ベーチェット病のライソゾーム酵素

——特に易熱性ライソゾーム膜不安定化血清因子——

橋本喬史・柳田たみ子・岡本茂樹・外山達一・富永淑子・安藤純子・清水 保*

Lysosomal enzymes in Behçet's syndrome —Special reference to thermolabile lysosomal membrane-labilizing serum factor— Pathological changes of venules and capillaries and perivascular infiltration with white cells suggested participation of lysosomes in pathogenesis of Behçet's syndrome and kinetics of lysosomal enzymes in Behçet's syndrome were studied.

Activities of cathepsin D, acid phosphatase and β -glucuronidase in serum, which were lysosomal marker enzymes, were determined with bovine hemoglobin, p-nitrophenyl phosphate and p-nitrophenyl glucuronide respectively as their matrices. With β -glucuronidase the activities were significantly higher in patients with Behçet's syndrome than normal controls ($p < 0.05$), and especially, higher values were detected in acute stage than quiet stage ($p < 0.05$).

A serum factor which determines the labiability of the lysosomal membrane was examined as a causative factor of pathological kinetics of lysosomal enzymes. Rat liver lysosomal fraction was incubated with test sera and activities of released β -glucuronidase were determined. Lysosomal membrane-labilizing ratio was defined as the percentage of released activity to the total activity of the fraction. The activities of thermolabile lysosomal membrane-labilizing serum factor, detected predominantly in the albumin fraction, were prominently elevated in some patients with Behçet's syndrome compared with normal controls.

Studies of lysosomal enzymes in Behçet's syndrome will serve promising roles in exploring pathogenesis but also in establishing diagnosis and treatment.

Takashi Hashimoto • Tamiko Yanagida • Shigeki Okamoto • Tatsuchi Toyama • Shukuko Tominaga • Junko Ando • Tamotsu Shimizu
Second Department of Medicine, Teikyo University School of Medicine

ベーチェット病の各所病変組織に認められる組織所見として、細小血管病変，とりわけ細小静脈・毛細血管病変と周囲の白血球浸潤を伴う浸出性炎が認められ¹⁾，血管透過性と白血球遊走能の亢進が病変形成に重要な意義を有するものと考えられている。われわれはベーチェット病の血管透過性についての検索を行ってきたが²⁾，病変の発現にライソゾーム酵素が関与している可能性が示唆されたので，血清ライソゾーム酵素活性を測定した。また病変形成へのライソゾーム酵素の関与を考える際，貪食細胞，特に好中球からのライソゾーム酵素の病的放出が重視される。

好中球からのライソゾーム酵素の病的放出は，免疫複合体の存在やライソゾーム膜を不安定化させる諸因子，CRP 複合体の貪食，ライソゾームへの微量化学物質の蓄積などによって起こりうるが，このうち，ベーチェット病患者血清中のライソゾーム膜不安定化因子について検討した。

対象と方法

血清ライソゾーム酵素については，cathepsin D, acid

phosphatase, β -glucuronidase 活性を定量した。対象はベーチェット病23例（活動期13例，緩解期10例）で，他に健康人10例についても測定した。血清は採血後ただちに氷冷して遠心分離し，溶血していないもののみ本試験に用いた。cathepsin D はウシヘモグロビンを基質としてBarrett法³⁾により活性を定量した。acid phosphataseの活性はp-nitrophenyl phosphateを基質とした和光キットで測定し， β -glucuronidase 活性はp-nitrophenyl glucuronideを基質とした塚元・柴田・北村法⁴⁾で測定したが，ともに遊離したp-nitrophenylを比色定量することによった。

ベーチェット病患者血清中のライソゾーム膜不安定化因子については，ラット肝ライソゾーム膜に対する不安定化作用を， β -glucuronidaseを指標としてベーチェット病21例，RA9例，SLE5例，PSS5例，健康人7例の血清について測定した。なお，ライソゾーム膜不安定化血清因子は，被験血清を56°C，30分熱処理することにより，易熱性のものと耐熱性のものにわけ，それぞれを易熱性ライソゾーム膜不安定化血清因子，耐熱性ライソゾーム膜不安定化血清因子とした。

