

原 著

ベーチェット病患者の虹彩における補体制御因子の 免疫組織学的検討

¹⁾東京女子医科大学 眼科学教室 (主任:小暮美津子教授)²⁾同 解剖学・発生生物学教室

クレ トモコ コグレ ミツコ チン レイリ
呉 朋子¹⁾ ・ 小暮美津子¹⁾ ・ 陳 麗理¹⁾
ニシカワ メグミ アイカワ エイゾウ
西川 恵²⁾ ・ 相川 英三²⁾

(受付 平成9年7月15日)

Immunofluorescence Study of Complement Regulatory Proteins in Irises from Patients with Behçet's Disease

Tomoko KURE¹⁾, Mitsuko KOGURE¹⁾, Li-Li CHEN¹⁾,
Megumi NISHIKAWA²⁾ and Eizo AIKAWA²⁾

¹⁾Department of Ophthalmology (Director: Prof. Mitsuko KOGURE),²⁾Department of Anatomy and Developmental Biology, Tokyo Women's Medical College

Although it's known that complement regulatory proteins, which protect self-cells from activation of the complement, spread widely in a living body, we haven't had any reports about the existence of them in the human iris yet.

In this study, we used an immunofluorescence technique and investigated the expression of C3bC4b receptor (CR1), membrane cofactor protein (MCP) and decay accelerating factor (DAF), which inhibit activation of C3, and homologous restriction factor 20 (HRF20), which inhibits activation of C9, in irises from 7 patients with Behçet's disease and 7 patients with glaucoma but without uveitis as controls.

CR1, MCP and DAF weren't observed in any patients. HRF20 was expressed on endothelial cells of vessels, iris stroma and iris pigment epithelium in all patients. Comparing the patients and the controls, revealed no significant differences. From these results, we propose as for activation of the complement system in the human iris, acceleration of vascular permeability and chemotactic activity of polymorphonuclear leucocytes, which are caused by activation of C3, occur easily and that cytolysis, which is caused by activation of C9, hardly occurs. We also propose the result that the less existence of complement regulatory proteins in the patients concerns the pathogenesis of the disease.

緒 言

ベーチェット病は口腔粘膜の再発性アフタ性潰瘍, 皮膚症状, 外陰部潰瘍, および眼症状を4大主症状とする原因不明の炎症性疾患で, 諸症状が再発と寛解を繰り返しながら慢性遷延性に経過する全身性疾患である。特に眼症状は重篤であれば

失明に至る率が高いため, 我々は今までに補体系を中心に眼症状増悪因子について検討してきた。

ベーチェット病の炎症局所には強い白血球の浸潤が観察され, 定型的な眼症状である再発性前房蓄膿性虹彩毛様体炎でみられる前房蓄膿細胞の大部分は白血球で占められる。患者白血球には貪食

能¹⁾や遊走能²⁾³⁾の亢進, 活性酸素産生能¹⁾⁴⁾⁵⁾やサイトカイン産生能⁵⁾⁶⁾の亢進などの機能異常が認められる。また, 補体系においては血清補体価や補体分解産物の値がその病期によって変動することが観察され^{7)~10)}, これらが炎症反応に重要な役割を果たすことが示唆されている。

一方, 補体の反応系には自己細胞を活性化された補体の侵襲から守り, 自己細胞に不要な反応を起こさないための自己防御システム, つまり補体制御因子が存在する¹¹⁾。これら補体制御因子は, 血球系をはじめ生体内に広く分布しており, 臓器によっては各補体制御因子の局在や発現強度が異なり^{12)~14)}, 病態によっても変化するとされている¹⁵⁾¹⁶⁾。しかし, 虹彩における補体制御因子の局在についての報告はまだない。

以前我々は, ベーチェット病患者末梢血の細胞表面に存在する補体制御因子を測定し, 補体第3成分(C3)の活性化を抑えるC3bC4b receptor (CR1)とmembrane cofactor protein (MCP)の明らかな低値に加え, 同じくC3の活性化を抑えるdecay accelerating factor (DAF)と, C9の活性化を抑えるhomologous restriction factor 20 (HRF20)にも低い傾向があることを明らかにした¹⁷⁾。この結果はベーチェット病の末梢血レベルでは補体制御因子の機能低下があり, これらがあいまって本症の病態形成に深く関与している可能性の高いことを示していた。

