

ており、担癌大腸粘膜にみられた胃型細胞形質の cryptal な発現は、陰窩の stem cell レベルで胃型細胞への形質転換が起きていることを示唆している。すなわち、胃型細胞への形質転換は UC 大腸粘膜に普遍的に見られ得るものの、stem cell レベルでの細胞形質転換は、colitic cancer の発生母地となった大腸粘膜に選択的に生じている現象と考察される。

E. 結論

colitic cancer の背景大腸粘膜には stem cell レベルでの

胃型細胞への形質転換があり、そうした大腸陰窩の存在は colitic cancer high risk UC 選別のためのマーカーになりうると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

colitic cancer / dysplasia の病理組織学的特徴. 味岡洋一、渡辺英伸、加納恒久、西倉健、向井玄、馬場洋一郎. 胃と腸 37: 956-970, 2002

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

遺伝子多型を用いた炎症性腸疾患感受性・疾患修飾遺伝子の検討

分担研究者 木内 喜孝 東北大学大学院 内科病態学 消化器内科 講師

研究要旨：炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎・クローン病）発症・病態には遺伝的要因が強く関与することが指摘され、欧米では既にクローン病の感受性遺伝子として NOD2 遺伝子が同定されている。本研究では日本人炎症性腸疾患における遺伝的要因を明らかにすることを目的に、HLA-DQB1/DRB1 遺伝子多型とクローン病病型との関係を Two-stage association study にて解析した。その結果、HLA-DQB1*04/DRB1*04 とクローン病小腸型との強い相関を認め、一方、クローン病小腸・大腸型、クローン病大腸型とは相関を認めなかった。このことより、欧米と日本では感受性遺伝子が異なることが再確認され、また同じ日本人クローン病であっても病型毎に遺伝的背景が異なることが明らかにされた。

共同研究者

高橋成一¹⁾、根来健一¹⁾、下瀬川 徹¹⁾、日比紀文²⁾、井上 詠²⁾

所属 東北大学医学部附属病院消化器内科¹⁾
慶應義塾大学医学部内科²⁾

A 研究目的

炎症性腸疾患（クローン病・潰瘍性大腸炎）の発症に遺伝因子が関与していることは既に定説となり、欧米においては複数の感受性遺伝子座位や感受性遺伝子 NOD2 が同定されている¹⁾³⁾。疾患感受性遺伝子が同定されることにより、本疾患の病因・病態の解明、診断・治療法の進歩への大きな貢献が予想されている。しかし、人種によって感受性遺伝子が少なくとも部分的に異なることが判明したため⁴⁾⁵⁾、欧米の研究結果をそのまま日本人に当てはめることは不可能であり、今後日本人炎症性腸疾患感受性遺伝子の解明を、行わなければならない。

炎症性腸疾患のような多因子疾患における感受性遺伝子同定戦略は、大きく分けて2通りある。1つは、罹患同胞対による連鎖解析によって感受性遺伝子座位を特定していく方法、もう1つは候補遺伝子解析による方法である（現実的には2つの方法を組み合わせて解析することが多い）。罹患同胞対を用いた連鎖解析は、欧米において既に10数件⁶⁾¹¹⁾に達する報告が存在し、その成果が欧米クローン病患者の感受性遺伝子 NOD2 同定

につながっている。残念ながら、現在まで日本人炎症性腸疾患を対象とした連鎖解析のまとまった報告は存在しない。一方、日本においては現在まで多くの候補遺伝子解析がなされ、表1の遺伝子多型との相関が報告されている。しかし、1) 症例一対照研究の解析だけである、2) sample size が小さい、3) HLA と TNF を除いて、再検討されていない、4) disease phenotype との関係が不明確、以上4点が問題であると、しばしば研究者より指摘されている。

表 1

Gene	Disease type	Author
HLADRB1*1502	Ulcerative colitis	Asakura H ¹²⁾
HLADQB1*0401, 0402	Crohn's disease	Nakajima A ¹¹⁾
TNF(-1031, -863, -857)	Crohn's disease	Negoro K ¹⁴⁾
Nramp1	Ulcerative colitis Crohn's disease	Kojima Y ¹⁵⁾
TNF-RSF1B	Ulcerative colitis Crohn's disease	Sashio H ¹⁶⁾
TNF(-308, -238)	Ulcerative colitis	Sashio H ¹⁶⁾
CD14	Ulcerative colitis	Obana N ¹⁷⁾
HSP70-2	Subgroup of the Crohn's disease	Esaki M ¹⁸⁾
MUC3A	Ulcerative colitis Crohn's disease	Kyo K ¹⁹⁾
ICAM1	Ulcerative colitis Crohn's disease	Matsuzawa J ²⁰⁾
MICA	Ulcerative colitis	Sugimura K ²¹⁾

以上より、今後日本において解析していかなければな

らない課題として以下の3点があげられる。1)罹患同胞対を用いた連鎖解析, 2)症例-対照研究手法以外の, transmission disequilibrium test を用いた相関解析, 3)日本人炎症性腸疾患病型を考慮に入れた相関解析。

本研究は上記の3)について, 現在まで報告された感受性遺伝子候補(表1)のうちでもっとも寄与危険の高い HLA-DQB1/DRB1 について解析を行った。

B. 研究方法

本研究では, 独立した症例-健常対照者群を2セット収集し, 最初のセット(第1セット: クローン病患者(以下 CD) 111例, 健常対照者(HC) 149例)における相関解析で有意とされた遺伝子多型と臨床表現型を, 独立した別のセット(第2セット: CD 107例, HC 149例)で再確認する two-stage association study を施行した。

対象遺伝子は, HLA-DQB1, DRB1 で, DNA タイピングには PCR-sequence specific primer (SSP) 法を用いた。CDとHCの比較は, 1座位毎の対立遺伝子頻度(one locus 解析)と, 隣接した2座位のハプロタイプ頻度を用いて行った(two loci haplotype 解析)。one locus 解析では, HLA-DQB1 と DRB1 のタイピングを行った後, 有意差検定(χ^2 解析)を行いクローン病と相関する対立遺伝子を同定した。さらに, 相関を示した対立遺伝子と CD の各臨床表現型(病型・診断時年齢・肛門部病変の有無)についても, 相関解析(χ^2 解析)を行った。two loci 解析では, それぞれのハプロタイプを既報の日本人ハプロタイプより推定し, ハプロタイプ頻度を計算したのち χ^2 検定を施行した。

(倫理面への配慮) 検体の採取に際しては, 倫理委員会の承認の上, 患者或いは健常対照者より文書にて同意を得た。

C. 研究結果

- 1) 第1セットにおいて, HLA-DQB1, DRB1 の対立遺伝子のうち, HLA-DQB1*04, DRB1*04, *15 において CD と HC での対立遺伝子頻度に有意差を認めた。
- 2) CD との相関を認めた対立遺伝子の各臨床表現型別の検討では, 病型別分類で小腸型クローン病と大腸型クローン病において HLA-DQB1*04, DRB1*04 の対立遺伝子頻度の有意な上昇を認めた。また, 小腸大腸型クローン病において DRB1*15 対立遺伝子頻度の有意な低下を認めた。その他の臨床表現型とは相関を認めなかった。
- 3) 上記より, i)日本人クローン病と HLA-DQB1*04, HLA-DRB1*04, *15 が相関する, ii)HLA-DQB1*04,

DRB1*04 は小腸型クローン病, 大腸型クローン病と相関する, iii)DRB1*15 は小腸大腸型クローン病のみと相関する, という仮説がたてられたため, 第2セットを用いて仮説の検定を行ったところ, HLA-DQB1*04, DRB1*04 の対立遺伝子頻度が CD において有意に上昇し, さらに臨床表現型別検討でも小腸型クローン病のみに同様の相関を認め, HLA-DQB1*04, DRB1*04 と日本人小腸型クローン病が相関することのみが2段階で確認された。

- 4) HLA-DQB1*04, DRB1*04 と小腸型クローン病との相関をさらに詳細に解析するため, HLA-DQB1*04, DRB1*04 の対立遺伝子を持つ検体でサブタイプ解析を施行したところ, HLA-DQB1*0401, *0402 及び DRB1*0405, *0410 の対立遺伝子が小腸型クローン病と強い相関を示した。
- 5) two loci haplotype 解析では, 小腸型クローン病と, ハプロタイプ HLA DQB1*0401- DRB1*0405 及び HLA-DQB1*0402-DRB1 *0410 との相関を認め, HLA-DQB1*04, DRB1*04 と小腸型クローン病との相関がハプロタイプとしての相関であることが示された。

D. 考察

本研究では, 日本人クローン病と HLA-DQB1/DRB1 遺伝子多型との相関を病型別に解析を行った。従来より, クローン病, 潰瘍性大腸炎は, 均一な疾患群というよりも, かなり heterogenous な症候群という考え方があった。事実, 同じクローン病でも, 小腸型・小腸大腸型・大腸型があり経過中ほとんどこの病型は移行しない。今回の研究で, 日本人小腸型クローン病のみが対立遺伝子 HLA-DQB1*04, HLA-DRB1*04 と相関するという事実は, この考え方を強く支持する証拠と考えられた。

