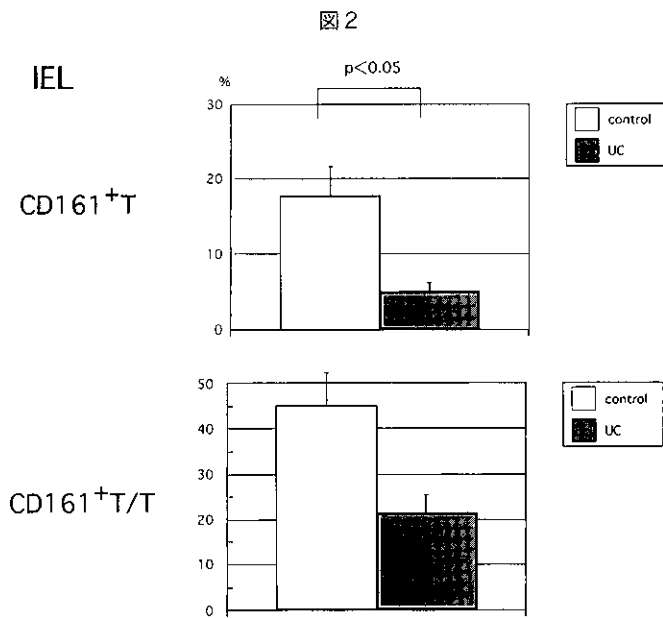


2. 潰瘍性大腸炎の大腸 IEL の CD161 + T (NKT) 細胞は、正常の大腸 IEL に比し有意に減少していた(図2).



3. 潰瘍性大腸炎の末梢血では、CD161 + T細胞は減少していなかった.

D. 考 察

NKT細胞の解析は、主としてマウスを用いて行われ

てきた。マウスNKT細胞は肝や骨髄に多く存在し、INF- γ もIL-4も産生できるTh0の性質を有し、免疫系をコントロールする細胞ではないかと推測されている。ヒトSLEのモデルマウスでは、その発症にしたがいNKT細胞が減少することが報告されており、NKT細胞の減少が病気の発症に関与しているのではないかと考えられている。

一方、ヒトではNKT細胞の解析はまだあまり進んでいない。マウスV α 14/J α 281のhomologueであるV α 24/J α Qを発現するT細胞がヒトNKT細胞とした報告が多い。これらの細胞は、CD161を発現し、肝に多く存在し、SSC、SLE、RA患者の末梢血で減少していることが分かっている。本研究では、われわれはCD161を発現している細胞をNKT細胞とした。マウスでは、NK1.1を発現しているT細胞の数%しかV α 14/J α 281を発現していないし、同じくヒトCD161+細胞の数%しかV α 24/J α Qを発現していないからである。

本研究で、マウスと異なりヒトでは腸上皮内リンパ球(IEL)にNKT細胞が多く存在することが分かった。そして潰瘍性大腸炎の大腸上皮内では、NKT細胞が減少していることが明らかになった。腸上皮内でもNKT細胞がなんらかの免疫調節の役割を担っていることが推測される。そして、NKT細胞の大腸上皮内における減少が局所での免疫系の破綻をきたし、潰瘍性大腸炎の病因の1つにつながっているのではないかと考えられた。

E. 結 論

1. ヒトNKT細胞は、腸上皮内に多く存在する。
2. 潰瘍性大腸炎の局所では、NKT細胞は減少する。

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

大腸炎モデルにおける TNF レセプターの役割の解析

分担研究者 向田 直史 金沢大学がん研究所（組織分子） 教授

研究要旨：野生型ならびに TNF レセプター p55 欠損マウスから得た CD4 陽性 CD45RB 強陽性細胞を、SCID マウスに移入して大腸炎の発症を検討した。細胞移入 8 週目で、野生型マウスから細胞を移入した SCID マウスでは 3 例中 2 例で肉眼的にも組織学的にも大腸での炎症所見が認められたのに対して、TNF レセプター p55 欠損マウスから細胞を移入した SCID マウスでは 2 例とも大腸での炎症所見は認められなかった。以上のことから、炎症性大腸炎での TNF の主要な標的細胞が T 細胞であることが示唆された。

A. 研究目的

炎症性腸疾患の治療を目的として、腫瘍壊死因子 (TNF- α) に対する抗体ならびにアンタゴニストの臨床治験が行なわれ、その有効性が報告されている。しかし、TNF- α がいかに炎症性腸疾患の病態の進展過程に関与しているかについては、現在でも不明な点が多い。本研究では、TNF- α の役割を解明するために TNF レセプター p55 欠損マウスから得た CD4 陽性 CD45RB 強陽性細胞を、SCID マウスに移入して大腸炎の発症を検討した。

B. 研究方法

BALB/c (以下野生型と略す) ならびに BALB/c マウスに 6 世代以上戻し交配した TNF レセプター p55 欠損マウスの脾臓から単核球を分離した。得られた単核球からマグネティック・ビーズ法で分離した CD4 陽性細胞から、さらにセル・ソーターを用いて、CD45RB 強陽性細胞を得た。得られた CD4 陽性 CD45RB 強陽性細胞 1×10^6 個を、SCID マウスの腹腔内に注射した。8 週後に脾臓ならびに腸管を取り出し、肉眼的ならびに顕微鏡的に観察した。

(倫理面への配慮)

本研究の動物実験は、金沢大学医学部附属動物施設の内規に基づき、申請をし、許可を受けている。

C. 研究結果

1) 野生型・TNF-Rp55 欠損マウスから、CD4 陽性 CD45RB 強陽性細胞を移入した SCID マウスの全例の脾臓で、未処理の SCID マウスでは認められない T 細胞領域が出現した。このことから、これらの細胞は

SCID マウスに生着したと判断された。

2) 野生型マウスから細胞を移入された SCID マウスでは、3 例中 2 例において、肉眼的にも顕微鏡的にも大腸の広い範囲にわたって、炎症所見が認められた。
3) TNF-Rp55 欠損マウスからの細胞を移入された SCID マウスでは、2 例中 2 例ともに、未処理の SCID マウスと比較して、大腸では明らかな炎症所見は認められなかった。

D. 考察

TNF- α のレセプターとしては、TNF-R-55 と TNF-Rp75 の 2 種類が存在しているが、TNF-Rp55 が TNF- α の大半の作用に関与していると考えられている。

動物での炎症性腸疾患モデル・臨床病態の検討から、炎症性腸疾患の病態には TNF- α が重要な役割を果たしている可能性が報告されている。本研究の結果から、TNF-Rp55 を介するシグナルが、TNF- α による炎症性腸疾患の成立に関与していることが示唆された。

さらに、TNF-Rp55 欠損マウス由来の T 細胞を移植した時には、大腸での炎症が起きないことから、TNF-Rp55 を介するシグナルの主な標的細胞が T 細胞である可能性が示唆された。

これらの知見は、TNF- α を標的とする、より選択性の強い薬剤の開発に繋がることが期待される。

E. 結論

CD4 陽性 CD45RB 強陽性細胞移入による、炎症性大腸炎モデルにおいて、TNF- α は T 細胞上の TNF-Rp55 を介して関与している可能性が示唆された。

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

Th1 慢性大腸炎モデルにおける TNF/TNFR 関連分子の関与

研究要旨：クローン病における TNF/TNFR 関連分子の関与を追求し，抗 TNF 抗体に匹敵する新治療法をマウス CD45RB^{high}T 細胞移入慢性大腸炎モデルを用いて検討した．TNF/TNFR 分子群に属す OX40/OX40L 分子は本モデルに関与し，抗 OX40L 抗体は腸炎発症を抑制した．

共同研究者
 渡辺 守，金井 隆典，戸塚 輝治
 所属 東京医科歯科大学大学院
 消化・代謝内科学

A. 研究目的

欧米にて，クローン病における抗 TNF 抗体の臨床応用が開始され，優れた成績を収めている．しかし，その作用機序はいまだ不明な点が多く，かつ，約3割の症例で無効である．TNF/TNFR ファミリーは TNF 以外に多数存在し，今回，本システムがクローン病病態形成に関与するか，さらに，抗 TNF 抗体以外の新しい治療戦略を検討した．

B. 研究方法

- クローン病マウスモデルの作製：6週齢 BALB/c マウスより脾細胞を分離した．抗 CD4 MACS ビーズを用い，CD4 陽性細胞を単離，CD45RB-FITC/CD4-PE による細胞膜染色にて CD4+CD45RB^{high} (30% high) 細胞を FACS にて sorting した．
- 得られた CD4+CD45RB^{high} 細胞を BALB/c SCID マウス腹腔内に 4×10^5 移入，経時的に体重減少，臨床症状を観察し，6-10 週後の大腸炎所見を組織学およびフローサイトメトリーにて検討した．
- 同様に，CD45RB^{high} 細胞移入後，コントロール IgG または抗 OX40L 抗体を 250 μ g/body，週3回，投与し，経時的に体重減少，臨床症状を観察し，6-10 週後の大腸炎所見を組織学およびフローサイトメトリーにて検討した．本研究は東京医科歯科大学動物実験委員会に倫理規定に関する規則に準じて行われた．

C. 研究結果

CD45RB^{high}細胞移入大腸炎モデルにおいて，下痢，体重減少が出現し，大腸は著明に肥厚した．組織学的にも著明なリンパ球浸潤を伴い，OX40L 陽性細胞の増加を認めた．抗 OX40 抗体投与群は投与6週後においてコントロール群に比し，体重は増加し，大腸肥厚も著明に抑制された．組織学的検討でもリンパ球浸潤は著明に抑制された．

D. 考案

難治性クローン病治療における抗 TNF 抗体の効果については欧米にてすでに広く認知され，優れた臨床成績をおさめている．しかし，抗 TNF 抗体治療になお抵抗性の症例も存在することも明らかとされ，TNF 以外の分子の関与が示唆される．TNF を代表とする TNF ファミリーはすでに多数存在することも知られており，これらの分子群のクローン病での関与を検討することは，新たなクローン病治療の開発につながると考えられる．OX40/OX40L 分子は TNF/TNFR ファミリーに属する分子として報告されている．OX40 分子は活性化 T 細胞に発現し，ヒト慢性関節リウマチ関節腔内 T 細胞やヒト重症筋無力症胸腺腫胚細胞中心 T 細胞などに発現を認める．今回の検討でも CD45RB^{high} 移入慢性大腸炎モデルにおいて，OX40/OX40L 分子群の発現増強と中和抗体である抗 OX40L 抗体が著明に腸炎発症を抑制したことは，本分子群の慢性大腸炎病態形成に関与することが示唆された．

