

ベーチェット病患者における末梢血単球の *in vitro* tumor necrosis factor- α 産生能

中村 聡¹⁾, 杉田美由紀¹⁾, 田中 俊一²⁾, 大野 重昭¹⁾

¹⁾横浜市立大学医学部眼科学教室, ²⁾横浜市立大学医学部第3内科学教室

要 約

ベーチェット病の病態には種々の細胞性免疫機序が関与すると考えられている。我々は代表的な炎症性サイトカインである tumor necrosis factor- α (TNF- α) について, *in vitro* で検討を行い, ベーチェット病の免疫病態について考察した。横浜市大付属病院眼科ぶどう膜炎外来通院中の眼症状を有するベーチェット病患者 12 例(男性 7 例, 女性 5 例)を対象とし, 採取した末梢血から単球を分離培養した後 lipopolysaccharide (LPS) を添加し上清中の TNF 濃度を ELISA 法により測定し, 正常対照群 6 例と比較検討した。その結果, 活動性の網膜ぶどう膜炎を有する群の TNF- α 産生能は非活動性群および対照群に比べ有意に上昇していた ($p < 0.01$)。また眼発作期患者の TNF- α 産生能は発作後期に比べ有意に低いという結果が得られた ($p < 0.02$)。以上の結果からベーチェット病の局所の炎症形成および活動性には活性化マクロファージの産生する TNF- α の関与が考えられた。(日眼会誌 96: 1282—1285, 1992)

キーワード: 腫瘍壊死因子 (TNF- α), ベーチェット病, 網膜ぶどう膜炎, 免疫病理, サイトカイン

Enhanced Production of *in vitro* Tumor Necrosis Factor- α from Monocytes in Behçet's Disease

Satoshi Nakamura¹⁾, Miyuki Sugita¹⁾, Shun-ichi Tanaka²⁾ and Shigeaki Ohno¹⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Yokohama City University School of Medicine

²⁾The Third Department of Internal Medicine, Yokohama City University School of Medicine

Abstract

In vitro tumor necrosis factor- α (TNF- α) production from peripheral blood monocytes (PBMC) was investigated among 12 patients (male: 7, female: 5) with uveoretinitis of Behçet's disease and 6 age-matched healthy controls. TNF- α production of PBMC after the stimulation with lipopolysaccharides (LPS) was significantly enhanced in Behçet's disease patients with active uveoretinitis (21.5 ± 2.8 U/ml) compared with both controls (5.7 ± 1.8 U/ml) ($p < 0.01$) and inactive cases (5.1 ± 1.4 U/ml) ($p < 0.01$). In the cases with active uveoretinitis, TNF- α production in the period of ocular attack (7.2 ± 6.2 U/ml) was significantly lower than that of the post-attack period (24.4 ± 13.9 U/ml) ($p < 0.02$). These results may indicate that TNF- α plays an important role in the immunopathogenesis of uveoretinitis in Behçet's disease. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 96: 1282—1285, 1992)

Key words: Tumor necrosis factor- α (TNF- α), Behçet's disease, Uveoretinitis, Immunopathogenesis, Cytokines

別刷請求先: 236 横浜市金沢区福浦 3-9 横浜市立大学医学部眼科学教室 中村 聡
(平成 4 年 2 月 26 日受付, 平成 4 年 4 月 14 日改訂受理)

Reprint requests to: Satoshi Nakamura, M.D. Department of Ophthalmology, Yokohama City University School of Medicine, 3-9 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama 236, Japan

(Received February 26, 1992 and accepted in revised form April 14, 1992)

I 緒 言

ベーチェット病はぶどう膜をはじめとする全身諸臓器のリンパ球および好中球浸潤を特長とする慢性再発性の炎症をきたす疾患であり、その病態には細胞性免疫の異常が深く関わっていると推測されている。しかしこの免疫反応を司るサイトカインについては1982年大野ら¹⁾により活動性のぶどう膜炎を有するベーチェット病患者において血清中のinterferon-gammaが有意に上昇していたという報告があるが、他には未だ十分な検討がなされていない。また免疫異常の指標としてリンパ球のサブセット²⁾やナチュラルキラー(NK)細胞の活性³⁾についての研究などがあるが、疾患の活動性の有無などの判定が困難で臨床症状との相関については不明瞭な点が多い。そこで今回我々はベーチェット病の免疫病態の解明の一環として末梢血単球の産生する代表的な炎症性サイトカインであるtumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)について*in vitro*での産生能を検討し、ぶどう膜炎の発作を中心とする臨床症状との相関についても考察を加えた。

