サルコイドーシスの病態における単球の関与について

第 1 編

サルコイドーシス患者末梢血単球のスーパーオキサイド産生能の検討

岡山大学医学部第二内科学教室（主任：木村郁郎教授）

岸　　俊　行

（昭和62年4月20日受稿）

Key words：superoxide, monocyte
sarcoidosis

緒　　言

サルコイドーシス（サ症）患者においては，遅延型皮内反応の減弱，末梢血Tリンパ球の減少，血清免疫グロブリン値の増加などの免疫学的異常が認められ[1]，主にリンパ球の異常を中心として多くの知見が報告されてきた．しかしながら，抗原の処理，情報伝達を通じてリンパ球の免疫応答の誘導や発現に重要な役割を演じている単球・マクロファージ系細胞に関する検討は多くはない．そこで我々は以前よりサ症患者における単球機能に着目し，検討を行ってきた[2]．今回は単球機能の指標のひとつとしてスーパーオキサイド（O_2^-）産生能について検討を行った．

対　　象

対象サ症は37例で，男性19例，女性18例，年齢は15歳から72歳，中央値は45歳であった．32例は組織診断例であり，5例は臨床診断例であった．罹病期間は1ヶ月から21年にわたっており，検査時ステロイドホルモンの投与されていたものは14例であった．

方　　法

検査方法は，ヘパリン加末梢静脈血からFicoll-Hypaque比重遠沈法により，単核球層を分離採取し，単核球を1 mMの$CaCl_2$を含むpH7.4 modified Krebs Ringer phosphate bufferにて，0.5～1.0×10^7個/mlに調整浮遊させた．なお塗沫標本を作製し，peroxidase及びGiemsaの2重染色を行い，単核球中の単球百分率を算出した．単核球浮遊液中に5 m Mglucose 20 μl，65 μM ferricytochrome C 40 μlを加え，37°C 5分間 preincubationを行った後，concanavalin A (Con. A) 100 μg/ml，cytochalasin E (Cyt. E) 20 μg/mlの濃度になるように同時に加え，最終反応液量を2 mlに調整し，2波長分光光度計（UA-210A，島津）にて，550 nmにおける吸光度を測定し，単球10^6個当りのO_2^-産生能を算出し，nmol/min/10^6個にて表示した．なお，この吸光度の変化がO_2^-産生に基づくものであることは，superoxide dismutase 20 μg/mlを反応液中に添加したところ抑制されたことにより確認した．

血清angiotensin-converting enzyme（ACE）活性は笠原氏法にて，血清リゾチーム活性は，血清をMicrococcus lysodeikticusに反応させ，比濁法にて測定した．また，immuno suppressive acidic protein（IAP）は一元免疫拡散法にて測定した．気管支肺胞洗浄（BAL）は気管支ファイバースコープを使用し型のごとく行い，May-Giemsa染色にて有核細胞の分類を行い，リンパ球百分率を求め，ヒツジ赤血球とのロゼット形成能を指標とし，Tリンパ球百分率を求めた．

結　　果

サ症全症例37例のO_2^-産生能の平均値±標準

偏差値は，9.8±6.4 n mol/min/10^6個であり，対照健常者38例の O_2^- 産生能6.6±3.5に比して有意の亢進（P<0.02）が認められた．

サ症患者を胸部X線病型別にみると，O型（無所見）4例では5.6±2.1，I型（肺門型）14例では12.4±8.7，II型（肺門肺野型）15例では9.4±3.9，III型（肺野型）4例では6.1±2.6であり，I型およびII型症例は対照健常者に比して，それぞれ P<0.05，P<0.02と，有意の高値を示した（図1）．I型およびII型症例はO型およびIII型症例に比して O_2^- 産生能の亢進する傾向が認められたが，症例数が少ないため各病型間に有意の差は認められなかった．また，肺野病変の有無に関連してI型とII，III型との間の比較では12.4±8.7（N=14），8.7±3.9（N=19）と有意の差は認められなかった．