また今回の結果より HLA-DQB1*04/DRB1 *04 遺伝子或いはその極近傍に小腸型クローン病感受性遺伝子が存在することが示され, 今後小腸型クローン病を対象に, さらに詳細な相関マッピングを行い感受性遺伝子の存在範囲を絞り込むことが今後の課題と考えられた。

E. 結論

3病型(小腸・小腸大腸・大腸)のうち, 小腸型クローン病のみが HLA-DQB1*04, HLA-DRB1*04 と相関を示した。すなわち, 日本人クローン病における disease heterogeneity を確認した。

F. 参考文献

- 1) Ahmad T, Satsangi J, McGovern D, Bunce M, Jewell DP. The genetics of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15(6): 731-48.
- 2) Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001 May 31;411(6837):599-603.
- 3) Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001 May 31;411(6837):603-6.
- 4) Inoue N, Tamura K, Kinouchi Y, Fukuda Y, Takahashi S, Ogura Y, Inohara N, Nunez G, Kishi Y, Koike Y, Shimosegawa T, Shimoyama T, Hibi T. Lack of common NOD2 variants in Japanese patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002 Jul;123(1):86-91.
- 5) Negoro K, McGovern DPB, Kinouchi Y, Takahashi S, Lench NJ, Shimosegawa T, Carey A, Cardon LR, Jewell DP, van Heel DA. Analysis of the IBD5 locus and potential gene-gene interactions in Crohn's disease. *GUT* 2003; 52: 541-6.
- 6) Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugerie L, Naom I, Dupas JL, Van Gossum A, Orholm M, Bonati-Pellie C, Weissenbach J, Mathew CG, Lennard-Jones JE, Cortot A, Colombel JF, Thomas G. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 1996 Feb 29;379 (6568):821-3.
- 7) Satsangi J, Welsh KI, Bunce M, Julier C, Farrant JM, Bell JI, Jewell DP. Contribution of genes of the major histocompatibility complex to susceptibility and disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Lancet* 1996 ;347 (9010):1212-7
- 8) Brant SR, Fu Y, Fields CT, Baltazar R, Ravenhill G, Pickles MR, Rohal PM, Mann J, Kirschner BS, Jabs EW, Bayless TM, Hanauer SB, Cho JH. American families with Crohn's disease have strong evidence for linkage to chromosome 16 but not chromosome 12. *Gastroenterology* 1998 Nov;115(5) 1056-61.
- 9) Rioux JD, Daly MJ, Green T, Stone V, Lander ES, Hudson TJ, Steinert AH, Bull S, Cohen Z, Greenberg G, Griffiths A, McLeod R, Silverberg M, Williams CN, Siminovitch KA. Absence of linkage between inflammatory bowel disease and selected loci on chromosomes 3, 7, 12, and 16. *Gastroenterology* 1998 Nov;115(5):1062-5.
- 10) Curran ME, Lau KF, Hampe J, Schreiber S, Bridger S, Macpherson AJ, Cardon LR, Sakul H, Harris TJ, Stokkers P, Van Deventer SJ, Mirza M, Raedler A, Kruis W, Meckler U, Theuer D, Herrmann T, Gionchetti P, Lee J, Mathew C, Lennard-Jones J. Genetic analysis of inflammatory bowel disease in a large European cohort supports linkage to chromosomes 12 and 16. *Gastroenterology* 1998 Nov;115(5):1066-71.
- 11) Cavanaugh JA, Callen DF, Wilson SR, Stanford PM, Sraml ME, Gorska M, Crawford J, Whitmore SA, Shlegel C, Foote S, Kohonen-Corish M, Pavli P. Analysis of Australian Crohn's disease pedigrees refines the localization for susceptibility to inflammatory bowel disease on chromosome 16. *Ann Hum Genet* 1998 Jul;62 (Pt 4):291-8
- 12) Asakura H, Tsuchiya M, Aiso S, Watanabe M, Kobayashi K, Hibi T, Ando K, Takata H, Sekiguchi S. Association of the human lymphocyte-DR2 antigen with Japanese ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1982 Mar;82(3):413-8.
- 13) Nakajima A, Matsushita N, Kodama T, Yazaki Y, Takazoe M, Kimura A. HLA-linked susceptibility and resistance genes in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1995 Nov;109 (5):1462-7.
- 14) Negoro K, Kinouchi Y, Hiwatashi N, Takahashi S, Takagi S, Satoh J, Shimosegawa T, Toyota T. Crohn's disease is associated with novel polymorphisms in the 5'-flanking region of the tumor necrosis factor gene. *Gastroenterology* 1999 Nov;117(5):1062-8.
- 15) Negoro K, Kinouchi Y, Hiwatashi N, Takahashi S, Takagi S, Satoh J, Shimosegawa T, Toyota T. Crohn's disease is associated with novel polymorphisms in the 5'-flanking region of the tumor necrosis factor gene. *Gastroenterology* 1999;117:1062-8.
- 16) Kojima Y, Kinouchi Y, Takahashi S, Negoro K, Hiwatashi N, Shimosegawa T. Inflammatory bowel disease is associated with a novel promoter polymorphism of natural resistance-associated macrophage protein 1 (NRAMP1) gene. *Tissue Antigens* 2001 Dec;58(6):379-84.
- 17) Sashio H, Tamura K, Ito R, Yamamoto Y, Bamba H, Kosaka T, Fukui S, Sawada K, Fukuda Y, Tamura K, Satomi M, Shimoyama T, Furuyama J. Polymorphisms of the TNF gene and the TNF receptor superfamily member 1B gene are associated with susceptibility to ulcerative colitis and Crohn's disease, respectively. *Immunogenetics* 2002 Mar;53(12):1020-7.
- 18) Obana N, Takahashi S, Kinouchi Y, Negoro K, Takagi S, Hiwatashi N, Shimosegawa T. Ulcerative colitis is associated with a promoter polymorphism of lipopolysaccharide receptor gene, CD14. *Scand J Gastroenterol* 2002

Jun;37(6):699-704.

18) Esaki M, Furuse M, Matsumoto T, Aoyagi K, Jo Y, Yamagata H, Nakano H, Fujishima M. Polymorphism of heat-shock protein gene HSP70-2 in Crohn disease: possible genetic marker for two forms of Crohn disease. *Scand J Gastroenterol* 1999 Jul;34(7):703-7.

19) Kyo K, Muto T, Nagawa H, Lathrop GM, Nakamura Y. Associations of distinct variants of the intestinal mucin gene MUC3A with ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Hum Genet* 2001;46(1):5-20.

20) Matsuzawa J, Sugimura K, Matsuda Y, Takazoe M,

Ishizuka K, Mochizuki T, Seki SS, Yoneyama O, Bannai H, Suzuki K, Honma T, Asakura H. Association between K469E allele of intercellular adhesion molecule 1 gene and inflammatory bowel disease in a Japanese population. *Gut* 2003 Jan;52(1):75-8.

21) Sugimura K, Ota M, Matsuzawa J, Katsuyama Y, Ishizuka K, Mochizuki T, Mizuki N, Seki SS, Honma T, Inoko H, Asakura H. A close relationship of triplet repeat polymorphism in MHC class I chain-related gene A (MICA) to the disease susceptibility and behavior in ulcerative colitis. *Tissue Antigens* 2001 Jan;57(1):9-14.

厚生科学研究費補助金特定疾患対策研究
「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

炎症性腸疾患と *IL18* プロモーター領域ハプロタイプの相関

研究協力者 田村 和朗 兵庫医科大学 先端医学研究所 家族性腫瘍部門 助教授

研究要旨： 炎症性腸疾患であるクローン病(CD) と潰瘍性大腸炎(UC)の発症に関わる遺伝的背景としてサイトカイン遺伝子の遺伝子型との相関が指摘されてきた。*IL18* 遺伝子のプロモーター領域の多型と炎症性腸疾患との関連を検討した。*IL18* 遺伝子の3種類のハプロタイプ (-656G/T, -607C/A, -137G/C, +113T/G, +127C/T)はCDならびにUCの疾患群おとび全てのIBD患者群と有意な相関が認められた ($P=0.002$)。特にハプロタイプ1 (-656G, -607C, -137G, +113T, +127C)はIBD発症に対して抑制的に、逆にハプロタイプ2 (-656T, -607A, -137C, +113G, +127T)およびハプロタイプ3 (-656T, -607A, -137G, +113T, +127C)は発症に相関する因子であることが示唆された。

共同研究者

指尾宏子¹⁾, 澤田康史¹⁾, 福田能啓¹⁾, 下山孝¹⁾,
山村武平²⁾

所属 兵庫医科大学消化器内科¹⁾
兵庫医科大学外科学第2²⁾

A. 研究目的

難治性の炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease: IBD) は潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis: UC) とクローン病 (Crohn's disease: CD) が知られているが、原因は未だ不明であり、その原因究明と根治的治療の開発が切望されている¹⁾。IBDも多くの疾患と同様に個人の疾患に対する易罹患性と環境因子などの多種多様な外的要因が加わり、その総和の結果によって発症することものと考えられている。UCとCDは消化管粘膜の局所免疫システムに何らかの異常が生じ、慢性化に転じた疾患と考えられる。その発症機序に関わる要因は実に多様な因子が考えられており、いわゆる多因子病として認識されている。個人が生来持ち合わせている易罹患性は腸管粘膜の透過性や局所免疫機構が重要であろうと予測されてきた。さらには細胞周期やアポトーシス関連分子など細胞分裂・維持、細胞死に機構にも関与していることが考えられる。

