

Title	潰瘍性大腸炎およびCrohn病におけるNitric Oxide産生と大腸粘膜のNitric Oxide Synthase活性の増加
Sub Title	
Author	木村, 裕之(Kimura, Hiroyuki) 石井, 裕正
Publisher	慶應医学会
Publication year	2004
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.81, No.4 (2004. 12) ,p.T199- T213
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	学位論文
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20041201-0199

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

学位論文

潰瘍性大腸炎および Crohn 病における Nitric Oxide 産生と
大腸粘膜の Nitric Oxide Synthase 活性の増加

慶應義塾大学医学部内科学教室

(指導: 石井裕正教授)

木 村 裕 之

(平成 15 年 12 月 14 日受付)

Key Words: nitric oxide, ulcerative colitis, Crohn's disease, nitric oxide synthase, peroxynitrite

生物学的活性を有する低分子化合物の一つである nitric oxide (NO) は、マクロファージや好中球のメディエーターとして炎症性反応において重要な役割を行っていることが知られている¹⁾。NO は nitric oxide synthase (NOS) を介して L-arginine より合成される。NOS のアイソザイムにはカルシウム依存型の構成型 (constitutive NOS, cNOS) とカルシウム非依存型の誘導型 (inducible NOS, iNOS) の 2 種類がある^{2, 3)}。cNOS は、さらに eNOS と nNOS の 2 つの isozyme に分類されるが、少量の NO を産生し心血管系や神経系のホメオスタシスに重要な役割を果たしていると考えられている⁴⁾。一方で iNOS はより多くの NO を産生し、細胞内病原体や腫瘍細胞に対する宿主の防衛機能に重要な役割を果たしていると考えられている^{5, 6)}。しかし、高濃度の NO は健常な組織に対しても毒性があり、傷害を与える可能性があると考えられている。さらに炎症組織にて活発に産生される NO とスーパーオキシドアニオンが反応すると、強い細胞毒性を有する peroxynitrite が産生され、それが組織傷害をさらに引き起こす可能性がある⁹⁾。

小腸および大腸の慢性炎症には、NO 代謝異常が関係していることが実験動物やヒトの両者にて徐々に明らかとされてきた⁶⁻¹¹⁾。NO 合成は慢性炎症性腸疾患にて増

加し、病態の進行に影響を及ぼす可能性がある。活動期の Crohn 病 (CD) や潰瘍性大腸炎 (UC) において、炎症のある腸管粘膜には多くの活性化されたマクロファージや顆粒球の浸潤がみられる¹²⁾。これらの細胞による高濃度の NO の産生と分泌は局所組織の損傷を強く誘導する。UC 患者より生検された直腸粘膜にて、NOS により同時に産生される citrulline の濃度の増加が Middleton らにより報告されている⁷⁾。Rachmilewitz ら¹³⁾は、大腸の NO 産生と NOS 活性は活動期の UC および CD 患者にて増加していることを報告している。また一方では、Crohn 病の大腸粘膜での NOS 活性は増加していないという結果の報告もみられる¹⁰⁾。UC においては、本質的に炎症は粘膜を主体としており、び慢性で、持続的な出血と著明な好中球の浸潤により特徴づけられている。CD においては、炎症は区域性で腸管全層に及び、縦走するアフタ様潰瘍、リンパ球の集積と肉芽腫の形成が特徴とされる¹²⁾。それゆえに、これらの 2 つの疾患はその病因を異にしており、炎症腸管の NO 産生において違いがある可能性がある。しかしながら、この 2 つの疾患において NO の動態につき詳しく検討した成績はみられない。

本研究において著者は、UC および CD 患者における末梢血清中の NO 濃度と大腸粘膜における NO 産生を

本論文は、Kimura H, Miura S, Shigematsu T, Ohokubo N, Tsuzuki Y, Kurose I, Higuchi H, Akiba Y, Hokari R, Hirokawa M, Serizawa H, and Ishii H: Increased nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase activity in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis and Crohn's disease. *Dig Dis and Sci* 42: 1047-1054; 1997 の一部、および Kimura H, Hokari R, Miura S, Shigematsu T, Hirokawa M, Akiba Y, Kurose I, Higuchi H, Fujimori H, Tsuzuki Y, Serizawa H, Ishii H: Increased expression of an inducible isoform of nitric oxide synthase and the formation of peroxynitrite in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis. *Gut* 42: 180-187; 1998 の一部を含む

測定した。同時に、UC および CD 患者において大腸粘膜の NOS 活性と UC・CD の活動性の関係を研究した。また著者は、UC および CD 患者における炎症部および非炎症部の大腸粘膜における NOS 活性を測定し、特に UC と CD の NO 産生の違いに注目した。さらに活動性 UC の大腸炎症において NO が主にどこから産生されるか、その反応物の peroxynitrite がどこで産生されているかについて免疫組織化学的に評価し、iNOS の活性と比較した。

対象と方法

1. 検討1

1) 対象患者

36名の潰瘍性大腸炎患者(男性25名、女性11名;平均年齢38.5歳、18-62歳)および18名のクローン病患者(男性15名、女性3名;平均年齢32.2歳、21-40歳)を対象とした。

潰瘍性大腸炎は臨床的、放射線学的、そして病理組織学的特徴を基準に¹²⁾診断し、既報¹⁴⁾に従って活動性スコアを計算した。すなわち、排便回数、体温、脈拍数、粘血便の存在、腹痛の有無にてスコア計算を行った。潰瘍性大腸炎の活動性に関して28名は活動期であり、うち8名は中等症、20名は軽症であり、残り8名は寛解期であった。13名が直腸S状結腸型で、15名が左半結腸型、そして8名が全結腸型であった。大腸鏡施行の時点で、18名の患者がprednisolone(10-40mg/日)服用中で、26名がsulfasalazine(2-6g/日)を、そして10名が6-mercaptopurine(30mg/日)服用中であった。2名は局所的にステロイド剤を投与されていた。13名はこれら薬剤の投薬を2種類以上受けていた。

クローン病の診断は臨床像、放射線学的、内視鏡的、そして病理学的診断基準により行った。クローン病の活動性はCrohn's disease activity index (CDAI)により判断した¹⁵⁾。病変の広がり内視鏡的および2年以内の小腸造影にて確認した。2名の患者は腸切除の既往があった。7名の患者は大腸型で、11名は小腸大腸型であった。これらの対象の中で、6名はCDAI150以上の臨床的に活動期にある状態であった。14名はprednisolone(10-30mg/日)服用中で、18名はsulfasalazine(3-6g/日)、そして10名は6-mercaptopurine(30mg/日)を大腸鏡施行の時点で服用中であった。14名はこれら薬剤の投薬を2種類以上受けていた。

コントロール群は20名の(14名男性、6名女性、平均42.1歳)大腸ポリープ患者とした。その大腸健常部

粘膜のバイオプシーでは、組織学的には正常であった。

患者はニフレックTMにて前処置後大腸鏡を施行した。炎症の重症度はRutegard¹⁶⁾らおよびWardle¹⁷⁾らの内視鏡的診断基準基準にて1)肉眼的に正常2)血管透過性不良・粘膜浮腫・顆粒状粘膜・易出血性3)発赤粘膜・表層性潰瘍形成4)白苔を伴った深い潰瘍形成という4段階に分類した。35名のUC患者のうち8名は内視鏡的に正常(grade 1)粘膜で粘膜への炎症性細胞浸潤像は見られなかった。これらの症例は非活動期の症例とした。全てのクローン病患者は、内視鏡的gradeにて3から4の活動性病変を有していた。潰瘍性大腸炎のそれぞれの患者は、内視鏡的に活動性のある遠位部の粘膜及び、肉眼的には健常(非病変部)な上行または横行結腸にあたる近位部の粘膜のバイオプシーを施行した。クローン病患者においては、肉眼的に炎症のある部分および病変と病変の間の肉眼的に炎症のみられない粘膜よりバイオプシーを施行した。通常の大腸鏡よりも微小病変を検出するため0.1%インジゴカルミンを使ったスプレー散布による着色も行った。本研究は学内倫理委員会の承認に基づき、全対象についてインフォームドコンセントを取得して行った。

2) 血漿 NO₂・NO₃(NO_x) およびサイトカインの測定

血液検体は空腹時の34名のUC患者および18名のCD患者より採取した。血漿NO₂・NO₃(NO_x)濃度はGrangerら¹⁸⁾の方法を改変し、全てのNO₂を*E.Coli*のNO₂還元酵素によりNO₃に還元し測定した。即ち、0.3Mのアモニウムformateと0.05単位のNO₂還元酵素(シグマ社製)を100μlの血漿に添加し、この混合液を37℃にて4時間インキュベーションした。インキュベーションの最後に2倍のGriess試薬を加え、室温にて10分間インキュベーションし、さらに1mlのGriess試薬を加え、543nmでの吸光度を測定し、NO₃レベルを標準曲線より求めた。

Interleukin (IL)-1β, IL-6 および tumor necrosis factor-α (TNF-α) の血漿濃度は28名の活動性UCと18名のCD患者にて測定をした。EDTA採血にて採取した血漿を用い、サンプル中のIL-1β, IL-6 および TNF-α を enzymed-linked immuno sorbent assay (ELISA) 法 (Quantikine HS kit, R&D Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota) にて測定した。尚、血漿中の最低感度は、(IL)-1βにおいて0.1 pg/ml, IL-6において0.094 pg/ml, TNF-αにおいて0.18 pg/mlである。

