

ファージ小集簇がみられ、CDの前駆病変との関連が示唆された。それらのマクロファージには視床下部ホルモンのcorticotropin-releasing factor(CRF)の産生が我々によって証明されているが、IBSではCRFに対する感受性が高い。

#### 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くない。

UCではB細胞の分化増殖の制御異常が主体をなし、それによって過剰に産生される非粘膜免疫グロブリンであるIgGと活性化された補体、ならびに活動性炎症によって上皮細胞傷害が持続する。上皮細胞の再生とそれ

に伴った形態変化も観察される。

CDではマクロファージの活性とそれに誘導されたT細胞の活性化と増殖が主体となり、肉芽腫の形成や線維化や癒痕化が誘導され、CDに特異的な病理組織像が形成されるIBSも粘膜透過性亢進とマクロファージ反応異常が主要な病態であることが明らかとなったが、CD患者にもIBS様症状を呈することが知られている、IBSがCDの前駆病変としての認識が必要である。

#### E. 結 語

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と組織修復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。またUCやCDの前駆病変把握も今後の課題として残されている。

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

T細胞移入マウス大腸炎におけるケモカイン発現の検討

分担研究者 向田 直史 金沢大学 がん研究所 教授

研究要旨:炎症性腸疾患におけるケモカインの病態生理学的役割を解析することを目的に, CD4陽性CD45R強陽性細胞を重症複合性免疫不全症候群(SCID)マウスを移植して引き起こされる, マウス大腸炎モデルでのケモカインの動態を検討した. 腸炎を発症したマウスの大腸組織で, 単球走化因子(MCP-1)・RANTESを始めとする種々のケモカイン mRNA の発現が増強するとともに, T細胞・マクロファージの浸潤を認めた. 以上の結果から, 大腸炎組織において発現が増強した種々のケモカインが, T細胞・マクロファージの浸潤を引き起こすことで, 炎症性腸疾患の発症に関与している可能性が示唆された.

A. 研究目的

炎症性腸疾患ではT細胞・マクロファージの腸管組織への浸潤が認められ, これが病態の成立に深く関与していると考えられるが, その分子機構は明らかではない. ケモカインと呼ばれる一群の生理活性物質が白血球の組織への浸潤に関与していることが報告されている. マウス大腸炎モデルを用いて, 種々のケモカインの発現と細胞浸潤の検討を通して, 炎症性腸疾患におけるケモカインの病態生理学的な役割を検討した.

B. 研究方法

BALB/cマウス脾臓から得たCD4陽性CD45RB強陽性細胞 $5 \times 10^5$ を重症複合性免疫不全(SCID)マウスに静脈内投与した. 経時的に大腸組織を採取して, 大腸を肉眼的に観察後, 一部は組織学的検索に, 一部はtotal RNAの抽出に用いた. 抽出されたtotal RNAを用いて, 特異的なプライマーを用いて, 半定量的に種々のケモカインならびにケモカイン・レセプターの発現をreverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR)法にて検討した.

C. 研究結果

- 1) 細胞移入3週後より軽度の炎症細胞浸潤が認められ, 5から7週目では細胞浸潤は高度となり, 盃細胞の消失, 上皮の過形成, さらには潰瘍・肉芽腫の形成を認めた.
- 2) 細胞移入3週目からCD4陽性細胞の腸管への浸潤が認められるようになり, その後浸潤は高度となった.

F4/80陽性マクロファージもCD4陽性細胞と同様の動態を示していた.

- 3) 大腸組織より得られたtotal RNAを用いて, 種々のケモカインならびにケモカイン・レセプターの発現を検討したところ, MIP-2・IP-10・Mig・MCP-1・MIP-1 $\alpha$ ・MIP-1 $\beta$ ・RANTES・MDC・LRAC・SLCの発現が, 細胞移入3から5週目以降に増強するとともに, そのレセプターであるCXCR2・CXCR3・CCR1・CCR2・CCR4・CCR5・CCR6・CCR7の発現も増強していた. その一方で, ナイーブT細胞の腸管へのホーミングに関与すると想定されているTECKとそのレセプターであるCCR9の発現は炎症の進展に伴い, 減弱していた.

D. 考案

本モデルでは, CD4陽性T細胞ならびにF4/80陽性マクロファージが大腸炎の発症と並行して, 腸管内に浸潤してきた. さらに, これらの細胞浸潤と一致して, 種々のケモカインとそのレセプターの発現が増強していたことから, これらのケモカインが協調的に働いて, 腸管へのT細胞・マクロファージ浸潤を引き起こし, 炎症性腸疾患の成立に関与している可能性が示唆された.

E. 結論

大腸炎を発症した大腸組織では, CD4陽性T細胞・マクロファージの浸潤と一致して, 種々のケモカインならびにそのレセプターの発現が増強していた.

## Th1 特異的転写因子 T-bet のクローン病の病態への関与

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:クローン病(CD)腸粘膜ではTh1型免疫反応が惹起されていると考えられている。近年Th1細胞分化に関与する転写因子T-betがクローニングされた。T-betはTCR刺激によりup-regulationされ、IFN- $\gamma$ 産生を誘導する。T-bet発現後にIL-12が作用し、Th1細胞分化を促進する。またT-bet発現に伴い、IL-12受容体 $\beta$ 2鎖がup-regulationされ、IL-12に対する反応性が増強すると報告されている。CDにおけるT-betの病態形成への役割について検討した。NL、UC、CDにおけるT-bet mRNAの発現をRT-PCR法で検討した。PBMCを抗CD3/抗CD28抗体で刺激、培養上清中のIFN- $\gamma$ 濃度とT-bet発現について検討した。LPMCをIL-12およびIL-18で刺激し、培養上清中のIFN- $\gamma$ 濃度とT-bet発現の相関について検討した。LPMC培養上清中のIL-12濃度をELISAで測定した。IL-12受容体 $\beta$ 2鎖の発現をRT-PCR法で検討した。【結果】CD腸粘膜のT-bet mRNAはNLより発現が亢進していたが、PBMCでは差を認めなかった。PBMCは抗CD3/抗CD28抗体刺激なしではIL-12刺激下でもIFN- $\gamma$ 産生を認めなかったが、抗CD3/抗CD28抗体刺激によりT-betがup-regulationされた後にIFN- $\gamma$ が産生された。一方、CDのLPMCでは抗CD3/抗CD28抗体刺激なしでIFN- $\gamma$ 産生を認めた。またIL-12、IL-18刺激によるIFN- $\gamma$ 産生とT-betの発現に相関を認めた。CDにおいてIL-12の産生及びIL-12受容体 $\beta$ 2鎖の発現が亢進していた。【結語】CDの腸粘膜局所でのTh1細胞の誘導には、IL-12に加え、抗原刺激によるT-betの発現亢進が不可欠であることが示唆された。

### 共同研究者

松岡 克善, 井上 詠, 佐藤 俊朗, 岸 祐介,  
一松 収, 新井 潤, 高木 英恵, 緒方 晴彦,  
岩男 泰, 石井 裕正<sup>1)</sup>, 小金井 一隆,  
福島 恒男<sup>2)</sup>, 金井 隆典, 渡辺 守<sup>3)</sup>  
所属 慶應義塾大学医学部 内科<sup>1)</sup>,  
横浜市立市民病院 外科<sup>2)</sup>,  
東京医科歯科大学 消化代謝内科<sup>3)</sup>

### A. 研究目的

クローン病(CD)は原因不明の慢性肉芽腫性炎症性腸疾患である。CD腸粘膜ではTh1優位の免疫反応により炎症が惹起されていると考えられている<sup>1)</sup>。近年Th0細胞からinterferon(IFN)- $\gamma$ 産生性のTh1細胞への分化に関与する転写因子T-bet(T-box expressed in T cells)がクローニングされ、炎症性疾患における役割が注目されている<sup>2)</sup>。T-betはT cell receptor (TCR)からの刺激によりup-regulationされ、IFN- $\gamma$ 遺伝子のremodelingによって、IFN- $\gamma$ 産生を誘導し、Th1細胞への分化をコントロールする。T-betの発現後にinterleukin(IL)-12が作用することで、naive CD4+T細胞はIFN- $\gamma$ 産生性のTh1細胞へと分化する<sup>3)</sup>。またT-bet発現に伴い、IL-12受容体 $\beta$ 2鎖がup-regulationされ、IL-12に対する反応性が増強すると報告されている。本研究では、CDにおけるT-betの病態形成への役割について検討した。