E. 結論

クローン病発症機序に TNF 以外の TNF/TNFR 分子群の関与が示され，新たな治療法の開発の可能性が考えられた．

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 における NKT 細胞の役割

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：NKT細胞は第4のリンパ球として最近注目され、Th1/Th2免疫バランスをIFN γ あるいはIL-4を産生することで生体の免疫系を支配している。このNKT細胞はヒトではT細胞受容体(V α 24+V β 11+)とNK受容体(NKR-PIA(CD3+CD161+))との2種類の受容体を持っている。進行・末期癌に対する免疫療法でこのNKT細胞はT細胞受容体の刺激で免疫抑制的に働き、NK受容体の刺激で免疫活性に働くことをはじめて見出した。今回はIBD症例でこのNKT細胞受容体がどのように関与しているかを検討した。クローン病では活動期でCD3+CD161+、NKR-PIAとV α 24+V β 11+が共に活性化しており、Th1/Th2比は低下していた。IL-10とV α 24+V β 11+とは相関を示し、CD3+CD161+とは負の相関を示した。一方、潰瘍性大腸炎は症例が少なく結論を見出すにはいたらなかった。

A. 研究目的

炎症性腸疾患 (IBD) の病因・病態に免疫異常が関与していることが知られている。しかし、NKT細胞はNK細胞とT細胞の両者の性質を持ち、第4のリンパ球として見出された免疫担当細胞でTh1/Th2バランスを支配するのみならず、自ずからも標的細胞にパーフォリンを用いて細胞障害性を示すことから最近注目されつつある。この細胞はIFN γ を産生してTh1に誘導し、また逆にIL-4を産生してTh2に誘導することがわかっている。我々は担癌症例に免疫療法を行い、さまざまな検討からNKT細胞の反応性に極めて特徴的な行動をとることをはじめて見出した。すなわち、このNKT細胞は2種類の受容体を持ち、一つは、T細胞受容体としてのV α 24V β 11を表標し糖脂質を認識しこの刺激でIL-4を産生する。一方、もう一つのNK細胞受容体(NKR-PIA)は糖質を認識してIFN γ を産生することが判明した(図-1)(図-2)(図-3)。

図2 CD3+CD161+とIL-12産生の相関(n=70)

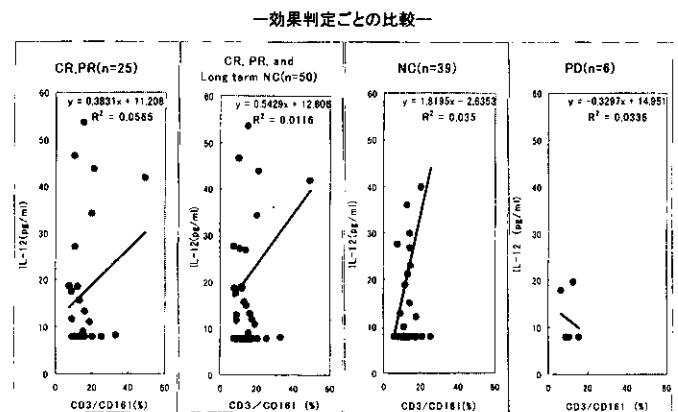


図1 V α 24+V β 11+とIL-12産生の相関(n=70)

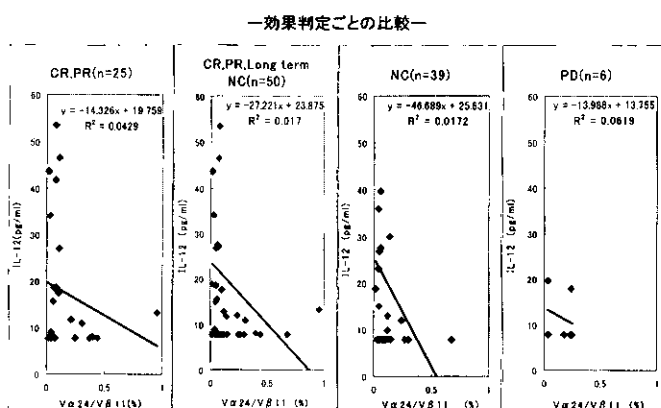
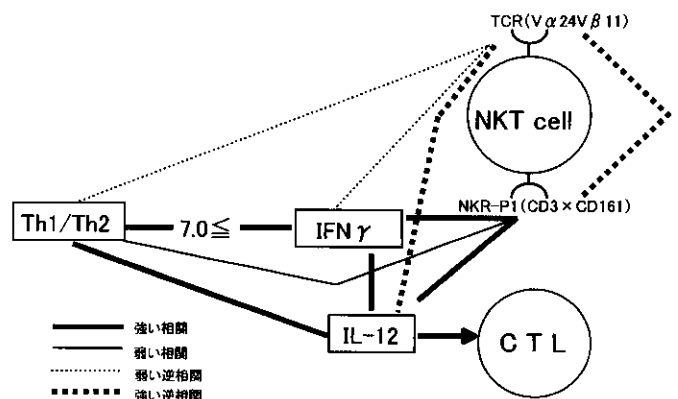


図3 NKT細胞の2種類の受容体(TCRとNKR)とTh1サイトカインとの相関



今回は、このNKT細胞がIBD (UCとCD) の病因・病態にどの様に関与しているかについて検討を加えたので報告する。

B. 研究方法

対象はCD 48例で活動期29例、非活動期19例である。一方、UCは12例で活動期5例、非活動期7例である。健常人は19例でcontrolとした。また悪性腫瘍症例は70例である。

免疫学的測定は、各種サイトカイン(TNF α , IFN γ , IL-12, IL-10)がELISA法で、NKT細胞はThree colorで測定した。NKT細胞のT細胞受容体はV α 24+V β 11+で、NK細胞受容体はCD3+CD161+で行い、それぞれのパーフォリン産生活性はその抗体を用いて測定した。

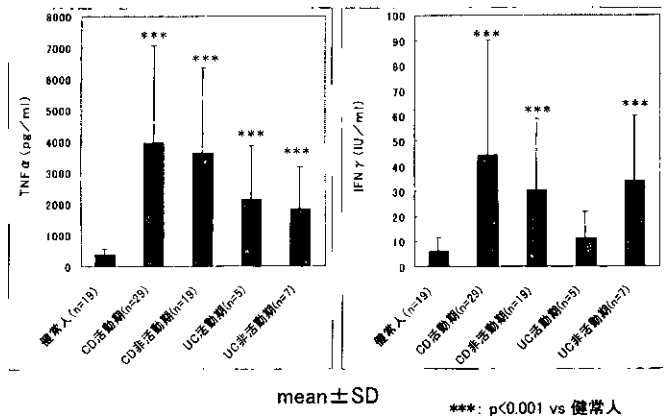
また、Th1/Th2比はCD4, IFN γ , IL-4のThree colorを用いてフローサイトメトリーで測定した。

C. 研究結果

TNF α の産性能は健常人に比較しUCおよびCDのいずれでも有意に亢進していた。また、UCに比較しCDでより高い値を示した。

一方、IFN γ はCDで有意に高い値を示したが、活動期でより高い値を示した。UCでは非活動期で高値を示した(図-4)。

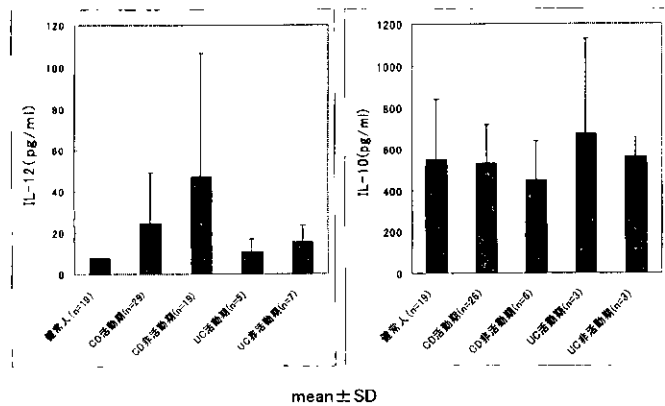
図4 IBDにおけるTNF α およびIFN γ 産生量の比較



IL-12はcontrolに比較しCDで高い値を示したが有意差は認められなかった。しかしUCでは差が認められなかった。

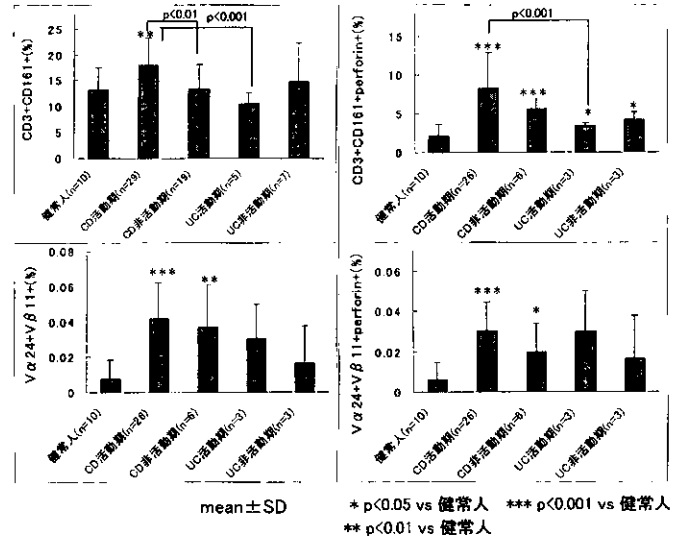
また、IL-10に関してはUCおよびCDで差は認められなかった(図-5)。

図5 IBDにおけるIL-12およびIL-10産生量の比較



NKT細胞を2種類の受容体を用いて検討した(図-6)。NK受容体のCD3+CD161+はCDにおいては非活動期に比べて活動期で有意に高値を示した。しかしUCにおいては非活動期に比較し活動期で低い値を示したが、症例数が少ないためか有意差は得られなかった。

