

Proceedings of the Complement Symposium  
Vol. 17, Sendai, 1980

## 第17回 補体シンポジウム

### 講演 抄録集

---

会 期 昭和55年 8月28日(木)・29日(金)・30日(土)

会 場 宮城県仙台市国分町 3丁目 3-7

宮城県民会館・第二会議室(6階)

電話 0222-25-8641

世話人 東北大学抗酸菌病研究所 橋 武彦

仙台市星陵町 4-1 (〒980)

電話 0222-74-1111 内線3457

---



## 御 案 内

### (1) 受 付：

シンポジウム第1日目午前8時30分より会場受付で行います。参加者は年会費（抄録代、会場費を含む）4,000円、懇親会費3,000円、合計7,000円を支払い、必ず名札をつけて御入場ください。年会費支払済みの方は必ず受付で御確認の上名札を受取ってください。

宿泊申込済みの方はシンポジウム前日午後3時より午後10時まで宿泊場所のニューシティホテル1階ロビーで、宿泊費（3朝食・1昼食・懇親会費を含む）20,000円から予約金10,000円を差引いた10,000円と年会費4,000円の合計14,000円をお支払いください。その際名札、朝食券、昼食券（28日の分）をお受取りください。

### (2) 講 演：

一般講演は発表10分、討論5分以内。

テーマディスカッションは発表8分で一括討論を予定しています。時間を厳守してください。プロジェクター1台を用意します。

### (3) 座長へのお願い：

時間のわく内で能率よくおまとめください。テーマディスカッションは予め、演者と打合せて、十分なディスカッションを展開してください。総討論時間は一題5分としてとってあります。

### (4) エクスカーション：

観光バス及び遊覧船による松島観光に参加申込みをされた方は、受け付けで、

3,200円（昼食代を含む）を支払い、参加のしおりをお受取りください。

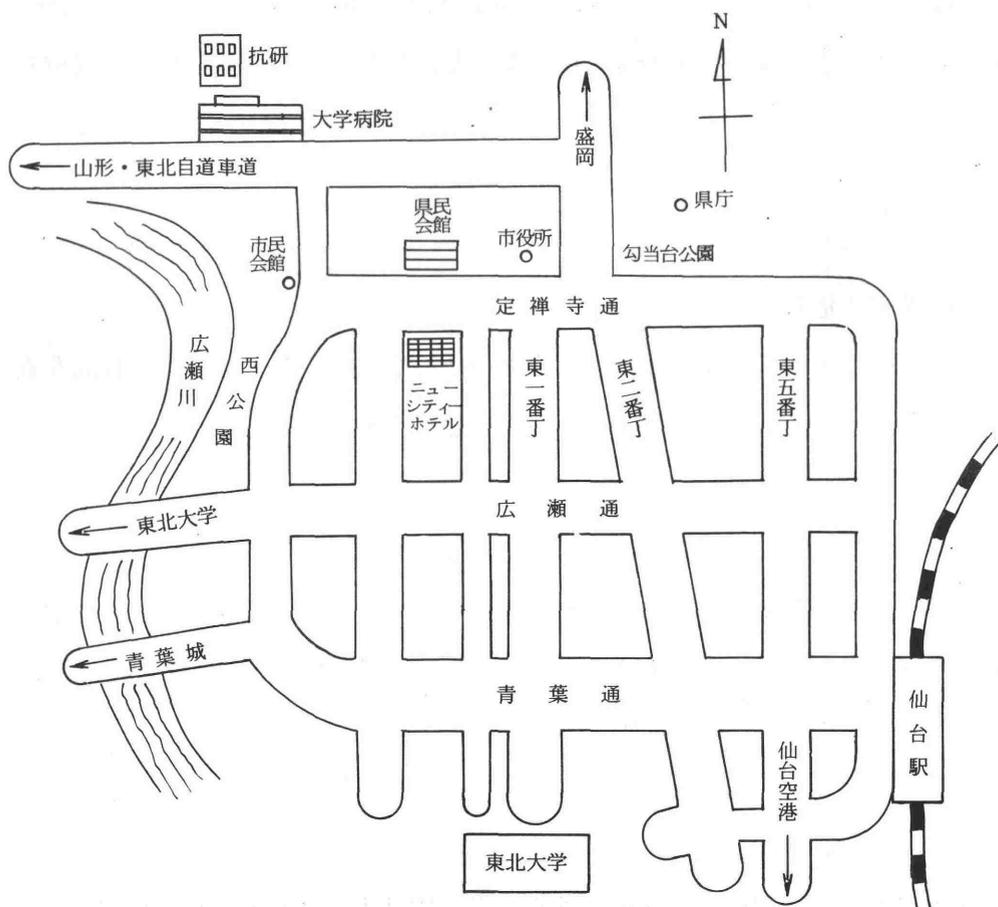
会場前発（29日午後1時）——バス——青葉城・青葉山東北大——バス——松島瑞巖寺、  
五大堂——船——塩釜——バス——ホテル到着（午後6時20分）

(5) 交 通：

宿泊場所（ニューシティホテル）と会場（県民会館）は定禅寺通りを距てて  
向い合っています。

仙台駅より徒歩20分、タクシー350～420円。

仙台空港より仙台駅まで空港バス45分、600円。



## 第1日 8月28日(木)

9:30~9:40 開会の挨拶 橘 武彦

9:40~10:25 一般講演(I) 座長 長沢 滋治, 高田 明和

1. 補体蛋白測定について——検査手技による測定値の影響——  
高野病院・免疫生化学 中嶋 憲章  
昭和大・第1内科 韓 啓司 杉崎 徹三
2. Coil Planet Centrifuge 法による血清総補体価測定法  
名古屋保健衛生大・衛・血液 勝田 逸郎  
名古屋保健衛生大・医・内科 平野 正美 伊藤 圓
3. CoVF 感作赤血球溶血反応による alternative complement pathway の測定法  
国立がんセンター研・ウィルス 田中 博子 横田 雅弘  
岡田 秀親

10:25~10:45 Coffee Break

10:45~12:30 一般講演(II) 座長 稲井 真弥, 井上 公蔵

4. ニジマスの補体系 I. 溶血補体系の存在とC5の同定  
金沢大・がん研・免疫生物 野中 勝  
金沢医大・血清 山口 宣夫  
金沢大・がん研・免疫生物 坂井俊之助 高橋 守信
5. 蛋白分解酵素によるC5b-7複合体分子の構造の解析  
金沢大・がん研・分子免疫 山本 健一
6. ZX formation 時におけるNeFの作用  
阪大・第1内科 中西 功 上田 尚彦  
安東 明夫 阿部 裕  
滋医大・第3内科 折田 義正  
大阪医大・病態検査 稲井 真弥 赤垣 洋二  
大阪府立成人病センター 永木 和義
7. ハプテン化-リポソームによる非特異的補体活性化の解析  
北里研 岡田 則子  
東大・医科研 保田 立二  
成人病試験研 大谷とし子  
北里研 英 清道  
東大・医科研 積田 享  
国立がんセンター研 岡田 秀親

8. C9欠損症のACH50に関する考察  
 岡山大学・第3内科  
 天野 哲基 宮島 啓人  
 大藤 真

9. Neuraminidase 処理細胞によるalternative complement pathway の活性化  
 国立がんセンター研  
 岡田 秀親 横田 雅弘  
 田中 博子  
 成人病試験研  
 大谷とし子  
 北里研  
 岡田 則子

10. Immune cytotoxicity に対する腫瘍細胞の感受性を高める物質の探索  
 北里研  
 岡田 則子  
 成人病試験研  
 大谷とし子  
 北里研  
 英 清道  
 国立がんセンター研  
 岡田 秀親

12:30~13:30 昼 食

13:30~15:00 テーマディスカッション  
 「Immune complexes をめぐって」

座長 広瀬 俊一, 鳥巢 要道

11. 新しい簡便なcirculating immune complex (CIC)の測定法について  
 ——ポリエチレングリコール沈殿物補体消費試験(PEG-CC)の検討——  
 九大・心療内科  
 手嶋 秀毅 吾郷 晋浩  
 九大・小児科  
 友岡 裕治  
 九大・第1外科  
 鳥巢 要道

12. ポリエチレングリコール補体消費試験(PEG-CC)による  
 小児科領域各種疾患の免疫複合体の測定  
 九大・小児科  
 友岡 裕治 宮崎 澄雄  
 合屋 長英  
 九大・心療内科  
 手嶋 秀毅  
 九大・第1外科  
 鳥巢 要道

13. 可溶性免疫複合体の単離, 組成分析および補体活性化能  
 九大・温研・内科  
 酒井 好古 江崎 一子  
 安田 正之 友岡 和久  
 延永 正

14. 血液患者および膠原病における免疫複合体の検索  
 C1q deviation test, Polyethylene glycol 沈殿法および Anti-antibody inhibition test.  
 九大・温研・内科  
 安田 正之 酒井 好古  
 延永 正

15. 補体 cold activation ——原因因子としての soluble cryoglobulin-like substance の証明——

京都府立医大・第1内科	竹村 周平	村上 正志
	田上 広樹	若松 美和
	古川 泰正	渡辺 幸一
	西田 康一	松村 直幸
	堀田 忠弘	横江 信義
	吉川 敏一	近藤 元治

16. 慢性肝疾患の抗補体因子——特に補体結合性IgG について——

福島医大・第2内科	森藤 隆夫	西間木友衛
	吉田 浩	粕川 禮司

17. EIA 法による特異的 HBs 抗原・免疫複合物の定量とその臨床的意義について

岡山大・保健管理センター	辻 孝夫
岡山済生会病院	荒木 清典

15:00~15:20 Coffee Break

15:20~16:35 一般講演(III) 座長 深山 昭雄, 天野 哲基

18. 嫌気性菌による補体活性化

東北大・歯・病院臨床検査	上山 陽子	
東北大・抗研・免疫	奥田 智子	橘 武彦

19. 過敏性肺臓炎における補体 alternative pathway の関与について

新潟大・第2内科	外山 譲二	近藤 有好
	荒川 正昭	

20. 低補体価を呈した Aspergillus fumigatus による過敏性肺臓炎の一症例

新潟大・第2内科	外山 譲二	中俣 正美
	原口通比古	成田 昌紀
	遠藤富士夫	矢田 省吾
	近藤 有好	荒川 正昭

21. 白癬における表皮内白血球遊走機序の解析

浜松医大・皮膚科	鈴木 典子	田上 八朗
	青島 忠恕	

22. IgA 腎症と補体

——とくに蛍光抗体法による  $\alpha 1$  H globulin, C3b inactivator の態度について——

順天堂大・腎臓内科	海老原 功	中山 秀英
	小出 輝	大野 丞二

16:35~18:20 テーマディスカッション

「血清補体価の変動と意義」

座長 近藤 元治, 酒井 好古

- |   |   |  |  |
|---|---|--|--|
| 23. 低栄養児における補体価と Phytohemagglutinin skin test について<br>和洋女子大 | 坂本 元子   |  |  |
| 24. 掌蹠膿疱症と補体<br>東京都立大久保病院・皮膚科<br>東京都臨床研                     | 河島 敏夫<br>鈴木 貴和  | 古賀 道之<br>田中 忍                                      |  |
| 25. 乾癬患者における抗角層抗体について<br>浜松医大・皮膚科                           | 田上 八朗   | 岩月 啓氏  |  |
| 26. SLE 及びRA における CRP と補体の動態<br>昭和大・第1内科                    | 韓 啓司<br>杉崎 徹三   | 中嶋 憲章  |  |
| 27. ヒト梅毒に於ける補体の変動<br>東京都臨床研・補体<br>東京都立大久保病院                 | 鈴木 貴和<br>嶋田 孝吉<br>河島 敏夫                                     | 田中 忍<br>古賀 道之                                      |  |
| 28. 肺癌患者における補体の動態<br>昭和大・第1内科                               | 韓 啓司<br>杉崎 徹三   | 中嶋 憲章  |  |
| 29. 糖尿病と補体<br>京都府立医大・第1内科                                   | 田上 広樹<br>若松 美和<br>渡辺 幸一<br>村松 直幸<br>吉川 敏一<br>竹村 周平          | 村上 正志<br>古川 泰正<br>西田 康一<br>堀田 忠弘<br>横江 信義<br>近藤 元治 |  |
| 30. インターフェロンの補体に与える影響<br>京都府立医大・第1内科<br>京都府立医大・微生物          | 松村 直幸<br>西田 康一<br>若松 美和<br>渡辺 幸一<br>竹村 周平<br>近藤 元治<br>岸田綱太郎 | 田上 広樹<br>堀田 忠弘<br>古川 泰正<br>横江 信義<br>吉川 敏一          |  |

18:40~20:30 懇親会

ニューシティホテル, 宴会場(2F)

## 第2日 8月29日(金)

9:00~10:15 一般講演(Ⅳ) 座長 西岡久寿弥, 永木 和義

- |   |                |       |
|---|----------------|-------|
| 31. ウシ補体第一成分の亜成分C1q の構造研究<br>奈良医大・細菌                    | 佐々木隆子<br>米増 國雄 | 山下 典明 |
| 32. マウスC1 subcomponent について<br>東北大・抗研・免疫                | 清野 仁<br>橋 武彦   | 奥田 智子 |
| 33. 加熱処理による C3 の限定水解<br>——熱不安定性ペプチド結合の同定——<br>北大・薬・衛生化学 | 瀬谷 司<br>小山 次郎  | 長沢 滋治 |
| 34. C4 のアミン結合部位の解析<br>北大・薬・衛生化学                         | 市原千嘉子<br>小山 次郎 | 長沢 滋治 |
| 35. マウス血清中に存在する C4 分子の多様性について<br>東北大・抗研・免疫              | 福岡 良博<br>橋 武彦  | 奥田 智子 |

10:15~10:35 Coffee Break

10:35~12:20 テーマディスカッション

「補体成分の遺伝子支配とその異常症」

座長 高橋 守信, 北村 肇

- |  |                         |                |
|--|-------------------------|----------------|
| 36. H-2遺伝子群中に存在する補体系制御蛋白(C4bp)の遺伝子座<br>金沢大・がん研・免疫生物          | 海藤 敏雄<br>高橋 守信          | 坂井俊之助          |
| 37. マウス C3 のアロタイプ決定基の性状<br>金沢大・がん研・免疫生物                      | 野中 真弓<br>海藤 敏雄<br>高橋 守信 | 坂井俊之助<br>野中 勝  |
| 38. 抗C1r を用いた C1 インヒビータ欠損の検出<br>——ロケット法による試み——<br>虎の門病院腎センター | 鈴木 好夫<br>岡崎 祐子          | 宗村 フサ<br>三村 信英 |

39. 正常人及び糖尿病患者における factor B の遺伝的多型性

関東通信病院・腎臓内科	中山 大典	池田 隆夫
東大・医・物療内科	行山 康	広瀬 俊一
柳原病院	宮崎 康	

40. C4 の遺伝的多型および cold activation による表現型の変化

京都府立医大・法医	西向 弘明	解良 芳夫
	阪田 潔	山沢 吉平
大阪府立成人病センター	北村 肇	永木 和義

41. 補体第 4 成分欠損症？

愛媛大・医・皮膚科	白石 聡	奈良有美子
	松田 光司	三木 吉治

42. 遺伝性補体第 9 成分欠損症の兄弟例

健生病院・小児科	河野 晃	
金沢大・がん研・分子免疫	山本 健一	右田 俊介
金沢医大・血液免疫内科	滝口 智夫	

43. 輸血後抗 C9 抗体を産生した補体第 9 成分 (C9) 完全欠損症の一例とその家族調査

九大：医・第 1 内科	木須 達郎	草場 公宏
	柳瀬 敏幸	
九大・温研・内科	酒井 好古	
九大・医・病院輸血部	稲葉 頌一	
九大・医・病院中検	大河内一雄	

12:20～ エクスカーションおよび自由行動

19:00～20:30 運営委員会

ニューシティホテル, 高砂(4F)

### 第3日 8月30日(土)

9:00~10:15 一般講演(V) 座長 田村 昇, 米増 國雄

44. C1 INA と C1s の反応について  
 浜松医大・第2生理 高田 明和 高田由美子
45. C1 活性化に及ぼす種々因子の検討  
 浜松医大・第2生理 高田由美子 高田 明和
46. ヒト尿由来の low molecular weight inhibitor (LMW-INH)  
 によるヒト C1 の不活化  
 大阪成人病センター 永木 和義 北野 悦子
47. マウス腹腔マクロファージと factor B  
 名古屋保健衛生大・医・微生物 森山 剛 川本 保子  
 市川 秀隆 深山 昭雄
48. ヒト末梢単核球による  $\alpha$ 1H グロブリンの産生  
 筑波大・基礎医学系 藤田 禎三 向井鏝三郎  
 福島 繁 浜口 秀夫  
 田村 昇

10:15~10:35 Coffee Break

10:35~10:50 運営委員会報告

10:50~12:20 一般講演(VI) 座長 岡田 秀親, 藤田 禎三

49.  $\alpha$ 1H グロブリンによる C5 site の形成阻害  
 筑波大・基礎医学系 伊藤 清子 田村 昇
50. 抗補体剤K-76COOH の C3bINA system の抑制作用について  
 阪大・医・細菌 洪 卿秀 木下タロウ  
 岡田真理子 井上 公蔵
51. K-76COOH を使った EAC1,4b,2a,3b, EAC4b,3b cells の簡単な作成法(II)  
 EAC1,4b,2a,3b (K-76), EAC4b,3b (K-76) cells の解析  
 阪大・医・細菌 洪 卿秀 木下タロウ  
 岡田真理子 井上 公蔵
52. ヒト白血球のEAC ロゼット形成における二価イオン依存性  
 東北大・抗研・免疫 佐藤 智 奥田 智子  
 橘 武彦  
 磐城共立病院・小児科 渡辺 信雄

53. モルモットC5 およびC8 の精製

阪大・医・細菌

木下タロウ 洪 卿秀

岡田真理子 井上 公藏

54. 「PEG 法による補体の分離条件の検討」II. トリス塩酸緩衝液を用いた方法

東京都臨床研・補体

田中 忍 斑目 君恵

北村ふじ子 鈴木 貴和

鳴田 孝吉

解 散

## 補体蛋白測定について

— 検査手技による測定値の影響 —

高野病院免疫生化学(昭和大第一内科)

中嶋憲章

昭和大学第一内科・韓 啓司

杉崎徹三

(目的) 免疫反応の増幅という観点から補体の研究が進み、最近では補体蛋白を測定することにより、各疾患の病状を把握しようとする試みができ、きた。補体蛋白を測定する方法として現在、最も普及しているのが single radial immuno-diffusion (SRID法) 及び laser nephelometer (L.N.) である。しかし、二法とも同一蛋白を測定しているにもかかわらず、時として測定値が相関しないことがある。これらは特に SLE 等の免疫疾患についてみられ、しばしば臨床検査値に影響を与えることがある。よって今回我々は一部の SLE 血清で高値に出るといわれる C1q と高値を示す C9 及び多抗原性をもつ C3, C3PA, Properdin (P) また C1S, C4, C5, C1INA, C3bINA について検討を行なった。

(対象及び方法) SLE 血清 21 例、心筋梗塞 4 例、胃癌 2 例、慢性リウマチ (RA) 2 例、肝硬変 2 例、HANE 1 例以上、昭和大学第一内科、及び高野病院内科にて診断されたものである。対照は 20~40 代の正常人 30 例である。方法は C1q, C1S, C4, C3, ( $\beta_1C$  only,  $\beta_1C/\beta_1A$ ), C3a, C5, C9, C3PA, Properdin (P), C1INA, C3bINA (Hoechst, Iatoron, Kent) の抗血清を用いて L.N. (Hyland), SRID で血清及び EDTA 加血漿を測定した。標準血清は QS 血清 (Hoechst) を 100% として用いた。

(結果) 無差別に選出した新鮮血清及び数回融解を繰り返して 2~3 年冷凍保存した血清を用いて L.N., SRID の相関をみると、新鮮血清では良好な相関を認められたが、冷凍保存血清では C1q, C3, C3a, C3PA, P の相関は低下し、C1S, C4, C5, C9 は良好な相関を示した。(表-1) 次に図-1 の如く新鮮血清を室温に保存し、一か月間の C1q, C3, C4 の蛋白の変動を L.N. SRID でみると、SRID では C1q, C3 は有意に上昇するのに対し、L.N. では変動しなかった。C4 は L.N., SRID とも安定した値を示した。classical pathway を介して activation されると考えられる SLE 患者血清 (2~4 年凍結融解を数回繰り返した) を用いて C1q と C4 の相関を L.N. と SRID で検討すると図-2 の如く L.N. では  $r=0.571$ , SRID では  $r=0.211$  であった。また、この血清での C1q の L.N. と SRID の相関は  $r=0.644$  であり、無差

別に選出した時良好な相関を示した C9 は  $r=0.461$  と著るしい相関の低下を示した。次に C3 蛋白質の測定に  $\beta_1C$ ,  $\beta_1C/\beta_1A$  の抗血清を用いて室温保存した血清の変動を CH50 と比較すると  $\beta_1C$  が類似した経時的低下を示した。(図-3) また、各補体成分と CH50 の相関をみると表-2 のように  $\beta_1C$  only が  $r=0.897$  と良好な相関をみた。各疾患での  $\beta_1C(C)$ ,  $\beta_1C/\beta_1A(A)$  の比 % を検討すると正常人 1.21 に対し SLE 0.82, RA 0.79, 肝硬変 0.81, 胃癌 0.78, 心筋梗塞 1.13 であった。またこれらの疾患の血清を室温保存し  $\beta_1C$  の消費量の比を検討すると HANE を除く疾患で低下率が高かった。

(考察並びに結論) 補体蛋白を測定する際、方法及び血清保存状態により測定値に著明な差が出る時がある。現在最も普及されている SRID では特に①免疫疾患で conversion 等の影響を受ける場合と②分子の破壊により寒天内の diffusion が変化し実測値より値が大となる場合がある。以上の結果より①として特に C3, C3PA, P が考えられ、②として補体成分中最も分子量の多い C1q が考えられた。しかし、L.N. においては始めから免疫沈降物の比蜀を測定している関係上多抗原になっても安定した結果が得られ、①、②の影響を受けにくい。また C9 には無差別に選出した sample では新鮮血清、冷凍血清共 L.N., SRID の相関が良好であったが SLE 血清での相関は低下した。このことは分子量最少の C9 では物理的現象よりも、SLE 等の疾患でみられる補体の activation の影響によって長期保存においては SRID に何らかの影響を与えるのではないだろうかと推測される。また C3 蛋白等のように  $\beta_1C$  から  $\beta_1A$  に conversion する成分は各種疾患により  $\beta_1C/\beta_1A$  が同一蛋白量であっても  $\beta_1C$ ,  $\beta_1C/\beta_1A$  の比をみることによってその conversion の状態を把握できるのではないかと思われる。そしてその  $\beta_1C$  を消費する conversion の強さは補体を活性する因子により各疾患で相異なるものと思われる。ゆえに補体蛋白を測定するには SRID では満足できぬ点があり、また L.N. では非特異的散乱の影響、及び抗血清中に含有される  $Ca^{++}$  イオンによって生じる不溶性塩に注意しなければならない。よって、補体蛋白を測定する際、手技方法による影響が多分にある為、同一疾患で測定するにもかかわらず相違した成績が出てくる可能性があると思われる。

X:SRID Y:L.N

表-1  
→

新鮮血清				冷凍保存血清(2~3年)			
蛋白	Y=	r	n	蛋白	Y	r	n
C1q	1.13x+31.0	0.944	32	C1q	0.42x+42.8	0.690	20
C1s	1.20x+19.1	0.906	32	C1s	1.01x+20.1	0.890	20
C4	0.94x+6.3	0.958	32	C4	0.91x+2.9	0.959	20
C3	0.90x+15.7	0.962	32	C3	0.42x+6.7	0.842	20
C3a	0.94x+30.4	0.852	32	C3a	0.42x+32.1	0.752	20
C5	0.84x+7.0	0.892	32	C5	0.45x+19.4	0.819	20
C9	0.64x+10.9	0.910	32	C9	0.63x+12.6	0.904	20
C3PA	0.59x+10.5	0.944	32	C3PA	0.74x+18.5	0.863	20
P	0.82x+3.9	0.903	32	P	0.94x+5.7	0.775	20
C11NA	0.74x+9.2	0.895	32	C11NA	0.68x+18.5	0.825	20
C3bINA	0.44x+12.9	0.899	32	C3bINA	0.45x+17.6	0.873	20

図-1  
↓

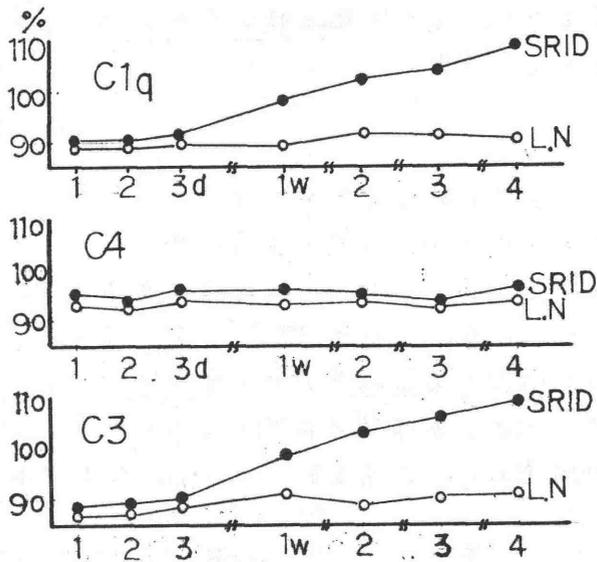


表-2 ↓

蛋白	r	Y
$\beta_2C$	0.897	4.10x-7.5
$\beta_2C/\beta_1A$	0.776	2.97x-10.5
C4	0.761	280x+15.1
C5	0.758	1.47x+42.1
C1q	0.697	2.35x+33.1
C9	0.672	1.37x+46.7
P	0.537	1.16x+48.3
C3PA	0.375	1.71x+47.1

表-1・新鮮血清, 保存血清に於けるSRIDとL.Nの相関

表-2・CH50と補体蛋白の相関

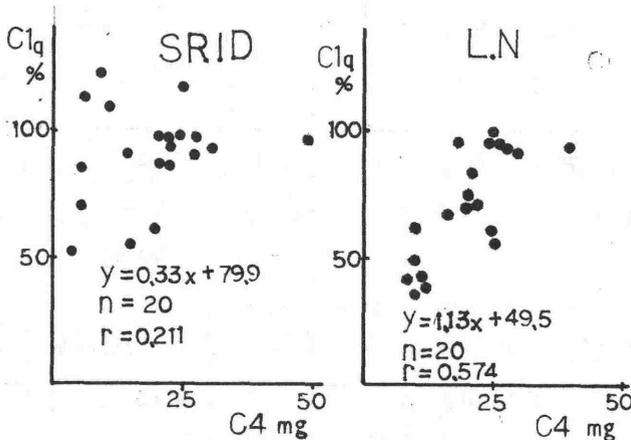


図-1・室温保存に於けるC1q, C4, C3の測定法による変動(d:日 w:週)

図-2・SLE血清C1q, C4の相関 - SRIDとL.Nの比較 -

## 2

# Coil Planet Centrifuge 法による血清補体価測定法

勝田逸郎 (名古屋保健衛生大学 衛, 血液)

平野正美, 伊藤圓 (名保大 医 内科)

Coil Planet Centrifuge (CPC) は、連続浸透圧濃度勾配内に赤血球を移動させ、赤血球膜の脆弱性の差により、生ずる溶血帯から赤血球膜物性を計測する目的で開発された装置である。この装置を用いると、赤血球を一定速度で移動させることが出来る。この現象を利用し、至適濃度の緩衝液で希釈した血清中に一定量のEAを通過させると血清中の補体価の差により、補体の濃度に反比例した長さの溶血帯が生ずる。この基本原理から実験を行ない、操作は簡単であり、しかも迅速性のあるCPCによる血清補体価測定法を考案したので報告する。

### I. 材料

1. 検体血液 本学の学生、及び本院入院外来患者血清
2. コントロール血清 健常者と考える50名より得た血清を合わせ、1mlずつ分注し、 $-80^{\circ}\text{C}$  に凍結保存する。コントロール血清の血清の補体価(CH50値)は、 $29.6 \pm 4.3$  (Mayer 1/5法 10回測定)であった。
3. セウテン、ヘロナル緩衝液 (株)日本凍結乾燥研究所製
4. EA (株)石津製薬製、CPC法による血清補体価測定に用いるEAは、10mlのEAを1,500rpmで10分間遠心して上清を取り、10g/dlヘモグロビン濃度とする。
5. 使用機器 CPC遠心器, CPC比色計, CPC孵卵器, CPC空コイル (株)バイオメディカルシステムズ製)

### II 方法

検体血清をGVBで3~5倍希釈し、空のCPCコイルの一端から、希釈検体血清を吸い、コイルに充填する。次に1~2mmのエアギャップを作り、EAをホリエテレンチューブの長さにして5.0cm幅注入し、これを付属のコイルアレスでコイルの両端を締め、余ったチューブを切り取る。これをCPC孵卵器に $37^{\circ}\text{C}$  10分間加温し、早速くCPC遠心器に装置し、15分間作動させ遠心操作後CPCコイルに生じた溶血幅をスケール、又は比色計にかけ、溶血曲線チャートから計測し、これより、血清補体価を求めた。

### Ⅲ、成績

#### 1、血清補体価とCPC溶血幅

コントロール血清の希釈系列を作成して、各希釈血清に対応する溶血幅を求めた(図1)。血清希釈倍数とCPC溶血幅の相関をみると、極めてきれいな直線関係が得られる( $y = 13.8x + 22.5$ ,  $r = 0.9998$ )。溶血幅22.5mmを差し引くと、血清希釈倍数と溶血幅は比例関係となり、血清補体価とCPC溶血幅は逆比例することを確認できる。差し引いた22.5mmは、実際にCPCコイルに生ずる溶血帯、対応させるとEA注入端から濃い溶血帯の開始点までのほとんど溶血が認められない距離に相当する。これはEAが補体と接触してから溶血した瞬間までの距離(17cmのCPCコイルは約3.5mのポリエチレンチューブコイルに巻かれているので、22.5mmはチューブの長さにして約40cm)即ちEA補体溶血のlag time(約65秒)と考えられている(図3)。

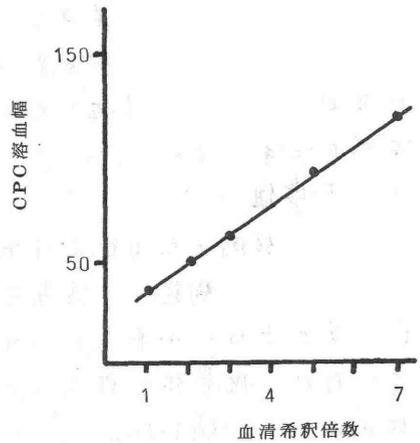


図1 血清希釈倍数と溶血幅

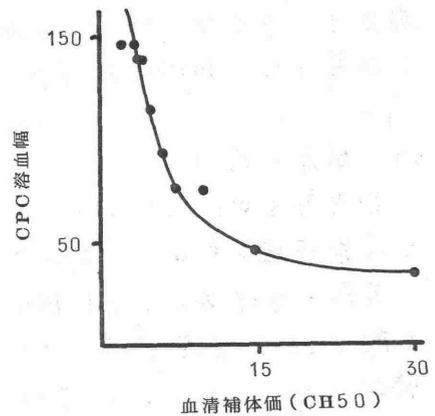


図2 CH50値とCPC溶血幅

図2は、補体価とCPC溶血幅を示し、CPCコイル内での補体価測定範囲は3~30のCH50単位である。測定に際しては、単位補体価あたりのCPC溶血幅の変化が大きい3~15CH50単位の濃度範囲が精度的には好適と考え、CPC法による補体価測定にあたっては、測定値がこの範囲に入るように血清を適度に希釈する必要があり、即ち3倍希釈血清を用いると測定可能範囲は9~90CH50単位であり、最適測定範囲は9~45CH50単位となる。

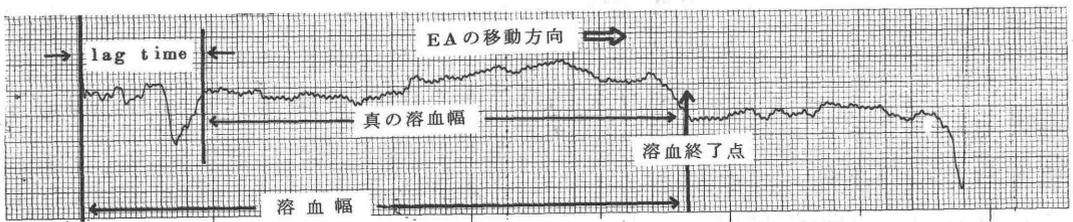


図3 CPC用比色計による溶血曲線

## 2 再現性

コントロール血清を3, 5, 7倍希釈し、それぞれでの再現性を求め表1に示した。

1) 本日も良好な再現性(CV値1.97~2.65)を得たと考へる。

## 3 正常値

健常者50例の血清補体価をMayer法とCPC法で測定し、結果を表2に示した。コントロール血清を希釈し、CPC法を行ない検量線を作成した。CPC法によるCH50値はMayer法とほぼ近似の正常値を得たが、Mayer法と比してやや広い正常域となった。これとは別の55例の健常者でCPC法とMayer法の相関を検討した結果では、相関係数0.725と好成績を得た。

## 4. 臨床的応用

肝疾患を中心にMayer法とCPC法で血清補体価を測定し、肝疾患をX印、他の疾患を●印で示した(図4)。肝疾患を除く56例の相関係数は0.71であり、回帰式は $y = 1.0/x - 1.41$ (実線)であった。肝疾患群は、相関係数0.562、回帰式は $y = 0.7/x + 0.79$ (破線)で、肝疾患群にCPC法とMayer法の補体価に解離を認められた。

## IV 結果及び考察

CPC法による血清補体価測定法の特徴はMayer法と異なり、補体過剰条件下での反応であり、EAが補体の濃度に応じて溶血する速度を測定してゐる点である。CPC法における補体価測定は、従来法と比して正常値、再現性とも非常に近似してあり、健常者での補体価の相関は0.725と好成績を得た。臨床的には肝疾患において従来法とのデータに解離を認めらるが、これは肝疾患の病態解明上からも極めて興味ある知見と考へ、更に検討を加へた。

表1 CPC溶血幅 再現性

	EA:Hb濃度 10g/dl, 5cm		
	血清希釈倍数 3倍	5倍	7倍
$\bar{x}$	63.7	93.1	109.7
SD	1.49	2.47	2.16
CV(%)	2.34	2.65	1.97

表2 血清補体価 正常値

	5倍希釈血清 EA:Hb 10g/dl, 5cm		
	Mayer法 CH50(u)	CPC法 溶血幅(mm)	CPC法 血清補体価(u)
$\bar{x} \pm 2SD$	21.2—38.2	70.7—126.5	17.5—40.3
$\bar{x}$	29.7	98.6	28.9
SD	4.3	14.1	5.8
CV(%)	14.4	14.3	20.0

(N=50)

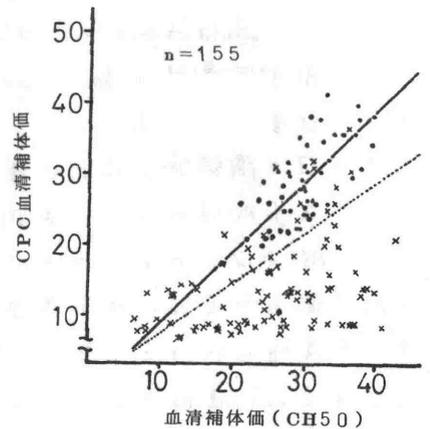


図4 CH50とCPC血清補体価

### 3

## CoVF感作赤血球溶血反応による alternative Complement pathwayの測定法

田中博子 横田雅弘 岡田秀親  
国立がんセンター研、ウイルス

Cobra venom factor (CoVF)は、コブラのC3bと考えられているが、これは $\beta$ 1H, C3b inactivatorによる制御をうけないため、Alternative complement pathway (ACP)のpositive feedback systemの強力なtriggerである。従って、CoVFを赤血球の存在下で血清と反応させると、一種のreactive hemolysisにより赤血球の溶血がおこるので、この反応はACPの測定法にも応用されている。このCoVF dependent hemolysisをより効率よく起こさせるため、CoVFをあらかじめ赤血球に吸着させておくことを考えた。ウサギ、ヒト等の赤血球をタンニン酸で処理し、これにCoVFを吸着させ、このtanned erythrocytes-CoVF (TE-CoVF)とモルモット、マウス等のACPとの反応性を $Mg^{2+}$  GVB中での溶血反応を指標として検討した。

〔実験材料及び方法〕

CoVFはCobra venom Naja Naja より DEAE-Cellulose column, Sephadex G-200 columnにて精製した。

赤血球は、0.11M phosphate buffer pH 7.5 (0.11M PB)中に $1 \times 10^9/ml$ の濃度に浮遊し、等量のタンニン酸溶液 (W/V,  $1/20,000$  in 0.11M PB) を加え、37°C 1時間反応させた。このタンニン酸処理赤血球を3回0.11M PBにて洗滌し、タンニン酸を除いた後、 $5 \times 10^8/ml$ の濃度に再浮遊し、等量のCoVF溶液と混合した。4°C 1晩放置後、37°C 20分振とうしたあと、2,000 rpm 10分遠心により、 $Mg^{2+}$  EGTA-GVB (2mM  $MgCl_2$ , 10mM Ethyleneglycol-bis( $\beta$ -aminoethyl ether) N, N'-tetraacetate, 0.1% gelatinを含んだ veronal buffered saline, pH 7.4) にて3回洗滌後、 $1 \times 10^8/ml$  に再浮遊し、TE-CoVFとした。

$1 \times 10^8/ml$ のTE-CoVF 100 $\mu$ lに $Mg^{2+}$  EGTA-GVBにて希釈した血清100 $\mu$ lを混合し、37°C 1hr反応した後、EDTA-GVB 800 $\mu$ lを加え、2,000 rpm 10分遠心し、その上清のOD<sub>414</sub>から溶血度を測定した。対照として、 $5 \times 10^8/ml$ のタンニン酸処理していない赤血球100 $\mu$ lにCoVF溶液100 $\mu$ l及び血清希釈液100 $\mu$ l、緩衝液200 $\mu$ lを混合し(37°C 1hr反応させ、EDTA-GVB 500 $\mu$ lを加えた後) 遠心上清のOD<sub>414</sub>を測定した。

〔結果及び考察〕

1) ヒト赤血球を用いて T-HuE-CoVF を作ると CoVF の量に応じてモルモ

ット ACP による溶血が認められる。  $5 \times 10^8$  /ml tanned HuE (T-HuE) に 800u/ml の CoVF を作用させた場合には、GPC を最終濃度 1 : 160 に希釈しても 50% の溶血を示した。又、CoVF を赤血球に吸着させず、HuE と共存させるだけでは、2400u/ml の CoVF を用いても、GP-ACP の検出感度は T-HuE-CoVF を用いた場合の  $\frac{1}{10}$  以下であった。

Increase of hemolytic sensitivity to guinea p:ig ACP depending on the dose of CoVF used for T-HuE-CoVF

Amount of CoVF *	4	12	40	120	400	1200
ACH <sub>50</sub> by T-HuE-CoVF	24	35	50	88	148	220

\* CoVF used for conjugation with T-HuE ( u/2.5x10<sup>8</sup> T-HuE/ml )

2) ウサギ赤血球を用いて tanned RabE-CoVF を作ると、ヒト赤血球を用いた場合と同様に CoVF の量に依存してモルモット ACP による溶血がおこる。その測定感度はヒト赤血球を用いた場合よりやや高い傾向が見られた。しかしながらヒトの ACP による RabE lysis は RabE に CoVF を吸着させてもほとんど亢進が認められなかった。ただし、血清を最終濃度 1 : 80 以上に希釈した際、CoVF の量に依存して溶血が上昇する傾向にあるので、CoVF の濃度を高めることにより、モルモット ACP 同様に感度を上げることが可能であるかもしれない。また、SRBC-bearing C3b はヒト補体と反応し容易に溶血されるので、tanned SRBC-CoVF を作成しヒト ACP 検定感度を高めることは可能であろう。

3) T-HuE-CoVF 及び T-RabE-CoVF を用いて BALB/c の EGTA-plasma による溶血活性を検討した。  $5 \times 10^8$  /ml ヒト赤血球当たり 400u/ml CoVF を反応させた T-HuE-CoVF を用いた場合、EGTA-plasma を最終濃度 1 : 40 に希釈した時 50% 溶血が見られた。また T-RabE-CoVF を用いた場合には、CoVF の量に応じて ACP による溶血が見られ、  $5 \times 10^8$  /ml ウサギ赤血球当たり 800u/ml の CoVF を反応させると、最終濃度 1 : 200 に希釈しても 50% 以上の溶血が認められた。

4) TE-CoVF の溶血が ACP によるものであると考える根拠としては、以下の通り知見を得ている。

1) GP 血清を 56°C 4 分間加熱すると溶血活性が失われる。TE-CoVF とこの加熱血清とを 15 分間反応させたあと EDTA-CI を加えても溶血しない。

で、Bの存在が必要であると推察された。又、このGP加熱血清存在下でTE-CoVFとGP血清のSephadex G100やG200あるいはDES2で行った分画のBが存在すると考えられる分画を加えると溶血が回復することもこれを裏付けると言えよう。

ii) EDTA-GVBでは溶血反応はおこらないが $Mg^{++}$ -EGTA中では血清による溶血がおこる。

以上の結果、CoVF感作赤血球を用いることにより、モルモットやマウスのACPを溶血反応により高感度に検出できることがわかった。この方法を用いてこのモルモット及びマウスのACP成分の精製を検討中である。

## 4

## ニジマスの補体系 I. 溶血補体系の存在とC5の同定

野中 勝, 山口宣夫\*, 坂井俊之助, 高橋守信

(金沢大・がん研・免疫生物, \*金沢医大・血清)

哺乳類の補体系の研究は、多くの成分の存在と多岐にわたる生物活性とを明らかにしてきたが、それらの内から補体系の基本的な段階、原始的な形態を明らかにする為には系統発生学的な研究が有用と思われる。これまでに溶血反応を用いた研究により、下等脊椎動物のみならず無脊椎動物からさえも補体系活性または補体系様活性が報告されてきたが、溶血反応のみによる方法には問題点が多く、中には哺乳類の補体系との関連性に疑問があるものも含まれている。従って、下等動物から個々の補体系成分を同定して、哺乳類のそれとタンパク分子としての対応関係を明確にすることが重要と考えられるが、これまでにその種の報告はサメのCl, カエルのCl<sub>g</sub>について行われているにすぎない。我々は硬骨魚類に属するニジマス (*Salmo gaidneri*) の血清中の単一補体系成分に対する抗血清を作製し、それをニジマスのC5と同定したので報告する。

〔方法〕 ニジマス抗羊赤血球活性 56°C, 30分処理し段階稀釈したサンプルと、 $2 \times 10^7$ 個羊赤血球 (Sh.E) を 0.6ml GVB<sup>+</sup> 中で25°C, 30分保温後、50倍稀釈した正常ニジマス血清 (NRTS) 0.4ml を加え 25°C, 60分保温し、2ml 氷冷 GVB<sup>+</sup> を加え 3,000 rpm, 10分遠心 上清の OD<sub>414</sub> を測定した。 ニジマス補体系 段階稀釈した NRTS と  $2 \times 10^7$  個のニジマス抗体で感作した Sh.E (Sh.EA) 又はウサギ赤血球 (Rab.E) を、1ml の GVB<sup>+</sup> 又は Mg·EGTA·GVB 中で25°C, 60分保温し測定した。 ニジマス抗 Sh.E 血清  $5 \times 10^8$ /ml の Sh.E をニジマス一匹当り 1ml ずつ、6週間隔で二度腹腔注射し、更に6週後に採血して得た。 ウサギ抗ニジマス C5 (a.C5)

NRTS と保温したサイモサンとウサギに免疫した処、NRTS と数本の沈降線と形成する抗血清が得られた。プロテインA・セファロースにこの抗血清を流して洗、1.0ml の NRTS を通すと溶血活性は消失したが、それに NRTS の DEAE・セファロース分画を加えると、一本の沈降線と一致して溶血活性の回復する部分が認められた。このタンパクを抗原性により精製してウサギに免疫し、単一補体系成分 (C5) に特異的な抗血清が得られた。

ニジマス抗 Sh.E IgM 5~15% PEG 沈澱, DEAE・セファロース, セファデックス G-200, セファロース CL-6B により精製し、11% の回収率と、39倍純化された。SDS-PAGE, 免疫電気泳動 (IEP) 的に純粋で、

分子量は還元前約100万、還元後は7.4万と2.3万であった。ニジマス C5  
 5~15% PEG 沈澱、DEAE・セファローズ、セファデックス G-200、CM・  
 セファローズで精製し、回収率22%で175倍純化され、SDS-PAGEで純度  
 95%以上であった。フルコースオキシダーゼ法により<sup>125</sup>I標識し、 $1 \times 10^6$   
 cpm/mg のものが得られた。

[結果] 古典・副両系路の存在 それ自体では溶血の起らない $1/50$ NRTS  
 と $2 \times 10^7$  Sh.E の混合液に精製したニジマス抗 Sh.E IgM を加えると、濃度依  
 存性の溶血が認められ、1~2 mg/ml で100% 溶血に到った。以後10 mg/ml  
 の IgM と保温、洗浄した Sh.E と Sh.EA とした。Sh.E, Sh.EA, Rab.E を標的  
 細胞として、GVB<sup>+</sup>, Mg. EGTA-GVB, EDTA-GVB 中で NRTS の titration  
 を行ほうと、Sh.E はいずれの溶液中でも溶血せず、Sh.EA は GVB<sup>+</sup> 中  
 のみ、Rab.E は GVB<sup>+</sup>, Mg. EGTA-GVB 中で溶血した。この結果は哺乳類  
 の補体系の場合と良く対応し、IgM, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> を必要とする Sh.E の溶血は古  
 典系路、Mg<sup>2+</sup> のみを要求する Rab.E の溶血は副系路によると考えられた。

a. C5 は両系路を阻害 a. C5 及び正常ウサギ血清から IgG, F(ab)<sub>2</sub> を  
 調製して両系路に対する影響を調べた。a. C5 由来のものは両者に対して  
 明らかに阻害効果を示した (Fig 1)。C5 の分子構造 正常ニジマ  
 ス血漿と a. C5 から作った免疫沈降物を SDS-PAGE で分析した。その

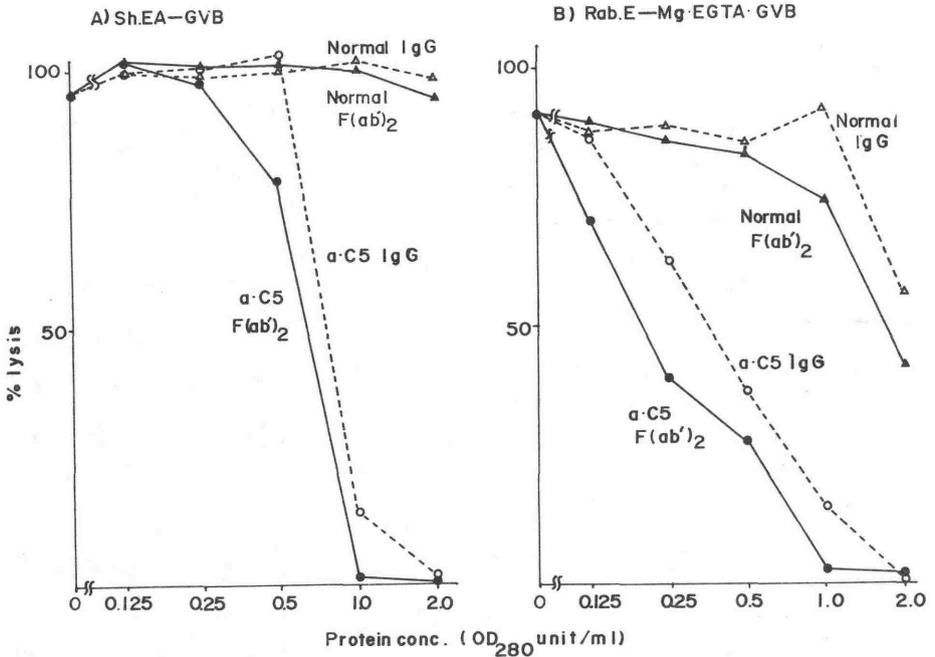


Fig. 1

その結果 Fig. 2 に示す様に、C5 は還元前は 19.4 万、還元後は 12.2 万と 8.6 万の分子量を有し、ヒト C3, C5 と区別しえない分子構造を示した。精製した C5 も同様の構造を有していた。LPS 活性化による C5 の Membrane attack complex (MAC) への取り込み <sup>125</sup>I 標識した C5 を NRTS に加え、GVB<sup>+</sup> 又は EDTA-GVB 中で LPS を加えて活性化し、セファデックス G-200 で分画して放射活性の分布を測定した。無処理の場合にはヒト C3 と一致して、オニオン交換樹脂に溶出された C5 は、GVB<sup>+</sup> 中での活性化により元の位置と exclusion の位置に 2 つのピークを示した。EDTA-GVB 中ではこの変化は認められず、T (Fig. 2)。G-200 exclusion に移行した部分を MAC 画分とした。LPS 活性化血清を a.C5 に対し IEP を行なうと、本来の位置と、より陽極側とに二相性の沈降線が見られ、MAC 画分では陽極よりのもののみが認められた。この移行は LPS の代わりにサイモザン、イヌリンでも認められ、又、オファトーロニーにより NRTS-a.C5 の沈降線は MAC 画分 a.C5 の沈降線に対してスパーを形成した。MAC 画分と a.C5 とで、免疫沈降物を SDS-PAGE にかけると、ウサギ IgG 以外に 5 本のバンドが検出された。

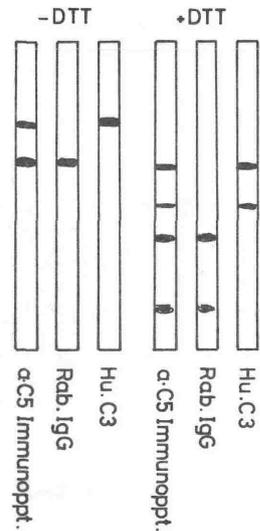


Fig. 2

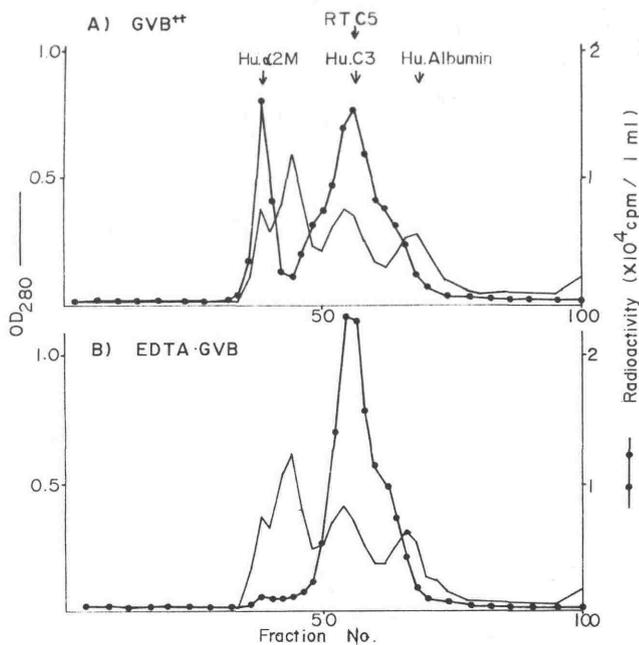


Fig. 3 Sephadex G-200

以上の結果は、ニジマス C5 は LPS 等による活性化の結果、非共有的に結合した多成分からなる分子量 50 万以上の複合体に取り込まれ、その際 IEP 移動度の変化、一部の抗原性の消失が起こることを示した。これは哺乳類の C5 が MAC に取り込まれる際の変化と良く一致している。

〔考察〕 初め抗原性により検出されたニジマス補体成分は、①古典、副両系路の活性に必須であ

ること、②分子構造がヒトCS、CFと区別しえたいこと、③LPSによる活性化：MACに取り込まれることにより、CFと同定された。ニジマスに於ける古典、副両系路の存在；哺乳類と極めて類似したMACの形成、及び分子構造的にヒトのものと区別しえたいCFの存在は、硬骨魚類と哺乳類という系統的にかけ離れた動物の間で、補体系の基本的性質が良く保存されていることを示していると思われる。

山本 健一

金沢大がん研分子免疫部

補体による細胞膜傷害反応は、もともと親水性の補体蛋白が活性化に伴って疎水性の複合体を形成し、かつこの複合体が膜脂質と強く結合することによって起ると考えられている。以上の反応に実際に関与している補体成分は C5b, C6, C7, C8, C9 の5つで、ポリペプチド鎖の数からいうと8つであるが、膜傷害性複合体の機能及び構造上、これらの成分がどのような役割を果たしているのかは明らかではない。今回この問題を明らかにする目的で、膜傷害性複合体の中間産物の C5b-7 複合体について、その前駆体、人工脂質二重膜 (リポソーム) に結合している C5b-7 複合体、及び fluid phase C5b-7 複合体に蛋白分解酵素のトリプシンを作用させて興味ある知見を得たのでその結果を報告する。

〔方法〕 ヒト C5, C6 及び C7 はそれぞれ Tack<sup>(1)</sup> 等及び Podack<sup>(2)</sup> 等の方法で精製した。精製補体成分の radioiodination は lactoperoxidase 及び glucose oxidase を用いて行った。I-C5b<sup>125</sup> あるいは I-C6<sup>131</sup> を含む C5b-6 複合体の精製は下記の方法で行った。まず我々が前に報告した方法<sup>(3)</sup>で正常ヒト血清より C7-depleted reagent を作製し、L-lysine-Sepharose 4B のカラムに通してプラズミノゲンとプラズミンを除いた。ついで I-C5<sup>125</sup> あるいは I-C6<sup>131</sup> を加え、ヒト血清処理チモサンで活性化し、生成した C5b-6 複合体を前報と同様の方法<sup>(3)</sup>で精製した。リポソームは dimyristoyl phosphatidyl choline を用いて Littman 等の方法<sup>(4)</sup>で作製した。リポソームに結合した C5b-7 複合体は、リポソーム、C5b-6 複合体及び C7 を 37°C で 10 分間インキュベートし、不連続ショ糖密度勾配超速心法でリポソームに結合していない蛋白を除き、作製した。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動は Weber と Osborn の方法<sup>(5)</sup>で行った。

〔結果〕 我々及び Podack 等<sup>(6)</sup>が報告しているように、C5b-6 複合体中の C5b の  $\alpha$  鎖はトリプシンあるいはプラズミンによって  $\alpha 1$  (7.5万) と  $\alpha 2$  (2.75万) の2つのフラグメントに分解されるが、 $\beta$  鎖は全く酵素分解を受けない。 $\alpha$  鎖はこれ以上プラズミンによって分解されないが、トリプシンを長時間作用させると  $\alpha 1$  フラグメントはさらに分解されて  $\alpha 1a$  (6万) になった (Fig. 1)。トリプシンはまた C5b-6 複合体中の C6 を数カ所で分解した (Fig. 1)。C7 はトリプシンによって少なくとも、3カ所で分解された (Fig. 1)。次に C5b<sup>125</sup>\*-6 複合体 (I-

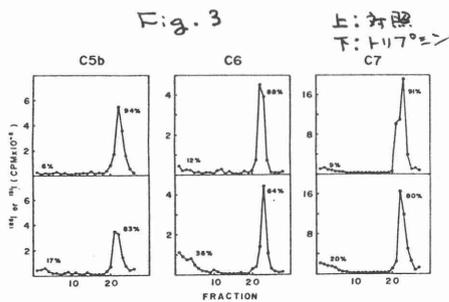
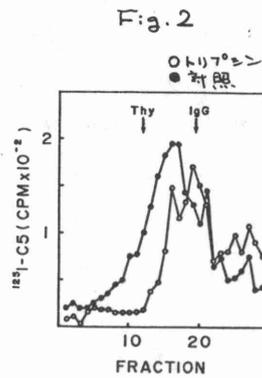
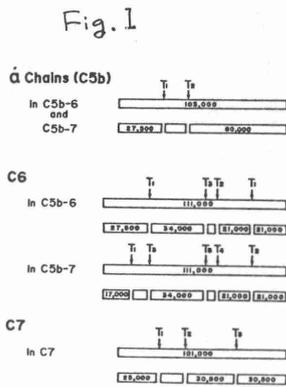
C5bを含む)、C5b-6<sup>※</sup> 複合体 (<sup>131</sup>I-C6 を含む)、あるいは <sup>131</sup>I-C7 を用いて先に述べた方法でリポソームに結合している C5b-7 複合体を作製し、それにトリプシンを作用させると、リポソームに結合している複合体中の C5b の鎖と C6 はトリプシンによる分解を受けたが (Fig. 1)、複合体中の C7 は酵素の作用を受けなかった。さらにリポソームに結合している C5b-7 複合体を 0.5% deoxycholate (DOC) で可溶化した後にトリプシンを作用させても上と同様の結果が得られた。すなわち、リポソームに結合している C5b-7 複合体中の C7 がトリプシンの作用を受けないのは、複合体がリポソームに結合したために起ったのではなく、C7 が複合体に組み込まれることによって起ったと考えられた。上に述べた C5b-7 複合体のサブユニットの酵素分解が C5b-7 複合体分子にどのような影響を与えるかを次の 2 つの方法で調べた。まず 0.5% DOC 存在下で C5b<sup>※</sup>-6 複合体 (前出) と C7 を 37°C で 10 分間インキュベートして fluid phase C5b-7 複合体を作製し、トリプシンを作用させ、10-40% ショ糖密度勾配超遠心法で分析した。トリプシン処理を受けていない C5b-7 複合体は 13-26S の沈降係数を示し、モノマー C5b-7 複合体とポリマー C5b-7 複合体が混在していた (Fig. 2)。一方、トリプシン処理 C5b-7 複合体中の大部分の C5b は約 7.6S の沈降係数を示すことから (Fig. 2)、酵素分解を受けた C5b-7 複合体は ショ糖密度勾配超遠心中サブユニットに解離していると考えられた。次にリポソームに結合している C5b-7 複合体に同様にトリプシンを作用させ、複合体のサブユニットがリポソームから解離してくるかどうか調べた。Fig. 3 に示されているように、トリプシン処理後不連続密度勾配超遠心を行うと、リポソームに結合している複合体中の C5b 及び C7 の全体の放射活性のそれぞれ 10% がリポソームから解離してきて、複合体中の C6 の場合はその全放射活性の約 24% がリポソームから解離してきた。

〔結論〕 以上脂質二重膜上における C5b-7 複合体形成過程に関して次のような知見が得られた。(1) C7 が C5b-7 複合体に組み込まれるとトリプシンの作用を受けなくなるのは、複合体中では C7 は主に C5b と接しているため、あるいは C5b-7 複合体の量体形成は C7 を介して行なわれるため、等の理由によって複合体中の C7 にトリプシンが接近できないことによると考えられる。(2) リポソームに結合している C5b-7 複合体中の C5b 及び C6 にトリプシンは接近可能で、いずれも数カ所で分解されるが、C5b, C6, C7 のいずれもリポソームから解離してこない。一方リポソームに結合していない fluid phase C5b-7 複合体は、酵素分解を受けるとサブユニットに解離してしまう。つまり C5b-7 複合体はリポソームに結合することによってトリプシンによる解離に抵抗性を示すようになった。これは C5b-7 複合体のそれぞれのサブユニット

が脂質二重膜構造に直接結合しているためと考えられる。

引用文献

- (1) Tack, B.F., S.C. Morris, and J.W. Prah1. Biochemistry 18:1490, 1979.
- (2) Podack, E.R., W.P. Kolb, and H.J. Müller-Eberhard. J.Immunol. 116: 263, 1976.
- (3) Yamamoto, K., and H. Gewurz. J.Immunol. 120:2008, 1978.
- (4) Littman, D.R., S.E. Cullen, and B.D. Schwartz. Proc.Nat.Acad.Sci. 76:902, 1979.
- (5) Weber, K., and M. Osborn. J.B.C. 244:4406, 1969.
- (6) Podack, E.R., and H.J. Müller-Eberhard. J.Immunol.124:332, 1980.



