

全身性エリテマトーデスにおける 補体による免疫複合体の可溶化能 に関する研究

— peroxidase を抗原に利用して —

第 2 編

臨床的考察

岡山大学医学部第 3 内科学教室 (主任: 太田善介教授)

相 原 泰

(昭和58年9月5日受稿)

Key words: 全身性エリテマトーデス
immune complex
alternative complement pathway
可溶化現象

緒 言

1975年 Miller と Nussenzweig によって補体による不溶性の免疫複合体 (IC) の可溶化現象が発見された¹⁾。本現象は IC に対する補体の強力な制御機能を示すものと考えられており、抗原抗体反応が生体内で起こっていると予想される免疫複合体病の病態形成に影響を及ぼしているのではないかと注目されている。このような観点より、可溶化能の簡便な測定法を考案し第 1 編においてその妥当性について検討を加えた²⁾。以下本論文においては、免疫複合体病の代表的疾患である全身性エリテマトーデス (SLE) における可溶化能を測定して、この可溶化能と他の補体系との関連並びに SLE 病態形成に及ぼす影響を検討した。

対 象

SLE 患者は ARA の診断予備基準³⁾ の 4 項目以上を満たす 50 名、正常人は 20 名を対象とした。

方 法

1. 可溶化能 (complex-release activity : CR-

A) の測定

補体による不溶性 IC の可溶化能は、IC の抗原に peroxidase を利用し、表 1 の如く測定した。また比色計にて測定した吸光度を CRA 値とした。

2. Alternative pathway (AP) のみによる CRA (ACRA) の測定

最終濃度 0.015M-EGTA-Mg⁺ を含む被検血清の CRA を測定し、この値を ACRA とした。

3. 補体系の測定

1) CH50

Mayer の原法を用いて測定した⁴⁾。正常値は 35 ± 5 U/ml ($M \pm 1$ SD) である。

2) AP の総溶血活性 (ACH50)

ウサギ赤血球の溶血を利用する天野らの方法を用いて測定した⁵⁾。

3) C4, C3, factor B

Behring 研究所製のプレートを使用し、single radial immunodiffusion により蛋白量 (% NH_S: normal human serum) を求めた。

4. 抗 DNA 抗体価

actinomycin-D-DNA 法により測定した⁶⁾。

正常値は 10% 以下である。

5. 抗核抗体 (ANF)

表1 CRA assay
CRA (complex-release activity of complement) assay
---Using Peroxidase (PO)-anti-PO Immune Complex---

PO-IC 0.2 ml (PO 0.2 μ g/Ab 2 μ g/PH 7.4-0.02 M-PBS-Mg ⁺⁺ , Ca ⁺⁺) Serum 0.1 ml ↓ incubation, 37°C, 1 h, add PBS ⁺⁺ 1 ml ↓ centrifuge, 3,000 rpm, 15 min, Supernatant 0.5 ml { 5-Aminosalicylic Acid (200mg/dl) H ₂ O ₂ } 0.4 ml ↓ incubation, 37°C, 1 h, add 1N-NaOH 0.1 ml ↓ add PBS ⁺⁺ 3 ml ↓ read O.D. 450 nm	<table border="1"> <tr> <td>PO-IC</td> <td>0.1 ml</td> </tr> <tr> <td>5-ASA (H₂O₂)</td> <td>0.4 ml</td> </tr> <tr> <td>PBS⁺⁺</td> <td>3.5 ml</td> </tr> <tr> <td colspan="2">-----</td> </tr> <tr> <td></td> <td>1.500 (O.D. 450 nm)</td> </tr> </table>	PO-IC	0.1 ml	5-ASA (H ₂ O ₂)	0.4 ml	PBS ⁺⁺	3.5 ml	-----			1.500 (O.D. 450 nm)
PO-IC	0.1 ml										
5-ASA (H ₂ O ₂)	0.4 ml										
PBS ⁺⁺	3.5 ml										

	1.500 (O.D. 450 nm)										

染色パターンは宮脇らの方法により判定した⁷⁾.