図6 IBDにおけるCD3CD161, CD3CD161perforin, V α 24V β 11, V α 24V β 11perforinの比較



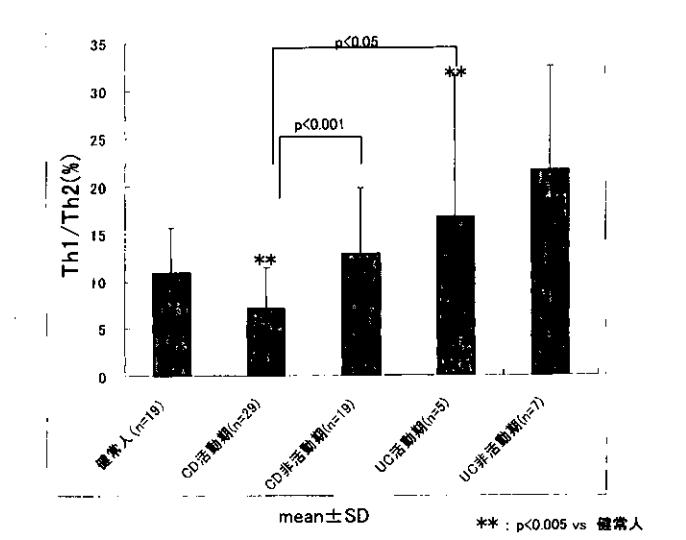
UCとCDとの活動期レベルで比較するとUCで有意に低値を示した。

NKT細胞でのNK受容体陽性細胞におけるパーフォリン陽性細胞について検討した。健常者に比較しCDおよびUCで有意に高い値を示した。またCD活動期とUC活動期で比べるとCDでより高い値を示した(P<0.001)。

一方、T細胞受容体のV α 24+V β 11+で検討すると健常者に比較しCDで有意に高い値を示し、UCでは差が認められなかった。また、パーフォリン産生能でも同じ傾向が認められた。

Th1/Th2バランスにつき検討を加えた(図-7)。CDの活動期でcontrolに比較し有意に低下していた。また、CDでは活動期で非活動期に比べ有意に低い値を示した。CDとUCの活動期レベルで比較するとCDで有意に低い値を示した。

図7 IBDにおけるTh1/Th2比の比較



D. 考 察

今回のNKT細胞に関する免疫学的検討症例がいずれも治療を受けていたため正確な病態を反映しているとは言い難く、さらにUC症例数が少ないことも問題が残されている。

しかし現時点では以下の結論にいたった。

CD活動期において、TNF α 、IFN γ 産生能は高値を示したが、IL-12産生能はむしろ低下していた。また、CD3+CD161+Perforin+とV α 24+V β 11+Perforin+は、ともに活動期で上昇したが、Th1/Th2は活動期で低下していた。

Th2系のサイトカインであるIL-10は、CD活動期においてV α 24+V β 11+Perforin+と正の相関が認められたが、CD3+CD161+Perforin+では負の相関が認められた。

CD活動期ではTh2系リンパ球が病態に関与している可能性が示唆された。

さらに症例を増やして検討を加えたい。

E. 参考文献

- 1) 河野 鐵, 谷口 克: NKT細胞抗原受容体とリガンド. 最新医学 55(4): 804-810, Apr 2000.
- 2) 荒瀬 尚: NKT細胞のサイトカイン産生とその意義. 最新医学 55(4): 818-823, Apr 2000.
- 3) 小安 重夫: NKT細胞の多様性とその分化. 最新医学 55(4): 791-796, Apr 2000.
- 4) 八木田 旭邦, 丸山 正二, 助川 寧, 大洞 あや, 小林 寿彰, 藤井 孝美, 竹内 正七, 竹之下誠一: 新生血管阻害剤と内因性IL-12とを用いた新免疫療法—特にNKT細胞の関与について—. Biotherapy 14(5): 433-439, May 2000.
- 5) 八木田 旭邦: 新免疫療法(仮称)(Novel Immunotherapy for Cancer; NITC)における血管新生阻害剤の役割. Biotherapy 14(10): 973-982, Oct 2000.

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

精製 Hsp60 投与による自己反応性とマウス大腸病理像の細菌分子種
による差異：*Yersinia enterocolitica* Hsp60, *Helicobacter pylori*
Hsp60, *Escherichia coli* GroEL の比較

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：*Yersinia enterocolitica* Hsp60 (Ye-hsp60), *Helicobacter pylori* Hsp60 (Hp-hsp60), *Escherichia coli* GroEL の3種類の細菌性 Hsp60 を精製した。精製 Hsp60 をマウスに週1回計9回腹腔接種し、大腸の病理像を検討した。大腸に対する血清の自己反応性と、哺乳類Hsp60に対する血清の反応性を固層酵素免疫測定法で調べた。その結果、Ye-hsp60接種群ではマウス大腸に腺管減少や糜爛や陰窩膿瘍類似所見が観察され、大腸に対する血清の自己反応性と、哺乳類Hsp60に対する血清の反応性は無処置マウスに比べて有意に増加していた。GroEL接種群では大腸病理変化と血清の反応性のいずれもYe-hsp60接種群より小さかった。Hp-hsp60接種群では大腸粘膜に糜爛が見られたがYe-hsp60接種群とは異なり漿膜側の炎症性変化が観察される一方、大腸に対する血清の自己反応性の上昇は見られなかった。これらの結果は、潰瘍性大腸炎類似モデルとしてはYe-hsp60接種が好ましいことを示している。

共同研究者

助川 寧, 丸山 正二, 若杉 慎司¹⁾,
山口 博之, 神谷 茂²⁾

所属 近畿大学 腫瘍免疫等研究所¹⁾,
杏林大学医学部 感染症学²⁾

A. 研究目的

Yersinia enterocolitica Hsp60 (Ye-hsp60) はヒト Hsp60 と50%のホモロジーをもつ分子である¹⁾が、我々はIBD患者血清中にYe-hsp60と反応する抗体価を見いだし、IBD患者腸管中にもYe-hsp60と反応する抗体価を見いだした²⁾。そこで、我々はHsp60が疾患で自己抗原的に働く可能性があると考え、精製Ye-hsp60をマウスに接種したところ、潰瘍性大腸炎に類似した自己免疫性大腸炎が生じていた³⁾。

今回は接種するHsp60の細菌分子種を、*Helicobacter pylori* Hsp60 (Hp-hsp60) や *Escherichia coli* のHsp60 であるところのGroELに変更した時のマウス大腸の変化と自己反応性をYe-hsp60接種の場合と比較検討し、もって大腸炎モデルとしてのYe-hsp60接種の妥当性を検証する。

B. 研究方法

1) 細菌性 Hsp60 の精製

Yersinia enterocolitica と *Helicobacter pylori* の染色

体DNAより、大腸菌GroELのDNA配列を元に合成した2つのプライマーを用いたPCR法により得たYe-hsp60とHp-hsp60のcDNAあるいはGroELのcDNAを蛋白発現プラスミドベクターpEx-1に組み込み、大腸菌pop2136にトランスフォームした。そしてYe-hsp60導入株、Hp-hsp60導入株、GroEL導入株をそれぞれ30℃で培養後42℃で2時間加熱しβ-ガラクトシターゼとの融合蛋白として各種Hsp60を大腸菌に発現させた^{4,5)}。発現したHsp60は不溶性画分から8M尿素を用いて精製した⁵⁾。

2) 動物と Hsp60 の接種

B 10A/SgSn雄マウス(日本SLC)を用いた。マウスは3週齢から、n-6不飽和脂肪酸強化飼料すなわち紅花油を5%添加したCE2(日本クレア)を自由摂食させ^{3,6)}、4週齢からHsp60を接種した。精製Hsp60のPBS溶液をマウスに週1回計9回各3μg/200μl腹腔接種した。同じ期間n-6不飽和脂肪酸強化飼料を自由摂食させたマウスをコントロール群とした。接種したHsp60は、Ye-hsp60, Hp-hsp60, GroELである。なおYe-hsp60は、接種ルートを変更に検討も行った。

3) 血清と大腸の採取

Hsp60の最終接種日の2日後に、エーテル麻酔下に後大静脈より全採血してマウスを犠牲させ、大腸を採種した。

4) 病理学的検討

大腸を常法によりパラフィン包埋し、大腸の縦切り切片をヘマトキシリン・エオジン染色して病理学的に検討した。

5) 大腸に対する血清の自己反応性と、哺乳類Hsp60に対する血清の反応性

大腸の一部をソニケートして10,000g上清を蛋白量2 μ g/mlとし、固層酵素免疫測定法(ELISA)固層化抗原とした。このELISAプレートに自己血清を100倍希釈してアプライし、2次抗原として抗マウスIgGMにて検出した。哺乳類のHsp60に対する血清の抗体価も、シグマ社のmammalian Hsp60を0.2 μ g/mlの濃度でELISA固層化抗原として同様に測定した。

6) 統計学的処理

統計的有意差の検定法としてMann-Whitney U検定を用いた。

C. 研究結果

1) 病理学的検討

Ye-hsp60接種群ではマウス大腸粘膜に杯細胞の膨化、腺管の膨張、腺管減少、炎症性細胞浸潤、糜爛、陰窩膿瘍類似所見や粘膜下層の浮腫が観察された。

Ye-hsp60接種群では腹腔接種と皮下接種の検討を行ったが、大腸の病理学的形態は腹腔接種と皮下接種の間で差異が見られなかった。

GroEL接種群では*Ye*-hsp60接種群に比べて大腸の変化は小さかったが、大腸粘膜に腺管減少や糜爛が観察された。

Hp-hsp60接種群では大腸粘膜に糜爛が見られたが*Ye*-hsp60接種群とは異なり漿膜側の炎症性変化が観察された。

2) 大腸に対する血清の自己反応性と、哺乳類Hsp60に対する血清の反応性

大腸に対する自己血清の反応性を、図1に示す。

哺乳類Hsp60に対する血清の反応性を、図2に示す。なお、図1、図2中の#は、コントロール群に対するMann-Whitney U検査値である。#: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$, ###: $p < 0.0001$ 。

