

# NPSLE 患者の髄液中補体第 3 成分(C3)と炎症マーカーに関する検討

浅野智之

福島県立医科大学医学部 消化器・リウマチ膠原病内科学講座

## 概要

### 【背景】

全身性エリテマトーデス (Systemic Lupus Erythematosus: SLE)は、自己抗体と抗原によって形成された免疫複合体が組織に沈着することで、補体の活性化を介した組織障害が起きる疾患である。この補体活性化による消費のため、活動期の SLE 患者における血清中の補体濃度は一般的に低下する。一方、SLE に神経精神症状を来した病態は神経精神 SLE (Neuropsychiatric SLE: NPSLE) と呼ばれ、その本態は中枢神経系における自己免疫性の炎症である。NPSLE 患者の髄液中には様々な自己抗体の発現が知られており、これまでの報告から免疫複合体の脳組織への沈着が炎症を惹起する機序が想定されている。従って、その過程で髄液中においても補体が炎症のメディエーターとして病態の形成に関与している事が予想される。しかし、これまで NPSLE 患者の髄液中における補体の動態に関する報告はほとんど無い。

本研究では NPSLE 患者の髄液中における補体成分補体第 3 成分 (3<sup>rd</sup> component of complement: C3) 及び炎症性関連分子の測定を行い、C3 が NPSLE 患者の髄液中における炎症のメディエーターであるか否かを検討した。

【対象と手法】本学で神経精神症状を来したために、髄液検査を施行された SLE 患者(n=18)を対象とした。これを NPSLE 群(n=14)および non-NPSLE 群(n=4)に分け、その髄液と血清を用いて C3 濃度をウェスタンブロット法で、代表的な炎症性サイトカインである Interleukin-6 (IL-6)の濃度および炎症性タンパクである  $\alpha 2$  Macroglobulin ( $\alpha 2$ MG)の濃度を ELISA 法で、それぞれ測定し統計解析を行った。

【結果】髄液中 C3 濃度は、NPSLE 群で non-NPSLE 群に比べ有意な上昇が見られた( $p = 0.023$ )。また、髄液中 IL-6 濃度も NPSLE 群で有意な上昇が見られ

た ( $p = 0.0003$ )。さらに、髄液中 C3 濃度と髄液中 IL-6 濃度の間に高い正の相関性が認められた ( $r = 0.8182, p = 0.0053$ )。一方、髄液中  $\alpha 2$ MG 濃度は NPSLE 群で non-NPSLE 群に比べて有意な上昇が見られた ( $p = 0.0029$ )。また、髄液中 IL-6 濃度と髄液中  $\alpha 2$ MG 濃度との間に高い正の相関性が認められた ( $r = 0.8029, p = 0.0003$ )。

【考察】本研究において、NPSLE 患者の髄液中 C3 濃度および  $\alpha 2$ MG 濃度の上昇が認められた。また、両者の上昇は髄液中 IL-6 濃度と高い相関性を有することが初めて示された。この事より、NPSLE 患者における髄液中の C3 が炎症性サイトカインを介した中枢神経系における炎症病態に関与する可能性が示唆された。

## 序論

全身性エリテマトーデス (Systemic Lupus Erythematosus: SLE) は、遺伝的素因を背景とし、感染・妊娠・紫外線・薬物など何らかの環境因子の刺激によって生体内に自己抗体が産生される疾患である。産生された自己抗体は抗原と結合する事で免疫複合体を形成し、それが皮膚・腎臓・腸管・血管壁などの組織へ沈着する事によって補体の活性化を起し臓器障害を来す<sup>1</sup>。SLE 患者の末梢血中では主に補体の古典経路が活性化し、補体の分解産物であるアナフィラトキシン (C3a や C5a) が生じる。この結果、肥満細胞や好塩基球から化学伝達物質が放出され、さらに好中球などの炎症細胞が遊走された結果、貪食作用やリソゾームの放出が起こる事で細胞・組織に傷害を起こす。さらに補体の最終産物である膜侵襲複合体も直接的に細胞障害を起こす。

