原 著 潰瘍性大腸炎患者における免疫機能異常について

東京大学医学部第二内科（指導 村尾 覚教授）

白鳥 康史

IMMUNOLOGICAL ABNORMALITIES IN ULCERATIVE COLITIS

Yasushi SHIRATORI, MD

The Second Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Tokyo
(Director: Prof. Satoru Murao)

概要 潰瘍性大腸炎の成立に関与している免疫系の異常を検討するため、潰瘍性大腸炎患者血中に出現する抗リンパ球抗体、および、その抗体と反応するリンパ球の性状について検討を行なった。潰瘍性大腸炎患者血清中の抗リンパ球抗体出現率を、fluorescence activated cell sorterを用いた蛍光抗体法および補体依存性細胞障害試験で検討したところ、約70%であった。この抗リンパ球抗体はFc receptor陰性T細胞と反応し、natural killer細胞とは反応しなかった。またこのT細胞はconcanavalin A誘導試験などから抑制機能を有すると考えられた。さらに潰瘍性大腸炎患者末梢血リンパ球中には、T細胞特異抗体である抗脳関連抗体および抗胸腺抗体と強い親和性を示す亜群の増加が認められた。以上の成績から、潰瘍性大腸炎の病因には抗リンパ球抗体およびこの抗体と反応するT細胞亜群の関与することが推察された。

緒 言

潰瘍性大腸炎患者における免疫異常として、患者血清中に出現する抗大腸粘膜抗体、抗大腸菌抗体などの体液性免疫の異常が報告されている。また、細胞性免疫異常として、mitogen刺激に対する末梢血リンパ球の反応性の異常、遅延アレルギー反応の異常、in vitroで認められる大腸粘膜に対する細胞障害性リンパ球の存在、antibody dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC) による大腸粘膜の障害などが報告されており、さらに局所免疫異常として大腸粘膜局在リンパ球の変動、大腸粘膜結合免疫グロブリンの存在などが論議されている。各種の免疫異常がその病態に関与すると考えられる疾患において、胸腺由来のリンパ球（T細胞）の特殊性についての検討がすすめられ、注目されている。すなわち、白井ら¹⁾はNZBマウス血中にT細胞に対する抗体（natural thymocytotoxic autoantibody: NTA）の存在することを報告し、NZBマウスのsystemic lupus

[昭和57年6月9日受稿]

erythematosus (SLE) 様症状の発現にこのNTAの関与する免疫統御系のアンバランスが関連しているのではないかと推測した。最近、ヒトの代表的な自己免疫疾患であるSLEの血中にもリンパ球に対する自己抗体の出現が報告されている²⁾。さらに、fluorescence activated cell sorter (FACS) を用いた蛍光抗体法により、種々の自己免疫疾患におけるNTAについての検索もなされてきている。

著者は潰瘍性大腸炎患者において、NTAの出現頻度、NTAと反応するT細胞亜群(subsets)の性状、NTAと病態との関連などを検討したので、以下その成績を記述する。

対 象

対象とした潰瘍性大腸炎患者は44例（男・20例、女・24例）で、年齢の範囲は17才から63才まで（平均年齢±標準偏差：32.7±10.7才）であった。症例は厚生省潰瘍性大腸炎調査研究班の診断基準³⁾に従って、症状、大腸X線所見、内視鏡所見、

組織所見をもとに診断した。また活動度は Truelove の診断基準⁴⁾により分類した。さらに、下痢を主症状とする細菌性大腸炎10例と性および年齢を対応させた健常者30例とを対照とした。また、潰瘍性大腸炎とSLE患者におけるNTAの異同の検討のため活動期SLE患者血清を用いた。これら被検者より得た血清は、検査に供するまで-70℃で保存した。一部の症例については、T細胞特異抗体に対する反応性を検討するため、ヘパリン加患者末梢血を採取後、直ちにリンパ球を分離し、検査を行なった。

方 法

末梢血リンパ球およびFc receptor陽性・陰性T細胞は以下の方法で分離した。

(1) 末梢血リンパ球 (PBL) からT細胞の分離

健常者のヘパリン加末梢血をLymphoprep (Lymphoprep; Nyegaard Co. Oslo) に重層し、2000rpmで20分間遠心後、中間層のリンパ球(PBL)を回収した。回収したPBLを0.01Mリン酸緩衝液-生理食塩水(PBS, pH 7.2)で洗浄後、2%ウシ胎児血清(fetal calf serum; FCS: GIBCO, NY)を添加したMinimum Essential Medium (MEM; 日水)中に浮遊し、以下の分離を行なった。

(a) Fc receptor陽性T細胞 (Fc R⁺ T細胞) の分離

Shoreらの方法⁵⁾に従い、上記のPBL (1×10^7 細胞)にFCS 12mlと洗浄ヒツジ赤血球 (sheep red blood cell; SRBC: 日本生物材料センター) 4mlとを加え、800rpmで5分間遠心後、0℃で60分間静置し、ロゼットを形成したT細胞をlymphoprepによる比重遠心法(2000rpm, 20分間)で分離した。つぎにこのT細胞を2% FCS添加PBSで洗浄したのち、4mMテオフィリン(theophylline; Eisai Co.)を加えて37℃で5% CO₂を含むCO₂インキュベーター内で60分間培養してテオフィリン感受性T細胞からSRBCを解離させた。この解離してきたT細胞をlymphoprepにより比重遠心し、中間層のリンパ球を『Fc R⁺T細胞』として実験に供した。

