 裕士, 内藤 広郎,
福島 浩平, 柴田 近, 小川 仁, 佐藤 俊,
上野 達也, 橋本 明彦, 北山 卓

所属 東北大学医学部 第一外科

A. 研究目的

潰瘍性大腸炎の発生機序に活性酸素が関与すると言われている^{1,2)}。組織障害に活性酸素が関与することの証明として脂質過酸化を証明する方法がある。脂質過酸化を証明するには、過酸化脂質産生を直接検出することが望ましいが、これまで広く行われてきた方法は、チオバルビツツ酸反応物質のように脂質過酸化反応の最終産物を測定する方法で、厳密な意味での脂質過酸化の証明とはなっていない。宮澤ら³⁾が開発した化学発光-高速液体クロマトグラフィー (CL-HPLC) 法は特定の分子種の脂質過酸化物を測定する方法で、これにより生体内過酸化脂質産生を直接証明することが可能になった。本法により、加齢に伴い脳、血清、肝臓内過酸化脂質が増加することが明らかにされた。phosphatidylcholine (PC) は細胞膜を構成する主要リン脂質であり活性酸素により過酸化を受ける標的分子である可能性が高い。PC の過酸化物 phosphatidylcholine hydroperoxide (PCOOH) を測定することは活性酸素が関与する組織障害の発生機序を知る上で極めて重要である。しかしながらこれまで炎症性腸疾患患者の血清 PCOOH は報告がない。我々は、炎症性腸疾患における活性酸素、脂質過酸化の関与を明らかにするために、CL-HPLC 法により炎症性腸疾患患者血清の PCOOH を測定した。

B. 研究方法

重症潰瘍性大腸炎手術例4例の術前血清中 PCOOH を CL-HPLC 法により測定した。対照には健康成人血清 (4例) を用いた。測定結果は mean ± SD で表し、Fisher 検定により $p < 0.05$ を有意とした。

C. 研究結果

炎症性腸疾患患者血清 PCOOH は $3821.25 \pm 2188 \text{ pmol/ml}$ で対照群 $69.5 \pm 8.03 \text{ pmol/ml}$ に比べ有意に高値を示した。

D. 考察

潰瘍性大腸炎患者血清中には大量の過酸化脂質が産生されていることが明らかとなった。今回の測定により PCOOH が潰瘍性大腸炎の重症度のパラメータとなりうる可能性と、潰瘍性大腸炎発生機序における過酸化脂質の役割がより明らかになるものと期待される。

E. 参考文献

- 1) Babbs, C: Oxygen radicals in ulcerative colitis. Free Rad Biol Med 1992;13:169-181.
- 2) Buffinton, G., Doe W.: Depleted mucosal antioxidant defences in inflammatory bowel disease. Free Rad Biol Med 1995;19:911-918.
- 3) Miyazawa, T., Yasuda, K., Fujimoto, K., et al: Chemiluminescence- high performance liquid chromatography of phosphatidyl choline hydroperoxide. Anal Lett 1987;20:915-925.

厚生科学研究費補助金特定疾患対策研究事業
「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究」班
分担研究報告書

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

分担研究者 金城 福則 琉球大学医学部 第一内科 助教授

研究要旨：[目的] 抗原レベルでCTLの反応を検討するため、細胞株のHLAクラスI分子に結合したペプチドを抽出し、自己のB cell line (BCL) にパルスし、その反応を検討した。[方法] HLA-A24 (+) 大腸上皮WiDrおよびその他の細胞株よりHLAクラスIに結合したペプチドを抽出した。抽出ペプチドまたは腫瘍抗原をHLA-A24 (+) UC患者 (YK) より樹立したBCLにパルスし、この患者のLPLより樹立したCTL lineのこれらのBCLに対する細胞障害活性を検討した。また、このCTL lineのT cell receptor (TCR) V beta repertoireについても検討した。[結果] CTL line YKはWiDr由来ペプチドをパルスしたBCLに対してのみ細胞障害活性を示した。TCR使用は比較的制限された。[総括] UC患者LPLより樹立したCTL lineはWiDr由来ペプチドを特異的に認識した。以上の結果は、CTL line YKが大腸上皮細胞株のHLAクラスI上に提示された抗原ペプチドを認識していることを示唆した。

共同研究者

砂川 隆, 与那嶺吉正, 斎藤 厚¹⁾,
渡辺 守, 日比 紀文²⁾

所属 琉球大学医学部 第一内科¹⁾,
慶應義塾大学医学部 内科²⁾

A. 研究目的

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、その上皮細胞傷害機序の1つに細胞傷害性Tリンパ球 (CTL) の関与が示唆されてる。これまでにわれわれはUC患者の末梢血リンパ球 (PBL) および大腸粘膜固有層リンパ球 (LPL) 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¹⁾。今回、分子レベルでCTLの反応を検討するため、酸抽出法を用いて細胞株のHLAクラスI分子に結合したペプチドを抽出し、自己のB cell line (BCL) にパルスし、その反応を検討した。また、このCTL lineのT cell receptor (TCR) V beta repertoireについても検討した。

B. 研究方法

- (1) LPLの分離：活動期UC患者YK (全大腸炎型) の手術検体からDispaseおよびcollagenase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。
- (2) 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-A24/32) 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、3~4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。
- (3) ペプチド抽出：HLA-A24陽性の大腸上皮細胞株WiDr, 食道上皮細胞株KE4 (HLA-A24/26) および肺癌細胞株11-18 (HLA-A2/24) とHLA-A24陰性の大腸上皮細胞株ACM (HLA-A2/11) よりpH3.3クエン酸リン酸バッファーにてHLAクラスIに結合したペプチドを遊離させ、回収し、セップバックC18で固相抽出後、centricon-3にて限外濾過した後に、凍結乾燥させ、HBSSに溶解し保存した。
- (4) 細胞傷害活性：抽出ペプチドまたは腫瘍抗原 (MAGE3, CEAペプチド) をHLA-A24陽性UC患者 (YK) PBLよりEBウイルスにてトランスフォームしたBCL¹³⁾ にパルスし、この患者のLPLより樹立したCTL line YKのこれらのBCLに対する細胞障害活性を検討した。ペプチドパルス試験では、クロム51でラベルした自己のBCLを抽出ペプチドと2時間インキュベートし、その後、4時間、CTL lineとインキュベートし、細胞障害活性を測定した。
- (5) TCR V beta geneの発現量：CTL lineよりRNAを抽出し、RT-PCRを行い、得られたバンドをNIH Image解析ソフトを用いて数値化することにより半定量化し、TCRのV beta geneの発現量を検討した。

C. 研究結果

HLA-A24陽性UC患者YKのLPLをHLA-A24陽性の大腸上皮細胞株WiDrで刺激して培養し、CTL line YKを樹立し、WiDrおよびその他の細胞株よりHLAクラスIに結合したペプチドを抽出し、UC患者YKのPBLより樹立したBCLにパルスし、その細胞傷害活性について検討した。

HLA-A24陽性のWiDr由来ペプチドをパルスした自己のBCLに対して、CTL line YKは細胞障害活性(16.5 ± 3.0% (E/T ration¹⁰))を示したが、WiDr由来ペプチドをパルスしなかったBCLに対しては細胞障害活性(1.5 ± 1.5% (E/T¹⁰⁰))を示さなかった。

さらに、WiDr由来ペプチドをパルスした自己のBCLとペプチドをパルスしなかったBCLを標的細胞としてET ratioを変えて検討したところ、CTL line YKはペプチドをパルスしなかったもの(4.3 ± 0.9% (E/T⁵), 7.0 ± 2.5% (E/T¹⁰), 6.2 ± 2.4% (E/T¹⁵))に比べ、ペプチドをパルスした自己のBCLに対し、ET ratioの増加と一致(9.7 ± 0.9% (E/T⁵), 12.7 ± 1.4% (E/T¹⁰), 14.8 ± 1.8% (E/T¹⁵))して細胞障害活性の増強を認めた。

HLAの一致しない大腸上皮細胞株より抽出したペプチドを自己のBCLにパルスして細胞障害活性の有無を検討したが、有意な細胞障害活性は示さなかった(4.2 ± 0.9% (E/T ration¹⁰))。

また、YKの細胞傷害活性が大腸上皮細胞に特異的かどうかをみるため、HLA-A24陽性の食道上皮細胞株KE4および肺癌細胞株11-18由来ペプチドをパルスしたBCLに対しては細胞障害活性を示さなかった(KE4; 4.4 ± 1.1% (E/T¹⁰), 11-18; 3.0 ± 1.0% (E/T¹⁰))。

さらに、HLA-A24結合モチーフを持つ腫瘍抗原CEAおよびMAGE3をパルスしたBCLに対しても細胞障害活性を示さなかった(CEA; 1.5 ± 0.4% (E/T¹⁰), MAGE3; 4.3 ± 1.1% (E/T¹⁰))。

CTL line YKのTCR (T cell receptor) V beta repertoireについてもRT-PCRで検討した。結果は、TCR V beta使用は比較的制限されており、10%以上を有意な発現とすると、V beta 2 (14%), 6 (13%), 8 (12%) および 13 (12%) の発現が有意に認められた。