臨床成績との比較検討を行ってみると（表1），血清リゾチーム活性が10.2 μg/ml以下の正常値群とそれ以上の異常高値群とでは，それぞれ5.4±2.2，9.4±5.6であり，異常高値群に O_2^- 産生能の亢進を認めた（P<0.02）．血清IAP量が正常値群（500 μg/ml未満）では5.1±2.1，高値群では11.9±8.9と，高値群に平均値の高値がみられたが，有意の差は認められなかった．血清ACE活性の正常値群（21.4 u以下）では11.5±9.6，高値群では9.2±3.9と有意の差は認められなかった．

罹病期間が18ヶ月未満の群では10.1±7.1，それ以上の群では9.5±6.1，胸郭外病変を有する群では10.7±7.0，有しない群では8.9±3.9，predonisoloneの非投与群では10.2±6.9（N=23），投与群では9.1±5.6（N=14）と各群間に有意の差は認められなかった．

BALを施行しえた10例について，BAL液中のリンパ球百分率が35%以上の増加群では12.0±2.9，35%未満では11.0±10.5と両群間に有意差は認められなかった．ところが，Tリンパ球が28%以上の群では12.0±4.1と，28%未満の群の5.8±1.6に比して O_2^- 産生の高い傾向がみられた．

さらに，同時にその他の末梢血単球機能[2]を検討することができた9例については，O_2^- 産生能と単球 β-galactosidase 活性，貪食能，走性との相関係数はそれぞれ −0.50，−0.28，0.34

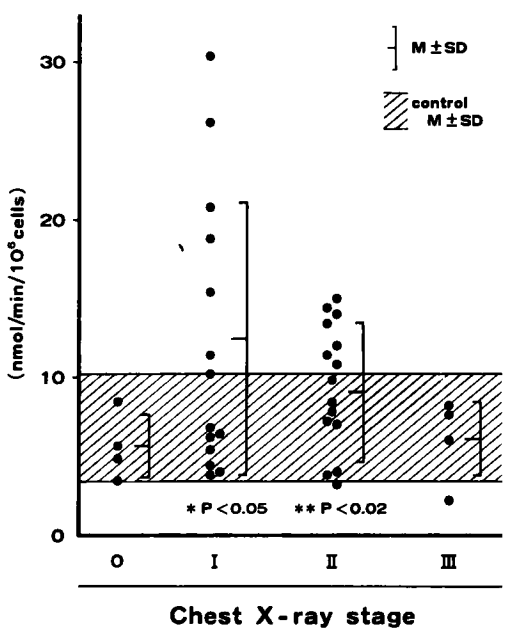

図1　胸部X線病型別にみたサ症患者単球の O_2^- 産生能

表1　サ症患者単球の O_2^- 産生能

罹病期間（月）		
18未満	(N=14)	10.1±7.1
18以上	(N=23)	9.5±6.1
胸郭外病変		
無	(N=17)	8.9±3.9
有	(N=20)	10.7±7.0
血清リゾチーム活性（μg/ml）		
10.2未満	(N=7)	5.4±2.2]*
10.2以上	(N=18)	9.4±5.6]*
血清IAP（μg/ml）		
500未満	(N=5)	5.1±2.1
500以上	(N=6)	11.9±8.9
血清ACE活性（u）		
21.4未満	(N=13)	11.5±9.6
21.4以上	(N=10)	9.2±3.9
BAL液中リンパ球（%）		
35未満	(N=4)	11.0±10.5
35以上	(N=6)	12.0±2.9
BAL液中Tリンパ球（%）		
28未満	(N=3)	5.8±1.6]**
28以上	(N=3)	12.0±4.1]**

（n mol/min/10^6 cells）　　平均値±標準偏差値
* P<0.02，** P<0.10

と，いずれも有意の相関関係は認められなかった．

考　　案

1913年 Jadassoh[3] が，サ症患者にツベルクリン反応陰性者の多い事に注目して以来，本症における液性および細胞性免疫異常について，免疫学の進歩とともに精力的に仕事が行われてきた[1,4]．特に，近年，Crystal ら[5] の BAL 液中の活性化 T リンパ球の増加の指摘にみられるようにリンパ球を中心に多くの報告がある．しかしながら，生体防禦において，抗原を貪食，消化し，その抗原情報を伝達する重要な役割を演じ，かつサルコイド肉芽腫を構成している類上皮細胞の前駆細胞である単球・マクロファージ細胞の異常を指摘する報告は今だ多くはない．Rechardt ら[6] は，skin window coverslip 法にてサ症ではマクロファージが著明に遊出することを，Goodwin ら[7] は末梢血単球数の増加を，Douglas ら[8] は単球表面の IgG・補体リセプターの増加を報告し，中田ら[2] は活動期症例の単球数と β-galactosidase 活性の亢進および走性，貪食能の低下を報告している．これらの報告の多くは単球機能の亢進を指摘している．