そこで今回は, ベーチェット病の炎症の場の一つである虹彩における補体制御因子の存在や動向を検討することを目的とし, 眼内手術時に切除された虹彩を用いて免疫組織学的研究を行った。また, これまでに虹彩における補体制御因子の存在や局在についての報告もないので併せて検討することも目的とした。

対象および方法

1. 対象

対象は東京女子医科大学病院眼科外来通院中のベーチェット病患者7例で, その内訳は厚生省ベーチェット病調査研究班が1987年度に作成した診断基準による完全型5例, 不全型2例, 男性3例, 女性4例, 平均年齢 42.3 ± 11.0 歳であった(表

表1 対象

	症例	性別	年齢	病型
ベーチェット病	1	M	39	完全型
	2	F	23	不全型
	3	F	56	完全型
	4	F	54	完全型
	5	F	39	完全型
	6	M	40	完全型
	7	M	45	不全型
対照者(緑内障)	1	M	57	POAG
	2	F	75	POAG
	3	M	59	POAG
	4	M	79	POAG
	5	M	59	POAG
	6	M	84	NTG
	7	M	80	PACG

POAG: 開放隅角緑内障, NTG: 正常眼圧緑内障, PACG: 閉塞隅角緑内障。

1)。眼病型はすべて網脈絡膜炎型で, 手術は緑内障2例(症例3, 5), 白内障5例であった。対照は, 自覚的, 他覚的にぶどう膜炎の既往のない緑内障患者7例(開放隅角緑内障5例, 正常眼圧緑内障, 閉塞隅角緑内障各1例)を用いた。その内訳は男性6例, 女性1例, 平均年齢 70.4 ± 11.6 歳であった(表1)。

以上の14例すべての患者に手術時に切除し本来であれば廃棄される虹彩を研究に使用すること, およびその目的を説明し, 承諾を得た。

2. 方法

すべての検体は, 虹彩切除後ただちに4%パラフォルムアルデヒドで4°C, 2時間固定後, 30%シュクロースで室温, 1時間洗浄した。その後OCT compaund (Tissue Tec)に包埋し, 液体窒素もしくはドライアイス・アセトンで急速に凍結し-80°Cで保存し, 後に-20°Cでクリオスタットで4μmの厚さに薄切した。凍結切片は, 3%過酸化水素水で1日4°Cでメラニン色素を脱色し, 1%酢酸水で室温で10分間中和後, 以下のモノクローナル抗体(MoAb)を一次抗体として間接酵素抗体法で染色した。MoAbは, ①CR1: 抗ヒトCD35MoAb(Cosmobio), ②MCP: 抗ヒトCD46MoAb (Immunotech), ③DAF: 抗ヒトCD55MoAb (Immunotech), ④HRF20: 抗ヒトCD59MoAb (Serotec)を用いた。陰性対照は一次抗体

表2 虹彩における補体制御因子の染色性

	症例	CR1	MCP	DAF	HRF20
ペーチェット病	1	-	-	-	±
	2	-	±	-	+
	3	-	-	-	+
	4	-	-	-	+
	5	-	-	-	±
	6	±	-	-	+
	7	-	-	-	±
対照者(緑内障)	1	-	-	-	+
	2	-	-	-	-
	3	-	-	-	+
	4	-	-	-	+
	5	-	-	-	±
	6	-	+	-	+
	7	-	-	-	+

- : 陰性, ± : 偽陽性, + : 陽性.

に0.01%リン酸緩衝食塩水と正常マウス IgG-1 (Chemicon) を用いたものとした.

間接酵素抗体法には LSAB キット (DAKO) を使用し, 発色にはアルカリフォスファターゼを用い, 内因性アルカリフォスファターゼの阻止にレバミゾールを使用した. 最後にメチルグリーンで核染色を行い光学顕微鏡で観察した. 染色性については, 明らかに染色されたものを陽性(+), 染色されていないものを陰性(-), わずかに染色されたが染色性が弱いものを偽陽性(±)として評価した.

また, 補体制御因子の加齢性変化の有無を知る参考として, 健常人の末梢血の細胞表面に存在する補体制御因子 (CR1, MCP, DAF-39例, HRF20-18例) を既報¹⁷⁾に従って測定後, 20~39, 40~59, 60~79, 80歳以上の4つに分類し, それぞれの値を比較検討した.

統計学的検討は Mann-Whitney の U 検定と t 検定で行い, 5%以下を有意とみなした.

結 果

1. CR1, MCP, DAF の染色性 (表2)

CR1, MCP, DAF は対照者の1例に MCP が染色されたのみで, 他には明らかな陽性所見はみられなかった.