一方、SLE に合併する中枢神経系の異常は、神経精神 SLE (Neuropsychiatric SLE: NPSLE) と呼ばれ<sup>2</sup>、予後不良な病態である。その本態は中枢神経系の炎症であるため、免疫応答のマーカーは血清中よりも髄液中でより顕著である事が予想される。実際に NPSLE における髄液中の自己抗体に関しては多くの報告がある。NPSLE 患者の血清中で約半数が陽性を示す抗リボソーム P 抗体価は髄液中でも上昇していることが報告され<sup>3</sup>、この抗体による炎症性サイトカイン発現の上昇の報告<sup>4</sup>がある。また、髄液中の抗神経細胞抗体<sup>5</sup>や N-methyl-D-aspartate (NMDA) の受容体に対する抗体 (抗 NMDA 受容体抗体)<sup>6</sup>が、NPSLE に関連するという報告もある。さらに当科において Watanabe および Sasajima らは、NPSLE 患者の血清中および髄液中で解糖系の酵素である Triosephosphate isomerase (TPI) に対する抗 TPI 抗体が増加していることを見出した<sup>7,8</sup>。この知見に基づき Sato らは、抗 TPI 抗体を産生するハイブリドーマをマウスの髄腔内へ投与し、脈絡叢への免疫グロブリンの沈着を示した<sup>9</sup>。す

なわち NPSLE 患者において、自己抗体から成る免疫複合体が組織へ沈着し炎症反応を起こすという発病メカニズムが、髄液中でも起きる可能性を示した。また SLE のモデルマウスである MRL/lpr lupus mouse model において、補体の合成を阻害する事で脳細胞の血管周囲への免疫グロブリンの沈着が抑制されたという報告がある<sup>10</sup>。これらの報告は、NPSLE の髄液中における補体成分が、免疫応答のメディエーターとして重要な役割を果たしている可能性を示唆している。血清中においては、免疫複合体形成のために補体成分は消費され濃度の低下を示す。従って、髄液中でも補体成分が血清中と同様に減少しているか否かを検討した。具体的には、補体活性化の主体である C3 (3<sup>rd</sup> component of complement)に着目し、NPSLE 患者の髄液中 C3 濃度を測定した。また、Interleukin-6 (IL-6)は血清中で補体の活性化により誘導される代表的な炎症性サイトカインであるが、髄液中でも IL-6 濃度が上昇し、さらにそれが C3 濃度と相関するか否かを検討した。さらに、IL-6 によって産生が亢進される  $\alpha$ 2 Macroglobulin ( $\alpha$ 2MG)の濃度を ELISA 法で測定した。

## 対象と方法

2003 年から 2014 年までに福島県立医科大学附属病院において SLE と診断された患者のうち、神経精神症状を来し髄液検査を施行された 18 例を対象とした。すべての SLE 患者は 1982 年のアメリカリウマチ学会の提唱する SLE の分類基準<sup>11</sup>を満たしていた。NPSLE の定義は 1999 年の同学会における NPSLE の分類基準<sup>2</sup>に従った。一方、SLE の確定診断は付いているが NPSLE 分類基準に従わず、さらに神経精神症状が SLE 自体の病態によるものではないと診断されたものを non-NPSLE と定義した。また、細菌性・ウイルス性髄膜炎などの感染症に伴う精神神経症状の症例は除外した。NPSLE 群と non-NPSLE 群の

患者背景については患者カルテで行い、年齢、罹患年数および神経精神症状が出現してから髄液検査を受けるまでの日数を調査した。さらに神経精神症状以外の SLE 随伴症状・採血データを集計した。SLE の活動性の評価として SLEDAI<sup>12</sup> (SLE disease activity index : 5 点未満は軽度, 6~10 点で中程度, 11~19 点で高い活動性, 20 以上で非常に強い活動性があると定義されている) を用いた。尚, これらはすべて髄液検査を受けたのとはほぼ同時期のデータで集計した。データの統計解析は PRISM6 (GraphPad 社)を用いた。変数の中央値は Mann-Whitney's U test,さらに 2 変量間の相関関係は Spearman's correlation coefficient by rank test でそれぞれ解析を行った。

