

# AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

旭川厚生病院医誌 (1992.12) 2巻2号:9～14.

フローサイトメトリーを用いた粘膜内リンパ球サブセットの測定 潰瘍性大腸炎の重症度と臨床経過における診断的有用性について

村上雅則、折居 裕、太田智之、佐藤健誠、蘆田知史、綾部時芳

# フローサイトメトリーを用いた粘膜内リンパ球サブセットの測定 潰瘍性大腸炎の重症度と臨床経過における診断的有用性について

村上 雅 則<sup>1)</sup> 折 居 裕 太 田 智 之  
佐 藤 健 誠 蘆 田 知 史<sup>2)</sup> 綾 部 時 芳

## 要 旨

潰瘍性大腸炎における粘膜内リンパ球サブセットと内視鏡所見の関係を解析し、フローサイトメトリーによる粘膜内リンパ球表面抗原の測定法の臨床的な有用性について検討した。潰瘍性大腸炎18症例を対象とし、内視鏡下生検材料より粘膜内のリンパ球を分離し、フローサイトメトリーを用いたtwo color analysisを行った。内視鏡的に炎症の強い粘膜においては、CD 4<sup>+</sup>T細胞の相対的増加とHLA-DR<sup>+</sup>細胞の増加がみられ、CD 4<sup>+</sup>CD 45 R A<sup>+</sup>細胞の減少が認められた。炎症所見のない粘膜では、粘膜のCD 4/CD 8比は末梢血の値に相関する傾向にあった。しかし、粘膜内のCD 4/CD 8比が末梢血よりも高い炎症性粘膜では、炎症所見が遷延化する傾向にあった。これらの結果から、粘膜内リンパ球サブセットの測定は、潰瘍性大腸炎の重症度や経過を予測する検査法と成り得ることが示唆された。

Key Words : 潰瘍性大腸炎, リンパ球サブセット, フローサイトメトリー, 粘膜内リンパ球

## はじめに

直腸から大腸にかけて潰瘍や出血が見られ、慢性・難治性に経過する潰瘍性大腸炎（以下UCと略す）は、クローン病とともに非特異性炎症性腸疾患に分類されており、その原因は未だ明らかではない。しかし、主たる炎症の場である腸管粘膜局所においては様々な免疫異常が報告されている<sup>1)2)</sup>。特に大腸粘膜内リンパ球の表面抗原について精力的な研究がなされてきた。これらの研究の多くは免疫組織学的な手法によるものであった。<sup>3)4)5)6)7)8)</sup>

我々は、1987年以来、UCの大腸粘膜内リンパ球表面抗原の変化についてフローサイトメトリーを用いて測定しており、内視鏡所見から見た炎症の活動性と粘膜内リンパ球サブセットの関係について報告してきた<sup>9)</sup>。

本研究は、UCの腸管粘膜局所における重症度とリン

パ球サブセットの変化との関係を明らかにし、生検材料を用いたフローサイトメトリーによるリンパ球表面抗原の解析の臨床的な有用性について評価する目的で行った。

## I. 対象と方法

入院もしくは外来で経過観察中のUC18例（男性11例、女性7例、年齢15歳～63歳）を対象とした。これらの症例は、原則として厚生省特定疾患消化吸収障害調査研究班の治療方針に従って治療を行った<sup>10)</sup>。病型の内訳は、直腸炎型5例、左側結腸炎型5例、全結腸炎型8例であった。対象例の大腸内視鏡検査時に、内視鏡一視野について4個以上の生検を数ヵ所行った。また、同時にヘパリン加末梢血を採血した。