(b) Fc receptor陰性T細胞 (Fc R⁻T細胞) の分離

Fc R⁻T細胞はPBLからB細胞とFc R⁺T細胞を取り除いて作製した。すなわち抗ヒト免疫グロブリン家兎抗血清(1mg/ml)をpetri dish (Falcon 3003)に約3ml注ぎ、1時間室温にて静置し、dishを抗ヒト免疫グロブリンで被覆した。余剰の抗血清を2% FCS添加MEMで3回洗浄して除去した後、このpetri dishにPBLを $1 \sim 1.5 \times 10^7$ /dishの割合で注ぎ、37℃で5% CO₂を含むCO₂インキュベーター内で30分間静置し、B細胞とFc R⁺T細胞をdishに付着させた。つぎにdish内の上清を採取し、その中に含まれるリンパ球を『Fc R⁻T細胞』とした。

上記の方法で分離したT細胞亜群中のB細胞の混入率はBlakeslee⁶⁾らの方法に従い、蛍光標識した抗ヒト免疫グロブリン家兎血清(fluorescence to protein ratio, F/P ratio=2.0)を用いて蛍光抗体染色法で検定したところ、両群とも2~3%程度であつた。蛍光標識凝集ヒト免疫グロブリンを用いたFcγの含有率の検定では、『Fc R⁺T細胞』での蛍光細胞の含有率は60~70%で、『Fc R⁻T細胞』には蛍光を示すFcγ T細胞の混入はほとんどみられなかつた (Figure 1)。

(2) 抗リンパ球抗体 (NTA) の検出

(a) 蛍光抗体-FACS法

まず潰瘍性大腸炎患者血清または対照血清を4℃で15000g, 60分間遠心して凝集免疫グロブリンを除去した。つぎに、前記の方法で得た『Fc R⁻T細胞』および『Fc R⁺T細胞』を標的細胞として、それぞれ 5×10^6 /0.1mlになるように2% FCS添加MEMで調整し、第一抗体として0.1mlの上述の潰瘍性大腸炎患者または対照血清を加え、4℃で20分間反応させた。その後2% FCS添加MEMで3回洗浄後、第二抗体としてfluorescent isothiocyanate (FITC: Research Organics Inc. Cleveland) で標識した抗ヒト免疫グロブリン家兎抗血清 (Fab., F/P ratio=2.0) を0.1ml加え、さらに4℃で20分間反応させた。2% FCS添加MEMで洗浄後、血中のNTAと結合して蛍光を発

するリンパ球数とその蛍光強度をFACS-II (Beckton Dickinson Electronics Laboratory) を用いて測定した。FACSの解析は、Herzenbergらの方法⁷⁾に従い、細胞数 1×10^4 あたりの細胞表面の蛍光強度を横軸に、細胞数を縦軸にとり、オシログラフィー上に描出した。同一検体についてduplicateで検討を行なった。

(b) 補体依存性細胞障害性試験

細胞障害性試験はKoikeらの変法⁸⁾に準じて行なった。96穴プレート (Nunc; Nunc, Denmark) の各穴に、前記の方法で得たT細胞亜群をそれぞれ 2×10^6 /mlに調整した浮遊液0.01mlと、PBSで希釈した潰瘍性大腸炎患者および対照血清(希釈倍数: 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64)を0.01ml注ぎ、20℃で30分間反応させた。ついで2% FCS添加MEMで洗浄したのちウサギ補体を0.01ml加え、さらに37℃で5% CO₂を含むCO₂インキュベーター内で90分間培養した。cell viabilityはtrypan blueを用いたdye exclusion法によった。細胞障害試験は常にtriplicateで行ない、鏡検で200個の細胞を数え、% killingで表示し、平均値をとった。

(3) 潰瘍性大腸炎とSLEにおけるNTAの異同の検討

潰瘍性大腸炎とSLE患者においてNTAと反応するリンパ球の異同を検討するため、2段階の細胞障害試験を行なった。まず2% FCS添加MEM培養液で 1×10^7 /mlに調整した健常者PBL浮遊液1mlにSLE患者血清0.5mlとウサギ補体1mlを加え、37℃で60分間静置し、SLE患者血清中のNTAと反応するリンパ球を破壊した。ついで2% FCS添加MEMで洗浄したのち、10% FCS添加RPMI 1640培養液 (RPMI 1640; GIBCO, NY) でリンパ球浮遊液を 2×10^6 /mlに調整した。このリンパ球浮遊液を96穴プレートの各穴に0.01mlずつ注ぎ、(2)-(b)の方法に従い潰瘍性大腸炎患者血清または健常者血清で補体依存性細胞障害試験を行なった。

(4) NTAと反応するリンパ球亜群 (Fc R⁺ T細胞) の機能検査

健常者PBLをLymphoprepの比重遠心法で回収し、2% FCS添加MEMで 1×10^7 /mlに調整した。この1mlに前述の細胞障害性試験陽性の潰瘍性大腸炎患者血清1mlを加え、20℃で30分間反応させた。ついで2% FCS添加MEMで洗浄後ウサギ補体1mlを加え、37℃で90分間培養し、NTAと反応するリンパ球を破壊した。ついでFCSに重層し1000 rpm, 6分間遠心し沈殿した生存リンパ球は潰瘍性大腸炎患者血清中のNTAと反応しないリンパ球であり、これにつきmitogen response, natural killer activity, concanavalin A誘導抑制性T細胞 (Con A Ts) 機能を検討した。対照として、潰瘍性大腸炎患者血清のかわりに、健常者血清を用いて同様な処理をしたリンパ球の機能を検討した。

