

アレルギー 21(9), 1972

第8回補体シンポジウム

委員長 国立がんセンターウイルス部 西岡久寿弥
日 時 昭和46年11月28日-29日
会 場 大阪府医師会館

日本アレルギー学会

第8回補体シンポジウム

委員長 国立がんセンターウイルス部 西岡久寿弥

日時 昭和46年11月28日-29日

会場 大阪府医師会館

(受付: 6月30日, 1972)

1. 赤血球沈降速度促進因子に関する研究 (第1報)

都立大久保病院

河島敏夫, 大山俊郎, 津田文男
宮沢政栄

国立がんセンター 関根暉彬, 西岡久寿弥

赤血球沈降速度(以下血沈(BSR)と略記)には種々の因子が介入する。長尾らは動物の実験的アレルギー炎症にて血沈の亢進はみられないが、諸種の動物の赤血球を用いて交換試験を行ない、ヒト赤血球のみが連鎖形成をすることにヒトと動物との血沈の有無を求めている。われわれは血沈と免疫反応とくに補体との関係に注目し検索し、多少の知見を得たので第1報として報告する。

被験者はSLE, 各種血管炎, Behçet 病その他免疫反応が関与し血沈が著しく亢進した患者を選び、血沈は型のごとく Westergren 法により、赤血球と plasma との交換実験などでは、赤血球を1/200 M PBS で2000rpm 10分、4°Cで3回洗滌した。補体価は血清補体価(以下S CH50), または血漿補体価(P CH50)を測定した。

1) S CH50 と BSR: 同一症例で経時的にS CH50 と BSR の変動を追求すると、両者がきわめて密接し関連しながら変動する例がみられる(SLE など)。

2) BSRの交換試験: SLE など患者血液と、これと homo (同一血液型)の健康人血液を用い、plasma と赤血球を組合せたところ、SLE などの plasma は健康人赤血球の沈降も著しく亢進させるが、健康人 plasma にはこの作用がほとんどみられない。また Myositis 患者血液で auto (同一患者の亢進時と軽快時)の交換実験でも、ほぼ同様の傾向が得られた。

3) homo 健康人赤血球による促進因子の吸収: 上述SLE など患者 plasma をあらかじめ homo 健康人赤血球と37°C, 30分 incubate した plasma はその促進能が失われ、この低下は加えた赤血球量に応じた。

4) 吸収後の P CH50 および赤血球上の補体: 3)の吸

取に用いた plasma の P CH50 は吸収に用いた赤血球量に応じて低下がみられ、その赤血球上に抗C3, 抗C4に陽性を示す物質が蛍光抗体法で partial に認められた。

これらの結果は、SLE などでは血沈促進因子の1つに補体が関与している可能性を示唆しており、促進因子として補体、あるいは IA との関係を追求しなければならない問題を提示している。

2. Single radial immunodiffusion 法による日本人血清の β_1C_{1A} および β_1E -globulin 値について

大阪府立成人病センター

平松誠一, 北村 肇, 永木和義
飯田恭子, 笠井よし子
寺井たみ子, 稲井真弥

single radial immunodiffusion 法を用いて、日本人男女の血清中の β_1C_{1A} および β_1E -globulin 量を測定した。

対象は、blood donor で、血液比重、血清 GPT 測定、血清梅毒反応、Au 抗原の検索の4項目の検査に合格した20才代、30才代、40才代の男女各50名と、50才代の男子50名、女子37名、総計 387名の血清である。

えられた両分画の測定値について統計学的処理を行なった結果、男子の β_1C_{1A} -globulin 値は、20-59才で有意差なく、 82 ± 17 mg/dl であり、女子では20-49才と、50-59才の間に有意差があり、前者は 88 ± 19 mg/dl で、後者は 104 ± 21 mg/dl であつた。男女間の有意差は、40才代および50才代にみられた。一方、 β_1E -globulin 値については、男子では20-59才、女子では20-49才の各測定値は対数正規分布を示し、いずれもこの年齢間には有意差をみとめず、男子の値は23-36 mg/dl (平均値29 mg/dl)、女子の値は23-39 mg/dl であり、女子の50-59才では 37 ± 10 mg/dl であつた。男女間の有意差は、50才代にのみみとめられた。以上の測定結果から、女子では両分画とも高令

者に高値を示し、また、 β_2 E-globulin は、男子と異なつた分布状態を示すことから、女子ではこれらの蛋白が加齢により増加し、かつ、その産生機構に男子とはちがつた機作が働いているものと想像される。

なお、 β_2 C₁A-globulin 量と C 3 値、 β_2 E-globulin と C 4 値の関係を個々の例について対比検討したところ、各補体成分の値は各分画量の平均値付近に分布していたが、少数ながら、蛋白量が高いにもかかわらず補体成分の活性が低い場合や、その逆の場合があるのがみられた。したがつて、 β_2 C₁A または β_2 E-globulin 値が正常であるからといつて、C 3 または C 4 値の測定を行なわないということの危険性を示唆するものであることが考えられた。

3. 発作性夜間血色素尿症と補体

北海道大学第2内科

今野孝彦, 藤田禎三, 大橋 晃
渡辺武夫, 安河内太郎

発作性夜間血色素尿症 (PNH) は、抗体の関与しない補体による溶血を特徴とする疾患である。今回、われわれは、3例の PNH の補体価 (CH50) を測定し、1例に CH50 の低値と著明な CH50 の日内変動を認めた。また、その血清に 1-2 mg/ml の cryoglobulin (Cryo) を認めた。免疫学的検索により以下の結論をえた。

- 1) PNH の溶血は補体によるものであり、抗体は関与せず、また溶血と血清補体価は一致しない。
- 2) CH50 の日内変動は、正常人で 5-6 u/ml の変動を示すが、PNH の 1例では 30-40 u/ml の CH50 の日内変動を示し、一定のパターンを示さなかつた。
- 3) CH50 の経時的測定と同時に、C 3、C 4、血清ヘモグロビン、Cryo、線溶活性、血中 cortisol を測定したが、相関関係を有さなかつた。
- 4) 症例 1 の CH50 の低値は、C 1 活性の低値と一致しており、C 3 活性は正常であつた。
- 5) 混合型 Cryo は、抗血清を用い Ouchterlony (37°C) で分析すると抗 IgG-IgM-Clq と反応した。
- 6) Cryo の PNH 溶血に対する作用を検討した結果、Cryo は PNH 赤血球の溶血を増強し、血清と Cryo を先に加え、後に PNH 赤血球を加えると溶血が阻止される傾向を示した。溶血に關与する補体量は、Cryo (1.90 mg/ml) のその約 1/20 量であつた。

