

①

特発性炎症性腸疾患（IBD）患者における
末梢血単核球の Interleukin-4 および
Interleukin-2 産生能に関する研究

弘前大学医学部法医学教室

塩谷 一 春

（指導 村上 利教授）

本文 50 枚

図表 29 枚

目 次

I . 緒 言	1 頁
II . 研 究 対 象	3 頁
III . 研 究 方 法	
1 . 試 薬 の 作 製	6 頁
2 . PBMC の 分 離 と 培 養	7 頁
3 . IL-4 産 生 量 の 測 定	8 頁
4 . IL-2 産 生 量 の 測 定	10 頁
5 . IL-4 お よ び IL-2 濃 度 の 算 出	12 頁
6 . PBMC の IL-4 産 生 量 と IL-2 産 生 量 の 相 関 関 係	13 頁
7 . 成 績 の 表 示 お よ び 検 定	13 頁
IV . 研 究 成 績	
1 . 至 適 培 養 条 件 の 検 討	14 頁
2 . PBMC の IL-4 産 生 能	15 頁

3. PBMCのIL-2産生能	18頁
4. PBMCのIL-4産生能とIL-2産生能の 相関関係	21頁
5. IL-2/IL-4産生比	22頁
V. 考察	23頁
VI. 結語	36頁
文献	38頁

I. 緒言

interleukin (IL)-4は helper T細胞から、IL-2は T細胞から産生されるサイトカインであり、種々の生物学的活性を有している。すなわち、IL-4は B細胞に対してその増殖を誘導すること¹⁾、IgE抗体や IgG₁抗体の産生²⁾、あるいは IgE の Fc部に対するリセプター (Fcε-R II) である CD23の発現を誘導すること³⁾、T細胞に対しては cytotoxic T細胞を誘導すること⁴⁾、肥満細胞に対してはその増殖を誘導すること⁵⁾などが知られている。一方、IL-2は種々の T細胞の他に、natural killer (NK)細胞や B細胞の増殖・分化⁶⁾や、lymphokine activated killer (LAK)細胞の誘導⁷⁾など、免疫応答での中心的役割を担っていることが知られている。従って、免疫異常が関与している疾患においては、これらのサイトカインの産生に異常が生じていることは十分に推測できる。

潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis:UC) とクローン病 (Crohn's disease:CD) は特発性炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease:IBD) とともに総称されるが、いまだ病因は不明である。しかし、近年IBDにおける種々の免疫異常が報告されるに及び、本症の病因・病態への免疫異常の関与が注目されている⁸⁾⁹⁾。例えば、UCやCDでは末梢血単核球のIgG、IgAおよびIgM産生能が亢進していること¹⁰⁾、UCの病変局所ではIgG₁含有細胞の増加が、CDではIgG₂含有細胞の増加が認められ¹¹⁾¹²⁾、血清中のIgG subclassも同様であること¹³⁾、IgE含有細胞¹⁴⁾や肥満細胞¹⁵⁾¹⁶⁾の増加やcytotoxic T細胞の増加¹⁷⁾が認められている。これらの報告から、IBDの病態にはIL-4産生動態の異常も関与していることが十分に推測される。しかし、IBDにおけるIL-4産生動態に関する報告はこれまで皆無である。一方、IBDにおけるIL-2産生動態に関しては、UC、CDともに低下しているとするもの¹⁸⁾¹⁹⁾²⁰⁾²¹⁾²²⁾、差

がないとするもの²³⁾、UCで差がなくCDで低下しているとするもの²⁴⁾、UCで亢進しCDで差がないとするもの²⁵⁾など一定の見解はまだ得られていない。

そこで著者は、IBDの病態へのIL-4の関与を追究する目的で、UC患者およびCD患者におけるPBMCのIL-4産生能をenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) にて測定するとともに、同時にIL-2産生能も測定し、両者の関連についても検討を加えた。

II. 研究対象

弘前大学医学部第一内科およびその関連病院において、臨床症状、小腸X線検査、大腸X線検査、大腸内視鏡検査、生検組織所見などから診断の確実なUC患者ならびにCD患者と、対照としての健常成人を研究対象とした。