(a) Mitogen刺激に対する反応

上記のように、各被検者血清と補体で処理したPBLを、細胞数が 2×10^6 /mlになるように10% FCS添加RPMI 1640培養液に浮遊させた。microculture用平底プレート (Falcon 3042) の各穴に、このリンパ球浮遊液0.1mlとFCS添加RPMI 1640培養液で希釈したconcanavalin A (Con A; Sigma, St. Louis) を0.1ml注入し、1穴当りのリンパ球数を 2×10^5 /0.2ml, Con A濃度を0, 10, 20, 40 μ g/mlとなるように調整した。37℃で5% CO₂を含むインキュベーター内で72時間培養後、各穴に0.5 μ Ci ³H-thymidine (New Engl Nucl, specific activity 20Ci/m. mol) を加え、さらに8時間培養した。ついでcell harvester (MASH II, Microbiological.) を用いて細胞を回収し、³H-thymidineの取り込みをliquid scintillation counter (Beckman) にて測定した。

同様にphytohemagglutinin (PHA; Wellcome, Beckenham, England) 刺激の場合についても検討した。この際、PHAの濃度は、20倍、40倍、80倍、160倍とした。以上の測定はtriplicateで行ない、測定値は平均値をとった。

(b) Natural killer (NK) 活性

Effector細胞として各被検者血清と補体で処理した上記PBLを、またtarget細胞として慢性骨髄性白血病由来のK562 cell lineを用いた。assayは

Staining with aggregated Hlg (% positive)

PBL	FcR ⁺ T	FcR ⁻ T
15 %	60 ~ 70 %	< 1 %

Figure 1. Preparation of Lymphocytes.

Figure 2. Fluorescence staining by sera from ulcerative colitis.

Figure 4. Titration of NTA in sera from ulcerative colitis by complement dependent cytotoxicity test.

Figure 5. Mitogenic response of PBL treated with NTA in sera from ulcerative colitis. Mitogenic effects of Con A on PBL, that were treated with serum (from ulcerative colitis or normal) plus complement, were determined. Lymphoproliferative response to Con A on PBL treated with serum from ulcerative colitis was significantly decreased.

Figure 3. FACS pattern of NTA in sera from ulcerative colitis. FcR⁻-T cells (a) and FcR⁺-T cells (b) were used as target cells. About 10~20% of FcR⁻-T cells reacted with NTA in patients with ulcerative colitis. In contrast, the NTA could not react with FcR⁺-T cells.

Figure 6. Natural Killer Activity of PBL treated with NTA from ulcerative colitis.

^{51}Cr -release assay of natural killer activity was examined, using K 562 cells as target. PBL treated with serum (from ulcerative colitis or normal) plus complement were used as effector cells. No significant difference was observed between them.

Figure 7. FACS pattern of PBL from ulcerative colitis.

PBL from ulcerative colitis were incubated with anti-BAT (a) and anti-HET (b), and then stained with FITC labelled goat anti-rabbit Igs. PBL from ulcerative colitis revealed high reactivity with anti-BAT and anti-HET comparing to PBL in normal healthy volunteers.

Figure 8. Serial study of abnormalities in PBL from patients with ulcerative colitis. Azulfidine (SASP) and prednisone therapy commenced after first assay(1) performed. (a) First line figures indicated the staining pattern with anti-BAT, (b) second line figures; staining pattern with anti-HET. The second measurement (2), at which time the patient's status improved, still showed mild abnormal T cell staining profiles. However, it returned to the normal profiles (3). At that time there was no evidence of disease activity, as judged by symptoms, endoscopic examination and rectal biopsy. Profiles (4) showed control profiles stained with either anti-sera.

duplicateで行なつた。まずK562細胞を ^{51}Cr (New Engl. Nucl., specific activity 200~300mCi/ml)とともに37℃で45分間培養したのち、MEMで洗浄して ^{51}Cr 標識K562細胞を作製した。これを10% FCS添加RPMI 1640培養液で $2 \times 10^5/\text{ml}$ に調整して浮遊させた。Target/Effector細胞比(T/E ratio)が1:12.5, 1:25, 1:50の割合の細胞浮遊液を作製して、37℃で5% CO_2 を含むインキュベーター内で4時間培養した。ついで1500 rpmで6分間遠心したのち、上清を0.1ml採取し、遊離した ^{51}Cr をgamma counter (Packard)で測定し、% lysisを次式により算出した。

$$\% \text{lysis} = \frac{\text{Exp} - \text{Sp}}{\text{Max} - \text{Sp}} \times 100$$

Exp: experimental target cell release (cpm)

Max: maximal target cell release (cpm)

Sp: spontaneous target cell release (cpm)

(c) Con A誘導抑制性細胞の測定

Showらの方法⁹⁾に従つて、被検者血清と補体で処理したPBLを細胞数が $4 \times 10^6/\text{ml}$ になるように10% FCS添加RPMI 1640培養液に浮遊させた。このリンパ球浮遊液5mlに $6 \mu\text{g}/\text{ml}$ のCon Aを加え、37℃で5% CO_2 を含むインキュベーター内で48時間培養した。これにmitomycin C (MMC: 協和醗酵) $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ を添加して30分間培養し、DNA合成を阻止した。このCon A-MMC処理リンパ球に他の健常者PBLを1:1の割合で混合し $2 \times 10^5/0.2 \text{ ml}$ に調整し、さらにCon A (0, 5, 10, $20 \mu\text{g}/\text{ml}$)を添加して72時間培養した。これに $0.5 \mu\text{Ci}$ ^3H -thymidineを添加し、 ^3H -thymidineの細胞内取り込みをliquid scintillation counterで測定した。Assayはtriplicateで行なつた。対照として1回目のCon A添加をしない、すなわちCon Aで誘導しないstimulator cellを用い、同様の処理を行なつた。Con A誘導抑制性細胞機能は次式から算出した。

$$\% \text{suppression} =$$

$$\left(1 - \frac{\text{Con A induced (cpm)}}{\text{Control (cpm)}}\right) \times 100$$

