

原 著

ベーチェット病患者における多核白血球の 補体第3成分 (C3) 産生能

東京女子医科大学 眼科学教室 (主任: 小暮美津子教授)

陳 麗 理

(受付 平成8年10月22日)

Production of the Third Component of Complement (C3) by Polymorphonuclear Leukocytes from Patients with Behçet's Disease

Li-Li CHEN

Department of Ophthalmology (Director: Prof. Mitsuko KOGURE)
Tokyo Women's Medical College

To elucidate the relationship between the functions of polymorphonuclear leukocytes (PMN) and the complement system in patients with Behçet's disease, we analyzed peripheral PMN and the following phenomena were assessed: ① production of the third component of complement (C3), ② relationship between secretion and expression of mRNA of C3, ③ effect of 12-*o*-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) on C3 production. The PMN samples were purified more than 98% by the double gradient method and were incubated for 24 hours. C3 levels in culture supernatants were quantitated by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay, and C3 mRNA were detected by a reverse transcription-polymerase chain reaction assay and Southern blot hybridization. C3 secretion by Behçet's PMN was significantly higher than that of normal PMN, though the expression of C3 mRNA by Behçet's PMN was almost the same as that of normal PMN. In the Behçet's PMN group, C3 secretion is closely related to the time-course of ocular attack. When TPA was added to the culture supernatant, C3 secretion and C3 mRNA expression by normal PMN were somewhat increased, while there were no changes in the Behçet's PMN. These observations indicate that Behçet's PMN are primed *in vivo* and suggest that C3 produced by PMN plays a role in the pathophysiology of Behçet's disease.

緒 言

Behçet 病 (B 病) は口腔粘膜, 皮膚, 眼, 外陰部のみならず関節, 消化器系, 血管系, 神経系など全身の諸臓器に再発性の急性炎症を起こし, 慢性遷延性に経過する難治性疾患であるが, その病因は未だに不明である。しかし, 本疾患の炎症局所には強い多核白血球 (polymorphonuclear leukocytes: PMN) の浸潤が観察され, 患者 PMN に遊走能¹⁾²⁾, 貪食能³⁾⁴⁾, 活性酸素産生能^{4)~6)}, ライソゾーム酵素分泌能⁷⁾⁸⁾, 細胞障害能⁹⁾¹⁰⁾やサイトカ

イン産生能⁶⁾¹¹⁾の亢進など, 種々の機能異常が認められる。これらのことから, PMN の機能異常が病態形成に深く関与していると考えられる。

B 病の諸症状の中でも眼症状は重篤で, 再発性前房蓄膿性虹彩毛様体炎や網膜ぶどう膜炎を主徴とし, しばしば失明に至る。眼局所においても浸潤している細胞は, 他の炎症部位と同様に PMN が主体であり¹²⁾, 臨床的にも病理組織学的にも網膜血管の透過性の亢進や血栓形成による閉塞性血管炎をはじめ多彩な眼病変が認められる。本症で

は、眼発作に伴い補体の古典経路や第2経路を介した活性化や血清補体価(CH50)の低下¹³⁾¹⁴⁾、補体分解産物の増加¹⁵⁾¹⁶⁾、房水中の補体分解産物の存在¹²⁾などが観察されることから、眼病変の発症機序の一因として、補体系の関与が考えられている。これら補体系の反応は補体の中でもC3を中心とした反応である。近年、このC3がヒトPMNから産生されることが報告されている^{17)~19)}。しかし、B病においてPMNがC3を産生しているか否かについての検討はこれまでになされていない。本研究は、患者末梢血PMNを分離培養し、C3の産生について検討したものである。

対象および方法

1. 対象

東京女子医科大学病院眼科にて経過観察中のB病患者25症例を対象とした(表1)。その内訳は、男性17例、女性8例、年齢は24~61歳(平均41.6±8.9歳)、完全型12例、不全型13例/前眼部型2例、

眼底型23例/活動期16例、非活動期9例、眼罹病期間は1.2~24年(平均7.3年)であった。眼底型病変を有する患者には、種々の薬物療法が行われていた。B病患者は全例、厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班が1987年度に改訂した診断基準を満たすものである²⁰⁾。疾患活動性の分類は、研究班の基準案に従った²¹⁾。健常対照には、患者群と性、年齢分布のほぼ等しい健常成人14名を用いた。なお本研究は、十分なインフォームド・コンセントを得て行った。

2. 方法

1) 白血球分離

末梢静脈血20mlをヘパリン採血し、PMNをフィコール二重比重遠心法により分離した。顆粒球分画を採取してリン酸緩衝生理食塩水(PBS(-))で3回洗浄後、PMNの精製をflow-cytometryで確認し、細胞数 2×10^6 /mlに調整して10% fetal calf serum (FCS) (Biocell Labora-

