

Proceedings of the Complement Symposium
Vol. 13. 1976 (Tokyo)

第13回 補体シンポジウム

講演集

日時：自 昭和51年9月17日(金)14:00
至 昭和51年9月18日(土)20:30まで

場所：東京都文京区本駒込3-18-12
東京都臨床医学総会研究所

Tel.(03)823-2101

目 次

| |
|---|
| 1. DNCB皮膚炎の炎症局症局内にみられる好中球遊走因子 並びにその阻害因子……………馬場 徹 他………… 1 |
| 2. 乾癬鱗屑中に認められた白血球遊走因子……………田上 八朗 他………… 4 |
| 3. 腎移植後における尿中補体蛋白の変動について……………大久保充人 他………… 7 |
| 4. 慢性糸球体腎炎におけるIgAと補体成分の腎組織沈着について……………阿部理一郎 他………… 9 |
| 5. 人工透析による補体系の変動……………平野 尚 他…………11 |
| 6. 肝・胆道系疾患における手術前・手術後の補体価の変動について……………高岡 哲郎 他…………13 |
| 7. 肝疾患における血清C1q蛋白量について……………荒木 清典 他…………15 |
| 8. 慢性関節リウマチの金療法による血清補体化の変化 (とくに β 1C/1A、 β 1E-globulinについて)……………平松 誠一 他…………18 |
| 9. 甲状腺疾患における血清補体価の動態について……………藤原 博 他…………20 |
| 10. 妊娠性疱疹の免疫学的研究……………斉藤 一夫 他…………23 |
| 11. 健康高齢者の血清補体成分について……………鶴見 信男 他…………25 |
| 12. 健康人のツ反応とCH ₅₀ に関する6期分類 (加齢にともなう変化)……………小暮美津子 他…………27 |
| 13. 血清補体価と動脈硬化性因子との関係……………里和スミエ 他…………29 |
| 14. 癌患者におけるツ反応とCH ₅₀ を指標とした6期分類の臨床的意義……………河村 一太 他…………32 |
| 15. 頭頸部悪性腫瘍と血清補体価 (ツ反応と補体による6期分類からみた検討)……………浅岡 一之 他…………35 |
| 16. Alternative Pathwayの測定・続報……………宮島 啓人 他…………37 |
| 17. 環元アルキル化IgGのAlternative Pathway 活性化能の検定……………谷本 潔昭 他…………39 |
| 18. グルカンによるAlternative Pathway 活性化の機作……………稲井 真弥 他…………40 |
| 19. Alternative Pathwayの不活化物質(INA)……………永木 和義 他…………43 |
| 20. Properdin系のsolid phase及びfluid phaseにおける作用機序 (I) EAC43 cell表面上及びfluid phaseでのProperdinの役割 ……………今野 孝彦 他…………46 |

| | |
|---|------------|
| 21. Properdin 系の solid phase 及び fluid phase に於ける作用機序 | |
| (II) Rabbit 及び Sheep erythrocytes 上に形成される Properdin dependent C3 convertase について | 今野孝彦 他 48 |
| 22. Alternative Pathway による補体系の活性の測定 | |
| (ウサギ血球の溶血反応) | 中山秀英 他 50 |
| 23. モルモット赤血球 (g. p. E.) のプロパジン系を介した溶血について | 行山 康 他 52 |
| 24. CVF- \bar{B} および C5-C9 によるゲル内殺菌反応 | 深山昭雄 55 |
| 25. 血漿と血清補体の解離における Vitamin E の意義 | 近藤元治 他 57 |
| 26. 血清と血漿の補体価の解離における一考察 | 天野哲基 他 60 |
| 27. ヒト補体第 1 成分 C 1 の活性化機構 | 高橋和彦 他 62 |
| 28. C 1 分子内活性化に関する研究 (3) | |
| (C1s activator 特異抗血清の作成、抗 C1r との identity) | 安田正之 他 65 |
| 29. 癌患者血清中の腫瘍特異抗体検出法の改良 | 岡田秀親 他 67 |
| 30. 抗補体活性の研究 | |
| (モデル実験における補体前結合の影響) | 森藤隆夫 他 73 |
| 31. 抗原抗体結合物による補体の活性化について | 藤田禎三 他 73 |
| 32. S-スルホ化 γ -グロブリンの補体結合性 | 福元裕二 他 75 |
| 33. IgE ミエローマ蛋白の補体結合性 | 飯田恭子 他 78 |
| 34. E. coli K-12由来の補体抵抗性変異株について | 秋山曜子 他 81 |
| 35. E. coli の補体感受性と菌体表層脂質の組成について | 岡田真理子 他 84 |
| 36. ヒト赤血球の補体レセプターの単離と性状 | 奥田智子 他 87 |
| 37. 補体による溶血反応に伴う血球膜の構造変化 | 中村真知子 他 90 |
| 38. 細菌細胞壁による補体系活性化について | 稲井真弥 他 93 |

DNCB 皮膚炎の炎症局所における 好中球遊走因子とその阻害因子について。

馬場徹 田崎加代子 (聖マリアンナ医科大学皮膚科)

園崎秀吉 (東大整形外科) 鳥巢要道 (九大第一外科)

INTRODUCTION

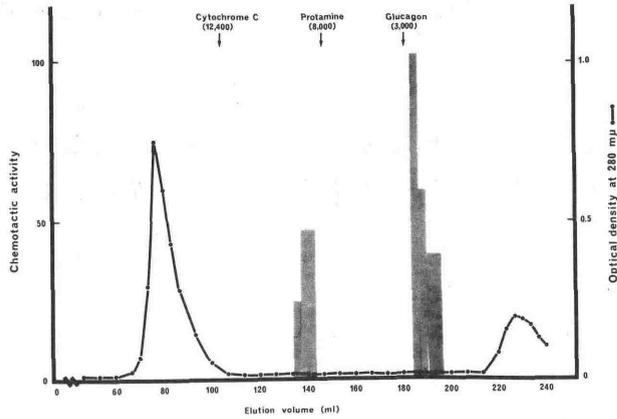
炎症の場^にに多核白血球が集積してくることは、古くよりよく知られた事実であり、急性炎症の主要な徴候として広く認められている。この多核白血球が、いかなる機序により炎症の局所へ集まってくるのかは、長らく不明のままであったが、1962年、*invitro* で白血球の遊走を観察する Boyden 法の開発以来、白血球を呼び寄せ^るものが化学物質としてとらえられるようになり、多核白血球遊走因子として、多くの物質が報告された。炎症局所における多核白血球動態の解明は飛躍的に発展した。しかしながら、白血球、chemotactic factor、およびそれを制御するであろう阻害因子については、今なお不明な事が多く動的な解析が得られるところである。

我々はモルモット皮膚に4%のDNCBを塗布してDNCB皮膚炎を惹起させ、経時的に皮膚を切り取り組織片より抽出物と^{して}、この抽出物に存在する好中球遊走因子およびその阻害因子を測定し炎症局所における白血球、遊走因子、阻害因子の機能を解析する事を試みた。

RESULTS

1) 20匹のモルモット背中に4% DNCB Acetonを塗布し経時的に1cm²の皮膚を切りとり、皮膚抽出液の白血球遊走因子を測定したところ、好中球遊走因子の活性は、6時間目より強くなり、12時間、24時間と増加し、48時間目には下降し、72時間では数を減じ96時間ではほとんど消滅する。

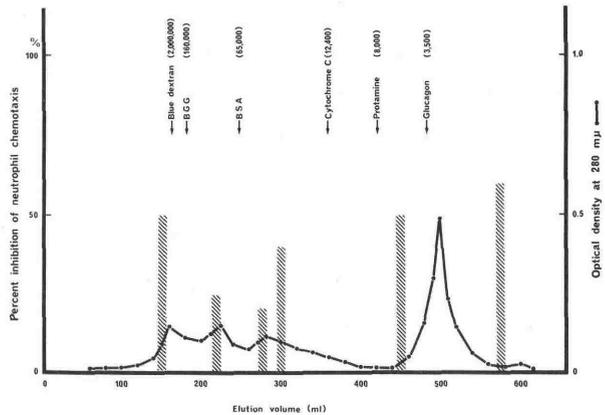
2) 好中球遊走活性の強い抽出液を Sephadex G50 フロストグラフィーにより分画したところ Fig 1 に示すようにニつのピークが存在する事がわかった。この両方の分画は56℃30分の加熱に安定で分子の大きさからC3分解産物とよく似ている。



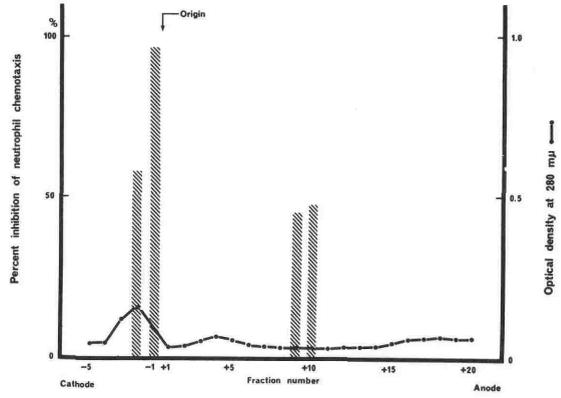
3) これらの所分画の性格を明らかにすべく Anti-C3で好中球遊走活性が抑制されるかを見たところ最初のピークが54.9% 後のピークが57.4%の阻害を行った。

4) 好中球遊走因子が炎症局所に2-24時間をピークに消褪してくる原因をさがすべく阻害因子の測定を行なった。その結果DNCBを塗布後48時間後の皮膚抽出液に阻害活性の強い事がわかった。尚この物質は56℃30分の加熱により活性を失うものである。

5) 阻害因子をSephadex 100にかけたところ種々の大きさの活性のが出現しFig2の如く出現し heterogeneity が存在するようである。



b) この因子を更に pevikon
 electro phoresis にかける
 と Fig 3 のようになった。



乾癬鱗屑中に認められた白血球

游走因子 田上八朗, 太藤重夫 (京都大学)

医学部 皮膚科教室)

乾癬は本邦においても近年急速に患者数を増しつつある慢性の鱗屑性紅斑を生ずる皮膚疾患である。しかし、その発症機序は未だ不明である。この病変部の病理組織学的特徴の一つとして、拡張した真皮乳頭の毛細血管から表皮内には、更に角層に向って白血球が游走する像が挙げられる。

Pinkus は squinting papillae と云う表現を用い、これが極めて特徴的の像であることを強調している¹⁾。特に急性増悪期、あるいは滲出性変化の強いものでは、好中球の游走が顕著で、角層の下に小膿疱を形成し、Kogoj's spongiform microabscess と名付けられる像を呈するに到る。従って、乾癬病変部角層に白血球游走を惹起する chemical mediator が存在することか想定されるわけである。

しかし、この現象に関しては 1966 年 Langhof & Müller²⁾ が乾癬鱗屑の homogenate が白血球游走活性を有することと報告している他、何の研究も行われてこなかった。我々は、乾癬鱗屑が他の角層と比較し、どのような白血球游走活性を示すかを検討し、更にその游走活性成分の分析を行った。

方法 正常角層としては callus, clavus と正常人及び患者より集めた。また炎症部位鱗屑の対照として非乾癬性紅皮症の鱗屑と、乾癬鱗屑として、尋常性乾癬、膿疱性乾癬の未治療部病変部より鱗屑を採取した。これらを生食あるいは pH 7.2 リン酸緩衝液加生食に懸濁させ homogenate を作製し、可溶性成分の抽出を行った。

(人間末梢血より) dextran 分離法により得た白血球、あるいは海狸に、0.2% glycogen 液と腹腔注射して 3 時間後に得た滲出液中の好中球より、0.5% 牛血清 albumin 加 Hanks 液に 2×10^6 cell/ml になるよう悬浮液を作製した。

Boyden 装置により細胞悬浮液側より 3 micron の pore size の Millipore filter を通過して試験液本体側の面で到達した細胞数を 10 視野で算定し、平均値をもつてその試験液の游走活性とした。

Sephadex G-200 及び Sephadex G-75 の molecular sieve chromatography

により、各角層抽出液に含まれる白血球遊走因子の分析を行な。

成績 尋常性乾癬の鱗屑、紅皮症の鱗屑および callus の抽出液と同様の方法で作製し、その 1:1000 (w/v) の抽出液の白血球遊走活性を同時に測定し比較すると図1の如くであり、乾癬鱗屑抽出液が極めて強い白血球遊走因子を含んでいることが確かめられた。図の如く、活性は透析(透析)と大きく失われるが、56°C、30分内の加熱あるいはその pH 5.4 を中和して失われず、また 50% 硫酸飽和で沈降しない点により、比較的小さい活性物質の存在によることかうかわれた。

更に Sephadex G-200 の molecular sieve chromatography を行うと分子量のマーカーである cytochrome c と一致する分画に極めて強い活性が認められた。Sephadex G-75 で更に分析してみると同様の領域に強い活性を認め(図2)、これは更に白血球遊走が顕著に認められる膿疱性乾癬の鱗屑でも全く同じ結果を得た。

炎症皮膚鱗屑中には多数の細菌の繁殖があり、血清成分も滲出して混入しているため、鱗屑より分離した細菌の培養液、患者血清についても、同様の molecular sieve chromatography による検討を行って見たが、いずれも cytochrome c marker に一致する強い活性は見られず、これは細菌由来、血清由来の chemotactic factor の混入による可能性は否定された。また、灯照の紅皮症の鱗屑抽出液を分析してみたが、乾癬のそれに見られたような極めて強い活性の cytochrome c marker の領域に証明されなかった。従って、この活性は乾癬鱗屑に特有のものであると考えられた。この活性物質は、56°C 30分内の加熱に耐えるか trypsin により分解されてしまう。また、動物、人間の皮内に注射すると好中球の強い浸潤を惹起することか確かめられ、生体内においても活性を呈することか分った。

Comparison of leukotactic activity of various horny tissues.

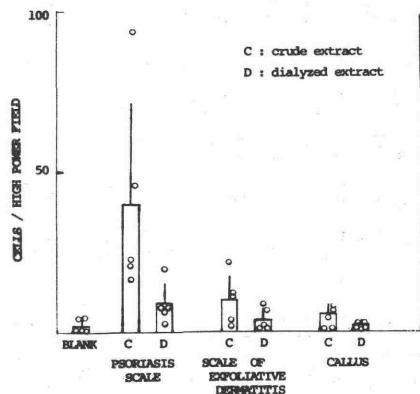
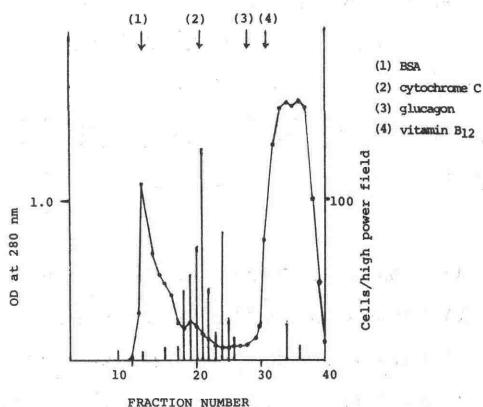


Fig. 2. Sephadex G-75 chromatography



既知の白血球遊走因子としてこのような活性の態度を示すものとしては、 C_3 , C_5 由来の chemotactic factor^{3), 4)} が知られている。そこで、この鱗屑可溶性成分を濃縮したものについて、抗 C_3 , 抗 C_5 血清と Ouchterlony 法により沈降反応を行わせてみた。膿疱性乾癬の鱗屑抽出液ならびに、そのうちで cytochrome c と同じ領域の分画は、抗 C_3 血清との内に沈降線を生じた。即ちこの活性を有する分画には C_3 由来の fragment が存在していることが証明された⁵⁾

また抗 C_3 血清, 抗 C_5 血清を加えることで、活性分画の白血球遊走活性を抑制できることを認められた。

結論 乾癬病巣において白血球が角層に向けて遊走する現象は、乾癬鱗屑中に極めて強い白血球遊走活性があるために生ずると考えられる。これは乾癬鱗屑に特有のもので、外すには内よりの chemotactic factor の混入によるものではない。

最近 Beutner et al⁶⁾, Jablonska et al⁷⁾ により乾癬鱗屑中に、IgG, C_3 の沈着が認められ、これが乾癬の発症に大きな役割を果していることが示唆されているが、我々はこの鱗屑中に補体由来の活性物質を認められたことは、乾癬に自己免疫現象が関与し、更にそれがこの特有の病像の発起に作用していることを示唆する点で極めて興味ある所見と考えられる。

1) Pinkus H, Meehregan AH : J Invest Dermatol 46:109, 1966.

2) Langhof H, Müller H: Hautarzt 17:101, 1966.

3) Ward PA: J Exp Med 126:189, 1967

4) Ward PA, Newman LJ: J Immunol 102:93, 1969

5) Bokish VA, Müller-Eberhard HJ, Cochrane, CG: J Exp Med 129:1109, 1969.

6) Beutner EH, Jablonska S, Jarzabek-Chrzelska M et al: Internat Arch Allergy appl Immunol 48:301, 1975.

7) Jablonska S, Chorzelski TP, Farzabek-Chorzelska M et al: Internat Arch Allergy appl Immunol 48:324, 1975.

腎移植後における尿中補体蛋白の変動について

北里大学医学部

内科 大久保充人

臓器移植科 大久保みどり, 柏木登

[目的] 腎移植後に見られる急性拒否反応に際しては、その病因に細胞性免疫が主役を占めていゝと考へられるが、これに引き続いて当然液性免疫の動員も起さるものと想定される。液性免疫反応の effector phase において補体が、plasmin系と並んで大きな役割を占めていゝのは周知の事である。

腎移植後の補体価の変動に關して、我々は血清レベルでの動向を検討した結果、拒否反応に一致した動きを認めてお8回補体シンポジウムで既に報告してゐる。しかし拒否反応の本態が細胞性免疫で、腎を中心に行われる反応である点を考へると、腎局所での動向が必ずしも早期にしかも充分に流血中へ反映されるとは考へ難い。又、補体の血清レベルは、産生、消費、及び体内分布のバランスを示すものであり、腎移植の際にこれらに影響を及ぼす因子として、手術、薬剤、透析、感染疾患を充分考慮に入らる必要がある。従つて、今回は腎レベルでの反応をより忠実に反映するであらうと思はれる尿中補体の動向を検討した。

[対象及び方法] 対象は昭和50年9月から昭和51年4月の間に北里大学において腎移植手術を受けた慢性腎不全患者25名である。その内訳は生体腎移植20例、死体腎移植5例である。対照として生体腎移植のドナー20名及びネフローゼ候群2名、SLE解症1名を用いた。これら患者及び対照群より、患者に關しては腎移植手術の2週間前より遠投送、対照群に關しては、ドナーは入院より解摘送、各毎日早朝第一尿を採尿し、直ちに -20°C に凍結保存した。

これらの尿を融解後、一昼夜流水にて氷室で透析、次にPEG 6,000にて約1/10に濃縮し、総蛋白、IgG、 $\beta_{2}\text{M}$ -globulin 及び β_{1E} -globulin の測定を行った。総蛋白はアタゴ屈折管にて、IgG、 $\beta_{2}\text{M}$ 、 β_{1E} は Hyland 社 Immunoplate を使用して、radial immun-diffusion法にて測定した。

[成績] 対照群では、リポイト・ネフローゼ、SLE解症も含めていゝものを $\beta_{2}\text{M}$ -globulin、 β_{1E} -globulin 共に尿中排泄を認めなかった。

移植患者では、移植前血液透析中には自己尿よりの尿中に $\beta_{2}\text{M}$ 、 β_{1E} が出現する例と常に陽性の例とがあり、全体として成りの変動を平めした。移植後は直後の利尿期に一致して陰性化するものが多かった。しかし術後数日目に accelerated rejection の形を取った3例では、いゝものを $\beta_{2}\text{M}$ 、

β₂E の尿中排出が持続し、腎機能が廃絶して血中透析に及びてきた。その他の症例では、拒否反応の認められなかった症例では、その後も引き続き尿中補体蛋白陰性であることが大部分であった。一方、腎移植後の尿中β₂Eは acute rejection を来した症例では、臨時的な rejection の判定時期又はその数日前より β₂C/1A-globulin が陽性となり、その後 anti-rejection therapy による腎機能の改善の時期に一致して、再び陰性化する例が多かった。尚、一部の症例で rejection が遷延した経過を取ったものでは、その間 β₂C/1A の尿中排泄も続行した。β₂E に関しては、β₂C/1A に p > 透過して陽性化する例及び拒否反応の全経過を通じて陽性化しないものがあった。

[考察] 腎移植の際の補体の動きに因しては、Boston 及び Denver からの報告がある。Carpester は、血中 β₂C/1A globulin を測定して、rejection に一致する上昇、次に一旦低下が起ると報告している。Lavigne は rejection の際に血中 CH₅₀ の低下を、Yokoyama, Torisu は CH₅₀, 1A₅₀, C4, C3 等の低下を認めている。一方尿中への補体の排泄に因しては、Hog さんが10名の腎移植患者に因して β₂C の動きを述べ、拒否反応に一致して β₂C の排泄増加を認めたと報告している。彼は同時に増強性糸球体腎炎の症例でも β₂C を測定し、疾病の活動期に β₂C の尿中への排泄増加を認め、これはその後治療により減少したという。彼の症例では、対照として用いたリボリド-ネフローゼの2例及び SLE 患者でネフローゼ症候群を伴った1例ではいずれも尿中総蛋白の多寡、IgG 排泄の有無に因かわらず、β₂C/1A, β₂E-globulin の尿中排泄は全観察期間を通じて認められなかった。少数例でもあり、Hog さんの症例とは疾患の相違もあるので、今後の検討が必要と思われた。次に彼の症例で、移植前に自己腎よりの尿中に β₂C/1A, β₂E の排泄が認められたが、その機序に因しては不明である。恐らく Hog さんの腎炎での β₂C 尿中排泄の延長線に因するものかも知れない。

腎移植後の動きは、拒否反応、腎機能の動向とよく相因していると思われ、拒否反応の補助診断法として有用であろう。

[結論] 腎移植患者25名について、腎移植前より遠隔迄毎日尿中 β₂C/1A, β₂E-globulin の動きを追求した結果、①移植前に、自己腎よりの尿中に β₂C/1A, β₂E-globulin の排泄を認めることが多かった。排泄量は大きく変動した。②移植後は、臨時的拒否反応に先立ち、尿中 β₂C/1A, 一部症例では更に β₂E の排泄を認めた。その後の尿中排出の動向は、拒否反応の経過とよく一致し、治療により rejection の抑へられた症例では、消失、rejection が遷延した経過を辿った症例ではその間尿中への補体蛋白の排出も持続した。

慢性糸球体腎炎における IgA と補体成分の腎組織沈着について

日大波多野内科

阿部理一郎, 大井洋之, 波多野道信

目的: 1969年, Berger は mesangium に IgG, C3 とともに IgA が沈着している慢性糸球体腎炎が血尿を主体とし, 腎機能がよい疾患として報告した。その後この疾患は "mesangial IgA deposits glomerulonephritis" "IgA glomerulonephritis" "IgA Nephropathy" などと呼ばれ, 慢性に経過する一般に予後がよい腎炎として注目を集めてきた。また補体系に關しては properdin が高率に沈着することより alternative pathway の関与が示唆されている。そこで我々は慢性糸球体腎炎と診断されたもののうち蛍光抗体法析見で IgA のみ染色され, 他の免疫グロブリンの沈着を殆んど認めない症例を選り補体成分の沈着について検討し腎組織における IgA と補体について推察した。

方法: 対象は慢性糸球体腎炎50例で全例に腎生検を施行し, えられた検体は直ちに凍結され -70°C に保存した。蛍光抗体法は厚さ約4μの凍結切片を作製し, Hyland 社製抗人 IgG, IgM, IgA, IgE, Fibrinogen, β₂C 血清を FITC で標識し直接法で, Behringwerke 社製抗人 C₁q, C₄, C₃, C₃a, C₅, C₉, C₃a 血清を間接法で, また抗人 properdin 血清は北太才 1 生化学今野彦彦氏作製のものを用い直接法で観察した。

成績: 慢性糸球体腎炎50例中6例に他の免疫グロブリンの沈着を殆んど認めず, IgA のみ diffuse に沈着を認めた (表1)。IgA の沈着は全例 mesangium に一致して認められた。補体成分では C₁q, C₄ は2例に, C₃, C₉, properdin は全例に沈着を認めた。これらの補体成分は IgA とほぼ同様に mesangium に認められた。しかし C₃a, C₅, C₃a の沈着は全例に認められなかった。また50例の慢性糸球体腎炎のうち C₁q, C₄ が陰性で C₃, C₉, properdin の沈着を認めた症例は今回選ばれた4症例のみであった。

考按: 慢性糸球体腎炎における腎組織の IgA と補体の関与を解明する為に IgA のみ diffuse に沈着を認めた症例を検討した。これらの症例は他の諸報の報告と一致して mesangium に沈着を認めた。補体成分の検討では全例 properdin の沈着を認め, これらは early component の沈着を認めるものと認めないものとはあった。このことより次のことが注目される。即ち腎組織の IgA が必ずしも alternative pathway のみでなく classical pathway も作動させる可能性のあること, また他の免疫グロブリンの沈着を呈する慢

性糸球体腎炎に比較して高率に properdin の沈着を認めたことである。しかし properdin の沈着を認めるにも拘らず C₃PA, C_{3a}, C₅ は全例に認められなかった。これらの成分は慢性糸球体腎炎全例において C_{3a}, C₅ 各 7%, C₃PA 10% と沈着性は低率であり、抗血清の力価の問題も含めて今後検討を要すると思われた。また 50 例中 1 例に表 2 の如く免疫グロブリンの沈着を全く認めず、C₃, C₉, properdin の diffuse な沈着を認めた症例もあり、免疫グロブリンとは別の補体活性因子の出現も示唆された。

- 結論：① 慢性糸球体腎炎 50 例中 6 例に Ig A のみ diffuse に沈着された。
 ② 補体成分の沈着では alternative, classical pathway の両方が推察された。③ これら Ig A, 補体成分の沈着は主に mesangium に認められた。

表 1) Ig A の diffuse な沈着を認めた症例

| | IgG | IgM | IgA | IgE | Fib. | C _{1q} | C ₄ | C ₃ | C _{3a} | C ₅ | C ₉ | C ₃ PA | P |
|--------|-----|-----|-----|-----|------|-----------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|-------------------|---|
| ① N.S. | - | (+) | ++ | - | ± | - | - | ++ | - | - | + | - | + |
| ② T.K. | - | - | ++ | - | - | - | - | ++ | - | - | ++ | - | + |
| ③ D.K. | (±) | - | ++ | - | + | - | - | ++ | - | - | ++ | - | + |
| ④ M.G. | - | - | ++ | - | - | - | - | ++ | - | - | ++ | - | + |
| ⑤ S.K. | - | ± | ++ | - | - | + | + | ++ | - | - | ++ | - | + |
| ⑥ T.S. | ± | - | ++ | - | + | + | + | ++ | - | - | + | - | + |

() = local

表 2) 直接法で β₂C のみ diffuse な沈着を認めた症例

| | IgG | IgM | IgA | IgE | Fib. | C _{1q} | C ₄ | C ₃ | C _{3a} | C ₅ | C ₉ | C ₃ PA | P |
|--------|-----|-----|-----|-----|------|-----------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|-------------------|----|
| ① T.N. | - | - | - | - | - | - | (+) | ++ | - | (+) | ++ | (+) | ++ |

() = local

人工透析による補体系の変動

阪大第1内科 平野 尚、折田 義正、安東 明夫
上田 尚彦、藤原 芳廣、阿部 裕
大阪府立成人病センター
稲井 真弥、平松 誠一

【目的】 最近腎疾患の発症・進展過程における補体系の関与が注目されている。しかし現在腎疾患の最終段階である透析患者に対する補体系の検討は殆んど見られぬ。我々は才6回日本腎臓学会西部部会において、“透析患者の血清補体価とハハリン・プロタミンの影響”と題して、A) ハハリン 2000u 静注後血清補体価は、低下傾向を示したが、C1~C5、C3活性は殆んど変化は認めなかつた。B) 透析中プロタミン 5mg 投与前後の血清補体価は変化がなかつた。C) 透析により血清補体価は有意にと昇することを報告した。今回、透析前後の血清補体価とC3活性、C4・C3・C5蛋白質量の変動、Total Protein (TP)との相関を検討し、透析の補体系への影響を検討したので報告する。

【方法】 対象は慢性腎炎により透析に移行した透析患者である。

- ① 透析日透析前血清補体価 38例
- ② 透析前(ハハリン)と透析終了後の血清補体価の比較 31例
C3活性・C4・C3・C5蛋白質量・TPの変動 16例
- ③ 透析後補体系の経日変動 3例

尚、患者血清は測定時まで -70°C に保存、血清補体価(CH50)はMayer法にて測定、C3・C4蛋白質量はBehringwerke社製ハルケケルを用い、C5蛋白質量はSRID法にて測定した。測定値は正常人プール血清(NHS)を100%とし、%表示とした。

【成績】

- ① 透析日透析前補体価は、平均89.7%とやや低値を示した。
- ② 透析により補体価は平均前値84.8%に比し、透析後平均98.7%と有意にと昇した。又C4・C3蛋白質量、C3活性、TPは表1のように有意にと昇した。C5蛋白質量は上昇傾向であった。尚、透析前の患者平均体重は 51.0kg で透析後平均 3.0kg の体重減少がおり、使用ハハリン量は、約 2000u である。透析前後の補体価の上昇率とTPの上昇率の相関係数は $r=0.618$ ($p<0.05$)であった。
- ③ 3例での透析後、次の透析に至る経日的な補体価、C3活性、TP

