

サルコイドーシスに関する研究

第 2 編

末梢血単球機能の検討

岡山大学医学部第 2 内科教室 (主任: 木村郁郎教授)

近 藤 昭

(昭和56年12月17日受稿)

Key words: Sarcoidosis,
Monocyte

緒 言

サルコイドーシス患者 (以下サ症と略す) の多くは PPD をはじめとする各種抗原に対する遅延型過敏反応の減弱がみられる¹⁾。これら細胞性免疫機能異常の機序として、従来より、リンパ球を中心とした研究が進められ、T-リンパ球の機能低下が証明されている¹⁾。一方では重症の真菌感染症²⁾、結核症³⁾あるいはウイルス感染症⁴⁾を合併し易く、また悪性腫瘍の合併率が高い⁵⁾ことなどより、細胞性免疫とくに単球-マクロファージ系の機能異常の存在が窺われる。そこでサ症におけるマクロファージの前駆細胞と考えられている⁶⁾末梢血単球の機能について各種方法を同時期に総合的に検査し、本症患者の単球機能の異常と病状との関係について検討を加えた。

対 象 症 例

対象症例は13例で (表 1) 男性 6 例, 女性 7 例, 年齢は12才から79才, 中央値44才であった。集検発見例は 4 例 (31%) であり, 国際診断区分では全例Ⅲ群, 即ち生検標本にて組織学的に診断が確定したものである。罹患部位は胸部12例(92%), 眼 6 例(46%), 表在リンパ筋腫脹 5 例(38%), 皮膚 2 例(15%), 肝, 骨各 1 例 (8%) であった。胸部レ線像はサルコイドーシス協議会による病型分類では, A 型 6 例(46%), B 型 5 例 (38%) D 型 1 例 (8%) であり残り

1 例は皮膚と眼病変のみで胸部レ線像に異常を認めなかった。初診時ステロイド剤投与症例は症例 1, 3 の 2 例で, 他の11例は未治療例であった。

方 法

末梢血単球数の算定: 末梢血塗沫標本の May-Giemsa 染色にて白血球を500個分類して単球の百分率を求め, コールターカウンターにて計測した白血球数に乗じて, 単球数を求めた。

単球 β -galactosidase 活性: ヘパリン加静脈血に Dextran 溶液を加え, 白血球層を分離し塗沫標本を作製した。25% Glutaraldehyde にて固定し調整染色液にて18時間染色し, 固定後, Mayer-Hematoxyline 液にて20分間染色した。顕微鏡下にて β -galactoside 顆粒を有する単球の百分率を求めた。調整染色液は N,N-Dimethylformamide 0.5ml, 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-galactoside (Sigma 社) 2mg を PH 5.4, 0.1M 酢酸緩衝液31mlに溶かし, Spermidin-HCl (Sigma 社) 8mg, 生食水0.5ml を混合し 1 M Potassium Ferrocyanide 1 M Potassium Ferricyanide の各々3.0mlを加えて作製した。

単球走性: Ficoll-Hypaque 比重遠沈法にて静脈血より単核球層を分離採取した。単球走走因子としては, Zymosan 活性化ヒト血清を使い, Boyden chamber と孔径 5 μ m の Millipore filter を使用し 37°C, 5% CO₂ incubator 中に

て90分間反応後、フィルターを Harris Hemat oxylin 液にて染色した。顕微鏡下400倍にて、フィルター表面より30 μ m の距離にまで遊走してきた400倍の全視野中の細胞数を計測し、5視野の平均値をもって単球走性指数とした。

単球貪食の測定：Ficoll-Hypaque 比重遠沈法にて分離した単核球を10% AB型ヒト血清を含む RPMI-1640 中に浮遊した。これを Labtek chamber に入れ、37°C、90分間、5% CO₂ incubator の中に静置し、浮遊細胞を除去し、ガラス板附着細胞をえた。この附着細胞にヒト補体結合 Zymosan を混じ、37°C、20分間反応させたのち、浮遊 Zymosan を洗滌除去し、chamber よりスライドグラスを取りはずし、Peroxidase-Giemsa 重染色を行なった。単球200個を数えて貪食細胞の百分率を求め、貪食指数とした。

