

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

刺激により異なるインターロイキン-18の分泌機構

研究要旨：インターロイキン (IL) -18はIL-1 β と構造上相同性の高いサイトカインで、インターフェロン- γ 産生誘導を介して強い炎症誘導活性を呈す。IL-18は、他のサイトカインと異なり生理活性を欠く前駆体としてマクロファージをはじめとする多様な細胞に恒常的に産生され、その活性型の分泌はプロセッシングレベルで制御されている。エンドトキシン刺激下では、カスパーゼ1が切断酵素として働くが、Fasリガンド刺激の基ではカスパーゼ1以外のカスパーゼが作用してIL-18分泌を促すことが判明してきた。このように、刺激によりIL-18プロセッシングに必要なカスパーゼをどの様に使い分けているかは今後の研究課題である。

共同研究者

筒井 ひろ子, 中埜 廣樹, 中西 憲司¹⁾,
岡村 春樹²⁾

所属 兵庫医科大学 免疫学医動物学¹⁾,
同 先端医学研究所生体防御部門²⁾

これは、一つにはIFN- γ のプロモーター領域に、IL-18により活性化されるNF- κ Bが存在するためとも考えられるが⁵⁾、詳細はいまだに不明である。また、IL-12はIL-18受容体 (R) を強く誘導する事実から¹⁰⁾、これもIL-12とIL-18のIFN- γ 誘導における相乗作用の一因となりうるであろう。この相乗作用はin vivoの実験でも確認されている。さらには、ある種の細胞内寄生性細菌感染の際にはマクロファージからIL-12のみならずIL-18も分泌されることが報告されていることから、これらのサイトカインが相乗的に働くことでより効果的にnitric oxideなどの細菌排除分子が産生され、速やかな感染防御を可能にするものと考えられる⁶⁾。もともと、IL-12とIL-18が過剰に産生・分泌される場合は炎症性病変が多様な臓器にもたらされ、逆効果となる。例えば、エンドトキシン肝障害がその良い例である^{11, 12)}。恐らく、クローン病も同様の機序に則って展開される病態なのかもしれない。このように、IL-18は生体防御に重要であるが、一度さじ加減を過つと疾病をもたらす強力なサイトカインといえよう。

A. 研究目的

インターロイキン (IL) -18は強力なインターフェロン (IFN) γ 誘導因子としてクローニングされたサイトカインで¹⁾、クローン病の疾患病変部位に強く発現誘導されていることから本疾患との因果関係が注目されている^{2, 3)}。IL-18はその特徴ある遺伝子構造から、通常のサイトカインと異なり生理活性を欠く前駆体としてマクロファージをはじめとする産生細胞内に恒常的に産生・貯蔵される⁴⁾。適度な刺激を受けてはじめて、IL-18前駆体は細胞内切断酵素により切断されて、活性型IL-18として細胞外に分泌される。このように、IL-18分泌はプロセッシングレベルにおいて重要な制御を受けているものと考えられる。本書では、内容が既に論文として刊行されているため、総説形式でまず特徴あるIL-18の生理活性について略記した後にIL-18分泌の制御機構について述べ、最後にIL-18の腸疾患への関わりの可能性について展望する。

B. 考察

[IL-18の生理活性]

IL-18の生理活性はなんと言ってもそのIFN- γ 産生誘導能にある¹⁾。IL-18の標的細胞はT細胞、NK細胞を含むリンパ球にとどまらず、マクロファージさらには樹状細胞にまで及ぶ^{4, 9)}。特筆すべきことは多様なサイトカインとの共同作用である。特に、IL-12、IL-15、IL-2、さらには標的細胞によってはIL-4との共存下で、IL-18のIFN- γ 誘導活性に顕著な相乗効果が観察される。

最近の研究で、IL-18はIL-4やIL-13といったアトピー応答に重要なサイトカインをも誘導することが判明した^{13, 14)}。但し、この現象も一度IL-12が共存すると消失し、さらには逆転して炎症応答増強という結果に至る^{14, 15)}。このように、IL-18は生体内の微細環境に即応してその異なる生理活性を発揮するのではないかと考えられる。

サイトカイン産生誘導以外にもIL-18はNK細胞やCD8+T細胞のパーフォリンを介した或いはFasリガンドを介した細胞障害活性を増強する作用がある^{4, 9)}。このような活性は、生体内における腫瘍退縮効果に反映される。IL-18を投与すると、接種された多様な腫瘍細胞株の生育が阻止されるという報告からもうかがえ、今後のIL-18の臨床応用が期待される¹⁶⁾。

[恒常的なIL-18産生]

IL-18の遺伝子構造の解析からIL-18の特異性が判明した^{17, 18)}。IL-18の上流は2カ所のプロモーター領域が

あるが、一方は恒常的に活性化されている。この事実は、IL-18の恒常生産性に反映されるものと考えられる。また、通常のサイトカイン遺伝子にはRNA-destabilizing elementsが多く含まれているのに反して、IL-18遺伝子には在っても1つのRNA-destabilizing elementしか存在しない¹⁷⁾。このことも、IL-18発現の恒常性並びに定常性を支えているものと考えられる。ところで、IL-18の本特性は構造類似性を有するIL-1 β には認められない。IL-1 β はあくまで誘導性のサイトカインで、恒常的な発現は認められず、その発現はmRNAレベル並びにプロセシングレベルで制御され、IL-18のそれとは異なる点に注意が必要である。

[IL-18 産生細胞]

IL-18の他の特異性に多様な細胞により産生される点が上げられる。通常のサイトカインは限られた細胞によってしか産生されない。しかし、IL-18はマクロファージをはじめ樹状細胞、軟骨細胞、骨芽細胞のストローマ細胞、皮膚のケラチノサイト、腸上皮細胞や気道上皮細胞、副腎皮質などの内分泌系、さらには神経系にもその発現が観察されている^{4,9)}。このようなIL-18産生細胞の多様性は、IL-18遺伝子構造に一部起因している。前述したIL-18のプロモーター領域には、通常のサイトカイン遺伝子プロモーターにはよく観察されるTATA構造が無いためであると考えられている。もっとも、今日まで、上皮細胞からの活性型IL-18の分泌は証明されていない。

[LPS刺激によるIL-18分泌はカスパーゼ1依存性である]

IL-18は、発表当初よりIL-1特にIL-1 β との相同性が着目されていた¹⁾。特に、IL-1 β と共通して切断酵素を用いるのではないかと予想されていた。その予想通り、IL-18前駆体もIL-1 β 前駆体と同様、カスパーゼ1により切断される^{19,20)}。ところで、カスパーゼはアスパラギン酸の後位で切断するシステイン酵素の総称である²¹⁾。現在、10種以上のカスパーゼが同定されている。そのなかのカスパーゼ1がIL-18前駆体の切断酵素であることは、COS細胞に様々なカスパーゼとIL-18前駆体を共導入したところ、カスパーゼ1とカスパーゼ4を導入した場合のみ活性型IL-18の分泌が観察され、IL-18前駆体とのアフィニティを考えるとカスパーゼ1が切断酵素と考えて良いという根拠に基づく^{19,20)}。さらに、このことは、カスパーゼ1欠損マウスのマクロファージをLPSで刺激しても、野生型マクロファージに認められるようなIL-18の分泌が全く観察されない事実により証明された¹⁹⁾。このように、LPS刺激ではマクロファージからのIL-18の分泌はカスパーゼ1に依存することが明らかとなった。ところで、カスパーゼ1も酵素活性のない前駆体として産生され自己融解あるいは他のカスパーゼにより切断されて活性型4量体になると考えられている。しかし、どのような機構によりLPS活性がカスパーゼ1前駆体を活性化してIL-18の分泌を促すのかについては現在でも明かではない。

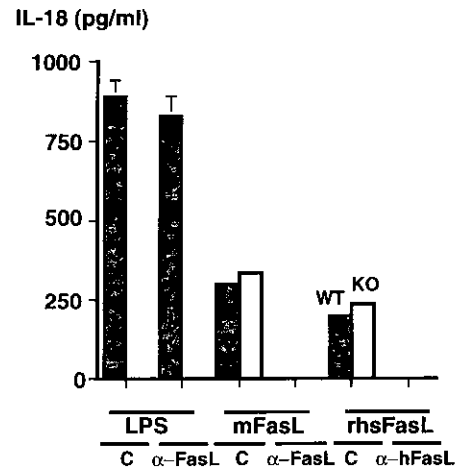
[Fasリガンド刺激によるカスパーゼ1非依存性IL-18分泌]

最近、好中球からFasリガンド(FasL)刺激により、カスパーゼ1を必要とせずにIL-1 β が分泌されることが報告された²²⁾。前述したように、IL-18はIL-1 β と構造上相同性が高いことから、IL-18にもカスパーゼを介さないプロセシング機構が存在する可能性が考えられ

た。そこで、マウスからKupffer細胞或いは脾マクロファージを採取し、FasL刺激によりIL-18が分泌されるかをELISAで検討した。その結果、図に示すように、膜型・可溶性を問わず、FasL刺激によってもLPS刺激時と同様IL-18がその上清中に観察された。FasL刺激によるIL-18の分泌はカスパーゼ1欠損マクロファージを用いても認められることから、FasL刺激によるIL-18プロセシングはカスパーゼ1非依存性であることが判明した²³⁾。また、FasL刺激によるIL-18分泌はFasL抗体により阻止されることから、Fas/FasL特異的な反応の結果生じる現象であることが確認された。また、予想通り、LPS刺激ではカスパーゼ1欠損マウスマクロファージからはIL-18は分泌されず、また、FasL抗体による影響も認められなかった。FasL刺激により分泌されたIL-18はマウスのNK細胞クローンからのIFN- γ 産生を促すことから、活性型IL-18であることが判明した。また、FasLによるIL-18分泌は、カスパーゼの一般的な阻害剤により阻止されることから、カスパーゼ1以外のカスパーゼがプロセシングに関与している可能性が示唆された。

図 Fasリガンド刺激によるKupffer細胞からのcaspase-1非依存性IL-18の分泌(文献23)

*P. acnes*を投与した野生型(WT)或いはcaspase-1欠損(KO)マウスからKupffer細胞を分離し、抗Fasリガンド抗体共存・非共存下に、LPS、膜型Fasリガンド、可溶性Fasリガンドと共に培養し、上清中のIL-18をELISAにて測定した。



[炎症性腸疾患におけるIL-18分泌の可能性]

この1年以内に、炎症性腸疾患患者の病変部位に活性型のIL-18並びに活性型カスパーゼ1が高度に局在する事実が相次いで証明された。特に、クローン病患者に顕著に認められる。免疫組織染色の結果から、IL-18は腸上皮並びに粘膜固有層に局在するマクロファージ系細胞である組織球に強く発現されている。また、粘膜下リンパ組織の樹状細胞にもIL-18発現が強く認められ手いる。もっとも、このIL-18は必ずしも活性型のみを反映しているわけではないので、これら陽性細胞全てが疾患局所の活性型IL-18のソースではない。また、高値のIL-18と病態との因果関係は不明である。ところで、最近、腸内細菌の一部がカスパーゼ1依存性のIL-18分泌に関与する可能性が報告されたが、本疾患におけるカスパーゼ1活性化に、腸内細菌叢の関与が深く疑われる。

ところで、炎症性腸疾患にFas/FasL系が関与している報告が散見される^{24,25)}。FasL陽性細胞の浸潤が病変

部位に観察されるという報告から、IL-18の分泌にも Fas/FasL系が関与する可能性も考えられる。

[おわりに]

炎症性腸疾患，特にクローン病にIL-18がどのような役割を果たしているかを解明するには，適正な動物モデルを用いての解析が不可欠である。解析可能な動物モデルを用いて，IL-18 或いはIL-18 Rの無い状況下での本疾患発症の軽重・有無が，クローン病におけるIL-18の位置付けを確定するものと期待する。