UCの病期・病型分類は、厚生省特定疾患潰瘍性大腸炎調査研究班の「潰瘍性大腸炎診断

基準(案)²⁶⁾」に、重症度分類は「潰瘍性大腸炎重症度分類(改訂案)²⁷⁾」に従った。CDの病型分類は日本消化器病学会クローン病検討委員会の「クローン病診断規準(案)²⁸⁾」に基づいた。また、CDの病期分類は I O I B D assessment²⁹⁾に準じ、スコアが0または1の場合を緩解期、2以上の場合を活動期とした。

対象の例数とその内訳は以下の如くであった。すなわち、UCの病期別では活動期11例(男7例、女4例)、緩解期19例(男8例、女11例)で、CDの病期別では活動期8例(男7例、女1例)、緩解期9例(男6例、女3例)であり、対照は22例(男15例、女7例)であった。平均年齢(mean±SD)はそれぞれ30.6±8.7歳、41.6±14.7歳、24.6±6.5歳、27.6±5.2歳および30.3±5.7歳であった。

UCの病変の拡がり重症度別の例数は表1の如くであった。CDの病型分類では、小腸型が活動期で1例、緩解期で3例、小腸・大腸型が活動期で6例、緩解期で5例および大腸型が活

動期で1例、緩解期で1例であった。

治療内容別にみると、活動期UCでは、副腎皮質ステロイドホルモン(SH)経口投与が2例、SH経口投与とsalicylazosulfapyridine(SASP)の併用が5例であり、これら7例をSH投与群とした。一方、SASP経口投与が3例、未治療が1例であり、これら4例をSH非投与群とした。緩解期UCでは、SH経口投与とSASP経口投与の併用が3例であり、これらをSH投与群とした。一方、SASP経口投与が14例、未治療が2例であり、これら16例をSH非投与群とした。活動期CDでは、SASP経口投与が4例、SASP経口投与とelemental diet(ED)療法の併用が1例、未治療が3例であり、SH投与例はなかった。緩解期CDでは、SH経口投与とSASP経口投与の併用が2例、SH経口投与とED療法の併用が1例であり、これら3例をSH投与群とした。一方、SASP経口投与とED療法の併用が2例、SASP経口投与が1例、ED療法が2例、未治療が1例であり、これら6例をSH非投与群とした。

Ⅲ. 研究 方 法

1 . 試 薬 の 作 製

1) Phosphate buffered saline (PBS)

Ca^{2+} , Mg^{2+} 非含有のPBSを作り、高圧蒸気滅菌後、使用した。

2) RPMI 1640液 (RPMI:GIBCO)

RPMI 1640液 (GIBCO) に Penicillin (GIBCO) 100 U/ml、Streptomycin (GIBCO) 100 μ g/ml、Gentamycin (Schering-Plough) 10 μ g/ml、 NaHCO_3 (和光純薬) 2 g/l および N-2-hydroxy-ethyl piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES: 関東化学) を 10 mM となるように加え、1N HCl で pH 7.2 に調整し、0.22 μ m ミリポアフィルターで濾過滅菌後、使用した。

3) Fetal bovine serum (FBS:GIBCO)

56℃、30分間恒温槽にて非働化後、0.22 μ m ミリポアフィルターで濾過滅菌して実験に供した。

4) Phytohemagglutinin-P (PHA-P:DIFCO)

滅菌蒸留水で 10 mg/ml 濃度に希釈し、 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ ミリポアフィルターで濾過滅菌後、使用時まで -20°C で保存した。なお、使用時には RPMI にて $400\text{ }\mu\text{g/ml}$ 濃度とした。

2. PBMC の分離と培養

1) PBMC の分離

ヘパリン加末梢静脈血から Conray-Ficoll 比重遠心法³⁰⁾にて PBMC を分離し、PBS および RPMI で洗浄後、 10% FBS 加 RPMI で $2.0 \times 10^6/\text{ml}$ 濃度の浮遊液とした。なお、一部の対照では 1.0×10^6 、 1.6×10^6 および $1.8 \times 10^6/\text{ml}$ 濃度の PBMC 浮遊液も作製し、至適細胞濃度について検討した。

