全身性エリテマートデスの臓器障害と白血球膜抗原，白血球活性酸素，血漿サイトカインとの関係

石井俊徳，大津由紀[1]，坂本京子[2]，
舌間優子[3]，嶋崎博子[4]

Relationship of Organ Disorders in Systemic Lupus Erythematosus to Leukocyte Surface Antigens, Leukocyte Active Oxygen and Plasma Cytokines.

Toshinori Ishii, Yuki Ohtsu[1], Kyoko Sakamoto[2],
Yuhko Shitama[3] and Hiroko Shimasaki[4]

Abstract To elucidate the role played by leukocytes in organ disorders of systemic lupus erythematosus (SLE), we measured the leukocyte membrane antigens which related to lymphocyte subsets, leukocyte adhesion molecules and complement regulatory proteins, active oxygen in leukocytes and plasma cytokines.

A significant increase of helper T cells (CD4+CD29+) and significant decreases of suppressor inducer T cells (CD4+CD45RA+), suppressor T cells (CD8+CD11b+) and NK cells (CD56+) were observed. These changes of lymphocyte subsets suggested decline of suppressor T cell function. Decrease of complement regulatory proteins on lymphocytes (CD35) and granulocytes (CD35 and CD46) were observed and this findings suggested the abnormality of immune complex clearance and suspended complement activation. Hyperproduction of active oxygen in monocyes of peripheral blood revealed indirectly participation of macrophages to tissue damages. Tumor necrotizing factor-α (TNF-α) and interferon-γ (IFN-γ) were increased significantly in plasma of SLE. These two cytokines have ability to activate monocytes to produce active oxygen and adhesion molecules.

Lupus nephritis related strongly to TNF-α and IFN-γ increases, moderately to active oxygen hyperproduction and weakly to CD46 decrease. Lupus pneumonitis weakly related to lymphocyte subsets, interleukin-1 β (IL-1β) and active oxygen. Skin manifestation also was the same as Lupus pneumonitis except active oxygen.

This result revealed that several factors related to the pathogenesis of SLE and that many kinds of combinations of these factors caused the variety of organ disorders and clinical manifestations in SLE.

Key words: SLE, leukocyte adhesion molecule, complement regulatory protein, active oxygen, cytokine.

目　的

全身性エリテマトーデス（SLE）は，抗体産生調節機構の異常により産生される自己抗体と自己抗原の免疫複合体によって惹起されるⅢ型アレルギーにより，種々の組織障害を来すいわゆる免疫複合体疾患と理解されている．そして免疫系の異常には遺伝，ホルモン，ウィルス，サイトカインが関与し，またⅢ型アレルギーによる組織障害の発現には，補体およびその制御機構，網内系，活性酸素産生系等多くの生体内機構および因子が複雑に関与しているものと考えられている（図１）．したがってある特定の因子のみを測定してもSLEの発症機構の全容に迫るには程遠く，リンパ系，補体制御系，サイトカイン，活性酸素，細胞接着分子等の多方面からのアプローチが必要である．そこで我々はリンパ球膜抗原，単球・顆粒球活性酸素および血漿サイトカインを測定し，SLEに共通した異常所見ならびに個々の臓器病変に特有な異常所見について検討し，

