

# 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 2 編

### 臨 床 的 考 察

岡山大学医学部第三内科教室 (主任: 大藤真教授)

吉 野 内 猛 夫

**Key words** : SLE, chemotaxis, complement  
alternative pathway

#### 緒 言

全身性エリテマトーデス (SLE) は低補価を示す代表的疾患であり, 補体成分が病変部に沈着しているという免疫組織学的所見や, 病態と補体価の変動がよく相関するという血清学的所見<sup>1),2)</sup>より, SLE の病態発現に補体系が重要な役割を果たしていると考えられている。

補体系の活性経路には classical pathway と alternative pathway の2種類が存在するが, この内, SLE における補体系の関与は, 生体内における抗原抗体反応による classical pathway の活性化と理解されていた。しかるに近年, alternative pathway の成分である properdin や factor B が腎臓や皮膚部に沈着しているという所見や血中濃度が低下しているという所見<sup>3)4)5)6)</sup>が明らかとなり, SLE の病態への alternative pathway の関与も推察されてきているが, この点については未だ不明の部分が多い。

著者は, 第一編<sup>7)</sup>において, classical pathway 及び alternative pathway のいずれを活性化しても, chemotactic factor が発生する事に着目し, chemotaxis assay 利用による classical pathway 及び alternative pathway の測定法の諸条件の基礎的検討を行ったが, 本論文においては, chemotaxis assay 利用により SLE における classical pathway 及び alternative pathway の活性を測定し, 両者の

かわり合いにつき検討を行い, SLE 病態への alternative pathway の関与につき考察を加えた。

#### 対 象

岡山大学第3内科へ入院又は通院している混合感染の無い SLE 患者30名を対象とした。なお, SLE の診断はアメリカリウマチ協会の診断予備基準<sup>8)</sup>に従った。

#### 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

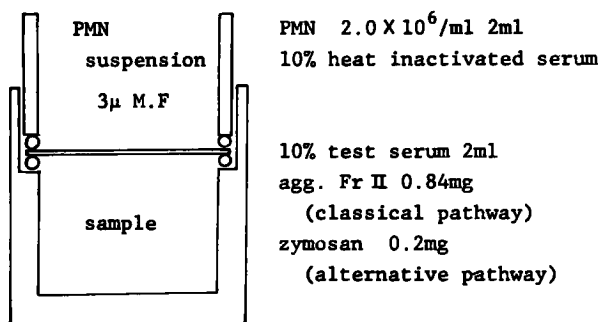
chamber は図1の如く Boyden 法<sup>9)</sup>を参考にして作製したプラスチック製で, 直径27mm, 上室容量, 下室容量共に2mlである。

millipore filter は日本ミリポア社製で pore size 3.0 $\mu$  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1/6容の6%デキストラン溶液を加え, 37 $^{\circ}$ 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, Hank's BSSにて3回洗浄の後, 非働化正常人血清を10%含む TC 199にて, 2.0 $\times$

Fig. 1 Chemotaxis assay



Chemotactic activity = PMN's counts/10 HPF

$$\text{Chemotactic index} = \frac{\text{patient's chemotactic activity}}{\text{control's chemotactic activity}} \times 100$$

10<sup>6</sup>/mlとなる様に調整した。

### 3) chemotactic factor の発生

SLE 患者血清0.2mlに classical pathway を活性化する為には, aggregated human Fr II (agg. Fr II) (Sigma 社製) 0.84mgを, 又 alternative pathway を活性化する為には zymosan (Sigma 社製) 0.2mgをそれぞれ加え, TC 199にて最終総量2mlとして下室に加え, 空気が入らないように注意深く millipore filter をのせた後, 上室に多核白血球浮遊液 2ml を入れ, 37°C, 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 index

400倍にて検鏡し, millipore filter の下面まで遊走した多核白血球を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。

又, chemotactic index は, 上記の chemotactic activity を同時に測定した正常人血清における chemotactic activity で除し%で表した。

classical pathway による chemotactic index を CCI, alternative pathway による che-

motactic index を ACI と略記した。

## 2. 補体系の測定

### 1) 血清補体価 (CH 50)

CH 50 は Mayer 原法<sup>10)</sup>を用いて測定した。

### 2) 補体各成分

C4, C3, C5 の測定は,  $\beta$ 1E,  $\beta$ 1C/1A,  $\beta$ 1F globulin の蛋白量を各々, Meloy 社, Hyland 社, Meloy 社製のプレートを使用し single radial immunodiffusion 法により行った。