以上の結果より Cryo と PNH 赤血球が生体内に共存するとき、Cryo はまず C 1 を活性化し、PNH 赤血球を溶血させるが、溶血に關与する補体はきわめて少量で

あり、強い抗補体作用を示す Cryo の存在により C 1 の活性が減少して CH50 の低値を示すと考えられる。また著明な CH50 の日内変動も Cryo がその主役をはたすと考えられた。

4. 若年性関節リウマチにおける補体系の動向

東京大学医学部整形外科 松浦美喜雄

Robert. B. Brigham Hosp. Shaun Ruddy,

J.S. Stillman, K.F. Austen

慢性関節リウマチ患者の関節液中で補体活性が低下していることは、すでにいくつかの報告により明らかになつてゐる。

Boston にある Robert B. Brigham 病院で若年性関節リウマチの患者 16 名より同日に採取された血清、関節液についてそれらの試料中での補体活性について検討を加えた。これらの試料中の C 1、C 4、C 2、C 9 活性を調べ、その結果、以下のことが判明した。

約半数の関節液中に C 4 活性が低下していた。(C 4 < 10000 u/ml) この群を、group I とし残りの群 (関節液中の C 4 > 10000 u/ml) を group II とした。group I には RA 因子の出現した患者 3 名が含まれ、病型 (poly-articular, systemic, pauciarticular の 3 型にわたつた場合) が group II の患者に比して比較的重症であり、さらに女性が多く、発症年齢が高かつた。抗核抗体は group I の 4 名 (うち 3 名は RA 因子陽性)、group II のうち 1 名に認められた。group I では、関節液中の C 1 活性、血清中の C 4 活性の平均は group II のそれに比して統計的に有意に低かつた。これらのことは、若年性関節リウマチの患者にあつても、成人の関節リウマチとはほぼ同様の病理機転がはたらいているものがあることを示している。

C 9 活性については、血清中での C 9 活性と関節液中中の C 9 活性が、対象となつた試料では、高度の一次相関を示し、これらの患者については、C 9 活性からみた滑液膜の態度がほぼ定常かつ類似であることを推定させる。GPT, Al-p-tase, LDH などについて、血清-関節液の相関を検討中である。上記の C 9 についての観察は、RA 因子陰性の成人の慢性関節リウマチ患者についてもみられた。

血清中の C 9 活性は、対象患者では正常より高いことから、BSI 値 (血沈値) との相関を検討した結果、この値と C 9 活性とは有意の相関を示した。補体系の最終成分である C 9 の活性が、ある種の炎症の process にあつて、1 つの炎症の indicator となりうるものがこれによ

り示唆されたと考える。

5. 腎移植患者における血清補体価の変動

都立大久保病院内科 倉田 要

慶応大学医学部内科

大久保充人, 田村寿夫, 井垣嘉之

丸茂菊男, 浅野誠一

東京電力病院泌尿器科 中村 宏

同種腎移植を施行した慢性腎炎患者4名につき, 血清補体価の変動を経時的に追求して拒否反応との関係を検討した。

血清補体価の測定は, Mayerの方法によりCH50を, Nelsonの方法によりC1, C4, C2を, IA法によりC3を, single radial immunodiffusion法により β_2 C₁A-globulinを測定した。

症例1. 28才, 男. 両側腎別, 脾別に続いて実弟より腎移植を受けた. 術後1カ月目, 3カ月目に rejection を起こし, プレドニンの増量により抑制し得たが, その後慢性拒否反応により1年6カ月目に死亡した. 血清補体は移植前後に高値を示しその後一時的に低下, 各 rejectionの初期に増加し引続いて低下した. 各補体成分の動きもCH50とはほぼ平行した。

症例2. 25才, 男. 抗リンパ球グロブリン, イムランの投与, 両腎別, 脾別に続いて実兄より腎移植を受けた. HLA抗体による不適合因子を1つ認めた. 一時 rejection を認めたがプレドニンの増量により抑制に成功, 以後順調に経過している. CH50は移植前後に変動し, rejection時に初期に上昇, 次いで低下を示したがその後しだいに安定していった. C1, C4の動きはだいたいCH50と平行した。

症例3. 15才, 男. 型のごとく免疫抑制剤投与, 腎, 脾別後, 実父より腎移植を受けた. HLA抗体法により不適合因子を2つ認めた. 術後頻回に rejection をきたし第4回目の rejection で死亡した. 各 rejectionの初期にCH50の上昇がみられ次いで低下した。

症例4. 13才, 男. 実兄より腎移植をうけた. 不適合因子は1つも認めず順調な経過をとつている。

(結論) CH50は移植前後に変動を示し, それ以後は安定した症例では大きな変動はなく, 一方 rejection をくり返した症例では, rejectionの初期に上昇, 続いて一時低下する傾向にあつた。

6. SLEの補体(抗補体作用を中心に)

岡山大学医学部第3内科

天野哲基, 森田 実, 西下駿三

河野勝昭, 大藤 真

全身性エリテマトーデス(SLE)の低補体価原因追求の一環として, 今回は, SLE血清の抗補体作用(ACA)が高いことに着目し, このACAの原因につき各種疾患と比較し検討した。

