

ベーチェット病およびサルコイドーシスの polarization assay による好中球遊走能

小川 智美

帝京大学医学部眼科学教室

要 約

ベーチェット病 47 例, サルコイドーシス 24 例, 健康人対照 53 例を対象に, 好中球遊走初期反応 (polarization) を polarization assay により検討した. ベーチェット病の polarization 値 (P 値) は対照より有意に高かった ($p < 0.05$, t 検定). 対照に比べ活動期は有意に高かったが ($p < 0.05$), 非活動期は差がなかった. 年齢, 性, 病型, コルヒチン投与は P 値に影響しなかった. サルコイドーシスの P 値は活動期, 非活動期とも対照およびベーチェット病の非活動期より有意に低く ($p < 0.05$), 各病期間に差はなかった. ベーチェット病では好

中球の遊走初期反応が亢進しているが, サルコイドーシスでは抑制あるいは障害されている可能性がある. Polarization assay はベーチェット病の好中球遊走初期反応を捕える優れた方法で, サルコイドーシスとベーチェット病の鑑別診断に役立つ. これらの疾患では病因および病態上好中球の作用は対照的と考えられる. (日眼会誌 99: 696-702, 1995)

キーワード: ベーチェット病, サルコイドーシス, 好中球, Polarization, Polarization assay

Neutrophil Chemotaxis by Polarization Assay in Behçet's Disease and Sarcoidosis

Tomomi Ogawa

Department of Ophthalmology, Teikyo University School of Medicine

Abstract

The early phase reaction of neutrophil chemotaxis (polarization) was studied in 47 cases with Behçet's disease and 24 cases with sarcoidosis by polarization assay. 53 normal subjects served as controls. The titer of polarization in Behçet's disease was significantly higher than in the controls ($p < 0.05$, t-test). The titer of the active stage was significantly higher than in the controls ($p < 0.05$), but there was no difference in the titers between the inactive stage and the controls. The age, the sex, type of disease, and colchicine did not influence the titers. The titer of polarization in sarcoidosis, however, was significantly lower in both the active and inactive stages than in the controls and the inactive stage of Behçet's disease ($p < 0.05$). There was no difference

in the titers between each stage. In Behçet's disease, neutrophil chemotaxis may be activated, whereas it may be suppressed or disturbed in sarcoidosis. Polarization assay is an excellent method for detecting neutrophil polarization in Behçet's disease and is useful to make a differential diagnosis between Behçet's disease and sarcoidosis. In the etiology and pathology of these diseases, neutrophils may play an opposite role. (J Jpn Ophthalmol Soc 99: 696-702, 1995)

Key words: Behçet's disease, Sarcoidosis, Neutrophil leukocyte, Polarization, Polarization assay

I 緒 言

ベーチェット病はサルコイドーシスと並ぶ我が国の代

表的なぶどう膜炎で, 病因は不明であるが, 病態上は対照的な疾患である. ベーチェット病は非肉芽腫性, サルコイドーシスは肉芽腫性のぶどう膜炎で, 前者は好中球

別刷請求先: 213 神奈川県川崎市高津区溝口 74 帝京大学医学部附属溝口病院眼科 難波 克彦
(平成 6 年 9 月 22 日受付, 平成 7 年 1 月 7 日改訂受理)

Reprint requests to: Katsuhiko Namba, M.D. Department of Ophthalmology, Teikyo University School of Medicine Mizonokuchi Hospital. 74 Mizonokuchi, Takatsu-ku, Kawasaki-shi, Kanagawa-ken 213, Japan

(Received September 22, 1994 and accepted in revised form January 7, 1995)

が病態に深く関与しているが¹⁾²⁾、後者は好中球の関与は少なく、リンパ球が主体とされている^{3)~5)}。したがって、両疾患の好中球機能を比較することは、これらの病因および病態の解明に有意義と思われる。

近年、好中球遊走のごく初期にみられる仮足を出した状態、すなわち、polarizationを捕える方法として、polarization assayが行われるようになった⁶⁾⁷⁾。本法による好中球遊走能については、皮膚科領域でベーチェット病に関する報告⁷⁾がみられるが、詳細な検討はなされておらず、また、ベーチェット病以外のぶどう膜炎については明らかにされていない。そこで、polarization assayにより、ベーチェット病の好中球遊走初期反応を眼科的立場から検討し、併せてサルコイドーシスとの比較を行った。

II 実験方法

1. 対象

ベーチェット病患者47例(男性25例,女性22例),サルコイドーシス患者24例(男性3例,女性21例),健康人対照53例(男性35例,女性18例)を対象とした。年齢は、ベーチェット病が28~66歳(平均44.6歳),サルコイドーシスが13~80歳(平均52.9歳),対照が22~61歳(平均36.1歳)であった。

