

集 会

第3回補体シンポジウム 記録

日 時：昭和41年7月22~23日

場 所：箱根 小涌園

(受付：10月13日, 1966)

- I 補体成分の基礎的研究
- II 各種疾患における補体及び補体成分の変動
- III 補体とその関連領域

第1日 7月22日(金)

I 補体成分の基礎的研究(座長：井上公蔵)

1. 補体第一成分の電気泳動的解析
国立がんセンター ○橋武彦, 高橋洋, 近江和夫, 上山陽子, 西岡久寿弥,
2. 人補体第2成分定量のころみ
大阪府立成人病センター ○永木和義, 藤川克躬, 稲井真弥
3. ヒト, モルモット補体成分に対する抗体の交叉反応およびヒト C₂ 測定について.
東大血清 ○田村昇, 横地妙子, 白井美津子
4. β_{1C} -Aglobulin Conversion に関する研究
東大血清 ○松橋直, 白井美津子 東大輸血部 大河内一雄
5. ヒト補体第4成分の免疫電気泳動像について
大阪府立成人病センター ○平松誠一, 永木和義, 藤川克躬, 稲井真弥
6. C_{3c} Deficient Serum
国立がんセンター研究所 ○鳥巢要道, 荒田孚, 園崎秀吉, 馬島尚
7. 血清中の抗補体性因子について
国立がんセンター研究所 井上雅晴, ○岡田秀親, 古瀬礼子
8. モルモット血清補体 C_{3d} について
阪大第1外科 ○森 隆 阪大細菌 米増国雄, 井上公蔵
9. 補体9成分の分離と力価測定法
国立がんセンター研究所 西岡久寿弥, 岡田秀親, ○向島達, 鳥巢要道, 真弓忠, 関根暉彬

II 各種疾患における補体及び補体成分の変動(座長：勝田保男)

1. 膠原病その他と血清補体価
東大物療内科 ○山本恵一郎, 勝田保男, 荒田孚
1. 追加 アレルギー性皮膚疾患における血清補体価の検討
名古屋大学 皮膚科 ○小林敏夫, 井沢陽平, 石川芳久, 別所正樹

2. ループス腎炎における血清補体

慶大内科 浅野誠一, 丸茂菊男, 若杉晃, 井垣喜之, 豊泉栄三, ○大久保充人, 田村寿夫, 倉田要

2. 追加 リウマチ患者の関節液中補体価

国立がんセンター研究所 ○園崎秀吉, 荒田孚, 鳥巢要道

3. 腎炎における血清補体 (第3報)

慶大内科 浅野誠一, 丸茂菊男, 若杉晃, ○井垣喜之, 豊泉栄三, 大久保充人, 田村寿夫, 倉田要
(座長: 稲井真弥)

4. 肝疾患時の補体に関する研究 (続報)

岡山大学 小坂内科 ○長島秀夫, 宮本千鶴子, 小坂淳夫

5. 肝疾患と補体

九大 榊屋内科 榊屋富一, ○酒井好古

5. 追加 正常人血清の補体価

国立がんセンター研究所 ○荒田孚, 鳥巢要道, 園崎秀吉

6. 補体価低値を示した患者血清補体成分について

大阪府立成人病センター ○藤川克躬, 永木和義, 稲井真弥

7. 小児期リウマチ熱及び重症筋無力症に於ける血清補体価について

東大 小児科 ○渡辺言夫, 瀬川昌也, 兵頭行夫

第2日 7月23日 (土)

III 補体とその関連領域 (座長: 藤井源七郎)

1. 補体第1成分の Esterase 活性について

京都府立医大微生物 小玉正智, ○矢野武, 塚本武司 増田内科 近藤元治

2. 全身性エリテマトーデスの抗核抗体と補体

東大物療内科 ○勝田保男, 横張滝一, 鈴木輝彦

3. 担癌ウサギにおける補体の動態

愛知がんセンター ウイルス部 ○吉田孝人, 伊藤洋平

3. 追加 ラットD A B肝癌の発がん過程における補体価の推移

国立がんセンター研究所 西岡久寿弥, ○張紹元 和洋女子大 坂本元子

(座長: 長島秀夫)

4. I A H Aによる同種移植抗体の検出

東大伝研外科 ○藤井源七郎, 後藤俊二, 石橋幸雄

4. 追加 マウス補体測定法について

東大伝研外科 ○後藤俊二, 藤井源七郎, 石橋幸雄

5. 抗凝固剤と抗補体剤の吞食におよぼす影響

東大 物療内科 ○菊谷豊彦, 村中正治

(座長: 安部 英)

6. 補体とプラスミン

京都府立医大 増田内科 ○近藤元治, 石丸寿一, 藤木典正, 増田正典
河村外科 小玉正智, 四方統男 微生物学教室 矢野武, 塚本武司, 菅沼淳

7. 補体とプラスミンとの関係

東大伝研アレルギー学部 ○芳賀邦夫, 瀬戸昭, 伊藤幸治
鳥取大学医学部石原内科 植木寿一

I 補体成分の基礎的研究

1. 補体第1成分の電気泳動的解析

国立がんセンター研究所

橋 武彦, 高橋 洋, 近江 和夫, 上山 陽子, 西岡久寿弥

薄層ポリアクリルアミドゲル電気泳動法でモルモットと精製補体第1成分は, EAC'₄ セルで2つの活性帯として分離検出されることは前年報告したが, 検出系に用いた寒天の抗補体性を DEAE-デキストランの添加によつて除去した場合, あるいはアガロースを用いることによつて原点附近にあらたに強い活性帯を認めた(泳動の速いものから F, M, S 溶血帯とする). C'₁をあらかじめ $10^{-3}M \sim 10^{-2}M$ EDTA で処理し, EDTA 存在のもとで泳動させると, 最も速く泳動する分画のみがみとめられ, その活性が著しく増大した.

Sephadex G-200 カラムクロマトグラフィーと蔗糖密勾配遠心による分離を行つたところどちらも2つの度活性ピークに分かれた. これを泳動してしらべると, 分子の小さいものは F, M 溶血帯が認められ, 分子の大きい分画は, M, S 溶血帯からなるパターンを示した. また 10^{-3} MEDTA 処理 C'₁ (処理 C'₁) を遠心すると, 遠心管の上部^{2/3}に活性が認められ管底部には溶血活性が認められなかつた. 処理 C'₁ を遠心前に必要充分量の Ca⁺ を補つて遠心すると, 遠心管の下部から上部にかけて活性の分布が認められた. ところで処理後 Ca⁺ を添加した C'₁ 及び未処理の C'₁ について EA C'₁ 形成をみると, EA C'₄ を用いての EA C'₁₄ セル形成と同一の態度を示したが処理 C'₁ では EA C'₁ セル形成が全く認められなかつた. これらを泳動すると EA C'₄ セルと反応して主として, F, M 溶血帯が認められた.

ところで Lepow のヒトの C'₁ の subcomponent の分離性にならつて処理 C'₁ を DEAE-セルローズカラムを用いて分離してみると, 三分画を混合することによつて EA C'₄ から EA C'₁₄ セルを形成することはできたが, EA C'₁ セルを形成することはできなかつた. ここでイオン強度 0.14 で溶出してくる分画 (Lepow の C'₁s に相当か) を泳動すると, F 溶血帯と全く一致した. 一方, 未処理の C'₁ の三溶血帯は EA C'₄ セルで検出されたものであるが, これを EA セルで検出すると常に S 溶血帯のみが認められた. 更に EA セルと共にクロマト

で分離された最初の部分 (Lepow の C'_{1q} に相当か) を検出系に加えると, S の他に M 溶血帯が弱いながら認められたが, F 溶血帯は全く検出できなかつた.

以上の結果から, 精製 C'₁ の三溶血帯のうち, 最も泳動の速い分画 (F) は EA C'₄ とのみ反応するが, EA セルとは反応しない. 最も泳動の遅い分画 (S) は EA セルとも反応し従つて complete macromolecular state を示す. 中間の泳動を示す分画 (M) は充分に明らかではないが, カラムの最初の溶出分画を加えると EA セルと反応するところから incomplete state の C'₁ でなかろうかと想定される. また, これら C'₁ の分画の反応態度から逆に EA C'₄ セルの C'₁ site の状態は, EA C'₁ セルのそれとは異なるといえよう.

討 議

稲井真弥 (成人病センター)

EA C'₄ Cell で, Lepow のいう C'_{1q} がくつついている可能性はないか.

橋武彦 (国立がんセンター)

モルモットのこの系では, Lepow のいうヒトの C'_{1q}, r, s, と夫々相当するものがあるか否かはまだ結論出来ない. C'₁s に相当するものだけは, EA C'₄ を溶かすことから同定される.

田村昇 (東大血清)

Sucrose density gradient の超遠心での recovery はどうか.

橋武彦.

geltin を入れた成績では, 約30%である.

田村昇.

EA C'₄ Cell と EA Cell で, C'₁ を assay したときの感度は?

橋武彦.

前者の方が, 4~6 倍感度がよい.

井上公蔵 (阪大細菌学)

Sephadex や超遠心のときに Ca⁺ を余分に入れられた経験はあるか.

橋武彦.

電気泳動のときには、Ca⁺を入れた。このときは、泳動像に著しい変化はない。Sephadex, 超遠心での経験はない。

井上公藏

Sephadex のときに Ca⁺ を入れると peakが1つになつた経験がある。

2. 人補体第2成分定量のこゝろみ

大阪府立成人病センター

永 木 和 義, 藤 川 克 躬, 稲 井 真 弥

1964年 Frank Austen 等はモルモット (G) 血清を用いて作製した A C'1,4 cell を用いて人 (H) 血清中の C'2 を定量する方法を発表している。その際 1,4,2 site formation 及び decag の実験に単離した C'2 を用いず H血清を稀釈して用いている。H血清を数百倍に稀釈して C'2 として用いた場合、稀釈H血清中にはなお大量の C'1 及び C'e が含まれていて、モルモット血清を用いて作製した EH C'1,4 cell に影響を支える事が当然考えられる。演者等は C'4H の精製を試みて C'1 destroyer を殆んど含まない C'4H を分離する事に成功したので、同時に C'1H 及び C'2H も分離してこれ等の補体成分及びG補体成分の種々の組み合わせで C'2G 及び C'2H の定量を試みた。

C'1G, C'2G は Borsos 等の方法により分離した。C'4G は可成りの製製に成功したが非常に不安定で使用に耐えないので今回の実験では A C'4G cell として用いた。C'1H は血清の酸性沈澱より C'1G と同様の方法で分離した。C'2G は酸性沈澱の上清を DE A カラムに apply し、0.09M NaCl で溶出される部分をブールし、これを CM sephadex C-50 カラムで gradient elution を行つた。C'4H は DE A E カラムの 0.13M—0.09M cut をブールし、更に CM sephadex C-50. Pevicm C-870 Zone electrophoresis, CM sephadex C-50 の順序で精製した。

使用した intermediate は、EAC'1H, C'4 H, EAC'1 H, C'4G, EAC'1G, C'4H 及び EAC'1G, C'4G の4種類で、単離した補体成分を用いる時はすべて cell 当り 300eff. mol. かえている。

1,4,2 site formation (30°C) Tmax で見ると、EA C'1 H, C'4 H cell では C'2H に対して4分、C'2G に対して20分、EA C'1H, C'4G cell では C'2H で12分、C'2G で25分、EA C'1G, C'4H cell では C'2H で6分、

C'2G で14分、EA C'1G, C'4G では C'2H で12分、C'2G で4分となつた。即ち EA C'1G, C'4G を除く他の3種類の cell ではすべて C'2H に対する 1,4site の数が C'2G に対する1,4 site の数より多くなつている。

1,42 site decay (30°C)

4種類の cell 共すべて C'2H のついた 1,42site の decay はその half life が6分乃至6分30秒で C'2G のついた1,4,2 site の half life 22分乃至31分とくらべて著明に早い。従つて dissociation constant も 1,4,2H site は 0.106乃至 0.117であるが、1,4,2G site のそれは 0.022乃至 0.031である。

全血清中及び単離 C'2G, C'2H の定量全血清中及び単離 C'2G を4種類のcellで定量すると EAC'1G, C'4H で最も重値を示し EAC'1G, C'4G がこれに次ぎ、EAC'1H, C'4H で最も低値となる。又全血清中の C'2G と単離 C'2G との比は EAC'1H, C'4H cell で最大となつている。この原因としてこの cell が C'2G に対して Tmax が最も長く (即ち 1,4site が少ない)、ここへ全血清が加わる事により (C'1 及び C'4 は C'2 に比し非常に eff. mol. が多い) 全血清中の C'1 及び C'4 によつて新しい 1,4 site generation が行われる為と考えられる。同様の事が C'2H でも見られる。C'2H の値は EAC'1G, C'4H で測定する時に最も高値を示し EAC'1G, C'4G cell 或いは EAC'1H, C'4G で最も低値となる。又全血清中の C'2H と単離 C'2H との比もこれ等の cell で最も大きく、この原因もこれの cell が C'2H に対する Tmax が長い為全血清中の C'1, C'4 による新しい 1,4 site generation が起る為と考えられる。

以上を総合すると、C'2G 測定には C'1G が、又 C'2 H 測定には C'4H が重要な意義を持つように思われる

が、この点について更に研究を進めたい。

討 議

井上公蔵 (阪大細菌)

Generation Curue につかつかつた時の C'2 の絶対量は、

夫々の細胞によつて違うわけか。

平松誠一 (成人病センター)

そうです。

3. ヒト, モルモット補体成分に対する抗体の交叉反応, およびヒト C'2 測定について

東大血清 田村 昇, 横地 妙子, 臼井美津子

1) 抗ヒト C' 血清が, モルモット C' 成分と交叉反応し, あるいは, 抗モル C' 血清がヒト C' 成分と交叉反応することは, 免疫血液学分野にて, 既に知られている。しかし, 補体9成分の中, どの成分がこの交叉反応にあずかるかは明らかでない。したがつて, 次の方法によりこれを検討した。

抗モル C'4, および C'3c 血清は, DEAE, CM セルローズカラムにより分離精製して得られた, 補体成分を含む分画を, ウサギに complete adjuvant で免疫し, 抗ヒト C' 抗体は, ウサギ血球と無処置新鮮ヒト血清を 0°C で反応された後に, 洗滌して得られる感作ウサギ血球を, 同様に, complete adjuvant でウサギに免疫して作製。これらの抗血清はいずれも免疫電気泳動による分析では, 抗 β_{1E} , 抗 β_{1C} と推定される抗体を含む。

抗モル C'4 血清は, EAC'4_{sp}, EAC'4_{sp}3_{Csp} 両者を強く凝集するが, EAC'4_{hu} とは, ほとんど反応しなかつた。抗モル C'3c 血清は, EAC'4_{sp} とほとんど反応しないが, EAC'4_{sp}3_{Csp} を強く凝集し, EAC'4_{hu} とは反応しない。しかし IA に反応するような状態にある EAC'4_{hu} とは反応してこれを凝集した。ヒト C'3 成分の中のいずれかの成分, おそらく C'3c が交叉反応にあずかるものと推定された。

抗 C'4_{hu} 血清は, EAC'4_{hu} と比較すれば, 弱い。EAC'4_{sp}, EAC'4_{sp}3_{Csp} を同程度に凝集する。この場合は, C'4 が交叉反応にあずかるものと思われる。より明確な結論を得るには, ヒト C'3 成分精製の上で再検討が必要である。

2) C'2_{hu} と EAC'1_{sp}4_{sp} との反応は, 著しく悪く, C'2_{hu} 測定には, EAC'1_{sp}4_{hu} を使用しなければならない。EAC'1_{sp}4_{hu} による精製 C'2_{hu} の測定値は,

EAC'1_{sp}4_{sp} による測定値より, 約 100 倍高い (既報), したがつて, 今回は, ヒト全血清中の C'2 測定を試みた。

新鮮ヒト血清中の C'2 の 50% 溶血値は, EAC'1_{sp}4_{sp} では 1 : 600, ~ 1 : 1100, EAC'1_{sp}4_{hu} では 1 : 9,000 ~ 1 : 18,000 で, 約 15 倍から 20 倍の感度の上昇がみられた。

ヒト血清中の C'2 測定に際しては, EAbC'1_{sp}4_{sp} の中の SA site あるいは, SAC11 site にヒト血清中の C'4 が反応し, その後に C'2 が反応することが考えられる。

討 議

吉田孝人 (愛知がんセンター)

β_1C と C'3c との活性との関係は?

田村昇 (東大血清)

のち程, 臼井さんがその data を示す。

吉田孝人

抗血清中に C'2, その他の成分に対する抗体はないか。

田村昇

今の段階では, 一応抗原性の最も強いと考えられている C'4 と C'3c とに対してみているつもりだ。

井上公蔵 (阪大細菌)

C'2 の濃度を上げていくと反応が出たのはどう説明するか。濃度を上げることによつてヒトの C'2 がモルモットの C'4 に反応するのか, C'2 に C'4 の contamination があるのか, どちらと考えているか。

田村昇

C'4 の Contamination よりも, むしろ C'2 の濃度をあげることによつて反応性が出ると考へたい。

4. $\beta_{1C} \sim A$ conversion に関する研究 第2報

東大医学部血清学教室 松橋 直, 臼井美津子

東大病院 輸血部 大河内 一雄

Polyanethol, Chlorophyl など種々の reagents によるヒト $\beta_{1C} \sim A$ conversion に関する観察は, 前回の研究会で報告した. 今回は, 2-mercaptoethanol 処置による補体沈降線の変動, モルモット補体の免疫電気泳動像およびヒト $\beta_{1C} \sim A$ conversion を観察する 2~3 の応用例について報告する.

1) 2-mercaptoethanol (ME): β_{1A} のみで β_{1C} を含まない ageing したヒト血清に, 最終濃度 0.1M の割合に M.E を加えて 37°C 2 時間作用させると, β_{1A} の沈降線は全く消えて, $\beta_2\gamma$ の領域に新しい沈降線が現われる. 0.03M の ME 処置では, β_{1A} 線がよわくなり β_2 の新しい沈降線と融合して二峰性を示した. 之に反し, 新鮮な血清では β_{1C} 線は消えさるか弱くなるかで, $\beta_2\gamma$ 領域の新しい線の出現はみとめられない. このことは β_{1A} と β_{1C} は構造的にもかなりちがったものであることを示す, 以上の所見はモルモットでも同様観察された.

2) モルモット補体成分に対する抗血清およびその免疫電気泳動像 (I.E.): モルモットの 3c を含む分画で免疫したウサギ 7826 と, 他の成分を含む分画で免疫したウサギ 7815 では, 全く異つた抗血清がえられた. 7826 は EAC'₁₄ では凝集が非常によわく, EAC'_{14,23C} で高い抗体価を示した. 7815 は EAC'₁₄ ですでに高い抗体価を示した (田村). 之らの I.E は新鮮血清と古い血清との間あまり変化はみられない. しかし ME 処置をすると, 古い血清では $\beta_2\gamma$ の沈降線の出現が 7826 で認められ, 7815 での沈降線はまた異つた像である. 新鮮モル血清を Zymosan, 免疫沈降物 (ヒト $\gamma G \cdot$ 抗ヒト γG) で処置すると, 7826 の沈降線はかなり弱くなり且陽極にのびて二峰性になる. 7815 の沈降線は弱くなるが移動度はあまり変らない. 以上のことから, 7826 の沈降線は $\beta_{1C}(3c)$ 7815 は $\beta_1E(C'_{14})$ と推定されるが, 更に検討を要する. ageing によるモルの $\beta_{1C} \sim A$ conversion は, ヒトにおけるほど電気泳動の移動度の差はみられないが, Zymosan., Imm. ppt. によるときは明らかに移動度の差がみられる. これは ageing による場合と, Zymosan., Imm. ppt. による場合とでは conversion にちがいがあると考えられる.

