

潰瘍性大腸炎に対する血球成分除去療法（サイタフェレシス） の治療効果におよぼす好中球接着分子の意義

宮川 佳也 松岡 美佳 須藤 訓
木村 信明 相澤 良夫

東京慈恵会医科大学内科学講座消化器・肝臓内科

(受付 平成 15 年 8 月 5 日)

THE ROLE OF NEUTROPHIL ADHESION MOLECULES ON THE EFFICACY OF CYTAPHERESIS THERAPY IN PATIENTS WITH ULCERATIVE COLITIS

Yoshinari MIYAGAWA, Mika MATSUOKA, Satoshi SUTOH
Nobuaki KIMURA, and Yoshio AIZAWA

*Division of Gastroenterology and Hepatology, Department of Internal Medicine,
The Jikei University School of Medicine*

Ulcerative colitis (UC) is a recurrent inflammatory disease of the colon and rectum characterized by rectal bleeding, diarrhea, fever and weight loss. In the last decade, UC has been increasing in Japan. Although the pathogenesis of UC has not been fully understood, granulocytes may play a key role in the aggravation of UC because large numbers of granulocytes are observed in the lesion on active phase of the disease. An adsorptive extracorporeal circulation therapy using a granulocyte and/or monocyte adsorption apheresis column (cytapheresis) is proved to be safe and effective in UC.

In order to clarify the mechanism of cytapheresis on the treatment of UC, we investigated the relationship between the mRNA expression of neutrophil adhesion molecules (CD62L and CD11b) and the efficacy of cytapheresis in 14 patients. Patients were received five or ten sessions of cytapheresis. Each session was performed at a velocity of 50 ml/min for 60 minutes. Neutrophils were collected just before and after the first, third, fifth and/or tenth session of cytapheresis at the device inflow site. Then, CD62L and CD11b mRNA was quantified by real-time PCR. Data were expressed as the ratio of CD62L mRNA/CD11b mRNA (CD mRNA ratio).

Results were as follows. The CD mRNA ratio was significantly lower in patients with active UC than in healthy controls (range; 3.6~55.5, median; 30.9 vs range; 45.1~167.2, median; 74.2). Moreover, the CD mRNA ratio before the each session of cytapheresis was gradually increasing to the normal level in patients with favorable response to cytapheresis. However, the elevated CD mRNA ratio was dramatically decreased after the cytapheresis. These findings suggested that mRNA expression of adhesion molecules in neutrophils could be involved in the efficacy of cytapheresis therapy.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2003; 118: 489-506)

Key words: ulcerative colitis, cytapheresis, granulocyte, adhesion molecule, real time PCR

I. 緒 言

潰瘍性大腸炎 (Ulcerative colitis; 以下 UC) は、わが国で近年増加している原因不明で難治性の慢性炎症性疾患である¹⁾。UC の病因には、遺伝的因子²⁾³⁾、環境因子^{4)–6)} などの多因子が関与し、その病態は免疫炎症反応により修飾されている^{7)–9)}ものと考えられているが、詳細はいまだ明らかにされていない。

本疾患の治療は、わが国では厚生労働省特定疾患難治性炎症性腸管障害調査研究班の潰瘍性大腸炎治療指針¹⁰⁾に基づいて、重症度に合わせて行われている。軽症の場合には salazosulphapyridine (SASP)¹¹⁾¹²⁾、5-aminosalicylic acid (5-ASA)¹³⁾ の経口投与が、あるいはそれらに加えて prednisolone (PSL) 注腸、betamethasone 坐薬¹⁴⁾ との併用が行われている。中等症の場合には、上記薬物に加え PSL 30~40 mg の経口投与、さらに azathiopurine または 6-mercaptopurine などの免疫抑制剤¹⁵⁾ との併用療法が行われている。また、重症および劇症例の内科的治療として 1955 年 Truelove が提唱したステロイド大量療法¹⁶⁾ は、その後ステロイド強力静注療法と呼ばれ、その有効性は著しいことから¹⁷⁾ 本邦でも広く行われている。重症および劇症例には、その他に PSL 動注療法¹⁸⁾ やステロイドパルス療法¹⁹⁾ が行われ、さらに、欧米では cyclosporin 持続点滴静注療法²⁰⁾ も行われている。しかし、これらの薬物療法のみでは治療抵抗性の難治例が存在することや、長期に薬物を使用することによる副作用の発現などの問題も指摘されており^{21)–24)}、新たな治療法が望まれている。

近年、慢性関節リウマチ²⁵⁾ や全身性エリテマトーデス²⁶⁾ などの免疫異常が関与する疾患群の患者の血中や病変局所に異常な活性化白血球が多いことに注目して、白血球系細胞を体外循環で膜やビーズを用いて吸着、除去する治療法 (サイタフェレシス) が試みられ、その有用性が報告されている。同様に免疫異常が関与する疾患と考えられている UC に対しても、重大な副作用のない新たな治療法として数年前より白血球除去療法 (LCAP)、顆粒球吸着療法 (GCAP) が試みられ、その有用性が明らかにされており²⁷⁾²⁸⁾、すでに

2000 年 4 月から保険診療として実施され普及しつつある。しかし、それらがどのような機序で病態に影響を及ぼし、疾患を改善させるかについては、必ずしも一致した見解が得られていない。

UC に対しておこなわれているサイタフェレシスは leukocytapheresis (LCAP) と granulocytapheresis (GCAP) である。LCAP と GCAP では、末梢血の単球やリンパ球の除去率にはかなりの違いがあるが、両治療とも共通して顆粒球が除去されることが知られている²⁸⁾²⁹⁾。また顆粒球は腸管粘膜局所に浸潤し、局所での炎症の形成に重要な役割を果たしている⁷⁾ と考えられることから、これらの治療による効果の一部は、末梢の顆粒球を除去したことが関係しているものと考えられる。顆粒球は炎症の局所に最初に動員される細胞で⁷⁾³⁰⁾、生体の防御反応や組織破壊に関与するが、最近の報告では免疫調節にも関与することが明らかになってきた^{30)–32)} ことから、局所の炎症を考えるうえで極めて重要な細胞と考えられる。

さらに、顆粒球が腸管炎症局所に浸潤する過程においては接着分子の関与が重要とされており⁷⁾、サイタフェレシスにより好中球接着分子の発現が変化し、浸潤能や組織障害能が減弱することが知られている³³⁾³⁴⁾。

そこで、本研究ではサイタフェレシスが病態改善にどのように寄与するかを明らかにする目的で、顆粒球の大部分を占める好中球の細胞表面上に発現する接着分子 (CD11b および CD62L) に着目し、UC 患者に対する LCAP、GCAP 前後での末梢血好中球の接着分子の遺伝子発現 (mRNA) 動態と臨床所見の改善効果との関係について検討した。

II. 対象と方法

対象は、当院にて治療中の活動期 UC 患者で、2000 年 4 月から 2003 年 3 月までの期間に、サイタフェレシスの適応があると判断した 14 例である。LCAP と GCAP の治療効果はほぼ同等とされているので、この 14 例に対し LCAP と GCAP を無作為に割り付け、GCAP、LCAP をそれぞれ 7 例ずつ施行した。

この 14 例の臨床的背景を Table 1 に示す。男性 7 例、女性 7 例、平均年齢は 44.7 歳 (17 歳~81 歳)、

Table 1. Clinical backgrounds of the patients with UC treated by cytapheeresis therapy

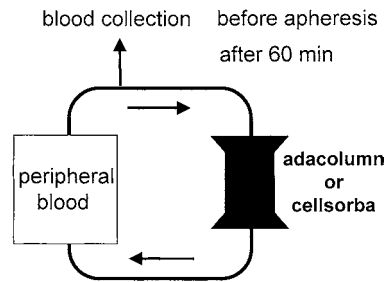
Case Number	Age	Sex	Disease location*	Duration of disease (months)	Duration of steroid therapy (months)	Activity	Cytapheresis therapy	Combined steroid therapy**
1	36	F	total	4	0	severe	GCAP	
2	79	F	total	24	0	severe	LCAP	
3	57	M	total	6	11	severe	LCAP	PSL 40 mg/day
4	28	M	total	9	0	moderate	GCAP	
5	39	M	left-sided	84	3	moderate	GCAP	PSL 5 mg/day
6	57	F	total	36	0	moderate	GCAP	
7	81	M	total	25	9	moderate	GCAP	PSL 40 mg/day
8	17	F	total	1	0	severe	LCAP	PSL 60 mg/day
9	33	M	left-sided	144	72	mild	LCAP	PSL 10 mg/day
10	51	M	left-sided	240	54	mild	LCAP	PSL 12.5 mg/day
11	38	M	total	108	13	severe	GCAP	PSL 10 mg/day
12	27	F	left-sided	60	27	severe	GCAP	
13	51	F	total	96	70	severe	LCAP	methylprednisolone 3,000 mg
14	32	F	total	12	6	severe	LCAP	