C. 参考文献

- 1) Okamura H, Tsutsui H, Komatsu T, et al: Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* 1995;378:88-91.
- 2) Monteleone G, Trapasso F, Parrello T, et al: Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn's disease. *J Immunol* 1999;163:143-147.
- 3) Pizarro TT, Michie MH, Bents M, et al: IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: Expression and localization in intestinal mucosal cells. *J Immunol* 1999;163:6829-6835.
- 4) Okamura H, Tsutsui H, Kashiwamura S, et al: Interleukin-18: a novel cytokine that augments both innate and acquired immunity. *Adv Immunol* 1998;80:281-312.
- 5) Okamura H, Kashiwamura S, Tsutsui H, et al: Regulation of interferon-gamma production by IL-12 and IL-18. *Curr Opin Immunol* 1998;10:259-264.
- 6) Nakanishi K, Yoshimoto T, Kashiwamura S, et al: Potentiality of interleukin-18 as a useful reagent for the treatment of infectious diseases. In: Holland SM ed. *Cytokine Therapeutics in Infectious Diseases*. 2000 In press. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- 7) Fantuzzi G and Dinarello CA: Interleukin-18 and interleukin-1b: Two cytokine substrates for ICE (caspase-1). *J Clin Immunol* 1999;19:1-11.
- 8) Dinarello CA: Interleukin-18. *Methods* 1999;19:123-132.
- 9) Tsutsui H, Matsui K, Okamura H et al: Pathophysiological roles of interleukin-18 for inflammatory liver diseases. *Immunol* 2000;Rev 174;In press.
- 10) Yoshimoto T, Takeda K, Tanaka T, et al: IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. *J Immunol* 1998;161:3400-3407.
- 11) Tsutsui H, Matsui K, Kawada N, et al: IL-18 accounts for both TNF-alpha-and Fas ligand-mediated hepatotoxic pathways in endotoxin-induced liver injury in mice. *J Immunol* 1997;159:3961-3967.
- 12) Sakao Y, Takeda K, Tsutsui H, et al: IL-18-deficient mice are resistant to endotoxin-induced liver injury but highly susceptible to endotoxin shock. *Int Immunol* 1999;11:471-480.
- 13) Hoshino T, Wiltrot RH, Young HA: IL-18 is a potent coinducer of IL-13 in NK and T cells: A new potential role for IL-18 in modulating the immune response. *J Immunol* 1999;162:5070-5077.
- 14) Yoshimoto T, Tsutsui H, Tominaga K, et al: IL-18, although anti-allergic when administered with IL-12, stimulates IL-4 and histamine release by basophils. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:13962-13966.
- 15) Yoshimoto T, Okamura H, Tagawa YI, et al: Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production by induction of interferon-gamma production from activated B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3948-3953.
- 16) Coughlin CM, Salhany KE, Wysocka M, et al: Interleukin-12 and interleukin-18 synergistically induce murine tumor regression which involves inhibition of angiogenesis. *J Clin Invest* 1998;101:1441-1452.
- 17) Tone M, Thompson SA, Tone Y, et al: Regulation of IL-18 (IFN-gamma-inducing factor) gene expression. *J Immunol* 1997;159:6156-6163.
- 18) Kim Y-M, Kang H-S, Paik S-G, et al: Roles of IFN consensus sequence binding protein and PU.1 in regulating IL-18 gene expression. *J Immunol* 1999;163:2000-2007.
- 19) Gu Y, Kuida K, Tsutsui H, et al: Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme. *Science* 1997;275:206-209.
- 20) Ghayur T, Banerjee S, Hugunin M, et al: Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production. *Nature* 1997;386:619-623.
- 21) Alnemri ES, Livinston DJ, Nicholson DW, et al: Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996;87:171.
- 22) Miwa K, Asano M, Horai R, et al: Caspase-1-independent IL-1b release and inflammation induced by the apoptosis inducer Fas ligand. *Nat Med* 1998;4:1287-1292.
- 23) Tsutsui H, Kayagaki N, Kuida K, et al: Caspase-1-independent, Fas/Fas ligand-mediated IL-18 secretion from macrophages causes acute liver injury in mice. *Immunity* 1999;11:369-367.
- 24) Simpson SJ, De Jong YP, Shah SA, et al: Consequence of Fas-ligand and perforin expression by colon T cells in a mouse model of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol* 1998;115:849-855.
- 25) Ueyama H, Kiyohara T, Sawada N, et al: High Fas ligand expression on lymphocytes in lesions of ulcerative colitis. *Gut* 1998;43:48-55.

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

炎症性腸疾患患者における末梢血単球由来樹状細胞の検討

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 (IBD) の病態における樹状細胞 (DC) の活性化の関与を検討する。
 [方法] 健常者 6 名, クロウン病 (CD) 7 名, 潰瘍性大腸炎 (UC) 5 名を対象に末梢血単球由来樹状細胞 (Mo-DC) の CD80, 86, 83, HLA-DR の陽性率, IL-12 産生量を比較検討した。[結果] CD80 の陽性率においてのみ, 健常者に比し CD で有意に高く, また UC でも高い傾向を示した。これらは, ステロイド剤投与の影響はみられなかった。IL-12 の産生量に関しては, 個体差が大きく一定の傾向を認めなかった。[総括] IBD, 特に CD において, 共刺激分子の CD80 の陽性率が有意に高かったことから, Mo-DC などの抗原提示細胞側からの刺激で T 細胞が活性化され, 病態に影響している可能性が示唆された。

共同研究者

畑 和憲, 天方 義人, 辻川 知之,
 安藤 朗, 佐々木雅也, 藤山 佳秀

所属 滋賀医科大学 第二内科

レート付着法により単球を分離した。②付着細胞を EDTA にて剥離し, 細胞 1×10^6 個に対して, IL-4 と GM-CSF を各々 20ng/ml 添加し, 6 日間培養した。③第 7 日に TNF- α を 5ng/ml 添加し, 72 時間後 (第 10 日) に回収したものを Mo-DC として用いた。④ Mo-DC は成熟, 活性化のマーカーである共刺激分子の CD80, 86, さらに CD83, HLA-DR の陽性率を flow cytometry にて解析した。⑤培養終了後の上清中における IL-12 の蛋白量を ELISA 法にて測定した。

A. 研究目的

樹状細胞 (dendritic cell, DC) は未感作の CD4 陽性, CD8 陽性 T 細胞に抗原提示できる唯一の細胞で, ごく少量の抗原で T 細胞を活性化する機能を有する。DC は, 成熟過程において, immature DC と mature DC に分類できる。immature DC は抗原処理能力を持ち, 抗原を捕捉, プロセッシング可能であり, mature DC は抗原処理能力を失うものの抗原を提示し T 細胞を活性化する。近年, 末梢血単球から, IL-4 と GM-CSF を用いて培養することで, immature DC を, さらに TNF- α を添加することで mature DC を得ることが可能となった。

外来抗原と接触する機会が多い消化管には, DC が密に分布しており, 腸管の粘膜免疫において, DC は大きな役割を担っていると考えられる。炎症性腸疾患 (IBD) では, DC の過度の活性化がその病態・病因に関与している可能性が考えられる。そこで, 今回我々は, 健常者, クロウン病 (CD), 潰瘍性大腸炎 (UC) 患者の末梢血単球由来樹状細胞 (monocyte derived dendritic cell, MoDC) を単離し, その活性化を比較, 検討した。

B. 研究方法

対象は, 健常者 6 例, CD 7 例, UC 5 例で, うちステロイド使用者は CD 4 例, UC 3 例であった (表 1)。方法は, ①末梢血 15ml をヘパリン加採血し, Ficoll-Paque を用いた比重遠心分離法にて, 単核球を採取, さらにプ

表 1 患者背景

		PSL(+)	PSL(-)
CD	active	1	0
	inactive	3	3
UC	active	2	0
	inactive	1	2

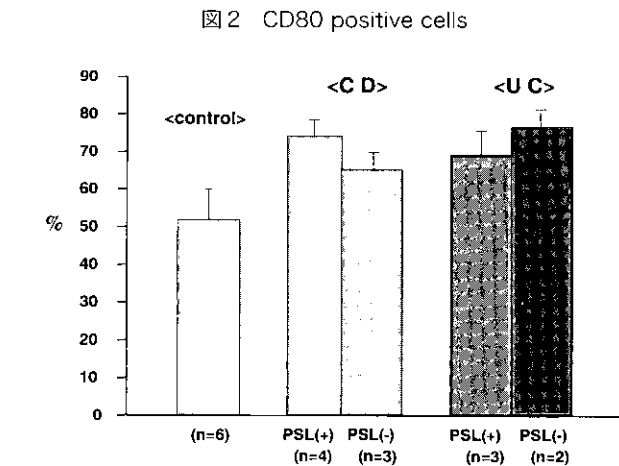
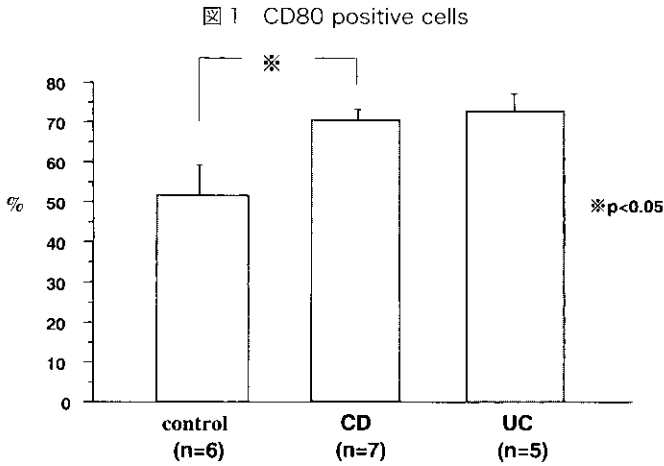
C. 研究結果

・CD80 陽性率

各種表面マーカー陽性率は炎症性腸疾患で高い傾向を示し (表 2), 特に共刺激分子である CD80 の陽性率の平均値は, 健常者 51.9%, CD 70.7%, UC 72.6% であり, 健常者に比し CD 患者で有意に高く, UC 患者でも高い傾向を示した (図 1)。ステロイドの影響について検討したところ, CD80 の陽性率はステロイド剤使用の有無で一定の傾向を認めなかった (図 2)。

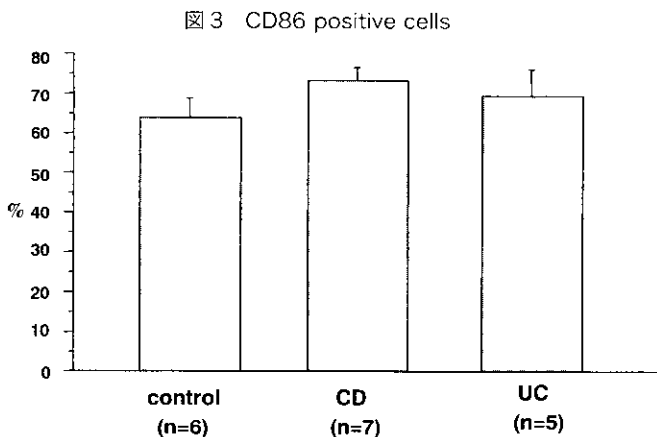
表2 各種表面マーカー陽性率 (%)

	CD80	CD86	CD83	HLA-DR
Control	51.9±8.0	64.1±5.0	47.1±6.6	74.2±6.1
CD	70.7±2.9	73.2±3.5	55.6±5.4	84.8±2.9
UC	72.6±4.7	69.3±6.7	57.5±8.0	78.4±6.7



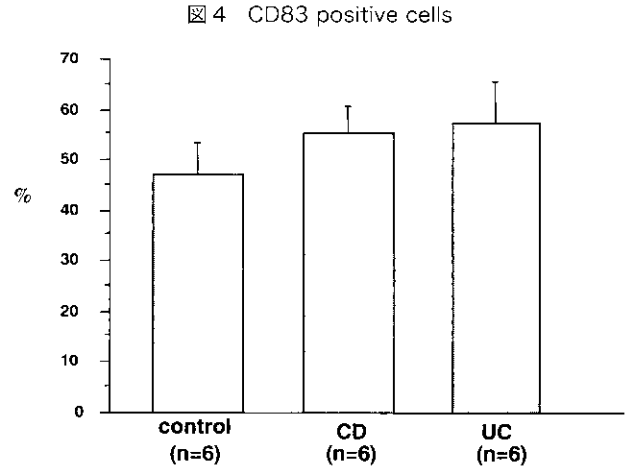
・CD86 陽性率

もう一方の共刺激分子であるCD86の陽性率は、健常者、CD、UCでそれぞれ64.1、73.2、69.3%とCD患者でやや高い傾向を示したものの、統計学的に有意差を認めなかった(図3)。またステロイドの影響もCD80と同様に一定の傾向を認めなかった。