ラット肝ライソゾーム浮遊液の作成はIgnarro法⁵⁾の変法によった。すなわち，200～250gのDonryu系ラ

* 帝京大学医学部第二内科学教室

図1 lysosomal enzyme activities in sera

ットより、十分脱血後、肝を採取し、氷冷 0.25 M sucrose で洗浄後、肝湿重量に対して6倍量の 0.25 M sucrose を加え、氷冷下10回ホモジナイズ (up and down) し、700×g、15分遠心した。得られた上清を3,500×g、15分遠心した後の沈殿物に肝湿重量と同量の0.25 M sucrose を加えて、さらに 3,500×g、15分遠心し、得られた沈殿物を1 g 肝/ml となるように 0.25 M sucrose 中に浮遊させ、ラット肝ライソゾーム浮遊液とした。

このライソゾーム浮遊液 0.3 ml と、0.25 M sucrose-0.04 M Tris acetate (pH 7.4) 1.2 ml の混合液に被験血清 0.5 ml を加え、37°C・10分間 incubation した後、15,000×g、15分超遠心し、得られた上清の β -glucuronidase 活性を測定した。

一方、血清のかわりに 0.1% Triton X-100-0.04 M Tris acetate (pH 7.4) 1.7 ml をライソゾーム浮遊液 0.3 ml に加えて、ライソゾーム膜を完全に破壊した際の β -glucuronidase 活性を同様に測定し、この際の β -glucuronidase 値で被験血清を加えたときの β -glucuronidase 値を除し、膜不安定化率とした。なお、この膜不安定化率をもって、被験血清のライソゾーム膜不安定化血清因子活性とした。

結 果

(1) ペーチェット病の血清ライソゾーム酵素活性

血清 cathepsin D 活性は、ペーチェット病、健康人ともに誤差範囲の微量を検出するにすぎなかった。

血清 acid phosphatase 活性は、ペーチェット病 23 例では 0.18~1.39 BL 単位、平均 0.614 BL 単位であり、健康人 10 例の 0.37~0.96 BL 単位、平均 0.627 BL 単位と比較して有意差は認められなかった。また、ペーチェット病の活動期 13 例では、平均 0.700 BL 単位、緩解期 10 例では平均 0.502 BL 単位であり、活動期の活性が高値を示したが、有意差はなかった。

血清 β -glucuronidase 活性は、ペーチェット病 23 例では

80~1,720 単位、平均 657.2 単位、健康人 10 例では 240~780 単位、平均 479 単位であり、健康人に比べてペーチェット病では有意な高値 ($p<0.05$) を示した。また、ペーチェット病の活動期 13 例では、平均 686.9 単位、緩解期 10 例では平均 618.5 単位であり、活動期に有意な高値 ($p<0.05$) を認めた (図 1)。

(2) ラット肝ライソゾーム膜に対する不安定化血清因子活性

ラットライソゾーム膜を不安定化する血清因子活性について、ライソゾーム膜不安定化率により検討した。

健康人 7 例の膜不安定化率は、15.4~36.8%、平均 24.4% であり、そのうち易熱性の部分が 0.9~11.8%、平均 3.7% であり、耐熱性の部分が 9.6~33.0%、平均 20.7% であった。これに対してペーチェット病 21 例では、膜不安定化率は 11.6~46.6% 平均 24.6% であり、平均値は健康人と変らなかったが、易熱性の部分は 0.7~35.0%、平均 8.8% と健康人に比べ高値を示し、ペーチェット病の一部では易熱性ライソゾーム不安定化血清因子活性が 20% 以上に著増していた。

他疾患では、RA や SLE でも同様に増加している例がみられた (図 2)。

(3) ペーチェット病の易熱性ライソゾーム膜不安定化血清因子の性状

易熱性ライソゾーム膜不安定化血清因子活性が、0.9% の健康人と 35.0% に著増しているペーチェット病の血清を 56°C・30 分熱処理したものとし、セファデックス G-200 で分画し、各分画の膜不安定化率をみることにより、易熱性ライソゾーム膜不安定化因子活性の存在部位について検討した。Fr. I は 19S, Fr. II は 7S, Fr. III はアルブミンに相当し、各分画の蛋白濃度を 2,500 γ 前後に調整し、それぞれの膜不安定化率をみた。その結果、Fr. III において熱処理前後の膜不安定化率に明らかな差が認められたので、易熱性ライソゾーム膜不安定化血清因子活性は主としてアルブミン分画に