*total: total colitis, left-sided: left-sided colitis, **PSL: prednisolone

1. GCAP · LCAP

anticoagulant
flow speed
total flow volume
apheresis

nafamostat mesilate
50ml/min
3000ml (60min)
5 sessions/course



2. Blood sampling

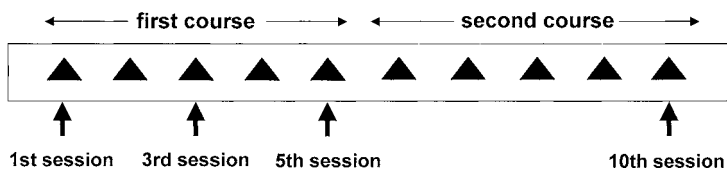


Fig. 1. Cytapheresis

罹病期間は平均 60.6 カ月 (1 カ月～240 カ月)、中央値 30.5 カ月であった。厚生労働省特定疾患難治性炎症性腸管障害調査研究班平成 9 年度研究報告書の基準による重症度判定³⁵⁾では、重症 8 例、中等症 4 例、軽症 2 例であった。軽症の 2 例は長期間のステロイド治療から離脱できない症例であった。対照には、健常人ボランティア (以下 健常人) 10 例 (男性 5 例女性 5 例、平均年齢 36.7 歳) を用いた。なお、健常人には GCAP, LCAP を施

行していない。

本研究は東京慈恵会医科大学倫理委員会の承認を得て実施され (承認番号: 13-104(2944))、実施にあたっては全員から文書による同意を取得した。

1. GCAP, LCAP の実施法と治療効果の判定

実施法を Fig. 1 に示す。GCAP は日本抗体研究所社製アダカラムを、LCAP は旭メディカル社製セルソーバを使用し、両側肘静脈あるいは単径静

脈からサイタフェレシスを60分間実施した。抗凝固薬にはnafamostat mesilate (Torii Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan)を用い、毎分50 mlの流速で1回の治療あたり60分間施行し約3,000 mlの血液を処理した。サイタフェレシスは、原則として5回を1クールとし、1または2クールすなわち計5回または10回実施した。GCAPは1クール目は週2回、2クール目は週1回施行し、LCAPは1クール目、2クール目とも週1回施行した。なお、1クール目と2クール目は連続して実施した。

なお、2例では3回のサイタフェレシスのみで治療を終了した。サイタフェレシス治療中は原則的に新たな薬物は使用せず、また以前から使用していた5-ASA、SASPなどの薬物は用量を変えずに継続使用とした。副腎皮質ステロイドは8例に併用され、うち4例ではサイタフェレシス治療前の投与量(PSL 5~12.5 mg)を継続し、3例は重症/中等症で下部消化管内視鏡検査上炎症が強度であったためPSL 40~60 mgにサイタフェレシス治療を併用、1例はステロイドパルス(methylprednisolone 1,000 mg, 3日間)療法をLCAP 2回目から併用した。

サイタフェレシスの治療効果は、厚生省難治性炎症性腸管障害調査研究班平成10年度研究報告書³⁶⁾に従い、以下のごとく著効、有効、無効に分類して判定した。すなわち、1) 著効: すべての臨床症状が消失し、CRPやESRの急性炎症マーカーが著明に改善し、下部消化管内視鏡検査(CF)上寛解となり、ステロイドホルモンの投与量を減量し、絶食中の患者は食事摂取を開始しても症状の増悪がない場合、2) 有効: 臨床症状が十分に改善し、CRPやESRの急性炎症マーカーが改善し、CFで緩解ではないが改善を認め、ステロイドホルモンの投与量を減量し、絶食中の患者は食事摂取を開始しても症状の増悪がない場合、3) 不変および悪化: 臨床的、内視鏡的に改善も悪化も認めない場合、および臨床的あるいは内視鏡的悪化を認めた場合に分類した。

2. 末梢静脈血の採取

サイタフェレシス治療の第1回目、3回目、5回目または10回目の治療開始時および治療60分のアフェレシス終了直前に、カラムに流入する直前

の末梢静脈血をヘパリン加注射器を用いて6 ml採取した。

対照とした健康人からは、早朝空腹時に肘静脈より同様の採血を行った。

3. 好中球分画の精製

好中球分画を精製し採取する目的で、Klebanoffら³⁷⁾の方法に準じて好中球を分離、精製した。すなわち、ヘパリン加末梢血をHanks液で2倍に希釈し、この希釈血液1容に対して、3% (w/v)デキストラン (Dextran T500, MW523000, Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden)加生理食塩水1/4容を加えて混和後、室温で30分間静置、血漿を含む上層のみを採取し赤血球を除去した。この上層をFicoll-Conray比重遠心液(リンホセパール: IBL, 東京, 比重は 1.077 ± 0.001)に重層し、1,800回転/分(400 G)で30分間室温で遠心した。遠心後に上清を除去し、好中球を含むペレットに0.2% NaCl液を加えて30秒間混和し、残存する赤血球を溶血させた。その後、直ちに等量の1.6% NaCl液を加えて等張とし、再度(280 G)遠心。ペレットをHanks液でさらに3回洗浄し、精製好中球分画とした。この分画を塗沫染色(ライトギムザ染色)して鏡検し、好中球が95%以上であることを確認した。

4. RNAの抽出

精製した好中球分画ペレットから、ISOGEN(和光純薬、大阪)を用い、Acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction法³⁸⁾に準じて総RNAを抽出し、エタノールで沈殿させた後に -80°C で保存した。

5. 好中球接着分子mRNAの定量および解析方法 (Table 2)

抽出した総RNAから、random primerを用いてcDNAを合成し、CD62LおよびCD11bのmRNA定量に用いた。定量は、real time PCR法³⁹⁾で行なった。すなわち、TaqMan Universal Master Mix (PE Applied Biosystems, CA, USA)に、それぞれのprimer setとTaqMan probeを加え、CD62LおよびCD11b mRNAを、それぞれreal time PCR法で定量した。CD11b mRNA定量用のprimerはGenbank J03925を参考に作製し、TaqManプローブ(exon11/CD11b-P)を2つのprimer(exon11/CD11b-Fと

Table 2. Primers and Probes for quantification of CD11b and CD62L mRNA by real-time PCR

primer	CD11b-F	5'-GGG AGC TAT GAC TGG GCT GG-3' (exon11)
	CD11b-R	5'-AGT AGG CGC CGA TCT GGG T-3' (exon12-13)
probe	CD11b-P	5'-TCA GCA CAT CGG CCT GGT AGC GAT GT-3' (exon11)
primer	CD62L-F	5'-TGA CGC CTG CCA CAA ACT AAA-3' (exon3)
	CD62L-R	5'-CAA AGG GTG AGT ACA GTC CAT GGT-3' (exon5)
probe	CD62L-P	5'-AGC CCT GGT CAT GCA GTG GCC ATG-3' (exon4)

exon12-13/CD11b-R)の間に設定するよう設計した。また、CD62L mRNA 定量用の primer は Genbank NM_000655 を参考に作製し、TaqMan プローブ (exon4/CD62L-P) を 2 つの primer (exon3/CD62L-F と exon5/CD62L-R) の間に設定するよう設計した (Table 2)。PCR 反応には real time PCR system (ABI PRISM 7700 Sequence Detection System: PE Applied Biosystems, CA, USA) を用い、95°C 30 秒間 denaturation, 60°C 40 秒間 annealing, 72°C 30 秒間 extension を 50 サイクル行ない、PCR 反応液中の蛍光強度を real time に測定した。

この定量系のスタンダードには、CD62L および CD11b の PCR 産物を blue-script vector (STRATAGENE, CA, USA) にクローニングした後、T7 RNA ポリメラーゼを用いて作製した RNA を用い、CD62L および CD11b の mRNA 量を、総 RNA 1 μ g あたりのコピー数として表現した。

Real time PCR 法で求めた好中球分画の総 RNA 1 μ g 中の CD11b mRNA copy 数および CD62L mRNA copy 数は、それぞれ $10^{3.97} \sim 10^{7.6}$ および $10^{4.92} \sim 10^{8.48}$ であった。それぞれの mRNA copy 数そのものの比較では、一定の傾向が認められず、PCR を用いた今回の定量系では、それぞれのサンプルにおいて cDNA 合成効率や PCR 効率の違いなどの要因により、サンプルごとの定量値に相応の誤差が生じている可能性が想定された。

好中球表面の CD11b と CD62L の発現は、CD11b が強発現する場合には CD62L の発現が低下するという、相反する動態を示す関係にあることが知られ⁴⁰⁾⁻⁴²⁾、mRNA 発現も CD11b と CD62L とは相反する動態を示す可能性が考えられる。そこで、本研究では、それぞれのサンプル

ごとに CD11b mRNA copy 数を分母、CD62L mRNA copy 数を分子とする以下の式で、両者の mRNA の発現状態を相対的な比率 (CD mRNA 比) として表わし、評価することとした。

$$\text{CD mRNA 比} = \frac{\text{CD62L mRNA copy 数}}{\text{CD11b mRNA copy 数}}$$

6. 統計学的検討

有意差の検定は、Wilcoxon matched pair 検定または Mann-Whitney U 検定を用いて行った。

III. 結 果

1. サイトフェレシスの治療効果 (Table 3)

Table 1 に示す UC 患者 14 例にサイトフェレシスを施行した。GCAP を重症 3 例、中等症 4 例に、また LCAP を重症 5 例、軽症 2 例に施行した。

サイトフェレシス法の種類、治療前の重症度および罹患期間と治療効果の関係を Table 3 に示す。GCAP の治療効果は全例 (100%) が有効であった。LCAP の治療効果は著効/有効が 5 例 (71.4%) で、うち 1 例が著効であり、不変・悪化は 2 例 (28.6%) であった。治療前に重症/中等症であった 12 例は全例が著効/有効であったが、軽症の 2 例はともに不変・悪化であった。この 2 例は罹患期間が 10 年以上と長期で、またステロイド依存性であり Table 1 に示すように副腎皮質ステロイド剤の使用期間もそれぞれ 4 年 6 カ月、6 年と長期であった。なお、サイトフェレシス中には一時的な軽度の気分不快を 1 例 (Case No 13) に、また翌日に微熱を 1 例 (Case No 6) に認めた以外、サイトフェレシスに関連した副作用はみられなかった。

Table 3. Efficacy of cytapheresis therapy in relation to type of cytapheresis, disease activity and duration of disease.

