ベーチェット病の白血球および血小板動態について

—人工微小流路を用いて視覚的にとらえた—

星 恵子・山本直弘・中川慎也・山崎淳子・水島 裕*

Movement of activated leukocyte and platelet in Behçet disease : Visual observation using artificial microchannels

Interaction of both leukocytes and endothelial cells is important for inflammation. Its process develop in the venules of microcirculation system. Thus, we visually observed flow movement of leukocyte and platelet of Behçet disease patients using artificial microcirculation model.

Venous blood of fourteen patients of Behçet disease and fifteen healthy controls were collected into syringe containing EDTA, respectively. Blood sample were whole blood diluted 4 times with plasma and PAF (10^{-6} M) added to whole blood.

Blood sample flow into modified cell-flow microchannels in a single-crystal silicon substrate and the time for 100 μ l of blood sample to pass through was measured.

Deformity of leukocyte (might be rolling and adhesion) and platelet aggregation were visually observed in Behçet disease patient on TV monitor. And also, mean passage time of 100 μ l sample prolonged in Behçet disease patient (147.92 ± 25.74 sec.) compared with healthy control (103.91 ± 7.58 sec.).

This study suggested that leukocyte and platelet were already activated in patients with Behçet disease, and activated these cells resisted to flow through the microchannels and hence interfered with the flow of other blood components.

Rec. 8/8/1996, Acc. 9/24/1996, pp 33~39

*Keiko Hoshi · Naohiro Yamamoto · Shinya Nakagawa ·
Junko Yamazaki · Yutaka Mizushima**

*key words : Behçet disease, microcirculation model,
artificial microchannels, visual observation*

慢性の炎症性疾患であるベーチェット病(ベ病)では、好中球や血小板の機能亢進のあることが知られている。機能の亢進した好中球が病巣部へ浸潤するには好中球の血管内皮への接着が必要であり、そのためには白血球と内皮細胞それぞれの接着分子の結合が不可欠であることも明らかになっ

てきた。また、これら好中球を中心とする炎症の展開の場が細静脈領域であることもわかってきた。それは、近年の光学機器の目覚ましい進歩により、微小循環系を生体顕微鏡下で観察することができるようになってきたからである。

今回、半導体微細加工技術を用いて製作した人工微小流路¹⁾を用いてベ病患者の白血球や血小板の動態を空間的、時間的視点から観察し、間接的ではあるが分子生物学的に得られた知見の一部を視覚的にとらえることを試みた。

* Institute of Medical Science, St. Marianna University School of Medicine 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター
Offprint requests to : Keiko Hoshi, Institute of Medical Science, St. Marianna University School of Medicine, 2-16-1 Sugao, Miyamae-ku, Kawasaki 216, Japan

表 1 ベーチェット病患者の症状および背景一覧

症例	年齢	性別	病型	服用薬物	採血時に認められた症状	HLA-B51
1	31	女	不全型	コルヒチン 2T, アゼブチン 2T	アフタ性口内炎	有
2	51	女	不全型	コルヒチン 2T	アフタ性口内炎	有
3	52	男	完全型	コルヒチン 1T, セレスタミン 1T, アダラート L2T	アフタ性口内炎	—
4	47	女	不全型	コルヒチン 1T, ロキソニン 2T	なし	—
5	52	女	不全型	コルヒチン 1T, ロキソニン 3T	アフタ性口内炎	無
6	51	男	不全型	コルヒチン 1T, サロベール 2T	アフタ性口内炎	—
7	43	女	完全型	コルヒチン 3T, プレドニン 50 mg	右片麻痺	無
8	27	女	不全型	コルヒチン 2T	アフタ性口内炎, 結節性紅斑	—
9	31	女	不全型	コルヒチン 2T, ロキソニン 3T	なし	無
10	33	男	完全型	コルヒチン 1T	アフタ性口内炎	有
11	55	男	不全型	コルヒチン 1T	なし	有
12	59	女	完全型	服用薬なし	なし	無
13	38	女	不全型	コルヒチン 1T	アフタ性口内炎	有
14	47	女	完全型	コルヒチン 1T, プレディニン 150 mg	毛嚢炎様皮疹	有

