リウマチ様関節炎の関節液中の白血球遊走因子

神原 武*, 岡元 勉**

Chemotactic factor(s) for leukocytes in the rheumatoid synovial fluids

Takeshi Kambara*, Tsutomu Okamoto**

われわれが追求してきたモルモットの遅延型アレルギー反応局所の3種のマクロファージ遊走因子(MCFS-1, 2, 3)の研究を拡大してヒトの慢性炎症性疾患に analogy を求めることと, リウマチ様関節炎(RA)組織には単核球(MNL)浸潤が強く多核球(PMN)浸潤がほとんどみられないのに, RA 関節液(RA-SF)には逆に PMN が多い点に興味をいだいたことから, RA の chemical mediation を知る第一歩として RA-SF 中の白血球遊走因子について検討を加えてみた. Ward & Zweifler¹⁾が RA-SF 中の PMN 遊走因子は C5a であるといっているが, C5a は PMN のみならず MNL にも強い遊走活性を示すので, RA-SF 中の PMN と MNL の浸潤の差を説明するのは困難である.

方 法

30例の RA-SF と対照として30例の OA-SF を採取し, 白血球数を数え, 遠沈上清を $-20\sim 80^{\circ}\text{C}$ に保存, 使用した. 白血球遊走活性は agarose 法と Boyden 法にて測定した. 健康人末梢血の bubby coat cells から Ficoll-Conray 法にて PMN 分画(90%以上 PMN)と MNL 分画(30%が単核球, 70%がリンパ球)を得, 洗浄後 30 mM HEPES, pH 7.4 と 10% FCS 加 RPMI 1640 に懸濁使用した.

結 果

① RA-SF 中には平均 $16,500/\text{mm}^3$ の白血球がみられ, 約80%は PMN, 20%が MNL であり, OA-SF では白血球数は $1,000/\text{mm}^3$ 以下であった. 一方 RA の滑膜組織には多数のリンパ球, プラズマ細胞, マクロファージがみられるが, PMN はきわめて少ない.

② RA-SF をモルモット皮内に注射すると白血球浸潤を起こし, RA-SF 中に白血球遊走因子の存在することを示唆した²⁾. *in vitro* でも RA-SF には agarose 法で強い PMN 遊走活性がみられ(図1), OA-SF では弱い. Boyden 法でも同様であった. agarose 法での遊走パターンはロケット型で, ZAS のそれと似ており, fMLP のそれとは異なる. この遊走活性と RA-SF 中の白血球数はよく相関し($r=0.690$, $P<0.001$)(図2), RA-SF 中のこの遊走因子は PMN 遊走の natural me-

図1 chemotactic activities for PMNs in RA- and OA-SF measured by agarose method

Chemotactic index was expressed as chemotaxis/spontaneous migration. ZAS and fMLP (10^{-7}M) were used as positive controls.

diator と考えられる.

③ この PMN 遊走因子の本態を知るために種々の抗血清を用い, 遊走活性の抑制をみた(表1). RA-SF 中の PMN 遊走活性は抗ヒト血清抗体, 抗 C5 抗体, 抗 C5a 抗体で強く抑制され, 抗 IgG 抗体である程度抑制された. したがって, この主要遊走因子は C5 由来因子で, たぶん C5a 様物質と考えられた. この遊走因子の分子量を知るために, RA-SF をヒアルロニダーゼ処理後セファデックス G-50 で溶出すると, 主要な遊走活性は分子量14,000の部に溶出し C5a と考えられた. 別に分子量30,000以上の部にも遊走活性がみられた(図3). しかし前者にはアナフィラトキシン活性(血管透過活性)がみられなかった. C5a にはつよいアナフィラトキシン活性が存在することが知られている. 一方われわれは, hippuryl-L-arginine を基質として RA-SF 中に carboxypeptidase B 様酵素が存在することを見いだした. これらのことから上記の小分子遊走因子は C5a それ自体ではなく, C5a des Arg の可能性があることが示唆された. また RA-SF 中の MNL 遊走活性は agarose 法でも Boyden 法でもみられなかった. セファデックス溶出分画にもみられないので, 遊走活性抑制物質の効果とは考えがたく, 遊走因子そのものの問題と考