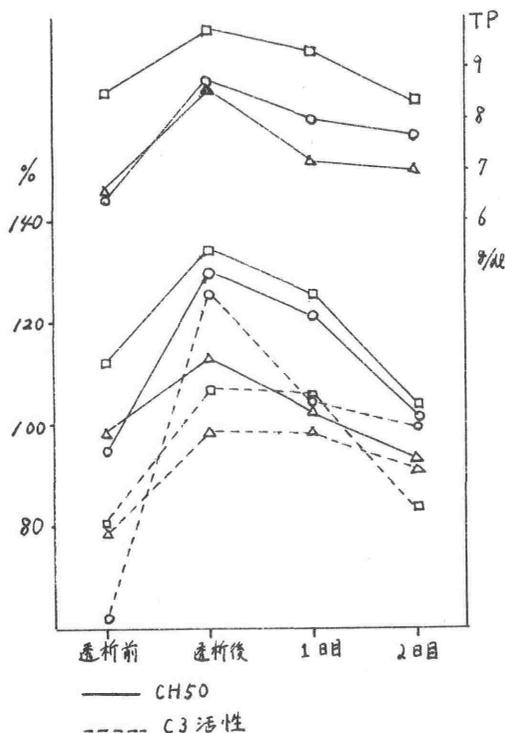
の変動は、図1に示すように透析により上昇した各成分は徐々に減少の傾向が認められる。

[考察と結論] 透析前透析患者の補体価、C3蛋白量、C3活性は、NHSに比し低値を示した。C3活性はC3蛋白量に比し低値を示し、解離が認められた。この原因は明らかでないが、透析患者での補体系の特徴的所見であると思われる。透析により補体価は上昇するが、これは透析によるTPの上昇と相関が認められた。又、経時的観察より透析により上昇した補体価、TP、補体成分は徐々に減少傾向にあった。これより、透析患者の透析による補体系の変動は透析による体液の濃縮と密接に関係していることが判明した。

表 1

| | CH50 | C4 | C3 | C5 | C3活性 | TP |
|------|-------------------|--------------------|------------------|-------|--------------------|---------|
| 透析前 | 84.8 | 131.3 | 85.5 | 102.8 | 72.6 | 7.1g/dl |
| 透析後 | 98.7 | 170.2 | 97.6 | 116.0 | 89.1 | 8.6 |
| 前後比較 | S | S | S | N.S | S | S |
| NHS | 43.4 _u | 29.4 _{mg} | 60 _{mg} | | 26000 _u | |

図 1



肝、胆道系疾患における手術前、手術後の補体価の変動について
名古屋市立大学 第一外科

高岡哲郎、品川長夫、由良二郎、柴田清人

国立がんセンター

岡田秀親

今回、我々は外科的肝胆道系良性疾患（胆石症主体）と、悪性疾患における、免疫能を検索する目的で、血清補体価、 C_3 、 C_4 値、免疫グロブリンを測定したので報告する。また、家兎を用いて肝胆道系腫瘍時における、血清補体価の変動についても若干の検討を加えたので報告する。

血清補体価は、Mayerの方法により CH_{50} を、Single radial immunodiffusion法により C_3 、 C_4 値、免疫グロブリンを測定した。良性疾患および、悪性疾患について術前値を比較してみると、悪性の場合、血清補体価の上昇がみられるようである（Fig 1）。 C_3 値は両者の場合、ほぼ正常範囲内にあるようであり、両者間には特に差が認められなかった。 C_4 値は、良性疾患に比べ、悪性疾患の場合やや高いようであった（Fig 2）。術前、術後を見ると、良性疾患の場合、術後1日目において、血清補体価は低下するものもあれば、上昇するものもあるのになら、悪性疾患の場合、すべて低下し、その低下の割合も大きかった（Fig 3）。

術前、術後の免疫能は、肝障害の程度、手術時間、輸液、輸血などさまざまな因子が関与していると考えられるので一元的に結論を出すことはできないが、胆道系悪性疾患例において、術後の感染性合併症が多いことは、術後の血清補体価の低下と関係があると思われる。

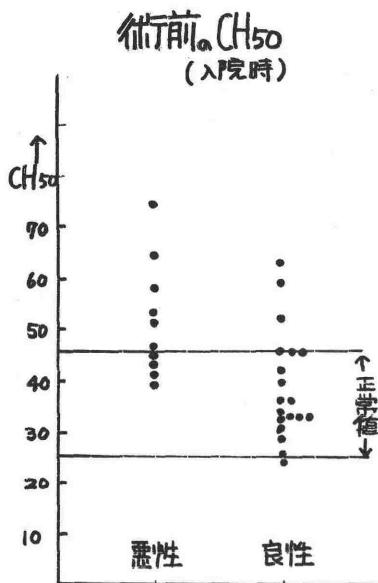


Fig 1

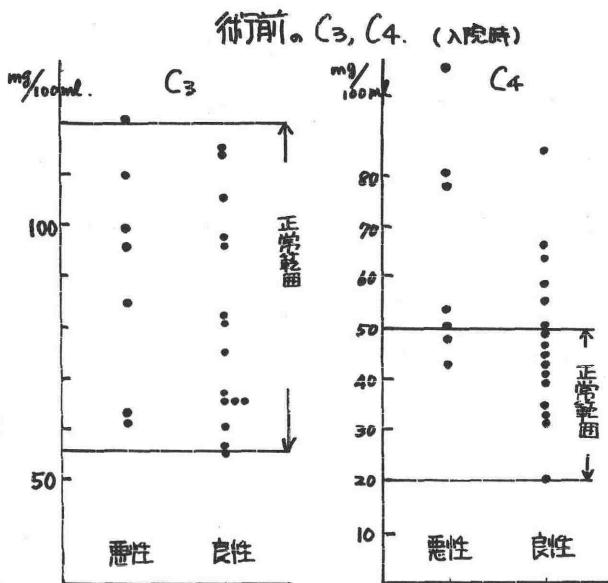


Fig 2

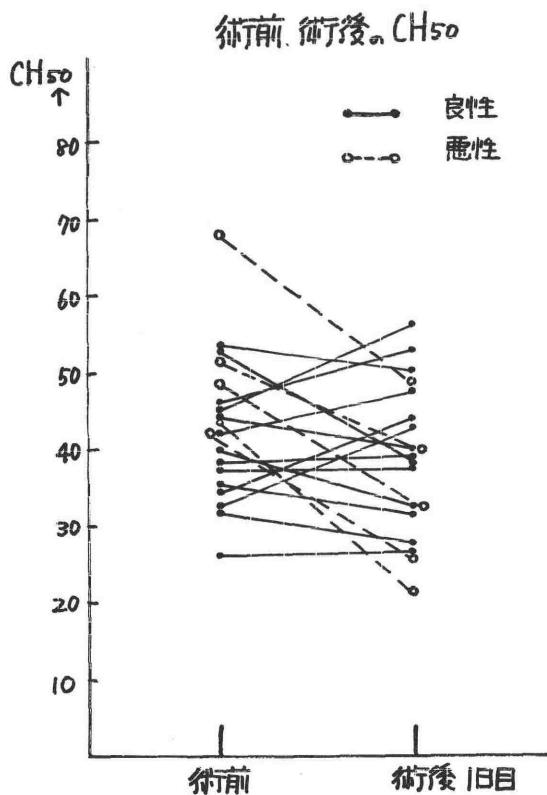


Fig 3.

肝疾患における血清中 C_{19} 値について

荒木清典 辻 孝夫 長島秀夫 岡山大学第一内科

[研究目的]

慢性肝疾患では高 γ グロブリン血症、リウマチ因子や抗ミトコンドリア抗体等が出現するとことから、ウイルス性肝炎の遷延化及至は慢性化に免疫現象が関与している事が考えられる。血清補体の検索も従来このよう下面から血清溶血補体価 CH_{50} 値や C_3 , C_4 蛋白量を中心に行なわれ、報告らもすでに報告してきた。

今回は、このような慢性肝疾患症例について、補体11成分の最初に反応するとされる C_{19} を抗血清を用いる Single Radial Immuno-diffusion 法により測定し、B型肝炎の病因ウイルス関連抗原とされる HB_{s} 抗原との関連を検討し、臨床的意義づけを試みるので、その成績を報告する。

[研究対象と方法]

対象として岡山大学第一内科入院中及至は外来通院中の肝疾患患者46症例と対象者として健常人6名の血清を選んだ。すなわち肝疾患としては HB_{s} 抗原陽性の急性肝炎2例、慢性肝炎15例、肝硬変症4例の計21例と、 HB_{s} 抗原陰性の急性肝炎1例、慢性肝炎6例、肝硬変症15例と、その他の肝疾患3例の計25例の合計46例であった。

方法としては家兔抗ヒト C_{19} 血清(ベリングヘル社)を1%の濃度に1.5%アガロース生食液に溶解し、Single Radial Immuno-plate を作成し、血清中 C_{19} を測定した。なお測定値は Standard として健常人 A, K. 例 (O 型) を多量に採血し 1 cc ずつ分注して $-70^{\circ}C$ に凍結保存したものを溶解して使用し、そのつど、これを 100% としあうわした。また血清溶血補体価 CH_{50} は micro-plate 法で、 C_3 , C_4 は抗 C_3 及び抗 C_4 血清(ベリングヘル社)を用い、同じく自家製 Plate で先の Standard 血清を用いて、同様に % であうわした。

[研究成績]

肝疾患の病型、 CH_{50} と各蛋白量についての関係を C_{19} 値上昇群と下降群に分けてあうわし、さらに以下のような各群に分けた。すなわち C_{19} 上昇群 (A 群) で C_4 , C_3 の変化のない A-(1) 群、 C_4 , C_3 共に低下例 A-(2) 群、 C_4 , C_3 共に上昇例 A-(3) 群、 C_4 値が上昇で C_3 値が低下群 A-(4) 群と、 C_{19} 値低下群 (B 群) で C_4 低下例 B-(1) 群、 C_4 無変化 B-(2) 群、 C_4 値が低下で、 C_3 値が無変化 B-(3) 群、 C_3 が低下で C_4 値が無変化 B-(4) 群に分け、別に C_{19} 値と C_4 値が無変化で C_3 値が上昇した群を C 群に分けた。その成績は表 1, 2, 3, に示すごとく、A-(1) 群は 4 例全例が慢性肝炎で、 HB_{s} 抗原陽性 1 例を除き、3 例が豆小葉病にしかは広範壊死を伴う型であり、2 例が CH_{50} 値が低下していった。A-(2) 群については、

5例あり / 1例を除いて HBs抗原陰性であったが、全例肝硬変症であり、そのうち HBs抗原陽性の1例と HBs抗原陰性の1例は CH₅₀値が著明に低下していた。また HBs抗原陰性例には、ルポイド肝炎の肝硬変1例が含まれていた。次に A-(3)群では3例あり、3例とも HBs抗原陰性の前硬変あるいは肝硬変であったが、1例のアルコール性肝硬変が含まれており、比較的代償性の病時期である事が注目された。A-(4)群に相当する症例はなく、B-(1)群は HBs抗原陽性の慢性肝炎であった。また B-(2)群は、HBs抗原陽性で、かつ腎炎を合併した亜小葉肝壊死を伴う慢性肝炎1例と、慢性肝炎非活動型1例と、肝硬変1例の合計3例であった。B-(3)群には HBs抗原陰性の Dubin-Johnson 症候群の1例があった。B-(4)群に属する症例はなく、別に C 群では、HBs抗原陰性の慢性肝炎活動型1例と肝硬変2例、および HBs抗原陽性の急性肝炎1例、慢性肝炎1例の合計5例があり、全例 CH₅₀値は低下がみられなかった。

[考察]

すでに著者らは、B型肝炎を中心に、HBs抗原の消長と血清トランスアミナーゼ値の上昇と抗補体性の問題や、肝細胞壊死と C₃、C₄蛋白質の問題を報告してきたが、今回は、抗原抗体系に最初に及ぶと考えられる C_{1q} について検索を加え、その C_{1q} 値と C₃ 値の解離現象あるいは CH₅₀ 活性から、Classical Pathway とは別に Alternate Pathway が肝疾患にみられる免疫現象に関与しているかどうか、を知る事を目的とした。

その結果、血清中における HBs抗原抗体の Immune Complex 形成から、主として Classical Pathway が主体に反応すると考えられる HBs抗原陽性肝炎と、対象群との間に著明な差は認められなかった。問題の C_{1q} 値については、慢性肝炎と肝硬変で免疫現象に関与する事などから、低下を予想したが、予想に反して高値を示す症例が多く、特に C_{1q} 上昇と C₄、C₃ 共に低下の非代償性肝硬変疾患群のある事が注目された。しかしながら C_{1q} の増減と、HBs抗原の有無、ならびに病型、特に C_{1q} Peptide と類似の Collagen に注目した線維化病変を検討しても、関連性は認められなかった。C₃ ならびに C₄ 蛋白質が共に低下している症例は、C_{1q} 値に関係なく肝硬変が多かったが、逆に代償性肝硬変では増加している症例もあった。

Classical Pathway と Alternate Pathway との関連で成分活性値と蛋白質の関係から、蛋白質が増加している場合、例えば C₃ 蛋白質が増加して C_{1q} 値と C₄ 値が正常あるいは低下している症例では、C₃ 以後の成分が主として反応している系、あるいは Alternate Pathway の系の関与を考えながら成績の C 群5例と B-(3)群の Dubin-Johnson 症候群1例のごとく、全例共に CH₅₀ 値が正常

であり、その意義づけは困難であった。

以上、血清中 C_{1g} 値の明確な臨床的意義づけは、できなかったが、非肝炎患者症例や自己抗体出現の有無などの関連性の検索が今後の課題として残された。

[結論]

肝炎患者における血清 C_{1g} 値の臨床的意義づけを求める目的で Single Radial Immuno-diffusion 法で測定し、非常に高値を示す症例と、低値を示す症例を認めながら、血清中 HBs 抗原、 Cu ならびに C_{2g} 蛋白質、 CH_{50} 価と肝炎患者の組織病型から明確な臨床的意義づけをすることは、困難であった。

(Fig.1)

Results of Serum C_{1g} Levels of Various Liver Diseases

1. Cases with elevated Serum C_{1g} Levels (A-Group)

| A-(1) Group | $C_{1g} +$ | $C_4 +$ | $C_3 +$ |
|-------------|------------|----------------|---------|
| Cases | Diagnosis | HBsAg in Serum | |
| Su, T. | CHcSN | Positive | |
| Ku, K. | CHcSN | Positive | |
| Ta, S. | CHcSN | Positive | |
| Hi, H. | CHcSN | Negative | |

| A-(2) Group | $C_{1g} +$ | $C_4 +$ | $C_3 +$ |
|-------------|-------------|----------------|---------|
| Cases | Diagnosis | HBsAg in Serum | |
| Yo, S. | LC | Positive | |
| Ko, K. | LC | Negative | |
| Yu, T. | LC | Negative | |
| U, S. | LC | Negative | |
| I, U. | LC (Lupoid) | Negative | |

| A-(3) Group | $C_{1g} +$ | $C_4 +$ | $C_3 +$ |
|-------------|------------|----------------|---------|
| Cases | Diagnosis | HBsAg in Serum | |
| Mi, K. | LC | Negative | |
| Ka, M. | LC | Negative | |
| I, H. | LC | Negative | |

| A-(4) GrDup | $C_{1g} +$ | $C_4 +$ | $C_3 +$ |
|---------------|------------|---------|---------|
| No Cases Here | | | |

AH; acute Hepatitis, CH; chronic Hepatitis, LC; Liver Cirrhosis cSN; with Sublobular Necrosis

(Fig.2)

Results of Serum C_{1g} Levels of Various Liver Diseases

2. Cases with decreased Serum C_{1g} Levels (B-Group)

| B-(1) Group | $C_{1g} +$ | $C_4 +$ |
|-------------|------------|----------------|
| Cases | Diagnosis | HBsAg in Serum |
| U, S. | AHcSN | Positive |
| Mo, T. | CHcSN | Positive |
| A, E. | CHcSN | Positive |

| B-(2) Group | $C_{1g} +$ | $C_4 +$ |
|-------------|-------------|----------------|
| Cases | Diagnosis | HBsAg in Serum |
| Ka, T. | CHcSN | Positive |
| Ni, T. | CH inactive | Negative |
| Sa, S. | LC | Negative |

| B-(3) Group | $C_{1g} +$ | $C_4 +$ | $C_3 +$ |
|-------------|--------------|----------------|---------|
| Cases | Diagnosis | HBsAg in Serum | |
| O, Y. | D-J Syndrome | Negative | |

| B-(4) Group | $C_{1g} +$ | $C_4 +$ | $C_3 +$ |
|---------------|------------|---------|---------|
| No Cases Here | | | |

AH, acute Hepatitis, CH, chronic Hepatitis, LC; Liver Cirrhosis cSN; with Sublobular Necrosis,

(Fig.3)

Results of Serum C_{1g} Levels of Various Liver Diseases

3. Others (C-Group)

| Cases | $C_{1g} +$ | $C_4 +$ | $C_3 +$ |
|--------|------------|----------|---------|
| I, K. | CH active | Negative | |
| Ka, M. | LC | Negative | |
| Wa, T. | LC | Negative | |
| Ta, T. | AH | Positive | |
| To, D. | CH active | Positive | |

AH; acute Hepatitis, CH; chronic Hepatitis, LC; Liver Cirrhosis cSN; with Sublobular Necrosis,

慢性関節リウマチの金療法による血清蛋白の変化——とくに $\beta_{1C}/IIA-$,
 β_{1E} -globulin について 大阪府立成人病センター 平松誠一, 小松系
貞雄, 土居志鶴, 永井 博

慢性関節リウマチ (RA) に対する金療法については内外に多くの報告
がみられ、いずれも高率に臨床的改善がえられるといわれている。しかし
、金製剤の作用機序については多数の研究業績があるにもかゝらずまだ
定説はないといつてよい。

RA においては、患者の関節液の補体価が低いことは以前から知られて
おり、また、C1の低下、C4、C2の低下、あるいはC3やC4の活性
の低下があるのにそれらの蛋白濃度は低下していない等の報告があり、RA
における関節内の補体の関与が重要視されている。一方、RA患者の血
清中の補体価は高いことが多いとされているが、補体成分の変化につい
ての報告は少ない。

われわれは、多くのRA患者血清中の各種蛋白成分を測定し、正準判別
分析により、健康人対照と比較したところ、両者の間では β_{1C}/IIA -globulin
と α_1 -acid glycoprotein がその区別に寄与していることを認めた。また、
患者を Stage I, II, Class I, IIの群 (Group I), Stage III, IV, Class
I, IIの群 (Group II), および Stage III, IV, Class III, IVの群 (Group
III) にわけた場合、Group IIIとGroup I, IIの区別には、Ig Aと β_{1E} -
globulin が寄与していることがわかった (Scand. J. Rheumatol., 1976, in
press)。

このように、RAの病態を把握するためには、その血清蛋白の変動が考
考になると考えられるが、金療法を施した場合、これが血清蛋白にどのよ
うな変化を及ぼすか知らべ、本療法の作用機序の解明に役立てようと試
みた。

分析対象は、金 (Gold Sodium Thiomalate) 治療群 (G1) 10例 (投与総
量が300 mg以上に達したもの) と、金投与していない対象群 (G2) 13
例で、観察期間は3~8ヶ月、平均5.5ヶ月である。

両群それぞれの観察開始時の症状 (Stage, Class, 発熱, 関節炎, 結節,
疲労, 朝のこわばり) と、検査成績 (体重, 関節炎数, 検血, 血沈, RA
HA, 各種血清蛋白量) を比較したところ、StageはG1で軽いものが多
く、RAHA titerはG2で低いものが多く、血清 Haptoglobin 量がG1
で高値を示す以外はその他の項目で両群に差はなかった。これらの英より
、G2は金療法による血清蛋白の変動をみるための対照として差支えない
ものと判断した。

今回は G1 と G2 について観察期間の前後の血清蛋白量の変化と二元配置の分散分析によって検討した。

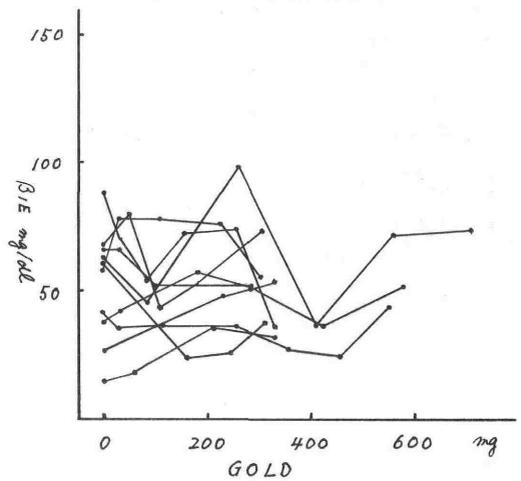
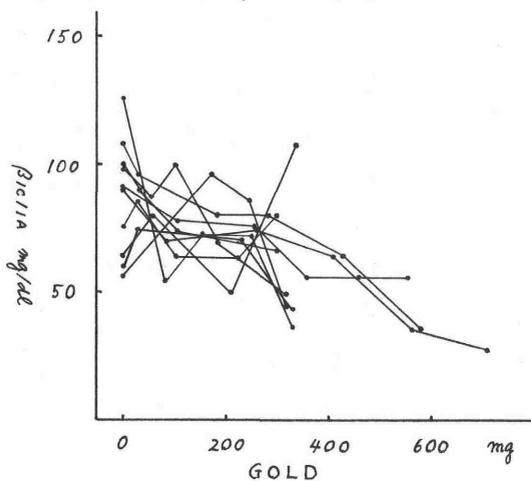
G1 では、Ig A の有意の低下を示し、また、acute phase protein である α_1 -acid glycoprotein と haptoglobin の低下も有意であった。しかし、 α_1 -antitrypsin や α_2 -macroglobulin の変動は無く、transferrin も変化がなかった。 $\beta_{1/1A}$ -globulin は G1 で有意の低下を示したのに反し、 β_{1E} -globulin は変動を示さなかった。

今回は G1 の各症例について、 $\beta_{1/1A}$ -globulin と β_{1E} -globulin 量と金投与量の関係を示している。 $\beta_{1/1A}$ 量は金投与量が増えるにしたがって低下してゆく傾向を示すが、 β_{1E} 量の変化は一定しない。

その他、金投与によって、血沈の改善、RAHA titer の低下もみられ、これらのことから、金の投与総量が 300 mg に達したところから急性炎症に対する抑制効果が見られることが推定される。しかし、acute phase protein ($\beta_{1/1A}$, β_{1E} を含めて) といわれる蛋白の一部でその値の低下がみられないことは、観察期間がまだ短いためなのか、RA に特異的なものなのか、あるいは、金製剤による特異な反応なのかは明らかでない。また、 $\beta_{1/1A}$ -globulin は、ここで検討された症例の全てにおいて健康人の値と比べて差がなく、これが金投与によって減少することの説明は困難である。

金製剤の作用機序については種々の説があり一定しないが、えられた結果から抗炎症作用や、免疫抑制作用の可能性は充分考えられるが、 $\beta_{1/1A}$ -globulin の変化について考えると、一種の細胞毒として血清蛋白の産生に抑制的に働いているのかもしれない。

以上、金投与による血清蛋白の変動についてしらべたが、現在、血清および関節液の補体価、補体成分の変化にも検討中である。



甲状腺疾患における血清補体の動態について

藤原 博, 砂川 保幸, 安田 克樹, 江崎 治夫 (広大 2 外)
 小坂橋 靖, 馬場 徹, 田崎 加代子 (聖マリーナ医大)

〔諸言〕 近年, 疾病と補体の関係について多数の報告がみられる。特に SLE やある種の腎炎, 骨髄腫などでは補体の異常が病気の診断や予後の判定に役立っていることが多い。甲状腺疾患である橋本氏病および Graves 氏病の病因に関して自己免疫疾患としての立場から細胞性免疫および体液性免疫の両面で研究が進められているが, これら甲状腺疾患と血清補体の関係についての報告が少い。われわれは Graves 氏病と橋本氏病を中心に, 甲状腺疾患と補体との関連性について追求し, 本疾患の成因, 症状, 予後における血清補体の役割を明らかにしようと試みた。

〔対象〕 広島大学第 2 外科甲状腺外来を受診した Graves 氏病 83 例 (未治療 12 例, 再発 17 例, 治療中 54 例, 治療後臨床的機能低下症状を呈し, 甲状腺剤による補充療法中 6 例), 橋本氏病 57 例 (未治療 16 例, 甲状腺剤による補充療法中 41 例), 甲状腺癌 17 例 (全例担癌状態に, 分化癌 15 例, 未分化癌 1 例, 転移癌 1 例), 甲状腺腺腫 (術前) 13 例, 腺腫様甲状腺腫 (術前) 10 例である。

〔結果〕

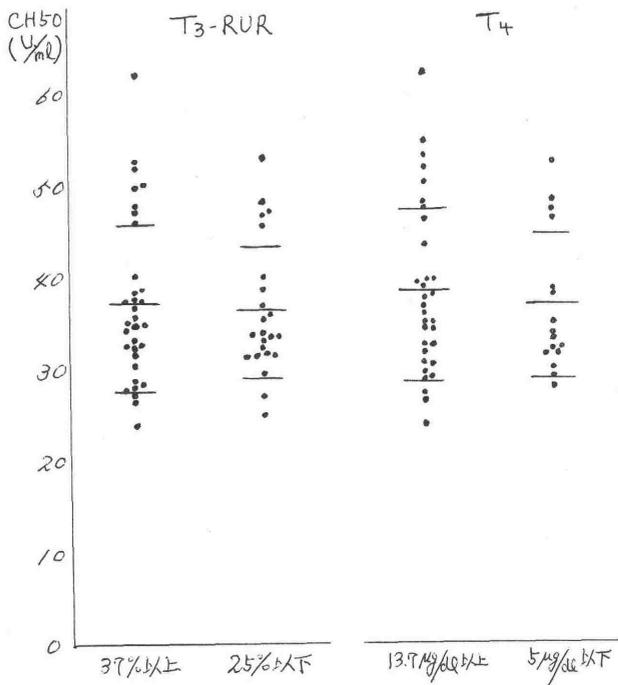
各種甲状腺疾患における CH50 の変動を比較すると (表 I), 対照群の 34.2 ± 7.0 に対し, Graves 氏病では 36.0 ± 7.6 , 橋本氏病では 32.7 ± 7.8 , 腺腫では 36.4 ± 6.6 , 腺腫様甲状腺腫では 35.4 ± 4.9 , 甲状腺分化癌では 34.0 ± 4.7 であり, いずれも対照群との間に有意差は認められなかったが, 甲状腺未分化癌の 1 例と肺腫瘍の甲状腺転移 1 例は共に高値を示した。

| 疾患名 | 症例数 | 検体数 | CH50 (M±SD) | CH50 分布率 (%) | | |
|-----------|-----|-----|-------------|--------------|-----------|--------|
| | | | | < 27.2 | 27.2-41.2 | 41.2 < |
| Graves 氏病 | 77 | 134 | 36.0 ± 7.6 | 11.2 | 68.7 | 20.1 |
| 橋本氏病 | 57 | 79 | 32.7 ± 7.8 | 11.4 | 60.8 | 27.8 |
| 腺腫 | 13 | 15 | 36.4 ± 6.6 | 13.3 | 60.0 | 26.7 |
| 腺腫様甲状腺腫 | 10 | 15 | 35.4 ± 4.9 | 6.7 | 80.0 | 13.3 |
| 甲状腺分化癌 | 15 | 22 | 34.0 ± 4.7 | 0 | 86.4 | 13.6 |
| 甲状腺未分化癌 | 1 | 3 | 45.7 ± 0.8 | 0 | 0 | 100 |
| 甲状腺転移癌 | 1 | 4 | 59.1 ± 19.2 | 0 | 25.0 | 75.0 |

正常 34.2 ± 7.0

表 I 各種甲状腺疾患の補体価

Graves氏病患者では、しばしば基礎代謝が亢進し、hypermetabolismの状態にあるところから、その指標となる T_3 resin uptake値(T_3 -RUR)で37%以上と25%以下の2群に、レゾマット T_4 法による血中サイロキニン値(T_4)で13.7 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 以上と5 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 以下の2群に分けて、CH50の変動を比較してみる。(図I)



図I Graves氏病患者の血中甲状腺ホルモンレベルによるCH50の比較

), T_3 -RUR 37%以上では36.8 ± 2.0, 25%以下では36.1 ± 2.2であり, T_4 13.7 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 以上では37.9 ± 9.2, T_4 5 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 以下では36.3 ± 2.8であった。このことは、甲状腺機能亢進症によってもたらされるhypermetabolismが血清補体に影響をおよぼすものではないことを示している。

表IIは、Graves氏病および橋本氏病の各6例の蛍光抗体法による甲状腺組織における補体と免疫グロブリンの局在を示したものである。組織沈着部位はWernerらの記載にしたがって分けた。補体成分(C₃A)に対し、Graves氏病6例中2例、橋本氏病6例中1例に基底膜を含む濾胞上皮下に沿って蛍光反応が認められた。免疫グロブリンにおいては、特にIgGに対し、Graves氏病では濾胞上皮下に沿って、橋本氏病では間質(破壊された実質を含む)に強い蛍光反応が認められた。IgMにはGraves氏病、橋本氏病共に蛍光反応が認められなかった。さらに、IgEに対して、橋本氏病の1例に濾胞上皮下に沿って蛍光反応を認めた。以上のことは、自己免疫疾患と考えられている橋本氏病は無論のこと、Graves氏病においても、甲状腺組織において抗原抗体反応に基づく免疫反応が起っているであろうことが示唆され、IgGと同定されているlong-acting thyroid stimulator

の証明と共に、Graves氏病の成因に免疫学的な機序の関与が考えられる。

| | | IgA | | IgG | | IgM | | IgE | |
|----------|---------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | FBM \mathcal{S} |
| Graves氏病 | 1 | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) |
| | 2 | (-) | (-) | (+) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) |
| | 3 | (-) | (-) | (+) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) |
| | 4 | (+) | (-) | (-) | (+) | (+) | (-) | (-) | (-) |
| | 5 | (+) | (-) | (+) | (-) | (+) | (-) | (-) | (-) |
| | 6 | (-) | (+) | (-) | (+) | (-) | / | / | / |
| 計 | $\frac{2}{6}$ | $\frac{0}{6}$ | $\frac{3}{6}$ | $\frac{0}{6}$ | $\frac{5}{6}$ | $\frac{1}{6}$ | $\frac{0}{6}$ | $\frac{0}{6}$ | |
| 橋本氏病 | 1 | (+) | (-) | (+) | (+) | (+) | (+) | (-) | (-) |
| | 2 | (-) | (-) | (-) | (+) | (-) | (-) | (-) | (-) |
| | 3 | (-) | (-) | (-) | (+) | (-) | (-) | (-) | (-) |
| | 4 | (-) | (-) | (+) | (-) | (-) | (-) | (+) | (-) |
| | 5 | (-) | (-) | (+) | (-) | (+) | (-) | (-) | (-) |
| | 6 | (-) | (+) | (+) | (+) | (+) | (-) | (-) | (-) |
| 計 | $\frac{1}{6}$ | $\frac{0}{6}$ | $\frac{2}{6}$ | $\frac{3}{6}$ | $\frac{3}{6}$ | $\frac{0}{6}$ | $\frac{0}{6}$ | $\frac{1}{6}$ | $\frac{0}{6}$ |