2. HRF20の染色性 (表2)

HRF20は対照者の1例を除いたすべての検体

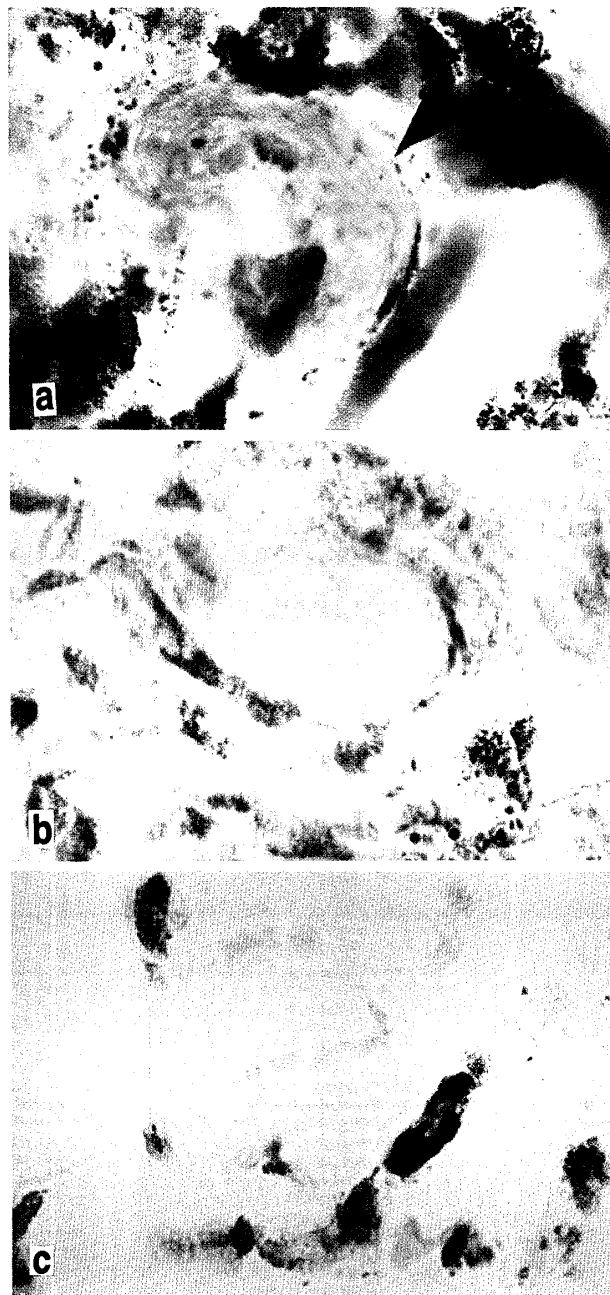


図1 虹彩における免疫組織学的染色

a. HRF20: 血管内皮細胞 (矢印) に染色性を認める (×500). b. 陰性対照 PBS: 血管内皮細胞には染色性を認めない (×500). c. 陰性対照 正常マウス IgG1: 血管内皮細胞には染色性を認めない (×500).

で陽性所見がみられた. ペーチェット病と対照者の間で有意な染色性の差は認められなかった. HRF20が染色された部位はペーチェット病, 対照者ともに血管内皮細胞と虹彩基質や虹彩色素上皮で, 血管内皮細胞に強い染色性がみられた. また, 各症例間では HRF20の染色部位に差はみられな