腫瘍細胞傷害性試験：静脈血より Ficoll-Hypaque 比重遠沈法にて単核球層を分離し、Microtest well 中にて37°C、90分間反応後、非附着細胞を除去して得られた附着細胞をエフェクター細胞とした。標的細胞としては、Hela 細胞と、当教室にて培養樹立したヒト扁平上皮肺癌由来細胞株 EBC-1 細胞を用いた。エフェクター細胞と標的細胞の比は前者は50：1、後者は10：1とした。エフェクター細胞と標的細胞を5% CO₂、37°C、40時間混合培養後、培養液を捨て、³H-thymidine を含む培養液を加えて、さらに5時間培養したのち、細胞を採取し細胞内に取り込まれた ³H-thymidine を測定した。腫瘍細胞傷害性は、標的細胞のみ培養時の細胞内の ³H-thymidine の cpm から、エフェクター細胞と混合培養時の cpm を差し引き、これを標的細胞のみ培養時の cpm で割った値、即ち ³H-thymidine の腫瘍細胞への取り込み阻止率として表わした。

血清 Angiotensin converting enzyme (ACE) の測定は hippuryl-L-histidyl-L-leucine を基質として、Cushman-Cheung 法の Lieberman 変法にて測定し、正常値は24~40uであった。

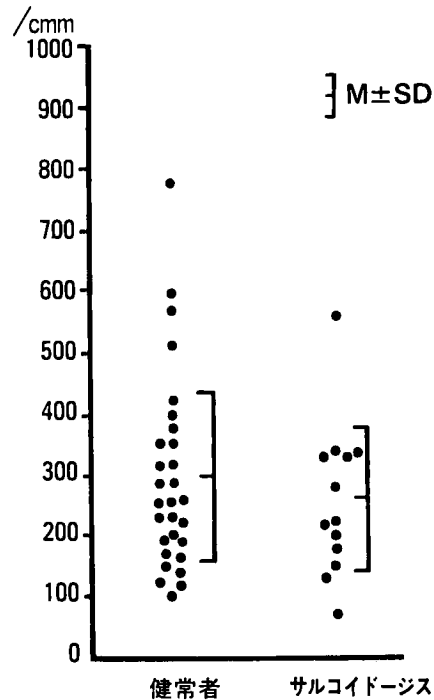
成 績

臨床一般検査成績(表1)：PPD皮内反応は1例を除いて全例に陰性(92%)であった。血清

表1 対象症例

症例	性	年齢	国際診断 区別	罹患臓器	胸部X-P サルコイドーシス 有病率	血清ACE	ツ反応
1	女	62	III	皮膚, 眼	異常なし	52	-
2	女	51	III	胸, 眼	A	54	-
3	女	42	III	胸	B	38	-
4	女	66	III	胸	A	44	-
5	男	44	III	胸, 眼	A	34	-
6	男	39	III	胸	B	63	-
7	女	44	III	胸	A	44	-
8	男	31	III	胸, 皮膚, 肝, 骨	B	105	-
9	男	29	III	胸, 眼	A	45	-
10	男	79	III	胸, 眼, 肝	D	25	-
11	女	42	III	胸, 眼	B	N.D.	-
12	男	12	III	胸	A	41	-
13	女	50	III	胸	B	67	+

図1 サルコイドーシス患者末梢血単球数



Angiotensin converting enzyme(ACE) 値は12例にて測定され、51.0 \pm 19.8(平均値 \pm 標準偏差値)であり40u以上の高値症例は、9例(75%)であった。