2) PBMC の培養

48 穴培養プレート (住友化学) の各 well に PBMC 浮遊液を $400\text{ }\mu\text{l}$ ずつ入れた。一方には $20\text{ }\mu\text{g/ml}$ 濃度になるように PHA-P を添加し、他方には非刺激として非添加の状態で、 5% CO_2 37°C で 24 時間培養した。なお、一部の対照では、

PHA-Pを 5、10、20および40 μ g/ml濃度になるように添加し、各々 6、12、24、36、48および72時間の培養を行い、至適なPHA-P濃度と至適培養時間について検討した。培養終了後、プレートのまま2000rpm、5分間遠心し、培養上清を採取し、測定時まで-80℃で凍結保存した。

3. IL-4産生量の測定

ELISAであるヒトIL-4測定キット(Genzyme)を用いて、培養上清中のIL-4産生量を測定した。なお、測定はtriplicateで行った。

1) 第1抗体固相化反応

第1抗体であるマウス抗ヒトIL-4モノクローナル抗体溶液を100 μ lずつ96穴マイクロプレートの各wellに加え、シールで密閉後、4℃で24時間静置した。次に、第1抗体溶液を除去し、carrier proteinとTween 20を含有するPBS洗浄液で4回洗浄後、第1抗体固相化プレートとした。

2) 第1反応

ヒト recombinant IL-4 (rIL-4) を標準検体とし、PBS洗淨液で 3000 pg/ml 濃度にした後、10% FBS加 RPMI で 1500、750、380、190、95、47.5 および 23.8 pg/ml 濃度の 2 倍希釈系列を作製した。

次に、各濃度の標準検体、被検検体である培養上清またはゼロブランク用の 10% FBS加 RPMI をそれぞれ 100 μ l ずつ各 well に入れ、シールで密閉後、室温で 2 時間反応させた。

3) 第 2 反応

第 1 反応終了後、検体および 10% FBS加 RPMI を除去し、洗淨液で 4 回洗淨した。次に、第 2 抗体である家兎抗ヒト IL-4 ポリクローナル抗体溶液を 100 μ l ずつ各 well に入れ、シールで密閉後、室温で 2 時間反応させた。

4) 第 3 反応

第 2 反応終了後、未反応の第 2 抗体溶液を除去し、洗淨液で 4 回洗淨した。次に、第 3 抗体である biotin 標識山羊抗家兎 Ig 抗体溶液を 100 μ l ずつ各 well に入れ、シールで密閉後、室温で 45 分間反応させた。

5) 第4反応

第3反応終了後、未反応の第3抗体溶液を除去し、洗浄液で4回洗浄した。次に、strept-avidin標識 horseradish peroxidase (HRP) 溶液を $100\mu\text{l}$ ずつ各 well に加え、シールで密閉後、40分間反応させた。

6) 第5反応

第4反応終了後、未反応の streptavidine 標識 HRP 溶液を除去し、洗浄液で4回洗浄した。次に、o-phenylenediamine (OPD) 錠剤を酵素反応基質液 ($0.015\% \text{H}_2\text{O}_2$) に溶解して作製した基質溶液を $100\mu\text{l}$ ずつ各 well に加え、室温で約10分間反応させた。その後、酵素反応停止液 ($2\text{N } \text{H}_2\text{SO}_4$) を $100\mu\text{l}$ ずつ各 well に加え、発色反応を停止させた。

4. IL-2 産生量の測定

ELISA である ヒト IL-2 測定キット (大塚製薬) を用いて、培養上清中の IL-2 産生量を測定した。なお、測定は duplicate で行った。

1) 第1反応

ヒト rIL-2 を標準検体とし、緩衝液で 1600、800、400、200、100、50 および 25 pg/ml 濃度の 2 倍希釈系列を作製した。次にあらかじめ第1抗体である抗ヒト IL-2 モノクローナル抗体が固相化されている 96 穴マイクロプレートを洗浄液で 3 回洗浄した。その後、非特異的吸着を防ぐ目的で、プレートを ice bath 上に置き、冷却しながら緩衝液を 150 μ l ずつ各 well に入れた。次いで、各濃度の標準検体、被検検体またはゼロブランク用の緩衝液を 50 μ l ずつ各 well に加え、シールで密閉後、37°C で一晚反応させた。