## 6

## ZX formation 時における NeF の作用

阪大・オ一内科 中西 功, 上田 尚彦, 安東 明夫, 阿部 裕

滋医大・オ三内科 折田 義正

大阪医大・病態検査学教室 稲井 真弥, 赤垣 洋二,

大阪府立成人病センター 永木 和義

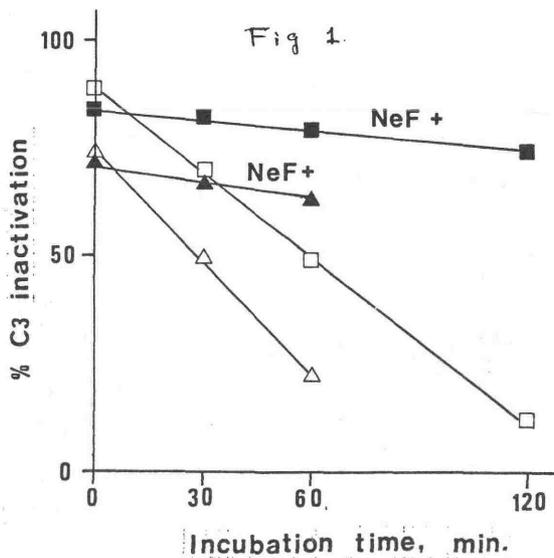
昨年、補体シニボジウムにおいて我々は、fluid phase では NeF により安定な C3 convertase が形成されるが C5 convertase は形成されにくいことより患者血清中の C3 のみの著しい低下の一因はこの NeF の fluid phase における作用ではないかと報告した。今回は NeF の fluid phase から solid phase への作用を見る目的で PLD 患者血清およびこれより精製した NeF を用い、NeF 存在下における ZX formation につき検討した。

#### <方法・材料>

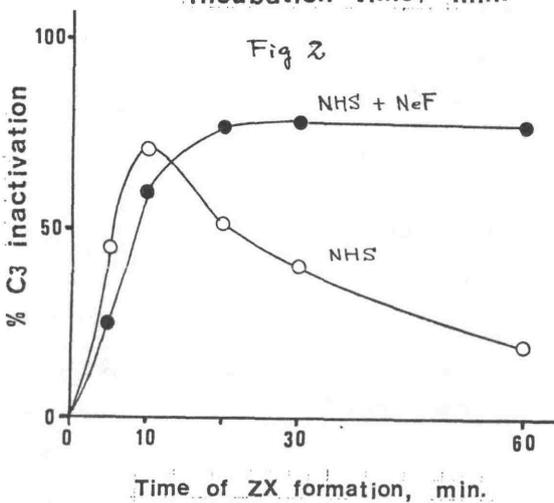
1) Zymosan: N.B.C. のものを  $100^{\circ}\text{C}$  90分 boiling l. saline で洗淨後  $0^{\circ}\text{C}$  に保存使用した。2) Serum: normal human serum (NHS') は健康人から。NeF 陽性 serum は PLD 患者より採血、分離し  $-70^{\circ}\text{C}$  に保存し使用した。3) NeF: PLD 患者より pool した serum より DAHA の方法に従い QAEA-50, SPC-25 を用いて精製した。4) Reagents: C4, C3, C5, factor B, factor D は成人病センターで分離精製したものを用いた。補体成分の溶血活性は intermediate cell を用いた tube 法にて測定した。5) ZX<sup>d</sup>: Zymosan 0.5mg に GVB で 10倍 (または 20倍) 希釈した NHS' を 1ml の割合で加え  $37^{\circ}\text{C}$  5分間 (または 10分間) incubate l. buffer で 3回洗い、さらに  $37^{\circ}\text{C}$  で 2時間 incubate したものを用いた。6) ZX formation: Zymosan 0.5mg に GVB で希釈した serum を 1ml の割合で加え  $37^{\circ}\text{C}$  で incubate l. cold の GVB が 2ml 入った tube に時間ごとに 0.2ml ずつくみ出し、ただちに遠心後、上清は補体成分測定用に保存、ppt はさらに cold の GGVB で 2回洗い、ZX を作成した。この ZX に精製した補体成分 (C3, C5 または C4) を加え  $30^{\circ}\text{C}$  20分反応し、各々の成分の不活化の % を clearing enzyme の activity として表わした。

#### <結果・考察>

1) Zymosan 上の C3BB に対する NeF の作用: ZX<sup>d</sup> に B, D を加え  $30^{\circ}\text{C}$  10分反応後、洗い、ZX を回復させた。これに NeF を加え  $37^{\circ}\text{C}$  で incubation。一定時間ごとにくみ出し、buffer で洗い、C3 と  $30^{\circ}\text{C}$  20分反応後、その不活化の



%を Fig 1 にプロットした。control としては NeF のかわりに buffer を加えたものを用いた。NHS を 10 倍希釈して作った ZX<sup>d</sup> (■—■), 20 倍希釈して作った ZX<sup>d</sup> (▲—▲) どちらの場合においても NeF を加えることにより C3 cleaving enzyme の activity の低下が見られず。NeF は Zymosan 上の C3bBb を安定化するものと思われた。



2) NHS に NeF を加えた場合の ZX formation (Fig 2): Buffer で 20 倍希釈した NHS に Zymosan を加えて 37°C で incubate した場合の ZX の T<sub>max</sub> は 10 分で、時直とともに C3 cleaving enzyme の activity の低下が見られる。一方 NeF を NHS に加えた場合の T<sub>max</sub> は 20 分とせせ遅れるが、activity の低下は 60 分後においてもほとんど見られぬ。これは Zymosan 上に形成された C3bBb に NeF が bind しこれを安定化することによるものと思われた。なお上清の C3 の低下は両

者ともほぼ同様パターンであるが C5 の低下は NeF を加えた系で遅れる。これは NeF により fluid phase での C3 の consumption がおこるため Zymosan 上の C5 cleaving enzyme の形成が遅れることによるものと思われた。

3) PLD serum による ZX formation: PLD serum (complement profile を Table 1 に示す) を buffer で 10 倍希釈し、これに Zymosan を加え 37°C で incubate した時の上清の補体成分の変化 (Fig 3) と ZX formation (Fig 4) を調べた。

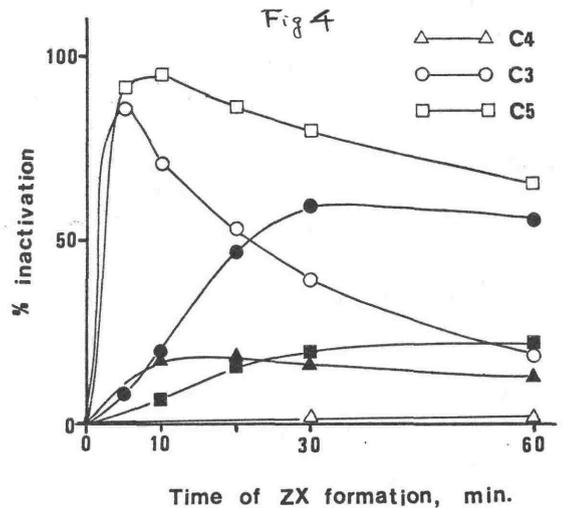
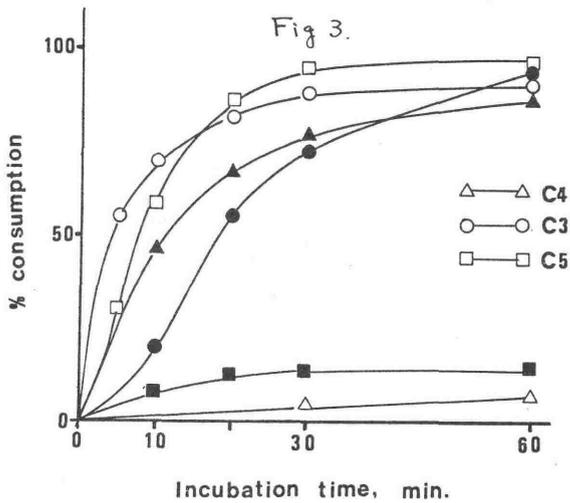
Table 1 Complement profile\*

Hemolytic activities		Protein concentrations	
CH50	21.1	P	113.1
C1	83.3	B	80.8
C4	87.0	C1-INA	105.8
C2	102.7	β <sub>1</sub> H	87.9
C3	3.6	C3b-INA	110.6
C5	131.3		
D	115.0	NeF**	93.6

\* Expressed as % of the level of NHS

\*\* Expressed as % C3 consumption

ControlとしてNHS'をbufferで10倍希釈したものにZymosanを加えたものを用いた。Fig3で示す様にNHS'では10~20分で著しいC3、C5のconsumptionを示す(○—○)。一方PLD serumではC3のconsumptionは徐々に起こり(●—●)またC5の低下はごく軽度である(■—■)。なおNHS'では見られなかったC4のconsumptionがPLD serumでは認められた(▲—▲)。Fig4にPLD serumによって形成されるZXを示すが、NHS'の場合に比べてC3のcleaving enzymeの形成は遅くまたそのactivityも低い。特にC5に著明である。しかしながらFig2と同様、時間が経過してもactivityの低下は認められなかった。またNHS'の場合には見られなかったC4 cleaving enzymeの形成が認められた。これらのことはTable1で示す様にPLD serumではC3の活性が著しく低値であるためZymosan上にC3 cleaving enzyme、特にC5 cleaving enzymeが形成されにくい。しかし一度形成されたenzymeはNeFにより安定化されdecayを受けにくいことによるものと思われる。またPLD serumではZymosan上にC3b、Bb、NeFが形成され、classical pathwayが活性化されることによりNHS'では見られなかった上清でのC4の著しい低下をきたしたものと思われる。



以上現在までの実験成績について報告した。しかしfluid phaseで形成されたC3bBbNeF complexがZymosan上に結合しZXが形成される可能性などについての検討は不十分であり、pure補体成分のみを用いた反応系で現在実験中である。

## 7 “ハプトエン化-リボソームによる 非特異的補体活性化の解析”

岡田則子<sup>1)</sup>、保田立二<sup>2)</sup>、大谷とし子<sup>3)</sup>、英清道<sup>1)</sup>、積田亨<sup>2)</sup>、岡田香親<sup>4)</sup>  
北里研究所<sup>1)</sup>、東大医科研<sup>2)</sup>、成人病試験研<sup>3)</sup>、国立がんセンター研<sup>4)</sup>

我々は、細胞膜が補体を抗体の介在なしに非特異的に活性化すること (nonspecific activation of complement: NAC) を見出し、その補体活性化に参与する細胞膜上の因子について解析し、報告してきた。その結果、非特異的な補体活性化を誘起する膜上の因子は、ある特定の变化による場合、例えば、膜上シアル酸の変性、と、さらに不特定の因子、多糖類や糖脂質の関与などが、我々や、Fearon, Müller-Eberhard らのデータにより、示されてきた。しかし、このように、生体膜を用いる、実験する限りにおいては、膜の処理により、複数の膜変化が生じるために、補体活性化のメカニズムを解析するのに、困難な問題を生じることが多い。特に alternative pathway の活性化においては、膜表面に共有結合で吸着した C3b 分子の三次構造が重要なポイントと捉えられている。つまり、細胞膜表面の物性が、如何にして C3b 分子の三次構造を変換するかを知ることで ACP の活性化物質認識機構を明らかにする、ことができるとなる。膜に、共有結合した C3b 分子と、膜の物性との関連を解析するためには、膜の物性を単純化し、それを、人工的に変換させる、人工脂質二重膜である、リボソームを用いることが、有用な手段であると考えた。リボソームに、種々の物質 (ハプトエン物質、荷電物質、糖脂質、糖蛋白質など) を組み込むことにより、膜の物性を変化させ、ACP の活性化機構が認識する物性の特徴を明らかにしたいと考えた。

今回は、ハプトエン化-リボソームの非特異的補体活性化能を、リボソーム lysis の系で、モルモット血清補体を用いて検討した結果について報告する。

### 【方法】

Liposome は, Dimyristyl phosphatidylcholine (DMPC): Cholesterol (Chol) = 1.0:1.0 の脂質混合液を基本とし、TNP-cap-dipalmityl-phosphatidyl-ethanolamine (DPPE) などの抗原物質等を適量加え、薄膜を形成し、0.2M Carboxyfluorescein (CF) をマーカーとして懸濁封入した。GVB<sup>-</sup>にて、Liposome を 15,000 rpm、20 分にて洗浄し、余分のマーカーを除き、GVB<sup>-</sup>にて、リン濃度 0.05 mM に調整して用いた。Liposome の補体活性化が、非特異的であることを調べるために、CF マーカー液の代わりに、GVB<sup>-</sup>

にて懸濁した Liposome (CF $\ominus$ ) を作成し、これを前もって血清と反応させることにより検討した。

補体活性化能の測定は、Liposome 25 $\mu$ l に、GVB<sup>+</sup>、2mM-H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>+</sup>、EGTA-GVB、または EDTA-GVB にそれぞれ希釈した新鮮血清、または非動化血清を 50 $\mu$ l 加え、25 $^{\circ}$ C (室温) または 30 $^{\circ}$ C に 2 時間、攪拌レタから反応させた。10mM EDTA-GVB 2.0ml 加えて反応停止後、①、補体活性消費量を、残存 C3 の溶血活性を測定する。および ②、活性化補体による Liposome 膜障害により遊離される CF マーカー量を、励起 490nm、蛍光 520nm で蛍光強度を測定することにより、検討した。

### 【結果】

①、DMPC/Chol の各分子比の Liposome は ACP を活性化しない。しかし、CCP の活性化による Liposome lysis が、Chol の分子比が 1.0 以上においては、弱いながらも、血清 4 倍希釈まで検出された。

②、この Liposome に、TNP、DNP、ABA、FITC などのハロゲン基を、スパーサーをつけて組み込むと、モルモット血清 (GPS) および C4 欠損モルモット血清 (CAD-GPS) を共に、ACP に活性化するように行った。しかし、DABA、DNS および Forssman 抗原の組み込みにおいては、ACP の活性化は検出されなかった。

③、TNP-Liposome は、TNP 量が、PC に対する分子比で 0.01 (エロト-70 濃度が 1%) を超えると、ACP 活性化能が検出され、エロト-70 濃度が、5 ~ 40% までほぼ 70 $^{\circ}$  以下に反応した。

④、この TNP-Liposome への、Stearyl amine (SA) Dicapylphosphate (DCP) や、Phosphatidic acid (PA) などの Charged substances の添加や、Chol の分子比の変化 (膜流動性の変化) などは、その ACP 活性化に認めべき変化は、ほぼなかった。しかし、PC 各分子種においては、DMPC  $\geq$  DPPC > DSPC > SM > Egg PC > DLPC  $\geq$  DOPC の順に、Liposome lysis の検出効率が高かった。

⑤、ハロゲン基である TNP を DPPE に結合する際に、同じ、種々の炭素鎖のスパーサーを挿入し、膜表面から TNP までの距離を炭素数が 0、3、4、5、6、8、12 位と変化させた。ACP 活性化は、C5 (GABA) で、検出されるようになり、C6 (cap) が最も強く、C8 で検出されたが、C12 と鎖長が伸びると、ACP 活性化能は、認められなくなった。(Table 1)

⑥、TNP-Liposome での、ACP 活性化は、ハトレイ、CAD、Str-2 モルモットおよび 予研の近交系、JY1、JY2、JY3、JY4、の各モルモットで検出されるが、Str-3 モルモットでは、全く検出されなかった。

[考察]

DMPC/CholのLiposomeは、Cholの量に依存して、弱いながら、CCPを活性化する。Alvingら(1977)はヒト血清において、DPPC/Chol-Liposomeが、Chol依存性に、CCP活性化を起すことを報告しており、この活性化には吸収操作にて取り除かれる因子が関与しているとしている。

我々の系においては、ヒト血清では、CCP活性化は検出されない。又、モルモット血清での、CCP活性化は、吸収操作により取り除くことは出来ない、という点で異なっている。TNP化SRBCは、ヒト補体のCCPを活性化すると報告されており、我々の用いた、TNP-Liposomeも、同様に、ヒト補体のCCPを活性化した。しかし、モルモット補体においては、CCP活性化も認められるが、強いACP活性化が起こる。種々のハフテニ基の挿入によって、ACP活性化が認められるが、その膜流動性の変化や膜荷電の変化は、ハフテニ化リポソームのACP活性化能にほとんど影響を及ぼさないが、ハフテニ基のエピト- $P$ 濃度が、重要な要素であり、5%以上になると最大のACP活性化能を示す。Cunninghamら(1979)は、Liposomeの組成バランスに由来する膜流動性や電荷、糖脂質等が、ACP活性化機序に主体的役割を果たしていることを推察している。我々が、今回ハフテニ化リポソームを用いて得た知見では、膜上のごく局部的な構造が重要であった。TNPとDPPEの間に6炭素鎖スパーサーを入れると最も強いACP活性化が認められたことから、C3b分子が膜の脂質二重層に共有結合したとき、6炭素分子鎖上のTNPに相当する高さの所に、C3b分子活性化認識receptor siteがあると推察された。Danceyら(1979)が報告しているように、TNP-Liposomeの免疫原性はC6スパーサーを挿入した時に強くなるので、補体活性化と、免疫原性の間の関連性が示唆される。多くの免疫強化物質が、ACP活性化能を有していることで、免疫応答の反応を修飾しているものと考えられている。

(Table 1)

Effect of the length of spacer of TNP-hapten on the liposome lysis by guinea pig complement

Spacer between TNP and DPPE	Liposome lysis	
	LC50*	LAmax**
C-0	10.4	0
C-3	16.0	0
C-4	15.2	5.2
C-5	24.0	27.7
C-6	30.4	50.0
C-8	25.6	13.3
C-12	11.2	0
Without TNP-DPPE	5.6	0

\* Reciprocal dilution of serum which gave 50% liposome lysis in GVB<sup>++</sup>.

\*\* Maximum % lysis of liposome by serum in Mg<sup>++</sup>-EGTA-GVB. Maximum lysis was usually observed around 1:4 dilution of guinea pig serum.

岡山大学才三内科 天野哲基・宮島啓人・大藤 眞

### (目的)

我々はヒト血清中の alternative pathway の活性を測定する為、ウサギ赤血球 (RaRBC) の溶血を利用する方法 (ACH50) を考案し、才三回生シンポジウムで発表した。ACH50 は alternative pathway の因子と共に C3, C5 とよく相関する為、ACH50 は C3~C9 もよく反映するものと理解し、C3~C9 溶血活性 (C3T) の検定に利用していた。ところが、この間に ACH50 はほぼ正常の為、early component の部分欠損症であろうと見違っていた C9 欠損症をも家系も経験した。(今年、日本臨床免疫学会発表) この事は、ACH50 への C9 の関与は非常に少ない事を示唆する訳でありその解釈としては

(1) 補体系による溶血の際、血球と血清の比率により、C8 迄の溶血 (C8-mediated hemolysis) と C9 迄の溶血 (C8/C9-mediated hemolysis) に差が大きい。

(2) 一般に alternative pathway による溶血では C8-mediated hemolysis と C8/C9-mediated hemolysis に差が小さい。

(3) RaRBC における溶血では C8-mediated hemolysis と C8/C9-mediated hemolysis との間に差が大きい。

という3つの可能性を考えらる。これらを追究して ACH50 に及ぼす C9 の関与につき考察する。

### (対象及び方法)

対象とした C9 欠損症は表1の如くで、特異な臨床症状や易感染性は認められない。遺伝形式は常染色体性共優性である。C9 欠損症血清 (C9DS) の CH50 は正常人の  $\frac{1}{2}$ ~ $\frac{1}{3}$  であるが精製 C9 (Cordis 社) の添加により、正常値に回復する。

alternative pathway による溶血の観察は 0.03M-EGTA-Mg<sup>++</sup>-GVB で希釈した血清と各種動物赤血球を 37℃, 40分攪拌反応させた後の上清の Hb 量の測定により行った。

### (結果)

1) 溶血に及ぼす血球と血清との比率

EA ( $1 \times 10^9/ml$ ,  $2.5 \times 10^8/ml$ ) 0.2ml の正常血清, C9DS 0.2ml による溶血

(classical pathway) を見ると、正常血清も C9DS も EA 濃度に殆んど関係なく溶血する事が認められた。

2) alternative pathway により溶血する血球

alternative pathway により溶血する血球は図1の如くで、溶血率は

①ウサギ、②モルモット、③マウス、④ラット、⑤ニワトリの順であった。

3) 各種血球の C8-mediated hemolysis と C8/C9-mediated hemolysis の比較(図2,3)

上記の血球の正常血清と C9DS による溶血を比較するとウサギ、マウス、ラットでは両者による差は殆んど認められぬが、モルモット、ニワトリでは正常血清に比して C9DS の溶血率は明らかな低値を示した。更にモルモット赤血球を用いて alternative pathway 活性 (GP-ACH50) を測定してみると C9DS の ACH50 は 107% に比して、GP-ACH50 は 36.2% (%NHS) と明らかな低値を示した。

4) RaRBC の classical pathway による C8-mediated hemolysis と C8/C9-mediated hemolysis の比較

RaRBC にヒトの凝集素を感作して、GVB 中で正常血清と C9DS による溶血を比較すると、両者に大差は認められぬが、

(考察)

C9DS の ACH50 がほぼ正常である事の原因として、測定条件や alternative pathway による溶血の特殊性を想定したから、血球・血清比は C8-mediated hemolysis や C8/C9-mediated hemolysis に殆んど影響を与えない事や、alternative pathway により溶血する血球の内でもモルモット赤血球の様に C9 の影響が明らかなものも存在する事より上記の可能性は消滅し、RaRBC は classical pathway による溶血でも C9 の余り関与しないという事から、C8-mediated hemolysis と C8/C9-mediated hemolysis に差が出るのは RaRBC の膜の特殊性によるものがある事が判明した。この事は ACH50 は C3~C9 溶血活性の検定には不適である事を示す訳であるから、C9 欠損症の場合は特殊で、alternative pathway の測定はモルモット赤血球よりは取り扱い、溶血効率、経済性より RaRBC の方が有用である。

我々の経験した C9 欠損症には易感染性は認められぬが、これは感染防御における C3 の重要性からすれば当然であろう。しかし、もし、病原体にウサギ赤血球型とモルモット赤血球型が存在するならば、C9 欠損症においては後者に罹患する可能性は高い筈である。

表1. C9欠損症の補体系

		CH50 (30-40 u/ml)	C9 (%NHS)		ACH50 (%NHS)	CRP
			Activity	Protein		
六〇	RA	12.5	0	0	90	(3+)
高〇	リウマチ	10	0	0	107	(1+)
夫	} 健康	51	65	47	113	(-)
長女		15	0	0	93	(-)
二女		36	40	53	92	(-)
原〇	紅斑	20.5	0	0	87	(±)
父	} 健康	52	40	99	120	(1+)
母		58	54	124	113	(1+)

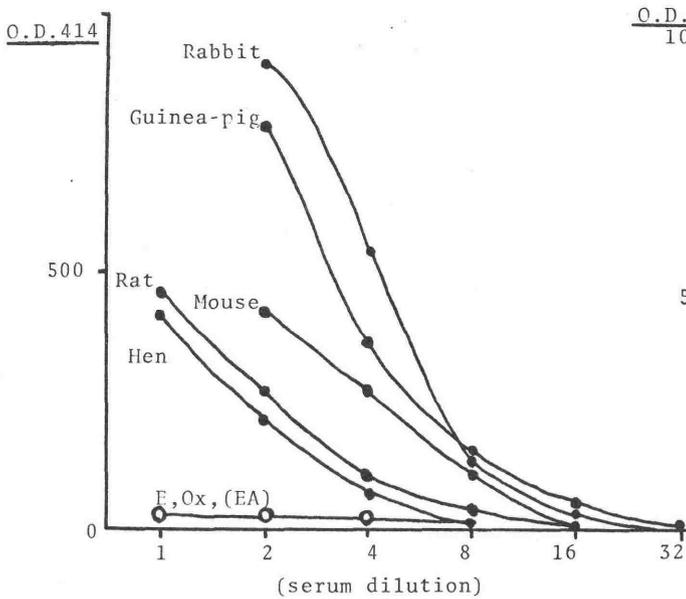


図1. 各種血球の alternative pathway による溶血

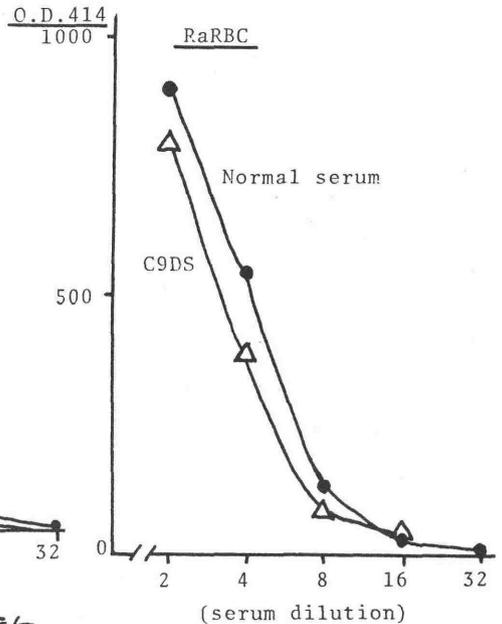


図2. RaRBCの溶血

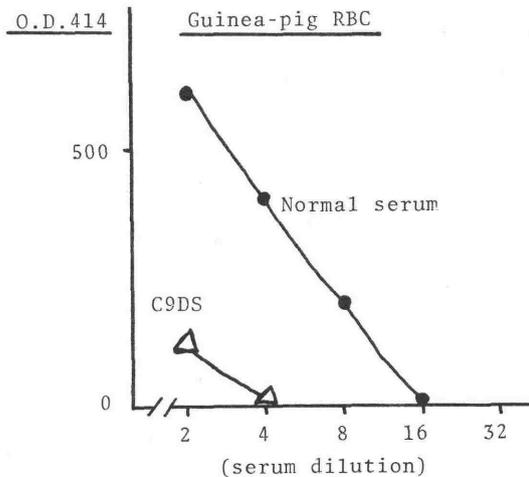


図3. モルモット赤血球の溶血

## 9 Neuraminidase 処理細胞による alternative complement pathway の活性化

岡田秀親<sup>1</sup>, 横田雅弘<sup>1</sup>, 田中博子<sup>1</sup>, 大谷とし子<sup>2</sup>, 岡田則子<sup>3</sup> (国立がんセンター研究所<sup>1</sup>, 成人病試験研究所<sup>2</sup>, 北里研究所<sup>3</sup>)

ヒツジ赤血球 (SHE) を neuraminidase (NAse) で処理したり. 過ヨウ素酸で処理し. sialic acid を除いたり. 破壊したりすると. ヒトの ACP (alternative complement pathway) を活性化するようになる (Fearon, Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 1971, 1978; Pangburn & Müller-Eberhard, Ibid. 75, 2416, 1978). 一方ヒト赤血球 (HuE) は NAse 処理をしてもヒト ACP を活性化せず. これは HuE の細胞膜に  $\beta$ H 様の抑制因子が存在している為であると報告されている (Fearon, Ibid. 76, 559, 1979).

我々は HeLa cell を NAse 処理するとモルモットの ACP を活性化するようになることを知ったが. ヒトの ACP は活性化しなかった (岡田, 雨宮, 岡田, 日本免疫学会総会記録, 8, 446, 1978). HuE と同様の  $\beta$ H 様の抑制因子が HeLa cell の細胞膜に存在していた為に. ヒト ACP を活性化できなかったのだとすると. その  $\beta$ H 様抑制因子は. モルモット C3b とは反応しないと考えられる. Sendai ウイルス感染 HeLa cell は. モルモットの ACP を活性化するか. ヒトの ACP は活性化しないという知見とも関係があると考えられるか. Influenza ウイルス感染 HeLa cell は. モルモットとヒトの両方の ACP を活性化するという知見も得ており. ACP 活性化における種特異性には複雑な問題が介在しているのかも知れない. そこで NAse 処理による ACP 活性化能の発現と. 補体の種差との関係について検討を行っている。

HeLa cell を NAse の種々の量で処理し. 残存 sialic acid 量を測定した. このときの ACP 活性化能すなわち非特異的補体活性化能 (NAC ability) を. 細胞膜上に沈着した C3b 等を FITC-anti C3 で検出する方法で検討した. Mg<sup>2+</sup>-EGTA-RVB 中でモルモット血清と反応させると. 13.5% の sialic acid が除去された HeLa cell はすでに ACP を活性化し C3b を細胞膜上に沈着する. これに対し. 74.2% の sialic acid を NAse 処理で失った HeLa cell でも. ヒトの ACP に対しては NAC ability を示さなかった (表 1). Fearon の報告した  $\beta$ H 様因子が. HeLa cell の膜上に存在していたと考えられるか. そう一つの可能性として. NAse 処理で. HeLa cell の viability が著明に低下したので. 細胞内からの放出物質の中に. 補体との反応をさ

またける因子が含まれていた事も考えられる。いずれにしても NAsE 処理細胞が現れる NAC ability は、それが反応する補体の種差が関与することが明らかとなったので、種々の赤血球と補体の種差との相関を係について検討を行った。ShE, HuE の他に、ウサギ赤血球 (RabE), モルモット赤血球 (MmE), ラット赤血球 (RatE) 及び DDD マウス赤血球 (MoE) を 1 $\mu$ ml の NAsE で処理した。これらの NAsE 処理赤血球及び無処理の赤血球を Mg-EGTA-GVB 中で 1:6 に稀释したモルモット血清, ヒト血清及びラット血清と反応させ、そのときの溶血の有無を検討した。結果をまとめたものが (表 2) である。RabE は NAsE 処理を 1 回くても、モルモット, ヒト, 及びラットの ACP で溶血を起すのに対し、ShE は NAsE 処理してもモルモットの ACP では溶血しない。これとは逆に、HuE は NAsE で処理しても、ヒト補体とは反応しないことは Fearon の報告通りであるが、モルモットの ACP では溶血した。これは HeLa cell に NAsE 処理した場合と同一の現象であった。なお、NAsE 処理 HuE のモルモット ACP による溶血性には HuE

(表 1) Induction of NAC ability by sialidase treatment of HeLa cells

dose of sialidase* ( $\mu$ g/ml)	sialic acid content/5x10 <sup>6</sup> cells**		NAC ability (FITC-anti C3)	
	(O.D.555)	% reduction	GPS	HuS
-	0.333		0	0
1.0	0.301	9.6	1	0
10	0.288	13.5	9	0
100	0.206	38.1	22	0
1,000	0.086	74.2	43	0

\* HeLa cells were incubated with N-acetyl-neuraminidase (from V. cholera, Sigma) for 30 min at 37°C in PBS<sup>-</sup> (pH 7.4).

\*\* Sialic acid was measured by modified thiobarbiturate assay by Warren.

(表 2) 赤血球の種類と補体の種類との相関係における溶血性

赤血球の種類	ウサギ		ヒツジ		ヒト		モルモット		ラット		マウス	
	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
NAsE 処理の有無	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
モルモット血清	+++	+++	-	-	++	+++	-	+++	-	±	±	+
ヒト血清	+++	+++	-	++	-	-	+++	+++	-	±	+++	+++
ラット血清	+++	+++	-	-	++	+++	+++	+++	-	±	++	++

の血液型は関連性を示さなかった。

$5 \times 10^7$ /ml HuE に等量のモルモット血清稀釈液と反応させ (Mg-EGTA-GVB 中) と、無処理の HuE で  $1/6$  モルモット血清の場合には 49.2% の溶血が認められた。これに対し NASE 処理 (0.9  $\mu$ /ml) HuE を用いると  $1/2$  モルモット血清で 54.4% の溶血が認められ、NASE 処理することによりモルモット ACP 活性化効率が 2 倍強くなっていったことになる。深山等は、ヒト赤血球の ATP レベルを低下させると溶血感度が高くなることを報告しているので、NaF (20 mM) で 4 時間処理して溶血反応性の亢進を検討したところ若干の亢進が認められた。しかし、50% 溶血価が 20 倍稀釈以上で認められることはなく、モルモット ACP 測定法として、感度が特に高いわけではなく、モルモット ACP 測定法としては、別に報告する CoVF- 感作赤血球の溶血法に道をやすらなわけにはならない。しかし、NASE 処理 SHE と NASE 処理 HuE に対するヒトとモルモットの ACP との関係の解析は、補体の反応制御機構の解明への手がかりとなり、今後の研究を進めている。

# 10 Immune cytotoxicity に対する腫瘍細胞の感受性を高める物質の探索

岡田則子<sup>1</sup>, ○大谷とし子<sup>1,2</sup>, 英清道<sup>1</sup>, 岡田秀親<sup>3</sup> (<sup>1</sup>北里研究所;  
<sup>2</sup>成人病試験研究所; <sup>3</sup>国立がんセンター研究所)

上咽頭癌や Burkitt リンパ腫等の培養腫瘍細胞は、補体の Alternative pathway (ACP; alternative complement pathway) を活性化する作用を持ってゐる (Okada & Baba, Nature, 248, 521, 1974)。しかし、これらの細胞は、補体と反応しても、細胞障害をおこすまでには至りにくい。<sup>86</sup>Rb をラベルした Raji cell は C9 までの反応が細胞膜上で起る kinetics と一致して <sup>86</sup>Rb の放出が認められるが、<sup>51</sup>Cr で標識した場合には <sup>51</sup>Cr の放出は、C9 が反応してから数時間以上経過しないと起らない (Schreiber, et. al. Clin. Imm. Immunopath., 15, 384, 1980)。Raji cell の上に補体が反応して (C5a67893)<sub>2</sub> complex が形成され、<sup>86</sup>Rb のような小分子のものが細胞膜を透過するような変化は起っても、蛋白分子等に結合した <sup>51</sup>Cr のごとき分子量の大きなものが通過できるような細胞膜破壊は起らず。又、trypan blue 染色で認められるような細胞の代謝障害も引きおこされ難いことを示している。このとき、Raji cell に puromycin を作用させておくと <sup>86</sup>Rb の放出と一致して <sup>51</sup>Cr も放出され、細胞膜障害が認められることから、彼等は、membrane damage に対する修復機序に、蛋白合成のステップが必需であるかと推察している。一方 Schlager 等 (J. Immunol. 119, 789, 1977; 120, 472, 1978) は、モルモット Line 10 腫瘍の系において、脂肪酸の取り込みを抑制すると、それと一致して immune cytotoxicity がおこるようになることから、membrane damage の修復に脂肪代謝が重要な役割を果しており、蛋白合成、DNA 合成、RNA 合成、糖代謝等は、直接的関係にないことを示す知見を報告している。このように、その機序についての解釈が必ずしも一致してゐない。いずれにしても、immune cytotoxicity に対する腫瘍細胞の感受性を高める薬物は、腫瘍に対する免疫療法を補助すると期待されるだけでなく、immune cytotoxicity に対する腫瘍細胞の抵抗機序解析の手がかりともなる。従つて、このような作用をもつた物質の探索を試みており、和漢薬の抽出物等に、その作用をもつたものを見つけたので報告する。

## [方法]

培養用 96 穴マイクロプレート各穴に検体稀釈液 (10% FCS 加 RRMI 640

に 100 u/ml penicillin 及び 100 µg/ml streptomycin を加えたもの（以下 FCS-RPMI1640 と略す）にて稀釈）を 0.05 ml ずつ滴加し、これに  $1 \times 10^6$ /ml Raji cell (in FCS-RPMI1640) を 0.2 ml ずつ滴加する。炭酸ガス培養器中で 37°C 17 時間培養後、1500 rpm 7 分間遠心し、上清を取り除き、GVBT<sup>+</sup> 0.05 ml に細胞を浮遊させる。これに GVBT<sup>+</sup> にて 80 倍稀釈したウサギ抗 Raji cell 血清を滴加し、更に 5 倍稀釈したヒト A B 型血清を補体として 0.025 ml ずつ加えた。37°C 1 時間反応させたあと、0.2% trypan blue 液を 0.05 ml 加えて、細胞の生存率を顕微鏡にて観察した。この条件下では、薬剤 (C) の対照が、約 40% の細胞障害反応を示した。薬剤等の作用時間等を検討した場合には、17 時間の培養のかわりに、1 時間、3 時間等の培養時間でも実験を行った。

[結果]

和漢薬の生薬を粉砕し、その 2g を 20 ml の 0.05 M phosphate buffer 中に入れ、氷室にて 1~3 日間攪拌抽出したものを濾紙にて濾過し、凍結保存しておいた標品について、Raji cell の immune cytotoxicity に対する感受性増強作用の有無をスクリーニングした。その結果、川芎の抽出液にその活性があることを知った。そこで 100g の川芎 (Cnidii Rhizoma) 粉末を 1 l のり

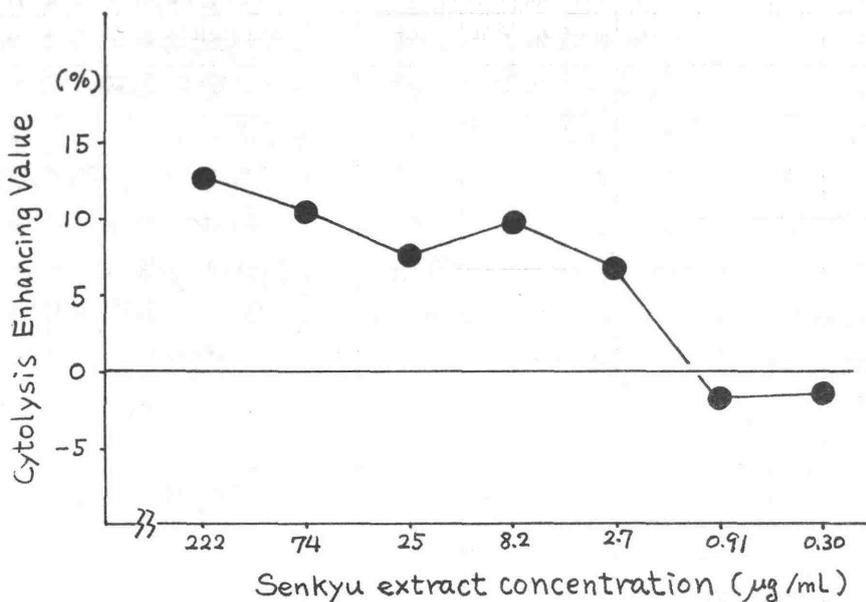


Fig 1. Effect of Cnidii Rhizoma (Senkyu) Extract on Immune Cytotoxicity of Raji Cells

ン酸緩衝液 (pH 7.0) 中で  $4^{\circ}\text{C}$  に於て 12 時間攪拌し抽出を行って、多量の粗抽出液を取り、分画精製の検討を始めた。粗抽出液を 8000 rpm 10 分間遠心し不溶物を除いたあと、1 l の粗抽出液に対し 500 g の  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  を加え、生じた沈澱を 8000 rpm 10 分間の遠心で集めた。この塩析沈澱を蒸馏水に溶解し、水に対して充分透析して硫酸を除去してから残存不溶物を遠心で除き、抽出溶液を凍乾乾燥して、川芎 Extract とした。この川芎 Extract は  $2.7\mu\text{g}/\text{ml}$  以上の濃度で Raji cell の immune cytotoxicity を enhance した (Fig 1.)。このものの自身の Raji cell に対する直接細胞障害作用は  $222\mu\text{g}/\text{ml}$  でも全く認められず、Fig 1. に示されるように immune cytotoxicity の enhance 作用が認められた。Mitomycin C は  $1\mu\text{g}/\text{ml} \sim 5\mu\text{g}/\text{ml}$  で immune cytotoxicity enhancement が認められるが  $8\mu\text{g}/\text{ml}$  以上になると直接細胞毒性が現われ、enhancement としての活性が認められない。これに比して川芎 Extract の immune cytotoxicity enhancing 活性は、きわめて広い濃度域で認められるので、in vivo でもその効果を發揮させやすいと考えられる。担癌動物に投与したときの宿主介在性抗腫瘍反応を有効に助長するかどうかについては目下検討中である。川芎 Extract を出発材料として、その中の有効成分の精製固定については今後の研究課題として計画中である。

# 新しい簡便な circulating immune complex (CIC) の測定法について

——ポリエチレングリコール沈殿物補体

消費試験 (PEG-CC) の検討——

九大心療内科 手嶋秀毅 吾郷晋浩

同小児科 反岡裕治

同第一外科 鳥巢要道

<目的> 患者血清中の circulating immune complex (CIC) の測定することの臨床的意義は重大であり、最近とくに注目されている。しかしながら従来の CIC の測定法は手技上、一般臨床検査として使用するほど容易ではないので、より簡便な測定法の確立を試みて、実際に臨床例に応用したので報告する。原理は血中の CIC を polyethylen glycol (PEG) により沈降させ、沈降物の補体消費能によって CIC の定量を行う Harkiss の理論を応用し、原法に必要な特殊な器具の使用を排し、補体溶血活性と同程度の手技になるよう、より簡約化した。

<方法> polyethylen glycol 沈降物による補体消費試験 (PEG-CC) の手技を表に示した。1検体3重法にて行う。先端の細くはった血液用分離管 10 ml を使用し、PEG の conc. は 6,000 のものを使用した。表の (1) では、PEG、EDTA の最終濃度はそれぞれ、2.5% と 0.02 M になっている。4°C で 90 分静置すると、検体は自濁して、CIC が析出して来る。遠心にて沈殿させ、1度洗淨したのち、30  $\mu$ l の GVB<sup>+</sup> に溶解する。ここで沈殿物は 10 倍に濃縮されたことによる。以下補体源として正常人血清を正確に 10  $\mu$ l 加え、沈殿物と補体とを反応させたのち、残存する補体価を求めたために、EA (CH 50 に使用するものと同じ) を加えて溶血反応をみる。対象と比較して、

## PEG-CC 手技

- 1) 検体 (血清) 0.3ml  
0.2M EDTA 50  $\mu$ l  
Borate buffer 50  $\mu$ l  
12.5% PEG 0.1ml  
4°C 90min.
- 2) cfg 1700g 10min. 4°C ppt を  
2.5% PEG 1.0ml で洗う。上清を捨てる。  
(cfg 1700g 15min. 4°C)
- 3) GVB<sup>+</sup> (37°C) 30 $\mu$ l  
pooled NHS 10 $\mu$ l  
37°C 30min.
- 4)  $1.5 \times 10^8$  EA 1.0ml  
37°C 60min.
- 5) 6.5ml 生食水 (4°C)  
cfg
- 6) OD<sub>414</sub>  

$$\left(1 - \frac{\text{検体溶血}}{\text{コントロール溶血}}\right) \times 100 (\%)$$

標準曲線より  $\mu$ g/ml eq AHG に換算

補体消費率 (PEG-CC%) を求める。

検体は患者血清のほか、関節液、動物血清を対象とした。-80°Cに保存して使用し、再凍結はさけた。

heat aggregated human globulin (AHG) は ChonII 分画を 20mg/ml 63°C 10分間したものをを用いた。

感作ウサギに抗原である BSA (10mg) を静注し、経時的に耳採血して C1C の変動をみた。

<結果> PEG-CC法では AHG の 5 µg/ml の濃度以上が測定可能であった。(図1)

BSA 抗 BSA 抗体の immune complex の抗原抗体と PEG-CC 値の関係を見ると、最適比よりやや抗原過剰域で最高値を示した。

感作ウサギを用いた in vivo での抗原 (BSA) の投与実験では、抗原投与後 2、3 分で振戦、過呼吸、放尿などのショック症状を示した。PEG-CC 値は 60 分から上昇しはじめ、90 分後に最高値を示し、180 分後には消失した。

患者血清で主たる疾患別に C1C 値を図 2 に示した。50 人の正常人の平均値は 6.4% で、S.D. は ± 6.9 であるので、臨床的に 2 S.D. に近い 20% 以下を正常値とした。異常値群のうち 50% 以上を示すものを高値群として注目すると、SLE、RA、肝炎、糖尿病、急性腎炎、癌などに高値群に属するものが多くみられた。C1C 値は、同一症例についてみると、治療や臨床症状をよく反映して変動しているのがみられた。

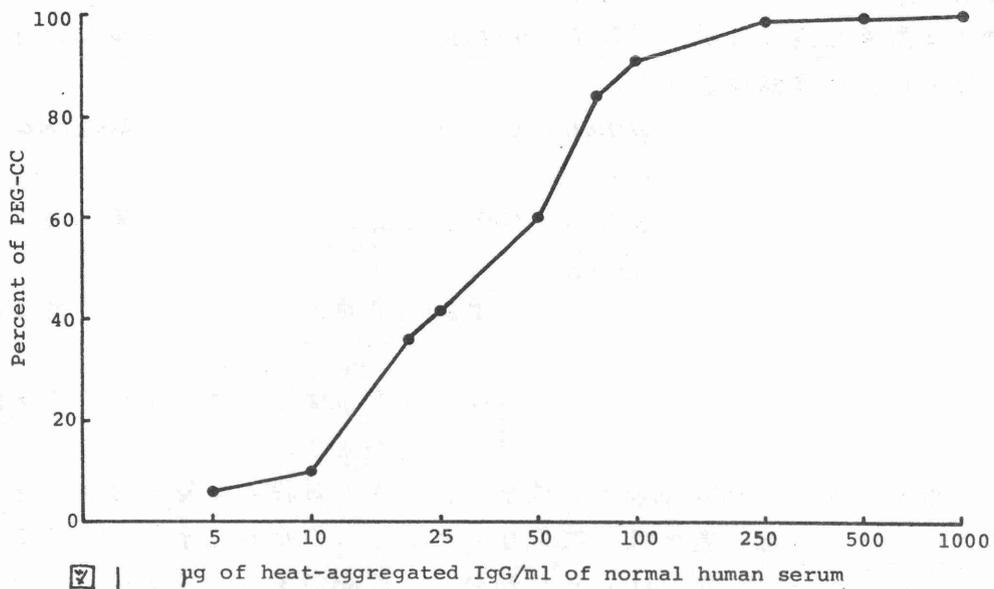
血清補体価との関係は、高 C1C 値群でも SLE では低補体価の傾向があるが、RA、糖尿病ではむしろ高補体価の症例もみられた。

<検討> PEG-CC法は手技が簡便であり、感度も臨床に應用できる程度に高く、AHG を用いたものでは、C1q や Raji cell を用いた radioimmunoassay とほぼ等濃度まで測定できる。