3) 大腸粘膜の NOS 活性の測定

NOS 活性は大腸生検検体を用いて L-arginine アナログの存在下に L-arginine から citrulline への変換能を算定することにより測定した¹⁹⁾。簡単に述べると、組織を 1mM EDTA, 1mM DTT, 10 µg/ml leupeptin, 0.2 mM PMSF の入った 50 mM Tris buffer (pH 7.0) に入れてホモジェナイズし、さらにこれを 30000 rpm にて遠心する。上清は ¹⁴C-L-arginine から ¹⁴C-citrulline への変換を阻害する N⁶-monomethyl-L-arginine を用いて測定を行った。すなわち、0.05 ml の上清を 1.0 mM CaCl₂, 1.0 mM MgCl₂, 10 µM L- [¹⁴C] arginine, 1 µM L-citrulline ([¹⁴C] citrulline の異化防止のため), 10 mM L-valine (非特異的な arginase 活性阻害のため), 1 µM FAD, 0.1 mM NADPH を含んだ 50 mM HEPES 液 (pH 7.2) に加え、この反応液が全部で 200 µl となるようにした。この反応液を 37°C にて 60 分間インキュベーションを行い、その後 Dowex (AG 50W-8) レジンと buffer の 1 対 1 の懸濁液を、分解されていない L- [¹⁴C] arginine を結合して取り除くために 1 ml 加えた。バックグラウンドの citrulline 生成を減ずるために 1 mM の L-NMMA を使用した。この測定法により Ca²⁺ 依存型の構成型 iNOS と Ca²⁺ 非依存型の誘導型のアイソザイムを測定することができる。1mM EGTA の存在下に (すなわち Ca²⁺ のない状態にて) 測定された活性が iNOS 活性を示すように、EGTA を加えてのインキュベーションも同時に行った。

4) ヘマトキシリン・エオジン染色による組織学的検討

大腸生検標本は、10%のホルマリン溶液にて固定し、脱水後パラフィン包埋した。4 µm の連続切片にてヘマトキシリン・エオジン染色を行った。組織学的炎症 grade は Riley らの方法²⁰⁾ に従い炎症性細胞の浸潤と組織破壊の程度を以下の 5 段階にわけた：1. 正常粘膜；2. 組織破壊のない軽度の慢性炎症細胞の浸潤；3. 組織破壊のない中等度の慢性炎症細胞の浸潤；4. 軽度の組織破壊のある著明な慢性炎症細胞の浸潤；5. 明かな組織破壊のある著明な慢性炎症細胞の浸潤

2. 検討 2

1) 対象患者

潰瘍性大腸炎患者を対象にして大腸粘膜での iNOS 活性と iNOS および nitrotyrosine の免疫組織学的検討を施行した。33 名の活動性潰瘍性大腸炎患者 (24 名の男性、9 名の女性；平均年齢 37.3 歳；18-57 歳) を対象とした。潰瘍性大腸炎は標準的な診断基準を基に診断さ

れ、活動性は検討 1 と同様にスコアを計算した。スコアは 0 から 8 ままであった。3 以上のスコアの患者は活動性とした。疾患活動性は 16 名にて中等度から重度、そして 17 名にて軽度であった。12 名が直腸 S 状結腸型で、13 名が左半結腸型、そして 8 名が全結腸型であった。大腸鏡施行時点で、16 名の患者が predonisolone (10-30mg/日) 服用中で、26 名が sulfasalazine (2-6 g/日) を、そして 8 名が 6-mercaptopurine (20-30 mg/日) 服用中であった。3 名は局所ステロイド剤を投与されていた。13 名はこれら薬剤の投薬を大腸鏡検査時点で 2 種類以上受けていた。

コントロール群は 18 名の (10 名男性、8 名女性、平均 40.8 歳) 大腸ポリープ患者とした。その大腸健常部粘膜のバイオプシーでは、組織学的には正常であった。

患者は標準的な前処置後大腸鏡を施行した。潰瘍性大腸炎のそれぞれの患者は、内視鏡的に炎症のある粘膜と、内視鏡的には正常な粘膜のバイオプシーを施行した。

2) 大腸粘膜の iNOS 活性の測定

検討 1 での腸粘膜の NOS 活性の測定に準拠して行った。

3) iNO 合成酵素と nitrotyrosine の免疫組織学的検討

iNOS および nitrotyrosine の大腸粘膜での免疫活性は標識 streptavidin biotin 法にて免疫組織化学的に検討した。採取した大腸生検組織は periodate/lysine/paraformaldehyde 溶液にて固定し、ドライアイスとアセトンで凍結する前に optimum cutting temperature (OCT) コンパウンド (Miles Inc, Elkhart, IN, USA) に包埋した。6 µm の厚さのクリオスタット切片を作成しゼラチンコートのスライドに移し、20°C にて 1 時間乾燥した。pH7.4 で、1% Triton X-100 を含む燐酸バッファー生食 (PBS) で 5 分間洗浄した後、1%ヤギ血清含有の PBS 内にてインキュベートした。iNOS (macNOS) および nitrotyrosine (mouse IgG ; Update Biotechnology Inc, Lake Placid, NY, USA) に対するモノクローナル抗体は、PBS にて 50 から 100 倍に薄め、一晚 4°C で切片上にて反応させた。それぞれの検体は 2 次抗体 (biotinylated anti-mouse IgG class 抗体 ; Amersham International plc Amersham, Bucks, UK) とともに 37°C 1 時間インキュベートし、さらに streptavidin 標識 fluorescein isothiocyanate (Streptavidin-fluorescein ; Amersham International plc) にて 30 分間室温にてインキュベートした。各ステップにて 1%ウシ血清アルブミン含有 PBS にて洗浄を行った。

標本はグリセリンゼリーにて封入し、蛍光顕微鏡 (Olympus, Tokyo, Japan) 下にて観察した。尚、1次抗体を除いて同様の操作を施行した標本をネガティブコントロールとした。

4) 免疫沈降法およびウェスタンブロット解析

本検討で用いた iNOS 抗体の特異性を検証するために、iNOS 活性の免疫沈降法および大腸粘膜組織でのウェスタンブロット解析を行った。

免疫沈降法では、大腸生検組織をホモジェナイズしたサンプルの蛋白を Nonidet P40 (1%) で処理して短時間ソニケーションした。可溶性蛋白 (500 µg) はトータルで 500 µl の免疫沈降バッファー (10 mM Tris/HCL, pH 7.4, 1% Nonidet P40, 1 mM EDTA, 0.5% BSA, 0.2 mM phenylmethanesulphonyl fluoride) 内で 4℃にて 10 時間、抗 iNOS (mac-NOS) (mouse IgG2a; Transduction Laboratories) (5 µg) モノクローナル抗体とともにインキュベーションした。5 µg のウサギ抗マウス IgG 抗体を加えた後、vortex にて攪拌し、さらに 4℃にて 1 時間インキュベーションを継続した。この混合液に固定された *Staphylococcus aureus* (Zymed Co., South San Francisco, CA, USA) の 10% 懸濁液 100 µl を加え、30 分インキュベーションの後 2500 g にて 20 分遠心をした。上清に残った iNOS 活性については上述のごとく測定した。

ウェスタンブロット解析では生検組織を 15 ml の typeB blender ホモジェナイザーを用いて 1 分間 2000 回転で 10 ストロークを 5 倍の煮沸分解バッファー (1% sodium dodecyl sulphate, 10 mM Tris/HCL, pH 7.4) 内でホモジェナイズし、10-15 秒間マイクロウェーブをかけた。サンプルの一部 (100 µg protein) を sodium dodecyl sulphate/polyacrylamide gel electrophoresis (12% gel (Protogel); National Diagnostics, Atlanta, GA, USA) にて溶解し、免疫電気泳動にてニトロセルロース膜上に固定した。非特異的結合部位をブロックするために 20 分間室温にて 3% の non-fat ドライミルクにてインキュベーションした。この膜を 4℃にて一晩攪拌しながら iNOS に対するモノクローナル抗体でインキュベーションし、さらに PBS/3% non-fat ドライミルクにて 30 分間室温にて攪拌しながら金コロイド結合 2 次抗体 (ヤギ抗マウス IgG; 1:200 希釈) とインキュベートした。この抗体が結合した膜を silver enhancing kit (Bioclin, UK) を用いて検出した。

統計的検討

全ての結果は平均および平均誤差にて表現した。群間差は ANOVA および Fisher's post hoc テストを使用した。血漿 NOx レベルおよび大腸粘膜 iNOS 活性の関係は直線回帰分析を使用した。p<0.05 をもって有意差とした。

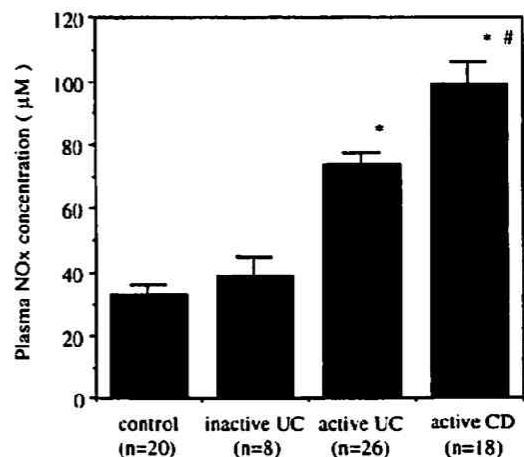
結 果

1. 検討 1

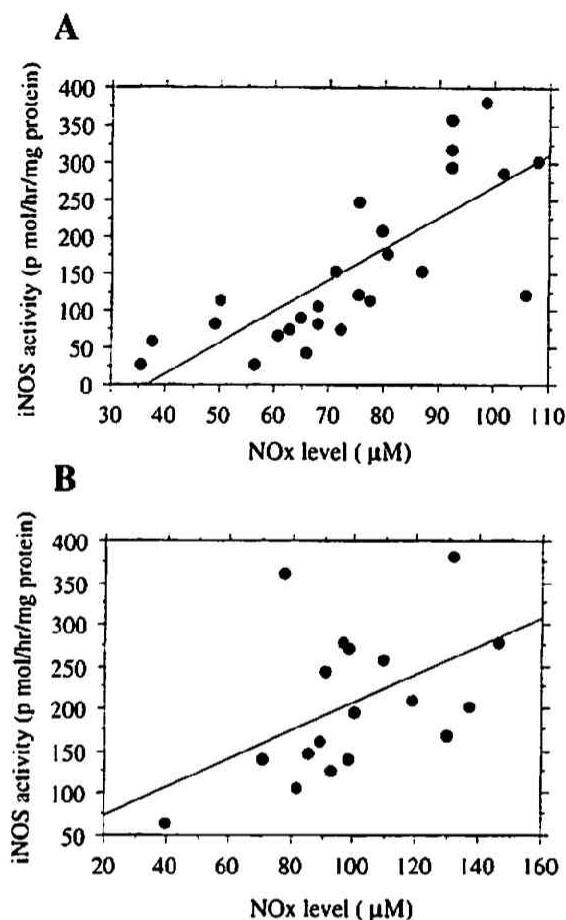
血漿 NO₂⁻・NO₃⁻ (NOx) およびサイトカインの測定

第 1 図は UC と CD 患者の血漿中の NO₂⁻と NO₃⁻ (NOx) 濃度を示している。活動期の UC と CD 患者はコントロールと比較して平均血漿中 NOx 濃度が著明に増加していた。これらの NO 代謝産物測定値は活動期 UC よりも CD 患者にて著明に増加していた。非活動期 UC 患者においてはコントロールに比較して血漿中 NOx 濃度は増加を示さなかった。