ベーチェット病の診断は、厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班の診断基準⁸⁾に従った。ベーチェット病の病型は、完全型が20例(男性8例,女性12例),不全型が27例(男性17例,女性10例)で、不全型のうち陰部潰瘍を欠くもの20例(男性17例,女性3例),眼症状を欠くもの7例(女性7例)であった。

サルコイドーシスの診断は、特徴的な肉芽腫性ぶどう膜炎、両側肺門部リンパ節腫脹の存在、血清アンジオテンシン変換酵素の上昇、ツベルクリン皮内反応陰性などによった。

両疾患とも活動期は、眼症状のあるものでは主に眼症状、ないものでは眼外症状が明らかに増悪したものとし、全身検査所見を参考にした。非活動期は、症状増悪後3週以上経過し鎮静化したもので、その後1か月以内に増悪していないものとした。

治療は、両疾患とも眼局所に副腎皮質ステロイド剤および散瞳剤の点眼を行い、ベーチェット病では、colchicine(コルヒチン®, 東京田辺, 東京)の内服(0.5~1.5 mg/日)を行った。ベーチェット病でコルヒチンを投与した者は31例,投与しなかった者は16例であった。両疾患とも全例副腎皮質ステロイド剤の全身投与は行っていない。

2. 方法

1) 好中球の調整

ヘパリン加肘静脈血を9 ml採取し、2% Dextran T 500® (Pharmacia, Stockholm, Sweden) 6 mlと混和

し、室温に20分間静置した。分離後、赤血球層を残して上清をプラスチック遠沈管に移し、10 mlのFicoll-Conray液に重層させ、22°C, 150 Gで25分間遠心分離し、好中球層(buffy coat)を採取した。混入した赤血球を0.2% NaClで30秒間低張処理し、同量の1.6% NaClで等張にし、4°C, 150 Gで5分間遠心分離した。上清を捨て、沈渣をCa⁺⁺を除いたKrebs Ringerリン酸緩衝液(以下KRP, pH 7.4)で2回洗い(150 G, 5分間)、得られた好中球浮遊液を1.0×10⁶個/mlに調整した。

2) Polarization assay

朝長ら⁶⁾の方法に準じて行った。遊走因子として、n-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine(以下,FMLP)(Sigma, St. Louis, USA)(10⁻¹¹~10⁻⁶mol/l)30 μlに好中球浮遊液270 μlを加え、振盪恒温槽で37°C, 10分間反応させた後、30%ホルマリン300 μlを加えて反応を停止させ、30分間水中に静置した。顕微鏡下で、Burker-Turk血球計算盤(Erma, 東京)の全視野(3 mm×5 mm)の好中球数に対するpolarizationした好中球(図1, 2)数の百分率を求め、polarization値とした。統計学的な有意差の検定はstudentのt-testを用いた。

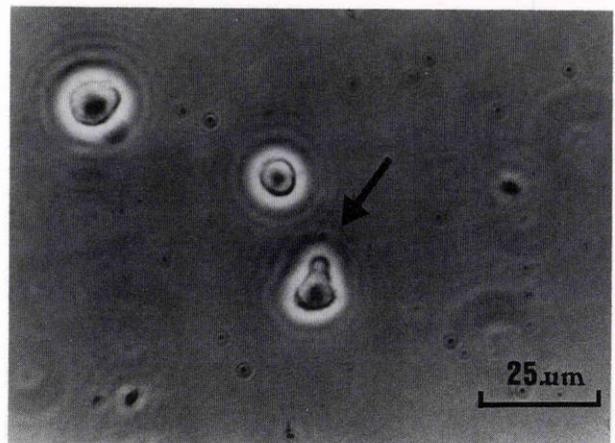


図1 Polarizationしたベーチェット病の好中球(矢印)。

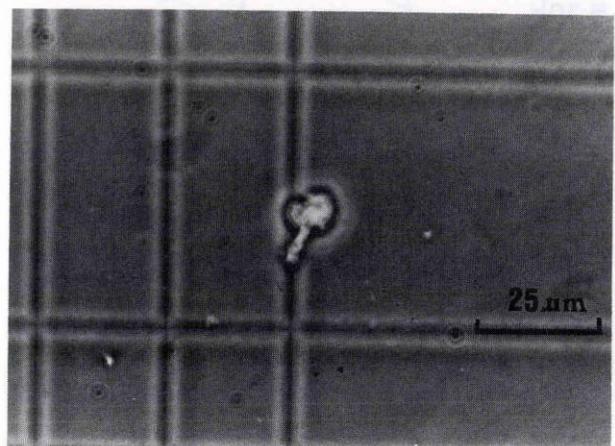


図2 Polarizationしたベーチェット病の好中球。

III 結 果

ベーチェット病の polarization 値は、対照に比べ、FMLP のすべての濃度で有意に高かった ($p < 0.05$, 図3). ベーチェット病の活動期の polarization 値は非活動期よりも有意に高く ($p < 0.05$), 非活動期と対照の間には差がなかった (図4). 同一のベーチェット病患者で活動期と非活動期の polarization 値をとともに測定し

