

神戸常盤大学で測定依頼を受けた各種補体異常について： 測定開始後 7 年を経て

北野悦子¹⁾、内堀恵美²⁾、北村 肇¹⁾、畑中道代¹⁾

¹⁾神戸常盤大学・保健科学部・医療検査学科、²⁾天理医療大学・医療学部・臨床検査学科

はじめに

臨床現場では、易感染性や全身性エリテマトーデスなどの免疫複合体病が疑われる症例、補体はその病態に関与する腎臓疾患で、補体検査がオーダーされることが多い。CH50 と C3, C4 のタンパク濃度が測定されることがほとんどであるが CH50 の低下が C3, C4 タンパク濃度のデータで説明出来ない場合も多く、その場合補体系の精査が必要となる。しかし、我が国では上記項目以外の補体精査が可能な施設はなく、多くの臨床医を悩ませてきた。

これまで長年にわたり本稿筆者の北村らが、臨床における補体の相談や解析の依頼を受けてきた（於大阪府立成人病センター、大阪府立看護大学医療技術短期大学部）。2007 年度より、測定の場を神戸常盤大学・保健科学部・医療検査学科に移し、補体チームとして筆者らが臨床症例に於ける補体の相談や解析の依頼を受けることになった。（補体研究会ホームページ参照 <http://square.umin.ac.jp/compl/>）。補体各成分の活性を測定できる施設は我が国では他に

はないためか、依頼数は予想以上に多く、2014 年 6 月現在で 356 件の依頼（相談を含む）を受けた。本稿では、実施している補体測定の方法、この 7 年間に受けた相談の概要、測定依頼を受けた症例の結果について紹介するとともに、現状での補体測定の問題点についても言及する。

1. 臨床医からの相談・解析・報告までの流れ

臨床現場で補体検査がオーダーされることが多い病状を表 1 に挙げた。保険診療検査が可能な CH50 と C4, C3 のタンパク濃度の検査から補体系の異常が疑われ、本学へ相談・精査の依頼要請が来ることがほとんどである。依頼者と e-mail あるいは電話で相談の上、精査が必要であると判断される場合、患者血清（多くの場合血漿も）をドライアイス詰めで送付してもらい、必要とされる各種の補体成分の溶血活性やタンパク濃度を測定し解析する^{1,2,3)}。臨床医にはデータとともに病態に関するコメントを送り返している。

表 1 補体検査をすべき病状など

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none">・ 易感染あるいは感染重症化で補体欠損症あるいは補体活性の著減が疑われるとき・ 免疫複合体病が疑われるとき・ 肝機能障害で補体タンパク濃度低下が疑われるとき・ 腎炎で代替経路活性化が疑われるとき・ C 型肝炎患者で cold activation 現象が考えられるとき・ 局所の浮腫が主症状で遺伝性血管性浮腫（HAE）を疑うとき・ 肉親が補体欠損症であるとき |
|---|

表 2 補体活性測定法のいろいろ

		呼称	方法	原理	一般施設	本学
一括	古典経路	CH50 (補体価)	溶血法	被検体中の補体による感作赤血球 (EA) の溶血を見る。現在も頻用されている。標準法、マイクロプレート法、ワンポイント法など。	○	○
			リポソーム法	溶血法の EA の代わりにハプテンを埋め込んだリポソーム中にマーカーを封入したものをを用いる。		
			ELISA 法	IgM をコートしたウェルで活性化させ、C5b-9 形成を ELISA で検出		
	代替経路	ACH50	溶血法	ウサギ赤血球の溶血を検出		○
			ELISA 法	LPS をコートしたウェルで活性化させ、C5b-9 形成を ELISA で検出		
	レクチン経路	レクチン経路 CH50	溶血法	マンナンと MBL を結合させた赤血球の溶血を検出		
			ELISA 法	マンナンをコートしたウェルで活性化させ、C5b-9 形成を ELISA で検出		
部分一括	古典経路	C42 generation assay (C42-Tmax)	2 段階免疫溶血反応	EA+被検血清/ 37°C 反応、汲み出し+正常血清 in EDTA/ 37°C 反応で溶血させることによって C1, C4 & C2 の一括活性が、被検血清 と 正常血清を逆にすると C3-C9 の一括活性が判明する。		○
単独成分	古典経路	補体成分溶血活性測定	溶血法	被検成分を変量し、他の成分を過剰に加えた免疫溶血反応系で溶血を検出する		○