## 結 果

### 1. CCI と CH50

CCI と CH50 との間には, 相関関係は認められなかったが, CH50 低値群 (CH50 ≤ 20) の CCI は 11.52 ± 20.24% であり, CH50 が 21 以上の群の CCI, 53.96 ± 36.25% に比し明らかに低値であった。 (p < 0.02) (Fig. 2, 3)

### 2. CCI と C4

CCI と C4 との間には, 正の相関関係 (y = 0.09x + 9.86, r = 0.53, p < 0.02) が認められた。 (Fig. 4)

### 3. CCI と C3

CCI と C3 との間には, 正の相関関係 (y = 0.45x + 4.27, r = 0.67, p < 0.01) が認められた。 (Fig. 5)

### 4. CCI と C5

CCI と C5 との間には, 相関関係は認められなかった。 (Fig. 6)

### 5. ACI と CH50

ACI と CH50 との間には, CCI と CH50 との関係同様に, CH50 低値群 (CH50 ≤ 20) の ACI は 51.10 ± 23.57% であり, CH50 が 21 以上の群の ACI, 86.04 ± 28.28% に比し, 低値を示す傾向が認められた。 (p < 0.05) (Fig. 7, 8)

### 6. ACI と C4

ACI と C4 との間には相関関係は認められ

Fig. 2 Relation between CH50 and CCI

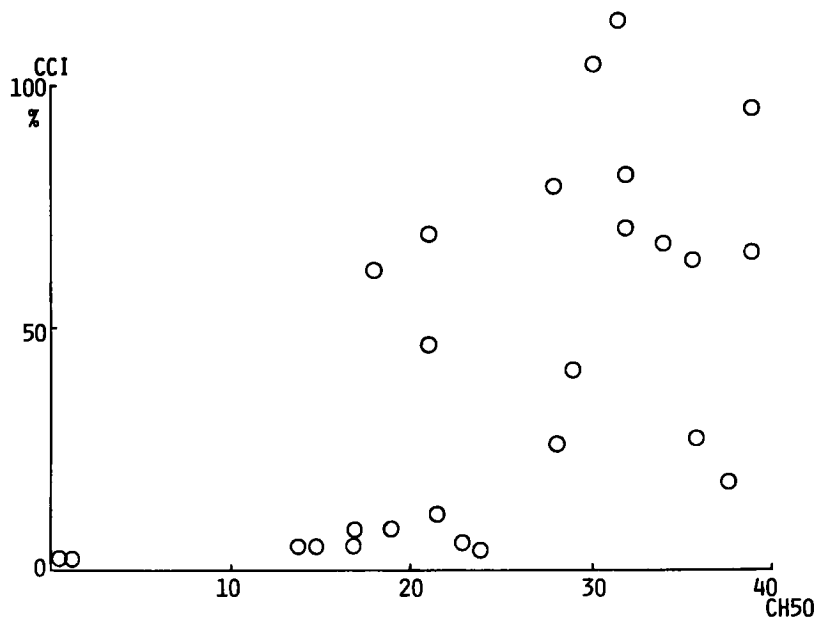


Fig. 3 Relation between CH50 and CCI

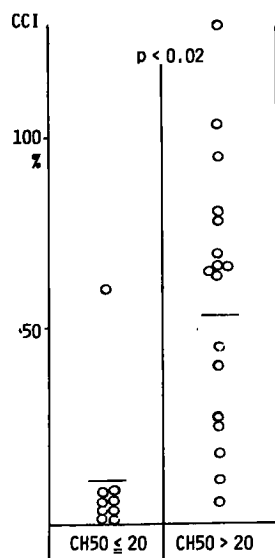
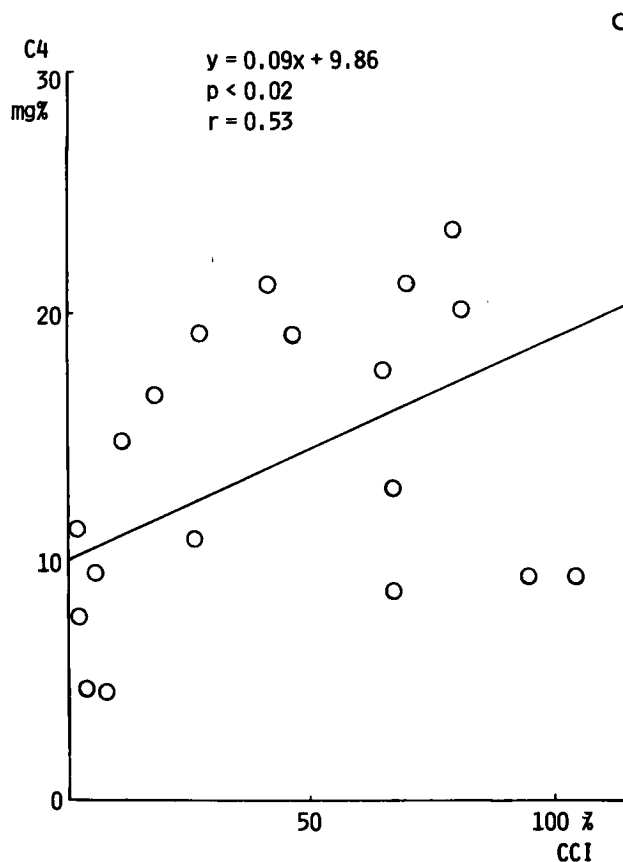


