

岡山医学会雑誌

第92巻5, 6合併号 (第1026, 1027号)

昭和55年6月30日発行

全身性エリテマトーデスの alternative pathway に関する研究 — chemotaxis assay を利用して —

第 1 編

alternative pathway 測定法の基礎的考察

岡山大学医学部第三内科学教室 (主任: 大藤真教授)

吉野内 猛 夫

(昭和55年5月12日受稿)

Key words: SLE, chemotaxis,
complement, alternative pathway

緒 言

全身性エリテマトーデス (SLE) は、臨床的、血清学的或いは組織学的検討により、生体内における抗原抗体反応の存在が強く示唆される代表的疾患と目されている事は周知の事実である。本症の血清学的検討から、病状と補体の変動は極めて特徴的である事より、本症の補体系の研究は病因解明に重要な鍵を与えてくれるものと考えられる。

SLEの血清補体価 (CH50) は急性期に低下し、しかも分画では C1, C4, C2, C3 の低下が著明な事より、補体系の活性化は抗原抗体反応による classical pathway を介するものと理解されている¹⁾。しかし乍ら、近年の alternative pathway の研究の進歩と共に SLE においても

alternative pathway の関与を示唆する研究²⁻⁵⁾ が次々となされてきた。この様な時点において、SLE における alternative pathway の活性を測定し、classical pathway の活性と比較検討する事は、補体系の病態への関与をより明確にする上で重要と考えられる。

そこで著者は、classical pathway 及び alternative pathway のいずれが活性化されても chemotactic factor が発生してくる事に着目し、血清の各々の pathway を特異的に活性化せしめて、その際生じてくる chemotactic factor を数量的に測定すれば、その血清中の補体系の classical 及び alternative pathway の活性が測定出来るのではないかと考えた。

以下本論文においては、classical 及び alternative pathway を活性化せしめて生じる che-

motactic factor の測定法を確立する為、その諸条件の基礎的検討を行った結果につき述べる。

方 法

1. Chemotactic factor の測定

chemotactic factor の測定は、図1の如く測定した。

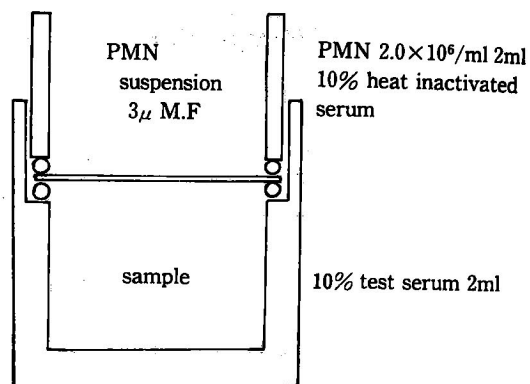
1) Chamber

chamber は図1の如く Boyden 法⁶⁾を参考にして作製したプラスチック製で、直径27mm、上室容量、下室容量共に2mlである。

millipore filter は日本ミリポア社製で、pore size 3.0μ を使用した。

2) 多核白血球の採取、調整

健康成人のヘパリン加末梢血に1/9容の6%デキストラン溶液を加え、 37°C 、1時間静置して赤血球を沈澱せしめ、得られた白血球含有血漿6mlを、Conray-Ficoll 溶液3ml上に静かに重層し、400Gにて30分遠心した。遠心後、リンパ球を含む中間層を除去して管底の多核白血球を集め、Hanks'BSSにて3回洗浄の後、非動化正常人血清を10%含むTC199にて $1.0\sim 2.0\times 10^6/\text{ml}$ となる様に調整した。本法による採取総細胞中



Chemotactic activity = PMN's counts/10 HPF

Fig 1 Chemotaxis assay

に占める多核白血球の割合は98%であり、リンパ球2%の混入が認められた。

3) Chemotactic factor の発生

補体源として新鮮な正常血清に、classical pathway を活性化する為には、aggregated human Fr II (agg. Fr II) (Sigma 社製) を、又、alternative pathway を活性化する為には zymosan (Sigma 社製) をそれぞれ加え、TC199にて最終総量2mlとし下室に加え、空気が入らな

