

博士論文

間質性膀胱炎の病型分類及び病因に関する臨床病理学的検討

秋 山 佳 之

間質性膀胱炎の病型分類及び病因に関する臨床病理学的検討

東京大学大学院医学系研究科

医学博士課程

外科学専攻

指導教員 本間 之夫 教授

秋山 佳之

目次

要旨	7
第一章 序文	8
間質性膀胱炎の概要	8
間質性膀胱炎にみられる炎症の特性	11
本研究の目的	12
第二章 間質性膀胱炎組織における炎症及び上皮剥離に関する形態学的検討	16
本章の背景と目的	16
研究方法	16
1) 対象検体	16
2) 光学顕微鏡を用いた従来の検鏡による IC の病理組織学的評価	17
3) 免疫組織化学的染色	18
4) 免疫染色標本のデジタル化と画像解析ソフトウェアによる組織定量解析 ..	18
5) 臨床病理学的検討	19
6) 統計学的解析	19

結果.....	20
1) IC 症例の臨床因子.....	20
2) 従来 of 検鏡による解析結果～病型間における形態学的差異～	20
3) リンパ球・形質細胞浸潤及び上皮剥離の定量解析	21
4) 浸潤リンパ球・形質細胞数及び上皮残存割合と臨床因子との相関	22
考察.....	23
1) 各病型における形態学的特徴所見と病型間における疾患概念の差異	23
2) ハンナ型間質性膀胱炎における炎症特性と上皮剥離	23
第三章 間質性膀胱炎における肥満細胞浸潤の意義の検討	36
本章の背景と目的.....	36
研究方法	37
1) 対象検体.....	37
2) 免疫組織化学的染色	38
3) 背景炎症との相関に着目した肥満細胞浸潤の定量解析.....	38
4) 臨床病理学的検討	39
5) 統計学的解析	39

結果.....	40
1) IC 症例の臨床因子.....	40
2) 組織学的所見.....	40
3) 浸潤肥満細胞数の定量解析及びリンパ球・形質細胞数との相関.....	41
4) 浸潤肥満細胞数と臨床因子との相関.....	41
考察.....	42
第四章 ハンナ型間質性膀胱炎組織浸潤形質細胞の抗原受容体軽鎖制限解析.....	50
本章の背景と目的.....	50
研究方法.....	51
1) 対象検体.....	51
2) 免疫組織化学的染色.....	52
3) 定量的 κ/λ 軽鎖制限解析.....	52
結果.....	53
考察.....	53

第五章 ハンナ型間質性膀胱炎組織浸潤形質細胞の CXCR3 ケモカイン受容体発現	
に関する検討	58
本章の背景と目的.....	58
研究方法	60
1) 対象検体.....	60
2) 免疫組織化学的染色	60
3) CXCR3 受容体発現細胞数の定量解析及びリンパ球・形質細胞数、臨床因子	
との相関.....	61
4) 形質細胞における CXCR3 受容体発現の検討.....	62
5) 統計学的解析	63
結果.....	63
1) CXCR3 受容体発現細胞数とリンパ球・形質細胞数及び臨床因子との相関	63
2) 形質細胞における CXCR3 受容体発現解析.....	64
考察.....	65

第六章 ハンナ型間質性膀胱炎組織におけるサイトカイン発現プロファイリングと 菌叢探索.....	73
本章の背景と目的.....	73
研究方法	74
1) 対象検体.....	74
2) Quantitative real time RT-PCR	74
3) 統計学的解析	76
結果.....	76
1) ハンナ型間質性膀胱炎組織におけるサイトカイン発現特性	76
2) ハンナ型間質性膀胱炎組織における菌叢探索	77
考察.....	77
第七章 結論	82
謝辞	84
参考文献.....	85

要旨

間質性膀胱炎は病因が不明で、病型（ハンナ型と非ハンナ型）の差異も明瞭ではない。本研究では、ハンナ型は著明な炎症細胞浸潤と上皮剥離を伴う炎症性疾患で、非ハンナ型と病理学的に明らかに異なることを示した。炎症の特性として、肥満細胞浸潤は特異的ではないこと、浸潤細胞は B 細胞系優位であること、形質細胞にクローナル増殖が見られること、CXCR3 受容体の発現が増加していることを特定した。以上より、間質性膀胱炎の病型分類は病理組織所見でより正確になること、ハンナ型間質性膀胱炎の病因には特定の抗原に対する免疫学的反応が関与している可能性のあることを示した。更なる病因の解明には、B 細胞増殖性疾患との関連性の検討や、幅広い抗原の探索が必要である。

第一章 序文

間質性膀胱炎の概要

【定義】

間質性膀胱炎（interstitial cystitis：IC）とは、「膀胱痛、膀胱不快感、頻尿などの過知覚膀胱症状を呈し、膀胱内にハンナ病変（Hunner lesion）または拡張術後粘膜出血（Mucosal bleeding after distension: MBAD）を認める疾患」と定義される[1, 2]。

ハンナ病変とは、膀胱鏡における毛細血管の集簇を伴った特有の膀胱粘膜の発赤所見のことを指す(図 1)。MBAD（拡張術後粘膜出血）とは、膀胱を生理食塩水などで拡張した後に排水すると拡張前には異常のなかった粘膜から出血が生じる所見をいう(図 2)。また、過知覚膀胱症状がありながらハンナ病変も MBAD も見られない症例もあり、これを過知覚膀胱（Hypersensitive bladder: HSB）とする。従って、過知覚膀胱症状のみられる一群の患者は、類似の症状を呈する他の疾患を除外した後は、IC または HSB に、IC は更にハンナ型 IC（HIC）と非ハンナ型 IC（NHIC）に分類される[1](図 3)。

【症状】

症状は頻尿や膀胱痛などで過知覚膀胱症状と総称される。頻尿は1日で数十回、膀胱痛はほぼ常時感じられ、時に激的な痛みとなる。これらの症状は身体的苦痛だけではなく個人的生活や社会的生活に広く影響してうつ的気分障害を招き、患者の生活の

質を著しく低下させる。症状の程度や生活の質への影響は、非ハンナ型 IC や HSB に比してハンナ型 IC でより強い。

【疫学】

本邦における IC の患者数は 2015 年の日本間質性膀胱炎研究会の調査によると、約 4500 人（人口比 0.004%、ハンナ型 IC は 2000 人）である。しかしながら、全人口のおよそ 1.0% に膀胱痛の経験があるとされていることや、諸外国の罹患率（0.01%-2.3%）を考慮すると実際の患者数はこれよりも多いものと推測される[3]。

【病因】

IC の病因は解明されていない。提唱されている仮説として、1：尿路上皮機能不全、2：炎症、3：低酸素状態（血流異常）、4：神経原性炎症（興奮性の亢進）、5：アレルギー・自己免疫学的機序、6：微生物感染、7：膀胱以外の他臓器疾患の関連症状、といったものがあるが、いずれも病因として特定されるまでには至っていない[1, 4]。

【診断】

IC に関して、国際的に広く合意の得られている診断基準はない。わが国で用いるガイドライン[1]では、過知覚膀胱症状（膀胱痛、膀胱不快感、頻尿など）を認めた患者に対して、他の類似疾患の可能性を除外した上で膀胱鏡検査と膀胱水圧拡張術を行う。そこで膀胱内にハンナ病変を認めた場合は HIC、ハンナ病変を認めないが MBAD を

認められた場合は NHIC と診断する。ハンナ病変も拡張術後粘膜出血も共に認めない場合は HSB と診断する (図 1-3)。

【病理組織学的所見】

本邦の代表的な病理診断学書では、「フィブリンや壊死物でおおわれた粘膜潰瘍を認め、下層の粘膜固有層には浮腫や出血と肉芽組織の形成を認める。リンパ球様の単核球の浸潤を伴い、時に神経周囲に目立つことがある。肥満細胞が多くみられることがある。これらの組織学的所見は特異的なものではない」とされている[5]。即ち、潰瘍(膀胱上皮の剥離所見)や上皮下の単核球浸潤、肥満細胞浸潤などの特徴を呈するが、特異的な所見はないとされている。これは諸外国においても同様で、病理所見は IC の診断基準にも取り入れられていない[6-8]。

【治療】

病因が解明されていないため根本的な治療法はなく、治療は主に過知覚膀胱症状への対症療法が中心となる。本邦において現在 IC に対して用いられている治療には、保存的療法(行動療法、食事療法、理学療法)、薬物療法(抗ヒスタミン薬、抗うつ薬、免疫抑制剤など)、膀胱内注入療法(dimethyl sulfoxide、ヘパリン、リドカイン、ステロイド、ボツリヌス毒素など)、外科療法(膀胱水圧拡張術、ハンナ病変焼灼術、膀胱摘出術)などがある。過活動膀胱に対して有効な薬剤(抗コリン薬や $\beta 3$ アドレナリン受容体作動薬)は、IC の過知覚膀胱症状には無効である。

患者の症状の程度や生活の質の改善・維持に主眼を置き、これらの治療方法を個々の症例に応じて複数組み合わせることが多い。

【指定難病】

ICの一部（HICのうち症状が重症のもの）は2015年に厚生労働省指定難病となった。HICでみられる、病態が不明、症例数が限定的、症状がより重症、特徴的な内視鏡的所見、などの特徴が指定の理由であろう。本研究でもHICを主な研究対象とした。

間質性膀胱炎にみられる炎症の特性

上述のようにICの病理組織所見は「非特異的慢性炎症所見」と理解されているが、その炎症の特性については不明な点が多い。

古くより肥満細胞の浸潤がICに特異的所見とされてきた[9-20]。欧州のICガイドラインでは、固有筋層内への肥満細胞浸潤をICに特徴的な所見とし、個数に関する基準（28個/mm²以上）も設けている[9]。しかし、ICにおける肥満細胞浸潤の特異性に関しては懐疑的な報告も散見されており、現在まで結論には至っていない[21-23]。その一方で、肥満細胞以外の炎症性細胞の特性についての研究は乏しい。

ICの膀胱組織を用いた遺伝子発現解析では、炎症性サイトカイン（IL-6、IL-10、IL-17A）やケモカイン（CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCR3）のmRNAの発現が

HICにおいて上昇していることが報告されている[10, 24, 25]。CXCR3 受容体とそのリガンド (CXCL9、CXCL10、CXCL11) や IL-17A は他の自己免疫性慢性炎症性疾患においても発現上昇が示唆されており[26, 27]、HIC との関連性について免疫組織化学的方法など、蛋白発現解析レベルでのより詳細な検討が必要であろう。

本研究の目的

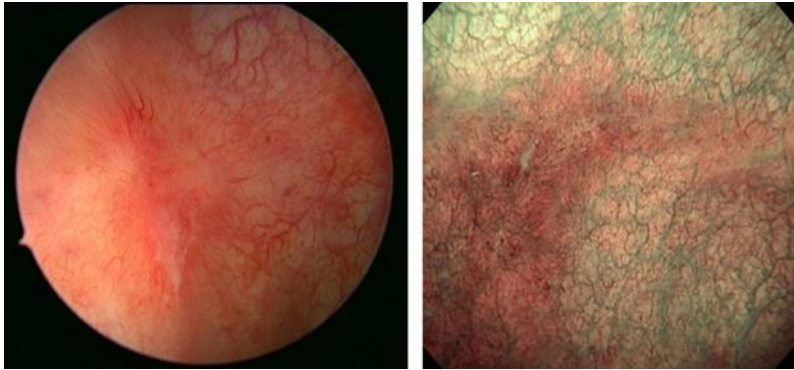
IC は膀胱の疼痛を伴う指定難病であり、その病因の解明が待たれている。しかし、膀胱の炎症は非特異的な慢性炎症とされるに留まりそれ以上の検討は不十分で、唯一特徴的とされる肥満細胞の浸潤さえも一定の見解が得られていない。

この現状の理由として、IC の患者数が限られていることに加え、これまでの研究がハンナ型 IC (HIC) と非ハンナ型 IC (NHIC) の区別を明確にしておらず、また近年の実験的手法を十分に活用していないことなどが挙げられる。これに対し、東京大学附属病院では、HIC と NHIC の鑑別が確実な 300 例以上という国際的にも多数の IC 症例が登録されており、最新の画像解析ソフトウェアや遺伝学的解析が可能な状況にある。

そこで本研究では、IC の膀胱組織について、より近代的な実験手法を用いて、IC の病型分類及び病因に関する病理学的な検討を行った。具体的には、一般的な病理所見に加えて、肥満細胞を含む炎症細胞に対する最新の画像解析ソフトウェアや特異性

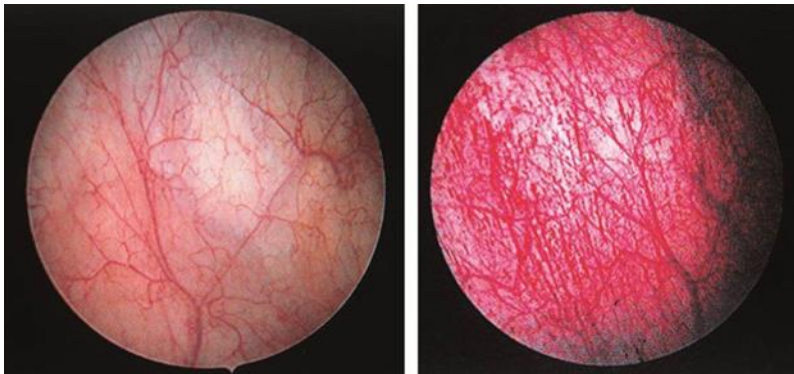
の高い抗体を用いた詳細かつ定量的な分析を行った。更にケモカイン受容体の発現を定量分析し、慢性炎症性疾患とひとくくりにされている IC の炎症の特性を明らかとし炎症の病因を解明することを試みた。

図1 ハンナ病変



(左) 正常の構造を欠く毛細血管の異常集簇像と発赤した粘膜
(右) 同部位の (Narrow Band Imaging) N B I 所見。毛細血管の異常集簇像がより鮮明になる。

図2 拡張術後粘膜出血 (M B A D)



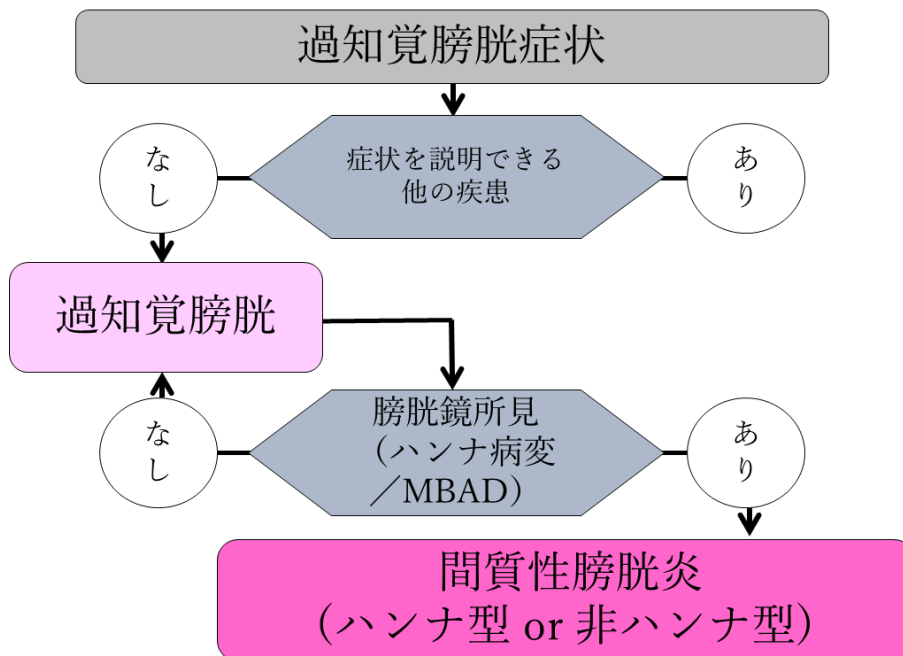
(左) 正常様膀胱粘膜
(右) 拡張術後の「五月雨状様の粘膜出血」

図3 間質性膀胱炎関連病態の分類と診断フローチャート
(A)

間質性膀胱炎関連病態の分類			
診断名	診断基準		
	症状*	類似疾患の否定	膀胱鏡所見
間質性膀胱炎 (ハンナ型)	必要	必要	ハンナ病変
間質性膀胱炎 (非ハンナ型)			拡張後膀胱出血
過知覚膀胱			上記所見なし 不明(未施行)

* 過知覚膀胱症状(膀胱痛、膀胱不快感、頻尿など)
IJU 21 (Suppl 1), 43-47, 2014

(B)



第二章 間質性膀胱炎組織における炎症及び上皮剥離に関する形態学的検討

第二章～第五章の各研究は、東京大学大学院医学系研究科・医学部倫理委員会の承認を得て施行した（承認番号 3124 及び 2381）。

本章の背景と目的

第一章で述べたように、一般的に IC の病理像は原則として非特異的な慢性炎症性変化と考えられ、その特性に関して広く合意の得られた見解は得られていない。しかしながら、これまでの多くの IC 組織研究は、病型（HIC と NHIC）の区別を明確にせず、両者を混在させたまま評価をしているものが多く、また、HIC におけるハンナ病変部と、背景組織（非ハンナ病変部）の違いについても十分な組織学的検討がなされて来なかった。本章では“HIC と NHIC”、“ハンナ病変部と背景”、といった対照とすべき区別を明確にし、さらに革新的画像解析ソフトウェアを応用して組織網羅的かつ定量的手法により IC の病理組織学的所見の詳細な再検討を行った。