表1 対象とした Behçet 病の症例

症例	年齢	性別	HLA-B51	病型	部位	活動性	治療	眼病歴(年)
1	39	M	-	不全型	眼底型	非活動期	Col	3.5
2	48	M	-	不全型	眼底型	活動期	Col	7.5
3	61	M	-	不全型	眼底型	活動期	Col	19
4	45	M	-	完全型	眼底型	非活動期	Col	24
5	30	M	-	不全型	眼底型	活動期	FK	13
6	41	M	-	不全型	眼底型	活動期	CsA	2.3
7	38	M	-	完全型	眼底型	活動期	Col+FK	1.3
8	52	F	-	完全型	眼底型	活動期	Col	5
9	34	F	-	不全型	眼底型	非活動期	Col	2.8
10	48	M	-	不全型	眼底型	非活動期	Col	13
11	36	F	-	不全型	眼底型	非活動期	Col	7.5
12	40	F	-	不全型	前眼部型	活動期	-	4.3
13	42	M	+	不全型	眼底型	活動期	Col	7.3
14	38	M	-	完全型	前眼部型	非活動期	-	4.8
15	24	M	+	不全型	眼底型	活動期	FK	1.9
16	49	F	-	完全型	眼底型	活動期	Col	9.5
17	48	M	+	完全型	眼底型	活動期	Col+CsA	12.9
18	33	F	-	完全型	眼底型	活動期	CsA	1.2
19	37	M	+	不全型	眼底型	活動期	Col+FK	8
20	35	M	-	完全型	眼底型	活動期	Col+CsA	1.8
21	45	M	-	完全型	眼底型	非活動期	Col	3.3
22	36	F	+	完全型	眼底型	非活動期	CsA	11
23	34	F	+	完全型	眼底型	非活動期	Col	2.5
24	46	M	+	不全型	眼底型	活動期	FK	6
25	61	M	-	完全型	眼底型	活動期	Col	8.4

Col: コルヒチン, FK: FK506, CsA: シクロスポリン。

tories Inc., Rancho Dominguez, CA)/90% Roswell Park Memorial Institute 1640培養液 (RPMI 1640) (GIBCO BRL, Grand Island, NY)/Kanamycin 60mg/l に浮遊した。白血球分離はすべて採血後3時間以内に終了し、4°Cで遠心分離し、その他の過程は水中で行った。

2) 細胞培養

10%FCS-RPMI 1640に浮遊したPMNを、37°C・5%CO₂-incubatorで培養した。12-*o*-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 10ng/mlを加えた群も作製し、同様の条件でPMNを培養した。24, 48時間後に上清を採取し、使用時まで-80°Cで保存した。細胞のviabilityはトリパンブルー染色で確認した。

3) PMNのC3分泌量の測定

PMN培養上清中のC3蛋白量の測定は、C3dに対する抗体を用いてPeakmanら²²⁾の方法を改良したsandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法で行った。炭酸重炭酸緩衝液で500倍希釈したウサギ抗ヒトC3dポリクローナル抗体(DAKO, Glostrup, Denmark)をマイクロプレートに100 μ l分注し、4°Cで一晩放置して固相化した。一次抗体を除き、0.1% bovine serum

albumin(BSA) (Sigma)加0.05%Tween 20-PBS(-) (T-PBS)200 μ lを加え、ブロッキング反応を37°Cで1時間行った。T-PBSで3回洗浄し、PMN培養上清100 μ lを加えて37°Cで2時間反応させた。T-PBSで3回洗浄後、0.5%BSA-T-PBSで1,000倍希釈したペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ヒトC3dポリクローナル抗体(DAKO) 100 μ lを加えて37°Cで2時間反応させた。T-PBSで3回洗浄後、3,3',5,5'-tetramethylbenzidine 100 μ lで発色させ、15分後に2N硫酸100 μ lを添加して反応を停止し、プレートリーダー(モデル3550 EIAリーダー, BIO-RAD社)で吸光度(optical density: OD 495nm)を測定した。全ての検体は培養上清採取後、2週間以内にtriplicateで測定し、その平均値を求めた。

4) PMNにおけるC3mRNAの発現

C3mRNAの発現は、reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)でC3mRNAを増幅後、これをmembraneにトランスファーし、cDNAとhybridizationすることにより検索した(図1)。mRNAは、培養後のPMNからRNA isolation Kit (Stratagene, La Jolla, CA)を用いてtotal RNAを抽出し、Oligo (dT) (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)により

オリゴヌクレオチドプライマー

Ex3, 5' ATCCCAGCCAACAGGGAG 3' (328-345)