FBM: follicular basement membrane

\mathcal{S} : connective tissue stroma

+ moderate

++ strong

- negative

表II 螢光抗体法による甲状腺組織内における補体と免疫グロブリンの局在

妊娠性癩癧の免疫学的研究

徳大 呂層科 齋藤一夫 北村征和 瀬口俊一郎
白石 聡

妊娠性癩癧とは比較的稀な疾患であり妊娠に際して全身に蕁麻疹性の皮疹が出現し、分娩により速かに自然治癒するが、再度妊娠に際して出現すると言われている。原因は不明であるが妊娠期産褥期あるいは月経前期などに体内に過剰なエストロゲン異常代謝産物ないしは内分泌産物が重要な役割を演ずると考えられている。我々は妊娠性癩癧の一例を経験し、若干の免疫学的検索を行ったので報告する。

＜方法＞

蛍光抗体直接法および間接法により患者の皮膚部と無癩部における免疫グロブリン(IgG, IgM, IgA)や補体(C₃, C₄)の沈着状態の検索と、入院時より週2回採血し、臨床経過とともに各種免疫グロブリン(IgG, IgM, IgA)およびCH₅₀, C₃, C₄の値を経時的に測定した。

抗ヒト IgG, M, A, FITC 外血清は Hyglend 社
抗ヒト IgG, A, IgM, C₃, C₄ FITC 外血清は Behring 社
IgG, IgM, IgA, C₃, C₄ は免疫拡散平板 (Partigen Behring 社)
を用いて測定した。

＜成績＞

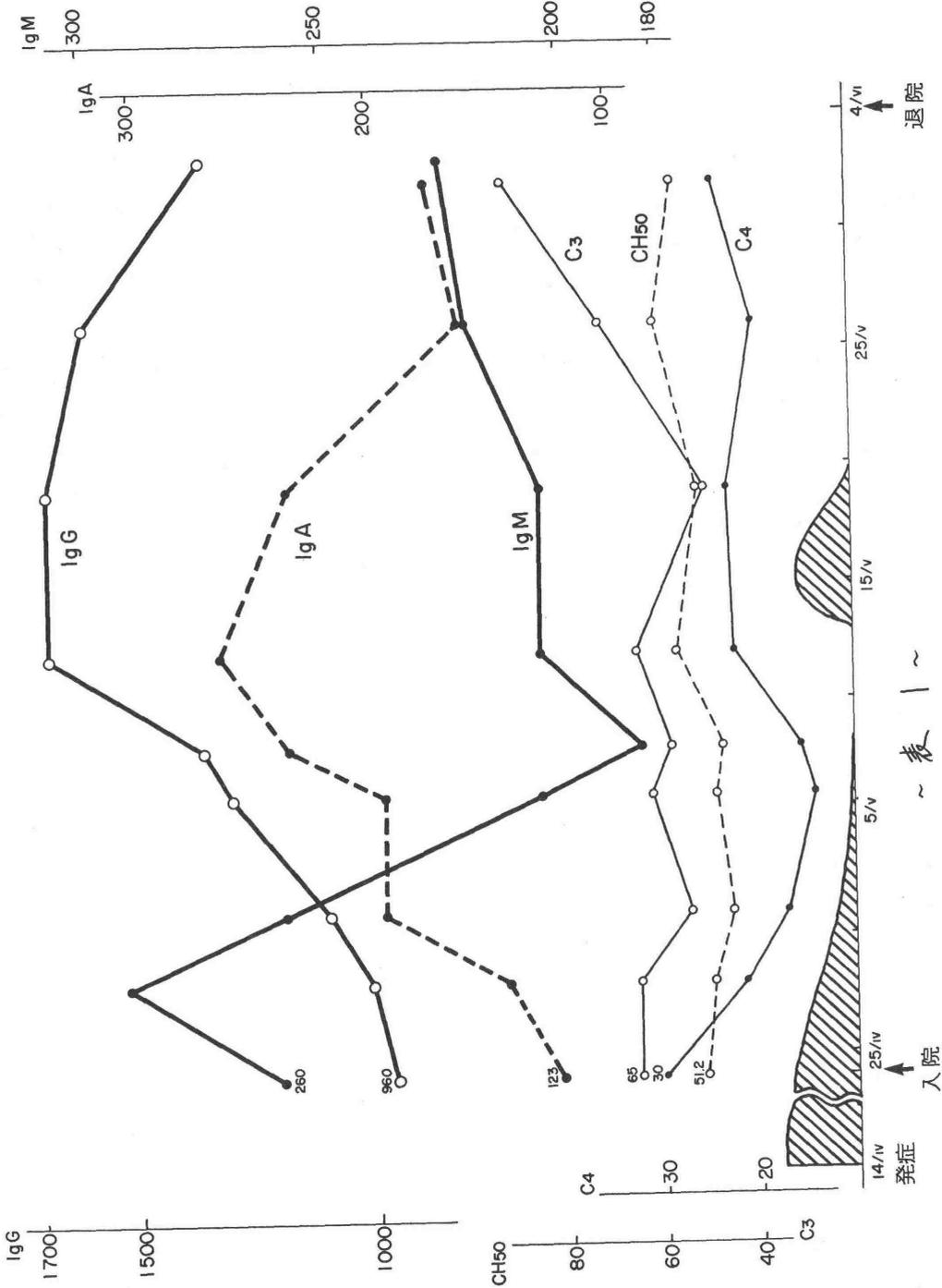
患者の皮膚部と無癩部の生検組織に行った蛍光抗体直接法では免疫グロブリン(IgG, IgM, IgA)や補体成分C₃の沈着は認められなかったが、補体成分C₃が表皮真皮基底膜部に明瞭な線状沈着として認められた。蛍光抗体間接法の成績も同様であった。

免疫グロブリン値、CH₅₀, C₃, C₄の値は表1に示すごとくであり、入院時IgMは高値を示し以後徐々に下降している。一方IgGは入院時より徐々に上昇し5月19日にはピークを示している。IgAはIgGと同様のパターンを示している。CH₅₀は入院時より退院時より高値を示している。C₃は症状の改善とともに上昇を示し退院時正常範囲値となった。

＜考察＞

以上の免疫学的所見より我々は、本疾患の原因となるべきものは不明であるが、ある種の抗原を想定した場合に血清蛋白の変動より一連の生体反応として説明出来るように思える。蛍光抗体直接法による各種免疫グロブリンとC₃の沈着が認められ、C₃の明瞭な基底膜部における沈着が認

ゆえに、間接法において正常値下の基底膜部にC3の沈着あり等あり、腎臓性腎病の及ぶ局所においてこの alternate pathway を活性化し何れか物質があるのではないかとと思われる。この点について今後検討を述べたいと思う。



健康高齢者の血清補体成分について

東京医科大学 老年病

鶴見 信男・高 博明

勝沼 英字

同 外科

河村 一太

都立大久保病院

河島 敏夫

近年、老人人口の増加に伴って、高齢者における各種疾患、病態の研究が、盛んに行われる様になつてきた。特に免疫関係の研究は、老人の重症感染症、癌、腎の治療に苦慮してゐる、多くの臨床家の、期待し、注目する所である。一般に、加齢に伴い、細胞免疫の低下、外来抗原に対する抗体産生能の低下、自己抗体の増多、免疫Globulin異常の出現、腎がみられ、これらに関し、多くの報告がある。しかし、免疫現象の重要な要因である補体の、加齢に伴う変化に関する報告は少ない。幸、我々は、このたび、都下某老人ホームの健康高齢者、175名について、血清補体価、血清補体成分の定量、並に、ツ反応について検索する機会を得たので、その結果について報告する。

〔対象〕

都下某老人ホーム在住の、62才から94才までの、健康と思われる老人、175名(男48名、女127名)、若年群として、研究室員、及び、本院院内血液銀行の献血者を対象とした。なお、老人ホームの老人は、定期健康診断で、献血者は、採血時の健康診断にて異常を指摘された者は除外した。

〔方法〕

検体は、採血後、可及的速かに遠心分離し、 -70°C で凍結保存した。測定は、 CH_{50} はMayerの方法にて、 C_{3c} (β_{1A}/β_{1c} globulin)、 C_4 (β_{1E} globulin) C_3 activator は、BeAring-werke社のM-partigen(single radial immunodiffusion法)にて測定した。ツ反応は、一般診断用(0.05 mcg/0.1 ml)のP.P.D.を使用、採血の翌日施行し、48時間後、判定した。

〔成績〕

CH_{50} は、表①の様に、50~59才が最も高く、その後、加齢に伴い低下し、特に70才以上で、著しい低下を示す例がみられ、平均値も、80才以上で

かなり減少を示した。

血清補体成分は、表②のごとく、 C_{3c} は、加齢に伴って増加傾向を示すが、有意差なく、 C_4 は一定の傾向を示さず、 C_3 activatorは、高齢者群で、やや高値を示すが、90才以上では、低下傾向を示した。

ツ反応は、表③のごとく、特に女性で、加齢に伴って陽性率の低下がみられた。

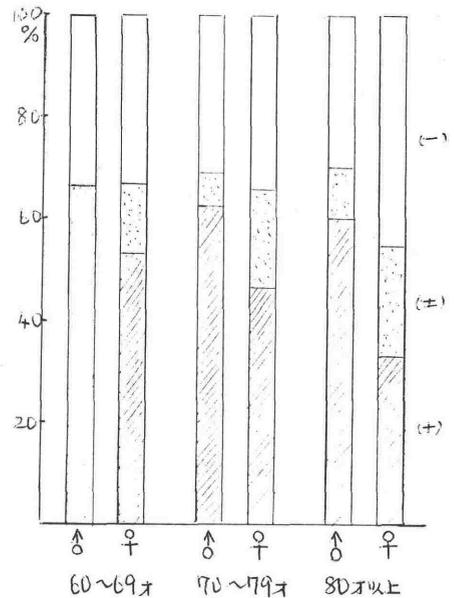
表1 年齢別血清補体価

| 年齢 | 例数 | M ± SD | Range |
|-------|-----|------------|---------|
| 10~19 | 26 | 40.9 ± 4.5 | 32 ~ 49 |
| 20~29 | 68 | 42.9 ± 4.6 | 33 ~ 56 |
| 30~39 | 65 | 45.8 ± 7.1 | 35 ~ 65 |
| 40~49 | 47 | 45.4 ± 6.3 | 35 ~ 65 |
| 50~59 | 42 | 47.9 ± 7.9 | 32 ~ 66 |
| 60~69 | 66 | 45.8 ± 8.1 | 27 ~ 72 |
| 70~79 | 101 | 42.0 ± 9.1 | 10 ~ 71 |
| 80~ | 74 | 39.5 ± 8.1 | 10 ~ 65 |

表2 年齢別血清補体成分 (mg/dl)

| 年齢 | C_3 | C_4 | C_3 activ. |
|-------|-------------|-------------|--------------|
| ~59 | 66.8 ± 10.0 | 39.1 ± 9.4 | 16.4 ± 5.0 |
| 60~69 | 68.9 ± 17.9 | 34.4 ± 10.5 | 18.0 ± 5.3 |
| 70~79 | 70.0 ± 10.3 | 41.8 ± 11.6 | 18.6 ± 4.3 |
| 80~89 | 72.4 ± 13.2 | 39.8 ± 12.5 | 18.3 ± 3.7 |
| 90~ | 71.1 ± 13.7 | 40.9 ± 6.3 | 16.3 ± 5.0 |

表3 年齢別ツ反陽性率



[考察]

CH_{50} は、加齢に伴って減少傾向を示し、特に70才以上で、著明な低下を示す例もみられ、老人の易感染性を考ふる上、重要な所見と思われる。しかし、 C_{3c} 、 C_4 の低下は認められなかった。S.R.I.D.法による補体成分の定量は、あくまでも蛋白量の定量で、その活性価と、必ずしも平行しない。この相違は、 C_1 、 C_2 、 C_5 以下の因子の低下による可能性と、 C_3 、 C_4 自体の異常で、活性化され難い可能性とが考えられる。 CH_{50} 低下例を中心に、可能な限り、他の成分を検索し報告した。

健康人のツ反とCH50に関する6期分類とその臨床的応用

小暮美津子(女子医大)

里和ス三王、河島敏夫、宮沢政保(都立大久保病院)

河村一夫(東京医大)

嶋田孝吉、西岡久寿弥(東京都臨床研)

これまで私は、各種疾患について、その免疫機構とツ反とCH50に関する6期分類法(以下6期分類法)にしたがって考察し、その生体防御面における恒常性のなかにも、個々の疾患において可成りの特徴的パターンのあることを報告してきた。

一方、疾患によっては好発年齢や罹病に性差があり、その病像や予後は加齢による影響と多分にこうむる。

そこで今回は、主として健康人を対象として、その加齢とともにいう免疫機構の変化と6期分類法に従って論じ、更にこれと2~3の疾患患者を対象として行った6期分類を比較し、その疾患の成り立ち、予後によぼす影響などについても若干ふれたいと思う。

健康人対象の年齢は10才から94才で総計482例、その性別は男172例、女310例であった。

全例の血清補体価(CH50)の測定とツ反を施行し、一部の症例についてはDNCBやリンパ球のsub-population、末梢血リンパ球数の測定と行い参考とした。

総数482例のCH50の平均値は43.2±9.6で、男女間に有意の差は認められなかった。CH50の平均値は、男女ともに加齢とともに高くなり、50才位を境に低くなる傾向が認められ、ツ反陽性率も50才位と頂上の減少する傾向があったが、これを6期に分類し、1期と4期、2期と3期に属するものの比率を各年齢群で、それぞれ比較すると60才位では1期、2期に属するものが多いが、70才以上ではその比率が逆転し、4期、3期に属するものが増加していった。3期に属するものの増加傾向は、すでに50才位から徐々に認められていたが、4期の比率の増加はややおくれ、60才位からはいまり、その増加は急激で、80才位では50%近い症例がこの4期に属していた。老化にともない、細胞性免疫の示標としたツ反は陰性化し、80才位にいたり60%の症例はツ反が陰性になっていたにもかかわらず、CH50の平均値±SDは、正常範囲内(35~50)にとどまっていた。

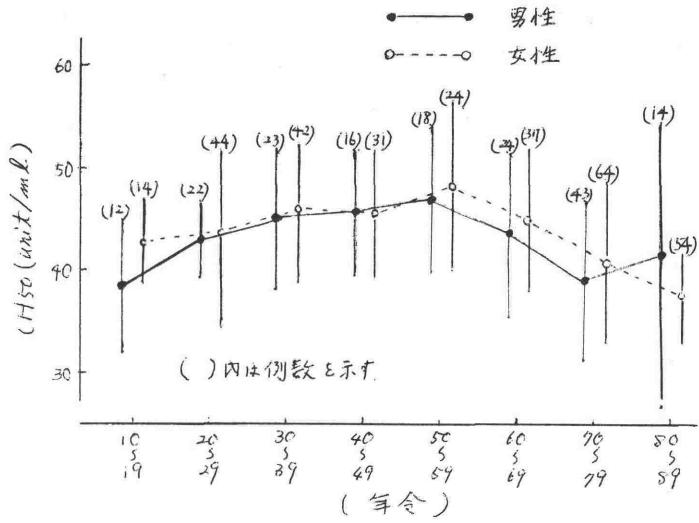
6期分類法

| | | |
|------------------|--------|---|
| CH ₅₀ | 3 | 2 |
| | 4 | 1 |
| | 5 | 0 |
| 0 | 10(mm) | |
| | F P D | |

全検体の6期分類

| | |
|-------------|-------------|
| 9.1 (%) | 13.8 (%) |
| 29.8 (%) | 44.1 (%) |
| 1.1 (%) | 2.1 (%) |

性別血清補体価 (Mean ± SD)



血清補体価と動脈硬化性因子との関係

都立大久保病院

里初スミエ, 河島敏夫, 岡本二郎, 七理泰,

小町礼子, 三須明美

東京都脳府医学総合研究所 嶋田考吉

〔目的〕

低補体血症については、免疫学的立場から多くの成果があるが、高補体血症については、炎症・悪性腫瘍などの例以外の場合にはその生理学的意味づけは明らかではない。我々は昨年当シンポジウムにて、脳動脈硬化症は同年代健常者より補体価が有意に高いこと、また脳卒中後遺症が強く残存している者や、再発をおこす者、一過性脳虚血発作をくり返す者の補体価は異常高値を長期間維持することを報告した。(図1, 2) 脳卒中発作直後に示す高値は *acute phase serum reactant* として説明されるが、図に示すように約3ヶ月間も高値を続けている場合の原因とはならない。さらに加齢と補体価との関係を見ると、高令になるほどばらつきが大きくなる。この個人差を観察すると、高補体価の者は動脈硬化が強い傾向にある。これらを明確にするために以下の検討を行なった。

〔方法〕

炎症性疾患, 悪性腫瘍, 膠原病などを除外した、当内科外来患者で40才以上の者、約300人を対象とした。

動脈硬化性因子として血圧, 心電図異常, 高脂血症, 脳動脈硬化, 腎機能異常, 糖尿病などの有無, 程度を点数別にして評価した。血圧は、 $200/100$ 以上を3点、 $181/101 \sim 200/110$ を2点、 $161/91 \sim 180/100$ を1点、それ以下を0とした。心電図は、心筋梗塞既往を3点、心筋虚血ST-T低下を2点、心房細動, 右脚ブロックを1点、異常なしを0とした。糖尿病はInsulin使用者を3点、経口糖尿病薬服用者を2、食事療法のみでコントロールがとれる者を1、糖尿病のない者を0とした。高脂血症はコレステロール 300 mg/dl 以上を2点、 250 mg/dl 以上を1、それ以下を0とした。脳動脈硬化症として、脳血管障害の既往があって1年以上経過している者を3点、多発性小軟化巣が臨床的に考えられる者2、頭痛・めまい・歩行障害のある者を1、ない者を0とした。

血清補体価 CH_{50} はMayer 50%溶血法により測定した。

〔結果〕

各疾患別にみた点数値の分布は、補体価が高い群ほど動脈硬化性因子の存在が認められた。男女別にもみだがこの傾向の性差はない。また疾患別に点数の高低をみると、点数の高い者が補体価も高いという関係はない。しかし、動脈硬化性因子のすべての点数合計数別に補体価平均値をみると、0点は43.6単位、1点は46.1単位、2点は48.7単位、3点は47.5単位、4点は52.5単位、5点は54.7単位、6点は57.6単位、7点は52.7単位、8点は56.3単位、9点は57.5単位、10点は62.0単位であった。6点から8点までは漸増状態を示さないが、傾向として、動脈硬化性因子が合併する数が多くなるほど補体価が上昇を示してゆく。同様に加算点数と補体価との間に相関関係が認められた。

これらの動脈硬化促進因子のなかで、補体価高値に関係のあるものの順序は、脳血管障害、高血圧、心電図異常、尿蛋白、糖尿病、高脂血症の順であった。

以上から動脈硬化の全身の進行程度と血清補体価高値との間に関係がある結果が示唆された。この原因として、動脈硬化の基盤にある動脈壁内膜の炎症に由来する血管透過性亢進、変性、破壊などが、補体価上昇にある役割をはたしているとは推定される。

図 1

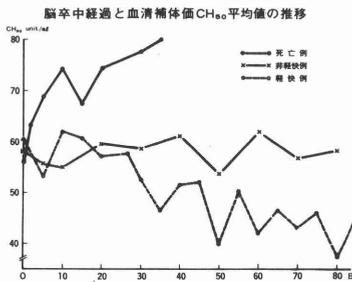
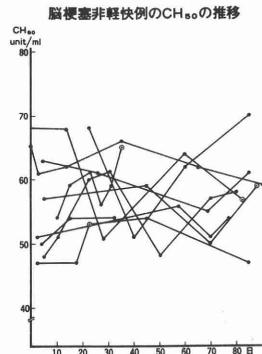
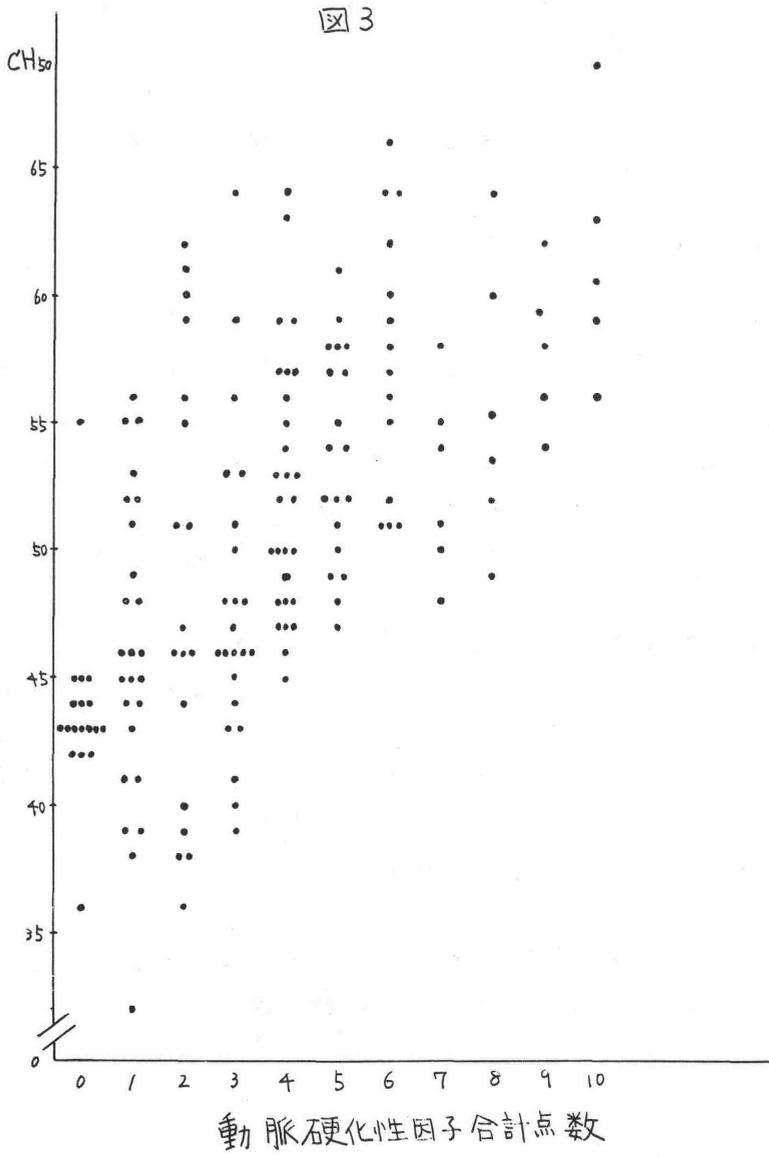


図 2





癌患者におけるツ反応、CH₅₀を指標とした六期分類の
臨床免疫学的意義

河村一太、早田義博、加藤治文、熊坂俊郎、新專雅行
(東京医大病院)

西川正夫、神山一郎(都立大久保病院)

西園久寿弥、嶋田孝吉(東京都臨床研)

生体の免疫現象は細胞性免疫と体液性免疫とに大別され、この二種の免疫現象は一応別系列のものとして考えられ、時には相互に細胞障害効果の抑制、あるいは促進へと働いて生体内での現象を複雑にしている。しかし、免疫担当細胞系々、系統発生、免疫応答の遺伝支配等を中心とする近年の研究の発展によって、生体の免疫現象は統一的に相関した作用をするものと考えられるようになった。

我々は癌患者における免疫反応性を補体を中心として追跡して来た。一方、細胞性免疫能の指標にPPD反応、T-cellの変動を検索して来た結果、細胞性免疫反応は病期の進展に伴って低下するのに対して、補体系は末期まで、正常範囲か、あるいは高値を保持していることからして、癌患者の免疫機能を把握する方法としてPPD反応と補体を指標とした六期分類を提唱した。すなわち、表1の如く、横軸にPPD反応、縦軸にCH₅₀をとり、0、I、II、III、IV、V期の六期に分類した。この分類の表現は例えば、II期とはPPD反応陽性、CH₅₀45以上、III期はPPD反応陰性、CH₅₀45以上を意味している。

今回は、肺癌、胃癌、頭頸部癌、乳癌、子宮癌等201症例を対象として、各臨床病期、ならびに癌の進展との相関性、さらに各種治療成績、予后について六期分類の臨床免疫学的意義について検討したので報告する。

表1 ツ反とCH₅₀を指標とした六期分類

| | | |
|------------------|-----|-----------|
| CH ₅₀ | | |
| 45 | III | II |
| 30 | IV | I |
| | V | 0 |
| | 10 | (mm.) PPD |

六期分類からみた癌の頻度はⅠ期0%、Ⅱ期13%、Ⅲ期42%、Ⅳ期31%、Ⅴ期13%、Ⅵ期1%で、補体が正常、あるいは高値を示すⅠ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ期は99%であった。しかし、PPD反応陰性例のⅢ、Ⅳ、Ⅴ期は45%であった。ちなみに肺癌についてみると、Ⅰ期10%、Ⅱ期48%、Ⅲ期32%、Ⅳ期8%、Ⅴ期2%であり、補体が正常か高値を示したものは98%、PPD反応陰性例は42%であった。また、胃癌、頸部癌、乳癌、子宮頸癌等についても同様の傾向を示した。

さらに癌の進展度すなわち臨床病期別に検討したが、臨床病期分類Ⅰ期、Ⅱ期でPPD反応陽性、補体が正常か、高値を示すものは60%であったが、臨床病期がⅢ、Ⅳ期と進展すると、六期分類でもⅢ、Ⅳ、Ⅴ期と進行する傾向がみられ、六期分類の臨床的有用性が認められた。

次に各症例の臨床経過について、追跡調査をした。先づ、入院時、PPD反応、補体を測定し、その後、手術を含めた治療を行って治癒退院し得た症例は、六期分類のⅢ期からⅡ期の方角性を示した。これに反し、入院、治療しても効果なく死亡した症例では、Ⅲ期あるいはⅣ期方向に集中して予後不良を示唆した。

さらに、入院治療して、軽快退院し、その後3カ月以上経過観察出来た症例について、入院時、退院時、3カ月以上の経過時の三点をプロットして、六期分類表での推移方角性を検索した結果、Ⅳ、Ⅲ期からⅡ、Ⅰ期方向に移行した。

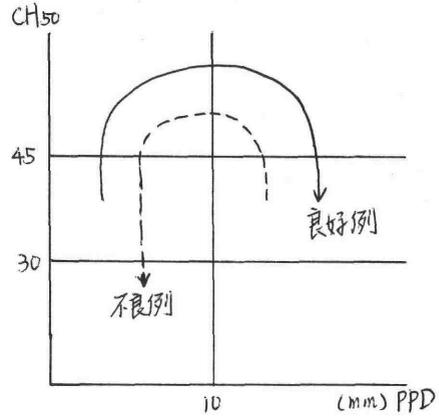
しかし、癌患者の病態を一括して検討するには進展度、一般状態等多くの因子が錯交しているため、ある程度の条件を加味して検討する必要がある。そこで、同一の臨床病期群、すなわちⅢ期について治療成績を検討してみた。

手術療法、抗癌剤による化学療法、放射線療法の合併療法を行った症例ではⅡ期、Ⅲ期より、Ⅲ期、Ⅳ期方向に移行して、死亡例もみられた。しかし、これにBCG、CWS等の免疫療法を併用した治療群ではⅢ期からⅡ期の方角性を示す傾向がみられたが、Ⅲ期、Ⅳ期方向に移行した症例では死亡した。

以上、癌患者は臨床病期が進展すると細胞性免疫反応は低下するが、体液性免疫系、特に補体は正常か高値を保ち、相補的に補償し、生体の免疫現象をある時期まで維持するものと考え、補体の免疫補償説を提唱し、それに基づいて六期分類の臨床的意義を検討した結果、治癒、軽快症例は表えるようにⅢ期、Ⅱ期、Ⅰ期、あるいはⅢ期よりⅡ期の方角に移行する、いわゆる“時計廻り方角”に、これに反し、予後不良症例ではⅡ期、Ⅲ期

よりⅢ期あるいはⅣ期、Ⅴ期方向に移行する。いわゆる“逆時計廻り方向”に動く傾向がみられた。が、細胞性免疫と体液性免疫の相互関係や、正確な位置づけは困難である。しかし、本研究で提示した六期分類は、癌患者の免疫反応性の把握、臨床経過の推移、治療指針、さらに予后判定へのアプローチとなり得るものと考えらる。

表2 六期分類の臨床的意義



頭頸部悪性腫瘍と血清補体価

— ツ反応と補体による6期分類の検討 —

慶大耳鼻科

○ 浅岡一之, 大山征夫, 中島康夫, 小津雷助, 堀内正敏,
小川浩司, 山崎嘉司.

