

原 著

アレルギー性鼻炎における血清ECPと血漿ECPの 違いについて

獨協医科大学越谷病院 耳鼻咽喉科

三須 俊宏

要 旨 好酸球顆粒蛋白の一つであるECPは、気道上皮障害を引き起こす事が知られている。血清ECPは、喘息や鼻アレルギー症状の重篤度を、反映していると報告されているが、血漿ECPは、血清ECPに比べ、常に低値となる。その値の違いが生じる理由を解明するため、アレルギー性鼻炎の症例を対象にして、検討した。患者血液を3種類の試験管に採血した。血液凝固剤入り、抗血液凝固剤入り、無添加の3種類である。その結果、血清ECPは、血漿ECPに比べ、常に高値を示した。しかも凝固剤を入れた血清ECPの方が無添加の血清ECPより高値であった。血清採取後の血餅中に存在する好酸球は、細胞膜が破綻し、顆粒の空胞化も顕著であった。一方、血漿採取時に生じたbuffy coat中の好酸球は、正常な形態を示すものが、大部分であった。ECP値は、好酸球細胞膜の破綻程度と有意な相関を示した。空胞化した顆粒を持った好酸球の細胞膜が破綻した時は、更なるECP高値を示した。以上の結果よりECPは、採血後に好酸球が、血餅という物理的な圧迫を受け、細胞崩壊をきたし、放出されるものと思われた。従って血清ECPは、好酸球の崩壊しやすさを、測定しているものであると思われた。

Key Words : 血清ECP, 血漿ECP, 好酸球細胞膜, 細胞崩壊, 電子顕微鏡

緒 言

Eosinophil Cationic Protein (ECP) は、好酸球顆粒蛋白の一つであり、気道上皮障害を引き起こす事が知られている。又、血清ECPは、喘息や鼻アレルギーの症状をよく反映していると報告されている^{1~3)}。しかし、血漿ECPは、血清ECPに比べ常に低値を示し、アレルギー症状を反映しない。血清と血漿の違いは、前者は、無添加、又は、血液凝固促進剤の入った採血管に採血し、後者は、抗凝固剤の入った採血管に採血する事による。血清を採取する時は、遠沈により血餅が生じ、好酸球はもちろん、あらゆる血球は血餅の中にとじ込められ、それらが混在することになる。一方、血漿を採取する時は、血液は凝固しないので、比重に従って、赤血球の上層に、buffy coatと呼ばれる好酸球を含んだ白血球の層が出現する。血清ECPが高値を示す理由として、採血時に添加される血液凝固剤の影響が考えられるが、好酸球が、

血餅の中に取り込まれ、機械的な圧力を受けた結果とも考えられる。そこで、血清ECPと血漿ECPの値を比較すると共に、それぞれの好酸球に、形態的な相違があるか電顕で検討する事にした。

方 法

当科を受診し、アレルギー性鼻炎と診断された5症例を対象とした。男性1例、女性4例である。通年性アレルギーが4例（ハウスダスト2例、ネコ1例、アスペルギルス1例）、季節性アレルギーが1例（スギ）、である。スギの1例は、非飛散期であった。患者に十分な説明をし、研究協力の同意を得た後、血液を3本の試験管に採血した。血液凝固剤の入った試験管、抗凝固剤の入った試験管、何も入れていない試験管である。一時間、室温に放置した後、遠沈（1500×g、4℃、10分間）し、血清又は、血漿を分離し、それぞれに含まれるECPを測定した。ECPの測定には、Pharmacia ECP radioimmuno assay kitを使用した。又、各々の試験管の好酸球を電顕で観察した。好酸球は、血液凝固剤（SST tube ベクトンデッキンソン社製）を入れた試験管、何も入れていない試験管では、血餅中に認め、抗凝固剤（EDTA-2K加）

平成15年9月10日受付、平成15年11月29日受理
印刷請求先：三須俊宏

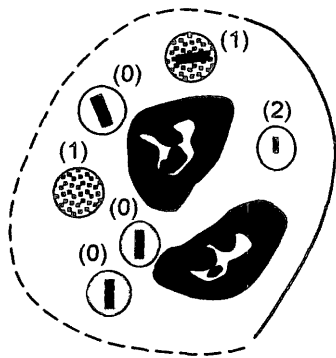
〒343-8555 埼玉県越谷市南越谷2-1-50
獨協医科大学越谷病院 耳鼻咽喉科