Ex8, 5' AAAGGCAGTTCCTCCACTTT 3' (850-870)

denaturation	94°C	1 min] 35 cycles
annealing	57°C	1 min	
extension	72°C	2 min	

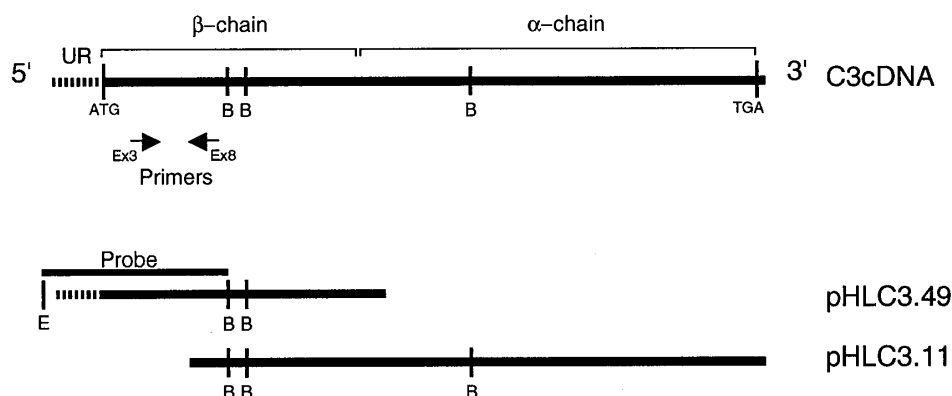


図1 ヒトC3cDNAの遺伝子構造および使用したプライマーとプローブ

UR: untranslated region, Cleavage site for the restriction enzymes BamH1 (B) and EcoR1 (E).

ポリ(A)⁺RNAを精製した。RT-PCRは、精製したmRNAよりMoloney murine leukemia virus reverse transcriptase (GIBCO)によってcDNAを合成後、C3 β 鎖のexon 3からexon 8部分を増幅した¹⁹⁾²³⁾。増幅条件は、denaturation 94°C 1分、annealing 57°C 1分、extension 72°C 2分で、35サイクル行った。PCR産物は1.2%アガロースゲルで電気泳動後、ナイロンフィルターHybond-N (Amersham Life Science, Buckinghamshire, England)にトランスファーした。プラスミドDNA (American Type Culture Collection 59111, clone pHLC 3.49)を制限酵素EcoR1とBamH1で切断し、RT-PCR増幅部位を完全に含む1286 base pairのDNAをThe GENE CLEAN II Kit (Bio 101 Inc., La Jolla, CA)で精製し、プローブとした。プローブはOligolabelling kit (Pharmacia Biotech)を用いて³²P-dCTP標識し、カラムで精製してから使用した。フィルターを標識プローブと65°Cで一晩hybridization (5× sodium citrate-sodium chloride; SSC, 5× Denhardt's solution, 100mg/ml salmon sperm DNA, 0.5% sodium dodecyl sulfate; SDS, 10% dextran sulfate)した。0.1% SDS+0.1×SSC, 65°Cでフィルターを洗浄し、X線フィルムに感光

させた。

陽性コントロールとした β -actinの電気泳動ポラロイド写真とC3をサザンブロットハイブリダイゼーションしたX線フィルムは、パブリックドメインソフトのNIH imageを用いて他覚的にバンドを評価した。ポラロイド写真はgreyを反転させて半定量した。各々の測定値から、C3/ β -actin \geq 0.6をバンドあり、C3/ β -actin $<$ 0.6をバンドなしと判定した。またTPAに対する反応では、C3/ β -actinの値が、TPA添加群/無添加群 $>$ 1を増加、TPA添加群/無添加群 \leq 1を非増加と判別した。

5) B病患者の背景因子とPMNのC3産生能との関係

背景因子としては、①年齢、②性別、③HLA-B51抗原保有の有無 (Terasaki-NIH Standard法)、④病型、⑤活動性、⑥内服治療薬の種類、⑦眼病歴、⑧同時に採血した血液検査データ (白血球数、PMN数、血小板数、血沈、CRP、CH50、C3およびC4蛋白量)、⑨Nussenblattらのscoring system²⁴⁾に従った眼症状と当教室で用いている眼外症状のスコア(表2)、⑩眼発作後の推移などと末梢血PMNのC3産生能との関係を検討した。

表2 Scoring system

<眼症状>	
1) 前房中細胞	0 : 0~4個 1 : 5~10個 2 : 11~20個 3 : 21~50個 4 : 51個以上 5 : hypopyon
2) 前房中フレアー	0 : なし 1 : かすかな混濁 2 : 明瞭な混濁 3 : 強い混濁 4 : フィブリンを伴う強い混濁
3) 硝子体混濁	0 : 全く正常眼底と同様にみえる 1 : 後極は明瞭にみえるが、硝子体中に焦点を合わせると多少の混濁あり 2 : 後極の詳細は分かるが、みえかたがややぼやける 3 : 後極の詳細がかすんでみえる 4 : 後極の詳細がかろうじてみえる 5 : 後極の詳細が全くみえない
4) 眼底 (網膜血管炎・網脈絡膜病変・黄斑浮腫・視神経炎・網膜新生血管)	0 : 症状なし 1 : 軽度 2 : 中等度 3 : 著明
<眼外症状>	
口腔内アフタ性潰瘍 外陰部潰瘍 皮膚症状 副睾丸炎	0 : 症状なし 1 : 4週間のうち半分未満の期間にわたり症状が存在 2 : 4週間のうち半分以上の期間わたり症状が存在 3 : 症状が常に存在
関節炎 消化器症状 血管症状 中枢神経症状	0 : 症状なし 1 : 軽度 2 : 中等度 3 : 高度