		Efficacy					
		excellent		moderate		no change and deterioration	
Type of cytapheresis	GCAP (<i>n</i> =7)	0/7	(0%)	7/7	(100%)	0/7	(0%)
	LCAP (<i>n</i> =7)	1/7	(14.3%)	4/7	(57.1%)	2/7	(28.6%)
Disease activity	severe (<i>n</i> =8)	1/8	(12.5%)	7/8	(87.5%)	0/8	(0%)
	moderate (<i>n</i> =4)	0/4	(0%)	4/4	(100%)	0/4	(0%)
	mild (<i>n</i> =2)	0/2	(0%)	0/2	(0%)	2/2	(100%)
Duration of disease	within 10 yrs* (<i>n</i> =12)	1/12	(8.3%)	11/12	(91.7%)	0/12	(0%)
	over 10 yrs* (<i>n</i> =2)	0/2	(0%)	0/2	(0%)	2/2	(100%)

*yrs: years

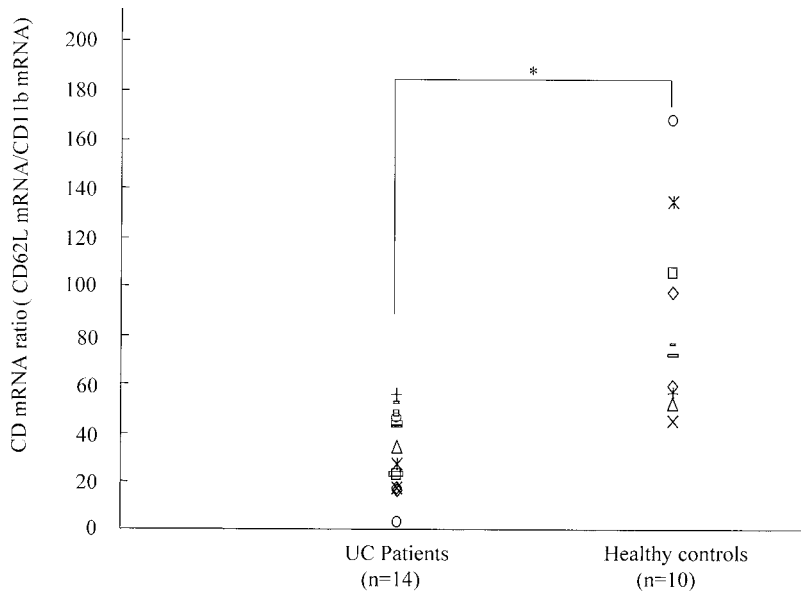


Fig. 2. CD mRNA ratios in patients with active UC and healthy controls.

The CD mRNA ratios in active UC group was significantly lower than those in healthy control group.

**p* value < 0.01, Mann-Whitney U test.

2. サイタフェレシス治療前の UC 患者の好中球接着分子 mRNA 発現動態 (Fig. 2)

サイタフェレシス治療前の UC 患者の CD mRNA 比と健常人の CD mRNA 比を比較すると、UC 患者では 3.6~55.5 (中央値: 30.9) と健常人の 45.1~167.2 (中央値: 74.2) に比し有意 (*p* < 0.01) に低値であり、UC 患者の末梢血好中球では CD11b mRNA に比して相対的に CD62L mRNA の発現が低いことが示された。

3. UC の重症度と好中球接着分子 mRNA 発現動態との関連

サイタフェレシス治療開始時における重症または中等症 12 例の CD mRNA 比は 3.6~47.6 (中央値: 25.3) と軽症例 2 例の 52.2 および 55.5 に比し有意 (*p* < 0.05) に低値であった (Fig. 3a)。また、中等症 4 例の CD mRNA 比は 17.3~34.3 (中央値: 22.8)、重症 8 例は 3.6~47.6 (中央値: 33.0) で、重症と中等症の間には差を認めなかった (Fig.

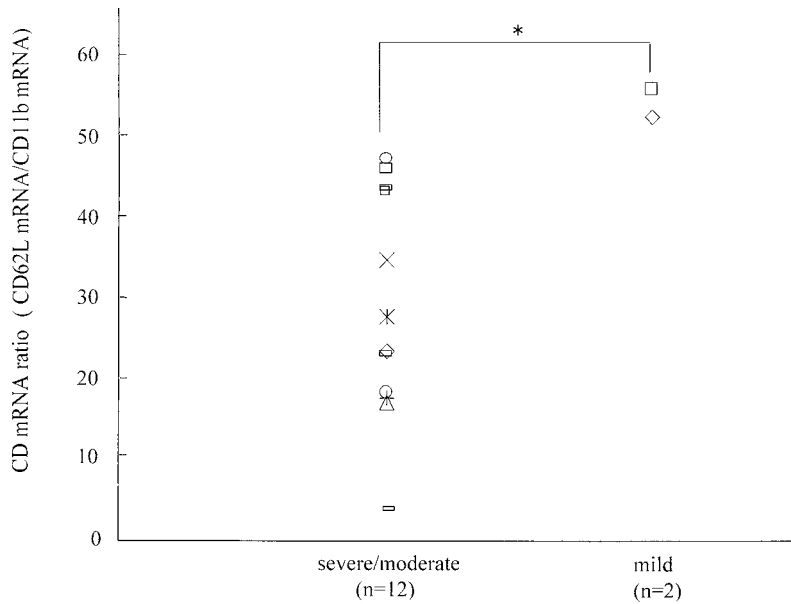


Fig. 3a. CD mRNA ratios in active UC patients with severe/moderate activity and mild activity. The CD mRNA ratios in severe/moderate activity group was significantly lower than those in mild activity.

* p value < 0.05, Mann-Whitney U test.

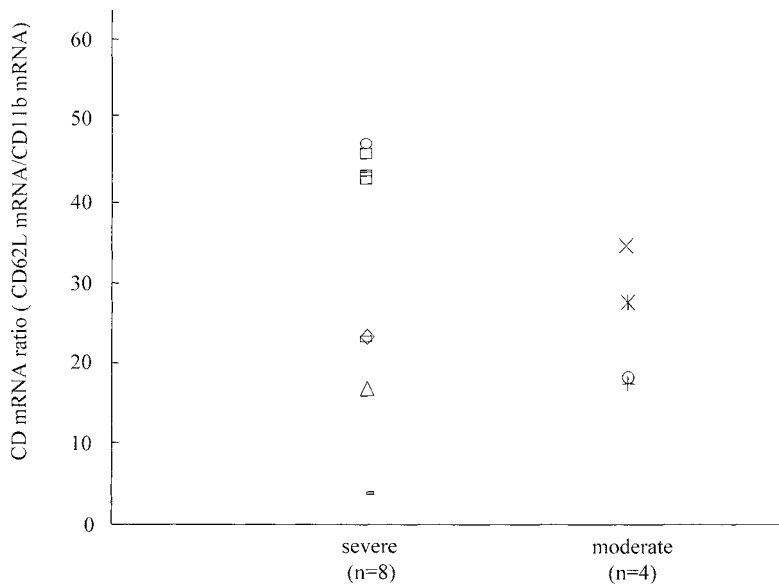


Fig. 3b. CD mRNA ratios in patients with UC with severe activity and moderate activity.

Significant difference was not observed in CD mRNA ratios between UC patients with severe activity and moderate activity.

3b).

4. サイトフェレシス治療による好中球接着分子 mRNA の変動

初回のサイトフェレシス開始時と最終回のサイ

タフェレシス開始時の CD mRNA 比を比較すると、最終回の CD mRNA 比は 1.05~185.7(中央値: 68.7) と、初回の 3.6~55.5(中央値: 30.9) に比べ、有意 ($p < 0.01$) に上昇していた。この上昇

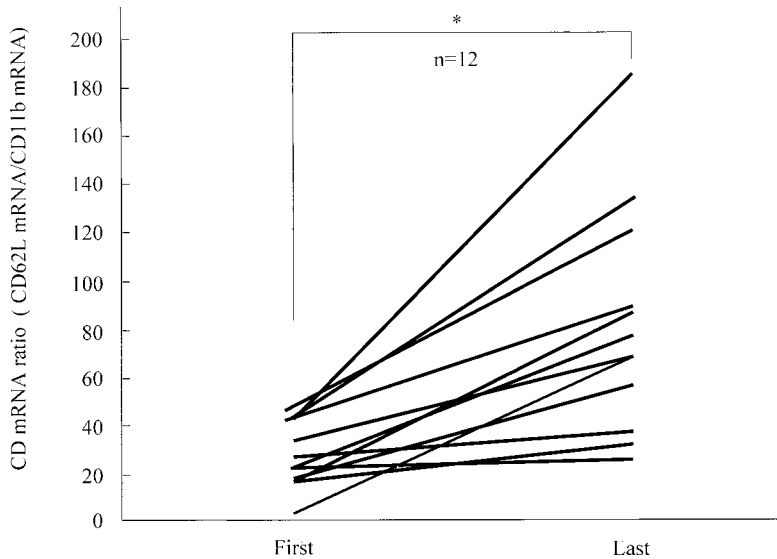


Fig. 4a. CD mRNA ratios before the first session and the last session of cytopheresis in 12 patients with active UC who favorably responded to cytopheresis therapy.