また, この研究は福島県立医科大学倫理委員会の定める倫理規則の承認 (No.613)に基づいて行われた。

髄液中の C3 濃度はウエスタンブロット法で定量した。C3 は  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖がジスルフィド結合を介して結合している。髄液中の C3 濃度の測定では、ジスルフィド結合を切断せず、非還元条件下でウエスタンブロット法を行った。髄液検体をメルカプトエタノール無添加ドデシル硫酸ナトリウム(SDS-2ME)溶液で 10 倍に希釈した後、5-20%ポリアクリルアミドゲル(WAKO 社)へ加え電気泳動(定電流 20 mA, 40 分)を行った。泳動したゲルをセミドライ泳動槽でニトロセルロース膜へ転写し(定電流 180 mA, 25 分)、ブロッキング液(1% ウシ血清由来アルブミン)で一晩ブロックした。転写膜を 0.1% Tween-20 添加リン酸緩衝生理食塩水(PBST)で 1000 倍希釈した抗ヒト C3 抗体 (1.2  $\mu$ g/ml, ウサギ, ポリクローナル, Abcam 社)で 2 時間反応させた後、PBST で振盪洗浄した(5 分間, 3 回)。次いで転写膜を PBST で 5000 倍希釈した Horse radish peroxidase (HRP) 標識抗ウサギ IgG 抗体 (0.2  $\mu$ g/ml, ポリクローナル, Promega 社)で 2 時間反応させた後に PBST で同様に振盪洗浄した。最後に検出試薬として

SuperSignal<sup>®</sup> West Dura Extended Duration Substrate (Thermo 社)を用い、1 分間反応させた後に EG-Capture MG (ATTO 社)で測定し、Image Saver 6 (ATTO 社)でバンドを検出した。同一転写膜上には定量用のスタンダードとして精製ヒト C3 がそれぞれ 1, 5, 10, 20, 40 ng/lane 含まれており、検出したスタンダード C3 のバンドの信号強度を CS Analyzer (ATTO 社)におけるデンシトメトリで検量線を作成し髄液中の C3 濃度を算出した。尚、髄液と血清の間で比較するための血清中 C3 濃度は、本学検査部において免疫比濁法で測定された数値をカルテより集計して用いた。

$\alpha$ 2MG に関しては、NPSLE 患者髄液中における量を質的に観察するためまずウエスタンブロット法で検出した。髄液検体をメルカプトエタノール添加 SDS 溶液(SDS+2ME)で 10 倍希釈した後、7.5%ポリアクリルアミドゲル(WAKO 社)へ加え電気泳動 (定電圧 200V, 60 分)を行った。泳動したゲルをセミドライ泳動槽でニトロセルロース膜へ転写し (定電圧 20 V, 25 分), 1% BSA-PBS で一晚ブロックした。転写膜を PBST で 1000 倍希釈した抗ヒト  $\alpha$ 2MG 抗体 (2.0  $\mu$ g/ml, ヤギ, ポリクローナル, Cappel 社) で 1 時間反応させた後、PBST で振盪洗浄した(5 分間, 3 回)。次いで転写膜を PBST で 5000 倍希釈した HRP 標識抗ヤギ IgG 抗体 (0.08  $\mu$ g/ml, ポリクローナル, Santa Cruz Biotechnology 社)で 1 時間反応させた後に PBST で同様に振盪洗浄した。最後に SuperSignal<sup>®</sup> West Dura Extended Duration Substrate に 1 分間反応させた後に EG-Capture MG で測定し、Image Saver 6 でバンドを検出した。

続いて髄液中の IL-6 濃度を市販の ELISA キットである Ready-SET-Go!<sup>®</sup> (eBioscience 社)を用いて測定した。96 穴マイクロプレートに付属の希釈液で 250 倍希釈した抗ヒト IL-6 抗体をそれぞれ 100  $\mu$ l ずつウェルに加え、4℃で一晩静置した。翌日、希釈液で 5 回洗浄し同液で 2 時間ブロックした。5 回洗

