

日本補体学会における、補体検査系 10 項目の構築とそれらの基準値策定

大谷 克城^{1,4)}、井上 徳光^{3,4)}、日高 義彦^{3,4)}、若宮 伸隆^{2,4)}

¹⁾酪農学園大学 農食環境学群 食と健康学類 栄養生理学研究室、²⁾医学・生理学研究室、

³⁾和歌山県立医科大学 医学部 分子遺伝学講座、⁴⁾日本補体学会

The analysis of complement factors and activation markers in normal Japanese individuals

Ohtani Katsuki^{1,4)}, Hidaka Yoshihiko^{3,4)}, Inoue Norimitsu^{3,4)}, Wakamiya Nobutaka^{2,4)}

¹⁾Department of Clinical Nutrition, ²⁾Department of Medicine and Physiology, Rakuno Gakuen University, ³⁾Department of Molecular Genetics, Wakayama Medical University,

⁴⁾The Japanese Association for Complement Research

[要約]

日本補体学会では、「新しい補体検査システムの構築による補体関連疾患の包括的登録と治療指針確立」を 2014 年に決議し、補体検査の構築と補体関連疾患のレジストリー構築を開始した。本論文では、10 項目（①補体の機能解析：CH50、②補体因子：C3、C4、③補体制御因子：CFH、CFI、C1 インヒビター活性、④補体活性化物：Ba, sC5b-9、C5a、⑤補体に対する自己抗体：Anti-CFH IgG）の補体検査系構築の概要と、それらの基準値の作成を試みたことを報告する。

[はじめに]

補体は、抗体の働きを補助する血清タンパク質として 100 年以上前に発見された。補体系の特徴は、補体の主な成分である補体成分 1～9 (C1～9) が中心となり、タンパク質分解により断片化され次の活性化反応を呼び込むカスケード反応を引き起こすことである。その他の補体関連因子としては、B 因子、D 因子などを含めた約 20 種類のタンパク質、8 種類の液性調節因子 (I 因子、H 因子、C4 結合タンパク質 (C4 binding protein: C4bp)、C1 インヒビター (C1-INH)、properdin、C3a/C5a インヒビター、ビトロネクチン、クラスタリン)、細胞膜上に存在する

調節因子 (CR1、MCP(CD46)、DAF(CD55)、CD59、トロンボモジュリン(THB)) と補体レセプター (C1qR、C3aR、C5aR1、C5aR2、CR1、CR2、CR3、CR4) などがあり、これらの分子が構成する複雑な反応系を補体系と呼んでいる (表 1、2) ¹⁻³⁾。

補体は、生物の進化の過程で、3 つの活性化経路を有するようになった。歴史的には最初に発見されたが、生物学的にはもっとも進化型である、抗体により発動される古典経路 (CP)、加水分解により低レベルで常時活性化が起こり発動される第 2 経路 (AP)、レクチンにより発動されるレクチン経路 (LP) の 3 つが存在する (図 1) ^{1,3)}。第 2 経路は、古典経路やレクチン経路による補体活性化の過程に組み込まれ、増幅ループ (amplification loop) と呼ばれる連続した補体活性化の増幅を引き起こし、外来由来の微生物や体内でできた異物をより効率よく排除する。

補体系の検査としては、個々の補体タンパク質を測定する検査と、補体系の活性化を測定する 2 種類の検査系が主に構築されてきた ⁴⁾。その後、補体の活性化物質や、補体制御因子の自己抗体を測定することが可能となり、現在までに多くの検査法が生み出されている ⁵⁾。補体検査は、以前日本でも、C1～C9 の全補体成分タンパク質の定量検査ができる時