研究方法

1) 対象検体

臨床的に間質性膀胱炎と診断された HIC 27 症例、NHIC 39 症例から得られた膀胱生検 93 検体を用いた。HIC は各症例につきハンナ病変部（Hunner-lesion : HL）、非ハンナ病変部（non-lesion area : NL）から各々1 検体、合計 2 検体を採取し解析対象

とした。間質性膀胱炎の診断は文献[1]に基づいて行った。検体採取時年齢、麻酔下最大膀胱容量、発症年齢、性別、症状スコア（O’Leary and Sant’s problem and symptom index）、1日排尿回数を臨床情報として記録した。

また、過去に東京大学医学部附属病院で採取された膀胱生検検体で、組織学的に慢性膀胱炎所見を呈する標本のうち、HICと同程度の炎症所見を呈する26症例（26検体）を東京大学医学部附属病院病理診断部のアーカイブより抽出し、対照群とした（非IC慢性膀胱炎群、“non-IC cystitis”）。対照26症例の内訳は、非特異的慢性膀胱炎：7症例、非浸潤性膀胱癌：19症例（非癌部）であり、平均年齢72.7歳、男女比は男性15症例、女性11症例であった。

2) 光学顕微鏡を用いた従来の検鏡によるICの病理組織学的評価

10%ホルマリン固定後にパラフィン包埋された対象検体のブロックから4 μ mの厚さの切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン（H-E）染色及び後に述べる免疫組織染色に用いた。

IC（HIC及びNHIC）のH-E染色標本を用いて従来の検鏡方法により図4に掲げる項目について組織学的検討を行った。

3) 免疫組織化学的染色

未染プレパラートを、自動免疫染色機 (Ventana Benchmark[®] XT autostainer, Ventana Medical Systems Inc., Tuscon, AZ, USA)を用いて脱パラフィン、抗原賦活化、下記抗体を用いた一次抗体反応、二次抗体反応、DAB 発色及びマイヤーのヘマトキシリンによる核の対比染色までの一連の工程を行った (Procedure: XT IVIEW DAB v3)。抗原賦活化は同自動免疫染色機専用の CC1 溶液 (pH 8.0) の中で 95°C、60 分間行った。一次抗体との反応時間は 32 分間、二次抗体との反応時間は 8 分間とした。

その後は、同自動染色機専用の I-VIEW DAB ユニバーサルキットを用いて DAB 発色 (LSAB 法) までを行った。リンパ球・形質細胞、尿路上皮の同定には T リンパ球：抗 CD3 抗体 (1:50, Clone LN10, Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK)、B リンパ球：抗 CD20 抗体 (1:100, Clone L26, Dako, Glostrup, Denmark)、形質細胞：抗 CD138 抗体 (prediluted, Clone B-A38, Nichirei Bioscience, Tokyo, Japan)、尿路上皮：抗 cytokeratin 抗体 (1:100, Clone AE1/AE3, Dako, Glostrup, Denmark)を 1 次抗体として使用した。

4) 免疫染色標本のデジタル化と画像解析ソフトウェアによる組織定量解析

免疫染色されたスライドを、NanoZoomer Digital Pathology system (浜松ホトニクス株式会社、日本)を用いてデジタル化した後、画像解析ソフトウェア (Tissue Studio

® ver. 3.5, Definiens AG, Munich, Germany) による上皮全エリアにおける免疫染色陽性細胞及び残存尿路上皮の同定、網羅的計測を行った (図 5)。標本サイズによる影響を補正するため、単位面積当たりの CD3、CD20、CD138 陽性細胞数 (cells/mm²) 及び cytokeratin AE1/AE3 陽性上皮の残存割合 (epithelial/specimen ratio, %) を算出し、最終的な比較検討に用いた。表 1 に今回の解析において設定した Tissue Studio® の設定項目・内容を表示した。炎症細胞浸潤は、リンパ球・形質細胞浸潤総数 (CD3、CD20、CD138 陽性細胞数の総和) で評価した。

5) 臨床病理学的検討

上皮残存割合、CD3、CD20、CD138 陽性細胞数と臨床情報 (検体採取時年齢、麻酔下最大膀胱容量、発症時年齢、性別、症状スコア (O'Leary and Sant's problem and symptom index)、1 日排尿回数) との相関を解析した。

6) 統計学的解析

連続変数には Wilcoxon rank-sum test を、離散変数に対しては Fisher の正確検定または χ^2 検定を用いて検定した。連続変数間の相関関係はスピアマンの順位相関係数を算出して解析した。p<0.05 を統計学的に有意とした。

結果

1) IC 症例の臨床因子

IC 症例の臨床因子を表 2 にまとめた。HIC 群は NHIC 群と比較して、発症時年齢、生検時年齢ともに高く（それぞれ、 $p = 0.0020$ 、 $p = 0.0054$ ）、また麻酔下最大膀胱容量が小さかった（ $p = 0.0064$ ）。しかし、症状スコア、1 日排尿回数は両群で有意差を認めなかった。

2) 従来 of 検鏡による解析結果～病型間における形態学的差異～

検鏡による IC 標本の炎症、上皮剥離の評価結果を表 3 にまとめた。多くの HIC 標本で、炎症性変化と上皮剥離を認めたのに対し、殆どの NHIC 標本では炎症性変化を認めず、上皮も保たれ豊富に残存していた。炎症性変化を認めたすべての標本において、浸潤している炎症細胞は主としてリンパ球と形質細胞から構成されており、顆粒球（好酸球と好中球）は圧倒的少数であった。従って、炎症細胞浸潤は殆どリンパ球・形質細胞浸潤で代替評価可能であると判断した。

HIC 標本では、ハンナ病変部、非ハンナ病変部で同様の炎症性変化を認めた。上皮剥離はハンナ病変の方が有意に高度であった（ $p = 0.001$ ）。HIC、NHIC の代表的な組織像を図 6 に示した。

以上、HIC では形態学的慢性炎症像及び尿路上皮剥離を認める一方で、NHIC では殆ど炎症性変化を認めず、尿路上皮も比較的保たれており、両病型の形態学的特徴は対照的な差異を呈することが示唆された。そこで、この両病型間における差異を客観的に立証するべく、次節では革新的な画像解析ソフトウェアを用いて組織標本の定量的解析を試みた。

3) リンパ球・形質細胞浸潤及び上皮剥離の定量解析

解析結果を図 7 に示した。

リンパ球・形質細胞数は HIC のハンナ病変部、非ハンナ病変部ともに NHIC よりも有意に多かったが ($p < 0.0001$)、非 IC 慢性膀胱炎群とは同程度であった。ハンナ病変部は、非ハンナ病変部よりも炎症細胞浸潤が強い傾向ではあったが、その差は統計学的に有意なものではなかった ($p = 0.0687$) (図 7A)。全リンパ球・形質細胞数に占める形質細胞数の割合は、HIC (ハンナ病変、非ハンナ病変) で他の 2 群よりも有意に高かった (図 7B)。

炎症細胞数の評価では、検鏡による結果と画像解析ソフトウェアによる定量解析結果は非常に強く相関していた (スピアマンの順位相関係数 $\rho = 0.853$, $p < 0.0001$) (図 8、表 4)。特に、検鏡で炎症を認めた (Grade 1 以上) 標本の全てが定量解析においてリンパ球・形質細胞数が 200 個/ mm^2 以上であったことから定量解析における炎症

のカットオフ値をリンパ球・形質細胞数 ≥ 200 個/mm²とすると、HICの92.6%(50/54)に炎症を認め、NHICの92.3%(36/39)で炎症を認めない結果となった。すなわち、定量解析を用いてリンパ球・形質細胞数を評価した場合、200個/mm²に閾値を設定すると、極めて正確にICの病型分類が可能となりうることが示唆された。

上皮剥離の定量解析では、HIC群（ハンナ病変、非ハンナ病変）では有意に他の2群よりも上皮残存割合が減少していた（ $p < 0.0001$ ）。HICでは、ハンナ病変は、非ハンナ病変よりも上皮剥離傾向が強かったが、統計学的有意差は認めなかった（ $p = 0.0572$ ）（図7C）。

4) 浸潤リンパ球・形質細胞数及び上皮残存割合と臨床因子との相関

HIC全54標本において、炎症細胞数と上皮残存割合には有意な相関関係を認めなかった（スピアマンの順位相関係数 $\rho = 0.085$, $p = 0.5394$ ）（図9）。

上皮残存割合、Tリンパ球（CD3）、Bリンパ球（CD20）、形質細胞（CD138）、炎症細胞数（CD3+CD20+CD138）と、臨床因子（検体採取時年齢、麻酔下最大膀胱容量、発症時年齢、性別、症状スコア（O’Leary and Sant’s problem and symptom index）、1日排尿回数）の間にはいずれも有意な相関関係は認められなかった（data not shown）。

考察

1) 各病型における形態学的特徴所見と病型間における疾患概念の差異 (図 10)

本研究では、IC の病理組織の詳細な検討により、HIC:上皮剥離を伴う炎症性疾患、NHIC:非炎症性疾患(形態学的に特記すべき所見を欠き、尿路上皮も保たれている)と明確な差異があることを定量解析によって客観的に明示した。さらに、HIC では、特徴的な「病変部」とされてきたハンナ病変部のみならず、肉眼的には正常様に見える非ハンナ病変部においても同程度の炎症細胞浸潤、上皮剥離が認められることを明らかにした。HIC では、膀胱全体にびまん性の炎症細胞浸潤 (pancystitis)、上皮剥離といった変化が起きていることが示唆された。今後 HIC の病態解明研究をさらに進める上で、「膀胱全体で惹起されている炎症反応」との概念を明確に持つことが肝要と思われた。

2) ハンナ型間質性膀胱炎における炎症特性と上皮剥離 (図 11)

HIC が NHIC とは明確に異なる炎症性疾患であることが明らかとなった。HIC の炎症特性として特筆すべきは、B 細胞系の浸潤が目立つことである。特に、同程度の炎症を呈した非 IC 慢性膀胱炎群と比較して有意に形質細胞浸潤が際立っていたが(図 7B)、この形質細胞の特性に関しては、第四、五章でさらに詳細に検討する。

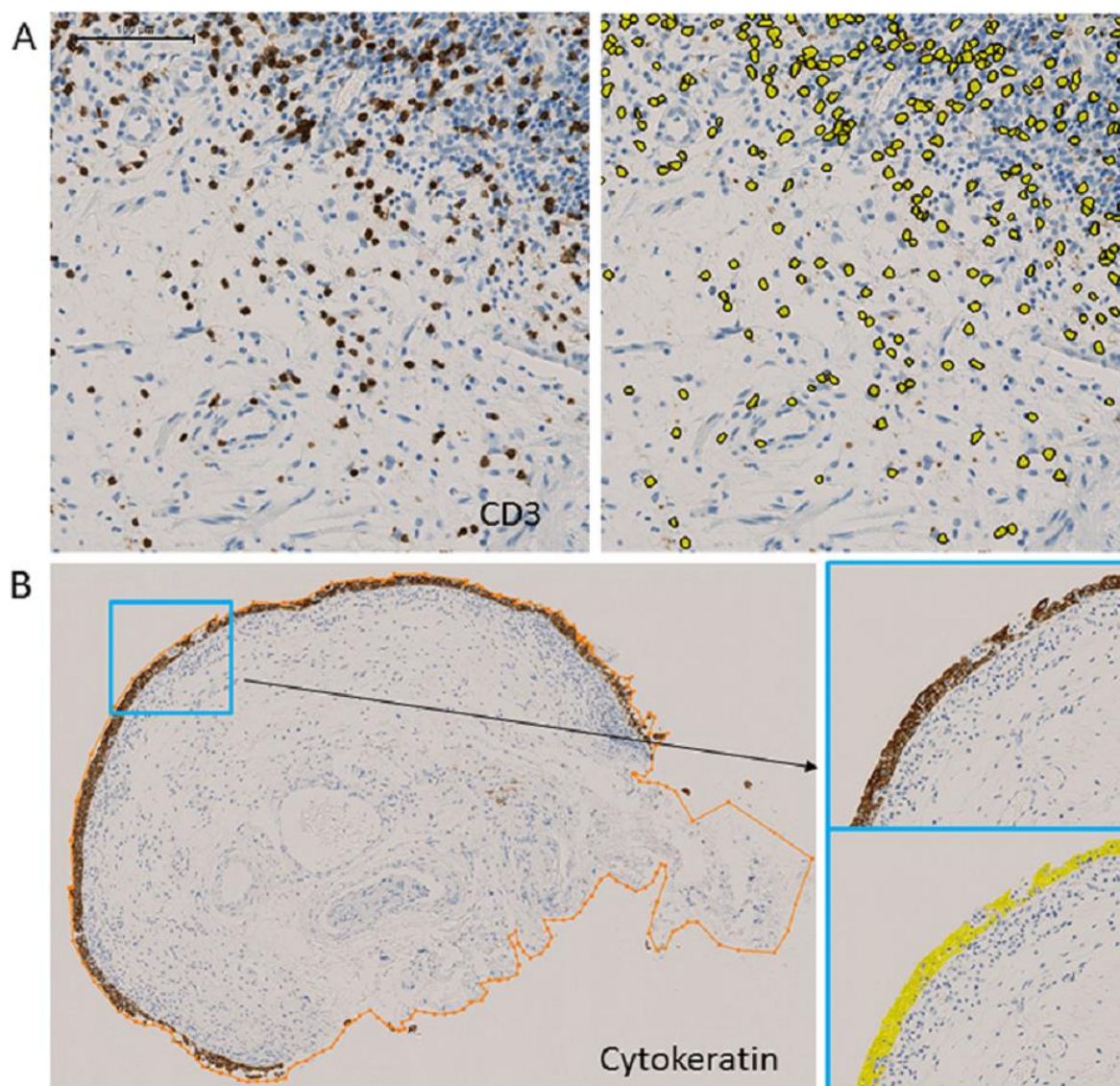
HIC と同程度の炎症を呈した非 IC 慢性膀胱炎群では上皮が全群中最も多く残存していたこと、HIC において上皮残存割合と炎症細胞数が相関を示さなかったことから、HIC における上皮剥離は、直下の炎症の影響による 2 次的なものではなく、1 次的な特異所見であると推測される。上皮下の著明な炎症細胞浸潤との関連性の有無も含め、特徴的上皮剥離の原因探索は HIC の病態解明における今後の主要な研究課題である。

図4 検鏡による組織検討の際の評価項目

検鏡による組織検討の際の評価項目

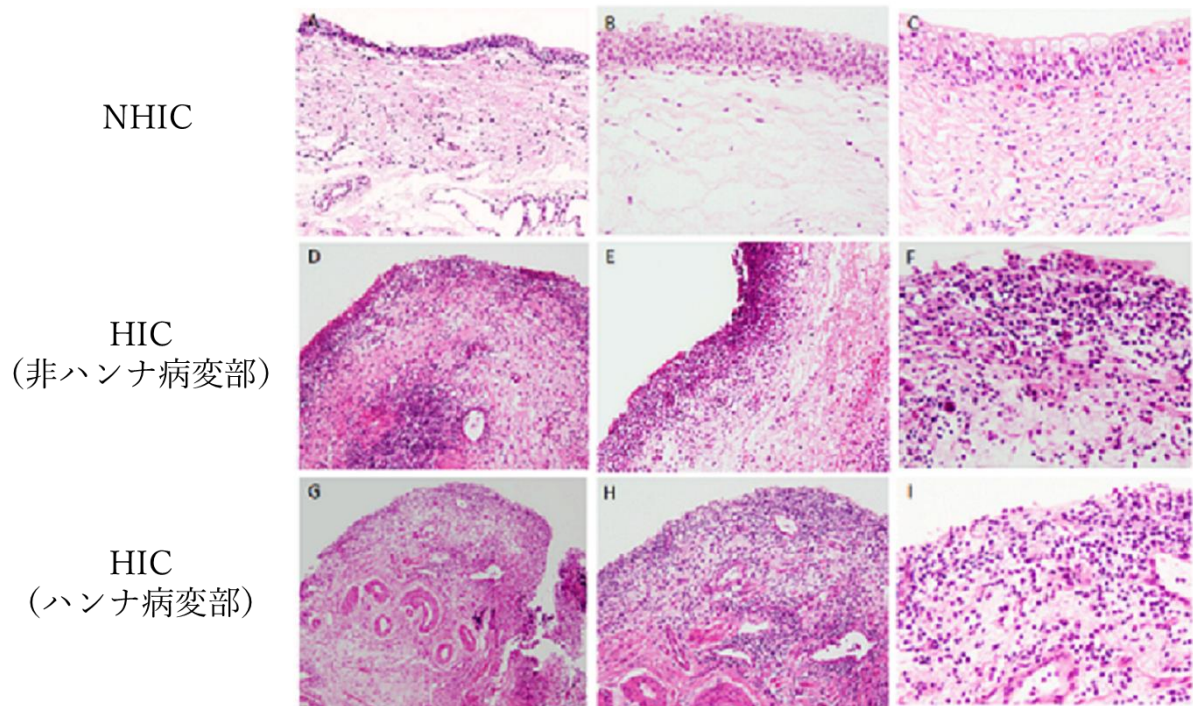
- **上皮下の炎症 (Subepithelial inflammation)**
 - Grade 0 : 正常 (None or subtle)
 - Grade 1 : 軽度 (Mild)
 - Grade 2 : 中等度～高度 (Moderate to Severe)
 - ※ predominant component of infiltrating inflammatory cells (lymphoplasmacytic infiltration/granulocytic infiltration)
- **リンパ濾胞 (Lymph follicle)** : あり/なし (present or absent)
- **”Plasma cell-rich area”** : あり/なし (present or absent)
 - ※ 対物20倍で形質細胞が全炎症細胞の3分の1以上を占めるエリア
- **好酸球、好中球浸潤 (Eosinophil, neutrophil)** : あり/なし (present or absent)
- **残存上皮 (Full-thickness epithelium)** : あり/なし (present or absent)
- **上皮剥離の程度 (degree of epithelial denudation/loss)**
 - Grade 0 : なし～3分の1以下の厚さの剥離
 - Grade 1 : 3分の1～3分の2の剥離
 - Grade 2 : 3分の2以上の剥離

