

発作期ベーチェット病患者赤血球のサイトライゾーム

佐賀 徳博, 松田 英彦

北海道大学医学部眼科学教室

要 約

眼発作期にあるベーチェット病患者で、赤血球の形態学的異常があるか否か透過型電子顕微鏡で検討した。全身的薬物治療を受けていない眼発作を有するベーチェット病患者5例と健康対照者3例の末梢静脈血から赤血球をエポキシ樹脂に包埋、1症例につき各々100個以上の赤血球を観察した。患者群では、胞体内にサイトライゾームが $5.4 \pm 1.5\%$ (平均値 \pm 標準偏差)と、対照の $0.5 \pm 0.4\%$ に比べ高頻度にみられ、その差は統計学的に

有意であった($p < 0.026$)。このことは、ベーチェット病患者における赤血球サイトライゾームの発生、あるいは除去と関連した病態生理を反映していると考えられた。(日眼会誌 99:1140-1144, 1995)

キーワード: ベーチェット病, 赤血球, フリーラジカル, 自己喰食空胞, サイトライゾーム

Cytolysosomes in Red Blood Cells of Patients with Behçet's Disease at the Exacerbation Stage

Tokuhiro Saga and Hidehiko Matsuda

Department of Ophthalmology, Hokkaido University School of Medicine

Abstract

Peripheral erythrocytes of 5 patients with Behçet's disease, not receiving systemic treatment, at the exacerbation stage, and those of 3 healthy controls were investigated with a transmission electron microscope. More than 100 cells were examined per subject. Cytolysosomes (autophagic vacuoles) were frequently observed in cells of the patients. The average frequency of appearance of cytolysosomes was $5.4 \pm 1.5\%$ (mean \pm deviation) in erythrocytes of the 5 patients, and $0.5 \pm 0.4\%$ in those of the 3

control subjects. The difference was statistically significant ($p < 0.026$). These results suggest that cytolysosomes of erythrocytes may reflect abnormal production or removal involved in the pathophysiology of Behçet's disease. (J Jpn Ophthalmol Soc 99:1140-1144, 1995)

Key words: Behçet's disease, Erythrocyte, Free radical, Autophagic vacuole, Cytolysosome

I 緒 言

ベーチェット病は眼症状、皮膚症状、口腔粘膜の再発性アフタ性潰瘍、外陰部潰瘍を主徴として全身の諸臓器を侵す疾患であり、原因は未だ不明である。眼組織においては、病理学的に血栓形成を伴う閉塞性血管炎の所見が網膜、虹彩、毛様体、脈絡膜などにみられ¹⁾、原因検索の一方方向として血液が調べられ、凝固能の異常^{2)~4)}や血小板の構造の異常⁵⁾が知られている。しかしながら、血栓形成の一役を担う赤血球における形態学的異常については報告がない。そこで、発作期にあるベーチェット病患者におい

て、赤血球について形態学的異常があるか否か透過型電子顕微鏡(以下、電顕)で検討した。

II 対象と方法

全身的薬物治療を受けていない眼発作を有するベーチェット病患者5例(男性4例,女性1例,完全型3例,不全型2例)および健康対照者3例(男性3例)を対象とした。年齢は、患者群で平均31.6歳,対照で28.3歳であった。発作時臨床所見は、前房蓄膿を伴う虹彩毛様体炎2例,前房蓄膿を伴っていない強い虹彩毛様体炎1例,強い網膜出血と白斑2例で、検査所見では赤血球数が425万

別刷請求先: 060 北海道札幌市北区北15条西7丁目 北海道大学医学部眼科学教室 佐賀 徳博
(平成7年4月6日受付,平成7年6月27日改訂受理)

Reprint requests to: Tokuhiro Saga, M.D. Department of Ophthalmology, Hokkaido University School of Medicine, Kita 15, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo-shi, Hokkaido 060, Japan

(Received April 6, 1995 and accepted in revised form June 27, 1995)