① 熊本大学医学部法医学講座
② 佐世保赤十字血液センター
③ 飯塚病院
④ ＣＲＣ

SLE の臨床症状の多様性との関連について調べてみた．

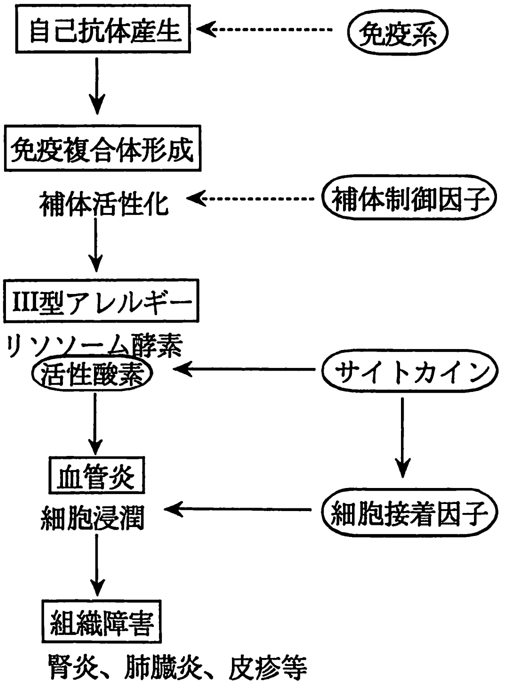

図1　SLEの発症機序
⟶ 促進，　---> 抑制

対　象

対象は熊本大学附属病院第2内科を受診し，アメリカリウマチ協会のSLE分類基準[1]をみたした21名の SLE 患者（男：女＝1：20，年齢41.7±10.5歳）で，全例副腎皮質ステロイド剤で治療中である．対照として健常人17名（男：女＝3：14，年齢31.2±17.0歳）を測定した．

方　法

1．検体の採取

真空採血管を用いヘパリン加静脈血10mlを採取した．活性酸素量の測定には全血をそのまま用いた．サイトカインの測定には，遠沈分離し－70℃で凍結保存しておいた血漿を用いた．白血球膜抗原の測定には全血をそのまま，あるいは Ficoll-Conray 法で分離したリンパ球を用いた．

2．白血球膜抗原の測定

静脈血100μℓと至適量のモノクローナル抗体を4℃30分反応させ，lysing reagent を2ml加え溶血させた後 PBS で2回洗浄した．直接蛍光抗体法の場合はこのまま，間接蛍光抗体法の場合はさらに fluorescence isothiocyanate(FITC) 標識ヤギ抗ヒト IgG を加え4℃30分反応させ，PBS 洗浄後 PBS 1 mlに再浮遊させた．フローサイトメリー（FCM, Cytoron：Ortho社）に検体を吸引させ，まず488nm のレーザー光の前方散乱光と側方散乱光の強度の二次元表示すなわちサイトグラム画面上でリンパ球，単球，顆粒球を分離し，測定対象血球を囲み（ゲイティング）選択した．次にゲイティングした血球について FITC 標識抗体による膜抗原の陽性率や平均蛍光強度（MFI）を測定した．MFI は細胞膜抗原に結合した FITC 標識抗体量を反映しており，したがって MFI 測定により相対的な膜抗原量を測定できる．

1）膜抗原によるリンパ球サブセットの測定

リンパ球サブセットの測定では，panT 抗原 CD 2（OKT11）と CD 5（Leu-1），T サブセット抗原 CD 4（OKT 4）とCD 8（T 8），T4 サブセット抗原 CD29（4 B 4）と CD45RA（2 H 4），T 8 サブセット抗原S 6 F 1（CD11b）とCD11b（Mo-1），pan B抗原CD19（B 4），NK細胞抗原 CD56（NKH-1）に対するモノクローナル抗体を用い白血球と反応させ，サイトグラム画面上でリンパ球に gating をかけ，結果は陽性率で表した．CD 4 のサブセットヘルパー T 細胞$CD4^+CD29^+$とサプレッサーインデューサーT 細胞$CD4^+CD45RA^+$，CD 8 のサブセット細胞障害性 T 細胞$CD8^+S6F1^+$とサプレッサー T 細胞$CD8^+Mo\text{-}1^+$の測定の場合は，FITC あるいは phycoerythrin（PE）を標識した抗体の組み合わせによる two color 染色を行い測定した．

2）白血球膜の細胞接着分子量の測定

細胞接着分子の測定は LFA-1 α（CD11a），CD44，Leu-8（L-selectin；CD62L）に対するモノクローナル抗体を用い，各白血球に gating をかけ，陽性領域の血球について MFI を測定し，相対的な膜抗原量とした．CD11b と CD29も細胞接着分子の一部なので，MFI を測定した．

3）白血球膜の補体制御蛋白量の測定

補体制御蛋白は，complement receptor 1（CR1：CD35）と membrane cofactor protein（MCP：CD46）に対する抗体を用いて測定した．結果は接着分子と同様に MFI で表した．

3．単球，顆粒球の活性酸素量の測定

ここで用いた活性酸素量の測定原理[2]は次の様なものである．細胞膜透過性のある 2' 7'-dichlorofluorescein diacetate（DCFH-DA）が細胞内でエステラーゼにより膜非透過性の DCFH に変化し，さらに活性酸素の一種である過酸化水素により DCF に変化する．488nm のレーザー光で励起された DCF は緑色蛍光を発するが，その蛍光の強度は DCF 量ひいては過酸化水素量に比例する．実際の測定は全血100 μℓ と DCFHDA（20 μM）500 μℓ を恒温槽で37℃30分反応させ，lysing reagent 2 mlで溶血後 PBS で3回洗浄再浮遊させ，FCM で単球，顆粒球の MFI を測定した．