図5 画像解析ソフトウェアによる浸潤細胞及び尿路上皮面積の定量解析



(A) CD3 陽性細胞の定量解析。(左) CD3 免疫染色陽性細胞 (右) 画像解析ソフトによる CD3 陽性細胞の同定及び細胞数の計測
(B) 上皮残存割合の測定。(左) 標本面積の測定 (オレンジ円) (右) (上) Cytokeratin AE1/AE3 陽性尿路上皮 (下) 画像解析ソフトによる Cytokeratin AE1/AE3 陽性エリアの同定及び面積の測定

図6 代表的な NHIC、HIC（非ハンナ病変部）、HIC（ハンナ病変部）の組織像

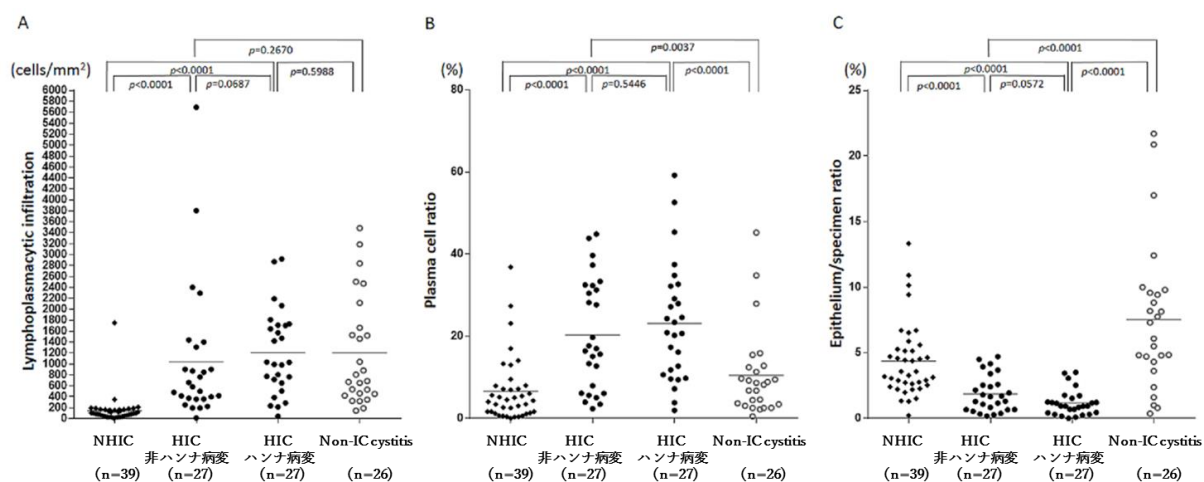


(A-C) NHIC の染色像。炎症細胞浸潤を殆ど認めず、尿路上皮も厚く保たれている。

(D-F) HIC 非ハンナ病変部の染色像。(D) リンパ球集簇像を伴う著明な炎症細胞浸潤。(E) 上皮下の顕著な炎症細胞浸潤 (F) 上皮の剥離と、リンパ球・形質細胞が殆どを占める炎症細胞浸潤

(G-I) HIC ハンナ病変部の染色像。(G,H) 上皮下の著明な炎症細胞浸潤と、剥離した尿路上皮 (I) 形質細胞優位の炎症細胞浸潤

図7 画像解析ソフトウェアによる炎症細胞浸潤と上皮残存割合の解析

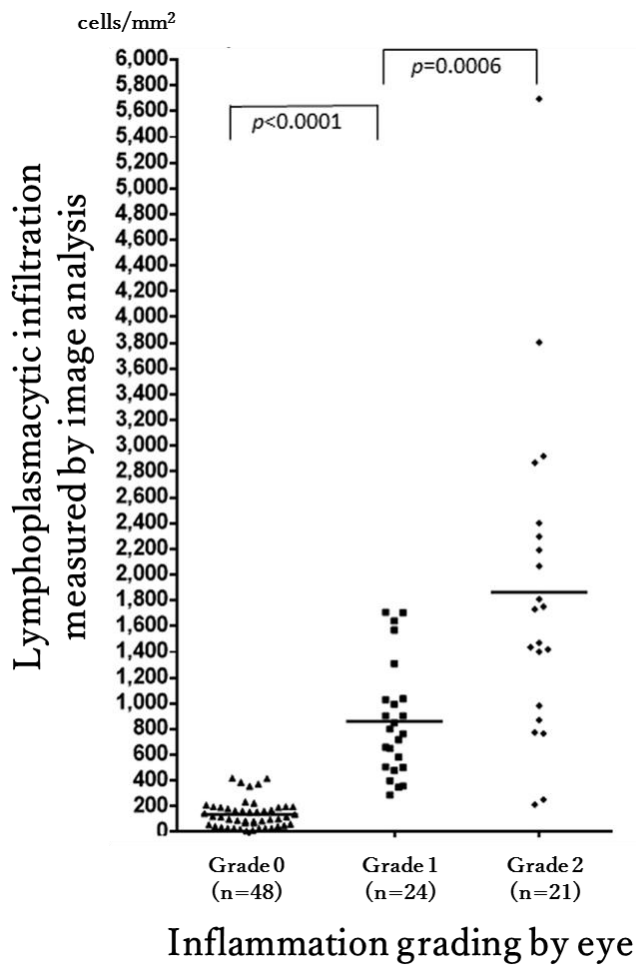


(A) リンパ球・形質細胞数の比較。HIC では NHIC よりも有意な炎症細胞浸潤を認める。非 IC 慢性膀胱炎群は、HIC と同程度の炎症細胞浸潤を認める。

(B) 各群における全リンパ球・形質細胞数における形質細胞数の割合。HIC (ハンナ病変、非ハンナ病変) では、形質細胞の割合が他の 2 群よりも有意に高いことが分かる。

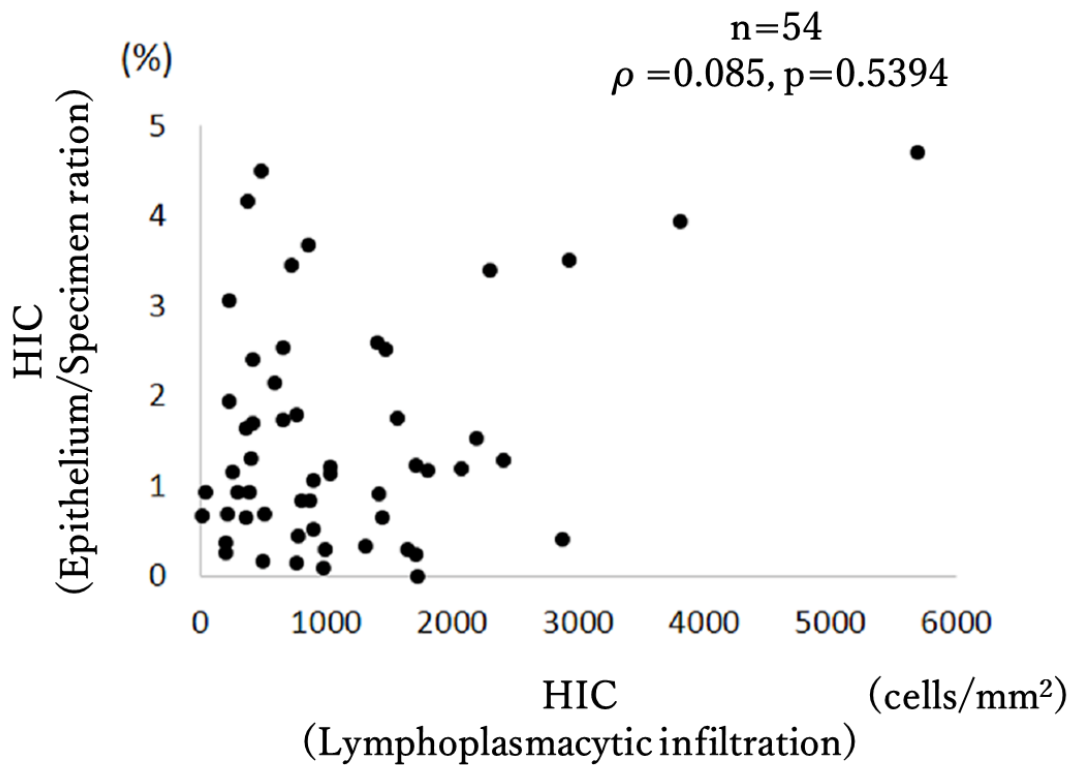
(C) 上皮残存割合。HIC (ハンナ病変部、非ハンナ病変部) では、NHIC、非 IC 慢性膀胱炎群よりも有意に上皮残存割合が低かった。

図8 検鏡による炎症評価と画像解析ソフトウェアによる炎症細胞数との相関 (IC 検体)



・両者には非常に強い相関関係（スピアマンの順位相関係数 $\rho = 0.853$, $p < 0.0001$ ）を認めた。

図9 HIC 標本におけるリンパ球・形質細胞数と上皮残存割合の相関



・炎症細胞浸潤（リンパ球・形質細胞数）と上皮残存割合には有意な相関関係を認めなかった。上皮剥離が、上皮下の炎症による 2 次的なものではない可能性を示唆する。

図 10 病型間における疾患概念の差異

- HIC
 - Inflammatory disorder
 - Epithelial denudation
 - Pancystitis

- NHIC
 - Non-inflammatory disease

図 11 HIC の病態

- HICの病態
 - 1) B細胞系優位の炎症細胞浸潤
 - 2) 特異的な上皮剥離

表 1 Tissue Studio®の設定項目と内容

Marker	Mode	IHC-threshold	Size selection	Filter
CD3	Manual ROI-nuclei	0.3	25 μ mm ²	Area<20 μ mm ² Length/Width>3
CD20	Manual ROI-nuclei	0.3	25 μ mm ²	Area<20 μ mm ² Length/Width>3
CD138	Manual ROI-nuclei	0.5	101 μ mm ²	Area<30 μ mm ² Length/Width>3
Cytokertin AE1/3	Manual ROI-marker area	0.4		

表 2 IC 症例の臨床因子

Clinical feature	NHIC	HIC	<i>P</i> value
Sex			0.0776
Male	12	3	
Female	27	24	
Age at the time of biopsy (years)			0.0054
≤40	11	2	
41–60	7	1	
≥61	21	24	
Age at the onset of disease (years)			0.0020
≤40	12	2	
41–60	13	5	
≥61	14	20	
OSSI			0.9376
0–7	3	5	
8–14	25	11	
≥15	11	10	
OSPI			0.5734
0–7	7	4	
8–14	24	15	
≥15	8	7	
Frequency of urination (/day)			0.4894
0–10	13	5	
11–20	19	17	
≥21	7	4	
Maximum bladder capacity (mL)			0.0064
≤400	3	8	
401–800	29	17	
>800	7	1	

HIC: Hunner-type IC, NHIC: non-Hunner-type IC, OSPI: O’Leary and Sant’s problem index, OSSI: O’Leary and Sant’s symptom index.

表3 検鏡によるIC標本の炎症及び上皮剥離の評価

Pathological feature	NHIC <i>n</i> = 39	HIC-NL <i>n</i> = 27	HIC-HL <i>n</i> = 27	<i>P</i> value
Subepithelial inflammation				NHIC vs HIC-NL: <0.0001 NHIC vs HIC-HL: <0.0001 HIC-NL vs HIC-HL: 0.0975
Grade 0	37	8	3	
Grade 1	1	11	12	
Grade 2	1	8	12	
Lymphoid aggregate/follicle				NHIC vs HIC-NL: 0.0025 NHIC vs HIC-HL: <0.0001 HIC-NL vs HIC-HL: 0.0542
Absent	38	19	11	
Present	1	8	16	
Plasma cell-rich area				NHIC vs HIC-NL: 0.0003 NHIC vs HIC-HL: <0.0001 HIC-NL vs HIC-HL: 0.7822
Absent	38	17	15	
Present	1	10	12	
Neutrophilic infiltration				NHIC vs HIC-NL: 0.0064 NHIC vs HIC-HL: <0.0001 HIC-NL vs HIC-HL: 0.2542
Absent	38	20	15	
Present	1	7	12	
Eosinophilic infiltration				NHIC vs HIC-NL: 0.0064 NHIC vs HIC-HL: <0.0001 HIC-NL vs HIC-HL: 0.1480
Absent	37	12	6	
Present	2	15	21	
Full-thickness epithelium				NHIC vs HIC-NL: <0.0001 NHIC vs HIC-HL: <0.0001 HIC-NL vs HIC-HL: 0.4142
Present	38	16	12	
Absent	1	11	15	
Epithelial denudation/loss				NHIC vs HIC-NL: <0.0001 NHIC vs HIC-HL: <0.0001 HIC-NL vs HIC-HL: 0.0010
Grade 0	33	15	5	
Grade 1	5	7	6	
Grade 2	1	5	16	

HL : Hunner lesion (ハンナ病変部)、 NL : non-lesion (非ハンナ病変部)

表4 検鏡法と定量解析法の結果の相関

		Lymphoplasmacytic infiltration measured by image analysis (cells/mm ²)					
		<200		200-1000		>1000	
		NHIC	HIC	NHIC	HIC	NHIC	HIC
Inflammation grading by eye	Grade 0 (normal)	36	4	1	7	0	0
	Grade 1 (mild)	0	0	1	16	0	7
	Grade 2 (moderate to severe)	0	0	0	6	1	14

NHIC: non-Hunner-type IC, HIC: Hunner-type IC

・NHICでは、39検体中36検体がリンパ球・形質細胞の定量解析で200個/mm²以下であった。

・HICでは、54検体中50検体がリンパ球・形質細胞の定量解析で200個/mm²以上であった。

第三章 間質性膀胱炎における肥満細胞浸潤の意義の検討

本章の背景と目的

先述したように、ICにおける肥満細胞浸潤の特異性に関しては肯定的/否定的見解ともに存在し、一定の結論には至っていない。このような一貫性のない見解を生み出している要因として、先述した不明瞭な病型分類に加えて、肥満細胞同定手法が標準化されていなかったことも考えられる。時代の変遷とともに、肥満細胞の染色方法は、ギムザ染色、PAS染色、トルイジンブルー染色、c-kit免疫染色、マストセルトリプターゼ免疫染色と移り変わってきたが、各染色法間には肥満細胞同定精度に誤差がある[11, 18]。中でも、2000年代以降に急速に普及してきたマストセルトリプターゼ抗体はヒト肥満細胞に対する特異的抗体であり、ヒト肥満細胞を高精度で同定可能である[11]。興味深いことに、ICにおける肥満細胞の特異性に関する懐疑的な報告はこのマストセルトリプターゼ抗体を用いて2000年代以降になされている[21, 22]。

本章では過去の研究方法を改良してICにおける肥満細胞浸潤を再検討することを目的とした。具体的には、肥満細胞同定にマストセルトリプターゼ抗体を用い、HICとNHICの病型を明白に区別した。HICとNHICを独立したコホートとし、個々に対応した別個の対照群（HIC：非IC慢性炎症、NHIC：正常膀胱）を設定した上、組織網羅的かつ定量的解析手法を用いて、ICにおける肥満細胞浸潤の意義を詳細に評価した。

研究方法

1) 対象検体

臨床的に間質性膀胱炎と診断された HIC 31 症例、NHIC 38 症例から得られた膀胱生検 100 検体を用いた。HIC は各症例につきハンナ病変部 (Hunner-lesion)、非ハンナ病変部 (non-lesion area) から各々1 検体、合計 2 検体を採取した。間質性膀胱炎の診断は文献[1]に基づいて行った。IC 症例の性別、検体採取時年齢、発症時年齢、病歴期間、症状スコア (O’Leary and Sant’s problem and symptom index、visual analogue scale for pain)、1 日排尿回数、平均 1 回排尿量、最大 1 回排尿量、麻酔下最大膀胱容量を臨床情報として記録した。

また、過去に東京大学医学部附属病院で採取された膀胱生検検体で、慢性膀胱炎と病理診断された症例のうち、IC ではなく、かつ HIC と同程度の炎症所見を呈する 19 症例 (19 検体) を東京大学医学部附属病院病理診断部のアーカイブより抽出し、非 IC 慢性膀胱炎群 (“non-IC cystitis”) とした。19 症例の内訳は、非特異的慢性膀胱炎 7 症例、非浸潤性膀胱癌 (非癌部) 12 症例であり、平均年齢 72.5 歳、男女比は男性 11 症例、女性 8 症例であった。さらに、形態学的に異常所見を呈しない膀胱生検 18 症例 (18 検体) を同様に抽出し、正常膀胱群 (“normal bladder”) とした。18 症例の内訳は、非浸潤性膀胱癌 (非癌部) : 16 症例、内反性乳頭腫 : 1 症例、膀胱平滑筋腫 : 1 症例であり、平均年齢 64.3 歳、男性 13 症例、女性 5 症例であった。いずれの症例に

