再発性アフタ患者の血中 Immune complex について

原 徹・木村 享・桜田 重世
林 洋紀・木村 義孝・南雲 正男

Circulating immune complexes in recurrent aphthous ulceration

Toru HARA・Toru KIMURA・Shigeyo SAKURADA
Yoki HAYASHI・Yoshitaka KIMURA・Masao NAGUMO

緒 言

近年, SLE をはじめとする各種疾患において, 免疫複合体 (immune complex, 以下 IC と略す) が疾患の発生と深く関係していると考えられている。特に SLE や Behçet 病については, 患者末梢血中の circulating immune complex (以下 CIC と略す) が種々の方法によって測定されており, 病態との関連性が注目されている。

再発性アフタは Behçet 病と類縁関係にある疾患であると考えられており, Lehner¹⁾は再発性アフタや Behçet 病では IC が病変の活動性に関連していると述べている。また Levinsky ら²⁾は再発性アフタと Behçet 病患者の血中の IC を測定し, 健康人と比較して有意に高値を示したと報告している。

今回, われわれは IC の物理化学的性質を利用して CIC を測定する, Harkiss ら³⁾や手嶋ら⁴⁾の方法を改変したポリエチレングリコール沈殿物補体消費試験 (polyethylene glycol precipitation-complement consumption test, 以下 PEG-CC 法と略す) を用いて, 再発性アフタ患者の CIC を測定し若干の知見を得たので報告する。

実験材料および方法

1. 熱会合型ヒトグロブリン (heat aggregated human globulin, AHG) の作製

Cohn II 分画 (Sigma 社) を生理的食塩水で 20 mg/ml

昭和大学歯学部第2口腔外科学教室

(主任: 南雲正男教授)

The Second Department of Oral Surgery, School of Dentistry, Showa University (Chief: Prof. Masao Nagumo)

受付日: 昭和57年11月25日

の濃度に溶解し, 63°C, 10 分間加熱したのち系列希釈を行い, 200 µg/ml から 6.25 µg/ml のものを作製した。

2. 試薬類

ほう酸緩衝液: 0.1 M boric acid, 25 mM disodium tetraborate および 75 mM NaCl で pH 8.4 に調整した。

ポリエチレングリコール: polyethylene glycol (PEG, 半井化学) は分子量 6,000 のものを用い, ほう酸緩衝液で所定の濃度の PEG 溶液を作製した。すなわち CIC の沈殿用として 12.5% 溶液, 洗浄用として 2.5% 溶液を作製した。

EDTA 液: 0.2 M EDTA に 1 N NaOH を加えて pH 7.2 に調整した。

3. 感作ヒツジ赤血球 (EA) とゲラチンペロナル緩衝液 (GVB[®])

いずれも補体溶血反応に使用する, EA および GVB[®] の作製に準じた⁵⁾。EA は 1.5×10^8 /ml の濃度になるように GVB[®] に浮遊した。

4. 補体

CH₅₀ が正常値の健康成人数名の血清 (NHS) を混合し, 補体の source とした。この血清をヒツジ赤血球で吸収したのち分注し, -80°C に凍結保存し, 使用直前に溶解して補体源とした。

5. 被検血清

臨床的に他疾患を合併していないと思われる慢性再発性アフタ患者13名より, 口腔内アフタが出現している時期に採血を行い, 血清分離後 -80°C に凍結保存した。なお, CIC の測定は採血後1週間以内に行った。また, 健康成人24名の CIC を測定し対照とした。

6. PEG-CC 法による CIC の測定 (図1)

検体 600 µl を試験管にとり, 各検体ともに二重測定法により測定した。検体に 0.2 M EDTA 100 µl, ほう酸緩衝液 100 µl を加えて攪拌し, 12.5% PEG 100 µl を加えて 4°C, 90 分間静置する。その後 1,700 G, 4°C