II 対象および方法

1. 対象

対象は横浜市大病院眼科ぶどう膜炎外来通院中の眼症状を有するベーチェット病患者のうち男性7例、女性5例、計12例で年齢は28歳から65歳、平均年齢は41.3歳であった。病型別では厚生省の診断基準で完全型が3例、不完全型が9例であった(表1)。対照として性別および年齢を一致させた健康成人6人を用いた。

2. TNFの測定

末梢血をヘパリン採血しFicoll-Conray(比重1.07)を用いた比重遠心法により単核球を分離後、10%ヒトAB型血清含有RPMI 1640培養液(GIBCO®)を用い培養フラスコ(FALCON® No. 3013)中で37°CのCO₂インキュベーターにより1時間培養後上清を吸引してリンパ球を除き、フラスコに吸着した単球を0.2%EDTAを4°C30分反応させて分離した。これを5×10⁶cells/mlに調整して24穴培養プレート(FALCON® No. 3047)にてlipopolysaccharide (LPS: DIFCO® E. Coli 055:B5)を添加し24時間培養後上清をハーベストし、そのTNF-alpha活性をELISA法(旭化成ヒトTNF-alpha測定キットPAC4D®)により測定し、正常対照群と比較検討した。また活動性の症例についてはぶどう膜炎の発作との相関を調べるこ

表1 対 象

症例No.	年 齢	性 別	病 型	HLA B 51
1	31	男	完全型	+
2	45	男	完全型	+
3	48	男	完全型	-
4	28	男	不全型	+
5	36	男	不全型	+
6	38	男	不全型	+
7	40	女	不全型	+
8	43	女	不全型	+
9	45	男	不全型	+
10	57	女	不全型	+
11	65	女	不全型	+
12	40	男	不全型	-

病型は厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班による診断基準(1987年)による

とを目的として可能な症例については発作の前後数回について測定を繰り返し、合計12例28検体について検討した。

3. 眼症状の分類(表2)

1) 眼症状の活動性による分類

眼症状の活動性とTNF-alpha産生能の相関を調べることを目的として、測定時の眼症状を、(1)活動性の網膜ぶどう膜炎:炎症の主体が網膜にあり、毎月1ないし2回のぶどう膜炎の発作を繰り返す症例、(2)活動性の虹彩毛様体炎:炎症の主体が虹彩毛様体にあり、毎月1ないし2回のぶどう膜炎の発作を繰り返す症例、(3)非活動性の症例:6か月以上ぶどう膜炎発作をおこしていない非活動性の症例、および対照に分けた。これにより対象12例28検体はそれぞれの採血時の病勢により、(1)6例17検体、(2)3例6検体、(3)3例5検体に分類された。この各群につきTNF-alpha産生能を測定した。

2) ぶどう膜炎発作の時期による分類

また活動性の網膜ぶどう膜炎を有する6例17検体について測定時の眼症状を、(1)発作期:ぶどう膜炎発作発症±3日(4検体)、(2)発作後期:発作後およそ1週から1か月の間(9検体)、(3)寛解期:最終発作後2か月以上経過(4検体)、の3つに分けて眼症状とTNF-alpha産生能の関連をみた。

III 結 果

1. 眼症状とTNF-alpha産生能

1) 眼症状の活動性とTNF-alpha産生能

活動性の網膜ぶどう膜炎を有する群のTNF-alpha

表2 眼症状の分類

眼症状の活動性分類	
(1) 活動性の網膜ぶどう膜炎	炎症の主体が網膜にあり, 毎月1ないし2回のぶどう膜炎の発作を繰り返す症例
(2) 活動性の虹彩毛様体炎	炎症の主体が虹彩毛様体にあり, 毎月1ないし2回のぶどう膜炎の発作を繰り返す症例
(3) 非活動性の症例	6か月以上ぶどう膜炎の発作をおこしていない症例
眼発作の時期による分類	
(1) 発作期	ぶどう膜炎発作発症±3日
(2) 発作後期	発作後およそ1週から1か月の間
(3) 寛解期	最終発作後2か月以上経過

産生能 (21.5±2.8 U/ml) (平均値±標準誤差) は非活動性群 (5.1±1.4 U/ml) および正常対照群 (5.7±1.8 U/ml) に比べ有意に上昇していた (p<0.01; Wilcoxon 順位和検定, 以下同じ). 一方眼症状が虹彩毛様体炎を主体とする群 (12.6±6.1 U/ml) は対照との間に有意差を認めなかった (図1).

