

〔集会〕

## 第10回補体シンポジウム

日 時 昭和48年12月10日-11日  
 会 場 福岡市第一勧銀ビル7階 三鷹ホール  
 世話人 九州大学医学部第一外科 鳥巢要道  
 (事務局) 国立がんセンター研究所 岡田秀親

### 1. TTHA を用いた EAC14 cell の作り方

大阪府立成人病センター

永木和義, 飯田恭子, 稲井真弥

(緒言)

EAC14 cell は, 補体成分, 特に C 1, C 2 および C 3 の定量に不可欠のものである. モルモット EAC14 cell (EAC14<sup>gp</sup> cell) については, すでに Mayer らが発表し, これを西岡らが改良し広く用いられている方法がある. しかし, ヒト EAC14 cell (EAC14<sup>hu</sup> cell) に

ついては多くの報告があるが, いずれも stable な cell は得られていない. 最近 Borsoss らは, EAC14<sup>gp</sup> cell に EDTA の存在下でヒトあるいはモルモット血清を加えることにより, ヒトあるいはモルモット EAC14 cell の作製に成功し, これに精製した C 1 を加えて, EAC 14 (gp or hu) cell が作れることを報告した. しかしながら西岡らの方法による EAC14<sup>gp</sup> cell 作製法では, EA に全血清を加えて 0°C, 7分30秒反応させるという非常に厳密な条件が必要であり, また, Borsoss らのヒト

表 1

buffer composition

	buffer A	buffer B
5 × VB stock	100 ml	20 ml
glucose	25 gm	45 gm
50 mM Ca TTHA	100 ml	100 ml
gelatin	1 gm	1 gm
ad aqua	1000 ml	1000 ml
pH	7.4	7.4
RSC at 0°C	0.085	0.029

procedures

EAC14 <sup>hu</sup>		EAC14 <sup>gp</sup>	
EA (5 × 10 <sup>8</sup> /ml) in buffer A	20 ml	EA (5 × 10 <sup>8</sup> /ml) in buffer B	20 ml
human serum dil. 1 : 10 $\bar{c}$ buffer A and incubated at 37°C for 15 min	50 ml	guinea pig serum dil. 1 : 10 $\bar{c}$ buffer B and incubated at 37°C for 15 min	4 ml
incubate at 30°C for 5 min		incubate at 30°C for 20 min	
Cfg at room temperature			
wash × 2 $\bar{c}$ buffer A		wash × 2 $\bar{c}$ buffer B	
wash × 2 $\bar{c}$ 0.3 mM Ca* GGVB		suspend in 0.15 mM Ca* 1 mM Mg* GGVB and incubate at 37°C for 2 hrs	
Cfg, resuspend in 0.15 mM Ca* 1 mM Mg* GGVB, store at 0°C			

山本健一, 高橋守信

あるいはモルモット EAC14 cell の作製法では, 単離された C1<sup>sp</sup> および C1<sup>hu</sup> を必要とする.

今回われわれは,

1) EA と C 1 の反応には Ca<sup>+</sup> が必要であり, EAC 14 と C 2 の反応には Mg<sup>+</sup> が必要であること

2) triethylene tetramine hexaacetic acid (TTHA) のキレート生成定数 (log k) は Ca<sup>+</sup> に対して 9.89, Mg<sup>+</sup> に対して 13.93 で, Ca<sup>+</sup> に比べ Mg<sup>+</sup> をより強く結合すること

を利用して, EA とヒト全血清で安定な EAC14<sup>hu</sup> cell を作り得たので報告する. また, この方法は EAC14<sup>sp</sup> cell の作製にも応用できた.

(方法および結果)

1) TTHA は NaOH で pH 7.4 に調製した 0.1M 溶液を作製, これに 0.1M CaCl<sub>2</sub> を等量加えて, 50mM Ca TTHA の stock solution を作製.

2) EA は通常の方法で作製したものを Ca TTHA buffer (後記) で 2 回洗った後, Ca TTHA buffer に浮遊させた.

3) ヒトあるいはモルモット血清は, Ca TTHA buffer で 10 倍に希釈後, 37°C, 15 分加温.

4) buffer 中の Ca TTHA の濃度は, 経験的に 5 mM とした.

5) 血清量, 反応温度および時間, イオン強度等を検討した結果, 表 1 に記す方法が最適であった. これらの条件の決定には, C 2 の溶血活性を示標とした.

以上の方法で作製した EAC14 cell によるヒトおよびモルモットの単離した C 1 および血清中の C 3 total の溶血活性は, 従来の方法で作製した EAC14 cell により得られた値とほぼ同じであったが, C 2 の溶血活性はヒト, モルモットともに従来の方法で得られた値より約 20% 低値を示した. この原因については不明である.

なお EAC14<sup>hu</sup> cell の stability を C 2 の溶血活性を示標として検討したところ, 少なくとも 3 週間は安定であった.

(結語)

われわれは, TTHA の存在下で EA と全血清を反応させることにより, 従来の方法よりも容易でしかも確実にヒトおよびモルモット EAC14 cell を作ることに成功した. 単離した補体成分を用いないで stable なヒト EAC14 cell を作り得たのは, 今回のわれわれの方法が初めてである.

## 2. 免疫溶血反応に及ぼす金属イオンの影響

金沢大学がん研究所分子免疫部

Hadding らは C9<sup>hu</sup> による EAC1-8<sup>hu</sup> の lysis が Fe<sup>+</sup> により inhibit されることを, Götze らは C9<sup>sp</sup> による EAC 1-8<sup>sp</sup> の lysis が Fe<sup>+</sup>, Fe<sup>+</sup>, Cu<sup>+</sup>, Zn<sup>+</sup> により inhibit されることを報告している. われわれは Lachmann らの reactive lysis の系を用いて, 種々の metal ions の影響, その作用機序について解析を行った.

(方法)

buffer は isotonic veronal saline, pH 7.5 (VB) を用いた. C<sup>5678</sup> は Goldman らの方法, C9<sup>sp</sup> は田村らの方法により精製した. C7<sup>hu</sup> or <sup>sp</sup>, C8<sup>hu</sup> or <sup>sp</sup> は Cordis から購入した. hemolytic assay は  $3 \times 10^7$  の cell と 0.1 u of CH<sub>69</sub> の C9<sup>sp</sup> とを種々の metal ion 存在下で 37°C, 90 分 incubate し, 溶血度を測定した.

(結果)

1) 種々の metal ion の存在下での EC5678<sup>hu</sup> の C9<sup>sp</sup> による lysis を調べた. Fe<sup>+</sup>, Fe<sup>+</sup>, Co<sup>+</sup> では inhibition はみられないが, 10<sup>-5</sup>M の Cu<sup>+</sup> では 124%, 10<sup>-4</sup>M の Zn<sup>+</sup> では 170%, 10<sup>-5</sup>M の Zn<sup>+</sup> では 70% の inhibition がみられた. 2) EC5678<sup>hu</sup> と種々の metal ion を 37°C, 15 分間 incubate したのち, VB で洗い, C 9 を加えてさらに 90 分間 incubate し, 溶血度を調べた. Cu<sup>+</sup> では 70% の inhibition がみられたが, 他の metal ion では inhibition はみとめられなかった. 3) Cu<sup>+</sup> と Zn<sup>+</sup> をそれぞれ C 9 と 37°C, 15 分間 incubate した後, VB に対して 48 時間透析し, その溶血活性を調べると, どの場合も C 9 の溶血活性の inhibition はみられなかった. 4) E, EC5678<sup>hu</sup>, EC5678<sup>hu</sup> の VB 中での mechanical lysis (37°C, 180 分間 incubate) におよぼす metal ion の影響を調べた. Cu<sup>+</sup> と Zn<sup>+</sup> はどの cell に対しても inhibition を示し, Co<sup>+</sup> は inhibition を示さなかった. 5) 種々の metal ion 存在下で EC5678<sup>hu</sup> と C9<sup>sp</sup> とを 90 分間 incubate した後 (% lysis ①), VB で洗い, VB あるいは C9<sup>sp</sup> を含む VB に suspend し, さらに 90 分間 incubate した

表 1

	% lysis ①	% lysis ②
Cu <sup>+</sup> (10 <sup>-5</sup> )	-14.2	11.2
Zn <sup>+</sup> (10 <sup>-4</sup> )	-21.0	2.0
Co <sup>+</sup> (10 <sup>-4</sup> )	11.5	3.3
C 9	18.9	5.0
VB	- 4.3	21.2*

\* C 9 を加える.

表 2

	% lysis ①	% lysis ②
Cu* (10 <sup>-5</sup> )	32.6	4.9
Zn* (10 <sup>-4</sup> )	2.2	47.5
Co* (10 <sup>-4</sup> )	62.1	9.1
C 9	72.6	17.3
VB	- 3.5	67.5

(% lysis ②). VB に suspend した場合には, 表 1 のごとくいずれも lysis がみられず, C 9 を含む VB に suspend した場合には, 表 2 のごとく Zn\* では lysis がみられた. 6) C9<sup>SP</sup> による EC5678<sup>bu</sup> の lysis に対する Zn\* の inhibitory effect と C 9 の input との関係を調べると, C 9 の input が増加すると Zn\* による lysis の inhibition は減少した.

以上の結果を総合して, C9<sup>SP</sup> による EC5678<sup>bu</sup> の lysis の Cu\*, Zn\* による inhibition の作用機序として次のようなことを考えている.

1) Cu\* の場合: C 9 が EC5678 に結合した後, lysis に至るまでの赤血球膜上での溶血過程を irreversibly に inhibit する. C 9 と reversibly に結合して, その結合を inhibit する可能性も考えられる.

2) Zn\* の場合: 上と同じく赤血球膜上での溶血過程を reversibly に inhibit し, C 9 とも reversibly に結合して, その EC5678 への結合を inhibit する. Zn\* の場合は C 9 に対する直接作用の方が大きいと考えられる.

### 3. 無脊椎動物体液中に存在する補体関連物質

国立がんセンター研究所ウイルス部

野口淳夫, 島田彰子, 田村 昇

無脊椎動物体液中における補体の存在については, カエル R 3 血清の溶血活性が昆虫類の体液によつて回復するという Morgun の報告 (1949) 以来, その研究が途絶えていた. しかし最近 Day らは, CoVF によつて活性化され溶血をひきおす系が無脊椎動物に広く存在し, このものが補体系の原型であると報告した. 一方これに対して, この現象が CoVF に混在する phospholipase-A の作用によるものだとする Hall らの反論もあり, 現在のところ明確な結論は得られていない. われわれはカイコを用いたところ, その体液中に脊椎動物の補体系の機能を亢進または阻害する活性が存在することを明らかにし得た.

(材料および方法)

カイコ (*Bombyx mori* L) は現行実用品種および数種

の保存系統を用いた. 体液は 5 令末期の幼虫の腹足部から氷冷下で採取した. 採取体液は 0.01MPTU (phenylthiourea) を 1/10 量加え, 遠心後上清を -70°C に保存した.

R 3 血清はいろいろな動物の血清 1 ml あたり 5 mg の zymosan を加え, 37°C, 60 分反応させた後遠心し, その上清を用いた. 溶血活性の測定は, IgM または IgM rich な hemolysin で感作した EA 2 × 10<sup>8</sup>/ml in gl-GVB\* 0.2 ml に希釈した R 3 血清とカイコ体液をおのおの 0.2 ml ずつ加え, 37°C で 120 分反応させた後, 生食 5 ml を加え, 遠心後 OD 414mμ で測定した. その他の方法については常法にしたがったので省略する.

(結果および考察)

#### 1. R 3 血清の溶血活性を上昇させる因子

いろいろな動物の血清から作製した R 3 血清に, カイコ体液を加え溶血活性の上昇を測定したところ, モルモット R 3 血清の場合が最も顕著であつた. したがつて以後の実験は主としてモルモット R 3 血清を用いることにした(表 1). 次にこの現象が補体依存性か否かを明らか

表 1 いろいろな動物から作製した R 3 血清の EA 溶血におよぼすカイコ体液の (HL) 影響

R 3 血清を作製した動物	EA の溶血 (%)		
	R 3 + buffer*	R 3 + 1/4 HL	R 3 + 1/8 HL
ヒト	1.6	4.1	3.6
モルモット	6.0	79.0	70.8
ラット	0.0	0.0	0.0
ウサギ	3.9	5.9	4.6
ウシガエル 37°C**	15.8	13.4	9.9
ウシガエル 17°C	10.0	80.2	54.8

\* R 3 血清は 1/4 希釈を用いた.

\*\* ウシガエルは 37°C, 17°C で測定した.

にするため, EAC142 および EAC14 を用い, それぞれ 0.01M EDTA GVB\*\* 中において, モルモット R 3 血清とカイコ体液を反応させた. その結果, EAC142 の溶血はカイコ体液を加えることによつて著しく上昇したが, EAC14 は全く溶血せず, この現象が補体依存性の反応であることが確認できた (図 1).

次にカイコ体液をいろいろな方法で処理し, その溶血活性の変化を調べた. その結果, 56°C, 30 分加熱で失活し, 透析では大部分残る. また CoVF, zymosan, LPS による前処理はすこしの影響も示さなかつた. 以上のよりに, カイコ体液中には脊椎動物の血清を zymosan で

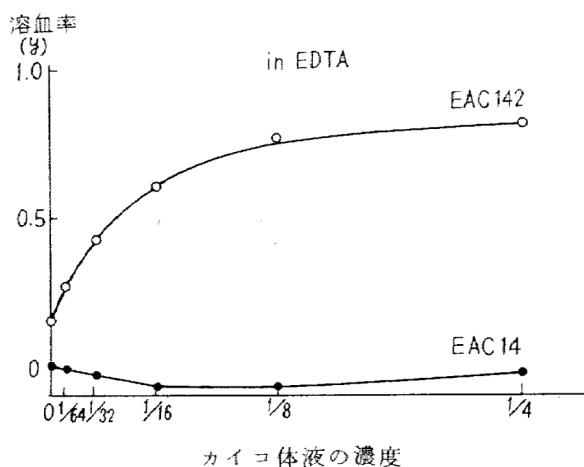


図1. モルモット R3 血清 (1/8 希釈) による EAC142 と EAC14 の溶血におよぼすカイコ体液の影響.

処理することによつて得られる R3 血清の、溶血活性を上昇させる因子が存在する。しかし CoVF 処理による R3 血清に対しては、その効果を示さなかつた。また各種の intermediate cell を用いてカイコ体液中の補体成分の測定を行つたが、inhibitor の存在もあつて、現在までのところ明確な結果は得ていない。

## 2. alternate pathway を障害する因子

上述したカイコ体液中に存在する因子が、脊椎動物の血清の存在下において、zymosan に吸収され得るか否か検討したところ、zymosan による補体の不活化が、カイコ体液によつて阻止されることが明らかになつた (表 2)。そこで、ヒト血清にカイコ体液を加え zymosan で処理したものを、免疫電気泳動法によつて調べたところ、 $\beta_{1c}$  の  $\beta_{1A}$  への conversion が完全に阻止されていた。以上から、カイコ体液中には alternate pathway

表2 zymosan による補体の不活化におよぼすカイコ体液 (HL) の影響

血清のいろいろな処理			残余補体価 ( $CH_{50}$ )	
血清	zymosan	HL	モルモット	ヒト
+			198.0	30.5
+		+	99.2	31.1
+	+		< 5	< 5
+	+	+	74.1	30.0
+	+	+	11.3	< 5

\* 血清に zymosan を加え 37°C, 60 分反応させ、上清に HL を加えた。その他の区では各要素を全部加えてから反応させた。

の阻害因子が存在していることがわかつた。

## 3. 両因子の同一性

カイコ体液中に存在する両因子が、それぞれ単一の物質であるか、さらには補体成分そのものかなどを明らかにするために、精製単離を行つた。現在のところまだ部分精製の段階であるが、硫酸塩析、CMセルロース、DEAEセルロース、Sephadex G-200 を通したところでは、両因子の活性 peak は常に一致する。以上から、R3 血清の溶血活性を上昇させる因子と、alternate pathway を障害する因子は、同一でかつ単一の物質であると現在のところ考えている。両因子の機能的相異は見かけ上のものにすぎず、実際には機構的に同一な現象であろうと考えられる。

## 4. 初乳の補体系

国立がんセンター研究所ウイルス部

中島俊一, 島田彰子, 田村 昇

都立築地産院 牛島広治

母乳栄養児が人工栄養児と比べて感染に対して抵抗力の強いことは周知の事実であり、初乳中 S-IgA を主とする免疫グロブリン等とともに補体系が重要な役割を果たしている可能性がある。

近年 properdin 系の研究が進み、IgA も properdin 系によつて補体と反応しうること、また必ずしも抗体を必要とせず、特にグラム陰性菌に対して有効であることが明らかにされてきた。

もしも、初乳中に properdin 系が存在し、初乳中の免疫グロブリンの大部分をしめる S-IgA や血清中の IgA と同様に補体と反応しうるものとするれば、E. coli を主とするグラム陰性菌感染が多く、かつ初感染が大部分である新生児期にきわめて有利であろう。

しかし初乳中の補体系に関しては、 $\beta_{1E}$ ,  $\beta_{1c}/\beta_{1A}$  が存在するとの報告以外全く報告がない。そこでわれわれは、初乳の補体系について検討を加えた。

(材料および方法)

正常分娩婦 5 名の第 1 日目から 4 日目までの初乳を採取し、15000rpm, 1 時間 2 回遠心し脂質をとり除き、使用時まで -70°C に保存した。

各成分の溶血活性は EAC1<sup>EP4Hu</sup> と oxyC2<sup>Hu</sup> 以外はすべてモルモット補体の成分を用いた。その他の方法については常法に従つたので省略する。

$\beta_{1E}$ ,  $\beta_{1c}/\beta_{1A}$  IgG, IgA, IgM は Behringswerke 社の partigen で測定した。