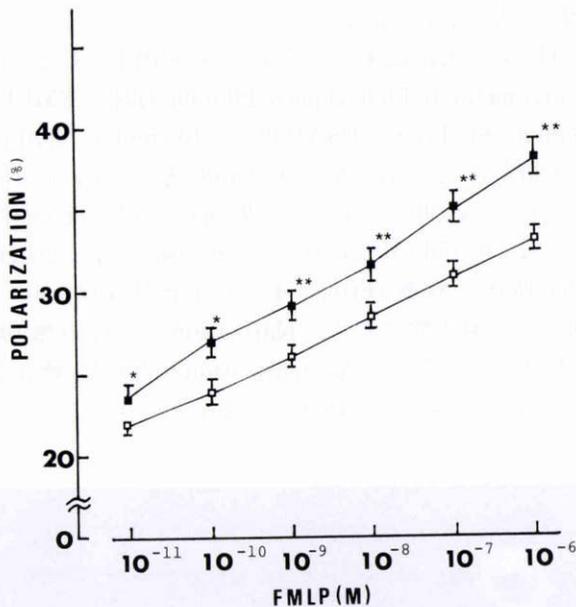


図3 ベーチェット病と対照の polarization 値.
 黒四角: Behçet (n=47), 白四角: control (n=53)
 **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$

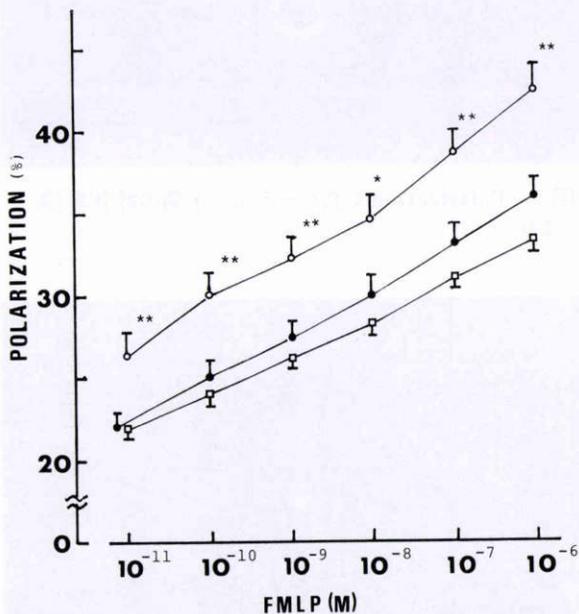


図4 ベーチェット病の活動期と非活動期の polarization 値.
 白丸: active (n=16), 黒丸: inactive (n=31), 白四角: control (n=53)
 **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$

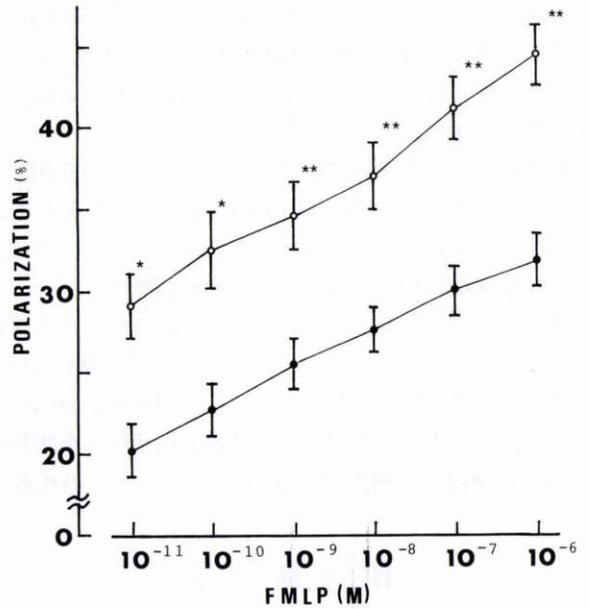


図5 ベーチェット患者7例の活動期と非活動期の polarization 値.
 白丸: active (n=7), 黒丸: inactive (n=7)
 **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$