図1 Autoreactivities between large intestine and autologous serum

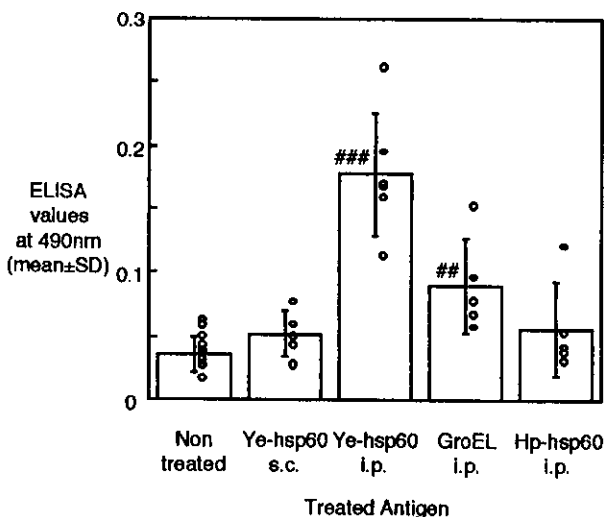
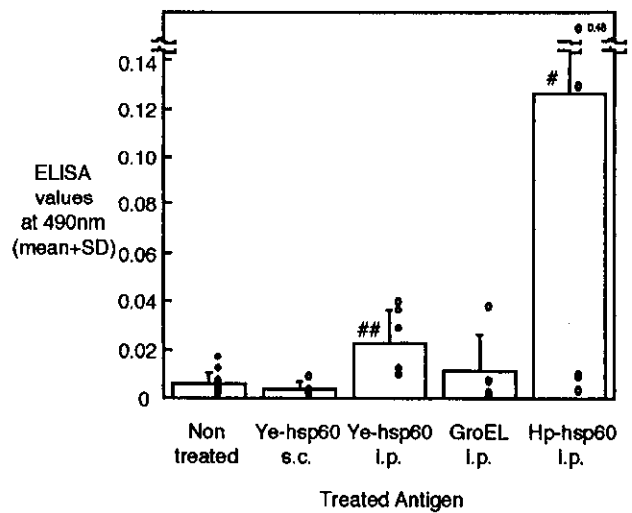


図1 Determination of antibody response to mammalian hsp60 in sera



D. 考察

Ye-hsp60をマウスに接種するルート腹腔から皮下投与に変更する検討により、*Ye*-hsp60皮下投与で大腸と自己血清の間の反応性は有意差は出ないものの上昇し、大腸に腹腔接種と同様の病理学的変化が誘導された。このことは、*Ye*-hsp60接種によりマウスに潰瘍性大腸炎類似の自己免疫性大腸炎が誘導されることを示す。*Ye*-hsp60腹腔接種により、自己大腸に対する反応性と哺乳類Hsp60に対する反応性のいずれも有意に増加していることは、皮下接種よりも腹腔接種のほうが抗原性を誘導しやすくモデルとしては好ましいことを示している。

前報^{3,6)}において、あまたある細菌性Hsp60のなかで我々が*Yersinia enterocolitica* Hsp60を選択したのは、Farmerが*Y. enterocolitica*感染症の病理像がIBDと類似している場合があると報告したからである⁷⁾。Blaserらは*Y. enterocolitica*や他の腸内細菌種に対する血清抗体価が急性期のクローン病で上昇していることを報告している⁸⁾。さらにIbbotsonらはIBD患者において、*Y. enterocolitica*菌体ホモジネート刺激に対する腸間膜リンパ節の単核細胞の増殖活性が大腸菌刺激に比べて有意に高値であることを報告している⁹⁾。

今回の検討で、*Y. enterocolitica* Hsp60と90%の相同性がある大腸菌のHsp60 (GroEL)(1)の精製蛋白をマウスに接種したところ、大腸病変は*Ye*-hsp60接種に比べて弱かった。同様に、GroEL投与マウスの大腸と血清の間の自己免疫反応も*Ye*-hsp60接種に比べて弱く、哺乳類のHsp60に対する抗体価は有意に上昇していなかった。

Hp-hsp60接種では、自己大腸に対する反応性上昇は有意で無く、哺乳類Hsp60に対する反応性が特定の個体で顕著に上昇していた。また、大腸の病理像は漿膜側の炎症性変化が強く、潰瘍性大腸炎には類似しない。

病理像と免疫反応における*Ye*-hsp60接種マウスとGroEL接種マウスや*Hp*-hsp60接種マウスとの違いは、*Ye*-hsp60のペプチド配列において哺乳類のHsp60と共通しGroELや*Hp*-hsp60とは異なる配列が、ヒトの潰瘍性大腸炎の病因で何らかの役割をはたしている可能性を示唆するものである。

E. 結 論

潰瘍性大腸炎類似モデルとしては、Hp-hsp 接種や GroEL 接種よりも Ye-hsp 接種が好ましい。

F. 参考文献

- 1) Yamamoto T., et al: Cloning and nucleotide sequence analysis of immunodominant heat-shock protein of *Yersinia enterocolitica*. Res. Micro. 1993; 144: 691-701.
- 2) 八木田旭邦ら: 炎症性腸疾患, 特にクローン病と Hsp60 の関与. 消化器と免疫 1993; 28: 124-127.
- 3) Sukegawa Y., et al: Induction of autoimmune colitis by *Yersinia enterocolitica* 60 Kilodalton Heat Shock protein. Scand J Gastroenterol 2000; 35: 1188-1193.
- 4) Yamaguchi H., et al: Detection and characterization of antibodies to bacterial heat-shock protein 60 in sera of patients with primary biliary cirrhosis. Microbiol Immunol. 1994; 38: 483-487.
- 5) Yamaguchi H., et al: Induction of secretion of interleukin-8 from human gastric epithelial cells by heat-shock protein 60 homologue of *Helicobacter pylori*. J Med Microbiol 1999; 48: 927-933.
- 6) Yagita A., et al: Mouse colitis induced by *Escherichia coli* producing *Yersinia enterocolitica* 60-kilodalton heat shock protein, light and electron microscope study. Dig Dis Sci 1999; 44: 445-451.
- 7) Farmer RG.: Infections causes of diarrhea in the differential diagnosis of inflammatory bowel disease. Med Clin North Am 1990;74:29-38.
- 8) Blaser MJ., et al: Patients with active Crohn's disease have elevated serum antibodies to antigen of seven enteric bacterial pathogens. Gastroenterology 1984; 87: 888-894.
- 9) Ibbotson JP., et al: Mucosal cell-mediated immunity to *mycobacterial*, *enterobacterial* and other microbial antigens in inflammatory bowel disease. Clin exp Immunol 1992; 87: 224-230.

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特徴的な炎症免疫反応と
 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) とクローン病 (CD) においてそれぞれ特徴的な、過剰かつ持続的な炎症免疫反応とそれに起因した組織構築の変化が惹起されており、UC および CD の病態を形成している。本研究は、本調査研究班の方針に基いて、それぞれに特異的な病因病態の解明と、それに依拠した治療法の開発と提言を目的に、両疾患それぞれに観察される炎症免疫反応の共通な部分と特異な異常状態を、それぞれに特徴的な形態変化と密接な関連の許で観察した。[方法] UC および CD 患者の大腸組織ならびに大腸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、当該抗原の mRNA の局在をあわせ観察した。[結果] UC, CD ともリンパ球やマクロファージ系細胞の著しい増多に好中球と好酸球を中心とした顆粒球系細胞が種々の程度に混在し、粘膜傷害が惹起されていた。両疾患とも炎症巣では、毛細血管の増生とともに内皮細胞に E-selectin, ICAM-1, MAdCAM-1 の発現が亢進しており、粘膜炎症巣形成に関与していた。しかし、CD では潰瘍底での MAdCAM-1 陽性血管の比率が有意に高く、潰瘍形成に消化管指向性のリンパ球が主要な役割を果していることが示唆された。さらに CD では肉芽腫形成が特徴的であるが、それを形成するマクロファージ系細胞が抗原提示細胞として Th1 リンパ球の増殖反応を惹起していることが観察された。一方、UC では、その病変部で CD19+20 - B リンパ球が胚中心を形成せず、異常に増殖していることがわかり、UC 病変が B 細胞増殖巣として位置付けられることが確認された。また UC では粘膜上皮細胞での水分代謝を調節している 11β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11β -HSD2) の発現が著明に減弱し、CD では著変なかったことから、UC では粘膜上皮細胞傷害が主要な病態の一つであることが明らかとなった。[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り、活動性病変では好中球を中心とした活動性炎症が共通した病態であり、それに引き続く炎症免疫反応のカスケードのところで相違していた。UC は mucosal B cell lesion であり、B 細胞の増殖の制御異常とそれによる粘膜上皮細胞傷害が主要であるが、CD では活性化されたマクロファージ系細胞による肉芽腫形成とそれによる Th1 細胞への過剰な抗原提示と活性化とそれに基く組織構築の改変が中心となっていることがわかった。それ故、その治療法の導入としての白血球除去を始めとした好中球の抑制が有効であり、それに引き続き UC, CD それぞれに特異な免疫抑制治療のプロトコル作成が必要ながわかった。

共同研究者

大谷 明夫¹⁾, 有廣 誠二^{1,6)}, 笹野 公伸¹⁾,
 村松 康成^{1,4)}, 樋渡 信夫²⁾,
 佐々木 巖, 福島浩平³⁾,
 中村 志郎, 神野 良男, 松本 誉之⁵⁾

所属 東北大学大学院医学系研究科 病理学¹⁾,
 同 第三内科²⁾,
 同 第一外科³⁾,
 同 心療内科⁴⁾,
 大阪市立大学医学部 第三内科⁵⁾,
 慈恵会医科大学 内科⁶⁾

