胸膜炎を併発した膠原病患者胸水中 白血球遊走因子の検討

中村 正・山口剛司・松下格司・松山隆美・田中弘允*¹⁾、新名主宏一*²⁾、
松原三郎・山本哲郎・神原 武*³⁾

Leukocyte chemotactic factor(s) in a lupus pleural effusion with neutrophil predominant infiltration
We studied a case of systemic lupus erythematosus with massive pleural effusion accompanying neutrophil predominant infiltration. The presence of immune complexes and the low complement level in the effusion suggested an activation of the complement system in the pleural cavity. The effusion contained strong neutrophil chemotactic activity in the morphological polarization assay and the Boyden's chamber. From the molecular size and heat stability of the chemotactic activity, the neutrophil chemotactic factors were suggested to be C5a and the related molecules. The effusion also contained trypsin-like amidase activities against chromogenic peptide substrates. One of them was identified to be plasmin.

These results suggested that the marked effusion of the lupus pleuritis might be resulted from the neutrophil dependent vascular permeability enhancement mechanism with participation of the complement system and probably other plasma cascades.

Tadashi Nakamura・Tsuyoshi Yamaguchi・Kakushi Matsushita・Takami Matsuyama・
Hiromitsu Tanaka*¹⁾、Kouichi Shin-ryozu*²⁾、Saburou Matsubara・
Tetsurou Yamamoto・Takeshi Kambara*³⁾

*¹⁾ First Department of Internal Medicine, *²⁾ Third Department of Internal Medicine,
Faculty of Medicine, Kagoshima University, *³⁾ Department of Allergy,
Institute for Medical Immunology, Kumamoto University Medical School

key words : lupus pleuritis, neutrophil chemotactic factor, complement, plasmin

膠原病に認められる呼吸器病変のなかで、全身性エリテマトーデス (SLE) は胸膜炎の頻度がもっとも高率 (20～60%) で、慢性関節リウマチ (RA) や強皮症などで間質性肺炎が多くみられる点とやや趣きを異にしている¹⁾。SLE に伴う胸膜炎では、大量の胸水貯留はおおむねまれで、浸潤細胞も主として単核細胞である²⁾。

筆者らは、SLE に伴う胸膜炎で心肺機能に異常をきたすほどの大量の胸水が貯留し、そのなかの浸潤細胞がほとんど好中球であった症例を経験し、胸水中の白血球遊走因子の検索を中心に、大量胸水貯留の病態解析を試み、興味ある知見を得たので考察を加えて報告する。

方 法

(1) 症例および胸水採取

アメリカリウマチ協会1982年改訂 SLE 分類基準のうち、6項目を満たし、約8年の経過を有する32歳女性で、著明な胸水貯留 (図1) のため全身状態の悪化をきたした患者であり、胸部症状発現より7日目に胸水を無菌

的に採取した。採取はプレドニゾロン維持量 (10 mg/day)、かつ抗生物質使用前に施行した。

(2) 胸水の検査成績

胸水の検査結果は表1に示した。種々の自己抗体陽性、LE細胞陽性、免疫複合体陽性、補体低値で、特徴的なことは、浸潤細胞の80%以上を好中球が占めていたことであった。細菌培養陰性、Limulus 試験陰性で細菌感染は否定された。

(3) 白血球遊走因子の測定

胸水は使用直前まで -80°C に保存。正常ヒト好中球に対する胸水中遊走活性を、形態学的 polarization 法^{3,4)} と Boyden chamber 法^{5,6)} とで測定した。対照として100倍希釈 zymosan (Sigma) 活性化血清を用いた。

(4) 耐熱性試験

胸水に対する 56°C 30分間の熱処理の、好中球遊走活性への影響を検討した。

(5) 好中球遊走因子の分子量推定

56°C 30分間の熱処理を加えた胸水を Toyopearl HW-55カラム (東ソー、東京) に展開し、ゲル濾過を行い、その各分画に関し形態学的 polarization 法にて好中球に対する遊走活性を測定した。分子量マーカーとして、

*¹⁾ 鹿児島大学医学部第一内科学教室

*²⁾ 同 第三内科学教室

*³⁾ 熊本大学医学部免疫医学研究施設アレルギー部門

図1 Chest rentgenogram on admission

The marked accumulation of fluids in the bilateral pleural cavity.