表 1. 補体系タンパク質

	成分の略号	分子量 (kDa)	血漿中濃度 (μg/mL)
古典経路	C1q	460	180
	C1r	83	50
	C1s	83	50
	C4	205	600
	C2	102	25
レクチン経路	MBL	400~600	1
	Ficolin	400~600	25
	CL-LK		0.34
	MASP1	97	6
	MASP2	83	0.5
	MASP3	100	5
第2経路	B因子	90	300
	D因子	24	1~2
	プロパージン	159	25
各経路共通	C3	185	1200
	C5	190	75
	C6	120	60
	C7	110	50
	C8	150	80
	C9	71	60
主な制御因子	C1インヒビター	105	275
	I因子	88	35
	H因子	150	500
	C4bp	600	250

表 2. 補体制御因子と補体レセプター

	分子名称	機 能
液性補体制御因子	I因子	コファクター存在下C3b, C4bの分解
	H因子	I因子のコファクター、C3転換酵素C3bBbからBb解離
	C4bp	I因子のコファクター、C3転換酵素の解離
	C1インヒビター	C1r、C1s、MASP1、MASP2の不活化
	プロパージン	C3転換酵素C3bBbに結合し酵素活性安定化
	ビトロネクチン(S蛋白)	C5b-9不活化
	クラスタリン	C5b-9不活化
	C3a/C5aインヒビター	C3a、C5aの分解
膜性補体制御因子	MCP (CD46)	I因子のコファクター
	DAF (CD55)	C3転換酵素の解離
	CD59	自己細胞上でのTCC形成阻害
	CR1 (CD35)	I因子のコファクター、C3転換酵素C4b2aの解離
補体レセプター	CR1 (CD35)	C3b、C4bレセプター、貪食、免疫複合体の輸送
	CR2 (CD21)	C3d、C3dgレセプター、B細胞活性化
	CR3 (CD11b/CD18, Mac-1)	iC3bレセプター、貪食、細胞接着
	CR4 (CD11c/CD18)	iC3bレセプター、貪食、細胞接着
	C3aR	C3aレセプター、血管透過性亢進、白血球遊走
	C5aR (CD88)	C5aレセプター、化学伝達物質の放出
	C1qR	C1qのコラーゲン様ドメインに結合するcC1qRと球状ドメインに結合するgC1qRが存在、貪食