人体における免疫監視機構は① alternate pathway による補体系 ② リンパ球を中心とした細胞性免疫. ③ 免疫グロブリン系 ④ classical pathway による補体系よりなるが これら4つの系は系統発生的にもまた免疫遺伝学的にもそれぞれ近い関係にあることが知られている。しかしながら、従来の腫瘍免疫学はまた細胞性免疫を偏重する傾向にある。そこで故には、頭頸部悪性腫瘍患者に対し、細胞性免疫の面からツ反応を、体液性免疫の面からは血清補体価をとりあげ、両者を同時期に測定し、西岡らの提唱した「ツ反応と補体による6期分類」と臨床経過との関係について検討をおこなった。対象は昭和49年7月より昭和51年2月迄の1年8ヵ月間に慶大耳鼻科に入院又は腫瘍外来を訪れた頭頸部悪性腫瘍患者のうち、補体価とツ反応の測定をおこなった109例である。血清補体価の測定は Mayer の 50% 溶血法にておこなった。図1は西岡らの提唱した「ツ反応と補体による6期分類」である。即ち縦軸に補体を横軸にツ反応をとり、補体は30~45を正常域とし、ツ反応は10mmを境として陰性、陽性に分けてある。これによりO~Vまでの6期に分類される。健康者はツ反応が陽性でかつ補体が正常域、即ちI期に入るわけである。故には患者の臨床経過より治療前、治療後、寛解時、5年治療、再発転移の5つの群に分けて6期分類を検討した。その結果、治療前群、再発転移群など担癌状態にある場合はII, III期に属するものが多く、寛解時群、5年治療群など非担癌状態にある場合はI, II期に属するものが多かった。各群における平均値では5年治療群のみが正常域と考えられるI期に属したが他の群はすべてII期に属した。また、寛解時群ではI期に近づく傾向を示したのに対し、再発転移群ではIII期に近づく傾向を示した。(図2)

従来、癌の治療は手術、放射線、化学療法が主体をなしていたが近年の免疫学の進歩に伴い、才々の治療法として免疫療法が登場した。現在、故には癌根治の癌後、再発転移防止を目的として免疫療法(OK-432, PSK, ミシワケ)をおこなっているが、経時的にツ反応、補体を測定することにより、6期分類の才々免疫療法の効果を検討したので併せて

報告する。

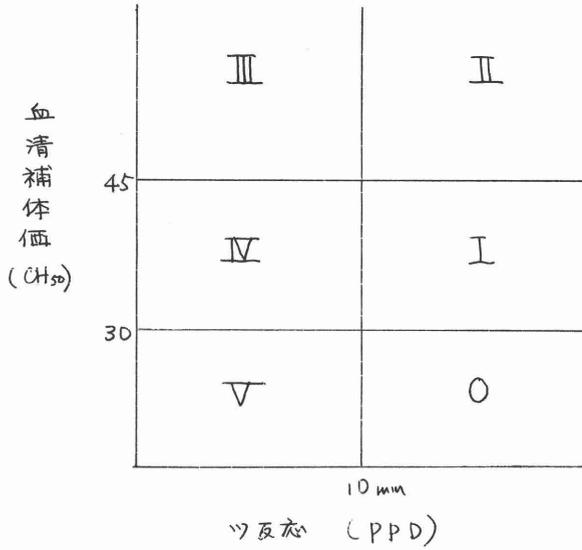


図 1. PPD反応と補体による6期分類 (西岡3)

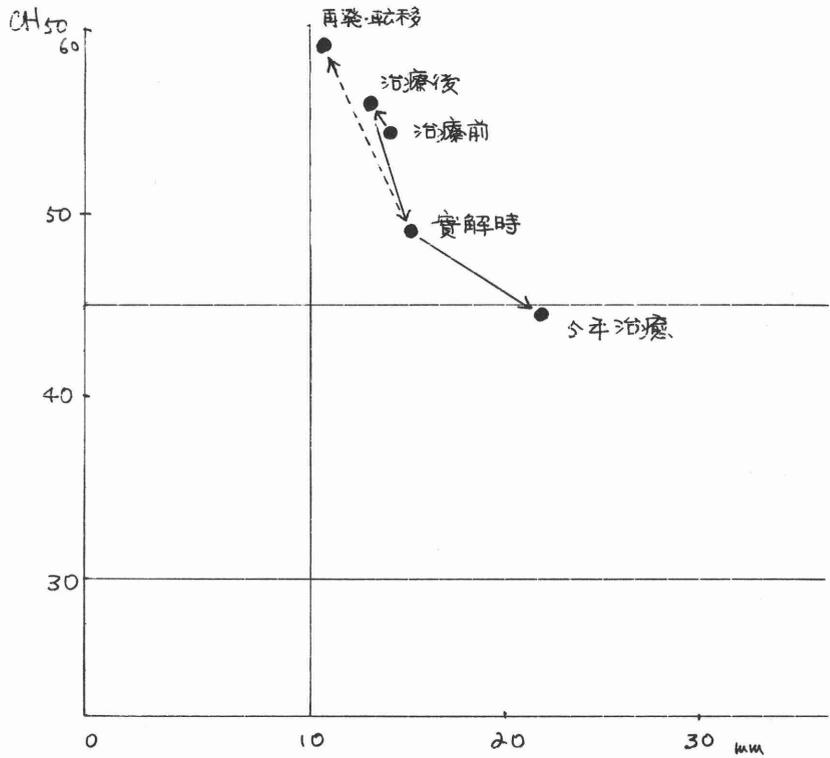


図 2.

1) RP-免疫血清

2) RP → Properdin

の定量

Alternative Pathway の測定・続報

宮島啓人, 天野啓基, 吉野内猛夫, 三橋康彦
大藤 真 (岡山大学医学部才三内科)

我々は昨年の本シンポジウムにおいてウサギ赤血球を用いる alternative pathway の測定法 (ACH50) を考案し, 全身性エリテマトーデス (SLE) を対象として検討を加えた。その結果, SLE においては ACH50 は恒値をとり, その変動は CH50 と密接な正の相関を示す事となり, SLE の生体内における alternative pathway の活性化は, 抗原抗体反応による classical pathway の活性化によって生じた C3b による positive feedback mechanism の作動が主因であろうと考案した。しかし乍ら, 生体内において直接, alternative pathway を活性化せしめる mechanism も考えらる事から, 今回, alternative pathway の component である properdin (P) と factor B (B) の活性をウサギ赤血球の溶血を用いる測定する方法を考案し検討を加えたので報告する。

I. Properdin 活性の測定

properdin を欠く血清 (RP) の作製にあたって, 稲井らによる Bentonite 法と Zymosan による方法を比較した。

右表の如く血清を Bentonite,

Zymosan で吸着すると ACH50 の低下が認められる。この事はウサギ

赤血球の溶血に P が関与している

事を示す訣であり RP とウサギ赤

血球を用いて P 活性の測定は可能であると考案した。Bentonite 法の方が

ACH50 の低下は強く, CH50 の低下は軽い為, RP の作製は Bentonite 法

を用いた。RP と患者血清との混合比は種々の検討により 7対3として下

式の如く P 活性を正常人との比 (%) で表した。

$$P \text{ 活性 } (\%) = \frac{\text{ACH50 (RP 0.7ml + 患者血清 0.3ml)} - \text{ACH50 (RP 1ml)} \times 0.7}{\text{ACH50 (RP 0.7ml + 正常人血清 0.3ml)} - \text{ACH50 (RP 1ml)} \times 0.7} \times 100$$

結果並びに考案: SLE においては P 活性は $85.1 \pm 15.4\%$ と正常人に比し有意に低下していた。

P 活性は ACH50 と密接な正の相関を示した。しかし乍ら CH50, $\beta 1C/1A$, $\beta 1E$, C3A とは相関しなかった。

以上の結果は SLE の生体内において, P を介する alternative pathway

の活性化の mechanism が存在する事を示唆する。

肺癌においては従来の報告に見られる P 活性の低下は殆んど認められなかった。

P 活性が ACH50 と相関する為、P 活性の測定は実は ACH50 の測定の結果を反映しているのではないかとの疑問が生じるが、ACH50 の極端に低下した例にも P 活性が高値である場合や、肺癌や Behçet 病においては P 活性と ACH50 の間に相関が認められなかった事等より否定出来よう。

II. B 活性の測定

factor B を欠く血清 (RB) の作製は血清を 50°C, 30分熱処理にて行った。RB の ACH50, CH50 は共に 0 であった事より、RB とウサギ赤血球を用いて B 活性の測定は可能であると考える。RB と患者血清との混合比は種々の検数より 1 対 1 とし下式の如く B 活性を正常人との比 (%) で表した。

$$B \text{ 活性}(\%) = \frac{\text{ACH50}(\text{RB } 0.5\text{ml} + \text{患者血清 } 0.5\text{ml})}{\text{ACH50}(\text{RB } 0.5\text{ml} + \text{正常人血清 } 0.5\text{ml})} \times 100$$

結果: SLE における B 活性は $80.0 \pm 19.7\%$ と正常人に比し低値を示した。

B 活性は ACH50, CH50 と正の相関を示した。

B 活性は前項の P 活性と相関しなかった。

以上、SLE の P 活性と B 活性との比較検討より、生体内における alternative pathway の活性化は positive feedback mechanism の作用以外に Properdin を介する活性化の mechanism が存在する事が考えられた。

還元アルキル化 IgG の alternative pathway 活性化能の検討

東京大学医学部物療内科 谷本 潔昭

行山 康

ヒト IgG は aggregate するに 補体の classical pathway ならぬ alternative pathway に活性化すること知られており、さうな alternative pathway については pepsin 消化により、F(ab')₂ の形にして Fc 部分と破壊しても活性化能を有すること知られてゐる。一方 IgG は還元アルキル化すると、抗原結合能力は失われるが、補体の classical pathway の活性化能も失われる。還元アルキル化した IgG が、補体の alternative pathway に活性化できる能力が失われるか、あるいは保持されるかに、これは未だ明らかでない。従つて、正常人血清を補体として使用し、未還元変性ヒト IgG ならぬ還元アルキル化変性ヒト IgG を加之して 37°C、1 時間 incubate し、CH₅₀、C3、C4、C3PA (B) を測定した。CH₅₀ は未還元変性ヒト IgG の 10mg から 0.1mg で著明に低下したから、還元アルキル化変性 IgG は 10mg を用いても CH₅₀ の低下はみられなかった。C4、C3PA も、同様に未還元変性 IgG では低下したが、還元アルキル化した変性 IgG では低下しなかった。C3 については、CH₅₀、C4、C3PA ほど未還元変性 IgG を用いても著明に低下はしなかったが、還元アルキル化 IgG では、さうな C3 の低下は弱く、CIA₅₀ を測定しても未還元変性 IgG を使用した時のみ低下がみられた。さらに免疫電気泳動を行つたところ、未還元変性 IgG でのみ、C3PA (GB 分) から GGG への転換がみられ、還元アルキル化 IgG では、このよう転換は認められなかった。

以上の結果から、IgG は、還元アルキル化して interchain disulfide bonds を切ると、補体の classical pathway ならぬ alternative pathway の活性化能も失うものと考えられるから、さらにこのことを確認するためにコブウ毒による溶血反応を用いて検討を加へてゐる。

グルカンによる Alternative pathway 活性化の機作

梶井真弥 松本美流子 永木和義
*徳比須繁え *小谷尚三

大阪府立成人病センター *阪大歯学部口腔細菌

くはじめに> 前回のシンポジウムで、alternative pathway を経る補体の活性化にあずかる多糖の構造を明らかにする目的で、微生物由来の多糖主としてグルカンを用いて補体系を活性化する作用について報告した。

すなわち、Str. mutans OME 176 がつくるグルカンは、一定の鎖長をもった α -1,3 結合の主鎖に α -1,6 結合の側鎖が結合した構造をもつ alternative pathway を活性化するか、このグルカンの活性発現には α -1,3 の主鎖と α -1,6 の側鎖がともに必要であるという結果を得た。

今回は、この OME 176 グルカンの alternative pathway 活性化かどのような機作でなされるかについて検討した結果を報告する。

く実験方法および材料>

1) GX formation

ヒト血清 1.0 ml 当り、500 μ g の OME 176 グルカン (G) を加え、37°C で incubate し、時間毎に反応液をくみ出しすぐに遠沈し、GVB で 3 回洗った後、C3 あるいは C5 と 30°C、10 分反応させる。遠沈後の上清の C3, C5 を定量する。

2) Decay

GX を 37°C、3 分あるいは 5 分をつくらせた後、よく洗い、37°C で incubate し、時間毎にくみ出し遠沈後 C3, C5 と反応させ、C3, C5 分解活性の低下をみた。

3) 回復実験

37°C、4 分をつくらせた GX を 37°C 中で 3 時間 decay させたものに、factor B factor D を加え、30°C、10 分 incubate する。遠沈後よく洗い C3, C5 と反応させた。用いた factor B は Baerick の方法、factor D は Fearon の方法に従って分離精製した。

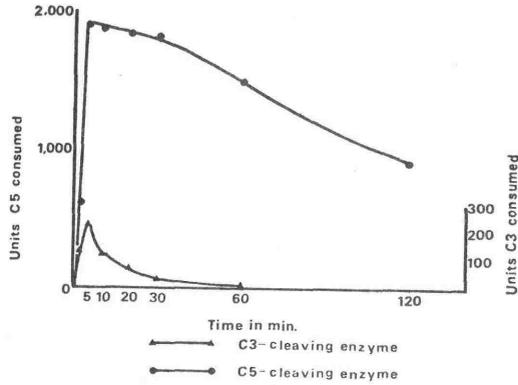
く結果>

1) GX 上の C3 and C5 cleaving enzyme の形成

37°C で時間毎につくらせた GX に、285 unit の C3, 2000 unit の C5 をそれぞれ加えて 30°C、10 分反応させ、遠沈後、上清中の C3, C5 を定量した。

図 1 に示すように、GX の C3, C5 を分解する活性は 5 分で最大となり、G とヒト血清とを incubation する時間が長くなるにつれて、減少していく。C5 を分解する活性は、溶血活性でみる場合、C3 よりもはよかに強い。

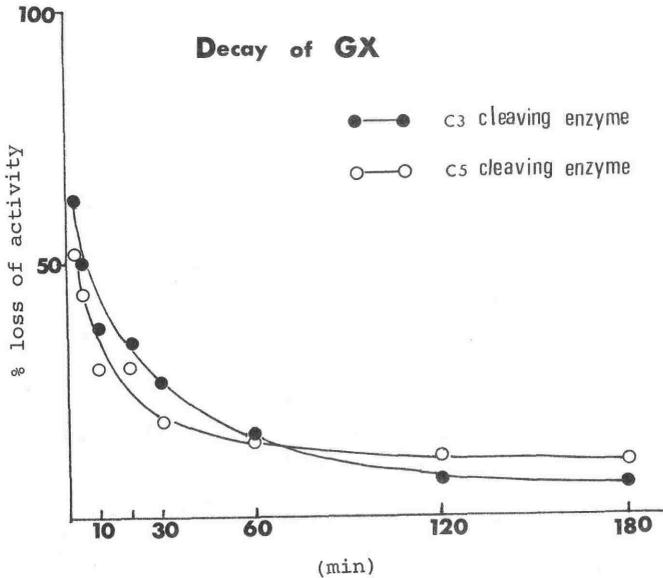
(図 1)



2) GX の decay

G を血清と 37°C 3 分間 (C3 cleaving enzyme)、又は 5 分間 (C5 cleaving enzyme) 反応させて作った GX を、GV B 中で 37°C に incubate すると、図 2 に示す通り、30 分までで GX の C3 あるいは C5 をこめず活性は半分に低下する。それ以後はゆるやかに decay し、3 時間 incubate すると活性はほとんどなくなる。このような条件で活性を失った GX を GX^d と名づけた。

(図 2)



3) B および D̄ による GX^d の回復

GX^d に B, D̄ を 30°C 10 分反応させ、よく洗った後 C3 あるいは C5 を反応させて活性が回復するかどうかを見た。その結果は表 1 に示す通りである。すなわち、B のみ D̄ のみでは回復せず、B, D̄ を同時に加えた時に、活性の回復は著しい。昨年、藤田らは、ヒト血清を用いて作った GX では

モルモット血清を用いて作ったGXと異なり、decayの途中でBのみでGXとしての活性を回復するステップがないことを報告した。そこで、GXのdecayの過程においてもBのみで活性が回復する過程があるかどうか検討した。GXを37°C、4分で作成し、37°C中でincubateし、時間毎にくみ出す。各時間毎のGX^dにB、 \bar{D} を加え、よく洗い、遠沈した後C3を加える。表2に示すように、どの段階のGX^dもBのみあるいは \bar{D} のみでは回復せず、B、 \bar{D} 同時に加えると回復することがわかった。

<結論> OM 8176 グルカンが alternative pathway を活性化する操作は、Zymosanとヒト血清を反応させた時、Zymosan上にC3, C5 cleaving enzymeができると同様に、グルカン上にC3, C5 cleaving enzymeが生成され、

C3以下がこわされていくものと考えられる。

これらのenzymeは37°C中でGXをincubateする事によりdecayし、B、 \bar{D} を同時に加えることにより活性は回復する。この点と、GXのdecayの過程でBのみで活性を回復するstepのない点は、GXの場合とほぼ一致する。

Table 1. Regeneration of GX from GX^d, by the addition of B and \bar{D}

| Preparations | Factors reacted with GX ^d or G | C3 inactivation (%) | C5 inactivation (%) |
|-----------------|---|---------------------|---------------------|
| GX | | 51 | 65 |
| GX ^d | | 3.0 | 13 |
| GX ^d | B | 0 | 5.5 |
| GX ^d | D | 15 | 13 |
| GX ^d | B+D | 83 | 42 |
| GX ^d | B/D | 45 | 37 |
| GX ^d | D/B | 31 | 10 |
| G | | 6.3 | 4.5 |

Table 2. Regeneration of GX from the various decay stages of GX

| | Time for decay (min) | C3 inactivation (%) by G or decayed GX treated with | | | |
|----|----------------------|---|------|-----------|------------------|
| | | GGVB | B | \bar{D} | $\bar{B}\bar{D}$ |
| G | | 10 | N.D. | N.D. | 7 |
| GX | | 99 | N.D. | N.D. | N.D. |
| GX | 5' | 56 | 50 | 60 | 94 |
| | 10' | 59 | 57 | 50 | 96 |
| | 30' | 35 | 31 | 38 | 96 |
| | 60' | 27 | 37 | 36 | 97 |
| | 120' | 22 | 33 | 24 | 97 |
| | 180' | 19 | 37 | 28 | 97 |

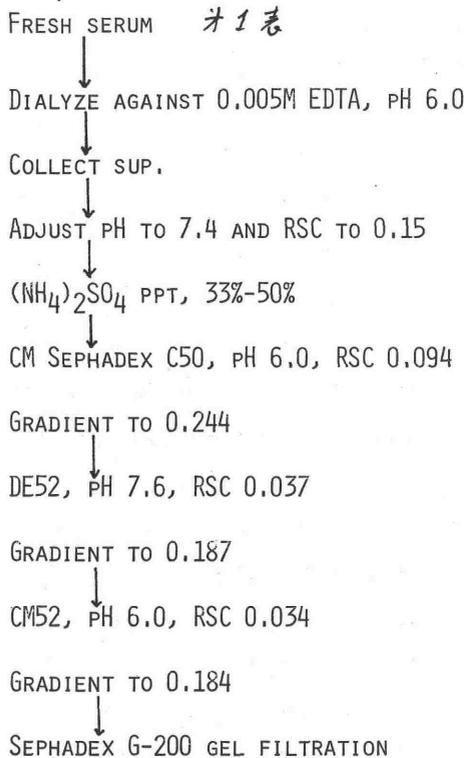
ALTERNATIVE PATHWAY の不活化物質 (INA)

大阪府立成人病センター 永木 和義, 瀧内 三枝子, 稻井 真珠

(目的) EAC43b cell の alternative pathway を介した溶血の開始材料は cell 上に \bar{D} , B および $C3b$ によって \bar{B} dependent hemolytic site が形成されることがある。この系の不活化物質としてはすでに $C3b$ inactivator ($C3b$ INA) が知られており, Alper 等⁽¹⁾ は $C3b$ INA は $C3b$ のみならず \bar{D} をも不活化すると報告している。しかし彼等の実験結果より見て $C3b$ INA が \bar{D} INA としての活性を持つとは断定出来ない。

我々は当初 \bar{D} inactivator を見出す目的で今回の実験をすべしと来たが、最終的に得られた物質は \bar{D} を不活化せずむしろ \bar{B} inactivator と思われる。

(材料) B はヒト血清より酸性沈殿, 硫酸沈殿, DEAE-sephadex, CM-sephadex および sephadex G-200 を用いて精製, 1mg/ml を原液として使用した。D は酸性沈殿, QAE-sephadex および sephadex G-75 を用いて精製, $OD_{280} = 0.215$ のものを原液として使用した。 $C3b$ INA は Cordis より購入した。EAC43b cell は精製した $C3$ と EA14 hu 23p cell を反応させて作り⁽²⁾ $0^{\circ}C$ に保存した。



(結果)

1. INA の精製 精製方法は才1表に示した。精製中の INA の活性は $\bar{D} + \text{サンゴ}$ / $30^{\circ}C, 30'$ / EAC43b + B/ $30^{\circ}C, 20'$ / C-EDTA の系で溶血阻止で assay した。新鮮血清 1ml からの INA の収量は $0.8 OD_{280}$ unit T, $OD_{280} = 0.247$ のものを原液として以下の実験に使用した。精製 INA は 5% フェース / 平衡液で 2.5g の band を示した。分子量は sephadex G-200 gel filtration profile より計算して 20万であった。
2. INA の作用材料 $\bar{D} + \text{INA}$ / $30^{\circ}C, T'$ / EAC43b + B/ $30^{\circ}C, 20'$ / C-EDTA の系で実験を行うと見かけ上の \bar{D} の不活化は time independent であった。又 B + INA の系でも同様の結果を得た。

第2表

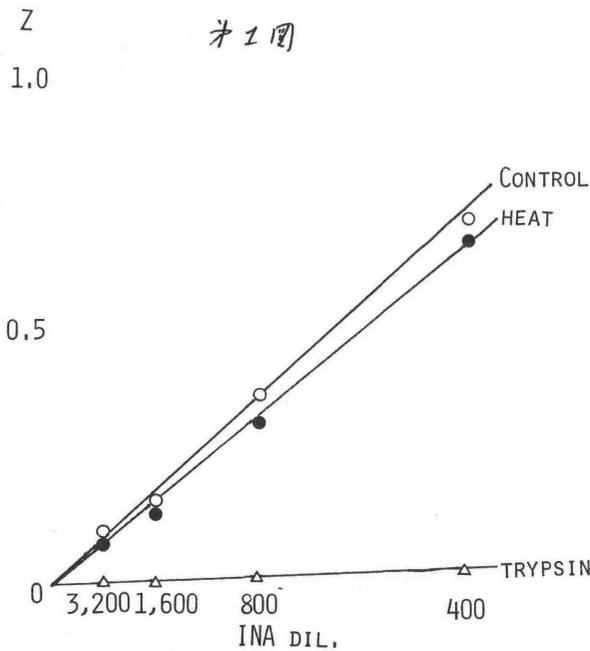
| | |
|--|------------------------------------|
| EAC43B, \bar{D} , B, INA / 0°C | → 30°C, 30' → C-EDTA, 37°C, 60' |
| EAC43B, \bar{D} , B, BUFFER / 0°C | |
| EAC43B, INA / 30°C, 15' / \bar{D} , B | |
| EAC43B, BUFFER / 30°C, 15' / \bar{D} , B | |
| B, INA / 30°C, 15' / EAC43B, \bar{D} | |
| B, BUFFER / 30°C, 15' / EAC43B, \bar{D} | |
| \bar{D} , INA / 30°C, 15' / EAC43B, B | |
| \bar{D} , BUFFER / 30°C, 15' / EAC43B, B | |

Z
 0.25
 1.25
 0.25
 1.21
 0.23
 1.22
 0.23
 1.24

T, 才2表に示す材料実験を行った。その結果は若くし明らかな材料に、INAをpreincubateするものがEAC43B cell, B, \bar{D} の何れであってcellの溶血度の

の低下は一定であり、INAはC3b, B, \bar{D} のどれにも直接作用せず、C3b, B, \bar{D} によって形成された \bar{B} に働くことが推定された。事実、EAC43B, \bar{B} cellを作りこれにINAを作用させることによりEAC43B, \bar{B} cellの溶血活性の低下を認めた。

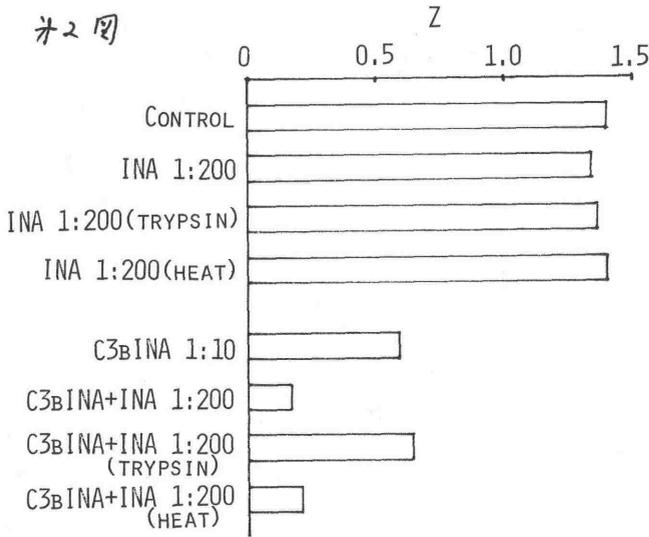
3. INA活性の測定 INA活性の測定はINA, B, \bar{D} , EAC43B cellを同時に加えて30°Cで30分incubate后 C-EDTAを加えてCellの溶血度の低下を行った。計算方法はGigli等のCI INA活性の定量法に準じた。この方法でINA活性を測定すると才1図に示す様にlinear dose responseが得



られた。又この図から明らかな材料にINAはheat stable (56°C, 30分), trypsin sensitiveであった。

4. INAとC3B INAあるものはそのacceleratorと同一才2表に示した実験に用いたEAC43B cellはC3b siteがexcessである(C1, C2, C5およびC6~9を加えたことにより充分に完全溶血する), 我々のINAがC3B INAと同一なことは断定出来る。すなわちC3b siteがlimitのcellを作ればINAを30°Cで30

オ2回



0分位かせた所。オ2回上半に示す様に C3b site には INA は全く作用しなかった。しかしこの回の下半に示す様に C3b INA の活性を著明に accelerate することを認めた。この C3b INA accelerating activity は INA 活性と同様に heat stable かつ trypsin sensitive であった。ゲル上の電泳泳動で INA 活性と

accelerator 活性は共に main の protein band と同じ位置に泳動された。

(まとめ)

1. 我々は alternative pathway の inactivator を分離した。
2. この inactivator は B inactivator である) と推定してゐる。
3. Inactivator は C3b INA accelerating activity を持つが、この両者が同一物質に由来するかどうかは不明である。
4. Whaley 等⁽³⁾ の C3b INA accelerator (A-C3b INA) とは分子量がことなり、A-C3b INA の分子量は 36 万である。

(文献)

1. Alper, C.A. et al., Proc. nat. Acad. Sci., 69: 2910, 1972
2. Fearon, D.T. et al., J. exp. Med., 140: 426, 1974
3. Whaley, K. & Ruddy, S., Sixth International Complement Workshop, 1975

Properdin 系の solid phase B u" fluid phase K 於ける作用秩序。
 (2) EAC43 cell 表面に, B u" fluid phase Z" の properdin の役割。
 北大(函)才1生化学 今野孝彦, 平井秀松。

Properdin 系に於ける properdin の役割については, 依然不明な点が多い。
 我々は EAC43 cell B u" fluid phase Z" の properdin の役割について検討を加えたいので報告する。

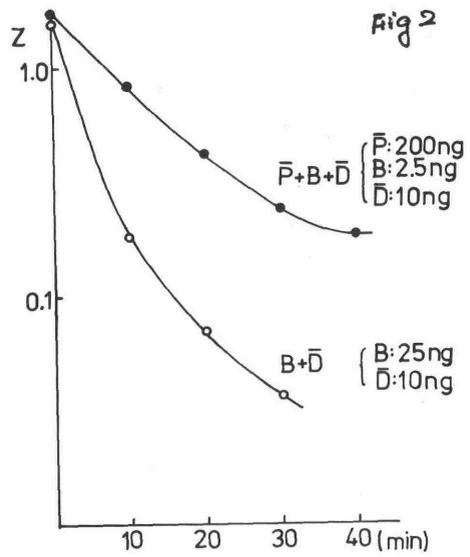
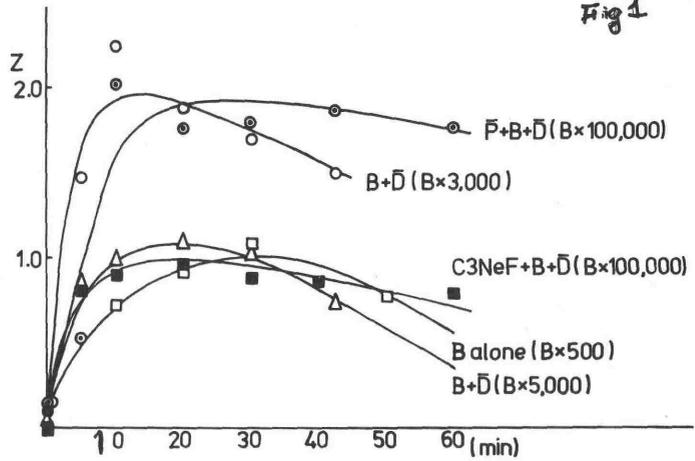
材料と方法

\bar{P} : B は既報の方法で精製した。B は ^{125}I を label し SDS-disc で単一な band に一致する放射活性を有する標品を用いた。

\bar{D} は QAE-Sephadex ゲル濾過をくり返し, 最終に等電点分画法を用いて精製した。E₁C₃ はイオン交換 γ-オクトヒドロキシアパタイト B u" ゲル濾過を用いて精製した。一部は Cordis より買ってきた。C₃b は EAC14⁰¹² と C₃ を incubate して作製した。

結果

(a) EAC43 cell を用いた解析。
 図1には示すように B 単独でも λ の量を増す (250ng) と増血が生ずる。 λ の Max は 25~30 分でであるが \bar{D} を入ると 5~10 分の Max となる。この時間には \bar{P} や C₃NeF が入ると λ の量も変化はないが, \bar{P} や C₃NeF が入ると λ の decay はかなり遅くなる。
 λ は \bar{D} を入ると 11 分より約 30 分の増血活性が得られる。
 B + \bar{D} で形成される convertase は約 4~5 分の half-life を有するが \bar{P} が入ると 15 分より長く延長する。しかし EAC43(B) 系に \bar{P} を加えても増血活性は増すが λ の half-life の延長はみられない。
 cell 表面上に形成される convertase を C₃ の清毒という点で検討すると, $\bar{P} + B + \bar{D} + C_3$ では 70~80% の清毒があるとすると, B + \bar{D} では



7~8%の消費しかみられなかった。

以上の実験より EAC43 cell 中の convertase 形成には \bar{p} の入り込みと λ の活性を要する。この作用は主に B の active site の unfold によると考えられる。