表1 細胞膜破綻スコア

0	破綻がない
1	細胞膜全周の50%未満の破綻
2	細胞膜全周の50~75%の破綻
3	細胞膜全周の75%以上の破綻

表2 顆粒空胞化スコア

0	顆粒が密に認められている
1	顆粒が粗になっている
2	顆粒が認められず空胞化を示す



崩壊指数 = $\{(0) \times 3 + (1) \times 2 + (2) \times 1\} \times 2 (50 - 75\%) = 8$

顆粒空胞化スコア 細胞膜破綻スコア

図3 好酸球崩壊指数の算出法
顆粒空胞化スコア (0 × 3 + 1 × 2 + 2 × 1) × 細胞膜破綻スコア (2) = 8

を入れた試験管では、buffy coat中に認めた。血餅，又はbuffy coatを2%グルタルアルデヒドで2時間固定し，0.1 M カコジレイトバッファーで，3回水洗後，1%オスミウム酸で後固定を行った。エポン樹脂に包埋後，超薄切片を作成した。好酸球を，各々10~15個電顕で観察した。電顕観察では，細胞膜破綻と顆粒の変化に重点を置いた。その形態的变化を，表1の基準で分類した。すなわち，好酸球細胞膜の破綻の程度により，4段階に分類し，細胞膜破綻スコアとした。全周にわたって細胞膜に破綻の認められないものをスコア 0，全周の50%未満に破綻を認めるものをスコア 1，50~75%に破綻を認めるものをスコア 2，75%以上の破綻を認めるものをスコア 3，とした。又，顆粒の空胞化の程度により，3段階に分類し，顆粒空胞化スコアとした(表2)。顆粒が密な電子密度を示すものをスコア 0，粗な顆粒状を示すものをスコア 1，空胞化を示す顆粒をスコア