6) 統計学的処理

測定結果は平均値±標準偏差で表記した。統計学的有意差検定には、t検定、Mann-WhitneyのU検定、 χ^2 検定、Fisherの直接確率法、Pearson相関係数、Spearman順位相関係数、一元配置分散分析法を用いた。p<0.05(両側検定)をもって有意差ありと判定した。

結 果

1. 白血球分離

末梢静脈血から分離したPMNの平均純度は98.4%であった。

2. PMNのC3分泌量の測定

はじめにPMNの24時間培養群と48時間培養群との間でPMN培養上清中の吸光度を比較し、両群に差がないことを確認し(p=0.999, paired t-test)。以下の実験にはPMNの24時間培養を用いた。PMN培養上清中の吸光度は、B病患者は 0.667 ± 0.241 ODで、健常対照の 0.477 ± 0.174 ODに比べて有意(p=0.014, unpaired t-test)に高値を示した(図2)。

3. PMNにおけるC3mRNAの発現

RT-PCRでは、543 base pairのC3のバンドが肉眼で確認できる例が少なかった。予備実験では、RT-PCRのテンプレートに用いたC3cDNAが

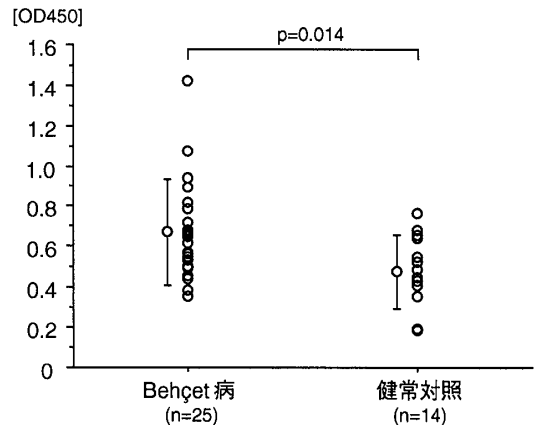


図2 無刺激で培養時の上清中のC3
バーは標準偏差を示す(以下、同様)。B病のC3は、健常対照に比べて有意に高値であった(p=0.014, unpaired t-test)。

0.005pg/mlまでサザンブロットハイブリダイゼーションで検出されたが(図3)、PMNからのRT-PCRでバンドのみえない症例においても、サザンブロットハイブリダイゼーションによりC3 mRNAの検出が可能であった。NIH imageの解析によるバンドの判定では、B病患者群の陽性例は25例中12例(48.0%)で、健常対照の14例中4例(28.6%)より多い傾向を認めたが、有意の差ではなかった(p=0.237, χ^2 検定)。

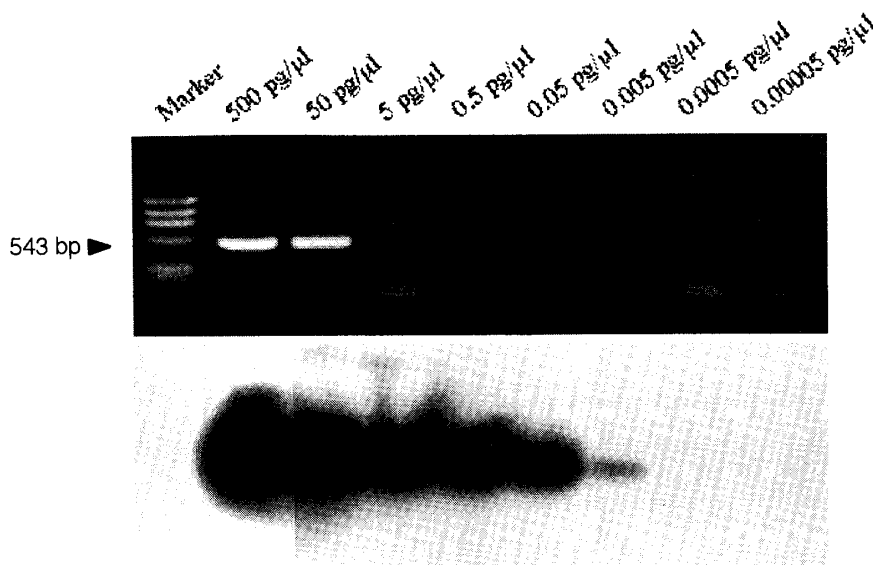


図3 C3cDNAのRT-PCRおよびサザンブロットハイブリダイゼーション
RT-PCRでバンドの明らかでないC3cDNA 0.005pg/μlまで、サザンブロットハイブリダイゼーションでは検出可能であった。

4. TPA が PMN の C3分泌と C3mRNA 発現に及ぼす影響

ELISA 法において TPA を添加した培養群の

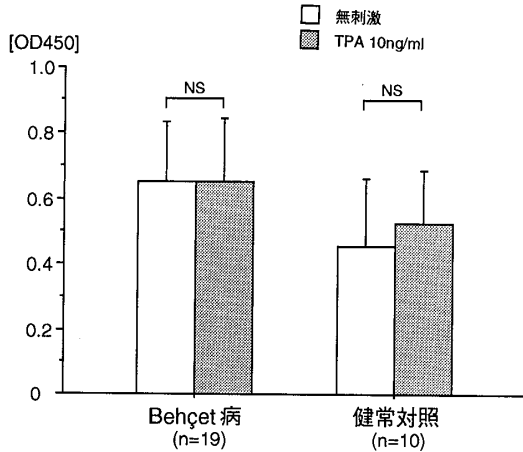


図4 TPA 添加による PMN 培養上清中の C3 の変化

NS: not significant.