### 1. 内視鏡的重症度の判定

生検材料を採取した部位の炎症の重症度は、内視鏡所見により評価した。Mattsらに準じてGrade I～IV分類した。<sup>7)</sup>

Grade I : Normal

Grade II : Mild granularity of the mucosa,

1) 旭川厚生病院消化器科  
〒078 旭川市1条通24丁目  
2) 旭川医科大学第3内科

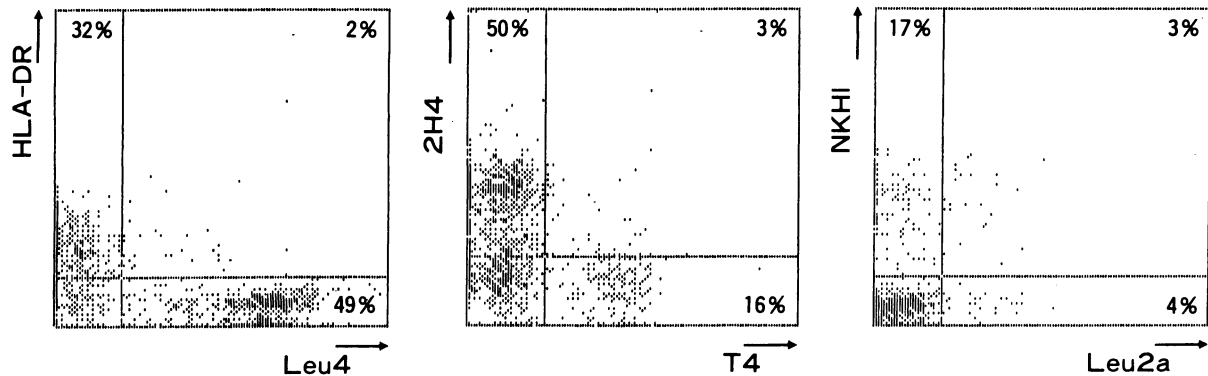


Figure 1  
Representative patterns of two-color flow cytometry obtained from colonic mucosa.

Mucosal lymphocytes were isolated from ascending colon mucosa obtained from a 63 years old male patient who had the total colitis of UC.

with mild contact bleeding.

Grade III : Marked granularity and edema of the mucosa, contact bleeding and spontaneous bleeding.

Grade IV : Severe ulceration of the mucosa with hemorrhage.

## 2. 末梢血試料の作成

対象症例より採取したヘパリン加末梢血から、Ficoll-Conrayによる密度勾配遠心法により単核球分画を分離し、末梢血試料とした。

## 3. 大腸粘膜試料の作成

生検材料 3~4 個をスライドグラスを用いて機械的に細切した後に、末梢血の場合と同様に Ficoll-Conray による密度勾配遠心法によって単核球分画を採取した。

## 4. フローサイトメトリーによるリンパ球表面抗原の解析

得られた末梢血試料ならびに大腸粘膜試料を各々 3~4 分等し、下記の monoclonal 抗体を用いて直接蛍光抗体法により二重染色した。Flow cytometer は、Coulter 社製の EPICS-C を用いた。測定時には、まず末梢血試料を使って forward angle light scatter と 90° angle light scatter によるリンパ球分画を設定し、これに gating される試料中の細胞群をそれぞれ、末梢血リンパ球分画 (PBL) と腸粘膜リンパ球分画 (IML) とした。本研究で使用した抗体は、Leu 4 (CD 3), Leu 2 a (CD 8), Leu 3 a (CD 4), anti-HLA-DR (以上、Becton-Dickinson 社製), B 1 (CD 20), 2

H 4 (CD 45RA), NKH 1 (CD 57) (以上、Coulter 社製) であり、FITC もしくは PE で標識された抗体を用いた。

## 5. 統計処理

フローサイトメトリーの結果は mean ± SD で示した。統計処理は、Student's t-test により検定を行った。

## II. 結 果

### 1. Two-color 解析の実際

フローサイトメトリーの測定結果の実際例を Figure 1 に示す。著者らの方法では、1 部位当り 3~4 個の生検組織より  $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$  の単核球が生細胞として分類された。この細胞数では、3~4 種類の two-color 解析が可能であったため、6~8 種類の抗体による二重染色の結果を測定出来た。

### 2. 炎症所見の活動度の関係と粘膜内リンパ球 subpopulation の変化について

$\alpha \beta$  型 T 細胞受容体を有する T 細胞群は、大別すると、CD 4 陽性の helper/inducer 細胞群と CD 8 陽性の suppressor/cytotoxic 細胞群に分類される。T 細胞亜群の変化を CD 4/CD 8 比で検討すると、Figure 2 に示すように、内視鏡所見が Grade III 以上の粘膜では、Grade II 以下の部位に比べて有意に CD 4/CD 8 比が高値を示した。従って UC の急性活動期粘膜では、T 細胞中の CD 4 陽性細胞が相対的に増加していると推定された。