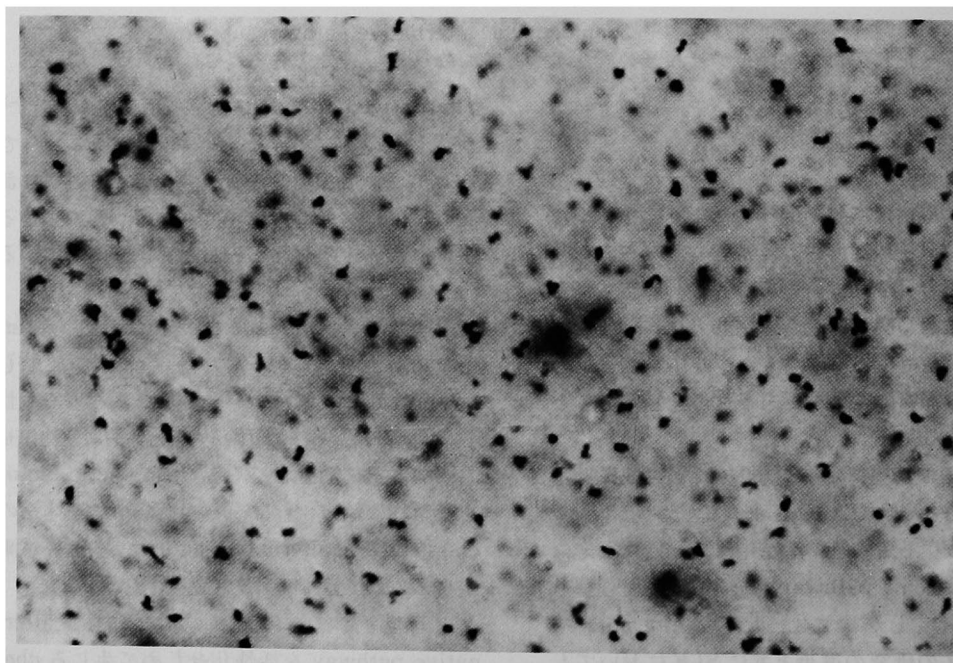


写真1 Filter 下面まで遊走した多核白血球 (弱拡大)

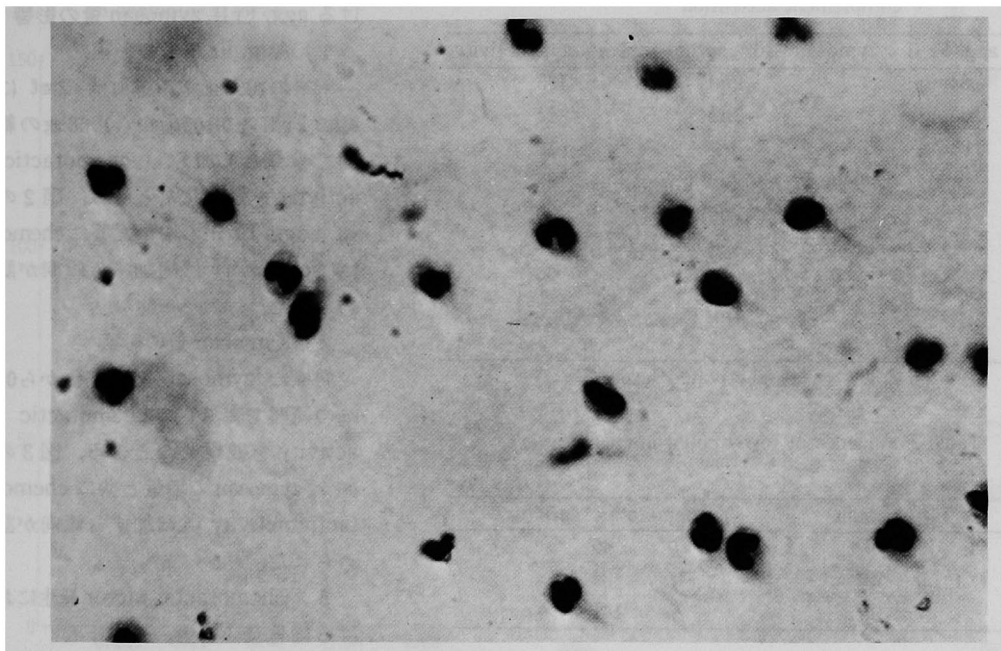


写真2 Filter 下面まで遊走した多核白血球 (強拡大)