(b) fluid phase での検討。

液相中の C3 convertase 形成は図3に示すようにかなり遅徐なカーブを示し、これは図1の \bar{p} や C3MeF を入り込めたときのカーブとよく似ている。このことは液相中の \bar{p} を中心とした反応は、reversible 反応を示唆する。¹²⁵I B を目標として、complex 形成を追った。明確な complex 形成はみられなかった。これは SDS-disc を用いた方法によるためか、検討中である。

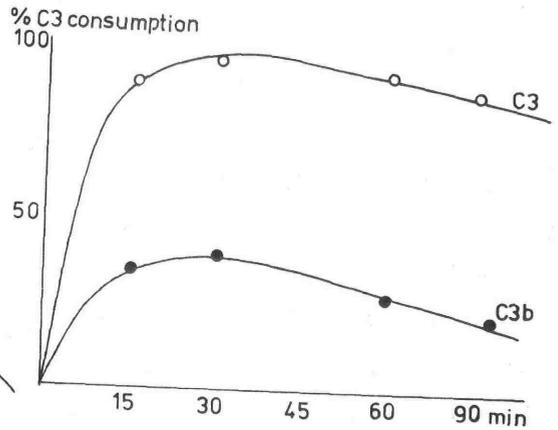
次に液相中で、native な C3a の必要な C3b が必要なかを検討した。表1に示すように C3 は C3b より明かに多量の良い反応を示し、液相中では、feedback system は有効ではないと思われる。

以上の実験より、D は B の active form に対する作用がある。 $\bar{p} = \bar{D}$ の相互作用は、さらに λ の作用を増強し、この仲間として C3a や C3b を要するものと思われる。

2価の金属イオンは \bar{p} の導入には必要ない。

C3MeF に関しては現在の段階では \bar{p} と independently λ と似た作用を示す。 λ の本体に類似した結論がつけられなかった。

FORMATION & DECAY of C3 CONVERTASE



| FIRST REACTION (a) | SECOND REACTION (b) | % C3 CONSUMPTION |
|---|---------------------|------------------|
| $\bar{P} + \bar{D} + \bar{D} + C3^{(c)}$ | BUFFER | 97.6 |
| $\bar{P} + \bar{D} + \bar{D}$ | $C3^{(c)}$ | 4.7 |
| $\bar{P} + \bar{D} + \bar{D} + C3^{(c)}$ | $C3^{(c)}$ | 97.2 |
| $\bar{P} + \bar{D} + \bar{D} + C3^{(d)}$ | $C3^{(c)}$ | 78.0 |
| $\bar{P} + \bar{D} + \bar{D} + C3^{(e)}$ | $C3^{(c)}$ | 40.2 |
| $\bar{P} + \bar{D} + \bar{D} + C3b^{(f)}$ | $C3^{(c)}$ | 59.0 |
| $\bar{P} + \bar{D} + \bar{D} + C3b^{(g)}$ | $C3^{(c)}$ | 12.0 |
| $\bar{P} + \bar{D} + \bar{D} + C3b^{(h)}$ | $C3^{(c)}$ | 28.8 |

P: 500ng
D: 2500ng

(a) First reaction was stopped by 0.04MEDTA-GGVB
(b) Second reaction was done in 0.01MEDTA-GGVB

(c) C3 100U
(d) C3 20ug (80U)
(e) C3 2ug (8U)
(f) C3b 50ug
(g) C3b 5ug
(h) D 25ng
(i) D 5ng

表1

Propendin は a solid phase B_u fluid phase K 及び 3 成分秩序。

(F) Rabbit B_u Sheep erythrocytes 上に形成 される propendin-dependent C3 convertase K ついて。

比大(医) 才 | 生化学 今野孝彦 平井秀松。

国Ⅱ かんせーγ-ウイルス部 田村 稔

Rabbit erythrocyte (Er) が B_u の propendin 赤血球に結合する"とこのことが知られているが、その機構は全く不明である。我々は この機構を検討中、Er K \bar{p} が結合する"とこの"最初の step"である"と見出し、同様の機構は、Sheep erythrocyte (Es) K も存在すること、この反応には 抗体が関与している"と見出し K 報告する。

材料と方法

各因子は、本抄録中に詳述してある。右の C6, 7, 8, 9 は Nelson and Yamura の方法で C3-C9 の source は rat の血清を用いる。

結果

(1) 各因子をくみ合わせて、Er, B_u Es の 2 種血をけると p, B, D, C3 がすべて結合している"とこのみ 2 種血のみからわかる。この 2 種血は、赤血球を充分洗滌する、C-EDTA を加えても 2 種血のみから、cell 表面上に K の site が形成されている"と見している。

(2) 上の因子を換えて 赤血球と反応させ、洗滌する。上の因子を換えてくみ合わせの reaction mixtures と incubate し、洗滌する、C-EDTA を加えると 2 種血 K \bar{p} が反応し、次に B, D, C3 が結合する"とこのより 赤血球表面上に convertase を形成する。

(3) C-EDTA の代りに C3, C5, C6-C9 をくみ合わせて 2 種血をけると C3, C5, C6, C9 のすべて K 結合する (表 1)

(4) 以上の反応様式より、classical pathway の関与を否定する意味で、intermediate cell K 各因子を 2 種血をけ K (表 2)

EAC1 K B, D, C3 を加えて、洗滌する、C-EDTA (rat) を加えても 2 種血のみからわかる。又 赤血球と \bar{p} の反応 K EDTA (あまり) 影響を与えなかった。

(5) 抗体の効果を検討してみると、形成される C3 convertase には、Anti-C3, Anti-B はほぼ完全に活性を抑制し、Anti-p は 20% 程度の抑制しかみられなかった。Er + \bar{p} で形成した Er \bar{p} には Anti-p は 100% 近い抑制効果を示し、Er + \bar{p} の段階で Anti-IgG は、全く抑制効果を示さなかった。(表 3)

6) 形成された convertase の decay は EAC43 上 $\bar{P}B, \bar{P}$ で形成された convertase の decay curve と類似した half-life 15分程度の bipotential の decay curve を示した。

以上の実験結果より

(1) Er, Bu, Es の Eト properdin 系による溶血の最初の step は \bar{P} が結合することである。

(2) この結合には、抗体を媒介とするか、x cell 表面上に \bar{P} の change の差による結合の可能性があるが、前者は否定的と思わしむ。

(3) 抗補素の inhibition の実験より、cell 表面上の enzyme の活性に必要因子は B C3 多量 D であり、 \bar{P} は unit を形成していても結合の必要可能性が低い。
→ 抗体を媒介する解法は。

(4) 最初の step にさらに他の因子が必要と思わしむ。EAC43 cell という人工的に C3b, 抗体を結合させた cell に対して、初等因子の自然な状態での解法に有効な方法と思わしむ。

Effects of later components on hemolysis of rabbit erythrocyte

| intermediate | C3 | C5 | C6-C9 | Y |
|--------------------------------|----|----|-------|-------|
| E+ \bar{P} +B+ \bar{D} +C3 | + | + | + | 0.267 |
| | + | + | - | 0.01 |
| | + | - | + | 0.005 |
| | + | - | - | 0.01 |
| | - | + | + | 0.03 |
| | - | + | - | 0.005 |
| | - | - | + | 0.005 |
| C-EDTA (rat) | | | | 0.386 |

表1

表3

Effects of antisera on hemolysis of rabbit erythrocyte

| intermediate | antisera | % inhibition |
|--------------------------------|----------|--------------|
| E+ \bar{P} +B+ \bar{D} +C3 | a-IgG | 2.6 |
| | a-C4 | 12.9 |
| | a-P | 20.6 |
| | a-B | 94.9 |
| | a-C3 | 97.1 |
| E+ \bar{P} | a-P | 98.7 |
| E | a-IgG+P | 4.1 |

表2

| Intermediate cells | First reaction | Second reaction | Y |
|--------------------|------------------|-----------------|------|
| Er \bar{P} | B+ \bar{D} +C3 | C3-C9 | 0.66 |
| | B+ \bar{D} +C3 | C3-C9 | 0.85 |
| Es \bar{P} | C4+C2 | C3-C9 | 0.0 |
| | B+ \bar{D} +C3 | C3-C9 | 0.0 |
| Es | C4+C2 | C3-C9 | 0.0 |
| | B+ \bar{D} +C3 | C3-C9 | 0.0 |
| EsA | C4+C2 | C3-C9 | 0.0 |
| | B+ \bar{D} +C3 | C3-C9 | 0.0 |
| EsAC1 | C4+C2 | C3-C9 | 0.99 |

Er \bar{P} : Rabbit erythrocyte (Er)+ \bar{P}
 Es \bar{P} : Sheep erythrocyte (Es)+ \bar{P}

Alternative Pathwayによる補体系の活性の測定 —ウサギ血球の溶血反応—

順天堂大学内科(腎) 中山秀英, 小出 輝
国立がんセンター研究所 田村 昇

目的

ウサギ血球はEGTA存在下でヒト血清によって溶血する。この反応は、alternative pathway を介して補体系が活性化されたことにより起こるものとされている。今回われわれは、この反応を利用して腎疾患およびSLE, サルコイドーシスなどのalternative pathway を介しての補体系の活性を、測定しうるか否かを検討した。

方法

1. ヒト血清によるウサギ血球の溶血反応 (AP-CH50測定)

緩衝液として2mMのMg⁺⁺を含む0.01M EGTA-GVBを用いた。通常、ヒト血清をこの緩衝液で1/20に希釈。0.2mlのウサギ血球(5×10⁷/ml)に緩衝液を加え、さらに希釈ヒト血清を0.8mlから0.25mlまで次第に減量して加えて、全量1mlとした。37°C, 30分反応させ、2mlの0.01MEDTA-GVBを加え遠心後、上清のO.D.414を測定し溶血の程度を求めた。たとえば1/20希釈の0.5mlが50%溶血を起こした時、この血清のAP-CH50は40units/mlの活性をもつものとした。血清希釈1/10以下で反応を行なう場合には、9vol.の血清に1vol.の0.01MEDTAをまず加え、それから0.01MEDTA-GVB・Mg⁺⁺で希釈し使用した。ウサギ血球のかわりにヒツジ血球を使う時は1×10⁸/mlの濃度で使用した。

2. 血清補体価はMayer法にしたがって測定した。またC₄, C₃, Factor BはImmunodiffusion plate (M-Pantigen[®])を用いて測定した。

実験結果

1. GVB⁺⁺中あるいはEGTA存在下でのヒト血清のRE, E, EAに対する溶血活性の比較

初めにこの反応にclassical pathwayの因子がどの程度関与しているかを検討するため、次のような実験を行なった。血球としてはウサギ血球(RE, 5×10⁷/ml)とヒツジ血球(E, 1×10⁸/ml), 感作ヒツジ血球(EA, 1×10⁸/ml)を使用した。緩衝液としては、0.01MEDTA-GVB・Mg⁺⁺とGVB⁺⁺を用い、AP-CH50測定法に準じて同一血清の溶血活性を求めた。表1に示すようにREの溶血はGVB⁺⁺中でも、EGTA存在下でも著しい変化は認められなかった。これに反してE, EAのヒト血清による溶血はEGTAが存在すると著しく低下を示し、

ほとんどが 2.5 units/ml 以下であった。おなわり $\frac{1}{2}$ 希釈血清でたかだが8~2

%程度の溶血にすぎなかった。したがってEGTA存在下中ではたとえC1, C4, C2が反応したとしてもそれは無視できよう。それ故EGTA存在下中でのヒト血清のウサギ血球に対する反応はPlatts-Millsらが

表1. GVB*中あるいはEGTA存在下でのヒト血清のRE, E, EAに対する溶血治性の比較

| 検体NO. | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | | |
|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
| 反応液 | GVB* | EGTA | GVB* | EGTA | GVB* | EGTA | GVB* | EGTA | |
| 血球 | RE | 102.0 | 48.7 | 121.9 | 40.0 | 94.3 | 36.6 | 79.0 | 38.4 |
| | E | 135.1 | <2.5 | 243.9 | <2.5 | 238.0 | <2.5 | 259.0 | <2.5 |
| | EA | 526.3 | <2.5 | 555.5 | <2.5 | 476.1 | <2.5 | 454.5 | 4.6 |

(50%溶血単位/ml)

指摘するように、alternative pathwayを介するものと考えられる。

2. AP-CH50とCH50およびC4, C3, Factor Bとの関係

各種疾患計114例についてAP-CH50を測定しCH50(Mayer法)およびC4, C3, Factor B量と比較した。図1に示すようにAP-CH50とCH50とは $r=0.846$ で正の相関を示した。C3とも $r=0.609$ で正の相関が認められた。(図2) Factor B, C4とは全体としては相関が認められなかった。

考察

以上のようにAP-CH50とCH50はよく相関した。補体系がclassical pathwayあるいはalternative pathwayのいずれかを介して反応したとしても、その結果C3-C9にまで反応が進んだためAP-CH50とCH50が相関するものと考えられる。事実AP-CH50はC3ともよく相関する。AP-CH50の測定は光天的にalternative pathwayの因子が欠如あるいは、C1, C4, C2の欠如が想定されるような場合を除いてはあまり有用な測定法とは言えないかもしれない。

Correlation between AP-CH50 and CH50

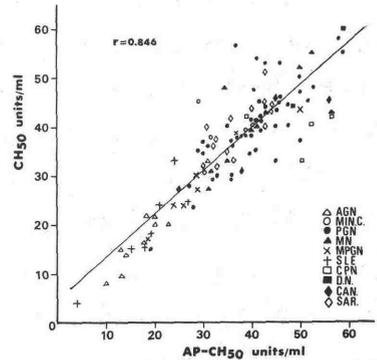


図 1

Correlation between AP-CH50 and Serum C3

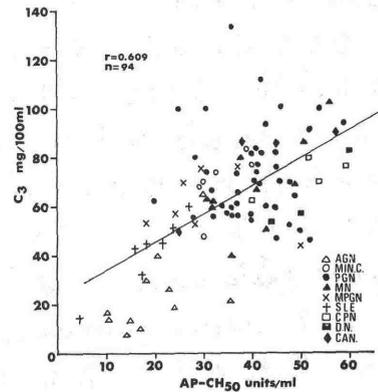


図 2

モルモット赤血球 (g.p.E) のプロロージン系を介した溶血
について 東大物療内科 行山 康, Public
Health Research Institute of City of New York, Abraham G. Asker

抗体によらないで補体系が活性化して、赤血球が引きおこされることは、PNH (先天性夜間性血色素尿症) 赤血球, ヒツジ赤血球, ウサギ赤血球などで報告がある。モルモット赤血球に関しては、ヒト血清ヒコブラ毒因子 (CVF) 存在下で反応させることにより溶血反応がおこることが知られている。今回、我々は g.p.E が CVF がなくともラット血清によりプロロージン系を介して溶血することを見出し、その反応機構の一端を知り得たので報告する。

<材料、及び、方法> 緩衝液; VBS¹ (PH7.5), 0.02M EDTA-VBS¹, 同定法通り作製した。溶血反応には Mg-EGTA-VBS¹ (1mM Mg²⁺, 5mM EGTA を含む VBS¹, PH.7.5) を稀釈液として用いた。g.p.E は心臓採血後、アルサーバー液に保存、4°C に保った。ヒツジ赤血球の場合の如く、aging する必要はなかった。ラット血清は 70-80, 分注し、-70°C に保存したものを用いた。ラット血漿 (plasma) はエーテル麻酔下、心臓採血にて、5mM EGTA.. 或いはヘパリン 5u/ml blood を含むように採血した。採血後、直ちに遠心分離し、得た plasma を、同日、実験に供した。同じラットより血清も採取し、plasma の pair sample として、溶血反応; Mg-EGTA-VBS¹ で稀釈したラット血清 0.4ml に 1×10^7 g.p.E 0.1 ml を加え、37°C 30min 加温後、冷えた生食水 2ml を加え、遠心、上清の 412 μ l における吸光度を測定し、定法通り、% 溶血率を算出した。抗血清—抗ラット factor B は Brade 等の方法に準じて、ラット factor B を単離後、ウサギに免疫したものを用いた。抗ラットプロロージンは、~~ラット~~ 血清ヒコブラ毒を 170°C で反応後、ガイモザンより eluate を得て、それをウサギに免疫した。得た抗 eluate 血清を、ラット RP セルを Farrow's 4B に結合させたカラムを通過させることにより、抗ラットプロロージン血清を得た。抗ラット C3 は、ガイモザン—ラット血清 ~~及び~~ 複合物を Freund の incomplete adjuvant と共にウサギに免疫し、得た抗血清をラット pseudoglobulin で吸収して、作製した。いづれの抗血清も、免疫電気泳動ではラット全血清に対して、ただ一本の沈降線を形成した。ガイモザンと 37°C 反応後のラット血清に対 (抗ラット factor B 及び抗ラット C3 はそれぞれ、native の β 易

節度をもった沈降線以外にのみ節度をもった沈降線を形成した。

< 結果 >

(量的関係) g.p.E (1×10^7 cells) に対し、ラット血清は Mg-EGTA VBS 0.4 ml 中に $5 \times 10^{-3} \sim 2 \times 10^{-2}$ ml 含むことにより、溶血活性の dose-response を示した。 2×10^{-2} ml が多いと完全溶血、或いは溶血阻止の傾向がみられた。参考の為に同量の赤血球 (1×10^7 cells) を使用して CH50 (感作ヒツシ赤血球), CVF H50 (g.p.E.) を行ったところそれぞれ $1 \times 10^{-3} \sim 2 \times 10^{-3}$ ml 及び $5 \times 10^{-5} \sim 5 \times 10^{-4}$ ml の範囲で dose response を示した。g.p.E のラット血清による溶血は、CH50 の測定、CVF による factor B の測定 (CVF H50) に比して比較的、高濃度の血清が必要であることが判明した。

(Kinetics). 22°C . では一分間の lag-phase の後直線的に溶血反応が進み 15 分後、傾きがゆるやかになったが、少しづつ溶血は増加し、40 分まででは plateau に達しなかった。反応の途中に 0.01 M EDTA (最終濃度) を加えると、溶血は完全に停止して、plateau を持続した。 30°C では lag-phase は直ちにみられ、0 時間より直線的に溶血反応が進み、15 分後、傾斜がゆるやかになったがやはり plateau に達しなかった。EDTA による inhibition は 22°C の場合と同様であった。EGTA は Ca^{2+} chelator であり、EDTA は Mg^{2+} , Ca^{2+} を chelate することから、上記の結果は、少くとも、この溶血反応には Ca^{2+} は不要で、 Mg^{2+} が重要であることがわかる。

(g.p.E. による吸収, サイロガンによる吸収, Sephadex-G-75 fraction の影響.) ラット血清を 10% g.p.E. (最終血清比). 2°C にて 2 回吸収後、溶血に対する影響をみれば、殆んど差がなかった。ラット血清を 1 ml あたり 2 mg のサイロガンで、^{吸収の前後で} 17°C にて 30 分反応後: ^{ラット血清の溶血を Sephadex-G-75 に分離した後} 調べたところ、完全に溶血活性を失っていた。TRIS-HCl pH 8.0 でラット血清 2 ml を fractionation L. exclude された部分 (RD) と include された部分 (D.fr.) とをそれぞれ 2 ml に濃縮した。もとの血清が $5 \times 10^{-3} \sim 2 \times 10^{-2}$ ml の範囲に溶血活性を示したのに対し、RD では $3 \times 10^{-2} \sim 1 \times 10^{-1}$ ml で溶血活性を示して、^{顕著な減少を} 示した。また D.fr. は全く溶血を ~~示さず~~ 示さなかった。

上記の結果よりラット血清中の g.p.E に対する自然抗体はこの溶血反応に殆んど影響を及ぼさぬこと、ラット γ 球蛋白が関与しているらしいこと、Sephadex-G-75 によるラット血清の ^{成分} 除去が、顕著な溶血活性の低下をもたらすことから、この溶血反応には低分

子蛋白 (D fr.) も関与していることが推定された。

(特異抗血清の吸収による影響) ラット血清を EDTA 存在のもとに 4°C で、抗ラット factor B, 抗ラットプロテイン, 抗ラット C3, 抗 Egg albumin (ラットアルブミンと交叉反応を示す) にて、抗体過剰減で吸収した。25000g, 60 min. 遠心後上清を VBS に透析し、得られた sample について、g.p.E に対する溶血活性を検討した (図 I)。抗 factor

* EXP. I EXP. II EXP. III

| Rat serum μl | 10 | 20 | 25 |
|-----------------|---------------------|------|----|
| Antisera to | Hemolysis (percent) | | |
| プロテイン | 0 | 0 | 0 |
| Factor B | 0 | 0 | 0 |
| C3 | 0 | 0 | 0 |
| EA | N.D. | 48 | 62 |
| Buffer | 100 | N.D. | 82 |

B, P, C3 では、ラット血清は殆んど溶血活性を消失するの比し、抗 EA による吸収では溶血活性を保持した。前記の要結果、及び、この実験より、ラット血清-g.p.E の

* それぞれ、ラット血清の異なる濃度に対し、個別に4つずつ実験の結果を示す。

EGTA 存在下での溶血システムには、Factor B, プロテイン, Factor D, C3 が関与していることが推察された。

(ラット Plasma による溶血) 0.05 MEGTA 及び ²⁵u heparin を 0.5 ml に含む

| 図 II | Hemolysis (%) | |
|--------------------------------------|---------------|---|
| Serum | 92 | た溶血中に、ラット血清 4.5 ml を心臓採血し、混和後、直ちに遠心し、 |
| Plasma | 18 | rat plasma を得た。同一ラットから血清をも、採取し、血清, Plasma |
| Plasma + Ca ⁺⁺ | 92 | の 10 μl の sample について、EGTA |
| Plasma + Protamin | 24 | buffer 存在下で g.p.E. に対する溶 |
| Plasma + Ca ⁺⁺ + Protamin | 99 | |

血活性を検討すると、血清 92%, Plasma で 18% と Plasma の溶血活性が低下していた。Plasma に最終濃度で 1 mM Ca⁺⁺ を excess に加え、過剰の protamin を加え、37°C 10 min 加温、析出した fibrin を除き、再び EGTA 存在下で g.p.E に対する溶血効果を検討した (図 II)。図 II に示されるように Ca⁺⁺ による plasma の凝固系の活性化により、溶血活性が血清 level まで回復したの比して、Protamin による凝固系の活性化は、溶血活性の回復をもたらさなかった。このことから、溶血反応には Mg⁺⁺ のみ必要であるが、Plasma は Ca⁺⁺ 依存性に凝固系が活性化されることが必要であることが判明した。すなわちラット血清は、Plasma の時に Ca⁺⁺ 依存性の凝固系の変化を受けて後、Ca⁺⁺ 非依存性に g.p.E に対する溶血活性を有するものと考えられた。

CVF-B および C5-C9 によるゲル内殺菌反応。

奈良県立医科大学細菌

深山昭雄

Classical あるいは Alternative pathway により活性化された C56789 は、未感作あるいは C3b を結合した各種動物細胞に作用して膜障害を引き起こすことが知られている。従って CVF-B complex のトリプシン活性化複合体 (CVF-B) が、ヒト C5-C9 と反応してモルモット赤血球を溶血することを見せたが、更に *Escherichia coli* B の rough strain に対しても同様の作用を示すことを明らかにした。

材料

- 1) 菌株および培養方法; *Escherichia coli* B/SM, *Escherichia coli* NIHJ, *Salmonella typhimurium* TV₅₄(smooth), *Salmonella typhimurium* 148/SM (semi-rough), *Salmonella typhimurium* 149/SM (complete rough) を Brain heart infusion broth (BHI) で 37°C 16 時間静置培養し、新鮮 BHI で 10 倍希釈し 2 時間振盪培養した。0.01M 磷酸緩衝液食塩水 (PBS) で洗浄後、10% の菌液を調整した。
- 2) CVF-B, ヒドラジン処理ヒト血清および補体成分 C5-C9 は PBS に透析後 濾過滅菌した。

方法

直徑 5cm のペトリディッシュに 2ml の 1.0% agarose を播げ直徑約 4mm の Well を作り、ヒト血清あるいはヒト補体成分を充滿し、無菌箱の中で充分拡散させる。1% agarose 1ml に 0.15ml の反応液と 0.1ml の菌液を 48°C で混合し重厚する。37°C 1 時間加温後、ストレプトマイシンおよび 0.02% tetrazolium の BHI agar 2.5ml を重厚後 37°C overnight 培養した。1% ホルマリン水で寒天表面に添加し、surface colony を除去した後、Well の周囲に見られる菌の発育阻止帯を観察した。

結果

1) ヒドラジン処理血清と CVF-B による殺菌作用

ヒドラジン処理血清の希釈液を Well に加え、拡散後、CVF-B と *E. coli* B を agarose gel 中で反応させることにより観察される阻止帯の直徑と血清量の logarithm は比例する。CVF-B を加えない対照では阻止帯は見られない。しかし *Salmonella typhimurium* の complete rough では CVF-B を加えない対照でも阻止帯が見られた。

2) 補体成分 C5-C9 と C5F-B による殺菌作用

C6, C7, C8 成分を含むヒト血清画分の一定量に精製 C5 (500, 250, 125 μ g/ml) を加え夫々 Well に置いた。C5F-B, C9 および菌液を含む agarose gel を重厚して殺菌作用を調べた。C5 あまゝは C678 単独では阻止帯は見られなかったが C5+C678 を含む Well の周囲に阻止帯が見られる。

3) C5 $\bar{6}$ と C7-C9 による殺菌作用

精製 C5 および C6 (Cordis 社製) と C5F-B を 30 $^{\circ}$ C 30 分間反応させたのち、Anti C5F で中和後、PBS で透析後濾過滅菌し、Well にその稀釋液を置き、C7-C9, 菌液を含む agarose gel を重厚した。1000 units/ml の C5, C6 から調整した C5 $\bar{6}$ でも阻止帯の直径は小さく、不透明であった。実験 2) で用いた C578 を含む血清画分は、微量のリゾチームを含んでいるので、C5 $\bar{6}$ の殺菌作用を リゾチーム加 agarose gel の中で行い、リゾチームを添加しなかった場合と比較した。リゾチーム添加により C5 $\bar{6}$ による阻止帯は、やや大きくはっきりと現れることがわかった。

血漿と血清補体の解離における Vitamin E の意義

京都府立医大 内科

近藤元治、竹村周平、吉川敏一、加藤治樹、横江信義、池崎 稔、

今西 仁、細川討明、増田正典

主として肝疾患々者々みられる血漿と血清の補体の解離は、血液凝固の際に生じられる因子が、in vitro で低温において補体系の classical pathway を活性化しにくくしと理解されているが、従来ヒトにおいては、血清補体価をもつて基礎的、臨牀的検索が行われて来たわけに、この現象のみならず意義は極めて大きい。

我々にては、「補体の cold activation」として肝疾患々者々における検討と報告し (AUNキ- 25:519, 1976, J. Immunol. in press)、37°C 分離血清を 0°~11°C に移行することで、(7) 4 時間で血清溶血補体価が失われること (図1, 2), NaCl 添加によりイオン強度を高めることで cold activation が阻止出来ること (図3), vitamin E (図4) あると pre-donisolone もこの cold activation 阻止の効らき、trans-AMCHA 一部の効ら cold activation 阻止の効らすが、Trasyolol, SBTI などの作用を及ぼすこととを明らかにした。

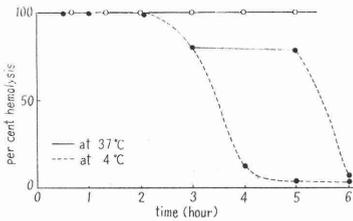


図1 K.N.: 37°C分離血清の、37°Cおよび4°Cにおける溶血の kinetics.

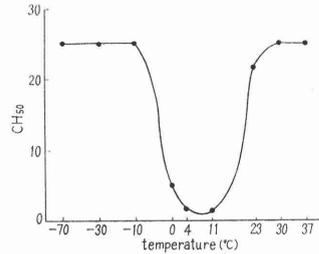


図2 H.Y.: 37°C分離血清 CH₅₀への温度の影響.

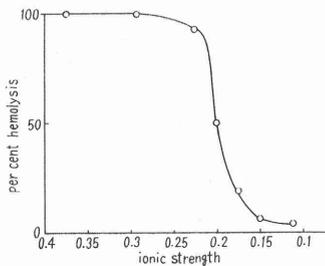
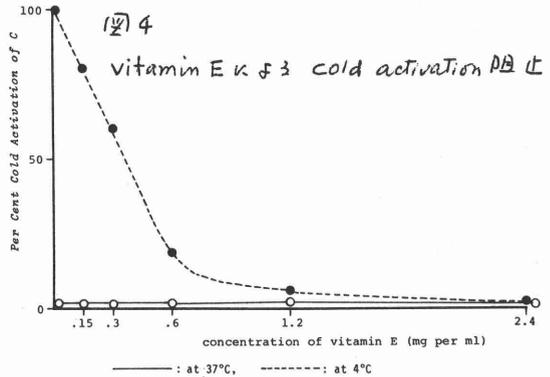


図3 K.N.: 37°C分離血清の cold activation に対するイオン強度の影響.