B 病では、TPA 添加による C3 の有意な増加はなかった ($p=0.837$, paired t-test). 健常対照は TPA 添加により C3 の増加がみられたが有意ではなかった ($p=0.109$, paired t-test).

C3 分泌量は、B 病患者では増加せず、無添加群とほぼ同様の値であった。健常対照では TPA 添加によって PMN の C3 分泌量に増加傾向がみられたが有意の差はなかった ($p=0.109$, paired t-test) (図4)。一方、NIH image による解析では、C3mRNA の増加例が B 病患者では19例中7例 (36.8%)、健常対照は10例中8例 (80.0%) であり、健常対照に増加傾向 ($p=0.050$, Fisher の直接確率法) を認めた (図5・表3)。ELISA 法とサザンブロットの NIH image による解析結果を表4にまとめた。C3mRNA の発現の増加と C3 分泌の増加の両者が同時にみられたのは、健常対照では10例中7例、B 病患者では19例中4例であった。

表3 TPA 刺激による PMN の C3mRNA 発現の変化

	Behçet 病	健常対照
C3mRNA 発現の減少・不変	12/19 (63.2%)	2/10 (20.0%)
C3mRNA 発現の増加	7/19 (36.8%)	8/10 (80.0%)

TPA 添加群/TPA 非添加群 > 1.0 を増加例とした。

TPA 添加で、健常対照は B 病よりも C3mRNA 発現が増加する例が多かった ($p=0.050$, Fisher の直接確率法)。

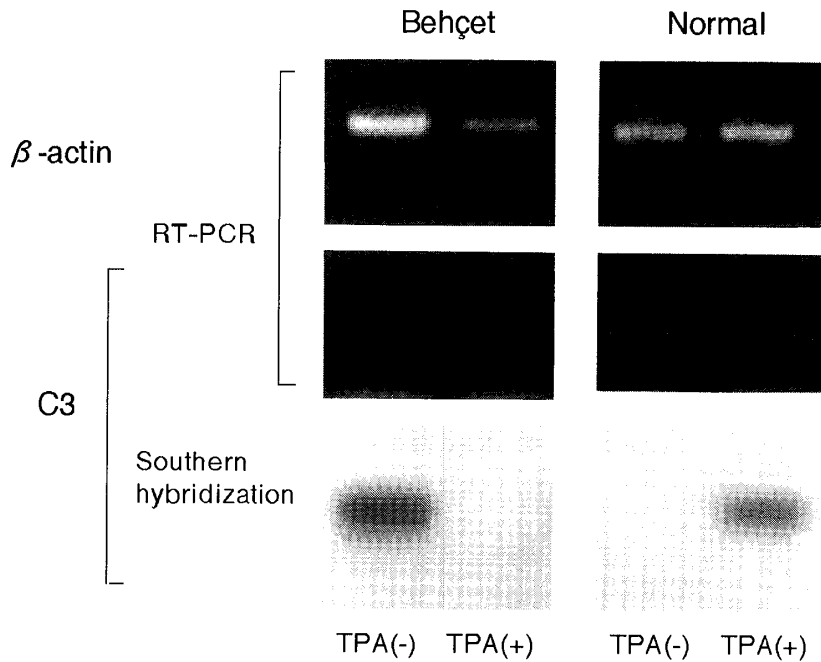


図5 PMN における C3mRNA の発現

B 病は無刺激で培養時にバンドの検出された1例を、健常対照は無刺激ではみられなかったバンドが TPA 添加により検出可能となった1例を示す。いずれも RT-PCR では検出不能であった。

表4 TPA刺激に対するC3mRNA発現とC3分泌量の変化

	C3mRNA発現	C3分泌量	症例数
健常対照 n=10	+	+	7(70)
		-	1(10)
	-	+	1(10)
		-	1(10)
Behçet病 n=19	+	+	4(21)
		-	3(16)
	-	+	6(32)
		-	6(32)

+：増加，-：減少または不変。

TPA添加群/TPA非添加群>1.0を増加例とした。

()内は%を示す。

C3mRNAの発現が増加したにもかかわらずC3分泌が減少したのは、健常対照では10例中1例、B病患者では19例中3例であった。C3mRNAの発現が増加せずにC3分泌が増加したのは、健常対照では10例中1例、B病患者では19例中6例であった。また、TPA刺激に全く反応せず、C3mRNAの発現もC3分泌も増加しなかったのは、健常対照では10例中1例、B病患者では19例中6例であった。