～547万,平均485万/mm³,白血球数が5,900～12,500,平均8,740/mm³であった。方法は,今まで著者ら⁶⁾による好中球微小管の異常の報告と同様に末梢静脈血10mlをヘパリン採血し,室温で毎分2,000回転で10分間遠沈し,血漿をメスピペットおよびマイクロピペットで捨て,22°Cの2.5%グルタルアルデヒド溶液をその上に静かに重層し,15分間固定した。Buffy coatを試験管から取り出し,0.1M 燐酸緩衝液を通し,さらに,上記固定液で15分間固定した後に細切し,1%四酸化オスミウム溶液で室温で後固定した。エタノールおよびアセトンで脱水,酸化プロピレンで透徹エポキシ樹脂に包埋した。1症例につき3～4つのエポブロックから超薄切片を作製した後,ウラン-鉛の二重染色を施し日立H-800電顕で鏡検した。グリッドはVeco社の300メッシュを用い,一つのグリッド上の数枚の切片のうち1枚を鏡検し,同じ赤血球を観察しないよう十分注意した。少なくとも1症例につき各々100個以上の赤血球を観察した。

III 結 果

観察した赤血球は,遠沈したうちbuffy coat内で固定された多核白血球の層に隣接する比重の軽いものだった。切片上でみられる赤血球の形態はトルイジンブルー染色による光学顕微鏡切片では対照と違いはなく,電顕による低倍の観察では鏡検上,ポリソームを持つ網状赤血球は認めず,患者群で細胞の変形がある印象が多少

あったが,対照群と比較し外観の明らかな違いはなかった(図1)。また,膜の超微構造にも対照と差はみられなかった。しかしながら,患者群では細胞質内にKentら⁷⁾がヒト赤血球で報告した,いわゆるNovikoffら⁸⁾のいうcytolysosomeあるいはDe Duve⁹⁾のautophagic vacuole(以下,ghadiallyにならないcytolysosome¹⁰⁾とする,図1)が5.4±1.5%(平均値±標準偏差)と,対照の0.5±0.4%に比べ高頻度に見られ,統計学的に有意であった(表1)。サイトライソゾームは大きさが0.2～0.6μmで,細胞質が分離し始めたもの(図2a)や,膜で境された小胞の中に異常高電子密度(図2b),膜様物(図2c),ミ

表1 末梢血赤血球におけるサイトライソゾームの出現率

	A	6.0% (10/167)	
	B	5.0 (8/161)	
患者群	C	6.0 (9/149)	5.4±1.5%
	D	2.9 (5/173)	
	E	6.9 (9/131)	
対 照	F	0.74% (1/135)	
	G	0.80 (1/125)	0.5±0.4%
	H	0.00 (0/220)	