Fig. 4 Relation between CCI and C4



なかった。(Fig. 9)

7. ACI と C3

ACI と C3 との間には相関関係は認められなかった。(Fig. 10)

8. ACI と C5

ACI と C5 との間には相関関係

Fig. 5 Relation between CCI and C3

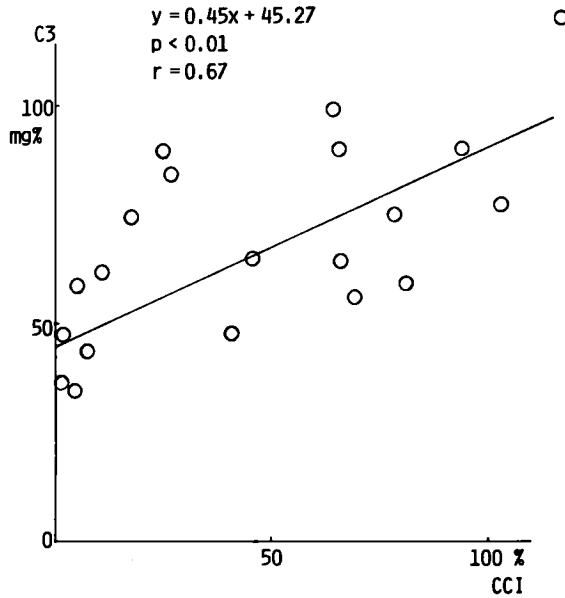
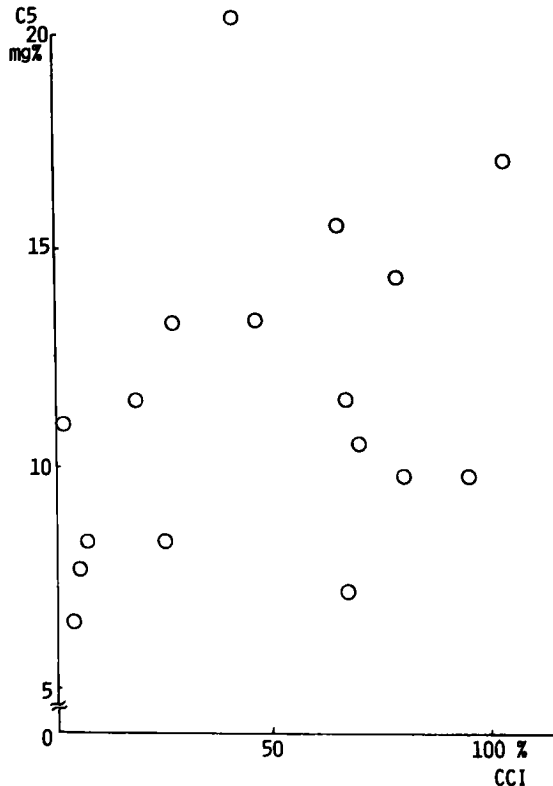


Fig. 6 Relation between CCI and C5



は認められなかった。(Fig. 11)

### 9. CCI と ACI

CCI と ACI との間には正の相関関係 ( $y = 0.75x + 45.45$ ,  $r = 0.89$ ,  $p < 0.001$ ) が認められた。(Fig. 12)