5. B病患者における背景因子とPMNのC3分泌およびC3mRNA発現の検討

PMN 24時間培養上清中のC3蛋白量は、①年齢、②性別、③HLA-B51抗原保有の有無、④病型、⑤活動性、⑥内服治療薬の種類、⑦眼病歴、⑧同時に採血した血液検査データ、⑨眼症状および眼外症状のスコアとの間に、有意の相関あるいは有意の差を認めなかった。全PMN数で算定したC3蛋白量とこれらとの間にも、有意の相関や有意の差がなかった。C3mRNAの発現例(12例)は非発現例(13例)に比べて、眼症状と眼外症状のスコアが有意に高かった(眼スコア $p=0.012$ 、全身スコア $p=0.014$ 、Mann-WhitneyのU検定)。他の背景因子については、C3mRNAの発現の有無による差は認められなかった。眼発作とPMNのC3分泌量との関係を、眼発作の時期が明らかな8例について検討した結果、C3分泌量は発作2日前

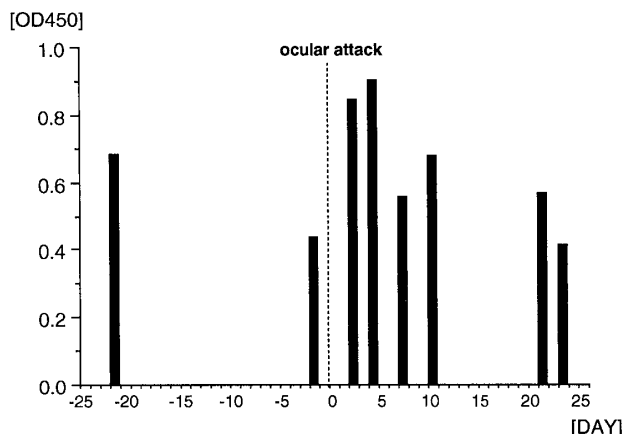


図6 B病の眼発作とPMN培養上清中のC3発作直前に一過性低値を示し、発作直後には高値となり、経過に伴い徐々に低下した。発作後の6例では、負の相関関係がみられた($r=-0.832$, $p=0.038$, Pearson相関係数)。

に一過性に低値(0.43OD)を示し、発作後急に上昇し、発作後4日目には最高値(0.89OD)となり、経過に従って徐々に低下していく変動がみられた(図6)。8例のうち眼発作後の6例(症例3, 5, 6, 7, 8, 20)に限っては、発作後の経過日数とC3分泌量との間に負の相関($r=-0.832$, $p=0.038$, Pearson相関係数)があり、眼スコアや全身スコアとC3分泌量の間には正の相関を認める傾向があった(眼スコア： $\rho=0.675$, $p=0.182$ 、全身スコア： $\rho=0.675$, $p=0.182$, Spearman順位相関係数)。また、この6例中、C3mRNAの発現は、眼発作から2, 4, 7, 10, 21日目に採取した症例のPMNに認められ、23日目の症例には認められなかった。

考 察

1. B病における補体系と白血球のかかわり

B病の病態形成には、PMNの機能異常が深く関与していると考えられている。眼症状の特徴として古くから挙げられている前房蓄膿性虹彩毛様体炎は大部分がPMNで占められ¹²⁾、他の病変局所においてもPMNを主体とした強い炎症細胞の浸潤が観察されている。

一方、B病の血清補体価は、平均では健常成人より高値であるが、臨床経過に伴い一過性に異常低値が観察され、これは補体の古典経路と第2経

路の両反応経路を介した活性化によることが各補体成分の活性の測定から明らかにされ、補体の中ではC3が中心的役割を果たしていると考えられている¹³⁾¹⁴⁾。低補体価に一致したC3蛋白量の低下はなく、むしろ増加傾向がみられることから、本症の場合には特に病態と関連した補体の活性化による消費が考えられ、C3の産生能はむしろ亢進していると思われる。補体が活性化されると、活性化された補体成分やそのフラグメントによって種々の生物活性が惹起される。本症では血清補体価の異常低値に一致して、炎症性補体フラグメントC4a, C3a, C5aに増加が認められている¹⁵⁾¹⁶⁾。これら補体フラグメントには、アナフィラトキシン作用やPMNの走化性亢進作用があり、PMNに働いて活性酸素を産生させる作用もある。中でもC5aは直接または間接的に単球に働き、強力なPMN走化活性を持つinterleukin-8(IL-8)産生を誘導することが示されている。補体の活性化で生成された他の補体フラグメントも、血中で白血球や単球、マクロファージなどの標的細胞に表現される補体レセプター(complement receptor:CR)を介して結合し、免疫粘着反応、活性酸素放出、リンホカイン産生、細胞融解、殺菌反応など多彩な生物活性を示す。