○ : 一般検査施設あるいは本学で実施している補体活性測定法

2. 補体解析の方法^{1, 2, 3)}

補体の測定には活性を測定する方法と、タンパク濃度を測定する方法の 2 つに分けることができる。前者はさらに一括して測定する方法、補体活性化の前半・後半に 2 分割して測定する方法、個々の補体成分の活性を測定する方法がある (表 2)。タンパク濃度の測定については、種々の血清タンパク濃度測定と同じように、特異抗体を用いて抗原性を指標として測定するが、一般的な検査施設では C3 と C4 のみしか測定していない。注意すべきことは、タンパク濃度は活性と必ずしも平行しないことである。活性化によって出現した不活性化分子も抗原性は保たれるので、タンパク濃度としては低下しない

めである。これらのうち本学で実施している測定法を以下に示す。

1) 溶血活性法による CH50 (一括測定法)

感作赤血球 (EA) と被検体を反応させ、被検体中の補体による古典経路を活性化させ、結果として起こる EA の溶血を見る方法である (図 1A)。古典経路活性化に参加する C1~C9 のすべての補体成分が機能して最終的に EA 上に C5b-9 複合体 (membrane attack complex, MAC) が形成されて溶血に至るため、C1~C9 を一括して活性を測定していることになる。したがって、CH50 が低値の場合でも C1~C9 のうちいずれの成分が低下している