(5) T細胞特異抗体による潰瘍性大腸炎患者PBLの検討

抗脳関連抗体および抗胸腺抗体はGolubらの方法¹⁰⁾¹¹⁾により作製した。すなわち、抗脳関連抗体(anti BAT)は1gのヒト脳ホモジネートとcomplete Freund's adjuvant (CFA; Difco, Detroit)とを等量に混合し、家兎の皮下に2週間隔で2回注射したのち、2回目の注射の2週後に採血し、血清をRaji細胞で十分に吸収した。また抗胸腺抗体(anti HET)は 1×10^8 細胞数のヒト胸腺リンパ球をCFAと共に家兎の皮下に2週間隔で2回注射し、血清を同様に吸収操作して作製した。これらの抗血清の特異性は、それぞれの抗血清でヒト末梢血リンパ球の補体依存性細胞障害を行ない、残余細胞についてヒト免疫グロブリン陽性細胞が95%以上であることで確認した。

潰瘍性大腸炎患者PBLに第一抗体としてT細胞特異抗体(anti BAT, anti HET)を加えて、4℃で20分間反応させた。ついでMEMで洗浄後、第二抗体として蛍光標識した抗家兎抗血清(F/P ratio=2.5)を加えて4℃で20分間反応させ、蛍光を発するリンパ球をFACSで解析した。対照として、健常者PBLについて同様の操作を行なつた。

結 果

(1) 抗リンパ球抗体(NTA)の検出

(a) 蛍光抗体—FACS法

蛍光顕微鏡で観察すると、潰瘍性大腸炎患者血清中のNTAと反応したリンパ球は蛍光を発していた(Figure 2)。『Fc R⁺ T細胞』を標的細胞とした蛍光抗体—FACS法での健常者血清の蛍光曲線上から、蛍光を示している細胞と、示していない細胞の間の変曲点を求め、その輝度より明るい細胞数の割合を測定したところ、正常人血清(n=30)では $3.3 \pm 0.6\%$ 、潰瘍性大腸炎患者血清(n=41)では $14.5 \pm 6.3\%$ (活動期(n=10): $19.8 \pm 5.5\%$ 、寛解期(n=31): $12.6 \pm 5.3\%$)を示し、潰瘍性大腸炎患者で有意に蛍光陽性細胞が増加していた($p < 0.001$, Table 1)。他方、細菌性大腸炎患者(n=10)では $3.7 \pm 1.9\%$ で、健常者との間では差が認められなかつた。30例の健常者血清に

Table 1. Incidence of NTA.

	1) FACS analysis			2) Complement dependent cytotoxicity		
	No. of examined	% positiveness M $\pm$ SD	No. of positiveness/(%) ($>M+2SD$)	No. of examined	% killing M $\pm$ SD	No. of positiveness/(%) ($>M+2SD$)
A) Fc-Receptor negative T cells						
Ulcerative Colitis	41	* 14.5 $\pm$ 6.3	29 (70.7%)	44	* 12.3 $\pm$ 6.3	20 (45.5%)
Active	10	* 19.8 $\pm$ 5.5	9 (90.0%)	6	* 19.5 $\pm$ 5.2	5 (83.3%)
Remission	31	* 12.6 $\pm$ 5.3	20 (64.5%)	38	* 10.9 $\pm$ 5.8	15 (39.5%)
Bacterial Colitis	10	3.7 $\pm$ 1.9	0	10	7.2 $\pm$ 3.8	0
Normal	30	3.3 $\pm$ 0.6	0	10	6.1 $\pm$ 4.0	0
B) Fc-Receptor positive T cells						
Ulcerative Colitis	10	10.1 $\pm$ 2.7	0	23	18.5 $\pm$ 4.2	1 (4.5%)
Active	2	11.0 $\pm$ 2.0	0	3	18.6 $\pm$ 4.1	0
Remission	8	9.9 $\pm$ 2.9	0	20	18.5 $\pm$ 3.8	1 (5.0%)
Bacterial Colitis	n. d.			5	19.7 $\pm$ 1.0	0
Normal	6	8.3 $\pm$ 4.1	0	8	18.3 $\pm$ 2.9	0

(*p<0.001) (n.d.; not done)

(x p<0.01)

における蛍光陽性細胞数の平均値より、標準偏差の2倍以上偏位した蛍光陽性細胞数を有するもの(蛍光陽性細胞数が4.5%以上占める)をNTA陽性例とすると、潰瘍性大腸炎患者では41例中29例(70.7%)(活動期: 10例中9例—90%,寛解期: 31例中20例—64.5%)が陽性であったが、10例の細菌性大腸炎には陽性例はなかった。

また『Fc R⁺ T細胞』を標的細胞とすると健康者血清(n=6)では8.3 $\pm$ 4.1%,潰瘍性大腸炎患者血清(n=10)では10.1 $\pm$ 2.7%(活動期(n=2): 11.0 $\pm$ 2.0%,寛解期(n=8): 9.9 $\pm$ 2.9%)を示し、有意差を認めなかった(Figure 3, Table 1).