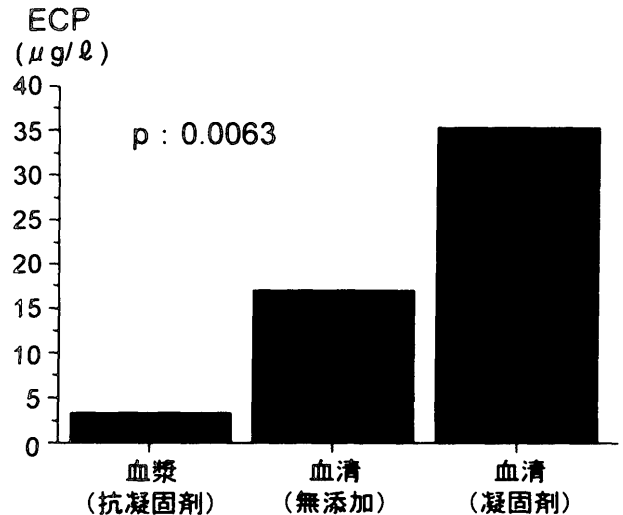


図1 抗凝固剤添加(血漿)，無添加(血清)，血液凝固剤添加(血清)の三群におけるECP値
三群間には有意の差(P = 0.0063)が認められた。

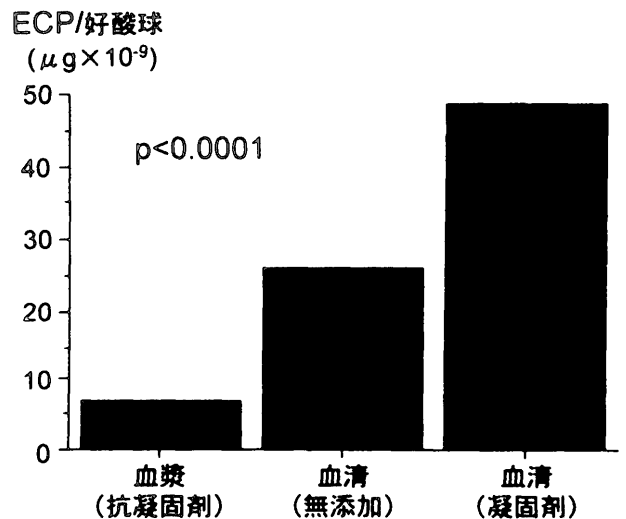


図2 好酸球1個あたりから出てくるECP値(ECP/総好酸球数)の三群間の比較
P < 0.0001で三群間に総ECP値より強い有意差を認めた。

2，とした。好酸球1個の中に含まれる，全ての顆粒の顆粒空胞化スコアを合算し，その値に細胞膜破綻スコアを掛けたものを，好酸球崩壊指数と定義した。例えば，図3に示した好酸球の場合，崩壊指数は，顆粒空胞化スコア (0 × 3 + 1 × 2 + 2 × 1) × 細胞膜破綻スコア (2) = 8となる。ECP値を総好酸球で徐し，好酸球1個から放出されたECPを算出し，好酸球細胞膜破綻スコア及び，好酸球崩壊指数との相関について検討した。

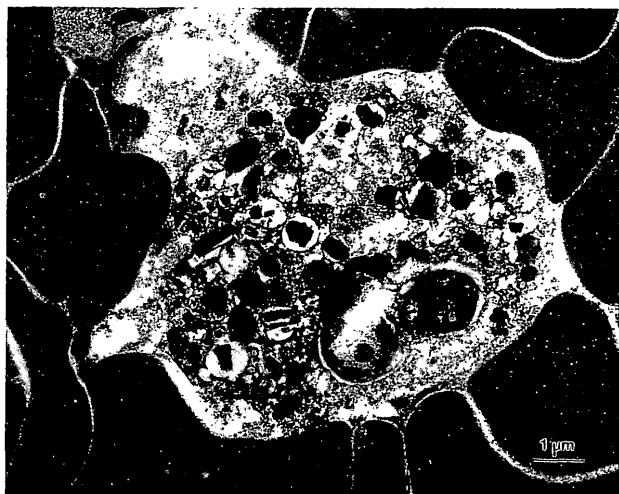


図4 血餅中の好酸球
細胞膜は破綻し、顆粒の空胞化も顕著である。

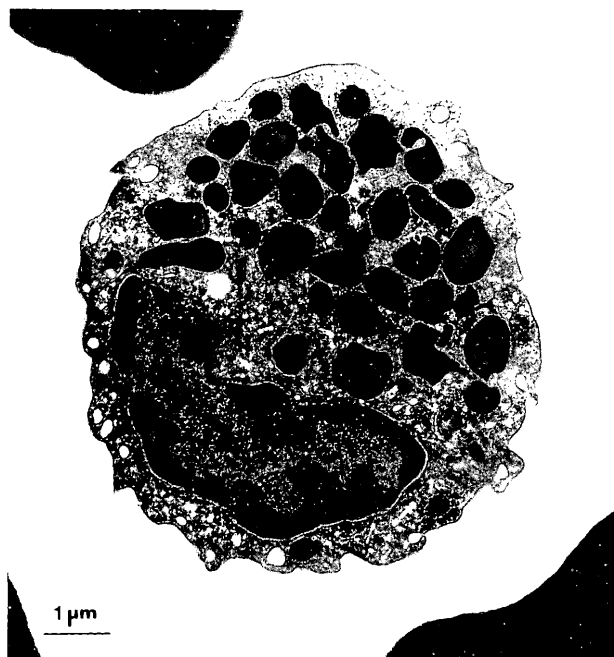


図5 buffy coat 中の好酸球
正常な形態を示している。

細胞膜破綻スコア

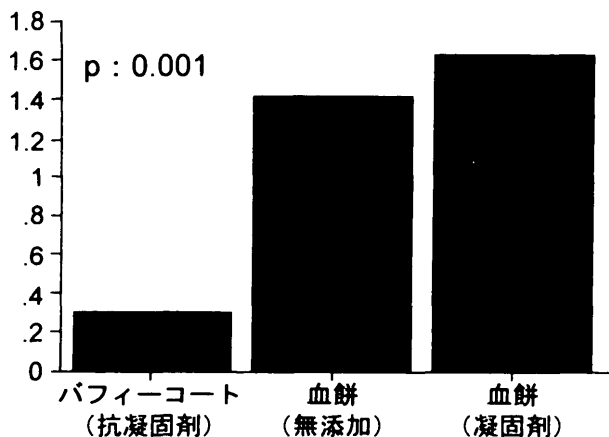


図6 細胞膜破綻スコア
buffy coat 中と血餅中（無添加群，凝固剤添加群）の好酸球細胞膜の破綻スコアの三群間の比較。三群間に有意差 (P = 0.001) を認めた。