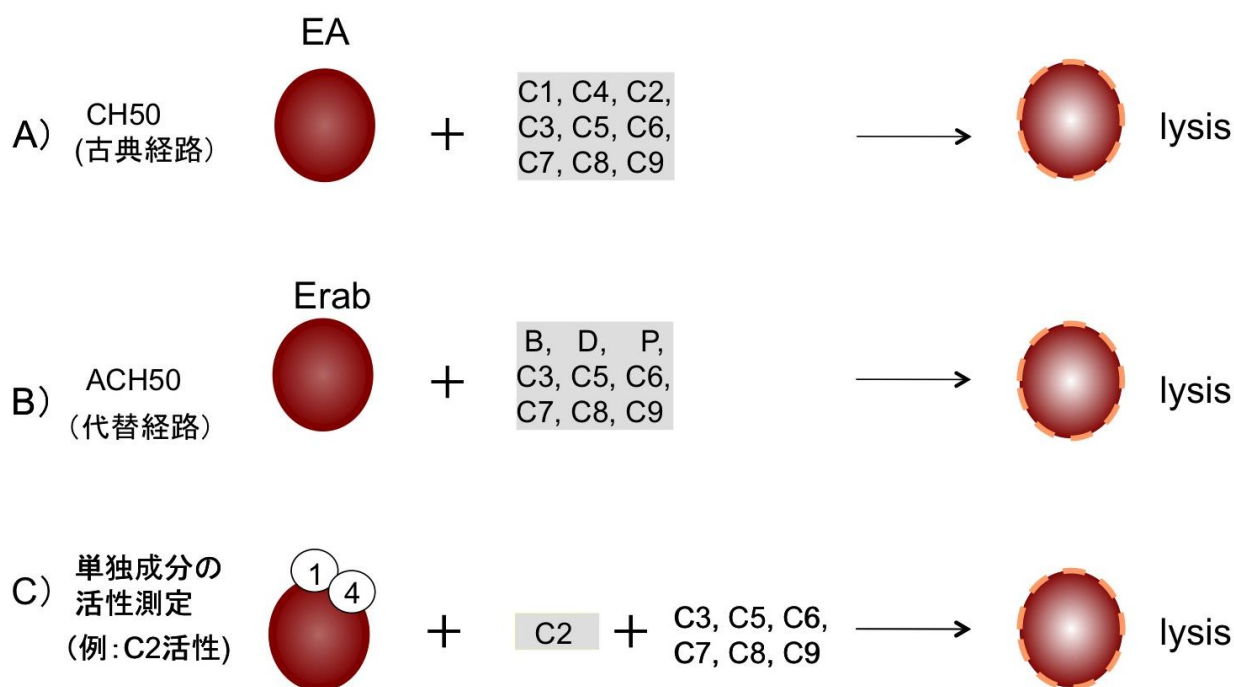


図1 補体活性の測定法

のかは不明であるが、臨床における補体のスクリーニングとしての意義も高いため、現在も補体測定的第一選択である。通常、Ca イオン及び Mg イオン存在下で一定量の緩衝液（GVB）中で、一定数の EA 数と変量した被検血清を 37°C で 1 時間反応させ、その溶血度から検体の活性を算出する。具体的には反応させた EA の 50%を溶血させる補体活性を 1 単位とし、1.0 ml の検体中に存在する単位数(単位/ml)として表す⁴⁾。実際の測定における手技については、オリジナルの Mayer 法が、標準法、ワンポイント法、更にマイクロプレート法と時代と共に改良されてきた⁴⁾。我々はマイクロプレート上で検体を変量させ（検体血清の希釈 12 系列）、マイクロプレートのまま反応、遠心、溶血度測定までできるシステムで行っている。

一般の検査施設ではワンポイント法で測定され

ることが多い。この方法の場合は、被検体を変量せず、1 点だけの濃度による溶血から CH50 を算出するため、精度が低いだけでなく、健常人血清（NHS）の 30%程度の値を示す場合でも“感度以下”と判定される。測定依頼を受けた検体で、マイクロプレート法で検体量を変量して測定すると、ある程度の活性が得られ、補体異常に該当しない例も数多く経験している。マイクロプレート法では C9 欠損以外の補体欠損症では、CH50 がほとんどゼロとなる。C9 欠損では C8 までの反応により溶血が起こるため、NHS の 25~40%の値を示す。C8 までの反応による溶血は、低イオン強度緩衝液中で著明に抑制されるため、C9 欠損かどうかを判断するには、GVB と同時に低イオン強度の緩衝液で CH50 を測定している。低イオン強度の緩衝液で低値となった場合には C9 欠損を強く疑い、C9 活性を測定する。

2) 溶血活性法による ACH50 (一括測定法)

代替経路 (副経路、別経路、第 2 経路とも呼ばれる) を介した補体一括測定法で、ウサギ赤血球を用いてその溶血を見る (図 1B)。代替経路では、C1, C4 及び C2 は参加せず、C3, B 因子、D 因子及び P 因子を介して C3 以降に活性化が進み、最終的に赤血球上に形成される C5b-9 複合体による溶血を検出する⁴⁾。古典経路では Ca イオン及び Mg イオンが必要であるが、代替経路では Ca イオンは必要でない。緩衝液としては、古典経路活性化による溶血を阻止するため Mg-EGTA 緩衝液が用いられる。一般の検査室では実施されておらず、本学でのみ可能である。

3) C42-Tmax 法 (C42 generation assay) (部分一括測定)

CH50 よりも詳細な補体活性のデータを得るための簡便な方法である。この方法は、我々が開発したもので、特殊な EA の中間生成体 (intermediate cell) や精製補体成分を必要としない。古典経路の C1, C4 および C2 までの初期反応が Ca イオン及び Mg イオンを必要とし、それ以降の C3~C9 の反応がこれらのイオンを必要としないことを利用したもので、それぞれの反応を分離し、一括して測定する^{5,6)}。まず、検体有感作赤血球 (EA) と反応させ、反応液の一部を経時的にくみ出し、これに過剰の NHS を EDTA 存在下に加え、60 分後の溶血を測定する。NHS 中の初期反応は EDTA で阻害され、検体中の成分により EA 上に形成される古典経路の C3 転換酵素 (C42) の量、すなわち C1, C4 および C2 の一括活性が測定できる。検体と NHS を加える順序を逆にすれば、検体中の C3~C9 の一括活性が分かることになる。検体中のそれぞれの一括活性が、

十分か不十分かが明らかになる。活性化経路の推定、補体のコールドアクチベーション (cold activation)、各種の補体成分欠損症など、低補体血症の解析には便利な方法である。一般的には行われていない様子であるが、EA と NHS さえあれば可能であり手技も簡単なため、一般の検査室や研究室でも試していただきたい。

4) 単独成分活性測定

補体活性化のそれぞれの補体成分活性を測定するものである。EA による免疫溶血反応を利用し、測定対象となる成分以外の成分を外から過剰に加えた系で行う^{4,6)}。C2 の溶血活性を測定する例を図 1C に示した。intermediate cell の作製に熟練を要し、精製 C2 や C5 を必要とするなど、手技は煩雑であり、一般的には行われておらず、本学でのみ可能である。