いように注意深く millipore filter をのせた後、上室に多核白血球浮遊液 2 ml を入れ、37℃、3 時間、静置培養した。

4) Millipore filter の固定、染色

培養後、millipore filter を取り出し、100%メタノールにて 3 秒間固定、水洗後、ヘマトキシリン液にて 15 分間染色し、水洗、キシロールにて透徹して検鏡した。

5) Chemotactic activity

400 倍にて検鏡し、millipore filter の下面まで遊走した多核白血球(写真 1, 2)を 10 視野以上数え、10 視野当りの遊走多核白血球数を chemotactic activity とした。

実験は duplicate で行い、chemotactic activity は平均値で表した。又、同時に行った対照実験(補体系を活性化する物質がない系)の random migration が 30 以上の場合は補体源をかえて再度やり直した。

2. 補体系の測定

CH50 は Mayer 原法⁷⁾を用いて測定した。alternative pathway の溶血活性 (ACH50)⁸⁾ はウサギ赤血球の溶血を利用する方法にて測定した。

結 果

1. Agg. Fr II 又は zymosan の補体活性化による chemotactic factor 発生 の検討

agg. Fr II 又は zymosan で補体系を活性化した際、chemotactic factor が発生するか否かを検討する為表 1 に示す如く、上室に多核白血球浮遊液 2 ml を入れ、下室に agg. Fr II 0.84 mg, zymosan 0.2 mg, 10% 正常人血清 2 ml, 10% 非働化血清 2 ml を種々に組み合わせて入れ、chemotactic activity を観察した。その結果、agg. Fr II 又は zymosan と正常人血清を加えた時のみ chemotactic activity は 135, 162 と高値であり、agg. Fr II 或いは zymosan と非働化血清を加えた場合は、他の対照と同様に明らかな低値を示した。

2. Chemotactic factor 発生における多核白血球数の検討

上室に加える多核白血球数を検討する為、 2.0×10^6 から 4.0×10^6 の多核白血球をそれぞれ上室に加え、下室には 10% 正常人血清と zymosan 0.2 mg を加えて chemotactic activity を測定した。

Table 1 Generation of chemotactic factor by complement activation

agg. Fr II	zymosan	10% serum	chemotactic activity
0.84mg	—	2ml	135
0.84mg	—	2ml*	14
0.84mg	—	—	12
—	0.2mg	2ml	162
—	0.2mg	2ml*	20
—	0.2mg	—	6
—	—	2ml	9
—	—	2ml	3
—	—	—	1

* 56°C 30' heat inactivated serum

Table 2 Influence of PMN count in chemotaxis assay

PMN count	chemotactic activity
2×10^6	46
3×10^6	89
4×10^6	141

Table 3 Influence of serum concentration in chemotaxis assay

serum concentration		chemotactic activity (zymosan lmg/serum 1ml)
upper chamber	lower chamber	
20 %	20 %	138
10 %	10 %	135
5 %	5 %	43

結果は表2に示す如く、多核白血球数が増加するに従い chemotactic activity も増加し、 4.0×10^6 の時 chemotactic activity は141であった。従って以下の実験では、 4.0×10^6 の多核白血球を上室に加える事とした。

3. 上室に加える非働化血清量の検討

上室の多核白血球浮遊液に加える非働化血清量を検討する為、表3の如く下室の正常新鮮血清の最終濃度に一致させて上室の非働化血清の最終濃度を5%、10%、20%と変えて、chemotactic activity を観察した。5%血清では chemotactic activity は43であるが、10%血清、20%血清では、135、138と高値であり、しかも、10%と20%との間には殆んど差は認められなかった。従って以下の実験では、上、下室の血清濃度を10%とした。

4. Chemotactic factor 発生における agg. Fr II, zymosan 量の影響

1) Agg. Fr II 量の影響

下室の10%正常新鮮血清 2ml に agg. Fr II を0.105mgから1.68mgの範囲で変量して加え、chemotactic activity を観察したところ、図2の如く agg. Fr II の増量と共に chemotactic activity は増加する傾向が認められた。