D. 考案

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、その大腸粘膜傷害機序についてantibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC)^{2,3)}やlymphokine-activated killer cell (LAK) 活性^{4,5)}などの細胞傷害機序が検討されてきた。近年、CTLに関してもShanahanらがUC患者PBL中にCTLが存在することを証明し⁶⁾、岡崎らもIBD患者のPBLがHLA class-I拘束性で大腸上皮細胞株を傷害することを示した⁷⁾。さらに、炎症局所におけるCTLの存在に関しても、ChottらはUC患者LPL中にV beta 3-J beta 1.6 TCR (T cell receptor)を発現し、未知の抗原を認識するCD8陽性T細胞が存在することを示し⁸⁾、また、Mullerらも炎症性腸疾患患者の炎症局所におけるCTLの存在をパーフォリンに対するin situ hybridizationや免疫染色を用いて証明した⁹⁾。われわれも、UC患者の末梢血リンパ球(PBL)および大腸粘膜固有層リンパ球(LPL)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¹⁾。CTLは標的細胞上のMHC分子に結合する抗原を認識するが、autologousの標的細胞のみならずHLA-A locusの一致するallogeneicの標的細胞

をも傷害することが報告されている¹⁰⁾。Stevensらはmelanoma患者のPBLをHLA-A locusの一致したallogeneicのmelanoma cell lineで刺激することにより腫瘍特異的なCTL lineの樹立に成功している¹¹⁾。われわれはCTLのcell line化をStevensらが報告した方法に準じて行った。すなわちLPLをHLA-A locusの一致した大腸上皮細胞株で持続的に刺激するという特殊な方法を用いることにより、抗原特異的の刺激による長期培養が可能となり、UC患者LPLよりT-cell lineの樹立に成功した。このUC患者LPLより樹立したT-cell lineのphenotypeはCD3+CD8+CD16-であり、HLAの一致する大腸上皮細胞株に対して高い細胞傷害活性を示し、HLAの一致しない大腸上皮細胞株に対しては有意な細胞傷害活性は示さなかった。また、このT-cell lineの細胞傷害活性は抗CD3、CD8及びHLA Class I抗体で著明に抑制され、HLA-class I拘束性のCTL lineであることが示された。さらに、HLAの一致する食道および肺癌細胞株に対しては有意な細胞傷害活性を示さず、大腸上皮細胞上の抗原を認識している可能性が示唆された。

今回、さらに分子レベルでこのCTL反応を検討するため、酸抽出法¹²⁾を用いて細胞株のHLAクラスI分子に結合したペプチドを抽出し、自己のB cell line(BCL)にパルスし、その反応を検討した結果、HLA-A24陽性のUC患者LPLより樹立したCTL line YKはHLA-A24陽性の大腸上皮細胞株由来ペプチドをパルスしたBCLにのみ細胞傷害活性を示した。以上の結果は、CTL line YKがHLA-A locusの一致した大腸上皮細胞株のHLAクラスI上に提示された抗原ペプチドを認識していることを強く示唆するものと考えられた。

以上のように、我々はUC患者LPLより樹立したCTL lineがHLA class-I拘束性で大腸上皮細胞由来ペプチドを認識することを示したが、今後、本症の発症および進展におけるCTLの関与や意義などについて症例数を増やして検討し、さらにCTLが認識する大腸上皮細胞上の抗原epitopeを同定していくことが本症の発症機序解明に有用と考えられる。

E. 参考文献

- 1) Yonamine Y, Watanabe M, Kinjo F, et al: Generation of MHC class I-restricted cytotoxic T cell lines and clones against colonic epithelial cells from ulcerative colitis. *J Clin Immunol* 1999;19:77-85.
- 2) Hibi T, Aiso S, Yoshida T, et al: Anti-colon antibody and lymphocytophilic antibody in ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* 1982;49:75-80.
- 3) Das KM, Kadono Y, Fleischner GM: Antibody-dependent cell-mediated cytotoxic activity in serum samples from patients with ulcerative colitis. *Am J Med* 1984;77:791-6.
- 4) Fiocchi C, Tubbs RR, Youngman KR: Human intestinal mucosal mononuclear cells exhibit lymphokine-activated killer cell activity. *Gastroenterology* 1985;88:625-37.
- 5) Hogan PG, Hapel AJ, Doe WF: Lymphokine-activated and natural killer cell activity in human intestinal mucosa. *J Immunol* 1985;135:1731-8.
- 6) Shanahan F, Leman B, Deem R, et al: Enhanced peripheral blood T cell cytotoxicity in inflammatory bowel disease. *J Clin Immunol* 1989;9:55-64.
- 7) Okazaki K, Morita M, Nishimori I, et al: Major his-

- tocompatibility antigen-restricted cytotoxicity in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1993;104:384-91.
- 8) Chott A, Probert CS, Gross GG, et al: A common TCR beta-chain expressed by CD8+ intestinal mucosa T cells in ulcerative colitis. *J Immunol* 1996;156:3024-35.
- 9) Muller S, Lory J, Corazza N, et al: Activated CD4+ and CD8+ cytotoxic cells are present in increased numbers in the intestinal mucosa from patients with active inflammatory bowel disease. *Am J Pathol* 1998;152:261-8.
- 10) Hayashi Y, Hoon DS, Park MS, et al: Cytotoxic T cell lines recognize autologous and allogeneic melanomas with shared or cross-reactive HLA-A. *Cancer Immunol Immunother* 1992;34:419-23.
- 11) Stevens EJ, Jacknin L, Robbins PF, et al: Generation of tumor-specific CTLs from melanoma patients by using peripheral blood stimulated with allogeneic melanoma tumor cell lines. Fine specificity and MART-1 melanoma antigen recognition. *J Immunol* 1995;154:762-71.
- 12) Storkus WJ, Zeh HJ III, Maeurer MJ, et al: Identification of human melanoma peptides recognized by class I restricted tumor infiltrating T lymphocytes. *J Immunother* 1993;14:94-103.
- 13) Hibi T, Ohara M, Toda K, et al: In vitro anticolon antibody production by mucosal or peripheral blood lymphocytes from patients with ulcerative colitis. *Gut* 1990;31:1371-76.

潰瘍性大腸炎に於ける NKT cell の検討

研究要旨：[目的] 最近の多くの基礎的研究から NKT cell が免疫応答のレギュレーターとして重要な役割を果たしていることが明らかにされ、各種全身性自己免疫疾患に於ける NKT cell の意義が研究されている。現在潰瘍性大腸炎は自己免疫性疾患の一つとして考えられており、潰瘍性大腸炎に於ける NKT cell の動態を検討することは病因病態究明の一助と成りえると考え本研究を計画した。[方法] 活動期潰瘍性大腸炎患者 11 名、非活動期潰瘍性大腸炎患者 10 名、対照として健常人 8 名の末梢血を採取し、ヒト NKT cell に相当する細胞として NKR-PIA+V β 11+/DNV α 24+T cell の解析を Flowcytometry analysis により検討した。また大腸内視鏡検査施行時に炎症所見が最大の粘膜を採取し RNA を分離し、RT-PCR 法にて V α 24J α QT cell の m-RNA の発現を同時に検討した。[結果] 末梢血中に於ける NKR-PIA+V β 11+/DNV α 24+T cell は、活動期潰瘍性大腸炎患者群 (active UC) では 2.32 \pm 0.57% (mean \pm SE)、非活動期潰瘍性大腸炎患者群 (inactive UC) は 23.2 \pm 3.01%、対照群 (Control) では 53.2 \pm 8.10% となり、Control と active UC (P<0.01)、Control と inactive UC (P<0.01)、active UC と inactive UC (P<0.01) それぞれの間に有意な差を認めた。更に活動期潰瘍性大腸炎患者の大腸粘膜炎症局所ではほとんどの症例で V α 24J α QT cell は存在していなかった。[総括] 潰瘍性大腸炎患者に於ては全身的に NKT cell が減少しており、そのことが免疫機構調節の機能失調を生じ病態形成に重要な意義を有していることが推測された。

共同研究者

鈴木 康夫, 和泉 秀彰, 齋藤 康

所属 千葉大学医学部 第二内科

一つとして考えられつつある。また病変局所の浸潤炎症細胞の解析にて T cell リンパ球が Th2 に大きく偏っていること⁶⁾、NKT cell 増殖因子の一つである IL-7 や IL-15 の発現の増加の報告^{7,8)}、NKT cell のリガンドである CD1d 分子が大腸粘膜で発現していることが明らかにされた⁹⁾。従って潰瘍性大腸炎に於ける NKT cell の動態を検討することは病因病態究明の一助と成りえると考え本研究を計画した。

A. 研究目的

最近マウスに於て T cell, B cell そして NK cell に次ぐ第四のリンパ球として NKT cell が同定され注目されている¹⁾。NKT cell は細胞表面に NK cell の細胞マーカーと共に T cell レセプターを併せ持つユニークな細胞群であるが、多くの基礎的研究から helper T cell に於ける Th2 cell 分化誘導、細胞表面上に発現した Fas リガンドを介し自己抗原反応性活性化 T cell にアポトーシスを誘導障害するなど免疫応答のレギュレーターとして重要な役割を果たしていることが明らかにされた²⁾。このユニークな細胞群がヒトに於ても存在することが明らかにされヒト免疫機構に於ける役割と共に、疾患における役割に興味を持たれる³⁾。自己免疫発症マウスモデルに於て NKT cell の減少が見られ同細胞に対する抗体投与にて症状が悪化することに加えヒト自己免疫疾患である、インシュリン依存性糖尿病⁴⁾、全身性エリテマトーデスや強皮症で NKT cell の減少が報告された⁵⁾。潰瘍性大腸炎は未だ原因不明の難治性腸疾患であるが、多くの研究成果より免疫的異常が病因病態に深く関わっていることが推測され、抗大腸粘膜抗体や抗好中球細胞質抗体といった自己抗体の存在も明らかにされ自己免疫性疾患の