浄し、スタンダードの精製 IL-6 および希釈液で 2 倍希釈した髄液サンプルをそれぞれ 100  $\mu$ l ずつウェルに加え 4°C で一晩静置した。翌日、5 回洗浄し、二次抗体として 250 倍に希釈した抗ヒト IL-6 抗体をそれぞれ 100  $\mu$ l ずつウェルに加え室温で 60 分間静置した。その後、5 回洗浄し 250 倍希釈した HRP 標識アビジンをそれぞれ 100  $\mu$ l ずつウェルに加え室温で 60 分間静置した。7 回洗浄し Substrate TMB 液をそれぞれ 100  $\mu$ l ずつウェルに加え室温で 15 分間反応させた。これに 2 規定硫酸を 50  $\mu$ l ずつ加え反応を停止させ、Microplate Reader (BioRad 社) で吸光度測定(450 nm)を行った。

続いて髄液および血清中  $\alpha$ 2MG 濃度を ELISA 法で測定した。髄液は 18 検体を測定したが、血清に関しては保存検体の無い症例が 8 例あり合計 10 検体を測定した(うち NPSLE 7 例, non-NPSLE 3 例)。過ヨウ素酸処理した抗ヒト  $\alpha$ 2MG 抗体 (2.0  $\mu$ g/ml, ヤギ, ポリクローナル, Cappel 社) を MaxiSorp 96 穴プレート(NUNC 社)にそれぞれ 100  $\mu$ l ずつ加え 4°C で一晩静置した。翌日 0.1% Tween-20 添加 Tris-HCl 緩衝液 (TBST) で 1 回洗浄を行い、10% ブロックエース (DS ファーマバイオメディカル社) をそれぞれ 300  $\mu$ l ずつウェルに加え 1 時間ブロックした。その後、TBST で 5 回洗浄した後に TBS で 200 倍希釈した髄液サンプルをそれぞれ 100  $\mu$ l ずつウェルに加え 4°C で一晩静置した。翌日 TBST で 5 回洗浄し、HRP 標識抗ヒト  $\alpha$ 2MG 抗体 (2.0  $\mu$ g/ml, ヤギ, ポリクローナル, GeneTex 社) をそれぞれ 100  $\mu$ l ずつウェルに加え室温で 60 分間反応させた。その後 TBST で 5 回洗浄し、3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB) Peroxidase Substrate (Cappel 社) で 15 分間反応させた。これに 1 規定塩酸を加え反応を停止させ、Microplate Reader で吸光度測定(450 nm)を行った。



## 結果

患者背景を表 1 に示す。両群ともに女性が多く年齢の分布もほぼ同等であった。NPSLE 群では non-NPSLE 群に比べて SLE の罹患年数が短く、SLE 発症と同時に中枢神経症状を来した例は 3 例で見られた。神経精神症状が出現してから髄液検査を行うまでの期間は両群でそれぞれ 3.5 日、3 日と短く、髄液は神経精神症状出現のほぼ急性期に採取されていた。また、神経精神症状発症時に NPSLE 群 14 例において、以下の随伴症状が認められた。皮疹 (6 例)、口腔内潰瘍 (1 例)、関節炎 (4 例)、胸膜炎 (4 例)、腎炎 (7 例) 及び腸炎 (2 例)。一方、non-NPSLE 群 4 例ではこれらの随伴症状は認められなかった。次に、患者の採血データおよび SLEDAI を表 2 に示す。ヘモグロビン値、リンパ球数、血小板数および抗 DNA 抗体価に両群間で差は見られなかった。血清中 C3 および C4 濃度は non-NPSLE 群に比べ NPSLE 群で有意に低下が見られ、NPSLE 患者の血清中において補体が活性化していることが示された。また、SLEDAI は non-NPSLE 群に比べ NPSLE 群で有意に高く、SLE 全体としての活動性が高いことが示された。

次に、NPSLE 患者の髄液の抗 C3 抗体によるウェスタンブロットを行った。non-NPSLE 群に比べて、NPSLE 群の C3 のバンド(分子量約 180 kDa)は強いシグナルを呈し髄液中における C3 濃度の上昇が示された (図 1)。これをデンストメトリーで定量化し、NPSLE 群と non-NPSLE 群との比較を行った。髄液中 C3 濃度は、NPSLE 群で non-NPSLE 群に比べ有意な上昇が見られた (median, 16.59 versus 8.92  $\mu\text{g/ml}$ ,  $p = 0.023$ ) (図 2a)。一方、血清中 C3 濃度は、NPSLE 群で non-NPSLE 群に比べ有意な低下が見られた (median, 57.5 versus 97.0  $\text{mg/dl}$ ,  $p = 0.037$ ) (図 2b)。また、髄液中 C3 濃度と血清中 C3 濃