2) Zymosan 量の影響

同様に、zymosan を0.025mgから0.4mgの範囲で変量して chemotactic activity を観察したところ、図3の如く、zymosan の増量と共に chemotactic activity は増加する傾向が認められた。

5. Chemotactic factor 発生における補体量の影響

classical pathway 由来の chemotactic factor 発生に及ぼす補体量の影響をみる為に、下室に agg. Fr II 0.84mgと、正常新鮮血清を0.3mlから0.038mlの範囲で倍数希釈したものを加え、それぞれの chemotactic activity を測定した。その結果、図4に示す如く、下室に加えた血清量

の増加と共に chemotactic activity の増加が認められた。

alternative pathway 由来の chemotactic factor 発生に及ぼす補体量の影響をみる為に、下室に zymosan 0.2mgと、正常新鮮血清を0.3mlから0.038mlの範囲で倍数希釈したものを加え、それぞれの chemotactic activity を測定した。結果は、図5に示す如く、agg. Fr II と同様に下室に加えた血清量の増加と共に chemotactic activity の増加が認められた。

6. Agg. Fr II による補体系活性化と chemotactic activity の関係

agg. Fr II による classical pathway 及び、alternative pathway の活性化の程度と chemotactic activity を比較する為に、正常新鮮血清に変量した agg. Fr II を加えて、37°C、60分反

Fig 2 Influence of agg. Fr II concentration in chemotaxis assay

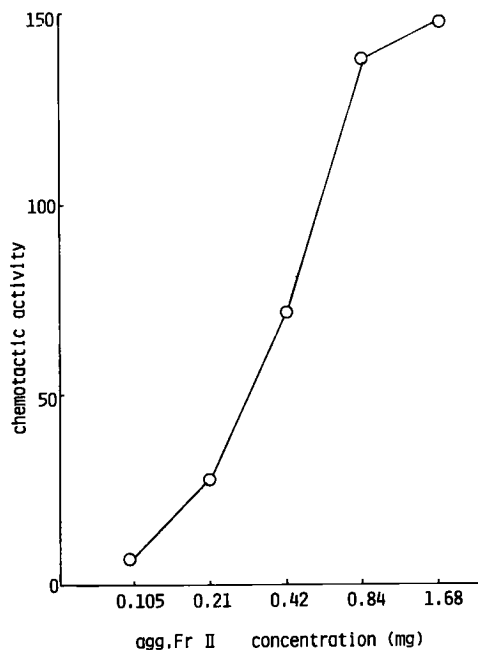
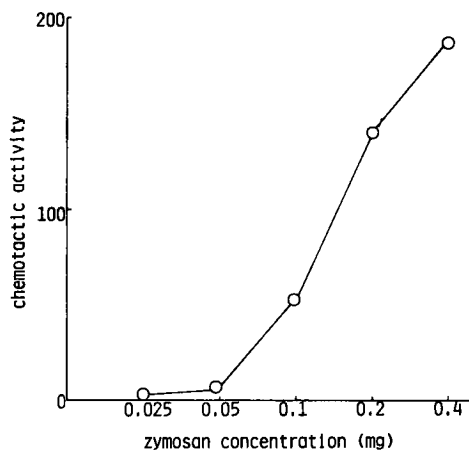


Fig 3 Influence of zymosan concentration in chemotaxis assay



応させた後に、CH50、ACH50 及び chemotactic activity を測定した。結果は、図 6 の如く、agg. Fr II 量の増加と共に CH50 は低下し、chemotactic activity は上昇するが、ACH50 にはあまり低下の傾向が認められなかった。

7. Zymosan による補体系活性化と chemo-

Fig 4 Influence of serum concentration in chemotaxis assay (agg. Fr II)