(b) 補体依存性細胞障害試験

『Fc R⁻ T細胞』を標的細胞とした時、健康者血清(n=10)では6.1 $\pm$ 4.0% killing,潰瘍性大腸炎患者血清(n=44)では12.3 $\pm$ 6.3% killing(活動期(n=6): 19.5 $\pm$ 5.3% killing,寛解期(n=38): 10.9 $\pm$ 5.8% killing)を示し、両者間に有意差を認めた(p<0.001).健康者の%killingの平均値より標準偏差の2倍以上(14.1% killing以上)を示したものを補体依存性細胞障害試験陽性とする、潰瘍性大腸炎患者では44例中20例(45.5%)(活動期: 6例中5例—83.3%,寛解

期: 38例中15例—39.5%)が陽性であったが、細菌性大腸炎では10例全例陰性であった。

『Fc R⁺ T細胞』を標的細胞とした時、健康者血清(n=8)では18.3 $\pm$ 2.9% killing,潰瘍性大腸炎患者血清(n=23)では18.5 $\pm$ 4.2% killing(活動期(n=3): 18.6 $\pm$ 4.1% killing,寛解期(n=20): 18.5 $\pm$ 3.8% killing)を示し、両者間に差を認めなかった(Table 1).

以上の結果から、潰瘍性大腸炎患者血清中のNTAはFc R⁻ T細胞と結合するものと考えられる。

(c) 潰瘍性大腸炎患者血中NTAの抗体価

3例の潰瘍性大腸炎患者血中のNTAの抗体価を、補体依存性細胞障害試験で検討したところ、1:8倍の希釈まで14.1% killing以上を示した(Figure 4).

(2) NTAの異同性

健康者PBLをSLE患者血清とウサギ補体で処理すると28% killingを示した。ついでSLE患者血清で処理した後の健康者PBLについて、NTA陽性潰瘍性大腸炎患者血清とウサギ補体で細胞障害試験を行なうと42 $\pm$ 5.6% killing(5例)を示し、また同じPBLについて潰瘍性大腸炎患者血清の

Table 2. Heterogeneity of NTA in ulcerative colitis and SLE by two step method of complement dependent cytotoxicity.

Procedure	% Killing
1) 1st step treated with NTA from SLE	28%
2) 2nd step	
a) treated with NTA from UC (5)	42±5.6%
b) treated with Normal sera (10)	37±6.0%

かわりに健常者血清を用いたときは、37±6.0% killing (10例) で両者間に有意差を認めなかつた。すなわち、潰瘍性大腸炎患者血清NTAに反応するリンパ球は、既に第一段階のSLE患者血清NTAと反応していたことを示した (Table 2)。

(3) NTAと反応するT細胞亜群の機能

(a) Mitogen刺激に対する反応

正常人PBLを健常者血清とウサギ補体で処理したリンパ球は、Con Aの濃度が20μg/mlのときに³H-thymidineの取り込みが最高であつた。(peak response 39708±5543cpm/2×10⁵細胞)。一方、健常者血清の代わりに、潰瘍性大腸炎患者血清で処理したリンパ球の20μg/mlのCon A濃度での³H-thymidine摂取率を検討したところ、潰瘍性大腸炎寛解期の患者血清では24351±4251cpm/2×10⁵細胞、活動期の患者血清では15099±3604cpm/2×10⁵細胞であり、いずれも健常者に比べ、有意に低下していた (各 p<0.01および p<0.001)。また有意差はなかつたが、活動期は寛解期よりも低い摂取率であつた (Figure 5, Table 3)。

Con Aの代わりにPHAを用いて同様な検討を行なつた。peak responseを示したPHA濃度80倍において、潰瘍性大腸炎活動期の患者血清では6785±810cpm/2×10⁵細胞、潰瘍性大腸炎寛解期の患者血清では7726±516cpm/2×10⁵細胞、健常者血清では8053±836cpm/2×10⁵細胞を示し、健常者に比べ潰瘍性大腸炎では有意差はなかつたが、やや低下傾向を認めた (Table 3)。

以上の結果より、潰瘍性大腸炎患者血清中の

Table 3. Mitogenic response.

Mitogenic effects of Con A and PHA on PBL that were treated with serum (from ulcerative colitis or normal) plus complement, were determined. Lymphoproliferative response to Con A on PBL treated with serum from ulcerative colitis was significantly decreased, but lymphoproliferative response to PHA on PBL treated with serum from ulcerative colitis was not significantly decreased.

	Response of Concanavalin A (20 μg/ml)	Response of Phytohaemagglutinin (×80)
	(cpm)	(cpm)
Ulcerative Colitis		
Active (6)	15,099±3,604 *	6,785±810
Remission (6)	24,351±4,251 ×	7,726±516
Normal (4)	39,708±5,543	8,053±838

* p<0.001

× p<0.01

( ) no. of examined

NTAと反応しないリンパ球はCon A刺激の場合の反応がCon A 20μg/mlの濃度で健常者血清の場合に比べて最も差があり、PHA刺激に対する反応では健常者との間で有意差がない。すなわち、逆に言うと潰瘍性大腸炎患者血清中のNTAと反応するリンパ球はCon A 20μg/mlの刺激に最高に反応する亜群に属していることになる。

(b) Natural killer活性

潰瘍性大腸炎患者血清と健常者血清との間で、リンパ球のNK活性におよぼす影響を検討した。T/E比が1:12.5, 1:25, 1:50のいずれの場合でも健常者と潰瘍性大腸炎活動期、および寛解期との間に% lysisに有意差はなかつた。すなわち、NTAと反応するリンパ球を破壊した後の残りのPBLのNK活性は不変であるので、潰瘍性大腸炎患者血清中のNTAはNK細胞と反応しないことが推定された (Figure 6)。

(c) Con A誘導抑制性細胞の検定

潰瘍性大腸炎のNTAと反応するT細胞が、Con A誘導抑制性細胞であるかいないかを検討した。健常者血清で処理したPBLのCon A誘導抑制性細胞機能は18±1.6%。潰瘍性大腸炎活動期の患者血清で処理したPBLでは4.8±2.7%、寛解期の患者血清で処理したPBLでは14.3±5.9%のCon A

Table 4. Suppressor T cell activity.