表1 Laboratory findings of pleural fluids(32 y.o., female)

ARA criteria	6/11	ANA	×320
onset after	7 days	(homogenous, speckled)	
appearance	yellowish, cloudy	ENA-Ab	(+)
bacterial culture	negative	Sm-Ab	(-)
limulus test	negative	RNP-Ab	(+)
viral check		DAN test	×640
	not significant	immune complex	
total protein	2.6(g/dl)		3.4(μg/dl)
LDH	397(W-U)	LE cells	(+)
C3	18.6(mg/dl)	cells count; numerous	
C4	3.2(mg/dl)	analysis; Poly	83.1%
		Lym	3.1%
		Mono	13.4%
		Mesoth	0.4%

blue dextran, bovine γ -globulin, cytochrome-C(Sigma)を用いた。

(6) アミド結合水解能を利用したプロテアーゼ活性の測定

筆者らの既報⁷⁾に準じ、胸水を生理的リン酸緩衝液(pH 7.4)で6時間 4°C で透析、遠沈後、種々の合成蛍光ペプチド基質(ペプチド研、大阪)を用いて、アミド水解活性を測定した。対照として生理的食塩水を用いた。

(7) 抗プラスミノゲン抗血清の胸水中アミド水解活性への影響

抗プラスミノゲン抗血清(Behringwerke AB, Sweden)を diisopropylfluorophosphate (Sigma)の最終反応濃度 2mM で 37°C 60 分間処理後、生理的リン酸緩衝液(pH 7.4)に対し、36時間透析、遠沈後、上清それ自体のプラスミンに対する2種類の合成蛍光ペプチド基質

表2 Chemotactic activity for PMNs in pleural fluids

fold dilution	polarization activity* (%)
× 2	95.7
× 10	95.7
× 100	58.4
× 1000	74.0
× 10000	35.1

* Data are given as relative activity, taking the polarization activity of 100-folds diluted zymosan activated serum as 100%.

水解活性を検出以下にした。この処理抗血清を用いて、胸水中のこれら2種類の合成基質に対する活性への影響を検討した。

結 果

(1) 胸水中の好中球に対する遊走活性

100倍希釈 zymosan 活性化血清を対照として、形態学的 polarization 法にて遊走活性を測定すると、この患者胸水中には好中球に対する強い遊走活性が存在した(表2)。遊走活性の濃度依存性パターンが2峰性を示したことは、複数の遊走因子共存の可能性を示唆した。

(2) 耐熱性の検討

56°C 30分間の熱処理を加えた胸水を、Boyden chamber 法を用いて好中球に対する遊走活性を測定すると、100倍希釈 zymosan 活性化血清(100%)と同等以上の遊走活性(114.7%)が認められた。

(3) 遊走因子の分子量

56°C 30分間熱処理した胸水を Toyopearl HW-55 カラムに展開すると、マーカー蛋白の cytochrome-C(Cyt-C; MW 12500)よりも、やや大きい分画にもっとも強い形態学的 polarization 活性が出現した(図2)。また、bovine γ -globulin(BGG; MW 160000)よりも大きい分画に幅広く遊走活性が存在していた。これより、胸水中には少なくとも2種類以上の、おそらくは蛋白・ペプチド性の高分子量好中球遊走因子が存在していることが推定された。