図1 標準曲線

にて遠沈し、沈殿物を2.5% PEG で洗浄する。上清を完全に捨て、沈殿物をあらかじめ37°C にしておいた GVB⁺ 60 μl に再浮遊し、補体源として NHS を20 μl 加え、37°C、30分間 incubate する。そののち残存補体の溶血反応をみるため、 1.5×10^8 /ml の EA 1.0 ml を加えてさらに37°C、60分間反応させ、4°Cの生理的食塩水で反応を止めて、その遠沈上清の吸光度 (OD₄₁₄) を測定した。結果は、図1の式によって補体消費率 (PEG-CC %) を算出し、平均値を求めた。なお、37°C GVB⁺ 60 μl に NHS 20 μl を加えたものに EA を加えて37°C、60分間反応させ、同様に生理的食塩水で反応を止めたものの OD₄₁₄ をコントロール 溶血とした。

結 果

1. 熱会合型ヒトグロブリン (AHG) による標準曲線の作製 (図2)

まず、PEG-CC 法による 検体の補体消費率を AHG に換算できるように、種々の濃度の AHG を用いて標準曲線を作製した。その結果、10 μg/ml で2%、50 μg/ml で63%の補体消費率であり、この間にはほぼ直線関係が認められた。すなわち、この PEG-CC 法では10 μg/ml 以上の AHG の測定が可能であることが示された。

2. 凍結保存による PEG-CC % 値の経時的変化 (図3)

健康人4名について、新鮮血清、3日後、1週間後、2週間後、および1か月後の-80°C凍結保存血清の PEG-CC % 値の測定を行った。その結果、凍結保存後1週間まではわずかに上昇するものの、大きな変動が認められなかった。それ以後は時間の経過とともに PEG-CC % 値がかなり上昇するものがあるため、以下の PEG-CC % 値の測定はすべて採血後1週間以内に行った。

$$\text{PEG-CC}(\%) = \left(1 - \frac{\text{検体溶血}}{\text{コントロール溶血}} \right) \times 100$$

図2 PEG-CC 法

図3 保存血清の経時の変化

3. 慢性再発性アフト患者の CIC 値 (図4)

慢性再発性アフト患者13例の平均 PEG-CC % 値は $17.90 \pm 5.23\%$ で、健康成人24例の平均 PEG-CC % 値は $7.16 \pm 1.30\%$ であった。患者群の PEG-CC % 値は、健康人群と比較して、5%の危険率で高値を示してい

図4 再発性アフタ患者および健康人の PEG-CC (%)

た。しかし、患者群の個々の症例をみると PEG-CC % 値にはバラツキが大きく、健康成人の平均値 ± 2 SD 以上の値を示したものは13例中6例(46%)であった。なお、それぞれの平均換算 AHG 値は患者群では約 25.7 $\mu\text{g/ml}$ 、健康人群では約 20.1 $\mu\text{g/ml}$ であった。

考 察

IC の形成は生体の防御反応の1つであり、健康人でも形成されているが、通常は形成された IC は細網内皮系細胞や貪食能を有する細胞に取り込まれて迅速に流液中より処理される。しかしながら何らかの理由により、血中の IC が大量に形成されたり、処理しきれなくなると、糸球体腎炎や結合組織および血管壁などに IC が沈着して、糸球体腎炎、SLE、慢性関節リウマチなどの疾患を引き起こすとされている⁶⁾。現在、SLE や各種腎炎、慢性関節リウマチ、Behçet 病、Sjögren 病などの疾患について CIC の測定が行われており、病態の指標として注目されている。

CIC の測定法に関しては、CIC の性質を利用して各種の方法で行われているが、測定法により必ずしも値が一致するとは限らないので、数種類の測定法の実施が望ましいとされている^{8,7)}。一般的によく行われている、Clq や Raji 細胞を用いる方法は、精製補体 Clq や Raji 細胞が必要であること、RI を用いるものがほとんどであり、簡便に IC を測定することが難しい。一方、Harkiss ら⁹⁾ は CIC の物理化学的性質すなわち一