第 2 図は活動期 UC および CD 患者の血漿中 NOx 値と炎症を有する大腸粘膜の iNOS 活性値の関係を示したものである。著明な正の相関が NO 代謝産物および両群患者の活動性粘膜における iNOS 活性の間に認められた。しかしながら、CD よりも UC にてより強い相関が認められた。(UC: r=0.78, p<0.001 CD: r=0.51,



第 1 図 UC と CD 患者の nitrite と nitrate (NOx) の血漿濃度。値は平均±標準偏差。*p<0.05: コントロールと非活動期 UC と比較。#p<0.05: 活動期 UC と比較。(Kimura H et al: Dig Dis Sci 42: 1047-1054. 1997 の第 1 図を許可を得て転載、改変)



第2図 血漿 nitrite/nitrate (NOx) 濃度と (A) 活動期 UC および (B) CD 患者の大腸粘膜における iNOS 活性の相関。 (A) 活動期 UC 患者の NOx 濃度と iNOS 活性には強い相関がみられた。 $r=0.78$, $P<0.001$, $y=156.646+4.258x$; $R^2=0.0604$ (B) UC ほどの相関ではないが、CD 患者の NOx 濃度と iNOS 活性にも有意な相関が見られた。 $r=0.51$, $P<0.05$, $y=42.036+1.667x$; $R^2=0.265$ (Kimura H et al : Dig Dis Sci 42 : 1047-1054. 1997 の第2図を許可を得て転載、改変)

$p<0.05$) サイトカインの血漿濃度の比較では、血漿 IL-6 値は活動期の CD 患者にてコントロールに比べて著明に上昇していた (CD : 18.5 ± 3.6 pg/ml コントロール : 1.6 ± 1.3 pg/ml, $p<0.05$)。しかし、活動期 UC ではコントロールに比べ、血漿 IL-6 値の著明な上昇は見られなかった (UC : 4.6 ± 2.8 pg/ml)。また、活動期 UC および CD 患者における血漿中 IL-1 β および TNF- α 濃度は、コントロールに比べ有意な上昇はなかった。

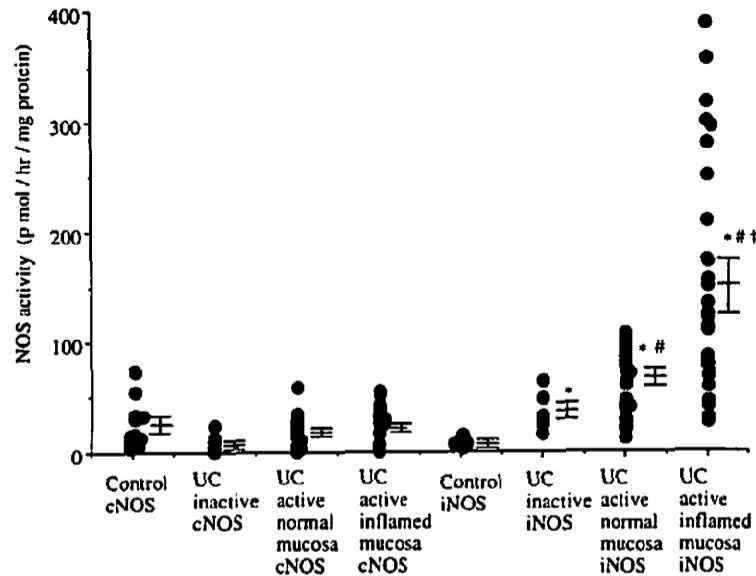
大腸粘膜の NOS 活性の測定

第3図は UC 患者における大腸粘膜の NOS 活性を示

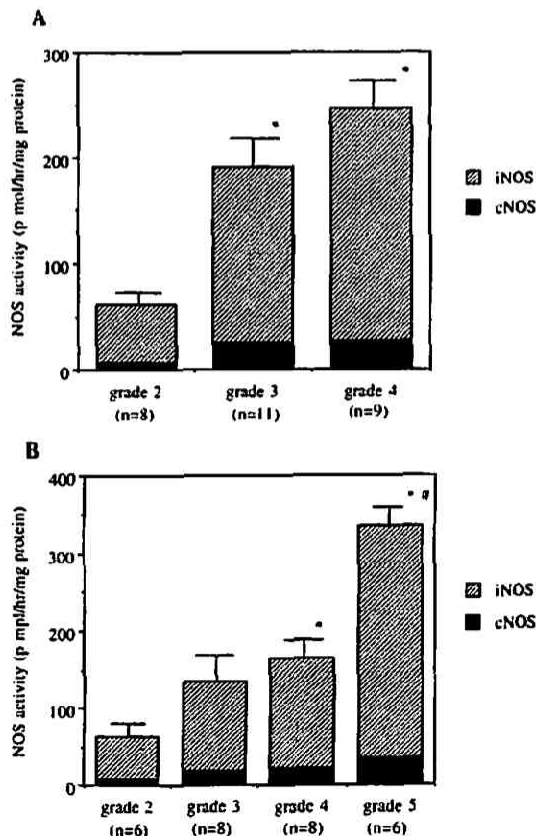
している。コントロールにおける正常大腸粘膜においては、cNOS 活性は 24.5 ± 4.0 pmol/hr/mg protein であり、iNOS 活性は 15 pmol/hr/mg protein 以下であった。非活動期の UC 患者では、炎症の見られない粘膜から採取された生検組織にて cNOS 活性は 25 pmol/hr/mg protein 以下であった。一方 iNOS 活性はコントロールに比してわずかながら、しかしながら有意差をもって上昇していた。活動期の UC 患者において、cNOS および iNOS 活性を正常 (非炎症部) 粘膜および炎症部位の粘膜の両者にて測定した。組織学的には、活動期 UC 患者より採取した非炎症部における組織では炎症細胞性浸潤の明らかな増加は見られなかった。コントロールに比べ、活動期 UC 患者の炎症部および非炎症部の粘膜においては cNOS 活性の増加は認められなかった。しかしこれとは対照的に、活動期 UC 患者の大腸粘膜の iNOS 活性は著明に上昇しており、この iNOS 活性の上昇は炎症部と非炎症部の粘膜の両者において認められた。ただし非炎症部の粘膜では上昇はより軽度にとどまった。また大腸粘膜の iNOS 活性増加は非炎症部よりも炎症部位の粘膜でより著明に認められた。

第4図は活動期 UC 患者の病変粘膜の NOS 活性と内視鏡的および組織学的に判定した炎症グレードとの関係を図示したものである。大腸 iNOS 活性は内視鏡的にも組織学的にも軽度の炎症粘膜よりも、高度の炎症粘膜においてより著明に上昇していた。即ち第4図 A に示すごとく内視鏡的グレード3または4の大腸より採取された大腸組織 iNOS 活性はグレード2における同活性よりも有意に増加していた。同様に、iNOS 活性は UC 患者の組織学的炎症グレードにも良く相関し、第4図 B に示すように炎症の重症度の増加とともに段階的に iNOS 活性は上昇した。

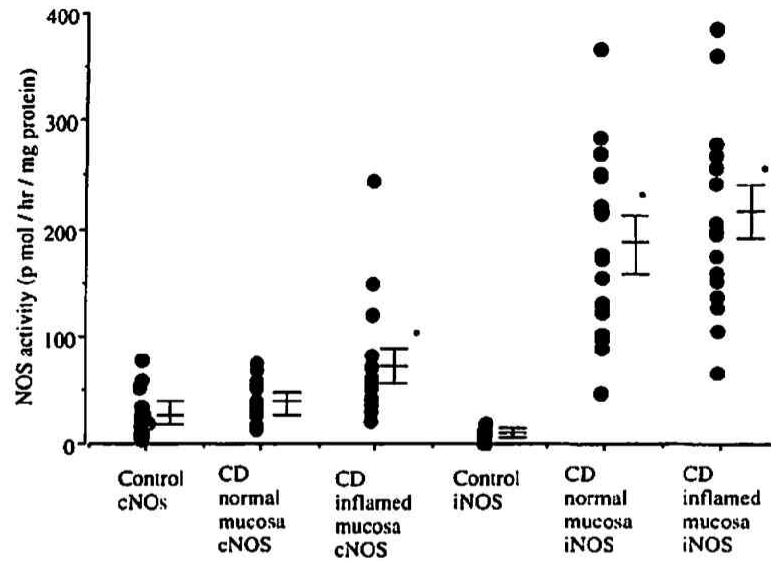
第5図は CD 患者における大腸 NOS 活性を示している。これらの活動期 CD 患者において、炎症の活動性が高い粘膜の cNOS 活性はコントロールに比較して有意に上昇していた。またこれらの患者の肉眼的に正常な粘膜部位においても、cNOS 活性は統計学的には有意差はないものの若干上昇しているように見える。活動期 CD 患者の炎症粘膜における iNOS 活性は、コントロールに比べ著明に上昇していた。しかしながら、組織学的炎症 grade 2 または 3 の患者と 4 または 5 の患者を比較した場合には、iNOS 活性は有意な差は認められなかった。CD 活動期患者の肉眼的に正常な大腸粘膜における iNOS 活性が、炎症粘膜における活性と有意差なく著明に上昇していたことは、特に注目すべき点である。組織学的には CD 患者の肉眼的に正常の粘膜での HE 染色で