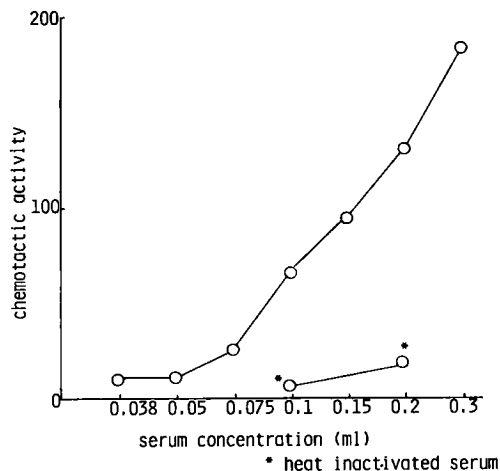
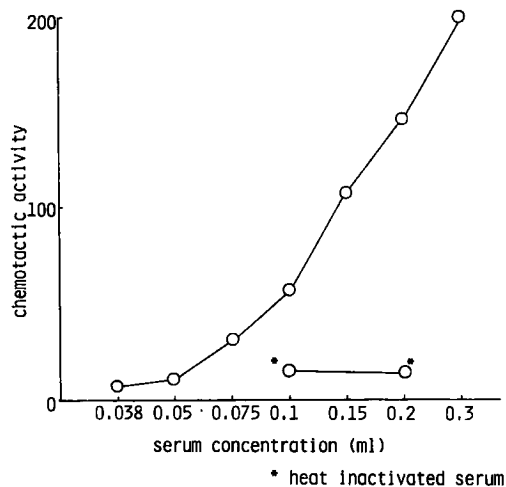


Fig 5 Influence of serum concentration in chemotaxis assay (zymosan)



tactic activity の関係

zymosan による補体系活性化の程度と chemotactic activity の関係をみる為に、正常新鮮血清に変量した zymosan を加えて、37°C、60分反応させた後に ACH50 及び chemotactic activity を測定した。

結果は、図 7 に示す如く、zymosan の増量に併ない ACH50 は低下し、発生する chemotactic activity は増加を示した。

Fig 6 Relation between CH50, ACH50, chemotactic activity and agg. Fr II concentration

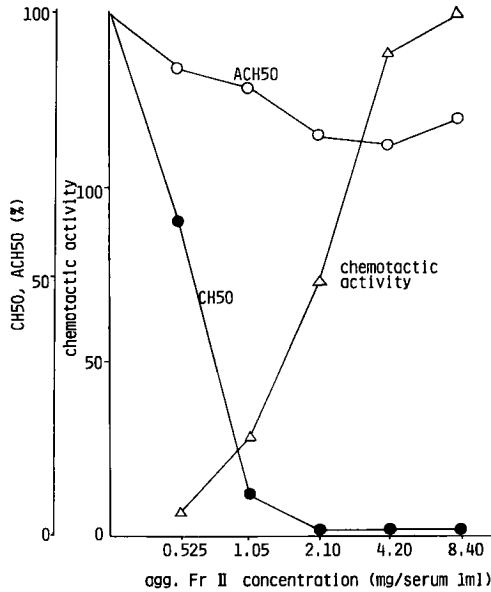
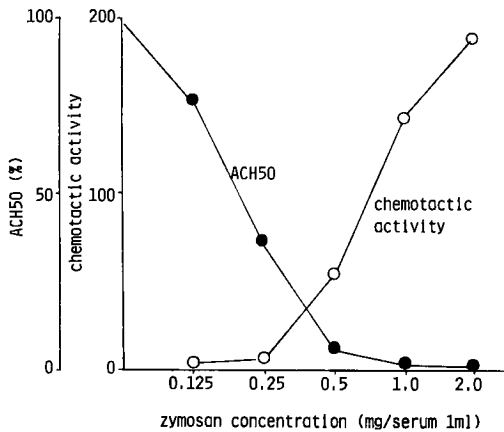


Fig 7 Relation between ACH50, chemotactic activity and zymosan concentration



考 按

1962年, Boyden⁶⁾が chemotactic factor を測定する方法を開発して以来, chemotactic factor には補体由来の chemotactic factor, leucogresin⁹⁾, フィブリン分解産物¹⁰⁾, コラーゲン分解物¹¹⁾, 細菌性遊走因子¹²⁾等が有る事が分かってきた。この内, 補体由来の chemotactic fac-

tor に関しては Ward により詳しく研究されており^{13,14,15)}, この chemotactic factor は補体が活性されて生ずる C3a, C5a, C567 である事が確認されている。