4．サイトカインの測定

血漿中の interleukin-1 β（IL-1 β），tumor necrotizing factor-α（TNF-α），interferon-γ（IFN-γ）を，市販の EIA アッセイキットを用いて，サンドイッチ法による enzyme linked immunosorbent assay（ELISA）で測定した．

5．臓器病変の判定

SLE の各臓器病変の有無は，理学的所見および臨床検査データに基づき行った．腎病変は6カ月以上にわたって尿蛋白1＋以上が持続する症例をループス腎炎ありと判定した．胸部レ線像で肺線維症の所見のみられる症例を肺臓炎ありとした．また SLE による紅斑やレイノー現象がある症例を皮膚病変ありと判定した．

6．統計解析

測定データについて，平均値の差や相関性の検定および判別分析は，macintosh を用い統計解析ソフト JMP（SAS 社）で行った．

結果および考察

1．リンパ球膜抗原（図2，3）

リンパ球膜抗原について SLE と健常人を比較すると，pan T 細胞（CD2）や pan B 細胞（CD19）には差がみられなかった．しかしサブセットについては，SLE で CD4 は減少傾向を示し，CD8 は有意に増加し，したがって CD4／CD8 比は減少していた．またヘルパーT 細胞（Th：CD4$^+$ CD29$^+$）の増加，サプレッサーインデューサー T 細胞（Tsi：CD4$^+$ CD45 RA$^+$）およびサプレッサー T 細胞（Ts：CD8$^+$ CD11b$^+$）の減少がみられ，自己抗体産生に対してそれを制御する免疫機能の低下が示唆された．NK 細胞（CD56$^+$）も SLE で有意に減少していた．この原因は明らかでないが，やはり自己抗体産生の制御機構の異常に関係している可能性がある．しかし

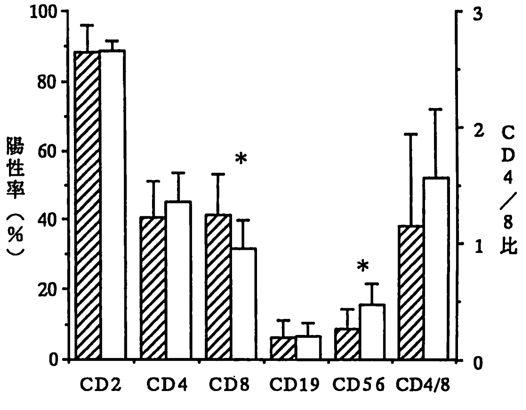

図2 SLE におけるリンパ球膜抗原

SLE, Control, *p＜0.05

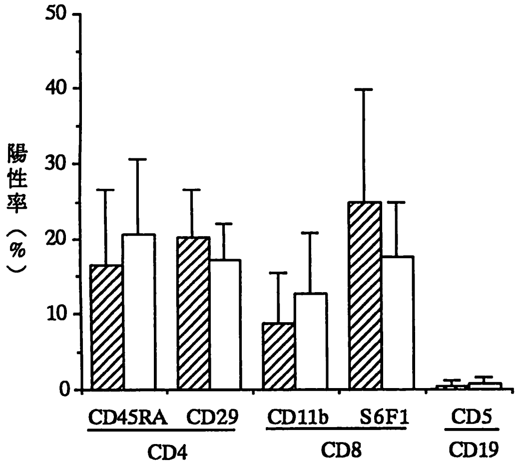

図3　SLE におけるリンパサブセット膜抗原
SLE, Control

NZB マウスやヒト慢性関節リウマチ患者で自己抗体産生細胞とされているCD 5$^+$ B 細胞（B auto）[3), 4)]の増加はみられなかった．細胞傷害性T細胞（Tc：CD 8$^+$S 6 F 1$^+$）は増加していた．この意義は明らかでないがウィルス感染に関係しているかもしれない．NZB／WF 2 マウスでは内因性レトロウィルス膜構造糖蛋白 gp 70と抗 gp 70抗体の免疫複合体が組織傷害を起こす[5)]ことが明らかにされている．しかしヒト SLE ではレトロウィルスの組織傷害への関与は現在のところ明らかではない．