報告者はインターフェロンを誘導する因子として単離された Interleukin-18 (11q22.2-q22.3) に注目し、そのプロモーター領域のハプロタイプと本症易罹患性を検討した。現在はTh1/Th2細胞誘導のメディエーターとして重要であることがわかってきた¹⁾。

B. 研究方法

潰瘍性大腸炎患者、クローン病患者の病態調査を行うとともに、インフォームドコンセントを得た上で、末梢血からDNA抽出を行った。健康成人を対照群とし、同様に核酸試料を抽出し、遺伝子多型解析に供した。

IL18 遺伝子の3種類のハプロタイプ (-656G/T, -607C/A, -137G/C, +113T/G, +127C/T) 解析はDNAシーケンス法によった。対立遺伝子およびハプロタイプの頻度を基に χ^2 法、Mantel-Haenszel法で統計的解析を行った。

(倫理面への配慮)

研究計画書、説明書、意思確認書等とともに兵庫医科大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する専門小委員会に申請し、「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」(平成13年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)に沿って審査を経た後、同大学倫理委員会で最終的な承認を得た。研究の内容や方法等を十分説明した後、研究協力依頼をする。個人の自由意思を尊重し、「意思確認書」に書面で意思を記載してもらい同意を得られた場合は、試料採取等を行った。試料や臨床情報は個人情報分担管理者のもと、連結可能匿名化し個人情報保護に努める。解析はネットワークから遮断されたコンピューターを用いた。

C. 研究結果

IL18 遺伝子の 5' 領域解析で 5 箇所 (-656G/T, -607C/A, -137G/C, +113T/G, +127C/T) に多型が認められ、日本人では 3 種類のハプロタイプが観察された (Fig 1)。CD 群, UC 群はハプロタイプ 1 (-656G, -607C, -137G, +113T, +127C) を有する個体は対照群と比較し少なく、逆にハプロタイプ 2 (-656T, -607A, -137C, +113G, +127T) およびハプロタイプ 3 (-656T, -607A, -137G, +113T, +127C) を有する個体の頻度が有意に高かった (IBD: $P=0.002$, CD: $P=0.011$, UC: $P=0.003$, Table 1)。有意差は -656G/T, -607C/A の多型により顕著に見いだされた。GC/GC, GC/TA および TA/TA の遺伝子型で比較すると IBD 群は対照群との間で有意差認めた ($P=0.0014$)。TA ハプロタイプを有する個体は IBD を発症する odds ratio は 2.46, 特に UC は 3.65 であった。

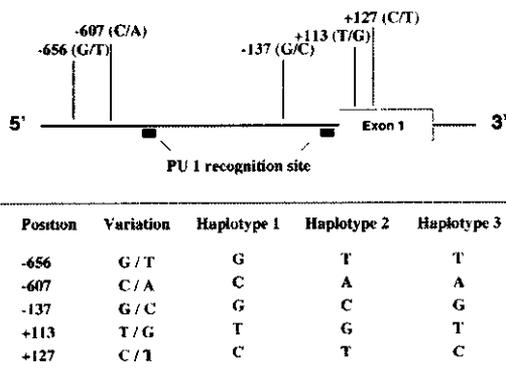


Fig 1. Gene structure of 5'-flanking region of *IL18*

D. 考案

インターフェロン γ 誘導因子として単離された interleukin-18 は Th1/Th2 細胞誘導のメディエーターとして重要であることがわかってきた²⁾。*IL18* 遺伝子は第 11 番染色体長腕に位置し、193 アミノ酸をコードする。interleukin-18 は CD 患者の炎症が存在する腸粘膜で発現が著明に亢進しており、CD の成因に重要な関係があると考えられてきた³⁻⁵⁾。報告者らは既に *IL18* コドン 35 に TCA/TCC 多型を見だし、CD 発症、特に女性患者の発症に関連することを報告した⁶⁾。*IL18* 遺伝子のプロモーター領域の遺伝子多型を基に解析した結果、ハプロタイプ 2 および 3 は IBD 発症と強い関連があり、ハプロタイプ 1 は IBD 発症に対して抑制的な役割を演じていることが示唆された。*IL18* 遺伝子プロモーター領域の遺伝子多型の差異によって、PMA/ionomycin で刺激した細胞の Interleukin-18 の発現量に差が生じることが報告されている⁷⁾。IBD 発症においても腸管粘膜における何

らかの刺激に対し、interleukin-18 誘導が生じていると考えられるが、その発現量がハプロタイプによって異なることが推測される。

Table 1. Haplotype frequency of -656 and -607 sites of *IL18*

	Haplotype			
	1	2	3	
IBD (n = 522)	173 (33.1%)	83 (15.9%)	266 (51.0%)	* $P=0.002$ * $P=0.003$ * $P=0.011$
Crohn's Disease (n = 282)	96 (34.0%)	38 (13.5%)	148 (52.5%)	
Ulcerative Colitis (n = 240)	77 (32.1%)	45 (18.8%)	118 (49.2%)	
Disease Free Cont (n = 242)	113 (46.7%)	30 (12.4%)	99 (40.9%)	

E. 結論

IL18 遺伝子プロモーター領域のハプロタイプ 2 (-656T, -607A, -137C, +113G, +127T) およびハプロタイプ 3 (-656T, -607A, -137G, +113T, +127C) は IBD 発症に相関する因子であり、ハプロタイプ 1 (-656G, -607C, -137G, +113T, +127C) は IBD 発症に対して抑制的な役割を演じることが示唆された。

(参考文献)

- Podolsky DK: Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 1997; 325: 928-937, 1008-1016.
- Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sorensen IA, Binder V. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 324: 84-88, 1991.
- Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, Torigoe K, Okura T, Nukada Y, Hattori K, Akita K, Namba M, Tanabe F, Konishi K, Fukuda S, Kurimoto M. Cloning of a new cytokine that induces IFN- γ production by T cells. *Nature* 378: 88-91, 1995.
- Pizarro TT, Michie MH, Bentz M, Woraratanadharm J, Smith MF Jr, Foley E, Moskaluk CA, Bickston SJ, Cominelli F. IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells. *J Immunol* 162: 6829-6835, 1999.
- Monteleone G, Trapasso F, Parrello T, Biancone L, Stella A, Iuliano R, Luzzza F, Fusco A, Pallone F: Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn's disease. *J Immunol* 1999; 163: 143-147.
- Kanai T, Watanabe M, Okazawa A, Nakamaru K, Okamoto M, Naganuma M, Ishii H, Ikeda M, Kurimoto M, Hibi T: Interleukin 18 is a potent proliferative factor for intestinal mucosal lymphocytes in Crohn's disease. *Gastroenterol* 2000; 119: 1514-1523.

- 6) Tamura K, Fukuda Y, Sashio H, Takeda N, Bamba H, Kosaka T, Fukui S, Sawada K, Fukuda Y, Tamura K, Satomi M, Yamada T, Yamamura T, Yamamoto Y, Furuyama J, Okamura H, Shimoyama T: *IL18* polymorphism is associated an increased risk of Crohn's disease. *J. Gastroenterol.* 37(Supple XIV): 111-116, 2002.
- 7) Giedraitis V, He B, Huang W-X, Hillert J: Cloning and mutation analysis of the human IL-18 promoter: a possible role of polymorphisms in expression regulation. *J. Neuroimmunol.* 112: 146-152, 2001.

F. 健康危機情報

現在、研究段階である

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tamura, K., Fukuda Y., Sashio, H., Takeda, N., Y., Banba, H., Kosaka, T., Fukui, S., Sawada, K., Tamura, K., Satomi, M., Yamada, T., Yamamura, T., Yamamoto, Y., Furuyama, J., Okamura, H and Shimoyama, T.: *IL18* polymorphism is associated with an increased risk of Crohn's disease *J. Gastroenterol.*, 37[suppl 14]: 111-116, 2002.
- 2) Inoue, N., Tamura K., Kinouchi, Y., Fukuda, Y., Takahashi, S., Ogura Y., Inohara, N., Núñez, G., Kishi, Y., Koike, Y., Shimosegawa, T., Shimoyama, T and Hibi, T.: Lack of common NOD2 variants in Japanese patients with Crohn's disease *Gastroenterol.*, 123: 86-91, 2002.
- 3) Sashio, H., Tamura, K., Ito, R., Yamamoto, Y., Bamba,

H., Kosaka, T., Fukui, S., Sawada, K., Fukuda Y., Tamura, K., Satomi, M., Shimoyama, T. and Furuyama, J.: Polymorphisms of *TNF* gene and *TNF receptor superfamily, member 1B* gene are associated with susceptibility to ulcerative colitis and Crohn's disease, respectively. *Immunogenetics.*, 53: 1020-1027, 2002.