補体系の活性化には抗原抗体反応等による classical pathway を介するもの, 菌体成分等による alternative pathway を介するもの, 或いは, 凝固, 線溶, キニン-カリクレイン系を介するもの等が知られている。これらの内, classical pathway のみ或いは alternative pathway のみを活性化させて chemotactic factor を発生させる事が可能であり, 更に, 血清中の各々の pathway 由来の chemotactic factor が数量的に測定出来るならば, 逆に各々の pathway 由来の chemotactic factor を測定する事により各々の pathway の補体活性の一面をうかがい知る事が出来ると考えられる。この様な観点から, Boyden 法を利用して著者が考案した classical pathway 及び alternative pathway の活性の測定法の基礎的検討を行った。

先ず第一に, 血清中の classical pathway 及び alternative pathway を活性化する目的で agg. Fr II 又は zymosan を加え, chemotactic factor が発生するか否かを検討したところ, 両者共に有意に高値の chemotactic activity が認められたが, 対照実験として 56°C, 30分加熱して補体系を非働化した血清では, 血清を加えない系と同様 chemotactic factor は認められなかった。この事は, agg. Fr II, zymosan が明らかに補体系を活性化して chemotactic factor を発生せしめている事を示唆するものである。

次に, 上室に加える多核白血球に関しては, 動物の多核白血球を採取する方法¹⁶⁾も報告されているが, 感染症を有する動物では多核白血球自身の遊走能力が低下する為, 感染症の有無が明確で採取の容易なヒト多核白血球を使用する事にした。上室に加える多核白血球数は文献により差が有るが, 多すぎると random migration が増加する為, 2×10^6 個から 4×10^6 個の多核白血球数につき検討を加えた。 2×10^6 個では chemotactic activity は低値であり, 多核白血球数が多い程 chemotactic activity は高値を示したが, 4×10^6 個の場合は random migration

が30以下である事より、上室には 4×10^6 個の多核白血球を入れる事とした。

細胞を浮遊させる medium としては、Hanks' BSSに0.5% bovine serum albumin を混じたもの¹⁷⁾、medium 199に0.5% ovo albumin を加えたもの¹³⁾等種々の報告が見られるが、生理的塩類溶液に一定濃度の蛋白質を含むものであれば細胞の遊走には影響を及ぼさないと考えられる。著者は、本実験では下室に補体源として血清を加える為上室には TC 199 に非働化血清を加える事とし、その血清濃度を検討した。この上室の血清濃度は上、下室に血清濃度差がある場合濃度差による遊走が出現する可能性が生じるので、下室の血清濃度と一致し更に random migration が出現しない値でなければならない。下室の血清量が多ければ後述する如く chemotactic factor の発生は盛んで chemotactic activity は高値となるが、下室に一致させた上室の非働化血清量が多くなる為 random migration も高値となる可能性がある。そこで、上、下室の最終血清濃度を5%、10%、20%と変えて比較検討してみると、10%では5%に比し chemotactic activity は高値であり更に20%と余り差がない為、上室の非働化血清の最終濃度は10%と決定した。10%における random migration は、表1でも明らかな如く判定上無視しうる低値である。

血清と agg. Fr II, zymosan との incubation 及び遊走の時間は、他の報告者と同様37°C、3時間行った。

agg. Fr II や zymosan の増量或いは補体源としての血清の増量と共に chemotactic activity が増加する事から、chemotactic activity を下室の血清の補体活性の一つの表現と理解する事は妥当であろう。

zymosan が alternative pathway のみを活性化する事は既に明らかとなっている為^{18,19)}、zymosan による chemotactic activity は alternative pathway の活性を反映していると考えられが、agg. Fr II による chemotactic activity が classical pathway 活性のみを反映するか否かは不明である。何故なら、agg. Fr II は alternative pathway を活性化させる IgA 或いは IgE を

少量乍ら含有する事等より、本法を施行する際は classical pathway のみを活性化する量の agg. Fr II を用いなければならない。血清1mlに種々の量の agg. Fr II を incubate させると、血清の CH50 は agg. Fr II が1.05mg以上で著明に低下するが、alternative pathway による溶血率である ACH50 は殆んど低下せず、4.20mgで ACH50 は75%となり、それ以上の低下は認められなかった。この結果から ACH50 の低下(25%)は、alternative pathway の component である properdin, factor D, factor B等の活性低下に起因すると理解するより、classical pathway の活性化による C3~C9の低下を反映するものと理解する方が妥当である。agg. Fr II が4.20mgでは chemotactic activity も137で適当と考えられる為、classical pathway 由来の chemotactic factor を発生せしめる agg. Fr II の量は、血清1mlに対し4.20mgと決定した。

zymosan による補体活性化の程度と chemotactic activity の関係をみると、血清の ACH50 は zymosan が0.5mg以上になると著明に低下し、1.0mgの時 chemotactic activity は141と適量を示した。この事から、alternative pathway 由来の chemotactic factor を発生せしめる zymosan 量は血清1mlに対し1.0mgと決定した。

