

Proceeding of the Complement Symposium

Vol. 24, Fukuoka, 1987

# 第24回 補体シンポジウム

講演 抄録集

---

会 期 昭和62年 7月16日(木)・17日(金)・18日(土)

会 場 福岡大学セミナーハウス

福岡市中央区六本松 3丁目 4-20

TEL (092) 751-8141

世話人 福岡大学医学部微生物学教室 岡田 秀親

〒814-01 福岡市城南区七隈 7丁目45-1

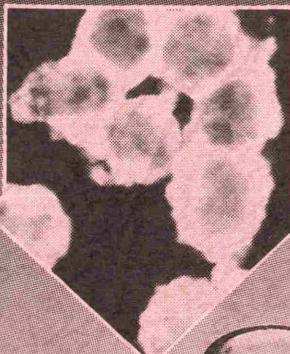
TEL (092) 801-1011 (内線 2890)

---

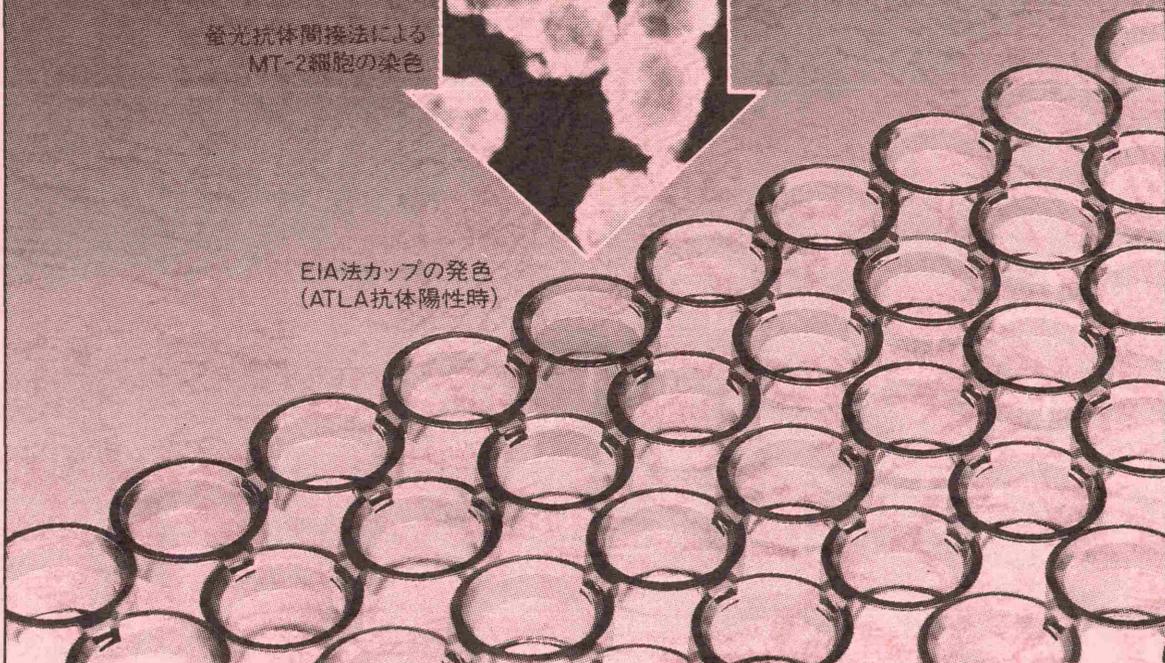
体外診断用医薬品

# ATLA抗体検出に 高感度で特異性がよい酵素免疫測定法を

蛍光抗体間接法による  
MT-2細胞の染色



EIA法カップの発色  
(ATLA抗体陽性時)



ATLA抗体検出用医薬品

## エイテスト<sup>®</sup>ATL

〈サンドウィッチ方式のカップ型酵素免疫測定法〉

エーザイ筑波研究所で開発したサンドウィッチ方式のカップ型酵素免疫測定(EIA)法によるATLA(成人T細胞白血病関連抗原)抗体検出用医薬品で、ATLA抗体を高感度に特異性よく検出することができる。

検出結果は蛍光抗体間接法と極めてよく一致し、ATL(成人T細胞白血病)診断の補助や血清又は血漿中のATLA抗体のスクリーニングなどに有用である。

★ご使用に際しては、添付文書をご参照ください。



エーザイ

東京都文京区小石川4

## 御 案 内

### 受 付

シンポジウム第1日(7月16日)正午より会場入口で行います。

会 場 費            1,000 円

懇親会費            4,000 円

### 演 説

発表時間は1題10分、討論5分、計15分とします。

プロジェクター1台を設置します。スライドは35mmサイズにかぎります。

スライドの枚数に制限はありませんが時間を厳守して下さい。

### 懇 親 会

第2日(7月17日)午後の演題終了後午後7時15分より行います。

### 運営委員会

運営委員会を第1日(7月16日)演題終了後19時00分より別室にて開催します。

### 総 会

総会を第2日(7月17日)午前の演題終了後12:00より会場で開催します。

### そ の 他

年会費未納の方、および新規会員になられる方は、前もって補体シンポジウム事務局宛振り込まれるか、当日受付で御納入下さい。抄録集は当日お受け取り下さい。

郵便振替(福岡5-9895)補体シヴポジウム事務局  
年会費 5,000円(但し、学生会員3,000円)



## 交通機関

### ① 博多駅周辺より

駅横バスセンター1階 **11**番乗り場で国体道路経由六本松方面行きバス乗車，護国神社前下車後 徒歩約3分（所要時間約30分）

又は駅前**3**番バス停より六本松方面行きバス（系統番号**10, 11, 15, 16, 17, 18, 19, 214, 215**）乗車，六本松3丁目バス停下車後 護国神社方面へ徒歩約7分（所要時間約30分）

### ② 天神周辺より

天神コア前**7**番バス停より六本松方面行きバス（系統番号**7, 8, 14, 201, 204, 205**）乗車，護国神社前下車後 徒歩約3分（所要時間約15分）

又は朝日会館前**10**番バス停より**12, 13, 60**番系統のバス乗車 護国神社前下車後 徒歩約3分（所要時間約15分）

### ③ パーソナルホテルリュウ御宿泊の方は，中央区役所前の大名2丁目バス停より**12, 13, 60**番系統のバスに御乗車下さい。（所要時間約12分）

### ④ 福岡空港からはバスで博多駅，天神を経由してお越し下さい。（所要時間約45分）

※ タクシーご利用の方は，運転手に**護国神社前福大大濠高舞鶴寮横**と御指示下さい。

（セミナーハウスは新施設ですので知られておりません。）

※ 会場および，その周辺には駐車施設がございませんので，公的交通機関を御利用のうえ，お越し下さい。







## 第24回 補体シンポジウムプログラム

第1日 7月16日(木)

( 12:50 ~ 13:00 ) 世話人挨拶

( 13:00 ~ 14:30 ) 臨床補体学教育講演：座長 広瀬 俊一

(1) 補体欠損症とその臨床 稲井 真彌

(2) 腎疾患と補体 大井 洋之

( 14:30 ~ 15:00 ) Coffee Break

( 15:00 ~ 15:45 )

座長 北村 肇

1. C3dg, C3c に対するモノクローナル抗体を用いた免疫複合体 ( IC ) の微量測定法の確立と臨床的検討

平野隆雄, 宮島宏明<sup>1</sup>, 小林茂人, 谷口 修, 橋本博史, 高井修平, 山川憲文, 石戸利貞<sup>1</sup>  
廣瀬俊一, 飯田恭子<sup>2</sup>

( 順天大内科, 相互生物医学研究所, <sup>2</sup>ニューヨーク大病理 )

2. ベーチェット病における CR1 ( C3b リセプター ) 陽性単球および B 細胞の異常

小林茂人, 平野隆雄, 宮島宏明<sup>1</sup>, 谷口 修, 高井修平, 橋本喬史<sup>2</sup>, 稲葉午朗<sup>3</sup>, 橋本博史  
廣瀬俊一, 飯田恭子<sup>4</sup>

( 順天大内科, <sup>1</sup>相互生物医学研究所, <sup>2</sup>帝京大第二内科, <sup>3</sup>七沢病院内科, <sup>4</sup>ニューヨーク大病理 )

3. 重症感染症時における Complement Components の変動

高岡哲朗, 由良二郎, 品川長夫, 真下啓二, 福井拓治

( 名古屋市大第一外科 )

( 15:45 ~ 16:30 )

座長 酒井好古

4. 超急性拒絶反応時の血清補体の変動について

宮川周士, 中 好文, 川口 章, 中田清三, 白倉良太, 広瀬 一, 川島康生, 松本美佐子<sup>1</sup>  
北村 肇<sup>1</sup>

( 大阪大第一外科, <sup>1</sup>大阪府成人病センター )

5. 膜性腎症における C4 および BF phenotype

中西 功, 椿原美治, 岡田倫之, 北村栄作, 横山健二, 飯田喜俊, 西向弘明<sup>1</sup>

( 大阪府立病院腎診療科, <sup>1</sup>大阪医大法医 )

6. 尿中C3c 測定の臨床的意義

西村美保, 小田禎一, 山口 覚<sup>1</sup>, 岡田秀親<sup>1</sup>  
(福大小児科, <sup>1</sup>同微生物学)

( 16:30 ~ 17:15 )

座 長 行山 康

7. MPGNと低補体 (752例のアンケート調査よりみて)

大井洋之, 関 正人, 波多野道信  
(日大第二内科)

8. 腎疾患における補体活性化因子の検討

一免疫固定法によるC3のC3cへのconversionの数量化の試み—  
宮平つね子, 山口義哉, 柴若継雄, 生駒雅昭, 小坂橋 靖<sup>1</sup>  
(聖マリアンナ大小児科, <sup>1</sup>日大第二内科)

9. 低補体腎炎におけるシアル酸の関与

藤田宜是, 大井洋之, 関 正人, 波多野道信  
(日大第二内科)

( 17:15 ~ 18:00 )

座 長 高岡哲朗

10. 骨髄腫を合併したC1q欠損症

天野哲基, 太田善介, 古田嘉男<sup>1</sup>, 徳光誠司<sup>1</sup>  
(岡大第三内科, <sup>1</sup>川崎医大川崎病院内科)

11. 流行性脳脊髄膜炎の発症を機に発見されたC3欠損症の1例

古賀達彦, 荒巻雅史, 織田慶子, 川上 晃, 島田 康, 富田尚文, 阪田保隆, 藤本 保  
本廣 孝, 山下文雄, 森山 剛<sup>1</sup>, 稲井真弥<sup>1</sup>  
(久大小児科, <sup>1</sup>大阪医大病態検査)

12. 皮膚血管炎を伴ったC5欠損症の1例

安東直彦, 岩崎 薫, 大塚智博, 山田吾郎, 本島新司, 福田 健, 池森亨介, 牧野荘平  
行山 康<sup>1</sup>  
(獨協医大アレルギー内科, <sup>1</sup>東大物療内科)

( 18:00 ~ 18:45 )

座 長 天野哲基

13. 髄膜炎菌性髄膜炎を発症したC9欠損症の3例

岡田 暹, 織田真由美, 佐野 正, 伊藤 仁, 森山 剛<sup>1</sup>, 余田 篤<sup>1</sup>, 池野洋二<sup>2</sup>, 稲井真彌<sup>1</sup>  
(市立四日市病院小児科, <sup>1</sup>大阪医大病態検査, <sup>2</sup>スペシャル・レファレンス・ラボ)

14. 各種結合織疾患患者における原血清補体溶血活性  
上田正博, 竹村周平, 出口雅子, 小野寺秀記, 岡本雅之, 福田 亙, 柳田国雄, 杉野 成  
近藤元治  
(京府医大第一内科)

15. 補体第3成分の分解に基づく死後経過時間推定法  
小湊慶彦, 三澤章吾  
(筑波大法医)

( 19:00 ~ 20:00 ) 運営委員会

第2日 7月17日(金)

( 9:15 ~ 10:00 ) 座長 富田基郎

16. C1 複合内のC1s の構造と機能について  
松本美佐子, 北村 肇, 永木和義<sup>1</sup>  
(大阪府立成人病センター研究所, <sup>1</sup>NTT大阪中央健康管理所)
17. Recombination により constitution site に発現するようになったマウス slp 遺伝子  
II Rrecombination site の解析  
Sa-nga Pattanakitsakul, 中山耕造, 高橋守信  
(金沢大がん研免疫生物)
18. C4 遺伝子発現における Posttranscriptional control  
中山耕造, 横山 茂, Sa-nga Pattanakitsakul, 野中 勝, 木村 博<sup>1</sup>, 柳 大烈  
高橋守信  
(金沢大がん研免疫生物, <sup>1</sup>滋賀医大放射線基礎)

( 10:00 ~ 10:45 ) 座長 高橋守信

19. モノクローン抗体を用いたB因子の機能局在の解析  
上田 章, John F. Kearney, Kenneth H. Roux, John E. Volanakis  
(九大医, Univ. of Alabama, Florida State Univ. )
20. 分子量の異なる二種類のモルモットB因子についての研究  
松下 操, 岡田秀親  
(福大微生物学)
21. <sup>1</sup>H-NMRによるアナフィラトキシンC3aの構造解析  
武藤 裕, 福元裕二<sup>1</sup>, 長沢滋治<sup>2</sup>, 荒田洋治  
(東大薬, <sup>1</sup>帝人生医研, <sup>2</sup>北大薬)

( 10 : 45 ~ 11 : 30 )

座 長 金子 勲

22. 血液凝固と補体 C5 由来マクロファージ遊走因子  
久木田一郎, 山本哲郎, 神原 武  
( 熊大免疫研アレルギー )
23. 抗体, 補体レセプターを介するヒト好中球の応答  
ーオプソニン化ザイモサン刺激による好中球の応答に及ぼす抗 FcR 抗体の影響  
高橋和彦, 長沢滋治, 小山次郎  
( 北大薬衛生化学 )
24. Streptococcus pyogenes の M 蛋白による抗貪食作用の解析  
洪 脚秀, 木下タロウ, 竹田潤二, 小園晴生, 井上公蔵  
( 阪大細菌学 )

( 11 : 30 ~ 12 : 00 )

座 長 米増國雄

25. 血清殺菌因子 RaRF による殺菌反応への補体の関与  
初瀬洋美, 季 育華, 渡辺真理子, 渡辺恵美子, 松下 操<sup>1</sup>, 岡田秀親<sup>1</sup>, 川上正也  
( 北里大分子生物, <sup>1</sup>福大微生物 )
26. 血清殺菌因子 RaRF により活性化される補体成分  
季 育華, 初瀬洋美, 猪原和泉, 久下周佐, 松下 操<sup>1</sup>, 岡田秀親<sup>1</sup>, 川上正也  
( 北里大分子生物, <sup>1</sup>福大微生物 )

( 12 : 00 ~ 12 : 30 ) 総 会

( 14 : 00 ~ 14 : 35 )

座 長 奥田智子

27. 実験用小動物の補体活性  
古典的経路の活性における種特異性  
鈴木映子, 野口 章, 原田 卓  
( 国立予研獣疫部 )
28. マウス血清 C1q 及び IgG の定量  
橋本平嗣, 米増國雄, 佐々木隆子, 塚尾典明, 樫葉周三  
( 奈良医大細菌学 )
29. C1s による Alternative Pathway 活性増強作用  
出口雅子, 竹村周平, 上田正博, 柳田国雄, 福田 互, 岡本雅之, 小野寺秀記, 杉野 成  
近藤元治  
( 京府医大第一内科 )

( 14 : 45 ~ 15 : 30 )

座 長 白石 聰

30. モノクローナル抗体感作赤血球による血清補体価測定  
廣島 幸, 安田玲子, 宮川周士<sup>1</sup>, 松本美佐子<sup>2</sup>, 北村 肇<sup>2</sup>,  
( 石津製薬, <sup>1</sup> 阪大第一外科, <sup>2</sup> 大阪府立成人病センター )
31. TNP - Cap - Liposome によるヒト補体活性測定について  
正木貴久<sup>1</sup>, 岡田則子<sup>1</sup>, 岡田秀親<sup>1</sup>  
( 石津製薬, <sup>1</sup> 福大微生物 )
32. 検体中の C8 による C3 あるいは C5 溶血活性測定値への影響  
北村 肇, 坪井睦美  
( 大阪府成人病センター )

( 15 : 30 ~ 16 : 15 )

座 長 長沢滋治

33. リコマラスミン酸による血清補体活性増強作用について  
金子 勲, 広瀬信一郎, 中村幸子, 古浜孝文  
( 三共バイオサイエンス )
34. C5 転換酵素の構造と機能 1  
小園晴生, 木下タロウ, 高田裕子, 竹田潤二, 洪 脚秀, 井上公蔵  
( 阪大細菌学 )
35. C5 転換酵素の構造と機能 2  
高田裕子, 木下タロウ, 小園晴生, 竹田潤二, 洪 脚秀, 井上公蔵  
( 阪大細菌学 )

( 16 : 15 ~ 16 : 45 ) Coffee Break

\* \* \* \* \*

( 16 : 45 ~ 17 : 45 ) 特別講演(1) 座長 西岡 久壽彌

Molecular mechanisms of human lymphocyte and complement  
cytotoxicity and control by target membranes.

Dr. Hans J. Müller-Eberhard

( Research Institute of Scripps Clinic, CA. )

( 17 : 45 ~ 18 : 45 ) 特別講演(2) 座長 岡田 秀親

Phylogeny of C3b / C4b regulation.

Dr. Irma Gigli

( University of California, San Diego, CA. )

\* \* \* \* \*

( 19:00 ~ 21:00 ) 懇 親 会

第 3 日 7 月 18 日 ( 土 )

( 9:15 ~ 10:00 )

座 長 木下タロウ

36. 心筋顆粒のモルモット赤血球溶血反応  
川本保子, 雪竹 潤, 深山昭雄  
( 保健衛生大微生物 )
37. 腫瘍細胞障害作用と補体レセプター  
奥田智子, 橘 武彦  
( 東北大抗酸研 )
38. Adult T cell leukemia ( ATL ) 細胞の補体抵抗性に関する研究 ( その 2 )  
岡田則子, 蔵屋幹夫, 松下 操, 岡田秀親, 藤田禎三<sup>1</sup>  
( 福大微生物, <sup>1</sup>筑波大免疫 )

( 10:00 ~ 11:00 )

座 長 岡田則子

39. 尿 DAF の精製  
石川曜子, 杉田雄二, 鶴沢真由美, 富田基郎, 木下タロウ<sup>1</sup>,  
( 昭和大薬生理化学, <sup>1</sup>阪大細菌 )
40. ウサギ DAF の精製とその性質  
杉田雄二, 鶴沢真由美, 富田基郎  
( 昭和大薬生理化学 )
41. DAF の作用機序について  
井上敏夫, 藤田禎三, 飯田恭子, 田村 昇  
( 筑波大基礎医系免疫 )
42. マウス補体レセプターの研究: CR1 の分布, CR2 の同定, CR1 と CR2 の免疫学的交差性  
木下タロウ, 竹田潤二, 洪 卿秀, 小園晴生, 酒井 寛, 井上公蔵  
( 阪大細菌学 )

( 11:00 ~ 12:00 )

座 長 藤田禎三

43. ヒト alternative complement pathway を介してヒト赤血球を溶解する抗ヒト赤血球モノクローナル抗体の検索  
岡田則子, 原田良子, 秀島 輝, 亀好良一, 岡田秀親  
( 福大微生物学 )

44. ヒト血液細胞におけるMembrane cofactor protein ( MCP ) の分布  
瀬谷 司, John P. Atkinson  
( Washington Univ. Sch. Med., St. Louis )
45. 正常モルモット血清によるインフルエンザB型ウイルスの不活化機構  
柴田伸一郎, 山本 典<sup>1</sup>, 前野幸一郎<sup>1</sup>  
( 名古屋市衛研, <sup>1</sup>名大病態研ウイルス )
46. マレック氏病ウイルス ( MDV ) 感染症におけるニワトリ補体活性化の影響  
大田博昭, 中島員洋<sup>1</sup>, 池森 豊, 加藤四郎<sup>1</sup>, 岡田秀親<sup>2</sup>  
( ゲン・コーポレイション, <sup>1</sup>阪大微研, <sup>2</sup>福大微生物 )



# 特 別 講 演



特別講演 (1)

Molecular mechanisms of human lymphocyte and complement cytotoxicity and control by target membranes.

Hans J. Müller-Eberhard

( Research Institute of Scripps Clinic, CA.)

特別講演 (2)

Phylogeny of C3b/C4b regulation.

Irma Gigli

( University of California, San Diego, CA. )

臨床補体学

教 育 講 演



# 臨床補体学教育講演 (1)

## 補体欠損症とその臨床

大阪医科大学病態検査学 稲井真弥

補体は動物の新鮮血清中に存在する20種類近い蛋白質によって構成されている反応系で、classical pathway または alternative pathway を経て活性化され、殺菌、溶菌など生体の感染防御にかかわる種々の生物活性を表すようになる。classical pathway は主として抗原抗体複合体によって補体が活性化される経路である。グラム陽性菌の細胞壁、グラム陰性菌の内毒素、種々の微生物が産生する多糖など微生物自身または微生物由来の多くの物質は、alternative pathway を経て補体を活性化する。すなわち微生物が生体に侵入した時、その生体の体液中に対応する抗体が存在するかどうかとは無関係に、生体の感染防御の初期反応として補体が活性化されると考えられる。その結果、微生物に C3b までが反応するとその微生物は、好中球やマクロファージなどの補体レセプターを介してこれら細胞に附着し、その貪食作用を受けやすくなる。C3 や C5 が活性化されるときに生じる分子量約 10000 のフラグメント C3a と C5a はアナフィラトキシンとしての活性があり、また C5a は好中球の遊走をうながす走化性因子としての活性がある。さらにこれら微生物上に C5b が結合し、C6 から C9 までが反応すると C5b-9 複合体が形成される。この複合体は膜侵襲複合体 (membrane attack complex) と呼ばれこの複合体の作用により、グラム陰性の杆菌や球菌は殺菌され、また溶菌が起こる。

上述のように補体は生体の感染防御にあずかる液性の因子群として重要な役割を果していると考えられるが、補体を構成する蛋白の先天的な欠損や異常症がどのような病態を示すかは、生体内での補体の役割を明らかにする重要な手掛りになると考えられる。

補体欠損症としては B 因子、D 因子および C4 結合蛋白を除き、すべての補体成分蛋白や制御蛋白の先天性欠損症や異常症が報告されている<sup>1)</sup>。

### ●先天性補体成分欠損症の概略

現在すべての補体成分蛋白について先天性欠損症や異常症が報告されている。これら補体成分蛋白の先天性欠損症または異常症に認められる補体系の異常と、その疾病または病態を表1に示した。表1に示した補体成分欠損症または異常症の症状をまとめると次の通りである。

- 1) 補体成分欠損症や異常症では、異常を認める補体成分の種類によってそれぞれ特有な疾病をひき起こしてくることはない。
- 2) C3 欠損症、C5 欠損症では重症な感染症を繰返し、明らかに易感染性が認められる場合がある。また C5, C6, C7, C8 の欠損症では髄膜炎や淋菌感染症を発症する例が多い。
- 3) C1q 異常症をはじめ C1r, C1s, C4, C2 などの欠損症では全身性エリテマトーデス (SLE), SLE 様、円板状エリテマトーデス (discoid lupus

表 1 先天性補体成分欠損症または異常症の補体系異常とその症状

欠損症または異常症	補体系の異常とその特徴	血清補体価 (CH50)	異常者の状態、疾病
C1q 異常症	正常な C1q と異なった抗原性を持ち、活性のない C1q の存在	検出不能	SLE 様症状
C1r 欠損症	C1r の欠損, C1s 低下	検出不能	慢性腎炎, DLE
C1s 欠損症	C1s の欠損, C1r 低下	検出不能	SLE, SLE 様症状
C2 欠損症	C2 の欠損	検出不能	健康, SLE, DLE など多数
C3 欠損症	C3 の欠損, C4, C2 の低下例あり	検出不能 (いちじるしい低下)	易感染性, SLE, SLE 様症状
C4 欠損症	C4 の欠損	いちじるしい低下	SLE 様症状, SLE
C5 欠損症	C5 の欠損	検出不能	SLE, 易感染性
C5 機能不全症	C5 の機能異常	正 常	Gram 陰性菌感染症
C6 欠損症	C6 の欠損	検出不能	Raynaud 症候群, 淋菌感染症, 髄膜炎
C7 欠損症	C7 の欠損	検出不能	Raynaud 症候群, 強直性脊椎炎, 慢性腎盂腎炎, 髄膜炎
C8 欠損症	C8 の欠損	検出不能	淋菌感染症, 色素性乾皮症, SLE, 髄膜炎
C9 欠損症	C9 の欠損	正常値の約35%	健康な例が多い

erythematosis, DLE) など自己免疫疾患類似の症状を示す症例が多い。

4) C9 欠損症や C2 欠損症のように全く異常がなく、健康な生活を送っている症例も多い。

表 1 に示したように補体成分の欠損症では血清補体価は検出不能または著しい低値を示し、欠損している成分の蛋白量は検出不能、その活性は正常プール血清の 0.5% 以下である場合が多い。C9 欠損症や C5 欠損症の一部の例では、血清補体価は必ずしも著しい低値を示さない。C9 欠損症の補体価は通常正常値の 35~40% の値を示し、炎症性疾患を合併している場合には正常値範囲または高値を示すことがあるので、注意する必要がある。著者らが大阪府日赤血液センターを訪れた献血者の中から発見した C5 欠損症の 2 症例では、補体価は 9.6 と 19.8 単位で、C5 活性は正常プール血清の 0.1% と 2.7% であった。

次に感染症を合併した主要な補体成分欠損症について述べる。なお補体系制御因子の欠損症と感染症については文献を参照されたい<sup>1)</sup>。

## ● 感染症を伴った補体成分欠損症

### 1 C3 欠損症

Alper の報告<sup>2)</sup>した最初の C3 完全欠損症の症例は 15 歳の女児で、14 回の急性肺炎、2 回の髄膜炎を含め重症の感染症のため 20 回の入院経験があり、明らかに易感染性が認められた。Alper の報告例に続いて報告された 2 症例も重症の感染症に罹患していた。

わが国では C3 欠損症は 3 症例報告されており、1 例は SLE を合併し、他の 2 例 (姉妹) は SLE 様の症状を示した。兵頭と小菅<sup>3)</sup>によって発見された SLE を合併した症例では、化膿性髄膜炎の既往歴があり、帯状疱疹の治癒が遅延し、また皮膚膿瘍を反復し、その治癒が遅延するなど易感染性が認められた。佐野らの報告<sup>4)</sup>した 2 症例は SLE 様の症状を伴ったが、特に易感染性があったと考えられる既往歴や症状は認められなかった。

### 2 C5 欠損症

C5 欠損症の最初の症例<sup>5)</sup>は SLE を合併した 20 歳の女性で、幼児期にしばしば耳、皮膚、上気道などの感染症に罹患したと報告されている。2 番目の症例は淋菌感染症を合併しており、過去 3 年間に 9 回全身性の淋菌感染症に罹患または再発したと報告されている<sup>6)</sup>。第 3 番目の症例の家系では、5 人の兄弟のうち 4 人が C5 欠損症で、4 人の兄弟 (男子 3 名、女子 1 名) はいずれも髄膜炎菌や淋菌による感染症に罹患していたと報告されている。

わが国では献血集団の中から 3 例の C5 欠損症

が発見されている。また福岡県日赤血液センターで発見された第 1 例の姉と弟の 1 人が C5 欠損症であることが判明し<sup>7)</sup>、大阪日赤血液センターで発見された 2 症例<sup>8)</sup>と併せ、5 例の C5 欠損症が存在することがわかっている。これら 5 例の C5 欠損症はいずれも明らかに易感染性があったといえるような既往歴はない。

### 3 C6 欠損症

第 1 番目の症例<sup>9)</sup>は 18 歳の女性で、悪寒、発熱、関節痛および両手指先端の疼痛を伴う紅斑状皮膚病変のため入院したが、1 年前に淋菌性関節炎に罹患した既往歴があり、種々検査の結果、淋菌性菌血症を伴う淋菌症と診断されている。次の 1 例は 6 歳の男児で<sup>10)</sup>、髄膜炎に罹患していたが、アンピシリンの投与によって症状は軽快した。しかし引き続き 2 回同一起因菌による髄膜炎に罹患している。

わが国では 3 例の C6 欠損症が発見されている。このうち 2 例は大阪府日赤血液センターを訪れた献血者の中から発見されたが<sup>11)</sup>、特に易感染性は認められていない。他の 1 例は済生会今治病院小児科 松井<sup>12)</sup>が発見した症例で、12 歳の男児で、短期間内に髄膜炎菌性敗血症と髄膜炎菌性髄膜炎に罹患した。症例の血清補体価が著しく低値であったことから、松井らは、補体成分欠損症を疑い、著者らが精査の結果、C6 欠損症であることが確認された。

### 4 C7 欠損症

本症の第 1 例は 42 歳の女性で、レイノー症候群と右示指の壊疽を伴っていた<sup>13)</sup>。その他の C7 欠損症としては健康な例、強直性脊椎炎を伴った例、慢性腎盂腎炎を伴った例がそれぞれ 1 例報告されている。その他 Ross と Densen の綜説<sup>14)</sup>によると髄膜炎菌性髄膜炎やその他の細菌による髄膜炎を発症した例が多い。

わが国では著者らが大阪地区の献血者集団の中から、5 例の C7 欠損症を発見した<sup>15)</sup>。これら 5 例の補体価、補体成分のプロファイルを表 2 に示した。これら 5 例の補体価はいずれも 2 単位以下、C7 の活性は正常値の 0.1% 以下であった。1983 年秋、静岡こども病院の三宅らは髄膜炎菌性髄膜炎に罹患した 8 歳の女児が C7 欠損症の疑いがあるとして著者らに精査を依頼し、補体系精査の結果、遺伝性 C7 欠損症であることがわかった<sup>16)</sup>。その後、広島小児科 小林ら、京大小児科 伊藤ら、川崎市立川崎病院小児科 由井ら、さらに東京医科大八王子医療センター小児科 田中らによって髄膜炎菌性髄膜炎、髄膜炎菌感染症などの症例がいずれも C7 欠損症であることが明らかにされた。これら 4 症例も、著者らによる補体系の

表 2 献血者集団の中から発見された5例のC7欠損症の補体価, 補体成分プロフィール

	Y. O.	S. Y.	T. S.	R. I.	K. M.	正常ヒト血清
CH50(u/ml)	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0	<2.0	41.4
補体成分 (正常ヒト血清に対する%)						(SFU/ml)
C1	104.3	80.0	78.5	58.5	21.2	110000
C4	96.6	81.9	79.2	63.9	80.3	75200
C2	100.6	149.0	85.3	84.0	89.3	1150
C3	126.3	70.8	79.2	66.7	100.0	24600
C5	100.0	90.1	99.0	63.6	120.0	210000
C6	135.0	108.0	124.0	120.0	25.0	18500
C7	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	19000
C8	125.5	140.6	87.5	125.0	81.9	22800
C9	122.0	105.4	62.2	110.8	150.7	26500

精査と家系調査によって、遺伝性 C7 欠損症であることが確認されている。すなわち現在までに髄膜炎菌性髄膜炎、髄膜炎菌感染症またはその他の髄膜炎を合併した C7 欠損症が 5 症例発見されている (表 3 参照)。

#### 5 C8 欠損症

本症の最初の症例は 23 歳の女性で、遷延性の淋菌感染症に罹患していたと報告されている<sup>17)</sup>。第 2 番目の症例は色素性乾皮症の家系の 1 員であり、第 3 番目の症例は SLE を合併していたと報告されている<sup>18)</sup>。また第 2 番目の症例の家系からは 3 例の C8 欠損症が発見されているが、特に C8 欠損によると考えられる疾患には罹患していない。わが国では著者らが大阪地区の献血者集団の中から 2 名の C8 欠損症を発見したが、この 2 名はいずれも健康な日常生活を送っている<sup>19)</sup>。しかし外国でその後報告された症例では髄膜炎菌性髄膜炎の合併例が多い<sup>14)</sup>。

#### 6 C9 欠損症

著者らが発見した C9 欠損症の第 1 例は献血者の中から発見され<sup>19)</sup>、特に異常はなく健康であった。その後わが国では C9 欠損症の報告が続き、わが国では C9 欠損症の頻度が高いことが予測された。著者らは大阪府日赤血液センター副所長 山口英夫博士らの協力を得て、大阪地区の献血者集団 (献血者, 100802 名) の中から 100 名の C9 欠損症を発見し<sup>20)</sup>、また患者集団としてスペシャル・レファレンス・ラボラトリー (SRL) に血清補体価測定に依頼があった 102152 名の検体の中から、83 名の C9 欠損症を発見した。SRL には日本全国の病院から検査の依頼があるので、研究対象とした 102152 名を地方別に分け、C9 欠損症の頻度を比較すると、各地方で C9 欠損症の頻度に大きな差がないことがわかった<sup>20)</sup>。

このように C9 欠損症の頻度が高いため、報告

された C9 欠損症の合併症には種々の疾患があり、特に感染症が多いとは考えられなかった。しかし最近髄膜炎を伴った C9 欠損症が 2 例発見された (表 3 参照)。第 1 例は済生会 今治病院 内科 蓮井らによって発見された。症例は 33 歳の女性で髄液の所見から細菌性髄膜炎と診断されたが、髄液から原因菌を検出することができなかった。この症例の血清補体価が 14.0 単位前後の低値を持続したため、C9 欠損症が疑われ著者らに検索が依頼された。精査の結果、補体価は 14.5 単位、C9 は蛋白、活性ともに検出できず、他の補体成分には異常はなく、C9 欠損症であることがわかった。第 2 例は富山市民病院小児科 南らによって髄膜炎菌性髄膜炎と診断された 12 歳の男児で、退院後健康を回復した時の血清補体価が 7.5 単位と低値を示したので、補体系の精査が著者らによって行われた。その結果 C9 は蛋白、活性ともに検出不能で、その他の成分に異常がなく C9 欠損症と診断された。

わが国ではさきに三神らが化膿性膝関節炎と髄膜炎を併発した C9 欠損症を報告している<sup>21)</sup>ので C9 欠損症で髄膜炎を併発した症例は今回の 2 例を加えて 3 症例となった。

#### ●まとめ

わが国では上述のように短期間内に、髄膜炎菌性髄膜炎など髄膜炎菌感染症やその他の細菌による髄膜炎を伴った後期反応成分の欠損症が 8 例発見された。後期反応成分の欠損症は献血者の中からも発見されているので、症例のすべてがこのような感染症に罹患するわけではない。しかし、これら欠損症の症例がグラム陰性菌やその他の細菌に感染する機会があった場合、後期反応成分の欠損は感染症を併発しやすい大きな risk factor となっていると考えられる。

表 3 最近わが国で発見された補体成分欠損症とその合併症

欠損症	年齢	性別	疾患	菌検出	予後	発見者
C6 欠損症	13	男	髄膜炎菌性敗血症*	血液より Y 群髄膜炎菌	良	1985 松井ら
C7 欠損症	8	女	髄膜炎菌性髄膜炎	咽頭培養より Y 群髄膜炎菌	良	1983 三宅ら
C7 欠損症	7	男	髄膜炎菌性敗血症	血液より髄膜炎菌	良	1984 小林ら
C7 欠損症	11	女	化膿性髄膜炎	不能	良	1985 伊藤ら
C7 欠損症	4	女	髄膜脳炎	細菌, ウイルス検出不能	良	1985 山井ら
C7 欠損症	15	男	髄膜炎菌性髄膜炎	髄液より Y 群髄膜炎菌	良	1986 田中ら
C9 欠損症	33	女	細菌性髄膜炎	菌検出不能	良	1985 蓮井ら
C9 欠損症	12	男	髄膜炎菌性髄膜炎	髄液より髄膜炎菌	良	1985 南ら

\*この症例は髄膜炎菌性髄膜炎を再発

表 4 わが国で報告された C3 から C8 までの欠損症の症例数と家系数

欠損成分	献血者		患者		合計	
	症例	家系	症例	家系	症例	家系
C3	0	0	4(1)*	2	4	2
C5	5	3	0	0	5	3
C6	3	2	2(1)*	1	5	3
C7	6	5	6	6	12	11
C8 $\alpha$ - $\gamma$	2	2	0	0	2	2
	16	12	12	9	28	21

\*家系調査によって発見され、合併症のなかった症例で発端者の兄弟である。

文 献

- 1) 稲井真弥: 補体機能の先天性異常, <岩波講座> 免疫科学 Ⅹ, “免疫と病気(1). 第 10 章”, (山村雄一, 岸本忠三, R.A. グッド編), 岩波書店(1984) p. 321
- 2) Alper, C.A., Colten, H.R., Rosen, F.S., Rabson, A.R., Macnab, G. & Gear, J.S.S.: *Lancet* **ii**: 1179 (1972)
- 3) 兵頭行夫, 小菅啓司: *臨床免疫* **13**: 23 (1981)
- 4) Sano, Y., Nishimukai, H., Kitamura, H., Nagaki, K., Inai, S., Hanasaki, Y., Murakami, I. & Igata, A.: *Arth. Rheum.* **24**: 1255 (1981)
- 5) Rosenfield, S.I., Kelly, M.E. & Leddy, J.P.: *J. Clin. Invest.* **57**: 1626 (1976)
- 6) Ralph, S., David, T.D., Gale, A.M., Francis, E.W. & Linville, M.: *Am. J. Med.* **67**: 638 (1979)
- 7) 木下幸子, 深田謙二, 前田義章, 吉成意之, 赤垣洋二, 稲井真弥: 補体シンポジウム抄録集, 第 19 卷 (1982) p. 18
- 8) 福森泰雄, 吉村敬次, 大軒子郎, 山口英夫, 犬久保康人, 赤垣洋二, 稲井真弥: 補体シンポジウム抄録集, 第 22 卷 (1985) p. 124
- 9) Leddy, J.P., Frank, M.M., Gaither, T., Baum, J. & Klempner, M.R.: *J. Clin. Invest.* **53**: 544 (1974)
- 10) Lim, D., Gewartz, A., Lint, T., Ghaze, M., Sepheri, B. & Gewartz, H.: *J. Pediatr.* **89**: 42 (1976)
- 11) 福森泰雄, 吉村敬次, 大軒子郎, 山口英夫, 犬久保康人, 赤垣洋二, 稲井真弥: 補体シンポジウム抄録集, 第 22 卷 (1985) p. 124
- 12) 松井 光, 越智繁樹, 大津京子, 稲田弥生, 赤垣洋二, 稲井真弥: 補体シンポジウム抄録集, 第 22 卷 (1985) p. 144
- 13) Boyer, J.T., Gall, E.P., Norman, M.E., Nilsson, U.R. & Zimmerman, T.S.: *J. Clin. Invest.* **56**: 905 (1975)
- 14) Ross, S.C. & Densen, P.: *Medicine* **63**: 243(1984)
- 15) 赤垣洋二, 稲井真弥, 吉村敬次, 福森泰雄, 犬久保康人, 山口英夫, 田中正好: 補体シンポジウム抄録集, 第 20 卷 (1983) p. 94
- 16) Miyake, T., Ohta, K., Kawamori, J., Hirao, T., Akagaki, Y. & Inai, S.: *Microbiol. Immunol.* **30**: 363 (1986)
- 17) Petersen, B.H., Graham, J.A. & Brooks, G.F.: *J. Clin. Invest.* **57**: 283 (1976)
- 18) Jasin, H.E.: *J. Clin. Invest.* **60**: 709 (1977)
- 19) Inai, S., Kitamura, H., Hiramatsu, S. & Nagaki, K.: *J. Clin. Lab. Immunol.* **2**: 85(1979)
- 20) 稲井真弥: 補体第 9 成分欠損症の病態と発生頻度に関する研究, 昭和 57~59 年度科学研究費補助金(一般研究 B) 研究成果報告書 (1985)
- 21) 三神昭雄, 今村宏嗣: 第 25 回日本リウマチ学会総会記録 (1981) p. 25
- 22) 稲井真弥: *Immuno-Review* **2**: 3 (1985)

## 臨床補体学教育講演（2）

### 腎疾患と補体

日本大学第二内科 大井洋之

日常の臨床で診断や治療に補体価がもっとも利用されている分野は、腎疾患であるといっても過言ではない。急性糸球体腎炎、膜性増殖性糸球体腎炎、ループス腎炎は明らかな低補体を早することが知られている。また、これら低補体腎炎の補体の変動を観察することは、病態を把握する重要な目安となっている。低補体時の各血清補体成分の低下の特徴は種々検討されており、ほぼ明らかにされている。腎疾患の分野は生検を中心に発達してきており、補体系を検討するに当たり、血清と組織の二つの材料を得ることが出来る利点がある。低補体腎炎に於ける腎生検組織の免疫グロブリンと補体の沈着パターンは血清の補体成分の低下とよく一致する。また低補体価を認めない他の腎疾患においても腎に於ける沈着パターンはそれぞれ特徴的であることが明らかにされている。診断や治療への応用より一步踏み込んで、補体系より病態面へのアプローチを試みることになると、何が補体系を動かしているか（補体活性因子）の検討が必要となってくる。腎疾患の血清中に出現する補体活性因子として知られているものに、immune complex やnephritic factor (C3NeF、C4NeF) 等が知られている。in vitro で解明された結果をもとに、in vivoでの検討を行うと様々な不明の現象が認められる。例えば、C3NeFの存在を認めても低補体価とならない状態の存在することや、C3NeFとして同一視されていたalternative pathwayの補体活性因子の中に様々な性質の因子の存在することが明らかになっている。本講演では我々の最近の知見を中心に腎疾患患者血清中に出現する補体活性因子について述べてみたい。



# 一 般 講 演



# 1 C<sub>3</sub>dg, C<sub>3</sub>cに対するモノクローナル抗体を用いた免疫複合体 (IC) の微量測定法の確立と臨床的検討

平野隆雄<sup>1</sup> 宮島宏明<sup>2</sup> 小林茂人<sup>1</sup> 谷口 修<sup>1</sup> 橋本博史<sup>1</sup>  
高井修平<sup>1</sup> 山川憲文<sup>1</sup> 石戸利貞<sup>2</sup> 廣瀬俊一<sup>1</sup> 飯田恭子<sup>3</sup>

1. 順天堂大学内科 (膠原病), 2. 相互生物医学研究所 (BML)

3. ニューヨーク大学病理

## 【目的】

免疫複合体 (IC) は自己免疫疾患, 腎, 癌など多くの疾患で検出され, その重要性が注目されている。IC の測定法は今まで種々の方法が開発されたが, 議論が多いところであった。われわれは native C<sub>3</sub> と反応しない抗 C<sub>3</sub>c, 抗 C<sub>3</sub>dg モノクローナル抗体を用いて IC の微量定量法を開発し, 種々の自己免疫疾患について検討を加えた。

## 【方法】

健常人 30 例, RA 50 例, SLE 50 例, ベーチェット 26 例, その他 20 例を対象とした。モノクローナル抗 C<sub>3</sub>c, 抗 C<sub>3</sub>d 抗体を ELISA 用プレートに coating し, 1%-BSA-PBS で非吸着部を blocking した。あらかじめヒト熱凝集 IgG (AHG) とヒト血清 (補体) を 37°C 30 min 反応させたものを陽性コントロールとし, AHG 或いはヒト血清を陰性コントロールとした。偽陽性となるリウマトイド因子を吸収する目的で, マウス熱凝集 IgG を加えた緩衝液でコントロール及び検体を希釈し, プレートウエルに加え反応させた。反応後 0.05% Tween 20-PBS で 3 回洗浄後, Bitin 標識モノクローナル抗ヒト IgG を加えた反応させた。さらに, 他に IC を測定する方法として抗 C<sub>3</sub>c, 抗 C<sub>3</sub>dg モノクローナル抗体のサンドイッチ法を確立し合せて比較検討した。

## 【結果・考察】

IC のアッセイ法は IC に結合した C<sub>3</sub> フラグメントを介して定量出来ることが確認された (図 1)。被験血清において, RA, SLE, ベーチェット病に高頻度に IC を検出することが出来た。とくに IC に関していまままで報告の少ないベーチェット病において高率に IC の出現頻度が高かった (表 1)。今後詳細に検討して報告したい。

图1

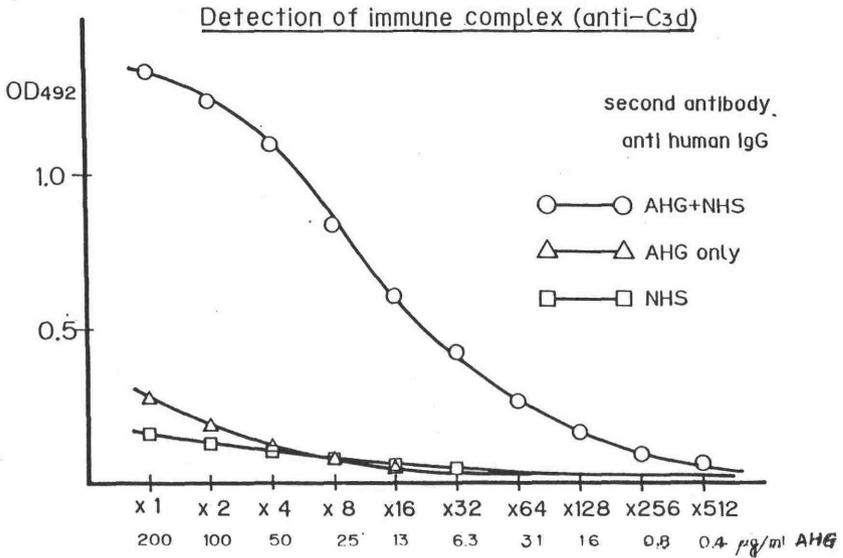


表1

Relationship between IC levels and complement activation as detected with mAb to C3 neoantigens \* µg/ml AHG

Samples	IC level	* neo anti-C3c bound *
Normals n=20	2.5 ±1.0	1.0 ±0.5
S L E n=50	10.4 ±8.9	12.8 ±7.4
R A n=20	8.7 ±4.3	10.6 ±3.4
Behcet n=13	12.3 ±5.7	19.9 ±7.3

## 2 ベーチェット病におけるCR1 ( C3bリセプター ) 陽性単球およびB細胞の異常

小林茂人<sup>1</sup> 平野隆雄<sup>1</sup> 宮島宏明<sup>1,2</sup> 谷口 修<sup>1</sup> 高井修平<sup>1</sup>  
橋本喬史<sup>3</sup> 稲葉午朗<sup>4</sup> 橋本博史<sup>1</sup> 廣瀬俊一<sup>1</sup> 飯田恭子<sup>5</sup>

1. 順天堂大学内科 2. 相互生物医学研究所 3. 帝京大学第二内科  
4. 七沢病院内科 5. ニューヨーク大学病理

### 【目的】

補体第3成分C3bに対するリセプター・CR1は、赤血球、リンパ球、好中球などの細胞表面に存在し、赤血球上のCR1は、免疫複合体のクリアランスやC3bの不活性化のcofactorなどの機能を果していると考えられている。全身性エリテマトーデス(SLE)や慢性関節リウマチ(RA)などの自己抗体や免疫複合体の関与する自己免疫疾患では、赤血球上のCR1の減少が報告され、最近では、リンパ球や好中球上のCR1の異常についての報告がみられている。

ベーチェット病は、病因不明の慢性炎症性疾患であり、临床上、口腔粘膜潰瘍、陰部潰瘍、ぶどう膜炎、関節炎、血管炎、小腸潰瘍、中枢神経症状、皮膚病変など多彩な症状を呈し、口腔粘膜に対する自己抗体、免疫複合体の存在、好中球およびリンパ球の異常などのさまざまな免疫学的異常が報告されている。とくに、活動期には補体の上昇がみられ、自己抗体や免疫複合体の存在、リンパ球の機能異常の存在などの知見から、ベーチェット病患者末梢血リンパ球および赤血球上のCR1の表現状態について検討した。

### 【方法】

順天堂大学内科および帝京大学第二内科にて加療中のベーチェット病患者26例、健常者22例。男女比は、7:13、平均年齢41歳、完全型:不全型の比は9:11。

末梢血リンパ球をFicoll-Hypaque法で分離、モノクローナル抗CR1抗体をbiotin標識化し、phycoerythrin(PE)-avidinと反応させ、一方、FITC標識Leuシリーズ(抗Leu4, 12, M3)抗体を使って、FACSによるtwo color解析を行った。

赤血球上のCR1については、モノクローナル抗CR1抗体にて、immunoradiometric assayによって、飯田先生によって測定していただいた。

### 【結果】

図1に代表的なFACS patternを示す。図1, A. はCR1陽性Monocyteを表す。右のベーチェット病患者では、CR1陽性Monocyteの数の増加(患者67.0%, 健常者25.0%)およびCR1抗原量の増加を示す。図1, B. はCR1陽性Bリンパ球数自体の減少(患者7.0%, 健常者16.8%)があり、CR1陽性B細胞は、患者5.7%, 健常者12.4%とベーチェット病患者で減少を示し、またCR1抗原量の減少も認められる。図1, CはTリンパ球を示すが、大きな差異は認められない。

表1に、ベーチェット病患者26例、健常者22例についての解析の結果を示す。ここで、CR1陽性B細胞数の減少が、患者群のB細胞数自体が健常者群より少ないことに起因し、両群B細胞上のCR1レベルの正しい比較にならない可能性があると考え、各SampleについてCR1陽性B細胞数を全B細胞数で割った値を求め、全B細胞中、CR1を表現しているB細胞の割合、つまり、B細胞上のCR1の表現レベルとし

た。同様な解析を monocyte についても行った。

CR1 陽性 Monocyte (CR1 + monocytes) は、ベーチェット患者では、 $62.6 \pm 13.7$  % と有意に増加し、monocyte 上の CR1 レベル (CR1 + mono / mono) は  $77.4 \pm 10.3$  と増加を示した。

一方、Bリンパ球数自体の減少が患者群にみられ、このため、CR1 陽性 B 細胞数 (CR1 + B cells) は減少しているが、B 細胞上の CR1 + B cells / B cells) もベーチェット病患者群では健常者群に比べ減少を示し、Bリンパ球上の CR1 の表現状態の異常が示唆された。

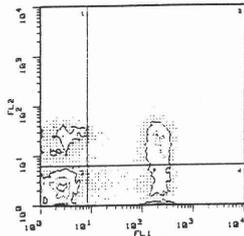
T 細胞については、両群に差異は認められなかった。

赤血球上の CR1 数について、患者 8 人について検索したが、健常者 91 人に比べ有意の増加を示した。

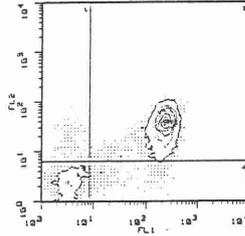
#### 【考案】

リンパ球、単球上の CR1 の表現状態や機能については、明らかでない点多いが、ベーチェット病の単球と赤血球上の CR1 の増加については、一元的には、補体成分や免疫複合体などの作用によって、CR1 が upregulate されている可能性があること、また monocyte の CR1 の増加については、chemotactic factor の影響があること、などが Speculation として考えられる。B cell 上の CR1 の減少も様々な原因が考えられるが、一般に CR1 は mature B cell の段階では表現されず、Sakane らの報告にあるように polyclonal B cell activation のメカニズムが、その原因として示唆される。なお当日は、SLE, RA, 肝疾患、感染症などのリンパ球上の CR1 レベルについての preliminary data を提示し、検討したいと考えている。

1 A, CR1+ monocytes in Behcet's and normal

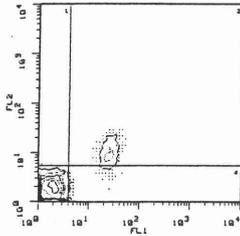


Leu M3  
normal

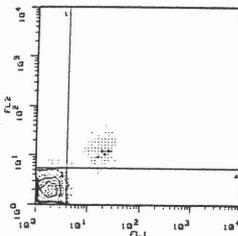


Leu M3  
Behcet

B, CR1+B lymphocytes in Behcet's and normal

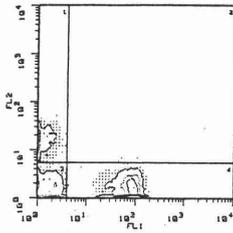


Leu 12  
normal

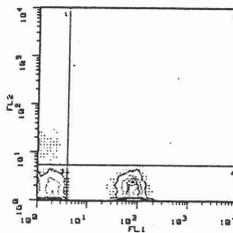


Leu 12  
Behcet

C, CR1+ T lymphocytes in Behcet's and normal



Leu 4  
normal



Leu 4  
Behcet

Table 1. The CR1 expression on monocytes, lymphocytes and in erythrocytes.

	BEHCET'S	NORMALS
CR1+monocytes	62.6 $\pm$ 13.7*	30.8 $\pm$ 15.4
CR1+mono/mono	77.4 $\pm$ 10.3**	54.6 $\pm$ 18.8
Monocytes	64.0 $\pm$ 21.6 (n=24)	62.7 $\pm$ 18.9 (n=18)
CR1+B cells	7.9 $\pm$ 5.9***	12.2 $\pm$ 5.2
CR1+B cells/B cells	72.5 $\pm$ 18.7***	83.1 $\pm$ 17.5
B cells	9.2 $\pm$ 5.0*** (n=26)	14.7 $\pm$ 6.4 (n=20)
CR1+T cells	3.3 $\pm$ 3.8	2.6 $\pm$ 2.6
T cells	57.0 $\pm$ 21.0 (n=21)	57.6 $\pm$ 9.8 (n=22)
CR1 on erythrocytes (ng/10 RBC)	311 $\pm$ 102 (n=8)	188 $\pm$ 75 (n=91)

Mean percent includes standard deviation except CR1 in erythrocytes expresses mean $\pm$ SD ng/10<sup>9</sup>RBC.

\* p<0.001, \*\* p<0.02, \*\*\* p<0.05 compared Behcet's to normals.