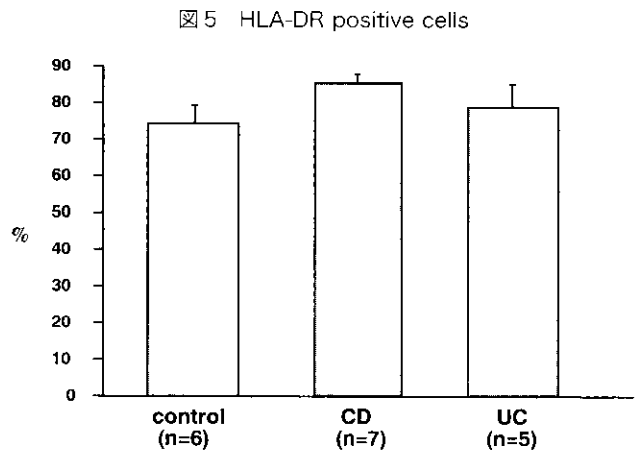
・CD83 陽性率

活性化されると表出してくるCD83の陽性率は、健常者、CD、UCでそれぞれ47.1、55.6、57.5%とIBD患者で若干高くなっているが、統計学的有意差を認めなかった(図4)。ステロイドの影響についても一定の傾向を認めなかった。



・HLA-DR 陽性率

MHC class II分子であるHLA-DRの陽性率は、健常者、CD、UCでそれぞれ74.2、84.8、78.4%と3群間で有意差を認めなかった(図5)。ステロイドの影響についても一定の傾向を認めなかった。



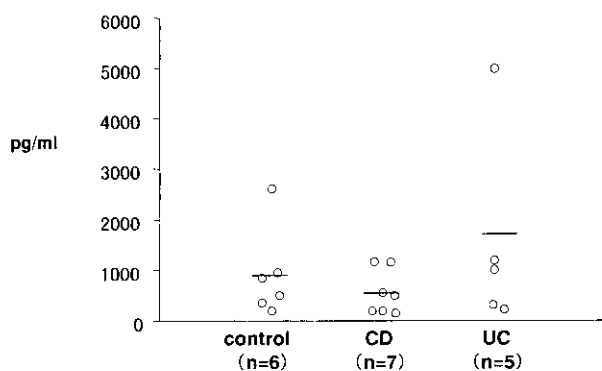
・IL-12 産生量

DCが活性化されると産生するIL-12に関しては、個体差が大きく、健常者とIBD患者で明らかな差を認めなかった(図6)。

表3 培養上清IL-12産生量 (pg/ml)

	平均値	標準偏差	最小値	最大値
健常者(n=6)	906	880	185	2600
CD(n=7)	566	461	140	1200
UC(n=5)	1543	1979	215	5000

図6 培養上清IL-12産生量



以上をまとめると、活性化の指標となるMo-DCの細胞表面マーカーは、共刺激分子のCD80だけが、CD患者で有意に、高い陽性率を示した。ステロイド剤使用の有無で、各種表面マーカーの陽性率に差を認めなかった。また、IL-12の産生量については、症例によりばらつきが多く、さらなる検討が必要と思われた。

D. 考察

1996年に、IL-4, GM-CSF, TNF- α を用いて、比較的大量に末梢血の単球からDC (Mo-DC) を誘導する方法が確立された^{1,2)}。このことにより、Mo-DCを用いることで、局所のDCの機能を類推することができるようになった。通常、DCはimmatureの状態表皮や粘膜系上皮組織など外界に接した器官・組織に広く分布している³⁾。腸管では、細菌などの抗原はM細胞を介して侵入し、immature DCがこれを捕捉、プロセッシングする。次にmature DCに成熟すると、MHC class II, HLA-DRやCD40, 共刺激分子 (CD80, CD86), CD83などを発現、またIL-12の産生を増加させ抗原提示機能を発揮し、T細胞を活性化する⁴⁾。このことから、IBDでもDCがその病態に関与していると考えられる。

一般にT細胞の活性化は、抗原提示細胞 (APC) との接着、APCの主要組織適合抗原 (MHC) に提示された抗原の認識、APCとの共刺激からなる。APCとしては、DC以外にマクロファージ、単球、B細胞、MHC class IIを発現した上皮細胞があるが、未感作のT、B細胞に抗原提示できるのはDCのみであり、またDCは抗原の免疫原性を数日間保持できるため、ごく少量の抗原で十分T細胞を活性化することができることから、DCは強

力なAPCということができる。DCによるT細胞の活性化では、DC・T細胞間の、MHC・TCR (認識)、CD40・CD40リガンド、CD80, 86・CTLA-4 (共刺激) が特に重要であり、特に共刺激がないとT細胞を活性化することができず、免疫応答が起こらないとされる。

今回我々は、IBDにおいて、DCの過度の活性化がその病態に関与すると仮説し、健常者、CD, UC患者のMo-DCの成熟、活性化の指標である共刺激分子 (CD80, 86), CD83, HLA-DR, IL-12産生量を比較、検討した。今回の実験では、IBD、特にCDにおいて、共刺激分子のCD80の陽性率が有意差をもって高値を示した。このことから、DC側からの刺激でT細胞が強く活性化され、IBDの病態に関与していることが示唆された。

他の表面マーカーでもIBDでやや高い傾向を示すものの、有意差がなかった要因としては、TNF- α で一樣にimmature DCを刺激し、長期間培養したことが考えられ、TNF- α を添加しない実験系や培養期間をもう少し短縮した実験系でのさらなる検討が必要と思われる。

各種表面マーカーの陽性率がステロイド剤の影響を特に認めなかったことは、IBDにおけるステロイドの作用は、DCの活性化の抑制には、関与しないと考えられる。また、IL-12の産生量に関しては、個体差が大きく、一定の傾向を認めなかったため、さらなる症例の追加による検討が必要と思われた。

今回の検討から、共刺激分子CD80の発現がIBD、特にCDで強く、またT細胞は共刺激がないと活性化されないことを考え合わせると、IBD、特にCDにおいて、例えば抗CD80抗体などの共刺激分子のブロックが治療に有効かもしれない。

E. 参考文献

- 1) Zhou LJ, Tedder TF: CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996;93: 2588-2592.
- 2) Bender A, Sapp M, Schuler G, et al: Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. J. Immuno. Methods 1996;196:121-135.
- 3) 稲葉カヨ, 稲葉宗夫: 樹状細胞の生物学的特性 最新医学 1999;54:2064-2611.
- 4) Banchereau J, Steinman RM: Dendritic cells and the control of immunity. Nature 1998;392:245-251.

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

IBD の病変形成におけるサイトカイン mRNA 定量の意義

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] 潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis; UC) やクローン病 (Crohn's disease; CD) は、原因不明の難治性慢性腸炎であり、その病態には免疫異常の関与が指摘され、その免疫調節因子である各種の腸管粘膜内サイトカインについて検討した。[方法] IBD 患者および健常対照者より得られた生検組織より抽出した RNA を、TaqMan PCR 法を用い各サイトカイン mRNA を測定した。[結果] 活動期潰瘍性大腸炎では、IL-1b, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12p40, IFN- γ , TNF- α において、サイトカイン mRNA の高発現がみられた。非活動期において高発現しているものはなかった。一方、活動期クローン病においては、IL-1 β , IL-8, IL-12p40 において、サイトカイン mRNA の高発現がみられた。また、IL-12p40 mRNA では非活動期においても高発現がみられた。[総括] UC においては IL-4, IL-5, IL-10 が、CD においては IL-12 がキーサイトカインとなり病態形成と関与していることが明らかとなった。

共同研究者

澤 禎徳, 神野 良男, 原 順一, 中村 志郎,
押谷 伸英, 足立 賢治¹⁾, 西口 幸雄,
平川 弘聖²⁾, 北野 厚生³⁾

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⁾

型 7 例, 直腸炎型 5 であった。クローン病では、活動期 10 例, 非活動期 7 例であり、大腸型 4 例, 小腸大腸型 13 例であった。栄養療法は、中心静脈栄養が 5 例であり、成分栄養剤が 9 例であった。大腸内視鏡的に得られた生検組織より、total RNA を抽出し、それを逆転写した後、TaqMan PCR 法を用い各サイトカインを定量した。計測において、ABI PRISM 7700 を用い標準品の発現との相対比で評価した。

C. 研究結果

活動期潰瘍性大腸炎では、IL-1b, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12p40, IFN- γ , TNF- α において、サイトカイン mRNA の高発現がみられた。非活動期において高発現しているものはなかった。一方、活動期クローン病においては、IL-1 β , IL-8, IL-12p40 において、サイトカイン mRNA の高発現がみられた。また、IL-12p40 mRNA では非活動期においても高発現がみられた。(略・Table 1)

D. 考察

IBD におけるサイトカイン発現の変化に関しては、これまで種々の報告¹⁻⁶⁾があるが、蛋白レベルの発現、分離単核球レベルでの産生誘導、mRNA の発現など、その検討様式に大きな差があるため一定の傾向が得られてはいない。今回我々は、IBD 患者より得た生検組織を用い、同一検体を用いて種々のサイトカインの mRNA を TaqMan PCR 法⁷⁻⁹⁾を用いて定量的に検討した。両疾患ともに、IL-1b, IL-8, TNF- α などの proinflammatory cytokines においては、各サイトカインともほぼ高発現をみた。一方、近年になりマウスの系でいわれた⁹⁾ Th1 (type 1 T helper cell) (IL-2, IFN-g) や Th2 (IL-4, IL-5, IL-10) の分類に基づいて検討されている。潰瘍性大

A. 研究目的

潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis; UC) およびクローン病 (Crohn's disease; CD) は炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease; IBD) といわれ、免疫学的応答の異常を指摘されているが、その病因は未だ明らかにされていない点が多い。近年、細胞間の局所的あるいは全身的な免疫の調節因子として、サイトカインなどの液性因子がその病態に重要と考えられている。今回我々は、少量の生検組織から多種のサイトカインの定量解析を同時に行うことが可能な方法として、TaqMan PCR 法を応用して、IBD 患者の各病態下における各サイトカインの mRNA 発現パターンを検討した。

B. 研究方法

潰瘍性大腸炎 23 例 (男性 15 例, 女性 8 例, 平均年齢 44.1 歳) 及びクローン病 17 例 (男性 15 例, 女性 2 例, 平均年齢 26.6 歳) を対象とした。また、健常対照群 8 例 (男性 6 例, 女性 2 例, 平均年齢 62.4 歳, 最低年齢 26 歳, 最高年齢 87 歳) とした。潰瘍性大腸炎では、活動期 10 例, 非活動期 13 例であり、全大腸炎型 11 例, 左側大腸

腸炎においては、IFN-g, IL-12p40などのTh1関連サイトカインだけでなく、IL-4, IL-5, IL-10などのTh2関連サイトカインがCDに比して高発現をみているが、これはUCにおいて自己抗体の産生などの液性免疫がUCにおいて活性化されていることを裏付けるものと考えられる。一方、クローン病においては、Th2関連サイトカインであるIL-12p40が活動期だけでなく非活動期でも高発現しているのは、細胞性免疫の活性化が肉芽腫形成などを惹起する背景を形成するものである。

E. 参考文献

- 1) Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N et al: Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 1999;283:1183-1186.
- 2) Issacs K, et al: cytokine messenger RNA profiles in inflammatory bowel disease mucosa detected by polymerase chain reaction amplification. *Gastroenterology* 1992;103:1587-1595.
- 3) Stevens C, Walz G, Singaram C et al: Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6 expression in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1992;37:818-826.
- 4) Mullin GE, Lazenby AJ, Harris ML, Bayless TM, James SP: Increased interleukin-2 messenger RNA in the intestinal mucosal lesions of Crohn's disease but not ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1992;102:1620-1627.
- 5) Monteleone G, Biancone L, Marasco R et al: Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells. *Gastroenterology* 1997;112:1169-1178.
- 6) Niessner M; Volk BA: Altered Th1/Th2 cytokine profiles in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease as assessed by quantitative reversed transcribed polymerase chain reaction (RT-PCR). *Clin Exp Immunol* 1995;101:428-435.
- 7) Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM: Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996;6:986-994.
- 8) Kuimelis RG, Livak KJ, Mullah B, Andrus A: Structural analogues of TaqMan probes for real-time quantitative PCR. *Nucleic Acids Symp Ser* 1997;37:255-256.
- 9) Bass H, Mosmann T, Strober S: Evidence for mouse Th1- and Th2-like helper T cells in vivo. Selective reduction of Th1-like cells after total lymphoid irradiation. *J Exp Med* 1989 Nov 1;170 (5):1495-511.