- 4) 田村和朗. 炎症性腸疾患の疾患感受性遺伝子. *生物物理化学*, 46: 27-34, 2002.
- 5) 武田直久, 田村和朗, 西上隆之, 津田祥美, 指尾宏子, 古山順一, 福井 信, 坂上 隆, 里見匡迪, 下山 孝: 潰瘍性大腸炎に合併する *scolitic cancer*・*dysplasia* の遺伝子異常とその応用 *日本大腸検査学会雑誌*, 19: 147-150, 2002.

2. 学会発表

- 1) 田村和朗(2002)潰瘍性大腸炎に合併する腫瘍性病変の遺伝子異常, DDW-Japan2002. 10.24-27, 横浜. (第 44 回日本消化器病学会大会プログラム, 99, 消 P-341)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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

プレバイオティクスによる潰瘍性大腸炎治療：発芽大麦(GBF)の
長期投与臨床試験

研究協力者 光山 慶一 久留米大学医学部 第二内科 講師

研究要旨：[目的]発芽大麦(GBF：germinated barley foodstuff)は、食物繊維とグルタミンに富むプレバイオティクスである。今回、活動期と緩解期 UC での GBF 長期投与の有用性を多施設で検討した。[方法]活動期 UC 患者 15 例(8 施設)に対して基準薬剤とともに GBF 20-30g/日を 6 ヶ月間投与し、臨床症状の推移を観察した。また、緩解期 UC 患者 22 例(3 施設)に対して基準薬剤に加えて GBF 10-20g/日を 12 ヶ月間投与し、臨床症状・内視鏡所見や薬剤投与量の推移を対照群(34 例)と比較した。[結果]活動期患者での臨床試験では、GBF により臨床症状の有意な改善がみられた。緩解期患者での臨床試験では、対照群に比べて累積再燃率とステロイド投与量の有意な減少がみられた。いずれの場合にも有害事象は観察されなかった。[総括]GBF は活動期および緩解期 UC の有効かつ安全なプレバイオティクスであることが示された。

共同研究者

富安信夫、佐田通夫¹⁾、花井洋行²⁾、
安藤 朗、藤山佳秀³⁾

所属 久留米大学医学部第2内科¹⁾
浜松医科大学光学診療部²⁾
滋賀医科大学消化器内科³⁾

験の結果を報告する。

B. 研究方法

1)活動期 UC での多施設臨床試験

ステロイドやアミノサリチル酸製剤による基準治療を行っても臨床症状が1ヶ月以上不変の、軽症・中等症の活動期 UC 患者を対象とした。中央症例登録法に基づくオープン試験方式で行い、対照群(n=7)では基準治療のみ、GBF 群(n=11)では基準治療に GBF(キリンビール株式会社、東京)を加えた。GBF は 20-30g/日を 2-3 回に分割して1ヶ月投与し、-1, 0, 1ヶ月目の Lichtiger 臨床スコアを判定した。その後、患者(n=15)に基準治療を継続しながら同量の GBF を 6 ヶ月間投与し、定期的に臨床スコアを評価した。(参加施設：札幌厚生病院、新潟大学第3内科、慶應義塾大学内科、藤田保健衛生大学消化器内科、滋賀医科大学消化器内科、兵庫医科大学消化器内科、川崎医科大学内科消化器Ⅱ、久留米大学第2内科)

2)緩解期 UC での多施設臨床試験

緩解期(Rachmilewitz 臨床活動性指数(CAI)≤4)の UC 患者を対象とした。UC の基準薬剤の投与は継続し、ステロイドは適宜減量した。オープン試験方式とし、対照群(n=34)では基準治療のみ、GBF 群(n=22)では基準治療に GBF を加えた。GBF は 10-20g/日を 1-2 回に分け 12 ヶ月間投与した。12 ヶ月以内に再燃(CAI>4)した場合は

A. 研究目的

潰瘍性大腸炎(UC)の病因はまだ解明されていないが、何らかの遺伝子異常によってもたらされる免疫学的異常に腸内細菌などの環境因子が加わって過剰・異常な免疫反応が腸管で惹起され、その結果炎症が発症・進展するものと理解されている。発芽大麦(GBF：germinated barley foodstuff)は、発芽した大麦の胚芽とアロイロン層よりなり、食物繊維とグルタミンに富むプレバイオティクスで、平成 12 年に厚生労働省より特別用途食品の個別評価型病者用食品として認可を受けている。GBF は腸内細菌 *Bifidobacterium* と *Eubacterium* の作用により酪酸に変換され、酪酸が上皮細胞にエネルギーを供給したり、上皮細胞での NF- κ B や STAT3 などの炎症促進性シグナルを抑制して抗大腸炎効果を発揮する。我々は活動期 UC を対象に GBF の短期投与試験を行い、その有効性と安全性を報告してきた。本稿では、活動期 UC および緩解期 UC を対象とした多施設での長期投与臨床試

その時期を end point とした。期間中には, CAI, Sandborn 疾患活動性指数(DAI), 基準薬投与量を定期的に評価した。(参加施設: 浜松医科大学光学診療部, 滋賀医科大学消化器内科, 久留米大学第2内科)

C. 研究結果

1)GBF 群と対照群の患者背景に差異はみられなかった。試験開始前と開始時では両群間の臨床スコアに差異を認めず, 投与開始1ヶ月後においてGBF 群では対照群に比較して有意な改善を認めた。さらに, GBF 投与開始6ヶ月後の臨床スコアは開始時に比べて有意に低下していた(図1)。臨床スコアの項目のなかでも血便と夜間排便の改善が顕著であった。GBF による有害事象は観察されなかった。

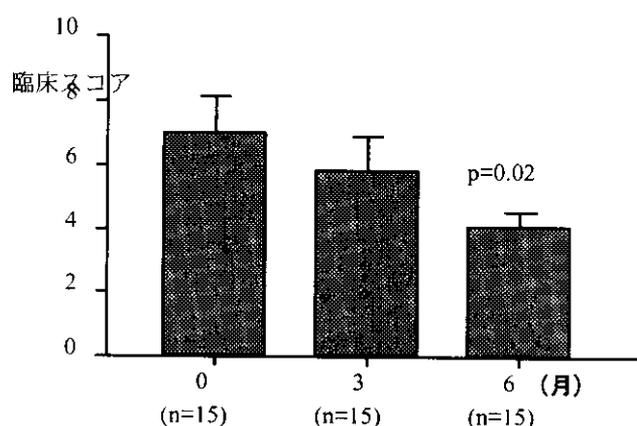


図1 活動期 UC 患者における GBF の効果

2)GBF 群と対照群の患者背景に差異はみられなかった。試験開始12ヶ月間での累積再燃率は, GBF 群で対照群より有意に低下していた(図2)。DAIは3, 6, 12ヶ月後においてGBF 群で対照群や開始時に比べて有意に低下していた。アミノサリチル酸投与量には両群間で差が無かったが, ステロイド投与量は3ヶ月後においてGBF 群で有意に低下していた。有害事象は観察されなかった。

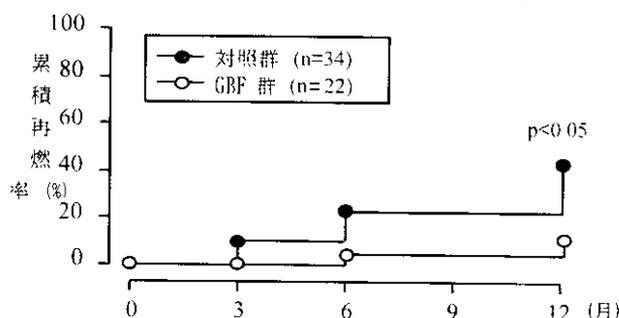


図2 緩解期 UC 患者における GBF の効果 (Kaplan-Meier 法)

D. 考察

従来 GBF の臨床効果は, 1ヶ月という比較的短期間の投与で評価されてきた。しかし, UC が再燃・緩解を繰り返す慢性疾患で長期の治療を要することを踏まえ

ると, GBF をより長期に使用した場合の有用性について検討する必要がある。本研究では, 活動期 UC に対して GBF の6ヶ月の長期投与を行った結果, 短期投与時と同様の有用性を確認できた。さらに, 緩解期 UC に対して12ヶ月の長期投与を行い, 緩解維持効果も有することが判明した。いずれの場合も明らかな有害事象は観察されず, GBF は UC の活動性を問わず積極的に試みるべきプレバイオティクスの1つと考えられた。

E. 結論

GBF は活動期および緩解期 UC の有効かつ安全なプレバイオティクスと考えられる。

F. 健康危機情報

本研究を含めたこれまでの臨床試験において GBF が原因と推定される有害事象は観察されず, さらに既に数千人への投与実績を考慮すると, GBF の安全性に大きな問題はないものと考えられる。