5) 補体成分タンパク濃度測定

本学では活性測定が可能な補体成分については、タンパク濃度の測定は実施していない。活性測定を実施していない Factor B, Factor D および補体制御因子の Factor H, C1-inhibitor (C1-INH) について、ELISA 法でタンパク濃度測定を実施している。

6) 補体異常解析の流れ (図 2)

一般の検査室で得られる CH50 と C3, C4 タンパク濃度測定の変動からは以下が推定される。

a) 低補体価で C4, C3 タンパク濃度ともに低下が認められない場合 : cold activation あるいは補体欠損症を疑う。EDTA 血漿で CH50 を測定し、低下が認められない場合は、cold activation の可能性が高

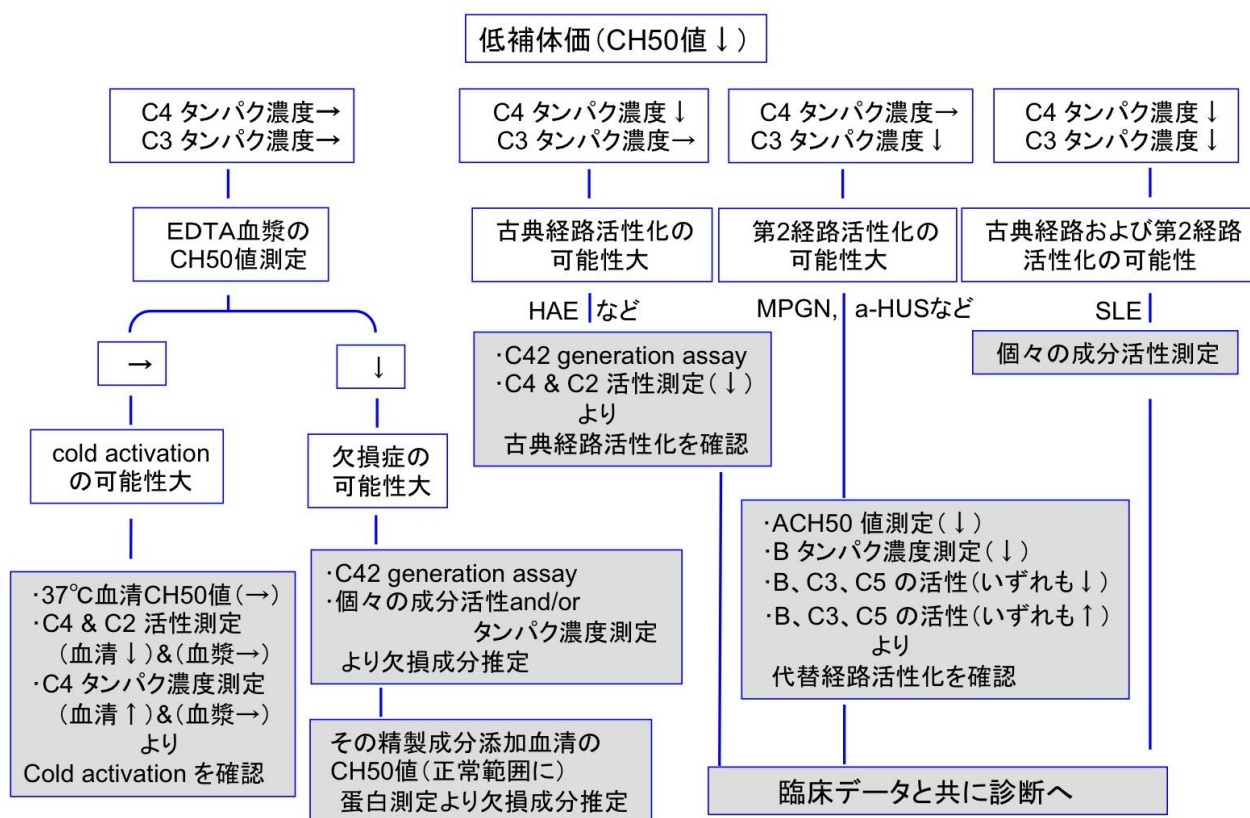


図2 補体異常解析のフローチャート

□ : 一般検査施設での測定

■ : 本学での精査

HAE : 遺伝性血管性浮腫、MPGN : 膜性増殖性糸球体腎炎、

aHUS : 非典型溶血性尿毒症症候群、SLE : 全身性エリテマトーデス

い。血漿でも低下する場合は、いずれかの補体成分の欠損症の可能性が高い。

b) 低 CH50、C4 あるいは C3 タンパク濃度が低下、あるいは両者の低下 : 古典経路、代替経路の活性化あるいはその両者による異常であることはわかるがその詳細は不明である。