### 3 重症感染症時におけるActivated Complement Componentsの変動

高岡哲郎、由良二郎、品川長夫、真下啓二、福井拓治  
名古屋市立大学医学部第一外科

#### 目的

重症感染症時しばしば adult respiratory distress syndrome (ARDS) を始めとした肺機能低下を合併することはよく知られているし、重症感染症より multiple organ failure (MOF) に移行する場合、肺が初発臓器となっていることが多い<sup>(1)</sup>。そして肝などのいわゆる reticuloendothelial system の機能低下時には代償的に異物、細菌などが肺に集積し肺障害が重篤になるとも言われている<sup>(2)</sup>。Craddock らが血液透析患者における白血球減少症と低酸素血症の成因は、体外循環によって活性化された補体により顆粒球の肺への sequestration が惹起された結果であると報告して以来補体、顆粒球と ARDS との関連が注目されている。よって今回我々は重症感染症時における補体系、特に活性化補体 (activated complement components) の変動について検討を行うと共に補体活性に対する蛋白分解酵素阻害剤、steroid 剤の効果についてもあわせて報告する。

#### 方法

(1) 臨床例；名古屋市立大学第一外科において重症感染症と判定された症例において経時的に CH50, C3, C4, activated complement components (C3a) を測定し、予後との関係について検討した。測定方法は CH50 は Mayer 法、C3, C4, C5 は single radial immunodiffusion 法、C3a は radioimmuno assay 法 (C3a des Arg kit, Upjohn) にて行った。

(2) IN-VITRO；serum に lipopolysaccharide (LPS) ; 1mg/ml of serum を添加し同時に蛋白分解酵素阻害剤 ( Gabexate mesilate: 20mg , Nafamostat mesilate: 2mg, Urinastatin: 10000U)、steroid 剤 (Hydrocortisone: 50mg) を加え 1 時間、37°C にて incubate し経時的に活性化補体を測定した。

#### 結果

(1) 臨床例；重症感染症時において、最も臨床的に重篤な時の C3a は、CH50, C3 とは逆に予後良好、不良群共に著明な上昇高値を示していた。しかし予後による差は認められなかった (Fig 1)。そして経時的変動を見てみるとこれも CH50, C3 とは逆に、予後良好群では経過とともに下降傾向を示したのに対し予後不良群では高値を示したままであったり、不安定な状態を示していた (Fig 2)。

(2) IN-VITRO；incubate 30 分後においては Nafamostat mesilate ( $p < 0.01$ )、Urinastatin ( $p < 0.01$ ) が、60 分後においては Nafamostat mesilate ( $p < 0.01$ ) が薬剤無添加群に比して有意に C3a 上昇を抑制していた (Fig 3)。

#### 考察

補体成分のうち特に C5 の活性化によって生ずる反応系は、白血球停滞や白血球減少症を引き起すこと<sup>(3)</sup>、また白血球の肺血管床への sequestration により顆粒球よりの free radical の産生<sup>(4)</sup>や lysosome 酵素の遊出<sup>(5)</sup>により肺の血管床に透過性変化が生ずること、ARDS の発症には C5 の活性化と白血球の両者が必要であること<sup>(7)</sup>などが報告されており C5a と白血球との関係は肺障害の病因を

知る上で重要な観点となっている。最近活性化補体が radioimmunoassay法の開発に伴い一般臨床患者においても容易に測定可能になったが、血中 C5a 値の解析には慎重を要する。すなわち C5a は血中より消失が早いことに加え白血球が C5a-receptorを持っているがため血中に遊離されたC5aが白血球と結合することにより実際に体内、血中で C5 が活性化されて生じたC5aよりも測定値は低い可能性が強く、現在の測定法においては臨症例におけるC5a値の信憑性は薄いと考えられる。事実、著者らの *in vitro*の検討においても血清中でC5を活性化すると C5aが著明に上昇したのに対し全血中ではその上昇は軽度であった<sup>(7)</sup>。また血清中において補体系を活性化した時の C3aと C5aの上昇傾向は、両者間に比較的よい相関が示された<sup>(7)</sup>。よって、現時点では補体系活性の程度を知るためには比較的安定性のある C3a の測定が最良であると考え、重症感染症例において C3aを測定したところ経時的C3a値と予後との間に密接な関係が認められた。そして活性化補体と血清補体価、補体蛋白量との逆相関より重症感染症時の血清補体価、補体蛋白量の低下は補体の活性化による消費の結果であろうという従来よりの推測が正しいことが証明された。また予後不良の症例は MOFに移行する症例が多いことより、重症感染症時における補体系の過剰な活性化とその持続は肺障害を初めとする MOF発生の要因となっている可能性を示すものであり、補体系の過剰反応の抑制は重症感染の病態悪化を阻止すると言う意味において重要な一治療法であると考えられた。よって今回蛋白分解酵素阻害剤とsteroid 剤による補体活性に及ぼす影響について*in vitro*にて検討を行ってみたところNafamostat mesilateは有意の差をもって補体系活性を抑制することが判明した。本実験は血清に LPS添加と同時に薬剤を添加した結果であること、反応時間が60分間であることなど実際に重症感染症時に生体内において起こる反応と同じであるとは考えにくいがある種の蛋白分解酵素阻害剤が補体活性を抑制するという今回の実験結果は重症感染症時においてそれら薬剤はimmuno modulatorとして試みるべき薬剤の一つであると考えられる。よって今後これら薬剤の投与時期、投与方法、投与量に関して臨症例において詳細に検討する必要がある。

#### 文献

- (1)高岡哲郎他：第33回日本化学療法学会西日本支部総会,1985 大阪
- (2)Lanser ME and Saba TM:Surgery 90:473-481,1981.
- (3)Craddock PR,et al.:J Clin Invest 60:260-264,1977.
- (4)Heflin AC,et al.:J Clin Invest 68:1253-1260,1981.
- (5)Goldstein IM,et al.:J Immunol 111:33-37,1973
- (6)Hosea S,et al.:J Clin Invest 66:375-382,1980
- (7)高岡哲郎他：第23回補体シンポジウム講演抄録集 22-23,1986 筑波

C<sub>3a</sub> in Severe Surgical Infection  
 <most critical day>

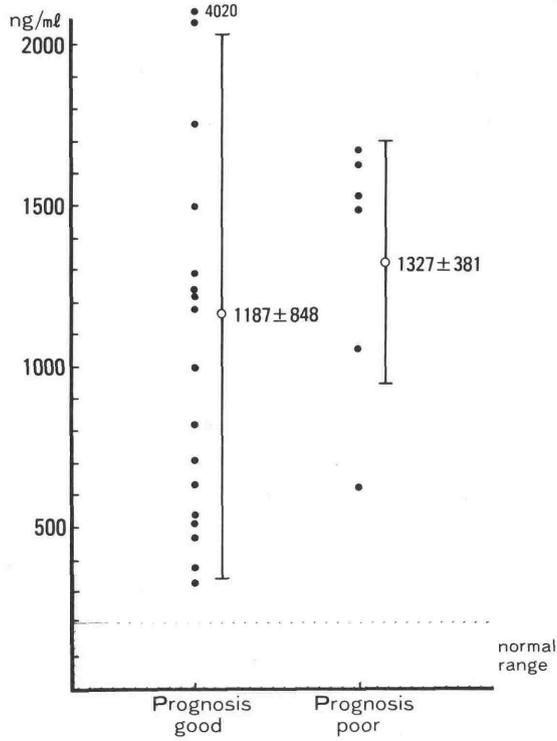


Fig.1

C<sub>3a</sub> in Severe Surgical Infections  
 <Prognosis : good>      <Prognosis : poor>

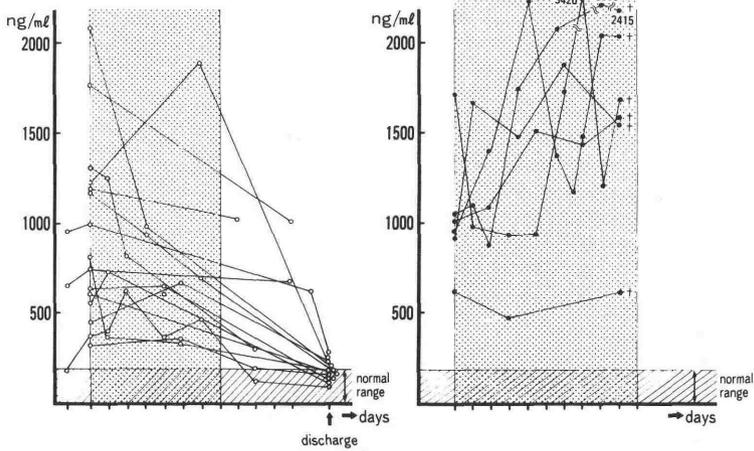


Fig.2

### Inhibitory Action of Drugs on Complement Activation

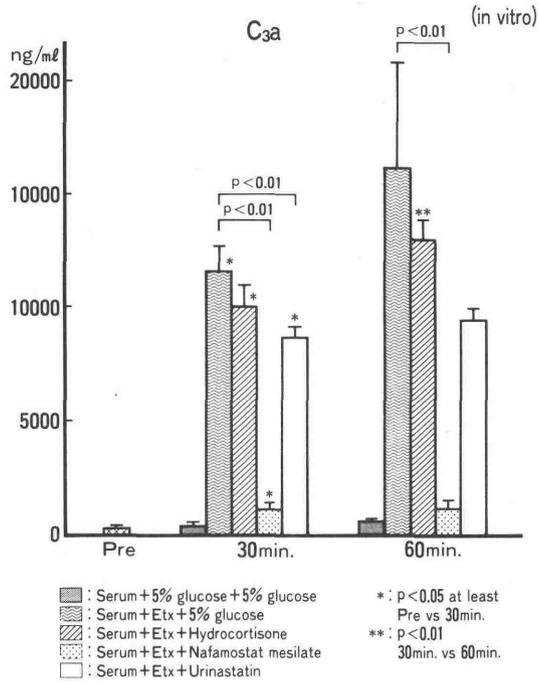


Fig.3

#### 4 超急性拒絶反応時の血清補体の変動について

宮川周士、中好文、川口章、中田清三、白倉良太、  
広瀬一、川島康生、松本美佐子\*、北村肇\*  
大阪大学第一外科、大阪府成人病センター\*

《はじめに》 拒絶反応の一つに超急性拒絶反応 Hyperacute Rejection がある。これは移植後、分単位で起こる Rejection のことで、抗体と補体の作用で起こるとされている。しかし、この際の補体の動きについて検討した報告は少ない。今回我々はこの Hyperacute Rejection の際に起こる補体の動きについて検討したので報告する。

《目的》 具体的には、自然抗体を持つ異種間に起こる Hyperacute Rejection と、自然抗体を持たない異種間に、あらかじめ抗体を投与した際に起こる Hyperacute Rejection との補体の動きの差を調べる事に置いた。特に、前者での Alternative pathway の動きに注目した。

#### 《方法》

##### (1) 実験モデル

A群；自然抗体による Hyperacute Rejection のモデルとしては Guinea Pig - Rat を置いた。

B群；自然抗体はなく、獲得抗体による Hyperacute Rejection のモデルには、Humster-Rat を置いた。

C群；Control として、Rat 間の移植を置いた。

##### (2) 実験動物

Guinea Pig (200~220g : ♀)、Humster (140~155g : ♀) を日本動物より購入し使用した。Rat は近交系 Lewis rat をオリエンタル酵母より購入し使用した。なお、Donner 及び Recipient の体重比を  $D/R = 0.7 \sim 0.8$  とした。

### (3) 心移植

エーテル麻酔下に、Ono-Rindsey 法に準じ、腹部に異所性心移植を行った。吻合時間は、約30分であった。Rejection の判定は、直視下、移植心の拍動によっておこなった。

### (4) 抗体(血清)

Humster-Rat (Lewis)間で心移植を行い。Rejection後、Complement Dependent Cytotoxicity (CDC) で128倍以上の titer を持つ、Rat anti-Humster血清を作成し使用した。

なお、この際の CDC は、Humster の Spleen Cell を Target とし、15倍希釈 Guinea Pig 血清を用いて調べた。また、Medium は阪大微研よりの MEMを用いた。

この抗体(血清)は、B群において、移植直前に、静脈内投与した。

### (5) 採血

移植後、clamp 解除前に、動脈血を採取し、前の値とした。clamp 解除後 5分の、Graft の R V 血 (Graft 灌流血)と、Rejection 時点での動脈血を採取した。各検体は、室温にて約40分放置後、血清を採取した。

### (6) 補体溶血活性

CH50 は通常の、ヒツジ感作赤血球(EA)を、ACH50はモルモット赤血球を、C4, C2, C3, C5は Intermediate cellと Reagentを用いていずれも Micro-titer 法にて測定した。

## 《結果》

### (1) Rejection time

A群 ;  $17.5 \pm 8.3$  min; n=8.

B群 ;  $12.0 \pm 4.4$  min; n=8.

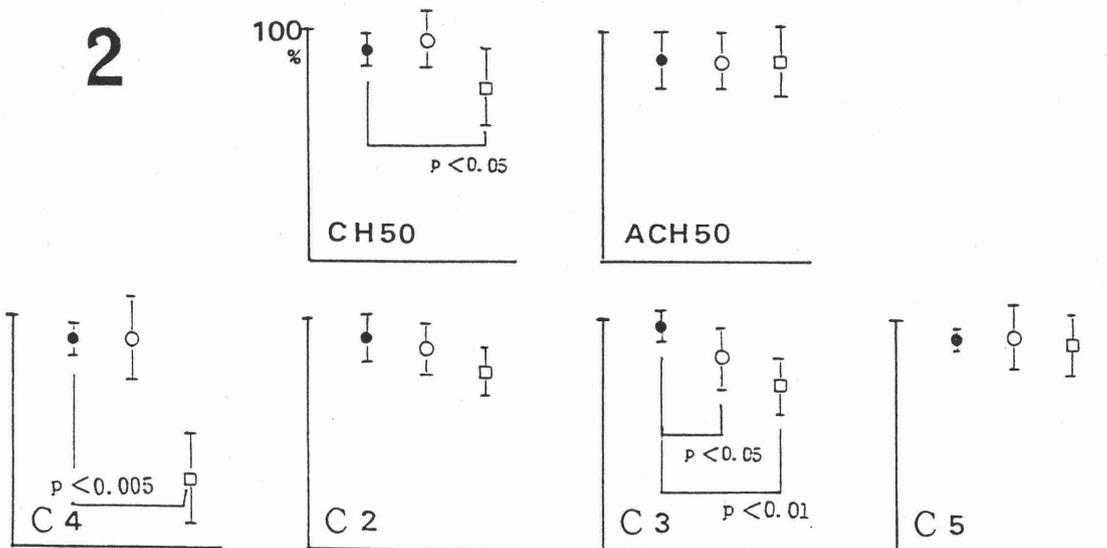
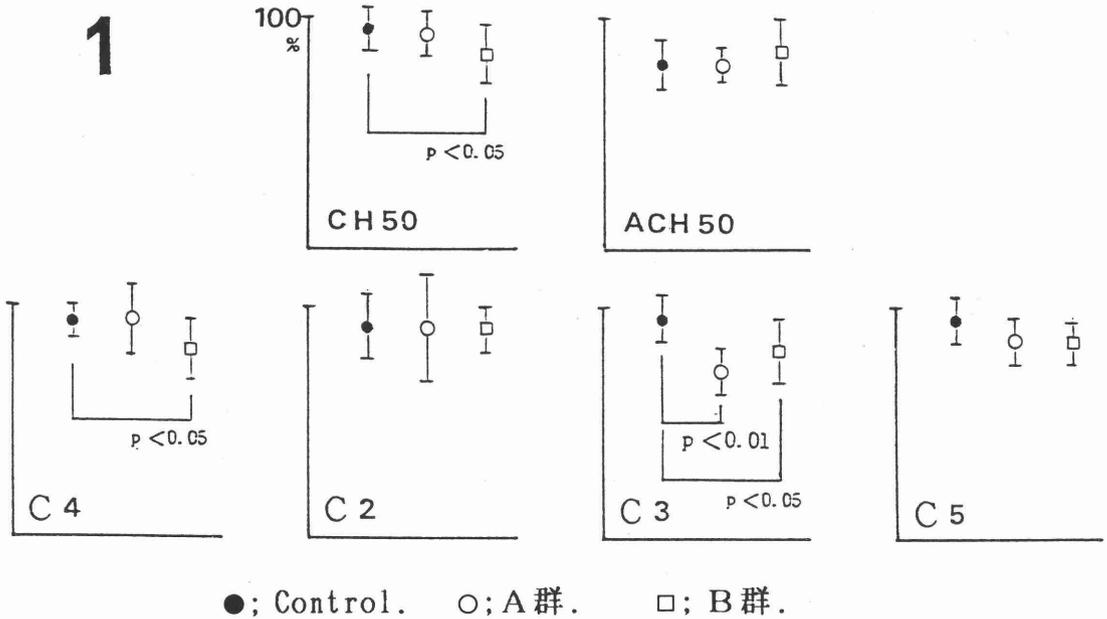
C群;全例拍動に問題は無かった。 ; n=6.

(2) 各群の補体溶血活性をグラフに示す。

グラフ1は、移植前の値を100とした時の、Rejection 時点の値である。

A群では、C3 が Control に比し、有意に低下していた。B群では、CH50、C4が有意に低下し、C3 も有意に低下していた。

グラフ2は、移植後5分の、Graft のRV血 ( Graft 灌流血 )の値である。同じく、移植前の値を100とした値である。



これでも上と同様、A群では、C3 の有意な低下を認め、B群では、CH50C4、C3 の有意な低下を認めた。特に、C4 は、 $p < 0.005$  と著名に低下しており、C2 も有意差はないが低下していた。

### 《考 察》

(1) A群では、Classical pathway の動きは見られず、C3 のみが有意な低下を示し、むしろ Alternative pathway の関与が考えられた。

(2) B群では、特に Graft 灌流血で、CH50、C4、C2 の動きが見られ、抗体に続く Classical pathway の動きととらえられた。また、単に Classical pathway の動きのみでは通常低下しない C3 も低下しており、in vivo での特徴か、組織破壊に続く、二次的な、Alternative pathway の動きが考えられた。

(3) A、B群を比較して、自然抗体を持つような異種間に起こる Hyperacute Rejection は、単に獲得抗体に続く補体の動きとは別のメカニズムにより Rejection される事が考えられた。

### 《文 献》

- 1) Berden, J.H.M., et al: Eur. J. Immunol. 8;158, 1978.
- 2) Forbes, R.D.C., et al: Laboratory Investigation 39;463, 1978.
- 3) Forbes, R.D.C., et al: American Association of Pathology 106;378, 1982.
- 4) Ono, K., Rindsey, E.S.: J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 57;225, 1969.

## 5

# 膜性腎症における C4 および BF phenotype

中西 功, 椿原 美治, 岡田 倫之, 北村 栄作,  
横山 建二, 飯田 喜俊, 西向 弘明\*  
大阪府立病院・腎疾患専門診療科  
大阪医科大学・法医学教室\*

### 〔目的〕

我々は昨年の本学会において、IgA 腎症（以下 IgA-GN）では健常人に比較し、高頻度に C4A もしくは C4B 座に欠損遺伝子(QO)の存在することを報告した。

今回、膜性腎症（以下 MN）における C4 欠損遺伝子の頻度を調べるとともに、MN および IgA-GN の BF phenotype についても検討した。

### 〔対象・方法〕

1) samples : 腎生検材料の光顕像および免疫蛍光抗体像により組織診断された MN 34 名、IgA-GN 72 名および control group として健常人 288 名より採取した serum もしくは EDTA-plasma を用いた。

2) C4 typing : Mauff らの方法に従い、Immunofixation electrophoresis 法により行なった。

3) BF typing : neuraminidase にて前処理した serum もしくは EDTA-plasma を polyacrylamide gel (pH3~5, pH5~8, pH 3~10, 2:5:1.4) を用いた等電点電気泳動法にて分離した後、Immunoblotting 法を行ない型判定した。

### 〔結果〕

#### 1) MN における C4 欠損遺伝子頻度

MN 34 名、IgA-GN 66 名および健常人 288 名における C4 欠損遺伝子頻度を Table 1 に、 $\chi^2$  検定の結果を Table 2 に示す。IgA-GN と同様 MN においても A 座、B 座とも欠損遺伝子のない頻度は control にくらべて有意に低く ( $P < 0.0005$ )、逆に Homozygous な欠損遺伝子を示す頻度は有意に高値であった ( $P < 0.005$ )。

#### 2) BF patterns (Fig 1)

neuraminidase 処理後の polyacrylamide gel 等電点電気泳動法により BF-F は BF-FA (anodal) と BF-FB (cathodal) の 2 つの subtype に分かれた。一方、BF-S の subtype は認められなかった。

#### 3) MN および IgA-GN における BF subtype

MN 34 名、IgA-GN 72 名および健常人 213 名における BF subtyping の結果を Table 3、Table 4 に示す。control group では FA-positive が 26.3%、FB-positive が 3.3% であるのに対し、MN では FA-positive が 44.1% ( $P < 0.05$ )、FB-positive が 17.6% ( $P < 0.001$ ) と control に較べて有意に高値であった。一方 IgA-GN では control に較べて有意差は認められなかった。

### 〔考察〕

膜性腎症 (MN) は糸球体毛細血管壁の肥厚を特徴とする原発性糸球体腎炎の一病型であり、臨床的にはネフローゼ症候群を呈することが多い。免疫蛍光抗体法では糸球体係蹄壁に沿って IgG、C3 の顆粒状の沈着がみられ、電顕では糸球体上

皮細胞下に沈着物 (deposits) がみられる。

MN の病因についてはいまだ明らかにされていないが、免疫学的な機序が発症に関与していると一般に考えられている。近年、本症と HLA との関連が各国において検討されており、免疫遺伝学的な機序の関与が注目されている。欧米では、HLA-B8、B-18、HLA-DR3 との相関、我国では HLA-DR2 との相関が報告されている。一方、本症と BF phenotype との関連については、1981年 Dyer らにより BF・F1 の頻度が有意に高いことが始めて報告されたが、その後この結果に対する反論もなされている。また C4 phenotype と MN との関連についての報告もない。

今回我々は日本人の MN における BF および C4 phenotype について検討したが、BF-FA、BF-FB の頻度が健常人に比較して有意に高いことが明らかとなった。さらに IgA-GN と同様、C4 欠損遺伝子も高頻度に存在することがわかった。以上より MN の pathogenesis の一因として BF、C4 の遺伝的素因の関与が示唆された。

Fig. 1

BF - Subtype

⊕



⊖

1 2 3 4 5 6 7 8

- 1) S                    2) F075S    3) & 4) FAS  
5) & 6) FBS    7) FAFB    8) FA

**Table 1.**

C4 phenotypic groups in patients and controls

Phenotypic groups	MN Number( % )	IgA-GN Number( % )	Control Number( % )
No C4 Null	9 (26.5)	18 (27.3)	172 (59.6)
One C4A Null	10 (29.4)	22 (33.3)	55 (19.1)
One C4B Null	11 (32.3)	19 (28.8)	54 (18.9)
Homozygous Null	4 (11.8)	7 (10.6)	7 ( 2.4)
Total	34	66	288

**Table 2.** $\chi^2$  analysis

Phenotypic groups		$\chi^2$	P
No C4 Null	MN vs Control	13.660	< 0.0005
	IgA-GN vs Control	22.738	< 0.0005
	MN vs IgA-GN	0.007	NS
One C4A Null	MN vs Control	2.008	NS
	IgA-GN vs Control	6.394	< 0.025
	MN vs IgA-GN	0.159	NS
One C4B Null	MN vs Control	3.493	NS
	IgA-GN vs Control	3.305	NS
	MN vs IgA-GN	0.136	NS
Homozygous Null	MN vs Control	8.030	< 0.005
	IgA-GN vs Control	13.385	< 0.0005
	MN vs IgA-GN	0.031	NS

**Table 3.**

BF phenotypic groups in patients and controls

Phenotypic groups	MN Number ( % )	IgA-GN Number ( % )	Control Number ( % )
FA	1 ( 2.9)	3 ( 4.2)	4 ( 1.9)
FAFB	1 ( 2.9)	0 ( 0 )	2 ( 0.9)
FAS	13 (38.2)	23 (31.9)	50 (23.5)
FBS	5 (14.7)	3 ( 4.2)	5 ( 2.4)
S	14 (41.2)	42 (58.3)	151 (70.9)
F075S	0 ( 0 )	1 ( 1.4)	1 ( 0.5)
Total	34	72	213

**Table 4.**

Distribution of the BF phenotypes in patients and controls

BF phenotypes	MN (n=34)	IgA-GN(n=72)	Control(n=213)
FA-positive	15 <sup>a</sup> (44.1%)	26 (36.1%)	56 (26.3%)
FB-positive	6 <sup>b</sup> (17.6%)	3 ( 4.2%)	7 ( 3.3%)
s-positive	32 (94.1%)	69 (95.8%)	207 (97.2%)
F075-positive	0 ( 0 %)	1 ( 1.4%)	1 ( 0.5%)

<sup>a</sup> p < 0.05<sup>b</sup> p < 0.001

## 6 尿中C3c測定の臨床的意義

福岡大学医学部小児科学教室 西村 美保, 小田 禎一  
同 微生物学教室 山口 寛, 岡田 秀親

### 〔目的〕

腎疾患における血清補体の関与は知られているが、尿中補体についての報告は少ない。今回私達は、各種腎疾患における尿中C3cを測定し、臨床的意義について検討したので報告する。

### 〔対象〕

11ヵ月～20才の腎疾患患者41例（男児20例，女児21例）；SLE 1例，IgA腎症7例，紫斑病性腎炎1例，膜性腎症2例，膜性増殖性糸球体腎炎2例，増殖性糸球体腎炎1例，遺伝性腎炎4例，急性糸球体腎炎5例，特発性ネフローゼ症候群7例，難治性ネフローゼ症候群2例，先天性ネフローゼ症候群1例，血尿4例，体位性蛋白尿2例，尿路感染症2例である。必要に応じ最長2年間の経過追跡を行った。

### 〔方法〕

一回新鮮尿をセルロース膜を用いて透析後，ポリエチレングリコール（分子量20000）で，10倍から100倍に濃縮した。ヒト補体成分C3c定量用免疫拡散板の抗原孔の中に被検濃縮尿をいれ，48時間室温静置後，形成された沈降輪の直径を測定した。標準血清により検量線を作成し，これより被検濃縮尿の沈降輪の直径に対応する蛋白濃度を求めた。

### 〔結果〕

①41例のうち7例に尿中C3cが検出された。尿中C3c陽性例では，検討した限りでは常時陽性で，C3cは尿中に継続排出していると考えられた。

その陽性症例は難治性ネフローゼ症候群2例，先天性ネフローゼ症候群1例，遺伝性腎炎2例，増殖性糸球体腎炎1例，血尿1例であった。

②尿中C3c検出例では全例血清C3cは正常値であり， $CH_{50}$ 値も正常範囲内であった。一方急性糸球体腎炎5例，膜性増殖性糸球体腎炎1例，特発性ネフローゼ症候群1例では，低補体血症におちいていたが，尿中C3cは検出されなかった。

③尿中蛋白量とは関係がみられなかった。26例に尿蛋白分画をおこなったが蛋白選択性とは無関係であった。

④尿中C3cを測定した41例のうち17例に腎生検をおこなった。17例のうち4例に腎糸球体内にC3の沈着が認められた。しかし，その症例には尿中C3cは検出されなかった。腎生検をおこなった17例中5例に尿中C3cが検出されたが腎糸球体内にはC3の沈着はみられなかった。このうち1例はminimal changeであり血管壁にC3の沈着がみられた。

⑤尿中C3c陽性7例のうち3例に経過中腎機能低下の進行がみられ，1例が血液透析に至った。これに対し，尿中C3c陰性例では腎機能低下するものは1例もみられなかった。以上の結果から，尿中C3cの測定は腎疾患の予後を知る指標の1つとなると考えられる。

〔まとめ〕

1. 11ヵ月～20才の腎疾患患者41例のうち7例に尿中C3cが検出された。
2. 尿中C3c排泄は尿蛋白量、蛋白選択性、腎糸球体内補体沈着や血清C3c濃度とは関連性を認めなかった。
3. 尿中C3c陽性7例のうち3例に経過中腎機能低下の進行がみられた。
4. 尿中C3cの測定は腎疾患の予後を知る指標の1つとなると考えられた。

尿中C3c検出例の血清生化学所見

症例	性別	年齢	C3	C4	CH50	BUN	クレアチニン	尿中C3c
1	女	11ヵ月	47	11	15	37	0.8	47.8 mg/l
2	男	8才	75	43	39	14	0.4	0.3 mg/l
3	男	11才	113	50		9	0.4	4.0 mg/l
4	女	14才	66	16		11	0.5	0.6 mg/l
5	女	15才	41	73	19	56	6.9	300.0 mg/l
6	男	16才	63	19	46	17	0.6	3.2 mg/l
7	男	19才	79	49		24	2.2	1.8 mg/l

## 7 M P G N と低補体 (752例のアンケート調査よりみて)

日本大学医学部第二内科  
大井洋之, 関 正人, 波多野道信

低補体はM P G Nの病態と密接な関係にあることが示唆される多くの検討が行われている。しかし、本疾患における低補体の出現頻度や、低補体の本疾患の診断にどの程度有効であり、また補体価の変動がどの程度病勢と一致するのか等に関しては想定の域を脱していないと思われる。これらのことについては現在まで多数の施設より報告されているが、限られた症例数であり、わが国における成人と小児を含めたM P G Nの全体像がつかめていないのが現状である。そこで以上のことを明らかにすることを目的に内科、小児科を含めた多数の施設のご協力のもとにアンケート調査を行った。

〔対象及び方法〕

アンケート用紙を作成し、補体価を測定してある症例について各施設に可能な限りの症例の記載を依頼した。アンケートは内科及び小児科合計88施設へ送付した。集計は、PC-9801 VMを使用し、統計処理は、Student T test及びカイ二乗検定により行った。

〔結果〕

アンケートは63施設（内科39施設、小児科24施設）より回答が得られた。回収率は71.5%で症例数は752例であった。年齢の記載のあった750例（男333例、女417例）の年齢分布は20歳以下が全体の69.3%であった。<sup>(図1)</sup> Subtypeはtype 1が508例で全体の68.1%、type 2は37例で5%、type 3は79例で10.6%、記載のなかったもの122例16.4%であった。

初診時のCH50、C3、C4の値をみると、CH50が20以下は全体の53.7%、C3が30mg/dl以下は44.4%、C4が10mg/dl以下は16.0%であった。<sup>(図2)</sup> 年齢との検討では、15歳以下のものが以上に比較しCH50、C3、C4、いずれも有意に低下を認めた。 $(p < 0.01)$  WHO臨床分類別では、acute nephritic syndrome, RPGN, recurrent or persistent hematuria,のものに低補体が多かった。補体の経過をみると<sup>(表1)</sup> persistent hypocomplementemiaが245例(34.5%)で最も多く認められ、次いでinitial hypocomplementemia with recovery; 212例(29.8%), occasional hypocomplementemia; 173例(24.3%), normo and raised; 81例(11.4%)であり、経過中低補体を認めたものは全体の88.6%となった。

補体の経過をsubtype別にみるとtype 2にpersistent hypocomplementemiaが多く66.7%をしめ、type 1、type 3では明らかな差を認めなかった。<sup>(図3)</sup> WHO臨床分類別では、RPGN syndromeを除く各症候群で4つの補体経過のパターンを認めた。acute nephritic syndromeではpersistent hypocomplementemiaが40.3%に認め、RPGN syndromeは、ほとんどがoccasional hypocomplementemiaであった。recurrent or persistent hematuriaでは持続性低補体を呈したものの率が最も多く、41.1%であり低補体を呈したものは全体の85.5%であった。

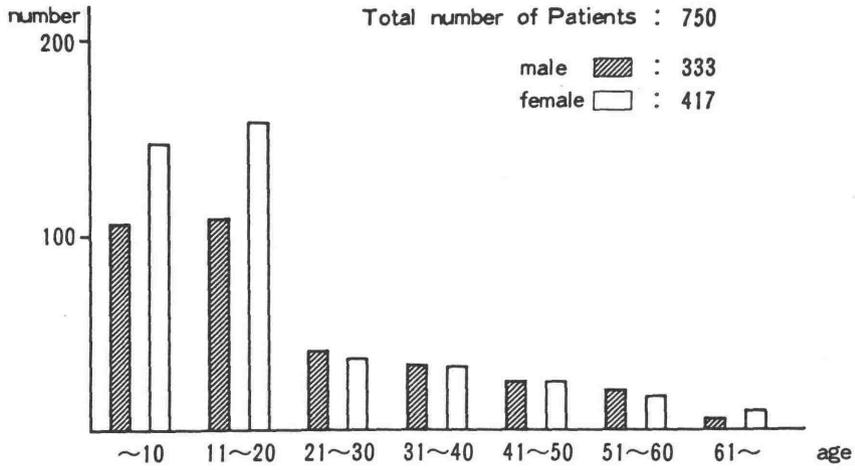
chronic nephritic syndrome, nephrotic syndrome では各補体変動のパターンに

差は認めなかったが正常又は高補体を持続したものが各々 26.3%, 30.6%と多い傾向をしめした。Chance proteinuria and or hematuria (CPH)症例 447例をC3値により分類すると、30mg/dl以下のものは217例(48.5%)であり、以上のものとは差はなかった。治療効果と補体経過の比較では、改善を認めたものうちinitial hypocomplementemia with recoveryであったものが156例(45.9%)と最も多く認められた。増悪したものはpersistent hypocomplementemia; 47例(38.8%), normo or raised; 43例(36.4%), であった。

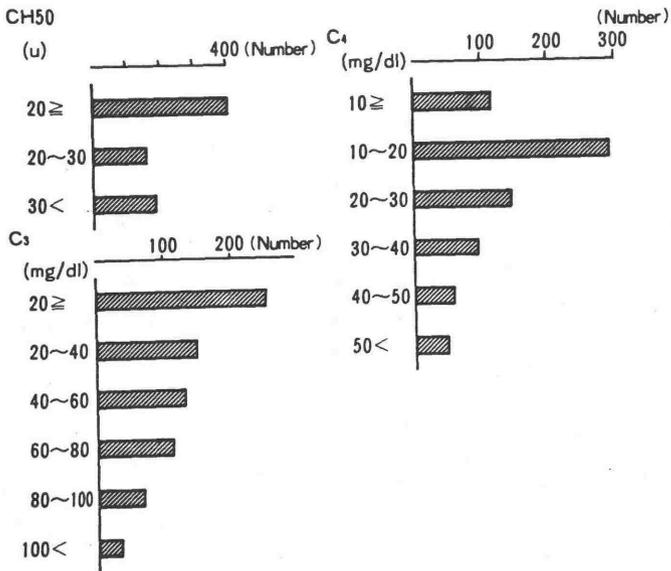
#### [考 察]

初診時の補体をみると44.4%に明らかな低C3値を認め、C4値は16%に明らかな低下を認めた。若干各施設により正常値に差はあるものの、このことより腎疾患において初診時のCH50, C3, C4, の測定は臨床像の軽重にかかわらず低補体があればMPGNを疑う目安となると思われる。補体の経過は多彩であるが経過中に低補体を認めたものは約90%を呈しており、初診時の補体価とともにその経過を観察し低補体の出現をみることはMPGNの診断に重要であると思われた。CPHでは約50%が明らかな低C3値を認めており15歳以下ではより低値であること、及びrecurrent or persistent hematuriaでCH50, C3, C4, の低値が多く認められることより、学校検診等による早期診断に補体価が重要であると思われた。subtype別にみた補体の経過は、type 2に最も持続性低補体が多く、C3 NeFの出現がsubtype中最も多いことが知られており、このことと一致するものと思われた。しかしながら、各typeとも様々な補体の変動を認めておりこれのみでsubtypeの特徴をつかむことは困難である。acute nephritic syndrome, recurrent or persistent hematuria, で発症したものでは持続性低補体を呈するものが約40%に認められることより、急性腎炎に典型的な補体の変動とは異なる補体経過より本症を疑い腎生検を施行する目安となると考えられた。chronic nephritic syndromeでは他のものに比較して正常又は高補体を呈する率が多くなり、これら症候群を同一線上において考えるならば、初期像より完成された臨床像を観察している可能性も考えられた。補体の経過と治療効果との比較では、必ずしも補体の変動が病勢に一致しないが、改善例には当初低補体で正常補体に復帰するものが多く認められ、症例によっては病勢や治療の目安となると思われた。

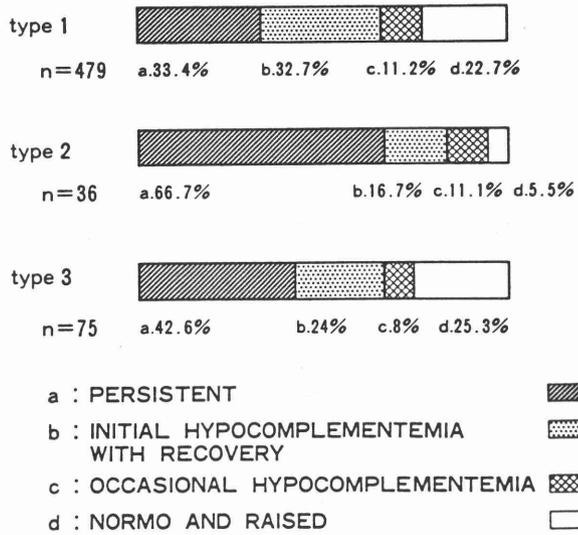
今回のアンケート調査では、組織学的診断に各施設で若干の差のあることやCut off値をどこに決め低補体とするか、又、持続性低補体の定義等多くの問題があるが現時点でのMPGNの全体像をある程度客観的にとらえることを目的とした。今後この結果をステップに更に詳細な検討が必要である。



(图 1)



(图 2)



(图 3)

n=711

COMPLEMENT PROFILE	NUMBER	
1.PERSISTENT	245	(34.5%)
2.INITIAL HYPOCOMPLEMENTEMIA WITH RECOVERY	212	(29.8%)
3.OCCASIONAL HYPOCOMPLEMENTEMIA	173	(24.3%)
4.NORMO AND RAISED	81	(11.4%)

(表 1)

## 8 腎疾患における補体活性化因子の検討

### —免疫固定法によるC3のC3cへのconversionの数量化の試み—

宮平つね子<sup>1)</sup> 山口義哉<sup>1)</sup> 柴若継雄<sup>1)</sup> 生駒雅昭<sup>1)</sup>  
小坂橋 靖<sup>2)</sup> 大井洋之<sup>2)</sup>

1) 聖マリアンナ医科大学小児科

2) 日本大学医学部第二内科

血清CH<sub>50</sub>およびC3の血清レベルは、補体の産生と消費（活性化）のバランスの上に成り立っており、それらの血清レベルから血清補体活性化因子の存在を推測することは難しい。そこで、従来、私どもは、C3のC3cへのconversionの程度を、二次元免疫電気泳動法およびCH<sub>50</sub>減少率を用いて検討してきたが、今回は、免疫固定法（IF法）を利用し、腎疾患におけるC3 conversionの程度の数量化を試みた。

#### <方法>

免疫固定法は、それぞれの検体をCorning社製 universal electrophoresis filmに1μlずつ塗布し、90V 60分間電気泳動を行う。次にBehringwerke社製抗ヒトC3c血清をセパラックス（Jookoo Sangyo社製）に浸透させ、ゲルフィルムに塗布し10分間反応させた後、脱蛋白を行う。Coomassie brilliant blue溶液で染色後、脱色、乾燥させた後、免疫固定されたバンドをデンシトメトリーで測定した。

(1) 正常プール血清とザイモザン溶液（4 mg/ml）を等量混合し、氷中（0℃）に保存したものを、37℃で2分、5分、20分浮置後氷中に保存したもののC3のC3cへのconversionの程度を免疫固定法により測定した。

(2) 膜性増殖性糸球体腎炎患者およびC3NeF陽性例と、正常プール血清をそれぞれ等量混合し、37℃ 30分浮置後、EDTA加緩衝液で2倍に稀釈しC3のC3cへのconversionの程度を同じく免疫固定法により測定した。尚、正常者においても同様の方法で測定した。

#### <結果>

(1) 正常者血清とザイモザンとの反応後のそれぞれの時点でのC3のC3cへのconversionの程度は0分、11.7%、2分、30.2%、5分、48.4%、20分、71.8%で、反応時間とconversionの程度は相関していた（図）。

(2) C3NeF陽性例においては13.6%から62.6%（平均32.0%）であった。

(3) 膜性増殖性糸球体腎炎患者においては、11.3%から22.4%（平均15.6%）であった。

(4) 正常者においては、7.0%から8.8%（平均7.8%）であった。

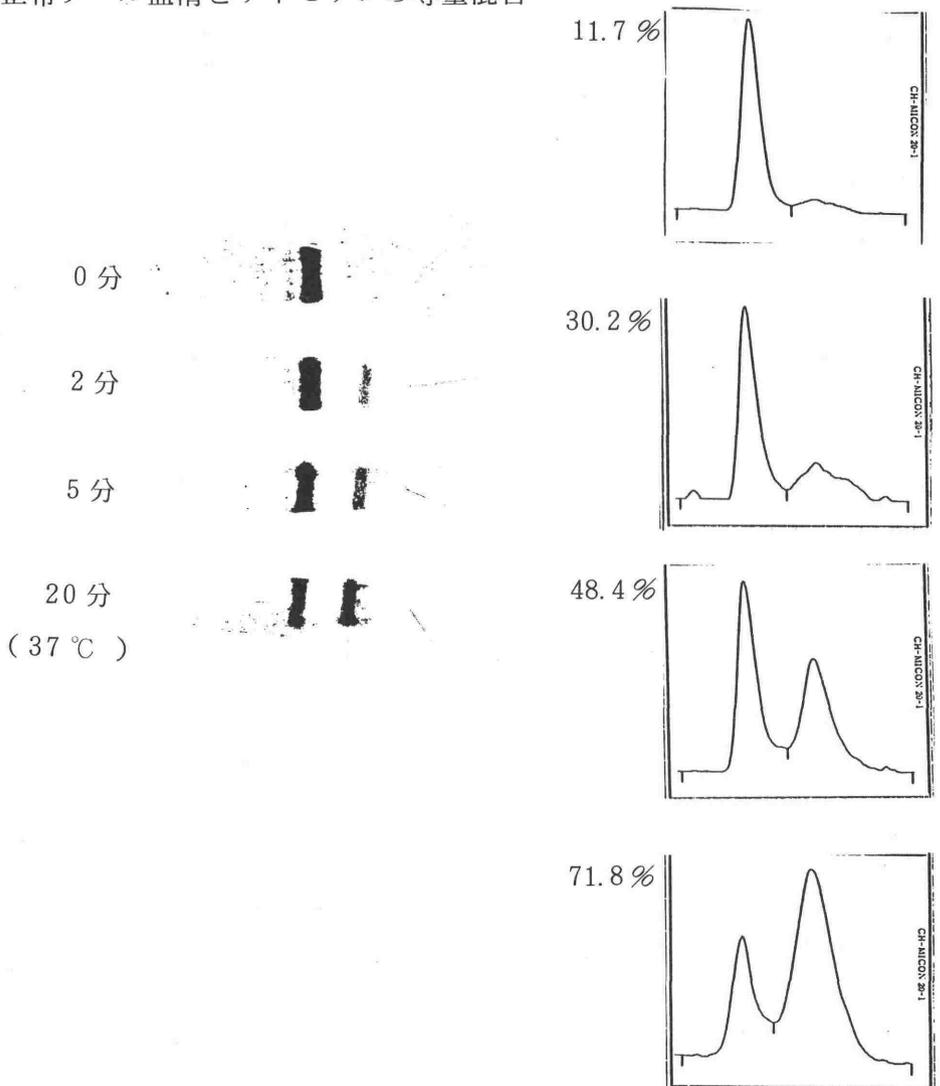
#### <まとめ>

(1) 今回の免疫固定法によるザイモザンの補体活性化の程度は、従来のCH<sub>50</sub>減少率、二次元免疫電気泳動法の結果ともよく相関した。

(2) C3NeF陽性例においても、C3のC3cへのconversionの程度は比較的低い例もみられた。

(3) 免疫固定法による補体活性化因子の検索は、その定量性と簡便性という点において有用であると思われたが、二次元免疫電気泳動の結果と一部一致しない点もあり、今後検討を要すると思われた。

図 正常プール血清とザイモザンの等量混合



文献 大竹皓子, Immunofixation 電気泳動法, 検査と技術  
Vol. 7 : 339 ~ 346. 1979.

## 9 低補体腎炎におけるシアル酸の関与

日本大学 第二内科

藤田宜是, 大井洋之, 関 正人, 波多野道信

### 〔目的〕

糸球体腎炎では、その経過中に低補体血症をきたす事が有り、補体の活性化が腎糸球体障害の発現に重要な役割を果していると考えられている。従って、糸球体腎炎の病態において補体活性化の mechanism を検討する事は糸球体障害の発現や進行を把握、予防する上で必要不可欠なものと思われる。

シアル酸は血清蛋白や組織中に分布し、Pangburn等の報告でその組織含有量の低下により固相上の C3bBb に対する Factor H の働きが低下する事が知られている。また 1981年 Rodriguez-Iturbe 等により、低補体を呈する事で知られる急性糸球体腎炎において血中シアリダーゼ活性および遊離シアル酸値が高い事が報告された。

そこで液相中に於てもシアル酸が補体の活性化に際し何等かの影響を及ぼしている事を想定し、糸球体腎炎におけるシアル酸と補体活性との関係を明らかにする為、低補体を呈する腎疾患に於て血中シアリダーゼ活性や遊離シアル酸及び総シアル酸値を測定、さらにその存在様式や他の血清蛋白との関連について検討を行なった。また、遊離シアル酸やシアリダーゼの補体活性化に及ぼす影響について二次元免疫電気泳動を用いて *in vitro* の検討を行なった。

### 〔方法〕

#### 1) 対象

対象は急性糸球体腎炎 (AGN) 17例, 全身性紅斑性狼蒼 (SLE) 27例 (低補体18例), 膜性増殖性糸球体腎炎 (MPGN) 25例 (低補体15例), 慢性増殖性糸球体腎炎 (OPGN) 11例, 及び健常者 9例である。

#### 2) 血中濃度の測定

総シアル酸は極東製薬のキットを用いて酵素法で測定した。遊離シアル酸は Hammond 等の方法により蛍光法で、シアリダーゼ活性は 4MU-NANA を用いた蛍光法で測定した。また C3 は SRID法で、Haptoglobin はローレル法で測定した。さらに、一部の症例については経時的測定を行ない、病勢との比較検討を行なった。

#### 3) C3 conversion study

*in vitro* に於ける補体の活性化は正常ヒト血清 (NHS) 等に各濃度の精製ノイラミン酸と種々の補体活性化物質を加え、37°Cで加温後二次元免疫電気泳動で C3 の conversion を測定した。

#### 4) ショ糖勾配超遠心法

AGN, SLE, MPGN, NHSの被検血清各3例ずつを5-40%ショ糖勾配超遠心法にて分画し、各画分に於けるシアル酸濃度を測定し、比較検討した。

### 〔結果〕

#### 1) 腎疾患に於ける血中濃度

総シアル酸の血中濃度はAGN, SLEで高値を示したが, MPGNでは低値を示し, CPGNではNHSと比べて有意な上昇を示さなかった。遊離シアル酸は, 一過性に低補体をしめずAGNでは高値を示し, 持続性低補体を示すSLEとMPGNでは高値を示さなかった。また, シアリダーゼ活性はAGNで高値を示し, MPGNでは低値を示した。統計学的検討に依り総シアル酸は急性相反応性蛋白である Haptoglobin と関連し, 遊離シアル酸とは相関を認めなかった。

## 2) 血中シアル酸の存在様式

シヨ糖勾配超遠心法により血清を分画すると, 遊離シアル酸は5%画分に多く集中し, 血清蛋白に結合したシアル酸はその他の画分に分散した。5%画分に於けるシアル酸値はNHSに比べAGNで特に高値を示した。また, その他の画分でのシアル酸はAGN, SLEで高値を示した。

## 3) ノイラミニダーゼによる補体の活性化

NHSに neuraminidase (Type V)を加え, 37°Cで30分加温後 C3 conversion study を行なった。NHS中のC3はdose-dependentにconversionを示した。さらに, この反応は $Mg^{++}$ ・EGTAの存在下でも進行し, EDTAの存在下やNHSのかわりにRBを用いた場合には阻止された。また, RDを用いた場合には阻止されなかった。この現象を確認する為に, 精製したC3, Factor B, Factor Dと $MgCl_2$ 及びneuraminidaseとの組合せでC3 conversion study を行なった所, 同様の結果が得られた。

## 4) ノイラミン酸による補体活性の阻止

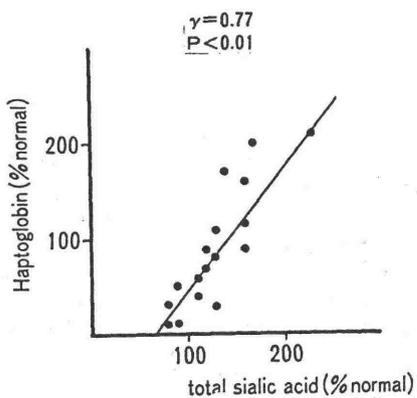
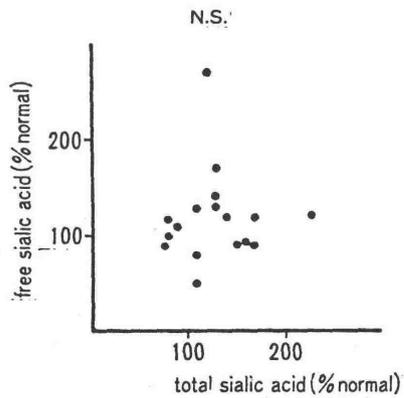
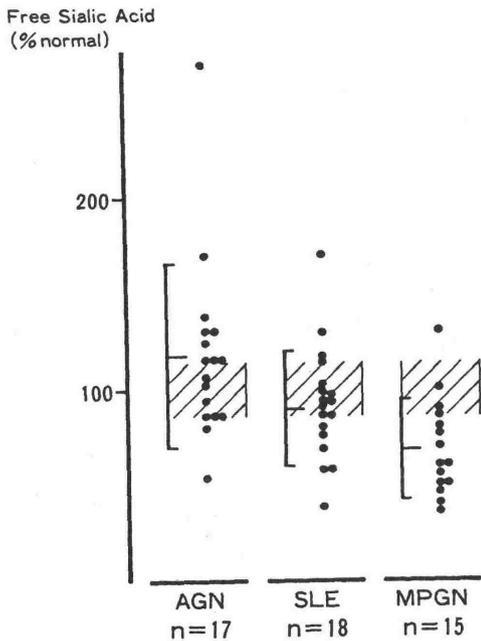
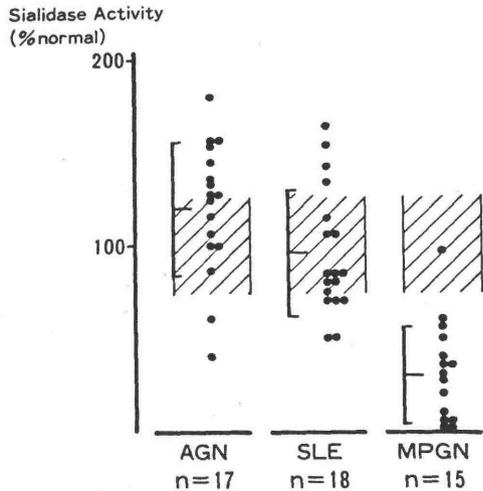
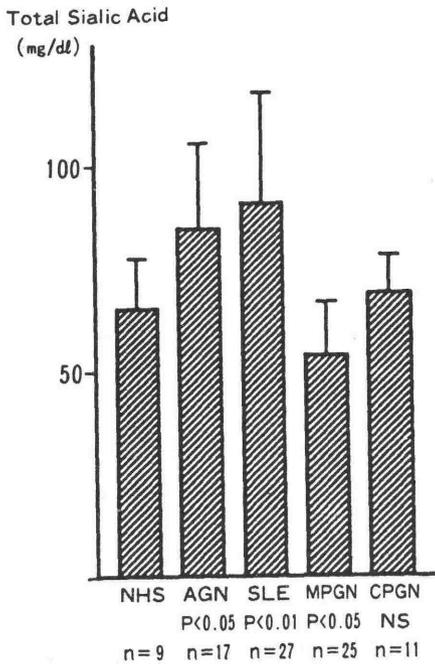
NHSに精製N-acetyl neuraminic acid (NANA)と種々の補体活性物質を加えて37°Cで30分加温後C3 conversion studyをおこなった。NHS中のC3はLPS, Zymozan, inulin, neuraminidaseによってconversionするが, NANAの存在下では阻止された。また, NHSに種々の濃度のneuraminidaseを加え, これにNANAを加えて同様の実験をおこなった所, C3のconversionの程度はNANAとneuraminidaseの量的なバランスで決定されている傾向が示唆された。

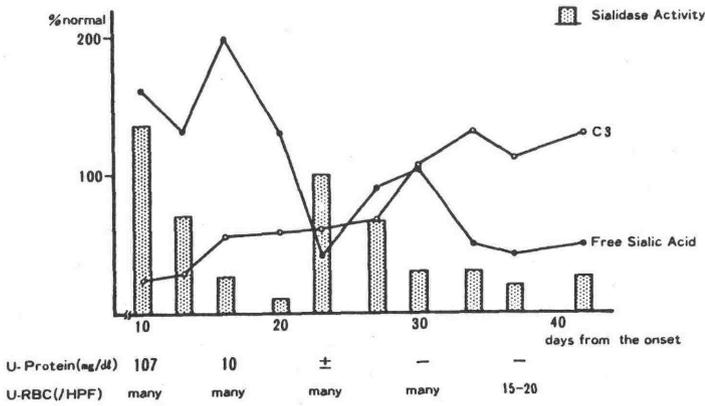
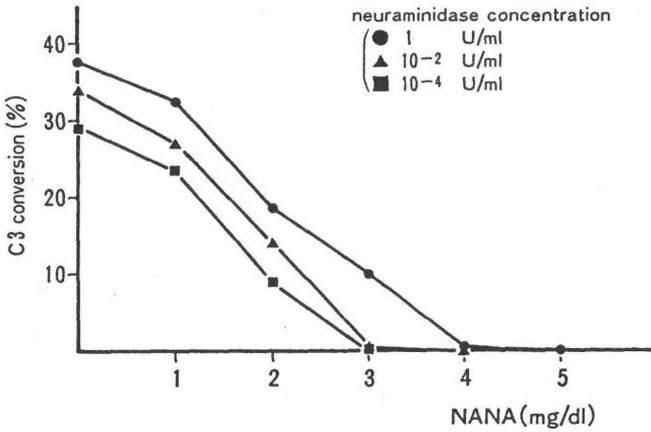
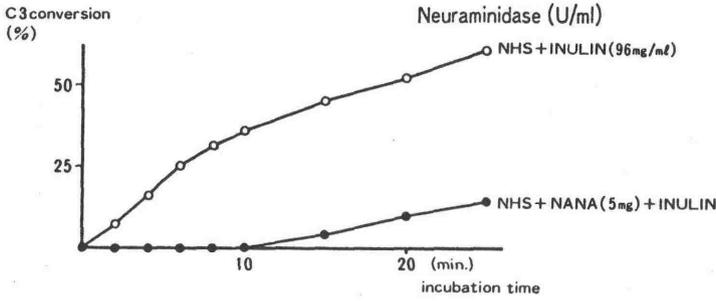
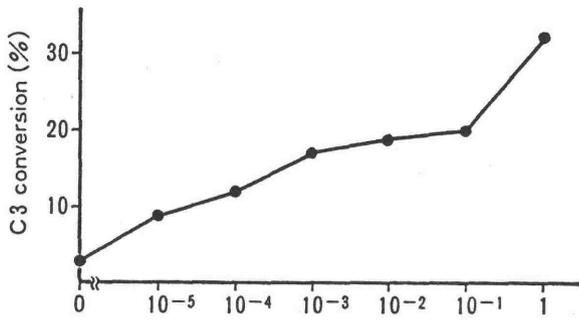
## 5) AGNにおける経時的変動