### 10. CCI, ACI と補体各分画

以上 CCI, ACI と補体各分画との関係をまとめると, Table 1 に示す如くになった。

## 考 按

生体内における補体系の働きとしては, 病原体等の侵入に対する生体防御機構の一環として生体に有利な反応系と理解されていたが, 自己免疫疾患等の病態発現等生体にとって不利な現象にも補体系が関与している事が明らかとなってきた。これらの疾患への補体系の関与は classical pathway を介するものと理解されていたが, 近年の alternative pathway の詳細な研究に併ない, SLE<sup>3)4)5)6)</sup>, 腎炎<sup>11)</sup>, 慢性関節リウマチ<sup>12)</sup>, 発作性夜間血色素尿症<sup>13)</sup>, 類天疱瘡<sup>14)</sup>, 脂肪異常栄養症<sup>15)</sup>等の病変に alternative pathway も関与している事が報告されてきた。しかし乍ら, これらの報告にみられる alternative pathway の関与の証明は, 主として alternative pathway の因子である factor B, properdin 等の蛋白の面からであり, 活性面よりの研究は少ない。第1編で述べた如く chemotaxis を利用する方法は, alternative pathway の活性を測定する方法としては有用なので, 本法を用いて SLE の病態への alternative pathway の関与を観察する事は有意義と考えられる。

まず classical pathway 由来の chemotactic index (CCI) と CH50 との関係を見ると, CH50 低値のものは CCI も低値を示す傾向が見ら

Fig. 7 Relation between CH50 and ACI

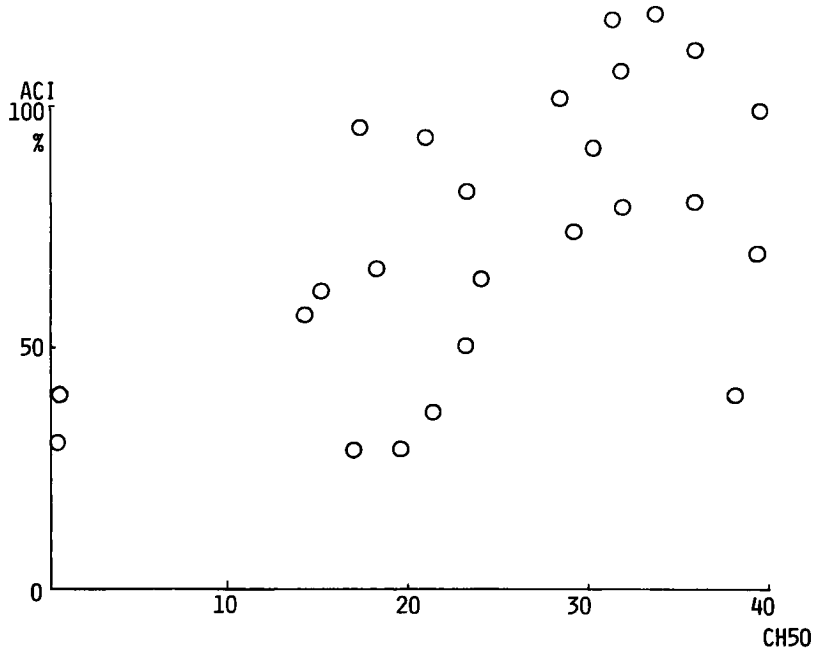


Fig. 8 Relation between CH50 and ACI

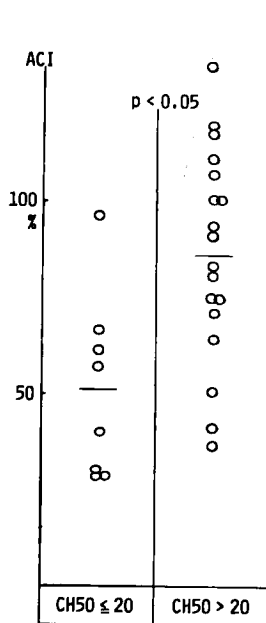
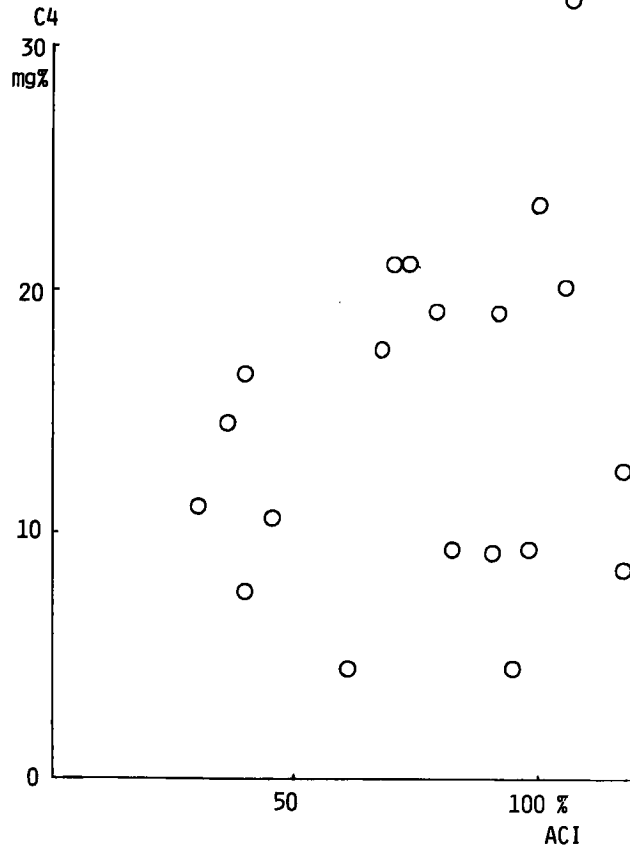