B. 研究方法

ヒト NKT cell に相当する細胞として Invariant V α 24J α QT cell の解析を試みた。患者末梢血よりヘパリン採血 40cc 中のリンパ球を分離し TCR α , CD4, CD8, V α 24, V β 11, NKR-PIA に対する抗体を用いた Flowcytometry analysis により、V α 24 positive CD4, CD8 double negative (DNV α 24+) に於ける V β 11 positive NKR-PIA positive 細胞を検討した。また採血と同日に施行された大腸内視鏡検査にて、炎症所見が最大の大腸粘膜から採取した生検サンプルより RNA を分離採取し、Primer として V α 24/C α と V α 24J α Q/C α を用いた RT-PCR 法にて V α 24J α QT cell の m-RNA の発現を同時に検討した。患者の内訳は、活動期潰瘍性大腸炎患者 11 名 (男 6 名, 女 5 名, 平均年齢 35.5 \pm 3.9)、非活動期潰瘍性大腸炎患者 10 名 (男 5 名, 女 5 名, 平均年齢 36.1 \pm 3.51)、対照として健常人 8 名 (男 3 名, 女 5 名, 平均年齢 30.3 \pm 4.69) で、それぞれの末梢血を採取し検討した。

C. 研究結果

末梢血中に於ける DNV $\alpha 24 + T$ cell 中の NKR-P1A + V $\beta 11 +$ 細胞の比率を Flowcytometry analysis により求めると、活動期潰瘍性大腸炎患者群 (UC active) では $2.32 \pm 0.57\%$ (mean \pm SE), 非活動期潰瘍性大腸炎患者群 (UC remission) は $23.2 \pm 3.01\%$, 対照群 (Control) では $53.2 \pm 8.10\%$ となり, Control と UC active ($P < 0.01$), Control と UC remission ($P < 0.01$), UC active と UC remission ($P < 0.01$) それぞれの間に有意な差を認めた (図1). またそれらのデータと末梢血中のリンパ球数から実際の NKT 細胞数 (/mm³) を求めると, active UC では 0.16 ± 0.09 (mean \pm SE), inactive UC では 1.73 ± 0.89 , Control では 3.79 ± 1.54 で, active UC と Control ($P < 0.05$) の間に有意な差を認めた (図2).

更に活動期潰瘍性大腸炎粘膜炎症局所に於ける NAT cell の存在を RT-PCR 法で検討したところ, ほとんどの症例で V $\alpha 24J \alpha Q$ は存在していなかった (図3).

図1 Frequencies of %NKR1-A+V β 11+ Cells of DN α 24+T cells PBL from patients with UC

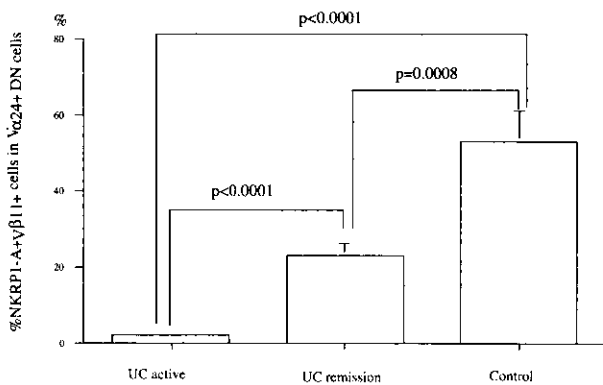


図2 Frequencies of NKT cells in PBL

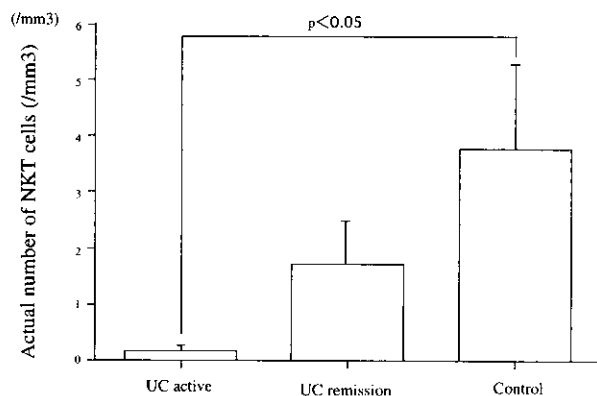
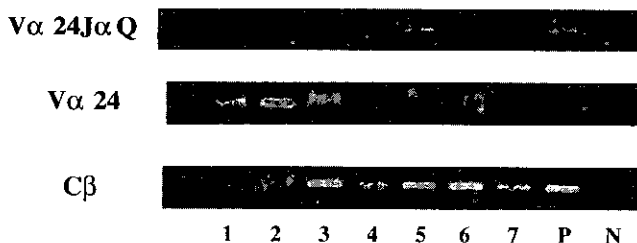


図3 Analysis of invariant V $\alpha 24J \alpha Q$ T cell in mucosa



D. 考察

潰瘍性大腸炎の病因は未だ不明ではあるが免疫学的検討の集積は著しく, その結果自己免疫性疾患の一部として本疾患が位置づけられつつある⁹⁾. 一方, NKT cell に関する研究成果からこの特異な細胞群が免疫機能の調節作用を有していることが次第に明らかにされると共に各種全身性自己免疫性疾患に於ける NKT cell の動態が検討され, 全身性エリテマトーデス, シェーグレン症候群そして全身性強皮症に於て, NKT cell が末梢血中で減少していることが報告された^{5,10)}. 本研究より潰瘍性大腸炎患者の末梢血中に NKT cell の減少が証明されたことは, 本疾患が全身性自己免疫性疾患の一つとして位置づける根拠と成りえるかもしれない. さらに非活動期に於ても, 活動期に比して増加するも, 健康人に比べ有意に減少していることが示された. このことは免疫調節機構の異常が病期に関わらず存在することが示され, 再燃再発の一因となりえる興味ある結果と思われた. RT-PCR 法による局所の検討も NKT cell の存在が減少していることが示され, 末梢血の減少は局所への集積の結果ではなく, 全身性に NKT cell が減少していることが支持された. 今後は潰瘍性大腸炎患者に於てなぜ NKT cell が減少するのか, いかにして病態形成に関わっているのかを検討する必要があると思われた.

E. 参考文献

- 1) 小野江和則: 免疫系に新たに加わった NK-T 細胞—非特異免疫から特異免疫へ— 炎症と免疫 1996;4: 553.
- 2) 小野江和則: NK-T 細胞とは アレルギー科 1996; 6:1-8.
- 3) Akemi Sakamoto, Yoshinori Oishi, Kazuhiro Kurasawa, et al: Characteristics of T-cell receptor V $\alpha 24J \alpha Q$ T cell, a human counterpart of murine NK1+T cells, from normal subjects. J Allergy Clin Immunol 1999;103:S445-51.
- 4) Wilson, S.B., Kent, S.C., Patton, K.T., et al: Extreme Th1 bias of invariant V $\alpha 24J \alpha Q$ T cells in T cells in type 1 diabetes. Nature 1998;391:177-181.
- 5) 坂本明美: 自己免疫疾患における double negative $\alpha \beta$ T 細胞の役割 臨床免疫 1996;28:1558-1565.
- 6) R. GIACOMELLI, A. PASSACANTANDO, I. PARZANESE, et al: Serum levels of soluble CD30 are increased in ulcerative colitis (UC) but not in Crohn's disease (CD). Clin Exp Immunol 1998;111:532-535.
- 7) Watanabe M, Watanabe N, Iwao Y, et al: The serum factor from patients with ulcerative colitis that induces T cell proliferation in the mouse thymus is interleukin-7. J Clin Immunol 1997;17:282-92.
- 8) Kirman I, Nielsen OH: Increased numbers of interleukin-15-expressing cells in active ulcerative colitis. Amer J Gastro 1996;91:1789-94.
- 9) Bleicher P. A., Balk S. P., Hagen S. J., et al: Expression of mouse CD1 on gastrointestinal epithelium. Science 1990;250:679-682.
- 10) Takayuki Sumida, Akemi Sakamoto, Hideyuki Murata et al: Selective Reduction of T cells Bearing Invariant V $\alpha 24J \alpha Q$ Antigen Receptor in Patients with Systemic Sclerosis. J Exp Med 1995;182:1163-1168.

厚生科学研究費補助金特定疾患対策研究事業
「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究」班
分担研究報告書

炎症性腸疾患における NKT 細胞

分担研究者 八木田 旭邦 近畿大学腫瘍免疫等研究所 教授

研究要旨：炎症性腸疾患における NKT 細胞炎症性腸疾患 (IBD) における潰瘍性大腸炎 (UC) とクローン病 (CD) は病因・病態に免疫異常が深く関与していると考えられる。なかでも第4のリンパ球系細胞として登場してきた NKT 細胞は、NK 細胞と T 細胞との両者の性質を持っているが、独立した細胞群で、CD1d というグローブ上に乗った糖脂質抗原を認識し且つ強力な細胞障害性を有する特異な細胞である。最近、この NKT 細胞は自己免疫疾患でも重要な役割が示唆されているが、IBD での報告は認められていない。今回、CD (16 例：非活動期 13 例、活動期 3 例) と UC (6 例：非活動期 4 例、活動期 2 例) および癌疾患 86 例で NKT 細胞活性を検討した。NKT 細胞活性は、NK 細胞と NKT 細胞および T 細胞のそれぞれの表面マーカーである CD56、CD161 および CD3 の Two Color と Three Color で検討した。現時点で NKT 細胞を正確に証明する表面マーカーは CD3 × CD161 と CD3 × CD161 × CD56 とが考えられる。UC では非活動期と活動期で差がなく健常人とも差がなかった。しかし活動期 CD の 3 例中全員が高値を示し、CD 病態に NKT 細胞が密接に関与していることが示唆された。