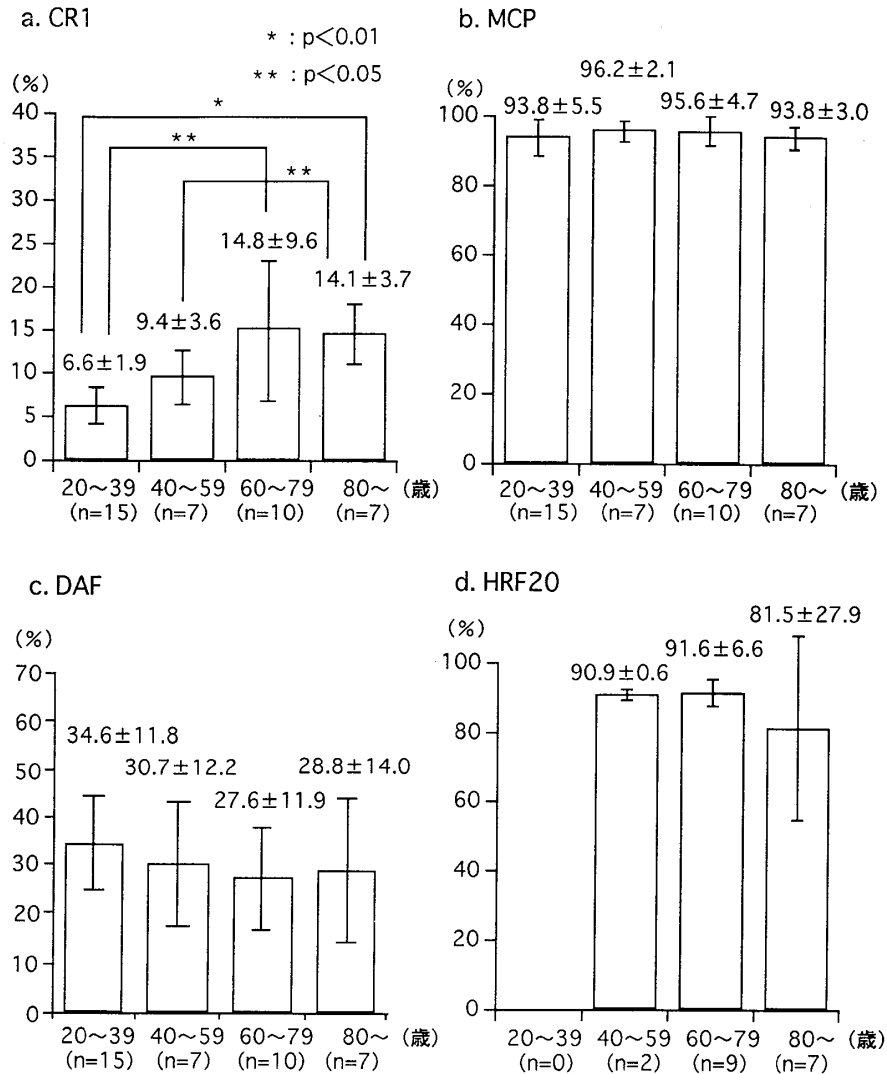


図2 健康人末梢血中の補体制御因子の年齢による変化

a. CR1は年齢が上昇するにつれてその値も上昇している。b~d. MCP, DAF, HRF20は年齢による変動を認めない。図の棒グラフは平均値、縦線は標準偏差を表わす。

かった。図1aでピンク色に染色している部位がHRF20陽性を示し、水色の部位はメチルグリーンによって染色された核、茶色の部位は脱色しきれしていないメラニン色素である。

3. 陰性対照について

CR1, MCP, DAF, HRF20すべてに染色性はみられなかった(図1b, c)。

4. 補体制御因子の加齢性変化について(図2)

CR1は年齢が上昇するにつれてその値も高くなる傾向があり、20~39歳は60~79, 80歳以上と比較して有意に低値を示した($p < 0.05$, $p < 0.01$)。また40~59歳も80歳以上と比較すると有意に低値

を示した($p < 0.05$)。

一方、MCP, DAF, HRF20ではすべて有意差はみられず、年齢による変動は認めなかった。但し、HRF20の20~39歳については該当する症例がなかったため検討を行っていない。

考 察

補体系は侵入異物を認識し、その情報を食細胞や免疫細胞、炎症細胞に伝達し除去する強力なエフェクターである。補体の反応経路の中で、C3が活性化されるとアナフィラトキシン活性や多核白血球遊走活性などを有する補体分解産物が産生され、局所の炎症を強力に修飾し、またC9が活性化

されると膜障害複合体が形成され細胞溶解をきたす。補体制御因子は活性化された補体系から自己細胞を守る働きを持ち、中でも主要なものとして、プロテアーゼ I 因子のコファクターとして働き、膜表面の C3b を iC3b に、C4b を iC4b に分解し、C3 の活性化を抑える MCP、C4b や C3b に結合し、これらが C2 や B に結合するのを阻害したり、既に結合して活性化された C2a や Bb を解離することによって C3 の活性化を抑制する DAF がある。さらに、HRF20 は膜障害複合体である C5b-7 に C8 や C9 が結合するのを阻害することによって、生体内で自己細胞を補体の攻撃から保護している。

CR1 は古くから IA レセプターとして知られる補体レセプターの一つである。CR1 は C3、C5 転換酵素の崩壊促進活性と、C3b を I 因子の存在下で iC3b に分解するコファクター活性もあり、補体制御因子としての側面も持っている。