6. Circulating immune complex (CIC) の測定

症例1, 3のCICはC1q-binding assayを用いて測定した⁸⁾. 正常値は2 μ g/ml以下である. 症例2のCICはRaji cell radioimmunoassayを用いて測定した⁹⁾. 正常値は10 μ g/ml以下である.

結 果

1. SLE の CRA (図1)

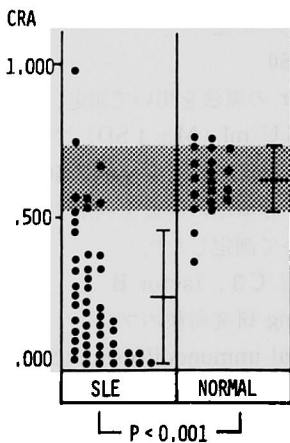


図1 CRA in SLE and normal subjects

SLE の CRA は $0.238 \pm 0.223 (M \pm 1SD)$ で

であり, 正常人の CRA $0.617 \pm 0.106 (M \pm 1SD)$ に比し有意に低値を示した ($p < 0.001$).

2. SLE の ACRA (図2)

SLE の ACRA は $0.157 \pm 0.140 (M \pm 1SD)$ であり, 正常人の ACRA $0.381 \pm 0.120 (M \pm 1SD)$ に比し有意に低値を示した ($p < 0.001$).

3. SLE の CRA, ACRA と補体系との比較 (表2)

SLE の CRA, ACRA と補体系 (CH50, ACH

50, C4, C3, factor B) との相関関係をまとめると表2の如くであった. CRA は補体系と密接な相関関係を示し (図3), ACRA は CRA に比し補体系と更に密接な相関関係を示した. SLE の CRA と補体成分との関係を見ると, CRA は C3 と最も高い相関 ($r=0.58, p < 0.001$) を示し, 以下 C4 ($r=0.48, p < 0.001$), factor B ($r=0.39, p < 0.001$) の順に相関が認められた.