共同研究者

丸山 正二、助川 寧¹⁾、高添 正和²⁾

所属 近畿大学腫瘍免疫等研究所¹⁾、
社会保険中央総合病院 内科²⁾

A. 研究目的

炎症性腸疾患 (IBD) の潰瘍性大腸炎 (UC) とクローン病 (CD) とは免疫異常を伴う自己免疫疾患と考えられている。今回は Th1 系のサイトカイン (TNF α 、IFN γ 、IL-12 および IL-18) と、Th1/Th2 比率、さらには NKT 細胞について検討した。NKT 細胞に関しては CD161 が代表的な表面マーカーであるが、癌患者 460 例における検討では CD3 × CD161 および CD3 × CD161 × CD56 とが病態と最も高い相関を示した。従って IBD においても NKT に対する評価は上記の Two Color および Three Color とで検討した。

B. 研究方法

対象症例は CD (16 例：非活動期 13 例、活動期 3 例) と UC (6 例：非活動期 4 例、活動期 2 例) および癌患者 86 例である。Th1 系のサイトカインの TNF α 、IFN γ および IL-12 とは末梢血中のリンパ球・単球系細胞を分離後、PHA で刺激して産生能力で測定し、IL-18 は血清でそれぞれ ELISA 法で測定した。

C. 研究結果

Th1 系のサイトカインを図 1 に示した。TNF α の産生

能力は CD 16 例中 13 例が非活動期で 3 例が活動期であったが、いずれも UC に比較し高い活性が認められた。しかし CD の活動期と非活動期とでは差が認められなかった。IFN γ では、CD の活動期で高い傾向が認められたが、UC では寧ろ活動期で低い傾向が認められた。CD では IL-12 は高かった。また IL-18 は 3 例中 1 例で異常高値を示した症例があった。Th1/Th2 比は CD4 × IFN γ / IL-4 比をフローサイトメトリーで測定した (図 2)。Th1/Th2 比は control 104 例の平均値 10.92 ± 4.78 に対して CD の非活動期では 13.0 ± 7.3 と同様であったが、活動期で 6.4 ± 2.6 と低下していた。UC では非活動期および活動期のいずれでも高値を示し、活動期でより高い値を示した。NKT 細胞について検討を加えると CD3 × CD161 及び CD3 × CD161 × CD56 のいずれにおいても CD の活動期で著しく高い値を示した。一方 UC では全体で低値を示したが、非活動期に比較し活動期でより低下を示した。すなわち、CD では活動期で高値を示したのに対し、UC では活動期でより NKT 細胞が低下していた。図 3 に CD 末梢血中の NKT 細胞における各種表面マーカーを示した。特徴的な点は CD の活動期 3 例がいずれも高い値を示した点である。

D. 考察

UC と CD とは病因論および病態論的にも異なることが知られつつあるが、Th1/Th2 比、更には NKT 細胞に関する報告は極めて少ない。今回の検討では症例が少ないために結論的なことは言えなが、極めて特徴的な傾向が認められた。その第 1 点は CD と UC とでは Th1/Th2 比で検討すると UC に比較し CD では低値を示すこと、そして第 2 点は活動期になるとよりその差が著明である

図 1

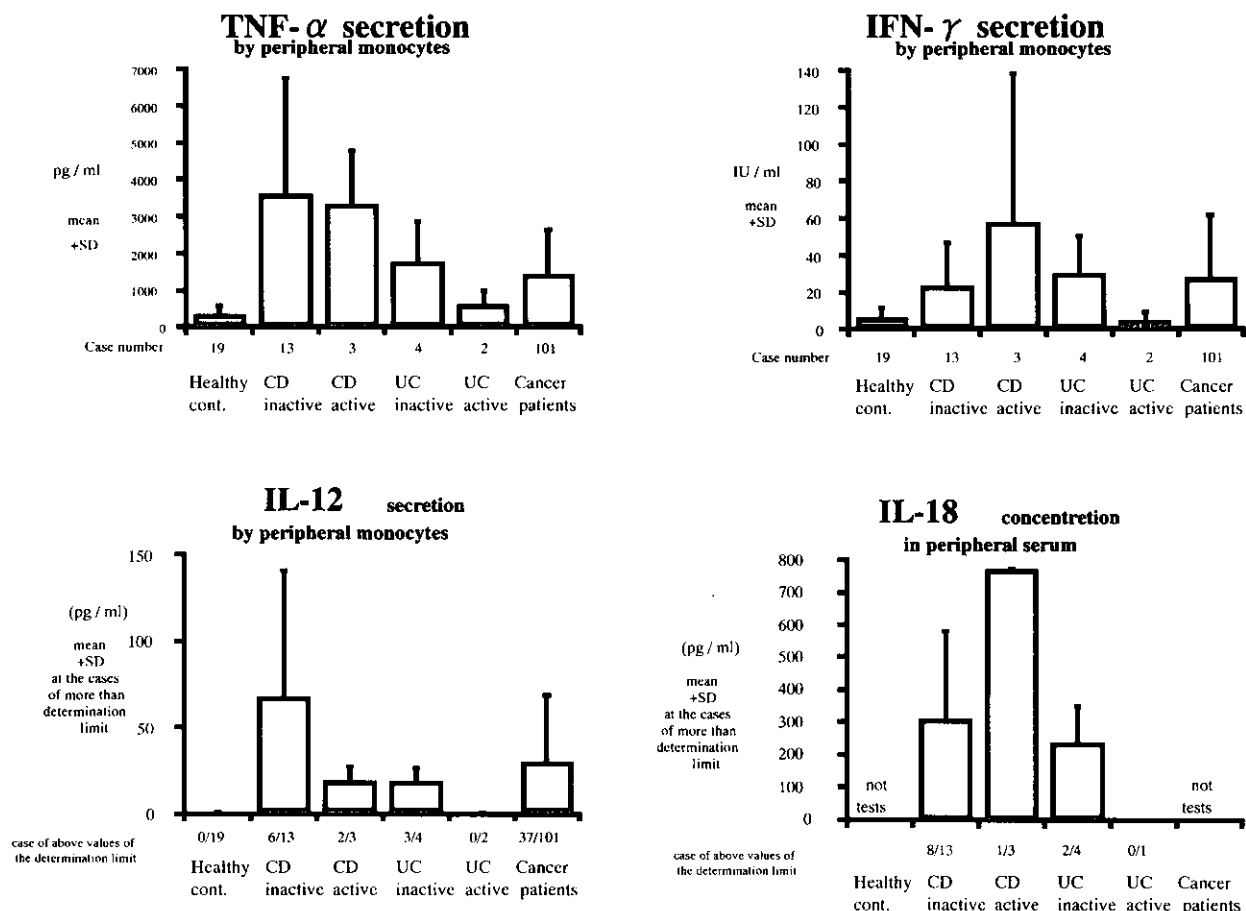
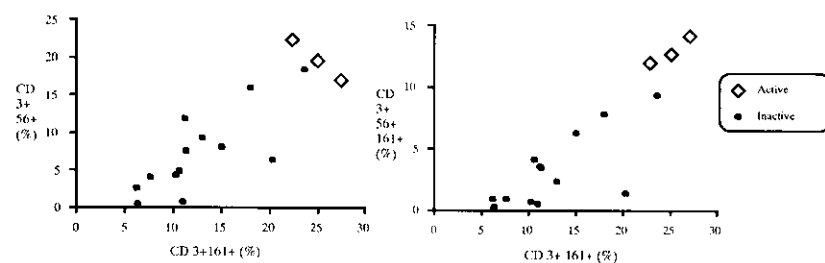


図 2

	Healthy control	CD inactive	CD active	UC inactive	UC active	Cancer patients with immunotherapy
n	104	13	3	4	2	86
Th1(%)/Th2(%) ratio	mean \pm SD cut off = 7 83/104, 80%	13.0 \pm 7.3 10/13, 77%	6.4 \pm 2.6 1/3, 33%	21.9 \pm 5.5 4/4, 100%	24.3 \pm 25.5 1/2, 50%	11.0 \pm 9.0 58/86, 67%
NKT CD 3+ 56+	mean \pm SD cut off = 10 N.T.	7.3 \pm 5.5 10/13, 77%	19.5 \pm 2.4 3/3, 100%	8.2 \pm 5.3 3/4, 75%	4.8 \pm 0.2 1/2, 50%	5.4 \pm 3.4 56/86, 65%
CD 3+ 161+	mean \pm SD cut off = 10 N.T.	12.6 \pm 5.3 10/13, 77%	24.7 \pm 2.0 3/3, 100%	15.2 \pm 10.4 3/4, 75%	9.6 \pm 1.0 1/2, 50%	12.3 \pm 5.3 56/86, 65%
CD 3+ 56+ 161+	mean \pm SD cut off = 2 N.T.	3.2 \pm 3.0 7/13, 54%	12.8 \pm 1.2 3/3, 100%	5.1 \pm 4.9 3/4, 75%	2.0 \pm 0.6 1/2, 50%	2.3 \pm 2.5 42/86, 49%

図 3

CD末梢血



ことである。第3点は、NKT細胞ではUCとCDでは非活動期では両者に差が認められなかったのに対し、活動期ではUCでより低下しCDでは高値を示すことである。結論CDとUCとでは細胞性免疫なかでもTh1/Th2比およびNKT細胞とで特徴的で差が認められた。