度との相関性は見られなかった ( $r = 0.3121$ ,  $p = 0.2073$ ) (図 3)。従って, C3 の動態は髄液と血清の間で異なることが示された。

次に、NPSLE 患者の髄液中 IL-6 濃度を ELISA 法で測定した。髄液中 IL-6 濃度は、NPSLE 群で Non-NPSLE 群に比べ有意な上昇が見られた (median, 111.1 versus 2.4 pg/ml,  $p = 0.0003$ ) (図 4)。また、髄液中 C3 濃度と髄液中 IL-6 濃度の相関性を評価するため両者を比較したところ、強い正の相関性が認められた ( $r = 0.8182$ ,  $p = 0.0053$ )。

次に、代表的な炎症性タンパクである  $\alpha 2$ MG 濃度を測定するために、抗  $\alpha 2$  MG 抗体による SLE 患者髄液のウェスタンブロットを行った。non-NPSLE 群に比べて NPSLE 群では髄液中  $\alpha 2$  MG のバンド (還元条件下で分子量約 170 kDa) は強いシグナル強度を示し、髄液中における  $\alpha 2$ MG の増加が示された (図 5)。

次に抗  $\alpha 2$ MG 抗体を用いた ELISA により髄液中・血清中それぞれの  $\alpha 2$ MG 濃度の測定を行い、NPSLE 群と non-NPSLE 群で比較した。髄液中  $\alpha 2$ MG 濃度は、NPSLE 群で non-NPSLE 群に比べ有意な上昇が見られた (median 2.01 versus 0.79  $\mu$ g/ml,  $p = 0.0029$ ) (図 6a)。一方、血清中において両群間での  $\alpha 2$ MG 濃度の差は見られなかった (median 1.33 versus 1.58 mg/ml,  $p = 0.2667$ ) (図 6b)。すなわち、NPSLE 患者における  $\alpha 2$ MG 濃度の上昇は髄液中でのみ起こる現象であることが示された。さらに、髄液中における  $\alpha 2$ MG 濃度と IL-6 濃度に強い正の相関性が認められた ( $r = 0.8029$ ,  $p = 0.0003$ )。

## 考察

本研究において、NPSLE 患者髄液中の C3, IL-6 および  $\alpha$ 2MG 濃度がそれぞれ上昇し、さらにそれらが正の相関関係にあることが示された。また髄液と血清との間で C3 濃度の相関が見られないことから、C3 は髄液中において独立した代謝を呈することが考えられた。これまで様々な NPSLE の病態の研究がなされているが、何が中枢神経系に炎症を惹起するプロモーターなのかは解明されていない。しかし、前述したように NPSLE の髄液中には様々な自己抗体の出現が報告されており、この自己抗体によって起こる炎症が補体を介して進展することが予想された。髄液中の補体は一般的には血液脳関門<sup>13</sup>のために血液中からは髄液内へ侵入しないとされ、その代わりに脳内の細胞によって産生され则认为られている。脳内の細胞で補体を産生するのは神経細胞やグリア細胞（アストロサイト、マイクログリアおよびオリゴデンドロサイト）であり、脳内で炎症が起きると炎症性サイトカインである IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  および IL-1 $\beta$  により補体成分の産生が上昇するとされている<sup>14,15</sup>。産生された補体成分は感染防御や炎症惹起のみならず、神経の新生、シナプス形成および神経の再生や増殖などの組織保護に関わる働きを有すことも最近になって明らかにされている<sup>14</sup>。

一方、活動性の高い SLE 患者血清中の C3 濃度は一般的に低下する。これは、免疫複合体が組織に沈着することで末梢血中の補体が消費されてしまうためである。脳組織に免疫複合体が沈着し補体が活性化するのであれば、同様のメカニズムによって消費された髄液中 C3 濃度は低下すると予想された。しかし、本研究では髄液中 C3 濃度の上昇が見られた。この理由として、“髄液内では消費される補体よりも産生される補体の量が遥かに多い”，また“中枢神経系の細胞への免疫複合体の沈着する量が、皮膚や腎臓など血清中の反応に比べて遥かに