### B. 研究方法

- 1) 正常(NL)、潰瘍性大腸炎(UC)、CDより腸粘膜リンパ球(LPMC)を分離、培養上清中のIFN- $\gamma$ 濃度をELISAで測定した。
- 2) T-bet mRNAの腸粘膜における発現をRT-PCR法を用いて調べた。
- 3) CD4+末梢血単核球(PBMC)におけるT-bet蛋白の発現をWestern blottingにて比較した。
- 4) PBMCを抗CD3/抗CD28抗体、IL-12、IL-18で刺激し、T-bet mRNA発現と培養上清中のIFN- $\gamma$ 濃度の変化をみた。
- 5) CDのLPMCを、抗CD3/抗CD28抗体を加えず、IL-12、IL-18で刺激し、IFN- $\gamma$ 濃度とT-bet発現の相関を検討した。
- 6) 腸粘膜におけるIL-12受容体 $\beta$ 2鎖の発現をRT-PCR法で検討した。
- 7) LPMCの無刺激培養上清中のIL-12濃度をELISA法にて測定した。  
検体の採取に際しては、倫理委員会の承認の上、患者より文書にて同意を得た。

### C. 研究結果

- 1) CDのLPMCではNL、UCと比較し、IFN- $\gamma$ 産生が亢進しており、Th1型の免疫反応が誘導されていた。
- 2) CD腸粘膜においてNLと比較し、T-bet mRNAの発現が亢進していた。
- 3) CD4+PBMCにおいてはNL、CDでT-betの発現に

差は認めなかった。

- 4) PBMCでは抗CD3/抗CD28抗体刺激なしでは、IL-12, IL-18を加えてもIFN- $\gamma$ 産生は低い。一方、抗CD3/抗CD28抗体刺激によってT-betをup-regulationさせた後に、IL-12, IL-18を加えると著明にIFN- $\gamma$ 産生が亢進した。
- 5) CDのLPMCではPBMCとは異なり、抗CD3/抗CD28抗体を加えずともIFN- $\gamma$ 産生が認められた。またIFN- $\gamma$ 産生とT-betの発現量に相関を認めた。
- 6) CD腸粘膜においてNLと比べ、IL-12受容体 $\alpha$ 鎖の発現が亢進していた。
- 7) CDのLPMCではNL, UCと比較し、有意にIL-12産生が亢進していた。

#### D. 考察

本研究では、CDの腸管局所におけるTh1型免疫反応の誘導機構におけるT-betの役割について検討した。従来よりCDのTh1型免疫反応の誘導にはIL-12やIL-18に代表されるPro-inflammatory cytokineの役割が重要視されてきた。しかし、PBMCにおいてはT-betのup-regulationなしにはIL-12やIL-18の刺激を加えてもIFN- $\gamma$ はほとんど産生されず、TCR刺激でT-betがup-regulationされた後にIFN- $\gamma$ が産生されるようになったことより、CDにおけるTh1細胞への分化にはT-betのup-regulationが必須であることが示された。CD腸粘膜においてT-betの発現が亢進していたが、PBMCではT-betの発現量に差は認めず、CDの腸管局所で抗原刺激に

よりT-betがup-regulationされていると考えられた。CDのLPMCはTCR刺激を加えなくてもIFN- $\gamma$ 産生を認め、腸管局所にmigrateしたPBMCが抗原刺激によりT-betをup-regulationし、IFN- $\gamma$ 産生性のTh1細胞に分化したと考えられた。またCDのLPMCではIL-12の産生が亢進しており、T-betをup-regulationした細胞にIL-12が作用することで、IFN- $\gamma$ 産生が高度に亢進すると考えられた。同時にCDではT-betのup-regulationに伴うIL-12受容体 $\alpha$ 鎖の発現亢進を認め、IL-12に対する反応性を亢進させていると考えられた。

#### E. 結論

CDの腸粘膜局所でのTh1細胞の誘導には、IL-12, IL-18に加え、抗原刺激によるT-betの発現亢進が不可欠であることが示唆された。

#### F. 参考文献

- 1) Levine AD, Fiocchi C. Immunology of inflammatory bowel disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2000; 16:306-309
- 2) Szabo SJ, Kim ST, et al. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 2000; 100:655-659
- 3) Mullen AC, High FA, et al. Role of T-bet in commitment of Th1 cells before IL-12-dependent selection. *Science* 2001; 292:1907-1910

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(2)

協力研究者 渡辺 守 東京医科歯科大学 医歯学総合大学院 消化・代謝内科学 教授

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<sup>high</sup>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ばかりではなく、すでに完成された腸炎への治療効果が示された。

共同研究者

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、優れた成績を取めている。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

- 1) クローン病マウスモデルの作製:6週令 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<sup>high</sup> (30% high) 細胞を FACS にて sorting した。
- 2) 得られた CD4+CD45RB<sup>high</sup> 細胞を BALB/c SCID マウス腹腔内に 4x10<sup>5</sup> 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。
- 3) 同様に、CD45RB<sup>high</sup> 細胞移入後、コントロール IgG または抗 OX40L 抗体を 250 μg/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。
- 4) さらに、治療効果判定のために、細胞移入 3 週間後、すなわち、下痢症状などの臨床症状が出現後より、コントロール IgG または抗 OX40L 抗体を 250 μg/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。

C. 研究結果

CD45RB<sup>high</sup> 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 週間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。さらに、細胞移入 3 週間後からの投与によっても、腸炎の治療効果を認めた。

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<sup>high</sup> 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。さらに、予防効果のみならず、治療効果も示され、今後、クローン病を中心とした炎症性腸疾患治療の新しい可能性を示唆した。

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。

## IBDにおけるNKT細胞の役割—特にステロイドとの関連

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：第4のリンパ球と考えられるNKT細胞が自己免疫の発病や病態に重要な役割を担っていると示唆されている。そこでUCとCD症例においてTh1サイトカインとNKT細胞について検討した。NKT細胞は2種類の表面マーカーを持っている。その一つはT cell markerのV $\alpha$ 24V $\beta$ 11とNK cell markerのCD3CD161で、前者はIL-4やIL-13を産生し免疫抑制の機能を担っており、後者は免疫活性を支配している。IBD症例のTh1サイトカインはCDおよびUCのいずれもが亢進していたがCDで顕著であった。NKT細胞で検討すると健常人に比較してT cell R NKT細胞とNKR NKT細胞のいずれも増加しておりその活性化細胞も増加していた。しかしNKR NKT/TCR NKT比で検討するとTCR NKT細胞が増加しているのに反し、TCR NKTパーフォリン細胞の低下が示唆された。またステロイドはTh1サイトカインを有効に抑制していたが、NKT細胞に対する抑制作用は認められなかった。

### 共同研究者

丸山 正二, 若杉 慎司, 助川 寧<sup>1)</sup>,  
工藤 正俊<sup>2)</sup>, 高添 正和<sup>3)</sup>

所属 近畿大学 腫瘍免疫等研究所<sup>1)</sup>,  
近畿大学医学部 消化器内科<sup>2)</sup>,  
社会保険中央総合病院 内科<sup>3)</sup>

### A. 研究目的

NKT細胞はT細胞, B細胞, NK細胞について第4のリンパ球として発見された。この細胞はT細胞受容体(V $\alpha$ 24V $\beta$ 11)とNK細胞受容体(CD3CD161)との特異的な受容体を持ち、Th1/Th2バランスを支配することで生体の免疫学的恒常性を維持していることが判明しつつあり、自己免疫疾患の発病や病態に重要な役割を演じていることが示唆されている。

最近、自己免疫疾患モデルマウスと考えられているNODマウス(I型糖尿病)でNKT細胞の関与が注目されている<sup>(1)(2)</sup>。

その機序としてTh2サイトカインのIL-4およびIL-10の産生能力の低下が示唆されており、NKT細胞のTCRを持つCD4-CD8-NKT細胞の減少が証明されている。

今回はUCとCDとにおいてNKT細胞がどのように関与しているか、またステロイドにコントロールされない免疫系である可能性が示唆されたので若干の文献的考察を加えて報告する。

### B. 研究方法

対象は、CD52例で活動期18例(ステロイド投与4例, 非投与14例), 非活動期34例(ステロイド投与0例, 非投与34例), およびUCは26例で活動期10例(ステロ

イド投与6例, 非投与4例), 非活動期16例(ステロイド投与6例, 非投与10例)である。

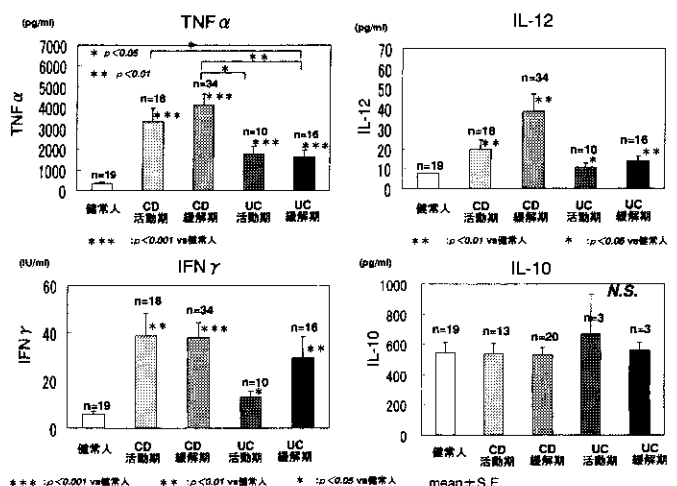
免疫学的測定は、各種サイトカイン(TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-12, IL-10)はELISA法で、NKT細胞はThree colorを用いてフローサイトメトリーで測定した。NKT細胞のT細胞受容体はV $\alpha$ 24V $\beta$ 11で測定しその活性レベルはperforin産生能で、同様にNK細胞受容体はCD3CD161で測定しその活性レベルはperforin産生能で検討した。