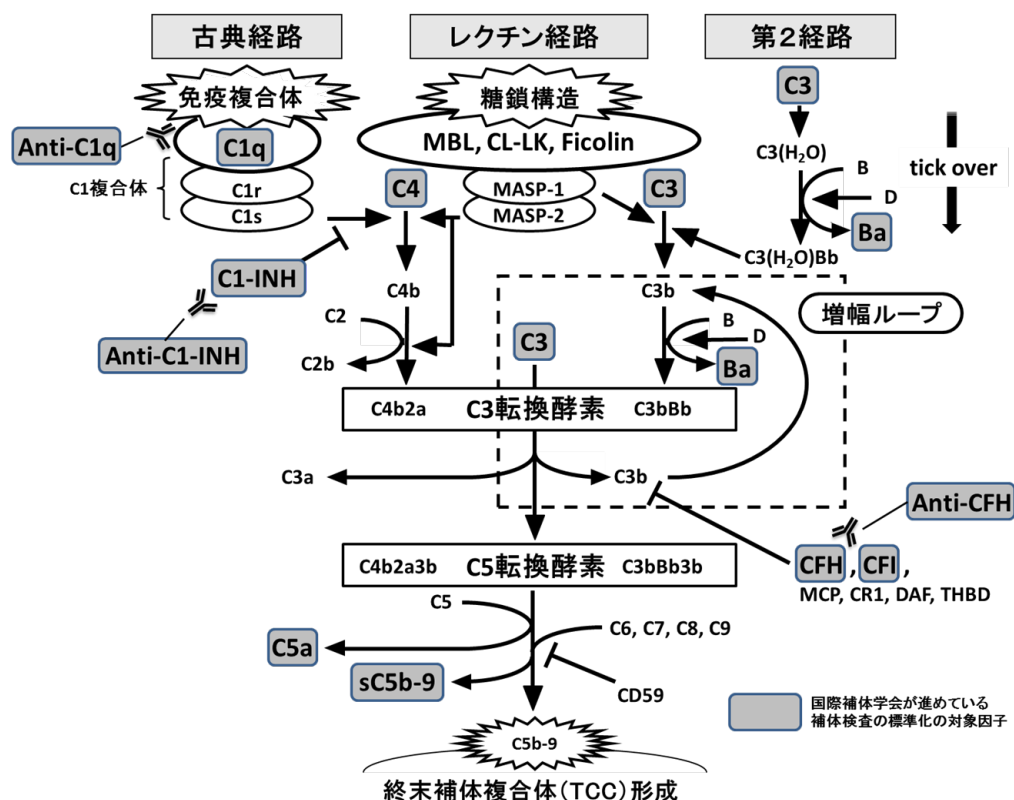


図 1. 補体系の活性化経路と補体検査の標準化の対象因子

代があったが、現在、補体関連疾患が疑われる際の検査として C3, C4, CH50, C1 インヒビター活性などの測定系のみが臨床で利用されている。実際、aHUS（非典型溶血性尿毒症症候群）や HAE（遺伝性血管性浮腫）などの補体関連疾患に対して、通常の C3, C4, CH50 の検査では、これらの補体関連疾患の局所の補体活性化の程度を十分に把握できない^{6,7)}。つまり、抗補体薬が利用できる環境になったにもかかわらず、適正な投与時期を見極めるための検査が存在せず、新規の検査法の開発が喫緊の課題となっている。そこで、日本補体学会理事会では、「新しい補体検査システムの構築による補体関連疾患の

包括的登録と治療指針確立」を掲げたプロジェクトを 2014 年に決議し、1) 血液等を用いる補体因子及び補体機能測定検査、2) 補体関連遺伝子検査、の 2 つの補体検査系の構築を開始した (<http://square.umin.ac.jp/compl/compl-examination/>)⁸⁾。国際補体学会 (ICS) においては、補体検査の国際標準化を目的として、約 20 項目の補体関連検査を提案している (表 3) が⁵⁾、日本補体学会は ICS の取り組みに参加しつつ、その第一段階として、検体採取等の輸送系の構築と以下の 10 項目の補体検査系を日本補体学会センターラボで構築し、それらの基準値の作成を試みた。

表 3. ICS が進める標準化補体検査

種類	測定項目
① 補体の機能解析	CH50 (古典経路)・AH50 (第2経路)・レクチン経路
② 補体因子	C3・C4・C1q
③ 補体制御因子	CFH・CFI・C1インヒビター活性・C1インヒビタータンパク質
④ 補体活性化物	C3a・C3dg・Bb (Ba)・(C5a)・sC5b-9
⑤ 補体に対する自己抗体	抗C1q抗体・抗C1インヒビター抗体 (G/A/M)・抗CFH抗体・C3Nef

下線は日本補体学会センターラボで構築し、それらの基準値の作成を試みた検査項目



図 3. 安定性・再現性試験

C3-SH ニットーボー, N-アッセイ TIA C4-SH ニットーボー (ニットーボーメディカル株式会社), CFI, CFH, anti-CFH IgG は、CFI (Human) ELISA Kit, CFH (Human) ELISA Kit, CFH IgG ELISA Kit (Avnova 社)、Ba, sC5b-9, C5a は MicroVue Ba EIA Kit, MicroVue sC5b-9 Plus EIA Kit, MicroVue C5a EIA Kit (Quidel 社)、C1 インヒビター活性は、ベリクローム C1-インアクチベーター (シスメックス株式会社) を用いて、それぞれのマニュアルに沿って、測定を行った (表 3)。

安定性試験や再現性試験では、もっとも影響を受けやすいと考えられる補体活性化物の終末産物である sC5b-9 検査を用いて試験を行った (図 3)。つまり、補体検査サンプル運搬における検体の補体活性化の変化や検体の凍結融解や分注作業による活性化の変化、さらに検査作業自体の信頼性や再現性を確認する目的で、5 人分の血清と血漿を用いて、5 回の凍結・融解負荷試験を行い、各血清と血漿サンプルについて sC5b-9 の測定を行った。