これまでに我々は、ベーチェット病の血清補体価 (CH50) は通常は高値を示すが眼発作直前に一過性に異常低値となることがあると報告した⁷⁾。その活性化には、① classical pathway と alternative pathway の両経路が働くこと⁸⁾、② アナフィラトキシン活性や多核白血球遊走活性を有する C3a、C5a が眼発作直前に血中で高値を示すこと⁹⁾、③ 補体の活性化により C3a、C5a の値が上昇すること⁹⁾、④ 末梢血中で補体制御因子に機能低下がみられ¹⁷⁾、これら補体反応系の異常がベーチェット病の病態と関わりが深いことを報告してきた。

今回の虹彩における補体制御因子の検討で CR1 はベーチェット病患者、対照者ともにほとんど染色されなかった。CR1 の分布が主に赤血球であることから、虹彩では発現しにくいと考えられた。ほとんどすべての細胞に分布しているとされている MCP と DAF も、ベーチェット病患者、対照者ともに染色性はほとんどみられなかった。これらの結果から、虹彩には C3 の活性化を抑える補体制御因子 CR1、MCP、DAF が存在しないことがまず考えられる。

補体の活性化を引き起こす要因のない正常虹彩

では、補体制御因子の必要も少ないことが予想される。しかし、ベーチェット病では眼発作時に房水中に出現した白血球から C3 の分泌亢進が認められ¹⁸⁾、房水中に C3 および C5 フラグメントからなる白血球遊走因子や C567 複合体も検出されている¹⁹⁾。このようにその病期によっては補体が十分活性化され、補体制御因子の必要が多いはずのベーチェット病でこれら補体制御因子が捉えられなかったことについては、ヒト虹彩にこれら補体制御因子が存在しないという可能性以外に、①ごく微量である、②既に使われていて発現しなかった、③細胞自体の異常で発現しなかった、などが考えられる。②、③については、今後メッセンジャー RNA レベルを含め検討の余地があると思われる。

また、HRF20 はベーチェット病患者、対照者ともに染色性が認められ、虹彩組織に存在することが確認できた。その発現部位は血管内皮細胞に強く、虹彩基質や虹彩色素上皮にも発現していた。ベーチェット病患者と対照者との間で染色性や発現部位に差はなかった。

以上の結果から、ヒト虹彩の補体制御因子の特徴として、C9 の活性化を抑制する制御因子は存在するが、C3 の活性化を抑制する制御因子の発現は少なく、ヒト虹彩における補体系の反応として血管透過性の亢進や白血球の遊走は起きやすいが、細胞溶解は起きにくいことが推察された。このことは、病理組織学的にベーチェット病では発作のたびごとに白血球の強い浸潤を伴う炎症が起きても組織の壊死性変化は起こりにくいという猪股らの報告²⁰⁾や、眼発作時の本症患者房水中に多核白血球遊走活性が認められるという嶋田らの報告¹⁹⁾と一致すると考えた。臨床的にも、ベーチェット病の眼発作時に血液房水柵 (blood aqueous barrier) が障害され、その回復が他のぶどう膜炎に比べて遅いこと²¹⁾、眼発作直後の蛍光虹彩所見で、虹彩血管に強い透過性亢進がみられる²²⁾という所見と一致していた。

今回の検討で対照者として緑内障患者を選んだ理由は、虹彩切除が緑内障手術の一つであるトラベクトミーにおいて必ず施行される手技であ

り、非炎症眼において生体レベルで虹彩を入手する方法が他になかったからである。緑内障手術は薬物療法が奏効しない進行例に対して最後の手段として行われる治療であることから、比較的若年者に多いベーチェット病に比べて高齢者が多くを占め、平均年齢にかなりの差がでてしまった。病理学的に虹彩組織自体は加齢に伴い閉塞血管の増加や虹彩実質の萎縮、硝子様物質の増加等が認められている²³⁾が、これらの加齢性変化が補体制御因子の発現におよぼす影響は明らかでない。血中レベルにおいても補体制御因子の加齢性の変化を詳しく検討した報告は今までにまだない。しかし、今回検討した健常人の末梢血中の補体制御因子のうち、CR1は年齢が上昇するに従ってその値も上昇したが、MCP, DAF, HRF20には年齢による変動はなかった。血中レベルと組織レベルを同一には扱えないが、少なくとも血中レベルにおける加齢性変化は明らかにはできなかった。