2．白血球膜接着因子（図4）

血管内皮細胞の ICAM-1（CD54）をリガンドとする膜接着因子 LFA-1 α はリンパ球，単球で増加し，顆粒球では逆に減少していた．CD11b も ICAM-1 と結合する膜接着因子 Mac-1 の β 鎖であるが，単球で増加していた．Leu-8 はコントロールと変らず，CD44は単球で減少し，リンパ球と顆粒球はコントロールと差がなかった．CD29は VCAM-1 をリガンドとする膜接着因子 VLA-4 の β 鎖であるが，リンパ球と単球で発現量が増加していた．この場合，直接病巣部に浸潤した細胞を測定しているのではないので明確なことは言えないが，障害臓器の浸潤細胞が主に単核球であることから考えると，LFA-1 α が臓器浸潤に関与している可能性が強く示唆される．

3．白血球膜補体制御蛋白（図5）

CR 1 は免疫複合体を C 3 b を介して細胞表面に結合し，循環血液中からクリアランスする役割を持っており，また MCP は活性化補体を分解する機能を持っている．SLE ではリンパ球，顆粒球で CR 1 の減少がみられた．赤血球膜上の CR 1 量の減少の報告[6)]もあり，SLE では免疫複

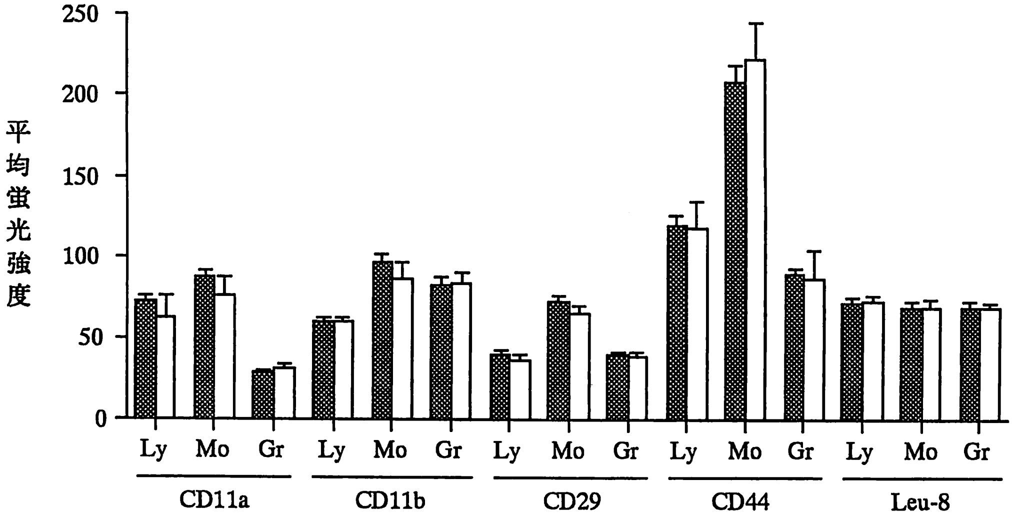

図4　SLE の白血球細胞接着分子　SLE, Control

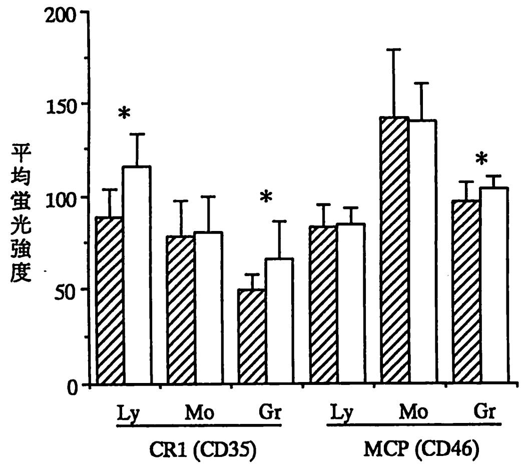

図5　SLE における細胞膜補体制御蛋白質

▨ SLE, □ Control, *p＜0.05

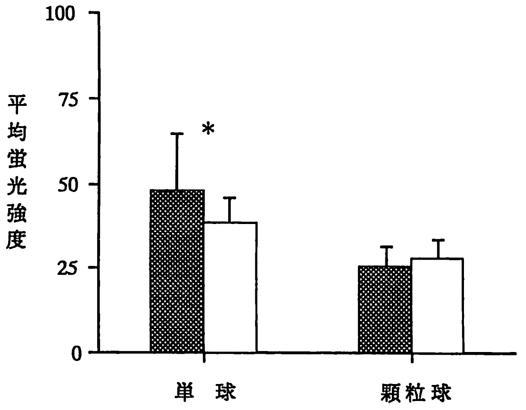

図6　SLE における白血球活性酸素量

▩ SLE, □ Control, *p＜0.05

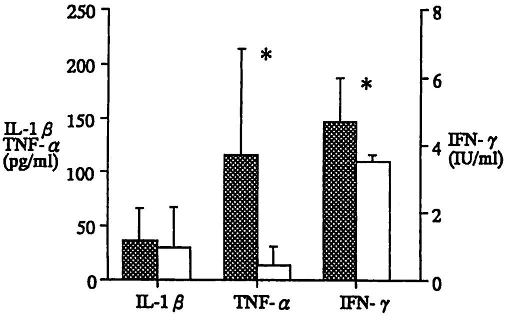

図7　SLE における血漿サイトカイン

▩ SLE, □ Control, *p＜0.05

合体処理能力の低下があると考えられる．MCP も顆粒球で減少しており，活性化補体が顆粒球膜に長期に残存し顆粒球を刺激活性化する可能性が考えられる．

4．活性酸素（図6）

SLE の単球では活性酸素量は有意に増加していたが，顆粒球では差がみられなかった．TNF-α はマクロファージと好中球の両方を活性化し，IFN-γ はマクロファージのみを活性化することと，我々のデータで TNF-α，IFN-γ ともに SLE で増加している結果からみて，単球，顆粒球共に活性酸素量も増加していることが予想された．しかし単球のみ活性酸素が増加していたことは，活性酸素に関しては IFN-γ の影響が強いことを示唆している．