プロパジン系は CoVF および zymosan で 37°C, 1 時

表1 colostrum の補体価

	colostrum				serum
	1日目	2日目	3日目	4日目	
C 1	< 2-64 (2)	< 2-48 (14)	< 2-32 (14)	< 2-16 (9)	24000-32000 (28000)
C 4	1200-6400 (4700)	3200-25600 (10000)	3200-25600 (12000)	2400-19200 (9500)	128000-512000 (192000)
C 2	< 2- 8 (3)	< 2-192 (46)	64-256 (110)	32-256 (160)	2400-4800 (3800)
C 3	< 2-64 (20)	48-96 (64)	48-96 (67)	32-48 (38)	3200-9600 (5900)
C 5	32-256 (100)	16-256 (150)	96-192 (145)	96-256 (130)	32000-48000 (40000)
C 6	80-640 (260)	320-640 (380)	320-640 (380)	320-640 (350)	96000-128000 (115000)
C 7	5120-32000 (12000)	5120-64000 (27000)	3840-48000 (22000)	3840-32000 (20000)	240000-320000 (300000)
C 8	160-640 (320)	160-640 (320)	160-320 (290)	160-320 (7600)	60000-80000 (62000)
C 9	2000-8000 (4400)	4000-6000 (5600)	4000-8000 (6000)	4000-16000 (7600)	60000-120000 (95000)

表2 初乳と血清の溶血活性の比

C 1	0.0005 (0.0001-0.002)
C 4	0.07 (0.04 -0.15)
C 2	0.02 (0.004 -0.05)
C 3	0.008 (0.005 -0.008)
C 5	0.002 (0.001 -0.005)
C 6	0.003 (0.001 -0.003)
C 7	0.07 (0.02 -0.07)
C 8	0.005 (0.002 -0.01)
C 9	0.06 (0.04 -0.09)

間処理後、初乳のC 3を測定して検討した。

(結果および考察)

全補体成分が表1に示すごとく存在する。成人ヒト血清との比率では、表2に示すごとくC 4, C 7, C 9が高く、C 1は少ない傾向がみられた。しかし初乳中では初日から2日目にかけて、高濃度のところで溶血活性の阻止がみられ、C 1が2以下のものはそのためかもしれない。

$\beta_{1c}/\beta_{1A}$ , IgG, IgA, IgMは日数を経るに従って減少する。

蛋白量あたりの各成分の溶血活性の第1日目から4日目までの変動は、図1にC 2の例を示したが、初日に低く、3日目までは増加する例が多い。しかし例数自体少なく、microplate法で測定したため、はつきりした傾向

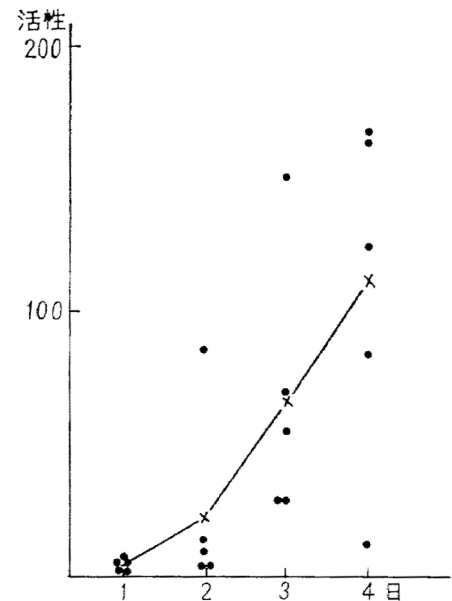


図1. C 2の溶血活性蛋白の変動。

は断定できない。

プロバジン系に関しては、CoVFおよびzymosanで処理した初乳はコントロールと比べて10-20%のC 3の不活化がみられる例もあるが、その差が判然としない例も存在した。Ouchterlony法でanti-GGGとの間に原液では沈降線が生じないが濃縮すると生じる。

以上の結果より、初乳中にはすべての補体系が存在

し、新生児期の host defense にかかなり重要な役割を果たしていると推察できる。

### 5. EAC1-8<sup>hu</sup> と C9<sup>gp</sup> による E\* 形成への 2 価金属イオンの影響

大阪府立成人病センター

北村 肇, 平松美佐子, 稲井真弥

#### (目的)

EAC1-8 と C 9 との反応において, C 8 として C8<sup>gp</sup> または C8<sup>hu</sup> を, C 9 として C9<sup>gp</sup> または C9<sup>hu</sup> を用い, それぞれ組合せを変えて 0.09M EDTA 中における E\* 形成をみたところ, EAC1-8<sup>hu</sup> と C9<sup>gp</sup> の組合せの場合は, 他の組合せの場合と異なり, 0.09M EDTA 中では E\* を作らないことが判明した. そこでこの原因追求を目的として実験を進めた.

#### (方法)

buffer は sucrose-gelatin veronal buffer; SGVB (pH 7.5,  $\mu = 0.055$ , Mg\* および Ca\* を含む) を用いた. 0.09 M EDTA は Frank の方法に準じて作製した. C8<sup>gp</sup> or <sup>hu</sup>, C9<sup>gp</sup> or <sup>hu</sup> はいずれも functionally pure なものを用いた. EAC1-7 cell は EAC1<sup>gp</sup> と 7 cell reagent (human serum より C 1, C 8 および C 9 を除いた fraction) を, EAC1-8<sup>gp</sup> or <sup>hu</sup> cell は EAC1-7 cell と C8<sup>gp</sup> or <sup>hu</sup> を incubation して作った.

#### (結果)

##### 1) 各組合せにおける 0.09M EDTA 中での E\* 形成

各組合せにおいて, EAC1-8 と C 9 を 0.09M EDTA 中で 30°C, 30min incubation した後の溶血 (□), 残った cell を SGVB に resuspend し, 37°C, 60min incubation した後の溶血 (▨), および, なお残った cell に再び SGVB 中で C 9 を加え, incubation した後の溶血 (▩) を測定した.

図 1 に示すごとく, EAC1-8<sup>gp</sup> と C9<sup>hu</sup> の場合は, すでに知られている EAC1-8<sup>gp</sup> と C9<sup>gp</sup> または EAC1-8<sup>hu</sup> と C9<sup>hu</sup> の場合と同様に, 0.09M EDTA 中で E\* は作るがその溶血は抑えられる. しかし EAC1-8<sup>hu</sup> と C9<sup>gp</sup> の場合は control (C9 なし) の場合と同様に E\* を作らない. しかも EAC1-8<sup>hu</sup> の site はなお intact であることが判明した.

##### 2) EAC1-8<sup>hu</sup> と C9<sup>gp</sup> による E\* 形成への EDTA およびイオン強度の影響

次に, EAC1-8<sup>hu</sup> と C9<sup>gp</sup> の場合, 0.09M EDTA 中で E\* を作らない原因を追求するため, 種々の EDTA 濃度の buffer を 2 種のイオン強度 ( $\mu = 0.150$  と  $\mu = 0.055$ ) の buffer を用いて作成し, それぞれの buffer 中での E\* 形成を比較した. その結果, 図 2 に示すごとく, いずれ

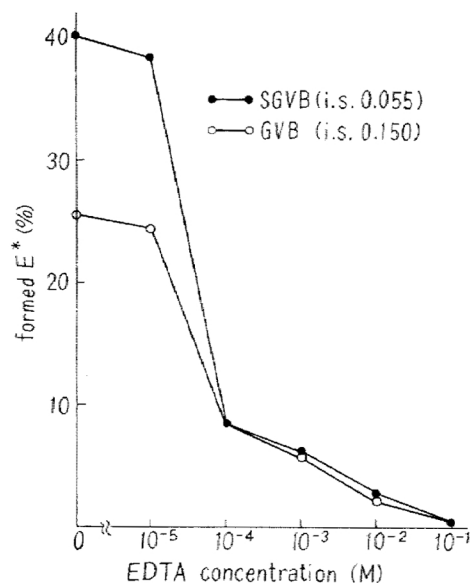


図 2.

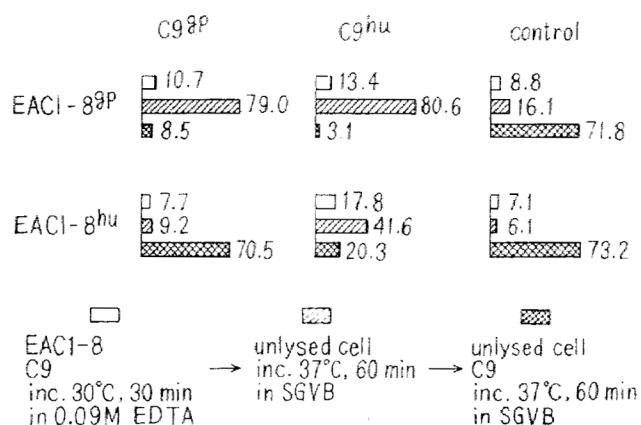


図 1.

のイオン強度でも EDTA 濃度が 100 $\mu$ M 以上の時は E\* 形成は抑制されるが, EDTA 濃度が 10 $\mu$ M 以下の時は E\* は形成される. また 2 種のイオン強度を持つ buffer の E\* 形成への効果を比較すると, EDTA 濃度が 10 $\mu$ M 以下の場合, 低イオン強度 ( $\mu = 0.055$ ) の方がより effective であつた. 以上より, この組合せにおいて 0.09 M EDTA 中で E\* を形成しないのは, イオン強度のためではなく EDTA そのものの効果であることが判明した. またこの事実は, 低濃度の EDTA が E\* 形成を抑えることより, この E\* 形成には 2 価金属イオンが必要である可能性を示す. そこで SGVB 中に contaminate している微量の金属イオンを IRC-50 resin を通すことにより除

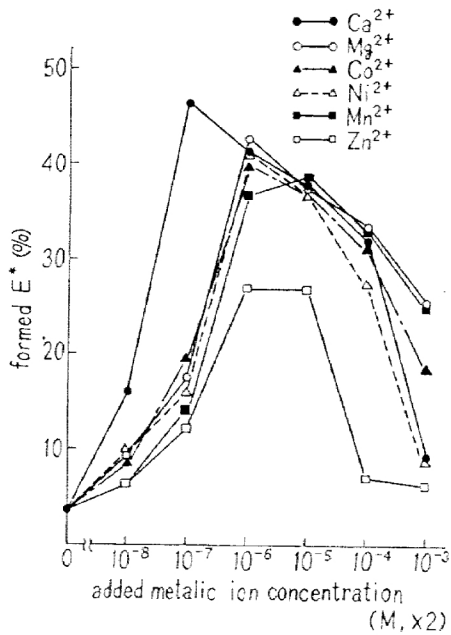


図 3.

き、2価金属イオンのE\*形成への影響を調べた。

### 3) 2価金属イオンのE\*形成への影響

各種濃度の2価金属イオンを含むbuffer中におけるE\*形成を比較した。図3に示すごとく、金属イオンを加えなかつたbuffer中ではほとんどE\*は形成されず、金属イオンを0.02μMから順次増量するに従ってE\*形成が認められた。Ca\*では0.2μM、その他の金属イオンでは2μM-20μMで最も効果的にE\*が形成された。しかし、いずれの金属イオンの場合も2mM以上の濃度ではかえってE\*形成は抑制された。各金属イオンの至適濃度におけるE\*形成への効果を比較すると、Ca\*が最もよく、Mg\*, Ni\*, Co\*およびMn\*がこれに続き、Zn\*は最も悪かつた。

以上より、EAC1-8<sup>HD</sup>とC9<sup>SP</sup>によるE\*形成には微量の2価金属イオンが必要であることが判明した。

### 6. ヒト補体第9成分(C9)のsingle radial immunodiffusionによる定量

金沢大学がん研究所分子免疫部

高橋セイ, 田中清子, 高橋守信

ヒトC9は、1969年 Hadding, Müller-Eberhardにより、血清のオイグロブリン分画から単一のα-グロブリンとして精製された。

われわれは、ヒトの種々の病的状態におけるC9の免疫化学的定量を行う目的のために、ヒトC9に対する特異抗血清を必要とした。ヒトC9を精製することを試

み、再現性の高い方法でこれに成功した。ヒト血漿400mlから、1.0M硫酸上清→DEAE→CM cellulose column→2.2M硫酸沈殿→ペピコン→Sephadex G-100ゲル濾過2回のステップを通して、ヒト血漿から回収率約8%、比活性は3300倍以上のものとして得ることができた。精製C9は、分子量7.9万、等電点4.4、抗全血清でinter-α-globulinであつた。

精製C9(95μg/ml)1mlとフロイド complete adjuvant 0.5mlを混合したものをウサギの前額部皮下に注射し、1週間後同じ場所に同じ量のC9をアジュバントとともに注射した。さらに1週間後に採血して抗血清を得た。

得られた抗血清1.5ml、バルビタール緩衝液(pH 8.6, μ=0.1)2.25ml, 3% agar(半井, agarose A-37)3.75mlで10×6.5cmのガラス板にまいて抗体寒天板をつくつた。

1検体14.7μl(直径4mmの穴)入れた。正常人(20-49才)29人に対してC9の定量を行つた結果、44.5±10.6μg/ml(±1SD)であつた。性別については、男(10名)41.5±14.4μg/ml(±1SD), 女(19名)46.2±8.1μg/ml(±1SD)であつた。

### 7. C1 proesteraseの精製およびその分子性状

九州大学第3内科 酒井好古

アラバマ大学 R.M. Stroud

(緒言)

血中において、C1sはそのprecursor formであるC1 proesterase(C1s)として存在する。immune complexesによるinternal activationあるいはtrypsin, plasminの蛋白分解作用によつて、C1sはC1sに活性化されることが知られている。この活性化機序を知る目的でC1sおよびC1sを精製し、両者の分子性状について検討した。

(成績)

anti-C1sの作成: ヒト, モルモット, ブタの抗C1sを作成するためそれぞれのC1sを迅速に精製した。血清より得られるneutral euglobulinを0.035M EDTA(pH 7.5; RSC 0.06)に対し透析し、その上清よりacrylamide gel electrophoresisにより抗原C1sを得、Freund's complete adjuvantを用いてウサギに免疫した。それぞれの抗C1sはmonospecificであり、EAC1を凝集し、C1s溶血活性を中和した。

C1sの精製: C1 proesterase, 新鮮ヘパリン血漿より0.06M-lysine存在下で得られるneutral euglobulin

の0.02 M EDTA, 0.005 M L-lysine (pH 7.5; RSC 0.04) 抽出物を DEAE cellulose column chromatography によつて精製した。精製された Cls は、抗ヒト血清に対しまた SDS acrylamide gel electrophoresis の上で homogeneous であり、その回収率は10-20%であつた。

Cl<sub>s</sub> および Cl<sub>s</sub><sup>-</sup> の specific activity: Cl<sub>s</sub> と Cl<sub>s</sub><sup>-</sup> の比活性を知るために、両者の精製標品を用いて溶血活性ならびに N 量を測定した。Cl<sub>s</sub><sup>-</sup> の 1 SFU は 0.01 μg/ml に当り、Cl<sub>s</sub> では 0.4 μg/ml を要し、Cl<sub>s</sub><sup>-</sup> の比活性は Cl<sub>s</sub> の 20-40 倍を示した。

Cl<sub>s</sub> および Cl<sub>s</sub><sup>-</sup> の電気泳動: 免疫電気泳動 (1% special noble agar, pH 8.6) において Cl<sub>s</sub><sup>-</sup> は特有な gull wing pattern を示し、その泳動度は Cl<sub>s</sub> に比し大である。

Cl<sub>s</sub> および Cl<sub>s</sub><sup>-</sup> の分子性状: Cl<sub>s</sub> および Cl<sub>s</sub><sup>-</sup> をそれぞれ 8 M urea 存在下で 0.1 M DTT により還元を行うと、SDS acrylamide gel electrophoresis 上で Cl<sub>s</sub><sup>-</sup> は 2 個の subunits よりなり、一方 Cl<sub>s</sub> は 1 個の polypeptide chain よりなることが示された。

Cl<sub>s</sub>, Cl<sub>s</sub><sup>-</sup> および Cl<sub>s</sub><sup>-</sup> subunits の分子量: SDS acrylamide gel 上で無処理 Cl<sub>s</sub> と Cl<sub>s</sub><sup>-</sup> の泳動度に認むべき差異がみられなかつたが、還元 Cl<sub>s</sub> は無処理 Cl<sub>s</sub><sup>-</sup> に比し移動度が遅れることが知られた。この所見は、還元により Cl<sub>s</sub> 分子の random coil arrangement が起こり、この状態がより正確な分子量を示すと考えられた。marker proteins を用いての分子量の測定結果、Cl<sub>s</sub> 140000, Cl<sub>s</sub><sup>-</sup> 110000 (104000-118000), Cl<sub>s</sub><sup>-</sup> subunit はそれぞれ 77000 (74000-80000), 36000 (32000-40000) であつた。超遠心分析法による分子量は、Cl<sub>s</sub> 133600 (124400-142700), Cl<sub>s</sub><sup>-</sup> 83200 (78200-88300), また、Cl<sub>s</sub> 4.2 S, Cl<sub>s</sub><sup>-</sup> 3.5 S の沈降係数が得られた。Cl<sub>s</sub> および Cl<sub>s</sub><sup>-</sup> のアミノ酸、糖分析: Cl<sub>s</sub> と Cl<sub>s</sub><sup>-</sup> のアミノ酸分析値には本質的な差異はみられなかつた。糖分析の結果、両者ともシアン酸含量の高い sialoglycoprotein であつた。

#### (結語)

精製 Cl<sub>s</sub> および Cl<sub>s</sub><sup>-</sup> の分子性状を検討した結果、Cl<sub>s</sub> から Cl<sub>s</sub><sup>-</sup> の活性化に際して一部 peptide が遊離し、単一 polypeptide 鎖が disulfide bond で結合する 2 個の polypeptide 鎖に変化することが示唆された。

#### 8. C1 proesterase の活性化機序

九州大学第3内科 酒井好古  
アラバマ大学 R.M. Stroud

#### (緒言)

精製 Cl<sub>s</sub> および Cl<sub>s</sub><sup>-</sup> の物理化学的性状を検討した結

果、後者は前者の 20-40 倍の溶血比活性をもち、電気泳動度が大、還元により Cl<sub>s</sub> は単一 polypeptide chain, Cl<sub>s</sub><sup>-</sup> は double polypeptide chains よりなることなどが知られた。Cl<sub>s</sub> activator を精製し、これを用いて Cl<sub>s</sub> を活性化する過程において、上記の両者の性状が再現することが知られた。