本学ではそれ以降の詳細な補体精査について、図2に示すフローチャートに従って測定・解析を実施する。まず CH50 をわれわれの系（マイクロタイター法）で測定し直すとともに ACH50 を測定し、古

典経路の活性化あるいは代替経路の活性化による低下なのかを推定する。その後、部分一括活性で異常成分のおおまかな絞り込みを行った後、各補体成分の溶血活性の測定による補体活性のプロファイルを作成する。成分欠損が疑われた場合、CH50 を再度測定し、その時に精製した欠損補体成分や他の補体成分を加え、欠損成分を加えた場合に、CH50 が正常レベルに回復することで確認を行っている。

3. 結果

1) 相談・依頼件数の推移

2007 年 10 月に開始以降、2014 年 6 月現在までの間に 356 件の相談を受けた。経年で見ると(図 3)、2010 年より相談件数が増加しており、各科の内訳では小児科がもっとも多く毎年半数程度を占めた。

小児科からの相談では(図 4)、当初は原因不明の感染症を繰り返す症例での依頼がほとんどであったが、経年で感染症関連の件数の割合が減少して、腎臓関連、その他が増加している。その他の症例では、アレルギー、自己免疫疾患、川崎病などがあつた。正常の場合も多くあり、相談・依頼件数が増加してはいるものの、重篤でないケースの相談も多くなっていると思われる。

腎臓内科からの相談件数は 2010 年から大きく増

加した(図 5)。非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS)で、Factor Hをはじめ Factor I, Membrane cofactor protein (MCP)、Factor B など多くの補体制御因子の異常が広く知られ始めた時期と一致する。

C1-INH は遺伝性血管性浮腫(HAE) I 型、II 型で遺伝子異常により活性が正常の 25%程度まで低下する。I 型はタンパク濃度も低下するが、II 型では正常あるいは増加する。I 型 II 型の鑑別のためには C1-INH タンパク濃度の測定が必要となる。C1-INH 活性は一般の検査施設で保険適応での測定が可能であるが、タンパク濃度測定は本学を含め 2 か所に限られている。2009 年までは相談・依頼はほとんどなかったが、補体研究会からガイドラインが出された 2010 年以降は相談件数が増加(13 例)した。