The CD mRNA ratios before the last session of cytopheresis were significantly higher.

First : the first session of cytopheresis, Last : the last session of cytopheresis

**p* value <0.01, Wilcoxon matched pair test

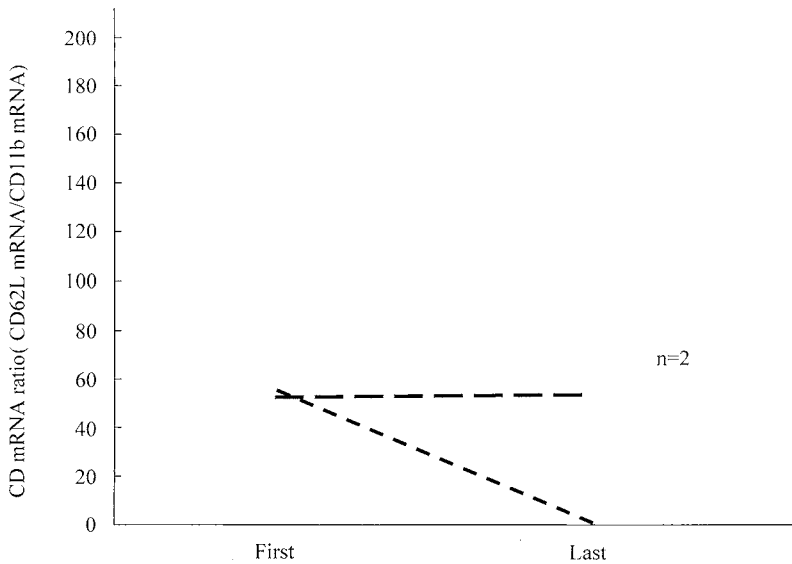


Fig. 4b. CD mRNA ratios before the first session and the last session of cytopheresis in 2 UC patients with active UC showing no response to cytopheresis therapy.

Significant difference was not observed in CD mRNA ratios between before the first session and the last session of cytopheresis.

First : the first session of cytopheresis, Last : the last session of cytopheresis.

は、著効/有効例では著明で、全例に明らかな上昇を認め、著効/有効例の最終回の CD mRNA 比は 23.6~185.7 (中央値: 73.4) と、健常人とほぼ同等

であった (Fig. 4a)。しかし、この上昇は不変・悪化群では明らかでなく、1 例ではむしろ明らかな低下を認めた (Fig. 4b)。

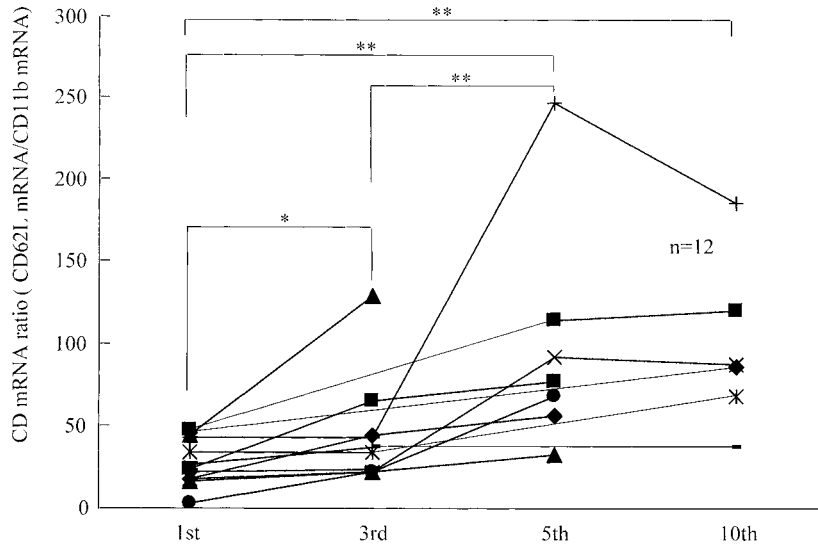


Fig. 5a. Time course of CD mRNA ratios before the each session of cytapheresis in 12 patients with active UC who favorably responded to cytapheresis therapy. CD mRNA ratio showed significant increase with progress of cytapheresis therapy. * p value < 0.05, ** p value < 0.01, Wilcoxon matched pair test.

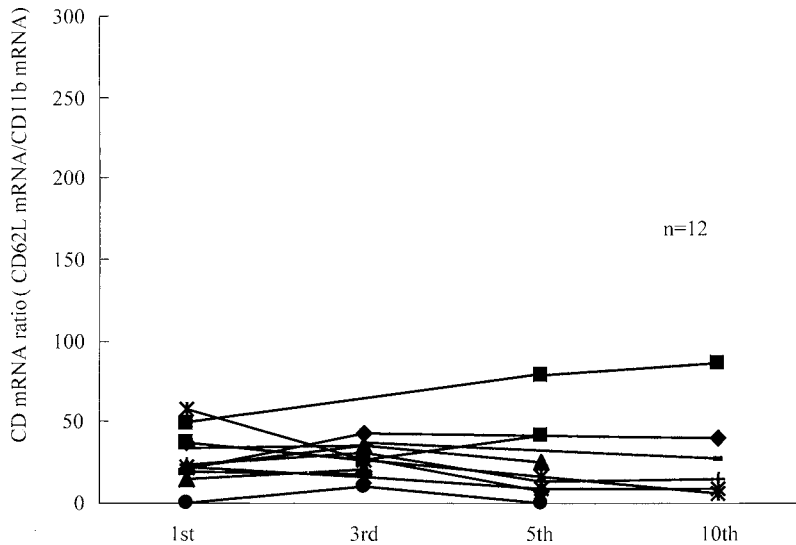


Fig. 5b. Time course of CD mRNA ratios after the each cytapheresis in 12 patients with active UC who favorably responded to cytapheresis therapy. Significant difference was not observed in CD mRNA ratios after the each session of cytapheresis. 1st: first cytapheresis, 3rd: third cytapheresis, 5th: fifth cytapheresis, 10th: tenth cytapheresis

また、著効/有効例 12 例において、治療回数ごとにみた好中球 CD mRNA 比の変動をサイタフェレシス開始時と 60 分終了時それぞれで検討した。サイタフェレシス開始時の CD mRNA 比

は治療回数を重ねることにより上昇したが (Fig. 5a), サイタフェレシス 60 分終了時の CD mRNA 比は治療回数を重ねても上昇傾向はみられなかった (Fig. 5b)。

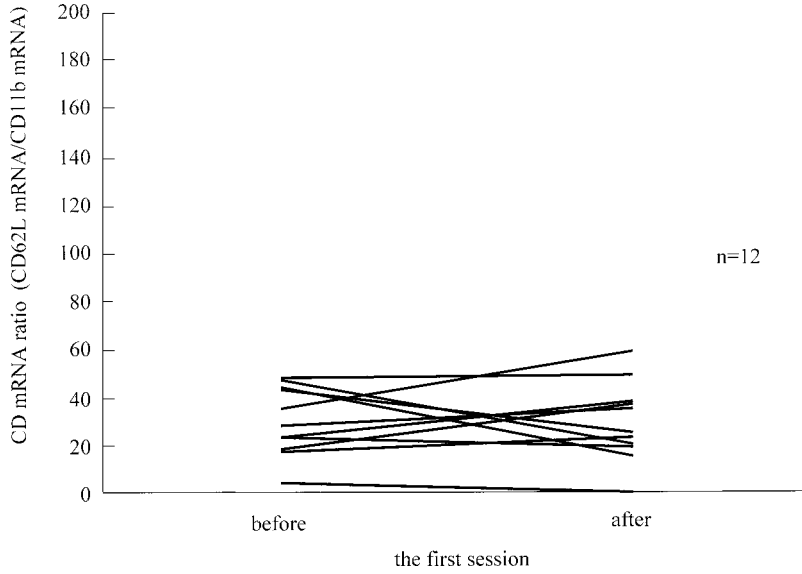


Fig. 6a. CD mRNA ratio before and after the first session of cytapheresis in 12 patients with active UC who favorably responded to the therapy. Significant difference was not observed in CD mRNA ratios between before and after the first session of cytapheresis.
 the first session : the first session of cytapheresis
 before : before cytapheresis pre column filtration, after : cytapheresis performed 60 minutes pre column filtration.

