

Proceedings of the Complement Symposium

Vol. 16 :

Beppu, Oita, 1979

## 第16回 補体シンポジウム

### 講演 抄録集

---

会 期 昭和54年 8月24日(金)・25日(土)・26日(日)

会 場 〒874 大分県別府市田ノ湯町13番13号

地方職員共済組合別府保養所

つ る み 荘

電話 0977-21-0101

世話人 九州大学温泉治療学研究所 酒 井 好 古

〒874 大分県別府市鶴見原4546

電話 0977-24-5301

---





## ご 案 内

補体シンポジウムはこのたび緑ゆたかな泉都大分・別府で開催されることになり、さきほどご案内申し上げましたところ、多数のご参加と演題のご応募をいただき厚く御礼申し上げます。

今回はご発表を一般講演およびワークショップの2形式に区分させていただきました。すなわち、一般講演を31題としこれを6つのセクションにし、ワークショップを(I)「臨床における今日的課題：Immune complexesとNephritic factor」の6題、(II)「補体タンパクの表現形質と遺伝的支配およびその異常症」の8題といたしました。これはご応募の演題が多数にのほりましたので、すべてのご講演につき、できるだけ十分につっこんだご討論をしていただくための試みです。この点をご理解下さり、とくに座長と演者の諸兄諸姉にご協力していただけますなら幸甚に存じます。

今年は米国よりアラバマ大学 R. M. Stroud 教授を当シンポジウムに招いております。こうした交流を機に我国の補体研究がますます盛んになりますことを心より願うものであります。

日本の代表的温泉地別府です。気候風土にも恵まれ、また観光地としても色々と楽しみの多いところです。不行き届きの点も多いと存じますが、リラックスした雰囲気の中で、心ゆくまで活発なご討論を期待申し上げます。

昭和54年8月

第16回補体シンポジウム

世話人 酒 井 好 古

## 第16回 補体シンポジウム

会 期 昭和 5 4 年 8 月 2 4 日 (金) 1 4 : 0 0 より  
2 5 日 (土)  
2 6 日 (日) 1 2 : 0 0 まで

会 場 〒874 大分県別府市田ノ湯町 13 番 13 号  
地方職員共済組合別府保養所  
つ る み 荘  
電話 0977-21-0101

世話人 九州大学温泉治療学研究所 酒井好古  
〒874 大分県別府市鶴見原 4546  
電話 0977-24-5301

お知らせとお願い

(1) 受 付

シンポジウム第1日正午より会場入口で受付を行います。

年会費（抄録代） 3,000 円

参加費（宿泊費，食費，懇親会費） 15,000円

抄録は受付でお受けとり下さい。その際、ご宿泊の部屋をご案内いたします。

## (2) 演 説

ご講演を一般講演とワークショップの2形式に区分させていただきますので、演者は座長のご指示に従ってご協力お願い申し上げますとともに、時間を厳守下さいますようお願いいたします。

## 一般講演

発 表            1 0 分

討 論            1 0 分

## ワークショップ

発 表            1 0 分

総合討論        3 0 分

### (3) スライド

プロジェクター 1 台を設置しております。

スライドは 35 mm サイズをご用意下さい。

### (4) 座長へのお願い

演題のご応募が多く、演説と討論の時間が十分でございせんが、演者のご協力の上、円滑な進行と活発なディスカッションが展開されますよう御高配お願いいたします。

### (5) 宿泊と食事

当日受付で宿泊のお部屋をご案内いたします。

8 月 2 6 日夕食、2 7 日朝・昼食および懇親会、2 8 日朝・昼食を用意いたします。

### (6) 懇 親 会

日時        8 月 2 5 日 (土) シンポジウム第 2 日午後 6 時 1 5 分より

場所        つ る み 荘

多数のご来駕をお待ち申し上げます。

### (7) 運営委員会

運営委員各位にご案内いたします。

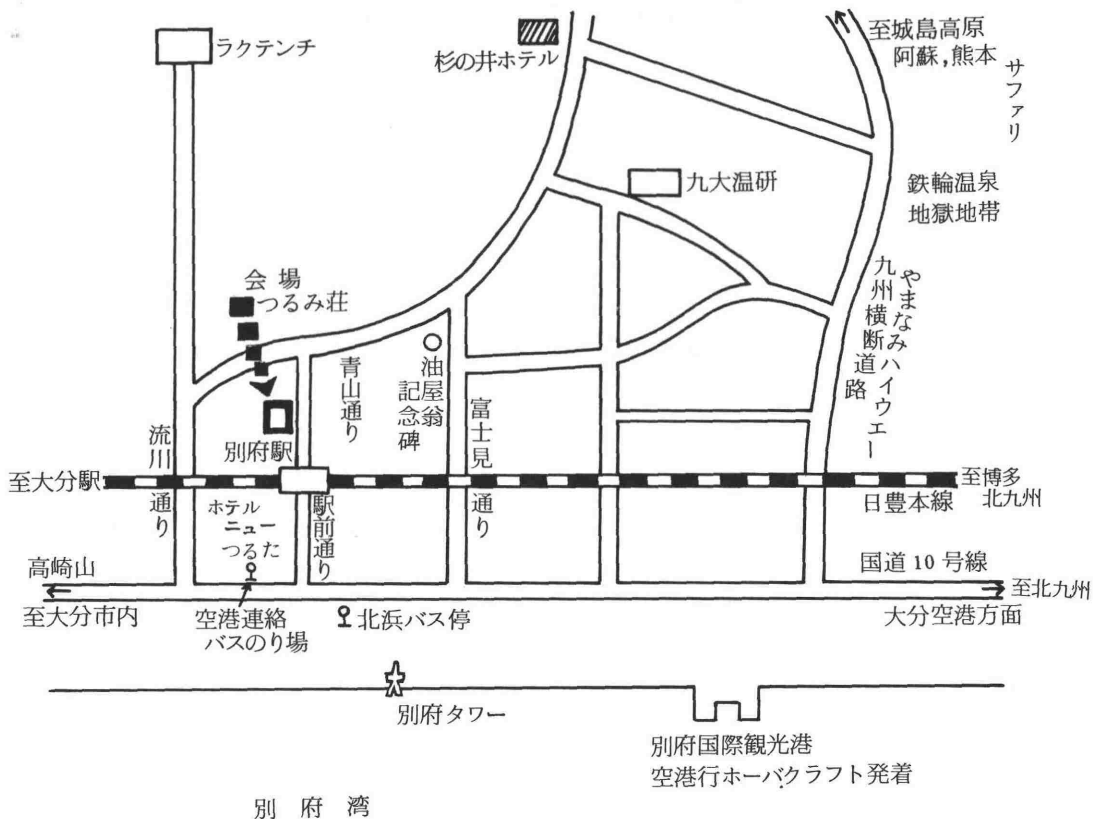


日 時 8月25日(土) シンポジウム第2日 正午より

場 所 つるみ荘

(8) 交 通

大分空港 — 北 浜	バス 1時間5分(750円)
北 浜 — つるみ荘	タクシー 約5分
大分空港 — つるみ荘	タクシー 約1時間(約4,700円)
大分空港 — 別府国際観光港	ホーバークラフト 約40分 (2,000円)
別府国際観光港 — つるみ荘	タクシー 約15分
別 府 駅 — つるみ荘	徒歩 5分



第 1 日 8月24日(金)

一般演題(I) : 14:00 - 15:25

座長 岡田秀親博士、長沢滋治博士

1. ジャコウネズミ ( *Suncus murinus* ) の血清補体

名古屋保健衛生大・医・微生物 深山昭雄、市川秀隆、高橋久英

広沢 進、川本保子

2. K-76 COOH を使つての EAC1, 4b, 2a, 3b, EAC4b, 3b cells  
の簡単な作成法

阪大・医・細菌

洪 郷秀、木下タロウ、井上公蔵

3. 免疫粘着反応を応用した梅毒血清テスト ( TPIAテスト ) の臨床的意義  
について

東京都臨床研・補体トキソ部

鈴木貴和、田中 忍、斑目君恵

北村ふじ子、嶋田孝吉

東京都立大久保病院

河島敏夫

4. 合成基質を用いた補体成分の簡易定量法について

阪大・蛋白研

新延道夫、人見裕司

猪狩伸比古、藤井節郎

Coffee Break

ワークショップ (I) : 15:45 - 17:25

座長 広瀬俊一博士、高橋守信博士

「臨床における今日の課題: Immune complexes ならびに

Nephritic factor」

5.  $^{125}\text{I}$ -C1q binding test によるウイルス肝炎患者血清中の  
immune complex と、その性状に関する検討

岡山大・第1内科

荒木清典、辻 孝夫、井上純一、  
尾上公昭、土屋正夫、篠原 徹、  
長島秀夫

熊山病院・内科

内藤紘彦

6. C1q deviation test による各種腎疾患における血中免疫複合体と  
補体系について

順天堂大・内科(腎)

中山秀英、小出 輝、大野丞二

筑波大・医学系

桜井徹志、田村 昇

7. 膠原病における Circulating immune complexes の検索 :  
C1q deviation test, polyethylene glycol 法および Anti-  
antibody 法

九大・温研内科

安田正之、江崎一子、酒井好古  
延永 正

九大・医・病院中検

太田敏行、大河内一雄

8. 螢光標識 C1q による肝組織内免疫複合物の局在

岡山大・第1内科

辻 孝夫、荒木清典、井上純一  
尾上公昭、土屋正夫、篠原 徹  
長島秀夫

熊山病院・内科

内藤紘彦

9. 腎疾患における Alternative pathway 活性化因子について

日大・第2内科

大井洋之、宮地秀尚、関 正人  
阿部理一郎、金沢和俊、波多野道信



10. Nephritic factor (NeF) 活性を認めた Partial  
Lipodysdrophy (PLD) の1例

阪大・第1内科	中西 功、赤垣洋二、藤原芳広
	上田尚彦、安東明夫、阿部 裕
滋賀大・第3内科	折田義正
大阪府立成人病センター	稲井真弥、永木和義
倉敷中央病院・小児科	武田修明

夕 食

一般講演(Ⅱ): 19:00—21:25

座長 井上公蔵博士、永木和義博士

11. ポリエチレングリコール法による補体の分離条件の検討

東京都臨床研・補体トキソ部 田中 忍、斑目君恵、北村ふじ子  
鈴木貴和、嶋田孝吉、西岡久寿弥

12. C4bの限定分解反応 — 新しいC4b誘導体の分離

北大・薬・衛生化学	長沢滋治、市原千嘉子
アラバマ州立大学	R. M. Stroud

13. マウスC4-binding protein の精製

九大・第1外科・臨床免疫	甲斐祥一
ニューヨーク大・病理	V. Nussenzweig、藤田禎三

14. Cell-bound C3b の構造変化と活性

大阪府立成人病センター 飯田恭子、永木和義、稲井真弥

15. 補体 alternative pathway の活性化を制御する低分子物質 ( low molecular weight inactivator, LMW-INA ) のヒト尿からの分離とその作用機序について

大阪府立成人病センター

永木和義、松本美佐子、北野悦子

稲井真弥

16. EAC1-8 の溶血への糖の影響

大阪府立成人病センター

北村 肇、稲井真弥

17. モルモット SC5b-9 の C9 溶血活性について

阪大・医・細菌

木下タロウ、洪 郷秀、井上公蔵

自由討論 : 21:30 -

第 2 日 8月25日(土)

一般講演(Ⅲ): 8:30—10:35

座長 近藤元治博士、鳥巢要道博士

18. C1s の活性化抑制作用について

丸善化成

吉田正也

浜松医大・第2生理

高田明和

19. BCG, OK-432 (Picibanil), PS-K (Krestin) および

Levamisole のモルモット補体系に対する影響

京都府立医大・第3内科

加藤治樹、西堀秀嗣、若松善和

古川泰正、横江信義、細川計明

京都府立医大・第1内科

近藤元治

20. 人型結核菌体抽出物質 (SSM) のヒト免疫能および補体系に対する影響

京都府立医大・第3内科

横江信義、若松美和、加藤治樹

池崎 稔、細川計明

京都府立医大・第1内科

古川泰正、近藤元治

21. 髒粒球による  $O_2^-$  radical 産生における SLE 血清因子の影響:

補体レセプターとの関係

九大・温研内科

神宮政男、酒井好古、延永 正

22. 貪食作用と Factor B 産生について

名古屋保健衛生大・医・微生物

川本保子、市川秀隆、深山昭雄



23. レンチナンによる補体第2経路活性化と腫瘍細胞障害性マクロファージ  
誘導の関連 — 抗腫瘍性における意義

味の素・中央研究所

羽室淳爾、鹿島信一、光本浩司

メイン大・微生物研

H. U. Schorlemmer

U. Hadding

D. Bitter-Suermann

Coffee Break

招待講演：10:55—11:55

座長 西岡久寿弥博士

Complement : Review of Regulator Activities

アラバマ大

R. M. Stroud 教授

昼 食

一般講演 (N) : 14:00—15:45

座長 深山昭雄博士、辻孝夫博士

24. [  $^{14}\text{C}$  ] -L-Leucine の感染時ラット補体への取込み

和洋女子大

坂本元子

東京都臨床研

西岡久寿弥、嶋田孝吉

25. ウイルス肝炎における肝内 C1q の組織沈着 — とくに HBs 抗原との  
かかわり合いを中心に —

岡山大・第1内科

井上純一、辻 孝夫、荒木清典

篠原 徹、尾上公昭、土屋正夫

長島秀夫

熊山病院・内科

内藤紘彦

26. 抗補体剤 K-76 による endotoxin 肝障害の阻止効果について

岡山大・第1内科

尾上公昭、辻 孝夫、荒木清典

篠原 徹、土屋正夫、井上純一

長島秀夫

熊山病院・内科

内藤紘彦

27. 原発性肝癌における補体

京都府立大・第1内科

田上広樹、渡辺幸一、吉川敏一

近藤元治

京都府立大・第3内科

松村直幸、西田康一、細川計明

28. Immunopotentiator OK-432 (PIC) 投与癌患者の補体系の変動

国立大阪病院・臨床検査部

船橋修之

国立循環器病センター・臨床検査部

児玉順三

国立大阪病院・外科

岡崎 晃、河原 勉、沼田憲男

国立大阪病院・産婦人科

小沢 満、田村博昭

国立大阪病院・泌尿器科

下江庄司

Coffee Break

ワークショップ (Ⅱ) : 16:05 - 18:05

座長 橘 武彦博士、北村 肇 博士

「補体タンパクの表現形質と遺伝的支配ならびにその異常症」

29. マウス C4 活性の多様性と測定法

東北大・抗研・免疫

福岡良博、奥田智子、橘 武彦

30. マウス C3 の構造遺伝子座のクロモゾーム上の位置決定

金沢大・がん研・免疫生物部 坂井俊之助

金沢大・医・実験動物施設 早川純一郎

金沢大・がん研・免疫生物部 天野重豊、高橋守信

31. 霊長類の補体系Ⅱ。赤血球と血小板の補体レセプター

東北大・抗研・免疫

奥田智子、橘 武彦

京大・霊長研・生化学

高橋健治

32. 家兎における C6 欠損形質の遺伝と 2, 3 の特性

農林水産省畜産試験場・育種部 阿部恒雄、小松正憲

金沢大・がん研

山本健一、右田俊介

33. 日本人における C3 (遺伝的) 多型現象の研究

京都府立医大・法医学

西岡弘明、阪田 潔、山沢吉平

神奈川県立こども医療センター

兵頭行夫、小菅啓司

名古屋保健衛生大・小児科

矢崎雄彦

大阪府立成人病センター

北村 肇

34. Hereditary Angioedema (HAE) の 1 家系と浮腫発現機序に関する考察

北大・第 2 内科

河野通史、知本武久、藤咲 淳

姫宮秀行

札幌鉄道病院・第 1 内科

三神昭雄



### 35. C 3 欠損の 1 家系

神奈川県立こども医療センター

小菅啓司、兵頭行夫

大阪府立成人病センター

北村 肇、永木和義、稲井真弥

### 36. 遺伝性補体第 9 成分欠損症

東大・物療内科

行山 康、茆原忠雄、谷本潔昭

広瀬俊一、堀内淑彦

懇親会：18:15—20:00

第 3 日

8月26日(日)

一般講演(V): 8:30—9:55

座長 白石聰博士、手嶋秀毅博士

37. 骨・関節疾患における血清中および関節液中の C1q と C3 について

奈良医大・細菌

植田真永、佐々木隆子、米増国雄

檜葉周三

阪大・整形外科

越智隆弘

38. 血清 C1q 値に関する検討

福島医大・第2内科

吉田 浩、細川康子、渡辺一夫

渡辺 進、鈴木秀幸、佐藤幹夫

森藤隆夫、粕川礼司

39. アトピー性皮膚炎と血清 C5 値

東京都立大久保病院・皮膚科

河島敏夫、古賀道之、安本良博

堀内佳代子

東京都臨床研

嶋田孝吉、西岡久寿弥

40. じんま疹における補体成分の動態(2報)

昭和大・第1内科

韓 啓司、中嶋憲章、杉崎徹三

Coffee Break

一般講演(V): 10:15—12:00

座長 行山 康 博士、天野哲基博士

41. SLE 患者における補体の動態

昭和医大・第1内科

韓 啓司、中嶋憲章、杉崎徹三

42. 補体 Cold activation とイオン強度

京都府立医大・第1内科

堀田忠弘、竹村周平、近藤元治

京都府立医大・第3内科

西堀秀嗣、松村直幸、西田康一

池崎 稔、細川計明

43. 補体の Cold activation と Anti-immunoglobulin

京都府立医大・第1内科

竹村周平、田上広樹、渡辺幸一

堀田忠弘、吉川敏一、近藤元治

京都府立医大・第3内科

細川計明

44. ヒト抗体よりなる抗原抗体複合体の補体による可溶化

金沢大・がん研・免疫生物部

高橋守信、野中真弓

東大・物療内科

広瀬俊一

45. 免疫複合体ー補体反応における RF の影響について

東大・物療内科

広瀬俊一、大浜用八郎、行山 康

金沢大・がん研

高橋守信

昼 食

解 散

# 1.

## ジャコウネズミ (*Suncus murinus*) の血清補体

深山昭雄・市川秀隆・高橋久英・広沢進・川本保子

(名古屋保健衛生大学・医・微生物)

免疫学的研究に適した小実験動物として、マウスが最も頻繁に用いられるが、その血清補体価の測定は、他の実験動物のそれとは異なり非常に困難である。従って補体の関与する免疫反応の解析は、マウスを使用する限り著しく制限されているのが現状である。我々は、最近、ジャコウネズミの飼育と繁殖に成功し、現在実験動物化の方向で、この動物について生物学的検討を加えつつある。ジャコウネズミは、爬虫目の一種で、マウス、ラットよりも霊長目に最も近縁な小動物であると言われている。生物学的諸性質を明らかにする一連の実験のなかで、今回は、この動物が補体研究に供せられるか否かを知る目的で、その血清補体価ならびに補体成分活性の測定を試みた。

### 方法

#### 1. ジャコウネズミの血清

300-600 日令の動物の血清を用いた。血清分離後個々に凍結保存したものと、プールした後凍結保存したものについて補体価を測定した。

#### 2. 全補体価 (CH50)

全補体価の測定には、普通に作製した感作赤血球 (EA) を使用した。C1, C4, C2 の各補体成分の測定には、ヒト補体成分から作製した intermediate cell およびモルモット補体成分から作製したものを用い、EDTA-C としてはラット血清を使用した。C3 の免疫粘着および factor B の活性は既報の方法で測定した。

### 結果

#### 1. 全補体価

CH50 は  $133 \pm 35$  で、可成高い補体活性を示した。しかし各個体の血清をプールすることにより補体価 (CH50=21) は著しく減少した。その理由は不明である。

#### 2. 補体成分 C1, C4, C2 及び B の溶血活性

ジャコウネズミの補体成分のなかで溶血活性の測定が可能であったものは、C1 と B だけであった。Fig. 1 に示すとおり、C1 活性は、C2 源として C2<sup>GP</sup>

を使用したとき、最も鋭敏であり、

oxyC<sub>2</sub><sup>hu</sup>を使用したときは低値

を示した。一方、C<sub>4</sub>、C<sub>2</sub>活性

は、ヒト、モルモット由来の

補体成分を種々組み合わせ

も測定できなかった。一方C<sub>3</sub><sup>sm</sup>

の溶血活性は、EAC142<sup>gp</sup>と、モ

ルモットC<sub>5</sub>-C<sub>9</sub>の各補体成分を

使用した実験では測定不可能

であったが、Immune adherenceを

用いて測定すると、1600 - 3200

倍のIA価を示した。factor B

活性は、モルモット血球の溶

血を用いる方法で測定すると

マウス、ヒト血清と同じ範囲

内の活性を示した (Table 1.)。

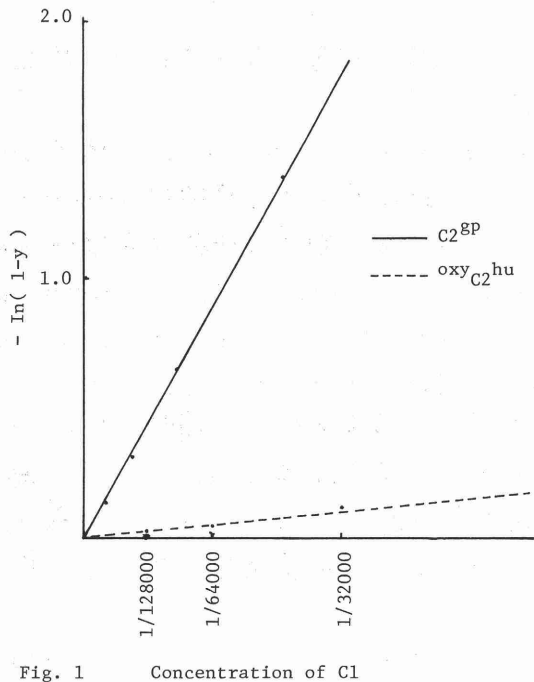


Fig. 1

Table 1. Serum complement of Suncus murinus

Dilution of serum( 63% lysis )		
C1	70,000	C <sub>2</sub> <sup>gp</sup>
	1,640	C <sub>2</sub> <sup>hu</sup>
C4	400	
C2	190	
C3	1,600 - 3,200 ( IA )	
factor B	880	

### 3. その他血清蛋白の特性

300 日令以上のジャコウネズミ血清をセルロースアセート膜で電気泳動するとβ領域に、M 成分様の像を示した。これが免疫グロブリンであるか否かについては現在検討中である。

### 考察

現在ジャコウネズミは実験動物用に繁殖中であり、免疫学的研究に使用できるか否かは、更に大量の動物を調べた上で決定されるべきである。しかし、少数例ではあるが、この動物の血清全補体価が普通の方法で測定できることは確実である。補体各成分の測定も同種の血清から作った intermediate cell を使用することにより可能であろうと思われる。

## 2.

K-76C00H を使った EACT,4b,2a,3b, EAC4b,3b cells の簡単な作成法

洪 卿秀, 木下タロウ, 井上公藏 (阪大, 医, 細菌)

### 目的

EACT,4b,2a,3b intermediate cells は, 補体の membrane attack mechanism や, classical C5 convertase を研究する上で重要な intermediate cells であり, EAC4b,3b cells は補体の alternative pathway 開始の解析に重要な intermediate cells である。さらに, これらの intermediate cells は, B lymphocyte を検出するのに使われている。従来, EACT,4b,2a,3b cells は EACT,4b cells と, 少なくとも functionally に精製した C2, C3 を利用して作ってきた。しかし, この方法では, EACT,4b cells を作るのも必ずしも容易でなく, 精製した C2, C3 を必要とする。今回は, さきに我々が, C5 反応段階の inhibitor として発表した K-76C00H (第8回日本免疫学会, 1978) を利用して, モルモット或いは人補体血清を使って EACT,4b,2a,3b cells, EAC4b,3b cells の簡便な作成法を考案したので報告したい。

### 方法

#### (1) RPgp の作り方

5mg Zymosan + 1.0ml of guinea pig serum

---

Stirred for 60 min at 0°C

---

Centrifuged

Sup.

---

Added 5mg Zymosan

---

Stirred for 60 min at 12°C

---

Centrifuged

Sup. (RP)                      Ppt. (ZP)

#### (2) RBgp と RBhu の作り方

RBgp は 56°C, 30 分熱処理し, RBhu は 50°C, 30 分熱処理して得た。

#### (3) モルモットと人血清による

##### EACT,4b,2a,3b, P cells の作り方

(a) 4 mg/ml の K-76C00Na 3 容と, モルモット血清原液 1 容を混合し, 0°C で overnight 攪拌させた後,  $3 \times 10^9$ /ml の EA を 2 容入れて, 30°C で 30 分反応させる。

(b) 4 mg/ml の K-76C00Na を 6 容と, ヒト血清原液 2 容を混合し, モルモット血清の

場合と同様に, 0°C で overnight 攪拌させ, その中に,  $1.2 \times 10^{10}$ /ml EA を 1 容と, さらに, 4 mg/ml K-76C00Na を 3 容入れて, 30°C で 50 分反応させる。緩衝液としては, SGVB<sup>++</sup> (sucrose-Veronal buffered saline with Ca<sup>++</sup> and Mg<sup>++</sup>, pH 7.3,  $\mu=0.08$ ) を, 反応後充分量の冷した SGVB<sup>++</sup> を加えて, 遠沈し, さらに, 同緩衝液で 3 回洗浄する。

#### (4) モルモットと人の RP による EACT,4b,2a,3b cells の作り方

作り方は, 上と同様な方法で作るが, whole serum の代りに RP を使い, EA の濃度を 1/10 にして作る。

# (5) モルモットと人の RP を使っての EAC4b,3b cells の作り方

EAC4b,3b <sub>gp</sub>	EAC4b,3b <sub>hu</sub>
1 volume of guinea pig RP	2 volumes of human RP
+ 3 volumes of 4mg/ml K-76 COONa in SGVB <sup>++</sup>	+ 6 volumes of 4mg/ml K-76 COONa in SGVB <sup>++</sup>
Stirred overnight at 0°C	Stirred overnight at 0°C
+ 2 volumes of $3 \times 10^8$ /ml EA in SGVB <sup>++</sup>	+ 1 volume of $1.2 \times 10^9$ /ml EA
	+ 3 volumes of 4mg/ml K-76 COONa in SGVB <sup>++</sup>
Incubated for 30 min at 30°C	Incubated for 50 min at 30°C
Centrifuged and washed three times with EDTA-GVB	
Resuspended in EDTA-GVB	
Incubated for 3hr at 37°C	
Centrifuged and washed three times with Mg-EGTA-GVB	
Resuspended in Mg-EGTA-GVB	
Stored at 0°C	

## 結果

EAC<sub>1,4b,2a,3b,P</sub>, EAC<sub>1,4b,2a,3b</sub> intermediate cells の性質

モルモット intermediate cells (EAC<sub>1,4b,2a,3b,P</sub>) を 37°C で 3 時間加温し, C2 を decay させると, EAC<sub>1,4b,3b,P</sub> cells を得ることが出来る。この cell と functionally に精製した C2 を反応させて, T<sub>max</sub> を測定してみると, T<sub>max</sub> が 12 分内外であることが分った。さらに, この intermediate cells を, purify した C5 と anti-C5 antiserum で作った沈降線で, C6-C9<sub>gp</sub> reagent と共に overlay して lysis の inhibition を見た結果, 完全に lysis がこの沈降線に block されるのが明らかとなった。又, 精製した C5<sub>gp</sub> あるいは, Cordis 社の C5<sub>hu</sub> を, C6-C9<sub>gp</sub> reagent を用いて, C5 の titration を行なってみると, Z=1.0 の範囲内で直線関係が得られ, C5 と intermediate cells の間に incompatibility が認められた (図 1, 図 2)。

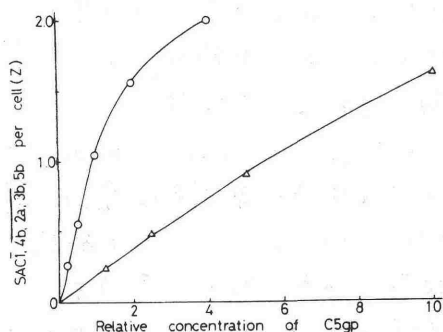


図 1

○—○ EAC<sub>1,4b,2a,3b,Pgp</sub>

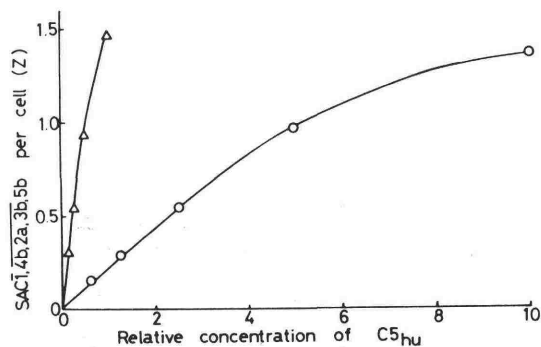


図 2

△—△ EAC<sub>1,4b,2a,3b,Pphu</sub> (図 1, 図 2)

# EAC4b,3b cells と EAC4b,3b,P cells の性質

図3

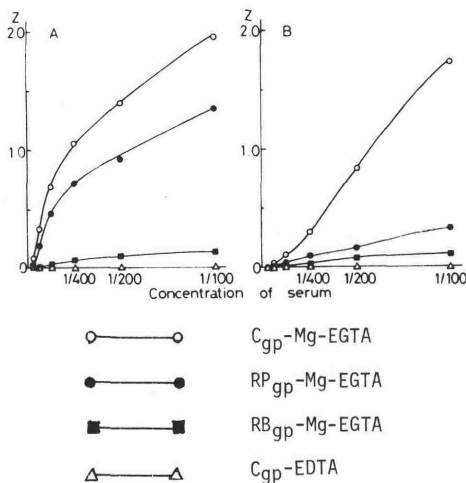


図4

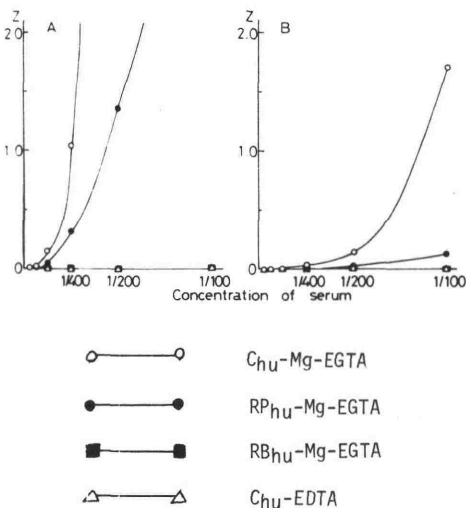
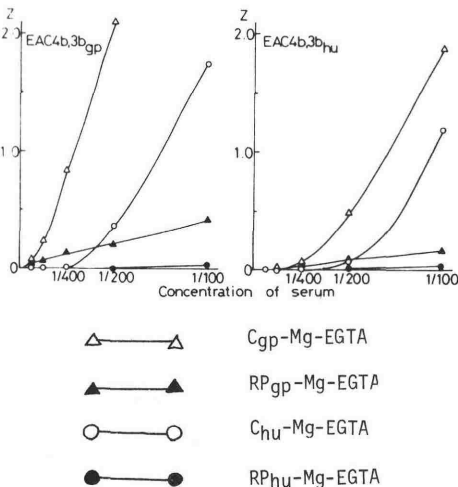


図5



RPで作られたEAC4b,3b cells は、C-Mg-EGTA では溶血を起すが、RP-Mg-EGTA、Rb-Mg-EGTA、C-EDTA では、溶血を起さない。一方、whole serumで作られたEAC4b,3b,P cells は、C-Mg-EGTA と RP-Mg-EGTA の両方に溶血を起すが、RB-Mg-EGTA C-EDTA では溶血を起さない。このような結果から、whole serumで作ったintermediate cells 上に、properdin (P) が存在し、EAC4b,3b,P cells となっていることが明らかとなった(図3)。人の場合も同様の結果が得られた(図4)。

最後に、EAC4b,3b<sub>gp</sub> と EAC4b,3b<sub>hu</sub> を Mg-EGTA の存在下で、人補体血清とモルモット補体との反応を比較した時、両血清共に同様の溶血が起ることが明らかとなった(図5)。

## 結論

classical, alternative 両経路の解析を行なうのに非常に重要なintermediate cellsであるEAC4b,3b,2a,3b cells と EAC4b,3b cells は、従来限られた研究室でのみしか利用し得なかったが、本研究により、容易に作れるようになった。これによって、classical pathway における補体の後期反応連鎖の解析や、alternative pathway の解析が非常に容易になると期待でき、補体の基礎的或いは、臨床的研究の発展に大きな貢献が期待できる。



### 3. 免疫粘着反応と応用した梅毒血清テスト(TPIAテスト)の臨床的意義について。

○鈴木貴和、田中 忍、斑目君恵、北村ふじ子、嶋田孝吉  
河島敏夫\* (都臨床研、補体・トキソ部、都大久保病院\*)

我々は、免疫粘着反応(以下、IA法と略す。)を梅毒血清テストに応用(に梅毒免疫粘着法-TPIA法を用いて梅毒患者の加療後の血中抗体価を追跡したところ、現在、日常検査に用いられている他の血清学的検査法とは異った成績が得られたので、その臨床的意義を含め報告する。

#### 【方法】

TPIAテストは、Nelsonの原法を一部改良して用いた。TP抗原液0.3ml、被検血清0.05ml、補体(モルモット:原液)0.05mlを加えた試験管に、50%ヒトO型血球液0.1mlを混和し、37℃30分反応させる。その後1000rpmで3分間遠心し、その上清中に残存するTP数を計測する。結果は、コントロール管上清中のTP数との相対比を求め、IA指数として表示した。IA指数20%以下を陽性、50%以上を陰性とし、その間を偽陽性とする判定基準を設けた。

#### 【結果および考察】

##### 1. TPIA法と他の梅毒診断法との比較。

同一患者血清について、TPIA法と現行の梅毒血清検査法の中から、ガラス板法、TPHA法およびFTA-ABS法の3法と併用し、IA法と他の梅毒診断法との比較を行った。現在まで延べ340例について実施した結果、次のような点が明らかになった。①定性的(被検血清の原液におけるIA指数で表示したもの)な比較結果から、IA法と他の検査法との一致率は、ガラス板法—65%、TPHA法—82%、FTA-ABS法—73%であり、IA法は、HA法とより近い反応結果を示すことが明らかになった。またガラス板法で陰性あるいは低カ価の検体が、IA法では高カ価となった例が多く、更に、FTA-ABS法陽性であるのに、IA法は偽陽性であった例数が多く観察され、18.2%の高率を占めた。②定量的比較では、上述3法のうち最も一致率が高いTPHA法においても、同一HA価を示した群の各検体が、IA法ではかなり幅のある抗体価を示して分散していた。(図-1)以上の結果から、IA法は上述3法とは相関性を持たないことが明確になり、同時に抗体価の変動をより把握し易い検査法であろうと推定した。

##### 2. 両TP反応(TPIA法・TPHA法)の反応性の相違点についての

検討。

患者血清を Sephadex G-200 カラムでゲル濾過し、主として 7S および 19S 画分における抗体分布を比較した。その結果、HA 抗体の活性は主として 7S 画分に集中しているのに対し、IA 抗体の活性は 19S 画分での分布が大であり、IA 法が 19S 抗体、すなわち IgM 抗体に対して鋭敏な反応であることを確認した。

### 3. 加療後の血中抗体価の追跡結果について。

顕性梅毒例について、その未治療時から経時的に抗体価を測定したところ、HA 法では加療による抗体価の変動は認められなかった。しかしながら IA 法ではガラス板法と類似した傾向を示し、加療による抗体価の減少が観察された。(図-2) ところが、ガラス板法陰転後も IA 法は、陽性値を示し続けており、両反応は相違する。

### 4. 患者血清の経時的なゲル濾過による追跡結果について。

顕性例について、その経時的な抗体分布の変動を追跡した結果、加療に伴って主として 19S 画分における抗体活性が漸次減少し、次第に 7S 画分へ移行していくことが明らかになった。(図-3) すなわち、加療による IA 抗体価の低下は、19S および 7S 画分での抗体活性の低に起因するものであるが、特に 19S 抗体価の低下に影響される。治療効果は TPIA 価の低下、すなわち、IgM 抗体の減少という形で追跡できることが示唆された。

以上のように TPIA 法と現行血清検査法と比較した結果、以下の事項が明確になった。

① TPIA 法はガラス板法、TPHA 法および FTA-ABS 法とは異なる独特の反応性を有する。特に同じ TP を抗原としている HA 法との反応性の相違は大きい。

② その反応性はガラス板法のそれと類似してはいるが、B 及び P の識別が可能である。

③ HA 法と比較した場合、IA 法は 19S 画分の抗体—IgM 抗体—に対する反応性が非常に高く、初期梅毒の診断法に有効である。

④ 加療による抗体価の減少は、特に IgM 抗体の減少と関連性があるために、IA 法は治療効果判定法として応用できる。

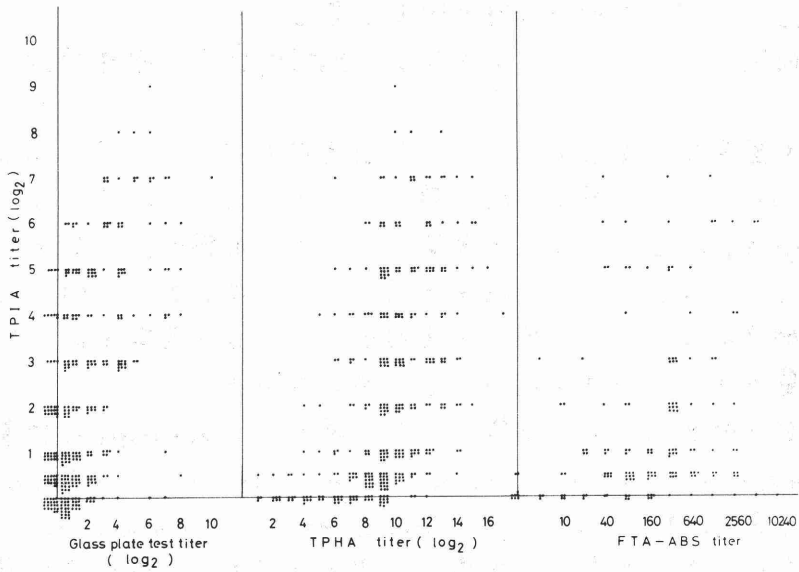


Fig. 1, Relationship between TPIA test and other tests.

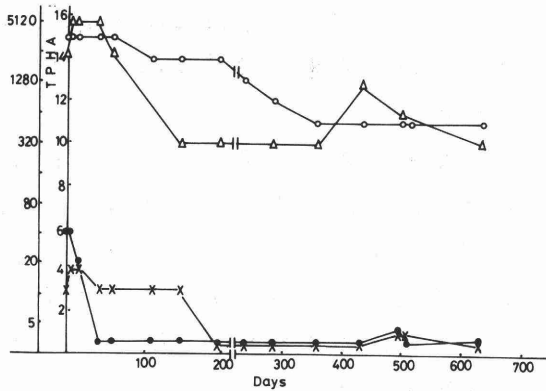
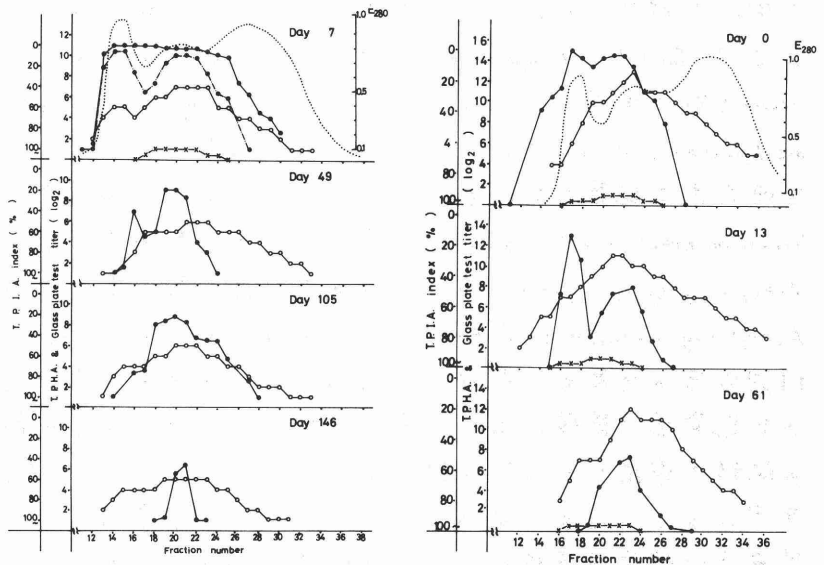


Fig. 2. Antibody titer after therapeutic treatment in patient with secondary syphilis.

- TPIA test
- TPHA test
- × glass plate test
- △ FTA-ABS test

Fig.3, Antibody distribution after treatment in patients with primary syphilis.