(4) 胸水中の合成蛍光ペプチド基質水解活性

P1 位にアルギニンあるいはリジンを持つ、6種類の合成蛍光ペプチド基質を用いて、胸水中のプロテアーゼ活性を測定すると、これらの基質を加水分解する活性は、対照にくらべて有意に高かった(表3)。この測定系では、カリクレインの特異基質を分解する活性がもっとも高いが、ここではプラスミン様活性に焦点を絞って解析を進めた。

(5) 抗プラスミノゲン抗血清の抑制効果

プラスミンの特異基質である2種類の合成蛍光ペプチ

図2 Toyopearl HW-55 column chromatography
Strong polarization activities (thick line) in the large position near cytochrome-C (Cyt-C) as a molecular weight marker protein.
Dotted line denotes protein concentration with absorbancy at 280 nm.

表3 Enzyme specificity on peptide-methylcoumaryl amide substrates of pleural fluids

substrate (final concentration, 100 μ M)	amidolytic activity* (nM/min)
Boc-Val-Leu-Lys-MCA(plasmin)	112.9
Boc-Glu-Lys-Lys-MCA(plasmin)	57.3
Pro-Phe-Arg-MCA (grand kallikrein)	281.7
Z-Phe-Arg-MCA(plasma kallikrein)	383.6
Boc-Phe-Ser-Arg-MCA(trypsin)	37.1
Boc-Gln-Ala-Arg-MCA(trypsin)	205.4

* The amidolytic activities are expressed as a velocity of aminomethylcoumarin release (nM/min).

ド基質を加水分解する胸水中の活性は、抗プラスミノゲン抗血清により同程度に抑制された(表4)。このことは、胸水中にはたしかにプラスミン活性が存在していることを示唆した。

考察

膠原病に伴う胸膜炎は、SLE に高頻度に認められるが、症状の一つである胸水貯留は、一般には中等量までで、胸水中浸潤細胞もリンパ球を主とした単核細胞が主である¹⁾。著明な胸水貯留と好中球優位の細胞浸潤をきたした SLE 症例で、白血球遊走因子の検討を行い、炎症細胞としての好中球と、補体系、線溶系とが複雑に相互関連して、胸水貯留という病態を修飾していたことが示唆された。本例での特徴的な点は、大量の胸水貯留(図1)と胸膜炎発症7日目にもかかわらず、胸水浸潤細胞のうちの好中球優位性である。

胸水の検査結果のうち、各種自己抗体陽性、低補体値、免疫複合体の存在、LE 細胞の存在などから、胸膜

表4 Effect of diisopropylfluorophosphate-treated anti-plasminogen serum

substrate	anti-plasminogen serum (fold dilution)	amidolytic activity (nM/min)
Boc-Val-Leu-Lys-MCA (plasmin)	(-)*	125.3
	× 1	69.6
	× 3	110.6
	× 10	115.8
	× 30	122.1
	× 100	112.0
Boc-Glu-Lys-Lys-MCA (plasmin)	(-)*	56.0
	× 1	26.0
	× 3	47.4
	× 10	48.2
	× 30	51.5
	× 100	49.2

* anti-serum not added.

炎は自己免疫学的機序によって惹起されたと予想される(表1)。補体値は、血清との総蛋白量の差に基づいて是正しても低値であり、免疫複合体の存在からみても胸水中での補体系活性化による消費を反映していると考えられた。

さて、そのような胸膜炎の過程において、好中球に対する遊走因子が遊離された結果、好中球優位の細胞浸潤が生じたと想定し、形態学的 polarization 法および Boyden chamber 法を用いて検討すると、胸水中には好中球に対する強い遊走活性がたしかに存在していた(表2)。その遊走活性は耐熱性であり、ゲル濾過法で分子量1.5万と16万~40万の幅広い分画とに、少なくとも2種類以上認められた(図2)。前述の補体系の活性化を考慮すると、それらは補体由来の可能性が高く、分子量の相似から、前者は C5a-様物質、後者は C5a des Arg と cochemotaxin との複合体かもしれない。これらの可能性は、抗体を用いた確認が必要である。