崩壊指数

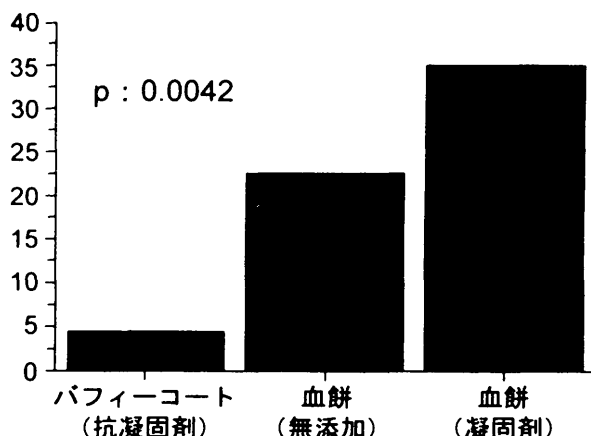


図7 好酸球崩壊指数
三群間に有意差 (P = 0.0042) を認めた。

結 果

1 ECP 値

試験管に、血液凝固剤を入れた血清 ECP が最も高値を示し、抗凝固剤を入れた血漿 ECP が、最も低値を示した。又、何も入れていない血清 ECP は、その中間値を示した。3群の値を比較すると、P 値 0.0063 で、有意の差を認めた (図1)。次に、好酸球1個あたりから出てくる、ECP の値 (ECP/総好酸球) を3群間で比較すると、P 値 0.0001 以下と、更に有意な差を認めた (図2)。

2 好酸球の形態的变化

3群における好酸球の形態について、電子顕微鏡で検

討した。(図4)は、血餅中にとじ込められた、典型的な好酸球である。好酸球細胞膜は破綻し(好酸球細胞膜破綻スコア3)、顆粒の空胞化も顕著である。一方、抗凝固剤を入れた時に出現する buffy coat 中の好酸球は、(図5)に示す様に正常な形態を示したものが大部分であった。細胞膜破綻スコア、及び好酸球崩壊指数は、buffy coat 中の好酸球が最も低く、凝固剤を入れた血餅中の好酸球が最も高値を示し、3群間で有意な差が認められた (図6, 7)。

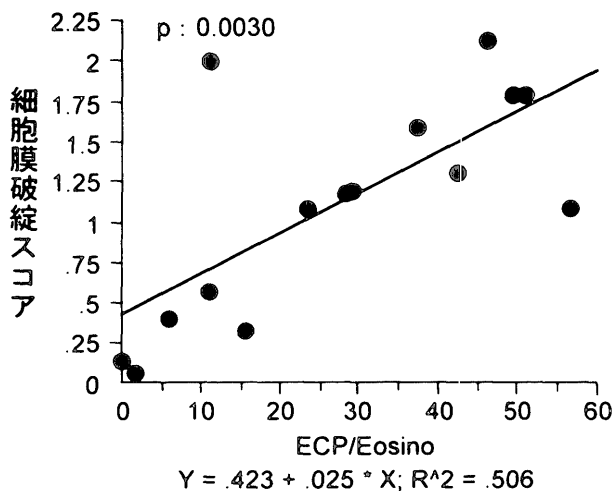


図8 好酸球1個より放出されたECP量と細胞膜破綻スコアの相関
相関係数0.506で両者に有意の相関 ($P = 0.0030$) を認めた。

3 細胞膜破綻スコア、好酸球崩壊指数とECP/Eosinoの関係

好酸球1個より放出されるECP量と、細胞膜破綻スコアの間には、相関係数0.506 ($p = 0.0030$) と、強い相関が示された (図8)。好酸球崩壊指数との間では、相関係数0.53 ($P = 0.0021$) と、さらに強い相関が認められた (図9)。

