リウマチ性疾患における補体分解産物 C 4 d, iC 3 b および Bb 濃度測定 of 臨床的意義

上 田 章・塚 本 浩*・長 沢 浩 平*・山 内 保 生*
多 田 芳 史*・草 場 公 宏*・仁 保 喜 之*

Jpn. J. Clin. Immun., 15 (3) : 254~260, 1992.

Quantitation of complement breakdown products, C 4 d, iC 3 b and Bb, in plasma from patients with rheumatic diseases

Akira Ueda, Hiroshi Tsukamoto*, Kohei Nagasawa*, Yasuo Yamauchi*,
Yoshifumi Tada*, Tomohiro Kusaba* and Yoshiyuki Niho*

Present : Department of Medicine, Miyazaki Prefectural Hospital

**The First Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Kyusyu University*

【Summary】

Circulating complement breakdown products, C 4 d, iC 3 b and Bb, in plasma from patients with various rheumatic diseases were determined by ELISA kits using monoclonal antibodies. Plasma C 4 d, iC 3 b and Bb, especially Bb, were elevated in systemic lupus erythematosus (SLE) with hypocomplementemia, and also in rheumatoid arthritis (RA), aortitis syndrome and Behçet's disease with hypercomplementemia. Among plasma levels of C 4 d, iC 3 b and Bb, there was no significant correlation in SLE, mixed connective tissue disease, polymyositis, progressive systemic sclerosis or RA. In aortitis syndrome and Behçet's disease, there was a positive correlation between C 4 d and iC 3 b. In SLE, C 4 d showed significant correlations with circulating immune complex (CIC) ($r=0.633$, $P<0.001$) and with CH 50 ($r=-0.346$, $P<0.01$). iC 3 b and Bb showed no significant correlation with CIC or CH 50. These data suggested that both pathways of the complement system were activated in patients with SLE and other rheumatic diseases, CIC activated the classical pathway resulting in plasma C 4 d elevation, and other factor activated the alternative pathway resulting in plasma Bb elevation.

Key words : complement breakdown product,
complement,
rheumatic disease,
systemic lupus erythematosus,
immune complex

【概 要】

種々のリウマチ性疾患患者を対象にして、血漿中の補体分解産物 C4d, iC3b および Bb 濃度をモノクローナル抗体を用いた EIA キットを用いて測定し、血清補体価、補体成分および免疫複合体量との関連を検討した。

一般に低補体血症を示す全身性エリテマトーデスだけでなく、高補体血症を示す慢性関節リウマチや大動脈炎症候群、Behçet 病などの炎症性結合組織疾患でも血漿中の C4d, iC3b および Bb が増加しており、とくに Bb の増加するものが多くみられた。全身性エリテマトーデス、混合性結合組織病、多発性筋炎、強皮症および慢性関節リウマチでは補体分解産物の間に相関を認めなかったが、大動脈炎症候群と Behçet 病において C4d と iC3b との間に正の相関を認めた。全身性エリテマトーデスにおいて C4d が免疫複合体量と正の、血清補体価と負の相関を示したが、iC3b と Bb は免疫複合体量や血清補体価との相関を示さなかった。以上、種々のリウマチ性疾患において、免疫複合体による補体古典的経路の活性化だけでなく、補体第 2 経路の活性化をも生じていることが示唆された。今後、各々の症例で補体分解産物を測定することは、補体活性化の関与する病態の解明に有用であると思われる。

I. はじめに

補体はリウマチ性疾患において、通常 CH 50, C3 および C4 が測定されており、これらの疾患の診断や疾患活動性の判定に用いられている。しかし、これらの値は補体産生と活性化などによる異化との総和を反映しており、直接補体活性化の指標とはなり得ない面がある¹⁻³⁾。補体分解産物 (complement breakdown product; CBP) は補体活性化に伴って液相中に出現するため、その測定は補体活性化を知る最も良い指標であると考えられる⁴⁻⁶⁾。

今回、我々はリウマチ性疾患患者を対象にして、古典的経路活性化の指標として C4d, iC3b を、第 2 経路活性化の指標として Bb, iC3b を測定し、検討した。

II. 対象と方法

1. 対 象

九州大学病院第 1 内科に通院または入院中のリウマチ性疾患患者のうち、全身性エリテマトーデス (SLE) 患者 79 名 89 検体、混合性結合組織病 (MCTD) 患者 14 名 18 検体、多発性筋炎 (PM) 患者 5 名 6 検体、強皮症 (PSS) 患者 12 名 12 検体、慢性関節リウマチ (RA) 患者 13 名 14 検体、大動脈炎