G. 論文発表

- 1) Mitsuyama K, Saiki T, Kanauchi O, Iwanaga T, Tomiyasu N, Nishiyama T, Tateishi H, Shirachi A, Ide M, Suzuki A, Noguchi K, Ikeda H, Toyonaga A, Sata M. Treatment of ulcerative colitis with germinated barley foodstuff feeding: a pilot study. *Aliment Pharmacol Ther* 1998; 12: 1225-30.
- 2) Kanauchi O, Iwanaga T, Mitsuyama K. Germinated barley foodstuff feeding. A novel nutraceutical therapeutic strategy for ulcerative colitis. *Digestion* 2001; 63 Suppl 1: 60-7.
- 3) Kanauchi O, Suga T, Tochiwara M, Hibi T, Naganuma M, Homma T, Asakura H, Nakano H, Takahama K, Fujiyama Y, Andoh A, Shimoyama T, Hida N, Haruma K, Koga H, Mitsuyama K, Sata M, Fukuda M, Kojima A, Bamba T. Treatment of ulcerative colitis by feeding with germinated barley foodstuff: first report of a multicenter open control trial. *J Gastroenterol* 2002; 37 Suppl 14:67-72.
- 4) Mitsuyama K, Toyonaga A, Sata M. Intestinal microflora as a therapeutic target in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 2002; 37 Suppl 14:73-7.
- 5) Kanauchi O, Mitsuyama K, Araki Y, Andoh A. Modification of intestinal flora in the treatment of inflammatory bowel disease. *Curr Pharm Des* 2003; 9: 333-46.
- 6) Bamba T, Kanauchi O, Andoh A, Fujiyama Y. A new prebiotic from germinated barley for nutraceutical treatment of ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 818-24.

H. 特許取得

US 6475533

Substance containing proteins and insoluble dietary fibers

derived from the germinated seed of a grass family plant and uses thereof. Kanauchi et al.

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

回腸囊炎症例における腸内細菌叢の検討—非回腸囊炎症例と比較して

研究協力者 畠山 勝義 新潟大学大学院医歯学総合研究科 消化器・一般外科 教授

研究要旨：回腸囊肛門吻合術後の腸内細菌叢を検索し、回腸囊炎との関係を検討した。潰瘍性大腸炎に対し回腸囊肛門吻合術が施行されたうちの18例を対象とした。対象の平均年齢は45.4歳（23-71歳）、男女比は7:11、平均術後経過月数は87.3ヶ月（6-178ヶ月）だった。便を採取後嫌気状態とし、24時間以内に培養、発育した集落にて生菌数を算出した。回腸囊炎の診断は臨床症状、内視鏡所見、組織像を検討しPDAI scoreを算出して行った。18例中、回腸囊炎と診断された症例は7例だった。回腸囊炎群は嫌気性菌の減少がみられ、特にBacteroidaceae及びBifidobacteriaが有意に減少していた。好気性菌の差はなかった。回腸囊炎群は嫌気性菌のBacteroidaceae及びBifidobacteriaが有意に減少しており、その発症と関連がある可能性がある。

共同研究者

岩谷 昭¹⁾、飯合恒夫¹⁾、桑原明史¹⁾、
岡本春彦¹⁾、須田武保¹⁾、山本達男²⁾、味岡洋一³⁾、
朝原 崇⁴⁾、野本康二⁴⁾

所属 新潟大学大学院消化器・一般外科¹⁾、
同細菌学分野²⁾、同分子病態病理学³⁾、
ヤクルト中央研究所⁴⁾

A. 研究目的

潰瘍性大腸炎に対する大腸全摘、回腸囊肛門吻合術は広く行われているが、その晩期合併症に回腸囊炎がある。回腸囊炎の治療に抗生物質が有効なことや、ピフィズス菌や乳酸菌の投与で再発が抑制できたとの報告もあることから、回腸囊炎の発症と腸内細菌とは何らかの関係があると言われてきた。今回、回腸囊肛門吻合術後の腸内細菌叢を検索し、回腸囊炎との関係を検討した。

B. 研究方法

潰瘍性大腸炎に対し当科で回腸囊肛門吻合術が施行されたうちの18例を対象とした。対象の平均年齢は45.4歳（23-71歳）、男女比は7:11、平均術後経過月数は87.3ヶ月（6-178ヶ月）だった。便を採取後嫌気状態とし、24時間以内に解析を行った。便希釈液を12種類の非選択、選択培地に塗抹し培養、発育した集落にて生菌数を算出した。回腸囊炎の診断は臨床症状、内視鏡所見、組織像を検討しPDAI scoreを算出、7点以上を回腸囊炎と

した。

C. 結果

PDAI scoreによる診断結果

18例中、回腸囊炎と診断された症例は7例だった。回腸囊炎群は非回腸囊炎群と比較すると、平均年齢が若く、平均術後経過月数が短かった（表1）。回腸囊炎群のPDAI scoreの合計は平均で8.4で、非回腸囊炎群は1.4だった。臨床所見がなくとも回腸囊炎と診断された症例や、症状から回腸囊炎を疑ったが回腸囊炎でなかった症例もあり、臨床所見のみで診断するのは難しいと思われた。

腸内細菌叢の結果

健康人10名とIPAA群全例を検討すると、IPAA群は総嫌気性菌、Bacteroidaceae、Bifidobacteria、Veillonellaが有意に減少していた。回腸囊炎群と非回腸囊炎群を比較すると、回腸囊炎群は嫌気性菌のBacteroidaceae及びBifidobacteriaが有意に減少していた（表2）。特にBifidobacteriaは、非回腸囊炎群で全例検出されたのに対し、回腸囊炎群はわずか29%に検出された。好気性菌の有意な差はなかった。

D. 考察

回腸囊炎の原因は不明であるが、多くは潰瘍性大腸炎の症例に発生することから潰瘍性大腸炎と同様の免疫学的要因が推定されている。しかし、メトロニダゾール

やシプロフロキサシン等の抗生物質が有効なことから、腸内細菌の関与も疑われている。回腸囊炎と腸内細菌叢の変化に関する報告は多数あるが、まだ一定の見解が得られていない。今回我々の結果では、嫌気性菌の *Bacteroidaceae* 及び *Bifidobacteria* が有意に減少していた。そういった腸内細菌叢の変化と回腸囊炎の発症とは関連がある可能性がある。近年、ビフィズス菌や乳酸菌などのプロバイオティクスの投与で、潰瘍性大腸炎や回腸囊炎の再発を抑制できたとの報告もある。我々も今後、ビフィズス菌製剤を投与し腸内細菌を改善することで、回腸囊炎の改善がみられるか検討を行いたい。

E. 結論

IL-17 は T 細胞に由来するサイトカインであるが、

IL-1 β や TNF- α と共通する proinflammatory cytokine としての性格を示す点が興味深い。今後、炎症性腸疾患の病態への関与が明らかにされていくものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

第 103 回日本外科学会総会で発表予定。

G. 知的所有権の取得状況

特に行っていない。

厚生労働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

クローン病の下痢症状に対する probiotics の臨床効果

分担研究者 福田 能啓 兵庫医科大学 消化器内科 助教授

研究要旨：クローン病は難治性の炎症性腸疾患であり、5-aminosalicylic acid 製剤や副腎皮質ホルモン、免疫抑制剤、さらには完全静脈栄養や成分栄養剤を用いた経腸栄養療法が行われている。しかし、これらの治療法によっても難渋する下痢症状の出現をみることがあり、社会復帰の妨げとなる。クローン病症例にみられた下痢症状改善を目的に prebiotics および probiotics を投与し臨床効果を検討したところ、改善効果があり QOL の低下防止に有用であると考えられた。

共同研究者

富田寿彦、福永 健、樋田信幸、小坂 正、堀 和敏、
澤田康史、下山 孝

所属 兵庫医科大学消化器内科

A. 研究目的

クローン病は難治性の炎症性腸疾患であり、原因が不明なため対症療法が行われている¹⁾。炎症抑制を目的に、薬物療法として 5-aminosalicylic acid 製剤であるペンタサや副腎皮質ホルモン、さらには免疫抑制剤が投与されている。しかし、病変が大腸にとどまらず広く小腸に及ぶことが多いため、消化吸収障害や蛋白漏出が加わり、しばしば栄養不良状態を合併する。したがって、完全静脈栄養や成分栄養剤を用いた経腸栄養療法が行われており、栄養状態の改善に伴って炎症抑制がみられ、緩解導入に有用であることが明らかとなってきた²⁾。

しかし、クローン病ではこれらの治療法によっても難渋する下痢症状の出現をみることがあり、社会復帰の妨げとなることもある。今回、クローン病症例にみられた下痢症状改善を目的に prebiotics および probiotics を投与し臨床効果を検討した。