統計解析：各群の平均値の検定には、Student's t

test または analysis of variance (ANOVA) と Student-Newman-Keul's test を用いた。P<0.05 をもって、有意差ありとした。成績は、平均値±SD (標準偏差) で示した。

[結果]

5 人の血清と血漿についての sC5b-9 検査における安定性試験では

(図 4)、血清では、サンプル No.43 は凍結融解の回数が増えるにしたがって、sC5b-9 値の上昇が認められたが、それ以外の 4 検体では、5 回の凍結融解では顕著な上昇は認められなかった。さらに、血漿では、5 回の凍結・融解負荷試験において、血清ほどの変化は認められなかった。また、5 人の血漿の各測定値においても、全体に大きなバラツキは認めず、検査自体の再現性は非常に高いと考えられた。

健康成人の 70 名の血液を用いた、表 3 の 10 項目における補体検査測定では、健康人の集団は、年齢 26 歳から 75 歳 (平均 45.2 歳) であり、男女比は、35:35 (それぞれ平均 44.7 歳と 45.7 歳) であった。最初に 24 名分の測定で、各測定の分布を見た (図 5)。24 名の C3, C4, CH50 は、ほぼ正規分布を示し、平均値±2SD の範囲に収束されていることが認められた。そこで、中央値から 95% の範囲とした、各検査の基準値を策定した。さらに、その後 46 名分を追加測定し、同様の方法で 70 名における基準値を策定した (表 4)。本方法で採取後、輸送、保存された