2) 第2反応

第1反応終了後、検体および緩衝液を除去し、洗浄液で 3 回洗浄した。次いで第2抗体である家兎抗ヒト IL-2 ポリクローナル抗体溶液を 100 μ l ずつ各 well に加え、シールで密閉後、室温で 2 時間反応させた。

3) 第3反応

第2反応終了後、未反応の第2抗体溶液を除去し、洗浄液で3回洗浄した。次いで第3抗体である peroxidase 標識山羊抗家兔 IgG 抗体溶液を $100\mu\text{l}$ ずつ各 well に加え、シールで密閉後、室温で24時間反応させた。

4) 第4反応

第3反応終了後、未反応の第3抗体溶液を除去し、洗浄液で3回洗浄した。次に、OPD 錠剤を酵素反応基質液 ($0.015\% \text{H}_2\text{O}_2$) に溶解して作製した基質溶液を $100\mu\text{l}$ ずつ各 well に加え、15分間反応させた。その後、酵素反応停止液 ($1\text{N} \text{H}_2\text{SO}_4$) を $100\mu\text{l}$ ずつ各 well に加え、発色反応を停止させた。

5. IL-4およびIL-2濃度の算出

2波長マイクロプレート光度計 (MODEL 3550 BIO-RAD) を用いて、各 well の 492nm における吸光度を測定した。次に、各 well の吸光度からゼロブランクの吸光度を差し引いて、実質吸光度とした。両対数グラフ上のX軸に IL-4 また

は IL-2 標準検体の 2 倍希釈系列の濃度を、Y 軸にそれぞれの実質吸光度をプロットし、標準曲線を作製した。この標準曲線を用いて、被検検体の実質吸光度から IL-4 または IL-2 の濃度 (pg/ml) を求め、これを被検 PBMC の IL-4 または IL-2 産生量とした。なお、最小測定濃度は IL-4 では 23 pg/ml、IL-2 では 12.5 pg/ml であった。

6 . PBMC の IL-4 産生量と IL-2 産生量の相関関係

対照、UC および CD における同一検体中の IL-4 産生量と IL-2 産生量の相関関係について検討を加えた。

7 . 成績の表示および検定

成績は標本集団の算術平均 ± 標準誤差の形で表示し、平均値の差の検定および相関の有意性の検定は、Students-t 検定により危険率 5% 以下のものを有意とした。

IV. 研究成績

1. 至適培養条件の検討

対照 ($n=3$) の PBMC を 1.0×10^6 、 1.6×10^6 、 1.8×10^6 または 2.0×10^6 /ml 濃度とし、 $10 \mu\text{g}$ /ml 濃度になるように PHA-P を添加した場合、培養上清中の IL-4 産生量は PBMC が 2.0×10^6 /ml 濃度で 24 時間培養した時に、最も高値を示した (図 1)。次に、対照 ($n=5$) の PBMC を 2.0×10^6 /ml 濃度とし、各濃度の PHA-P を添加した場合、培養上清中の IL-4 産生量は $20 \mu\text{g}$ /ml 濃度になるように PHA-P を添加し、24 時間培養した時に、最も高値を示した (図 2)。以上より、PBMC の IL-4 産生能の測定では、 2.0×10^6 /ml 濃度の PBMC、 $20 \mu\text{g}$ /ml 終濃度の PHA-P 添加および 24 時間の培養を至適培養条件とした。また、PBMC の IL-2 産生量の測定の至適培養条件も、同時測定の点から同一とした。

なお、対照、UC および CD とも非刺激時の

PBMCの培養上清中のIL-4およびIL-2産生量は、いずれも著者が用いたELISAでは測定感度以下であった。従って、以下ではPHA-P刺激時のみの成績について述べた。