しかし本研究において、ヒト虹彩にはC3の活性化を抑制する制御因子は少ないが、C9の活性化を抑制する制御因子は存在し、その局在は血管内皮細胞と虹彩基質、虹彩色素上皮であることを明らかにした。ベーチェット病と対照者とを比較すると、組織レベルにおいては両者に明らかな差が認められなかった。対照者と比べベーチェット病の方が補体制御因子の必要が多いはずであることを考えると、本研究でベーチェット病患者における補体制御因子の機能低下がクローズアップされる。今後は機能低下の要因について遺伝子レベルを含め、その動向を検討していくことが次の課題と思われた。

結 論

眼内手術時に切除した虹彩を用いて補体制御因子CR1, MCP, DAF, HRF20の発現と局在をモノクローナル抗体を用いて免疫組織学的に検討した。

ヒト虹彩組織においてはC3の活性化を抑制するCR1, MCP, DAFに明らかな発現はなかった。一方C9の活性化を抑制するHRF20は血管内皮細胞と虹彩基質、虹彩色素上皮に明らかに発現していた。以上は、ヒト虹彩における補体系の反応

として、C3の活性化に基づく血管透過性の亢進や白血球の遊走などは起きやすいが、C9までが活性化されて生じる細胞溶解は阻止されている可能性の高いことを示していた。

ベーチェット病においてはその染色性、発現部位は対照者との間に差がなく、これら補体制御因子の発現低下が本症の病態に深く関与していると思われた。

稿を終えるにあたり、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方に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Pronai L, Ichikawa Y, Nakazawa H et al: Enhanced superoxide generation and the decreased superoxide scavenging activity of peripheral blood leukocytes in Behçet's disease—Effects of colchicine. *Exp Rheumatol* 9: 227-233, 1991
- 2) Matsumura N, Mizushima Y: Leukocytes movement and colchicine treatment in Behçet's disease. *Lancet* ii: 813, 1975
- 3) Efthimiou J, Addison IE, Johnson BV: In vivo leukocyte migration in Behçet's syndrome. *Ann Rheum Dis* 48: 206-210, 1989
- 4) Niwa Y, Miyake S, Sakane T et al: Autooxidative damage in Behçet's disease—Endothelial cell damage following the elevated oxygen radicals generated by stimulated neutrophils. *Clin Exp Immunol* 49: 247-255, 1982
- 5) 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年度研究業績集: 85-90, 1990
- 6) 西川 恵, 古川浩司, 兼岡秀俊ほか: ベーチェッ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年度研究業績集: 122-124, 1992
- 7) 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: 1260-1286, 1971
- 8) 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
- 9) 小暮美津子, 島川真知子, 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
- 10) 呉 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
- 11) 岡田秀親：補体の制御蛋白質。免疫 28 : 87-92, 1991
 - 12) Funabashi K, Okada N, Matsuo S et al: Tissue distribution of complement regulatory membrane proteins in rats. Immunology 81 : 444-451, 1994
 - 13) Ichida S, Yuzawa Y, Okada H et al: Localization of the complement regulatory proteins in the normal human kidney. Kidney Int 46 : 89-96, 1994
 - 14) Simpson KL, Holmes CH: Differential expression of complement regulatory proteins decay-accelerating factor (CD55), membrane cofactor protein (CD46) and CD59 during human spermatogenesis. Immunology 81 : 452-461, 1994
 - 15) Simpson KL, Houlihan JH, Holmes CH: Complement regulatory proteins in early human fetal life: CD59, membrane cofactor protein (MCP) and decay-accelerating factor (DAF) are differentially expressed in the developing liver. Immunology 80 : 183-190, 1993
 - 16) 柴田 徹：腎における補体制御因子とその調節。臨床免疫 26(5) : 543-550, 1994
 - 17) 呉 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(5) : 376-380, 1996
 - 18) 陳 麗理：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。東女医大誌 67 : 33-42, 1997
 - 19) 嶋田孝吉, 矢尾板英夫, 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
 - 20) 猪股 孟, 鬼木信乃夫, 生井 浩：ベーチェット病眼病変の病理組織学—23症例についての検討一。眼科 Mook 28 : 232-243, 1986
 - 21) 八代成子, 小暮美津子, 霜村三季ほか：急性前部ぶどう膜炎のフレア値。眼紀 47 : 196-201, 1996
 - 22) 高橋義徳：ベーチェット病のフルオレセイン静注法による房水動態の研究。東女医大誌 60 : 476-483, 1990
 - 23) 木村泰朗, 沖坂重邦, 樋渡正五：加齢による虹彩の形態学的変化。眼紀 32 : 2325-2333, 1981