炎症性腸疾患に合併した静脈血栓症について

分担研究者 馬場 忠雄 滋賀医科大学 第二内科 教授

研究要旨：[目的]炎症性腸疾患の腸管外合併症の一つである静脈血栓症は、我が国では頻度が少ないながら死亡原因として重要な病態である。今回、静脈血栓症の発症要因に関わると考えられる血小板、凝固線溶系の関与について検討した。[方法]当科において静脈血栓症を合併した4例を含め治療中のクローン病、潰瘍性大腸炎患者症例の血小板マイクロパーティクル、血小板第4因子、 β トロンボグロブリンおよびAPCレジスタンスの測定を行った。[結果]血小板マイクロパーティクルは、活動期炎症性腸疾患症例で高い傾向が認められた。また、血小板第4因子、 β トロンボグロブリン値も活動期のクローン病、潰瘍性大腸炎とも高値の症例が多かったが、血栓症合併症例と非合併症例では差を認めなかった。APCレジスタンスの症例は認められなかった。[総括]活動期の炎症性腸疾患では、血小板第4因子、 β トロンボグロブリン値が高値であり、血小板の活性化が生じていることが確認された。しかし、本邦における静脈血栓症の原因としてAPCレジスタンスの関与は考えにくいと思われる。

共同研究者

佐々木 雅也, 辻川 知之, 安藤 朗,
藤山 佳秀¹⁾, 程原 佳子²⁾

所属 滋賀医科大学 第二内科¹⁾, 同 輸血部²⁾

A. 研究目的

炎症性腸疾患においては、眼、皮膚、関節などに腸管外合併症を生じることが知られている。静脈血栓症も、腸管外合併症の一つと考えられ、欧米では1.2-9%の頻度で発症するとされているが、本邦での報告例は、欧米に比べ稀である。しかしながら、静脈血栓症は、潰瘍性大腸炎やクローン病の死亡原因として重要な病態であり、今回、静脈血栓症の発症要因に関わると考えられる血小板、凝固線溶系の関与について検討した。

B. 研究方法

当科にて経験したクローン病65例、潰瘍性大腸炎165例のうち、静脈血栓症を合併したのは4例であった(表1)。原疾患はクローン病1例、潰瘍性大腸炎3例のいずれも活動期に静脈血栓症を認めており、年齢は18歳から44歳、いずれも男性であった。クローン病では門脈に、潰瘍性大腸炎では下大静脈に血栓症を認めたほか、脳静脈洞血栓症の稀な血栓症も経験した。今回、これらの症例を含め、当科において治療中の活動期クローン病、潰瘍性大腸炎症例の血小板マイクロパーティクル、血小板第4因子、 β トロンボグロブリンの測定をおこなった。血小板マイクロパーティクルは、3.8%クエン酸ナトリウムスピッツにて採決後、 $0.8 \mu\text{g/ml}$ のPGE1

を添加、60分放置の後、 1000×10 分の遠心をおこない、plate rich plasmaを採取した。PBSを用いて $20000/\mu\text{l}$ に調整、 $100 \mu\text{l}$ に4%PFAを $25 \mu\text{l}$ 添加し、室温にて15分静置した。FITC CD42を $20 \mu\text{l}$ 加え30分静置し、フローサイトメトリーにて血小板マイクロパーティクルの測定をおこなった。血小板第4因子、 β トロンボグロブリンは、20ゲージ針を用いてポリエチレン注射器で止血帯を使用せずに採血し、冷却した専用容器にて2-3回反転混合した。その後、砕氷水に15-30分放置後、 2000g で30分遠心した。上静をマイクロピペットで採取し、EIA法にて測定した。凝固線溶系の検討として、APCレジスタンスを検討した。APCレジスタンスはCOATEST (r) APC Resistanceキットにて測定した。

表1 静脈血栓症を併発した炎症性腸疾患症例

1	Y.I.	44歳 男性	クローン病(小腸大腸型)	門脈
2	S.K.	19歳 男性	潰瘍性大腸炎(重症)	下大静脈
3	T.M.	18歳 男性	潰瘍性大腸炎(中等症)	右大腿~下大静脈
4	S.K.	27歳 男性	潰瘍性大腸炎(重症)	上矢状静脈洞

C. 研究結果

血小板マイクロパーティクルは、活動期炎症性腸疾患症例で高い傾向が認められたが、有意差は認めなかった(図1)。一方、血小板第4因子、 β トロンボグロブリン

値は、活動期潰瘍性大腸炎、クローン病において高値の症例が多く、特に β トロンボグロブリンがほとんどの症例でカットオフ値の2倍以上であった(図2)。一方、APCレジスタンスを認める症例は、静脈血栓症を合併した4例を含め、いずれの症例にも認めなかった。

図1 炎症性腸疾患患者末梢血の血小板由来マイクロパーティクル

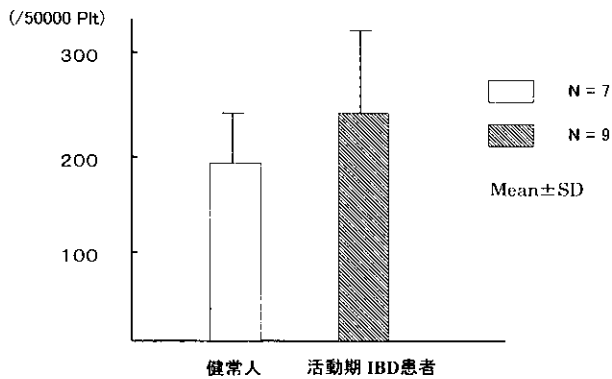
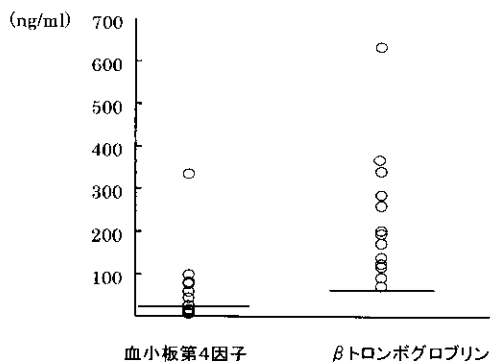


図2 活動期炎症性腸疾患患者の末梢血血小板第4因子、 β トロンボグロブリン



D. 考 察

活動期の炎症性腸疾患患者では、血小板第4因子、 β トロンボグロブリン値が高値であり、血小板の活性化が生じていることが確認された。また、炎症性腸疾患患者では、血小板のサイズが小さくなるとの報告もあり、

我々の血小板マイクロパーティクルの増加はこれに合致した結果と考えられる。しかしながら、血小板の活性化は、静脈血栓症を合併する症例に特異的に認められるのではなく、活動期炎症性腸疾患において高頻度に合併する病態と考えられた。近年、とくに欧米では、静脈血栓症の要因として APC レジスタンスが注目されている。APC レジスタンスは、凝固系の第5因子の遺伝子異常があり、506番目のアミノ酸であるアルギニンがグルタミンに変異することにより、線溶系の作用に抵抗し、凝固亢進となる病態である²⁾。欧米では、静脈血栓症の症例には高頻度に APC レジスタンスが証明され、50%以上に認めるとの報告もある³⁾。炎症性腸疾患における静脈血栓症においても、Liebman らによりこの APC レジスタンスの関与が報告されたが⁴⁾、否定的な見解もみられる。今回、当科で治療中の炎症性腸疾患症例には、静脈血栓症を合併した4例を含め、APC レジスタンスを認める症例は1例もなかった。本邦ではこれが炎症性腸疾患と APC レジスタンスに関する初めての検討であるが、本邦では、欧米に比べ静脈血栓症の合併が少ない要因として、APC レジスタンスがないことが考えられる。本邦における炎症性腸疾患の静脈血栓症の合併要因としては、他の凝固線溶系、血管内皮の障害などから検討を加える必要があると考えられた。

E. 参考文献

- 1) Jaremo P, Sandberg-Gertzen H: Platelets density and size in inflammatory bowel disease. *Thromb Haemost* 1996;75:560-561.
- 2) Bertina RM, Koeleman BPC, Koster T, et al: Mutation in blood coagulation factor v associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994;369:64-67.
- 3) Kupferminc MJ, Eldor A, Steinman N, et al: Increased frequency of genetic thrombophilia in woman with complications of pregnancy. *N Eng J Med* 1999;340:9-13.
- 4) Liebman HA, Kahani N, Sutherland D, et al: The factor v leiden mutation increases the risk of venous thrombosis in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1998;115:830-834.

厚生科学研究費補助金特定疾患対策研究事業
「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究」班
分担研究報告書

Crohn's disease (CD) 腸管局所における Vdelta2 T 細胞の役割

分担研究者 棟方 昭博 弘前大学医学部 第一内科 教授

研究要旨：[目的] CD腸管局所においてポリクローナルな増加を示す Vdelta2 T細胞の病態における役割を明らかにする。[方法] CD94, CD158a, CD25, Vgamma9 TCR, Vdelta2 TCR の各関連マーカーについて免疫染色を施行し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡で炎症巣3視野の陽性細胞数をcountし平均値を求めた。[結果] CD腸管局所では Vgamma9/Vdelta2 T細胞が増加しており、多様で、かつ Cytolytic T細胞のもつマーカーである、CD94, CD158を発現しており、CD25も陽性であった。[総括] 以上のことから、CD腸管では、末梢から急速に流入した、cytolyticな機能を有する Vgamma9/Vdelta2 T細胞が糖脂質や、リン脂質の活性化を受け、病態形成に関与していることが示唆された。

共同研究者
石黒 陽, 山形 和史, 桜庭 裕丈

所属 弘前大学医学部 第一内科

A. 研究目的

著者らはこれまでの検討から、腸管の Vdelta2 T細胞 receptorの頂点に位置するコドン97位からは1-4個の疎水性アミノ酸が連なった配列であり、さらにCD腸管では、その数の増加とともに、多様なクローンで構成されることを明らかとした。このことはCD腸管において、これまでの報告を考え併せると^{1,6)}、リン脂質や、糖脂質などの複合脂質の認識において特殊な状況が存在することを示唆する。最近、末梢血 Vgamma9/Vdelta2 T細胞がリン脂質を認識し、一方これらの抗原はNK細胞のマーカーであるCD94分子を発現させること⁷⁾、これを発現したT細胞はMHCclass1抗原から抑制性シグナルを受け取るが、MHCclass1抗原を欠失した細胞に対してkiller活性を発揮することなどが次第に明らかになってきた^{8,9)}。そこで、今回はNK活性の可能性について明らかとする目的で、その関連マーカーの有無について検討した。

