

原田病および交感性眼炎の脳脊髄液細胞の検索 (図2, 表2)

有賀 浩子・大野 重昭 (北海道大学医学部眼科学教室)
樋口 真琴・松田 英彦

Immunological Studies on Lymphocytes in the Cerebrospinal Fluid
of Patients with Vogt-Koyanagi-Harada Disease
and Sympathetic Ophthalmia

Hiroko Ariga, Shigeaki Ohno, Makoto Higuchi
and Hidehiko Matsuda

Department of Ophthalmology, Hokkaido University School of Medicine

要 約

原田病および交感性眼炎の免疫病態解明のため、急性期のステロイド治療前の原田病患者8例、交感性眼炎患者2例の髄液中T細胞、B細胞の比率とT細胞サブセットの検索を行い、末梢血と比較検討した。このうち6例(交感性眼炎1例)についてはロゼット法で、4例(交感性眼炎1例)についてはLeuシリーズモノクローナル抗体を用い、fluorescein activated cell sorterで陽性細胞を検出した。その結果、1)ロゼット法では、6例中5例で末梢血と比較して髄液中のロゼット形成細胞が増加していた。2)モノクローナル抗体による検索では、4例中3例で、末梢血と比較し髄液中のLeu4陽性細胞が増加していた。3)Leu3a/Leu2a比は同一患者では末梢血と髄液で近似した値を示し、さらに末梢血Leu3a/Leu2a比は、健常人と比較して高い値をとった。4)原田病と交感性眼炎の間に差はみられなかった。以上より2疾患の病態形成にはhelper/inducer T細胞が重要な役割をはたしていることが示唆された。(日眼 92:225—228, 1988)

キーワード：原田病，交感性眼炎，髄液細胞増多，リンパ球サブセット

Abstract

Lymphocyte populations in the cerebrospinal fluid (CSF) and peripheral blood lymphocytes (PBL) were studied in Vogt-Koyanagi-Harada disease (VKH) and sympathetic ophthalmia (SO) by determining the percentage of T cells, B cells and T cell subpopulations. E rosetting techniques were used in six patients (five with VKH and one with SO) and fluorescein activated cell sorter techniques with monoclonal antibodies in four patients (three with VKH and one with SO). It was shown that the percentage of E rosette-forming cells and Leu4-positive lymphocytes was increased in the CSF of the patients as compared with PBL. The Leu3a/Leu2a ratio in PBL of patients was higher than that of normal controls. The Leu3a/Leu2a ratio of the patients was almost equal between PBL and the lymphocytes in CSF. No substantial difference was found between VKH and SO in terms of the population of lymphocytes. It is therefore suggested that helper/inducer T cells play some role in the immunopathogenesis of VKH and SO. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92: 225—228, 1988)

Key words: Vogt-Koyanagi-Harada disease, Sympathetic ophthalmia, Pleocytosis, Lymphocyte subpopulation

別刷請求先：060 札幌市北区北15条西7丁目 北海道大学医学部眼科学教室 大野 重昭 (昭和62年7月30日受付)

Reprint requests to: Shigeaki Ohno, M.D. Dept. of Ophthalmol., Hokkaido Univ. School of Med.

Kita 15, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo 060, Japan

(Accepted July 30, 1987)

I 緒 言

Vogt-小柳-原田病（以下原田病）は両眼性汎ぶどう膜炎，漿液性髄膜炎，脱毛，毛髪白変，皮膚白斑，感音性難聴などを生じる原因不明の全身疾患である。一方，交感性眼炎は穿孔性眼外傷の有無を除けば原田病と類似の疾患であると考えられている。これら二疾患はメラノサイトに対する自己免疫疾患であるとする説が有力であるが，その本態ははまだ明らかにされていない。

近年，免疫学の進歩により様々な疾患において何らかの免疫応答異常が病因，病態の一部に関与していることが明らかにされてきている。とくに，末梢血レベルだけでなく炎症局所における炎症細胞の検討により，炎症の場における免疫病態が明らかになりつつある。原田病の急性期には，ほとんどの例で髄液細胞増多がみられ，その主体はリンパ球であることがわかっている¹⁾²⁾。これらのリンパ球は髄膜の炎症に直接関与していると考えられるがその詳細な免疫学的検討はほとんどなされていない。