以上より、chemotaxis assay を利用する事により血清中の classical pathway 及び alternative pathway の活性を測定する方法を考案したが、この測定法には更に若干の問題が提起される。

第一に、chemotactic factor 発生に関与する補体系は全補体系の活性の一部(C7まで)であり、本法によって得られた値が全補体系の活性を正確に反映するか否かは不明である点である。

又、病的血清の chemotactic activity を測定する際の問題点としては、その血清のみによる遊走(spontaneous chemotaxis^{15,20)})の問題がある。即ち、感染症を有する血清等には既に chemotactic factor が存在する可能性があり、この場合は本法による測定は無意味であるから、対照実験として必ず spontaneous chemotaxis が無い事を確かめねばならないし、もし存在する場合には補正を行なう必要がある。

更に、血清中の chemotactic factor inactiva-

tor 存在の問題がある。chemotactic factor inactivator は Ward により正常人血清中に存在する事が報告²¹⁾されて以来、Hodgkin's disease²²⁾, liver cirrhosis²³⁾ 等 chemotactic factor 低値の疾患においてその高値が報告されている。SLE においても C5 由来の chemotactic factor に対する inhibitor が低率ながら出現する事も報告されている²⁴⁾。しかし、inhibitor の出現は一般に感染症と深い関連がある様なので、対象を混合感染症のない症例を選べば、余り問題はないと考えられる。

結 論

血清中の補体系の classical pathway と alternative pathway の活性を測定する為、chemotaxis を利用する方法の基礎的検討を行ない次の結論を得た。

1. Boyden の chemotactic chamber (上、

下室容量 2 ml millipore filter の pore size, 3 μ) を使用する場合、上室のヒト多核白血球は、4.0 $\times 10^6$ 個を、10%非働化ヒト血清加 TC199 に浮遊させる方法が適当であった。

2. 下室には10%新鮮血清を入れ、血清中の補体系の内 classical pathway のみと活性化するには agg. human Fr II を血清 1 ml に対して 4.20mg を、又 alternative pathway の活性化には zymosan 1 mg 加える場合が最適であった。

3. 本法によって求められる chemotactic activity は下室の血清量(補体量)に dose-dependent であり、補体系由来の chemotactic factor の量をよく反映すると考えられた。

謝 辞

稿を終わるにあたり、本研究の御指導、御校閲を受けた恩師大藤真教授に深甚なる感謝の意を表す。又、直接御指導を受けた天野哲基博士に感謝の意を表す。

文 献

1. 森田 実, 西下駿三, 天野哲基, 大藤 真: SLE の血清補体価に関する研究. アレルギー, **20**, 159—169, 1971.
2. Perrin, L.H., Lambert, P.H., Nydegger, U.E. and Miescher, P.A.: Quantitation of C3PA (Properdin Factor B) and other complement components in diseases associated with a low C3 level. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **2**, 16—27, 1973.
3. Perrin, L.H., Lambert, P.H. and Miescher, P.A.: Properdin levels in systemic lupus erythematosus and membranoproliferative glomerulonephritis. *Clin. Exp. Immunol.* **16**, 575—581, 1974.
4. Wilson, M.R., Arroyave, C.M., Nakamura, R.M., Vaughan, J.H. and Tan, E.M.: Activation of the alternative complement pathway in systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* **26**, 11—20, 1976.
5. 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.
6. Boyden, S.: The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J. Exp. Med.* **115**, 453—466, 1962.
7. Mayer, M.M.: Procedure for titration of complement. In *Experimental Immunology* ed. E.A. Kabat and M.M. Mayer, Charles, C. Thomas, Publisher. Springfield, Illinois, pp. 149—153, 1961.
8. 天野哲基, 吉野内猛夫, 三橋康彦, 宮島啓人, 大藤 真: SLE の alternative pathway. 臨床免疫, **8**, 289—197, 1976.
9. Yoshida, K., Yoshinaga, M. and Hayashi, H.: Leucocyte emigration *in vivo* and in the Boyden chamber. *Nature* **218**, 977,—978, 1968.
10. Stecher, V.J. and Sorkin, E.: The chemotactic activity of fibrin lysis products. *Int. Arch. Allergy.* **43**, 879—886, 1973.