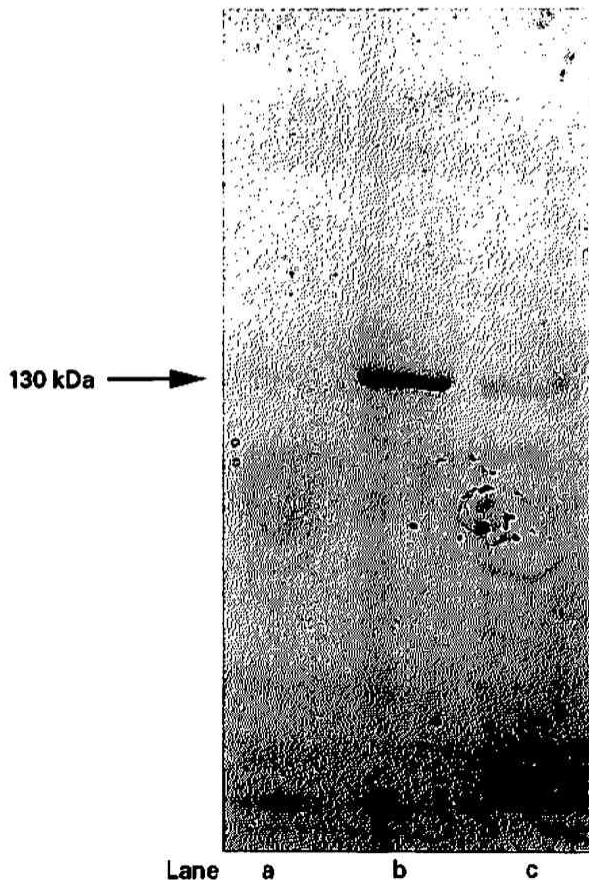
第3図 UC患者の大腸NOS活性。コントロール：コントロール対象者からの正常大腸粘膜非活動期 UC：非活動期 UC患者からの大腸粘膜活動期 UC 正常粘膜：活動期 UC患者からの非炎症部位の大腸粘膜活動期 UC 炎症粘膜：活動期 UC患者の組織学的に活動性のある大腸粘膜 cNOS：constitutive (カルシウム依存性) NOS 活性；iNOS：inducible (カルシウム非依存性) NOS 活性 *P<0.05 コントロール iNOS と比較。#P<0.05 非活動期 UC の iNOS と比較。†P<0.05 活動期 UC の正常な非炎症部粘膜の iNOS と比較 (Kimura H et al : Dig Dis Sci 42 : 1047-1054. 1997 の第3図を許可を得て転載、改変)



第4図 活動期 UC 患者における大腸粘膜の NOS 活性と内視鏡的 (A) または炎症の組織学的 grade (B) の関係。炎症の重症度は方法に記載したように4段階からなる内視鏡的診断基準および5段階からなる組織学的診断基準を用いて grade 分類を行った。cNOS：constitutive (カルシウム依存性) NOS 活性；iNOS：inducible (カルシウム非依存性) NOS 活性 *P<0.05 grade2 と比較。#P<0.05 grade4 と比較。(Kimura H et al : Dig Dis Sci 42 : 1047-1054. 1997 の第4図を許可を得て転載、改変)



第 5 図 CD 患者の大腸 NOS 活性コントロール：コントロール対象からの正常大腸粘膜 CD 正常粘膜：活動期 CD 患者の大腸非炎症部粘膜，CD 炎症粘膜：活動期 CD 患者の組織学的炎症のある大腸粘膜 cNOS：constitutive（カルシウム依存性）NOS 活性；iNOS：inducible（カルシウム非依存性）NOS 活性 * $P<0.05$ コントロール cNOS または iNOS と比較（Kimura H et al：Dig Dis Sci 42：1047-1054. 1997 の第 5 図を許可を得て転載，改変）



第 6 図 抗 iNOS 抗体を用いての Western blotting 法による大腸粘膜生検標本の inducible NOS (iNOS) の検出，Lane a，iNOS はコントロール対象からの組織学的正常粘膜のホモジェネートでは検出できなかった，Lane b，重度（grade4）の炎症を有する活動期 UC 粘膜にて，抗 iNOS 抗体は 130kDa の位置に明瞭なバンドを検出できた，Lane c，軽度（grade2）の炎症を有する UC 粘膜では弱いバンドのみが検出された，（Kimura H et al：Gut 42：180-187, 1998 の第 1 図を許可を得て転載，改変）

は、炎症性細胞浸潤の明かな増加は認められなかった。

2. 検討2

検討に用いた抗 iNOS 抗体が iNOS 蛋白を特異的に検出していることを検証するために、抗 iNOS 抗体を用いた iNOS 活性の免疫沈降および Western blotting による検討 (第6図) を正常大腸組織と活動性 UC の病変部組織にて行った。免疫沈降法では非炎症部粘膜および炎症部粘膜の両者において抗体と反応後に上清に残った活性は5%以下であり、本抗体が iNOS 活性を検出していることが示された。

Western blotting による検討では、正常大腸にては iNOS は検出されなかった (lane a)。強い炎症のある活動性 UC 粘膜においては (grade 4)、抗 iNOS 抗体は、130 kDa に位置するバンドとして明瞭に検出された (lane b)。一方で、軽度の炎症粘膜では (grade2) かすかなバンドが検出されたのみであった (lane c)。

UC 患者の大腸組織における iNOS の免疫組織化学的検討では、iNOS 蛋白の局在は粘膜固有層と同様に粘膜上皮においてもその発現の増強が観察された。一方コントロール症例では iNOS 陽性の免疫反応は粘膜上皮でも粘膜固有層でも検出されなかった。第1表は活動期の UC 患者の炎症を有する大腸組織にて iNOS 染色陽性の割合を示したものである。iNOS の局在を組織学的に軽度から中等度の炎症を有する患者 (grade2 または 3) と高度の炎症を示す患者 (grade4 または 5) とで比較をした。grade2 または 3 の炎症を示す大腸粘膜の 54% しか iNOS は免疫染色で陽性ではなかった。これらの患者では iNOS 免疫反応は主に粘膜固有層でのみ観察され、19% が粘膜上皮にても iNOS 免疫反応を示した。これらの患者の肉眼的に正常な粘膜においては iNOS 免疫反応はほとんどみられず、一例で粘膜固有層に陽性を

示したのみであった。一方で、組織学的に高度の炎症を有する (grade4 または 5) 大腸粘膜での iNOS 分布には重要な相違があった。すなわち iNOS 陽性反応は全ての炎症粘膜において観察され、また grade4 または 5 の炎症粘膜では第7図に示すように粘膜固有層 (grade2 または 3 では 19% で grade4 または 5 では 81% ; $p < 0.05$) と同様に大腸粘膜の粘膜上皮にて著明な増加を呈していた。Grade4 または 5 の活動性炎症粘膜のある2名の患者では、iNOS 陽性反応は第8図に示すように粘膜上皮のみであった。また grade4 または 5 の炎症のある患者でも、iNOS 免疫反応は1例を除いては正常粘膜では明らかに検出できなかった。

第9図は活動性 UC 患者の炎症粘膜における iNOS 酵素活性と iNOS の陽性部位の関係を示すものである。iNOS 免疫反応陽性を示す粘膜は陰性粘膜よりも、有意に高い iNOS 活性を呈していた。さらに、粘膜固有層と粘膜上皮細胞両者において iNOS 免疫反応を呈している炎症粘膜は、iNOS が粘膜固有層のみに限局している粘膜よりも有意に高い iNOS 酵素活性を呈していた。

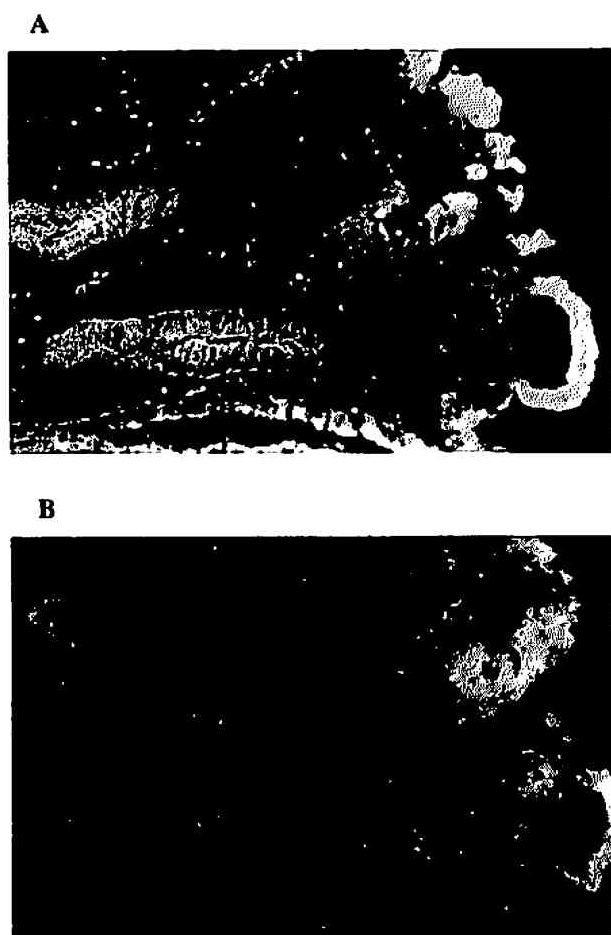
第2表は活動性 UC 患者の大腸組織における nitrotyrosine 染色陽性の割合を示したものである。大腸組織の nitrotyrosine 染色はチロシンのニトロ化の存在を示すもので、この染色を組織学的に軽度から中等度の炎症 (grade2 または 3) と高度の炎症 (grade4 または 5) を示す患者群にて比較した。コントロール症例では、nitrotyrosine 免疫反応は粘膜上皮と粘膜固有層の両者にて検出されなかった。grade2 または 3 の炎症と分類された患者にては nitrotyrosine 免疫反応陽性は常に粘膜固有層において、41% の割合で観察された。第10図は grade4 または 5 患者からの大腸粘膜の粘膜固有層にて認められた典型的な nitrotyrosine 免疫反応陽性を示すものである。これら高度の炎症粘膜を示す患者