括弧内は観察実数

平均値±標準偏差

患者群と対照で出現率の差は統計学的に有意であった。

p<0.002, t-test; p<0.026, Mann-Whitney U test

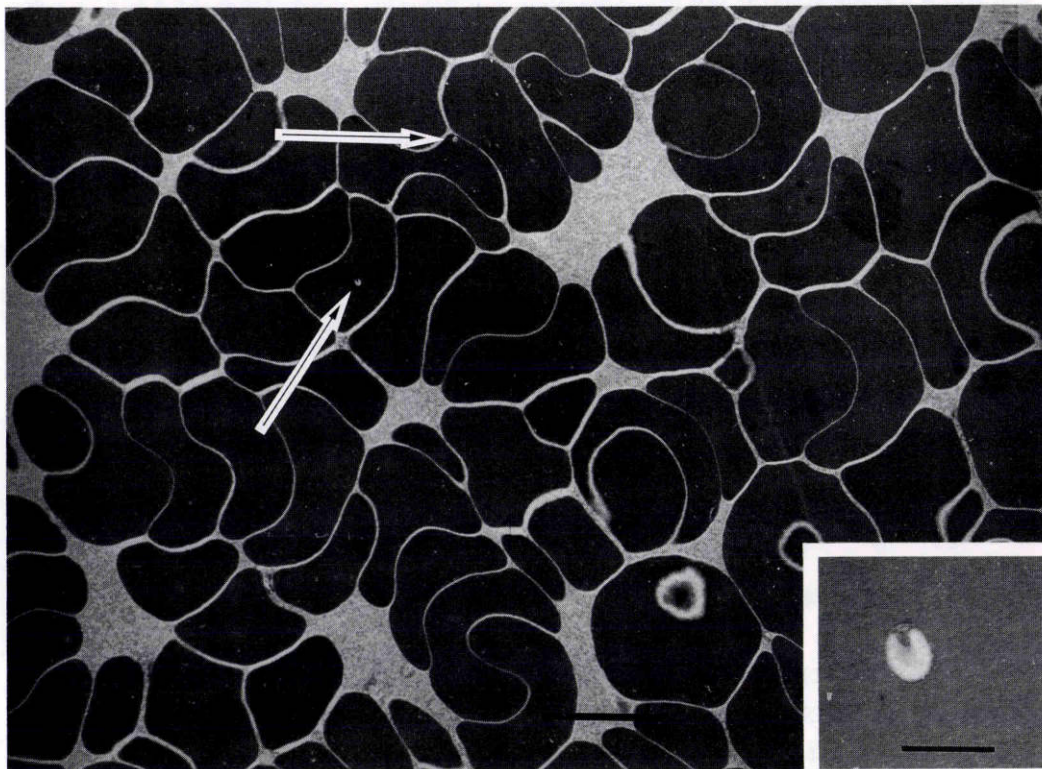


図1 眼発作用ペーチェット病患者赤血球の低倍電子顕微鏡写真。

矢印はサイトライソゾームを示す。バーは5μm,挿入は下方の矢印が示すサイトライソゾームの拡大像,異常な高電子密度がみられる。バーは0.5μm

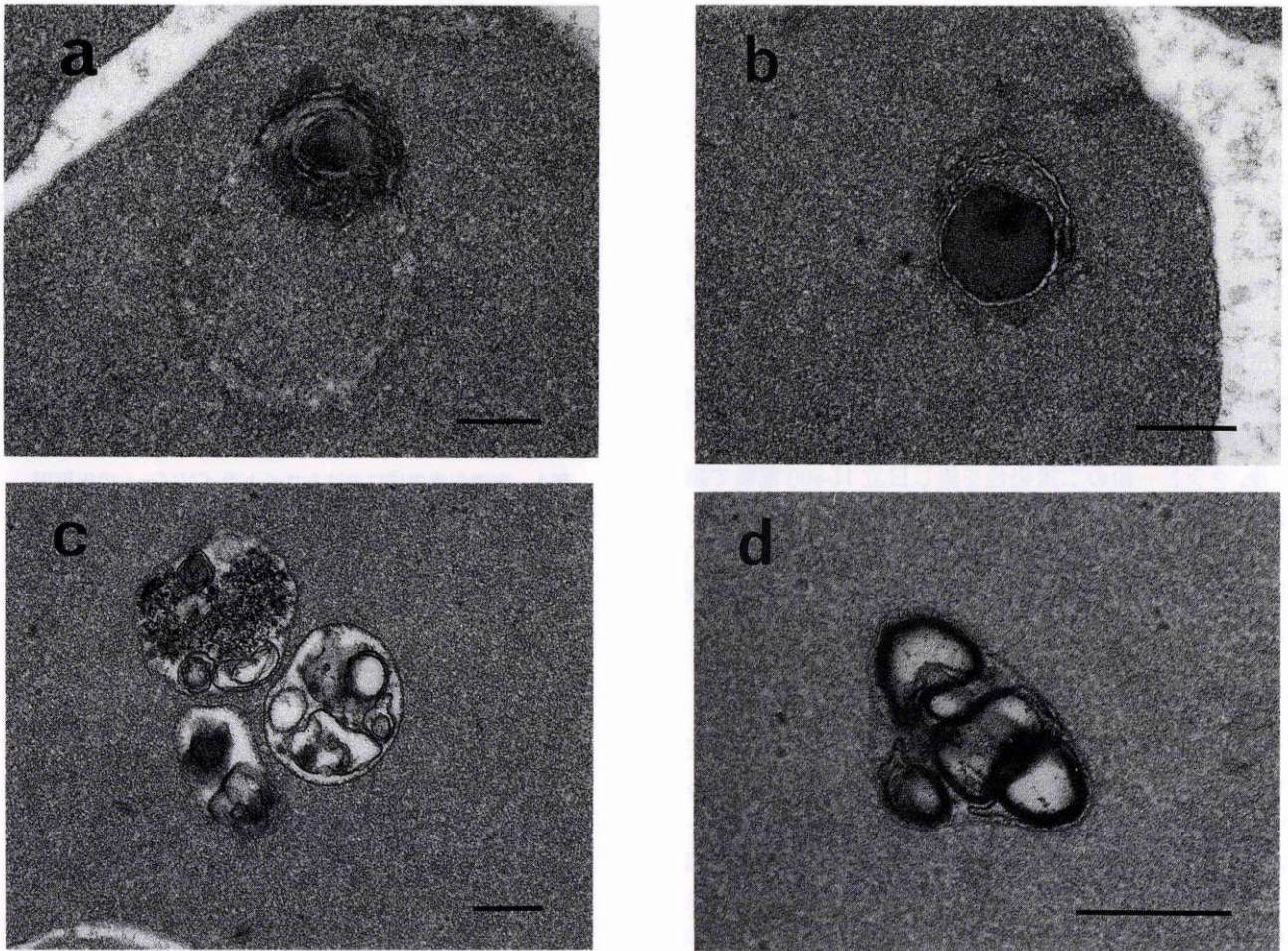


図 2

a: 患者赤血球の電子顕微鏡写真. 細胞質が分離し始め, その部位に接して高電子密度がみられる. b: 患者赤血球の電子顕微鏡写真. 膜で境された小胞の中に高電子密度体がみられ, それを小管構造が囲んでいる. c: モノソーム (monosome) を数個認めた未熟な患者赤血球の電子顕微鏡写真. 小胞が3個みられ, その中に, 高電子密度と膜様物を認める. 高電子密度はフェリチンと考えられる. d: モノソームが散在する患者網状赤血球の電子顕微鏡写真. ミエリン様の構造がみられる. バーは $0.2 \mu\text{m}$