B. 研究方法

CDR3領域の塩基配列に関しては sequenceにて決定し、クロナリテイについてはSSCPで検討した。また、CD94, CD158a, CD25, Vgamma9 TCR, Vdelta2 TCRの各関連マーカーについて免疫染色を施行し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡で炎症巣3視野の陽性細胞数をcountし平均値を求めた。

C. 研究結果

- 1) CD腸管局所における Vdelta2T細胞の90%以上が Vgamma9 TCR陽性であった。
- 2) CD腸管局所における CD94 (+) /Vdelta2 T (+)細胞は、Control, 潰瘍性大腸炎(UC)に比し、有意に増加していた ($P < 0.05$, $P < 0.05$)。
- 3) CD158a (+) /Vdelta2 T (+)細胞は、Control, UCに比し、CD腸管局所で有意に増加していた ($P < 0.05$, $P < 0.05$)。
- 4) CD25 (+) /Vdelta2 T (+)細胞は、Control, UCに比し、CD腸管局所で有意に増加していた ($P < 0.05$, $P < 0.05$)。
- 5) SSCPでは、Controlにおいてスメア状に展開しており、ポリクローナルであった。
- 6) ControlおよびCD腸管の Vdelta2 TCRのCDR3 loopの頂点に位置する97位アミノ酸は90%が疎水性アミノ酸で保存され、さらにCD腸管では98位のアミノ酸も70%程度が疎水性であった。また、連続するものでは4個のアミノ酸が疎水性であった。

D. 考察

Vdelta2/Vgamma9 Tcellは末梢で最も有意な集団である¹⁰⁾が、今回の検討ではCD腸管の Vdelta2T細胞の90%以上が Vgamma9 TCRとのヘテロダイマであった。クロナリテイの検討では、健常者末梢血ではポリクローナルでかつ腸管ではオリゴクローナルであるのに対し、CDでも末梢血ではポリクローナルで、特にCD腸管でのポリクロナリテイは、主に末梢血から流入したクローンで構成されることが推測された。

従ってCD腸管では、末梢から流入した多様な Vdelta2/Vgamma9 Tcellクローンが数多く存在することが示唆された。

近年、NK活性を有しかつTCRを発現した細胞群の存在が明らかとされ、中でも Vgamma9/Vdelta2 T細胞

の発現分子および動態が着目されるに及んでいる。即ちCD94はNKGAと会合し、HLA-Eをと結合して抑制性のシグナルを伝達し¹¹⁾、CD158aはHLA-Cwと結合し、抑制性もしくは活性化のシグナルを伝達する¹²⁾。これらの分子はkiller inhibitory receptor (KIR)と称され、リガンドであるMHC-class I関連分子からの抑制性シグナルを伝達し、TCRからの抗原刺激に対する閾値を決定することが報告されている⁹⁾。また、これらの細胞集団は同一の抗原刺激に対して、ポリクローナルなまま挙動をとる^{7,13)}。今回の検討では、Vdelta2 T細胞はCD94およびCD158aを発現することから、NK活性を持つことが示唆された。

伝達されるシグナルは、上記の如く多数の因子により規定されるわけであるが、最終的にはCD25の有無で決定することが可能と考え、検討した結果、CD腸管では、UC、controlに比し、有意にCD25 (+) Vdelta2 (+) T細胞が増加していた。また、CDR 3 loopの頂点に位置するとされる97位から疎水性アミノ酸が連続したクローンが殆どであり、その認識抗原は過去の報告と考え併せる¹⁻⁶⁾と、複合脂質であることが推測される。

リン脂質、およびIL-2が、未熟な末梢血Vgamma9/Vdelta2 T細胞のCD94を発現させるが、胸腺および成熟T細胞では発現させないという報告もあり⁷⁾、今回のわれわれの検討と考え併せると興味深い。今後は(1)末梢からの流入経路、(2)抗原によるin vitroでの活性化能、(3)effector機能などについて検討を要すると思われる。また、MHC class I分子は生体に普遍的に存在する分子であり、この分子の発現が減少すると、NKT細胞に抑制性のシグナルが入らず、活性化し病態に関与することも報告されている。そこで、リガンドであるところのMHC class Iの発現をpreliminaryに検討した結果、CD腸管のfocalな炎症巣において、腺管上皮の基底膜側にVdelta2 T細胞が入り込み、かつ上皮細胞のMHC class I分子が減弱ないし欠失する傾向がみられている。これらの点についても今後検討を加える予定である。

CD腸管局所ではVgamma9/Vdelta2 T細胞が増加しており、多様で、かつCytolytic T細胞のもつマーカである、CD94、CD158を発現しており、CD25も陽性であった。以上のことから、CD腸管では、末梢から急速に流入した、cytolyticな機能を有するVgamma9/Vdelta2 T細胞が糖脂質や、リン脂質の活性化を受け病態形成に関与していることが示唆された。

E. 参考文献

- 1) Tanaka Y, Sano S, Nieves E, De Libero G, Rosa D, Modlin RL, Brenner MB, Bloom BR, Morita CT: Nonpeptide ligands for human gamma delta T cells. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:8175-9.
- 2) Constant P, Davodeau F, Peyrat MA, Poquet Y, Puzo G, Bonneville M, Fournie JJ: Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial

ligands. Science 1994;264:267-70.

- 3) Burk MR, Mori L, De Libero G: Human V gamma 9-V delta 2 cells are stimulated in a cross-reactive fashion by a variety of phosphorylated metabolites. Eur J Immunol 1995;25:2052-8.
- 4) Kaufmann SH: Immunity to intracellular microbial pathogens. Immunol Today 1995;16:338-42.
- 5) Morita CT, Beckman EM, Bukowski JF, Tanaka Y, Band H, Bloom BR, Golan DE, Brenner MB: Direct presentation of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens to human gamma delta T cells. Immunity 1995;3:495-507.
- 6) Fournie JJ, Bonneville M: Stimulation of gamma delta T cells by phosphoantigens. Res Immunol 1996;147:338-47.
- 7) Boullier S, Poquet Y, Halary F, Bonneville M, Fournie JJ, Gougeon ML: Phosphoantigen activation induces surface translocation of intracellular CD94/NKG2A class I receptor on CD94- peripheral Vgamma9 Vdelta2 T cells but not on CD94- thymic or mature gamma delta T cell clones. Eur J Immunol 1998;28:3399-410.
- 8) Halary F, Peyrat MA, Champagne E, Lopez-Botet M, Moretta A, Moretta L, Vie H, Fournie JJ, Bonneville M: Control of self-reactive cytotoxic T lymphocytes expressing gamma delta T cell receptors by natural killer inhibitory receptors. Eur J Immunol 1997;27:2812-21.
- 9) Carena I, Shamshiev 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;186:1769-74.
- 10) Delfau MH, Hance AJ, Lecossier D, Vilmer E, Grandchamp B: Restricted diversity of V gamma 9-JP rearrangements in unstimulated human gamma/delta T lymphocytes. Eur J Immunol 1992;22:2437-43.
- 11) Brooks AG, Borrego F, Posch PE, Patamawenu A, Scorzelli CJ, Ulbrecht M, Weiss EH, Coligan JE: Specific recognition of HLA-E, but not classical, HLA class I molecules by soluble CD94/NKG2A and NK cells. J Immunol 1999;162:305-13.
- 12) Kim J, Chwae YJ, Kim MY, Choi IH, Park JH, Kim SJ: Molecular basis of HLA-C recognition by p58 natural killer cell inhibitory receptors. J Immunol 1997;159:3875-82.
- 13) 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;185:91-7.

厚生科学研究費補助金特定疾患対策研究事業
「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究」班
分担研究報告書

クローン病肉芽腫におけるリンパ球の活性化に関する
免疫組織化学的研究

分担研究者 松本 誉之 大阪市立大学医学部 第三内科 講師

研究要旨：[目的] クローン病の肉芽腫が抗原提示の場として機能していることを証明するため、*in vitro*の病変肉芽腫で実際にリンパ球の活性化と増殖が惹起されているのかを明らかにする。[方法] 手術に至ったクローン病患者の切除標本を用い、リンパ球サブセットと細胞増殖関連抗原であるKi67との二重染色を免疫組織化学的に行った。[結果] クローン病の肉芽腫においてKi67陽性の増殖Tリンパ球の頻度はリンパ濾胞と同程度であった。また、それら増殖Tリンパ球のサブセットについては、CD45RO優位のCD4陽性Tリンパ球が主体であった。[総括] クローン病の肉芽腫においては、代表的な抗原刺激の免疫装置として知られるリンパ濾胞に匹敵するTリンパ球の活性化、分化・増殖が惹起されていることが示された。

共同研究者

神野 良男, 中村 志郎, 原 順一, 澤 禎徳,
渡辺 芳久, 押谷 伸英, 荒川 哲男,
黒木 哲夫¹⁾, 前田 清, 西口 幸雄,
平川 弘聖²⁾, 北野 厚生³⁾, 大谷 明夫,
名倉 宏⁴⁾