典型的な臨床症状を示したAGNの一例についてシアリダーゼ活性や遊離シアル酸を経時的に測定してみると, 症状の改善にともなってC3は正常化するが, シアリダーゼとシアル酸の変動は必ずしもこれらと一致しなかった。

### 〔考察〕

液相中でのシアル酸, シアリダーゼと補体の関係について検討した所, シアリダーゼは補体活性に促進的に, 遊離シアル酸は抑制的に働く傾向が認められた。シアリダーゼ活性はAGNにおいて高く, AGNにおける低補体の一因と考えられた。また遊離シアル酸は, AGNに於て高くSLE, MPGNでは低い事や補体活性に抑制的に働く事から, 低補体血症の改善や継続に何等かの影響を与えているものと思われた。さらに, C3の活性化がシアル酸とシアリダーゼの相互作用で決定されている可能性がin vitroの検討及びAGNの症例に於て示唆された。





ACTIVATION OF ALTERNATIVE PATHWAY BY NEURAMINIDASE

combination of complement	C3 conversion
C3 + B + D + MgCl <sub>2</sub>	100
C3 + B + MgCl <sub>2</sub> + neuraminidase	83
C3 + D + MgCl <sub>2</sub> + neuraminidase	0
C3 + MgCl <sub>2</sub> + neuraminidase	0

INHIBITION OF COMPLEMENT ACTIVATION BY NANA

Chemicals with NHS	C3 conversion	
	in PBS	in NANA (5 mg)
inulin	46	4
LPS	34	7
Zymosan	75	4
neuraminidase	48	5

天野哲基，太田善介  
 岡山大学第三内科  
 古田嘉男，徳光誠司  
 川崎医科大学川崎病院内科

(目的)

C1q欠損症(C1q-D)は遺伝性が明確でない事や合併症として無r-G $\ell$ 血症や多型滲出性紅斑，蕁麻疹様皮疹がある事，更にはC1qと沈降線を形成する低分子C1q precipitinが認められる事がある等で，他の補体欠損症と比較して特異な存在である。又，G1q-Dと報告されているものでも補体価は10単位以下の低値であり，測定不能の症例は稀である。今回，補体価が長期にわたり測定不能でIgG3 $\lambda$ 型骨髓腫を合併した，C1q precipitinを伴わないC1q-Dを経験したので報告すると共に，本患者血清がC3，C4蛋白量が正常であるにも拘わらず，C4，C2活性が低下しているという血清・血漿補体価解現象と考えられる補体系プロフィールを呈した事より，本現象におけるC1qの必要性につき考察する。

(症例)

75才の女性で生来，健康であり，易感染性や膠原病様症状はない。昨年2月より腰痛が出現し，入浴時に蕁麻疹が出没するようになった。対症療法にて軽快せず，下肢痛，歩行困難が生じた為，10月，精査の目的で川崎医科大学に入院した。両親の近親結婚はなく，輸血歴もない。現症では右上腕部に搔痒を伴う蕁麻疹を認めるがRaynaud現象，日光過敏症，DLE様皮疹等は認められない。検査にては血清蛋白7.8g/dl(r-G $\ell$  36.8%，IgG 3,710mg，IgA 10mg，IgM 40mg)でIEPによりM蛋白(IgG3 $\lambda$ 型)，骨髓像で形質細胞67%を認め，IgG3 $\lambda$ 型骨髓腫と診断された。他に抗核抗体はcytoplasmic pattern，抗平滑筋抗体が陽性であった。cryoglobulinは陰性で，C1q結合法による血中の免疫複合体も1.9 $\mu$ g/mlと正常である。蕁麻疹の皮膚生検では血管炎の像もなく，免疫グロブリンや補体の沈着も認められなかった。血清，血漿補体価は測定不能でC3 75mg/dl，C4 26.5mg/dlと正常であったので補体欠損症を疑われ，岡山大学第三内科に照会された。オフトロニー法による補体蛋白の検討では，C1q以外の成分及び制御因子は認められる事よりC1q-Dが推定された。血清の溶血活性はC1 4.7%NHS以下，C4 27.8%，C2 48.9%，C3 91.6%，C5 75.7%，C3 total 75.1%であった。Agnelloらのいう低分子C1q precipitinは証明されなかったが，正常血清と混合すると強い抗補体作用が認められた。正常血清と患者血清を混合しても正常血清のC1q沈降線に変化は見られなかった。患者血清とC1(Cordis)を混合するとC1量が多いと溶血

しないが、希釈により微量の溶血が認められた。又、E A C 1 に患者血清を加えると軽度ながら溶血が認められた。オフトロニー法によるC 4 蛋白の沈降線は血漿 (E D T A) に比して血清では spur を形成した。半年以上の経過中、骨髓腫に対しM C V P療法を施行し、I g G 量が低下しても補体価、C 1 q の測定不能は持続した。

#### (考察)

C 1 q - D が無 r - G l 血症に合併する事はよく知られているが、骨髓腫においてもC 1 q が低下する例がある事が報告されており、C 1 q と免疫グロブリンの代謝には密接な関連があると考えられる。今回報告したC 1 q - D は高令の為に家族調査が出来ず遺伝性は明らかではないが、骨髓腫の治療にも拘わらず補体価やC 1 q が測定不能であったので、他の報告に見られるような不完全欠損ではなく、又、採血後に生じた aggregated I g G 3 によるC 1 q の消費とも考えにくい。本症では膠原病を思わせるような症状もなく、蕁麻疹の皮膚生検でも血管炎像は認められず、低補体性血管炎蕁麻疹症候群とも異っている。更に輸血歴はなく、低分子C 1 q precipitin も証明されず、C 1 q 結合法による血中免疫複合体も正常であった事より抗C 1 q 抗体が形成されC 1 q が選択的に消費されたとも考えにくい。以上から現在迄に報告されている約10例のC 1 q - D に比較するとかなりかわった症例と考えられる。

次に本症例のC 3, C 4 蛋白量が正常で、C 4, C 2 活性が低下していた事及び血清のC 4 が spur を形成する事等は、血清、血漿補体価はC 1 q が欠損している為に共に測定不能ではあるが、採血後の補体の変化である、血清・血漿補体価解離現象が起っている事を示唆する。本現象は低温により生じたcryoglobulin やその類似物質により classical pathway が活性化されるものであるという解釈から、補体の cold activation とも言われている。しかし、我々は、本現象が認められる血清中には cryoglobulin や免疫複合体は非常に微量で短時間に急激にC 4, C 2 を強力に低下させるとは考えられない事、活性化がC 3 以下には及ばない事、C 1 q 活性は全く低下していない事 (福島医大・吉田) 及びH A N E 症例との対比により、C 4, C 2 活性を低下させる機序がH A N E と同様、C 1 esterase によるものであれば、解離現象例も低温によりH A N E 症状が出現する筈であるが、これらの症状は認められない事等より、本現象の原因は、classical pathway の activation 以外に未知のC 4, C 2 のみが不活化される機序が存在するのではないかと考察してきた。今回のC 1 q - D が家族歴が不明の為に真のC 1 q - D である証明は困難であるが、C 1 q 欠損患者において血清・血漿補体価解離現象が認められるとすれば、本現象にC 1 q が関与しないという証明となる訳で興味ある症例と考える。

## 補体系検査

CH 50 血清 } 測定不能  
           血漿 }

蛋白定量：SRID法

C3 75 mg/dl (正常: 55 ~ 120)

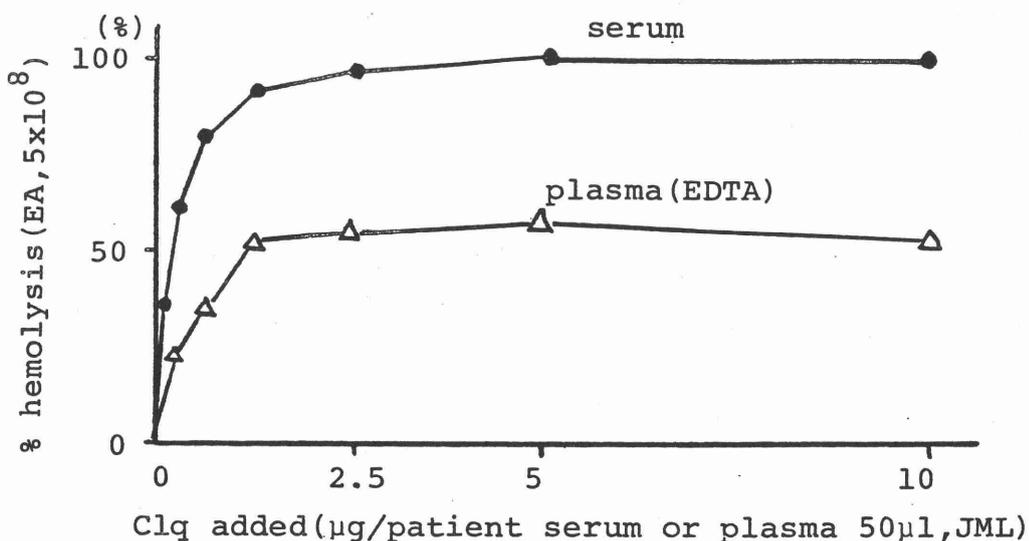
C4 26.5 mg/dl (正常: 25 ~ 50)

オクタロニー法

C1q(-) C1r(+) C1s(+)  
 C4(+) C2(+) C3(+)  
 C5(+) C6(+) C7(+)  
 C8(+) C9(+) C1INH(+)  
 C3INA(+) factor B(+)  
 βIH(+)

活性測定 (対照: 100%)

C1活性 4.7%以下  
 C4活性 27.8%  
 C2活性 48.9%  
 C3活性 91.6%  
 C5活性 75.7%  
 C3 Total活性 75.1%



流行性脳脊髄膜炎の発症を機に発見されたC<sub>3</sub>欠損症の1例

古賀達彦、荒巻雅史、織田慶子、川上 晃、  
島田 康、冨田尚文、阪田保隆、藤本 保、  
本廣 孝、山下文雄

久留米大学小児科学教室

森山 剛、稲井真弥

大阪医科大学病態検査学教室

補体欠損症には種々の感染を合併することが多い。今回、我々は流行性脳脊髄膜炎の発症を機に発見されたC<sub>3</sub>欠損症の1例を経験したので報告する。

<症例>

10才8カ月の男児。主訴は、発熱、嘔吐、頭痛。乳幼児期には特に易感染性を思わせる既往歴はなかったが、1年ほど前より、月に2回ほどの頻度で上気道炎、外耳道炎を反復していた。昭和61年3月27日より発熱。翌日より頭痛、頻回の嘔吐、出血斑がみられ近医受診し、内服抗生剤の投与をうけた。3月30日には項部痛が出現し、3月31日、某病院小児科を紹介され、白血球数増多、血小板数減少、肝脾腫などを指摘され当科へ入院した。入院時は意識清明であったが、項部強直があり、頬部、腹部、両下肢の出血斑を認めた。髄液検査で、細胞数 3,277/mm<sup>3</sup>、糖 22mg/dl、蛋白 252.4mg/dl、塗沫でグラム陰性球菌がみられ、培養により *Neisseria meningitidis* が検出された。また、他の検査値異常として、補体価 9.9CH<sub>50</sub>U/ml、C<sub>3</sub> 4mg/dl以下であり、C<sub>3</sub>欠損症が疑われた。

家族歴では両親はイトコ結婚であり、父の2名の兄が1人は生後3カ月時に高熱の後死亡。他の1人は4才時に疫痢の診断で死亡している。両親と兄のC<sub>3</sub>の値は、患児と正常者の中間の値を示しヘテロ接合体と考えられる。従って本児のC<sub>3</sub>欠損は遺伝性のものと考えた。

流行性脳脊髄膜炎の経過は、ABPCの投与により速やかに軽快治癒したが、本児の免疫学的異常を考慮して、治療期間が長くなり、25日間の投与となった。

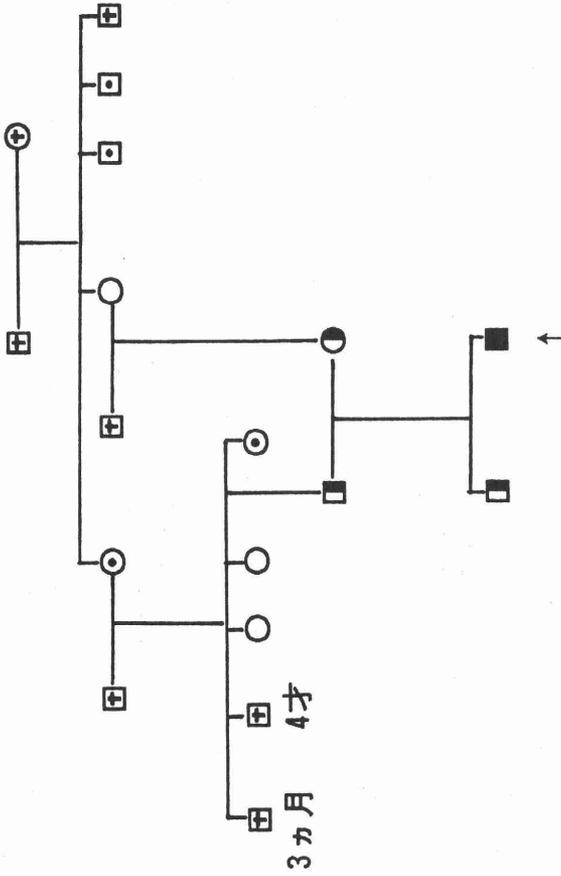
治癒後、外来で経過観察中であるが、C<sub>3</sub>は依然低値を示しているが、易感染性は認められていない。

我々が調べた範囲内でのC<sub>3</sub>欠損症は、日本では2家系4例が報告されているが、いずれも両親がイトコ結婚である。本例は髄膜炎菌感染を機に発見された症例としては本邦で最初の症例である。

補体の経過	#86-0746					
	4/1	4/18	4/22	6/2	8/4	9/20
C <sub>3</sub> (mg/dl)	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
C <sub>4</sub> (mg/dl)	18	15	16	12	12	40
CH <sub>50</sub> (U/ml)	9.9	9.4	10.3	12.1	10.0	4.4

n. d. : not detected

補体各成分溶血活性	#86-0746	
	患児 (%)	正常人血清
CH50 (U/ml)	6.2 (15)	41.9
C1 (SFU/ml)	104,000 (102)	102,000
C4	34,000 (41)	83,000
C2	436 (42)	1,050
C3	224 (1)	22,000
C5	153,000 (135)	113,000
C6	19,000 (68)	28,000
C7	13,000 (143)	9,100
C8	9,300 (89)	10,500
C9	4,200 (233)	1,800



## 12 皮膚血管炎を伴ったC<sub>5</sub>欠損症の1例

獨協医科大学アレルギー内科

○安東直彦, 岩崎 薫, 大塚智博, 山田吾郎, 本島新司, 福田 健, 池森亨介,  
牧野荘平 東京大学物療内科 行山 康

補体は主に感染防御と炎症・アレルギーに関与しており, 低補体を示す疾患は多岐にわたっている。本邦でも種々の補体欠損症が報告されており, 血管炎を伴うC<sub>5</sub>欠損症も数例の報告がある。今回我々も皮膚血管炎を伴うC<sub>5</sub>欠損症の1例を経験したので報告する。

症例 31才 男性 自動車販売業(主訴) (i)発熱 (ii)蕁麻疹様皮疹 (iii)関節痛 (iv)手指の腫脹 (家族歴)特記すべき事なし, (既往歴)特記すべき事なし, (現病歴)生来健康であったが, 昭和62年1月28日頃より発熱, 同時に四肢体幹, 足底に米粒大の蕁麻疹様の皮疹が出現する。手指の腫脹, 関節痛が加わり軽快しない為に当科受診となる。(現症)皮膚は頸部から足底にかけて米粒大の蕁麻疹様皮疹が散在し, 手指はリーゼーシ様に腫脹していた。顔面の紅斑, リンパ節の腫脹, 日光過敏症等はなく, 頻尿, 残尿感等の尿路感染症を疑う所見も認めなかった。(入院時検査所見)白血球12,400, 血沈72mm, CRP4+と急性炎症症状を認め, 白血球分画においても好中球88%, 単球6%, リンパ球6%と左方移動を示した。肝腎機能には特に異常を認めなかったが免疫グロブリン分画においてIgGが1,985mg/dl, IgAが271mg/dlと多クローン性の高グロブリン血症を示した。血清学的には免疫複合体陰性, 抗核抗体陰性, RAHA陰性, LEテスト陰性で抗DNA抗体も1.2U/mlと上昇していなかった。T細胞, B細胞百分率も異常なく, OKT<sub>4</sub>は53%, OKT<sub>8</sub>は15%であった。しかし血清補体価(CH<sub>50</sub>)は6単位以下で測定できなかった。補体欠損症を疑い各コンポーネントを測定したところ, C<sub>5</sub>が2.0mg/dl以下で検出できなかった。C<sub>4</sub>は入院時25mg/dlと正常範囲であったが, その後の測定では10mg/dlと軽度低下してきた。また, C<sub>1</sub>エステラーゼ抑制因子も11mg/dlと軽度の低下を示した。皮膚生検では, 表皮下に強い浮腫があり水疱様を呈し, 真皮では血管周囲に著しい好中球の浸潤が認められ, 血管壁の変性, 好中球の破壊像も認めた。骨髓穿刺では特に異常は認められなかった。(家族における各補体成分)遺伝性補体欠損症を疑い家族について補体各成分を測定したところ, 弟と娘のCH<sub>50</sub>が, 26単位, 20単位と低く, 母親と弟のC<sub>5</sub>が, 7.1mg/dl, 7.7mg/dlと低値を示した。又母親と患者のC<sub>1</sub>エステラーゼ抑制因子は共に11mg/dlと軽度の低下を示した。(まとめ)本症例は, Leucocytoclastic angitisを呈したC<sub>5</sub>欠損症で, SLE様症状, 検査所見は呈さなかった。家族におけるC<sub>5</sub>の低下値より遺伝の存在が示唆された。

## 13 髄膜炎菌性髄膜炎を発症した C9欠損症の3例

○岡田 暹<sup>1)</sup>、織田 真由美<sup>1)</sup>、佐野 正<sup>1)</sup>、伊藤 仁<sup>1)</sup>、  
森山 剛<sup>2)</sup>、余田 篤<sup>2)</sup>、池野洋二<sup>3)</sup>、稲井 眞彌<sup>2)</sup>

(<sup>1)</sup>市立四日市病院小児科、<sup>2)</sup>大阪医科大学病態検査学、  
<sup>3)</sup>スペシャル・レファレンス・ラボラトリー)

C9欠損症は稲井らによって世界第1例が発見され、その後の研究により日本に比較的多い補体成分欠損症として知られている。また、C9完全欠損者は健康な日常生活を送っており、従来より疾患特異性のある欠損症としては報告されていなかった。しかしながら、昨年度の本シンポジウムで我々は、髄膜炎菌性髄膜炎及び細菌性髄膜炎を伴ったC9欠損症の2例を報告し、C9欠損症でも他の後期反応成分欠損症と同様、髄膜炎菌性髄膜炎を発症しやすいことを示唆した。最近我々は、髄膜炎菌性髄膜炎を発症したC9欠損症の3例を経験したので報告する。

### 症例 I

#### [臨床経過の概略]

症例は14歳男児で症例Ⅱの弟。昭和56年3月15日(入院当日)朝より、頭痛あり、夕方より頭痛増強、嘔吐くり返す。19時より、drowsy stateになり、本院救急外来に23時30分受診。体温 37.4 °C、Stiffneck(++)、Kernig (++)、ルンバール：WBC 16,500/3、蛋白 400 mg/dl 以上、糖 15 mg/dl、塗抹、培養にて、*Neisseria meningitidis* が検出される。ABPC、GMにて、著明に改善。3月17日に意識清、3月19日に頭痛、Stiffneck (-)、以後順調に経過し、後遺症なく退院する。入院時検査所見；WBC 20,800、Stab 7%、Lymph 7%、Mono 3%、Plt.  $55.0 \times 10^4$ 、CRP (3+)、IgG 1,310 mg/dl、IgA 144 mg/dl、IgM 281 mg/dl。

#### [補体検索]

退院後健康時のCH50 が 10.0 U/ml と低値を示したため、補体各成分の活性測定を行った。表に示すように、C9の溶血活性は検出不能であったが、その他の補体成分は正常であった。さらに、オクタロニー法によってもC9蛋白が検出できなかったことより、C9欠損症と診断した。

## 症例 II

### [臨床経過の概略]

症例は17歳男児で症例 I の兄。弟の発病3日後の昭和56年3月18日に発症。高熱、頭痛あり、3月19日に入院する。Stiffneck (+++), Kernig (+++), ルンバール: WBC 8,100/3、蛋白 400 mg/dl 以上、糖 8 mg/dl、培養にて、*Neisseria meningitidis* が検出される。ABPC、GMにて、著明に改善、入院1週目に解熱、Stiffneck 消失。以後順調に経過し、後遺症なく退院する。検査所見; ESR(1°) 8 mm、CRP (3+)、IgG 1,140 mg/dl、IgA 173 mg/dl、IgM 337 mg/dl、WBC 25,600、Stab 8%、Seg 83%、Lymph 2%、Mono 7%、Plt.  $32.5 \times 10^4$ 。

### [補体検索]

CH50 は退院後健康時に 13.7 U/ml と低値を示したため、弟同様補体各成分の活性測定を行った。表に示すように、C9の溶血活性は検出不能であったが、その他の補体成分は正常であった。C9蛋白も検出不能であり、C9欠損症と診断した。

### [家系調査]

兄弟ともにC9欠損のホモ接合体であることが判明したので、できるかぎり広範な家系調査を行った。新たに12名の家族の補体精査の結果より、父・母・末弟・父方伯母・母方叔父の5名が、C9蛋白・活性ともに正常者の半分の値を示すヘテロ接合体と判明した(図1)。

## 症例 III

### [臨床経過の概略]

症例は8歳男児。昭和58年4月9日より発熱、頭痛、嘔吐あり、4月11日本院受診。意識清、Stiffneck (++)、Kernig (++)、4月12日、体幹、眼球結膜に petechia 出現する。入院時、ルンバール: WBC 19,000/3、蛋白 86 mg/dl、糖 26 mg/dl、培養にて、*Neisseria meningitidis* 検出される。検査所見(4月11日); WBC 17,400、Stab 4%、Seg 82%、Lymph 10%、Mono 4%、Plt.  $16.4 \times 10^4$ 、IgG 1,457 mg/dl、IgA 124 mg/dl、IgM 123 mg/dl、CH50 21.2 U/ml、C3 87 mg/dl、C4 48 mg/dl、4月21日、CH50 26.5 U/ml、C3 115 mg/dl、C4 54 mg/dl、ABPCに著明な反応を示し、入院7日目に解熱、頭痛、Stiffneck 消失、以後順調に経過し、後遺症なく退院する。

〔補体検索〕

CH50は、退院後 17.9 U/ml と低値を持続したため、補体系の精査を行った。表のように各補体成分の溶血活性を測定すると、C9が検出限界以下であったほかはすべて正常であった。C9蛋白も検出限界以下であったので、C9完全欠損症と診断した。

〔家系調査〕

可能な限り家系調査を行った。図2のように兄もC9蛋白・活性ともに検出限界以下でC9完全欠損者であることを確認した。その他の8名の家族のうち、父・母・父方伯母・父方叔母の4名がC9欠損ヘテロ接合体と判明した。

〔結論〕

症例ⅠからⅢは、いずれも発症時より髄膜炎を疑わせる症状があり、髄膜培養にて *Neisseria meningitidis* を検出したが、抗生剤の投与により完治した。退院後、補体系の異常に気づき精査の結果、C9欠損症であることがわかった。これら3症例のうち、症例(弟)Ⅰと症例Ⅱ(兄)は短期間内にもともに発症した。一方、症例Ⅲとその兄もともにC9欠損症であったが、症例Ⅲ(弟)のみ発症し、兄は寮生活を送っていたため感染機会がなく発症しなかったものと考えられた。以上のことから、髄膜炎菌に感染機会がある場合には、他の補体後期反応成分の欠損症と同様、C9の欠損は髄膜炎発症の一つの重要な因子となりうると考えられる。

Figure. 1

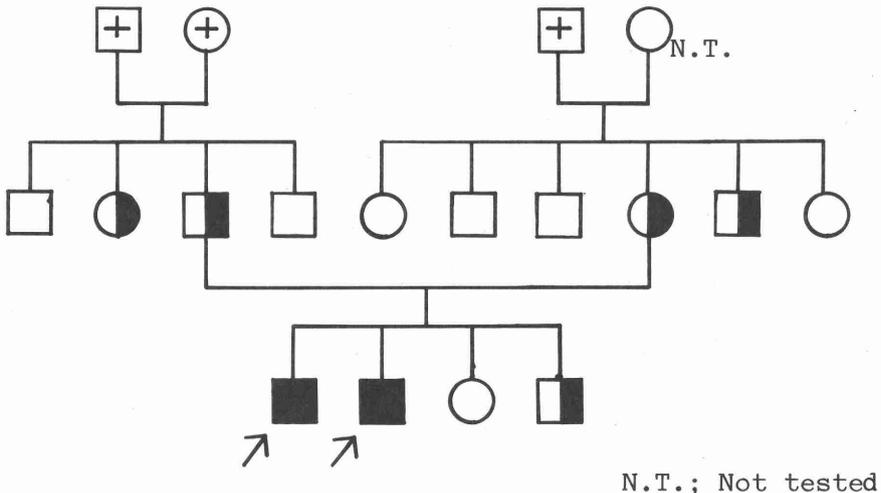
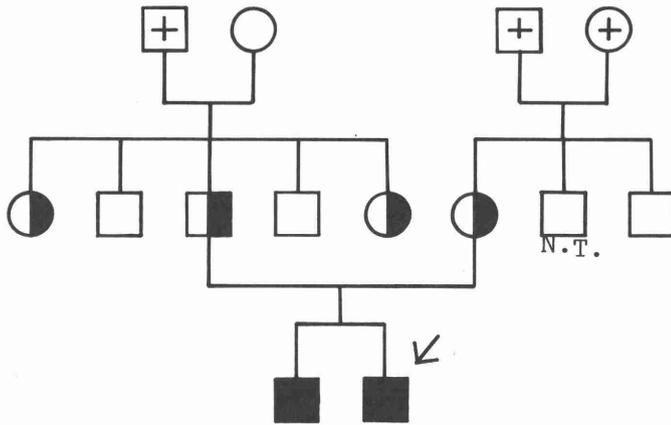


Table Complement profile of patients with C9D.

	症例 I	症例 II	症例 III	NHS
CH50 (U/ml)	10.0	13.7	17.9	39.7
C1 (SFU/ml)	50,900	90,000	50,100	93,500
C4	41,700	76,200	80,800	81,100
C2	1,040	1,260	1,760	1,600
C3	45,600	44,600	64,100	59,200
C5	167,000	243,000	278,000	235,000
C6	12,400	12,300	10,900	11,800
C7	11,500	11,500	10,800	12,400
C8	17,900	17,400	25,900	17,500
C9	N.D.	N.D.	N.D.	25,700

N.T.; Not detected.

Figure. 2



N.T.; Not tested

上田正博、竹村周平、出口雅子、小野寺秀記、岡本雅之、福田 互  
柳田国雄、杉野 成、近藤元治 (京都府立医科大学第一内科)

### 【 目 的 】

臨床的に補体は、C3、C4などの成分の蛋白定量や、いわゆる補体価(CH50)として表される溶血活性が汎用される。補体価の測定にあたっては、血清を希釈し、一定量の感作ヒツジ赤血球(EA)の50%を溶血させるのに必要な血清量を求め算出される。このエンドポイント法に対し、溶血のカイネティクスを利用した補体測定法も報告されている<sup>1</sup>。このカイネティクス法では、一定量のEAを溶血させるのに要する時間は、血清希釈倍数に比例する。しかし、原血清では検討されていない。そこで我々は、原血清を用い補体による溶血活性の測定を試みているが、①悪性疾患患者において、高補体価を示す血清は、原血清中では必ずしも補体活性が高いとは限らない、②このような血清では、ある程度の希釈倍数までは逆に活性が高まることがある、③原血清中に補体溶血を阻止する因子の存在が疑われる、などの事実が判明し、前回の補体シンポジウムで報告した<sup>2</sup>。今回は、この方法を用いて正常人ならびに各種結合織疾患患者の血清について検討を加えた。

### 【 対象ならびに方法 】

①対象：京都府立医大第一内科および関連病院に通院または入院中の結合織疾患患者のうち、全身性エリテマトーデス(SLE) 24名、慢性関節リウマチ(RA)20名、混合性結合織疾患(MCTD)12名を対象とした。正常人血清として、血液・尿生化学検査、胃X線、腹部超音波検査などにて健常と考えられた69名の血清を用いた。

②原血清による補体溶血活性：表1に示すごとく原血清に感作ヒツジ赤血球(EA)を加え、溶血のカイネティクスを濁度の変化として記録し、その減少が最初の50%となるまでに要する時間(CHT1/2秒)を測定した。濁度の変化は血小板凝集計を用い測定した。溶血曲線を図1に示す。

正常ヒト血清に対する活性指数(CHT 1/2%)を以下の式で求め、原血清の補体溶血活性とした。

$$\frac{1/\text{被検血清のCHT}1/2 \text{ (秒)}}{1/\text{正常血清のCHT}1/2 \text{ (62.9秒)}}$$

### Method

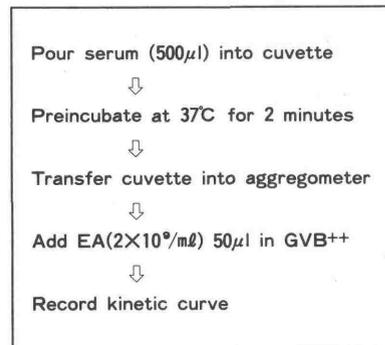


表 1

③CH50は Mayer法<sup>3</sup> に準じ測定した。各補体成分(C1q,C1r,C4,C2,C3,C5,C6,C7,C8,C9,P,B,C11NH,I,C4bp,β1H)は、特異抗血清を用い免疫拡散法で測定した。各蛋白濃度は、正常ヒトプール血清を100%とし、それに対する百分率で表した。

④SLE の疾患活動性: 表2 に示した 9項目に対する陽性項目数を百分率で表した。

【 結 果 】

1) 正常人血清におけるCH50とCHT1/2(%)

正常人69名の検討では、CH50の平均±標準偏差は 35.9±4.4、CHT1/2%は、106.6±28.5であった。CH50とCHT1/2(%)との間には弱いながらも負の相関( $r = -0.395$ ,  $p < 0.001$ )が認められた (図2)。

2) CHT1/2(%) と補体成分の関連

正常ヒト血清47例につき補体各成分の蛋白量を測定した。CHT1/2(%) との関連を検討したところ、有意の相関が認められたのは、補体成分の中では、C1q ( $r = -0.457$ ,  $0.001 < p < 0.01$ )、C2 ( $r = -0.357$ ,  $0.01 < p < 0.02$ )、C8 ( $r = -0.394$ ,  $0.001 < p < 0.01$ )、B ( $r = -0.418$ ,  $0.001 < p < 0.01$ ) の 4成分であり、総て負の相関であった。制御因子あるいはcofactorと相関は認められなかった。

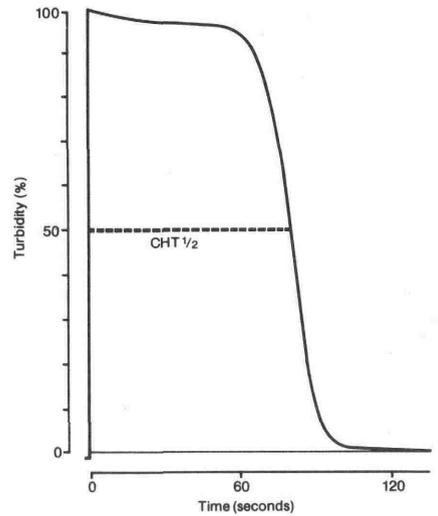


図 1

SLE 活動性判定項目

1. 発熱 (> 37.0)
2. 関節痛
3. 紅斑
4. 口腔潰瘍/脱毛
5. 赤沈促進 (> 30 mm/hr)
6. CH50 低下 (< 20 u/ml)
7. 白血球減少症 (< 4000 /cmm)
8. 低アルブミン血症 (< 3.5 g/dl)
9. LE 細胞/テスト

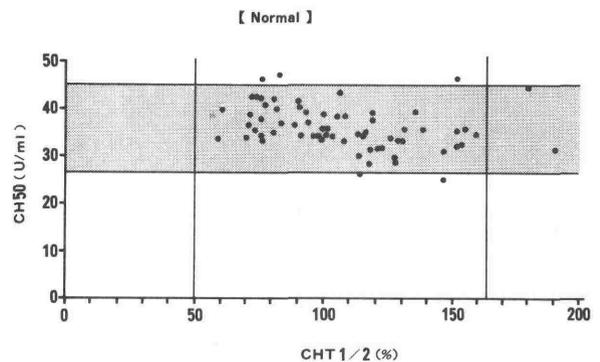


図 2

表 2

る時間)が比例関係にあるといわれており<sup>1)</sup>、両者の負の相関は、後者つまり希釈血清と原血清の違いにもとずくと考える。CH50は補体成分の活性を主として反映していると考えられ、これは、正常人血清における検討で、CH50とC1r,C4,C2,C3,C5,C8,C9などの補体成分が有意な正の相関を示したことから支持される。

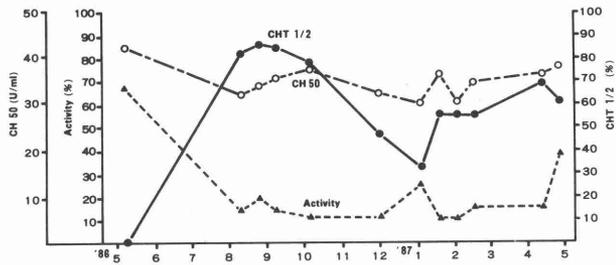


図 6

一方CHT1/2(%)は制御因子、その他の物質も含めた総合的な補体溶血活性を反映していると考えられる。正常人における検討では、C1q,C2,C8,Bなどの成分と弱い負の相関を認めたが、制御因子とは相関を認めなかった。このことは、一つには補体成分単独、あるいは制御因子単独といった影響を受けるのではなく、両者のバランスの影響を受ける可能性が考えられる、また一つには、補体系以外の因子の関与も考えられ、現在検討中である。

結合織疾患のうち、RA、MCTDではCH50は正常あるいは高補体価を呈すとされており、今回の検討でも、正常人と有意差は認めなかった。しかし、CHT1/2(%)は、正常人に比べ有意な低下を示した。原血清中での補体活性の低下を来す因子はやはり不明であるが、補体成分の低下によるものでない事は、CH50が低下していない事から推測される。

SLEでも、CHT1/2(%)は正常人に比べ有意に低下していたが、CH50も有意に低下していることから、これは主として補体成分の低下によるものと考えられる。臨床上SLEの疾患活動性の指標として、CHT1/2(%)の有用性が、とくにCH50の変動が少ない症例において示唆された。RA、MCTDなどの疾患活動性との関連は現在検討中である。

従来は補体測定に、原血清の補体活性の測定を加えれば、疾患の病態における補体の役割の解明に役立つことが期待される。現在、種々疾患におけるCHT1/2(%)、疾患活動性との関連およびCHT1/2(%)に影響を及ぼす因子などについて検討中である。

### 【文献】

- 1) K.M.Pruitt, M.E.Turner and R.J.Boackle: A kinetic model for the quantitative analysis of complement. *J.theor.Biol.*, 44, 207-217, 1974
- 2) 竹村周平, 上田正博, 出口雅子, 小野寺秀記, 谷川徹, 加藤治樹, 吉川敏一, 杉野成, 近藤元治: 原血清を用いた補体活性測定法の開発とその有用性, 第23回補体シンポジウム抄録集, 9-13, 1985
- 3) M.M.Mayer: Complement and complement fixation. *Experimental immunology* (Kabat & Mayer) 2nd ed., Charles C.Thomas, pp133-240, 1964

### 3) 各種結合織疾患患者におけるCH50とCHT1/2%

RAおよびMCTD患者のCH50は、各々 $38.3 \pm 7.6$  (n=28)、 $36.0 \pm 7.0$  (n=22) と健常人と差は認めず、殆どの症例が正常範囲内にあった。しかしながらCHT1/2(%)は、 $64.9 \pm 28.5$  (n=28)、 $56.3 \pm 31.7$  (n=22) と、原血清中の補体活性は、低下しているものが多く、健常人に比し有意に低下していた ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ) (図3, 4)。

一方、SLE患者(n=34)では、CH50は $30.5 \pm 11.5$ 、CHT1/2(%)は $53.3 \pm 40.1$  であり、健常人に比し両者とも有意に低下していた ( $0.01 < p < 0.02$ ,  $p < 0.001$ )。個々の検体についてみると、CH50は正常範囲にあるがCHT1/2(%)の低下しているもの、CH50、CHT1/2(%)とも低下しているもの、CH50は低下しているが、CHT1/2(%)は正常範囲のものと同様であった (図5)。

### 4) SLE 疾患活動性とCHT1/2(%)

比較的長期にわたり経過を追った症例で疾患活動性とCHT1/2(%)の関連をみた。51歳女性で、CH50は全経過を通じて正常範囲内での変動を示した。一方CHT1/2(%)は疾患活動性が高いと低値を示し疾患活動性が低くなると上昇してくる傾向を示した (図6)。

### 【考案】

正常人血清では従来の補体価 (CH50) とCHT1/2(%)の間には弱いながらも負の相関を示した。前者は溶血のエンドポイントをみる、

後者は溶血の速度をみることの違い、ならびに、希釈血清と原血清との違いがある。補体量 (血清の希釈倍数の逆数) と速度 (一定のEAを溶血するのに要す

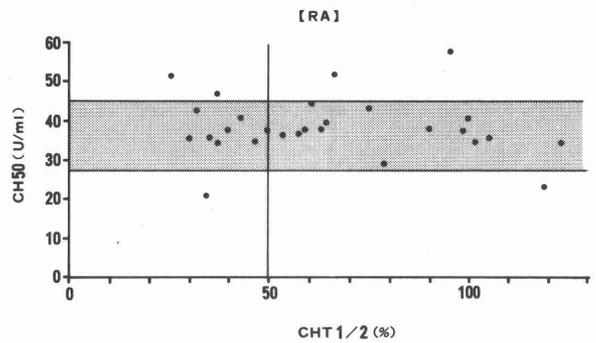


図 3

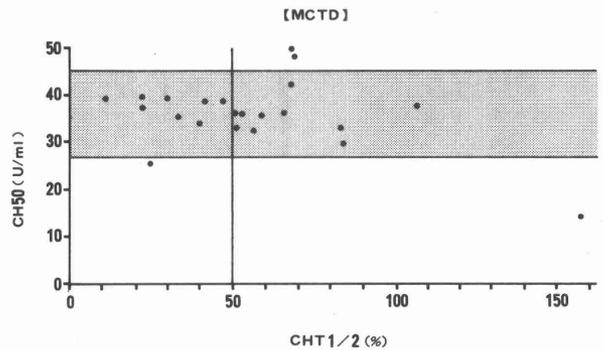


図 4

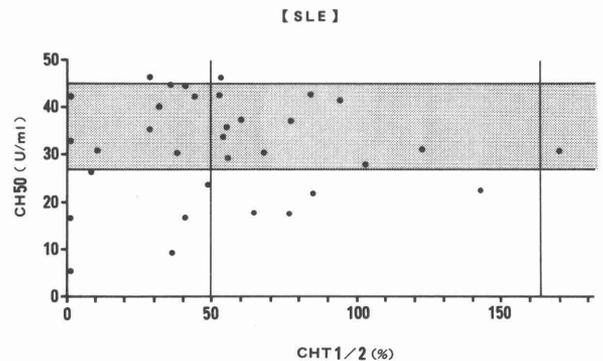


図 5

小湊慶彦、三澤章吾（筑波大、法医）

死後経過時間の推定は法医学上非常に重要であり、これまでも、多くの屍体内物質の変化から推定を試みてきたが、未だ化学物質を用いる方法は確立されていない。我々は、放置血清中において自然分解することが知られている補体第3成分(C3)に着目し、交差免疫電気泳動を用いて、屍血中 $\beta_1C$ の $\beta_1A$ への移行から死後経過時間の推定を試みてきた。

(方法) 健康成人より採血し全血のまま、 $37^{\circ}C$ 、 $30^{\circ}C$ 、 $23^{\circ}C$ 及び $14^{\circ}C$ に静置した。 $37^{\circ}C$ と $30^{\circ}C$ に関しては72時間後まで12時間毎に、 $23^{\circ}C$ に関しては5日後まで1日毎に、また $14^{\circ}C$ に関しては10日まで2日毎に、上清を採取し、直ちに $-80^{\circ}C$ に凍結保存し試料とした。また死亡時刻の明確な司法解剖例、行政解剖例及び検死例の心臓血をも試料とした。 $\beta_1C$ 、 $\beta_1A$ の定量は、筑波大基礎医学系免疫学教室の御厚意により提供された、抗ヒト $\beta_1A$ 抗血清を用いた交差免疫電気泳動法にて行った。

(結果) C3は、内部に存在するチオエステル結合が加水分解により開裂し、不活化型のC3( $H_2O$ )となり、次にH因子とI因子により分解され、その分解産物は生体内においては除去される。この一連の反応は、C3と $H_2O$ の反応、C3( $H_2O$ )とI因子などとの反応の2つに分けられ、後者の酵素反応は非常に速いため前者がこの一連の反応の律速段階であると考えられる。C3と水の反応において、水はC3に比べて大量に存在するので、この加水分解は一次反応とみなすことができ、従って、C3の分解過程は次式によって表わされることになる。

$$dC/dt = -kC \quad (1)$$

但し、Cは native C3の濃度、kは一次反応速度定数。

(1)式より、 $C = C_0 * \text{EXP}(-kt)$ が得られる。但し、 $C_0$ はC3の初期濃度。ところで、C3の分解産物の濃度をAとすれば、 $A = C_0 - C$ となる。ここでC3の分解率Xを求めると、 $x = A / (C + A) = A / C_0$ となる。前2式より、次式が導かれる。

$$x = 1 - \text{EXP}(-k t) \quad (2)$$

故に、  $-\log(1 - x) = k t \quad (3)$

ところで、図1に健康成人の全血を各温度内に放置し、経時的にサンプリングした結果を示す。横軸に時間、縦軸に $\beta_1C$ と $\beta_1A$ の面積比 $x$ の $-\log(1 - x)$ をとり、各時間における $-\log(1 - x)$ をプロットした。明らかに、時間と $-\log(1 - x)$ の間には直線関係があることがわかる。各温度において反応速度定数 $k$ (0.514, 0.384, 0.186, 0.079%/h)が求められる。また、反応速度定数 $k$ と絶対温度 $T$ との間には、

$$\log k = -E/(RT) + a \quad (4)$$

が成り立っている。但し、 $E$ は活性化エネルギー、 $R$ は気体定数、また $a$ は定数である。

図1の結果からArrhenius plotを行なうと、図2が得られる。(  $r = 0.992$  )。他3名から採血し同様の実験を行った。算出された $E/R$ と $a$ の平均値は、6590と16.1であった。以下の計算においてはこれらの値が用いられた。

図3に夏季から冬季にかけて死亡時刻の明確な司法解剖例、行政解剖例および検死例の心臓血を試料とした場合の死後経過時間(PMI)と $\beta_1C$ と $\beta_1A$ の比( $x$ )との関係を示す( $n = 26$ )。両者の間には、有意な相関がある( $r = 0.832$ )。回帰直線を求めると、 $\text{PMI}(\text{hours}) = 1.64 + 1.56x$ となり、この結果より95%の信頼限界を求めると8.0時間となる

ところで、(4)式よりある時刻の温度が判れば、その時の反応速度定数が決められる。即ち、経時的温度変化が明確な場合、経時的に反応速度定数が求められ、ある時刻のC3の分解率 $x$ が求められることがわかる。実際の死亡例においては、屍体冷却過程が不明であるため、死亡時(直腸温37度)から $I$ 時間後(直腸温 $T(0)$ )まで直腸温が直線的に下降したと仮定すれば、任意の時刻 $t$ の絶対温度 $T(t)$ は、

$$T(t) = [T(0) - 37] / I + 310 \quad (5)$$

となる。但し、 $T(0)$ は死後 $I$ 時間後の直腸温。経時的温度変化が仮定されたので、(1)、(4)、(5)式より、死後 $I$ 時間後のC3分解率(計算値 $x$ )が求められる。in vitroのC3分解実験から得られた値、 $E/R = 6590$ ,  $a = 16.1$ を用いて、数値解として死後 $I$ 時間後の計算値 $x$ を求め、実測値 $x$ と比較した(図4)。図から明らかなように、実測値 $x$ が計算値

xより大である傾向がある。また実測値 x が0から10の範囲では、実測値 x と計算値 x の間には直線関係が成り立っており、有意の相関関係があった ( $r = 0.852$ )。実測値 x が10以上では実測値が増加しても計算値 x はほぼ一定であった。次に実測値 x が10以下の例について、実際的应用を試みた。(1), (4), (5) 式に任意の I を用い、計算値 x を求めた。実測値 x に最も近い計算値 x を導きだす I を死後推定時間 (Calculated PMI) とし、実際の死後経過時間 (PMI) とを比較した(図5)。両者の間には直線関係が成り立っている ( $PMI = 1.05 * cPMI - 2.57; r = 0.941$ )。この結果より95%の信頼限界を求めると、7.0時間である。

(考察) C3の分解率に基づく死後経過時間推定法を用いて、24時間以内の死後経過時間の推定が可能であることが示唆された。この方法の特徴はC3の分解産物 Beta 1Aは、幾つかの例外を除いて、生体内において存在しないため、死亡前のC3分解率(x)は0であり、個人差がない点である。例外としては敗血症などの血液内細菌汚染状態、SLEなどのような補体系活性化状態があげられる。しかし分解速度には、結果から明らかなように、若干の個人差が存在する。また $\beta 1C$ から $\beta 1A$ への移行が温度の影響を受けるため、(5)式による補正を行ったが、実際の体温下降には、initial lag periodがあり、また指数関数的変化がある。従って近似の程度に問題があり、実測値 x と計算値 x との間の直線関係の不成立や実際の死後経過時間 (PMI) と死後推定時間 (calculated PMI) との間に差異が生じたのだろう。

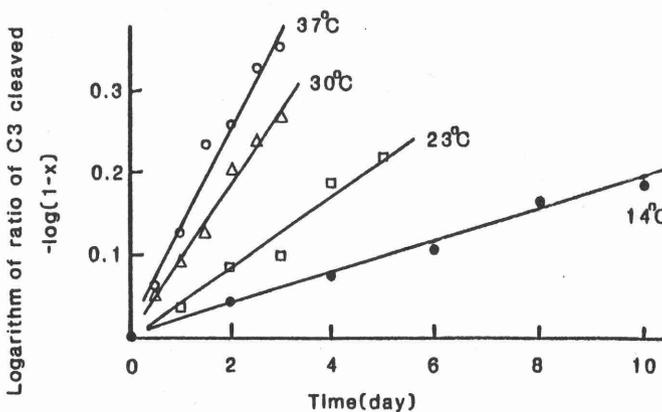


Fig.1

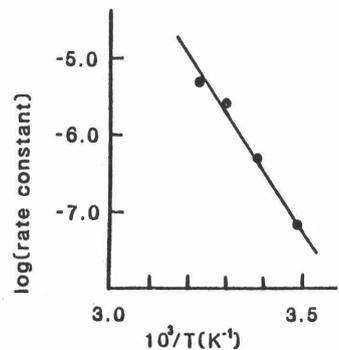


Fig.2

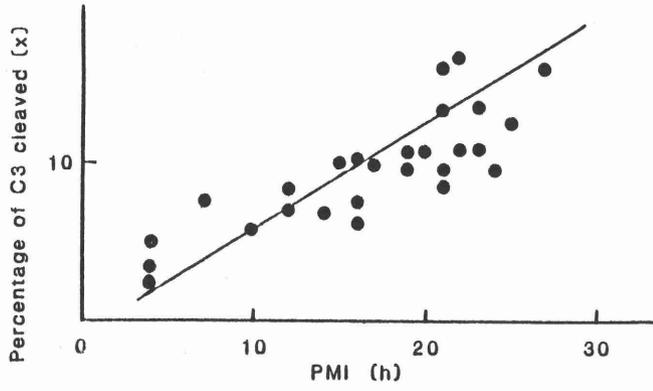


Fig.3

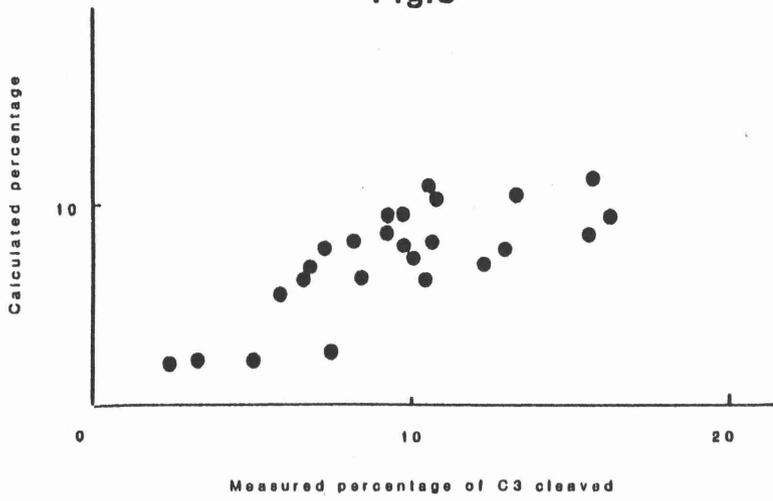


Fig.4

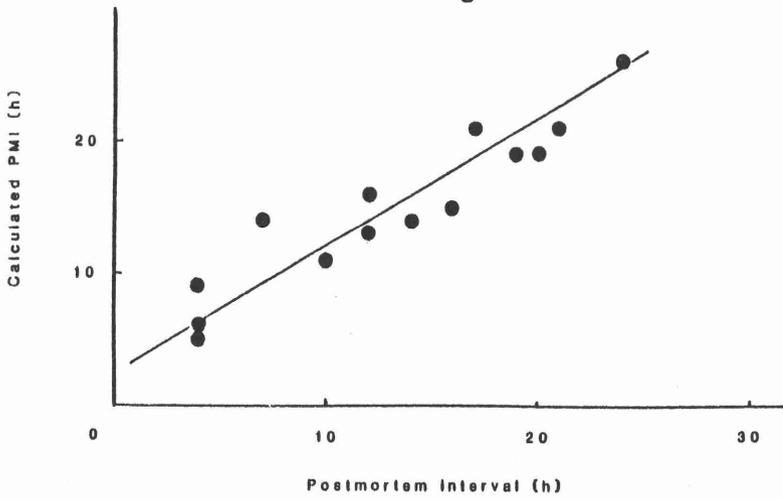


Fig.5

## 16 C1 複合体内の C1s の構造と機能について

松本美佐子<sup>1</sup>、北村肇<sup>1</sup>、永木和義<sup>2</sup>

1. 大阪府立成人病センター研究所 第6部
2. NTT大阪中央健康管理所

〔はじめに〕

補体第1成分 C1 は認識部位としての機能をもつ C1q と触媒部位としての機能をもつ C1r<sub>2</sub>-C1s<sub>2</sub> 四量体との複合体として存在する。C1r<sub>2</sub>-C1s<sub>2</sub> は8コの球状ドメインからなる細長いヒモ状構造で、C1 のなかでは折りたたまれた状態で C1q に結合していると考えられ、その四次構造について近年いくつかのモデルが提唱されている (Arlaud, G. J., et al, *Immunology Today*, vol. 8, No. 4, 1987; Perkins, S. J., *Biochem. J.* 228, 1985; Schumaker, V. N., et al, *Mol. Immunol.* 23, 1986)。今回我々は C1 複合体内の C1s の構造と機能の関係を C1s に対するモノクローナル抗体 (MAB) を用いて調べた。

〔材料・方法〕

ヒト補体成分  $\overline{\text{C1}}$ 、C4 および C2 はヒト血漿より分離精製したものをを用いた。C1s に対する4種の MAB (M365、M81、M241 および M80) の性状は既報 (Matsumoto M., et al, *J. Immunol.*, 137, No. 9, 1986) の通りである。

- 1)  $\overline{\text{C1}}$  の C4、C2 分解活性; MAB による溶液中の  $\overline{\text{C1}}$  の C4、C2 分解活性に対する阻害は、MAB 存在下に加えた C4、C2 の溶血活性の減少を測定することでみた。
- 2) EAC42site 形成; 限定量の  $\overline{\text{C1}}$  と変量した MAB を 30°C、30分間反応させた後、EAC4cell および過剰の oxyC2 を加えて 30°C、20分間反応させ、更に過剰の C-EDTA を加えて EAC42site の形成を調べた。
- 3) 免疫複合体上の  $\overline{\text{C1}}$  の活性;  
EAC14site 形成; EAC1cell と MAB の混合液に限定量の C4 (Z≒1.0) を加えて反応させた後、反応液を遠心し、上清中の C4 の溶血活性を測定するとともに、cell の方に C2gp、C-EDTA を加えて EAC14site が形成されているかどうかを調べた。