3) ヒト β -lipoprotein allotype に対する抗体をもつ頻回輸血患者が 2 例見出されたが (大河内), これは gel 内拡散法で検出され, C'F, IA はいずれも陰性である. しかしこの患者血清の γG を分画しヒト新鮮血清に加えて I.E 像をみると, $\beta_{1C} \sim A$ の conversion が, gel 内拡散法で陽性になるヒトでのみみられた. また G-Myeloma で且 albumin 沈降線が異常に長くのびる γ の領域にまできている症例が見出されたが, この患者血清 0 γG を分離し, 正常新鮮血清に加えて I.E 像をみると, 正常 albumin 沈降線が γ の領域にまでびてきて, 同時に $\beta_{1C} \sim A$ conversion が観察された. albumin と paraprotein との抗原抗体反応とは直ちに断定できないが, $\beta_{1C} \sim A$ conversion もみられたということは意味ふかいことで, 更に検討したい.

討議

吉田孝人 (愛知がんセンター)

anti β_{1C} はどうやってつくつたか.

田村昇 (東大血清)

C'_{3C} fraction を Freund の incomplete adjuvant と一緒に注射した.

吉田孝人 (〃)

Müller-Eberhard の方法で anti β_{1C} をつくつたのだが, 他の band が多くでて困っている.

田村昇

彼の方法は必ずしもきれいな preparation をつくつているとは限らない.

松橋直 (東大血清)

Immunoelectrophoresis の沈降線は, 免疫を重さねたり, 時間をかけたり, 更に反応時間をおくと, minor components が出てくるが, この方法の宿命のように思う.

橋武彦 (国立がんセンター)

β_{1C} の Conversion pattern で, 陽性側に泳動している方に spur のあるのをみとめたが, どう説明するか.

松橋直 (東大血清)

他の線が混じっている β_{1C} . 以外に Müller Eberhard の C'6 などの pattern が入っていると考えられる.

橋武彦

β リボ蛋白に対する輸血の結果の抗体分析は lipid 部分と蛋白部分の差として説明できないか。

松橋直

β リボ蛋白の抗原性は、現在8つ位知られている。この結果 allogeneic な点を考えている。lipid をはずしても反応はおこる。

稲井真弥 (成人病センター)

沈降線が双子山を形成したときは、もう conversion をしているとみてよいか。Conversion をしたあとの溶血活性は。

臼井美津子 (東大血清)

双子山を形成したときは、 $\beta_1C \sim \beta_1A$ の二つが共存しているときである。Conversion をしたあとの溶血活性はみていない。

5. ヒト補体第4成分の免疫電気泳動像について

大阪府立成人病センター

平松 誠一, 永木 和義, 藤川 克躬, 稲井 真弥

精製ヒト C'4 の免疫電気泳動を行い、その占める位置を確認し、各種操作によるその変化を観察し、併せて各種疾患時の血清中 C'4 の変動と、C'4 の沈降線との関連性をしらべた。

免疫電気泳動の条件としては、寒天は1% Oxoid Ion agar No. 2 を用い、6 v/cm, 1時間半泳動を行い、これを阪大微研製抗ヒト馬血清に対して反応させた。

その結果、C'4 の位置は、原点より陽極側へ向う、 β_1 Globulin の部位の1本の沈降線として認められ、こつがC'4であることを更に確かめるために、Ouchterlony 法を併用し、C'4及び抗 β_1C/β_1A Globulin血清をdiffusion させて、上記沈降線の同定を行い、所謂 β_{1E} Globulin を確認した。

次に C'4 の hydrazine 処理による沈降線の変化をしらべた。即ち、hydrazine 処理時間と共に、 β_{1E} の沈降線は陰極側へ伸び、かつ β_{1C} と交叉するが、陽極側は対照と変りなかつた。

更に、C'4 の抗原抗体複合物による変化をしらべるために、新鮮正常血清に、Egg albumin/anti-Egg albumin を種々の量に添加して、泳動像の変化をしらべたところ、 β_{1E} が β_{1C} と交叉するのを認めたが、陰、陽極側への移動は認められなかつた。また、 β_{1A} の出現 (β_{1C} に連続する二相性沈降線) を認めた。

また、患者血清について、そのC'4値の変動と、 β_{1E} の沈降線の変化の関連性をしらべるために、C'4 を生食水

にて稀釈し、沈降線の変化を観察したところ、沈降線は稀釈に伴い、その長さや濃度を減ずるが、位置や形状の変化は示さなかつた。尚、C'4 値が正常値の4分の1になると沈降線は認められなくなつた。

そこで、各種疾患患者血清について免疫電気泳動を行い、 β_{1E} の沈降線の様相を観察し、予め測定しておいた当該血清の C'4 値との関係をしらべたところ、両者の間に、略平行関係があることがわかつた。

討議

西岡久寿弥 (国立がんセンター)

β_{1E} の沈降線と C'4 活性との間の量的関係は? $\beta_{1E} = C'4$ を結びつけられるか。

松橋直 (東大血清)

β_{1E} の沈降線は抗原抗体沈降物で吸収できるものではありませんか。

稲井真弥 (成人病センター)

稀釈しても沈降線はなくなるが C'4 活性は残っている。この系では沈降物を加えた限りでは、C'4 活性が過剰にありすぎて吸収できなかつた。 $\beta_{1E} = C'4$ と考えて間違いないと思う。

松橋直 (東大血清)

一般に purify した sample で Immunodiffusion をやつても沈降線が数本出てくるので、この方法だけで $C'4 = \beta_{1C}$ と決定することは難づかしい。

6. C'3c Deficient Serum

国立癌センターウイルス部

鳥巢 要道, 荒田 孚, 園崎 秀吉, 馬 島 尚

我々は正常健康人の血清補体価 (C'H50) を Mayer の変法を用いて測定中全く溶血活性をもたない血清のある事に気づいた, この一群は性別, 年齢, 血液型に関係なく, 又極めて健康である事に注目してその追求を始めた. まず C'H50 を測定した所ほとんど1単位以下である. 2321人の正常健康人の血清より再検できた10例の低補体価血清を有する人の健康状態はきわめて良好で特記すべき臨床所見, 既往歴を認めなかつた. この低補体価血清の中でどの補体成分の低下によりこのようなC'H50の低下をきたしているのかを調べるため西岡, 岡田等がモルモット血清より分離精製した機能的純粋な補体各成分 (C'1, C'4, C'2, C'3c, C'3b, C'3e, C'3f, C'3a, C'3d) を用いてこの血清, 及び正常血清の各成分の力価測定を行なつた所, C'3c が正常価2000~8000単価あるのに比較して1~10単位と驚くほど低活性である事を認めた. この事はCIA50で測定した結果とよく一致した. 次に C'3c が低活性を示す血清が本態的に C'3c の欠如によるものか, 又は血清中に存在する Inhibitor によるものかを測定した. これは正常血清, 及び低補体価血清の中に存在する IA Inhibitor を測定したものである. その結果正常血清の50% IA Inhibitor は1:48~1:128と全血清中の Inhibitor の量に差がない事が分つた. 更にDEAEカラムクロマトグラフィーにより C'3c と Inhibitor の分離を試みた. これは低補体価血清, 及び正常血清を全く同じ条件で pH 7.5に合わせ, 12000回転, 30分遠沈してその血清を pH 7.5 I S 0.080 に合わせて, 2.5×50cm I S 0.080, pH 7.5のDEAEカラムに applyして I S 0.080, M/200phosphate Buffer. pH 7.5で洗い流した後, 0.08~0.25Mの linear gradient elutionでC'3c及びそのInhibitorを分離した. それによると, 正常血清, 及び低補体価血清のInhibitorの量, 及び活性は全く変化しないのに比べて C'3c の活性は正常血清が 2500単位以上, 低補体価血清は16単位より少なかつた. ここにおいて, 我々はこの血清を C'3c deficient serum と名付けた.

補体の第3成分は西岡, Linscott, 井上, Nelson により機能的純粋な成分として6つに分離精製されている

が, 一方 Müller Eberhard は電気泳動の手技を用いて第3成分を C'3, C'5, C'6, C'7, C'8, C'T, と分離名付けている. ここで C'3 は β_{1c} globulin と全く同一 (synonymous) のもので他の補体活性及び蛋白を含まないものであると結論した. 我々はこの C'3c deficient serum で電気泳動を行なつた所, 正常血清と同じように C'3c deficient serum にも β_{1c} globulin の沈降線の鮮かに出ることを確認した. この事は Müller Eberhard の結論を全く説明できないものである. 免疫電気泳動とはあくまでも定性的なものであり, β_{1c} globulin の何パーセントが C'3c の活性をもつかという議論は不可能であり, 又機能的純粋に精製された C'3c という補体成分と電気泳動上の沈降線より同定された β_{1c} globulin とを同一のものであるとすることは不可能である.

討議

稲井真弥 (成人病センター)

C'3c inhibitor と, C'3c を分けた条件は?

鳥巢要道 (国立がんセンター)

全血清を, イオン強度0.08, pH 7.5にして高速遠心した上清を, DEAE cellulose に applyして, gradient elution した.

近藤元治 (京都府立医大内科)

このような C'3c deficient な人に, 臨床症状はなにかあつたか.

鳥巢要道

今まで調べたところでは健康にみえる. 変つた症状はない.

稲井真弥

Müller Eberhard の data をみると, ヒトの C'3c とモルモットの C'3c で euglobulin 分画に沈澱したり, 上清に残つたりするが, この点についての検討は? 井上先生にお聞きしたい.

井上公蔵 (阪大細菌)

C'3c の沈澱条件は C'3b や C'1 と異なり, その条件によつてまちまちであり, ヒトとモルモットの差が, 一般的にあるとはいきれない.

β_{1c} = C'3c といいきれないところ結論だつたが, ina-

ctive な C'3c が存在しているとすればそれが β_1c の沈降線になる可能性もあると思うが, Müller Eberhard の sample には, 殆んどが inactive な C'3c を含んでいる可能性もあるのではないか.

西岡久寿弥 (国立がんセンター)

Inactive な C'3c の沈降線については分つていないが, 少なくとも活性の上でみた active な C'3c と β_1c 沈降物を形成するものが synonymous であるということは認められない.

田村昇 (東大血清)

この例は蛋白形成の anomalieがあつて, C'3cのSA₁₄₂にくつつく活性はあるが, そのあとの C'3bに作用する活性を欠如しているような globulinを形成していると考えられないか. 全血清の Immunelectrophoretic pattern で異常はないか? もう一つの解析法は, もしそうだとすれば, Immunoprecipitates で処理すれば, β_1c の lysis は薄くなるのではないか.

松橋直 (東大血清)

Immunelectrophoresis 全体の pattern では異常は認められなかつた.

7. 血清中の抗補体性因子について

国立がんセンターウイルス部

井上 雅晴, 岡田 秀親, 古瀬 礼子

我々は, C3H/He マウスを用いて腫瘍免疫の実験を行っているが, その血清中に強い抗補体作用がある為, 補体の関与する免疫反応を用いて, その抗体を解析することが困難なのが現状である. 抗補体性物質を抗体分画から分離しようと試みて実験を進めているが, そこで得られた知見について述べる.

抗補体活性の検定は, Sample 0.8ml と 3C'H₅₀ のモルモット血清 (GPC') とを混合して, 氷室にて overnightし, 翌日 2.5×10^8 /ml の感作ヒツジ血球を 0.2ml 加えて 37°C で 60 分振盪し, 溶血阻止力によつて判定している.

マウス及びウサギの正常血清を Sephadex-G 200 を用いてゲルろ過をすると, 共にニカ所に, 抗補体活性が強く認められる. 一つは first peak に一致し, 他の一つは無機イオンより更におくれて流出する. これをそれぞれ Fr. I 及び Fr. II としてとりあつかつている.

Fr. I は硫酸による塩析分画においても, 又 Geon を支持体とし Veronal-HCl (pH 8.6) Buffer 系での Zone Electrophoresis でも, γ -グロブリン分画と分離できなかった. pH 5.5i.s. 0.04 で透析すると沈澱側にくる. Fr. I には C'1 活性もあるが, Fr. I を EA で吸収しても抗補体活性は落ちないし, 又, 56°C 90 分の処置をしても失活しない.

Fr. II は透析により消失し, 凍結乾燥によつても失活する. OD_{260m μ} 及び OD_{280m μ} 等には 特異吸収は認

められなかつた. DEAE セルローズカラムクロマトグラフィーでは pH 7.6i.s. 0.018 では吸着され i.S. 0.05 ~ 0.10 で elute される.

Fr. I 及び Fr. II が補体のどの成分を阻止するののかについては検討中である.

討議

吉田孝人 (愛知がんセンター)

ウサギの補体にはどう作用するか.

岡田秀親 (国立がんセンター)

Interchangeability の問題は, 他の Components 全部を含めて検討しなければならないが, まだやつていない.

田村昇, (東大血清)

Inhibitor の成績は何を基準にして示されたか. Inhibitor の中に他の component の存在はないか.

岡田秀親

夫々の反応系に入れた Inhibitor の量に対応して形成される z-value の減少で表わした. ウサギの fraction については全部の component assay は済んでいない.

永木和義 (成人病センター)

Inhibitor の C'1,4,2, に対する影響は, pH の変化によつてはどう変わるか.

岡田秀親

Microplate assay では, 影響はない. pH を変えるだけで C' の活性が違うので説明できない.

井上公蔵, 阪大細菌)
 Inhibitor の量によつて, 逆に enhancement があるのか.
 岡田秀親
 そうです.
 藤井源七郎 (東大伝研)
 Inhibitor の Fr. I と, Fr. II との作用や量の差は?
 岡田秀親
 比較実験はまだ充分には済んでいない.
 深山昭雄 (奈良医大細菌)

雄と雌で Inhibitor の差は?
 岡田秀親
 マウスの大部分の実験は雄を使つたが, 比較は試みていない.
 米増国雄 (阪大細菌)
 Inhibitor の component assay の時に C'2 を加えた理由は?
 岡田秀親
 C'2 分画に immunolysis の enhancement がある.
 C'2 は CM cellulose を一度通した最初の分画である.

8. モルモット血清補体 C'3d について

大阪大学医学部第一外科 森 隆
 大阪大学医学部細菌 米増 国雄, 井上 公蔵

現在免疫溶血現象に關与する補体成分としては9成分が知られているが, 我々はその最後に作用する C'3d について, EAC'1,4,2,3c,3b,3e,3f,3a (a-cell) を以つて, その作用を調べた. これに用いた補体成分は本年 Nelson らが発表した方法に準じて取つた. 精製した C'3d は免疫電気泳動法によつて β_1 -グロブリンの位置に沈降線を認め a-cell を含む寒天を重層して, そこに一致して溶血斑を認めた. 又 Ouchterlony 法を a-cell 寒天内で行い, 沈降線を境に溶血が阻止されることからこの線が C'3d によるものであることを同定した. 尚この抗体は C'3d の溶血能を中和することも別に確めた. 次に A-cell と C'3d による E* の生成を Kinetically に調べた. 第一次上澄 (lysis curve) は lag phase を示すが, この時既に形成されていた S* site を溶血させて加算すると, S* generation curve が求められ, この合計の curve には lag は認められない. 既に lysis curve の lag は, Frank らのいう S*→Hb.+Ghostには尚 multiple steps の存在することを support する. 更に同様に, 0°C, 30°C, 37°C に於ける S* generation を, 種々の濃度の C'3d について比較した. これによると d-cell (E* precursor by Frank?) の形成は 0°C に於ても充分進み, 30°C のものに匹敵する (勿論 lysis curve は低温で著しい遅延を示す). 一方 37°C では C'3d の高濃度での最終値は同じであるが, 低濃度では 0°C, 30°C よりも却つ

て低くなる. これは 0°C, 30°C では低濃度の C'3d 中でも S* 形成は時を追つて持続し, 最終値に近づいて行く為で, C'3d が C'3f 迄の成分と異なり Ag-Ab. complex に取られず turn over するという説に一致する様に思われる. 37°C で低値を示す理由としては a-cell の半減期が 37°C では 30°C の約 1/4 に短縮されるので, これが主役をなすと思われる. d-cell の lysis はイオン強度の高い側で促進される. d-cell generation はイオン強度とは関係なく, 又 0.09M EDTA 中でも充分進む. 又 0.09M EDTA 中で lysis を阻止して 30°C で, incubate した d-cell により調べると d-cell の decay は殆どない. C'3d の定量はその初期の de-cell 形成の度を以つて行わねばならぬが, その時用いる a-cell 上の a-sites/cell と S* の形成の初速度との關係については更に検討が必要である. 従来 C'3d は C'3a と共に, C'-fixation に与らないとされて来たが, 一定量の C'3d を用いて調べると, a-cell の濃度に比例した S* が作られ, この上澄の C'3d を初速度を以つて測定すると, 形成された S* 数とは逆に直線關係を示してその活性が減少して, 明らかなる C'3d の depletion を認めた.

討議

岡田秀親 (国立がんセンター)

deplete するために使つた血球を wash していくときにはなれてくることはないか.

森隆 (阪大第一外科)

測定できる限界量の d をつかっているの、洗っている間に遊離するか否かははつきりしない。

田村昇 (東大血清)

C'3a site が limit になつている条件だと思ふが、C'3a site を excess にして検討するのが C'3d titration のために必要ではないか。

森隆

過剰に C'3a を使つて、果して 50~100 という C'3a site が出来るかどうかという、もし過剰に a site が出来たとき、同じような結論ができるかどうかは残され

た問題である。

井上公蔵 (阪大細菌)

C'3d の transfer などの問題が含まれるので、どちらかを limit にして解析しなければならないと思ひ、C'3a site を limit にして start したのである。

西岡久寿弥 (国立がんセンター)

Z max はどのくらいか

森隆

complete lysis ができるが、殆んどの実験は limit の C'3a site しかつくりえない条件である。

9. 補体成分の分離と力価測定法

国立がんセンター研究所

西岡久寿弥, 岡田 秀親, 向島 達, 鳥巢 要道

真弓 直, 関根 彬

補体各成分の分離精製は、西岡 Linscott, 井上, Nelson, Jensen, Gigli, Tamura 等の成績にもとづいて CM, DEAE, イオン交換セルローズの gradient elution をもとに各成分を得た。この方法により得られた各成分は極めて、functionally pure で、C'2, C'3e 以外は、蛋白質含有量が低い。これらの各成分を用いて Component の測定を作つた。即ち C'1:EA4+C'2+EDTA-C', C'4:EA1+C'2+EDTA-C', C'2:EA₁₄+EDTA-C' C'3c:EA₁₄+C'2+HuE. (IA) or EA₁₄+C'2+befad (IH). c'3b:EA₁₄2c+ef+ad. C'3c:EA₁₄2cbf+ad, C'3f:EA₁₄2c+be+ad. C'3d:EA₁₄2cbef+d. C'3d:EA₁₄2cbef+a で測定した。C'3 group はすべて同一の Reagent から出発し、同じ量加えている。そしてこれらの量は、いずれの成分の Titer を最高に与えるものである。このような測定系を用いて、各成分の物理化学的性状を調べる目的で Geon zone Electrophoresis, Cohn's ethanol fractionation, 各 pH とイオン強度に対する溶解性を調べた。Geon 及び Polyacrylamide による電気泳動では C'3 群は C'3d, C'3b, C'3e が比較的早く、C'3c, C'3f, C'3a が遅く動く分画に分かれた。Cohn's の第 6 法に準じた分画法で最も特徴的なものは Fr. III₀ で、この fraction には C'1, C'3c 以外は証明出来なかつた。しかし e-site generation

による方法で調べると C'3c の存在する事が証明された。この fraction には、inhibitor の介在を示すもので、我々の測定法では、見かけ上 0 を与えたものと考えられる。溶解性は、イオン強度の変化ではあまり大きな変化はないが、一般的に C'1 は ppt に C'4, C'2 は Sup に、C'3 群では、c.b は ppt に多く、e.f.a.d. は一般に Sup に来る傾向を示した。pH に対しては C'1 では pH 7.5 C'3c, C'3b では pH 5.0~6.0 が、最も ppt に多い。この事は現在の CM, DEAE による分離方法は、各群の最も良いところを応用している事が判ると同時に、その分離に細心の注意が必要である。

我々の C'3 群に関する測定法は EA₁₄2c cell と EA₁₄2cbef cell を出発点としているが、極めて再現性があるが、Fr. III₀ に見られた如く、inhibitor の存在する場合は、b.e.f の Component は正確な titer を示さない。更に各 Component の Kinetics を調べるためには、この測定系では解析が難しい。そのため我々は各種の intermediate cell による測定法を検討した。即ち各 intermediate cell の site 数と dose-response curve を検討した。その結果約 70 site/cell の EA₁₄ より出発して、最終的に 50 site/cell の f cell が得られた。この各 step の間では a stage 以外、即ち c.b.e.f.a では dose-

response curve が充満した。したがって c.b.e.f.a. の component の測定は, intermeniate cell にて充分出来ることを示す。種々の原因を可及的に除くためこのような in intermediate cell にて行わねばならないと考える。又 d に関しては, initial velocity で測定せねばならない。しかし intermediate cell, 特に b cell は不安定のため, titer が変動しやすいが, 測定系の中に 3e を加えて, e stage. として測定すると, 極めて再現性が高く, high titer を与えた。

更に 3c に関しては, I.A と I.H との間に差が認められるが C'2. と C'3c の各量に対して I.A, I.H との比較を試みた。同じ site 数で比較すると C'2 の稀釈したところでは I.H の反応は I.A に比較して低下する。この事実から C'2 分画の中に immune hemolysis の enhance ment をきたすものがあることが判明した。

討議

田村昇 (東大血清)

C'2 分画を入れると溶血が enhance されることはどう説明するか。C'3d の contamin か? C'2 そのものの作用か?