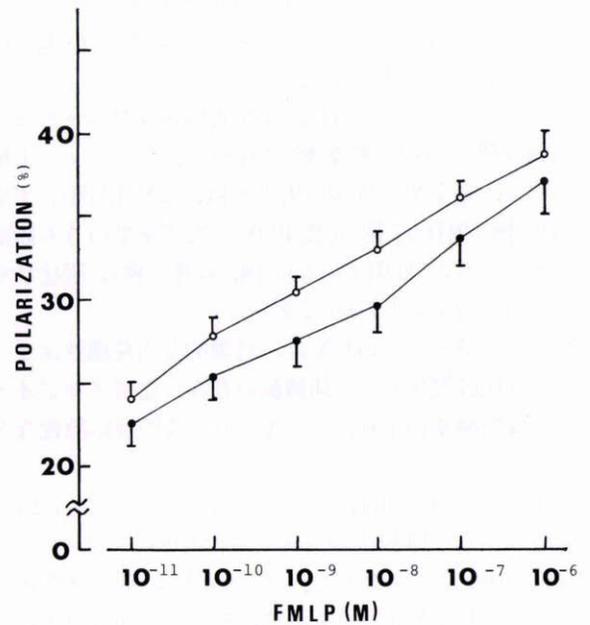


図6 ベーチェット病の年齢による polarization 値.
 黒丸: ≥ 45 yrs (n=19), 白丸: < 45 yrs (n=28)

得たものは7例であった。これらを対象に活動期と非活動期の polarization 値を比較すると、図4の傾向はより顕著となり、paired t-test により5%の危険率で有意差が認められた (図5). 次に、ベーチェット病患者を45歳以上と45歳未満とに分け、各々の polarization 値を比較したところ、有意差はみられなかった (図6). また、ベーチェット病患者で性別、病型別の polarization 値を検討した。男性と女性、完全型と不全型の各々の間に有意差はなかった (図7, 8). さらに、ベーチェット病患者

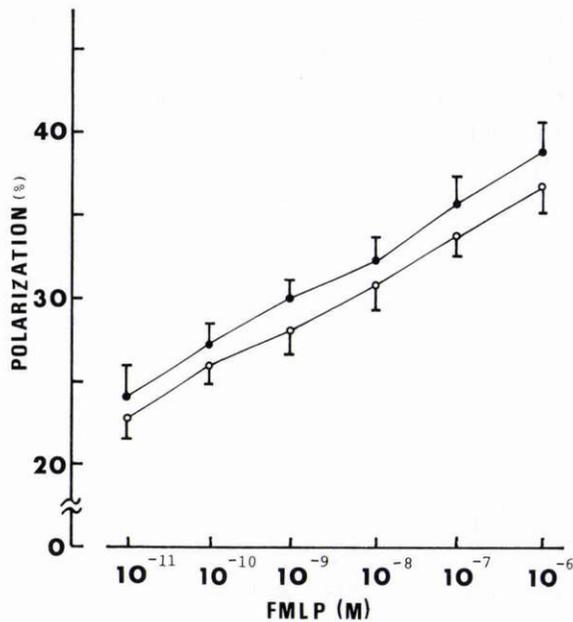


図7 ベーチェット病の性別による polarization 値. 黒丸: male (n=25), 白丸: female (n=22)

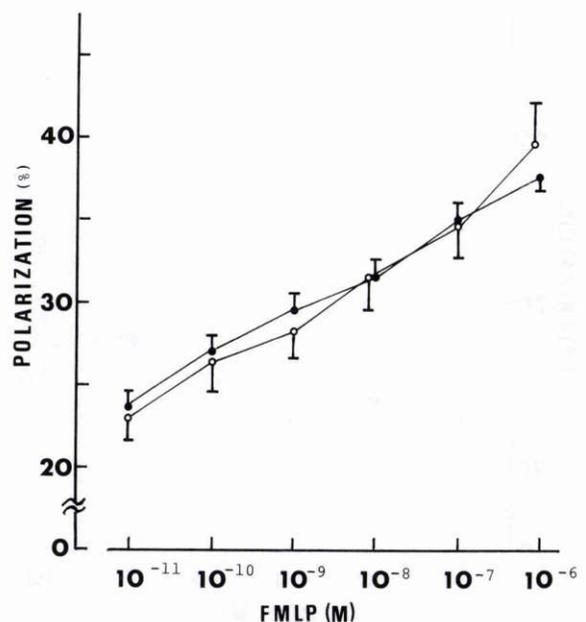


図9 ベーチェット病のコルヒチン投与と polarization 値. 黒丸: colchicine (+) (n=31), 白丸: colchicine (-) (n=16)