所属 大阪市立大学医学部 第三内科¹⁾,
同 第一外科²⁾,
大阪市立住吉市民病院 内科³⁾,
東北大学大学院
医学系研究科病理学講座病理形態学分野⁴⁾

A. 研究目的

クローン病 (以下 CrD) の病因は未だ不明であるが、その背景には単球/マクロファージ (以下 MΦ) 系細胞の機能異常の存在が示唆されている¹⁾²⁾。我々は、ラングハンス型巨細胞や類上皮細胞といった肉芽腫を構成する MΦ 系細胞に、抗原提示の際に必要な *costimulatory molecule* のなかでも代表的な B7 分子の発現があり、CrD の肉芽腫が抗原特異的な免疫反応の場となっている可能性を既に解明してきた³⁾。これまで抗原提示細胞によるリンパ球の活性化を確認する方法としては Mixed lymphocyte reaction (以下 MLR) として知られる *in vitro* の実験系が用いられていた。しかし最近 Saiki らは、ヒト胃腸様病変粘膜で細胞増殖因子の Ki67⁴⁾ と CD4,8 の二重染色により、*in vivo* におけるリンパ球の活性化を免疫組織化学的に確認し報告した⁵⁾。CrD 肉芽腫を単離し、MLR でリンパ球の活性化を *in vitro* で観察することは現状では困難であるため、今回われわれは

Saiki らの方法を発展させ、*in situ* において、実際にリンパ球の活性化が生じているのかについて、そのサブセットも含めて免疫組織化学的に検討を行った。

B. 研究方法

CrD 患者の外科的切除標本 15 例、大腸癌手術症例の癌部粘膜より十分離れた小腸・大腸粘膜 7 例を用いた。採取した切除組織は、細切した後速やかに periodate-lysine 2% paraformaldehyde (PLP) で固定し、10%、15%、20% の sucrose 加 phosphate buffered saline (PBS) で 12 時間洗浄後 OCT compound にて包埋凍結した。その後 cryostat にて 5 μm の凍結連続切片作製し、リンパ球サブセットに対する抗体と Ki-67 抗体を、ENVISION kit を用いて二重染色を行った。光学顕微鏡の 400 倍視野のもと肉芽腫、潰瘍底、リンパ濾胞の 3 部位において、各リンパ球サブセットにおける Ki67 の陽性細胞数と Ki67 陽性細胞における各リンパ球サブセット数を計測し比較検討した。

C. 研究結果

1. 健常小腸、大腸粘膜では Ki67 陽性細胞は、陰窩の上皮細胞に認められるのみであった。CrD 肉芽腫では Ki67 陽性細胞が肉芽腫周囲に比較的多数認められた。2. CrD の肉芽腫、潰瘍底、リンパ濾胞 (T 細胞域) で測定した各リンパ球サブセットにおける Ki67 の陽性率は、CD4 については潰瘍底がもっとも高率で、リンパ濾胞と肉芽腫間では有意差は認められなかった。しかし、CD8 については病変部位による差は認められなかった。CD45RA と CD45RO についてはともに潰瘍底での陽性率がもっとも高く、リンパ濾胞と肉芽腫間に有意差は認められなかった (略・表 1)。この結果は肉芽腫の周囲でもリンパ球が増殖していることを示した。

D. 考 察

CrDの病変粘膜およびその腸管膜リンパ節における非乾酪性肉芽腫の出現は、本症の最も代表的な病理組織所見として知られ、その診断学的意義は非常に大きい。我々は、細胞接着分子の観点から炎症性腸疾患病変粘膜における免疫異常を解明してきた。今回はCrD病変粘膜の肉芽腫で実際にMΦからリンパ球への抗原提示にともなうリンパ球の活性化・増殖反応が惹起されているのか、in vivoにおける autologus MLR の組織版ともいえる Saikiらの方法、すなわち細胞核に存在する細胞増殖因子 Ki67 と細胞膜表面抗原であるリンパ球サブセットとの二重染色法を用いて検討した。

正常の小腸・大腸粘膜では陰窩の上皮細胞以外に Ki67 陽性細胞を認めなかったが、CrD 病変肉芽腫のリンパ球には Ki67 の発現が認められ、肉芽腫において実際にリンパ球の増殖が生じていることを確認した。つぎにCrDの代表的な病変と考えられる肉芽腫、潰瘍底、リンパ濾胞での各リンパ球サブセット (CD4, 8 と CD45RA, 45RO) における Ki67 陽性率の比較検討では、CD4, CD45RA, CD45RO とも潰瘍底が最も高率であった。これは潰瘍底では腸内細菌などが大量に浸入し、非特異的な免疫反応も盛んに生じているためと考えられた。そして、肉芽腫とリンパ濾胞のT細胞領域の間では Ki67 陽性率に有意差は認められず、肉芽腫では代表的な抗原提示のリンパ装置としてしられるリンパ濾胞に匹敵するTリンパ球の増殖が引き起こされていると考えられた。また、データの記載はないが、各病変部位のKi67陽性細胞におけるリンパ球サブセット比率を検討したところ、CD4とCD8については、いずれの部位でもCD4

の方が著明に高率であったが、CD45RAとCD45ROに関しては肉芽腫だけが他部位と異なりCD45RO優位を示していた。以上よりCrD病変肉芽腫ではCD45RO優位のCD4Tリンパ球主体の抗原特異的免疫反応が惹起されていることが明らかとなった。以上よりCrDの病因・病態における肉芽腫の重要性が示唆された。

E. 結 論

今回の検討からCrD病変肉芽腫は、代表的な抗原刺激の免疫装置として知られるリンパ濾胞に匹敵するTリンパ球の活性化、分化・増殖を生じる抗原特異的な免疫反応の場となっていることが免疫組織化学的に示唆された。

F. 参考文献

- 1) Nagura H.: Mucosal defense mechanism in health and disease. *Acta Pathol Jpn* 1992;42:387-400.
- 2) Fiocchi C.: The immune system in inflammatory bowel disease. *Acta gastroenterol belg* 1997;60:156-162.
- 3) Hara J., et al: Expression of costimulatory molecules B7-1 and B7-2 in macrophages and granuloma's of Crohn's disease. *Lab invest* 1997;77:175-84.
- 4) Bacchi CE.: Detection of cell proliferation in tissue sections. *Braz J Med Biol Res* 1993;26:677-87.
- 5) Saiki Y., et al: Immunophenotypic characterization of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma *Lab invest* 1996;75:67-76.

大腸炎モデルマウスにおける粘膜 IL-7/IL-7 レセプターシグナル異常 (T細胞受容体 α 鎖欠損マウスを中心として)

分担研究者 日比 紀文 慶應義塾大学医学部 内科 教授

研究要旨：慢性大腸炎を自然発症する T細胞受容体 α 鎖欠損 (TCRa $^{-/-}$) マウスおよび IL-7 受容体欠損 (IL-7R $^{-/-}$) マウスを用いて IL-7 を介した免疫調節機構の異常を解析し、慢性大腸炎における IL-7/IL-7 レセプターシグナルの役割を追究した。TCRa $^{-/-}$ では上皮における IL-7 蛋白, IL-7mRNA 発現低下に伴い、生後 12 週目で慢性大腸炎発症を認めた。発症後 TCRa $^{-/-}$ の大腸炎症部では IL-7RmRNA 発現増加と IL-7R 陽性細胞の粘膜固有層浸潤を認めた。大腸炎症部より分離した LPL では IL-7R 陽性の CD4 陽性 TCRbdim 細胞および gdT 細胞の増加を認めた。IL-7R $^{-/-}$ と交配した TCRa $^{-/-}$ においては慢性大腸炎の発症、IL-7 発現異常は認めなかった。TCRa $^{-/-}$ において、IL-7/IL-7 レセプターシグナルの異常に伴う慢性大腸炎発症機序が明らかとなった。

共同研究者

福井 一人, 山崎 元美, 高木 英恵,
江崎 俊彦, 中野 雅, 矢島 知治, 井上 詠,
金井 隆典, 渡辺 守

所属 慶應義塾大学医学部 内科

3. 大腸炎発症前後の TCR $\alpha^{-/-}$ マウス大腸粘膜リンパ球ならびに脾臓リンパ球をフローサイトメトリーにて比較検討。
4. TCRa $^{-/-}$ マウスとおよび IL-7R $^{-/-}$ マウスの交配により T細胞受容体 α 鎖と IL-7 レセプターのダブルノックアウトマウスを作製し、大腸炎発症の有無、大腸粘膜上皮細胞 IL-7 蛋白発現の免疫組織学的検討、大腸粘膜リンパ球のフローサイトメトリーによる解析をおこなった。

A. 研究目的

リンパ球の分化、増殖を司るサイトカインの一つであるインターロイキン 7 (以下 IL-7) が大腸上皮細胞より産生され、IL-7 レセプター陽性の腸管粘膜内 T細胞の増殖を調節する機構、すなわち粘膜 IL-7 機構が存在する事を我々は初めて報告した。そしてこれまでの研究で、IL-7 の調節異常が大腸炎の発症ならびに炎症持続に関与する可能性を示してきた。我々は、炎症による粘膜 IL-7 機構の異常を追究し、IL-7 が大腸において生理的に果たす役割を解明するために、その他の炎症性腸疾患モデルマウスに関し検討を行った。

B. 研究方法

1. デキストラン硫酸塩 (molecular weight 50,000) 1% 溶解水経口投与による大腸炎、ならびにオキサゾロンの 50% エタノール溶解液注腸による大腸炎症粘膜において、上皮細胞の IL-7 蛋白発現と IL-7R 陽性浸潤細胞発現を免疫組織学的に検討。
2. 慢性大腸炎モデルである TCR $\alpha^{-/-}$ マウス大腸粘膜の炎症を組織学的に確認。大腸炎症粘膜での上皮細胞 IL-7 蛋白発現と IL-7R 陽性浸潤細胞発現を 1. と同様に免疫組織学的に検討。