2. PBMCのIL-4産生能

1) 病期別検討

PHA-P刺激時のPBMCの培養上清中のIL-4産生量は、活動期UCでは $64.0 \pm 9.8 \text{ pg/ml}$ ($n=11$)であり、対照の $123.8 \pm 17.1 \text{ pg/ml}$ ($n=22$)に比し有意に ($p<0.01$) 低下していた。一方、緩解期UCでは $121.5 \pm 19.5 \text{ pg/ml}$ ($n=19$)、活動期CDでは $132.9 \pm 31.3 \text{ pg/ml}$ ($n=8$)および緩解期CDでは $150.9 \pm 27.1 \text{ pg/ml}$ ($n=9$)であり、いずれも対照と差はなかった。UCでは緩解期に比し活動期で有意に ($p<0.05$) 低下していたが、CDでは活動期と緩解期で差はなかった。また、活動期ではCDに比しUCで有意に ($p<0.05$) 低下していたが、緩解期ではUCとCDで差はなかった (図3)。

2) 活動期UCの罹患範囲別およびCDの病型分類

別 検 討

活動期 UCにおける罹患範囲別の PBMC の IL-4 産生量は、左側大腸炎型では $49.8 \pm 9.5 \text{ pg/ml}$ ($n=4$)、全大腸炎型では $72.1 \pm 14.0 \text{ pg/ml}$ ($n=7$) であり、左側大腸炎型と全大腸炎型で差はなかった (図 4)。

CDでは、互いに有意差を認めなかった活動期と緩解期を併せて、病型分類別の PBMC の IL-4 産生量を検討した。CDの小腸型では $81.5 \pm 17.9 \text{ pg/ml}$ ($n=4$)、小腸・大腸型では $172.1 \pm 26.0 \text{ pg/ml}$ ($n=11$) および大腸型では $101.0 \pm 39.0 \text{ pg/ml}$ ($n=2$) であり、3群間で差はなかった (図 5)。

3) 活動期 UCにおける重症度別検討

活動期 UCにおける重症度別の IL-4 産生量は軽症では $56.0 \pm 4.5 \text{ pg/ml}$ ($n=3$)、中等症では $74.2 \pm 16.3 \text{ pg/ml}$ ($n=6$) および重症では $45.5 \pm 22.5 \text{ pg/ml}$ ($n=2$) であり、3群間で差はなかった (図 6)。

4) 治療内容別検討

治療内容から、SH非投与群とSH投与群に分け、そのIL-4産生量を検討した。活動期UCのSH投与群は $46.7 \pm 6.4 \text{ pg/ml}$ ($n=7$)であり、SH非投与群の $94.3 \pm 16.3 \text{ pg/ml}$ ($n=4$)に比し有意に ($p<0.01$)低下していた。また、対照の $123.8 \pm 17.1 \text{ pg/ml}$ ($n=22$)に比し、SH非投与群は差はなかったが、SH投与群は有意に ($p<0.01$)低下していた。緩解期UCのSH投与群も $78.3 \pm 34.7 \text{ pg/ml}$ ($n=3$)と、SH非投与群の $129.6 \pm 22.0 \text{ pg/ml}$ ($n=16$)に比し有意に ($p<0.005$)低下していた。なお、対照に比しSH非投与群およびSH投与群とも差はなかった(図7)。

緩解期CDのSH非投与群は $124.8 \pm 29.1 \text{ pg/ml}$ ($n=8$)、SH投与群は $203.0 \pm 50.6 \text{ pg/ml}$ ($n=3$)であり、SH非投与群とSH投与群で差なかった。また、いずれも対照と差はなかった(図8)。

5) PBMCのIL-4産生能と発症経過年数の相関

活動期UC ($n=11$)におけるPBMCのIL-4産生量と発症経過年数の相関係数は $r=0.106$ であり、有意の相関を認めなかった(図9)。緩解期UC

($n=19$)におけるPBMCのIL-4産生量と発症経過年数の相関係数も $r=0.118$ であり、有意の相関を認めなかった(図10)。

活動期CD($n=8$)および緩解期CD($n=9$)におけるPBMCのIL-4産生量と発症経過年数の相関係数は各々 $r=-0.286$ および $r=0.103$ であり、有意の相関を認めなかった(図11、12)。