4. SLE と正常人における ACRA/CRA 比 (図4)

ACRA/CRA 比を求めると SLE では $0.73 \pm$

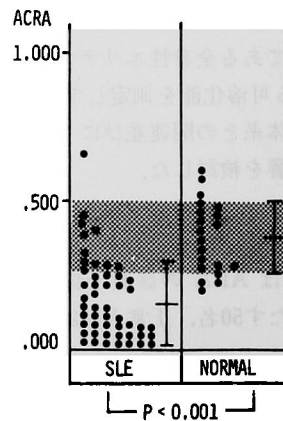


図2 ACRA in SLE and normal subjects

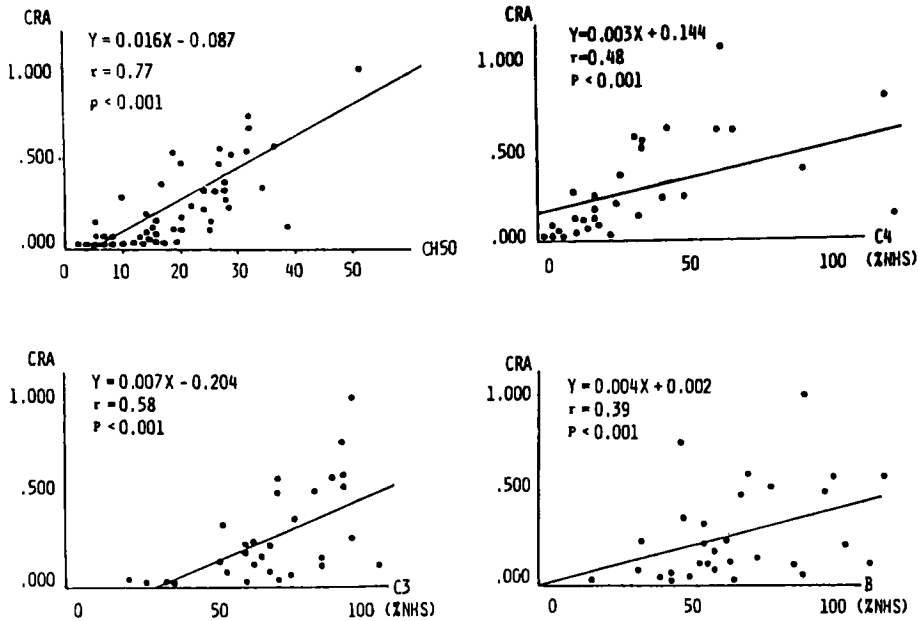


図3 Relation between CRA and CH50, C4, C3 and factor B in SLE

表2 Correlation coefficients between CRA/ACRA and complement levels in SLE

	CH50	ACH50	C4	C3	Factor B	CRA
CRA	0.77*	0.64*	0.48*	0.58*	0.39*	
ACRA	0.81*	0.67*	0.49*	0.65*	0.53*	0.90*

*p<0.001

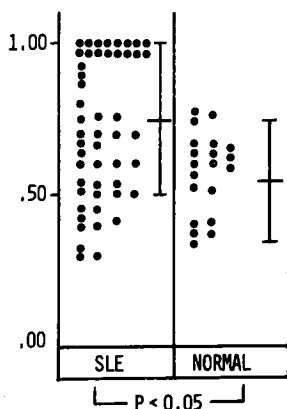


図4 ACRA/CRA ratio in SLE and normal subjects

0.24 (M±1SD) であり、正常人0.55±0.20 (M±1SD) に比して有意に高値を示した(p<

0.05).

5. 症例における検討

CRA, 補体系, 抗 DNA 抗体価, ANF, CIC を経時的に測定し得た SLE の 3 症例を示す.

1) 症例1: Y.W. 17才, 女性 (図5)

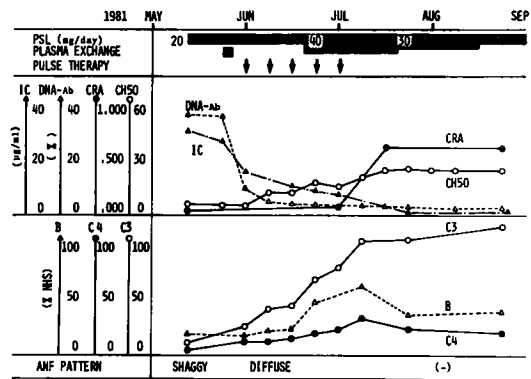


図5 Case 1 Y.W. 17y. Female

発熱, 腎症にて発症した。病初期 CH50 と CRA の低下, 抗 DNA 抗体価と CIC の上昇を認め ANF は shaggy pattern を呈し典型的な急性期 SLE であった。Prednisolone (PSL) 投与と共に、血漿交換療法と副腎皮質ステロイド剤超大量投与 (パルス療法) を併

用し、上記の検査所見の改善を認めた。CRA は CH50 よりもより早期に正常域への回復が認められ、補体成分の C4 低値は C3 に比して遷延傾向を示した。

2) 症例 2 : I.M. 29才, 女性 (図 6)

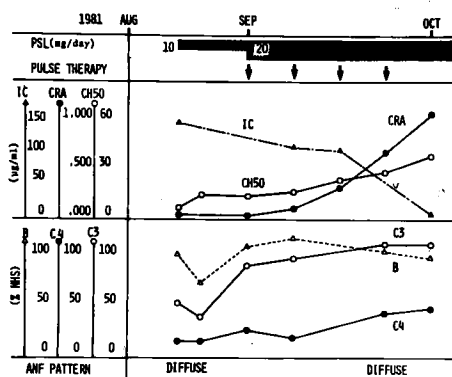


図 6 Case 2 I.M. 29y. Female

顔面、四肢の紅斑と腎症にて発症した。PSL 投与とパルス療法により CH50, CRA, CIC の改善を認めた。本症例も症例 1 と同様に CRA は CH50 に比してより早期に正常域への回復が認められ、C4 低値が遷延した。