においても病変部以外の正常粘膜から採取され、組織学的に悪性病変や炎症細胞浸潤などの形態学的所見を呈さない検体を解析対象とした。前章で述べたように、これらの非 IC 対照群は、HIC v.s 非 IC 慢性膀胱炎、NHIC v.s 正常膀胱、の対比の意図のもとに設定したものである。

2) 免疫組織化学的染色

第二章「研究方法；免疫組織化学的染色」で述べた方法と同様に Benchmark[®] XT を使用して免疫組織化学的染色を行った (Procedure: XT IVIEW DAB v3)。T リンパ球、B リンパ球、形質細胞の同定には、同一の CD3、CD20、CD138 抗体を同条件で用いた。肥満細胞の同定には、抗ヒトマストセルトリプターゼ抗体 (1:4000, Clone L26, Dako, Glostrup, Denmark) を 1 次抗体として使用した。

3) 背景炎症との相関に着目した肥満細胞浸潤の定量解析

第二章「研究方法；免疫染色標本のデジタル化と画像解析ソフトウェアによる定量解析」で記載した方法と同様の手法により免疫染色標本のデジタル化を行い、Tissue Studio[®]を用いてリンパ球・形質細胞及び肥満細胞浸潤の定量解析を行った。Tissue Studio[®]による CD3、CD20、CD138 陽性細胞の同定は表 1 に記載したものと同様の設定で施行した。マストセルトリプターゼ陽性細胞同定のための設定は、Mode:

Manual ROI-nuclei、IHC-threshold: 0.8、Size selection: $72 \mu \text{mm}^2$ 、Filter: Area < $15 \mu \text{mm}^2$ または Length/Width > 3、とした。HIC では、ハンナ病変部、非ハンナ病変部の各検体のうち、肥満細胞数のより多い一方の検体を解析対象とした。他の 3 群はそれぞれ 1 症例 1 検体を解析した。肥満細胞数は、「上皮全エリア」及び「平滑筋層内のみ」をそれぞれ別個に解析・評価した。背景の炎症と、肥満細胞浸潤との相関を検討するため、炎症細胞浸潤（リンパ球・形質細胞数：CD3、CD20、CD138 陽性細胞数の総和）と肥満細胞数との相関関係を解析した。

4) 臨床病理学的検討

肥満細胞数と臨床因子（性別、検体採取時年齢、発症時年齢、病歴期間、症状スコア（O'Leary and Sant's problem and symptom index、visual analogue scale for pain）、1 日排尿回数、平均 1 回排尿量、最大 1 回排尿量、麻酔下最大膀胱容量）との相関を解析した。

5) 統計学的解析

連続変数に対しては、2 群間：Wilcoxon rank-sum test、多群間：Steel-Dwass test を、離散変数に対しては Fisher の正確検定または χ^2 検定を用いて検定した。連続変

数間の相関関係はスピアマンの順位相関係数を算出して解析した。p<0.05 を統計学的に有意とした。

結果

1) IC 症例の臨床因子

結果を表 5 にまとめた。NHIC では、HIC と比較して年齢、発症年齢が有意に若く、また、麻酔下最大膀胱容量が大きかった (p<0.01)。IC 群 (HIC+NHIC) は有意に非 IC 群 (non-IC cystitis + normal bladder) よりも女性の占める割合が高かった (p<0.001)。

2) 組織学的所見

組織学的検討では、第二章の結果と同様に HIC、非 IC 慢性膀胱炎群において著明なリンパ球・形質細胞浸潤を認める一方で、NHIC、正常膀胱群では殆ど炎症細胞浸潤を認めなかった。肥満細胞浸潤は、NHIC 及び正常膀胱群よりも HIC 及び非 IC 慢性膀胱炎群に多く認められたが、HIC と非 IC 慢性膀胱炎群との間、NHIC と正常膀胱群との間の差はいずれも検鏡上は明白ではなかった(図 12)。平滑筋を含む検体は、HIC17 症例、非 IC 慢性膀胱炎 13 症例、NHIC20 症例、正常膀胱群 13 症例に含まれ

ていた。4群全てにおいて、筋層内には殆ど炎症細胞を認めなかった。検鏡上、筋層における肥満細胞浸潤は4群間で明確な差を認めなかった。

3) 浸潤肥満細胞数の定量解析及びリンパ球・形質細胞数との相関

浸潤細胞の定量解析結果を図13に示した。リンパ球・形質細胞数は、HICと非IC慢性膀胱炎との間、NHICと正常膀胱との間でそれぞれ同等であった(図13A)。上皮全エリアにおける肥満細胞数は、リンパ球・形質細胞数の結果と同様、HICと非IC慢性膀胱炎との間、NHICと正常膀胱との間でそれぞれ有意な差を認めなかった(図13B)。筋層内の肥満細胞数は、4群間全てで有意差を認めなかった(図13C)。

上皮下におけるリンパ球・形質細胞数と肥満細胞数は有意に相関していた(スピアマンの順位相関係数 $\rho = 0.46$, $p < 0.001$) (図14)。

4) 浸潤肥満細胞数と臨床因子との相関

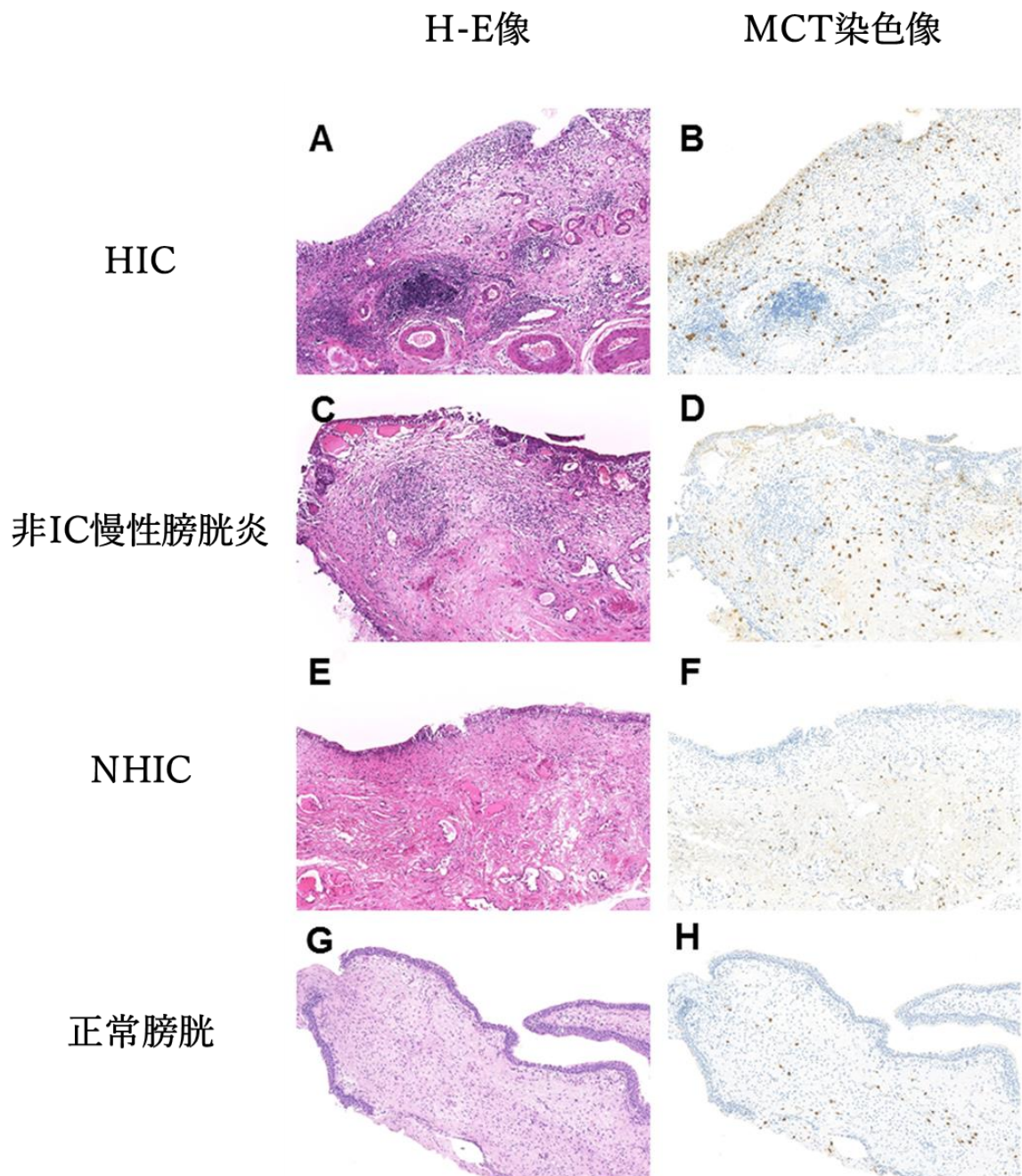
肥満細胞数と臨床情報(性別、検体採取時年齢、発症時年齢、病歴期間、症状スコア(O'Leary and Sant's problem and symptom index、visual analogue scale for pain)、1日排尿回数、平均1回排尿量、最大1回排尿量、麻酔下最大膀胱容量)との間にはいずれにも有意な相関関係を見出すことは出来なかった(表6)。

考察

ICにおける肥満細胞浸潤の意義に関しては、特異的であるとの報告がある一方で、懐疑的な報告もあり、これまでも多くの議論が交わされてきた [10-23]。ICにおける肥満細胞浸潤に関する過去の研究結果に矛盾が生じてきた原因として、1) 肥満細胞同定に用いた手法が統一されていなかったこと [28] : c-kit 免疫染色、エステラーゼ染色、トルイジンブルー染色、PAS 染色、ギムザ染色など、2) 肥満細胞浸潤の最も強い部位など、標本中の部分的な箇所 (殆どが 1-2mm² 以下) のみしか解析されていないものが多いこと [29]、3) 対照群の構成が統一されていないこと ; HIC と NHIC を単一のコホートに混在させ、両者を明確に区別していない、4) 肥満細胞浸潤に影響を及ぼす可能性のある背景の炎症に対する考慮がなされていなかったこと、などを考えた。そこで、今回われわれは、1) 2000 年以降に普及が拡大してきたヒト肥満細胞特異的マストセルトリプターゼ抗体を用い、2) 画像解析ソフトを使用して上皮下または平滑筋の全エリアを解析対象とし、3) HIC と NHIC を明確に区別し、独立したコホートとして解析し、4) HIC、NHIC の背景炎症の評価を行い、炎症の程度を基準として各々に対応する非 IC 対照群を設定すること、により IC における肥満細胞浸潤の意義に関してより詳細な検証を行った。その結果、肥満細胞浸潤は、HIC と非 IC 慢性膀胱炎の間、NHIC と正常膀胱の間、に有意差はなく肥満細胞浸潤は IC に特異的なものではないという結論に至った。さらに、リンパ球・形質細胞数と肥満細胞

数が強い相関関係を示したことから、肥満細胞が背景炎症にある程度影響されて浸潤していることを初めて示唆する所見を明示した。本研究結果からは、肥満細胞浸潤の IC の病態生理への関与に関しては今後更なる検討が必要であるものの、少なくとも診断的意義は低いものと考えられた。

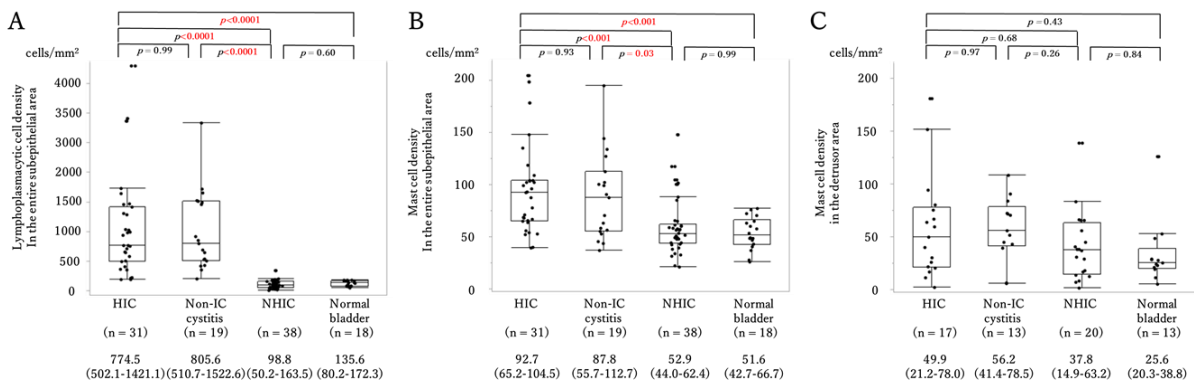
図 12 代表的な組織像



MCT；マストセルトリプターゼ

炎症細胞浸潤、肥満細胞浸潤ともに HIC 及び非 IC 慢性膀胱炎で優位に認める一方、NHIC、正常膀胱では乏しい所見である。

図 13 リンパ球・形質細胞及び肥満細胞浸潤の定量解析結果



(A) リンパ球・形質細胞数の比較

HIC と non-IC cystitis、NHIC と normal bladder では同程度のリンパ球・形質細胞浸潤を認めた。

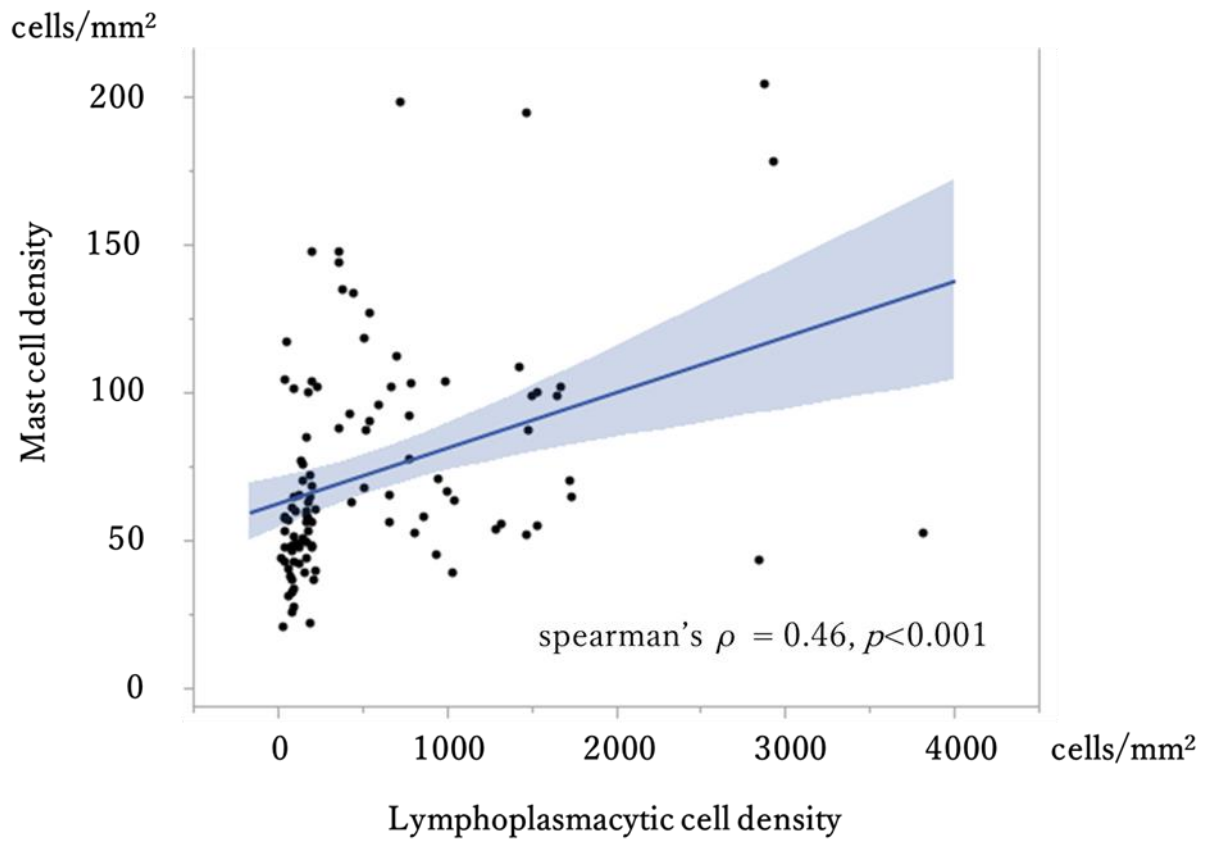
(B) 上皮全体下の肥満細胞数

リンパ球・形質細胞数と同様、HIC と non-IC cystitis、NHIC と normal bladder で同程度であった。

(C) 筋層内の肥満細胞数

4 群間のいずれにも有意な差を認めなかった。

図 14 リンパ球・形質細胞数と肥満細胞数との相関



上皮下におけるリンパ球・形質細胞数と肥満細胞数は有意に相関していた（スピアマンの順位相関係数 $\rho = 0.46, p < 0.001$ ）。

表 5 IC 症例の臨床因子

	HIC †	NHIC	P value
No. (male / female)	31 (3 / 28)	38 (11 / 27)	0.07
Mean age at the time of biopsy (years)	68.5 ± 11.1 [38 - 88] ¶	55.8 ± 17.8 [20 - 83]	<0.01*
Age at onset of IC (years)	65.3 ± 10.3 [38 - 80]	52.6 ± 17.6 [15 - 81]	<0.01*
Years from symptom onset to biopsy (years)	3.3 ± 2.6 [0 - 11]	3.3 ± 3.7 [0 - 15]	0.50
OSSI ‡	13.2 ± 4.0 [7 - 20]	12.0 ± 3.6 [3 - 20]	0.30
OSPI ‡	11.6 ± 3.6 [3 - 16]	10.8 ± 3.8 [1 - 16]	0.42
VAS ‡	6.7 ± 2.4 [1 - 10]	6.0 ± 2.9 [0 - 10]	0.46
Urinary frequency (/day)	16.3 ± 5.4 [7 - 30]	15.6 ± 7.4 [4 - 42]	0.36
Average voided volume (mL)	109.8 ± 41.7 [40 - 220]	125.4 ± 81.1 [30 - 400]	0.92
Maximum voided volume (mL)	168.0 ± 58.6 [50 - 300]	219.3 ± 112.9 [50 - 500]	0.08
Maximum bladder capacity at hydrodistension (mL)	526.7 ± 180.4 [200 - 900]	698.7 ± 181.0 [400 - 1200]	<0.001*