3. PBMCのIL-2産生能

1) 病期別検討

PHA-P刺激時のPBMCの培養上清中のIL-2産生量は、活動期UCでは $637.8 \pm 144.8 \text{ pg/ml}$ ($n=11$)であり、対照の $1362.8 \pm 199.1 \text{ pg/ml}$ ($n=22$)に比し有意に($p<0.05$)低下していた。一方、緩解期UCでは $1270.8 \pm 199.6 \text{ pg/ml}$ ($n=19$)、活動期CDでは $1324.3 \pm 423.3 \text{ pg/ml}$ ($n=8$)および緩解期CDでは 823.1 ± 219.2 ($n=9$)であり、いずれも対照と差はなかった。UCでは緩解期に比し活動期で有意に($p<0.05$)低下していたが、CDでは活動期と緩解期で差はなかった。また、

活動期ではCDに比しUCで低下傾向 ($p < 0.06$) を示したが、緩解期ではUCとCDで差はなかった (図 13)。

2) 活動期 UC の罹患範囲別および CD の病型分類別検討

活動期 UC における罹患範囲別の PBMC の IL-2 産生量は、左側大腸炎型では $645.0 \pm 260.0 \text{ pg/ml}$ ($n=4$)、全大腸炎型では $633.7 \pm 188.1 \text{ pg/ml}$ ($n=7$) であり、左側大腸炎型と全大腸炎型で差はなかった (図 14)。

CD における病型分類別の IL-2 産生量は、小腸型では $636.8 \pm 321.9 \text{ pg/ml}$ ($n=4$)、小腸・大腸型では $1065.0 \pm 269.8 \text{ pg/ml}$ ($n=11$) および大腸型では $1870.0 \pm 1280.0 \text{ pg/ml}$ ($n=2$) であり、3 群間で差はなかった (図 15)。

3) 活動期 UC における重症度別検討

軽症では $610.0 \pm 131.6 \text{ pg/ml}$ ($n=3$)、中等症では $519.3 \pm 232.9 \text{ pg/ml}$ ($n=6$) および重症では 1035.0 ± 295.0 ($n=2$) であり、3 群間で差はなかった (図 16)。

4) 治療内容別検討

活動期 UC の SH 投与群は $425.1 \pm 115.5 \text{ pg/ml}$ ($n=7$) であり、SH 非投与群の $1010.0 \pm 270.2 \text{ pg/ml}$ ($n=4$) に比し有意に ($p<0.05$) 低下していた。また、対照の $1362.8 \pm 199.1 \text{ pg/ml}$ ($n=22$) に比し、SH 非投与群は差はなかったが、SH 投与群は有意に ($p<0.01$) 低下していた。緩解期 UC の SH 投与群も $810.0 \pm 346.5 \text{ pg/ml}$ ($n=3$) と、SH 非投与群の $1357.3 \pm 224.9 \text{ pg/ml}$ ($n=16$) に比し有意に ($p<0.005$) 低下していた。なお、対照に比し、SH 非投与群および SH 投与群とも差はなかった (図 17)。

緩解期 CD の SH 非投与群は $738.3 \pm 174.3 \text{ pg/ml}$ ($n=6$)、SH 投与群は $992.7 \pm 635.0 \text{ pg/ml}$ ($n=3$) であり、SH 非投与群と SH 投与群で差はなかった。また、いずれも対照と差はなかった (図 18)。

5) PBMC の IL-2 産生能と発症経過年数の相関

活動期 UC ($n=11$) における PBMC の IL-2 産生能と発症経過年数の相関係数は $r=-0.185$ であり、

有意の相関を認めなかった(図19)。緩解期UC($n=19$)におけるPBMCのIL-2産生能と発症経過年数の相関係数も $r=0.028$ で有意の相関を認めなかった(図20)。

活動期CD($n=8$)および緩解期CD($n=9$)におけるPBMCのIL-2産生能と発症経過年数の相関係数は各々 $r=-0.338$ および $r=-0.373$ であり、いずれも有意の相関を認めなかった(図21、22)。

4. PBMCのIL-4産生能とIL-2産生能の相関関係

対照($n=22$)におけるPBMCのIL-4産生量とIL-2産生量の相関係数は $r=0.103$ であり、有意の相関を認めなかった(図23)。

活動期UC($n=11$)におけるIL-4産生量とIL-2産生量の相関係数は $r=0.643$ であり、有意な($p<0.05$)相関を示した(図24)。緩解期UC($n=19$)での相関係数は $r=0.663$ であり、有意な($p<0.005$)相関を示した(図25)。