我々は原田病の免疫病態を知る手がかりの1つとして，髄液中に検出されるリンパ球のサブセットを検索し，炎症の場における免疫担当細胞を解析することを目的とした。

II 対象および方法

1. 対象

対象は北大眼科ぶどう膜炎外来を受診した原田病患者8例，交感性眼炎患者2例で，年齢は26歳から70歳，平均43.8歳であった。これらの患者において採血および腰椎穿刺による髄液検査をおこなった。発病から検査日までの期間は5日から30日，平均14.9日でいずれもステロイド治療前の急性期の症例であり全例に著明な髄液細胞増多を認めた（表1）。

このうち症例1から6についてはロゼット法で，また症例7から10についてはモノクローナル抗体を用い，Fluorescein activated cell sorter (FACS) で細胞膜抗原を検索した。採血と腰椎穿刺は同時に行った。なお，ロゼット法では年齢，性を一致させた健康正常人の末梢血も同時に検討した。

2. 方法

1) ロゼット法：末梢血はヘパリン採血し，比重遠沈法にてリンパ球を分離したのち，橘らの方法により，ロゼット形成の有無を検索した³⁾⁴⁾。まず，ポリ-L-

表1 原田病および交感性眼炎患者の背景

症例	年齢・性	病名	検査病日	髄液細胞数
1	54・♂	原田病	6	90/3
2	24・♀	原田病	10	199/3
3	35・♀	原田病	21	249/3
4	51・♂	原田病	17	277/3
5	26・♂	原田病	28	127/3
6	35・♀	交感性眼炎	30	34/3
7	37・♂	原田病	5	41/3
8	59・♀	原田病	13	745/3
9	70・♀	交感性眼炎	10	87/3
10	47・♀	原田病	9	2146/3

リジン (PLL) 処理プレートにリンパ球浮遊液をまき，さらにウシ胎児血清 (FCS) にて PLL の非特異的結合を阻止した。

T細胞用プレートは，FCSを除いたのち，酵素処理したヒツジ赤血球 (E) を 2×10^5 /ml になるように FCS に浮遊させ， $10 \mu\text{l}$ ごとに各孔に加え室温で90分静置のち， $4 \sim 8^\circ\text{C}$ で一晚反応させた。一方，B細胞用プレートは FCS を除いたのち，PBS でプレートを洗滌した。補体レセプター検出用指示細胞 (EAC) を 2×10^5 /ml になるように PBS に浮遊させ， $10 \mu\text{l}$ ずつ各孔に加え， 37°C で60分間反応させた。そののち， 37°C で30分間倒置し，未反応細胞を除き，翌日 T細胞と同時に判定するため 4°C で一晚倒置のまま放置した。

翌日，T細胞用プレートも30分間倒置し，未反応細胞を除去したのち，両プレートとも0.005% Brilliant Cresyl Blue で核染し鏡検した。そして青染した有核細胞中のロゼット形成細胞の百分率をもとめ，通常4コ以上の E または EAC が付着した有核細胞を陽性と判定した。単球，多核白血球の混入は，ベルオキシダーゼ染色を行い，以下の計算式により補正し，T細胞の百分率を算出した。

$$T \text{ 細胞 } (\%) = \textcircled{E} \times \frac{\textcircled{E} + \textcircled{C}}{\textcircled{E} \times [\textcircled{C} - \textcircled{P}]}$$

① E ロゼット形成細胞 (%)

② C : EAC ロゼット形成細胞 (%)

③ P : ベルオキシダーゼ陽性細胞 (%)

髄液は採取ののち遠沈し，Hanks 液で洗滌し，末梢血と同様の方法で検索した。

2) モノクローナル抗体を用いた方法：末梢血はヘパリン採血しロゼット法と同様に比重遠沈法でリンパ

球を分離した。こののち、Hanks液で洗滌をくり返し、各試験管に 1×10^6 コの細胞数となるよう分注し、ここにFITC標識モノクローナル抗体を加え、4℃で30分間反応させた。その後、再度洗滌し、FACSにて陽性細胞を検出した。なお用いたモノクローナル抗体は、Leu2a, Leu3a, Leu4, Leu11, HLA-DR, s-Igの6種類であった。Leu2aは, suppressor/cytotoxic T細胞と、Leu3aは, helper/inducer T細胞と、Leu4はT細胞と、HLA-DRはB細胞+活性化T細胞と、s-IgはB細胞と特異的に反応するモノクローナル抗体である。