興味あることは、膠原病の一つである RA 関節液との相似性であり、RA 関節炎においても好中球優位性の細胞浸潤と C5a-様物質の存在が報告されている^{1,8)}。膠原病漿膜炎として共通性があるのか、たんに炎症過程の一面面を把えているのか、今後の検討が必要である。一方、本例胸水中に、一般的に認められる lupus pleuritis での単核細胞優位性浸潤がなかった点は、単核細胞遊走阻止因子⁹⁾の存在も示唆され、これものこされた検討課題である。

本例で認められた大量の胸水貯留と好中球浸潤とを一元的に説明するには、Williams ら^{10,11)}の実験報告が魅力的である。

彼らは、ある種の炎症刺激により、組織間液に存在し

ているであろう少量の補体因子がまず活性化され、C5a ないし C5a des Arg が産生される。これにより好中球が浸潤し、それに伴い好中球依存性血管透過性が亢進し、炎症の病態を形成する白血球と補体の両者が、炎症局所に流血中より動員されると考えている。

また、同様な好中球依存性の透過性亢進は、Issektz¹²⁾によっても報告されている。すなわち、好中球遊走因子の刺激により、好中球浸潤と透過性亢進とはまったく一致した時間的経過を示したという。

これらの報告を考慮すると、本例での大量胸水貯留と著明な好中球浸潤は、おおむね、一元的、同時に惹起した可能性が高い。Shingu ら¹³⁾は、SLE 患者の血清が正常ヒト好中球の活性酸素種産生を促進し、それは、血清中の免疫複合体のレベルと正の、血清補体値と負の相関を、それぞれ示すことを報告している。また、彼ら¹⁴⁾は、活性酸素種により C5 から C5a-様物質が産生されることも示している。これらの報告と同様の現象が本例でも生じていたと仮定すると、補体系活性化、好中球遊走、活性酸素種放出が、相互に関連して、正のフィードバックをかけ、病態を増悪していた可能性があり興味深い。

他方、合成蛍光ペプチド基質を用い、胸水中のアミド水解活性を測定すると、プラスミン、カリクレイン、トリプシンに対する特異基質を分解する活性が高いことが判明した(表3)。また、少なくともこのプラスミン様活性は、プラスミンによるものであることが、免疫学的に確認出来た(表4)。ただし、本研究で用いた合成蛍光ペプチド基質は、小分子であるので、血中の α_2 -マクログロブリンに捕獲された状態の酵素と、遊離状態の酵素とを区別出来ないこともある⁷⁾。

したがって、胸水中トリプシン型酵素(表3)の状態に関しては、ゲル濾過による分画で再確認する必要がある。当然ながら胸水中には、血漿由来あるいは組織由来の抑制物質が共存しているであろうし、これらの酵素と複合体を形成しているかもしれない¹⁵⁾。

ともかく、胸水中にトリプシン型酵素に特異的な合成基質を分解するプロテアーゼ類が存在したことは、本胸膜炎において、キニン・カリクレイン系、補体系、凝固・線溶系が互に関連し、相互作用した可能性をも示唆させる。事実、血漿カリクレインは線溶系のプラスミノゲンに作用し、プラスミンを生成する場合があることが知られている。さらに、プラスミンは、補体成分を基質として活性化しうることが *in vitro* のある条件下では観察されている¹⁶⁾。

一方、ヒト好中球は、適当な刺激を受けるとプラスミノゲン・アクチベータを分泌することも報告されている¹⁷⁾。したがって、本例での胸膜炎の発症、それに引きつづく大量の胸水貯留、好中球優位の細胞浸潤という一

連の現象に、補体系と好中球のみならず、線溶系やキニン系が参加した可能性も否定は出来ない。

In vivo における炎症反応の解析はとても複雑で、多くの相互システムが恒常性を修飾したり、制御したりしている。今後、症例を集積し、本研究で提示された相互システムの関わりを、lupus pleuritis の過程という観点から明らかにしていく必要がある。