5．サイトカイン（図7）

血漿中のサイトカインを測定してるみと，SLE では TNF-α はコントロールの約9倍，IFN-γ は約1.4倍と増加していたが，IL-1β は軽度の増加であった．NZB／W F1マウスでは TNF-α の産生低下が報告[7]されているが，我々の症例では逆に増加しているという結果となった．IFN-γ については NZB／W F1マウスに 1FN-γ を投与することによりループス腎炎が悪化し，抗 IFN-γ 抗体を投与すると生存率の改善がみられるという報告[8]がある一方，ヒト SLE では明らかな IFN-γ の異常はみられないともいわれている．しかし我々の結果は NZB／W F1マウスの結果を支持するものであった．IL-1 は SLE 末梢血単核球で産生および反応性が低下しているという報告[9]が多い．しかし MRL-1 pr マウスでは腎マクロファージがIL-1 を多量に産生しループス腎炎の病態に深く関わっているものと推測[10]されており，ヒトでも増加していてもおかしくない．

6．SLE の臓器病変と各測定因子との関係

SLE は多彩な臓器病変を有しており，その病像は非常に heterogeneous である．したがって臓

器病変の違いによって各因子の状態も異なっているものと考えられる．そこでSLEを臓器病変（腎炎，肺臓炎，皮膚病変）の有無で各々2群に分け，両群間で有意差のある因子を調べてみた．その結果，腎炎では単球CD29，単球CD46，IL-1β，単球および顆粒球活性酸素に有意差がみられた．肺臓炎では単球Leu-8，リンパ球CD11b，顆粒球CD35に有意差がみられたが，皮膚病変では全ての因子に有意差がみられなかった．この結果は腎炎と肺臓炎における臓器障害の発生機序が異なる可能性を示唆しているが，皮膚病変については関与する因子は同定できなかった．皮膚病変の場合その診断がかなり曖昧である可能性を否定できず，生検で血管炎の存在を確認しないと特異性に欠けると考えられる．また治療薬（副腎皮質ステロイド剤）の影響や，症例数が少ないことも考慮しなければならない．しかし副腎皮質ステロイド剤の投与量については，各臓器障害の有無においていずれも有意差がなく，したがって本来あるべき因子の差が副腎皮質ステロイド剤により修飾されたとは考えにくい．