活動期CD($n=8$)におけるIL-4産生量とIL-2産

生量の相関係数は $r=0.660$ であり、有意な ($p<0.05$) 相関を示した (図 26)。緩解期 CD ($n=9$) における相関係数は $r=-0.244$ であり、有意の相関を認めなかった (図 27)。

5. IL-2/IL-4 産生比

同一検体中の IL-4 産生量に対する IL-2 産生量の比を、IL-2/IL-4 産生比とした。

IL-2/IL-4 産生比は活動期 UC で 10.9 ± 2.6 ($n=11$)、緩解期 UC で 12.1 ± 1.5 ($n=19$)、活動期 CD で 8.7 ± 2.7 ($n=8$) および緩解期 CD で 7.2 ± 2.2 ($n=9$) であり、いずれも対照の 16.4 ± 3.9 ($n=22$) と差はなかった。UC および CD とともに活動期と緩解期で差はなかった。また、活動期では UC と CD で差はなかったが、緩解期では UC に比し CD で有意に ($p<0.05$) 低下を示した (図 28)。

V. 考察

近年、免疫学の進歩に伴い種々のサイトカ

インが発見・同定されるようになり、それらが免疫応答のみならず、炎症反応、造血反応および内分泌系などの調節にも深く関与し、生体の恒常性維持に重要な役割を果たしていることが明らかにされている。IBDにおいても、IL-1、IL-2、IL-6、IL-8、tumor necrosis factor (TNF) および interferon (IFN) などのサイトカインの動態が報告されるようになってきている。IL-4はB細胞の増殖作用¹⁾、IgE抗体の産生誘導²⁾、cytotoxic T細胞の誘導⁴⁾および肥満細胞の増殖作用⁵⁾などの生物学的活性を有するが、IBDの病変局所でもこのような生物活性の働きを思わせる病態が観察される。従って、IBDの病態へIL-4が関与している可能性が推測されるが、この点に関する研究はいまだ報告されていない。また、免疫応答の中心的役割を果たしているIL-2産生動態に関しては、これまでいくつか報告されているものの、いまだ一定した見解は得られていない。

そこで著者は、IBD患者のPBMCを用いて、helper T細胞から産生されるIL-4を測定するとともに、同時にT細胞から産生されるIL-2についても測定を行い、サイトカイン産生能からみたIBD患者のT細胞機能について検討を加えた。

サイトカインの測定法は、生物学的活性測定法 (bioassay) と免疫学的測定法 (immunoassay) に分類される。Bioassayには生物学的活性を測定できる利点があるが、サイトカイン依存性細胞株の特異性やその維持が容易でないという問題に加え、種々の抑制因子などの影響により、必ずしも産生されたサイトカインの真の活性を反映していない場合もあるという欠点がある。一方、今日広く用いられてきた immunoassay はサイトカインに特異的なモノクローナル抗体を用いることから、特異性にすぐれ、簡便に測定できる利点を有するが、測定されたサイトカインレベルが必ずしもそのまま生物学的活性を示すとは限ら

ず、変性したり活性のないサイトカインを含んでいる場合もある。従って、サイトカインの測定においては、両者を併用するのが望ましいとされるが、今回著者は特異性と簡便性の点から、IL-4およびIL-2の測定法として immunoassay である ELISA を用いた。

UCやCDでは、特に活動期でT細胞が活性化されていることが報告されている^{3,1)}。従って、非刺激時のPBMCでも、その培養上清中にはある程度のIL-4やIL-2が産生されていると考えられたが、著者の成績では対照のみならず、UCおよびCDでも培養上清中のIL-4やIL-2産生量は、検出感度以下であった。このことから、今回用いた immunoassay で PBMC の IL-4 や IL-2 産生能を検索するには、PHA刺激などによるT細胞の強い活性化が必要であることが示唆される。

PHA刺激によるPBMCのIL-4産生能に関する著者の成績では、対照に比し活動期UCのみで低下を示し、緩解期UC、活動期および緩解期CD