また、ステロイドに対するTh1サイトカインとNKT細胞の反応性についても検討した。

### C. 研究結果

(1) IBD症例におけるTh1とTh2サイトカインの相違 (図-1)

図1 IBDにおけるサイトカイン産生能の比較



CDとUC症例とにおいてTh1サイトカインのTNF $\alpha$ 、IFN $\gamma$ およびIL-12の産生能力を検討した。

TNF $\alpha$ の産生能力はCDの活動期および非活動期のいずれにおいても健常人に比較し有意に亢進していた(p<0.001)。またUCにおいても健常人と比較して有意に高値を示した(p<0.01またはp<0.05)。

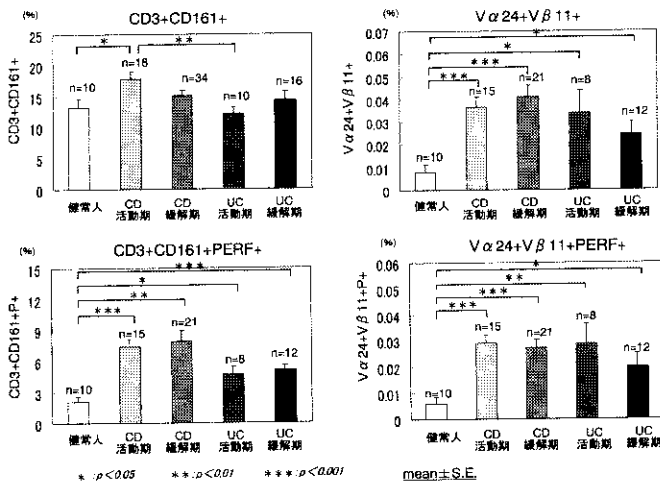
IFN $\gamma$ 産生能力においては、健常人に比較してCD群で最も高く(p<0.01またはp<0.001)、UC群でも有意に高かった(p<0.05またはp<0.01)。

IL-12に関してもCDおよびUCで健常人に比較し有意に亢進し(p<0.01またはp<0.05)、その傾向はTNF $\alpha$ と同様の傾向が認められた。

一方、Th2サイトカインのIL-10ではUCおよびCDのいずれでも健常人との差は認められなかった。

(2) NKT細胞におけるTCR陽性細胞とNKR陽性細胞の変化(図-2)

図2 IBDにおけるNKT細胞のNKRおよびTCRの比較



NKT細胞はNK細胞と共通のNK受容体(NKR-P1:CD161)とCD3(T細胞マーカー)とのダブル陽性細胞すなわちCD3CD161NKT細胞および特異的なV $\alpha$ 24V $\beta$ 11NKT細胞とがある。

一般的にはヒトでCD3CD161NKT細胞は数%~20%認められ、V $\alpha$ 24V $\beta$ 11NKT細胞は0.03%~0.3%と考えられている。

CDの活動期においてCD3CD161NKT細胞は健常人またはUC活動期と比較し有意に増加しており、UCでは健常人と差が認められなかった。一方、V $\alpha$ 24V $\beta$ 11NKT細胞ではCDで著明に増加しており(p<0.001)、UCでも0.05%と有意で増加していた。

またNKT細胞の活性化レベルをパーフォリン産生能で検討した。

NKT細胞の活性化レベルもNKT細胞数と同様の傾向が認められた。

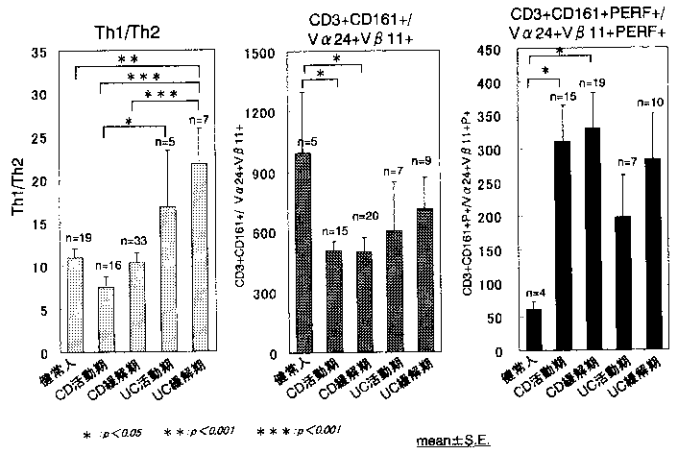
(3) IBDにおけるTh1/Th2比とNKT細胞のNKT(Th1/Th2)比(図-3)

(a) Th1/Th2比についてCD4+IFN $\gamma$ /IL-4比でフローサイトメトリーで測定した。

健常人に比較し、UCの非活動期においてTh1/Th2比が亢進していた(p<0.01)。またCDに比較してもUCで亢進する傾向が認められた。

(b) 一般的にNKT細胞が2種類の受容体を持っていることはすでに述べた。

図3 IBDにおけるTh1/Th2、CD3+CD161+/V $\alpha$ 24+V $\beta$ 11+、CD3+CD161+パーフォリン+/V $\alpha$ 24+V $\beta$ 11+パーフォリン+の比較



NKR-P1(CD3CD161)は何らかの刺激でIFN $\gamma$ を産生しTh1優位に作用し、逆に若干の問題点が残ってはいるがTCR(V $\alpha$ 24V $\beta$ 11)は刺激でIL-4、IL-13の産生を促進してTh2優位に作用すると考えられている。

そこでNKT細胞の受容体別にTh1/Th2と同様の考えで検討した。

まずNKT細胞数であるCD3+CD161+/V $\alpha$ 24+V $\beta$ 11+比で比較すると、健常人に比しCDの活動期と非活動期のいずれにおいても有意に低下していた(p<0.05)。一方UCでは低下傾向が認められたものの有意差はなかった。

また、NKT細胞の活性化率すなわちCD3+CD161+perforin/V $\alpha$ 24+V $\beta$ 11+perforin比で検討すると細胞数の比と逆転していた。

この点は極めて注目される点である。

すなわち、V $\alpha$ 24V $\beta$ 11陽性の抑制系NKT細胞が増加している可能性が示唆される。しかし活性化の比率で検討するとV $\alpha$ 24V $\beta$ 11パーフォリン産生能が低下している可能性がうかがわれる。

以上の結果をまとめると、CDにおいてはTh1サイトカインは著明に亢進している。しかしTh1サイトカインに対する抑制サイトカインであるIL-10(IL-4は測定していないが)は増加していない。しかもNKTにおけるTh1/Th2系をみるとV $\alpha$ 24V $\beta$ 11陽性細胞数が増加しているにも拘らずこの細胞の活性は低下しているものと考えられる。

すなわちこの結果はCDではV $\alpha$ 24V $\beta$ 11陽性細胞は増加しているにも拘らずIL10産生があまり増加していないことは、その細胞の機能低下を示唆しているものと推察される。この傾向はUCでも認められるがCDで顕著であった。

(4) ステロイドのTh1サイトカインおよびNKT細胞、NK細胞に対する抑制効果の相違

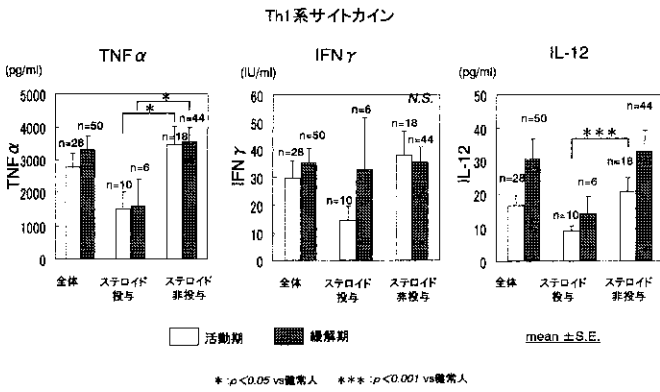
IBD症例は活動期および非活動期のいずれにおいてもTh1サイトカインが健常人に比較して有意に産生能力が亢進していることはすでに述べた。