末梢血単球数(図1)：13例の単球実数は 277 \pm 121/cmmで、対象健常者例の299 \pm 144/cmmに比較して有意の差は認められなかった。

単球 β -galactosidase活性(図2)：検討症例10例では35.8 \pm 16.9%で、健常者14例の33.7 \pm 12.1%

図2 サルコイドーシス患者末梢血単球のβ-galactosidase活性

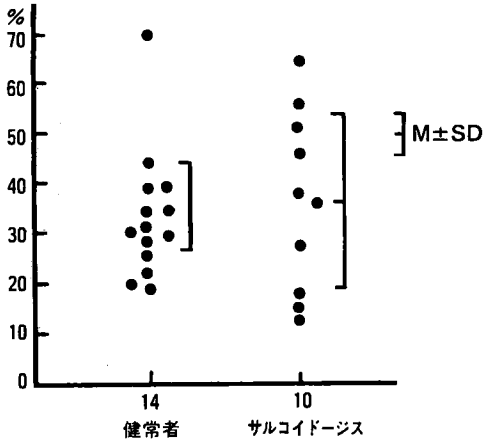
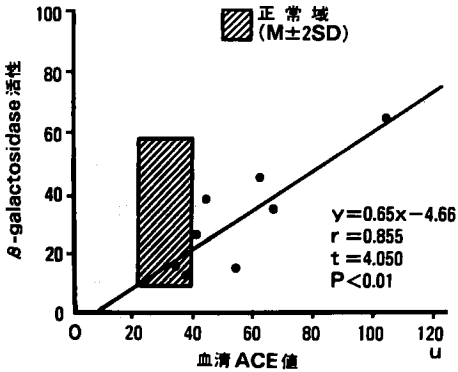


図3 サルコイドーシス患者における単球β-galactosidase活性と血清ACE値との相関



％に比して有意の差は認められなかった。しかし、ACE値の上昇例にβ-galactosidase活性の上昇 ($r=0.855$ $P<0.01$) がみられた。(図3)。

単球走性(図4)：検討症例13例では 28.2 ± 7.0 であり、健常者58例の 34.8 ± 8.0 に比較して有意な低下 ($P<0.01$) がみられた。しかし病変の拡がり、血清ACE値との間には有意の相関は認められなかった。

食食作用(図5)：12例について検討され、食食指数は 49.2 ± 24.1 で、健常者28例の 84.1 ± 9.4 に比較すると著明な低下 ($P<0.001$) が認められた。このうち病変が胸廓に限られる6例では平均 48.7 ± 26.4 、胸廓以外の臓器にも病変の及

図4 サルコイドーシス患者末梢血単球走性

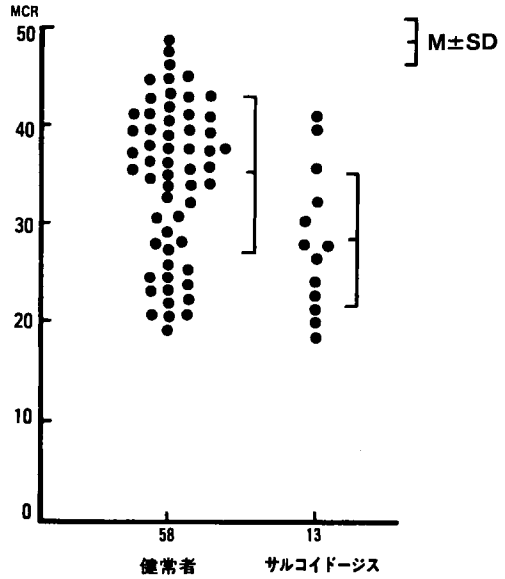
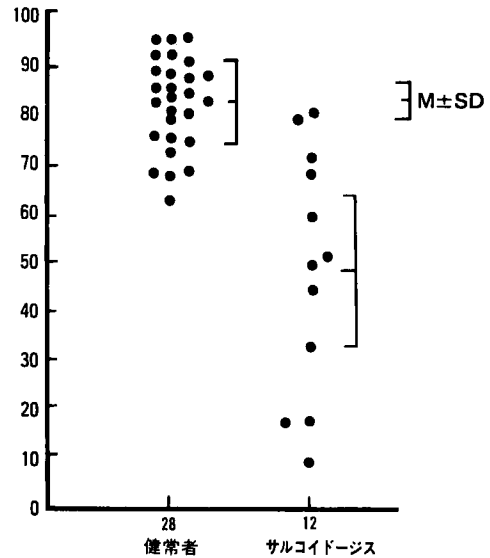


図5 サルコイドーシス患者末梢血単球食食指数



んでいる6例では 49.6 ± 21.6 であり、両者間に差はみられなかった。また血清ACE値と食食指数との相関検査したところ、ACE値の上昇例に食食指数の低下例がみられた(図6)。しかし有意の相関は認められなかった ($r=-0.364$, $P<0.1$)。