次に、Grade III 以上の炎症部位で増加していた CD 4

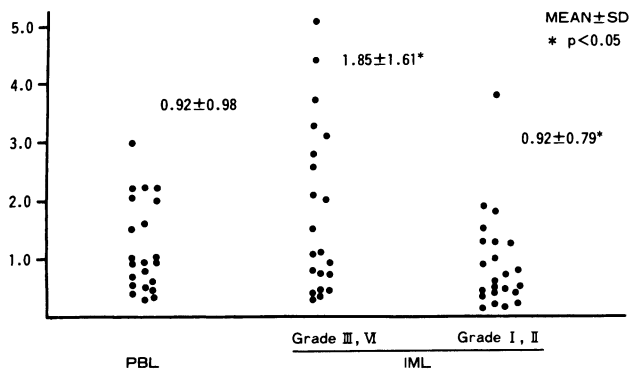


Figure 2  
Distributions of CD4/CD8 ratio and endoscopic grade

陽性細胞が、如何なるサブセットであるかを検討した。CD 4 陽性細胞は、CD45RA 抗原の発現の有無により 2 群に分類されている。IML を CD 4 抗体と CD45RA 抗体で二重染色し、その成績を Figure 3 に示す。

内視鏡的に炎症所見が軽微であるか、もしくは認めない粘膜では、CD 4 陽性細胞の約半数が CD45RA 二重陽性であるのに対して、Grade III 以上の所見を示す粘膜では CD 4 陽性細胞中の CD45RA 二重陽性細胞の割合が有意に減少していた。すなわち、CD 4 陽性細胞中の naive T 細胞が減少し、一度活性化された細胞が相対的に増加していると推定された。

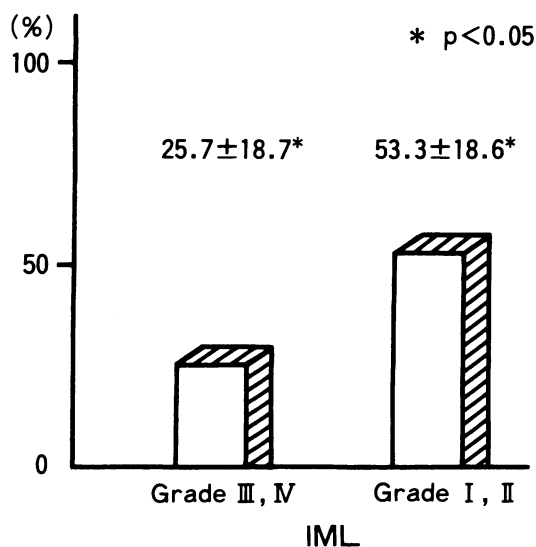


Figure 3  
The percentage of CD 4 (+) CD45RA (+) double positive cells.

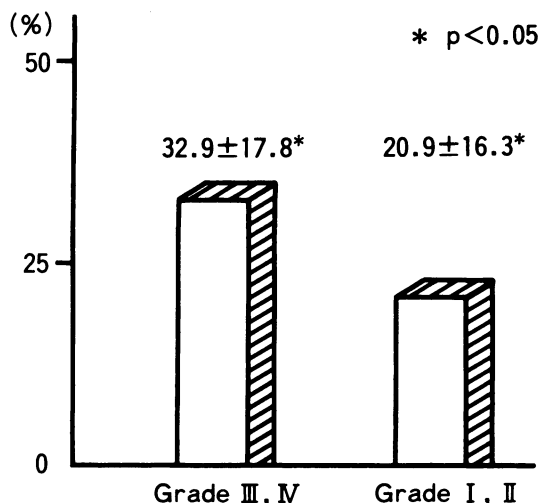


Figure 4  
The percentage of HLA-DR positive cells and endoscopic grade.