向島達 (国立がんセンター)

まだ結論出来る段階ではない。

西岡久寿弥 (国立がんセンター)

C'3d の CM からの elution character からみて, C'2 分画の中に含まれる作用物質と, 従来の C'3d とが同じものであるといきることは難しいと思う。

横張竜一 (東大物療)

C'2 分画の溶血増強作用をみる時の Mg⁺ の requirement は?

向島達

EDTA inhibition の傾向はみられるが, C'2 と同定はされていない。

II. 各種疾患における補体及補体成分の変動

1. 膠原病その他の疾患と血清補体価

東大物療内科 山本恵一郎, 勝田 保男, 荒田 孚

1. active なリウマチ様関節炎 (RA) 患者 6 例につき, 2~4 週の間隔で 4~6 カ月にわたり, 血清補体価 (C'H50) を測定, 同時に測定した赤沈値 (ESR), C 反応性蛋白陽性度 (CRP) と比較検討した。血清補体価は経時的変動が大きく, 6 例とも高値ないし正常域を変動した。経過中同一患者の血清補体価の最高と最低の差は, 20~50C'H50 単位/ml に及んだ。

血清補体価がいずれかと云えば, ESR と近い変動経過をとるもの 3 例, CRP と比較的に近い変動をとるもの 3 例をみたが, 血清補体価と ESR ないし CRP の変動関係に一定の pattern をみとめることはできなかつた。

2. RA 患者 117 人の single determination における血清補体価を, 病度 (Stage I-IV) に分類して検討すると, Stage I, II では正常人の値より増加しているものも減少しているものもあり分散が甚しいが, Stage III, IV では分散が小となり, 各 Stage を通じて平均値は正常値よりいずれも高い値を示した。

3. Behçet 症候群患者 (完全型 9, 丸全型 17) の血清補体価も, RA 患者として正常より deviate する傾向が著しく, 一般に高値を示すものが多かつた。また attack の前, 中, 後の血清補体価の変動を検討したが一定の変動傾向を示さなかつた。

4. 全身性エリテマトーデス患者 11 例中 3 例に血清補体価の著明な低下をみたが, 血清補体価と血清抗核抗体価の間にはつきりした逆相関はみられなかつた。

皮膚筋炎 4 例中 1 例に著しい血清補体価の高値をみた強皮症 (7 例), Sjögren 症候群 (2 例) の血清補体は, 正常かやや高値を示した。

5. その他肝癌患一肝炎 (慢性 7, 急性 1 例), 肝硬変 (8 例), 閉塞性黄疸 (2 例) の血清補体については, 肝硬変の 4 例, 慢性肝炎の 1 例に著明な低下を, また閉塞性黄疸の 2 例に著明な上昇をみたが, 血清補体価と RA test 値とに相関はなかつた。

6. 上記諸疾患を通じて, 血清 C'H50 と血清 C'I50 の値に rough な正相関がみられた。

1. 追加 アレルギー性皮膚疾患における血清補体価の検討

名古屋大学皮膚科

小林 敏夫, 井沢 洋平, 石川 芳久, 別所 正樹

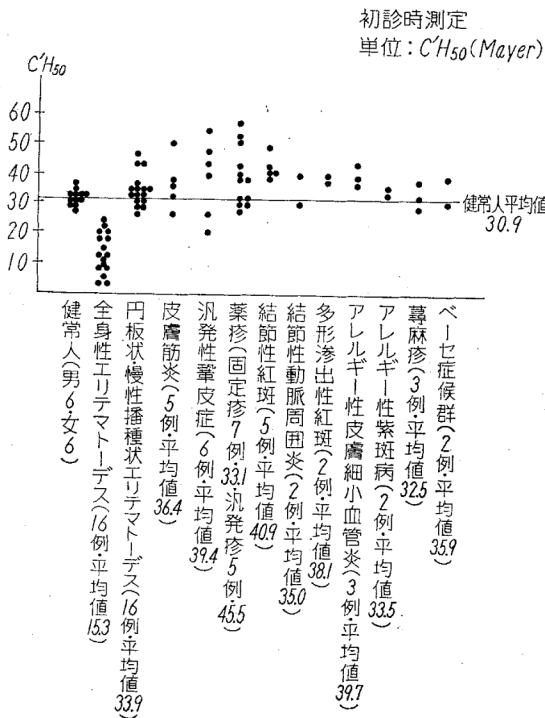
私等が、発症機序においてアレルギーの関与が考えられる、各種の皮膚疾患について血清中の補体量をMayerの50%溶血法によつて測定した結果は別表のようなものである。

抗原—抗体反応に際して補体が消費されるならば、これらのアレルギー性皮膚疾患においては血清補体価が低アレルギー性皮膚疾患における血清補体価

値を示すことが考えられるが、私等が初診時に採血した材料による血清補体価は、SLEを除いては、予想に反して殆どの症例が正常範囲またはそれ以上の高値を示した。従来報告では全身的影響の考えられるものは血清補体価の低下を来すと指摘しているものがあるが、汎発性薬疹で全身に渗出性炎症を伴つた紅斑、水疱を認めた症例でもC'H₅₀が50以上の高値を示した。

皮膚症状の発現前に一時血清補体価が低下しても、皮疹を訴えて私等のところへ来診する時には既に反動的に増加しているのかも分らない。この点を確かめるためには、適当な患者を入院させて、人工的に薬疹、蕁麻疹などを発生させ、発疹前から血清補体量の消長を経時的に追跡することが考えられるが未だ患者の協力が得られない。

SLE及び汎発性皮膚筋炎では殆どの症例において常時血清補体価の低値を認める。入院患者について、経過的に経過を観察してゆくと、全身症状の激しいSchub時に血清補体価がZeroに近づくことは肯けるが、症状が寛解して血沈値の亢進、白血球減少などの血液所見が改善されても、C'H₅₀のみは依然として低値に止まるものが多かつた。SLE患者は農家の子女や女子工員などで、低蛋白食などによる慢性栄養障害が想像される女性が多い点から考察すると、肝機能低下などによる補体生産能力の減退も推測される。



2. ループス腎炎における血清補体

慶大内科

浅野 誠一, 丸茂 菊男, 若杉 晃, 井垣 嘉之
豊泉 栄三, 大久保充人, 田村 寿夫, 倉田 要

我々は、4例の Systemic Lupus Erythematosus (SLE)の患者について、特にその臨床経過と関連して、血清補体を測定したので報告する。方法はC'に関しては、Kabat-Mayerの方法で、IAに就いては、Nelson-西岡の方法で、各々測定した。

その結果、SLEに於いて、その補体価の変動は比較的よくその臨床経過、特に発熱顔面発疹、尿蛋白、尿中赤血球等の変動と関連して、臨床症状の悪化に伴つて、補体価の低下を見ている；なお、1例のみではあるが、臨床的に症状の悪化を来す以前に既に補体価の低下を認

めたものがある、又、Lange 等によれば、補体は臨床症状の改善に遅れて、正常化すると述べているが、我々の例では、やはり 1 例 CRP 陽性の時期に既に補体の正常化したものがあり、これは Ellis 等の報告に一致する。これ等の事実は、予後の判定、SLE の病因論等の観点より見て、興味深い、なお、症例をかさねて今後の検討に待ちたい。

なお、血清補体の低下は腎障害の程度とは特に関連を有さないようであるが、腎疾患で、補体価の低下をみるものは限られた疾患であり、それ等は SLE の他に、我々が今回も報告している急性腎炎の初期、ネフローゼ症候群の一部である。後者にはなお、SLE によるネフローゼ症候群も含まれている可能性が考えられる。

又、リウマチ熱、リウマチ様関節炎等に於いて、従来補体価は正常、或いは、高値を示すとの報告もあり、SLE 以外の膠原病との比較検討が必要と思われる。

我々の症例は全例、その経過のどこかでステロイドを

使用しており、過去にステロイドによる補体価の低下を報告しているものもあるが、今回の我々の症例ではステロイドの使用により、補体価の低下を来したものはなく、又、我々のモルモットにステロイドを筋注した実験でも、注射後にわずかに血清補体価の上昇を認めたのみであつた。

なお、SLE の血清に就いて従来よくいわれている抗補体作用に関しては、今回我々は全く検討を加えていないので、今後この点も検討して行きたいと考えている。

(結論) 我々は、SLE の患者 4 名に就いて、その臨床経過と関連して、血清補体価を測定した、その結果。

(1) 補体価は臨床症状の悪化と関連して低下をみた、特に腎障害の程度とは関連がなかつた。

(2) 1 例、臨床症状の悪化に先だつて、補体価の低下をみた。

(3) ステロイドの使用により、血清補体価の低下を認めなかつた。

2. 追加 リウマチ患者の関節液中補体価

国立がんセンターウイルス部

園崎 秀吉, 荒田 孚, 鳥巢 要道

慢性関節リウマチは関節液中補体価が低いものがあるという報告は已になされている。我々は病状と補体価がどの様に関連しているかを見る為、主として東大整形外科外来を訪れた慢性関節リウマチ、変形性関節症の患者より関節液と血清を採取して検討した。関節液は主として膝関節より採取し、同時に血清を採取した。リウマチ患者は 37 名でアメリカリウマチ協会の発表したクリテリアでは 15 名が Classical RA, 13 名が Definite RA, 9 名が Possible RA であつた。変形性関節症の患者は 20 名で、いずれも特徴ある非感染性の関節炎とレントゲン上典型的な所見、及び関節液の典型的な所見を供えていた。又正常人 6 名より協力を得て関節液を採取してコントロールとした。正常人血清補体価は荒田の発表したデータに従つた。又関節液中蛋白量を 280m μ の吸光度を測定して計算した。

結果の概略は以下の如くである。リウマチの血清中補体価は 1 例を除き全て正常値よりやや高く、平均 45.2 であつた。これに反し、変形性関節症では血清中補体価は

全て正常範囲で平均 37.5 単位であつた。

関節液中補体価は正常人 6 名は 6 単位から 10 単位の範囲で平均 8 単位であつた。

変形性関節症ではこれに比し高くほとんどは 12 から 20 の範囲にあり、平均 13.6 単位であつた。変形性関節症では臨床的に炎症々状が強いほど関節液中は高く、炎症が消退し、関節液中蛋白量や関節液量が減少するに従つて補体価も正常値に落ちつく傾向にある。変形性関節症では局所炎症々状の強さに直接関係して補体価が変動するようである。

これに反し、37 人のリウマチより採取した 43 検体の関節液中補体価は 35 単位から 0 単位まで非常にばらつきが大きい。その 3 分の 1 は正常値よりも低かつた。

炎症々状が始つたばかりの例が 10 例あつたが、これの当初の関節液中補体価は全て一様に極めて高い値を示したがこれは時間と共に炎症々状が未だ強く残つていても補体価は急速に低下した。これらの低補体価の例では変形性関節のレベルよりも蛋白量ははるかに高いにもかか

ならず補体価は非常に低いのである。

この事は局所で抗原抗体反応の結果補体が消費されている結果かもしれない。

リウマチの中で長期にわたって関節液が貯溜し、いわ

ゆる関節水腫の状態のものは関節液中補体価は比較的高く変形性関節症と似た経過を辿る。

リウマチの6例に於て IA_{50} を測定したが、およそ CH_{50} と平行して IA_{50} も変動した。

3. 腎炎における血清補体 (第3報)

慶大内科

浅野 誠一, 丸茂 菊男, 若 杉 晃, ○井垣 嘉之
豊泉 栄三, 大久保充人, 田村 寿夫, 倉 田 要

前回の本シンポジウムにおいて腎炎患者の血清補体価について報告したが、その後春に例数を増し、幾つかの新しい知見を得た。

対象は15才から44才までの腎炎患者合計79例(男子40例, 女子39例)であつた。疾患別では急性腎炎18例, 亜急性腎炎1例, 慢性腎炎34例, ネフローゼ症候群19例, ループス腎炎4例, および慢性腎炎で急性再燃を繰り返すもの3例であつた。

急性腎炎第1週では C' 及び IA は極度に低下したが、 C' は第3週頃にはほぼ正常値に回復した。しかし IA はその後も低値を持続するものが多かつた、 C' が3週まで0を持続したにもかかわらず第3週には尿蛋白が陰性となつた症例もあつた。本例では IA は他の急性腎炎1週目のように0を示さず、発病7日目に4,000を示した。亜急性腎炎では長期間 C' が低値を持続したが、数週以内に補体価の回復する急性腎炎では補体低下の期間の長いものが必ずしも予後が悪いとは言えないようである。

慢性腎炎は潜在期, 進行期, および NP の上昇を示す末期とに分けて検討したが、昨年報告した成績以上のものは得られなかつた。すなわち C' , $C'1$ は各期とも正常, IA は潜在期, 進行期には低下, 末期には正常値を示すものが多かつた。慢性腎炎末期に補体が正常値を示すのは、腎障害が高度のために正常, C' は潜在期, 進行期には低下, 末期には抗原抗体反応の場が減少したためか或は生体の反応の反応力が低下したためとも解釈できる。

ネフローゼ症候群では、その経過中血清補体価の変動が激しく、著しい低価をとつたものもあつた。ステロイド療法によつて尿蛋白が陰性化した症例2例は、いずれ

もその動揺は他の陰性化しなかつた症例程強くなかつた。血清補体価の動揺の激しい原因は、補体の産生に変化がないと仮定すれば、抗原抗体反応が反復されていることを意味し、ネフローゼ症候群における尿蛋白の強さと合ろせ考えると興味ある事実である。又、ステロイド治療によつて尿蛋白が改善すると補体の著しい低下は認められなくなる。

ネフローゼ症候群ではステロイドを使用しているものが多いが、ステロイドが血清補体価を低下させるとの報告もあるため、人およびモルモットの血清に種々の量のプレドニゾロンを混ぜ、その溶血率を測定した。しかしプレドニゾロンを混ぜない血清との間に差異は認められなかつた。又正常人およびモルモットに種々の量のプレドニゾロンを筋注してその前及び3時間後の血清 C' を比較したが、3時間後に C' は僅に上昇し、ステロイドが C' を低下させるとは考え難い。

慢性腎炎で急性再燃を繰り返す2例で再燃前後の補体をみると、平常は C' は低値を示したが、再燃時或はその直後にはむしろ上昇して正常値となり、その後再び平常の値に戻つた。

腎炎患者で扁桃摘を行つた13例は扁桃摘後補体は大部分正常化の傾向にあり、炎症単除去により免疫学的にも良好な結果が得られたものと考えられた。

討議

鳥巢要道(国立がんセンター)

2の質問 $C'H_{50}$, IA が0とはどういうことか。

大久保充人(慶大内科)

1 IA は2000以下, $C'H_{50}$ は20以下ということである。

進藤宙二(東大伝研)

約10年前、晴嵐荘で結核の補体価を測定させたことが

あるが、今回、種々の疾患についての補体価の発表がされ、特に臨床面で補体が問題になつてきたことは喜ばしい。

稲井真弥（成人病センター）

Whole C'が下がつた時、C'1には変動はなかつたか。

井垣喜之（慶大内科）

1例だけ、急性腎炎で、1週間のうちに低値をとつたものがあるが、その他の例は変動はなかつた。

稲井真弥

C'H₅₀やIAが低下するのは、他の成分が関係するの

か。

井垣喜之

そのように思う。

藤井源七郎（東大伝研）

小林先生の報告では、SLEでC'の非常に低下しているのがあり、物療の例では余り変化がないが、内科と皮膚科でSLEの定義が異つているのがどうか。

小林敏雄（各大皮膚科）

SLEの診断はマイケルソンの定義によつてやつている。全身症状を中心として診断しているが内科の方はどうか？

勝田保男（東大物療）

皮膚科のSLEは、全く診断の容易な症例が来ると思う。内科の方では、特に診断に対する定義が異なるのではないが、比較的軽い例が集まる傾向はある。しかし軽症の例でも既往の症状や免疫学的検査を中心にして診断をつけている。

小林敏雄

皮疹がなくともLE細胞現象があればSLEと診断しているか。

勝田保男

免疫学的検査法を重視はするが、臨床症状も重要視していることは勿論である。

張紹元（国立がんセンター）

SLEが免疫疾患である確証はない。抗核抗体もSLE以外の慢性関節リウマチ、重症筋無力症などでも可成り陽性になるがどうか？

勝田保男

SLEの診断に抗核抗体のみを中心としているのではなく、これと臨床症状、病理組織所見を総合して診断している。また抗核抗体も蛍光抗体法では、staining titerが他の陽性に出る疾患に比して、SLEでは高く出るから、titerを参考にすると、必ずしも誤ることはない。

4. 肝疾患時の補体に関する研究（続報）

岡山大学医学部小坂内科

○長島 秀夫，宮本千鶴子，小坂 淳夫

第2回補体シンポジウムおよび第15回日本アレルギー学会において急性肝炎の黄疸期、黄疸消退期および発病後第6～8週（回復期）においても血清補体価がやや高値をしめす例を指摘したが、今回は急性肝炎症例について血清補体価の増加と臨床像との関係を検討し、次のような結果がえられた。

血清補体価はMayerの50%溶血法により測定した。また、C' componentsの測定（Pillemer et alの方法）を一部の症例について行つた。血清Properdinの測定はPillemerの方法を用い、血清Lysozymeの測定は菌芽遊法を改良した方法（エーザイ研究所）に準じた。

成績および結論

1. 急性肝炎黄疸期（33例）の血清補体価（C' unit/

ml）は42.0、亜黄疸期（22例）46.4、回復期S-GPT 50 k.u. 以上のもの（7例）39.7、S-GPT 50k.u. 以下のもの（49例）37.0（正常人20例 Mean Value 30.5）と病状の回復に伴つてC'H₅₀値は正常化する。

そのさいS-GPT値、血清Alkaline Phosphatase値BSP血中停滞率はC'H₅₀値の正常化に伴い正常範囲内に復帰する。

2. 急性肝炎初発時S-GPTの活性増加と同時あるいはやや遅れて血清補体価は高値をしめす。

3. 急性肝炎発病後第5～8週以後においてもC'がやや高値を持続するものでは慢性化をしめすもの（肝生検像でグリソン氏鞘結合織の増殖が予想外に多いもの、境界板の乱れやPiecemeal necrosisをしめすもの、細

胆管の増殖がやや強いもの (focal necrosis を伴う), 肝炎後過 Bilirubin 血症) と漸次 C' の正常化をみ臨床的治ゆに向うものが含まれる.