考 察

ECP⁴⁾ は、Major Basic Protein (MBP)⁵⁾、Eosinophil-Derived Neurotoxin (EDN)⁶⁾、Eosinophil Peroxidase (EPO)⁷⁾ と共に、好酸球特異顆粒に存在する塩基性蛋白で、寄生虫に対し毒性を発揮し、種々の臓器でも障害を引き起こす事が知られている^{8~11)}。ECPは好酸球顆粒マトリックスに存在し、脱顆粒により遊離されると考えられている。脱顆粒の様式としては、大多数の研究者は、exocytosisの、様式をとると考えてきたように思う。しかしながら、アレルギー局所において好酸球が、exocytosisにより、脱顆粒をしている像を電顕レベルで示した報告は、いまだになく、細胞崩壊に伴う顆粒放出と考えられる^{12,13)}。血液凝固剤を添加する事により、ECP値が上昇する事から、凝固剤に好酸球活性化因子が存在するとの仮説もあったが¹⁴⁾、その仮説を積極的に示唆するエビデンスはない。今回の結果でも、無添加の場合でも抗凝固剤添加のものに比べれば、ECPは高値を示した。この事は凝固剤にのみ好酸球活性化因子があるという仮説が正しくない事を示唆しているものと考えられる。Venge¹⁵⁾ は、凝固の過程で放出される

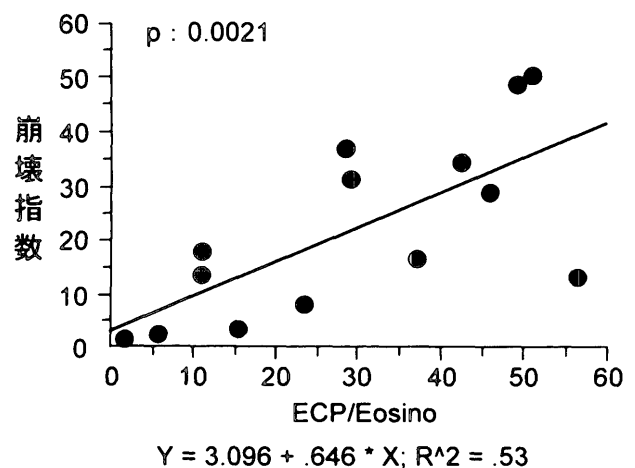


図9 好酸球1個より放出されたECP量と好酸球崩壊指数の相関
相関係数0.53で両者にはより強い相関 ($P = 0.0021$) を認めた。

KallikreinやFibronectinのような物質が、好酸球を活性化しECPを放出すると考えたが、凝固の際、好酸球が崩壊する事実には気付いていなかった。

血餅中の好酸球は、細胞崩壊が著しく、血漿を分離した時に得られるbuffy coat中の好酸球は、intactなものが多かった。又、好酸球細胞膜が破綻した時ECP値は上昇し、顆粒が空胞化した好酸球の細胞膜が破綻した時は、さらにECP値は上昇する事がわかった。顆粒が空胞化するという事は、細胞膜と顆粒膜が融合して分泌される、exocytosis像が見つからない事からpeacemeal degranulationという脱顆粒様式が提案された¹⁶⁾。しかし、活性化した顆粒膜に管状構造物が出現する事¹²⁾、さらに顆粒蛋白が、その管状物を通して、細胞質に放出される事¹²⁾が明らかになっており、今回の実験でも、空胞化した顆粒からECPが細胞質に漏出するものと考えられる。従って血清中のECPは、顆粒空胞化に伴い細胞質に放出されたものが、細胞膜破綻により、出て来たものと考えられる。

ECPは、人体の血流の中には、ほとんど検出されないとされる。その理由として、血漿中にはほとんど認めず、過去のデータでも¹⁵⁾、血漿ECPは、血清ECPに比べ常に検出閾値ぎりぎりの低値を示している事からも想像される。ECPは、採血後、1時間に試験管内で好酸球より放出されたものである。抗凝固剤の入った試験管内では、好酸球が血餅という物理的な圧迫を受けず、細胞崩壊しない為、ECPはほとんど放出されない。従って、血漿ECPは低値となるのであろう。これに対し、凝固剤を入れた試験管では、血餅中にとじ込められた好酸球が物理的な圧迫を受け、細胞崩壊をきたし、細胞外