図 1 a) 人工微小流路装置の回路図(文献 1 より). b) シリコンチップ(実際に血液の通る部分)の拡大模式図

図 2 シリコンチップを顕微鏡下でみた時の写真

上段：健常人，下段：ベ病患者，左が無刺激，右が PAF 添加時であるが，ベ病患者では無刺激の状態でも健常人の全血に PAF を添加した時以上に白血球も血小板凝集塊も多数認められる。

表 2 白血球数および血小板凝集塊数

	白血球数(個)		血小板凝集塊数(個)	
	無刺激	PAF 添加	無刺激	PAF 添加
ペーチェット病 (n=14)	4.0±1.6	6.8±2.0	1.8±2.0	3.1±1.9
健常人 (n=15)	2.6±0.9	4.8±1.5	1.1±0.8	1.8±1.8

**P<0.01

N.S. 有意差なし

ビデオテープの画面を 10 秒間隔で一時停止した時の一視野に認められた白血球数および血小板凝集塊数(平均±S. D.)

対象と方法

(1) ベ病患者 14 例(表 1)と性・年齢をほぼ一致させた健常人 15 例(男性 5・女性 10)を対象に EDTA 採血し，血液の一部を残し，残りの血液を 3000 回転 15 分間遠心分離し血漿を得る。毛細血管レベルでのヘマトクリット値に近似するように全血に自己血漿を加えて 4 倍希釈したものを試料 ① (全血)とした。試料 ① に

PAF(Sigma 社)10⁻⁶M を加えたものを試料 ② とした。

(2) 人工微小流路(図 1)は，単結晶シリコンプレート上に半導体微細加工技術によって等径 6 μm，等価長 20 μm の溝 2600 本が刻まれたチップを用いている。このチップを専用のホルダーに入れ，顕微鏡ステージ上にホルダーを装着する。ホルダー上にシリンドーを立てて，この中に試料 300 μl を入れて 20 cm 水柱の引圧で流す。試料が等径 6 μm，等価長 20 μm の微細な溝を流れる様子を顕微鏡下でとらえ，それを TV モニターで写し，映像をビデオカメラに収める。この時，同時に 100 μl の試料が通過する時間を測定する。なお，試料を流す直前に毎回生食水 100 μl の通過時間を測定し，およそ 40 秒前後に調整しておく。

結 果

(1) 顕微鏡下での観察

チップを顕微鏡下でみると，黒い縁どりの六角

表 3 全血および PAF 添加時の通過時間
—ベパーチェット病患者—

症例	年齢	性別	① 全血 (秒)	生食水 (秒)	全血/生食水	② PAF (秒)	生食水 (秒)	PAF/生食水
1	31	女	132.78	40.35	3.29	280.78	40.46	6.94
2	51	女	187.98	41.89	4.49	144.97	39.83	3.64
3	52	男	137.25	38.34	3.58	173.90	38.56	4.51
4	47	女	125.90	38.03	3.31	183.99	40.24	4.57
5	52	女	130.40	41.08	3.17	153.65	40.79	3.77
6	51	男	124.01	40.28	3.08	202.63	41.63	4.87
7	43	女	153.99	40.01	3.85	187.92	38.37	4.90
8	27	女	212.07	38.52	5.51	125.30	37.61	3.33
9	31	女	133.59	38.66	3.45	156.08	40.74	3.83
10	33	男	179.22	39.06	4.59	139.27	39.89	3.83
11	55	男	111.18	38.85	2.86	135.98	40.08	3.39
12	59	女	166.00	38.64	4.30	167.35	38.77	4.32
13	38	女	167.55	38.99	4.30	195.16	40.22	4.85
14	47	女	108.97	40.13	2.72	130.55	41.45	3.15