エリン様(図2 d)のものを含むものなど様々な構造が認められた. その他, 患者1例において, 網状赤血球ミトコンドリアマトリックス内に鉄と思われる微細な高電子密度(図3)を認めた. 患者群でのサイトライソゾームを持つ赤血球の総数41個のうち, ミトコンドリアを持つものは4個, リボソームが散在するものは5個, 対照では1個であった.

IV 考 按

ペーチェット病における赤血球の形態異常については, 今まで報告がない.

赤血球のサイトライソゾームは形態学的に空胞や顆粒状の異常封入体の集合として両生類の末梢赤血球で最初に発見され¹¹⁾, その後, その存在は稀ではあるが, ヒトにおいても健康人の末梢赤血球で明らかにされ, ライソゾーム酵素である酸性フォスファターゼを含むことが証明された⁷⁾¹²⁾.

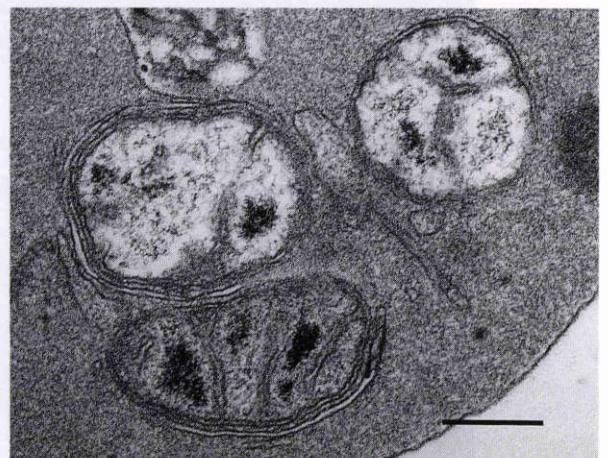


図3 患者網状赤血球の電子顕微鏡写真. モノソームが散在し, ミトコンドリアのマトリックス内には鉄と思われる微細な高電子密度を認める. バーは $0.2 \mu\text{m}$

今回の検討では赤血球を連続切片で観察していないので、切片上サイトライソゾームがみつからなかった血球にも、これが存在する可能性はあるが、一定の条件下で対照と出現率に明らかな差を認めた。