A. 研究目的

腸管粘膜組織は、たった一層円柱上皮によって生体と体外環境を境界する生体の主要なバリア構造であるが、想像を絶する莫大な量と種類の抗原に曝露されている。しかし腸管粘膜は、生体に必要な物質の選択的な取り込み機能と体外からの抗原侵襲に対する強力な生体防御機能を兼ね備えた極めてユニークな組織構築と機能を有している。それに主要な役割を果しているのが粘膜に特異な炎症反応とその免疫機構である粘膜免疫機構 (mucosal immune system) である。さらにこの粘膜免疫機構は積極的に全身の炎症免疫反応を制御し、粘膜を介して侵入した抗原に対する過剰な全身の炎症免疫反応を制御している。こうした腸管粘膜組織で機能しているバリア機構による生体防御系の恒常性維持機構の破綻や

未熟性は、炎症性腸疾患を始めとした腸管粘膜のさまざまな炎症免疫疾患の病因と重要なかわりを有していることは十分に理解される。炎症性腸疾患の炎症粘膜では、UC,CDそれぞれに特徴的な過剰かつ持続する炎症免疫反応とそれに起因した組織構築の変化が観察されており、両者間に相違した病因と炎症免疫学的機序が想定されている。しかし現在でもなおこれに相応した科学的に裏付けられた治療法が行なわれているとは限らず、当該疾患の患者増とあいまってその確立が急務となっている。

本研究は前述のような実情をふまえ、本調査研究班の方針に基いて、それぞれに特異的な病因病態の解明と、それに依拠した治療法の開発と提言を目的に、両疾患それぞれに観察される炎症免疫反応の共通な部分と特異な異常状態を、それぞれに特徴的な形態変化と密接な関連の許で観察した。

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、形態観察ならびに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。細胞増殖能の測定はKi67の免疫染色による標識率をもって行った一部組織は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法で当該抗原のmRNAの検出を行った。尚、手術摘出組織の使用した本研究を実施するにあたって、東北大学医学部、医学系研究科倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

1. 炎症免疫担当細胞の浸潤と血管内皮細胞接着分子の発現

健常大腸粘膜として採取された大腸癌非癌健常部位粘膜でも、粘膜固有層には相当数のIgA形質細胞と、それとほぼ同数のリンパ球、それらの10%相当のマクロファージ、数%の樹状細胞や顆粒球系細胞が観察され、明調の細胞質を有するマクロファージが被覆上皮細胞層直下に層状に密に配列していた。固有層の毛細血管にはHLA-DR抗原とICAM-1(CD54)が弱く発現しているものもあったが、E-, P-selectin(CD62E, 62P)やMAdCAM-1はほとんど発現されていなかった。

UC, CDの活動性炎症を有する粘膜ではともにリンパ球とCD68+陽性マクロファージが著増し、好中球と好酸球、IgG形質細胞も著しく増加し、IL-8産生細胞も多数観察された。UCでは後者の増加がより顕著であった。ともに固有層には小～細静脈様小血管が増加し、HLA-DR抗原やICAM-1の発現が増強し、E-, P-selectin, MAdCAM-1も陽性となっており、好中球やリンパ球の接着像や固有層への遊出像が観察された。しかしUCの潰瘍底ではMAdCAM-1の発現は減弱していた。

2. 潰瘍性大腸炎大腸粘膜におけるB細胞の分化増殖とクローン病粘膜におけるT細胞増殖反応

UC, CD粘膜ではB細胞の増殖が観察され、殊にUCに著しく、Ki67標識率はUC潰瘍底で41.8%、炎症粘膜では18.3%にも及んだ。しかしCDでは3.1%で、健常粘膜では標識されなかった。さらにUC病変部ではCD19+20-の未熟なB細胞が胚中心を形成することなくびまん性に多数出現していた。一方、CDの肉芽腫は昨

年度報告したようにco-stimulatory molecule(CD80,86)を発現する活性化されたマクロファージ系細胞によって構成されているが、それらにはINF- γ , IL-12の発現が観察され、IL-4の発現は確認されなかった。さらに肉芽腫周囲のCD4+T細胞は4.2%以上のKi67陽性率であった(大阪市立大グループとの共同研究)。

3. 炎症腸疾患大腸粘膜上皮細胞の障害

UCの大腸粘膜上皮は潰瘍を形成していない部分でも変性像がほとんど認められなくとも杯細胞の減少や粘液産生能の減弱が観察され、上皮細胞間に好中球が介在している部位ではさまざまな程度に変性像がみられた。しかしCD非潰瘍部では、形態的には健常部と比較して著変はなかった。さらに上皮細胞機能面では、健常およびCD非潰瘍部粘膜におけるKi67標識は主として腺底部を中心に観察されるが、UCでは腺管全長にわたって散在して標識されていた。また11 β -HSD2は健常粘膜では恒常的に発現しており、CD非潰瘍粘膜ではそれと著変なく、UCでは著明に減弱していた。

D. 考察

炎症性腸疾患を代表するUCとCDでは、持続する高度な活動性炎症免疫反応とそれによって起因する腸管組織の構築変化を特徴としているが、活動性炎症による粘膜の形態変化と機能障害に共通点が多く、その結果粘膜バリアの破綻と腸内抗原の過剰な侵入がうながされる。しかし、その際誘導される抗原特異的な免疫応答と、組織構築の改変には、両疾患で相違する点が少ない。

UC, CD粘膜ともに、活動性の炎症巣にはE-, P-selectin, ICAM-1およびMAdCAM-1等の細胞接着分子を発現した血管の増生が認められ、IL-8産生単核球の増加と強い好中球浸潤、好酸球や単球-マクロファージ系細胞および粘膜指向性のリンパ球が著増している。それぞれ疾患やその病期による相違はあるがこれらは慢性活動性炎症を特徴とする両疾患の共通した病理像を反映していると考えられる。すなわち、病因が著しく相違しているにもかかわらず、UC,CDとも好中球を除去することにより急性期の活動性炎症を終焉させることができ、非特異的な免疫抑制療によって病像を改善できることは炎症免疫の共通部分からも説明可能である。

しかし、UCの潰瘍底ではMAdCAM-1の発現は減弱しCDの潰瘍底と相違していて、両者の潰瘍形成機序の相違が示唆された。また、その部分に形成されている肉芽腫やリンパ管内のマクロファージにはco-stimulatory moleculeとともにINF- γ , IL-12の発現がみられ、その周囲のCD4+T細胞には高い増殖能が観察された。そのことから、CDの全層性の潰瘍性病変や癒痕を伴う炎症巣では、マクロファージによる抗原提示とTh1リンパ球の増殖反応があり、それが病変を進行、持続させることになっていると考えられる。一方、UCではびまん性に胚中心形成を認めないCD19+20-の未熟B細胞の増生が観察され、UCがmucosal B cell lesionと呼ばれるゆえんである。UCにはIgG型の非粘膜系の抗体産生と、それによる補体を介した上皮細胞傷害も報告されており、こうした粘膜内で制御されない異常なB細胞増殖とのかかわりが示唆される。

UCでは潰瘍やびらんが形成されていない部位でも、上皮細胞の機能異常と不規則な増殖や細胞死が存在することの一端が今回明らかにされたが、こうした部位では腺窩膿瘍や上皮間好中球浸潤も観察され、また上皮細胞にアポトーシスが不規則に誘導され、しばしばp53の発

現増強が観察されている。すなわちUCには上皮細胞をターゲットとした炎症免疫反応とその傷(障)害、癌化のリスクがCDよりより顕著に表現されているといえる。

E. 結 論

UC, CDとも活動性病変では、慢性活動性炎症と、それによる粘膜障害が共通した病態であるが、それに引き続く炎症免疫反応カスケードのところで相違していた。それ故、その治療法のコンセプトとしては、活動性炎症の終焉を目的とした好中球の抑制が共通して急性活動期での初期治療には有効であることが考えられ、それに引き続き、UC, CDそれぞれに特異的な免疫異常の改善を目的とした免疫療法のプロトコール作成が必要であることが明らかとなった。

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：潰瘍性大腸炎（以下UC）に対する白血球除去・吸着療法（以下LCAP）を、対照に sham カラムを用いて、多施設共同二重盲検試験で客観的に有効性・安全性・有用性を比較検討した。UC25 例が登録され6例がプロトコール違反で脱落、最終的に true 群 10 例、Sham 群 9 例で群間比較した。有効率は、true 群 10 例中 8 例 80%、sham 群 9 例中 3 例 33% で、true 群に高い有効率が得られた ($p < 0.05$)。有害事象は治療後の発熱 1 例 (sham 群)、抗凝固剤による蕁麻疹 1 例 (sham 群)、MRSA 感染 1 例 (true 群) で、残りの 2 例はIVHのカテーテル熱 (sham) と右尿管結石による腹痛 (sham) であった。以上、LCAPが従来のUC治療に比し、高い有効性を有することが客観的に明らかにされた。難治性クローン病（以下CD）に対して、LCAPの有用性を多施設共同臨床試験で検討した。CD は 17 例登録され、全例に 5 回以上の LCAP 治療を完遂できた。17 例の効果は、著効 1、有効 5、不変 7、悪化 4 で有効 6 例、有効率 35% であった。治療経過中に発し経過観察で自然消褪した悪心・嘔吐、発熱、腹痛、腰痛が 3 例に認められたが、安全 14 例、ほぼ安全 3 例で LCAP の安全性は示唆された。有効性評価項目中 IOIBD score、赤沈、CRP と CDAI には、著明改善が約 20% にみられたが、大腸内視鏡所見と病理組織所見には著明改善はなかった。大腸内視鏡所見と組織像の改善は、臨床所見の改善より遅滞するか、改善し難いものと推測された。今回の多施設共同試験で、LCAP が CD にも有用であることを示唆された。