- OD at 280nm
- TPIA test
- TPHA test
- × Glass plate test
- △ FTA-ABS test



## 4.

## 合成基質を用いた補体成分の簡易定量法について

大阪大学蛋白質研究所 新延道夫, 人見裕司, 猪狩伸比古, 藤井節郎

従来, 補体成分を定量する方法としては, 溶血活性を用いる方法, あるいは  $C_{\text{esterase}}$ ,  $C_{\text{if}}$  のように酵素活性を持った因子については Acetyl-Tyr-ethyl-ester, Acetyl-Arg-methyl-ester などを基質としてその水解活性で調べる方法とがある。しかしながら, いずれの方法も一長一短があり, 例えば溶血活性の場合は感度が高い半面, 操作が煩雑であり, 合成基質を用いた場合には容易に定量できるが感度の低いことが難点である。

我々は最近, 蛋白分解酵素の合成基質として, 種々の  $\alpha$ -naphthylester 誘導体 (Acetyl-Tyr- $\alpha$ -naphthylester, Tosyl-Lys- $\alpha$ -naphthylester, Acetyl-Gly-Lys- $\alpha$ -naphthylester, Tosyl-Arg- $\alpha$ -naphthylester, Pro-Phe-Arg- $\alpha$ -naphthylester, Benzoyl-Phe-Val-Arg- $\alpha$ -naphthylester, D-Val-Leu-Lys- $\alpha$ -naphthylester) を開発し, 組織, 体液中に含まれる蛋白分解酵素の微量定量法についての検討を行なっているが, 今回は Acetyl-Tyr- $\alpha$ -naphthylester を用いた血清レベルにおける  $C_{\text{esterase}}$  の微量定量法を確立したので, これについての成績を中心に述べることにする。

まず,  $C_{\text{esterase}}$  及び  $C_{\text{if}}$  についての基質特異性を種々の  $\alpha$ -naphthylester 及び alkylester である Acetyl-Tyr-ethyl-ester, Tosyl-Lys-methyl-ester, Acetyl-Gly-Lys-methyl-ester, Tosyl-Arg-methyl-ester を用いて調べてみた。アッセイ法は  $\alpha$ -naphthylester 誘導体の場合は酵素反応により遊離した  $\alpha$ -naphthol をジアゾニウム塩によりカップリングさせた後, 生成した沉澱を酢酸で溶解して 515nm で比色定量する方法であり, alkylester 誘導体の場合はヒドロキサマト法を用いて行なった。その結果, 表 1 に示されるように,  $C_{\text{esterase}}$  においては Tosyl-Lys- $\alpha$ -naphthylester, Acetyl-Gly-Lys- $\alpha$ -naphthylester, Acetyl-Tyr- $\alpha$ -naphthylester の順に水解し, alkylester の場合は Acetyl-Gly-Lys-methyl-ester, Acetyl-Arg-methyl-ester, Acetyl-Tyr-ethyl-ester の順に水解した。さらに両定量法の感度を吸光度で比較した場合, Acetyl-Tyr-ethyl-ester 水解活性を 1 とすると, Acetyl-Tyr- $\alpha$ -naphthylester では約 30 倍の感度の上昇が認められた。一方,  $C_{\text{if}}$  では Acetyl-Gly-Lys- $\alpha$ -naphthylester に対する活性が最も高く, Alkylester の場合は, Acetyl-Arg-methyl-ester 水解活性を 1 とすると, Acetyl-Gly-Lys- $\alpha$ -naphthylester では約 40 倍の感度の上昇が認められた。以上の様に  $\alpha$ -naphthylester を用いた定量法は感度が高く, 各種病態時における蛋白分解酵素の変化を微量の試料で検出しうる可能性を示している。そこで Acetyl-Tyr- $\alpha$ -naphthylester を用いることにより血清中の  $C_{\text{esterase}}$  の定量性について調べてみた。定量法は抗原抗体複合体を, 緩衝液で希釈した血清に添加し,  $C_{\text{1}}$  を活性化

したのを、数回、緩衝液で洗浄し、血清中の C1 esterase 以外の Acetyl-Tyr- $\alpha$ -naphthylester 水解活性を有する酵素を除く、そして抗原抗体複合体を EDTA を含む緩衝液で懸濁し遠心した上清を酵素液として使用する。図 1 に血清量と C1 esterase 活性の関係について示した。この上清の Acetyl-Tyr- $\alpha$ -naphthylester 水解活性は C1 esterase inhibitor あるいは C1 esterase の抗体により阻害されることから C1 esterase である。この方法により、血清中の C1 esterase は血清 25  $\mu$ l でも測定可能であることが認められ、血清中の classical pathway を介する補体系の変動を容易に測定しうることが示唆された。なお、alternative pathway 因子である  $\bar{B}$ ,  $\bar{D}$  についても、 $\alpha$ -naphthylester 誘導体を基質として用いた場合の定量性について検討しているのを併せて報告する。

Table 1

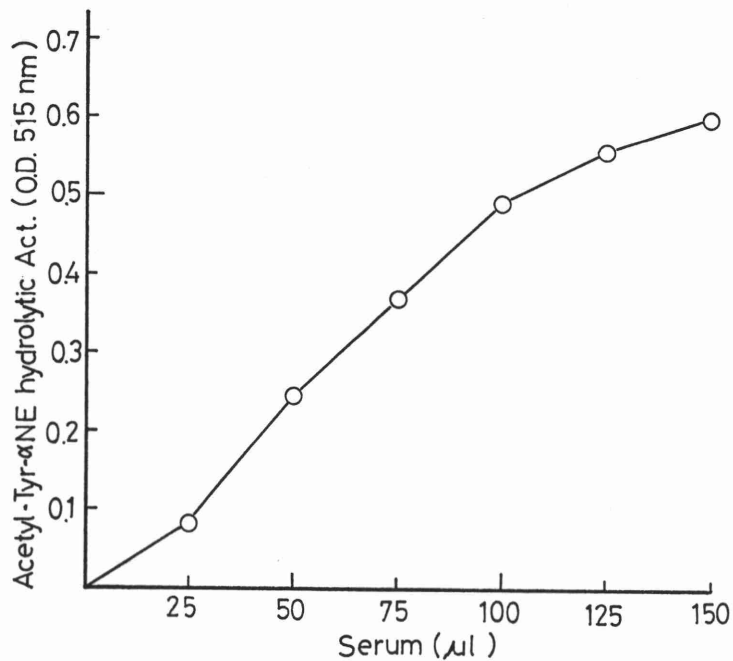
Comparison of the Relative Sensitivity on Hydrolytic Activities to various Synthetic Substrates of C1 esterase and C1r

	Substrates	C1 $\bar{s}$	C1 $\bar{r}$
Alkylester	Acetyl-Tyr-Ethylester	<u>1.0</u>	N.D.
	Acetyl-Arg-Methylester	<u>1.5</u>	<u>1.0</u>
	Acetyl-Gly-Lys-Methylester	6.2	0.8
	Tosyl-Arg-Methylester	0.3	0.1
	Tosyl-Lys-Methylester	0.4	N.D.
$\alpha$ -Naphthylester	Acetyl-Tyr- $\alpha$ -NE	30.7	2.1
	Tosyl-Lys- $\alpha$ -NE	49.8	0.2
	Tosyl-Arg- $\alpha$ -NE	7.8	2.2
	Acetyl-Gly-Lys- $\alpha$ -NE	41.3	39.2
	Pro-Phe-Arg- $\alpha$ -NE	6.0	4.8
	Benzoyl-Phe-Val-Arg- $\alpha$ -NE	3.0	1.0
	D-Val-Leu-Lys- $\alpha$ -NE	10.0	5.0

N.D.: not detectable

Fig. 1

Standard Curve on Acetyl-Tyr- $\alpha$ -naphthylester  
Hydrolytic Activity of Clesterase in Human  
Serum



## 5. $^{125}\text{I}$ -C1g binding test によるウイルス肝炎患者血清中の immune complex と、その性状に関する検討

荒木清典, 辻 孝夫, 井上純一, 尾上公昭, 土屋正夫, 篠原 徹,  
長島秀夫\*, 内藤紘彦\*\* (\*岡山大学 第一内科, \*\*熊山病院 内科)

ウイルス肝炎における血清中 immune complex は 皮疹, 関節炎や蛋白尿との関連で報告されているが, 更に免疫系の種々の細胞に作用して, 肝炎の発症や慢性化 及び急性増悪(シュブ)のメカニズムにも大きな役割を演じていると予想される。昨年の本シンポジウムにおいて, ウイルス肝炎における C1g binding activity (C1g BA) について報告したが, 今年は, やはり C1g を用いる事により, Immune Complex の大きさ, その性状について検討したので報告する。

対象は岡山大学第一内科に入院し, 腹腔鏡下肝生検にて肝組織診断の確定した各種肝炎患者の血清を用いた。

C1g は Yonemasa & Stroud<sup>1)</sup> の方法にて精製し, ラクトパルオキシゲナーゼ法で $^{125}\text{I}$ をラベルし, Zubler & Miescher<sup>2)</sup> の  $^{125}\text{I}$ -C1g binding test を行った。別に患者血清 200  $\mu\text{l}$  を蔗糖密度勾配超遠沈を使って分画し, 各々 C1g binding test を行った。慢性肝炎の急性増悪を解析する目的で, 患者血清に binding test の要領で C1g を加え, その沈殿物をウロウミンT法で $^{125}\text{I}$ をラベルし, 蔗糖密度勾配超遠沈 および 7.5% SDS-PAGE を行なって分画採取し, 各々の分画物を同定した。同定に際しては,  $\alpha$ -HBsAg,  $\alpha$ -IgG,  $\alpha$ -IgM, 等の抗血清を加え(含2% Dextran T500), 4°C 12 over night し, 12,000 rpm で遠心した。別に, 精製 C1g, Cohn Fraction II, 精製 HBs抗原(adv), 及び liver specific protein (K.H. Meyer zum Büschenfelde) を, 同じ条件で SDS-PAGE を行なり, その泳動パターンを比較し同定の一助とした。

C1g binding activity (Fig. 1) は, 急性肝炎では比較的低値を, 慢性肝炎では, 肝硬変に近づくにつれて高値を示した。そして血清トランスアミナーゼ値とは, 相関が得られていない。また HBs抗原の有無とは, あまり関係がなかった。

C1g binding activity を経時的に観察すると (Fig. 2), シュブの極期に低値を, その前後で各々高値を示し, ほとんどの症例で, このようなパターンがみられた。

患者血清と蔗糖密度勾配超遠沈にて分画し、Clq binding test と行なうと (Fig. 3) 19S 以上の分画及び 7S 付近に Clq BA が高値を示した。

Clq を用いて分離した IC、に  $^{125}\text{I}$  をラベルし分画した所、(Fig. 4) 放射活性のある 4 つのピークが観察され、シエーブの時期によつて、形を変えている。このピークを分画採取し、抗血清により同定した所、第 3 のピークは IgG である事が判明し、第 1 のピークも、ほぼ HBS 抗原であると考えられている。

慢性ウイルス肝炎患者血清中の IC は 肝細胞壊死の前後に高値になり、分子量から、少なくとも二種類のものが存在し、シエーブの時期により、そこに登場する抗原抗体系が、質的にも量的にも変化している様子が観察できた。

1. Yonemasu, K., et al.: Clq: Rapid purification method for preparation of mono-specific antisera and for biochemical studies. J. Immunol., 106, 304-313, 1971.
2. Zubler, R.H. et al.: Detection of immune complexes in unheated sera by a modified  $^{125}\text{I}$  Clq binding test. J. Immunol., 116, 232-235, 1976.

Fig. 1

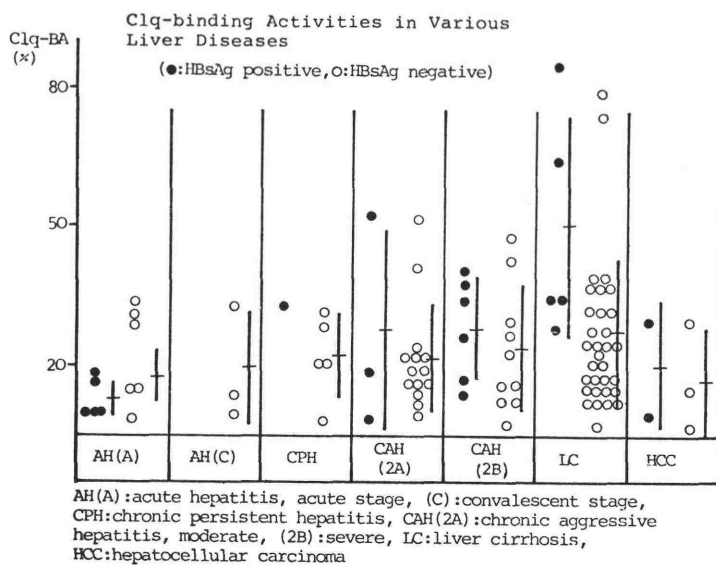




Fig. 3

SUCROSE DENSITY GRADIENT ULTRA-CENTRIFUGAL ANALYSIS  
OF VARIOUS HEPATITIS SERA

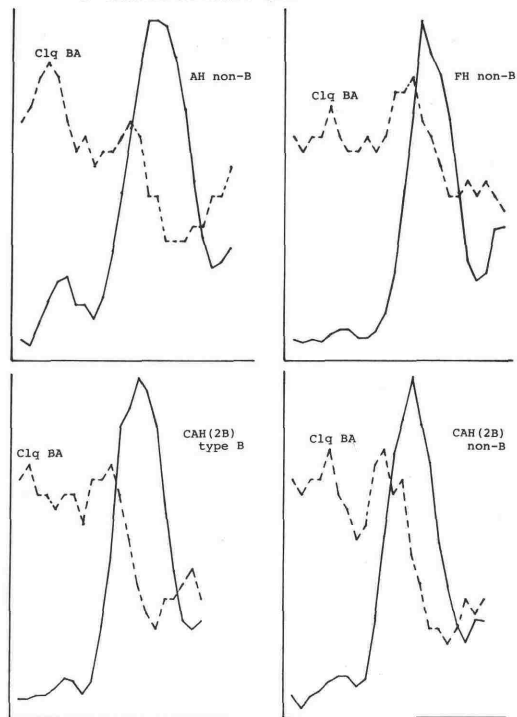
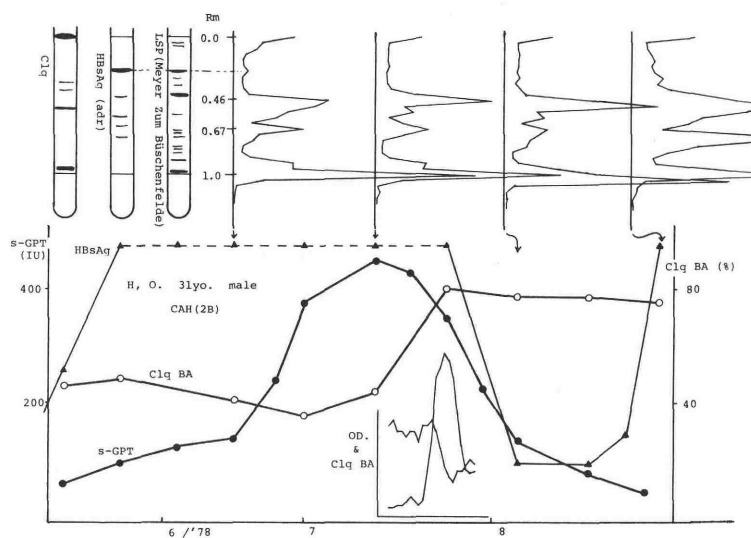


Fig. 4



## 6. C1q deviation testによる各種腎疾患における 血中免疫複合体と補体系について

順天堂大学内科(腎) 中山秀英, 小出輝, 大野丞二  
筑波大学医学系 桜井徹志, 田村昇

### 〔目的〕

第14回本シンポジウムにおいて腎疾患を中心に全身性エリテマトーデス, サルコイドーシスなどの補体系を測定し, これらのうち急性糸球体腎炎, 膜性増殖性糸球体腎炎およびSLEで補体系の著しい変動を認め, 補体系が疾患の活動性指標となることを報告した。

近年, 種々の方法により免疫複合体の測定が可能となり, 既に諸家の報告がなされているが, 腎疾患に関して免疫複合体と補体系との関係ならびに治療経過による免疫複合体の動きを総合的に検索した報告は数少ない。このような理由から, 今回感作ヒツジ血球を用いたC1q deviation testにより各種腎疾患およびSLEについて免疫複合体の測定を行い, 病期による免疫複合体の動きと補体系との関係について検討した。また同時に免疫複合体測定が治療効果判定に有用であるか否かも合わせて検討した。

### 〔対象〕

微小変化群(MC) 11例, 急性糸球体腎炎(AGN) 13例, 膜性腎症(MN) 17例, 膜性増殖性糸球体腎炎(MPGN) 15例, SLE 18例およびサルコイドーシス(SAR) 14例, 計88例の患者より得た162検体である。検体は測定時まで $-70^{\circ}\text{C}$ に保存した。

### 〔方法〕

1. C1qの精製: 米増らの方法で精製し, クロラミンT法を用い $^{125}\text{I}$ を標識した。

2. Hemolysin(A)と感作ヒツジ血球(EA)の作製: ヒツジ血球でウサギを過免疫し得られた抗血清を硫酸法, DEAEセルロースカラムでIgG分画を分離してhemolysinを作製した。 $1 \times 10^9$ 個/mlのヒツジ血球を攪拌しながら至適濃度のhemolysinを等量加え,  $37^{\circ}\text{C}$ , 30分反応させ感作血球を作製した。

3. 免疫複合体測定: Sobelらの方法に準じて行なった。すなわち1容の患者血清, 2容の生食水と2容のショ糖ヤロナール緩衝液を混和し,  $56^{\circ}\text{C}$ , 30分加熱したのち,  $1 \mu\text{g}$ の標識C1qを加え室温で30分反応させた。こ

れに 200  $\mu$ l の EA ( $2 \times 10^9$  個/ml) を加え、さらに 45 分反応させたのち、これから 200  $\mu$ l を取り出し 40% ショ糖液に重層し 13,000 G で 5 分間遠心した。マイクローチューブの先端を切り離し、各マを  $\gamma$ -カウンターで測定した。各検体の測定値は免疫複合体による標識 C1q の EA への結合阻止率 (% inhibition) で表わした。

4. 補体成分の定量: C1q, C4, C3, C5, C9, フォホリジン(P), B因子(B),  $\beta$ 1H グロブリンは SRID 法で測定した。

### 〔結 果〕

1. 加熱凝集ヒト IgG (AHG) による標識 C1q の各種 EA への結合阻止  
まず種々の hemolysin 濃度 ( $1/50 \sim 1/400$ ) で感作した EA を作製し、これを用いて加熱凝集ヒト IgG による標識 C1q の結合阻止率を検討した。この結果 hemolysin 濃度  $1/300$  で感作した EA を用いた時、この EA への標識 C1q の結合率は 57% を示し加熱凝集ヒト IgG 量  $3.8 \mu\text{g/ml}$  まで検出可能であった。しかし hemolysin 濃度  $1/50, 1/100, 1/200$  で感作した EA では、標識 C1q の結合率がそれぞれ 71%, 85%, 88% と増加し加熱凝集ヒト IgG 検出感度が  $7.5 \sim 31 \mu\text{g/ml}$  と低下する傾向が認められた (Fig. 1)。

### 2. 各疾患における免疫複合体の測定値

急性糸球体腎炎、膜性腎症、膜性増殖性糸球体腎炎および SLE では正常群に比し免疫複合体が有意に増加していた。特に SLE では  $30.3 \pm 26.9$  と最も高値を示した。正常群の測定値の平均値  $\pm 2$  S.D. 以上を陽性とした場合、初診時の陽性率は、SLE が 72% と最も高く、次いで膜性増殖性糸球体腎炎 53%、急性糸球体腎炎 50%、膜性腎症 29% であった。しかし微少変化群、サルコイドーシスではそれぞれ 1 例の陽性が認められたにすぎなかった (Fig. 2)。

### 3. 免疫複合体と疾患活動性、治癒および補体系との関係

急性糸球体腎炎、膜性増殖性糸球体腎炎および SLE について経時的に免疫複合体を測定した。それ結果、これらの疾患では活動期に一致して免疫複合体の増加が見られ、とくに膜性増殖性糸球体腎炎、SLE ではアレドニソロンなどの投与により著明な免疫複合体の低下もしくは消失が認められた。(Fig. 3, 4, 5)。また補体系との関係では、急性糸球体腎炎は 2 例で C1q, C4, C3, P との負の相関が認められたが、今回対象とした急性糸球体腎炎全体では免疫複合体はいずれの補体成分とも相関しなかった。膜性増殖性糸球体腎炎では免疫複合体は C4, C3 と負の相関を示した。また活動期 SLE では C4, C3 以外に C1q, P と負の相関を示した。

# 〔考 案〕

今回の測定で急性糸球体腎炎，膜性増殖性糸球体腎炎およびSLEにおいて臨床経過と一致した免疫複合体の動きを認め，また従来の治癒性指標である補体系との関係をも認めた。このことは免疫複合体の測定が治療経過追求に役立ち得ること，フロレドニソロン治療が免疫複合体の減少に関与していることを示唆している。SLEでは免疫複合体によりclassical pathwayを介して補体系が主として活性化されており，一方膜性増殖性糸球体腎炎では免疫複合体によりclassical pathwayを介して形成されたC3bに始まるC3b feedback cycleによっても補体系の活性化が起こっていると考えられる。

Fig.1

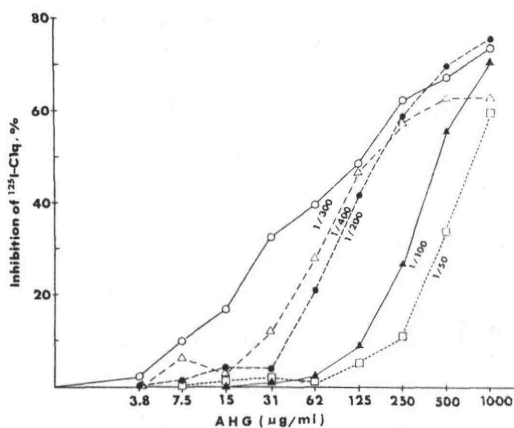


Fig.2

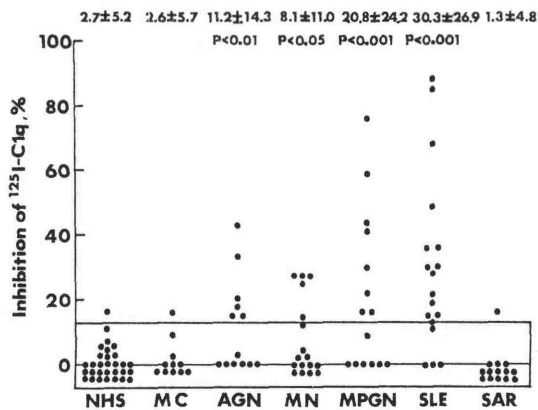


Fig.3

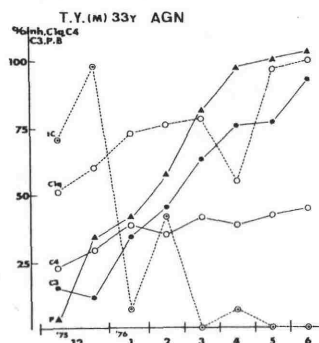


Fig.4

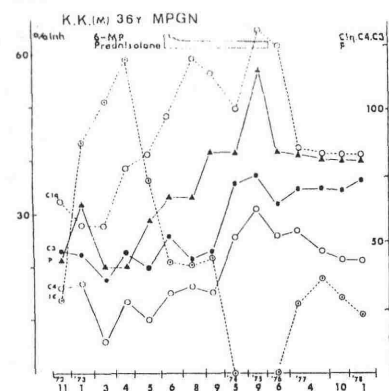
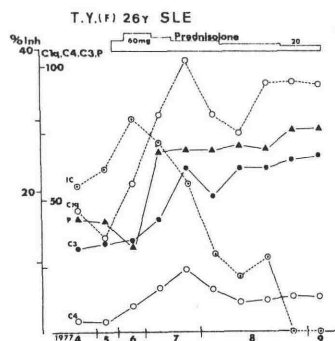


Fig.5



7. 主として膠原病における *Circulating immune complexes* の検索 ; *C1q deviation test*, *Polyethylene glycol* 法および *Anti-antibody* 法

九州大学温病治療学研究所内科

宇田正之, 江崎一子, 酒井好古, 延永正

九州大学医学部付属病院検査部

大田敏行, 大河内一雄

I: 目的

全身性エリテマトーデス (SLE), 慢性関節リウマチ (RA), 糸球体腎炎などの疾患では、その血清中に *circulating immune complexes* (CIC) が存在し、*immune complex disease* として検出されている。これらの疾患においては、CIC の検索は診断、治療経過の観察に重要な情報を提供する。

しかしながら CIC には抗原抗体の *affinity*, 抗体の *class* や *subclass*, 複合体のサイズ, 補体結合性, 組織との親和性など多様である。これら CIC の多様性が多彩な病変をもたらすものと考えられる。従来種々の CIC 検出法が報告されているが、それらは CIC の物理化学的性状, 生物学的機能を利用した各々異なった原理に基づいており、全ての CIC を検出する方法はまだ確立されていない。したがって、いくつかの方法を組合せてその検索を行なわなければならないのが現状である。そこで今回、*C1q* ガル内沈降反応, *C1q deviation test*, *Polyethylene glycol* (PEG) 沈澱法, *Anti-antibody* 法を行ない、主として膠原病を対象として血中 CIC を検索し、組織障害の一要因としての補体との関連を検討した。

II: 方法

(1) *C1q* ガル内沈降反応。既報の方法<sup>(1)</sup>により得られた *C1q* を用い、Agnella の方法<sup>(2)</sup>に準じ、0.6% agarose 中に 4°C 72 時間反応後、*C1q* と被検血清との間に形成される沈降線の有無を判定した。

(2) *C1q deviation test*。 *C1q* に <sup>125</sup>I をラベルし、Salzel の方法<sup>(3)</sup>に準じ、自作ヒツジ赤血球を用い、*heat aggregated IgG* による標準曲線を作成し、CIC の量を算出した。

(3) PEG 沈澱法。Creighton の方法<sup>(4)</sup>に準じ、0.01N barate buffer, (pH 8.5,  $\mu=0.1$ ) で PEG 6000 の 8% 溶液を作り、その 0.5 ml と同緩衝液で 5 倍希釈非動化した被検血清 0.5 ml を混和し、4°C 1 夜静置後、1200 G 25 分間遠心し沈澱を得た。4% PEG で 1 回洗滌後 PBS に溶解し、Lowry 法にて溶液および原血清のタンパク濃度を測定した。PEG 法による CIC

は蛇蛻タンパク量の原血清タンパク量に対する百分率(% protein precipitate)で表わした。

(4), Anti-antibody 法。Mizgrom<sup>(5)</sup>, Kana<sup>(6)</sup> の方法に準じた。  
anti-antibody を polyvinylpyrrolidone K-90, 2.5 mg/dl, Tween 80, 50 mg/dl を含む PBS にて 2~3 凝集単位に希釈し、その 25  $\mu$ l と、同緩衝液にて倍敬希釈した被検血清 25  $\mu$ l を混和し 20 分後、0.3% 抗 D 抗体懸液と O 型 Rh+ 血球浮遊液 25  $\mu$ l を加え 20 分間反応させた。被検血清中の CIC 量は希釈血清が anti-antibody による血球凝集反応を阻止する最大希釈倍敬にて表わした。

(5), 血清補体価測定法。CH<sub>50</sub> は GVB<sup>2+</sup> を緩衝液として使用し、Kent<sup>(7)</sup> 法により測定した。C<sub>4</sub>, C<sub>3</sub> は SRID 法によった。正常値は CH<sub>50</sub>: 174.7  $\pm$  26.1 u/ml, C<sub>4</sub>: 49  $\pm$  25 mg/dl, C<sub>3</sub>: 145  $\pm$  22 mg/dl である。

### III: 成績

(1), Cig ゲル内蛇蛻反応。Table 1 の如く、SLE 33 例中 17 例、悪性関節リウマチ (MRA) 17 例中 3 例が陽性であった。RA では 47 例中 1 例のみであったが、RA の関節液 22 例中 10 例が陽性であった。

(2), Cig deviation test。SLE 15 例中 10 例は 5  $\mu$ g/ml 以上の CIC が検出され、7 例の 20  $\mu$ g/ml 以上の値を示す症例では、全例 Cig ゲル内蛇蛻反応が陽性であった。血清補体価との相関は Fig. 1, Table 2 の如く、Cig ゲル内蛇蛻反応陽性例 13 例すべてが低補体価を示したのに対し、陰性例 15 例では 10 例が低補体価、5 例は正常値であった。陽性群の CH<sub>50</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>3</sub> は陰性群に比しいずれも明らかな低値を示した。

(3), PEG 蛇蛻法。Fig. 2 の如く、MRA が最も多量の CIC が証明され、陽性率も高く、Sjögren's syndrome, RA でも同様であったが SLE では正常者との差を認めなかった。MRA は RA に比し CIC 量が多く、しかも低補体の傾向が示された。(Table 3)。

(4), Anti-antibody 法。Table 4 の如く、MRA 8 例中 7 例、RA 17 例中 10 例が 2 倍以上の値を示し、CIC 陽性と判定した。陽性例の CH<sub>50</sub>: 176.2  $\pm$  52.0, 陰性例の CH<sub>50</sub>: 222.2  $\pm$  66.8 であり、MRA では RA に比し、CIC 量も多く、より明らかな低補体価傾向が認められた。(Fig. 3)。

### IV: 考察

Creighton の PEG 蛇蛻法は Immune complex や aggregated IgG のような大きなタンパク分子を蛇蛻させるが、この方法によって RA, MRA,

Sjögren's syndrome においては高率に immune complex が検出されたが、SLE では低率であった。—オ Agnello<sup>3</sup>, Sobel<sup>3</sup> の精製 C1q を用いる方法では SLE で高率, RA 血清では低率であった。しかし、RA 関節液では約半数に陽性であった。Milgrom<sup>3</sup> の anti-antibody 法は aggregated IgG を検出せず、IgG あるいは immune complex のみを特異的に検出する。現時点では、これらの原理の異なる検出方法を併用し、補体を測定して immune complex disease の病態の解析をすることが必要である。

Referencies.

(1). 宇田正之, 酒井好古: C1分子内活性化に関する研究 (5) C1qの精製および精製C1qによる Immune complex の検出. オ15回 補体シンポジウム講演抄録集. 86-87, 1978.  
 (2). Agnello,V and Koffler,D et al.: C1q precipitins in the sera of patients with systemic lupus erythematosus and other hypocomplementemic states: Characterization of high and low molecular weight types. J. Exp. Med. 134: 228s-241s, 1971.  
 (3). Sobel,AT, Bokish,VA. et al.: C1q deviation rest for the detection of immune complexes, aggregates of IFF, and bacterial products in human serum. J. Exp. Med.142: 139-160, 1975.  
 (4). Creighton,WD. and Lambert PH. et al.: Detection of antibodies and soluble antigen-antibody complexes by precipitation with polyethylene glycol. J. Immunol.111: 1219-1227,1973.  
 (5). Milgrom,F. and Dubinsky,S. et al.: Human sera with "anti-antibody"/ Vox.Sang.1:172-183,1956.  
 (6). Kano,K and Nishimake,T, et al.: Detection of circulation immune complexes by the inhibition of anti-antibody. Clin. Immunol. Immunopathol.9: 425-435,1978.

	No. of cases	No. of positives
SLE	33	17
MRA	17	3
RA	47	1
MCTD	4	1
PSS	5	1
Sjögren's syndrome	11	1
Synovial fluid of RA	22	10

Table 1.  
Precipitin reaction of C1q in gel diffusion.

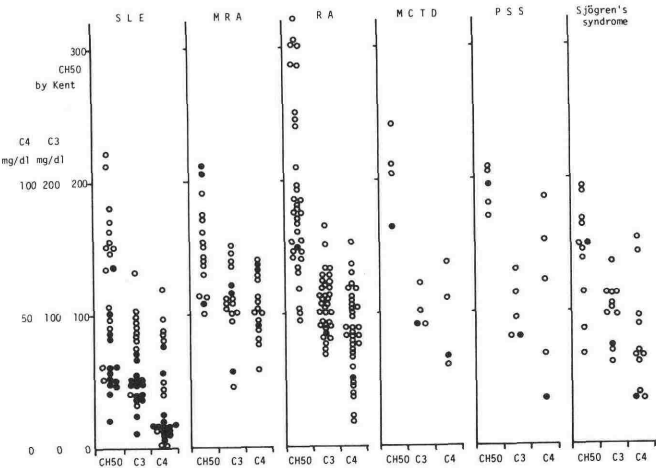


Figure 1. Correlation between precipitin reaction of C1q in gel diffusion and serum complement levels,  
Solid circle; positive C1q precipitin reaction.  
Open circle; negative C1q precipitin reaction.

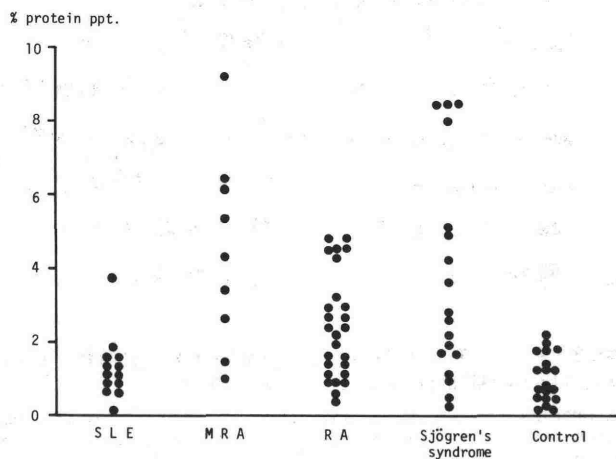


Figure 2.  
Precipitation with polyethylene glycol in pathological sera.

	Precipitin reaction of Clq in gel diffusion	
	positive	negative
CH50 u/ml	63.1 $\pm$ 33.1	104.5 $\pm$ 51.9
C4 mg/dl	9.3 $\pm$ 6.2	28.7 $\pm$ 19.0
C3 mg/dl	42.8 $\pm$ 15.7	79.4 $\pm$ 27.4

Table 2. Serum complement levels and precipitin reaction of Clq in gel diffusion in SLE. ( Mean  $\pm$  1 SD ).

	M R A	R A
% prot. ppt.	4.82 $\pm$ 2.45	1.87 $\pm$ 1.24
CH50 u/ml	112.3 $\pm$ 45.9	136.5 $\pm$ 28.6
C3 mg/dl	90.8 $\pm$ 28.8	111.8 $\pm$ 30.7

Table 3. The amount of protein precipitated with polyethylene glycol and serum complement levels in MRA and RA. ( Mean  $\pm$  1 SD ).

Titer	< X 2	X 2	X 4	X 8	X 16	X 32
M R A	•	••	•	•	•	••
R A	••••	••	••	••••	•••	

Table 4. Titers of inhibition of anti-antibody in MRA and RA.  
Double circle; positive Clq precipitin reaction.

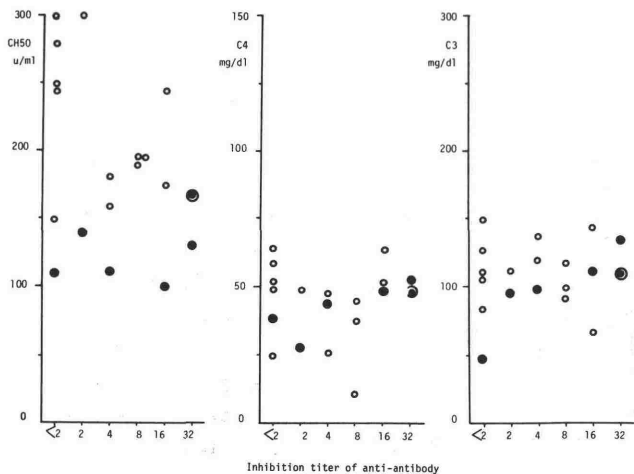


Figure 3. Correlation between serum complement levels and inhibition titers of anti-antibody in MRA and RA.  
Solid circle; MRA.  
Open circle; RA.  
Double circle; positive precipitin reaction of Clq in gel diffusion.



## 8. 螢光標識 C1g による肝組織内免疫複合物の局在

辻 孝夫, 荒木清典, 井上純一, 尾上公昭, 土屋正夫, 篠原 徹,  
長島秀夫\*, 内藤祐彦\*\* (\*岡山大学第1内科, \*\*熊山病院 内科)

### 目的

慢性肝疾患における血中免疫複合物 (immune complex: IC) の病因論的役割を解析するために, 渡者らはまず Zuber<sup>1)</sup> の C1g-binding test や肝組織内の C1g の局在様式を検討した<sup>2,3)</sup>。今回は, 螢光標識 C1g を用いて肝組織内 IC の局在について検索したの<sup>2)</sup>, その方法と成績を報告し, 併せて本方法の問題点についてふれる。

### 方法

検索対象としたのは, 肝組織診断の確定した慢性肝疾患 10 例 (うちヨーロッパ分類<sup>4)</sup> による chronic persistent hepatitis 2 例, chronic aggressive hepatitis with moderate activity 3 例, chronic aggressive hepatitis with severe activity 3 例, liver cirrhosis 2 例) からの新鮮凍結肝生検材料を用いた。また, 血清中の HBsAg および HBeAg の有無は reversed passive hemagglutination test (RPHA) と passive hemagglutination test (PHA) によった。螢光標識 C1g (FITC-C1g) は, C1g E Yonemasu と Storand<sup>5)</sup> の方法で精製し, fluorescein isothiocyanate isomer I (BBG) を蛋白・色素比を 60 : 1 の割合で 4°C, 6 時間の条件で型おしく標識し, Sephadex G 25 column chromatography と DEAE cellulose column chromatography を用いて調整し, acetan liver powder は用いなかった。染色条件は, さまの凍結肝材料の 6 μm 切片を未固定とアセトン固定を用い, 37°C, 45 分間で行った。また, FITC-C1g の活性を調べるために, human Cohn FII (NBC) による aggregated gamma-globulin (A<sub>9</sub>B<sub>9</sub>) と DNA を用い, 螢光測光による C1g-binding test を行うと共に, DNase (Worthington BC) を用いて組織処理を行ったのちの切片についての染色を行った。さらに染色前に, 63°C, 10 分間の熱処理を加えたのちに, 0.1 mg/ml の protamine sulfate を含んだ phosphate buffer saline (protamine-PBS) で 37°C, 20 分間処理する方法を行った。

### 成績

FITC-C1g は HBsAg の有無にかかわらず, すべての肝細胞ならびに浸

細胞と線維細胞の核にみられた。また、 $t=3$ によつては、類洞血管内に deposit 様に、内腔域ではびまん性に淡く局在し、一部では deposit 様に観察された。また、固定の有無と protamine-PBS 処理で、これらの所見に差はなかった。しかしながら、DNase の前処理によつてほとんどすべての螢光は消失し、chronic aggressive hepatitis の症例でのみ、piecemeal necrosis 部で deposit 様に、さらに小葉周辺部の肝細胞膜、小葉内類洞壁の極く一部に陽性局在を示し、IC 所見として注目された。

Table 1. DETECTION OF POSITIVE FLUORESCENCE IN LIVER TISSUE AFTER DNase TREATMENT

Diagnosis <sup>a)</sup>	Serum HBsAg	No. cases	No. positive	Grading of fluorescence
CPH	positive	2	0	- , -
CAH 2A	positive	2	1	- , +
	negative	1	0	-
CAH 2B	positive	2	2	+ , ++
	negative	1	1	+
Liver cirrhosis	positive	2	0	- , -
Total		10	4	

a): CPH=chronic persistent hepatitis, CAH2A=chronic aggressive hepatitis with moderate activity, CAH2B=CAH with severe activity

### 総括と結論

FITC-C1g を用いて、慢性肝炎の活動型症例の肝組織内免疫複合物の局在を DNase 前処理することにより明らかにしたが、その陽性局在は極めて少なかった。これらの所見から、ヒトの生体内では、仮に、免疫複合物が発生しても、非常に速い補体の結合とクリアランスが行われ、in vitro system で新たに補体を加えても、補体と免疫複合物は非常に少ないのではなうかと推察された。

### 文献

1. Zubler, R.H. et al.: Detection of immune complexes in unheated sera by a modified  $^{125}\text{I}$  C1q binding test. J. Immunol., 116, 232-235, 1976.
2. 荒木清典, 辻秀夫ほか: ウイルス肝炎各種病型における C1q binding test の成績. 第15回補体シンポジウム (生駒) 講演集, pp. 156-159, 1978.

3. Tsuji, T., et al.: Tissue localization of Clq in HBs antigen positive liver disease patients by direct immunofluorescent technique. *Acta Med. Okayama*, 31, 81-89, 1977.
4. De Groote, J., et al.: A classification of chronic hepatitis. *Lancet*, ii, 626-628, 1968.
5. Yonemasu, K., et al.: Clq: Rapid purification method for preparation of mono-specific antisera and for biochemical studies. *J. Immunol.*, 106, 304-313, 1971.

## 9. 腎疾患における Alternative pathway 活性化因子について

日大 オス内科 大井 洋之 宮地 秀尚 関 正人

阿部 理一郎 金沢 和俊 浪多野 道信

泉西部茨松医療センター 名和 紀之

ある種の腎疾患患者血清中には Alternative pathway を活性化する factor の出現が知られている。今回我々はこれら factor の検出及び性質について検討した。

### (方法)

腎生検により診断された各種腎疾患 200 例よりの 600 検体について検討した。Alternative pathway 活性化因子の検出には昨年発表したごとく Alper 等の方法を modify し使用した。これら検出された症例について Vallota の方法も行った。あなわち患者血清を 1, 0.01 M EDTA 3 mM Mg NH<sub>4</sub> を 3 とし、37°C, 20 分 反応後、0.01 M EDTA とし、電気泳動法にて C3 の conversion を観察した。補体価は CH<sub>50</sub> を Mayer の方法で、C1q・C4・C3・C5・C9・B (Behringwerke 社製), P (今野孝彦氏より供与された) を SRID により測定した。

検出された factor について sucrose density gradient を用いて検討した。

また anti IgG Sepharose 4B により Immunoabsorbent を行った。

### (結果および考察)

7 人の腎疾患患者において Alper 等による方法および Vallota の方法の両方で検出された。7 人の症例の補体各成分は表 1 のごとくであり、MPGN 3 例, SLE 2 例, AGN 2 例であった。

MPGN の 3 例は 56°C, 30 分 反応後でも失活しない heat stable な factor であり, SLE・AGN は 56°C あるいは 50°C で失活する heat labile な factor であった。MPGN 患者はいずれも persistent hypocomplementemia であった。また SLE 患者・AGN 患者で検出された factor はいずれも病勢の強い時期の他補体時に一過性に出現したものである。

次に各 factor について Zymosan による影響をみるために、患者血清に Zymosan 2 mg/ml を加え、15°C あるいは 37°C で 60 分 反応、遠心後

上清について Vallota の方法で C3 の conversion をみたが, heat stable・heat labile な factor のいずれも影響を受けなかった (図3)。

各々1例ずつ sucrose density gradient および anti IgG Sepharose 4B column を用いて Immunoabsorbent を行ったところ, 2例とも AS に一致し, Immunoabsorbent で吸収され 0.2 M glycine HCl (pH 2.2) で eluate された (図3, 図4)。

今回の検討で Alper 等の方法について陽性であっても Vallota の方法で陰性の血清が存在した。またこの時必ずしも低補体を示さなかった。しかし図5のごとく疾患の極期や病勢の強い時に一致して出現した。

以上

① Alper 等のモルモット血球を用いた方法は Vallota's method と必ずしも一致しなかった。しかし検出された時期は病勢の強さと一致した。

② スフの方法で一致した血清についての検討で, heat stable な factor は MPGN 患者のみで認められ, 疾患特異性があると思われた。また他の報告と一致し, IgG の可能性がある。

③ heat labile な factor は AGN・SLE の各疾患の低補体時に一過性に認めた。その factor の解明はなお検討を必要とする。

Table I

Complement levels in seven patients									
Type of Renal disease	patient	CH <sub>50</sub>	Clq % mg/dl	C4 mg/dl	C3 mg/dl	C5 %	C9 %	P %	B mg/dl
MPGN	TK	13↓	85	9.4	2	0	94	104	14
	IY heat stable	13↓	87	36	N.D.	70	80	92	14.4
	KY	13↓	57	18.8	N.D.	34	40	37	15.6
SLE	AK	13↓	53	10.4	6	96.5	58.5	70	26.8
	TK heat labile	13↓	77	4.4	5.2	90	70	59.5	50.8
AGN	HT	13↓	94	36.4	50	80	57	30	31.6
	ON	13↓	77	5.6	N.D.	53	78	N.D.	20.8

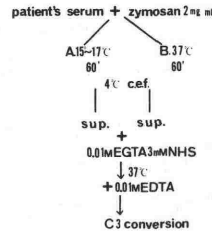
N.D. = not detected

# EFFECTS OF ZYMOSAN

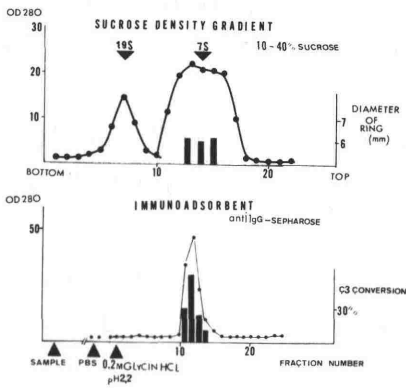
NE = NO EFFECT

TYPE OF RENAL DISEASE	PATIENT		A 15°C	B 37°C
MPGN	T. K.	HEAT STABLE	NE	NE
	I. Y.		NE	NE
SLE	T. K.		NE	NE
	A. K.	HEAT LABILE	NE	NE
AGN	H. T.		NE	NE

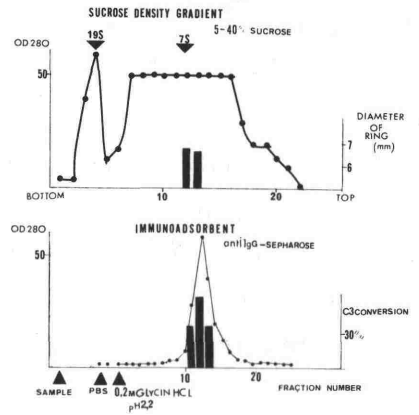
## METHOD



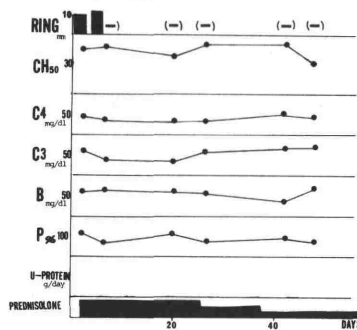
MPGN CASE T.K.  
HEAT STABLE



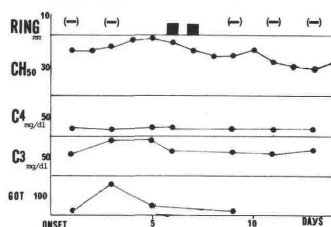
SLE CASE A.K.  
HEAT LABILE



## PURPURA NEPHRITIS I.G.



## ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION Y.M.



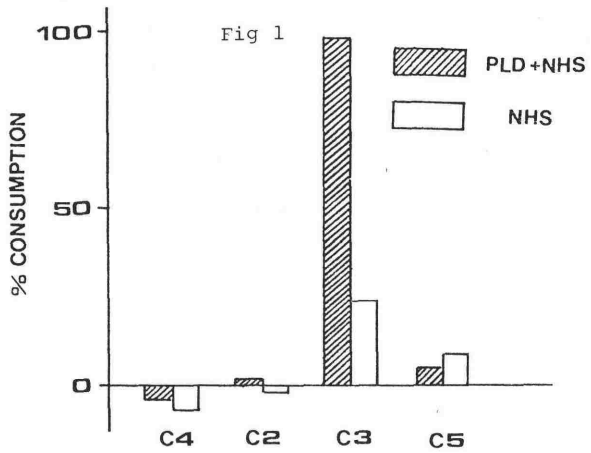
モルモット赤血球溶血法，いずれの方法にても強い NeF 活性を認めた。

[ NeF の in vitro における検討 ]

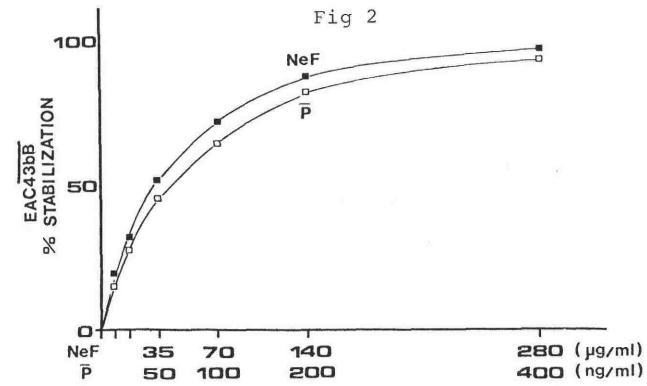
1) NeF 活性が患者血清中の IgG fraction に存在するかどうかを anti-IgG affinity column を用いて調べた。Table 2 に示す様に NeF 活性は素通りに存在せず、acid elute 中に存在した。以下 NeF の実験には この acid elute を使用した。

2) Fluid phase における作用：患者血清と NHS を等量混合し 37°C 30 min. incubation 後 C4,C2,C3,C5 活性を測定。また同時に GBG の I.E.P. を行った。なお control として NHS のみを incubate したものをを用いた。Fig 1 に示す様に C3 活性のみが著明に低下したが、C5 の低下は認められなかった。一方 GBG は control に比しやや強い GGG,GAG への conversion がみられた。