B. 研究方法

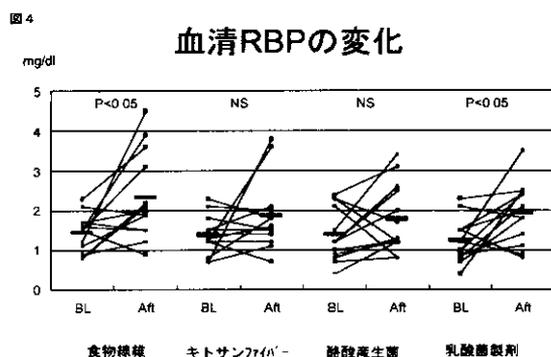
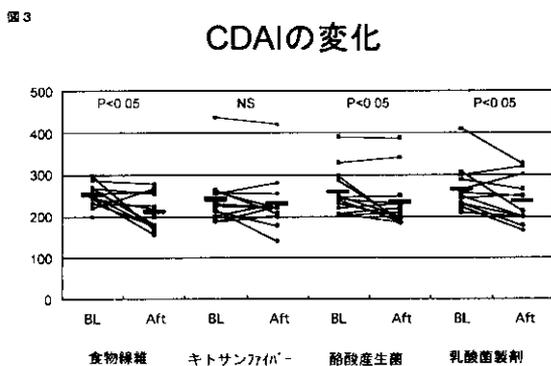
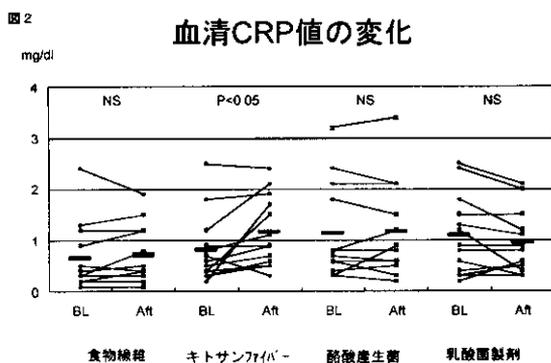
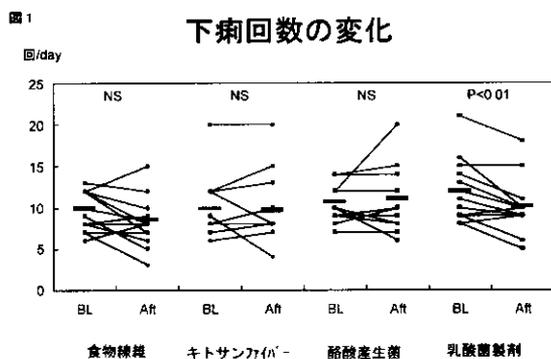
成分栄養剤を用いた経腸栄養療法施行中の 1 ヶ月以上継続する難治性の下痢症状を呈するクローン病を対象にした。52 例をランダムに食物繊維投与群、キトファイバー投与群、酪酸菌製剤投与群、乳酸菌製剤投与群の 4 群に分けた。食物繊維投与群ではアルギン酸ナトリウ

ムを主成分とする製剤を 1 回 25ml、1 日 3 回経口投与し、キトファイバー群では 1 回 2g、1 日 2 回経口投与した。酪酸産生菌群では、*Clostridium butyricum* を含有する製剤を 1 日 3 回投与した。乳酸菌製剤投与群では、*Streptococcus faecalis* や *Aspergillus oryzae* NK 菌などを含有する総合胃腸薬製剤を 1 回 6 錠、1 日 3 回投与した。それぞれの群で、その時点で継続している治療法に加えて 4 週間投与し、治療前後で下痢回数、血清 C-reactive protein 値、Crohn's Disease Activity Index(CDAI)、血清 retinol binding protein(RBP)の値を調査・測定した。

C. 結果

食物繊維群、キトサンファイバー群、酪酸産生菌群、乳酸菌含有総合胃腸薬群の 4 群における投与前の平均の下痢回数はそれぞれ 9.9 ± 2.84 回、 9.8 回 ± 3.78 、 10.6 ± 2.22 回、 11.9 ± 3.82 であり、投与後にはそれぞれ 8.5 ± 3.20 回、 9.6 ± 4.13 回、 11.0 ± 3.81 回、 10.1 ± 3.35 回であった。乳酸菌含有総合胃腸薬群で有意な改善がみられた ($P < 0.01$) (図 1)。炎症指標である血清 CRP 値は食物繊維群、キトサンファイバー群、酪酸産生菌群、乳酸菌含有総合胃腸薬群で開始前はそれぞれ 0.65 ± 0.65 mg/dl、 0.82 ± 0.67 mg/dl、 1.14 ± 0.93 mg/dl、 1.09 ± 0.78 mg/dl であった。投与後にはそれぞれ 0.72 ± 0.56 mg/dl、 1.16 ± 0.89 mg/dl、 1.15 ± 0.91 mg/dl、 0.94 ± 0.61 mg/dl となり、キトサンファイバー群で炎症反応の増加がみられた ($P < 0.05$) (図 2)。投与前の CDAI は食物繊維群、キトサンファイバー群、酪酸産生菌群、乳酸菌含有総合胃腸薬群でそれぞれ 251 ± 27.5 、 241 ± 64.8 、 258 ± 55.1 、 $264 \pm$

54.3 であり、投与後はそれぞれ 210 ± 42.4 、 231 ± 65.9 、 232 ± 62.4 、 236 ± 53.9 であった。食物繊維群、酪酸産生菌群、乳酸菌含有総合胃腸薬群で低下がみられた ($P < 0.05$) (図3)。投与前の血清 RBP 値は食物繊維群、キトサンファイバー群、酪酸産生菌群、乳酸菌含有総合胃腸薬群でそれぞれ $1.44 \pm 0.47 \text{mg/dl}$ 、 $1.36 \pm 0.49 \text{mg/dl}$ 、 $1.38 \pm 0.68 \text{mg/dl}$ 、 $1.23 \pm 0.54 \text{mg/dl}$ であり、投与後にはそれぞれ $2.33 \pm 1.10 \text{mg/dl}$ 、 $1.85 \pm 0.90 \text{mg/dl}$ 、 $1.77 \pm 0.87 \text{mg/dl}$ 、 $1.04 \pm 0.76 \text{mg/dl}$ であった。食物繊維群と乳酸菌含有総合胃腸薬群で増加をみとめた ($P < 0.05$) (図4)。



D. 考察

クローン病の緩解導入に完全静脈栄養療法や成分経腸栄養療法が有用であるが激しい下痢症状を呈することがある。ロペラマイドなどの止痢剤投与で改善をみることもあるが、一般に行われている対症療法に抵抗性であることも少なくない。成分栄養剤投与時の高浸透圧性の下痢や回盲部病変のための胆汁酸吸収不全による下痢、短腸症候群などの下痢が合併していることもあり、それぞれの原因に応じた対策が必要である3)。

今回は、外来で成分栄養剤投与による維持療法中に頑固な下痢症状を併発したクローン病症例に対して、腸内細菌叢への影響を考慮して prebiotics および probiotics の併用投与を試みた。下痢回数は食物繊維群、キトサンファイバー群、酪酸産生菌群、乳酸菌含有総合胃腸薬群で減少傾向をみたが、食物繊維群と乳酸菌含有総合胃腸薬群で改善傾向は強く、乳酸菌含有胃腸薬群では有意に減少した ($P < 0.01$)。しかし、血清 CRP 値はいずれの群でも優れた改善効果を見とめず、今回の治療期間では抗炎症効果を見とめなかった。これらの prebiotics や probiotics がおもに大腸で腸内細菌叢に働く可能性を考慮すると、小腸に主な病変部位を有するクローン病ではその効果が不十分ではなかったかと考えられた。一方、下痢回数や腹痛、発熱などの臨床症状の総合たる CDAI の変化をみると、何れの群でも改善傾向にあった。とくに、食物繊維群、酪酸産生菌群、乳酸菌含有総合胃腸薬群では有意な改善がみられた ($P < 0.05$)。さらに、消化管からの栄養素の吸収を反映すると考えられる rapid turnover protein である血清 RBP 値が下痢の減少とともに増加したことは、成分栄養剤が小腸からより多く吸収されるようになったことを推測させる。したがって、直接的な抗炎症作用がないものの、炎症反応を増悪させることもないので、成分栄養剤を用いたクローン病の栄養療法時の併用療法として有用であると考えられた。

今後は、これらの prebiotics や probiotics 投与時の腸内細菌叢の変動を含めた無作為割付試験を行い、有用性を明らかにしてゆく必要がある。

E. 結論

薬物療法、栄養療法時に下痢症状の続くクローン病症例に probiotics を併用投与したところ、症状の改善効果を見とめ QOL 低下の防止に有用であった。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 日本消化吸収学会雑誌印刷中
2. 日本消化吸収学会で発表

文献

1) 福田能啓、富田寿彦、馬場裕子、里見匡迪、下山 孝、Crohn's 病の内科治療、「炎症性腸疾患の臨牀－診断から

治療まで－」改定第2版、編集、朝倉 均、多田正大、日本メディカルセンター、2001.5.10

2) Fukuda Y, Kosaka T, Okui M, Hirakawa H, Shimoyama T., Efficacy of nutritional therapy for active Crohn's disease, J Gastroenterol, 30 (13), 83-87, 1995

3) 小坂 正, 田中淳二, 富田寿彦, 堀 和敏, 福田能啓, 田村和民, 下山 孝 (2001) 経腸栄養療法にともなう便回数の増加に対するデンプン・デキストリン投与の有用性. 静脈経腸栄養雑誌, 16, 91-94.