HLA class II 抗原は、主として B 細胞・単球や活性化 T 細胞に発現されている。末梢血では、数種類の抗原の中でも HLA-DR 抗原の発現量が最も多く、腸管粘膜内リンパ球においても同様の傾向であることが報告されている<sup>12)13)</sup>。

UC の粘膜内 HLA-DR 抗原陽性細胞について検討した成績を Figure 4 に示す。Grade III 以上の内視鏡所見が見られた粘膜では、HLA-DR 抗原陽性細胞が有意に増加していた。ここでは結果を示さないが、大部分の症例において、単球と推測される Mo 2 抗体陽性細胞や、CD 3・HLA-DR 二重陽性の活性化 T 細胞割合は 5% 以下であった。従って活動性炎症粘膜における HLA-DR 抗原陽性細胞の増加は、主として B 細胞の増加を反映していると考えられた。

### 3. 内視鏡所見の経過と、IML のサブセットの関係

CD 4 / CD 8 比の平均値は、活動性炎症粘膜で上昇していたが、Figure 1 に示すように幅広く分布していた。また、PBL においても同様で、臨床的な重症度とは関係なく、症例によって広く分布していた。

次に内視鏡的に炎症所見を認めない部位（主に直腸炎型や左側結腸炎型の上行結腸粘膜）と PBL の CD 4 / CD 8 比を比較した。（Figure 5）

検体数は少ないが PBL と IML の間に相関関係が認められた。

上記の結果から炎症の活動性と部位別による IML の変化を解析する目的で、CD 4 / CD 8 比の IML と PBL

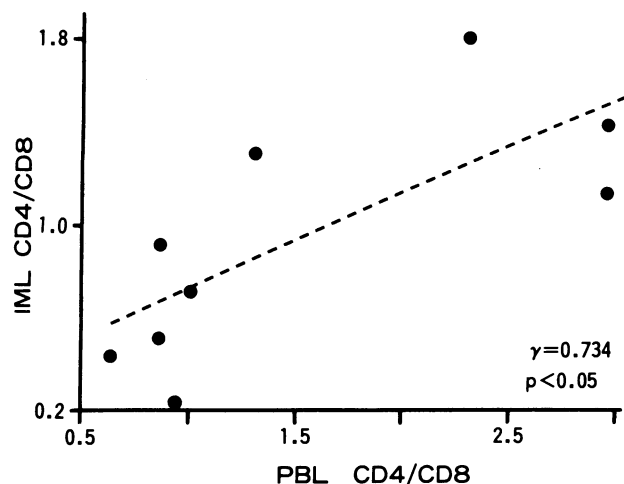


Figure 5  
Correlatin of CD4/CD8 ratio between IML in non-inflamed mucosa and PBL.

の比率を算出した。この比率と内視鏡所見の経過との関係について検討した。Figure 6に示すように、IMLのCD4/CD8比がPBLよりも高値の粘膜は6/7部位で、いずれもGradeIII以上の内視鏡所見であり、4~8週後の内視鏡所見は1Gradeの改善にとどまっていた。これに対して、IMLのCD4/CD8比がPBLよりも低い粘膜ではGradeII~IVの所見がほぼ同数であり、4~8週後には2Grade以上の改善がみられた。これらの結果は、検体数が少ないため統計学的な有意性について論ずることは出来なかった。しかし粘膜のリンパ球サブセットの変化はUCの経過と関連している可能性が示された。

### III. 考 察

消化管には、gut-associated lymphoid tissue (GALT) と呼ばれる免疫機構が存在し、全身性の免疫機構と連携を取りつつ、常に食物や腸内細菌などの異物にさらされている特殊な環境の中で、独特な機能を果たしている<sup>14)15)</sup>。

GALTには、パイエル板、腸間膜リンパ節、虫垂、粘膜内、に分布するリンパ球、形質細胞、マイクロファージや、血管の内皮細胞などが含まれる。腸管粘膜内(特に大腸粘膜)に存在するリンパ球については、多くの重要な研究がなされてきた。