健康対照者における封入体の出現頻度は平均0.5% (0~0.8%)であり、他の報告による0.1~0.3%⁷⁾と比較してほぼ同様であった。それに対し、患者群では2.9~6%と明らかに高く、その差は統計学的に有意で、少ない場合でも4倍、平均値で比べるとほぼ10倍の開きを認めた。今回検討した赤血球は比重の軽いものであり、検索されたサイトライソゾームは網状赤血球のものを含んでいた。電顕的に網状赤血球はミトコンドリアやリボソームの有無によって成熟赤血球と区別されるが、鏡検して頻度を算出する際、赤血球細胞質がミトコンドリアを持たずリボソームのみを有する時、網状赤血球であるという同定は困難であった。したがって、算出された頻度は、成熟赤血球のサイトライソゾームの真の出現率を表すものではないが、発見されたサイトライソゾームは網状赤血球に存在するものは少なく、網状赤血球分を除いても患者群で明らかに高頻度であった。これは網状赤血球におけるサイトライソゾームの出現頻度が低いということの意味するわけではなく、ミトコンドリアを持っていたものではすべてサイトライソゾームを有しており、頻度が高い傾向があるとした報告⁷⁾と矛盾はないと思われる。したがって、結果はサイトライソゾームの存在がベーチェット病の病態を表現していることを示唆している。

赤血球サイトライソゾームは溶血性貧血、外傷などで脾臓の摘出を受けた場合、特に貧血があつて脾臓摘出を受けたときに増加する⁷⁾ことが知られ、この構造物は正常では脾臓によって除去されることが推測されてきた^{13)~15)}。一方で、電顕的に赤血球の膜に小口があき、サイトライソゾームが細胞外と交通していること¹⁰⁾から、また網状赤血球を培養すると、エクソサイトーシスによってそれらが細胞外に排出されることから赤血球の成熟と関連し、脾臓以外での除去経路が提出されている¹⁶⁾。今回の検討では、サイトライソゾームは細胞質の中心より細胞膜に近い辺縁にあるものが多かったが、エクソサイトーシスの所見は認めなかった。ベーチェット病においては、脾臓の機能異常や赤血球の成熟についての報告はない。また、サイトライソゾームと血栓形成との関連は不明である。今回の結果の意味づけおよび解釈は困難であるが、次の推測し得る説明を加えておきたい。

ベーチェット病の病態においては、好中球の機能亢進に基づく活性酸素の産生による組織障害が重要とされている¹⁷⁾¹⁸⁾。図4、5にみられるような膜様物は超微構造的にはリン脂質を含むことを示唆しており、同様の構造はリポフスチン様色素にも認められ¹⁹⁾、フリーラジカルがその生成に関与していると考えられている^{20)~23)}。フリー

ラジカルを発生させるヒドラジン類(hydrazine and its derivatives)は赤血球膜に作用して、リポフスチンを生成させることがスペクトロスコピーを用いて証明されている²⁴⁾。加えて、フリーラジカルを発生させる6-ヒドロキシドパミン²⁵⁾は神経細胞にサイトライソゾームを形成させる²⁶⁾。赤血球のサイトライソゾームがフリーラジカルによって生成したという報告はないが、否定する報告もみあたらない。したがって、眼発作を有するベーチェット病において赤血球サイトライソゾームが流血中に高頻度でみられたことは、組織を攻撃するフリーラジカルの発生あるいはその消去²⁷⁾に関連した病態生理と何らかの関係があると考えられるだろう。一方、この構造物を除去する脾臓の障害、赤血球の成熟の異常に関連している可能性もあり、今後、検討の必要がある。