第1表 活動性 UC 患者の大腸組織の iNOS 免疫反応の局在と陽性率

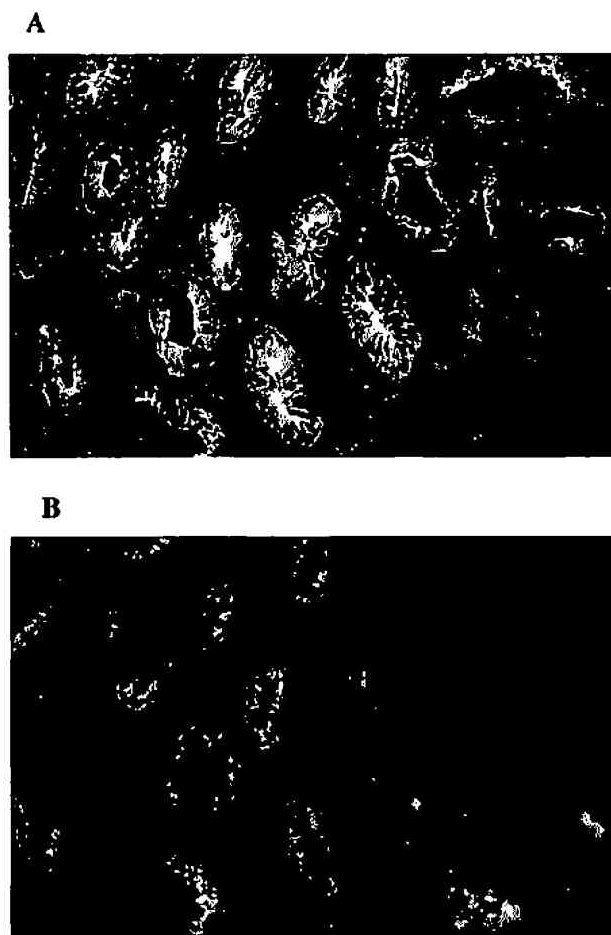
括弧内の値はパーセントを示す。

iNOS の染色は UC 患者の沈静化および活動性の炎症大腸粘膜と比較した。組織学的 grade は軽度及び中等度 (grade2 または 3) と重度の炎症 (grade4 または 5) に分けた。(Kimura H et al: Gut 42: 180-187, 1998 の表1 を許可を得て転載、改変)

	Grades 2 and 3 (n=17)		Grades 4 and 5 (n=16)	
	Quiescent mucosa	Actively inflamed mucosa	Quiescent mucosa	Actively inflamed mucosa
Negative	16 (94)	8 (47)	15 (94)	0 (0)
Epithelium only	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (12)
Lamina propria only	1 (6)	6 (35)	0 (0)	3 (19)
Both epithelium and lamina propria	0 (0)	3 (19)	1 (6)	11 (69)



第 7 図 UC 活動期炎症粘膜の iNOS の免疫組織化学的検討。iNOS 免疫反応の局在は iNOS (macNOS) に対する抗体を用いたラベルされた streptavidin-biotin 法にて検出した。活動性の高い (grade4) 炎症粘膜のより得られた生検標本 (A) 著明な iNOS 陽性反応が粘膜固有層と同様に大腸粘膜の粘膜上皮にて観察された (B) 1 次抗体を反応させないネガティブコントロール写真を示す (拡大率 $\times 100$)



第 8 図 UC 活動性炎症粘膜における iNOS 活性の免疫組織化学的検討。iNOS 免疫反応の局在は iNOS (macNOS) に対する抗体を用いたラベルされた streptavidin-biotin 法にて検出した。バイオプシー片は grade5 の非常に活動性野高い炎症粘膜より得られた、この症例では iNOS 反応は大腸粘膜の粘膜上皮にて確認された (A) 1 次抗体のないネガティブコントロール写真を示す (B) (拡大率 $\times 100$) (Kimura H et al : Gut 42 : 180-187, 1998 の第 4 図を許可を得て転載、改変)

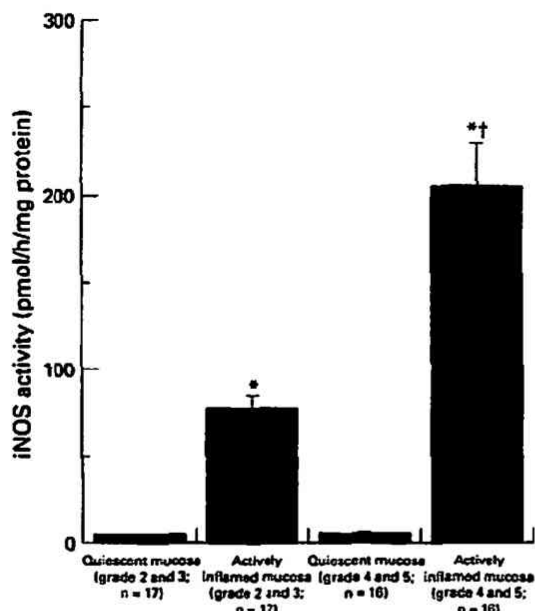
第 2 表 活動性 UC 患者の大腸組織のニトロタイロシン免疫反応の局在と陽性率

括弧内の値はパーセントを示す。

Nitrotyrosine の染色は UC 患者の非炎症部および活動性の炎症部大腸粘膜を比較した。

組織学的 grade は軽度及び中等度 (grade2 または 3) と重度の炎症 (grade4 または 5)。(Kimura H et al : Gut 42 : 180-187, 1998 の表 2 を許可を得て転載、改変)

	Grades 2 and 3 (n=17)		Grades 4 and 5 (n=16)	
	<i>Quiescent mucosa</i>	<i>Actively inflamed mucosa</i>	<i>Quiescent mucosa</i>	<i>Actively inflamed mucosa</i>
Negative	17 (100)	10 (59)	16 (100)	0 (0)
Epithelium only	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (6)
Lamina propria only	0 (0)	7 (41)	0 (0)	12 (75)
Both epithelium and lamina propria	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (19)



第9図 活動期 UC 患者の炎症大腸粘膜における iNOS 酵素活性と iNOS 免疫反応の部位の関係。値は平均と標準偏差で表されている。* $P < 0.05$ iNOS 免疫反応のない大腸粘膜と比較。† $P < 0.05$ 粘膜固有層と上皮細胞両者にて iNOS 免疫反応が観察された大腸粘膜と比較 (Kimura H et al: Gut 42: 180-187, 1998 の第5図を許可を得て転載、改変)

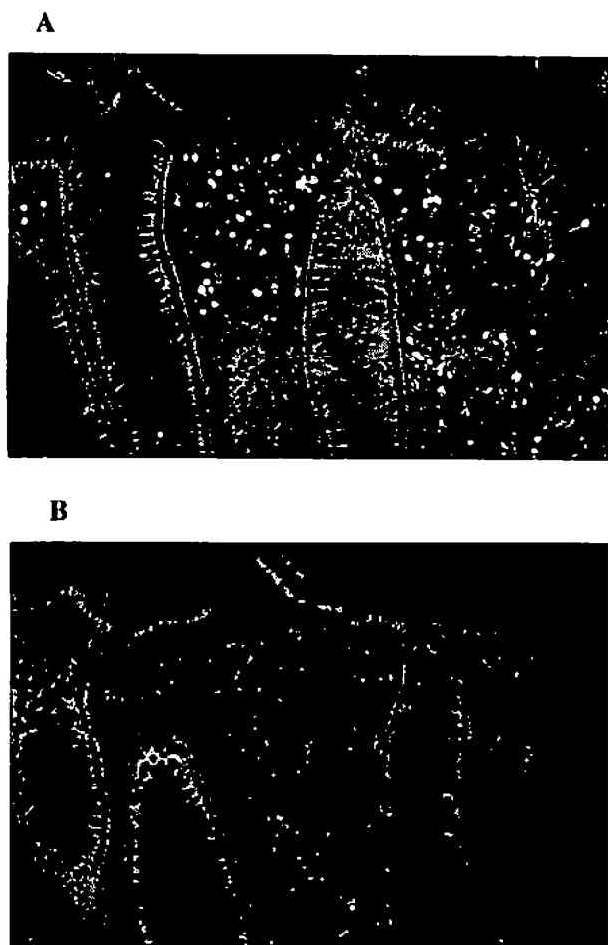
においては、全ての生検標本において nitrotyrosine 免疫反応が陽性を示しており、この nitrotyrosine 反応の75%は粘膜固有層のみで認められた。一方、その他においては nitrotyrosine の反応は第7図に示すように粘膜上皮においても認められた。

考 察

活動性炎症性腸疾患患者の腸管においては、NO の産生増大が慢性炎症に伴う組織傷害機序に何らかの役割を果たしていると考えられている^{6, 8, 9, 13}。本研究において著者は血漿 NOx 値と UC および CD 患者の炎症性粘膜における誘導型 NOS (iNOS) 活性との間に正の相関を見出した²¹。この相関は UC 患者においてより明瞭なものであった。さらに、血漿 NOx 濃度は、非活動性 UC の患者に比べ、活動性 UC 患者において著明に上昇していた。この所見に一致して、UC 患者の大腸粘膜における NOS 活性の上昇は、組織学的や内視鏡的なスコアによる疾患の活動性に良く相関することも証明した。