定濃度の PEG 中では、生理的活性の差によって CIC のような血清中の大きな分子の蛋白は沈殿するが、free の免疫グロブリンは溶性のままで残るという性質を利用して、沈殿した CIC に補体作用させ、EA の溶血反応によって補体消費率を求めて CIC を定量する方法を報告した。この方法は RI を使用することもなく、特殊な材料を必要としない簡便な方法である。今回われわれは、Harkiss ら⁹⁾ および手嶋ら⁴⁾ の方法を改変した方法を用いて、慢性再発性アフタ患者の CIC を測定した。同じ PEG を用いた沈殿法による CIC の測定には Creighton ら⁸⁾ の方法があり、PEG によって沈殿した蛋白量を CIC として定量するのであるが、PEG による沈殿物には CIC 以外の免疫グロブリンや Clq, C₃ も含まれており⁹⁾ 特異性に問題がある。その点、PEG-CC 法は沈殿物の補体結合能を考慮している点ですぐれている。しかし、IgA の IC などのような補体結合能のない IC の測定には不適当である。

PEG-CC 法の感度については、手嶋ら⁴⁾ は同じ Cohn II 分画の AHG を用いて検討しており、5 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で測定可能であるとし、これは Clq や Raji 細胞を用いた radioimmunoassay と比較して劣らない感度であると報告している。われわれの検討では AHG 10 $\mu\text{g/ml}$ から 50 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で測定可能であったが、慢性再発性アフタ患者でも健康人でも測定値はほとんどこの範囲に入っており、本方法の適応の妥当性が示された。なお、本方法の評価の算定法として補体消費率あるいは AHG 換算量として表すことが可能であるが、本方法では CIC 以外の変性 IgG などを同時に検出している可能性も考えられるので、測定値は補体消費率で表現した。

Lehner¹⁾ は Behçet 病および再発性アフタで IC を測定し、Behçet 病患者の 55% および再発性アフタ患者の 27% に CIC が検出され、それが疾患の活動性に関連していると述べている。また、Levinsky ら²⁾ は 60% の Behçet 病患者および 40% の再発性アフタ患者に CIC が検出できたとしている。今回のわれわれの検索結果でも、慢性再発性アフタ患者の CIC が健康人の CIC よりも有意の高値を示すことが認められ、CIC の再発性アフタへの関与が示唆された。しかし、個々の症例をみるとかなりバラツキがあり、13例中7例は健康人と同程度の CIC しか検出できなかった。これは、実際に CIC がそのような症例には生じていないのか、補体結合能のない IgA のような CIC のみが産生されているため、PEG-CC 法で測定できなかった可能性が考えられる。また、CIC には種々の分子量の IC があり¹⁰⁾、大きさによって補体結合能の異なることが考えられ、そのために CIC が検出されなかったことも推測される。したがって、CIC の存在と再発性アフタの病因を短絡的に結びつけることはできない。しかし、Lehner¹⁾ およ

び Levinsky ら⁹⁾ は病変の活動性の差により CIC に変動がみられることを報告していることから、経時的に CIC を測定するとまた別の結果が得られるかもしれない。今後、この点について検討の余地がある。

血中の IC が再発性アフタにどのように関与しているかは明らかではない。Ullman ら¹¹⁾ は再発性アフタの血管壁に IgM, IgA, および C₃ の沈着がみられることから、IC の血管への沈着によって血管炎が引き起こされるのではないかと述べている。また、われわれの教室の角田ら¹²⁾ は緑連菌の IC を作製して、これを好中球に添加するとライソゾーム酵素が大量に放出されることから、このライソゾーム酵素が組織障害を起こしてアフタの発生につながる可能性を示唆している。これは、緑連菌に対する抗体が慢性再発性アフタ患者で高値をとるという報告¹³⁾に基づいており、さらに Behçet 病および再発性アフタ患者では、好中球機能の亢進が報告^{14,15)}されていることから、われわれは再発性アフタの発生機序の説明をうる可能性があると考えている。しかし、現在 IC の抗原部分の同定が困難であることから、緑連菌の IC が実際に血中に生じているかどうかは不明である。Burton-kee ら¹⁶⁾ は再発性アフタ患者間の CIC には crossreaction があり、何か外来性の因子が抗原として関連している可能性のあることを報告している。したがって、今後 IC の抗原部分の同定が可能になれば、再発性アフタの発生のメカニズムの究明に、大きな手がかりになると考えられる。今後、この点についても検討をすすめていきたい。