ACAの高い疾患は高 γ -GI血症を示す肝硬変症, 橋本病, SLE, RAであつた. SLEにおいては γ -G量, IgG量の多い群がACAが高く, 各血清分画では γ -GI分画に特にACAが高かつた. このことから, ACA測定の際, 血清を56°C, 30分処理することにより生ずるheat-aggregated IgGのACAが疑われ, SLE血清の γ -GI分画を種々温度処理すると56°C, 63°C処理群のACAは無処理群よりむしろ減少した. このことは, heat-aggregated IgGより強いACAを有する抗補体物質が γ -GI分画にあるということを示唆するがその1つとして immune complexの存在が考えられる. SLEのACAとDNA抗体価は正の相関を示し, 抗核抗体のうち, DNA抗体の存在を示す, shaggy pattern群ではDNase処理によるACAの減少率は高く, その減少する分画が γ -GI分画であることより, SLE血中にDNA-抗DNA抗体複合物が存在し抗補体性を示したものと考えられる. 次いで immune complexに付着した補体蛋白に対する抗体といわれる immuno-conglutinin(IC)あるいは, immune complexに対する抗体ではないかといわれる rheumatoid factor(Rf)をSLEについて測定してみると, CH50が低下するにつれIC titerは上昇する傾向にあり, Rfが血中に多いほど, ACA, DNA抗体価は高い傾向にあつた. さらに, CH50が20以下の群にはACAが高い例が多かつた. 各症例についてみると, ACAが長期間高値を示すものは腎障害も強く, 蛍光抗体法にて granular-lumpy typeを示していた。

以上総括すると, SLE患者の生体内において抗原抗体反応が起こり, immune complexが血中に浮遊し, 補体を結合することにより低補体価を招来し, さらには腎に沈着することにより, lupus nephritisを惹起せしめると考えられる。

7. 蛋白尿中の補体成分およびそのinactivatorについて

大阪府立成人病センター

北村 肇, 笠井よし子, 稲井真弥

蛋白尿中への補体成分の排泄について検討した. 対象

は蛋白濃度50mg/dl以上の患者尿で、検体を遠心、透折および濃縮し、microtiter 法によるC1-C9の溶血活性および single radial immunodiffusion 法によるC1q, C1-inactivator, $\beta_1C_{1/A}$ および β_1E -gl. の蛋白量を測定した。溶血活性についてcomponent 別にみるとC7が一番多く検出され、44例中42例に、次でC9 40例, C4 37例, C8 31例と多く、C2, C3, C5, C6は10-19例で半数以下に、C1は1例のみに検出された。原尿の蛋白濃度別にみるとC1, C2やC6などのcomponent については原尿蛋白濃度がかかなり高くないと検出されにくかった。また、同一尿についてみると、C7だけ検出されたものから、C1-C9すべて検出されたものまで種々あるが、蛋白濃度の高い検体ほど多種の成分が検出された。C1-inactivator の蛋白量については19例中11例に検出され、C1qは19例すべて検出されなかつた。 $\beta_1C_{1/A}$ および β_1E -gl. について42例測定したが、検出されたのはそれぞれ25例および21例で、 $\beta_1C_{1/A}$ -gl. とC3溶血活性、および β_1E -gl. とC4溶血活性の関係をみると、 $\beta_1C_{1/A}$ -gl. は検出されてもC3溶血活性が検出されなかつた例(7例)があつたのに反し、 β_1E -gl. が検出されなかつたがC4溶血活性が検出できた例が多数(18例)あつた。また、tube 法による血清および尿中のC8溶血活性の定量を行なつた結果、慢性腎疾患患者において、血清中のC8値は正常血清中のそれとあまり差がないが、患者尿中への1日排泄量は全循環血漿中におけるC8量の5-10%に達する例があつた。以上より次のことが考えられた。1)尿中への全補体成分が排泄され得る。2)C7, C9, C4およびC8はほとんどの例に検出された。3)C1, C1qは検出されにくい。4)C3溶血活性より $\beta_1C_{1/A}$ -gl. が、 β_1E -gl. よりC4溶血活性の方が検出されやすい。5)C8についても尿中へかなり排泄されても血清中のC8値はそれほど減少しない。

8. nonfunctional C1 inactivator を有する血管神経性浮腫の1症例

九州大学医学部心療内科

手嶋秀毅, 井上貞久

大阪成人病センター

永木和義, 飯田恭子, 稲井真弥

hereditary angioneurotic edema (HANE)は急性限局性浮腫による呼吸困難(声門浮腫), 腹痛発作, 浮腫等の

表1

	(正常人)	(患者)
C1	160000 × 1.5 × 10 ⁸	56700 × 1.5 × 10 ⁸
C4	64000 "	40 "
C2	1060 "	49 "
C3	800	400
C5	25600	25600
C6	25600	25600
C7	12800	12800
C8	102400	102400
C9	3200	3200
C1 INH	252000	32000

症例を呈する疾患として知られ、Donaldson らによつて本症には補体系の異常のあることが指摘され、さらにC1の酵素作用、補体系と線溶系、キニン系との関係を明らかにしてゆく手がかりを与える疾患として注目されているが、本邦においては、橋本、山本らの一家系の報告があるにすぎない。

最近、われわれは呼吸困難発作、腹痛、四肢の深部浮腫があり、補体系の異常を示し遺伝性で、抗プラスミン剤が有効であつた症例を経験したので報告する。

患者は43才の男子で、10年前ころより特に誘因なく腹痛発作があり、3年前足を捻挫してからは連日のように呼吸困難、腹痛の発作がおこるようになった。主なる検査では、耳鼻科で喉頭浮腫を指摘された。末梢血、止血機構、線維素溶解能試験、antitrypsin 量等に特に異常はなかつた。治療はEACA, AMCAを用いて呼吸困難、喘鳴、腹痛の改善がみられた。抗キニン剤は効を示さなかつた。

補体系では表1のようにC4, C2の著しい低下があつた。

β_1E , $\beta_1C_{1/A}$ の蛋白量は正常量であつたが、C1 INHの蛋白は正常人の約2倍と多く、crossed I.E.P. でもLaurell のいう2峰性は示さなかつた。

9. ヒト・リンパ球のE, EAC4 C3 結合性とその起源

国立がんセンターウイルス部

橋 武彦, 西岡久寿弥

東邦大学医学部小児科 矢田純一

上咽頭癌生検材料由来の培養細胞はリンパ芽球様形態

を呈し、EAC4 C3 と強く反応することを認めた（昨年本シンポジウムで発表）。この細胞の起源を知るためにヒト・リンパ球を中心にして検索中、ヒト胸腺リンパ球がヒツジ赤血球（E）自身を強く結合することを認めたので、リンパ球のEおよびEAC4 C3 結合性がそれぞれ独自の細胞集団であるかどうかをヒト胸腺リンパ球に豊富に存在するヒト胸腺リンパ組織抗原（HTL：矢田ら）との関連性からしらべた。EAC4 C3 は至適濃度のウサギ抗ヒツジ赤血球・IgM 抗体でEを感作したのち、C1 gp（1000 SFU）、C4 hu（300 SFU）、C2 gp（200 SFU）、およびC3 gp（300 IAC 50）を型のごとく作用させた後、EDTA および温度処理をして作製した。Eの結合性はウシ胎児血清の存在下で観察した。HTLの存在は蛍光抗体法によりしらべ、300個以上のリンパ球について結合したEまたはEAC4 C3 細胞の数およびHTLの存在の有無を観察した。結果は次のとおりである。