Table 2	
Binding of PLD serum to anti-IgG sepharose	
	C3 %consumption
Breakthrough peak	20.6
acid elute ( 1mg/ml )	61.2
control normal IgG ( 1mg/ml )	19.7



3) Solid phase における作用：EAC43b( $1.5 \times 10^8$ /ml) に factor B ( $0.1 \mu\text{g/ml}$ ) , factor D ( $66 \text{ ng/ml}$ ) を等量加え 30°C 20 min. incubation 後 cold buffer (low  $\mu\text{GGVB}$ ) で 1 回洗い、EAC43bB( $1.5 \times 10^8$ /ml) を作成した。この cell に NeF または  $\bar{P}$  を等量加え、さらに 30°C 20 min. incubation 後 buffer で 1 回洗い、C-EDTA (GPS を 0.01M EDTA.GVB で 20 倍希釈したもの) を加え 37°C 60 min. incubation



後 OD を測定し  $\Sigma$  を計算。一方 EAC43bB に、ただちに C-EDTA を加えた時の値を 100 として、NeF または  $\bar{P}$  を加えた時の値を % 表示した。Fig 2 に示す様に NeF ,  $\bar{P}$  とともに dose-dependent に C3bB を stabilize した。

$\beta_2\text{H}$  の作用をみるため NeF

(140  $\mu\text{g/ml}$ ) または P(200 ng/ml) にて stabilize

Table 3

させた EAC43bB ( $1.5 \times 10^8/\text{ml}$ ) に変量した  $\beta_1\text{H}$  を加え 30°C 30 min. incubation 後 buffer

で 1 回洗、C-EDTA を加え溶血をみた。Table 3

に示す様に P にて stabilize された C3bB は

$\beta_1\text{H}$  により decay を受けやすいのに比し、

NeF により stabilize された C3bB は  $\beta_1\text{H}$  の作用を受けにくいことがわかった。

NeF により stable な C3 convertase

C5 convertase が形成されているかを確

かめるため、EAC43b ( $1.5 \times 10^8/\text{ml}$ ) に

factor B(10  $\mu\text{g/ml}$ ) factor D(66 ng/ml) を

加え EAC43bB を作り、これに NeF(140

$\mu\text{g/ml}$ ) 加え 30°C 20 min. incubation 後

buffer で 2 回洗、C3(100 SFU/ml) または

C5(100 SFU/ml) または両者を加え 37°C 30

min. incubation 後上清の C3 または C5 活性

を測定し % consumption を計算した。なお

control としては NeF のかわりに buffer

を加え、30°C 20 min. decay させたもの(

EAC43bB<sup>d</sup> と表現した)を用いた。Fig 3

に示す様に NeF により Solid phase におい

て C3B<sup>u</sup> C5 convertase が形成され、しか

も C3 と C5 を同時に加えたものにより強い

C5 convertase 活性を認めた。

### [まとめ]

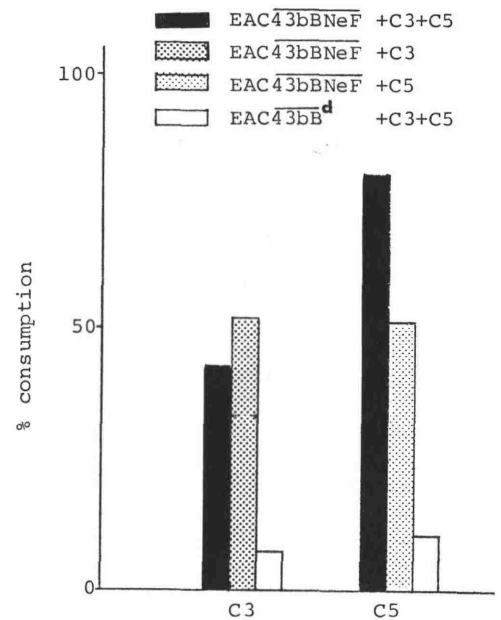
1) 本邦オ一例目の NeF 陽性の PLD を経験した。

2) NeF は Properdin と同様 cell surface 上の C3bB を stabilize する作用を認めた。また NeF で stabilize された C3bB は Properdin の場合と異なり  $\beta_1\text{H}$  の作用を受けにくい。

3) NeF は Fluid phase において C3 convertase を形成するか Solid phase と異なり C5 convertase は形成しない。この NeF の Fluid phase における作用が、患者血清中にて持続的な C3 のみの低下をきたす一つの機序と考えられた。

$\beta_1\text{H}$ addition ( $\mu\text{g/ml}$ )	Z	
	EAC43bBP	EAC43bBNeF
none	0.851	1.604
0.05	0.701	
0.19	0.548	
0.78	0.315	1.510
3.13	0.222	1.474
12.5	0.164	1.415
50.0	0.143	1.313
200.0	0.142	1.262

Fig 3





# 10. Nephritic factor (NeF) 活性を認めた Partial Lipodystrophy (PLD) の一例

阪大オ一内科 中西 功, 赤垣 洋二, 藤原 芳廣, 上田尚彦,  
安東 明夫, 阿部 裕

滋賀医大オ三内科 折田 義正

大阪府立成人病センター 稲井 真弥, 永木 和義

倉敷中央病院小児科 武田 修明

PLD は皮下の脂肪ソシキの部分的な萎縮を示す原因不明のまれな疾患である。この疾患の患者血清中には NeF が高頻度に検出され、また MPGN との合併例が欧米において報告され、本症と補体系および腎炎との関連が注目されている。しかし我国においては PLD の報告も非常に少なく、また NeF の検討を加えた症例はない。今回我々は NeF 強陽性の PLD を経験し、NeF の in vitro における役割を中心に検討したので報告する。

[症例： 10才 女児]

<主訴> 両頬部の萎縮・低補体血症

<既往歴>・<家族歴> 特記すべきものなし

<現病歴> 6才頃より両頬部の萎縮がみられ始め、52.7月一過性の蛋白尿・血尿 出現時に C3蛋白の低下に気付かれる。以後C3低値が持続するため低補体血症を伴う PLD と考えられた。

<検査成績> 肝キノウ・血糖などの異常を認めず。また現在のところ腎キノウ、尿所見は正常。

<血清補体系> 1) 補体価および補体成分 (Table 1): CH50 は Mayer 法,

C1 - C9活性は Intermediate cell を用いた tube 法,  $\bar{P}$ ,  $\bar{D}$  は Minta, Martin の溶血リング法, factor B  $\beta_1H$  は single radial immuno diffusion 法にて測定した。カッコ内の値は同時に測定した pooled normal human serum (NHS) の値を示す。CH50 の低下、補体成分では C3が他の成分に比し著しい低値を示したが、C5, Properdin,  $\beta_1H$  などの異常は認められなかった。

2) NeF 活性: 患者血清中の NeF 活性は、Immunoelectrophoresis (I.E.P.) 法, C3 溶血活性法 (オ15回補体ミニボで報告)、Arnout の

Table 1 Complement profile

CH50	9.3 u	( 42.0 )
C1	105,000 u	( 121,000 )
C4	33,000 u	( 64,000 )
C2	620 u	( 950 )
C3	800 u	( 47,000 )
C5	195,000 u	( 249,000 )
C6	12,000 u	( 10,300 )
C7	14,000 u	( 13,600 )
C8	144,000 u	( 160,000 )
C9	29,200 u	( 31,800 )
$\bar{P}$	117.1 %	( 100 )
$\bar{D}$	81.2 %	( 100 )
B	12.8 mg/dl	( 8.1-29.3 )
$\beta_1H$	95.3 %	( 100 )

## 11. ポリエチレングリコール法による補体の分離条件の検討

田中 忍、斑目君恵、北村ふじ子、鈴木貫和、嶋田孝吉  
西岡久寿弥 (都臨床研、補体・トキソ部)

近年、補体成分を分離する際の前処理法として、ポリエチレングリコール (PEG) による分画法が用いられている。しかし、このPEGによる分画法は、1976年に Tack and Prahl によって報告された条件を、そのまま踏襲した感があり、分画に際しての条件検討を系統的に行なった報告は現在のところなされていないようである。そこで今回、我々はPEGによる補体分画の際の pH、塩濃度およびPEGの分子量の影響について検討したので報告する。

### 【実験方法】

出発材料としての血漿は、0.1 M  $\text{CaCl}_2$  に一晚透析してフィブリンを除去した後、各種 pH および塩濃度の緩衝液に透析したものをを用いた。緩衝液はリン酸緩衝液 (PB と略す) を用い、モル数は 0.01 ~ 0.20 モルを、そして pH は 4.0 ~ 8.0 の各種を用意した。PEG (和光純薬) は平均分子量が 400 ~ 7500 のものを用いた。(各々 PEG 400 ~ 7500 と略す)。各々の PEG 50g を、各種 PB に溶解し、容量 100 ml としたものを 50% 溶液として用いた。分画は原則として氷中で行なった。5 ml の血漿に 50% PEG の合目的量を加え、30 分後、4,000 rpm 20 分間遠心し、沈渣を 0.1 M PB (pH 7.0) に溶解して全量 1 ml とした。分画は段階的に行ない、5% で析出した画分を 5P、その上清を 7% PEG 濃度としたものを 7P とし、以下順次に 10 ~ 30P とした。

#### 1. PEG の分子量による影響

分子量の異なる 4 種の PEG を用いて、PEG 濃度 5 ~ 30% の間で段階的分画を実施し、各々の画分に含まれる補体成分を測定した。(図-1a)。  
なお、この実験では 0.1 M PB (pH 7.0) を溶媒として用いた。

PEG 400 の場合、補体各成分ともほぼ 20P ~ 30P 画分に析出した。この補体成分の分布は PEG の量が増加するに従って低濃度側の画分へと移行し、PEG 7500 では、5P ~ 15P 画分を析出した。いずれの PEG の場合でも、C2 が他の成分よりやや高い濃度で析出する傾向にあったが、それ以外の成分は、ほぼ一致した画分中に見出された。従って、特定の成分を他の成分と分離する、いわゆる精製度は低いものと思われた。

分子量 1000 以下の PEG では、補体成分の析出範囲が広く、一方、P

PEG 7,500は粘度が高く再現性のある成績が得にくいために、以後の実験ではPEG 4,000を統一して用いた。

## 2. 塩濃度の影響

0.01～0.2MPB (pH 7.0)を用いて、塩濃度が補体成分の分画に与える影響について検討した(図1b)。まず、0.01Mの塩濃度で分画を行なった場合には、5～10p画分に各補体成分が分布したが、塩濃度の増加と共に、その分布は高いPEG濃度の画分へ移行し、0.2MのPB濃度下では、7～20p画分に殆どの補体成分の活性が認められた。

補体各成分同士の分離程度は、C2がやゝ他の成分と遅れて析出するため分離可能であることが推定されるのみであり、いつれの塩濃度下でも特定成分を単独で分離することは困難であった。

0.01Mおよび0.05Mの塩濃度では、原血漿の各補体成分の活性が著しく低下した。これをゲル内拡散法で検討したところ、各成分の量的な低下は認められなかった。故に、この活性低下は原血漿の透析中に生じたものと推定された。一方、0.2Mの塩濃度下では、各成分の分布が広い範囲にわたった。これらの結果から、以後の実験では、0.1MPBを用いた。

## 3. pHの影響

分画時のpHは補体各成分の等電点を考慮した場合に、その分離度に大きな影響を与えるものと推定された。しかし実際には酸性側のpHでは、低濃度のPEG画分に補体成分が析出するが、pHがアルカリ側へ移行するに従って、高い濃度のPEG画分側に補体成分の活性が認められた。しかも、C2以外の各成分ともに、その等電点に関係なくほぼ同一の画分中に認められた。

## 4. 各画分の純度

以上①～③の実験で得られた各画分について免疫電気泳動を行ない、他の血清成分の混入程度を検討した。上述したいつれの実験においても、アルブミンは高いPEG濃度でも、その上清に残存する。しかし、ほとんどのアルブミンやIgGその他の血清成分は、補体成分の挙動と一致していた。従って、PEGによる分画それだけで各成分の精製に効果的とはいえない。尤も収量のよい条件での濃縮操作の意義がある。

## 【結論】

PEGによる補体成分を収量よく得るためには、分子量4,000のPEGを用い、pH 6～7、塩濃度は0.1～0.15モルの条件が最適である。

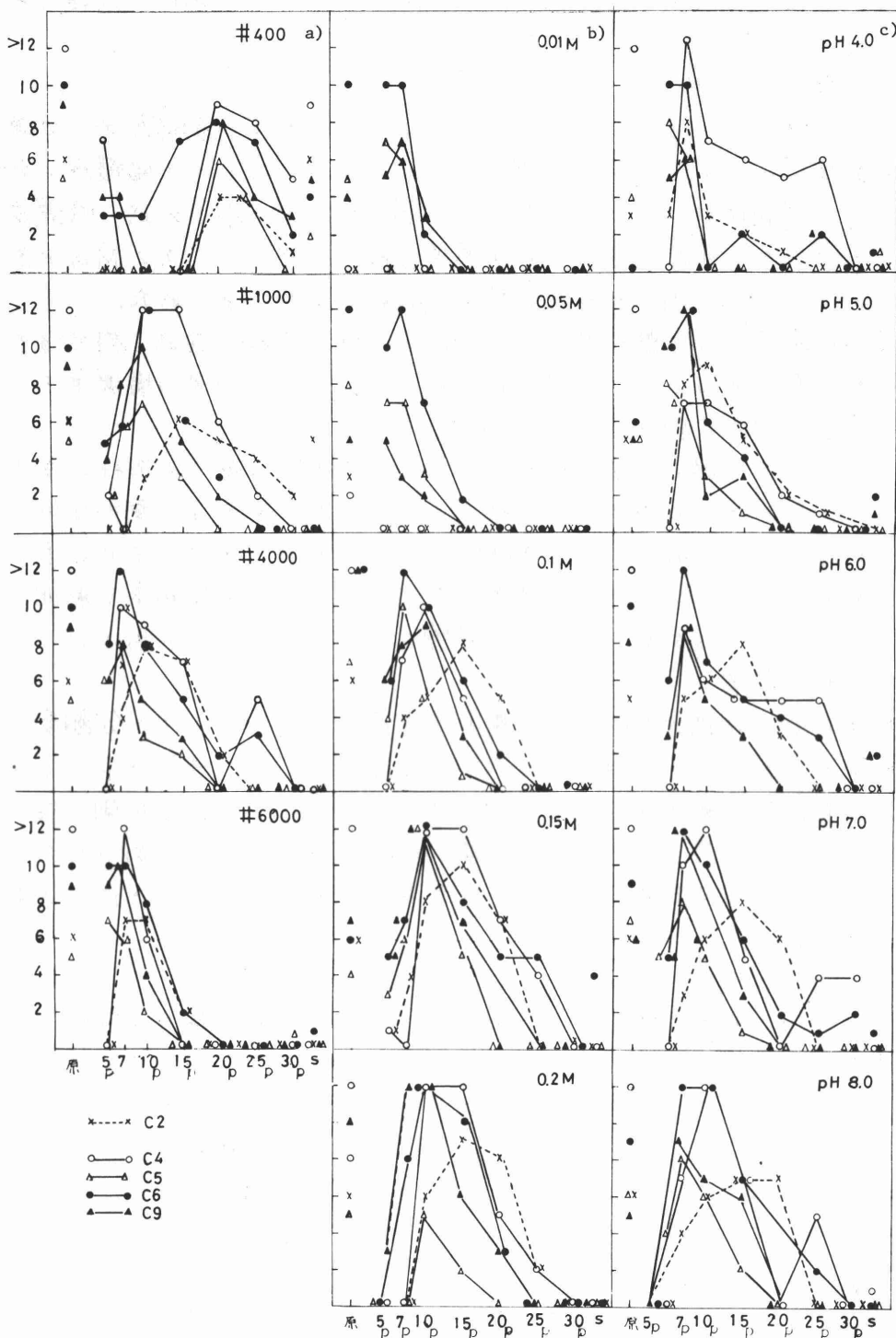


Fig1, Hemolytic activity of complement component in the fractions separated by PEG fractionation.

## 12. C4b の限定分解反応 — 新しい C4b 誘導体の分離

北大 薬学部 衛生化学 長沢滋治, 市原千嘉子  
アラバマ州立大学 R. M. STROUD

近年, 補体系の制御因子 C4b INA・C3b INA の作用機構に関する研究が進み, このプロテアーゼの活性発現には高分子蛋白質 (MCF と略), あるいは  $\beta_2H$  が補酵素として必要になることが明らかになってきた。

すなわち, C3b の一次分解産物は三本鎖構造の C3b' で, 血中のプロテアーゼ (フラスミンなど) の作用で C3c と C3d に分解されることも明らかにした。

最近, C4b の分解フラグメントの一つである C4c は  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  の四本鎖構造をもつことが報告された。これは,  $C4b \xrightarrow{C4b\text{ INA}} C4c + C4d$  の限定分解の過程で C4b の  $\alpha$  鎖が少くとも 2ヶ所切断を受けることを示唆している。

そこで, 我々は C4b の分解反応の再検討を行ない, C4b の分解反応の中間体として, C4b と分子量, Disc-PAGE の泳動度の同じ C4b 誘導体, C4b', の生成することを明らかにした。C4b INA による  $C4b \rightarrow C4b' \rightarrow C4c + C4d$  の各限定分解段階とも MCF を必要とした。

また, MCF の簡便な精製法を確立し, MCF の蛋白化学的な特性値をしるべたので合わせて報告する。

### 実験材料と方法

C4b, C4b INA は前回の本シンポジウム抄録集に示した方法により調製した。MCF の活性測定も前回に報告した方法に準じて行なった。

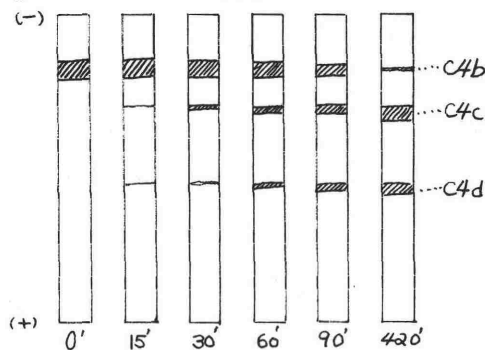
高分子コファクター (MCF) の精製 : ヒト血漿を Gelatin-Sepharose に通し, fibronectin (Ig) を吸着除去したのち, ポリエチレングリコール (PEG) 分画し, 沈澱 (PEG 4000, 5% (w/v)) を生理食塩水に溶かす。10 mM  $CaCl_2$  を加え脱フィブリン化したのち, 再び PEG 分画 (PEG 4000, 5%) し, 沈澱を 0.01 M Tris / 0.15 M NaCl / 0.1 M Glycine / 0.1 M Dextrose / 0.01%  $NaN_3$  に溶かし, Biogel A-15m を用いてゲル濾過を行なう。MCF 活性は分子量 100 万のオメガ 6 の蛋白ピークの画分に回収される。この画分を 0.02 M phosphate / 0.15 M NaCl / 0.01 M EDTA, pH 7.0 に対して透析し, Heparin-Sepharose を用いたフロマトグラフィーを行なう。食塩濃度を 0.15 M  $\rightarrow$  0.6 M まで連続的に上昇させると, MCF 活性は食塩濃度 0.5 M 前後から溶出しはじめる。MCF 画分を anti-IgM-Sepharose に通して IgM を吸着除去することにより,

SDS-PAGE でほぼ単一のバンドを示す MCF 標品が得られる。収量は 10mg/300ml 血漿である。

## 実験結果

C4b 分解の経時変化： MCF の存在下で，C4b INA による C4b 分解を経

### A) SDS-PAGE ; 非還元



### B) SDS-PAGE ; 還元

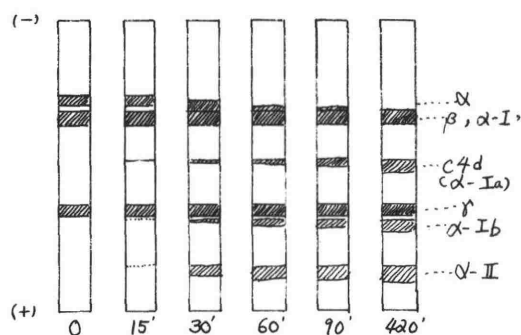


図1：SDS-PAGE を用いた C4b の分解反応の解析

時的に SDS-PAGE 法により解析した。

図1に示したように，非還元試料の SDS-PAGE では反応30分後から C4c (分子量 14.5万) と C4d (分子量 5万) のフラグメントが増加してくる。C4b のバンドは90分後でも濃く染色され，420分後になってほぼすべての C4b が C4c と C4d に分解された。一方，

同じ反応液を還元後 SDS-PAGE で分析したところ，非還元 SDS-PAGE では C4c，C4d の生成がほとんどみられない30分反応液では，すでにα鎖がほとんど消失し，新たにβ鎖と同じ分子量のバンド(α-I)と分子量1.8万のバンド(α-II)が検出された。反応がさらに進行すると，α-Iのバンドが消失するとともに C4d のバンド(α-Ia)と分子量2.8万のバンド(α-Ib)が増加してきた。この結果は，まず C4b と分子量の同じ C4b 誘導体，C4b'，が中間体として生成し，ついで C4c と C4d とに切断されることを示唆した。

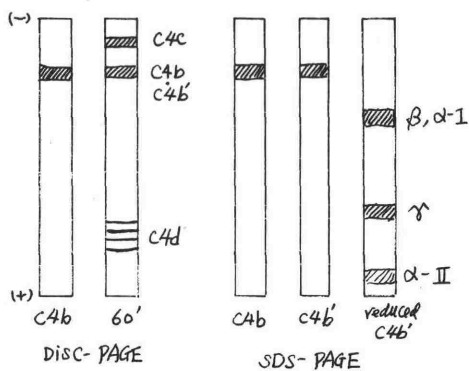


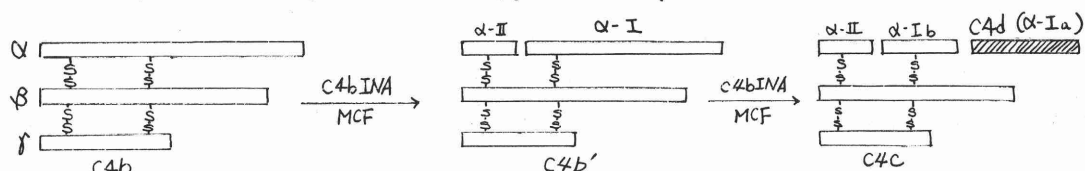
図2 C4b' の電気泳動図

### C4b' の分離

：新らしい C4b 誘導体の生成を確証し，ポリペプチド鎖構造を明らかにするため，C4b' の分離を試みた。上記の60分間反応液を Disc-PAGE にかき，C4b に相当するバンドを切断し，生理食塩水で抽出

れた(図2)。抽出液のSDS-PAGEでは分子量20万のバンドを示し、見かけ上C4bと分子量は変わらない。還元後SDS-PAGEすると、 $\beta$ 鎖、 $\alpha$ -I鎖、 $\gamma$ 鎖、 $\alpha$ -II鎖の四本のバンドに分離した。すなわち、C4bINAはMCFの存在下にC4bの $\alpha$ 鎖を分子量7.5万と1.8万とに切断するが、両フラグメントはジスルフィド結合で互いに、あるいは $\beta$ ,  $\gamma$ 鎖と結合しているため、C4bと分子量の変化がないものと考えられる。分離したC4b'はMCFの存在下でC4bINAによりC4cとC4dの2フラグメントに切断された。

以上の結果から、C4bの分解機構を下記の様に推定した。



C4cとC4dの分離: 上記の420分反応液を等電点電気泳動にかけると、pI 5.3のC4cとpI 4.0~4.6のC4dのピークに分離した。C4cはDisc-PAGEではC4bよりも陰極側に単一成分として泳動するが、C4dはアルブミン領域に約四本のバンドとして泳動した。最近、C4の genetic polymorphism が報告されているが、これはC4d構造領域の charge heterogeneity に起因する可能性が高いことを示唆している。

高分子コファクター(MCF)の蛋白化学的性質: MCFはSDS-PAGEでは、fibronectinと同じ泳動度を示し、分子量45万と推定される。Bio-gel A-15mでは約100万のピークとなることから、生理的条件下では2量体を形成しているものと考えられる。8M Urea-1% SDS中でメルカプトエタノールにより還元すると、C3の $\beta$ 鎖と同じ分子量のバンドを示すことから、分子量7.5万のポリ $\alpha$ ヘキソド鎖が六本ジスルフィド結合で結合した高分子蛋白と推定される。アミノ酸組成を表Iに示した。MCFはヘキソース3.5%, アミノ糖3.0%, シアル酸1.7%を含む糖蛋白質であり、Sephacrose-IEFを用いた等電点電気泳動法により等電点6.7と推定した。

表I MCFのアミノ酸組成(モル%)

Asp	7.93	Gly	7.84	Ile	4.15	His	2.58
Thr	5.62	Ala	3.96	Leu	5.99	Lys	5.25
Ser	7.28	1/2 Cys	4.89	Tyr	4.06	Arg	4.24
Glu	13.65	Val	5.07	Phe	3.41		
Pro	7.65	Met	0.74	Trp	5.62		

# 13. 「マウス C4-binding protein の精製」

九州大学第一外科臨床医局

甲斐詩一

ニユーヨーク大学病理

V. NASSENZWEIG, 藤田 誠三

(はじめに)

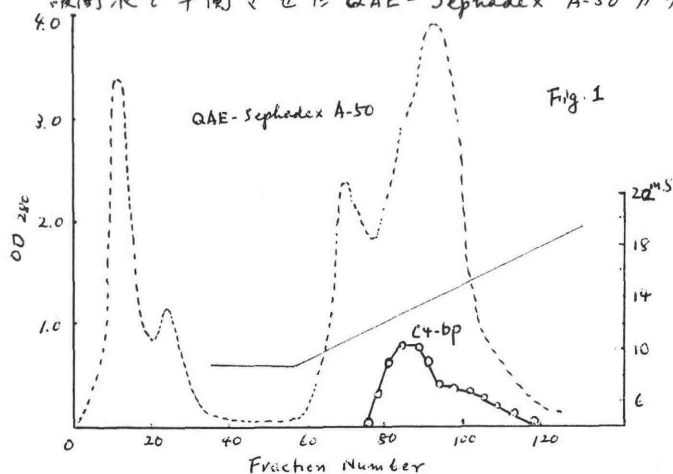
補体系を規制する因子の中で最近注目されているものの一つに C4-binding protein (C4-bp) がある。その作用に関してはまだ不明の部分が多いが、精製された本物質を得ることが、その解明に必要であると考えられる。我々はマウスの血清を用いて、ヒト C4b に結合するマウスの C4-bp の精製を試みたので報告する。

(材料および方法)

C4-bp の source として Ss-low strain である AKR/J マウスの雄の血清を用いた。各精製段階の C4-bp はウサギ抗マウス C4-bp 抗血清を含んだアカロース板 (5x5 cm) 上で Rocket immunoelectrophoresis (RIE) を行なって半定量的に検出した。

(C4-bp の精製)

雄 AKR/J マウスの血清 9 ml に、26% Polyethylene glycol (分子量 6,000, PEG) 45 ml を加え室温で 20 分攪拌した後、12,000 g で 30 分間遠心した。沈殿を 0.05 M リン酸緩衝液 (0.04 M NaCl, pH 8.25, i.s. 7.4 mS) に浮遊させ、同緩衝液で平衡させた QAE-Sephadex A-50 カラム (2x16 cm) に apply して



直線的食塩濃度勾配により分画した。C4-bp は 11 mS より溶出を始めた。(Fig. 1) C4-bp 活性部分を pool して上記の如く PEG にて沈澱濃縮した。

沈澱を 0.05 M 酢酸塩緩衝液 (0.05 M NaCl, pH 6.0, i.s. 7.0 mS) に溶解し、同緩衝液で平衡させた CM-Sephadex C-50 カラム (1x27 cm) に apply

して食塩濃度勾配により分画を行なった。C4-bp は 11 mS より溶出し始めた。(Fig. 2) C4-bp 活性部分を pool して上記のリン酸緩衝液に対して over night で透析した後、<sup>QAE-</sup>Sephadex A-50 カラム (1x15 cm) 分画をくり返した。



Fig. 2

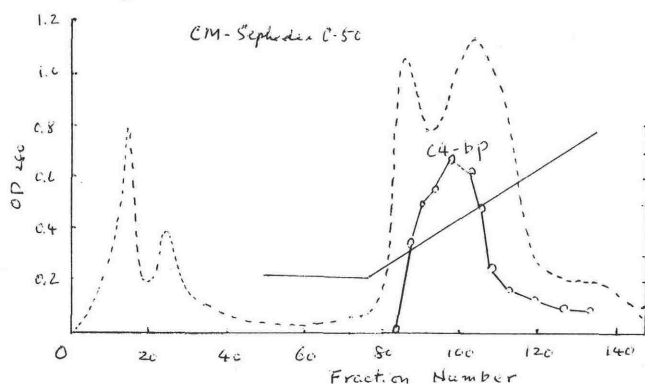
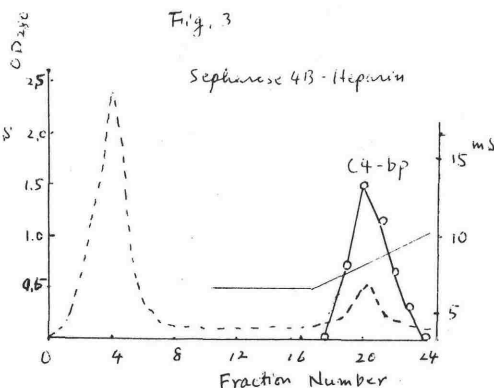


Fig. 3



C4-bp 活性分画を集めたリン酸緩衝液（上記と同じもの）で透析し、同緩衝液で平衡させた Sepharose 4B-Heparin カラム（ $0.4 \times 8$  m）に充填して食塩濃度勾配による分画を行なうと、単一の鋭利な蛋白 peak に一致して C4-bp 活性が見られた。<sup>(Fig. 3)</sup> O.D. 250 0.070 で収量は 7.7 ml であった。

本物質の分子量および純度を知らすために、7.5% の SDS-ポリアクリルアミドゲルによるスラブ型電気泳動（SDS-PAGE）を行なった。2-Mercaptoethanol により還元した条件下で 77,000 dalton に単一の主なる line を得た。RIE と SDS-PAGE との結果より我々は本物質をマウスの C4-bp と同定した。RIE の peak の高さによって C4-bp の活性を計測した結果、収率 4%, purification index 約 500 であった。

C4-bp の分子量を知らすために、更に次の二つの実験を行なった。① Immune precipitation, ② EDTA-plasma の Sepharose 6B ゲル濾過。

すなわち、①では<sup>125</sup>I でラベルした C4-bp と抗 C4-bp 血清 IgG 分画とを 10 分間水中で incubate して結合させた後、Staphylococcus A を加えてこの結合物を沈殿し、界面活性剤 NET-NP 40 および DOC により Staphylococcus A を取り除く処理を行ない、6M urea, 2% SDS で溶出させた sample を 7.5% SDS-PAGE にかける。染色・乾燥させた後 Radioautography を行なった。還元した条件下で 70,000 dalton の部に単一の line を得た。

② マウスの EDTA-plasma を Sepharose 6B カラムによるゲル濾過を行ない、既知のマウス蛋白 IgM, IgG, C3, アルブミンをマーカーにして分子量を計測すると約 96,000 であった。

以上の結果よりマウスの C4-bp は、分子量 70,000 ないし 77,000 dalton の蛋白が S-S 鎖により互いに結合したポリマーであると考えられる。

(C4-bpのヒトC4bに対する binding activity)

① fluid phase における結合

ヒトC4bを一次元では200Vで電気泳動し、二次元には抗C4-bp抗血清を含むアガロース板上に免疫電気泳動させる crossed immunoelectrophoresis (CIE) により電気泳動度を見ると、コントロールに置いたヒトtransferrinよりやや速いβ領域にある。一方、精製したC4-bpと37°Cで30分間 incubate すると、C4bのピークは original の泳動度より明きかに速い領域へ移動した。また<sup>125</sup>IでラベルしたC4-bpをC4bとともに incubate して、抗C4b抗血清に対する RIE, CIE を行ない、Radioautography を行なって C4-bp の存在を見てみると、RIE, CIE における C4b のピークに全く一致した。これらの結果から、C4-bp は C4b と fluid phase において結合すると考えられる。

② cell-bound C4b に対する C4-bp の結合

ヒツジ赤血球(E)をウサギの抗Eヘモリジン抗体で感作させ(EA), ヒトC1, C4 をそれぞれ400, 100 effective molecular site 結合させた EAC14 cell を作製した。1×10<sup>9</sup>/ml に調整した EAC14 100 μl に10 μl の<sup>125</sup>I-C4-bp を加えて37°Cで90分間 incubate した後、3回遠心洗滌をくり返し、沈澱をガンマカウンターで測定した。EAC14群はEA, EAC1のコントロール群より<sup>125</sup>I-C4-bpの取り込みが明きかに高かった(p<0.05)。C4のsite数を減少させると<sup>125</sup>I-C4-bpの取り込みも減少した。一方、C4 siteは上記の通りにして、異なったC3 site数をもつEAC143 cell を作製して同様の実験を行なったが、<sup>125</sup>I-C4-bpの取り込みはC3のsite数に影響されなかった。更には、抗C4-bp抗血清を<sup>125</sup>I-C4-bpと incubate した後、EAC14と incubate すると、著明な<sup>125</sup>I-C4-bp取り込み抑制効果のあることが判明した。以上の結果より<sup>125</sup>I-C4-bpはcell-bound C4bに特異的に結合することが示唆された。この結合反応は温度依存性があり、37°Cでは結合するが0°Cでは結合しない。また、C4-bpを56°Cで30分加熱してもその結合に影響を及ぼさないことが解っている。

更に我々は、cell-bound C4bに結合したC4-bpが、C4bの溶血活性を抑制するかどうかについて検討したが、AKR/J マウス血清では著明な抑制作用が見られたにも拘らず、C4-bpにはその作用のないことがわかった。

14. Cell-bound C3b の構造変化と活性

大阪府立成人病センター 飯田恭子 永木和義 箱井真弥

従来、cell-bound C3b は、C3bINA の作用を受け、C3c と C3d に切断され、C3c を遊離して、cell 上に残った C3d は、溶血活性を示さず、ウシ血清中の *conglutinin* と反応するとされていた。長沢らによって *fluid phase* における C3 分解が、C3bINA と cofactor, *plasmin* による *step* の反応であることが明らかにされ、cell-bound C3 の分解にも疑問が持たれた。一方、Linscott らによって *conglutinin* との反応性は、C3b から C3d への分解途中の *step* で出現することが示唆された。

今回、単離した補体成分、 $\beta_1H$ , C3bINA, *plasmin* を用いて、C3 分子の cell からの遊離とその溶血活性、*conglutinin* との反応性、I.A. 活性について検討したので報告する。

《方法》

*conglutinin* はウシ血清より、Zymosan 吸着、酸性沈殿、DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィー、および Sepharose 6B ゲル濾過で分離した。*conglutinin* 活性の測定は、Linscott の方法に従い、 $2.5 \times 10^7$  の cell を希釈した *conglutinin* 0.5 ml に suspend し、 $37^\circ C$  30' 反応後、 $0^\circ C$  - overnight 放置し、軽く凝集をほぐし、その 20  $\mu$ l を PBS 10 ml に取る。Coulter Counter を lower threshold 10, upper threshold 30 に設定して凝集していない cell を count する。*conglutinin* を加えない control の count から凝集 % を求めた。

《結果》

- 1) EA に単離補体成分を順次作用させて各種の *intermediate cell* を作成しその *conglutinin* との反応性を測定した。
- 表 1 に示すように EAC1423b までの各 cell は、反応性を全く持たず、これに  $\beta_1H$  および C3bINA を作用させた cell (EAC1423k cell) のみが反応性を持つ。
- 2)  $\beta_1H$  と C3bINA を変量して作成した EAC1-3k cell の *conglutination*, hemolytic, I.A. activity を見ると、高い dose では、*conglutinin* との反応性が増し、溶血活性、I.A. 活性を失って行く。
- 3) EAC1-3k cell にさらに *plasmin* を作用させると、*conglutinin* との

Table 1

Cells	Conglutination (%)
EAC14	0
EAC142	0
EAC1423b	0
EAC1423k	85

反応性は、全く失くなる。

4)  $^{125}\text{I}$  でラベルした C3 を EAC1-3b cell を作成し、C3 の遊離を観察した。

Table 2

Treatment		$^{125}\text{I}$ -C3			Conglutination (%)	Hemolytic activity (Z)
1st step	2nd step	released (%)		remained (%) on cells		
		1st step	2nd step			
buffer	buffer	5	5	90	0	> 5
buffer	plasmin	5	24	71	0	> 5
$\beta$ 1H	buffer	3	6	91	0	> 5
$\beta$ 1H	plasmin	8	19	74	0	> 5
C3bINA	buffer	7	9	84	0	> 5
C3bINA	plasmin	9	30	61	0	> 5
$\beta$ 1H+C3bINA	buffer	16	4	80	90	0.60
$\beta$ 1H+C3bINA	plasmin	18	67	15	0	0.17

表2で示すように、第1 step で  $\beta$ 1H と C3bINA の作用を受けると control の 5% に比べ、17% の C3 が遊離する。第2 step で plasmin を作用させると、67% の C3 が遊離して、cell 上には、15% の C3 が残った。

5) plasmin の作用を経時的に測定した。

図1に示す通り、EAC1-3k cell では10分で73%のC3が遊離し、85%がプラトーであった。EAC1-3b cell から、ゆっくりとC3の遊離が起こる。この各点の cell で、conglutinin との反応性を測定したところ、EAC1-3k cell に buffer を作用させた cell、すなわち EAC1-3k のみに反応性があった。

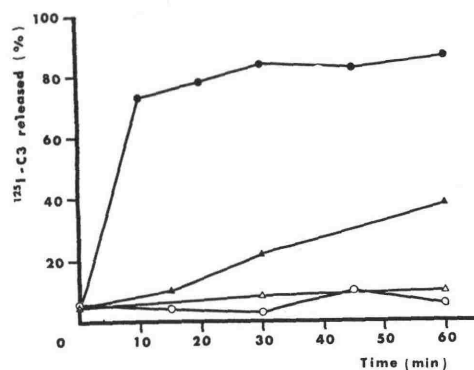


Figure 1

● EAC1-3k + plasmin  
○ EAC1-3k + buffer  
▲ EAC1-3b + plasmin  
△ EAC1-3b + buffer

((考察))

cell-bound C3b は、 $\beta$ 1H と C3bINA の作用で、C3k となる。C3k は、溶血活性を持たず、conglutinin との反応性を持つ。この C3k には、もはや、 $\beta$ 1H は、結合できない (Nagaki et al., IAAAI, 1978)。C3k は、分子内部鎖間 S-S 結合で、つながっているが、立体的には、全く元の C3b とは異

つた構造を取っていると考えられる。

plasmin は、C3b を分解する。C3k は、この plasmin の作用を非常に受けやすい構造に変化しており、速やかに分解される。cell 上に残る C3 は、15% を越えないことから、C3b の 15% に相当する大きさの fragment が cell に残ると考えられる。C3b の分子量を 18 万とすると、残った fragment の大きさは、2.7 万と計算され、C3d の分子量とよく一致する。

すなわち、plasmin の作用を受けて、初めて C3c と C3d に分解される。C3d は、conglutinin との反応性を失くしている。

15.