PBL, treated with serum (from ulcerative colitis or normal) plus complement, were incubated with or without Con A for 48 hours, and then incubated with MMC to block DNA synthesis. These treated PBL were incubated with allogenic PBL for 72 hours under Con A stimulation, and ^3H -thymidine incorporations were assayed.

$$\%Ts = \left(1 - \frac{\text{Con A induced (cpm)}}{\text{Control (cpm)}}\right) \times 100$$

NTA in patients with active stage of ulcerative colitis reduced Con A-induced Ts activity.

(* $p < 0.001$) ( ) no. of examined.

	Suppressor T cell Activity (% Suppression)	Capacity of residual Con A Ts Activity
Ulcerative Colitis		
Active (6)	4.8 $\pm$ 2.7%*	24 $\pm$ 13.8%*
Remission (6)	14.3 $\pm$ 5.9%	73.1 $\pm$ 30.5%
Normal (4)	18.0 $\pm$ 1.6%	100 %

誘導抑制性細胞機能を示した。健常者の血清で処理したCon A誘導抑制性細胞機能を100%とすると、潰瘍性大腸炎患者では活動期24.4 $\pm$ 13.8%, 寛解期73.1 $\pm$ 30.5%と低下を示し、潰瘍性大腸炎の活動期の場合は健常者との差は有意であった($p < 0.001$, Table 4)。すなわち、潰瘍性大腸炎血清のNTAと反応するT細胞にはCon A誘導抑制細胞機能を有するものが含まれる。

(4) 細胞特異抗体による潰瘍性大腸炎患者PBLの検討

FACSを用いた蛍光抗体法によるT細胞特異抗体での、潰瘍性大腸炎患者および健常者PBLの反応性はFigure 7に示した。T細胞特異抗体である抗脳関連抗体(anti BAT)による蛍光抗体では、健常者PBLの蛍光パターンに比べ潰瘍性大腸炎(9例)PBLではanti BATに対する反応性の高い明るい細胞が相対的に増加し、逆にanti BATに対する反応性の低い細胞は減少していた。さらに、他のT細胞特異抗体である抗胸腺抗体(anti HET)による蛍光抗体でも、潰瘍性大腸炎患者PBLは健常者PBLに比べ、anti HETに対する反応性の高い明るい細胞の増加を認めた。

Table 5. Serial analyses of NTA and Ts.

Case	Severity	Severe	Moderate	Mild
1	NTA Ts	22 6.4		10 47.2
2	NTA Ts		17 33.9	9 n.d.
3	NTA Ts	26 19		9 68.8
4	NTA Ts		19-18 49.3-59.3	
5	NTA Ts		14 87.1	17 n.d.

(NTA: % reactive T cells)

(Ts: (%), Suppression of normal serum=100%)

(n.d.: not examined)

(5) 経時的検討(潰瘍性大腸炎患者同一症例について)

潰瘍性大腸炎患者5例について、臨床像と蛍光抗体-FACS法によるNTA結合性Tリンパ球(健常者血清を用いた場合の蛍光曲線の変曲点の輝度より強い輝度を示す細胞)の割合、Con A誘導抑制性細胞機能との関係について検討した。Table 5に示すごとく、症状改善例はNTA結合性Tリンパ球の割合が減少し、Con A誘導抑制性細胞機能は増加を示した。症状が固定した例では、これらのデータに変動はみられなかった。

また潰瘍性大腸炎患者3例について、T細胞特異抗体に対するPBLのFACSパターンと臨床像との関係を検討したが、いずれも症状の改善とともに、健常者のパターンに近づいてきた。そのうちの1例をFigure 8に示した。

考 案

潰瘍性大腸炎は自己免疫疾患の一つと考えられているが、自己抗体についての検討はまだ緒にいたばかりである。すでにStricklandら¹²⁾は補体依存性細胞障害試験で、潰瘍性大腸炎患者血中に末梢血リンパ球に対する抗体の出現することを報告しているが、細胞障害性試験では補体の良否により成績が著しく左右され、また色素自体の細胞障害性にも問題がある。著者らも同一検体でも4%程度の誤差を認めている。さらに、潰瘍性大

腸炎のようにNTAと反応するリンパ球がminor populationであると、NTAの有無の判定が明瞭でなく、再現性や感度の点で疑義が生じている。これに対し、蛍光抗体—FACS法は著者の成績では $3.3 \pm 0.6\%$ の低いbackgroundを示し、陽性蛍光細胞数が少ない時でも検出可能で、NTAと反応するリンパ球がminor populationの場合にも容易に判定できる利点をもつ。本研究ではTable 1に示した如く、蛍光抗体—FACS法と細胞障害性試験のそれぞれの場合の潰瘍性大腸炎患者血中NTAの陽性頻度を比較すると、細胞障害性試験での45.5%に比べ蛍光抗体—FACS法では70.7%の出現率を認めた。また、FACS陽性例23例中細胞障害陽性例は17例のみであったが、逆に細胞障害陽性18例のうち17例がFACS陽性例であった。すなわち、細胞障害試験よりも蛍光抗体—FACS法の方が感度がよいといえよう。