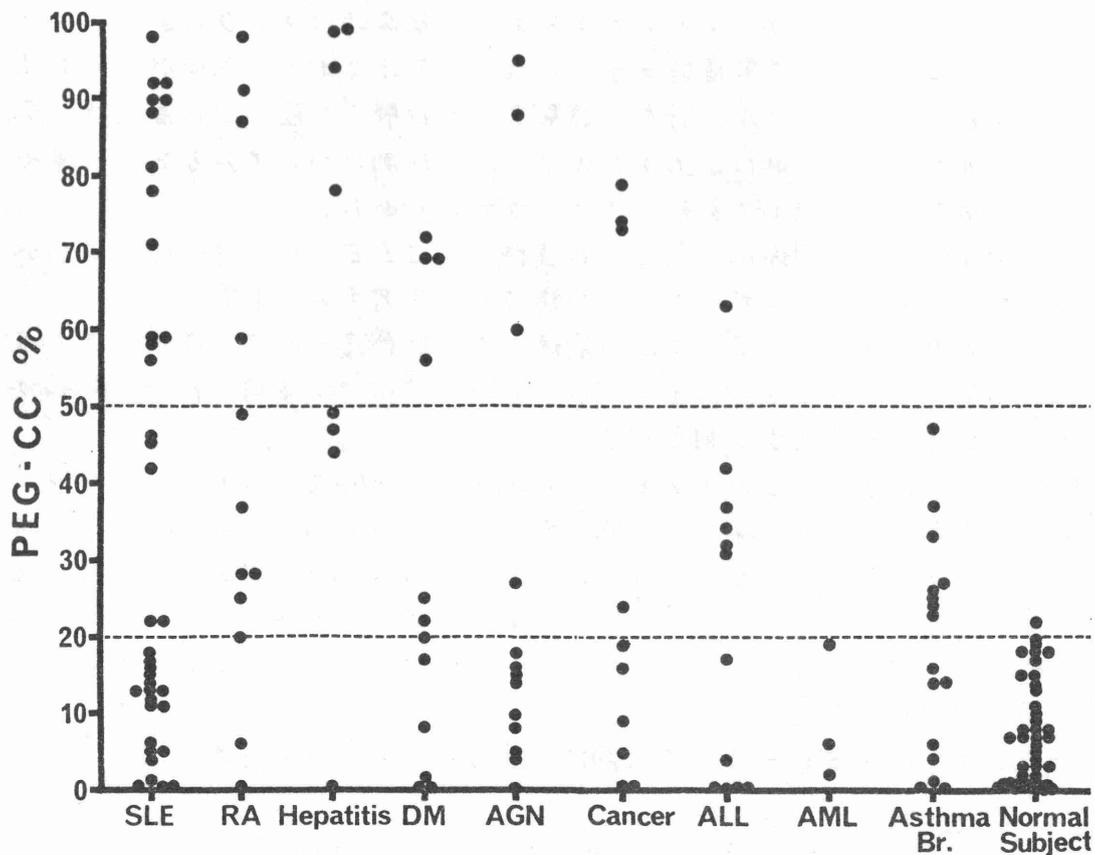
測定された値は、BSA を用いた immune complex を in vitro, in vivo でとらえており、測定値は C1C 値を示している。immune complex はやや抗原過剰域のものが高値を示した。抗原あるいは抗体の大過剰域では値は低くなるので、C1C の size に左右されると考えられる。

臨床に應用してみると、従来の方法によって測定されている疾患についても、同様の結果を得た。

以上より、PEG-CC法は簡便で感度のよい C1C の測定法といえる。



2 Circulating Immune Complexes detected by PEG-CC



ポリエチレングリコール補体消費試験 (PEG-CC) による

小児科領域各種疾患の免疫複合体の測定

九大小児科 友岡裕治 宮崎澄雄 合屋長英

九大心臓内科 牛嶋邦毅

九大牙-外科 島築要道

### 1. 目的

急性糸球体腎炎や慢性関節リウマチなどの疾患の中には、病変局所に免疫複合体の沈着が認められることがある。このことより、免疫複合体が、その疾患の病変の成立に重要な役割をもつと知られる。そのため、患者血清中の免疫複合体 (Circulating immune complexes; 以下 CIC と省略) を測定することにより、臨床診断への応用、病態生理の解明に有力な手がかりを得ることができると思われている。今回われわれは PEG-CC を用いて小児科領域各種疾患の CIC を測定し、有知な結果を得たので報告する。

とくに SLE の 1 症例について経過を追ったものについて報告する。また SLE と若年型糖尿病の患者血清を用いて、*in vitro* において抗原性の check を行った。

### 2. 方法と材料

CIC の測定は文献<sup>1)</sup> に基づき PEG-CC によって行った。*in vitro* での免疫複合体の作製と測定は SLE の患者血清に DNA (子ウシ胸腺由来) を 1ml あたり 45 $\mu$ g, 150 $\mu$ g, 375 $\mu$ g, 750 $\mu$ g, 1500 $\mu$ g おつ加え、37°C で 2 時間 incubate したのち PEG-CC にて測定した。同様に若年型糖尿病の患者血清中に regular insulin (ウシ由来, 40U/ml) を 0.03 ml, 0.1 ml, 0.5 ml おつ加え、37°C で 2 時間反応させたのち、PEG-CC にて測定した。

患者血清は九大小児科およびその関連病院小児科に入院中又は外来受診中の 2才から 17才までの約 70 名を対象にした。検体は採血後 4 時間以内に血清分離を行い、-80°C に保存した。測定は 2 週間以内に行い、一度解凍したものは再使用しなかった。疾患は SLE 3 名、潰瘍性大腸炎 1 名、川崎病 4 名、若年性関節リウマチ 6 名、若年型糖尿病 11 名、急性糸球体腎炎 11 名、アレルギー性紫斑病 6 名、ネフローゼ症候群 9 名、ALL 11 名、再生不良性貧血 2 名、悪性リンパ腫 5 名、AML 3 名であった。なお正常成人 20 名をコントロールとして測定した。

### 3. 結果

(1) 各種疾患における CIC の定量 (表 1)

正常成人は 0~20.8 PEG-CC% の値を示し平均値が 6.6 PEG-CC% であったが 2 SD に近い 20 PEG-CC% を便宜上正常上限として、それ以上を陽性とした。

SLEでは3例全例とも80PEG-CC%以上の高値を示した。潰瘍性大腸炎は1例のみだが、79.7PEG-CC%と高値を示した。川崎病は4例中3例が強陽性を示した。特にそのうちの1例は99.5PEG-CC%と高値を示した。この症例は典型的なMCLSであり、心電図異常もみられたが、アスピリン(50mg/kg)の治療開始後1週間で10.0PEG-CC%と正常に復し、ECG異常もみられなくなった。(この症例は冠動脈瘤の有無を調べるため心カテを行う予定である。)若年性関節リウマチでは6例中4例(66.7%)が陽性で値は高値を示した。若年型糖尿病では11例中7例(63.6%)が陽性を示した。急性糸球体腎炎では11例中2例(18.2%)のみが陽性であった。そのうち1例は95.1PEG-CC%と非常に高値を示した。この症例は発熱、梅毒、咽頭痛を伴い測定の前日に浮腫、蛋白尿を呈した。なおCH50、C3は各々17.5、45と低値を示す急性期の症例であった。その他の症例は回復期(1ヵ月前後)に測定したものである。アレルギー性紫斑病では6例中2例のみが弱陽性を示した。急性リンパ性白血病では11例中5例(45.5%)が陽性であった。その他の再生不良性貧血、悪性リンパ腫、急性骨髄性白血病では一部に陽性を示すもののみみられたが、高値を示すものは少なかった。

### (2) SLEの1症例におけるCICの推移(図1)

患者は15歳の女児で、SLEの診断でステロイド剤にてコントロールされていたが、蛋白尿、尿潜血が出現し、発熱、蝶形紅斑、手の二ばり感、膝関節痛をきたしたため当科紹介入院となった。これらの症状は入院後約2週間で寛解した。入院時低値を示した血清補体価CH50、C3、C4は徐々に回復した。入院1ヵ月目のLEテストと抗核抗体はともに3+と高値を示した。この時のCICは89.8PEG-CC%と高値であった。入院1ヵ月半再び関節症状が出現し、約2週間続きおさまった。LEテストは3+から-まで改善した。抗核抗体も2+になった。この時のCICは90PEG-CC%~56.7PEG-CC%と高値を示しながら徐々に改善し37.8PEG-CC%にまで減少した。しかし入院3ヵ月半に蛋白尿が出現し、その1週間後にCICは79.3PEG-CC%へと急激な悪化を示した。このように同一患者においてもその値の変動が著しいため経時的な検査が必要であるといえる。

### (3) in vitroでのCICの測定

上記SLE患者血清にDNAを加え、若年型糖尿病患者血清にはinsulinを加えてin vitroで反応させてPEG-CCを行った。この結果、抗原量によってCIC値が変動し抗原特異性を示すと思われる。

### <考察>

簡便なPEG-CCにて小児科疾患の血清を測定し、陽性例が自己免疫疾患

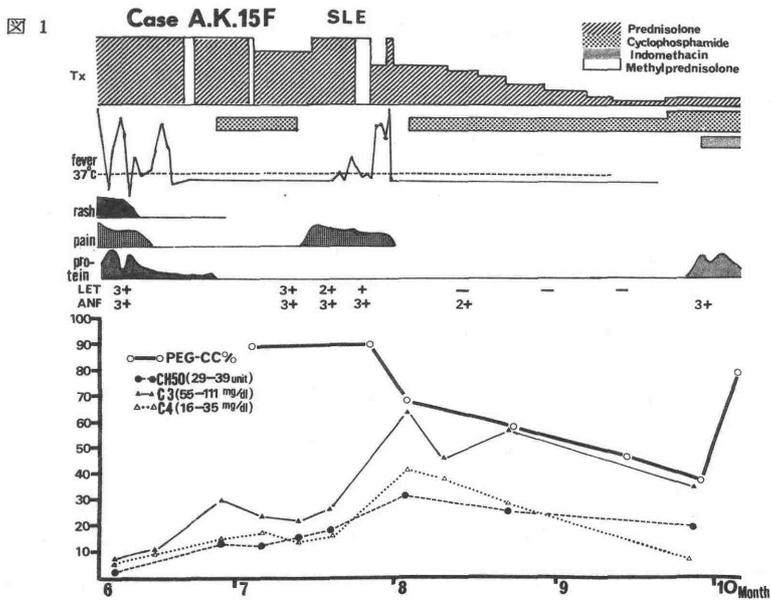
や ALL などにみられた。

- ・ SLE の症例では症状の増悪に平行して CIC 値の増動がみられた。
- ・ *In vitro* での実験でも CIC 値は抗原特異性を示した。

以上より PEG-CC の測定値は臨床経過を反映しており、CIC 値を測定していると言える。

表 1 PEG-CC for immune complexes in the sera

Diagnosis	No. Case	No. Positive	Immune complexes PEG-CC%	
			Mean	Range
SLE	3	3	87.7	(80.9 - 92.2)
Ulcerative colitis	1	1	79.7	
MCLS	4	3	60.9	(13.1 - 99.5)
Juvenile rheumatoid arthritis	6	4	53.8	(9.2 - 95.6)
Juvenile diabetes mellitus	11	7	40.2	(5.5 - 77.1)
Acute glomerulonephritis	11	2	20.0	(0 - 95.1)
Anaphylactoid purpura	6	2	15.9	(0 - 42.6)
Nephrotic syndrome	7	1	7.3	(0 - 22.2)
ALL	11	5	23.8	(0 - 63.3)
Aplastic anemia	2	1	22.2	(2.9 - 41.5)
Malignant lymphoma	5	2	18.9	(0 - 45.4)
AML	3	0	9.1	(2.4 - 19.2)
Normal human serum	20	0	6.6	(0 - 20.8)



九州大学温泉治療学研究所内科

酒井好古，江崎一子，安田正之，友岡和久，延永 正

目的： 膠原病ならびに血液疾患における可溶性免疫複合体 (CIC) の病因と診断、治療的意義を明らかにする目的で polyethylene glycol を用いる方法で CIC を選択的に分離し、補体活性化能に関する検討を行った。さらに不溶化 CIC を作成し、CIC の単離を試みた。

方法：

Polyethylene glycol precipitation-complement consumption test (PEG-CC)。Harkiss の方法に準じ (1)、0.02 M EDTA 存在下、0.125 M borate buffer saline (pH 8.1, RSC 0.075) 系で被験血清 300  $\mu$ l に PEG 6000 を終濃度 2.5% に加え、0°C, 90 分孵置，遠沈沈層を洗滌後，30  $\mu$ l GV B<sup>+</sup> または 30  $\mu$ l 0.04 M Mg<sup>++</sup>-EGTA buffer に溶解し、それぞれ 7  $\mu$ l 血清 (NHS) 15  $\mu$ l, 50  $\mu$ l と 37°C, 30 分反応させた二種によって classical pathway (CH50), alternative pathway (AH50) の補体消費率を求めた。

4% polyethylene glycol precipitation (4% PEG)。Creighton の方法に準じ (2)，被験血清 100  $\mu$ l に 0.02 M borate buffer saline (pH 8.5) 400  $\mu$ l，さらに 8% PEG 500  $\mu$ l を加えて 0°C, 90 分放置，遠沈沈層を 4% PEG で洗滌後，Lowry 法によりタンパク量を測定。CIC を被験血清タンパク量に対する沈澱タンパク量の百分率で表わした。

C1q-coupled Sepharose 6B および C1q-coupled IgG-Sepharose 6B。Rejnek の方法により Sepharose 6B を CNBr によって活性化した (3)。活性化した Sepharose 6B, 0.1 M borate buffer saline (pH 9.0, RSC 0.075) 50% ケルに 7  $\mu$ l IgG (Cohn Fr II 5 mg/ml) を等量加え，4°C, 1 夜回転反応させ，IgG を不溶化した。0.1 M borate buffer saline で十分洗滌，1 M glycine で処理後，IgG-Sepharose 6B, 0.075 M Tris buffer saline (pH 8.1, RSC 0.15) 50% ケル 12 ml に C1q (3.38 mg/ml) 1.16 ml を加え，4°C, 1 時間 rotor で反応，C1q-coupled IgG-Sepharose 6B を作成した。C1q-coupled IgG-Sepharose 6B 50% 浮遊液 1 ml を CIC の検体 0.5 ml (予め血清 2 ml より 2.5% PEG-

0.02 M EDTA を加えて得られる沈澱を 0.075 M Tris buffer saline 1 ml に溶解) と反応せしめ、室温で 40 分間反応させた後、十分に洗滌。0.075 M Tris buffer saline - 0.2 M 1,4-diaminobutane (pH 11, RSC 0.15) 1 ml 中に CIC を解離する。単離した CIC について免疫化学的に、SDS-6% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) により分析した。

成績:

1. Polyethylene glycol precipitation-complement consumption test (PEG-CC).

正常ヒト血清に種々の濃度の PEG を加え、各沈澱分画について補体消費をみると、2.5% PEG で得られる分画は  $15.3 \pm 8.4\%$  を示し、この濃度で病的血清中の CIC が特異的に検出される (図 1)。またそれぞれ沈澱タンパク質も SDS-PEG によって分析した結果、2.5% PEG で特異的に CIC が回収されることを示された。以上の成績より、図 2 に示すプロトコールに従い、CIC の補体活性化能も検出した。

2. 膠原病ならぬに血液疾患における CIC.

慢性関節リウマチ (RA)  $48.7 \pm 26.7\%$ , 悪性関節リウマチ  $39.2 \pm 31.6\%$ , 全身性エリテマトーデス (SLE)  $44.0 \pm 9.5\%$ , シェーケレン症候群  $33.0 \pm 26.8\%$ , 急性骨髄性白血病  $27.3 \pm 22.8\%$ , 悪性リンパ腫  $42.0 \pm 14.1\%$  であった (図 3)。各疾患における溶血活性 (CH50), C4, C3 タンパク質量は CIC 陽性・陰性両群の間に有意差がない。RA における CIC は一般に classical pathway を活性化した (10 例中 8 例) が、SLE では classical pathway のみならず (8 例中 7 例), alternative pathway の活性化もみられた (8 例中 5 例)。4% PEG と

COMPLEMENT CONSUMPTION BY THE PRECIPITATES FROM SERA IN VARIOUS CONCENTRATIONS OF PEG IN THE PRESENCE OF EDTA

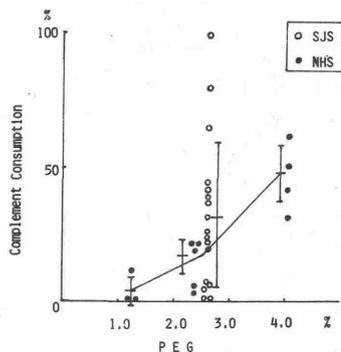


図 1

POLYETHYLENE GLYCOL PRECIPITATION-COMPLEMENT CONSUMPTION TEST (PEG-CC)

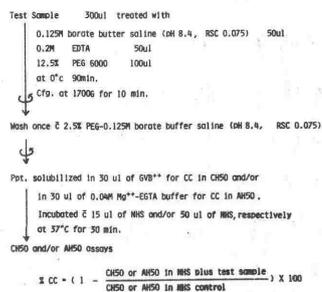


図 2

CIRCULATING IMMUNE COMPLEXES IN COLLAGEN DISEASES AND IN BLOOD DISEASES

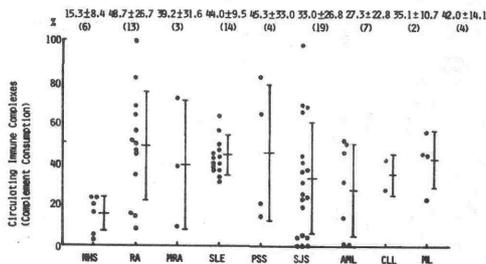


図 3

PEG-CCの成績も対比すると明らかな相関はみとめられなかった(図4)。

3. *in vitro*抗原抗体反応系におけるPEG-CCの検討。BSA-抗BSA系による*in vitro*で形成される抗原抗体反応をLaser-Nephelometer (Behring社)で検出、同時に2.5%PEG-0.02MEDTA沈降タンパク量をLowry法で測定した。図5に示すようにNephelometryによる抗原抗体複合物の形成と抗原抗体沈降タンパク量はBSAの同じ濃度において最大値を示した。同時に検討したPEG-CCの最大値は抗原抗体最適比よりやや抗原過剰域において観察された。

Bisdiazotized benzidineによるaggregated IgGは5μgで50%の補体を消費した(図6)。

4. C1q-coupled Sepharose 6BおよびC1q-coupled IgG-Sepharose 6BによるCICの単離。不溶化C1qを用い、CICの単離を試み、免疫化学的に、またSDS-PAGEによる組成分析した。

結論: 膠原病, 血液疾患において2.5%PEG-0.02MEDTAによって沈降タンパクの補体消費が検出された。4%PEGの成績とは相関性はみとめられなかった。従って両法を併用することによってCICが検出されるを得ない。*in vitro* BSA-抗BSA系における最大の補体沈着性は抗原抗体最適比よりやや抗原過剰域においてみられた。不溶化C1qを用いCICを単離分析した。

文献:

- (1) Harkiss, G. D., Brown, D. L.: Clin. exp. Immunol. 36: 117, 1979.
- (2) Creighton, W. D. et al.; J. Immunol. 111: 1219, 1973.
- (3) Rejnek, J. et al.: J. Immunol. 102: 638, 1969.

CIRCULATING IMMUNE COMPLEXES IN 4.0% PEG AND IN 2.5% PEG-0.02M EDTA

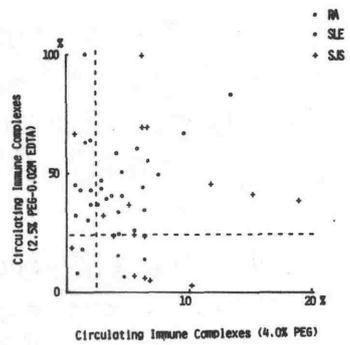


図 4

Detection of BSA-Anti BSA Immune Complexes Prepared in vitro

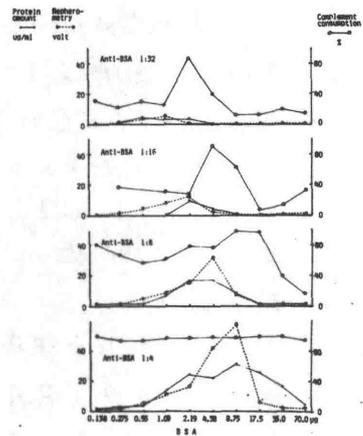


図 5

Detection of Aggregated IgG in NHS

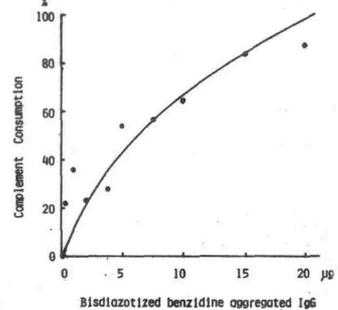


図 6

# 14

血液疾患および膠原病における免疫複合体の検索。

: C1g deviation test, Polyethylene glycol 沈澱法および  
Anti-antibody inhibition test.

九州大学温泉治療学研究所内科

安田正之 酒井好古 延永 正

## I: 目的

可溶性免疫複合体 (Circulating immune complexes: CIC) は種々の疾患で認められており、その検索方法も数多く開発されている。血液疾患、膠原病を対象として原理の異なる3方法にて検出を行ない、それらCICの性状に若干の検討を加えた。

## II: 方法

C1g precipitation reaction (C1g-PR) および C1g deviation test (C1g-DT)。Agnella<sup>①</sup>, および Sabel<sup>②</sup> に準じ、C1g, C1r, C1sの系統的分離方法<sup>③</sup>を用いて得られたC1gを用いて行った。

Anti-antibody inhibition test (AA)。Milgram<sup>④</sup>, Kanaz<sup>⑤</sup>の方法の大田<sup>⑥</sup>による変法にて、V型 microtiter plate にて行った。

Polyethylene glycol 沈澱法 (PEG)。Crelgton<sup>⑦</sup> に準じ測定した。  
CH50は Kent<sup>⑧</sup> に準じ測定した。

Sucrose density ultracentrifuge。5~40%の sucrose density gradient を 0.01 M PBS, pH 7.2 にて作成し、1.5 x 9.6 cm の tube に 0.25 ml の血清を重量し、日立 RPS 40 T 型、平均半径 11.1 cm, 350,000 rpm, (152,000 g), 4℃ 18 時間遠心した。終了後、日立 DGF-U にて top 5 分画し、0.01 M EDTA 下で C1g-DT を行った。

## III: 成績

1) 疾患別 CIC の検索。Table 1. の如く、C1g-DT では急性骨髄性白血病 (AML), 慢性骨髄性白血病 (CML), 慢性リンパ性白血病 (CLL), 自己免疫性溶血性貧血 (AIHA), IgA 欠損症で 25~50% の陽性率で認められたが、悪性リンパ腫, 特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) では全例陰性であった。AA法では AML, CLL, Lymphoma, AIHA, IgA 欠損症, Myeloma に陽性例が認められた。

C1g-DT の定量値では (Figure 1.), Leukemia, CLL, AIHA, SLE で高値例が認められた。

C1g-DT および AA法による陽性群と陰性群の補体価を対比すると、

差異は認められなかった。(Figure 2.)

Table 2. の如く、悪性関節リウマチ(MRA)、慢性関節リウマチ(RA)、SLE、強皮症(PSS)、皮膚筋炎(DM)、混合性結合織炎(MCTD)、江ノ川症候群(SjS)に対し、Cig-PR、PEG法、AA法を同時に行なった。各方法の陽性率は、Cig-PRではSLEで高率に陽性であり、14例中10例に認められた。PEG法はそれぞれの疾患でも高率に陽性であった。PEG法の定量値では(Figure 3.) MRAで最も高値であった。一方SLEでは2例の異常高値値を除き、比較的低値値であった。AA法ではSLE、MRAで検出率、定量値とも高値であった。また3方法ともに陽性を示した例はSLEに最も多く6例に認められた。RA、SLE、SjS(Figure 4)におけるCICと血清補体価との間には有意差は認められなかった。

## 2) CICの経時的変動。

症例1, 69才女, B-CLL(Figure 5)。巨脾に対しsplenectomyを行なったが、Cig-DTによるCICの増加、低補体を来し、化学療法によりCICの減少と補体価の回復を認めた。

症例2, 23才女, SLE(Figure 6)。昭和50年発症し寛解していたが、53年1月発熱で再発し、Prednisolone 80 mgにてCig-DT、4%PEG法によるCICの減少を来した。AA法は陰性であった。

## 3) CICの超遠心分析(Figure 7)。

前記2症例(Case 1, 2)とMRA(Case 3)に施行し、各分画についてCig-DTを行なった。Case 1, 2におけるCICは7Sと19Sより大きな領域にその活性が認められたがCase 3. では7Sより小さなCICが認められた。

## IV: 考察

血液疾患、膠原病ともに同一疾患、同一症例でも検査方法により、検出率および定量値の差異が認められる。またCICと補体価との関連をみると、SLEでCig法との間に差を認められ、他の疾患では有意差は認められなかった。しかし症例を経時的に観察すると、たとえ正常範囲内ながらもCICと補体価、病勢の変動はよく一致していることが示された。したがってCICにより病態、病勢を判断する際には2-3の方法を組合わせて行うことが必要と思われる。またCICのサイズには、症例によって差異のあることが示唆されたが、Cig-DTとともに他の方法を組合わせて検討することが必要と思われる。

	Clq deviation test			Anti-antibody inh. test		
	cases	positives	%	cases	positives	%
A M L	36	9	25	7	1	14
C M L	6	2	33	1	0	0
C L L	4	2	50	2	1	50
Lymphoma	17	0	0	4	1	25
I T P	10	0	0	1	0	0
A I H A	6	2	33	2	1	50
Second. IgA def.	4	2	50	4	1	25
Myeloma	3	0	0	3	1	33
S L E	31	17	55	14	11	79

Table 1: Clq-DT and AA in blood diseases.

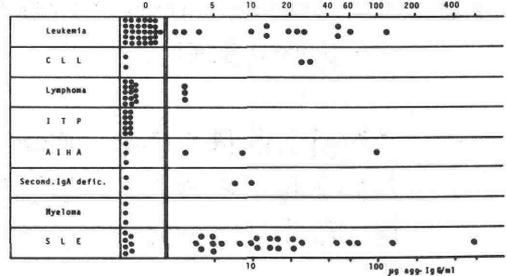


Figure 1: Clq-DT in blood diseases.

	No. cases	N R A	R A with nodules	R A with amyloid	R A	S L E	P S S	D M	H C T D	Sjogren's synd. with S L E	
										total	S L E
Clq	1	0	2	1	10	2	1	1	3	2	
PEG	6	7	3	11	11	9	4	6	13	3	
A A	4	3	3	6	10	5	1	3	5	2	
Clq+PEG	1	0	2	1	9	2	0	1	2	1	
PEG+AA	3	2	2	6	7	5	0	3	4	1	
AA+Clq	0	0	2	0	7	0	0	1	1	1	
All pos.	0	0	2	0	6	0	0	1	1	1	
All neg.	0	0	0	2	0	0	2	1	1	0	

Table 2: Clq-PR, PEG and AA in collagen diseases.

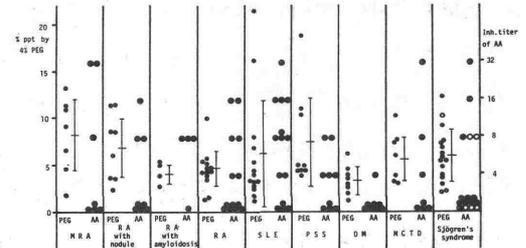


Figure 3: % ppt. of PEG and inhibition titer of AA in collagen diseases. Open circle; Sjs with SLE.

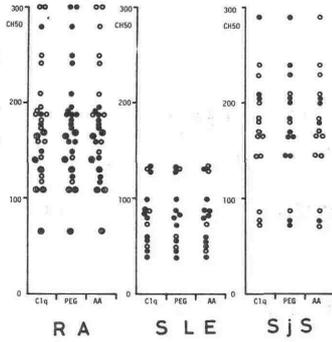


Figure 4: Correlation between CH50 and Clq-PR, PEG and AA. Open circle; positive. Solid circle; negative. Double circle; MRA.

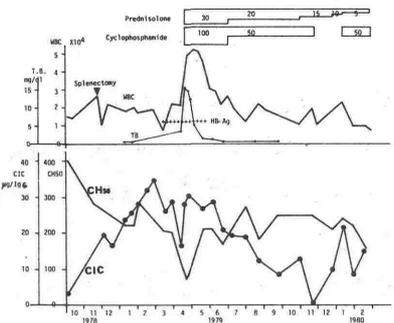


Figure 5: Case 1, B-CLL.

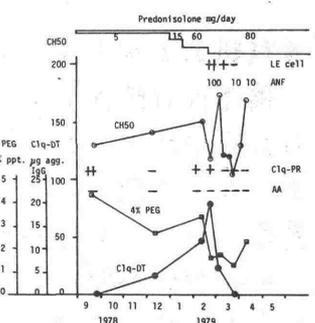


Figure 6: Case 2; SLE.

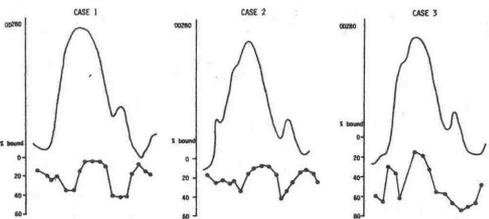


Figure 7: Ultracentrifugal pattern and Clq-DT.

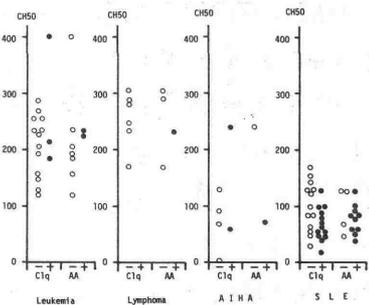


Figure 2: Correlation between CH50 and Clq-DT and AA in blood diseases.

(1) Agnello, V: J. Exp. Med. 134; 228s, 1971. (6) 近文正: 尿毒症性血小板的血球凝集. 1979年度報告書. (A671) 1979.  
(2) Sobel, AT: J. Exp. Med. 142; 139, 1975. (7) Creighton, WD: J. Immunol. 111; 1219, 1973.  
(3) 近文正: 尿毒症性血小板的血球凝集. 1979年度報告書. 233, 1979. (8) Kent, JF: Am. J. Trop. Med. Hyg. 12; 103, 1963.  
(4) Milgrom, F: Vox. Sang. 1; 172, 1956.  
(5) Kano, K: Clin. Immunol. Immunopathol. 9; 425, 1978.

# 15 補体 COLD ACTIVATION — 原因因子としての soluble cryoglobulin-like substance の証明 —

京都府立医科大学第一内科 竹村周平 村上正志 田上広樹  
若松美和 古川泰正 渡辺幸一 西田康一 松村直幸 堀田忠弘  
横江信義 吉川敏一 近藤元治

補体 cold activation (CA) の原因については、本シンポジウムにおいて発表してきたごとく、cryoglobulin と soluble cryoglobulin-like substance (SCS) が考えられたが、後者については全くの推測でその証明は未だなされていない。immune complex 測定法として知られている polyethylene glycol (PEG) 沈殿法ならびに抗補体活性を組み合わせた方法が PEG-complement consumption として報告されているが、これを応用し cryoglobulin 陰性例における補体 CA を検討し SCS をその原因として確認したので報告する。

## ◀ 材料および方法

補体 CA は陽性であるが cryoglobulin の認められない 37°C 分離血清を用いた。なお前回報告した anti-IgG の検討では IgG anti-IgG が 113  $\mu\text{g}/\text{ml}$  と高濃度であった。対照として anti-IgG は高濃度に認めるが補体 CA を示さない肝疾患患者についても検討を加えた。

PEG-EDTA 溶液による沈殿ならびに抗補体活性の検討； Harkiss らの方法を若干変更し検討した。すなわち PEG (MW 6000) を 0.01M phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4 に溶解し 12.5% 溶液とし、その 1.0 ml に 0.2M EDTA, pH 7.2 溶液 0.5 ml を加之混和後、血清 3.0 ml を加え 4°C 2 時間反応を行った。反応後 1100 G 10 分間遠心し得られた沈殿物を冷 PBS 溶液 (2.5%) で洗浄し、3.0 ml の veronal buffered saline (VBS<sup>†</sup>) を加え、37°C 2 時間放置し沈殿物を再溶解したのち遠心し、その上清について抗補体活性の検討を行った。なお溶液中の免疫グロブリンを特異抗血清を用い Ouchterlony 法で検討した。また蛋白量は Folin-Lowry 法で測定した。抗補体活性の検討は上記操作で得られた上清 0.1 ml に補体源として VBS<sup>†</sup> で 0.8 CH<sub>50</sub>/ml となるように希釈した正常ヒト血清 1.0 ml を加え、37°C 30 分放置後の溶血活性ならびに 4°C 4 時間放置後の溶血活性を求め算出した (表 1)。

## ◀ 結果

### 1. PEG-EDTA 溶液による沈殿性

4°C 72時間の放置により、cryoglobulinの存在が認められたいにもかかわらず、補体CAを示した患者血清をPEG-EDTA溶液混和後、低温に2時間保存すると、肉眼的に沈殿物の形成を認めた。蛋白量は300 µg/mlであり、IgG、IgM免疫グロブリンが含まれていた。一方、血清とPEG-EDTAを混和後37°Cに保存した場合には全く沈殿物の出現は認めなかった。もちろん血清のみを4°Cに2時間保存しても沈殿物の出現はなかった。

対照として用いた補体CAは示さないが、anti-IgGは高濃度である肝疾患患者血清においても沈殿物は認められ、おのこの蛋白濃度は232 µg/ml、106 µg/mlであった。

## 2. 沈殿物の再溶解液の抗補体活性

補体CA陽性血清から得られた沈殿物の再溶解液(37°C保存)は、37°Cにおいて2.4%と弱い抗補体活性を示したにすぎなかったが、4°Cにおいては95.8%と非常に強い抗補体活性を示した。しかしながら、対照血清から得られた再溶解液については、症例2において37°Cで弱い抗補体活性を示した以外は、37°Cにおいても4°Cにおいても全く抗補体活性を示さなかった(表2)。

## ◀ 考 案

補体CAの発見以来、その原因については種々の面から検討がなされてきた。この現象が血清と血漿の補体価の解離として報告されたように、最初この原因として凝固系の関与が推測された。しかし血漿においても長時間低温に保存すると、血清同様補体価は低下すること、さらには血清に抗凝固剤を添加することにより血漿と同様ある程度補体価の低下は防げることなどから、補体CAへの凝固系の関与は否定的となった。

cryoglobulinは低温で白色沈殿あるいはゲル状の物質として生じる蛋白として知られているが、このcryoglobulinによる補体系の活性化はよく知られており、補体CAの一因であり約半数において認められる。しかしながら、cryoglobulin陰性例での補体CAの原因については、抗補体活性の面からの検討やanti-IgG (rheumatoid factor) の検討から、SCSの可能性が推測されていた。今回検討を加えたPEG-EDTA溶液により得られた沈殿物の37°C溶解液は低温でのみ強い抗補体活性を示し、37°Cでは抗補体活性は認められなかった。補体CAは低温における強い抗補体活性の出現に他ならないことを考えあわせると、PEG-EDTA溶液を加えて低温で得られた沈殿物は、cryoglobulin陰性例における補体CAの原因物質と考えられる。またこの物質は低温ではじめて出現すると考えられ、さらに低温で出現しても沈殿物として認めら

れないことから soluble cryoglobulin-like substance と考えられた。

## ◀ 結 語

補体CAの原因として cryoglobulinがその一つと考えられていたが、補体CAを呈しながら cryoglobulinの認められない症例につき検討を加え以下の結論を得た。

1) cryoglobulinの認められない補体CA血清を PEG-EDTA 溶液と混和し低温に保存することにより沈殿物が生じた。また PEG-EDTA 混合血清を 37°C に保存しても沈殿物の出現は無かった。もちろん血清のみを低温に保存しても沈殿物は認められなかった。対照として用いた anti-IgG は高濃度に含むが補体CAを示さない肝疾患患者血清中にも沈殿物の出現を見た。

2) cryoglobulinの認められない補体CA陽性血清から得られた沈殿物の 37°C 再溶解液は、4°C でのみ強い抗補体活性を示し、37°C における抗補体活性は殆んど認められなかった。これに対し、補体CAの認められない対照血清から得られた沈殿物の再溶解液は低温において全く抗補体活性を示さなかった。

3) 補体CAの原因は cryoglobulin ならびに SCS の二つが判明した。

表1. Detection of soluble immune complex by PEG-complement consumption

0.01M PBS pH 7.4 (0.5ml)  
 0.2 M EDTA (0.5ml)  
 serum (3.0ml)  
 12.5% PEG (1.0ml)  
 |  
 4°C 2hr  
 |  
 cfg & wash pellets with cold 2.5% PEG  
 |  
 VBS<sup>++</sup> (3.0ml)  
 |  
 37°C 2hr  
 |  
 sup. (0.1ml)  
 NHS(complement)(0.8CH50/ml)  
 |  
 37°C 30min or 4°C 4hr  
 |  
 EA, hemolysis

表2. Anticomplementary activity of precipitates\* obtained by PEG-EDTA

case	CAC	PEG ppt	anticomplementary activity at	
			37°C	4°C
1	+	300µg/ml	2.4%	95.8%
2	-	232	3.1	0
3	-	106	0	0

\*Precipitates were redissolved at 37°C for 2 hr and used for the anticomplementary activity assay.

福島医大 第2内科

森藤隆夫

西向木友衛

吉田 浩

粕川禮司

目的：慢性肝疾患患者血清中にみられる抗補体因子と、低温下での補体活性現象の関係について検討した。

方法：抗補体活性（ACA）の測定は、倍々希釈した被検血清と、あらかじめ4CH<sub>50</sub>に調整したモルモット補体（GPC）をmicroplateの各wellでよく混和し、4°C overnight 放置した。その後、感作血球を加えて溶血、不溶血を判定し、約50%不溶血を示す最終希釈倍数値をACA力価とした。

RA血清による抗補体活性抑制試験は、ACAの測定と同様に被検血清の希釈系列を2列つくり、一方に非働化健常人血清、他方にRA患者血清を等量混和し、2時間反応させ、その後GPCを加えてACA測定に準じた。

RA血清による低温下における補体活性現象の抑制：37°C分離血清を二分し、一方に非働化RA患者血清、他方に3.8% EDTA液を混和し、4°Cに保存した。その後一定時間毎に、各血清をくみ出し溶血補体価を測定した。

成績：室温分離血清では、溶血活性を示さない肝疾患とG型骨髓腫患者の未処置血清と、非働化後の血清についてACAを測定し、同時にRA血清によるACA抑制試験の成績を図I, IIに示す。肝疾患では未処置血清、非働化血清の両方にACAが認められたが、骨髓腫では非働化血清にのみACAが認められた。一方、RA血清を加えた場合、両疾患とも明らかなACAの抑制がみられた。

RA血清による低温下補体活性現象の阻止反応を図IIIに示す。37°C分離直後36CH<sub>50</sub>あった本患者血清の溶血補体価は4°C保存60分後13CH<sub>50</sub>、120分で消失した。一方、EDTA混和血清は180分後でも27CH<sub>50</sub>を保持していた。

RA混和血清は、60分後27CH<sub>50</sub>、120分後20CH<sub>50</sub>、180分後12CH<sub>50</sub>と、EDTAほど補体活性を維持できなかった。したが、無処理血清と比較した時、明らかに溶血補体価の減少は少なかった。

考察：濱若らは、今まで、低温下で溶血補体活性が消失する現象について、低温で補体を結合するようになったIgG型 immune complex, 変性IgGなどを想定し、温度条件の違いによるACAの変化, 未処置血清と非働化血清のACA, cryoglobulin などについて検討してきた。

RFは変性したIgG分子と結合した時、補体の結合を抑制することが報告されており、本性質を利用して補体結合性IgG分子を検索することができる。今回示されたように、G型骨髄腫と同様、肝疾患においてもRA血清でACAが抑制されたことは、肝疾患のACA因子の1つは、変性IgGであること、また、低温での補体活性現象をRA血清が抑制したことは、本現象に補体結合性IgG分子が関与していることを示す成績と考えられる。

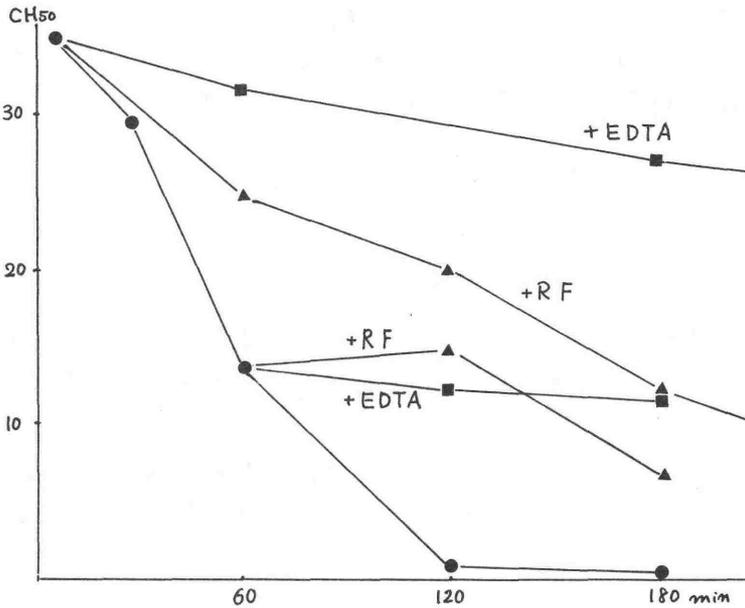
図1 patterns of ACA of unheated and heated sera

Sera		ACA. Dilution of sera, 1 to							
		1	2	4	8	16	32	64	128
chronic hepatitis	unheated	-	-	-	-	-	±	+	+
	heated	-	-	-	-	±	+	+	+
G-myeloma	unheated	±	+	+	+	+	+	+	+
	heated	-	-	-	-	-	-	±	+

□ 2. Inhibition test of ACA by RA serum

		Inhibition by	ACA, Dilution of sera, 1 to							
			1	2	4	8	16	32	64	
chronic hepatitis	unheated	N	-	-	-	-	-	±	+	+
		RA	±	+	+	+	+	+	+	+
	heated	N	-	-	-	-	±	+	+	+
		RA	±	±	+	+	+	+	+	+
-----										
G-myeloma	heated	N	-	-	-	-	-	-	±	±
		RA	±	+	+	+	+	+	+	+

□ 3



EIA法による特異的HBs抗原・免疫複合物の定量と  
その臨床的意義について

辻 孝夫<sup>1)</sup>， 荒木清興<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 岡山大学保健管理センター， <sup>2)</sup> 岡山済生会病院

HBV持続感染者にみられる血中の特異的HBs抗原・免疫複合物(specific HBsAg-IC)の検出法については、すでに Pernice ら<sup>1)</sup>の報告がみられる。今回、我々は、さきの Enzyme immuno-assay (EIA)法<sup>2)</sup>に補体C1qを利用し、specific HBsAg-ICを検出可能にしたので、その方法を報告する。

### 〔対象と方法〕

対象はHBV持続感染者15例と非B型肝炎活動型2例、健常人5例の合計22例である。方法はさきに報告したマイクロプレートとPhoto-Elisa 1型微量比色計(organon Technika)を用いるEIA法にC1q, IgG, C3の各々抗血清を利用して行う(Fig. 1)。すなわち各ウエルに非動化した被検血清を100  $\mu$ lずつ入れ、室温で37°C, 2時間incubateし、5回洗浄後ウサギ抗ヒトC1qの1/1000をIgG, C3(ハキスト社製を100倍稀釈)を150  $\mu$ l加え、37°C, 40分間incubateしてのち再び5回洗浄し、FITC標識ブタ抗ウサギIgG(Dakopatts社製を200倍稀釈)を加え、37°C 40分間incubateし、O-phenylene diamineとurea peroxideを用いて発色し、Ht管にとり比色した。判定は吸光度(OD)比が $\geq 1.2$ の場合に陽性とした。

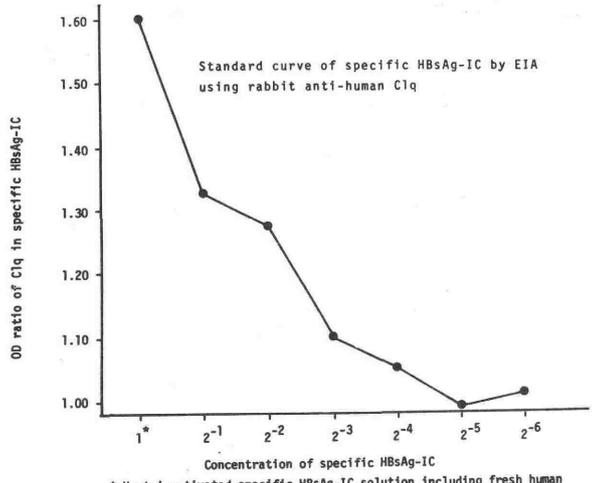
### 〔成績〕

抗ヒトC1qとIgG, C3を用いた場合のcut off値は各々3.85, 2.28, 2.51となつたがIgGとC3の場合はcut off値を越えるものがあり、C1qを利用した場合が安定していた。また、特異的精製HBs抗原-免疫複合物を作成し、倍率稀釈したstandard curveでもdose responseを示した(Fig. 2)。症例におけるspecific HBsAg-ICの検出成績では、病型別で、慢性肝炎活動性activity severe (CAH 2B)例で高率に検出された(Fig. 3)。HBs抗原のtiterとICの関係ではtiterの高いものにICが低値を示す症例があった。

### 〔考察と結語〕

すでに血中ICの測定には、C1q結合テストなどと、specific HBsAg-IC

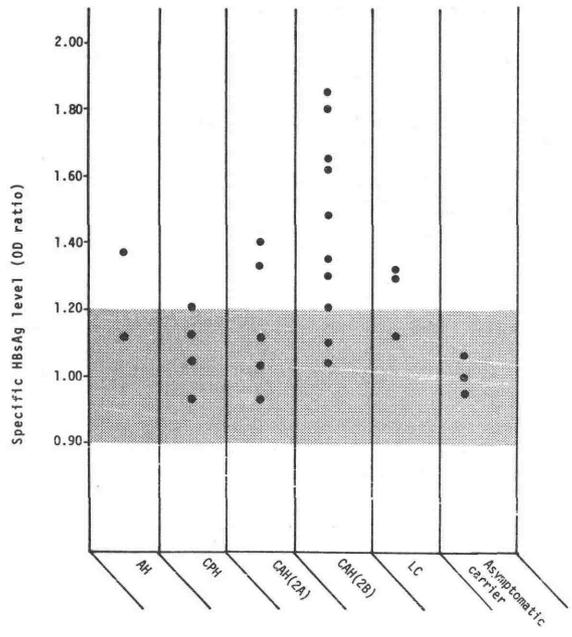
Fig. 2.



\* Heat inactivated specific HBsAg-IC solution including fresh human complement with AB blood type 500 $\mu$ l and specific HBsAg-IC 500 $\mu$ l consisted of HBsAg(100ng/ml)250 $\mu$ l and human HBsAb 2<sup>10</sup> titer of PHA)250 $\mu$ l

Fig. 3.

Circulating specific HBsAg-IC levels in HBV carrier with various liver diseases



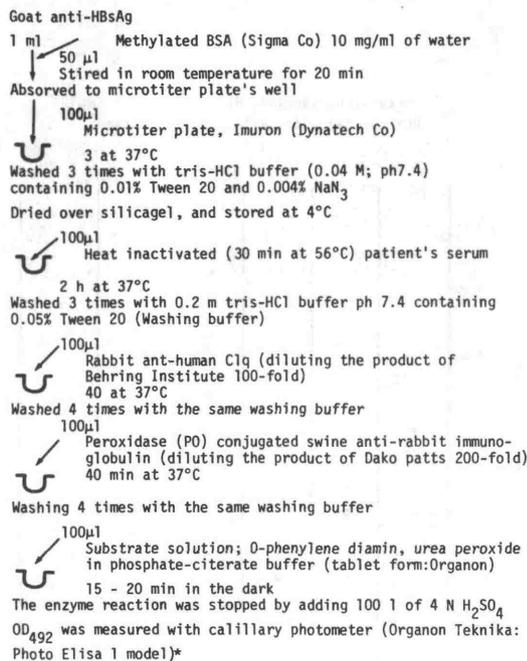
として Pernice<sup>1)</sup>らの IgG を利用した方法があるが、前者は間接的な検出方法であり、後者は定量性に欠けていた。今回の著者らの EIA 法は specific HBsAg-IC の定量性があること、かつ severe type の B 型肝炎活動性肝炎例で高率に検出され、疾患の活動性の有無を判定し得る方法として有用と考え報告した。

[文献]

- 1) Pernice, W. et al: Clin exp Immunol 37: 376, 1979.
- 2) 辻 孝夫 ほか: 肝臓 21: 641, 1980.

Fig. 1.

Method



\* The subjects in wells were judged positive for specific HBsAg-IC when the OD ratio [(sample OD - blank OD) / (mean negative control OD - blank OD)] was  $\geq 1.2$ .

# 18

## 嫌気性菌による補体活性化

上山陽子

東北大学歯学部附属病院臨床検査室

奥田智子, 橘 武彦

東北大学抗酸菌病研究所免疫学部門

### 目的

口腔内では嫌気性菌の占める割合が大きく、感染症に関与している場合が非常に多い。正常の部位では無害であるが、ひとたび粘膜の防壁を破ると病原性を発揮する潜在的に有害な細菌から宿主はどのように防禦されているのか、その解明の一助として補体と嫌気性菌との関係を調べた。有芽胞菌、無芽胞桿菌、球菌等、種々の細菌を用いて、薬物処理、非処理、培養温度時間変化による補体活性化能をみた。合わせて混合唾液中の補体成分の有無を調べた。

### 材料と方法

抗血清： 抗 C1q, 抗 C1s, 抗 C1q, 抗 factor B (Bf) はキリスト製品。抗 C3, 抗 C4 は自家製ウサギ抗血清を用いた。

嫌気性菌： 菌種までわかっている菌は岐阜大医学部嫌気性菌実験施設で分離されたもの、属だけのものは本附属病院臨床検査室の小野田和広技官により分離された菌を用いた。GAM 半流動培地で保存し、使用時 GAM ブイヨンで 37°C で培養した。

唾液中の補体成分： 健康な 25 歳の女性の混合唾液を 90 ml 採取し、4°C でミニコン B 15 を用いて約 100 倍に濃縮し Ouchterlony 法で沈降線の形成及び血清補体との spur 形成の有無を調べた。

嫌気性菌による補体活性化能の測定： *Clostridium* と *Leptotrichia* は培養時間によりグラム陽性 (G+) とグラム陰性 (G-) の占める比率が変るため、それぞれ 37°C で 20 時間と 48 時間、12 時間と 24 時間培養したが、他は 20 時間培養した菌を生食水で 3 回洗滌後、吸光度を 650 nm で 0.300 にして使用した。正常ヒトのプール血清を等量の細菌浮遊液と混合し、EGTA 存在あるいは非存在下に 37°C、60 分インキュベートし、遠心後上清の残存補体価を測定した。細菌を含まないコントロールの CH50 の値を 100% とし、残存補体のパーセントで示した。

血清の抗体価の測定： マイクロタイタープレートを用いて非働化血清を 0.01 M EDTA-GVB で 2 倍希釈し、37°C、2 時間インキュベート後、4°C で一夜放置し、完全凝集を示す最大希釈度の管数で示した。

bound C3 の測定： 細菌を PBS で充分洗滌後 PBS に浮遊し、

FITC標識抗C3<sup>h</sup> (1:20) と 0° 60分反応させた。PBSで4回洗滌後PBSに浮遊し7日立蛍光分光光度計MPF-4型で蛍光強度を測定した。

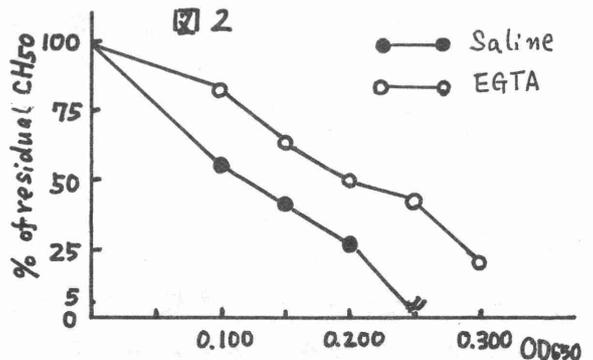
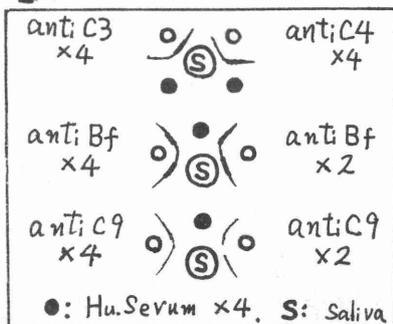
### 結果と考察

1. 唾液中の補体成分: ゲル内沈降反応で C3, C4, C9, Bf が検出されいずれも血清と fuse した。Clq, Cls は: の条件では検出されなかつた (図1)。

### 2. 細菌の補体活性化能

(a) dose response: Propionibacterium acnes を用いて Saline または EGTA 存在下で種々の濃度の細菌を反応させ残存補体価を測定した。Saline, EGTA 両者とも菌体量の増加に応じて補体の消費がみられた (図2)。(b) Kinetics: 2種の菌 (OD<sub>650</sub>:0.300) を用いて同量の血清と混合し, 37°C でインキュベートし時間毎に残存補体価を測定した。いずれも Saline の方が EGTA より反応速度は速かつた。補体活性化能の弱い菌でも60分後には50%の消費を示した (図3)。(c) 種々の細菌の補体活性化能と抗体価: いずれの細菌でも補体消費がみられ, 一般に Saline の方が EGTA より高かつた。Propionibacterium と Bacteroides は EGTA 存在下でも消費が高く, 細胞壁による alternative pathway の強い活性化能が示唆された。G(+) と G(-) による活性化能の差異は認められなかつた。抗体価と Saline 中での消費率とは必ずしも相関せず原因について検討中である (表1)。(d) 培養温度時間による影響: 4種の菌を用いて 37°C と 41°C で 20時間培養後の補体活性化能を比較した。Clostridium 以外は 37°C の方が若干高く, Saline と EGTA ではいずれも同じ傾向であつた。bound C3 は補体の消費とよく相関した (表2)。(e) 薬物処理: P. acnes と F. varium を用いて種々の濃度の Trypsin, Glutaraldehyde, Neuraminidase で処理して補体活性化能をみたが, 未処理のものとの差は認められなかつた。

図1



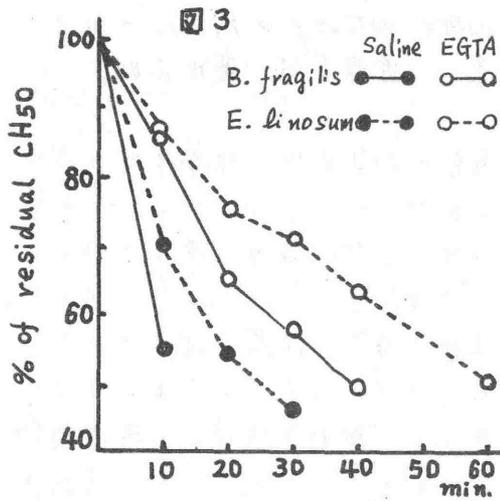
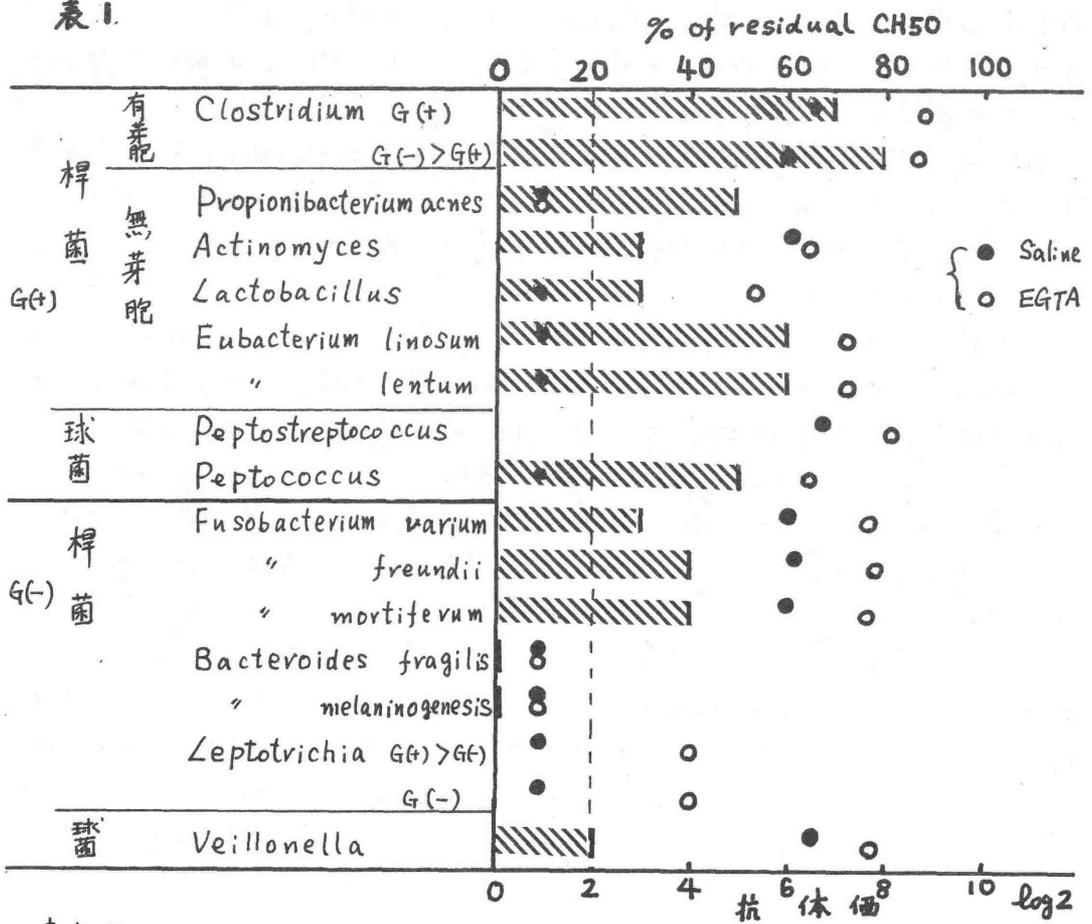


表 2

	温度	Saline		EGTA	
		消費 %	bound C3 %	消費 %	bound C3 %
<i>Clostridium</i>	37	26.4	78.2	8.5	82.0
	41	57.6	100	20.3	100
<i>Propionibacterium acnes</i>	37	79.9	100	53.7	100
	41	58.0	86.1	48.4	84.9
<i>Eubacterium linosum</i>	37	57.3	100	20.3	100
	41	44.1	89.5	17.1	78.3
<i>Fusobacterium varium</i>	37	35.6	ND	25.7	ND
	41	37.1		20.3	

表 1.