補作. alternative pathway の活性化を制御する低分子物質  
(low molecular weight inactivator, LMW-INA) のヒト尿か  
らの分離とその作用様式について

大阪府立成人病センター 永木和義

松本美佐子 北野悦子 稲井真珠

昨年のシンポジウムで我々は血清中に存在する低分子の補作系の制御物質についてその分離方法と一部性質について報告した。この物質の分子量は 1,000 ~ 10,000 と推定していたので尿中にも排泄されているものと考え、今回は LMW-INA をヒト尿より分離したのがその方法と作用様式について報告する。

(材料と方法) Cobra venom factor, B, D, PIH, C3bINA およびその他の溶血系の reagent, EA, EAC43 cell 等はいずれも所定量で精製または調製した。Sephadex G-25, G-15, QAE Sephadex A-25, DEAE cellulose (Whatman DE 32) はそれぞれの使用法に従って用いた。濃縮には Amicon の Diaflo membrane UM 20 (分画分子量 20,000) および UM 2 (分画分子量 1,000) を用いた。LMW-INA の精製途中の活性の指標には C3bF-B 形成の疎密を用いた。

(結果)

1. LMW-INA のヒト尿よりの分離 10名の健康人より尿 2l を集め直ちに sodium azide, PMSF, EACA および EDTA を加えてグラスフアイバー・フラスコ (東洋利発 GA 200) で有機成分を除いたのを UM 20 を通過させ UM 2 で濃縮した。この濃縮尿を出発材料として Sephadex G-25, DE 32, G-15, QAE Sephadex A-25 (Fig. 1 ~ 4) で分画、最後に G-15 を用いて脱塩した。収量は約 90 mg,  $E'_{280nm} = 0.05$ ,  $E'_{230nm} = 13$  であった。アミノ酸分析では asparagine のみを全重量の 10% 以下で証明した。また carbohydrate はフェノール硫酸法で 0.1% 以下であった。分子量は UM 20 を通過し UM 2 で濃縮されたこと、ゲル透過で MW 14,500 の Bactracin より稍おくれで溶出されたことから 1,000 ~ 1,400 と推定した。また LMW-INA の活性は熱に安定 (56°C, 30分) であった。

2. 作用様式

a. EAC43 cell (1x10<sup>8</sup>/ml) に等量の B (30 µg/ml) D (66 µg/ml) を加えて 37°C で反応、珪肉毎に一部を汲み出して C3bB 活性を測定すると (Fig. 5), LMW-INA (1 mg/ml) の存在下 (●—●) では対照 (○—○) に比べてその形成が少くかつ decay が早い。また 25°C に於ける EAC43B の decay は  $T_{1/2} = 12.4$  分であった。LMW-INA が 1 mg/ml または 1.6 mg/ml 存在すると  $T_{1/2}$  は

れぞれ 9.1 および 7.5 分と短くなった。

b. Zymosan にヒト血清を 0.2 ml/mg zymosan の 37°C 7.5 分反応すると Zymosan 上に C3 convertase が形成された (ZX)。しかし LMW-INA は ZX 形成を妨げる。また ZX から B を decay させた ZX<sup>d</sup> に B, D を加えて再び ZX を形成するときにも LMW-INA は作用して ZX の regeneration を妨げる (Fig. 6)。

c. LMW-INA は β14 とことなり C3bB の形成を抑制する。Fig. 7 に示す様に C3, B, D, または C3b に LMW-INA を加えて 37°C 7.5 分 (1) 反応後透析して LMW-INA を除いてそれぞれの活性を測定してもこれは LMW-INA の作用を受けていない。また C3bB 複合体の形成および形成された C3bB にも LMW-INA は影響しない。しかし C3b と B を 37°C 7.5 分 (1) 反応後に D と LMW-INA を同時に加えた場合、または C3bB に LMW-INA を加えた時に C3bB 活性は減少する。この実験に用いた C3 は 100 μg, D は 17 μg, B は 2.4 μg, C3b は 5.4 μg, LMW-INA は 300 μg である。

d. LMW-INA が C3b 上の B の receptor に作用してどうかを確かめるために次の実験をおこなった。C3 を 80/cell (●.....●), 200/cell (○—○) および 1,500/cell (△—△) 加えた 3 種の EAC43 cell を作り (Fig. 8), それぞれ  $1 \times 10^8$ /ml の cell 当たり等量の B を 5 μg/ml, 700 μg/ml, 100 μg/ml の濃度のものを加えさらに一定量の D (66 μg/ml) を反応させて 3 種類の EAC43bB cell を作製。これ等 3 種の cell 上の C3bB の site 数はそれぞれ 0.66, 0.64, 0.62 とほぼ等しい。これらの cell を作る時に LMW-INA が存在すると C3bB 形成は抑制されるかという疑問は 3 種の cell 共にほぼ等しい。このことは LMW-INA は C3b 上の B receptor に作用せず C3b と B の結合したあとで D により活性化された際に作用してゐることを示してゐるものと推定してゐる。

(総論)

我々はヒト原より分子量 1,000 ~ 1,400 の alternative pathway の活性化の制御に働く物質を発見した。その構造はまだ不明である。

この物質は C3bB (C3bB) の形成を妨げる。その活性化を抑制し、また C3bB の decay を促進する。

Fig.1

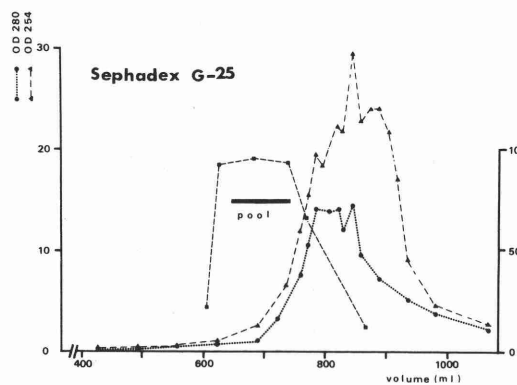


Fig.2

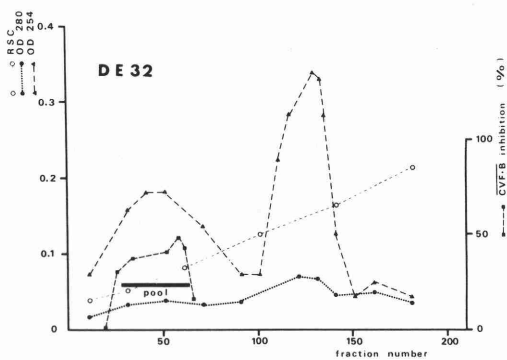


Fig.3

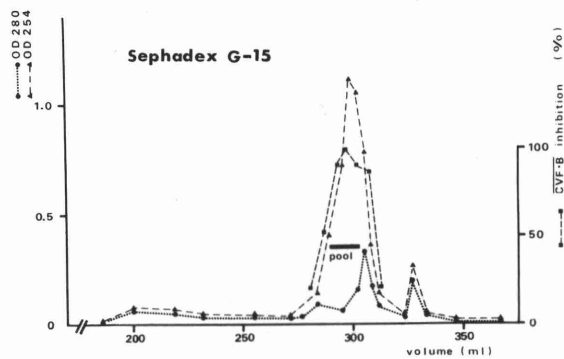


Fig.4

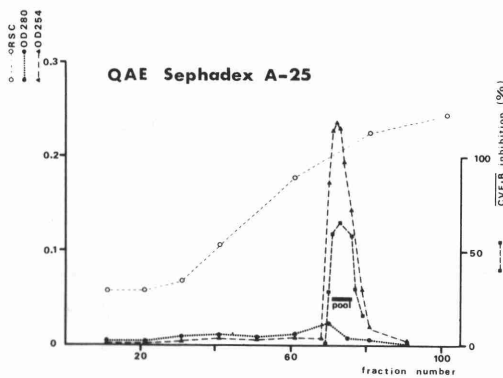


Fig.5

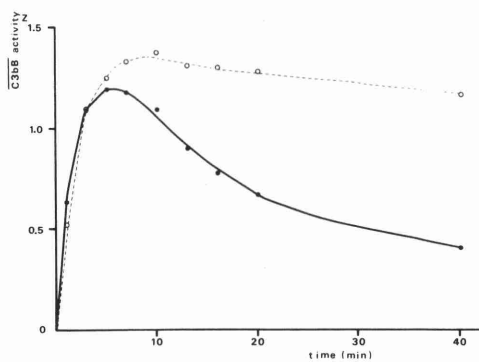




Fig.6

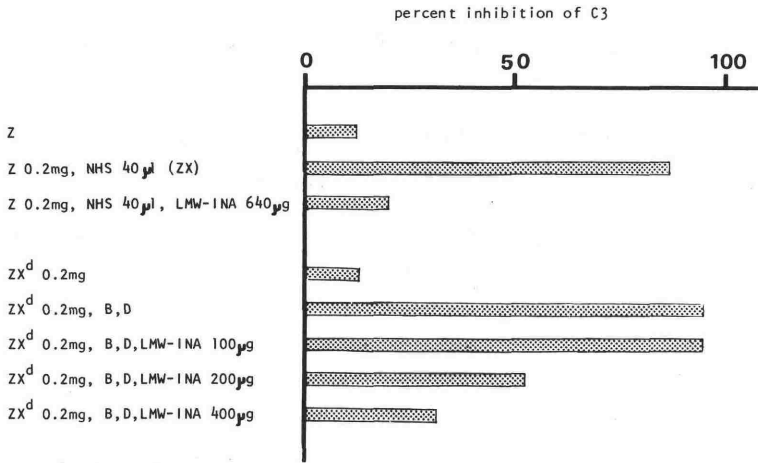


Fig.7

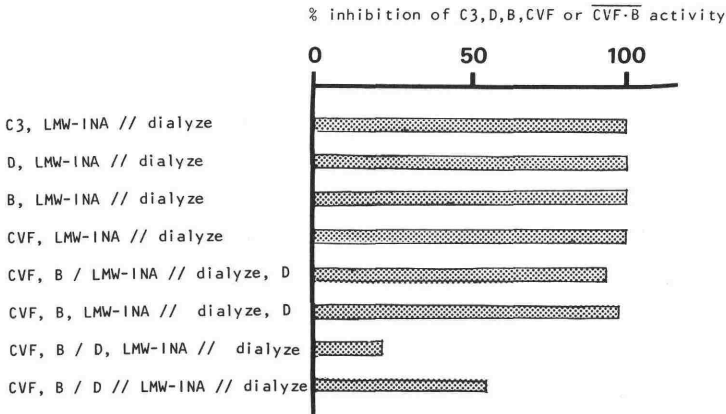
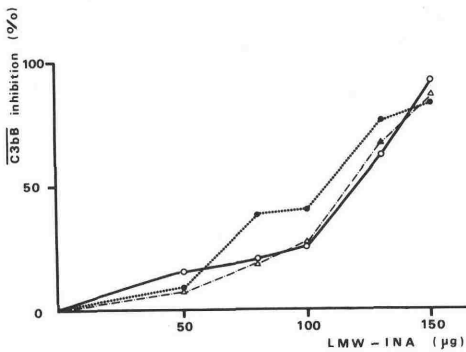


Fig.8



大阪府立成人病センター 北村 肇、稻井真弥

私達が発見したヒト補体カ9成分欠損症(C9D)の血清補体価(CH50)は17.1単位 $\pm$ (NHS 41.6単位)。C9の抗原性や溶血活性が検出不能であったにもか、わらずそれほど低値を示さなかった。この原因を追求するために種々の実験を行い、以下の興味ある知見を得た。

### 1. 種々のbuffer中におけるC9D血清のCH50

Table 1 に示すごとく C9D の CH50 は 通常の *gelatin veronal buffer* (GVB) 中の値に比し、低い $\times$ 強度の *glucose gelatin veronal buffer* (GGVB) *i.s.* = 0.075) や *sucrose gelatin veronal buffer* (SGVB, *i.s.* = 0.075) では低値を示した。又、同時に測定した NHS の CH50 は GGVB 中が高く、SGVB 中の値はほぼ GVB 中の値に同じであった。

### 2. C9D血清によるEAC1-8形成

種々のbuffer中でのEAとC9D血清を反応させ、洗滌後GGVBに浮遊、過剰のC9を加えた後溶血を測定することにより、2 EA上にできたC8 site数を比較した。Figure 1に示すごとくC8 siteの数はGGVB>SGVB>GVBとなり、C8 siteは低い $\times$ 強度bufferにおいてむしろ効率良く作られることが判明した。このことはEAとC9D血清によるEAC1-8の溶血(C9が起きる、いわゆるEAC1-8のspontaneous lysis)がbufferにより大きく異なることを示唆する。

以下の実験は精製した補体成分で作ったEAC1-7やEAC1-8およびC8, C9を用いて行った。

### 3. 種々のbuffer中におけるEAC1-8のspont. lysis

EAC1-7と変量したC8を反応させ、C8 site数の異なる3種のEAC1-8を作製し、GVB, GGVBあるいはSGVBに浮遊させ、溶血をみた(Figure 2)。EAC1-8の溶血はC8量に比例して高くなること、やbufferにより大きく異なり、GVB>GGVB>SGVBとなることが判明した。

### 4. EAC1-8作製時のbufferについて

EAC1-7とC8をGVB, GGVBあるいはSGVB中で反応させ、できたEAC1-8を再び3種のbufferのいずれかに浮遊させ、溶血を測定した。Table 2に示すごとくEAC1-8の溶血は、EAC1-8作製時のbufferには関係なく、浮遊させるbufferにより影響をうけることが判明した。

## 5. 各種の糖を含む低イオン強度 buffer

単糖類から四糖類まで計 16 種の糖を用い、final 0.094M の各々の糖を含む pH 7.4, i.s. = 0.10 の等張ペロナル buffer を作製した。NHS の CH50 をこれらの buffer 中で測定すると、GVB 中で 40.0 単位のと、単糖類入り buffer 中ではいずれも 44.5 ~ 47.8 単位と高く、二糖類では 38.2 ~ 41.3 単位では GVB と同じ、三~四糖類では 35.1 ~ 37.9 単位と低値を示した。また EACI-8 をこれらの buffer に浮遊させ、溶血を測定すると (Figure 3)、いずれの糖も溶血を抑えることが明らかにた。その抑制力は単糖類より多糖類の方が強かった。また ribose, glucose, sucrose および raffinose を用い、糖の濃度を変えて buffer を作り、EACI-8 の溶血をみた実験より、いずれも糖濃度の高いほど溶血を抑えることが判明した。

次にこれらの buffer 中における EACI-8 の spont. lysis の抑制機構の解析を試みた。すなわち、上記の各種の糖を含む等張 buffer は、糖の濃度に応じてイオン強度も低いため、EACI-8 の溶血抑制は糖自体の作用であるのか、低イオン強度の作用であるのか明らかでない。この点に注目して、以下の 2 つの実験を行った。

## 6. 糖以外の試薬による低イオン強度 buffer

糖のかわりに urea, ethylene glycol (EG) あるいは tri-ethylene glycol (TEG) を用いて i.s. = 0.10 の buffer を作り、EACI-8 の溶血をみた。

Figure 3 に見られるごとく、これらの低イオン強度 buffer 中では EACI-8 の溶血の抑制は全く見られなかった。

## 7. GVB への糖の添加

GVB に較べて微量の glucose または sucrose を加えた buffer (浸透圧は上昇するがイオン強度は不変) 中における EACI-8 の溶血を測定すると、溶血は糖を添加することによって明らかに減少した。糖の代りに対象として用いた NaCl や EG では GVB 中の溶血度とほぼ同じであった。これらのことから EACI-8 の溶血を抑えるのは糖の作用であることがわかる。

## 結論

- i) C9D 血清中の CH50 値は低イオン強度 buffer 中では低値である。
- ii) その原因は EA と C9D 血清によってできた EACI-8 の溶血が低イオン強度 buffer 中では抑えられるからである。
- iii) 低イオン強度 buffer 中では EACI-8 の spont. lysis が抑えられるのはイオン強度の作用ではなく、buffer 中に含まれた糖の作用である。

iv) 糖による EAC1-8 の溶血抑制力は糖の種類により差があり、多糖類の方が単糖類より効果的であった。

Table 1.

BUFFERS	CH50 TITER OF		
	C9D	C9D + C9	NHS
GVB	17.1	39.8	41.6
GGVB	8.8	52.4	58.0
SGVB	<5.0	42.9	38.6

Table 2.

PREPARATION OF EAC1-8 IN	% HEMOLYSIS OF EAC1-8 IN		
	GVB	GGVB	SGVB
GVB	46.4	4.4	4.2
GGVB	50.6	4.2	4.0
SGVB	40.0	3.4	1.0

Fig. 1

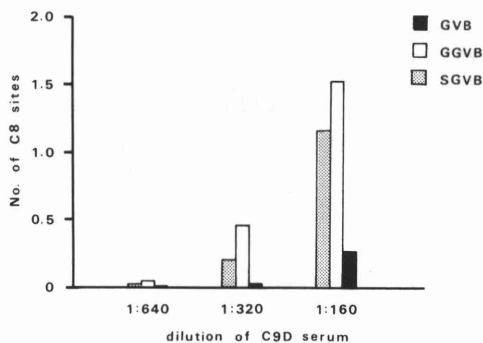


Fig. 3

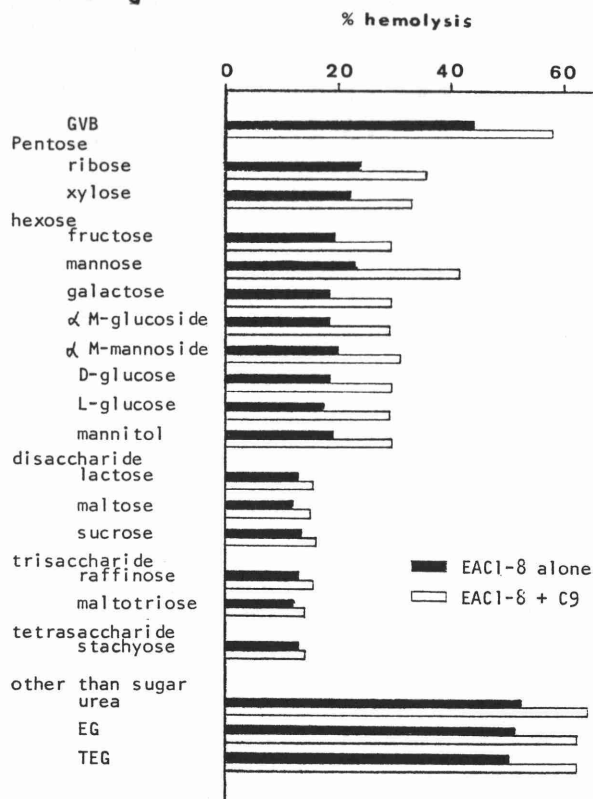
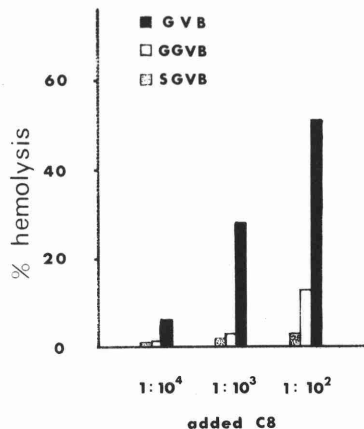


Fig. 2



木下タロウ, 洪 卿秀, 井上公藏 (阪大, 医, 細菌)

### 目的

モルモット補体血清を Zymosan で活性化した時, 反応液中に EAC-8 を溶血する活性即ち C9 の活性を示す巨大分子が形成される。この活性物質を部分精製した所, Kolb & Müller-Eberhard (J. Exp. Med. 138: 438, 1973) がヒト補体で報告した SC5b-9 に相当する複合体である事が判明した。今回は, このモルモット SC5b-9 による EAC-8 の溶血の機序を明らかにすべく実験を行なったので報告する。

### 方法

・SC5b-9 の形成と部分精製: Tamura & Shimada (Immunology 20: 415, 1971) の方法に準じて精製した C9 をラクトパーオキシダーゼ法で  $^{125}\text{I}$  ラベルし, これを補体血清に混ぜた後,  $10\text{ mg/ml}$  の Zymosan で  $37^\circ\text{C}$ , 60 分間活性化した。反応後遠心し, 上清を, セファデックス G200, セファロス 4B, ショ糖密度勾配遠心 ( $10\% \text{ } \gamma - 40\% \text{ } \gamma$ ) で順次分画し, SC5b-9 を精製した。SC5b-9 は, 高分子画分に取り込まれた  $^{125}\text{I}$  C9 のカウントと, C9 溶血活性で追跡した。ゲル透過, ショ糖密度勾配遠心は, すべて  $1\text{ mM EDTA-TBS}$  ( $5\text{ mM Tris HCl}$ ,  $\text{pH } 7.5$ ,  $0.145\text{ M NaCl}$ ,  $1\text{ mM EDTA}$ ) 中を行なった。

・C9 溶血活性の測定: EAC-7 ( $2 \times 10^7$  cells), C8 (25 effective molecules/cell) と被検液, あるいは, EAC-8 ( $2 \times 10^7$  cells) と被検液を全量  $1\text{ ml}$  になるように EDTA-GVB 中で混ぜ,  $37^\circ\text{C}$  で 60 分間反応後溶血率を測定した。SC5b-9 精製の過程では, 同様の条件下, マイクロタイター法で測定した。EAC-7 は, C5 を特異的に阻害する抗補体剤 K76COOH (Hong et al. J. Immunol. 122: 2418, 1979) を用いて作製した EACI-3 (洪 卿秀ほか, 本シンポジウムにて発表) に, 精製した C2, C5, C6, C7 を順次反応させて作製した。EAC-8 は, EAC-7 に精製した C8 を反応させて得た。

### 結果

$^{125}\text{I}$  C9 を含んだモルモット補体を, Zymosan で活性化した後 ショ糖密度勾配遠心を行うと, free の C9 のほかに, 重い画分に C9 溶血活性と  $^{125}\text{I}$  のカウントが回収され alternative pathway の活性化に伴って, 反応液中に C9 活性を示す巨大分子の形成される事がわかる (図 1)。この活性物質を, セファデックス G200 (図 2), セファロス 4B (図 3), ショ糖密度勾配遠心で分画した。得られた画分は, Ouchterlony 法で, 抗 C3 には沈降線を形成せず, 抗 C5 と抗 C9 に対

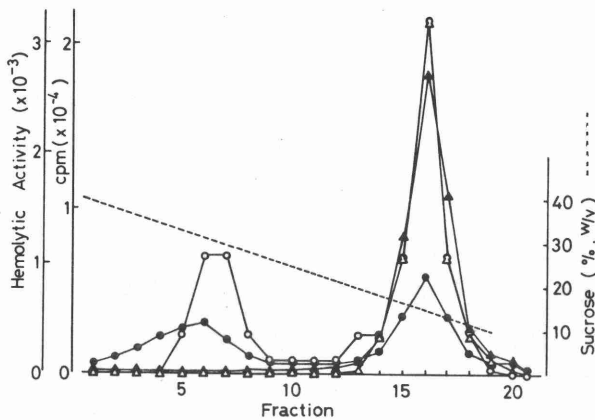


図1, ショ糖密度勾配遠心

○, ● Zymosan 処理 gpc-<sup>125</sup>IC9  
 △, ▲ gpc-<sup>125</sup>IC9  
 ○, △ 溶血活性 ●, ▲, cpm

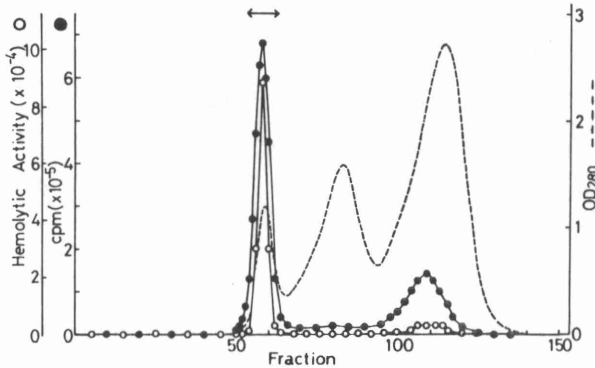


図2, セファックス G200.

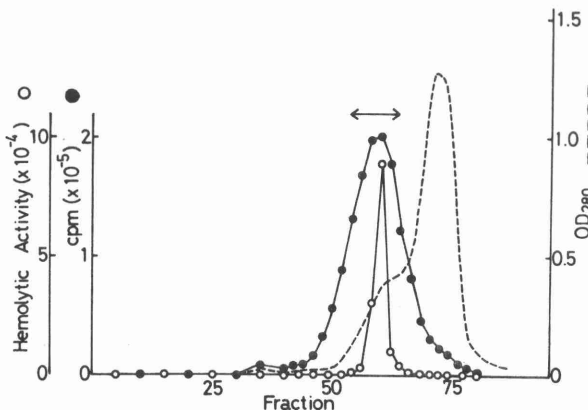


図3, セファロース4B.

して互いに fuse する一本の沈降線を形成した。オートラジオグラフィーの結果, 抗C5による沈降線にもC9が取り込まれていた。この沈降線を, 精製したC5と抗C5, C9と抗C9の沈降線に合わせると, どちらも精製した成分による沈降線から spur が形成された。免疫電気泳動で, 抗モルモット全血清に対しては2本の沈降線が現われたが, α領域の沈降線にのみC9が取り込まれており, β領域の沈降線は不純物であると考えられた。ゲルにEAC-7とC8を重層するとα領域の沈降線に相当する所でのみ溶血が起り, 溶血斑は, 最初抗C9, 抗C5による沈降線とともに阻止されるが, 数時間後には抗C5による沈降線を越えて広がった。これらの事から, 活性物質はモルモットのSC5b-9であると考えられた。SDSPAGEで解析すると, ヒトSC5b-9とよく似たパターンであり, C5b, C6, C7, C8の各1分もあつと, 3分子のC9が含まれていると計算されたが, さらにヒトのS proteinに相当すると思われる成分が1分子含まれていると計算された。

SC5b-9のEAC-8に対する溶血反応は, kinetics, dose

response curve : ともにC9による

反応と区別できなかった。またこの反応は、抗C9によって阻害され、これは1分の抗C9で充分であったが、抗C5では全く阻害が起らなかった(図4)。

SC5b-9をEからEAC-8までのすべての intermediate cellに加えて所、EAC-8だけが溶血した。さらに各 intermediate cellと精製成分を用いてSC5b-9の活性を測定すると、確かにC7としての活性を示したが、C9としての活性に比べると100分の1以下であった(表1)。

ヒト血清を10mg/mlのZymosanで活性化した後、ショ糖密度勾配遠心を行なったが、C9活性を示す巨大分子は形成されておらず、SC5b-9の位置に相当する画分に、C9阻害活性が認められ、Kolb & Müller-Eberhardの報告と一致した。

結論

モルモットSC5b-9がC9活性を持っている事が明らかになり、膜障害に関して不活性であると考えられてきた液相中で進む反応が、少なくともモルモット補体においてはそうではないと考えられる。液相中で形成される後期反応成分複合体が膜上のC5b-8 siteに反応し得るのであるから、免疫溶血反応を、膜上で進む反応だけでとらえる事は片手落ちであると言わなければならない。SC5b-9が、複合体全体としてのC5b-8 siteに反応するのか、C9だけが転移するのかを明らかにする事が、この溶血反応の機序を解明する鍵であるので、現在、C5とC9をそれぞれ<sup>125</sup>Iと<sup>131</sup>Iで別々にラベルしてそれらを含んだSC5b-9を形成し、intermediate cellへの吸着を検討しつつある。

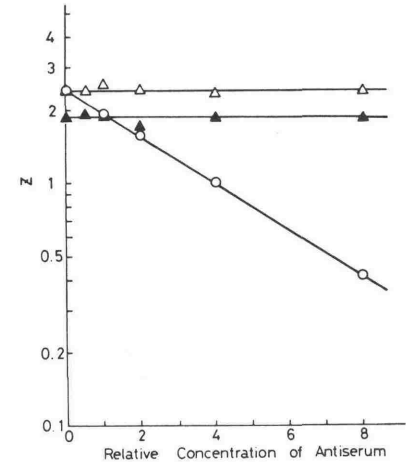


図4, O, 抗C9, Δ, 抗C5+  
EAC-8    ▲, 抗C5+抗C5処理EAC-8

TABLE 1 Reactivity of guinea pig SC5b-9 as complement component

Intermediate cell <sup>a)</sup>	Per cent lysis	
	With SC5b-9 <sup>b)</sup>	With SC5b-9 <sup>b)</sup> + reagent described <sup>c)</sup>
E	0	-
EA	0	0.3 (C4/C2/C-EDTA)
EAC $\bar{1}$	0	0 (C2/C-EDTA)
EAC $\bar{1}$ , 4b	0	0 (C-EDTA)
EAC $\bar{1}$ , 4b, 2a	0	0 (C5-C9)
EAC $\bar{1}$ , 4b, 2a, 3b	0	1.1 (C6-C9)
EAC1-5b	0	0 (C7-C9)
EAC1-6	0	45.1 (C8+C9)
EAC1-7	0	0 (C9)
EAC1-8	92.5	-

a)  $2 \times 10^7$  cells/ml in reaction mixtures after all the reagents were added.  
b) SC5b-9 complex was used at 100 times the amount for 63% lysis of EAC1-8.  
c) Bars indicate successive additions of reagents.

丸 善 化 成 働 吉 田 正 也

浜松医大第2生理 高 田 明 和

補体系抑制物質には，生理的抑制物質及び薬理的抑制物質がある。このうち薬理的抑制物質とは，*in vitro*, *in vivo* において補体系に加えられ，抑制作用を示すものを言うが，その中で各種アミノ酸及びその誘導体の補体抑制作用や，抗線溶物質の補体抑制作用については種々の報告<sup>1),2)</sup>があり，その作用機構や条件等についても検討されてきている。

一方グリチルリチンは，甘草より抽出され，ステロイド様骨格を持つグリチルレチンと2つのグルクロン酸よりなっており，ステロイド類似の作用や抗線溶作用を持つなど多元的な作用を示すが，その補体抑制作用についてはこの補体シンポジウムでも報告<sup>2)</sup>されている。

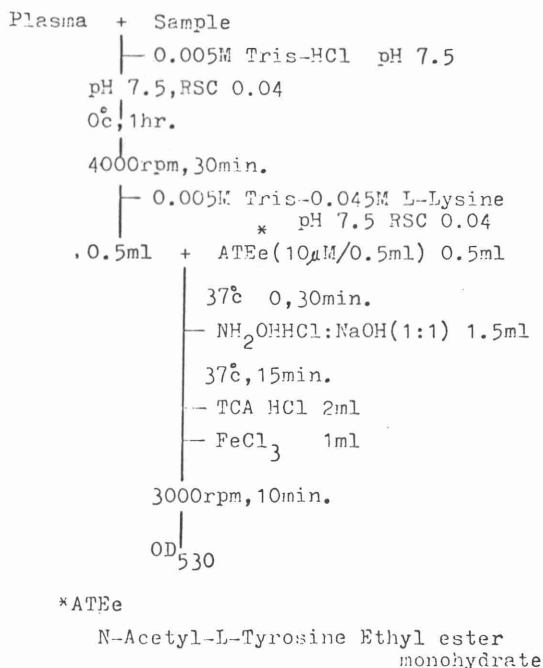
また補体系は，各種補体成分により構成されているがそのうちの補体第1成分C1の活性化の抑制については，Taylor and Fudenberg,<sup>3)</sup> Haines and Lepow,<sup>4)</sup> Tamura and Nelson<sup>5)</sup>らにより報告されており，Sakai and Stroud<sup>6)</sup>は血漿をeu-globulinにする際，0.06M L-Lysineを加えるとC1s→C1s̄が抑制されC1sが得られることを報告している。

今回我々はC1s̄のN-acetyl-L-tyrosine ethyl ester (ATEe)の水解活性により，L-Lysine類似物質グリチルリチン関連物質及びテストステロンのC1sの活性化阻害を調べ興味ある知見を得たので報告する。

#### 実験材料及び方法

試料は t-AMCHA. cis-AMCHA. EACA. Citruline. Arginine, Norleucine L-Lysine. Ornithine. Cysteine. Glycyrrhetic acid. Dipotassium glycyrrhizinate, Mono ammonium

Fig.1 Measurement of C1s





glycyrrhizinate. Glycyrrhetic acid hydrogen succinate. Testosterone を用いた。操作は次の通りである。正常ヒト plasma を 3000 rpm. 10 min. 遠心分離し、その上澄 6 ml に各試料 0.67 ml を加える。次に 0.005 M Tris HCl pH7.5 RSC 0.04 で調整し、0°C, 1 hr 静置して 4000 rpm. 30 min. 遠心分離を行なった。残査を 0.005 M Tris. HCl -0.045 M-L-Lysine pH7.5 RSC 0.04, 1.2 ml で溶解せた後、生成した C1s に ATEe を加え、Hesterin 法に従って ATEe 水解能を調べ、抑制率を求めた。

実験結果

1) L-Lysine 類似物質

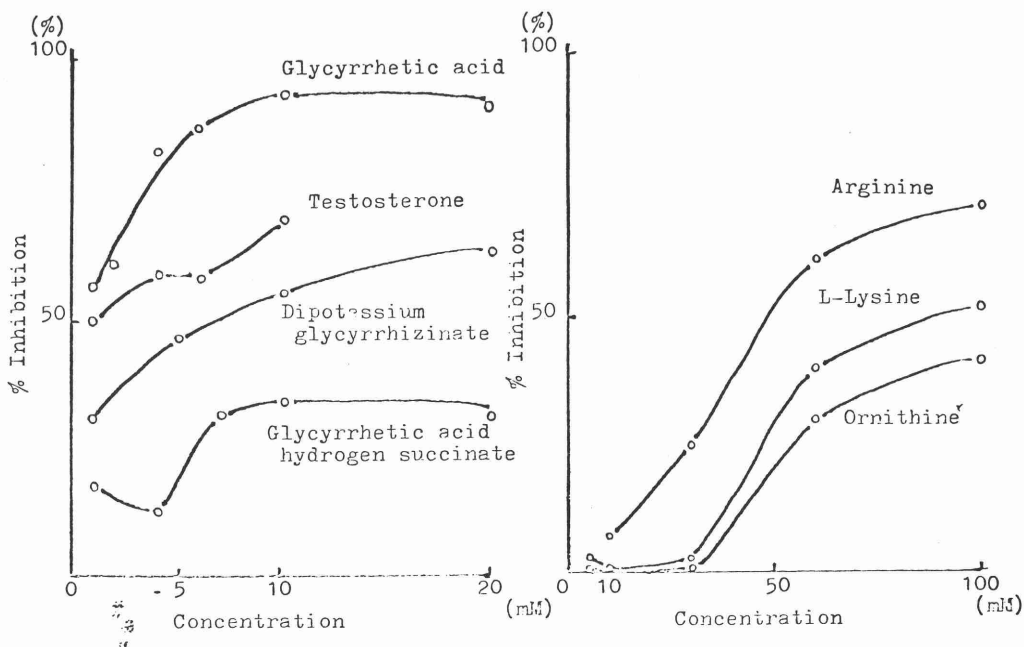
抑制が認められたのは、L-Lysine. Arginine. Ornithine であった。抑制率は最終濃度 0.06 M で 30~55% で濃度が増すにつれて抑制率も高くなったが、0.06~0.1 M でほぼ一定の値となり、それ以上濃度を増しても抑制率は変わらなかった。

2) グリチルリチン関連物質

Glycyrrhetic acid. Dipotassium glycyrrhizinate. Glycyrrhetic acid hydrogen succinate. Testosterone に抑制が認められた。しかし Monoanmonium glycyrrhizinate についてはエタノールで溶解した場合、抑制を認めずアセトン、ジオキサンで弱い抑制が認められた。

また抑制率では 0.01 M で 30~90% であり、Glycyrrhetic acid は、強い抑制を示した。抑制率の傾向は、L-Lysine 系と同じ動きを示した。

Fig.2 % Inhibition of the activation of C1s



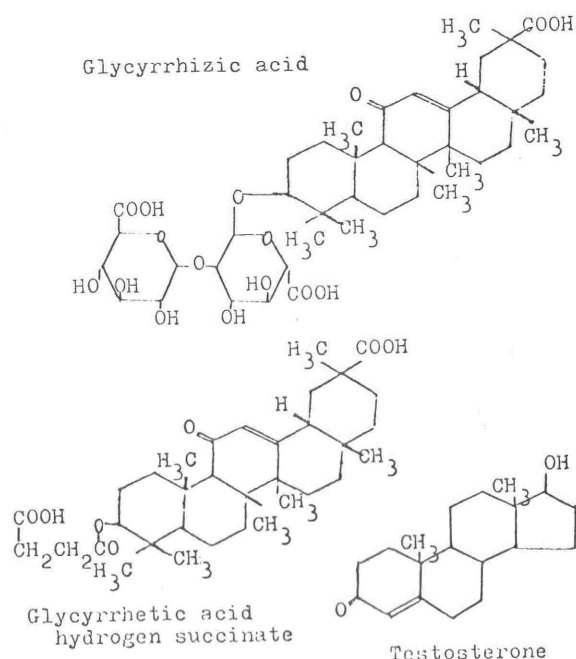
## 考察

1) C1s の活性化において L-Lysine, Arginine, Ornithine, Glycyrrhetic acid, Dipotassium glycyrrhizinate, Glycyrrhetic acid hydrogen succinate, Testosterone に活性化抑制が認められた。そしてその抑制率は一定濃度以上になると増加しなかった。またグリチルリチン関連物質は、L-Lysine 類似物質にくらべ  $\frac{1}{10}$  の濃度でも高い抑制率を示した。

2) L-Lysine 類似物質の構造式を考えると、2つのアミノ基と炭素鎖が抑制率に関与している様に思われる。一方グリチルリチン関連物質と L-Lysine 類似物質とでは、構造の類似性が無いにもかかわらず何れも抑制した。これよりグリチルリチン関連物質と L-Lysine 類似物質とでは、C1s 活性化の抑制の作用機序が異なっているように推察される。またグリチルリチン関連物質でも、抑制に關与するのは、グルクロン酸骨格ではなく、グリチルレチン酸骨格すなわちステロイド類似骨格が関与しているのではないかと推察される。

3) 試料の溶媒について考えると、Mono ammonium glycyrrhizinate の場合、エタノール溶解では抑制されず、アセトン、ジオキサンでは弱い抑制が認められ、また Glycyrrhetic acid と Glycyrrhetic acid hydrogen succinate では抑制率が異なっている。これらの結果より溶媒の種類によって極性その他の変化が生じ、類似物質にもかかわらず抑制率が異なるのではないかと推察される。

Fig.3 Structure of Glycyrrhizin and related substances.



- 1) 峯田周吉, 高田明和他 第14回補体シンポジウム講演集 75~78. 1977
- 2) 有本之嗣, 高田明和他 第14回補体シンポジウム講演集 79~82. 1977
- 3) N. A. Soter, K. F. Austen and I. Gigli: J. Immunol. 114:928, 1975
- 4) A. L. Haines and I. H. Lepow: J. Immunol. 92:456, 1964
- 5) N. Tamura and R. A. Nelson, Jr.: J. Immunol. 101:1333, 1968
- 6) K. Sakai and R. M. Stroud: J. Immunol. 110:1010, 1973

# 19. BCG, OK-432 (Picibanil), PS-K (Krestin) および Levamisole のモルモット補体系に対する影響.

加藤治樹、西堀秀嗣、若松美和、古川泰正、横江信義、細川計明（京都府立医科大学 第3内科）、近藤元治（同 第1内科）

## ＜緒言＞

現在、癌免疫療法に一般の関心が向けられ、臨床的に多数の immuno-potentiator が使用されている。これらの中には補体系活性化作用を持つものがあり（in vitro）、in vivo においても OK-432, PS-K, Levamisole がヒト補体レベルを上昇させることを報告した。今回は、BCG, OK-432, PS-K, Levamisole の3種類の異なる投与量とそれぞれモルモットに投与し、これらの薬剤の投与量によるモルモット補体系に対する作用の差異について検討したので報告する。

## ＜材料および方法＞

薬剤投与方法：Hartley系モルモットに BCG 10 mg/kg, 2 mg/kg および 1 mg/kg, OK-432 0.2 mg/kg, 0.02 mg/kg および 0.002 mg/kg とそれぞれ皮下注射で、PS-K 2000 mg/kg, 600 mg/kg および 60 mg/kg、Levamisole 100 mg/kg, 30 mg/kg および 3 mg/kg とそれぞれ経口で、30日間毎日投与した。

血清：薬剤投与前および投与後10日目毎に心腔より採血し、遠心分離後  $-70^{\circ}\text{C}$  に保存した。

補体活性の測定：一定希釈の血清を用い、CH50 は羊感作血球（EA）の溶血率で、ACH50 はウサギ赤血球（RaE）の溶血率で測定した。

補体蛋白定量：抗モルモット C4、C3血清（富士臓器）を用い、免疫拡散法で測定した。

## ＜結果＞

### 1) OK-432 のモルモット補体系への影響

OK-432 0.2 mg/kg 投与によって CH50, ACH50 は著明に上昇したが、0.02 mg/kg, 0.002 mg/kg 投与では逆に低下し、60日目になって CH50 は元のレベルにもなったが、ACH50 は回復しなかった。C4、C3蛋白量も 0.2 mg/kg 投与でわずかに増加したが、0.02 mg/kg, 0.002 mg/kg 投与ではやや減少した。

### 2) PS-K のモルモット補体系への影響

PS-K 2000 mg/kg, 600 mg/kg 投与により CH50, ACH50 は著明に上昇し、特に

ACH50 は投与中止後もさらに上昇して160%に達したが、60 mg/kg 投与ではCH50は逆に軽度の低下を示し、ACH50はほとんど変化しなかった。C4蛋白量は3投与群間で大きな差はなかったが、C3は2000 mg/kg 投与で150%に増加し、600 mg/kg投与によっても増加したが、60 mg/kg 投与ではほとんど変化しなかった。

### 3) BCG のモルモット補体系への影響

BCG 2 mg/kg 投与でCH50, ACH50は著明に上昇し、10 mg/kg 投与によってもかなり上昇したが、1 mg/kg投与では大きな変化はみられなかった。C4は、最初全倒やや減少したが、投与中止後10 mg/kg 投与群で著増がみられた。C3は2 mg/kg, 10 mg/kg, 1mg/kgの順で増加がみられた。

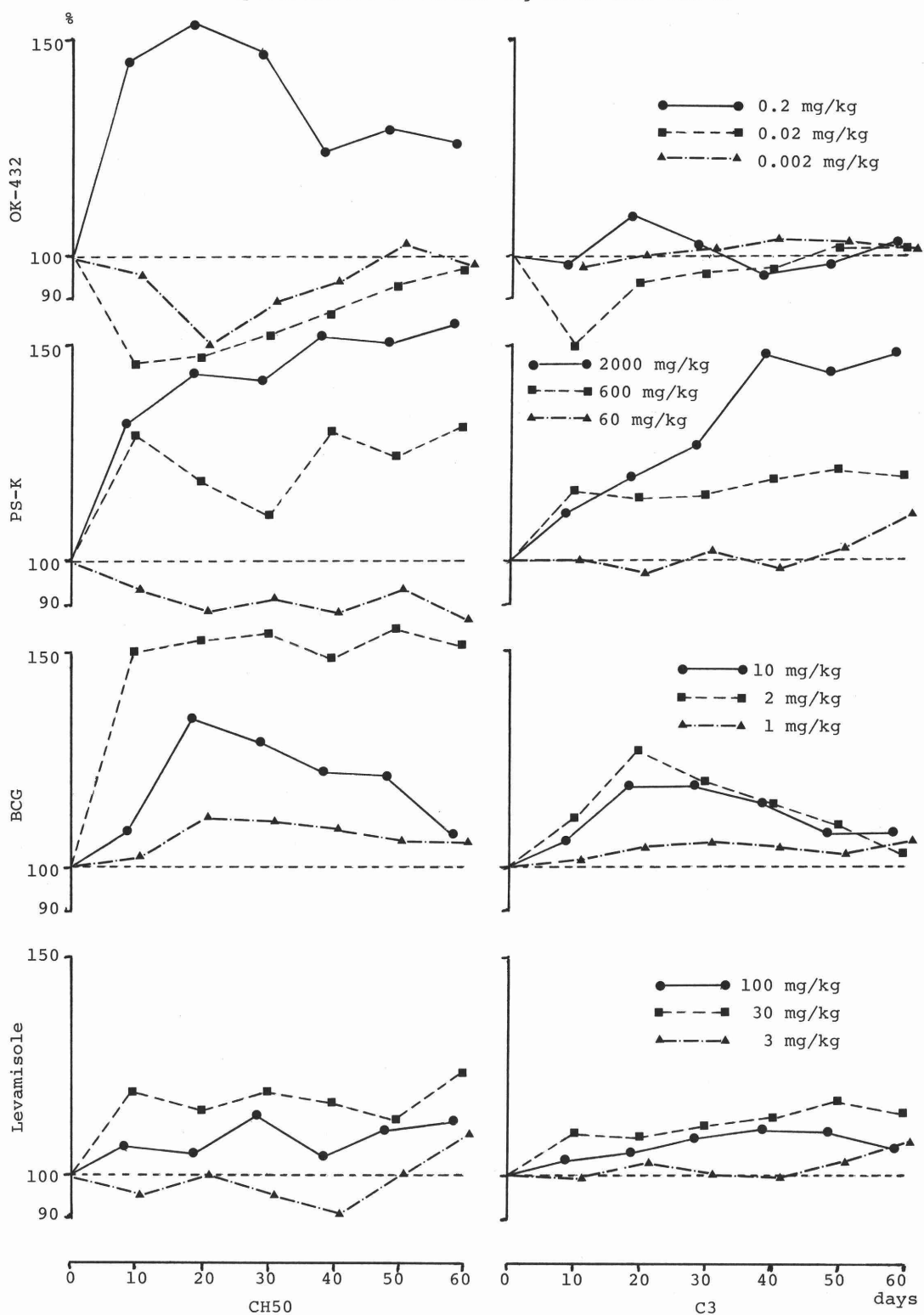
### 4) Levamisole のモルモット補体系への影響

Levamisole 30 mg/kg 投与でCH50, ACH50は上昇したが、3 mg/kg 投与ではやや低下し、60日目に元のレベルにもどった。100 mg/kg 投与では5匹中3匹が投与開始後1週間以内に死亡し、CH50, ACH50にも大きな変化はみられなかった。C4は3 mg/kg投与でよく増加したが、100 mg/kg 投与ではほとんど変化がなかった。C3は30 mg/kg 投与で増加がみられたが、3 mg/kg 投与ではほとんど動かなかった。

## ＜考 案＞

これらの immunopotentiator 投与によって、各投与量におけるCH50, ACH50の動きはほぼ並行した動きを示した。CH50, ACH50の上昇とC4, C3蛋白量との関係とみると、各薬剤投与群でC4よりもC3の量的増加によってCH50, ACH50の上昇の程度が規制されているようにみえたが、C3の増加には各投与群にかなりの差があった。また各薬剤の投与量とCH50, ACH50との関係とみると、OK-432, PS-Kでは投与量が多い程それらの上昇は著しいが、BCG, Levamisoleの大量投与ではむしろCH50, ACH50の上昇は抑制された。同時にC3量の増加も抑制された。これら4つの immunopotentiator が in vivoでどのように補体系に作用するのか明らかではないが、これらを投与することによってC3が増加し、これがCH50, ACH50を上昇させているように考えられる。腫瘍免疫における補体系の役割の中で、とりわけC3の重要性が強調されているが、今回の結果からこれら immunopotentiatorはC4, C3蛋白量に影響を及ぼし、CH50, ACH50の上昇を促し、その結果として補体系を介した抗腫瘍効果を発揮する可能性が示唆された。

Effect of Immunopotentiators on Guinea Pig Serum CH50 and C3



横江信義 若松美和 加藤治衛 池崎稔

細川計明 \* 古川泰正 \* 近藤元治

(京都府立医科大学第3内科および\*第1内科)

## 【緒言】

担癌生体における低下した生体反応の改善を目的として、すでに BCG をはじめとするいくつかの非特異的免疫賦活剤が開発され、多くの成果をあげている。この作用機序は、リンパ球あるいはマクロファージを中心とする細胞性免疫能を賦活するという考え方が多いが、これらの物質の中には *in vitro* で補体系を活性化するものがあり、我々は補体系を中心とした宿主免疫能の賦活が、腫瘍免疫において重要な役割を演じているのではないかと考えてきた。そこで BCG, OK-432, PS-K が *in vitro* で補体の主として *alternative pathway* を活性化し、また OK-432, PS-K, Levamisole が *in vivo* でモットおよびヒトの補体価を上昇させることを検討し、すでに報告してきた。

今回は、いわゆる「丸山ワクチン」として知られる SSM (Specific Substance Maruyama) がヒトの免疫能および補体系に及ぼす影響につき検討した。

## 【材料および方法】

1) 対象および投与方法: 担癌生体では、それ自体補体価が高く、また腫瘍の進展や化学療法剤の併用により生体の免疫能が刻々と変化するために、非担癌高齢免疫不全者を対象とした。すなわち 60才以上の非担癌高齢者 120 名の中から、PPD 皮内反応、PHA 皮内反応の低値を示す 12 名を選び、7 名に SSM-A (2 $\mu$ g/ml) を、他の 5 名に SSM-B (0.2 $\mu$ g/ml) をそれぞれ 1 回 1 ml を 3 回隔日に筋肉注射し、3ヶ月間継続した。薬剤投与前および投与開始後一ヶ月ごとに採血し、血清を -70°C で保存した。

2) 皮内反応: PPD 皮内反応には diagnostic tuberculin を、PHA 皮内反応には Difco 社の Bactophytohemagglutinin-P の 0.1 ml を両前腕内側に同時に皮内注射し、それぞれ 48 時間あるいは 24 時間後の発赤の平均直径 (mm) で表わした。1ヶ月ごとの検査に際し、皮内注射部位を変更する様に留意した。

3) 免疫グロブリンおよび補体タンパクの測定: 経時的に採血した血清について一元免疫拡散法を用いて、IgG, IgA, IgM, C4, C3, C5, C9, C1q, C1-INH, C3A

および properdin を測定した。

4) 補体溶血活性の測定: 補体 classical pathway の測定は、羊感作赤血球 (EA) の溶血による CH50 で、また補体 alternative pathway の測定は、非感作ウサギ赤血球 (RaE) の溶血による ACH50 で行い、それぞれの buffer として  $\text{GVB}^{++}$  および  $0.03\text{M EGTA-Mg}^{++}\text{-GVB}$  を用いた。

5) in vitro における補体活性化: 新鮮血清  $0.1\text{ml}$  に、 $\text{GVB}^{++}$  または  $0.03\text{M EGTA-Mg}^{++}\text{-GVB}$  で種々の濃度に溶解した SSM  $0.1\text{ml}$  を加えて  $37^\circ\text{C}$  で  $1\text{hr}$  反応させた後、 $\text{GVB}^{++}$  または  $0.03\text{M EGTA-Mg}^{++}\text{-GVB}$  で適当な濃度に希釈し、EA による溶血率で classical pathway を、また RaE による溶血率で alternative pathway の活性化を検討した。