#### (成績)

Cl<sub>s</sub> activator の精製: 0.06 M L-lysine 存在下で新鮮血漿より neutral euglobulin を得、この分画より 0.02 M EDTA, 0.005 M L-lysine (pH 7.5; RSC 0.04) で抽出される分画をさらに DEAE および CM cellulose column chromatography により精製した。

Cl<sub>s</sub> activator と Cl<sub>r</sub> の同一性: 精製 Cl<sub>s</sub> activator は免疫化学的に Cl<sub>r</sub> と identical であることがわかつた。Cl<sub>s</sub> activator と Cl<sub>r</sub> の両活性の peak は、acrylamide gel electrophoresis における精製 Cl<sub>s</sub> activator の示す単一蛋白に一致してみられた。

Cl<sub>r</sub> による C1 proesterase の活性化: DFP で安定化した Cl<sub>s</sub> と精製 Cl<sub>r</sub> を 37°C で incubate し、経時的に溶血活性の測定と電気泳動を行った。Cl<sub>s</sub> より Cl<sub>s</sub><sup>-</sup> 活性化は 3 時間で完了した。精製 Cl<sub>s</sub> を 37°C で incubate し、経時的に得た samples を還元すると、単一 polypeptide 鎖より 2 個の polypeptide 鎖が形成される過程が明らかに示され、Cl<sub>s</sub> から Cl<sub>s</sub><sup>-</sup> へ convert されていることが確認された。

Cl<sub>s</sub><sup>-</sup> esterase 活性中心: Cl<sub>s</sub> および Cl<sub>s</sub><sup>-</sup> に DFP-<sup>32</sup>P を処理すると <sup>32</sup>P は Cl<sub>s</sub><sup>-</sup> にのみ取り込まれた。DFP-<sup>32</sup>P で処理した Cl<sub>s</sub><sup>-</sup> を還元すると、<sup>32</sup>P は Cl<sub>s</sub><sup>-</sup> の 36000 dalton subunit にのみ選択的に取り込まれた。

insoluble Cl<sub>s</sub><sup>-</sup> の調整: 精製 Cl<sub>s</sub><sup>-</sup> を CNBr で活性化した Sephadex G-25 に処理することにより insoluble Cl<sub>s</sub><sup>-</sup> を作成した。この insoluble Cl<sub>s</sub><sup>-</sup> は C2<sup>50</sup> activity を destroy する性質を保持している。

#### (結語)

Cl<sub>s</sub> activator を精製することにより、これが Cl<sub>r</sub> と identical であることが知られた。Cl<sub>s</sub> は Cl<sub>r</sub> により Cl<sub>s</sub><sup>-</sup> へ活性化されることが明らかにされた。Cl<sub>s</sub><sup>-</sup> の esteratic site は、36000 dalton subunit に局在することが示された。insoluble Cl<sub>s</sub> は基質と Cl<sub>s</sub><sup>-</sup> の interaction の研究に有用である。

#### 9. C3 のトリプシン分解産物の性質

金沢大学がん研究所分子免疫部

高橋守信, 高橋セイ, 田中清子



抗原抗体結合物 (Ag-Ab) に結合した C3(C3b)は、血清中の C3b inactivator の作用をうけて C3c と C3d の少なくとも2つの分解産物に分解する。非常によく似た限定分解はトリプシンによつてもひきおこされることも報告されている。C3c は液相に遊離し、C3d は Ag-Ab に結合して残ると推定され、この状態の Ag-Ab は IA 活性を失う。われわれは、モルモット血清 (GPS) と反応させた Ag-Ab または zymosan からトリプシンによつて C3c に相等すると考えられる C3 のフラグメントを遊離、精製し、その性質を調べたのでその一端を報告する。

(材料および方法)

プールした GPS または個体別の GPS を Ag-Ab または活性化した zymosan と反応させ (37°C, 30分), 次に PBS-saline で5回洗った。トリプシン (20μg/ml) 処理は37°C, 30分間行つた。次いで5倍量の SBTI を加え、上清を分離、濃縮し、ペピコン電気泳動で精製した。

(結果および考察)

(1) 精製した C3c (Try) は、免疫電気泳動法ではほぼ単一の標品であつた。SDS-ディスク電気泳動では、プールした GPS から精製した C3c (Try) は、分子量約12万に相当するところに2-3本の泳動帯を示すが普通であつた。個体別の GPS では必ず1本であるので genetic polymorphism を表すものと思われる。(2) C3c (Try) の還元分解を行うと、C3c(Try) ディスク電気泳動上で分子量3-4万のサブユニットに分解することが示された。すなわち、C3c (Try) は、上記の分子量のサブユニット、3-4本の多鎖構造からなり立つものと思われる。C3分子は、還元分解によつて2本の chain(H鎖12万, L鎖6万) からなりたつているので、C3→C3c への分解過程で1本鎖構造→多鎖構造への変換がみられたものと推定された。

10. 高補体価を呈する腎障害

日本大学波多野内科

大井洋之, 海津嘉蔵, 春田一典, 藤多和義

松本紘一, 奈倉勇爾, 吉沢信行, 藤川雅彦

吉川昌一, 名和紀之, 原田 稔

高橋満喜雄, 波多野道信

聖マリアンナ医科大学皮膚科

馬場 徹, 園崎秀吉, 鳥巢要道

近年補体学の分野における進歩は目覚しく、特に alternative pathway, classical pathway の2つの活性経路の発見はその主なものであり、種々疾患において複雑な

免疫反応における補体関与の様子が明らかにされつつある。腎疾患においても低補体を呈する lupus 腎炎, 急性腎炎 membransproliferative G.N. においてかなり特長的なこれら pathway の関与の様子が徐々に見いだされており、腎疾患解明の一助となるべく期待をもたらせている。今回われわれは、各種腎障害における補体価を経時的に約5カ月観察し、低補体価を呈する腎障害と対称的に高補体を呈する腎障害を見だし得たので報告する。今回報告する症例は lupus腎炎4例, lipid nephrosis 5例, 慢性腎炎10例で、全例に生検を施行し、顕微鏡および蛍光抗体法を、一部に電顕を行い確定診断をつけた。各血清は-80°Cに保存し、同時に CH<sub>50</sub>, anticomplement

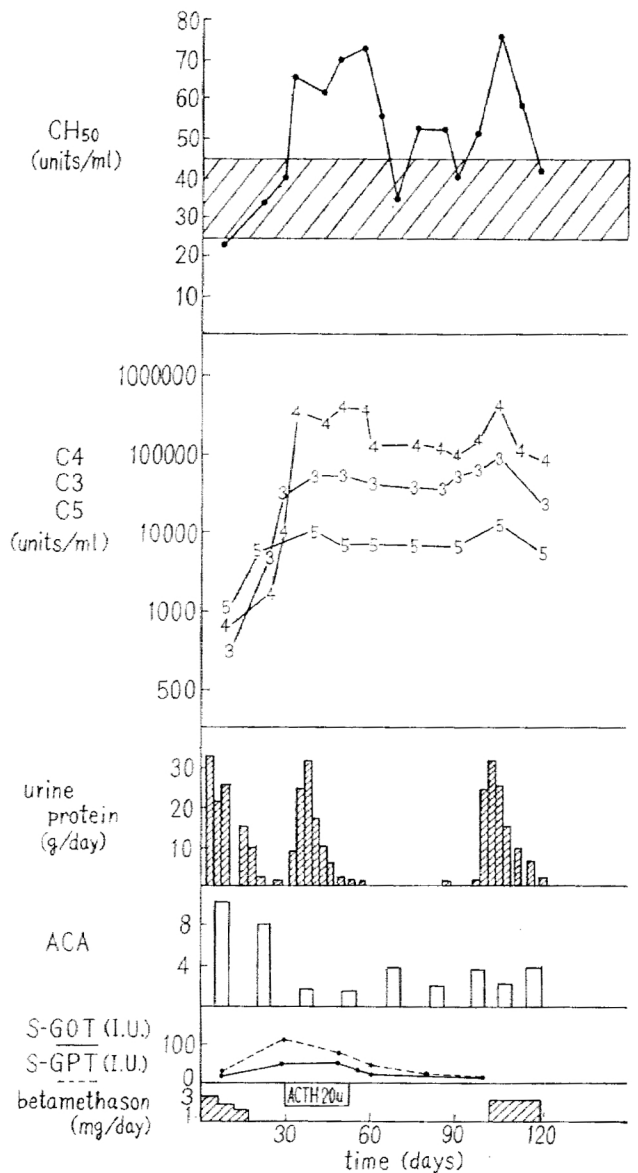


図1. Lipid nephrosis (22y, female).

activity(ACA)および補体成分の溶血活性, single radial immunodiffusion 法により定量を行い臨床像との対比を試みた. 低補体を呈した腎障害の1つである SLE においては, 全例で病勢とほぼ平行して補体価は変動し, 疾患の状態把握と治療効果判定の重要な目安となった.  $CH_{50}$  は全般に低値で, その変動は ACA の変動と一致する anti DNA antibody 抗核抗体の出現と負の相関を呈しており, また各 component では C 3, C 4 が特に  $CH_{50}$  とともに変動していた. これらのことより, SLE の本態ともいわれている DNA anti DNA complex が補体価の変動に大きく関与していることがうかがわれた. これら低補体を呈する SLE の症例に対し, 免疫的関与がないとされる lipoid nephrosis の症例全例に蛋白出現時に一致して高補体を呈する現象が認められた(図1). 症例の中には蛋白出現時に低補体を呈していることがあったが, このような時期にはプラズマなどの点滴による GOT, GPT の上昇とともに ACA の増加を認めており, 補体は liver に depend して上らないものと思われた. 各補体成分では, C 4, C 3 の定量で正常の上限にもかかわらず溶血活性が著明な高値を示しており, lipoid nephrosis では蛋白出現時補体はなんらかの機序により hyperactivation の状態になると思われた. 慢性腎炎においては変動のないものと変動の激しいものの2つの補体変動の型があり, 変動のないものは  $CH_{50}$  はやや低値で安定しており治療効果が認められ, 変動の激しいものは,  $CH_{50}$  は高値に変動し治療効果は認められない傾向にあった. 各  $CH_{50}$  補体成分においても同様の特長があった.

#### (まとめ)

(1) lupus 腎炎において, 補体は病状把握・治療判定に有効と思われる. (2) lipoid nephrosis において蛋白出現時著明な hyperactivation の状態となる特長がある. (3) 慢性腎炎の補体価変動は2つの type にわかれ病状把握に有効と思われる. 以上腎疾患における低補体は2つの pathway の解明により徐々に明らかにされつつあるが, 腎疾患の中に lipoid nephrosis や現在検索中であるが membranous nephropathy のごとく著明な高補体を呈するものもあり, 腎障害と高補体の関係についても解明がいそがれる.

#### 11. 喘息血清補体価の変動について

九州大学心療内科 手嶋秀毅, 井上貞久

大阪府立成人病センター 永木和義, 稲井真弥

気管支喘息は即時型アレルギーに属し, 血中の IgE 抗体も高濃度にみられ, 即時型アレルギーとして喘息と

補体との関係はあまり注目されていなかったが, 近年, alternate pathway を介して IgE と補体との関係が注目され, 一方では, 喘息のアレルギー反応型として Coombs の分類にいうⅢ型あるいはⅣ型の反応が観察されている. そこでわれわれは, 喘息の抗原抗体反応, 気管支粘膜の浮腫, 平滑筋の牽縮に補体が関与しないかとの考えのもとに, 今回は喘息患者血清の  $CH_{50}$  の分布, 症状経過と補体価との関係, 皮下反応前後での補体価の変動の測定結果について報告する. そのうちには, アレルゲンテストにより補体の急激な変動を示す症例もあつたので併わせ報告する.

喘息患者の補体の分布は, 127名の現在治療中の患者, および現在は緩解期であつても喘息の既往のある者を対象にした. Mayer 法に従つて  $CH_{50}$  を測定した. 平均値 38.7, 標準偏差 10.1 で, 正常人に比較すると平均値は高く, 標準偏差も大で, 喘息患者の補体は一般に高値群が多く, しかも低値, 高値にばらつきが多いといえる. 5単位以下のもの3名, その他のアレルゲンテスト後5単位以下に低下した症例もあつた.

喘息の経過と補体の変動は, 症状の起伏によつて  $CH_{50}$  の変動しているのがみられた.

アレルゲンテスト前後の補体の変動については, まず51名の患者について皮内反応陽性度と  $CH_{50}$  を比較した. 皮内反応, 土, 十群では差はないが, それ以上強度に出るものは  $CH_{50}$  の高い者が多かつた. 比較的発作の多発している17名の小, 中学生を対象にしたものでは, 変動差が正常人の日内変動4単位をこえ, 10単位以上あるものをみても5名あつた. 5時間後ではほとんど元に復していたが, なおも変動が進行しているものがあつた. 127名の群では16名にみられた. そのうち, アレルゲン投与前  $CH_{50}=0$  でありながら, 抗原であるハウスダストを吸入することで, 15分後には  $CH_{50}$  の急激な上昇がみられる症例があつた. 各補体成分の活性は, 前で C 1, C 4, C 2 が低く, のち活性が正常に復しているのがみられたが,  $\beta_{1E}$ ,  $\beta_{1C}$  の蛋白量は前後にて変化はなかつた. また, 他にハウスダスト吸入で症状の誘発された症例で,  $CH_{50}$  が27.6から37.7に上昇しているのがみられた. 真菌類に遅延型反応を示すある症例は, 経過を追うと皮内反応の強陽性に出た2-3日後の  $CH_{50}$  が0に低下していた.

#### 12. 肝炎と補体

九州大学第1外科

鳥巢要道, 北村征和, 府川光之, 西村正也

岡山大学第1内科

辻 孝夫, 内藤 紘彦, 野崎 肇  
佐藤 公身, 小坂 淳夫

われわれは先年本シンポジウムにおいて, 肝臓移植患者における肝移植術前術後の補体価の変動より, 肝臓が補体成分のうちC4, C3, C5を生産していることを報告した. 今回は, 各種肝疾患における補体の動態につき検討を加えた.

1) 50例の急性肝炎を1-2日間隔で採血測定した結果(図1), 急性肝炎においては肝細胞障害に先だつ

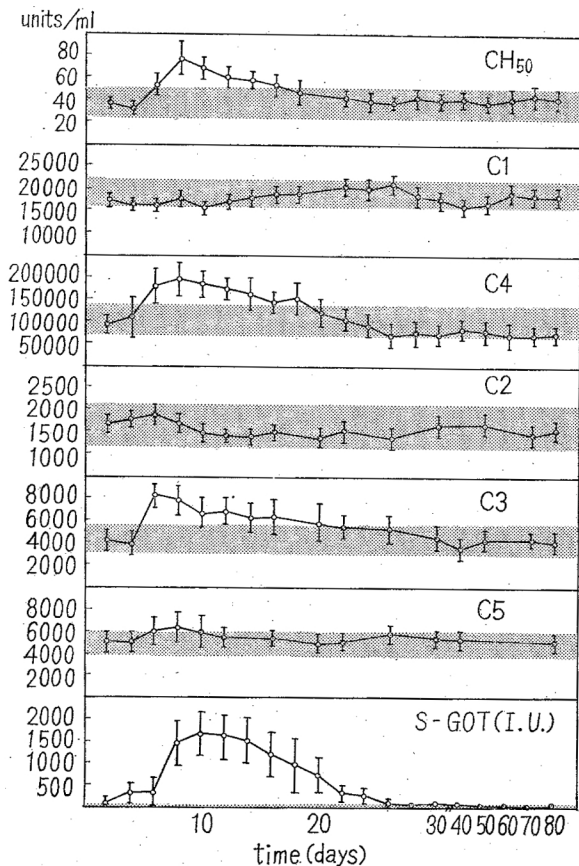


図1.

ほぼ同時にCH<sub>50</sub>, C4, C3の上昇がみられる. 肝細胞障害の極期をすぎるとともに補体成分はだんだん正常に近づいてくることが明らかとなった. このことは, 肝炎による肝細胞障害がおこり, 今までホメオスターテックなレギュレーションが働いていたのに, それが反動的に活性化されるため, 補体は一時過産生の状態となることを意味する.

2) 活動型慢性肝炎30例においては, 増悪寛解をくりかえす急性肝炎より700日の経過を追つたのが図2の1

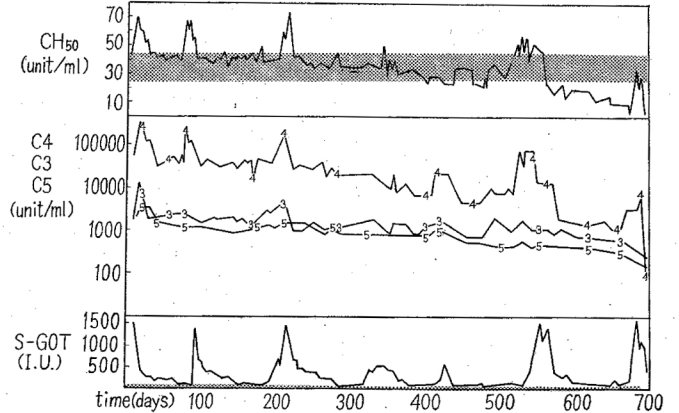


図2.

例で, 急性増悪時に S-GOT の上りと並行して補体成分の一時的上昇があり, 寛解期には下降する.

たいへん興味深くまた注意すべき点は, 図2にあるように CH<sub>50</sub> 全体のレベルが増悪寛解をくりかえすたびに低下してくることで, 肝障害の進展をよく表現している. また, 末期の肝炎には肝細胞の反応性の低下とともに産生細胞の減少が明らかとなる.

3) 免疫抑制療法下の移植患者(肝臓移植5例, 腎移植15例)の術後におこつた急性肝炎では, Australia antigen およびそれに付随する抗補体作用(anti complement activity)が上昇するにもかかわらず, 補体成分の変動は少ない.