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

肉芽腫好発モデルとしての
インターロイキン1・レセプター・アンタゴニスト欠損マウスの解析

分担研究者 向田 直史 金沢大学がん研究所 腫瘍分子科学 教授

研究要旨：IL-1の内因性の阻害物質であるIL-1レセプター・アンタゴニスト (IL-1ra) 遺伝子を欠損させたマウスを作成し、*Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) 投与によって生じる肝内での肉芽腫の形成におけるIL-1raの病態生理学的役割を解析した。その結果、1) *P. acnes* 投与によって生じる肉芽腫の数・大きさ、さらにはマクロファージ・CD3陽性細胞の浸潤も、野生型のマウスに比べて、IL-1ra欠損マウスでは有意に増加していた。2) *P. acnes* 投与後の肝臓内では、IL-1ra欠損マウスではIFN- γ の発現が野生型に比べ早期に認められる上に、IL-4の発現も著明に亢進していた。以上の結果から、IL-1ra遺伝子が欠損することによって、生体内でのTh1・Th2サイトカイン産生のバランスが崩れる結果、肉芽腫形成が亢進する可能性が示唆された。

共同研究者
飯笹 久

所属 金沢大学がん研究所 腫瘍分子科学

ていることを見出すとともに、その分子機構についても解析を加えたのでここに報告する。

B. 研究方法

- 1) マウスIL-1ra染色遺伝子の翻訳領域のほとんどを含んだ、第2から4エクソンをネオマイシン耐性遺伝子に置き換えたターゲット・ベクターを用いて得られた、ヘテロ接合マウスを交配して、得られたマウスについてサザン法にて遺伝子型をスクリーニングした。
- 2) IL-1ra欠損マウスならびに野生型のマウス (C57BL/6 x 129のF1ハイブリッド) に、加熱処理した*P. acnes* 菌体 (1 mg) を静脈内投与して、経時的に肝臓を採取して、組織学的ならびに免疫組織学的に検索を加えた。さらに、肝臓組織からtotal RNAを抽出し、reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) にて、インターフェロン γ (IFN- γ)・IL-4遺伝子の発現を検討した。

C. 研究結果

- 1) *P. acnes*を投与すると、投与3日目より、野生型のマウスにおいてもグリソン鞘を中心に肉芽腫の形成が認められた。IL-1ra欠損マウスでは、*P. acnes* 投与後7日目にいたるまで、野生型に比べて、肝内の肉芽腫の数・大きさともに、有意に増加していた。
- 2) *P. acnes* 投与後の、マクロファージ・CD3陽性リンパ球の浸潤を免疫組織学的に検討したところ、全経過を通して、IL-1ra遺伝子欠損マウスでは、野生型マウスに比べて、マクロファージ・CD3陽性リンパ球の浸潤が有意に増強していた。
- 3) *P. acnes* 投与後に生じる肉芽腫の発生には、IFN- γ などのTh1サイトカインの関与が、我々を含めた複数のグループから報告されている。肝内でのIFN- γ 遺

A. 研究目的

炎症性腸疾患の病巣局所では、インターロイキン (IL)-1、腫瘍壊死因子 (TNF) などのいわゆる炎症性サイトカインが過剰に発現されることが報告されている。さらに、TNFに対する抗体・アンタゴニストは炎症性腸疾患の治療薬として注目されていることから、これらの炎症性サイトカインが炎症性腸疾患の成立に大きな役割を果たしている事が想定されている。IL-1の内因性阻害物質である、IL-1レセプター・アンタゴニスト (IL-1ra) の発現異常と炎症性腸疾患発症との関連を示唆する以下のような報告がある。1) IL-1ra遺伝子は遺伝的多型を示すが、特定の遺伝型のヒトで炎症性腸疾患の発症率が高い。2) IL-1ra抗体を投与すると、フォルマリン-免疫複合体で誘導されるウサギの実験的腸炎モデルが重篤になる。

Crohn病の特徴的な病理所見は類上皮細胞からなる肉芽腫形成であるが、内因性に産生されるIL-1raが*Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) 投与によって生じる肝内肉芽腫の成立を制御する可能性を示唆する結果を現在までに我々は得ている。したがって、IL-1ra遺伝子を発生病工学的な方法にて欠損させたマウスでは、*P. acnes* 投与によって肝内肉芽腫の形成、ひいては何らかの刺激に応じた腸管での肉芽腫形成も亢進している可能性があることが考えられる。今回、我々はIL-1ra遺伝子欠損マウスにおいて、*P. acnes* 投与によって肝内肉芽腫形成が亢進し

伝子発現を、RT-PCRにて検討したところ、IFN- γ 遺伝子発現増強が野生型ではP. acnes投与5日目、IL-1ra 遺伝子欠損マウスでは3日目で認められたが、その程度には大きな差は認めなかった。一方で、IL-1ra 遺伝子欠損マウスではTh2サイトカインであるIL-4の発現が、野生型のマウスに比べて有意に増強していることが認められた。

D. 考察

今回の結果から、IL-1ra遺伝子欠損マウスでは、野生型のマウスに比べて、P. acnes投与によって、肝臓内へのマクロファージ・CD3陽性Tリンパ球の浸潤が強くなり、その結果肝臓内における肉芽腫形成が高度になることが明らかになった。

我々の以前の報告を含めて、幾つかのグループの報告から、P. acnes投与によって生じる肝内肉芽腫の形成には、IFN- γ を始めとするTh1サイトカインの産生亢進が関与していることも明らかになっている。しかし、肝内でのIFN- γ ・IL-4遺伝子発現をRT-PCRにて検討したところ、IL-1ra遺伝子欠損マウスでは、P. acnes投与によってTh1サイトカインの発現の亢進は起きておらず、むしろIL-4などのTh2サイトカイン発現の亢進が認められた。サイトカイン遺伝子発現パターンと、実際のサイトカイン蛋白の発現とが一致するかについては、今後の検討が必要であるが、遺伝子発現パターンから見る限りにおいては、IL-1ra遺伝子欠損マウスではTh1サイトカインの発現には大きな変化がないにもかかわらず、Th2サイトカインの発現亢進、すなわちTh1/Th2サイトカイン発現のバランスの崩れが起きた結果、肉芽腫の形成の亢進が起きていると考えられる。

肉芽腫の形成にあたっては、炎症の初期に浸潤してくる好中球をはじめとする顆粒球が重要な役割を果たしている可能性も示唆されている。IL-1ra遺伝子欠損マウスでは、野生型のマウスに比べて、顆粒球数が、骨髄以外の、末梢血・脾臓にて著明に増加していた。しかしながら、P. acnes投与3日目以降のIL-1ra遺伝子欠損マウスの肝臓内で、顆粒球浸潤が野生型にくらべて亢進している所見は得られなかった。顆粒球浸潤が肉芽腫形成の初期に起こっている可能性が高いと考えられるので、P. acnes投与直後についてさらに組織学的に検索することによって、肉芽腫形成における顆粒球の役割が解明されることが期待される。

本研究を通して、IL-1ra遺伝子欠損マウスが微生物の刺激によって、Th1・Th2サイトカイン産生バランスの崩れを引き起こされることを通して、肝内での肉芽腫形成が好発することが示唆された。今後、このような分子機構による肉芽腫形成が腸管においても起きるかについて検討を加えることによって、IL-1ra遺伝子欠損マウスが腸管での肉芽腫形成を主徴とするCrohn病の好発モデル動物となりうるか、検討する必要があると考えられる。さらには、このような疾患モデルを用いて、Crohn病の分子機構を解明する必要があると考えられる。

E. 参考文献

- 1) Fujioka N, Mukaida N, Harada A, et al: Preparation of specific antibodies against murine IL-1ra and the establishment as an endogenous regulator of bacteria-induced fulminant hepatitis in mice. *J Leukocyte Biol* 1995;58:90-98.
- 2) Mansfield JC, Holde H, Tarlow JK, et al: Novel genetic association between ulcerative colitis and the anti-inflammatory cytokine interleukin-1 receptor antagonist. *Gastroenterology* 1994;106:637-642.
- 3) Heresbach D, Alizadeh M, Dabadie A, et al: Significance of interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist genetic polymorphism in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 1997;92:1164-1169.
- 4) Ferretti M, Casini-Raggi V, Pizarro TT, et al: Neutralization of endogenous IL-1 receptor antagonist exacerbates and prolongs inflammation in rabbit immune colitis. *J Clin Invest* 1994;94:449-453.
- 5) Zahedei KA, Uhlir Cm, Rits M, et al: The mouse interleukin 1 receptor antagonist protein: gene structure and regulation in vitro. *Cytokine* 1994;6:1-9.
- 6) Tsuji H, Mukaida N, Harada A, et al: Alleviation of lipopolysaccharide-induced acute liver injury in Propionibacterium acnes-primed IFN- γ -deficient mice by a concomitant reduction of TNF- α , IL-12, and IL-18 production. *J Immunol* 1999;162:1049-1055.
- 7) Katschinski T, Galanos C, Coumbos A, et al: γ interferon mediates Propionibacterium acnes-induced hypersensitivity to lipopolysaccharide in mice. *Infect Immun* 1992;60:1994-2001.

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

炎症性腸疾患の病態と大腸粘膜における組織構築の変化

分担研究者 名倉 宏 東北大学大学院 医学系研究科病理 教授

研究要旨：[目的] 炎症性腸疾患の炎症粘膜では、潰瘍性大腸炎 (UC)、クローン病 (CD) において、それぞれ特徴的な好中球や単核球の浸潤、潰瘍形成、線維化が観察され、UC,CD 両疾患の特徴的な病態を形成している。本研究では、UC,CD の病態解明と、それぞれに特異的な治療法の開発を目的に、両疾患の炎症巣におけるマトリックス分解酵素群や細胞接着分子群の局在を免疫組織化学的に観察した。[方法] UC および CD 患者の大腸組織ならびに大腸癌患者の健常部の大腸組織を PLP 固定し、凍結切片を作成し、酵素抗体法を用いて、免疫組織化学的に観察した。一部組織は *in situ hybridization* 法で、該当抗原の mRNA の局在を観察した。[結果] UC,CD 粘膜の活動性病変部では、co-stimulatory molecule を発現し、HLA-DR と ICAM-1 の発現が増強した免疫学的に活性化マクロファージが著増し CD でより顕著であった。こうした炎症巣において、UC,CD ともに小～細静脈様血管が増加し、UC ではその血管内皮細胞に E-, P-selectin の発現が強くなり、好中球浸潤が目立った。CD ではそれらの血管系に MADCAM-1 が発現していた。また UC,CD それぞれにマトリックス分解酵素及びそのインヒビター等の特徴的な発現が観察され、CD の線維化の機序の一端が明らかとなった。[総括] UC,CD とも持続する活動性炎症と、それによる粘膜傷害が主要な病変であるが、増生した血管系の内皮細胞が発現する細胞接着分子、浸潤する炎症免疫担当細胞のフェノタイプ、および組織構築の改変に関与するマトリックス分解酵素およびそのインヒビター等において、UC,CD それぞれ特徴的であった。治療法もその特徴をみきわめ、疾患特異的なターゲティングが必要であることが分かった。

共同研究者

大谷 明夫, 有廣 誠二¹⁾, 熊谷 進司,
 樋渡 信夫²⁾, 中村 志郎, 松本 啓之³⁾

所属 東北大学大学院 医学系研究科病理¹⁾,
 同 第三内科²⁾,
 大阪市立大学医学部 第三内科³⁾

A. 研究目的

消化管粘膜はたえず栄養物質のほか、さまざまな微生物抗原の侵入や物理化学的侵襲を受けており、また腸管粘膜が曝露されているこれら無数の抗原物質には、腸管粘膜を構成する組織細胞と偶然に共通抗原構造を有するものもあるが、そこには粘膜免疫機構によるバリア機構が備えられ、生体外からの侵襲に対処している。その破綻が消化管粘膜でのさまざまな炎症性疾患や炎症免疫異常を惹起させ、これが炎症性腸疾患の病因病態に密接なかかわりを有している^{1,2)}。炎症反応は、炎症性刺激やそれに随伴して傷害された組織細胞に対する血管反応、すなわち血漿成分の滲出と好中球の遊出に始まり、引き続き、単球マクロファージ系細胞の動員活性化、抗原特異的「粘膜炎」への移行に伴う消化管指向性のリンパ球の