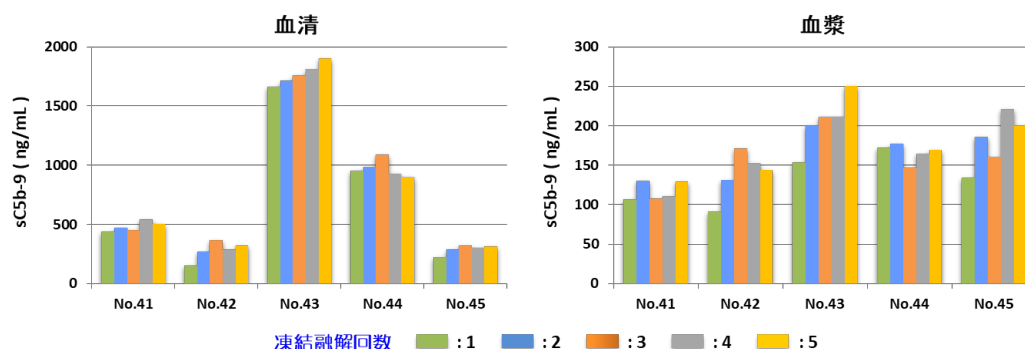


図 4. 安定試験の結果

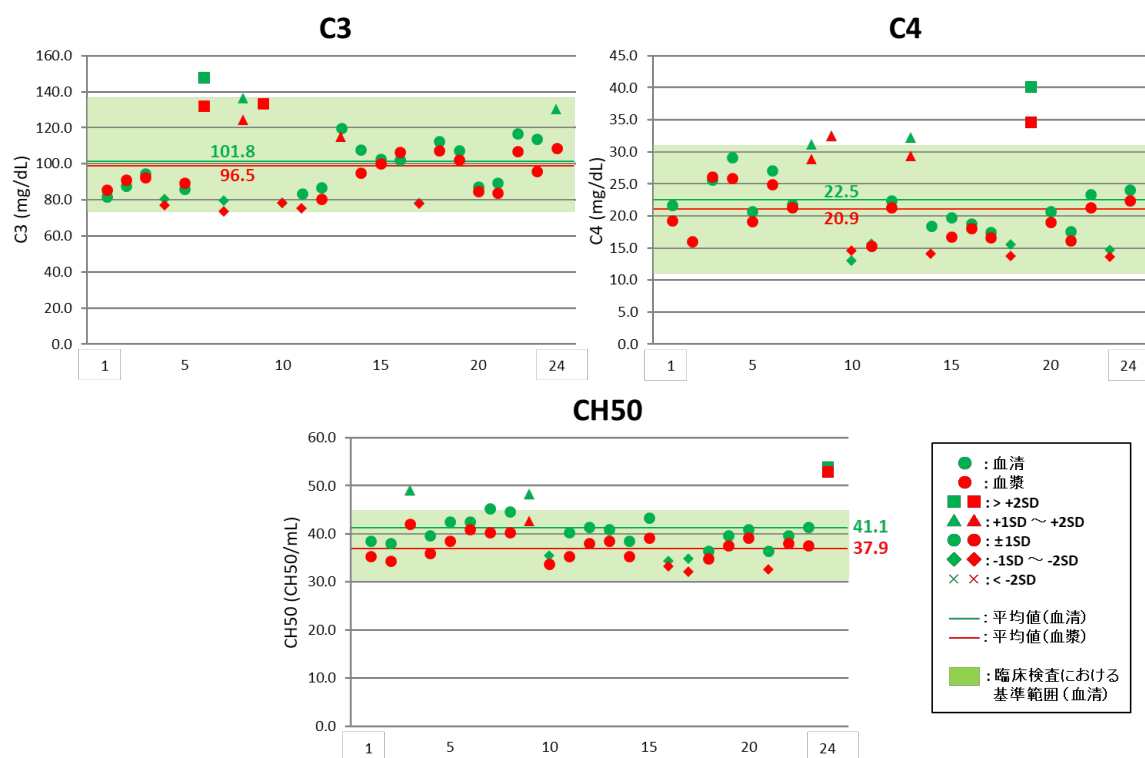


図 5. C3, C4, CH50 のばらつき度

血液サンプルにおいて、C3, C4, CH50 では、血清と血漿における基準値の差異はほとんど認められなかった。また、補体活性化制御因子である CFH, anti-CFH IgG についても、大きな差異はなかったが、CFI は、血清と血漿で大きく差があった。これは、血清では、補体活性化がおこり補体の消費によって減少したのではないかと考えられた。一方、補体活性化分解物である Ba, sC5b-9, C5a については、

血清と比較して EDTA-2N 血漿において、有意に低値を認めた。この原因としては、血漿中に補体活性化制御因子が多く残っていることで活性化が制御されていることや、さらに EDTA-2Na の添加により Ca イオンの機能が抑制されて、補体活性化が血清に比較してより抑制されている可能性が考えられた。

表 4. 基準値

		血清		血漿	
		n = 24	n = 70	n = 24	n = 70
sC5b-9	ng/ml	148.0 - 1243.6	181.0 - 1265.8	37.0 - 260.6	58.4 - 311.2
Ba	ng/ml	419.6 - 1714.0	438.1 - 1545.7	275.6 - 685.2	245.5 - 648.7
CFH	μg/ml	285.9 - 710.7	237.7 - 662.9	229.8 - 714.6	209.9 - 654.3
anti-CFH IgG	AU/ml	393.9 - 1069.0	393.9 - 1476.4	393.9 - 1183.0	393.9 - 1438.5
C5a	ng/ml	0.50 - 32.33	1.25 - 27.33	0.20 - 15.62	0.20 - 14.22
C3	mg/dL	60.4 - 143.2	61.6 - 138.8	61.3 - 131.7	60.8 - 130.0
C4	mg/dL	9.1 - 35.9	11.0 - 35.0	8.7 - 33.1	10.8 - 33.2
CH50	CH50/ml	31.7 - 50.5	32.4 - 49.6	31.2 - 43.2	31.3 - 44.5
CFI	μg/ml	28.8 - 55.6	11.2 - 41.6	72.0 - 139.2	44.7 - 202.7
C1-inhibitor (activity)	%			77.6 - 144.0	79.1 - 139.5