結 語

われわれは、PEG-CC 法により再発性アフタ患者 13 例と健康成人 24 例の CIC の測定を行い、以下のような結果を得た。

1. 再発性アフタ患者の CIC は、健康人に比較して有意に高値であった。
2. 再発性アフタ患者では CIC 値のバラツキが大きく、明らかに健康人より高値であったのは 13 例中 6 例であった。

本論文の要旨は、第 35 回日本口腔科学会総会（1981 年 6 月、東京）において発表した。

引 用 文 献

- 1) Lechner, T.: Immunological aspects of recurrent oral ulceration and Behçet's syndrome. *J Oral Path* 7: 424 1978.

- 2) Levinsky, J. and Lechner, T.: Circulating immune complexes in recurrent oral ulceration and Behçet's syndrome. *J Exp Immunol* 32: 193 1978.
- 3) Harkiss, G.D. and Brown, D.L.: Detection of immune complexes by a new assay, the polyethylene glycol precipitation-consumption test (PEG-CC). *Clin Exp Immunol* 36: 117 1979.
- 4) 手嶋秀毅, 吾郷晋浩, 友岡裕治, 他: ポリエチレングリコール沈殿物補体消費試験 (PEG-CC) による Circulating Immune Complex (CIC) の定量と臨床応用. *アレルギー* 30: 59 1981.
- 5) 進藤宙二編: 免疫学アレルギー学実験法, 第 1 版, 文光堂, 東京, 1971, 230 頁.
- 6) 濱島義博: Immune complex 測定の意義と批判. *臨床免疫* 9: 1055 1977.
- 7) 相川崇史, 谷本深昭: 流血中の immune complex 測定法とその問題点. *日臨免誌* 3: 57 1980.
- 8) Creighton, W.D., Lambert, P.H. and Miescher, P.A.: Detection of antibodies and soluble antigen-antibody complexes by precipitation with polyethylene glycol. *J Immunol* 111: 1219 1973.
- 9) Digeon, M., Laver, M., Riza, J. and Bach, J.F.: Detection of circulating immune complexes in human sera by simplified assays with polyethylene glycol. *J Immunol Methods* 16: 165 1977.
- 10) Gupta, R.C., O'Duffy, J.D., McDuffie, F.C., et al.: Circulating immune complexes in Behçet's disease. *Clin Exp Immunol* 34: 213 1978.
- 11) Ullman, S. and Gorlin, R.J.: Recurrent aphthous stomatitis. *Arch Dermatol* 114: 955 1978.
- 12) 角田左武郎, 木村 享, 桜田重世, 他: 白血球ライソゾーム酵素放出に及ぼす緑連菌の効果 II 報 血清処理緑連菌 および 緑連菌処理血清の効果. *日口外誌* 26: 877 1980.
- 13) 南雲正男: 緑連菌抽出抗原による再発性アフタの免疫学的研究. *口科誌* 21: 884 1972.
- 14) Sobel, J.D., Haim, S., Obedeanu, T., et al.: Polymorphonuclear leukocyte function in Behçet's disease. *J Clin Path* 30: 250 1977.
- 15) Lechner, T.: Immunopathology of Behçet's syndrome. ed 1, Academic Press, London, 1979, p 55.
- 16) Burton-Kee, J.E., Mowbray, J.F. and Lechner, T.: Different cross-reacting circulating immune complexes in Behçet's syndrome and recurrent oral ulcers. *J Lab Clin Med* 97: 559 1981.