消化管粘膜への移動 (ホーミング) が行われる³⁾。

こうした一連の炎症免疫反応は、血管内皮細胞に発現する細胞接着分子やさまざまな炎症反応をメディエイトする活性物質によって司られている。傷害を受けた組織は、線維芽細胞や血管増生によって修復や構築の改変が行われることになるが、その際にマトリックス分解酵素やそのインヒビターによって修復を受けている⁴⁾。炎症性腸疾患のうち UC と CD のそれぞれの特徴的な組織変化や病態は炎症免疫反応のプロセスの相違によるものと考えられる。本研究ではその炎症免疫反応プロセスに関与する血管内皮細胞における細胞接着分子の発現とマトリックス分解酵素やそのインヒビターの局在様式に注目して両疾患の大腸組織を免疫組織化学的に検索をした。炎症性疾患の治療は、単に炎症免疫反応を抑制するというのではなく、炎症のプロセスのどの段階をターゲットとして設計するかを明確にすることにより、より疾患ならびにそのステージ特異的かつ効果的なものとなる。本研究の成果はこうした炎症免疫反応の科学的根拠に基づいた治療法の開発に一石を投じることとなる。

B. 研究方法

手術的に摘出された UC,CD 患者の大腸組織を PLP 固定後、凍結保存し、免疫組織化学染色に使用した。免疫組織化学染色は、ヒストファイブ (SAB 法) とエンビ

ジョンキット (DAKO) を用いた酵素抗体法で行い、それぞれの免疫染色陽性細胞の同定にはその二重染色法を用いた。一部の組織は4%パラフォルムアルデヒドと0.5%グルタルアルデヒド混合液で固定の後、パラフィン包埋し、in situ hybridizationで該当抗原のmRNAを観察した。

C. 研究結果

1. 炎症性腸疾患大腸粘膜における炎症免疫担当細胞の動態

健常大腸粘膜には、固有層を中心に生理的狀態でも恒常的に、IgA形質細胞を中心とした多数の形質細胞とほぼそれと同数のリンパ球、およびそれらの10%相当のマクロファージと、数%の樹状細胞や顆粒球系細胞、肥満細胞等が不規則に分布しているが、マクロファージは特に被覆上皮細胞層直下に層状に密に配列している。

UC粘膜ではIgG形質細胞とマクロファージ、および好中球を中心とした炎症免疫担当細胞の増多が著しい。健常粘膜のマクロファージは、CD68陽性で、酸フォスファターゼ活性や、貪食能は高いが、HLA-DR抗原やICAM-1 (CD54)の発現は弱く、co-stimulatory molecule (CD80, 86)もほとんど検出されない。いわゆる scavenger macrophage としてもつばら機能していることが相定される。UC、CD粘膜の活動性病変部ではCD68+マクロファージが著増していた。さらにそれらは、CD80、CD86のco-stimulatory moleculeを発現するものが増加し、それとともにHLA-DRやICAM-1の発現が増強されていて、免疫学的に活性化された状態にあったが、CDでより顕著であった。CD粘膜の非乾酪肉芽腫巣は、CD80+, CD86+, HLA-DR+, ICAM-1+のCD68+マクロファージの集簇巣である。その周囲にはCD4+, CD8+Tリンパ球が集簇し、これらはCD28を発現していた。これらはしばしばCD80+, CD86+マクロファージと接着していた (図1, 2)。

図1

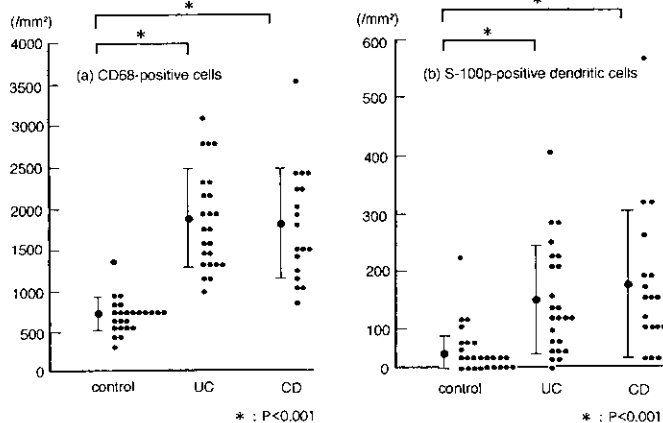
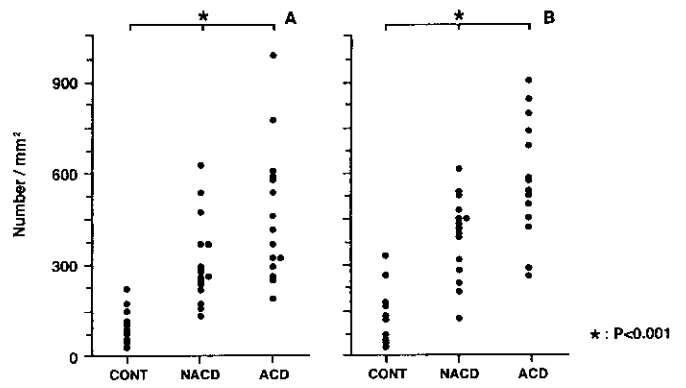


図2

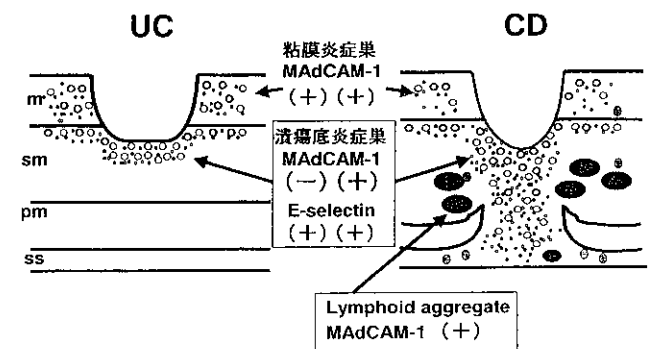


2. 炎症性腸疾患大腸粘膜における血管内皮細胞のフェノタイプの変化

活動炎症巣では、背の高い内皮細胞からなる小～細静脈様小血管が増加し、HLA-DR抗原とICAM-1発現が増強され、さらに、健常大腸粘膜では認められないE-, P-selectin (CD62E, 62P)が特に好中球浸潤の強い活動性炎症巣に強く発現していた。リンパ球の粘膜組織特異的なホーミングを司る細胞接着分子であるMAdCAM-1は、健常粘膜ではリンパ濾胞の細静脈、PCVのみに発現していたが、CDでは粘膜炎症巣でも発現し、UC潰瘍底肉芽組織では減弱傾向にあった。しかも、CDでは粘膜下層の深部でもリンパ濾胞形成部を中心に強く発現していた (図3)。

これらのことから粘膜内の好中球浸潤にはE-, P-selectin陽性の血管系が、消化管粘膜指向性のリンパ球の浸潤にはMAdCAM-1陽性血管系が関与し、殊にCDでは後者の過剰な動員と反応が関与していることが示唆された。

図3



3. 炎症性腸疾患大腸粘膜における線維化とマトリックスの変化

UC、CD両疾患の潰瘍底では、小静脈中膜平滑筋と線維芽細胞にマトリックス分解酵素であるMMP-1が、浸潤している好中球にはMMP-8の発現が観察された。さらに活動性炎症の強い粘膜固有層でも、線維芽細胞にMMP-1の発現がみられ、galatinase活性を有する膜型セリンプロテアーゼであるseparaseは潰瘍底および周囲線維化巣の線維芽細胞に陽性に染色されていたが、線維化を伴わないUC陰窩膿瘍部や健常粘膜部にはほとんど発現していなかった。

マクロファージや線維芽細胞の遊走、増殖に関与す

る血小板由来増殖因子(PDGF)やその受容体(PDGF-R)は、その蛋白、mRNAともに活動炎症巣や潰瘍底のマクロファージや好中球、潰瘍底の血管内皮細胞や線維化層の線維芽細胞に発現し、UCと比較してCDでより密に、広く発現が観察された。

D. 考察

腸管粘膜は、体外から食物抗原のほか、多種かつ多量の微生物や物理化学的侵襲を受けているが、そこにはそうした環境に応じた生体防御機能が備えられている。その代表的なものが粘膜免疫機構とそれに担われた粘膜バリアである。炎症性腸疾患は、腸管での粘膜バリア機能が破綻した結果、粘膜内に過剰に侵入した抗原に対する持続的かつ過剰な生体反応とそれによって惹起された粘膜傷害と考えることができる。

しかし、炎症性腸疾患を代表するUCとCDでは、基本的な病態が持続する炎症免疫反応であることは共通しているが、その病理組織像が相違しており、そのことからおのずから臨床経過や治療法も異なったものとなる。組織構築はそこに存在する実質細胞と、それを支える血管系やリンパ管系、および線維芽細胞の支持組織からなっている。さらに腸管粘膜では、生理的状态でも多数の炎症免疫担当細胞が分布し、粘膜免疫機構による粘膜バリアを形成している。

本研究から、侵襲抗原に直接対し、それらを除去し、あるいはそれらの抗原情報をリンパ球提示するマクロファージ系細胞、炎症巣へ好中球やリンパ球等の炎症免疫担当細胞をリクルートさせる血管系内皮細胞、および持続する炎症免疫反応によって破壊された組織の修復や改変に主要な働きをするマトリックス分解酵素やそのインヒビターが、UCとCDで一部共通した分布やフェノタイプを有するが、その相違点がそれぞれの疾患特異的な病理組織像を形成し、動態を示すことが明らかとなった。

UCは、粘膜を中心とした持続する活動性炎症(chronic active inflammation)が特徴的であるが、特に活動性炎症の高度な粘膜では、その場合好中球をリクルートさせる血管系の、特にHEV様の内皮細胞に、HLA-DR、ICAM-1等の細胞接着分子の他に、それにふさわしいE-, P-selectinが強く発現していた³⁾。CD68陽性マクロファージには酸フォスファターゼが強く、CD80、86分子の発現は、潰瘍底以外の健常腸管と同様ほとんどみられなかった。しかしCDでは、MA d CAM-1陽性血管が肉芽腫巣を中心に多く、リンパ球浸潤の強い炎症巣でもその発現が高度であった。UC潰瘍底では減弱傾向にあったことから、粘膜内への好中球浸潤にE-, P-selectin陽性血管が、消化管指向性のリンパ球の浸潤にはMA d CAM-1陽性血管がその役割を果たしていることが本研究の免疫組織化学的観察からも確認された。

しかも、UCのマクロファージは酸フォスファターゼ反応が強いが、co-stimulatory moleculeの発現がないか弱いことから、これらは外来の抗原の処理-scavenger的役割を果たしていることがわかるが、CDでは、数の増加はUCとほぼ同数であるが、むしろHLA-DR、ICAM-1に加えco-stimulatory moleculeの発現が強いことから抗原提示細胞として機能が強く、侵襲抗原に対し強い免

疫反応を誘導していることが示唆された⁵⁾。

粘膜免疫機構では、パイエル板を中心とした誘導装置(inductive site)と粘膜固有層での侵襲抗原に対処する効果装置(effector site)に二分されるが、生理的な炎症免疫反応が存在する腸管粘膜では両siteが共存することをかねてから筆者らは報告してきた。しかし、UCでは炎症粘膜巣はeffector siteとしての性格が強く、CDでは侵襲抗原に対し、炎症巣でさらに新しい抗原提示とそれに対する免疫応答が惹起され、またナイーブT細胞とB細胞の集簇巣であるリンパ濾胞の形成の頻度が高いことから、inductive siteとeffector siteが同じ微小環境に共存し、遅延性アレルギーを中心とした免疫反応が持続維持されているものと考えられる。

炎症免疫反応による組織傷害は、肉芽組織の形成から線維化、癒痕組織の形成を至る治療に至るが、それにはマクロファージや血管内皮細胞、線維芽細胞の遊走や増殖、組織構築の改変に関与するPDGF、TGF- β 、bFGF(fibroblast growth factor)、およびマトリックス分解酵素やそのインヒビターが主要な役割を果たしているが^{6,7)}、本研究でもPDGFやgelatinase活性を有する膜型セリンプロテアーゼ活性を有するseparaseは線維化を伴わないUC陰窩膿瘍部や健常部にはほとんど発現をみないが、潰瘍底や線維化巣に発現し、かつUCと比較しCDではより密に、広く発現していることが観察されたが、この局在様式はUCとCDの特徴的な病理組織像の形成の機序をよく説明できる。

こうしたUC、CDのそれぞれの炎症免疫担当細胞の動態や線維化の機序を考慮した非特異的な免疫抑制を目的とした現在の治療法に代わる疾患に特異的な治療法の開発も可能である。

E. 参考文献

- 1) Nagura H, Ohtani H: Mucosal immune system and mucosal inflammation. In: Bioregulation and Its Disorders in the Gastrointestinal Tract. Yoshikawa T, Arakawa T eds, Blackwell Science Japan, Carlton, 1998;95-104.
- 2) Schreiber S: Inflammatory bowel Disease: Immunologic Concept. Hepato- Gastroenterol 2000;47:15-28.
- 3) Nakamura S, Ohtani H, Watanabe Y, et al: In situ expression of the cell adhesion molecules in inflammatory bowel disease: Evidence of immunologic activation of vascular endothelial cells. Lab Invest 1993;69:77-85.
- 4) Matrisian LM: Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. Trends Genet 1990;6:121-125.
- 5) Hara J, Ohtani H, Matsumoto T, et al: Expression of costimulatory molecules B7-1 and B7-2 in macrophages and granulomas of Crohn's disease. Demonstration of cell-to-cell contact to T-lymphocytes. Lab Invest 1997;77:175-184.
- 6) Ohtani H, Kagaya H, Nagura H: Immunohistochemical localization of transforming growth factor β receptors I and II in inflammatory bowel disease. J Gastroenterol 1995;30 (Supl):76-77.