へ放出される為、血清ECPは高値となるものと考えた。Kato等¹⁷⁾も、物理的な刺激で、好酸球からの脱顆粒が亢進するという報告をしている。

血清ECPは、喘息や鼻アレルギーの症状をよく反映していると、過去に様々報告されている^{1~3)}。しかしながら、血清ECP値と自覚症状が一致する場合、又、一致しない場合と、報告にばらつきがみられる。その理由として、血清分離までの時間によるECP値の変動¹⁸⁾や、アレルギー性鼻炎では、反応の主体が鼻粘膜に限局されているため、局所の状態の変化が、直ちに血清中の値に反映されていない^{1,19)}、などと考察されている。今回の実験で、血清ECPの高値は、血餅にとじ込められ、物理的な圧迫で容易に崩壊する多数の好酸球の存在を、意味している事が明らかにされた。ECP高値の場合、局部に遊走した物理的に崩壊しやすい好酸球は容易に崩壊するものと、想像される。今回は、正常者からの採血は行わなかったが、スギ花粉症患者の非飛散期に採血した1例は、ほぼ正常者と考えられる。この症例では、抗凝固剤を入れた血漿ECP、何も入れていない血清ECPは、きわめて低値であり、血液凝固剤を入れた血清ECPも低値であった。しかもbuffy coat中及び、何も入れていない血餅中の好酸球は、100%細胞膜が正常であり、凝固剤を入れた血餅中の好酸球のわずか30%にのみ細胞膜破綻を認めるにすぎなかった。結論として、血清ECPは、血餅という物理的な刺激による好酸球の崩壊しやすさを測定しているという事が言えるだろう。

まとめ

- ① 血清ECPと、血漿ECPの違いについて、それぞれの値を比較し、同時に好酸球の形態についても電顕観察を行った。
- ② 血清ECPは、血漿ECPに比べ、常に高値を示した。ECPは、人体の血流の中には、ほとんど認めず、採血後血餅中の好酸球が、物理的な圧迫を受け、細胞崩壊をおこし、放出されるものと思われる。従って顆粒が空胞化した好酸球の細胞膜が破綻した時、最も高い値を示した。
- ③ 血清ECPは、好酸球の崩壊しやすさを、測定しているものであると考えられる。

謝 辞 稿を終えるにあたり、終始、本研究の御指導ならびに御高閣を賜りました獨協医科大学越谷病院耳鼻咽喉科渡辺建介教授に深謝致します。

文 献

- 1) 木下裕美, 山田 燦, 四家正一郎: 小児アレルギーに

おける Eosinophil Cationic Protein の研究. 金医大誌, **19**: 142-148, 1994.