1) 5個以上のE結合リンパ球は100% HTL 陽性で、2個以上のEを結合したリンパ球の平均90%がHTLをもっていた。逆にHTL陰性リンパ球はすべてEの結合は認められなかった。したがってこのHTL陽性、E結合性リンパ球は同一の細胞集団でT細胞の性質と考えられる。2) 2個以上のEAC4 C3を結合するリンパ球は99% HTL陰性であり、逆にHTLの存在はEAC4 C3を結合していないリンパ球の99%に認められた。したがって、EAC4 C3結合性は上記T細胞と異なつたリンパ球集団の性質であると予想され、CRL (complement receptor lymphocyte: Nussenzweig) と同様B細胞の特性と考えられる。

10. IgG の熱による polymerization と polymerized IgG の補体結合性

東京大学医学部物療内科 横張龍一

1) rivanol による polymerized IgG の沈殿

血清に rivanol を加えると、主として IgG を上清に残して他の血清タンパクが沈殿する。したがって、精製 IgG に rivanol を加えても変化はみられない。しかし、IgG を加熱して一部を polymerize したものに rivanol を加えると、濁濁がみられる。これを遠沈によつて除去くと、上清中には unpolymerized(monomer)IgG のみが残っていることが、上清の Sephadex G-200 による濾過で確かめられた。また rivanol による polymerized IgG の沈殿に際しては、unpolymerized IgG のまきこみはないことも、 I^{131} IgG を用いての実験で確かめられた。

2) IgG の加熱による polymerization の kinetics

1%前後の IgG 溶液 (pH8.0M/10 ペロナル緩衝液) を62°Cに加熱、0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 75, 90分に samplingを行ない、3.5vol. の0.5% rivanol を加えて遠沈、上清に残る unpolymerized(monomer)IgG の量を immunoplate を用いて測定した。この測定値の logarithm を加熱時間に対してプロットすると biexponential な曲線が得られた。このことは、IgG の熱による polymerization が速いものと遅いものからなつていていることを示している。換言すれば、IgG には熱に対する反応性という physicochemical な点で異なる2つの成分の存在が想定される。

3) polymerized IgG の補体結合性

加熱した IgG を Sephadex G-200 でゲル濾過を行なうと、polymerized IgG と unpolymerized (monomer) IgG の2つのピークに分けられる。monomer IgG は補体を結合しないが、polymerized IgG は補体を結合する。いろいろな濃度の polymerized IgG に一定量の補体を加え、37°C、60分処理後 EA を加え、さらに37°C、60分 incubate して溶血を起こさせ、 $\log(y/1-y)$ をプロットすると、polymerized IgG の量との間に直線関係が得られた。

4) 加熱IgGの補体結合性の kinetics 上記の所見は、補体結合反応による polymerized IgG 測定を容易にしたので、IgG を62°Cに加熱、経時的に sampling を行ないその補体結合性を追つたところ、反応時間にしたがって biexponential なものであり、immunoplate で測定された結果とよく平行する。

11. C1 エステラーゼおよびプロ C1s の精製

徳島大学医学部酵素生理

村松 睦、須見洋行、岡村和子
藤井節郎

徳島大学医学部皮膚科 白石 聡

生体内において抗原抗体結合物が生じると種々のプロ酵素が活性化され、ついで種々の起炎物質等が産生するといわれている。すなわち、補体系ではC1のC1エステラーゼへの転換を引き金とする一連の反応であり、アナフィラトキソンの形成である。また線溶系、カリクレイン系の活性化がいわれているが、これらのプロ酵素相互間の関連については不明な点が多い。これらの関係を明らかにするために、C1s およびC1エステラーゼを精製した。

ヒト血清より Lepow らの方法によつて euglobulin 分画を得、それを活性化して C1 エステラーゼにしたのち、0.057Mリン酸緩衝液 pH 7.4で平衡化した DEAE-cellulose カラムに吸着させ、0.75M NaCl を含む同じ緩衝液で勾配溶出する。ついで、pH 6.8, 0.05Mリン酸緩衝液で平衡化した hydroxylapatite カラムに吸着させ、0.25Mの緩衝液で勾配溶出する。さらに0.02M glycine 緩衝液 pH 9.0で平衡化した TEAE-cellulose カラムに吸着させ、0.5M NaCl を含む同じ緩衝液で勾配溶出を行なつた。得られた標品は、超遠心、disc 泳動で単一であつた。S_{20,w} = 4.3, 分子量は約11万であつた。この標品はキノゲン I および II のいずれからも徐々にではあるがキノンを遊離した。

euglobulin 分画を、不活性のまま 0.057Mリン酸緩衝液 (1 mM EDTA を含む, pH 7.4)で平衡化した DEAE-cellulose カラムを用い、0.5M NaCl を含む同じ緩衝液で勾配溶出する。trypsin で活性化し、ATE 水解能を有する分画を集め、2 mM EDTA の存在下に今一度、DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィーを行なう。ついで0.05Mリン酸緩衝液, pH 7.4で平衡化した hydroxylapatite カラムに吸着させ、リン酸緩衝液で step wise に溶出すると、0.15Mで溶出された。超遠心、disc 泳動、免疫電気泳動により均一であつた。S_{20,w} = 8.4, 分子量は約 18万であつた。精製標品は C1r, trypsin, plasmin および kallikrein で活性化されるが、C1s 単独および C1 エステラーゼによる活性化はみられなかつた。