C. 研究結果

1. デキストラン硫酸塩溶解水経口投与による大腸炎、ならびにオキサゾロン注腸による大腸炎症粘膜においてはマウス正常大腸粘膜と同様に、粘膜内リンパ球の IL-7 レセプター陽性細胞は少数で上皮の IL-7 産生も保たれており、IL-7 の調節異常は認められなかった。
2. 生後 16 週の TCR $\alpha^{-/-}$ マウス大腸組織像ではワイルドタイプに比し、著明な粘膜の肥厚と炎症細胞浸潤がみられ慢性大腸炎が認められた。免疫組織化学で、TCR $\alpha^{-/-}$ マウス炎症部粘膜上皮において、IL-7 蛋白の減少が認められた。また、多数の IL-7 レセプター陽性細胞が浸潤していることが示された。
3. 大腸炎を発症した TCR $\alpha^{-/-}$ マウスの大腸粘膜リンパ球では CD4 陽性 TCR bdim 細胞という特殊な細胞集団が認められた。CD4 陽性 TCRbdim 細胞の大多数 (95%) は IL-7 レセプターを発現していた。CD4 陽性 TCRbdim 細胞は大腸炎未発症の TCR $\alpha^{-/-}$ マウスではほとんど認められなかった。また、脾臓リンパ球での同様な検討では、大腸炎を発症した TCR $\alpha^{-/-}$ マウスにおいても CD4 陽性 TCRbdim 細胞は認められなかった。

4. TCR α -/- × IL-7R-/- ダブルノックアウトマウスの大腸組織像では粘膜の肥厚はみられず、大腸炎の発症は認められなかった。免疫組織化学で、大腸粘膜上皮のIL-7発現が保たれていることが示された。ダブルノックアウトマウスの大腸粘膜リンパ球のフローサイトメトリーではCD4陽性TCRbdim細胞が消失していた。

D. 考察

我々は胸線、骨髓にて未熟なリンパ球の分化、増殖を司るとされてきたインターロイキン7 (以下IL-7) が大腸上皮細胞より産生され、レセプターを発現した腸管粘膜内T細胞の増殖を調節する機構、すなわち粘膜IL-7機構の存在を初めて明らかとした。腸管局所におけるIL-7はその後、gdT細胞、パイエル板、さらにT細胞の胸線外分化の場として報告されたcryptopatchの発生に不可欠であることが明らかとされ、正常の腸管粘膜免疫機構の維持に必須の因子と考えられている。

これまでの研究で、ヒト潰瘍性大腸炎炎症粘膜では、上皮由来のIL-7の産生が低下しており、また浸潤リンパ球のIL-7レセプターの発現が高まっていることより、粘膜局所におけるIL-7の発現低下が、大腸炎の持続に関与する可能性のあることを示してきた。また、IL-7トランスジェニックマウスを用いて、IL-7の調節異常そのものが大腸炎の発症に関与すること、および炎症の慢性化に伴いヒト潰瘍性大腸炎と同様に、炎症部粘膜における上皮IL-7発現の低下と浸潤リンパ球のIL-7レセプター発現上昇が認められることを報告し、IL-7の調節異常が大腸炎の発症にも関与する可能性を示してきた。

今回、短期間に外的刺激によって惹起される大腸炎と、長期に渡り慢性化する大腸炎、ふたつの性質の異なる大腸炎においてIL-7/IL-7レセプター調節異常の有無について検討を行い、大腸炎における粘膜IL-7機構の役割を検討した。

まずShort termの腸炎モデルマウスであるデキストラ硫酸塩溶解水経口投与による大腸炎、ならびにオキサゾロン注腸による大腸炎ではIL-7の調節異常は認められず、この種の大腸炎の発症、持続においては粘膜IL-7機構の関与は否定的であった。

前述したように、IL-7/IL-7レセプター調節異常を今までに確認できた腸炎は、ヒト潰瘍性大腸炎ならびにIL-7トランスジェニックマウスという慢性腸炎を呈する疾患ならびにモデルマウスにおいてであり、慢性腸炎における検討が必要と考えられたため、安定した慢性腸炎モデルとしてTCR α -/-マウスを用いた。

TCR α -/-マウスは1993年にTonegawaらにより報告された動物モデルである。このモデルは生後8週から16週より直腸から盲腸までの連続性の炎症、肥厚を認め、小腸は正常に保たれる。組織学的には大腸上皮の過形成、陰窩膿瘍、杯細胞の減少を認め、粘膜固有層にはリンパ球、好中球の浸潤が観察される。

慢性大腸炎発症後のTCR α -/-マウス大腸炎症部粘膜においてはヒト潰瘍性大腸炎ならびにIL-7トランスジェニックマウスと同様のIL-7/IL-7レセプター調節異常を認めた。特にIL-7レセプター陽性細胞が粘膜固有層内への浸潤は顕著であった。TCR α -/-マウスのフローサイトメトリーでの粘膜固有層リンパ球の解析では、TCR α 鎖欠損に伴って出現し、TCR β 鎖を淡く発現する特殊なリンパ球集団を認めた。これはTCRbdim細胞と呼ばれている。最近の知見でTCR α -/-マウス大腸粘膜固有層Tリンパ球においては β 鎖同士で会合しホモ

ダイマーとなっていることが明らかとなり、この細胞はTCR β 細胞とも呼ばれるようになった。TCRbdim細胞は殆ど全てがCD4陽性である。

このCD4陽性TCRbdim細胞が炎症性サイトカインの一種であるIL-4を多く産生すると考えられている。本マウスに抗IL-4抗体を投与したところ腸炎発症を抑制することが出来たという報告から、本マウスに発症する慢性腸炎はIL-4優位になることによるTh2腸炎であり、IL-4を多く産生するCD4陽性TCRbdim細胞が炎症の責任細胞であると位置づけられている。CD4陽性TCRbdim細胞は大腸炎発症後のTCR α -/-マウスでも脾臓では認められず、同細胞の出現は大腸炎症局所の変化であることが示唆された。今回このCD4陽性TCRbdim細胞の大多数(95%)がIL-7レセプターを発現していることが判明した。

そこで、TCR α -/-マウスとおよびIL-7R-/-マウスの交配によりT細胞受容体 α 鎖とIL-7レセプターのダブルノックアウトマウスを作製し、CD4陽性TCRbdim細胞により惹起されるはずの慢性腸炎がIL-7レセプター欠損により変化するかどうかを検討した。するとダブルノックアウトマウスでは大腸炎の発症は認められず、大腸粘膜上皮のIL-7発現が保たれていた。フローサイトメトリーでの解析でCD4陽性TCRbdim細胞が消失していた。IL-7レセプターのノックアウトにより、炎症責任細胞の消失ならびに炎症発症が抑制されたことは、IL-7/IL-7レセプターの調節異常が大腸炎発症への関与を裏付ける所見であると考えられた。

以上大腸炎モデルの検討より、Short termの腸炎においては炎症局所における上皮細胞のIL-7産生を中心とする粘膜IL-7機構は保たれるのに対し、TCR α -/-マウスをはじめとする慢性腸炎においては局所免疫における粘膜IL-7機構の破綻が、発症・持続に関与すると考えられた。このIL-7/IL-7レセプターの調節異常をターゲットにした慢性腸炎の治療法の開発が、今後の重要な研究課題といえる。

E. 参考文献

- 1) Boirivant M, Fuss IJ, Chu A, Strober W: Oxazolone colitis: A murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to Interleukin 4. *J Exp Med* 1998;188:1929-39.
- 2) Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R: A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 1990;98:694-702.
- 3) Watanabe M, Ueno Y, Yajima T, Iwao Y, Tsuchiya M, Ishikawa H, Aiso S, Hibi T, Ishii H: Interleukin 7 is produced by human intestinal epithelial cells and regulates the proliferation of intestinal mucosal lymphocytes. *J Clin Invest* 1995;95:2945-53.
- 4) Watanabe M, Watanabe N, Iwao Y, Ogata H, Kanai T, Ueno Y, Tsuchiya M, Ishii H, Aiso S, Habu S, Hibi T: The serum factor from patients with ulcerative colitis that induces T cell proliferation in the mouse thymus is interleukin-7. *J Clin Immunol* 1997;17:282-92.
- 5) Watanabe M, Ueno Y, Yajima T, Okamoto S, Hayashi T, Yamazaki M, Iwao Y, Ishii H, Habu S, Uehira M, Nishimoto H, Ishikawa H, Hata J, Hibi T: Interleukin 7 transgenic mice develop chronic colitis with de-

- creased interleukin 7 protein accumulation in the colonic mucosa. *J Exp Med* 1998;187:389-402.
- 6) Mombearts P, Mizoguchi E, Grusby MJ, Glimcher LH, Bhan AK, Tonegawa S: Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T cell receptor mutant mice. *Cell* 1993;75:1-20.
 - 7) Bhan AK, Mizoguchi E, Smith RN, Mizoguchi A: Colitis in transgenic and knockout animals as models of human inflammatory bowel disease. *Immunol Rev* 1999;169:195-207.
 - 8) Das KM, Dasgupta A, Mandal A, Geng X: Autoimmunity to cytoskeletal protein tropomyosin. A clue to the pathogenetic mechanism for ulcerative colitis. *J Immunol* 1993;150:2487-93.
 - 9) Takahashi I, Kiyono H, Hamada S: A CD4+T cell population mediates development of inflammatory bowel disease in T cell receptor alpha-deficient mice. *Gastroenterology* 1997;112:1876-82.
 - 10) Iijima H, Takahashi I, Kishi D, Kim JK, Kawano S, Hori M, Kiyono H: Alteration of Interleukin 4 Production Results in the Inhibition of T Helper Type 2 cell-dominated Inflammatory Bowel Disease in T Cell Receptor alpha Chain-deficient Mice. *J Exp Med* 1999;190:607-16.