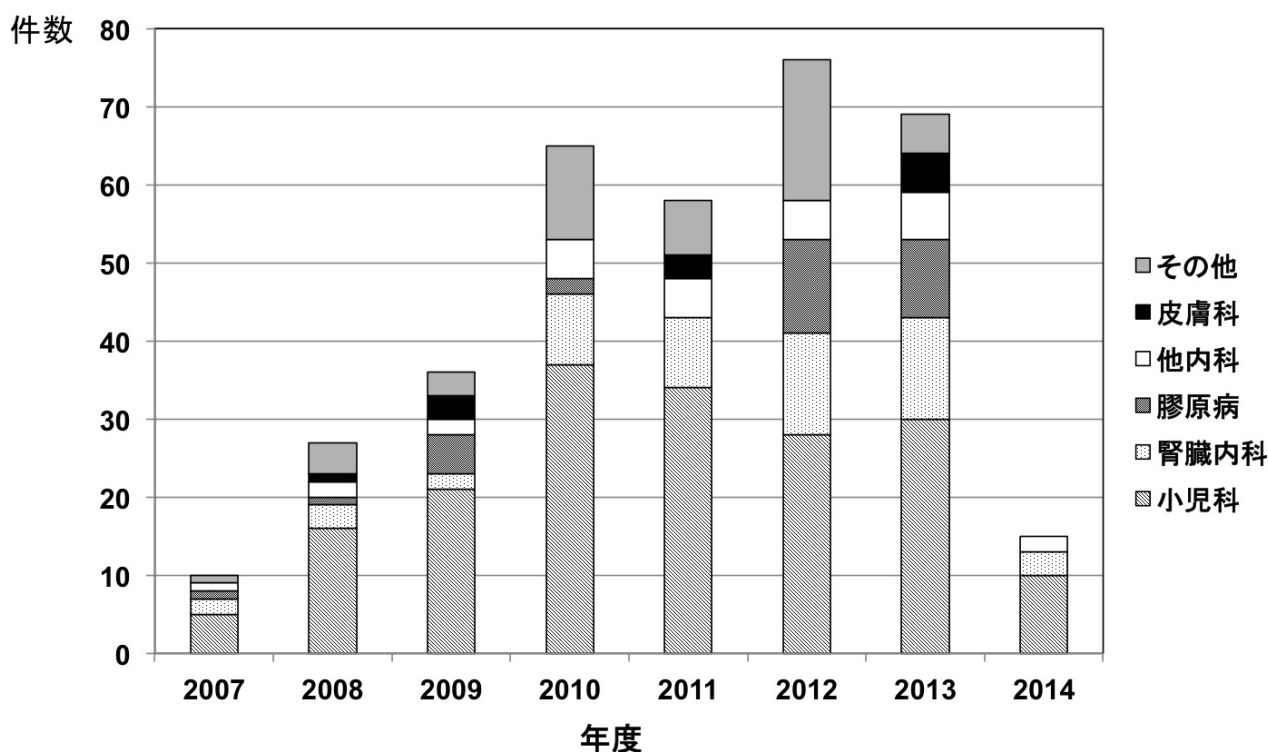


図 3 臨床各科からの相談件数

各年度は 4 月～翌年 3 月 (2007 年度は 6 ヶ月、2014 年度は 3 ヶ月現在)