4) 非免疫抑制患者における acute hepatitis (50), chronic persistent hepatitis (30), chronic aggressive hepatitis(30), fluminant hepatitis(5), liver cirrhosis(15)の補体価は順に低く, 肝細胞障害の程度, 範囲ならびに肝細胞の生物学的反応性を正しく反映する.

### 13 各種皮膚疾患における血清補体価と血沈値の関係

都立大久保病院

河島敏夫, 米沢芳子, 松浦紅子

芳賀ふじ子, 宮沢政栄

国立ガンセンター 西岡久寿弥, 嶋田孝吉

金沢大癌研究所分子免疫部 高橋守信

(目的)

1 昨年および昨年の本シンポジウムにおいて, 赤血球沈降反応(以下血沈と略記)促進因子の1つとして, 補体に関与している可能性を示唆する in vitro の実験結果のいくつかを報告した. 今回は, 各種の炎症性皮膚疾患々者を対象に, 皮膚病状経過にともなつて, 血清補体価と血沈値がどのように変動するかを検討したところ, 疾患の種類や病状により, 両者の変動にいくつかの

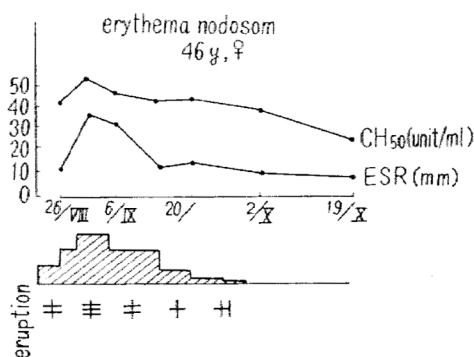


図 1.

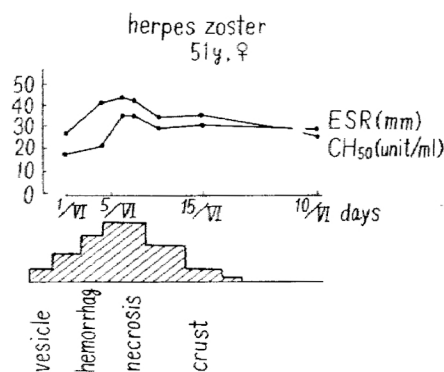


図 2.

pattern がみられたので報告する。なお対象患者は、その発症や増悪機序に免疫反応、またはその可能性が考えられた6つを選んだ。

#### (方法)

皮膚病状の経過につれて、できるかぎり頻繁に採血して、補体活性と血沈値を測定し、それらの変動のpatternを調べた。補体活性は血清補体価 (Mayer-CH<sub>50</sub>値)を、血沈値は Westergren 法による1時間値を求めた。

#### (成績)

##### A. アレルギー性疾患

各種皮膚アレルギー性疾患をいちおう次のごとく分けて記載する。

(1) アレルギー性血管炎、結節性紅斑、脂肪織炎の多くなど、いわゆる血管炎では、その発症機序のいかんを問わず皮膚病状経過と両者がきわめてよく一致し、病状の増悪につれて CH<sub>50</sub> 値も上昇し、血沈値も亢進し、軽快、治癒につれて、しだいに正常域への復帰がみられ、またその変動程度も皮膚病状の軽重とよく一致した (図1)。

(2) 多形滲出性紅斑、紫斑病、急性じんま疹など、皮膚表層の微細血管やその周囲に主病変を示すものでは、(1) のように、両者がよく一致した変動を示すもの、CH<sub>50</sub> 値のみ変動するものなどがみられ、また同一疾患でも症例により必ずしも同一の pattern を示さなかつた。

(3) 湿疹、皮膚炎など、表皮や真皮上層の病変を主体とする delayed type の疾患では、一般に CH<sub>50</sub> 値の上昇をみることが多いが、血沈値にはほとんど変化がみられなかつた。しかし、病変が全身性に及ぶもの、ことに自家感作性皮膚炎や、また広範囲のアトピー性皮膚炎などでは経過中、時に両者が一致した変動を示す例もみ

られた。

(4) 薬疹は個々の症例により、皮膚病変やその程度が著しく異なり、皮膚病状と CH<sub>50</sub> 値、血沈値の間にも種々の pattern がみられた。

##### B. 感染症

種々の感染症のうち、帯状疱疹、水痘では、皮疹の増悪につれて、CH<sub>50</sub> 値の上昇、血沈値の亢進が、軽快、治癒につれて、もとに復帰し、それらに密接な関連性がみられた (図2)。しかし、変性腫瘍等に本症を併発した例では、特に血沈値の著しい促進を示し、両者の一致した変動はみられなかつた。

また細菌感染症のうち、毛囊炎、膿痂疹など病変が比較的表層に止まる疾患では、一般に CH<sub>50</sub> 値、血沈値にも変動が少なく、皮下膿瘍、蜂窩織炎、丹毒等全身症状をとともなうものでは、CH<sub>50</sub> 値の上昇、血沈値の亢進がみられた。

##### C. その他

SLE では活動期に CH<sub>50</sub> 値の低下と血沈値の亢進が、一方、DLE では CH<sub>50</sub> 値の上昇時血沈値の促進がみられた。

また Behçet 氏病でも、病状増悪時 CH<sub>50</sub> 値の著しい上昇、血沈値の亢進がみられた。硬皮症、天疱瘡、デューリング疱疹状皮膚炎、サルコイドーシス、掌蹠膿疱症、各種紅皮症でも一般に CH<sub>50</sub> 値上昇時、血沈値の亢進傾向がみられた。

##### (まとめ)

以上免疫反応の関与が考えられる皮膚科領域の種々の疾患について、血清補体価と血沈値の変動の pattern を追求した。

その結果、一般的傾向としては、皮膚病状増悪時血清補体価の上昇と血沈値の亢進をみるものが多い。また特

に発熱など全身症状をともなう疾患にこの傾向がみられた。しかし、SLEのごとく、補体価の低下時、血沈値の促進をみる疾患もあり、臨床疾患における血清補体価と血沈値の関係はさらに詳細に検討する必要がある。

14. 正常および異常妊娠における血清補体価の動態

新潟大学産婦人科 樋口正臣, 竹内正七

(緒言)

妊娠現象は父方の遺伝子を賦与された胎児およびその付属物による一種の同種移植現象と考えられるため、妊娠の成立およびその持続、分娩、産褥という一連の現象を免疫学的な面から解明しようとする試みが、近年種々なされるようになった。今回われわれは、この妊娠現象および流産を中心とする異常妊娠における血清補体価の動態を  $CH_{50}$  値の測定により比較検討を行つてみた。

(研究方法および研究対象)

$CH_{50}$  値の測定は Mayer の原法に基づいて行つた。研究対象としては新潟大学産婦人科に来院または入院した正常妊婦28名、正常褥婦 119名、切迫流産後流産した17名、胞状奇胎7例を測定した。

(結果および考案)

正常妊娠時の  $CH_{50}$  値は、妊娠前期 (-4カ月)  $52.3 \pm 8.5$ , 中期 (5-7カ月)  $48.1 \pm 8.3$ , 後期 (8-10カ月)  $54.2 \pm 9.1$  の値を示し、妊娠成立とともに  $CH_{50}$  値は急増するが、中期はいくぶん低下し、分娩に近づくにつれ上昇する傾向が認められた。その後、分娩を境にして産褥第1日目は、 $48.3 \pm 5.2$  とやや低下し、2日目  $55.2 \pm 8.8$ , 3日目  $59.1 \pm 7.0$ , 4日目  $54.7 \pm 11.3$ , 5日目  $51.3 \pm 6.7$  の値を示し、3日目を peak にしてその後は漸減する傾向がみられた。胞状奇胎7例においては、 $47.2 \pm 1.6$  と流産よりいくぶん高値であり、正常妊娠より低値を示したが有意性は認められなかつた。また、切迫流産後流産した例では  $42.5 \pm 8.6$  と同時期の正常妊娠補体価に比して有意の差 ( $P < 0.05$ ) の低値を示した。このことは、死亡した fetus の排泄機序において免疫現象が関与している可能性を示すのかもしれない。また、妊娠中毒症、重症妊娠悪阻、習慣性流産等における  $CH_{50}$  値の変化については現在検討中であり、今後、臨床所見と対比しながら検討していきたい。

15. 小児急性熱性皮膚粘膜リンパ腺症候群における免疫学的研究

九州大学第1外科

鳥巢要道, 北村征和, 府川光之, 西村正也  
日赤中央病院小児科 川崎富作, 窪田誠一

聖マリアンナ医科大学皮膚科 馬場 徹

東京大学整形外科 園崎秀吉

「川崎病」とは頸部リンパ腺腫張、両側眼球結膜の充血、口唇の乾燥発赤、ビラン輝裂、口腔粘膜のビマン性充血、指趾先の爪皮膚移行部よりの膜様落屑を特徴とする主として乳幼児にみられる急性熱性疾患で、1967年、川崎が50例の自験例を報告したものである。

その後各地にて報告が相次いで行われ、今や新しい独立した疾患としての概念を確立しつつある。疾患の原因については未だ明らかでなく、発病が乳幼児に多いこと、発病より全治までの経過の短いことなどより、本疾患の原因追求は容易でない。

われわれは、東京日赤中央病院、都内開業医院、福岡市内開業医院等で本疾患の規準を満足すべき臨床症状を具備した43例につき、免疫学的検討、特に血清グロブリン (IgM, IgG, IgA) ならびに血清補体の詳細な検討を行つた。血清は、発病よりできるかぎり2-3日の間隔で臨床症状が全く消退するまで行つた。

免疫グロブリンの変動については3つの型があることを見いだした。

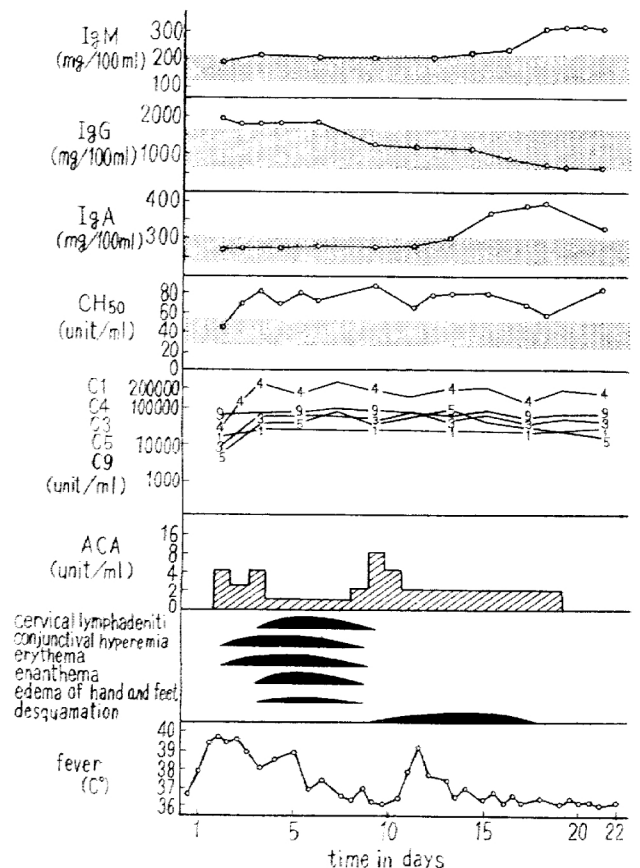


図1.

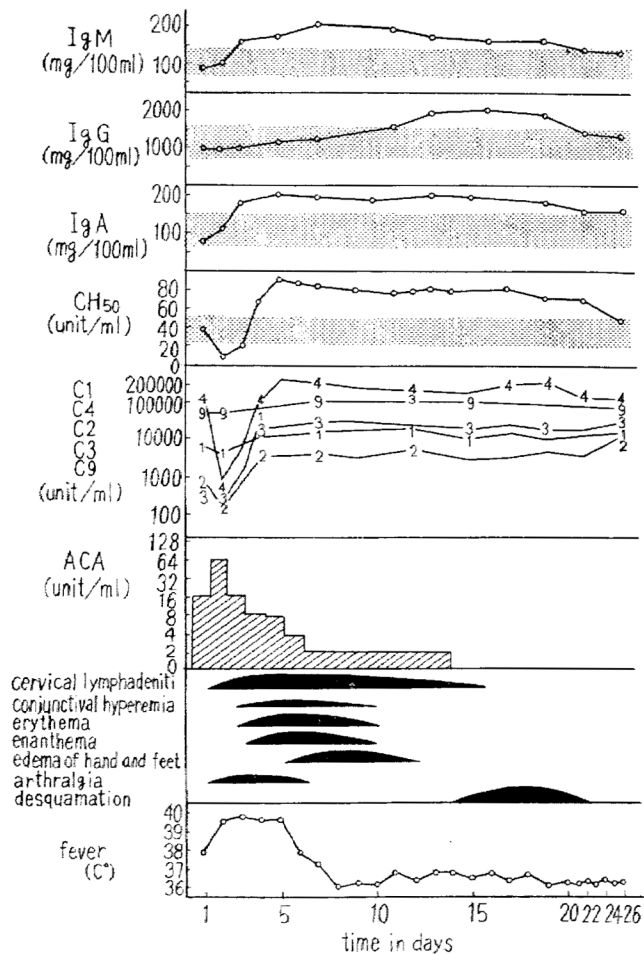


図 2.

I) 病日2日くらいより IgM が上昇, 7-8日 でピークに達し, 以後下降する. IgG は最初平常で7日目くらいより上昇し, 14-18日 でピークに達する. IgA は第3病日くらいにより上昇をはじめ, 臨床症状の消退するまで高い (全体の38%).

II) 病日初めより IgG が上昇しており, 7-10日目頃より下降する. IgM, IgA は初め全く変動しないが, 15-20日にかけて上昇してくる (30%). この型には, 15日前後に一度下降していた熱が再び出ることがあるが一過性に下降する.

III) 第II型と同じように初期 IgG が上昇しているが2次発熱なく, また全経過を通じて IgM の上昇はない. IgA はやや高価を示す (32%).

血清補体学的検討では CH<sub>50</sub> が本症候群ではきわめて高く, 持続的高値を全経過を通して示すものである. 43例の CH<sub>50</sub> 平均値は 78.54±6.8で, 正常同年代乳幼児の 39.35±4.3に比し高い. 溶血活性ではC4, C3, C5が高く, C1, C2, C9などは顕著でない. 蛋白量では

表 1 Complement components in Kawasaki's disease

test	per ml	Kawasaki's disease	control
CH <sub>50</sub>	unit	73.2±10.1	38.5±6.3
C1	unit	16300±2200	13200±1400
C1q	mg	0.258±0.031	0.208±0.052
C4	unit	129500±28000	45600±20500
	mg	0.498±0.091	0.312±0.073
C2	unit	2900±400	1750±300
C3	unit	6400±950	3300±650
	mg	1530±0.198	1200±0.140
C5	unit	2400±180	1900±210
	mg	0.067±0.019	0.053±0.021
C9	unit	54000±21000	49000±24000

C4が0.598mg/ml, C3が1.583mg/ml, C5が0.098mg/ml となり, 溶血活性ほど顕著でないが高い.

臨床症状と補体価の動きで特徴的なことは, 第2-第4日目に一時的補体価の低下をみ, この時期に一致して関節痛, 抗補体作用が出現する. この抗補体作用は56°C, 30分の非動化に耐え C3 inhibitor とは異なる.

以上のことより, 本疾患の原因となるべきものは不明であるが, ある種の抗原を想定した場合それに対応する生体反応の度合により臨床症状の強弱があり, 一連の血清蛋白の変動が説明できるように思う.

#### 16. エリテマトーデスにおける血清中 C3 および C4 の活性と蛋白量の関係について

大阪府立成人病センター

平松誠一, 岡田たみ子, 稲井真弥

岡山大学第3内科

天野哲基, 宮脇昌二, 西下駿三, 大藤 真

前々回および前回の当シンポジウムにおいて, 正常人血清中のC3およびC4の活性と蛋白量の関係についてのべた. すなわち, 両成分ともその活性と蛋白量はおおむね平行するが, 若干のもの (C3で4.1%, C4で2.6%) に, 蛋白量は正常範囲にありながら活性が正常以下を示すものがあることがわかった.