4. 高度の肝内胆汁うつ滞例での C' 増量は血清総 Bilirubin 量, 血清 Cholesterol 量および血清 Alkaline Phosphatase の著増と比較的平行するのが特長的で, そのさい S-GPT の活性増加が C'H₅₀ 値低下時にみられるものがある.

5. 肝硬変症で Hypersplenismus をしめす例 (3 例) や溶血性貧血例 (1 例) で摘脾前後の C' の比較では, 術前 C'H₅₀ 値が低下していたものが術後はやや増量をみていることは C' の動態観察上とくに注目された.

6. 肝疾患以外の他疾患で C' のやや高値をしめす例では血清総 Bilirubin 量, 血清 Alkaline Phosphatase,

血清 Cholinesterase, BSP 試験, T.T.T., 血清 Cholesterol 等の各測定成績と C' 値とは相関がないが, 膠原病では RA test および CRP 陽性, 白血球増多等を見るものが多く, また, 胆のう炎, 胆石症, 結核性腹膜炎, 肺炎, 白血球減少症 (白血球著減をきたす時期に一過性に C' の増加をみ直ちに減少する症例) などにみられる C' 増加の臨床像は種々の様相を呈し, 血清補体の臨床的解析には多元的な要因のあることが示唆される.

7. 急性肝炎症例について血清中の Properdin (13 例) および Lysozyme (22 例) を定量し, 血清補体価と対比し検討したが, 血清 Properdin 量および Lysozyme 量は略々正常範囲内の変動をしめすものが多く, 血清補体価の変動との間に一定の関係がえられなかつた.

5. 肝疾患と補体

九大榎屋内科 榎屋 富一, ○酒井 好古

肝障害の成立と進展の過程に免疫現象が関与するかどうかを補体の面から検討した. 臨床的には急性肝炎, 慢性肝炎, 肝硬変症を対象として, 体質性過ビリルビン血症, 肝癌, 胆道疾患は今回の報告から割局した. 実験的肝障害は 5% エチオニン溶液として 50mg/日 20 日間モルモット筋肉注射を行つて作成した.

1) 血清溶血活性は急性肝炎例で高値, 慢性肝炎例で正常域にあり, 肝硬変症例では低値を示した.

2) 血清 C'142C 成分活性は 50% Immune Adherence 活性として測定すると, 急性肝炎例で高値, 慢性肝炎例で正常上界にあり, 肝硬変症例で低下した.

3) 血清第 1 成分活性は, 63% C'1 活性として測定すると, 急性肝炎例で高値, 慢性肝炎例でやや高値, 肝硬変症例で正常上界にあつて, 肝硬変症例で必ずしも健康人平均値を下廻らないが, 急性及び慢性肝炎例と比較すると, 減少した.

4) 溶血活性が正常域に位する症例の多くは血清 GPT 値は正常であり, 溶血活性が高値あるいは低値を示す症例全例で血清 GPT 値異常を示した. C'142C 活性, C'1 活性と GPT 値との関係も同様であつた.

5) エチオニン障害群における血清溶血補体活性は, 直処置対照群に比し減少しており, 血清 C'142C 成分活

性も対照群に比し減少しているに對し, 血清第 1 成分活性は必ずしも対照群よりも減少していなかつた.

6) 補体活性が低い肝疾患症例の血清, 同じく低い肝障害モルモット血清の抗補体作用の意義は少なかつた.

7) 実験的肝障害を作るのに使用されたエチオニンは in vitro で補体第 1 成分活性を阻害したが, in vivo で の投与量では血清第 1 成分活性を低下させない.

8) エチオニン障害肝細胞は単一細胞につき対照群が 118 抗体有効分子数であるに比し, 約 3 倍量の 338 有効分子数の細胞結合性抗体を結合していることを認めた. 補体成分が障害部位へ動員され, 消費され得ることを確認した.

9) シアノガム 41 を支持体とする薄層電気泳動法により, 肝障害時血清第 1 成分活性を EAC'4, C'2, EDTA-C' を重層し, 溶血帯として検討したが, 特異なパターンを認めるには至らなかつた.

討議

園崎秀吉 (国立がんセンター)

酒井先生え, 2つの血清を混ぜると enhance されることがあるから, Inhibitor の実験をもう少し詳細に説明して下さい.

酒井 (九大)

Anti-complementary effect を測る 方法はいくつかあるが、補体価の低かつた患者の血清をモルモット血清に加えて、 CH_{50} の変化を測定してみたが、モルモット血清補体価はかえつて enhance される結果を得た。

進藤 (伝研)

黄疸時の血清 anticomplementary effect があるというが bilirubin がどれだけふえると黄疸となるか。ポルフィリン核には anti-complementary effect があるから、そのことと関係があるのではないか。

樹屋 (九大)

長島助教授の報告の如く、黄疸時に CH_{50} が高値を示すものがあるから Blirubin による抗補体作用では考えにくい。

外科の報告で Choledocs を結紮すると、抗原抗体反応や補体価の変動があるというのがあるが、これは胆汁酸の為ではないかと思う。

小坂 (岡山)

黄疸は Bilirubin が 2~3 mg/dl 以上になると肉眼的に認められるようになる。間接ビリルビンはポリフィリン核が開環しても細胞に対し多少は毒性があるが、直接ビリルビンの時は毒性はなくなる。閉塞性黄疸の時には、直接ビリルビンが増加するので多少異と思う。黄疸時には、補体価が高い例が多いが、必ずしも、黄疸の程度とは平行しない。

急性肝炎の時には、血清中胆汁酸はふえぬが、閉塞性黄疸の時には増加する。胆汁酸のふえるような管内閉塞性黄疸の時に補体価が高くなるようだ。

進藤 (伝研)

ビリルビン、ビリベルヂンも補体作用を抑える作用があるのに、それらの血中濃度が高い黄疸時に逆に補体価が高くなることの理由が理解できない。

兵藤 (東大小児科)

未熟児で黄疸の強い例では $C'H_{50}$ が 10 単位前後のことがある。

小林 (名大)

慢性栄養失調症で、蛋白欠乏があり、潜在性の肝機能失調が存在しているようなことはないか。

小坂 (岡山)

慢性肝炎の中で、特に若年性肝硬変症が増加しているが抗原抗体反応との関係、特に S L E との関係があるのではないかと云われている。近年 S L E が増加しているが、これは栄養低下とは別に考えなければならないと思う。

稲井 (成人病センター)

小林先生え：補体価と $C'4$ 値と血清蛋白量とのあいだの関係を検討してみたがそれらに関係はみいだされなかつた。低蛋白血症の場合でも補体価は正常値を示していた。

小林 (名大)

S L E が貧困階級に多いので、栄養障害をその誘因と考えて検討してみたが、血清蛋白量は正常あるいは正常以上であつた。

藤川 (成人病センター)

先天性溶血性貧血で $C'4$ も CH_{50} も低値を示していた症例で、別脾により 10 日位で正常以上に補体価が一つたん上昇してから、正常値にもどつた患者を経験している。

樹屋 (九大)

溶血性黄疸では間接ビリルビンの増加による、補体の抑制が考えられる。酒井君が、障害肝細胞に β_{1c} が付着していることを証明したが、 β_1 globulin の中に鉄と結合するトランスフェリンがあるが、これが、炎症巣に集まつてくる理由が分からなかつた。これも将来取上げるべき問題である。

5. 追加 正常人血清の補体価

国立がんセンター研究所ウイルス部

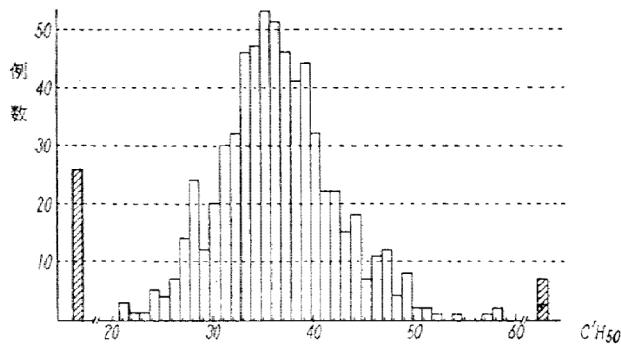
荒田 孚, 鳥巢 要道, 園崎 秀吉

今日まで正常人血清の補体価は $C'H_{50}$ においてはほぼ 30 単位から 40 単位とされてきたようであるが、我々は 641 例の健康正常人血清の $C'H_{50}$ を測定した結果上記の値

がおおよそあてはまることを見出した。

補体価測定は Mayer の 50% 溶血法により、50 倍、40 倍、32 倍、25 倍の血清希釈度で行なつた。この血清希釈

図1 正常健康人の C'H50



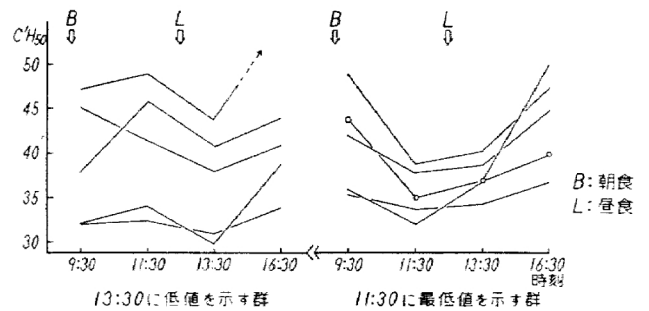
度で行なうとき、溶血度90%と10%の間に2点以上をとり且つ勾配 $1/n=0.20 \pm 0.02$ をとるためには補体価が20単位以下と60単位以上は測定が不能となる。

血清は東大病院輸血部と某血液銀行より入手したものであり、全数 641例であつた。その内訳は東大病院輸血部より 153例、他が某血液銀行からのものである。

補体価測定の結果は図1に示す通りである。20単位以下27例、60単位以上8例あり、これらを除いた残りの606例についてみると平均 36.43標準偏差5.47の正規分布を示した。従つておおまかに平均35と考へて 1σ をとれば従来から言われていたように補体価の正常値30~40単位は正しいといえる。

母集団の検討の結果は、例とも16才以上60才までの成人男女であり、血液銀行より入手した血清で売血及び預血の別が明らかになつたものは各々 313例及び 919例であつたが、これらと東大輸血部より得た 153例のそれぞれの集団の補体価の間には有意差はなかつた。又補体価に性差もみられなかつた。血液型と補体価の間にも有意

図2 C'H50 の日差変動



差はみられない。

年齢別に5才ずつ区切つて調べた補体価では女性36才以上は例数が少なく未詳であるが16才以上60才までの男性と16才以上35才までの女性の間での補体価にさしたる変動はみられない。しかしある地区での小・中学校生において学年別の男女の補体価を調べると、小学3~4年の間で急に補体価が上昇し中学1年で補体価が急激に減少する傾向がみられた。

次に健康正常人10名の補体価の日差変動を調べた結果は図2に見られる通り補体価が昼食後2時間目の採血時に最低値を示した群と昼食前に最低値を示した群とに分かれた。又それぞれの最高値と最低値は 44.0 ± 6.40 と 35.90 ± 4.15 であり、更に個々の日差よりその平均値と標準偏差を求めて 8.50 ± 4.27 を得た。

討議

関根暉彬 (北里研究所)

170例のヒト血球について、田村の方法で EAC'43C Cell に対する IA Reactivity をしらべたところ、170例中1例に極めて低いものが認められた。血清中の inhibitor, anti C'3C については特に低いものはなかつた。

6. 補体価低値を示した患者血清の補体成分について

大阪府立成人病センター

○藤川 克躬, 永木 和義, 稻井 真弥

昨年アレルギー学会に於て各種患者血清の C'H50, C'1, C'4 の相互関係について報告したので今回はこの三者の内、何れかが低値を示したものを集めて検討した。症例数は60例件数は 136件で同一症例が多数含まれるので統計的処理は実施しなかつたが下記の如き傾向がみられた。

- 1) 補体価正常群 (C'H50 75以上) 35例41件
C'4 だけの低下15件, C'1 だけの低下4件で明らかに C'4 の低下例が多いが著減例はない。
- 2) 補体価中等度低下群 (C'H₅₀ 74~31) 23例43件

大部分がC'4だけ低下，一部は10''effective molecule以下であるがC'1低下は1例である。

3) 補体価著減群 (C'H5030以下) 20例52件C'1, C'4共に正常例は4例だけで残りは総てC'4低下又は著減している。C'1も低下例が可成り見られたが著減例は1例のみで，且つC'1低下例は凡てC'4も同時に低下している。特にこの群の中でC'H50 15以下の血清では全例C'4は著減していたがC'1は正常から低下迄に殆ど均等に分数していた。

従つてC'4はC'1に比し変動が激しくC'H50低下の原因となることが多いと考えられる。但しC'4 activityが正常の約 $1/20$ でC'H50正常の例があることからC'4著減例以外ではC'2以下のstepの成分の減少が原因で

補体価低下するものもあると考えられる。

1 Aを同時に測定したものは少数であるが補体価正常で1 A低下せるものにC'4が同時に低下している例が数例みられた。一方C'H50正常，C'1低下例2例では1 Aは正常であつた。

吸収処理することにより β_1 で， β, C 沈降線を容易に識別出来る様にした抗人馬血清を用いて患者血清の免疫電気泳動を実施したが，C'4の低下と β_1 で沈降線の消失とが良く平行することがわかつた。

なお，C'H50, C'1, C'4が特異な低下を示した興味ある症例4例に関して経過を追いその変動と原因について考察した。

7. 小児期リウマチ熱及び重症筋無力症に於ける血清補体価について

東大小児科

渡辺 言夫，瀬川 昌也，兵頭 行夫

我々は，小児リウマチ熱及び小児重症筋無力症について，Mayerの方法によつてその血清補体価 (C'H₅₀)を測定した。小児リウマチ熱は昭和39年1月から41年1月までに東大小児科に入院した患者17例で，うち心炎を伴わないもの7例，心炎を伴うもの10例である。前者の血清補体価の平均値は35.3単位，後者では26.6単位で，心炎を伴うものの方が血清補体価は低値であつた。また，臨床経過と補体価の関係についてみると，心炎を伴わないリウマチ熱では急性期における平均値は35.8，寛解期における平均値は29.8であつた。急性期に上昇した補体価は寛解期には下降している。

一方，心炎を伴う群では急性期の平均値25.3寛解期の平均値33.4単位で，急性期には低く，寛解期には上昇している。この結果は，小児リウマチ熱に於ける心炎の発生に，免疫学的過程が関与していることを考えさせる。

重症筋無力症に於いては，昭和40年7月から，41年5月までの東大小児科外来及び入院患者25例について測定した。その中，全身型5例，眼筋型20例であつた。その結果，血清補体価の平均値は，全身型では21.9単位，眼筋型では26.2単位で全身型の方が低値を示した。更に，寛解期における血清補体価は，僅か3例についてであるが，26.4~32.1単位で平均値は30.0単位であつた。眼筋

型のうち，20.1，19.3単位と低値を示した症例があつたが，この症例は筋電図上所謂 Waining (減衰) を示した。Wainingは尺骨筋の刺戟によつておこる第5指の屈曲についてみたが，Wainingがみられるということは，臨床的に眼筋型であつても，眼筋以外の筋肉にも刺戟伝導障害がみられるということを示すもので，全身型の要素をもつていると考えられる。このように，Wainingを示すものは眼筋型でも血清補体価が他の眼筋型よりも低い傾向にあることは，興味ある所見で，全身型と眼筋型は免疫学的にも何らかの相違があるのではないかと思われる。最近，重症筋無力症の免疫学的な研究が盛んであるが，我々の結果もその免疫学的機序を示唆している。今後，更に症例を重ねて臨床像と血清補体価との関連につき検討する予定である。

討議

平松 (成人病センター)

リウマチ熱で心炎のある場合に，急性期と寛解期を対比されたが，寛解期とは心炎を全く残さないことをいうのか。

渡辺 (東大小児科)

寛解期とは，心炎が残つていても，血沈その他を参照

して改善していれば弁膜症を残していても、寛解期とした。

平松（成人病センター）

リウマチ熱を否定できて、ASLOの高いものではどうか

渡辺（東大小児科）

Cholea があり、ASLOの高いのに他に何も無いものが1例あつたが正常だつた。Sharlach は測定していない。

張（国立がんセンター）

心内膜炎で、心筋抗体を検索した理由は何か？

渡辺（東大小児科）

Kaplan がリウマチ性心筋炎で抗心筋抗体を蛍光抗体法でしらべているのでやつてみた。

鳥巢（国立がんセンター）

藤川先生え

午前中、私が報告したように正常人で CH_{50} が低値を示す例で、C'1, C'4, C'2. が正常だつたのに C'3c のみが、異常に欠乏してる例が、10例以上みつかつています。国立がんセンターで200例の患者について CH_{50} の低かつたものについてもやはり、C'3c が低値であつた。私の検索した、2000余例の中には C'4 の低下していたものはみつかつていない。

藤川（成人病センター）

低そうなものをえらんでやつたのではないが、C'4 が低かつた。

向島達（国立がんセンター）

がんが再発したり転移した場合にCRPが陽性になり

C' 価も上がることがあるが、CRPとC' 価との関係をしらべた人があれば考えていただきたい。

渡辺言夫（東大小児科）

リウマチ熱や白血病では関係なかつた。

入江健二（国立がんセンター）

血清中のC' 価をリウマチ熱や Myasthenia gravis でみておられるが血中補体は、産生量と消費量のバランスであるので産生量をみなければならぬと思う。何かアイデアはないか。

渡辺言夫（東大小児科）

特にアイデアはないが、臓器たとえば、肝、脾のC'1をはかろうと思う。白血病、リウマチ熱では白血球結合C'1を測つた。白血球細胞にはC'1がついている。

石橋（伝研）

疾病と補体との関係で、補体の消費される機序はいろいろ考え得るが産生機序については、むづかしい問題である。そのことに関して興味ある事は、制癌剤や大量の放射線照射により、必ず補体価の低下が認められる。この時に大量の骨髄移植を行うと補体価の回復がおこるので、補体の産生機序について、このような骨髄細胞の関与がうかがわれる。

Parabiosis の時の補体価の変動を検討中であるが、DBA系マウスは補体価が低い、補体価の高い他の系との間につくつたFIとの間にParabiosisをやると体内で抗原抗体反応が起つているはずなのにもかかわらず、DBA系マウスの補体価が上昇するという、一見奇妙な現象をとらえている。

III. 補体とその関連領域

1. 補体第成分の Esterase 活性について

京都府立医科大学微生物学教室

小玉 正智, 矢野 武, 塚本 武司

同増田内科 近 藤 元 治

補体第1成分が esterase 活性を有することは、従来より報告されているが、我々は今回ポリアクリルアミドゲル (Cyanogum 41) を用いた電気泳動法を使用しこれを確かめんとした。

ヒト並びにモルモットの血清、臓器及び EAC'14 Cell より得た C'1 について、 α -naphthylacetate の基剤による nonspecific esterase の検出を試み、次いで p-toluene sulfonyl-L-arginine methylester (TAME) 及び N-acetyl

tyrosine ethylester (NATE) を基剤として pH indicator method で specific esterase の検出を試み、同時にヒト及びモルモット血清について in vitro での nonspecific esterase の活性度の定量を行い、 C'_{1} の esterase 活性阻害剤といわれる diisopropyl fluorophosphate (DFP) の esterase 活性阻害効果も併せて検討した。その結果

1) ヒト血清は、gel 上で三本の nonspecific esterase 活性を示し、1本は $\beta\sim\gamma_1$ globulin 領域に巾広く活性を有し、他の2本は albumin 領域に存在した。

56°C30分、60°C10分の温度処理で、この内 $\beta\sim\gamma_1$ 領域の活性及び postalbumin の陰極によつた部分の活性が著明に低下或は消失した。

又 DFP の添加に依つても同様の結果を認めた。

A.T.E., T.A.M.E. に対する態度は、共に postalbumin 部分に1本の活性帯を示した。

2) モルモット血清は、ヒトと同様に3本の nonspecific esterase 活性を示すが、ヒトと比較して γ_1 globulin 領域より陰極側に活性が強かつ巾広く、殆んど albumin 領域に迄連続して広がっていた。

温度処理、DFP 添加による活性の低下は、ヒトの場合と類似した性質を示した。

A.T.E., T.A.M.E. に対しても、ヒトの場合と同様に、postalbumin 領域に1本の活性帯を示した。

3) 更にヒト血清モルモット血清について、in vitro で nonspecific esterase の活性を検すると、モルモット血清では、ヒト血清よりも10~15倍高い esterase 活性を示した。又、両血清とも DFP 添加により著明な活性

の低下を示した。

4) 臓器抽出液については、脾臓では、 β -globulin 領域、albumin 領域に各1本、肝では globulin 領域全般に互つてと、albumin 領域に1本。心では albumin、及び Post albumin 領域に1本。腎では γ から β globulin 領域に巾広い1本と albumin 領域に1本の如き、nonspecific esterase 活性を認めた。

又、何れの臓器についても、A.T.E., T.A.M.E. に対しては、同様に Post albumin 部に1本の活性を示した。

5) ヒト C'_{1} 及びモル C'_{1} について、同様に3種の基剤について検討したが、in vitro での nonspecific esterase については十分な活性を認めるが、Cyanogum の gel 上では一定した結果が得られなかつた。これは採取せる C'_{1} の Esterase 活性が微弱なため、gel 上での発色が十分に得られなかつたことと、Cyanogum の抗補体作用の検出、及び活性の低下を来さない濃縮法を工夫し、更に詳細に研究を行いたい。

討議

橘武彦 (国立がんセンター)

Esterase 活性の内、いわゆる non specific なものと specific なものと両方とも C'_{1} esterase 活性と結びつけて考えていられるか?