形、ちょうど算盤の珠が連なっているようにみえるが、珠と珠との間隙が等価径 $6\mu\text{m}$ で、珠と珠が接している等価長が $20\mu\text{m}$ である(図 1 b)。試料は全血を用いているので、特に問題がなければ赤血球、白血球、血小板といった血球成分のすべてが、この流路を滞りなく速やかに流れていくのが観察される(図 2)。

写真上段が健常者で、左が無刺激、右が PAF を添加した場合である。健常者の無刺激では血液が速やかに流れ、 $100\mu\text{l}$ の試料が流れる間に白血球や血小板凝集塊が時々散見される程度で、個々の血小板や赤血球は確認できない。PAF を添加すると、無刺激の時にくらべて白血球および血小板凝集塊が多く観察されるようになる。

下段がベ病患者で同じく左が無刺激、右が PAF 添加時のものである。写真をみてわかるように、ベ病患者では無刺激でも、白血球の転回や接着のためと思われる白血球の変形や血小板凝集塊が多く観察される。PAF を添加すると視覚的にこれらの所見が増強するのが認められ、赤血球も一つ一つは確認できないが、連鎖形成に似た帯状の流れとして観察される。

白血球と血小板凝集塊について、ビデオカメラに収めた映像を 10 秒間隔で一時停止し、一視野に認めた白血球と血小板凝集塊それぞれの個数を調

べた(表 2)。その結果、ベ病患者の白血球数は無刺激の状態で 4.0 ± 1.6 個認められ、健常人の 2.6 ± 0.9 個に比べて多かった。PAF を添加した場合には白血球数は、両者とも有意に増加した($p < 0.01$)。また、血小板凝集塊も無刺激の状態で健常人 1.1 ± 0.8 個に比べてベ病患者では 1.8 ± 2.0 個と多かった。PAF の添加では視覚的には健常人でも血小板凝集塊の増加を認めたが、統計学的にはベ病患者でのみ有意に増加した($p < 0.01$)。

(2) 検体 $100\mu\text{l}$ の通過時間

ベ病患者 14 例の ① 全血、② PAF 添加時の通過時間を表 3 に示した。各検体測定毎に生食水 $100\mu\text{l}$ の通過時間を 40 秒前後に調整しているので、それぞれ生食 $100\mu\text{l}$ の通過時間を 1 とした時の比(全血/生食水、PAF/生食水)も示した。比の値が大きいほど通過時間が長いことをあらわす。

(3) ベ病患者と健常人との比較

上記 2 の結果を健常人とくらべたのが表 4 である。健常人 15 例の全血 $100\mu\text{l}$ の平均通過時間が 103.91 ± 7.58 秒であるのに対し、ベ病患者 14 例では 147.92 ± 25.74 秒と有意に延長した($p < 0.01$)。また、当然とは思われるが、全血/生食水の通過時間比もベ病患者 3.75 ± 0.78 に対して健常人では 2.67 ± 0.08 と、ベ病患者のほうが人工微小流路の通過に要する時間が有意に延長した($p <$

表 4 全血および PAF 添加時の通過時間
—健康人との比較—

	全血(秒)	全血/生食水	PAF(秒)	PAF/生食水	PAF/全血
パーチェット病 (n=14)	147.92±25.74	3.75±0.78	169.82±41.77	4.29±0.97	1.14±0.36
健康人 (n=15)	103.91±7.58	2.67±0.08	138.06±21.96	3.53±0.54	1.32±0.18

平均±S. D.
*p<0.05, **p<0.01
N. S. 有意差なし

表 5 全血および PAF 添加時の通過時間比
—HLA-B51 との関連性—

	全血/生食水	PAF/生食水	PAF/全血
陽性 (n=6)	3.71±0.85	4.30±1.42	1.20±0.47
陰性 (n=4)	3.69±0.49	4.21±0.52	1.14±0.11

平均±S. D.
N. S. 有意差なし

0.01).