SLE の活動期にあつては, CH<sub>50</sub> が低下し, C3 またはC4もその活性が減少することがわかつており, 本症の診断に有用な手段の1つとされている. そして, C3, C4の活性の測定を行うかわりに, それぞれの蛋白量を測定することを推奨している報告もある. しかし,

上に述べたように、正常人の血清についてこれらの蛋白量と活性の解離がみられる以上、SLEにおいて、蛋白量のみを測つて活性の変動を論ずることが妥当かどうかはなほ疑問といえる。そこで今回は、SLEの患者について、その経過中にこのような解離現象がおこるかどうかをしらべた。

患者は、成人病センターおよび岡山大第3内科で観察している27例で、それぞれの患者から採取した血清試料は93検体である。 $\beta_{1C/1A}$ 、 $\beta_{1E}$ の定量はPartigenを用い、C3はIA活性を、C4は溶血活性をmicrotiterを用いて測定した。

#### (結果)

1) 正常人血清についてしらべた活性と蛋白量の正常範囲に入るものは、C3については41検体(44.1%)、C4については58検体(62.4%)で、それぞれの残りのものが正常範囲外にあり、解離を示すものは、C3では23検体(24.7%)、C4でも23検体(24.7%)であつたが、これらは両者が共通しているものもあり、共通していないものもあつた。

2) これらの解離現象が、SLEの活動性と関連性があるかどうかをしらべた。SLEの活動性を規定するcriteriaとして、臨床症状は発熱、紅斑、関節痛のいずれか2

つを有し、検査所見として、 $CH_{50}$ が20単位以下、anti-DNA titerが20%以上、antinuclear factorはshaggy patternを示し、LE cellが陽性であるものとした。

各検体について、その採取時期を活動期と寛解期にわけて、えられたC3、C4の蛋白量と活性の関係をしらべた結果は表に示すとおりである。

すなわち、活動期のもの17検体中4検体(23.5%)がC3の解離を示し、これは寛解期の解離率(76検体中19検体25%)と差はなかつた。また、蛋白量、活性ともに低下しているものは活動期のもののうち7検体(41.2%)で、この率は寛解期のもの(15.7%)に比して高かつた。

一方、C4についてみると、活動期の8検体(47.1%)が解離を示し、寛解期のものでは15検体(19.7%)を示すにすぎなかつた。

このことから、C4の解離はSLEの活動期に特徴的な現象であると考えられた。

SLEにおいて、その活動性免疫過程は、C3またはC4の抗原性を損うことなしにその活性を抑制するらしいと考えられる。もちろん、免疫反応以外の他の原因によるC1sの活性化も考慮するべきであろうが、C3またはC4の解離現象の説明となるように思える。

表1  $\beta_{1C/1A}$ -globulin level and C3 activity in SLE

$\beta_{1C/1A}$	normal (C3)			decreased (C3)		
	normal n (%)	decreased n (%)	total n	normal n (%)	decreased n (%)	total n
SLE n=93	41 (44.1)	23 (24.7)	64	10 (10.8)	19 (20.4)	29
active SLE n=17	5 (29.4)	4 (23.5)	9	1 (5.9)	7 (41.2)	8
inactive SLE n=76	36 (47.4)	19 (25.0)	55	9 (11.8)	12 (15.7)	21

表2  $\beta_{1E}$ -globulin level and C4 activity in SLE

$\beta_{1E}$	normal (C4)			decreased (C4)		
	normal n (%)	decreased n (%)	total n	normal n (%)	decreased n (%)	total n
SLE n=93	58 (62.4)	23 (24.7)	81	4 (4.3)	8 (8.6)	12
active SLE n=17	6 (35.3)	8 (47.1)	14	3 (17.6)	3 (17.6)	3
inactive SLE n=76	52 (68.4)	15 (19.7)	67	4 (5.3)	5 (6.6)	9

## 17. 膠原病の血清中における抗補体活性に関する研究

東京大学物療内科

荻田忠厚, 行山 康, 谷本潔昭

広瀬俊一, 堀内淑彦

各種膠原病と補体との関係については, SLEを初めとして種々の疾患で検討がなされている. 低補体価の原因として, 自己免疫疾患においては immune complex による consumption といわれているが, 産生系の問題も指摘されている. RA では一般に血清補体価は正常ないし高値を示すといわれているが, 低補体価を示すものもあり, 悪性リウマチとの関連でこの種の RA は注目に値する.

一方, 抗補体活性の面から検討すると, SLE および他の膠原病や肝疾患にも抗補体活性 (anti-complementary activity, 以下 ACA と略す) が認められ, Heimer は正常人にも認められると報告している. また, 血清中において補体の各種 inhibitor 以外にも ACA を示す物質についていくつかのものが知られている.

ACA 測定に用いた被検血清は, 1) 非働化したままのもの, 2) 非働化後ヒツジ赤血球に対する自然抗体を吸収したものをを用い, 補体としてモルモット血清を加えた後, 感作血球を加え溶血阻止率を ACA の値とした.

その結果, 従来一部で行われている1)の方法で測定した ACA は, RA 35例中3例に強い ACA を示した. この3例は  $CH_{50}$  が15単位前後と低補体価を示し, 臨床症状は関節のみならず肺病変を伴つたり, 強い IgG-RF を示した興味ある症例であつた. しかしながら2)の方法によれば, 従来の血清希釈濃度は程度の差はあれ全ての例に強い ACA を認めた. これらのことから, 未吸収血清では自然抗体中の hemolysin により溶血が促進され, ACAが mask されていると考えられる. これに対する他の原因も考えられるが, 自然抗体を主な因子と考える1つの根拠は, 自然抗体が陰性の血清では1), 2)の結果に差が認められなかつたことによる. したがつて非働化, 吸収の操作は本反応系においては欠くべからざるものであると考えられた.

ACA の定量的測定のためには補体および被検血清の dose responseを知ることが必要であるので, これについて検討を行った. その結果, まだ検討の余地はあるが, 一応われわれは被検血清は100倍, 補体量は  $2CH_{50}$  との結論を得た.

ACA を示す因子の性質を検討するため, RA 患者血

清で吸収前後において Shephadex G-200 ゲル濾過を行ったところ, 未吸収血清では7 Sを中心にして前後に2つの peak を認めた. 吸収済み血清についても同様にゲル濾過を行うと, 先に述べた2つの peak に加えて RA テスト陽性部分 (19 S分画) に一致してもう1つの peak が現れる. このことから, 19 S の自然抗体の吸収によりこの peak が出現したと考えた.

次に吸収済み血清を DEAE で分画し, 等張 VB で透析後 ACA をみると, first peak と次の小さな peak (IgG 分画で RA テスト陰性) および IgM を含む RA テスト陽性と一致する peak の両方に抗補体活性をみた. これらの結果, ACA を示すものは RF 活性と関係をもつ 19 S分画に存在するもの, IgG と考えられる 7 S分画に含まれるもの, および性質の明らかでない 7 S前半に含まれるものがあげられる. 考えうるものとしては immune complex, 変性 IgG, 変性 IgM, 熱安定性の C3 INH・C6 INH, immunoconglutinin 等があるが, 物質の同定は今後検討していくつもりである.

抗補体因子の検討の1つとして RF について調べた. その結果, immunoabsorbent で精製した IgG-RF, IgM-RF を抗体として, 還元・アルキル化した変性 IgG を抗原として補体結合反応をみると, RF は抗原と反応しても有意な補体消費を示さなかつた. さらに, 種々の量の IgG-hemolysin で感作された血球に RFの溶血に及ぼす影響をみた. すなわち, subagglutinating doses ウサギ IgG-hemolysin で感作されたヒツジ血球に RF を加えると IgM-RF では溶血の増強が認められた. この反応系でみるかぎり, IgM-RF は補体結合能をもつか, または増強すると考えられる. また還元・アルキル化した IgG を熱処理し不溶性変性 IgG を作り, 洗浄後 RF の吸収を行い, RF-titer の低下および ACA の低下を溶血反応で調べると著しい ACA の低下をみた. このことから RF の吸収と ACA の低下との間に密接な関連を持つことが考えられるが, この反応系では正常人においても程度の差はあつても吸収操作によつて ACA の低下がみられることから, RF 以外の因子の関与する可能性もある.

これらの結果より, ACAを検討する場合には非働化後ヒツジ赤血球による吸収操作が不可欠のものであり, 補体溶血反応における自然抗体の重要性を示唆するものではないかと考えた. また ACA は一部 RF の存在に関連し, 他方 RF 以外のなお性質の同定されない物質 (たとえば IgG など) の関与していることが考えられた.



18. 骨髄腫における C<sub>1</sub>INH- $\alpha_1$ AT,  $\alpha_2$ M との関係

京都府立医科大学第3内科

近藤元治, 中西和夫, 中西善夫

細川計明, 増田正典

C<sub>1</sub>INH(C<sub>1</sub> esterase inhibitor)は polyspecificity を有する inhibitor であつて, 補体系のみならず, キニン系あるいは線溶系にも作用して, これらの3つの系を結ぶ上で重要な鍵をにぎっている. ただ臨床的には, これを欠く HANE 以外にはこれまで大きな変化の報告されておらず, その増減が, 临床上補体成分の変動ほどには注目されていないのが実情である.

これまでになわれわれは,  $\alpha_1$  antitrypsin deficiency, SLE等において, C<sub>1</sub>INHの不活性化あるいは機能低下を認め, 同時にC<sub>4</sub>, C<sub>2</sub>の低下から, 補体系の活性化とC<sub>1</sub>INH,  $\alpha_1$  antitrypsin ( $\alpha_1$ AT), あるいは $\alpha_2$  macroglobulin ( $\alpha_2$ M)などの関連性を示唆してきた.

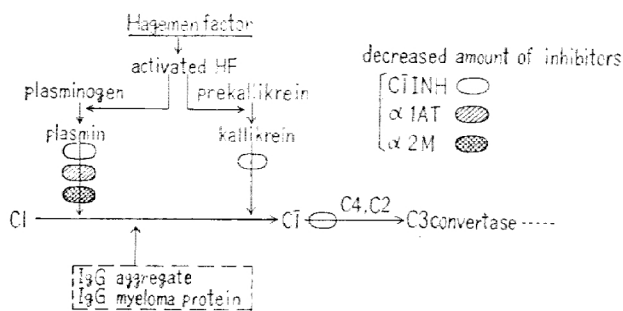


図1. Proposed mechanism of activation of complement system in IgG myeloma.

その後, 各種症例につきこれらの成分を測定した結果, IgG myeloma のいくつかの症例にC<sub>4</sub>の極端な低下とC<sub>1</sub>INHの低下, 場合によっては $\alpha_1$ ATあるいは $\alpha_2$ Mの低下を伴った例を得た. myelomaのような異常蛋白血症においては, 免疫グロブリン以外の蛋白についても, そのmetabolismに異常をきたす場合が考えられるので, おのおのの蛋白についても, そのmetabolismの解析が検討されねばならないが, IgG aggregate あるいはIgG myeloma proteinの補体系 classical pathwayを介した活性化が, C<sub>1</sub>, plasmin, (kallikrein?)の活性化を導き, ためにC<sub>4</sub>, C<sub>2</sub>の不活化, さらには対応するinhibitorであるC<sub>1</sub>INH,  $\alpha_1$ AT,  $\alpha_2$ Mとのinactive complex形成をもたらしたという仮説が成立した.

19. 補体レセプターとC<sub>3</sub>

国立がんセンター 奥田智子, 橋 武彦

霊長類の赤血球はEAC<sub>43</sub>に対するレセプターを有

し, 両者が吸着現象を呈することは古くから知られている. ヒトのリンパ球の中にもEAC<sub>43</sub>と反応するものがあることが見いだされ, これはBリンパ球に特異的な反応とされている. しかしEACを作るのに用いる補体の種の違いによつてリンパ球とのロゼット形成に大きな違いのあることが報告されてきた.

われわれはヒト血清を用いてEACを作る際, 反応条件の違いによつて2種の異なつた反応性をもつEACを得たので, その性質を解析した.

(結果)

1) EA (IgM)を大量のGVB\*の存在下でヒト血清と反応させて得られたEACはHuEと反応する(H活性)が, Daudi細胞(バーキッドリンパ腫由来の培養細胞)とは反応しない.

2) EA (IgM)を少量の緩衝液中でヒト血清と反応させて得られたEACはDaudi細胞と強くロゼットを形成する(D活性)が, HuEとの反応はわずかである.

3) EDTA または EGTA の存在下, あるいは非働化血清を用いての反応ではH活性もD活性も得られないので補体が関与していると考えられる.

4) 血清をあらかじめゼイモザンで処理した場合はD活性が出現しないが, その際C<sub>3</sub>を加えれば強いD活性が発現するのでC<sub>3</sub>が関与している.

5) 精製したヒト補体成分より作つたEAC<sub>14</sub>, EAC<sub>142</sub>, EAC<sub>1423</sub>, EAC<sub>43</sub>およびそれらにC<sub>3</sub>bINAを反応させたもののうち, EAC<sub>1423</sub>またはEAC<sub>43</sub>にC<sub>3</sub>bINAを作用させた場合のみD活性が発現する.

6) H活性のみをもつEAC(H)にNBSを反応させてC<sub>3</sub>bINAとの反応部位を失わせた後に, C<sub>3</sub>bINAを作用させてもD活性が発現しない.

7) 血清または腹水より高度に精製したC<sub>3</sub>bINAを用いてもD活性の発現がみられた.

8) EAC(H)をトリプシンで処理するとD活性が発現した.

9) EAC(H)とC<sub>3</sub>bINAとの反応を経時的に観察するとH活性の低下に伴つてD活性が発現した.

以上の実験結果より, Daudi細胞上にはbound C<sub>3</sub>bがさらに開裂反応を受けて生じるC<sub>3</sub>フラグメントに対するレセプターがあり, これは従来IAレセプターといわれているものとは異なる. ヒトの末梢血リンパ球では同一の細胞上に両方のレセプターの存在することが確認された.

## 20. 細胞膜による補体の活性化

国立がんセンター研究所 岡田秀親

聖マリアンナ医科大学皮膚科 馬場 徹

ある種の培養細胞に、新鮮血清を反応させると、ヒト赤血球 (HuE) に吸着反応を起こすことを知った。ヒト血清の他に種々の血清について検討してみても、同様の結果であつた。

この血清処理に際しては、 $Mg^{2+}$  の存在は必要であるが、 $Mg^{2+}$ -EGTA で、 $Ca^{2+}$  をキレートしても反応が起こることから、 $Ca^{2+}$  の存在は必要としないことが明らかとなつた。また、C4 deficient モルモット血清によつても陽性の反応がおこり、そのような場合でもツ反応後 C3 の細胞膜への吸着が起こっていることが、蛍光抗体法および  $^{125}I$  をラベルした anti C3 により確認された。ロゼットをつくる HuE をあらかじめトリプシンで処理しておく、この反応が起こらなくなつた。したがつて、この反応は alternate pathway を細胞膜が活性化し、それによつて形成された C3b (細胞膜上に) が、一種の immune adherence を起こして、HuE と rosette を形成すると考えられる。

一方、このような反応性がない細胞に、Moloney sarcoma virus を感染させると陽性に変化することから、ウイルス感染によるある種の細胞膜上の変化により、細胞膜が補体活性化能を獲得する場合があることが示された。この事実は、virus infection により、抗原抗体反応によらない一種の免疫反応が起こることを示唆しており、自己免疫疾患の中のあるものにはこのような機序が原因の 1 つとなつていることも推測される。

## 21. 補体反応よりみた antigenic modulation

帝京大学整形外科 張 紹元, 三木 浩

国立ガンセンター研究所ウイルス部

田村 昇, 島田彰子

1963年 Old と Boyse らは、TL 抗原で免疫を行い、強力な抗 TL 抗体を持つマウスに TL 抗原を有する白血病細胞を注入したところ、注入された白血病細胞がいささかの抑制をも受けずに増殖することを発見した。この細胞と TL 抗血清を用いて direct cytotoxic test を行つても cytotoxicity は起こらないので、かれらは細胞が TL 抗原を失つたものと考え、これを antigenic modulation という呼称で報告した。その後の研究の知見を要約すると、

1) TL (+) の細胞に抗 TL allo 血清を加え、補体の作用しない条件で incubate すると発生する。

2) この現象の発生は、細胞の metabolic activity に依存する。

3) 抗体の Fab fragment でも modulation を起こすのに有効である。

4) modulation を起こすと complement lysis が起こらなくなる。

5) 蛍光抗体法でみると蛍光がだんだん薄れていく。

6) この細胞で TL 抗血清を吸収することはできない。

7) modulation の結果、細胞膜面で TL に隣接する  $H2d$  抗原の量が増える。

以上の所見より、modulationの結果 TL 抗原が消失するものと思われていた。ところが、antigenic modulation を起こして complement lysis が起こらなくなつた細胞に humanE を加えると IA 現象が起こり、補体結合反応も陽性であつた。さらに長時間を経過すると IA 反応も少しずつ弱くなり、また蛍光も薄れていくが、これらの方法は定量的でないので、antigenic modulation を起こした細胞を用いて経時的に bound C1 を測定した。その結果 modulation を起こすと bound C1 が少しずつ減少することがわかつた。しかしながら、complement lysis が起こらなくなるのは数分から数10分で完了するが、蛍光、IA、あるいは bound C1 が減少するにはかなりの長時間を要し、大きな時間的なズレがあるので、 $H^2$  を標識した抗体を用いて antigenic modulation を起こし、complement lysis が起こらなくなつていく過程と、標識抗体が細胞に結合し、細胞の isotope の count が増加して行く過程をみたところ、isotope の count が増加して行くのと、complement lysis が起こらなくなるのは、お互いに independent に進行しており、modulation の結果、抗原または抗原抗体結合の site が簡単に消失していないことがわかつた。C9 結合反応でも、antigenic modulation を起こし、complement lysis が起こらなくなつて3時間経過しても未だに C9 を結合する site があることを示し、antigenic modulation の結果、抗原 site が細胞から消失するのと、complement lysis が起こらなくなることは、時限が違い 2 step の反応が関与していることが考えられる。modulation を起こした細胞で抗体を吸収することができない点に関しては、先に抗原 site に結合し、modulation を起こさせた抗体が blocking 作用をしているために生じたとも考えられ、また complement lysis が起こらなくなることや、TL 抗原と隣接する  $H2d$  抗原の量が増加するのは、抗体が結合した抗原 site に

構築上の変化が生じ、各 site の距離が開いたりまたは細胞膜と抗原抗体結合 site の距離が遠くなつたりして、cytolysis に有効な穴が punch できなくなれば容易に起こり得る現象であり、必ずしも modulation が起きると抗原が消失するとはいえない。

最近高橋は、H2 の系で抗 H2 allo 血清を感作したマウスの細胞に rabbit 抗マウス Ig 血清を加えて incubate すると、antigenic modulation に似て complement lysis が起こらなくなることを発見した。Taylor らはこの場合、抗体を結合した site が細胞の一局部に集中し、cap formation を起こし、やがてはゴルジ小体に呑み込まれることを報告したが、この現象は一見 antigenic modulation に似ているが、本質的には異なるものであり、この点に関して検討を加えて報告する。

以上、補体反応の面から今まで抗原が細胞から失われると考えられていた antigenic modulation を検討してみた。今までの成績を要約すると、1) complement lysis (-), 2) complement fixation (+), 3) IA test (+), 4) C1 fixation test (+), 5) C9 fixation test (+) となり、antigenic modulation を起こしても、抗原あるいは抗原抗体結合 site は簡単に細胞から消失しておらず、この現象の生物学的意義は、腫瘍細胞が宿主の免疫反応の攻撃から逃れ、増殖し宿主を斃す点にあり、補体研究の対象としての興味深さは、抗原抗体結合 site が消失していないにもかかわらず complement lysis が起こらなくなる点にあるものと考えられる。はたしてどのような変化が起きて complement lysis が起こらなくなるかは未だに不明であるが、細胞膜面における抗原の分布状況、または抗体と結合した抗原あるいは細胞膜の構築上の変化が、この現象の真の姿であると推察する。