12. ヒト C1 (C1 hu) と C1 inactivator (C1 INA) との反応について

大阪府立成人病センター

永木和義, 飯田恭子

C1 hu は Nelson らの中性沈殿で得られたものをさらに Sephadex G-200 で 2回 gel filtration を行なつた。また C1 INA は中性沈殿を除いた上清より精製した。C1 hu と C1 INA との反応はすべて 30°C で 30分行なつた。その結果、1) C1 hu と C1 INA を fluid phase で作用させたのち残つた C1 の溶血活性を縦軸に、使用した C1 INA の量を横軸にとると両者の関係は横軸に凹となる。これに反して C1 の代わりに C1s を用いると両者の関係は直線となる。すなわち C1 と C1 INA との反応は C1s と C1 INA との反応型式とまったく異なつてい

る。2) EAC1 cell に C1 INA の一定量を作用させたのち、初めに cell 上にあつた C1 の量を横軸に、C1 INA により消費された C1 の量を縦軸にとると両者の間には原点を通る直線関係が成立する。すなわち一定量の C1 INA は cell 上に何個の C1 が存在していても常にその一定の割合のみを消費している。

3) 2 と同じ実験で、初めに cell 上にあつた C1 の量と消費された C1 INA の量との関係を見ると、cell fixed の C1 がある程度以上増加すると消費される C1 INA の量は増加せず一定になる。逆に、一定量の C1 INA が消費されているにもかかわらず消費される C1 の絶対量は増加する。

以上の事実より、C1 hu と C1 INA との間の反応は単純な stoichiometric な反応ではなくかなり複雑な系を介しての反応と思われるが、両者が protein-protein complex を作るものか、あるいは enzymatic な反応であるかは不明である。

13. 補体第 1 成分と第 4 成分との反応におよぼす TAME と ATEe の影響についての比較

国立がんセンター研究所ウイルス部

島田彰子, 田村 昇

TAME, ATEe はヒトまたはモルモットの C1 によつて加水分解される。そして TAME は C1 の本来の基質である C2 と拮抗して EAC14 と C2 から EAC 142 が形成されるのを抑制する。われわれは ATEe についても同様の実験を試みたところ、ATEe は C1 の合成基質でありながら TAME とはまったく異なつて、EAC 142 の形成を阻害しないことが判明したので、さらに C1 ともう 1 つの本来の基質である C4 との反応に、TAME と ATEe がいかなる影響を与えるかを比較検討した。

EAC1 と C4 の反応による EAC 14 の形成に対して、TAME は同様に C4 と拮抗して EAC 14 の形成を阻害し、それと平行して液相からの C4 活性の消失も遅れた。ATEe も EAC 14 の形成を阻害するが、その作用は非拮抗的であり、EAC 14 の形成が著しく抑制されているにもかかわらず、C4 は液相より対照とほとんど同じように消失した。また、液相中での活性型 C1 による C4 の不活性化に対しても、TAME はそれを阻害するが、ATEe はほとんど影響を与えなかつた。さらに、ATEe のエステル部分を除いたアセチルタイロシンについても検討したところ、ATEe とまったく同じ様式で C1 と C4 の反応を阻害することが判明した。これに反して

TAMe のエステル部分を除いたトシルアルギニンは、ほとんど阻害作用を示さなかつた。

ATEe は TAMe と同じように EAC1 によつても加水分解されるが、ATEe は C1 の C4 に対する作用を阻止するのではなく、C1 の作用を受けた C4 が血球膜あるいは免疫グロブリンに存在すると仮定されているレセプターに結合するのを阻止すると考えられる。

14. C1 INH に関する研究

京都府立医科大学増田内科

近藤元治, 細川計明

C1 INH (C1-esterase inhibitor) は、補体第1成分のみならず、plasmin, kallikrein に対する inhibitor として関心が持たれている。C1 INH は、活性 C1 (C1) の enzymatic active center に結合して、その酵素活性を阻止することが知られているが、その作用機序には不明の点が多い。

1) C1 を異なる濃度の C1 INH と反応後、C4, C2 および TAMe, AAMe に対する C1 の residual activity をみると、C1 INH の濃度の増加に伴ない、C1 の溶血活性、C2 および TAMe に対する作用が著しく低下するのに対し、C4 および AAMe に対する作用は、比較的障害されにくかつた。このことは、C1 を 52°C に加熱すると、溶血活性、C2 および TAMe に対する作用が容易に破壊され、一方 C4 および AAMe に対する作用が障害されにくいという解離現象 (dissociation) をみたことと比べて、C1 の enzymatic site, あるいは C1 molecule の conformational change の問題に、解決の糸口を与えるものと思われる。

2) C1 INH による C1 の inhibition は、1 molecule 対 1 molecule の反応であるとされていたが、この反応は C1 あるいは C1 INH のそれぞれの濃度に影響され、また温度や時間も影響しており、両者の反応になんらかの enzymatic process が働いている可能性が考えられる。

3) C1 INH は、電気泳動的に α_2 -globulin とされている。 α_1 -antitrypsin deficient serum は、凍結保存中に C4 および C2 の titer が極度に低下し、同時に C1 INH の機能も著しく低下することがわかつた。これは α_1 -AT の欠如に起因する plasmin あるいは kinin 系の関与により C1 の活性化が起り、この C1 が C4, C2 さらには C1 INH の機能を奪つたと考えられる。この血清は、免疫電気泳動により、C1 INH の沈降線が β 領域に延長し、C1 との結合、または C1 INH の破

壊を意味するものと思われる。

15. C1 inactivator を欠如したモルモット血清

国立がんセンター研究所ウイルス部

田村 昇, 奥田智子

東京大学医科学研究所

成内秀雄, 白井美津子

C1 inactivator の欠如が先天性血管神経性浮腫の病因であることは、すでに知られているが、われわれは C1 inactivator を欠如していると思われるモルモット血清を見いだした。

補体血清を得る目的で全採血したモルモット血清の中にまったく溶血活性がないものがあり、その血清について補体各成分の溶血活性を調べると、C4 と C2 の活性は $1/2$ 稀釈でもまったく認められず、また C1 inactivator の活性も $1/20$ 稀釈でまったく検出されなかつた。その他の補体成分と C3 inactivator の活性は正常モルモットのそれとほぼ同じであつた。

immunolyso-electrophoresis 法で、C1 の溶血活性をみると、正常モルモット血清では、C1 は S と M の 2 つの溶血帯に分かれるが、この血清では、C1 は S と M と F の 3 つの溶血帯に分かれた。これはヒトの HANE に特有な像として、橋らによりすでに認められているものである。正常血清では F 溶血帯の部位に C1 inactivator が泳動されるので、F の溶血帯はみられないが、C1 inactivator を欠如したこのモルモット血清では、精製 C1 と同様に 3 つの溶血帯に分かれると考えられる。