症候群患者 12 名 16 検体、および Behçet 病患者 10 名 11 検体を対象にした。

2. 補体分解産物 C4d, iC3b および Bb の測定

C4d, iC3b および Bb は富士レビオ社のモノクローナル抗体を用いた EIA キットを用いて測定した^{7,8)}。検体は患者血液を EDTA 加試験管に採血後、直ちに遠心分離して、血漿を採取し、キットの補体活性インヒビター液を等量加えて混和した後、使用時まで -80°C に凍結保存した。

3. 血清補体価、C3 および C4

血清補体価 (CH 50) は Mayer 原法の 1/2.5 法によって 50% 溶血活性を測定した⁹⁾。C3 および C4 濃度は九州大学病院検査部で laser nephelometry 法によって測定した。

4. 血中免疫複合体

血中免疫複合体 (CIC) は C1q-EIA 法により測定した。cut off 値は $15.0 \mu\text{gEq/ml}$ である¹⁰⁾。

5. 統計学的検定

有意差検定は student's t test を用いて行った。

図 1 Plasma C4d levels in various rheumatic diseases. Bars show mean $\pm$ SD, shadowed area depicts mean $\pm$ 2 SD of normal controls. SLE, systemic lupus erythematosus; MCTD, mixed connective tissue disease; PM, polymyositis; PSS, progressive systemic sclerosis; RA, rheumatoid arthritis; AoS, aortitis syndrome; BD, Behçet's disease.

図 2 Plasma iC3b levels in various rheumatic diseases.

III. 結 果

1. 各種リウマチ性疾患患者の補体分解産物 C4d, iC3b および Bb 濃度

各種リウマチ性疾患患者血漿中の補体分解産物 C4d, iC3b および Bb 濃度を図 1, 2 および 3 に示した。C4d, iC3b および Bb の陽性率はそれぞれ, SLE 患者で 24%, 13% および 54%, MCTD 患者で 56%, 28% および 50%, PM 患者で 0%, 17% および 33%, PSS 患者で 8%, 8% および 50%, RA 患者で 21%, 21% および 50%, 大動脈炎症候群患者で

13%, 31% および 56%, Behçet 病患者で 27%, 36% および 64% であった。すなわち, 低補体血症を示す SLE 患者だけでなく, 高補体血症を示す RA, 大動脈炎症候群, Behçet 病などの炎症性結合組織疾患患者でも血漿中の C4d, iC3b および Bb のいずれもが増加しており, とくに Bb の増加するものが最も多かった。

2. 各種リウマチ性疾患患者の補体分解産物 C4d, iC3b および Bb の間の相関

表 1 に各疾患における補体分解産物 C4d, iC3b

図 3 Plasma Bb levels in various rheumatic diseases.

表 1 Relationships among plasma C4d, iC3b and Bb in various rheumatic diseases

	n	r C4d-iC3b	r Bb-iC3b	r C4d-Bb
SLE	89	0.033	0.086	0.131
MCTD	18	0.165	0.015	0.280
PM	6	0.678	-0.050	-0.140
PSS	12	-0.171	-0.352	0.141
RA	14	0.404	-0.227	0.047
AoS	16	0.414	0.459	0.670**
BD	11	0.123	-0.253	0.651*

*0.01<P<0.05, **0.001<P<0.01

n=number of samples; r=correlation coefficient

SLE: systemic lupus erythematosus, MCTD: mixed connective tissue disease, PM= polymyositis, PSS: progressive systemic sclerosis, RA: rheumatoid arthritis, AoS: aortitis syndrome, BD: Behçet's disease.

および Bb の間の相関係数 (r) を示したように, SLE, MCTD, PM, PSS および RA 患者では, C4d, iC3b および Bb のいずれの間にも有意の相関を認めなかった。しかし, 大動脈炎症候群と Behçet 病患者において, C4d と Bb との間にそれぞれ $r=0.670$ ($p<0.01$) および $r=0.651$ ($p<0.05$) の正の相関を認めた。

3. SLE 患者における補体分解産物と CH 50, C3, C4 および CIC との間の相関

SLE 患者における C4d と CIC との間の相関を図 4 に示したが, $r=0.633$ ($P<0.001$) と強い正の相

図 4 Relationships between plasma C4d and CIC in patients with systemic lupus erythematosus.