潰瘍性大腸炎においては、Kobayashiらは、大腸粘膜内のリンパ球サブセットを解析した結果、炎症の病理学的重症度とT細胞サブセットの間には密接な関係

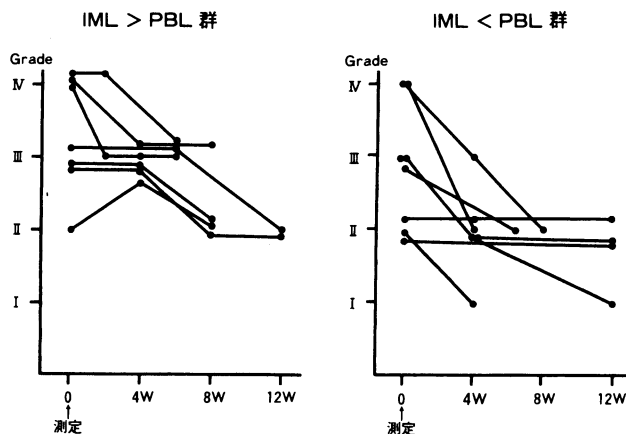


Figure 6  
Clinical course of endoscopic feature in UC.

があることを報告している<sup>9)</sup>。その中で、炎症の重症度が増すにつれ、CD4陽性T細胞が増加すると述べている。これらの研究は免疫組織学的方法によって行われており、病態の解明に寄与してきた。著者らは、粘膜からの分離リンパ球をフローサイトメトリーを用いた方法で測定してきた。この方法は定量性に優れ、複数の抗体や多数の検体を短時間に処理することが出来る利便性がある。

著者らの成績では、内視鏡的炎症所見の重症化に伴ってIMLでのCD4陽性細胞の相対的増加が認められており、免疫組織学的方法によるKobayashiらの結果と同様の傾向であった。しかし、個々の検体についてみると、Figure2のように、粘膜のCD4/CD8比は幅広く分布していた。この原因の一つとして、末梢血のCD4/CD8比が粘膜の測定値に影響を与えていることが考えられた(Figure5)。粘膜のリンパ球サブセットを評価する場合には、末梢血リンパ球サブセットを同時に測定し、その成績を考慮する必要があると思われる。

全結腸型のUCでも、すべての大腸粘膜が同程度の炎症所見を示していることは少なく、部位により炎症の程度は様々なことが多い。

腸管局部の免疫反応には、全身性の変化とは異なる、その部位に特異的な状態が存在することを示唆している。著者らが、全身性変化を反映している末梢血の測定値と比較することを目的にCD4/CD8比が末梢血よりも高い粘膜と低い粘膜に分類し解析を試みたのは、上記の理論的背景に沿ったものである。

このように分類すると、Figure6のように、測定時

の内視鏡所見との相関だけではなく、その後の経過に関連していることが示された。今後、更に症例を積み重ねて検討しなければならないが、CD4/CD8比が少なくとも末梢血よりも高い部位であることがCD4優位の粘膜と判定する場合の条件の一つと考えられる。CD4陽性細胞群の一部が炎症のコントロールにとって重要な役割を担っていると推定される。そして、このような粘膜では炎症が遷延化する傾向にあった。しかし、このメカニズムについては明らかではない。また、粘膜の腺管を破壊するエフェクター機構についても未だ不明な点が多いが、粘膜内CD4陽性細胞の変動を測定することは、炎症の消長を予測する重要な指標であると思われる。