## 22. ヒト IgM の補体結合活性の多様性

九州大学歯学部生化学 尾上 薫, 池田正春

ヒトの immunoglobulin (Ig と略) のうち、C1 を起点とする conventional pathway によつて補体を賦活化するのは IgG と IgM の2つのクラスであるが、同じクラス内でも IgG の4つのサブクラスのうち IgG4 は補体を結合せず、他のサブクラス間でも活性の程度は異なることが知られている。IgM クラスについても、ウサギ、マウスの一部の IgM 抗体は補体結合活性がないという報告があり、ヒト IgM でも C1q を結合するものとしなないものの2つのグループが存在するという Mac Kenzie ら<sup>1)</sup>の報告がある。リウマチ因子にも補体結合活性の高いものと低いものがあるというが、一方、石坂

ら<sup>2)</sup>や Müller-Eberhard ら<sup>3)</sup>の報告では、ヒト IgM の実験全例が補体結合を示しているため、補体結合活性に関して IgM はいくつかのグループに分けられるのかどうか、また、2種類存在すると推定されている IgM のサブグループと補体結合活性の関係はどうか、という点は現在まだ明らかでない。これらの点を検討するために、われわれはヒト Waldenström IgM 6例についてモルモットおよびヒトの補体に対する結合活性を種々の条件下で比較してみた。

### (材料と方法)

1. IgM 蛋白: Waldenström マクログロブリン血症の患者6例の血清より、ゾーン電気泳動と Sepharose 6B によるゲル濾過で可及的に会合体を含まない IgM を精製した後、さらに少量含まれていたアルブミンと IgM の complex を、抗ヒトアルブミン抗体を Sepharose ゲルに結合させた immunoabsorbent により除去したものをを用いた。

2. 補体結合試験: 一定量の Ig に変量の polystyrene latex (P.L. と略, 径 0.091  $\mu$ ) を加え、試験管を傾斜回転させつつ 3°C, 16hrs incubate して Ig を P.L. に吸着させた後、約 50 CH<sub>50</sub> 単位のモルモット補体(血清)または約 15 CH<sub>50</sub> 単位のヒト補体(血清)を加え、3°C, 18hrs, または 37°C 1hr incubate した後遠心し、上清の残余補体量を測定した。

CF<sub>50</sub> の測定は、上記の実験で最高の補体結合を示した至適の Ig/P.L. 比を求め、種々の濃度の至適比 Ig-P.L. 混合物に約 100 CH<sub>50</sub> 単位のモルモット補体(血清)を加え、50 CH<sub>50</sub> 単位を結合するに要する Ig 量を求めた。

対照実験で、P.L. または Ig 単独では補体を結合せず、補体結合は P.L. に吸着した Ig のみによることが示されたので、CF<sub>50</sub> は P.L. に吸着した Ig 量で表した。

### (結果)

#### 1. モルモット補体との反応

図1は P.L. 吸着法による IgG と IgM の補体結合を示す。至適比においては IgG の方が補体結合量が大きい。P.L. 過剰となるにしたがつて IgM より結合量の低下が著しい。これは、P.L. 上の Ig の分布が希薄になると IgG は急速に補体を結合しにくくなることを示していると考えられる。この系ではまた、十分に還元・アルキル化した IgG (red. IgG) や F(ab')<sub>2</sub> は 3°C では結合活性を示さないなど、通常の Ag, Ab complex や aggrega-

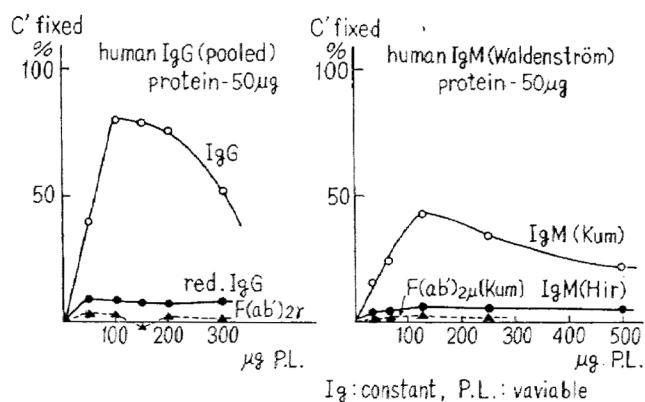


図1. Complement fixation test.

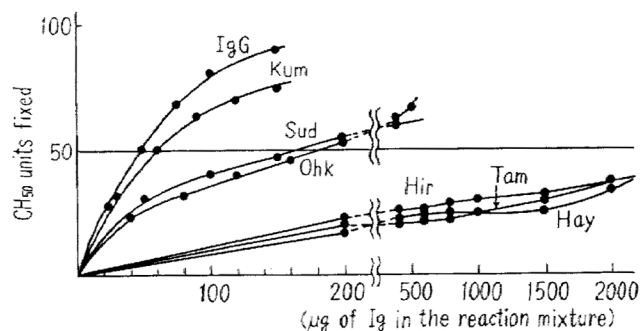


図3. Complement fixation by Ig-P.L. (guinea pig complement) 37°C, 1hr.

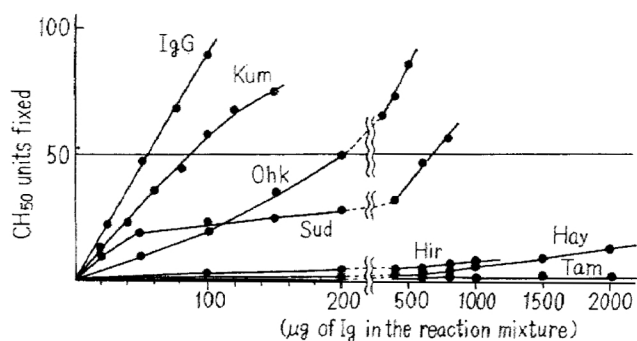


図2. Complement fixation by Ig-P.L. (guinea pig complement, 3°C, 18hrs).

表1 Quantitative complement fixation by immunoglobulin adsorbed onto polystyrene latex (3°C, 18 hrs, guinea pig complement)

Ig	CF <sub>50</sub>	% of Ig adsorbed onto polyst. latex	CF <sub>50</sub> /adsorbed Ig
IgG (pooled)	53.5μg	56%	30μg
IgM Kum (κ)	89μg	87%	77μg
IgM Ohk (κ)	200μg	100%	200μg
IgM Sud (λ)	700μg	97%	679μg
IgM Hir (κ)	8CH <sub>50</sub> /1 mg*	58%	8CH <sub>50</sub> / 580μg*
IgM Tam (κ)	2CH <sub>50</sub> /2 mg*	97%	2CH <sub>50</sub> /1940μg*
IgM Hay (κ)	14CH <sub>50</sub> /2 mg*	64%	14CH <sub>50</sub> /1280μg*

ted Ig を用いる方法と同様の結果が得られる。図において IgM (Kum) と IgM (Hir) に著しい活性の差が認められる。

3°Cにおける CF<sub>50</sub> の測定結果は図2, 表1に示すとおりで, IgM 6例中3例 (Hir, Tam, Hay) の活性はきわめて低いのにに対し Kum, Ohk, Sud はかなりの活性を示した。

表2 Quantitative complement fixation by immunoglobulin adsorbed onto polystyrene latex (37°C, 1 hr, guinea pig complement)

Ig	CH <sub>50</sub>	% of Ig adsorbed onto polyst. latex	CF <sub>50</sub> /adsorbed Ig
IgG (pooled)	50μg	56%	28μg
IgM Kum	60μg	100%	60μg
IgM Ohk	185μg	100%	185μg
IgM Sud	170μg	97%	165μg
IgM Hir	37CH <sub>50</sub> /2 mg*	78%	37CH <sub>50</sub> /1560μg*
IgM Tam	37CH <sub>50</sub> /2 mg*	100%	37CH <sub>50</sub> /2000μg*
IgM Hay	37CH <sub>50</sub> /2 mg*	64%	33CH <sub>50</sub> /1280μg*

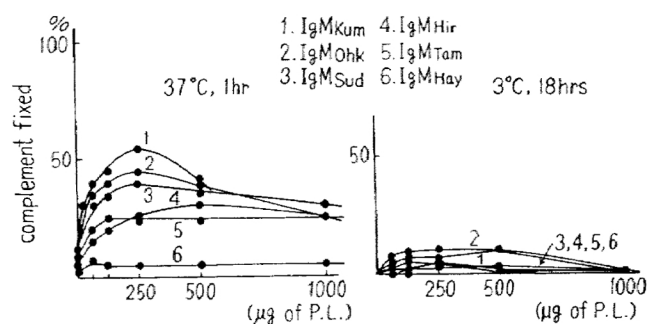


図4. Complement fixation by Ig-P.L. (human complement).

37°C (図3, 表2) においては全例とも活性が上昇しているが, やはり (Kum, Ohk, Sud) と (Hir, Tam, Hay) 2群の間には10倍以上の活性の差がみられた。

2. ヒト補体との反応

図4, 表3に示すように, 3°Cにおいてはヒト IgM とヒトの補体との反応はきわめて弱い。これに反し, 37°Cでは Hay 以外の5例はいずれも活性を示した。各例

表3 Complement fixation by immunoglobulin adsorbed onto polystyrene latex (Ig, proteins used: 50μg, human complement)

IgM proteins	37°C, 1 hr	3°C, 18hrs
IgM Kum	53%	10%
IgM Ohk	44%	10%
IgM Sud	40%	5%
IgM Hir	30%	4%
IgM Tam	26%	3%
IgM Hay	8%	4%

間の活性の差はモルモット補体の場合のように著明ではないが、モルモット補体に対して結合活性の低いものはヒト補体に対してもやや活性が低いという傾向はみられた。ただ、Hayのみはほとんど有意の活性を示さなかった。

IgM が37°Cにおいて3°Cよりもはるかに効率よくヒト補体を結合するという結果は、田村ら<sup>9)</sup>の研究成績とよく一致している。結合効率がよくなるのは、37°Cにおいては alternative pathway による補体系の賦活化が加算されることによるという可能性があるため、その程度を推量するため、F(ab')<sub>2</sub>の活性をしらべてみたところ、3°Cより37°Cにおいて高い活性を示すことは事実であるが、その程度は IgM の活性よりずっと低く (10-20%程度)、37°CにおけるIgMの活性の大部分は conventional pathway によると考えられる。

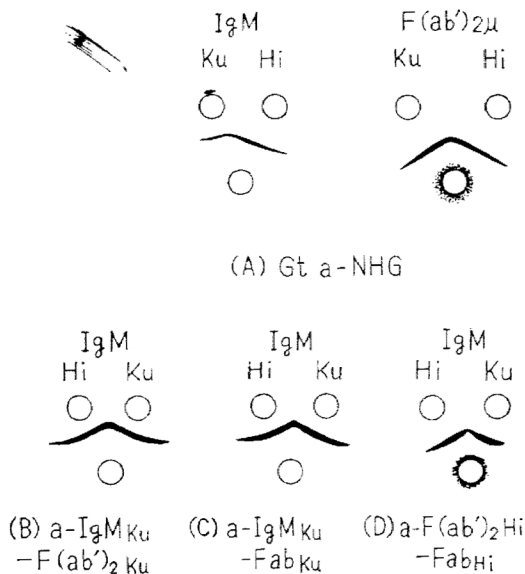


図5. 抗原性の比較.

3. 抗原性の比較

IgM の補体結合活性に差がみられるのはμ鎖の定常部の構造に差異があるのではないかと(たとえばサブクラス)ということをしらべるため、各例について抗原性の比較を行つた。図5はその結果の一部を示したもので、Kum と Hir はモルモット補体結合活性に著明な差があるにもかかわらず、ヒト全血清に対する抗血清 (A), KuのFcに対する抗体 (B), KuのFcとヒンジ部に対する抗体 (C), Kのヒンジ部に対する抗体等のいずれでしらべても同等の抗原性を示した。他の例についてもμ鎖の定常部に抗原性のちがいは検出されなかつた。なお、L鎖の型は Sud が2, 他の5例はすべてκである。

4. F(c)5μ フラグメントの活性

IgMの活性の差がFcの構造に基づくのかどうかをしらべるため、活性の高いKumと低いHir両者をPlautらの高温トリプシン法で消化後F(c)5μを分離精製し活性を測定したが、両者ともモルモット補体に対してほとんど有意の活性を示さなかつた。これは消化法あるいは測定法が適当でないためかもしれないので今後検討を要する。ただ、F(c)5μの会合体と考えられるFr.1 (図6)は、P.L.を加えなくても活性を示した (図7)

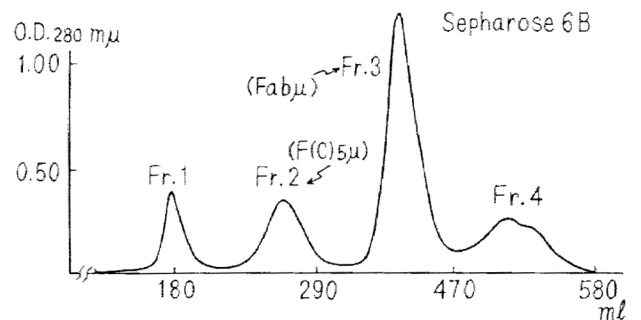


図6. IgM (Kum) の高温トリプシン消化物のゲル濾過.

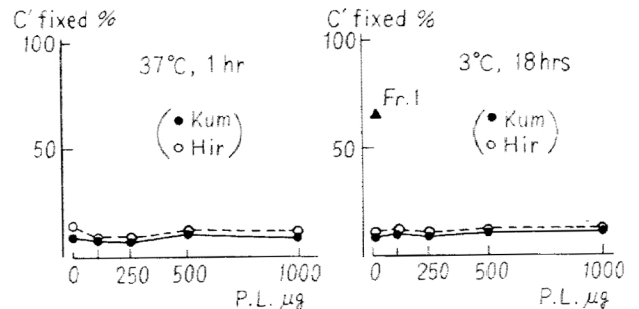


図7. F(c)5μ の補体結合活性 guinea pig complement.

ので、このフラグメントの性状をしらべると興味ある結果が得られる可能性がある。

#### (考察)

比較した例数が限られてはいるが、精製したヒト Waldenström IgMの補体結合活性に多様性がみられることは確かで、モルモットの補体を用いた場合にはかなり判然と2群に分けられるようである。ただ、ヒトIgMの生体内の活性ということの主眼におくと、37°Cにおけるヒト補体との反応性は6例中5例の間で、かなり接近していたことをむしろ重視すべきであろう。しかし、この条件下でも Hay のようにきわめて活性の低い蛋白があることは、ヒト補体をほとんど結合しない IgM 群の存在を推定させる。

このような活性の差がヒンジ部や Fc 部等の定常部構造のちがいに基づくのかどうかについては、少なくとも抗原性分析上は差が認められなかつた。可変部の構造差が P.L. との吸着状態に影響しはしないかという測定法上の問題点も今後検討してみる必要があると思われる。

#### (文献)

- 1) MacKenzie, M.R., Warner, N.L., Linscott, W. D. and Fudenberg, H.H.: J. Immunol. 103, 607, 1969.
- 2) Ishizaka, T. Ishizaka, K., Salmon, S. and Fudenberg, H.H.: J. Immunol. 99, 82, 1967.
- 3) Augener, W., Grey, H.M., Cooper, N.R. and MüllerEberhard, H. J.: Immunochemistry 8, 1011, 1971.
- 4) Tamura, N. and Nelson, R.A. Jr.: J. Immunol. 101. 1333, 1968.

#### 23. リウマトイド因子の補体結合能力の検討

東京大学物療内科 谷本潔昭

Scripps Clinic and Research Foundation

N.R. Cooper, J.S. Johnson and J.H. Vaughan

リウマトイド因子 (rheumatoid factor; RF) が発見されて以来、数十年の年月が経過したにもかかわらず、その生物学的意義が明確に確立されていないのは、1つは RF の多様性にもよるが、主たる原因は補体との関係が不明確なためと思われる。RF と補体との関係が不明確な原因としては、RF の抗原とされている変性 IgG あるいは抗原抗体複合物がきわめて強い補体結合能力を有し、通常の補体結合反応においては RF 自身の補体結合能力をマスクしてしまうこと、補体価の測定に使用する hemolysin 感作ヒツジ血球が、RF と結合することなどがあげられる。

演者らは、以上の難点を克服するために抗原として、

IgG を還元アルキル化して補体結合能力を失わせ、また hemolysin を IgM と IgG とに分け、RF と反応しない IgM hemolysin で感作した血球を用いて通常の補体結合反応を行い、消費された残りの補体は、 $CH_{50}$ , C1, C2, C3の titer の測定で行い、対照と比較したがほとんど差を認めなかつた。このため RF が IgG hemolysin と反応すること、ならびに IgM が抗体として血球表面に存在する場合の方が、補体結合能力が増すことを利用し、次のような反応システムを考案し、明確に RF の補体結合能力を示すことに成功したので、詳細を報告する。

IgG hemolysin を還元アルキル化して、補体結合能力を失わせた後、非働化吸収済みの IgM RF と反応させ、さらにこれにヒトまたはモルモットの補体を加えると、図1に示すごとく7例の polyclonal IgM RF はほぼ凝

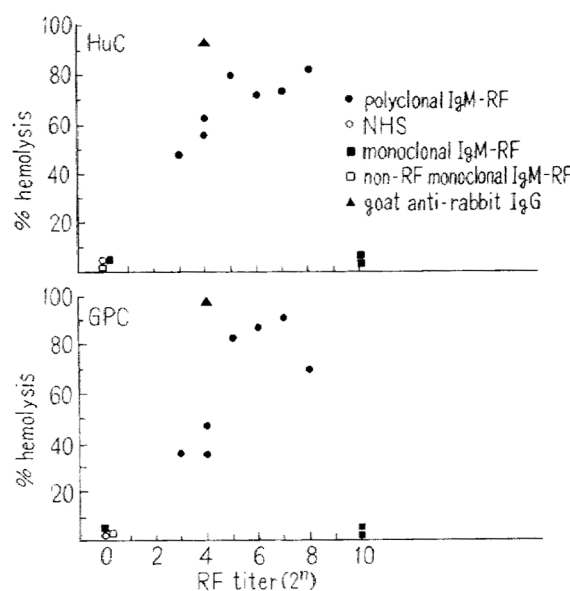


図1. Relation between hemolytic activity and sensitized sheep cell agglutination (SSCA) titer in sera of patients with rheumatoid arthritis.