EAC142site 形成 ; EAC4cell に限定量の  $\overline{C1}$  を反応させて EAC14cell を作製し、MAb と反応後、過剰あるいは限定量の oxyC2 と過剰の C-EDTA を加えて EAC142site の形成を調べた。

- 4) C1 transfer-fixation test ; 限定量の  $\overline{C1}$  が結合している EAC1cell を MAb の存在下で EAC4cell と GGVB 中 30°C、30 分間反応させた後、過剰の oxyC2、C-EDTA を加えて EAC4cell の溶血を測定した。

〔結果〕

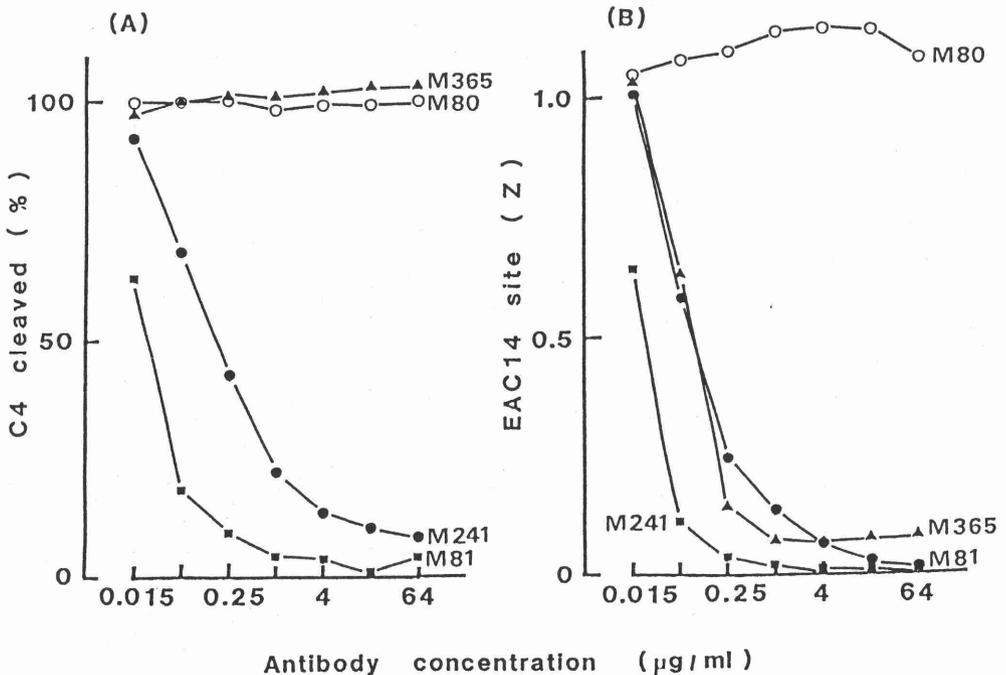
- 1)  $\overline{C1}$  の C4、C2 分解活性 ; 溶液中での  $\overline{C1}$  の C4、C2 分解活性に対する MAb の阻害効果は、 $\overline{C1}$ s 単独の場合に示す阻害効果と同じであった。すなわち、C4 分解活性は M241、M81 で完全に阻害され、M365 で 50% 程阻止された。また、C2 分解活性は M241 で完全に M81 で 50% 阻害されたが M365 では阻止されなかった。
- 2) 免疫複合体 (EA) 上の  $\overline{C1}$  の C4 分解活性 ; M241、M81 は溶液中の  $\overline{C1}$  に対するのと同様に免疫複合体上の  $\overline{C1}$  の C4 分解活性を完全に阻止し、その結果、EAC14site の形成も抑えた。一方、M365 は C4 分解活性に影響を与えないにもかかわらず、EAC14site の形成を完全に阻止した (図 1)。
- 3) EAC14cell 上の  $\overline{C1}$  による C2 分解活性 ; 反応させる C2 量が Z=1 前後の場合 (図 2 A)、C2 分解活性は M241 によって阻止され他の MAb では影響をうけなかったが、C2 量が反応液中過剰に存在する場合 (図 2 B)、EAC142site の形成は M365 により増大した。M81 は C2 量が変化しても全く阻害効果を示さなかった。
- 4) EAC42site 形成 ;  $\overline{C1}$  による EAC42site 形成において、M241 のみ阻害効果を示し、M365 は逆に EAC42site 形成を 2 倍以上増大した (図 3)。しかし、この増大効果は M365 の Fab フラグメントではみられなかった。
- 5) C1 transfer-fixation test ; GGVB 中での C1 transfer-fixation test では M365 が存在する時のみ EAC4cell は溶血した。M365 を Fab フラグメントにすると EAC4cell は溶血しなかった (図 4)。

[考察]

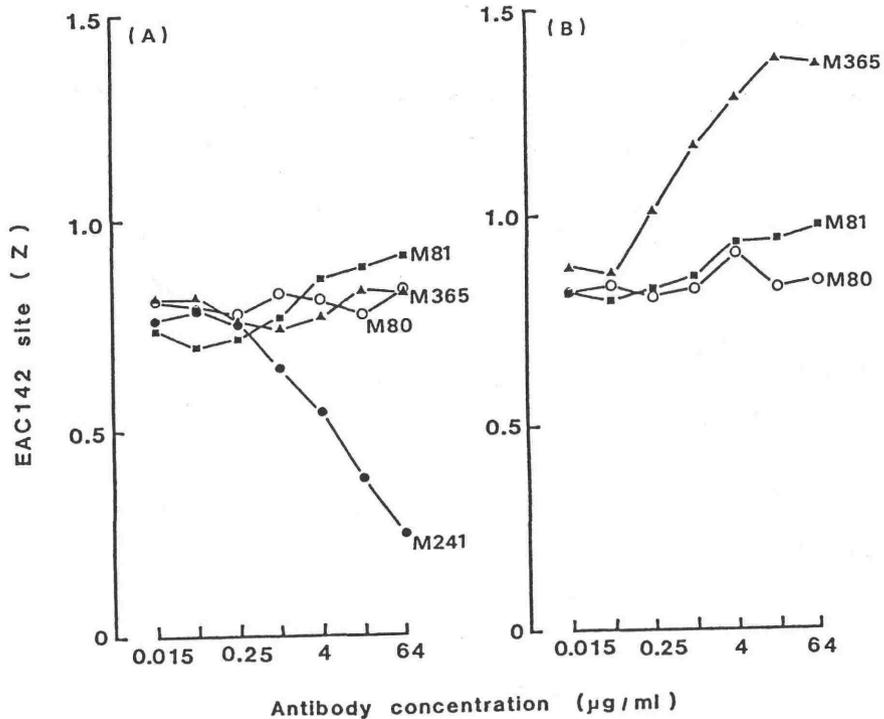
免疫複合体上の  $\overline{C1}$  の C2 分解活性は 溶液中の  $\overline{C1}$  の場合と異なり M81 により全く阻害されなくなることから、両者の  $\overline{C1}$  内の  $C1s$  の conformation には差があるものと思われる。M81 は免疫複合体上の  $\overline{C1}$  の C4 分解活性を完全に阻害するので、 $C1s$  上の C4 結合部位と C2 結合部位は全く異なった位置に存在すると考えられる。

M365 は限量量での  $\overline{C1}$  による EAC42site 形成を増大させたので特異な MAb と思われたが、C2 が過剰に存在する時のみ EAC142site 形成を増大させることから、EAC4cell 上あるいは EAC4cell 間で  $\overline{C1}$  を transferさせ C4b に結合した C2 を次々分解させていくと推定される。また、EAC1cell 上での EAC14site 形成の阻害及び C1 transfer-fixation testの結果より、M365 は EAC1cell から  $\overline{C1}$  をはずしていると考えられる。M365 のこれらの作用は抗体を Fab フラグメントにすると消失するので、MAb が  $C1s$  に結合することによる立体障害とも考えられる。しかし、M365 と同じ  $\gamma 1$  サブクラスで  $C1s$  の H 鎖上のエピトープを認識する他の MAb (M81、M80) ではこういった現象が生じないことから、M365 のエピトープに特異なものと思われる。

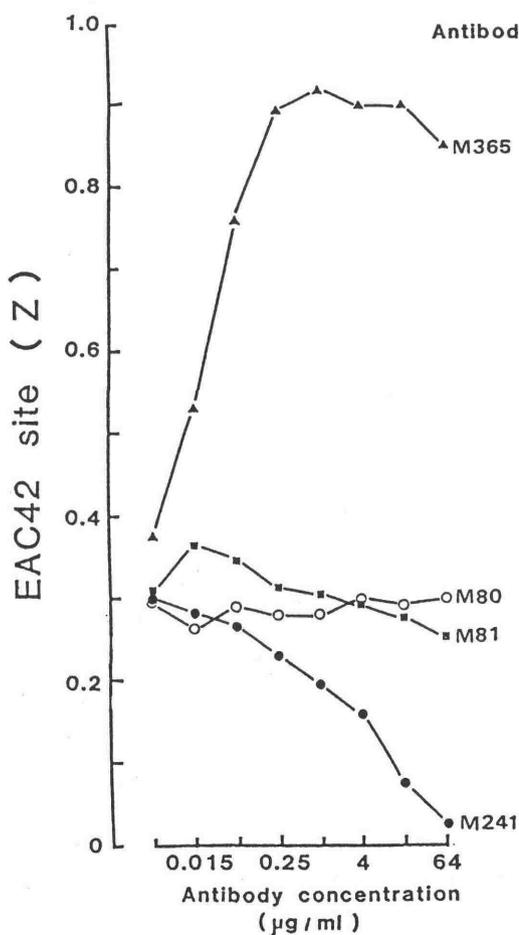
☒ 1



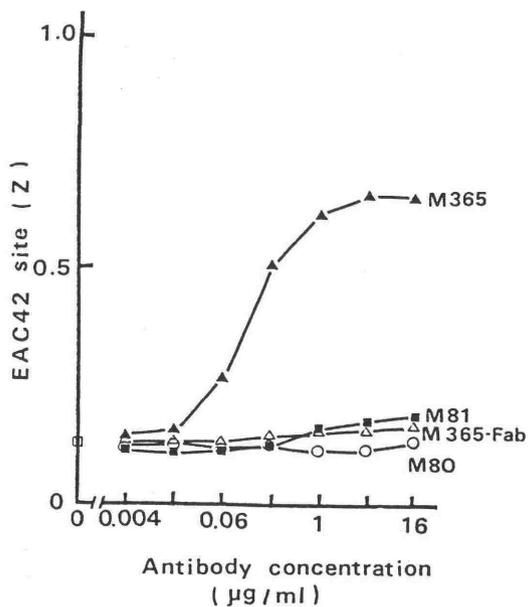
☒ 2



☒ 3



☒ 4



17 Recombination により、constitutive に発現するようになったマウス slp 遺伝子

II Recombination site の解析

Sa-nga Pattanakitsakul、 中山 耕造、

高橋守信

金沢大学、がん研究所、 免疫生物

(はじめに)

マウス補体第4成分は、溶血活性を持つ C4 と、活性を持たない sex-limited protein (slp) の2つのアイソタイプから成りたち、その構造遺伝子は共に H-2 の S 領域に存在している。C4 は constitutive に発現しているが、slp は一般にテストステロンによって誘導される。ところが特定のマウスの系統では slp が constitutive に発現している。我々はすでに constitutive に slp を発現している W7 マウスを用いてコスミドをベクターとしたクローニングをおこない、C4 遺伝子と slp 遺伝子の recombination によって生じた、5' 側が C4 由来、3' 側が slp 由来の recombinant gene が3つ (slp<sup>w7b</sup>、slp<sup>w7c</sup>、slp<sup>w7d</sup>) 存在する事、またこれら3つの recombinant gene が C4 由来の 5'-flanking 部位を持つ事が W7 マウスにおける slp の constitutive な発現の原因である事を明らかにしている。またこれら3つの遺伝子は非常に近い部位で recombination を起こしている事を示して

いる ( 1, 2 ) 。

今回我々は recombination の機構を探る一歩として、recombination site の塩基配列を決定し解析をおこなった。その結果 3 つの gene は異なる部位で recombination を起こしており、MHC の class I、II で知られている Recombinational hot spot は、必須ではない事を示す結果を得たので報告する。

#### (方法)

得られたコスミドクローンを puc19 にサブクローニングし、制限酵素地図を作成した。

これらのサブクローンをさらに M13 ベクターにクローニングし、ジデオキシ法により塩基配列を決定した。

#### (結果)

現在までの解析により、3 つの recombinant gene (  $slp^{w7b}$ 、 $slp^{w7c}$ 、 $slp^{w7d}$  ) は遺伝子の 5' 部位で recombination を起こしていると考えられる。よってこの部位の塩基配列を決定した。C4 と、典型的な  $slp$  である  $slp^{w7a}$  とを比較したところ、全体的に非常に高いホモロジーが認められたが、いくつかの塩基に置換が見られた。この塩基置換をそれぞれ C4 及び  $slp$  に特有な配列と考え、recombinant gene の配列をこれと比較した。

その結果  $slp^{w7b}$  は第 2 イントロンもしくは第 3 エクソンで recombination が起こっていると考えられたが、明確なホットスポットは認められなかった。しかしながら

第2イントロンに CT rich な配列が認められた。一般的に recombination はイントロンで起こりやすいと考えられており、この CT rich な配列は興味深く思われた。

slp<sup>w7c</sup> は第5イントロンから第7イントロンの間で recombination を起こしていたが、やはり hot spot は認められなかった。しかしながら、第7イントロンに、入フェージのカイ配列及び human mini-satellite の core sequence に相同な配列が存在した。

slp<sup>w7d</sup> は第7イントロンもしくは第8エクソンで recombination を起こしていると考えられた。しかしながら特徴的な配列は認められなかった。

#### (考察)

現在のところ真核細胞における recombination の機構はほとんど理解されていない。近年、Leroy Hood のグループ等により、MHC のクラス I、II 内に特徴的な配列が認められ、この部位で recombination が起こっていることが示されている。この配列は recombination において重要な働きをしていると考えられており hot spot と呼ばれる(3)。

本研究では3つの遺伝子について、recombination site を決定したが、それぞれの遺伝子は異なる部位で recombination を起こしており、hotspot と考えられる配列は認められなかった。この事は hot spot は必ずしも recombination に必須ではない事を示していると思われた。

( 文献 )

- (1) Nakayama K. et al. (1987) J. Immunol., 138,620
- (2) 中山耕造 et al. (1986) 補体シンポジウム抄録集
- (3) Kobori J.A. et al. (1986) Science、 234,173

## 18 C4 遺伝子発現における、Posttranscriptional control

中山耕造、横山 茂、Sa-nga Pattanakitsakul、  
野中 勝、\*木村 博、柳 大烈、高橋守信  
金沢大学がん研究所免疫生物部・\*滋賀医学大放射  
線基礎医学

(はじめに)

マウスの補体第4成分は、constitutive に発現する C4 (溶血活性を持つ) と、一般にテストステロンに誘導される Sex-limited protein (Slp、溶血活性を持たない) の2つのアイソタイプから成り立っている。C4 と Slp の血中濃度は構造遺伝子と不可分に H-2 の S 領域にマップされる遺伝要因に支配され、系統間で著しく異なっている。例えば C4 の血中濃度は C4<sup>h</sup> と C4<sup>l</sup> の遺伝子型を持つマウス間で 20 倍に及ぶ差がある。肝臓の mRNA を定量すると、ほぼ血中濃度が反映されており、翻訳以前の段階の調節機構により 20 倍にも及ぶ差が生じていると考えられている。従ってマウス C4 遺伝子は、遺伝子発現の量的な調節を研究するうえで重要なモデルであると考えられる。

今回我々は、C4<sup>h</sup> と C4<sup>l</sup> とを比較することによって、transcriptional control よりも posttranscriptional control が C4 遺伝子の発現により重要な役割を演じている事を明らかにしたので報告する。

## [方法]

$C4^l$  遺伝子の 5'-flanking 部位のクローニングは B10.BR の高分子DNA を BamHI で完全に消化し、ファージ由来の Hisajima arm をベクターとした、ねらい打ち法でおこなった。

$C4^h$  (FM) と  $C4^l$  (B10.BR) の 5'-flanking 部位の DNA フラグメントを PSVOCAT ベクターにサブクローニングし、ヒトヘパトーマ由来 HepG2 細胞にリン酸カルシウム法で導入後、CAT アッセイをおこないプロモーター活性を測定した。

定量時における S1p の影響を除くため、S1p を発現していない B10( $C4^h$ ) と B10.BR( $C4^l$ ) のメスの肝臓より核を分離し、Nuclear transcription (run-on アッセイ) をおこない、転写量を直接定量して比較した。なお系統間で差の見られない C3 の転写量も合わせて定量し、コントロールとした。

## (結果)

$C4^l$  (B10.BR) の 5'-flanking 部位をクローニングし、塩基配列を決定し、 $C4^h$  (FM) のそれと比較した。その結果 -1700bp および -300bp 付近に、それぞれ 12bp 及び 30 bp の欠失が  $C4^l$  に見られたが、それ以外は非常に相同性が高かった。プロモーター活性の違いが  $C4^h$  と  $C4^l$  との差が生じている原因であると仮定し、これを検証するために CAT アッセーによって  $C4^h$  と  $C4^l$  のプロモーター活性を

比較した。その結果  $C4^h$  がわずかに強いプロモーター活性を示す傾向が見られたが、血中濃度の差を説明できるほどの違いは見られなかった。

次にプロモーター活性は  $C4^h$  と  $C4^l$  で差がなく post-transcriptional な control によって  $C4^h$  と  $C4^l$  の差が生じていると仮定し、これを検証するため  $C4^h$  と  $C4^l$  のマウスの肝臓核を分離し、Nuclear transcription をおこない、転写量を直接定量して比較した。その結果  $C4^h$  と  $C4^l$  間において、ほとんど差が見られなかった。

(考察)

$C4^h$  と  $C4^l$  の肝臓の mRNA を定量すると血中濃度を反映し、20 倍以上の差が見られる。この事は翻訳以前での段階、すなわち転写、RNA スプライシング、mRNA の安定性のいずれかの調節機構に差がある事を示している。今回我々は Nuclear transcription を行い、in vivo では転写レベルに差がない事を明らかにした。また RNA スプライシングにおいて差があるならば、 $C4^l$  において、スプライシングされていない、もしくはスプライシングの途中の高分子の  $C4$  mRNA が存在するはずであるが、ノザン・プロッティングにおいて、そのような高分子 RNA は検出されない。よって  $C4^h$  の mRNA が  $C4^l$  に比較して安定な事が、 $C4^h$  の血中濃度が  $C4^l$  のそれより 20 倍も高い原因であると結論できた。

この事は、mRNA の安定性が補体遺伝子発現において重

要な役割を果たしている可能性を示していると思われる。

## モノクローン抗体を用いた B因子の機能局在の解析

上田 章 1) John F. Kearney 2)  
Kenneth H. Roux 3) John E. Volanakis 2)  
1) 九州大学 医学部  
2) Univ. of Alabama at Birmingham  
3) Florida State Univ.

### [目的]

B因子は分子量約9万の糖蛋白で、第2経路C3転換酵素の構成因子となる。すなわちBは $Mg^{++}$ または $Ni^{++}$ イオンの存在下で、C3bと結合し、次にDによってBのarginyllysyl peptide bondが解離され、分子量3万のBaの放出とC3bBbの形成が生ずる。この反応過程のなかで、今までBa部分についての機能は明らかでなかったが、今回、モノクローン抗体を用いて解析を行い、Ba部分にC3bへのbinding site(s)が存在することを示唆する結果を得たので報告する。

### [方法]

補体成分B、D、C3、Pはヒト血しょうより、既報の方法を用いて精製した。BのフラグメントBa、Bbは、 $Mg^{++}$ の存在下でBをDとSephacrose C3iで分解しSephadex G-100カラムを用いて精製した。

Bに対するモノクローン抗体(Mab)は、精製したBで免疫したBalb/cマウスのリンパ節細胞を骨髄腫細胞P3X63Ag8.653とPEG法によって細胞融合して得た。抗体産生クローンの検出は、Bを結合させたマイクロプレートによるELISA法で行い、そのアイソタイプはELISA法と蛍光抗体法によって決定した。Mabのアイソタイプは、HA4-1AとFD3-20が $\gamma 1 \kappa$ 、HA4-1BとHA4-15が $\gamma 2a \kappa$ であった。以下の実験に用いた4種類のMabのIgはcaprylic acid法を用いて精製し、Fabはそれをpapainで分解した後、DEAE-SephacelとSephadex G-100カラムで、F(ab')<sub>2</sub>はpepsinで分解した後、Sephadex G-100とProtein A-Sepharose 4Bカラムを用いて精製した。

### [結果]

#### 1) Mabの結合特異性

direct-binding solid-phase法により、Bでcoatingしたマイクロプレートへの<sup>125</sup>I-Mabのbindingをみたところ、HA4-1AとFD3-20はBとBaにHA4-1BとHA4-15はBとBbに結合した。inhibition experiment、すなわちfluid-phase inhibitorとしてB、BaおよびBbを用いて、Bでcoatingしたマイクロプレートへの<sup>125</sup>I-Mabのbinding阻害をみたところ、direct binding法の結果と一致が見られた。次にそれぞれのMabの間のcross-reactivityをみた。

anti-Baとanti-Bbとの間、2つのanti-Baの間にはcross-reactivityが見られなかったが、anti-Bb (HA4-1BとHA4-15)の間にはcross-reactivityがみられ、B b上の同一またはoverlapするepitopeを認識しているものと考えられた。

## 2) BとB bの免疫電子顕微鏡による解析

Bは3つのドメインを、B bは2つのドメインをもつことが示唆された。anti-Ba anti-Bb、Bの3者から成る複合体の電顕像では anti-Baとanti-Bbが異なったドメインへ結合すること、HA4-1AとFD3-20とでは異なった形の複合体を作ることから、2つのanti-BaはB aドメイン上の別々のepitopeを認識していることが考えられ、この結果はserologic binding testと一致した。

## 3) Bの溶血活性に及ぼすM a bの効果 (表1)

M a bとBとを反応させた後、EC3 b、P、Dを加え、30分後にC'-EDTAを加えてBの活性を調べた。2つのanti-Bbはdose-dependentにBの溶血活性を抑制した (50%inhibition:  $8 \mu\text{g/ml}$ ) が、anti-Baの抑制効果は非常に弱かった (HA4-1A; 310, FD3-20;  $163 \mu\text{g/ml}$ )。

次に、BとM a bを反応させた後、EC3 bを加え30分反応後に、血球を洗滌し、fluid-phaseのM a bとBを除いた後、PとDを加えてBの活性に対するM a bの効果を調べた。この系では、HA4-1Aが最も強い抑制効果を示した (50%inhibition;  $7.9 \mu\text{g/ml}$ )。HA4-15とFD3-20も抑制効果を示したが、その効果は弱かった ( $113,430 \mu\text{g/ml}$ )。

以上の結果から、anti-BaとくにHA4-1Aは活性反応過程の初期に、anti-Bbは後期に作用することが示唆されたので、これを確認するために、EC3 b B bの崩壊速度に及ぼすM a bの効果、 $^{125}\text{I-B}$ のEC3 bへのbindingに対するM a bの効果を調べた。

## 4) EC3 b B b convertaseの崩壊速度に及ぼすM a bの効果(表2)

EC3 b B bの半減期 ( $T_{1/2}$ ) は3.6分で、Pは、 $T_{1/2}$ を20分に延長させた。HA4-1BとHA4-15は $50 \mu\text{g/ml}$ の濃度で $T_{1/2}$ をそれぞれ0.7, 0.9分に短縮した。HA4-15のF a bフラグメントも同様に $T_{1/2}$  0.5分とC3 convertaseの崩壊を促進させた。一方、2つのanti-BaはC3 convertase崩壊速度に効果を与えなかった。

## 5) $^{125}\text{I-B}$ のEC3 bへのbindingに及ぼすM a bの効果 (表3)

$^{125}\text{I-B}$ とM a bを反応させた後、EC3 bを加え、30分後に血球と上清を分離してEC3 bへの $^{125}\text{I-B}$ のbinding率を調べた。HA4-1AのIgG、F a bはdose dependentにBのEC3 bへのbindingを阻害した(50%inhibitionはそれぞれ  $10, 13 \mu\text{g/ml}$ )。

FD3-20の阻害効果は非常に弱くその50%inhibitionは $172 \mu\text{g/ml}$ であった。一方、anti-Bbには阻害効果はみられなかった。

### [考 察]

我々はBに対するM a bを用いてBの構造と機能について解析を行った。anti-Bb anti-BaいずれのM a bもBの溶血活性を阻害したが、その作用機序は異なっており、anti-Bbの場合にはEC 3 bへの125 I-Bのbindingには影響がなく、EC 3 b B bからのB bの解離を促進させることにあった。一方、anti-Baのひとつ、HA 4-1 Aは125 I-BのEC 3 bへのbindingを抑制したことから、C 3 bへのbinding site(s)がBのB a部分にあることが示唆された。

これまでに、B aは3つのregionから成り、それぞれのregionがhomologyを示す約60個のアミノ酸から成ること、C 2 bがB aとhomologyをもつこと、H、C 4 b p、C R 1も同様のhomologous internal repeatsをもち、かつC 3 bまたはC 4 bと結合する性質をもつことが報告されており、B a、C 2 bともにC 3 bと結合することが示唆されていた。さらに、B aの3つのregionの内いずれがC 3 bに対するbinding site(s)をもつのか検討中である。

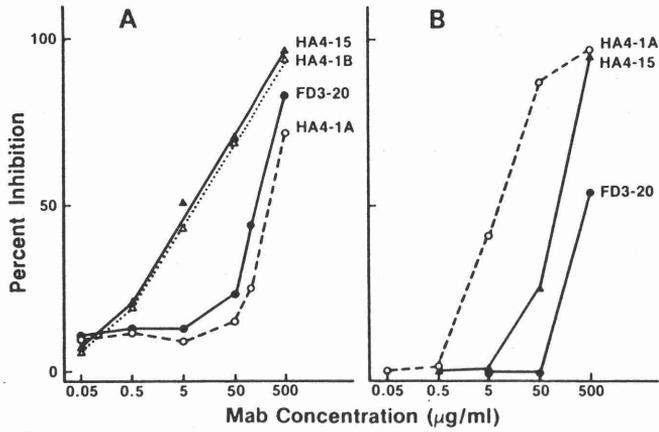


Figure 1. Inhibition of hemolytic activity of B by the anti-B Mab. A, a limited amount of B was preincubated with the indicated concentrations of Mab and the mixture added to EC3b in the presence of optimal amounts of D and P. C3 convertase sites were measured as described in the text. B, a limited amount of B preincubated with the indicated concentrations of Mab was incubated with EC3b. The cells were then washed and incubated with optimal amounts of D and P to form the C3 convertase.

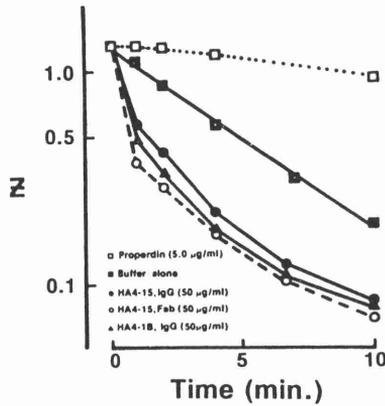


Figure 2. Effect of the anti-Bb Mab on the rate of decay of EC3bBb.

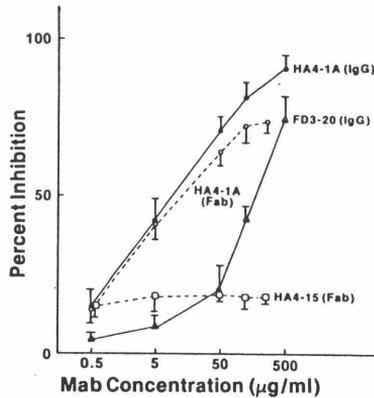


Figure 3. Inhibition of binding of  $^{125}\text{I}$ -labeled B to EC3b by anti-Ba Mab. The mean inhibition of binding  $\pm 1$  SEM for four experiments are shown.

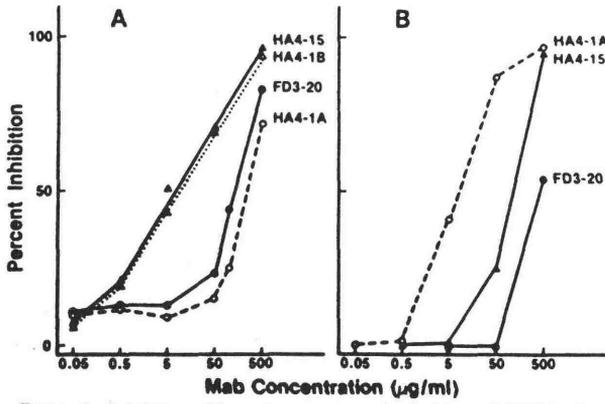


Figure 1. Inhibition of hemolytic activity of B by the anti-B Mab. A, a limited amount of B was preincubated with the indicated concentrations of Mab and the mixture added to EC3b in the presence of optimal amounts of D and P. C3 convertase sites were measured as described in the text. B, a limited amount of B preincubated with the indicated concentrations of Mab was incubated with EC3b. The cells were then washed and incubated with optimal amounts of D and P to form the C3 convertase.

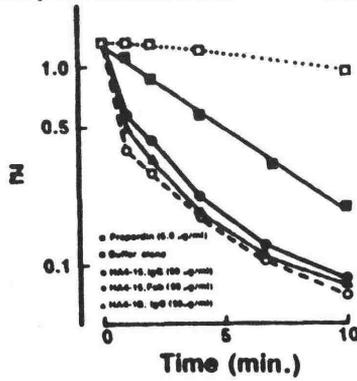


Figure 2. Effect of the anti-Bb Mab on the rate of decay of EC3bBb.

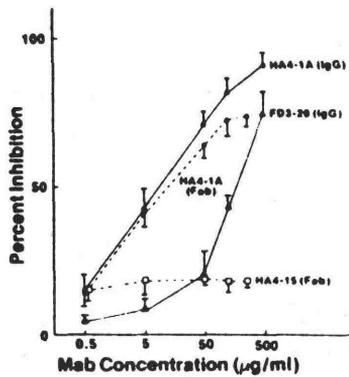


Figure 3. Inhibition of binding of <sup>125</sup>I-labeled B to EC3b by anti-Ba Mab. The mean inhibition of binding  $\pm$  SEM for four experiments are shown.

松下 操、岡田秀親

福岡大学医学部微生物学教室

### 【目的】

Factor B ( B )は Alternative complement pathway の C3 convertase を構成するセリンプロテアーゼの Zymogen であり、ヒト B については既に全一次構造が明らかになっている。

モルモット B に関しては分子量が 100 - 106 kDa でヒト B より大きく、Ba フラグメントにヒトとは異なり Chemotactic activity があること、又、ヒトとモルモットの活性比較から B と D は compatibility があるが、B と C3b では compatibility がないことなどが報告されている。従って、ヒト B との比較からもモルモット B の生化学的性状を明らかにすることは、反応機構を知る上で重要な情報になることと思える。今回我々はモルモット B の精製を試みたところ、分子量の異なる 2 つのタイプの B ( B1, B2 )を得たので報告する。

### 【材料および方法】

B の精製；モルモット B は Hartley EDTA-plasma の 12-26 % PEG 4,000 沈殿画分から順次 CM-Sephadex, DEAE-Sephacel, S-Sepharose, HCA-column, Mono P のクロマトグラフィーを行なって精製した。尚、B 活性はモルモット血清を 50°C 30 分加熱して調製した RB の存在下でのウサギ赤血球による溶血反応により測定した。

イムノブロット； SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis ( SDS-PAGE ) により分離した蛋白をニトロセルロース膜に転写後、ウサギに免疫して作成した抗 B1 血清と peroxidase 結合抗ウサギイムノグロブリンを順次反応させ 4-クロロ 1 ナフトールを基質として発色させた。

B の half life； EAC4<sup>pp</sup>3b<sup>pp</sup> に B 及び D<sup>hu</sup> を反応させて形成した C3 convertase の decay 実験により B1 と B2 の half life (  $t_{1/2}$  ) を求めた。

アミノ酸配列； Applied Biosystems 社の 477A Protein Sequencer を用いて分析した。

### 【結果】

Hartley モルモット EDTA-plasma より B の精製を行なったところ、SDS-PAGE 上移動度の異なる 2 つのタイプの B が得られた。100 kDa の B を B1, 96 kDa の B を B2 とした。( Fig.1)

C3<sup>pp</sup>, 存在下で D<sup>hu</sup> により分解生成した Ba, Bb を比較すると、Bb については、いずれの B も分子量 62 kDa であったが、Ba は B1 では 38 kDa, B2 では

34 kDa と違いがみられた。( Fig.2 )

B1 , B2 それぞれについてウサギに免疫して作成した抗血清は B1 , B2 との反応性に於て差異は認められなかった。

抗 B1 抗血清を用いたイムノプロットの結果, 個々に調べた 8 匹の Hartley モルモットの血清中, 全てに B1 , B2 が認められた。( Fig.3 )

又, モルモット血清を Zymosan 処理すると SDS - PAGE 上 B1 , B2 のそれぞれの Ba に相当するバンドが見られた。( Fig.4 )

Endoglycosidase F の処理をすることにより B1 , B2 いずれも分子量は 90 kDa に移行した。( Fig.5 )

EAC4<sup>90</sup>3b<sup>90</sup> と Dh<sub>v</sub> を用いた B の decay 実験の結果より half-life はいずれの B も 3 分であった。( Fig.6 )

N 末端部 15 残基アミノ酸配列を比較をすると B1 , B2 に違いがみられなかつた。( Fig.7 )

### 【考察】

Hamuro らは、モルモット B の分子量を 106 kDa と報告しているが、これは分子量的に見て、我々の精製した B1 に相当する B と思われる。

Endoglycosidase F 処理の結果より、B1, B2 は N-glycoside 結合糖鎖構造に相違があると推察される。

### 【謝辞】

アミノ酸配列分析をして戴いた福岡大学医学部病態生化学総合研究室, 緒方繁憲博士に感謝致します。

Fig.1



B1 B2

Fig.2

C3b — —

Bb — —

Ba

B1 B2

Fig.3



Fig.4



GPS B1 B2

Fig.5



B1 B2 B1 + B2  
Endo F

Fig.6

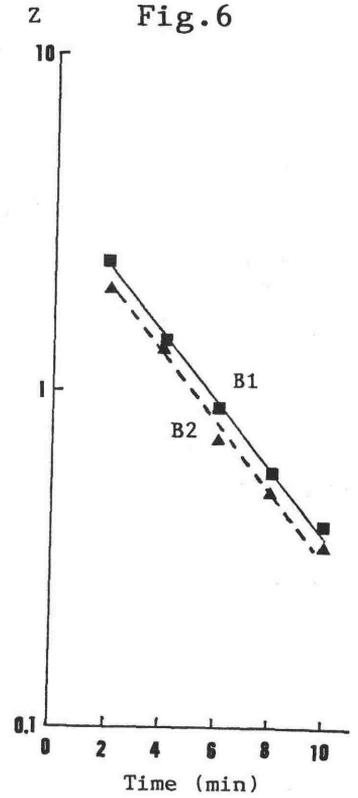


Fig.7

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
B1:	Thr	Thr	Leu	Pro	X	-Ser	Arg	Pro	Trp	Ser	Pro	X	-X	-Leu	Glu
B2:	Thr	Thr	Leu	Pro	X	-Ser	Arg	Pro	Trp	Ser	X	-Lys	Ser	Leu	X
Hu-B:	Thr	Pro	Trp	Ser	Leu	Ala	Arg	Pro	Gln	Gly	Ser	Cys	Ser	Leu	Glu

○武藤 裕<sup>1</sup>、福元裕二<sup>2</sup>、長沢滋治<sup>3</sup>、荒田洋治<sup>1</sup>  
東大・薬<sup>1</sup>、帝人生医研<sup>2</sup>、北大・薬<sup>3</sup>

### 【はじめに】

アナフィラトキシンC3aは、補体系第三成分C3が活性化されたときに生じる生理活性物質であり、多くの炎症反応にかかわっていることが知られている。C3aは、アミノ酸77残基によって構成されているが、その活性発現にはカルボキシル末端のArg-77が必須である。また、還元アルキル化によってもその活性が失われることからC3aの高次構造が、その活性発現にとって重要であることが知られている。このような事実から我々は、 $^1\text{H-NMR}$ によりC3aとC3a-des Argの構造比較をおこなった。

C3aについては、X線結晶回折がおこなわれているがアミノ末端12残基の電子密度像は、得られていない。このアミノ末端部分を含めたC3aのcore部分について更に詳しい解析を行うためC3aのC末端7残基を欠いたC3a-Arg69をC3のTrypsin処理により調製し $^1\text{H-NMR}$ により構造解析を行った。

### 【方法】

C3a及びC3a-Arg69の精製は、C3をTrypsin処理し(molar ratio=1/100) BPTIで反応を止めた後、CM-Celluloseによるイオン交換クロマトグラフィーによりC3bや未反応のC3との分離を行う。更にMono-S FPLCカラムを用いることによりC3a, C3a-Arg69を分離精製した(Fig 1)。

C3a-des ArgはHugliらの方法(1)に準じて行った。ただし、C3aとC3a-des Argの比較では、C3aにCPase-Bを加えることにより反応前後でスペクトルの比較をおこなった。

$^1\text{H-NMR}$ スペクトルの測定はBruker社製400MHz  $^1\text{H-NMR}$ の装置を用いて25°Cで行った。pH値は、23°Cで測定した。

### 【結果】

#### <1> C3aとC3a-des Argの比較

C3aとC3a-des Argの $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを比較してFig 2に示す。

Fig.1

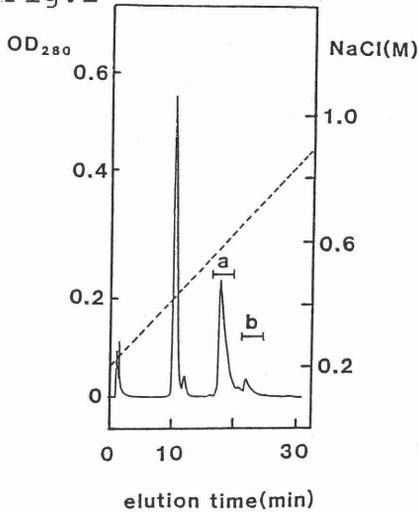
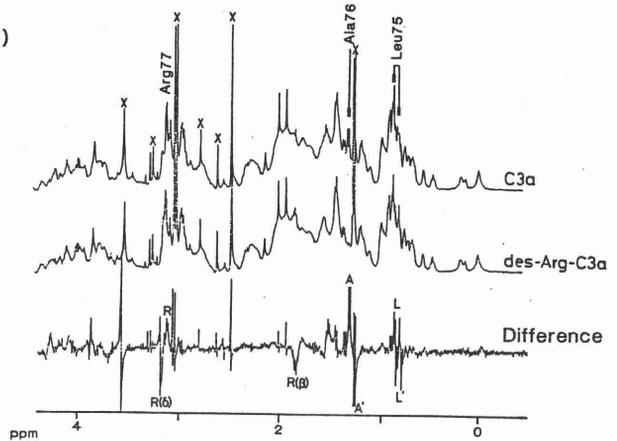


Fig.2



また、ここには両者の差スペクトルも示してある(測定条件は200mM NaCl, pH=7.5)。この差スペクトルを見ると、Leu-75,Ala-76には、ケミカルシフトの変化が見られるがこの両者の他の部分にあるシグナルについては、変化が生じていなかった。特にC末端部分にあるHis-67,His-72はC3aとC3a-des Argで同じpH滴定曲線を与えた(2)。これらのことから 1)水溶液中においては、C3aとC3a-des Argに大きな構造上の違いがないこと、2)C3aが水溶液中で、X線結晶回折像で見られたC末端部分のβ-turn構造をとっている可能性が小さいことがわかった。

C3aのC末端部分の構造を支えているのは、N末端部分にあるcore部分であることが示唆されているが(2)、この部分の構造解析を行うため、C3a-Arg69について<sup>1</sup>H-NMRの測定を行った。

## <2> C3a-Arg69の<sup>1</sup>H-NMRスペクトル

### 1) Tyr残基の帰属

<sup>1</sup>H-NMRは、アミノ酸残基ごとの情報を得ることができる分光器であるが、重要な情報を得ようとする場合シグナルの帰属が大切なステップになる。C3aの場合2個あるTyr残基の帰属をまずつけるためC3a-Arg69にCPase/Difference法(3)を適用した。この場合は、pH5.0の状態にCPase Pをサンプルに作用させ、スペクトルの経時変化を追った。Fig 3に2個のTyrに由来するシグナルの変化を示してある。C3a-Arg69にはTyr-15とTyr-59の2個のTyrがあるが、Fig 3を見る限りTyr aのシグナルのみが変化を起こし、このシグナルがC3a-Arg69のC末端に近いTyr-59であることがわかった。

Fig. 3

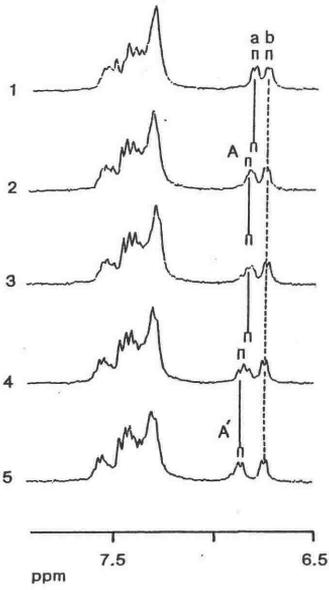


Fig. 4

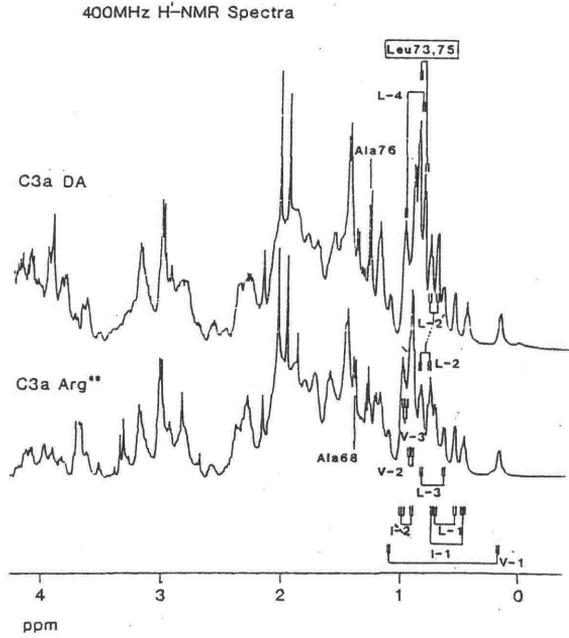


Fig. 5

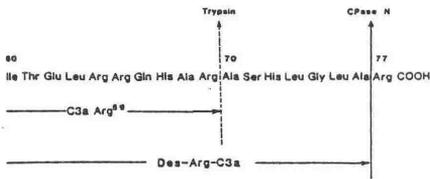
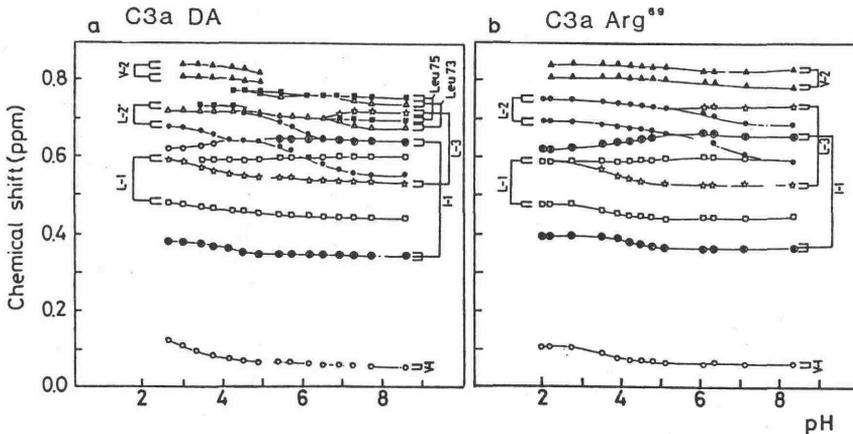


Fig. 6



## 2) メチルシグナルのスペクトル

Fig 4にC3a-des ArgとC3a-Arg69のメチル領域 (Val, Leu, Ileのシグナルが観察される。) のスペクトルを比較した。また、Fig 5には両者のC末端の一次配列を示してある。Fig 4を見るとLeu-73,75以外のシグナルは、ほとんど保存されておりcore部分の解析を行うためにはC3a-Arg69を用いればよいことがわかる。

このFig 4のスペクトルの中で大きな違いは、C3a-Arg69のL-2のシグナルがC3a-des ArgではL-2'にシフトしている点である。これらのメチルシグナルの挙動を詳しく見るため400mM NaClの条件下でpH滴定をおこなった (Fig 6)。この結果からL-2, L-2'ともにHis-67の影響を受けている同一のLeu残基であることがわかった。このことからL-2はC3a-Arg69のC末端に近く、His-67に近いLeu-63であると考えられる。

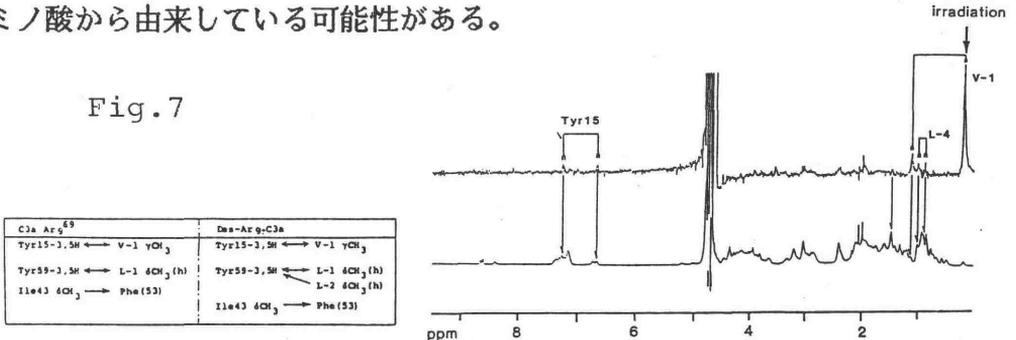
C3a分子中にはIle-43,60の2個のIle残基があるが、さきほど述べたCpase Pを用いた解析からI-1がIle-60, I-2がIle-43であると考えられる。

## 3) NOEによる解析

$^1\text{H-NMR}$ により構造解析を行う場合NOEの測定が重要な手法となる。これはあるアミノ酸残基のシグナルが分離している場合そのアミノ酸残基と立体的に近いアミノ酸残基のシグナルを同定する手法である。Fig 7にはその一例でV-1のVal残基と立体的に近いアミノ酸残基のシグナルを同定した例が示してある。ここでは、V-1とTyr 15, L-4が近い位置にあることがわかる。また、Fig 7のinsetではこのNOEの実験の結果をまとめてある。Tyr-59に対してL-2 (Leu-63)にNOEが観察されること、及びLeu-63はHis-72の影響を受けることからTyr-59からHis-67の部分は $\alpha$ -helixに近い構造を取っていると考えられる。また、Ile-43とPhe残基にNOEが観察されるがこれらの結果は、X線結晶回折とも一致する。

しかし、Tyr-59とL-1, Tyr-15とV-1に観察されるNOEはX線結晶回折の結果で説明できるものではなく、L-1, V-1は電子密度像の得られていないN末端部分にあるアミノ酸から由来している可能性がある。

Fig. 7



【まとめ】

水溶液中では、C3a, C3a-des Argに大きな構造上の違いはない。また、core部分の独立性は強くL-1, V-1の帰属が更につけばX線結晶回折では電子密度像の得られなかったN末端部分についても構造上の知見が得られると考えられる。

【Reference】

- (1) Fernandez, H. Z., & Hugli, T. E. (1976) *J. Immunol.* 117, 1688.
- (2) Moto, Y., Fukumoto, Y., & Arata, Y. (1985) *Biochemistry* 24, 6659.
- (3) Endo, S., & Arata, Y. (1985) *Biochemistry* 24, 1561.

久木田一朗，山本哲郎，神原武

熊大医，免疫研，アレルギー部門

<目的> 1969年のWilkinsonら、Borelらの報告を初めとして、人あるいは動物の正常血清にマクロファージ(Mp)遊走活性の存在が示されて来た。我々もモルモット血清で同様の結果を得、その活性は抗C5抗体で吸収されることよりC5由来因子であることを報告した。しかし、世界的に必ずしも解析は進まなかった。その一つの原因として、この因子の活性化機構の解析が困難であったことが考えられる。この問題に関しては、幾つかの報告が遊走活性出現と血液凝固との関係についてなされた。Borelらは血漿には遊走活性はないと報告したが、Hausmanら、Jungiは血漿にも遊走活性が存在するとした。しかし、これらの報告はいずれも長時間(90分前後)のincubation時間を必要とするBoyden法を用いており、この方法では遊走活性測定中にBoyden chamber内の血漿にartificialに遊走活性が出現する可能性を否定出来ないと考えられる。実際我々はこの人工的な現象をplasma kallikreinの遊走活性研究の過程で経験した。そこで、この問題を解決するために、従来Boyden法での測定に加えて、新たにpolarization法での測定を行い、これらの結果を総合的に検討した。後者の方法は遊走因子の作用した直後の白血球が遊走を起こすに先立って極性をもった形態に変化するという性格を用いた短時間測定法である。その結果、血清中にはactiveな遊走因子が確かに存在すること、この因子はC5由来の高分子因子であり血漿中ではinactiveであることが明かになったので活性化機構の解析を含めて報告する。

<方法> モルモット心穿刺にて全血容量9に対し抗凝固剤(20mM Na<sub>2</sub>EDTA in saline pH 7.0)容量1を用いて採血した。このEDTA血の一部にCaCl<sub>2</sub>を終濃度5mM加え凝固を起こし、血清を調整した。残りの血液を2000 rpm, 次いで8000 rpmで遠心して血漿を調整した。この血漿の一部にCaCl<sub>2</sub>を終濃度5mM加えて血漿由来血清を作製した。いずれの標品も作製後heparinを終濃度5u/ml加えた。Boyden法測定時にはこれらはheparin加PBSに透析した。遊走活性測定には腹腔浸出Mpを指標細胞とし、nucleopore膜を用いたBoyden変法を行い、膜下面の顕微鏡下5視野での遊走細胞数で表した。polarization法の指標細胞は、モル

モット末血の6% dextran上清よりリンパ球比重分離液を用いた比重遠心法にて単核球分画を調整し、血小板を除いたあと0.5% BSA加 Hanks液に細胞数  $3-5 \times 10^6$  Cells/mlで浮遊させたものを用いた。測定は、この細胞浮遊液 270 $\mu$ lに sample 30 $\mu$ lを加え、37°C 10分間温置後細胞を paraformaldehyde固定した。この細胞を  $\alpha$ -naphthyl acetateを基質とする nonspecific esterase染色を液中で 37°C 35分間行い、96穴組織培養プレートにまいた。Nomarski装置付き倒立顕微鏡下に数えた esterase positive cell 200個のうち polarized cellのパーセントを算定した。抗モルモットC3、抗モルモットC5及び抗モルモットmacrophage chemotactic factor from skin-1 (MCFS-1, Kambara et al., Am J Pathol 1977, 87:359-374)の各抗血清はそれぞれ教室で精製した標品をウサギに免疫して得た。各抗血清をIgGに精製後F(ab')<sub>2</sub>とした後BrCN活性化 Sepharose 4Bに固定化し免疫吸着カラムを作製した。免疫吸収実験は各抗体アフィニティカラム (1.4 x 1.8 cm)を用いたクロマト法を室温で8 ml/hrの流速で行った。吸収の効果はC5溶血活性測定、オキタロニー法、ELISA法を用いた抗原の定量分析により確かめた。zymosan activated serum (ZAS)はモルモットプール血清に5 mg/mlのzymosanを加え37°C 60分温置後遠心して上清を用いた。

#### <結果>

##### I. モルモット正常血清のMp遊走活性

モルモット正常血清の遊走活性を Boyden法で測定すると血清 10倍希釈前後に至適濃度をもち、それより低濃度では濃度依存性のみられる活性の存在が認められた。また、血清の活性は、濃度依存性が見られる範囲で checkerboard analysisを行って調べると、positive gradientの濃度に比例し、また上室下室等濃度においても濃度上昇につれ遊走細胞数の増加がみられ、chemotacticかつ chemokineticな活性であることが示された(表1)。

##### II. 遊走活性出現と血液凝固との相互関係

###### (1) Boyden法を用いた血漿、血清、血漿由来血清の遊走活性

dose response curveより ED<sub>50</sub>を出し活性の比を見ると、血漿：血清：血漿由来血清 = 1 : 1.4 : 1.8 となりいずれも遊走活性が認められた。

###### (2) polarization法とBoyden法との比較

始めに、polarization法の assayに必要な反応時間を決めるために、合成ペプチドの fMLPを用いて、細胞浮遊液と混和後の反応時間と polarization陽性細

胞比率の関係を調べた。その結果、反応早期より最高値に近い反応が見られ、10分間の温置で十分測定出来ることが分かった。従って、以後の polarization assayは 37°C 10分間の温置で行った。次に、fMLPとZASを用いて、polarization法と Boyden法とでの活性を比較すると、二種類の標品とも両測定法でほぼ同様の dose response を示すことが分かった。そこで、血清および血漿を両測定法で比較すると、血清は polarization法においても Boyden法と同様10倍希釈(10%)から100倍希釈(1%)にかけて濃度依存性の活性が認められ fMLPや ZASの両測定法での結果の関係と同様であった。ところが、血漿には polarization法では全く活性が認められず、Boyden法で認められた活性との discrepancyが出現した。

### (3) 血漿における polarization活性の出現

血漿における Boyden法と polarization法との discrepancyを説明する仮説として我々は、血漿中の何らかの遊走因子前駆体が Boyden chamber内で測定中に活性化されたのではないかと考えた。Boyden法では下室の sampleは nuclepore膜の poreを通して上室の細胞浮遊液と接することになる。ために、血漿と細胞浮遊液あるいは細胞浮遊用の培養液とを混じて一定時間温置後 polarization活性を測定すると、何れにも活性が出現した。そこで、培養液中のCa<sup>++</sup>イオンが必須ではないかと考え、血漿に培養液あるいは5 mM CaCl<sub>2</sub>を加えて温置すると30分で polarization活性の出現がみられ、先の仮説が強く支持された。直、このとき血漿には heparinが共存しており凝固は起きなかったが、heparinを加えていない血漿に同様の処理を施すと凝固がみられた。

### III. Ca<sup>++</sup>再加温置により血漿に出現する遊走因子の性格

Ca<sup>++</sup>処理血漿を各種抗体カラムで吸収すると、抗C5抗体カラムで強い遊走活性の吸収がみられた。polarization活性でも同様に抗C5抗体カラムで強く活性は吸収された(表2)。分子量測定のため Sephacryl S-300カラムに展開すると、正常血清を展開して得られる遊走活性のパターン同様分子量15万の部位に分画され、C5aが溶出される低分子の部分には活性はなかった。これらの結果は我々が以前より報告している正常血清中のC5由来Mp遊走因子の性格と同一であった。

<考察> 我々は、既に正常血清中のC5由来Mp遊走因子の性格が Sephacryl S-300を用いたゲル濾過で分子量約15万の部位に分画され、血管透過活性を

持たず、易熱性であり既知の native C5、C5a、C5adesArg、C5adesArg-cochemotaxin complexとは区別されることを報告した。今回、我々はこの因子の活性化機構の解析のために、血漿中のMp遊走活性の有無について 検索を加え、Boyden法と polarization法との間に、その結果に discrepancyを見だし、この解明に努めた。その結果、heparin存在下 EDTA血漿にCa++を再加後温置することによって Boyden法の測定に必要な時間内に polarization活性が出現し、その因子の性格は正常血清中の因子と同一であったことより、C5由来Mp遊走因子は血漿中では非活性であり、Boyden法でみられる血漿の遊走活性は chamber内で、おそらく生理的には凝固と一致しておこるCa++依存性の回路によって活性化されたために出現したものであろうと結論づけられた。すなわち、血漿中のC5が血液凝固により、あるいは血液凝固を惹起させる条件下において活性化を受け、遊走活性を持つ因子が産生されるものと考えられた。以上のことは、補体の古典経路や第2経路を介さず、しかも血液凝固過程に関連して補体C5が活性化され、新たな活性物質が出現するという凝固系と補体系とを結びつける全く新しい回路の存在を示唆するものと考えられる。

今回報告する補体由来の因子はゲル濾過で native C5よりわずかにおくれて分画され、活性化に一定の温置時間が必要なことから、native C5が何らかの限定分解を受けて活性化されたと考えるのが最も妥当と思われる。従来、in vitroで補体因子と凝固系の因子、線溶系の因子あるいは血小板等を用いてC5aやC3a様の物質の出現を示唆する報告があるが、これらは低分子の因子であり、我々の因子とは異なる。一方、Wetselらは、trypsinあるいは thrombinによりC5が限定分解され高分子のまま多核白血球遊走活性を持つ様になることを報告している。この因子がMpに対して遊走活性を持つかどうか、wholeの血液あるいは血漿でこの現象が起きるかどうかなど、この因子と正常血清中の因子との異同について我々の因子の分子レベルでの解析を含めて、さらに検討を進める必要があると思われる。ただ、今回報告するC5の活性化は heparin存在下にも生ずることを考えると、antithrombin-heparin複合体により瞬時に抑制されるという thrombinが作用すると見るには疑問が残る。すなわち、我々の因子が凝固系の cascadeのどこで関係して活性化を受けるか解析する必要があり、凝固因子欠損血漿、酵素阻害剤等を用いた実験で検索を進めていく必要がある。

以上の如く、今回は in vitroでの解析を中心に報告するが in vivoの現象との

関連を遅延型アレルギー反応を例にとって考えてみると、この反応を組織レベルで特徴づける fibrinの形成とMpの浸潤という2つの重要な現象を、血管透過性亢進に伴う血漿成分の浸出とその凝固反応、それに伴うMp遊走因子の活性化とその結果生ずるMp浸潤という様に、生化学的に一元的に理解する道を開くのではないかと思われる。今後、in vivoでのこの因子の同定が必要と思われる。

Table 1. Chekerboard analysis of normal guinea pig serum for macrophage migration

Serum concentration (%)	below filter				
	above filter	3.3	1.7	1.1	0
3.3		459 <sup>#</sup>			3
1.7		663	79		
1.1		813		27	
0		1,004	199	63	12

<sup>#</sup> The number of migrated cells per 5 high power fields of a microscope.