単球の腫瘍細胞傷害作用(図7)：標的細胞に

図6 サルコイドーシス患者末梢血単球貪食指数と血清 ACE 値との相関

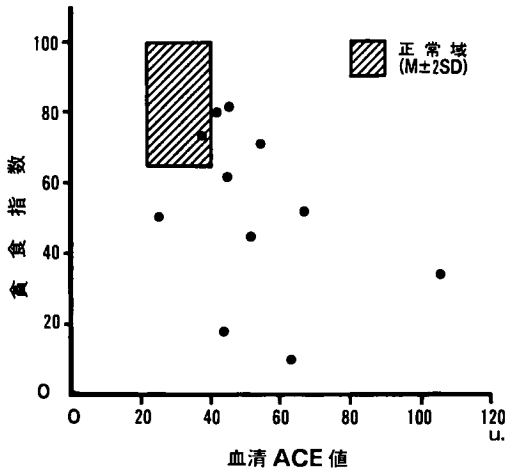
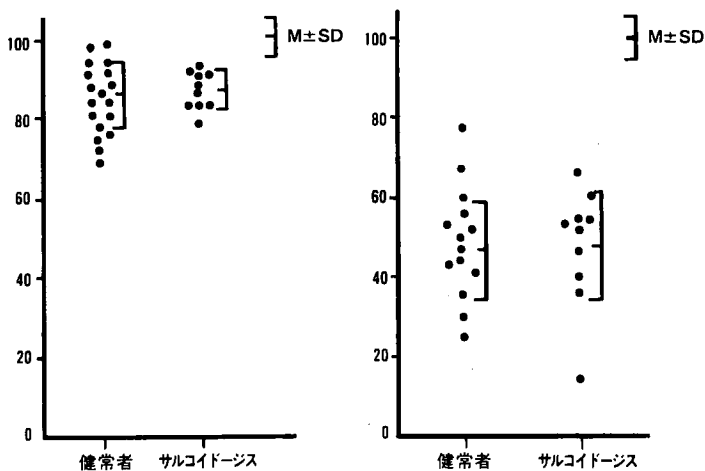


図7 サルコイドーシス患者末梢血単球の腫瘍細胞傷害作用



EBC-1 細胞を用いた場合の腫瘍細胞増殖抑制率は10例において 87.0 ± 4.6 で健常者19例では 85.5 ± 8.0 であった。また Hela 細胞を標的細胞とした場合には10例にて 47.5 ± 14.0 で、健常者18例では 46.4 ± 11.8 であり、いずれの標的細胞に対する増殖抑制率も、健常者との間に差は認められなかった。

考 案

サ症では PPD など各種抗原による遅延型過敏

反応の減弱^{1,7)}、ウィルス⁴⁾、結核³⁾、真菌²⁾の重症感染症の合併がみられ、また悪性リンパ腫を中心とした肺癌などの悪性腫瘍の合併率が健常者の11倍から3倍高いことが報告されており、サ症における細胞性免疫機能、そのうちでもマクロファージ系細胞の機能低下が窺われる。

サ症の末梢血単球は数量的には健常者との間に差はまったく認められなかった。一部には単球数の増加傾向の報告⁸⁾もみられるが、これらは末梢白血球中の百分率の上昇を報告したものであり、サ症においては末梢白血球数の減少^{8,9)}が知られており、単球実数としては著明なる増加とは言えない。また健常人の単球実数もばらつきが多く、単球実数の増加が本症に特徴的な所見とは考えられない。Schmitt, E. ら¹⁰⁾も肉

芽腫を形成する疾患の Monocytopoiesis を検査し、結核症においては亢進がみられたが、サ症においては健常者との間に差はなかったと報告している。

末梢血単球の機能について、今回の著者の成績をまとめてみると、単球の活性化を示す単球中の β -galactosidase 活性は平均値において健常人に比較して、やや増加傾向がみられた。そして、サ症における全身の肉芽腫の量をよく反映すると言われている^{12,13)} 血清 ACE 値の高い症例に β -galactosidase 活性の上昇

がみられた。サ症においては血清中 Lysozyme 量と ACE 量が正の相関を示すことから、本症における macrophage の活性化が報告¹²⁾されており、さらに著者の成績にて末梢血単球の β -galactosidase 活性と血清 ACE 値との間にも正の相関がみられたことは、本症の活動期においては、肉芽腫を形成している epithelioid cell の前駆細胞と考えられる単球も活性化されることが判明した。そして単球の β -galactosidase 活性は血清 ACE とともに本症の活動性