3) 症例 3 : K.O. 33才, 女性 (図 7)

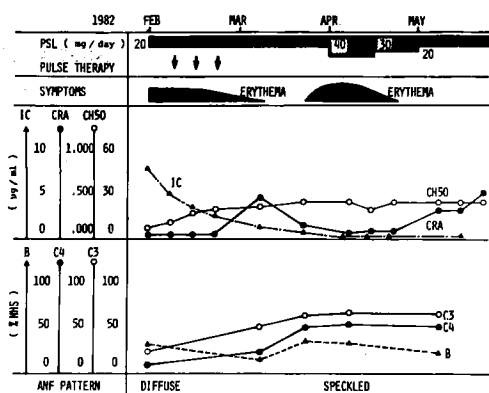


図 7 Case 3 K.O. 33y. Female

発熱、顔面紅斑にて発症した。この症例も PSL 投与とパルス療法にて CH50, CIC の改善を認めた。しかし、CRA の変動は CH50 や CIC の変動と一致せず、全身紅斑が出現する時期に一致して CRA が低下することが認められた。その後 PSL 増量にて CRA と紅

斑の改善を認めた。

考 察

SLE は低補体価をきたす代表的疾患であり、その病因に IC が強く関与していると考えられている。SLE の低補体価は classical pathway (CP) の early components, 特に C4, C2 の低下が特徴的である。しかしながら、Pillemerらにより AP (alternative pathway) の存在が報告されて以来¹⁰⁾、今日に至るまで AP の研究は著しく進歩し、SLE の腎、皮膚病変組織に AP の成分である factor B, properdin, factor H 等の沈着が報告され¹¹⁾¹²⁾¹³⁾、SLE の病態形成に及ぼす AP の関与が注目されてきた。最近発見された IC の可溶性現象は IC に対する補体の新しい生物活性であるが、本現象により可溶化した IC は分子量、分子組成の著しい変化をきたすのみならず、補体の活性化能力や膜レセプター (C3, Fc) との反応性を失ってしまうことが明らかにされている¹⁴⁾。又、リンパ球などの細胞の膜レセプターに結合した IC に充分量の補体を反応させると、IC が細胞膜より解離するいわゆる「解離現象」¹⁵⁾¹⁶⁾も IC が補体により可溶化された結果によるものであると考えられている。本現象は AP 依存性の反応であり、AP の精製 6 成分 (C3, factor B, factor D, properdin, factor H, factor I) のみで可溶化が起こり¹⁷⁾、CP はこれを促進させるのものであることも明らかにされている。この為、可溶化能の測定は AP 活性の測定法としても注目されている。AP 活性の測定法としてウサギ赤血球の溶血を利用する天野らの方法がすでに考案されているが、この方法は AP のみならず CP の late components の影響も受けるので AP 活性の測定には AP 依存性の反応である可溶化能を測定する方が有用と考えられる。その為に著者は第 1 編で述べた如く、peroxidase を利用した可溶化能の簡便で臨床的に有用な測定法を考案した。

SLE において CRA を測定してみると、正常人に比して有意に低下していることが認められた。更に、CP の影響を除き AP のみによる可溶化能を表わす ACRA も正常人に比して有意に低下していることが認められた。このことよ

り、SLEにおいては生体内におけるAP活性の低下が明らかである。SLEにおけるAP活性の低下はCP活性化の結果生じたC3bによるpositive feedback mechanismの作働が主因であると考えられていたが⁵⁾、現在ではすべてのクラスの免疫グロブリンより成るICが直接にAPを活性化して¹⁸⁾、IC自体は可溶化されるということが明らかにされているので¹⁴⁾¹⁹⁾、SLE血清中あるいは組織に沈着しているICが直接APを活性化する可能性も考えられる。