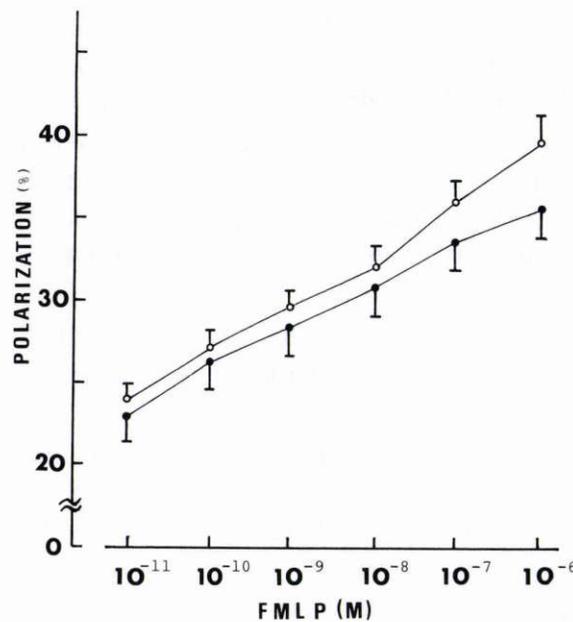


図8 ベーチェット病の完全型と不全型の polarization 値. 黒丸: complete type (n=20), 白丸: incomplete type (n=27)

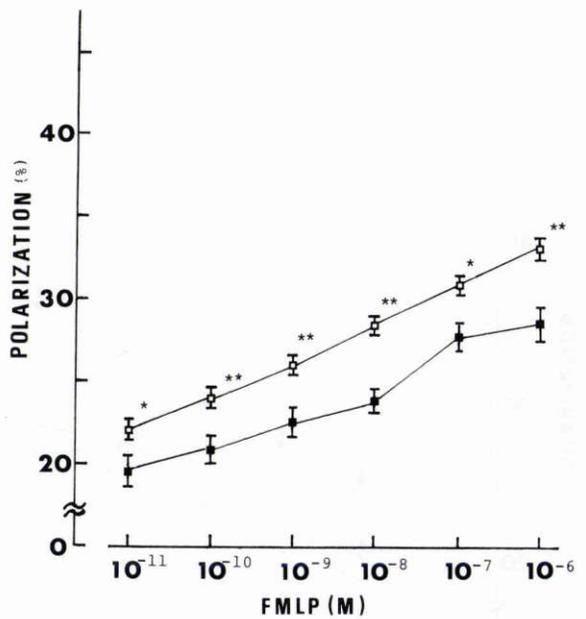


図10 サルコイドーシスと対照の polarization 値. 黒四角: sarcoidosis (n=24), 白四角: control (n=53) **p<0.01, *p<0.05

の polarization に対するコルヒチン投与の影響を検討したところ、コルヒチン投与群と非投与群の polarization 値に有意差は認められなかった (図9)。

一方、サルコイドーシスの polarization 値は、対照よりも有意に低かった (p<0.05, 図10)。また、活動期および非活動期の polarization 値はともに対照よりも有意に低く (p<0.05), 両者の間には差がなかった (図11)。また、サルコイドーシスは、活動期も非活動期もベーチェット病の非活動期に比して有意に低かった (p<

0.05, 図12)。

IV 考 按

Polarization assay は、好中球浮遊液に遊走因子を加えると好中球の形態変化が起こるという Smith ら⁹⁾の報告を応用し、1984年朝長ら⁶⁾が、好中球のごく初期の遊走能をみる方法として確立したものである。

好中球は、遊走因子の存在しない無刺激状態でも、方

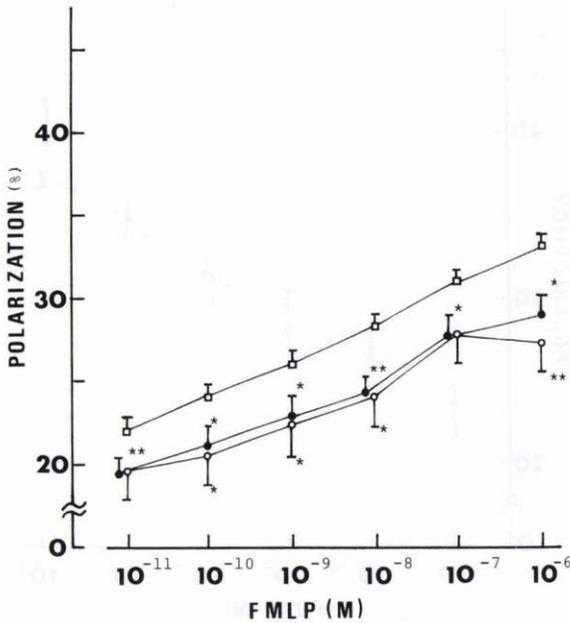


図11 サルコイドーシスの活動期と非活動期の polarization 値.
 白丸：active (n=9), 黒丸：inactive (n=15), 白四角：control (n=53)
 **: p<0.01, * : p<0.05