これらの症例においてステロイド投与例と非投与例とでTh1サイトカインの産生抑制作用を検討した。

TNF $\alpha$ においては活動期と非活動期とのいずれにおいてもステロイド投与例で低下していた(p<0.05)。

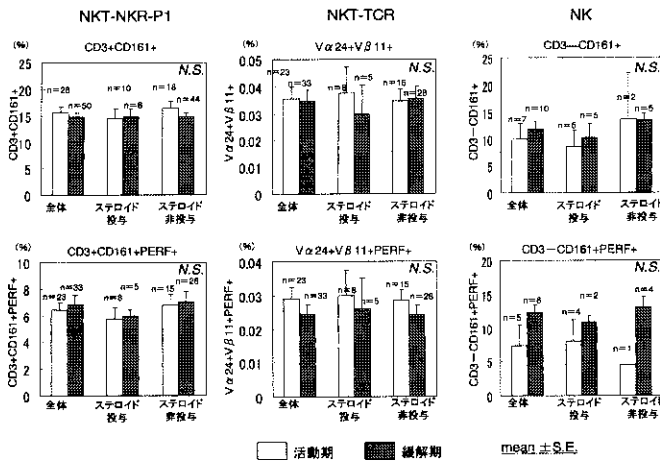
一方IFN $\gamma$ では有意差は認められなかったが、IL-12産生能力では活動期でのみ有意に抑制していることが判明した(p<0.001)(図-4)。

図4 IBD(CD・UC)患者の免疫に対するステロイド剤の影響



NKT細胞の2種類の細胞すなわちCD3CD161陽性細胞およびV $\alpha$ 24V $\beta$ 11陽性細胞のいずれにおいてもステロイドで陽性細胞数の低下がないことが判明した。またそれぞれの細胞の活性化(パーフォリン産生能力)に対する抑制作用も認められなかった。この事実はNK細胞でも同様にステロイドで抑制されないことが判明した(図-5)。

図5 IBD(CD・UC)患者の免疫に対するステロイド剤の影響



#### D. 考察

NODマウスのI型糖尿病(IDDM)では膵島 $\beta$ 細胞の自己抗原を認識するTh1細胞が過剰に産生され、この異常な免疫反応がIDDMの病状を悪化させる主因と考えられる。

最近このNODマウスにおけるNKT細胞の異常、特にNKT細胞によるTh2サイトカインのIL-4産生能力の低下が原因とする論文が少なからず報告されている(1)(2)(3)。

WilsonらはIDDMを発症した患者と発症していない双子の兄弟との間でヒトNKT細胞であるCD4-CD8-V $\alpha$ 24JaQ T細胞の機能を比較した。その結果、IDDM非発症例ではNKT細胞のIL-4とIFN $\gamma$ との産生能力に差は認められなかったが、IDDM発症例ではIL-4産生能力は認められずIFN $\gamma$ 産生能のみが認められた(4)。

今回の我々の検討と照合してみるとNKT細胞のTCR陽性細胞とNKR-P1陽性細胞もIBDで一見数の増加と機能のいずれも亢進していた。

しかし、NKT細胞のTh1/Th2比(NKT-NKR-P1/TCR比)で検討した場合、NKT-NKR-P1細胞に比べNKT-TCR細胞の増加が認められたのに対し機能の点では逆にNKT-TCR細胞の低下が示唆された。

事実、IL-4の測定はできなかったが同じTh2サイトカインのIL-10はTh1サイトカインの亢進にも拘らず増強されていなかった。

もう一つ重要な点は、NKT細胞の機能異常はステロイドの関与を受けていない点も注目すべき点と考えられる。

自己免疫病は1種類の要因で発症するものでないことは周知の事実である。今後IBDの発症や病態にNKT細胞の異常が十分に考慮されてしかなるべきと考えられる。

#### E. 参考文献

- Gombert JM, Herbelin A, Tancrede-Bohin E et al. Early quantitative and functional deficiency of NK1-like thymocytes in the NOD mouse. *Eur J Immunol* 26, 2989 (1996)
- Hammond KJ, Poulton LD, Palmisano LJ et al.  $\alpha$ / $\beta$ -T cell receptor (TCR)+CD4-CD8-(NKT) thymocytes prevent insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic(NOD)/Lt mice by the influence of interleukin(IL)-4 and/or IL-10. *J Exp Med* 187, 1047 (1998)
- Laloux V, Beaudoin L, Jeske D, Carnaud C & Lehuen A. NKT cell-induced protection against diabetes in V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 281 transgenic nonobese diabetic mice is associated with a Th2 shift circumscribed regionally to the islets and functionally to islet autoantigen. *J Immunol* 166, 3749 (2001)
- Wilson SB, Kent SC, Patton KT et al. Extreme Th1 bias of invariant V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q T cells in type 1 diabetes. *Nature* 391, 177 (1998)



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

細菌性 hsp60 投与による自己免疫性マウス大腸炎モデルの開発

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：細菌性 hsp60 が炎症性腸疾患で自己抗原的に働く可能性がある。 *Yersinia enterocolitica* hsp60 をマウスに接種すると自己免疫性の大腸炎を生じ、電顕所見が潰瘍性大腸炎に類似していた。この大腸炎モデルは市販マウスに接種すれば発症する利点を持ち、自己抗体の関与・大腸局所での細胞性免疫の関与・腸内細菌の関与・n6 不飽和脂肪酸の影響という点でもヒトの潰瘍性大腸炎との類似性を持つ。マウスのストレインによる発症のしかたの違いや、接種する hsp60 の細菌分子種による発症のしかたの違いは、ヒト潰瘍性大腸炎の機序解明という点で有用な知見と思われる。

共同研究者  
助川 寧, 丸山 正二, 若杉 慎司<sup>1)</sup>,  
山口 博之, 神谷 茂<sup>2)</sup>  
所属 近畿大学 腫瘍免疫等研究所<sup>1)</sup>,  
杏林大学医学部 感染症学<sup>2)</sup>

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<sup>(1)</sup> が、我々は IBD 患者血清中に Ye-hsp60 と反応する抗体価を見だし、IBD 患者腸管中にも Ye-hsp60 と反応する抗体価を見だした<sup>(2)</sup>。そこで、我々は細菌性 hsp60 が疾患で自己抗原的に働く可能性があると考え、Ye-hsp60 を発現させた大腸菌の加熱死菌 (Ye-hsp 発現死菌) を B10A 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<sup>(3)</sup>。

この大腸炎モデルの開発と機序の解明のため、1) マウスストレイン、2) 飼料中の n6 不飽和脂肪酸の関与、3) 大腸局所での哺乳類 hsp60、CD14、CD80、CD86 の発現、4) 腸内細菌の関与、5) 接種する hsp60 を精製した場合、6) アジュバントの影響、7) 投与ルート、8) 接種する hsp60 の細菌分子種 を検討した。

B. 研究方法

1) 細菌性 hsp60 発現大腸菌の調整

*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<sup>(4,5)</sup>。Ye-hsp60 を発現させた大腸菌を加熱し死菌として捕集した。

2) 細菌性 hsp60 の精製

大腸菌に発現させた hsp60 は不溶性画分から 8M 尿素を用いて精製した<sup>(5)</sup>。

3) 動物と Ye-hsp 発現死菌の接種

B10A/SgSn 雄マウス (日本 SLC) を用いた。マウスは 3 週齢で購入し、4 週齢から Ye-hsp 発現死菌の PBS 溶液をマウスに週 1 回計 9 回各 10 μg/200 μl 腹腔接種した。同じ期間無処置で飼育したマウスをコントロール群とした<sup>(3)</sup>。

4) マウスストレインの検討

B10A/SgSn 雄マウスの他、BALB/cCrSlc、C57BL/6CrSlc (日本 SLC) を用いた。

5) 飼料中の n6 不飽和脂肪酸の関与の検討

マウスは 3 週齢から、普通飼料 (日本クレア社 CE2) もしくは 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<sup>(3,6)</sup>、4 週齢から Ye-hsp 発現死菌を接種した。実験期間中同じ飼料を継続した。なお脂肪酸の劣化を防ぐために、n-6 不飽和脂肪酸強化飼料は冷凍保存し、毎日小分けして与え、残飼料は毎日廃棄した。

6) 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死させ、大腸を採取した。

7) 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。一部の試料は電顕に付した。同じく Hsp60 の最終接種の 2 日後に大腸を採種し、1% グルタルアルデヒドと 4% ホルマリンで 4℃ 6 時間以上固定し、1% 4 酸化オスミウムで後固定し Epon 812 resin に包埋した。Ultratome Nova (LKB, Bromma, Sweden) で薄切後に、

酢酸ウラニルとクエン酸鉛で2重染色し、透過型電子顕微鏡 (Model 1200 EX; JEOL, Tokyo) で観察した。

8) 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  $\mu$  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  $\mu$  g/ml の濃度で ELISA 固層化抗原として同様に測定した<sup>(6)</sup>。