今回著者は単球機能を測定する方法の1つとして中川原ら[9] が開発した Con. A と Cyt. E との2重刺激による O_2^- 産生能測定法を用いてサ症患者末梢血単球の O_2^- 産生能を測定した．サ症においては健常者に比して，O_2^- 産生能の亢進を認め，特に肺門型，肺門肺野型での亢進が著明であった．Kanegasaki ら[10] も，単球の化学発光を測定し，活動期サ症で化学発光の増強を認め，一重項酸素を含む活性酸素産生の亢進が推定されると報告している．Rosen Y ら[11] は，本症に特徴的なリンパ球・マクロファージなどの単核球浸潤を伴った肺胞炎は，肺門型に最も高頻度に認められ，肺門肺野型，肺野型の順に低下すると報告している．著者の単球の O_2^- 産生能が肺門型，肺門肺野型に亢進が認められたことと考えあわせると，O_2^- 産生能の亢進は，肺胞炎の存在を反映していることが窺われる．さらに，Crystal ら[5] は BAL 液中の T リンパ球百分率が28％以上の群を high-intensity alveolitis 群とし，本群が活動期症例であることを肺機能検査，Ga シンチ等の所見より裏づけて報告している．著者の成績においても BAL 液中の T リンパ球百分率が28％以上の群において O_2^- 産生能の亢進がみられたことから，O_2^- 産生能の亢進が本症における alveolitis の存在，ひいては本症の活動性の指標として評価できると思われる．

O_2^- などの活性酸素が肺組織障害作用を有し，線維化を起こすことが知られている[12] が，肺の線維化がみられる肺野病変を有するⅡ型，Ⅲ型とそうでないⅠ型との比較においては，両群間に有意の差は認められなかった．また，罹病期間の長いものほど線維化へ移行する症例が多いが，罹病期間を18ヶ月に区切って比較したが，O_2^- 産生能に差はみられず，O_2^- 産生能の亢進が直接的に肺線維化に作用している証拠は得られなかった．肺線維化には病巣局所，即ち肺内のマクロファージや好中球の O_2^- 産生能が重要な鍵をにぎっていると思われる．

リゾチームは単球・マクロファージ細胞より分泌され，単球の活性化により産生が亢進し，サ症においても血清リゾチーム活性の亢進が認められる[13]．血清中リゾチーム活性亢進群に O_2^- 産生能の亢進がみられたことから，本症の単球は何らかの刺激により活性化されていることが示唆された．

血清中の IAP は炎症性疾患や担癌患者で増加し，リンパ球の芽球化の抑制などの免疫抑制作用を有し，サ症においても活動期症例において増加がみられた[14]．この IAP 増加例に，O_2^- 産生能の亢進する傾向が認められたことも O_2^- 産生能亢進がサ症の活動性を反映していると考えられる．

Prednisolone は，単球・マクロファージ細胞の機能を抑制することから，本剤の投与症例に O_2^- 産生の低下が予想されたが，結果的には，非投与群との間に差が認められなかった．北川ら[15] は，*in vitro* において，単球の O_2^- 産生に及ぼす hydrocortison の影響を検討し，hydrocortison 1 mM 添加により O_2^- 産生は抑制されはじめ，6 mM で完全に阻止されたと報告している．今回の対象症例に対する prednisolone 投

与量を血中cortison濃度に換算するとせいぜい10^{-3}mMと推定され，この程度の濃度では単球のO_2^-産生に影響しないと思われる．Kanegasakiら[10]も，同様にprednisolone投与による化学発光への影響は認められなかったと述べている．

サ症における単球機能についてはβ-galactosidase活性の亢進，走性，貪食能の低下など報告してきたが[2]，これらの異常と今回のO_2^-産生能の亢進との間には有意な相関は認められなかった．このことは単球の各種機能のうちで，O_2^-産生能は前述の諸機能とはまた異なった機能の亢進であろう．