髄液は検体量が十分得られないためLeu2a, Leu3a, Leu4の3種類のみを検索した。

III 結 果

Eロゼット形成細胞(T細胞)はコントロール末梢血では $63 \pm 12\%$ (M \pm SD), 患者末梢血では $54.5 \pm 7\%$, 患者髄液では $69 \pm 16.5\%$ であった(図1)。患者髄液中では、末梢血に比し、T細胞比率が高く、一方患者末梢血ではむしろコントロールの末梢血より低かった。これを各症例ごとに比較すると、一例を除き髄液中のT細胞比率は末梢血より高くなっていった。

モノクローナル抗体を用いた方法では、患者末梢血のLeu2a陽性細胞比率は $16 \pm 2.6\%$, Leu3a陽性細胞は $46.9 \pm 5.1\%$, Leu4陽性細胞は $60.2 \pm 6.3\%$, Leu11陽性細胞は $16.1 \pm 3.7\%$, HLA-DR陽性細胞は $10.7 \pm$

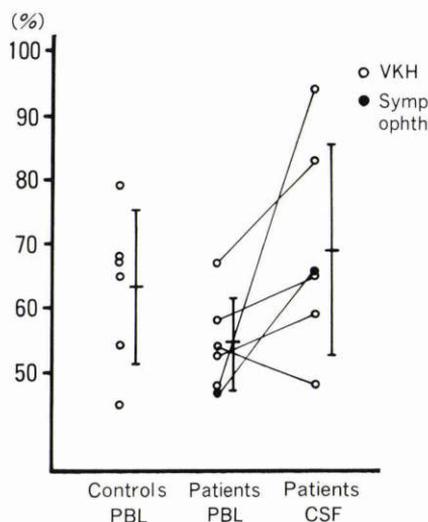


図1 原田病および交感性眼炎におけるEロゼット形成細胞比率 (PBL: peripheral blood lymphocytes, CSF: cerebrospinal fluid lymphocytes)

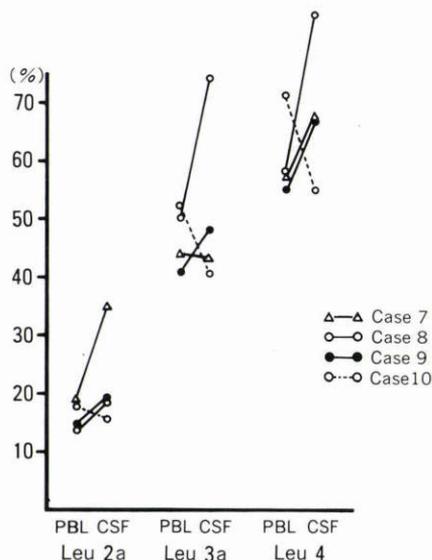


図2 原田病および交感性眼炎におけるTリンパ球サブセット (PBL: peripheral blood lymphocytes, CSF: cerebrospinal fluid lymphocytes)

表2 末梢血および髄液中リンパ球のLeu 3a/Leu 2a比

症例	PBL	CSF
7	2.34	1.22
8	2.86	2.48
9	3.78	3.95
10	2.97	2.65

PBL: peripheral blood lymphocytes
CSF: cerebrospinal fluid lymphocytes

4.9%, s-Ig陽性細胞は $27.8 \pm 7.7\%$ であった。これに対し髄液では、Leu2a陽性細胞 $22.1 \pm 8.6\%$, Leu3a陽性細胞 $51.1 \pm 15.5\%$, Leu4陽性細胞 $70.1 \pm 15.7\%$ であり、これらの値を各症例ごとに検討してみると、図2に示すように1例を除いていずれの陽性細胞も髄液中リンパ球の方が末梢血より高値であった。髄液中で陽性細胞の比率が減少していた例は症例10で、 $2,146/3$ と著明な髄液細胞増多をみた例であった。