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 の病態解明に向けて:クローン病発症における *Mycobacterium paratuberculosis* の関与についての研究

分担研究者 千葉 勉 京都大学大学院 消化器内科 教授

研究要旨：クローン病の病態形成に腸内細菌叢が関与していることが示唆されている。*Mycobacterium paratuberculosis*(MPT)は牛のヨーネ病の病原菌であるが、本疾患の病理像は人のクローン病と類似点が見られる。そこで MPT に特異的な配列 IS900 のリコンビナント蛋白を合成し、それを用いて MPT に特異的な ELISA の系を確立した。その結果、クローン病患者の抗 MPT 抗体陽性者は他の IBD 患者に比し、明らかに高率であった。また人マクロファージ(MP)を用いた感染実験で、実際に MPT が人の MP に感染することが示された。以上より、MPT がクローン病の病態に関与していることが示唆された。

A. 研究目的

クローン病の発症率は増加の一途をたどっているが、その原因は未だに不明である。しかし近年のその病態の形成に腸内細菌叢が重要な役割を担っていることが示唆されている。最近クローン病の病因に関与する遺伝子として NOD2 が同定されたが、本遺伝子はマクロファージに特異的に発現している。興味深いことに本遺伝子は細胞内の LPS の受容体であり、その C 端側の LRR(Leucine rich repeat)領域に LPS が結合することによって、細胞の NF-κB の活性化を促進させることが明らかとなった。そしてクローン病患者の変異（あるいは SNP）では、LPS による NF-κB 活性化が抑制されていることが示された。このことは腸内細菌に対する免疫反応の障害がクローン病の発症に関与する可能性を示唆している。

一方、牛のヨーネ病はクローン病類似の肉芽腫病変が腸管に形成されるが、その原因菌として *Mycobacterium paratuberculosis*(MP)が同定されている。興味深いことに MP は人畜共通感染症を生じる *Mycobacterium avium* に IS900 という MP 特有の遺伝子カセットが挿入されたものであるが、MP が人に感染している、あるいはしうるといふ証拠はまだ得られていない。そこで今回は MP に特異的な領域である IS900 に対するリコンビナント蛋白を合成し、それを用いて ELISA 系を確立して、クローン病患者の MP に対する真の抗体価を測定し、クローン病の病態に MP 感染が関与しているか否かを検討す

ることを目的とした。また同時に、ヒト・マクロファージに対して MP が感染しうるか否かを in vitro 実験で検討した。

B. 研究方法

1. MP を培養し、DNA を抽出したのち、IS900 部分に特異的なプライマーを用いて増幅させた。このように PCR で増幅した 990bp の IS900 に特異的な DNA を GST reading frame をもった pGEX-4T-2 ベクターに挿入した。
2. このベクターを導入した大腸菌を培養したのち、それをグルタチオン・セファローズ 4B カラムにかけて、合成蛋白を抽出した。
3. 合成蛋白については SDS-PAGE でスクリーニングした。さらに合成蛋白の一部をアミノ酸分析にかけて、IS900 が正しく合成されたかどうかを検討した。
4. この MP-GST 蛋白をプレートにコーティングし、ELISA 系を確率した。
5. これを用いてクローン病をはじめ種々の腸疾患患者の血清の抗体価を測定した。
6. 一方、本 IS900 蛋白を用いて、IS900 特異的抗体を、マウスハイブリドーマより作成した。本抗体を用いて、クローン病患者をはじめとする種々の腸疾患患者の大腸組織中の MP の存在を検討した。
7. 一方、IS900 特異的なプローベを用いて PCR サザン解析をおこない、患者の組織中の MP 遺伝子の

同定をおこなった。

8. ヒトのTHP-1細胞をPMAでマクロファージに分化させたのち、培養したMP(MOI 10)を感染させた。感染4日後に細胞を破壊したのち、CFU アッセイをおこない、MPの増殖を確認した。

C. 研究結果

1. 合成した蛋白はアミノ酸分析により IS900 蛋白そのものであることが確認された。
2. クローン病患者では、IS900 に対する特異的 IgG, IgA が正常コントロールに比して有意に上昇していた。(24/40 例 (60%))。しかし潰瘍性大腸炎では4/20 例 (20%)、結核患者では1/10 例 (10%) で陽性であった。
3. 一方、抗 IS900 抗体を用いた免疫組織学的検討では、クローン病患者では70%に陽性であったが、潰瘍性大腸炎では約20%、さらに結核患者、正常者では1例も陽性例はなかった。
4. さらにPCR サザーンを用いた検討では、クローン病患者では29/29 例 (100%) で遺伝子が同定されたが、潰瘍性大腸炎では20/33 例 (61%)、また正常人では8/11 例 (72.7%) であった。
5. HPI 細胞を用いた in vitro の感染実験では、CFU アッセイにて MP の増殖が確認された。また in situ hybridization でも細胞内に MP の感染が確認された。

D. 考察

今回の研究から、クローン病患者では MP に特異的な IS900 に対する抗体価が正常人や潰瘍性大腸炎などの他の腸疾患患者に比して、著明にかつ特異的に上昇していることが明らかとなった。また免疫組織学的な検討においても、クローン病患者の大腸粘膜に IS900 に対する特異的免疫反応が確認された。さらに PCR サザーンによって、IS900 の遺伝子の存在も確認された。これらの成績はクローン病患者に MP が特異的に感染していることを強く示唆している。

従来から MP がヒト・クローン病の病原菌ではないかという可能性は考えられており、その抗体価を測定するところみはいくつかおこなわれてきた。しかし MP は IS900 以外の部分は *Mycobacterium avium*(MA)と同一であることから、MA との交差反応があり、特異的ではないとの指摘がなされてきた。そこで今回私達は、MP に特異的な IS900 に対する抗体価の測定をおこなった。したがって今回の検討では MA の交差反応を考慮する必

要はまったくなくなった。実際 MA 感染患者での陽性例は認められなかった。この特異性の問題は免疫組織化学、PCR においても同様であったが、今回はすべて IS900 に照準をあてることでもって、この問題はほぼ解決されたものと言える。

牛のヨーネ病はわが国でも最近増加の一途をたどっており、畜産の領域では大きな問題となっている。この増加は近年わが国でもクローン病患者が増加してきている事実と合致している。MA は人畜共通の感染症であることが明らかとなっているが、MP については今までヒトに感染するという証拠は得られていない。そこで今回私達は、ヒトのマクロファージへの感染実験を試みたが、少なくとも in vitro では、MP はマクロファージに感染して増殖することが判明した。このことをもって、in vivo でも感染している証拠にはなり得ないが、今後ひとの組織からの培養も含めて、その感染を明らかにしていくことが重要である。さらにもし MP がクローン病の発症に関与しているとすれば、クローン病患者の治療法の確立に大きく貢献できるものと期待される。

研究協力者の研究

1. マウス Dextran Sodium Sulfate(DSS)腸炎における急性期蛋白 Heme oxygenase1 による大腸炎病態修飾機序の解明

京都府立医科大学第一内科 吉川 敏一

Heme oxygenase1(HO1)は様々なサイトカインや酸化ストレスにより誘導される急性期蛋白であり、炎症の場面に介入し抑制的に働くことが知られている。そこでマウス DSS 腸炎モデルを用いて、その病態形成における HO1 の役割を検討した。その結果大腸粘膜における HO1 mRNA 発現は DSS 腸炎で経時的に増加した。さらに DSS 腸炎の DAI score は HO1 阻害剤 ZnPP 投与によって有意に増加した。また ZnPP 投与群では生存率も有意に低下し、大腸粘膜における IFN γ 、TNF α 蛋白量も増加した。以上より DSS 腸炎で誘導される HO1 は炎症に対して抑制的に作用している可能性が示唆された。

2. DSS 腸炎モデルと *Yersinia enterocolitica* Hsp60 大腸炎モデルにおける CD25, CD4 抑制性 T 細胞
近畿大学腫瘍免疫等研究所 八木田 旭邦

CD25, CD4 抑制性 T 細胞は最近抑制性の T 細胞として注目を集めている。本 T 細胞は種々の自己免疫疾患の発症抑制において重要な役割をはたしていることが報告されているが、IBD における関与については不明な点が多い。そこで本研究では、DSS 腸炎と研究者らが開

発した自己免疫的機序で発症する *Yersinia Hsp60* 投与による腸炎における CD25, CD4 細胞の動態を検討した。その結果大腸粘膜の CD25, CD4 細胞は DSS 投与により腸炎がなかった(血便なし)マウスにおいて、腸炎が生じたマウスのみならず正常マウスと比較しても有意に高値であった。一方 Hsp60 による腸炎では大腸の CD25, CD4 細胞数に変動はなかったが、そのうち CD69 陽性の活性化細胞は明らかに低下していた。以上より、IBD における CD25 陽性細胞の役割が示唆された。