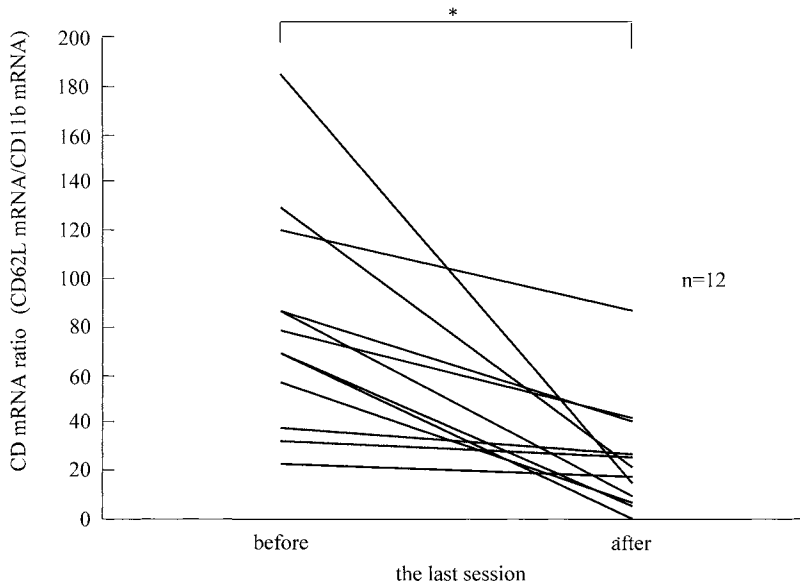


Fig. 6b. CD mRNA ratios before and after the last session of cytapheresis in 12 patients with active UC who favorably responded to the therapy. CD mRNA ratios showed significant decreasing at the last session of cytapheresis therapy.
 the last session : the last session of cytapheresis
 before : just before cytapheresis
 after : just after cytapheresis performed 60 minutes
 **p* value <0.01, Wilcoxon matched pair test

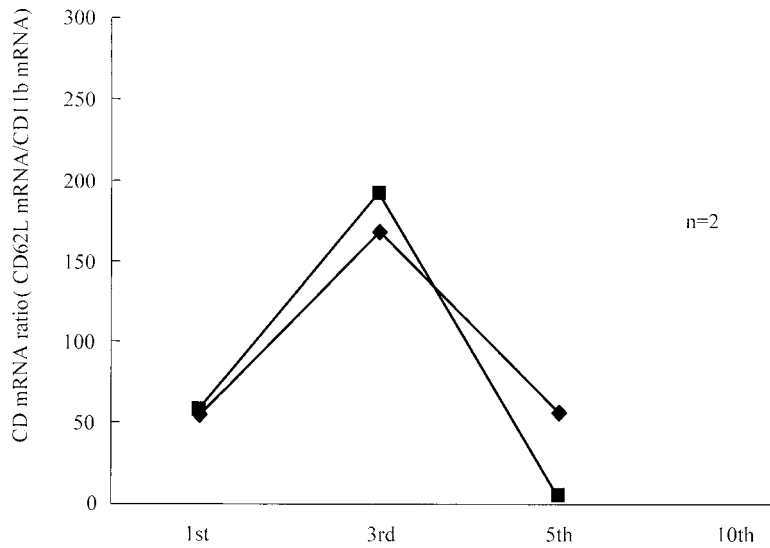


Fig. 7a. Time course of CD mRNA ratios before the each session of cytapheresis in 2 patients with active UC showing no response to cytapheresis therapy. Significant difference was not observed in CD mRNA ratios before the each session of cytapheresis.

1st : first cytapheresis, 3rd : third cytapheresis
5th : fifth cytapheresis, 10th : tenth cytapheresis

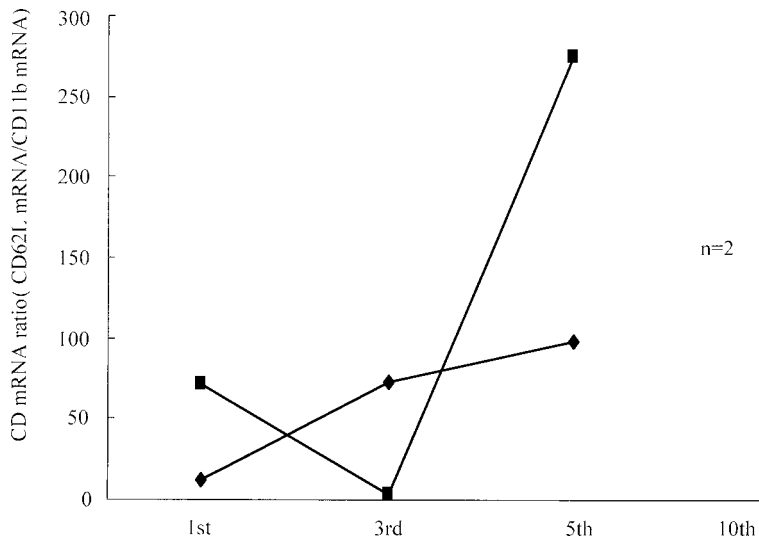


Fig. 7b. Time course of CD mRNA ratios after the each cytapheresis in 2 patients with active UC showing no response to cytapheresis therapy. Significant difference was not observed in CD mRNA ratios after the each session of cytapheresis.

1st : first cytapheresis, 3rd : third cytapheresis
5th : fifth cytapheresis, 10th : tenth cytapheresis

さらに、著効/有効例12例においてサイタフェレシス開始時と60分終了時でのCD mRNA比の変化をサイタフェレシス初回と最終回それぞれ

において検討すると、初回のサイタフェレシスでは開始時と60分終了時では明らかな変化を認めなかった (Fig. 6a)。しかし、最終回のサイタフェ

レススでは、開始時の CD mRNA 比に比べ、60 分終了時の CD mRNA 比は著明に低下していた (Fig. 6b)。一方、不変・悪化例 2 例では治療回数ごとにみた CD mRNA 比の変動に一定の傾向を認めなかった (Fig. 7a, 7b)。

なお、サイタフェレシス法の違いや併用療法の違いは CD mRNA 比の変動に影響せず、GCAP、LCAP とともに著効/有効例では同様の CD mRNA 比の変動を示した。

IV. 考 察

UC は原因不明の難治性慢性疾患であり、近年わが国では明らかに罹患者数が増加している疾患である¹⁾。UC の病態は、おもに細胞性免疫応答の異常により修飾されているものと考えられている⁴³⁾⁴⁴⁾。すなわち、細胞障害性 T リンパ球⁴³⁾、炎症起因性サイトカインを産生する単球⁴⁵⁾ やリンパ球などの相互作用によって局所の組織障害が惹起されるメカニズムが推測されている⁹⁾。さらに、大腸粘膜局所にはリンパ球とともに単球⁴⁶⁾ や顆粒球⁷⁾ が大量に浸潤していることから、大腸局所での粘膜障害には顆粒球も重要な役割を果たしているものと推測されている⁴⁷⁾。

UC に対するサイタフェレシス療法は、従来の薬物療法に比して重症例や難治例に高い改善効果を示し、かつ重篤な有害事象が少ないことから、副腎皮質ステロイド剤や免疫抑制剤にとってかわる可能性のある治療法として注目を集めている²⁷⁾²⁹⁾。サイタフェレシス治療は、炎症の主役である白血球を体外に除去し、過剰となった免疫反応を抑制することにより、腸管局所の炎症を沈静化に導くと考えられ、わが国では UC の標準治療のひとつとして一般化されている。

現在サイタフェレシスの標準的な適応は重症 UC であるが、ステロイド治療中の中等症・軽症例でステロイド依存性を示す症例にも、ステロイド離脱もしくは減量にサイタフェレシスの有効性が期待されている。また、若年発症の UC にはステロイド長期使用による副作用の問題を避けるため、当初からサイタフェレシスが施行される機会も増加し、UC 治療におけるサイタフェレシスの位置づけは必ずしも明確にされていないのが現状である。

サイタフェレシスとして、わが国では GCAP と LCAP が行われている。GCAP には顆粒球の吸着剤として特殊加工した酢酸セルロースビーズ (直径約 2 mm) を充填した直接血液還流型のアダカラムが用いられている。このカラムは、顆粒球、単球を比較的選択的に除去し除去率は約 40% で、活動期 UC に対する有効率は 58.5% と報告されている²⁷⁾。一方、LCAP で使用されるセルソーバは、極細のポリエステル繊維の不織布を充填した膜型カラムで、白血球が 3 μm 以下の極細繊維に吸着する性質を利用したものである。顆粒球以外に単球をほぼ 100% 除去し、リンパ球除去率も 40~60% と白血球全般を除去している。活動期 UC に対する有効率は 69.8% で、ステロイド治療との比較試験で有用性が実証されている²⁹⁾。

われわれは、活動期 UC 14 例に GCAP、LCAP を 7 例ずつ施行し、その治療効果を検討した。重症/中等症の 12 例は、GCAP、LCAP にかかわらず全例が著効・有効であり、不変・悪化であった軽症の 2 例を除けば GCAP、LCAP の有効率に差はないと考えられた。また、ステロイド併用例と非併用例でその効果に差を認めなかった。

軽症の 2 例は罹患期間が長く、ステロイド依存例であった。ともに LCAP を施行し、好中球の吸着効果は良好であったが臨床症状の改善は明らかなでなかった。長期にわたる炎症状態においては、顆粒球、単球、リンパ球、それらを取りまく炎症起因性サイトカインなどによる腸管局所での免疫炎症反応がさまざまな修飾を受けた状態と考えられ、単に白血球を除去するだけでは、腸管局所の病態を改善するには至らない症例もあるものと考えられる。