少ない”などのメカニズムの違いによるものなどが考えられる。しかし 1971 年の報告によると、NPSLE 髄液中の補体成分 C4 濃度は疾患活動期で低値であるという報告がある(C3 の報告は無い)<sup>16</sup>。反対にその後の 2 例の報告では、NPSLE 患者の髄液中 C3 濃度はコントロール群に比べて差が無いが、髄液と血清中の補体濃度をそれぞれのアルブミン濃度で補正したインデックス値で見ると C4、C3 インデックス値が増加するという報告がある<sup>17,18</sup>。後者の 2 例では NPSLE 患者の髄液中における補体の産生の亢進があると結論づけており、本研究の結果をサポートするものである。しかし、各報告の間で患者背景、補体の測定法および髄液が採取された時期が異なるため、今後も症例数を増やして検討を続ける必要があると考えられた。

また、本研究で NPSLE 患者の髄液中には高濃度の IL-6 が検出されており、髄液中 C3 と正の相関を示した。これまでの報告では NPSLE 患者における IL-6 濃度は髄液中で上昇し<sup>19</sup>、さらに NPSLE の中でも精神症状に焦点を当てた”Lupus Psychosis”の病態においては髄液中 IL-6 濃度が感度・特異度が高いマーカーであると報告されており<sup>20</sup>、本研究の結果と一致している。一般的に補体が活性化される過程において C3 は C3a へ分解され、さらに補体活性化経路の下流タンパクである C5 は C5a へ分解される。これらはアナフィラトキシンと呼ばれ、補体受容体を持つ好中球やマクロファージに結合し、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  などの炎症性サイトカイン分泌を促進する<sup>15,21</sup>。その他にも IL-6 は脳のグリア細胞によって産生される事が知られている<sup>22</sup>。本研究の髄液中 C3 と IL-6 の高い相関性は、髄液中に増加した C3 が血炎症のメディエーターとして IL-6 産生を促進させ、炎症病態の形成に関与している可能性を示している。

さらに、我々は IL-6 により誘導される炎症性タンパクである  $\alpha 2$  MG の濃度を測定した。NPSLE 患者において髄液中  $\alpha 2$  MG 濃度は上昇し、さらに髄液中

IL-6 濃度と正の相関を示した。 $\alpha 2$  MG は分子量約 720 kDa の高分子であり、血清中では主に肝臓で産生されるが、中枢神経内ではグリア細胞が産生<sup>23</sup>している。 $\alpha 2$  MG の主な機能は、①タンパク分解酵素の阻害機能<sup>24</sup>および②タンパクの担体機能<sup>25</sup>である。すなわち、 $\alpha 2$  MG は炎症時の過剰なタンパク分解酵素を抑制して組織障害を防ぐ。一方、 $\alpha 2$  MG は IL-6 に結合しその担体として働き、IL-6 活性の維持に寄与する。本研究の NPSLE 患者髄液中の IL-6 と  $\alpha 2$  MG の高い相関性は、IL-6 のシグナルにより髄液中に  $\alpha 2$  MG 産生が促進された可能性を示している。

NPSLE に対する治療としては、高用量ステロイドやシクロフォスファミドを始めとする免疫抑制剤が用いられている。しかし、日常臨床においてこうした治療に抵抗性を示し難渋する NPSLE の症例も少なくないため、難治性の中枢神経疾患に対する新規治療法の開発が望まれている。NPSLE における中枢神経系の炎症の進展に補体が重要な役割を果たしているとするれば、補体制御をターゲットとした新しい治療戦略が考えられる。

## 結語

本研究では NPSLE 患者において髄液中 C3 濃度の上昇が示された。これは、SLE 患者血清中で観察される C3 濃度の低下と対照的な現象である。また、髄液中における IL-6 濃度と、C3 濃度および  $\alpha 2$  MG 濃度の相関性が示された。この結果は我々が当初想定した、髄液中の炎症病態の形成に補体が関与しているという仮説を支持するものである。今後、病態への補体の関与を証明するためには、髄液中の補体の活性化フォームの増加を示す必要がある。また、3 種類ある補体活性化経路のどの経路が優位に働いているかを明らかにする必要がある。それによって、NPSLE の病態の解明および新たな治療法の開発が期待される。