まとめ

調べた 15 種の嫌気性菌はいずれもヒト補体を活性化した。P. acnes, B. fragilis, B. melaninogenesis は EGTA 存在下でも高い活性を示したが、その他のものは Saline の方が高い消費を示した。

私共はこれまで、動物実験で過敏性肺臓炎の病態発現には補体系の関与が重要であろうと考えしており、一昨年の本シンポジウムやアレルギー学会等で報告してきている。すなわち沈降抗体陽性の感作動物は抗原吸入後に *Arthus* 型肺病巣を呈し、組織障害に一致して補体価の低下を伴う。また感作動物はあらかじめの *Cobra Venom Factor* で補体を除去し抗原を吸入させると発熱や急性の出血性肺炎病巣の発現が阻止される。これらの点より本症の病因にⅡ型アレルギーの関与が推定されるが、沈降抗体陰性の非感作動物でも抗原吸入後早い時期に軽度の組織障害を示す。そこで今回は、本症の病態発現機構の一部には補体 alternative pathway を介するメカニズムも考えられるのではなからうかと思ひ、各種抗原を用いて *in vitro* での検討を行ったのでその実験成績を報告する。

材料；過敏性肺臓炎の代表的真菌抗原 *Micropolyspora faeni* (以下 *M. faeni*) および *Thermoactinomyces vulgaris* (*T. vulgaris*) を Edwards の double dialysis method で不溶性の菌体成分 (organisms) と可溶性の汁液 (extract) とを分離し、extract はさらに 0.45 $\mu$  と 0.22 $\mu$  のミリポアフィルターに通したものに分けた。他の真菌抗原として、島居薬品製の *Aspergillus*, *Candida*, *Alterinaria*, *penicillium*, *cladosporium* の extract を用いた。補体 alternative pathway の活性化能と比較するため control として Sigma 社の Zymosan を用いた。キレート剤として magnesium ethylene glycol tetra-acetic acid (Mg EGTA), ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) を用いた。補体源としては、上記各種抗原すべてに対して沈降抗体が陰性の正常人血清を用いた。

実験方法；以上のように準備した各種抗原と Zymosan を生食で段階希釈したものに等量の正常人血清を加え、37°C 1時間 incubate し、遠沈後上清を以下の補体 alternative pathway 活性化能の検討に用いた。才一は、免疫電気泳動上で C3 proactivator (factor B) が C3 activator (factor B) に conversion するのを易動度の変化でみる方法。才二は、抗原と正常人血清を incubate する際にあらかじめ最終濃度が 10mM にするよう Mg EGTA を加え、classical pathway のみを block し CH50 の低下率をみる方法。才三は、ウサギ赤血球を用いた APCH50 の低下率をみる方法である。抗原と正常人血清を incubate する際、classical pathway と alternative pathway 共に block するためキレート剤 EDTA を用いた。

成績；実験に用いた各種抗原はすべて 20mg/ml の高濃度では、免疫電気

泳動上で正常人血清の C3 proactivator を C3 activator に conversion した。この conversion は表 1 に示すように EDTA を加えることにより完全に block されたが、MgEGTA には block されなかった。以上より、これから抗原には補体 alternative pathway の活性化能があるものと推定されたが、次にその活性化能を定量化する目的で MgEGTA 存在下での CH50 の低下率をみると、表 2 のように *M. faeni* および *T. vulgaris* の菌体成分は Zymosan に匹敵するほどの強い alternative pathway 活性化能を示した。extract 抗原の場合は高濃度ではじめて補体を消費したが、ミリボアフルターにより粒子成分を除去することによりその活性化能も低下した。正常人血清の ApCH50 も抗原を加えて incubate することにより低下し、表 3 に示すような成績が得られた。各種抗原の CH50 および ApCH50 の 50% 低下に要する濃度は表 4 に示すようであった。

考察；以上のような成績から、実験に用いた各種抗原は程度の差はあれすべて補体 alternative pathway 活性化能を有すると思われた。*M. faeni* および *T. vulgaris* では、特に菌体成分が強い活性化能を有し、extract でも粒子成分が多いほどその活性化能が強いことより、これから真菌類の構成成分の一部には Zymosan に匹敵するほどの alternative pathway 活性化物質が含まれているものと考えられる。従って抗原暴露条件によっては、特に高濃度、大量の場合には、補体 alternative pathway を介する肺の組織障害が起る可能性が予想される。今後は *in vitro* での実験でこの点をさらに検討する予定である。

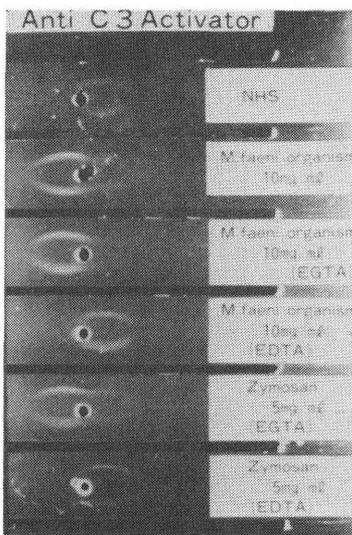


表 1,

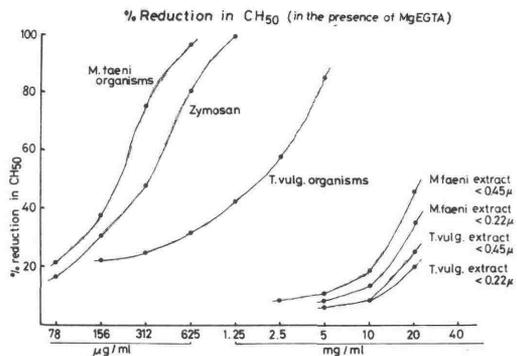


表 2,

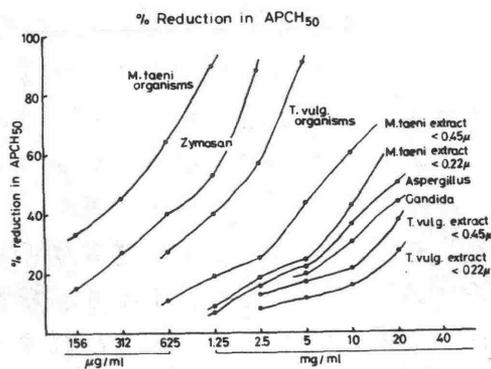


表3,

Concentration required to produce 50% reduction

	CH <sub>50</sub> (MgEGTA)	APCH <sub>50</sub>
M. faeni organisms	210 µg/ml	340 µg/ml
M. faeni extract, < 0.45µ	21 mg/ml	6.5 mg/ml
M. faeni extract, < 0.22µ	25 mg/ml	14 mg/ml
T. vulgaris organisms	1.52 mg/ml	1.6 mg/ml
T. vulgaris extract, < 0.45µ	38 mg/ml	28 mg/ml
T. vulgaris extract, < 0.22µ	45 mg/ml	42 mg/ml
Aspergillus	> 50 mg/ml	20 mg/ml
Candida	> 50 mg/ml	30 mg/ml
Alterinaria	35 mg/ml	17 mg/ml
Penicillium	> 50 mg/ml	> 50 mg/ml
Cladosporium	> 50 mg/ml	> 50 mg/ml
Zymosan	320 µg/ml	950 µg/ml

表4,

## 20 低補体価を呈した *Aspergillus fumigatus* による過敏性肺臓炎の一症例

新潟大学才2内科 外山譲二 中俣正美 原口通比古 成田昌紀  
速藤富士夫 矢田省吾 近藤有好 荒川正昭

過敏性肺臓炎は別名、外因性アレルギー性肺胞炎とも呼ばれ、欧米では古くより *farmer's lung*, *pigeon breeder's disease* など多くの報告がみられる。近年本邦においても注目されてきており報告が増加している。本症は従来、発症が抗原暴露後4~6時間後頃より症状が出現する Arthus 型であり、患者血清中に高率に沈降抗体が証明されることよりⅡ型アレルギーによるものと考えられていたが、近年細胞性免疫の研究がすすむにつれ、Ⅳ型アレルギーの関与を証明する報告も多くみられるようになってきている。また本症で補体価が低下したとする報告もない。このように現在本症はⅡ型かⅣ型かその免疫学的機序が問題となっている。私共は1970年の本シンポジウムで動物実験により本症における補体価の関与の重要性を報告したが、最近急性発症期に著明な低補体価を呈し、その後の各種の検討からⅡ型アレルギーが主因と思われる本症を経験したので報告する。

症例；24才，男性，会社員

家族歴；特記事項なし

既往歴；小学生の頃より胸部異常陰影を指摘されていた。

現病歴；昭和47年検診で胸部異常陰影を指摘され、某病院で肺結核の診断で治療を受けた。昭和50年7月、咳嗽、喀痰出現し別の病院を受診、胸部X線上で限局性浸潤影がみられ肺炎として入院治療を受けた。その後も昭和51年2月、昭和52年5月、昭和53年3月の3回、同様の症状と限局性肺浸潤影が出現し、同病院で肺炎として入院治療を受けた。昭和53年8月下旬頃から、発熱、乾性咳嗽、呼吸困難が出現し同病院を受診、胸部X線上でこれまでは異なる両側全肺野に散布するびまん性粒状影が認められたため、昭和53年9月7日当科に紹介され入院した。

入院時理学的所見；T<sub>1</sub>ノゼ，バチ指はない。全肺野に軽度の捻髪音を聴取。心音清，腹部異常なし。

入院時検査成績；胸部X線は両側全肺野，特に中下肺野にびまん性粒状影の散布を認めた。赤血球56mm/h，末梢白血球数12,200，CRP(6+)，総蛋白8.9g/dl (1-g<sub>2</sub> 37.9%) とそれぞれ上昇しており，免疫グロブリンでは IgG 3310mg/dl，IgA 730mg/dl と上昇，しかし IgM 102mg/dl，IgE 199IU/ml と正常であった。補体価は CH<sub>50</sub> 15.0 U/ml，C<sub>142</sub>H<sub>50</sub> 35.3 U/ml と著明に低下しており，補体蛋白では C<sub>3c</sub> 60mg/dl，C<sub>4</sub> 11.7mg/dl，C<sub>3A</sub> 29.2mg/dl と

C4の低下を認められた。肺機能では低酸素血症，拘束性肺機能障害，拡散機能障害を認められた。

免疫学的検査成績；アレルギー反応内テストでは即時反応で *Aspergillus* に強陽性，*Candida*，*penicillium*，*cladosporium* に陽性，しかし遷延，遷延反応はいずれも陰性であった。*M. faeni*，pigeon serum など *Cochet-Lelong* 法による各種沈降抗体では *Aspergillus fumigatus* へのみ強陽性を示した。患者自家血清と *A. fumigatus* を 37°C で incubate し CH50 の低下率をみると表 1 に示すように，正常人コントロールと比べて本例では著明な補体結合性抗体が証明された。*A. fumigatus* に対する特異的 IgE 抗体 (RAST)，白血球遊走阻止試験 (LMIT) は陰性であった。

入院後経過；補体価は入院 1 週後に正常化した。1 ヶ月後には自覚症状肺陰影の改善をみた。1.5 ヶ月後の胸肺生検では肉芽腫性間質性肺炎の像が認められた。以上より過敏性肺炎と診断し prednisolone 30mg の投与を開始したところ，自覚症状，肺陰影，赤沈，CRP， $\beta_2$ ，肺機能等の著明な改善をみた。

吸入誘発試験；ステロイドを中止し，ほぼ正常化した時点で *A. fumigatus* 抗原を用いて吸入誘発試験を施行した。*A. fumigatus* 3mg 吸入 7-8 時間後より表 2 に示すように，発熱，咳嗽，息切れなどの症状が出現し，同時に白血球増多，低酸素血症，肺機能障害がみられた。吸入前後における補体価および補体蛋白質量の変動は表 3 に示すように一過性の低下傾向が認められた。

考察；過敏性肺炎の発症機構の問題で原型アレルギー説に反論する根拠はいくつかあげられているが，その一つには補体の関与が充分に実証されていない点がある。私共はこれまでに動物実験で本症の病態発現に補体価がきわめて重要であると考えており，アレルギー学会等で報告してきている。可溶性抗原吸入後に一過性の補体価の低下があり，Cobra Venom Factor で補体を除去すると発熱や急性の出血性肺炎が阻止される。しかしながら臨床経験する本症で低補体価を示す例は少なく，報告されたものは多くは高補体価を示す。事実，本例以外の私共の症例も補体価はむしろ高値である。動物実験では一過性の低下の後にはむしろ高値になる。仮に本症で補体消費が起こっているとしても微量の場合は代償的に高値となることも考えられる。

pigeon breeders disease では患者で沈降抗体より MIF や lymphocyte blast transformation の方が高率に検出されることより，本症では細胞性免疫の方

が重要であろうとある報告がみられる。しかし本例では LMIT で塵作リンハ球を証明できず、IgE の関与もないと思われる。補体の低下と著明な補体適合性抗体が証明された点より、本例では B 型アレルギーの関与が主体であろうと思われた。過敏性肺臓炎は異なる多くの抗原による疾患の総称名であり、抗原の種類によつてはそれだけ病態・発現機構に差があるとも考えられ、今後本例の様な免疫学的検索の集積が望まれる。

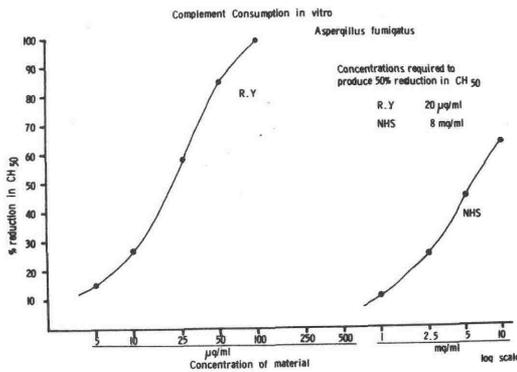


表 1

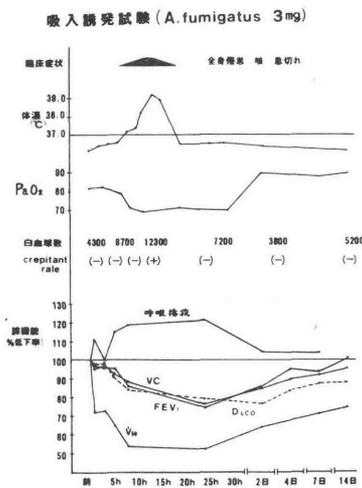


表 2

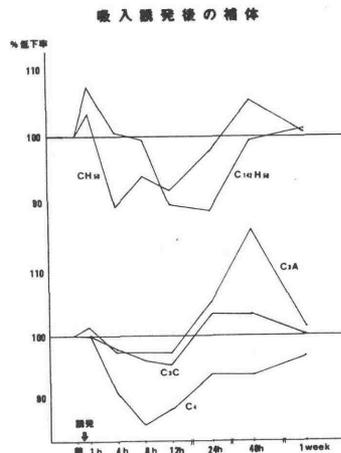


表 3

# 21 白癬における表皮内白血球遊走機序の解析

浜松医科大学皮膚科教室 鈴木典子, 田上八朗, 青島忠恕

## I. 目的

白癬はカンジダ症と同じく真菌の角層内感染により生じる浅在性皮膚真菌症である。これらの病変においては、湿疹様皮膚炎の組織像に加えて角層下膿疱あるいは白血球の遊走が特徴に認められる。

Sohnleら<sup>1)</sup>によりカンジダ症においては菌体による alternative pathway を介する補体の活性化がこの角層下膿疱の発症に関与することが報告されているが、もう一つの非常に日常的に見られる皮膚疾患の白癬におけるこのような病変形成の発症機序に関しては検索は行なわれていない。この研究の目的は、モルモットに実験的に白癬を起させ、種々の検索を行ない、白血球の表皮内遊走機序を明らかにしようとするものである。

## II. 方法

- 1). ハートレイ系モルモットに閉鎖密封法<sup>2)</sup>により *T. mentagrophytes* を接種し白癬を作製した。
- 2). 種々の時期の病変皮膚を採取し、蛍光抗体法により免疫グロブリン、補体の存在を調べると同時に、表皮PBS抽出液 ( $1\text{ml}/\text{cm}^2$ ) を作製し、その白血球遊走活性を測定した。また、血清を採取し、抗体価を調べる一方、血清と白癬菌とを反応させ、その白血球遊走活性についても検索を行なった。
- 3). *T. mentagrophytes* を TC199 に培養し、種々の時期の培養液と、菌体ホモジネートの白血球遊走活性を調べた。
- 4). 白血球遊走活性を有するものについては、Sephadex G-75, Sephadex G-25 でゲル濾過を行ない、含まれる白血球遊走因子について検討を行なった。
- 5). 白血球遊走活性は、モルモット腹腔滲出液より得た多核白血球を用い、Boyden法により測定した。

## III. 結果

閉鎖密封法によるモルモットの白癬はその免疫の状態により図1のような経過を示し自然治癒する。非免疫動物では5~7日目に血清抗体の出現があるが、角層内の菌には免疫グロブリンや補体の沈着は証明できなかった。

血清と白癬菌菌体を反応させると図2に示すように免疫血清では明らかに強い白血球遊

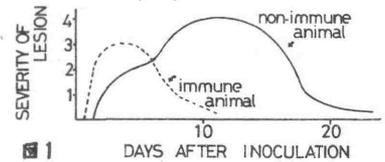


図1

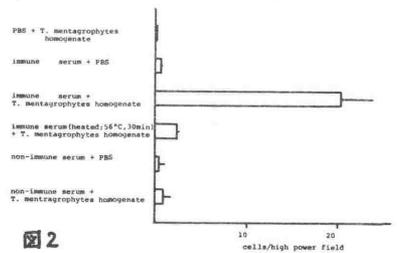


図2

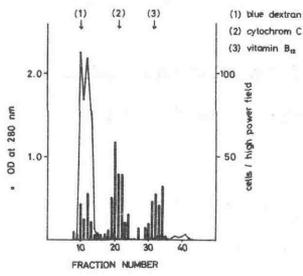


図3 Zymosan活性化血清  
Sephadex G75分画のchemotaxis

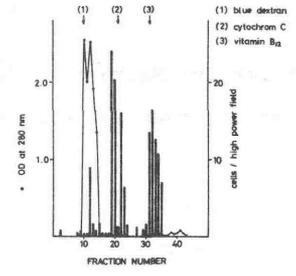


図4 T.ment + 免疫血清  
Sephadex G75分画のchemotaxis

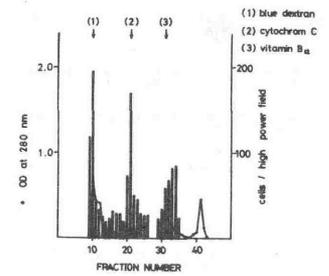


図6 白癬14日目表皮抽出液  
Sephadex G-75分画のchemotaxis

走活性が生じ、これは56°C, 30分熱処理した  
ものでは認められない。この血清をSephadex  
G-75でゲル濾過すると、血清をZymosanで  
活性化したもの(図3)のそれと類似した活  
性パターンが認められ、とくにcytochrome C  
の近くに溶出する活性成分の存在が認めら  
れた。(図4)

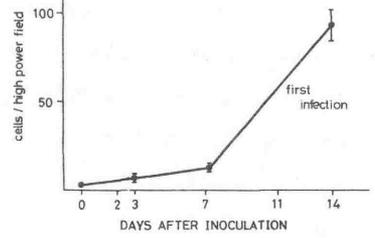


図5 白癬表皮抽出液のchemotaxis  
経時の変化

さて白癬表皮抽出液の白血球遊走活性は、その炎症症状、組織学的な白  
血球の表皮内遊走状態ときわめて一致した動きをみせ、炎症極期の14日の  
抽出液にきわめて強い活性が見られた。(図5) このSephadex G-75による溶  
出パターンでは、7日目の弱い活性を持つ抽出液にはほとんどみられない  
cytochrome Cの近くに溶出する強い活性がみられ、活性化された血清のそ  
れに類似している。(図6)

なお、白癬菌培養液、あるいは菌体ホモジネートにも白血球遊走因子  
が認められたが、主体は低分子のものであった。

#### IV. 考察

これまで真菌症における白血球遊走因子の産生は、Candida<sup>1)</sup>をはじめ、  
Coccidioides immitis<sup>3)</sup>, Paracoccidioides brasiliensis<sup>4)</sup>などいずれも血清の  
alternative pathway を介して起ることが報告されてきた。白癬において  
は病変形成は非免疫動物ではむしろ緩やかに進行し、菌体によるこのよ  
うな alternative pathway を介する活性化が主体ではなく、血清抗体の産生  
をまっして起る classical pathway を介する補体の活性化が主体であるこ  
とが明らかとなった。また、菌体表面におけるこれらの沈着がないことよ  
り、可溶抗原が表皮内へ入り、そこで血清成分と反応すると考えられた。  
この際放出される菌由来の白血球遊走因子も、この現象に関与する可能性  
が示唆された。

## V. 文献

- 1) Sohnle PG, Frank MM, Kirkpatrick CH: Mechanisms involved in elimination of organisms from experimental cutaneous candida albicans infections in guinea pigs. J Immunol 117:523-530,1976.
- 2) Tagami H, Watanabe S, Ofuji S: Trichophytin contact sensitivity in guinea pigs with experimental dermatophytosis induced by a new inoculation method. J Invest Dermatol 61:237-241,1973.
- 3) Galgiani JN, Isenberg RA, Stevens DA: Chemotaxigenic activity of extracts from the mycelial and spherule phases of *Coccidioides immitis* for human polymorphonuclear leukocytes. Infection Immunity 21:862-865,1978.
- 4) Calich VLG, Kipnis TL, Mariano M et al: The activation of the complement system by *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro: its opsonic effect and possible significance for an in vivo model of infection. Clin Immunol Immunopathol 12:20-30,1979

## IgA腎症と補体

—とくに蛍光抗体法による、 $\beta$ H Globulin,  
C3b Inactivator の態度について—

順天堂大学腎臓内科 薮元原 功、中山秀英、  
小出輝、大野丞二

## &lt; 目的 &gt;

IgA腎症は1968年 Berger らにより報告されて以来、その特徴的な蛍光抗体所見、特異な臨床像より他の慢性糸球体腎炎より独立した1つの腎症として多くの報告がみられる。とくに本邦では諸外国に比し、頻度が高く、その詳細な検討が期待されている。補体系の検索ではC3, C5, C9, Properdin (P) が高率に糸球体メサンジウムに認められるのに、early components であるC1q, C4の陽性率は低く、本腎症ではalternative pathway の関与が示唆されている。われわれはalternative pathway に関与する因子である $\beta$ H globulin, C3b Inactivator につき24例のIgA腎症で検討を加えた。

## &lt; 方法 &gt;

対象は昭和54年8月から55年3月までに施行した腎生検にて、IgA腎症と診断された24例であり、蛍光抗体法により各種補体成分の検索を行なった。蛍光抗体法は直接法および間接法を行ない、直接法はIgG, IgA, IgM, IgE, C1q, C4, C3 (Behringwerke社製) またP (今野孝彦氏より供与された)、 $\beta$ H、factor B (自家製)、C3bINA (Kent社製)、C5, C9 (Behringwerke社製) につき間接法を施行した。

これとは別に本腎症と診断された30例につき、血中C1q, C4, C3, C5, C9, P, B,  $\beta$ HE SRIDにて測定した。

## &lt; 結果 &gt;

血清中の補体成分の定量の結果は表1に示すように、C9を除き健常群との間に差はみられなかった。C9は $115.8 \pm 38.3$  (%NPS) と高い傾向が認められた。蛍光抗体法でのIgA沈着程度により(++)と(+++)にわけ比較するとC5, C9はIgA(+++)で高い傾向にあつたが他の成分には差は認められなかった。(表2)

蛍光抗体法による各補体成分の陽性率は、表3のごとくであり early

components である C1q, C4 の陽性率はそれぞれ 21%, 13% であった。それに対し C3, C5, C9 の陽性率は 92%, 75%, 88% と高率であり、P, B1H も 98%, 100% に陽性であった。B, C3b/NA は 13%, 21% と陽性率は低かった。

現着部位は C3 は IgA と同様にメサンジウム中心に現着が認められ、P, B1H もほぼ同様の pattern をとった。C3b/NA は一部 IgA と似た pattern をとったが、程度は弱かった。C1q, C4 は segmental な pattern を呈しその現着程度は弱かった。

### < 考 察 >

IgA 腎症の成因に関しては現在のところ明らかでないが、IgA が補体成分とともにメサンジウムに証明されること、メサンジウムに電顕で electron dense deposits を認めることなどの理由で immune complex 腎炎と考えられている。メサンジウムに現着する IgA は、補体を活性化しないといわれてきたが、最近では classical pathway をも活性化することが明らかになっている。本症では、高率に C3, P, C5, C9 が証明され、alternative pathway の関与が示唆される。われわれの今回の結果では、alternative pathway の modulator である B1H が全例に陽性であった。このことから、in vivo に於ても現着した C3 の炎症作用を阻止するよう働いている可能性がある。それに対し C3b/NA の陽性率が低かったのは、現着していないか、または B1H と異なり酵素作用により反応が行なわれるため、基質の分解後はもはや検出されないの、現着が一過性であったのか、蛍光抗体法の敏感度などの影響なども考えられる。

血清補体レベルが変動しないことは多くの報告にみられ、本腎症での補体活性が systemic disease とは異なった型で行なわれているのではないかと考えられ、補体 receptor ともあわせ考える必要がある。C9 高値は慢性炎症を表わしていると考えられるが、現着する補体が本症にどのような意味をもつのか、発症に重要な役割を果たしているのかなど、今後の研究が期待される。

### Profil of Complement Components in IgA nephropathy

	IgA (n=36)	NHS (n=37)
IgA	309.8 ± 93.5 p < 0.001 mg/dl	202.9 ± 64.2
C1q	101.9 ± 16.1 %NPS	97.0 ± 8.5
C4	39.7 ± 9.9 mg/dl	39.0 ± 6.8
C3	69.4 ± 15.3 mg/dl	71.2 ± 10.3
C5	100.8 ± 24.8 %NPS	97.2 ± 11.9
C9	115.8 ± 38.3 p < 0.01 %NPS	97.1 ± 10.7
B	14.3 ± 3.0 mg/dl	14.0 ± 3.2
P	92.6 ± 16.4 %NPS	97.0 ± 15.2
β1H	101.88 ± 16.09 n=30 %NPS	100.08 ± 15.60 n=25

表 1

### Serum C5 and C9 levels in IgA nephropathy

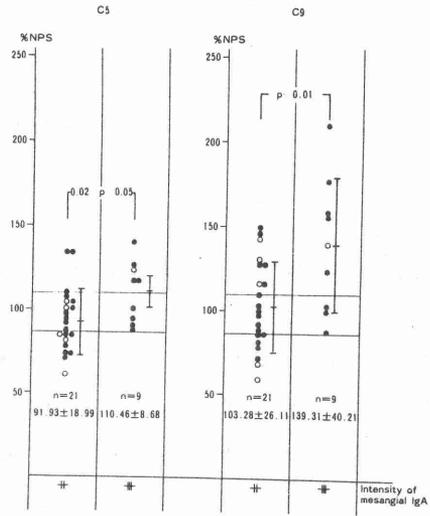


表 2

### Complement Components, activating factors and modulators located in the Glomeruli of IgA nephropathy

Complement Components	Incidence of positive fluorescence				Total
	Immunoglobulin in the glomeruli				
	IgA alone	IgA+IgG	IgA+IgM	IgA+IgG+IgM	
C1q	0/2 (0%)	2/11 (18)	1/2 (50)	2/9 (22)	5/24 (21)
C4	0/2 (0)	1/11 (9)	0/2 (0)	2/9 (22)	3/24 (13)
C3	2/2 (100)	10/11 (91)	1/2 (50)	9/9 (100)	22/24 (92)
C5	2/2 (100)	7/11 (64)	1/2 (50)	8/9 (89)	18/24 (75)
C9	2/2 (100)	10/11 (91)	1/2 (50)	8/9 (89)	21/24 (88)
P	2/2 (100)	11/11 (100)	1/2 (50)	8/9 (89)	22/24 (92)
B	0/2 (0)	2/11 (18)	0/2 (0)	1/9 (11)	3/24 (13)
β1H	2/2 (100)	10/10 (100)	2/2 (100)	9/9 (100)	23/23 (100)
C3bINA	1/2 (50)	3/11 (27)	0/2 (0)	1/9 (11)	5/24 (21)

表 3

### Serum Complement Components levels in IgA nephropathy

Complement Components	IgA alone		associated with another immunoglobulin		p
	n	mean ± SD	n	mean ± SD	
C1q	8	111.17 ± 18.68	23	98.20 ± 15.76	np
C4 %NPS	8	42.57 ± 9.71	23	37.43 ± 9.59	np
C3 mg/dl	8	65.37 ± 15.76	23	68.65 ± 12.06	np
C5 mg/dl	8	101.12 ± 30.98	23	99.00 ± 20.63	np
C9 %NPS	8	122.05 ± 56.92	23	116.77 ± 35.18	np
P %NPS	8	90.31 ± 24.35	23	90.87 ± 13.44	np
B mg/dl	8	14.62 ± 4.72	23	14.13 ± 2.43	np
β1H %NPS	7	103.00 ± 19.50	19	99.71 ± 14.67	np

表 4

近年、栄養と免疫あるいは感染に関する研究が、単に低栄養のみならず過剰栄養の場合にもその抵抗性が抑制されるとして多面的にすすめられてきている。

免疫系のなかでも、補体成分のC3が、液性免疫と細胞性免疫の相互の関連を直接に結びつけている役割を果していることから、補体系と細胞性免疫系の相互の関係について、補体溶血活性とツベルクリン反応を用いて臨床的にAgingや肺がん患者および各種感染症で検討されている。

従来、低栄養状態におけるこれらの関係をAnimal modelのなかで検討してきたが、今回ヒトを用いる機会に恵まれ、各例のfollow-up studyによってその動向を観察することができたのでその一部を報告する。

#### 方法

A 対象；グアテマラ人（マヤインディオと白人の混血児）年令6M～36M、男女15名の低栄養の乳幼児（Marasmus及びEdematous acute malnutrition）について病院入院時より、0日、7、14、21日の3週間、栄養療法中のfollow-up studyおよび同日の断面の観察を行った。follow-upが完全になされたのは8例で、個別の断面の観察は45例について行った。

対照群には、10名の健康な乳幼児について、同年令、同種を採用した。

#### B 栄養状態の確認

1. 体位、皮下厚を測定
2. 臨床所見；皮膚の変化、毛髪の変化、浮腫、脱水症状、角化症など。
3. 血液学的、生化学的検査；赤血球数、白血球数、白血球分画、ヘモグロビン(Hb)、ヘマトクリット(Ht)、アルブミン(ALb)、総蛋白質(T.P.)

#### C 感染症の確認

低開発地域において低栄養状態の乳幼児を対象に補体価を測定する場合には、Hostに感染症あるいは炎症症状の有無を確認することが重要である。

1. Polymorphonuclear Leucocytes (P.M.N.L)によるO<sub>2</sub>のup takeを測定  
P.M.N.LはDextranにより血液より抽出し、95% P.M.N.LのCell populationを収獲し、Qxygen monitorで測定した。

## 2. 微生物学的所見による検査

咽喉，血液，尿，糞を培養し，菌の有無を確認した。

### D Phytohemagglutinin (PHA) 反応

細胞性免疫系の指標としてPHA皮膚反応を採用した。PHAは0.1  $\mu$ g / 0.1 mlの滅菌生理的食塩水を用い，皮下注射し，24時間後にその硬結の直径を測定し，発赤を参考として観察した。

### E 補体溶血活性 (CH50)

補体価の測定にはmayer法による50%溶血反応を用いた。

### F 栄養摂取量

毎日の食事の摂取量は担当の医学部学生および看護婦により記録され，中米食品成分値により蛋白質量およびエネルギー量を算出した。

## 結果

### A Gómez classification による補体価と他の指標

栄養状態を分類する1つの方法にGómezによる分類がある。Grade Iは同年令の標準体重に対する10%~23.99%の体重減少，Grade IIは24%~39.99%の体重減少，Grade IIIは40%以上の減少を示す。

CH50値は正常群，GI，GIIは殆ど変化なく，GIIIがやや低値を示したが有意差は認めなかった。

PHA皮膚反応はその直径の平均値において，また陽性の比率においてGII，GIIIは正常群に比し有意に低下した。

血液性状ではGII，GIIIのALb, Hbが有意に低下しているが，GIIとGIIIの間には変化は認められなかった。これはGII，GIIIの殆どの例が，marasmusで，慢性の低栄養状態を維持していることによると考えられる。

### B PHA皮膚反応別にみた補体価と他の指標

栄養状態の分類による各指標の変化のうち，PHA反応が有意に変化したことから，皮膚反応別に各指標を比較した。

補体価はいづれの群でも変化は認められないが，T.P., ALb, Hb, Htは陰性時に有意に低下するが，PHAが陽転し，その反応が増強されるに伴ないそれらの値が高くなっている。なかでもT.P.はその回復が最も早く，Hb, Ht, ALb, は陽転化後も有意に低い値を示した。栄養状態の確認には，体位，

体格による分類よりも、P H A 皮膚反応がより強く影響を与えることが考えられる。

### C 感染症の確認

微生物学的所見にもとづく菌の有無に拘らず、補体価に有意の変化は認められなかった。Klebsiella, Proteus, Psudomonea(尿) Shigella "B2" (糞)などは補体価にやや高い値を示したが、同種の菌でも低値を示すものもあり、E. coli, Salmonella C2などは低値を示した。

感染菌を有しながら補体価への影響がないことについては、1) この補体価が感染後の Complement response を過ぎた時期に測定された例が多いこと、2) 一般に gram-negative 菌は補体価には影響を与えないこと、3) 局所の感染は腎や膀胱に炎症を伴わない限り、補体価への影響はないこと、などが推測される。

P.M.N.L の O<sub>2</sub> up take に表われた感染菌の中でも、補体価と特に関連を有するものは認めなかった。

### D Edematous acute malnutrition 及び marasmus の follow-up 観察

Edematous acute malnutrition の場合、蛋白質欠乏症の特徴が顕著で、T.P., Alb, が初期には有意に低く、後半に回復した。P H A 反応は初期には3例中1例の陽性で反応も小さいが、後半以降急速に陽転、反応の増強が見られた。一方、CH50は0日ではやや高い傾向を示し、回復にともない正常範囲中で低下しており、期間中常時正常値を示した。

marasmus の場合は慢性症状ですべての血液性状、生化学的所見も安定して顕著な変化は認められない。しかし、P.M.N.L による O<sub>2</sub> up take は回復とともに高くなり、P H A 反応の直径も増強された。CH50は期間中変化は認められなかった。

### E 補体価と P H A 反応の相互関係

重篤な低栄養の初期には P H A 反応は殆どの例が陰性を示したが、補体価は正常範囲にあった。栄養状態の回復にともない P H A 反応は陽転し、その抵抗性にも増強される傾向がみられた。

まず低栄養の初期にまづ補体が調整され、さらに細胞性免疫が増強されていく過程が、低栄養から回復期にいたる補体の動きであり、細胞性免疫が消失している場合も補体が維持されていることが観察された。この現象は従来 animal model での結果を実証するものであった。

## 掌蹠膿疱症と補体

東京都立大久保病院皮膚科

河島敏夫, 古賀道之

東京都臨床医学総合研究所

鈴木貴知, 田中忍

## 目的

ヒトの生体防衛機構のうち補体系は特に早期から鋭敏に反応する機構であることを見ればしばしば報告してきた。ここではその本態が未だ不明とされている掌蹠膿疱症をとりあげ、補体関与の有無、そのパターン等を局所組織及び血清レベルから検索し、さらに他の2~3の生体反応と対比した。なお本症は主として手掌、足蹠にほぼ限局する無菌性小膿疱、小水疱を主体とし、周囲の発赤、角化時に痂皮を形成するもので、しばしば軽快、増悪をくりかえす極めて難治性の疾患である。

## 検索方法

(1) 局所病巣部における補体成分の検出: 病巣局所組織特に小水疱や小膿疱などの一般組織所見を検討すると同時に、蛍光抗体法により局所補体成分の検出を試みた。

(2) 皮膚局所変性組織(鱗屑痂皮)が血清補体系に与える影響をみるため、乾燥鱗屑痂皮のPBS懸濁液を血清に作用させ、補体価(CH50)やC4, C3, C5など補体成分の変化を追求した。

(3) 臨床的に局所病変と各種検査成績とくに血清レベルでの補体価や成分値の関係、変動を追求した。

## 結果

(1) 局所組織所見: 病巣部の主病変は表皮内水疱で、水疱内に多数の多核白血球を混じっている。周囲にSpongiosisやリンパ球、好中球の遊走を見る。かかる表皮の変化に合致して真皮では血管周囲のリンパ球、一部好中球の浸潤を見るが、形質細胞は少ない。蛍光抗体法ではこれら細胞浸潤部に一致して、C3やC4など補体成分が、又その一部は基底膜にも認めることが多かった。又IgG, IgMなど免疫グロブリンも認められた。

(2) 局所変性組織の血清補体価に与える影響: 本症病巣部の乾燥鱗屑痂皮を採取し、PBSで10倍に稀釈して懸濁液を作製した。これを稀釈してその各種濃度液を血清に添加し37°C 30分作用させたのち、血清補体価(CH50)やC4, C3, C5など補体成分を測定した。図1は種々の濃度の懸濁液を加えた際の補体価の低下をみたもので、原液では著しい低下があり、以後濃度の減少につれて低下率は少なくなった。図中□□□は懸濁液遠沈後上

清のみでの抑制作用を示したものである。

なお類似の表皮変性組織を同様に処理して作用させたところ、鱗屑痂皮の性質により多少の相違もみられたが、ほぼ類似の傾向を認めた。

### (3) 血清レベルの補体価

(i) 初診時の血清補体価：本症105例の初診時における血液補体価を5単位ごとに区分してその頻度をみると、40~44単位と50~54単位との2つの峰がみられた。これを皮膚病変程度と対比したところ、重症型は $51.2 \pm 2.9$ 、中等症型は $46.3 \pm 2.9$ 、軽症型は $43.2 \pm 2.2$  CH50単位で、皮膚局所炎症病変が著しい例では高く、軽症例ほど正常域に近づいた。

次に一部の血清についてCH50の他、Clq, C4, C3PA, C3, C5, C9各蛋白量を免疫拡散法で測定した結果、図2の様に各成分とも可成りのばらつきがみられたが、膿疱多発高補体価例では各成分とも可成りの高価を示した。特にC5, C9は上昇もばらつきも大きかった。一方軽症型では、Clq, C4, C3はむしろやや低く、逆にC5, C9はむしろ高価を示したがいづれも有意差はなかった。

(ii) 皮疹経過と補体価の関係：本症は軽快、増悪をくりかえす慢性炎症性疾患であるため、個々の症例について、局所病変の変動とその際の血清補体価及び成分値の変化とを比較検討した。その結果、①皮疹増悪時には一般にCH50の他、Clq, C4など前期成分も、C3PA, C3, C5, C9など後期成分も揃って高く、軽快時には正常域に近づいた。しかし一部の例ではC5, C9がなお高値にとどまる例もみられた。②ごく稀には皮疹増悪時CH50をはじめ各成分の低下をみたが、それらはその後さらに皮疹の増悪をみた。③扁桃誘発試験例でも、皮疹の増悪とClq, C4など前期成分をはじめ他の成分の変動がみられた。

(iii) 病状の軽重と補体成分値：局所病変を詳細に区分し得た約40例について皮疹をI, II, III, IVに区分し、各群における成分値の平均値を比較したところ、CH50値は軽症型から徐々に上昇し、Clqは重症型のみ高値を、C4値は中等、重症型とも高値を、C3値は重症型のみわづかの高値を示した。しかしC5は軽症型から徐々に上昇し、C3PA, C9は中等症型から上昇がみられた。

この様に平均値をみると後期成分のうち特にC5が、次いでC3PA, C9などが皮膚局所病変と平行して高値を示し、重症型に至り初めてほぼ全成分の上昇がみられた。

(iv) 補体系と他の生体反応の比較：血清レベルの補体価を他の種々の検査成績、例えばα<sub>1</sub>-Antitrypsin, 血清蛋白、各種免疫グロブリン、ASLO

CRP, 各種肝機能, 末梢血各種血球数, 血沈値等と対比した。その結果, CH50 は特に白血球数や血小板数の変動と比例した。補体成分とそれらを比較したところ, C1q, C4, C3などに全く関連がみられず, C5, C9, 特にC3PAと最もよく平行した。

### 考察

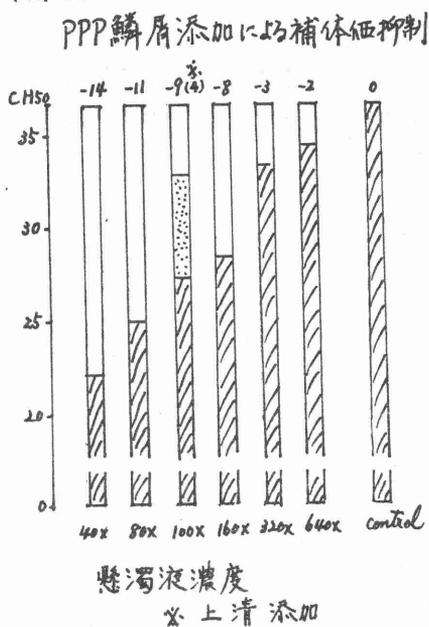
Tagami らは痲皮の分析により, 分子量から局所のC5aの存在を示唆している。一方本症における血清レベルの補体価(CH50)の高値はすでに報告してきた。

さく本症では歯菌, 扁桃炎等focusを示唆する報告が多く, 血清レベルの補体価が直ちに局所炎症病変のみに由来した変動か否かは必ずしも明らかではない。しかし私共が多くの臨床例から, 局所病変と, 血清レベルの補体価を比較した結果から考えると, 全般的傾向としては, 血清補体価や成分値は皮膚局所病変を反映している反応と考えられ, 又そのパターンはAlternative pathwayの参加が強い様に思われるが, Classical pathwayによる参加も否定し得なかった。

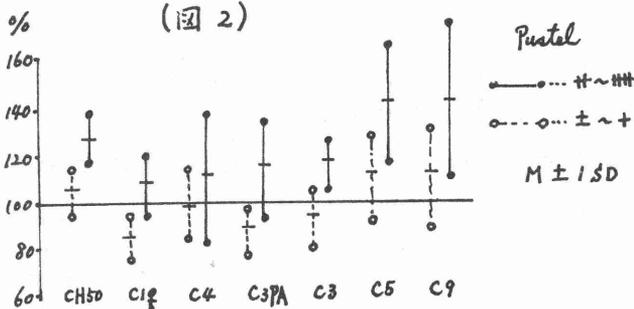
### まとめ

- (1) 本症皮膚局所病巣にはC4, C3など補体成分が検出された。
- (2) 本症の鱗屑痲皮には強力な補体抑制作用がある。
- (3) 血清レベルでCH50をはじめ, C1q, C4, C3PA, C3, C5, C9など各成分と皮膚病変との関連性を明らかにした。

(図1)



(図2)



(表)

皮膚の軽重と補体反応

皮膚	±	+	++	+++
CH50 unit/ml	±	+	++	+++
C1q %	-	-	-	+
C4 mg/ml	-	-	±	+
C3 mg/ml	-	-	-	+
C5 %	+	++	++	+++
C9 %	-	++	++	++
C3PA mg/ml	-	-	+	+++

## 25 乾癬患者における抗角層抗体について

浜松医科大学皮膚科教室 田上八朗, 岩月啓氏

### I. 目的

乾癬は全身に生ずる鱗屑を伴う紅斑性局面を臨床的特徴とし、組織学的には表皮の増殖と角化不全ならびに表皮内から角層に向う白血球の遊走を呈する慢性疾患である。この増悪時には肉眼的な角層下膿疱の形成も認められる。

これまで表皮細胞の異常増殖という面からのみ捉えられてきたが、この異常増殖の引き金としては白血球の遊走が関係している可能性が考えられる。さらに病変部角層には psoriatic leukotactic factor と呼ばれる強い白血球遊走活性をもつ物質が証明され、補体由来の anaphylatoxin (C3a, C5a) の存在が認められている。

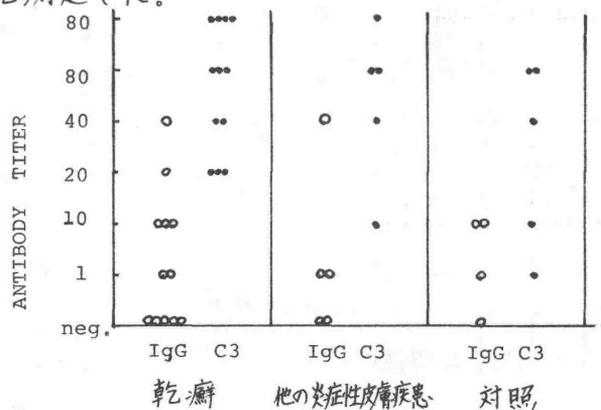
一方、角層は本来免疫的監視の外にあるため、どの人間にも抗角層抗体が証明できるが、Beutner らは乾癬の病変部角層にこの抗体の沈着を認め、これが補体を活性化して、特有の病変を惹起する可能性を示唆している。抗角層抗体は、どの人間にも証明できるとされているが、乾癬患者での抗体価はどうか、とくに補体結合性抗角層抗体の抗体はどうかについて調べるのが本研究の目的である。

### II. 方法

乾癬患者11名、他の炎症性皮膚疾患を有する患者5名、およびなにもそのような病変を持たないもの5名について正常皮膚の凍結切片を作製し、蛍光抗体間接法を施行した。血清は分離後24時間以内に、Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>含有PBSで稀釈し、抗原と反応させたあと、FITC標識抗ヒトIgG, IgM, IgA, C3の各抗血清と反応させ、抗体価を測定した。

### III. 結果

昭和55年6月20日までに12名、71名における検査結果を図に示す。IgA, IgMの抗角層抗体は陰性であったが、自分自身の角層に対するIgG抗角層抗体は13名で陽性であった。乾癬患者で20~40倍の



ものが2名ずつ認められたが、対照との差は明らかではない。

一方、C3結合性抗体の抗体価はIgG抗体価より高く、全例で陽性であった。しかも、乾癬患者ではいずれも20倍かそれ以上であり、やや対照に比し高い傾向が認められた。

#### IV. 考察

抗角層抗体、とくに補体結合性抗体は、乾癬病変の特有の変化の発症に関与していることがこれまで示唆されているが、わたしたちのこの研究結果からは、乾癬の患者に対照よりやや高い抗体価が認められたのみである。現在のところ、はっきりと抗体価の上昇が、病変の発症に結びついているということを云いうるほどの結果ではなく、むしろ局所の表皮の状態の要因などの果たす役割も無視できないと考えられる。今後症例数をふやし検討してゆきたい。

#### V. 文献

1) Tagami H, Ofuji S: Characterization of a leukotactic factor derived from psoriatic scale. Br J Dermatol 97:509-518,1977.

2) Beutner EH, Jablonska S, Darzabek-Chorzelska M et al: Studies in immunodermatology. VI. IF studies of autoantibodies to the stratum corneum and in vivo fixed IgG in stratum corneum of psoriatic scales. Int Arch Allergy appl Immunol 48:301-323,1975.