Table 2. Immunoadsorption of polarization activity in Ca-treated plasma

Sample	( absorbance at 280nm )	% of polarized monocytes
Ca-treated plasma		
neat	( 34.00 )	47.1
2 fold diluted	( 17.00 )	41.0
4 fold diluted	( 8.50 )	32.4
8 fold diluted	( 4.25 )	29.2
Effluent of		
Sephrose 4B	( 17.00 )	38.6
Anti-C5-Seph	( 17.00 )	11.1
Buffur ( PBS )		11.0
fMLP ( $5 \times 10^{-8}$ )		31.3

After adjusting the absorbance at 280nm of each effluent and the applied Ca-treated plasma, polarization activity was measured. 60 $\mu$ l of each sample were added to 240 $\mu$ l of the cell suspension in a polypropylene tube, and the mixture was incubated for 10min at 37°C.

## 23 抗体,補体レセプターを介する ヒト好中球の応答

— オプソニン化ザイモサン刺激による好中球の応答に  
及ぼす抗FcR抗体の影響

高橋和彦,長沢滋治,小山次郎  
北海道大学・薬学部・衛生化学

### [目的]

食細胞による抗体,補体依存性の生体防御反応は外界からの微生物の侵入を防ぎ、有害な異物を排除するために不可欠である。この反応は基本的には好中球などの食細胞が抗体や補体成分C3フラグメントを結合したバクテリアなどの異物を認識し排除することである。

この認識は主に食細胞上に存在するIgG抗体のFc部分と結合するFcレセプター(FcR)とC3の活性化産物C3biと結合する補体レセプター3(CR3)を介して行われる。両レセプターの重要性は自己免疫疾患患者やレセプター欠損患者の食細胞機能の研究からも示されており、両レセプターの構造と機能を明らかにするため多くの研究が行われている。我々はヒト好中球のFcRの研究を行い、既にUnkelessらにより報告されている分子量51-73kdのFcR(モノクローナル抗体(mAb)3G8で認識される)とは異なる新しいタイプのFcR(分子量40kd, mAb IV3と反応する)を見だし、好中球上に少なくとも二種類のFcRの存在することを明らかにしてきた(1)。また、免疫複合体刺激による好中球のスーパーオキシド( $O_2^-$ )生成,脱顆粒に及ぼす抗FcR mAbの効果調べてきた(2,3)。

パン酵母細胞壁多糖であるザイモサンは補体第二経路の発見及び作用機序の解明に中心的な役割を果たしてきただけでなく、血清と反応させたザイモサン,いわゆるオプソニン化ザイモサンがC3フラグメントを結合していることから補体レセプターを介する食細胞との結合,貪食, $O_2^-$ 生成などの応答をみる刺激物として汎用されている(4)。しかし、ザイモサンの $\beta$ -グルカンにCR3が結合する性質があること,血清にザイモサンに対する自然抗体が含まれていることなどから、オプソニン化ザイモサンと好中球の相互作用には補体レセプター以外の因子の関与があると考えられる。そこで我々はオ

プソニン化ザイモサン刺激による好中球の応答に及ぼす抗FcR抗体の影響などを調べ興味ある知見を得たので報告する。

#### [方法]

1. 細胞：ヒト末梢血からデキストラン沈降法，フィコール・パック比重遠心法で分離した後、残存する赤血球を低張処理して好中球を得た(純度98%以上)。
2. オプソニン化ザイモサン：Law らの方法(5)に従ってザイモサン(Sigma社)をアルカリ，SDSで処理したものをを用いた。1) 血清処理ザイモサン，血清1mlあたり15mgのザイモサンを加え、37°C, 20分反応させたのち遠心洗浄した。自然抗体(A)とC3フラグメント(C)が結合しているのでZACと呼ぶ。2) 抗体結合したザイモサン(ZA)，血清と0°C, 30分あるいはEDTA添加血清と37°C, 20分反応させた後、遠心洗浄して得た。3) 補体結合ザイモサン(ZC)，2)で述べた抗体除去血清(あるいはカルシウム再添加血清)と37°C, 20分反応し遠心洗浄した。
3. O<sub>2</sub>生成：37°Cで保温したキュベット中でKrebs-Ringerリン酸塩緩衝化生理食塩水，1mlに浮遊した好中球(1×10<sup>6</sup>)をサイトカラシンB(cytoB)の存在下あるいは非存在下で2分間反応させたのち、種々のオプソニン化ザイモサン(1.5mg)で刺激した。生じたO<sub>2</sub>はスーパーオキシドディスムターゼで阻害されるチトクローム c の還元量をA<sub>550</sub>で経時的に測定した。

#### [結果・考察]

免疫複合体，フォルミルペプチド，コンカナバリンAなどが刺激物である場合、好中球はcytoBで前処理された時に強いO<sub>2</sub>生成応答を示すことが知られている。そこでまず種々のオプソニン化ザイモサンとcytoB処理した好中球を反応させO<sub>2</sub>生成を経時的に測定した結果を図1に示した。ZACで刺激した場合、1-2分間のlag timeの後、強いO<sub>2</sub>生成が、ZCではその1/3程度の応答が認められた。ZAによるO<sub>2</sub>生成はZ単独と同様にほとんど認められず、血清中のZに対する抗体量が好中球のFcRを刺激するのに十分でないことを示している。ZACとZCとの応答の差は抗体に依存するものと考えられるがZAでO<sub>2</sub>生成が見られないことから、ZAC刺激は 1) ZCと同様に補体レセプター

を介する刺激、2) FcR単独でなくCR3など他のレセプターとの協調を介する刺激、からなると考えられる。

次にZACとZCを刺激物として好中球の $O_2^-$ 生成応答におけるcytoB処理の影響を調べた(図2)。ZCを刺激物とした場合、cytoB処理の有無で好中球の応答に相違はなかった。一方、ZACではcytoB処理していないとき $O_2^-$ 生成は1/3に減少し、ZCによる応答とほぼ一致した。このことは抗体に依存する応答がcytoB処理した好中球でのみ観察されることを示唆している。

ZAC刺激による細胞応答におけるFcRの関与を明らかにするため、抗FcR mAb の効果を調べた(図3)。抗FcR mAb(IV3)で好中球を前処理するとcytoB処理好中球のZACに対する $O_2^-$ 生成は1/3に減少した。他方、cytoB未処理群ではIV3 による阻害は見られなかった。なお、3G8の効果については現在検討中である。

以上の結果はいわゆるオプソニン化ザイモサン(本抄録中ではZACと呼んだ)と好中球との相互作用におけるFcRの重要性を示している。またZA,ZACを用い好中球の結合,貪食,脱顆粒反応についても現在検討中であり、あわせて報告する予定である。

なお、本研究の一部は上原記念生命科学財団、東京生化学研究会の助成を受けた。

#### [文献]

1. Looney, R. J. et al. (1986) J. Exp. Med. 163, 826
2. Takahashi, K. et al. (1985) Blood 66, 92a
3. 高橋ら (1986) 日本免疫学会総会・学術集会記録 16, 254
4. Babior, B. M. & Cohen, H. J. (1981) Methods in Hematology, Vol. 3 (Leukocyte Function) 1-38
5. Law, S. K. et al. (1979) J. Immunol. 123, 1388

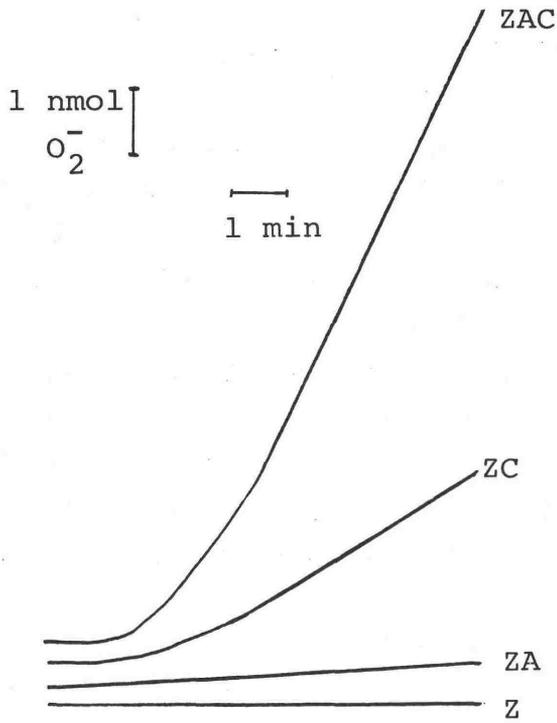


図1 種々のオプソニン化ザイモサン刺激による好中球の $O_2^-$ 生成

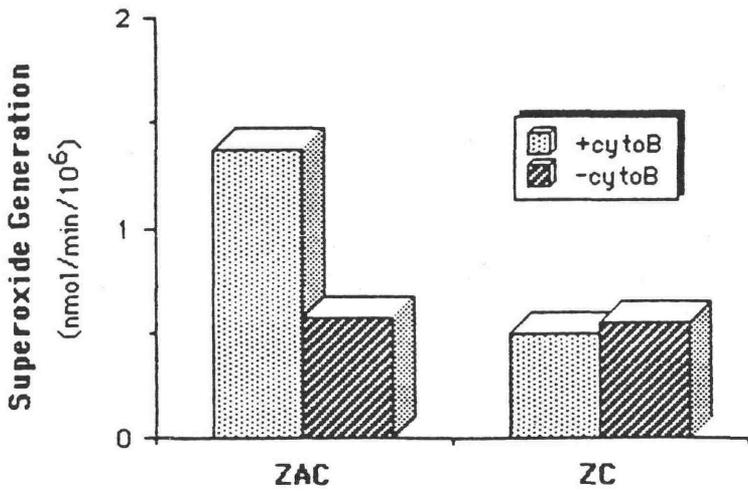


図2 ZAC, ZC刺激による好中球の $O_2^-$ 生成に及ぼすcytoBの効果

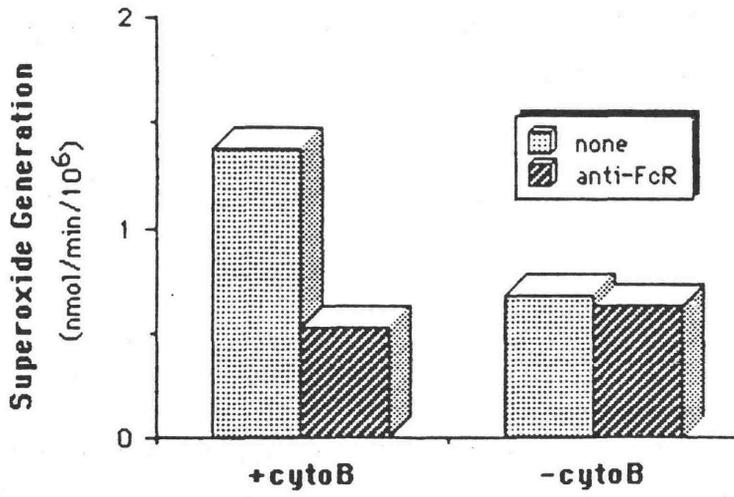


図3 ZAC刺激による好中球の $O_2^-$ 生成に及ぼす抗FcR mAbの効果

洪 卿秀、木下 タロウ、竹田 潤二、小園 晴生、  
井上 公蔵

大阪大学 医学部 細菌学

研究目的：Streptococcus pyogenes は白血球に貪食されれば容易に殺されるが、 $\beta$  溶血性 A 群 Streptococcus はその菌体表層に M 蛋白をもち、その抗貪食作用によって生体内に侵入した場合に殺菌を免れて組織内で増殖し、種々の化膿性疾患を起こすばかりでなく、リウマチ熱や糸球体腎炎を続発する。M 蛋白がいかにして抗貪食作用を発揮するかを、補体によるオプソニン作用に対する M 蛋白の制御という観点から研究した。

実験方法：Streptococcus pyogenes A 群 3 型の C 2 0 3 株 (M+) とそれに由来する C 2 0 3 S 株 (M-) は中外製薬研究所、宇佐美 博子博士から分与された。M+ 菌はマウスを数代通過させて毒力を上げたものを用いた。ヒト血液による間接殺菌反応は Lancefield の方法によっておこなった。ヒト補体成分は、当教室で分離精製し、Iodogen によりヨード標識した。ウサギ抗 M 蛋白抗血清は M+ 菌を sonicate し細胞壁を主とする菌体を用いて Incomplete adjuvant で免疫して得られた。M 蛋白に対する抗体の IgG fraction は 50% 飽和硫酸、DE-52 cellulose column を通し、その Fab fragment はパパイン消化した後、CM-52 cellulose を用いて精製した後それぞれを M- 菌で 1 晩吸収して用いた。SDS-PAGE は Laemmli の方法によった。

結果：補体活性化の Classical pathway を抑え、Alternative pathway のみを許す MgEGTA 存在化で、ヨード標識した C3 を加えたヒト補体血清と M+ 菌、M- 菌を用いて反応させ、時間的に C3 の菌体上の沈着のし方を調べて見た時、30 分後では、M- 菌は約  $2 \times 10^4$  molecules/cfu の結合がみられたが M+ 菌では  $3.5 \times 10^3$  molecules/cfu しか結合しなかった。M+ 菌から M 蛋白を除くために M+ 菌を Trypsin 処理し intact な M+ 菌との B と C3 の結合数を比較した時、Trypsin 処理 M+ 菌の方が未処理の M+ 菌より 5-6 倍多く結合していた。補体の Classical pathway をも起こさせる  $Ca^{++}$  存在化で、ヨード標識した B を加えたヒト補体血清を用いて M+ 菌、M- 菌と反応させ B の結合数を比較した時、M- 菌の方が M+ 菌の 4 倍多く結合していた。さらに、Trypsin 処理 M+ 菌と未処理の M+ 菌での B と C3 の結合数を比較した時、B の結合数は Trypsin 処理 M+ 菌の方が未処理 M+ 菌の 3 倍多いのに対して、C3 の結合数は Trypsin 処理 M+ 菌、未処理 M+ 菌の両方共に同程度結合していた。更に、M+ 菌と M- 菌とを用いて C3 の結合数を時間的に調べた時でも M+ 菌上の C3 の結合数は M- 菌上の C3 の結合数の 75% であった。

次に、M 蛋白に対する IgG 抗体とその Fab fragment を M+ 菌に前処理して菌体上の M 蛋白の Alternative pathway の C3 転換酵素の阻害活性を抑える事ができるかどうかを MgEGTA 血清存在下での C3 の結合数を指標として調べて見た時、IgG 抗体 又 その Fab で処理した M+ 菌は未処理の M+ 菌より C3 の結合数が増加した。

考察：M- 菌のヒト白血球による貪食作用は C3b 又は

iC3b によるオプソニン作用によっている。M+菌では Alternative pathway による C3bの菌体表面への結合は抑制されているが、Classical pathway をも許す条件では C3b は充分量結合しているのにオプソニン作用は発揮出来ない。この場合、M+菌上へ結合した C3b はM蛋白によって機能的にその生物活性を阻害されており B の結合によって C3 転換酵素 (C3bBb) を形成できないでいる事が見いだされた。このことは、この増幅 C3 転換酵素による C3 の活性化を抑制させるだけでなく、オプソニンとしての C3b あるいは iC3b が白血球表面の CR1あるいは CR3 レセプターへ結合する活性をもM蛋白が阻害している事を示唆している。

## 25 血清殺菌因子 RaRF による殺菌反応への補体の関与

初瀬洋美、季 育華、渡辺真理子、渡辺恵美子、松下 操\*、  
岡田秀親\*、川上正也  
北里大. 医. 分子生物, \*福岡大, 医, 微生物

### 目的

グラム陰性腸内細菌の細胞壁リポ多糖体 (LPS) の糖鎖部分は、菌種特異的な O 多糖体の他に、いく種かの菌に共通な rough core から成り立っている。私達は core 多糖体に結合する補体依存性の殺菌因子がいろいろな動物の血清にあることを報告してきた (1, 4, 6)。RaRF は Ra および R2 と呼ばれる core を持つ rough 型腸内細菌に特異的に結合し、補体を活性化することによって殺菌する因子である (1, 2)。

その活性は軟骨魚綱以上の脊椎動物の血清に広く見出され、それらの因子の大部分は熱処理 (56°C, 30分) および還元剤処理 (25mM mercaptoethanol) によって失活するなどの共通性を持っている (4)。また哺乳綱から両棲綱にいたる代表種の RaRF は Ra 菌の LPS 非還元末端に特異的に結合することが、単糖による阻害実験によって証明されている。これらの RaRF は Ra 多糖体への結合に  $Ca^{++}$  または  $Mg^{++}$  を必要とするほか、推定分子量も良く似ている。それらの RaRF の殺菌には同種または異種の新鮮血清成分を必要とすること、また、ある種の RaRF では C4 成分を必要とすることから、殺菌には補体が必須であると考えられる (5)。マウスの RaRF は Mr 28,000 のポリペプチドからなり、血清中では Mr 300,000 の分子として存在している (3)。

ここでは各種動物血清による殺菌の様子を示し、マウス RaRF によって誘導される殺菌に補体のいかなる成分が関与するかをしらべた結果を報告する。

### 方法

ICR マウス血清に Ra 菌を加えて吸着した RaRF を N-acetyl-D-glucosamine 溶液で溶出する方法で RaRF を調製した (1)。また Ra 菌で免疫したマウスの血清から硫酸分画によって抗体画分を、さらに Ra 菌吸着と溶出によって Ra 特異抗体を作った。

スポット法 (5) によって RaRF の殺菌力価を測定した。すなわち *Salmonella typhimurium* Ra chemotype strain を含む Agarose 平板に、RaRF の階段希釈液 2 $\mu$ l を滴下し、吸収させた後、補体液を重層して 37°C, 60分おき、さらに栄養を含む溶液を加えて 37°C に培養した。殺菌斑を生ずる最高希釈倍数

をもって力価とした。R a 菌によって R a R F を吸収除去した正常モルモットおよび C 4 欠如モルモットの血清 (C 4 D) を補体源として用いた。またそれから、W.P.Kolbら(1979)の方法によって C 1 q と C 1 q 除去血清 (C 1 q D) を、Bolotinら(1977)の方法で C 4 を調製した。

### 結 果

#### 1) 各種動物血清の殺菌

自然界における R a R F の分布を調べるために、節足動物以上の動物血清について、抗 R a 殺菌活性の検索をおこなった (4)。ことに、脊椎動物については、あらゆる綱または亜綱に属する代表的な種を、入手可能な限り選んで、血清の殺菌活性を測定した。その結果、抗 R a 殺菌活性は哺乳綱から魚綱にいたるほとんど全ての種に見出された (F i g. 1)。被検种群の平均力価が  $2^4$  以上であった時は、調べた限りの全ての個体に活性が検出されていた。

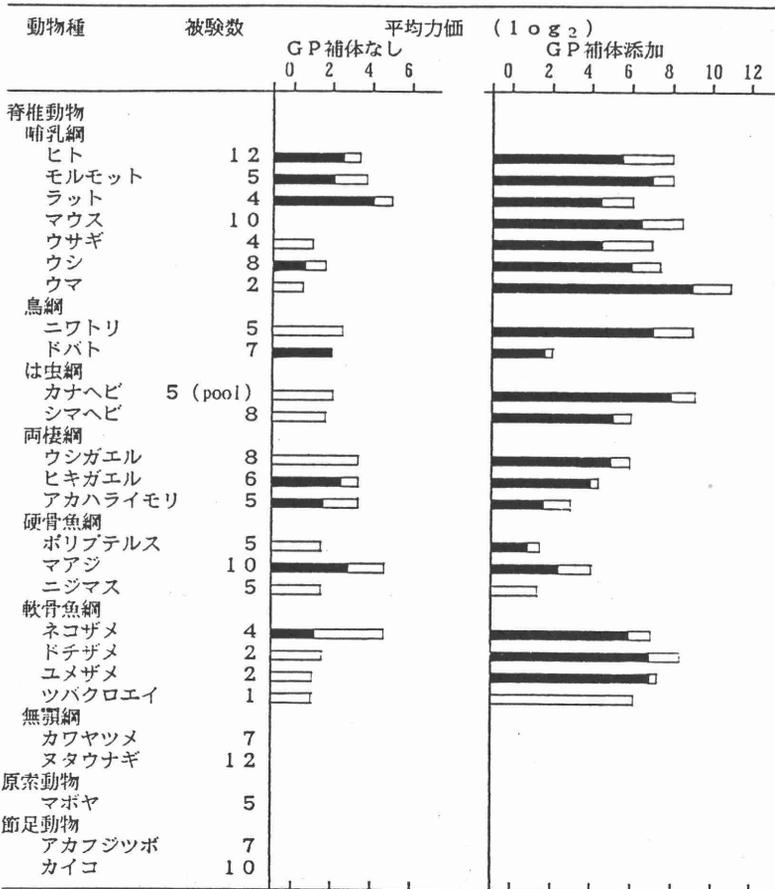


図 1. 各種動物血清の抗 R a 殺菌力価。モルモット補体 (G P C) の存在下および非存在下で、各個体の殺菌活性を測定した。■, 透明殺菌斑を作る力価。□, 不透明殺菌斑を作る力価。いずれも各個体の力価の幾何平均。

哺乳綱から軟骨魚亜綱までの抗Ra殺菌活性は、上に述べたようなRaRFの一般性質を具えているので、それらの殺菌活性の少なくとも一部はRaRFの殺菌作用によるものであると推定される。

精製したRaRFを、前述の方法でRa菌平板に滴下して、そのまま37°Cに置いて、殺菌斑は現れない。これに、適当な補体（例えばRa菌で吸収し、10倍に希釈した同種動物血清）を加えると、はじめて殺菌斑が現れる（2）。

動物によっては、少なくとも一部の補体成分がisologousでないとRaRFの殺菌作用を援助できない。例えば、両棲綱に属するウシガエル (*Rana catesbeiana*) やヒキガエル (*Bufo japonicus*) のRaRFに、哺乳綱のモルモット血清を加えても、殺菌は起こらないが、同種または近縁種であるカエルの血清の添加によって殺菌がおこった。

## 2) 補体成分の関与

### a) C1q

RaRFおよび抗Ra抗体標品を適当に希釈して、その殺菌力価をはかった。75~150  $\mu$ lの正常モルモット血清を補体として作用させると、いずれもほぼ同じ力価 ( $2^5 \sim 2^7$ ) であった。しかし、C1qDを作用させた場合には、抗Ra抗体の殺菌斑は現れなかった。C1qDにC1qを補って (19  $\mu$ g C1q/ml C1qD) 作用させると、抗体の殺菌作用が復活した。

これに対して、C1qDを作用させたときのRaRFの殺菌力価は完全な血清 (C) を作用させたときと同じであった。さらに、一定量のC1qDに種々量のC1qを補っても (Table 1)、RaRFとC1qDによる殺菌活性の増強は見られなかった。なお、RaRFの代りにC1qの階段希釈液を滴下して、CまたはC1qDを作用させて測定したが、殺菌斑は全く現れなかった (表示なし)、RaRF画分の滴下によって生じる殺菌斑は、その画分に混在しているC1qによって作られているのではないと考えられる。

これらの結果から、RaRFによって誘導されるRa菌の殺菌反応にはC1qが必要でないことが明らかである。

### b) C4

正常マウス血清のRaRF殺菌力価をC4Dモルモット血清を補体として作用させて測定すると、その力価は正常モルモット血清 (C) を作用させたときよりも低かった (Table 2)。C4D血清にC4を加えると、マウス血清の殺菌力価は回復した。マウス血清中のC4を除くために、0.2 M  $\text{NH}_4\text{OH}$  で処理すると、C4Dでは全く活性が見られず、C4D+C4で力価の回復が著明にみられた。精製したRaRF画分の力価も、C4Dでは極めて低く、C

4 + C 4 Dでは高かった。

これらの結果から、RaRFによるRa菌の殺菌反応にはC4が関与していることが明らかである。

**Table 1.** Bactericidal titer ( $\log_2$ ) of RaRF and anti-Ra antibody

	Comp( $\mu$ l)	100	0	0	0	0	0	0	0
	C1qD( $\mu$ l)	0	100	100	100	100	100	100	0
	C1q ( $\mu$ g)	0	3.8	1.9	1.0	0.5	0.2	0	2.8
Samples									
anti-Ra Ab <sup>a</sup>		6	4	5	<0	<0	<0	<0	ND
anti-Ra Ab <sup>b</sup>		6.5	7	6	<0	<0	<0	<0	<0
RaRF		5.5	9	5.5	5	6	6	6	<0

a Purified by affinity method

b Purified by ammonium sulfate precipitation (1.06 mg/ml)

ND, not done

**Table 2.** Bactericidal titer ( $\log_2$ ) of mouse sera and RaRF

	Comp( $\mu$ l)	75	0	0
	C4D ( $\mu$ l)	0	75	75
	C4 ( $\mu$ g)	0	0	125
Samples				
Untreated serum		7.5	4	6
Ammonia treated <sup>a</sup> serum		6.5	<0	5.5
RaRF		8.5	2	7

a 0.2M  $\text{NH}_4\text{OH}$ , 45min.

### 考 察

これまでの研究で、RaRFによって引き起こされるラフ型Salmonellaの殺菌反応には、C1qが不必要でC4が必要であることが示された。C1rおよびC1sが関与するかどうかは明らかでないが、溶血法などを用いる定量的な実験によって証明する必要がある。

RaRFはRa多糖と極めて類似した多糖鎖を持つR2型株にも作用して補体存在下で殺菌するが、Taylor(1983)は、ヒト血清中に、E.coli R2型株を補体依存的に殺菌する因子があることを報告している。しかし、その本態は不明である。Braudeら(1986)はRe型株に特異的に結合する血清蛋白を見つけ、こ

れが物理化学的性質の点でRaRFとよく似ていることを報告した。そして、LoosとClas(1986)は、Re菌の殺菌にはC4を菌体に結合させる血清蛋白が必要であるといっている。これらの血清因子はおそらくRaRFまたはRaRF類似の蛋白質であると推定される。

#### References

1. Ihara, I., Y. Harada, S. Ihara, and M. Kawakami: A new complement dependent bactericidal factor found in nonimmune mouse sera: specific binding to polysaccharide of Ra chemotype Salmonella. *J. Immunol.* 128:1256-1260(1982).
2. Kawakami, M., I. Ihara, A. Suzuki, and Y. Harada. Properties of a new complement dependent bactericidal factor specific for Ra chemotype Salmonella in sera of conventional and germ free mice. *J. Immunol.* 129:2198-2201(1982).
3. Ihara, I., H. Ueda, A. Suzuki, and M. Kawakami. Physicochemical properties of a new bactericidal factor, Ra-reactive factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107:1185-1190(1982).
4. Kawakami, M., I. Ihara, S. Ihara, A. Suzuki, and K. Fukui. A group of bactericidal factors conserved by vertebrates for more than 300 million years. *J. Immunol.* 132:2578-2531(1984).
5. Ihara, I. and M. Kawakami. Titration of bactericidal activity against smooth and rough strains of Salmonella which are resistant in isotonic medium. *Microbiol. Immunol.* 25:751-762(1981).
6. 川上正也. 血清の補体依存性殺菌タンパク (Camp). *日本細菌学会雑誌* 39:1-14 (1984).

## 26 血清殺菌因子 RaRF により活性化される補体成分

季 育華、初瀬洋美、猪原和泉、久下周佐、松下 操\*、

岡田秀親\*、川上正也

北里大. 医. 分子生物, \*福岡大, 医, 微生物

### 目 的

RaRFはRa型およびR2型腸内細菌に結合して、補体を活性化しこれらの菌を殺すが(2, 6)、この因子が補体のいかなる経路を活性化するかは興味ある問題である。RaRFによる殺菌反応には補体のC1qが不要で、C4成分が必要であることが示された。ここでは、より定量的な溶血実験系を用いて、RaRFによっていかなる補体経路の活性化が引き起こされるかを調べた。

### 方 法

Salmonella typhimurium Ra chemotype 株から細胞壁リポ多糖(LPS)を抽出し、精製した。LPSをアルカリ処理しヒツジ血球(E)に結合させた(ELPS)(1)。ヘモリジン感作血球は常法によって作った。C1qはKolbら(1979)の方法で、C4はBolotinら(1977)の方法で、C2はKerrら(1979)の方法で調整した。メディウムとしては、GVBのほかに、MtGVB(2.3% mannitol, 0.06M NaCl含有)を用いた。原則として、 $1.5 \times 10^8$  /mlのEAまたはELPSの200  $\mu$ lに補体成分などを加え、全量を600  $\mu$ lとしてインキュベートし、比色によって溶血を測定した。

### 結 果

#### 1) 溶血の補体依存性

種々量のRaRFを結合させたELPSに、20HD<sub>50</sub>の正常モルモット血清(C)を加えた(Fig. 1)。溶血はRaRFの量に依存して増加した(●)。LPSを結合させないEでは、RaRFによる溶血はなかった(○)。300 ngのRaRFを与えたELPSに種々量のCを作用させると、その量に依存して溶血がおこった(Fig. 2)。HD<sub>50</sub>がEA系に比べて低いのは、血球表面のepitope densityが低い( $\sim 6 \times 10^5$  /cell)ためと推定される(1)

また、CにRaRF(10~640ng)を加えてインキュベートしても、CのEA溶血活性は変化しなかった。

ELPSにRaRFを加えるときに、RaLPSの糖鎖の非還元末端を占めるN-acetyl-D-glucosamine および L-glycero-D-mannoheptose 誘導体(>8mM)

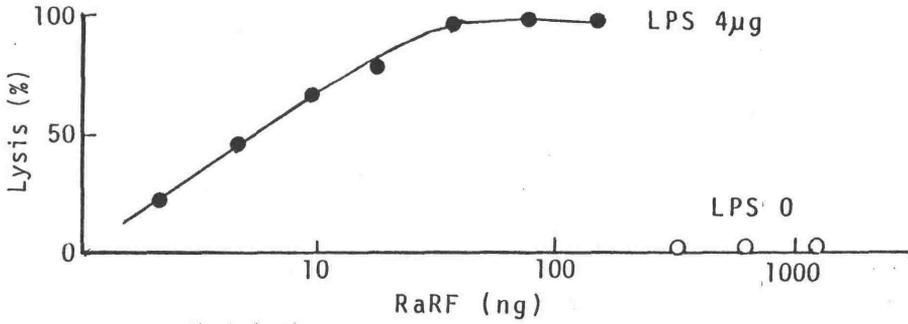


Figure 1. Dose dependent lysis of ELPS-RaRF (●) or E + RaRF (○).

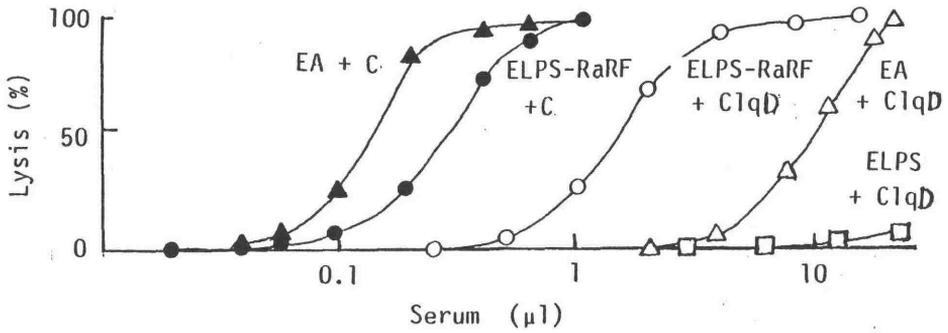


Figure 2. Hemolysis of ELPS-RaRF (●, ○), ELPS (□) and EA (▲, △) with untreated (solid) and Clq deprived (open) guinea pig sera.

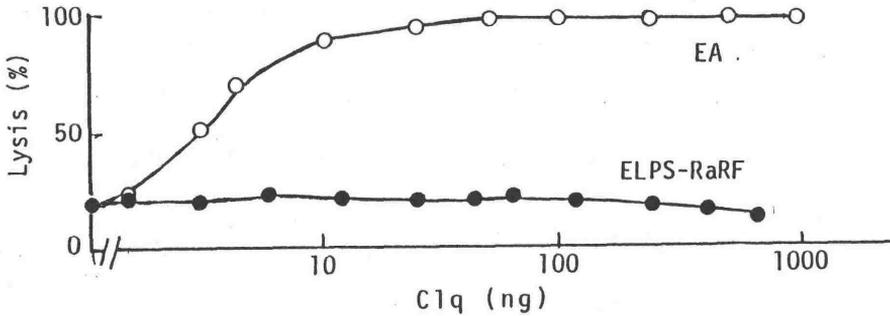


Figure 3. Effect of Clq on the lysis with ELPS-RaRF (●) and EA (○).

が存在するとRaRFの結合が特異的に阻害され、溶血は起こらなくなった(1)。

これらの結果および既報の事実から、RaRFはRaLPSの糖鎖に特異結合した時にだけ補体を活性化することを示している。

## 2) C1qの非関与

EAまたはELPS・RaRFに、CまたはC1q除去モルモット血清(C1qD)を加えて、それらの溶血を測定した。比較のために、Table 1にHD<sub>50</sub>を示した。これより、ELPS・RaRF系ではEA系に比較してC1qDに感受性が高いことがわかる。

ELPSFの溶血系では、LPSによって第2経路も活性化されていると推定される。しかしRaRFを結合させていないELPS(□)はC1qDによって殆ど溶血しなかった。このことは、ELPS・RaRFとC1qDによる溶血には、LPSにより引き起こされる第2経路活性化が殆ど貢献していないと考えられる。

Table 1. C1qD感受性の比較

感作血球	(A)	(B)	(B) / (A)
	CのHD <sub>50</sub> ( $\mu$ l)	C1qDのHD <sub>50</sub> ( $\mu$ l)	
EA	0.14	10.0	71.4
ELPS・RaRF	0.31	1.5	4.8

EAに種々量のC1qを加え、これに20%溶血量(5 $\mu$ l)のC1qDを加えたところ、Fig. 3に示すように、C1q添加による溶血の増加が明瞭に見られた(○)。EAの代わりにELPSに抗Ra抗体を感作した血球(ELPS・Ab)を使用したときも、C1q添加による溶血増加が起こった(表示なし)。しかし、ELPS・RaRFに種々量のC1qと20%溶血量(1 $\mu$ l)のC1qDを加えた時は、C1qによる溶血増加は全く見られなかった(●)。

この系におけるC1qDの20%溶血量(1 $\mu$ l)の中のC1q以外の成分が不足している可能性もあるが、Fig. 2の結果を合わせて考慮すると、ELPS・RaRFの溶血には、C1qが関与しないと考えられる。

### 3) C4の関与

ELPS・RaRFまたはEAに、C4欠如系モルモット血清(C4D)を20 $\mu$ lまで加えても溶血はほとんど起こらなかった(○, △)(Fig. 4)。しかし、2 $\mu$ lのC4DにC4を加えると、ELPS・RaRFの溶血は、EAの溶血と同様に、C4量に依存して起こることが観察された(Fig. 5)(●, ▲)。

さらにELPSに種々量のRaRFを加える実験によって、ELPS・RaRFの溶血はRaRF量に依存しており、100ED<sub>50</sub>のC4および300ngのRaRFで90%以上の溶血が起こることがわかった。ELPS・RaRFにC4を加えた後、C2とC・EDTAを添加したときも、同程度の溶血がおこった。

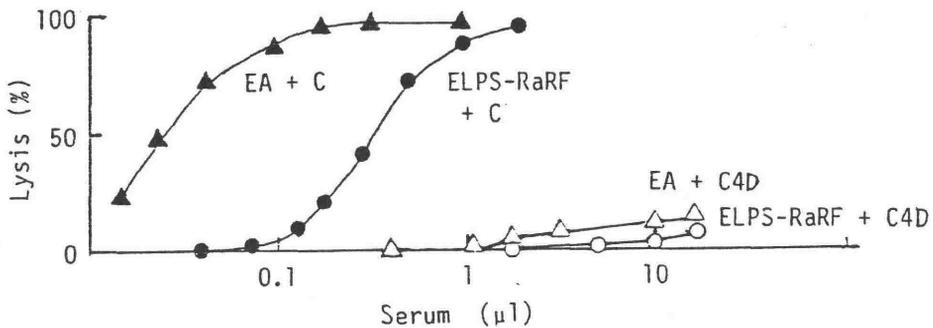


Figure 4. Hemolysis of ELPS-RaRF (●, ○) and EA (▲, △) with normal (solid) and C4 deficient (open) guinea pig sera. (in low ionic strength MtGVB)

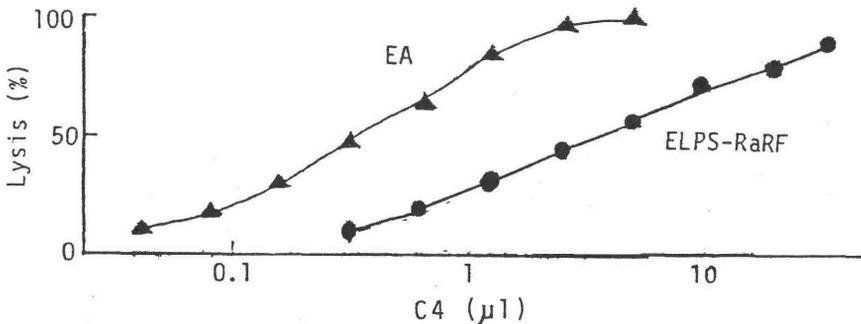


Figure 5. Effect of C4 on the lysis with ELPS-RaRF(●) and EA(▲). (in low ionic strength MtGVB)

これらのことから、R a R Fによって引き起こされる補体の活性化反応にはC 4が関与していることが明らかである。

#### 考 察

従来および今回の研究で、R a R Fは、R a多糖体鎖非還元末端のN-acetyl-D-glucosamineおよびL-glycero-D-mannoheptoseを含む決定基に、特異的に結合した時に補体を活性化することが証明された。また決定基に結合したR a R Fは、C 1 q亜成分の関与なしに、C 4以下の古典経路初期因子を活性化することが明らかになった。

R a R Fが直接作用する補体成分はまだ明らかではない。この活性化反応におけるC 1 rとC 1 sの関与の有無について検討中である。

Reference は前報に同じ。

実験用小動物の補体活性  
古典的経路の活性における種特異性

鈴木映子 野口 章 原田 卓

(国立予防衛生研究所 獣疫部)

目的. モルモットは補体活性化機構の解明に大きく貢献した. そのモルモットの補体活性と他種実験動物補体系の比較を行う. 今回はマウス, ラット, ハムスター, スナネズミ, チンチラにおける古典的経路の補体活性化を調べた.

材料と方法. 動物: 1) 近交系マウス (DD, CBA, DBA, C3H/He, BALB/c, C57BL/6, A) 30匹と非近交系マウス (ICR) 3匹, 2) 近交系ラット (WKAH/HKm, DA, F344/N, WBN, W/m) 11匹, 3) シリアンハムスター6匹, 4) スナネズミ4匹, 5) チンチラ5匹, 6) 非近交系 モルモット (Hartley) 12匹とC4欠損モルモット1匹を準備した. これらの動物は3ヶ月-1年齢であった (マウスは一部のみ4週齢).

補体 (血清): 血液は心臓穿刺により採取し, 室温で90分間凝固後, 低温で遠心 (3000rpm, 15分) してその上清 (血清) を個体別に  $-70^{\circ}\text{C}$  に保存した.

CH50活性: 血清中の感作ヒツジ赤血球 (EA) に対する溶血活性 (CH50/ml) を測定した (Mayer法; 岡田秀親, 臨床免疫, 第5巻, 第9号別冊, 1973). 被検血清1mlとEA ( $2 \times 10^8$ /ml) 0.5mlの混合液を  $37^{\circ}\text{C}$  恒温槽中で1時間反応させた. 反応終了後, 遠心 (2000rpm, 10分) し, 上清を別の試験管に取り, 再蒸留水6.5mlを加えて分光光度計でOD414を測定した. 溶解度  $y$  は次式により求めた. CH50/ml値は得られた値の1/5量で表わした.

$$y = \frac{[\text{各被検血清稀釈の OD}_{414}] - [\text{Blank control の OD}_{414}]}{[\text{Complete lysis control の OD}_{414}]}$$

$$\frac{\text{OD}_{414}}{-[\text{Blank control の OD}_{414}]}$$

C(142)H50活性: 被検血清1mlとEA ( $2 \times 10^8$ /ml) 0.5mlの混合液を  $30^{\circ}\text{C}$ , 15分間反応後, EDTA-GVBの0.5mlを加え, さらに1/12.5GPC-EDTAの5mlを加え,  $37^{\circ}\text{C}$ , 60分間反応させた. 反応後は, CH50活性の操作と同様に行った.

結果: マウス, ラット, ハムスター, スナネズミ, チンチラ血清中の古典的経路におけるC1-9の全補体活性CH50 (以下A) と前半の補体活性C142H50 (以下B) を調べた. また対照補体活性として正常モルモットとC4Dモルモットの補体活性を調べた. その結果を下記表に示した.

## Complement Actiivty in Classical Pathway

Species	Complement Activity			
	No. Animal	CH <sub>50</sub> /ml	No. Animal	C <sub>142</sub> H <sub>50</sub> /ml
Mouse	33	—*	7	84- $\geq$ 400
Rat	11	34- 128	8	60- 218
Hamster	6	34- 76	5	84- 160
Mongolian Gerbil	4	0- 4	2	16- 90
Chinchilla	5	-	2	-
Guinea Pig	12	250- 350	0	nt
GP-C <sub>4</sub> D	1	7	1	-

\*, <2 CH<sub>50</sub>/ml, nt, Not tested

マウスはA活性を全く示さなかった。一方、B活性は84-400 CH<sub>50</sub>/ml 値の範囲で全てのマウスに検出された。その反応は低血清希釈で阻止され、高血清希釈で溶血活性を示した。系統間でB活性差が見られた。

ラットはA活性に於て、34-128 CH<sub>50</sub>/ml, B活性に於て60-218のC<sub>142</sub>H<sub>50</sub>/mlを示した。

スナネズミはA活性は殆どみられない。B活性は16-90のC<sub>142</sub>H<sub>50</sub>の範囲で全てに検出された。

チンチラはAB両活性を示さなかった。

考察：実験用小動物のマウス、ラット、ハムスター、スナネズミとチンチラにおけるCH<sub>50</sub>活性とC(142)H<sub>50</sub>活性を調べた結果、モルモットの平均CH<sub>50</sub>値(300 CH<sub>50</sub>/ml)に比較して、ラットはその値の1/4, ハムスターは1/6, スナネズミは1/50以下の活性を示したが、C(142)H<sub>50</sub>活性も同様に示した。マウスは何れの系統もCH<sub>50</sub>活性を全く示さず、一方、C(142)H<sub>50</sub>活性は高い傾向を示した。この事実はマウスにおけるC3-9活性の問題点を指摘した。C4欠損モルモットは当然ながらCH<sub>50</sub>とC(142)の両活性を示さなかったがチンチラもまた両活性を示さなかった。実験用小動物の補体活性化における種特異性が見られた。

橋本平嗣 米増國雄 佐々木隆子 塚尾典明  
 檜葉周三  
 奈良医大 細菌学

### [目的]

補体成分の中で、C2、C4、C3、C5、C6、C7、C8、Factor B、Factor Dには、遺伝的多様性が知られている。このうち、C2、C4、Factor Bをコードする遺伝子は、ヒト、マウスとも MHC上にあることが報告されている。本研究は、補体活性化の古典経路始動の必須成分である補体第一成分の垂成分 C1qに、遺伝的多様性が存在するかどうかを検討するために、純系が容易に入手出来るマウスを使用して、血清 C1qの定量を行うと同時に、ペプチド鎖構造に関しても解析を行った。これらの解析を通じて、マウス各純系間で C1qの理化学的性状に差はみられず、量的な差のみが認められたので、Kohlerらによりヒトで報告されている様に、この C1qの量差がマウス各純系間の IgGの差と相関するののかについても検討を加えた。

### [方法]

#### (1) マウス

大阪大学微生物病研究所より分与され、本研究室で系統維持しているCF-1、Swiss Albino/NIH、A/He、AKR/N、BALB/c、CBA、C3H/He、C57BL/6J、C57BL/10Sn、DBA/2、NZB、NZWの12系統並びにシオノギ製薬より購入したBALB/c-nu 各 8週齢の雌雄 総数 889匹のマウスより採血した。血液は、37°C30分、さらに室温で30分静置し、遠心分離により血清を得、分離後すぐに -70°Cに保存した。

#### (2) C1qと IgGの定量

抗マウスC1q 抗血清は、既報の方法<sup>1)</sup>で高度の純化したマウスC1q でウサギを免疫して作成し、抗マウスIgG 抗血清は Miles Laboratories, Inc. (Elkhart, IN, U.S.A.) より購入した。これらの抗血清を用い、一元放射免疫拡散法(SRID)により定量した。

#### (3) C1qの溶血活性

感作ヒツジ赤血球(EA)と C1qでEAC1q4を作成後、ヒト C1r、C1sを加えEAC14 とし洗浄後モルモットC2及びC-EDTAを逐次反応させ遠沈後、上清の吸光度を413nm で測定して算定した。

#### (4) C1qを構成するペプチド鎖の解析

抗マウス C1q抗血清より、硫酸沈澱、DEAE-セルロースを用いて IgG分画を得た。この IgGを等量域になるように各系統のマウス血清に加え、37°C 60分加温後、4°Cに4日間静置して得られた沈降物を、0.3M NaCl/10mM EDTA (pH 7.4) にて洗浄し、凍結乾燥した。こうして得られた沈降物を還元アルキル化後、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)により分析した。

#### (5)統計学的処理

データの解析は、Student's t-testにより行い、相関性の有無は、正規相関及び Kendallの順位相関により求めた。

### [結果]

889匹のマウス(雄457匹、雌432匹)の血清 C1q量及びその溶血活性ならびに IgG量を測定し、系統ごとの平均値をTable 1に示した。C1qについては蛋白量とその活性とも、A/He、NZWの雄で有意に上昇し、Swiss Albino/NIH、A/Heの雌、C57BL/10Snの雌雄で顕著な高値が認められた。一方、CF-1の雌とBALB/cでは顕著に、特にBALB/c-nu (nude)では、全体の平均値の17%にまでC1qレベルは低下していた。C1qの比活性は、測定したすべてのマウスでほぼ同値で、約  $2 \times 10^{13}$  effective molecules/mgであった。IgG量は、Swiss Albino/NIHとC57BL/10Snの雌、NZB、で顕著に増加しており、その値は全体の平均値の約150%に相当していた。また、CF-1の雌、CBAの雄では、IgG量の低下が認められ、特にBALB/cとBALB/c-nu(nude)では、各々全体の平均値の24%と7%まで低下していた。

各系統から雄10匹、雌10匹ずつを無作為抽出し、各々の C1qと IgG量をプロットすると、図1のようになった。全体としては順位相関のみが認められたが、IgG量が平均値より低いところでは、IgG量と C1q量の間、強い正規相関が認められた。

C1q分子を構成するペプチド鎖は、SDS-PAGEで解析した結果、各系統間で差は認められなかった。

### [考察]

血清中の C1q量および IgG量には、マウス各系統間で差が認められたが、C1qの比活性は、ほぼ同値であり、C1qを構成するペプチド鎖の分子量は、すべての系統で同じであった。以上のことから、マウス C1qには、遺伝的多様性は存在しないと考えられた。何故、系統間でC1q並びにIgGレベルに差があるのかは、現在のところ、不明である。

[文献]

1) Yonemasu, K. and Sasaki, T.(1981) :Biochem. J. 193, 621-629

Table I. Mean serum levels of Clq and IgG in mice

Strain	Sex	Number	Clq		IgG (mg/ml)
			Protein amounts ( $\mu\text{g/ml}$ )	Haemolytic activity (effective molecules $\times 10^{-12}/\text{ml}$ )	
CF-1	male	38	121.5 $\pm$ 48.0	2.46 $\pm$ 0.98	9.24 $\pm$ 3.07
	female	40	92.7 $\pm$ 33.0***	1.86 $\pm$ 0.67***	7.16 $\pm$ 1.86*
Swiss Albino/NIH	male	67	134.2 $\pm$ 55.9	2.81 $\pm$ 1.07	11.17 $\pm$ 4.10
	female	66	153.8 $\pm$ 46.3***	3.12 $\pm$ 0.91***	20.24 $\pm$ 4.24**
A/He	male	54	151.4 $\pm$ 19.9**	3.08 $\pm$ 0.41***	17.72 $\pm$ 3.11
	female	22	157.0 $\pm$ 30.8***	3.15 $\pm$ 0.63***	14.60 $\pm$ 4.10
AKR/N	male	22	134.5 $\pm$ 31.9*	2.75 $\pm$ 0.64	15.20 $\pm$ 3.06
	female	16	138.5 $\pm$ 47.0*	2.80 $\pm$ 1.01*	14.68 $\pm$ 3.45
BALB/c	male	27	81.6 $\pm$ 24.2***	1.63 $\pm$ 0.45***	3.21 $\pm$ 0.31***
	female	49	75.6 $\pm$ 26.9***	1.53 $\pm$ 0.48***	3.09 $\pm$ 0.32***
BALB/c-nu(nude)	male	10	22.4 $\pm$ 8.1***	0.45 $\pm$ 0.16***	0.94 $\pm$ 0.28***
	female	10	20.1 $\pm$ 7.9***	0.44 $\pm$ 0.16***	0.93 $\pm$ 0.29***
CBA	male	57	85.2 $\pm$ 29.8***	1.71 $\pm$ 0.56***	6.95 $\pm$ 1.26**
	female	39	119.7 $\pm$ 43.2	2.43 $\pm$ 0.51	13.43 $\pm$ 2.58
C3H/He	male	33	116.6 $\pm$ 14.7	2.35 $\pm$ 0.25	11.27 $\pm$ 3.77
	female	30	122.6 $\pm$ 20.4	2.48 $\pm$ 0.40	12.87 $\pm$ 4.26
C57BL/6J	male	42	106.6 $\pm$ 34.5*	2.15 $\pm$ 0.79	16.57 $\pm$ 2.70
	female	59	113.1 $\pm$ 38.9	2.27 $\pm$ 0.80	17.28 $\pm$ 6.27
C57BL/10Sa	male	29	159.7 $\pm$ 32.5***	3.25 $\pm$ 0.65***	18.55 $\pm$ 4.02*
	female	29	176.4 $\pm$ 32.1***	3.48 $\pm$ 0.62***	23.04 $\pm$ 3.27**
DBA/2	male	42	130.0 $\pm$ 23.3	2.63 $\pm$ 0.51	13.33 $\pm$ 1.53
	female	39	122.7 $\pm$ 24.9	2.42 $\pm$ 0.60	13.17 $\pm$ 1.59
NZB	male	26	110.9 $\pm$ 32.4	2.25 $\pm$ 0.73	14.69 $\pm$ 5.59
	female	19	113.2 $\pm$ 26.2	2.35 $\pm$ 0.61	20.11 $\pm$ 2.77*
NZW	male	10	148.3 $\pm$ 20.5**	3.30 $\pm$ 0.51***	23.25 $\pm$ 3.92**
	female	14	145.3 $\pm$ 32.5*	3.01 $\pm$ 0.70**	23.04 $\pm$ 4.15**
Average		389	120.8 $\pm$ 6.0	2.44 $\pm$ 0.16	13.24 $\pm$ 3.25

Values are expressed as Mean  $\pm$  One standard deviation(SD).