## 謝辞

本研究に関し，ご指導いただいた本学生化学講座 橋本康弘教授，検体提供にご協力いただいた北里大学 膠原病感染症内科 廣畑俊成教授，本学神経内科学講座 宇川義一教授および吉原章王助教に感謝の意を表します。

また，実験に際してご指導・ご協力いただいた生化学講座 荻谷慶喜准教授，伊藤浩美助教，星京香氏，菅野真由美氏，当講座 渡辺浩志教授，大沼京子氏および佐藤千賀子氏に感謝の意を表します。

## 文献

1. Rahman A, Isenberg DA. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2008;358:929-39.
2. The American College of Rheumatology nomenclature and case definitions for neuropsychiatric lupus syndromes. *Arthritis Rheum* 1999;42:599-608.
3. Hirohata S, Arinuma Y, Takayama M, Yoshio T. Association of cerebrospinal fluid anti-ribosomal p protein antibodies with diffuse psychiatric/neuropsychological syndromes in systemic lupus erythematosus. *Arthritis research & therapy* 2007;9:R44.
4. Nagai T, Arinuma Y, Yanagida T, Yamamoto K, Hirohata S. Anti-ribosomal P protein antibody in human systemic lupus erythematosus up-regulates the expression of proinflammatory cytokines by human peripheral blood monocytes. *Arthritis Rheum* 2005;52:847-55.
5. Weder-Cisneros ND, Tellez-Zenteno JF, Cardiel MH, et al. Prevalence and factors associated with headache in patients with systemic lupus erythematosus. *Cephalalgia* 2004;24:1031-44.
6. Arinuma Y, Yanagida T, Hirohata S. Association of cerebrospinal fluid anti-NR2 glutamate receptor antibodies with diffuse neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2008;58:1130-5.
7. Watanabe H, Seino T, Sato Y. Antibodies to triosephosphate isomerase in patients with neuropsychiatric lupus. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;321:949-53.
8. Sasajima T, Watanabe H, Sato S, Sato Y, Ohira H.

Anti-triosephosphate isomerase antibodies in cerebrospinal fluid are associated with neuropsychiatric lupus. *J Neuroimmunol* 2006;181:150-6.

9. Sato S, Watanabe H, Shio K, Kobayashi H, Ohira H. Association of anti-triosephosphate isomerase antibody and MRL/MpJ-Faslpr mouse. *J Neuroimmunol* 2010;226:110-5.

10. Alexander JJ, Bao L, Jacob A, Kraus DM, Holers VM, Quigg RJ. Administration of the soluble complement inhibitor, Crry-Ig, reduces inflammation and aquaporin 4 expression in lupus cerebritis. *Biochim Biophys Acta* 2003;1639:169-76.

11. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;25:1271-7.

12. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum* 1992;35:630-40.

13. Reese TS, Karnovsky MJ. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol* 1967;34:207-17.

14. Rutkowski MJ, Sughrue ME, Kane AJ, Mills SA, Fang S, Parsa AT. Complement and the central nervous system: emerging roles in development, protection and regeneration. *Immunol Cell Biol* 2010;88:781-6.

15. Morgan BP, Gasque P. Extrahepatic complement biosynthesis: where, when and why? *Clin Exp Immunol* 1997;107:1-7.

16. Petz LD, Sharp GC, Cooper NR, Irvin WS. Serum and cerebral spinal fluid complement and serum autoantibodies in systemic lupus



erythematosus. *Medicine (Baltimore)* 1971;50:259-75.

17. Jongen PJ, Boerbooms AM, Lamers KJ, Raes BC, Vierwinden G. Diffuse CNS involvement in systemic lupus erythematosus: intrathecal synthesis of the 4th component of complement. *Neurology* 1990;40:1593-6.

18. Jongen PJ, Doesburg WH, Ibrahim-Stappers JL, Lemmens WA, Hommes OR, Lamers KJ. Cerebrospinal fluid C3 and C4 indexes in immunological disorders of the central nervous system. *Acta Neurol Scand* 2000;101:116-21.