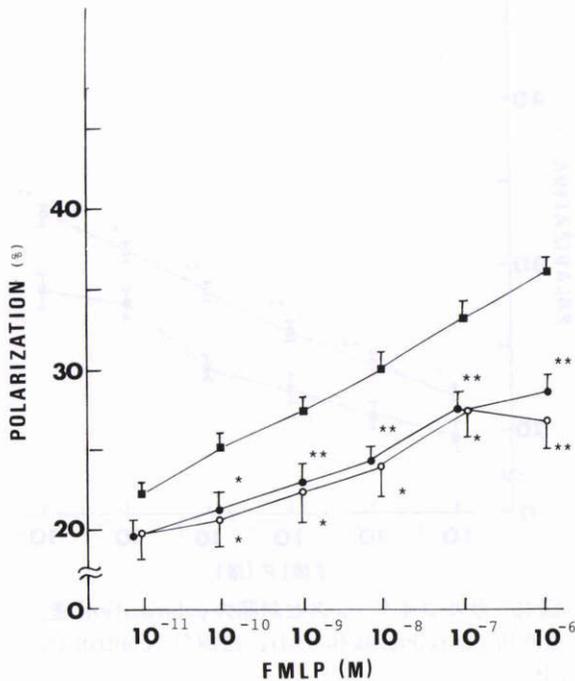


図12 ベーチェット病の非活動期とサルコイドーシスの polarization 値.
 黒四角：Behçet (inactive) (n=31), 白丸：sarcoidosis (active) (n=9), 黒丸：sarcoidosis (inactive) (n=15)
 **: p<0.01, * : p<0.05

向性を持たずに一定の範囲を無秩序に動き回るが、これを random motility (あるいは random movement) という。random motility は、遊走因子の存在下で著しく

増強し、この状態は chemokinesis と呼ばれる^{10)~12)}。続いて、好中球遊走因子の濃度勾配に従って移動を始め (chemotaxis), そのごく初期に仮足を出す、これを polarization と呼ぶ⁹⁾。これまで遊走能をみる方法として、好中球を移動させ、chemotaxis を直接観察する Boyden chamber 法が広く行われてきたが¹³⁾, polarization assay は好中球を移動させず、遊走因子を加えることにより、polarization を中心に chemokinesis から chemotaxis の初期までを捕える方法である。本法は、Boyden chamber 法のように手技が複雑ではなく、簡便で再現性にも優れている。我々の施設では、熟練した検者間の測定誤差は 5% 未満であった。

これまでベーチェット病では、polarization よりあとの chemotaxis については多くの報告があるが、polarization についての報告はほとんどない。ベーチェット病の好中球機能については、遊走能^{14)~18)}, 貪食能, 殺菌能^{19)~24)}のすべてが亢進していることが知られている。本病の好中球遊走能については、Boyden chamber 法により、房水および血液中の好中球について測定されている。増田ら¹³⁾は、房水の好中球遊走能が活動期、特に眼発作の直前から直後にかけて亢進するとし、三好ら¹⁷⁾は、血液中の好中球遊走能は活動期に著明に亢進するが、非活動期には健常人と差のないことを報告している。Polarization assay によるベーチェット病の好中球遊走能については、これまで渡辺ら⁷⁾の報告があるのみで、活動期には非活動期や健常人より亢進しているが、非活動期には健常人と差がないとしている。今回、我々も同様の結果を得たが、さらに、個々の症例での活動期と非活動期の遊走能を比較したところ、活動期と非活動期の間に一層顕著な差を認めた。これらのことから、ベーチェット病の好中球遊走能は非活動期には亢進していないが、活動期には polarization を含む遊走の全段階にわたり著明に亢進しているものと思われる。したがって、ベーチェット病の好中球は易刺激性で、抗原物質などの刺激に対し、過敏あるいは過剰に反応しやすいものと考えられる。

我々は、さらに年齢、性、病型 (完全型および不全型) の polarization に与える影響についても検討したが、いずれも差はなかった。本病は、一般に青年期から壮年期にかけて症状が最も激しく、壮年期以降には病態が弱くなる傾向がある。そこで、若年者は年長者よりも高い polarization 値を示すものと思われたが、本研究の結果では、その傾向はみられなかった。その理由として、年齢よりも polarization に与える影響の大きい他の因子が関与している可能性が考えられる。

Polarization に対するコルヒチン投与の影響について、渡辺ら⁷⁾はコルヒチンが polarization に影響しないことを報告しているが、我々の結果も同様であった。コルヒチンは、好中球の運動の方向性を決める微小管の重合を阻害することにより、好中球の遊走を抑制する¹¹⁾¹²⁾。