Fig. 9 Relation between ACI and C4



れ、CCI は CH50 同様 SLE の急性期には低値を示し寛解期には正常値を示す傾向が認められた。CCI と補体各分画との関係においては、CCI と C4、C3 との間に相関関係を認

Fig. 10 Relation between ACI and C3

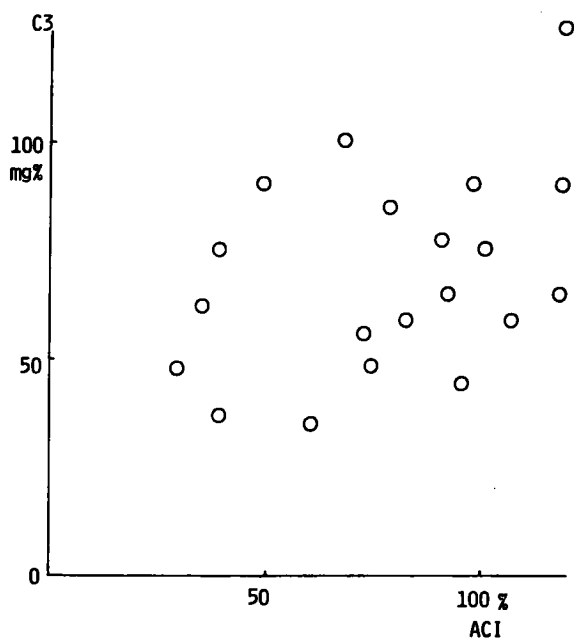
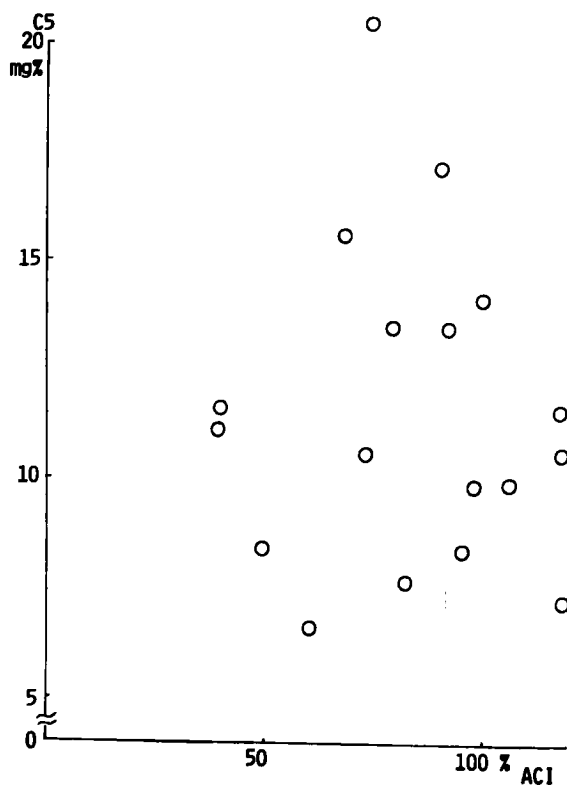


Fig. 11 Relation between ACI and C5



めたが C5 とは相関しなかった。SLE の CH50 と補体各分画との関係を見ると、Table 1 に示す如く CH50 は C4, C3 と相関し C5 とは相関していない事から、CCI と C4, C3 との相関は当然の結果と考えられる。