さらに、この血清が C1 のエステラーゼ活性を阻止するか否かを正常血清と比較検討した。正常血清の 0.3ml は、ある量の C1 (約 25 万 C1 H₅₀ 単位) のもつエステラーゼ活性を完全に阻止するが、この欠如血清の 0.3ml はまったく C1 のエステラーゼ活性を阻止しないばかりでなく、それ自身でもわずかではあるがエステラーゼ活性を示した。

なお、抗 C4 血清や抗 C2 血清で検出できるような C4, C2 蛋白はこの血清中に存在している。

16. dithiothreitol によるモルモット補体第3成分特異的結合能の阻害

金沢大学がん研究所分子免疫部

高橋セイ, 田中清子, 河野寛一

高橋守信

第7回補体シンポジウムにおいて、西岡らは、モルモ

ットのC3活性におよぼす dithiothreitol の作用について成績を発表した。われわれは、西岡らの追試を行っている過程で、DTT (dithiothreitol) が液相におけるC3へ直接作用をもつことをみいだした。また、同じ還元剤であるメルカプトエタノールにも、同様な作用があることがみいだされた。

われわれの実験成績によると

1) DTT やメルカプトエタノール (ME) 存在下で EAC 142cell とC3との反応が IA および溶血反応ともに阻害された。L-システイン、ヨードアセトアミドには、125mM まで阻害作用は認められない。

2) 西岡らの発表結果と一致して、EAC 43cell やEAC 1423 cell の bound C3については、IA の阻害作用は DTT, ME ともに認められなかった。

3) DTT やメルカプトエタノールによるC3への直接阻害作用は、われわれが使用した濃度の範囲 (100 mM-1 mM) では可逆的であり、透析により還元剤を除去すればC3活性は、ほぼ元のレベル近くまで回復した。しかし、還元アルキル化したC3について透析後のC3活性の回復はみられなかった。

4) このようなC3の還元アルキル化による阻害作用の原因は、C3のEAC 142cell への特異的結合能が阻害されるためであることが明らかにされた。すなわち、モルモットC3分子が EAC 142cell へ結合するには、1個以上の labile な-SS-結合の存在することが必要であると結論された。

5) 還元アルキル化したC3の電気的易動度、抗原性、分子量などは、処理しないC3に比べて変化はなかった。

6) タンニン酸処理血球に還元したC3、あるいは還元アルキル化したC3を非特異的に吸着させて IA を調べると、未処理のC3よりもむしろ IA を促進させる作用がみられた。

17. モルモット補体第3成分の構造と活性

国立がんセンター研究所ウイルス部

奥田智子, 高橋健治, 山主公子

西岡久寿弥

モルモット補体第3成分の溶血活性と IA 活性 (immune adherence) に対する化学試薬の影響を調べ、その際の分子の変化を検討した。

精製したC3と同容の化学試薬とをpH 7.5で30°に90分反応させ、反応混合物を透析した後、残存する溶血、

IA 活性を測定した。モノヨード酢酸、ヨードアセトアミド、無水コハク酸、PCMB, DNFB, グリオキサール、システイン、シスタミン、TPCK, DEP などはいずれもC3の活性に影響を与えなかった。それに反して、ジチオスレイトール、アセチルイミダゾール、テトラニトロメタン、N-ブロムコハク酸イミド、クロラミン-T、ヒドロキシルアミンを作用させると、溶血活性、IA 活性のいずれも低下した。すなわち-SS-結合の切断に伴うコンホメーションの変化、チロシン、トリプトファン、あるいはメチオニン残基がC3の活性発現に関与していると思われる。C3を封管中で6N-HClで110°Cに24時間加水分解した際のアミノ酸組成はヒトのC3について報告されている組成とよく類似している。DAB法でトリプトファンを定量すると1分子当たり約25残基であるが、N-ブロムコハク酸イミド (NBS) を作用させて活性を失ったものは著しくトリプトファン含量が減少していることが確認された。

C3に液相で NBS を作用させるとC3が EAC 142に結合し得なくなることがC3-I¹²⁵を用いて確かめられた。NBS処理によつてC3 convertase の作用部位、あるいはEAC 142への combining site が影響を受けることが示唆される。

EAC 1423に NBS を作用させると、C3の溶血活性は低下するが IA 活性の低下はみられなかった。また NBS で処理すると EAC 1423はC3 inactivator の作用を受けなくなることがわかった。

18. ghost ヒツジ赤血球を用いた immune adherence の定量的解析

国立がんセンター研究所ウイルス部

西岡久寿弥, 奥平博一, 奥田智子

immune adherence (IA) の反応機構を解するため精度の高い簡単な定量的方法が要求されている。補体成分とくにC3の IA または溶血活性と構造の関係を追究して行く目的をもつて、免疫溶血系と同じヒツジ赤血球(E)-ウサギ抗体を抗原抗体系とした定量 IA 法をここに樹立した。

I¹²⁵でラベルしたウサギ IgM 抗ヒツジ抗体 (M*) で感作したEを抗原抗体系とし、C1, C4, C2, C3を反応させたのち、GVB* で洗滌、沈殿血球に蒸溜水を加え溶血、5倍等張の veronal buffer 食塩水を1/5量加え等張化し (以下 ghost EM* および各種の intermediate cell とする)、IA レセプターをもつた各種の intact

な細胞と反応させ、冷 GVB* を加えて 750×G10分遠心すると、IA 反応性をもった EM* の中間反応体が IA receptor をもった細胞とともに沈殿するので、この I¹²⁵ を auto γ で測定するのが原理である。