本論文の要旨は、第10回日本炎症学会(1989年7月21日、東京)において発表した。

文 献

- 1) Sahn, S.A.: Immunologic diseases of the pleura. Clin. Chest Med. 6: 83-102, 1985.
- 2) Ferreira, J.E., Reiter, W.M., Saldana, M.J.: Systemic lupus erythematosus presentations as chronic serositis with no demonstrable antinuclear antibodies. Am. J. Med. 76: 1100-1105, 1984.
- 3) Kukita, I., Yamamoto, T., Kawaguchi, T., Kambara, T.: Fifth component of complement (C5)-derived high-molecular-weight macrophage chemotactic factor in normal guinea pig serum. Inflammation 11: 459-479, 1987.
- 4) Roos, F.J., Zimmermann, A., Keller, H.U.: Effect of phorbol myristate acetate and the chemotactic peptide fNLPNTL on shape and movement of human neutrophils. J. Cell Sci. 88: 399-406, 1987.
- 5) Boyden, S.: The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. J. Exp. Med. 115: 453-466, 1962.
- 6) Kambara, T., Ueda, K., Maeda, S.: The chemical mediation of delayed hypersensitivity skin reactions: I. Purification of a macrophage-chemotactic factor from bovine γ -globulin-induced skin reactions in guinea pigs. Am. J. Pathol. 87: 359-374, 1977.
- 7) Nakamura, T., Yamamoto, T., Ishimatsu, T., Kambara, T.: A high-molecular-weight trypsin-like protease in the skin sites of delayed hypersensitivity in guinea pigs. Am. J. Pathol. 114: 250-263, 1984.
- 8) Matzner, Y., Partridge, R.E.H., Babior, B.M.: A chemotactic inhibitor in synovial fluid. Immunology 49: 131-138, 1983.
- 9) Pettersson, T., Welin, M.-G., Weber, T.H.: *In vitro* production of leukocyte migration inhibitory factor by lymphocytes in exudative pleural effusions. J. Clin. Lab. Immunol. 8: 107-111, 1982.
- 10) Williams, T.J., Joes, P.J.: Mediation of increased vascular permeability after complement activation. Histamine-independent action of rabbit C5a. J. Exp. Med. 153: 136-153, 1981.
- 11) Wedmore, C.V., Williams, T.J.: Control of vascular permeability by polymorphonuclear leukocytes in inflammation. Nature 289: 646-

- 650, 1981.
- 12) Issekutz, A.C.: Effect of vasoactive agents on polymorphonuclear leukocyte emigration *in vivo*. Lab. Invest. 45: 234-240, 1981.
- 13) Shingu, M., Oribe, M., Todoroki, T., Tatsukawa, K., Tomooka, K., Yasuda, M., Nobunaga, M.: Serum factors from patients with systemic lupus erythematosus enhancing superoxide generation by normal neutrophils. J. Invest. Dermatol. 81: 212-215, 1983.
- 14) Shingu, M., Nobunaga, M.: Chemotactic activity generated in human serum from the fifth component of complement by hydrogen peroxide. Am. J. Pathol. 117: 201-206, 1984.
- 15) Klech, H., Rona, G., Knoth, E., Kummer, F., Bayer, P.M.: Neutrophil elastase α_1 -proteinase inhibitor complexes in pleural effusions. Klin. Wochenschr. 66: 346-350, 1988.
- 16) Bennett, W.R., Yawn, D.H., Migliore, P.J., Young, J.B., Pratt, C.M., Raizner, A.E., Roberts, R., Bolli, R.: Activation of the complement system by recombinant tissue plasminogen activator. JACC 10: 627-632, 1987.
- 17) Granelli-Piperno, A., Jean-Dominique, V., Reich, A.: Secretion of plasminogen activator by human polymorphonuclear leukocytes. Modulation by glucocorticoids and other effectors. J. Exp. Med. 146: 1693-1706, 1979.