19. Hirohata S, Miyamoto T. Elevated levels of interleukin-6 in cerebrospinal fluid from patients with systemic lupus erythematosus and central nervous system involvement. *Arthritis Rheum* 1990;33:644-9.

20. Hirohata S, Kanai Y, Mitsuo A, Tokano Y, Hashimoto H. Accuracy of cerebrospinal fluid IL-6 testing for diagnosis of lupus psychosis. A multicenter retrospective study. *Clin Rheumatol* 2009;28:1319-23.

21. Monk PN, Scola AM, Madala P, Fairlie DP. Function, structure and therapeutic potential of complement C5a receptors. *Br J Pharmacol* 2007;152:429-48.

22. Horii Y, Muraguchi A, Suematsu S, et al. Regulation of BSF-2/IL-6 production by human mononuclear cells. Macrophage-dependent synthesis of BSF-2/IL-6 by T cells. *J Immunol* 1988;141:1529-35.

23. Mori T, Iijima N, Kitabatake K, Kohsaka S. Alpha 2-macroglobulin is an astroglia-derived neurite-promoting factor for cultured neurons from rat central nervous system. *Brain Res* 1990;527:55-61.

24. Barrett AJ. Alpha 2-macroglobulin. *Methods Enzymol* 1981;80 Pt

C:737-54.

25. Matsuda T, Hirano T, Nagasawa S, Kishimoto T. Identification of alpha 2-macroglobulin as a carrier protein for IL-6. J Immunol 1989;142:148-52.

## Figure Legends

### 図 1 .

非変性条件下における髄液を用いて、抗 C3 抗体によるウェスタンブロットを行った。コントロールの C3 は分子量 180 kDa のバンドとして検出された。Non-NPSLE 群に比べて NPSLE 群で髄液中 C3 のバンドは強いシグナルを示した。

### 図 2.

- a. SLE 患者髄液を抗 C3 抗体によるウェスタンブロットを行い、バンドの信号強度をデンシトメトリーで定量した。髄液中 C3 濃度は、NPSLE 群で non-NPSLE 群に比べ有意な上昇が見られた (median, 16.59 versus 8.92  $\mu\text{g/ml}$ ,  $p = 0.023$ )。
- b. SLE 患者血清中の C3 濃度は免疫比濁法で定量した。血清中 C3 濃度は、NPSLE 群で non-NPSLE 群に比べ有意な低下がみられた (median, 57.5 versus 97.0  $\text{mg/dl}$ ,  $p = 0.037$ )。

### 図 3.

SLE 患者における髄液中および血清中 C3 濃度の相関図を示す。両者に C3 濃度の相関性は見られなかった( $r = 0.3121$ ,  $p = 0.2073$ )。

### 図 4.

抗 IL-6 抗体による ELISA で髄液中 IL-6 濃度を測定した。髄液中 IL-6 濃度は NPSLE 群で Non-NPSLE 群に比べ有意な上昇が見られた (median, 111.1 versus 2.4  $\text{pg/ml}$ ,  $p = 0.0003$ )。

図 5.

変性条件下における髄液を用いて、抗  $\alpha 2\text{MG}$  抗体によるウェスタンブロットを行った。コントロールの  $\alpha\text{MG}$  は 170 kDa のバンドとして検出された。Non-NPSLE 群に比べ NPSLE 群で髄液中  $\alpha 2\text{MG}$  のバンドは強いシグナルを示した。

図 6.

抗  $\alpha 2\text{MG}$  抗体を用いた ELISA で、髄液中および血清中の  $\alpha 2\text{MG}$  濃度を測定した。

- a. 髄液中  $\alpha 2\text{MG}$  濃度は、NPSLE 群で non-NPSLE 群に比べ有意な上昇が見られた (median 2.01 versus 0.79  $\mu\text{g/ml}$ ,  $p = 0.0029$ )。
- b. 血清中  $\alpha 2\text{MG}$  濃度は両群間で差は見られなかった (median 1.33 versus 1.58  $\text{mg/ml}$ ,  $p = 0.2667$ )。