虫垂切除は潰瘍性大腸炎の発症を抑制するか —日本人における症例対照研究

分担研究者 樋渡 信夫 東北大学医学部 第三内科 助教授

研究要旨: [背景] 欧米の疫学研究においては、若年での虫垂切除が潰瘍性大腸炎の発症を抑制し、クローン病ではその傾向が認められないとの報告が多い。 [目的] 日本人においても、虫垂切除が潰瘍性大腸炎の発症を抑制するか否かを、症例対照研究の手法を用いて検討する。 [方法] 平成元年以降当科を受診した潰瘍性大腸炎258例、クローン病182例を症例とした。当院受診者の中から、性・誕生年を一致させた非IBD患者を、症例1例あたり2例をランダムに選び対照とした。症例が発症した時点での虫垂切除歴を、直接聴取あるいは病歴および腹部視診所見をカルテより調査した。切除歴の無い者に対して、切除歴の有る者のその後の潰瘍性大腸炎あるいはクローン病発症の相対危険度をオッズ比により推定した。 [成績] 1) 潰瘍性大腸炎患者で発症前に虫垂切除の既往を有していたのは5例(1.9%)で、対照群の14.9%に比し、オッズ比0.11 (95%信頼区間: 0.05~0.24) と有意に減少していた。罹患範囲別にみると、全大腸炎型ではオッズ比は有意に低値であったが、直腸炎型では差がなかった。2) クローン病で切除歴を有していたのは18例(9.9%)で、対照と比較して有意差はみられなかった。罹患範囲別にみても小腸型、小腸大腸型、大腸型で差はみられなかった。 [結論] 日本人においても、虫垂切除は潰瘍性大腸炎の発症を有意に抑制していることが示唆された。今後、虫垂が潰瘍性大腸炎の発症に如何に関与しているかの解明が必要である。

共同研究者

須貝 真生, 桂島 良子, 織内 竜生,
根来 健一, 下瀬川 徹, 豊田 隆謙

所属 東北大学医学部 第三内科

れた症例は非切除例として扱った。(4) 切除歴のないものに対して、切除歴のあるものの、その後のUCあるいはCDの発症の相対危険度をオッズ比により推定した。

表1 症例の性・5歳階級別分布

	潰瘍性大腸炎			クローン病		
	男	女	計	男	女	計
~10	1	2	3	2	0	2
10~14	10	8	18	13	3	16
15~19	23	15	38	40	18	58
20~24	33	33	66	46	14	60
25~29	16	18	34	22	4	26
30~34	12	11	23	8	4	12
35~39	11	11	22	3	0	3
40~44	12	7	19	1	1	2
45~49	4	11	15	2	1	3
50~54	2	3	5	0	1	1
55~59	4	3	7	1	2	3
60~64	1	1	2			
65~	3	3	6			
合計	132	126	258	138	48	186

A. 研究目的

欧米の疫学研究で、若年での虫垂切除が潰瘍性大腸炎(以下UC)の発症を抑制し、クローン病(以下CD)ではその傾向がないとの報告が多くなされている¹⁻⁹⁾。

そこで、欧米と比較してUCの罹患率の低い日本人においても、虫垂切除がUCの発症を抑制するか否かを、症例対照研究の手法を用いて検討した。

B. 研究方法

(1) 症例は平成元年より11年3月までに東北大学医学部附属病院第三内科を受診したUC258例、CD186例である。症例の性別発症年齢別分布を表1に示した。(2) 対照は、同時期の第3内科受診者のうち、症例と性、誕生年(±1年)を一致させた非炎症性腸疾患患者(遺伝性消化管ポリポシス患者は除く)を症例1例あたり2例ずつ選んだ。(3) 虫垂切除の有無は、症例の発症以前の切除歴とし、直接聴取、あるいは病歴の既往歴と腹部視診所見により判定した。手術時に初めてCDと診断さ

C. 研究結果

UCにおいて発症前に虫垂切除の既往を有していたのは、258例中5例(1.9%)で、対照群の516例中79例(15.3%)に比し、オッズ比0.11 (95%信頼区間: 0.05-0.24) と有意に減少していた(表2)。性別にみると、男性でオッズ比0.14、女性では0.09と、ともに有意であったが、女性でより有意な結果であった。UCの発症年齢により20歳未満と20歳以上の2群に分けてみると、20

歳以上群ではオッズ比が0.09と有意であったが、20歳未満群では有意差を認めなかった。調査時点での腸切除の有無でみると、非切除例でも有意差を認めた。罹患範囲別では、全大腸炎型でオッズ比0.08と有意な結果を示したが、直腸炎型ではオッズ比0.39と有意差は認められなかった。

次にCDにおける虫垂切除の既往は186例中18例(9.7%)にみられたが、対照では372例中42例(11.3%)でオッズ比0.84(95%信頼区間:0.47-1.51)と算出され、有意ではなかった(表3)。性別、発症年齢別、罹患範囲別に群分けして検討したが、いずれも有意差は認められなかった。

表2 潰瘍性大腸炎における虫垂切除の既往

	潰瘍性大腸炎症例		対照		OR(95%CI)
	総数	虫垂切除例(%)	総数	虫垂切除例(%)	
総数	258	5(1.9)	516	79(15.3)	0.11(0.05-0.24)
男	132	2(1.5)	264	26(9.8)	0.14(0.04-0.50)
女	126	3(2.4)	252	53(21.0)	0.09(0.03-0.24)
20歳以上	199	4(2.0)	398	76(19.1)	0.09(0.04-0.20)
20歳未満	59	1(1.7)	118	3(2.5)	0.66(0.07-6.40)
手術歴有	55	0	110	17(15.5)	-
手術歴無	203	5(2.5)	406	62(15.3)	0.14(0.06-0.31)
直腸炎	43	3(7.0)	86	14(16.3)	0.39(0.11-1.37)
左側大腸炎	80	0	160	21(13.1)	-
全大腸炎	135	2(1.5)	270	44(16.3)	0.08(0.02-0.24)

表3 クロウン病における虫垂切除の既往

	クロウン病		対照		OR(95%CI)
	総数	虫垂切除例(%)	総数	虫垂切除例(%)	
総数	186	18(9.7)	372	42(11.3)	0.84(0.47-1.51)
男	138	14(10.1)	276	27(9.8)	1.04(0.53-2.06)
女	48	4(8.3)	96	15(15.6)	0.49(0.16-1.54)
20歳以上	110	12(10.9)	220	30(13.6)	0.78(0.38-1.58)
20歳未満	76	6(7.6)	152	12(7.9)	1.00
小腸型	43	6(14.0)	86	9(10.5)	1.39(0.46-4.17)
小腸大腸型	110	9(8.1)	220	24(10.9)	0.73(0.33-1.62)
大腸型	33	3(9.1)	66	9(13.6)	0.63(0.16-2.49)

D. 考察

日本人においても欧米からの報告と同様に、虫垂切除の既往はUCの発症を抑制することが強く推測された(表4)。

表4 潰瘍性大腸炎患者における虫垂切除の頻度
—症例対照研究—

報告者	UC患者	対照	オッズ比(95%CI)
Gilatら	4/133(3)	27/266(10)	0.2 (0.1-0.8)
Gentら	9/220(4)	32/220(15)	0.3 (0.1-0.6)
Smithsonら	7/197(4)	26/243(11)	0.3 (0.1-0.7)
Rutgeertsら	1/174(<1)	41/161(26)	0.02 (0.002-0.8)
Russelら	21/423(5)	44/423(10)	0.4 (0.2-0.8)
Minochaら	10/193(5)	70/394(18)	0.25 (0.13-0.50)
Dugganら	9/201(5)	57/295(19)	0.20 (0.1-0.4)
Koutroubakis	11/134(8)	18/134(13)	0.58 (0.26-1.27)
Dijkstraら	6/75(8)	16/75(21)	0.32 (0.12-0.84)
本研究	5/258(2)	79/516(15)	0.11 (0.05-0.24)

クローン病患者における虫垂切除の頻度
—症例対照研究—

報告者	CD患者	対照	オッズ比(95%CI)
Gilatら	40/247(16)	52/494(11)	1.6 (1.1-2.6)
Gentら	14/130(11)	10/130(8)	1.4 (0.6-3.4)
Smithsonら	11/117(9)	26/243(11)	0.9 (0.4-1.8)
Russelら	39/344(11)	24/344(7)	1.7 (1.0-2.9)
Koutroubakis	19/76(25)	10/76(13)	2.2 (0.95-5.11)
本研究	18/186(10)	42/372(11)	0.84 (0.47-1.51)

A+/総数(%)

UCにおける虫垂切除の意義については、(1) UC罹患保因者は急性虫垂炎に罹患しにくい、(2) 虫垂切除はUCの発症を抑制する、との主に2つの考えができる。後者に関しては、虫垂切除により腸管運動や粘液組成の変化、腸管内感染の欠如がおこるため、UCが発症しにくくなる、B cellやhelper T cellを豊富に含む虫垂切除により、UC発症に必要な免疫反応が抑制される、などの推測がなされている¹⁰⁾。

最近、直腸炎型、左側大腸炎型の症例で虫垂病変が報告されていることと併せ、今後の検討が必要であると考えられる。

E. 結論

日本人においても、虫垂切除はUCの発症を有意に抑制していることが強く示唆された。今後、虫垂切除がUCの発症にいかに関与しているかの解明が必要である。

F. 参考文献

- Gilat T, Hacoheh D, Lipos P, et al: Childhood factors in ulcerative colitis and Crohn's disease. An international cooperative study. Scand J Gastroenterol 1987;22:1009-1024.
- Gent AE, Hellier MD, Grace RH, et al: Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy. Lancet 1994;343:766-767.
- Smithson JE, Rayford-Smith G, Jewell GP: Appendectomy and tonsillectomy in patients with inflammatory bowel disease. J Clin Gastroenterol 1995;21:283-286.
- Rutgeets P, D'Haens G, Hiele M, et al: Appendectomy protects against ulcerative colitis. Gastroenterology 1994;106:1251-1253.
- Russel MG, Dorant E, Brummer R-JM, et al: Appendectomy and the risk of developing ulcerative colitis or Crohn's disease: Results of a large case-control study. Gastroenterology 1997;113:377-382.
- Minocha A, Raczkowski CA: Role of appendectomy and tonsillectomy in pathogenesis of ulcerative colitis. Dig Dis Sci 1997;42:1567-1569.
- Duggan AE, Usmani I, Neal KR, et al: Appendectomy, childhood hygiene, Helicobacter pylori status, and risk of inflammatory bowel disease: a case-control study. Gut 1998;43:494-498.
- Koutroubakis IE, Vlachonikolis IG, Kapsoritakis A, et al: Appendectomy, tonsillectomy, and risk of inflammatory bowel disease. Dis Colon Rectum 1999;42:225-230.
- Dijkstra B, Bagshaw PF, Frizelle FA: Protective effect of appendectomy on the development of ulcerative colitis. matched, case-control study. Dis Colon Rectum 1999;42:334-336.
- Russel MG, Stockbrugger RW: Is appendectomy a causative factor in ulcerative colitis? Eur J Gastroenterol Hepatol 1998;10:455-457.