## 【結果】

1) 皮内反応: PHA 皮内反応は、SSM-A 群では投与開始後上昇し、3ヶ月間の投与期間中効果は持続し、さらに投与中止後若干低下する傾向を示した。

PPD 皮内反応でも同様の傾向がみられた。

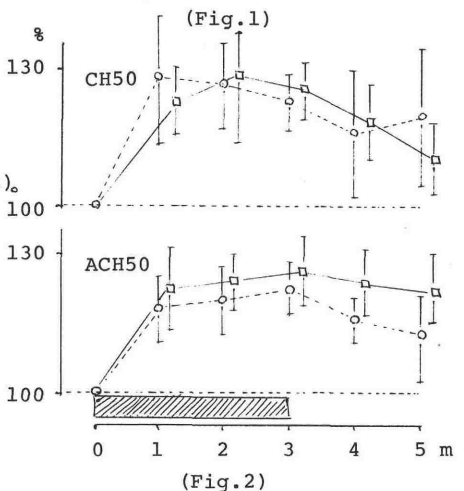
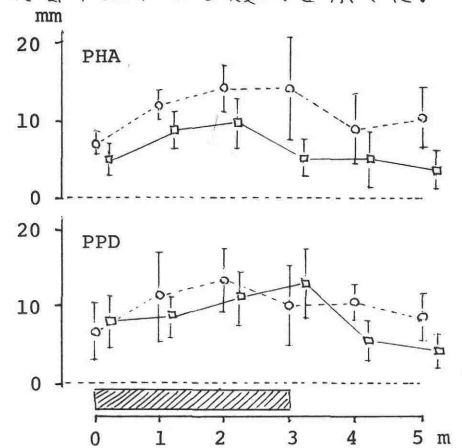
SSM-B 群では、免疫能を賦活する傾向がある。たとえばいうものの、SSM-A 群ほど著明ではなかった (Fig.1)。

2) 免疫グロブリン: 免疫グロブリンのタン白量に就いては、特に一定の傾向はみられなかった。

3) in vivo における classical および alternative pathway に対する影響: 薬剤投与前の値を  $100\%$  とし、投与後の動きを  $\text{means} \pm \text{s.e.}$  で表わした。

両群とも、投与後に CH50 は著るしく上昇し、投与休止後若干低下するが、少なくとも2ヶ月間は、この傾向が持続した。ACH50 においても同様の傾向がみられた (Fig.2)。

4) 補体系タン白に対する影響: 薬剤投与前の値を  $100\%$  とし、投与後の動きを  $\text{means} \pm \text{s.e.}$  で表わした。C4, C3, C5, C9では、SSM-B 投与により、多少増加する傾向がみられたが SSM-A ではほとんど変化はなかった。SSM では dose response をみられず、むしろ適量の使用により C4, C3, C5, C9 のタン白量は増加



○—○ SSM-A ( $2\mu\text{g/ml}$ )  $n=7$   
 □—□ SSM-B ( $0.2\mu\text{g/ml}$ )  $n=5$

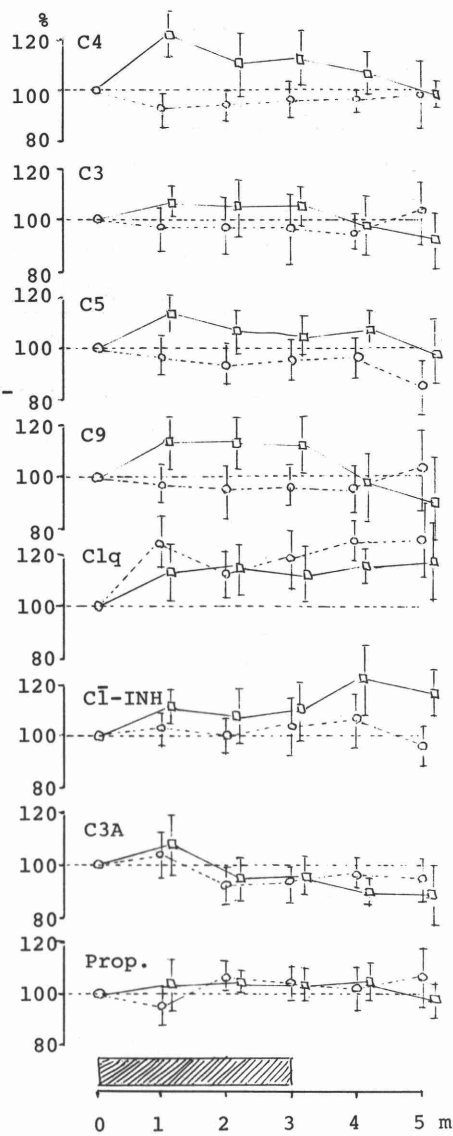
するものと思われる。C1q はどちらの群に於ても増加がみられた。C1-INH では SSM-B 群で軽度の増加があったが SSM-A 群ではほとんど変化はみられなかった。C3A および properdin では一定の傾向は得られなかった。(Fig.3)。

5) in vitroにおける補体活性化: SSM 200  $\mu$ g  
 ~0.02  $\mu$ g/ml の範囲では classical および alternative pathway に全く影響を及ぼさなかった。

### 【考察】

スルワクチン (SSM) は人型結核菌より分離抽出した多糖体および核酸を主成分とする物質で皮膚結核の治療薬として開発されたが、現在は癌に対する免疫療法剤として注目されている。非担癌高齢免疫不全者に SSM を投与することにより PHA および PPD 皮内反応は増強され、同時に血清補体の EA および RaE に対する溶血活性を著しく上昇させることがわかった。補体タンパク成分については、SSM-B 群で C4, C3, C5, C9, C1q, C1-INH の増加がみられたが SSM-A 群では C1q 以外ほとんど変化なく、これは投与量に多いに関係があるものと思われる。in vitro ではほとんど補体系に影響を与えなかった。

補体を供給することで自家腫瘍の抑制あるいは移植腫瘍の拒絶反応の増強がみられることは種々の実験で報告されている。今回の検討で SSM により EA および RaE の溶血率は著明に上昇し補体の増加が示唆された。これらの結果より、補体系を中心とした宿主免疫能が、腫瘍免疫のひとつの中心的な因子であり得ると考えられた。



(Fig.3)

○—○ SSM-A (2  $\mu$ g/ml) n=7  
 □—□ SSM-B (0.2  $\mu$ g/ml) n=5



## 21. 顆粒球による $O_2^-$ radical 産生における SLE 血清因子の影響

### — 補体レセプターとの関係 —

久々温研内科 神宮政男, 酒井好石, 延永 正

(目的) : FC および補体レセプター (FCR, C4R, C3R) は顆粒球膜表面に存在し、免疫過程において、オプソニン効果を介し、貪食作用の引き金<sup>1)</sup>的役割をなす。humoral factor に異常がみられる膠原病<sup>2)</sup>や、末梢白血球自体に形態上異常がみられる白血病<sup>3)</sup>においては、FCR や C3R の異常が報告されており、興味深い。その原因として、細胞自体によるものと、血清因子によるものか考えられる。一方、顆粒球が貪食時に遊離する。

Superoxide radical ( $O_2^-$ ) は細胞内殺菌作用を有し、また貪食とは無関係に活性化補体や IgG などによる顆粒球膜刺激を介し、産生されること<sup>4), 5), 6)</sup>が報告されている。 $O_2^-$  は一旦、細胞外すなわちプラズマ中に遊離すると、脂質の過酸化や核蛋白の分解などを引き起こし、生体に不利な組織傷害をきたすことが示唆されている。全身性エリテマトーデス (SLE) の血中には、免疫複合体 (IC) やそれによる活性化補体が存在することから、我々は、顆粒球機能としての免疫学的レセプターおよび、 $O_2^-$  産生におよぼす SLE 血清因子の関与について検討を加えた。

(方法) 顆粒球は SLE 患者および健常者へパリン血より Boyum の方法<sup>7)</sup>にて分離し、低張食塩水 (生塩水 1 : 蒸留水 2) にて、混在赤血球を溶血させ、洗浄後、Krebs Ringer 緩衝液 (KRP) ないしは Hank's 液に浮遊させた。Shandon 社製細胞遠心器の各セルにこの顆粒球を 2 滴ずつ入れ、スライドをセットし、500 rpm, 5 分間遠心、乾燥後、FITC 標識抗ヒト IgG・IgM、IgA・C3 抗血清にて、蛍光染色を行ない、顆粒球細胞質内の封入体検索を行なった。FCR 検索には、900 倍希釈の抗ヒッジ赤血球抗体 (A) の 7S 分画 (Cordis) をヒッジ赤血球 (E) に感作することにより作られた EA7S を用いた。C4R および C3R の検索にはそれぞれ EAC14, EAC1423 を用いた。EAC14 の作成は Borsos らの方法<sup>8)</sup>によった。さらに EAC14 を単離した CZ (自家製) および C3 (Cordis) と反応せしめ、EAC1423 を作成した。 $2 \times 10^8/ml$  に浮離せしめた EA7S, EAC14, EAC1423 の各  $25 \mu l$  とハンクス液にて  $4 \times 10^6/ml$  に浮離せしめた顆粒球  $25 \mu l$  を混和し、170 g, 3 分間遠心、室温に放置、30 分後、ペレットをこわし、その 1 滴をブルーinstans スライド上に滴下、検鏡し、3 個以上の E を付着している細胞をロセット陽性とし、ロセット陽性細胞の比率を算出した。次に健常者顆粒球浮遊液  $25 \mu l$  を等量の SLE 血清ないしは、

健常者血清と $4^{\circ}\text{C}$ 、30分間反応後、2回洗浄し、同様にロゼット法を行なった。また、SLE血清をポリエチレングリコール(PEG)にて処理し、その沈澱蛋白および上清分画とそれぞれ、顆粒球を同時に反応後、ロゼット法を試みた。さらに、このSLE血清 $0.35\text{ml}$ をセパデックスG-200にて分画を行ない、得られた3つの分画別に血清をブールし、濃縮後、各分画別顆粒球を前処理した後、同様にロゼット法を試みた。一方、血清(SLEまたは健常者) $0.1\text{ml}$ 、Con A( $5\text{mg/ml}$ ) $25\mu\text{l}$ 、サイトカラッシンE( $300\mu\text{g/ml}$ ) $25\mu\text{l}$ 、NBT( $4\text{mM}$ ) $0.2\text{ml}$ にKRPを加え、全量を $2.3\text{ml}$ とし、 $0.0540$ における吸光度を読み取った後、KRPに浮遊せしめた健常者顆粒球 $0.2\text{ml}$ ( $4\times 10^6$ 個)を加え、 $37^{\circ}\text{C}$ 、30分間反応後、直ちに $0^{\circ}\text{C}$ に冷却し、 $2000\text{rpm}$ 、5分間遠沈し上清の $0.0540$ を読み取り、その差をNBT還元度とした。 $0^{\circ}\text{C}$ にて反応した系、 $\text{O}_2$  dismutase(SOD)を加えた系、顆粒球を加えない系などを対照とした(Table 1)。SLE血清 $1.2\text{ml}$ のセパデックスG-200による分画を行ない、これを4分画にブールし、濃縮後、各分画別に、上記と同様にして顆粒球のNBT還元におよぼす影響をみた。なお、Hypoxanthine( $272\mu\text{g/ml}$ ) $0.2\text{ml}$ 、Xanthine oxidase( $40\mu\text{g/ml}$ ) $0.1\text{ml}$ をKRP $1.7\text{ml}$ に加え、 $37^{\circ}\text{C}$ 、30分間における $0.0540$ の吸光度差( $0.177$ )を恒数(K)とし、各系の吸光度差のKに対する比をNBT還元度(%)とした。

(結果)：SLE患者顆粒球におけるFCR、C4R、C3Rの陽性率をみると、Table 2のように、それぞれ健常者に比較すると有意に低下を示した。健常者顆粒球をSLE血清にて前処理すると、C4R、C3Rは、それぞれ、 $-41\%$ 、 $-39\%$ とロゼットの阻止がみられた。健常者顆粒球を健常者上清にて前処理すると、C4R、C3Rは $-6\%$ 、 $+5\%$ と特にロゼット陽性率に著しい変化はみられなかった。このSLE血清のセパデックス分画による各ピーク別に健常者顆粒球を前処理すると、C4R、C3Rはそれぞれ、第1分画にて、 $-62\%$ 、 $-69\%$ 、第2分画にて、 $-48\%$ 、 $-61\%$ 、第3分画にて、 $-20\%$ 、 $-40\%$ と、ロゼット阻止がみられた。同時にSLE血清のPEG処理による沈澱蛋白にて前処理すると(Table 3)ロゼット阻止の高度にみられた。しかし、上清にて顆粒球を前処理した場合にも、軽度ながらも阻止がみられた。一方、健常者血清のPEG処理による沈澱蛋白ないしは上清にて顆粒球を前処理した場合には、ロゼット形成にはほとんど影響はみられなかった。SLE患者顆粒球の細胞質封入体とC4R、C3Rとの関係を見ると、封入体陽性群においてC4R、C3Rは低下傾向を示し、特にIgG封入体においてその傾向が強く示唆された(Table 4)。次にSLE血清による

健常者顆粒球を介したNBT還元をHypoxanthine-Xanthine oxidase系による30分間におけるNBT還元( $K=0.177$ )に対する比率にしてみると(Table 1)  $26.72 \pm 7.91\%$ であり、これにSODを加えると、 $78.7 \pm 6.9\%$ のNBT還元阻止がみられた。一方、健常者血清による顆粒球を介したNBT還元は $4.9 \pm 0.67\%$ と極く軽度であった。SLE血清のセファデックス分画による顆粒球を介したNBT還元をみると、第1分画により、 $36.7\%$ 、第2分画にて $10.2\%$ 、第3分画にて $8.5\%$ 、第4分画にて $6.2\%$ と、第1分画により最も強いNBT還元刺激がみられた。

(考按) SLE患者顆粒球のFCR, C4R, C3Rは健常者に比べ、有意に低下を示し、低下の原因として、血清因子が考えられた。すなわち、C4R、C3R低下の原因として流血中のC4ないしはC3結合I.Cによるレセプターブロックが考えられたが、I.C以外の比較的低分子成分すなわち、C4, C3 fragmentや、ある種ツレセプターinhibitorの関与も示唆された。一方、SLE血清により、顆粒球依存性のNBT還元が認められ、この還元はSODを加えることにより、阻止されることや顆粒球を加えないとみられないことから、 $O_2$ 依存性のNBT還元としてよいと思われる。この血清中の $O_2$ 産生因子は、セファデックス分画の第1分画に最も強くみられた。以上、組織傷害作用の可能性を有する $O_2$ が、SLE血清因子により顆粒球より刺激、放出され、かつ生体防御作用をもつC4, C3各レセプターが、SLE血清因子により阻害されることを報告したが、これら2つの面よりみた顆粒球機能におよぼすSLE血清中の因子として、I.Cが両面に共通し、最も強く示唆された。すなわち、C4またはC3結合I.Cが顆粒球のC4およびC3レセプターに結合し、これによる顆粒球の膜刺激またはI.C貪食により、 $O_2$ 産生が刺激される。この際同時にライソゾーム酵素も遊離される。Smithらは慢性腎炎患者リンパ球のC3レセプター阻害の原因として、血清中のI.Cを指摘し、他の低分子因子の関与はほとんどないとしており、<sup>9)</sup>我々の成績とはやや異なるが、リンパ球と顆粒球ではレセプターのaffinityが異なる可能性がある。また $O_2$ による直接的<sup>10)</sup>ないしは間接的<sup>11)</sup>な血管内皮細胞傷害の報告がみられ、組織傷害の病態的機序に関する $O_2$ の役割が注目される。

文献 1). D.J.Scribner and D.Fahrney.: Neutrophil receptors for IgG and complement: Their roles in the attachment and ingestion phases of phagocytosis. J.Immunol.116:892,1976.

2). 中井孝紀, 森藤忠夫, 谷本潔昭, 堀内淑彦.: Fcロゼットの臨床への応用. 3. SLE末梢血ならびにRA関節液リンパ球のFcレセプター保有細胞の変動. リウマチ. 17: 373, 1977.

- 3). Ross G.D., Rabellino E.M. and Polley M.J.: Combined studies of complement receptor and surface immunoglobulin-bearing cells and sheep erythrocyte rosette-forming cells in normal and leukemic human lymphocytes. J.Clin. Invest. 52:377, 1973. 4). Goldstein I.M., Roos D., Kaplan H.B., et al.: Complement and immunoglobulins stimulate superoxide production by human leukocytes independently of phagocytosis. J.Clin. Invest. 56:1155, 1975. 5). Goldstein I.M., Feit F., and Weissmann G.: Enhancement of nitroblue tetrazolium dye reduction by leukocytes exposed to a component of complement in the absence of phagocytosis. J.Immunol. 114:516, 1975. 6). Johnston R.B., J.R., and Lehmyer J.E.: Elaboration of toxic oxygen by-products by neutrophils in a model of immune-complex disease. J.Clin. Invest. 57:836, 1976. 7). Boyum A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. J.Clin.Lab.Invest. 21(Suppl. 97):77, 1968. 8). Borsos T. and Rapp H.J.: Hemolysin titration based on fixation of the activated first component of complement. Evidence that one molecule of hemolysin suffices to sensitize an erythrocyte. J.Immunol. 95:559, 1965. 9). Smith M.D., Verroust J., Adam C., et al.: A study of the material inhibiting EAC-rosette formation in the sera of patients with nephropathies. Clin.Exp.Immunol. 30:364, 1977. 10). Sacks T., Moldow C.F., Craddock P.R., et al.: Oxygen radicals mediate endothelial cell damage by complement-stimulated granulocytes. An in vitro model of immune vascular damage. J.Clin. Invest. 59:1161, 1978. 11). 神宮政男, 江崎一子, 逆永正, 酒井好吉.: SLE血清に与る顆粒球依存性培養血管内皮細胞傷害とO<sub>2</sub>産生および superoxide dismutase. 第7回日本臨床免疫学会総会. 昭和54年6月, 東京.

1. NBT Reduction by Polymorphonuclear leukocyte (PMN) stimulated by SLE Serum

Conditions	(1) N=10 KRP 2.0 ml	(2) N=2	(3) N=3	(4) N=5	(5) N=5
NBT	0.2 ml	"	"	"	"
PMN(Normal)	0.2 ml	"	"	"	0
Serum	0.1(SLE)ml	"	"	0.1(Normal)	0.1(SLE)
SOD(Sigma)	0 ml	75 Units	0	0	0
Temperature	23°C	23°C	0°C	23°C	23°C
NBT reduction	26.72±7.9%	78.7±6.9*	4.9±0.6%	3.6±0.6%	0%
(% control)					
NBT Reduction by Xanthine-Xanthine Oxidase system (K= 0.177)					
* % inhibition, KRP = Krebs Ringer phosphate buffer.					

3. Rosette inhibition by serum fractions treated with polyethyleneglycol (PEG).

granulocyte	serum	serum fraction (PEG)	ROSETTE EAC14	INHIBITION EAC1423
normal (1)	SLE	pellet	-65%	-66%
"	"	supernatant	-14%	-20%
" (2)	"	pellet	-72%	-80%
"	"	supernatant	-32%	-42%
" (3)	normal	pellet	-6%	+3%
"	"	supernatant	-8%	+5%

2. Percent of rosette-forming polymorphonuclear leukocytes (PMN) in patients with connective tissue diseases and blood diseases.

receptors subjects (number)	EA7s	EAC14	EAC1423	E
Systemic lupus erythematosus (N=16)	40.3±11.9%	23.9±11.6%	26.3±12.2%	0%
Rheumatoid arthritis (N=14)	48.1±12.5%	36.7±10.0%	46.9±14.2%	0%
Progressive systemic sclerosis (N=8)	44.1±17.2%	27.0±13.1%	29.2±12.4%	0%
Acute myelocytic leukemia (N=4)	54.5±6.3%	40.0±7.9%	47.0±10.6%	0%
Normal persons (N=15)	52.6±14.3%	38.9±11.6%	47.0±11.1%	0%
* p<0.02, **p<0.01, *** p<0.001,				

4. Cytoplasmic inclusion bodies and C4- and C3-receptors.

Inclusions	C4R(%)	C3R(%)
IgG(+)	20.7±11.5	23.4±17.9
(-)	31.0±8.2	31.0±2.9
IgM(+)	23.5±13.5	11.5±3.5
(-)	24.7±11.2	28.3±11.5
C3(+)	19.3±10.1	23.8±10.6
(-)	27.7±11.2	27.7±8.5

## 22. 貪食作用と Factor B 産生について

川本保子・市川秀隆・深山昭雄  
(名古屋保健衛生大・医・微生物)

補体の初期反応成分, C4, C2 および Properdin 系の Factor B が, マクロファージ (Mφ) により合成され, それを支配する遺伝子座が, MHC 領域に近接していること, Mφ が Fc receptor, C3b receptor を持つことなどから, 免疫反応における補体蛋白の働きを, 種々の角度から検討している。マウスを抗原刺激した場合, あるいは *in vitro* で Mφ を LPS 刺激した場合に, Factor B の産生が変化することと, 私達は観察した。

今回は, Mφ が異物を貪食した場合に Factor B がどのような変化を示すか調べた。

### 方法

1. ギイモザン Schnyder & Baggiolini の方法 (J. Exp. Med., 148, 1449) で調整し, MEM に浮遊させた。これを新鮮 ddY マウス血清で 37°C 15 分間感作し (ZC), 対照は 56°C 30 分間加熱マウス血清で感作した (Z)。
2. マクロファージ 前回と同じ方法で培養した。
3. Phagocytosis Mφ 1 個当り 25 個のギイモザンを加え, 37°C 2 時間培養した。上清中に残ったギイモザンを洗浄除去し, 培養液を新たに加え, 7 日まで培養した。ギイモザンを加えない Mφ を対照とした。
4. Factor B の測定 深山らの方法 (Biken J., 18, 193) によった。
5. 酵素活性の測定 リゾチームは Parry らの方法 (Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 119, 384), 酸性ホスファターゼは Andersch らの方法 (Amer. J. Clin. Path., 17, 571), 乳酸脱水素酵素 (LDH) は Wróblewski らの方法 (Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 90, 210) により測定した。

細胞内の酵素活性は, 培養上清を採取後, 付着細胞を PBS で洗浄し, 1% Triton X-100 で細胞を溶解し, 測定した。

6. 貪食作用の算定 カバースリップ上に培養した Mφ を, May-Grünwald Giemsa 染色し, Mφ 100 個当りの細胞内のギイモザンの数を数えた。

### 結果

1. ギイモザンの貪食 付着細胞の 95% 以上がギイモザンを貪食しており, Table 1. から明らかのように, ZC が Z より多く取り込まれた。

Table 1. はZに対する比で表わしている。

## 2. Factor Bの産生

ZおよびZCの飼食により、MφのFactor Bの産生が高められ、5日目には、ZCがZをしのぐようになった (Fig. 1)。

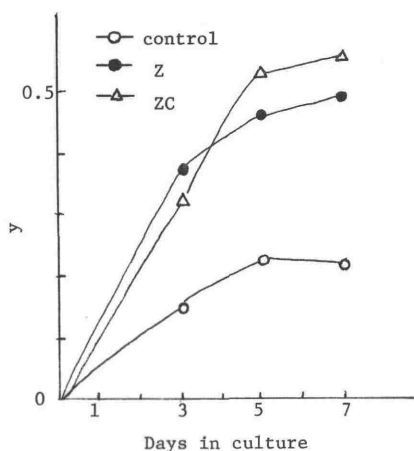


Fig. 1

## 4. 酸性ホスファターゼ活性

培養上清中の活性は、終始 Z>ZC>対照の順であった。細胞内の活性も同様であったが、5日目以後は、ZCがZより高くなった (Fig. 3)。

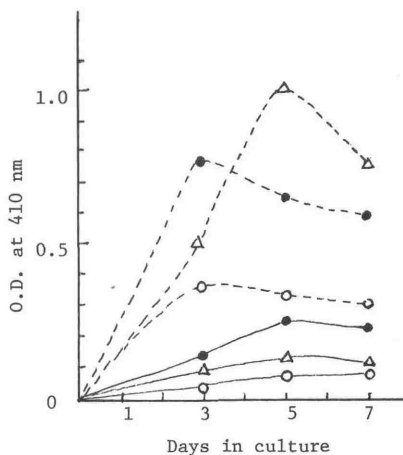


Fig. 3

Table 1.

	2 hr	3rd day	5th day	7th day
Z	1	1	1	1
ZC	1.71	1.38	1.51	2.39

3. リゾチーム活性 3, 4日目までは、培養上清中、細胞内ともに対照にくらべ活性は低い。5, 6日目以後は、飼食により培養上清中の活性が高くなった (Fig. 2)。

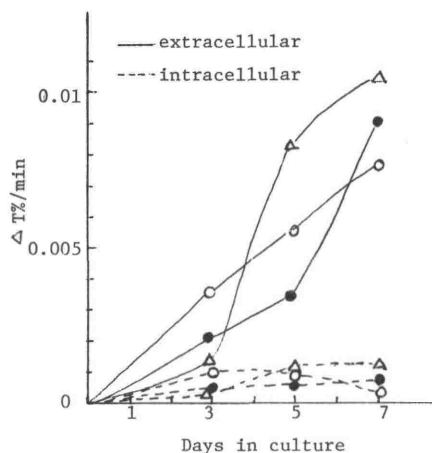


Fig. 2

5. LDH活性 培養上清中の活性は、Z, ZCが対照にくらべやや高かった。細胞内の活性も飼食により高まり、5日目にはZCがZをしのぐようになった (Fig. 4)。

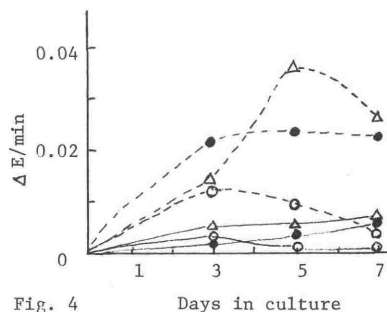


Fig. 4

## 考察

Mφ が Z, ZC 11 ずつのザイモザンを貪食しても Factor B の産生が高まり、抗原刺激や、in vitro の LPS 刺激に比較し、きわめて効果的であったことは興味深い。

Mφ がザイモザンを貪食すると lysosomal enzyme の分泌、LDH の合成、分泌が高まるが、リゾチームは変化がないという報告がある。今回も、Z を貪食するとほぼ同じ結果になった。ところが、オプロニン化された ZC では、4, 5 日目には酸性ホスファターゼの分泌、LDH の合成、分泌がさらに高められ、リゾチームも対照にくらべ、明らかに分泌量が多かった。単に、培養上清中および細胞内の活性が高まるだけならば、Table 1. に示すように、貪食の程度によらずともよいが、3, 4 日目までは Z にあるが、以後、急速に活性が増加する様は、Z の貪食時とは異なる機構があるのではないかと思われる。C3b receptor を介しての、単に蛋白合成の促進、膜透過性の変化なのか、細胞内での補体系の関与も含んだ現象なのか、不明だが、今後、Mφ の産生する他の補体蛋白の変動を追うことにより、調べたい。

羽室淳爾、鹿島信一、光木浩司（味の素・中央研究所）  
H.U. Schorlemmer, U. Hadding, D. Bitter-Suermann  
(Inst. für Medizinische Mikrobiologie der  
Universität Mainz, B.R.D.)

（はじめに）

抗腫瘍性多糖レンチナンは *In vivo*, *In vitro* の双方の系において、細胞障害性 T リンパ球 (CTL) の誘導を顕著に増強し、又、SRBC に対する pfc 誘導を *In vivo*, *In vitro* において増強する。この様に免疫活性に就いての多様な知見にも拘らず、レンチナンの抗腫瘍性発現の機序は未だ明確でない。

レンチナンは APC の活性化を為し、此の活性化は、レンチナン分子上に C3b, Bb, D 及び他のプロベルジン系酵素が complexation し、所謂 unit enzyme を形成することにより効率的に起こる。一方レンチナンは他の Immunomodulators (殆んどは APC 活性化剤) とは異なり *In vitro* に於いては、murine M $\Phi$  を活性化しないが、*In vivo* においては活性化する。レンチナン類似の多糖体で S180 退縮活性の異なるものを調べると *In vivo* における腫瘍細胞障害性 M $\Phi$  誘導活性と S180 退縮活性には、良好な相関が認められる。

これらの現象のレンチナンの抗腫瘍性発現における意義を解明すべく、腫瘍細胞障害性マクロファージ誘導と、レンチナン分子上に形成される unit enzyme による C3 の feedback activation の関連を報告する。

（実験方法及び結果）

#### レンチナンによる補体第2経路の活性化

C4 deficient guinea pig serum (C4dgps) を種々の濃度のレンチナンと 37°C、1hr incubation 後、常法の溶血法により、残存、C3, C5, factor B 活性を測定すると表1に示す様に、3つの因子の何れもが活性化された。この活性化は、normal gps 中にも同程度に起こり、レンチナンは補体を by path メカニズムで活性化することが確認された（文献参照）。後に述べるレンチナン関連多糖は CM-パヒマランを除き、何れも同程度の C3, C5, factor B の活性化を示した。



### レンチナン粒子上での C3 cleaving enzyme の生成

C4dgps 100  $\mu$ l に DGV<sup>+</sup> に懸濁したレンチナン (5 mg/ml) を 100  $\mu$ l 添加し、37°C 4 min, incubation した後、9,950 g で 1 min 遠沈し、氷冷 DGV<sup>+</sup> にて、2 回十分に洗浄し、ここに得られた pellets に精製 C3 (10 unit) を添加し、37°C で反応し、残存 C3 活性を測定したところ、図 1 に示す C3 分解初速度を示す unit enzyme (PX) の生成していることが判明した。この unit enzyme の C3 分解活性は、37°C で半減期は 4 min であった。PX から Bb が遊離した decayed PX=PXd は、factor B の添加により PX に戻り、再び C3 分解活性を示す。又、此の regeneration は anti-serum  $\beta$  の存在下に block される。

### レンチナン及び関連多糖による活性化 M $\Phi$ の誘導

CBA/J マウスにレンチナン及び関連多糖を 2 mg/Kg、3 日間 i.p 投与し 3 日目及び 6 日目に PEC を採取して、<sup>51</sup>Cr 標識 P 815 を標的細胞として 37°C にて 18hrs <sup>51</sup>Cr 遊離テストを行ない腫瘍細胞障害活性を調べた結果を表 2 に示す。これら多糖の S 180 退縮活性と腫瘍細胞障害性 PEC の誘導活性の間に良好な相関が認められた。

### 腹腔 M $\Phi$ よりのリソゾーム酵素遊離に及ぼすレンチナンの効果

レンチナン類似の構造を持つ zymosan は In vitro において、M $\Phi$  と incubation すると lysosomal enzyme を遊離することが判明しているが、レンチナンの場合には、この効果は観察されず (表 3)、図 2 に示す、M $\Phi$  により生合成された C3 の M $\Phi$  分泌 lysosomal enzyme による C3b への分解は起こらず、In vitro における、C3b を介した M $\Phi$  活性化の amplification loop は始動しない。

### レンチナンの誘導する腹腔 M $\Phi$ のリソゾーム酵素活性

レンチナンを NMRI マウスに 2 mg/Kg、3 日間、i.p. 投与後 4 日目に PEC を採取、3 hrs の adherence の後、M 199 培地中 24 hrs 培養後、adherent cell 及び培養液中の  $\beta$ -glucuronidase 活性を検定した。レンチナン投与群の M $\Phi$  は正常 M $\Phi$  に比し、 $\beta$ -glucuronidase の含量が増加すると共に、同酵素の培養上清への遊離も有意に上昇した (表 4)。

### C3b による腫瘍細胞障害性 M $\Phi$ の誘導

先に述べた方法によりレンチナンを用いて PX を調製し、精製 C3 と DGV<sup>+</sup> 中にて 37°C、4 min 反応後、反応上清 (免電泳的に C3b と C3a を含む) 2 ml を normal PEC adherent cell に (PEC  $2 \times 10^6$  の 37°C、3 hrs) 添加し、24 hrs incubation しここに <sup>51</sup>Cr-P815 を添加し、標的 P 815 の細胞障害能を測定したところ、C3 単独の反応上

清では、lysis は 6.8 %であつたのに対し、レンチナン由来PX と C3 の反応上清では、64 %と明らかに腫瘍細胞障害性 M $\Phi$  の誘導がみられた。

(考 察) レンチナンは APC の活性化能を有するが、In vitro においては M $\Phi$ 活性化は観察されず、Allison らの提唱する APC 活性化剤 = M $\Phi$ 活性化剤との説には合致しない。これは他の APC 活性化剤が M $\Phi$ よりのリソゾーム酵素の遊離を亢進するに対し、レンチナンには本効果が欠如し、リソゾーム酵素による C3 の C3b へのフラグメンテーションがおこらぬ故と考えられる。レンチナン分子上に unit enzymeが形成され C3 より C3b が生成し、M $\Phi$  が活性化される事実は、レンチナンの抗腫瘍性機構を考える上で重要である。

T cell adjuvant たるレンチナンの作用で生ずるリンホカインによる M $\Phi$  の活性化と C3b による M $\Phi$  の活性化により functional に同一の活性化 M $\Phi$  が誘導されるか否かの検討が今後の課題である。

表 1

factor	Consumption (%)					
	Conc of lentinan ( $\mu$ g/ml)					
	5	25	50	250	500	2500
C 3	0	16	48	68	78	82
C 5	—	—	30	39	30	20
B	—	16	39	60	78	70

表 2

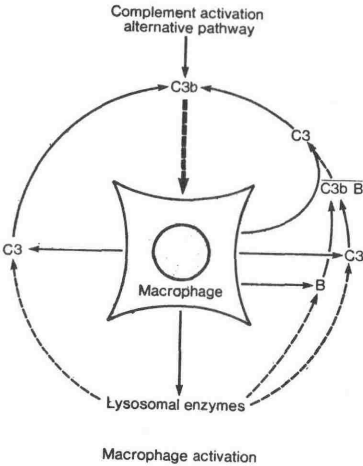
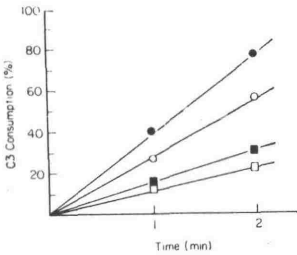
P S	lysis (%)	
	d3	d6
lentinan	45	80
pachyman	3	23
pachymaran	42	60
HE-pachyman-1	0	21
# -2	62	57

表 3

conc lentinan ( $\mu$ g/ml)	$\beta$ -glu	
	total※	release(%)
0	1.82	5.5
10	2.34	3.2
50	2.18	8.0
200	1.80	4.2
500	1.74	5.7
Zymosan	1.44	27.8
Zymosan 50 $\mu$ g/ml ※ m $\mu$ /ml		

表 4

	vitro	$\beta$ - glu	
		total(mu/ml)	release(%)
normal	—	4.08	11.5
	lentinan	3.92	14.3
	zymosan	4.45	47.9
induced	—	11.6	30.6
	lentinan	11.5	29.6
	zymosan	10.0	54.8



坂本 元子 (和洋女子大), 西岡 久壽彌, 嶋田 孝吉 (都臨床研)

栄養状態の良否にかかわらず, *Staphylococcus aureus* を感染させると, 補体の動向は感染後 3 日目をピークとした一時的な上昇がみられ, さらに経時的に追跡すると漸次低下し, 5 日から 7 日目頃より再上昇していく過程が観察された。この現象をわれわれは Ist Complement response と再上昇期を IInd Complement response と名付けた。この補体 response について, Ist Complement response は, 感染に対し, 急速免疫態勢を整えるための補体価の上昇とし, 抗体産生の時期に至って低下し, さらに IInd Complement response は炎症の症状と相俟って, 抗原, 抗体反応に要求される補体価の上昇があるものと考えていた。

今回, この上昇期における補体への標識アミノ酸の取り込みについて検討し, 免疫防衛態勢時における補体の産生をみたので報告する。

#### 方 法

動物; Sprague Dawley 系 (SPF), 雄性ラット, 30 匹を使用した。

栄養条件; 18% たん白食 (Vitamin Free Casein), 0.5% たん白食を与え, 8 週間飼育した。飼料は 20 g/day/rat (4 週間) および 30 g/day/rat (5 ~ 8 週間) を制限して与え, 水は自由に摂取させた。

感染; *Staphylococcus aureus* 226 株を用い, 18% 群には  $8 \times 10^9 / \text{ml}$  を 0.2 ml, 0.5% 群には  $2 \times 10^9 / \text{ml}$  を 0.2 ml を皮下に接種した。

標識アミノ酸; 〔 $^{14}\text{C}$ 〕-L-Leucine を用い, 10  $\mu\text{Ci}$  を腹腔内に注射し, 2 時間後に 18% 群は尾静脈より, 0.5% 群は腋下静脈より採血し〔 $^{14}\text{C}$ 〕の測定に供した。

補体中の〔 $^{14}\text{C}$ 〕-L-Leucine の測定; ヒツジの stroma ( $\times 1$ ) 0.25 ml に抗血清 ( $\times 150$ ) を 0.25 ml を加えて 37°C, 60' で incubate し, 抗原-抗体結合体をつくり, ラット (補体) 血清 ( $\times 1$ ) を 0.5 ml 加えて, 20°C, 60' で incubate した後, 3 回 gelatin veronal buffer (GVB<sup>+</sup>) で洗い, 活性化された抗原, 抗体, 補体結合体 (Ag-Ab-C-complex) の形で沈澱させる。これを吸引しながらマイクロフィルターで吸着させ, 乾燥後取り込まれているアイソトープ量を測定した。

〔 $^{14}\text{C}$ 〕-L-Leucine の測定には Liquid Scintillation Spectrometer (Packard, U.S.A.) を用い, 5 分間測定した。

#### 観察項目

##### 1) 抗原-抗体-補体結合体の至適条件決定

2) [ $^{14}\text{C}$ ]-L-Leucine の取り込み条件の決定

3) 抗原-抗体-補体結合体の確認

4) 感染後 3 日目および 13 日目の補体に取り込まれた放射能活性量の測定結果

1) Ag-Ab-C-complex の至適条件はヒツジ stroma 原液に, 抗血清,  $\times 50$ ,  $\times 100$ ,  $\times 200$  の条件と, 抗血清  $\times 200$  で抗原量  $\times 1$ ,  $\times 2$ ,  $\times 4$  に安定した反応が認められた。今回は抗原量を充分に与えるため, ヒツジ stroma,  $\times 1$  に対し, 抗血清  $\times 150$  を至適条件と決定した。

2) [ $^{14}\text{C}$ ]-L-Leucine  $10\mu\text{Ci}$  をラットの腹腔内に注射し, その後 15 分, 2 時間, 4 時間, 8 時間, 24 時間, 30 時間, 48 時間後に採血し, [ $^{14}\text{C}$ ] の取り込み量を測定した。図 1 に示すごとく, 取り込みのピークは注射後 2 時間にあらわれ, 4 時間後には急激な下降を示し, 8 時間以降の取り込みはわずかであった。したがって注射後 2 時間を取り込みのピークとして採血を行なった。

3) Ag-Ab-C-complex の確認については, 活性化された補体以外のたん白質の存在を確認するために,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  の存在しない EDTA (0.04M) を緩衡液として, 補体が結合しない状態の Ag-Ab-C-complex のみ, すなわち補体の存在しない状態のものと, GVB $^{++}$  すなわち  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  の存在する緩衡液で, Ag-Ab-C-complex の状態のものとを比較して, [ $^{14}\text{C}$ ] を測定したところ, 表 1 に示すごとく, いずれの検体においても, GVB $^{++}$  の場合に比し, EDTA (0.04M) の場合は, B.G 値と同様に低値を示し, GVB $^{++}$  中で補体のみを測定していることを確認した。

4) 感染後 3 日, 13 日目の補体溶血活性 (CH50), [ $^{14}\text{C}$ ]-L-Leucine の dpm/ml (血清) および Specific Activity (SA) (ラット血清 1 ml 当りの補体溶血活性の力価に対する, 血清 1 ml の補体中に取り込まれたアイソトープ活性量) は表 2 に示すとおりである。

18 % 群, 0.5 % 群ともに感染後 3 日目の補体へのアイソトープ取り込みは, 非感染群に対し有意に高く, 補体溶血活性も上昇しているが, SA 値も有意に高い値を示した。

一方 13 日目では 18 % 群は炎症も殆ど回復を示したが, [ $^{14}\text{C}$ ] の取り込み量も低く, CH50 も正常範囲に低下している。したがって SA 値も低く, 非感染群と同様の傾向を示した。

0.5 % 群では CH50 は 18 % 群に比し低値を示しているが, [ $^{14}\text{C}$ ] 測定量は著るしく高い値を示し, これは非感染群においても同様に顕著に高い値を示した。SA 値も同様に高い値を示した。また 13 日目は感染群は高い値

を示し、SA 値も高い値を示した。

0.5 % 群は感染の有無に拘わらず、18 % 群に比し、 $[^{14}\text{C}]$  の取り込みは顕著に高く、補体溶血活性に対する  $[^{14}\text{C}]$  の取り込み率も著るしく高いことが明らかとなった。

まとめ

補体の合成量は微量でとくに活性化された補体量は少ない。

補体への取り込みの時間は早く、2 時間でそのピークを示すことが明らかとなった。

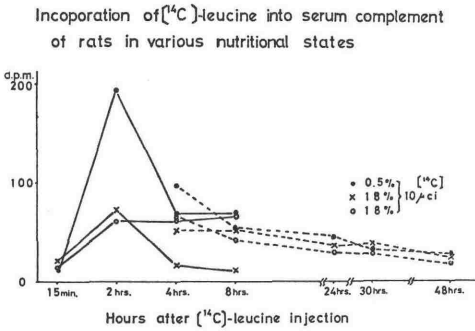
低栄養状態で細胞性免疫能が低下している場合、補体の溶血活性(CH50)は低下するが補体の incorporation は顕著に高いことが認められ、低栄養状態における補体の Turnover が著るしいことは予測される。

感染後 3 日目の補体のピーク時は、感染群が非感染群より高く、この補体価の上昇に相俟って、補体の incorporation も高まっていることが明らかとなった。

感染による炎症の程度によって incorporation も異なり、炎症が重篤な場合は補体の incorporation も高いことが推測される。

図 1

表 1



INHIBITION OF BINDING  $[^{14}\text{C}]$ -LEUCINE FRACTION TO ANTIGEN ANTIBODY COMPLEX BY EDTA

	SAMPLE NO.	1	2	3	4	B.G.
GVB <sup>++</sup>	18% NO INF.	43.0	43.0	42.0	55.5	17.0
	18% INF.	103.8	108.4	-	-	17.6
EDTA (0.04M)	18% NO INF.	15.0	15.6	16.0	17.7	17.0
	18% INF.	13.2	21.4	-	-	17.6

表 2

CH50 AND  $[^{14}\text{C}]$ -LEUCINE IN COMPLEMENT IN RAT SERA ON 3RD AND 13TH DAY IN S. AUREUS INFECTION

DIET AND GROUP	3RD DAY				13TH DAY			
	CH50	$^{14}\text{C}$ IN C	SPEC. ACT.		CH50	$^{14}\text{C}$ IN C	SPEC. ACT.	
18%	INFECTION	138.4 ± 5.22	244.4 ± 23.17	1.80 ± 0.177	117.6 ± 2.25	90.0 ± 32.92	0.77 ± 0.292	
	NO INFECTION	106.0 ± 1.00	128.6 ± 11.93	1.21 ± 0.113	106.0 ± 1.00	84.1 ± 24.66	0.80 ± 0.231	
0.5%	INFECTION	113.2 <sup>**</sup> ± 0.97	558.1 <sup>**</sup> ± 17.73	4.97 <sup>**</sup> ± 0.194	62.6 <sup>*</sup> ± 1.12	363.6 <sup>**</sup> ± 9.92	4.40 <sup>**</sup> ± 0.342	
	NO INFECTION	85.8 <sup>**</sup> ± 1.56	306.9 <sup>**</sup> ± 67.5	3.63 <sup>**</sup> ± 0.750	84.2 <sup>*</sup> ± 1.46	272.2 <sup>**</sup> ± 26.56	3.25 <sup>**</sup> ± 0.367	
B.G. 4)		17.6			13.8			

1) CH50 LEVEL/ML OF RAT SERUM DETERMINED BY SAKAMOTO'S METHOD.   
2) DPM/ML OF  $[^{14}\text{C}]$ -LEUCINE INCORPORATED IN SERA.   
3) SPEC. ACT. : RATIO OF  $[^{14}\text{C}]$  IN COMPLEMENT/CH50 IN 1ML OF RAT SERUM.   
4) B.G. : BACK GROUND COUNT OF ISOTOPE.   
\*\* : P 0.01, SIGNIFICANT DIFFERENCES BETWEEN 18% AND 0.5% GROUP IN BOTH GROUPS   
\* : P 0.05

25.