昭和大学第一内科

輯 啓司, 中嶋襄章 (高野病院  
免疫生化), 杉崎徹三

(目的) 我々は才16回補体シンポジウムに於いて SLE における補体の動態について報告した。SLE ではその補体の activation は殆んどが classical pathway であり properdin, factor B, の変動は amplification loop に関与するものと考えられた。SLE における B の変動は、その平均値はほぼ正常範囲であるが、上下のバウツキが激しく、活動期において低下するものが約50%であり、非活動期でも約20%に低下が見られるという。すなわち急性増悪期には低下するものと考えられているが、他方感染の合併したときには上昇すると報告されている。要するに、B は SLE において amplification loop の作動により低下する一方、Acute phase reactant として上昇すると推測される。

今回我々は acute phase protein の一つである CRP と血清補体成分の動態を SLE 及び RA 患者について比較検討を識みた。

(対象並びに方法) ARA の診断基準を満した SLE 20例 60検体及び RA 3例 20検体を対象とした。血清補体成分及び CRP の測定には  $-80^{\circ}\text{C}$  に冷凍保存した患者血清を用いた。測定には Laser Nephelometer (Hyland) を用い、抗血清は抗 C1q, C1s, C4, C3, C5, C9, factor B, Properdin, C1INA, C3bINA (Haechst, Iatron, Kent) を使用した。標準血清には QS 血清 (Haechst) を用い、これを 100% として算定した。

(結果) SLE 及び RA 患者血清では CRP と補体の相関は殆んどなかった。CRP の平均値は RA:  $4.63 \pm 3.68$  (mg/dl) SLE:  $2.88 \pm 2.75$  (mg/dl) で RA が SLE より高値であった。補体成分値を比較すると C1INA を除いて RA より SLE で低値であり、C4, C1s は著明な差を示した。(C4 は SLE:  $73.8 \pm 40.9\%$ , RA:  $196.9 \pm 41.8\%$ , C1s は SLE:  $66.6 \pm 33.2\%$ , RA:  $121.2 \pm 34.6\%$ ) SLE における CRP と補体の経時的変動を見ると、CRP 陰性患者では C4, C3, B は強い相関で変動し、臨床症状もこれらの値の負の相関を示した(図1)。CRP 陽性患者では C4, C3 の変動は相関するが、B とは相関せず、臨床症状は C4, C3 とのみ負の相関を示した(図2)。次に RA における

補体と CRP の変動を見ると C1q, C1s, C4, C3, B, C3bINA の変動には多少の相関を認めただ、CRP との相関は殆んど認められなかった。(図3)

(考察並びに結論) 活動性の RA では CRP の陽性頻度が高く、感染を伴わない活動性 SLE では CRP 陽性率は 4% であると報告されている。我々の症例でも SLE の活動性は C3, C4 等の補体成分との相関が高く、これらの補体成分 CRP との間には相関を認めない。従って SLE の病因と CRP との間には因果関係は存在しないものと推測される。しかしながら CRP には Classical pathway の activation を著明に増幅する働きがあり、Immune Complex disease である SLE を悪化させる可能性も推測され、CRP の陽性化を速やかに診断し、その原因を取り除くことが、SLE の治療に有意義と思われる。RA で血液中に immune complex の存在が証明されているが、補体の動態は SLE とは全く異なり immune complex を構成する抗原及び抗体が異なるためであろうと推測された。

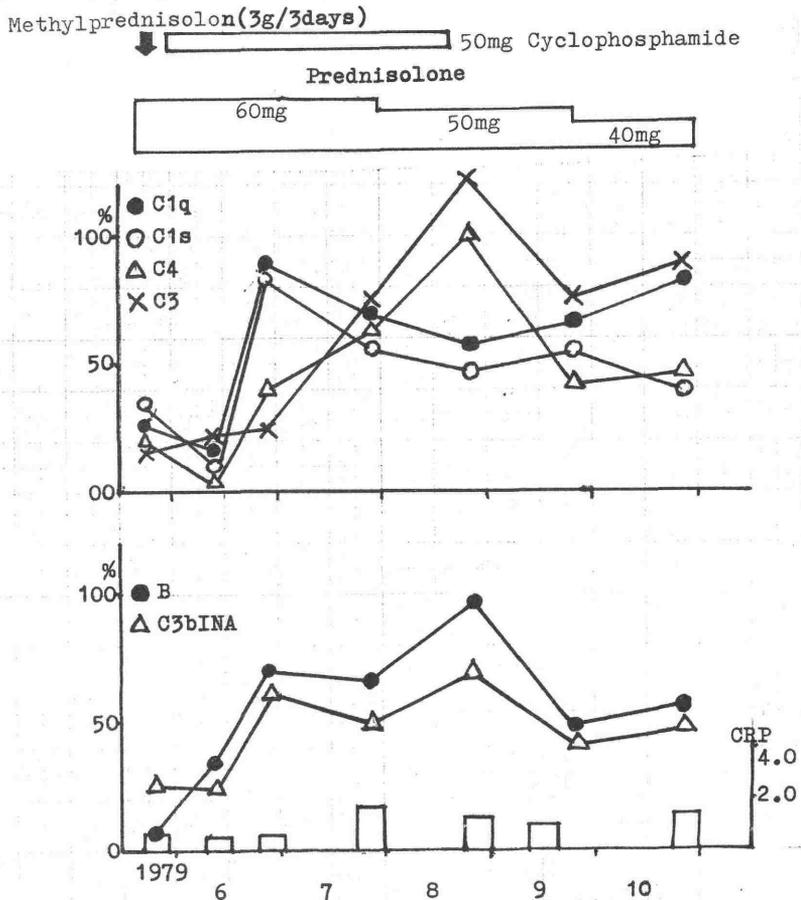


Fig1. Complement profile in a patient with SLE(CRP negative)

Prednisolone 60mg  
 Cyclophosphamide 60mg/day  
 40mg  
 35mg

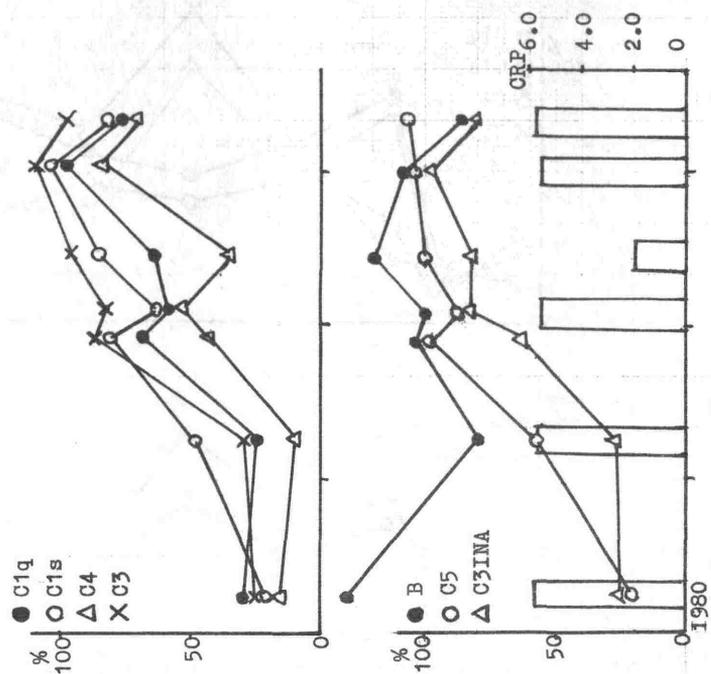


Fig2. Complement profile in a patient with SLE (CRP positive)

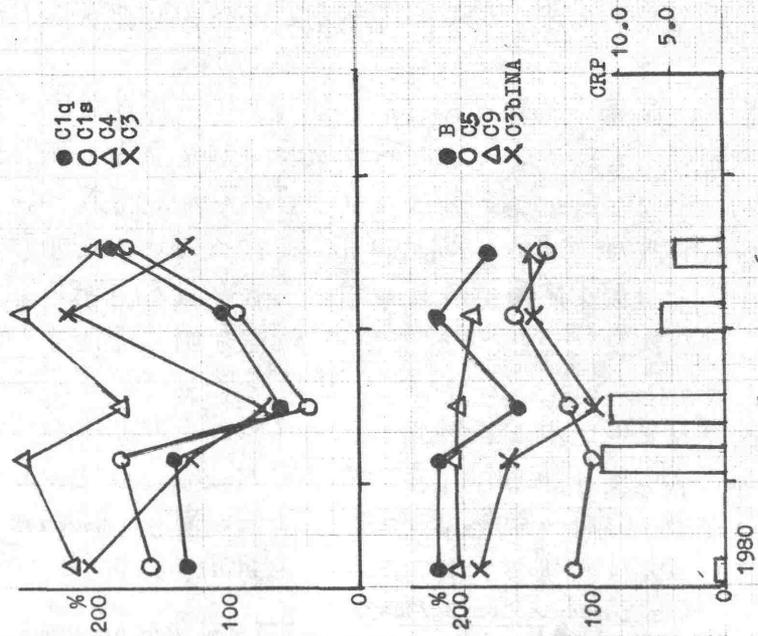


Fig3. Complement profile in a patient with RA.

○鈴木貴知\*、田中 忍\*、嶋田孝吉\*、河島敏夫\*\*、古賀道之\*\*  
 (\* 都臨床研、補体、\*\* 都立大久保病院)

従来、梅毒に関しては、抗体価の変動についての検討が広く行なわれてきたが、補体面からの研究は殆どなされていない。我々は梅毒に感染した患者の血清中にCRPが出現し、かつ加療に伴って減少することをすでに報告した。このCRPは炎症など組織変性の際に出現する急性期蛋白の一種であり、補体成分のうち特にC3やC5も同じ範疇に入るとされている。従って梅毒に於ても罹患時や加療時の患者血清中の補体成分の含量にはCRPと同様の变化が期待出来る。梅毒患者の加療に伴う血中のC3、C4含量の経時的変動について検討を行なったので報告する。

#### (材料と方法)

臨床的、あるいは血清学的に梅毒と診断された患者から、加療と共に経時的に採血した。得られた血清中のC3、C4含量を一次元免疫拡散法によって測定すると同時に、TPHA法、ガラス板法およびTPIA法によって、抗体価の変動を追跡した。(患者血清は、都立大久保病院皮膚科より供与を受けたものである。)

#### (結果および考察)

##### ①、加療後の抗体価の変動

アセチルスピラマイシン、あるいはバイシリン投与を受けた患者血清中の抗体価の変動を追跡した結果は、前回報告した如く、TPIA法、およびガラス板法による抗体価は著明な低下を示したが、TPHA法では、殆どの症例に於て、かなり長期間にわたって、その低下を認めることが無かった。

##### ②、血中C3、およびC4含量の変動

梅毒患者16例(顕症初期例4例、Ⅱ期例8例、再感染例2例、病期不詳例2例)について、血中のC3、C4含量の変動について追跡した。ヒト梅毒の場合には、対照とも言うべき感染前の血清を入手することが不可能なために、感染前後における比較は非常に困難なことである。しかしながら、C3、C4量とともに、正常人と比較した場合には、明らかな有意差とは言い難いが、高い値を示す傾向が観察された。加えて、患者血清中のC3量は、加療によって短期間で減少し、その後は正常域に向かって、ゆるやかに増加していくという現象も認められる。即ち、上述した16例に

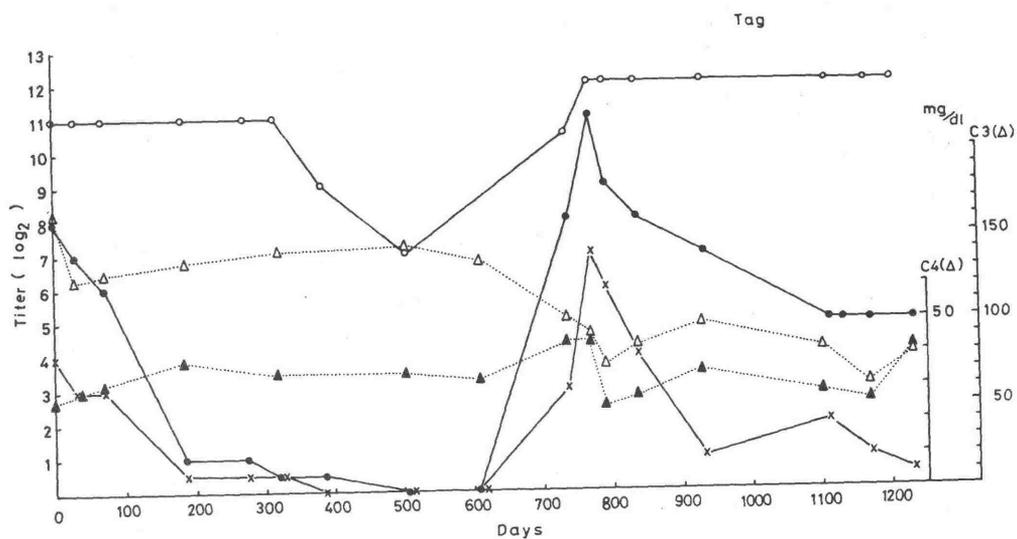
ついでに検討結果は、C3 および C4 とともに加療後の低下が認められたものが7例、C3 の低下は認められたが、C4 の変動の無かったもの3例、C3、C4 とともに変動が認められなかったもの2例、C4 のみ上昇傾向を示したものの2例、C3 が増加し、C4 は減少を示したものの1例、そしてC3 の上昇のみ観察されたものが1例であった。この様に、加療後にC3 が低下する現象は、16例中10例にも及び、注目すべきことであろうと考えられた。更に、この低下現象は、主としてIgM抗体を検出するTPIA法や、ガラス板法による抗体価の著明な減少と、期を一にしていることから、加療に伴うTPの死滅と大きな関連性を有するものと推定された。

ところで、C3と同様に急性期蛋白の一種であるCRPが、TP感染時に患者血清中に生ずることが報告されており、我々も本年度の細菌学会総会席上で、CRPが感染と共に上昇し、しかも、加療によって次第に減少してくることを報告した。また血中CRP量の減少は、加療による抗体価、特にTPIA価の減少と類似した動向を示すことを明らかにし、CRPの出現が、菌汚染部の炎症に由来するものであると考えられることから、TPIA法の治療効果判定法としての有用性を裏づける一つの傍証となるであろうと報告した。このCRPについては、classical pathwayで補体を活性化することが知られており、故に、血中のCRP量の変動と、C3およびC4含量の変動との間には、何らかの関連性が存在することが示唆された。そこで、これらの相関性を検討したところ、CRP量とC4量との間には相関性は認められないが、C3量との間には明らかな相関性が認められた( $r=0.85$ )。梅毒感染患者血清中の、加療に伴うC3、C4量の減少は、classical pathwayでの補体の消費を意味すると考えられるため、Jarish-helixheimer反応との関連性を暗示するものとも考えられる。

表1. 梅毒の病期と補体の変動

C 3	C 4	初	II	再	?	計
	↘	3	1	2	1	7
↘	→	1	2			3
	↗					
→	→		2			2
	↗		2			2
	↘		1			1
↗	→				1	1
	↗					

梅毒患者におけるC3, C4量の変動  
(顕症二期, 再感染例)



昭和大学第一内科

韓 啓司, 中嶋憲章(高野病院  
免疫生化学), 杉崎徹三

(目的) 異種細胞に対する最大の宿主防ぎ機構である免疫監視という概念が、移植片拒絶及び腫瘍細胞の認識と排除と云う機能を説明するのに用いられてきた。すなわち、リンパ球が宿主にとり非自己と認識した異種移植片又は癌細胞の認識と破壊を行う能力を有すと考えられている。腫瘍免疫におけるこれらの領域での研究の著しい進展は細胞性免疫反応に重点を置くこととなり、宿主反応における体液免疫の役割を無視する結果となった。近年補体が移植片拒絶及び腫瘍細胞の破壊に一定の役割をはたすことが知られてきた。

現在殆んど腫瘍細胞には腫瘍特異抗原が存在することが知られている。担癌動物の腎に immune complex を証明出来ることより、これらの宿主血清中には IC が存在するはずであると考えられている。担癌動物では補体価に変動のあることが知られ、未治療癌患者では低補体血症を呈することが知られており、その原因について研究がなされている。Old らによると腫瘍細胞がアロ抗体で感作されても腫瘍の成長は進行するが、これにモルモット血清を注射すると速やかに完全な腫瘍の排除が認められた。

以上のことより、癌患者における免疫監視機能の解析の一端として、血清補体の動態を検討することは有意義であると考えた。

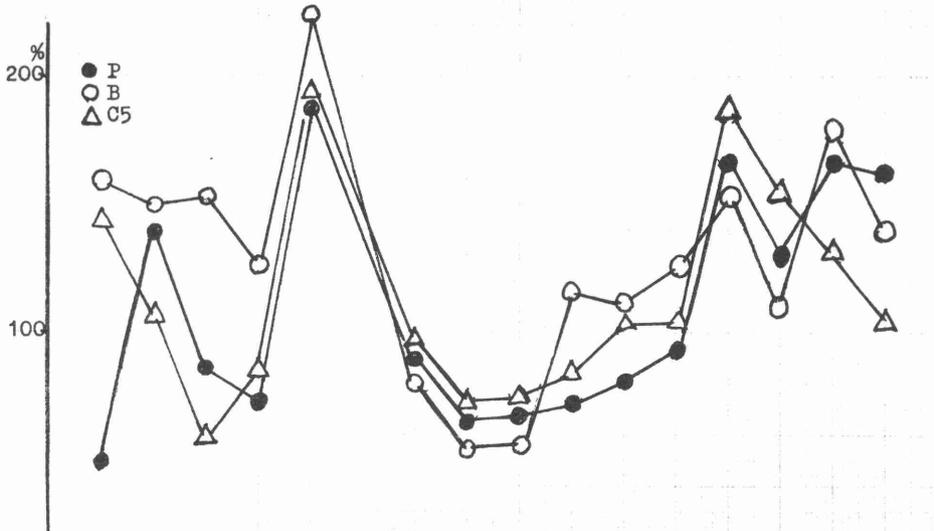
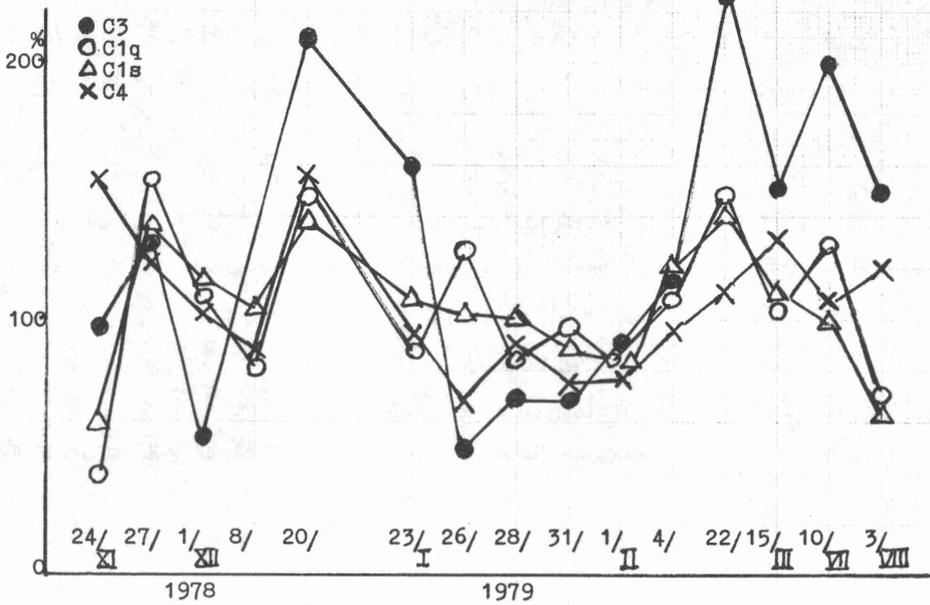
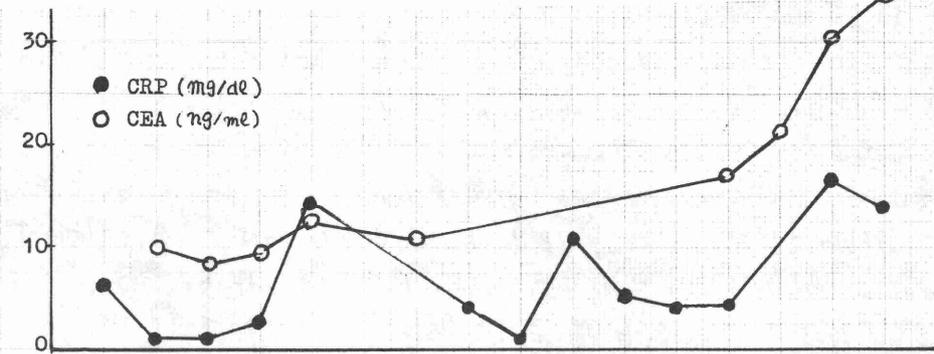
今回我々は病巣発見より死亡する迄経時的に観察し得た肺癌患者について血清補体、CRP、CEA等の動態を検討したので報告する。

(対象並びに方法) 臨床検査並びに手術により診断した肺癌患者7例について検討した。全例に 5Fu, PSK を投与した。尚全例2〜10ヶ月の経過で死亡しており、内2例は肺葉摘除手術を行った。経時的に採取した血清を  $-20^{\circ}\text{C}$  に冷凍保存し、補体成分、CRP、CEA を検索した。測定方法は、補体成分及び CRP は Laser Nephelometer 法により、CEA は S-W 法を用いた。測定には、抗 C1q, C1s, C4, C3, C5, C9, properdin, factor B, C1INA, C3bINA, C3a 血清 (Hoechst, Iatrom, Kent) を用いた。標準血清には QS 血清 (Hoechst) を使用し、これを 100% とし算定した。

(結果) 肺癌患者血清補体値は個々の症例でバラツキが大きい。各症例での経時的変動も激しく、発病初期において C1q, C1s, C4, C3, C5, C9, B, P, C3bINA の間にかんりの相関を認めるが、症状悪化し末期になると相関は乏しくなる。特に7例中5例で C3 と P の相関が著明であった。死亡直前の補体成分値は低下するもの、上昇するものがありバラツキが激しい。CRP は多くの症例で経過中上昇を認めたが、これには補体成分との相関を認めなかった。CEA は7例中3例陽性で2例は極く軽度の上昇を示し、他の3例は陰性であった。CEA 値と補体成分並びに CRP とは相関を認めず、又 CEA 陽性及び陰性患者間に補体値並びにその変動に差異は認められなかった。

(考察並びに結論) 以上の結果より肺癌患者では、特に発病初期では classical pathway の作動している可能性が推測され、全経過を通じて alternative pathway の関与している可能性がある。しかしながら、免疫監視機構として補体が腫瘍を排除出来る能力には限界があり、末期には補体成分が十分に存在していても機能出来ない状態になるものと推測される。これにはリンパ球の機能障害や blocking antibody, CEA 等の出現が関与しているものと考えられる。尚 CRP はその変動と症状が殆んど相関しないことより大部分は感染の合併により上昇するものと考えられるが、CRP が classical pathway の activation を増幅する機能を有すると考えられていることより、これに immuno-potentiater としての機能を期待出来るかと推測する。

Complement, CRP and CEA profiles in a patient with lung cancer



京都府立医科大学第一内科 田上広樹 村上正志 若松美和  
 古川泰正 渡辺幸一 西田康一 松村直幸 坂田忠弘 吉川敏一  
 横江信義 竹村周平 近藤元治

〔目的〕糖尿病患者において、血清補体価の測定は従来からなされ、高値を呈することが一般に知られているが、alternative pathway の活性を示すACH50の検討はなされていない。今回我々は多数例において、血清補体価(CH50)、補体成分の蛋白量ならびに、ACH50を測定し、補体の面から糖尿病の病態を検討した。

〔対象と方法〕京都府立医科大学第一内科糖尿病外来通院中の糖尿病患者170名について検討を加えた。補体classical pathwayの測定は、羊感作赤血球(EA)溶血を利用したMayer法に基き、また補体alternative pathwayの測定は、非感作ウサギ赤血球(RaE)の溶血による方法で行い、補体成分については、一元免疫拡散法を用いて、C1g、C4、C3、C5、C9、C3 activator (C3A)、C1 inhibitor (C1INH)の各蛋白濃度を測定した。

〔成績〕糖尿病患者において、1)血清補体価は $39.8 \pm 7.2$  CH50と健常成人の $33.3 \pm 3.6$  CH50と比べて高値を呈した(図1)。2)ACH50は、 $13.7 \pm 2.6$ と健常成人の $10.9 \pm 1.4$ と比べ著明な上昇を示した(図2)。3)補体成分蛋白濃度は、C1g  $123.8 \pm 14.7\%$  (健常成人 $101.4 \pm 10.5\%$ ) (図3)。C4  $32.5 \pm 8.8$  mg/dl ( $26.8 \pm 7.5$  mg/dl) (図4)、C3  $89.9 \pm 15.9$  mg/dl ( $72.7 \pm 9.0$  mg/dl) (図5)、C5  $136.5 \pm 33.2\%$  ( $101.2 \pm 28.5\%$ ) (図6)、C9  $157.0 \pm 63.0\%$  ( $99.9 \pm 25.0\%$ ) (図7)、C3A  $21.7 \pm 5.0$  mg/dl ( $15.2 \pm 2.5$  mg/dl) (図8)、C1INH  $42.8 \pm 11.2$  mg/dl ( $25.3 \pm 4.1$  mg/dl) (図9)と全て上昇を認めた。

4)合併症の面から検討を加えるために、以下のごとく糖尿病患者を分類した。まず腎障害の程度を尿蛋白(-)の群と、 $0.1$  g/dl以下の(±)の群、 $0.1$  g/dl以上の(+)に分類した。尿蛋白(-)群では、 $39.1 \pm 7.3$  CH50、(±)の群では、 $40.0 \pm 5.0$  CH50、(+)群  $41.8 \pm 8.0$  CH50 (図10)と腎障害の程度によりやや上昇傾向を示したが、有意の差は認めなかった。血管障害の程度は眼底所見によるScottの分類に従い分類し比較した。糖尿病性変化の認め

ない0群では、 $38.9 \pm 8.0$  CH50。Iの群  $42.1 \pm 7.4$  CH50。IIの群  $39.6 \pm 7.0$  CH50。IIIの群  $41.5 \pm 6.3$  CH50 (図1)。と血管障害の程度では特に差は認めなかった。次に糖尿病のコントロール状態をHbA<sub>1c</sub>を指標として分類し、各群を比較した。HbA<sub>1c</sub> 8.5%以下の群では  $37.5 \pm 10.2$  CH50。8.5%以上の群では  $39.4 \pm 6.5$  CH50 (図12)とコントロールの良悪による差は特に認めなかった。さらに血管障害との関連性が注目されているHDL-Chと補体価を比較した。HDL-Ch  $45\text{mg/dl}$ 以下の群においては、 $38.4 \pm 5.2$  CH50。  $45\text{mg/dl}$ 以上の群では  $38.5 \pm 9.7$  CH50と差は認めなかった。(図12)

〔考察ならびに結論〕従来から糖尿病患者において、血清補体価は高値を呈するといわれている。さらに血清補体価のみでなく、今回検討を加えた補体成分蛋白全てにおいて高値を呈した。また alternative pathway の活性を反映するといわれているウサギ血血球の溶血活性(ACH50)も著明な上昇を示した。糖尿病患者の高補体価並びに、補体成分蛋白濃度の上昇がいかなる機序に基づくものか、興味あるところである。その解明の急の一つのアプローチとして、糖尿病の状態を種々の面から検討を加えたいのである。糖尿病の合併症の有無、コントロールの良悪、さらにHDL-Chにつき検討したが、いずれも有意の差を認めなかった。またこの高補体価の状態が、生体特に糖尿病患者における易感染性を考えた場合に、それと代償する為に上昇しているのか、あるいは単なる炎症性反応物質としての上昇なのかの検討も望まれる。いずれにしても、現時点で糖尿病患者の高補体を理論づけるのは困難であるが、さらに検討を要する。

図1

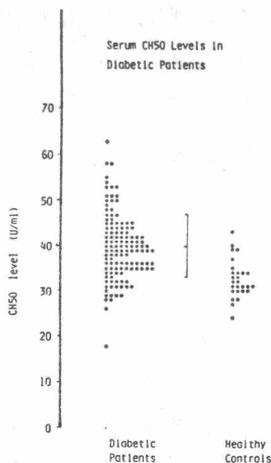


図2

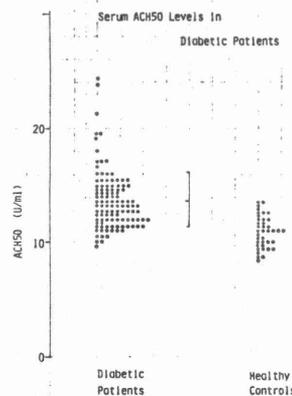


図3

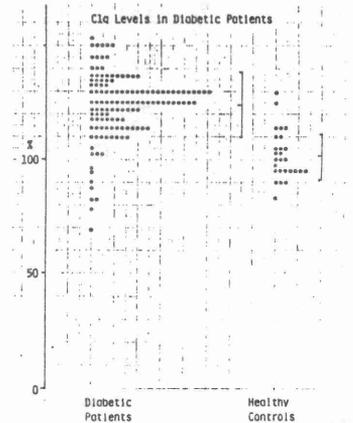


Fig 4.

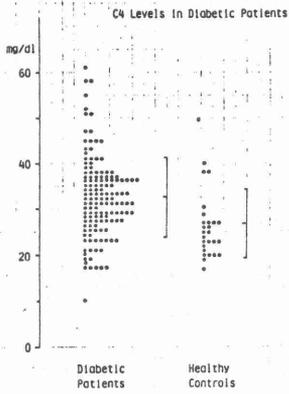


Fig 5.

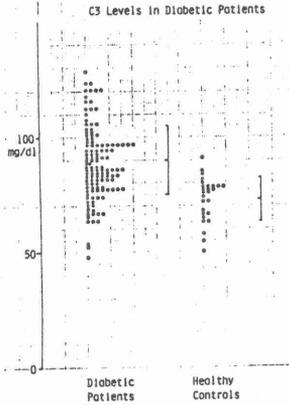


Fig 6.

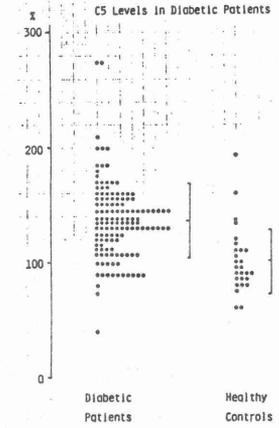


Fig 7.

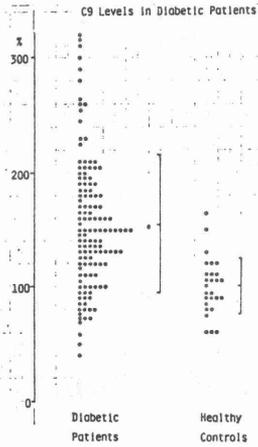


Fig 8.

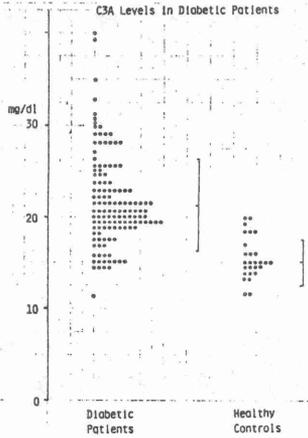


Fig 9.

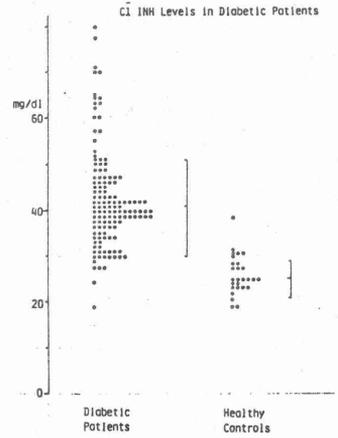


Fig 10.

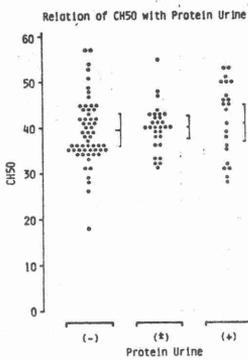


Fig 11.

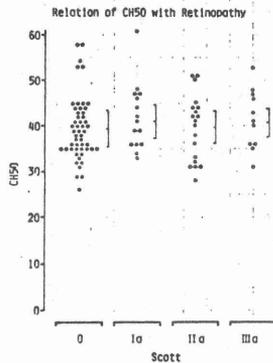
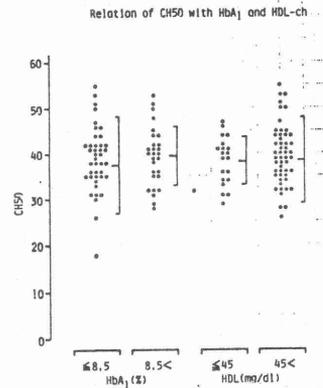


Fig 12.



松村直幸, 田上広樹, 西田康一, 坂田忠弘, 若松美和, 古川泰正, 渡辺  
 幸一, 横江信義, 竹村周平, 若川敏一, 辻藤元治 (京都府立医科大学 第  
 7内科) 岸田細太郎 (同 大学 微生物学教室)

▶ 目的 ◀ インターフェロン(IF)はウイルス感染症のみならず, 悪性  
 腫瘍の治療に有望とす臨床報告も多く, IFの臨床応用への期待は限り  
 なく大きい。一方, IFによる Natural Killers 活性の増強, マクロファージ  
 の異物食能の亢進, 癌芽細胞のK細胞への命比亢進, 抗体産生の増加  
 などのIFの持つ多彩な生物学的活性が報告されてゐる。また, 補体は殺  
 菌, 免疫作用をはじめとして生体の防禦機構に重要な役割を演じてゐる。  
 IF投与による血中の補体レベルの変動を調べることから, このIFの持つ  
 多彩な作用の解明に役立つものと考え, 種々の患者ならびに健康人へIF  
 を投与し, 経時的に血清補体価の変動を検討した。

▶ 対象と方法 ◀ 京都府立医科大学へ入院した, 病状の比較的安定してゐ  
 る種々の患者27名(悪性腫瘍4, 膠原病5および肝疾患1名)ならびに  
 健康人4名に, ヒト白血球IF(HLIF)5万単位/1回筋注投与(生食水  
 に溶解)を, また, 悪性腫瘍3名の患者にHLIF 500万単位/1回筋注投与  
 をおこなひ, そのほか投与ならびに投与後6, 12, 24, 48時間における  
 血清補体価(CH50)を採血後直ちにMayer法に従つて測定した。また,  
 コントロールとしてIF非投与の健康者10名に生食1mlを筋注投与し,  
 同様の検討をおこなつた。

▶ 成績 ◀ 1. IF非投与の健康者における血清補体価の変動 注射お  
 よび日内変動による補体の変動をみるため, 健康者10名に生食を注射し  
 , そのほか注射後, 6, 12, 24, 48時間におけるCH50の変動を調べた。  
 生食の注射によるCH50の変動は常に $\pm 5\%$ 以下の範囲内の変動を示す  
 ことが, ほぼ一見であった。2. HLIF 5万単位/回投与による種々の患  
 者ならびに健康者における血清補体価への影響 (1)悪性腫瘍 IFが投  
 与された4例のうち, 細胞内腫: 18 U/ml, 軟骨肉腫: 14 U/ml, 肺癌 14 U/ml  
 の3例では, とくに著明な上昇を呈した。大腸癌では5 U/mlであった。経  
 時的にみると, CH50の上昇は投与後24時間後著しい傾向があった。3.  
 (2)膠原病 多発性筋炎の7例では15 U/ml, ソウマ骨節炎: 7 U/ml, SLE  
 : 6 U/ml, 強皮症: 5 U/mlとCH50の著明な上昇がみられた。他の7例の  
 多発性筋炎では4 U/mlであった。経時的には投与後6~12時間後におい

昇が著明であった。Fig. 2 (b) 肝疾患 CH50は5U/ml以上の上昇がみられるのは2例中の2例のみで、他の症例ではCH50の上昇は軽度又は認められなかった。Fig. 3 肝疾患の中で、特に病名との関係は認められなかった。(c) 健康人 健康人ではCH50はそれぞれ5, 5, 5, 5U/mlと軽度の上昇傾向を呈した。Fig. 4 2. HLIF 500万単位投与による口清補体価への影響 肺癌、神経膠芽腫、神経星細胞腫の悪性腫瘍患者に例1F 500万単位投与後、経時的にCH50の変動を調べると、1F 5万単位投与時にみられるCH50の著明な上昇は認められなかった。Table 2.

▶ 考察 ◀ 1Fが発見された以来、臨床的にウイルス感染症や悪性腫瘍の治療に試みられており、その有効性が報告されてきた。1Fの抗腫瘍性に関する詳細な機序は不明であるが、これらについては *in vitro* での解析を中心とした基礎的研究がなされ、1Fの持つ多彩な生物学的活性が明らかになってきた。神経は抗体と見られる細菌の溶解や貪食を促進するだけでなく、抗体産生や細胞性免疫などに影響を及ぼし、生体防禦機構として重要な役割を演じている。また、神経の増殖による腫瘍抑制作用も数多く報告されている。我々はこれらについて、各種の免疫賦活物質の投与と口中神経価が上昇することを報告してきた。今回の検討は、少量のヒト白血球1Fの投与により、各種疾患患者および健康人の口清補体価が上昇することを認められた。とくに、悪性腫瘍や膠原病では肝疾患および健康人と比較して、神経価の上昇傾向が著明であった。このことが、1Fの生体増殖による影響が疾患により異なることを意味するのかもしれない。しかし、1Fその自体がその病態に関与していることを意味するのかわかり不明である。しかし、HLIF 500万単位の大量投与による悪性腫瘍の予例では神経価の上昇が認められた。ことことは、必ずしも *dose dependent* ではないことを示している。

以上、1Fによる神経価上昇の機序については現在のところ不明であるが、1Fの神経系への関与は新たに見いだされた1Fの生物学的活性の一つとして注目され、このことは1Fの持つ抗ウイルス性あるいは抗腫瘍性の発現と何らかの関連性を有する可能性が考えられる。

Table 1. Serum CH50 level in healthy controls as a result of the injection of normal saline solution.

Case	Name	Age	CH50 (U/ml)				
			Before	6	12	24	48(hrs)
1	M. M.	29	31	31	31	31	30
2	R. W.	30	31	31	32	31	32
3	N. M.	32	30	30	31	30	30
4	T. H.	33	29	30	30	30	29
5	S. T.	32	30	29	31	31	31
6	K. W.	32	27	27	27	27	27
7	Y. W.	31	36	36	37	37	36
8	T. Y.	33	42	43	43	42	42
9	M. T.	26	37	37	37	37	37
10	A. M.	36	31	30	31	30	30

Fig. 1. Serum CH50 level in four patients with malignant diseases as a result of the injection of  $5 \times 10^6$ U of human leukocyte interferon.

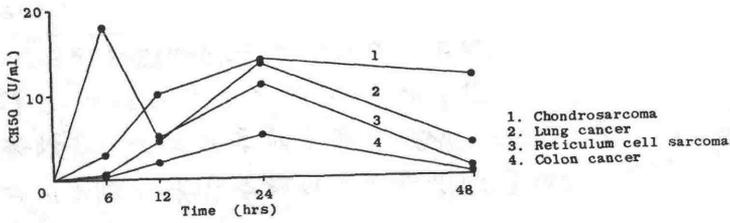


Fig. 2. Serum CH50 level in five patients with collagen diseases as a result of the injection of  $5 \times 10^6$ U of human leukocyte interferon.

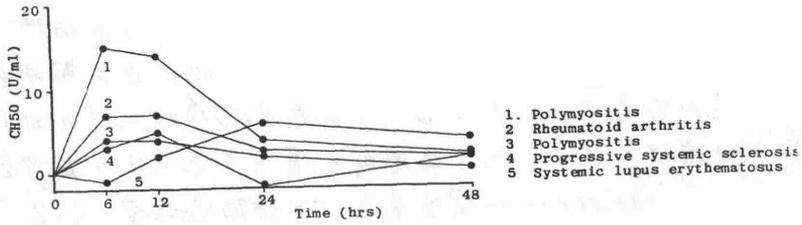


Fig. 3. Serum CH50 level in twelve patients with liver diseases as a result of the injection of  $5 \times 10^6$ U of human leukocyte interferon.

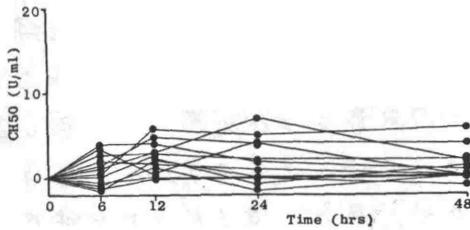


Fig. 4. Serum CH50 level in four healthy controls as a result of the injection of  $5 \times 10^6$ U of human leukocyte interferon.

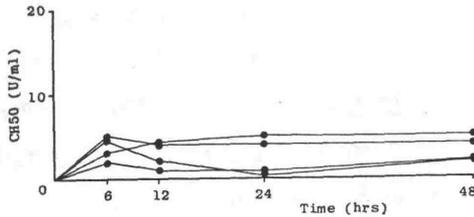


Table 2. Serum CH50 level in three patients with malignant diseases as a result of the injection of  $3 \times 10^6$ U of human leukocyte interferon.

Case	Diagnosis	Age	CH50 (U/ml)				
			Before	6	12	24	48(hrs)
1.	Glioblastoma	54	31	30	30	30	30
2.	Lung cancer	63	38	37	38	37	37
3.	Cerebral astrocytoma	16	36	36	36	35	35

〔目的〕 C<sub>1q</sub>は immune complex や変性免疫グロブリンに結合するのみならず、抗体が存在しない系でも細菌のLPSのLipid Aやある種の腫瘍ウイルスに結合して後続補体成分を活性化させる事が報告されている。ヒトC<sub>1q</sub>は分子内にヒドロキシアロリン、ヒドロキシリジンと大量のグリシンを含み、N末側の約半分がコラーゲン様三重らせん構造をとる事が明らかにされている。この様にC<sub>1q</sub>は特異的および非特異的宿主防御機構ならびに免疫病の病態修飾において重要な意義を持つだけでなく、コラーゲンとの関連性やその発生を含め蛋白質化学上においても極めて興味をさそふものであり、その分子構造と生物学的機能を検討するために ヒト以外の動物のC<sub>1q</sub>を純化し、ヒトC<sub>1q</sub>分子との異同の解析を試みた。

〔方法〕

(1) C<sub>1q</sub>の純化：新鮮ウシ血清より、EGTA沈殿、ゲルろ過、DEAE-セファデックスとCM-セルロースにより純化した。各段階でのC<sub>1q</sub>の回収率は抗ウシC<sub>1q</sub>抗体を用いた単純免疫拡散法で調べた。

(2) 最終C<sub>1q</sub>標品の純度の検定：SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動および抗ウシ全血清抗体を用いた免疫電気泳動法で行なった。

(3) アミノ酸および糖組成分析：純化C<sub>1q</sub>標品を6N HCl 110°Cで24時間および48時間加水分解を行なったものをアミノ酸組成分析に、1N HCl, 100°Cで1時間、4時間および10時間加水分解を行なったものを糖組成分析に用いた。なおトリプトファンは分光光度計で、システインはシステイン酸として、シアリ酸はWarrenの方法で測定した。

(4) 吸光係数およびN含量の測定：C<sub>1q</sub>標品を水に完全に透析した後凍結乾燥し、さらにデシケーターで定重量迄乾燥した標品を用いて行なった。

(5) C<sub>1q</sub>溶血活性の定量：感作血球(EA)とC<sub>1q</sub>標品でEAC<sub>1q</sub>4を作製後ヒトC<sub>1q</sub>およびC<sub>1s</sub>を加えEAC<sub>14</sub>とする。洗浄後モルモットC2とモルモットC-EDTAと逐次反応させ溶血度を413nmでの吸光度で測定した。

(6) C<sub>1q</sub>標品の構造解析：純化C<sub>1q</sub>を10mMヨード酢酸アミドを含む8M尿素に終夜透析を行ない非共有結合サブユニットを、8M尿素存在下に還元アルキル化して共有結合ペプチド鎖を得た。これらの解析はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で行ない、非共有結合サブユニットと共有結合ペプチド鎖の相互関連性は、調製用SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて相互

に分離した非共有結合サブユニットを逐次還元アルキル化して解析を行った。

〔結果〕

(1) Cl<sub>g</sub>の純化と最終標品の純度：10 mM EGTA (pH 7.5) への終夜透析で得られる原血清蛋白量の約1.3%に当る沈殿にはCl<sub>g</sub>の約84%が含まれていた。これを素材料としてセファローズ6B, DEAE-セファテックスおよびCM-セルローズで純化した最終Cl<sub>g</sub>標品の回収率は約25%となった。この最終Cl<sub>g</sub>標品は、ウシ全血清に対する抗体を用いた免疫電気泳動でslow & regionに唯一の沈降線を生じ、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分子量約407,000の均一なバンドを示した。

(2) アミノ酸および糖組成：ウシCl<sub>g</sub>は大量のグリシンとヒドロキシリジンおよびヒドロキシアロリンを分子内に含み (Table. 1)、糖として大量のガラクトースとグルコースの他、少量のマンノース、グルコサミン、フコースとシアル酸を含む事 (Table. 2) が示された。

Table 1. Amino acid composition of Cl<sub>g</sub> residues/1000

Hyp	44.5
Asp	71.0
Thr	60.2
Ser	66.9
Glu	96.5
Pro	54.5
Gly	164.7
Ala	40.0
Cys	17.5
Val	63.4
Met	16.3
Ile	41.0
Leu	50.6
Tyr	38.2
Phe	45.3
Hyl	19.9
Lys	41.4
His	20.5
Arg	42.1
Trp	5.6

Table 2. Carbohydrate composition of Cl<sub>g</sub> weight %

Fuc	0.23
Man	0.78
Gal	3.67
Glc	2.83
GlcNAc	1.13
GalNAc	trace
NeuNAc	0.26
Total	8.90

(3) 吸光係数およびN含量：ウシCl<sub>g</sub>は、紫外部吸光スペクトルで278nmに最大吸光を持ち、280nmの吸光係数 (A<sub>1cm</sub><sup>1%</sup>)は、 $7.3 \pm 0.12$  であり %Nは14.8 ± 0.58%であった。

(4) 溶血活性：純化Cl<sub>g</sub>標品は  $3 \times 10^{13}$  effective molecules/mg の溶血活性を示した。

(5) 分子内ペプチド鎖構造：非共有結合サブユニットおよび共有結合ペプチド鎖はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動でそれぞれ分子量46,000と45,000の2本のバンドおよび分子量23,600のバンドと22,200の中の広いバンドを生じた。尿素で変性後逐次還元アルキル化すると分子量46,000のサブユニットからは分子量23,600と22,200のペプチドが、分子量45,000のサブユニットからは分子量22,200のペプチドのみが生じた。デンストメーターによる比からこれらのサブユニットとペプチド鎖の相互関係はヒトCl<sub>g</sub>に見られるものと同であった。

〔考察〕ウシCl<sub>g</sub>は分子量約407,000の糖蛋白であり、ヒトCl<sub>g</sub>と本質的に同一のペプチド構造をとるものと考えられる。わずかな違いは、ヒトA、B、およびC鎖より似かよった分子量の3種のペプチド鎖から成り立つことおよび

び分子内アスパラギン結合糖鎖にガラクトース含量が多く、シアル酸量が少ないと思われる事である。これらの分子構造の差がIgGをcoatしたLatex粒子の凝集能や細菌由来のコラゲナーゼへの感受性の差として表現されるかもしれない。

東北大 抗研究疫 清野 仁, 奥田 智子, 橋 武彦

ヒト C1 は 3 つの subcomponent  $C1q$ ,  $C1r$ ,  $C1s$  が  $Ca^{++}$  を介して結合した高分子蛋白質複合体として存在しており、各 subcomponent は精製され、その分子量や分子構造などが明らかにされている。最近になり、他の動物ラビットやラットなどにおいても C1 の各 subcomponent の存在が確認され、精製が試みられている。しかしマウス C1 に関しては、我々が本シンポジウムにおいて  $C1q$  の存在を報告しただけである。

今回、我々はマウス  $C1q$  について新たな知見を得、更に  $C1r$  と  $C1s$  の存在も確認できたので報告する。

### 〈方法〉

1)  $C1q$  の精製法及び測定法は第 15 回補体シンポジウムで報告した。即ち IgG Sepharose, DEAE Sepharose, CM cellulose, ACA 22 にて精製し、活性はラテックスグロブリン液の凝集能と溶血活性で測定した。

Table I Assay of  $C1r$  and  $C1s$

	EAC4 <sup>a)</sup>	EAC1q <sup>b)</sup>	EAC1q + $C1s$ <sup>c)</sup>
$C1r$ assay		-	+
$C1s$ assay	+	-	

- a)  $C1qrs$      $C1rs$                      $C1s$   
 b)  $C1qrs$      $C1rs$   
 c)  $C1qrs$      $C1rs$      $C1r$

2)  $C1r$  及び  $C1s$  の溶血活性の測定 (Table I)

は EAC4, EAC1q を intermediate cell として用いて行なった。

即ち、a) EAC4 で測定できるものは  $C1qrs$ ,  $C1rs$ ,  $C1s$  の 3 種で、b) EAC1q で測定でき

るものは  $C1qrs$  と  $C1rs$  であることから b) が (-) で a) が (+) であるものは  $C1s$  assay、同様 b) が (-) で c) が (+) であるものは  $C1r$  assay となる。

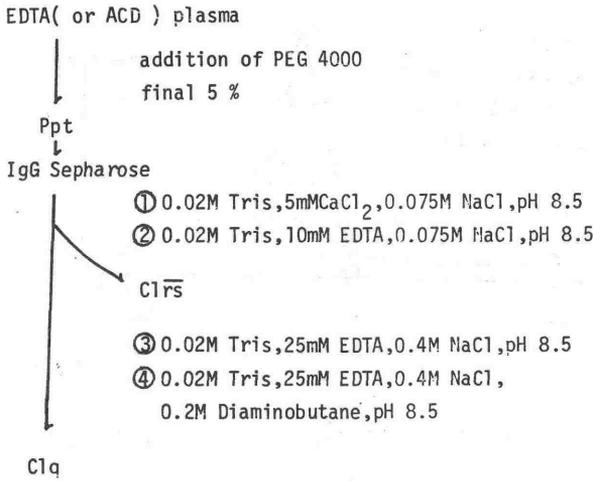
3) SDS PAGE は (a) 0.1% SDS, 0.5M 尿素を含む 5% ポリアクリルアミドゲルと 0.1% SDS, 0.5M 尿素を含む 0.05M リン酸緩衝液 pH. 7.2 を用いる系と (b) (a) の系から尿素を除き 3.75% ポリアクリルアミドゲルを用いる系の 2 種を行なった。

### 〈結果及び考察〉

1) マウス  $C1r$ ,  $C1s$  の確認

ヒトの場合、IgG Sepharose (Fig. 1) の緩衝液 ② で  $C1rs$  complex が ④ で  $C1q$  がそれぞれ溶出されることが知られている。マウスにおいても緩衝液 ④ で

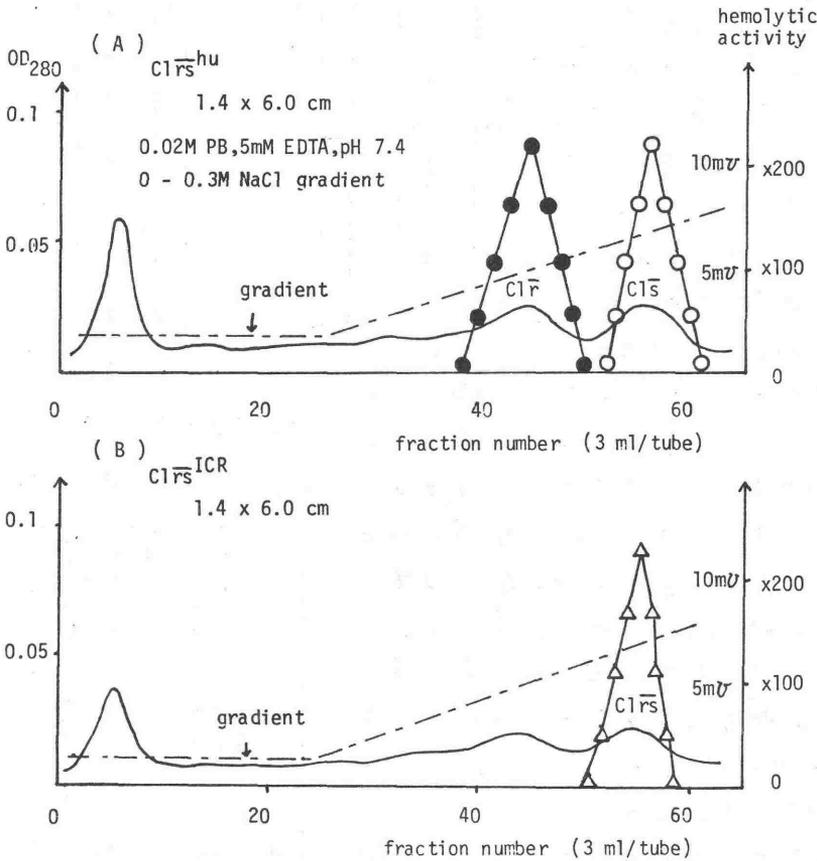
Fig.1 Purification of Clq and C1rs



C1qが溶出されることは既に報告したが、同様に緩衝液②でヒト C1rs complex に相当する活性が得られた。即ち C1q<sup>hu</sup>, C1q<sup>mo</sup> とマウスの②溶出部分を合わせることによって始めて EA により C1活性が測定できた。更に C1q<sup>hu</sup>, C1q<sup>mo</sup> と C1rs<sup>hu</sup> とも同様の活性を示し、C1q と C1rs はマウスとヒトで互いに compatible であることがわかった。

次にマウス C1rs より C1r と C1s を精製する際は DEAE Sepharose

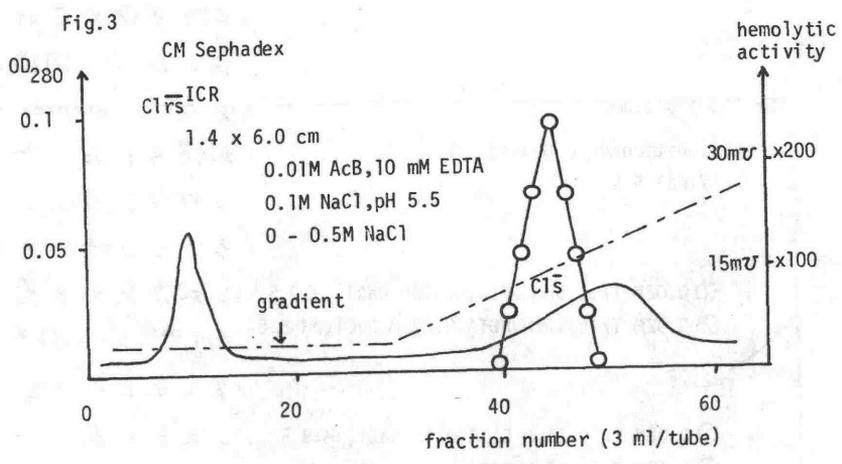
Fig.2 DEAE Sepharose



を行なった(Fig.2) ヒトの場合(A) C1rs は C1r と C1s に分離できたがマウスではヒト C1s が溶出される部位に C1rs complex として溶出された。次に CM Sephadex を用いてマウス C1r, C1s の分離を試みた(Fig.3)。食塩濃度を上昇することにより、C1rs 活性をもたない C1s が溶出された。このクロマトで C1r の活性は測定できなかった。

したが、C1rs から C1s を分離できたことは C1r の存在を示すものと考えられた。C1s 部分は更に DEAE Sepharose で精製した。

ヒトとマウス  
 $C1r^s$  は SDS  
 PAGE (Fig.4)  
 で全く同じ分  
 子量をもつこ  
 とが示された。



2) マウス  $C1r$  の検討

SDS PAGE 上マウス  $C1r$  はヒト  $C1r$  とは異なり 3本の band が認められる (Fig.6) ことは既に報告した。この3本の band のうち II が夾雑物である可能性も考えられ検討を加えた。先ず、米増らの方法でもマウス  $C1r$  を精製したが、やはり同様の結果が得られた。更に  $C1r$  と親和性をもつ DNA の可能性も考えられ DNase で処理したが II の band は消失しなかった。又数系統のマウスにおいても同様の  $C1r$  が得られた。尿素を含まない 3.75% ゲルを用いた SDS PAGE (Fig.5) ではヒト、マウスとほぼ同じ約 400,000 の分子量をもつ一本の band が得られた。これらの結果からマウス  $C1r$  はヒト  $C1r$  とは異なる構造をもつことが強く示唆された。更にマウス系統間で SDS PAGE (Fig.6) 上 II, III の分子量が異なることがわかった。即ち ICR と C3H が同じで、それぞれ 58,000, 53,000 であるのに対し DDI では 55,000 と 50,000 であった。このことはマウス  $C1r$  にアロタイプが存在する可能性を示しており、現在検討中である。

Fig.4 SDS PAGE (a)

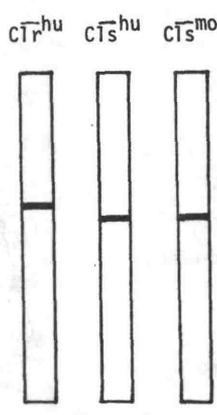


Fig.5 SDS PAGE (b)

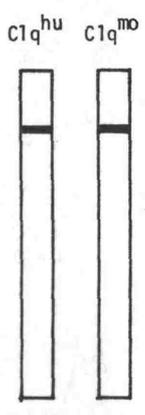
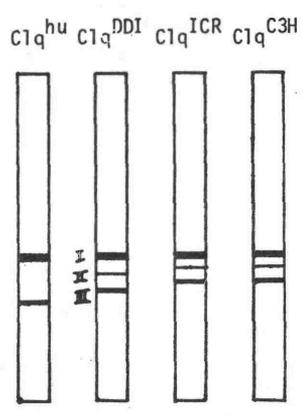


Fig.6 SDS PAGE (a)



目的] 補体成分C3は補体成分のなかでは最も多彩な生理活性を示す蛋白質である。C3は $\alpha$ 鎖(分子量11万)と $\beta$ 鎖(分子量7.5万)の二本鎖構造をし、C3コンバルターゼにより $\alpha$ 鎖のN末側77~78番目のArg-Ser結合が限定水解をうけ、C3a(分子量8千)とC3b(分子量18万)とに切断される。C3bには短寿命な膜結合活性が発現し、細菌膜表面等に結合する。

近年、C3bの膜結合反応に関する研究が活発になり、これまでに、i) C3分子中にチオールエステル結合がありC3の活性化に伴ってチオールエステル結合も切断されること、ii) チオールエステル結合の開裂により、新たに生成したカルボキシル基が膜表面の水酸基とエステル結合を形成することが明らかにされた。しかし、いまだにチオールエステル結合を構成するアミノ酸残基の性質やポリペプチド鎖中の位置などについては明らかでない。

演者らは、C3を中性のpHで加熱するだけで、i)  $\alpha$ 鎖が分子量8万と3万のポリペプチド鎖に切断されること、ii)  $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖間のS-S結合の開裂が同時に起こること、を発見した。通常のペプチド結合は加熱処理だけでは切断されないことから、この知見はC3の $\alpha$ 鎖中に反応性の高い特異なペプチド結合が一ヶ所存在することを示唆する。

本研究は、この特異なペプチド結合の諸性質ならびに膜結合性カルボキシル基との関連性を検討し、C3の構造と活性との相関性を明らかにしようとするものである。

実験方法] C3<sup>1)</sup>、C3b IMA<sup>2)</sup>、pHはヒト血漿からそれぞれ既報の方法により精製した。

ポリペプチド鎖の分析: C3を種々の条件下、または試薬処理後、SDS存在下に加熱処理し、ポリペプチド鎖の構造変化をLaemmliらの方法<sup>3)</sup>によるSDS-Disc PAGEで解析した。

### 結果および考察]

#### i). C3の加熱処理条件の検討

C3をpH7~9の条件下で加熱すると、5分以内に $\alpha$ 鎖の限定水解が観察され、分子量8万と3万のフラグメントが $\alpha$ 鎖の減少に伴って増加した。(図1)。1% SDS存在下でも加熱処理による切断が認められたが、C3をメタノールで還元した後では加熱処理による切断は認められな

った。

温度も $50^{\circ}\text{C}$ 以上になると切断反応が速かになり、 $80^{\circ}\text{C}$ 以上が至適な条件であった。

### ii). 種々の化学試薬の影響

C3をDFP、トランジロール、ロイペロチン、アンチパイニン、キモスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤で前処理して加熱分解を行なったが阻害剤の影響はみられなかった。また、EDTAのようなキレート剤も反応を阻害しなかった。これらの事実と至適温度が $80^{\circ}\text{C}$ 以上であることを考慮すると、プロテアーゼの混入によってC3の分解反応が起きたとは非常に考えにくい。

C3の補体活性を非可逆的に失活させるヒドロキシルアミンやメチルアミンでC3を前処理すると、加熱処理によるC3の切断は認められない。また、C3コンバーターで活性化したC3bも加熱処理による切断反応は認められない。アミン試薬やC3コンバーターで処理したC3のチオールエステル結合を開裂させることが知られている。したがって、この結果は、C3の $\alpha$ 鎖上にチオールエステル結合の保持されていることが加熱処理によるペプチド結合の切断のために伸縮であることを強く示唆している。

おそらく、C3の $\alpha$ 鎖上のある特定のペプチド結合がチオールエステル結合と共役して著しく励起された状態になり、中性のpH条件下で加熱するだけで容易にペプチド結合の切断をおこすものと考えられる。

一方、DTNBでチオール基の定量を行うと、加熱処理によって5分以内にC31分子につき1個のチオール基が新たに出現した。SH保護試薬のモイヨード酢酸存在下にC3を加熱処理すると、 $\alpha$ 鎖の限定水解はおこるが、 $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖間のS-S結合の開裂はおこらない。このことはチオールエステル結合の開裂に由来するチオール基が、 $\alpha$ 、 $\beta$ 鎖間のS-S結合と交換反応をおこすことにより、 $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖が開裂したことを示唆する。

C3bは血清中でC3bINAと $\beta_1\text{H}$ の作用により限定水解をうけ、 $\alpha'$ 鎖が7万と3万とに切断されたC3b'に存在することが知られている。加熱処理により限定水解されたC3<sup>H</sup>とC3b'のポリペプチド鎖構造は良く似ている(図2)。C3<sup>H</sup>の $\alpha$ 1鎖はC3b'の $\alpha$ 1鎖より約800ほど分子量が大きい。これは丁度C3<sup>a</sup>の分子量に相当する。したがって加熱処理もC3bINAも $\alpha$ 鎖上の同一のペプチド結合を切断している可能性が高い。C3<sup>H</sup>の $\alpha$ 2鎖の方がC3b'の $\alpha$ 2鎖より少し分子量が大きい。これはC3bINAによる $\alpha$ 2鎖の二次的切断がおこったためとして説明できる(図3)。

C3bINAの作用機構や特異性解明は補体制御機構における深い問題の一つであり、現在、このペプチド結合の同定を進めつつある。

図1. C3加熱分解及応の経時変化 (10% SDS-DISC PAGE).