† HIC: Hunner type interstitial cystitis, NHIC: Non-Hunner type interstitial cystitis

‡ OSSI/OSPI: O'Leary and Sant's symptom index/O'Leary and Sant's problem index, VAS: Visual analogue scale (for pain)

¶ mean ± SD [range]

* $p < 0.05$, statistically significant difference by Wilcoxon rank-sum test

表 6 肥満細胞浸潤と臨床因子との相関

	Mast cell density			
	HIC †		NHIC	
	Submucosa (n = 31)	Detrusor (n = 17)	Submucosa (n = 38)	Detrusor (n = 20)
Age (years)	$\rho = -0.30,$ ($P = 0.10$) ‡	$\rho = 0.25,$ ($P = 0.34$)	$\rho = 0.19,$ ($P = 0.25$)	$\rho = 0.33,$ ($P = 0.15$)
Years from onset to biopsy (years)	$\rho = 0.14,$ ($P = 0.45$)	$\rho = 0.59,$ ($P = 0.10$)	$\rho = -0.06,$ ($P = 0.73$)	$\rho = -0.29,$ ($P = 0.22$)
OSSI †	$\rho = -0.19,$ ($P = 0.31$)	$\rho = 0.01,$ ($P = 0.99$)	$\rho = -0.05,$ ($P = 0.78$)	$\rho = -0.14,$ ($P = 0.56$)
OSPI †	$\rho = 0.06,$ ($P = 0.77$)	$\rho = 0.07,$ ($P = 0.77$)	$\rho = 0.02,$ ($P = 0.88$)	$\rho = -0.04,$ ($P = 0.88$)
VAS †	$\rho = -0.33,$ ($P = 0.07$)	$\rho = 0.15,$ ($P = 0.57$)	$\rho = -0.35,$ ($P = 0.04$)	$\rho = -0.55,$ ($P = 0.20$)
Urinary frequency	$\rho = -0.12,$	$\rho = -0.05,$	$\rho = -0.02,$	$\rho = -0.14,$

	($P = 0.54$)	($P = 0.86$)	($P = 0.89$)	($P = 0.55$)
Average voided volume (mL)	$\rho = 0.03,$ ($P = 0.88$)	$\rho = 0.22,$ ($P = 0.42$)	$\rho = 0.21,$ ($P = 0.20$)	$\rho = 0.41,$ ($P = 0.07$)
Maximum voided volume (mL)	$\rho = -0.06,$ ($P = 0.76$)	$\rho = -0.02,$ ($P = 0.95$)	$\rho = 0.13,$ ($P = 0.44$)	$\rho = 0.51,$ ($P = 0.02$)
Maximum bladder capacity at hydrodistension (mL)	$\rho = -0.05,$ ($P = 0.80$)	$\rho = 0.16,$ ($P = 0.55$)	$\rho = 0.27,$ ($P = 0.10$)	$\rho = 0.34,$ ($P = 0.14$)

HIC: Hunner type IC, NHIC: Non-Hunner type IC, OSSI/OSPI: O’Leary and Sant’s symptom index/ O’Leary and Sant’s problem index, VAS: Visual analogue scale (for pain)

‡ Spearman’s correlation coefficient ρ and P -value (in parentheses)

第四章 ハンナ型間質性膀胱炎組織浸潤形質細胞の抗原受容体軽鎖制限解析

本章の背景と目的

形質細胞の抗原受容体軽鎖制限とその臨床的意義

形質細胞とは、Bリンパ球が抗体分泌のために分化した細胞であり、その表面にB細胞と同様に抗原受容体（抗体）を発現している。1つの抗原受容体分子は、2本の同一の重鎖（H鎖）と、2本の同一の軽鎖（L鎖）を含む4本のポリペプチドから構成されている。それぞれの鎖は、抗原結合部位を含み、多様性に富むVドメイン（可変領域）と、全てのクローンで比較的保持されている、機能の保持・発揮に必要なCドメイン（定常領域）から構成される。重鎖は、Cドメインの違いによって、 μ 鎖、 δ 鎖、 γ 鎖、 ε 鎖、 α 鎖と呼ばれる5つの型（クラス）に分けられる。それぞれに異なる物理学的、生物学的特性及びエフェクター機能をもち、液性免疫応答の間にクラススイッチを起こす。同様に、Cドメインにおいて異なる κ 鎖、 λ 鎖と呼ばれる2つの型の軽鎖がある。それぞれのB細胞は κ 鎖か λ 鎖を発現するが、両方共には発現せず、またB細胞クローンの一生を通じて固定されたままである[30]。通常の状態では、 κ 鎖クローンと λ 鎖クローンは4:1以内に数的分布するとされる。多発性骨髄腫や形質細胞腫、形質細胞への分化傾向を示すB細胞性腫瘍といったB細胞（Bリンパ球と形質細胞）がモノクローナルに増殖する疾患では、この軽鎖発現のバランスが崩れる。 κ 鎖/ λ 鎖の比率が、5.5以上若しくは0.7以下に偏った場合を軽鎖制限と呼び、

B 細胞のクローナル増殖を示唆する所見として広く血液腫瘍などの診断に応用されている[31]。ここでは、B 細胞のクローン性増殖を起こす血液腫瘍以外の疾患を特筆しておかねばならない。関節リウマチや、シェーグレン症候群、IgG4 関連硬化性胆管炎などの慢性自己免疫性疾患や、ピロリ菌感染、Epstein-Barr ウイルス感染などのある種の微生物感染においても B 細胞のクローナル増殖が起きていることが報告されている[32-37]。第二章において、HIC では B 細胞系優位のリンパ球浸潤が起きていることを明らかにした。そこで、浸潤している B 細胞のクローナリティを探索する目的で本章では HIC 組織に浸潤している形質細胞の κ/λ 軽鎖制限解析を行った。

研究方法

1) 対象検体

第二章（間質性膀胱炎組織における炎症及び上皮剥離に関する形態学的検討）で用いた検体を利用した。炎症所見の乏しい NHIC を除いた、HIC 27 症例 54 検体（ハンナ病変部、非ハンナ病変部より各 1 検体）、非 IC 慢性膀胱炎 26 症例 26 検体を解析対象とした。

2) 免疫組織化学的染色

形質細胞の κ/λ 鎖に対する *in situ hybridization* (ISH) を Benchmark[®] XT (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) を使用して、脱パラフィン、酵素処理、hybridization、1次抗体反応、2次抗体反応、DAB発色及びマイヤーのヘマトキシリンによる核対比染色まで施行した (Procedure: XT INFORM Probes UV DAB v3 SP)。酵素処理は、付属のプロテアーゼ 3 試薬を用いて、37°Cで4分間反応させた。その後、FITC 標識された Kappa 及び Lambda プローブ (INFORM Kappa/Lambda Probe, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) を用いて室温で4分間、85°Cで12分間、47°Cで4分間、室温で1時間、の順に hybridization した。その後1次抗体として抗 FITC 抗体 (1:8000, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA) を用いて室温で20分間反応させた後、2次抗体と8分間反応させ、付属の ultra View DAB ユニバーサルキットを用いて DAB 発色を行い、マイヤーのヘマトキシリンを用いて核の対比染色を行った。

3) 定量的 κ/λ 軽鎖制限解析

第二章「研究方法」に記載した方法と同様の方法を用いて免疫染色標本のデジタル化に引き続く Tissue Studio[®]を用いての κ/λ -ISH 陽性細胞数の網羅的定量計測を行った。Tissue Studio[®]による κ/λ -ISH 陽性細胞同定の設定は、Mode: Manual ROI-

nuclei、IHC-threshold: 0.5、Size selection: $101 \mu \text{mm}^2$ 、Filter: Area < $30 \mu \text{mm}^2$ または Length/Width > 3、とした。軽鎖制限の判定基準は過去の文献の中から厳格なものを採用し、 $\kappa:\lambda$ 比率 > 5.5 以上または 0.7 以下とした[7]。 κ/λ -ISH 陽性細胞数が 50 個以下の検体や、非特異的にバックグラウンドが染色された検体は解析対象から除外した。

結果

解析可能であった症例は HIC26 症例 (46 検体)、非 IC 慢性膀胱炎 23 症例 (23 検体) であった。HIC 26 症例中、8 症例 (31%) 9 検体で軽鎖制限を認めた。8 症例中 5 症例は κ 鎖優位であった。軽鎖制限はハンナ病変部のみにとどまらず、非ハンナ病変部においても認められた (ハンナ病変 3 検体、非ハンナ病変 6 検体) (表 7)。 κ 鎖優位の軽鎖制限を示す代表的な HIC の組織像を図 15 に示した。一方、非 IC 慢性膀胱炎 23 症例全てにおいて、軽鎖制限は認められなかった。

考察

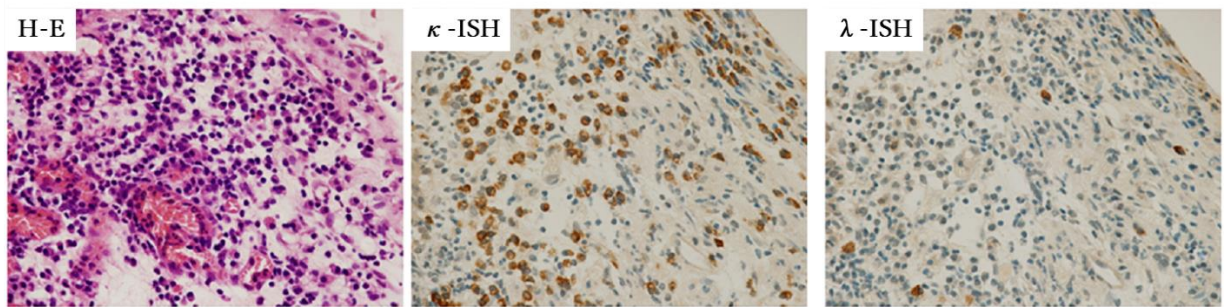
先述したように、軽鎖制限は、形質細胞のクローナル増殖を示唆する所見である。過去にも、IC 症例において著明な形質細胞浸潤や B 細胞関連遺伝子の発現上昇が報告されているが[8, 38-41]、B 細胞のクローナリティを検討した研究は例を見ない。

今回、われわれは HIC の約 30%の症例で形質細胞の軽鎖制限を認めることを突き止めた。つまり、HIC 症例では、頻繁に膀胱組織において形質細胞のクローナル増殖が起きていることが示唆される。この事実からは HIC の病因として、超早期の mucosa-associated lymphoid tissue(MALT) lymphoma など B 細胞増殖性疾患との相同性を第一に想定する。しかし、これまでに HIC と MALT lymphoma との明らかな臨床的相関を示唆する報告はなく、自験例でも HIC が MALT lymphoma に進展したという事例の経験はない。この点に関する検証には、トランスクリプトーム解析やエクソーム解析による HIC 浸潤 B 細胞の腫瘍原性遺伝子変異、融合などの探索が今後必要であろう。

病態として次に考えられるものは、膀胱局所において特定の免疫応答により B 細胞クローンの選択と増殖がおきている状態である。B 細胞のクローン増殖が自己免疫性慢性炎症性疾患において頻繁に認められることは広く知られている [32]。シェーグレン症候群における B 細胞のモノクローナル増殖と、引き続く MALT lymphoma への進展は良く知られた事実である [33]。他にも、関節リウマチ患者の滑膜組織や、IgG4 関連硬化性胆管炎などの自己免疫性慢性炎症性疾患においても B 細胞のクローナル増殖が報告されている [34-36]。自己免疫関連疾患以外にも、ピロリ菌感染や Epstein-Barr ウイルス感染などの微生物感染も B 細胞のクローナル増殖を引き起こす [37]。

以上より、HIC の病態として、1) primary な B 細胞増殖性疾患、2) 自己免疫学的機序や、微生物感染などにより膀胱局所での特定の免疫応答が惹起されている状態、を想定した。次章では、2) に焦点を当て、形質細胞のケモカインレセプター発現特性について研究した結果を述べる。

図 15 κ 鎖優位の軽鎖制限を示す代表的な HIC の組織像



(左) 上皮下の形質細胞優位の炎症細胞浸潤像 (H-E 染色)

(中) 形質細胞の殆どが κ -ISH 陽性である。

(右) 左の連続切片では、 λ -ISH は殆ど陰性であり、この症例では κ 鎖優位の軽鎖制限を認めた。

表7 HIC 症例における軽鎖制限解析の結果

Case No.	HIC	
	NL	HL
1	$+(\kappa)$	-
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	-	NE
7	-	-
8	-	-
9	-	-
10	-	-
11	-	NE
12	$+(\kappa)$	-
13	$+(\lambda)$	-
14	-	$+(\kappa)$
15	-	NE
16	-	-
17	-	$+(\kappa)$
18	$+(\lambda)$	$+(\lambda)$
19	NE	-
20	-	-
21	$+(\lambda)$	NE
22	-	-
23	$+(\kappa)$	-
24	-	NE
25	NE	NE
26	-	-
27	-	-

HL：ハンナ病変部、NL：非ハンナ病変部

NE：解析対象除外症例

第五章 ハンナ型間質性膀胱炎組織浸潤形質細胞の CXCR3 ケモカイン受容体発現に関する検討

本章の背景と目的

ケモカイン及びケモカイン受容体と慢性炎症性疾患

ケモカインは細胞の走化性を誘導するサイトカインの総称で、chemotactic cytokine の略称である。ケモカインは特徴的なシステイン残基をもつ分子量約 9kDa の蛋白質が主体で、これまでに 50 種類以上のケモカインが同定されている[42]。殆どのケモカインは 4 つのシステイン残基をもっており、最初の 2 つのシステイン残基モチーフ配列によって、CXC ケモカイン、CC ケモカイン、C ケモカイン、CX3C ケモカインの 4 種類に分類される。

一方、ケモカイン受容体は、約 350 個のアミノ酸から構成される分子量約 40kDa 程度の 7 回膜貫通型 G 蛋白共役型受容体である[42]。細胞外領域は N 末端と 3 つの細胞外ループからなる。結合するケモカインに従って、CXCR、CCR、XCR、CX3CR と分類されている。

ケモカインは好中球や単球を遊走させるサイトカイン群として見出されたが、その後免疫細胞に広く様々なケモカイン受容体が発現していることが同定され、急性/慢性炎症での役割が研究されてきた[43]。本研究では、自己免疫性慢性炎症性疾患にお

いてその関与が示唆され[27, 44]、IC 組織においても関連遺伝子の発現上昇が報告されている[24, 25]、ケモカイン受容体 CXCR3 に注目した。

CXCR3 受容体は、活性化 T 細胞、特にタイプ 1 ヘルパー T 細胞 (Th1 細胞) をはじめ、肥満細胞、B リンパ球、形質細胞など複数の免疫細胞で発現が同定されている[43, 45]。CXCR3 受容体とそのリガンドであるケモカイン CXCL9、10、11 で形成される経路は炎症部位へのこれら免疫細胞の遊走に関与するだけではなく[43]、Th1 細胞によって放出された IFN- γ を介して炎症の持続・増幅にも関与していることが報告されている[27]。さらに、持続的な抗原刺激により、B 細胞、形質細胞の CXCR3 受容体発現が上昇することが報告されており、関節リウマチや全身性エリテマトーデスといった自己免疫疾患ではメモリー B 細胞や、形質細胞といった 2 次免疫応答を経た成熟 B 細胞で CXCR3 受容体発現の上昇が報告されている[44, 46-48]。前述の通り、IC でもこの CXCR3 経路の関連遺伝子の発現上昇が報告されていること、第四章で明らかになった HIC 組織浸潤 B 細胞のクローナル増殖という事実から、本章では特に B 細胞、形質細胞における CXCR3 受容体の発現変化に注目しながら、その病態への関与について検討を行った。

研究方法

1) 対象検体

第二章で使用した検体を本研究においても用いた。HIC 27 症例（54 検体）及び非 IC 慢性膀胱炎（non-IC cystitis）15 症例（23 検体）、計 77 検体を解析対象とした。BCG 膀胱内投与は、特定の抗原に対する免疫応答を惹起する可能性があるため、非 IC 慢性膀胱炎群で BCG 投与歴のある 11 症例は解析対象から除外した。その結果、対照群は男性 8 症例、女性 7 症例、平均年齢 72.5 歳で構成されるコホートとなった。HIC はハンナ病変、非ハンナ病変より各々 1 検体ずつ採取、解析した。非 IC 慢性膀胱炎症例で複数の切片において炎症所見を認める症例は、各症例最大 2 検体までを解析対象とした。選択基準は、第二章で先述したとおり、「HIC と同程度の炎症所見を呈するもの」とした。