图 2 lysosomal membrane-labilizing serum factor in human sera

图 3 lysosomal membrane-labilizing ratio in three fractions by Sephadex G-200

图 4 efficacy of protease inhibitors to lysosomal membrane-labilizing ratio

存在するものと考えられた(図3)。

ベーチェット病と膠原病における易熱性ライソゾーム膜不安定化血清因子の性状の異同について、プロテアーゼ・インヒビターであるアプロチニンとトラネキサム酸に対する活性の変化をみることにより検討した。対象はベーチェット病2例と膠原病3例(RA1例, SLE2例)である。トラネキサム酸2.2 mg/ml, 5.5 mg/mlを被験血清に加えることにより、ベーチェット病、膠原病ともに膜不安定化率は低下した。これに対してアプロチニン222 unit/ml, 555 unit/mlを被験血清に加えると、膠原病では膜不安定化率は低下したが、ベーチェット病では低下がみられなかった(図4)。

考 案

血清ライソゾーム酵素として、cathepsin D, acid phosphatase, β -glucuronidase 活性を測定した。ベーチェット病では対照健康人に比べ、 β -glucuronidase 活性が有意に高く、特に活動期に上昇していたが、早坂ら⁶⁾も β -glucuronidase, cathepsin D について同様な知見を得ている。

水野ら⁷⁾は、血清 acid phosphatase, β -galactosidase, N-acetyl- β -galactosidase 活性を測定し、健康人に比べN-acetyl- β -galactosidase 活性の上昇を認めており、増田ら⁸⁾はベーチェット病患者の末梢白血球のライソゾーム酵素を調べ、眼発作期に好中球の myeloperoxidase 活性が低下していたことから、眼発作期には他のライソゾーム酵素よりも myeloperoxidase の血清への遊離が重要であると考えている。これらの成績からベーチェット病では活動期を中心に血清ライソゾーム酵素活性が上昇しているものと考えられる。

各種血清ライソゾーム酵素のうち、病変形成にもっとも重要な意義を有するものと考えられるプロテアーゼについて、cathepsin D 活性をみたが、検出しえなかったことはプロテアーゼ・インヒビター活性の上昇による可能性があると思われた。

この点に関して、教室の高野ら⁹⁾は、5種のプロテアーゼ・インヒビターを測定し、ベーチェット病では対照健康人に比べ α_1 -antitrypsin や α_1 -antichymotrypsin が有意な高値を示すことを確めており、ベーチェット病では血清プロテアーゼ活性も上昇しているものと推測される。

今後、血清ライソゾーム酵素のみならず、病変局所のライソゾーム酵素動態についても検索し、ライソゾーム酵素の病変形成に果たす役割りを明らかにして行かねばならない。

ベーチェット病では、血清ライソゾーム酵素活性やプロテアーゼ・インヒビターが活動期を中心に上昇しており、acridine orange で染色した末梢好中球のライソゾ

ームの蛍光は活動期に強いといわれている¹⁰⁾。また、病変部位の組織所見からも病変形成にライソゾーム酵素が関与している可能性が強く、貪食細胞、特に好中球からのライソゾーム酵素の病的放出が重視される。好中球からのライソゾーム酵素の病的放出は、免疫複合体の存在やライソゾーム膜を不安定化させる諸因子、CRP 複合体の貪食、ライソゾームへの微量化学物質の蓄積などにより起こりうるが、ベーチェット病患者では、血球膜の異常を指摘した報告もあり¹¹⁾、患者血清中のライソゾーム膜不安定化因子について検討した。

ラット肝ライソゾーム膜不安定化率から、ライソゾーム膜不安定化血清因子について検索したが、ベーチェット病の一部では主にアルブミン分画に活性を有する易熱性ライソゾーム膜不安定化血清因子活性が健康人にくらべ、著増していた。この因子活性はRAやSLEの一部でも増加していたが、ベーチェット病のものはプロテアーゼ・インヒビターであるアプロチニンによる活性の変化の相違から、膠原病のものとは異なったものである可能性が示唆された。なお、*in vitro*における易熱性ライソゾーム膜不安定化血清因子の成績を直接*in vivo*における作用に結びつけることには問題があるが、この因子は酵素、特にプロテアーゼである可能性が強い。