の指標になると考えられた。しかし一方では単球走性、貪食能は著明に低下がみられ、低下の強さは病状の活動性の強さと関係しているようであった。しかし腫瘍細胞傷害作用は健常者のそれとまったく同等であった。即ち単球の Lysozomal enzyme 活性からみれば活性化状態にあることが考えられるが貪食走性機能は低下しており、1見、互いに相反する成績がえられた。

サ症患者血清中にはリンパ球の phytohemagglutinin (PHA) に対する反応を抑制する物質¹⁴⁾をはじめとする各種細胞の免疫機能を抑制する物質の存在、あるいは異常なる増加が報告されている。即ち、Manderazo, E.G. ら¹⁵⁾らは chemotactic factor inactivator の増加をサ症血清中に認め、本物質は白血球の走性に抑制的に作用するのみならず、貪食をも抑制する可能性を報告している。また Campbell, P.B. ら¹⁵⁾らは末梢単球に対する leukotactic inhibitor をサ症血清中に認め、本物質は好中球の走性をも抑制することを報告している。またサ症患者のリンパ球は macrophage inhibitory factor (MIF) の産生が亢進していること^{1,17)}も判明しており、この MIF はマクロファージおよびその前駆細胞の単球の運動を停止させ、epithelioid cell への成熟に働き、肉芽腫形成の増強に関与していることも判明している^{18,19)}。またスポンジによる実験的に形成された肉芽腫中に、マクロファージの貪食機能を抑制する glycoprotein の存在が知られて²⁰⁾おり、サ症患者の肉芽腫にも同様な物質が産生され血中へ分泌されている可能性も考えられる。さらに、著者の貪食機能測定方法は、単球の C₃-receptor を介しての貪食をみたもので、サ症患者血清中には immune complex が存在しており²¹⁾、この immune complex が C₃-receptor をふさいで、receptor 数の減少を来していることが貪食指数の低下として表現されている可能性も考えられる。一方では薬剤とくに副腎皮質ホルモン剤の投与は単球貪食能の低下を来す²²⁾ことが知られているが、今回検討しえた13例のうち、検査時に副腎皮質ホルモン剤の投与されていたのは2例であり、この2例と非投与例11例との間に単球走性、貪食能において有意の差は認められなかったので、

一応これらの機能低下に及ぼす steroid 剤の影響は除外できる様に思われる。

サ症患者末梢単球自体には機能的異常は無¹⁵⁾いという報告があり、今回の著者の成績においても単球内の enzyme 活性は低下というよりもむしろ亢進している傾向にあり、かつまた腫瘍細胞への傷害作用も正常であったことなどより、単球自身には異常はないと考えられる。そして本症における単球機能検査における低下は MIF, leukochemotactic inhibitor あるいは immune complex など患者血清中の反応阻害因子の増加あるいは出現によることが強く示唆された。しかし Schmidt, M.E. ら²³⁾の一連の報告では、サ症患者の単球の C₃ receptor 産生の亢進と、貪食能の亢進を、又田宮²⁴⁾らは単球遊走因子としてカゼインを使用しサ症患者単球走性の亢進を報告しており、著者の成績と大きな差異がみられた。その理由の1つとして検査方法論の違いがあると思われる。著者の方法は、貪食機能は C₃ receptor を介しての作用であり、単球走性は遊走因子として Zymosan にて活性化されたヒト補体成分を使用しており、いずれの反応も補体が強く関与する反応であり、サ症において両機能ともに低下がみられたことは、本症の単球機能のうち、血清補体系を介する反応に特異的に欠損があるのではないかと考えられた。以上のごとくサ症の細胞性免疫反応の異常を一元的に説明することは困難である。すなわち、サ症においては同じような遅延型過敏反応であっても PPD に対しては皮膚反応の低下がみられるし、Kveim 抗原に対してはむしろ反応亢進がみわれ、まったく相反する成績が得られている。さらに PPD 皮内反応時に、局所に副腎皮質ホルモンを注射するだけで陽転がみられる。従ってサ症患者単球の機能を検査するについても、方法論の違いにより、かなり相反した結果がみられている。しかし、最後に著者の成績を中心として諸家の報告をまとめてみると、サ症患者の単球はそれ自体の活性は正常もしくは亢進状態にあるが、血清中の反応阻害因子の存在あるいは異常増加が、検査における機能低下として表現されたと考えられる。