近年、サイタフェレシスの治療効果発現機序について精力的に研究が行われている。サイタフェレシス治療前後では、顆粒球やマクロファージ/単球およびリンパ球のサイトカイン産生能⁴⁸⁾⁴⁹⁾ や、顆粒球のエラスターゼ活性⁴⁵⁾ に変動がみられることが報告されている。すなわち、サイタフェレシスで治療効果を認めた症例では、サイタフェレシス後に HLADR+CD8+T 細胞が相対的に減少し⁵⁰⁾、末梢白血球における interleukin (IL)-1, IL-6, IL-8, TNF- α などの炎症起因性サイトカイン産生能が低下し⁴⁹⁾、抑制性サイトカインで

ある IL-4 産生が増加する⁴⁸⁾ という報告がなされている。RA 患者では GCAP 後に T リンパ球の増殖能の低下や単球のサイトカイン産生能の変化を認める²⁵⁾³¹⁾ とも報告されている。また、サイタフェレシスでは多核白血球の活性酸素産生に關与する活性化血小板が除去される可能性⁵¹⁾ も示唆されている。さらに、大腸の炎症組織中では、サイタフェレシス有効群において、サイタフェレシス後にペルオキシダーゼ陽性浸潤細胞、ICAM-1 陽性血管内皮細胞が減少するが、無効群では変化を認めないこと⁵²⁾ が報告されている。

われわれは、GCAP と LCAP の治療効果には大差がないこと、両者に共通して顆粒球が除去されることに着目し、これらのサイタフェレシス治療では、顆粒球の除去が治療効果に直接関係するものと想定した。さらに、GCAP と LCAP では顆粒球の吸着除去率に違いがあるにもかかわらず、治療効果に差がないことから、サイタフェレシス治療では単に顆粒球の総数を減らすことだけでなく顆粒球の性質に影響をおよぼすことも治療効果に關与すると考えた。顆粒球は炎症の局所に最初に動員される細胞で⁷⁾³⁰⁾、生体の防御反応や組織破壊に關与するが、最近の報告では免疫調節にも關与することが明らかになってきた³⁰⁾⁻³²⁾ ことから、局所の炎症を考えるうえで極めて重要な細胞と考えられる。

最近、好中球が大腸局所に浸潤する機序が解明されつつあり、血管内皮細胞との接触過程から組織内に浸潤するまでの過程が、接着分子の発現と接着分子間の相互作用の観点から詳細に論じられるようになった⁷⁾。代表的接着分子であるセレクチンファミリーの CD62L⁴⁰⁾⁴¹⁾⁵³⁾ は、好中球をローリングさせ血管内膜との接触に關与するが、炎症性サイトカインや補体成分で刺激を受けると shedding され減少する⁴⁰⁾。一方、インテグリンファミリーの CD11b⁴¹⁾⁵³⁾ は、これらの刺激により発現が増強し、好中球は血管内皮細胞上のリガンドである ICAM-1 と強固に結合し⁵⁴⁾⁵⁵⁾、内皮の間隙を通り抜け炎症組織に浸潤するとされている。また、炎症性サイトカインや補体成分で刺激を受けた好中球は、容易に活性酸素を放出し、組織破壊に關与すると考えられている⁵⁶⁾。最近、活性酸素は組織障害に作用するだけでなく、T リンパ球

の機能を変化させることにより免疫応答の調節に關与し³²⁾、局所での炎症の持続に一定の役割を果たしているとも考えられている⁵⁷⁾。

したがって、好中球での接着分子の発現動態を理解することは、サイタフェレシスの作用機序を理解するうえで極めて重要と考えられる。しかし、CD62L や CD11b は好中球のみならず多様な白血球系細胞に発現する接着分子であることが知られている⁴⁰⁾⁴¹⁾。そこで、われわれは精製した好中球分画から総 RNA を抽出し、この 2 つの接着分子の好中球での発現について mRNA 発現の面から検討した。その結果、サイタフェレシス治療前の活動性 UC 患者では健常人に比し CD mRNA 比が有意に低い、すなわち活動性 UC 患者の末梢血好中球では相対的に CD62L mRNA が減少し、CD11b mRNA が増加していることが示された。この変化は重症/中等症で明らかであり、炎症が強い症例ではこの現象が著明であることが示された。炎症性腸疾患の病変部粘膜内には CD62L 分子の発現が消失し、CD11b 分子の発現が著明に増加した好中球が著しく増加していること⁷⁾ が知られているが、活動期の UC 患者好中球は末梢血でも同様の CD mRNA 発現動態を示すことから、活動期には末梢血好中球も循環血中の炎症性サイトカイン等の影響により刺激され病変部粘膜内と同様の接着分子の発現状態に変化しているものと考えられる。

サイタフェレシスの治療経過に沿って末梢血好中球 CD mRNA 比の変動について検討すると、各サイタフェレシスの開始時の CD mRNA 比は、サイタフェレシスを重ね腸管の炎症が沈静化するにつれて有意に上昇し、CD62L mRNA 発現の増強と CD11b mRNA 発現の減弱が認められた。このことから、臨床症状が改善するにつれて、UC 患者の末梢血好中球は健常人の末梢血好中球と類似したパターンの接着分子 mRNA 発現に変化していくものと考えられた。この現象は、炎症の沈静化に伴い、UC の末梢血中好中球はサイトカイン等の影響を受けることがなくなり、治療経過とともに正常の接着分子 mRNA 発現状態に変化していくことを意味しているものと考えられる。次に、サイタフェレシス終了直後の好中球 CD mRNA 比について経過をみると、サイタフェレ

シスを重ね炎症が改善しても CD mRNA 比は低いレベルを保った状態であった。このことから、どの時期においてもサイタフェレシス終了直後には、CD62L mRNA^{LOW}、CD11b mRNA^{HIGH} の状態に変化することが示された。すなわち、サイタフェレシス初回では、末梢血好中球 CD mRNA 比はサイタフェレシス開始前から低いため、サイタフェレシスを施行しても CD mRNA 比は変動なく低い。しかし、炎症が改善しはじめると末梢血好中球 CD mRNA 比は上昇し、サイタフェレシスを施行すると終了直後には CD62L mRNA^{LOW}、CD11b mRNA^{HIGH} の状態に変化し、末梢血 CD mRNA 比は初回のレベルまで低下する。さらに炎症が改善した時期では、末梢血好中球 CD mRNA 比は前回以上に上昇し、サイタフェレシスを施行すると終了直後には好中球 CD mRNA 比は初回と同様のレベルまで低下することが判明した。サイタフェレシスによる好中球 CD mRNA 比の一過性の低下は、人為的に好中球を浸潤能の低い状態に変化させることにより、局所の炎症の鎮静化に寄与すると考えられる。サイタフェレシスにより末梢血好中球が一時的に減少すると、新たな好中球が骨髄や辺縁プールから末梢血に動員されると考えられるが、循環プールに入った成熟好中球は約 10~16 時間滞留した後組織に移動し 1~4 日程度で寿命を終えることが知られている⁵⁸⁾。このような好中球の著しい動的变化を勘案すると、サイタフェレシスにより一過性に著しく低下した好中球 CD mRNA 比が次のサイタフェレシス時には前回以上に上昇しているという変化は矛盾しないと考えられる。

澤田ら³⁴⁾は、GCAP による顆粒球接着分子の発現変動をフローサイトメトリーで解析し、サイタフェレシスにより顆粒球表面の CD62L 分子が減少し、CD11b 分子は増加することを報告した。また、柏木ら³³⁾は、アダカラムに充填するビーズと末梢血を混合培養すると、澤田らの報告と同様に顆粒球の CD62L 発現量が低下し、CD11b は増加すると報告した。われわれの研究は、同様の変化が mRNA 発現についても生じていることを初めて明らかにしたものである。

また、GCAP に用いるアダカラムに充填されているビーズと顆粒球とを混合培養すると、顆粒球

はエラスターゼを放出し顆粒球内のエラスターゼ活性は低下することが示されている³³⁾。混合培養後の顆粒球は遊走能も低下しているが³³⁾、Jutilla らは CD62L low、CD11b high の表面形質を有する顆粒球は炎症局所への浸潤能が著しく低下している⁴²⁾ ことを指摘している。

われわれの研究では、サイタフェレシス直後の末梢血好中球 CD mRNA 比はどの時期のサイタフェレシスにおいても同程度に低く、CD62L mRNA 量が低下し CD11b mRNA 量が増加した好中球が優勢となっている。GCAP で顆粒球除去率は必ずしも高率ではなく、GCAP 中にこのようなカラムの影響を受けた好中球の一部は末梢血中に再循環しているものと考えられる。また、LCAP の顆粒球吸着除去率はほぼ 100% とされているが、我々の UC 症例での検討では LCAP 終了時におけるカラム流出側では、顆粒球数は 0 の症例もあるが LCAP 開始前と相応の数が認められる症例もみられ、LCAP においてもカラム内で同様の機序により修飾を受けた顆粒球が再循環しているものと考えられる。このような好中球は、血管内皮へのローリング作用や炎症局所への浸潤能が低下し、さらに、サイタフェレシス後の好中球はエラスターゼ活性も低下していることから、炎症局所での組織障害作用は著しく減弱していると考えられ、サイタフェレシスによるこれらの現象が炎症の沈静化を促すきっかけとなり、その結果過剰な炎症を抑制し生体内での炎症の調節に関与している可能性が示唆される。