我々が検討した限りでは、全血清のうち、とくに一番陽性側に流れるエステラーゼ活性は C'_{1} 活性の位置と異つた所に来ることを認めている。

2. 全身性エリテマトーデスの抗核抗体と補体

東大物療内科

○勝田 保男, 横張 竜一, 鈴木 輝彦

1. 抗核抗体と補体の関係、全身性エリテマトーデス (SLE) 患者血清中には多様の抗核抗体が証明されているが、その中補体結合性抗核蛋白抗体を Latex-Nucleoprotein 詳薬 (Hyland) を抗原とし、牛血清の conglutinin を使用する conglutination で証明する方法を考案し、他の抗核抗体検出法と比較した。本法 (LE conglutination Test) は Latex-Nucleoprotein 試薬 0.01ml と新鮮牛血清 0.2ml を被検血清またはその稀釈液 0.1ml

に加え、37°C 約1時間振盪混和後生じた凝集を肉眼的に判定する方法であつて、従来の補体結合反応などと比べて操作が容易で短時間で結果が出る利点がある。LE conglutination Test を蛍光抗体法、LE Test (Hyland)、EL細胞検査の結果と比較すると、その陽性率は各々 44.8%, 86.2%, 31.0%, 55.2% であつて、LE conglutination Test の陽性率は EL細胞検査より低い、その力価は SLE の活動性の強い程高い傾向があり、経過予後を判定

する上に役立つものと考えられる。蛍光抗体法は最も陽性率が高く、補体が関与しない。LE congl, Test 陰性 32例中蛍光抗体法陽性例が24例あり、蛍光抗体法は抗核抗体検出法として優れていると同時に多様な抗核抗体を共通に証明出来る方法であると思う。

2. LE細胞現象と補体の関係、LE細胞現象の第1段階で、傷害された細胞核と患者血清中の抗核抗体が速やかに結合することは、蛍光抗体法、直接法で証明される。しかしヘパリン血ではLE細胞は著しく減少し、補体阻害剤であるEDTA加血では証明し難くなることから、細胞核と抗核抗体の結合が白血球に貪食される段階で補体が関与することが推測される。そこでAg-Ab-C'₁₄₂とC'3cの結合を阻害するフロリジン、サルドツクスと、Ag-Ab-C'_{1423c}とC'3bの結合結合を阻害するCu-Chlorophyllinを、予め溶血系で同一の抑制を示す割合の量を加えた試験管に採血して、LE細胞生成の程度を半定量的に検査した。その結果を凝血法と比較すると、Cu-Chlorophyllin加血ではLE細胞数の減少は極めて軽度乃至不変であつたが、サルドツクス、フロリジン加血ではその減少は極めて著しかつた。以上の実験から遊離ヘマトキシリン体(細胞核と抗核抗体の結合物)が白血球に貪食される段階で関与する補体成分はC'_{1423c}であつて、従来いわれたimmune phagocytosisと同様の機構がLE細胞現象の第2段階で関係していることが明らかとなつた。

討議

藤井(伝研外科)

抗核抗体に補体結合性抗体と非結合性抗体とがあるのですが、SLEの臨床症状や病期等との間に何らかの関係があるか?

勝田(東大物療内科)

その点については、特に検討はしていない。蛍光抗体法は、抗核抗体の検索法として最も、鋭敏なものであるが、LE conglutination testはSLEのやや症状の著しい症例では於て、陽性となり、特に titer の高い例では重症例が多い。

小林(名大皮膚科)

SLEでは、全身の毛細管が障害されるのであり腎における病変は形態学的には腎炎の型をしており、症状としては、ネフローゼ症状を呈する。全身の組織がダメージをうけるのであるから、白血球以外のものについてもSLEの抗原抗体反応の存在を検討されたことがあるでしょうか?

勝田(東大物内)

末梢白血球を使用して、蛍光抗体法により抗核抗体をしらべているが、臓器を使用したことはない。腎組織を使用してしらべた報告はあるが、末梢血の結果とはほぼ一致している。

進藤(伝研)

Conglutinationの問題と Complement との関係は? 横張(東大物療)

ConglutinationをおこすEAC' complexはウシC'の場合にはIAをおこしたが、ウマC'の場合はIAをおこさなかつた。Inhibitorの問題もあるが、この点からC'3cは不必要だと考える。しかし、ウマのR₃でつくつたEAR3 complexはconglutinationをおこさなかつたのにこれをEDTA中でウマ、ウシ、ヒト血清で処理するとconglutinationをおこすようになるので、C'3群のある成分は必要ではないかと考えている。

3. 担癌ウサギに於ける補体の動態

愛知県がんセンター研究所 ウイルス部

○吉田孝人, 伊藤洋平

ここ2・3年来担癌人血清の補体価の測定はかなりおこなわれて来たが、1個体での担癌以前、以後の補体の変動を知ることは出来ずデータの解釈の一方的であつたきらいをまぬかれ得なかつたのが現状である。

目下 Shope papilloma-Carcinoma 系での免疫実験を

試みつつあるが、まず手始めにウサギに継代されて来たシヨープ乳頭腫由来の Carcinoma Vx2, Carcinoma Vx7 移植担癌ウサギの補体価(C'H₅₀)の変動の探索を試みたところ興味ある事実を見出したので報告する。

C'H₅₀の測定は正常ウサギ及び担がんウサギ血清で

2.5% glucose veronal buffer saline containing Ca^* (0.00015M), Mg^* (0.0005M) 及び 0.01% gelatin, pH 7.4が最適条件であつたのでこの buffer をもちいて行つた。

CaVx2 移植ウサギ18例中15例の平均移植前 $\text{C}'\text{H}_{50}$ は 9を示し、これが腫瘍増大と共に漸次高まり 9倍もの高い $\text{C}'\text{H}_{50}$ 値を示す様になつた。しかしあとの 3例は移植前より20から40の $\text{C}'\text{H}_{50}$ 値を示し、1例は典型的な移植癌の変動、即ち腫瘍の腫大と共に補体価は下降し次第にもとのレベル迄上昇してくるという型をとり、2例

は殆んど変動せず担癌ウサギは死の転機をとつたのであつた。Ca Vx2 移植例はまだ6例であるが移植前 $\text{C}'\text{H}_{50}$ 価10前後が5倍もの上昇を取る事実が同様にあることがわかつた。

組織学的な所見としては Ca Vx2で 190から 200代、Ca Vx7 では90から 100代、いづれも大腿筋中に継代しているが、両腫瘍とも未だに皮フ癌としての組織像 (Verhornter platteu epithel Krebs)をのこしている。

目下この補体価上昇の原因追求を補体の各成分の立場及び腫瘍と生体との関係という立場より行つている。

3. 追加 ラット D.A.B. 肝癌の発癌過程における補体価の推移

国立がんセンター研究所 ウイルス部

西 岡 久寿弥, ○張 紹 元

和洋女子大 坂 本 元 子

我々は過去1年半にわたりD.A.B. による Rat 肝癌の発癌過程に於る血清補体価の推移を測定したのでここに報告する。

Rat は Wister-Imanich Rat ♂, 生後6週目のもので、高蛋白食飼育群1群 (protein content 26%) 中等量蛋白食飼育群3群 (protein content 13%) 各群20匹で、この飼料に0.05% D.A.B. を混合し自由に摂取せしめ実験開始後2カ月、4カ月、6カ月後に採血し補体価を測定した。高蛋食飼育群は8カ月にも採血した。別に中等量蛋白飼育群10匹に脾臓剔出を行い D.A.B. を投与し、血清補体価の推移を測定した。尚各群各々20匹対照を取つてある。なお補体価は Mayer の $\text{C}'\text{H}_{50}$ の方法で測定した。

高蛋白食飼育群は D.A.B. 投与後4カ月で補体価の著しい低下を示し、6カ月より漸時上昇を示すも対照群より低い、8カ月後にも尚対照群より低いがこの時割検しても肝癌の発生は認めず、脾重量は増加している。

中等量蛋白食飼育群はD.A.B投与後2カ月で補体価の低下を示し、対照群に比し1%の危険率で有意義の低下を示し、6カ月はかなりバラつきを示しているがなお5%の危険率で有意義の低下を示している。

この群で示される6カ月の補体価の変動を解析するため、6カ月後に動物を解剖し、おのおの補体価と肝臓、脾臓の重量及び病理検索を行つた。この中で特に興味ある血清補体価と脾臓重量の関係を示すと、対照群では脾臓

重量は全例1gm以下で補体価は高い。D.A.B. 投与群では全例脾臓重量が増加しており補体価は著しく低いものと正常値と同じ様に高いものとバラついている。補体価の顕著に低いものには肝癌の発生は認められず、脾のリンパ濾胞の萎縮像も顕著でない。補体価の正常値に近く高いもの3例に肝癌の発生が認められ、脾の follicular atrophy の像が顕著であつた。

上述の実験から補体価の変動と脾臓の果す役割を重視し、10匹の D.A.B. に脾臓剔出を行い、D.A.B. を投与して補体価の変動を追究した。この例に於ても実験開始後2カ月に対照群に比し1%の危険率を以て有意義の低下を示して居るが4カ月、6カ月後は正常値と変わりなく高い値を示して居る。脾臓を剔出したり D.A.B. 投与群に対しては4カ月後に1%の危険率を以て有意義の上昇を示しており、この脾剔群は現在解剖した5例中4例に肝癌が発生している。

討 議

鳥巢要道 (国立がんセンター)

体内に癌ができると、どうして補体価が上昇するのか
吉田孝人 (愛知がんセンター)

病変局所における補体結合、補体の消費と血清中の補体価との関係は、補体の消費による補体産生機構への刺激、 C' -inhibitor の動態、各 component の比率の変化、defence mechanismの一環としての補体の過剰生産等の問題を考慮に入れて検討しなければならないと思う。

進藤宙二 (東大研)

結核の例を挙げてみても、生体内で抗原抗体反応が vivid に進行しているときは吉田君の挙げたような因子が夫々組合つて dynamic に動き消費と増産をくりかえしていると考えられる。

西岡久寿弥 (国立がんセンター)

我々は、がん患者血清の C'level を測つて、いると、正常人以上にばらつきが多いので、この問題を整理しようと思つて、この実験を企画した。その結果、D.A.B. 投与初期において C'level が低下し、その後 normal からそれ以上に C'level の上昇したものに発癌した例が多い。補体価が低下した状態のものでは、発癌率が低いことをみたので、生体内における Immune Responsiveness の grade に応じて補体価の低下あるいは上昇があるのではないかと考えており、発癌の過程に応じて補体価を追求することは意義があると思う。

宮沢政栄 (都立大久保病院)

補体価の低下している時期の肝細胞の Cytological な変化を是非追究してほしい。

瀬戸昭 (東大伝研)

肝細胞の D.A.B. 結合蛋白に対する抗体の追究はされ

ていませんか

西岡久寿弥 (国立がんセンター)

補体価低下と D.A.B. 結合蛋白形成との時期が一致すること、及び High Protein 食による阻止作用から、その抗体の役割は充分考えられるので今後追究して行きたい。

藤川克躬 (成人病センター)

体内で補体を大量に消費するのに充分なほど抗原抗体反応が D.A.B. の発がん過程で、おこっているのか

張紹言 (国立がんセンター)

D.A.B. を毎日与えて感作しつづけていることは、些少な抗原感作であるということとはできないと思う。

藤井源七郎 (東大伝研)

マウスの homograft では grafting 直後に補体価が一時的低下することをみているが、ウサギの Vx tumor の移植は homograft に相当するので、C'level の低下はなかつたでしょうか

吉田孝人 (愛知がんセンター)

C' の高いウサギで一時的補体価が低下しすぐに上昇した例が一例ある。それ以外の case では、一時的低下を認めなかつた。

4. IAHA による同種移植抗体の検出

東大伝研外科

○藤井源七郎, 後藤 俊二, 石橋 幸雄

Immune adherence hemagglutination (IAHA) は、補体を介する極めて鋭敏な免疫反応である。われわれは、この方法を同種移植の場合に応用して、容易に、かつ明瞭に donor のリンパ節細胞と反応する血清抗体を検出し得たので、IgG および IgM 抗体分劃についてもその IAHA 活性をしらべ、cytotoxic 試験の成績と対比して検討した。

測定方法

- | | |
|-------------------------------|--------------|
| 1) 試験管法 | 2) マイクロタイター法 |
| 0.5ml……稀釈血清……1 drop (0.025ml) | |
| 0.2ml……donor のリンパ節細胞……1 drop | |
| 7.5×10 ⁶ /ml (マウス) | |
| 4×10 ⁶ /ml (ウサギ) | |
| 0°C, 30分間 | |

遠心, 0°C, 洗滌, 2 X.

0.7ml……稀釈液に浮遊……2 drop.

0.2ml……モル補体, 人赤血球……1 erop

マウス血球で吸収, 1/40

37°C, 30分間

0.1ml (4×10⁸/ml) 人O血球, (1.5×10⁸/ml)

1 drop

37°C, 10分, 振盪

37°C, 60分, 静置

IAHA法により、C57Bl 8 マウスより皮膚移植した C3H/He ♀ マウスの血清中に、donor (C57Bl) のリンパ節細胞と反応する抗体が、すでに 1st-set 後よりみられ、3rd-set 後は高い IA₅₀ 値 (980) を得たが、この血清は、donor のリンパ節細胞に対して cytotoxic activity

を有することも示された。同様に C57Bl より C3H/He マウスに10日おきに3回皮膚移植し、最終移植後5日目に採取した血清より、Sephadex G-200 ゲル濾過法により IgM, IgG 分割をとり、それぞれについて I A H A と cytotoxic 活性を測定したところ、何れの活性も IgG には無く、IgM 側にあり、しかも IgM のピークに一致する分割では、かなり抑制を示唆する成績を得た。

一方、雑系白ウサギに黒ウサギより皮膚移植した場合、その血清中には 1st-set 後より I A H A 陽性抗体の出現を見3rd-set 後その値は急速に上昇するが、cytotoxic 活性は 2nd あるいは 3rd-set 後の血清で始めてみられ、2-Mercaptoethanol 抵抗性の IgG 抗体の出現とはほぼ一致する。また 1st-set および 3rd-set 後の血清より得た IgM と IgG 分割についてみると、I A H A 活性は両方の IgM にみられるが、cytotoxic 活性は 3rd-set 後の IgG 分割のみられた。

同種移植で、細胞結合性抗体は、donor-recipient 間

の組織抗原間の交叉反応性 (cross-reactivity) にまた血清抗体の出現は、その異種性 (heterogeneity) に関係あることは、すでに示唆して来たところである。上述のように、donor-recipient の組合せにより、出現する抗体の種類がかわり、ある場合は、その抗体活性が、抗体の種類により分離することは、同種移植反応において血清抗体が、passive transfer や enhancement の実験で示す不定な成績を理解する上に興味深いものとする。この点については、西岡らの指摘する 19S 分割中にある C'-inhibitor の関与の問題もあり、さらに検討を加えたい。

討議

進藤 宙二 (東大伝研)

本日ここに示された Homograft Rejection にあずかる抗体が Cytotoxic effect の活性にもとずいて流血中の抗体として明らかに示されたことは極めて重要な知見である。

4. 追加 マウス補体測定法について

東大伝研外科

○後藤 俊二, 藤井源七郎, 石橋 幸雄

我々はマウス補体測定について検討を加えておりますが、先に発表しましたようにマウスの血清補体測定には高濃度の溶血素としてのウサギ抗血清を必要とします。即ちヒツジ血球 $5 \times 10^7/\text{ml}$ 1.0ml に対し $1/10$ 稀釈のウサギ抗羊血清を要し、かつ血球凝集の影響を少なくするため3分という短い感作時間で補体を加え溶血を見ております。この方法でマウス血清補体を測定すると、C₃H/He, C₅₇BL 等で $60 \sim 80 \text{ C}'\text{H}_{50}/\text{ml}$ という値が得られておりますがなお測定不能のマウスの系が多数あります。

何故このような大量のウサギ抗血清を必要とするのかという点についてはわかっておりません。そこで次の実験を行つて見た。

ウサギ抗血清より硫酸ソーダで $\gamma\text{-G1}$ を落とし、さらにこれを DEAE Cellulose Chromatography で 7S-G1 と 19S-G1 に分画し、これを濃縮しこの3つの sampele を使つて、マウス補体で溶血を見ると、7S にくらべ19

Sの方が高い溶血を示し、7Sでは16倍稀釈に peak があり19Sでは6~8倍に peak がありそれより高濃度では inhibition が見られた。

次にヒツジ血球と7S, 19Sとの感作時間の影響を見ると、7Sでは強い凝集のためか、3分に溶血の peak があり、19Sでは凝集が少く、peak は9分でした。

以上より求めた optimal な条件で C3H/He マウスの血清補体価を測つてみると、7Sでは31.5, 19Sでは108.0, $\gamma\text{-G1}$ では $76.0 \text{ C}'\text{H}_{50}/\text{ml}$ であり、19S抗体を用いた場合にはマウス補体は多少高く測定できるのではないかと考えます。

この理由としては、1つには19S抗体が、凝集を起すことが少く、充分な血球感作ができること、もう1つは19S抗体の efficiency が高いことによるものと考えられます。

5. 抗凝固剤と抗補体剤の吞食に及ぼす影響

東京大学物療内科

○菊 谷 豊 彦, 村 中 正 治

痛風の発症機序として、高尿酸血症から、尿酸ソーダ結晶沈着がおこり、そこに白血球が遊走して、結晶を吞食した結果、lysosomal enzyme, 起炎物質の放出がおこることが想定されている。われわれは白血球による尿酸ソーダ結晶の吞食に注目し、その際の補体の関与について、抗凝固剤、抗補体剤の面から検討したので、報告する。control として、墨粒を作り、同じ実験条件下で、尿酸ソーダ結晶の吞食像と対比した。