従って増加した全身の NO は、炎症を生じている腸粘膜における NO 産生増大を主に反映しているということ、少なくとも UC においては示唆していると思われる。活動期の UC 患者において、上昇した腸粘膜 NOS 活性はほとんどがカルシウム非依存性の誘導型タイプ (iNOS) であり、カルシウム依存性の構成型タイプ (cNOS) はあまり変化がないということも今回の検討で明らかとなった。したがって、これらの炎症時に cNOS によって産生される NO の、全身の NO に対する貢献度は少ないものであると考えられる。免疫組織学的には、組織的に高度の炎症を有する患者の大腸粘膜は、より軽度の grade の炎症を有する組織よりも iNOS 免疫反応陽性をより高率に呈していたことを今回の検討で示した²²。増大した NO 産生は活動性炎症粘膜に限られており、iNOS 免疫反応はこれらの患者の肉眼的に正常な非炎症部粘膜にては事実上検出されなかった。また、Miller らは²³ iNOS を阻害するアミノグアニジンを含んだ飲料の摂取はモルモットにおけるトリニトロベンゼンスルホン酸惹起性腸炎の炎症反応を用量依存的に抑制したと報告している。これらの所見より、炎症が存在する腸管においては iNOS による NO 産生の異常な増加は炎症の更なる増悪において重要な因子となり、組織傷害の進行の鍵を握るかもしれないと想定される。実際、iNOS 欠損マウスを用いた実験では dextran sulfate sodium による実験的大腸炎の発症や程度が抑制される成績が得られている^{24, 25}。

大腸粘膜における増大した NO 産生源は、今まで確認されていない。しかしながら、炎症粘膜に集積した食細胞系の白血球 (好中球, 単球, マクロファージ) が潜在的に傷害性のフリーラジカルの重要な発生源となっているといういくつかの証拠がある^{11, 12}。Grisham らは²⁶ 循環血流内でなく、血管外に遊走した好中球が iNOS の酵素活性によって非常に大量の NO を産生するというを示した。炎症性腸疾患における小腸または大腸の炎症は leukotrieneB4 や platelet-activating factor のような炎症性メディエーターの放出と同様に組織由来のサイトカインの増大に関係している²⁷。さらには、これらのサイトカインのいくつかは食食能のある白血球 NOS の誘導因子として知られている^{1, 2}。内皮細胞、線維芽細胞や肥満細胞も炎症が生じた組織における NO 産生に貢献しているであろう。これらの活性の主な部分は一般的にカルシウム依存性であるとされている²。しかしながら近年、小腸上皮細胞自身が NO の重要な産生源であるという証拠が示されており、エンドトキシンやさまざまなサイトカインに対しての反応として、培



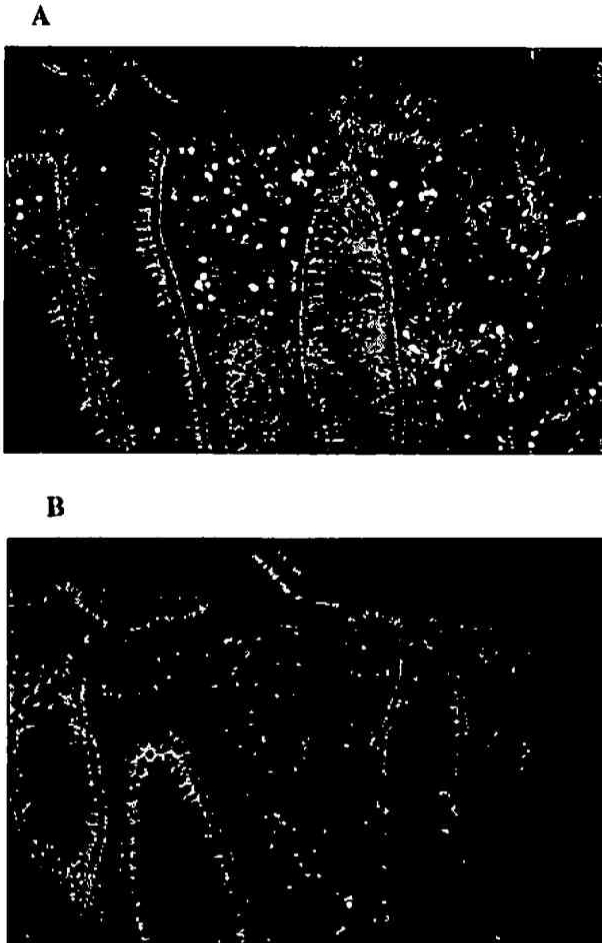
第 10 図 UC の活動期炎症粘膜における nitrotyrosine の免疫組織化学。免疫反応の局在は nitrotyrosine に対する抗体を用いて、ラベルされた streptavidin-biotin 法にて検出した。生検標本は grade4 の活動性炎症を示す粘膜より得られた。Nitrotyrosine 免疫反応は大腸粘膜の粘膜固有層にて観察された (A) 1 次抗体を反応させないネガティブコントロール写真を示す (B) (拡大率 $\times 400$) (Kimura H et al : Gut 42 : 180-187, 1998 の第 6 図を許可を得て転載、改変)

養小腸上皮細胞において、iNOS 活性および NO_x 産生は増大することが示された^{28, 29}。さらに、炎症性腸疾患患者の炎症性の大腸粘膜にて iNOS が誘導されうとの報告がみられる^{33, 31}。これらの知見や今回の著者の潰瘍性大腸炎の高度の活動性炎症のみられる粘膜上皮で高率に iNOS 免疫反応が見られたことは、粘膜上皮が慢性炎症時に重要な NO 産生源となっていることを、および上皮での NO 産生が強く関わっていることを示唆している。尚、本研究において、腸炎患者からの活動性炎症粘

膜において iNOS 活性が酵素学的手法にて検出されたが、iNOS 免疫反応が観察されない場合がみられた。この食い違いの理由は不明であるが、iNOS に対する特異抗体での組織学的な検討はより感度が低いという可能性、および低い活性は非特異的なバックグラウンド染色との区別ができないことが考えられる。

炎症性腸疾患において過剰に産生された NO が如何にして組織傷害と関連するかという機序については不明な点が多い。炎症が生じている腸管の微小血管内皮では傷害により NO への反応性が変化しているという報告もみられる³²。NO の過剰産生が炎症を促進することによる一つのメカニズムとしては、多核白血球と単球の遊走能を起こさせる能力が考えられる^{33, 34}。NO が組織傷害と炎症を促進する他のメカニズムは、細胞内鉄の放出、ミトコンドリア機能の抑制そして DNA 合成の抑制に関係している³⁵⁻³⁷。NO は酸素分子と速やかに反応し、さまざまな酸化及び窒素化合物を産生するという能力により間接的に組織傷害を起こしている可能性も考えられる⁶。炎症性腸疾患の活動性粘膜では細胞上皮や細胞間領域の細胞骨格を構成するタンパク質に酸化ストレスやニトロ化が生じていると報告されている³⁸。Weitzman ら³⁹や Thomas ら⁴⁰は白血球由来の oxidant が毒性を示さない濃度においても *in vitro* にて突然変異性があり、大腸における慢性炎症と悪性新生物発生に関係している可能性を指摘している。さらに、N₂O₃ のような NO の自動的な酸化産物は *in vitro* においてニトロ化や変異性の能力がある^{41, 42}。細菌により多量に産生される 1 次または 2 次アミン類とともに UC の管腔の低い pH コンディションは N-ニトロソ化合物の産生に促進的である⁴³。また、腸内細菌をリファマイシンなどの抗生剤により抑える事により、サイトカイン産生や NO 産生の減少により大腸炎モデルが改善する事から、大腸細菌叢が NO 代謝を介して腸炎の病態に大きい影響を与えている可能性も考えられた⁴⁴。また本研究に示したような大腸粘膜における著しい NO 産生の存在は、特に慢性的に炎症の存在する大腸において NO 依存性のニトロソ化合物および酸化化合物の寄与を通して、潰瘍性大腸炎における悪性変異化を促進する可能性があると思われた。

Peroxynitrite ion はスーパーオキシドと NO の速やかな反応により産生される反応性のある酸化物である^{5, 45}。Peroxynitrite は蛋白と反応してチロシンの水酸基のとなりの 3 位にニトロ基がつくことで安定した産生物である nitrotyrosine となる。二酸化窒素 (NO₂) のような他の NO 類による生体内でのチロシンのニトロ化は理論的には可能であるが実際には少ないも



第 10 図 UC の活動期炎症粘膜における nitrotyrosine の免疫組織化学。免疫反応の局在は nitrotyrosine に対する抗体を用いて、ラベルされた streptavidin-biotin 法にて検出した。生検標本は grade4 の活動性炎症を示す粘膜より得られた。Nitrotyrosine 免疫反応は大腸粘膜の粘膜固有層にて観察された (A) 1 次抗体を反応させないネガティブコントロール写真を示す (B) (拡大率 $\times 400$) (Kimura H et al : Gut 42 : 180-187, 1998 の第 6 図を許可を得て転載、改変)

糞小腸上皮細胞において、iNOS 活性および NOx 産生は増大することが示された^{28, 29)}。さらに、炎症性腸疾患患者の炎症性の大腸粘膜にて iNOS が誘導されうとの報告がみられる^{30, 31)}。これらの知見や今回の著者の潰瘍性大腸炎の高度の活動性炎症のみられる粘膜上皮で高率に iNOS 免疫反応が見られたことは、粘膜上皮が慢性炎症時に重要な NO 産生源となっていることを、および上皮での NO 産生が強く関わっていることを示唆している。尚、本研究において、腸炎患者からの活動性炎症粘

膜において iNOS 活性が酵素学的手法にて検出されたが、iNOS 免疫反応が観察されない場合がみられた。この食い違いの理由は不明であるが、iNOS に対する特異抗体での組織学的な検討はより感度が低いという可能性、および低い活性は非特異的なバックグラウンド染色との区別ができないことが考えられる。