ウィルス肝炎における肝内 C1q の組織沈着—とくに HBs 抗原とのか  
がわり合いを中心—

井上純一, 辻孝夫, 荒木清典, 篠原徹, 尾上公昭, 土屋正夫,  
長島秀夫\*, 内藤紘彦\*\* (\* 岡山大 第一内科, \*\* 倉山病院 内科)

目的: 補体系 1 成分の C1q は補体反応系の classical pathway で抗原抗  
体複合物と最初に反応することが知られており, 近年, 結合組織の collagen  
と構造的にも部分的にも類似性を示す蛋白であることが判明し (1, 2, 3),  
さらにその体内組織局在についてもすでに膠原線維や線維細胞の細胞質に  
一致することや, リンパ球の中でその細胞膜に局在する細胞があることが  
疫学者らによって報告されている (4)。今回は, さらに慢性肝炎の進展秩序  
を免疫組織学的に解析することを目的としてこの C1q の局在様式を病因ウ  
イルスを区別し, 病時期を考慮して検討したので報告する。

対象および方法: 研究材料として当科に入院し, 腹腔鏡・肝生検あるいは  
剖検により組織診断の確定した Acute hepatitis (AH) 2 例, Fulminant hepa-  
titis (FH) 1 例, Chronic persistent hepatitis (CPH) 4 例, Chronic aggressive hepa-  
titis (CAH): (2A) 3 例, (2B) 15 例と Liver cirrhosis (LC) 5 例, Hepatocellular  
carcinoma (HCC) 6 例および Lupoid hepatitis (LH) 3 例, Portal fibrosis  
(PF) 1 例の計 40 例の肝組織を用いた。このうち, RPHA 法による HBsAg 陽  
性肝疾患は 23 例, 陰性 17 例である。C1q の肝組織内局在様式を検索する方  
法として蛍光抗体直接法を行い, 固定方法としては 2% パラホルムアルデ  
ハイド硫酸固定法あるいは冷アセトン法を用いた。一部の症例ではクリオ  
スタット連続切片にて C3, C4 の補体成分, IgG, IgA, IgM の各種免疫グロ  
ブリンの検索を行い, B 型肝炎患者例については型のごとく, tetramethyl  
rhodamine で標識した抗 HBsAg 免疫抗体を用いて二重染色を行い, C1q と  
HBsAg 陽性細胞や細胞壊死とのがわりあいについて検討を加えた。

成績: 1) AH 例では, C1q はグラー域で膠原線維に軽度陽性を呈するに過  
ぎず, 実質内の浸潤細胞の膜上の蛍光の強度も軽度であった。

2) CPH では AH と蛍光所見に差異はみられなかった。

3) 慢性活動性肝疾患では活動性病変の強いものほど piecemeal necrosis 部  
に一致して immune deposit 様の沈着をみ, 同時にその部には IgG, C3,  
C4 があつた。同様の所見は実質内にもみられ, 膠原線維あるいは格子線

維に一致して、さらに浸潤リンパ球の膜表面にびまん性ないしは顆粒状に C<sub>1</sub>q が強く染色された。以上の所見を Fig. 1 に示す。HBsAg 陽性の有無では、C<sub>1</sub>q 陽性リンパ球の局在および immune deposit 様沈着ともに両者に差異はなかった。

4) 肝小葉内で focal ないしは diffuse に肝細胞膜に一致して C<sub>1</sub>q 局在陽性所見がみられた。この膜様 C<sub>1</sub>q 局在は HBsAg 陽性 23 例中 6 例 26%、陰性 17 例中 3 例 17% であり、HBsAg 陽性例で高かった (Table 1)。

5) HBsAg 陽性 19 例の肝組織内での C<sub>1</sub>q と HBsAg 分布様式との検討では、肝細胞内に HBsAg をみみ例に膜様 C<sub>1</sub>q を 6 例中 5 例に認め、肝細胞内での局在様式では membrane & cytoplasm 型に 3 例、cytoplasm 型に 2 例であった。肝組織内の C<sub>1</sub>q 陽性リンパ球については、膜様 C<sub>1</sub>q 陽性例で程度は ± Ⅲ と一定の傾向はみく、C<sub>1</sub>q の immune deposit 様沈着については ± Ⅱ と非膜様例に比べ強い傾向にあった (Table 2)。

6) 膜様 C<sub>1</sub>q 陽性例について、補体成分、免疫グロブリンの肝細胞膜局在を検討すると (Table 3)、IgG は HBsAg 陽性 5 例中 2 例に、陰性 3 例中 1 例に認められた。疾患名はそれぞれ LC, HCC, および CAH (2B) であり、疾患の特徴はみられなかった。IgA, IgM については同部位に認められず、C3, C4 も膜様 C<sub>1</sub>q 陽性部位には検出されなかった。

総括と結論: 1) AH, CPH ではグラー域の C<sub>1</sub>q 陽性所見は軽度であった。

2) 慢性活動性肝疾患では piecemeal necrosis 部に一致して immune deposit 様の沈着をみたが HBsAg 陽性の有無で差異はみられなかった。3) 膜様 C<sub>1</sub>q 局在は HBsAg 陽性 23 例中 6 例 26% に、陰性 17 例中 3 例 17% にみられた。

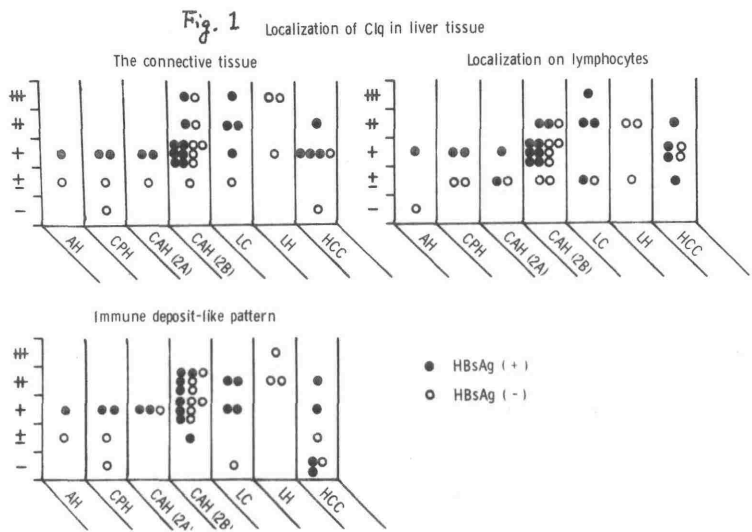
4) これら膜様 C<sub>1</sub>q 陽性例では同時に IgG を認明できるものとできないものとかあり、両群に疾患の特徴は認められなかった。

以上、ウールス肝炎患者の肝内 C<sub>1</sub>q 組織局在所見で immune deposit 様沈着と肝細胞膜上に特異蛍光を認める場合はともに肝炎が臨床的、病理学的に活動型を呈するものが多く、肝細胞壊死と C<sub>1</sub>q とのかかわりあいから示唆された。

## 文献

- 1) Stround, R.M., et al.: Sub-units of the first complement component in immunologic deficiency syndromes: Independence of C1s and C1q. Clin. Exp. Immunol. 7, 133-137. 1970.

- 2) Reid, K.B.M.: A collagen-like amino acid sequence in a polypeptide chain of human Clq( asubcomponent of the first component of complement), Biochem.J. 141, 189-203, 1974.
- 3) Reid, K.B.M., et al.: Subunit composition and structure of subcomponent Clq of the first component of human complement. Biochem.J. 155, 19-23, 1976.
- 4) Tsuji, T., et al. : Tissue localization of Clq in HBs antigen positive liver disease patients by direct immunofluorescent technique. Acta Med,Okayama, 31, 81-89, 1977.



**Table 2**      Detections of positive Clq on hepatic cell membrane in various liver diseases

Histological diagnosis	No.Cases	No.Positive	HBsAg Positive		HBsAg Negative	
			No. Cases	No. Positive	No. Cases	No. Positive
AH	2	0	1	0	1	0
CPH	4	0	2	0	2	0
CAH (2A)	3	0	2	0	1	0
CAH (2B)	15	4 (26.7) <sup>a</sup>	8	2	7	2
LC	5	2	4	2	1	0
LH	3	1	0		3	1
HCC	6	2	4	2	2	0
Other type	2	0	2	0	0	
Total	40	9 (22.5)	23	6 (26.0)	17	3 (17.0)

a. Number in parentheses, number in percentage



**Table 2.** Detections of tissue HBsAg and tissue Clq in HBsAg positive liver disease patients

Histological diagnosis	No. Cases	HBsAg pattern in lobules		HBsAg pattern in cells		Localizations of Clq								
		Extra-hepatic cell	Hepatic cell	Membrane & cytoplasm	Cytoplasm only	Lymphocytes				Immune deposits				
						-	±	+	++	+++	-	±	+	++
AH	1		1	1		1								1
CPH	2		2		2			2						2
CAH (2A)	2		2	1	1	1	1							2
CAH (2B)	8(2)	2	6(2) <sup>a</sup>	5(2)	1			6(1)2(1)			1	3(1)4(1)		
LC	4(2)	1(1)	3(1)	2(1)	1	1		2(1)1(1)			2	2	2(2)	
HCC	2(2)		2(2)		2(2)	1(1)	1(1)							2(2)
Total	19(6)	3(1)	16(5)	9(3)	7(2)	4(1)10(2)4(2)1(1)					1	12(3)6(3)		

a. Number in parentheses, number in positive Clq on liver cell membrane patients

**Table 3.** Clq, C3, C4 and immunoglobulins on liver cell membranes

HBsAG	No. cases	Ig G		Ig A		Ig M		C3		C4	
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Positive group	5	2	3	0	5	0	5	0	5	0	5
Negative group	3	1	2	0	3	0	3	0	3	0	3

## 26. 抗補体剤 K-76 による endotoxin 肝障害の阻止効果について

尾上公昭, 辻孝夫, 荒木清典, 篠原徹, 土屋正夫, 井上純一,  
長島秀夫\*, 内藤紘彦\*\* (\*岡山大学第一内科, \*\*熊山病院内科)

ヒトにおける劇症肝炎の病因として endotoxin の関与が注目されている。今回演者らは、補体阻害作用のある K-76 と endotoxin 肝障害時の Kupffer 細胞の機能のかわり合いを解析することを目的として、ラットに endotoxin (LPS; E. coli 026:B6) (Difco社) を用い、腹腔内に1回、または2回投与することにより肝障害を発生させ、蛍光抗体直接法にて肝組織内 LPS の局在を比較した。また補体成分阻害剤としては、補体成分 C5 阻害剤である K-76 を投与し、別に無処置実験群と immunopotentiator 投与群における阻止効果を比較検討した。

### (方法)

S.D.系ラット 120 匹(体重約 300g) を用い、使用薬剤は補体成分 C5 阻害剤 K-76, PSK, LZM, OK-432 の immunopotentiator と無処置実験群の合計 5 群である。K-76 は endotoxin 投与前から腹腔内へ 5mg ずつ連日投与し、OK-432 は 5KE を 2 回腹腔内投与、PSK (5% 水溶液), LZM (0.1% 水溶液) は連日経口投与を行った。実験方法は LPS (E. coli 026:B6) 1.0mg 大量 1 回投与実験と 2 回投与実験(初回 0.1mg, 2 日後に 2 回目 0.05~1.2mg) を行った。全例につき、ルチンの染色法による組織学的検討と FITC 標識抗 LPS (Difco社) を用い、蛍光抗体直接法による LPS の局在様式を検討し、特に生存例については心腔内採血により確保した血清にて肝機能検査を行った。

### (成績)

1 回投与実験では、無処置実験群, PSK 群, LZM 群各 6 匹のうち死亡例はそれぞれ 4 匹, 5 匹, 4 匹であり、肝組織内 LPS は Kupffer 細胞, 肝細胞, 類洞血管内に局在した。また、死亡例と生存例を比較すると生存例で類洞血管内局在が少なかった。2 回投与実験では各群において死亡例はほとんどなく、死亡例数による有意差はみられなかったが、2 回目 LPS 1.2mg 投与実験でのみ、PSK 群 5 匹中 3 匹が死亡し、無処置実験群, LZM, OK-432, K-76 の各群に比較し、死亡例が多かった。肝機能検査成績を比較してみると S-GOT 値では LZM 群, K-76 群に低値を示す傾向にあった (Fig.1) が、S-GPT 値には傾向がなかった。S-LDH 値をみると LZM 群と K-

76 群では、実験群に比較して、有意の低値を示した (Fig.2)。その他 bilirubin, AL-Pase 等の肝機能には傾向は認められなかった。蛍光抗体法による LPS の染色所見では、LZM 群、K-76 群に Kupffer 細胞の肥大増殖がみられたが、特に K-76 群では Kupffer 細胞内の顆粒が大きく、時には inclusion body 様の染色を示すものもあり、貪食様式の違いを考えさせた。  
(総括と結論)

ヒトにおける劇症肝炎の病因を endotoxin と間葉系細胞の機能とのみから解析することを目的として、ラットに LPS を投与し、抗補体剤 K-76 を中心に各種薬剤につき、その肝細胞障害発生阻止効果について検討した。その結果、LZM 群、K-76 群で血清 GOT 値、LDH 値が対照に比較し低値を示し、肝障害発生阻止効果がうかがわれ、さらに肝組織内 Kupffer 細胞の LPS 貪食所見が強かった。これらの成績から endotoxin 肝障害は Kupffer 細胞の機能との関係が重要視されると共に、抗補体剤 K-76 と網内系組織とのみから解析することが強く示唆された。

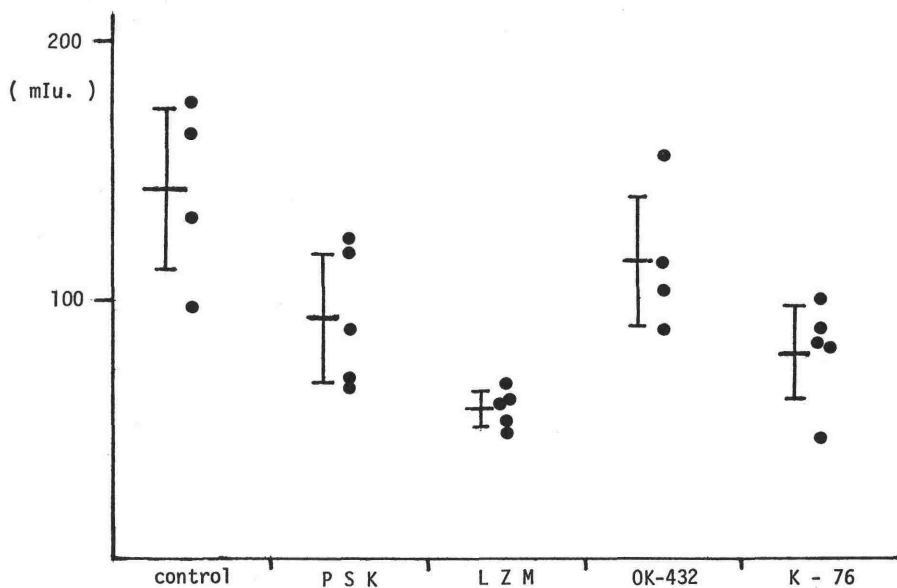


Fig.1 S-GOT Levels in Various Groups of Experimental Endotoxin-induced Hepatitis.

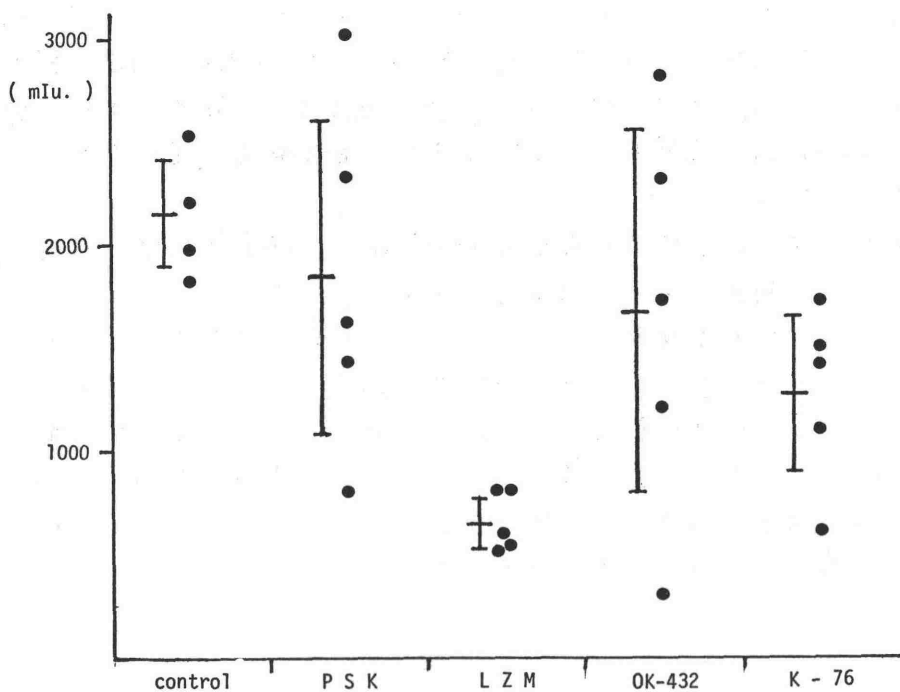


Fig.2 S-LDH Levels in Various Groups of Experimental Endotoxin-induced Hepatitis.

## 原発性肝癌における神経

田上広樹 渡辺幸一 吉川敏一 近藤元治  
(京都府立医科大学第1内科)

松浦直幸 西田康一 細川計明  
(同大学第3内科)

〈目的〉 癌患者における血清神経は、癌の進展と共に上昇する二つが一般的に知られているが、原発性肝癌においては従来の報告に一定の傾向を認めない。一方、血清神経は測定の問題点として、神経の Cold activation (以下 CA) という現象が重視されている。この現象は血清を終濃に凍存すると神経系が活性化され、溶血神経が急速に低下するものゝ、肝疾患、特に慢性肝炎、肝硬変に高率に認められている。我々では多くの原発性肝癌が肝硬変を合併することから、これら肝硬変の原発性肝癌における血清神経の報告に疑問がもてられた。今回、我々はこれを考慮して原発性肝癌における、1) 血清神経 (CH50) を検討すると共に、2) ACH50 (Alternative Pathway Activity), 3) 神経蛋白成分、4) 臨床経過における神経の変動について検討した。

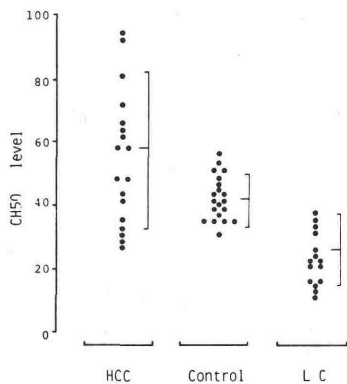
〈対象と方法〉 京都府立医科大学及び関連病院に経験した、8例の原発性肝癌 (肝硬変合併、4例、非合併4例) について、37°C で血清分離した後、CH50 を Mayer 法で測定した。止むなく凍存する場合にのみ血清に NaCl を終濃度 0.53M となるよう添加し、CA を阻止した。ACH50 は非感作ツヤギ赤血球の溶血を利用し、神経蛋白成分は一元免疫拡散法で測定した。

〈成績〉 原発性肝癌における、1) 血清神経 (CH50) は  $58.1 \pm 4.00$  び、健康人 (22例) の  $42.45 \pm 6.49$  に比し明らかに高値を呈した。同一検体を 4°C、6 時間放置すると CH50 は  $27.93 \pm 13.24$  に低下した。2) ACH50 は正常範囲ない高値に分布した。3) 神経蛋白成分では、C18, C5 の上昇が著明で、C9 は高値を呈した。C1INH は正常範囲ない高値を呈し、C3, C4 では殆んどが正常範囲であった。4) 抗癌剤未使用症例の経過では、CH50 の低下、C5, C1INH の増加を認め、C9 に大きな変化はなかった。また抗癌剤使用症例の経過では、

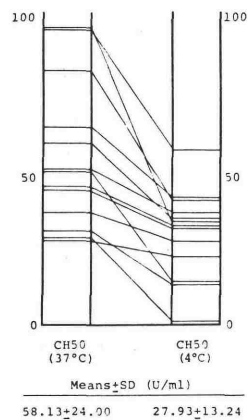
CH50の低下, CINH, C9の減少を認めだが, C5は変動するも増減の傾向はなかった。

〈考察と結論〉 肝癌生体における血清神経因子は病期、病態を考慮しなければならぬが、一般的に高い神経レベルを呈するといわれている。今回の検討より、原発性肝癌における血清神経因子と他の癌と同様に上昇することが判明した。しかしながら、患者血清を室温下に保存すると神経CAによりCH50は低下する。又、肝硬変合併の有無にかかわらず神経CAの影響をうける。このことは、従来の経路を呈すると報告された肝癌の神経因子は、神経CAの影響をうけていた可能性を推察させた。又、ACH50の上昇より alternative pathway の亢進も重要であると考えられた。一般的に高神経因子を呈する諸因子として、1) 神経系刺激物質による神経因子の産生亢進、2) Inhibitors による消費の抑制、3) 神経因子の生産 catabolism の低下、4) 癌細胞での神経因子の産生等が考えられる。今回の各神経成分の検討より、C1g, C5の著明な増加、CINH, C9の比較的増加を呈したことより、これらの神経成分の産生が何らかの原因で亢進されたか、或いは消費が抑制されたと考えられた。C4, C3については殆んどが正常範囲に分布するにもかかわらず、CINHの著明な上昇(>50mg/dl)を呈した3例に限り、C4, C3の著明な上昇があり同時にC5, C9は一段と上昇していた事実は、Inhibitor の働きのことより興味深い。又、最近 Cortex ライブラットヘパト-A由来細胞株を用いて、C4, C3, C5、並びにCINHの神経因子が産生されることを報告しているが、我々の今回の成績と考え合わせると、特に原発性肝癌においては、癌細胞における神経因子の産生も考慮が必要なのと思われた。現在、更に検討中である。

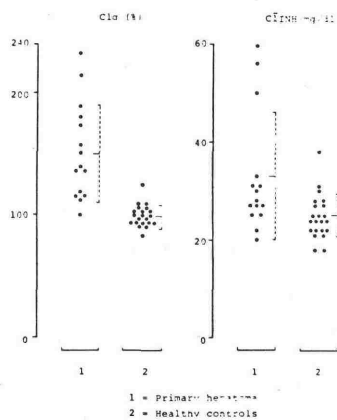
Serum CH50 levels  
in patients with liver diseases



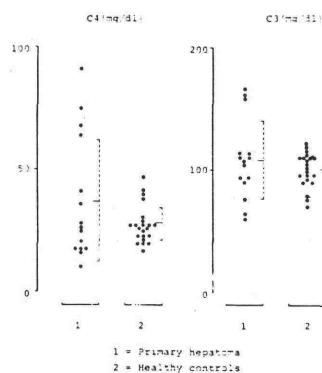
Cold activation of complement  
in patients with primary hepatoma



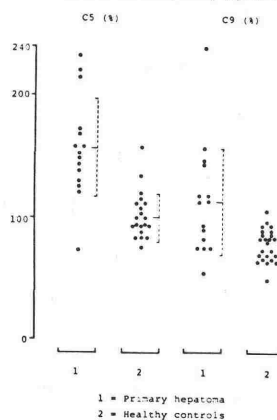
Values for C1q and C1INH  
in patients with primary hepatoma



Values for C4 and C3  
in patients with primary hepatoma

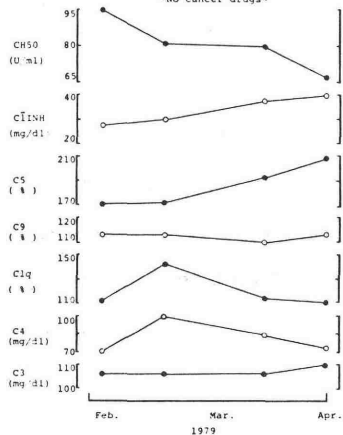


Values for C5 and C9  
in patients with primary hepatoma

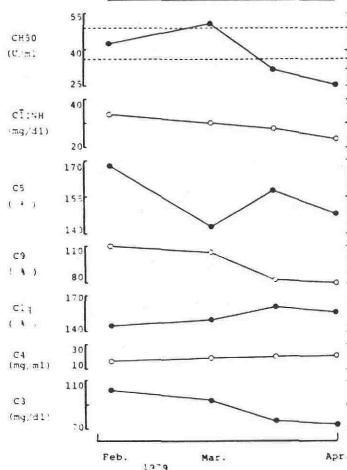


Follow up studies for  
CH50 and complement components

Case 1. S.U. (54 Y.O.) Primary hepatoma  
-No cancer drugs-



Follow up studies for  
CH50 and complement components  
Case 2. M.M. (60 Y.O.) HCC WITH LC  
S-PU (750mg/dl, NCS1600U/W)  
WMC (10-2 in total)



船橋修之、児玉順三<sup>1)</sup>、岡崎 晃<sup>2)</sup>、河原 勉<sup>2)</sup>、沼田憲男<sup>2)</sup>  
小沢 満<sup>3)</sup>、田村博昭<sup>3)</sup>、下江庄司<sup>4)</sup>

国立大阪病院 臨床検査部、外科<sup>2)</sup>、産婦人科<sup>3)</sup>、泌尿器科<sup>4)</sup>、  
国立循環器病センター 臨床検査部<sup>1)</sup>

非特異的な癌免疫療法は、今や、日常癌治療の中に組み入れられる趨勢にある。しかし、より効果的に免疫療法を行うためにも、担癌患者の選択、効果判定に臨床上何らかの有力なパラメーターが必要とされる。この目的にそって、我々はOK-432を手術、抗癌薬剤投与、X線療法などと併用した症例について治療開始前後の免疫パラメーターが示す変動について検討した。OK-432投与は細胞性免疫のみならず液性免疫機能の賦活及び補体活性の変動もみられた(臨床免疫に投稿中)。今回、これらの症例について補体系蛋白を測定し、OK-432投与前後でのC1q、C1s、C4、C3c、C5、C9及びC1INH、C3bINH、properdin、C3ACTについて検討したので報告する。

#### 〔対象と方法〕

対象症例は胃癌(10例)、子宮癌(8例)、肺癌(4例)、膀胱癌(4例)、その他、卵巣癌(2例)、乳癌(2例)、腎癌(3例)、食道癌(2例)、白血病(2例)、副腎腫の肝転移肝癌(1例)、リンパ肉腫(1例)、免疫不全症(1例)、計40症例である。

OK-432単独治療例は9例で、他は全て抗癌薬剤又はX線との併用症例である。使用した抗癌薬剤はMMC、5-FU、FT-207、BLM、CQなどの組み合わせで、X線、コバルト照射を併用した症例もある。OK-432投与は原則として初回0.2KEより始め、0.5、1.0と段階的に漸増し、2.0KEにて維持した。補体系蛋白の定量は単拡散法にて測定した。C1q、C1s、C5、C9、C1INHはBehringwerkeの抗血清を使用、properdin、C3bINHはKent社の抗血清を使用して単拡散プレートを作り測定した。C3c、C3ACT、C4はM-partigen plateを用いた。測定値はQS標準血清を100とした場合の%で示した。

#### 〔結果〕

対象症例30症例のうちCH<sub>50</sub>値が30u/ml以上を示す症例は23例(76.9%)と癌患者では高CH<sub>50</sub>値を示すものが多い。OK-432投与後のCH<sub>50</sub>値は科別に見ればその増減に差はあるが全体的に見ると46.7%が増加、26.7%が減少又は不変である。OK-432投与後、高CH<sub>50</sub>を示す症例のうち約半数が更に高CH<sub>50</sub>を示すようになる。24症例についてOK-432投与前と1ヶ月後の補体成分、



Inhibitor, Activator の蛋白を定量した。対象癌患者の補体成分は正常人とくらべて全ての成分が高値を示し、特に  $C_9$ 、 $C_5$ 、 $C_{1s}$ 、 $C_4$  が高いものが多い（図I、III）。OK-432投与1ヶ月後の補体成分の変動は投与前既に高値を示す成分は投与後も高値であり、全般的に更に高値となる。投与前後で最も変動が見られた成分は相関係数から見て  $C_{3c}$  である（図II）。

$C_{1INH}$ 、 $C_{3ACT}$ 、 $C_{3bINH}$  が投与前に正常人のそれより高値を示し、そのうちでも  $C_{1INH}$  が最も高い。しかし properdin は正常人以下の値をとるものが多い。OK-432投与後は properdin が低い症例で増加傾向が見られ、これら4成分のうち最も変動する（図I）。

properdin、 $C_{1INH}$ 、 $C_{3ACT}$ 、 $C_{3bINH}$  蛋白の変動と補体各成分、並びにこれら相互間における関連性をみるため、OK-432投与前後についてそれぞれ相関係数、相関直線を求めた（表1）。全体的に見て、どの成分もあまり良い相関性は見られないが、そのうちでも properdin と  $C_{3bINH}$ 、 $C_{1INH}$  と  $C_{3ACT}$ 、 $C_4$ 、 $C_9$  が、 $C_{3bINH}$  と  $C_9$  がやゝ相関性を示し、OK-432投与前後では  $C_{1INH}$  と  $C_{3c}$ 、 $C_{3ACT}$  が、 $C_{3ACT}$  と  $C_{3c}$ 、 $C_5$  が、 $C_{3bINH}$  と  $C_{1INH}$  がより相関性は良くなる。

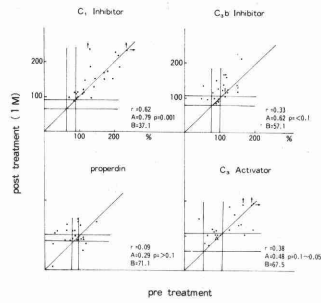
$CH_{50}$  値と補体系成分の蛋白量との関連を知るため、OK-432投与前後の症例件数を高  $CH_{50}$  を示す群と低  $CH_{50}$  値を示す群とに分け  $CH_{50}$  正常群と比較した（図II）。正常補体価群に比べ低、高補体価群は補体系各成分は properdin 以外は全て高い値を示し、その差の程度は  $C_9$ 、 $C_5$ 、 $C_{1s}$ 、 $C_4$ 、 $C_{1INH}$  の順で大きい。 $C_{1q}$ 、 $C_{3ACT}$ 、 $C_{3bINH}$  は正常群よりやゝ多い程度の増加である。

properdin のみが正常域かそれ以下の値を示し、低補体価群において著大な低下が見られる。低、高補体価群での補体系各成分を見ると、低補体価群は高補体価群に較べ各成分はすべて低い。そのうち差の大きな成分は  $C_{1q}$ 、 $C_{3c}$ 、 $C_5$ 、 $C_{1INH}$  である。以上要約すると、

1. 担癌患者の補体系各成分蛋白は properdin 以外全て高値であり、 $C_9$ 、 $C_5$ 、 $C_{1s}$ 、 $C_4$ 、 $C_{1INH}$ 、 $C_{3ACT}$  の順で増加している。properdin は正常域かそれ以下である。
2. OK-432投与後の補体系蛋白は  $C_{3c}$  が最も変動は大きいが著明増加例はない。 $C_{1INH}$  は最も変動なく、他の成分は増加傾向である。properdin は前値の低いものは正常域又はそれ以上に増加する。
3.  $CH_{50}$  値の高低と補体系蛋白は癌患者では低補体価でも properdin は低い。他の成分は全て高値である。
4. 各補体系成分蛋白間に於ける相関性は  $C_{1INH}$  と  $C_4$ 、 $C_9$ 、 $C_{3ACT}$  が、properdin と  $C_{3bINH}$  が、 $C_{3ACT}$  と  $C_9$  がやゝ相関性を示す。

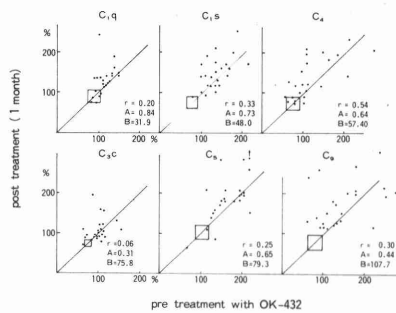
Alteration of C<sub>1</sub> INH, C<sub>3</sub>b INH, properdin and C<sub>3</sub> activator in cancer patients treated with OK-432

☒ I



Alteration of complement components in cancer patients treated with immunopotentiator, OK-432

☒ II



Comparison of protein in complement system with low and high CH<sub>50</sub> titer groups

☒ III

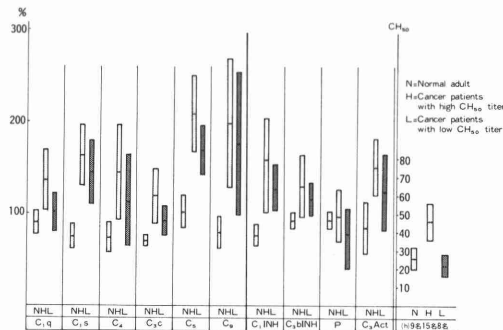


表 1.

Interrelation between complement inhibitor, activator and complement components in cancer patients treated with OK-432

Y \ X		C <sub>1</sub> q	C <sub>1</sub> s	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub> c	C <sub>3</sub> a	C <sub>4</sub>	C <sub>1</sub> INH	C <sub>3</sub> a	Prop	C <sub>3</sub> bINH
C <sub>1</sub> INH	pre	0.00	0.00	0.50	0.06	0.24	0.39		0.15		
	A	0.03	-0.00	0.59	0.50	0.60	0.42		0.42		
	B	136	140	66	89	31	74		82		
	post	0.18	0.00	0.34	0.31	0.20	0.37		0.46		
properdin	pre	0.00	0.00	0.50	0.06	0.24	0.39		0.15		
	A	0.03	-0.00	0.59	0.50	0.60	0.42		0.42		
	B	136	140	66	89	31	74		82		
	post	0.18	0.00	0.34	0.31	0.20	0.37		0.46		
C <sub>3</sub> Act	pre	0.00	0.00	0.50	0.06	0.24	0.39		0.15		
	A	0.03	-0.00	0.59	0.50	0.60	0.42		0.42		
	B	136	140	66	89	31	74		82		
	post	0.18	0.00	0.34	0.31	0.20	0.37		0.46		
C <sub>3</sub> bINH	pre	0.00	0.00	0.50	0.06	0.24	0.39		0.15		
	A	0.03	-0.00	0.59	0.50	0.60	0.42		0.42		
	B	136	140	66	89	31	74		82		
	post	0.18	0.00	0.34	0.31	0.20	0.37		0.46		

γ indicated coefficient of correlation  
A and B indicated linear:  $y = AX + B$   
pre and post showed pre-treatment and post-treatment

マウス補体 C4 成分の測定法としては, 前々回の本ミニポジウムで報告した  $\text{EAC1}^{9p, \text{oxyC2}^{hu}}$ ,  $\text{EDTA-C}^{9p}$  を使う方法 (E-C' 法) と, 最近 Nussenzweig らの報告した  $\text{EAC1}^{9p, \text{oxyC2}^{hu}}$   $\text{C4D}^{9p}$  を使う方法 (C4D 法) とがある. 原理的には両方法とも C4 活性を測っているはずであるが, 今回我々はこの 2 つの測定法で, 感度の差によるものではない異なる結果を得たので報告する.

### (結果と考察)

#### 1) 血清と血漿 C4 活性の違いについて

BALB/c, DDI ( $\text{Ss}^h$ ) について, E-C' 法では血清の方が血漿よりも高かったが, C4D 法では逆に血漿の方が血清よりも高かった. また血清は E-C' 法の方が高く, 血漿は C4D 法の方が高かった. ところが  $\text{Ss}^h$  にはあるが  $\text{C5}^-$  strain である B10.D $\alpha$ /o や DDD では C4D 法によると血清, 血漿ともにゼロ, E-C' 法では血漿でほとんどゼロであった. 従ってマウス C4 活性測定系に マウス C5 の関与の可能性が考えられる.

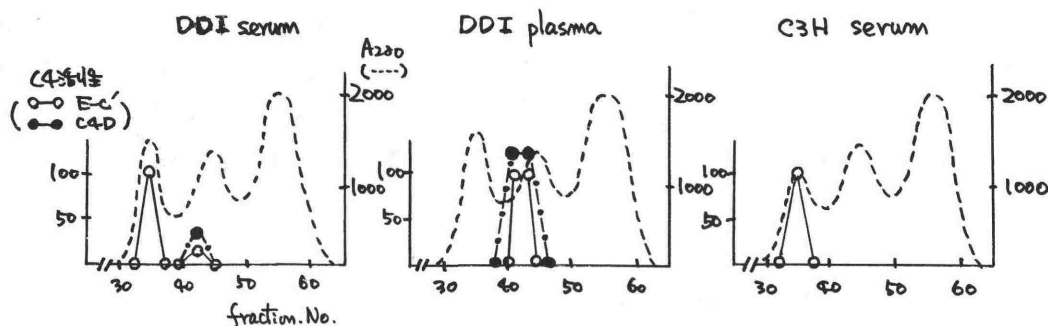
strain.		serum		plasma	
		C4D	E-C'	C4D	E-C'
DDI, BALB/c	$\text{Ss}^h$ $\text{C5}^+$	40	360	240	120
B10.D $\alpha$ /o, DDD	$\text{Ss}^h$ $\text{C5}^-$	0	360	0	±
C3H	$\text{Ss}^d$ $\text{C5}^+$	0	360	0	±
AKR	$\text{Ss}^d$ $\text{C5}^-$	0	360	0	0

#### 2) Sephadex G-200 による分画の活性測定

Nussenzweig らによれば  $\text{Ss}$  は血清中では bp と結合しているが血漿中では free の形で存在している. そこで血清と血漿での C4 活性の差が  $\text{Ss}$  の存在様式の違いにあるかどうかを調べるため, 血清を  $\text{VBS}^{9p}$ , 血漿を  $\text{EDTA-VBS}$  の各 buffer で G-200 クロマトを行ない C4 活性のパターンを調べた.

図に示すように 血清の場合 E-C' 法では 1 ピークに全 C4 活性の約 8 割が, 2 ピークに 2 割というように分布するが, C4D 法では 2 ピークにのみ活性がみられた. 血漿の場合は E-C' 法, C4D 法の

両方法で第2ピークにのみ活性がみられた。さらに C3H 血清では第1ピークにのみ E-C 法で活性がみられ、第2ピークにはどちらの方法でも活性はみられなかった。



また血漿の第1ピークと第2ピークをあわせて VBS<sup>TM</sup> でクロマトし、E-C 法ではかると 活性は第2ピークから第1ピークに移動し かつ せいは C4D 法ではゼロであった。

このことから E-C 法は bp と結合した C4 活性をはかれるが C4D 法は free の C4 しか活性としてはかれないと考えられる。

### 3). C2<sup>9P</sup> の結果.

2つの測定法に違いを求めると C4D 法で assay 系に供給される C2<sup>9P</sup> が考えられる。つまり C2<sup>9P</sup> は free C4 とは effective に反応するが C4-bp complex とは反応しにくいことが考えられる。しかし C2<sup>9m</sup> と C2<sup>9P</sup> を比率を変えて free C4 に対して加えてみたが C2<sup>9P</sup> は effective に働き、complex 型の C4 に対しても同様であった。従って assay 法による C4 活性の違いは C2<sup>9P</sup> 以外に原因があると考えられる。

### 30. マウス C3 の構造遺伝子座のクロモソーム上の位置決定

坂井俊之助<sup>1</sup> 軍川純一郎<sup>2</sup> 天野重昭<sup>1</sup> 高橋安信<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 金沢大学がん研究所免疫生物部

<sup>2</sup> 金沢大学医学部実験動物施設

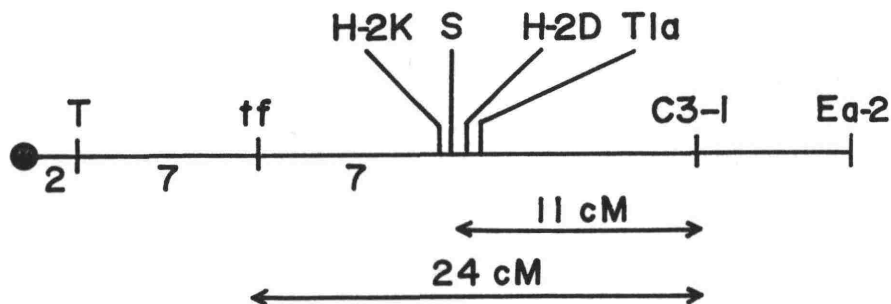
マウス C3 の構造多形性 (アロタイプ) が単一の遺伝子座によって支配され、しかもそれが H-2 の近傍に存在していることが、我々及び別の研究グループによって 1978 年に報告された (1, 2)。我々はこの遺伝子座を C3-1 locus と命名した。その後、マウス C3 のアロタイプに対するアロ抗血清の作製に成功し、この C3-1 が構造遺伝子であることを主張し (3, 4)、更に C3-1 locus の複対立遺伝子が野生マウス、胎児新生児マウスに於ても発現されていることを明らかにした (4, 5)。C3-1 locus は H-2 から 11 centimorgan (cM) の位置にあることは既に報告しているが H-2 の遠位側にあるか近位側にあるかは不明であった。本研究では、マウスのオ 17 クロモソームの遺伝子マーカーとして xf を用い、これと C3-1 との連鎖の程度を調べることによって、C3-1 のクロモソーム上の位置を決定した。

〔方法〕 戻し交配を行ったマウス、(TF/GnLe × NC)F<sub>1</sub> × TF/GnLe, の xf の発現 (脱毛・再生を反覆する) <sup>の有無の決定</sup> は、マウスの生後 3 ヶ月までの期間、注意深く何度も観察することによって行った。その後、マウスの EDTA 血漿を用いて C3 アロタイプを決定した。C3 アロタイプ決定は、(1) ポリアクリルアミドゲル平板上の等電点泳動と immunofixation (文献 1, 3-5)、(2) アロタイプ抗血清 (文献 3, 4) の両法の併用によって行った。

〔実験成績〕 C3-1 と xf は同一クロモソームにあるから戻し交配マウスでは両者は連鎖して発現されていた ( $\chi^2 = 26.04$ ,  $p < 0.001$ )。但し、Recombination の割合は 24.0% で、C3-1 と H-2 の場合の Recombination frequency (11%) よりはるかに大きかった。xf と H-2 の距離は 7 cM、xf と centromere の距離は 9 cM である。一方では C3-1 と H-2 の距離は 11 cM であるから、C3-1 の位置は、17 クロモソーム上で H-2 よりも遠位側になければならない。図 1 に C3-1 の位置を示した (6)。

[考察] 最近、哺乳動物の幾つかの種で補体成分の構造遺伝子クロモソーム上の位置が報告されてきている(綜説として文献7)参照。その結果、補体系の増幅酵素の構成要素である C3, C4, B因子, C2 が全て、主要組織適応抗原複合体 (Major histocompatibility complex, MHC) と連関する遺伝子によって支配されていることが明らかになった。このことは、補体系が他の MHC 関連の生物機能(免疫反応、移植反応)とともに、脊椎動物への進化の過程で発展してきた事を示唆している(この研究の一部は 本年5月25日-28日、西ドイツ、ケルンで開催された 3rd International workshop on complement genetics に於て報告された)。

図1. C3-1 locus の、マウス第17号染色体上の位置



# [文献]

- (1) Natsuume-Sakai *et al.* *J. Immunol.* 121; 491, 1978.
- (2) Da Silva, F.P. *et al.* *Proc. N.A.S.* 75; 963, 1978.
- (3) Natsuume-Sakai, S., *et al.* *J. Immunol.* 121; 2025, 1978.
- (4) Natsuume-Sakai, S., *et al.* *J. Immunol.*, 123; in press, 1979.
- (5) Amaro, S., *et al.* *J. Immunol.* 122; 426, 1979.
- (6) Natsuume-Sakai, S., *J. Immunol.*, 123, in press, 1979.
- (7) Lachmann, P.J. and H.J. Hobart. *Brit. Med. Bull.* 34; 247, 1978.