7．SLEの臨床検査データと測定因子の相関関係

抗DNA抗体と各因子で有意の相関がみられたのは，リンパ球サブセットCD8$^+$とCD8$^+$S6F1$^+$，リンパ球CD11aとLeu-8，顆粒球Leu-8であった．補体系ではCH50と顆粒球CD29，C4と顆粒球CD11bおよびCD35に相関がみられた．尿蛋白とは単球活性酸素，IL-1β，TNF-α，IFN-γと正の相関，リンパ球CD35と負の相関がみられた．また単球活性酸素とIFN-γ，単球CD11aとTNF-αおよびIFN-γ，IL-1βと顆粒球CD11aとの間にも相関がみられた．これらの結果は自己抗体産生および臓器障害にリンパ球サブセット，細胞接着分子，補体制御蛋白および活性酸素が複雑に密接に関係していることを示している．特にループス腎炎の場合は（図8），DNA-抗DNA免疫複合体により活性化された単球，顆粒球よりIL-1β，TNF-αが産生され単球を刺激し細胞接着分子の増加，活性酸素産生の亢進をもたらす．またリンパ球もIL-1β，TNF-αに刺激され，細胞接着分子の増加とIFN-γの産生増加を生じる．さらにIFN-γによる単球の細胞接着分子の発現増加と活性酸素産生亢

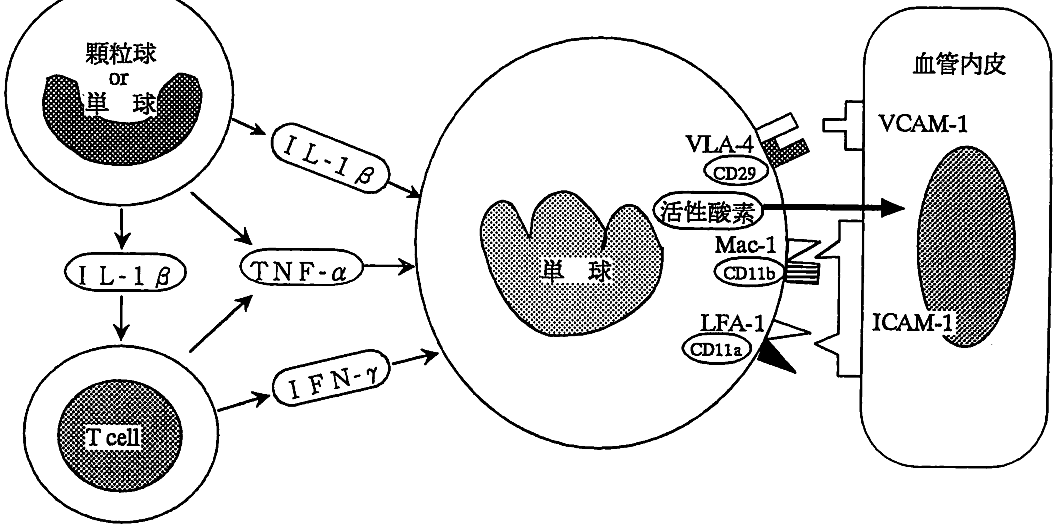

図8 SLEにおける血管内皮傷害に関する因子の関係

の結果，単球の血管内皮細胞への接着と活性酸素による障害をもたらすことが推測される．顆粒球も活性酸素産生能力を持ち数も単球より圧倒的に多いが，SLE の血管内皮細胞障害に関しては，活性酸素産生の亢進がみられず，また細胞接着分子の発現増加もないことから直接関与していないものと思われる．

8．SLE 臓器障害の測定因子による判別

SLE の臓器障害を特徴づける測定因子があれば，その因子によって臓器障害の有無を推測することが可能と考えられる．この場合複数の測定因子を組み合わせれば，的中率は高くなるし，また臓器障害を特徴づける測定因子がない場合でも予測が可能となる可能性がある．そこで判別分析法を用いて，ループス腎炎，ループス肺臓炎，皮膚病変の有無について分析してみた．判別分析による分類と実際の症例の一致率が最も高い場合の判別に有用な最少の測定因子について調べてみると（表1），4～6個の測定因子を用いて各臓器障害とも90%以上の一致率で判別が可能であった．またこれらの測定因子により臓器障害の判別が出来るということは，これらの因子が臓器障害に深く関与しているともいえる．また関与因子が3種類の血球の細胞接着分子，補体制御蛋白，活性酸素，複数のサイトカインと多岐にわたっていることは，SLE の発症機序の複雑さをうかがわせる．さらに各臓器障害で関与する因子が異なっており，各臓器障害の生成機序が異なっていることを示唆している．ループス腎炎では単球の細胞接着分子，補体制御蛋白，活性酸素および TNF-α（単球も産生する）が判別に有用な因子であり，単球の関与が強く示唆される．しかしループス肺臓炎では関与する血球が3種類であり，サイトカインも IFN-γ とループス腎炎とは明らかに異なる．また皮膚病変では単球の関与が強いが，ループス腎炎とは関係する因子がやや異なっている．