炎症性腸疾患において過剰に産生された NO が如何にして組織傷害と関連するかという機序については不明な点が多い。炎症が生じている腸管の微小血管内皮では傷害により NO への反応性が変化しているという報告もみられる³²⁾。NO の過剰産生が炎症を促進することによる一つのメカニズムとしては、多核白血球と単球の遊走能を起こさせる能力が考えられる^{33, 34)}。NO が組織傷害と炎症を促進する他のメカニズムは、細胞内鉄の放出、ミトコンドリア機能の抑制そして DNA 合成の抑制に関係している³⁵⁻³⁷⁾。NO は酸素分子と速やかに反応し、さまざまな酸化及び窒素化合物を産生するという能力により間接的に組織傷害を起こしている可能性も考えられる⁶⁾。炎症性腸疾患の活動性粘膜では細胞上皮や細胞間領域の細胞骨格を構成するタンパク質に酸化ストレスやニトロ化が生じていると報告されている³⁸⁾。Weitzman ら³⁹⁾や Thomas ら⁴⁰⁾は白血球由来の oxidant が毒性を示さない濃度においても *in vitro* にて突然変異性があり、大腸における慢性炎症と悪性新生物発生に関係している可能性を指摘している。さらに、 N_2O_3 のような NO の自動的な酸化産物は *in vitro* においてニトロ化や変異性の能力がある^{41, 42)}。細菌により多量に産生される 1 次または 2 次アミン類とともに UC の管腔の低い pH コンディションは N-ニトロソ化合物の産生に促進的である⁴³⁾。また、腸内細菌をリファマイシンなどの抗生剤により抑える事により、サイトカイン産生や NO 産生の減少により大腸炎モデルが改善する事から、大腸細菌叢が NO 代謝を介して腸炎の病態に大きい影響を与えている可能性も考えられた⁴⁴⁾。また本研究に示したような大腸粘膜における著しい NO 産生の存在は、特に慢性的に炎症の存在する大腸において NO 依存性のニトロソ化合物および酸化化合物の寄与を通して、潰瘍性大腸炎における悪性変異化を促進する可能性があると思われた。

Peroxynitrite ion はスーパーオキシドと NO の速やかな反応により産生される反応性のある酸化物である^{5, 45)}。Peroxynitrite は蛋白と反応してチロシンの水酸基のとなりの 3 位にニトロ基がつくことで安定した産生物である nitrotyrosine となる。二酸化窒素 (NO_2) のような他の NO 類による生体内でのチロシンのニトロ化は理論的には可能であるが実際には少ないも

のである⁴⁶⁾。Peroxynitriteの免疫反応の著明な増大は急性のエンドトキセミアによるラットの大動脈と肺にて報告されている^{47, 48)}。Kooyら⁴⁹⁾は窒素由来酸化物はヒトでの急性肺傷害において産生されることを示し、peroxynitriteは炎症性肺疾患において重要な酸化物であるかもしれないと示唆している。実験的なモルモットの腸炎では、Millerら²³⁾は免疫組織化学的にnitrotyrosineとiNOSは同じ場所に局在しており、NO産生阻害はnitrotyrosine産生を防ぐということを示している。今回著者はnitrotyrosineに対する特異的な抗体を用いて、活動性UC患者の炎症粘膜の傷害においてperoxynitriteのようなNO由来の酸化物の影響を証明することにより、チロシンの窒素化が活動性UC患者の大腸粘膜においてin situに生じていることを示した。Nitrotyrosine染色の陽性率も疾患の活動性の増大とともに増加し、活動性UC患者の不可逆的な組織傷害に関係していると考えられた。しかしながら、nitrotyrosine染色は主に粘膜固有層にて観察された。これはNO自体がチロシンのニトロ化を起こすのではないので、貪食性白血球からのスーパーオキシドアニオンが簡単に到達し得ない粘膜上皮にては産生されにくいためと考えられた。

クローン病では、炎症粘膜において増大したiNOS活性を観察できた。UC患者におけるNOS活性が、活動性のCD患者の活性よりも2倍高いという以前の論文¹³⁾とは異なり、本研究では、CD患者での炎症粘膜におけるiNOS活性の上昇の程度は、活動性UC患者のそれと相違はなかった。一方で、CD患者の炎症粘膜でのcNOS活性は、UC患者においては見られないような著明な上昇を認めた。正確な原因は分からないが、この相違はおそらく炎症組織でのcNOS活性に影響を与えるような、貪食性の白血球ではない例えば内皮細胞などの違いによるものではないかと考えられる。さらに、CD患者の炎症の無いまたは「沈静化した」粘膜においても著明にiNOS活性が上昇し、炎症粘膜のiNOS活性とそれほど違いがない値を示したことは着目すべき点である。UCおよびCD患者の血漿IL-6の違いと同様に、酵素活性の違いはこれらの疾患の病態の重要な違いと関連しているかもしれない¹²⁾。CD非炎症粘膜におけるiNOS活性の上昇を説明するいくつかの可能性は存在する。一つの可能性は、正常粘膜に覆われながらもこのような場所では粘膜固有層へのマクロファージやリンパ球の集積を伴った早期の粘膜炎症性変化があるというものである⁵⁰⁾。もう一つの可能性として、沈静化した粘膜も異常な量の炎症性メディエーターを放出するように感作され

ている可能性があるということである。Wardkeらは¹⁷⁾大腸粘膜バイオブシーの培養にて、CD患者の一見正常な粘膜が正常人よりも多くのエイコサノイドを産生する事を発見した。炎症細胞の著明な反応能力の増大はBaldassano⁵¹⁾や著者らのグループ⁵²⁾によっても証明されている。第3の可能性は、CDにおけるiNOS活性の増加は炎症細胞からだけでなく、性質が変化した上皮細胞や腸管平滑筋、粘膜下ニューロンからの由来もあるということである⁵⁰⁾。

本研究の対象患者の多くが、炎症性メディエーターの放出を抑制するとされる副腎皮質ステロイドやサラゾピリンを投与されていたという点は考慮すべき点である。特に、副腎皮質ステロイドはiNOS活性の抑制剤として知られている。それゆえに、本検討結果がサイトカインを含めこれらの影響によりバイアスがかかったものであると想像はできる。しかしながら、血漿NOx濃度や粘膜NOS活性と患者群が服用している薬剤との間に(データは示してはいないが)何の関連性も見い出せなかった。さらには、そのような治療は炎症反応を最小化するものと期待されているもので、ステロイド治療は腸管粘膜固有層のマクロファージの数を直接増加させるという可能性は残るが、従って治療薬剤は著者が観察したNO産生増大の原因とはならないと考えられた。

以上のことよりiNOSを介するNO合成はUCおよびCD患者の炎症を起こしている大腸粘膜において有意に増加しているものと結論した。特にUC患者においては増加したiNOS活性は末梢血のNO濃度や大腸の炎症の程度に良く相関し、NOとくに大腸上皮のそれが病態の増悪と密接に関係する可能性が考えられた。一方、CD患者においてはcNOSを介したNO合成は炎症粘膜において上昇しており、炎症粘膜での炎症性細胞のみがNO産生の増加の原因ではないことを示すものと思われる。さらにiNOS活性の著明な上昇が非炎症部の粘膜においても観察された。このようなUCやCDにおけるNOの違いはこれらの疾患における特徴的な臨床像の違いと関連する可能性があると考えられた。

総 括

1. 腸粘膜におけるnitric oxideの産生増大は、炎症性腸疾患の増悪因子となっている可能性がある。本研究では、潰瘍性大腸炎患者およびCrohn病患者における血中のnitric oxideと大腸粘膜のNO合成酵素(nitric oxide synthase, NOS)活性を測定し、病変の活動性との関連性を検討した。さらに潰

瘍性大腸炎患者の大腸粘膜において、炎症の程度と誘導型 NOS (iNOS) 発現およびペルオキシナイトライト (peroxynitrite) 産生との関連につき組織学的に検討した。

2. 活動期の潰瘍性大腸炎患者および Crohn 病患者の血清中 NOx 濃度は著明に上昇し、患者大腸粘膜の NOS 活性と血清 NOx 濃度には正の相関が認められた。
3. 活動期潰瘍性大腸炎患者においては、iNOS 活性は病変部において著明に上昇がみられたが、非病変部の粘膜においてもわずかに上昇がみられた。この iNOS 活性の増加は内視鏡的及び組織学的な炎症の grading と相関していた。iNOS 免疫染色では粘膜固有層のみならず粘膜上皮にて強い発現を認めた。一方、構成型 NOS (cNOS) 活性の増大は潰瘍性大腸炎患者においては認められなかった。また、peroxynitrite の産生は活動性のある炎症粘膜の粘膜固有層にて観察された。
4. それに対して、Crohn 病患者では病変部のみならず非病変部の肉眼的に正常な粘膜においても iNOS 活性の著明な増大を認めた。さらに cNOS 活性に関しても病変部において上昇が認められた。
5. 以上の結果より、炎症性腸疾患患者の血中の NOx 濃度上昇は腸管の炎症を反映している可能性が考えられた。粘膜内で産生される iNOS 由来の nitric oxide およびその代謝産物は炎症性腸疾患の大腸粘膜における炎症と組織障害に密接に関係している可能性を明らかにした。しかし一方潰瘍性大腸炎と Crohn 病においては腸管病変における nitric oxide に両方で差異がみられる可能性があると考えられた。

稿を終えるに当たり、御指導・御校正を賜りました慶應義塾大学医学部内科学教室石井裕正教授に深謝いたします。また、直接御指導下さいました防衛医科大学校内科学第二講座三浦総一郎教授に感謝いたします。また、研究に御協力いただいた慶應義塾大学医学部消化器内科研究室内の諸先生方に感謝いたします。

文献

- 1) Moncada S, Higgs A : The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329 : 2002-2012, 1993
- 2) Nathan C : Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6 : 3051-3064, 1992
- 3) Stuehr DJ, Nathan CF : Nitric oxide : A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory in-