好中球や単球・マクロファージのO_2^-産生は，細胞膜にあるNADPHオキシダーゼが貪食やある種のレクチンなどの膜刺激物質によって活性化されることにより，酸素が酸化されてO_2^-が産生される[16]．また，免疫複合体や補体フラグメントも貪食を介さず，好中球や単球を活性化し，O_2^-を産生する[17]．さらに慢性関節リューマチ患者において，関節液中好中球は末梢血好中球に比して活性酸素産生の亢進がみられるとの報告[18]もある．サ症においては，血中に免疫複合体が有意に高率に検出されるとの報告[19]もあり，末梢血中においてすでに単球が活性化されており，O_2^-産生能の亢進がみられたのかもしれない．Murryら[20]はトキソプラズマに感染あるいは免疫されたマウスの腹腔マクロファージは，正常マクロファージの4～25倍の活性酸素を産生すると報告している．本間ら[21]は，サ症患者の生検材料から高頻度にかつ高濃度にPropionibacterium acnes (P. acnes) を分離し，本症の病態にP. acnesの関与を示唆している．著者らも本症の肺胞リンパ球のP. acnes添加培養にて幼若化が亢進され，特に活動期症例に著明であったことから，本症肺胞リンパ球が，P. acnesに特異的に感作を受けていることを報告した[22]．よってサ症単球のO_2^-産生の亢進に本菌の関与が窺われ，今後に検討していく予定である．

結　論

サ症患者の末梢血単球のO_2^-産生能を測定し，サ症の臨床像及びBAL液細胞成分との関連について考察し，以下の結論を得た．

1．サ症患者の末梢血単球のO_2^-産生能は，対照健常者に比して有意の高値を示した．

2．胸部X線病型別にみると，肺門型，肺門肺野型でO_2^-産生能の亢進が認められた．

3．血清リゾチーム活性異常高値群で，O_2^-産生能の亢進が認められたが，血清IAP量，血清ACE活性，罹病期間，胸郭外病変の有無，prednisolone投与の有無によるO_2^-産生能に差は認められなかった．

4．BAL液中Tリンパ球百分率が28%以上の群はそれ未満の群よりもO_2^-産生能の亢進が認められた．

5．サ症において，末梢血中ですでに単球は何らかの刺激によって活性化されていることが窺われた．

本論文を擱筆するにあたり，御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜わった恩師木村郁郎教授に深甚の謝意を表します．また，終始御懇篤なる御指導を賜わった中田安成講師，大熨泰亮助教授に深謝します．

なお本論文の要旨は第24回日本胸部疾患学会（昭和59年東京）において発表した．

文　献

1．James DJ, Neville E and Walker A: Immunology of sarcoidosis. Am J Med (1975) **59**, 388－394.
2．中田安成，片岡幹雄，近藤　昭，山下二郎，野田憲男，佐藤俊雄，小林洋三，大熨泰亮，木村郁郎：サルコイドーシス患者の単球機能異常．日胸疾会誌 (1982) **20**, 1049－1055.
3．Jadassohn J: Die Tuberkulide. Arch Derm Syph (1913) **119**, 10－83.
4．Ronal PD, James HD and Milton DR: Immunologic abnormalities in sarcoidosis. Ann Int Med (1980) **92**, 406－416.
5．Crystal RG, Roberts WC, Hunninghake GW, Gadek JE, Fulmer JD and Line BR: Pulmonary

sarcoidosis: A disease characterized and perpetuated by activated T-lymphocytes. Ann Int Med (1981) **94**, 73−94.