11. Chang, C. and Houck, J.C.: Demonstration of the chemotactic properties of collagen. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **134**, 22—26, 1970.
12. Ward, P.A., Lepow, I.M. and Newman, L.J.: Bacterial factors chemotactic for polymorphonuclear leucocytes. *Am. J. Pathol.* **52**, 725—736, 1968.
13. Ward, P.A., Cochrane, C.G. and Müller-Eberhard, H.J.: The role of serum complement in chemotaxis of leucocytes in vitro. *J. Exp. Med.* **122**, 327—347, 1965.
14. Ward, P.A., Cochrane, C.G. and Müller-Eberhard, H.J.: Further studies on the chemotactic factor of complement and its formation in vivo. *Immunology* **11**, 141—153, 1966.
15. Ward, P.A.: Leukotactic factors in health and disease. *Am. J. Pathol.* **64**, 521—530, 1971.
16. Hirsch, J.G. and Church, A.B.: Studies of phagocytosis of group A streptococci by polymorphonuclear leucocytes in vitro. *J. Exp. Med.* **111**, 309—322, 1960.
17. 青木隆一: 白血球遊走因子について. *日本臨牀*, **27**, 171—184, 1969.
18. Pillemer, L., Blum, L., Lepow, L.H., Ross, Q.A., Todd, E.W. and Wardlaw, A.C.: The properdin system and Immunity: 1 Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin and its role in immunophenomena. *Science* **20**, 279—285, 1954.
19. Götze, O. and Müller-Eberhard, H.J.: The C3-activator system: An alternative pathway of complement activation. *J. Exp. Med.* **134**, 90S—108S, 1971.
20. Michael, E.N. and Michael, E.M.: Spontaneous chemotaxis in patients with glomerulonephritis and the nephrotic syndrome. *J. Pediatr.* **83**, 390—398, 1973.
21. Berenberg, J.L. and Ward, P.A.: Chemotactic factor inactivator in normal human serum. *J. Clin. Invest.* **52**, 1200—1206, 1973.
22. Ward, P.A. and Berenberg, J.L.: Defective regulation of inflammatory mediators in Hodgkin's disease: Supernormal levels of chemotactic factor inactivator. *N. Engl. J. Med.* **290**, 76—80, 1974.
23. Demeo, A.N. and Andersen, B.R.: Defective chemotaxis associated with a serum inhibitor in cirrhotic patients. *N. Engl. J. Med.* **286**, 735—740, 1972.
24. Perez, H.D., Lipton, M. and Goldstein, I.M.: A specific inhibitor of complement (C5) -derived chemotactic activity in serum from patients with systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* **62**, 29—38, 1978.

Studies on alternative pathway in systemic lupus erythematosus**— Using the chemotaxis assay —****Part 1. Fundamental studies of chemotaxis assay****Takeo YOSHINOCHI**

The 3rd Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. T. Ofuji)

To measure the activities of classical or alternative complement pathway using the modified Boyden's chemotactic chamber (each compartment 2ml and filter, pore size 3μ), suitable conditions were examined and the following results were obtained.

- 1) The upper compartment of the chamber contained 4×10^6 polymorphonuclear cells and 10% heat inactivated human serum in medium TC-199.
- 2) The lower compartment contained 10% fresh human serum as a complement source in medium TC-199.
- 3) To generate the classical complement pathway-derived chemotactic factor(s), 0.84mg of heat aggregated human Fr. II was added to the lower compartment (4.2mg/ml fresh serum).
- 4) To generate the alternative complement pathway-derived chemotactic factor(s), 0.2mg of zymosan was added to it (1mg/fresh serum).
- 5) In this assay, the chemotactic activities derived from classical or alternative complement pathway were dose-dependent upon the serum (complement) concentrations in the lower compartment.