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

「炎症性腸疾患に対する白血球除去・
 吸着療法の効果に関する多施設共同研究」

主任研究者 下山 孝 兵庫医科大学 第四内科 教授

研究要旨：UC に対する LCAP の客観的な有効性・安全性・有用性を評価するため、Sham カラムを用いた多施設共同二重盲検法で比較するプロトコール、体外循環治療中の記録用紙、有害事象報告書、諸検査結果記録用紙、患者症状記録日誌、患者説明用文章と同意書を作成した。CD は UC よりさらに希少な疾患なので、二重盲検でない多施設共同での LCAP の効果を検討するプロトコールを作成した。

共同研究者

里見 匡迪, 澤田 康史, 近野 真嗣,
 大西 国夫, 山本 憲康

所属 兵庫医科大学 第四内科

A. 研究目的

本研究の目的は若年者に多く発症して再燃と緩解を繰り返す原因不明の難治性炎症である潰瘍性大腸炎(以下 UC) とクローン病(以下 CD) 対して「白血球除去・吸着療法」を新しい治療法として確立することにある。

B. 研究方法

白血球系細胞吸着・除去療法(以下 LCAP) の有用性と安全性をさらに客観的に評価し、LCAP を UC の治療法として確立するため、LCAP に白血球系細胞吸着・除去フィルター(以下 true カラム) を使用して治療する群(以下 true 群) と、白血球系細胞吸着・除去能が無いフィルター(以下 sham カラム) を装着して治療する群(以下 sham 群) を設けて、改善効果と有用性、有害事象発生を、群間比較検討することにした。CD に対しては sham 群を設けずに、通常の LCAP で治療を行いその効果を検討することにした。主任研究者がカラムにナンバリングを行い、割り付け責任者は、本研究の治療は一切触れないことを前提に、主任研究者自身が当たることとした(厚生省エイズ疾病対策課に承諾を得た)。過去に LCAP 等の白血球系細胞除去療法を経験した症例は本研究から除外した。患者はコントローラーにより無作為に割り付けられ、多施設共同盲検試験で有効性・有害事象を検討する。主治医とは別に治療責任医師を設け、主治医にカラムの情報が漏れないよう二重盲検を徹底して行うよう配慮した。

1. 研究組織：13 大学病院と 2 総合病院の計 15 施設で

白血球系細胞吸着・除去療法の有用性を検討する。2. 研究設備：上記の施設はこれまで班プロジェクト研究に参加し、旭メディカル社製プラソート 2500 (LCAP) か、日本抗体研究所顆粒球吸着器 (G-1 カラム) 用アダモニターが配備されている。従って、新規の設備設置は必要ない。研究費の大半は、治療毎の白血球系細胞吸着・除去セット(カラム、シャムカラム、回路)の購入に用いられる。3. 研究対象：活動期重症 UC と、1 日 6 行以上の血性下痢を有する中等症患者で、狭窄の軽い大腸型もしくは小腸・大腸型 CD を対象にする。UC は LCAP70 例を目標にし、CD の場合は 80 例を目標とするが、適切な症例は UC に比し少ない。目標症例を集めるのは 3 年間の努力目標とする。特に年次的に研究を変える必要はなく、目標症例が集まれば、開封して群間比較評価に入る。4. 治療方法：白血球除去療法 (LCAP) 群には、吸着・除去能のないシャム (Sham) カラムを装着した対照群を設け、真の治療 (True) 群と有効性・有害事象を群間比較する。患者はコントローラーにより無作為に割り付けられ、多施設共同盲検試験で有効性・有害事象を検討する。治療のプロトコールはすでに当研究班が白血球系細胞除去療法のプロジェクト研究に用いた形式とする。いずれの施設も平成 6 年 12 月～10 年 4 月までに行った班のプロジェクト研究で機械に習熟しており、患者に危険はない。LCAP は、原則として週 1 回(重症では 1 週目のみ 2 回)、60 分で抗凝固化した 3 リッターの全血から白血球系細胞を吸着・除去する。5 週間を 1 クールとし、3, 6, 10 週目に大腸内視鏡検査を施行する。5. 有効性の判定：6 週時点で血便が消失しており、下部消化管内視鏡検査で緩解と診断できた症例を著効、臨床症状、内視鏡検査で明らかな改善があるが緩解に至らなかったものを有効とする。患者は、全例が絶食・完全静脈栄養でステロイド 1 日 30～60mg の強力静注療法を受けている。血便が消失し、内視鏡的に改善を確認したら、UC では食事開始し、CD では経腸経管成分栄養療法を開始し、ステロイドを減量する。緩解例には維持療

法を続ける。倫理面への配慮:研究に先立ち、それぞれの施設の倫理委員会の許可を得て、しかる後研究を開始する。患者から同意を得た後治療にエントリーする。患者への治療説明文章は、厚生省のGCPにのっとり、簡単でわかりやすく、かつできるだけ詳しく説明する。発症した再発重症患者の場合は、ステロイド剤投与がないままのShamコントロールは非人道的と考えられ、通常の2/3以上のステロイド剤を使用し、Shamまたは真の白血球除去療法を追加併用することにした。

C. 研究結果

平成10年度は研究で使用するshamカラムを検討して製作し、二重盲検法を用いる多施設共同研究のプロトコールを作成した。本年度は完成したプロトコールに則り研究を実施するため、分担研究者と研究協力者の各実施医療機関で倫理委員会に承認を求め、19施設中UC研究治療については18施設で承認を得た。倫理委員会で承認を得た施設から登録を受け付け、主任研究者がコントローラーになり、登録された患者を最小化法でtrue群と、sham群に割り付けて研究治療を開始した。現在までに14例のUC患者が登録されて、うち8例が治療期間を終了している。8例のうち、1例は中間評価(5回の治療後)で悪化と判定され、脱落症例となった。7例は最終評価まで治療を継続し、最終評価の結果は著効2例、有効4例、不変1例であった。

CDに対しては、平成10年度に本邦で初めてLCAPの多施設共同研究のプロトコールを作成した。UC同様に分担研究者と研究協力者の各実施医療機関で倫理委員会に承認を求め、すべての施設で承認を得た。倫理委員会で承認を得た施設から登録を受け付け、現在までに4例のCD患者が登録され、うち3例が治療期間を終了している。3例のうち、1例は中間評価(5回の治療後)で悪化と判定され、脱落症例となった。2例は最終評価まで治療を継続し、最終評価の結果は不変2例であった。

D. 考察

本年度より平成10年度に作成したプロトコールに則り、trueカラムとshamカラムを使用して多施設共同無作為割り付け二重盲検試験を実施した。現段階では目標症例数(30例)に達していないため、開封を行っていないので詳しい解析を実施していない。目標症例数に達した時点で解析を行い、true群とsham群の改善効果を比較することにより、true群の優れた有効性と安全性が実証されることを期待している。最終的には白血球除去・吸着療法を潰瘍性大腸炎に対する治療法として確立し、ステロイドの使用量を減少しステロイドの副作用を軽減することで、患者のQOLの向上につなげたい。またステロイドの副作用を軽減することで副作用の治療にかかる医療費を削減できると考える。また、炎症症状を早期に改善し入院日数を短縮することで、入院費の削減にもつながると考える。

CDについても、現段階では目標症例数(30例)に達していないため、解析を実施していない。目標症例数に達した時点で解析を行い、CDに対するLCAPの有用性を明らかにしたい。またCD患者のLCAP適応を決定し、この結果が今後無作為群間比較臨床試験につながることを期待している。最終的にはLCAPにより、栄養療法抵抗性のCD患者の症状を軽減することにより、患者のQOLの向上につなげたい。

E. 結論

UCに対するLCAPの二重盲検法に参加される施設が少なく、登録される患者も二重盲検法故に少ない。登録患者の集まりが悪いので、治療研究の期間延長が必要となるかもしれない。しかし、shamカラムを用いた二重盲検法の科学的重要度は高く、本治験を最後まで遂行する。

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

活動期潰瘍性大腸炎に対する顆粒球吸着療法の有効性について

研究要旨：[目的]顆粒球吸着療法が最近潰瘍性大腸炎に対する薬物療法、外科的治療に並ぶ新たな第三の治療方法として臨床応用が開始された。しかし現在までのところ、いかなる症例に対して有効か、またいかなる時期に本治療法を用いることが最も適切かについては不明である。従って、本治療法の有効性を明らかにすると共にその適応と限界についての解析を試みた。[方法]厚生省炎症性腸疾患研究班による診断基準および重症度分類に従い、中等症および重症の活動期で入院を要した13症例を対象とした。使用器具は、日本抗体研究所が開発した220gの酢酸セルロースビーズを吸着体とした直接血液灌流型カラムで、吸着型血液浄化装置と組み合わせて使用した。治療方法は、一回の治療における体外循環量は30ml/min.×60min.とし治療回数は1回/週で連続5週間とした。評価項目は、臨床所見、免疫マーカーを含む血液検査そして治療開始前と治療開始後7週目の内視鏡所見更に活動性の指標としてUlcerative Colitis Activity Index (UCAI)を用いた。[結果]13症例8症例(61.6%)に対して有効であった。有効症例は無効症例に比べ血清補体価CH50値が高値であり、症状悪化後短時間で顆粒球吸着療法を実施していた。また無効例の多くが大腸内視鏡所見で偽ポリポーシスを伴う深掘れ潰瘍を呈していた。治療開始3週目のUCAIを判定することにより、最終的治療効果が予測された。[総括]顆粒球吸着療法は活動期潰瘍性大腸炎患者の初期治療として安全かつ有効な治療法であることが示された。

共同研究者

鈴木 康夫, 吉村 直樹, 齋藤 康

所属 千葉大学医学部 第二内科

B. 研究方法

対象患者は厚生省炎症性腸疾患研究班による診断基準および重症度分類に従い⁵⁾、中等症および重症の活動期で入院を必要とした13症例、男5例、女8例で平均年齢29.8±9.9歳であった。臨床経過分類では再燃緩解型9例、慢性持続型3例、初回発作型1例であった。罹患範囲による病型では、全大腸炎型11例、左側大腸炎型2例であった。重症度分類では、中等症5例、重症8例であった。

使用器具は、日本抗体研究所が開発した220gの酢酸セルロースビーズ(直径:2mm)を吸着体とした直接血液灌流型カラムで、吸着型血液浄化装置(大塚電子株式会社、アダモニターMM6-P)と組み合わせて使用した。治療方法は、一回の治療における体外循環量は30ml/min.×60min.とし治療回数は1回/週で連続5週間とした。

評価項目としては、腹痛、粘血便や下痢を主な項目とした臨床所見や、各種血液検査の他に免疫マーカーとしてCD4、CD8、CD11、HLA-DRについても検討した。内視鏡所見としては治療開始前と治療開始後7週目に施行した。さらに潰瘍性大腸炎の活動性の指標として臨床症状および血液検査結果そして合併症を加味して数値化したUlcerative Colitis Activity Index (UCAI)(表1)⁶⁾を用いて病状の変化および治療効果についてそれらの推移を判定した。

A. 研究目的

潰瘍性大腸炎の炎症局所所見を検討してみると、単球や好中球そして好酸球といった活性化された顆粒球が多く浸潤していることが明らかにされている¹⁾。これら顆粒球系の細胞は、食事や細菌といった外的要因によって容易に刺激された腸管内免疫担当細胞そして腸管上皮自身から産生される各種起炎性サイトカインを介して末梢血中より大部分が動員され腸管に浸潤し、炎症形成の病態の中心をなしていることも明らかにされている^{2,3)}。最近日本抗体研究所において末梢循環血液中より効果的に顆粒球を吸着除去するビーズ型顆粒球吸着器(G-1)が開発され潰瘍性大腸炎の治療法として臨床応用され良好な成績が報告され⁴⁾、現在まで施行されている薬物療法と外科的治療に並ぶ新たな第三の治療方法として期待されている。しかし現在までのところ、顆粒球吸着療法がいかなる症例に対して有効か、またいかなる時期に本治療法を用いることが最も適切かについては不明である。従って、本治療法の有効性を明らかにすると共にその適応と限界について検討を試みた。

表1

UCAI (Ulcerative colitis activity index)