## 31. 霊長類の補体系 II. 赤血球と血小板の補体レセプター

奥田 智子・橘 武彦（東北大・抗研・免疫）  
高橋 健治（京大・霊長所・生化学）

IAレセプター（IAR）は霊長類赤血球と非霊長類血小板に存在するとされている。しかし霊長類と非霊長類とで本当にそのような差があるのであろうか？あるとすれば何故であろうかという素朴な疑問を解くために、様々な進化段階にある霊長類と非霊長類について、いろいろな種の補体を用いて赤血球のIARを測定し、また血小板のIARをロゼット法で検出する方法を考案して測定し、比較免疫学的考察を行う。

〔方法〕 指示細胞：IARをロゼット法で検出するための指示細胞としてヒツジ赤血球を抗ヒツジ赤血球IgM抗体で感作し（EAM），様々な霊長類の新鮮血清と反応させてEACを得た。あるいはEAMC14<sup>0x2</sup>とEDTA-GVBで稀釈した血漿からEACを作製したものもある。用いる補体の濃度，反応時間は夫々の補体について20～30%程度溶血する条件を選んだ。原猿類の補体は更に50%溶血する条件でも行った。EAMC1423（C3：ヒト，モルモット，マウス）は精製した補体成分から作製した。

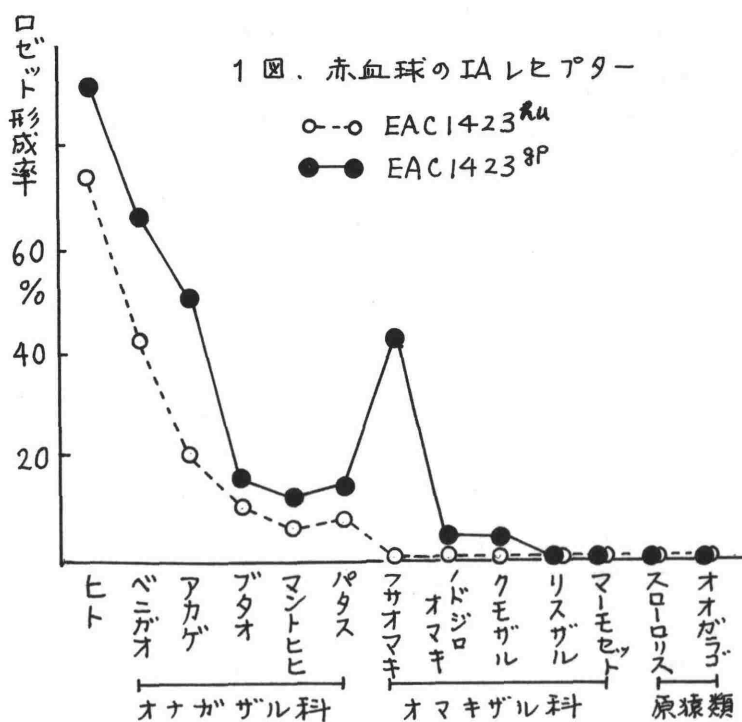
細胞分離：0.02M EDTA-PBSを含むプラスチックシリンジを用いて等容の血液を採取し，プラスチック試験管に入れたリンホプレップに重層して遠心し，管底より赤血球を，中間層より白血球分離を得た。赤血球はPBSで3～4回洗滌しPBSに再浮遊した。白血球分離は1000rpm 10分遠心して2回くり返してリンパ球を除き，上清を3000rpm 10分遠心して血小板を沈澱させ，PBSで3回洗滌してPBSに再浮遊した。

ロゼット形成：1). suspension法あるいは 2) マイクロテストプレート法を用いた。

1). Cooke社U型マイクロタイタープレートの中でEAC（ $1 \times 10^8/\text{ml}$ ）25 $\mu\text{l}$ と被検赤血球（ $1 \times 10^7/\text{ml}$ ）25 $\mu\text{l}$ を混和し，37°C 60分静置後静かに再浮遊し1個以上のEACを付着した赤血球の百分率を顕微鏡下に計数した。同様にEAC（ $1 \times 10^8/\text{ml}$ ）25 $\mu\text{l}$ と血小板浮遊液25 $\mu\text{l}$ を混和し，1000rpm 5分遠心して37°C 60分静置後再浮遊させ顕微鏡下に血小板を付着したEACの百分率を求めた。2). 橘らのリンパ球膜マーカー測定法を応用した。PLLで処理したFalcon社マイクロテストプレート3034にEAC（又は赤血球）を付着させ，PLLの陽性荷電を中和後血小板浮遊液（又はEAC）を加え37°Cに静置

後プレートも反転して未反応の血小板（又はEAC）を脱落させ、顕微鏡下にロゼット形成率を測定した。

〔結果及び考察〕 赤血球のIAレセプター：EAC1423<sup>flu</sup>又はEAC1423<sup>9p</sup>を用いて測定すると（1図）オナガザル科のニホンザル、ベニガオザル、アカゲザルではヒト赤



カゲザルではヒト赤血球より弱いながらもロゼットを形成する。オナガザル科でもより下等のフタオザル、マントヒヒ、パタスモンキーは非常に弱い。オマキザル科ではフサオマキザルがEAC1423<sup>9p</sup>と強く反応するが、他は極めて弱く原猿類赤血球は全く反応しなかった。

オナガザル科新鮮血清より作製したEAC（オナガザル科）

またはEAC（オマキザル科）を用いると（表1），オナガザル科赤血球は高いロゼット形成を示し，オマキザル科の中のインドジロオマキザル，フサオマキザルはオナガザル科と同程度の高いロゼット形成を示すがクモザルでは弱く，リスザルは更に弱い。シルバーマーモセット，原猿類のオオガウゴ，スローロリスではどの補体を用いてもその赤血球にIAレセプターを認める事ができなかった。

このように霊長類の長い進化の過程で赤血球のIAレセプター構造は変化し，進化的にヒトと離れているものはもはやEAC1423<sup>flu</sup>とは反応しないが，近縁の補体を用いて作製したEACとは反応する。しかし原猿類赤血球にはいずれの補体を用いてもIAレセプターを検出することができなかった。血小板のIAレセプター：オナガザル科およびリスザル以外のオマキザル科の血小板にはいずれの補体を用いてもIAレセプターを検出することができなかった。調べた霊長類の中で血小板にIAレセプターの検出されたものは



リスザル, オオガラゴであり, これらはヒト, モルモット, ウサギ, 霊長類いずれの補体を用いてもロゼット形成が見られ, 赤血球のIAレセプターが補体の種に強く依存するのと対称的である。赤血球と血小板とでロゼット形成メカニズムが異なるのか, あるいは両者のレセプター構造が異なるのかも知れない。霊長類では赤血球にIAレセプターが認められなにかあるいは非常に弱いオオガラゴ, リスザルにおいてその血小板にIAレセプターが認められ, 赤血球に明かにIAレセプターの認められるものでは血小板に認められなかった。しかしモルモット, ウサギでは血小板にIAレセプターが認められるが, 赤血球にも弱いながらIAレセプターが認められた。

表 1. 霊長類赤血球のIAレセプター (各種補体による)

EAC 赤血球	ヒ ト	ニ ホン ガル	ア カ ゲ ザ ル	ブ タ オ ザ ル	マ ン ト ヒ ヒ	イ ド ジ ロ オ マ キ	リ ス ザ ル	マ ー モ セ ット	オ オ ガ ラ ゴ	ス ロ ー ロ リス	モ ル モ ット
ヒ ト	74	56	54	56	23		35		2	82	92
ベニガオザル	42	48	44	39	84		75		0		66
ブタオザル	10	81	75	72	82		20		0		15
パタスモンキー	7	21	20	22	16		45		1		13
マントヒヒ	6	66	51	59	82		34		0		11
イドジロオマキ	2	73	79	66	75	85	86	74	1	0	0
フサオマキ	0		81	72	74	94	99	89	0	0	43
クモザル	0	2	9	29	22	28	28	63	0	3	0
リスザル	1	5	0	6	3	3	3	13	0	2	4
マーモセツト	0		0	0	0	0	0	2	0	0	0
オオガラゴ	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
スローロリス	0		0	1	0	1	0	0	0	1	0

阿部恒夫<sup>1)</sup>・小松正憲<sup>1)</sup>・山本健一<sup>2)</sup>・右田俊介<sup>2)</sup>

1) 農林水産省 畜産試験場, 育種部 2) 金沢大, がん研

〔目的〕 家兎における C6 欠損は、Rother et al., (1961) によりドイツにおける一系統に初めて発見され、その後メキシコ (Biro and Garcia, 1965) およびケンブリッジ (Lachmann, 1970) の系統においても見出されている。著者等は、家兎の溶血補体活性の品種・系統間差異を研究する過程において、アンゴラ種の一系統において C6 欠損を見出し、このことを第 16 回国際動物血液型学会に報告した。その後、その系統を用いて (1) C6 欠損形質の遺伝様式, (2) 抗-兎 C6 の作成および各動物血清に対する交叉反応性, C6 活性の比較, (3) 兎血清中の C6 レベルと遺伝子型との関係などについて検討したので報告する。

〔方法〕 材料: 農林水産省長野種畜牧場で閉鎖集団として飼育されているアンゴラ種 56 頭を供試した。動物血清は、採血後 1 時間以内に分離し、 $-80^{\circ}\text{C}$  に凍結保存した。

抗-兎 C6 の作製: C6 欠損成兎の四肢掌および筋肉内に C6 活性正常の兎血清 1 ml と FCA を等量混和したエマルジョンを第 1 回免疫し、2 回目以降は背部皮下に同量抗原を 2 週間隔で 8 回免疫した。

全溶血補体活性の測定: 0.5% の割合で感作 S R B C を含む 1% アガロース平板を作り、単純放射状溶血法により測定した。試料の量は  $10\mu\text{l}$  とし、反応時間は  $5^{\circ}\text{C}$ , 21 時間さらに  $37^{\circ}\text{C}$ , 1 時間とした。

C6 量の測定: 抗-兎 C6 を用いた単純放射状免疫拡散法によった。抗原量は  $4\mu\text{l}$ , 反応時間は室温 72 時間とした。

C6 活性の測定: 5% 感作 S R B C / ml, 新鮮 C6 欠損血清 0.25 ml および 1% アガロース・ハックス溶液 8.75 ml を混和したものをを用いてゲル平板を作り、単純放射状溶血法を実施した。試料の量は  $5\mu\text{l}$  とした。

C6 活性阻止試験: 血清試料 0.1 ml に抗-兎 C6 希釈血清 0.1 ml を混和し  $37^{\circ}\text{C}$ 、30 分放置後、その C6 活性をゲル内溶血反応により測定した。対照として C6 欠損血清を用いた。測定値は、saline control の値を 1.00 とした相対値で示した。

〔成績ならびに考察〕 (1) アンゴラ種集団中の溶血補体欠損個体は、51 匹中 25 匹 (49%) であり、欠損個体は外観上全く健康で異常は認められず、

繁殖性も正常のようであつた。

C6欠損形質に関する交配試験の結果は Table 1に示されるように欠損×欠損の交配からは欠損個体のみが産れ、欠損×正常の交配からは欠損個体と正常個体の産子が得られた。また欠損形質は性に関係なく発現していることから常染色体上の劣性遺伝形質であることが確認された。

Table 1. Inheritance of C6 deficiency in Angora rabbits.

Mating type	No. of families	Offspring		x <sup>2</sup>
		Normal	Deficient	
N × N	9	9 (7.48) *	0 (1.52)	1.829
N × d	19	14 (14.11)	10 (9.89)	0.002
d × d	5	0 ( 0 )	7 ( 7 )	-

\* Expected numbers

(2) C6欠損家兎に同品種の正常家兎血清を免疫注射することにより、β 域に1本の沈降線を示す抗体が産生された。各種動物の正常血清にこの免疫血清を加えるとそれぞれの血清中のC6活性が阻止されることから、この抗体は抗-C6であると推定された。( Table 2 )

Table 2. Inhibition test of C6 activity by anti-rabbit C6.

Animal serum	Antiserum	Antiserum dilution					Saline control
		1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	
Rabbit	Anti-C6	0	0	0	.06	.40	1.00 **
	Control *	.70	.70	.80	.93	.93	1.00
Cattle	Anti-C6	0	.01	.30	1.00	1.00	1.00
	Control	.50	.81	1.00	1.00	1.00	1.00
Pig	Anti-C6	0	0	.19	.38	.69	1.00
	Control	.30	.40	.50	.60	.87	1.00
Horse	Anti-C6	0	.01	.40	1.00	1.00	1.00
	Control	.60	.70	.75	.80	.90	1.00

\* C6 deficient rabbit serum were used as antiserum control.

\*\*C6 activity were expressed as relative value to saline control (1.00).

さらに、この抗血清を用いて各動物血清中のC6に対する交叉反応性をOuchterlony 法および Counter current immunoelectrophoresis によつて調べたところ Table 3 に示されるように、人、牛、豚、緬羊、山羊、犬、モルモット、マウス (ddy) に対して反応性を示したが、馬、ハムスター、鶏に対しては交叉反応性は認められなかった。家兎C6欠損血清を用いた感作SRBCの溶血系において各動物血清の相対的C6活性を比較したところ、C6活性と交叉反応性は必ずしも平行していなかった。すなわち、馬血清は抗C6と反応性は示さなかったがC6活性は認められ、一方マウスでは交叉反応性はあつたがC6活性は認められなかった。

Table 3. Cross-reactivity of various animal sera anti-rabbit C6, and comparison of C6 activity in the sera

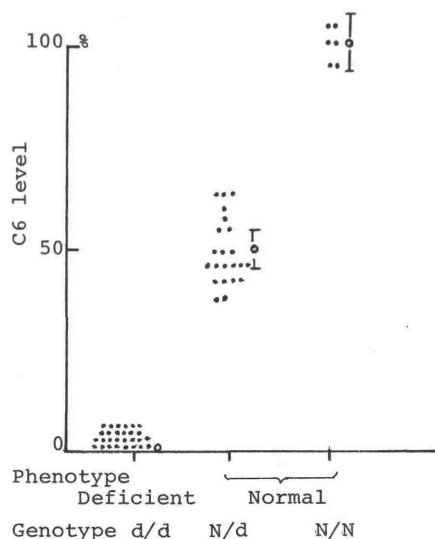
Animal	Number of samples	Cross-reactivity	Relative C6 activity
Normal rabbit	5	+++	1.00
C6 deficient rabbit	5	-	0
Human	1	++	2.46
Cattle	5	++	6.14
Horse	5	-	2.79
Pig	5	+	3.81
Sheep	5	+	4.59
Goat	5	+	2.10
Dog	2	++	5.30
Guinea pig	1	+	8.81
Hamster	1	-	0.25
Mouse	1	++	0
Chicken	5	-	0.05

(3) アンゴラ種集団の各個体血清中のC6量を抗-兎C6を用いて定量したところ Fig.1 に示されるように、正常レベルのもの6例、正常の約半量のもの28例、欠損のもの28例の3群に大別された。これらの分布は、C6欠損劣性遺伝子( $d$ )が集団中に0.7の頻度( $\div \sqrt{0.5}$ )で存在すると仮定した場合の期待値とよく一致した。またC6欠損アンゴラ雄( $d/d$ ) $\times$ 正常ニュージランドホワイト雌( $N/N$ )の交配から産れたF1( $N/d$ )8匹のC6量は、正常の約半量であった。これらのことから、家兎血清中のC6量は遺伝子型による量的差異を示すものと推察された。

Fig.1. Distribution of C6 level in the sera of Angora rabbit population.

### 〔結論〕

アンゴラ種兎の一系統にC6欠損個体が高頻度で存在することを発見し、その遺伝をしらべたところ無伴性劣性遺伝であることを確認し、血清中のC6量は遺伝子型により量的支配を受けていると推察した。また、C6欠損兎を免疫して得た抗-兎C6は、人をはじめとする他動物の血清中C6と交叉反応性を示すことを明らかにした。



33. 日本人における C3 (遺伝的) 多型現象の研究

京都府立医大・法医学：西岡弘明・阪田潔・山澤吉平  
神奈川県立こども医療センター：矢頭行夫・小菅啓司  
名古屋保健衛生大・小児科：矢崎雄彦  
大阪府立成人病センター：北村肇

血清(血漿)の高圧電気泳動を行うと異った易動度をもつ C3 band が見られ、この pattern は遺伝的に支配される事がわかっている。Alper & Propp (1968)の報告以来、高頻度であらわれる S とそれよりも高い易動度の F を含め、20 種以上の variants が健康人より発見されている。また C3 silent gene (C3<sup>-</sup>) が存在し、この同型接合体が C3 欠損 (C3-D) を示す事も見出された。さらに hypomorphic variant, つまり phenotype は見かけ上は FS 型であるが、F 域の蛋白質量は normal な FS 型の F の蛋白質量に比べ少く、phenotype f は C3<sup>f</sup> gene により発現されると見られる稀な variant も報告されている。これらのすべての phenotype は常染色体上の優劣の無い対立遺伝子、例えば C3<sup>S</sup>, C3<sup>F</sup>, C3<sup>f</sup>, C3<sup>-</sup> 等によって発現する事が確かめられている。我々は日本人を検査対象として C3 の遺伝的多型現象の検討を行った。

C3 型検査法… typing は 1 検体あたり 1.5  $\mu$ l の血清を使用し、了カロースケル高圧電気泳動法 (20V/cm, 1.5 hr. および 2.5 hr.) と抗原抗体交叉電気泳動法により行った。泳動の際、ケルの発熱が非常に大い為、効率的に強制冷却できる装置を考案し使用した。緩衝液は Ca<sup>2+</sup> を含む veronal buffer (Teisberg 1970) pH 8.6 で支持体は中等度の電気浸透 (-Mr = 0.15 ~ 0.19) の Agarose A-37 (半井) を使用した。

(1) 日本人の C3 型

血縁関係のない健康な 1,092 名について C3 型を調査すると、1,082 名は C3-SS 型、9 名は C3-FS 型、1 名は C3-SS<sub>slow</sub> 型 (後称) であった。なお SS 型と判定したものの中に genotype で C3<sup>S</sup> のホモの他、C3<sup>S</sup>/C3<sup>-</sup> や C3<sup>S</sup>/C3<sup>f</sup> 等のヘテロも含める可能性があるがこの判別は行っていない。上記の実験条件 (2.5 hr 泳動) での模式図を Fig. 1 に示す。FS 型の個体を含む 2 家族について遺伝調査を行ったが、すべての phenotype は常染色体上の優劣のない gene (C3<sup>F</sup>, C3<sup>S</sup>) の組合わせで発現されている事が確認された。しかし S および易動度の低い C3 成分をもつ SS<sub>slow</sub> 型はこの phenotype を支配する gene の異型接合体と思われるが家族調査が行えないので遺伝的であるとは

断定できない。以上の日本人試料より遺伝子頻度は  $C3^S=0.995$  となり、人類学的には白人 ( $C3^S=0.75$ , Alper & Propp 1968) より高頻度である。

## (2) C3 欠損 (C3-D) 家系調査

C3 蛋白量、C3 活性等の測定により C3 欠損 (C3-D) である事が判明した2個体を含む家系全員の血清を用い C3 typing を行った (別演題参照)。C3 蛋白量および活性値が NHS のそれらとほぼ同等である個体は電気泳動像で C3-S 部にのみ band を示し phenotype は SS と判定された。次に蛋白量・活性が NHS の約半分の値を示す個体では C3-S 部に染色性の低い band が見られ、phenotype を C3-(S-) とした。C3-D の個体では C3 域に band はあらわれなかった (C3-(-))。以上の調査結果で2人の C3-D は夫々 C3-(S-) の両親から生じており、この家系のすべての個体の C3 phenotype は  $C3^S$  と  $C3^-$  の gene の組合わでで発現されている事が確認できた。なお phenotype と genotype の関係は Fig. 2 に示す。

これとは別に、両親および子供の1人かともに  $C3^S/C3^-$  で残る1人の子供が C3-D と同様の pattern である家系が発見された。CH50 および C3 量を Fig. 3 に示す。しかしこの C3-D と思われた個体は膜性増殖性糸球体腎炎と診断され、この血清と NHS を混合した実験により C3-NaF をもっている事が示唆されたため、本来の genotype は  $C3^S/C3^S$  あるいは  $C3^S/C3^-$  である可能性も高く、遺伝的な C3-D とは断定し得ない。

## (3) C3 hypomorphic variant と思われる1例

C3 hypomorphic variant はこれまでに2例報告されている (Alper et al. 1971, McLean et al. 1978) が、いずれも phenotype は fS 型である。我々は52才の健康で重大な既応歴のない女性より同様の variant と思われる例を検出した。CH50 は 32u (NHS=41u)、C3 蛋白量は NHS の 69.5% であった。一次元の電気泳動像では C3-S 部とそれよりやや易動度の大きい部域に染色性の低い band が見られ、交叉泳動像の peak も染色濃度に比例した高さが見られた。S 部の band は normal の C3-SS 型に比べ染色度も弱く交叉泳動での peak も低い。そして易動度の大きい band の C3 量はこの S 部の約半分であり、日本人の C3-F より低易動度である。そこで一次元の高圧泳動後のゲルを等間隔に切り出し溶出液より C3 溶血活性を測定したところ、易動度の大きい部にも活性が認められたためこの様子の phenotype を一応 C3-f<sup>\*</sup>S とした (Fig. 4)。この実験は採血後3時間以内に行っており、再現性があり、かつ transferrin (Tf-C) とほぼ同易動度の  $\beta$ 1A-globulin は全く認められなかった。

以上がこれまでに得られた実験結果である。

日本人においては欧米人に対し C3 型の variants が極めて少ない事が特徴的である。したがって欧米で報告されている動脈硬化症や cystic fibrosis の集団には C3-F positive の頻度が高い (Sørensen & Dissing 1975, Schjøtz et al. 1978) という, variant と疾患との関係も日本人を対象に調査する事は困難であると見られ, 事実 400 人の日本人動脈硬化症患者を検査しても variant は 1 人も発見できなかった。

Fig. 1

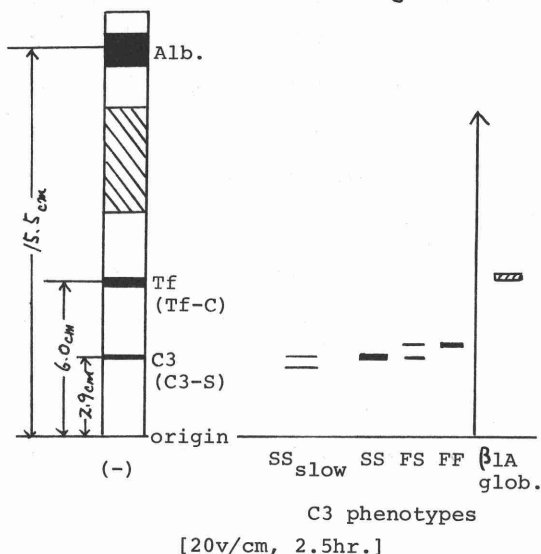


Fig. 2

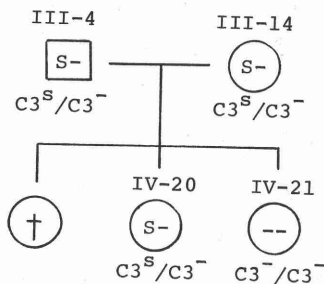


Fig. 3

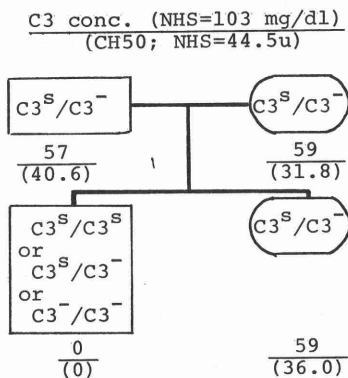
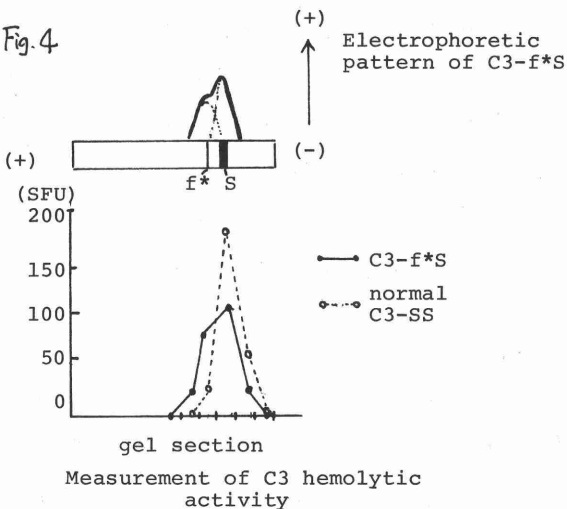


Fig. 4



## 34. Hereditary Angio Edema (HAE) の一家系と浮腫発現機序に関する考察

\* 河野通史 知本武久 藤咲淳 姫宮秀行

\*\* 三神昭雄

\* 北海道大学医学部第2内科

\*\* 札幌欽道病院第1内科

HAE は C1INH の質的あるいは量的な減少によってもたらされる、特異な浮腫発作と腹痛を特徴とする稀な疾患で、常染色体優性遺伝であることが知られている。本邦ではこれまでに確実なものが4家系報告されており、手嶋、永木、天野らによってかなり詳細な検討が加えられている。HAE の浮腫の成因に関しては、凝固、線溶、補体系にかかわる多数の *proteinase* と *proteinase inhibitor* の *Cascade* が想定されているが、そもそもの原因である、C1INH の減少については、Weiller の HAE の患者では *In vivo* において常に "hidden hemideficiency" の状態にあるという仮説が広く認められている。

今回我々は本邦では5番目の確実な HAE の家系を発見し、症例の検討を通じてこうした浮腫発現の機序に関する仮説を実際に証明しえたので報告する。

### <症例>

K.Y. 16才 女性

6才時頃より手指、前腕を中心として限局した移動性の浮腫が出現するようになり、同時に腹痛も頻発するようになった。その後一時寛解していたが、13時頃より再び浮腫、腹痛発作が頻発し、精査を求めて当科を受診した。受診時右肘関節下より前腕及び手全体に及ぶ *non-pitting edema* があり、手を握ることも困難であった。この浮腫に先立って激しい腹痛があり、白血球増多等も認められている。HAE を疑い、以下のような検討を行った。

### <材料と方法>

被検血清は全て  $-70^{\circ}\text{C}$  に保存し、検査時に融解して用いた。凍結融解は繰り返さないようにした。対照正常ヒト血清は男女各20名より得た血清を *pool* し  $-70^{\circ}\text{C}$  に保存したものを使用した。

CH<sub>50</sub>は Mayer の  $1/2.5$  変法によった。



C1, C4 は Borsoo と Rapp の方法, C2, C3, C5 は永木らの方法に従った。C1INH,  $\alpha$ 1-antitrypsin,  $\alpha$ 2-macroglobulin の定量は Behringwerke 社製 M-partigen plate を用いた。

C1INH の functional assay は CIs を enzyme とし、AGLMe を基質とする hydroxamate 法、ATEE を基質とする pH stat 法による esterase 活性で測定した。Esterase 活性の測定は北大薬学部衛生化学教室に依頼した。

### <結果>

CH<sub>50</sub> は患者の非発作時 32.0  $\mu$ 、発作時 34.1  $\mu$  と低下していたが、両者の間に差は見られなかった。又、家系内に CH<sub>50</sub> 値を示した者は無かった。

#### (図1)

C1 は患者の発作時、非発作時を含め、家系内に低下している例は見られなかった。

C4 は患者が、非発作時 11.4%, 発作時 14.5% と著明に低下していたが、両者の間に著明な差は見られなかった。家系内では母親が 2.2% に低下しており、母方からの遺伝であることが示唆された。

C3 と C5 は患者を含め、全例が正常であった。(表1)

C1INH は、蛋白量でみると、非発作時 31.5%, 32%, 発作時 36.5% でむしろ発作時の方が増加している傾向にあった。しかし、pH stat による測定では、非発作時 14.2%, 発作時 0% で、発作時には全々の C1INH が消費し尽されることが明らかとなった。母親の C1INH は蛋白量でみると 76% であるが、これまで浮腫、腹痛発作は経験したことがない。(表2)

$\alpha$ 1-antitrypsin は、345 mg/dl、 $\alpha$ 2-macroglobulin は 368 mg/dl であった。

患者は入院中手指背より浮腫を出現し、直ちに EACA 4g/6 hrs の割合で点滴静注したが、浮腫の伸展は阻止できず、EACA 投与中であるにもかかわらず、右前腕全体に及び、更に左手より前腕全体に拡大した。消腫に要した時間もそれまでの発作と同様に全く短縮されなかった。

### <考察>

HAE において何故発作的に浮腫が生ずるのかは実際のところ不明な点が多い。外傷などにより誘発されることもあるが、trigger のはっきりしないことも多い。我々の症例でも寒冷、温熱、運動などで誘発を試みたがいずれも成功しなかった。注目されることは、C1INH が蛋白量でみる限り、発作、非発作時其ほとんど変化が無いのに対して、activity でみると

、発作時に全でゼロになってしまう点である。このこと C1INH activity が残存する限り浮腫は発生しないことを意味しており、Weiller の仮説に近い実例と考えられる。我々の症例は、手嶋や永木らの症例と異なり CH<sub>50</sub> の低下も軽度で、C1 は全く正常であったが、これもあるいは、非発作時 C1INH の activity が 14% 程度はあっても保存されていたためかもしれない。

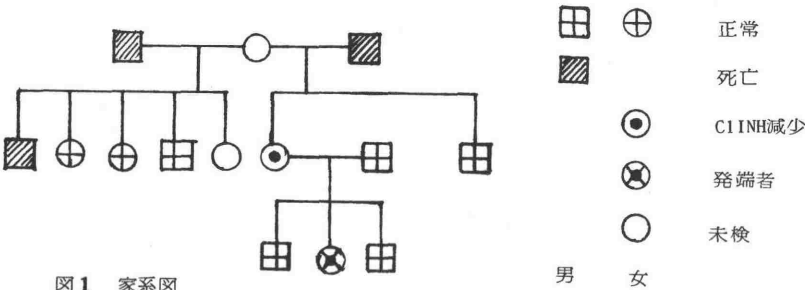


図 1 家系図

	患 者		母 親
	発作時	寛解期	
CH <sub>50</sub> (u)	34,1	32,0	43,6
C 1 (%)	106,3	117,5	132,0
C 2 (%)	14,5	11,4	21,0
C 3 (%)	75,5	79,0	93,0
C 4 (%)	183,6	145,7	112,9
C 5 (%)	104,8	128,7	92,6

表 1. 補体成分の溶血活性

	患 者		母 親	正常人
	発作時	寛解期		
蛋白量 (%)	36,5	31,5	76	100
活性 (%)	0	14,2 (0,48u/ml)	N D	100 (3,36 u/ml)

表 2. C1INH

神奈川県立こども医療センター  
小菅 啓司、兵頭 行夫

大阪府立成人病センター  
北 村 肇、永木 和義、稲井 真弥

本邦が1例と思われるC3欠損例について報告する。

発端者は14才の女児で、10才のとき蝶形紅斑、DLE様皮疹、脱毛、関節炎、抗核抗体およびLEテスト陽性などによりSLEと診断された。以後、ステロイド剤の投与をうけている。血清補体価(CH50)は常に低値であり、C3はanti-βIC/IAによるradial immunodiffusion法で全経過を通じて検出不能であったため、C3欠損を疑い家系調査を行った。図1に示すごとく4代にわたる大家系で、そのうち34人についてCH50、C3の蛋白および溶血活性を測定したところ、<sup>(表1)</sup>発端者(IV-10)以外にも1人のC3欠損例(IV-18)が発見された。この2例の両親を含めた11人のC3蛋白および活性はNHSの約50%の値を示し、全家系は正常、heterozygous deficiencyおよびhomozygous deficiencyの3種によって遺伝関係が説明された。なお、IV-18は健康な15才の男児で易感染性もない。

2例のC3欠損例について補体学的検討を加えた(表2)。C3以外の各補体成分の活性および蛋白量は、C4、C2が低値、C9が高値であった。なお、これらの値は2例の間に差が見られた。また2例ともにCH50は精製C3を加えることによりreconstituteされ、I.A.活性、bactericidal活性、およびA-CH50値はNHSに比しかなり低値であった。

表1.

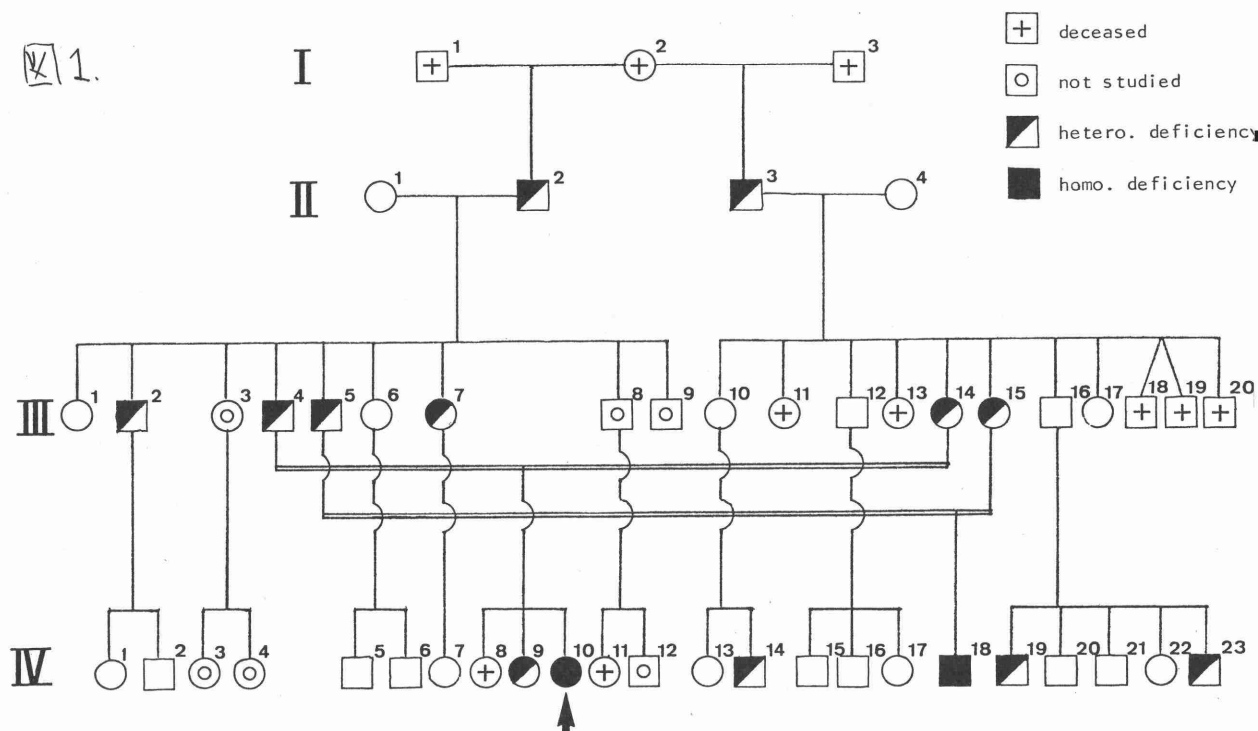


表1.

		CH50	C3 hemolytic activity % of NHS	C3 protein conc. % of NHS	genotype		CH50	C3 hemolytic activity % of NHS	C3 protein conc. % of NHS	genotype
II-	1	20.9	104.0	88.2	$C3^s / C3^s$	IV-	5	37.9	119.0	$C3^s / C3^s$
	2	32.8	30.7	33.8	$C3^s / C3^-$		6	31.8	99.0	$C3^s / C3^s$
	3	49.5	47.2	60.3	$C3^s / C3^-$		7	34.7	112.0	$C3^s / C3^s$
	4	50.3	128.0	94.1	$C3^s / C3^s$		9	20.9	40.0	$C3^s / C3^-$
III-	1	52.5	132.0	120.6	$C3^s / C3^s$		10	5.2	0.1	$C3^- / C3^-$
	2	26.6	34.0	23.5	$C3^s / C3^-$		13	34.7	136.0	$C3^s / C3^s$
	4	37.4	43.9	38.2	$C3^s / C3^-$		14	26.3	39.6	$C3^s / C3^-$
	5	28.1	34.0	33.8	$C3^s / C3^-$		15	37.3	123.0	$C3^s / C3^s$
	6	42.1	85.8	70.6	$C3^s / C3^s$		16	36.7	106.0	$C3^s / C3^s$
	7	33.3	51.9	60.3	$C3^s / C3^-$		17	36.0	134.0	$C3^s / C3^s$
	10	45.9	125.0	107.4	$C3^s / C3^s$		18	6.9	0.2	$C3^- / C3^-$
	12	39.6	120.0	88.2	$C3^s / C3^s$		19	37.8	70.8	$C3^s / C3^-$
	14	34.9	54.7	38.2	$C3^s / C3^-$		20	42.9	162.0	$C3^s / C3^s$
	15	30.3	41.5	33.8	$C3^s / C3^-$		21	54.2	189.0	$C3^s / C3^s$
	16	43.9	85.8	64.7	$C3^s / C3^s$		22	50.3	158.0	$C3^s / C3^s$
	17	44.7	127.0	107.4	$C3^s / C3^s$		23	32.3	60.4	$C3^s / C3^-$
IV-	1	36.8	115.0	94.1	$C3^s / C3^s$	Control				
	2	34.6	132.0	101.5	$C3^s / C3^s$	NHS	40.0	100.0	100	$C3^s / C3^s$

表2.

Case	VI-10 proposita Female, 14 T.I. SLE	VI-18 Male, 15 Y.I. healthy	NHS
Sex, Age Name Diagnosis			
CH50	5.2	6.9	40.0
hemolytic activity of complement SFU(% of NHS)			
C1	71,200 (42.9%)	192,500 (116.0%)	166,000
C4	19,200 (17.6%)	24,000 (22.0%)	109,000
C2	625 (43.1%)	810 (55.9%)	1,450
C3	70 (0.16%)	64 (0.15%)	42,400
C5	315,000 (105.0%)	242,000 (80.7%)	300,000
C6	12,550 (135.0%)	4,400 (101.1%)	9,300
C7	20,300 (108.0%)	15,500 (79.8%)	18,800
C8	75,000 (114.0%)	56,400 (85.5%)	66,000
C9	45,400 (214.1%)	38,300 (180.7%)	21,200
A.CH50 (CH50 of alternative pathway by rabbit RBC)	< 2.4	6.0	28.8
Immunochemical quantitation of complement and complement related proteins			
$\beta$ 1C/1A (mg/dl)	not detected	not detected	68.0
$\beta$ 1E (mg/dl, % of NHS)	15.5 (39.7%)	13.5 (34.6%)	39.0
$\beta$ 1F (% of NHS)	158.1%	82.6%	100%
B (mg/dl, % of NHS)	34.0 (197.7%)	18.8 (109.3%)	17.2
$\beta$ 1H (mg/dl, % of NHS)	75.0 (143.1%)	33.0 (63.0%)	52.4 $\pm$ 13.7
Reconstitution of CH50 by purified C3			
before addition of C3	5.2	6.9	40.0
after addition of C3	35.7	33.6	not tested
Immune Adherence			
by EA	32	0	256
by EAC142	64	64(inhibition)	16,000
Immune bactericidal activity (E.coli)			
without Ab	10	20	40
with Ab	10	20	160
Reconstitution with C3			
without Ab	40	80	not tested
with Ab	160	160	not tested

行山 康, 荏原 忠雄, 谷本 環昭, 広瀬 俊一,  
堀内 淑彦, 東京大学医学部 物療内科.

補体第9成分(C9)欠損症に関しては昨年のホッペンボジウムにおいて、  
稲井らにより健康者よりの一例が世界ではじめて報告された。今回、我々  
は発熱を繰り返し低補体価を示す入院患者の一例がC9欠損症であることを  
見い出したので、その病歴の詳細と遺伝関係について検討したことを報  
告する次第である。

症例：52才男性(H.O.) 21才時、虫垂切除。22才時、十二指腸  
潰瘍にて、胃十二指腸切除。術後一週間経って腸閉塞をおこし、再手術。  
さらに5日後、再び腸閉塞をおこし手術を受けた。全身状態が悪化し、尿  
毒症、意識混濁となったが利尿剤投与に徐々に回復、S-25-8、(23才時)あ  
い孔切除、およびゆ着はく離の手術を受けて後、約20年間、健康に過ごして  
きた。S-46、特に感冒様症状もなく、40℃台に達する発熱が出現し、  
2日で下熱した。このような発熱発作が1ヶ月に一回のわりあいであり、  
その都度、抗生剤を投与されていた。発熱後は倦怠感が強く、2年ほどは半  
休職状態であったが、S-48、より、抗生剤(ビクシリン)を6ヶ月続けて投  
与されて後、発熱発作が出現しなくなり、4年間は健康に過ごしてきた。

S52-1、悪寒、戦りつを伴う38~40℃の発熱が出現するようになっ  
て、再び、近医にて、適宜、抗生剤の投与を受けていた。S52-10、某院に  
て、膠原病と云われ、プレドニン15mg/日を投与されるようになったが、発  
熱発作の出現は抑制されなかった。S-54-3 東大病院物療内科を受診し、  
ステロイドのwithdrawal syndrome および CH50、10単位(正常25-45)  
であることも指摘され、精査のため入院。入院中は低補体価以外、  
特に目立った所見を認めず、発熱もおこらなかったのを3週後退院  
した。2週後、40℃台の発熱、嘔気を主訴として救急入院。腹部単純X-P  
で、腸管に特有のニボー形成を認め、麻痺性イレウスと診断された。白血球  
数18200、CRP(+)、RA(-)、Hb13.4g/dl、RBC.489×10<sup>4</sup>、尿、正常、総  
蛋白6.8g/dl、BUN19、LDH163、アブリ1-4アン453mg/dl、で、炎症  
性の検査所見であった。保存的治療のみで2日後に下熱、以降4~5日に  
一回37.5℃程度の微熱の発現をみたが、抗生剤(ビクシリン)投与を  
開始してから微熱も出現しなくなった。CH50は常に10単位前後で  
あったため、C3-C9総活性も測定したところ低値であり、以下に述

べる C9 の免疫化学的検討。C9 溶血活性を行ない、その結果 C9 欠損症であることが発見された。

方法：総補体価測定は Mayer 原法の  $\frac{1}{5}$  の反応容量で  $4 \times 10^7$  EA cell にて 50% 溶血を示す血清量の逆数を溶血単位とした。C1, C4, C2 は所定の方法に従って精製し、それによって EAC14, EAC4 cell を作製した。C4 は C4 欠損セルモット血清、C6 は C6 欠損ウサギ血清により測定した。C3, C5, C6, C7, C8, C9 は Cordis 社より購入し、C9 の溶血活性は EAC1-7 + C8<sup>hu</sup> (or C8<sup>sp</sup>) と検体の稀釈により測定した。抗 C9 は ヘキスト社より購入したもののほか、金沢大学医学部 がん研・高橋守信博士の御好意により、抗 C9 と標準血清を供与いただいた。C9 蛋白量は、8% の抗 C9 血清を含んだ 1.5% アガロース平板に 4mm 径の孔をうがり、沈降輪の大きさより測定した。

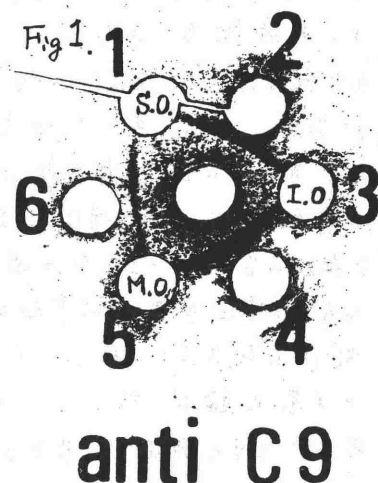
結果：①補体活性測定、( ) 内は同時測定の 5 検体の変動中を示す。但し、C3, C5, C7, C8, C9 は一検体のみのコントロール、; CH50, 72 (90-320); C1,  $2.85 \times 10^4$  ( $1.14 - 5.10 \times 10^4$ ); C4,  $4.14 \times 10^4$  ( $1.28 - 5.46 \times 10^4$ ), C2, 2670 (2900-4700), C3, 50000 (16,000), C5, 52,500 (37,700), C6,  $1.62 \times 10^3$  ( $0.55 - 4.4 \times 10^3$ ), C7,  $3.2 \times 10^4$  ( $2.6 \times 10^5$ ), C8,  $4.0 \times 10^5$  ( $3.2 \times 10^5$ ), C9 < 250, ( $7.3 \times 10^4$ ), C3-C9 96 (357-610),

で、CH50, C9, C3-C9 total activity が特に低下していた。C9 溶血活性は、C8<sup>sp</sup> を用いた場合でも C8<sup>hu</sup> を用いた場合でも、H.O. 血清はコントロール血清の  $\frac{1}{300}$  以下の溶血活性を示した。日を替えて 5 回ほど繰り返し測定した CH50 は常に低値を示したが、0 ではなく、C8 による E\* 形成の影響が考えられた。

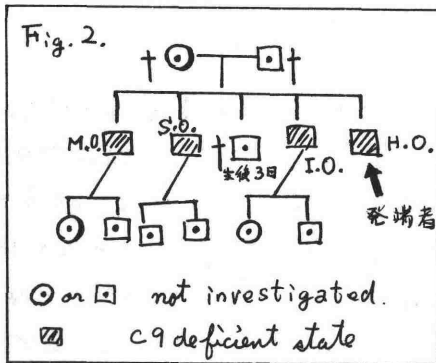
②免疫化学的検査：H.O. 血清は Ouchterlony 法でゲル内沈降反応をみたが、ヘキスト社および高橋博士より供与されたウサギ抗 C9 血清と全く沈降線を生じなかった。

一方、コントロール血清の沈降線は H.O. 血清添加の孔に曲がることなく到達していた。

Mancini 法による C9 蛋白の測定では、H.O. は全く沈降輪を生ぜず、一方、ささぎまの患者血清の C9 値は  $88.5 \pm 36.7 \mu\text{g/ml}$  ( $n=47$ ) であった。



③ 家族歴の検討 ; 両親は父(心疾患)母(脳血管障害)とも死亡し



ている。同胞4人のうち1人は、生後3日で死亡しており、Fig. 2のI.O., S.O., M.O.について検討した。CH50は、I.O. 93, S.O. 69 で低下していたが C4, C6 は正常範囲であった。C9蛋白量は Mancini 法によって、I.O., S.O., M.O. のいずれにも検出されなかった。

また、Ouchterlony 法によるゲル内転

降反応では Fig. 1 に示すごとく、1. S.O., 3. I.O., 5. M.O., は中央の孔より拡散させた抗 C9 と全く沈降線を生ぜず、発端者の H.O. 血清と同様な態度をとった。2, 4, 6 はそれぞれ異なるコントロール血清である。以上より同胞すべてが C9 欠損症であることが推定された。

考察、及び結論 : C9 欠損症は本邦で 1 例、欧米で 2 例 (高橋博士による) 報告されており、本症例は 4 例目にあたりと考えられる。これまでの報告例はすべて健康者より発見されているが、本例は、原因不明の 1~2 日続く、発熱を繰り返すという点で他と異なっている。これは、ひとたび体内に侵入した比較的病原性の弱い細菌が、生体の感染防御能と適当な均衡を保っているためと推定されるが、感染病巣をつきとめることはできなかった。この場合 C9 欠損による殺菌能の低下が細菌の vegetation に有利な影響を与えたことが推察される。