次に alternative pathway 由来の chemotactic index (ACI) と CH50 との間には、CCI 同様 CH50 低値のものは ACI も低値を示す傾向が認められたものの、CH50 低値群 (CH50 ≤ 20) の ACI の平均値は  $51.10 \pm 23.57\%$  であり、CH50 低値群 (CH50 ≤ 20) の CCI の平均値  $11.53 \pm 20.24\%$  と比較してわずかの低値しか示さなかった。この事は、ACI は CH50 が低下してもわずかしこ低下せず、SLE における低補体価は classical pathway による消費が主体であり alternative pathway は余り活性化されていないことを示すものと思われる。ACI と補体各分画の間にはいずれも相関関係が認められなかった。この点は、SLE 患者において endotoxin を血清に加える事により発生する chemotactic factor と血清の C4, C3 との間に相関関係が認められなかったという Clark の報告<sup>16)</sup>と一致するかも知れない。alternative pathway 由来の chemotactic factor としては C5 由来のもの (C5a) の他に、factor B の分解産物である Ba が chemotactic factor となるという報告<sup>17)</sup>もある。又、classical pathway と alternative pathway 由来の chemotactic factor の発生には、時間的差があると云う報告<sup>18)</sup>が見られる。更に、正常人血清を zymosan で活性化すると、classical pathway

Fig. 12 Relation between CCI and ACI

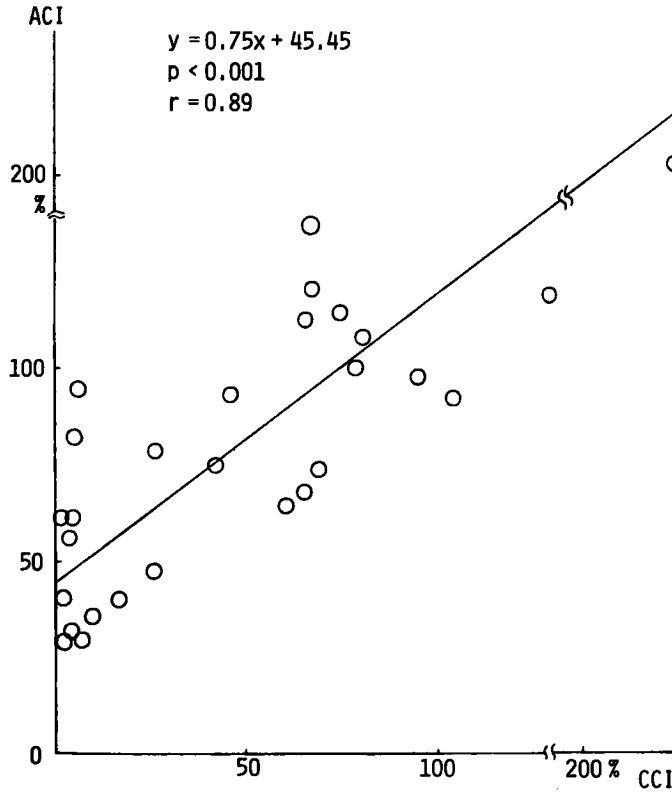


Table 1 Correlation coefficients between CCI, ACI, CH50 and complement components

	CCI	ACI	CH50	C 4	C 3
ACI	0.89**				
CH50	0.29	0.26			
C 4	0.53*	ns	0.45*		
C 3	0.67**	ns	0.67**	0.52*	
C 5	ns	ns	ns	0.45*	ns

\*\*p<0.01  
\*p<0.05  
ns : not significant

活性化の時と異なり C 3 に比し C 5 の低下が著明であると言う報告もみられる。ACI と補体各分画との間に相関が認められないのは、上記の如く、alternative pathway 由来の chemotactic factor の発生が classical pathway 由来の chemotactic factor の発生よりも複雑な為とも推察されるが、詳細は不明である。

1973年, Ward<sup>20)</sup>が正常人血清中に chemotactic factor inactivator が存在する事を発見して以来, Hodgkins' disease<sup>21)</sup>, 癩<sup>22)</sup>, liver

cirrhosis<sup>23)</sup>など chemotactic factor 低値の疾患において chemotactic factor inactivator が増加している事が報告されているし、最近 SLE においても, Perez らにより C 5 由来の chemotactic factor に対する inhibitor が少数ながら存在すると云う事も報告<sup>24)</sup>されており、病的状態では, chemotactic index が補体系の活性化を直接反映すると考える事は危険であるが, CCI が CH50 や C 4, C 3 と相関する事より, これらの inactivator の活性はかなり弱いものであろうと考えられる。

CCI と ACI との間には正の相関関係が認められ, CCI (X) と ACI (Y) との回帰直線は  $y=0.75x+45.45$  となり, CCI が 0% となっても ACI は約 46% 残っている事となる。この事は, SLE の急性期に classical pathway 活性が極度に低下しても, alternative pathway 活性は充分残って

いる事を示している。alternative pathway は発生的に見て最も原始的な生体防御機構であるから, ヒトの生体防御には重大な役割を果すと考えられる。この事は, factor B が低下した C 2 欠損症<sup>25)</sup>や C 3 欠損症<sup>26)</sup>に, 重症感染症を合併しやすい事実からみて明らかである。CH50 が極度に低値を示し, 更に細胞性免疫能が低下している急性期 SLE においても感染症の合併が少ないのは, これらの alternative pathway 活性が残存して生体防御に働いてい