文 献

- 1) 猪俣 孟, 鬼木信乃夫, 生井 浩: ベーチェット病眼病変の病理組織学. 猪俣 孟, 他(編): 眼科 Mook, 28, 眼病理学, 金原出版, 東京, 232—243, 1986.
- 2) Chajek T, Aronowski E, Izak G: Decreased fibrinolysis in Behçet's diseases. *Diath Hoemorrh* 29: 610—619, 1973.
- 3) 斉藤一宇: Behçet 病の線溶能の検討. *日眼会誌* 77: 693—698, 1973.
- 4) 水島 裕: ベーチェット病と血小板機能. 厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班. 昭和57年度研究業績, 173—177, 1982.
- 5) 有森 茂: ベーチェット病血小板の超微形態像. 厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班. 昭和59年度研究業績, 158—163, 1985.
- 6) 佐賀徳博, 松田英彦: ベーチェット病における多核白血球の微小管について. *日眼会誌* 89: 349—353, 1985.
- 7) Kent G, Minick OT, Volini FI, Orfei E: Autophagic vacuoles in human red cells. *Am J Pathol* 48: 831—857, 1966.
- 8) Novikoff AB, Essner E: Cytolysosomes and mitochondrial degeneration. *J Cell Biol* 15: 140—145, 1962.
- 9) De Duve: General properties of lysosomes. The lysosome concept. In: De Reruck AVS, et al (Eds): *Lysosomes*. Little, Brown & Company, Boston, 1—35, 1963.
- 10) Ghadially FN: *Ultrastructural Pathology of the Cell and Matrix*. Second Edition, Butterworths, 482—485, 1982.
- 11) Tooze J, Davies HJ: Cytolysosomes in amphibian erythrocytes. *J Cell Biol* 24: 146—150, 1965.
- 12) Schaeffer K, Brinkley BR, Young JE, Oliver SS, Chang JP, Guillen WM: The occurrence of lysosome-like structures in sickling erythrocytes. *Lab Invest* 23: 297—301, 1970.
- 13) Crosby WH: Normal functions at the spleen relative to red blood cells: A review. *Blood* 14: 399—408, 1959.
- 14) Weed RI, Weiss L: The relationship of red cell fragmentation occurring within the spleen to cell

- destruction. *Trans Ass Am Physns* 79: 426—438, 1966.
- 15) **Lux SE, John KM**: Isolation and partial characterization of a high molecular weight red cell membrane protein complex normally removed by the spleen. *Blood* 50: 625—641, 1977.
 - 16) **Gronowicz G, Swift H, Steck TL**: Maturation of the reticulocyte in vitro. *J Cell Sci* 71: 177—197, 1984.
 - 17) **Niwa Y, Miyake S, Sakane T, Shingu M, Yokoyama M**: Auto-oxidative damage in Behçet's disease—Endothelial cell damage following the elevated oxygen radicals generated by stimulated neutrophils. *Clin Exp Immunol* 49: 247—255, 1982.
 - 18) **中村 聡, 杉田美由紀, 田中俊一, 大野重昭**: ベーチェット病患者における末梢単球の *in vitro* tumor necrosis factor-alpha 産生能. *日眼会誌* 96: 1282—1285, 1992.
 - 19) **Saga T, Tagawa Y, Takeuchi T, Nerome K, Matsuda H**: Electron microscopic study of cells in vitreous of guinea pig. *Jpn J Ophthalmol* 28: 239—247, 1984.
 - 20) **Siakotos AN, Armstrong D**: Age pigment, a biochemical indicator of intracellular aging. In: Ordy JM, et al (Eds): *Neurobiology of Aging*. Plenum Press, New York, 360—399, 1975.
 - 21) **Mead J**: Free radical mechanism of lipid damage and consequences for cellular membranes. In: Pryor W (Ed): *Free Radicals in Biology*, Vol 1. Academic Press, New York, 51—68, 1976.
 - 22) **Shimasaki H, Ueta N, Mowri H, Inoue K**: Formation of age pigment-like fluorescent substances during peroxidation of lipids in model membranes. *Biochim Biophys Acta* 792: 123—129, 1984.
 - 23) **Marzabadi MR, Sohal RS, Brunk UT**: Effect of alpha-tocopherol and some metal chelators on lipofuscin accumulation in cultured neonatal rat cardiac myocytes. *Anal Cell Pathol* 2: 333—346, 1990.
 - 24) **Jain SK, Hochstein P**: Generation of superoxide radicals by hydrazine. Its role in phenylhydrazine-induced hemolytic anemia. *Biochim Biophys Acta* 586: 128—136, 1979.
 - 25) **Pederson JZ, Sherbini SE, Finazzi AA, Rotilio G**: A substrate-cofactor free radical intermediate in the reaction mechanism of copper amine oxidase. *Biochemistry* 31: 8—12, 1992.
 - 26) **Horvath TL, Naftolin F, Leranath C**: Luteinizing hormone-releasing hormone and gamma-aminobutyric acid neurons in the medial preoptic area are synaptic targets of dopamine axons originating in anterior periventricular areas. *J Neuroendocrinol* 5: 71—79, 1993.
 - 27) **空地顕一, 淀井淳司**: Behçet病とサイトカイン. *医学のあゆみ* 164: 65—68, 1993.