つぎにLeu3a/Leu2a比をみると症例7を除いては末梢血、髄液のいずれも高値を示し同一症例では末梢血と髄液で近似した値を示していた(表2)。

なお、以上のすべての結果において交感性眼炎は原田病と同様の動きを示した。

IV 考 按

我々は、原田病の炎症局所における免疫病態を知る手がかりとして、急性期患者髄液中のリンパ球サブセットの検索を行った。

その結果、Eロゼット法、モノクローナル抗体による方法のいずれにおいても、髄液中のT細胞の割合が末梢血に比して増加していた。T細胞のサブセットに関しては検索した4例中3例においてLeu2a, Leu3a, Leu4のいずれの陽性細胞も末梢血に比し髄液中で増加していたが、さらにLeu3a/Leu2a値は高い値をとる傾向にあった。

原田病は、頭痛、微熱などの感冒様症状を前駆とすることが多いことから、これまでウイルス学的研究もおこなわれてきたが、ウイルス説を支持する成績はいまだみられない。逆にひとたび発症すると免疫異常の色彩がこくなる。たとえば、血清中にはウイルス感染と関連したインターフェロン(INF)- α は検出されず、むしろ免疫応答に関与するINF- γ が検出され⁵⁾、また末梢血リンパ球はメラノサイトに対する傷害性もち⁶⁾、炎症局所ではリンパ球とメラノサイトの接着像が認められている⁷⁾。なお交感性眼炎については、臨床像、病理像とも原田病と差異はみられず、また、今回の我々の結果でも両者に差はなく、病態についてはほぼ同一と考えてさしつかえないであろう。

本病の免疫異常を考えた場合、その主体をなしているのは、今回の我々の結果ではT細胞と考えられ、これは本病で検出されるINF- γ がT細胞由来であることと一致する⁸⁾。

サブセットの検索ではLeu3a陽性細胞が優位であり、これは髄液のみならず末梢血でも同様の傾向であり、T細胞の中でもhelper/inducer細胞の関与が示唆された。しかしT細胞自体は、患者末梢血ではコント

ロール群と比して増加しておらず、炎症の場である髄液中に動員されている可能性も考えられた。

いずれにしろ、本病の病態を知るためには炎症局所におけるリンパ球の動きを検討することが必要であり、今後さらに症例数をふやしモノクローナル抗体の数をふやすとともに個々の細胞の機能を検討することが必要である。

稿を終えるにあたり、ロゼット法について御指導いただいた北大免疫研究所病理小野江和則教授、安水良知先生、FACSについて御指導いただいた市立札幌病院病理吉木敬先生、谷口 雅技師に深謝いたします。

本研究は文部省科学研究費および日本眼科医学会学術振興助成金の補助を受けた。

文 献

- 1) 皆川玲子, 大野重昭, 広瀬茂人他: 原田病患者の臨床統計. 臨眼 36: 1249-1253, 1985.
- 2) 鎌先なな子, 庄司紘史, 加藤正郎他: Vogt-小柳-原田病における髄膜炎の検討. 神経内科 19: 155-158, 1983.
- 3) 橋 武彦, 吉田明子: ヒトのT細胞, B細胞の微量測定法. 免疫実験操作法 A, 455-462, 1974.
- 4) 小野江和則: E-Rosetteの意義, 改良とその応用. 北海道大学免疫科学研究所紀要, 第35集, 1-7, 1980.
- 5) 加藤富士子, 大野重昭, 松田英彦他: Vogt-小柳-原田病患者血清中および脳脊髄液中のインターフェロンの検索. 日眼 85: 39-43, 1976.
- 6) 前沢信義: Vogt-Koyanagi-Harada病における細胞障害性Tリンパ球の存在とその意義. 日眼 85: 216-221, 1976.
- 7) 松田英彦: Vogt-小柳-原田症候群及び交感性眼炎におけるMelanocyteの電子顕微鏡学的研究. 日眼 74: 135-140, 1970.
- 8) 大野重昭, 小竹 聡, 藤井暢弘他: Vogt-小柳-原田病におけるインターフェロンの研究. 日眼 86: 132-137, 1982.