したがって、好中球が方向性をもって運動する polarization よりあとの chemotaxis はコルヒチンにより抑制されるが、方向性をもたない polarization は障害されないものと思われる¹¹⁾。このことから、主に polarization よりあとの chemotaxis をみる Boyden chamber 法は、コルヒチン投与の有無が好中球遊走能の測定結果に影響するが、polarization assay はコルヒチンの影響を受けないため、コルヒチンを内服していることの多い本病患者の好中球遊走能の測定には、より適していると考えられる。

サルコイドーシスは、ベーチェット病とは対照的な疾患で、主に好中球が病態に関与しているベーチェット病とは異なり、主として単球が病巣形成に深く関与している³⁾⁻⁵⁾。本病では、全身に肉芽腫を形成するが、この肉芽腫はマクロファージや類上皮細胞およびリンパ球などから成る。類上皮細胞は、活性化された T リンパ球由来の因子により病巣に移動した単球がマクロファージを経て分化したものであり、リンパ球は血中から移動したものと増殖したものとから成る²⁵⁾。ところで、一般に好中球などの細胞の遊走を抑制する因子として、液性因子と細胞性因子とがある。液性の遊走抑制因子には、作用機序と性質の異なる2種類の因子が報告されている。一つは、cell directed inhibitor (CDI) と呼ばれ²⁶⁾、細胞に直接作用し遊走を抑制する因子であり、悪性腫瘍²⁷⁾や骨髄腫²⁸⁾、重症感染症などの患者血清中に存在することが報告²⁹⁾されている。もう一つは、chemotactic factor inactivator (CFI) で³⁰⁾、遊走因子を不活化することにより間接的に細胞の遊走を抑制する因子である。一方、細胞性の遊走抑制因子としては、遊走因子が細胞に作用して生じる細胞の不活化現象 (deactivation) も考えられる³¹⁾。

一般に好中球の遊走は、遊走抑制因子とこれに拮抗する遊走促進因子の相互作用により起きるが、サルコイドーシスでは、CDI, CFI などの抑制因子が好中球の遊走を阻止することが確認されている²⁶⁾³²⁾。したがって、今回サルコイドーシスの polarization 値が症状と無関係に常に異常に低かったことは、本病の好中球の遊走がごく初期から、直接または間接的に抑制されていることを示唆する。一方、ベーチェット病では、好中球遊走抑制因子の存在は明らかにされていないが、抑制因子よりも促進因子が優位に作用することにより、好中球が積極的に病態に関与している可能性が考えられる。

このように、polarization assay はベーチェット病のように、好中球が病因あるいは病態に積極的に関与していると考えられる疾患では、その遊走を初期からの確に捕えることの出来る簡便かつ優れた方法である。一方、サルコイドーシスのように、好中球が直接には関与せず、むしろ機能が抑制されていると考えられる疾患では、polarization 値が病態に関係なく常に異常に低いことにより、ベーチェット病などの鑑別に役立つ方法であると

思われる。ベーチェット病とサルコイドーシスは、病態上種々の点で対照的な疾患であるが、本法を用いた好中球機能の研究の結果、これらの疾患は、病因あるいは病態に対する好中球の関与についても対照的な疾患であると考えられる。

稿を終えるにあたり、御校閲頂きました帝京大学医学部眼科学教室主任丸尾敏夫教授、ならびに本研究を御指導下さいました帝京大学医学部附属溝口病院眼科医長難波克彦助教授に深謝致します。

本稿の要旨は、第24回日本ぶどう膜炎・眼免疫研究会(平成5年9月18日、松江)で発表した。

文 献

- 1) 橋本喬史：ベーチェット病と炎症。炎症 1: 354—361, 1981.
- 2) 橋本喬史, 徳富研二：ベーチェット病。自己免疫疾患およびアレルギー性疾患。総合臨床 38: 550—554, 1989.
- 3) Hunninghake GW, Gadek JE, Young RC, Kawanami O, Ferrans VJ, Crystal RG, et al: Maintenance of granuloma formation in pulmonary sarcoidosis by T lymphocytes within the lung. N Engl J Med 302: 594—598, 1980.
- 4) Hunninghake GW, Gorrett KC, Richerson HB, Fantone JC, Ward PA, Rennard SI, et al: Pathogenesis of the granulomatous lung diseases. An Rev Respir Dis 130: 476—483, 1981.
- 5) 泉 孝英：サルコイドーシスにおける気管支肺胞洗浄液所見と治療。Current Therapy 3: 382—390, 1985.
- 6) 朝長昭光, 門田淳一, 福島喜代康, 中島 学, 平谷一人, 宮崎幸重, 他：ヒト好中球 polarization assay の検討—chemotaxis の簡便法として。医学のあゆみ 128: 450—452, 1984.
- 7) 渡辺理恵, 溝口昌子：Polarization assay を指標としたベーチェット病患者末梢血好中球機能。日皮会誌 98: 1451—1457, 1988.
- 8) 1987年ベーチェット病診断基準：厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班, 昭和61年度研究業績: 16—17, 1987.
- 9) Smith CW, Hollers JC, Patrick RA, Hassett C: Motility and adhesiveness in human neutrophils. Effects of chemotactic factors. J Clin Invest 63: 221—229, 1979.
- 10) 平林洋一, 小林陽之助：好中球の機能—食殺菌を中心に。Medical Immunology 13: 465—469, 1987.
- 11) 山本俊輔, 樋口安典：白血球浸潤(機序を中心として)。水島 裕, 他(編)：炎症と抗炎症療法。医歯薬出版, 東京, 27—34, 1982.
- 12) 竹内明輝：ケモタクティックファクター。水島 裕, 他(編)：炎症と抗炎症療法。医歯薬出版, 東京, 159—164, 1982.
- 13) Boyden S: The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. J Exp Med 115: 453—466, 1962.
- 14) 増田寛次郎, 渋谷英美, 三島濟一：Behçet 病前房水中の多核白血球遊走活性の経時的変化。眼臨 66: 734—737, 1972.