集価に比例して溶血を示す。これに反して3例中2例の mixed cryoglobulin より分離された monoclonal IgM RF は、高い凝集価を示すにもかかわらず、溶血を示さない。もう1つの monoclonal IgM RF, RF 活性のない正常血清、Waldenström の IgM は、ウサギ IgG と凝集反応も示さないし溶血反応も示さない。陽性対照としたヤギ抗ウサギ IgG は、低い凝集価にもかかわらず強い溶血活性を示す。同様の傾向は、ウサギ IgG hemolysin の代わりに、還元アルキル化した変性ヒト IgG を用いて血球を感作しても認められ、この場合には、3例の

monoclonal IgM RF 全例が強くヒト IgG と反応して凝集反応を示すにもかかわらず、溶血反応を示さなかつた。

以上述べてきた溶血反応に対する補体の関与は次のようにして確かめられた。感作血球ならびに RF の複合物に、 $I^{125}$  をラベルした精製 C 4, C 3, C 8 を含んだ補体 (吸収済み正常人血清) を加え、 $37^{\circ}\text{C}$ 、60分反応させて溶血を起こさせる。この溶血したストローマを超速心で落とし、cell bound の C 4, C 3, C 8 を測定したが、% 溶血と直接の相関をみた。またこの溶血反応が、EGTA, EDTA, hydrazine, コブラ毒, anti C 1q, C 4, C 3, C 5, C 6 で阻止されることから、補体の classical pathway を介して溶血反応が起こることが明らかにされた。

このようにして確立された直接溶血法は、全血清を用いることができ、また手技が比較的簡単のため大量の検体を扱うことができる。図 2 は、慢性関節リウマチの

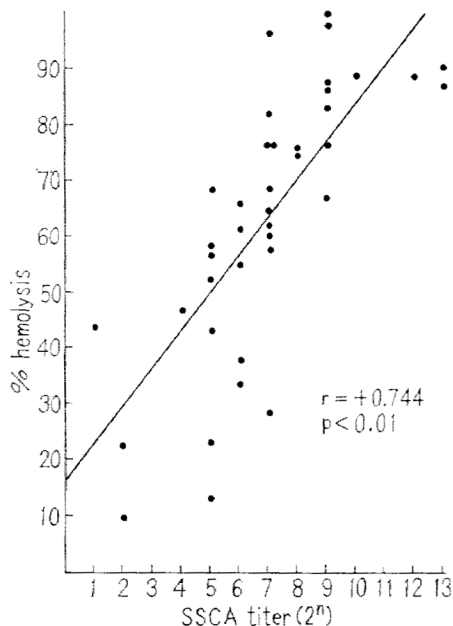


図 2. Relationship between hemolytic activity and RF titer.

血清について凝集価と溶血率を比べたものであり、はっきりとした相関関係が両者の間にあることを示している。その他、慢性関節リウマチの関節液、慢性関節リウマチ以外の他疾患の血清についても同様の結果を得た。また、慢性関節リウマチの関節液の低補体価をもたらす原因の1つとして、このリウマトイド因子の補体結合性によるものと思われる結果も得られた。

もう1つ著者らの試みた直接溶血法の応用は、Jerne

の hemolytic plaque assay を利用した RF の産生細胞検出である。現在までに報告されている RF の産生細胞検出方法は、蛍光抗体法を利用した蛍光ラベル変性 IgG を用いる方法と、IgG 感作血球と産生細胞との間の rosette 形成による方法があるが、いずれの方法もほとんど全ての B-cell が IgG の Fc 部分に対して receptor を持っていることが明らかにされて以来、RF の産生細胞を検出しているとはいえない。これに反して、著者の plaque forming cell は感度は多少落ちるが、高度に特異的であるといえよう。この方法を利用した結果は表 1 に

表 1 Detection of RF producing cells by Jerne's hemolytic plaque assay

	lymphocyte from		
	peripheral blood	bone marrow	synovial fluid
tested cases	8	4	12
positive cases of plaque forming cells (PFC)	0	2*	2**

\* One case (Ra) is positive direct plaque (2.2 PFC/ $10^6$  cells) and another case (Ro) is negative direct but positive indirect plaque (2.5 PFC/ $10^6$  cells).

\*\* Positive direct plaque (Pa) (13.8 PFC/ $10^6$  cells) and (Lo) (10.8 RFC/ $10^6$  cells).

示すごとくであり、末梢血に RF の産生細胞を検出することは困難であり、関節液、骨髄中には産生細胞が認められることがある。現在本法の手技の改良、症例の増加は進行中である。

#### 24. 抗 GBG 抗血清の性状

北海道大学生化学

今野孝彦, 平井秀松

先の第23回日本アレルギー学会ワークショップで、高度に精製された glycine-rich  $\beta$ -glycoprotein (GBG) の詳細な物理化学的性状と、Pillemer らのいう properdin factor B 活性を有することなどを報告した。GBG は分子量 105000, pI=5.60 であるが、最近 Mayer らが、モルモット血清より GBG 様蛋白 (HLF) を単離し、分子量  $\approx$  100000, pI 6.3 であると報告しているが、この数値はヒト GBG と似た値である。興味ある点は、HLF が、goat 抗 GBG 抗血清を用いるとヒト血清とゲル内沈降反応で spur を形成する交叉反応を示すという点である。alternate pathway は、classical pathway や免

疫グロブリン産生機構より、より primitive な機構と考えられ、この点からも興味深い。われわれも、高度に精製された GBG をウサギに免疫してえた抗 GBG 特異抗血清を用いて、数種の動物との反応を観察し、2, 3 の知見をえたので報告する。

#### 1) 抗 GBG 抗血清と zymosan 処理血清との反応

zymosan 処理血清は、抗 GBG 抗血清に対して、互いに spur を形成する  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -領域の3本の沈降線を形成する。市販の抗  $\beta_2$ -glycoprotein II (GGG) 抗血清に対しては、fuse する  $\beta$ ,  $\gamma$ -領域の沈降線を形成する。

#### 2) 各種動物血清との反応

モルモット、ラット、マウス、ウシ、ウマの血清と抗 GBG 抗血清は、ゲル内沈降反応で fuse する沈降線を形成し、ヒト血清または GBG (精製) と spur を形成する。しかし、ヒト以外の各種動物血清は、抗 GGG 抗血清とは反応しない。このことは、GBG が GGG ともう1つの fragment である GAG よりなり立っており、GBG と GAG の抗原性が異なっているとすれば、抗 GBG 抗血清と反応する各種動物血清の反応部分は、ヒト GBG に対して GAG が共通抗原決定基である可能性がある。この点を確認するために吸収試験を行った。

#### 3) ラット (またはウマ) 血清による吸収試験

定量的沈降反応で、やや抗原過剰域で吸収した抗 GBG 抗血清と zymosan 処理血清は、免疫電気泳動で  $\alpha$ -領域の沈降線は消失し、 $\beta$  との領域の spur も消失し、あたかも抗 GGG 抗血清との反応ようになる。このことは、GAG の一部または全部が共通抗原決定基である可能性があることを証明しているが、ウサギに免疫しているためなお共通抗原決定基は決められない。さらに下等な動物により免疫することにより、この点と各種動物間の差異を見いだしうるかもしれない。

### 25. GBG から GGG への転換について

大阪府立成人病センター

藤田禎三, 稲井真弥

glycine-rich  $\beta$ -glycoprotein (GBG) は properdin 系の1つの因子 factor B の活性をもっていることが報告されている。GBG は、血清に zymosan, inulin 等, alternate pathway を介して補体を活性化する物質を反応させた場合には、易動度が  $\gamma$ -領域に変わって glycine-rich  $\gamma$ -glycoprotein (GGG) に転換する。この転換の機作と意義を明らかにする目的で以下の実験を行った。

#### (方法)

#### 1) GBG から GGG への転換は免疫電気泳動で観察

した。支持体は1% agarose を使用し、0.002M EDTA を含む pH 8.6,  $\text{is}=0.05$  の veronal acetate buffer で泳動し、抗血清はベーリングベルケ社製の抗  $\beta_2$ -glycoprotein II と北大第1生化学教室の今野孝彦先生より供与を受けた抗 GBG ウサギ血清を用いた。

2) GBG は Boenisch, Alper の方法に準じて単離し、ディスク電気泳動で single band を示し、factor B の活性を有した。

3) factor B の活性は、新鮮ヒト血清を50°C, 30分加熱して作った RB (factor B を欠く血清) と、zymosan (N.B.C. 製) と sample を37°C, 60分間反応させ、C 3-9 (C3T) の低下を%で表した。

4) immune precipitate (Ippt) は egg albumin (N.B.C. 製) と serum bovine albumin (Sigma 社製) を抗原として用い、それに対するウサギ抗血清と至適濃度で反応させ、0.01M EDTA を含む生理的食塩水で2回洗い、使用した。

5) heat aggregated human IgG は Cohn F II (N.B.C. 製) より、Müller-Eberhard, Kunkel の方法によつて作成した。

6) RP (properdin を欠く血清) は、新鮮ヒト血清と zymosan 2mg/ml を 17°C 30分間反応させ作成した。

#### (結果)

1) 0.1%  $\text{NaN}_3$  を加えた血清を4°Cに保存し、採血後4週, 10週, 16週後に GBG の転換を調べたが、転換は全く起らなかった。

2) 新鮮ヒト血清を50°Cに加熱し、GBG の転換と

表1 The conversion of GBG and loss of factor B activity by heating at 50°C

	normal human serum			isolated GBG		
	C3T	factor B activity	conversion of GBG	factor B activity	conversion of GBG	
NHS	1280		(-)			
50°C	0'	1093	100%	18.4%	(-)	
	5'			44.9		
	10'	986	97.5	(+)	100	(-)
	12.5'	963	91.9			
	15'	942	75.5			
	17.5'	909	33.8			
	20'	883	16.7	(#)	100	(-)
30'	746	0	(##)	100	(-)	

\* factor B activity destruction.



表2 The conversion of GBG in normal human serum and RP treated with immune precipitate

amount ( $\mu\text{g N/ml}$ )	fixed complement	C3T destruction	conversion of GBG
Ea-anti Ea complex 200	85.3%	71.0%	(卅)
100	73.1		(卅)
20	41.7		(+)
10	35.8		(+)
5	23.4		(+)
RP+Ippt (200 $\mu\text{g N/ml}$ )	83.7	44.6	(-)
NHS+zymosan	100	100	(卅)
RP+zymosan	5.5	10.1	(-)

factor Bの失活を調べた。その結果、50°C、0分でGBGの転換は起こり、30分で完全にGGGとglycine-rich  $\alpha$ -glycoprotein(GAG)に転換する。factor Bの活性は、15分で約半分になり、30分で完全になくなってしまう。

3) 単離したGBGを用いて同じ実験を行うと、50°Cに加熱しても転換は全く起こらず、factor Bの活性は5分で半分になり、10分で全くなってしまう。

4) そこで alternate pathway が動かない条件で同様に加熱し、GBGの転換を調べた。RPと0.01M EDTAを含む新鮮ヒト血清を50°Cに加熱してもどちらも転換は起こらず、GBGは陽極側に長い沈降線をつくる。

6) egg albuminとその抗体で作ったIpptを变量して新鮮ヒト血清に加え、37°C、30分間反応後、血清補体価の低下とGBGの転換を調べた。GBGの転換は、Ippt 5 $\mu\text{g N/ml}$ で起こり、Ipptの増量につれて増強する。また、血清補体価の低下もそれと平行した。さらに他のIppt, aggregateさせたヒトIgGによってもGBGの転換が認められた。

7) RPにIpptを加え、37°C、30分間反応させると、補体価、C3Tともに低下するが、GBGの転換は起こらない。

#### (結語)

今回の実験で、新鮮ヒト血清を50°Cに加熱すると容易にGBGの転換が起こるが、4°Cに放置しても転換は起こらなかった。factor Bの活性は50°Cに加熱することによって失われるが、単離したGBGでは転換を伴わない。この加熱による転換には、他の因子(少なくともproperdin, Me\*)が必要であり、単なる物理化学的な変化と思われぬが、C3Tの低下とは一致しない。また、Ipptによる補体の活性化はGBGの転換を伴い、この転

換にも properdin が必要であることが判明した。

#### 26. 免疫殺菌反応に伴う大腸菌表層成分の変化について

大阪大学細菌 井上公蔵, 天野恒久

われわれの従来の実験から、グラム陰性菌に対し抗体と補体は、まず第一に菌の細胞壁を侵襲して、これに“channels”を形成することを明らかにした。この“channels”を通じて菌体の細胞膜の外側に存在すると考えられている表在性酵素、たとえば alkaline phosphatase は容易に遊出されるが、細胞膜内にある菌体内酵素、たとえば、 $\beta$ -D-galactosidase の遊出はかなり遅れ、細胞壁による保護作用が弱まって細胞膜が破綻するようになってはじめて遊出されてくる。一方、この細胞壁に形成された“channels”を通つて菌体外からは、たとえば、リゾチームが侵入して細胞膜深部の murein に到達してこれを分解し、その結果菌は spheroplasts に変化する。

菌の表層構造に対する補体の侵襲点を決定するために、われわれは  $^{14}\text{C}$  で標識した E. coli を用いて、これが免疫殺菌反応を受ける際に菌体外へ遊出される構造を追求しようとした。

一方、1968年 Smith および Becker は、免疫溶血反応の進行に伴って、全反応液中の titrable acid が増大し、磷脂質にも変化が認められると報告した。しかし、最近 liposome に対する補体作用の研究などから、補体の作用によつては膜の磷脂質は分解されないとの報告もある。

#### (材料および方法)

Escherichia coli B/SM あるいは E. coli K12, W3110/SM を用いた。菌を  $^{14}\text{C}$ -[U]-glucose を加えた合成培地に培養し、この  $^{14}\text{C}$  標識菌を bentonite 処理により血清リゾチームを除いたウサギ抗血清で感作し、これに同様にリゾチームを除いたモルモット補体血清(RL)を加えて殺菌させ、菌体より上清へ遊出されてくる  $^{14}\text{C}$  化合物を分画追求する。

E. coli B/SM の phospholipase-less [PLAL] mutants の分離は、今秋、日本細菌学会関西支部総会で報告した方法によつて行つた。E. coli K12, W3110/SM の補体抵抗性変異株は、microtiter 中で一定濃度のウサギ抗血清と一定高濃度のモルモット補体血清に、階段希釈した菌を加えて培養し、増殖の認められた部分のうち、はじめに加えた菌の最大希釈に当るものを取り、同様な操作をさらに繰返した後、得られた菌を分離、純化して用いた。

(結果および考察)

さきに補体シンポジウムで発表したごとくリゾチームを除いた補体 (RL) の作用により, 感作菌  $^{14}\text{C}$  の8ないし20%が, われわれの用いた条件下で60分以内に上清に遊離してくる. これをクロロホルム・メタノールにより分画すると, 非働化 RL ( $\Delta\text{RL}$ ) を用いた対照系に比べて, クロロホルム相 (Cs), メタノール・水相 (Ms) および中間相への画分はいずれも増大している (表1, 図1).

リポド画分をさらに薄層クロマトグラフィー (TLC) により分画すると, 活性 RL を用いた系では, 上清中に

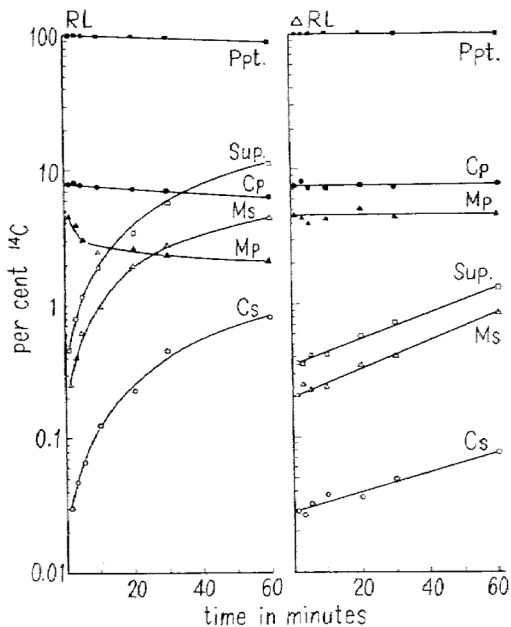


図1. Release and distribution  $^{14}\text{C}$  from sensitized *E. coli* treated with RL.

表1 Distribution of  $^{14}\text{C}$  of *E. coli* B after treatment with antibody and RL (lysozyme-free complement)

		Ab+RL	Ab+ $\Delta\text{RL}$
supernatant		12.9	1.4
precipitate		87.2	98.6
Sup.	chloroform phase	0.8	0.09
	MeOH-water phase	4.5	0.83
	interphase	7.6	0.46
Ppt.	chloroform phase	6.4	7.8
	MeOH-water phase	2.2	4.4
	interphase	78.5	86.4

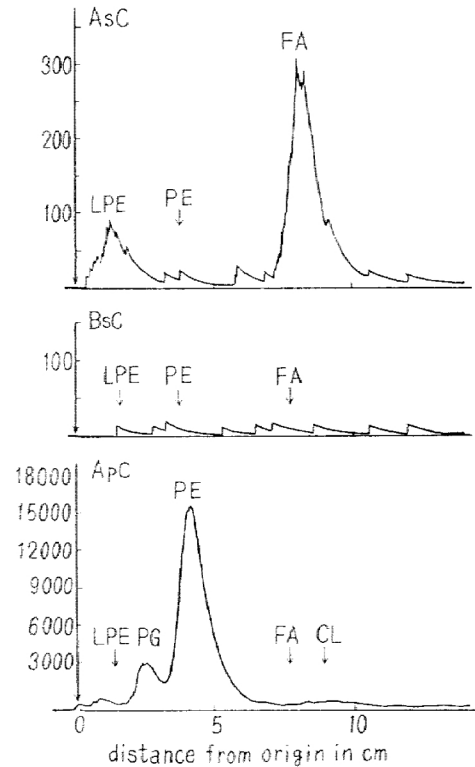


図2. Scans of radioactivity of TLC of the supernatants (AsC, BsC) and of precipitate (ApC) (A: BA+RI, B:BA+ $\Delta\text{RL}$ ).