- 2) 本島新司, 緒方英嗣, 立石欣司: 気管支喘息における血清および喀痰 Eosinophil Cationic Protein 濃度の測定. アレルギー, **44**: 1272-1281, 1995.
- 3) 石垣信男, 益原千加, 坂巻規益子, 他: 小児気管支喘息における Eosinophil Cationic Protein の血清中濃度測定値と喘息発作の関係. アレルギー, **49**: 1093-1103, 2000.
- 4) Olsson I, Venge P.: Cationic proteins of human granulocytes. II. Separation of the cationic proteins of the granules of the granules of leukemic myeloid cells. Blood, **44**: 235-246, 1974.
- 5) Gleich G, Loegering D, Mann K, et al: Comparative properties of the Charcot-Leyden crystal protein and the major basic protein from human eosinophils. J. Clin. Invest, **57**: 633-640, 1976.
- 6) Durack D, Ackerman S, Loegering D, et al: Purification of human eosinophilderived neurotoxin. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **78**: 5165-5169, 1981.
- 7) Olsen R, Little C.: Purification and some properties of myeloperoxidase and eosinophil peroxidase from human blood. Biochem. J, **209**: 781-787, 1983.
- 8) McLaren D, Mackenzie C, Ramalho - Pinto F.: Ultrastructural observations on the in vitro interaction between rat eosinophils and some parasitic helminths. Clin. Exp. Immunol, **30**: 105-118, 1977.
- 9) Jong E, Mahmoud A, Klebanoff S.: Peroxidase - mediated toxicity to Schistosoma mansoni. J. Immunol, **126**: 468-471, 1981.
- 10) Frigas E, Loegering D, Gleich G.: Cytotoxic effects of the guinea pig eosinophil major basic protein on tracheal epithelium. Lab. Invest, **43**: 35-43, 1980.
- 11) Tai P, Hayes D, Clark J, et al: Toxic effects of eosinophil secretion products on isolated rat heart cells in vitro. Biochem. J, **204**: 75-80, 1982.
- 12) 渡辺建介, 喜友名朝盛, 三須俊宏: 鼻アレルギー鼻粘膜内に遊走した好酸球の脱顆粒様式. アレルギー, **48**: 500-506, 1999.
- 13) 渡辺建介: アレルギー性鼻炎と好酸球. アレルギー科, **10**: 306-311, 2000.
- 14) 安場広高, 佐竹範夫, 木野 稔, 他: 成人気管支喘息患者の血清中および血漿中ECP濃度についての基礎的検討. アレルギー, **40**: 1282-1288, 1991.
- 15) Venge P.: Serum measurements of eosinophil cationic protein in bronchial asthma. Clin Exp Allergy, **23**: 3-7,

- 1993.
- 16) Ann M, Takuma F, Linda L, et al : Mature eosinophils stimulated to develop in human cord blood mononuclear cell cultures supplemented with recombinant human interleukin -5. *American Journal of Pathology*, 138 : 69-82, 1991.
- 17) Kato M, Kephart G M, Morikawa A, et al : Eosinophil infiltration and degranulation in normal human tissue : Evidence for eosinophil degranulation in normal gastrointestinal tract. *Int Arch Immunol*, 125 : 55-58, 2001.
- 18) 栗原和幸, 山田 節, 斎藤博久, 他 : 血液中の Eosinophil Cationic Protein 測定に関する基礎的条件の検討. *アレルギー*, 41 : 512-518, 1992.
- 19) 服部琢, 加藤昌志 : スギ花粉症季節前投薬における血清 ECP 値. *耳鼻臨床*, 87 : 761-766, 1994.

The Difference Between the Serum ECP and the Blood Plasma ECP in Nasal Allergy

Toshihiro Misu

Department of Otorhinolaryngology Koshigaya Hospital, Dokkyo University School of Medicine

ECP is one of the basic proteins in eosinophil granules. It is known that the serum ECP reflects well the seriousness of asthma and nasal allergy. But ECP does not exist in the blood stream. It is detected in the blood serum preserved in the test tube for one hour, especially with blood coagulant. Only a small amount of ECP is detected in the blood plasma. One hour after blood collection, the blood was centrifuged and ECP in serum and blood plasma was measured by radioimmunoassay. The eosinophils in cruor and buffy coat were observed by electron microscope. Ten to fifteen eosinophils in each test tube were observed. The value multiplied the factor of the destruction of the cell membrane by the factor of the vacuole change of the granules was defined as destruction index. The highest ECP value was detected in serum with blood coagulant, the lowest ECP value was in blood plasma and middle value was in serum with additive free ($p = 0.0063$). Most eosinophils in buffy coat had intact cell mem-

brane, but many eosinophils in cruor were destroyed. The degree of the destruction of the cell membrane and the destruction index showed the significant difference in 3 groups. The ECP value (ECP/Eosinos) showed the significant correlation both with the degree of destruction of the cell membrane ($p = 0.0030$) and the destruction index ($p = 0.0021$). It is concluded that ECP in serum was released from destroyed eosinophils in test tube during clot formation after the blood collection. It is considered that the eosinophils compressed in clot formation cause destruction. Therefore, the level of serum ECP indicates the easiness of eosinophil destruction.

Key Words : serum ECP, blood plasma ECP, eosinophil cell membrane, eosinophil destruction, electron microscope