以上より、われわれはサイタフェレシスが治療効果におよぼす機序を、初回と最終回に分けて考察した。すなわち、初回のサイタフェレシスでは CD mRNA 比のさらなる低下はみられず、この時期のサイタフェレシスの治療効果には、循環血中の好中球を除去しその総数を減らすとともに、好中球の活性酸素産生能、エラスターゼ活性などの機能を低下させることにより、組織障害能を低下させることが関与しているものと考えられた (Fig. 8)。一方、後期のサイタフェレシスでは、サイタフェレシス直後の末梢血好中球 CD mRNA 比は著しく低下していた。この機序として、サイタフェレシスのカラムにより優先的に CD mRNA 比の高い好中球が除去されるとともに、

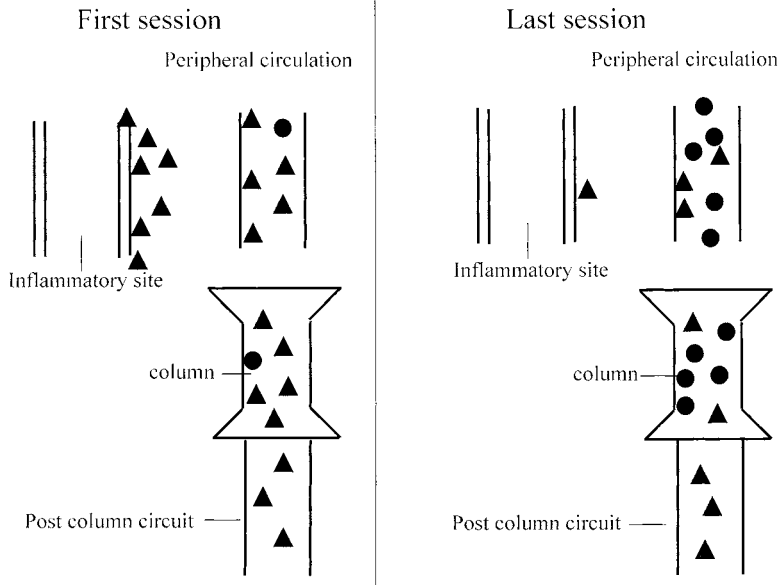


Fig. 8. In the first session of cytapheeresis PMNs with low CD mRNA ratio were rich in the peripheral circulation. Just after cytapheeresis PMNs with low CD mRNA ratio were also rich in the post column circuit and peripheral circulation. The number of PMNs were decreased and these PMNs had low ability in damaging the tissue. On the other hand in the last session of cytapheeresis PMNs with high CD mRNA ratio were rich in the peripheral circulation. Just after cytapheeresis PMNs with low CD mRNA ratio were rich in the post column circuit and peripheral circulation. The number of PMNs were decreased and these PMNs had low ability in damaging the tissue.

First session: first session of cytapheeresis

Last session: last session of cytapheeresis

●: CD mRNA high ratio

PMN: CD mRNA low ratio PMN

カラムを通過し再循環する好中球の CD 比が著しく低下した状態に変化した可能性が考えられる。このような好中球は、血管内皮へのローリング作用が減弱し、組織への浸潤能が著しく低下していると考えられることから、この時期のサイタフェレシスでは、好中球を除去しその総数を減らすことおよび好中球の組織障害能が低下することに加えて、好中球接着分子が変化し炎症局所への浸潤能が低下することが相まって治療効果に關与しているものと考えられた (Fig. 8)。

なお、サイタフェレシスが無効であった 2 例は、罹患期間が長期でステロイド投与期間も長く、治療開始時の重症度は軽症であった。UC の活動期は、顆粒球や単球などの急性炎症性細胞が炎症の主体をなす acute on chronic の状態であり⁴⁹⁾、この時期には急性炎症に關与する細胞を吸着除去するサイタフェレシスが効果を発揮しやすいものと考えられる。しかし、この 2 例は長期のステロイ

ド投与によって炎症反応が修飾され、サイタフェレシスが有効性を発揮しにくかったものと考えられる。また、無効の 2 例ではサイタフェレシスによる CD mRNA 比の変動が一定でなく、ステロイドは好中球機能に影響を及ぼす可能性⁵⁹⁾があることから、長期ステロイド使用により顆粒球接着分子の発現動態に異常が生じていた可能性も推測された。

以上、本研究で、われわれはサイタフェレシス治療過程における末梢血好中球 CD62L, CD11b mRNA 量の変動を検討し、サイタフェレシスは単に好中球数を減らすだけでなく、接着分子 mRNA の変化を通じて UC の炎症を沈静化させ、病状の改善に寄与している可能性を示した。

今後は、サイタフェレシスの治療効果発現機序について多様な視点から解明を進め、UC におけるサイタフェレシス治療の選択基準を明確にすることが必要と考えられる。

V. 結 語

1. 活動期 UC 患者の治療前の好中球 CD mRNA 比は健常人と比較して有意に低値で、相対的に CD62L mRNA 量発現が低下し、CD11b mRNA 量が増加していることが示された。
2. UC の重症度別では、軽症に比し重症/中等症例で好中球 CD mRNA 比が有意に低値を示した。
3. UC では GCAP, LCAP 療法を重ね臨床症状が改善するとともに、好中球 CD mRNA 比は上昇した。
4. 臨床症状が改善した時期の GCAP, LCAP では、施行前に健常人と同等に復していた好中球 CD mRNA 比が施行直後には著しく低下した。
5. これらの結果から、GCAP, LCAP による好中球の接着分子 mRNA の変動が、治療効果に関係していることが示唆された。

本稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました東京慈恵会医科大学内科学講座消化器・肝臓内科戸田剛太郎主任教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究にご協力下さった東京慈恵会医科大学消化器・肝臓内科（青戸病院）の諸先生方、東京慈恵会医科大学腎臓内科（青戸病院）ならびに同血液浄化部の諸氏のご助言に深謝いたします。

なお、本研究の要旨は第 89 回日本消化器病学会総会、第 45 回日本消化器病学会大会にて発表した。

文 献

- 1) 守田則一, 広橋紀正, 中村健一, 古野純典, 笹川力, 白木和夫 ほか. IBD の全国疫学調査第 1 報: 潰瘍性大腸炎の疫学的研究. 厚生省難治性炎症性腸管障害調査研究班: 平成 4 年度研究報告書 1993. p. 145-8.
- 2) 二見佐知子, 青山乃伸朗. 遺伝的素因と炎症性腸疾患の発症と病態: 炎症性腸疾患の最新動向, 医のあゆみ 1996; 178: 543-9.
- 3) Mansfield JC, Holden H, Tarlow JK, Di Giovine FS, McDowell TL, Wilson AG, et al. Novel genetic association between ulcerative colitis and the anti-inflammatory cytokine interleukin-1 receptor antagonist. *Gastroenterology* 1994; 106: 637-42.
- 4) Wakefield AJ, Fox JD, Sawyerr AM, Taylor JE, Sweeney CH, Smith M, et al. Detection of herpesvirus DNA in the large intestine of patients with ulcerative colitis and Crohn's disease using the nested polymerase chain reaction. *J Med Virol* 1992; 38: 183-90.
- 5) 村田有志, 新井田修久, 高橋敏之, 吉田 豊 ほか. 潰瘍性大腸炎およびクローン病の発症に及ぼす喫煙の影響. *最新医学* 1989; 1448-55.
- 6) 古野純典. 炎症性腸疾患と食習慣. *Modern Physician* 1992; 12: 1621-3.
- 7) 小林絢三, 中村志郎, 押谷伸英, 松本誉之, 北野厚生. 特発性炎症性腸疾患変部粘膜局所の好中球浸潤と細胞接着分子の発現動態に関する免疫組織化学的検討. 厚生省特定疾患難治性炎症性腸管障害調査研究班: 平成 4 年度研究報告書 1992. p. 244-6.
- 8) Sasakawa T, Takizawa H, Bannai H, Narisawa R, Asakura H, et al. Activated CD4+ and CD8+ cells in the colonic mucosa of ulcerative colitis patients. *Digestion* 1995; 56: 516-22.
- 9) Sartor RB. Cytokines in intestinal inflammation: pathophysiological and clinical considerations. *Gastroenterology* 1994; 106: 533-9.
- 10) 棟方昭博, 下山 孝. 潰瘍性大腸炎治療指針改定案: 厚生省特定疾患難治性炎症性腸管障害調査研究班: 平成 10 年度研究報告書 1999. p. 123-5.
- 11) Azad Khan AK, Piris J, Truelove SC. An experiment to determine the active therapeutic moiety of sulphasalazine. *Lancet* 1977; 2: 892-5.
- 12) 棟方昭博. 薬の知識サラゾスルファピリジン. *臨消内科* 1988; 13: 771-3.
- 13) 棟方昭博, 樋渡信夫, 武藤徹一郎, 土屋周二, 福島恒男, 小林絢三 ほか. メサラジン経口放出調節製剤 N-5-ASA の軽・中等症潰瘍性大腸炎に対する臨床効果. *薬理と治療* 1994; 22: S2509-30.
- 14) 大沢 直, 富士原彰. 潰瘍性大腸炎に対するベーターメサゾン坐剤の治療効果. *日本大腸肛門病会誌* 1979; 32: 8-12.
- 15) Sandborn WJ. A review of immune modifier therapy for inflammatory bowel disease: Azathioprine, 6-Mercaptopurine, Cyclosporine, and Methotrexate. *Am J Gastroenterol* 1996; 91: 423-33.
- 16) Truelove SC, Witts LJ. Cortisone in ulcerative colitis: final report on a therapeutic trial. *Br Med J* 1955; 29: 1041-8.
- 17) Truelove SC, Jewell DP. Intensive intravenous regimen for severe attacks of ulcerative colitis. *Lancet* 1974; 1: 1067-70.