3. 炎症性腸疾患におけるマクロファージ遊走阻止因子の役割とその制御による臨床応用への可能性

北海道大学第三内科 浅香 正博

マクロファージ遊走阻止因子(MIF)は様々な細胞に分布し、種々の炎症や細胞の増殖反応に関与していることが報告されている。今回の検討で研究者らは DSS 腸炎における MIF の発現を検討し、その役割について検討した。DSS 腸炎においては腸粘膜における MIF の発現が増強していた。さらに抗 MIF 抗体の投与により、DSS 腸炎が軽減し、TNF α や INF γ , さらに MMP mRNA の発現が抑制された。一方ヒトの IBD 患者の白血球や大腸組織においても MIF の発現の増強がみられた。また MIF KO マウスおよび Tg マウスを用いた検討でも、MIF の腸炎に対する効果が確認された。以上より MIF は IBD において、その進展に対して促進的に作用している可能性が示唆された。

4. Hypoxia Inducible Factor (HIF)1 α の炎症性腸疾患における役割

慶応大学医化学教室 末松 誠

炎症性腸疾患において、腸管免疫システムを取り巻く腸管内外の微少循環が局所免疫で重要な役割をはたしていることが示唆されている。実際炎症時における低酸素状態によって VEGF が IBD 患者の T 細胞で発現増強していることが報告されている。そこで HIF の conditional KO マウスを用いて腸炎における HIF の役割を検討した。HIF1-KO マウスに C45Rb high T 細胞を transfer して腸炎を発症させた。現在本マウスの腸炎の状態について解析中である。

5. 潰瘍性大腸炎の病変部および末梢血における Th1/Th2 バランスの検討

札幌医大第四内科 新津 洋司郎

潰瘍性大腸炎(UC)の免疫反応は Th2 優位との報告が多いが、大腸組織においても同様に Th2 優位かどうか

は明らかではなかった。そこで研究者らは CD62L マーカーを用いて組織中の Th1,2 細胞について検討した。UC、およびその他の疾患患者の直腸粘膜組織を、CD4, CD45RO, CD62L 抗体で染色し、共焦点顕微鏡を用いて細胞数をカウントした。その結果、1) 活動期 UC 患者の直腸病変部では CD4, CD45RO+ メモリー細胞が健常人、非活動期患者に比して有意に増加していた。さらに活動期 UC では、CD62L 細胞 (Th2 細胞) が有意に増加していた。またこの際、末梢血の CD4, CD45RO+ 細胞、さらに Th2 細胞の数と相関関係が見られた。以上の結果から、UC では、末梢、病変部ともに Th2 有意であることが判明した。

E. 結論

1. *Mycobacterium paratuberculosis* 感染がクローン病の病態に関与している可能性が示唆された。
2. DSS 腸炎モデルにおいて、酸化ストレスで誘導される急性期蛋白の HO1 の発現が増加し、これが炎症に対して抑制的に作用していることが判明した。
3. マウスの腸炎モデルにおいて、CD25CD4T 細胞は炎症の進展を抑制していることが示唆された。
4. MIF は腸炎発症に対して促進的に作用することが判明した。
5. IBD において、炎症による微少循環の変化が HIF1 を介して、炎症にさらに影響している可能性が示唆された。
6. 潰瘍性大腸炎では末梢血のみならず、炎症粘膜局所においても Th2 反応が優位であることが明らかとなった。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 仲瀬裕志、千葉 勉：大腸：酒井 紀、早川弘一、西崎 統、小林祥泰、福井次矢編、認定医・専門医のための内科学レビュー2002—最新主要文献と解説—, 91-96, 2002, 総合医学社。
2. 千葉 勉：炎症から発癌への移行が考えられる疾患：Colitic Cancer 潰瘍性大腸炎発癌の診療上の問題点, 21-26, 2003, 新興医学出版社。
3. 岡崎和一、仲瀬裕志、千葉 勉：粘膜ドラッグデリバリーシステムによる炎症性腸疾患に対する新しい治療法：Molecular Medicine 39(9), 1056-1063, 2002。
4. Watanabe T, Yoshida M, Shirai Y, Yamori M, Yagita H, Chiba T, Kita T, Wakatsuki Y: Administration of an antigen

- at a high dose generates regulatory CD4+ T cells expressing CD95 ligand and secreting IL-4 in the liver. *J Immunol* 168: 2188-2199:2002.
5. Nakase H, Okazaki K, Tabata Y, Ozeki M, Watanabe N, Uose S, Ohana M, Uchida K, Nishi T, Itoh T, Kawanami C, Chiba T: New cytokine delivery system using gelatin microspheres containing interleukin-10 for experimental inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Exp Ther* 301:59-65:2002.
 6. Nakase H, Okazaki K, Ohana M, Ikeda K, Uchida K, Uose S, Itoh T, Iwano M, Watanabe N, Yazumi S, Kawanami C, Inoue F, Chiba T: The possible involvement of microorganisms, other than *Helicobacter pylori* in the development of rectal MALT lymphoma in patients negative for *H. pylori*. *Endoscopy* 34:343-346:2002.
 7. Watanabe N, Okazaki K, Yazumi S, Nishi T, Matsuura M, Chiba T: Acute graft-versus-host disease in the small intestine. *Gastrointest Endosc* 55:716:2002.
 8. Watanabe N, Ikuta H, Chiba T, Honjo T, et al: Activation and differentiation of autoreactive B-1 cells by interleukin-10 induce autoimmune hemolytic anemia in Fas-deficient anti-erythrocyte immunoglobulin transgenic mice. *J Exp Med* 196:141-146:2002.
 9. Yoshida M, Shirai Y, Watanabe T, Yamori M, Iwakura Y, Chiba T, Kita T, Wakatsuki Y: Differential localization of colitogenic Th1 and Th2 cells monospecific to a micro flora-associated antigen in mice *Gastroenterology* 123:1949-1961 2002.
 10. Watanabe N, Okazaki K, Matsuura M, Chiba T: Elimination of local macrophages in the intestine prevents chronic colitis in interleukin-10 deficient mice *Dig Dis Sci* 2002 (in press).
 11. Nakase H, Okazaki K, Tabata Y, Chiba T: Biodegradable microspheres targeting mucosal immune-regulating cells: New approach for treatment of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol (Suppl)* 2002 (in press)
 12. Tojo M, Matsuzaki K, Minami T, Honda Y, Yasuda H, Chiba T, Saya H, Fujii-Kuriyama Y, Nakao M: The aryl-hydrocarbon receptor nuclear transporter is modulated by the SUMO-1 conjugating system. *J Biol Chem* 277:46576-46585:2002.
 13. Okazaki K, Nakase H, Watanabe N, Tabata Y, Ikada Y, Chiba T: Intestinal drug delivery systems with biodegradable microspheres targeting mucosal immune-regulating cells for chronic inflammatory colitis. *J Gastroenterol* 37(Suppl IV) 44-52:2002.
2. 学会発表
1. 松浦 稔、河南智晴、岡崎和一：潰瘍性大腸炎における治癒過程期粘膜拡大観察の臨床的意義：第 63 回日本消化器内視鏡学会総会・シンポジウム、2002.4.18
 2. Chiba T, Nakase H, Watanabe N, Okazaki K : Development of an oral drug delivery system targeting immunoregulating cells in inflammatory bowel disease: A new therapeutic strategy: International Symposium, 2002.4.25
 3. M Matsuura, K Okazaki, H Nakasae, Y Tabata, M Ohana, T Nishi, T Watanabe, H Tamaki K Uchida, T Chiba: Rectal Immunization with Antigen-Containing Microspheres Induces Stronger Th2 Responses Than Oral Immunization: A New Method for Vaccination: Digestive Disease Week and the 103rd Annual Meeting of the American Gastroenterological Association. 2002.5.19
 4. N Watanabe, K Ikuta, K Okazaki, H Nakase, Y Tabata, M Matsuura, H Tamaki, T Honjo, T Chiba. Elimination of Local Macrophages in the Intestine Prevents Chronic Colitis in Interleukin-10 Deficient Mice *Digestive Disease Week and the 103rd Annual Meeting of the American Gastroenterological Association*, 2002.5.19
 5. Y Wakatsuki, M Yoshida, Y Shirai, T Watanabe, M Yamori, T Kita, T Chiba: Differential Localization of Colitogenic CD4 T Cell Subsets Monospecific to a Micro Flora-Associated Antigen in a SCID-Transfer Model: *Digestive Disease Week and the 103rd Annual Meeting of the American Gastroenterological Association*, 2002.5.19
 6. 松浦 稔、玉置敬之、岡崎和一：腸管粘膜内マクロファージをターゲットにした IBD 治療の開発 -Microsphere を用いた drug delivery system-: 第 77 回日本消化器病学会近畿支部例会, 2002 9 7
 7. 西 俊希、玉置敬之、岡崎和一：骨髄移植直後の急性 GVHD 消化管病変に対する内視鏡的診断の有用性: 第 69 回日本消化器内視鏡学会近畿地方会, 2002.10.5
- H. 知的所有権の取得状況
特許取得、実用新案登録は現在のところおこなっていない。