シリコン化試験管に健康人より静脈血をとり、37°Cにて incubate した。墨粒は市販の墨を生理的食塩水内でよくすり、使用前に、毎分3000回転、20分遠心し、その上澄を使用した。尿酸ソーダ結晶作成を、Seegmillerの変法により、白血球に吞食される程度の、均一な、針状結晶を得た。使用前に、生理的食塩水内でよく砕いた。血液1ccに対して5mg使用した。

墨粒吞食像を3時間目、尿酸ソーダ吞食像を2時間目に、それぞれ観察した。その結果、墨粒吞食像の程度により4段階(0.1.2.3)に分類し、好中球100コを数え、Scoreを求めた。尿酸ソーダ結晶吞食像については、好中球100コ中の吞食細胞の%を求めた。

抗凝固剤として、Heparinを用いると、吞食像は共に

著明であつた。EDTA(1%)を使用すると、吞食はほぼ完全に抑制されたが、Mg-EDTA(1%)では両者ともに、吞食が旺盛であつた。NaF, Citrate(3.8%)では、吞食像はほとんど認められなかつた。Oxalateの場合、墨粒吞食は明かに抑制されたが、尿酸ソーダ結晶はかなり認められるという、解離した結果が得られた。

抗補体剤として知られている Sod, Cu-Chlorophyllin と Phlorizin をえらび、ヘパリン使用のもとで、両異物添加のもとに吞食実験を行つた。Chlorophyllin は抗補体作用が充分あると思われる濃度(最終濃度 1000 γ /cc boold)で、Phlorizinは飽和溶液 0.2cc添加のもとで、吞食像は control と比較して、抑制されていながつた。

次に血清を非動化(56°C, 30分)した場合には、墨粒吞食像は著減し、尿酸ソーダのそれは軽度減少していた。

Tyrode 氏液で血液を3回洗い、最後に血球を同液内に浮遊させてから、血清を添加したものとしなないものに吞食像の差をみた。墨粒、尿酸ソーダ結晶ともに前者に著明に強い吞食像が認められ、後者では弱かつた。

以上痛風発症機序解明の手がかりとして、補体の関与の有無をみるために上記の実験を行つたので報告する。

6. 補体とプラスミン

京都府立医大 増田内科

○近藤 元治, 石丸 寿一, 藤木 典生, 増田 正典

同 河村外科 小玉 正智, 四方 統男

同 微生物

矢野 武, 塚本 武司, 菅 沼 惇

アレルギー性病変の発現に関し、種々の因子の関与が考えられているが、アレルギー性炎症に参加するといわれている補体ことに C'_1 と Plasmin の作用を比較する時、いくつかの共通点を見出し得る。即ち両者共、血清 Euglobulin 分画に活性を有し、又 Esterase 活性を有して TAME, ATyEe を分解、更に炎症局所に両者の集中

することも知られている。Lepow (1954) の、Plasmin が Complement 活性を抑えるという報告に始り、Lepow 一派により数々の追求が成され、Plasmin が C'_1 を activatei この activated C'_1 が更に Plasmin の活性化に働くのではないかとの推論に至つているが、今一つ両者の関連を明かにしたデータはない。今回は C'_1 と Pla-

smin の関係につき抗プラスミン剤 EACA, AMCHA, 補体阻止物質 Chlorophyllin, 抗ブラダイキニン剤 Homochlorcyclizine, 並にエステラーゼ活性阻止物質 DFP を用いて, 主として反応の障害の面から検討した.

1) PCA 反応が Chlorophyllin で阻止されることは知られているが, EACA, AMCHA によつても阻止された. これらは抗体の皮内注射以前に局所或は全身的に用いる必要があり, 抗体が局所に固着 (anchor) される mechanism —これには C'_{142c} が必要とされている—を阻害するのではないかと考えられる. 又 C'_1 のみの皮内注射による血管透過性亢進も, EACA, AMCHA の局所投与で阻止された.

2) 然し抗プラスミン剤には Chlorophyllin と異り, 免疫溶血現象の阻止は見られず, 又全身的投与によつて, ヒト血中補体価 ($C'H50$) への影響は見られなかつた.

3) Standard Fibrin Plate を用いた Plasmin 活性の測定には, Euglobulin 分画が Proactivator, SK (Streptokinase) が activator として用いられるが, EAC'_{14} より EDTA で elute して得たヒト C'_1 を euglob の代りに用いても Fibrinolysis を来たし, 又 euglob を $56^\circ C$, 30分非動化, 或は $0^\circ C$ で E.A (感作血球) を作用させ, C'_1 free の状態にした上で Plasmin 活性を見る場合, euglob. そのまま用いた場合に比し, 明かに lysis area の縮小を認め Plasmin 活性の低下が考えられる. 従つて, C'_1 も又 Proactivator 的な働きをすると考えられる. この Fibrinolysis は抗プラスミン剤及び Chlorophyllin で阻止されたが, $DFP 10^{-4}M$ では抑制されなかつた.

4) 血清中の esterase 活性は, SK 添加による Plasmin 活性上昇に伴い著明な増加を認めるが, 血清非動化により esterase 活性は著明に低下し, これはもはや SK で activate されなかつた. この事は SK により血清 C'_1 の活性が上昇した事を意味する. 又この SK による esterase 活性の上昇は, EACA, AMCHA, Chlorophyllin では抑制出来ず, DFP, Homochlorcyclizine により著明に抑制された. 又 EAC'_{14} より得た HuC'_1 の esterase 活性は, SK 添加によつても上昇しなかつたが, これは C'_1

が Ag-Ab complex より得られた為に, すでに esterase 活性を得ていたと考えられる.

討議

芳賀 邦夫 (東大伝研)

AMCHA は, 0.5ml 中 12.5 γ で阻止を認めた.

近藤 元治 (京都府立医大)

我々の系では AMCHA の阻止は未だ認められなかつた. 今後検討したい.

進藤 宙二 (東大伝研)

抗原抗体反応と蛋白分解酵素との間には密接な関係があると考えていたが, その面から見て, プラスミンと補体との関係は今後ますます検討を加えねばならない.

安部 英 (東大吉利内科)

プラスミンと activator とくに C'_1 との関係は一応別個にその活性を追求しながら比較検討すべきと思う. substrate としてのエステルはもつといろいろなものをえらぶべきではないか. C'_1 はその活性化あるいは阻止作用の矛盾があるから, その作用を分けて追求すべきではないか.

近藤元治 (京都府立医大)

C'_1 depletion によりプラスミン活性が低下するのは事実であり, activator は各種の要因が関連しているので, それらの要因を出来るだけ解析して両者を結びつきたい. C'_1 は EAC'_{14} からとつたものであり, activated form と思う. これがプラスミン系に作用し活性化し, またその産物から逆に C' 系に作用するか, あるいはエステラーゼ活性をおびた C'_1 が溶血活性を失うような事実をあわせて考えると両者の系の結びつきも十分考えなければならぬと思う.

橘 武彦 (国立がんセンター)

エステラーゼ, 蛋白分解酵素, 補体分画などが, 抗体分子に作用して, その活性を変える可能性を考えるべきではないか.

安部 英 (東大吉利内科)

プラスミンはたしかに抗体を侵襲することを考えなければならぬが, より長い分子, 例えば fibrin に対する侵襲力の方がはるかに強い.

7. 補体とプラスミンとの関係

東京大学伝染病研究所

○芳賀 邦夫, 瀬戸 昭, 伊藤 幸治

鳥取大学医学部 石原内科 植木 寿一

Ratnoff (1948), Chaistensen (1946), Pillemer 及びその協同研究者らはストレプトキナーゼにより活性化されたプラスミンが補体の作用を破壊すると報告している。これに反して Boisvert (1942) は 幼児の血清に, Christensen (1949), Clifton 等 (1950) は赤猿, 家兎, 犬及びモルモットの血清にストレプトキナーゼを添加してもその中に含まれている補体には影響がなかつたが, それはこれら血清中にプラスミンゲンが乏しいからであろうと報告している。その他多くの研究報告はあるけれども, 私らはプラスミン製剤は試験管内免疫溶血反応における補体の作用及び PCA 反応について阻止的に作用することを見出したので, その研究結果を報告する。

プラスミン製剤は PL05 (ミドリ十字), NBC (Nutritional Biochemicals' Corporation), MRL (Mann Research Laboratories) の三種製剤を, 対照として γ -グロブリン (ニチャク) を用いて補体作用の阻止試験を行った。

その結果 PL05 は 3125 γ で阻止し, NBC は 19 γ , MRL は 39 γ で阻止を認めた。 γ -グロブリンは 391 γ で補体作用を阻止した。

プラスミンそのものは温度によりその作用を失うとされているので温度による影響を検討した。その結果 PL05 は 37°C 1 時間作用により補体作用阻止力が減弱したが, NBC 及び γ -グロブリンは温度による補体作用阻止力の低下は認められなかつた。MRL は 37°C 2 時間作用により僅かに減弱を認めた。

PCA 反応では前処置後抗原惹起注射の時間を 1 時間, 2 時間及び 4 時間に就いて検討したが, PL05 は時間後及び 2 時間後では阻止したけれども, 4 時間後では阻止は認められなかつた。NBC, MRL 及び γ -グロブリンは各時間について阻止作用を示した。これらプラスミン製剤のフィブリノライシスによる単位は PL05 は 5.300 u/ml, NBC は 22.000 u/ml であり MRL は 12.500 u/ml であつた。

以上の成績は三種のプラスミン製剤及び γ -グロブリン

が抗アレルギー作用を示す結果であるが, これらの作用は所謂プラスミンそのものの作用と関係がないようである。補体因子についての阻止部位を検討したのに C'4 の阻止であることが分かつたし, またトリプシンの作用は阻止しなかつたので, chlorophyll などとは様子の違う阻止と考えられた。阻止因子の本態について更に研究中である。

進藤 宙二 (東大伝研)

プラスミンの製品 lot によりその reactivity が随分違うので, contamin をしらべなければならない。この中には癌センターで調べたところ, C'4 の作用阻止も認められている。

芳賀 邦夫 (東大伝研)

これらの plasmin の中に C'4 活性はなかつた。

岡田 秀親 (国立がんセンター)

plasmin 製品中には非常に溶けにくいものが随分あるように思うが, 製品の純度はどうか。

安部 英 (東大吉利内科)

イオン強度, 温度をあげるとよく溶けるが, 物質的に単一かどうかはまだ結論はできない。よく溶けるものと溶けないものとの間に, 作用は若干異なるようである。

近藤 元治 (京都府立医大)

プラスミン製剤と抗体とを混ぜて注射した時, Plasmin だけで色素の漏出はおこらないか, 出血病変はどう説明するか。

芳賀 邦夫 (東大伝研)

Plasmin だけの対照はおいているが, Plasmin lot によつて出血病変は異なる。

安部 英 (東大吉利内科)

Plasmin の反応等における時間的経過, 反応中間体などの差によつて, さらに夫々の段階に inhibitor が加わつて, 起こす lesion は異なるので, その点から解析しなければならない。

Plasmin の製造過程は夫々に異つているが日本の製品の純度はかなり高いと思う。

あ と が き

この研究会は創説の当初から少壮研究者の御意見を尊重して、なる丈実際に手がけている人々の会合として出発したのでありますが、次第に参会者の増えて来ましたことは、補体の重要性が認められた研究者の増えたことを意味致します。またこのシンポジウムは今年1月 La Jolla で開かれ、西岡久寿弥博士らが参加されました Complement Workshop (第4回) に比適するものであります。さらに来秋Montrealでの第6回国際アレルギー学会のシンポジウムに Complement がとり上げられましたことは Complementology の重要性が国際的にも認められたことを示します。医学に貢献する 斯学のために御同慶の至りに存じます。

今回の御報告御討議をかえりみまして、基礎的研究の展開の顕著であつたことは申すまでもありませんが殊に臨床面研究に優れた興味深い事項の多かつたことをうれしく思いました。また体液酵素の角度からプラスミンなどとの相関の探求のはじまりかけたことも、その将来性に期待出来ることでありましょう。

研究報告者、熱心な討議に参加された方々に敬意を表し、益々御精進あらんことお願い致しますと同時に今回も一方ならぬ御援助を賜わつたエーザイ株式会社に対し、一同に代わり謝意を表します。

(進藤宙二記)

**Abstracts of Papers presented at the Third Symposium
on Complementology**

**Immunolyso-electrophoresis of the First Component of
Guinea Pig Complement**

**Takehiko Tachibana, Hiroshi Takahashi, Kazuo Ohmi, Yoko Kamiyama
and Kusuya Nishioka**

National Cancer Center Research Institute

Guinea pig C'1 has been separated into three activities as define hemolytic spots on the polyacrylamide gel by our immunolyso-electrophoresis technique. All the three activities, i.e. the fast (F), medial (M) and slow (S) moving spots were demonstrated by double layer method of agar-DEAE dextran gel mixtures containing EAC'4 cell and partially purified C'2, and EDTA-C'. But, in the system using EA cell, Sspot alone was observed.

The electrophoretic run of C'1 treated with 10^3 M to 10^{-2} M EDTA resulted in the marked activity of F spot and disappearance of M and spots. By Sephadex G-200 chromatography and sucrose density gradient centrifugation of purified C'1, the obtained were two C'1 activity peaks in which the heavy molecular fraction comprised mainly S and M and the light on mainly M and F in electrophoresis. After centrifugation of EDTA-treated C'1, in the presence of EDTA, C'1 activity was shown as single peak which was found in a similar position of light molecular fraction of intact C'1. Recalcified C'1 after the treatment of EDTA was separated into two activity peaks, both composed of F and M, by centrifugation. But the recalcified C'1 could not form EAC'1 instead of C'1.

Subcomponents of guinea pig C'1 could be obtained by DEAE-cellulose column chromatography followed by Lepow's method. The eluate at ionic strength of 0.14M relative NaCl (probably corresponding to Lepow's human C'1s) ran at the position of F spot in electrophoresis. When the fraction corresponding to Lepow's C'1q was added into detection system containing EA cell, weak M spot was revealed on the gel but F spot was not.

From the above observations, it is suggested that there are different active states of C'1, e.g. a complete macromolecular state which might react with EAC'4 as well as EA cell, and incomplete macromolecular states which might react with EAC'4 cell, but not with EA cell.

**The Cross-Reactivity of Anti-human or Anti-guinea Pig Complement
Component Sera and the Titration of C'2 in Human Serum**

Noboru Tamura, Taeko Yokochi and Mitsuko Usui

Dept. of Serology, School of Medicine, University of Tokyo

Anti-guinea pig C'4 and anti-guinea pig C'3c rabbit sera were prepared by immunization with the preparation of complement component, which were prepared by the methods of DEAE- and CM-cellulose column chromatography. Anti-human C' rabbit sera were prepared by immunization with antigen-antibody-human C' complexes. On the immunoelectrophoresis, these sera contained anti- β 1E and/or anti- β 1C. All the sera were absorbed with EA. Anti-guinea pig C'4 serum agglutinated EAC'4 gp and EAC'4 gp 3c gp but did not reacted with EAC'4 hu. Anti Mguinea pig C'3c serum did not reacted with EAC'4 gp or EAC'4 hu, and agglutinated only EAC'4 gp 3c gp. However, when the human C' intermediate prepared with whole human C' showed immune-adherence reactivity, anti-guinea pig C'3c

serum agglutinated these cells. Anti-human C' sera agglutinated EAC'4 gp as well as EAC'4 gp 3c gp. These results suggest that either C'4 or C'3c reacts as cross-reactive antigen.

Human C'2 should not be titrated with EAC'1, 4 prepared with guinea pig C'4. The incompatibility involving the reaction of human C'2 with EAC'1, 4 gp was reported previously. Therefore, C'2 in human serum was measured with either EAC'14, hu or EAC'1, 4, gp. C'2H₅₀ units/ml with EAC'1 gp 4hu ranged between 9,000 and 18,000 and those with EAC'1 gp 4gp varied from 600 to 1,100. The titers of C'2 in human sera obtained with EAC'1, 4 prepared with guinea pig complement were interpreted to result from the combination of C'4 in the human serum with sites on the erythrocytes not occupied by guinea pig C'4.

Studies on the Conversion of β_{1C} -Globulin

T. Matsubashi, M. Usui and K. Okochi*

Department of Serology, and* Blood Transfusion Service Center, Faculty of Medicine,
University of Tokyo

We have already reported that β_{1C} -globulin was converted into $\beta_{1A(G)}$ globulin by treating fresh human sera with polyanethol, chlorophyll, plasmin etc.

Further studies will be reported here.

1) 2-mercaptoethanol (ME) treatment: Aged human or guinea pig sera with completely converted β_{1A} -globulin was treated with ME (final concentration 0.1 M) at 37 C for 2 hours. The resultant sera showed no β_{1A} -globulin line but new precipitation line was found in β_2 - γ -globulin region. When the serum was treated with 0.03M ME, β_{1A} -globulin line became weakened and two-humped precipitation line was recognized in β_2 - γ -globulin region. On the contrary, when fresh human or guinea pig serum was treated with ME, β_{1C} -globulin line was weakened or disappeared and no new precipitation line was produced.

2) β_{1CA} globulin conversion of guinea pig serum: β_{1CA} globulin conversion in aged guinea pig sera was not so prominent as in aged human sera, but it was remarkable in such fresh serum as was treated with zymosan or immune precipitates.

3) β_{1CA} globulin conversion of fresh human serum by miscellaneous antigen-antibody reaction: New anti β -I lipoprotein antibodies were found by skin test in sera of two patients who have received frequent blood transfusion. The antibodies were detected by immunodiffusion technique but not by complement fixation or immunoadherence reaction. When the γ -globulin fraction of the antiserum was added to a fresh serum which reacted with the antiserum, the β_{1CA} globulin conversion occurred.

We found a myeloma patient serum which immunoelectrophoretic pattern showed abnormally elongated albumin precipitation line. The cause of elongation of albumin line was considered to be the interaction between albumin and anti-albumin antibody-like substance in myeloma protein. In fact, the elongated albumin line was observed when the γ G-globulin fraction containing myeloma protein was mixed with normal human albumin. When fresh human serum was mixed with the fraction, β_{1CA} globulin conversion was also occurred.

Immunoelectrophoretic Patterns of the fourth Component of Human Complement

Center for Adult Diseases, Osaka

Seiichi Hiramatsu, Kazuyoshi Nagaki, Katsumi Fujikawa and Shinya Inai

By the use of the immunoelectrophoresis, the situation of the isolated C'4 was determined, and the changes of C'4 resulting from various treatments were investigated. In addition to that, relation between the change of C'4 activity of the various patients' sera and that of the precipitin line of C'4 was examined.

The precipitin line corresponding to C'4 by immunoelectrophoresis revealed a single line which migrates from the original point to anodal side in β 1-globulin region.

To examine the precipitin line of C'4 in the whole human serum, Ouchterlony double diffusion method was also used. With these methods, this line was correspond with β 1E-globulin.

As it is difficult to detect the β 1E- and β 1c/1A line in the whole human serum, an absorbed anti-human horse serum was used.

This anti-human horse serum (produced by the Research Foundation for microbial Disease, Osaka University) was absorbed with the whole human serum from which β 1E- and β 1c/1A globulin fraction were eliminated by chromatography. Using this antiserum, the β 1E and β 1c/1A lines were easily detected.

Under the hydrazine treatment of C'4, the β 1E line extends to cathodal side with the times of this process and gets across the β 1c line, but it was no change on anodal side.

About the effect of immune precipitate on C'4, this treatment results that the β 1E line gets across the β 1c line, but the transfer of the β 1E line to cathodal or anodal side was not investigated.

The length and density of C'4 line decreased with dilution of C'4 by a saline solution, but no changes of the situation and form were observed by this treatment. And the β 1E line vanished when the activity of C'4 became one-fourth of normal value.

It was recognized that the alternation of the β 1E line in the various patients' sera kept pace with C'4 activity of these sera.