[考察]

日常の診療で利用される主な補体検査は、血漿もしくは血清における C3, C4, CH50 の 3 つである。臨床現場では、これらの測定値から、どの補体系が活性化され、どんな疾患が関与するかを即座に判断することが必要になる。「補体異常解析のフローチャート」は、北野らによるものが多く利用されているが、関根らはさらに発展させて「補体値からみた診断のためのフローチャート」を作成している⁹⁻¹¹⁾。しかしながら、これらのフローチャートを用いても、補体制御系因子の遺伝子異常に由来する aHUS や HAE などの補体関連疾患では、局所の異常補体活性化のために、C3, C4, CH50 の測定値はあまり顕著な変化はしない¹¹⁾。その後、これらの補体制御系因子を直接測定してみると、当該補体タンパク質の機能不全であり、タンパク質濃度の低下が顕著でないことが報告された。これらの疾患では、補体制御因子の量的な測定よりは、補体制御系の機能不全でおこる補体活性化に付随した、補体活性化分解物の検査が理に適っていると考えられる。特に、aHUS では、第 2 経路の活性化分解物 Bb (Ba) や、Terminal complement complex (TCC) 形成を示唆する sC5b-9, C5a などが有用であるとする検査結果が報告されている^{12, 13)}。また、補体制御系因子 (CFH や MCP) に対する自己抗体が高値になると、抗体により補体制御系の機能が抑制され、補体活性化が亢進する可能性がある¹⁴⁾。aHUS では、これら制御因子の自己抗体値が低下すると疾患の病状が軽快する報告もあり、これら自己抗体の定量検査も重要な検査項目とみなされるようになっている。

従来から、日本人における補体因子については、特に補体後期成分 (C7-9) の欠損症や特徴的な MBL の遺伝子多型が報告されている^{15, 16)}。このように、欧米人とアジア人は補体因子の血中濃度や補体活性化のレベルが一部で異なることが予想される。そこで、日本における世界標準の補体検査の必要性が出てくる。世界標準の補体検査のなかで、今回は、重

要な 10 項目について日本人における一次基準値 (70 名) を策定した。現在 70 名での基準値であるが、例数が多いとさらに、基準値の値が正確なものになると考えられるので、今後さらに人数を増やした基準値を策定することを計画している。従来健常人においては、通常の C3, C4, CH50 については、性別、年齢などの影響はあまり受けないと考えられているが、妊娠などは、斎藤らによると補体因子の上昇を認めた報告がある¹⁷⁾。妊娠に関しても、世界標準の補体検査の項目について、基準値の策定をすることが、妊娠に関与する補体関連疾患の評価の際には必要になると考えられる。

補体検査については、一般の血液検査とは異なり、その輸送・管理が非常に重要である。通常、補体検査用の血液は、できる限り速やかに血漿に分離後凍結し、ドライアイスでの輸送が求められる。つまり、補体は常温では速やかに活性化する可能性があるため、特に補体活性化分解物の測定では、その検査値については血漿分離までの時間や温度条件、さらに輸送に注意が必要であることが推測できる。Zhang らは、aHUS や C3 腎症の補体検査に対して、血液検体の輸送条件に補体因子定量や補体検査がどのくらい影響を受けるのか、前向き試験を全米で行った¹⁸⁾。その結果、C3, C4, C5, CFB, CFH, CFI, プロパーゼンは、輸送に関して比較的安定であるが、CH50 では 5% 程度の低下がおこり、補体活性化分解物については、Ba は 10% 程度増加がおこり、sC5b-9 や C3c に関しては 50% 程度の増加が認められたことを報告している。日本は、商品の輸送や医療検査試料等の輸送に関しても、その確実さと安定性では、世界で高い信頼を得ている。しかしながら、補体検査、とくに、補体活性化分解物等の測定値においては、Smith らの研究結果と本論文の基準値を踏まえて、一定の配慮をもって評価することが重要であると考えている。このような補体検査の脆弱性を考慮して、各国では血液サンプルをそれぞれの国や地域のセンターラボへ、最大限の慎重さをもって輸送し、