- hibition in tumor target cells. *J Exp Med* 169 : 1543-1555, 1989
- 4) Kurose I, Miura S, Fukumura D, Yonei Y, Saito H, Tada S, Suematsu M, Tsuchiya M : Nitric oxide mediates Kupffer cell-induced reduction of mitochondrial energization in hepatoma cells : A comparison with oxidative burst. *Cancer Res* 53 : 2676-2682, 1993
- 5) Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA : Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite : Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 : 1620-1625, 1990
- 6) Roediger WEW, Lawson MJ, Radcliffe BC : Nitrite from inflammatory cells : A cancer risk factor in ulcerative colitis? *Dis Colon Rectum* 33 : 1034-1036, 1990
- 7) Middleton SJ, Shorthouse M, Hunter JO : Increased nitric oxide synthesis in ulcerative colitis. *Lancet* 341 : 465-466, 1993
- 8) Miller MJS, Sadowska-Krowicka H, Chotinaruemol S, Kakkis JL, Clark DA : Amelioration of chronic ileitis by nitric oxide synthase inhibition. *J Pharmacol Exp Ther* 264 : 11-16, 1993
- 9) Yamada T, Sartor RB, Marshall S, Specian RD, Grisham MB : Mucosal injury and inflammation in a model of granulomatous colitis in rats. *Gastroenterology* 104 : 759-777, 1993
- 10) Boughton-Smith NK, Evans SM, Hawkey CJ, Cole AT, Balsitis M, Whittle BJR, Moncada S : Nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Lancet* 342 : 338-340, 1993
- 11) Grisham MB, Specian RD, Zimmerman TE : Effects of nitric oxide synthase inhibition on the pathophysiology observed in a model of chronic granulomatous colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 271 : 1114-1121, 1994
- 12) Kirsner JB, Shorter RG : *Inflammatory Bowel Disease*, ed 3. Philadelphia, Lea & Febiger, 1988
- 13) Rachmilewitz D, Stampler JS, Bachwich D, Karmeli F, Ackerman Z, Podolsky DK : Enhanced colonic nitric oxide generation and nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 36 : 718-723, 1995
- 14) Hibi T, Ohara M, Kobayashi K, Brown WR, Toda K, Takaishi H, Hosoda Y, Hayashi A, Iwao Y, Watanabe M, Aiso S, Kawai Y, Tsuchiya M : Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoprecipitation studies on anti-goblet cell antibody using a mucin producing cell line in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 35 : 224-230, 1994
- 15) Best WR, Becktel JM, Singleton JW, Kern F Jr : Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* 70 : 439-444, 1976
- 16) Rutegard L, Ahlgren L, Stenling R, Nilsson T : A sim-

- ple index for assessment of disease activity in patients with ulcerative colitis. *Hepatogastroenterology* 37 : 110-112, 1990
- 17) Wardle TD, Hall L, Turnberg LA : Use of coculture of colonic mucosal biopsies to investigate the release of eicosanoids by inflamed and uninflamed mucosa from patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 33 : 1644-1651, 1992
- 18) Granger DL, Hibbs JB Jr, Perfect JR, Durack DT : Metabolic fate of L-arginine in relation to microbistatic capacity of murine macrophages. *J Clin Invest* 85 : 264-273, 1990
- 19) Knowles RG, Merrett M, Salter M, Moncada S : Differential induction of brain, lung and liver nitric oxide synthase by endotoxin in the rat. *Biochem J* 270 : 833-836, 1990
- 20) Riley SA, Mani V, Goodman MJ, Herd ME, Dutt S, Turnberg LA : Comparison of delayed release 5 aminosalicylic acid (mesalazine) and sulphasalazine in the treatment of mild to moderate ulcerative colitis relapse. *Gut* 29 : 669-674, 1988
- 21) Kimura H, Miura S, Shigematsu T, Ohokubo N, Tsuzuki Y, Kurose I, Higuchi H, Akiba Y, Hokari R, Hirokawa M, Serizawa H, and Ishii H : Increased nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase activity in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis and Crohn's disease. *Dig Dis and Sci* 42 : 1047-1054, 1997
- 22) Kimura H, Hokari R, Miura S, Shigematsu T, Hirokawa M, Akiba Y, Kurose I, Higuchi H, Fujimori H, Tsuzuki Y, Serizawa H, Ishii H : Increased expression of an inducible isoform of nitric oxide synthase and the formation of peroxynitrite in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis. *Gut* 42 : 180-187, 1998
- 23) Miller MJS, Thompson JH, Zhang X-J, et al. role of inducible nitric oxide synthase expression and peroxynitrite formation in guinea pig ileitis. *Gastroenterology* 1995 : 109 : 1475-83.
- 24) Hokari R, Kato S, Matsuzaki K, Kuroki M, Iwai A, Kawaguchi A, Nagao S, Miyahara T, Itoh K, Sekizuka E, Nagata H, Ishii H, Miura S. Reduced sensitivity of inducible nitric oxide synthase-deficient mice to chronic colitis. *Free Radic Biol Med* 31 : 153-63, 2001
- 25) Krieglstein CF, Cerwinka WH, Laroux FS, Salter JW, Russell JM, Schuermann G, Grisham MB, Ross CR, Granger DN. Regulation of murine intestinal inflammation by reactive metabolites of oxygen and nitrogen : divergent roles of superoxide and nitric oxide. *J Exp Med* 194 : 1207-1218, 2001
- 26) Grisham MB, Miles AM, Owens M, Johnson GG : Molecular, biochemical and cellular characterization of the inducible nitrite oxide synthase in circulating vs. extravasated polymorphonuclear leukocytes (PMNs). *Gastroenterology* 106 : A693, 1994
- 27) Sartor RB : Cytokines in intestinal inflammation : Pathophysiological and clinical considerations. *Gastroenterology* 106 : 533-539, 1994
- 28) Tepperman BL, Brown JF, Whittle BJR : Nitric oxide synthase induction and intestinal epithelial cell viability in rats. *Am J Physiol* 265 : G214-G218, 1993
- 29) Dignass AU, Podolsky DK, Rachmilewitz D : NOx generation by cultured small intestinal epithelial cells. *Dig Dis Sci* 40 : 1859-1865, 1995
- 30) Reynolds PD, Middleton SJ, Hunter JO, Facer P, Bishop A, Evans T, Polak JM : High expression of iNOS in colonic mucosa in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 108 : A903, 1995
- 31) Singer II, Kawka DW, Scott S, Weidner JR, Mumford RA, Riehl TE, Stinson WF : Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 111 : 871-885, 1996
- 32) Hatoum OA, Binion DG, Otterson MF, Gutterman DD. Acquired microvascular dysfunction in inflammatory bowel disease : Loss of nitric oxide-mediated vasodilation. *Gastroenterology* 125 : 58-69, 2003
- 33) Belenky SN, Robbins RA, Rennard SI, Gossman GL, Nelson KJ, Rubinstein I : Inhibitors of nitric oxide synthase attenuate human neutrophil chemotaxis *in vitro*. *J Lab Clin Med* 122 : 388-394, 1993
- 34) Belenky SN, Robbins RA, Rubinstein I : Nitric oxide synthase inhibitors attenuate human monocyte chemotaxis *in vitro*. *J Leukoc Biol* 53 : 498-503, 1993
- 35) Granger DL, Taintor RR, Cook JL, Hibbs JB : Injury of neoplastic cells by murine macrophages leads to inhibition of mitochondrial respiration. *J Clin Invest* 65 : 357-370, 1980
- 36) Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z : Iron depletion : Possible cause of tumor cell cytotoxicity induced by activated macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 123 : 716-723, 1984
- 37) Kwon NS, Stuehr DJ, Nathan CF : Inhibition of tumor cell ribonucleotide reductase by macrophage-derived nitric oxide. *J Exp Med* 174 : 761-767, 1991
- 38) Keshavarzian A, Banan A, Farhadi A, Komanduri S, Mutlu E, Zhang Y, Fields JZ. Increases in free radicals and cytoskeletal protein oxidation and nitration in the colon of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 52 : 720-728, 2003
- 39) Weitzman SA, Gordon LI. Inflammation and cancer : role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis. *Blood* 76 : 655-63, 1990
- 40) Thomas EL, Jefferson MM, Bennett JJ, Learn DB : Mutagenic activity of chloramines. *Mutat Res* 188 : 35-43, 1987
- 41) Nguyen T, Brunson D, Crespi C : DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 : 3030-4, 1992
- 42) Grisham MB, Yamada T : Neutrophils, nitrogen oxide, and inflammatory bowel disease. *Ann NY*

- Acad Sci 664 : 103-10, 1992
- 43) Roediger WEW, Lawson MJ, Radcliffe BC : Nitrite from inflammatory cells : a cancer risk factor in ulcerative colitis? Dis Colon Rectum 33 : 1034-6, 1990
- 44) Stefano F, Eleonora D, Andrea M : Inhibition of intestinal bacterial translocation with rifazimin modulates lamina propria monocyte reactivity and protects against inflammation in a rodent model of colitis. Digestion 66 : 246-256, 2002
- 45) Huie RE, Padmaja S : The reaction of NO with superoxide. Free Radic Res Commun 18 : 195-9, 1993
- 46) Beckman JS, Crow JP : Pathological implications of nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite formation. Biochem Soc Trans 21 : 330-4, 1993
- 47) Szabo C, Salzman AL, Ichiropoulos H : Endotoxin triggers the expression of an inducible isoform of nitric oxide synthase and the formation of peroxynitrite in the rat aorta *in vivo*. 363 : 235-8, 1995
- 48) Witzemann TM, Gardner CR, Laskin JD : Production of nitric oxide and peroxynitrite in the lung during acute endotoxemia. J Leukoc Biol 56 : 159-68, 1994
- 49) Kooy NW, Royall JA, Ye YZ : Evidence for *in vivo* peroxynitrite production in human acute lung injury. Am J Respir Crit Care Med 151 : 1250-4, 1995
- 50) Sankey EA, Dhillon AP, Anthony A, Wakefield AJ, Sim R, More L, Hudson M, Sawyerr AM, Pounder RE : Early mucosal changes in Crohn's disease. Gut 34 : 375-381, 1993
- 51) Baldassano RN, Schreiber S, Johnston RB Jr, Fu RD, Muraki T, MacDermott RP : Crohn's disease monocytes are primed for accentuated release of toxic oxygen metabolites. Gastroenterology 105 : 60-66, 1993
- 52) Suematsu M, Suzuki M, Kitahara T, Miura S, Suzuki K, Hibi T, Watanabe M, Nagata H, Asakura H, Tsuchiya M : Increased respiratory burst of leukocytes in inflammatory bowel diseases --- The analysis of free radical generation by using chemiluminescence probe. J Clin Lab Immunol 24 : 125-128, 1987