共同研究者

朝倉 均¹⁾、飯塚 文瑛²⁾、金城 福則³⁾、
 櫻井 俊弘⁴⁾、里見 匡迪、福田 能啓、
 澤田 康史、近野 真嗣、大西 国夫、
 山本 憲康⁵⁾、高添 正和⁶⁾、戸澤 辰雄⁷⁾、
 名川 弘一⁸⁾、西上 隆之⁹⁾、馬場 忠雄¹⁰⁾、
 日比 紀文¹¹⁾、樋渡 信夫¹²⁾、福島 恒男¹³⁾、
 藤原 研司¹⁴⁾、牧山 和也¹⁵⁾、松本 誉之¹⁶⁾、
 棟方 昭博¹⁷⁾、北洞 哲治¹⁸⁾、鈴木 康夫¹⁹⁾、
 楠神 和男²⁰⁾、高後 裕²¹⁾

所属 新潟大学医学部 第三内科¹⁾、
 東京女子医科大学 消化器内科²⁾、
 琉球大学医学部 第一内科³⁾、
 福岡大学筑紫病院 消化器科⁴⁾、
 兵庫医科大学 第四内科⁵⁾、
 社会保険中央総合病院 内科⁶⁾、
 兵庫医科大学 臨床病理部⁷⁾、
 東京大学大学院医学系研究科 腫瘍外科⁸⁾、
 兵庫医科大学 第二病理⁹⁾、
 滋賀医科大学 第二内科¹⁰⁾、
 慶應義塾大学医学部 内科¹¹⁾、
 仙台赤十字病院 大腸疾患センター¹²⁾、
 横浜市立市民病院 副院長¹³⁾、

埼玉医科大学 第三内科¹⁴⁾、
 長崎大学医学部 光学医療診療部¹⁵⁾、
 大阪市立大学院 消化器器管制御内科学¹⁶⁾、
 弘前大学医学部 第一内科¹⁷⁾、
 国立大蔵病院 臨床研究部¹⁸⁾、
 千葉大学医学部 第二内科¹⁹⁾、
 名古屋大学医学部 第一内科²⁰⁾、
 旭川医科大学 第三内科²¹⁾

A. 研究目的

若年者に多く発症し再発・緩解を繰り返す原因不明の難治性炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎（以下UC）に対する白血球除去・吸着療法（以下LCAP）の有効性と安全性を、客観的に評価することを目的とした。また、完全静脈栄養療法と経管経腸成分栄養療法が無効のクローン病（以下CD）に対するLCAPの効果、多施設共同で臨床試験し、CDの新しい治療法としての有用性を検討した。

B. 研究方法

1. UC に対する LCAP の有効性と安全性の検討。
 - a. 試験内容：LCAP の有効性と安全性を客観的に評価するために、白血球を吸着除去するカラムを使用

する群（以下 true 群）と白血球除去膜を内蔵しないカラムを装着して治療する群（以下 sham 群）に患者を分けて、二重盲検試験で群間比較した。主任研究者がコントローラーとして重症または難治性中等症 UC 患者を無作為に割り付け、多施設共同二重盲検試験で LCAP の有効性・有害事象を検討した。主治医とは別に LCAP 担当医師を設け、主治医にカラムの情報が漏れないように十分注意して、二重盲検試験を徹底するよう配慮した。

b. 研究組織：全国 13 大学病院と 2 総合病院で、今回の臨床研究に対して倫理委員会の認可を得た。これらの施設は、平成 7 年以来厚生省特定疾患「難治性炎症性腸管障害」調査研究班のプロジェクト研究「白血球除去療法」に参加しており、LCAP の治療手技には十分習熟していた。また本研究用の機器、旭メディカル社製プラソート 2500 もすでに配備されていた。したがって、主任研究者から登録例毎順序に、白血球系細胞吸着・除去セット（true カラムまたは sham カラムと還流用回路）を届けるにとどまった。

c. 対象患者：活動期 UC 重症例と 1 日 6 行以上の下痢を有する難治性中等症例を対象とした。ただし過去に白血球系細胞除去療法を経験した症例は除外した。目標は UC 患者 80 例としたが、sham カラムを用いることで各施設の倫理委員会の認可が遅れ、さらに患者の同意と主治医の協力が得られず、適切な患者の登録が難行した。努力目標に 3 年間の登録期間おいたが、平成 12 年 4 月からは顆粒球除去療法が、UC に対する細胞成分除去療法として健康保険診療に認可されたため、本研究に同意する患者はほとんど皆無になった。かかる事情で目標数に到達しないまま研究終了時期になったので、平成 13 年 1 月 16 日開催の平成 12 年度第 2 回総会で症例を固定し、開封評価した。

d. 治療方法：UC 患者は、全例が絶食・完全静脈栄養療法をうけており、1 日 30～60mg のステロイド強力静脈療法をうけているか、初回発作型でステロイド未投薬例である。LCAP 開始時はステロイドの投薬量を変えないようにし、ステロイド未投薬例には、LCAP 開始とともに、通常の 30～40mg の 2/3 以上のステロイド投与を開始した。血便が消失し、内視鏡的に改善を確認したら、食事を開始しステロイドを漸次減量した。

LCAP は原則として週 1 回（重症例では 1 週目のみ 2 回まで、流速毎分 50ml で 60 分間、抗凝固化した 3 の全血を体外還流し、白血球系細胞を吸着除去した。5 週を 1 クールとし 2 クールまで行うものとした。開始後 3 週目（3 回目開始前）、6 週目（5 回終了後）と 10 回終了後に大腸内視鏡検査を行った。

e. 有効性判定：前記大腸内視鏡検査時に判定した。血便が消失し、6 週目に大腸内視鏡所見上で緩解となった場合は著効とした。臨床症状が明らかに改善し、大腸内視鏡所見上でも明らかに改善したものは、10 回施行後に緩解に至らなくても有効と判定した。

f. 倫理面への配慮：患者への LCAP 治療の説明文章は、GCP 基準にのっとり簡単に分かりやすいものとし、主治医または LCAP 担当医師から、できるだけ詳しく説明して文書で同意を得た。ステロイド投与がない状態で発症した重症例を、ステロイド投与

なしで sham 群に割り付けるのは、無治療になるので人道上問題と考え、前述のごとく通常量の 2/3 以上のステロイド剤を投与して、今回の研究を行った。

2. CD に対する LCAP の有効性と安全性の検討。

a. 試験内容：CD の場合は LCAP の有効性と安全性を、sham 群を設けずに多施設共同臨床試験で、パイロット研究として検討した。

b. 研究組織：全国 14 大学病院と 2 総合病院で、今回の CD 臨床研究に対して倫理委員会の許可を得た。いずれの施設も LCAP に習熟しており、主任研究者から LCAP 用セットを届けるだけでよかった。

c. 対象患者：治療前 2 週間以上、完全静脈栄養または経管経腸成分栄養療法を行っても、CDAI が 200 以下にならない CD 患者を対象とした。患者は狭窄の軽い大腸型または小腸・大腸型、すなわち大腸に病変を有する患者に限定した。CD の目標症例を 40 例としたが、UC と同時に倫理委員会に認可を求めたために、各施設の倫理委員会の認可が大幅に遅れ、多くの施設で平成 11 年後半から 12 年に認可された。したがって、UC の項で述べたように患者の同意が容易に得られず、登録症例は目標数に到達しないまま研究終了時期を迎えた。平成 13 年 1 月 16 日開催の平成 12 年度第 2 回総会で、CD に対する効果を評価した。

d. 治療方法：CD の治療プロトコールは、本研究班が UC に対して行った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を踏襲した。いずれの施設も平成 7 年から平成 9 年度までに行った厚生省特定疾患「難治性炎症性腸管障害」調査研究班のプロジェクト研究「白血球除去療法」に参加している。したがって LCAP の治療手技に十分習熟しており、患者に対する危険は全くないと考えた。絶食・完全静脈栄養療法をうけていた CD 患者は、臨床症状の改善とともに経管経腸成分栄養療法に移行した。

e. 有効性判定：CDAI と IOIBD の改善、炎症指標（CRP と赤沈値）の改善、大腸内視鏡検査所見と病理組織像の改善を指標に総合的に判定した。判定の時期は UC の判定時期と同様に行い、各項目毎に最終判定時期（10 回終了後）のもので効果を表現した。

f. 倫理面への配慮：前述のごとく、研究に先立って各施設の倫理委員会の許可を得てから研究を始めた。患者への説明文書は GCP にのっとり簡単に分かりやすいものにし、主治医からできるだけ詳しく説明して文書で同意を得た。

C. 研究結果

1. UC に対する LCAP の有効性・安全性・有用性

a. 対象症例と脱落症例：最終的に 25 例の UC 患者が登録された。症例固定時に 6 例が脱落例になった。症例③は LCAP 治療直前に排便回数が 1 日 6 行から 3 行に改善していたため、症例⑦も LCAP 治療直前に排便回数が 1 日 6 行から 2 行に改善していたために脱落とした。症例⑧は LCAP 治療開始時に、顕血便がみられなくなったので、重症度が不適切として脱落例とした。ステロイド使用に関して、プロトコールでは「すでにステロイドを前使用している症例では、LCAP 治療開始前に 2 週間以上投与しても、臨床上改善が得られない場合に登録する。ステロイド未使用の症例では、LCAP 治療開始と同時にステ

ロイドを投与開始する」と規定してある。症例⑬はステロイド開始がLCAP治療開始3日前でプロトコル違反、症例24はステロイド未使用の患者であるが、LCAP治療をステロイド未使用のままで行したので、プロトコル違反で脱落とした。また、症例⑭は治療開始前9日前から、免疫抑制剤を使用し始めたので脱落と判定した。よって最終評価は19例で行われた。

- b. 最終評価：true群10例（13例中脱落3例）、sham群9例（12例中脱落3例）で最終評価した。true群10例中、著効2例、有効6例、不変2例、悪化0例で、8例が有効例で、有効率80%であった。sham群9例中、著効1例、有効2例、不変3例、悪化3例で、有効例3例、有効率33%にとどまった。true群で有意に有効率は高かった（ $p < 0.05$ ）。

有害事象は治療後の発熱1例（sham群）、抗凝固剤による蕁麻疹1例（sham群）、MRSA感染発症1例（true群）で、残りの2例はIVHのカテーテル熱（sham群）と右尿管結石による腹痛（sham群）であった。