脂肪酸 (FA) およびリゾ磷脂質, 特に lysophosphatidylethanolamine (LPE) が見いだされる. これに反し,  $\Delta\text{RL}$  を用いた対照系では, 上清へのリポド画分の遊出は非常に少なく, 時にわずかの phosphatidylethanolamine (PE) が見いだされるにすぎない (図2). これらの変化は, リゾチームを補体系に加えることにより増強される.

また他の対照系として, 補体の代わりに EDTA-osmotic shock を加えた系では, 大量 (40%前後にも達する) の  $^{14}\text{C}$  が上清中へ遊出してくるが, その大部分はメタノール・水相および中間相に分布し, FA や LPE は見いだされない.

免疫殺菌に伴うこれらの変化を経時的に追及すると, 殺菌反応のごく初期にまず PE が上清のクロロホルム相中出现し, これは時間がたつてもほとんど増大しないが, 次いで FA および LPE が同画分中に増大することが見いだされた (図3).

なお, 反応上清クロロホルム相中出现する FA 中には  $\beta$ -hydroxy-myristic acid などのヒドロキソ脂肪酸はほとんど見いだされず, したがって FA は菌体表層の lipopolysaccharide の lipid A 画分から由来したものでは

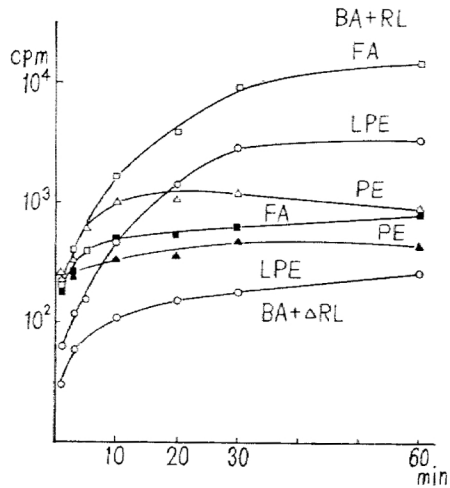


図3. Distribution of  $^{14}\text{C}$  among the spots of TLC.

ないようである。

以上の結果から補体の作用に伴って菌体表層の磷脂質がFAとリゾ体に変化することが明らかになったが、この作用(phospholipase A作用)が補体諸成分の活性化に伴って、補体成分から形成ないしは活性化されるのか、補体の活性化に伴って血清中の補体成分以外の pro-phospholipase Aが活性化されるのか、あるいは免疫殺菌の進行に伴い、菌体内の phospholipase Aが活性化されるのか、または、補体作用によつて菌体表層の基質がこの菌体酵素の作用を受けることができる状態に活性化されるのか、といった問題が提起される。

この問題を解決するため、われわれは *E. coli* B/MS より phospholipase A-less mutants を分離した。これを用いて免疫殺菌反応を行つてみると、これらの変異株

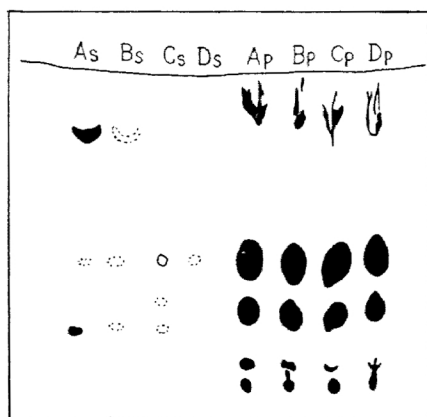


図4. Autoradiogram of TLC of lipids from the supernatants (As to Ds) and the precipitates (Ap to Dp) of *E. coli* B/SM, 1-1 (A,B) and D4 PLAL (C,D) treated with antibody and RL (A,C) or  $\Delta$ RL (B,D).

は、いずれも抗体および補体により親株同様に殺菌される。しかし、反応上清のクロロホルム相画分へのFAおよびLPEの出現はほとんど認められない(図4)。

さらにわれわれは、*E. coli* K12, W3110/SMを用いて、この株が homologous なウサギ抗血清で感作された時、モルモット補体でよく殺菌されることを見いだしたが、この株より、免疫殺菌に対して非常に抵抗性のある変異株を数株分離した。これらの変異株は、しかし、phospholipase A活性を親株と同様にもっていることが示された。したがって、phospholipase Aの有無と、菌の補体に対する感受性とは無関係であると考えられる。

#### (結論)

以上の成績から、免疫殺菌反応に伴って発現される phospholipase A作用は菌体側から由来すること、phospholipase Aを欠落している菌でも免疫殺菌反応に、親株と同様に感受性をもち、この菌が抗体と補体により殺される際には、菌体の磷脂質の分解はみられないこと、さらに抗体および補体による殺菌作用に高度の抵抗性を示す変異株においても、親株と同様に phospholipase A活性が認められることが明らかになった。

したがって、通常の菌が免疫殺菌を受ける際に認められる菌体の磷脂質の分解は、抗体および補体の一次的な侵襲の結果に続発して、菌の phospholipase Aが活性化されるのか、あるいは、免疫殺菌の結果菌の磷脂質が菌の phospholipase Aの活性中心に近づくことができるようになるのかであろう。以上の成績は、さらに、さきに Smith and Becker が報告した免疫溶血反応に伴う全反応液中での titrable acidの増大と磷脂質の変化でも、たぶん赤血球の場合にも同様な機作が働いていることを考察させる。

#### 27. ヒト体内における C3, C4 の分布について—新しい組織固定法による蛍光抗体法の成績

岡山大学第1内科

辻 孝夫, 内藤 紘彦, 野崎 肇, 徳山勝之  
岡田武志, 江草国之, 小坂淳夫

#### (目的)

補体成分の血清中からの単離やその種々の作用については、本邦でも国立がんセンターの西岡博士をはじめとして、多くの知見が集積されている。

しかるに、この補体成分のヒト体内での産生場所に関する知見になると内外でもほとんど報告はみられず、仮に報告があつても、主として抗原・抗体・免疫複合物との関連から検討されたものが、演者らの成績も含めて多

いようである。

演者らは、以上のような補体成分の産生場所を明らかにすることを目的として、従来蛍光抗体法で用いられていた組織固定法に変えて、新しい固定方法を開発したので、その方法を用い、今回は主としてC3 ( $\beta_{1c}/1_A$  グロブリン)、C4 ( $\beta_{1E}$  グロブリン) のヒト体内における分布について、現在までに検討できている成績について報告する。

#### (研究方法と対象)

研究方法としては、蛍光抗体直接法を用いた。FITC 標識抗 C 3 および C 4 液 (Meloy 社) と抗 C 3 および C 4 血清 (Hyland 社) から  $\gamma$  グロブリンを硫酸塩析、DEAE-column chromatography を用いて FITC (BBL 社) を F/P ratio = 1.5 になるように標識精製した自家製液を用いた。なお以下に示す新しい固定法による免疫グロブリンの局在も、FITC-抗 IgG, IgA, IgM, IgE, IgD

表 1 Materials

diagnosis	No.
fulminant hepatitis	4
subacute hepatitis	1
chronic hepatitis	45
active form	(14)
inactive form	(10)
sublobular hepatic necrosis (SN) form	(21)
liver cirrhosis	6
hepatoma	6
total	63

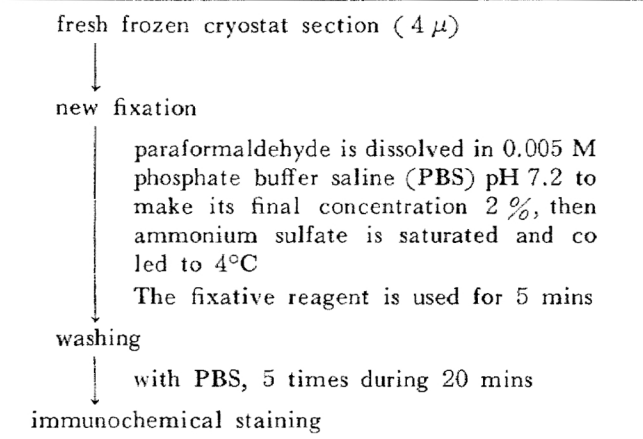


図 1. The new fixation for immunoglobulins and complement components (the method of Author's own design).

(Meloy 社) を用い検討した。研究対象としては、表 1 に示すように肝疾患々者 63 例から得た肝生検材料と慢性肝炎活動型例 (Ki. T. 例, 21 才, 男子) の剖検全組織材料すなわち、肝臓、腎臓、脾臓、睾丸、十二指腸、小腸、心臓組織を用いた。

補体成分と免疫グロブリン固定のための新しい方法：方法の要点は図 1 に示す。すなわち、新鮮な組織を dry-ice acetone と iso-pentane を用いて急速に凍結し、ルチンのクリオスタット切片 (4  $\mu$ ) にしたのちスライドガラスに貼り、fan で乾燥する。そのうち 0.005M phosphate buffer saline (PBS) に paraformaldehyde を 2% に溶解し、さらに硫酸を飽和にした新しい固定液 (4°C) を 5 分間マウントし固定して、20 分間に PBS を 5 回とりかえよく洗浄し、その固定標本について、おのおのの標識液で検討した。

また固定方法の従来方法、すなわちアセトン、グルタルアルデヒド・パラホルムアルデヒド、2% 酢酸エタノールおよび蛍光抗体用パラフィン法と比較を行った。

#### (成績)

肝臓内分布：従来の蛍光抗体用パラフィン法による C 3, C 4 の分布成績では肝細胞の細胞質に多く、その他に間質内に deposit 様に局在していたが、新しい固定法では主として間質の浸出性病変部や血管内、類洞内に著明で、肝細胞の細胞質内では肝生検材料による新鮮材料の場合でも非常に少なかった。また細胞成分では、間質すなわちグリソン鞘に浸潤している形質細胞様細胞や診断不明の円形細胞 (リンパ球?) の細胞質に C 3, C 4 がともにあり、その局在は細胞質が慢性のものと同様に細胞膜表面顆粒状のもの 2 種類が区別された。

慢性肝炎活動型や亜小葉性肝壊死を伴う型 (sublobular hepatic necrosis; SN 型) でみられるリンパ球の著明な集簇、すなわちリンパ濾胞様浸潤の部分では、C 3 と C 4 はリンパ球とリンパ球の間隙に局在し、すでに報告した IgG, IgM の局在と同じ所見であり、C 3 と C 4 の分布に差は認められなかった。

また肝細胞の局在の有無を詳細にみると、グリソン鞘に近い壊死部ないしは小葉辺縁部の肝細胞質に慢性ないしは顆粒状に局在していた。このうち、特に注目されたのは肝炎 B 抗原陽性例の同様な部分で、肝細胞質、肝細胞核内に IgG 局在と同時に C 4 局在を認めるものがあつた。

なお、従来の蛍光抗体用パラフィン法やアセトン固定

による間質部分や Kupffer 細胞近くでの deposit 局在は、この新しい固定法では特に強い蛍光として同様に観察された。

肝臓外分布：腎臓、脾臓、睾丸、十二指腸、小腸、心臓で、血管内局在は全例に、C 3、C 4ともに観察された。臓器別での特異的な分布としては、まず腎臓で糸球体の基底膜部に量の差はあるが、C 3、C 4が認められたことと、脾臓内で円形細胞、貪食細胞様細胞の細胞質ならびに、十二指腸、小葉粘膜下の浸潤円形細胞の細胞質におけるC 3、C 4の局在であった。

その他の部分、すなわち腎臓尿管、睾丸の実質部、心筋では、C 3とC 4ともに陰性であった。

従来の固定方法との比較と免疫グロブリンの分布：従来の蛍光抗体用パラフィン法とアセトン以外の固定方法では、C 3、C 4ともに抗原性が消失して、陰性であった。また、肝臓内のアセトン固定では deposit 様局在ないし腎臓の基底膜の deposit 様局在のみ観察され、この局在は IgG の局在と同じ所見であった。

蛍光抗体用パラフィン法は比較的良好であると考えられる成績を得たが、肝臓内類洞血管や全身の血管内局在の蛍光が著しく弱かった。

#### (考案)

補体成分に関する血清中の活性や反応系に関する報告は多い。また免疫性疾患すなわち SLE や関節リウマチ、腎炎、結節性動脈炎などにおける抗原、抗体、免疫複合物としてのC 3、C 4局在証明の報告はみられる。

しかるに、補体成分のヒト体内における形態学的な分布に関しては、ほとんど報告がみられず、特に産生場所に関する形態学的知見は皆無であった。

演者らは、このような問題点は、蛍光抗体法における組織固定方法を改良することによって明らかにすることが可能と考え、硫安飽和で血清蛋白を塩析した状態で、paraformaldehyde で固定するという全く新しい方法を開発した。現在、症例数増加と抗血清のよいものを調整中であるので、さらに検討したいと考えている。

#### (まとめ)

蛍光抗体法により、C 3、C 4のヒト体内分布を新しい組織固定液、すなわち硫安で飽和した2%paraformaldehyde 液を用いて検討し、現在までの成績について述べた。

#### (文献)

- 1) Tsuji, T., Ohta, Y. and Kosaka, K: Immunofluorescent studies of liver diseases. Recent Ad-

vances in Gastroenterol. 3, 239, 1967.

- 2) 水野保夫他：蛍光抗体法による慢性肝動型患者の肝組織内 $\beta_1C/1A$  globulin および $\beta_1E$  globulin の検討. アレルギー 20, 291, 1971.

## 28. Immune lysis of ATP ase incorporated liposome

奈良県立医科大学細菌

加藤卓次、横尾順子、蓑田一三夫  
深山昭雄、樫葉周三

### (目的)

われわれは、ヒト赤血球の免疫溶血反応において、球膜 ATPase-ATP の相互関係が最終溶血度に著明な影響をおよぼすことを明らかにした。今回、補体作用と細胞膜 ATPase-ATP の関係をより単純化した系で研究する目的で、Haxby らによつて報告されたリポゾームに、さらに Micrococcus lysodeikticus の細胞質膜より分離精製した ATPase を封入することを試み、この ATPase 封入リポゾームに対する補体作用を研究した。封入 ATPase は、卵白リゾチームを封入した時とは異なり、明かに脂質膜中で結合していると考えられたので、この ATPase 封入リポゾームの性質をまず明らかにし、immune lysis に対する感受性が、膜の状態によつてどのように異なるかを研究した。

### (方法および材料)

Micrococcus lysodeikticus の細胞質膜 ATPase は、本実験においては主として shocked wash ATPase を用い、これは Muñoz らの方法により分離した。n-butanol 抽出 ATPase は、リポゾームの細胞質膜に封入できなかった。リポゾーム作成に用いた磷脂質は、Haxby らの方法に従つて、Forssman 抗原を含む分画 (Fr. II a) としてヒツジ赤血球膜より分離抽出した。リポゾームの作成は、抽出磷脂質 (Fr. II a) をガラス壁にフィルムとして伸ばし、これに低温で galactose, ATPase,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  あるいは ATP を適時加え、サーモミキサーで激しく攪拌することにより作成した。ATPase 封入の際の量的関係は次に示すとおりで、反応液は等張に保持してある。リポゾーム浮遊液は、0.075 M KCl-0.075 M NaCl 溶液で遠沈洗浄し、過剰の反応液を除去した。

lipid (Fr. II a) #15 30 $\mu$ g 有機磷

ATPase #6 72 $\mu$ g 蛋白質

1.08M galactose cont. 40mM  $MgCl_2$  0.3ml  
100mM Tris-HCl (pH 7.5) で全量を 1.2ml にする。

リボゾームの immune lysis の指標として、溶出ガラクトースを測定するため反応液に  $\beta$ -galactose dehydrogenase と NAD を加え、生ずる NADH を 340nm で定量し、トリトン X 処理（最終濃度 1%）で溶出するガラクトース量を 100% としてその溶出度を求めた。補体はモルモット血清、抗体はウサギ抗ヒツジ赤血球を使用し、ともに 100000  $\times$ g, 24 時間超遠沈を行い実験に供した。

#### （結果）

1) 先にわれわれは、ヒツジ赤血球膜脂質より作成したリボゾームに卵白リゾチームを封入した時、補体および amboceptor の作用によりリゾチームの溶出が認められるが、抗リゾチーム抗体によつてはリゾチームの溶出は認められないことを示した。ATPase 封入リボゾームでは、補体および抗体の作用により、同時に封入したガラクトースの溶出がすみやかにみられるにかかわらず、

ATPase 蛋白の溶出は全く認められない。さらに amboceptor を anti ATPase に置き換えても、反応速度は遅いが、ガラクトースの溶出を認めた。

2) ATPase 封入リボゾームは ATPase 活性を現さないが、トリトン X で処理することにより ATPase 活性が再現される。

3) ATPase 封入リボゾームを 60°C 加熱を行った時、トリトン処理リボゾームの ATPase 活性は, soluble ATPase を加熱した時に比較して著しく耐熱性である。

4) ATPase を封入する際、Ca<sup>+</sup>, ATP を添加した時、補体および amboceptor によるガラクトースの溶出を時間的に追及した結果、Ca<sup>+</sup> 存在下で ATP を過剰に加えた時は、ガラクトースの最終溶出度は低下するが、Ca<sup>+</sup> 非存在下では、ATP を過剰に加えてもガラクトース溶出度に変化は認められなかつた。