2) 免疫組織化学的染色

第二章に記載した内容と同様に Benchmark[®] XT を用いて免疫組織化学的染色を行った（Procedure: XT IVIEW DAB v3）。T リンパ球、B リンパ球、形質細胞の同定にはこれまでと同一の抗 CD3、CD20、CD138 抗体を同条件で用いた。CXCR3 発現細胞の同定には、マウスモノクローナル抗 CXCR3 受容体抗体（1:100, Clone 1C6, BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Germany）を 1 次抗体として使用した。

3) CXCR3 受容体発現細胞数の定量解析及びリンパ球・形質細胞数、臨床因子との相関

第二章に記載した方法と同様の手法で免疫染色標本のデジタル化を行った後、Tissue Studio[®]を用いてリンパ球・形質細胞数及び CXCR3 陽性細胞数の網羅的定量解析を行った。Tissue Studio[®]による CD3、CD20、CD138 陽性細胞の同定のための設定は表 1 に記載したものと同様のものを用いた。CXCR3 陽性細胞同定の設定には、Mode: Manual ROI-nuclei、IHC-threshold: 0.3、Size selection: $20 \mu\text{mm}^2$ 、Filter: Area $< 15 \mu\text{mm}^2$ または Length/Width > 3 、と設定した。CXCR3 陽性細胞数とリンパ球・形質細胞数 (CD3、CD20、CD138 陽性細胞数の総和) との相関関係を解析した。その後、リンパ球サブセットにおける CXCR3 発現特性を推測するために、CXCR3、CD3、CD20、CD138 陽性細胞数 ($/\text{mm}^2$) 相互間の相関関係を解析した。臨床病理学的検討として、CD3、CD20、CD138、CXCR3 各陽性細胞数と臨床因子 (年齢、病歴期間、症状スコア (O'Leary and Sant's problem and symptom index、visual analogue scale for pain)、1 日排尿回数、平均 1 回排尿量、最大 1 回排尿量、麻酔下最大膀胱容量) との相関関係を検討した。

4) 形質細胞における CXCR3 受容体発現の検討

形質細胞浸潤を豊富に認める検体に対して、ランダムに選択した 3 つの“plasma cell-rich area”（第二章参照；対物 20 倍視野で、全炎症細胞の 3 分の 1 以上を形質細胞が占めるエリア）における全単核球数に対する CXCR3 陽性細胞数及び形質細胞数の割合を連続切片を用いて算出、比較した。HIC ではハンナ病変、非ハンナ病変のうち、より形質細胞数の多い一方の切片を各症例で選択して解析対象とした。

つづいて、これらの標本に対して CXCR3 及び CD138 蛍光免疫 2 重染色を行った。CXCR3 抗体は、これまで用いたものと同様のマウスモノクローナル抗体を使用し、希釈倍率を 100 倍から 50 倍へと変更した。CD138 抗体は新たにウサギモノクローナル抗体（1:50, clone SP152, LifeSpan BioSciences, Seattle, WA, USA）を用いた。未染プレパラートをキシレンにて脱パラフィン後、エタノールで親水化した。PBS で洗浄後、EDTA 緩衝液（pH 8.0）中で 120°C、10 分間オートクレープ処理を行い、抗原の賦活化を行った。流水洗浄後、風乾した後、20 倍希釈したヤギ全血清を用いてブロッキング処理を行った。つづいて、各々 50 倍希釈した 1 次抗体を混注し、室温で 60 分間反応させた。Tris buffered saline（TBS）で洗浄後、蛍光標識 2 次抗体（Alexa Fluor 488 標識ヤギ由来抗マウス IgG 抗体及び、Alexa Fluor 594 標識ヤギ由来抗ウサギ IgG 抗体、invitrogen, Eugene, Oregon, USA）と反応させ、DAPI で核対比染色を行った。

DAKO Fluorescent Mounting Medium (DAKO North America, Carpinteria, CA, USA)

で封入し、蛍光顕微鏡 (BX50F4, Olympus, Tokyo, Japan) を用いて観察した。

5) 統計学的解析

連続変数に対しては、2群間：Wilcoxon rank-sum test、多群間：Steel-Dwass test を、離散変数に対しては Fisher の正確検定または χ^2 検定を用いて検定した。連続変数間の相関関係はスピアマンの順位相関係数を算出して解析した。p<0.05 を統計学的に有意とした。

結果

1) CXCR3 受容体発現細胞数とリンパ球・形質細胞数及び臨床因子との相関

リンパ球・形質細胞及び CXCR3 陽性細胞の Tissue Studio[®]による定量解析結果を図 16 に示した。リンパ球・形質細胞数、CXCR3 陽性細胞数ともに、HIC (ハンナ病変部、非ハンナ病変部) と非 IC 慢性膀胱炎群との間に有意な差を認めなかった。

CXCR3 陽性細胞数とリンパ球・形質細胞数、及び T リンパ球数は全ての群において有意に強い相関関係を認めたが、CXCR3 陽性細胞数と B 細胞及び形質細胞数との相関は HIC (ハンナ病変部、非ハンナ病変部) 症例でのみ認められ、非 IC 慢性膀胱炎群では認められなかった (表 8)。

CXCR3 陽性細胞数及び CD3、CD20、CD138 陽性細胞数と、臨床因子（年齢、病歴期間、症状スコア（O’Leary and Sant’s problem and symptom index、visual analogue scale for pain）、1 日排尿回数、平均 1 回排尿量、最大 1 回排尿量、麻酔下最大膀胱容量）との間にはいずれにも有意な相関関係を見出すことは出来なかった（表 9）。

2) 形質細胞における CXCR3 受容体発現解析

Plasma cell-rich area を含んだ解析対象検体は、HIC 22 症例、非 IC 慢性膀胱炎 8 症例であった。免疫組織像の比較では、多くの HIC 症例で CXCR3 陽性細胞と CD138 陽性細胞が類似した分布形態を示す中、非 IC 慢性膀胱炎群では plasma cell-rich area の多くで CXCR3 は陰性であった（図 17 (a)-A, B、(b)-F, G、(c)-K, L）。ランダムに選択した 3 つの plasma cell-rich area における全単核球数に対する形質細胞（CD138 陽性細胞）と CXCR3 陽性細胞数の比率の和の平均値は、HIC では 1.0 を超えており非 IC 慢性膀胱炎よりも有意に高かった ($p=0.04$)。従って、HIC における CD138 と CXCR3 の共発現が示唆された。一方、非 IC 慢性膀胱炎群ではその和の平均値は 0.80 で 1.0 以下であった。蛍光 2 重染色では、多くの HIC 症例（ハンナ病変、非ハンナ病変）において CXCR3 と CD138 の共発現を認めたが、非 IC 慢性膀胱炎群では多くの症例で共発現は認められなかった（図 17 (a)-C, D, E、(b)-H, I, J、(c)-M, N, O）。

考察

本研究では、1) CXCR3 受容体を発現している細胞数は、全体の総数としては HIC と非 IC 慢性膀胱炎群との間で有意な差を認めなかった。2) 形質細胞における CXCR3 受容体発現上昇は IC に特徴的である可能性がある、という結果を得た。

炎症の形成、維持に関与する CXCR3 受容体とそのリガンドを介した経路は、慢性炎症では非特異的に増強されており、IC に特異的ではないことが本研究結果から示唆された。既報[18, 19]では、おそらく対照群及び NHIC よりも HIC の炎症所見が強かったために、HIC 群における CXCR3 受容体関連遺伝子の発現上昇を認めたものと思われる。

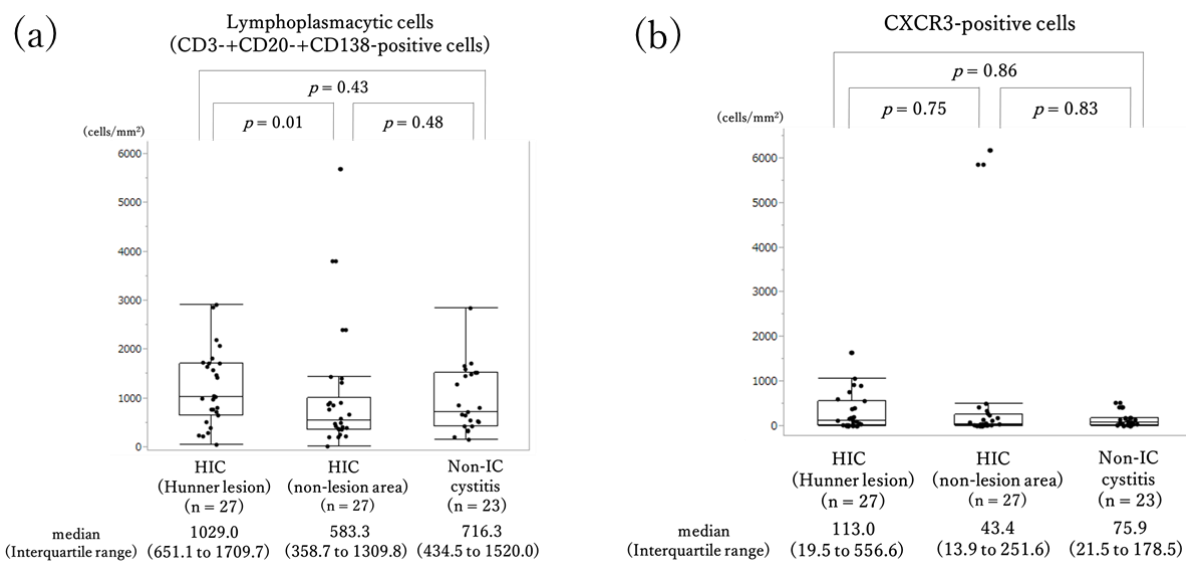
CXCR3 受容体は同定以来、主に I 型ヘルパー T 細胞で発現が誘導され、いわゆる Th1 型優位の免疫応答に関与すると報告されてきた[43]。T 細胞系以外、特に B 細胞系における発現動態に関しては、そもそも T 細胞ほど CXCR3 を高頻度に発現していないこともあり、多くは知られていなかった [27, 43, 45]。ところが、近年になって持続的な抗原刺激を伴う 2 次免疫応答では、B 細胞の成熟過程において CXCR3 受容体の発現が上昇していくという事実が報告された[39-41]。その後、関節リウマチでは末梢血中のメモリー B 細胞における CXCR3 の発現が上昇していることも同定された [44]。

つまり、CXCR3 受容体は T 細胞優位に発現し、主に Th1 系の免疫応答を惹起するが[27]、自己抗原などによる持続的な活性化刺激の存在下では、B 細胞、形質細胞は CXCR3 受容体発現を上昇させて炎症局所に遊走することにより免疫応答を増強させているものと想定される[44]。

今回の結果では、HIC では非 IC 慢性膀胱炎と比べて有意に形質細胞の CXCR3 発現が上昇していた。これと上記を勘案すると HIC 膀胱組織へ浸潤している形質細胞は、2 次免疫応答を経て分化・成熟を来したものである可能性がある。つまり、前章で、HIC では形質細胞の軽鎖制限を認めることから、B 細胞増殖性疾患との関連性や特定の抗原に対する免疫応答の存在が病態に関与している可能性があると述べたが、本章の結果を踏まえると、後者の可能性を優位に考えるほうが自然である。また、抗原の候補としては、膀胱自己組織や微生物（細菌、ウイルス、真菌など）が第一に想定される。膀胱自己組織に対する自己免疫疾患だとすると、HIC の特異的な上皮剥離所見（図 11）を考慮し、自己抗原として膀胱上皮を構成する物質が優先的な探索対象となるであろう。つまり、「膀胱上皮に対する自己免疫応答の結果、上皮下への B 細胞系優位のリンパ球浸潤が惹起され、上皮が剥離することで HIC の病態が形成される」、という仮説が立てられる。この点に関しては、膀胱組織に特有の上皮構成物質の絞り込みと膀胱組織浸潤抗体のクローニングによる免疫沈降法を用いた抗原探索や血中自己抗体の検索などが今後の検討課題として考えられる。

微生物探索のなかでも、菌叢の存在の有無は 16SrRNA 遺伝子のスクリーニングにより比較的簡便に推定可能である[49]。そこで、次章では HIC 組織におけるサイトカイン発現プロファイリング及び菌叢の探索に関する検討を行った。

図 16 リンパ球・形質細胞及び CXCR3 陽性細胞の定量解析

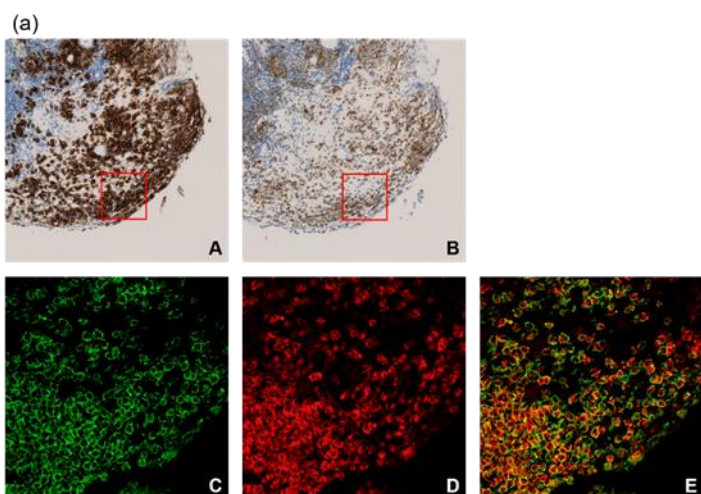


(a) リンパ球・形質細胞数

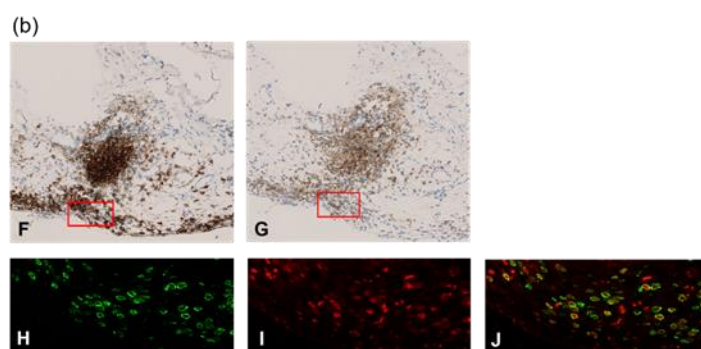
(b) CXCR3 陽性細胞数

(a)、(b)いずれも HIC と非 IC 慢性膀胱炎では統計学的に有意な差を認めなかった。

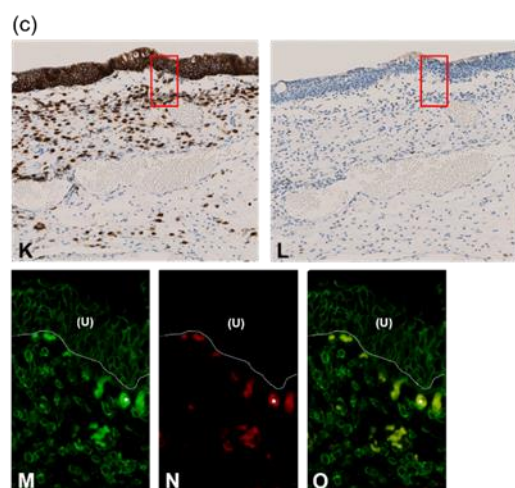
図 17 CD138 及び CXCR3 免疫染色の代表的な組織像



(a) HIC (ハンナ病変部)
 A : CD138
 B : CXCR3
 C (A の枠内) : CD138 蛍光
 D (B の枠内) : CXCR3 蛍光
 E : Merge (C+D)
 CD138 発現細胞の殆どが CXCR3 を共発現していることが分かる。



(b) HIC (非ハンナ病変部)
 F : CD138
 G : CXCR3
 H (F の枠内) : CD138 蛍光
 I (G の枠内) : CXCR3 蛍光
 J : Merge (H+I)
 CD138 発現細胞の殆どが、CXCR3 を共発現していることが分かる。



(c) 非 IC 慢性膀胱炎
 K : CD138
 L : CXCR3
 M (K の枠内) : CD138 蛍光
 N (L の枠内) : CXCR3 蛍光
 O : Merge (M+N)
 CD138 発現細胞の殆どは CXCR3 を発現していないことが分かる。

表 8 CXCR3、CD3、CD20、CD138 陽性細胞間の相関関係

(cells/mm ²)	CXCR3-positive cells			CD3-positive T cells			CD20-positive B cells			CD138-positive plasma cells			Lymphoplasmacytic cells ‡		
	HIC (HL) †	HIC (NL)	Non-IC cystitis	HIC (HL)	HIC (NL)	Non-IC cystitis	HIC (HL)	HIC (NL)	Non-IC cystitis	HIC (HL)	HIC (NL)	Non-IC cystitis	HIC (HL)	HIC (NL)	Non-IC cystitis
CXCR3-positive cells				0.34 ¶ (0.04)	0.40 (0.04)	0.51 (<0.01)	0.58 (<0.01)	0.48 (0.02)	0.33 (0.07)	0.48 (0.01)	0.47 (0.01)	-0.11 (0.62)	0.56 (0.01)	0.45 (0.01)	0.46 (0.02)
CD3-positive cells							0.62 (<0.01)	0.66 (<0.01)	0.54 (0.01)	0.44 (0.02)	0.68 (<0.01)	0.22 (0.58)	0.82 (<0.01)	0.80 (<0.01)	0.91 (<0.01)
CD20-positive B cells										0.43 (0.02)	0.41 (0.04)	0.40 (0.02)	0.91 (<0.01)	0.82 (<0.01)	0.76 (<0.01)
CD138-positive plasma cells													0.68 (<0.01)	0.72 (<0.01)	0.34 (0.04)