A. 臨床症状		SCORE	MAX
1. (1)便性状	NORMAL=0, SOFT=1		
(OUT PATIENT)	LOOSE=2, WATERY=3	□×6	
(2)便回数	0~2/DAY=0		
(IN PATIENT)	3~4/DAY=1, 5~/DAY=2	□×3	18
(この項目は(1)か(2)の一方のみ点数化)			
2. 下血	OCCULT BLOOD(-)=0, (+~++)=1		
	MACROSCOPIC BLOOD=2		
	REMARKABLE BLOOD=3	□×10	30
3. 腹痛	NONE=0, SLIGHT=1		
	MODERATE=2, SEVERE=3	□×5	15
4. 一般状態	WELL=0, SLIGHT DISTURBED=1		
	MODERATELY D.=2		
	SEVERELY D.=3	□×10	30
5. 体重減少	LESS THAN 1% (IN 1 WEEK)=0		
	MORE THAN 1% (IN 1 WEEK)=1	□×10	10
6. 発熱	<37.5°C=0, 37.5~38.0°C=1		
	38.0~38.5°C=2, >38.5°C=3	□×10	30
B. 検査データ			
1. CRP	(-)(±)=0, (+)~(2+)=1, (3+)=2, (4+)~3	□×10	30
2. TP	≥6.5g/dl=0, <6.5g/dl=1	□×10	10
3. A/G	≥1.04=0, <1.04=1	□×10	10
4. K値	≥3.6mEq/l=0, <3.6mEq/l=1	□×10	10
C. 合併症			
1. 関節症状	無=0, 有=1	□×5	5
2. 皮膚症状	無=0, 有=1	□×5	5
3. その他の合併症	無=0, 有=1	□×5	5

評価 UCAI=SCORE/MAX(208)×100 [] 点

20以下：非活動期，20以上：活動期

C. 研究結果

患者一人一人の治療成績を結果一覧表(表2)にまとめた。

有効症例数は13症例中8例(61.6%)で、著明改善3例、改善5例であり、これら8症例は全て入院前に施行していた治療を継続あるいは中止し顆粒球吸着療法のみ

を併用することによってその他の治療の併用や薬物の増量を必要とせず改善に至り退院となった。5症例では効果なく無効と判断した。これら5例の無効症例の内4例は、不変あるいは悪化にて免疫抑制剤を含む薬物療法の強化が行われたがそれらも効果なく最終的に大腸全摘術が施行された。残り1例はそれまで使用経験のなかったプレドニンの静注療法を開始したところ緩解に至り退院となった。副作用は2例に於て顆粒球吸着療法施行毎に一時的な頭痛を認めたが、鎮痛薬の内服にて軽快し治療の中止を必要とする程ではなかった。その他は、本治療と関係が疑われる副作用は認められなかった。

次に有効症例と無効症例との違いを解明する目的で各種背景因子を検討した。

罹病期間、臨床経過分類、罹患範囲、重症度分類および一般血液検査値や免疫マーカーでは差は認めなかったが、血清補体価CH50値と症状悪化後のステロイド治療開始から顆粒球吸着療法施行に至るまでの日数に差を認めた。すなわち有効症例に於ては1例を除き全例血清補体価CH50値は正常値以上を示し、無効症例に於ては1例を除き全例正常以下であった。またステロイド開始後顆粒球吸着療法施行するまでの期間は有効症例に於て無効症例に比べ短期間であった(他施設の症例を総合して検討したところ、有効症例数45例および無効症例数40に於て、血清補体価CH50値に関してはP<0.05、ステロイド開始後顆粒球吸着療法施行までの期間に関してはP<0.01で有意な差を認め、その他の項目に関しては統計上有意差は認めなかった)。

次に治療開始前の大腸内視鏡所見によって本治療の有効性に違いが生じたか否かを検討した。内視鏡所見の分類は、粘膜の浮腫、発赤とビランが顆粒状に存在する場合を“ビラン”型、潰瘍が多発し粘膜の浮腫、発赤も強いが潰瘍は比較的浅い場合を“潰瘍形成”型、潰瘍は深く粘膜欠損の強い状態で所謂“深掘れ潰瘍”を形成し縦走傾向を示すことが多い場合を“深掘れ潰瘍”型、さらに潰瘍周辺の粘膜の腫張が著しく著明なポリープ様粘膜を形成する所見を“偽ポリポーシス”として区分比較検

表2 G-1 治療結果一覧表

患者No.	患者イニシャル	PSL総投与量(mg)	治療開始前2週間のPSL量(mg)	開始時PSL量(mg)	PSL追加増量から治療開始までの期間(日)	開始時CH50値(U/mL)	内視鏡所見	重症度分類	結果	副作用	転帰
(1)	R.T.	8000	0	0	0	49.3	偽ポリポーシス+潰瘍形成	中等症	改善		
(2)	I.K.	10000	280	20	30	25.2	潰瘍形成	重症	改善		
(3)	E.A.	6000	140	10	28	50.1	びらん	中等症	著明改善	頭痛	
(4)	K.M.	6000	440	40	28	49.6	偽ポリポーシス+深掘れ潰瘍	重症	不変		手術
(5)	H.H.	5000	280	20	28	42.6	潰瘍形成	重症	改善		
(6)	M.F.	40000	420	30	28	32.4	潰瘍形成	重症	著明改善	頭痛	
(7)	A.I.	0	0	0	0	29.9	びらん	中等症	不変		PSL増量
(8)	M.S.	37000	420	30	28	38.9	潰瘍形成	中等症	改善		
(9)	Y.O.	2500	1060	60	53	28.2	潰瘍形成	重症	不変		手術
(10)	A.S.	2000	840	60	53	20.1	偽ポリポーシス+深掘れ潰瘍	重症	不変		手術
(11)	C.A.	30000	1120	80	26	37.4	偽ポリポーシス+深掘れ潰瘍	重症	改善		
(12)	H.T.	8000	920	80	230	10.0	偽ポリポーシス+深掘れ潰瘍	重症	不変		手術
(13)	R.T.	8000	0	0	0	48.9	偽ポリポーシス+潰瘍形成	中等症	著明改善		

討した。

有効症例の内視鏡所見の多くが、ピラン型か潰瘍形成型であるのに対し、無効症例の5例中3例は偽ポリポーシを伴う“深掘れ潰瘍”型であった。

次に本療法施行中出来るだけ早期に最終的な治療の有効性を判定しうるか否かを検討する目的で、治療経過中に於けるUCAI値の推移を検討した(図1, 有効症例は実線, 無効症例は破線)。2回の体外循環終了後のUCAIを治療前値と比較すると、有効症例では明らかに改善を認めたのに対して無効例では不変であった。

最後に本治療による緩解維持を目的に、原則4週に1度の顆粒球吸着療法を継続しえた7症例とステロイド静注療法にて緩解し薬物療法単独で経過観察した7症例のKaplan-Meier法による緩解維持率を比較した。有意差は認めなかったが顆粒球吸着療法施行群に於て緩解維持率が高い傾向を認めた(図2)。

図1 UCAIの変動

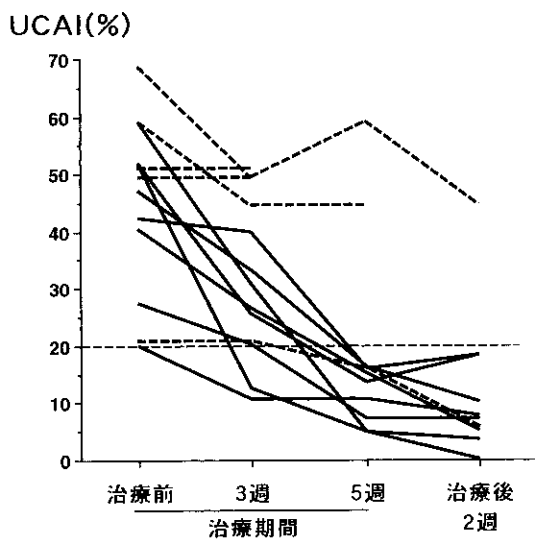
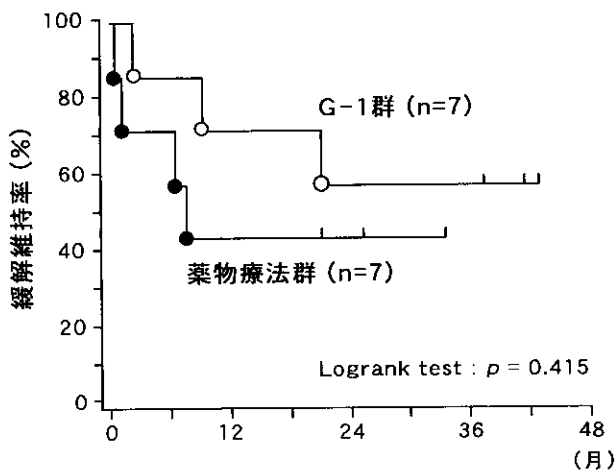


図2 Kaplan-Meier法による緩解維持曲線



D. 考察

最近、末梢血中の白血球を除去する治療法が慢性炎症性疾患で有効との報告がなされ⁷⁻¹⁰⁾新たに、末梢血中の白血球とりわけ顆粒球を有効に吸着除去する顆粒球吸着器(G-1)が開発された。G-1は吸着除去することによる

量的変化を生じさせるばかりでなくさらに *in vitro* の実験結果より活性酸素産生能の低下、起炎症性サイトカイン産生能の低下や顆粒球表面形質の変化など質的变化を生じさせ活性化された顆粒球の炎症局所への浸潤能を極めて低い状態にさせていることが示されている。潰瘍性大腸炎の活動期炎症局所においては、活性化された顆粒球が末梢血から次々に動員浸潤し腸管粘膜の傷害の主役を演じていると考えられている¹¹⁾。従ってG-1を用い活性化された顆粒球を除去あるいは機能変化させることは潰瘍性大腸炎の活動期の治療法として有効性を発揮する可能性がある⁴⁾と考えられた。また潰瘍性大腸炎は一端再燃を繰り返すと大部分の症例でステロイド剤を併用するが、ステロイドは様々な副作用を伴い大量および長期に使用すると副作用が重大な影響を及ぼし患者の Quality of lifeを著しく損なう。従って安全で副作用も少ないステロイド治療を補う治療法の確立が急務である。

今回の我々の治療成績で、その安全性と有効性が実証された。ステロイドに代わりあるいはステロイドとの併用として本療法を適応することは、従来避けえなかったステロイドの副作用を軽減し患者の Quality of life向上に寄与すると考えられた。更に今回の検討より、本療法は症状悪化後短期間で開始することがその有効性を高めることと、血清補体価CH50値が正常上限以上の症例に有効であることが判明した。一般に顆粒球は炎症の初期相でその進展と悪化に重要な役割を演じていることから、出来るだけ病状悪化後早期に活性化された顆粒球を吸着除去したことが病勢の改善につながったと推測された。血清補体価CH50値の多少が本療法の有効性に与えた影響の機序は現在のところ不明であり今後の研究課題と考えられた。

内視鏡所見の検討から治療前に偽ポリポーシを伴う深掘れ潰瘍を認めた症例は無効例が多くこのような症例に対しては、本治療法の適応は慎重にする必要があると推測された。しかし同様な内視鏡所見を呈しても、2回/週×3週間の強化療法を施行し明らかな改善を認める症例も経験した。今後施行回数増加など、症例に応じた運用方法の見直しを検討する必要があると思われた。

最後に本療法が再燃予防効果を有するか否かを検討したが、1回/月の施行で有意ではないが薬物療法単独群に比べ緩解維持率が高い傾向を認めた。従って今後本療法の潰瘍性大腸炎に対する緩解維持効果の有無に関し、症例数を増やし検討する必要があると思われた。

E. 参考文献

- 1) 小林絢三, 中村志郎, 押谷伸英, 他: 特発性炎症性炎症性腸疾患変部粘膜局所の好中球浸潤と細胞接着分子の発現動態に関する免疫組織化学的検討 厚生省特定疾患難治性炎症性腸管障害調査研究班 平成4年度研究報告書 1992:p244-247.
- 2) Y. Suzuki, H. Saito, J. Kasanuki, T. Kishimoto, Y. Tamura, and S. Yoshida: Significant increase of interleukin 6 production in blood mononuclear leukocytes obtained from patients with active inflammatory bowel disease. *Life Sciences* 1990;47:2193-2197.
- 3) Y. Suzuki, S. Kinoshita, T. Iwai, Y. Kitsukawa, and Y. Saito: Cytokine production in patients with inflammatory bowel disease. *Cytokine, Cholera, and the Gut* 1995;18:121-130.
- 4) 下山孝, 澤田康史, 田中隆夫, その他: 潰瘍性大腸炎の活動期における顆粒球吸着療法 日本アフレン