6. Rechardt L and mustakallio KK: Macrophage response to epidermal abrasion in sarcoidosis. Acta Pathol Microbiol Scand (1965) **65**, 521−527.
7. Goodwin JS, Dehoratius R, Israel H, Peakd GT and Messner RP: Suppressor cell function in sarcoidosis. Ann Intern Med (1979) **90**, 169−173.
8. Douglas SD and Danghaday CC: Kinetics of monocyte receptor activity for immunoproteins in patients with sarcoidosis. Ann NY Acad Sci (1976) **278**, 190−200.
9. Nakagawara A, Ferdais Nabi BZ and Minakami S: An improved procedure for the diagnosis of chronic granulomatous disease, using concanavalin A and cytochalasin E. Clin Chim Acta (1977) **74**, 173−176.
10. Kanegasaki S, Homma JY, Homma H and Washizaki M: Enhanced chemiluminescence responce of phagocyting monocytes from sarcoidosis patients. Int Archs Allergy Appl Immunol (1981) **64**, 72−79.
11. Rosen Y, Athanassiades T, Moon S and Lyons HA: Nongranulomatous interstitial pneumonitis in sarcoidosis. Chest (1978) **74**, 122−125.
12. Johnson KJ, Fantone III JC, Kaplan J and Ward PA: *In vitro* damage of rat lungs by oxygen metabolites. J Clin Invest (1981) **67**, 983−993.
13. Zorn SK, Stevens CA, Schachter EN and Gee JBL: The angiotensin converting enzyme in pulmonary sarcoidosis and the relative diagnostic value of serum lysozyme. Lung (1980) **157**, 87−94.
14. 中田安成，小林洋三，岸　俊行，江尻東伍，大熨泰亮，木村郁郎：サルコイドーシス患者血清の Immunosuppressive Acidic Protein 測定の意義．日胸疾会誌 (1984) **22**, 751−756.
15. 北川誠一，高久史麿，元吉和夫，坂本　忍：ヒト顆粒球および単球のスーパーオキサイド (O_2^-) 産生に及ぼすハイドロコーチゾンの影響．医学のあゆみ (1979) **109**, 89−90.
16. 大柳善彦：スーパーオキサイドと医学．共立出版，東京 (1981) pp 23−39.
17. Goldstein IM, Roos D, Kaplan HB and Weissmann G: Complement and immunoglobulins stimulated superoxide production by human leukocytes independently of phagocytosis. J Clin Invest (1975) **56**, 1155−1163.
18. James DW, Betts WH and Cleland LG: Chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes from rheumatoid joints. J Rheumatol (1983) **10**, 184−189.
19. Gupta RC, Kneppers F, Deremee RA, Huston KA and Mcduffie FC: Pulmonary and extrapulmonary sarcoidosis in relation to circulating immune complexes by two radioimmunoassays. Am Rev Respir Dis (1977) **116**, 261−266.
20. Murry HW, Juangbhanigh GW, Nathan GF and Gohn ZA: Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. II. The role of oxygen intermediates. J Exp Med (1979) **150**, 950−964.
21. 本間日臣：サルコイドーシスの発生機構に関する研究—感染論的立場からの基礎的研究—難病の発生機構．豊倉康夫編，東京大学出版会，東京 (1981) pp 245−304.
22. 中田安成，江尻東伍，岸　俊行，小林洋三，藤田道雄，大熨泰亮，木村郁郎：サルコイドーシス肺胞リンパ球の Propionibacterium acnes に対する反応性の検討．日胸疾会誌 (1985) **23**, 413−419.

Mononuclear phagocyte abnormality in sarcoidosis
I. Studies on superoxide production of blood monocytes in patients with sarcoidosis

Toshiyuki KISHI

Second Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School

(Director : Prof. I. Kimura)

The superoxide production of peripheral blood monocytes stimulated by concanavalin A and cytochalasin E was examined in sarcoidosis patients.

The superoxide production of monocytes was significantly enhanced in sarcoidosis patients (9.8 ± 6.4 nmol/min/10^6 cells) compared with healthy controls (6.6 ± 3.5) ($p < 0.02$). The levels of superoxide production were 12.4 ± 8.7 in 14 patients with stage 1 sarcoidosis (bilateral hilar lymphadenopathy), 9.4 ± 3.9 in 15 patients with stage 2 sarcoidosis (bilateral hilar lymphadenopathy and parenchymal involvement) and 6.1 ± 2.6 in 4 patients with stage 3 sarcoidosis (parenchymal involvement). These levels were significantly higher in patients with stage 1 and 2 sarcoidosis than in healthy controls. The superoxide production was significantly enhanced in patients with elevated serum lysozyme activity and slightly enhanced in patients with high percentages of T-lymphocytes (over 28%) in bronchoalveolar lavage fluid.

These data suggest that peripheral blood monocytes in sarcoidosis patients have been activated by unknown factors.