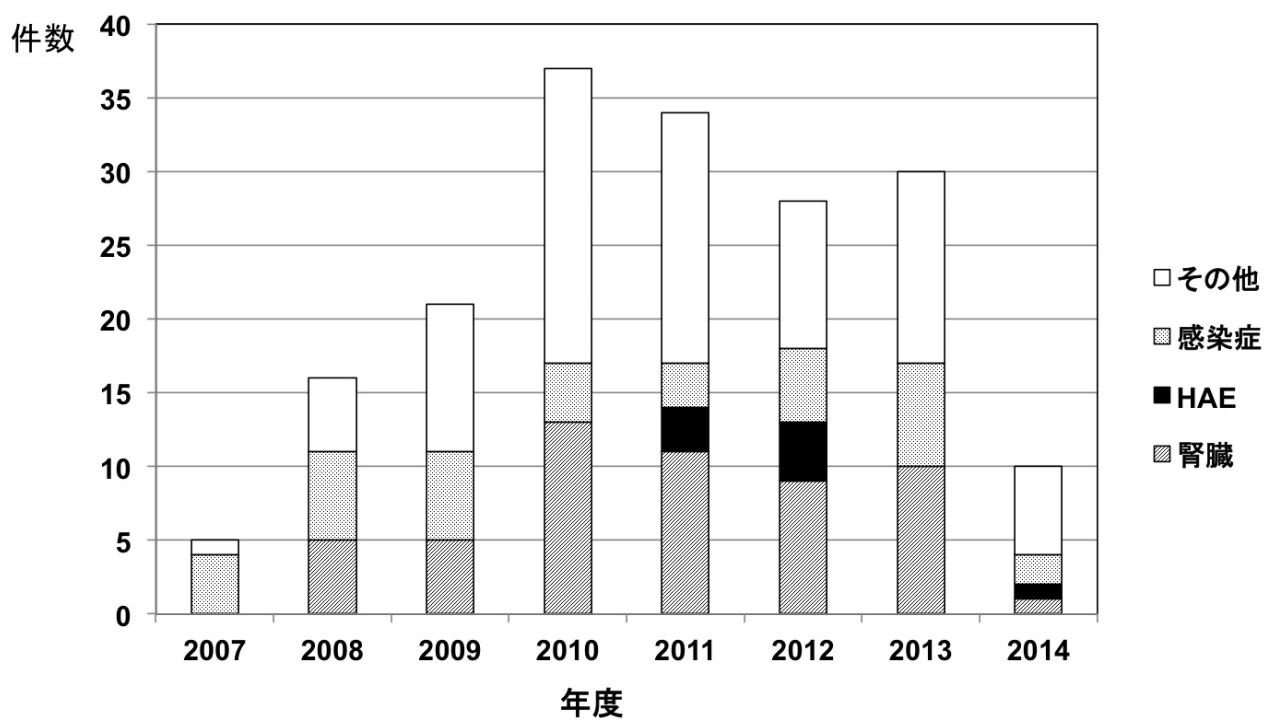


図4 小児科からの相談内容とその件数

各年度は4月～翌年3月（2007年度は6ヶ月、2014年度は3ヶ月現在）

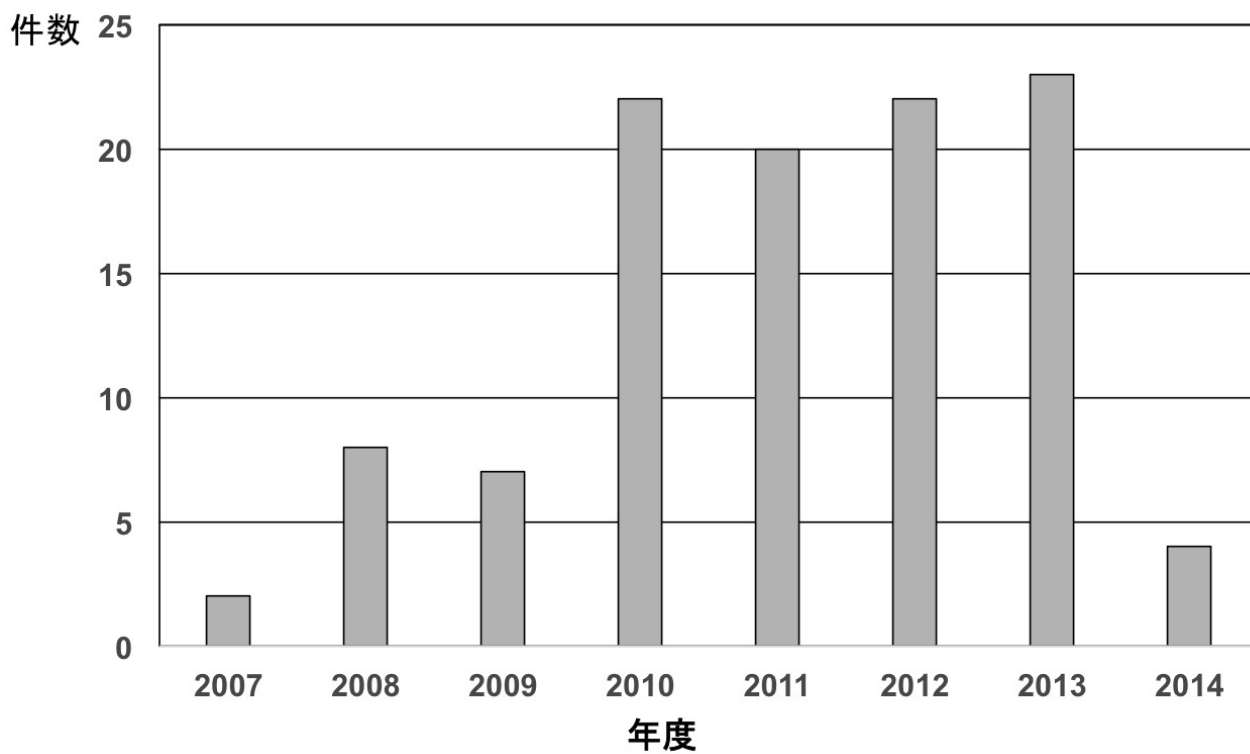


図5 腎臓疾患についての相談件数

各年度は4月～翌年3月（2007年度は6ヶ月、2014年度は3ヶ月現在）

2) 測定結果

相談を受けた中で、当研究室で精査が必要と判断し測定にいたった症例はほぼ半数であった。測定結果を表 3 に示す。

補体成分の欠損症では C9 欠損が日本では 0.1% と高い頻度で認められており、本学の測定でも多くの症例で C9 欠損が判明した。C9 以外の欠損は稀ではあるが散見された。

補体欠損を疑い精査に至った場合でも、抗原抗体複合体により一時的に古典経路が活性化している場合が多くみられる。それ以外では cold activation が増加傾向にある。C1-INH については測定に至った 6 例で、5 例が I 型、1 例が II 型と判明した。古典経路の活性化では通常 C4 活性、C2 活性ともに低