近年、ヒトPMNがC3を産生することが明らかとなり、Fariedらは全身性エリテマトーデス患者のPMNでC3の分泌が亢進していることを報告している¹⁷⁾。今回、B病においても末梢血PMNからC3が産生され、量的にも健常対照に比べて明らかに多いことを報告した。更に、TPA刺激に対するPMNのC3産生能の変化を蛋白および遺伝子レベルで調べ、本症におけるPMNと補体系の関係について考察した。

2. PMNのC3分泌量の測定について

PMN培養上清中のC3蛋白量は、B病は健常対照より有意に多かった。ELISAに用いた抗ヒトC3d抗体は、C3分子上のC3dエピトープおよび遊離C3dの両方を認識し、一分子のC3が分解されると一分子のC3dが産生されることから、測定したC3dの蛋白量はC3の蛋白量と等しい。また、PMNは培養に際して十分に洗浄して血清中の

C3および遊離C3dを除いているため、本報告の測定結果は培養PMNよりのC3分泌量のみを表すと考えられた。

3. TPAがPMNのC3産生に与える影響

CキナーゼのアゴニストであるTPAは細胞膜を通過して直接Cキナーゼを活性化し、細胞内シグナル伝達を促進する。ヒトPMNのC3分泌は、TPA, dioctanoyl glycerol, mezereinなどのprotein kinase C(PKC) activatorによって亢進することから、TPAにはPKCを介してPMNのC3分泌を促進する作用があると報告されている¹⁷⁾。本報告でTPAを添加した場合のB病PMNからのC3分泌量はほとんど変化がなかったのに対して、健常PMNにはC3分泌量の増加傾向がみられた。また、TPA刺激によるC3 mRNA発現の増加がB病では36.8%、健常対照では80.0%にあった。TPAは広範囲な生物学的作用を有するが、PMNにおけるC3の産生に関しては、分泌促進作用のみでなく遺伝子レベルにも作用しているようである。以上から今回の結果は、正常PMNではPKCを介してC3を分泌しているが、活性化されていなかったために添加されたTPAに反応してC3mRNAの発現を増し、C3の分泌量が増加したと考えられた。しかし、B病PMNは既に活性化されてC3分泌能が亢進していたためTPAを加えても分泌量に変化がなかったと考えた。

4. B病PMNのC3産生能について

B病では既に述べたように、補体が活性化され種々の生物活性の存在が報告されている。しかし、補体の標的細胞に表現されるCR1, CR2, CR3や補体制御因子membrane cofactor protein(MCP), decay accelerating factor(DAF), membrane attack complex inhibition factor(MACIF)が健常成人より低下していることが示されている²⁵⁾²⁶⁾。その理由として、これらの細胞自体の異常やこれらの細胞が血中で度重なる補体の活性化によって、既にプライミングされている可能性が考えられている。B病のPMNはTumor necrosis factor- α やIL-8を産生し、オートクラインの機序で、PMNが活性化されると報告されて

いる¹¹⁾。B病ではPMNからのC3分泌は亢進しているが、PMNにTPAを添加培養しても、健常PMNでは亢進するC3分泌やC3mRNAの発現はみられなかった。今回は、PMNの細胞内におけるC3産生量を定量していないため、C3の合成が翻訳レベルで亢進しているか否かは不明であるが、少なくとも転写レベルでの亢進はなかったと思われた。この理由としては、既にB病PMNが血中で活性化され、プライミングされているためと考えるのが妥当のようである。

5. B病の疾患活動性とPMNのC3産生能との関連

B病の疾患活動性を全身的に捉えて、PMNのC3分泌量とC3mRNAの発現を検討したところ、本報告では活動期と非活動期との間に差がなかった。一方、眼活動性を指標として発作の時期が明らかでない症例のみを検討すると、眼発作前後でPMNのC3分泌量に大きな変動がみられ、この変動はこれまで報告されているCH50の動向¹³⁾と似ていた。B病の諸症状の中でも、眼症状は発作の自覚が明確で、他覚的にも正確な所見が得られやすく、疾患活動性の信頼できる指標となる。眼発作後の6例において、眼スコアや全身スコアとPMNのC3分泌量が正の相関を示し、C3mRNAの発現が眼発作直後から3週間後までみられたことは、眼発作前後の補体系の変動にPMNから産生されるC3も関与していることを示唆するものと考えられた。