集中的な補体検査体制を組むことが行われている¹⁹⁾。しかし、このような検査管理体制にも大きな欠陥が見逃されている。現在ほとんどの検査ラボでは、 -80°C の超低温冷凍庫が整備され、血漿についても本冷凍庫で保存されている。しかし、Morgan らによると、 -80°C の超低温冷凍庫では、血漿に関して6 - 10 年間の保存は、血液の補体活性化の制御に問題があると報告している²⁰⁾。日本補体学会でも、長時間の -80°C の超低温冷凍庫での血漿保存に関し、補体活性化レベルとその安定性について今後検証する必要性を感じている。

近年、新規の補体検査の必要性が高まり、ICSでは、補体検査の標準化会議 External Meeting on Standardization of Complement Measurementsを毎年の国際補体会議の際に開催している。2015年の本会議では、2010年から始まった外部精度評価(External Quality Assessment: EQA) 1~5からの教訓とEQA5の成果が示された¹⁴⁾。EQA6/2016からは、各国の参加者がINSTAND社に検査項目を登録し、ブラインドサンプルが参加者へ送付され、測定値を報告する方法で行われている。それぞれの検査に対しての測定値が、主催者側の基準値の範囲内に収まっていた場合、その評価系が、ある一定期間(12か月または24か月)妥当性があるとする証明書(Certificate)が発行される。各国の補体検査の地域センターラボは、本EQAに参加し毎年その精度管理を行っている。日本補体学会センターラボも2016年から、本論文の10項目を含む補体検査系について、毎年EQAに参加し証明書を受けている。今後は、さらに、10項目以外の補体検査について、順次基準値を策定し、公開することを計画している(<http://square.umin.ac.jp/compl/compl-examination/>)⁸⁾。ぜひ、補体検査に携わる医療関係の皆様には、本基準値を含めて、補体学会の基準値やその他の情報を参考に、補体検査値を評価していただくことを期待する。

[謝辞]

本研究に対して、補体検査の意義、基準値の作り方、補体検査のシステム構築に有益な助言をいただいた、北村肇氏、伊藤喜久氏、和田道彦氏に感謝いたします。本研究は、日本補体学会の委託研究費(アレクシオンファーマ合同会社及びCSLベーリング社)、文部科学省科学研究補助金(大谷克城: 17K08615, 若宮伸隆: 17H04108)、喫煙科学研究財団助成金により行われました。

[利益相反]

本研究に関わる著者のCOI開示を以下に行う。若宮伸隆 講演謝礼(アレクシオンファーマ合同会社、武田薬品工業株式会社)

[文献]

- 1) 大谷克城. 第3編 感染防御と免疫, 2. 自然免疫. 小熊恵二、堀田博、若宮伸隆編集. シンプル微生物学 改訂第5版. 東京: 南江堂, 92-98 (2018)
- 2) 北村 肇. 第3章 補体制御因子, 第4章 補体レセプター. 補体学入門: 東京学際企画, 45-58 (2010)
- 3) 大谷克城、井上徳光、若宮伸隆. 補体関連検査とその考え方. 腎と透析 83(4): 538-543 (2017)
- 4) 北村 肇. 第11章 補体測定法の種類と意義. 補体学入門. 東京: 学際企画, 146-157 (2010)
- 5) 井上徳光. 補体の病気と検査. FOCUS「補体」シリーズ: 日本補体学会, 40-44 (2018)
- 6) Kavanagh D, Goodship TH, Richards A. Atypical hemolytic uremic syndrome. *Semin Nephrol*. 33(6): 508-530 (2013)
- 7) Gower RG, Busse PJ, Aygören-Pürsün E, Barakat AJ, Caballero T, Davis-Lorton M, Farkas H, Hurewitz DS, Jacobs JS, Johnston DT, Lumry W, Maurer M. Hereditary angioedema caused by c1-esterase inhibitor deficiency: a literature-based analysis and