9) 大腸局所での哺乳類 hsp60, CD14, CD80, CD86 の発現検討

Ye-hsp 発現死菌を週 1 回計 9 回 10  $\mu$  g 腹腔接種し、最終接種日の 2 日後に大腸を採取し、凍結標本とした。anti-Hsp60 は、3C8 抗体を用いた<sup>(4)</sup>。抗マウス anti-CD14, anti-CD80 および anti-CD86 は、ファーミンジェン社より購入した。それぞれの抗体は FITC 標識し、マウス大腸に対して直接法で発現を検討した。

10) 腸内細菌の関与の検討

germ-free BALB/c マウスに 4 週齢から Ye-hsp 発現死菌を週 1 回計 9 回 10  $\mu$  g 腹腔接種し、大腸病理像を検討した。

11) 精製 Ye-hsp の接種

精製 Ye-hsp60 の PBS 溶液を B10A マウスに週 1 回計 9 回各 3  $\mu$  g/200  $\mu$  l 腹腔接種した<sup>(6)</sup>。

12) アジュバントの影響

4 週齢 B10A 雄マウスを用いた。抗原は、精製した Ye.hsp60 および、GroEL (メルク社) を用いた。マウスへの抗原投与は、1 匹のマウスに対して 200ng をアジュバント (Freund 完全アジュバント, Difco 社 0638-60-7) と共に週 2 回計 17 回腹腔接種し、最終接種 2 日後に大腸を採取し、大腸の病理学的スコアを調べた。

13) 投与ルート

精製 Ye-hsp60 では、接種ルートを皮下に変更する検討も行った。精製 Ye-hsp60 の PBS 溶液を B10A マウスに週 1 回計 9 回各 3  $\mu$  g/200  $\mu$  l 腹腔接種した。

14) 接種する hsp60 の細菌分子種

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た。精製細菌性 hsp60 の PBS 溶液を B10A マウスに週 1 回計 9 回各 3  $\mu$  g/200  $\mu$  l 腹腔接種した。

15) 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

*Yersinia enterocolitica* hsp60 (Ye-hsp60) を発現させた大腸菌の加熱死菌 (hsp 発現死菌) を BALB/c マウスや B10A マウスに接種すると、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。大腸と自己血清の間には自己反応性が見られた。大腸局所で哺乳類 hsp60, CD14, CD80, CD86 の発現が見られた。普通飼料で飼育したマウスよりも 5% 紅花油添加飼料で飼育したマウスで大腸の変化がより大きかった。C57BL/6 マウスに hsp 発現死菌を接種すると大腸の病理像は感染性腸炎に類似していた。germ-free BALB/c マ

ウスに hsp 発現死菌を接種しても大腸の変化は弱いものであった。

さらに Ye-hsp60 を精製して B10A マウスに接種した。アジュバントと共に接種するとアジュバントによる大腸の変化がかぶさって評価しづらかった。アジュバントを用いずに精製 Ye-hsp60 を接種すると大腸の変化は hsp 発現死菌接種時よりも弱いながら、杯細胞の膨化、腺管の膨張、炎症性細胞浸潤、粘膜下層の浮腫が見られ、6 匹中 2 匹に陰窩膿瘍類似所見や粘膜潰瘍が観察された。電顕的には、精製 Ye-hsp60 接種群の大腸上皮で、エンテロサイトと杯細胞のネクロシスと潰瘍形成が観察された。また、上皮細胞が腫大して細胞間隙が拡大していた。一方、粘膜層と上皮下のレチクル層で、血管周囲のレチクル線維が欠落している像が観察された。大腸と自己血清・哺乳類 hsp60 と自己血清の間に自己反応性が見られ、大腸局所で哺乳類 hsp60 の発現が見られた。投与ルートの検討では、皮下投与よりも腹腔投与の方が血清の自己反応性が大きかった。*Helicobacter pylori* hsp60 (Hp-hsp60), *Escherichia coli* GroEL の hsp60 を精製してマウスに接種すると、GroEL 接種群では大腸病理変化と血清の自己反応性のいずれも 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。

## D. 考察

Hsp60 と疾患との関連性は、感染症、慢性関節リウマチ、ベーチェット病、原発性胆汁性肝硬変など、さまざまな疾患で報告されている。IBD 患者においても患者血清が自己の腸管と自己免疫反応を示すことと Hsp60 の関連が示唆されている。

我々の Ye-hsp60 接種による大腸炎モデルで、hsp 発現死菌接種でも精製 Ye-hsp60 接種でも、さらに接種するルートを腹腔から皮下投与に変更しても、マウスの大腸病理像で潰瘍だけでなく陰窩膿瘍類似所見が観察されており、大腸と自己血清の間で自己免疫反応がおきていた。さらに、hsp60 を接種したマウスの大腸において病変部位にほとんど近接してマウスの hsp60 が発現しており、血清中には哺乳類の hsp60 に対する抗体反応が検出された。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<sup>(3,6)</sup>。

大腸局所で CD14, CD80, CD86 の発現が見られており、自己抗体という液性免疫だけでなく細胞性免疫の機序も働いていると考えられる。

このモデルは無菌マウスで発症し難いことから、腸内細菌の関与も考えられ、n6 不飽和脂肪酸の影響により増悪するという点でもヒトの潰瘍性大腸炎との類似性を持つ。

精製 hsp60 を接種したマウスの大腸病変は、hsp 発現死菌を接種することで生じる大腸病変よりも軽度である。hsp60-specific T 細胞を TCR  $\beta$  鎖ノックアウトマウスに移入することで腸炎が生じるが、ノーマルマウスに移入するとクローンが拡大せず腸炎も発症しないことが報告されている<sup>(7)</sup>。ラット大腸粘膜にマイコバクテリウム hsp60 遺伝子を導入すると hsp60 に対する自己抗体が誘導されるが大腸粘膜の障害は認められないとの報告もある<sup>(8)</sup>。このことは、hsp60 刺激によってトリガーされた自己免疫のカスケードが大腸障害という結果に達する

には、何らかの未知の条件が必要であることを示唆している。我々のモデルでも大腸菌死菌の菌体成分がアジュバントとして働くことで、精製hsp60接種時よりも腸炎が強くなっているものと思われる。またマウスストレインの検討で、B10A やBALB/c ではUC類似となり、C57BL/6では感染性腸炎類似になることから、遺伝的背景因子も影響していると考えられる。

*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

*Yersinia enterocolitica* hsp60投与により自己免疫性マウス大腸炎が発症する。UC類似モデルとしてはhsp60発現死菌の接種が簡便で病変もより強いが、精製hsp60をアジュバントを用いることなく投与してもUC初期病変類似の自己免疫性大腸炎が発症する。

#### 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) 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.
- 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) Sukegawa Y., et al : Induction of autoimmune colitis by *Yersinia enterocolitica* 60 Kilodalton Heat Shock protein. Scand J Gastroenterol 2000 ; 35 : 1188-1193.
- 7) Steinhoff U., et al : Autoimmune intestinal pathology induced by hsp60-specific CD8 T cells. Immunity 1999 ; 11 : 349-358.
- 8) 折笠博司史ら : ラット大腸粘膜へのマイコバクテリウム heat shock protein 65 コードプラスミド DNA 導入による粘膜免疫の誘導. 日消誌 2001 ; 98 : 1048-1059.

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

潰瘍性大腸炎における CD56 および CD57 陽性 T 細胞の検討

分担研究者 金城 福則 琉球大学光学 医療診療部 第一内科 助教授

研究要旨: NK マーカーと T 細胞レセプターの両者を有する NKT 細胞が近年, 各種領域で注目され, 自己免疫疾患での減少が報告されている. 一方, 潰瘍性大腸炎(UC)は, その発症において免疫異常が病因病態に深く関わっていることが推測され, 自己免疫疾患の一つと考えられている. そこで, NK マーカーである CD56 もしくは CD57 陽性の T 細胞の割合について LPL を用いて検討した. UC 患者および non-IBD control のそれぞれ 9 例の生検標本から酵素法にて LPL を分離し, PHA および IL-2 の存在下に 10 日間培養し, 増殖してきた細胞をフローサイトメトリーにて検討した. その結果, 1) LPL 中の CD56<sup>+</sup> T 細胞は UC と non-IBD control で有意差はなかったが, UC において低い傾向があった. 2) LPL 中の CD57<sup>+</sup> T 細胞は UC で control より有意に増加していた. 3) UC では CD4<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup> T 細胞が増加し, CD8<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup> T 細胞が減少していた.