† HL : ハンナ病変部、NL : 非ハンナ病変部

‡ Lymphoplasmacytic cells: Sum of the CD3-positive cells, CD20-positive cells and CD138-positive cells

¶ Spearman's correlation coefficient ρ and P -value (in parentheses), bold when $P < 0.05$

表9 CXCR3、CD3、20、138陽性細胞数と臨床因子との相関関係

	CD3 (cells/mm ²)		CD20 (cells/mm ²)		CD138 (cells/mm ²)		CXCR3 (cells/mm ²)	
	HIC-HL	HIC-NL	HIC-HL	HIC-NL	HIC-HL	HIC-NL	HIC-HL	HIC-NL
	(n = 27)	(n = 27)	(n = 27)	(n = 27)	(n = 27)	(n = 27)	(n = 27)	(n = 27)
Age (years)	$\rho = 0.02,$ $P = 0.94$	$\rho = 0.04,$ $P = 0.84$	$\rho = -0.04,$ $P = 0.85$	$\rho = 0.04,$ $P = 0.84$	$\rho = 0.35,$ $P = 0.07$	$\rho = 0.19,$ $P = 0.35$	$\rho = 0.18,$ $P = 0.36$	$\rho = -0.20,$ $P = 0.31$
Years from onset to biopsy (years)	$\rho = 0.003,$ $P = 0.99$	$\rho = -0.001,$ $P = 0.98$	$\rho = 0.24,$ $P = 0.23$	$\rho = -0.02,$ $P = 0.94$	$\rho = 0.16,$ $P = 0.42$	$\rho = 0.33,$ $P = 0.09$	$\rho = 0.38,$ $P = 0.05$	$\rho = -0.13,$ $P = 0.52$
OSSI †	$\rho = 0.05,$ $P = 0.81$	$\rho = 0.31,$ $P = 0.13$	$\rho = -0.11,$ $P = 0.59$	$\rho = 0.37,$ $P = 0.06$	$\rho = -0.19,$ $P = 0.36$	$\rho = 0.34,$ $P = 0.09$	$\rho = -0.30,$ $P = 0.14$	$\rho = 0.25,$ $P = 0.22$
OSPI †	$\rho = 0.14,$ $P = 0.50$	$\rho = 0.12,$ $P = 0.55$	$\rho = 0.004,$ $P = 0.98$	$\rho = -0.06,$ $P = 0.78$	$\rho = -0.14,$ $P = 0.51$	$\rho = 0.20,$ $P = 0.34$	$\rho = -0.22,$ $P = 0.28$	$\rho = 0.08,$ $P = 0.71$
VAS †	$\rho = 0.18,$ $P = 0.37$	$\rho = 0.31,$ $P = 0.13$	$\rho = 0.12,$ $P = 0.54$	$\rho = 0.25,$ $P = 0.22$	$\rho = -0.01,$ $P = 0.94$	$\rho = 0.15,$ $P = 0.47$	$\rho = 0.001,$ $P = 0.99$	$\rho = -0.14,$ $P = 0.48$
Urinary frequency	$\rho = 0.22,$ $P = 0.28$	$\rho = 0.37,$ $P = 0.06$	$\rho = 0.04,$ $P = 0.84$	$\rho = 0.30,$ $P = 0.14$	$\rho = 0.03,$ $P = 0.89$	$\rho = 0.37,$ $P = 0.06$	$\rho = -0.22,$ $P = 0.27$	$\rho = 0.37,$ $P = 0.06$

Average voided volume (mL)	$\rho = 0.10,$ $P = 0.62$	$\rho = -0.16,$ $P = 0.43$	$\rho = 0.21,$ $P = 0.30$	$\rho = -0.22,$ $P = 0.29$	$\rho = 0.12,$ $P = 0.56$	$\rho = -0.40,$ $P = 0.04$	$\rho = 0.16,$ $P = 0.43$	$\rho = -0.43,$ $P = 0.03$
Maximum voided volume (mL)	$\rho = 0.07,$ $P = 0.73$	$\rho = -0.05,$ $P = 0.81$	$\rho = 0.25,$ $P = 0.23$	$\rho = -0.11,$ $P = 0.59$	$\rho = 0.01,$ $P = 0.98$	$\rho = -0.19,$ $P = 0.35$	$\rho = 0.06,$ $P = 0.79$	$\rho = -0.18,$ $P = 0.37$
Maximum bladder capacity at bladder distension (mL)	$\rho = -0.13,$ $P = 0.53$	$\rho = 0.06,$ $P = 0.78$	$\rho = -0.03,$ $P = 0.89$	$\rho = 0.25,$ $P = 0.22$	$\rho = -0.18,$ $P = 0.38$	$\rho = -0.07,$ $P = 0.75$	$\rho = 0.02,$ $P = 0.91$	$\rho = -0.01,$ $P = 0.95$

HIC-HL: Hunner type interstitial cystitis-ハシナ病変部, HIC-NL: Hunner type interstitial cystitis-非ハシナ病変部,

OSSI/OSPI = O'Leary and Sant's symptom index and problem index, VAS = visual analogue scale (for pain)

Significant difference: * $P < 0.05$ by Spearman rank coefficient correlation test

第六章 ハンナ型間質性膀胱炎組織におけるサイトカイン発現プロファイリングと菌叢探索

本章の研究は、東京大学大学院医学系研究科・医学部倫理委員会の承認を得て施行した（承認番号 10581）。

本章の背景と目的

本研究のこれまでの結果によって、HIC の病態における特定の免疫応答の存在が示唆された。そこで、本章では、T 細胞系（CD3、CD4、CD8）のリンパ球表面抗原及び代表的炎症性サイトカイン（IFN γ 、TNF α 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10）の遺伝子発現を評価し、HIC では Th1 細胞を介した細胞性免疫（CD4、CD8、IL-2、IFN γ 、TNF α ）か、Th2 細胞を介した液性免疫（CD4、IL-4、IL-5、IL-10）のどちらが優位となった免疫応答が惹起されているのかを探索した。

また、特定の免疫応答を誘発している抗原が存在しているとすれば、自己組織、微生物（細菌、ウイルス、真菌）などが第一に想定される。本章では、細菌探索、菌叢解析で広く一般的に用いられている手法である 16SrRNA 遺伝子のクローニング[49]を目的として、HIC 組織中の 16SrRNA 遺伝子の PCR による増幅を施行し、HIC 組織中における細菌の探索も試みた。

研究方法

1) 対象検体

2015年～2016年の間に得られた、HIC14症例28検体（平均年齢65.5歳、男性2症例、女性12症例。ハンナ病変部、非ハンナ病変部より各1検体採取）及び対照群6症例7検体（平均年齢67.7歳、男性4症例、女性2症例）の膀胱生検検体を対象とした。対照群の内訳は非IC慢性膀胱炎2症例（濾胞性膀胱炎、非特異的慢性膀胱炎各1症例）、膀胱癌2症例（乳頭癌、上皮内癌各1症例：各々癌部、非癌部より各1検体採取）、正常膀胱1症例（尿膜管癌症例の膀胱正常組織）であった。

2) Quantitative real time RT-PCR

RNA、DNA抽出

採取した生検組織は、直ちにRNAlater[®] RNA安定化試薬(Qiagen, Hilden, Germany)に浸漬した。Qiazol(Qiagen)試薬、RNeasy Plus Universal Mini Kit (Qiagen)のプロトコールに従い、total RNA, genome DNAの抽出を実施した。抽出したtotal RNAは、Agilent 2200 TapeStation (Agilent Technologies, CA)において、genome DNAはNanodrop Lite スペクトロフォトメーター(Thermo Fisher Scientific, MA)を用い、クオリティーチェック、濃度測定を行った。

Quantitative real time RT-PCR

リアルタイム定量 RT-PCR 法を用い、リンパ球関連表面抗原 (cluster of differentiation ; CD) (CD3 ϵ 、CD4、CD8 α 、CD20)、サイトカイン (IFN γ 、TNF α 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10)、内部標準として 36B4 遺伝子における mRNA 発現レベルを測定し、HIC 及び対照群間で比較した。本研究において使用した各プライマーの配列を表 10 に示した。

組織から抽出した total RNA(500ng)は、GeneAce Reverse Transcriptase (日本ジーン、日本) を用いて cDNA に合成し、解析サンプルとした。逆転写反応にはランダムヘキサマー プライマーを用いて 42°C、60 分間反応を行った。合成後、サンプル DNA 20 μ L に蒸留水を加え、20~50 倍希釈し KAPA SYBR FAST qPCR キットにてリアルタイム PCR 解析を CFX96 (BIO-RAD, CA) を用いて行った。PCR の反応条件は、初期変性反応を 95°C 2 分、その後のサイクルは 95°C 5 秒、60°C 20 秒、72°C 20 秒の 3 ステップを 40 サイクル行った。各サンプルのコピー数は、既知濃度のスタンダードサンプルを用いて Ct (threshold cycle) 値をプロットした検量線から算出し、その値を 36B4 のコピー数で補正した。RT-PCR は各プライマーあたり 3 回施行し、結果は平均値を採用した。

16SrRNA 遺伝子 PCR 解析

2) で述べた方法により組織から抽出したゲノム DNA50ng を鋳型に KAPA HiFi HotStart Ready Mix (日本ジェネティクス) を用い 16SrRNA 遺伝子特異的ユニバーサルプライマー(フォワード : TGCTGCCTCCCGTAGGAGT、リヴァース : ATTACCGCGGCTGCTGG) を用いて、PCR 反応を行った。PCR の反応条件は、初期変性反応を 95°C 3 分、その後のサイクルは 95°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 30 秒の 3 ステップを 40 サイクル行った。PCR 反応液をアガロースゲル電気泳動し、UV イルミネーターでバンドの有無を確認した。

3) 統計学的解析

連続変数の 2 群間比較には Wilcoxon rank-sum test を、多群間比較には Steel-Dwass test を用いて検定し、 $p < 0.05$ を統計学的に有意とした。

結果

1) ハンナ型間質性膀胱炎組織におけるサイトカイン発現特性

結果を図 18 に示した。HIC ハンナ病変部、HIC 非ハンナ病変部、対照群の 3 群間で発現量に有意差を認めた遺伝子は、CD4、CD8、IL-4、IL-5 であり、いずれも対照群において HIC よりも高い発現量であった。

2) ハンナ型間質性膀胱炎組織における菌叢探索

解析 35 検体の全てにおいて、16SrRNA 遺伝子の増幅は得られなかった。検体の品質の問題や、実験手法に問題がある可能性も疑い、ヒト 18S r RNA 遺伝子の増幅を試みたところ、全検体で増幅を得られたため、16SrRNA は全検体で検出感度以下であると判断した (図 19)。

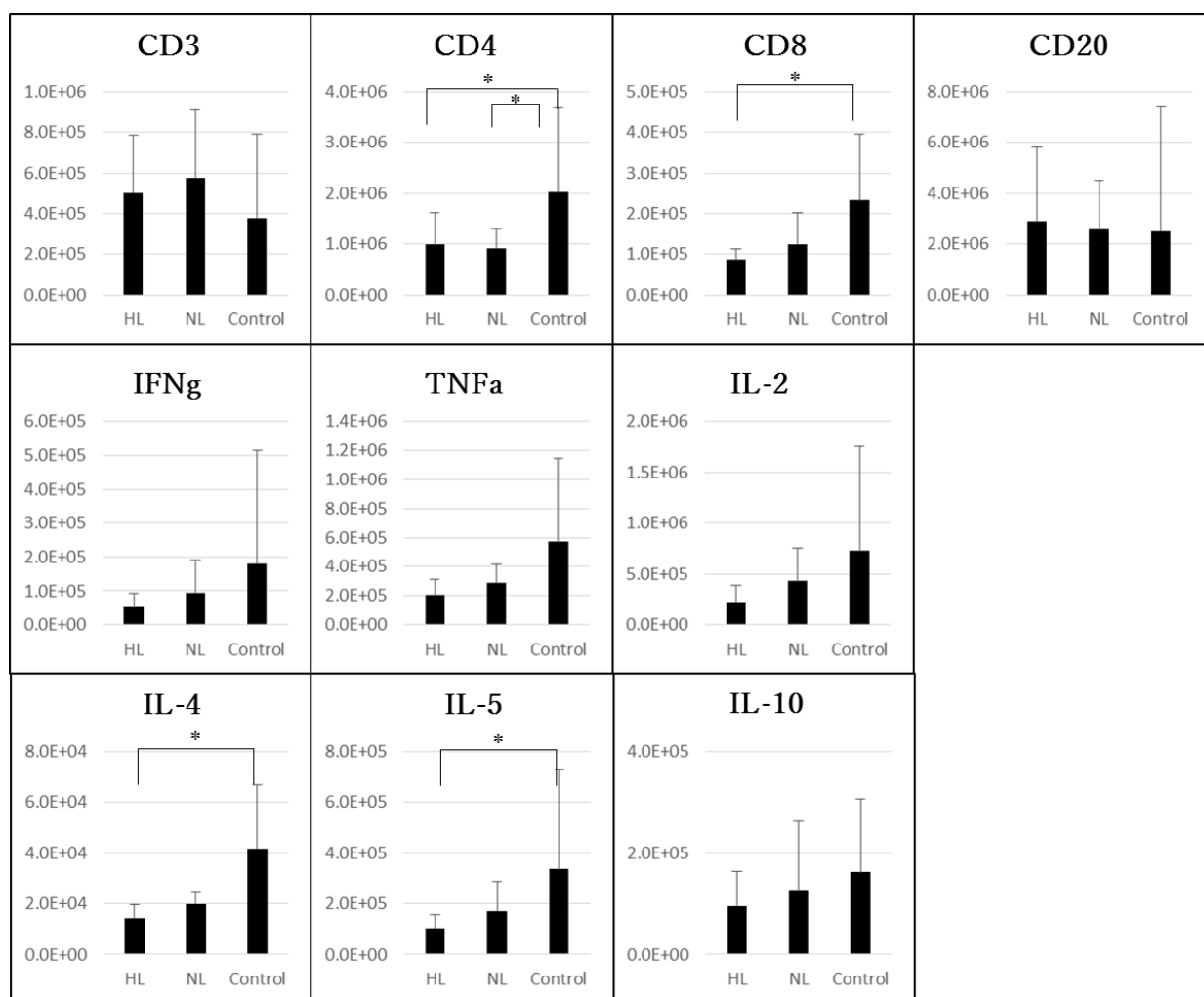
考察

本研究では、主に Th1、Th2 系に特徴的なサイトカインの遺伝子発現プロファイリングを行い、HIC では Th1 系、Th2 系のどちらが優位の免疫応答が起こっているのかを探索した。しかし、対照群と比較して HIC における有意な遺伝子の発現変化をいずれのサイトカイン及びリンパ球関連細胞表面抗原においても認めず、HIC 特徴的な免疫応答プロファイリングを明らかにすることは出来なかった。ただし、対照群 7 検体のうち、4 検体が表在性膀胱癌症例から採取したものであった。表在性膀胱癌では、血清中の Th1/Th2 サイトカインバランスが変化することが報告されており [50]、膀胱組織内においても同様の癌背景における影響がなかったとは言い切れない。したがって、厳密には非癌症例のみで構成される対照群と HIC との比較が望まれるが、現状では膀胱に悪性病変を疑う所見のない限り、尿路を対象とする施術の際に膀胱組

織を採取することは倫理上認められておらず、この点は本研究の限界とすべき点である。

これまでの研究結果により HIC では特定の抗原に対する免疫応答が惹起されている可能性が示唆されているが、今回の研究において 16SrRNA 遺伝子の増幅が全く得られなかったことから膀胱組織中の細菌の存在頻度は極めて低いものであることが判明した。何らかの抗原が存在すると仮定した場合、ウイルス、真菌などの細菌外微生物や、自己組織など幅広い探索が必要であると考えられた。

図 18 Quantitative real time RT-PCR 解析

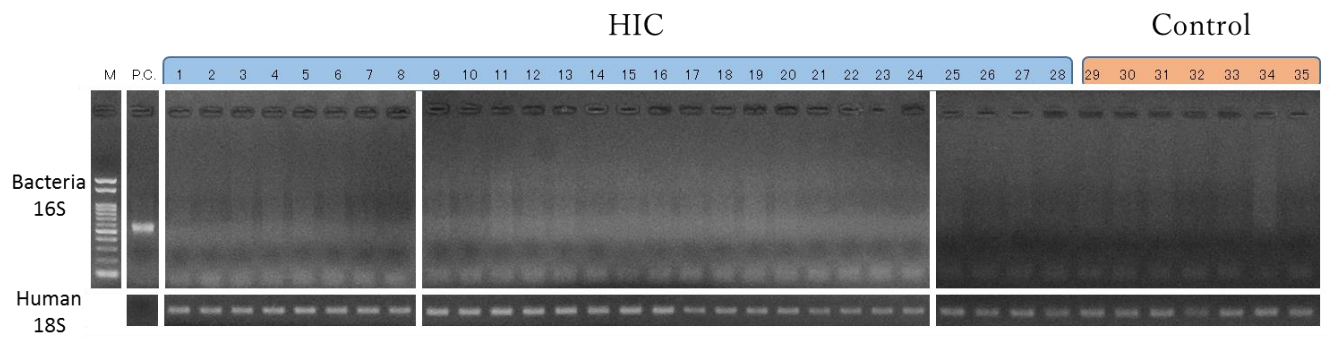


HL：ハンナ病変部、NL：非ハンナ病変部

* p<0.05 significant difference by Steel-Dwass test

・縦軸は、サンプル 1 μgRNA あたりのコピー数を示す。

図 19 16SrRNA 遺伝子 PCR 解析



M：マーカーDNA

P.C：ポジティブコントロール マウス糞由来 DNA

HIC では、奇数：ハンナ病変部、偶数：非ハンナ病変部、から得られた検体であることを示す。

表 10 CD3 ϵ 、CD4、CD8 α 、CD20、IFN γ 、TNF α 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、36B4 各遺伝子のプライマー配列