関が得られた。さらに C4d は CH 50 との間に $r=-0.346$ ($P<0.01$), C3 との間に $r=-0.310$ ($P<0.01$) の弱い負の相関を示したが, C4 とは有意の相関を示さなかった。iC3b は C3 との間に $r=0.328$ ($P<0.01$), C4 との間に $r=0.253$ ($P<0.05$) の弱い正の相関を示したが, CIC や CH 50 とは有意

表 2 Relationships among C 4 d, iC 3 b, Bb, CH 50, C 4, C 3, and CIC in SLE

	C 4 d	iC 3 b	Bb	CH 50	C 4	C 3	CIC
C 4 d	—	0.033	0.131	-0.346**	-0.171	-0.310**	0.633***
iC 3 b	0.033	—	0.086	0.156	0.253*	0.328**	-0.040
Bb	0.131	0.086	—	0.025	-0.007	-0.048	0.346

*0.01<P<0.05, **0.001<P<0.01, ***P<0.001

の相関を示さなかった。Bb は CH 50, C 3, C 4 および CIC のいずれとも有意の相関を示さなかった (表 2)。

IV. 考 案

補体系の活性化は、種々のリウマチ性疾患における組織や臓器障害において重要な役割を演じており、その活性化経路には、免疫複合体などによって活性化される古典的経路と細菌壁成分などによって活性化される第 2 経路の 2 つの経路が知られている。in vitro における補体活性化の存在や程度を知るために、従来血清補体価や補体成分の活性や蛋白量を測定することが行われてきたが、最近直接 CBP を測定する方法が開発されてきた¹¹⁾。CBP の検出は、従来免疫電気流動法を用いて補体成分の分解を検出する方法やポリエチレングリコール (PEG) で補体成分を沈降させた後上清中の CBP を、免疫拡散法やロケット免疫電気流動法により定量する方法が報告されているが^{12,13)}、操作の複雑さや感度の点で難点がある。今回使用した C 4 d, iC 3 b および Bb 測定用 ELISA キットは CBP のみと反応するモノクローン抗体を用いており、PEG などによる補体成分と CBP の分離の必要もなく、短時間で簡単に、且つ高い感度で CBP を測定することができ、臨床的に有用である^{7,8)}。

SLE 患者では、低補体血症と同時に血清中に抗 DNA 抗体をはじめとする種々の自己抗体や免疫複合体の存在がみられ、さらにそれらが種々の臓器に沈着していることが知られており、ループス腎炎をはじめとする SLE の臓器障害の機序として、CIC による補体古典的経路の活性化が考えられている。また、これらの抗 DNA 抗体価、CH 50 および CIC 測定は SLE の診断や治療上のマーカーとしてよく用いられている。

今回の SLE 患者血漿 C 4 d, iC 3 b および Bb はいずれも上昇するものがみられたが、その 3 者の間に相関が認められなかった。また CIC が C 4 d と正の相関を示したことは、SLE では CIC による古典的経路の

活性化がおり、そのために同経路の初期成分である C 4 の分解産物 C 4 d の増加がみられたものと考えられる。

しかしながら、SLE では古典的経路だけでなく、第 2 経路の活性化が生じているとの報告もある^{12,17,18)}。第 2 経路の B の分解産物である血漿 Bb が増加しているが C 4 d の増加のみみられない症例がある点は、古典的経路よりむしろ第 2 経路の活性化が進行している場合もありうることを示唆された。もちろん、Bb は古典的経路活性化に伴う増幅経路 amplification loop を介しても増加するので、C 4 d, iC 3 b および Bb の 3 者を同時に測定することにより、両経路のうちのどちらの経路が主に活性化されているか知ることが可能であると思われる。

SLE 以外のリウマチ性疾患では、RA 患者の関節液中で、補体価の低下、CIC の検出および C 3 d の上昇していることが報告されている^{19,20)}。また、RA 患者血清では C 3 d がリウマトイド因子、CIC、CRP および臨床的活動性と正の相関があるとの報告もある²¹⁾。今回の我々の成績では、RA に限らず、大動脈炎症候群や Behçet 病など高補体血症を示すリウマチ性疾患でも、C 4 d, iC 3 b および Bb のいずれもが増加しており、これらの疾患での補体活性化の関与が考えられる。とくに Bb の増加を示す症例が多くみられたことは、これらの疾患において、古典的経路よりむしろ第 2 経路活性化の病態形成への関与の重要性が示唆された。

次に、RA 患者において、補体成分蛋白の合成が亢進しているとの報告がある^{22,23)}。従って、これらの炎症性疾患において CBP が増加しているにもかかわらず、血清補体価が低下せずに逆に上昇している理由は、補体成分蛋白の合成の亢進が補体活性化による補体の消費異化の亢進を上まわっているためと考えられる。この補体産生亢進の詳細なメカニズムは明らかにされておらず、残された研究課題である。