共同研究者

砂川 隆, 与那嶺 吉正, 豊見山 良作,  
外間 昭, 斎藤 厚  
所属 琉球大学 第一内科

A. 研究目的

NK 細胞マーカーと T 細胞レセプターの両者を有する NKT 細胞が近年, 各種領域で注目されているが, 自己免疫疾患の発症に関する報告も多く見られ, 自己免疫発症マウスモデルやヒトにおいては慢性関節リウマチ, 強皮症, 全身性エリテマトーデス, インスリン依存性糖尿病などで NKT 細胞の減少が報告されている. 一方, UC はその発症において免疫異常が病因病態に深く関わっていることが推測され, 自己免疫疾患のひとつと考えられている. そこで, NK 細胞マーカーである CD56 もしくは CD57 陽性の T 細胞の割合について大腸粘膜固有層リンパ球(LPL)を用いて検討した.

B. 研究方法

活動期 UC 患者 (全大腸炎型) および non-IBD control のそれぞれ 9 例の生検検体から Dispase I および collagenase II を用いた酵素法にて LPL を分離した. 分離した LPL を PHA および IL-2 の存在下に 10 日間刺激培養した. 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 PHA(1 μg/ml) を含む medium を使用し, 2~5 日に 1 回, その半量を交換した. 増殖してきた細胞の表面抗原について抗 CD3, CD4, CD8, CD56 および CD57 抗体を用いてフローサイトメトリーにて検討した.

C. 研究結果

UC 患者および control の培養 LPL における CD56 陽性の T 細胞の割合はそれぞれ  $3.9 \pm 4.4\%$ ,  $6.5 \pm 5.0\%$  で, LPL 中の CD56 陽性 T 細胞は UC と control で有意差はなかったが, UC において低い傾向が認められた. UC 患者および control の CD56 陽性 LPL における CD4 および CD8 陽性細胞の割合はそれぞれ, UC 患者で  $42.3 \pm 33.5\%$  および  $64.7 \pm 23.4\%$  であり, control で  $20.1 \pm 13.3\%$  および  $48.8 \pm 23.1\%$  であり, CD4 および CD8 細胞の比は UC と control で有意差は認められなかった. UC 患者および control の培養 LPL における CD57 陽性の T 細胞の割合はそれぞれ  $25.6 \pm 18.9\%$ ,  $8.0 \pm 7.2\%$  で, LPL 中の CD57 陽性 T 細胞は UC で control より有意に増加していた ( $P < 0.05$ ). UC 患者および control の CD57 陽性 LPL における CD4 および CD8 陽性細胞の割合はそれぞれ, UC 患者で  $60.7 \pm 36.0\%$  および  $34.0 \pm 22.0\%$  で, control で  $24.8 \pm 26.3\%$  および  $50.8 \pm 29.9\%$  で, CD4 および CD8 細胞の割合は UC 患者と control で明らかな違いを認め, UC において CD57 陽性 LPL における CD4/8 比の増加が認められた.

D. 考察

今回の検討では, CD4<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup> T 細胞が UC で有意に増加していた. この細胞は慢性関節リウマチで病因病態に関わっているとの報告があり, UC においても病因病態との関連についてさらに検討する必要があると思われる. また, CD8<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup> T 細胞は control と比較し, 低い傾向が認められた. この細胞は心臓, 骨髄および腎移植患者, 慢性関節リウマチ, エイズ, 末期腎不全患者などの末梢血における増加が報告されており, その役割として免疫抑制機能が注目されている. この CD8<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup> T 細胞は, CD4<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup> T 細胞とは逆に, UC

においても異常に亢進した免疫反応を抑制する細胞として機能している可能性が考えられるが、UCにおいては何らかの原因によるCD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup>T細胞数の減少により、その免疫抑制機能も全体として低下している可能性が考えられた。今後、さらに検討症例を増やし、これらの細胞のサイトカイン産生能などの免疫機能についても検討していく必要があると思われた。

#### E. 結 論

- 1) LPL中のCD56陽性T細胞はUCとnon-IBD controlで有意差はなかったが、UCにおいて低い傾向があった。
- 2) LPL中のCD57陽性T細胞はUCでcontrolより有意に増加していた。
- 3) UCではCD4<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup>T細胞が増加し、CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup>T細胞が減少していた。

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

クローン病における肉芽腫の免疫学的意義に関する研究

分担研究者 松本 誉之 大阪市立大学大学院 消化器器管制御内科学 助教授

研究要旨: クローン病の特徴的病変である非乾酪性肉芽腫がT細胞に対する免疫応答の場であることを示してきた。この肉芽腫並びにその前駆体として考えられるマクロファージの集簇巣は、主として VEGFR3 陽性のリンパ管内あるいはその周囲に局在し、CD80/86 などの副刺激分子を介して、周囲に存在する増殖期にある CD45RO 陽性 T 細胞とのクロストークが確認された。また、肉芽腫構成細胞は IL-12 や IFN- $\gamma$  などの Th1 サイトカインの強い産生がみられた。さらに、この T 細胞群は、通常のリンパ節のリンパ球のリンパ球と同程度の増殖能を示した。以上より、肉芽腫では、腸管腔よりリンパ管を介して侵入した何らかの疾患特異抗原への抗原特異的免疫応答な場であること、このような免疫応答が腸管壁内のリンパ管沿いに腸間膜リンパ節にいたり、全層性病変や飛び越し病変などの特徴的病変を形成すると考えられた。

共同研究者

中村 志郎, 神野 良男, 澤 禎徳, 原 順一,  
渡辺 芳久, 押谷 伸英, 荒川 哲男<sup>1)</sup>,  
大谷 明夫, 名倉 宏<sup>2)</sup>

所属 大阪市立大学大学院  
消化器器管制御内科学<sup>1)</sup>,  
東北大学大学院 病理形態学<sup>2)</sup>

A. 研究目的

クローン病に疾患特異的な病理学的変化である肉芽腫が、疾患特異的な免疫応答の場であること、その肉芽腫性変化の中心をなすマクロファージ系細胞の異常な活性化を集簇が腸管粘膜内のリンパ管と密接に関係して伸展すること、これらの変化がクローン病の臨床像形成に重要な役割を果たしうることを明らかにする。

B. 研究方法

クローン病患者の外科的切除組織を用い、病変部に存在する肉芽腫並びにその前駆病変と考えられるマクロファージの集簇層の局在とその部位における免疫応答の特徴ならびにその伸展におけるリンパ管の意義を免疫組織化学的手法により検討する。具体的には、外科的切除組織を速やかに PLP 固定した凍結切片上での免疫多重染色法により、それぞれの細胞と周囲の細胞やリンパ管との関係を明らかにする。また、肉芽腫構成細胞の抗原提示細胞としての役割と周囲の細胞との関係を in situ MLR (Mixed lymphocyte reaction) 解析と考える得る、Ki67 ならびにリンパ球マーカーの二重染色解析により検討する。

C. 研究結果

肉芽腫を構成する細胞は、形態学的には類上皮細胞あるいはラングハンス型多核巨細胞の形態をとり、表面形質では主として CD68 陽性 CD80/86 陽性 HLA-DR 陽性であった。一部の細胞は CD83 陽性であり FDC (Follicular Dendritic cells) と同様の形質であった。これらの肉芽腫細胞の周囲には、CD4 陽性 (一部 CD8 陽性) CD28 陽性のリンパ球が密接に接触していた。また、同様の形質を持つマクロファージの集簇巣がしばしばみられた。

これらの肉芽腫/マクロファージの集簇巣は、一層の薄い内皮細胞を持つ管腔内に高頻度で確認された。この内皮細胞は von Willebrand factor や PAL-E・CD36 などの血管内皮細胞のマーカーは持たず、VEGFR3 (Vascular Endothelial Cell Growth Factor Receptor 3) をもつことから、リンパ管内皮細胞と考えられた。

このような肉芽腫/マクロファージの集簇巣は粘膜内から粘膜下層・漿膜下層を経て腸間膜リンパ節に確認された。出現頻度は漿膜下層から腸間膜リンパ節に多かった。

このような肉芽腫/マクロファージの集簇巣では、CD4 / CD8 陽性のリンパ球で Ki67 を核内に発現した増殖期のリンパ球がしばしばみられ、その頻度は扁桃や末梢リンパ節の T zone のそれと同等であり、同部において抗原特異的な免疫応答とそれに引き続くリンパ球の抗原特異的活性化が起こっているものと推察された。

これまで、肉芽腫では Th1 系サイトカインの独占的な発現がみられたことを報告していること、クローン病ではアフタ性潰瘍を中心として CD4 T 細胞のオリゴクローナルな活性化が確認されることを報告しており、同部では肉芽腫細胞から何らかの疾患特異抗原による T 細胞の活性化が惹起されることを示唆している。さらにこのよ