この補体の解離現象が比較的肝疾患に集中してみられること、*in vitro* で vitamin E 欠乏より cold activation が阻止出来ること、および vitamin E 欠乏より容易に肝疾患が成立することから、この現象は vitamin E の欠乏、何らかの因果関係があるのではなかと考え、猪豚例では C 欠乏 vitamin E 欠乏ラットにつき、血漿と血清の補体の検討を試みた。

図5は、肝疾患々者の血清中 vitamin E の濃度を横軸に、血漿と血清の補体解離を% $[(\text{血漿CH50} - \text{血清CH50}) / \text{血漿CH50} \times 100]$ で縦軸に示したものである。血清 vitamin E の正常値は $0.75 \sim 1.25 \text{ mg/dl}$ とすると、補体解離の大きいものは、vitamin E 正常範囲にあるいはそれ以下において見られるが、vitamin E 量との相関関係はみられなかつた。

そこで、ラットと vitamin E 欠乏食で飼育し、血漿および血清補体の解離の程度を比較すると、図6が示す如く、その程度は vitamin E 欠乏状態で比較的高く、ヒトにおける正常範囲と比較する時、やはり vitamin E 高値では補体の解離は少ない、こと。問題となるのは、市販の固形飼料で飼育したラットに補体の解離を示す例のあり、ここで、後に血清 vitamin E を測定したところ 0.5 mg/dl 前後であり、ヒトに較べて低値であり、また、補体解離を示すラットに、vitamin E あるいは predonisolone を1週間注射した後の検討では、補体の解離はほとんど消失していったが、これは注射された薬剤が、流血中に残存していることと否定出来ず、更に検討を必要としている。

図5 肝疾患々者における血清 vitamin E 値と補体解離

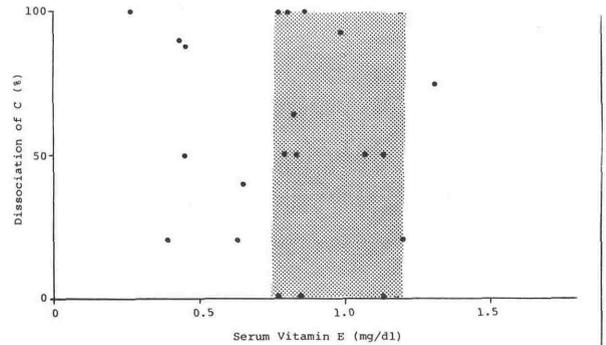
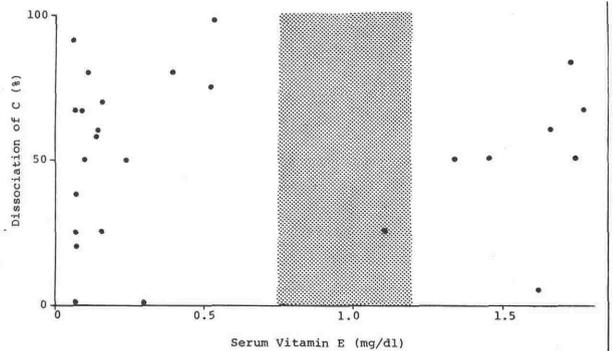


図6 ラットにおける血清 vitamin E 値と補体解離



vitamin E の補体に対する作用は、従来全く報告されておらず、また肝疾患にみられる血漿と血清補体の解離の秩序についても、その詳細は不明である。我々の報告した vitamin E による補体の cold activation の阻止作用が、in vivo でどのような作用があるかは、極めて重大な事柄である。その検討の過程で、vitamin 欠乏ラットのみにあらず、一応正常とみられているラットにも補体の解離が認められることは、vitamin E と共に、何らかのヒントを与えるものと考えられる。

血清と血漿の補体価の解離における一考察

天野哲基, 吉野内猛夫, 三橋康考, 宮島哲人
大藤 真 (岡山大学医学部オニ内科)

我々は才11回補体シンポジウムにおいて、血清と血漿の補体価に明らかな解離の見られる症例を呈示し、この現象に血液凝固が関与しているのではないかと考察を行った。その後、幾つかのグループにより種々の検討がなされ、この現象は classical pathway の cold activation によるものではないかとの考えが注目されて来ている。

今回、この解離現象が classical pathway の cold activation とは考えがたい知見につき検討を加える。又、解離例の血清補体価の低下は C4, C2 の極端な低下のみによるものであり、hereditary angioneurotic edema (HANE) の補体像とよく類似している。この為、解離現象が HANE 同様、C1 esterase の活性化により起こるものであるか否かとの観測から、解離例と HANE 例の比較検討を行った。

(解離例について)

- 1) 血清と血漿の補体価の解離の見られる疾患は必ずしも血中に immune complex, cryoglobulin の存在が推察されるものではない。
- 2) 血清或いは血漿 (EDTA) + Ca^{++} の補体価の低下は血液凝固 (自己或いは他人の血餅) が存在する方が明らかに効果的である。
- 3) 正常人血液 (EDTA) と患者血清 (血漿) を混合し、その血液 (EDTA) 或いは血漿 (EDTA) に Ca^{++} を加えて凝固せしめると補体価の低下が見られる際、血液 (EDTA) の方が補体価低下が著明である。
- 4) 血清 C4 は極度に低下しているが $\beta 1E$ 量は正常である。 $\beta 1E$ の免疫電気泳動では陽極側への conversion が認められる。(しかし、C3 以下には何ら変化が認められない。
- 5) 37°C 分離血清と低温分離血清の抗補体作用 (正常人血清と混合して低温で incubate 前後の補体価を比較する) を比較すると 37°C 分離血清の抗補体作用が強い。
- 6) 解離例の血清、血漿の抗補体作用は 56°C, 30分処理にて失活しない。

(HANE 例について)

- 1) 55才、女性で全身の移動する無痛性浮腫、腹痛発作、喉頭浮腫が頻発。家族に祖母、母と同様の発作あり、喉頭浮腫にて死亡。血清補体価

低値。β₂E量低値。C1INH蛋白量低値(正常人の1/4~1/8)

2) 血清と血漿(EDTA)の補体価には先項の如き解離はなく、むしろ逆解離(血清補体価>血漿(EDTA)補体価)が認められた。

3) 血漿(EDTA)補体価は採血後、経時的に低下するが、血漿(Heparin)、血清の補体価の低下は著明でない。

4) HANE 血清、血漿(EDTA, Heparin)には抗補体作用はない。(血液凝固が存在しても)

5) 血漿(EDTA)は37°C, 40分加温すると強力な抗補体作用が出現する。しかし、正常人血清と混合して加温すると抗補体作用は出現しない。

6) 血清にEDTAを加えて加温しても、抗補体作用は出現する。

7) 56°C, 30分非働化した血漿(EDTA)では上記の抗補体作用は認められない。

以上より、血清と血漿の補体価解離をimmune complex 等による classical pathway の活性化の結果生じた heat labile である C1 esterase によるものであると考えるのは否定される。

本現象を患者血中の C1 esterase とは異なり heat stable な factor (proesterase?) が低温で血液凝固により活性化され、基質である C4, C2 のみを急激に破壊すると理解したところであろう。

ヒト補体第1成分 C1 の活性化機構

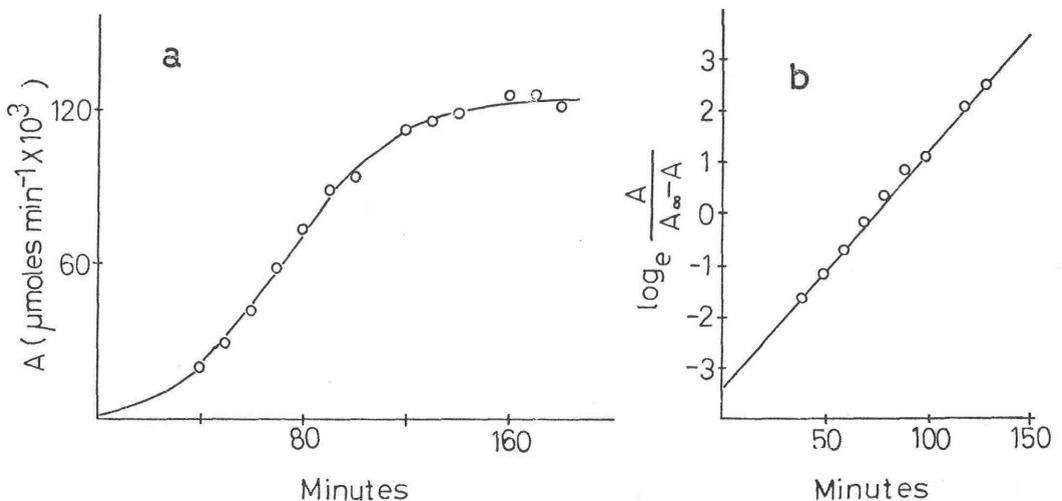
北大・薬学部・衛生化学

高橋和彦, 長沢滋治, 小山次郎

〔目的〕 補体第1成分 C1 は C1q に C1r と C1s の2種類の zymogen が結合した複合体として存在している。抗原抗体結合物に C1q を介して結合すると C1r と C1s は連鎖的に protease に活性化される。既に我々は C1r が H と L 鎖の2本の polypeptide 鎖から成ることを明らかにし、C1r が活性化に際し、C1s や他の血中 protease の zymogen の活性化と同様に polypeptide 鎖の切断を伴うことを推定した⁽¹⁾。この推定は C1r が1本鎖の polypeptide から成るという最近の Porter ら⁽²⁾、Cooper ら⁽³⁾の研究により支持されている。C1s の場合には C1r により切断されて活性化されることが知られているが、C1r の polypeptide 鎖を切断して活性化する因子については不明である。今回、我々は部分精製した C1r を用いてその活性の出現過程を解析し、C1r を活性化する因子を明らかにすることを試みた。また、Ca²⁺ の存在で C1q-C1r-C1s に抗原抗体結合物を加えると C1s esterase 活性が出現することを見出し、抗原抗体結合物による C1 の活性化を測定できる系を得たので報告する。

〔結果〕 C1r を 4 mM リン酸緩衝液, pH 7.5 中で、37°C に保つと、C1r の esterase 活性が出現し、しかもこの活性は S 字曲線を描いて現われることを認めた(図1a)。この活性の出現が式(1)に示す2次反応速度式の積

Fig.1 Autocatalytic activation of C1r



$$\frac{dA}{dt} = k \cdot A \cdot (A_{\infty} - A) \quad (1)$$

$$\log_e \frac{A}{A_{\infty} - A} = k \cdot A_{\infty} \cdot t + \log_e \frac{A_0}{A_{\infty} - A_0} \quad (2)$$

(k:rate constant, A_{∞} :final activity, A_0 :initial activity)

分式(2)にしたがって進行することは、Clrの活性化発現が2次反応速度式にしたがう自己活性化反応であることを示している。すなわち、先ずClrが自己触媒的に徐々に活性化してClrを生じ、次いでこのClrの作用でClrは急速に活性化されると説明されよう。このClrの自己活性化反応が、精製したClrの添加によって促進されて活性化のS字曲線のlag phaseが短縮するので、Clr自身がClrを活性化する作用を持つことを、また、反応液中のClrの濃度を増大するとlag phaseの短縮が見られることから、この自己活性化反応がClrの分子間反応であることを示唆している。

他方、Cl5について同様の解析を行なったが、Cl5には自己活性化作用は観察されず、Clrの存在によって初めて活性化された。なお、ClrによるCl5の活性化はEDTAを加えてCa²⁺を除いた条件では加えたCl5はすべて活性化されたが、Ca²⁺存在下では加えたCl5の一部しか活性化されなかった。おそらくCa²⁺の存在下では、Clrは結合して複合体を形成しているCl5のみを活性化するのであろう。

次にClrとCl5にPorterらの方法にしたがって精製したClqとCa²⁺を加えてClを再構成してから、卵アルブミンとモルモットIgG2抗体の結合物を加えて、Clの活性化反応を測定した。その結果、すべての成分が存在するときのみCl5の活性が急速に出現し、いずれの成分の1つを欠いても活性化は起こらないことを見出した(表1)。このことは我々の精製したClrがClqの存在下で抗原抗体結合物によって活性化され、連鎖的にCl5を活性化することを示している。

Table 1. Activation of Cl

| Antigen (13.6 μ g) | Antibody (157 μ g) | Clq (1.6unit) | Clr (0.17unit) | Cl5 (0.4unit) | Ca ²⁺ (10mM) | evolved Cl5 (unit) |
|---------------------------|---------------------------|------------------|-------------------|------------------|----------------------------|-----------------------|
| + | + | + | + | + | + | 0.14 |
| - | + | + | + | + | + | 0.03 |
| + | - | + | + | + | + | 0.01 |
| + | + | - | + | + | + | 0.00 |
| + | + | + | - | + | + | 0.00 |
| + | + | + | + | - | + | 0.00 |
| + | + | + | + | + | - | 0.01 |

[考察] Clr の活性化は自己触媒的で polypeptide の限定水解を伴う点で trypsinogen の活性化の場合と似ている。trypsinogen の自己活性化は、Zymogen 自身のもつ inherent な活性によって始動され、活性化された trypsin により活性化が更に進むと説明されている。また、trypsinogen 2 分子が結合すると、構造上の変化がひきおこされ、一方の分子に trypsin 様の active site が形成され、これがもう一方の trypsinogen を活性化するという 2 分子間の "active trypsinogen" 説が提唱されている。Clr の場合にも自分自身を活性化する inherent な活性を持っていると考えられよう。最近、Clr が dimer で存在しており、Cl 中で Cl_q 1 分子に Clr 2 分子が結合していることが報告されている。したがって、Cl 中の Clr の自己活性化は次のように説明されよう。Cl 分子中の Cl_q が抗原抗体結合物と結合すると、Cl_q になんらかの conformation 変化をひきおこし、Cl 中の 2 分子の Clr の一方に active site が形成され、もう一方の Clr を活性化するようになる。

Cl_s が Cl_r により活性化されるほかに、自己活性化するとの報告⁽⁴⁾もあるが、我々の実験結果では Cl_s の自己活性化は認められなかった。したがって Cl 中の Cl_s の活性化は Cl_r の自己活性化によってのみ誘発されるのであろう。また、Cl_r による Cl_s の活性化反応の様子が Ca²⁺ の存在によって影響されることから Cl の活性化反応の研究には複合体形成の効果を考慮しなければならない。今回、複合体形成下での Cl_r、Cl_s の活性化機構を研究する系を得たことは今後の研究に意義あることと考える。

[文献]

- [1] Takahashi, K., Nagasawa, S. and Koyama, J. (1975) FEBS Lett. 55, 156
- [2] Ziccardi, R. J. and Cooper, N. R. (1976) J. Immunol. 116, 496
- [3] Sim, R. B. and Porter, R. R. (1976) Biochem. Soc. Trans. 4, 127
- [4] Morgan, P. H. and Nair, I. G. (1975) Biochem. Biophys. Res. Comm. 66, 1037

C1分子内活性化に関する研究(3)

C1s activator 特異抗血清の作成, 抗C1r との identity

九州大学第三内科

守田正之, 酒井好右

(目的)

Naff and Ratnoff (1968) は C1r が C1s を活性化する事を示した。C1s は diisopropylphosphoro fluoride (DFP) 処理により stabilize する事ができ、それを 37°C に解置しても C1s への活性化は起らない。

DFP-treated C1s は精製した C1s activator により 37°C で活性化され、この C1s activator は C1r と identical である事が明らかにされた。

(K. Sakai and R.M. Stroud, 1974)

今回 C1s activator を分離し、家兎に免疫し、特異抗血清を迅速に作成する方法を得た。この C1s activator 抗血清の特異性により、C1s activator と C1r の cross reactivity を検討し、抗体の面より C1s activator と C1r との identity を確かめる事を目的とした。また、本抗血清を用い免疫化学的方法によって C1s activator の動態を観察したので、その臨床上の preliminary data を報告する。

(成績)

(1) 抗血清作成法

ACD 加ヒト全血 / unit あたり 25% CaCl_2 1.0ml を加え、血清を分離し、L-lysine (PH 7.5) を加え最終濃度 0.06M とし、 $1/10$ N HCl で PH 7.5, 0.005M Tris (PH 7.5) で RSC 0.04 に adjust した後、0°C 90分 incubate する。0°C, 12000 rpm の遠心沈澱により euglobulin を得、これを 0.005M Tris, 0.045M L-lysine (PH 7.5, RSC 0.035) にて 2 回洗滌する。この euglobulin を原血清量の $1/10$ 量の 0.005M Tris, 0.005M L-lysine (PH 7.5, RSC 0.300) に溶解し、0.02M EDTA, 0.005M L-lysine (PH 7.5, RSC 0.04) に対し、4°C 1 夜透析後、沈澱として C1r を除去する。その上清を 6% preparative disc polyacrylamide gel に apply し、65V 90分, 150V 260分 4°C で電気泳動を行なった。泳動後 2mm の segments に slice し、各 segment へ dextrose 加 veronal buffer (PH 7.5, RSC 0.075) 中に elute した各 eluate と、DFP-treated C1s を 37°C, 120分反応させた後、形成される C1s を、EAC4, C_2 および C^1 -EDTA を用いて spot check により測定し、eye estimation により

Cis activator の存在を求めた。40の溶血活性を示す segments と eluates を完全 Freund adjuvant と共に十分に混和した後、家兔の膝関節 リンパ節、両下肢、臀部、背部の皮内に接種し、3週目の booster の後 1 週間後に抗血清の力価を測定した。2 回目の追加免疫の後、充分な力価を示す抗血清を得る事ができた。

(2) *Cis activator* 抗血清の特異性

Ouchterlony, Van Oss の方法により、本抗血清は、正常人血清に対し 単一の沈降線を形成し、この沈降線は C_{1g} , C_{1s} , C_{1s} inhibitor 各々の沈降線とは fuse しない事が確かめられた。更に、免疫電気泳動においては、正常人血清、CT に対し単一の沈降線を表出し、その移動度は C_{1g} , C_{1s} , C_{1s} inhibitor とは異なる事が認められた。

(3) C_{1s} 結合感作血球との agglutination

Tamura and Nelson (1968) の方法により得た CT の濃度を変え、これと EAC₄ を incubate し EACT₄ を作成し、*Cis activator* 抗血清による EACT₄ の agglutination を検討した。400 倍希釈 CT を作成した EACT₄ とは agglutination が生じたが、EAC₄ とは agglutination が認められなかった。

(4) *Cis activator* の活性および C_{1r} 溶血活性の neutralization

分離した *Cis activator* の DFP-treated C_{1s} の活性化および C_{1g} , C_{1s} の C_{1r} linking activity に対する中和反応を検討する。

(5) 臨床成績

本抗血清を用い single radial immunodiffusion により、現在観察中の臨床例の preliminary data を示す。

正常人対照 100% に対し、SLE、自己免疫性溶血性貧血(AIHA)例では夫々平均 59% 60% と低値がみられ、腎炎では 97% であり 対照に比し動揺域が著しい。すなわち SLE, AIHA では classical pathway の関与が示唆され、腎炎では *Cis activator* の値からみ限り classical pathway の関与が minimal のようである。

(結論)

Cis activator 特異抗血清を迅速に作成する方法を得た。

この抗血清の特異性を明らかにし、*Cis activator* と C_{1r} との identity を検討した。

臨床例における *Cis activator* の動態を観察し、その preliminary data を示した。

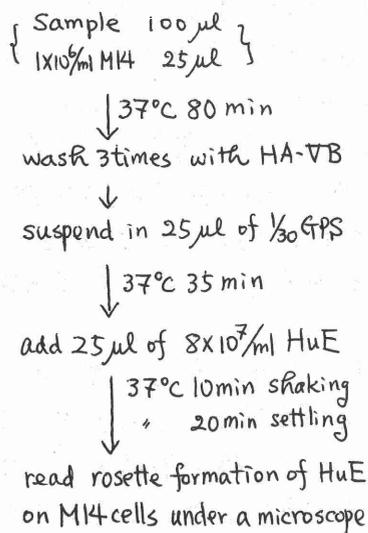
がん患者血清中の腫瘍特異抗体検出法の改良

岡田香親*, 入江礼子**, Donald L. Morton**

(* 国立がんセンター研究所; ** UCLA School of Med, Div. Oncology)

Melanoma cell line (M14) を提供した同一患者の末梢血リンパ球から株化した Lymphoblastoid cell line (L14) を利用することにより、allogeneic な関係にある他の Melanoma 患者についても、M14 を用いて、腫瘍特異抗体を検索することが可能である。即ち、患者血清をあらかじめ L14 で吸収することにより、HLA 等の allogeneic Ags に対する抗体を吸収除去することができるので、残った M14 に対する抗体が、腫瘍特異抗体と一応みなすことができる。この方法を用いて、M14 や M10 (Melanoma cell line #10) で vaccination を行った患者等も含めて、癌患者血清中の specific anti M14 抗体の検索、追跡を、UCLA において行っている。抗体の検出は主として

Fig1. IA による M14 に対する抗体検出法



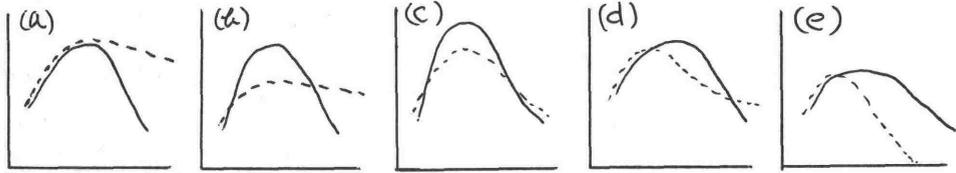
Immune adherence (IA) 法を用いて行っているが、L14 で吸収すると、M14 に対する抗体価が、かえって上昇するという現象がしばしば認められる。その代表的なパターンを挙げてみると Fig 2 (a)~(e) のごとくである。この現象を説明する possible mechanisms として、以下のような可能性を挙げることができると考えた。

① L14 で吸収される抗体 (例えば、抗 HLA 抗体... M14 には、HLA 抗原も存在している) が、非補体結合性抗体が主体となっていることがあるとすれば、その場合には、M14 に specific な抗原 (OFA, oncofetal antigen, の存在が明らかにされている) に反応する anti-OFA 等の反応を、すぐ近接して

反応する HLA-anti-HLA 等の反応が、立体的に障害をなしえる。従って anti-HLA 等を、L14 で吸収すると OFA-anti-OFA の反応が効率よくおこる。

② IA receptor に反応する C3b 様の特性をもった物質が患者血清中に存在しており、これが、ヒト赤血球 (HuE) の IA による rosette formation を抑制する。とこのか、L14 で吸収すると L14 には C3 receptor (IA receptor) が存在するので、C3b 様物質を吸収し、IA inhibition がなくなるので、抗

Fig 2. Melanoma cell で Vaccination を行った患者血清中の抗M14抗体価をIA法で追跡した場合、経時変動のパターンの代表例。点線はL14で吸収せずに測定した場合、実線はL14で吸収後に測定した場合を示す。縦軸は抗体価、横軸は時間(月)とあらわす。



抗体価が高くなるように見える。

③ Rheumatoid factor (RF) 様物質が、患者血清中に存在しており、このRF様物質が、M14と反応した抗体に反応して、IAを抑制する。あらかじめ、被検血清をL14で吸収すると、L14-antibodies complexで、RF様物質が吸収除去され、そのおかげでは、M14-antiM14のIA反応を抑制せず、抗体価が上昇したように見える。

④ Vaccination を強力に行った場合等では、^{tumor} specific antibody である anti-OFA が多量に生成されると考えられ、次には anti-OFA に対する anti-idiotypic antibody (anti-antiOFA) が生成されるのである。一方、癌患者から established された L14 には、リニパ球としての surface immunoglobulin あるいは antigen receptor として anti-OFA の Fv-domain と同一構造をもったリニパ球の混在が考えられる。このような場合には、anti-OFA like receptor をもったリニパ球は anti-antiOFA と反応するので、L14の吸収操作で、anti-antiOFA が除去され、antiOFA が、M14 と反応するときの反応効率が高くなる。

これらの可能性のうち、②の可能性は、用いた IA 法の手段を考慮することにより否定された。すなわち、M14 cells と、被検血清とを反応させたあと、補液を加える前に、3回細胞を洗浄するので、検体血清に C3 様物質が入っていたとしても、除かれてしまうはずである。そこで残りの、①、③、④のうち、どれが本態あるいは主因をなしているのか、又は、それ以外の機序によるものなのかを検討する為、いくつかの実験を行った。
[方法及び結果]

反応液として用いた HA-VB (Human serum albumin 加 veronal buffered saline) は、glucose 1g, KCl 0.2g, 25% HSA 8ml, 0.1M MgCl₂ 5ml, 0.03M CaCl₂ 5ml, 5xVB 192ml を蒸留水で 1000ml にして調整した。実験には、このHAVBを反応液、稀释液、洗浄液として使用した。

まず、最も可能性が高いと考えた、③についての検討を行うため、E (ヒツジ赤血球) を PDHS (pooled anti-HM antigen human serum), Rabbit-ambo, Baboon-anti-E 等で感作し、種々の EA をつくり、これで患者血清を処理した (Pt. serum 100 μ l + 1x10⁹/ml EA 100 μ l を 37 $^{\circ}$ C 30分、次いで 4 $^{\circ}$ C over night)。これら全ての EA による処理で、IA で測定する抗体活性の上昇が認められたので、少なくとも③の機序が存在していることが示されたと考えた。遂に、unrelated Ag-Ab complex で活性の上昇がおこることは、①及び④の可能性は低いということになる。

しかし④の機序も、腫瘍の免疫療法を考へる上で、重要な課題の一つであるので、それが、ある程度は役割を演じているかどうかを直接検討する為、検体患者血清を患者自身のリンパ球で処理してみた。すなわち、anti-anti-OFA を働かしているのではあるが、この処理で、リンパ球上の anti-OFA like receptor により anti-anti-OFA が吸収され、M14 に対する IA でみた抗体価の上昇が認められるようになった。少なくとも、検討した範囲内においては、autologous lymphocytes での処理での活性上昇は認められなかった。従って、③の機序が主体をなしていると考えた。

E, EA (IgG), EA (IgM) をつくり、これらで処理した場合の IA 抗体価の上昇の比較を行ったところ、EA (IgG) が最も効率がよかった。一方、Fig 2(e) のような患者の後期の部分の血清のように、少なくとも吸収前には、抗体価が認められない血清は、他の抗体価を示す血清と混合することにより、inhibitory に働くので、この inhibitory 活性を指標にして今回検討した結果、その inhibitory 活性は IgM 分画に来ることが判明した。これらの結果は、従来言われていた RF と同一の性格であるので、③の RF 様物質は、RF であると考へられる。

[考察]

癌患者血清中の腫瘍に対する抗体等を IA 等で測定する場合には、RF とあるかじめ EA 等で吸収除去する前処理が必要である。このことは、癌患者に限らず、全ての被検血清前処理として必要不可欠である。又、膜蛍光抗体直接法や、Radioimmunoassay 間接法等で、抗体の種類を同定を行う実験等においても、被検血清から、RF を除去しておかないと、IgM 陽性と誤判する可能性があるので、RF 除去の前処理は、常に不可欠の要である。なお、IgM 抗体である RF が、IA を抑制する機序は不明である。

なお、本研究は、昭和 51 年度日本学術振興会 日米癌協力研究事業 米国派遣研究者として、UCLA 滞在中に行われた共同研究である。

抗補体活性の研究

—モネール実験における補体前結合の影響—

福島医大才2内科

森藤隆夫 亀田貞彦 吉田浩

菅川礼司 吉田起夫

演者らは、昨年の本シンポジウムにおいて、肝疾患々者血清の溶血補体価および抗補体活性 (ACA) を検討し、(1) 肝病変の進行に伴ない、溶血補体価低下例、ACA陽性例がより多く認められること。(2) ACA測定の際、incubation 温度の違いで、ACA出現様式が異なること。(3) 同一症例の血清分離までの温度の違いで、補体価とACA値に違いがみられること、などを報告し、これらの現象の理由の一つとして、Immune-complex の可能性に \rightarrow して考察した。

今回、これらのACA因子の一つとして Cryoglobulin (Cryo) が推定されたので、血清中のCryoの検出を試み、そのACAおよび血清学的性状を検討した。更に、溶血補体価を示さない血清において、非幼稚化前血清のACAが、非幼稚化後に減少することを認めたことから、ACAに与える非幼稚化の影響を、63 $^{\circ}$ C 20分の熱処理を aggregate させた Human-Fraction II (agg-GI), ホルマリン処理感作羊血球 (FEA), Human-Albumin と抗-Human-Alb-ウサギ血清との Soluble immune-complex などを用いて、これらのGPCの結合性と、これらの結合物に前以 \rightarrow てGPCを結合させ、非幼稚化 $_{\lambda}$ 後再びGPCを加え、その結合性を測定して両値の比較を行 \rightarrow たので報告する。

Cryoglobulin は、ACA陽性を示した肝硬変症14例中9例、慢性肝炎11例中3例に認められた。Cryoは全例ACA陽性を示し、4例はRA陽性、中1例でWaalor-Rose反応も陽性、3例にC₁gが認められたが、HBs抗体、抗核抗体、抗DNA抗体を認めた症例はなかった。Cryoを非幼稚化すると、ACAは4例で不変、5例で軽度低下、3例で著明に低下した。

血清中のACA因子の一つにCryoが考えられた事から、Cryo除去前後の血清についてACAを測定すると、慢性肝炎の2例、肝硬変の1例でCryo除去前のACAと比較して、除去後の血清では50%以上のACAの低下を示したが、他の9例では示したる変化を示さず、肝疾患々者血清にみられるACA因子として、Cryo以外の物質も推定された。

ACAを示した肝疾患々者の中、8例は10倍希釈血清1.0mlでも溶血活性は認められなかつた事から、これらの8例の血清につき、非幼稚化前後の

ACAを測定すると、3例で非幼稚化後のACAが明らかに低下し、他の血清も非幼稚化により軽度の低下が認められたことから、ACAに対して非幼稚化が与える影響を、以下の実験モデルで検討した。

agg-G1, FEAは共に補体結合性を示すが、これらが今た補体を結合していった状態と、一度補体を結合し(agg-G1-C)、その後非幼稚化した状態とで、補体を加え、その結合性を残った補体量を測定することで比較した。

(表I)。agg-G1は、実際11.7CH₅₀(①CH₅₀-①CH₅₀)を結合出来るのに対して、agg-G1に一度補体を結合(agg-G1-C)させた後に非幼稚化して余分の補体を破壊し、更に補体を加えてその結合力をみると、8.6CH₅₀(①CH₅₀-②CH₅₀)と低下していった。

(表I)

| | ① | ② | ③ | ④ |
|---------------------|-----|-----|------|------|
| agg-G1 | 1.0 | 1.0 | | |
| X10 ⁶ PC | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| VB | 2.0 | - | 1.0 | 3.0 |
| | 37℃ | | 60' | |
| | 56℃ | | 30' | |
| X10 ⁶ PC | | 1.0 | 1.0 | |
| VB | | 1.0 | 1.0 | |
| CH ₅₀ | 2.4 | 5.5 | 19.0 | 14.1 |