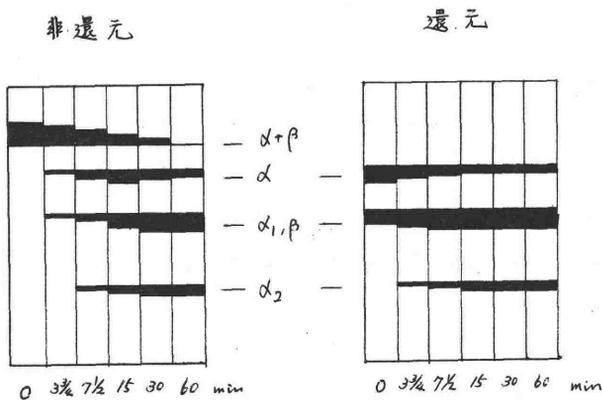
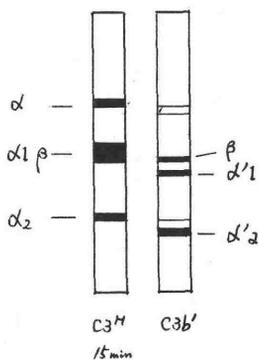


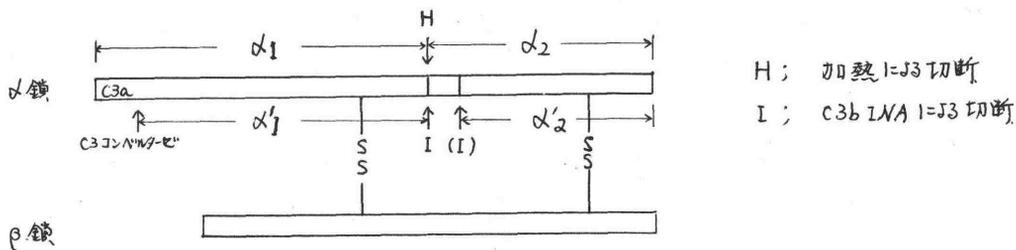
図2. 加熱分解した C3 (C3<sup>H</sup>) と C3b' の  
ペプタード鎖構造の比較  
(10% SDS-DISC PAGE, 還元)



文献]

- 1) S. Nagasawa, R.H. Shand  
Immunochimistry 1977 Vol 14 749-754
- 2) Laemmli U.K  
Nature 1970 227. 680-685

図3. C3<sup>H</sup> と C3b' の模式図



目的] C4<sub>c</sub>-C1(C1S)により C4<sub>a</sub>+C4<sub>b</sub> に限定水解されると, C4<sub>b</sub>フラグメント分子上に結合部位が励起され, C4<sub>b</sub> は免疫複合体などに結合する。免疫複合体上の C4<sub>b</sub>を核として C3コンバーター位の活性化反応が進行するところから, 免疫複合体と C4<sub>b</sub>の結合反応は古典的経路の活性化にとって重要な反応と云える。しかし, C4<sub>b</sub>分子上に励起される結合部位は非常に短寿命のため, その化学構造等に関する知見は殆ど得られていない。

一方, C3b分子上に励起される短寿命の膜結合活性部位に関する研究が近年急速な進展を遂げ, i) C3の側鎖構造に4オルエステル構造が存在すること, ii) C3の活性化にともなって4オルエステル結合が断裂されること, iii)遊離したカルボキシル側鎖が膜上の水酸基との間にエステル結合を形成することなどが明らかになった。さらに, C3の非可逆的失活誘発剤であるアルキルアミン類がこの4オルエステル結合を切断すると同時に, 新たに遊離したカルボキシル基と共有結合を形成することも明らかになった。

C4もC3と同様に, アルキルアミン処理により失活するところから, C4分子上にもC3と同様な反応性の高い4オルエステル結合の存在する可能性が高い。今回, 筆者らはC4とメチルアミンの結合反応を解析し, i) C4のα鎖上にアミン結合部位が1ヶ所存在すること, ii) アミン結合活性はC4の特有な分子構造と関係していること, iii) アミン結合 C4はC4<sub>b</sub>と同様に C3bINA で限定分解をうけ C4<sub>c</sub>+C4<sub>d</sub> に切断されることを応用し, C4<sub>d</sub>フラグメント上にメチルアミン結合部位の存在することを明らかにしたので報告する。

実験方法] C4<sup>1)</sup>, C1S<sup>2)</sup>, C3bINA<sup>3)</sup>, 高分子エポキシ樹脂(MCF)<sup>1)</sup>はヒト血漿からそれらの既報の方法により精製した。

C4に結合したメチルアミンの定量: C4にモル比で 800 倍の <sup>14</sup>C-メチルアミン (40.4 mCi/mmol) を pH 8.0, 37°C で反応させ, 経時的に一定量 SDS-PAGE で分離し, 染色ゲル上の C4バンドを切断し, 液体シンチレーションカウンターで C4に結合したメチルアミンの放射活性を測定した。C1Sを活性化した C4<sub>b</sub>についても同様に <sup>14</sup>C-メチルアミンとの結合活性を測定した。

SDS-PAGE は Fairbanks<sup>4)</sup> の方法により行った。

### 結果]

C4とメチルアミンの結合反応: C4と <sup>14</sup>C-メチルアミンを 37°C で 44時間反

示せば、表 I に示したように、  
 C4 ( $5.8 \times 10^{-11}$  mol) に 4686 cpm の  $^{14}\text{C}$ -メチルアミンが結合していった。これは、  
 メチルアミン  $5.8 \times 10^{-11}$  mol に相当し、  
 C4: メチルアミンが 1:1 のモル比で結合したことを意味している。一方、  
 同じ条件下で C4b と  $^{14}\text{C}$ -メチルアミンを反応させた場合には、殆どメチルアミンの結合は見られず (0.06 モルメチルアミン / モル C4)、メチルアミンの結合反応には C4 に固有な分子構造が必須であることを示唆している。

メチルアミン処理した C4 を還元後、SDS-PAGE にかき  $\alpha, \beta, \gamma$  鎖に分離し、各ポリペプチド鎖の放射活性を測定した。その結果、メチルアミンは  $\alpha$  鎖とのみ結合していることが明らかになった (表 I)。このような結果は C4 の  $\alpha$  鎖上にメチルアミン結合部位が 1ヶ所存在していること、その結合部位は C4  $\rightarrow$  C4b の活性化に伴う分子構造変化により失活していることを示唆している。

メチルアミン結合部位の解析: C3bINA は高分子性のエフアグラーゼ蛋白質 (MCFを略、C4b と同じ) の共存下に、C4b の  $\alpha'$  鎖を 2ヶ所限定水解し、C4c (分子量 15万) と C4d (分子量 4.5万) の 2 フラグメントを生産する。従って、メチルアミン処理した C4 を C4b とほぼ同じ速さで C3bINA + MCF により限定水解を行う。C4c + C4d に切断されることを見出した。そこで、この反応を用いて、 $^{14}\text{C}$ -メチルアミンの結合部位を解析した。 $^{14}\text{C}$ -メチルアミン処理した C4 を C3bINA + MCF により限定水解し、経時的に SDS-PAGE で分離し、C4c, C4d バンドの放射活性を測定した。図 1 の結果から C4d フラグメントにメチルアミンの結合していることが明らかになった。

表 I C4, C4b に結合した  $^{14}\text{C}$ -メチルアミン量

放射活性 (cpm)			
C4	4684	C4b	272
$\alpha$	3554	$\alpha'$	251
$\beta$	166	$\beta$	27
$\gamma$	44	$\gamma$	46

\* C4, C4b ( $5.8 \times 10^{-11}$  mol) を  $1 \mu\text{Ci}$  の  $^{14}\text{C}$ -メチルアミンと 44 時間  $37^\circ\text{C}$  で反応後、SDS-PAGE で分離し、放射活性を測定

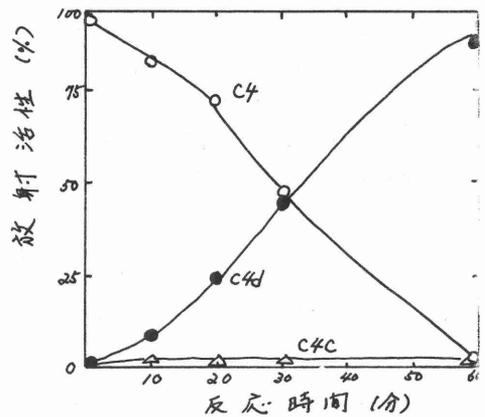
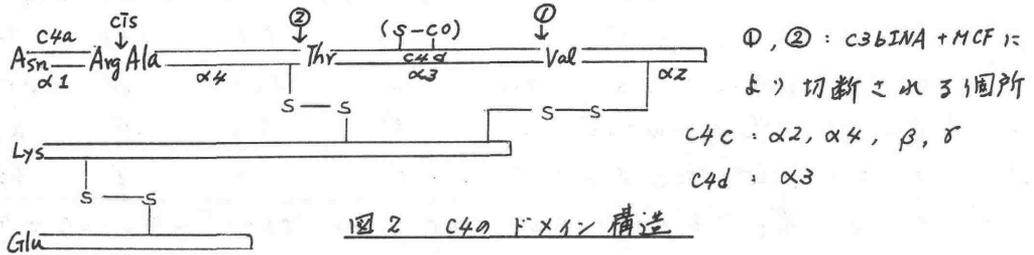


図 1.  $^{14}\text{C}$ -メチルアミン-C4 複合体の C3bINA による限定水解

C4のドメイン構造: 先に漢者らはC4bがC3bINA+MCFの作用により、中間体C4b'を経てC4c+C4dに限定水解されることと報告した。C4c, C4dのN末端アミノ酸の分析結果から推定されるC4のドメイン構造を図2に示した。



考察]  $^{14}C$ -メチルアミンを用いた同位体実験により、C4分子中にアミン結合部位が1ヶ所存在することを確認された。C4と結合したメチルアミンはSDS, 尿素, キルカマトエタノール処理によって分離できない。これは、メチルアミンがC4と共有結合を形成したことを示唆している。通常のアミノ酸側鎖はメチルアミンと共有結合を形成しないこと、さらに、C4bはメチルアミンと結合しないことなどは、C4分子中に反応性の高い特異なカルボキシル基が1ヶ所存在し、C4 → C4bの分子変化により反応性を消失することを示唆している。

還元した $^{14}C$ -メチルアミン・C4複合体のSDS-PAGEにより、メチルアミンは $\alpha$ 鎖に結合していること、さらにC3bINA処理により $^{14}C$ -メチルアミン結合部位がC4dドメイン上に位置していることが明らかにされた。

C4bはC4dドメインを介して免疫複合体に結合することが多くの研究者により示唆されている。免疫複合体との結合活性を消失したC4bはメチルアミン結合活性も消失していた。この実験結果はC4dドメイン上のアミン結合部位と免疫複合体結合部位とが同一の可能性を強く示唆している。

C3の場合には側鎖上の4オエステル結合がメチルアミンや免疫複合体との結合部位と考えられている。おそらく、C4の場合にも、 $\alpha$ 鎖のドメイン上に4オエステル結合が存在し、メチルアミンや免疫複合体との結合部位として機能する可能性が強く、現在、アミン結合反応と交代したSH基の遊離に関する分析を進めつつある。

文献]

- 1) S. Nagasawa, R. M. Stroud. Mol. Immunol. in press
- 2) K. Takahashi, S. Nagasawa, J. Koyama (1974) FEBS Lett. 41, 280
- 3) S. Nagasawa, C. Ichihara, R. M. Stroud. J. Immunol. in press
- 4) A. Fairbanks, T. Steck, D.F.H. Wallach (1971) Biochemistry 10, 2606

前回の本ミニポジウムで 我々は EDTA-C<sup>99</sup>を用いる E-C method と C4D<sup>99</sup>血清を用いる C4D method で マウス C4 活性が各系統におよび異なり, さくに Ss<sup>h5q</sup>系統血清の Sephadex G-200 分画のオ1ピーク部分 (C4 活性は E-C method でのみ, オ2ピーク部分は E-C と C4D method で測れることを示した。今回は血清中の C4 分子の性質について さくに検討を加えた。

〔方法〕 C4 活性: EACI<sup>99</sup>, <sup>99</sup>C<sub>2</sub><sup>hu</sup>, EDTA-C<sup>99</sup>を用いて マイクロタイター法で測定した。(E-C method).

C5 活性: EAC14<sup>hu</sup>, C5D<sup>mo</sup>を用いて マイクロタイター法で測定した。

Ss 蛋白, Ss-bp, C5 蛋白の定量: DTT 電気泳動による。Ss 蛋白は EAC<sup>mo</sup> と anti Ss 抗血清との凝集の inhibition でも測定した。なお anti-Ss-bp 抗血清は 金沢大学がん研究所の高橋守信先生より供与された。

マウス C5 の精製: マウス血漿の 10% PEG 4000 沈澱を 0.02M PB (0.03M NaCl, 2mM EDTA, 10mM EACA, 10mM Benzamidine) pH 7.4 に溶かし, QAE-Sephadex クロマトグラフィーを行なうと 食塩濃度 0.1 M 付近で C5 が溶出される。C5 画分を濃縮し Sephadex G-200 4<sup>u</sup>ル分画を行ない さくに anti C5D<sup>mo</sup>-Sepharose を通して SDS-PAGE で単一の標品を得た。(MW は 22万であり, 14万と 8.4万の二本鎖から成っていた。)

〔結果と考察〕 C4 活性のクロマト上での挙動: ICR マウス血清 (Ss<sup>h5q</sup>C5<sup>+</sup>) を Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup> を含む VBS (VBS<sup>++</sup>) で Sephadex G-200 4<sup>u</sup>ル分画すると蛋白のオ1ピークとオ2ピークに一致した C4 活性がみられた (図-1)。

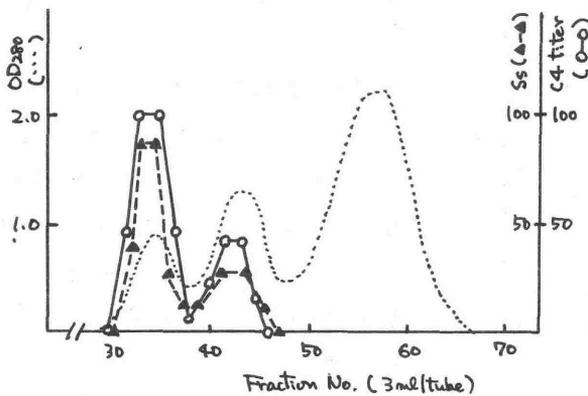


図-1. Sephadex G-200

オ1ピークとオ2ピークに一致した C4 活性がみられた (図-1)。オ1ピーク画分をあらかじめ Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup> を含む Tris-HCl 緩衝液で QAE-Sephadex クロマトを行なうと 図-2 のように C4 活性部分 (回収率 95%) と Ss 蛋白部分に分けられた。また Ss-bp は C4 活性部分, Ss 蛋白部分の両方にみられた。従って Sephadex G-200 のオ1ピーク

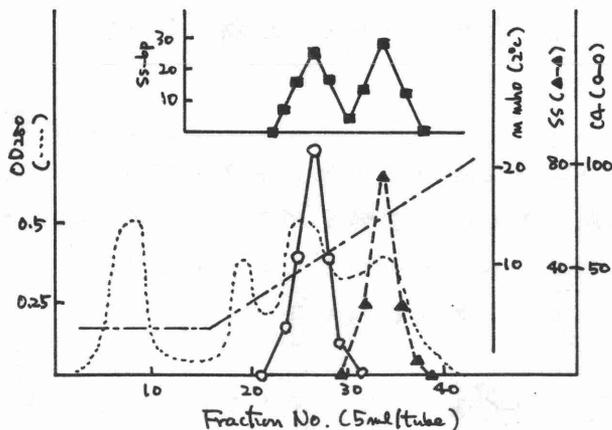


図-2 QAE-Sephadex クロマトグラフィー

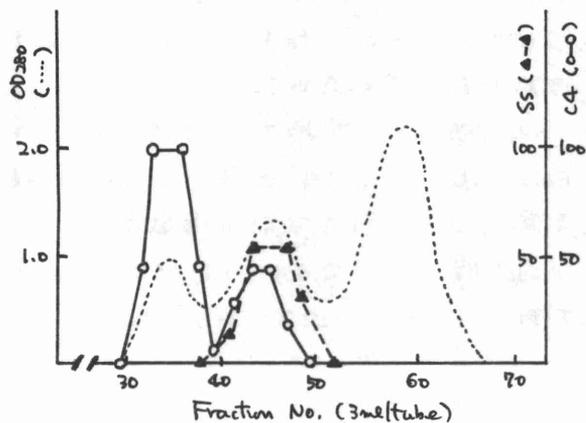


図-3 Sephadex G-200

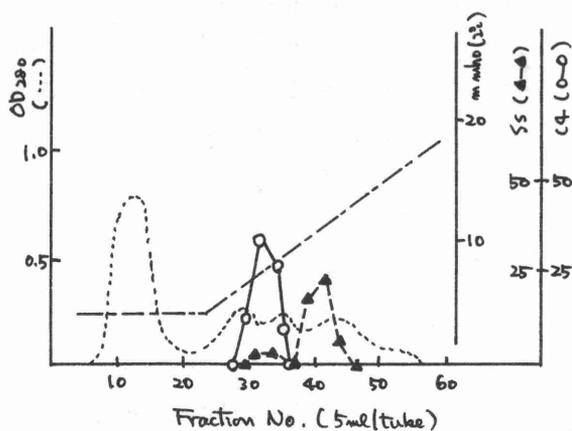


図-4 QAE-Sephadex クロマトグラフィー

部分は C4 と SS-bp の複合体、SS と SS-bp の複合体から成り、と  
いって考えられる。

C4/SS-bp 複合体および SS/SS-bp 複  
合体部分を 各々濃縮して  $Ca^{++}$ 、  
 $Mg^{++}$  と 0.5M NaCl を含む VB で  
Sephadex G-200 上を 1 回 通過を行  
った結果、SS/SS-bp 複合体は解  
離して SS が 1 ピーク部分  
にみられたが、C4/SS-bp 複合体  
の場合は 解離せず C4 活性  
は 1 ピーク部分にみられ、  
両者の性格は異なりこじがわ  
かった。

また 血清をそのまま  $Ca^{++}$ 、 $Mg^{++}$   
と 0.5M NaCl を含む VB で Sepha-  
dex G-200 上を 1 回 通過すると、0.15M  
NaCl 存在下で 1 ピーク部分  
にみられた SS 蛋白の大部分は  
1 ピークに移動するが C4  
活性は大部分が 1 ピークに  
みられた。(図-3)。

結局、1 ピークに存在する  
C4 分子は SS 抗原性をもたな  
いが、あるいは非常に低いと  
考えられる。

次に、血清を VB5<sup>+</sup> で Sephadex  
G-200 上を 1 回 通過して得た 1 ピ  
ーク部分も 同様に QAE-Sepha-  
dex クロマトを行なうと 図-4  
に示すように C4 活性部分(回  
収率 70%)と SS 蛋白部分に分け  
られた。

以上の結果から、血清中には  
C4/SS-bp 複合体、SS/SS-bp 複合体

および遊離のC4, 活性をもたないS5蛋白の4種が存在することが示唆される。

マウスC5の要求性について : S5<sup>h</sup>C5系統の血清をVBS<sup>h</sup>でSephadex G-200ゲル淨過するとオ1ピークのみでC4活性がみられる, 血清の場合もEDTA-PBSでSephadex G-200ゲル淨過するとどの画分にもC4活性がみられる。S5<sup>h</sup>C5<sup>h</sup>系統の場合, C5はSephadex G-200ゲル淨過でオ2ピーク画分にみられることから遊離型のC4活性測定にはマウスC5が必要であることを考へるので我々の精製したマウスC5をS5<sup>h</sup>C5系統のSephadex G-200ゲル淨過のオ2ピーク画分に加えたところC4活性が測定できた。すなわち複合型C4活性を測るためにはマウスC5は必要ないが遊離型C4活性の測定にはマウスC5が必要であると考へられる。

[まとめ] 血清中では一部のC4とS5蛋白が各々S5bpと結合して複合体を形成していると思へる, 0.5M NaCl存在下でS5蛋白との複合体は解離するがC4との複合体は解離しない。複合型のC4活性はE-C methodでのみ測定可能でありそのS5抗原性は非常に低いと思へる。また血清中には遊離型のC4とS5蛋白も存在しそのC4活性はE-C, C4Dの両methodで測れるがマウスC5を必要とする。

H-2遺伝子群中に存在する補体系制御蛋白  
(C4bp)の遺伝子座

金沢大学 がん研究所免疫生物部

海藤敏雄, 坂井俊之助, 高橋守信

生体防御反応には、正の方向に働くeffectorと、これを制御するregulatorの機構が存在する。これは免疫応答系のみならず、補体系にも存在し、補体系の増幅作用を有する C3 コンベルターゼ、 $\overline{C4b2A}$  および  $\overline{C3bBB}$  は、C4b に特異的に結合する C4bp および C3b に結合する  $\beta_2H$  によってその活性の阻害をうける。C3 コンベルターゼの構成成分である、C2、C4、C3 および B 因子はすべて MHC に連関すると考えられ、補体系のうち中心的な機能単位としての反応系の構成成分の構造遺伝子座が生体防御反応の統御に最も重要は MHC に存在することは、補体系の意義から考え、充分納得できることである。我々の研究の目的は C3 コンベルターゼの反応系と regulator を含めて遺伝的、進化論的に理解しようとすることである。本研究ではマウス C4bp の電気泳動度を支配する遺伝子座が H-2 遺伝子群に密接に連関することを明らかにした。

[方法および結果]

1) アロタイプ検出方法

マウス C4bp の電気泳動的に異なるアロタイプの検出は、3M 尿素、および 1% NP-40 を含む 0.5% isogel を支持体とし、2% 濃度の LKB Ampholine, pH 3.5-10 を用いた等電点電気泳動法によった。泳動はフロースマを 4°C, 200V 5 時間行い終了後、ウサギ抗マウス C4bp 特異抗血清を用いた immunofixation 法によった。したがって、C4bp のアロタイプ検出には、抗血清の特異性が充分確かめられる必要がある。

2) ウサギ抗マウス C4bp 血清: a) H-2<sup>d</sup> のハプロタイプをもつマウス血清中の C4bp は C4b と結合し、血漿中の C4bp に比べ電気泳動度は陽極寄りに移行することが、免疫電気泳動法および二次元免疫電気泳動法によって発見者の報告と一致することが確かめられた。b) H-2<sup>d</sup> マウス血清に抗マウス C4 を加えると、加えた抗マウス C4 量に依存して、C4bp 量の低下が認められた。しかし H-2<sup>d</sup> の血漿、H-2<sup>k</sup> の血清および血漿では C4bp 量の低下はなかった。c) 作製した抗 C4bp は、C4bp の発見者である Dr. Nussenzweig より分与された抗 C4bp と オフテロニー法で H-

z<sup>k</sup>の血漿に対し、完全に同一の一本の沈降線を形成した。また抗C4bpによって生じた沈降線は、抗C3、抗C4、抗B因子血清と生じた沈降線と完全に区別できた。

### 3) マウスC4bpのアロタイプ

B10系およびA系のH-2 Congenic マウスのC4bpの等電点の位置(pI)を検討した。B10系ではH-2<sup>k</sup>のハプロタイプをもつB10BR、B10AKMおよびH-2<sup>d</sup>をもつB10D2のC4bpのpIは同一で、pH 6.7〜7.0にかけて2〜3本のバンドが検出された(C4bp-k.d型)。これに対し、H-2<sup>b</sup>のB10 およびH-2<sup>f</sup>のB10MのC4bpのpIは6.3〜6.6にかけて2〜3本のバンドが検出された(C4bp-b.f型)。次にB10とは遺伝的に異なるA系のH-2 Congenic マウスを検討した。H-2<sup>k</sup>をもつA.TLのC4bpはC4bp-k.d型であり、H-2<sup>f</sup>をもつA.CAのC4bpはC4bp-b.f型で、B10系の結果と同様。H-2 ハプロタイプによってC4bpの等電点の位置が異なることが見い出された。上記の結果はヒトトランスフェリンの泳動度を指標とした二次元免疫電気泳動法によるRf値によっても確認され、B10のC4bpのRfは0.92でB10AKMのC4bpのRfは0.86であった。したがってマウスC4bpのアロタイプの遺伝子座はH-2遺伝子群に密接に関連すると考えられる。

### 4) マウスC4bp遺伝子座のH-2遺伝子群中の位置

H-2遺伝子群中でのC4bpの位置を、H-2<sup>b/a</sup>のHTI、H-2<sup>q/b</sup>のHTHマウスを用いて検討したところ、HTIはb.f型でHTHはk.d型であった。HTHはH-2D領域がbで、K~Gがkもしくはdなので、C4bpの遺伝子座はK~Gに存在すると考えられた。このことはHTIがK~Sにかけてbで、H-2D領域がdであることから裏づけられた。

### 5) 交配実験によるC4bp遺伝子座の検討

以上の結果をさらに確認するため、B10とB10BRを用いた交配実験を行いS領域をマーカーとして、C4bpのアロタイプがS領域と関連するか検討した。両者のF<sub>1</sub>のC4bpのpIはb.f型とk.d型の中間に位置し、k.d型とは明らかに区別出来た。F<sub>1</sub>をB10BRに戻し交配した仔のC4bpのアロタイプと、S領域の遺伝子座分析の結果は16匹がS<sup>ell</sup>でC4bp-k.d型、22匹がS<sup>h2</sup>でC4bpはF<sub>1</sub>型であった。以上の結果C4bpのアロタイプを決定する遺伝子座はS領域に密接に関連し、両遺伝子間に交差は認められなかった。

結論 マウスC4bpの電気泳動<sup>度</sup>を支配する遺伝子座はH-2遺伝子座群中にある。

金沢大学がん研究所免疫生物部

野中真弓, 坂井俊之助, 海藤敏雄, 野中勝  
高橋守信

我々及びその他の研究室の研究によつて、マウスC3の構造がH-2に関連した単一の遺伝子座によつて支配されていることが明らかになった(1,2)。この遺伝子座(C3-1)はマウスのオ17クロモソーム上の、H-2よりも11 Centimorgan だけ遠位の位置に存在する(3,4)。C3-1の複対立遺伝子の支配するC3アロタイプとして、これまでに3種類(C3-1A, C3-1B, C3-1C)が、純系マウスや野生マウスの間に見出されている(5,6)。これらC3アロタイプは、アガロース電気泳動(長時間)、や、ポリアクリルアミドゲル内等電点泳動(IEF)と immunofixation によつて検出、同定できる。さらに我々はアロタイプ特異的なアロ抗血清を作製することに成功している。(5,6,7)。このことは、マウスC3アロタイプがC3の抗原性の差異を表現していることを意味している。この研究はマウスC3アロタイプの抗原決定基の性状を明らかにするために行った。マウスの3種のアロタイプを精製し、その物理化学的、免疫化学的性状を比較した。

材料と方法 (マウスC3アロタイプ) C3-1AはN/Cマウスの、C3-1BはBALB/cマウスの、C3-1CはICRマウスのEDTA-血漿から精製した。約100mlの雌マウスのEDTA-血漿からTachらのヒトC3精製法に準じて精製を行い、SDS-PAGEや免疫電気泳動法で単一の標品を得た。(トリプシン分解フラグメント)。精製したマウスC3アロタイプとトリプシン(E:S比 1:50または1:8)を、37°Cでインキュベートすると、C3は次第に分解する。E:S比 1:8で37°C、60分間インキュベートすると、C3はほぼ完全にC3cとC3dフラグメントに分解した。C3cとC3dを9100カラム(1×100cm)によつて分離して互いの混入のない標品を得た。

実験成績 (1) SDS-PAGE. マウスC3アロタイプは、何れも還元アルキル化によつて2つのポリペプチド鎖(MW 132,000, 75,000)に分離する。このβ鎖の分子量はヒトC3のβ鎖に比べて9,000 daltonsも小さい。

(2) PAS 染色。 マウス C3 アロタイプは何れも糖蛋白である。 たゞヒト C3 と異って糖鎖は $\alpha$ 鎖にしか検出されなかった。(3) トリプシン分解、フラグメント。 C3-1A, C3-1B アロタイプのトリプシン分解産物から単離した C3c フラグメントは対応するアロタイプ特異抗血清と強い反応性を示した。 一方、C3d は全く反応性を示さなかった。

考察 (1) 精製したマウス C3 アロタイプは 何れも全体として非常に類似した物理化学的性状を示した。 即ち、マウス C3 アロタイプが、ポリペプチド鎖の大きい欠損、SS 結合の有無、糖鎖の有無、などの、大きい差異に基づくものでないことを示している。(2) マウス C3 のアロタイプ決定基は C3c フラグメントを構成するポリペプチド鎖アミノ酸配列の差異に基づくものであろう。 おそらく複数(3個以上)のアミノ残基の置換によるものと思われる。(3) C3 の $\beta$ 鎖は種の分化の過程で大きい変化をうけてきたものと思われる。 おそらく $\beta$ 鎖は C3 の生物活性の発現に直接関与することはないのであろう。

#### (文献)

1. S.Natsuume-Sakai et al. (1978) J.Immunol. 121;491.
2. F.P.DaSilva et al. (1978). Proc.N.A.S. 75;963.
3. S.Natsuume-Sakai et al. (1979). J.Immunol. 123;947.
4. P.Rubinstein et al. (1979). ibid. 122;2584.
5. S.Natsuume-Sakai et al. (1979). ibid. 121;2026.
6. S.Natsuume-Sakai et al. (1979). ibid. 123;216.
7. M.Nonaka et al. (1980). ibid. in press.

# 38 抗C<sub>1</sub>rを用いたC<sub>1</sub>インヒビター欠損の検出 — ロケット法による試み

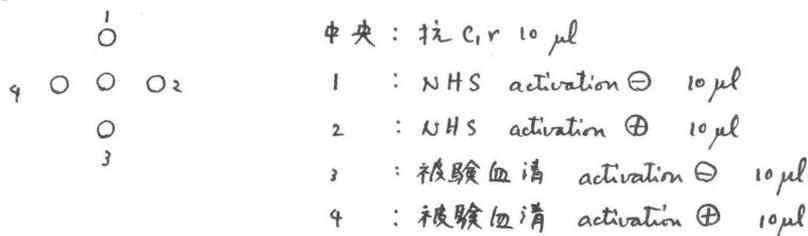
鈴木好夫, 宗村フサ, 岡崎祐子, 三村信英 鹿の内科院腎センタ

L. Mecarelli, J. Leibowitch Hôpital Necker, Paris

[目的] 遺伝性血管神経性浮腫(以下HANE)の発症の料序はC<sub>1</sub>INHIBITOR(以下C<sub>1</sub>INH.)欠損が原因であり, その本態は活性化されたC<sub>1</sub>rをC<sub>1</sub>INH.欠損の故に, これを結合し不活性にすることができないことにある。この研究は先ずヒト血清からC<sub>1</sub>rを分離し, これをウサギで免疫し得た抗血清を免疫吸着法にて夾雑物を除去し精製抗C<sub>1</sub>rを得る。これをアガロース板中に2%が含ませ, 免疫電気泳動法でロケットを捕記させると, activateした正常人血清(以下NHS)ではロケットは形成されるが, C<sub>1</sub>INHIBITOR Deficiency(以下C<sub>1</sub>INH-D)ではその血清をactivateしてもロケットは消失する(ロケットが形成されない)。これをを用いてC<sub>1</sub>INH-D血清の料能的検出を目的とする。

[方法] 凝集IgG(以下agg. IgG)は型を如く, 精製IgGを56°Cで20分incubateし, 3,000 rpmで10分遠心し沈殿物を除去し, IgG 10<sup>mg</sup>/ml PBS濃度で作製した。ロケット法による免疫電気泳動法は先づ2行した。元免疫拡散法(以下DID)には生食で溶解した1.2% agaroseを用いた。ロケット法免疫電気泳動(IEP)にはグリシンVeronal Bufferで溶解した1.2% agaroseを用いた。

免疫拡散法は厚さ1 mmのアガロース板のwellの直径3 mm, well間距離3 mm, 被験血清又は抗C<sub>1</sub>r容量10 µlとした。incubation時間は98日経過させた。



血清のactivationは次のように行なった。

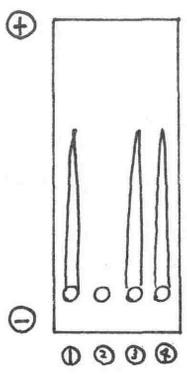
血清 20 µl + agg. IgG 5 µl  $\xrightarrow{37^{\circ}\text{C } 60'}$  activated serum

この activated serum は well に入れ、その前 EDTA を final 濃度 0.02M に混ぜて用いた。

ロケット法 IEP は顕微鏡用ポリアクリレート厚さ 1mm のアカードス板 (アカードス容量として 3 ml) に抗 C<sub>1</sub>r を 2% に混ぜて用いた。well 直径は 3 mm とし、被験血清容量は 10 μl とした。泳動は 8 mA, overnight, 又はその簡略法 16 mA, 3 時間で行った。電気泳動緩衝液は Versal buffer を用いた。

[結果] 上記の方法により = 元免疫拡散法を行っても, activation ⊖ の NHS と抗 C<sub>1</sub>r 血清は一本の沈降線を形成したが, agg. IgG の activation ⊕ の NHS とは沈降線を形成した。しかし、臨床的 HANE の症状をもつ、抗 C<sub>1</sub>INH を用いた血清 C<sub>1</sub>INH 定量で C<sub>1</sub>INH の低値と測定された症例では, activation ⊖ の場合は抗 C<sub>1</sub>r と沈降線は形成したが, activation ⊕ の場合も, NHS と異なり沈降線を形成した。

ロケット法の免疫電気泳動法は activation ⊖ の NHS ではロケットを形成するが, activation ⊕ の場合はロケットを形成した。しかし、C<sub>1</sub>INH-D の血清は activation ⊕ の場合も Rocket を形成した。その所見を図に記すと下記の如くである。



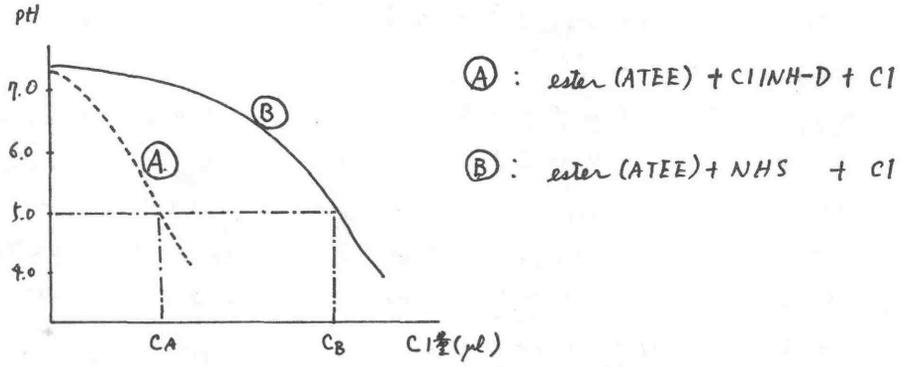
- ① : NHS activation ⊖ Rocket 形成 ⊕
- ② : NHS activation ⊕ Rocket 形成 ⊖
- ③ : C<sub>1</sub>INH-D activation ⊖ Rocket 形成 ⊕
- ④ : C<sub>1</sub>INH-D activation ⊕ Rocket 形成 ⊕

臨床的 HANE の場合も = 元免疫拡散法, 免疫電気泳動法とも同じ結果が得られた。

[考察をいふこと]

従来 C<sub>1</sub>INH-D の検査は、臨床的この欠損の疑いのある症例の血清において抗 C<sub>1</sub>INH を用いて single radial immunodiffusion 法又は免疫電気泳動法 (ロケット法) で C<sub>1</sub>INH の蛋白定量を行って、その結果、この C<sub>1</sub>INH が蛋白量として充分存在しなかったり不足している場合がある。このことが知られて、従って C<sub>1</sub>INH の蛋白定量に加えて C<sub>1</sub>INH の機能の有無の検査

は、CIINHが拮抗上はCI esterase inhibitorであり、ester (ATEE)を基質とした場合、CI esteraseが stoichiometricに esterを加えて加水分解するのをCIINHが抑制する：とを利用し、被験者清かとの量のCI、即ち例えはpH 5.0に達するCI量を知らないとよこ CIINHの拮抗の有無を知らないとかできない。図示をよこ下図の如くである。



たこ之(A)の場合CIINHの蛋白量として充分存在しても esterase inhibitorの拮抗は持たない：とわかる。

最近、CIINHの作用本態が activateしたC1rとCIINHが抗原抗体的に結合し、結合された activated C1rはその拮抗を失う：とわかる：と知らされた。その結果 classical pathwayの activationが抑制されたわけである。逆にCIINH-Dでは activated C1rは不活性化されたので classical pathwayの活性化は促進し臨床上の症状を示すようになった。よこ activated C1rをCIINHが結合する：と理論的に知り、CIINH-DをCIINHの蛋白定量はよこその拮抗本態をもとにして知り方法として、抗C1r血清を用いたニニ免疫拡散法及びロケット法の免疫電気泳動を行なった。ロケット法ではCIINHの拮抗の有無がロケット形成の有無という all or noneの形式で一目瞭然と知り：とわかった。しかし技術上の困難な点はよこ、短時間、特に簡略法では約3時間の泳動でCIINHの拮抗の有無とその拮抗本態をもとにして知り：とわかった。

関東逓信病院 腎臓内科 中山大典 池田隆夫  
 東京大学医学部物療内科 行山 康 広瀬俊一  
 柳原病院(東京足立区) 宮崎 康

### 〔目的〕

Factor Bの遺伝的多型性はAlperらによつて初めて報告され、常染色体上対立遺伝子として、アガロース電気泳動で認められるBFS, BFFが存在し、稀な対立形質として、BFS1, BFF1が認められている。Factor Bの産生は、HLA遺伝子座と同じ第6染色体短腕上の遺伝子によつて規定されており、HLA遺伝子座に存在すると想定されるIr遺伝子とも連鎖していると考えられる。このことから各種疾患において、Factor Bが遺伝的多型性の特徴を示すと想定されるが、実際にはFactor Bの基本的パターンは遺伝形式から考えられるようなFF, FS, SSの三種及びこれらと変異型との組み合わせしかなく、疾患との関連づけは困難とされていた。ところが昨年、Rammらはインスリン依存性糖尿病においてFの変異型であるF1の遺伝子頻度が極めて高く、BF遺伝子が糖尿病をおこす遺伝子と近接しており、BFF1がインスリン依存性糖尿病の同定及びキャリアーの発見につながる可能性を示した。しかし、Weitkampらはインスリン依存性糖尿病におけるBFF1の頻度がコントロールと比較して有意差を示さず、Rammらとの差違は人種差によるものではないかとしている。又、オーストラリアのKirkらはインスリン依存性糖尿病、とくに10キ以下の患者においてBFF1の高頻度を示し、さらにフランス、西ドイツからもインスリン依存性糖尿病におけるBFF1の高頻度が報告されている。本邦では、宝来らが正常人におけるFactor Bの遺伝子頻度を示したが、糖尿病における報告はみられていない。我々は、正常人及び糖尿病患者におけるFactor Bの遺伝的多型性を検討し、以下の結果を得たので報告する。

### 〔方法〕

抗血清: Müller-Eberhardらの方法によつて、人Factor Bを精製後、家兎に免疫して得たものを用いた。一部の実験は、Behring社の抗C3アフラクター血清を使用した。得られた結果にかわりはなかった。

アガロースゲル電気泳動及び免疫固定: 検体とした患者血清は $-70^{\circ}\text{C}$ に保存し、ただ一回融解使用した。泳動用バッファーと同じバッファーで、アガロースを1.2%に溶かし、 $6.5 \times 8.5 \text{ cm}$ のガラス板に1mmの厚さの $7^{\circ}$

プレートを作製した。泳動用バッファーには、 $0.0018M$ の乳酸カルシウムを含むバルビタールバッファー pH 8.6,  $\mu = 0.05$ を用い、ゲルを冷却しながら  $11 \text{ volts/cm}$ で6時間泳動した。泳動後のプレートには、稀釈した抗Factor B血清の0.4 ~ 0.6 mlを口紙に汲み込ませて重層した。室温で48時間反応させた後、PBS pH 7.2にて24時間ゲルの洗浄を行ない、乾燥後ブリリアントクレシブルで染色した。

抗原抗体交叉電気泳動: 1st dimensionの電気泳動は上記のアガロース電気泳動を行ない、泳動後ゲルを通電方向に平行に切り取り、1.4%の抗Factor B血清を含むアガロースゲルの一端に乗せて、2nd dimensionの電気泳動をゲルを冷却しながら、 $16 \text{ volts/cm}$ で、3.5時間泳動した。泳動後は上記の如く、洗浄、乾燥及び染色を行なった。

### (成績)

Alperらの報告では、Factor Bは5本のバンドとして識別されると報告されており、我々の場合も確かに5本のバンドが存在したが、陽極よりの第一番目のバンドは不明瞭なことが多かった。Alperらの報告に従って、三番目のバンドと考えられる幅広いバンドの位置をもとに易動度の位置を比較検討した。大多数にみられる易動度の遅い型をSS型、速い型をFF型、その中間型をFS型として型の如く分類すると、表に示すように、正常人172人で、SS型138人、FS型30人、FF型4人で、遺伝子頻度はBFS 0.890, BFF 0.110であった。糖尿病患者90人ではSS型76人、FS型1人で、遺伝子頻度はBFS 0.917, BFF 0.083であり、インスリン依存性糖尿病患者ではSS型25人、FS型3人、FF型0人で、遺伝子頻度はBFS 0.946, BFF 0.054であった。正常人と糖尿病患者、インスリン依存性糖尿病患者との間で、遺伝子頻度に統計学的な有意差は認められなかった。稀な遺伝子型であるBFS1, BFF1は同定されなかったが、同定困難な症例が数例みられ、変異型との関係を検討中である。

抗原-抗体交叉電気泳動で、図に示す如く、SS型は陰極側に偏った一つのピークから成り、FF型は陽極に偏った一峯性のパターンを示した。FS型は陰極側のピークのオが大きい、二峯性のパターンを示した。

Table	Bf TYPES			
	DM	IDDM	CONTROL	
PHENOTYPES	SS	76	25	138
	FS	13	3	30
	FF	1	0	4
	Total	90	28	172
GENE FREQUENCY	BfS	0.917	0.946	0.890
	BfF	0.083	0.054	0.110

Figure Antigen-Antibody crossed electrophoresis

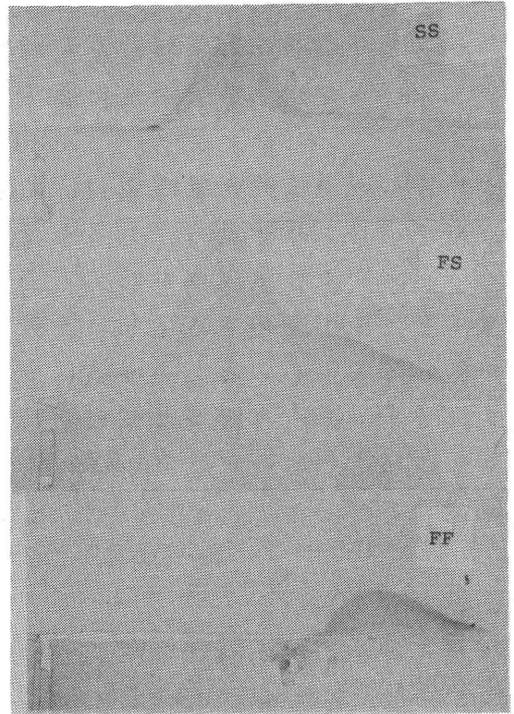
[考察]

本邦における正常人及び糖尿病患者における Factor B の遺伝的多型性を検討した。正常人では、遺伝子頻度は、BFS 0.890, BFF 0.110 であった。本邦で、室来らが 1970 年に報告している 360 例の正常人 BF の遺伝子頻度を検討したものでは、BFS 0.824, BFF 0.176 であった。この報告と比較して、我々の結果はやや BFS の頻度が高いが、ほぼ同様の傾向を示した。又、Alper らの 86 人の Oriental における遺伝子頻度は、BFS 0.890, BFF 0.110 と我々の同一の結果である。

糖尿病患者では、インスリン依存性をも含めて、正常人と比較して、やや BFS の遺伝子頻度

が高かったが、有意差を示さず、又、BFF1, BFS1 は同定されなかった。我々の結果では、Raum らの報告と異なり、インスリン依存性糖尿病患者で BFF1 の高い頻度がみられなかったが、Raum らの報告は白人に関するものであり Weitkamp らが指摘しているように、人種差のために、日本人では、インスリン依存性糖尿病患者において、BFF1 の高頻度が出現しない可能性が考えられる。又、Kirk らは、10 年以下のインスリン依存性糖尿病患者において BFF1 の頻度が 47 人中 19.1% にみられたと報告している。今回の我々の症例にはこのような若年者は含まれておらず、今後検討を要する問題と考える。又我々のインスリン依存性糖尿病患者の症例数は 28 と少なく、今後例数を増やして、さらに検討する予定である。

↑  
2nd Dimension E.P.