C'3c Deficient Human Serum with β 1c Precipitin Line

**Motomichi Torisu, Makoto Arata, Hidekichi Sonozaki,
and Hisashi Majima,**

Virology Division (Director: K. Nishioka, M.D.)
National Cancer Center Research Institute

Sixty-nine cases of 2321 blood donors showed less than 20 unit of C'H50. After a period of one or two months, 22 cases of these 69 cases were reexamined and all of the 22 cases again showed complement titer lower than 20 C'H₅₀. Ten cases out of this low complement group showed extremely low hemolytic activity, less than one unit. It was found out that they were apparently in good health and not relate to age, sex or blood type.

The ten sera with low hemolytic activity revealed extremely low C'IA50 activity, less than 1:9 (except one which revealed 1:30) in comparison with that of normal control which produced the same patterns at the dilution of either 1:4000 or 1:6000. Reactivity of each nine components of complement of these sera was measured, employing functionally pure guinea pig components of complement. The results indicated that reactivity of C'3c was strikingly low as compared with the control sera. More endeavour was made to determine whether C'3c low reactivity was due to deficiency in C'3c or to presence of larger amount of C'3c inhibitor in the test serum. We recognized that there was no difference in inhibitory activity of C'3c reactivity as measured by immune adherence between 5 normal sera and 5 low hemolytic activities. The sera, one from normal and another from low hemolytic activity, were applied to DEAE cellulose column in order to measure the amount of C'3c and its inhibitor in separated form. The result indicated that remarkably low reactivity of C'3c was due to C'3c deficiency itself but not to its inhibitor. Immunoelectrophoretal analysis of these sera was carried out in collaboration with Matsushashi and Usui. Rabbit anti human β 1c antiserum was prepared after Matsushashi's method. The precipitin line developed in all 10 cases of these C'3c deficient sera as well as in normal sera, and essentially no difference could be observed. As compared with precipitin lines developed with rabbit antiwhole human serum antiserum, these precipitin lines correspond to β 1c globulin and this was confirmed by conversion pattern

of β 1c to β 1A globulin as observed in both C'3c deficient and normal sera. Recently Muller-Eberhard stated C'3 is synonymous with β 1c globulin, but from these observations, we could not conclude that C'3c was synonymous with β 1c globulin (or C'3 of Muller-Eberhard).

The Properties of Guinea Pig Complement Inhibitors in the Sera from Rabbit and C3H/He Mouse

Masaharu Inoue, Reiko Furse, Hidechika Okada and Kusuya Nishioka

(From the Virology Division, National Cancer Center Research Institute)

It has been recognized that the lack of knowledges on C'-inhibitor makes hazard in the study of tumor immunity as well as in that of transplantation immunity. This report deals with the results of the separation of anticomplementary substances (not antibody, but C'-inhibitors) in the sera from rabbits and C3H/He mice, and also their characterization.

Separation of the sera. The anticomplementary activity in these sera were evidenced in two parts of fraction on gel-filtration with Sephadex G-200. The first part is approximately correspondent to the first peak of the serum protein fractionated with Sephadex G-200 and the second to the fourth peak. The former is tentatively named Fr. I and the latter is Fr. II. Both fractions exhibit the anticomplementary effects mostly through the inhibition of C'3 activity, but the exact component of C'3 is still unknown.

The properties of the Fr. I. The Fr. I is non-permeable through cellophane membrane, stable at 56°C for 90 min., precipitated at pH 5.5 with i.s., 0.001M NaCl equivalent, and not inactivated through absorption with EA cells. The anticomplementary activity by incubation with GPC, is more strengthened at 37°C than at 0°C and the longer the stronger as far as time is concerned.

The properties of the Fr. II. The Fr. II is permeable through cellophane membrane, stable at 56°C for 90 min., and not inactivated through mixture with EA cells, but inactivated through lyophilization. The Fr. II immediately acts on C' while the Fr. I dose rather slowly as described above. The anticomplementary activity of Fr. II is eluted from DEAE cellulose column at pH 7.7, i.s. 0.045.

Studies on Guinea Pig C'3d

***Takashi Mori, Kunio Yonemasu and Kozo Inoue**

(1st Department of Surgery and Department of Bacteriology, Osaka University Medical School)

The kinetic analysis of d-sites formation (SAC' 1, 4, 2, 3c, 3b, 3e, 3f, 3a, 3d) from a-sites (SAC' 1, 4, 2, 3c, 3b, 3e, 3f, 3a) and C'3d and their lysis show that the formation of d-sites is rather rapid even at 0°C and the final values reached are independent of the concentration of C'3d added at 0°C and 30°C. At 37°C, however, the final values of d-sites formed depend on the concentration of C'3d.

This difference seems to be due to that of decay rate of a-site at different temperature. The d-site does not decay at 30°C. The plotting of the reciprocal of initial velocity against that of a-cell concentration used (Lineweaver-Burk's plot) shows a straight line. Those data suggest the enzymic nature of C'3d. However, C'3d can clearly be depleted from the liquid phase by a-cells and the amount of removed C'3d is proportional to the concentration of a-cell added. C'3d preparations used in these experiments are fairly pure as judged by means of immunoelectrophoresis combined with the spot-lysis of a-cells in agar.

The Separation and Measurement of Nine Components of Guinea Pig C'

**Kusuya Nishioka, Hidechika Okada, Tatsu Mukojima, Motomichi Torisu,
Makoto Mayumi and Teruaki Sekine**

From the National Cancer Center Research Institute

Methods for separation, purification with DEAE and CM cellulose columns, and measurement of nine components of guinea pig complement were recently established by R.A. Nelson, J. Jensen, I. Gigli, and N. Tamura.

The nine components of complement in our laboratory were separated from guinea pig serum with a little modified system. Each of the separated components had more than 1,000 C'H50 in activity, but the contamination of other components was less than 30 C'H50, if it were. The inactive protein contained in the separated components was extremely low except C'2 and C'3e.

Using these components, measurement system was built up, i.e. C'1: EA4, C'2, EDTA-C; C'4: EAI, C'2, EDTA-C'; C'2: EA14, DETA-C'; C'3c: EA142, C'3 befad (IH), or EA142, HuE (IA); C'3b: EA1423c, C'3 efad; C'3e: EA1423c, C'3 bfad; C'3f: EA1423c, C'3 bead; C'3a: EA1423 cbef, C'3d; C'3d: EA1423 cbef, C'3a. Especially in titration of C'3 group, the same effective molecule of the separated components was used in the assay system and this assay system could provide reproducible maximum end-titer of each component.

With the assay system, nine components in Geon zone electrophoresis and Cohn's ethanol fractions were measured. Most of them were found in β -globulin region and C'3d, 3b, 3e were slightly in the faster fraction and other C'3 components were in the slower fraction.

Dose response curve and site number was determined in each step. Provided site number of EA14 was about 70 per cell, site number of SA1423 cbef would have been about 50 per cell. Dose response curve was linear in each step except in terminal step.

These results proved that titration of C'3c, b, e, f and a could be performed with intermediate cell and titration with intermediate cell would be superior to other assay system in analysis of kinetics and inhibition. But EA1423cb cell is extremely unstable and titration of C'3e was performed with C'3e site generation. In this case titer of C'3e was reproducible and maximal. On titration of 3c with IA and IH, there was a remarkable difference between them. Studied on the same sites in number higher dilution of C'2 would be more sensitive in IA, and these results suggested that high concentration of C'2 would bring out immune hemolysis effectively. Under these experiment C'2 fraction enhanced the immune hemolysis, especially after EA1423 cbefa cell stage and multiple nature of C'3d activity was discussed.

Serum Complement Levels in Collagen Diseases

Keiichiro Yamamoto, Yasuo Katsuta and Makoto Arata

Dept. of Physical Therapy and Internal Medicine Faculty of Medicine, University of Tokyo

1) Repeated estimations of serum complement were made at 2- to 4-week intervals during 4 to 6 months in six patients with active rheumatoid arthritis (RA). The results obtained in each case studied were compared with the corresponding ESR and CRP titres. Serum complement values ranged between normal and markedly raised levels, and showed significant fluctuations during the course of the disease in many cases. The difference of serum complement titres between the highest and the lowest reached 50 CH50 unit per ml in some cases.

Any pattern of these complement changes and that of ESR or CRP changes did not reveal a consistent correlation.

2) Single complement determinations were made in 117 patients with RA rheumatoid and the results were grouped according to the clinical assessment of disease activity. (stage I-IV). There is a tendency for the serum complement to become less elevated and less deviated in successive stages. The

mean complement value obtained at each stage was found to be higher than that of the normal group.

3) The serum complement levels estimated in patients with Behcet's syndrome—9 cases of complete type and 17 cases of incomplete type—also had a tendency to deviate from normal as in the patients with RA, but no definite tendency was seen in changes of serum complement responding to the attack of the disease.

4) Significant depression of serum complement was found in 3 of 11 patients with systemic lupus erythematosus, but it did not always correlate with titres of the serum antinuclear factors. In one of 4 patients with dermatomyositis high serum complement value was obtained. Seven cases of scleroderma and two cases of sjögren's syndrome were found to have values within the normal range or slightly elevated.

5) A rough positive correlation was seen between the titres of C'H50 and those of C'I 50 in the diseases above mentioned.

The Consideration about Behaviors of Serum Complement Activities of Allergic Skin Diseases

T. Kobayashi, Y. Izawa, Y. Ishikawa and M. Betsusho

Department of Dermatology, Nagoya University

We have determined serum complement activities of so-called allergic skin diseases such as urticaria, drug eruption, erythema nodosum, erythema exsudativum multiforme, vasculitis allergica cutis, periarteritis nodosa, BCG ulcer, scleroderma, dermatomyositis, erythematodes etc. by the method of Mayer.

In those diseases, when patients visited our clinic complaining each skin eruptions, their serum complement activities showed higher averages than normal subjects.

As an only exception, all patients of systemic lupus erythematoses showed remarkable low averages. Chronic discoid or disseminate type of erythematodes showed high or normal averages.

According to some reports, in the cases of systemic diffuse eruptions serum complement activities were low.

But in our experience, severe diffuse drug eruptions, urticarias showed high averages.

We want to follow-up the behaviors of serum complement activities of these allergic skin diseases before giving antigens till eruptions appear with hospitalized patients.

These results will be reported at next meeting.

Serum Complement in Systemic Lupus Erythematosus

**Asano, S., Marumo, K., Wakasugi, A., Igaki, Y., Toyozumi, E.,
Okubo, M., Tamura, S., & Kurata, K.**

Department of Internal Medicine, Keio University School of Medicine

We report here on the fluctuations of serum complement levels of four patients suffering from the systemic lupus erythematosus (SLE) in relation to their clinical courses. Estimations of C' and I.A. were done according to the original methods of Kabat-Mayer's and Nelson-Nishioka's, respectively.

In the patients of SLE, serum complement levels correlated well with their clinical signs and symptoms, esp. fever, exanthema on the cheek, Proteinuria, erythrocytes in the urinary sediment, etc., and the clinical aggravation accompanied lowering of the serum complement. But the degree of renal lesions did not seem directly related to the complement levels.

In one patient, whose course we could follow up fairly well clinically, showed low level of the complement in advance to the clinical exacerbation, such as pyrexia.

The lowering of the serum complement is observed in only a few renal diseases, and besides SLE, they are, as we report elsewhere, the initial stage of the acute glomerulonephritis and some of the nephrotic syndrome. In the latter there may possibly be included the nephrotic type of SLE.

Some authors reported normal or high serum complement in the rheumatic fever or rheumatoid arthritis and hereafter we are going to make further investigation on the serum complement of the collagen diseases in comparison with that of SLE.

All of our cases were treated with steroids somewhere in their clinical courses, which seemed to lower the complement level in no way, contrary to some other authors who reported the lowering effect of steroid on the serum complement. Further, we did not observe the decrease of serum complement in guinea pigs after the intramuscular injection of the steroid.

As to the anti-complementary effects of the serum from the patients of SLE, we did not consider them at all here in this report.

In summary, we estimated the serum complement in four patients of SLE in relation to their clinical courses, with the following results.

- 1) Decrease of serum complement was closely related with the clinical aggravation of SLE, but it did not directly correlate with the degree of renal lesions.
- 2) No lowering effects of the steroid on serum complement were observed.

Complement Activity in Synovial Fluids of Patients with Rheumatoid Arthritis

Hidekichi Sonozaki, Makoto Arata, and Motomichi Torisu

It is said that the whole complement titer in the synovial in rheumatoid arthritis markedly decreases in patients with the disease active. The purpose of this investigation was to study the relationship between the inflammatory activities of the disease and complement value in synovial fluid.

Sera and synovial fluid were obtained from 6 normal control subjects, 37 patients with rheumatoid arthritis and 20 patients with Osteoarthritis. They were separated into 15 for classical RA, 13 for definite RA and 9 for possible RA according to the American Rheumatism Association's criteria. All the patients with osteoarthritis had the characteristic history of non-infectious arthritis, typical radiographic and synovial fluid findings. Synovial fluid was obtained aseptically by aspiration of the suprapatellar pouch and blood was drawn at the same time by venepuncture. Then, the patient's sera and synovial fluid complement activity were measured by C'H50 method of Mayer's. The amount of the total protein in the synovial fluid was measured on a Beckman spectrophotometer, model DU2, at wave lengths of 280 m μ . Serum C' values of all the rheumatoid arthritis but one were slightly elevated and gave a median value of 45.2 unit.

On the other hand, the majority of serum C' values of the 20 patients with osteoarthritis were within normal range (median value 37.5 unit). Synovial fluid complement values in the 6 normal control subjects ranged from 6 units to 10 units (median value 8 unit).

The synovial fluid C' value of the patients with osteoarthritis ranged from 12 to 20 units and had a median value of 13.6 unit. The greater the inflammatory symptoms, the greater the amount of C' activity in synovial fluid and as inflammatory symptoms subsided and volume of fluid or total protein concentration in synovial fluid reduced, then C' activity fell gradually toward the normal range. The synovial C' titer seemed to be directly related to the activity of local inflammation in osteoarthritis. Forty-three synovial fluids in the 37 patients with rheumatoid arthritis revealed various complement activities ranging from 35 units to 0 unit.

In one-third of the tested subjects, the C' activity was less than the values in normal synovial fluid. In 10 patients with rheumatoid arthritis examined early in the course of the arthritis, initial synovial fluid C' levels were increased uniformly and significantly in proportion to the degree of inflammation, but with the passage of time, the C' levels in these synovial fluids decreased rapidly, in spite of continuance

of the disease activity. Although, the protein concentration in these cases was elevated over a range of osteoarthritis, the synovial fluid complement values were quite low. This might be an evidence for a local antigen-antibody reaction utilizing complement in rheumatoid arthritis. In several patients with chronic rheumatoid arthritis and persistent effusions (so called a state of "hydrops"), complement activities in synovial fluid were relatively high and followed the course similar to that of osteoarthritis.

Fluctuations of Serum Complement Levels in Nephritic Patients

**Asano, S., Marumo, K., Wakasugi, A., Igaki, Y., Toyozumi, E.,
Okubo, M., Tamura, S. and Kurata, K.**

Department of Internal Medicine, Keio University School of Medicine

In our previous papers, we reported on the variations of the serum complement levels in the nephritic patients, to which we added further substantial cases and gained some new findings.

We made estimates of C' , $C'1$, and immune adherence (I.A.) according to the original methods of Kabat-Mayer's and Nelson-Nishioka's respectively, in the total of 79 nephritic patients, through the age of 15 to 44 (40 of them are males and 39, females).

During the first week after the onset of the acute nephritis, both C' and I.A. took extremely low values. As to the C' , it returned almost to normal limits by three weeks, while the I.A. still kept low levels all through the courses in most cases.

We divided the patients suffering from the chronic glomerulonephritis into three groups, that is, inactive, progressive, and terminal ones. C' and $C'1$ remained normal in all stages. In the meanwhile, I.A. decreased in the inactive and progressive phases, while in the terminal stage it showed normal values in most cases.

Patients of the nephrotic syndrome showed extreme fluctuations in their serum levels of the complement, some of which proved very low. But cases, where proteinuria was improved by steroid therapy, showed no such extremely low values. Contrary to some other authors who reported depressing effect of the steroid on the serum complement level, our experiments on the effects of the steroid *in vitro* and *in vivo* showed no decrease in the serum complement.

In patients of the lupus nephritis, C' correlated well to their clinical states, whilst I.A. still kept low even after the clinical remission in most cases.

Two patients of the chronic glomerulonephritis whose complement was subnormal, suffered from frequent exacerbations, and then, their complement temporarily became normal when estimated during or immediately after the exacerbations.

After tonsillectomy, C' , $C'1$, and I.A. decreased markedly below normal in almost none of the 13 cases of the nephritic patients.

Complement Level in Liver Diseases

Hideo Nagashima, Chizuko Miyamoto and, Kiyowo Kosaka

1st Dep. of Internal Medicine, Okayama University Medical School

This work was undertaken to examine the clinical significance of raised complement level in infectious hepatitis.

Total C' was performed according to Mayer's 50% hemolytic method and also the method of Pillemer et al was used in the determination of total C' and C' components.

Serum properdin level was determined according to Pillemer et al and serum lysozyme was also determined by Frankel-Conrat's or Tolles Fromagel's method with the modification by Eizai institute,

Japan.

The results were as follows:

- 1) In the icteric phase of acute hepatitis (A.H.) (33 cases) total C' level slightly raised (Mean value: 42.0 units/ml), in the subicteric phase A.H. sera (22 cases) showed relatively high titers of total C' (46.4 units/ml) and in the convalescent stage A.H. sera with slightly high S-GPT level showed slightly high titers of total C' (39.7 units/ml) and A.H. sera became normal when the patients recovered. In acute hepatitis the activities of S-GPT and alkaline-phosphatase and pathological Bromsulphalein retention rate became normal when total C' level returned to normal level.
- 2) In the acute phase of acute hepatitis raised S-GPT activity was coincident with (or just a little later) raised total C' level.
- 3) In 5—8 weeks after the onset of acute hepatitis some sera showed slightly raised level in total C', and some of these cases led to the development into chronic hepatitis.
- 4) In primary biliary cirrhosis or intrahepatic cholestasis pathological sera showed raised total C' level with hyperbilirubinemia, hypercholesterinemia and high serum alkaline phosphatase activity.
- 5) Cirrhosis sera with hypersplenismus usually showed lowered serum total C', but these sera showed slightly high titers after splenectomy.
- 6) The above clinical experiments in contrast to the other diseases with high serum C' level indicated that the mechanism of raised serum C' was dependent upon various kind of factors.
- 7) It seems that acute hepatitis serum properdin and lysozyme levels were not correlated with serum total C' level.

Studies on Complement in the Liver Diseases

Tomiichi Masuya and Kouko Sakai

3rd Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Kyushu University, Hukuoko

It seems significant to study how immunological phenomena would be able to take parts in the course of the liver diseases. Behavior of Complement and its components in acute hepatitis, chronic hepatitis and livercirrhosis was studied in this report. For the purpose of making experimental liver damages, male guinea pigs weighing 500 g were used, intramuscularly injected with 5% ethionine solution, 50 mg every day for 20 days.

- 1) Serum hemolytic C' activities, measured as 50% immune hemolysis by M.M. Mayer, showed higher levels in acute hepatitis, normal levels in chronic hepatitis and lower levels in livercirrhosis.
- 2) Serum C'142c component activities, measured as 50% immune adherence by K. Nishioka, showed higher levels in acute hepatitis and in chronic hepatitis, while showing lower levels in livercirrhosis.
- 3) Serum C'1 activities, measured as 63% C'1 fixation by T. Borsos, showed higher levels in acute hepatitis and in chronic hepatitis, and slightly higher levels in livercirrhosis.
- 4) Pathologic abnormal GPT values were observed in most cases with abnormal activities of C' and C'-components, normal GPT values in many cases with normal C' and C'-component activities.
- 5) The group of animals treated with ethionine showed lower levels in serum hemolytic activities and adhesive activities than the control group, while showing higher levels in serum C'1 activities.
- 6) Little anticomplementary effect of sera with low C' titers in livercirrhosis and ethionine treated animals was observed.
- 7) Ethionine per se inhibited serum C'1 activities in vitro but such doses as administered did not make serum C'1 activities decrease in vivo.
- 8) Hepatocytes of the group animals with ethionine intoxication carried 338 eff. Ab. mcls. per cell, while hepatocytes of the control group animals did 118 eff. Zb. mols. per cell.
- 9) Serum C'1 activities were studied by means of C'1 fixation's overlaying above Cyanogum 41 thin layer electrophoresis. No specific patterns in sera with liver damages were yet observed.