同様にFEAに全補体、および補体成分のC1、あるいはC142(Zymosan処理)を結合させた後に

非幼稚化し、また全補体も加えて、前処理FEAの補体結合能を比較した(表II)。FEAは7.1CH₅₀の補体結合能を示す(①CH₅₀-①CH₅₀)のに対して、一度補体を結合した後に非幼稚化すると、3.7CH₅₀(①CH₅₀-②CH₅₀)と結合力は低下した。一方前以ってC1と反応したFEA③の結合力7.3CH₅₀は、非幼稚化後も①と同じ補体結合力(7.1CH₅₀)を有するが、前以ってC142と反応したFEA④の結合力4.9CH₅₀は全補体と結合したFEA②の結合力3.7CH₅₀に類似した補体結合力の低下を示した。

更に、10⁶ H₂Albの1~32×10⁴倍希釈液と、抗H₂Albウサギ血清の60倍希釈液(共に単独ではACAを示さない)とを反応させたSoluble Immune-Complexを用い、その抗補体活性が前以って補体を加え非幼稚化しておくことにより、どれ程の抑制がなされるかを検討した(表III)。①の8×10⁴倍希釈抗原液までのACAをコントロールとして、前以って20倍希釈全補体加の②と、5倍希釈全補体加の③との比較をみると、②では更に補体を結合する余力があるため①との差は1管程であったが、③で十分に補体を結合させた後に非幼稚化して再び①と同量の補体量を加えると、その差は2管となり、明らかに抗補体活性の抑制がみとめられた。

以上、血清の抗補体活性が非幼化により低下する秩序は明らかではないが、抗体活性の低下、抗原抗体結合物の解離、易熱性抗補体活性物質の存在とともに、これらのモデル実験の結果から、自己補体の結合の問題も検討される必要があると考えられた。また、この実験中、C₁のみの前以つての結合では、続々この補体結合に影響がみられなかった成績は、才川回をシンボジウムで西岡木が報告した、寒天内溶血反応でみられた全補体による溶血活性が、そのC_{1q}成分と抗C_{1q}抗体による沈降線により阻止されなかった成績と一致するものと見られ興味をもたれた。

(表I)

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|----------------------|----------|-----|---------------------------|-----------------------------|------|
| FEA | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.8 | |
| X10 GPC | 2.0 | 2.0 | X10 C ₁ 2.0 | X10 C ₁₄₂ 2.0 | 2.0 |
| VB | 1.2 | 1.2 | 1.2 | 1.2 | 1.2 |
| | 36% | | 60' | | |
| | PPT wash | | | | |
| VB | 2.0 | | 2.0 | 2.0 | |
| | 56% 30' | | | | |
| X10 GPC | 2.0 | | 2.0 | 2.0 | |
| Sup-CH ₅₀ | 5.9 | 9.3 | 5.7 | 8.1 | 13.0 |

(表III)

| | 前結合 | | X10 ⁴ | | | | | | | |
|---|-----|-----|------------------|---|---|---|---|----|----|---|
| | Ab | C | Ag | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | C |
| 1 | 60x | | | - | - | ± | ± | + | + | + |
| 2 | 60x | 20x | | - | ± | ± | + | + | + | + |
| 3 | 60x | 5x | | ± | ± | + | + | + | + | + |
| 4 | 60x | - | | - | ± | ± | + | + | + | + |
| C | | | | + | + | + | + | + | + | + |

抗原抗体結合物による補体の活性化について

北大才二内科 藤田複三 小野幸久 三神紀雄

<はじめに>

前回の補体 Σ ニホ Σ ウ4に於いてウサギIgGのFab₂は血清中のC3, B, P等を結合して, C3及びC5を不活化することを報告した。Fab₂上K形成されるC3及びC5を分解する活性は, Bのdecayとともに低下し, B及びDを加えることによりその活性は回復する。—オウサギIgGのFc部分はC1を結合し, classical pathwayを活性化させること知られてゐる。今回, 我々は, 卵白アルブミンとその抗体(ウサギIgG)で作成した抗原抗体結合物が, どのように補体を活性化するかについて検討した。

<方法>

抗原抗体結合物は, 卵白アルブミンとそのウサギ血清(非効化)をEDTAの存在下で至適濃度で結合させ, EDTAを含む生理的食塩水で4回洗浄後, 0°Cに保存した。C3はLundh社のものを, C5はVroon社の方法で部分精製したものを用いた。BはBoenish社の方法でDはFearon社の方法で精製したものを, 用いた。

<結果>

抗原抗体結合物(以下Ippと略す) 500 μ g NをGVBで一度洗浄し, GVBで10倍に希釈した正常ヒト血清5mlを加え, 37°CでIncubateし, 1, 2, 4, 7, 15, 30分で0.3mlをとり, K₂S₂O₈冷GVBで10倍に希釈し, GVBで一度, GGVBで一度洗浄後, C3は及びC5は各60SFIを加え, 37°C 30分間Incubateし, 冷GGVBを3ml加え反応を止め, 遠心後血清中のC3及びC5を測定した。Controlに対する不活化のパーセントをIpp上にて形成されるC3及びC5の分解活性とした。

図1に示すように, 分解活性(%)を縦軸に, 時間を横軸にとり, C3, C5ともに4-7分のpeakを再び分解活性がIpp上K形成される。その12時間にはC3及びC5のdecayすると考えられた。

そこで, Ipp (100 μ g N/ml血清) を37°C 2分間反応させ, Ipp上にてC3及びC5の分解活性 Σ (Ipp \cdot Xと名づけた) のdecayをみた。Ipp \cdot Xを37°C, GVBでIncubateするとその活性は約20分で半分となり, 60分は10%以下に120分は1%以下となりその活性は失われる。そこで37°C 2分にて形成されたIpp \cdot Xを120分間decayしたものをIpp \cdot X^dと名づけた。

以上、実験より、IppT 上には classical pathway の C3 分解活性 (C42) と alternative pathway の C3 分解活性 (C3B) が形成されることが推察された。そこで IppT-X^d に B、D, 0.5% C2hu を加えて C3 & C5 の分解活性の回復を検討した。B、D は IppT-X^d に 30°C 30分 incubate (66V/D で2回洗浄後 C3 と反応させた。0.5% C2hu は IppT-X^d + C3 hu と同時に反応させた。各自不活化のパーセントを表した。

表1に示すように、B または D, 単独では IppT-X^d の回復はなされ、B、D を同時に加える場合及び 0.5% C2hu を加える場合、C3 の分解活性は回復する。同時に検討した C5 の分解活性の回復は C3 に比べて著しく遅い。

<考察>
ウサギ IgG の FC は C1 を結合して classical pathway を、Fc(ab)2 は alternative pathway を活性化させることはすでに判明している。従来、ウサギ IgG で形成した抗原抗体複合体は classical pathway を活性化し、種々の生物学的活性を発現することが知られてきたが、alternative pathway の発見以来、このように補体を活性化するの機構が不明であった。今回の実験でウサギ IgG を作用させた抗原抗体複合体は一部は C1 の classical pathway を、一部は C3B を経て alternative pathway を活性化することが明らかになった。この点に関しては classical pathway を活性化し、それによって生じた C3b はこの alternative pathway を活性化し、これによって生じた C3b はこの alternative pathway を活性化し、これを繰り返すことで、観察されたことである。

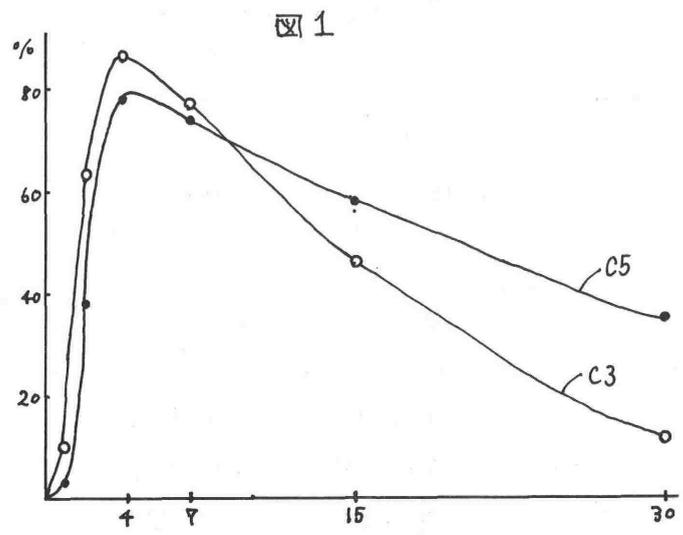


表1

| | C3 | C5* |
|---|------|------|
| IppT-X | 62.2 | 30.5 |
| IppT-X ^d | 0 | 3.2 |
| IppT-X ^d + B | 0 | 5.4 |
| IppT-X ^d + D | 0 | 9.7 |
| IppT-X ^d + B+D | 45.3 | 22.6 |
| IppT-X ^d + 0.5% C2hu (100SFU) | 5.4 | 9.7 |
| IppT-X ^d + 0.5% C2hu (1100SFU) | 61.5 | 33.3 |

* 不活化のパーセント

S-スルホ化 γ -グロブリンの補体結合性

帝人 生物医学研究所

福元裕二 増保安彦 渡辺恒雄 富部克彦

大阪府立成人病センター

永木和義 稲井真弥

ヒトガンマグロブリン(G γ)の補体結合性を除去する手段として、G γ を化学的に処理する方法はいくつかの報告がある。すなわちCohenらは、G γ をアミド化、カルバミル化することにより、またBarandunらは、還元アルキル化することによって、補体結合性が著るしく減少することを示した。この様な抗体の化学修飾による補体結合性の変化をみることは、抗体の構造と補体結合の関係を明らかにしていく上で、重要な手がかりを与えるものと考えられる。我々は、G γ をテトラチオン酸ナトリウム及び亜硫酸ナトリウムと温和な条件で反応させ、G γ の鎖間のS-S結合のみを選択的に切断し、スルホ化したもの(S-スルホ化 γ -グロブリン、G γ S)を得て、その生物活性を検討した結果、補体結合能がきわめて弱く、かつ抗体カ価はもとのG γ とほぼ同等に保たれており、抗体活性減期もG γ とほとんど差異がなかった。また、このG γ Sは、生体内でもとのG γ に再結合され、補体結合能を回復することが認められた。今回、G γ Sの生物活性のうち、補体結合性について詳細に検討したので報告する。

(材料および方法)

G γ Sは1% G γ に14mMテトラチオン酸ナトリウム及び54mM亜硫酸ナトリウムを加えて、45°C、4.5hr加温後、透析して試薬を除いた。この条件で得られたG γ Sは、Na₂-³⁵S O₃を用いたG γ S中のH鎖に3.1個、L鎖に0.9個の-³⁵S O₃⁻が取り込まれていることから、鎖間のS-S結合のみが切断、スルホ化されていることを確かめた。

ペアシン処理ガンマグロブリン(G γ P)は市販のものを用いた。

BDBによるaggregationはIshijakaらの方法に従って行ない、G-200により、dimer以上のものを集めた。

immune complexはhuman anti-tetanusとtetanus toxoidを最適比で結合させたものを用いた。

補体との反応は、正常ヒト血清と試料を等量で混合し、37°Cで1hr反応させて、CH50および補体各成分の活性を測定した。

(結果)

1) CH50 (Fig 1)

GGは10 mg/ml serumで60%以上の補体を消費するのに比較して、GG SはGG Pと同様に50 mg/ml serumの濃度でも低値を示した。

次にBDBでaggregateさせたGG及びGG Sについて検討した結果、aggregateさせたGG Sは、もとのGG Sに比較して、明らかに補体結合能が認められる様になるが、aggregateさせたGGに比べると明らかに、補体結合能が弱いことがわかった。

さらに、immune complexにした場合にも、GGに比較して、補体結合能が低下していることが示された。

2) 補体各成分 (Table 1)

GGはC1, C4, C2, C3を顕著に消費しており、通常のclassical pathwayを経て補体系を活性化しているのが認められるが、GG Pは、各成分ともに、ほとんど影響を与えていない。一方、GG Sでは、C4, C2, C3, C5, C3 totalは、ほとんど変化ないが、C1のみが、濃度を上げると70%以上も消費されることがわかった。モルモット血清を使用した場合にも、同様な結果を得た。

3) GG SによるC1の消費について

この原因を明らかにするため、GG Sと同様に、ヒンジ部位のS-S結合を切断し、アルキル化した還元アルキル化GGについて比較した結果、補体価の減少は、GG Sと全く同じであるにもかかわらず、GG SにみられるようなC1の消費は認められなかった。このことから、GG SによるC1消費の原因として

① スルホ化による独自の抗体の構造変化による

② $-SO_3^-$ の負電荷による

最近、デキストラン硫酸などの硫酸基を含んだポリアニオンがC1のみを不活化するという報告があり、この可能性も考えられる。

が推察されるが、さらに詳しく検討中である。

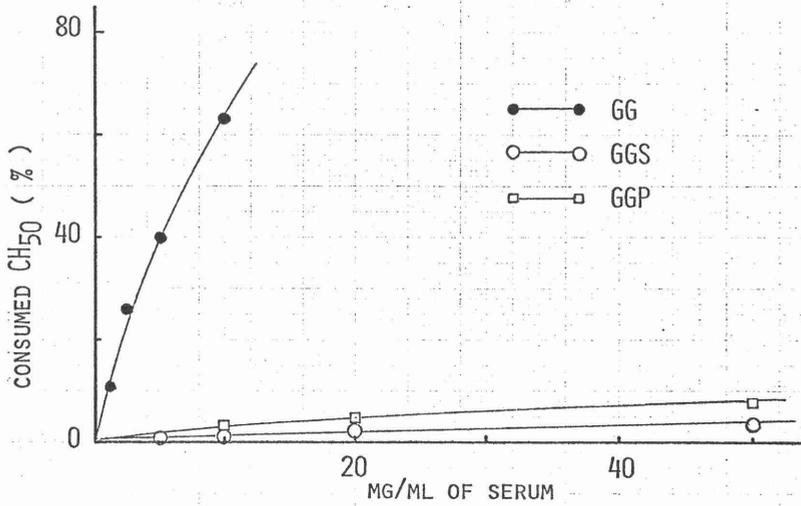
(結論)

1) GG SはGGに比較して補体結合能が著しく弱い。

2) aggregateさせたGG Sは、もとのaggregateさせないGG Sに比べると補体結合性が認められるようになるが、aggregateさせたGGに比べると明らかに補体結合能は弱い。

3) GG Sは高濃度でC1を顕著に消費するにもかかわらず、これに続くC4, C2, C3には、ほとんど影響を与えず、totalのCH50は変わらない。

Fig 1



COMPLEMENT FIXATION OF GG, GGS AND GGP.

Table 1

CONSUMPTION OF HUMAN COMPLEMENT COMPONENTS BY GG, GGS AND GGP

| MG/ML OF SERUM | CH50 | % LOSS OF ACTIVITY | | | | | |
|----------------|------|--------------------|------|------|------|-----|----------|
| | | C1 | C4 | C2 | C3 | C5 | C3 TOTAL |
| GG | 10 | 23.7 | 68.4 | 83.6 | 32.2 | 1.2 | 19.0 |
| GGS | 10 | 31.2 | 10.5 | 2.3 | 5.3 | 0 | 1.5 |
| | 50 | 76.2 | 0 | 4.5 | 1.3 | 2.3 | 1.8 |
| GGP | 10 | 0 | 5.3 | 6.1 | 1.3 | 0 | 0 |
| | 50 | 17.5 | 21.1 | 6.8 | 6.6 | 3.5 | 2.3 |

IgE ミエローマ 蛋白の補体結合性

大阪府立成人病センター 飯田恭子
永井博
平松誠一
稲井真弥

我々は、K型IgE骨髄腫の一例(K.G)を経験し昨年の免疫学会において、その性状について報告した。すなわち、分子量20万、沈降定数7.6Sで、既に報告されているN.D.やP.S.と違わず、またアミノ酸組成や含水炭素量もほとんど差異が認められなかった。この患者のIgE(KGE)と石坂博士より供与されたIgE(PSE)の抗原性の相違を、Ouchterlony法によって比較したところ、Fc部分は共通であるが、Fd部分の抗原性に一部ちがいがあることが推定された。

IgEの補体結合性については、1972年、Ishizakaが、モルモット血清を用いて、whole molecule, Fc fragment, F(ab)₂ fragmentのいずれもが、alternative pathwayを活性化すると報告している。今回我々は、2例のIgE(KG)及び(P.S)を用いて、ヒト及びモルモット血清に対する補体結合性を検討した。

《材料と方法》

IgE: K型IgEミエローマ血清(KGE)及び入型IgEミエローマ血清(PSE)から硫酸塩析、DEAEセルロースカラムクロマトで分離した。これを抗ヒト抗体をカップルしたimmunoabsorbentを素通りさせて精製した。

Fc fragment: 0.01M Cystein, 2mM EDTAを含む0.1M P.B pH7.0中、1/50重量のマーキュリパパイインで37°C 100分間消化した。Sephadex G-150によるゲル濾過で、Fcに相当する部分を集めた。K.G.のFcは、anti K chainの抗体カラムを素通りさせ、又P.S.のFcは、anti λ chainの抗体カラムを素通りさせて、intact IgE, Fab fragmentなどを除去した。

以上のIgE及びそのFc fragmentは、bisdiazotized benzidine (BDB)で、カップリングさせ、G-200又は、G-150によるゲル濾過で、dimer 以上のoligomerを集めて、補体との反応に用いた。

((結果と考察))

各 sample を saline で希釈したものを 0.5 ml をヒトあるいは、モルモット血清 1.0 ml と 37°C 60 分間、反応後、CH50 及び各補体成分の溶血活性を測定した。saline と反応させた control の活性を 100 とし、各 sample の活性の減少を百分率で表した。

Table 1 は、ヒト血清を用いた時の、補体成分の消費を示している。KG, Fc (293 $\mu\text{g N/ml}$) を用いた時、CH50 は、64%, C4 88%, C2 86% 低下しているが、C3T (C3~C9) は 23% しか低下していない。これは classical pathway を介して補体が活性化されたことを示すパターンである。PS, Fc の時も、活性はやや劣るが、同様の傾向である。whole molecule の IgE を用いた時は、Fc fragment に比較して活性は、低く KG (214 $\mu\text{g N/ml}$) は、CH50 14%, C2 23%, C3T 12% の低下であった。これも Fc fragment と同様に、classical pathway が活性化されたといえるパターンである。C1 の消費は、いずれも 10% 以下の値である。昨年報告した IgA の場合も、IgE 同様、classical pathway を活性化するが、C1 の消費は少なかった。その原因は、不明であるが、結合した C1 が、IgG の場合だけ不活性化され、IgE, IgA の場合には、活性化なの、あるいは IgE, IgA には結合されずに抗体表面で活性化が起こったなど考えられる。

Table 2 はモルモット血清を用いた時の結果である。この時、C4, C2 の低下は、著しいものではなく、classical pathway が活性化されたとは言えず、むしろ alternative pathway が活性化されたパターンを示している。

((結論))

2 例のミエローマ血清 KG, 及び PS は、ヒト血清中の補体を classical pathway を介して活性化した。モルモット血清を用いた時には、従来から言われていたように、alternative pathway を活性化したといえるパターンを示した。この補体の source による差異は、実際に活性化の経路が違うのか、それとも、いずれも両経路が活性化されていて、補体成分活性低下の程度に差があるのかなど、その原因については、明かでない。

TABLE 1

| Agg. I ₉ E | AMOUNT (μ gN/ML) | % LOSS OF ACTIVITIES | | | | | | |
|-----------------------|--------------------------|----------------------|------|------|------|------|------|------|
| | | CH50 | C1 | C4 | C2 | C3T | C3 | C5 |
| K.G. I ₉ E | 214 | 14 | 6 | 9 | 23 | 12 | 23 | 10 |
| | 107 | 11 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| P.S. I ₉ E | 186 | 11 | 10 | 14 | 19 | 5 | 11 | 9 |
| | 93 | 8 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| K.G. Fc | 293 | 64 | 8 | 88 | 86 | 23 | 46 | 6 |
| | 147 | 45 | 8 | 52 | 68 | 19 | 40 | 2 |
| P.S. Fc | 293 | 47 | 8 | 48 | 66 | 18 | 41 | 7 |
| | 147 | 29 | 8 | 33 | 41 | 15 | 35 | 1 |

TABLE 2

| Agg. I ₉ E | AMOUNT (μ gN/ML) | % LOSS OF ACTIVITIES | | | | | | |
|-----------------------|--------------------------|----------------------|----|----|----|-----|----|----|
| | | CH50 | C1 | C4 | C2 | C3T | C3 | C5 |
| K.G. I ₉ E | 214 | 11 | 9 | 18 | 1 | 9 | 12 | 9 |
| | 107 | 7 | 5 | 3 | 9 | 4 | 10 | 0 |
| P.S. I ₉ E | 186 | 7 | 9 | 18 | 7 | 4 | 12 | 5 |
| | 93 | 8 | 7 | 10 | 4 | 0 | 10 | 5 |
| K.G. Fc | 293 | 12 | 17 | 5 | 6 | 19 | 46 | 1 |
| | 147 | 11 | 12 | 0 | 6 | 14 | 15 | 1 |
| P.S. Fc | 293 | 13 | 0 | 9 | 6 | 19 | 30 | 3 |
| | 147 | 7 | 0 | 0 | 0 | 12 | 11 | 3 |

Escherichia coli K-12 由来の補体抵抗性変異株について.

秋山 曜子*, 井上 公藏(阪大・医・細菌)

目的

免疫殺菌反応における補体による膜侵襲機構および殺菌機構を明らかにするために、補体抵抗性変異株を分離し、主にその内外膜の変化と補体抵抗性獲得との相互関係を明らかにせんとした。

方法

(1) 変異株の分離 : E. coli K-12. W3110/SM の Trypticase soy broth 培養における後期対数増殖期の菌を 0.1% glucose Tris medium (TGM) で 10^{-4} - 10^{-3} に希釈し、その 0.1ml を 1:150 非働化ウサギ抗 E. coli K-12 抗血清および 1:2 モルモット補体血清を含む TGM の 0.9ml と混合し、37°C で 1 ないし 3 日間培養し、充分菌が増殖したものを選び、上記の操作を 5-15 回繰返して、分離した。

(2) 内外膜の分離 : 0.03% glucose を含む TGM に ^{14}C -[U]-glucose を $0.5\mu\text{Ci/ml}$ になるように加えて培養した菌を Osborn らの方法に従って、lysozyme-EDTA

表 1

Sensitivities of the strains obtained to complement action

| Strain | Complement | Survivors/ml | | | |
|----------|------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | - | 2.8×10^5 | 5.6×10^4 | 2.0×10^3 |
| W3110/SM | + | 2.0×10^2 | 0 | 0 | 0 |
| | - | 2.9×10^5 | 3.8×10^4 | 4.1×10^3 | 4.3×10^2 |
| III | + | 2.6×10^5 | 2.9×10^4 | 2.8×10^3 | 1.1×10^2 |
| | - | 2.4×10^5 | 3.9×10^4 | 3.5×10^3 | 4.4×10^2 |
| IV | + | 4.0×10^4 | 3.7×10^4 | 3.2×10^3 | 1.8×10^2 |
| | - | 4.7×10^4 | 5.3×10^4 | 5.3×10^3 | 4.3×10^2 |
| V | + | 2.0×10^5 | 5.2×10^4 | 4.1×10^3 | 2.2×10^2 |

Reaction mixture contained 1/167 anti-E. coli K 12-antiserum + 1/3.3 complement serum and bacteria, and was incubated at 37°C for 60 min.

* 現住所: Department of Microbiology, University of Southern California, School of Medicine, Los Angeles, California 90033, U. S. A.

表 2.

Per cent survivor, and per cent release of ^{14}C -compounds and of ^{14}C -lipids from the sensitized bacteria into the surrounding medium by complement action

| Strain | C | Final complement concentration | | | | | |
|-----------------|------------------------|--------------------------------|-----------------|------------------------|----------|------------|-------|
| | | 1 : 2.5 | | | 1 : 10 | | |
| | | Survivor | Release of | | Survivor | Release of | |
| ^{14}C | ^{14}C -lipid | | ^{14}C | ^{14}C -lipid | | | |
| III | C | 14.7 | 49.3 | 3.45 | 54.9 | 26.8 | 1.89 |
| | ΔC | 100 | 3.34 | 0.486 | 100 | 3.18 | 0.222 |
| IV | C | 19.2 | 30.1 | 2.65 | 59.3 | 17.5 | 1.54 |
| | ΔC | 100 | 3.67 | 0.495 | 100 | 3.80 | 0.329 |
| V | C | 21.8 | 30.2 | 1.18 | 70.3 | 17.0 | 1.18 |
| | ΔC | 100 | 3.85 | 0.532 | 100 | 3.91 | 0.315 |
| W3110/SM | C | 2.87 | 56.2 | 4.07 | 34.8 | 26.6 | 2.08 |
| | ΔC | 100 | 3.54 | 0.302 | 100 | 3.10 | 0.239 |

Reaction mixture contained about 2×10^9 sensitized bacteria/ml and complement serum at a concentration indicated, and was incubated at 37°C for 60 min.

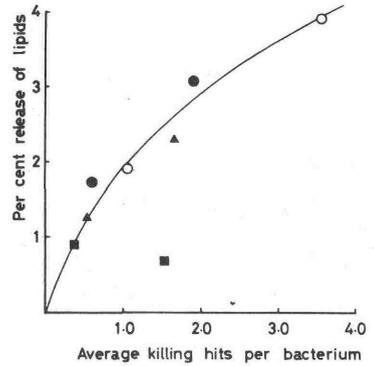


図 1

中で spheroplast 化し、これを osmotic shock および超音波処理により burst させ、蔗糖密度勾配遠心法により分離した。

分離した膜は、一部はクロロホルム・メタノール抽出してリポド画分をとり、Silica gel 薄層クロマトグラフィー および、その脂肪酸画分のガスクロマトグラフィー によって分析した。又、一部は、SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) で比較検討した。

結果

得られた数種の株についてその親株に対する抗血清による凝集性をしらべると、1株を除いて凝集性はほぼ1管低下していた。しかし、補体に対する抵抗性は著しく高かった(表1)。しかし、これらの株は補体と反応しないわけではなく、抗血清および補体血清を加えると、親株と同程度の IA 活性を示す。又、これらの株は親株と同様に phospholipase A 活性を持っている。

これらの株と補体とが反応した後 lesion 形成に至るかどうかが、あるいは、我々が従来見て来た phospholipids の遊出があるかどうかをしらべてみると、感作した ^{14}C 標識菌を高濃度の補体で処理した場合には、菌体から ^{14}C 物質が遊出し、それに膜リポドも含まれている(表2)。

表2から、補体によって与えられる killing hit 数と、遊出リポド量との関係を求めてみると、これらの株から上清中へ遊出されるリポド量と、菌当りの killing hit 数とはほぼ比例し、(図1)、従って、抵抗株ではや

表 3.

Fatty acid composition of outer and inner membranes of E. coli

| | K 12 W3110/SM | | | | | | | |
|--------|----------------|------|------|------|----------------|------|------|------|
| | inner membrane | | | | outer membrane | | | |
| | W | III | IV | V | W | III | IV | V |
| 14 : 0 | 4.4 | 2.8 | 2.5 | 2.6 | 5.7 | 3.9 | 3.7 | 4.5 |
| 16 : 0 | 53.7 | 47.3 | 45.0 | 44.9 | 50.0 | 44.0 | 48.6 | 48.2 |
| 16 : 1 | 1.8 | 2.9 | 3.1 | 3.4 | 2.3 | 2.3 | 2.2 | 2.3 |
| 17 CPA | 30.9 | 29.2 | 28.0 | 28.8 | 28.2 | 27.7 | 30.2 | 27.6 |
| 18 : 0 | trace | 0.7 | 1.1 | 1.0 | 0.3 | 1.2 | 1.0 | 0.8 |
| 18 : 1 | 2.2 | 7.0 | 8.9 | 5.5 | 3.2 | 6.9 | 6.4 | 3.4 |
| 19 CPA | 6.2 | 6.6 | 7.9 | 9.7 | 5.2 | 7.9 | 4.5 | 8.1 |

W: the parent strain

はり lesion 形成が少ないのではな
ないかと考えら
れる。その原
因を追求するた
めに、各株を ^{14}C
で標識した後、
内外両膜を分離
し、それらのリ
ピド画分を薄層
クロマトグラフ
イーにより、又、
膜蛋白を SDS-PAGE
により比較検討

したが、いづれも、親株と殆ど変りはなかった。

しかし、これらの株の膜リピドを構成する脂肪酸をガスクロマトグラ
フィーでしらべてみると、親株Wに比べて、抵抗株では、短い脂肪酸が減
って長鎖の脂肪酸が増量しており、(表3)、又、親株Wと抵抗株のそれ
ぞれの内外両膜の構成磷脂質を分離し、それぞれの磷脂質についてその構
成脂肪酸を比較しても、上記の変化は更に著明となる。

抵抗株では膜の流動性を高める不飽和酸が減少し、それが飽和酸に変
ったり、或いは1つ炭素数の多いチクロアロパン酸になっており、膜の流
動性の低下が補体に対する抵抗性の獲得に関係していることが明らかとな
った。

尚、ガスクロマトグラフィーに関しては、大阪市大の天野郁也、大野
佳美両先生の御指導を受け器具や reference 物質を使用させて頂いたことに
厚く感謝します。

Escherichia coli の補体感受性と菌体表層脂質の組成について

岡田 真理子*, 井上 公藏 (阪大・医・細菌)

目的

補体による溶細胞反応が C5b-9 複合体によって発現されることは最近の研究から明らかであるが, C5b-9 複合体が如何にして細胞膜を侵襲するかについては, Mayer の Doughnut hypothesis と Müller-Eberhard の C8 insertion hypothesis が提案されており, いずれもそれぞれ, 根拠と speculation との見争な組合せといふことができる。我々は, E. coli および人工モデル膜 liposome をモデルとして補体による溶細胞反応の機序について研究してきたが, 前回迄の本シンポジウムで報告してきた如く, 補体による膜侵襲機構は或る補体成分, あるいはそれらの複合体に由来する酵素活性によるものでないこと, 他の膜障害機構, 例えば, E. coli の bacteriophage lysis や liposome の phospholipase A による trapped marker の遊出には認められない膜磷脂質の遊出が補体による膜障害に特異的であること, 更に, 補体により遊出される膜磷脂質量は補体により形成される lesion 数に比例すること等を明らかにしてきた。これらの結果から, 我々は補体による膜障害機構は上記の二つの仮説のうち Mayer の doughnut hypothesis に近い機序によって起ると考えるに至っている。もし, C5b-9 複合体が膜の phospholipid bilayer 中へ挿入沈下されるのであれば, 膜の流動性と, 補体による lesion の effective formation との間に何らかの関係が考えられる。それ故, 我々は E. coli B/SM 株を用いて, その培養条件を変えることにより膜の脂質構成成分を変化させて, 膜の構成成分, 流動性と菌の補体に対する感受性との関係を究明し, C5b-9 複合体の膜中への effective insertion が膜の構成成分の変化に如何に反応するかを解明せんとした。

方法

E. coli B/SM strain 1-1 を Tris glucose medium (TGM) で培養した。¹⁴C 標識菌は glucose を制限した TGM に ¹⁴C-[U]-glucose を加えた培養することによって得られた。培養は TGM の pH, Mg⁺⁺ 濃度, 又は, 培養温度を変化させ, あるいは, aerobic または anaerobic に培養して, 菌の膜構成成分を変化させた。得られた菌を洗浄, 感作後, 更に洗浄して, 補体血清で処理し, 補体に対

* 現住所: 東京都臨床医学総合研究所, 炎症研究部門。

表 1.