表1　SLE における臓器障害の判別分析

臓器障害	判別に有用な測定因子	一致率
ループス腎炎	単球 CD29，単球 CD46，単球活性酸素，TNF-α	96.4%
ループス肝臓炎	単球 Leu-8，リンパ球 CD11b 顆粒球 CD35，IFN-γ	96.4%
皮膚病炎	単球 Leu-8，単球 CD11b，単球 CD29，リンパ球 CD35，TNF-α，IL-1β	92.0%

まとめ

SLE において自己抗体産生から臓器障害に至る各段階に関係していると推測される因子について，その異常の有無を調べてみた．その結果1）サプレッサーT 細胞機能低下を示唆するリンパ球サブセットの異常，2）補体制御機能異常を示唆する膜補体制御蛋白量の低下，3）直接組織障害に関与すると考えられる活性酸素の白血球内増加、4）T 細胞、B 細胞、単球、好中球の活性化に関与するサイトカインの増加がみられた。またSLE の臓器障害と測定因子の関係を相関分析および判別分析で調べてみると、臓器毎に関与する因子は異なっていた。つまり SLE の発症には複数の因子が関与しており、症例によって関与する因子の組み合わせが異なっており、それが臨床症状の多様性につながっているものと考えられる。SLE の代表的な臓器障害であるループス腎炎の場合、細胞接着分子の発現増加と活性酸素の産生亢進をきたした単球により糸球体血管内皮細胞が障害されている可能性が強く示唆された。また顆粒球、リンパ球も産生するサイトカインを介して間接的に血管炎に関与していると推測された。

文　献

1．Tan, E. M., Cohen, A. S., Fries, J. F., Masi, A .T., McShane, D. J., Rothfield, N,F., Schaller, J. G., Talal, N. & Winchester, R. J.: The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 25: 1271–1277, 1982

2. Bass, D. A., Parce, J. W., Dechatelet, L. R., Szejda, P., Seeds, M. C. & Thomas, M.: Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophiles. J. Immunol. 130: 1910－1917, 1983.
3. Hayakawa, K., Hardy, R. R., Honda, M., Herzenberg, L. A., Steinberg, A. D., & Herzenberg, L. A.: Ly-1 B cells, functionally distinct lymphocytes that secrete IgM autoantibodies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 2494－2498, 1984.
4. Hardy, R. R., Hayakawa, K., Shimizu, M., Yamasaki, K. & Kishimoto, T.: Rheumatoid factor secretion from human Leu-1+ B cells. Science 236: 81－83, 1987
5. Izui, S., McConahey, P. J., Clark, J. P., Hang, L. M., Hara, I. & Dixon, F. J.: Retroviral gp70 immune complexes in NZBxNZW F2 mice with murine lupus nephritis. J.Exp.Med. 154: 517－528, 1981.
6. Miyakawa, Y., Yamada, A., Kosaka, K., Tsuda, F., Kosugi, E. & Mayumi, M.: Defective immune adherence (C3b) receptor on erythrocytes from patients with systemic lupus erythematosus. Lancet 2: 493－497, 1981
7. Jacob, C.O., & McDevitt, H. O.: Tumour necrosis factor-α in murine autoimmune 'lupus' nephritis. Nature 331: 356－357, 1988
8. Jacob, C.O., Meide, P. H. & McDevitt, H. O.: in vivo treatment of (NZB/NZW) F1 lupus-like nephritis with monoclonal antibody to γ-interferon. J.Exp.Med. 166: 798－803, 1987
9. Alcocer-Varela, J., Laffon, A. & Alarcon-Segovia, D.: Clin. Exp.Immunol. 54: 125－132, 1983
10. 宮坂信之：自己免疫疾患治療の現状と展望．臨床免疫21：868－879, 1989