2. CDに対するLCAPの有効性・安全性・有用性

- a. 対象症例と脱落症例：CDは18例の登録申し込みがあったが、1例LCAP治療開始前に登録を拒否したため、最終的に17例が評価対象となった。除外例は1例もなく、17例でLCAP治療を完遂した。
- b. 最終評価：17例中、著効1例、有効5例、不変7例、悪化4例で、有効例は6例あり、有効率は35%であった。有効性の評価のうち、IOIBD score、赤沈・CRP値、CDAIに著明改善が約20%みとめられたが、大腸内視鏡所見と病理組織像には著明改善は得られなかった。臨床症状に比べて、大腸内視鏡所見と病理組織像の改善は遅滞するか、または改善し難いものと推測された。

治療経過中に発し経過観察で自然消褪した悪心・嘔吐、発熱、腹痛、腰痛が3例に認められたが、安

全14例、ほぼ安全3例で、重要な有害事象は1例もなかった。

D. 考察

平成10年から、UCに対するLCAPの有効性・安全性・有用性を客観的に評価するためshamカラムを対照にした多施設共同無作為割り付け二重盲検試験を実施した。shamカラムを用いるために、全国各施設での倫理委員会の認可が1年以上かかり、平成12年4月からは顆粒球除去療法が、UCに対する細胞成分除去療法として健康保険診療に認可されたため、本研究参加に同意する患者はほとんど皆無の状態になった。したがって登録患者と研究実施施設が少なく、登録UC例は25症例、評価対象例は19症例に過ぎなかった。しかし、この少ないUC症例でもLCAPには有意に高い有効性、有用性が得られ、かつ安全であることが示された。

CDに対するLCAPの有効性は、パイロット的に多施設共同臨床試験で行われた。今回の研究では、従来の完全静脈栄養または経管経腸成分栄養療法を2週間以上行っても、CDAIが200以下にならないCD患者でも、LCAPが有効な症例が35%存在することが明らかになった。

E. 結論

今回の多施設共同二重盲検臨床試験で、LCAPは有意に高い有効性をもつUC治療法であることが、客観的に証明された。またCDの多施設共同臨床試験で、従来の完全静脈栄養または経管経腸成分栄養療法が無効なCD患者でも、LCAPを併用することで約35%の症例に有用な治療効果が得られることが明らかになった。UCとCDの患者は、若年に発症し再燃・緩解を繰り返すので、社会生活のQOLは著しく疎害されている。患者血液から活性化された有害な白血球を吸着除去することで、早期に患者の症状が改善し、結果的に患者が社会生活を、良好なQOLをもって送れようになることを期待している。

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

潰瘍性大腸炎に対する白血球除去療法の効果

分担研究者 高添 正和 社会保険中央総合病院 内科 部長

研究要旨：潰瘍性大腸炎（以下UC）でステロイド（ST）治療に難渋する症例や減量目的にて白血球除去療法（以下LAP）を施行し、その成績につき報告する。対象：直腸炎型を除くUC30例（年齢14-62歳（平均27.4歳）、男16、女14）に対し、LAPを1回/週行い5週間後に効果を判定する（集中治療）。有効例に1回/月の維持療法を施行した。判定は臨床症状の改善度（下痢回数・下血・発熱・腹痛）、ST減量に伴う再燃性、大腸内視鏡の改善度で見た。結果：I全体での奏効率は、有効例（17）とやや有効例（4）で70%（21/30）。II UCの活動性に対する効果は、緩解期86%（6/7）、中等症78%（7/9）、活動期57%（8/14）。III副作用は頭痛20%（6/30）、嘔気10%（3/30）、発熱3%（1/30）と重篤なものはなかった。ST依存性のUCに対し、LCAPは安全で有効な治療法であり、緩解維持療法としても今後期待される治療法と思われた。

共同研究者

近藤 健司、一森 俊樹、田中 寅雄、
須崎 愛、浜田 勉、泉 嗣彦¹⁾、
篠田 俊雄、吉本 宏、鈴木 快文、
中井 歩、須田 博文、樋口 直仁、
市川 公夫、山家 敏彦²⁾

所属 社会保険中央総合病院 内科¹⁾、
同 透析センター²⁾

A. 研究目的

炎症性腸疾患、なかんずく潰瘍性大腸炎に対する治療は薬物療法であるが、寛解と再燃を繰り返す経過中に薬物療法に対する依存性や離脱困難例が出現し、長期医療管理の上で薬物療法の副作用のみが前面に出て来ることが稀ならずある。白血球除去・吸着療法は非薬物療法として副作用の出現頻度は少なく、よしんば出現しても施行中の短期間のみ限られており、長期的な副作用の出現の可能性が極めて低いことが明らかにされており、今回当院においてステロイド治療に難渋する潰瘍性大腸炎に対する治療効果を報告する。

当院で、1994/10月より、潰瘍性大腸炎（以下UC）でステロイド（ST）治療に難渋する症例や減量目的にて白血球除去療法（以下LAP）を施行し、その成績につき報告する。

B. 研究方法

直腸炎型を除くUC30例（年齢14-62歳（平均27.4

歳）、男16、女14）に対し、LAPを1回/週行い5週間後に効果を判定する（集中治療）。有効例に1回/月の維持療法を施行した。集中治療としてセルソーバ（LCAP）8例、アダカラム（GCAP）10例、遠心分離（CF-LA）12例行ない、LAP療法終了後の臨床症状の改善度（下痢回数・下血・発熱・腹痛）、ST減量に伴う再燃性、大腸内視鏡の改善度のいずれかに改善を認める場合に有効とし、改善の程度が軽い場合はやや有効とした。

C. 研究結果

I：集中療法において全体での奏効率は、有効例（17）とやや有効例（4）で70%（21/30）であった。各治療法別にみると、CF-LA66%（8/12）、LCAP75%（6/8）、GCAP70%（7/10）となった。

II：UCの活動性に対する効果は、緩解期86%（6/7）、中等症78%（7/9）、活動期57%（8/14）となった。

III：ST（プレドニン）総投与量は、有効例7300mg、無効例8600mgと差を認めなかった。集中療法LAP開始までの初発年齢の期間も有効例4.0年、無効例3.6年と差を認めなかった。

IV：副作用は頭痛20%（6/30）、嘔気10%（3/30）、発熱3%（1/30）と重篤なものはなかった。

V：7例の維持療法（LCAP2例、CF-LA5例）は6ヶ月～2.5年までの観察期間中3例再燃を認め、ST治療を必要とした。

D. 結語

ST依存性のUCに対し、LCAPは安全で有効な治療法であり、緩解維持療法としても今後期待される治療法と思われた。

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

白血球除去・吸着療法を試みた Crohn 病の 1 例

分担研究者 金城 福則 琉球大学 第一内科 助教授

共同研究者

久貝 雪野, 豊見山 良作, 洲鎌 理知子,
砂川 隆, 平田 哲生, 座覇 修,
外間 昭, 斎藤 厚¹⁾, 小川 由英²⁾

所属 琉球大学 第一内科¹⁾,
琉球大学 血液浄化療法部²⁾

A. 研究目的

白血球除去・吸着療法（以下 LCAP）は、平成 6 年度の厚生省炎症性腸疾患腸管障害調査研究班の多施設共同研究により、中等症・重症・劇症の潰瘍性大腸炎患者に対し、改善率 69.8% と、プレドニゾロン投与群の改善率 37.5% に比し有意に高い改善率が得られている。しかし、Crohn 病（以下 CD）に対しての LCAP の有用性は少数の報告のみであり、検討が必要と思われる。今回、我々は「炎症性腸疾患に対する白血球除去・吸着療法の効果に対する多施設共同研究」に参加し、小腸大腸型 Crohn 病の患者に LCAP を施行し有効と考えられた症例を経験した。

B. 研究方法

本研究の対象患者の選択基準は、大腸型または主病変が大腸にある小腸大腸型 Crohn 病患者で、1 週間の完全静脈栄養療法（以下 IVH）でも下痢または血便が消失しない Crohn's Disease Activity Index: CDAI が 200 以上の活動期の患者、また、可能であった場合には登録前 4 週間以内に小腸造影検査、大腸造影検査または大腸内視鏡検査でアフタ様病変・粘膜の多発びらん・潰瘍、あるいは敷石様所見・縦走潰瘍等の Crohn 病に特徴的な活動性病変が確認されている 13 歳以上 75 歳未満の患者を対象とすることとなっている。なお、治療研究開始前 1 ヶ月以内に CD の治療を目的とした栄養療法以外の治療を行った患者や、重篤な心血管系疾患に罹患した患者、感染症に罹患し治療中の患者、低血圧患者、過去に LCAP を受けたことがある患者などは除外するとされている。以上の選択基準を満たし、本研究の主旨ならびに内容、副作用等について十分な説明を行い、同意を得られたため、LCAP を開始した。症例は 18 歳の男性であり、小腸大腸型 Crohn 病と診断されていた。主訴は腹痛、軟便、微熱であった。現病歴では、平成 7 年 6 月に前記症状を認め、7 月に近医を受診し、精査により小腸大腸型 Crohn