つぎに、PAF を添加した場合、ペ病患者的の平均通過時間は 169.82±41.77 秒、PAF/生食水 4.29±0.97 と無刺激の時にくらべ延長するが、統計学的には有意でない。一方、健康人ではそれぞれ 138.06±21.96 秒、3.53±0.54 と無刺激の時にくらべて、PAF の添加により有意な延長が認められた(p<0.01)。したがって、PAF の添加ではペ病患者と健康人との通過時間差はわずかとなった(p<0.05)。

さらに PAF/全血をみると、ペ病患者は 1.14±0.36、健康人 1.32±0.18 と両者間に差がない。これは PAF で刺激した場合、むしろ健康人で通過時間が有意に延長するためと考えられる。

(4) HLA-B51 との関連性

ペ病患者 14 例のうち HLA の検索がなされていた 10 例(HLA-B51 陽性 6 例と陰性 4 例)について全血および PAF 添加時の通過時間比を比較

した。HLA-B51 の有無では差がなかった(表 5)。

考 察

ペ病患者の好中球機能を亢進させる因子については、これまでもいろいろな角度から検討されており²⁻⁴⁾、PAF などの炎症メディエーター^{5,6)}や同じ脂質性メディエーターであるロイコトリエン B₄をはじめ IL-6、TNF-α あるいは IL-8 などのサイトカインの産生異常⁷⁾、あるいは活性酸素の関与も指摘されている。このようにさまざまな炎症メディエーターやサイトカインさらには接着分子⁸⁾などが関与して好中球は炎症巣へ浸潤していくと考えられるが、その前段階として好中球の血管内皮細胞表面への接着が重要である。

これまで、白血球の接着能をみるには赤血球の変形能をみる nuclepore filtration method が用いられたり⁹⁾、血小板の凝集能をみるには、Born の比濁法が一般的であるが、いずれの方法もその様子を可視下でみることはできない。

菊池らが開発した人工微小流路は、シリコンチップ上に半導体による微細加工技術によって等価径 6 μm、等価長 20 μm の溝がつくられ、血液試料を 20 cm 水柱の引圧で流すと溝の中を血液が流れる様子が TV モニターで観察できる。この装置は、主に血液レオロジーの研究に用いられてきたが、白血球の転回、接着に類似した流動挙動がこの装置によっても観察されることがわかり、

さらに、白血球の物理的な通過抵抗を調べることによって、白血球の活性化の程度を知る良い指標になるのではないかと考えられている¹⁰⁾。

また、今回用いた人工微小流路は個々の血球成分にわけて観察することもできるが全血でも可能である。べ病の炎症局所では好中球や血小板の相互作用¹¹⁾もあると考えられるので、全血を用いてできるということは、これらをより生理的な条件下で観察できることであり、この点においても非常にすぐれた方法と考えられる。

この装置に取りつけられている TV モニターを用いて、健常人の全血が流れる様子を 10 秒間隔で一時停止した画面でみると、白血球数は平均 2.6 ± 0.9 個であり、個々の血小板や赤血球は確認できない。しかし、ここに PAF を加えると白血球数は平均 4.8 ± 1.5 個と増え、血小板も凝集塊をつくり、平均 1.8 ± 1.8 個確認できるようになる。これは、PAF によって白血球が活性化されて、白血球が転回あるいは接着しやすい状態になったためと、血小板も凝集塊をつくるために、結果的に微小流路を通過するのに時間がかかり、TV モニター上に血球をとらえることができるようになったと考えられる。

しかし、べ病患者では無刺激の状態においても白血球数は平均 4.0 ± 1.6 個、血小板凝集塊も平均 1.8 ± 2.0 個と、白血球数も血小板凝集塊数も健常人に比べて有意に多く認められた。そのためか、PAF を添加した場合には健常人のほうが無刺激の時と比べて通過に要する時間が延長し ($p < 0.01$)、べ病患者のほうが PAF の添加による通過時間の延長は軽度で統計学的にも有意ではなかった。それは、べ病患者の白血球や血小板は PAF はじめ種々の炎症メディエーターやサイトカインによってすでに活性化されているため、新たに PAF を加えて刺激しても反応性が悪く、したがってべ病患者の白血球や血小板は反応性が低下した状態にあると考えられた。