フローサイトメトリーを用いた粘膜内のリンパ球表面抗原の測定は、UCの病態研究の目的だけではなく、診療上の有用な手段として期待される。

#### 文 献

- 1) Tuchiya M : Immunological abnormalities involving the thymus in ulcerative colitis and therapeutic effects of thymectomy. *Gastroenterol Jpn.* 19 : 232-246, 1984
- 2) 朝倉 均, 日比紀文 : 潰瘍性大腸炎・Crohn病の免疫異常. *医学のあゆみ* 147 : 371-374, 1988
- 3) Badr-EI-Din S, Treijdosiewicz LK, Heatley RD, Losowsky MS : Local immunity in ulcerative colitis-Evidence for defective secretory IgA production. *Gut* 29 : 1070-1075, 1988
- 4) Kobayashi K, Asakura H, Hamada Y, Hlbi T, Watanabe M, Yoshida T, Miura S, Aiso S, Tsuchiya M : T lymphocyte subpopulations and immunoglobulin-containing cells in the colonic mucosa of ulcerative colitis-A morphometric and immunohistochemical study. *J Clin Lab Immunol* 25 : 63-68, 1988
- 5) Selby WS, Janossy G, Jewell DP : Intestinal lymphocyte subpopulations in inflammatory bowel disease : an analysis by immunohistological and cell isolation techniques. *Gut* 25 : 32-40, 1984
- 6) 太田弘昌 : 潰瘍性大腸炎の大腸粘膜内リンパ球subsetの検討. *日消誌* 83 : 1143-1152, 1986
- 7) 山岡博之 : 非特異性炎症性腸疾患の病変部リンパ球, 特にT細胞亜群の免疫組織学的研究. *日消誌* 83 : 1461-1472, 1986
- 8) 小林研介, 日比紀文, 浜田慶城, 他 : 潰瘍性大腸炎における大腸粘膜内T細胞subsetのmonoclonal抗体を用いた免疫組織学的研究. *消化器と免疫* 11 : 28-33, 1983
- 9) 盧田知史, 綾部時芳, 村上雅則, 他. : 潰瘍性大腸炎における粘膜内リンパ球subsetsのtwo color flow cytometryによる解析. *日消誌* 87 : 1822-1828, 1990
- 10) 井上幹夫, 他 : 潰瘍性大腸炎の薬物治療指針 (改訂案). 厚生省特定疾患消化吸収障害調査研究班 昭和60年度業績集. 1986, p189.
- 11) Matts SGF : The value of rectal biopsy in the diagnosis of ulcerative colitis. *Quarterly J Med* 120 : 393-407, 1961
- 12) Selby WS, Janossy G, Mason DY, et al : Expression of HLA-DR antigens by colonic epithelium in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 53 : 614-618, 1983
- 13) Poulsen LO, Elling P, Brandts  $\phi$  rensen F, et al : HLA - DR expression and disease activity in ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 21 : 364-368, 1986
- 14) Mestecky J, McGheeJR : Immunoglobulin A (IgA)-Molecular and cellular interactions involve in IgA biosynthesis and immune response. in *Advance in Immunology* vol.40 p153-245, Academic press, New York, 1987
- 15) Nagura H, Sumi Y : Immunological functions of the gut - Role of the mucosal immune systems. *Toxicol pathol* 16 : 154-164, 1988

## Flow Cytometric Analysis of Mucosal Lymphocytes in Ulcerative Colitis : Role for The Diagnosis of Disease Severity and Estimation of Clinical Course

Masanori MURAKAMI<sup>1)</sup>, Yutaka ORII, Tomoyuki OHTA, Kensei SATOH, Toshifumi ASHIDA<sup>2)</sup> and Tokiyoshi AYABE

In this study we assessed the comparison between the subset of mucosal lymphocytes and endoscopic findings in ulcerative colitis, and also investigated the clinical value of flow cytometric methods measuring the surface antigen of mucosal lymphocytes. 18 cases in patients with ulcerative colitis were examined. Mucosal lymphocytes were isolated from biopsy specimens, then two-color analysis by flow cytometry were carried out. In obviously inflamed mucosa, the subset of mucosal lymphocytes showed increased rate of CD4(+) T-cells and HLA-DR(+) cells, and decreased the CD4(+)CD45RA(+) T-cells. It was likely that the mucosa expressing larger CD4/CD8 ratio of mucosal lymphocyte than that of peripheral blood lymphocyte (PBL) showed delayed healing of inflammation, although the CD4/CD8 ratio in non-inflamed mucosa was correlated with that of PBL. These results suggested that flow cytometric analysis of mucosal lymphocytes would be expected one of useful tools for diagnosis of severity and clinical course in ulcerative colitis.

**Key Words** : Ulcerative colitis, Lymphocyte subset, Flow cytometry, Mucosal lymphocyte.

---

1) Dept. of Gastroenterology, Asahikawa Kosei General Hospital. 1-24, Asahikawa, 078 Japan

2) The third department of Internal Medicine, Asahikawa Medical College.