Significantly deviated from the total average with  $0.01 < P < 0.05(*)$ ,  $0.001 < P < 0.01(**)$

and with  $P < 0.001(***)$ .

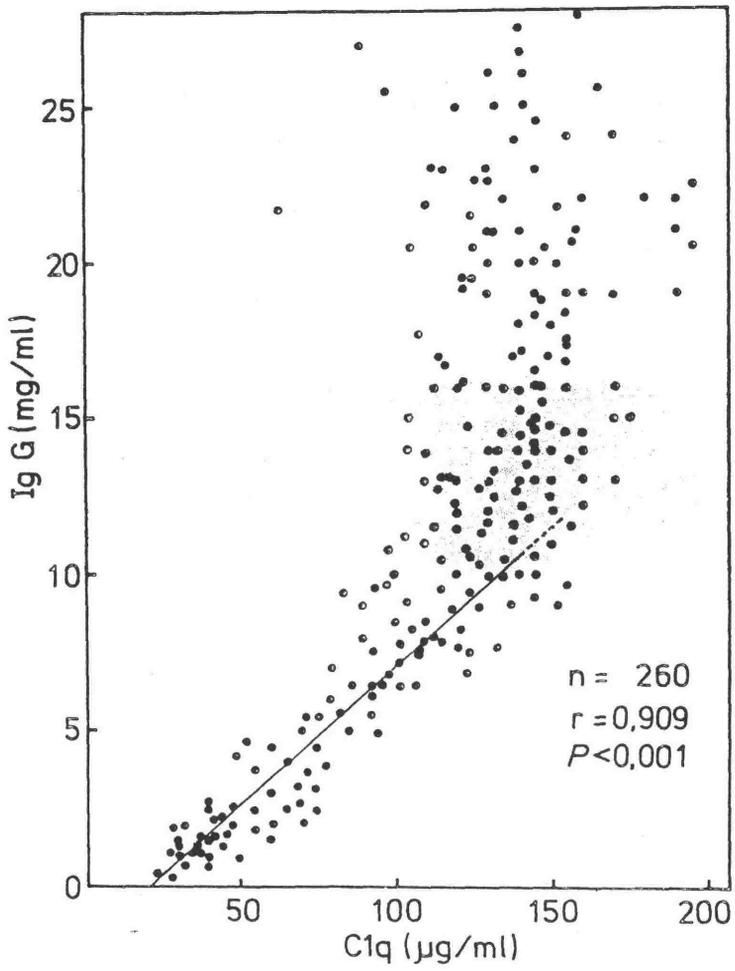


図1. 血清C1q量とIgG量の関係

出口雅子、竹村周平、上田正博、柳田国雄、福田 互、岡本雅之  
小野寺秀記、杉野 成、近藤元治 (京都府立医科大学第一内科)

### 【目的】

補体活性化経路にはclassical pathwayとalternative pathwayが知られているが、第3の経路として、活性化されたC1がclassical pathwayの成分であるC4とC2を介さず、直接alternative pathwayを活性化するC1 bypass pathwayがMayらにより報告されている<sup>1</sup>。さらに最近、ヒトIgMにより感作された寄生虫、ランブル鞭毛虫が①C2欠損ヒト血清ならびにC4欠損モルモット血清により溶解が生じ、②C2欠損血清からC1を除くことにより、その溶解活性がなくなり、③C1q, C1r, C1sのC1の総てのサブコンポーネントがC2欠損血清の溶解活性に必要であり、さらに④C2欠損血清の溶解活性は、血清からB因子を除くことにより失活することが知られ<sup>2</sup>、C1 bypass pathwayにおける、C1q, C1r, C1sとB因子の関与が推測されている。

今回は、C1のalternative pathwayに与える影響を知るため、精製したヒトC1sのC4欠損モルモット血清(C4DGPS)におけるalternative pathway活性への作用を検討した。

### 【方法】

C4欠損モルモットより心臓採血し、血清を得た。ヒトC1sは、Cooperらの方法<sup>3</sup>にてヒト血清より精製した。SDS-PAGEにてC1sは90%以上の純度であり、その約50%が活性型C1s、50%がnative C1sであった。また精製C1sはOuchterlony法でC1s以外の補体系蛋白とは反応せず、さらにC4溶血活性は全く認められなかった。

ヤギ抗ヒトC1s(IgG)はAtlantic Antibodyより購入した。ウサギ赤血球(RaRBC)は、ethylenediamine tetraacetate (EDTA) 採血にて得られた全血を、生理食塩水で洗浄後、0.03M ethyleneglycol tetraacetate (EGTA)、0.1%ゼラチン、0.15M NaCl含有ペロナル緩衝液、pH 7.5(EGTA-GVB)でさらに洗浄し、 $2 \times 10^9$ /mlに調整した。

#### 1) C4DGPSによるRaRBC溶血に与えるC1sの影響

EGTA-GVBで1/2倍希釈したC4DGPS 0.6mlに各種濃度のC1s および、60 $\mu$ l ( $2 \times 10^9$ /ml)のウサギ赤血球を加え、37°Cで反応後、0, 1, 2, 3, 4, 5分後に100 $\mu$ lの検体を取り、冷0.01M EDTA-GVB 3.4mlの入った試験管に加え、3000rpm, 5分間遠心し、上清中の血色素を吸光度412 nmで測定した。

#### 2) 抗C1s血清によるC1sの作用に対する阻止効果

EGTA-GVBにて1/2 倍希釈したC4DGPSに①buffer ②C1s 17 $\mu$ g ③C1s 17 $\mu$ g+抗C1s 360 $\mu$ g ④抗C1s 360 $\mu$ g を各々加えた後、60 $\mu$ l ( $2 \times 10^9$ /ml)のRaRBC を加え、37 $^{\circ}$ Cで反応させ、0,1,2,3,4,5分後各々より100 $\mu$ l をとり、1)と同様に溶血を測定した。

### 3)各血清希釈におけるC4DGPSのRaRBC 溶血におよぼすC1s の影響

EGTA-GVBにて 1/4ならびに 1/8に希釈したC4DGPS 0.8mlに17 $\mu$ gのC1s またはbufferを加えた後、80 $\mu$ l ( $2 \times 10^9$ /ml)のRaRBC を加え、37 $^{\circ}$ Cで反応させ、0, 2.5, 5, 10, 20, 30, 40分後に各々より100 $\mu$ l を取り1)と同様に溶血を測定した。

### 4)C4DGPSにおよぼすC1sの影響

EGTA-GVBで1/2 倍希釈したC4DGPS 0.4mlにC1s 34 $\mu$ gまたは対照としてbufferを加え37 $^{\circ}$ C30反応させた後、各々のACH50 を測定した。

## 【 結 果 】

### 1)C4DGPSによるRaRBC 溶血におよぼすC1s の影響

1/2 倍希釈したC4DGPSにおいて、37 $^{\circ}$ C 2分反応後の溶血率は、対照15% に比べ、34 $\mu$ gのC1s を加えた場合70%、17 $\mu$ gで45%、8 $\mu$ gで17% と、濃度依存性に溶血率の増加が認められた(Fig.1)。

さらに、1/4倍希釈したC4DGPSにおいても、反応後 5分で、対照38% に対し、C1s 34 $\mu$ gを加えると52% と増加したが、40分後の溶血率は60% と両者に差は認めなかった。さらに 1/8倍希釈したC4DGPSにおいても、反応10分後の溶血率は対照4%に対し、34 $\mu$ gのC1s を加えると11% と増加したが、40分後の溶血率は15% と両者に差は認めなかった(Fig.2)。

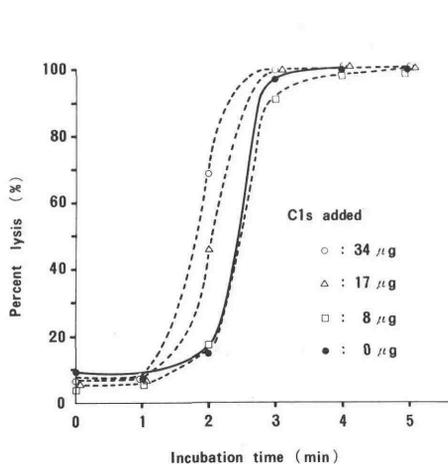


Fig. 1

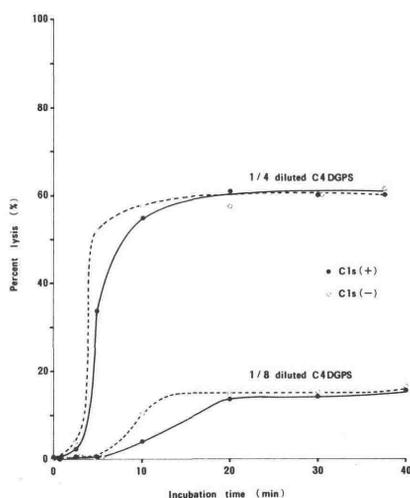


Fig. 2

## 2)抗C1s 血清によるC1s 作用の阻止効果

1/2 倍希釈したC4DGPSにおいて、反応2 分後の溶血率は、対照12% に対し17 $\mu$ g C1sを加えた場合46%、17 $\mu$ gC1s ならびに抗ヒトC1s 血清を加えたものでは23% で、C1s による溶血率の増加は抗血清で抑制された。抗ヒトC1s のみを加えたものは15% で、対照と差を認めなかった(Fig.3)。

## 3)ACH50 におよぼすC1s の影響

C4DGPSのACH50 は、C1s を34 $\mu$ g加えると12u/mlと、対照の10u/mlに比し約20% の増加をしめした。

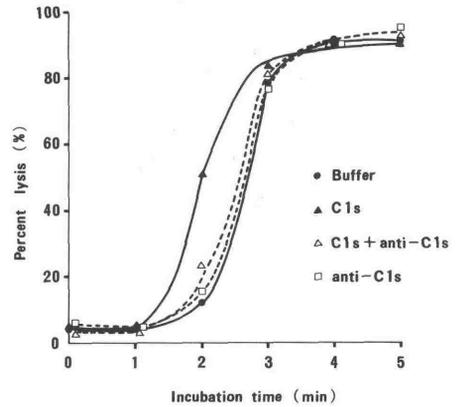


Fig. 3

## 【考案】

活性型C1s のalternative pathway におよぼす影響をC4欠損モルモット血清において検討した。1/2 倍希釈のC4DGPSにおいて、C1s はその投与量に比例して、RaRBC の溶血速度を速めた。C1s によるC4DGPSにおけるRaRBC の加速作用が、精製した C1sの中に含まれる微量の他の因子によるものである可能性を除外するため、その作用が C1sに対する特異抗体で抑制されるか否かを検討した。C1s による加速作用は、抗ヒトC1s を加えることにより抑制され、他の因子によるものではないと考えられた。さらに C1sは 1/4倍ならびに 1/8倍希釈したC4DGPSにおいても、RaRBC の溶血反応の速度を速める作用を示した(Fig.2)。しかしプラトーに達した時の溶血率は、1/4倍希釈C4DGPSでは約60%、1/8倍希釈C4DGPSでは約15% と、C1s を加えても増加を認めなかった。しかしながら、あらかじめC4DGPSと C1sを反応させておくと、C1s 34 $\mu$ gを加えたものでは、対照に比し、約20% のACH50 の増加が認められた。これらの事実より、C1s がC4 DGPSにおいてalternative pathway の反応を単に促進するだけでなく、RaRBCの溶血を量的にも増加させる可能性があると考えられる。

C1s がいかなる機序でC4DGPSにおいて、RaRBC の溶血反応を亢進するのかわからないが、classical pathway の活性化によって生じる C1sが、C4の関与なしにalternative pathway の反応を促進させる事実は興味深く、C4欠損症ならびにC2欠損症が、他の補体成分欠損症に比べ、比較的感染症の罹患率が低いことを考えると、この活性化経路の重要性がうかがわれる。

## 【文献】

1) J.E.May and M.M.Frank : A new complement-mediated cytolytic

mechanism —the C1-bypass activation pathway. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 649, 1973

- 2) M. Deguchi, F.D. Gillin and I. Gigli : Mechanism of killing of *Giardia lamblia* trophozoites by complement. J. Clin. Invest. (in press)
- 3) G. Valet and N.R. Cooper : Isolation and characterization of the proenzyme form of the C1s subunit of the first complement component. J. Immunol. 112, 339, 1974

## 30 モノクローナル抗体感作赤血球 による血清補体価測定

廣島幸<sup>1</sup>・安田玲子<sup>1</sup>・宮川周士<sup>2</sup>・松本美佐子<sup>3</sup>・北村肇<sup>3</sup>

<sup>1</sup>石津製薬

<sup>2</sup>大阪大学第一外科

<sup>3</sup>大阪府立成人病センター

### 《はじめに》

ヒツジ赤血球 (E) に対するモノクローナル溶血素 (Am) を作製し、それを用いて感作赤血球 (EAm) を作り、血清補体価を測定したところ、従来のポリクローナル溶血素 (Ac) による感作赤血球 (EAc) とは異なり、種々の興味あるデータを得たので報告する。

### 《方法》

1) Am の作製 : ホモゲナイズしたモルモットの腎臓をラットに免疫し、11日目に追加免疫をした。更に3日後にその脾細胞と骨髓腫細胞 NS-1 とを細胞融合することによりハイブリドーマを得た。その培養上清中の溶血素価の測定 および ELISA 法によりスクリーニングを行い、2種類の陽性クローンを得た。クローニングは限界希釈法により行った。今回の各実験には、これらの陽性クローンを培養増殖させその培養上清をプールして用いた。なお、これらの産生する抗体は2種類共に IgM であった。

2) EAm および EAc の作製 : 0.01M EDTA-GVB に浮遊させた E ( $1.0 \times 10^9$  /ml) と同緩衝液で希釈した Am あるいは Ac (Cordis社製抗ヒツジ赤血球stroma 抗体 IgM) とを等量混合して37°Cで10分間反応させ、0°C、15分放置した後、GVB で2回洗浄して、それぞれ EAm あるいは EAc を作製した。一部の実験には当研究室で作製した Ac による EAc も使用した。保存には GGVB に浮遊させ0°Cに置いた。なお、EAc では Ac の濃度を高くすると凝集するものがあったが、EAm では Am の濃度を高くしても凝集しなかった。

3) 補体価 (CH50) 測定法 : 血清補体価はマイクロタイター法により測定した。GVB で連続 3/2 倍希釈した検体 25 $\mu$ l、GVB 50 $\mu$ l、および GVB に浮遊させた EA ( $1.5 \times 10^8$  /ml) 25 $\mu$ l とを 37°Cで1時間反応させた後の吸

光度を測定した。通常（試験管法）の補体価測定と同様に、各穴の吸光度より  $y/1-y$  を計算し、両対数グラフの縦軸に血清量を横軸に  $y/1-y$  をとってプロットし、各点を結び、50%溶血を示す血清希釈倍数を求め、その血清の補体価 ( $u/ml$ ) とした。

4) フォルスマン (F) 様抗体価測定法 : ヒト血清中の F 様抗体価は、0.01M EDTA-GVB に浮遊させた未感作の E ( $1.5 \times 10^8/ml$ )  $25\mu l$  と同緩衝液で連続 3/2 倍希釈した検体  $25\mu l$  とを  $37^\circ C$  で15分間反応させ洗浄した後、GVB で 120 倍希釈したモルモット血清  $100\mu l$  を加えて  $37^\circ C$  で1時間反応後の溶血をみた。この方法で50%溶血を示す血清希釈倍数をその血清の F 様抗体価 ( $u/ml$ ) とした。

5) 吸収血清 (abs-NHS) の作製 : 正常ヒト・プール血清 (NHS) 中の異好抗体を EDTA 中で E と反応させることにより除き、abs-NHS とした。

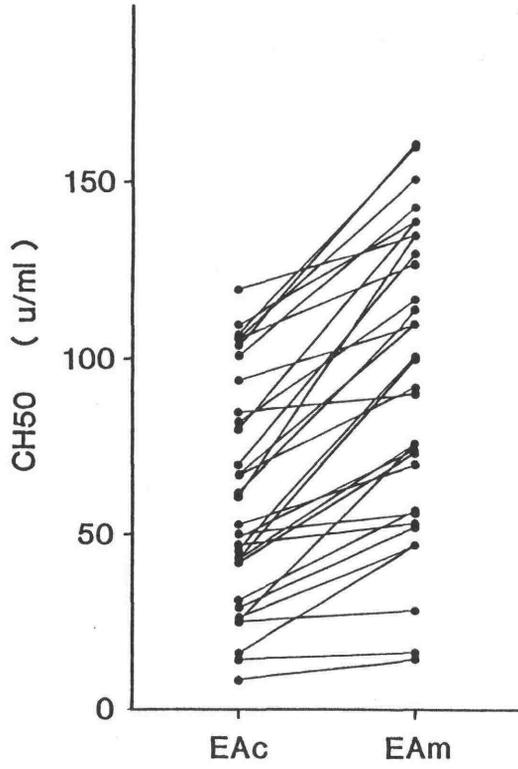
## 《結果》

1) EAm および EAc による NHS の補体価測定 : グラフ上の血清量と  $y/1-y$  値の各プロットは EAm の場合も EAc の場合も直線にのった。なお、 $1/n$  は EAm で 0.304、EAc で 0.268、補体価は EAm で  $125.3 u/ml$ 、EAc で  $117.8 u/ml$  であった。

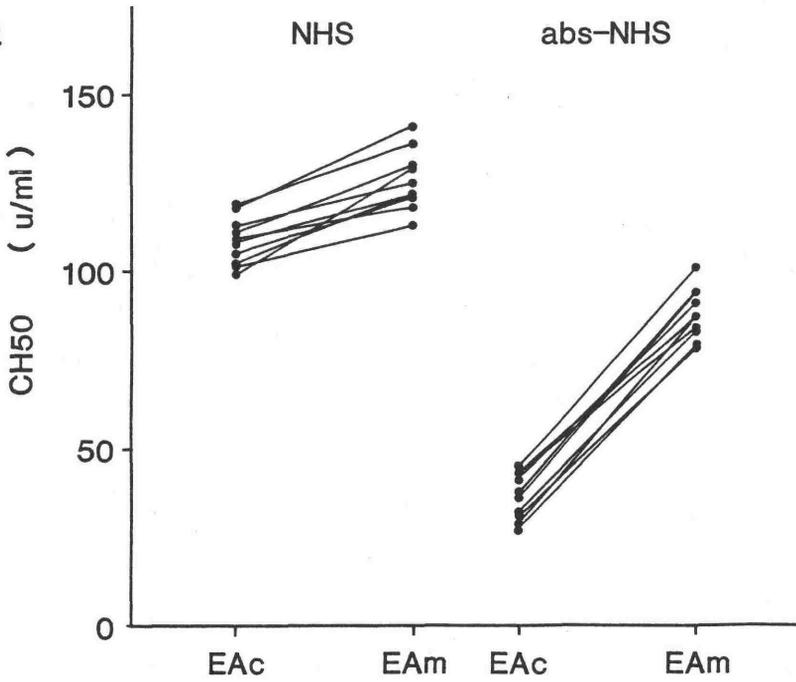
2) EAm および EAc による患者血清の補体価測定 : EAm あるいは EAc を使って各種患者血清32検体の補体価を測定した。図1に示すように、いずれの検体の場合も補体価は EAc よりも EAm の方が高値であった。ただし、その差は検体により大きく異なった。また、これらの血清補体価測定時の  $1/n$  の平均  $\pm$  S.D. は、EAm で  $0.291 \pm 0.0228$ 、EAc で  $0.273 \pm 0.0708$  であり、そのバラツキは有意に EAm の方が小さかった ( $p < 0.01$ )。

3) 個々のヒツジから調製した E による補体価 : 10頭のヒツジから別々にとった E でそれぞれ10種類の EAm および EAc を作製し、それらを用いて NHS と abs-NHS の補体価を測定した (図2)。NHS の補体価は、いずれのヒツジの E でも EAc による値よりも EAm による値の方が高値であった。ただし、E による測定値のバラツキには、EAc (S.D. = 6.37%) EAm (S.D. = 6.70%) 間で差がなかった。いっぽう、abs-NHS では EAc による補体価は EAm による値に比してはるかに低値であり、バラツキに関しても、EAm (S.D. = 8.26%) より EAc (S.D. = 17.63%) の方がバラツキが大きかった ( $p < 0.01$ )。

☒ 1



☒ 2



以上のことは EAc による補体価は検体中の抗ヒツジ赤血球抗体 (F 様抗体) の量により大きく影響をうける可能性があることを示唆する。そこで次に F 様抗体濃度の異なる血清について、EAm と EAc を用いて補体価測定を試みた。

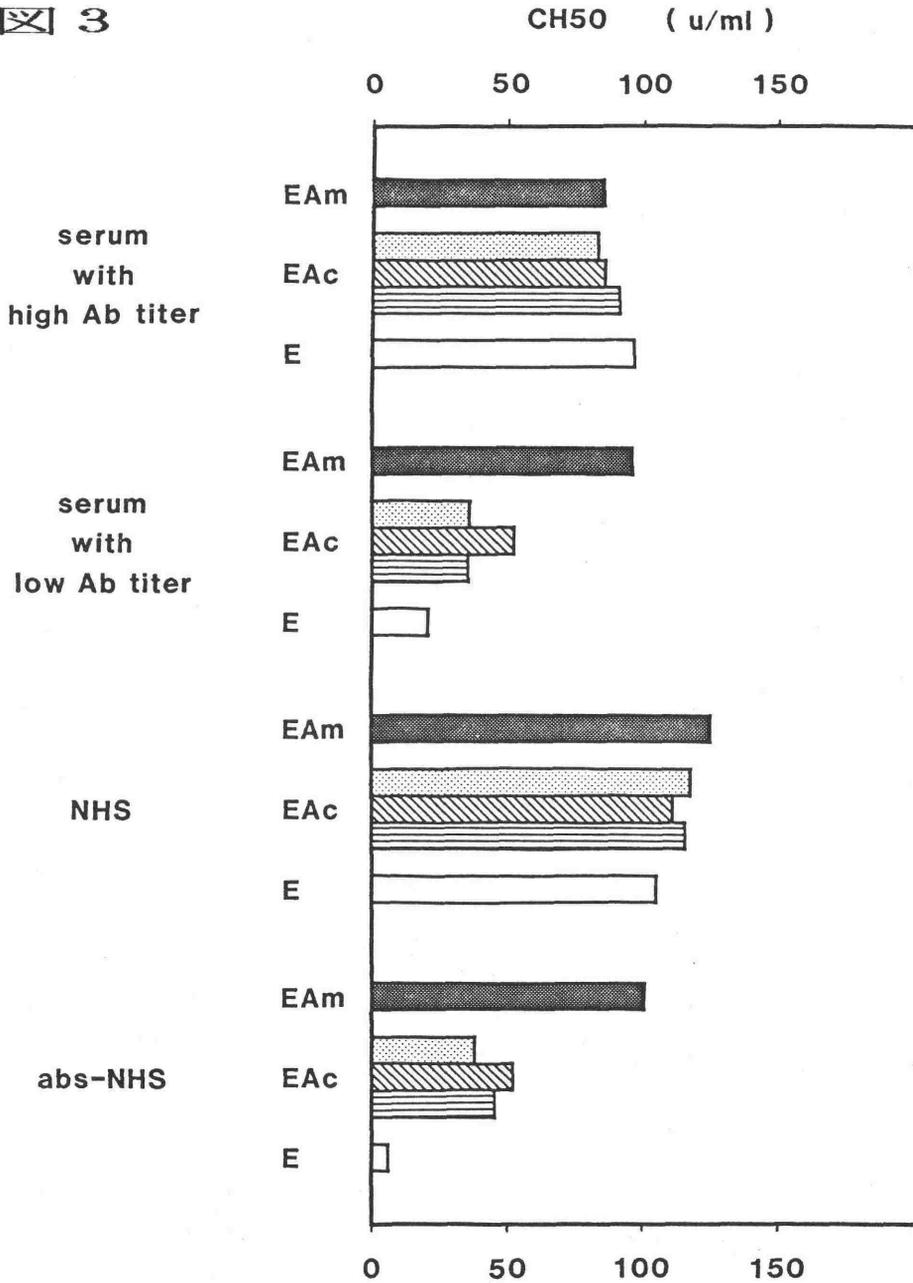
4) 各種血清中の F 様抗体価 : 先ず、計69人の個々の血清中の F 様抗体価を測定したところ、その値は、最低値 25.7 u/ml、最高値 2,010 u/ml、平均±S.D. は  $271.2 \pm 354.3$  u/ml と広範囲に分布することが判明した。なお、NHS の F 様抗体価は 300 u/ml であった。

5) F 様抗体価の補体価への影響 : 次に、これらの血清のうち、F 様抗体価の高い血清、低い血清、および、NHS、abs-NHS、計4種についてその補体価を EAm、3種の EAc、および E で測定した。その結果、図3に示すように、F 様抗体価の高い血清 (2,010 u/ml) では、EAm で 84.8 u/ml のとき、EAc を用いた場合 83.0 u/ml、85.7 u/ml あるいは 90.8 u/ml で、ほとんど差がなかった。更に未感作の E でさえ 96.7 u/ml と高値を示した。いっぽう、F 様抗体価の低い血清 (81.1 u/ml) では、EAm で 95.8 u/ml のとき、EAc を用いた場合 52.5 u/ml、36.0 u/ml、あるいは 35.6 u/ml とかなり低値となり、E ではさらに低値 (20.7 u/ml) であった。また、NHS では F 様抗体価の高い血清と同様の、abs-NHS では F 様抗体価の低い血清と同様のパターンであった。これらのことは、EAc による補体価は検体中の F 様抗体の影響を大きくうけるが、EAm ではうけにくいことを示す。

### 《結論》

以上より、血清補体価測定において、EAm は EAc に比して、①ほとんどの場合補体価が高値である、② 1/n のバラツキが小さい、③ヒツジ個体差の影響をうけにくい、④検体中の F 様抗体価の影響をうけにくいことが明らかになった。これらのことから、EAm は従来の EAc よりも補体価の測定に適していると考えられた。

3



### 31 TNP-Cap-Liposome によるヒト補体活性測定について

正木貴久<sup>1)2)</sup> 岡田則子<sup>2)</sup> 岡田秀親<sup>2)</sup>

1)石津製薬(株)

2)福岡大学医学部微生物学教室

一般に、補体活性の測定は感作ヒツジ赤血球 (EA) を用いる Mayer らの方法や、その変法によって CH50 が求められる。しかしヒツジ赤血球は、ヒツジによる個体差や、採血後の使用期限が一ヶ月前後であることなどから品質管理が困難である。そこで我々は、ヒツジ赤血球に代えて、脂質二重膜で構成される Liposome の利用を検討している。すなわち、Liposome の膜上に抗原を組み込むことによって、抗体の存在下で補体と反応させると、Liposome が溶解することを利用して、Liposome に包含させておいた marker 物質が、補体反応によって放出されるのを定量することによって補体活性を測定する方法である。Liposomes による補体の活性化について、すでに岡田ら (Immunology 1982) は、TNP-Cap-Liposomes がモルモットの alternative complement pathway を活性化することを見出している。そこで本研究では、TNP-Cap-Liposomes を基本とし、ヒト補体活性測定に適した Liposomes の組成について検討した。また、補体活性の測定には、操作の簡略化をはかるため、マイクロプレート法を用いた。

#### 〔方法〕

##### Liposomes の組成

Dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) : cholesterol (Chol.) = 1:1 (モル比) を基本組成とし、抗原として trinitrophenyl (TNP) 基を持つ TNP-aminocaproyl-dipalmitoylphosphatidylethanolamine (TNP-Cap-DPPE) を 0~0.01 (モル比)、負の荷電物質である dicethylphosphate (DCP) を 0~0.5 (モル比) 添加した。さらに、ganglioside である GM<sub>1</sub>, GM<sub>3</sub>, GD<sub>1a</sub>, GD<sub>1b</sub>, GT<sub>1b</sub>, GG<sub>1</sub> を上記組成に添加した。また、Chol.についても 0~2 (モル比) の間で変量してその影響を検討した。

##### Liposomes の調製

上記組成の脂質を methanol:chloroform (1:2) に溶解混合し、ロータリーエバポレーターにて溶媒を留去し、リビッドフィルムを作製した。これに 0.2 M carboxy fluorescein (CF) を marker として加え、>55°C で vortexing によって Liposomes を作製した。余分の marker は 15,000rpm 20min の遠心操作によって除去した。

Liposomes の洗浄および保存には GVB<sup>-</sup> を用いた。

### Liposomes lysis の測定 (マイクロプレート法)

マイクロプレートに GVB<sup>++</sup> で 2 倍連続希釈したヒト血清 25  $\mu$ l および GVB<sup>+</sup> 25  $\mu$ l を加え、さらに 30 倍希釈ウサギ抗 TNP 抗血清 5  $\mu$ l と、GVB<sup>-</sup> に懸濁させた種々の組成の TNP-Cap-Liposomes 5  $\mu$ l を加えた。37°C 1 時間反応後、10mM EDTAGVB 50  $\mu$ l を加え反応を止めた後、放出された marker 量を、excitation 490nm, emission 520nm にて蛍光強度測定 (コロナ マイクロプレート蛍光光度計 MTP-F) によって求めた。10% Triton X-100 10  $\mu$ l 添加反応後の蛍光強度を 100% として marker release を求めた。

### TNP-ShE の作成

1 $\times$ 10<sup>8</sup>/ml のヒツジ赤血球 (ShE) に終濃度 200  $\mu$ g/ml となるように 2,4,6-tri-nitrobenzene sulfonic acid sodium salt (TNBS) を加え、生食液中 37°C 30 min 反応させ、洗浄後、GVB<sup>++</sup> に浮遊させた。

### [ 結果および考察 ]

#### TNP の抗原性

まず、TNP を抗原としたとき、これを ShE に結合させた TNP-ShE の抗 TNP 抗体存在下における補体による溶血と、市販の EA (石津製薬社製) の補体による溶血を比較した。その結果、Fig.1 に示したように、TNP-ShE は抗 TNP 抗体の存在下で EA と同様に補体による溶血反応を示した。したがって、Liposomes の抗原として TNP を用いることによって EA の補体による溶血反応と近似した補体反応をみる事が可能であると考えられる。

#### 抗原量について

TNP-Cap-DPPE を DMPC:Chol.:DCP = 1:1:0.1 に 0, 0.0005, 0.001, 0.0025, 0.005, 0.01 (モル比) 添加した結果、0.0025, 0.005 (モル比) が最も大きな maximum marker release (60%) を示し、0 (モル比) の場合は Liposome の溶解はみられなかった。

#### Chargingについて

DCP を DMPC:Chol.:TNP-Cap-DPPE = 1:1:0.005 に 0, 0.001, 0.01, 0.1, 0.5 (モル比) 添加した結果、0.01, 0.1 (モル比) で最も大きな maximum marker release (60%) を示した。これは DCP の (-) charge によって、Liposomes の marker 保持率が上昇したためと考えられる。

#### Gangliosides の影響について

DMPC:Chol.:TNP-Cap-DPPE:DCP:ganglioside = 1:1:0.005:0.01:0.1 のモル比で gangliosides を添加した結果、今回用いた gangliosides はいずれもこれらを含まないものに比べて maximum marker release を減少 (0~30%) させる傾向にあった。さらに、これらの血清希釈にともなう marker release の減少が

gangliosides を含まないものに比べるとゆるやかであった。このことから gangliosides には膜の保護作用があるのではないかと考えられる。

#### Chol. 量について

Chol. を DMPC:TNP-Cap-DPPE:DCP = 1:0.005:0.02 に 0, 0.1, 0.3, 0.5, 1, 2 (モル比) 添加した結果、1, 2 (モル比) で最も大きな maximum marker release (60%) を示した。また、0~0.3 (モル比) では Liposomes の形成がみられず、Liposomes の形成に Chol. が重要であることを示している。

#### 〔 結 論 〕

以上の結果より、TNP-Cap-Liposome (DMPC:Chol.:TNP-Cap-DPPE:DCP = 1:1:0.005:0.01) により、ヒト補体活性の測定が可能であることが明らかとなった。しかし、EA に比べると maximum marker release が低く、血清希釈にともなう marker release の減少もゆるやかである。したがって、今後これらを改善するためさらに検討する予定である。

本研究は、臨床病理学振興会研究奨励金の助成を受けた。

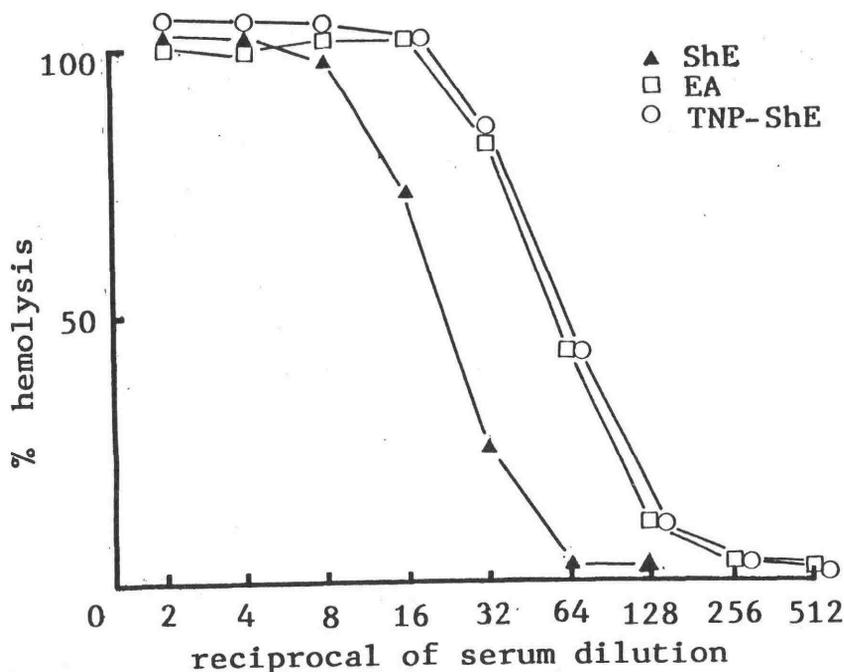


Fig. 1 Hemolysis of ShE, EA and TNP-ShE with anti-TNP by human serum

## 32 検体中の C8 による C3 あるいは C5 溶血活性測定値への影響

大阪府立成人病センター  
北村 肇、坪井 睦美

### 《はじめに》

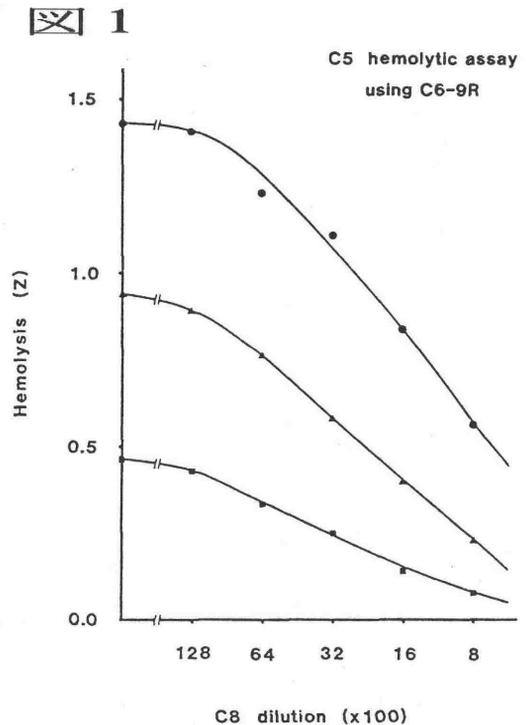
私達は昨年、C3 非依存性免疫溶血反応を抑制する血清中の因子は C8 であることを報告した。今回、この現象について更に検討を加え、興味あるデータを得たので報告する。

### 《材料と方法》

TTHA 法で感作赤血球 (EA) と NHS より EAC14 をつくり、ヨード化した C2hu を作用させて EAC142 を、さらに C3hu を反応させて EAC1423 を作製した。補体成分は C5 はヒト由来のもの (C5hu) を、C6~C9 はヒト由来のもの (C6hu, C7hu, C8hu, C9hu) あるいはモルモット由来のもの (C6gp, C7gp, C8gp, C9gp) を使用した。C3 や C5 溶血活性測定に用いる C6-9 試薬 (C6-9R) はモルモット血清より KSCN およびヒドラジン処理で作製した。C3 溶血活性は GGVB 中で変量した検体に EAC142 と過剰の C5hu を、また C5 溶血活性は検体に EAC1423 を加え、37°C、4分間反応させた後 C6-9R を加え、37°C、60分後の溶血を測定した。

### 《結果》

I) C3 あるいは C5 溶血活性測定値への検体中の C8 の影響  
種々の濃度の C8hu を含む C5 溶液中の C5 溶血活性を測定した。図 1 に示すように C8 の濃度に応じて溶血は抑えられた。なお、C5 の代わりに C3 を使った C3 溶血活性測



定においても同様であった。

II) 精製 C6hu, C7hu, C8hu および C9hu による C5 溶血活性測定

同様の実験を C6-9R の代わりに精製 C6hu, C7hu, C8hu と C9hu を用いて同様の実験を行ったところ、C8hu による溶血抑制は全く見られなかった(図2)。

III) 精製 C6gp, C7gp, C8gp および C9gp による C5 溶血活性測定

同様の実験を C6-9R の代わりに精製 C6gp, C7gp, C8gp と C9gp を用いて同様の実験を行ったところ、溶血は C8hu の濃度に応じて明らかに抑制された(図3)。

以上より、検体中の C8 による C3 や C5 溶血活性測定における溶血抑制は、過剰の C6~C9 としてモルモット血清由来の C6-9R を使うことによるものであると考えられた。

IV) 精製 C6gp, C7gp, C8gp および C9gp による溶血への C8hu の影響

次に C8hu による溶血抑制のメカニズムを明らかにするため、C8 は C8hu あるいは C8gp を、C6, C7, および C9 はすべてモルモットの成分を用いて実験を進めた。

i) C5, C6~C9 を同時に EAC1423 へ添加した場合

図4に示すように、C8hu に比し C8gp の場合は効率良く溶血し、C8hu + C8gp の場合は、C8hu の場合と同程度の溶血であった。

図2

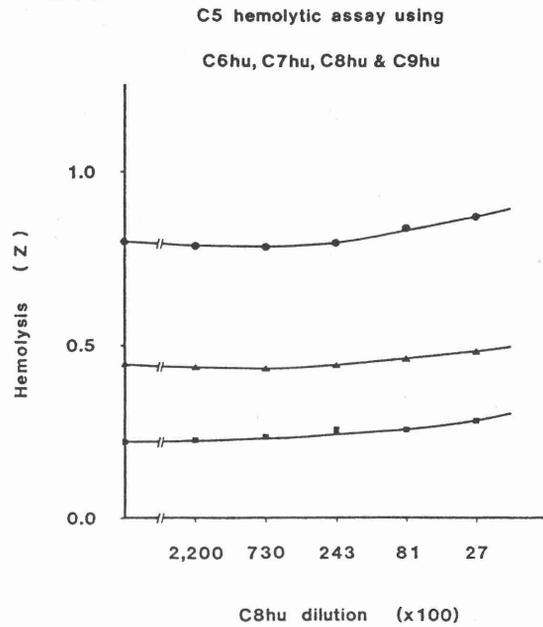
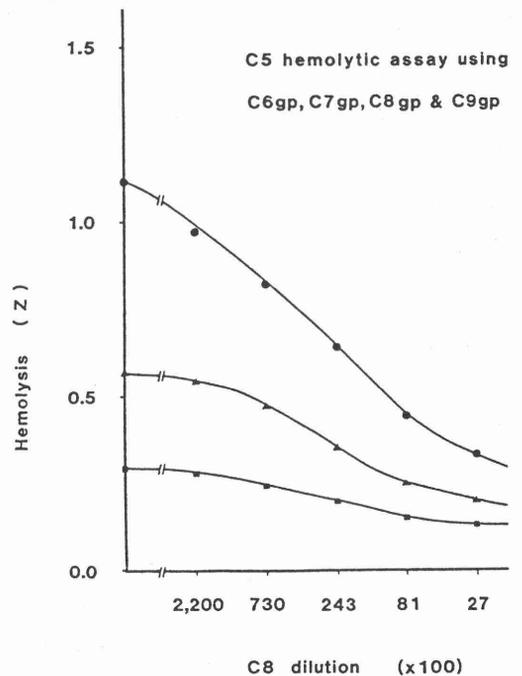


図3



ii) EAC1-7 の場合

EAC1423, lim.C5 および C6gp,C7gp から成る EAC1-7 を作製し、洗浄の後、C8gp and/or C8hu および C9 を加えたところ、C8gp の場合は効率良く溶血したが、C8hu+C8gp の場合は、C8hu 単独の場合と同程度の溶血であった(図5)。

iii) EAC1-8 の場合

EAC1423, lim.C5, C6gp, C7gp および C8hu or C8gp から成る EAC1-8 (EAC1-8hu or EAC1-8gp) を作製し、洗浄の後 C9 単独で、あるいは C8 および C9 を加え溶血をみたところ、図6に示すように EAC1-8hu の溶血は C9

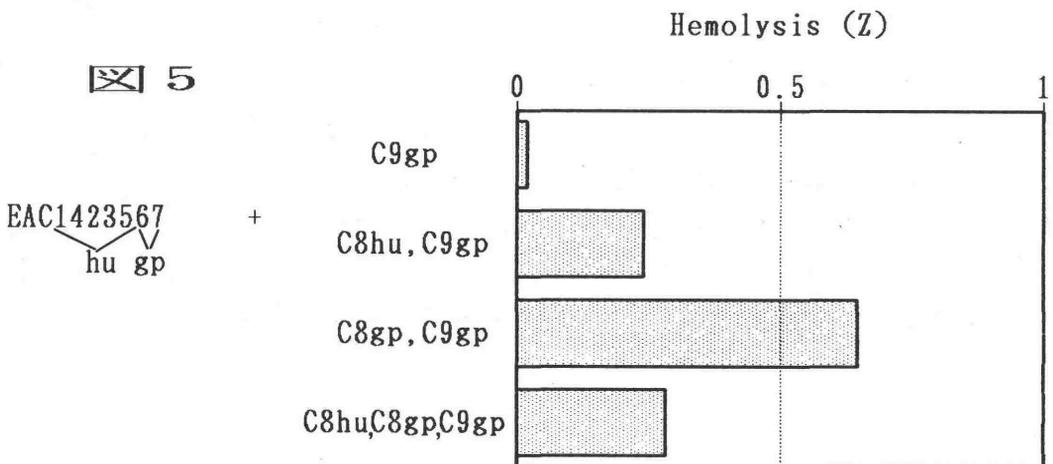
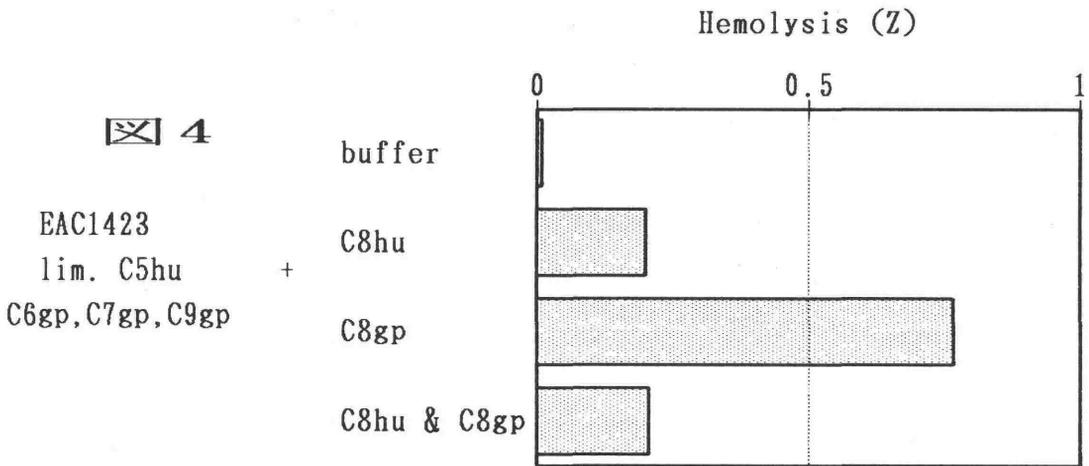
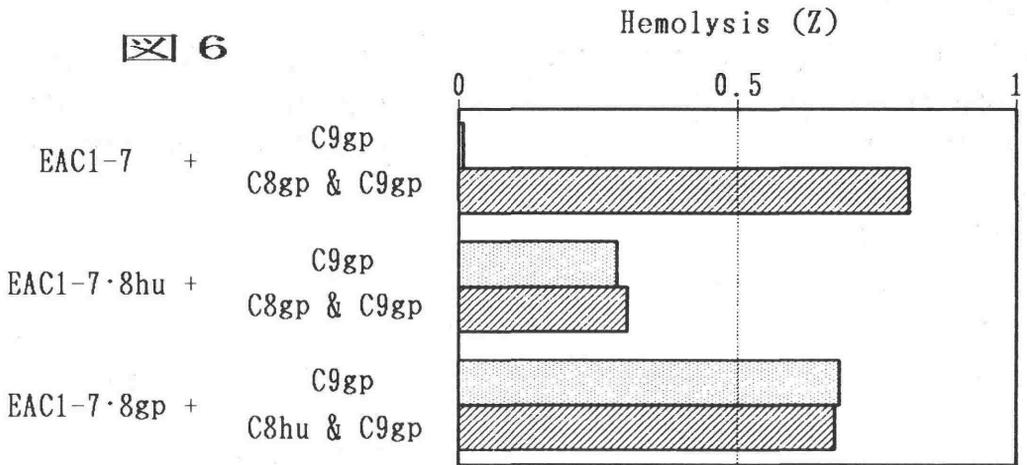


図 6



単独でも C8gp+C9 でもほとんど差なく、また EAC1-8gp の溶血も C9 単独でも C8hu+C9 でも明らかな差はなかった。

V) C6~C9 の各成分の source を変えた種々の組み合わせにおける溶血への C8hu の影響

過剰の C6~C9 として各成分を gp or hu のいずれかを使ったすべての組み合わせによる EAC1423 と lim.C5 の溶血への C8hu の影響をみた。その結果、組み合わせにより溶血度は大きく異なること、および C6gp, C7gp, C8gp, C9gp と C6hu, C7gp, C8gp, C9gp の 2 つの組み合わせの場合だけ溶血は C8hu によって抑制されることが明らかになった。

#### 《考察および結論》

以上より、C1~C5 が hu、C6 と C7 が gp から成る EAC1-7 は C8gp+C9gp の場合に比し、C8hu+C9gp の場合は溶血率は低く、また C8gp と C8hu が共存する場合は C8hu が先に EAC1-7 に結合し、C8gp+C9gp による溶血を抑制するものと考えられた。また、このことが C3 や C5 の溶血活性測定において検体中の C8 により溶血が抑えられる原因であると考えられた。

### 33 リコマラスミン酸による血清補体活性増強作用について

金子 勲, 広瀬信一郎, 中村幸子, 古浜孝文  
三共(株) バイオサイエンス研

〔はじめに〕

補体系は感染防御・炎症およびImmune complex可溶化現象等に重要な役割を果たす。我々は先に低濃度の亜鉛イオン( $Zn^{++}$ )がC2に作用しC3 convertase (EAC142a)の形成を阻害( $150=4 \mu M$ )することにより補体活性(第I経路)を抑制することを報告した。血清中の $Zn^{++}$ 濃度が15-20  $\mu M$ であることを考慮すると、血清補体活性は通常、血清亜鉛イオンにより一定程度抑制されていることが示唆される。今回、我々は $Zn^{++}$ に選択的なキレート作用を持つ植物毒の一種リコマラスミン酸が血清中の $Zn^{++}$ を特異的マスクすることにより補体活性を増強したのでその詳細について報告する。

〔方法と材料〕

リコマラスミン酸: カビの一種 *Diheterospora chlamidosporia* の培養液より DEAE-Sephadex A25 等のカラムクロマトおよび再結晶化を繰り返しリコマラスミン酸モノアンモニウム塩 ( $C_9 H_{17} N_3 O_8$ ) を単離精製した。TLC, 元素分析, アミノ酸分析, NMR 分析により純品であること確認した。

補体成分: 正常人より採血し、室温で約40分放置後、2,500rpm, 5分間遠心後、血清を採取しそれを補体として使用した。C3, C5, C2, B, D, P, H, I はヒトプラズマから常法により単一成分にまで精製した。他の成分は Cordis社より購入した。

補体活性測定法:  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$ , glucose, gelatinを加えたVeronal buffer (DGVB $^{++}$ )で希釈した正常ヒト血清0.1 mlにリコマラスミン酸などの検体を含むDGVB $^{++}$  0.1 mlを加え 30°C, 5分反応させ、その後  $1 \times 10^7$  EA(感作赤血球)を含むDGVB $^{++}$  0.1 mlを加え、37°C, 60分間反応させる。溶血度から溶血部位数(Z)を求め検体無添加のコントロール値( $Z_0$ )との比( $Z/Z_0$ )により検体の効果を調べた。 $Z_0$ は約1.0になるように血清を希釈した。補体各成分の中間体への反応もこれに準じた。

〔結果〕

1. リコマラスミン酸によるヒト血清補体活性増強

Zn<sup>2+</sup> にキレート作用を持つリコマラスミン酸を 1/100希釈正常ヒト血清に添加し、EAを加えて溶血反応を行った。その結果、リコマラスミン酸はその濃度依存的に補体活性を増強し、0.5 mMではコントロールの2倍以上にまで増強した(図1)。一方、Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> をキレートするEDTA或いはEGTAは低濃度で部分的に補体活性を増強させるものの 1.0 mM 以上では完全に阻害した。また、リコマラスミン酸の誘導體でZn<sup>2+</sup> キレート作用が消失したSubstance J には増強効果が殆ど認められなかった。なお、ヒト血清90% を用いてもリコマラスミン酸による増強効果が同様にみられた。以上のことはリコマラスミン酸が血清Zn<sup>2+</sup> をキレートすることにより補体活性を増強する可能性を示す。

そこで、リコマラスミン酸(100 μM) 存在・非存在下でZn<sup>2+</sup> (ZnCl<sub>2</sub>)を血清に添加し、補体活性がどのように変化するか調べた。その結果、リコマラスミン酸非存在下では補体活性がZn<sup>2+</sup> により強く阻害され、50% 阻害濃度(I50) は 4 μM であったが、リコマラスミン酸存在下では 75 μMまで阻害されず当量の 100 μM 以上で強く阻害されるというsigmoidal curve が得られた(図2)。一方、始めに 100 μM Zn<sup>2+</sup>を添加し、補体活性を低下させている状態にリコマラスミン酸を添加すると、その濃度依存的にまた2相性に補体活性が回復することが分かった(図3)。以上のことから、リコマラスミン酸はo-フェナンスロリンと同様に Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> はキレートせずに反応液中のフリーもしくはタンパク結合性のZn<sup>2+</sup> を特異的にキレートすることにより Zn<sup>2+</sup>の抑制

Lycomarasmic acid

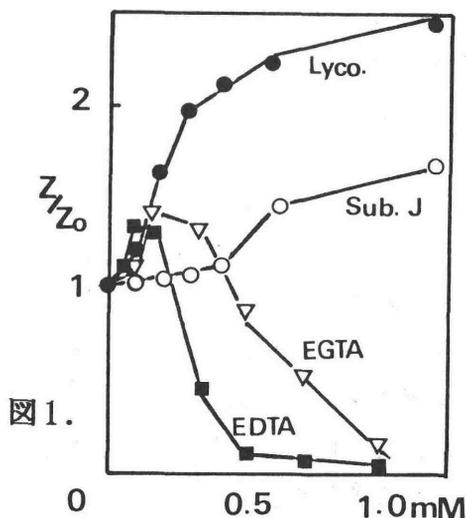
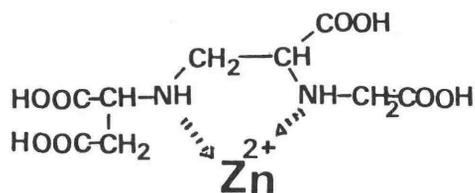


図1.