SLEにおけるICの可溶性能(CRA)と他の補体系との間にはすべて密接な相関関係が認められた。CRAと補体成分との相関はC3が最も高い相関を示した。可溶化現象はAP依存性の反応であるが、CRAとの相関がC4よりもfactor Bの方が低かったのは生体内に多量のfactor Bが存在する為と考えられた²⁰⁾。CRAとC4との相関が認められたことにより、生体内でも可溶化現象はCPの影響を受けていると推察されたが、CRAとACRAが非常に高い相関関係を示したことより、SLEにおいては可溶化現象に及ぼすCPの影響は少ないものと思われた。このことを明らかにする為に、正常人

とSLEとで各々のACRA/CRA比を比較すると、正常人に比してSLEではこの比が有意に1.0に近いことが認められ、このことはACRAとCRAの間に差が少ないことを示す訳であり、SLEの可溶化に及ぼすCPの影響は少ないものと考えられた。

SLEのCRAとCH50は高い相関関係が認められた。しかしながら、個々の症例を経時的に観察するとCH50とは異なる興味あるCRAの態度が認められた。症例1、2共に発症時著明なCRA、CH50の低下を示したが治療と共にCRAがCH50よりも早期に正常域に回復した。これはC4低値が持続する為にCH50の回復が遅れている為と考えられた。このようにSLEではCPのearly componentであるC4の低下が遷延する症例が多く認められる訳であるが、その様な時点においても生体内のIC可溶性能力は正常に回復していることを示し、このことからSLEの治療並びに予後判定にCRAは有用な指標になり得ると考えられる。症例2においては治療前後で腎生検を行なった。治療前の初回腎生検における螢光所見では内皮下を主としてメサンギウムと上皮下に大量の免疫グロ

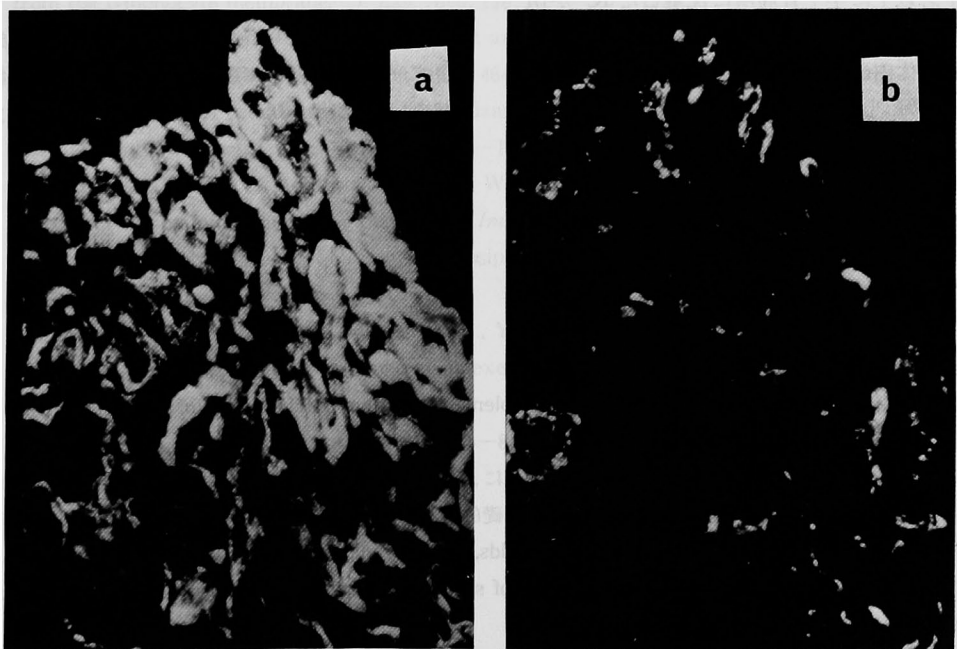


図8 Immunofluorescence staining of biopsied glomeruli in case 2. Lumpy pattern is shown before treatment (a), and granular pattern is shown after treatment (b).