* Department of Allergy, Institute for Medical Immunology, Kumamoto University Medical School 熊本大学医学部付属免疫研究所

** Division of Orthopedic Surgery, Department of Surgery, Saga Medical School 佐賀医科大学整形外科学教室

表1 effect of anti-sera on chemotactic activity for PMN in RA-SF*

samples	chemotactic index (mean $\pm$ SD)	% inhibition
SF+buffer**	3.94 $\pm$ 0.10	2
SF+normal rabbit serum	4.01 $\pm$ 0.16	0
SF+anti-HS***	1.17 $\pm$ 0.05	95
SF+anti-C3	3.76 $\pm$ 0.21	8
SF+anti-C5	1.24 $\pm$ 0.09	92
SF+anti-C5a	1.21 $\pm$ 0.12	93
SF+anti-IgG	3.33 $\pm$ 0.09	22

* 10 μ l of anti-sera was added to 50 μ l of SF.

** phosphate-buffered saline (pH 7.3)

*** antibody to whole human serum

表2 chemotactic activity and anaphylatoxin activity of C5a and C5a des-Arg

samples*	chemotactic activity (migrated cell/5HPF) (mean $\pm$ SD)		anaphylatoxin activity [dye leakage (μ g)]
	PMN	MNL	
C5a(15 μ g/ml)	710 $\pm$ 35	435 $\pm$ 20	25
C5a(5 μ g/ml)	394 $\pm$ 11	178 $\pm$ 11	16
C5a des-Arg (450 μ g/ml)**	618 $\pm$ 45	12 $\pm$ 4	0
C5a des-Arg (45 μ g/ml)	358 $\pm$ 33	3 $\pm$ 1	0
RA-SF	387 $\pm$ 44	5 $\pm$ 1	ND
fMLP	732 $\pm$ 21	422 $\pm$ 19	ND

* Test samples were diluted with phosphate-buffered saline (pH 7.3).

** C5a was digested by immobilized carboxypeptidase B for 10 minutes at room temperature.

えられた。

④ そこで *in vitro* で C5a と C5a des Arg を作成し, PMN および MNL 遊走活性とアナフィラトキシン活性を検討した(表2)。C5a は PMN にも MNL にも強い遊走活性を示し, モルモット皮膚にアナフィラトキシン活性をもつ。一方, C5a des Arg は PMN 遊走活性が低下して, 9~30 倍の大量で C5a と同じ遊走活性を示すが, 依然として PMN 遊走活性を保持している。RA-SF 中の白血球遊走活性に相当する遊走活性を示す C5a des Arg の量は 45 μ g/ml であり, その 10 倍量の C5a des Arg (450 μ g/ml) でも MNL 遊走活性はきわめて弱く, アナフィラトキシン活性はみられなかった。

考 察

RA-SF 中の白血球遊走因子は, 抗 C5a 抗体で抑制

図2 correlation between chemotactic activity for PMNs in RA-SF and number of PMNs in the SF

図3 Sephadex G-50 elution profile of chemotactic activity for both PMNs and MNLS and of anaphylatoxin activity in RA-SF

Anaphylatoxin activity was expressed by extravascular dye leakage (μ g). The eluant was PBS, pH 7.3, and fractions were collected every 1.5 ml. BSA and Cyt-c were chromatographed as molecular weight makers.

される分子量14,000のものでアナフィラトキシン活性をもたず, MNL 遊走活性もみられないので, 生化学的測定はまだなされていないが, C5a そのものではなく C5a des Arg であろうと考えられる。このことから RA-SF 中に PMN が多い理由も説明できる。

抗血清を恵贈くださった Dr. E.L. Becker (Univ. Connecticut) と津元博士(化血研)に深謝します。

文 献

- 1) Ward, P.A., Zweifler, N.J.: Complement-derived leukotactic factors in inflammatory synovial fluids of humans. J. Clin. Invest. 50: 606-616, 1971.
- 2) Kambara, T., Kutsuna, T., Okamoto, T., Nakamura, T.: Inflammatory activities of synovial fluids from rheumatoid and osteoarthritis to guinea pig skin. Acta Pathol. Jpn. 32: 575-583, 1982.