末梢血のT細胞にはFc γ T細胞(T γ)が10~15%、Fc μ T細胞(T μ)が約70%含まれている。Fc γ レセプターは採取直後のリンパ球に検出されるが、Fc μ レセプターはそのままのリンパ球上に十分表出されておらず、培養検出を行なう必要がある。MorettaらはこれらT μ 細胞とT γ 細胞とでT細胞の機能を分けたが、近年T μ 細胞には種々の機能をもつ細胞が含まれていることが知られてきている¹³⁾。すなわち、Con Aで培養中にT μ 細胞からT γ 細胞への変換がみられ、Con Aで刺激するとT μ ・T γ の両細胞群から抑制性T細胞が誘導され、またT μ 細胞をモノクローナル抗体で検討するとinducerとcytotoxic/suppressorの両方の細胞が含まれていた。著者らは、テオフィリン法によりT γ 細胞を含むFc R⁺ T細胞を、また抗ヒト免疫グロブリン家兎血清被覆ディッシュを用いT γ 細胞とB細胞を除いてT μ 細胞を含むFc R⁻ T細胞を作製した。

『FcR⁻ T細胞』を標的細胞として蛍光抗体—FACS法で測定した場合、健常者血清では $3.3 \pm 0.6\%$ に陽性蛍光リンパ球が出現した。この数値は著者が分離したT細胞亜群中のB細胞(蛍光陽性となる)の混入率2~3%とほぼ一致し、恐らく

混入したB細胞や好中球が蛍光を発したものである。陽性蛍光リンパ球の比率は、健常者および細菌性大腸炎に比べて潰瘍性大腸炎患者では有意に多く存在し、また潰瘍性大腸炎患者のなかでも活動期10例では、寛解期31例に比べて有意に多かつた。陽性蛍光リンパ球が有意に多い症例は、検討した潰瘍性大腸炎症例の70.7%であり、とくに活動期では90%の高率に達した。また補体依存性細胞障害試験でも同様な結果が観察され、潰瘍性大腸炎患者血中にNTAが出現していることが確認された。またその抗体価は、補体依存性細胞障害試験で8倍希釈までのみ陽性であったことより、高いものではなかつた。そして経時的に臨床経過を観察した潰瘍性大腸炎の同一症例で臨床症状の改善とともにNTA結合性Tリンパ球の割合が減少したことは、潰瘍性大腸炎の活動度とNTAが密接な関係にあることが推定された。

本研究の成績では潰瘍性大腸炎患者のNTAはFcR⁺ T細胞とは反応せず、FcR⁻ T細胞とのみ反応した。この点はFcR⁺およびFcR⁻ T細胞の両者と反応するSLEのNTAとは多少異なるようである⁸⁾¹⁴⁾。しかしあらかじめSLEのNTAで処理し、ついで潰瘍性大腸炎患者NTAで行なつた補体依存性細胞障害試験で、健常者との間に差が生じなかつたことから、潰瘍性大腸炎患者NTAと反応するリンパ球はSLE患者NTAと反応するリンパ球と重複していると推察された。

近年SLEなどの自己免疫疾患の病因として、抑制性T細胞の機能低下ないし減少が注目されている¹⁵⁾。SLEにおいて自己抗体の産生に抑制性T細胞が関与すること¹⁶⁾、SLEのNTAと反応するT細胞はconcanavalin Aで誘導される抑制性T細胞であること⁸⁾¹⁴⁾¹⁶⁾、NZBとNZB/F₁マウスのNTAが抑制性T細胞と反応すること¹⁷⁾などが報告されている。潰瘍性大腸炎について、Hodgsonらは末梢リンパ球におけるconcanavalin A誘導抑制性T細胞が減少すること¹⁸⁾、その変動が症状と並行し、T μ リンパ球の減少と関連すること¹⁹⁾などを報告している。本研究では、NTAと反応するFcR⁻ T細胞の機能をK562を標的細胞として検討した

NK活性は潰瘍性大腸炎患者と健常者血清処理の間に差はなく、このFc R⁻ T細胞はNK活性を有していないと考えられた。またmitogenの一つであるPHAに対する反応も健常者と潰瘍性大腸炎患者血清処理との間に差はなく、NTAと反応するT細胞はPHAで幼若化が誘導されない細胞と考えられた。しかしCon Aに対する反応は、健常者血清処理でpeak responseを示す20 μ g/mlの濃度において比較すると、潰瘍性大腸炎患者血清処理では有意に抑制され、さらに活動期の方が寛解期に比べ著明に抑制された。またCon A濃度が10および40 μ g/mlの場合の³H-thymidineの取り込みは、健常者と潰瘍性大腸炎リンパ球との間で差がなく、潰瘍性大腸炎のNTAと反応するT細胞はCon A濃度が20 μ g/mlで反応する亜群に属していると考えられた。ついでCon A誘導抑制性T細胞機能におよぼす効果を検討した著者の成績では、活動期潰瘍性大腸炎のみが健常者に比べ有意の低下を示し、少なくとも活動期潰瘍性大腸炎のNTAは、抑制性T細胞の機能を低下させていることが明らかとなった。しかも同一症例で経時的に潰瘍性大腸炎NTAのCon A誘導抑制性T細胞機能への影響を検討したところ、症状の改善とともにCon A誘導抑制性T細胞機能を低下させる効果が減少してくることを認め、潰瘍性大腸炎にCon A誘導抑制性T細胞機能が深く関与していることが考えられた。

一方T細胞に特異的な抗体に対する反応性を検討した著者の成績は、これらの抗体に対し強い親和性を示すT細胞が潰瘍性大腸炎で増加をしていることを示した。また経時的検討でも、症状の改善とともに蛍光パターンが正常化した。抗脳関連抗体でリンパ球亜群の検討をしたBrouet⁽¹¹⁾⁽²⁰⁾の成績を鑑みると、これは潰瘍性大腸炎においても末梢T細胞自体に異常のあることを推定させる。