下するが、C4 活性のみが低下し、C2 活性は正常で C4 のアロタイプを疑う例が 10 例あった。

腎臓疾患では代替経路が活性化される疾患があるが、その中で C3 nephritic factor (C3NeF) や C4 nephritic factor (C4NeF) などが関与する膜性増殖性糸球体腎炎などでは、血清の補体活性は大きく低下する。しかし、aHUS では多くの場合腎臓局所でしか活性化が起らず、血清での補体活性は大きく低下しないことが多い。したがって CH50 や C3 タンパク濃度が著減しない症例では測定に至らない場合も多く結果が少数に留まった。

古典経路・代替経路両者が活性化される全身性エリテマトーデスの例も散見された。精査の結果、補体系の異常を認めない症例も多く存在した。

表 3 測定依頼を受けた症例の結果

	年度							
	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
欠損症								
C1q 欠損	1				1(?)			
C3 欠損			1	1(?)				
C5 欠損			1					
C6 欠損				1	1 (+C7D ヘテロ)			
C7 欠損		1		1	1	1		
C9 欠損		1	6	6	6	4	7	1
古典経路活性化								
免疫複合体	4	3	5	2	6	12	11	
HAE					1	5		
Cold activation			2	3	2	3	5	
代替経路活性化		1	1	1		1	1	
MPGN		1						
MPGN Type II				1				
aHUS								
Factor H 欠損		1		1			1	
抗 Factor H 抗体		1						
古典・第 2 経路の活性化		2	3	3	3	2	3	
その他								
C4 アロタイプ?		2		5	1	2		
軽度の CP 活性化		1	8		5	2	2	
正常		6		11	6	8	5	

各年度は 4 月～翌年 3 月 (2007 年度は 6 カ月、2014 年度は 3 カ月現在)

4. 今後の補体検査について

本学では主に溶血活性により各補体成分の活性を測定してきたが、この方法は測定対象補体成分ごとに intermediate cell の準備と精製補体成分を必要とするだけでなく、技術、経験、手間を要する。精製補体成分は、以前に精製したものを使用しているが枯渇しつつある。本学での精製は困難であり、また活性を有した補体成分の入手も困難になりつつあるため、最近是个々の補体成分の活性測定を断念せざるを得ない状況にある。そのため、部分一括測定により、補体系の異常が活性化経路の前半 (C1, C4, C2) にあるのか C3 以降にあるのかを決定し、そのうえで患者血清に精製補体成分を加え、CH50 値の回復により欠損成分を同定している。

最近相談が増加している補体が関与する腎臓疾患では、C3NeF, C4Nef や補体制御因子の測定が必要となるが、本学では Factor H の蛋白量のみしか測定できない。TTP, aHUS 等 については血栓性微小血管障害症 (TMA) 診断・研究ネットワーク (東京大学、奈良県立医大、国立循環器病研究センター) で補体制御因子の遺伝子診断、蛋白の解析をされているが、依頼数の多さ、高額な測定費用など、すべての依頼に応じることは難しいと推察される。

近年、C5 を標的とする薬剤 eculizumab が臨床で使用されるようになり、その劇的な治療効果から補体がこれまで考えられてきた以上に病態に大きく関与していることが示唆されている。補体系が想定

外の疾患の病態にも関与している可能性もあり、臨床の知見から新たな補体の機能を予見できる可能性が高い。今後、臨床ではますます補体測定の必要性が増すと考えられる。そのためには、臨床で必要とされる補体検査について、溶血活性測定法より簡便で一般検査施設でも実施可能な検査方法の確立が望まれる。

【文献】

- 1) 畑中道代、北野悦子、北村 肇、最近の補体測定法、臨床検査、52:911-916 (2008)
- 2) 北村 肇、補体学入門、基礎から臨床・測定法まで、学際企画 (2010)
- 3) 畑中道代、北村 肇、補体異常の評価法、補体への招待、119-129 (2011)
- 4) 北村 肇、北野悦子、補体測定法、生物薬科学実験講座第 10 巻、免疫と生体防御 I、体液性免疫 (長沢滋治、豊島聡 編)、廣川書店、213-255 (1999)
- 5) 小林恵美、北野悦子、北村 肇、C42-Tmax 測定による低補体血清の補体活性の解析、臨床化学、26: 221-228 (1999)
- 6) Kobayashi E, Kitano E, Kitamura H: A novel assay for serum complement activity: C42 generation assay. Int Arch Allergy Immunol 120:71-77 (1999)