- clinical commentary on prophylaxis treatment strategies. *World Allergy Organ J.* 4(2 Suppl): S9-S21 (2011)
- 8) 日本補体学会の検査 : <http://square.umin.ac.jp/compl/compl-examination/>
 - 9) 北村肇. 日常の臨床で補体異常をみつけたらどうしたらよいか. 補体学への招待: 補体研究会, 69-79 (2002)
 - 10) 北野悦子, 内堀恵美, 北村肇, 畑中美千代. 神戸常磐大学で測定依頼を受けた各種補体異常について. 補体 51: 4-12 (2014)
 - 11) 関根英治, 大森智子, 町田豪. 補体異常値を示す疾患とそのメカニズム. 補体 52: 14-26 (2015)
 - 12) Cataland SR, Holers VM, Geyer S, Yang S, Wu HM. Biomarkers of terminal complement activation confirm the diagnosis of aHUS and differentiate aHUS from TTP. *Blood* 123(24): 3733-3738 (2014)
 - 13) Cofield R, Kukreja A, Bedard K, Yan Y, Mickle AP, Ogawa M, Bedrosian CL, Faas SJ. Eculizumab reduces complement activation, inflammation, endothelial damage, thrombosis, and renal injury markers in aHUS. *Blood* 125(21): 3253-3262 (2015)
 - 14) Prohászka Z, Nilsson B, Frazer-Abel A, Kirschfink M. Complement analysis 2016: Clinical indications, laboratory diagnostics and quality control. *Immunobiology.* 221(11): 1247-1258 (2016)
 - 15) Inai S, Kitamura H, Hiramatsu S, Nagaki K. Deficiency of the ninth component of complement in man. *J Clin Lab Immunol.* 2(1): 85-87 (1979)
 - 16) 芥子 宏行, 大谷 克城, 坂本 隆志, 岸 雄一郎, 荒木 宏昌, 鈴木 定彦, 若宮 伸隆. 日本人における MBL (mannan-binding lectin) 遺伝子変異と血中濃度の検討. 医学の歩み 194: 957-958 (2000)
 - 17) 斎藤 滋, 中西 彰, 一条 元彦. 正常妊娠及び流産における補体系及び血中免疫複合体の変動. 日本産科婦人科学会雑誌(0300-9165) 35(11): 1981-1990 (1983)
 - 18) Zhang Y, May KS, Shao D, Keenan A, Nester CM, Smith RJH. Recommendations on biomarker analysis for alternative pathway-mediated renal diseases. XXVIth Int. Complement Workshop, late breaking abstracts 51 (2016)
 - 19) Prohászka Z, Kirschfink M, Frazer-Abel A. Complement analysis in the era of targeted therapeutics. *Mol Immunol.* 102: 84-88 (2018)
 - 20) Morgan AR, O'Hagan C, Touchard S, Lovestone S, Morgan BP. Effects of freezer storage time on levels of complement biomarkers. *BMC Res Notes.* 10(1): 559 (2017)

The analysis of complement factors and activation markers in normal Japanese individuals

Katsuki Ohtani, Norimitsu Inoue, Yoshihiko Hidaka, Nobutaka Wakamiya

The Japanese Complement Research Association has resolved in 2014 to establish comprehensive registration and treatment guidelines for complement-related diseases by constructing several new complement examinations, and is working to build complement examinations and to build a registry for complement-related diseases. As the first step of this complement examination, in this paper, the examination system of 10 items (①Function analysis: CH50, ②Complement factors: C3, C4, ③Complement regulators: CFH, CFI, C1-inhibitor (activity), ④Activation products: Ba, sC5b-9, C5a, ⑤Anti-CFH IgG) has been constructed and we report to create the reference values for an individual complement analysis system.

Key words: complement factor, complement system, complement related-diseases, complement examinations