この術式により、IA receptor をもっている細胞はことごとく反応性を示し、細胞数との量的関係、温度要求性が明示された。

また C3 の EM* 上に結合された site を、dithiothreitol, N-ブロムコハク酸イミドで処理すると C3 の溶血活性は不活化剤の dose に応じて破壊されるが IA 活性は変化をうけない事実も確認された。

ghost EM* を用いて、新鮮ヒト血清の IA 反応性を定量的に測定することも可能になり、 2×10^7 の ghost EM* ヒト赤血球 2×10^8 を用いて全量 0.6ml 37°C の反応系では、 $X = \left(\frac{y}{1-y} \right)^{\frac{1}{n}}$ [ただし、X は加えたヒト補体量、y はヒト赤血球と結合した ghost EM* の率] の式が成立し、 $\frac{1}{n} = 0.24-0.26$ であった。

19. (Fab')₂ による cytotoxicity

国立がんセンター研究所 岡田秀親

腹水型腫瘍細胞の MM₁₀₂ や、ヒツジ赤血球 (ShE) で免疫したウサギの γ G を pepsin 消化して、抗 MM₁₀₂ および抗 ShE の (Fab')₂ を作成した。残存の可能性のある末梢化の γ G は anti Fc-sepharose (ヤギの anti Fc を Br CN 法で結合) で処理することにより除去した。これらの (Fab')₂ で感作した MM₁₀₂ あるいは ShE にウサギ血清 (RaS) またはモルモット血清 (GPS) を反応させると cytotoxicity (または hemolysis) が起こることを知った。ShE-(Fab')₂ に精製した GPC1 を作用させても、C1 transfer 法で検出される C1 の結合はまったく認められず、また I¹²⁵-anti Fc を作用させても radioactivity は、ShE-(Fab')₂ には反応しない。このことは、(Fab')₂ の中に混在していた intact な γ G による溶血ではないことも示している。しかしながら、C4 deficient の GPS によつては溶血が認められなかつたので、alternate pathway そのものによる溶血とは考えられなかつた。

ShE-(Fab')₂ を EDTA の存在下で 1/5, あるいは 1/15 の GPS, または RaS で処理してから血球を洗い、GVB* におきかえてから 1/10 GPS を作用させると EDTA 血清で処理することにより溶血の亢進がみられ、その亢進は、ShE あるいは ShE- γ G を処理した場合よりも強い (表 1)。

表 1 Percent Hemolysis by 1/40 GPS of RBC Treated with EDTA-GPS

RBC	Dilution of GPS in EDTA for Treatment		
	0	1/15	1/5
ShE	2.1	6.2	13.6
ShE- γ G	7.3	17.8	33.0
ShE-(Fab') ₂	3.5	19.8	38.8

これは、alternate pathway による補助的増強作用の可能性を考えてみなければならないことを示している。(Fab')₂ が classical な意味での非補体結合性抗体のモデルとして考えうると仮定すれば、非補体結合性抗体が自然抗体による cytotoxicity を増強すると考えられる。もしこれが事実だとすれば、一般に行なわれている cytotoxicity test で complement dependent cytotoxic antibody 活性が検出された場合でも、本質は、非補体結合性抗体による補体血清中の自然抗体の増強作用をみている危険も考えられるわけである。

20. 免疫溶血反応の終末反応段階におよぼす soluble ATPase の作用

奈良県立医科大学 上田 浩, 深山昭雄

M. lysodeikticus の cytoplasmic membrane より抽出した soluble ATPase が免疫溶血反応で intermediate EAC7 cell の lysis を阻害することを示した。EA1, EAC4, EAC14, EAC7 に soluble ATPase を作用させ、その形態変化を顕微鏡下で観察すると、EAC7 に特異的に形態の若返りが見られ、この変化は 5 分以内に現われはじめ、15-20 分でほとんど最高に達する。それ以上作用が続くと、またもとの球状に変化する。この形態変化と一致して、EAC7 を ATPase と 37°C, 15 分間 preincubate した後、C8, C9 を加えた時の溶血を ATPase なしの対照と比較した時、溶血速度が著しく減少することを示した。さらに、EAC7 の溶血にほとんど影響しない量の ATPase を作用させる時、同時に ATP を変量加えて C8, C9 による溶血能を比較すると、加えた ATP 量に比例して ATPase 阻害が増加することがわかつた。

EAC7 と ATPase を 37°C, 15 分間 preincubate した後、完全に ATPase を洗滌除去した後の EAC7 の C8, C9 による溶血能を観察すると、ATPase による阻害が完全に消失している。同時に ATPase 除去後の EAC7 の形態は、完全に球状に変化していることが判明した。

ATPase の阻害作用が、C 8, C 9 と ATPase が共存する時のみ現われることから、C 8 あるいは C 9 に対しても阻害作用を持っているのではないかと考え、この点を検討中である。

21. 免疫溶菌による大腸菌菌体成分の変化について (第 2 報)

大阪大学医学部細菌学教室

井上公藏, 矢野健一, 高見沢昭久
天野恒久

免疫溶, 殺菌に伴い菌体壁の phospholipid とくに phosphatidylethanolamine (PE) が補体作用に伴って lysophosphatidylethanolamine (LPE) および遊離脂肪酸 (FA) として反応上清の lipid 抽出物 (chloroform 相) に見いだされることを前回の補体シンポジウムで報告した。その後の本研究の結果は次のとおりである。

1) 補体作用により感作菌からまず PE を含む成分が遊出し、時間の経過とともに菌体外への PE の増量はあまりないが、LPE および FA が反応上清中に増大する。

2) 反応初期に遠沈により上清と菌体とを分離し、後者は洗滌後さらに緩衝液に再浮遊して incubate を続行すると、lipid 成分の上清中への遊出はみられるが、反応期間を通じて補体と共存せしめた系に比べて少ない。

3) 反応上清中に遊出してくる ^{14}C を Sephadex G-50 あるいは G-200 による gel filtration により分画し、さらに chloroform-methanol 抽出により分画すると、methanol 水相にくる成分は主として比較的分子量の小さいものであり、chloroform 相にくるものは、反応上清中には 4 S 蛋白程度の大きさの成分として存在する。

4) E. coli から分離精製した ^{14}C -PE に補体あるいは cold の感作菌と補体を加えても LPE および FA への分離はみられない。

5) 比較実験として、ハブ (Trimeresurus flavoviridis) 毒より分離精製した phospholipase A を E. coli に作用させると、菌はこの酵素によつて殺されず、また、菌体の PE は LPE と FA に分解されるが、菌体外へ遊出せず菌体内に留っている。