うな変化はリンパ管を介して腸間膜リンパ節に至る，その間に系リンパ管的にskip病変などクローン病に特徴的な臨床病像を形成することが示唆された。

近年，クローン病の遺伝学的解析により，NOD2などのマクロファージ上の分子の異常が報告されている．日本人におけるNOD2の異常の関与については，訪米とは異なっていることが考えられているが，マクロファージ上における腸内細菌抗原に対する免疫応答調節因子の遺伝的（あるいは後天的）な欠陥が肉芽腫反応などを惹起する可能性が考えられる．今後，このようなマクロファージの免疫応答異常を惹起する要因と腸内細菌抗原とのinteractionを解析することにより，本症の病因の解明およびそれに基づく治療や患者管理法が開発されるものと期待される．

#### 参考文献

- 1) Nagura H.:Mucosal defense mechanism in health and disease.Acta.Pathol.Jpn42:387-400,1992.
- 2) Fiocchi C.:The immune system in inflammatory bowel disease.Acta.gastroenterol.belg.60:156-162,1997.
- 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 77:175-84,1997.
- 4) Bacchi CE.:Detection of cell proliferation in tissue sections.Braz J Med Biol Res.26:677-87,1993.
- 5) Saiki Y.,et al.:Immunophenotypic characterization of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma.Lab invest 75:67-76,1996.
- 6) Ward M.:The pathogenesis of Crohn's disease. Lancet II :903-5,1977.
- 7) Wakefield AJ.,et al.:Granulomatous vasculitis in Crohn's disease.Gastroenterol 100:1279-87,1991.
- 8) 中村志郎，他.:クローン病病変粘膜におけるマクロファージおよび肉芽腫に関する免疫組織化学的研究. 消化器と免疫 No.30:116-121,1995.
- 9) 嘉数朝政，他.:クローン病の肉芽腫病変形成におけるTh1細胞の意義. 消化器と免疫 No.35:122-5,1998.
- 10) Thomas P Prindiville., et al. :Analysis of function, specificity and T cell receptor expression of cloned mucosal T cell lines in Crohn's disease. JAI 9:193-204, 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

潰瘍性大腸炎病変粘膜におけるカベオリン II の発現増強

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：炎症性腸疾患病変粘膜における上皮細胞の変化として、カベオリンの発現を免疫組織学的に検討した。潰瘍性大腸炎の病変粘膜上皮において、カベオリン II の発現の増強が認められた。この変化は、クローン病の活動期粘膜においては認められず、また、虚血性大腸炎でも認められなかった。一方、カベオリン I の発現の変化は認められなかった。潰瘍性大腸炎に特異的な上皮細胞の変化が存在する。

A. 研究目的

我々は、潰瘍性大腸炎病変粘膜における補体活性化制御蛋白 Decay-accelerating factor(DAF)の発現増強を見だし報告してきた。今回、さらなる膜蛋白の発現の変化を検討するためカベオリン I および II の発現について免疫組織化学的に検討した。

B. 研究方法

十分なinformed consentを得た上で、大腸内視鏡下生検および手術材料を得た。潰瘍性大腸炎(UC:活動期10例、非活動期5例)、クローン病(CD)10例、虚血性大腸炎5例、健常粘膜10例より得た組織を10%ホルマリン固定後、薄切切片を作成し、一時抗体にウサギ抗カベオリン I, II 抗体(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), 二次抗体に Vector 社の ABC キットを用いて染色した。

C. 研究結果

カベオリン I の発現は、健常粘膜、UC、CDにおいて変化は認められず、その発現は、粘膜筋板を構成する平

滑筋細胞、血管内皮細胞に認められたが、上皮細胞には発現が認められなかった(図1)。

一方、健常粘膜においてカベオリン II の発現は認められなかったが、すべての活動期潰瘍性大腸炎病変粘膜の上皮細胞管腔側に強い発現が認められた(図1)。この変化は、非活動期の病変粘膜では弱く、クローン病および虚血性大腸炎の病変粘膜では認められなかった(図2)。

図2. カベオリン II の免疫染色像. A, UC 活動期; B, UC 非活動期; C, クローン病; D, 虚血性大腸炎。

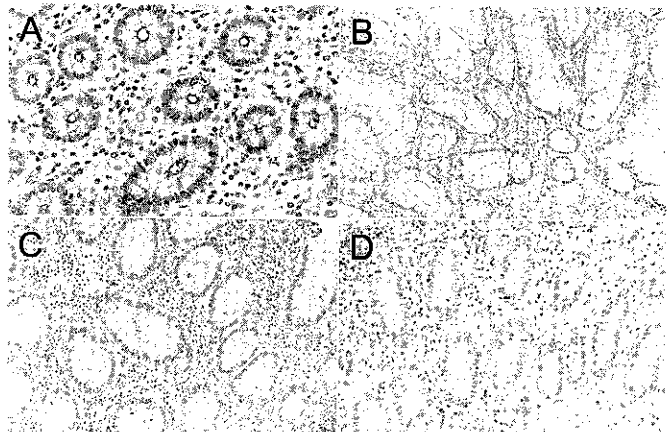
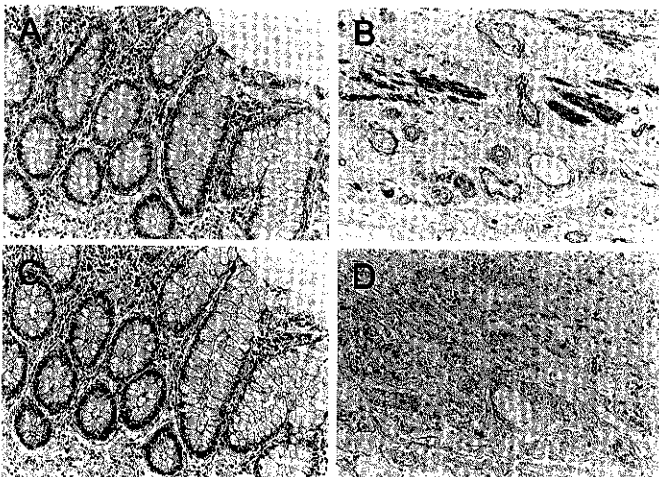


図1. カベオリン I (A, B) およびカベオリン II (C, D) の免疫染色像. カベオリン II の発現が、上皮細胞の管腔側に認められる(C)。



D. 考察

最近の細胞膜研究の進歩により、細胞膜にはカベオラやラフトと呼ばれるスフィンゴ脂質やコレステロールに富む部位が存在し、ここには様々のレセプターやGPIアンカー蛋白が集中して存在し細胞内へのシグナル伝達を効率よく担っていることが明らかになってきた。特にカベオラは細胞膜の陥凹構造で、この裏打ち蛋白がカベオリンである。我々が以前に見いだしたUC粘膜で発現が増強している DAF などの GPI 型蛋白もカベオラに集中して存在しており、DAF の発現の増強と今回のカベオリン II 発現増強の結果から、潰瘍性大腸炎病変粘膜ではカベオラ構造自身の変化が存在するものと推察される。



この変化は、クローン病や虚血性大腸炎では認められないことから、潰瘍性大腸炎の病因との直接の関連が示差される。

#### E. 結論

潰瘍性大腸炎病変粘膜では、カベオリン II の発現の亢進に基づく、カベオリン構造強いては膜構造の変化が存在する。病因、病態形成との関連については今後の検討が必要である。

#### F. 研究発表

論文発表：

1. Andoh A, et al: Epithelial expression of Caveolin-2, but not Caveolin-1, is enhanced in the inflamed mucosa of patients with ulcerative colitis. *Inflammatory*

*Bowel Diseases* 2001;7;210-214.

2. Andoh A, et al: Intestinal trefoil factor induces decay-accelerating factor expression and enhances the protective activities against complement activation in intestinal epithelial cells. *J. Immunol.* 2001;167;3887-3893.