病と診断された。以後、入退院を繰り返していたが、本人が新聞にて白血球除去療法を知り、本治療を希望したために当科紹介入院となった。理学的所見では腸音軽度亢進、腹部は平坦・軟、圧痛・反跳痛なく、腫瘤も触知しなかった。肛門部に skin tag を認めたが、痔瘻等は認めなかった。入院時検査所見では、白血球数は正常であり、貧血を認めず、血小板数と CRP の上昇を認めた。入院時の CDAI は 310 点、IOIBD assessment score は 5 点であり、2 週間の IVH を施行後もそれぞれ 376 点、6 点と活動期のままであったため、LCAP を開始した。5 回目までは週に 1 回、その後は 2 週おきで計 7 回施行した。2 回目を終了したあたりから排便回数が減少し、腹痛も軽減しはじめた。治験期間中、IVH のカテーテル感染による発熱、炎症反応の上昇を認めたが、カテーテル抜去にて速やかに改善した。また、治験期間に貧血の出現も認めたが自然軽快した。4 回目終了時より成分栄養療法（以下 ED 療法）を開始したが、症状の増悪もなく、IVH を徐々に減量し ED 療法のみとした。最終的には、排便回数も 1~2 回となり、認められていたごく軽度の腹痛と圧痛などの症状もほぼ消失し、退院となった。治験期間中、病状の変化を患者本人に記録してもらった。便の回数の記載ならびに腹痛の程度や痛みの持続時間、便の性状については、程度により点数化を行った。腹痛の程度と持続時間、排便回数、便の性状、下痢の回数ともに改善を認めた。血液検査所見では、白血球数は入院時より正常だったためあまり変化はなかったが、ESR、CRP は高値であったのがほぼ正常化した。また、Hb が入院時 12.3mg/dl であったのが LCAP 施行 2 回目より 10mg/dl 前後まで低下したが、その後自然軽快した。大腸内視鏡検査所見では、直腸 S 状結腸移行部附近を治療前後で比較すると、LCAP 開始前に認められた縦走潰瘍が LCAP 終了時にはほぼ癒着化していた。CDAI と IOIBD assessment score は、LCAP 直前には CDAI が 376 点、IOIBD assessment score が 6 点であったが、最終的にはそれぞれ 134 点、2 点と改善した。

C. 研究結果と考察

小腸大腸型 Crohn 病患者に対し、完全静脈栄養療法下にて白血球除去・吸着療法を週に 1 回の割合で 5 回、その後は 2 週に 1 回の割合で 2 回、計 7 回施行した。腹痛、排便回数、便の性状などの臨床症状はほぼ消失または正常化し、血液検査所見では炎症所見の改善をみた。また、治験期間中に貧血を認めたが自然軽快した。これは体外循環に伴う貧血であると思われた。活動性の評価では、

CDAIは正常化したが、ごく軽度の腹痛と圧痛を認めたため IOIBD assessment score は2点であった。大腸内視鏡検査所見においては、直腸S状結腸移行部に認められた縦走潰瘍がほぼ癒痕化しており、改善が認められた。以上のことから、小腸大腸型Crohn病患者に対して、白血球除去・吸着療法は有効な治療法であると思われた。しかし、今回はIVHやED療法との併用であったため、単独治療でLCAPを施行した場合と、IVHあるいはED療法を施行した場合との有効率の違いに関しては、今後検討する必要があると思われた。

D. 結 論

白血球除去・吸着療法は小腸大腸型Crohn病患者に対しても有効な治療法の一つになり、QOLを上げる可能性をもっている。

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

クローン病上部消化管病変の外科治療—特に胃十二指腸病変について

分担研究者 亀岡 信悟 東京女子医科大学 第二外科 教授

研究要旨：クローン病進行胃十二指腸病変を有する患者は、Quality of lifeが著しく障害される。自験例に加え文献的考察を行い、外科治療法について考察した。対象は、胃十二指腸病変のために手術適応となった症例ある。2000年12月までの本邦報告例は自験例5例を含めて32例であった。手術適応は狭窄が30例(93.8%)と大部分を占め、出血および穿孔は各々1例のみであった。病変の発生部位をみると、十二指腸球部を中心とする部位に発生しており、比較的狭窄範囲が短い症例が多かった。術式では胃切除15例(46.9%)、胃空腸吻合が10例(31.3%)、狭窄形成術(strictureplasty)4例(12.5%)であった。胃十二指腸病変に対する狭窄形成術は、生理的で術後ダンピング症状は認めなかった。狭窄範囲が短い病変では考慮すべき術式であると考えられる。

共同研究者

板橋 道朗, 小川 真平, 作田 奈美¹⁾,
 飯塚 文瑛²⁾

所属 東京女子医科大学 第二外科¹⁾,
 同 消化器内科²⁾

(46.9%)に施行されていた。胃切除以外の術式では、胃空腸吻合が10例(31.3%)で最も多く、そのうち6例に迷走神経切離術が施行されていた。当科では、狭窄の範囲が比較的狭い症例においては、積極的に狭窄形成術(strictureplasty)を施行している。本邦における文献的検索では、他に1例のみ狭窄形成術を施行した症例が認められるのみで、全体で4例であった。胃十二指腸病変に対する狭窄形成術は、生理的な食物の通過が確保され、術後合併症としてのダンピング症状は認めなかった。

A. 研究目的

クローン病の上部消化管病変のために手術適応となることは、比較的稀である。しかしながら、進行胃十二指腸病変を有する患者では著しくQuality of lifeが障害される。至適外科治療法について考察した。

B. 研究方法

胃十二指腸病変のために手術適応となった症例を対象とし、他部位の腸管病変のために胃、十二指腸に手術操作を行った症例は対象外とした。自験例に加え文献的考察を行った。

C. 研究結果

2000年12月までに報告されたクローン病本邦報告例は自験例5例を含めて32例であった。年齢は、平均26.6歳(16-56)で男女比は29:4であった。手術適応は狭窄が30例(93.8%)と大部分を占め、出血および穿孔は各々1例のみであった。病変の発生部位をみると、胃幽門部および十二指腸球部が最も多く12例(37.5%)、次いで十二指腸球部のみ7例(21.9%)、胃幽門部および十二指腸球部、第2部が6例(18.8%)、十二指腸球部および第2部が4例(12.5%)の順で、手術適応となるクローン病胃十二指腸病変は、十二指腸球部を中心とする部位に発生しており、比較的狭窄範囲が短い症例が多かった。術式について検討すると胃切除が最も多く、15例

D. 考察

自験例を含めた本邦報告例32例の胃十二指腸病変の外科治療法について検討すると、その手術適応は狭窄が大部分を占めていた。狭窄症状については待機的に対応可能な病変であるので、H2ブロッカー投与や内視鏡的バルーン拡張術などの保存的治療を施行しても症状が改善されない症例について施行すべきである。また、病変部位と狭窄の長さについてみると、手術適応となるクローン病胃十二指腸病変は、十二指腸球部を中心とする部位に発生しており、比較的狭窄範囲が短い症例が多かった。術式について検討すると胃切除が最も多く、15例(46.9%)に施行されていた。胃切除以外の術式では、胃空腸吻合が10例(31.3%)で最も多かった。しかし、胃切除は侵襲が大きく、胃空腸吻合は非生理的でいずれも術後ダンピング症状の可能性がある。当科では積極的に狭窄形成術(strictureplasty)を施行している。比較的狭窄範囲が短い症例が多く、生理的で術後ダンピング症状もないことからクローン病胃十二指腸病変に対する手術法として有用である。

E. 結論

胃十二指腸病変に対する狭窄形成術は、生理的で術後ダンピング症状は認めなかった。狭窄範囲が短い病変では考慮すべき術式であると考えられる。

潰瘍性大腸炎手術例からみたステロイド使用時の手術適応について

分担研究者 畠山 勝義 新潟大学医学部 第一外科 教授

研究要旨：[目的] 教室の潰瘍性大腸炎手術例からステロイド使用時の手術適応を検討する。[対象] 1984年8月から2000年4月までに教室で大腸全摘、遠位直腸粘膜抜去、W型回腸囊肛門吻合術の終了した88例で、初回手術時平均年齢は33.9歳、男女比は43:45、初発から手術までの期間は平均60.1ヶ月であった。[結果] 術前ステロイドによる副作用は、全体の75%に認められた。重症副作用は17%に認められた。投与期間が12ヶ月を越えると何らかのステロイド副作用が出現し、5年以上になってくると半数が重症副作用を合併していた。プレドニゾロンに換算したステロイド投与量で総量が10,000mg以上例では通常の副作用だけでなく、重症副作用の発生頻度が高くなっていた。[結論] ステロイド投与量で総量が10,000mg以上例は重症副作用を起こしやすく手術適応と考えられた。

共同研究者

須田 武保, 飯合 恒夫, 岡本 春彦

所属 新潟大学医学部 第一外科

A. 研究目的

潰瘍性大腸炎（以下UC）の治療中に発生するステロイドホルモン（以下ステロイド）の副作用はしばしば手術適応となる。しかし使用したステロイドの量の値を手術適応としてどの程度に設定するかはいまだ未定であり、検討すべき課題である。本研究では、教室のUC手術例からステロイド副作用発生状況を検討し、ステロイド使用時の手術適応および具体的にステロイド量からの手術適応を決定することを目的とした。

B. 研究方法

対象は1984年8月から2000年4月までに教室でUCに対して大腸全摘、W型回腸囊肛門吻合術の終了した88例である。対象の初回手術時平均年齢は33.9歳、男女比は43:45、初発から手術までの期間は平均60.1ヶ月であった。病型では再燃緩解型72、急性劇症型5、初回発作型6、慢性持続型5であり、罹患範囲では全大腸炎型76、左側大腸炎型12、重症度では重症65、中等症23であった。この対象例でのステロイドによる副作用の発生状況とステロイド投与状況との関係を検討した。ステロイドの使用量はプレドニゾロンに換算して検討した。

C. 研究結果

教室での潰瘍性大腸炎手術例だけで見ると重症・軽症を合わせたステロイドの副作用は、88例中66例（75%）に認められた。このうち重症副作用は15例（17%）に

認められた。病型別、罹患範囲別、重症度別で副作用の発生状況に差はなかった。副作用の有無からプレドニゾロンに換算したステロイドの平均総投与量、平均投与期間、平均月単位投与量でみると、ステロイド副作用（-）群（5,762mg, 7.2ヶ月, 902mg）、ステロイド軽症副作用（+）群（16,718mg, 34ヶ月, 822mg）、ステロイド重症副作用（+）群（19,510mg, 56ヶ月, 509mg）であった。

ステロイドの総投与量と投与期間から副作用の発現状況をみた（図1）。投与期間12ヶ月を越えると何らかのステロイド副作用が出現していた。投与期間が5年以上になってくると半数が重症副作用を合併していた。重症副作用は、ステロイド投与期間8ヶ月、総投与量6,250mg（月平均781mg）から認められた。総投与量では10,000mgを越えると副作用が出現しやすくなり、重症副作用も認められるようになった。

図1 ステロイド総投与量と投与期間からみた副作用