ブリン及び補体の沈着を認め lupus nephritis の lumpy pattern と診断された(図8-a)。しかし、CRA と CH50 が正常域に回復した約9週後の2回目腎生検の蛍光所見では免疫グロブリンと補体の沈着は内皮下に軽度残存しているのみで、量、範囲共に初回腎生検に比して著しく減少し、メサンギウムの沈着物は消失し granular pattern と診断された(図8-b)。症例3においては血管炎に起因する皮膚紅斑の消長が CH50, CIC よりも CRA とよく相関が認められたことより、AP を活性化する IC が皮膚紅斑に関与しているのではないかと考えられた。

可溶化現象が生体内で起こり得る現象なのか否か、又、生体内で起こり得る現象ならばこの現象は生体にとって有利なのか不利なのか、更に SLE を代表とする免疫複合体病の患者の血清、組織に検出される IC とどのような関係があるかどうかは現在のところ議論の余地が多く今後の詳細な検討に待たなければならない。しかし、CRA の検討からも SLE においては AP 活性の低下が明らかであり、著者の経験した症例においても腎、皮膚障害の消長と CRA の相関が認められたことや、CRA の正常域回復に伴い予想以上に早く腎局所に沈着した IC が消失したことなどより、可溶化現象は生体内でも起こり生体内に沈着した組織障害性 IC の排除に影響を及ぼしているのではないかと推察される。

結 語

SLE 患者50名における補体の免疫複合体可溶

化能(CRA)を測定し、CRA と他の補体系との関連並びに CRA の SLE 病態形成に及ぼす影響を検討し次の結論を得た。

- 1) SLE の CRA と ACRA は正常人に比し有意に低下を示した。
- 2) SLE の CRA と ACRA は共に他の補体系(CH50, ACH50, C4, C3, factor B)と密接な相関関係を示した。
- 3) SLE の AP 活性低下が明らかとなり、SLE の血清中あるいは組織に沈着している IC が直接 AP を活性化する可能性が考えられた。
- 4) SLE の CRA は AP 活性に密接に依存しており、CP による促進作用は少なかった。
- 5) SLE の CRA は CH50 よりもより早期に正常域に回復する症例が認められ、SLE の治療と予後判定に CRA は有用な指標になり得ると考えられた。

以上のことより、SLE においては AP 活性の低下が明らかとなり、個々の症例からも腎、皮膚等の組織障害の消長と CRA の相関が認められたことより、CRA は生体内に次着した組織障害性 IC の排除に影響を及ぼしているのではないかと推察された。

稿を終るにあたり、御指導御高聞を賜った恩師太田善介教授に深甚の謝意を表するとともに、終始御懇篤なる御指導を賜った天野哲基博士に深謝します。

文 献

1. Miller, G.W. and Nussenzweig, V.: A new complement function. Solubilization of antigen-antibody aggregates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 418-422, 1975.
2. 相原 泰: 全身性エリテマトーデスにおける補体による免疫複合体の可溶化能に関する研究—peroxidase を抗原に利用して—第1編. 可溶化能測定法の基礎的考察. 岡山医学会雑誌, 96, 61-67, 1984.
3. Cohen, A.S.: Preliminary criteria for the Reynolds, W.F., Franklin, E.C.F., Kulka, J.P., Pope, M.W., Shulman, L.E. and Wallace, S.L. classification of systemic lupus erythematosus. *Bull. Rheum. Dis.* 21, 643-648, 1971.
4. Kabat, E.A. and Mayer, M.M.: *Experimental Immunochimistry*, 2nd Ed., Thomas, C. Co, Springfield, pp. 133-240, 1961.