る事を示すものと考えられる。

CCI と ACI とが相関している事の説明としては、CCI と ACI が共に関与する C3 ~ C9 の late component が低下している為、或いは immune complex により classical pathway のみならず直接、alternative pathway も活性化されている為、或いは classical pathway が活性化された際生じる C3b が、活性化された factor B ( $\bar{B}$ ), properdin と反応して、更に C3 を活性化するという C3b positive feedback 機構<sup>27)</sup> が作動した為等の可能性が考えられる。この内、late component の低下については、SLE における補体各成分を見ると急性期には C4, C2 の低下が著明であり、late component の低下はあまり著明ではない<sup>1)2)</sup> ので否定されよう。生体内の immune complex 自身により直接 alternative pathway が活性化されているという可能性については、実験的に作成した soluble immune complex を用いた実験では、alternative pathway 活性化の為には大量の immune complex が必要であり、生体内に推察される immune complex 量の程度では alternative pathway の活性化は無いと考えられる。1972年、Müller-Eberhard が、classical pathway 活性化の際生じた C3b が、factor D の存在下で活性化された factor B ( $\bar{B}$ ) と結合し C3b Bb (p) を形成、これが再び別の C3 を活性化するという positive feedback 機構の存在を報告<sup>27)</sup> している。SLE の生体内において classical pathway 活性化の際に多量の C3b が発生すると推察されるので、CCI と ACI との相関関係は、この feedback 機構の作動により説明するのが最も妥当と考えられる。

以上、SLE における classical pathway と alternative pathway のかわり合いにつき検討を加えたが、図12に示す如く CCI, ACI 共約200%の chemotactic index を示すものが30例中3例認められ、これら3例は、agg. Fr II や zymosan を加えなくても、約100%近くの chemotactic index を示した。Michael 等<sup>28)</sup> は腎炎の患者血清において spontaneous chemotactic factor が存在する事を報告している

が、この事は、SLE 血清中にも spontaneous chemotactic factor が存在する事を示唆する。SLE の低補体価や血中における immune complex 存在の可能性を考え合わせると、この場合の spontaneous chemotactic factor は血中に遊離している C5a の可能性があるが、chemotactic factor には補体由来以外にも leucogresin, フィブリン分解産物、コラーゲン分解物等が存在し、これらは SLE 急性期に存在する可能性があるため、さらに検討が必要である。chemotaxis assay を利用する補体系の測定法は溶血法による補体系の測定法とは異なり、多くの factor が関与し、種々の影響を受ける事が多いと考えられるが、生体内における補体系の別の生物活性を観察する意味においても又、重要と考えられる。

## 結 論

chemotaxis assay を利用する方法により、SLE における classical pathway と alternative pathway 活性を測定して両者のかわり合いにつき検討を加え、次の結論を得た。

1. Classical pathway 活性 (Classical pathway-derived Chemotaxis Index, CCI) は、血清補体価 (CH50) が低値を示す症例において低値を示す傾向が認められた。又、CCI は血清中の C4, C3 と正の相関関係を示したが、C5 とは相関しなかった。

2. Alternative pathway 活性 (Alternative pathway-derived Chemotactic Index, ACI) は、血清補体価 (CH50) が低値を示す症例において低値を示す傾向が認められたが、その低下は軽度であった。又、ACI は C4, C3, C5 のいずれとも相関しなかった。

3. CCI と ACI は正の相関関係を示したが、CCI に比し ACI は比較的 normal 範囲に保たれていた。

以上の事より、SLE における alternative pathway の活性化は、抗原抗体反応による classical pathway 活性化の結果生じた C3b による positive feedback 機構の作動によるものと推察された。又、低補体価を呈する SLE 患者においても、alternative pathway による



生体防御は充分残存してその役割を演じているものと推察された。

### 謝 辞

稿を終るにあたり、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。

尚、本論文の要旨は、1976年10月、IX International Congress of Allergology (Buenos Aires-Argentina) に於て発表した。