1st Dimension E.P. →

## C4の遺伝的多型および Cold Activation による 表現型の変化

西向弘明・解良芳夫・阪田 潔・山沢吉平 (京府医大・法医)  
北村 肇・永木和義 (大阪府立成人病センター)

ヒトC4の遺伝的多型現象は、Rosenfeld et al. (1969)にはじまり数々の報告がなされている。しかし遺伝子座数は1つとする説と2つとする説に分かれ、また表現型もC4F・C4S およびC4rare (C4MやC4Fi)の遺伝子により発現されるという説とそれらのsilent gene (C4<sup>+</sup>, C4<sup>0</sup>)も大きく関与しているという説に分かれており、未だ一致した見解はない。我々はまず日本人の健常者を対象にこの多型現象を検討した。次に肝疾患々者の血清試料では特定のvariantがよく出現し、これがcold activationに関連していると思われるため、これについても検討を加えた。

### 〔実験方法〕

(1) 健常者試料は血清補体価がnormal (32-45単位)のものを選び、これらのEDTA (final 5mM, 10mM) plasma, heparin plasma, serumを使用した。表現型検査にはアガロースゲル (羊井化学・ME) を用い、高圧でのimmunofixation electrophoresis (IFE, 20V/cm, 2.5hr) とAntigen-antibody crossed electrophoresis (ACE)を使用した。泳動緩衝液は予備実験より結果の良好なO'Neill et al. (1978)によるTris/glycine / barbital buffer, pH 8.8 (gelは20mM-EDTAを含む)を主に使用した。

(2) 肝疾患々者では血清及び血漿補体価を測定し、cold activation (C.A)が認められる試料を選別し、serum と plasma によるIFE像を比較した。さらにCA serum + normal serum, CA serum + Cl<sub>2</sub>, CA serum + immune precipitate (Ova albumin / anti ova albumin ; Ippt), C4 + Cl<sub>2</sub>等の処理をした試料についても比較した。

### 〔結果および考察〕

#### (1) 健常者のC4型

C4表現型は20mM-EDTAを含むgel bufferを使用した場合、plasma, serum, serum + EDTAのいずれも同一patternを示した。易動度の高い成分Fおよび低い成分Sは、それぞれ複数のバンドから構成されている。

F・S両成分を有す検体(FS)の中にはIFEで二成分に濃度の差の認められるものがあり、AACEで展開すると明らかにローフの差とがあらわれり。数家族の遺伝調査により、表現型はRosenfeldやAwdehの説のよいうに二つの座における遺伝子の組合せで発現され、濃度の差はsilent geneが関与しているとするのが適切と考えられた。図1にIFE・AACE pattern, 表現型, 予想される遺伝子型を示す。また表現型の集団調査・家族調査結果を表1に示す。

(2) Cold activation による C4 表現型の変化

Cold activation を示す3例(plasma CH50 = 32~40u, serum CH50 < 5u.)ではEDTA-plasmaとserumで表現型が変化した。plasmaではF=S, S(本来のgeneticのものと考えられる)であっても、serumではすべてFよりわずかながら易動度の高い領域にやや幅狭くあらわれた。CAserumのC4の易動度はC4+C12により生ずるC4i(Rosenfeldの方法に準じた)やnormal serum(C4F=S)+Iyptによるものとも異なった。またCAserumにnormal serumを加えたもの(1:1, incubated at 4°C for 2hr), Iyptを加えたもの, C12を加えたものは、すべてCAserumの易動度に一致した。patternの比較を図2に示すが、これまでの実験ではCAserumのC4表現型は特異的なものであることが示唆された。

なお、欧米で発見されているC4変異型にF1とMがあるが、今回の実験でF1の易動度はCAserumのものに、Mの易動度はnormal serumやplasmaにC12を加えたものに類似している事がわかった。これらの変異型には遺伝以外の要素もかかっている場合がありうるのだから今後は綿密な検査が必要である。

{ 図 1 }

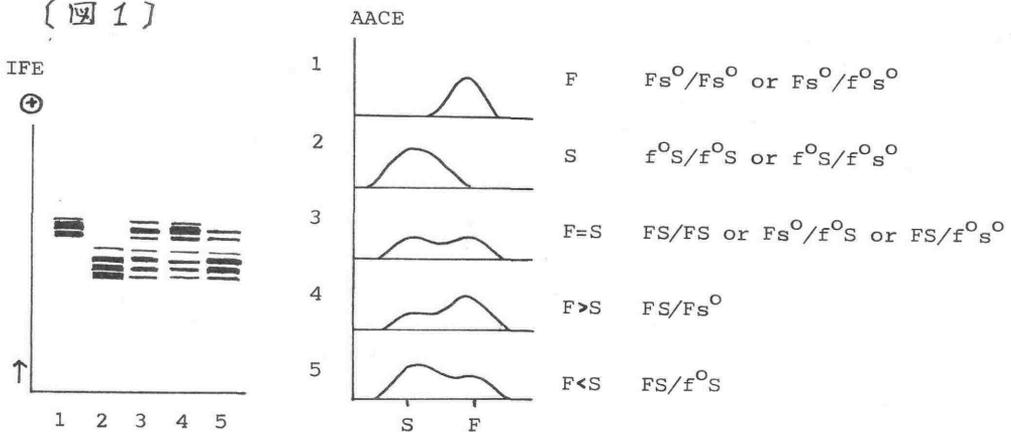


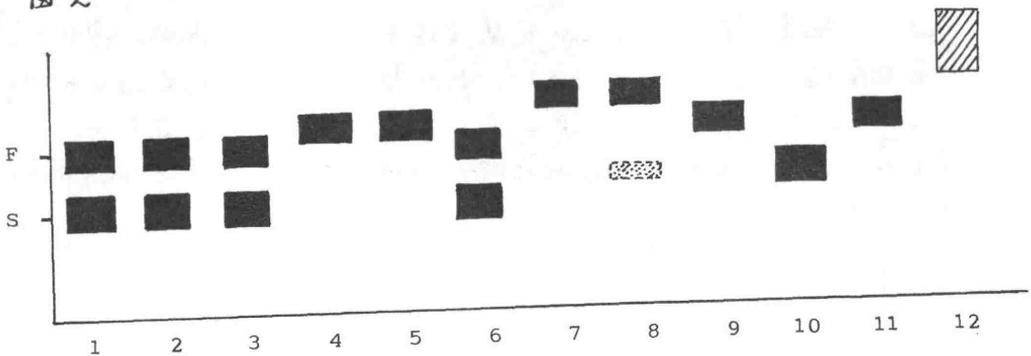
表 1

Distribution of C4 phenotypes in the Japanese population and families.

phenotypes	F	S	F=S	F>S	F<S	total
No.	9 (6.8%)	5 (3.8%)	74 (56.1%)	19 (14.4%)	25 (18.9%)	132 (100.0%)
	F & S: 118 (89.4%)					

matings		No. of children					
F	M	No.	F=S	F>S	F<S	F	S
F=S	x F=S	4	7	0	0	0	0
F=S	x F>S	3	2	2	0	0	0
F<S	x F=S	1	1	0	0	0	0

图 2



- |                                  |  |
|----------------------------------|--|
| 1) normal serum (F=S)            | 7) pure C4 + Cl $\bar{s}$                  |
| 2) normal plasma (F=S)           | 8) normal serum (F=S) + Ippt               |
| 3) CA plasma (F=S)               | 9) CA serum + Ippt                         |
| 4) CA serum                      | 10) normal serum (F=S) + Cl $\bar{s}$      |
| 5) CA serum + normal serum (F=S) | 11) CA serum + Cl $\bar{s}$                |
| 6) pure C4 (F=S)                 | 12) aged serum (F=S) (room temp. 3 months) |

愛媛大学医学部皮膚科

白石 聡，奈良有美子，松田光司，三木吉治

ヒト補体成分のうち，C9, alternative pathway 以外の各因子については，それぞれの欠損症例が報告され，易感染性や SLE が，その主症状となっている。

ところが，日本では C1 inhibitor 欠損に伴う遺伝性血管神経性浮腫以外の報告がなく，補体成分欠損症は，ごく稀と考えられる。

われわれは，顔面，手，足に SLE 様の紅斑を伴う症例で，補体第4成分の欠損を経験したので報告する。

患者 48才，女性，民宿業

既往歴 子宮後屈の手術（35才）

家族歴 血族結婚否定，三女に RA がある以外に家族内に重症感染症，原因不明熱，紅斑，易出血などは認められない。

現病歴 昭和54年8月 全身倦怠感とともに，顔面に潮紅出現。近医で副腎皮質ホルモン剤の外用を行うも変化なし。  
 9月 1~2週に1回，38~40°Cの発熱があり，置き薬の解熱剤を計5回位内服。  
 10月 手，膝，肘関節痛出現，数日で消退。  
 11月 背部に発疹  
 昭和55年1月 口腔粘膜疹出現し，約1ヶ月間続く。  
 2月 掌蹠に"しもやけ"様皮疹出現，鼻出血をくり返し某病院に3週間入院したが，内科的に異常はないといわれた。  
 4月 再び口腔粘膜疹と手関節痛出現。  
 5月 当科受診，SLEの疑いで入院となる。

入院時現症

顔面，耳介に網目状褐色調の紅斑があり，口唇，口腔粘膜に血痂をつけたびらん面がある。

両側掌蹠，指趾腹に褐色調の浸油性紅斑があり，足蹠では，その中に

不整形小潰瘍を認める。

両側前腕伸側にびまん性淡紅色斑，背部に径2cmまでの中央に痂皮をつけた紅斑，一部びらん面があり，ほぼ全身に毛孔一致性の褐色小丘疹が見られる。

病理組織像

顔面，手掌の紅斑ともに，真皮上層の浮腫と基底層の液状変性，血管付属器周囲の比較的限局性のリンパ球浸潤を見る。顔面では角栓形成と表皮突起の消失もみられる。

蛍光抗体直接法

顔面，手掌の紅斑ともに IgG, C3 の沈着なし。

RBC	286 x 10 <sup>4</sup>
Hb	8.5 g/dl
Ht	25.7 %
WBC	2600
Seg	15.0 %
lymph	43.5 %
mono	28.0 %
eosino	11.0 %
baso	.5 %
aty.lym	1.5 %
meta	.5 %
Platelet	9.4 x 10 <sup>4</sup>

T.Protein	7.3 g/dl
Alb	43.0 %
α <sub>1</sub> -gl.	5.0 %
α <sub>2</sub> -gl.	9.6 %
β-gl.	9.9 %
γ-gl.	32.0 %

Na	138 mEq/l
K	3.4mEq/l
Cl	100 mEq/l
Fe	66 μg/dl
Urea-N	17 mg/dl
Creatinine	.5 mg/dl

T.bili	.4 mg/dl
D.bili	.2 mg/dl
GOT	38 IU/l
GPT	20 IU/l
LDH	128 IU/l
ALP	161 IU/l
γ-GTP	36 IU/l
ZTT	20 U
Chol.	146 mg/dl
P.lipid	150 mg/dl
T.G.	250 mg/dl
血糖	81 mg/dl

血清梅毒反応 (-)
CRP (±)
RA (-)
ASO 120 T.U.
Coombs direct (+)
LE test (-)
抗DNA x80以下
ANF (-)
寒冷凝集反応 x256
Hb 抗原 (-)
LE現象 (-)

出血時間	4分
APTT	31.9 sec.
PT	110 %
Fibrinogen	395 mg/dl
FDP	10-20 mg/dl
Plasmin	(-)

Immunoglobulins		
IgG	2129	mg/dl
IgA	811	mg/dl
IgM	121	mg/dl
IgD	2.0	mg/dl
IgE	259	U/ml

患者，家族の補体

		CH50	C3 mg/dl	C4 mg/dl
Y.Y. (患者)	測定不能	100	0	
T.Y. (兄)	42	84	25	
K.Y. (長女)	測定不能	90	8.7	
T.A. (次女)	38	61	38	
S.K. (三女)	46	100	40	
NHS-pool	37	72.5	25.8	

血沈	118
尿蛋白 (-)	
ツ反 (-)	
カンジダ皮膚テスト (-)	
MED	1.5分

## 治療および経過

入院後、高熱が続き、貧血著明となったため、新鮮血輸血（総量1,000 ml）、ベータメタゾン2mg投与にて、下熱、皮疹も改善しつつある。

## 患者および家族の溶血活性（CH50，Mayer法），補体成分定量

1. 患者の血清，血漿のCH50は測定不能で radial immunodiffusion (RID) でC4は全く検出できず，C3は正常範囲であった。

2. 長女の血清，血漿のCH50は，測定不能であったが，RIDでC4は8.7mg/dlと正常人の約1/2と低値であった。兄，次女，三女のCH50，C4は正常で，C3はいずれも正常範囲を示した。

現在，他の補体成分の蛋白量，溶血活性ならびに，患者血清に精製したC4を加え，溶血活性が回復するかどうかを検討中である。

河野 晃

健生病院小児科

山本健一， 右田俊介

金沢大学 がん研究所分子免疫部

滝口智夫

金沢医科大学 血液免疫内科

補体第9成分（以下C9と略す）欠損症に関しては、第15回及び第16回の本シンポジウムにおいて、それぞれ稲井ら、行山らにより報告されている。今回我々は、C9欠損症の兄弟例を発見し、その家族調査を行い、HLAとの関連について検討したので報告する。

<症例> 13才，男

既往歴：2才6ヶ月のとき紫班病性腎炎に罹患し、その後蛋白尿及び顕微鏡的血尿が持続していたが、10才ごろには尿所見は正常化していた。それ以外に著患はなく、予防接種、水痘、麻疹などは普通の経過を見ている。

家族歴：父，慢性肝炎（HB<sub>s</sub>抗体陽性） 弟，著患なし。

現病歴：12才のとき、CH50を測定したところ、8.6 units/血と低値であった。6ヶ月後再検し、同様の結果を得たので下記のごとく精査を行った。

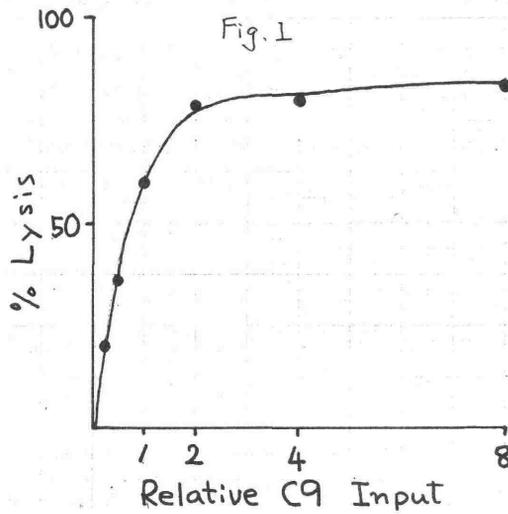
<血清補体 Profile > 溶血活性測定法による各補体成分値は以下のごとくであった（正常血清対照値を100%として表示）。

CH50	C1	C2	C3	C5	C6	C7	C8	C9
10	200	94	100	128	114	115	100	not detectable

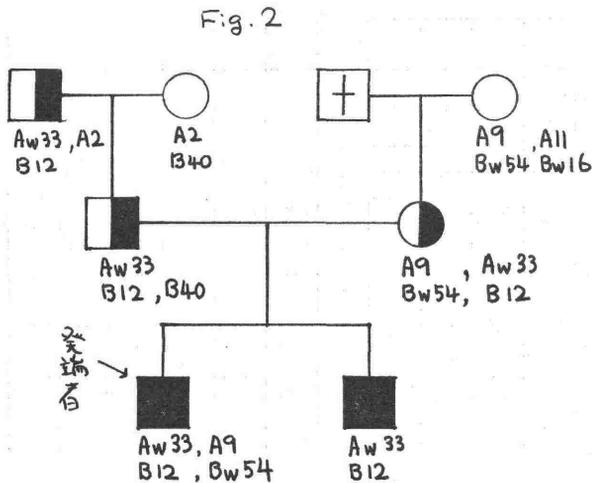
又、Mancini法による補体成分値は以下のごとくであった。

C1q	C4	C3	C5	C9	B	P	C1-INH
88	100	152	103	not detectable	115	180	128

以上、本症例患者血清中にはC9活性及び抗原性、ともに検出できず、さらにFig. 1に示されている様に精製ヒトC9を患者血清に加えることにより血清補体値が回復することから、本症例はC9欠損症と考えられた。



<家系調査> 患者の家族について、その血清C9値を溶血活性測定法及び Mancini 法で測定し、また HLA typing も行った。その結果を Fig. 2 に示す。



発端者の両親及び父方祖父が heterozygotes と考えられ、又発端者の弟の血清中には C9 活性も抗原性も検出されず homozygotes と考えられた。以上の結果より本 C9 欠損症例は遺伝性と結論され、その遺伝様式は autosomal codominant とであると思われる。また HLA typing の結果から C9 の発現を支配する遺伝子と MHC 遺伝子群との密接な連関は否定される。

<考察> 本例は、世界で 5 番目の遺伝性 C9 欠損症の報告と思われるが、行山らの報告 以外はいずれも健常者より発見されている。我々の報告

した兄弟例も、弟は著患なく、兄は紫斑病性腎炎に罹患したもののほぼ普通の経過であり、一応健常者と考えられるが、いずれも長期の経過観察が必要である。ヒトの補体成分の発現に関与する遺伝子のうち、現在までC2及びC4の発現に関与する遺伝子はMHC遺伝子群中にあると考えられているが、C3, C5, C6, C7, C8, 等後期補体成分の発現に関与する遺伝子はいずれもMHC遺伝子群とは関連していない。しかしC9の発現に関与している遺伝子がMHC遺伝子群と関連しているかどうかについては報告されていない。本症例の家系調査からC9の発現に関与している遺伝子もMHC遺伝子群とは密接に関連していないと思われる。

## 輸血後抗C9抗体を産生した補体系成分(C9)完全欠損症の一例とその家族調査

木須達郎<sup>1)</sup>, 草場公宏<sup>1)</sup>, 柳瀬敏幸<sup>1)</sup>, 酒井好吉<sup>2)</sup>  
 稲葉頌一<sup>3)</sup>, 大河内一雄<sup>4)</sup>

1)九州大学医学部第一内科

2)九州大学温泉治療学研究所内科

3)九州大学医学部附属病院輸血部

4) " " " 中央検査部

### <緒言>

胃癌手術のため輸血を受けた後、正常ヒト血清に対してアガロースゲル内で沈降反応を生じる血清が見出された。種々の検討を加えた結果、この沈降反応は患者血清中に産生された抗C9抗体の存在によることが判明した。詳細な家系調査を行い、家系内に発端者を含む3名のC9完全欠損者と13名のC9部分欠損者を見出した。本家系における補体系検索の結果とC9欠損症の遺伝機構について報告する。

### <材料および方法>

発端者は65才女性、54年11月に胃癌手術のため赤血球沈層6単位、新鮮凍結血漿7単位の投与を受けた。輸血後の発端者血清およびその世代、いわゆる母親の血清について補体系の検索を行った。C9の蛋白量はハキスト社製抗C9血清を用いてロケット免疫電気泳動法で測定し、250人の正常ヒトプール血清に対する百分比を示した。発端者の同胞について補体系各成分の溶血活性を測定し、C9完全欠損者3名については精製C9添加による溶血活性の回復試験を行った。

### <結果>

表1, 表3に示すように発端者の同胞7名中、発端者を含め3名がC9完全欠損, 2名が部分欠損, 残り2名が正常であった。C9完全欠損の3例について各濃度の精製C9を添加し溶血活性の回復試験を行ったところ、発端者以外の2名は活性が回復したが、発端者では活性の回復はみられなかった(表2)。C9完全欠損と部分欠損の同胞5名についてC1~C9の各成分溶血活性を測定した(表1)。発端者を除く4名ではC9以外の他の成分は正常範囲内にあったが、発端者ではC9以外にC4, C2, C3, C5, C6, C7の溶血活性も低下していた。これらの現象には発端者血清中に存在する抗C9抗体の影響や抑癌生体という特殊性、その他の因子が関与しているかもしれない。図1に示すようにFIII世代にも11名の部分C9欠損者が見出された。血清補体価(CH50)はC9完全欠損者では、16,

16, 23と低下していたが、C9部分欠損者では1名(Ⅲ-13)を除きすべて正常範囲にあった。C9蛋白量はC9部分欠損者ではヒトプール血清の22~46%であった(表3)。図1に示すように、このC9欠損症は不完全優(劣)性遺伝子によると推定される。

〈考案〉

私どもは胃癌手術のため輸血をうけたことにより、血清中に抗C9抗体を産生して正常ヒト血清との間に沈降反応をおこすにいたったため稀有一症例を見出し、家族調査を行って同一家系内に3名の完全欠損者と13名の部分欠損者を見出した。私どもの今回の成績あるいは、稲井ら、行山ら、天野らの報告からも明らかのように、補体C9部分欠損症は比較的多いと想定されるが、私どもの症例のように輸血によってC9に対する抗体を産生するため、その影響を考慮しなければならぬような潜在症例が今後問題となろう。C9欠損は常染色体座位の不完全優(劣)性遺伝子により、遺伝子型正常ホモ接合体(C,C), ヘテロ接合体(C,c), 欠損-ホモ接合体(c,c)の補体活性は遺伝子の量効果 dosage effect をよく反映している。

私どもの症例では現在のところ、特定の疾患との関連はみられていない。HLA-A,BおよびC抗原系についても検索したがC9欠損との間に相関は認められなかった。子代発端者の近い過去には近親婚はみられなかった。

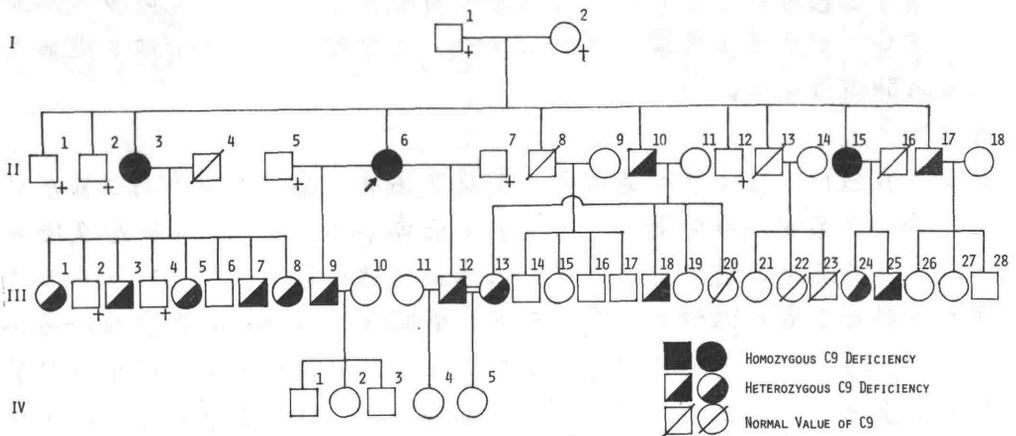


図1. PEDEGREE OF C9 DEFICIENT FAMILY

表1. Hemolytic Activities of Serum Complement Components  
in the C9 Deficient Family

		C1	C4	C2	C3	C5	C6	C7	C8	C9
Homozygous Deficiency	II- 3	800	3200	1600	1600	3200	12800	6400	6400	< 200
	II- 6	6400	<200	<200	<200	<200	<200	<200	1600	< 200
	II-15	1600	1600	1600	800	3200	3200	1600	1600	< 200
Heterozygous Deficiency	II-10	1600	3200	800	800	3200	3200	1600	1600	400
	II-17	3200	800	1600	1600	3200	6400	3200	6400	200
Normal	II- 8	1600	3200	800	400	6400	3200	800	3200	1600
	II-13	1600	6400	1600	800	800	3200	1600	3200	800
Healthy Control		3200	3200	3200	1600	1600	6400	6400	12800	1600

表2. Restoration of Serum Complement Hemolytic Activity by Adding  
Various Concentrations of Isolated C9 in the Homozygous C9  
Deficient Serum

	Amount of Isolated C9 Added (U/ml)					
	100	25	6.25	1.57	0.40	0
II- 3	1.000	0.940	0.904	0.651	0.551	0.399
II- 6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
II-15	1.000	0.923	0.776	0.542	0.363	0.309
Healthy Control	0.926	0.925	0.898	0.908	0.908	0.949

表3. CH50, C3, C4 and C9 in the Family of C9 Deficiency

	CH50 (U/ml)	C3 (mg/dl)	C4 (mg/dl)	C9 ( % )
II - 3 **	16	109	60	0
(II - 4)	52	80	37	98
II - 6 **	23	115	80	0
II - 8	40	78	54	84
II -10 *	42	78	54	35
II -13	66	90	50	95
II -15 **	16	95	54	0
(II -16)	55	75	52	98
II -17 *	52	101	62	35
III- 1 *	60	98	43	36
III- 3 *	60	86	44	22
III- 5 *	52	86	44	38
III- 7 *	42	86	60	32
III- 8 *	46	75	39	34
III- 9 *				< 50
III-12 *				< 50
III-13 *	23	70	44	42
III-18 *	30	64	38	36
III-20	29	88	41	96
III-22	39	90	56	120
III-23	36	82	34	75
III-24 *	70	110	77	46
III-25 *	39	86	34	34

\*\* homozygous deficiency  
\* heterozygous deficiency  
C9 ; 100 % = 250 pooled NHS

高田 明知 高田 由美子  
( 浜松医大 才二生理 )

CIINA (CI inactivator) は CI5, CI5 と 1:1 の結合をし, これらと不活性化する。Kondo らは CI5 が CIINA の存在下でも AAME (acetyl arginine methyl ester) を水解するが, TAME (tosyl arginine methyl ester) の水解は阻害されることを示した。Gigli & Austen は CI5 の C4 分解は CIINA で抑制されないが, C2 分解は抑制されることを示している。これは CI5 に 2 つの active site がある可能性を示すが, Nagasawa は CI5 の heterogeneity を推測している。我々はこの問題をさらに解明するために実験を行った。

### 方 法

CI5: 血漿の ionic strength を低下させ CI をしり, これを Takahashi の方法で IgG-Sepharose に吸着させ, EDTA-buffer で溶出した。

CIINA: 血漿の ionic strength を低下させ CI を含む不溶物を除去した後, lysine-Sepharose を通し, 吸着部分を phosphate buffer で溶出した。さらに CIINA の活性ある部分を再度 lysine-Sepharose につせ, phosphate-NaCl の gradient で溶出し, さらに CIINA の活性ある部分を G-200 を通して純化した。

発色基質の水解: 最近用済された発色基質 (chromogenic substrates) は酵素が水解されるとパラニトロアニリンの赤色を呈することを利用している。CI5 の基質としては C2, C4 の他に TAME, ATEE のような合成基質もあるが, これら発色基質の CI5 に対する感受性をしるべた。

表 1

基質	構造	主要 protease	OD <sub>405</sub>
S-2222	Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-pNA	Factor Xa	0.099
S-2444	Pro-Glu-Gly-Arg-pNA	urokinase	0.269
S-2238	H-D-Phe-Pip-Arg-pNA	thrombin	0.302
S-2160	Bz-Phe-Val-Arg-pNA	serine proteases	0.230
S-2251	H-D-Val-Leu-Lys-pNA	plasmin	0.102

OD<sub>405</sub> は 0.5 ml の 5U (30 分 ATEE を 5 μmole 分解する CI5 の量) の CI5 と 0.5 ml の基質 100 μg を 60 分, 37°C で incubate し, 1 ml の 50% 酢酸溶液で反応をしめ, 吸光度を 405 nm で測定したものである。

CH50: Mayer 法に示した。

AP50: Platts-Mills & Ishizaka の高田変法に示した。

## 結果と考察

### 1) ATEe と基質にした際の CIINA の C15 抑制作用

C15 に CIINA を加え、混液の ATEe 水解能を測ると、CIINA の濃度を増やすに従い、C15 の活性は低下する。オウゴンには血漿 (P) を加えたもの、右は純化した CIINA を加えたものがある。これに heparin (H) を加えたと C15 自体にはあまり作用はないが、CIINA の作用を強く阻害した。

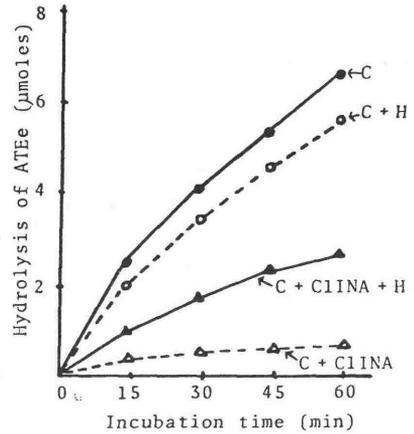
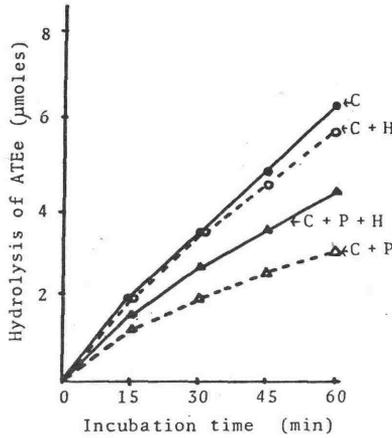


図 1

即ち ATEe 水解能は高かった。

### 2) S-2238 と基質にした際の CIINA の C15 抑制作用

Thrombin の基質である S-2238 を用い、CIINA の C15 抑制作用をみると、全く抑制がみられなかった。これに heparin を加えたと C15 活性はやや増強した。即ち C15 の S-2238 水解は CIINA の作用をあまりうけない。

### 3) ATEe と S-2238 の水解の比較

C15 と CIINA を混合し、ATEe を基質にして測定すると 10 分以上の incubate で ATEe を基質にした C15 活性は 95% 以上失われる。この状態で S-2238 を加えたと C15 は CIINA の存在下で S-2238 を水解し、これに heparin を加えたと C15 の活性はやや増強した。

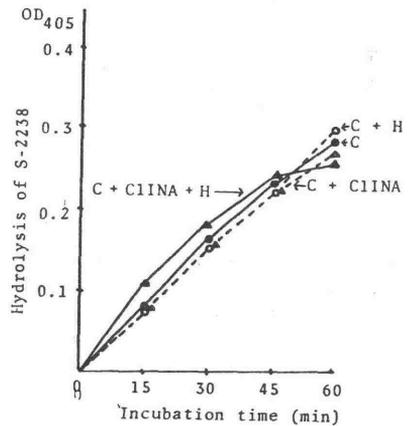


図 2

### 4) Protamin sulfate と C15 の反応

C15 に protamin 硫酸を加えたと C15 の活性は抑制されるが、これに CIINA を加えても抑制の程度はかわらない。又 C15 に CIINA を加え、基質として ATEe を用いると当然ながら C15 の活性は抑制されるが、これにさらに protamin 硫酸を加えたと C15 の活性は低下しなかった。(図 3) このことは C15 に CIINA と結合する site と CIINA と結合しない site と 2 つあることを示唆するが、もう一つの考えは C15 の heterogeneity があるという考えである。

3. 即ち CIINA の抑制されやすい CI5 と抑制されにくい CI5 があると云う考之にある。現在の段階では之じと云之ないが、一つの molecule に 2 つの site と云う考之は比較的受け入れられにくいものと思われる。

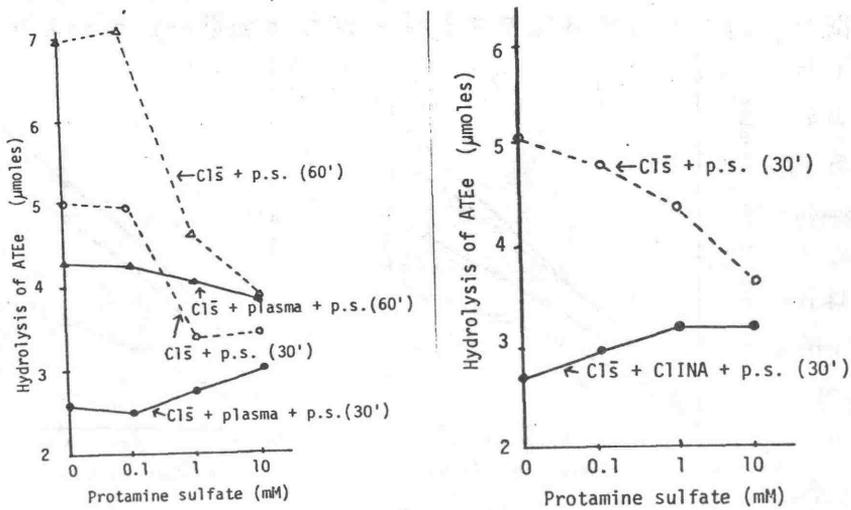


図 3

5) Polyanion, polycation の補体系全体に対する作用

Heparin, dextran sulfate のような polyanion は CIINA の作用を抑制するが、補体系全体に対しては CH50, AP50 と同じくらいに classical pathway, alternative pathway の両方とも同程度に阻害する。一方 protamin 硫酸, histone のような polycation は classical pathway は抑制するが、alternative pathway はほとんど抑制しない。

結 論

- 1) CI5 は protease に対する 発色基質のほとんどを  $\text{H}^2$  を水解したが、Thrombin に対する基質 S-2238 を最も水解した。
- 2) CI5 の ATEe に対する水解能は CIINA により抑制されるが、heparin, dextran sulfate は CIINA の作用に拮抗した。
- 3) CI5 と CIINA を incubate し、ATEe を水解しないようにしておき、さらに S-2238 を加えるとこれを充分水解した。
- 4) 以上より CI5 の heterogeneity が CIINA と反応する site と反応しない site をもつことが推察された。

高田由美子 高田明和

(浜松医大 才二生理)

補体系と凝固, 線溶系の関係は近年非常に注目を集めている分野である。線溶系はフィラスミンによる Cl, C3 の活性化により補体系と関係している。最近 Cooperらはフィラスミンは  $C1r$  と  $C1F$  にし, この  $C1F$  が  $C1s$  と  $C1F$  にすると云っている。一方凝固系は血小板に附着したトロンビンが  $C3/C5$  convertase として作用し,  $C3, C5$  を活性化することにより補体系と関係している。又補体が活性化されると単球からの tissue factor が放出され, これが凝固を促進することも報告されている。Cl は抗原抗体複合物のみならず, 血漿繊維素により活性化されるので, これを用い Cl 活性化におよぼす種々の因子を検討した。

## 方 法

Cl<sub>5</sub> 活性の測定: Nelson & Sakai & Stroud の方法を用いた。血漿の pH を 7.5 に合わせ, イオン強度を pH 7.5, 0.005M の Tris-HCl buffer により RSC 0.04 に下げた。この稀釈血漿を 0°C の食塩加水溶液中に 60分放置後, 3,300 rpm で 30分遠心し, 沈渣を再度 0.005M buffer にとみし遠心した。この沈渣を RSC 0.140 の pH 7.5 の Tris-HCl buffer に溶解した。0.5ml の Cl<sub>5</sub> 溶液と 0.5ml の acetyl tyrosine ethyl ester (ATEe, 10 $\mu$ moles/0.5ml) 溶液を混合し, ATEe を水解する程度を塩化才二鉄と塩酸ヒドロキシアミンの発色によりしるべた。

ClINA の純化: Cl inactivator (ClINA) は血漿を lysine-Sepharose を通し, 吸着部分を 0.2M phosphate buffer で溶出した。ClINA の活性ある部分を再度 lysine-Sepharose にのせ, phosphate buffer に加えた NaCl の gradient で溶出, 活性ある部分を取り, これをさらに G-200 を通し純化した。

Plasmin 活性: 0.8ml の血漿からえられた沈渣 0.4ml に 0.1ml の UK (urokinase: 100 u) 又は buffer を加え, これに 4% オセイノ溶液を 0.5ml 加えた。これを 37°C で incubate した後, 3ml の 15% のトリクロロ酢酸を加え, 2時間氷水中に放置した後遠心し, 上清の OD<sub>280</sub> を測定した。

## 結 果 と 考 察

1) 種々の RSC における Cl<sub>5</sub> の生成と plasmin の混在

RSC を 0.01 から 0.04 近変化させこむえられる Cl<sub>5</sub> の量はほとんど変化しなかつた。図 1 に示すように, 沈渣をそのまま casein と incubate しても, 又 UK を加えて plasminogen を plasmin にして, casein と incubate しても, ほとんど casein を分解しなかつた。即ち沈渣には active な plasmin も

plasminogen も 存在し たら いた。

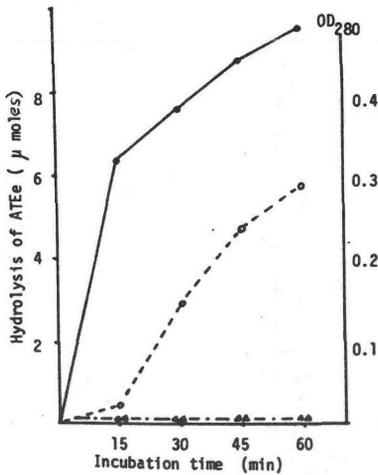


図 1

Hydrolysis of ATEe and caseinolysis by the precipitate containing Cl<sub>5</sub>.

0.4 ml of the precipitate, which was obtained from 0.8 ml of the plasma, was used for hydrolysis of ATEe and caseinolysis.

- indicates hydrolysis of ATEe by the precipitate.
- indicated caseinolysis by the mixture of Glu-plg (0.4 cu) and UK (100 u).
- ▲---▲ indicates caseinolysis by the precipitate.
- △---△ indicates caseinolysis by the mixture of the precipitate and UK (100 u).

2) 血液及び CIINA による生成した Cl<sub>5</sub> の抑制

Cl は抗原抗体複合物により活性化されるが、血液中の CIINA によりすぐ不活性化される。血液中の CIINA が稀釈により得られる Cl<sub>5</sub> を不活化するに充分量であるをしようとした。血液を稀釈して得た Cl<sub>5</sub> に血液のものと量を倍数稀釈しに加え、残存する Cl<sub>5</sub> の活性をしようとした。又純化した CIINA を血液中の濃度に調整し、これを倍数稀釈して Cl<sub>5</sub> に加え、その効果をしようとした。

図 2 に示すように血液中の CIINA は 2 倍稀釈の状態でも、その中に含まれる Cl<sub>5</sub> を完全に不活化した。このことは血液そのものに抗原抗体複合物を加えて Cl を活性化してもすぐ不活性化されるために ATEe 水溶液性で Cl<sub>5</sub> を測定出来ないこと、又 Cl の活性化は血液稀釈時のように CIINA の作用のあまり働かない状態のみよく測定出来ることを示す。

3) 血液稀釈時の Cl 活性化に対する種々アミノ酸の効果

血液稀釈時に種々のアミノ酸を加えて、Cl 活性化に対する作用をしようとした。(表 1)

Inhibition of Cl activation and Cl<sub>5</sub> by various aminoacids

aminoacids	% inhibition	
	Cl activation	Cl <sub>5</sub>
L-lysine	97.0	2.0
DL-ornithine	94.2	3.0
L-arginine	80.9	0
L-citrulline	3.9	0
DL-norleucine	7.0	0
6AHA (EACA)	20.5	1.5
tranexamic acid	11.4	2.0

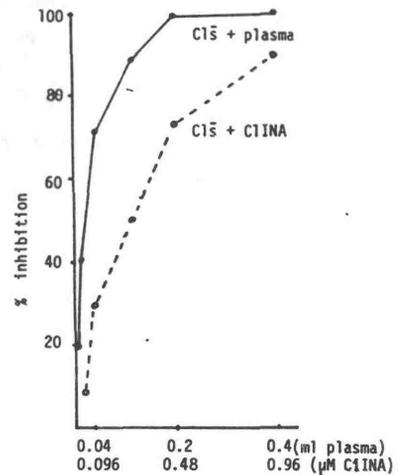


図 2

Inhibition of Cl<sub>5</sub> by plasma or CIINA.

表1に示す如く, lysine, arginine の様な  $\alpha, \omega$ -aminoacid が最も活性抑制作用が強く,  $\omega$ -aminoacid であり 6aminohexanoic acid (EACA) や tranexamic acid (t-AMCHA) は抑制作用が弱く, plasmin による線溶抑制作用と逆であった。plasmin による線溶抑制作用は tranexamic acid > EACA > lysine の順であった。一方既に活性化された Cl<sub>2</sub> に対しは、これらのアミノ酸は 60mM の濃度でほとんど抑制しなかった。

#### 4) Cl<sub>2</sub> の ATEe 水解活性と CH50 の凝固の影響

血漿に Ca<sup>++</sup> はトロンビンで凝固させ、フィブリン塊をとり除き、これを稀釈して CH50 と ATEe 水解活性を測定した。表2に示すように CH50 は Ca<sup>++</sup>、又はトロンビン凝固時と血漿の間に有意の差はなかった。一方 Cl<sub>2</sub> による ATEe 水解能をみると、トロンビン凝固時は血清、血漿の間に差はないが、Ca<sup>++</sup> 凝固時には血清の方が 15% 程度低下した。このことは Cl が XIII 因子によりフィブリンに結合されることが示唆する。

表2 Effects of coagulation on ATEe hydrolysis and CH50

	Ca <sup>++</sup> *	thrombin**
% ATEe hydrolysis	86.2 ± 2.0(13)***	97.3 ± 2.8(13)
% CH50	98.8 ± 1.7(9)	97.7 ± 1.8(9)

\* Human plasma was clotted by CaCl<sub>2</sub> and fibrin was removed.  
 \*\* Human plasma was clotted by thrombin and fibrin was removed.  
 \*\*\* mean ± standard error (No. of experiments).

## 結 論

- 1) 血漿稀釈時の Cl の活性化は混在するプラスミンによることは考えられない。
- 2) Cl 活性化抑制はリジンやアルギニンのような  $\alpha, \omega$ -アミノ酸が最も強く、EACA, tranexamic acid (t-AMCHA) は弱かった。
- 3) すでに活性化された Cl に対しはこれらのアミノ酸はほとんど抑制効果をもたなかった。
- 4)  $\omega$ -aminoacid の線溶抑制作用は Cl 活性化に対する作用と逆で tranexamic acid > EACA > リジンの順であった。
- 5) Ca<sup>++</sup> 再添加、トロンビン添加で血漿を凝固させると、CH50 は血清、血漿であまり差はなかったが、Ca<sup>++</sup> 再添加による凝固時の血清には ATEe 水解能が低下していた。即ち Cl が凝固時に XIII 因子によりフィブリンに結合している可能性を示す。

# 46 ヒト尿由来の low molecular weight inhibitor (LMW-INH) によるヒト C1 の不活化

大阪府立成人病センター 永木 和義 北野 悦子

(目的) 我々は昨年シンポジウムで LMW-INH のヒト尿からの分離と、これが alternative pathway C3 convertase の活性化を抑制することについて報告した。今回は LMW-INH の分離方法を改善し、かつこれがヒト C1 を不活化することを発見したのでこれについて報告する。

(材料と方法) ヒト尿は健康な成人男性の新鮮尿を用いた。ヒト IgG 感受性赤血球 EA, intermediate cell, C1q, C1s, B, D, cobra venom factor (CVF), C2, RC1q は我々の研究室で作製または分離精製した。C1q の溶血活性は C1q のみを欠く RC1q 血清と換作および EA を同時に反応させた one step 法で測定した。C1s 溶血活性および C1 溶血活性は EAC4, C2 および C-EDTA を用いて測定, CVF-B 活性は CVF-B に D を作用させこれにモルセット非感受性赤血球およびヒト C-EDTA を反応させて測定した。

(結果)

1. LMW-INH 分離方法の改善 昨年報告した方法では最終段階で脱塩の目的で Sephadex G-15 のゲルコロームを水で行うと LMW-INH の 230nm における吸光度の減少と 280nm の吸光度の増加および LMW-INH 活性の非常に低下が見られた。今回は原尿を活性炭 (1.5%) で処理したのを Amicon UM2 で濃縮して 5mM phosphate buffer の存在下で Sephadex G-15 によるゲルコロームを行った。活性炭処理を 7-10% DEAE をはぶいて直ちに QAE Sephadex A-25 に添加緩衝液濃度勾配で LMW-INH を溶出した。これを凍結乾燥後少量の水にとおして Bio-gel P2 に添加、水で溶出して脱塩した。OD 230nm/280nm の比は前回の方法の 2.6 から 7.8 0 に増加、さらに吸光度も 2l の尿から出発して前回の方法による 34mg から 1,500mg と著しく改善された。LMW-INH の組成、純度については検討中であるが高圧液相クロマトグラフィーでは日をゲル #3010, #3020 の何れでも吸光度 230nm では単一のピークを得ている。

2. LMW-INH の C1 に対する作用 液相中の C1 (1.95FU/ml) または C1 を 1.2FU/cell 結合した EAC1 に LMW-INH を加えて 37°C で 30 分反応後 (EAC1 cell の場合はよく cell を洗い) 過剰の C2, C2 および C-EDTA を加えて C1 溶血活性を測定した所、LMW-INH は

dose-dependentにCIを不活化した(Fig. 1)。次にEAC1 cellに温度、時間を変えてLMW-INHを反応させ、よく洗ったこのcellに残るCIの溶血活性を測定した所LMW-INHの作用は温度および時間依存性があり、EA上のCIを10%不活化するに必要な時間は7°Cでは0.7', 20°Cでは2.5', 0°Cでは9'であった(Fig. 2)。さらにC1β, C1γとLMW-INHを反応させた所(Fig. 3)に何かしらLMW-INHにより不活化された。しかしLMW-INHを作用させたこのEAはC1β結合能を対照と同程度に保っていた。

LMW-INHのC1β, C1γに対する作用とC2FB活性阻害作用が同一分子に由来するかを検討するためLMW-INHをEAC1 cellで吸収した。しかし対照(EAで吸収)に比してC1β不活化作用は僅かに減少したのみで、はっきりした差は得られなかった。

LMW-INHとC1, C1βまたはC1γを反応してこの等量の活性を不活化したこのC2FB又はC2FBの大量に遊離すると不活化されたC1, C1β, C1γ活性は60%以上恢復した。しかしEAC1 cellにLMW-INHを作用させたこの遊離してもcell上のC1活性は恢復しなかった。

C1の不活化物はC1INAはγパリンによりその活性が増強される。LMW-INHの活性もC1γに対してはγパリンにより増強されたがC1βに対するLMW-INHの作用にはγパリンは無効であった。

(まとめ)

LMW-INHのヒト尿からの分離方法を改善し、このLMW-INHがC1を不活化することを明らかにした。しかし結果に示したLMW-INHの作用はその大部分がCa<sup>++</sup>のキレートによるものとして説明しよう。現在LMW-INHのchelating agentとしての作用を検討中である。

Fig. 1

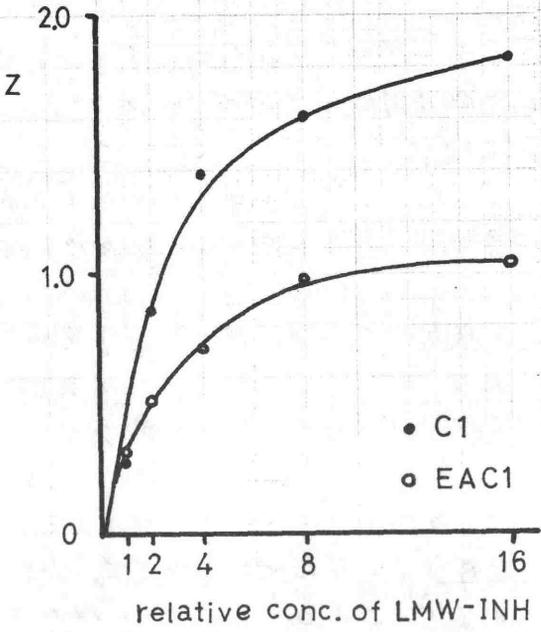


Fig. 2

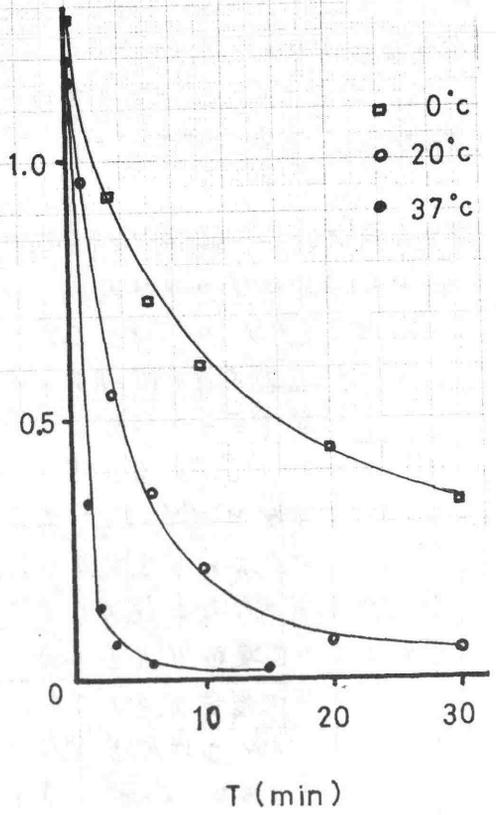
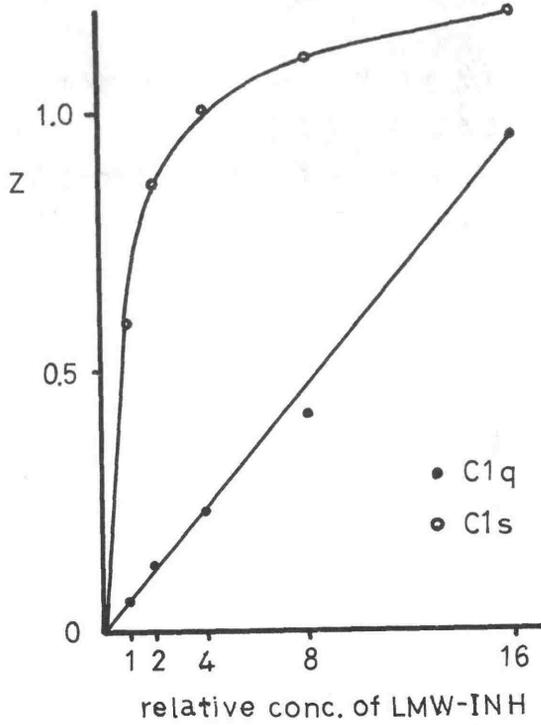


Fig. 3



森山 剛・川本保子・市川秀隆・深山昭雄  
(名古屋保健衛生大・医・微生物)

マウス腹腔マクロファージ(Mφ)が Zymosan 粒子を貪食した時、貪食後 24~48 時間以内では、Zymosan 粒子数に比例して factor B 分泌量は抑制されるが、さらに培養を持続すると逆に貪食粒子数に比例して factor B 分泌量が増加してくることを示した。同時に貪食 Mφ のこの二相性の factor B 産生能とその培養形態には、密接な関係のあることを報告した(第9回免疫学会)。一方、すでに Bianco らは、活性化ヒト factor B が Mφ の伸展(偽足形成)を促進させる作用のあることを報告している(J. exp. med., 149, 372, 1979)。今回我々は、マウス factor B とマウス腹腔 Mφ の培養形態の関係を明らかにしようとした。

#### 材料および方法

1. マクロファージ C3H/HeN マウス正常腹腔細胞をヘパリン加 5% FCS-MEM で採取し、シャーレ当り  $6 \times 10^5$  個を 5% FCS-MEM で 1 時間培養した後、非付着細胞を LAH-MEM で洗浄により除去し、付着細胞を以下の実験に用いた。

2. マウス B(mB), ヒト B(huB) および活性化ヒト B(CVF-huB) mB, huB および CVF-huB は、深山らの方法(Microbiol. Immunol., 23, 987, 1979, Biken J., 18, 193, 1975)に準じて、それぞれ精製した。

3. 抗マウス B-F(ab')<sub>2</sub> (Anti-mB-pepF(ab')<sub>2</sub>) および抗マウス C3-F(ab')<sub>2</sub> (Anti-mC3-pepF(ab')<sub>2</sub>) 抗マウス B 家兔血清および抗マウス C3 家兔血清を DEAE-セルロースを用い、リン酸緩衝液、pH 8.0 で溶出させ IgG 画分を得、その画分をペプシンで消化し、ゲル濾過によりそれぞれの F(ab')<sub>2</sub> フラグメントを得た。

4. 偽足の形態 Mφ を、Anti-mB-pepF(ab')<sub>2</sub>, mB および huB の存在下で、ヘパリン加 LAH-MEM で培養しその形態を観察した。対照は作用物質の代わりに、PBS と共にヘパリン加 LAH-MEM で培養した。Mφ の形態は、伸展の割合を示す各種の測定法から、赤血球の大小不同症を表わすのに用いる方法に従った。つまり、Mφ の短径と長径の比が 1.3 以上を基準とし、それ以上の値を示す Mφ の全 Mφ に対する割合で表わした。

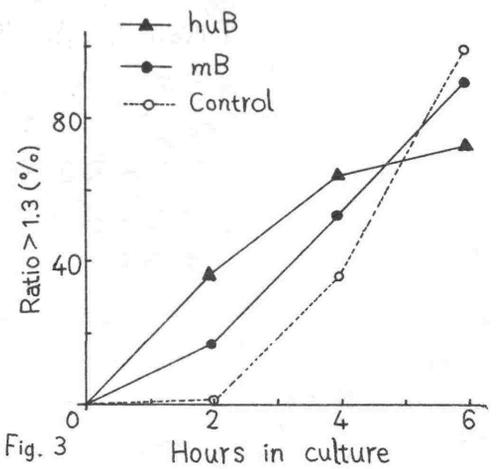
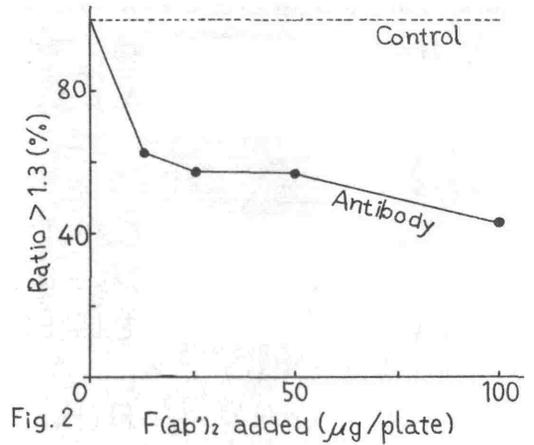
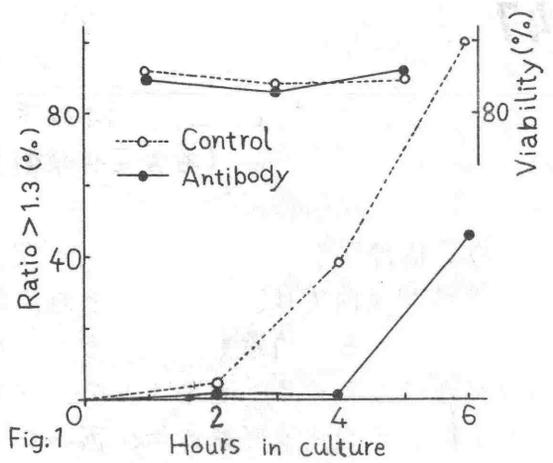
## 結果

1. Anti-mB-pepF(ab)<sub>2</sub> の作用  
 抗体 100 μg/plate を作用させたところ、対照が4~6時間で急激な偽足の伸展を示すのに対し、抗体を作用させた系では、4時間まではほとんど伸展せず6時間後にも多少の伸展を示したが、対照との間には明らかな差を認めなかった。また、抗体存在下でのMφの生存率は、培養6時間後でも対照と同じであった (Fig. 1)。なお、Anti-mB-pepF(ab)<sub>2</sub> の代わりに Anti-mC3-pepF(ab)<sub>2</sub> を作用させた時は、偽足伸展阻止作用を全く認めなかった。

2. Anti-mB-pepF(ab)<sub>2</sub> の Dose response  
 Mφの偽足の伸展を明らかに阻止する6時間後の抗体の Dose response を検討した (Fig. 2)。

3. mB および huB の作用  
 4 μg/plate の mB および huB を作用させると、2時間以内に偽足の伸展が見られ、4時間後まで伸展が促進される。しかし、6時間近く経過すると、その促進作用は見られなくなり、対照とほぼ同様になる。また、huB は mB に比べて、伸展を促進させる割合が高い (Fig. 3)。さらに、huB とその活性化物 CVF-huB の伸展作用を比較したところ、CVF-huB は最もその作用が強かった。