べ病患者では 50~60% に HLA-B51 が陽性であることから、べ病の病因に HLA-B51 が関与するといわれている。そこで、べ病患者の HLA-B51 の有無で微小流路の通過時間を調べた。HLA-

B51 の有無については特に通過時間に関連性は見出せなかった。

今回、微小流路を用いてべ病患者の白血球および血小板の動態を検討した。これまでべ病患者の好中球機能や血小板機能が亢進していることは数多く報告されているが、それらを視覚的にとらえることはできなかった。今回の方法によれば、白血球の転回、接着と思われる動きやそれによる変形および血小板が凝集する様子を直接目でみることができる。また、これら白血球や血小板機能が亢進することによって、微小流路の通過に抵抗を示すことを、 $100 \mu\text{l}$ という一定量の試料が微小流路を通過する時間を計測することによって確認できる。さらに、全血を用いて行えるので、より生理的な条件下で血球動態をとらえることができるという利点もある。

最後に、現在べ病治療薬の有効性をみるのに有用な検査がなく、臨床所見の改善だけに頼っている。しかし、べ病は再発再燃を繰り返す疾患であるために、薬効評価が難しい場合がある。今回のこの方法を用いて、べ病患者の白血球や血小板機能が視覚的に改善するか、また、微小流路を通過する時間が短縮するかなどを調べることによって、客観的な薬物の有効性評価にも応用できるのではないかと考えられる。

文 献

- 1) Kikuchi Y, Sato K, Mizuguchi Y: Modified cell-flow microchannels in a single-crystal silicon substrate and flow behavior of blood cells. *Microvascular Research* 47: 126-139, 1994.
- 2) 丹羽鞆負: Behcet 病患者リンパ球分泌上清中にみられる好中球機能亢進因子について. *最新医学* 43(2): 294-303, 1988.
- 3) 渡辺理恵, 溝口昌子: Polarization assay を指標としたパーチェット病患者末梢血好中球機能. *日皮会誌* 98(14): 1451-1457, 1988.
- 4) 坂根 剛, 岳野光洋, 上田裕司, 西川 恵: パーチェット病単核細胞によるサイトカイン産生パターンと好中球機能異常との関連. 厚生省特定疾患パーチェット病調査研究班, パーチェット病に関する研究 平成元年度研究業績: 36-37, 1990.
- 5) 仲村恒敬: パーチェット病における PAF の役割—好中球機能亢進の機序—. *最新医学* 43(2): 308-311, 1988.
- 6) 立浪和也, 片山寿夫, 石黒真美, 新田耕治, 窪田靖夫: パーチェット病と血小板活性化因子の関連. *日本眼科*

- 紀要 43(9) : 1122-1127, 1992.
- 7) Mege J-L, Dilsen N, Sanguedolce V, Gul A, Bongrand P, Roux H, Ocal I, Inanc M, Capo C : Overproduction of monocyte derived tumor necrosis factor α , Interleukin(IL)-6, IL-8 and increased neutrophil superoxide generation in Behcet's disease. A comparative study with familial mediterranean fever and healthy subjects. J of Rheum. 20(9) : 1544-1549, 1993.
- 8) 加来秀彦, 水川廣海, 岸いずみ, 柳田たみ子, 稲葉午朗 : ペーチェット病眼発作による末梢白血球接着分子の検討. リウマチ 34(3) : 608-615, 1994.
- 9) 飯島茂子, 大塚藤男, 菊池佑二 : 白血球の壁粘着能(付着能)に及ぼす Cepharanthin の抑制効果. 新薬と臨牀 42(2) : 303-307, 1993.
- 10) Kikuchi Y : Flow behavior of leukocytes in artificial microchannels and a measures of their rheological activity. Microcirculation annual 1994. 日本医学館, 1994, p 167-168.
- 11) 高橋 淳, 柴田榮里, 山本孝吉, 大熊 稔, 湯浅武之助, 笹田昌孝 : ペーチェット病患者好中球と血小板の相互作用—GM-CSF 存在下での活性酸素放出の検討一. 炎症 12(3) : 239-243, 1992.