最近、三村ら¹²⁾は患者血清中の好中球 β -glucuronidase 活性化因子の存在を指摘しており、桃井ら¹³⁾はベーチェット病では、好中球や血小板などの血球膜の異常、特に膜脂質の異常があり、その成因としてセリル・プロテアーゼ・インヒビターの一種で阻止される因子が存在するとしており、易熱性ライソゾーム膜不安定化血清因子の解明はベーチェット病の病因・病態に結びつくものと考えられる。

結 語

ベーチェット病の各所病変部位に共通してみられる組織所見から、病変形成におけるライソゾーム酵素の役割に注目して検討した。ベーチェット病では β -glucuronidase 活性が健康人に比べ有意な上昇を示し、特に活動期に高かった。また貪食細胞からのライソゾーム酵素の病的放出を起こさせる可能性のあるものとして、ベーチェット病の一部に易熱性ライソゾーム膜不安定化血清因子活性が著増していることを指摘した。

文 献

- 1) 橋本喬史, 賀古建次, 青山友三: ベーチェット病の関節炎と血管病変。厚生省特定疾患ベトエツト病調査研究班(昭和49年度研究業績), 1975, p 259~261.
- 2) 橋本喬史, 清水 保: ベーチェット病の細小血管病変。厚生省特定疾患系統的血管病変に関する調査研究班(1976年度研究報告書) 1977, p 243~248.

- 3) Barrett, A.J.: Lysosomal acid proteinase of rabbit liver. *Biochem. J.* 104: 601~608, 1967.
- 4) 柴田 進, 北村元仕: 現代診断検査法大系別巻・日常臨床生化学定量法. 中山書店, 1963, p 212~214.
- 5) Ignarro, L.J.: Effects of anti-inflammatory drugs on the stability of rat liver lysosomes *in vitro*. *Biochem. Pharmacol.* 20: 2847~2860, 1971.
- 6) 早坂征次, 朝岡 真, 佐々木一夫: ペーチェット病眼病変とライソゾーム酵素. 厚生省特定疾患ペーチェット病調査研究班 (昭和50年度研究業績), 1976, p 83~86.
- 7) 水野伝一, 後藤佐多良: ペーチェット病の病因追求に関する生化学的研究—ペーチェット病患者血清中のリソゾーム酵素活性. 文部省特定疾患難病班 (昭和50年度研究業績) 1976, p 53~55.
- 8) 増田寛次郎, 難波克彦, 伊沢保穂・他: ペーチェット病患者白血球ライソゾーム酵素の動態. 厚生省特定疾患ペーチェット病調査研究班 (昭和54年度研究業績) 1980, p 175~178.
- 9) 高野喜久雄, 柳田たみ子, 清水 保: ペーチェット病における血清中プロテアーゼ・インヒビター. 厚生省特定疾患ペーチェット病調査研究班 (昭和51年度研究業績) 1977, p 14~17.
- 10) 桃井宏直, 松井良樹, 渡辺京子・他: ペーチェット病患者好中球内 RNA と Lysosome. 厚生省特定疾患ペーチェット病調査研究班 (昭和52年度研究業績) 1978, p 4~8.
- 11) Momoi, H.: Humoral activating factor of Behçet's disease and erythrocyte membrane disorder. *Studies on Etiology and Prevention of Behçet's Disease* (Behçet Disease Research Committee of Japan, Ministry of Welfare, Japan, 1975), 1976, p 87~92.
- 12) 三村康男, 山田光則, 春尾えり子: ペーチェット病における末梢血好中球 β -glucuronidase 活性. 厚生省特定疾患ペーチェット病調査研究班 (昭和53年度研究業績) 1979, p 28~32.
- 13) 桃井宏直, 松井良樹, 渡辺京子・他: Protease Inhibitor, Gabexate Mesilate (Foy®) 投与時のペーチェット病患者多形核白血球内ライソゾームの変化について. 厚生省特定疾患ペーチェット病調査研究班 (昭和53年度研究業績) 1979, p 16~21.