2) 眼発作との相関

患者の眼発作期の TNF-alpha 産生能 (7.2±3.1 U/ml) は発作後期 (24.4±5.1 U/ml) に比べ有意に低く (p<0.02), また炎症の寛解期 (5.3±1.7 U/ml) で

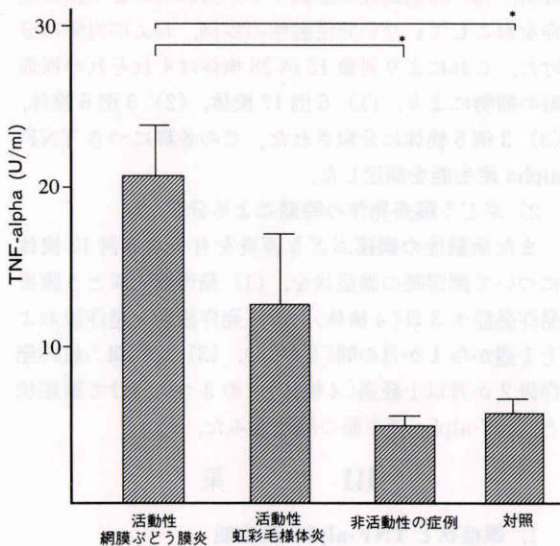


図1 眼症状の活動性と TNF-alpha 産生能. 値は平均値±標準誤差 (n=28). *p<0.01

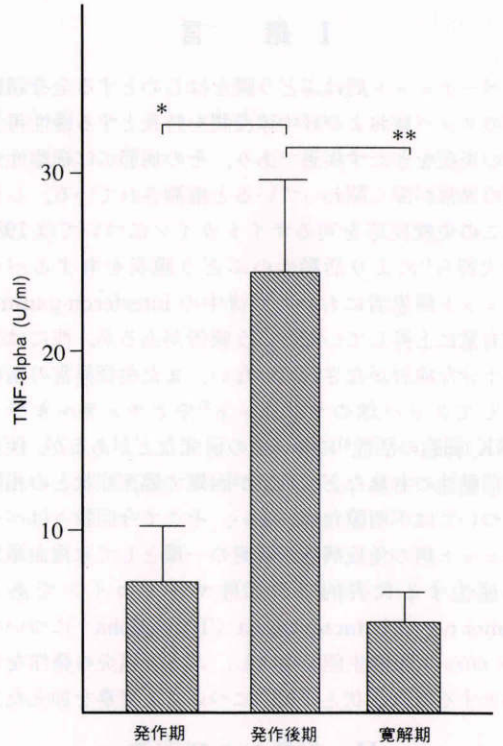


図2 眼発作と TNF-alpha 産生能の相関. 値は平均値±標準誤差 (n=13). *p<0.02, **p<0.01

も発作後期に比べ有意に低い (p<0.01) という結果が得られた (図2).

2. HLA-B 51 と TNF-alpha 産生能

患者の HLA-B 51 の有無, 性差と TNF-alpha 産生能については例数が少ないこともあり, 明らかな相関は認められなかった.

IV 考 按

TNF-alpha は単球・マクロファージの産生する蛋白質で 1975 年 Carswell ら⁴⁾によりマウスの血中に発見され, 当初その主な働きは腫瘍細胞の壊死効果であるとされていた. しかし最近の知見では TNF-alpha は血管内皮細胞および線維芽細胞の表面抗原 (HLA class II) の誘導⁵⁾, 好中球の活性化⁶⁾およびスーパーオキシド産生の誘導⁷⁾, マクロファージの IL-1 産生誘導⁸⁾などの多彩な生物活性を有する, 免疫・炎症に関わるサイトカインとしての役割を有することが明らかになってきた. これまでに systemic lupus erythematosus⁹⁾, 川崎病¹⁰⁾など, その病態に免疫異常が関わっていると推測される疾患において血中