- 18) 馬場正三. 重症型潰瘍性大腸炎の動注療法の応用. 医のあゆみ 1992; 160: 904-8.
- 19) 押谷伸英, 北野厚生, 岡部 弘, 中村志郎, 松本誉之, 小林純三. 潰瘍性大腸炎急性期に対するステロイドパルス療法の有用性に関する検討. 日消病会誌 1993; 90: 1397-404.
- 20) Cohen RD, Stein R, Hanauer SC. Intravenous cyclosporine in ulcerative colitis: A five-year experience. Am J Gastroenterol 1999; 94: 1589-92.
- 21) Thorn GW. Clinical considerations in the use of corticosteroids. N Engl J Med 1966; 274: 775-81.
- 22) Taffet SL, Das KM. Sulfasalazine: adverse effects and desensitization. Dig Dis Sci 1983; 28: 833-42.
- 23) 知念葉子, 仲本 学, 内間康文, 大城淳一, 平田晴男, 嘉手納啓三 ほか. サラゾピリン内服中に巨赤芽球性貧血を呈した症例. 沖繩医学会誌 1998; 37(3): 53.
- 24) 荻野英郎, 橘 良哉, 米島博嗣, 里村吉威, 鶴浦雅志, 三輪淳夫. 5-aminosalicylic acid 投与中に間質性肺炎を併発した潰瘍性大腸炎の1例. 日消病会誌 1998; 96: 164-9.
- 25) Kasiwagi N, Hirata I, Kasukawa R. A role for granulocyte and monocyte apheresis in the treatment of rheumatoid arthritis. Ther Apher 1998; 2: 134-41.
- 26) 橋本博史, 津田裕士, 横山真和, 山形寿太郎, 平野隆雄, 廣瀬俊一 ほか. 治療としてのリンパ球アフェレーシス. 臨血 1985; 26: 1892-7.
- 27) Sawada K, Ohnisi K, Fukui S, Yamada K, Yamamura M, Amano K, et al. Leukocytapheresis therapy, performed with leukocyte removal filter, for inflammatory bowel disease. J Gastroenterol 1995; 30: 322-9.
- 28) Shimoyama T, Sawada K, Hiwatasi N, Sawada T, Matsueda K, Munakata A, et al. Safty and efficacy of granulocyte and monocyte adsorption apheresis in patients with active ulcerative colitis: a multicenter study. J Clin Apheresis 2001; 16: 1-9.
- 29) 下山 孝, 澤田康史, 田中隆夫, 齋藤吉春, 棟方昭博, 豊田隆謙 ほか. 潰瘍性大腸炎の活動期における顆粒球吸着療法: 多施設共同無作為割付比較試験. 日アフェレシス会誌 1999; 18: 117-31.
- 30) Cassatella MA. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. Immunol Today 1995; 16: 21-6.
- 31) 柏木伸仁, 橘 武彦, 足立正一. 顆粒球除去療法の開発と臨床応用. 炎症と免疫 1999; 7: 30-6.
- 32) Roth S, Droge W. Regulation of T-Cell activation and T-cell growth factor (TCGF) production by hydrogen peroxide. Cell Immunol 1987; 108: 417-24.
- 33) 柏木伸仁, 平田一郎, 粕川禮司. 顆粒球・活性酸素と炎症反応の調節. J Act Oxyg Free Rad 1995; 6: 77-92.
- 34) 澤田康史, 大西国夫, 福永 健, 長瀬和子, 福井信, 山村 誠. ビーズを用いた白血球系細胞除去療法:潰瘍性大腸炎治療における顆粒球吸着療法の有効性メカニズムについて(接着分子, Mac-1とLECAM-1の変動より). 日アフェレシス会誌 2000; 19: 14-6.
- 35) 棟方昭博. 潰瘍性大腸炎診断基準改定案. 厚生省特定疾患難治性炎症性腸管障害調査研究班: 平成9年度研究報告書. 1998. p. 96-9.
- 36) 下山 孝, 澤田康史. 炎症性腸疾患に対する白血球除去・吸着療法の効果に関する多施設共同研究. 厚生省特定疾患難治性炎症性腸管障害調査研究班: 平成10年度研究報告書 1999. p. 126-9.
- 37) Klebanoff SJ, Clark RA. The neutrophils: Function and clinical disorders. Amsterdam: North-Holland Publ; 1978. p. 77-9.
- 38) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 1987; 162: 156-9.
- 39) 船渡忠男. リアルタイム定量PCRの応用. SRL宝函 1998; 22: 217-20.
- 40) Walcheck B, Kahn J, Fisher JM, Wang BB, Fisk RS, Payan DG, et al. Neutrophil rolling altered by inhibition of L-selectin shedding *in vitro*. Nature 1996; 380: 720-3.
- 41) Springer TA. Adhesion receptors immune system. Nature 1990; 346: 425-34.
- 42) Jutila MA, Rott L, Berg EL, Butcher EC. Function and regulation of the neutrophil MEL-14 antigen *in vivo*: comparison with LFA-1 and MAC-1. J Immunol 1989; 143: 3318-24.
- 43) Powrie P. T cells in inflammatory bowel disease: protective and pathogenic roles. Immunity 1995; 3: 171-4.
- 44) Stenson WF. Inflammatory bowel disease. In: Yamada T, editors. Textbook of Gastroenterology, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1999. p. 1775-81.
- 45) Suzuki Y, Kinoshita T, Iwai T, Kitsukawa Y, Saito Y. Cytokine production in patients with

- inflammatory bowel disease. *Cytokines, Cholea, and the Gut* 1995; 18: 121-30.
- 46) Grimm MC, Pullman WE, Bennett GM, Sullivan PJ, Pavli P, Doe WF. Direct evidence of monocyte recruitment to inflammatory bowel disease mucosa. *J Gastroenterol Hepatol* 1995; 10: 387-95.
- 47) 吉田憲正, 山口泰司, 吉川敏一, 近藤元治. 炎症性腸疾患病態解明と最新治療: 顆粒球の動態と治療. *最新医* 1997; 52(8): 15-20.
- 48) Noguchi M, Hiwatashi N, Hayakawa T, Toyota T. Leukocyte removal filter-passed lymphocytes produce large amounts of interleukin-4 in immunotherapy for inflammatory bowel disease: role of bystander suppression. *Ther Apheresis* 1998; 2: 109-14.
- 49) 鈴木康夫, 吉村直樹, 齋藤 康. 潰瘍性大腸炎に対する顆粒球吸着療法の効果と機序に対する考察. *日アフエリシス会誌* 2001; 20: 17-26.
- 50) 澤田康史, 大西国夫, 小坂 正, 福井 信, 山村 誠, 天野國幹. 特発性炎症性腸疾患に対する白血球除去器を用いた体外循環治療の有効性について. *日臨免疫会誌* 1994; 17: 883-5.
- 51) 杉村一仁, 鈴木恒治, 長谷川勝彦, 吉田 研, 本間 照, 成澤林太郎. 潰瘍性大腸炎活性化血小板による多核白血球活性酸素産生能に与える影響. 厚生省特定疾患難治性炎症性腸管障害調査研究班: 平成10年度研究報告書 1999. p. 93-7.
- 52) 下山 孝, 澤田康史, 大西国夫, 小坂 正, 江頭明盛, 山村 誠. 内科分科会プロジェクト: 研究潰瘍性大腸炎に対する白血球除去療法, 顆粒球除去療法の有効性の検討. 厚生省特定疾患難治性炎症性腸管障害調査研究班: 平成8年度研究報告書 1997. p. 37-40.
- 53) 大島秀男, 八木田秀雄, 奥村 康. 炎症性腸疾患における細胞浸潤と接着分子. *最新医* 1997; 52: 42-6.
- 54) Smith CW, Kishimoto TK, Abbass O, Hughes B, Rothlein R, McIntire LV. Chemotactic factors regulate lectin adhesion molecule 1 (LECAM-1) dependent neutrophil adhesion to cytokine-stimulated endothelial cells in vitro. *J Clin Invest* 1991; 87: 609-18.
- 55) Picker LJ, Warnock RA, Burns AR, Doerschuk CM, Berg EL, Butcher EC. The neutrophil selectin LECAM-1 presents carbohydrate ligands to the vascular selectins ELAM-1 and GMP-140. *Cell* 1991; 69: 927-38.
- 56) Condliffe AM, Kitchen E, Chilvers ER. Neutrophil priming: pathophysiological consequences and underlying mechanisms. *Clin Sci* 1998; 94: 461-71.
- 57) Shimizu Y, Newman W, Tanaka Y, Shaw S. Lymphocyte interactions with endothelial cells. *Immunol Today* 1992; 13: 106-12.
- 58) 古沢新, 中村裕一. 好中球の基礎: 産生と動態: 好中球の回転(動態). 笹田昌孝 編. 好中球: 機能低下と機能亢進. 東京: 医薬ジャーナル社; 1998. p. 14-7.
- 59) Crockard AD, Boylan MT, Droogan AG, McMillan SA, Hawkins SA. Methylprednisolone-induced neutrophil leukocytosis down-modulation of neutrophil L-selectin and Mac-1 expression and induction of granulocyte-colony stimulating factor. *Int J Clin Lab Res* 1998; 28: 110-5.