結 論

サルコイドーシス患者13例において末梢血単球の機能について検討し、以下の成績を得た。

- 1) 末梢血単球数は $277 \pm 121/\text{cmm}$ と健常者との間に差は認められなかった。
- 2) 単球 β -galactosidase 活性は 35.8 ± 16.9 で健常者と比較して差は認められなかった。しかし血清 ACE 値と β -galactosidase 活性とは、低い相関ながら正の相関がみられた ($r=0.85$)。
- 3) 単球走性は 28.2 ± 7.0 と健常者に比し有意な低下 ($P<0.01$) がみられた。
- 4) 食食指数は 49.2 ± 24.1 と健常者に比して

著明な食食能力の低下 ($P<0.001$) がみられた。

5) 腫瘍細胞傷害作用は、標的細胞がヒト扁平上皮肺癌由来培養細胞 (EBC-1) の場合は、 87.0 ± 4.6 , Hela 細胞の場合は 47.5 ± 14.0 で、健常者に比して差は認められなかった。

以上、サ症末梢血単球の食食、走性において健常者に比して機能低下が認められたが、実数 β -galactosidase 活性、腫瘍細胞傷害作用には異常は認められなかった。

擧筆に臨み御指導、御校閲をいただいた恩師木村郁郎教授に深謝するとともに、終始懇切な御指導と助言をいただいた中田安成講師に感謝の意を表する。

参 考 文 献

1. Jamus, D.G., Neville, E. and Walker, A.: Immunology of sarcoidosis. *Am. J. Med.* **59**, 388-394, 1975.
2. Israel, H.L. and Ostrow, A.: Sarcoidosis and aspergilloma. *Am. J. Med.* **47**, 243-250, 1969.
3. Hopkins, A.: Tuberculous meningitis as a complication of sarcoidosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychia.* **37**, 644-646, 1974.
4. Modi, C.M. and Valatis, J.: Herpesvirus encephalitis and pulmonary sarcoidosis, A case report with necropsy findings. *Neurology* **24**, 1096-1101, 1974.
5. Brincker, H. and Wilbek, E.: The incidence of malignant tumors in patients with respiratory sarcoidosis. *Br. J. Cancer* **29**, 247-251, 1974.
6. Cline, M.J., Lehrer, R.I., Territo, M.C. and Golde, D.W.: Monocytes and macrophages: Functions and diseases. *Ann. Intern. Med.* **88**, 78-88, 1978.
7. Goldstein, P.A., Janicki, B.W., Mirro, J. and Foellmer, J.W.: Cell-mediated immune response in sarcoidosis. *Am. Rev. Resp. Dis.* **117**, 55-62, 1978.
8. Reisner, D.: Boeck's sarcoidosis and systemic sarcoidosis. A study of thirty-five cases. *Am. Rev. Tuberc.* **49**, 437-462, 1944.
9. 三上理一郎, 細田 裕, 小高 稔: サルコイドーシス, 日本サルコイドーシス研究協議会による調査成績を中心に. *日本臨床*, **32**, 1604-1033, 1974.
10. Schmitt, E., Meuret, G. and Stix, L.: Monocyte recruitment in tuberculosis and sarcoidosis. *Br. J. Haematol.* **35**, 11-17, 1977.
11. Rhodes, J.M., Bennedsen, J., Larsen, S.O., Riisgaard, S. and Spärck, J.V.: Correlation between in vivo and in vitro function tests for activated macrophages. *Infect. and Immun.* **23**, 34-40, 1979.
12. Silverstein, E., Friedland, J. and Ackerman, T.: Elevation of granulomatous lymph-node and serum lysozyme in sarcoidosis and correlation with angiotensin-converting enzyme. *Am. J. Clin. Pathol.* **68**, 219-224, 1977.
13. 四元秀毅: 血清アンギオテンシン変換酵素活性. 362-367, 日本サルコイドーシス研究協議会編: サルコイドーシス. 東京大学出版会, 東京, 1979.
14. Mangi, R.J., Dwyer, J.M. and Kantor, F.S.: The effect of plasma upon lymphocyte response in vitro.