遺伝子名	フォワードプライマー	リヴァースプライマー
CD3 ϵ	hCD3e-Cl α F1: TACTTCCTGTGTGGGGTTCAG	hCD3e-R1: TGAGGGCATGTCAATATTACTGTGG
CD4	hCD4-F2: AGGTGCAATTGCTAGTGTTCG	hCD4-R2: TACATTGCACTGAGGGGCTAC
CD8 α	hCD8A-F1: GTCATGGCCTTACCAGTGACC	hCD8A-R2: TATAGGAGGAAGGTGGGACTG
CD20	hCD20-F2: ATGAATGGGCTCTTCCACATT	hCD20-R1: TTGACCAAACACTTCCTGGAG
IFN γ	hIFNG-F1: TGACCAGAGCATCCAAAAGAG	hIFNG-R2: TACTGGGATGCTCTTCGACCT
TNF α	hTNFA-F1: GTGCTTGTTCTCAGCCTCTT	hTNFA-R1: ATGGGCTACAGGCTTGTCACT
IL-2	hIL2-F1: TAACCTCAACTCCTGCCACAA	hIL2-R1: CCTGGTGAGTTTGGGATTCTT
IL-4	hIL4-F1: TCTACAGCCACCATGAGAAGG	hIL4-R1: AACGTACTCTGGTTGGCTTCC
IL-5	hIL5-F4: CCTGCAAGAGTTTCTTGGTGT	hIL5-R4: TGCCTGGAGAAAATACTTCA
IL-10	hIL10-F2: GAGCAGGTGAAGAATGCCTTT	hIL10-R1: ATAGAGTCGCCACCCTGATGT
36B4	h36B4-F1: AATGTTTCATTGTGGGAGCAG	h36B4-R1: GTGAACACAAAGCCACATTC

第七章 結論

ICにはHICとNHICがあるとされながら、両病型の明確な差はこれまで明らかではなかった。ゆえに、臨床研究、基礎研究ともに両病型の明瞭な識別がなされないまま施行されたものも多く、結果として一貫性を伴わない報告が散見されてきた。また、ICにおける病理組織像は、これまで非特異的な慢性炎症像とされてきたため、多くの診断基準に組織所見項目が取り入れられていない。本研究では、革新的な画像解析ソフトウェアを用いてICの病理組織所見の詳細な検討を行い、病型分類が組織所見によって明快になることを明示した。明確な病型分類に基づく病因の検討によって、その特定に迫る以下の結果を得た。

1) HICとNHICでは形態学的炎症像に明瞭な差異を認めた。HICでは、上皮剥離及びリンパ球・形質細胞を中心とする炎症細胞浸潤が著明であるのに対して、NHICでは炎症細胞浸潤を殆ど認めず、上皮も比較的保全されていた。すなわち、HIC：炎症性疾患、NHIC：非炎症性疾患であることを明らかにした。

2) ICに特徴的であるとされてきた肥満細胞浸潤は、背景の炎症に注目しながら非IC群と比較・検討した結果、ICに特異的な所見ではないことが示唆された。肥満細胞浸潤は、背景の炎症とある程度相関して増加していた。

3) HIC は、リンパ球・形質細胞浸潤が著明な炎症性疾患であることが判明したが、特に B 細胞・形質細胞の浸潤割合が高いことが特徴的であった。さらに、形質細胞の κ/λ 軽鎖制限解析により HIC 組織浸潤形質細胞はクローナル増殖を来していることが示唆された。特定の抗原の存在による免疫応答の惹起、または B 細胞増殖性疾患との病態的相同性が HIC の病因として示唆された。

4) HIC 組織浸潤形質細胞ではケモカインレセプター CXCR3 の発現が亢進しており、B 細胞系への持続的な抗原刺激が存在している可能性が考えられる。

5) HIC 組織に特徴的なサイトカイン発現の変化は認められなかった。16S r RNA 遺伝子は検出感度以下であり、抗原の探索には自己組織や細菌以外の微生物など幅広い検討が必要であると考えられた。

本研究によって、HIC と NHIC は明瞭に病態生理の異なる亜型であり、臨床所見に加えて病理組織所見を加味すると病型分類がより正確に可能になることが示唆された。また、HIC では浸潤する形質細胞のクローナル増殖を認め、その病因に特定の抗原に対する免疫応答が関与している可能性が示された。

謝辞

大学院で学ぶ機会を与えて下さり、終始懇切なご指導、ご鞭撻を受け賜りました。東京大学大学院医学系研究科泌尿器外科学分野、本間之夫教授、コンチネンス医学講座、井川靖彦教授に深甚なる感謝の意を表します。間質性膀胱炎の世界的権威でおられる本間教授の直接指導を受けて大学院での研究生活を送ることが出来た幸運を有難く感じております。また、本研究の共同研究者である秋田大学大学院医学系研究科器官病態学講座、前田大地准教授には病理組織像の基本的な検鏡方法に始まり、研究の細部にわたって多大なるご指導を受け賜りました。改めて厚く御礼申し上げます。

免疫染色を始め、技術的にサポートして下さった東京大学大学院人体病理学・病理診断学分野、佐久間慶技術専門職員に深謝致します。

参考文献

1. Homma Y, Ueda T, Tomoe H, Lin AT, Kuo HC, Lee MH, Oh SJ, Kim JC and Lee KS. Clinical guidelines for interstitial cystitis and hypersensitive bladder updated in 2015. *Int J Urol.* **23**: 542-9, 2016.
2. 日本間質性膀胱炎研究会 ガイドライン作成委員会 編. 間質性膀胱炎診療ガイドライン. ブラックウェルパブリッシング, 2007.
3. Yamada Y, Nomiya A, Niimi A, Igawa Y, Ito T, Tomoe H, Takei M, Ueda T and Homma Y. A survey on clinical practice of interstitial cystitis in Japan. *Transl Androl Urol.* **4**: 486-490, 2015.
4. Peeker R and Fall M. Toward a precise definition of interstitial cystitis: further evidence of differences in classic and nonulcer disease. *J Urol.* **6**: 2470–2, 2002.
5. 向井 清、真鍋俊明、深山正久. 外科病理学 第4版. 文光堂: 924-925, 2006.
6. Gillenwater JY and Wein AJ. Summary of the National Institute of Arthritis, Diabetes, Digestive and Kidney Diseases Workshop on Interstitial Cystitis, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, August 28–29, 1987. *J Urol.* **140**: 203–6, 1998.
7. Fall M, Johansson SL and Aldenborg F. Chronic interstitial cystitis: a heterogeneous syndrome. *J Urol.* **137**: 35–8, 1987.

8. Lynes WL, Flynn SD, Shortliffe LD and Stamey TA. The histology of interstitial cystitis. *Am J Surg Pathol.* 14: 969–76, 1990.
9. van de Merwe JP, Nordling J, Bouchelouche P, Bouchelouche K, Cervigni M, Daha LK, Elneil S, Fall M, Hohlbrugger G, Irwin P, Mortensen S, van Ophoven A, Osborne JL, Peeker R, Richter B, Riedl C, Sairanen J, Tinzl M and Wyndaele JJ. Diagnostic criteria, classification, and nomenclature for painful bladder syndrome/interstitial cystitis: an ESSIC proposal. *Eur Urol.* **53**: 60-7, 2008.
10. Logadottir Y, Delbro D, Fall M, Gjertsson I, Jirholt P, Lindholm C and Peeker R. Cytokine expression in patients with bladder pain syndrome/interstitial cystitis ESSIC type 3C. *J Urol.* 192: 1564-8, 2014.
11. Yamada T, Murayama T, Mita H and Akiyama K. Subtypes of bladder mast cells in interstitial cystitis. *Int J Urol.* 7: 292-7, 2000.
12. Peeker R, Enerback L, Fall M and Aldenborg F. Recruitment, distribution and phenotypes of mast cells in interstitial cystitis. *J Urol.* 163: 1009-15, 2000.
13. Theoharides TC, Sant GR, el-Mansoury M, Letourneau R, Ucci AA Jr and Meares EM Jr. Activation of bladder mast cells in interstitial cystitis: a light and electron microscopic study. *J Urol.* 153: 629-36, 1995.
14. Christmas TJ and Rode J. Characteristics of mast cells in normal bladder,

bacterial cystitis and interstitial cystitis: *Br J Urol.* 68: 473-8, 1991.

15. Johansson SL and Fall M: Clinical features and spectrum of light microscopic changes in interstitial cystitis. *J Urol.* 143: 1118-24, 1990.

16. Feltis JT, Perez-Marrero R, and Emerson LE: Increased mast cells of the bladder in suspected cases of interstitial cystitis: a possible disease marker. *J Urol.* 138: 42-43, 1987.

17. Lynes WL, Flynn SD, Shortliffe LD, Lemmers M, Zipser R, Roberts LJ 2nd and Stamey TA. Mast cell involvement in interstitial cystitis. *J Urol.* 138: 746-52, 1987.

18. Aldenborg F, Fall M and Enerback L: Proliferation and transepithelial migration of mucosal mast cells in interstitial cystitis. *Immunology.* 58: 411-6, 1986.

19. Kastrup J, Hald T, Larsen S and Nielsen VG. Histamine content and mast cell count of detrusor muscle in patients with interstitial cystitis and other types of chronic cystitis. *Br J Urol.* 55: 495-500, 1983.

20. Larsen S, Thompson SA, Hald T, Barnard RJ, Gilpin CJ, Dixon JS and Gosling JA. Mast cells in interstitial cystitis. *Br J Urol.* 54: 283-6, 1982.

21. Gamper M, Regauer S, Welter J, Eberhard J and Viereck V. Are mast cells still good biomarkers for bladder pain syndrome/interstitial cystitis? *J Urol.* 193: 1994-2000, 2015.

22. Liu HT, Shie JH, Chen SH, Wang YS and Kuo HC. Differences in mast cell infiltration, E-cadherin, and zonula occludens-1 expression between patients with overactive bladder and interstitial cystitis/bladder pain syndrome. *Urology*. 80: 225.e13, 2012.
23. Dundore PA, Schwartz AM and Semerjian H: Mast cell counts are not useful in the diagnosis of nonulcerative interstitial cystitis. *J Urol*. 155; 885–887, 1996.
24. Ogawa T, Homma T, Igawa Y, Seki S, Ishizuka O, Imamura T, Akahane S, Homma Y and Nishizawa O. CXCR3 binding chemokine and TNFSF14 over expression in bladder urothelium of patients with ulcerative interstitial cystitis. *J Urol*. 183: 1206-12, 2010.
25. Homma Y, Nomiya A, Tagaya M, Oyama T, Takagaki K, Nishimatsu H and Igawa Y. Increased mRNA expression of genes involved in pronociceptive inflammatory reactions in bladder tissue of interstitial cystitis. *J Urol*. 190: 1925-31, 2013.
26. Kirkham BW, Kavanaugh A and Reich K. Interleukin-17A: a unique pathway in immune-mediated diseases: psoriasis, psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis. *Immunology*. 141: 133-42, 2014.
27. Lacotte S, Brun S, Muller S and Dumortier H. CXCR3, inflammation, and autoimmune diseases. *Ann NY Acad Sci*. 1173: 310-7, 2009.

28. Larsen MS, Mortensen S, Nordling J and Horn T. Quantifying mast cells in bladder pain syndrome by immunohistochemical analysis. *BJU Int.* 102: 204-7, 2008.
29. Nordling J, Anjum FH, Bade JJ, Bouchelouche K, Bouchelouche P, Cervigni M, Elneil S, Fall M, Hald T, Hanus T, Hedlund H, Hohlbrugger G, Horn T, Larsen S, Leppilahti M, Mortensen S, Nagendra M, Oliveira PD, Osborne J, Riedl C, Sairanen J, Tinzl M and Wyndaele JJ. Primary evaluation of patients suspected of having interstitial cystitis (IC). *Eur Urol.* 45: 662-9, 2004.
30. Abbas AK, Lichtman AH and Pillai S. *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System.* Fourth edition. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders, 2014.
31. Samoszuk MK, Krailo M, Yan QH, Lukes RJ and Parker JW. Limitations of numerical ratios for defining monoclonality of immunoglobulin light chains in B-cell lymphomas. *Diagn Immunol.* 3: 133–8, 1985.
32. Ferraccioli G and Tolusso B. Infections, B cell receptor activation and autoimmunity: different check-point impairments lead to autoimmunity, clonal B cell expansion and fibrosis in different immunological settings. *Autoimmun Rev.* 7: 109–13, 2007.
33. Bahler DW and Swerdlow SH. Clonal salivary gland infiltrates associated with

myoepithelial sialadenitis (Sjögren's syndrome) begin as nonmalignant antigen-selected expansions. *Blood*. 91: 1864–72, 1998.

34. Doorenspleet ME, Klarenbeek PL, de Hair MJ, van Schaik BD, Esveldt RE, van Kampen AH, Gerlag DM, Musters A, Baas F, Tak PP and de Vries N. Rheumatoid arthritis synovial tissue harbours dominant B-cell and plasma-cell clones associated with autoreactivity. *Ann Rheum Dis*. 73: 756–62, 2014.

35. Maillette de Buy Wenniger LJ, Doorenspleet ME, Klarenbeek PL, Verheij J, Baas F, Elferink RP, Tak PP, de Vries N and Beuers U. Immunoglobulin G4+ clones identified by next-generation sequencing dominate the B cell repertoire in immunoglobulin G4 associated cholangitis. *Hepatology*. 57: 2390–8, 2013.

36. Owens GP, Ritchie AM, Burgoon MP, Williamson RA, Corboy JR and Gilden DH. Single-cell repertoire analysis demonstrates that clonal expansion is a prominent feature of the B cell response in multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *J Immunol*. 171: 2725–33, 2003.

37. Pereira MI and Medeiros JA. Role of *Helicobacter pylori* in gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *World J Gastroenterol*. 20: 684–98, 2014.

38. Pacella M, Varca V, Venzano F, Toncini C, Carmignani G and Simonato A. Interstitial cystitis with plasma cell bladder infiltration: case report and literature review.

Arch Ital Urol Androl. 82: 122–4, 2010.

39. Christmas TJ. Lymphocyte sub-populations in the bladder wall in normal bladder, bacterial cystitis and interstitial cystitis. Br J Urol. 73: 508–15, 1994.

40. Gamper M, Viereck V, Geissbühler V, Eberhard J, Binder J, Moll C, Rehrauer H and Moser R. Gene expression profile of bladder tissue of patients with ulcerative interstitial cystitis. BMC Genomics. 10: 199, 2009.

41. Gamper M, Viereck V, Eberhard J, Binder J, Moll C, Welter J and Moser R. Local immune response in bladder pain syndrome/interstitial cystitis ESSIC type 3C. Int Urogynecol J. 24: 2049–57, 2013.

42. Rossi D and Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. Annu Rev Immunol. 18: 217-242, 2000.

43. Luster AD. Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. N Engl J Med. 338: 436-45, 1998.

44. Henneken M, Dorner T, Burmester GR and Berek C. Differential expression of chemokine receptors on peripheral blood B cells from patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. Arthritis Res Ther. 7: 1001-13, 2005.

45. Sallusto F, Lenig D, Mackay CR and Lanzavecchia A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. J

Exp Med. 187: 875–83, 1998.

46. Marques CP, Kapil P, Hinton DR, Hindinger C, Nutt SL, Ransohoff RM, Phares TW, Stohlman SA and Bergmann CC. CXCR3-dependent plasma blast migration to the central nervous system during viral encephalomyelitis. *J Virol.* 85: 6136–47, 2011.

47. Muehlinghaus G, Cigliano L, Huehn S, Peddinghaus A, Leyendeckers H, Hauser AE, Hiepe F, Radbruch A, Arce S and Manz RA. Regulation of CXCR3 and CXCR4 expression during terminal differentiation of memory B cells into plasma cells. *Blood.* 105: 3965–71, 2005.

48. Hauser AE, Debes GF, Arce S, Cassese G, Hamann A, Radbruch A and Manz RA. Chemotactic responsiveness toward ligands for CXCR3 and CXCR4 is regulated on plasma blasts during the time course of a memory immune response. *J Immunol.* 169: 1277–82, 2002.

49. Woo PC, Lau SK, Teng JL, Tse H and Yuen KY. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect.* 14: 908-34, 2008

50. Lang F, Linlin M, Ye T and Yuhai Z. Alterations of dendritic cell subsets and TH1/TH2 cytokines in the peripheral circulation of patients with superficial

transitional cell carcinoma of the bladder. *J Clin Lab Anal.* 26: 365-71, 2012.