4. mB および huB の Dose response  
 Mφの偽足の伸展を促進している培養4時間後の Dose response を検討した。mB および huB のどちらも、数倍の希釈で対照との差が認められなくなった。mB は、約 1 μg/plate 以下



で偽足伸展が対照と同様になるが、huBでは、約 $3\mu\text{g}/\text{plate}$ 以下で対照との差がなくなった。

### 考察

我々の行った一連の実験から、LPS, ZymosanなどMφの活性化をもたらす物質は、そのfactor B産生能を高めることがわかっている。同時に活性化Mφは形態学的に著明な偽足を形成するようになる。今回の成績から、添加したmBはMφの伸展作用を促進することは明らかであるが、培養時間の経過と共に、Mφ自体が培養液中に放出するfactor Bの影響が強くなり、10時間以上の培養細胞については、添加mBの作用は、認められなくなるものと考えられる。しかし、factor BがMφに直接はたらいて伸展作用を示すのか、あるいは、C3および蛋白分解酵素との反応の結果形成されるC3bを介した作用であるかは、現在検討中である。

筑波大学基礎医学系

藤田 複三 向井 鎌三郎 福島 繁

浜口 秀夫 田村 昇

### <はじめに>

1970年代後半の補体学の進歩は C3bINA, C4bp,  $\beta_{1H}$  に代表される control protein の存在下で、はじめて補体が生体防御に有益に働くことを明らかにした。しかも control protein の機能は、起りうる反応の場 (microenvironment) によって規定されている。今回我々は、局所における補体の活性化及びそのコントロールを明らかにする目的で、ヒト未梢単核球による  $\beta_{1H}$  の産生を検討したので、その結果について報告する。

### <材料と方法>

- 1) ヒト未梢単核球は、イマセルを用いて比重遠心法にてヒトリンパ球及び単球を得た。これらの細胞を PHA の存在下にて培養し、3日後に、メチオニンを含む培地に移し、 $^{35}\text{S}$ -メチオニンを加えて、11時間培養しその上清と細胞成分を遠心分離した。細胞成分は 2% NP-40 で 4°C 30分間溶解し、10,000 g 30分間遠心分離し、核成分と膜成分を除去した。加えて  $^{35}\text{S}$ -メチオニンは 約10% 細胞内にヒトこきれた。
- 2) Pulse-chase : 上記同様の操作にてヒト未梢単核球を培養し、 $^{35}\text{S}$ -メチオニンを加えて 3時間培養し、その後 cold のメチオニンを加えて、3, 6, 9, 14時間後に上清及び細胞内の  $\beta_{1H}$  の産生を検討した。
- 3)  $\beta_{1H}$  の産生は、cold の  $\beta_{1H}$  とその抗体を用いて、ロケット電気泳動及び交差電気泳動を行い、そのラジオオートグラフより沈降線ととりこまれた放射能物質より判定した。
- 4) 更に 培養上清に cold の  $\beta_{1H}$  とその抗体を加え、抗原抗体複合物を形成し、それを 2% SDS で可溶化し、それをとりこまれ  $\beta_{1H}$  分子を SDS-PAGE によって検討した。

### <結果>

予備実験にて 抗原抗体複合物に非特異的に結合するたんぱく質を除去したことが明らかになったため、交差電気泳動の一次元泳動では卵白アルブミンとその抗体で ロケット電気泳動を行い、その後二次元の泳

動を行った。二次元のコントロールとしてはトランスフェリンとその抗体による沈降線を用いた。図1-1は細胞上清を含む資料の染色像で、1-2はそのラジオオートグラフである。染色像では卵白アルブミンのロケットとトランスフェリンとβHのピークが見え、ラジオオートグラフでは卵白アルブミンに特異的に吸着した放射活性とβHに一致した放射活性を見ることが出来る。ついで細胞溶解液にて同様の実験を行い図1-3,4を示した。培養上清と同様に細胞内にもβHが合成されている事が明らかになった。

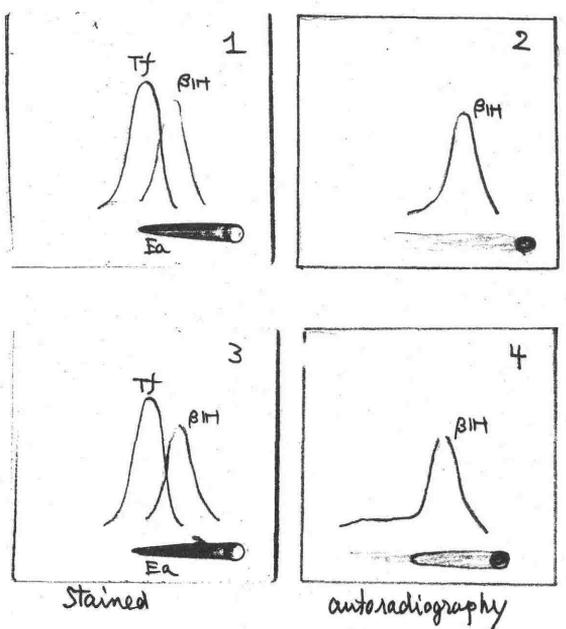
ついで上記実験結果をより明らかにするために、Pulse-chaseによりβHの産生を経時的に検討した。3時間β-メチオニンにてpulseし、細胞を洗った後、メチオニンを加えて(chase)3, 6, 9, 14時間に培養上清と細胞内においてβHの清長をロケット電気泳動にて検討した。培養上清では、3時間ではまだβHが分泌されておらず、9時間ではピークとなり、14時間ではその放射活性はあまり変化がない。一方細胞内では6時間、9時間、14時間とβHの放射性は減弱して行く。

βHを分子でとらえるため、培養上清におおむね、至適濃度を決定したColdのβHとその抗体を加え、産生されたβHをもとに沈降させ、沈降物をよく洗い、SDSで可溶化してSDS-PAGEを行った。その後ラジオオートグラフを行い、放射活性のとりこみを見た。コントロールには卵白アルブミンとその抗体による沈降物を用いた。染色パターンはβHに一致して分子量15,000のところにラジオオートグラフにてβHのバンドを認め、このバンドは卵白アルブミンとその抗体との沈降物には認められなかった。

図1

< 結論 >

ヒト赤血球核球によってβHが産生されていることを明らかにした。この事は局所においてもcontrol proteinが存在し、補体系を制御している事を示す。



筑波大学基礎医学系 伊藤 清子, 田村 昇

補体系の制御因子 β1H グロブリンについては、(1) C3b に対する C3b inactivator の作用を促進させ、(2) alternative pathway の C3 convertase C3bB や C3bBP からの B の decay を促進し、(3) C3b に結合して C5 convertase の作用を阻害する、などの働きが報告されている。しかし、この第三の作用については否定的な報告もみられる。そこで我々はこの点について検討を加えてみた。

〈β1H グロブリンの精製〉 β1H グロブリンは ACD-ヒト血漿から、永木や Whaley らの方法に準じて精製した。得られた β1H は SDS-ゲル電気泳動で単一のバンドを示し、alternative pathway の C3 convertase C3bB や C3bBP の形成を阻害し、その decay を促進したが、classical pathway の C3 convertase C142 の形成や decay には影響を与えなかった。

〈EAC1423 と C5 の反応に及ぼす β1H グロブリンの影響〉

C3 limit で C5 excess の場合

C3 の濃度を変えて作製した EA C1423 ( $1 \times 10^8/ml$ ) に同容量の β1H を加えて 37°C で 20 分間反応させ、洗浄後に excess の C5, C6~9 を加えて溶血させた場合には、図 1 に示すように、β1H の C3 に対する影響はほとんどみられなかった。

C3 excess で C5 limit の場合

excess の C3 (約 160 SFU/cell) を用いて作製した EAC1423 ( $1 \times 10^8/ml$ ) に同容量の β1H を 37°C で 20 分間反応させ、洗浄後、種々の濃度の C5 と excess の C6~9 を加えて溶血させた場合には、図 2 に示すように、β1H の量に応じて EAC1423 と C5 による EAC14235 の形成が阻害された。EAC1423 の代わりに EAC43 を用い、β1H と反応させたあと、C1 と C2、limit の C5 と excess の C6~9 を反応させた場合にも、同様に β1H により C5 site の形成が阻害された。

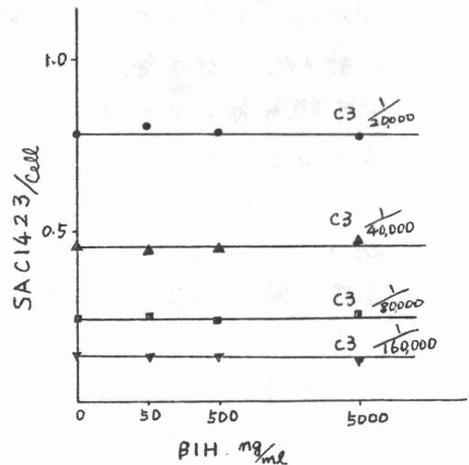


fig1. Effect of β1H on EAC1423

< EAC1423 による C5 consumption に対する  $\beta$ 1H の影響 >

EAC1423 と C5 の反応の  $\beta$ 1H による阻害が、C5 convertase による C5 の活性化の阻害によるのか、活性化された C5 の EAC1423 への結合の阻害によるのか、を明らかにするため、 $\beta$ 1H 存在下における EAC14235 形成時の C5 consumption の度を調べた。

約 160 SFU/cell の C3 を作製した EAC1423 ( $1 \times 10^8$ /ml) に同容量の  $\beta$ 1H (5000 ng/ml) を反応させ、洗浄後、limit の C5 と 25°C で反応させ、EAC14235 の形成と反応上清に残存する C5 活性を時間を追って調べた。図 2 に示すように、 $\beta$ 1H は EAC14235 の形成と C5 の consumption を同時に阻害した。即ち、 $\beta$ 1H は C5 convertase による C5 の活性化を阻害している。

< 考察と結論 >

C5 convertase C1423 と C5 との反応は、C3 excess で C5 limit の時に、 $\beta$ 1H によって阻害される。C3 limit の時には、永木らが報告しているようにほとんど阻害されなかった。 $\beta$ 1H が C3b 分子に結合することによってこの阻害が起きるものとすれば、C3 limit の時にこの阻害効果はむしろ著明になってよいはずであるが結果は逆であった。C3 excess の時の方が、 $\beta$ 1H の C3b 分子への結合がより強く起きるとすれば、このような結果が生じてもおかしくない。

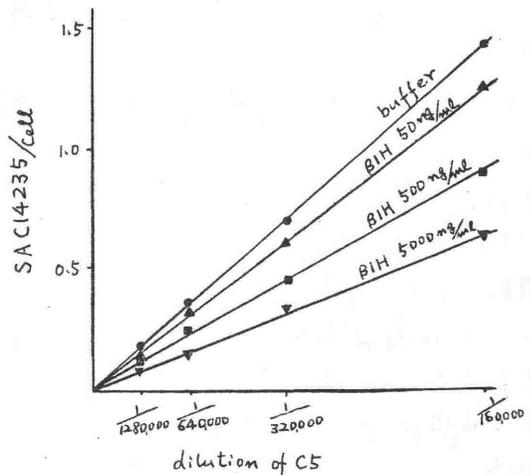


fig2. Effect of  $\beta$ 1H on EAC14235 formation from EAC1423ex. + C5lim.

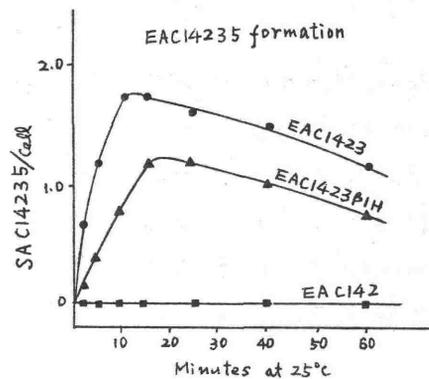
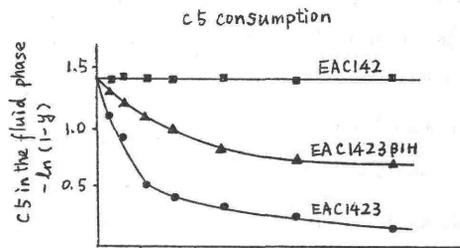


fig3. Effect of  $\beta$ 1H on consumption of C5 during EAC14235 formation from EAC1423ex. + C5lim.

目的

我々は、さきに抗補体剤 K-76COOH を開発し、これが C5 反応段階を特異的に抑制することを第 8 回日本免疫学会で報告した。この性質を利用して、感作血球 EA を本薬剤存在下で、ヒト又はモルモット補体血清に作用させて、EAC1-3b ce11 や EAC4b3b ce11 を作る簡便法を考案し、第 16 回補体シンポジウムで報告した。その際、この薬剤存在下では長時間反応後も形成された EAC1-3b の溶血活性、IA 活性があまり低下せず、ce11 上での C3b 分解が抑制されることが注目された。従って、K-76COOH は、血清中の C3b 不活化酵素系を抑制している可能性が考えられるのでそれを追究した。

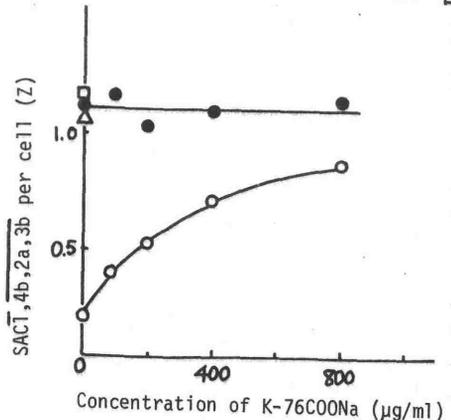
方法

ヒト補体成分 C3 は、Tack & Prahl の方法に準じ、さらに Hydroxylapatite および DE52 cellulose columns で再クロマトして精製した。精製した C3 の一部は、Trypsin による限定分解により、C3b とした。又、精製したヒト C3 は、lactoperoxidase 法で <sup>125</sup>I を label し、35,000-70,000 cpm/μg で実験を行なった。ヒト C3bINA と β1H は、33%-50% 硫酸沈殿、QAE-Sephadex-A50 で分離し、β1H は、さらに Sephadex G200, DE32 columns で精製し、成人病センターの永木和義先生より頂いた Rabbit antiβ1H antiserum に対するゲル内沈降反応で確認した。又、C1gp, C4hu, C2gp, C5gp, C6gp, C7gp, C8gp, C9gp は、当教室での従来の方法で精製した。尚、一部の実験には、Cordis 社製 C1hu, C4hu, C2hu, C3bINAhu を用いた。

結果

EAC1gpC4huC2gpC3hu に C3bINA + β1H を反応させる系に、K-76COOH を添加して反応後 C5-9gp reagent で溶血させ、その溶血活性低下がこの薬剤で抑制されるかどうかを調べてみると 400μg/ml で C3b 不活化の約 60% が抑制された(図1)。

図1. C3bINA + β1H による EAC1-3b 上の C3b 不活化に対する K-76COOH の影響



- : EAC1-3b + C3bINA + β1H
- : EAC1-3b solo
- △: EAC1-3b + C3bINA
- : EAC1-3b + β1H



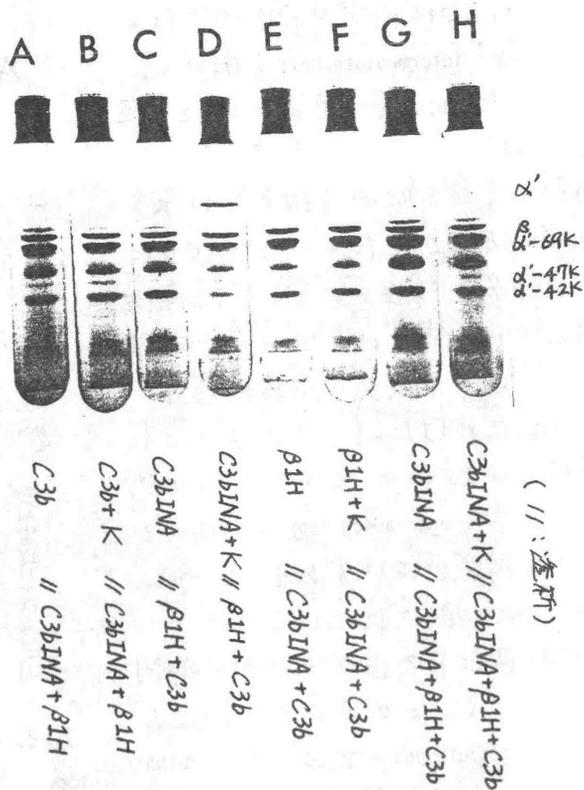
前回、本シンポジウムで、K-76C00H を使って EAC1-3b(K-76) cells の簡単な方法を報告したが、この cell 上に C3b' 又は、C3d fragment が存在するかどうかを調べるために、 $^{125}\text{I}$  で label された C3 を添加した正常ヒト血清を K-76C00H で処理して EAC1-3\*(K-76) cell を作成し、この cell を 4% SDS で solubilize した後、alkali 処理して、還元 SDS-PAGE を行ないその gel を 1mm 間隔に切って、 $\gamma$ -counter で count してみると、intact な C3b の  $\alpha'$  chain と  $\beta$  chain だけの peak が存在し、それ以外の peak が存在しないことがわかり  $\alpha'$  chain の切断が K-76C00H で完全に阻害されていることが明らかとなった。

このことは、slab gel SDS-PAGE の autoradiography でも同様の結果を得た。又、 $^{125}\text{I}$ -C3 を加えて作成した EAC1-3\*(K-76) cell に、さらに C3bINA, B1H を作用させると、membrane-bound C3b は、membrane-bound C3b' となるが、同時に K-76C00H を反応させた場合には、C3b の  $\alpha'$  chain の切断が阻止されることも確かめた。これらのことから、正常ヒト血清中での K-76C00H の濃度は、前報の EAC1-3b cell 作成条件下では、3mg/ml の濃度で C3bINA 系を完全に抑えていることが、明らかとなった。

### 考察

K-76C00H は、C5 反応段階に対して非常に特異性の高い阻害剤であると同時に、今回の実験結果から C3bINA 系をも抑制することが明らかとなった。但し、C3bINA の阻害には、K-76C00H のかなりの濃度を必要とし、特異的酵素阻害剤としては阻害濃度が高すぎると考えられる。しかし、その阻害は、cofactor に対してではなく、C3bINA に直接作用することが明らかになった。この性質は、EAC1-3b cell や EAC4b,3b cell 作成に非常に便利な試薬として、K-76C00H が使用できることを示している。

図4. K-76C00H の C3bINA 系への作用



# 51

K-76C00H を使、ての EAC1,4b,2a,3b, EAC4b,3b cells の簡単な作成法 (II)

EAC1,4b,2a,3b (K-76), EAC4b,3b (K-76) cells の解析

洪 御秀, 木下タロウ, 岡田真理子, 井上公蔵 (阪大・産・細菌)

## 目的

第16回本シンポジウムで、我々は、C5 反応段階の inhibitor である K-76C00H を利用して、モルモット或いはヒト補体血清を使って、EAC1,4b,2a,3b cell, EAC4b,3b cell の簡単な作成法を報告した。今回、別報で報告するように、K-76C00H が C5 反応段階の inhibitor であるだけでなく、C3bINA 系をも抑制することを明らかにしたので、この EAC1,4b,2a,3b (K-76) cell と EAC4b,3b, (K-76) cell の性質をさらに解析し、これらの intermediate cells が EAC roset assay に利用できることを確認したので、その詳細について報告したい。

## 方法

ヒト補体成分 C3 は、Tack and Prahl の方法に準じ、さらに Hydroxylapatite 及び DE-52 cellulose column で再クロマトして精製した。精製したヒト C3 は、lactoperoxidase 法で  $^{125}\text{I}$  を label し、70,000 ~ 35,000 cpm/ $\mu\text{g}$  で実験を行なった。ヒト B1H は 33% ~ 50% 硫酸沈殿、QAE-Sephadex-A-50 column で精製した。又、ヒト Factor B は、50% ~ 75% 硫酸沈殿、8% ~ 23% PEG4000 沈殿、さらに、CM-23, Sephadex-G-200, DE-32 column chromatography で精製し、Behring 社の anti human C3 activator antiserum に対するゲル内沈降反応で確認した。感作血球は、ウサギ抗体で感作したヒツジ赤血球、又は、ウサギ抗体を Sephadex-G-150 で分画して得た IgM 抗体で感作したヒツジ赤血球を用いた。EAC roset assay に用いた Raji cell 及び Daudi cell は、東北大学抗酸菌研橋武彦先生より頂いたものを、10% FCS 加 RPMI1640 medium で培養し、assay は培養 3 ~ 4 日の cell を用いて行なった。精製した bovine conglutinin は、成人病センターの飯田先生より提供して頂いた。

## 結果

まず、EAC1-3b(K-76) cell 作成時の反応系中の EA(IgM) 濃度と、本来 EA(IgM)C1-3b (K-76) cell 上の C3b 数の関係を調べるために、正常ヒト血清に K-76C00H を加えて一夜低温放置したものに、一定の  $^{125}\text{I}$ -C3 と EA(IgM) の濃度を 4 段階に変量して加えて、EA(IgM)C1-3\* (K-76) cell を作成した。これらの cell に bound した  $^{125}\text{I}$ -C3b の count を測定してみると、bound した  $^{125}\text{I}$ -C3b の数は、 $1 \times 10^9/\text{ml}$  の濃度で作った EA(IgM)C1-3b\* (K-76) cell よりも、 $1 \times 10^8/\text{ml}$  の濃度で作った EA(IgM)C1-3b\* (K-76) cell の方が 10 倍多く cell 上に bound していることがわかり、さらに、bound した  $^{125}\text{I}$ -C3b の数と反応時の cell の濃度とが、両対数で直線にのることが明らかとなった。又、別報で示すように K-76C00H は、C3bINA system をも抑制し、K-76C00H で作った intermediate cells は、C3b だけが cell 上に存在し、C3b, C3d fragment が cell 上に存在

(ないということ)を明らかにしたので、この薬剤処理により作成された EAC1-3b(K-76)cells は EAC rosset assay に利用できると考えられる。  $1 \times 10^8$ /ml EA(IgM) の濃度で作った EA(IgM) C1-3b(K-76) cell の Raji cell と Daudi cell との rosset formation を調べてみると、Raji cell で約 60% の Rosset が形成されたが、Daudi cell では 5% 以下しか Rosset が形成されず、cell 当りに付着する EAC の数も少なかった。

表 1. EA(IgM)C1-3b (K-76) 上の C3b 量と Rosset 形成

EAC1-3b(K-76)作成時の EA IgM 濃度	$^{125}$ IC3b count $1 \times 10^8$ cells	% Rosset vs. Raji cell	% Rosset vs. Daudi cell
$1 \times 10^8$ /ml	7783 (cpm)	57	4.5
$2.5 \times 10^8$ /ml	3019 ( "	26.5	2.8
$5 \times 10^8$ /ml	1374 ( "	22.6	2.7
$1 \times 10^9$ /ml	781 ( "	19.6	5.1

さらに、EA(IgM)C1-3作成時の EA(IgM) の cell の濃度の増加に応じて、EAC rosset 形成がどのように変化するかを調べてみると、Raji

cell との rosset は、cell 上に bound した C3b の数に応じて減少していった。なお、Daudi cell との rosset は、作成時の cell 濃度にかかわらず 5% 以下であった(表 1)。

$1 \times 10^8$ /ml EA(IgM) の濃度で作った EA(IgM) C1-3b(K-76)cell を一定の C3bINA と  $\beta$ 1H で処理した後、Raji cell と Daudi cell の Rosset 形成を調べてみると、Raji cell では約 80%、Daudi cell では約 60% の Rosset が形成された。

EA(IgM) の濃度を 4 段階に変量して作成した EA(IgM)C1-3 (K-76) cell と bovine conglutinin との反応を調べてみると、EA(IgM)C1-3(K-76)cell 自体では conglutination は生じなかったが、C3bINA、 $\beta$ 1H を作用させてやると、conglutination が起るようになり、EAC(IgM)C1-3cell 作成時に bound した C3b の数に応じて conglutination 活性が高かった。

前回の補体シンポジウムで、この薬剤で作った EAC4b3b(K-76)cell が alternative-pathway の assay にも利用できることを示したが、今回はさらに、一定量の EAC4b, 3b,P cell を用いて、変量した精製ヒト Factor B を反応させた後、Rat 又は g.p.C EDTA で溶血させると、溶血量の区数が加えた Factor B 量に比例することが明らかとなった(図 1)。

又、EAC4b, 3b,P cell と一定量のヒト Factor B との反応系にヒト  $\beta$ 1H を変量して加えて反応させた後、C-EDTA を加えて溶血させると、溶血は  $\beta$ 1H の量に応じて阻止された(図 2)。

これらの事から、K-76C00H を利用して作成された EAC4b, 3b,P cell が Factor B や  $\beta$ 1H を assay するのに非常に有効な intermediate cell であることも明らかとなった。さらに、K-76C00H で処理して作成した EAC1-3b, EAC4b, 3b cells の cell 上に、C3b と結合可能な Factor B, Properdin,  $\beta$ 1H が bound しているかどうかを調べるために、 $1 \times 10^8$ /ml EA を加えて(従って C3b/cell が多い)作った intermediate cell を anti B

図1. EAC4b, 3b (K-76)を用いたFactor Bの溶血活性.

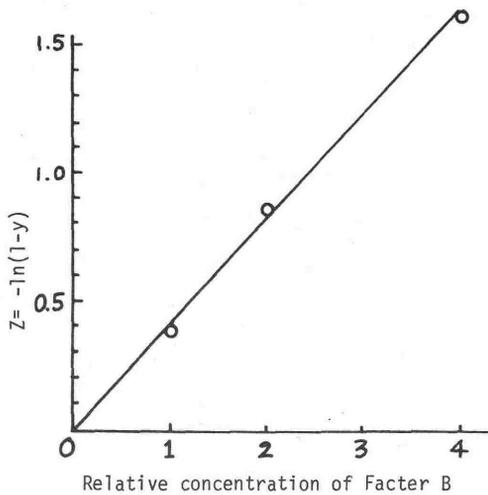
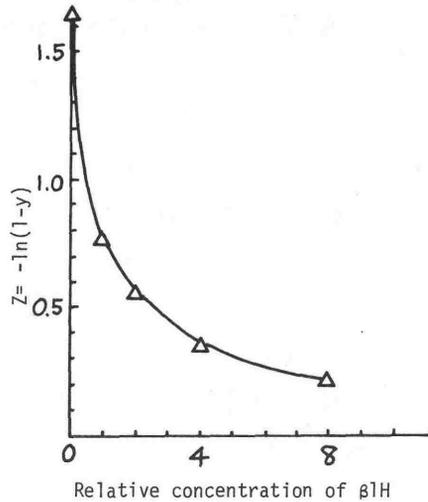


図2. EAC4b, 3b (K-76)+Factor B系に対するβ1Hの影響



antiserum, Anti P antiserum 及び, anti β1H antiserum を用いて, それぞれによる agglutination を調べたところ, 正常ヒト血清を K-76C00H で処理して作成した EAC1-3b(K-76)cell は, Factor B, Properdin, β1H が bound していることがわかり, RP で作成した EAC1-3b(K-76)cell では, Properdin が減少していることを示し, 前回示したように, properdin が cell 上に bound していることを, さらに確認した。

### 考察

K-76C00H は, C5 反応段階に対して非常に特異性の高い阻害剤であるが, 高濃度で用いた場合には, さらに C3bINA 系をも抑制することが明らかとなったので, この薬剤を用いて作った EAC1-3(K-76) cell が, EAC roset assay に利用できることを明らかにした。また, 正常ヒト血清と K-76C00H で処理して作成した EAC1-3(K-76) cell の cell 上には, bound C3b/cell を極度に多くする条件で作成した場合には, Factor B, properdin が bound していることを確認し, この cell を EDTA-GVB で洗って, 37°C で 3 時間 incubate して作った EAC4b, 3b(K-76) cell は, properdin だけが bound しており, EAC4b, 3b, P cell となっていることを確認した。又, この EAC4b, 3b, P cell と精製した Factor B と Rat 又, モルモット C-EDTA で, Factor B に関して one hit に lysis を起すことも確かめた。

以上のことから, この薬剤で作成した EAC1-3(K-76) cell と EAC4b, 3b(K-76) cell は, 前回で報告したように, classical pathway, alternative pathway の解析をするのに非常に有用な cell であるばかりでなく EAC roset assay 用としても利用できることを明らかにした。

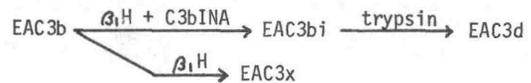
## 52 ヒト白血球のEACロゼット形成における二価イオン依存性

佐藤 智\* 奥田 智子\* 橘 武彦\* 渡辺 信雄\*\*

\* 東北大学 抗研 免疫      \*\* 磐城共立病院 小児科

感作ヒツジ赤血球 (EAIgM) に C5 欠損マウス新鮮血清 (1:20 倍) を 37°C、2 時間反応させて作った抗原抗体補体結合物 (EAC<sup>mouse</sup>) は、バーキットリンパ腫由来の Daudi 細胞および Raji 細胞とロゼットを形成するがヒト赤血球と結合しないため、従来から C3d レセプター (C3dR) の検出に利用されてきた。我々はこの EAC<sup>m</sup> とヒト好中球および単球が Mg<sup>++</sup> 依存性にロゼットを形成することを見出し、一昨年の本シンポジウムで報告<sup>1)</sup>したが、その後、β<sub>1</sub>H、C3bINA、プロテアーゼによって逐次分解を受けた各種の膜結合 C3b フラグメントに対するレセプターの存在が認められ、EAC<sup>m</sup> がどのレセプターと反応するのかを明らかにする必要がある。そこで、今回精製補体成分を用いて EAC3b、EAC3x、EAC3bi、および EAC3d を作製し、各種白血球とのロゼット形成とその際の二価イオン依存性を観察したので報告する。

〔研究材料および方法〕 C1 はモルモットより精製し、その他はヒト血清から Tack<sup>2)3)</sup> の方法に準じて C4、C2、C3、β<sub>1</sub>H、および C3bINA を精製し、機能的特異性を検討した上で EAC を作製した。trypsin は Sigma 社製 (Type III) である。まず定法に従って EAC-14<sup>Oxy</sup>2 を作り、続いて C3 を結合させて EAC14<sup>Oxy</sup>23b (以下 EAC3b) を作製した。この EAC3b に β<sub>1</sub>H を 37°C、60 分作用させたものを EAC3x、β<sub>1</sub>H と C3bINA を 37°C、60 分作用させたものを EAC3bi とした (右図)。



更に、EAC3bi に trypsin を 37°C、30 分間作用させ

引き続いて trypsin inhibitor (SBTI, Sigma 社) で処理したものを EAC3d とした。EAC<sup>human</sup>、EAC<sup>mouse</sup> は既報<sup>6)</sup>の方法、EAC<sup>horse</sup> は Eisenberg<sup>7)</sup>の方法に従って作製した。

白血球分画は、Ficoll-Isopaque を用い比重遠心法により末梢血から単核細胞層と赤血球層を得、前者から FCS 処理プラスチックシャーレに付着させて単球を (純度 79%)、更に非付着細胞から EN ロゼット法で Tリンパ球を除去し Bリンパ球 rich 分画 (EN-RFC 2%、POX 陽性 35%) を得た。顆粒球は、比重遠心後の赤血球層に Dextran を加え

赤血球沈降後の浮遊細胞として採取した(好中球88%、好酸球11%、リンパ球1%)。

ロゼット形成は橘・吉田<sup>8)</sup>のマイクロプレート法に従って行なった。

コングルチニンはLackmann<sup>9)</sup>の方法に準じてウシ血清より抽出した。

〔結果および考察〕 全血清(補体)を用いて作製したEACと白血球のロゼット形成: 反応をGVB<sup>++</sup>又は0.04MEDTAGVB中で行な

った。その結果(表1)、リンパ球はEDTAに影響されないが、単球および顆粒球はEAC<sup>m</sup>だけでなくEAC<sup>ho</sup>とのロゼット形成も著しく低下した。EAC<sup>m</sup>とEAC<sup>ho</sup>はコングルチニンにより凝集する。従って膜結合C3b<sup>i</sup>が共通して存在すると理解され、単球顆粒球の二価イオン依存性がC3b<sup>i</sup>と関連しているのではないかと考えられた。

表1 %RFC

	EAC <sup>h</sup>		EAC <sup>ho</sup>		EAC <sup>m</sup>		E <sub>N</sub>	POX(+)
	+	-	+	-	+	-		
リンパ球	18	17	17	11	13	13	73	0.8
単球	83	84	91	3	75	3	2	91
顆粒球	99	98	99	23	78	0.3	0.2	99
コングルチニン	+		++		+			

① +: GVB<sup>++</sup> - : 0.04MEDTAGVB  
② 凝集の程度

精製補体成分を用いて作製したEACと白血球のロゼット形成(表2)

EAC3bロゼットは、Bリンパ球単球、および顆粒球に共通してみられEDTAは影響しない。EAC3xはEAC3bにβ<sub>2</sub>H<sub>1</sub>を作用させることにより新しい部位(

表2 %RFC

EDTA <sup>①</sup>	EAC3b			EAC3x			EAC3b <sup>i</sup>			EAC3d		
	0	0.01	0.04	0	0.01	0.04	0	0.01	0.04	0	0.01	0.04
Bリンパ球rich	98	97	95	94	91	82	76	54	30	25	30	30
単球	82	84	75	65	72	NT	83	2	1	0	0.3	0
顆粒球	99	99	98	96	96	76	93	0.7	2	4	0.7	3
ヒト赤血球	95	96	96	75	74	79	4	5	3	3	3	3
Raji細胞	0.4	0.2	0	51	55	50	54	67	63	62	74	58
コングルチニン	-			-			+			-		

① 0: GVB<sup>++</sup>  
0.01(0.04): 0.01(0.04)MEDTAGVB

C3x)が現われ、C3xRを介してEDTAの存否に拘らずRaji細胞とロゼットを形成すること(既報)が再確認された。次にEAC3b<sup>i</sup>であるが、まず単球・顆粒球と二価イオンに依存してロゼットを形成することが確かめられた。また、Bリンパ球も一見EDTAの影響をうける如く見える。しかし、EAC3b<sup>i</sup>には膜結合C3bがないこと、Bリンパ球rich分画には単球・顆粒球が35%混在していて前述の様にEDTAによりEAC3b<sup>i</sup>ロゼットが阻害されること、又、EDTA存在下のEAC3b<sup>i</sup>ロゼット形成細胞はペルオキシダーゼ染色(POX)陰性であったことから、Bリンパ球がEDTAの影響をうける如く見えるのは、Bリン

パトリック分画中の単球・顆粒球のためと思われる。Bリンパ球自体はEDTAの存在に拘らずEAC3b<sup>-</sup>ロゼットを形成すると考えられる。EAC3dについては単球・顆粒球がほとんどロゼットを形成しないこと、従ってBリンパ球が二価イオン濃度に拘らずEAC3dロゼットを形成することが示された。この場合もロゼット形成細胞はペルオキシダーゼ染色陰性であった。

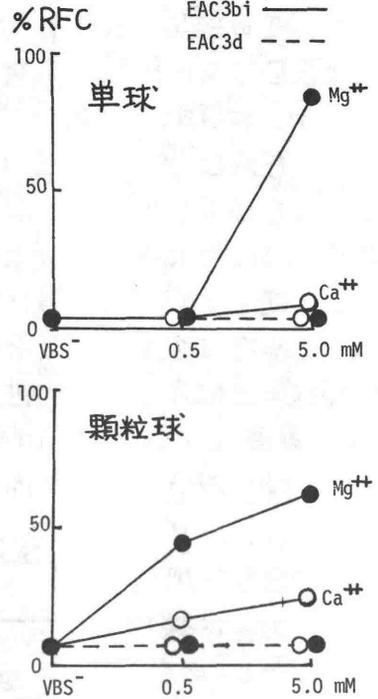
更に、単球・顆粒球のEAC3b<sup>-</sup>およびEAC3dロゼット形成のMg<sup>++</sup>・Ca<sup>++</sup>依存性を観察した(図1)。単球はVBS<sup>-</sup>中ではEAC3b<sup>-</sup>とロゼットを形成しないが、とくにMg<sup>++</sup>濃度に依存して形成率が上昇した。これに対してC3dRは5mM濃度でも検出されなかった。従って単球・顆粒球のEAC<sup>m</sup>ロゼット形成は主にC3b<sup>-</sup>Rが関与していると考えられる。

〔結語〕 1) Bリンパ球はC3b、C3b<sup>-</sup>、C3d、いずれのEACロゼット形成にも二価イオン依存性がない。2) 単球・顆粒球のC3bRによるロゼット形成には二価イオン依存性がないが、C3b<sup>-</sup>Rでは二価イオンに依存する。3) Raji細胞は、EAC3xをはじめEAC3との結合に二価イオン依存性がない。4) EAC<sup>m</sup>は単球・顆粒球とのロゼット形成に際しC3b<sup>-</sup>Rと強く結合する。5) EAC<sup>ho</sup>と単球・顆粒球のロゼット形成も二価イオンに依存する。

〔文献〕

- 1) 橘 他 第15回補体シンポジウム記録、44頁(1978)
- 2) Tack 他 Biochemistry, 15:4513 (1976)
- 3) Bolotin 他 Biochemistry, 16:2008 (1977)
- 4) 奥田 他 第15回補体シンポジウム記録、48頁(1978)
- 5) Okuda 他 Immunology, in press (1980)
- 6) 橘 他 第14回補体シンポジウム記録、89頁(1977)
- 7) Eisenberg 他 J. Immunol., 118:1428 (1977)
- 8) 橘 他 免疫実験操作法、A:455 (1975)
- 9) Lackmann 他 Handbook of Experimental Immunology, 5A.7 (1978)

図1



木下タロウ, 洪 郷秀, 岡田真理子, 井上公藏 (阪大・医・細菌)

### 目的

補体の膜障害機構を解析していく上で, C5以下の後期反応成分を, 単一な蛋白として数百 $\mu\text{g}$ 以上得ることは, 大変有用である。

ヒト補体の後期反応成分は, おでに充分実用的な精製法がすべての成分について発表されている。モルモットでは, わずかにC5で, Cook, C.T. et al. 1971, J. Immunol. 106, 467, C9で Tamura & Shimada, 1971, Immunology, 20, 415 の報告があるだけで, 分子構造に関する知見は全く得られていない。ヒトとモルモットでは, 感作血球の溶血に必要なC9の数が違い, これをC8が決定していると考えられる事など, 成分によっては両者でかなりの違いがある可能性もあるので, ヒトの成分からの類推だけでモルモットの成分を論じることは危険である。

今回は, Tamura & Shimada, 1971 のC9の精製法の途中で得られる画分からC5とC8を精製し, 若干の解析を行なったので報告したい。

### 方法

C9精製の途中で得られる2M硫酸沈殿物を本発材料として, C5とC8を精製した。精製中の操作はすべて4℃で行なった。沈殿を氷冷した水に溶かし, 5mM TrisHCl, pH7.5-1mM EDTA-0.09M NaCl に透析後, 遠心して不溶物を除去した。その上清に, 0.2M NaAcetate buffer, pH5.0 を加えてpHを5.6まで下げ, そのまま1時間攪拌後遠心, 沈渣を0.02M NaAcetate buffer, pH5.6-0.09M NaCl で一回洗浄後, 24.7mM NaBarbital buffer, pH7.3-0.710M に溶解し, C5の材料とした。酸性沈殿の上清は, Tris で中性に戻し, C8の本発材料とした。両者を, -70℃に数ヶ月凍結した場合にも精製に影響はなかった。

◦ C5: Sephadex G200 (5mM TrisHCl, pH7.5-1mM EDTA-0.145M NaCl), DE52 (5mM TrisHCl, pH7.5-1mM EDTA-0.07-0.2M NaCl), Biogel HTP (0.05-0.3M NaKPB, pH6.9) の順にクロマトグラフして精製した。

◦ C8: CM cellulose (10mM NaPB, pH6.0-0.1-0.3M NaCl), DE52 (5mM NaPB, pH7.4-1mM EDTA-0.01-0.15M NaCl) Biogel HTP (0.05-0.3M NaKPB, pH6.9), Sephadex G200 (5mM TrisHCl, pH7.5-1mM EDTA-0.145M NaCl) の順にクロマトグラフして精製した。

◦ C5のTrypsin分解: 400~500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のC5を2%w/wのTPCK-Trypsinを用い, 37℃, pH7.5,  $\mu=0.15$ で分解し, 1~90分の各時間ごとに4倍量のSBT1で反応を停止した。分解物を, 還元, 非還元 SDS-PAGE, 抗C5抗血清に

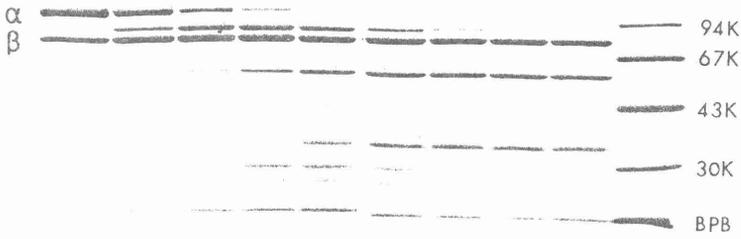
よる免疫電気泳動で解析した。

・C8の $\alpha$ 鎖,  $\beta$ 鎖の分離; 精製したC8を, 1% SDSで50°C, 120分処理して,  $\alpha$ - $\delta$ 鎖と $\beta$ 鎖に分解し, Biogel P-300 (5mM Tris HCl, pH7.5-1mM EDTA-0.145M NaCl-0.1% SDS) で分離した。  $\alpha$ - $\delta$ 鎖は, 還元アルキル化して CM- $\alpha$ 鎖とCM- $\delta$ 鎖に分解し, Biogel P-300で分離した。  $\beta$ 鎖は, Biogel P-300で再クロマト後還元アルキル化し, CM- $\alpha$ 鎖と共にアミノ酸分析を行なった。

### 結果および考察

・C5: 250mlの血清から1.6~4mgのC5が得られた(収率約4-10%)。このC5は, alkali disc PAGE, SDS-PAGEで単一のバンドを示し, 還元下 SDS-PAGEで $\alpha$ 鎖(M.W. 104K),  $\beta$ 鎖(M.W. 79K)に分かれた。 Trypsinによる分解を還元 SDS-PAGEで解析すると,  $\alpha$ 鎖のみが分解され,  $\beta$ 鎖は全く影響を受けなかった。  $\alpha$ 鎖はまお10分以内に91K, 29K, 27Kの fragments に分解された。 合計のM.W. が元のM.W. と一致しないが詳細は不明である。 次いで, 91K fragment は58Kと34Kの fragments に分解され, これは60分でほぼ完了した(図1)。 非還元の SDS-PAGEでは, 90分後でもほとんど変化はなく, 30分以後わおかにM.W. 130~140Kのバンドが出現した。 免疫電気泳動では, 90分後まで元のC5の位置に強い沈降線があり, 30分後に, より陽極側に弱い沈降線があらわれ, 元の沈降線からspurを形成した(図2)。 非還元 SDS-PAGEと免疫電気泳動の結果は, 130~140Kの fragment が弱い沈降線に相当すると考えれば, 時間的変化も一致する。 この fragment の形成と, 34K fragment の形成は時間的に一致せず,  $\alpha$ 鎖の27K, 29K, 34K, 58K fragments への分解と, 130~140K fragment の形成との間には, さらに別の変化が起るらしい。

・C8: 750mlの血清から12mgのC8が得られた(収率約20%)。 このC8は alkali disc PAGEで単一のバンドを与え, バンドに相当する位置に溶血活性が回収された。 非還元 SDS-PAGEでは, 85Kと60Kの2本のバンドに分かれ, 還元 SDS PAGEでは, 60Kと24Kの2本のバンドに分かれた(図3)。 ヒトC8の構造から类推して, S-S結合で結ばれた $\alpha$ 鎖(60K)と $\beta$ 鎖(24K)が $\beta$ 鎖(60K)と非共有結合していると考えられたので, 一次元を非還元, 二次元を還元下で, 二次元 SDS-PAGEを行いこれを確認した。  $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖が殆んど同じ大きさであるので, それぞれを分離し, アミノ酸分析により異同を検討した。 モル%で比較すると, 1モル%以上違うのは, His, Thr, Gly, Ala の4アミノ酸だけであり, 両鎖はかぎりよく似た構造のペプチドであると考えられた(表1)。



C5 1min 3min 5min 10min 20min 30min 60min 90min standard

図1. C5のTrypsin分解 (還元SDSPAGE 8.5%ゲル)

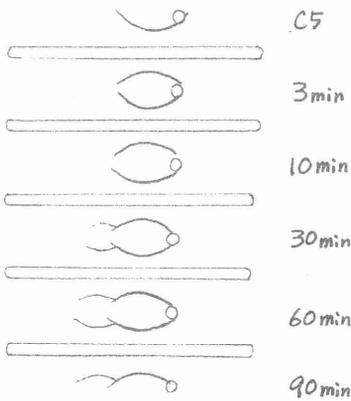


図2, C5のTrypsin分解  
(免疫電気泳動)

溝: anti C5  
陽極 左側

表1 C8  $\alpha$ ,  $\beta$ 鎖のアミノ酸組成

	$\alpha$ (mole%)	$\beta$ (mole%)	$\alpha$ - $\beta$
Trp	0.27	0.36	-0.09
Lys	6.04	5.85	0.19
His	1.25	2.49	-1.24
Arg	6.05	5.88	0.17
CMCys	5.30	5.85	-0.55
Asp	9.71	10.06	-0.35
Thr	3.94	5.22	-1.28
Ser	7.77	7.76	0.01
Glu	12.38	12.11	0.27
Pro	4.17	4.80	-0.63
Gly	9.69	6.83	2.86
Ala	6.40	5.36	1.04
Val	4.70	5.57	-0.87
Met	2.09	1.61	0.48
Ile	4.01	4.24	-0.23
Leu	7.39	7.20	0.19
Tyr	5.11	4.90	0.21
Phe	3.71	3.91	-0.20

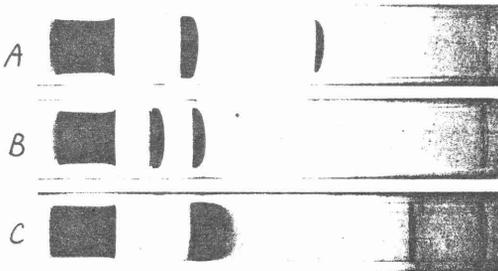


図3. C8のゲル電気泳動

A: 還元SDSPAGE (12.5%ゲル)  
B: SDS PAGE (12.5%ゲル)  
C: alkali disc PAGE (5%ゲル)

○田中 忍, 斑目君恵, 北村ふじ子, 鈴木貴和, 嶋田寿吉

(都臨床研 補体)

我々は前回の本シンポジウム席上に於て、補体分画時の前処理法としてのPEGを利用した方法について、リン酸緩衝液(以下、PBと略す。)を使用した場合の条件検討結果について報告した。即ち、PEG分画法を利用して補体各成分の収率を増すためには、分子量4000のPEGを、イオン強度を0.1~0.15モルとし、PHを6~7に調製したPBを利用するという条件が最適であると結論づけた。しかしながら、PBを用いた際には、上記条件を用いてもなお再現性に乏しいということを経験したため、種々の緩衝液について検討した結果、トリス-HCl 緩衝液(以下、トリスB. と略す。)を用いた場合に、高い再現性が得られることが明らかになった。従って今回は、トリスB. を用いたPEG分画法の条件検討結果について報告する。

(方法)

ヒトプール血漿は、予め0.1M-CaCl<sub>2</sub>に一晩透析し脱フィブリンした後、更に0.1MのトリスB. (pH 7.0)に透析して出発材料とした。緩衝液は、0.1M-トリスB. を基準緩衝液とし、阻害剤として、EDTAを1mM、PMSFを1mM、E-Amino-m-caproic Acidを10mM、そしてBenzamidine 10mMを添加して使用に供した。イオン強度検討時には、上記緩衝液(pH 7.0)に、0.05~0.20MのNaClを添加し、pHは、6~9の4段階について検討を加えた。PEGは、平均分子量が400~20000の5種を利用した(各々、PEG 400~20000と略す)。各PEGは、目的に応じた各種トリスB. に溶解させて50% 溶液としたものを用いた(但し、PEG 20000のみ25% 溶液とした)。分画は、原則として氷中で実施した。得られた沈査は、0.1MトリスB. (0.1M-NaClを含む、pH 7.0)に溶解させて、全量を一定にした。分画は段階的に実施し、5%濃度で析出した沈査を5P、その上清に更にPEGを加えて7%として得た画分を7Pとし、以下順次に10~20Pを得た。

(結果と考察)

①PEGの分子量による影響。

各PEGについて、段階的分画法を実施して得られた画分(5P~20P)中の各補体成分を測定した。その結果、PEG 400では、各成分ともに

全画分にわたって広範囲に析出してあり、20%上清中にも残存することを認めた。各補体成分ともに、PEGの分子量の増加とともに低濃度の画分中に析出してあり、例えばC3は、PEG 1000 では7~10Pに、4000では7Pに、そして6000以上のPEGでは5Pに集中して析出した。

### ②. イオン強度による影響。

PEG 4000を用いて、0.1M-トリスB. (pH 7.0)にNaClを0~0.2M濃度に添加して比較検討した。PBを用いた際とは大中に異なり、イオン強度差による影響は殆ど見い出されなかった。(ちなみに、PBでは、イオン強度の増加に伴って、高濃度の画分への分布移行が観察された)。

### ③. pHの影響

PB利用時には、各成分ともに、酸性側のpHでは低濃度の画分中に、そして、アルカリ側のpHでは高濃度の画分中への移行が観察されており、pHもまた分画時の結果を左右する主要因子となり得ることが示唆されたが、トリスB. では、pH 6~9の各条件時ともに差は見られず、pHの影響は、殆ど受けなれりことを確認した。

### ④. 2段階分画法による検討。

上述した実験結果に基づき、0.1M-NaClを含む0.1M-トリスB. (pH 7.0)を用いて、分子量1000, 4000, 6000の3種のPEGによる2段階分画法を検討した。即ち、3%, 5%および7%PEG濃度で得た上清に、更にPEGを添加して、10~20%濃度とし、各々の画分中の補体含量および活性の測定を行なった。殆どの補体成分は、10Pまでの画分中に析出された。PEG 1000では、20%上清中に補体成分の残存を認め、一方、PEG 6000は活性が高く再現性に欠けることもあって、PEG 4000の利用が好ましいことが、一層明らかになった。また、3%あるいは5%からスタートさせる2段階法で、10Pまたは15Pを得る方法が最適であることも確認された。

### ⑤. 洗い込み法の検討。

既に免疫電気泳動法を利用して報告した如く、PEGを用いた分画法では、得られた沈査における他の血漿成分の混入が著しく、カラム操作に移る準備段階としては、これら混入成分の除去を効率よく実施する必要があると考えられる。そこで、各PEG濃度で得た沈査を洗い込む方法を用いて、混入成分の除去を検討した。即ち、得られた沈査を、5%, 10%および15%の各PEG溶液で1~3回にわたって洗い込み、各々の段階で得られた沈査中の補体各成分の含量と活性とを測定した。その結果、PEG

4000 を利用した場合に於ても各検査は、15%以上のPEG溶液で洗い込まない限り、容易に洗浄液上清中へと移行してしまうことが明らかになった。加えて、免疫電気泳動法による検討結果から、この場合には、Albumin画分のみが上清中へ移行することも明らかとなり、洗い込み法の効果は、単に、この点にとどまるにすぎないことも判明した。

図1 補体成分の分離に於けるpH、塩濃度およびPEGの分子量の影響。

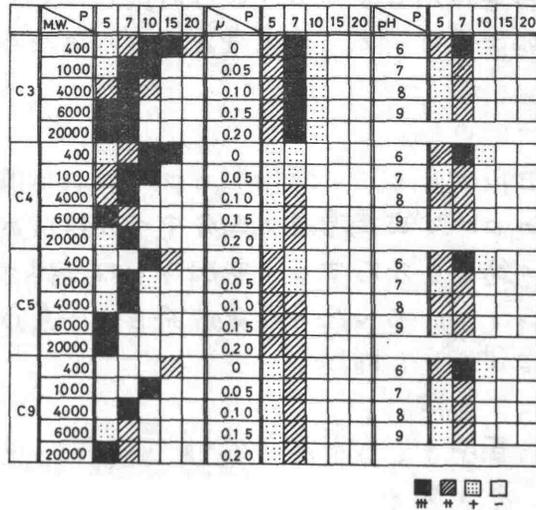
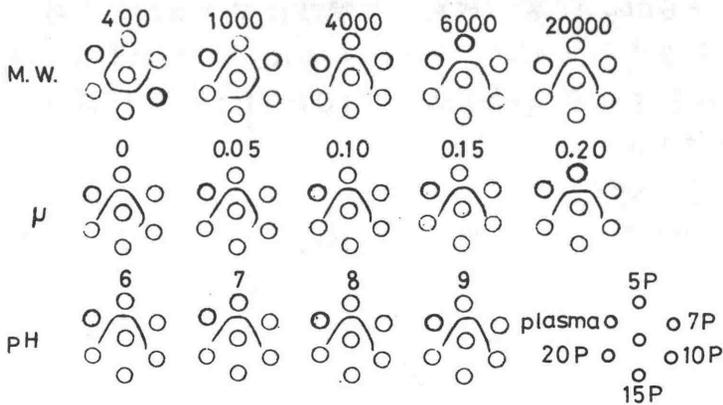


図2 PEG各分画に於けるC3の分布。









第17回 補体シンポジウム講演集

昭和55年 8月 1日 印刷  
昭和55年 8月 8日 発行

編集代表者 第17回 補体シンポジウム 世話人・橋 武彦

発行所 〒113 東京都文京区本駒込 3丁目18番22号  
東京都臨床医学総合研究所内  
補体シンポジウム事務局TEL (03) 823-2101

印刷所 〒980 仙台市山田字杉土手 3番120号  
株式会社 シコダ

領布価格 3,000円