- Demonstration of a humoral inhibitor in patients with sarcoidosis. *J. Exp. Immunol.* **18**, 519-529, 1974.
15. Maderazo, E.G., Ward, P.A., Woronick, C.L., Kubik, J. and DeGraff, A.C.: Leukotactic dysfunction in sarcoidosis. *Ann. Intern. Med.* **84**, 414-419, 1976.
 16. Campbell, P.B.: Defective monocyte leukotaxis in sarcoidosis. Possible relationship to a plasma factor. *Am. Rev. Resp. Dis.* **116**, 251-259, 1977.
 17. Kataria, Y.P., LoBuglio, A.F. and Bromberg, P.A.: Sarcoid lymphocytes: Spontaneous transformation and release of macrophage migration inhibition activity. *Am. Rev. Resp. Dis.* **113**, 315-323, 1976.
 18. 岸本 進, 絹脇悦生: 肉芽腫生成の免疫学的背景. *臨床科学*, **16**, 464-470, 1980.
 19. Masih, N., Majeska, J. and Yoshida, T.: Studies on experimental pulmonary granulomas. I. Detection of lymphokines in granulomatous lesions. *Am. J. Pathol.* **95**, 391-406, 1979.
 20. Bole, G.G., Jourdain, G.W. and Wright, J.E.: Isolation and chemical characterization of a granuloma glycoprotein that inhibits macrophage phagocytosis. *J. Lab. Clin. Med.* **86**, 1018-1031, 1975.
 21. Hedfords, E. and Norberg, R.: Evidence for circulating immune complexes in sarcoidosis. *Clin. Exp. Immunol.* **16**, 493-496, 1974.
 22. Stossel, T.P.: Phagocytosis: Clinical disorders of recognition and ingestion. *Am. J. Pathol.* **88**, 741-752, 1977.
 23. Schmidt, M.E. and Pouglass, S.D.: Monocyte IgG receptor activity, dynamics and modulation. Normal individuals and patients with granulomatous diseases. *J. Lab. Clin. Med.* **89**, 332-340, 1977.
 24. 志摩 清, 津田富康, 安藤正幸, 田宮二郎, 池田 俊, 徳臣晴比古: サルコイドーシスにおける単球と血清因子. *内科*, **40**, 931-937, 1977.

Studies on Patients with Sarcoidosis

Part II. Monocyte Function in Sarcoidosis Patients

Akira KONDO

The Second Department of Internal Medicine Okayama University

Medical School, Okayama 700, Japan

(Director; Prof. I. Kimura)

Functions of peripheral blood monocytes in 13 patients with sarcoidosis were studied and compared to normal individuals.

The mean absolute number of monocytes was $277 \pm 121/\text{cmm}$ ($M \pm SD$) in sarcoidosis patients and $299 \pm 144/\text{cmm}$ in controls. However, there was no significant difference between the two groups.

Lysosomal enzyme activity of monocytes was histochemically determined by ability of staining to beta-galactosidase. The mean percentage of beta-galactosidase positive monocytes was 35.8 ± 16.9 in sarcoidosis patients and 33.7 ± 12.1 in controls. There was no significant difference between the two groups.

Monocyte chemotactic response was measured in vitro by Boyden's millipore technique using zymosan activated human serum as chemoattractant. Chemotactic response was significantly reduced in sarcoidosis patients (28.2 ± 7.0) compared with controls (34.8 ± 8.0).

Ability of monocyte to phagocytize the complement coated zymosan was also significantly lower in sarcoidosis patients (49.2 ± 24.1) compared with controls (84.1 ± 9.4).

Monocyte-mediated cytotoxicity was tested by the inhibition of ^3H -thymidine uptake by two tumor cell lines. The growth-inhibitory activity was 87.0 ± 8.6 in sarcoidosis patients and 85.5 ± 8.0 in controls using human squamous lung cancer cell line (EBC-1) for the target cell, and 47.5 ± 14.0 and 46.4 ± 11.8 respectively using Hella cell. There was no significant difference between the two groups using either target cell.