Complement Hemolytic Titer of Normal Human Sera

Makoto Arata, Motomichi Torisu and Hidekichi Sonozaki

Division of Virology (Director: Kusuya Nishioka)

National Cancer Center Research Institute

By studying the distribution characteristics of complement 50% hemolytic titer (C'H50) of 641 normal human sera taken from apparently healthy blood donors, it was found out that the complement titer was distributed nearly in symmetric curve with mean value of 36.43 with standard deviation of 5.47. Human complement hemolytic activity was measured according to C'H50 method of Mayer's. There was no correlation between complement titer and sex or blood type.

On the other hand, while investigating averages of C'H50 in each age from six to sixty, it was noticed that C'H50 remarkably increased in the ages of ten, eleven and twelve.

Moreover, the variation of C'H50 during daytime was observed in ten healthy volunteers. C'H50 was measured four times a day, that is, before breakfast, before lunch, one hour and four hours after lunch. The result indicated that the difference between maximum and minimum in C'H50 of each case had mean value of 8.50 unit with standard deviation of 4.27 unit.

Serum Complement Levels of Children with Rheumatic Fever and Myasthenia Gravis

Nobuo Watanabe, Masaya Segawa and Yukio Hyodo

Department of Pediatrics University of Tokyo

There are some reports that immunological mechanism has a significant role in the occurrence of rheumatic carditis and myasthenia gravis.

We estimated a serum complement levels of children with rheumatic fever and myasthenia gravis by Mayer's method. Of 17 patients with rheumatic fever, 7 cases are with carditis and 10 without carditis. In acute phase, the mean value of serum complement was 35.3 C.H 50/ml in cases with carditis and 26.6 in cases without carditis. And in remission the mean values were 29.8 and 33.4 respectively. These results suggest that an immunological mechanism has some relationship to the occurrence of rheumatic carditis. Concerning myasthenia gravis, serum complement levels of 25 patients were estimated. Five of them were general type and 20 were ocular type. The mean complement level was 21.9 in general type and 26.2 in ocular type. In remissive phases, though we had only 3 cases, mean value was 30.0, respectively. We had 2 cases of ocular type with a waning phenomenon in E.M.G., and their serum complement levels were rather lower. The waning phenomenon indicates that general muscles are involved, so we can regard such a case as a general type. These two types of myasthenia gravis can be said to be different from each other in the stand point of complementology.

Esterase Activity on First, Component of Complement

Masashi Kodama, Takeshi Yano and Takeshi Tsukamoto

From the Department of Microbiology, Kyoto Prefectural University of Medicine

Motoharu Kondo

(From Department of Internal Medicine)

It is said that C'₁ has the esterase activity.

We tried to study this activity (specific or nonspecific) of human serum, guinea pig serum, human

organs, human C'_1 and guinea pig C'_1 against, A.T.E. (N-Acetyl Tyrosine Elthytester), T.A.M.E. (p-Toluenesulfonyl-L-Arginine Methylester Hydrochloride), and α -Naphthyl Acetate, by means of polyacrylamide gel electrophoresis.

Results :

1) Human serum had three non specific esterase activity bands.

One of these had wide activity, spread from γ_1 - to β -globulin region.

The other two existed on the albumin region.

56 C, 30 min. and addition of Diisopropy Fluoro-phosphate (D.F.P.) inhibited the activity of γ_1 to β -globulin region, and post albumin region. Reactivity against A.T.E., T.A.M.E. was shown at post albumin region as only one band.

2) G.p. serum, in spite of wide, strong activity of non specific esterase, to be the same pattern as the human serum.

3) The activity pattern of human organs mainly resembled that of human serum, but partially they indicated individual patterns.

4) Human C' and g.p. C' sufficiently indicated non specific esterase activity in vitro.

On the gel, however, we could not gain constant results.

This fact suggests gained C'_1 had faint esterase activity, so we could not get sufficient reaction figure.

Antinuclear Antibodies in S.L.E. and Complement

Yasuo Katsuta, Ryuichi Yokohari and Teruhiko Suzuki

Dept. of Physical Therapy and Medicine, University of Tokyo

1) The sera of patients suffering from S.L.E. contain a series of substances which react upon components of nuclei.

A new and simple method for the detection of complement-fixing antinucleoprotein antibody was devised by using conglutination, and compared with the other methods for detection of antinuclear antibodies. The procedure of this method (L.E. conglutination test) was to add 0.01 ml of Latex- Nucleoprotein reagent (Hyland) and 0.2 ml of fresh bovine serum in the S.L.E. serum or its diluents. The tubes were incubated for 60 minutes at 37°C in waterbath with continuous shaking. After incubation the resultant visible agglutination was read with the naked eye.

Comparison of the L.E. conglutination test with fluorescent antibody technique, L.E. cell test and L.E. test (Hyland) were made.

The L.E. conglutination test was positive 26 of 58 samples of S.L.E. (44.8%), and the tier of its test was well correlated with clinical activity of S.L.E. but not so sensitive as fluorescent antibody technique or L.E. cell test.

2) Since the discovery of the L.E. cell phenomenon, it is well known that the four factors are concerned in the formation of L.E. cell, ie. L.E. cell factor, damaged cell nuclei, leucocyte and complement. Several experiments have shown that in the first phase L.E. cell factor in the S.L.E. serum gains contact with damaged leucocyte cell nuclei in a short time. When heparin, Na-EDTA or Mg-EDTA had been added previously to the blood of S.L.E., L.E. cell could not be found or was much decreased. This fact suggests that the complement is necessary in the second phase of phagocytosis of free hematoxylin body by leucocytes.

Then in order to determine what components of complement are necessary in the L.E. cell formation, following experiments were made.

In the L.E. cell test by the blood clot technique, Saldox, Phlorizine or Cu-Chlorophyllin were added previously to the blood, and the number of L.E. cell were compared semiquantitatively with the standard method. By the addition of Saldox or Phlorizine to the blood, L.E. cells were decreased very much, but

in cases of Cu-Chlophyllin containing blood the L.E. cell formation was almost never influenced.

From these results, it may be concluded that the components of serum complement necessary for the L.E. cell formation are C' 1423c, and that these components of C' accelerate phagocytosis of specifically sensitized nuclei by leucocytes.

Serum Complement Level in Tumor-bearing Rabbits

Takao Yoshida and Yohei Ito,

Laboratory of Viral Oncology, Research Institute
Aichi Cancer Center, Nagoya

Although complement levels in the serum of tumor-bearing humans have been investigated in these recent years it has not been possible to compare complement levels before and after tumor-induction in a single subject, and the objective interpretation of the findings has not been feasible.

Immunological experiments employing Shope papilloma-carcinoma system are now being carried out in our group. In the present paper we report our findings on the alteration of complement value ($C'H_{50}$) in the tumor-bearing rabbit, which were transplanted with carcinoma (ca) $V \times 2$, and (ca) $V \times 7$, both being neoplasia of Shope papilloma origin.

The optimum assay condition of $C'H_{50}$ in the serum of normal rabbits and tumor-bearing rabbits was in 2.5% glucose veronal buffer saline containing Ca^{++} (0.00015 M), Mg^{++} (0.0005 M) and 0.01% gelatin, at pH 7.4.

$C'H_{50}$ among the rabbits before tumor transplantation was on the average 9 (15 cases out of 18 cases). This value increases 9 fold steadily along with the increase in tumor size.

Three cases, however, showed a high $C'H$ value (20—40) from the beginning, and one case of the three followed a typical process of transplanted tumor, i e., a decrease of complement titer along with development of the tumor, finally recovering to the original level of complement. Complement level of the rest did not vary until the death of these tumor bearing rabbits.

Among the 6 cases of transplanted ca $V \times 7$, the $C'H_{50}$ value of 10 before transplantation increased 5 folds showing a similar tendency as ca $V \times 2$.

Although ca $V \times 2$ has elapsed 190 to 200 generations and ca $V \times 7$ has elapsed 90 to 100 generations respectively, and both tumors had been transplanted in thigh-muscles, they still retain histological characteristics as skin cancer (squamous cell carcinoma with central keratinous nests).

Investigation of this increase of complement level is now under way in connection with variation in complement components and relation between tumor and host.

Complement Level of Rat Serum during the Course of Hepatoma Induction

by **D.A.B.**

Kusuya Nishioka, M.D., Sauyuan Change, M.D. and Motoko Sakamoto

Dept. of Virology National Cancer Center Research Institute

Rat serum complement was measured during the course of hepatoma induction by D.A.B..

The animal consists of a group of 20 rats fed by high protein diet (protein content 26%) and 3 groups of 20 rats fed by moderate protein diet (protein content 13%) containing 0.005% D.A.B..

For each group 20 control rats were given.

Serum complement was measured according to $C'H_{50}$ method of Mayers 2, 4, and 6 months (8 months for high protein diet group) after the onset of D.A.B. feeding.

All the rats fed by moderate protein diet were sacrificed 6 months after D.A.B. feeding and the

high protein diet group 8 months after.

The liver and spleen were studied and serum complement was measured.

In the high protein feeding group the serum complement dropped 4 months after D.A.B. feeding which gradually elevated from 6th month to 8th month but still remained to be lower than the control group. On 8th month after D.A.B. feeding none of the rats developed hepatoma, while the spleen showed no remarkable follicular atrophy.

In the moderate protein diet feeding group the C' level of serum dropped 2 months later but gradually elevated from 4th month to 6th month. Although there was some individual difference they were still lower than the control group and the spleen weight was prominently increased.

In order to analyze the individual difference shown in this group a group of rats were sacrificed 6 months after D.A.B. feeding, the liver and spleen were examined, and serum complement was measured. In this group all rats fed by D.A.B. shows a marked increase in spleen weight while the complement level varied from normal to markedly low level. In the rats which showed low complement level no hepatoma was detected and no remarkable lymph follicular atrophy of the spleen was noted, while in the other 3 rats was shown elevated serum complement as high as detected in normal hepatoma associated with prominent follicular atrophy of the spleen. In the control group all spleens were less than 1 gram and the complement level was relatively high.

From this findings spleen was suspected to play an important role in change of the serum complement, so 10 rats were submitted to splenectomy followed by feeding them with moderate protein diet containing 0.005% D.A.B.. In this group the serum complement markedly dropped 2 months later while it elevated as high as in the control group. Six months later, in this group, 4 out of 5 rats developed hepatoma.

Humoral Antibody in Homotransplantation Measured by Immune-adherence Hemagglutination (IAHA)

Fujii, G., Goto, S. and Ishibashi, Y.

Department of Surgery, Institute for Infectious Diseases, University of Tokyo

Employing immune-adherence hemagglutination (IAHA) that has been found to be highly sensitive antigen-antibody reaction in collaboration with complement, antibodies in the sera of mouse and rabbit that received skin homografts were followed and activities of 19S and 7S γ -globulin of the sera were also investigated.

Observation that high concentration of mouse serum inhibits IAHA reaction has led us to wash cells as antigen after mixing with mouse serum as antibody at 0°C to remove some possible IA-inhibitor. By this modified method, a strong IAHA pattern was obtained in reaction mixture containing a donor's lymph node cells, diluted guinea pig C' and the serum of C3H/He mouse that received skin homografts from C57B1 mouse. The titer of IA50 obtained with the sera 8 days following the 1st-, 2nd, and 3rd-set grafting was 80, 160 and 1280 respectively. These sera were also found to be cytotoxic to the donor's node cells. These IAHA and cytotoxic activities were demonstrated only in 19S fractions obtained by Sephadex G-200 gel filtration of C3H/He mouse serum obtained 5 days after the 3rd-set grafting, but not in 7S fractions of the same serum.

In rabbit serum following the 3rd-set grafting, IAHA reactive antibody was shown strongly in both 7S and 19S fractions. Cytotoxic activity was demonstrated strongly only in the 7S fraction of the serum. However, in the serum after the 1st-set grafting no cytotoxic activity was demonstrated in the 19S fraction that showed IAHA reactivity.

As being observed in the present experiment, the mode of appearance of antibodies seems to be different between various combinations of donor-recipient and it seems interesting to investigate the dissociation of the antibody activities in 19S and 7S γ -globulin for understanding the role of humoral antibody in homotransplantation immunity. However, this observation should be also studied carefully in connection with the problem of C' inhibitor present in 19S γ -globulin fraction as indicated by Dr. Nishioka et al.

Further Studies on Mouse C' Titration

S. Goto, G. Fujii and Y. Ishibashi

Department of Surgery, Institute for Infectious Disease, The University of Tokyo

Serum complement (C) activity in mice, that has ever been difficult to measure, has now been measured quantitatively by employing sheep erythrocytes, 5×10^7 /ml, sensitized with a large amount of rabbit anti-sheep erythrocyte (E).

By the method, level of 60 to 80 mouse C'H 50/ml of mouse C' activity was obtained in some strains of mice, such as C3H/He, C57B1 and BALB.

In the present report, activities of 19S and 7S γ -globulin in the system to measure mouse C' were examined.

Fractoins of 7S and 19S γ -globulins were prepared from γ -globulin of rabbit anti-sheep E anti-serum by fractionation with DEAE cellulose column. After dialysis to normal saline, the fractions that showed approximately same levels of hemolytic activities were tested as a sources of antibodies to sensitize sheep E.

Optimal time to sensitize sheep E to get the highest hemolysis was 9 minutes with 19S antibody and 3 minutes with 7S antibody respectively. With 7S antibody strong hemagglutination occurred after 3 minutes' incubation. Employing this optimal sensitization time fresh serum of C3H/He mouse revealed much higher titer such as 108.0 C'H50/ml with 19S antibody and lower titers such as 31.5 C'H50/ml with 7S antibody and 76.0 C'H/50ml with whole γ -globulin.

These results suggest that 19S antibody prepared from rabbit anti-sheep E antiserum seems to be useful to measure mouse C' to give higher titer of C' activity without any remarkable hemagglutination that may cause inhibition of hemolysis by mouse C' in the presence of 7S and whole serum antibodies.

Effects of Anticoagulants and Anticomplementary Agents on Phagocytosis

Toyohiko Kikutani and Masaharu Muranaka

Dept. of Physical Therapy and Medicine (Director Prof. Y. Oshima)

University of Tokyo

The attack of gout is supposed to be induced by the phagocytosis of deposited monosodium urate crystals by neutrophil leukocytes.

Under the influence of anticoagulants and anticomplementary agents, we observed the phagocytosis of monosodium urate crystals and carbon particles in vitro. Blood was gained in the siliconed test tube by the venipuncture from the healthy person and was incubated in warm bath at 37°C. As for carbon particles, the phagocytic activity of leukocytes was classified into 4 grades (0, 1, 2, 3) according to the content of carbon particles in neutrophil leukocytes in 3 hrs' incubation and was expressed by total score in 100 neutrophil leukocytes. As for monosodium urate crystals, the phagocytic activity of leukocytes was expressed by the (%) of phagocytes in 100 neutrophil leukocytes in 2hrs' incubation.

Kinds of anticoagulants were heparin Sod. citrate, Oxalate, EDTA, Mg-EDTA and NaF. Significant phagocytic activity of leukocytes was observed, when Heparin or Mg-EDTA was used as anticoagulants. On the contrary, EDTA, Oxalate, Sod. Citrate or NaF suppressed the uptake of carbon particles or Sod. urate crystals by leukocytes.

Sod. Cu-Chlorophyllin and phlorizin have anticomplementary action. Experiments of phagocytosis were made in vitro under the influence of heparin and the above anticomplementary agents. Sod. Cu-chlorophyllin (final conc. 1000 γ /ml. blood) and phlorizin (saturated soc. 0.2 ml/ml. blood) suppressed neither the uptake of carbon particles nor sodium urate crystals by neutrophil leukocytes in comparison with the control experiment.

When the inactivated serum (56°C 30 min.) was added to the blood washed three times by physio-

logical saline solution, phagocytic activity of leukocytes diminished.

After washing blood three times by Tyrode's solution, the addition of fresh serum enhanced phagocytosis, in comparison with the case containing no serum.

Complement and Plasmin

Motoharu Kondo, Hisakazu Ishimaru, Norio Fujiki and Masasuke Masuda

(Kyoto Pref. Univ. of Med., Dept. of Internal Med.)

Masashi Kodama, Norio Shikata

(Kyoto Pref. Univ. of Med., Dept. of Surgery)

Takeshi Yano, Taekshi Tsukamoto and Atsushi Sukanuma

(Kyoto Pref. Univ. of Med., Dept. of Microbiology)

Concerning the allergic phenomena, the first component of complement (C'_1) and plasmin seem to have some similar acting mechanisms. Hence, biochemically, these have activities either in the euglobulin fraction of the serum or in the inflamed tissue provoked by allergic phenomena, and also have esterase activity to hydrolyze TAME and ATyEe.

We have studied the relationship between C_1 and plasmin, using the antiplasmin agent (EACA & AMCHA), the anticomplement agent (Chlorophyllin), the antibradykinine agent (Homochlorcyclizine) and the esterase inhibitor (DFP), from the standpoint of their inhibitory reaction.

1) PCA reaction is inhibited by the local and general use of EACA and AMCHA, as seen in Chlorophyllin. By the fact that they have to be used before the injection of antibody in the skin of guinea pig, we could conclude that they act as inhibiting the anchorage mechanism of the antibody to the local tissue, in which C_{142c} are necessary. They also inhibit the increase of the vascular permeability caused by the intracutaneous injection of C_1 .

2) In contrast to Chlorophyllin, EACA and AMCHA do not inhibit the immune hemolysis in vitro. Oral or intravenous administration of AMCHA causes no influence on the complement titer ($C'H_{50}$) of human serum.

3) Examining the plasmin activity by the fibrin plate method, euglobulin fraction of the serum is used as proactivator, and streptokinase (SK) as activator. C_1 eluted from EAC₁₄ by EDTA is also activated by SK and causes fibrinolysis. When euglobulin fraction is inactivated at 56°C for 30 min., or treated with sensitized sheep RBC at 0°C in order to avoid C_1 , marked decrease of lysis area is observed. This may suggest that C_1 behaves like proactivator and is activated by SK.

4) The esterase activity in the serum is known to be activated by the addition of SK. However, after the inactivation at 56°C for 30 min. its activity markedly decreased, even though SK is added. The increased esterase activity by SK is not inhibited by EACA, AMCHA and Chlorophyllin, although it is inhibited by Homochlorcyclizine and DFP. We conclude that the activation of esterase by SK owes to the activation of C_1 esterase.

Thus, it is still difficult to clarify the relations between complement and plasmin system and the above data may throw the light on the problems of their relationship.

EACA: -Amino Caproic Acid

AMCHA: trans-4-Aminomethylcyclohexane Carboxylic Acid

The Relationship between Complement and Plasmin**Kunio Haga, Akira Seto, Koji Ito**

Institute for Infectious Diseases Tokyo University

Juichi Ueki

Faculty of Medicine Tottori University

Since Boivert's work in 1942, there have been many reports concerning the interrelationship between complement and plasmin. Recently we also found the inhibitory effect of plasmin preparations on complement activity in immunehemolysis and PCA.

Plasmin preparations examined are those of Midori Juji, NBC and MRL. The inhibitory effect of these preparations was proved to be different in its strength and not to be proportional to fibrinolytic activity. Their thermolability is not the same, either. The inhibitory factor involved in these plasmin preparations is unknown as yet, but it does not seem that this factor is plasmin itself. From the results of tests carried out with C'components, this factor seems to attack C'4 and has at such inhibitory activity on proteolytic enzyme, trypsin, as chlorophyllin.