を解除しその結果補体活性を増強するものと考えられる。なお、リコマラスミン酸による補体活性増強効果はヒト血清だけでなくラット、マウス血清を用いても同様に認められた。

## 2. C3 convertase (EAC142a) 形成反応への影響

すでに報告したように  $Zn^{++}$  は C2 に作用し C3 convertase (EAC142a) の形成反応を特異的かつ可逆的に阻害する。そこで  $Zn^{++}$  による EAC142a 形成阻害作用をリコマラスミン酸が消去することが可能か調べた (図 4)。 $Zn^{++}$  50  $\mu M$  存在下で C3 convertase 形成反応 (C2 活性) は著しく低下しているが、リコマラスミン酸を添加するとその濃度依存的に C2 活性が上昇し、当量の 50  $\mu M$  ではほぼコントロールレベルまでに回復した。一方、 $Zn^{++}$  非存在下ではリコマラスミン酸は C2 活性に影響を与えない。また、反対にリコマラスミン 100  $\mu M$  存在下で  $Zn^{++}$  の dose response をとってみると、 $Zn^{++}$  は当量の 100  $\mu M$  以下まで C2 反応を阻害せずにそれ以上では阻害されるという典型的な sigumoidal curve が得られた (図 5)。リコマラスミン酸非存在下の I 50 は 4  $\mu M$  であった。以上のことはリコマラスミン酸が  $Zn^{++}$  による C3 convertase 形成抑制作用を可逆的に解除することを示す。血清中ではアルブミンなど  $Zn^{++}$  と親和性のあるタンパクとの関係を考慮しなければならないが、おそらく同様なメカニズムでリコマラスミン酸は血清中の  $Zn^{++}$  の抑制作用を打ち消すことが考えられる。

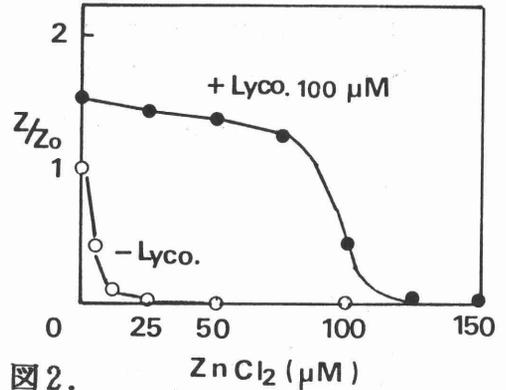


図 2.

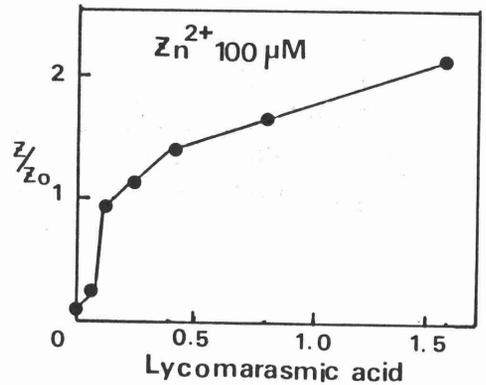


図 3.

〔考察〕

血清中に存在する亜鉛イオン( $Zn^{2+}$ )によりC3 convertase (EAC142a)形成反応(C2 活性)が抑制されているため血清補体活性は通常一定程度抑制されていると考えられる。リコラスミン酸は血清中のフリーもしくはタンパク結合性の $Zn^{2+}$ を特異的にキレートすることにより $Zn^{2+}$ の抑制を解除しその結果補体活性を増強させるものであると思われる。補体は感染防御およびImmune complex可溶化現象において重要な役割を果たす。その意味でリコラスミン酸のin vivo 効果に興味を持たれる。

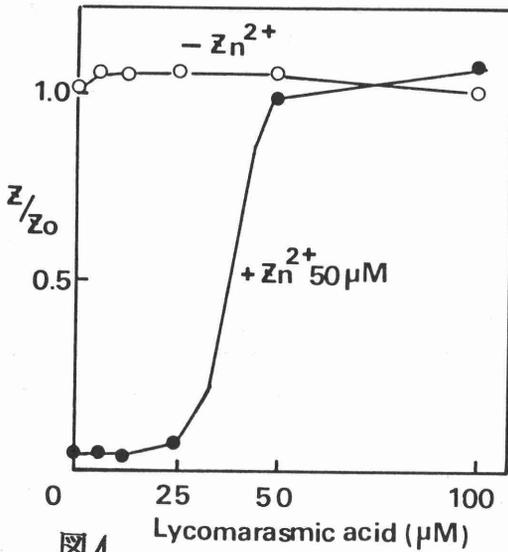


図4.

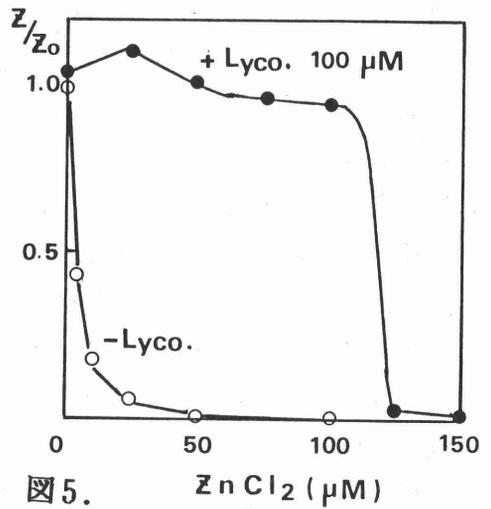


図5.

## 34 C5 転換酵素の構造と機能 1

小園晴生、木下タロウ、高田裕子

竹田潤二、洪卿秀、井上公蔵

大阪大学医学部細菌学教室

### 目的

C5転換酵素は、C3転換酵素C4b2aに、C3bが何らかの形で会合し、その活性を生ずると考えられている。しかし、その具体的配置、その会合の様式（共有結合か、電氣的親和力か、等）は明かでない。我々は、精製した補体成分を用いることと、血清中にラベルした補体成分を混ぜて反応を起こすことにより、古典経路ではC4b-C3b, 代替経路においてはC3b-C3bという共有結合した構造体が、効率よくできることを見出したのでここに報告する。

### 方法

1 古典経路： 感作したヒツジ赤血球に、 $^{125}\text{I}$ で標識した精製ヒト補体成分を順次加えることによって、C5転換酵素をつくり、SDS-PAGE後、autoradiogramを行い解析した。定量には、densitometerを用いた。

2 代替経路： ウサギ赤血球と、 $^{125}\text{I}$ で標識した精製ヒト補体成分を含む正常ヒト血清を、反応させ、SDS-PAGE後、autoradiogramを行い解析した。

### 結果

1  $^{125}\text{I}$ 標識C4を用いて作製したEAC142 cellの非還元SDS-PAGEを行うと、標識蛋白は、200Kのbandとなるが、C3を加えると新たに、400Kのbandが出現し、C3の増量とともにそれは増加した。同時にC4b自体の200Kのbandは、減少した。同様の実験を、 $^{125}\text{I}$ 標識C3を用いて行うと、200Kのband以外に、

やはり400Kのbandが観察できた。還元下では、94KのC4b- $\alpha'$ がC3の増量とともに減り、230Kのbandが増えていた。230KのbandはC4標識でもC3標識でも、同様に観察された。C4標識で一次元目還元、二次元目hydroxylamine処理の2D-SDS-PAGEを行うと、230Kのbandからは、 $\alpha'$ の位置のspotが検出された。これらのことより、C4bがC3bのacceptorとなり、共有結合(ester結合)したC4b-C3b dimerが形成されること、そしてC3b- $\alpha'$ はC4b- $\alpha'$ と結合していることがわかった。このdimer形成は非常に効率よく、C3b/C4b比が1/2位では54%ものC3bがC4bと会合していた。

2 time courseをとってみると、C4b monomerの減少に相関してC4b-C3b dimerの増加が観られた。また、C3b-C4b dimerの形成速度は、C3b monomerの結合速度と同等以上であった。

3 正常ヒト血清に標識したC3を加えウサギ赤血球と反応後、ghostのSDS-PAGEを行うと、200K bandと400K bandが観られた。還元下では、C3 $\alpha'$ とC3 $\beta$ 以外に250K付近に新たなbandが強く出現した。一次元目非還元、二次元目還元の2D-SDS-PAGEを行うと400KのbandからはC3 $\beta$ の位置と、250K付近にspotが現れたがC3 $\alpha'$ の位置には何も検出できなかった。しかし、一次元目を同様に行い、二次元目に還元とhydroxylamine処理を同時にしてからPAGEを行うと、C3 $\alpha'$ の位置とC3 $\beta$ の位置にのみspotが現れた。これらのことより、代替経路においては、C3b-C3bというdimerが形成され、 $\alpha'$ 同士でester結合をしていると考えられた。

4 次にdimerを形成しているester結合の安定性を検討した。EAC142 cellをpH7.4、37°Cでincubateした後、SDS-PAGEを行い、bandの濃さより算出した分子数を、時間に対してplotすることにより、C4b-C3b dimerの血球からの解離の半減期は4.7時間、C4bと血球上のacceptor分子間では11.7時間となった。これより、C3b-C4b間のester結合のそれは7.9時間と計算できる。

## 考察

C3転換酵素によって活性化されたC3bは、単に標的表面に結合するだけでなく、直接C4b或はC3b上に特異的に結合することがわかった。C4b-C3b, C3b-C3bというdimerの形成は、次演題で述べるように、高親和性のC5結合部位を形成し、C2a或はBbによる基質分解に、新たな特異性をもたらすものと思われる。

## 35 C5 転換酵素の構造と機能 2

高田裕子<sup>1)</sup>，木下タロウ，小園晴生，竹田潤二，洪 卿秀，井上公蔵  
大阪大学 医学部 細菌学

### 〔目的〕

C5転換酵素 (C4bC2aC3b・C3bBbC3b) は、C3転換酵素(C4bC2a・C3bBb) によって開裂形成されたC3bのうち、C3転換酵素のごく近傍の標的表面上に結合したものと、C3転換酵素から成ると考えられてきた。しかし、C3転換酵素の近傍に結合したC3bと、遠くに結合したC3bとを区別する仕方、種々の標的物質上で定まった四次構造をとれるかどうかなど、疑問点が多かった。我々は、最近、C3転換酵素によって開裂された C3b には、標的表面上に直接共有結合しているものと、C3 転換酵素内のC4bまたはC3bに共有結合して、C4b-C3b二量体またはC3b-C3b二量体を形成しているものとの二種類があることを見いだした。ここでは、後者のC4b-C3b二量体または C3b-C3b 二量体が、C5の高親和性結合部位として働いていることを示唆する結果を得たので報告する。

### 〔方法〕

1. EAC4・EAC43・EAC3 cellは、感作ヒツジ赤血球EAと精製補体成分から作成し、酵素活性部位であるC2a・Bbを崩壊させたものを用いた。
2. C5のcellへの結合は、<sup>125</sup>I-標識C5を用いてDGVB中で行い、反応後オイルに重層して遠心分離し、結合C5量を調べた。結合部位数と結合定数は Scatchard-plot より求めた。
3. 二量体の分子数は、cellに結合した標識蛋白量と非還元 SDS-PAGE後の autoradiogram 上の単量体と二量体のバンドの濃さの比率とから求めた。

<sup>1)</sup> 現、大阪医科大学病態検査学

## 〔結果〕

1. EAC43 Cell への C5 の結合能を Scatchard-plot によって調べると、結合定数が  $2.1 \times 10^8 M^{-1}$  の均一な高親和性結合部位が、1.6 個の C3b に 1 個存在した。

2. C3b を変量して作成した 5 種類の EAC43 cell のそれぞれの C5 結合部位数を求めたところ、全結合 C3b 分子数とは直線関係が得られなかったが、C4b-C3b 二量体の分子数との間には直線関係が得られた。即ち C4b-C3b 二量体が C5 の高親和性結合部位を形成していることが推察された。

3. EAC1423 cell を  $37^\circ C$  中に 0-8 時間 おいて C4b-C3b 二量体を崩壊させ、C5 の結合能を調べると、時間とともに減少した。それぞれの時間での C5 の結合部位数を求め、その時の C4b-C3b 二量体分子数を求めたものを plot すると、双方とも半減期 約 5 時間で一致して減少した。

4. EAC43 cell への C5 の結合は、抗 C3 抗体だけでなく、抗 C4 抗体によっても 80% 以上阻害された。これまでの結果から、EAC43 cell 上には、単独で結合している C3b と、C4b-C3b 二量体を形成しているものがあるが、後者のみが高親和性 C5 結合部位として効果的に働いていることが示唆された。

5. EA に trypsin で C3b を結合させた EAC3-(1)、即ち、C3b がランダムに結合していると考えられる細胞には、ほとんど C5 が結合しなかった。C3b を増幅結合させた EAC3-(2) では、結合定数が  $3.7 \times 10^8 M^{-1}$  で、70 個の C3b に 1 個の割合の C5 結合部位が存在した。更に C3b を増幅結合させた EAC3-(3) では、結合定数が  $3.2 \times 10^8 M^{-1}$  で 24 個の C3b に 1 個の割合の C5 結合部位が存在した。代替経路活性化過程に C3b-C3b 二量体が形成されることと、EAC43 cell を用いた C5 の結合実験結果をあわせて考えると、C3b-C3b 二量体の形成によって高親和性 C5 結合部位ができると考えられる。

6. EAC4 cell へもわずかに C5 が結合したので、これを解析すると、結合定数が  $8.1 \times 10^7 M^{-1}$  で、100 個の C4b に 1 個の高親和性 C5 結合部位が存在した。この結合は抗 C4 抗体で阻害されるが、抗 C3 抗体では阻害され

なかった。EAC4 cell の SDS-PAGE による解析から C4b-C4b二量体に相当すると考えられる分子が存在することより、C4b-C4b二量体が高親和性結合部位を形成していると考えられる。

#### 〔考察〕

EAC43 cell 上に、C4b-C3b二量体の分子数にほぼ一致して高親和性のC5結合部位が存在した。EAC3 cell では、増幅C3b数の増加は、C5の結合定数にほとんど変化を与えず、高親和性C5結合部位を形成しているC3bの割合を増加させた。従来報告では、C5は、cellに結合しているC3b 1個に1個結合でき、その結合定数は我々の結果の1/50～1/100の値となっていた。我々の実験では、EAC4 cell でも100個に1個の高親和性結合部位が存在している。これらのことよりC5は、単独のC3bと同様C4bにも低親和性結合能を持つと考えられ、C4b-C3b二量体・C3b-C3b二量体・C4b-C3b二量体では、二点結合することによって高親和性の結合をすることができると思われる。C5 転換酵素内にC4b-C3b二量体・C3b-C3b二量体・C4b-C4b二量体の高親和性C5結合部位が形成されると、周囲に単独で結合したC3bがあってもそれと区別して、酵素活性部位であるC2aやBbの最も近傍にC5を結合することができると考えられる。

EAC4 cell にわずかであるが、C4b-C4b二量体の形成に応じてC5が結合することは、C3欠損患者血清やin vitroでの、C3非依存性の補体溶血活性が存在する原因を説明するものと思われる。

## 36 心筋顆粒のモルモット赤血球溶血反応

保健衛生大・医・微生物

川本 保子、雪竹 潤、深山 昭雄

【目的】 ヒトならびに家兎の心筋細胞マイクロソーム画分には、モルモット赤血球を溶血させる因子が存在し、その赤血球膜上には、補体C5b-9,あるいはNK細胞や細胞障害性Tリンパ球によって形成される membrane lesionと極めてよく類似したチャンネルが認められることを明らかにした。

この溶血反応は温度依存性であり、EDTA存在下で効率よく進行すること、30°Cの反応では溶血準備状態にある反応中間体が得られることも報告した。

今回は、Percoll密度勾配遠心によるマイクロソーム顆粒の分画と、CHAPS(3-[(3-cholamidopropyl-dimethylammonio)-1-propanesulfonate)による顆粒の可溶化を試みたので報告する。

【方法】 1. 心筋マイクロソーム顆粒の分離。0.3Mショ糖中で細切した心筋をホモジェナイズし、分別遠心でマイクロソーム画分を得た。

2. Percoll密度勾配遠心。R緩衝液(0.01M PIPES, 100mMKCl, 3mMNaCl, 3.5mM MgCl<sub>2</sub>, 1.25mMEGTA, 1mMATP)で等張にした90%, 60%, 39% Percollをそれぞれ10, 5, 8.75ml重層して不連続密度勾配を作り、マイクロソーム画分をのせて30,000g, 15分遠心した。管底より1mlずつ分取した。

3. 顆粒の可溶化。顆粒をHEPES緩衝液(0.01MHEPES pH7.4, 1.19%KCl, 1mM DTT, 0.1mMPMSF)に懸濁し、CHAPSを10mMになるよう加え、37°C、2時間反応させた。200,000g、60分遠心し、上清をHEPES緩衝液に透析した。

4. 溶血活性の測定。顆粒あるいは可溶化液0.1mlとモルモット赤血球 $1 \times 10^7$ 個をEDTA-GVB中で37°C 90分反応させた。生理食塩水3mlを加えて遠心し、上清の413nmの吸光度を測定して溶血率を算出した。

5. セリン・エステラーゼ活性の測定。Green & Shawの方法によった。すなわち、N-benzyloxycarbonyl-L-lysine thiobenzyl ester(BLT)を基質とし、生じたbenzyl mercaptanをEllman試薬と反応させ、生成したthiophenoxide chromophoreを測定した。

6. 蛋白質の定量。BCA protein assay reagent(Pierce社)あるいは、Bradfordの方法で行なった。標準蛋白には牛血清アルブミンを用いた。

【結果】 1. 心筋顆粒のPercoll密度勾配遠心による分画。 図1に示すように、密度勾配遠心の結果3本のバンド ( $\sigma = 1.03, 1.056, 1.08$ ) が形成された。main bandは $\sigma = 1.03$ で、他の2本は量的に極めて少なかった。各フラクションの蛋白量 (·····) と溶血活性 (—) を測定すると、main bandの位置に溶血活性のピークが認められた。図には示していないが、セリン・エステラーゼの活性も蛋白、溶血活性のピークに一致していた。

2. 阻害因子の存在について。 心筋顆粒の分離に際し、溶血活性を阻害する物質の存在が示唆されたので、活性のピーク (fr.17) に対する他の分画の影響を調べた。Percollの濃度が高いFr.5は溶血活性を抑制する傾向が見られた。 $\sigma = 1.08, 1.056$ のbandに相当するFr.11, 13,あるいは、心筋ホモジェネートの1,800 rpmの遠心で得られる上清のFr.25は、活性に影響しなかった。顆粒を含むが溶血活性を全く示さないFr.18は、Fr.17の溶血活性を強く阻害した (図2)。

3. 溶血活性とセリン・エステラーゼ。 細胞障害性Tリンパ球では、その障害活性とセリン・エステラーゼには強い相関があり、この酵素の役割の重要性が示唆されている。心筋顆粒の溶血作用におけるセリン・エステラーゼの役割を知るため、セリン・エステラーゼの阻害剤 PMSF の影響を調べた。PMSF を終濃度 1.2mM 加えて溶血活性を測定すると、ヒト、家兎ともに活性の増加が見られた。セリン・エステラーゼの活性はPMSFにより低下したが、その作用は弱かった (図3)。

ヒト心筋顆粒を家兎に免疫して得られた抗体を、顆粒と4°C 60分反応させた後、溶血活性を測定すると、ヒト、家兎いずれの顆粒も活性が上昇した。しかし、セリン・エステラーゼ活性は強く阻害された (図4)。

4. 顆粒の可溶化。 ヒト心筋顆粒を、0.1mM PMSF, 1mM DTT存在下、0.01M HEPES緩衝液 (pH 7.4) 中で10mM CHAPS を添加して可溶化した。図5に示すように、蛋白量3 $\mu$ g以上で強い溶血活性が認められた。

この溶血活性を示す因子は耐熱性であり、100°C、30分の加熱においても50%活性を保持していた。この反応は 0.2-2mMのEGTAあるいはEDTA、0.5-1.5mMのPMSF、0.1-5mMのDTT存在下で活性化された。

この因子は、羊赤血球は溶解しないが、ヒト単核球の cell line である U937 細胞を障害することが明らかになった。

【考察】 ヒトならびに家兎心筋顆粒中に見出されるモルモット赤血球溶血因子は、 $\sigma = 1.03$ の顆粒中に存在することが明らかとなった。また、 $\sigma = 1.03$ より軽い分画に溶血反応を阻害する物質の存在が示唆された。

Demonstration of inhibitory granules against hemolytic activity

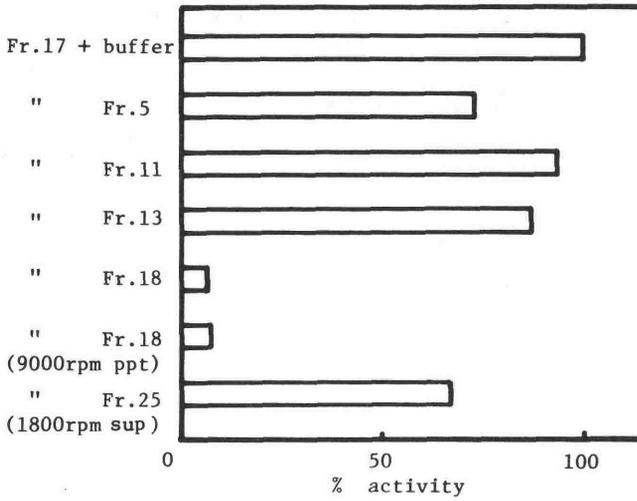


图 2

Effects of PMSF on the hemolytic and esterase activities of granules

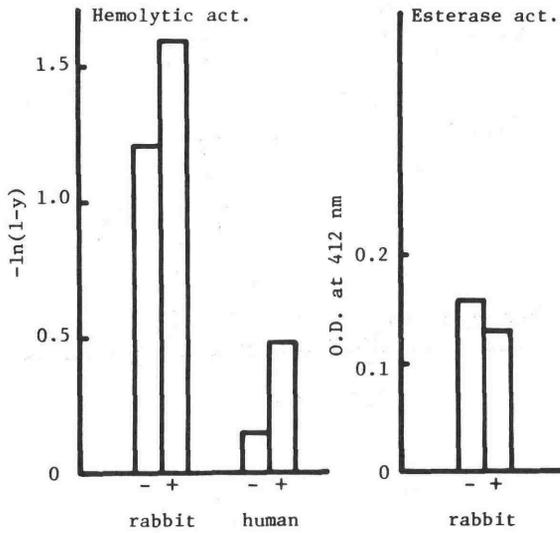


图 3

細胞障害性Tリンパ球の場合と異なり、セリン・エステラーゼと溶血活性の相関は低く、むしろ、活性を抑制する方向に調節している可能性が示唆された。

溶血活性を示す因子は 10mM CHAPS で可溶化され、モルモット赤血球のみならず、U937細胞も障害し得る耐熱性の物質であると考えられた。

なお、溶血活性の阻害を示す抗ヒトC9抗体は、SDS-PAGEで展開した顆粒の、分子量27Kと32.5Kの蛋白を認識した。いずれかが有効分子であるのか、あるいは調節因子にすぎないのかは明らかではないが、現在、有効分子、阻害因子の分離を試みている。

Percoll-gradient fractionation of rabbit cardiac muscle granules

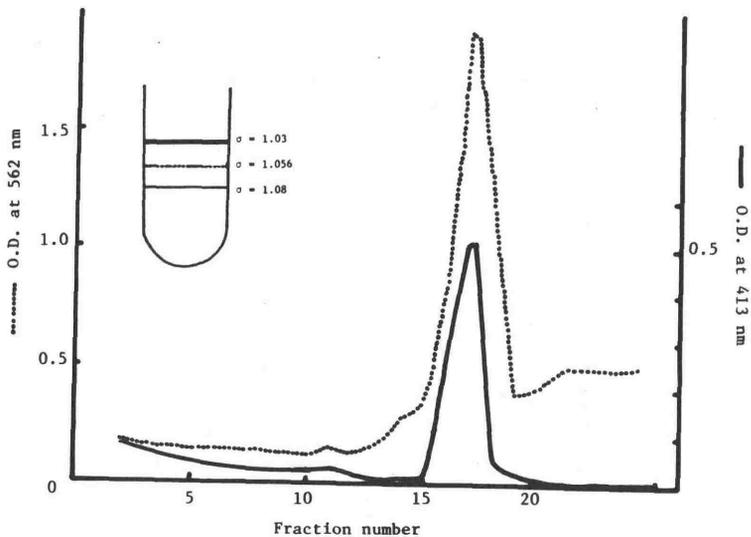


図 1

Effects of antibody on the hemolytic and esterase activities of granules

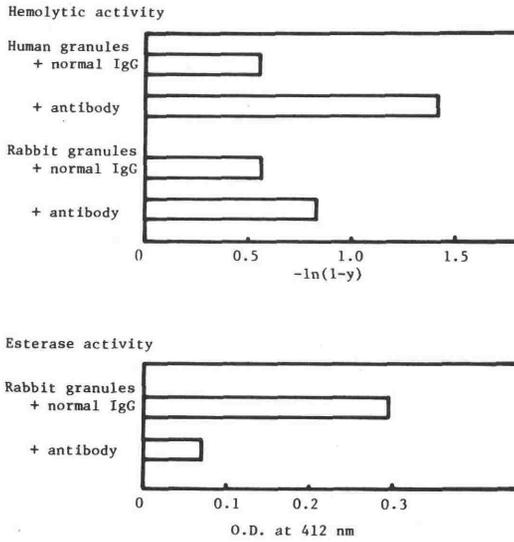


图 4

Hemolytic activity of granule extract

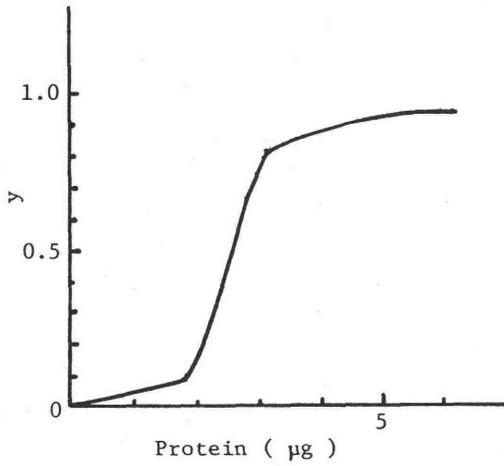


图 5

奥田 智子・橋 武彦  
東北大学抗酸菌病研究所

## &lt;目的&gt;

補体系の研究が進み、補体分子の機能の多様性、それぞれの活性に対するきめ細かい制御機構の存在が明らかとなった。これらの結果は補体系の機能についてまだ未知の重要なものが残されていることを示唆していると思われる。細胞間相互作用や細胞の機能発現に補体に関与していると考え、補体レセプター (CR3) に着目した。CR3 はオプソニン化異物の貪食に働いていることが知られているが、貪食以外の機能を検索した。その結果、CR3 の iC3b 結合部位に対する単クローン抗体 Mac-1 がマウス腹腔細胞の腫瘍細胞障害作用を特異的に阻害することを見出したので報告する。

## &lt;材料と方法&gt;

6~8週令の C3H/HeSlc マウス (♀) を用いた。標的細胞は 10% FCS を含む RPMI 培地で継代培養したものを用いた。レンチナン、TAK ((1→3)-β-D-グルカン) はそれぞれ千原呉郎氏 (国立がんセンター)、佐々木琢磨氏 (金沢大がん研) より分与された。

単クローン抗体: Mac-1 (M1/70)、Mac-2 (M3/38.1, 2.8 HL2)、LFA-1 (FD441.8)、抗β鎖 (M18/2.a.8) は無血清培地 Hy-Medium 606 (コージン) の培養上清を RPMI で 10 倍希釈して用いた。あるいは IgG を精製し、ペプシンで消化後 Superose 12 等で精製して F(ab')<sub>2</sub> を得た。

腫瘍細胞障害試験: 種々の刺激剤を腹腔に投与し、一定時間後にヘパリンを含む RPMI で腹腔を洗滌して、腹腔滲出細胞を得た。4 × 10<sup>6</sup> / ml になるように 2% FCS 含 RPMI に浮遊させ、一定量ずつ 96 穴 U 型プレートにまき、37°C で 90 分インキュベートした後、激しく洗滌して非付着性細胞を除いた。抗体あるいは種々の試薬を含む RPMI (血清不含) 200 μl を加え、<sup>125</sup>I Udr で標識した標的細胞を加え、CO<sub>2</sub> 下 37°C で 20 時間後の上清の放射活性を測定した。エフェクターを含まない対照群の値を差引き、specific release (%) で表わした。

NK 活性: エフェクターとして G10 カラムを通過させた正常マウスの脾細胞、あるいは OK432 投与一日後の PEC をシャーレに付着させて付着する細胞を除いたものを用いた。<sup>51</sup>Cr 標識した YAC-1 を標的細胞として 4~5 時間で遊離される放射活性を測定した。

## &lt;結果&gt;

1. 1KE の OK432 あるいは 10% proteose peptone 1ml を腹腔に投与し、1 日後の腹腔滲出細胞 (PEC) による YAC-1 細胞の killing と Mac-1 の影響を調べた (Fig. 1)。proteose peptone による PEC も弱いながら killing を示し、Mac-1 によって阻害されたが、OK432 による PEC では著しい阻害が明らかである。

常在腹腔細胞やチオグリコレートによる PEC もペプトンと類似の傾向を示した。

2. OK432 投与後、1日、2日、3日、4日目の PEC を比較すると1日後が最も高く、その後徐々に活性が低下した ( Fig. 2 )。

3. 反応時間を5、14、21 時間で比較すると5時間では殆ど  $^{125}\text{I}$  の遊離がみられず、15時間以上を要した ( Fig. 3 )。

4. Mac-1 を精製して  $\text{F(ab}')_2$  にしたものでも、その量に応じて反応の障害がみられた ( Fig. 4 )。

5. Mac-2、LFA-1、I-A<sup>k</sup> に対する抗体は Yac-1 の killing を障害しなかった。Mac-1 や LFA-1 の  $\beta$  鎖に対する抗体では弱い障害がみられた ( Fig. 5 )

6. 種々の標的細胞を用いて killing に対する感受性を調べた ( Fig. 6 )。YAC-1 が最も感受性が高く、B16 や RL 81 も障害されるが、EL4 は障害されなかった。

7. OK432 投与後1日目の PEC の非付着性細胞はNK様活性を示し、4時間の  $^{51}\text{Cr}$  release で YAC-1 を殺すが、この反応は Mac-1 で障害されない ( Fig. 7 )。

8. OK432 と同様に補体の第二経路のアクチベーターであり、また抗腫瘍活性を示すことの知られている多糖体レンチナン、あるいは TAK を腹腔に投与し、1日後の PEC の活性を調べた。いずれの PEC も YAC-1 に対する障害活性を示し、その障害反応は Mac-1 抗体により障害された ( Fig. 8 )。

#### < 考 察 >

Mac-1 は LFA-1 ( leukocyte function associated antigen ) と共通の  $\beta$  鎖を有し、同一ファミリーに属する蛋白である。LFA-1 が CTL やNK細胞の killing に関与することから、Mac-1 もマクロファージや好中球の killing に関与しているのではないかと考えた。種々の刺激剤を用いて採取した PEC について検索した結果、OK432、レンチナンあるいは TAK で刺激後1日目の PEC は YAC-1 に対し細胞障害作用を有し、その活性は Mac-1 により強く障害された。

OK432 投与後4日目、あるいは BCG 投与後10~30日の、いわゆる活性化マクロファージの含まれる PEC では活性が弱く、Mac-1 による障害も微弱であった。標的細胞としては YAC-1、RL 81、B16 などNK感受性の細胞が感受性が高く、活性化マクロファージの標的細胞として知られる EL4、MM48などは感受性が低い。しかし G10カラムを通過させた正常マウスの脾細胞や、PEC の非付着細胞によるNK活性は Mac-1 で障害されなかった。したがって Mac-1 によって障害される細胞障害活性をもつエフェクターは、いわゆる活性化マクロファージやNK細胞とは異なるものであり、OK432等の投与により早期に増強されるものである。

Fig 1. Lysis of YAC-1 by PEC

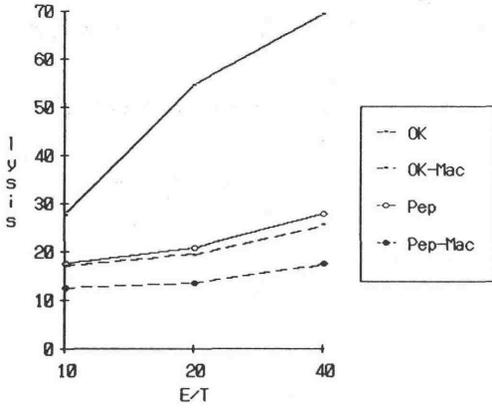


Fig 2. Lysis of YAC-1 by PEC

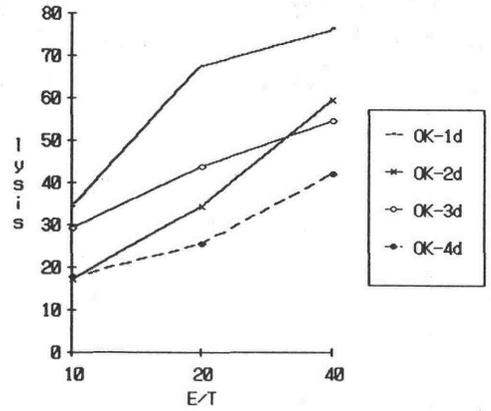


Fig 3. Time course of YAC-1 lysis

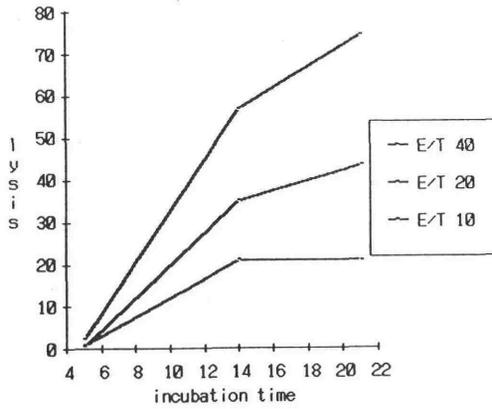


Fig 4. Effect of F(ab')2 anti-Mac1

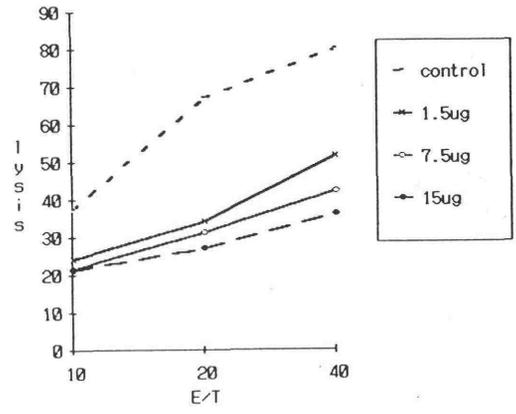


Fig 5. Effect of various antibodies

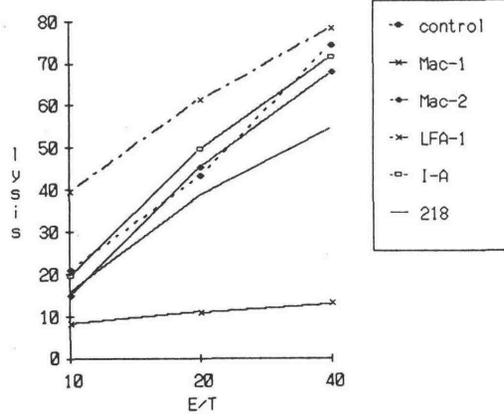


Fig 6. Lysis of various target cells

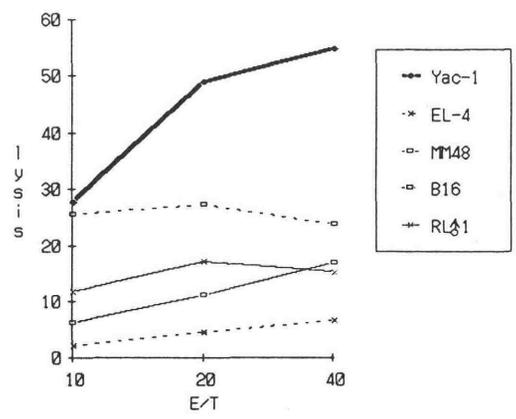


Fig 7. Effect of Mac-1 on NK activity

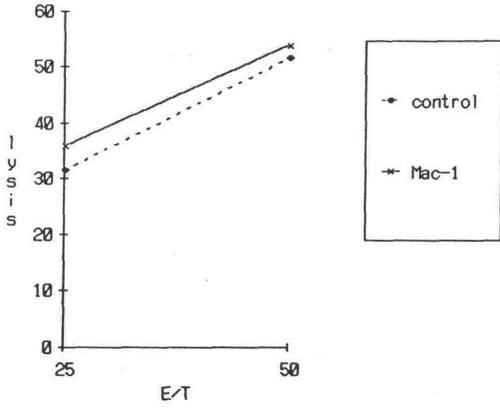
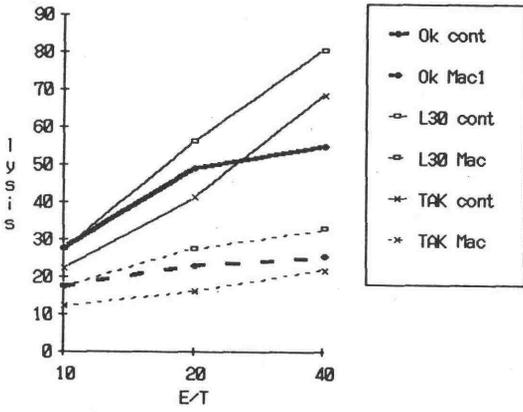


Fig 8. PEC elicited with OK432, lentinan or TAK



岡田則子<sup>1)</sup> 蔵屋幹夫<sup>1)</sup> 松下操<sup>1)</sup> 岡田秀親<sup>1)</sup> 藤田禎三<sup>2)</sup>

1) 福岡大学医学部微生物教室

2) 筑波大学基礎医学系免疫

はじめに：成人 T 細胞白血病 (ATL) 患者の血清中には ATL 細胞に対する抗体 (ATLA 抗体) が存在し、高力価である場合も多い。しかし、このような ATL 細胞は抗体及び補体による細胞障害を免れていると考えられ、その機序について解析を行っている。ATL の培養株化細胞を用いて抗体存在下での補体感受性を調べると異種の補体には比較的感受性であるが、同種補体に対してはきわめて抵抗性であることが示された (第 15 回日本免疫学会 15,481;1985)。そこで、種特異的に補体反応を抑制する膜上因子である decay accelerating factor (DAF) に対するモノクローナル抗体 (1C6) 及び、我々が新たに得たヒト赤血球をヒト alternative complement pathway を介して溶血するようにさせる抗ヒト赤血球モノクローナル抗体 (1F5) を用いて、ATL 細胞の補体抵抗性について検討した。

#### 〔方法〕

培養株細胞：MT2 (HTLV-1 感染 T 細胞株)、Raji (バーキットリンパ腫由来) 及び C24 (メラノーマ由来) を用いた。これらの各細胞をウサギに免疫して抗 MT2、抗 Raji 及び抗 C24 抗血清も用意した。

モノクローナル抗体：1C6 (IgG<sub>1</sub>) 及び 1F5 (IgG<sub>1</sub>) を Protein A アフィニティカラムにて精製したのちに、各々固定化ペプシン及びパインにて処理して、F(ab)<sub>2</sub> 及び Fab フラグメントを得た。

細胞障害試験： $3 \times 10^5$  個の細胞にモノクローナル抗体  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  を  $20 \mu\text{l}$  加え室温にて 20 分間反応後、希釈したウサギ抗血清  $20 \mu\text{l}$  を加え、GVB<sup>+</sup> 又は  $5\text{mM Mg} \cdot 10\text{mM EGTA} \cdot \text{GVB}$  にて希釈したヒト血清 (HuS-GVB<sup>+</sup> 又は HuS-MgEGTA)  $50 \mu\text{l}$  加えた。37°C 1hr 反応後 EDTA-GVB を加えて反応を停止させ、propidium iodide (PI)  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$   $20 \mu\text{l}$  を加え、室温で 5 分反応後遠心洗滌し、フローサイトメトリー (FACS Analyser) により PI 可染細胞を検出して、cytotoxicity を算出した。必要に応じてトリパンブルー法も行った。

膜上 C3 の定量：FITC 標識抗 C3 抗体と反応後、フローサイトメトリーにて検出した。

モノクローナル抗体の反応性：FITC 標識抗マウス IgG 抗体と反応後、フローサイトメトリーにて検出した。

### 〔結果〕

① HuS-EDTA 又は非働化 HuS 中で MT2 を incubate すると抗 C3 抗体と反応するようになる。HuS-MgEGTA 中での incubation は C3 の deposition を促進した。この条件では cytotoxicity は検出されなかった。1C6, 1F5 をあらかじめ反応させたのち、同様に行っても C3 deposition, cytotoxicity は共に変化しなかった。

② 1C6, 1F5 を反応させてから、抗 MT2 抗体を添加し、HuS-GVB<sup>++</sup> または HuS-MgEGTA 中で incubation すると 1C6 添加 MT2 の cytotoxicity が増強された。

③ この cytotoxicity の増強は 1C6-IgG whole molecule, F(ab)<sub>2</sub> および Fab フラグメントでも同様に起こった(Figure 1)。

④ 1C6-Fab フラグメント添加 MT2 は抗 MT2 抗体存在下に HuS-MgEGTA 中での C3 deposition を増強したが、抗 MT2 非存在下 C3 deposition には変化を及ぼさなかった(Table 1)。

⑤ MT2 以外の Raji や C24 では抗体存在下での cytotoxicity および C3 deposition に対して 1C6, 1F5 共に変化を与えなかった。

⑥ 1C6 及び 1F5 反応 MT2 の抗 mouse IgG 反応量は 1C6>1F5 であった。

### 〔まとめ〕

HTLV-1 感染 T 細胞株である MT2 は特異抗体の関与なしにヒト ACP を活性化し細胞膜上に多量の C3 を deposit する。それにもかかわらず、ヒト補体に対して細胞障害抵抗性を示す。MT2 の膜上 DAF を 1C6-Fab フラグメントでブロックすると C3 deposition の上昇と共に、細胞障害の増強がみられた。このことより MT2 においては、常時血清中の補体 C3 が deposition を起こしているにもかかわらず、特異抗体が加わっても、膜上 DAF が機能して、C3 deposition の増幅拡大が閾値をこえないように働き、細胞障害が起こらないようにしていることが示された。我々が新たに得たモノクローナル抗体 1F5 は MT2 細胞での抗原量が 1C6 より少なく、MT2 細胞上での補体反応の制御機能に対する抑制効果は検出されなかった。

Effect of 1C6 fragment on MT2 -HuC' lysis  
with anti-MT2 antibody

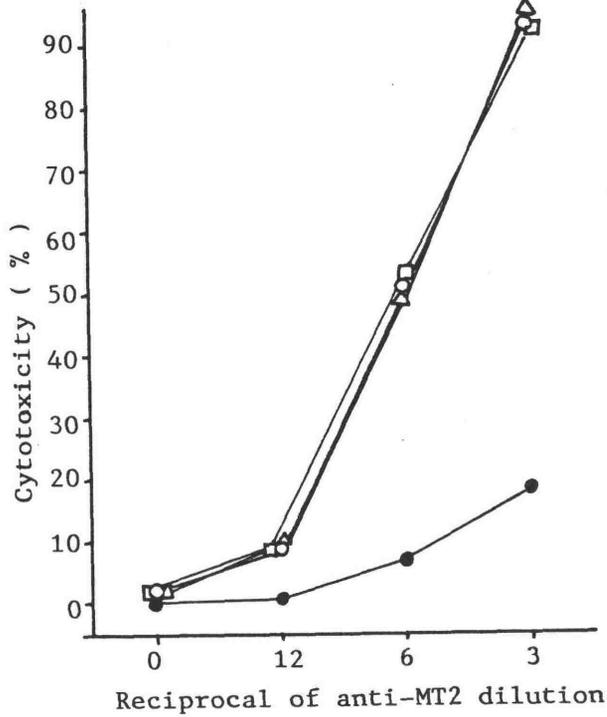


Figure 1. MT2 cells were preincubated with 1C6 (O), 1C6-F(ab')<sub>2</sub> (□), 1C6-Fab (Δ) or buffer alone (●) at R.T. for 20 min, and incubated with anti MT2 and HuS as a complement source.

Table 1. Enhancement by 1C6-Fab of C3 deposition on MT2 at reaction with anti MT2 and human complement in GVB<sup>++</sup>

MoAb	peak channel value of C3 deposition			
	1/5 HuS		1/15 HuS	
	aMT2(+)	aMT2(-)	aMT2(+)	aMT2(-)
1C6-Fab	162.8	29.6	66.6	14.2
1F5-Fab	58.2	28.0	15.4	12.1
buffer	59.8	20.8	13.8	8.1

# 尿DAFの精製

石川曜子\* 杉田雄二\* 鷗沢真由美\* 富田 基郎\*

木下 タロウ\*\*

\* 昭和大・薬・生理化学

\*\* 大阪大・医・細菌学

## 〔はじめに〕

DAF (Decay-accelerating factor) は補体活性化を阻害する因子としてられている。赤血球膜上に発見されたDAFは分子量70Kの一本鎖糖蛋白であり、細胞表面上のC3b、C4bに結合することにより古典的経路、第二経路のC3、C5コンバーターゼの生成を阻害、解離失活化させる機能を持つ。現在、DAFは血液細胞、上皮細胞、およびそれらの細胞培養株の表面膜以外に、外分泌液中、尿中にも見い出されており、膜型と分泌型とが考えられている。発作性夜間血色素尿症 (PNH) では赤血球膜DAFの欠損が一因とされておりDAFの構造、性状の解明はこのような補体感受性による溶血性疾患に重要な手掛かりとなると考えられている。又、DAFのみならずPNHにおいてはアセチルコリンエステラーゼ、アルカリ性ホスファターゼも低値を示すといわれている。これら一群の膜蛋白質はC末のアンカー部分にphosphatidyl inositol (PI) を含むPI型蛋白であると、最近示唆されている。今回分泌型DAFを膜型DAFと比較するために、我々は尿中よりDAFの大量精製を試み、その構造解析を行なった。

## 〔方法〕

90倍濃縮尿4.9L (すなわち原尿としては441L、持田製薬より供与された) を硫酸塩析したところ、硫酸35~60%沈殿分画にDAF活性が認められた。この沈殿を溶かしイオン交換水に透析後遠心し、その上清を20mMリン酸緩衝液、pH7.5に調整し、同緩衝液で平衡化したDEAE-Sephacel (4.5x27cm) イオン交換クロマトグラフィーにかけて、同緩衝液中0-300mM NaClによる塩濃度勾配で溶出した。DAF活性測定と抗DAF抗体を用いたイムノプロットングで確認して得られたDAF分画を限外濾過により濃縮後、Sephacryl S-300 (2.5x128cm) でゲル濾過を行なった。同様にして得られたDAF分画を濃縮後、更にBio-Gel A 0.5 m (3.5x93cm)

によるゲル濾過を行ない、DAF活性部分を分取した。ついでDAFと挙動を同じくして混在してくる蛋白を除くため、アフィニティークロマトグラフィーを行なった。すなわちウサギIgG-Sepharose(2,0x6,5cm)にて非特異を除去した後、ヒト赤血球膜に対するDAFモノクローナル抗体(2,5mg/ml)を用いたanti-DAF Mab Sepharose(1,5x1cm)によりMedofらの方法(1)に基づいて精製した。

#### [結果と考察]

硫酸沈殿35-60%分画に80%近くのDAF活性が存在した。DEAE-Sepharose Iオン交換クロマトグラフィーではSDS-PAGEにおいては、DAFと予想されるバンドは同定できず、イムノブロッキングと活性測定の結果からフラクションNo. 90-115をDAF活性部分として得た(図1)。続いて行なったSe-phacryl S-300, Bio-Gel A0,5mのゲル濾過により、SDS-PAGEの結果から推定すると30%純度にまで精製された。anti-DAF Mab Sepharoseでのアフィニティークロマトグラフィーでは50mMジエチルアミン、140mMNaCl, pH11,5での溶出部分にDAF活性の高い、単一バンドが得られた(図2、3)。DAFは60-70Kの拡散したバンドとして観察され、なんらかのheterogeneityがあると思われる。精製行程における総蛋白量と比活性の結果を(表1)に示した。本精製法で約5mgのDAFが得られる。現在この精製DAFを用いて構造解析や諸性質の検討を行なっているが、特に現在報告されている膜型DAFの構造(2)と比較検討し未だ不明な点の多い分泌型DAFの構造および機能を解明したい。

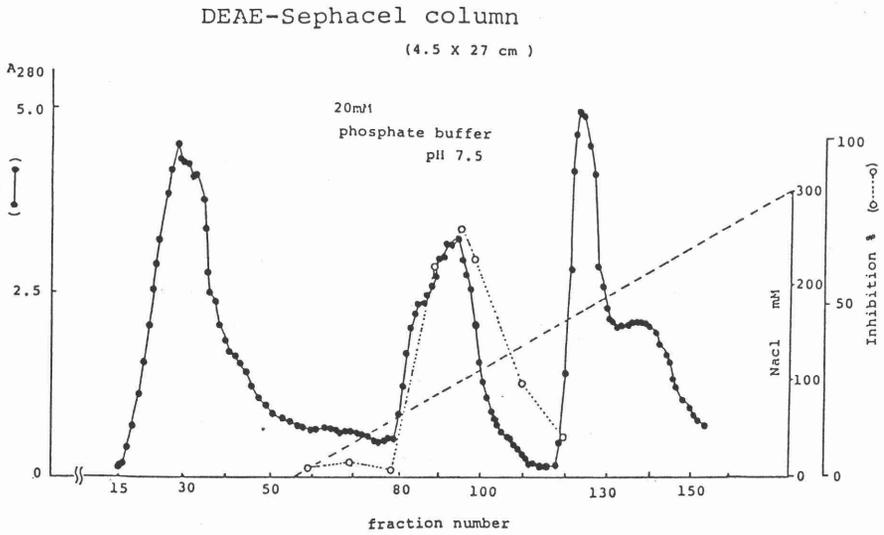
#### [謝辞]

濃縮尿を供与して頂いた持田製薬株式会社に深く感謝いたします。

#### [文献]

- (1) Medof, M.E. et al. (1987) J.Exp.Med., 165, 848-864
- (2) Caras, I.W. et al. (1987) Nature, 325, 545-549

(图1)

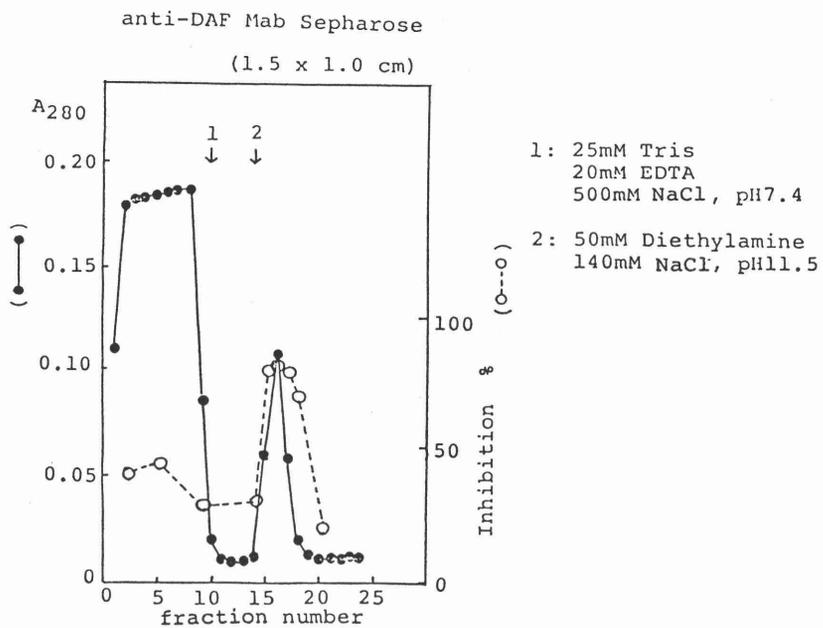


(表1)

Amounts of protein and activities  
during the isolation of urine DAF.

Purification procedure	Proteins (mg)	Activities	
		Total (units)	Specific (units/mg)
urine	17,738	39,690	2
ammonium sulfate 35-60% ppt.	5,652	34,650	6
DEAE-Sephacel	465	6,881	14
Bio Gel A-0.5m	52	4,960	95
anti-DAF Sepharose	4.6	428	465

(图2)



(图3)

SDS-PAGE analysis  
of purified urine DAF

-66K

-45K

-29K

# 40 ウサギ DAF の精製とその性質

杉田 雄二、 鷺沢 真由美、 富田 基郎  
昭和大学・薬・生理化学

## 【はじめに】

当初、モルモット、ヒト赤血球膜より精製された DAF (decay-accelerating factor) は、自己の補体攻撃から我が身を守る為、補体と接触する全ての細胞膜上に存在しているらしい。この様な役割を持つ膜制御因子は恐らく全ての動物種の赤血球膜上に存在すると思われるが、その作用機作が一樣であるとは考えにくい。今回、我々は、膜制御因子の理解をさらに深めるため、ウサギ赤血球膜について制御因子の検討をおこなった。

## 【材料と方法】

ウサギ赤血球膜は、赤血球を低張緩衝液で処理後、連続遠心により調製した。C5コンベルターゼ崩壊促進活性は、K76-モノカルボン酸処理したモルモット血清とヒツジ感作赤血球を用いて EAC1-3b、P を作成し、ヒト DAF 活性測定(1)と同様に行った。精製タンパク質のアミノ酸組成は、ピコタグワークステイション(ウオーターズ)を用い塩酸加水分解後、PTC-アミノ酸とし、TSKゲル ODS-80T<sub>M</sub>(東洋ソーダ)により分析した。

## 【結果】

### 1) 制御タンパク質の精製

ウサギ赤血球膜ブタノール抽出液を出発材料として、C5コンベルターゼ崩壊促進活性を指標にして制御タンパク質の精製を行なった。ヒト DAF の精製(1)に準じた操作により、SDS-PAGE でほぼ単一バンドを示す迄に精製できた(ヒト DAF 精製と異なり、ストローマのトリプシン前処理は行なわなかつた)。表1に精製のまとめを示す。赤血球膜 5.78 g から、約 2.5 mg の精製標品が得られた。非還元下 SDS-PAGE の移動度から分子量は 66 kDa であり、ヒト DAF よりも少し小さかつた(図1)。アミノ酸組成はヒト DAF とよく似ていた(表2)。

### 2) ヒト CR1、DAF との比較

粗活性分画を <sup>125</sup>I ラベルした後、ヒツジ赤血球と 37°C, 2 時間反応させ、赤血球をよく洗った後、赤血球に結合したタンパク質をオートラジオグラフィ

ーで分析したところ、66 kDaのタンパク質が、選択的に結合していた。又、この結合反応は、50  $\mu$ g/mlのLDL添加により、ほぼ完全に阻害された。さらに、この制御タンパク質のコンベルターゼ崩壊促進活性に及ぼすLDLの効果をヒトDAF, CR1と比較したところ、ヒトDAFと同様に、効率のよい阻害が見られたが、CR1は阻害を受けなかつた(図2)。次に、ヒト、ウサギC3-セファロースへの親和性を検討した。ヒト(図3a)、ウサギ(図3b)C3-カラムでヒトDAF, ウサギ精製タンパク質は、結合はしないものの、それぞれ同動物種の組み合わせのとき、明らかな溶出の遅れが見られた。又、ヒトCR1は、これら2種のC3カラムに結合した。

#### [考察]

最近、ヒトDAFは、C末にホスファチジルイノシトール(PI)を含むオリゴ糖が共有結合していて、PIの脂肪酸部分が膜アンカーである事が明らかとなつた。ヒトDAFの赤血球への結合、又、HDL, LDLによる、この結合の阻害は、PIと細胞膜、あるいはリポ蛋白質との相互作用によると考えられる。さらに、ヒトDAFは、CR1に比べ、C3との親和性がはるかに低い。これら、ヒトDAFとの性質やアミノ酸組成の比較から、我々の精製したウサギ赤血球膜タンパク質は、DAFであると考えられる。又、同じ動物種のC3-カラムからのDAFの溶出に遅れが見られたことから、DAFは、ウサギ、ヒトC3の相同性の低いドメインと親和性があるのであろう。最近、Horstmann, Muller-Eberhardは、ウサギ赤血球がI因子のコファクター活性をもつ事、またウサギC3を結合したヒツジ赤血球とロゼット形成をする事からCR1の存在を示唆した(2)。しかしながら、我々の実験では、ブタノール抽出液中にはDAFに由来する崩壊促進活性しか検出できなかつた。これはCR1の量が少ない為か、崩壊促進活性を持たない別の制御たんぱく質が存在するのか今のところ不明である。

#### [文献]

- (1) Sugita et al. (1986) J. Biochem. 100, 143
- (2) Horstmann and Muller-Eberhard (1986) Eur. J. Immunol. 16, 1069

Table 1. Total activities and amounts of protein during the isolation of rabbit DAF<sup>a)</sup>.