結 論

B病における末梢血PMNのC3産生能を検討し、以下の結果を得た。

1. B病PMNではC3の分泌量が増加していたが、C3mRNAの発現は健常PMNと変わらなかった。

2. TPA刺激により、健常PMNはC3mRNAの発現を増し、C3の分泌量が増加したが、B病PMNはTPA刺激に反応せずC3mRNAの発現とC3の分泌量はともに変化しなかった。

3. B病PMNのC3の分泌量は、眼発作時に高値であったが、経過とともに低下した。

以上から、B病末梢血PMNではC3の分泌能

が亢進しており、in vivoでプライミングされている可能性が示唆され、PMNから産生されたC3が病態形成の一端を担っていると考えられた。

本研究をまとめるにあたり、終始ご指導とご校閲を賜りました東京女子医科大学眼科学小暮美津子教授、ならびに東京女子医科大学解剖学・発生生物学相川英三教授、西川 恵講師に心から深謝いたします。また、貴重なご助言をいただきました東洋大学工学部奥田智子教授に感謝いたします。研究にご協力いただきました眼科学教室、解剖学・発生生物学教室の諸先生に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Matsumura N, Mizushima Y: Leucocyte movement and colchicine treatment in Behçet's disease. *Lancet* ii: 813, 1975
- 2) Efthimiou J, Addison IE, Johnson BV: In vivo leucocyte migration in Behçet's syndrome. *Ann Rheum Dis* 48: 206-210, 1989
- 3) 粕川禮司, 鈴木秀幸, 佐藤幹夫ほか: ベーチェット病と免疫複合体. 厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班昭和54年度研究業績: 40-41, 1979
- 4) Pronai L, Ichikawa Y, Nakazawa H et al: Enhanced superoxide generation and the decreased superoxide scavenging activity of peripheral blood leukocytes in Behçet disease—Effects of colchicine. *Exp Rheumatol* 9: 227-233, 1991
- 5) Niwa Y, Miyake S, Sakane T et al: Auto-oxidative damage in Behçet disease—Endothelial cell damage following the elevated oxygen radicals generated by stimulated neutrophils. *Clin Exp Immunol* 49: 247-255, 1982
- 6) 西川 恵, 佐藤孝子, 樋口千恵子ほか: ベーチェット病における多核白血球の活性酸素産生とサイトカインによる調節機構. 厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班平成2年度研究業績: 85-90, 1990
- 7) 橋本喬史: ベーチェット病と炎症. *炎症* 1: 354-361, 1981
- 8) 難波克彦: ベーチェット病の眼発作型と白血球ライソゾーム酵素. *日眼会誌* 85: 1463-1467, 1981
- 9) 大原守弘, 粕川禮司: 好中球の細胞傷害作用. *最新医* 43: 304-307, 1988
- 10) Ohara M, Shirdo M, Miyata M et al: Natural and antibody-dependent cellular cytotoxicity of polymorphonuclear leukocytes. *Tohoku J Exp Med* 140: 59-66, 1983
- 11) 西川 恵, 古川浩司, 兼岡秀俊ほか: ベーチェット

- ト病における好中球の自己産生サイトカイン。厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班平成4年度研究業績：122-124, 1992
- 12) 嶋田孝吉, 矢尾阪英文, 鹿野信一：Behçet 病患者房水中の白血球遊走活性。日眼会誌 75：2100-2105, 1971
 - 13) 小暮美津子, 原 弘子, 嶋田孝吉：ベーチェット病における補体。日眼会誌 75：1260-1268, 1971
 - 14) 小暮美津子, 大野弓子：Behçet 病における alternate complement pathway。日眼会誌 79：172-176, 1975
 - 15) 吳 朋子, 小暮美津子, 福田尚子：ベーチェット病における補体分解産物 C4a。臨眼 48：666-667, 1994
 - 16) 小暮美津子, 島川眞知子, 高橋義徳ほか：ベーチェット病における補体分解産物 C3a, C5a。眼臨医報 86：1068-1072, 1992
 - 17) **Faried HF, Tachibana T, Okuda T**: The secretion of the third component of complement (C3) by human polymorphonuclear leukocytes from both normal and systemic lupus erythematosus cases. *Scand J Immunol* 37：19-28, 1993
 - 18) **Okuda T, Tachibana T**: Secretion and function of the third component of complement (C3) by murine leukocytes. *Int Immunol* 4：681-690, 1992
 - 19) **Botto M, Lissandrini D, Sorino C et al**: Biosynthesis and secretion of complement component (C3) by activated human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol* 149：1348-1355, 1992
 - 20) 厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班：1987年ベーチェット病診断基準。厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班昭和61年度研究業績：16-17, 1986
 - 21) 橋本喬史：ベーチェットにおける疾患活動性の評価。厚生省特定疾患ベーチェット病調査研究班平成5年度研究業績：58-61, 1993
 - 22) **Peakman M, Lobo-Yeo A, Senaldi G et al**: Quantification of C3d in biological fluids by an enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunol Methods* 104：51-56, 1987
 - 23) **Maarten HL, de Brujin, Feyn GH**: Human complement component C3: cDNA coding sequence and derived primary structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 82：708-712, 1985
 - 24) **BenEzra D, Forrester JV, Nussenblatt RB et al**: Uveitis Scoring System. Springer-Verlag, Berlin・Heidelberg (1991)
 - 25) 金井久美子, 小暮美津子, 福田尚子ほか：ベーチェット病における補体レセプター CR2。臨眼 44：629-663, 1990
 - 26) 吳 朋子, 小暮美津子：ベーチェット病における補体制御因子 CR1, MCP, DAF, MACIF。日眼会誌 100：376-380, 1996