TNF-alpha値が増加していたという報告がある。一方、ベーチェット病の病態には細胞性免疫の異常が深く関わっていると推測されている。しかしこれまでの研究は主に末梢血のT細胞サブセット²⁾、NK細胞の活性³⁾などについてであり、これら免疫担当細胞の相互作用をつかさどるサイトカインについてはinterleukin-2¹¹⁾およびinterferon-gamma¹⁾の変化に関する報告があるが、他のサイトカインについての報告は少ない。また従来報告では活動性の有無などの判定が困難で臨床症状との相関については不明瞭な点が多い。今回我々の結果は網膜ぶどう膜炎の活動性と末梢血単球のTNF-alpha産生能とが相関を有することを明らかにした。

眼症状が虹彩毛様体炎を主体とする症例では対照と比較してTNF-alphaの値は増加傾向にあるものの有意差が認められなかった。これは虹彩毛様体炎を主体とするベーチェット病の症例が一般に軽症であり、重症例では多くの場合網膜ぶどう膜炎も有することよりTNF-alphaの値がぶどう膜炎の重症度を現していると解釈される。またこの値がぶどう膜炎の発作時に一時的に低下し、その後上昇するのは大野ら¹⁾の報告による血中interferon-gammaの値の推移とよく一致した。このことを説明する仮説として、活動性のぶどう膜炎を有する症例では非発作時にもinterferon-gammaを産生するT細胞の活動性が高く、これにより活性化された単球が増加しているものと考えられる。また発作時には眼局所においてはこの反応が継続し、一方全身において著しく亢進した炎症反応に対するなんらかの抑制機序が働き、末梢血中のinterferon-gammaおよび単球のTNF-alpha産生能が低下する可能性が考えられる。この仮説の証明にはなんらかの眼局所における免疫担当細胞間相互作用を調べる手技が必要であり、現時点では立証され得ないが、ベーチェット病の局所の炎症は活性化した好中球より産生されるスーパーオキシドによる組織障害、血管の炎症性の閉塞などによるとされているため、ぶどう膜炎は炎症の場において活性化したマクロファージより産生されるTNF-alphaの直接の作用の結果であると推測される。HLA-B51に関しては今回症例数も少なく明らかな相関は認められなかった。

ベーチェット病はなんらかの遺伝的疾患感受性を有する個体に対して細菌あるいはウイルスなどの外因が

作用して引き起こされると考えられているが、今後はこの感受性の詳細な解析とその後の生体内の免疫機構、とくにサイトカインレベルでの研究を進めることで疾患の全貌が明らかになることが期待される。

文 献

- 1) Ohno S, Kato H, Fujii N, et al: Studies on spontaneous production of gamma-interferon in Behçet's disease. *Ophthalmologica* 185: 187-192, 1982.
- 2) Sakane T, Kotami H, Takada S, et al: Functional aberration of T cell subsets in patients with Behçet's disease. *Arthritis Rheum* 25: 1343-1351, 1982.
- 3) Kaneko F, Takahashi Y, Muramatsu R, et al: Natural killer cell numbers and function in peripheral lymphoid cells in Behçet's disease. *Br J Dermatol* 113: 313-318, 1985.
- 4) Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, et al: An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 3666-3670, 1975.
- 5) Stemme S, Fager G, Hansson GK: MHC class II antigen expression in human vascular smooth muscle cells is induced by interferon-gamma and modulated by tumor necrosis factor and lymphotoxin. *Immunology* 69: 243-249, 1990.
- 6) Shalaby MR, Aggarwal BB, Rinderknecht E, et al: Activation of human Polymorphonuclear neutrophil functions by interferon-gamma and tumor necrosis factors. *J Immunol* 135: 2069-2073, 1985.
- 7) Tsujimoto M, Yokata S, Vilcek J, et al: Tumor necrosis factor provokes superoxide anion generation from neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 137: 1094-1100, 1986.
- 8) Nawroth PP, Bank I, Handley D, et al: Tumor necrosis factor/cachectin interacts with endothelial cell receptors to induce release of interleukin 1. *J Exp Med* 163: 1363-1375, 1986.
- 9) Maury CPJ, Teppo A-M: Tumor necrosis factor in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 32: 146-150, 1989.
- 10) Furukawa S, Matsubara T, Jujoh K, et al: Peripheral blood monocyte/macrophages and serum tumor necrosis factor in Kawasaki disease. *Clin Immunol Immunopathol* 48: 247-251, 1988.
- 11) Sakane T, Suzuki N, Ueda Y, et al: Analysis of interleukin-2 activity in patients with Behçet's disease. *Arthritis Rheum* 29: 371-378, 1986.