- 15) **Shimada K, Yaoita H, Shikano S**: Chemotactic activity in the aqueous humor of patients with Behçet's disease. *Jpn J Ophthalmol* 16: 84-92, 1972.
- 16) **松村則幸, 水島 裕**: Behçet 病患者の白血球遊走による検討. 厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班, 昭和48年度研究業績: 190-193, 1974.
- 17) **三好和夫, 白神 輝, 宮本 弘, 原田秀夫, 増田和彦, 山野利尚**: ベーチェット病の好中球機能と血清中の chemotactic factor. 厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班, 昭和49年度研究業績: 241-248, 1975.
- 18) **Sobel JD, Haim S, Obedeau N, Meshulam T, Merzbach D**: Polymorphonuclear leucocyte function in Behçet's disease. *J Clin Pathol* 30: 250-253, 1977.
- 19) **森山穂積, 三村康男**: ベーチェット病患者における末梢血好中球の Nitroblue Tetrazolium (NBT) 還元試験. *眼臨* 69: 29-31, 1975.
- 20) **井上泰彦, 倉員健一, 生井 浩**: ベーチェット病の好中球 NBT 還元能-眼発作との関係について. 厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班, 昭和49年度研究業績: 155-156, 1975.
- 21) **難波克彦**: Behçet 病白血球のライソゾーム酵素. *日眼会誌* 84: 1092-1098, 1980.
- 22) **難波克彦**: ベーチェット病の眼発作型と白血球ライソゾーム酵素. *日眼会誌* 85: 1463-1467, 1981.
- 23) **坂根 剛, 丹羽靱負**: Behçet 病患者にみられる好中球機能亢進による auto-oxidative damage. 厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班, 昭和55年度研究業績: 62-73, 1980.
- 24) **三村康男, 山田光則, 湯浅武之助**: Behçet 病患者好中球における Protease 活性と活性酸素産生能. 厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班, 昭和56年度研究業績: 102-107, 1981.
- 25) **Pinkston P, Bitterman PB, Crystal RG**: Role for Interleukin-2 in T-lymphocyte alveolitis. *Am Rev Respir Dis* 125: 53, 1982.
- 26) **Maderazo EG, Ward PA, Woronick CL, Quintiliani R**: Partial characterization of a cell-directed inhibitor of leukotaxis in human serum. *J Lab Clin Med* 89: 190-199, 1977.
- 27) **Maderazo EG, Anton TF, Ward PA**: Serum-associated inhibition of leukotaxis in humans with cancer. *Clin Immun Immunopathol* 9: 166-176, 1978.
- 28) **Van Epps DE, Williams RC**: Suppression of leukocyte chemotaxis by human IgA myeloma components. *J Exp Med* 144: 1227-1242, 1976.
- 29) **Soriano RB, South MA, Goldman AS, Smith CW**: Defect of neutrophil motility in a child with recurrent bacterial infections and disseminated cytomegalovirus infection. *J Pediatr* 83: 951-958, 1973.
- 30) **Maderazo EG, Ward PA, Woronick CL, Kubin J, Degraff AC**: Leukotactic dysfunction in sarcoidosis. *Ann Intern Med* 84: 414-419, 1976.
- 31) **Ward PA, Becker EL**: Mechanisms of the inhibition of chemotaxis by phosphonate esters. *J Exp Med* 125: 1001-1020, 1967.
- 32) **奥山悠子, 寺井継男, 与沢宏一, 阿部庄作, 大崎 饒, 村尾 誠**: サルコイドーシス患者血清の多核白血球走化性に及ぼす抑制効果. *日胸会誌* 20: 403-407, 1982.