5. 天野哲基, 吉野内猛夫, 宮島啓人, 三橋康彦, 大藤真: SLE の alternative pathway. 臨床免疫, 8, 289—297, 1976.
6. 西村隆夫, 宮脇昌二, 倉田典之, 垂水禧直, 大藤真: actinomycin-D (³H) DNA (AM-DNA) 法による DNA 抗体の検索. リウマチ, 11, 328—335, 1971.
7. 宮脇昌二, 倉田典之, 西村隆夫, 大藤真: 抗核抗体の staining pattern に関する研究. アレルギー, 19, 282—293, 1970.
8. Nydegger, U.E., Zubler, R.H., Gabay, R., Joliat, G., Karagevrekis, C.H., Lambert, P.H. and Miescher, P.A.: Circulating complement breakdown products in patients with rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* 59, 862—868, 1977.
9. Theofilopoulos, A.N., Wilson, C.B. and Dixon, F.J.: The Raji cell radioimmunoassay for detecting immune complexes in human sera. *J. Clin. Invest.* 57, 169—182, 1976.
10. Pillemer, L., Blum, L., Lepow, I.H., Wurz, L. and Todd, E.W.: The properdin system and immunity III. The zymosan assay of properdin. *J. Exp. Med.* 103, 1—13, 1956.
11. Rothfield, N., Ross, H.A., Minta, J.O. and Lepow, I.H.: Glomerular and dermal deposition of properdin in systemic lupus erythematosus. *N. Engl. J. Med.* 287, 681—685, 1972.
12. Provost, T.T., Tomasi, T.B.J.: Evidence for complement activation via the alternate pathway in skin diseases. *J. Clin. Invest.* 52, 1779—1787, 1973.
13. Carlo, J.R., Rothfield, N.F. and Ruddy, S.: Demonstration of BIH globulin together with C3 in the dermal-epidermal junction of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 22, 13—18, 1979.
14. Takahashi, M., Takahashi, S. and Hirose, S.: Solubilization of antigen-antibody complexes: A new function of complement as a regulator of immune reactions. *Prog. Allergy* 27, 134—166, 1980.
15. Miller, G.W., Saluk, P.H. and Nussenzweig, V.: Complement-dependent release of immune complex from the lymphocyte membrane. *J. Exp. Med.* 138, 495—507, 1973.
16. Miller, G.W. and Nussenzweig, V.: Complement as a regulator of interactions between immune complexes and cell membranes. *J. Immunol.* 113, 464—469, 1974.
17. Fujita, T., Takata, Y. and Tamura, N.: Solubilization of immune precipitates by six isolated alternative pathway proteins. *J. Exp. Med.* 154, 1743—1751, 1981.
18. Frank, M.M., Gaither, T., Adkinson, F., Terry, W.D. and May, J.E.: Activation of alternative complement pathway by human immunoglobulins. *J. Immunol.* 116, 1733, 1976.
19. Miller, G.W.: Solubilization of IgA immune precipitates by complement. *J. Immunol.* 117, 1374—1377, 1976.
20. Sakurai, T., Fujita, T., Kono, I., Kabashima, T., Yamane, K., Tamura, N. and Kashiwagi, H.: Complement-mediated solubilization of immune complexes in SLE. *Clin. Exp. Immunol.* 48, 37—42, 1982.

**Studies on Complex-release Activity of Complement in
Systemic Lupus Erythematosus**

— Using Peroxidase as an Antigen in the Immune Complex —

Part 2. Clinical Studies

Yasushi AIBARA

Third Department of Internal Medicine, Okayama

University Medical School, Okayama Japan

(Director : Prof. Z. Ota)

Complex-release activity (CRA) of complement was measured in 50 systemic lupus erythematosus (SLE) patients by a simplified method using peroxidase as an antigen in the immune complex. The relation between CRA and other complement levels was investigated, and the influence of CRA on the pathogenesis of SLE was discussed.

CRA and ACRA (CRA via the alternative pathway) in SLE were lower than those in normal subjects. CRA and ACRA in SLE correlated well with CH50, ACH50, C3, C4 and factor B. The enhancement of CRA via the classical pathway in SLE was less strong than that in normal subjects. As reduced CRA normalized shortly after the administration of corticosteroid in some SLE patients with persistent hypocomplementemia, the measurement of CRA might be more useful than that of CH50 for clinical purposes.

The above results suggest that the alternative complement pathway was activated by immune complexes *in vivo* and that CRA might play an important role in the clearance of immune complexes *in vivo*.