学会発表：

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」平成 13 年度第 1 回総会において発表した。

G. 知的所有権の取得状況

特になし。

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

クローン病に対する自血球除去・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 消化器内科 教授

共同研究者

朝倉 均<sup>1)</sup>, 金城 福則<sup>2)</sup>,  
里見 匡迪, 福田 能啓, 澤田 康史<sup>3)</sup>,  
日比 紀文<sup>4)</sup>, 松本 誉之<sup>5)</sup>, 飯塚 文瑛<sup>6)</sup>,  
楠神 和男<sup>7)</sup>, 戸澤 辰雄<sup>8)</sup>, 鈴木 康夫<sup>9)</sup>,  
棟方 昭博<sup>10)</sup>

所属 新潟大学医学部 第三内科<sup>1)</sup>,  
琉球大学医学部 第一内科<sup>2)</sup>,  
兵庫医科大学 消化器内科<sup>3)</sup>,  
慶應大学医学部 内科<sup>4)</sup>,  
大阪市立大学大学院  
消化器器官制御内科学<sup>5)</sup>,  
東京女子医科大学 消化器内科<sup>6)</sup>,  
名古屋大学医学部 第一内科<sup>7)</sup>,  
兵庫医科大学 臨床病理部<sup>8)</sup>,  
千葉大学医学部 第2内科学<sup>9)</sup>,  
弘前大学医学部 第一内科<sup>10)</sup>,

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:LCAPは原則として週1回,流速毎分50mlで60分間,ナファモスタットメシレートで抗凝固化した全血3リッターを体外還流し,白血球系細胞を吸着除去し,処理後の血液を再び患者に返血した。5週を1クールとし2クールまで行うものとした。治療開始前2週間以内,6週目(5回終了後)と10週目(7回終了後)に大腸内視鏡検査を行った。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LCAP治療の説明文章は,新GCP基準にのっとり簡単で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。

3. 研究結果および考察

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例が登録されたことになり,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。

1. 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,クローン病(以下CD)の中で,完全静脈栄養療法と経管経腸成分栄養療法抵抗性を示す患者に対する白血球除去療法(以下LCAP)の有効性と安全性を,多施設共同臨床試験し評価すること。

2. 研究方法

a. 試験内容:CDの場合はLCAPの有効性と安全性を,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。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。しかし,実際に臨床研究治療ができたのは9施設9大学病院であった。今回,実際の治療に携わった9施設のみ共同著者としたが,本9施設すべてがLCAPに習熟しており,主任研究者からLCAP用セット(膜と回路その他)を届け,治療は各々の施設で独自に行って頂いた。

b. 臨床症状(CDAI)に対する評価:17例中10例(58.8%)に臨床症状の改善を認めた(ただしCDAI±50は不変とした)。大腸型と小腸大腸型に分けた場合大腸型12例中6例(50%)に、小腸大腸型5例中4例(80%)に改善を認めた。さらにCDAIの200点以上改善した症例を著名改善とすると、CD患者全例の17例中4例(23.5%)、大腸CD患者12例中2例(16.7%)、小腸大腸型CD患者5例中2例(40%)が著名改善であった。また、50~199の改善は17例全体で6例(35.3%)、大腸型で12例中4例(33.3%)、小腸大腸型で5例中2例(40%)であった。悪化はCD患者17例中5例(29.4%)に認められ、その内訳は大腸型12例中5例(41.7%)で小腸大腸型の悪化は認められなかった。他の2例(大腸型1例と小腸大腸型1例)は臨床症状(CDAIで±50以下の変動)不変であった。

c. 最終評価:臨床症状に画像診断を加えた最終評価は17例中、著効1例、有効5例、不変7例、悪化4例で、有効以上の有効例は6例あり、有効率は17例中6例の35.3%であった。有効性の評価のうち、IOIBD score、赤沈・CRP値、CDAIに著名改善が約20%認められたが、大腸内視鏡所見と病理組織所見を含めた場合、著名改善は小腸大腸型に1例認められただけであった。

つまり、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、重篤な有害事象は1例もなかった。

### 3. 考 察

CDに対するLCAPの有効性の評価をパイロット的に多施設共同臨床試験で行なった。今回の臨床研究では、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患者の約35%に対し、LCAPが臨床症状と内視鏡的な画像面でもさらに改善を示すことが明らかになった。

### 4. 評 価

#### 1) 達成度について

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%の症例に画像診断でも有用な治療効果が得られることが明らかになった。CD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は著しく阻害されている。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が期待できた。

#### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

今まで薬剤を与えるばかりの治療であったが、人工透析を代表とする体外循環治療法により、白血球をコントロールすることで、薬剤や栄養療法でコントロールが難しかったクローン病患者の約35%をさらにコントロールできるようになった。これは学術的・世界的にみても、日本より発信した新しい治療法と言える。ステロイドの生涯投与量を減らすことは、患者さんにとってもステロイドの副作用を少なくできることで、本治療は効果が比較的早く、患者の入院期間を従来の治療法より短くできるものと考ええる。つまり、患者の社会復帰が早くなり、患者QOLを上げる治療法であると言える。

#### 3) 今後の展望について

臨床症状は17例中12例改善するものの、画像診断で縦走潰瘍・狭窄等の改善は少なく、1週間に1回の治療では治療効果が少ないのか？、1回の治療が3,000ccの処理血液量では少ないのか？今後検討する必要がある。

### 5. 結 論

白血球除去療法はクローン病の臨床症状を約60%改善したことより、従来の薬剤療法、特に多くの場合ステロイドの増量を必要とせず、薬剤の副作用を減らす事ができるクローン病治療法と考える。

しかし、画像診断的に35%の改善しか認めず、治療回数、治療血液量等、さらなる検討が必要である。

## 活動期潰瘍性大腸炎に対する顆粒球吸着除去療法の最適基準の考察

協力研究者 鈴木 康夫 千葉大学医学部附属病院 第二内科 助手

研究要旨：顆粒球吸着除去療法(GCAP)は、活動期潰瘍性大腸炎の新たな治療法として広く実施されつつあるが治療成績には大きな相違があり、運用方法の違いや対象患者の臨床背景に大きな違いが存在することなどに起因すると推測される。当科で無作為に実施した13症例の有効症例、無効症例に於ける治療前の各種患者背景因子、各種血液学的検査結果および大腸内視鏡所見をretrospectiveに比較検討した結果、GCAP施行前のステロイド投与期間が4週以上の症例あるいは大腸内視鏡検査所見で深掘れ潰瘍を形成している症例で無効症例が多かった。そこでステロイド投与期間が4週以内かつ深掘れ潰瘍を形成しない条件を満たす活動期症例11例に対してGCAP療法を選択実施したところ全て緩解し、条件を満たさない2症例は無効であった。従ってGCAPは出来るだけ早期に、潰瘍所見の高度でない症例に対して実施することが有効であると思われた。

### 共同研究者

吉村 直樹, 齋藤 康  
所属 千葉大学大学院医学研究院 細胞治療学

### A. 研究目的

顆粒球吸着除去療法(GCAP)は活動期潰瘍性大腸炎(UC)に対する新たな治療法として有効性が実証され、2000年4月一般臨床施行が認可されて以降広く行われ臨床経験が蓄積されつつある。しかしGCAPの有効性発現の詳細な機序は未だ不明であり、運用方法を含めさらに研究する必要がある。実際、現在施行されている症例の有効率に関し施設間での相違が大きいのは、実施時期や施行方法そして患者背景などのばらつきが大きいことに起因することが推測される。GCAPをより効率良く運用するためには、適応基準を明確化することが必要であると考へた。そこで、有効性が十分に発揮されることが期待される適応基準を検索設定し、その適応基準に添って施行し実際に有効率が向上するか否かを証明することが必要である。我々は多施設共同研究の一環としてGCAPを無作為に実施した13症例のretrospectiveな検討から有効、無効症例の施行前に存在する相違を見だし、それに基づき適応基準を設定し患者を選択GCAPを実施し、有効率が無作為施行時に比較して向上するか否かを検討することによって、適応基準の妥当性を評価することを考へた。

### B. 研究方法

#### <Retrospective study>

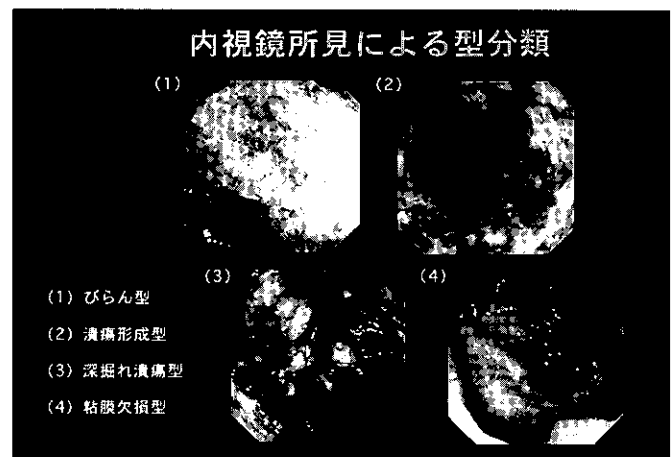
平成7年2月から平成10年9月の間に実施された多施設共同臨床研究「活動期潰瘍性大腸炎患者に対する顆粒球吸着除去療法有効性の検討」時、当科にて無作為に施

行した13症例の有効症例8例と無効症例5例の治療開始前の患者背景、各種血液検査および大腸内視鏡検査所見を比較検討した。

大腸内視鏡所見は可能な限り深部大腸まで観察し、最も炎症の強い部位の所見を肉眼所見から以下の4型に分類した(写真1)。

- (1) 粘膜の浮腫、発赤とビランが顆粒状に存在するビラン型
- (2) 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潰瘍型
- (3) 潰瘍は深く周辺粘膜の腫脹も強く偽ポリポージスを伴う深掘れ潰瘍型
- (4) 深掘れ潰瘍が更に広範に認められる粘膜欠損型

写真1



#### <Prospective study>

一般臨床治療が認可された平成12年4月以降、入院加療を必要とする中等症以上の活動期潰瘍性大腸炎患者