Effects of the growth condition (gas phase, pH or temperature) on the sensitivity of E. coli B to the immune bactericidal reaction

| Growth condition | | | Final concentration of RL or ΔRL | Per cent killed |
|------------------|----------------------|------------------|----------------------------------|-----------------|
| pH | Gas phase (Bubbling) | Temperature (°C) | | |
| 7.4 | O ₂ | 37 | 1 : 300 | 90.2 |
| | | | 1 : 600 | 55.5 |
| 7.4 | N ₂ | 37 | 1 : 300 | 97.7 |
| | | | 1 : 600 | 81.1 |
| 7.07 | O ₂ | 37 | 1 : 150 | 61.2 |
| | | | 1 : 300 | 39.9 |
| 8.3 | O ₂ | 37 | 1 : 150 | 94.9 |
| | | | 1 : 300 | 46.6 |
| 7.07 | O ₂ | 37 | 1 : 200 | 99.5 |
| | | | 1 : 400 | 66.7 |
| 7.07 | O ₂ | 25.5 | 1 : 200 | 99.5 |
| | | | 1 : 400 | 63.9 |

する感受性は colony count 法で、又、菌の脂質構成脂肪酸は、ガスクロマトグラフィーにより決定した。

結果:

E. coli B/SM を aerobic あるいは anaerobic に培養した場合、anaerobic に培養した菌の方が補体に対する感受性は高い(表 1)。

培地の pH を変化させた場合には、pH 7.0 培地に比べて 8.3 で培養した場合の方が感受性が高かった(表 1)。

培養温度を 25.5°C および 37°C と変えても菌の感受性は殆ど変わらなかった(表 1)。

これらの菌の脂質構成脂肪酸をしらべてみると、不飽和脂肪酸 (16:1, 18:1) が増加する場合には補体により感受性が高く、これらが減少し(或いはこれらが減少して炭素数の 1 つ多いチクロプロパン酸が増加すると感受性は減少する(表 2)。このような変化と、秋山および井上の報告する補体耐性変異株の結果から考えると、一般に、構成脂肪酸の短鎖のものや、不飽和酸が増加し、チクロプロパン酸が減少する場合、即ち、膜の

表 2.

Effects of the growth condition (gas phase, pH or temperature) on the fatty acid composition of the lipid of E. coli B

| Growth condition | | | Fatty acid composition (%) | | | | | | |
|------------------|----------------|-------------|----------------------------|------|------|-------|------|------|-------|
| pH | Gas phase | Temperature | 14:0 | 16:0 | 16:1 | 17:0V | 18:0 | 18:1 | 19:0V |
| 7.4 | O ₂ | 37 | 4.6 | 41.7 | 3.4 | 29.5 | tr | 8.6 | 11.8 |
| 7.4 | N ₂ | 37 | 4.0 | 42.0 | 19.0 | 13.7 | tr | 18.9 | 1.7 |
| 8.3 | O ₂ | 37 | 3.7 | 41.2 | 18.7 | 12.1 | tr | 22.0 | 1.7 |
| 7.07 | O ₂ | 37 | 5.2 | 40.4 | 0 | 31.2 | tr | 3.4 | 19.2 |
| 7.07 | O ₂ | 25.5 | 2.0 | 29.1 | 26.1 | 5.8 | tr | 36.7 | tr |

tr: less than 1.0 %

流動性が增大すると考えられる場合の方が補体に対する感受性は高かった。但し、高温培養 (37°C) に比べて、低温培養 (25.5°C) では、構成脂肪酸はより流動性になっていると考えられるのに、感受性は変らなかった。

培地中の Mg^{++} 濃度を変化させた場合には、構成脂肪酸の組成には大きな変化は認められなかったにも拘らず、 Mg^{++} 高濃度培地で培養した菌の方が補体に対する感受性が高かった。高 Mg^{++} 濃度で培養した菌の方が補体をより effective に利用できるのか、alternative pathway を経ての補体活性化がこのような菌の菌体表面で起り易いのか、あるいは、 Mg^{++} はグラム陰性菌菌体壁外膜の磷脂質や lipopoly saccharide (LPS) 間の anchor として膜構造の保持に重要な役割をもっているので、高濃度 (10^{-2} mM) Mg^{++} 加培地中で培養された菌は、反応液中では、 Mg^{++} の放出と膜構造の乱れを来すのかも知れない。

これらの培養条件の異なった菌の免疫殺菌反応における磷脂質の菌体外遊出を ^{14}C 標識菌を用いてしらべると、aerobic と anaerobic, pH の変化では、殺菌率でみた場合には感受性に相違があるのに、磷脂質の遊出では殆んど差が認められなかった。又、逆に、殺菌率では殆んど差のなかった培養温度の変化では、低温培養菌の方が磷脂質の遊出は大きかった。培地の Mg^{++} 量の変化では、殺菌率での相違と一致して、高 Mg^{++} 培地培養菌の方がより多くの磷脂質を遊出させた。このことは、膜形成に過剰の Mg^{++} が利用された場合には、 Mg^{++} 濃度の低い反応 medium 中では、通常の菌が EDTA で前処置された場合と同様に、 Mg^{++} の放出と共に磷脂質や LPS 間の結合が緩むことによるのかも知れない。

考察

菌体膜磷脂質の脂肪酸構成が膜の流動性を高めるような方向に転移すると、補体に対する感受性は高くなる。但し、菌体磷脂質の遊出量の多少と菌の死を指標とする感受性とは必ずしも一致しない。これは、上記の一般的傾向と共に、それぞれの場合に膜構成の相違が全磷脂の脂肪酸構成ではなくて、個々の磷脂質の構成比や、それらの中の構成脂肪酸の変化により影響されるのか、あるいは、 $C5b,6,7$ に始まると考えられる複合体の挿入沈下と $C5b-9$ の完成との間の gap として説明できるのか、更に複合体の挿入およびそれに伴う磷脂質の放出と effective killing hit の完成との間の gap で説明できるのかは今後検討しなければならない。

ガスクロマトグラフィーは、阪大蛋白質研、蛋白質有機化学部門、田井晰先生の器具を使用させて頂きましたことを感謝します。

ヒト赤血球の補体レセプターの単離と性状

東北大 抗研免疫 奥田智子, 橋 武彦

現在補体レセプターとして C3b, C3d, C4b に対するものが知られている。これらは顆粒状, マクロファージ, 単球, 細網細胞の他にリンパ球にも存在する。正常リンパ球には C3b レセプターも C3d レセプターも共に存在するが, その検出率は C3b レセプターの方が高い。それに対して バーキットリンパ腫由来の培養細胞や CLL では C3d レセプターの方が著しく高くなることが知られ, これらレセプターの生物学的意義を明らかにする事は非常に興味深く重要な問題である。そのために先ず, C3b レセプターのみを有するヒト赤血球を用いてレセプターを単離し, 得られた物質の若干の性質について得た知見を報告する。

C3b レセプターの単離

ヒト O 型赤血球を洗滌後, 0.01M - リン酸緩衝液に浮遊して溶血させ, 得られたゴーストを同じ緩衝液で洗滌する。ゴーストに 0.2% Nonidet P40 (PH 9.0 トリス緩衝液) を加えて 4°C で攪拌し, 遠心して (8000g 60分) 上清を PH 7.5 に調整する。グルタルアルデヒドで処理したヒツジ赤血球 (CHOE), ウサギ抗ヒツジ赤血球の IgM 分画, ヒト補体より作製した CHO EAC^h を上清に加え 4°C で反応させる。遠心して沈渣を PBS で洗滌後, 2M - チオリアン酸ナトリウムを加えてレセプターを溶出させ, 遠心後上清を PBS に対して透析する。

EAC^h の凝集反応

マイクロプレートを用いて試料の GVB⁺ 又は EDTA - GVB による 2 倍希釈列を作り, 1 × 10⁵/ml の EAC^h 又は EAC^{mouse} (C3d レセプターとのみ反応し, C3b レセプターとの反応性を有しない¹) を加えて, 37°C で 10 分攪拌後, 静置して凝集像を 0~4 の段階で判定する。表 1 に示すように, 単離された試料は 128 倍希釈迄 EAC^h と凝集反応を示

TABLE 1 Hemagglutination of EAC by receptor substance.

| | Dilution of receptor | | | | | | | - |
|-----------------------------|----------------------|-----|-----|------|------|------|-------|---|
| | 1:2 | 1:4 | 1:8 | 1:16 | 1:32 | 1:64 | 1:128 | |
| EAC ^h + receptor | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 2 | 0 |
| EAC ^h + control1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| EAC ^h + control2 | ± | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| EAC14 + receptor | 4 | 4 | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| EAC1 + receptor | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| EAC ^m + receptor | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| EAC ^m + control1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

すがEAC^mとは反応しない。対照としてヒツジ赤血球 (control 1) 又はヒト赤血球をトリアミンで処理してImmune Adherenceの活性を消失させたもの (control 2) を用いて全く同じ抽出操作を行ったものではEAC^hとの凝集反応は殆んど認められない。200 SFUのC4^hを用いて調整したEAC^h C4^hも抽出されたレセプターによって凝集する。これはN.R. Cooperが初めて報告したEAC14がIAレセプターと反応するという事実²⁾を裏書きするものである。

EAC^hの凝集反応の阻害

単離されたレセプターを種々の濃度のC3, C3bおよび対照としてBSAと共に37°Cで15分反応させた後, EAC^h (予めEDTA-GVBで37°C 60分処理したもの) を加えて凝集像を観察する。表2に示すようにC3によって弱い, C3bによって強い凝集阻害が見られる。

TABLE 2 Inhibition of agglutination of EAC^h with the receptor substance.

| Amount of soluble protein | Degree of agglutination in presence of | | |
|---------------------------|--|-----|-----|
| | C3 | C3b | BSA |
| 1000 µg | 2 | 0 | 3 |
| 500 | 2 | 0 | 3 |
| 250 | 3 | 0 | 3 |
| 125 | 3 | 0 | 3 |
| 63 | 3 | 2 | 3 |
| 32 | 3 | 3 | 3 |
| 0 | 3 | 3 | 3 |

Immune Adherenceの阻害

試料の2倍稀釈列にEAC^h ($5 \times 10^7/ml$) を加えて37°Cで30分インキュベートしてからヒトO型赤血球 ($1 \times 10^8/ml$) を加えて10分間振盪後静置して凝集像を判定する。単離されたレセプターによって4倍稀釈迄IAが阻害された。EAC14によるIAに対して阻害が認められた。

骨髄培養細胞ロゼット形成の阻害

リンパ球のC3bレセプターと赤血球上のC3bレセプターとが同一のものであるか否かを知るために, 赤血球より得られたレセプターによるリンパ系細胞のEAC^hとのロゼット形成に対する影響を調べた。細胞としては骨髄細胞をEBウイルスによってtransformさせて樹立された培養細胞 (KMBM, CBBM) - いずれもわれわれの研究室の工藤俊雄博士によって樹立され, 提供された - を用いた。抽出したレセプターをEAC^h又は

TABLE 3

| cells | rosette \bar{c} EAC ^h | | | | rosette \bar{c} EAC ^m | | | |
|-------|---|------------------|------|-----|---|------------------|------|-----|
| | in the presence of isolated receptors absorbed with | | | PBS | in the presence of isolated receptors absorbed with | | | PBS |
| | EAC ^h | EAC ^m | none | | EAC ^h | EAC ^m | none | |
| KMBM | 28 | 5 | 2 | 29 | 14 | 7 | 6 | 10 |
| CBBM | 22 | 4 | 0 | 28 | 12 | 4 | 8 | 12 |

EAC^mと37°Cで15分インキュベートしてからKMBM又はCBBM細胞を加えて静置し、1時間後に静かに再浮遊させて検鏡し、指標細胞3個以上付着したものを陽性細胞として陽性率を算出した。また抽出されたレセプターを予めEAC^h又はEAC^mで吸収したものについても同時に同じ実験を行った。その結果を表3にまとめた。いずれの細胞も遊離レセプターの存在しない場合(PBS)は、EAC^hと29%および28%の細胞がロゼットを形成するが、遊離レセプターの存在下ではEAC^hとのロゼットは阻害され、2%および0%となる。遊離レセプターを予めEAC^hで吸収するとこの阻害は見られなくなるが、EAC^mで吸収しても吸収効果はない。EAC^mとのロゼット形成は遊離レセプターによってほとんど影響されない。

ヒト赤血球より抽出したレセプターはリンパ系培養細胞のEAC^hとのロゼット形成を阻害する。すなわちリンパ系培養細胞もヒト赤血球も共通のC3bレセプター構造を有すると考えられる。また遊離のC3bレセプターの存否にかかわらず、骨髄細胞とEAC^mとのロゼット陽性率がほぼ一定であることは、細胞表面のC3bレセプターとC3dレセプターはそれぞれ独立に指標細胞と反応するものと考えられる。

1. T. Okuda and T. Tachibana, Japan. J. Exp. Med., 44, 531 (1974)
2. N. R. Cooper, Science, 165, 396 (1969)

補体による溶血反応に伴う血球膜の構造変化

中村真知子^{*}, 大西俊一^{*}, 北村肇, 稲井真知

(^{*}京大, 理, 生物物理, 大阪府成人病センター)

安定な有機ラシカルをリン脂質に結合させたアナログを用いて, その電子スピン共鳴スペクトルを測定するスピニラベル法は生体高分子や生体膜の動的構造変化を観測するたための有効な方法である (1)。我々は図1に示したリン脂質ラベルラベル1-トヒツジ血球およびヒト血球を用いて, 凝集反応および補体による溶血反応における血球膜の構造変化を観測したのでここに報告する。膜構造変化のパラメーターとして *overall spinning* とよばれる2 π (図2参照) を用いた。2 π が小さくなるにつれ膜の流動性が増加する。これについては *McLennan* らにより理論的に証明されている (文献1参照)。

材料および方法 血球へのラベル法としては, リン脂質ラベルを *sonication* により *dispersion* にしたものと血球とを *incubation* した後余分なラベルを遠心により除いた。これらの処理は血球膜の構造および機能には影響しないことが確かめられている。ヒト血球としてはA型を用い, ヒト抗体としてはO型血清およびヒト血球に対するウサギ血清を用いた。これらは京都日赤血液センター佐治氏より提供された。補体による溶血反応の *intermediate cell* としては, EA, EA(C₁-7), EA(C₁-8), EA(C₁-9) を調製した。モルモット (8は井上らの方法に従って北村により精製された。ヒトC₉は *condis* から購入された。Osmotic shock による *ghost* の調製法としては田中の方法 (2) を用いた。とくにことわらぬものは 0.5mM *CaCl*₂ と 0.5mM *MgCl*₂ を含む 5mM *veronal buffer* を用い, 0.5mM *MgCl*₂ のみを含む *buffer* を用いた場合ととくに *Mg-ghost* とよぶ。10% *buffer* 中で溶血させた *ghost* は *NaCl* を4元等張に含む1%後, 37°C で *incubation* を行ない *rescaled* させた。Mg *ghost* と (8や (9) と反応させる場合は, Mgイオンのみを含む等張 *veronal buffer* 中で 37°C 30' *incubation* を行なった。

結果 Table I はヒツジ血球および抗体, 補体成分としてモルモット全血清を用いた場合のスペクトルの *overall spinning* の値を測定したものである。E, EA, および E+C では全く変化が認められなかった (56.8G)。一方補体による完全溶血後の *ghost* および 36% BSA により溶血を阻害した EA(C₁ では 52.8G に変化し, これは osmotic shock にする *ghost* の値と同じになる。ヒト血球の場合も絶対値は異なるが, 補体による溶血の結果 *overall spinning* の減少が観測された。

Table II は intermediate cell の スパクトル変化であって, E, EA, EA(1-7), EA(1-8) 2つは splitting value は 56.6G から 58.8G の間にある。構造変化は認められず。溶血した cell と遠心に処理した EA(1-9) cell 2つは 55.8G から 58.8G に変化し, また 0.09 M EDTA により溶血阻害した場合には 58.6G に変化した。これは EA(1-9) cell と完全溶血させた ghost の値の 52.9G より小さい。

Table III に見られるように, Intermediate cell と 0.5 mM MgCl₂ と含む buffer 中で溶血後 resealed させた場合, E, EA, EA(1-7) cell の Mg ghost の スパクトルはそれぞれ 56.8G から 55.5G であり変化はほとんどない。EA(1-7) cell を Mg ghost に 1 した後 (8 と (9) と反応させた場合は感作血球と直接全血清を用いて ghost に 1 した時と同じく 52.0G になりスパクトル変化はハモクロセンヤウの他の血球内のイオンの存在には無関係であることが確かめられた。また EA(1-8) cell を Mg ghost に 1 した場合 58.1G と変化するが EA(1-7) cell の Mg ghost に (8) と作用させても変化はほとんど 55.6G にとどまる。これと同じ現象は WGA や EIT 血球に対する抗体による凝集させた血球の Mg ghost においても観察された。

考察

血球膜の構造はシフトンヤ抗体による凝集反応によって変化し得る。補体による溶血反応では膜の流動性が増加し, osmotic shock による場合と同じ変化を示した。補体成分のうち (9) による効果は著しく, (8) は Mg ghost に 1 した場合現われる潜在的な効果を持つていた。C₁ から C₉ に至る成分は膜構造に対してほとんど影響を与えないことが観察された。Mg ghost と同じ実験において, intact 血球における補体の作用と同じ構造変化が再現された。その他の条件に於て調製した ghost や血球膜から抽出した全脂質を用いて調製した liposome に対しては補体による構造変化は認められなかった。さらに田中により研究された osmotic shock による溶血反応においてはこれらのスパクトル変化が血球内側にある収縮性蛋白質アプチンおよびスファトリンからなる網目構造の切断によると結論されてくる (2)。補体による溶血反応においても同様に補体の収縮性蛋白質への作用が予想される。

文献

- (1). FARUMASHIA II (1975) P. 706, 大西, 伊藤
- (2). B. B. A 426 (1976) P. 218 田中, 大西

図 1. phosphatidyl choline
- label

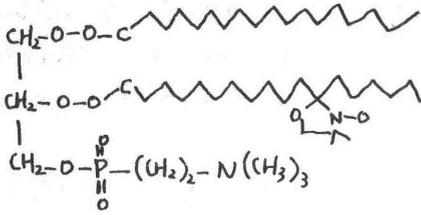


図 2

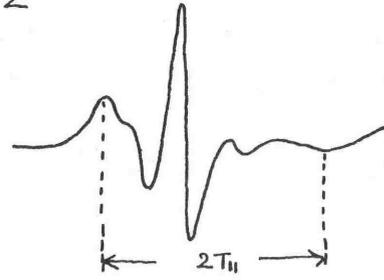


Table 2

モルモット全血清を用いた場合の
血球の ESR スピントールの overall splitting

| | $2T_{II}$ |
|------------------------|-----------|
| E | 56.7 |
| EA | 56.8 |
| E+C | 56.8 |
| EAC lysed | 52.9 |
| EAC in BSA | 53.0 |
| EAC inactivated in BSA | 56.9 |
| E lysed osmotically | 52.8 |

Table 2

Intermediate cell における
ESR スピントールの overall splitting

| | $2T_{II}$ |
|--------------------------|-----------|
| E | 56.7 G |
| EA | 56.8 |
| EAC ₁₋₇ | 56.8 |
| EAC ₁₋₈ | 56.4 |
| EAC ₁₋₉ | |
| 2.5FU/cell 15' | 55.8 |
| 10FU/cell 15' | 54.8 |
| 10FU/cell 60' | 55.1 |
| in 0.09 M EDTA | 54.4 |
| EAC ₁₋₉ lysed | 52.9 |

Table 3

Mg-ghost を用いた実験

| Mg ghost of | Incubated with | $2T_{II}$ |
|--------------------|-----------------------------------|-----------|
| E | — | 56.8 G |
| EA | — | 56.3 |
| EAC ₁₋₇ | — | 55.5 |
| EAC ₁₋₇ | C ₈ | 55.6 |
| EAC ₁₋₇ | C ₈ and C ₉ | 52.0 |
| EAC ₁₋₈ | — | 54.1 |
| E | C ₉ | 56.8 |

細菌細胞壁による補体系の活性化について

稲井 眞 弥 松本 美佐子 安田 玲子

永木 和 義 小谷 尚 三^{*}

大阪府立成人病センター。 * 阪大歯学部口腔細菌

Alternative pathway (A.P.)を経て補体系を活性化する代表的な物質の一つである zymozan はパン酵母の細胞壁である。その他の細菌の細胞壁の補体系におよぼす影響については、A群溶連菌等のペプティドグリカンについて検討した Bokrisch の報告がある以外あまり検討されていない。

細胞壁はその基礎構造をなしている細胞壁ペプティドグリカンと特殊構造物とからなっている。ペプティドグリカンはすべての細菌細胞壁の基本的構築単位であるが、細菌表層においてペプティドグリカンの占める割合はグラム陽性菌ではグラム陰性菌に比し大きい。ペプティドグリカンはペプティド部分とグリカン部分とからなり、グリカン部分はグルコサミンとムラミン酸の二種類のアミノ糖が交互に β -1,4 グリコシド結合したテトラ多糖である。ペプティド部分はD型アミノ酸、ニ塩基ないしニ酸性アミノ酸を主体とする特異な組成のペプティドサブユニットと、隣合うサブユニット間を連結するアミノ酸又はペプティドからなる架橋部分とによって構成されている。細胞壁の特殊構造物は多糖類、タイコ酸、リポ多糖、リポタンパク等多岐にわたっている。各種細菌の血清学的特異性を決定する抗原物質はこの部分に含まれる場合があり、又細菌細胞表層の生物学的、免疫学的活性もこの部分によって支配されている。細菌細胞壁の生物活性としては発熱原性、皮膚に対する急性および慢性毒性、アジュバント作用、心臓に対する傷害作用、白血球の游走阻止作用等が知られている。

実験材料および方法

細胞壁の材料として使用した菌は種々の連鎖球菌、ブドウ球菌およびその他のグラム陽性球菌 (*Gafrkyia tetragenae*, *Sarctina lutea*, *M. lysodeikticus*) と、グラム陽性桿菌として *L. plantarum*, *Act. viscosus* 結核菌等である。

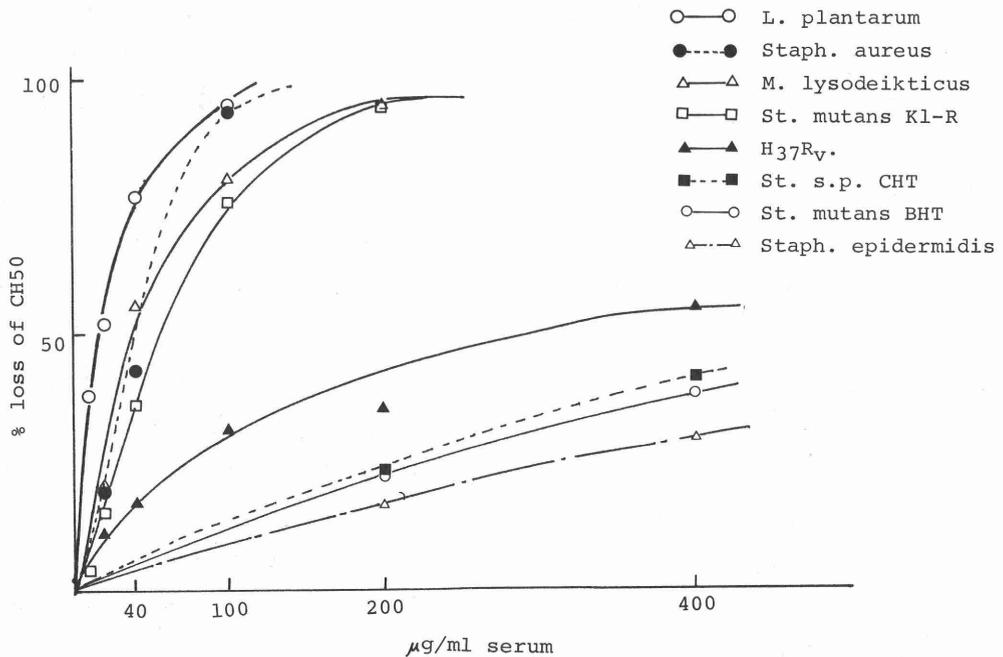
細胞壁は細菌を機械的に破壊し、分別遠心によって粗細胞壁画分を分離し、これをトリフミン、ペフニン、SDS 等で処理し精製細胞壁画分を得た。ペプティドグリカンはこの精製細胞壁画分を5~10% TCA で60°C (厚には40°C)で抽出し不溶性画分を分離したものである。

粗検材料のヒト補体に対する活性は、材料とヒト血清とを37°C 60分間 incubate 後、遠心し、上清中のCH50, C1, C4, C2, C3の溶血活性を測定し、controlと比較し不活化された値を%であらわした。

実験結果

1) 連鎖球菌: *St. mutans* K1-R (図1)をはじめ, *St. pyogenes* 543/100, *St. faecalis* IFO 12580, *St. salivarius* IFO 3350, *St. thermophiles* IFO 3535, *St. lactis* IFO 12546 からの細胞壁は血清補体価を低下させる強い活性が認められた。各材料で処理した血清の補体成分活性のプロファイルを見ると *St. pyogenes*, *St. faecalis* 等では C₄, C₂ 特に C₂ の低下が著しく Classical pathway (C.P.) が活性化されたと考えられる結果が得られた。その他の菌の場合には C₃, C₅ の低下が著しいにもみかわらず。C₁, C₄, C₂ の低下は比較的軽度で。C.P. のみならず A.P. も活性化されたと考えられた。

2) グド-球菌およびその他のグラム陽性球菌: *Staph. aureus* 209P の生菌および死菌には補体系を活性化作用が認められるが、その細胞壁にも強い活性が認められた(図1)。この菌の菌体又は細胞壁を反応させた血清の補体成分活性のプロファイルを見ると、C₁, C₄, C₂, 特に C₂ の低下が著しく主として C.P. が活性化されたことを示す結果を得た。この菌の場合、血清中の抗体が菌体又は細胞壁と反応し C.P. を活性化したものと考えられる。この菌のプロテドグリカン をグリカン部分とプロテド部分に分けて検討すると、特殊構造部分が一却含まれたグリカン部分の方が活性が強かった。一方 *Staph. epidermidis* の細胞壁はその活性が著しく弱いことがわかった(図1)



その他 *Gaffeyia tetragena*, *Sartina lutea* 等にもかなり強い活性が認められた。

3) *M. lyodeikticus*: この菌の細胞壁には強い活性があり。 *M. lyodeikticus* NCTC 2665 の細胞壁は図 1 に示したように、 $40 \mu\text{g/ml}$ で 50% 以上、 $200 \mu\text{g/ml}$ 以上では 90% 以上補体を不活性化する。特異なことは処理血清では C1 の低下はなく、又 C4, C2 の低下が軽度であるにもかかわらず、C3, C5 特に C5 の活性の低下が著しく、主として A.P. を経て補体が活性化されたことを示したことがある。

4) グラム陽性桿菌: *L. plantarum* ATCC 8014 の γ - γ -4 ドグリカンには非常に強い活性があり、図 1 に示したように $20 \mu\text{g/ml}$ で約 50% 以上、 $100 \mu\text{g/ml}$ 以上で 98% 以上補体を不活性化することがわかった。処理血清の補体成分活性をみると C1, C4, C2 は約 50% 不活性化され、又 C3, C5 はいずれも 90% 以上不活性化されており、この菌の γ - γ -4 ドグリカンは C.P. および A.P. の両経路を経て補体系を活性化するものと考えられる。尚この γ - γ -4 ドグリカンから得た γ - γ -4 部分、グリカン部分はもとの γ - γ -4 ドグリカンに比し活性は著しく弱かった。

又 *Act. viscerum* ATCC 15982 の細胞壁、結核菌 (*H37RV*) の細胞壁にもかなり強い活性が認められた。その他 *Cl. botulinum* 190L や *チフテリア* 菌、*B. megaterium* の細胞壁にも活性が認められた。

結論

以上主としてヒト寄生性のグラム陽性菌の細胞壁、 γ - γ -4 ドグリカンについて検討したが、多くの菌種、菌株からの細胞壁には補体系を活性化する強い作用が認められた。これら材料で処理した血清の補体成分のプロファイルをみると 1. 連鎖球菌や *Staph. aureus* は血清中の抗体と材料中の抗原物質と反応して C.P. が活性化されたと考えられた。2. *M. lyodeikticus* では主として A.P. が活性化されたと考えられる興味ある成績を得た。

Staph. aureus や *L. plantarum* の γ - γ -4 ドグリカンを、グリカン部分と γ - γ -4 部分に分けて検討すると、いずれも出発材料の γ - γ -4 ドグリカンに比し活性が弱いことがわかった。

第13回 補体シンポジウム講演集

昭和51年 8月25日印刷

昭和51年 8月28日発行

編集代表者 第13回補体シンポジウム 世話人 宮沢 政栄
発行所 東京都中央区築地5-1-1 国立がんセンター研究所ウイルス部内
補体シンポジウム事務局 Tel.(03) 542-2511 内246
印刷所 東京都中央区八丁堀3-13-2
株式会社 三田村印刷所

分与価格 1,500円