今後、CH 50 や補体成分の測定だけでなく、本法による CBP の測定は、補体の関与する種々の疾患の

病態形成の解明に有用であると思われる。

文 献

- 1) Schur, P.H. : Complement in lupus. Clinics in Rheumatic Diseases, Vol. I, ed. by Rothfield, N.R., W. B. Saunders Company, London, 1975, pp. 519~543.
- 2) Goldstein, I.M. : Clinical applications of complement measurements in rheumatic diseases. Am. J. Med. Sci., 269 : 172~182, 1975.
- 3) Ueda, A., Kusaba, T., Yanase, T. : Determination of the second component of complement (C2) by electroimmunoassay in sera from patients with systemic lupus erythematosus. Clin. exp. Immunol., 53 : 217~224, 1983.
- 4) Perrin, L.H., Lambert, P.H., Miescher, P.A. : Complement breakdown products in plasma from patients with systemic lupus erythematosus and patients with membranoproliferative or other glomerulonephritis. J. Clin. Invest., 56 : 165~176, 1975.
- 5) Hopkins, P., Belmont, H.M., Buyon, J., et al. : Increased levels of plasma anaphylatoxins in systemic lupus erythematosus predict flares of the disease and may elicit vascular injury in lupus cerebritis. Arthritis Rheum., 31 : 632~641, 1988.
- 6) 上田 章・長沢浩平・塚本 浩・他 7 名 : モノクローン抗体を用いた Intact B と分解産物 Ba の Radioimmunoassay の開発と臨床応用。リウマチ, 30 : 103~108, 1990.
- 7) Tamerius, J.D., Pangburn, M.K., Müller-Eberhard, H.J. : Detection of a neoantigen on human C3bi and C3d by monoclonal antibody. J. Immunol., 135 : 2015~2019, 1985.
- 8) 柳田国雄・竹村周平・福田 互・他 8 名 : 結合組織疾患における補体分解産物測定の臨床的有用性。日臨免誌, 13 : 356~364, 1990.
- 9) Nagaki, K., Fujikawa, K., Inai, S. : Studies on the fourth component of complement : II. the fourth component of complement in guinea pig and human platelets. Biken J., 8 : 129~141, 1965.
- 10) 上田 章・長沢浩平・塚本 浩・他 4 名 : フレライザ C1q-CIC EIA キットおよびフレライザ C3d-CIC EIA キット (富士レビオ社) による免疫複合体の測定とその有用性の検討。医学と薬学, 24 : 115~119, 1990.
- 11) Cooper, N.R., Nemerow, G.R., Mayes, J.T. : Methods to detect and quantitate complement activation. Springer Semin. Immunopathol., 6 : 195~212, 1983.
- 12) Kajdacsy-balla, A., Doi, E.M., Bagasra, O. : Activation of factor B of the alternative pathway of complement : assessment by rocket immunoelectrophoresis. Am. J. clin. Pathol., 88 : 66~73, 1987.
- 13) Senaldi, G., Peakman, M., Alhaq, A. et al. : Activation of the alternative complement pathway : clinical application of a new technique to measure fragment Ba. J. Clin. Pathol., 40 : 1235~1239, 1987.
- 14) 上田 章・草場公宏・岩橋徳二・他 1 名 : SLE 患者における抗 DNA 抗体の性状と疾患活動性との関連—ことに長期間抗 DNA 抗体価高値を示す非活動性 SLE 症例の検討。日臨免誌, 6 : 153~159, 1983.
- 15) Sjöholm, A.G. Sturfelt, G. : Cleavage of C2 in pathological serum and plasma studied by crossed immunoelectrophoresis. Acta path microbiol. scand., Sect. C, 92 : 265~269, 1984.
- 16) Sturfelt, G., Johnson, U., Sjöholm, A.G. : Sequential studies of complement activation in systemic lupus erythematosus. Scand. J. Rheumatol., 14 : 184~196, 1985.
- 17) Oglesby, T.J., Ueda, A., Volanakis, J.E. : Radioassays for quantitation of intact complement proteins C2 and B in human serum. J. Immunol. Method., 110 : 55~62, 1988.
- 18) Petri, M., Kolb, W., Morrow, P., et al. : Association of complement activation tests with clinical measures of lupus activity. Arthritis

- Rheum., 32 : S 75, 1989.
- 19) Zvaifler, N.J. : Breakdown products of C'3 in human synovial fluids. J. Clin. Invest., 48 : 1532~1542, 1969.
- 20) Petersen, N.E., Elmgreen, J., Teisner, B. et al. : Activation of classical pathway complement in chronic inflammation ; elevated levels of circulating C 3 d and C4d split products in rheumatoid arthritis and Crohn's disease. Acta. Med. Scand., 223 : 557~560, 1988.
- 21) Essen, R.V., Isomäki, H. : Immunonephelometric quantitation of complement split product (C 3 d) plasma levels in rheumatic disease. Scand. J. Rheum., 14 : 421~426, 1985.
- 22) Weinstein, A., Peters, K., Brown, D. et al. : Metabolism of the third component of complement (C 3) in patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum., 15 : 49~56, 1972.
- 23) Ruddy, S., Colten, H.R. : Rheumatoid arthritis. Biosynthesis of complement proteins by synovial tissues. N. Engl. J. Med., 190 : 1284~1288, 1974.
-