以上の結果から補体の活性化にともない、菌体壁の PE をふくむかなり大きな構成成分が菌体外へ遊出し、さらに PE は LPE と FA へと分解されることが明らかとなった。

22. PCA 反応の免疫組織化学的研究

横浜市立大学形成外科 西岡久寿樹

同 第 2 病理 田中俊夫

1958年 Z. Ovaryにより提唱されたPCA反応は、passive に投与した抗体が組織固着というアレルギー反応の第 1 歩というべき重要な要素を第 1 歩としてその反応が始まることから、複雑な in vivo におけるアレルギー反応を解析していく上において絶好のモデルといえよう。またモルモットの γ_1 抗体がモルモットに対してレアギン様抗体としての作用を有することから注目されてきており、一方最近になり、ようやくこの γ_1 抗体と補体系の反応がいわゆる“alternate pathway”を介して反応することが明らかになるにおよんで、homogenic systemの上で γ_1 抗体により生じる PCA 反応は γ_1 抗体の組織固着における target cell(or tissue)の問題や、血管透過に際し補体系の関与の追跡といった重要な問題点を含んでいる。昨年演者は岡田とともに RI を用いて PCA 反応を検討すべく定量 PCA 法を報告しさらに本年 9 月アレルギー学会総会において γ_1, γ_2 抗体の組織固着の時間的推移および PCA 反応による血管透過性の変化の強さを定量的に解析し報告した。さらに今回組織形態学的に蛍光抗体法および抗 horseradish peroxidase (HPO) の抗体を製精しいくつかの知見を得たので報告した。

方法および結果

まず蛍光抗体間接法を heterogenous な rabbit 抗 BSA $\gamma_2\text{G}$ により生じさせた。PCA 反応に生じさせ特異的傾向の存在が venule を中心とした血管壁に存在している事実を確かめ、次に rabbit にモルモットの $\beta_1\text{C}$ を免疫して得た抗 $\beta_1\text{C}$ 血清を得、これに FITC をラベルした homologous $\gamma_1\text{G}$, heterogenous $\gamma_2\text{G}$ により一定時間後感作させた皮膚および PCA 反応を生じた皮膚において観察した結果、抗 $\beta_1\text{C}$ 血清と特異的に反応する蛍光像を得たので、現在 HE 染色と比較の上その局在性および補体第 3 成分との関連性について検討を加えた。

一方さらに検討を加え、horseradish peroxidase type II (SIGMA) を塩析し Sephadex G-50 を通し、抗原として比較的 purified された HPO をウサギおよびモルモットに Freund の complete adjuvant とともに免疫し、抗 HPO rabbit 血清、モルモット血清によつてモルモットに PCA 反応を生じさせることに成功したので、光顕レベルの上で解析でき得るモデルとして追跡中である。

以上、演者らは PCA 反応を in vivo におけるきわめ

て優れたアレルギー反応の解析モデルとして提唱し、その反応の場における補体系の関与が形態学的にも否定でき得ないものと考え、組織化学的方法論よりのアプローチの1つとしていくつかの問題点を提起した。

23. 創傷治癒と PCA 反応

横浜市立大学第2病理学教室 田中俊夫

同 形成外科 西岡久寿樹

創傷治癒過程 (wound healing process) は、臨床的にも外科領域において大前提である一方、組織修復における肉芽組織形成過程を探究するきわめて単純なモデルでありながらその掘り下げた研究は近年まで比較的少ない。

そのような外科的手術創や皮膚切開創の治癒過程において現在まで明らかになってきている事実は、まず機械的刺激を受けた組織の血管より血清タンパク、血球成分の滲出といった事実が始まるいわゆる一連の「炎症」における chain reaction の1つと考えられることであり、またその組織反応の主体をなす代表的細胞は、線維芽細胞、macrophage および毛細血管内皮細胞の3種である。これらの細胞は、組織修復過程においてきわめて重要な役割をなしていると考えられ、特にその中でも毛細血管の新生において、血管内皮細胞の遊走および増殖分裂はきわめて重要な役割をなしているといえる。

これらの細胞の活性化はいわゆる創治癒12時間ころより始まる増殖期において生じてくることである。このような創修復の一連の過程において、経時的に PCA 反応を起こし、その反応の強さおよびそれに伴う組織像を比較検討したので報告した。

この実験の目的には latent period の短い抗体が必要であつたため、ウサギの抗 BSA 抗体よりモルモットの

皮膚感作能を有する γ_2G fraction を DEAE カラムクロマトグラフィー、磷酸濃度勾配法により分離した。

次いで 300-400gr の Hartley 雑系モルモットの脊部に8カ所長さ1cmの創を作成、6-0 ナイロン糸にて縫合後、24時間目から5日目までの time course を比較、さらに他の群には、short time course として3時間、5時間、9時間、12時間、16時間、24時間の time course を比較検討した。この場合創の内側に抗体 (タンパク量 30 γ) を感作し、反対側には0.15M NaCl を 0.1ml 皮内注射し、30時間後に、2.5mg/ml の BSA と1% Evans blueの等量混合液を経静脈的に全身投与し、その activity を Evans blue の描く青いスポットにより測定した。またそれぞれの組織学的検索を施行した。その結果3時間から5時間の time course ではほとんど PCA 反応が生じなかつたが、9時間目から12時間ころにかけて PCA 反応の亢進を認め、24時間から1週間目の間はその差を PCA 反応における Evans blue の滲出ではほとんど認めなかつたので「定量 PCA」により追跡した。また組織学的には内皮細胞の増生を経時的に認め、それよりやや遅れて血管の透過性が亢進してくるのを認めた。また抗体感作皮膚および、非感作皮膚の組織学的所見では HE のレベルでは著明な差を認めることは困難であつたが、当然のことながら抗体感作皮膚群の方が、macrophage および、PMN の滲潤が多い印象を受けた。

以上創傷治癒過程において PCA 反応を生じさせた結果、形態学的に内皮細胞の増生 (殖) 時期にその亢進がほぼ一致して認められた事実は、PCA 反応に関与する抗体の target cell としての内皮細胞系を考えるべく興味ある知見といえよう。