### 文 献

1. Schur, P.H.: Complement in lupus. *Clin. Rheum. Dis.* 1, 519-543, 1975.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 吉野内 猛夫: 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 測定の基礎的考察. *岡山医学会雑誌*: 投稿中
8. Cohen, A.S., Reynolds, W.F., Franklin, E.C.F., Kulka, J.P., Pope, M.W., Shulman, L.E. and Wallace, S.L.: Preliminary criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Bull. Rheum. Dis.*, 21: 643-648, 1971.
9. Boyden, S.: The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J. Exp. Med.* 115, 453-466, 1962.
10. Mayer, M.M.: Procedure for titration of complement. In *"Experimental Immunochemistry"*. ed. E.A. Kabat and M.M. Mayer, (ed) Charles, C. Thomas, Publisher. Springfield, Illinois, pp, 149-153, 1961.
11. Mclean, R.H. and Michael, A.F.: Properdin and C3 proactivator. Alternative pathway components in human glomerulonephritis. *J. Clin. Invest.* 52, 634-644, 1973.
12. Ruddy, S., Fearon, D.T. and Austen, K.F.: Depressed synovial fluid levels of properdin and properdin factor B in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 18, 289-295, 1975.
13. Götze, O. and Müller-Eberhard, H.J.: Proxysmal nocturnal hemoglobinuria. Hemolysis initiated by the C3 activator system. *N. Engl. J. Med.* 286, 180-184, 1972.
14. Jordon, R.E., Day, N.K., Sams, W.M.J. and Good, R.A.: The complement system in bullous pemphigoid. I. Complement and components levels in sera and blister fluids. *J. Clin. Invest.* 52, 1207-1214, 1973.
15. Sissons, J.G.P., West, P.J., Fallows, S.J., Gwyn Williams, D., Boncher, B.J., Amos, N. and Peter, D.K.: The complement abnormalities of lipodystrophy. *N. Engl. J. Med.* 294, 461-465, 1976.

16. Clark, R.A., Kimball, H.R. and Decker, J.L.: Neutrophil chemotaxis in systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* **33**, 167-171, 1974.
17. Hamuro, J., Hadding, U. and Bitter-Suermann, D.: Fragments Ba and Bb derived from guinea pig factor B of the properdin system. *J. Immunol.* **120**, 438-444, 1978.
18. Gallin, J.I., Clark, R.A. and Frank, M.N.: Kinetic analysis of chemotactic factor generation in human serum via activation of the classical and alternate complement pathways. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **3**, 334-346, 1975.
19. 平松 誠一, 藤田 禎三, 稲井 真弥: 補体活性化に伴う C5 の変化について. 第11回補体シンポジウム抄録集. pp. 86-88, 1974.
20. Berenberg, J.L. and Ward, P.A.: Chemotactic factor inactivator in normal human serum. *J. Clin. Invest.* **52**, 1200-1206, 1973.
21. 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.
22. Ward, P.A., Goralrick, S. and Bullock, W.E.: Defective leucotaxis in patients with lepromatous leprosy. *J. Lab. Clin. Med.* **87**, 1025-1032, 1976.
23. Demeo, P.A. 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.
25. Newmann, S.L., Vogler, L.B., Feigin, R.D. and Johnston, R.B.: Recurrent septicemia associated with congenital deficiency of C2 and partial deficiency of factor B and the alternative complement pathway. *N. Engl. J. Med.* **299**, 290-292, 1978.
26. Ballou, M., Shira, J.E., Harden, L., Yang, S.Y. and Day, N.K.: Complete absence of the third component of complement in man. *J. Clin. Invest.* **56**, 703-710, 1975.
27. Müller-Eberhard, H.J. and Götze, O.: C3 proactivator convertase and its mode of action. *J. Exp. Med.* **135**, 1003-1008, 1972.
28. Michael, E.N. and Michael, E.M.: Spontaneous chemotaxis in patients with glomerulonephritis and the nephrotic syndrome. *J. Pediatr.* **83**, 390-398, 1973.

**Studies on alternative pathway in systemic lupus erythematosus**

**— Using the chemotaxis assay —**

**Part 2. Clinical studies**

**Takeo YOSHINOCHI**

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

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. T. Ofuji)

The relationship between the classical complement pathway and the alternative complement pathway was studied in 30 SLE patients. The activities of both pathways were measured by chemotaxis assay, and the following results were obtained.

- 1) The classical pathway-derived chemotactic index (CCI) was correlated with the level of CH50, C4 and C3, but not with those of C5.
- 2) The alternative pathway-derived chemotactic index (ACI) was correlated with the level of CH50, but not with those of C4, C3 and C5.
- 3) CCI was positively correlated with ACI. Both indices were low but CCI was more depressed than ACI.

These findings suggest that the alternative complement pathway is activated mainly by the C3b positive feedback mechanism which is probably triggered via the classical complement pathway, and that the alternative complement pathway probably play a part in defence mechanism instead of reduced classical complement pathway in SLE.