Purification procedure	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (units/mg)
1.Extracts	1,251,450	517	2,421
2.DEAE-Sephacel	803,014	55	14,600
3.2nd Bio-Gel A-0.5m	677,960	2.4	282,483

a) All assays of decay-accelerating activity were done in the range that the dose-response was linear. One unit of decay-accelerating activity was defined as the amount of activity to cause a 30% reduction of convertase sites.

Table 2. Amino acid compositions of rabbit and human DAF<sup>a)</sup>.

Amino acid	mol%	
	Human <sup>b)</sup>	Rabbit
Asp	8.0	7.9
Thr	8.0	7.1
Ser	14.1	11.5
Glu	14.1	11.6
Pro	6.8	7.4
Gly	5.4	7.5
Ala	7.4	8.4
Cys	1.5	ND
Val	5.5	7.1
Met	1.0	1.3
Ile	4.2	3.6
Leu	7.8	8.1
Tyr	3.2	2.8
Phe	3.1	3.7
Lys	4.9	6.6
His	2.3	1.2
Arg	2.8	4.2
Trp	ND	ND

a) Values are not corrected for losses during hydrolysis (24hr).

b) values are quoted from our previous report (1).

图1



图2

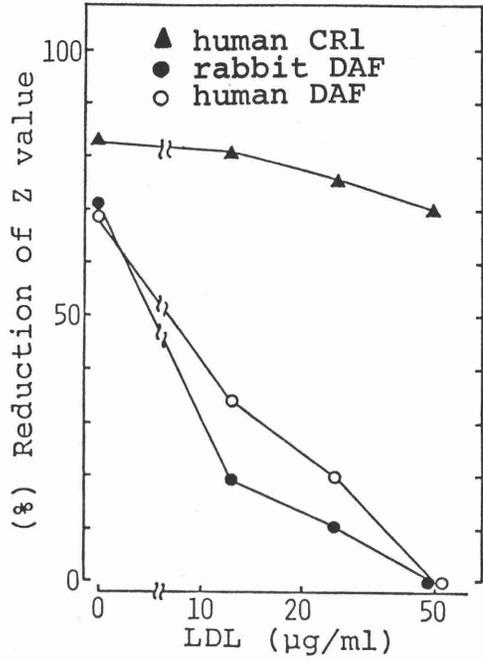


图3 a

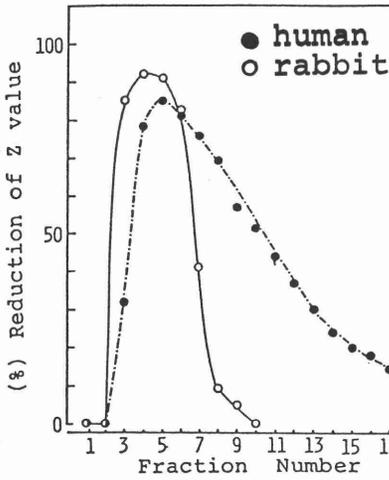
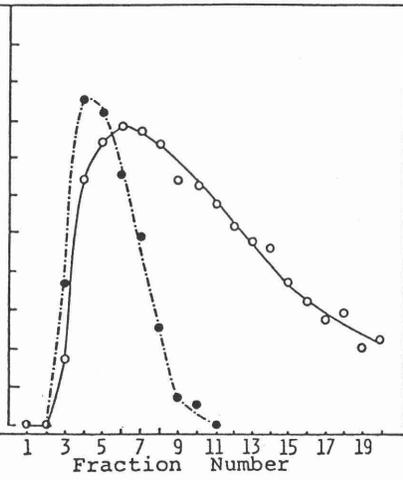


图3 b



## 41 DAFの作用機序について

井上敏矢 藤田禎三 飯田恭子 田村昇  
筑波大学基礎医学系免疫

### [目的]

Decay-accelerating factor (DAF) は自己細胞膜上での補体系の活性化を阻害する因子であり、古典経路および第二経路のC3分解酵素の活性化を阻害している。しかしDAFの作用機序についてはC3分解酵素の形成を阻害するのか、または形成されたC3分解酵素からのC2a, Bbの解離失活を促進することによるのか、未だ明らかではない。今回我々は、DAFが、C4bとC2、C3bとB因子の結合には全く影響を与えず、C2aとBbに作用し、結合部位より解離させることを明らかにした。

### [方法]

#### 1. C4b2a Siteの形成および解離失活

EAC14に精製したDAFを少量結合させ、酸化したC2を加える前、または加えた後に抗DAF単クローン抗体1C6を作用させ、30度でインキュベートし、C4b2a Siteの解離失活を経時的に測定した。

#### 2. EAC14によるC2の消費に与えるDAFの影響

EAC14および精製したDAFを結合したEAC14-DAFを用いてEAC14によるC2の消費を溶血活性で測定し、比較した。

#### 3. オートラジオグラフィ

(1) 古典経路 ヨード125で標識したC2をEAC4bおよびEAC4b-DAFに結合させ、C1を加え30度でインキュベートし、C2の分解および解離を経時的に、オートラジオグラフィで調べた。また、ヒトEAC4bを用いて、ヒト赤血球膜上のnativeなDAFについても、同様な実験を行なった。

(2) 第二経路 EAC43bおよびEAC43b-DAFにヨード125で標識したB因子を結合させ、D因子を加え、30度でインキュベートして、B因子の分解、Bbの解離を経時的にオートラジオグラフィで調べた。

### [結果と考察]

図1に示すように、C2を加える前に1C6を作用させた場合、C4b2a siteの形成および解離失活が、それぞれコントロールと同程度になっている。一方、C2を加えた後に1C6を作用させた場合、C4b2a siteの形成

は抑制されたままであるが、DAF の解離失活活性は阻害され、コントロールと同程度になっている。

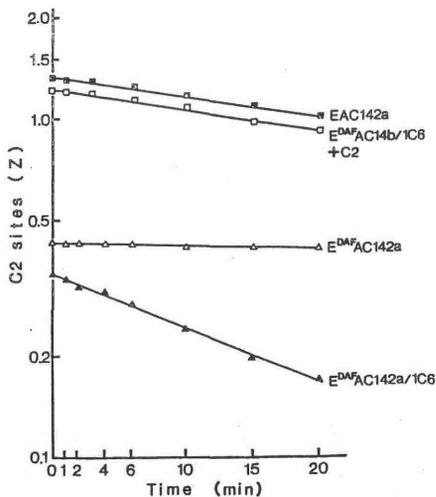
このことから、DAF は細胞膜上に組み入れた場合も、C4b2a の解離失活を促進する因子であることが明らかとなった。また、図 2 に示すように、EAC14b-DAF は、EAC14b に比較して、C2 を、より速く分解している。このことから、DAF は EAC14b と native な C2 との結合を阻害する活性は持たないと考えられた。

オートラジオグラフィの結果は上記の結果を、より直接的に示している。即ち古典経路において EAC4b および EAC4b-DAF に対する native な C2 の結合は同程度であり、C1 によって C2a と C2b に分解される速度も同じであった。しかし、EAC4b に結合した C2a が、ゆるやかに解離していくのに対して、EAC4b-DAF に結合している C2a は大部分がすみやかに解離した。(図. 3)

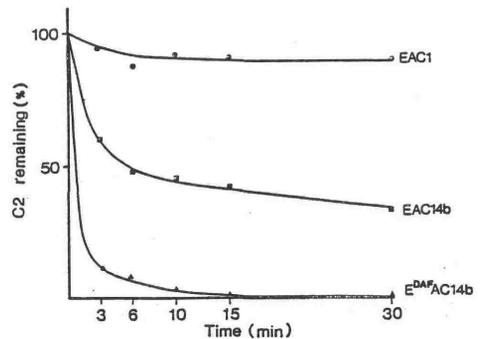
また、ヒト EAC4b から C2a がすみやかに解離しているが、IC6 で処理することにより、C2a がゆるやかに解離するようになった。(図. 4)

第二経路においても EAC43b および EAC43b-DAF に対する B 因子の結合は同程度であり、D 因子による Ba, Bb への分解速度も同じであったのに対し、EAC43b-DAF においては Bb の解離が、EAC43b に比較して、速くなっていた。(図. 5)

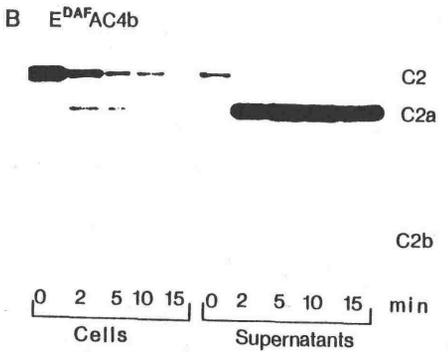
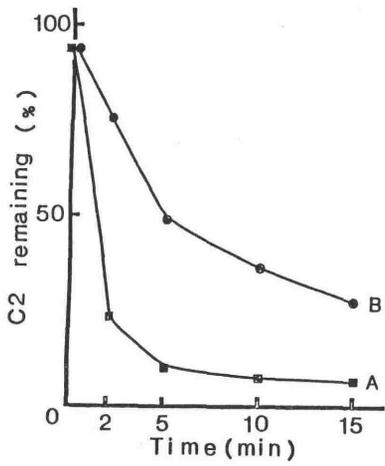
以上の実験により、DAF は C2 および B 因子の C4b, および C3b への結合を阻害するのではなく、C4b2a および C3bBb からの C2a, Bb の解離を促進することにより C3 分解酵素の活性を阻害することが明らかとなった。



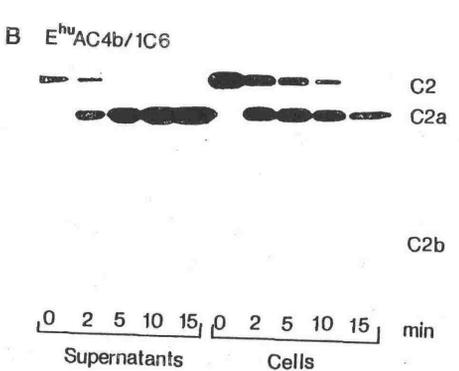
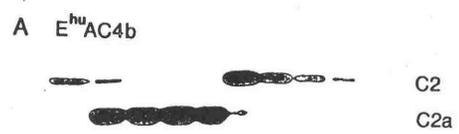
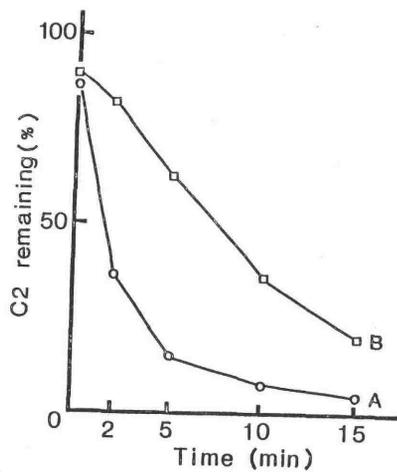
1



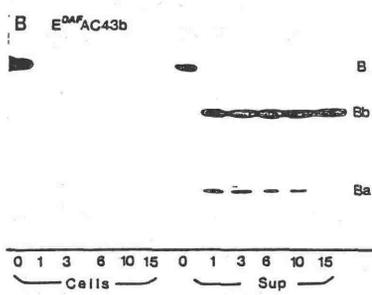
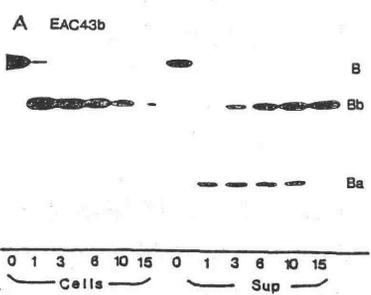
2



**3**



**4**



**5**

## 42 マウス補体レセプターの研究：CR1の分布、CR2の同定、CR1とCR2の免疫学的交差性

木下タロウ、竹田潤二、洪 卿秀、小園晴生、酒井寛、井上公蔵  
大阪大学医学部 細菌学教室

### 目的

1型補体レセプター（CR1）は、C3b、iC3b、C4bで標識された異物を結合する。ヒトCR1は分子量約22万の膜タンパク質で、赤血球、多形核白血球、マクロファージ、Bリンパ球等に広く存在する。食細胞のCR1は、標識された異物の貪食に働き、赤血球CR1は、血中の免疫複合体（抗原・抗体・補体複合体、以下IC）を捕捉運搬し、肝クッパー細胞に伝達する。このようにCR1は異物のクリアランスに重要な働きをしている。マウスは、異物のクリアランスの動物モデルによく用いられるが、マウス、モルモット等では、赤血球ではなく血小板がクリアランスに働くことが多くの研究で示されている。しかし、マウスCR1に対する抗体が作られていなかったため、各種細胞での分布など基本的な情報が欠如しており、血小板にCR1が存在し、ICを結合しているかどうか不明であった。我々は、すでにマウスCR1を脾細胞から精製し、分子量19万のタンパク質であることを報告した（Kinoshita et al., 1985, J. Immunol. 134: 2564）。今回はマウスCR1に対するモノクローナル抗体を作成し、CR1の分布を調べたので報告する。

一方、2型補体レセプター（CR2）は、ヒトにおいて成熟Bリンパ球に存在する分子量15万の膜タンパク質であると同定されている。CR2の生理的意義は充分解明されていないが、Bリンパ球の活性化あるいは増殖に関与していると報告されており、また Epstein-Barrウイルスのレセプターでもある。今回マウスのCR2を同定し、またCR1とCR2の間に免疫学的交差性を見いだしたのであわせて報告する。

### 方法

1) 抗マウスCR1モノクローナル抗体の作成：マウス脾細胞抽出液からC3-セファロースによるアフィニティークロマトグラフィーでマウスCR1を部分精製した。この標品で免疫したSDラットの脾

細胞をマウスミエローマと融合し、得られたハイブリドーマの培養上清をWestern blotting 法でスクリーニングした。すなわち部分精製 CR 1 を SDS-PAGE で分離後ニトロセルロース膜に transfer しておき、これに培養上清を反応させた。ヨードで標識したウサギ抗ラット IgG でモノクローナル抗体の結合したバンドを検出した。こうして7種の抗マウス CR 1 産生クローンを得た。このうち3種のカッパ鎖抗体産生クローン (8 C 1 2, 7 E 9, 7 G 6) から、マウス抗ラットカッパ鎖モノクローナル抗体—セファロースを用いて抗体を精製した。

2) Immunoprecipitation: 細胞を Iodogen 法を用いて<sup>125</sup>I で、surface label 後 NP 40 で抽出した。抽出液にモノクローナル抗体を加え反応後、抗ラット抗体—セファロースで抗原抗体結合物を集め洗浄後 SDS-PAGE のサンプルバッファーで溶出し、SDS-PAGE で解析した。

3) 細胞表面へのモノクローナル抗体の結合: 細胞をヨードラベルした抗体と室温で60分反応させた。非特異結合の測定には、ラベルしていない抗体を過剰量同時に存在させた。脾細胞、マクロファージ、赤血球の場合には反応液を oil (フタル酸ジブチル: フタル酸ジニル, 6:4) に重層し、遠心して沈澱と上清に分離しカウントした。血小板は遠心で3回洗浄後カウントした。

4) ロゼット反応: EC 3 b は、EAC 1 gp 4 hu 2 hu にマウス C 3 を反応させ cell 当り 6000 分子の C 3 b を結合させた。EC 3 d は EC 3 b をマウス H とマウス I で処理して EC 3 b i にした後、さらに trypsin 処理して得た。ラベルした C 3 を用いて C 3 d への分解が完全に進んでいることを確認した。

ロゼット反応は、B-lymphoma (WEHI 279, 2PK3) を EC 3 b あるいは EC 3 d と 37°C で 30 分間反応後観察した。抗体による阻害をみる時は、B-lymphoma を抗体とあらかじめ室温で 15 分間処理した後、indicator cell を加えた

5) CR 1 のコファクター活性の測定: <sup>125</sup>I で標識したマウスの C 3 b をマウス I と CR 1 で 37°C、60 分間反応させた後、還元 SDS-PAGE で  $\alpha'$ -chain の分解を解析した。

6) Flow cytometry: マウスの脾細胞、胸腺細胞、腹腔細胞、末梢血細胞をモノクローナル抗体で間接蛍光染色し、スペクトラム III で解析した。

## 結果

### 1) マウスCR1の分布。

モノクローナル抗体8C12は脾細胞表面に特異的に結合し、また surface label した脾細胞の抽出液から分子量19万のCR1を特異的に沈澱させた。8C12はI因子によるC3bのiC3bへの分解反応におけるCR1のコファクター活性を阻害した。また、B-lymphomaとEC3bの間のロゼットを阻害した。これらの事から8C12は、CR1のリガンド結合部位を認識する抗体であると考えられた。

8C12を用いた flow cytometry あるいは、ヨードでラベルした8C12の細胞表面への結合実験でCR1の分布を調べた。CR1は、脾リンパ球、末梢血リンパ球、末梢血顆粒球、腹腔マクロファージには存在したが、胸腺リンパ球には存在せず、ロゼット反応から予想されていた分布が確認された。赤血球には、CR1は検出されなかった。予想に反して、血小板にもCR1は検出されなかった。さらに、以下の二つの結果からも、血小板にはCR1が存在しないと考えられた。即ち、8C12は、血小板とEC3bの間のロゼットを阻害しなかった。また、surface label した血小板の抽出液からは8C12でCR1のバンドが検出されなかった。

### 2) マウスCR2の同定と、CR1との免疫学的交差性。

モノクローナル抗体7G6は、surface label した脾細胞の抽出液から、CR1のバンドだけでなく分子量15万のバンドをも沈降させた。そこで、EC3dとB-lymphomaの間のロゼット反応に対する影響を調べると、このCR2によるロゼットは、7G6で阻害された（なお、8C12はこのロゼットを阻害しなかった）。また、7G6は胸腺細胞にはまったく結合しなかった。これらの事から、7G6はマウスCR2を認識していると考えられた。

もうひとつのクローン7E9も surface label した脾細胞抽出液から分子量19万と15万の2本のバンドを沈降させたので、7E9もCR2を認識していると考えられた。また、7G6と7E9を組み合わせるとCR1のサンドイッチラジオイムノアッセイが組め、それぞれ単独では組めなかったため、二つのクローンは、異なるエピトープを認識することがわかった。

## 考察

マウスCR1のリガンド結合部位に対するモノクローナル抗体を用いてCR1の分布を調べたところ、Bリンパ球と食細胞に存在し、Tリンパ球には存在しないという予想通りの結果であった。赤血球にはCR1がまったく検出されず、これもロゼット反応からの予想が確かめられた。しかし血小板にもまったくCR1が検出されなかった。これは、マウスにおいてICを運搬する血小板の immune adherence receptors がおそらくCR1とは異なるC3結合性因子であることを示唆している。

7G6がEC3dとB-lymphoma間のロゼットを阻害すること、脾リンパ球には結合するが、胸腺細胞には全く結合しないこと、そしてヒトCR2の分子量が15万であることから、7G6の認識する分子量15万の分子がマウスCR2であると考えられた。

ヒトのCR1とCR2には、アミノ酸配列、DNA塩基配列に相同性が見いだされており、ともに60残基のアミノ酸配列が繰り返している構造を持っている。またCR1のリガンド結合部位を認識するモノクローナル抗体がCR2と弱く反応する。マウスのCR1と分子量15万の分子に少なくとも2つの共通のエピトープが存在することは、分子量15万の分子がCR2である可能性はさらに支持している。

### 43 ヒト alternative complement pathway を介してヒト赤血球を溶解する抗ヒト赤血球モノクローナル抗体の検索

岡田則子 原田良子 秀島輝 亀好良一 岡田秀親

福岡大学医学部微生物学教室

〔はじめに〕

自己又は同種の細胞膜上では補体の反応による障害がむやみに起こらないように仕組まれている。そのような抑制因子として、例えば赤血球では DAF や C8 binding protein あるいは homologous restriction factor (HRF) 等が知られているが、これら膜上の種特異的補体反応制御因子の全体像を把握するには及んでいないと思われる。そこで我々は、ヒト赤血球に反応してヒト alternative complement pathway (ACP) を活性化して溶血を起こすようにするモノクローナル抗体の検索を行い、得られた抗体の反応分子についての解析をすすめている。

〔方法〕

モノクローナル抗体の作製：ヒト赤血球 (HuE) を Balb/c マウスに免疫し、その脾細胞と P<sub>8</sub>U-1 (Balb/c 由来 AZG 耐性形質細胞腫株) とで抗体産生ハイブリドーマを得た。assay は、HuE, Neuraminidase 処理 (Neu-HuE) および Proteinase-K 処理 HuE (Prot-HuE) の凝集 (HA) および 5mMMg-10mMEGTA-GVB にて 3 倍希釈したヒト血清 (HuS-MgEGTA) 添加による溶血 (HL) 反応を行った。

DAF 活性抑制効果の検討：ヒト赤血球より Nicholson-Weller らの方法にて得た DFA 画分による EAC142 の溶血活性の阻止効果に、得られたモノクローナル抗体が影響を及ぼすかを調べた。

フローサイトメトリーによる細胞への反応性：FACS Analyser を用いて有核細胞及びモルモット血球への反応性を間接蛍光抗体法にて検討した。

PNH 患者血球への 1F5 反応性：PNH 患者 (2例) 血球を Ficoll-Paque にて赤血球と白血球分画に分けた。赤血球は更に Ham test 及び Sucrose test を行い残った赤血球についてもフローサイトメトリーにより 1F5 反応性を検討した。DAF のモノクローナル抗体 1C6 を筑波大学藤田助教授より分与を受け、同時に検討した。

〔結果〕

① 得られた抗体産生ハイブリドーマは、HuE に HA 活性を示すウェル 368 のうち、HuS-MgEGTA で溶血するウェルは 0 であった。Neu-HuE に HA 活性を示すウェル 245 のうち、HL を示したのが 2 ウェル、Prot-HuE での HA 活性を示すウェル 189 のうち HL を示したのが 2 ウェルであった。Neu-HuE で HL 活性のあるクローン 1F5 (IgG<sub>1</sub>) 及び 1F9 (IgG<sub>3</sub>)、Prot-HuE で HL 活性のあるクローン 7C8 (IgM) 及び 3B2 (IgM) を得た。この 4 クローン中 1F5 は、HA 価に比較して最も強い HL 活性を示した。

② 各々の抗体の DAF 活性抑制効果を検討した結果 1F5 は 20% inhibition を示した。他の 1F9, 7C8 及び 3B2 は抑制効果を示さなかった。

③ 培養系細胞への各抗体の反応を調べると 1F5 は Raji (ヒトバーキットリンパ腫由来), MT2 (HTLV-I 感染症ヒト T 細胞株), C24 (ヒトメノラーマ由来) の各細胞と反応した。3B2 は C24 と弱く反応した。1F9 及び 7C8 は反応しなかった。又 1F5 はモルモットの赤血球及び白血球とは反応しない。

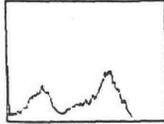
④ 健康人赤血球では 1F5 は 100% 強陽性に反応するが、PNH 赤血球では症例 1 で 35% , 症例 2 で 54% が陰性を示した。これらの PNH-E は Ham test 後には 13% 及び 32% に、Sucrose test 後には 7% 及び 11% に 1F5 反応陰性の赤血球が減少した (Figure 1)。又、PNH-白血球にも 1F5 反応性の低下が認められた。1C6 反応性については FACS Analyser では検出感度が悪く、二次抗体法では解析はできなかった。

#### 〔まとめ〕

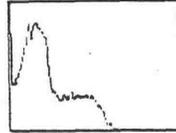
ヒト赤血球をヒト ACP で溶解出来るようにする抗ヒト赤血球モノクローナル抗体を作ることは出来なかった。しかし、膜上シアル酸が種とは無関係に ACP を抑制する効果のあることが分かっている (Okada N. et.al. Nature 299,261 1982; Immunology48,129 1983) ので、Neuraminidase でシアル酸を除いて検討し、1F5 モノクローナル抗体を得た。この 1F5 はヒトの赤血球のみならず、白血球や他の癌細胞にも広く存在する抗原を認識するが、この抗原はモルモット血球には存在しない。この 1F5 が非常に弱いながら DAF 活性の抑制を示したことから抗 DAF モノクローナル抗体 1C6 と対比して検討を進めたが、フローサイトメトリーによる抗原分布の違いより、1F5 は抗 DAF 抗体とは異なるものと思われる。PNH 患者血球における 1F5 negative population の出現及び Ham test, Sucrose test による異常赤血球除去によるその減少は、1F5 抗原の消失が本疾患と明瞭な相関を持つことを示している。

PNH は、補体反応に影響する分子として、DAF 欠損 (Medof M.E. et.al. Proc. N.A.S. 82,2980 1985; Davitz M.A. et.al. J. Exp. Med. 163;1150 1986) のみならず、Homologous restriction factor (Zalman E.T. et.al. J. Exp. Med. 165,572 1987) の欠損も報告されており、これらの分子と同様に phosphatidylinositol を anchor lipid とするアセチルコリンエステラーゼの欠損 (Futerman A.H. et. al. Biochem. J. 226,369 1985) 等、PNH 血球異常の統一的な解釈もなされつつある。我々の得た 1F5 モノクローナル抗体の反応分子の同定を現在進めている。

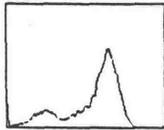
patient I  
PNHE



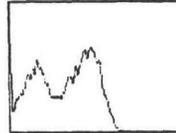
patient II  
PNHE



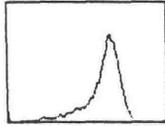
PNHE-Ham



PNHE-Ham



PNHE-sucrose



PNHE-sucrose



Normal



Normal

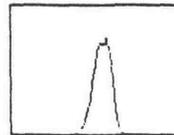


Figure I

## 44 ヒト血液細胞における Membrane cofactor protein (MCP) の分布

瀬谷 司, John P. Atkinson

Washington University School of Medicine, St. Louis

[はじめに]

ヒト補体の活性化によって、異物（ある種の細菌など）は破壊をうけるが、正常自己細胞は破壊を免れる。この補体の自己認識の mechanism は長く不明であったが、近年、細胞上の補体制御因子である Decay-accelerating factor (DAF), C3b receptor (CR1), Homologous restriction factor (HRF) による『宿主細胞の自己補体からの防御』が示されつつある。我々はヒト血液細胞および cell-line から、I の cofactor として働く新たな制御因子を同定し、Membrane cofactor protein (MCP) と名付けた。MCP は 1) SDS-PAGE で Mr 45,000~70,000、多くは doublet、2) I の cofactor として C3b, C4b を iC3b, iC4b に限定分解する。3) Decay-accelerating activity はもたない。従って、MCP の活性の profile は DAF のそれと相補的である。4) 恐らくは自己細胞上に沈着した C3b を不可逆的に不活性化するように働く。などの点が明らかにされてきた。今回、我々は、ウサギ抗ヒト MCP 抗体 を作成し、血液細胞上の MCP の分布を調べたので報告する。

[方法]

MCP の精製及び抗体作成; MCP はヒト T cell-line, HSB-2 から既報のごとく精製した。抗体は MCP 0.3 $\mu$ g を6度にわたってウサギに免疫して得た。

Cofactor 活性; Methylamine 処理 C3 を、SH 蛍光試薬, DACM で標識し、DACM-C3<sub>MA</sub> とした。一定量の DACM-C3<sub>MA</sub> と I を MCP のサンプルに加え、37°C、2~6時間インキュベートした。C3 の蛍光  $\alpha$  鎖が  $\alpha 1$  fragment に変換した割合(%Cleavage)から MCP の Cofactor 活性を見積もった。

血液細胞の分離; Heparin 加 新鮮血 (10ml) から遠心で platelet rich plasma (PRP) を調製し、PRP から platelets (PL) を得た。残りの沈降細胞から、Ficoll-Hypaque 法によって mononuclear cells を分離した。polymorphonuclear leukocytes (PMN) と erythrocytes (E) は Ficoll の沈澱

画分に methylcellulose を加え、沈降分離法によって精製した。

Flowcytometry; 一次抗体のソースとして、抗MCP F(ab')<sub>2</sub> を調製した。二次抗体として、FITC をラベルしたヤギ抗ウサギIgG抗体を購入した。マーカー抗体として Phycoerythrin をラベルした以下のものを購入した; Leu2a (Suppressor/cytotoxicT), Leu3a (HelperT), Leu3m (Monocyte), Leu11 (NKcell), Leu12pe (Bcell)。分離した血液細胞を一次抗体及び plasma と混ぜ、30分後に洗浄した。次に細胞に二次抗体、plasma、ヤギIgGを加えて、非特異的な二次抗体の吸着を防ぐとともに蛍光染色を施した。Two-dimensional flowcytometry の場合、二次抗体と共にマーカー抗体も加え、緑・赤の同時染色を施した。洗浄後、直ちにFACS4000 (Becton-Dickinson) で細胞の蛍光解析を行った。

Immunoprecipitation; 細胞の surface-labeling は Lactoperoxidase 法で行った。有核細胞及び PL はそのまま、E は ghost にしてから NP-40 で可溶化し、抗MCP抗体と Staph Cowan (Calbiochem) で immunoprecipitation を行った。サンプルは SDS-PAGE と autoradiography で解析した。

## [結果]

抗MCP抗体の characterization; 抗MCP抗体は MCP の cofactor 活性を阻害したが、CR1, H, C4bp の cofactor 活性を阻害しなかった。この抗体は DAF, CR1, H と全く交叉しなかったが、痕跡量の C4bp を認識した。MCP が C4bp と共通の determinant antigen を持つ可能性を、現在検討している。

血液細胞における MCP の分布; Flowcytometry と immunoprecipitation によって、各血液細胞の MCP の分布を調べた。MCP は、E にはないが、PMN, PL, mononuclear cells には存在した。mononuclear cells の subsets を、さらに Two-dimensional flowcytometry で解析し、SuppressorT, HelperT, NK, B cell のリンパ球群と Monocyte が MCP を持つ事が判った。即ち、MCP は E を除く全血液細胞に存在し、極めて広い分布を示す事が明らかとなった。immunoprecipitation の結果は、1) 総ての個体が、高分子性MCP (MCP-H) と低分子性MCP (MCP-L) を発現し、2) 遺伝的に規定される MCP-H dominant, MCP-L dominant, equal (H と L がほぼ等しい) の3タイプに明瞭に分けられうること、3)このタイプは PL, Lymphocytes の MCP に反映されるが、PMN には反映されず、4) いかなるタイプの MCP をもつ個体でも PMN は MCP-H に類似の単一の MCP のみを発現すること、などが明らかになっ

た。他の結果も併せて、まとめを Table 1 に示す。

[考察]

MCP は従来、C3b-affinity isolation の手法を用いて、C3b結合性膜蛋白質、gp45-70 として報告されてきた。同じ affinity isolation の方法で、Cole らは gp45-70 の分布を調べ、E と PMN には存在しないと報告した。従って、今回の結果は、PMN に MCP があるとする点で、従来の報告と異なる。さらに、PMN の MCP は、これまで immunoprecipitation によって知られた mononuclear cells の MCP, PL の MCP と種々の面で相異なることも、今回明示された。抗体との反応性が極めて良い点、分子量が MCP-H とほぼ相似な点などから考えて、PMN の MCP は一次構造において他と異なるのではなくて、むしろ cell-surface への expression, または post-translational modification などにおいて他と異なると、考えている。Cole らが PMN の MCP を affinity 法で殆ど検知できなかったのは、1) 細胞内に C3 結合性 (または MCP 結合性) 蛋白質があって、MCP と C3b の結合を妨げた、という可能性の外に、2) PMN の MCP は、CR1 のように、普段 cell-surface に express されていない、3) PMN の MCP の、蛋白質化学的性質が他と相異しており、この相異が C3 への結合性を弱めている、などの可能性が考えられ、現在検討中である。

Table 1.  
Summary of properties of MCP

	MCP antigen	SDS-PAGE (Mr)	pI	Cofactor
E	-			
PL	++	D* (60k, 55k)	4.3-3.7	+
PMN	++	S* (62k)	4.8-4.1	++
Lymph	++	D (60k, 55k)	4.3-3.7	+
Mono	+	?	?	?

\* D, doublet; S, singlet

## 正常モルモット血清によるインフルエンザB型ウイルスの不活化機構

柴田伸一郎<sup>\*</sup>, 山本典<sup>\*</sup>, 前野幸一郎  
(名古屋市衛研<sup>\*</sup>, 名大・医・病態研・ウイルス)

### 要約

インフルエンザB型ウイルスに等量の正常モルモット血清(GPS)を加え36℃30分反応させると、古典経路の補体によりウイルスは中和される。この不活化機構を解析し、以下の結果を得た。

1. 古典経路の補体蛋白はウイルス粒子表面に蓄積し、ウイルスのHA活性は阻害される。
2. GPS処理によりウイルス粒子RNAは分解され、分解産物は粒子外へ放出される。
3. GPSの処理によりウイルスエンベロップの一部に障害がおこり、トリプシン、ヘモグロビン分子の通過が可能となる。

### 目的

GPS中に存在するβインヒビターはインフルエンザB型ウイルスを中和するが、A型ウイルスに対する中和能はない。βインヒビターのB型ウイルスに対する中和能の解析から、βインヒビターはウイルスにより直接活性化される抗体非依存性の古典経路の補体蛋白であることを示唆した(J. gen. virol. 1987)。本研究は正常モルモット血清の古典経路による補体のインフルエンザB型ウイルスの不活化機構を調べることを目的とした。

### 材料と方法

1. ウイルスは10日令のニワトリ尿液腔内で増殖させたインフルエンザB/神奈川/73を使用した。ウイルス感染価はMDCK細胞を用い、プラック法で測定した。
2. モルモット血清は、正常モルモットから得た新鮮血清を使用した。
3. 蛋白は10% SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、銀染色法で測定した。

### 結果

1. ウイルス液に等量のGPSを加え36℃30分間反応させると、ウイルスHA活性、感染価いずれも中和される。0℃での反応、56℃30分非飢化血清では中和はおこらない。
2. GPS処理ウイルスをトリプシンで処理するとHA活性は回復するが、感染価の回復はない。
3. GPS処理ウイルスを10%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動すると、非ウイルス粒子蛋白がみられるが、トリプシン処理によりM蛋白、NP蛋白と共に減少する。

4. G P S 処理ウイルスをニワトリ赤血球に吸着させ、pH 5.2 の条件下で融合させると、G P S 非処理の対照ウイルスに比べ著しく高い溶血がおきた。
5. ネガティブ染色による電子顕微鏡観察で、染色液の粒子内侵入とエンベロップの障害がみられた。
6.  $^3\text{H}$  ウリジンラベルウイルスを G P S で処理し、蔗糖濃度勾配 (10% - 40%) で遠心した。ウイルス粒子 RNA の放射活性は減少し、遠心工部で TCA-soluble な放射活性があらわれた。

### 考察

一般に古典経路の補体活性化は抗体を必要とし、ウイルスと反応した抗体により古典経路の補体は活性化される。活性化された補体はウイルス表面への蓄積、ウイルスの凝集、ウイルスの溶解、のいずれかによりウイルスを中和するものと考えられている。インフルエンザ B 型ウイルスによる G P S 中の補体古典経路の活性化はウイルス粒子表面への補体成分の蓄積とウイルスエンベロップの障害をまねき、ウイルスは致死的なゲノムの崩壊を受ける。

大田博昭<sup>1)</sup> 中島員洋<sup>2)</sup> 池森豊<sup>1)</sup> 加藤四郎<sup>2)</sup> 岡田秀親<sup>3)</sup>

1)ゲン・コーポレイション 2)大阪大学微生物病研究所

3)福岡大学医学部微生物

## 【はじめに】

多くのウイルス、中でも EB ウイルスのような腫瘍原性を持つウイルスについて、その感染細胞は抗体非依存性に補体の活性化能を持つことが知られ、病原性との関連が注目されてきた。MDV はニワトリに内臓腫瘍を発現させたり、あるいは神経系に病原性を示す herpes ウイルスである。また、主として呼吸器ルートで感染増殖し、B リンパ球、T リンパ球と次々に感染し、長い潜伏期間を経たのち発症することが知られている。MDV は3つの血清型があり、病原性を有するウイルスは I 型に属する。本研究は、病原性の異なった MDV 株を感染させた細胞の補体活性化能について比較し、病原性との関連を検討した。また MDV の隣接部位の組織反応、C3 の沈着についても合わせて検討した。

## 【材料と方法】

MDV : 表 1 に示すような3つの血清型9株を実験に用いた。

細胞 : 初代ニワトリ胚 (CE) 細胞を通常の方法で培養し用いた。

補体 : 3~5週齢の SPF 鶏より採血した血清をブールし、補体として用いた。

この血清の溶血活性は古典的経路 1:24~32、第2経路 1:20~24 の範囲にあった。

## 【結果】

MDV 感染細胞による補体の活性化

MDV の各株を CE 細胞に接種し、24 時間後あるいは 72 時間後に無固定のまま新鮮血清、EGTA-Mg 添加による  $Ca^{2+}$  イオンキレート血清あるいは Depleted 血清 (熱処理または Zymosan 処理による) と反応させ、その感染細胞膜上に C3 の沈着が起こってくるかどうかを FITC-antiC3 を用いた蛍光抗体法で検出し補体の活性化能を調べた (表 1)。

MDV 各株を細胞に接種した時、すべての MDV 株において接種 24 時間後の細胞には CPE は全く認められなかったが、72 時間後においては CPE が認められた。腫瘍原性のある GA, JMC, BC/C20 のウイルス接種 24 時間後と 72 時間後の感染細胞を新鮮血清あるいは  $Ca^{2+}$  イオンキレート血清と反応させた時に C3 の沈着が観察された。同じ血清型 I に属する非腫瘍原性の BC/C53 と C2 株は腫瘍原性を持つ株と異なり、比較すると、ウイルス接種 24 時間後の細胞では  $Ca^{2+}$  イオ

ンキレート血清との反応で C3 が認められなかった。血清型 II に属する HPRS-24 および SB-1 株は血清型 I の非腫瘍原性のウイルス株と同じ結果であった。さらに血清型 III に属する FC-126 および 0-1 株感染 24 時間後の細胞はいずれの血清との反応においても C3 の沈着は認められなかった。この結果から、MDV 感染初期の細胞の補体活性化能と、MDV 株の腫瘍原性に高い相関があることが示唆された。

MDV 接種部位における感染初期の組織像と C3 の沈着 *In vitro* で見られた感染細胞の補体活性能が MDV 感染ヒナにおける組織学的変化にどのように影響するかを知る目的で、GA, SB-1, FC-126 の各株を 1 日齢ヒナに接種し、3 日後の接種部位の組織化学的な変化と C3 の沈着の有無を調べた。GA 株接種ヒナにおいてはドット状に C3 の沈着が認められたが細胞浸潤等の組織反応はほとんど認められなかった。一方、SB-1 株と FC-126 株接種ヒナにおいては C3 の沈着は認められなかったにもかかわらず、偽好酸球、リンパ球の弱い細胞浸潤が認められた。

#### [考察]

MDV 感染の比較的初期であるウイルス接種後 24 時間目の感染細胞において、腫瘍原性を持つ GA, JMC, BC/C20 株の感染細胞は  $Ca^{2+}$  イオンの存在、非存在の両方の条件でニワトリ新鮮血清と反応させた時、C3 の沈着が認められた。 $Ca^{2+}$  イオン非存在下での C3 の沈着は非腫瘍原性の MDV では認められなかった。従って MDV 感染細胞の  $Ca^{2+}$  イオン非依存性の補体活性化能と腫瘍原性の発現との間に関連性の存在がうかがわれたが、それを説明する作業仮説は立て得るに至っていない。しかし、ウイルス感染 24 時間後において、非腫瘍原性の血清型 I と II に属する MDV 各株感染細胞でみられた  $Ca^{2+}$  イオン依存性の補体の活性化は、第 1 経路を介して行われるものと考えられる。一方、すべての MDV 株接種 72 時間後の細胞には CPE が現れ、これらの細胞は  $Ca^{2+}$  イオン非依存性に C3 の沈着が認められたが、これは CPE の結果、細胞内容物が露出し、そこに補体が反応した可能性が考えられるので、この点についての検討を行う必要が残されている。組織学的な検討において、腫瘍原性を持つ GA 株の接種ヒナに C3 の沈着は認められ、非腫瘍原性の MDV では C3 の沈着は認められなかった。この結果は *in vitro* の結果とよく一致している。しかし、鶏痘ウイルスのワクチン株で認められたような炎症性の細胞反応(第 2 3 回シンポジウム)は GA 株接種ヒナにおいてはほとんど認められず、逆に SB-1 や FC-126 接種ヒナの方が強いものであった。GA 感染細胞は補体を活性化するにもかかわらず chemotactic factor 等の働き得なかったことになり、その理由の解明を今後の課題としたい。

Serotype Strain	Time sample- collected	Fresh NCS treated with			
		none	EGTA-Mg <sup>2+</sup>	heating	zymosan
I (tumorigenic)					
GA	24	+	+	-	-
	72	+	+	-	-
JMC	24	+	+	-	-
	72	+	+	-	-
BC/20	24	+	+	-	-
	72	+	+	-	-
(nontumorigenic)					
BC/C53	24	+	±	-	-
	72	+	+	-	-
C-2	24	-	-	-	-
	72	+	+	-	-
II					
HPRS-24	24	+	-	-	-
	72	+	+	-	-
SB-1	24	+	-	-	-
	72	+	+	-	-
III					
FC126	24	-	-	-	-
	72	+	+	-	-
0-1	24	-	-	-	-
	72	+	+	-	-

Virus-infected cells at 24 or 72 hr post inoculation were incubated with variously treated NCS and deposition of C3 on the each cells were observed using immunofluorescent technique.

# 補体研究会（補体シンポジウム）会則

## I. 総 則

- (1) 本会は補体研究会（The Japanese Association for Complement Research）という。
- (2) 本会は補体研究ならびにこれに関連する分野の進歩発展を図ることを目的とする。
- (3) 本会は前条の目的を達成するため、次ぎに定める事業を行う。
  - 1) 年1回以上にわたる総会ならびに学術集会（補体シンポジウム）の開催。
  - 2) 内外の関連学術団体との連絡および協力。
  - 3) その他の必要な事業。

## II. 会 員

- (4) 本会は、補体研究ならびにこれと関連する分野の学問の研究を志す人々をもって組織される。
- (5) 本会に会員として入会を希望する者は、所定の申込書に必要事項を記入し、会費を添えて本会事務局に提出するものとする。
- (6) 本会の会費については細則で定める。
- (7) 会員は学術集会において、その業績を発表することができると共に、その抄録集の配布を受ける。
- (8) 会員で故なくして2年間会費を滞納したものは退会とみなす。
- (9) 本会の名誉を著しく毀損した会員は、運営委員会の議を経て除名することができる。

## III. 役 員

- (10) 本会に次の役員をおく。
  - 運営委員……………若干名
  - 事務局長……………1名
  - 監 事……………2名
  - 補体シンポジウム当期および次期世話人……………2名
- (11) 運営委員は会員から選挙により選出し、任期は4年とし連続の再任は認めない。細則で定めるところの選挙規定に従って2年毎に選挙を行い、半数ずつ交代するものとする。
- (12) 事務局長の選出は運営委員会が行い、総会での承認を得て決定する。任期は4年とし、再任を妨げない。

- (13) 監事は、運営委員経験者の中から運営委員会が選出し、総会での承認を得て決定する。
- (14) 監事は会計および選挙等を監査する。監事の任期は4年とし、留任は認めない。任期中監事を辞任するものが生じた際には、所定の手続きを経て速やかに後任を補充するものとし、その際の任期は前任者の残留期間とする。
- (15) 運営委員会は、運営委員、補体シンポジウム世話人（当期及び次期）および事務局長よりなる。
- (16) 運営委員会は、構成員の過半数の出席を要する。
- (17) 運営委員会は会務の審議、本会の運営にあたる。
- (18) 補体シンポジウム世話人は、運営委員会が選出決定する。
- (19) 補体シンポジウム世話人は、補体シンポジウムを主宰する。
- (20) 補体シンポジウム世話人の任期は、前期補体シンポジウム開始時に始まり、主宰補体シンポジウム終了時に終わる。

#### IV. 学術集会・総会

- (21) 年次集会（補体シンポジウム）を行う。時宜に応じて必要な集会を開催することができる。
- (22) 運営委員会は、補体シンポジウム開催中または必要に応じて事務局長がこれを招集する。
- (23) 総会は年1回、補体シンポジウム開催中に当期世話人が招集し、運営委員会決定事項の報告と必要な討議を行い、承認を求める。

#### V. 会 計

- (24) 経理会計は事務局に於て行う他、必要に応じ補体シンポジウム世話人もこれにたずさわる。
- (25) 本会の経費は、会費・寄附金・その他の収入および利子をもってこれにあてる。
- (26) 補体シンポジウムにおいては、出席会員から参加費を徴収することができる。
- (27) 本会の会計年度は1月1日に始まり、12月31日に終わり、総会に於いて会計報告を行う。
- (28) 監事は会計の監査を行い、その結果を総会に於いて報告する。

#### VI. 会則変更

- (29) 本会の会則を変更する場合には、総会出席会員の3分の2以上の賛成を必要とする。

## 附 則

この会則は昭和 60 年 3 月 1 日より施行する。

## 細 則

### I. 会 費

- (1) 本会の年会費は当分の間年額 5,000 円とする。但し学生会員（学部学生及び大学院学生）は 3,000 円とする。学生会員は学生証の写し等を毎年度事務局へ提出し、確認を受けるものとする。

### II. 選挙規定

運営委員の選出は、当分の間次の規定に従って行う。

- (2) 運営委員の定数は 6 名を原則とする。
- (3) 選挙事務は事務局において行う。
- (4) 運営委員の選挙にあたり、運営委員候補者名簿を作成する。
- (5) 運営委員候補者として、任期満了の運営委員は 3 名、運営委員経験者は 1 名を推薦する事ができる。
- (6) 事務局は、運営委員候補者名簿および投票用紙を、会員に総会開催 2 ヶ月前までに郵送し、会員はそれにもとずき、所定の日時までに 3 名連記で投票を行う。
- (7) 開票には、少なくとも監事 1 名の立会いを必要とする。監事は、開票結果にもとずいて、得票数の上位 3 名の運営委員と次点 1 名を定め、運営委員会および総会に報告する。
- (8) 次点者は運営委員に欠員が生じた場合に、その任に当たる。

### III. 事務局

- (9) 本会の事務局は当分の間、福岡大学医学部微生物学教室におく。

## 附 則

細則(1)は昭和 62 年度より施行する。

現在の役員は次の方々です。

事務局長	岡田秀親	(福岡大・医)
運営委員	天野哲基	(岡山大・医)
〃	北村肇	(大阪府立成人病センター)
〃	白石聰	(愛姫大・医)
〃	長沢滋治	(北大・薬)
〃	藤田禎三	(筑波大・基医)
〃	行山康	(東大・医)
監事	稲井真弥	(大阪医大)
〃	田村昇	(筑波大・基医)

## 第24回補体シンポジウム賛助会員

石津製薬株式会社  
岩井化学薬品株式会社  
エーザイ株式会社  
大塚製薬株式会社  
(財)化学及血清療法研究所  
三共製薬株式会社  
株式会社津村順天堂  
日水製薬株式会社  
ファルマシア・ジャパン株式会社  
ヘキストジャパン株式会社

### 第24回補体シンポジウム講演抄録集

昭和62年6月24日印刷

昭和62年6月27日発行

編集者代表 第24回補体シンポジウム 世話人 岡田 秀親

発行所 〒814-01 福岡市城南区七隈7丁目45-1

福岡大学医学部微生物学教室

補体シンポジウム事務局 ☎(092)801-1011

印刷所 〒810 福岡市中央区白金2丁目9-6

城島印刷有限公司 ☎(092)531-7102

# Diamedix Corp.

(旧社名 Cordis Laboratories)



## ◎補体成分: Complement Components

Human C1 ~ C9  
Human C1q  
Guinea Pig C1 ~ C9

## ◎補体成分欠損血清

C4 Deficient Guinea Pig Serum

## ◎補体不活化物質: Complement Inactivator

Guinea Pig C1 Inactivator  
Human C1 Inactivator  
Human C3 Inactivator

## ◎ヒツジ赤血球抗体

Antibodies against Sheep Red Cells Stroma (Hemolysin)  
Antibodies against Sheep Red Cells (IgM, 19S)  
Antibodies against Sheep Red Cells (IgG, 7S)

## ◎コブラ毒因子

Cobra Venom Factor (Naja Haje)  
Cobra Venom Factor (Naja Naja Kaouthia)

## ◎全補体

Guinea Pig Whole Complement  
Human Whole Complement

## ◎ヒト補体成分抗血清

Antiserum to Human C1 Inactivator (goat)  
Antiserum to Human  $\beta$ 1C  $\beta$ 1A (C3) (goat)  
Antiserum to Human C8 (IgG fraction) (goat)  
Antiserum to Human C9 (IgG fraction) (goat)

お問合せは下記へ

日本総代理店



**ニチメン株式会社**

大阪化学品第二部化工原料第一課  
大阪市北区中之島2丁目2番2号 電話(06)223-5011

日本総発売元

**石津製薬株式会社**

大阪市東区道修町2丁目2番地  
電話(06)231-5003

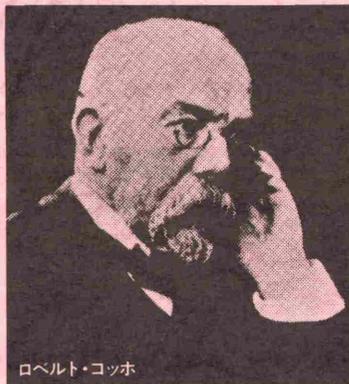
# 医療史に残る 数々の医薬品開発の 豊かな経験と実績をふまえて……

創立以来120余年、  
ヘキストは化学のあらゆる分野で、  
また世界130カ国の国々で  
活躍を続けている総合化学会社です。  
とくに医薬品の分野では、  
解熱鎮痛剤アンチピリンをはじめ  
抗ジフテリア血清、ツベルクリン、  
サルバルサンなど世界の医薬品史に残る  
高水準の製品を生み出してきました。  
細菌学者ロベルト・コッホ、  
免疫学の創始者エミール・フォン・ベーリング、  
そして化学療法の先駆者パウル・エーリッヒ。  
ヘキストは、ノーベル賞受賞のこれら偉大な科学者との  
共同業績を今日に受け継ぎ、  
数多くのすぐれた医薬品の提供と、  
年間約700億円、世界各国で4,200名以上の  
スタッフを投入して明日の医療に貢献する  
医薬の研究開発活動を続けています。  
日本でも、  
現在話題のバイオテクノロジーの分野にいち早く進出、  
モノクローナル抗体技術の確立と  
その臨床応用をめざし、  
将来の新薬創製に向けての  
新たな第一歩を踏み出しています。

ヘキストジャパン株式会社

〒107 東京都港区赤坂八丁目10-16

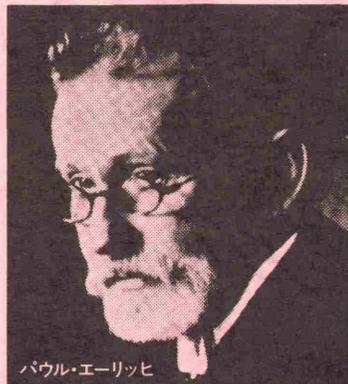
Hoechst



ロベルト・コッホ



エミール・フォン・ベーリング



パウル・エーリッヒ

胃 癌

肺 癌

食 道 癌

乳 癌

結 腸 癌

直 腸 癌



KRESTIN

カワラタケの培養菌糸体から抽出した蛋白多糖体

経口・抗悪性腫瘍剤 PSK

クレスチン<sup>®</sup>

■包装1g×105包・105g(瓶入り) ■健保適用品 (要) (指)

用法・用量 通常1日3gを1～3回に分服。  
但し症状により適宜増減します。

- ① 本剤は、主として宿主を介して抗腫瘍作用を揮うとされています。
- ② 担癌状態および抗悪性腫瘍剤投与による宿主の免疫能の低下を阻止、もしくは正常レベル向って回復させます。
- ③ 他抗悪性腫瘍剤、腫瘍切除、放射線照射併用効果が認められています。
- ④ 臨床上、食欲増進、体重増加等、全身状態改善が報告されています。

副作用、使用上の注意は添付文書をご覧ください。

三共株式会社 〒104 東京都中央区銀座2-7