著者は本論文において、潰瘍性大腸炎患者血中にNTAが存在し、これがFc R⁻ T細胞のCon A誘導抑制性T細胞と反応すること、さらにNTAの出現頻度およびこの抑制性T細胞の機能を低下させる程度と症状とが関連することを示した。このよ

うな異常が本症発生に一次的な意味をもつものであるか、二次的に発生する現象であるかの論議は、今後の重要な課題と思われるが、少なくとも著者の成績から何らかの機序により産生されたNTAが抑制性T細胞を障害し、その結果B細胞の機能が亢進してNTAを含む自己抗体の産生を増強するという悪循環を形成する可能性が考えられる。このような免疫調節機能の異常の最初の原因が、NTAの産生を含めたB細胞の異常によるのか、抑制性T細胞の機能異常で説明できるか、または遺伝的要因によるものかなどについては今後検討する必要がある。

結 論

潰瘍性大腸炎患者の血中に出現する抗リンパ球抗体、その抗体と反応するリンパ球の性状、および患者末梢血リンパ球の異常を検討した結果、次の知見を得た。

1) 潰瘍性大腸炎患者において抗リンパ球抗体は約70%の頻度に出現した。

2) 抗リンパ球抗体はFc receptor陰性T細胞の約20%と反応した。

3) 抗リンパ球抗体と反応するリンパ球は、cocanavalin Aで誘導される抑制性T細胞であった。

4) 抗リンパ球抗体はNK細胞や、PHA反応性細胞とは反応しなかった。

5) 抗脳関連抗体および抗胸腺抗体などのT細胞特異抗体と強い反応性を示す細胞が潰瘍性大腸炎患者末梢血リンパ球中に増加していた。

以上の成績から潰瘍性大腸炎に認められる抗リンパ球抗体は、潰瘍性大腸炎患者においてみられる末梢血リンパ球を含めた免疫統御系の異常に強く関与していること、またこの抗リンパ球抗体およびそれと反応するT細胞亜群が潰瘍性大腸炎の病態成立に関与することが推定された。

謝辞 稿を終わるにあたり終始御指導していただきました東京大学免疫学教室 奥村康講師に深甚の謝意を表します。さらに症例を提供していただいた関連病院の諸先生方にも深謝致します。

文 献

- 1) Shirai T and Mellors RC: Natural thymocytotoxic autoantibody and reactive antigen in New Zealand Black and other mice. *Proc Nat Acad Sci* 68: 1412, 1971.
- 2) Steinberg: Immunofluorescence studies of anti T cell antibodies and T cells in SLE. *Arthritis Rheum* 22: 57, 1979.
- 3) 厚生省特定疾患, 潰瘍性大腸炎調査研究班: 潰瘍性大腸炎診断基準 (案). *日医新報* 2673: 31, 1975.
- 4) Truelove SC and Witt LJ: Cortisone in ulcerative colitis. *Brit Med J* 2: 1041, 1955.
- 5) Shore A, et al: Induction and separation of antigen-dependent T helper and T suppressor cells in man. *Nature (London)* 274: 586, 1978.
- 6) Blakeslee D and Baines MG: Immunofluorescence using dichloro triazinyl amino fluorescein (DTAF). *J Immunol Methods* 13: 305, 1976.
- 7) Herzenberg LA: Fluorescein activated cell sorting. *Scientific Americans* 234: 108, 1976.
- 8) Koike T, et al: Differential sensitivity of functional subsets of T cells of the cytotoxicity of natural T lymphocytotoxic autoantibody of SLE. *Arthritis Rheum* 22: 123, 1979.
- 9) Show L, et al: Suppressor cell activity after concanavalin A treatment of lymphocytes from normal donors. *J Exp Med* 143: 1100, 1976.
- 10) Golub ES: Brain-associated θ antigen: Reactivity of rabbit anti-mouse brain with mouse lymphoid cells. *Cellular Immunology* 2: 353, 1971.
- 11) Brouet J and Chevalier A: Serologically defined subpopulations of human T lymphocytes. *J Immunol* 122: 260, 1979.
- 12) Strickland RG, et al: Lymphocytotoxic antibodies in patients with inflammatory bowel disease and their spouses-evidence for a transmissible agent. *Clin Exp Immunol* 30: 188, 1977.
- 13) Cooke A, et al: Con A-induced suppressor activity of lymphocytes distinguished by the presence or absence of the Fc receptor. *Cellular Immunology* 47: 90, 1979.
- 14) Okudaira K, et al: Detection of anti-lymphocyte antibody with two-color method in systemic lupus erythematosus and its heterogeneous specificities against human T cell subsets. *J Clin Invest* 64: 1213, 1979.
- 15) Bresnihan B and Jasin HE: Suppressor function of peripheral blood mononuclear cells in normal individuals and in patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 59: 106, 1977.
- 16) Strelkauskas AJ, et al: Isolation and characterization of naturally occurring subclasses of human peripheral blood T cells with regulatory functions. *J Immunol* 120: 1278, 1978.
- 17) Shirai T, et al: Differential cytotoxic effect of natural thymocytotoxic autoantibody of NZB mice on functional subsets of T cells. *J Immunol* 120: 1924, 1978.
- 18) Hodgson HJF, et al: Decreased suppressor cell activity in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 32: 451, 1978.
- 19) Knapp JW and Smolen JS: Con A induced suppressor cell activity in inflammatory bowel disease and other inflammatory disease. Pena AS, et al, ed. *Recent Advances in Crohn's Disease (Development in Gastroenterology)*, Martinus Nijhoff, The Hague, 1981, p380.
- 20) Brouet JC and Toben H: Characterization of a subpopulation of human T lymphocytes reactive with heteroantiserum to human brain. *J Immunol* 116: 1041, 1976.