遺伝形式に関しては、常染色体優性性とする両親のどちらかがヘテロ接合体であるとして、4人が C9 欠損となる確率は  $\frac{1}{2} \times \frac{1}{2} \times \frac{1}{2} \times \frac{1}{2} = \frac{1}{16}$  である。一方、常染色体劣性性の場合、両親ともヘテロ接合体であったとして、4人がホモ接合体として生ずる確率は  $\frac{1}{4} \times \frac{1}{4} \times \frac{1}{4} \times \frac{1}{4} = \frac{1}{256}$  である。優性遺伝の可能性が高い。なお、この点を確認すべく、第 3 世代を調査中である。もし、優性遺伝とあるならば、補体系蛋白では C1 Inh の遺伝に類似しているが、C1 Inh 欠損の遺伝では、ヘテロ接合体(遺伝形質伝搬者)で C1 Inh 蛋白は正常者の 0~50% に存在するので、この C9 欠損例では全く C9 蛋白が存在しない点で特有と云える。なお、非常に少量の正常血清 (1/5000 ~ 1/20000) の添加によって、H.O. 血清の溶血能は回復することから、C9 に対する Inhibitor によって溶血活性が低下しているとは考え難かった。以上、補体活性測定、免疫化学的検討、家族調査等より C9 欠損症と考えられる家系を報告した。



植田真永、佐々木隆子、米増國雄、樫葉園三

(奈良医大・細菌)

越智隆弘 (阪大・医・整形外科)

各種の骨・関節疾患患者からの血清(115例), 及び関節液(91例)のC<sub>q</sub>とC<sub>3</sub>の蛋白量を測定し、関節液においては、それぞれを関節液中のalbumin値との比率で求めた。補体系タンパクはhost defence mechanismにおいて、重要な役割をはたすだけでなく、cytotoxic hypersensitivity(type II)やimmune-complex mediated hypersensitivity(type III)が見られる病態においても密接な関係がある。C<sub>q</sub>はclassical pathwayの引き金になる。そして、Antigen-Antibody complexと結合するだけでなく、おそしくnon-specificに変性し可溶性化したimmunoglobulinや他のpolyanionic substanceと結合することができ、これによって補体系がactivateされる。一方、C<sub>3</sub>はalternative pathwayにおいて、essentialな成分である。Rheumatoid Arthritis(RA)の病因論にimmune mechanismの関与を示唆する多くの事実があり、我々はRA患者血清のC<sub>q</sub>とC<sub>3</sub>レベルを測定し、他の骨・関節疾患(gout, transient synovitis, osteomyelitis, osteosarcoma)でのC<sub>q</sub>やC<sub>3</sub>と比較してみた。

## (材料と方法)

患者: 阪大及び厚生年金病院整形外科を受診した患者を対象とした。

RAの診断は、American Rheumatism Associationの診断基準にのっとり行われた。systemic-diseaseや再発がなくtransient synovitisをもった患者グループについては、標準的な診断名がなく「transient synovitis(TS)」と名づけた。

血清: 115例中、RA(44), probable RA(17), gout(14), TS(28), osteomyelitis(7), osteosarcoma(5)はつき検査した。採血後、血液は室温で60分更に4°Cで120分間凝固させ遠心分離後-70°Cに保存した。

関節液: 91例中、RA(17), TS(24), degenerative joint disease(DJD)(50), はつき検査した。吸引採集後、遠心分離して-70°Cに保存、assay前には、5μlのtesticular hyaluronidase(1mg/ml)で37°Cで60分digestionした後に施行した。

assayの方法: single radial immunodiffusion(SRID)で測定した。それぞれの感度はC<sub>q</sub>が2μg/ml、C<sub>3</sub>が10μg/mlである。

データの整理: student's t-testにより行い、synovial fluidはそれぞれF-testで比較し、student's t-testで行った。C<sub>q</sub>とC<sub>3</sub>の相関はkendallのrank correlationにより解析した。

## (結果)

血清中の健康日本人における15才から75才までのC<sub>q</sub>とC<sub>3</sub>の平均値は、それぞれ、 $136.5 \pm 122 \text{ mg/ml}$ ,  $1,081 \pm 2173 \text{ mg/ml}$ である。血清C<sub>q</sub>量はRAとosteomyelitisでは著しく増加し、RA, probable RA, gout, osteomyelitisでは正常人と比べPvalueが $<0.001$ と統計学上

有意であり、TSでは  $P\text{value} < 0.05$  となり、osteosarcomaでは有意差がなかった。血清  $C_3$  量は RA と gout では正常人と比べ有意差が見られたが、probable RA, TS, osteomyelitis では有意差がなかった。関節液中の albumin 濃度は、RA, TS, DJD の 3 つのグループでの有意差がなく、このことは違った pathogenesis をもつ、いろいろな type の hydroarthrosis においても、むしろ constant であるとみなされる。その結果、単に濃度を測定するだけでなく、同じ synovial fluid での albumin 濃度といういろいろな成分の濃度の比率を出す事は、関節液の浸出量に影響される事がなく、さうに信頼できる値と思われる。関節液中の  $G_b$  は、RA において他の 2 つのグループよりも  $G_b$  量も  $G_b/\text{albumin ratio}$  も著しく増加する。DJD では  $G_b/\text{albumin ratio}$  が  $P < 0.01$  と有意差が見られたが、 $G_b$  量では  $P < 0.05$  とわずかに有意差があるにすぎなかった。関節液中の  $C_3$  は、RA においては、 $C_3$  量、 $C_3/\text{albumin ratio}$  は高値を示し他の 2 つに比べ有意差があったが、TS や DJD では有意差が見られなかった。 $G_b$  と  $C_3$  の相関は血清、関節液ともに見られなかった。

#### (考察)

RA をはじめとして各種の骨・関節疾患において、補体の活性やその蛋白量は RA では低下するとされている。それは、補体の hypersynthesis や hypercatabolism によると思われていた。我々の data では、RA や Osteomyelitis では  $G_b$  レベルは著しく増加し、一斉に TS, osteosarcoma, 激しい炎症をもつケースにおいてさえ  $G_b$  レベルは normal range であることがわかった。synovial fluid では、 $G_b$  レベルも  $G_b/\text{albumin ratio}$  も RA の患者でのみ増加した。Rheumatoid factor をもつ人でも、もたない人でも  $G_b$  レベルには違いはなかった。 $G_b$  の増加は明らかに、Ruddy & Austin の結果と矛盾する。これは、我々は immune complex や変性 immunoglobulin との結合を避けるために、高イオン強度で SRID を行い、hyaluronic acid の影響を除くために、hyaluronidase で synovial fluid を処理した所であり、絶対量として判定するのにより賢明な方法である事によると思われる。この増加は、Ruddy の報告のように RA における補体の hypermetabolism が起こるということとは矛盾しない。血清  $C_3$  レベルは RA や gout で増加するが、その程度は  $G_b$  に比べ著しく少い。synovial fluid の  $C_3$  もわずかに増加する。おそく、この増加は、hypermetabolism 又は RA において  $C_3$  の conversion によって  $C_3$  の antigenicities の変化によると思われる。血清や関節液中の  $C_3$  量と  $G_b$  量の相関が見られなかったことは、これら 2 つの補体は別個に変動し、各種の骨・関節疾患では別個の pathological な役割に関与していると考えられる。

血清C<sub>1</sub>g 値に関する検討。

吉田 浩，細川康子，渡辺一夫，渡辺進，鈴木秀幸，佐藤幹夫，森藤隆夫，粕川礼司。(福島医大 第2内科)。

補体C<sub>1</sub>成分の subcomponent の一つである C<sub>1</sub>g について、各種疾患患者血清中の濃度を single radial immunodiffusion 法にて測定した。さうに1部の例につき、immune complex 値との関係についても検討した。

対象：福島医大第2内科入院へ外来通院中の患者で、消化器・膠原病を主体とし、その他、呼吸器・腎疾患・各種の悪性腫瘍をも含めた。

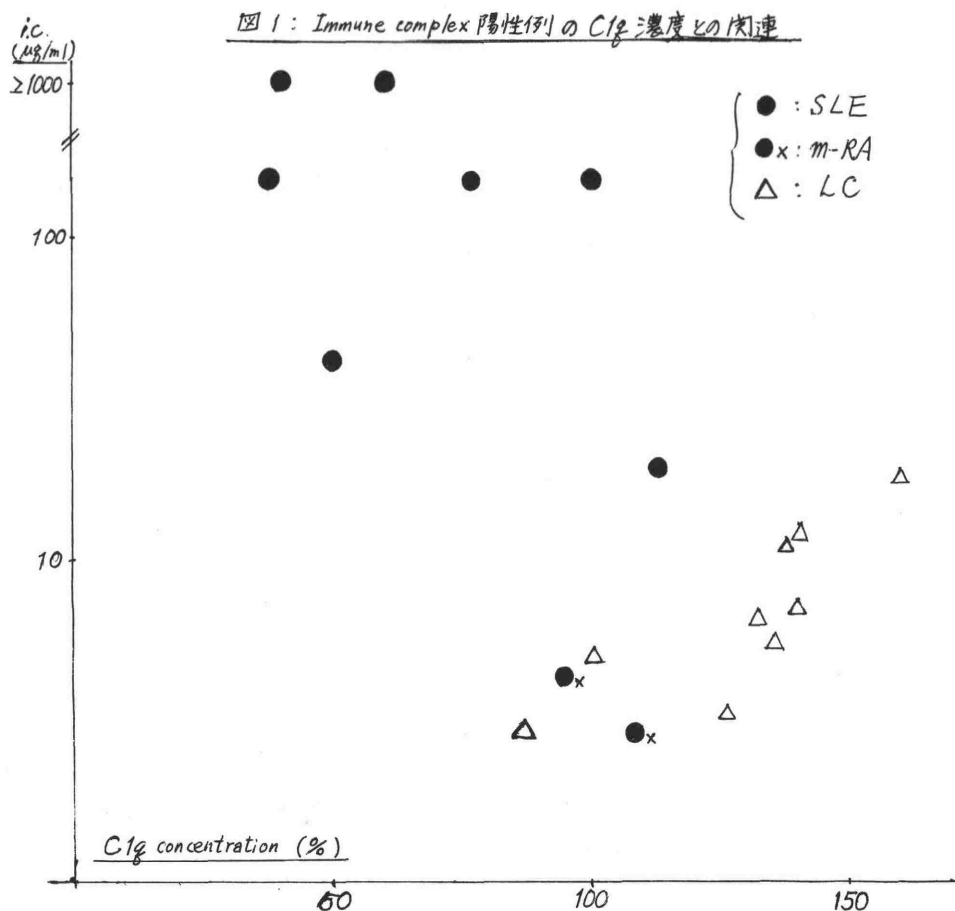
成績と考察：(表1)はその結果を示したものであり、健常成人プール血清を基準値(100%)として比べたものである。消化器疾患では肝疾患、特に肝硬変症(LC)は168.3±40.0%と最も高く、次に急性肝炎(AH)、慢性肝炎≡hepatoma、肝内胆汁うっ滞症と続き、いずれもプール血清値より高い値を示した。消化性潰瘍、胆道疾患、非特異性反応性肝炎では健常人値と有意の差はみられない。呼吸器疾患でも著変なく。膠原病ではSLEで低下を示した。この中で、急性期にある例や腎症を伴った例ではより著明な低下が認められ、CH50値との間に有意の相関がみられた。その他では、腎疾患で透析を受けている者、食道癌例で軽度の上昇がみられた。最も高い値を示したものはLC群であるが、少数例においては基準値以下を示した例が認められ、それらの約半数には腹水がみられた時期のものであったがCH50値を用いては一定の傾向を示さず、肝機能などでも特異的な異常は指摘出来なかった。C<sub>1</sub>gは肝以外の臓器で産生されることが報告されており、それを裏付ける劇症肝炎例の経験もあるので併せて報告する。即ち入院より数日至る約一週間、連日、CH50、C<sub>1</sub>g、C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub>値を測定したが、C<sub>1</sub>g値は150~170%と高値を示し、他は正常の20~30%を占めるにすぎなかった。重症肝障害時のC<sub>1</sub>gの意義は不明であるが、他臓器での産生亢進、分解の遅延などが推測されようが何らかの形で肝

表1: C <sub>1</sub> g concentrations in sera of patients with various disorders.		
Peptic ulcers	(n=12)	107.3 ± 22.5 %
Cholecystitis, stones	(n= 7)	98.1 ± 19.8 %
Liver diseases		
Liver cirrhosis	(n=12)	168.3 ± 40.0 %
Chronic active hepatitis	(n=11)	138.2 ± 19.7 %
Chronic inactive hepatitis	(n=14)	122.9 ± 26.6 %
Acute hepatitis	(n= 7)	161.8 ± 26.6 %
Nonspecific reactive hepatitis	(n=6 )	106.0 ± 12.0 %
Intrahepatic cholestasis	(n= 2)	125.7 ± 10.8 %
Hepatoma(with cirrhosis)	(n= 5)	134.9 ± 25.0 %
Bronchial asthma	(n=10)	112.7 ± 15.3 %
Chronic bronchitis	(n= 5)	107.1 ± 22.3 %
S L E	(n=10)	77.8 ± 21.9 %
R A	(n=13)	110.2 ± 15.3 %
Uremia- Chronic nephritis	(n=13)	129.0 ± 43.2 %
Cancers		
Esophagus	(n=4)	124.3 ± 31.2 %
Stomach , early.	(n= 7)	111.6 ± 20.9 %
" , advanced.	(n= 8)	110.1 ± 31.9 %
Colon	(n=5 )	117.4 ± 35.2 %

障害に關与しているであろう可能性は否定できない。

表に入っていないが、Monoclonal gammopathy 例の多くでは  $(130.0 \pm 13.7\% (n=8))$  高値を示すが、CH50 が正常～高値にもかかわらず C<sub>1q</sub> の低下例が見出され、血清の 45℃, 50℃ の加温による C<sub>1q</sub> 値の低下が観察された。C<sub>1q</sub> が著減し、CH50 が測定不能と低下した例に抗補体活性を検索すると、血清の 45℃, 50℃, 56℃ の加温(30') により各々 2, 16, 1280 倍と増加が認められ、易熱性の M 成分が C<sub>1q</sub> との結合、即ち補体活性化に關与しているものと考えられた。

近年、C<sub>1q</sub> を用いた immune complex の測定法が開発されてきているが、それによつて得られた immune complex 値と血清 C<sub>1q</sub> 値との関連をみた報告は少ない。C<sub>1q</sub> solid phase radioimmunoassay 法にて得られた値 (approx. r-gl. に換算) と C<sub>1q</sub> 値が同時に測定された例は多くないが、immune complex 陽性例についてのみに調べたものが図に示した。高 immune complex 値を示した SLE 例では C<sub>1q</sub> 値は低値を示しており、逆相関の傾向がうかがわれた。また、m-RA 例では immune complex 量は多いものではないが、C<sub>1q</sub> 値の大部分は 130～140% と高い値を示しており、SLE と LC との血清中の C<sub>1q</sub> の意義は異なるものであろうと考えられた。



都立大久保病院・皮膚科

河島敏夫, 古賀道之, 安木良博, 堀内佳代子

東京都臨床研

嶋田孝吉, 西岡久新弥

アトピー性皮膚炎患者血清では各種免疫グロブリンのうちとくに IgE 高値例が多く, また皮膚局所は一般湿疹様組織所見のほか, 浸潤性局所などでは好酸球の浸潤とみることも多い。

われわれは本症患者の皮膚病変を中心に, 血清補体価 (CH50), その他種々の検索を重ねてきた。その結果, 血清の CH50 や一部の補体成分が皮膚症状と関連した動遷を示すことから, 補体の皮膚局所病変への参加のほか, 生体反応として血清レベルでも補体の対応する *complement response* があるものと考えてきた。

今回は本症患者 (一部病厂者と含む) 59 例について, 血清 CH50 のほか C1q, C4, C3, C5, C9 および C3PA 各蛋白質量を測定し (パル4ゲン, プレート使用), これと皮膚病変, 経過, 各種免疫グロブリン, 末梢血血球数など, およびそれら相互の関連性を検討した。その結果

(1) 今回の被験患者の CH50 は  $40.2 \pm 4.8$  単位で, 多少のバラツキがみうれ, また皮膚症状が重く広範囲例に高値例が多かった。また測定した補体成分のすべてに可成りのバラツキがみうれ, また経過による動遷もみうれた。しかもとくに C5 値は全般的に高値例が多く, 動遷中も極めて大きく, 皮膚症状とも平行する例が多かった。

(2) 各種免疫グロブリン値では IgE 高値例が最も多く, また皮膚症状の軽重とも平行する例が多かった。しかし他の免疫グロブリン値との関係は明うかではなかった。また末梢血中の各種血球のうちでは好酸球増加例が最も多く, 皮膚症状の重いものに多くみうれた。

(3) 皮膚症状の軽重を基準に, C5, IgE, 好酸球数相互の関連性を検討したところ表に示したように, 重症広範囲 11 例は IgE は全例が高値で, C5 は 10 例が高値で, 好酸球数は 6 例が増加を示した。重症例 10 例では IgE 高値 6 例, C5 高値 7 例, 好酸球増加 5 例がみうれた。中等症 13 例では IgE 高値 9 例, C5 高値 6 例, 好酸球数増加 7 例がみうれた。軽症 10 例では IgE 高値 8 例, C5 高値 4 例で, 好酸球増加は 1 例のみみうれなかった。治療後 (アトピー病厂者) の 15 例では IgE, C5 高値はあがかる例がで, 好酸

球増加例は1例もみられなかった。これらを要約すると一般にIgEもCSも共に高値を示すものでは皮膚症状もおもくそれらはよく手行っている。しかし中等症や軽症例のなかにはCS値が正常値を示しているにも、IgE値がお高値を示す例もみられた。

(4) 個々の例で皮膚症状の経過を追ってIgE・CS、好酸球数の変動を追求めたところ、CS値は皮膚症状の改善やIgE値の復帰に先立って正常レベルへ復帰する傾向がみられた。このことは血清レベルでの補体測定、ことにC5の測定によりアトピー性皮膚炎の予後が判定される可能性を示唆している。

Grade of skin lesion	Severe wide spread	Severe	Moderate	Mild	Convalescent
No. of Cases Total 59	11	10	13	10	15
C5 >120%	10	7	6	4	3
IgE >500 unit/ml	11	6	9	8	3
Eosinophils count >400	6	5	7	0	0

第15回補体ミニポジウムに於いて我々は、じんま疹患者では発疹時血清 C3, C5 の低下が見られることより, *alternative pathway* により C3 が活性化され出現する C3a, C5a アナフィラトキシンが発疹発現に関与している可能性を報告した。今回我々はこの点に関してさらに検討した。すなわち, C3a アナフィラトキシン (C3a), Properdin (P), C3b INA の測定を加え、さらに C3, Factor B (B) の activation の有無を二次元免疫電気泳動を行い検討した。

(対象並びに方法) じんま疹出現患者について、血清補体成分及び関連因子である C1q, C1S, C4, C3, C5, C9, C3a, B, P, C3b INA, C1-INH と、それぞれの特異抗血清を用い、レーザーネフェロメーター (ハイランド) により測定した。標準血清には QS 血清 (ヘキスト) を用い、これを 100% として測定した。C3 及び B の conversion の検索には、採血後 4℃ 1 時間放置し遠心分離して得た新鮮血清について二次元免疫電気泳動を行った。造影剤でじんま疹を呈した患者では、症状改善後の血清を用い、造影剤と試験管内で 37℃ 30 分間反応させ、C3 及び B の二次元免疫電気泳動を行った。

(結果) じんま疹出現時患者血清 15 例 21 検体の成績を表に示した。

C1q は平均値  $103.0 \pm 14.7$ , C1S:  $96.7 \pm 14.1$ , C4:  $99.9 \pm 16.7$ , C3:  $69.1 \pm 10.5$ , C5:  $81.5 \pm 9.9$ , C9:  $96.7 \pm 16.1$ , B:  $122.7 \pm 17.3$ , P:  $70.4 \pm 12.5$ , C3a:  $132.3 \pm 19$ , C3b INA:  $104.4 \pm 13.5$ , C1INH:  $101.1 \pm 10.1$  であった。

二次元免疫電気泳動により、C3 及び B の conversion を検討したところ、C3 の C3c への conversion を認めしたが、B には conversion を認めなかった。造影剤静脈注射時にじんま疹の出現した患者では、C3, C5, C9 の低下と C3a の上昇、P の低下が認められた。二次元免疫電気泳動を行ったところ C3 の conversion を認めしたが、B の conversion は認められなかった。患者血清と造影剤を試験管内で反応させたところ、同様に C3 の conversion を認めしたが、B の conversion はなかった。

(考案) 前回報告したように、C1q, C4 に変動なし、C1S も殆んど正常値を示したことより *classical pathway* の関与は全くないものと推測された。C3 は  $69.1 \pm 10.5$  と低値を示したが、C5 は  $81.5 \pm 9.9$ , C9 は  $96.7 \pm$

16.1とterminal components 程変動が少なかった。Pは $70.4 \pm 12.5$ と低値を示し、C3aは $132.3 \pm 19.0$ と高値であり、Bも $122.7 \pm 17.3$ と上昇した。C3bINABやC1INHには変動はなかった。C3BにBについてconversionを検討したところ、C3ではconversionを認めたが、Bには認められなかった。これらの結果は造影剤によるじんま疹患者血清の成績及び試験管内実験結果とはほぼ同様の傾向を示した。以上のことより、じんま疹発症時にC3のactivationがあり、その結果C3aの上昇とC5のactivationをきたし、C5aも上昇するものと推測され、これらのアナログトキシンがmast cellに働き、ヒスタミン、ヘパリン、SRS-A等を遊離し、これらの化学伝達物質により発症するじんま疹の存在する可能性が推測される。C3のactivatorとしては、Bにactivationを認めないことよりC3 activatorによるC3のactivationの可能性は不明である。造影剤の場合試験管内でもC3がactivationされ、しかもBのconversionを認めないことより、C3 activatorによらずC3のactivationされる可能性が推測されるが、Pの低下することよりProperdin systemの関与は否定できない。

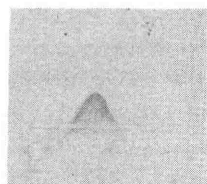
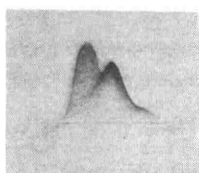


図 じんま疹患者血清の  
二次免疫電気泳動  
上: C3  
下: Factor B

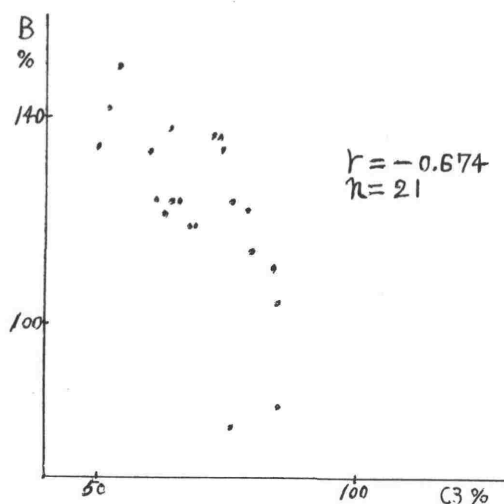


図 じんま疹患者血清に於ける  
C3とFactor Bの相関



Patient	Sex	C18	C1S	C4	C3	C5	C9	C3a	P	B	C3bINA	CIINH
N T	M	104	127	104	52	64	84	128	61	142	102	92
		103	102	107	76	84	94	113	81	124	108	98
		94	104	118	60	82	98	118	45	134	94	94
M H	F	71	95	96	74	86	103	94	82	134	111	121
		96	120	92	79	81	136	124	71	124	92	103
		92	117	89	85	80	72	134	86	104	85	94
		123	98	104	85	105	95	119	83	84	98	111
M O	M	111	94	103	76	72	82	148	62	80	94	104
K M	F	105	94	94	84	93	72	164	64	111	105	94
M T	M	85	96	97	61	74	92	138	79	124	104	94
M N	M	104	98	160	63	84	96	128	82	122	116	108
		98	78	85	54	73	124	168	59	150	78	94
H I	M	104	99	96	64	74	85	154	86	124	92	85
Y I	M	100	94	82	65	84	94	138	85	124	111	85
T M	M	94	85	74	68	72	85	134	71	119	104	92
A H	F	142	96	96	72	85	106	124	68	136	123	103
H F	M	124	104	94	50	72	102	136	64	134	94	103
E K	M	104	92	100	64	86	122	125	81.6	138	132	96
M S	F	92	78	99	68	72	85	164	60	119	112	103
K I	M	106	64	103	72	94	103	114	52	136	124	124
T I	M	110	96	104	80	95	100	114	56	114	114	104
Mean value		103.0	96.7	99.9	69.1	81.5	96.7	132.3	70.4	122.7	104.4	101.1
S.D		±14.7	±14.1	±16.7	±10.5	±9.9	±16.1	±19.0	±12.5	±17.3	±13.47	±10.1

表 じんま疹患者に於ける各補体成分一覽表

昭和大学医学部第一内科学教室  
 輯 啓司, 中嶋豪章, 杉崎徹三

SLE患者血清の補体成分及び関連因子を測定し、補体の活性系路について検討した。

(対象並びに方法) ARAの診断基準を4項目以上満したSLE患者24例46検体について検討した。患者血清のC1q, C1s, C4, C3, C5, C9, Factor B (B), Properdin (P), C3aアナフィラトキシン (C3a)

C3bINA, C1INHについて、それぞれの特異抗血清を用い、L-サ-ネ720メ-ター (ハイランド社、中嶋らの方法) により測定した。標準血清にはQS血清 (ヘキスト) を用い、これを100%として算定した。さらにC3及びBについては患者新鮮血清を用い二次元免疫電気泳動を行い、Conversionの有無を検討した。

(結果) 一部症例の各補体成分並びに関連因子のデータを表に示した。

C1q, C1s, C4がほぼ正常で、C3, C5, C9の低下を示した症例は3例3検体に認められた。他の21例では殆んど全検体でC1からC9までの低下がほぼ相関して認められた。各測定値間の相関係数を表に示した。

C1qとC1sの相関は $r = 0.907$ , C1sとC4:  $r = 0.917$ , C4とC3:  $r = 0.919$ , C4とC5:  $r = 0.828$ , C4とC9:  $r = 0.807$ であった。amplification loop関連因子であるP, B, C3bINAとC4及びC3との相関も表に示すとく高度であった。early componentsの低下がなくC3の低下した症例ではP及びC3bINAの低下とC5, C9の低下を認めた。C3の低下があり臨床的に活動期にある患者血清について二次元免疫電気泳動を行ったところ、C3及びFactor BのConversionを認めた。

C1sとC1INHの相関を見ると負の相関( $r = -0.569$ )を示した。C3aはC3と相関を示した( $r = 0.815$ )。

(考察) SLEはimmune complex diseaseであり低補体血症を呈する代表的疾患である。C4及びC3の低下がSLEの活動期診断に有意義であることが報告されている。今回我々はSLE患者24例, 46検体について補体成分及び関連因子を測定し、補体の活性系路について検討した。3症例3検体でearly componentsの低下がなく、C3及びterminal componentsの低下を認めた。これらの症例ではP及びC3bINAの低下を認めたことより、alternative pathwayによりC3がactivationされたものと推測された。

他の21例ではC1からC9までの補体成分の低下の間の相関が非常に高く classical pathway により activation されていると推測された。

C4と amplification loop 関連因子であるP, B, C3bINA との相関が非常に高かったことより、classical pathway による補体の activation には amplification loop による C3 の activation が強く関与していると推測された。SLE患者回着ではC3aの上昇を示すという報告があるが、我々の成績ではC3とC3aの相関が高く( $r=0.815$ )、活動期SLEではC3が著明に低下することより、C3aは値を示すものと推測された。

C1SとC1INH が著明な負の相関( $r=-0.569$ )を示すことよりC1Sの活性化があるとC1INHがこれに働き消費されるため代償性に合成の増加が起るのではないかと推測された。

Patient	Sex	C1g	C1S	C4	C3	C5	C9	C3a	P	B	C3bINA	C1INH
K Y	F	15	42	6	9	39	50	20	18	35	30	154
		21	37	13	12	24	34	16	24	50	17	123
		55	45	40	25	54	62	43	32	66	32	122
H K	F	63	54	34	70	92	107	124	117	106	96	111
		22	34	13	23	68	65	66	12	47	15	145
H M	M	28	47	31	10	35	34	56	22	23	9	139
		110	104	141	124	107	111	99	97	99	106	95
		40	41	71	76	74	79	104	80	89	84	133
E H	F	66	52	25	25	38	54	36	20	54	30	136
		79	71	10	12	49	10	53	29	71	24	139
		47	33	45	75	80	76	84	76	106	85	144
		101	89	100	106	104	93	103	112	120	100	103
Y O	F	11	35	26	25	42	82	88	3	17	10	135
		84	89	94	82	96	102	104	111	101	98	99
*M W	F	117	84	73	34	74	52	62	16	115	20	101
		87	84	86	65	74	80	89	68	86	84	100
		89	81	101	104	102	89	98	111	103	96	113
*H S	F	107	99	146	42	59	74	96	41	105	64	103
*C A	F	104	101	101	57	72	84	84	65	89	67	85

SLE患者に於ける各補体成分 ※ Alternative pathway

	C1q	C1s	C4	C3	C5	B	P
C1q							
C1s	0.907						
C4		0.917					
C3			0.919				
C5			0.828	0.817			
C9			0.807				
B			0.707	0.688			
P			0.699	0.809			
C3bINA			0.736	0.795	0.814	0.606	0.929
C1INH		-0.569					
C3a				0.815			

表 SLE患者血清に於ける各補体成分の相関係数

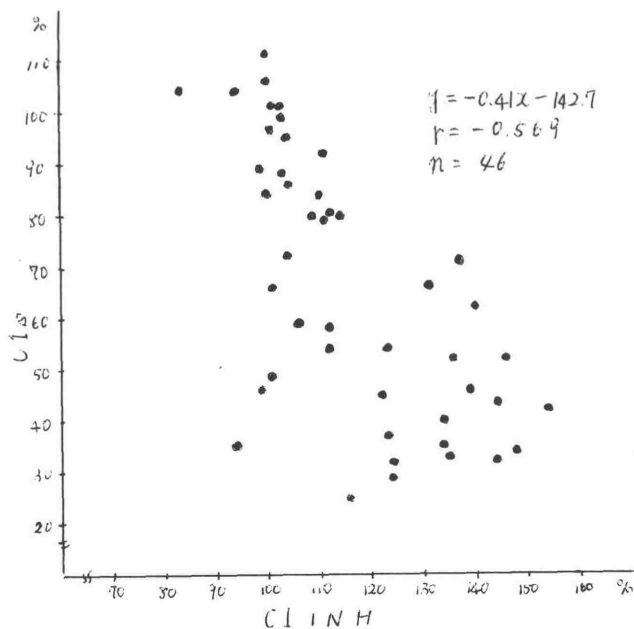
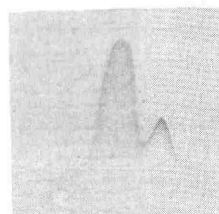


図 SLE患者血清に於ける C1s と C1INH の相関



上: C3  
下: Factor B



図 SLE患者血清の  
二次元免疫電気泳動

堀田忠弘 竹村周平 近藤元治 (京都府立医科大学  
第1内科) 西塚秀嗣 松村直幸 西田康一 池崎裕  
細川計明 (同大学第3内科)

近年、各種疾患において補体を測定し検討することは疾患の分析上非常に意義があり、重要視されつつあるが、それに伴って補体価測定上若干の混乱が生じている。それは、血清を低温に保存した後、溶血補体活性 (CH50) を測定すると極度に低下した値を得るという現象が、肝疾患を中心に時々みられるからである。(我々はこれを補体の cold activation; C.A.C と呼ぶことを提唱してきた)。従って、保存された血清における低補体価は必ずしも *in vivo* の値を反映するものではなく、*in vitro* で活性化されて、低下した可能性があることから、保存血清における補体測定の意義に大きな波紋が生じたのである。このような現象があるために、補体価測定は血漿で行った方がよいという意見も出されているが、EDTA、citrate、heparin 等の抗凝固剤には確かに数時間 C.A.C を阻止する効果がみられるものの、やはり24時間後には同様に C.A.C の影響を受け、さらに補体測定時  $\text{Ca}^{++}$  と  $\text{Mg}^{++}$  の再添加を必要とするわけがわしこのあることから、補体測定用検体の保存に適切な方法が望まれている。C.A.C の原因としては、低温下において生じる immune complex である cryoglobulin のその一つであるが cryoglobulin の検出できない例もある。これは  $37^{\circ}\text{C}$  で分離した血清を低温に置くことによって補体系の classical pathway を活性化する物質が生じる事から、特異なクローンから生じた immunoglobulin が低温下で変性して抗原性を得それに対する抗体と反応して cryoglobulin あるいは、cryoglobulin like soluble immune complex を形成するのではないかと推測しているが、詳細不明である。今回イオン強度の面から C.A.C の阻止及び原因の一つである cryoglobulin に対する若干の検討を行ったので報告する。

### 1 イオン強度の C.A.C に対する影響

C.A.C を示した患者血清 0.5 ml に 1.2, 1.8, 2.4, 6.0 M の NaCl 溶液 0.1 ml を加え終濃度  $\mu = 0.33, 0.43, 0.53, 1.13$  として経時的に溶血活性を測定した。測定法は Mayer 法に従った。(図1) NaCl 非添加の血清では

、低温設置後約1時間ではほぼ  $CH_{50}$  は  $O_{16}$  因子の $\gamma$ に対してイオン強度を増すに従って、補体価が保たれ終濃度  $\mu = 0.53$  以上では24時間後においてほぼ100%保たれた。その肥9名のC.A.Cを示す患者について同様の検討を行ったがほぼ同様の結果を得た。

## 2. イオン強度の健康人血清補体価に対する影響

健康人4名の血清0.5mlに種々の濃度のNaClを加え溶血活性を測定した。(表1)NaCl添加群と非添加群との間に差は見られなかった。実際、補体価の測定に際しては、検体を相当希釈するため保存時の高いイオン強度は問題にならないと考えられる。

## 3. イオン強度の cryoglobulin に対する影響

C.A.Cを示し、且、cryoglobulinemiaを認め患者4名につき検討した。37°Cで分離した患者血清0.5mlに1.2M~6.0MのNaCl溶液0.1mlを加え、低温下に72時間設置後、Folin法にて蛋白質量を定量した。80 $\mu$ g/ml以上を便宜上cryoglobulin陽性としているが、(図2)に示す如くイオン強度が上昇するにつれてcryoglobulinの量は減りした。終濃度 $\mu = 0.73$ 以上では、すべての症例においてcryoglobulinの出現は抑えられた。

以上イオン強度を増加させるとC.A.C阻止可能で、且、低温下でcryoglobulinの出現を抑えることから、イオン強度の上昇が低温下でのimmune complex形成阻止に働き、その結果補体を活性化せる物質が形成されずC.A.Cの阻止として認められるのではないかと考えられる。補体価測定に際しては、37°C分離直後の血清を使用するのが望ましいが、實際上困難であり、NaCl添加して保存しておくのが簡便であり補体価の安定に保たれる。検体の長期保存に関しては現在検討中である。

Fig.1 Inhibition of C.A. by NaCl

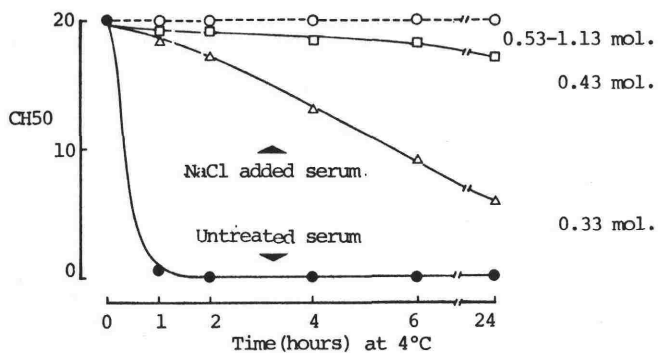
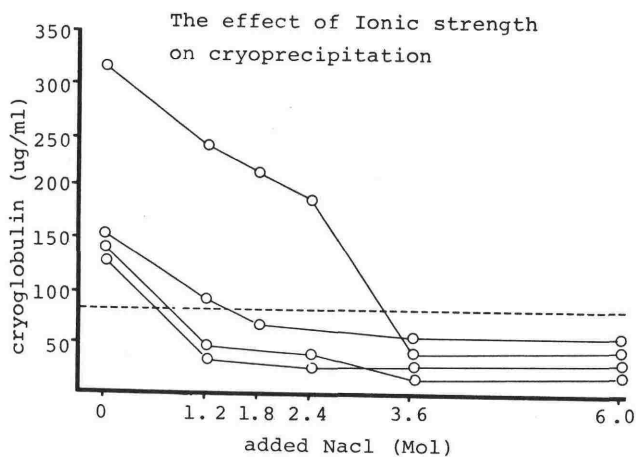


Table 1. Effect of ionic strength on CH50 of normal human serum.

case	age	sex	the final ionic strength of the mixture			
			0	0.33	0.43	0.53
1. N.M.	30	n	31	31	32	31
2. T.H.	31	n	35	35	35	35
3. M.W.	30	m	49	49	49	49
4. S.Y.	22	f	39	40	39	39

Fig. 2



竹村 周平 田上 広樹 渡辺 幸一 堀田 忠弘 石川 敏一

近藤 元治 (京都府立医科大学第一内科) 細川 計明 (同第三内科)

【緒言】 補体の Cold activation (以下補体CA)の機序の解明の上で、その原因を説明することは意義深い。現在のところ原因に関しては、cryoglobulin 一因となり得るとされているが、cryoglobulinの認められない補体CA陽性血清も存在し未だ不明の点が多い。今回は antiimmunoglobulin の面から補体CAを検討し興味ある結果を得たので報告する。

【対象ならびに方法】 血清：補体CAを示す肝疾患患者4例につき、採血血清分離を $37^{\circ}\text{C}$ で行い実験に用いた。なおcryoglobulinは4例中3例に認められた。

Cross-linked immunoadsorbentの作製：ヒト血清を33%飽和硫酸でグロブリン粗分画を得、ついでDEAE celluloseを用いIgGを精製した。精製IgGを2.5% glutaraldehydeと混ぜ一夜放置後、生いたゲルに0.1M phosphate buffer pH 7.4を加え攪拌し同様の操作をくり返した。さらに溶出液として用いる0.1M glycine-HCl buffer pH 2.5で洗浄し最終的に0.01M PBS pH 7.2で充分洗浄し、30 mg/mlの浮遊液を作製した。

Serum antiimmunoglobulinの測定：immunoadsorbentsを検体と等量混ぜ、 $37^{\circ}\text{C}$  / 1時間、さらに $4^{\circ}\text{C}$  20時間放置後、遠沈にてimmunoadsorbentsを分離し、充分に洗浄後 anti-immunoglobulinを0.1M glycine-HCl bufferで溶出した。溶出液はNaOHで中性に戻し、LC パルチゲン(ヘキスト)を用いて各免疫グロブリン濃度を測定した。

Anti-immunoglobulinの吸収と吸収血清の正常ヒト血清に及ぼす影響：補体CAを示す血清を $56^{\circ}\text{C}$  30分間非働化し、immunoadsorbentsを混ぜ、 $37^{\circ}\text{C}$  / 1時間反応後遠沈しimmunoadsorbentsを除き、その上清をanti-immunoglobulin吸収血清とした。吸収操作を行っていない非働化血清を対照とした。各血清に等量のヒト血清を補体源として加え、混合液を $4^{\circ}\text{C}$ に保存後、随時的に血清を取り出し、溶血活性の変化をヒツジ感作赤血球を用いて測定した。

### 【結果】 1. 血清 anti-immunoglobulin濃度

補体CA陽性血清は対照群に比較して、全て高い anti-immunoglobulin濃度を



示した (Table 1)。免疫グロブリンの class は、4 例中 3 例が IgG、4 例中 1 例が IgM、IgA であった。cryoglobulin 陰性の症例では IgG anti-immunoglobulin 値を示した。

#### Anti-immunoglobulin 吸収補体 CA 陽性血清の正常ヒト血清への影響

補体 CA は示すか cryoglobulin の認められない症例に前述の通り操作を加え anti-immunoglobulin 吸収血清を作製した。正常ヒト血清への影響は、anti-immunoglobulin 吸収血清を加えた方が非吸収血清を加えた方に比べ、明らかに溶血活性の低下が抑えられた (Table 2)

### 【結論】

補体 CA の原因について antiimmunoglobulin の面から検討を加えた。今回対象とした補体 CA 陽性血清においては全例において、cryoglobulin の有無にかかわらず、高濃度の antiimmunoglobulin が認められた。さらにこれらの anti-immunoglobulin が補体 CA の原因かどうかの検討のためにこれらの anti-immunoglobulin 吸収操作を行った。ここで補体 CA を示す血清は低温 ( $4^{\circ}\text{C}$ ) において強い抗補体活性を示す誤であるが、この antiimmunoglobulin 吸収血清と非吸収血清を用いた低温における抗補体活性の検討では、明らかに、anti-immunoglobulin 吸収血清において抗補体活性が低下を示した。これらの結果により補体 CA の原因として antiimmunoglobulin の関与が強く示唆された誤である。

3 例において cryoglobulin が認められたが、その出現機序を考えると、血清中に含まれる antiimmunoglobulin が低温において IgG と反応し (IgG の抗原性が低温で出現すると考える) anti-IgG-IgG complex を生じるのであろう。cryoglobulin の認められない症例においても同様に考えられる。低温で anti-IgG-IgG complex を生じるが、cryoprecipitate としては認められないいわゆる soluble な complex が出現するのであろう。いずれにしても補体 CA において antiimmunoglobulin の関与が確立された誤である。

Table 1. Anti-immunoglobulins reactive with human IgG in the sera with CAC

Case	CAC	cryoglobulin	Anti-Ig ( $\mu\text{g/ml}$ ) reactive with human IgG		
			IgG	IgA	IgM
1	+	+	151	16	21
2	+	+	75	27.5	250
3	+	+	157.5	16	18
4	+	-	113.5	12.5	10
Normals	-		80.7 $\pm$ 7.1	12.3 $\pm$ 1.3	13.4 $\pm$ 6.8

Table 2. Time course of the residual complement hemolytic activity of normal human serum mixed with adsorbed or unadsorbed heat inactivated CAC positive serum at 4°C

	Residual C. hemolysis(%) after kept at 4°C for				
	0	2	4	6	24hours
NHS + unadsorbed serum	89.4	82.3	75.1	59.7	6.7
NHS + adsorbed serum	89.9	88.8	88.1	78.9	48.5

高橋宇信<sup>1</sup> 野中真弓<sup>1</sup> 広瀬俊一<sup>2</sup><sup>1</sup>金沢大学がん研究所免疫生物部<sup>2</sup>東京大学医学部物療内科

抗原抗体沈降物が高濃度の補体と37℃で反応すると、分子量の著しい低下がおこり、低速遠心では低下しなくなる。同時に抗原抗体複合体の分子組成、生物活性にも著しい変化がみられる(抗原抗体複合体の補体による可溶化現象、Complement-dependent solubilization of immune complexes)。この現象は、1975年、Miller, Nussengreny によって始めて見出された(1)その後の研究によって、補体が抗原抗体の統御因子であるという新しい概念が明らかにされつつある(可溶化現象に関する綜説としては、文献(2)(3)(4)参照)。本研究は、ヒト抗体よりなる抗原抗体沈降物か、ヒト血清によって可溶化するかどうかを決定するために行った。

[研究材料と方法] (可溶化現象の測定) 三種類の複合体を作製した。その際、抗体分画は予め放射性ヨードで標識しておいた。複合体は何れも抗原抗体比の等量点附近で作製した。(1) Tetanus toxoid-ヒト IgG 抗体 (2) 血液型 A 型物質-ヒト IgM 抗体 (3) 血液型 A 型物質-ヒト IgA 抗体。可溶化反応の測定は文献(5)(6)の如く行った。(免疫結着現象の測定) 予め血清とインキュベートした抗原抗体複合体も、EDTA存在下で O 型ヒト血球と37℃、45分間反応させた。反応液の0.1 ml もとり、Lymphoprep 0.3 ml の上に重層し、100×G で8分間遠心した。上清をパスツールピペットで別の試験管に移し、血球と結合している放射能と上清中の放射能をオート、カウンタで測定した。

[実験成績] テストした三種類の複合体は、ヒトの新鮮血清(～1:16)と37℃でインキュベートすると、何れも、速やかに可溶化した。Tetanus-antitetanus (IgG 抗体) の場合の例を図1に示す。非衡化血清、EDTA-添加血清では、全く可溶化現象は認められなかった。この反応には *alternative pathway* の諸因子が必須であった。一方、C2欠損ヒト血清中では可溶化現象は緩徐にしか進まなかった。精製したヒト C2 を加えると、反応初速度は正常ヒト血清中と同じレベルにまで回復した。これらの諸成績は

ヒト抗体よりなる免疫複合体も、これまで調べた全ての複合体の場合と同様に可溶化されることを示している。可溶化した抗原抗体複合体は、ヒト赤血球膜に対する親和性(免疫粘着反応, *Immune adherence*)を全く失っている(図2)。

[考察] 可溶化現象が生体内、特に人体内でも起りうるかどうかを調べるための第一歩としてこの研究を行った。その結果、ヒト抗体のどのクラス(*IgG*, *IgM*, *IgA*)から成る複合体も可溶化することが確かめられた。可溶化した複合体は、ヒト赤血球のEA受容体に対する反応性を全く持たなかった。可溶化現象は、生理的反応条件(高濃度の補体、少量の複合体、37°Cでラインキューベーション)で起る現象であるから、類似の現象が生体内でもおこりうると思われる。もしこの仮定が正しいければ、補体は生体内の抗原抗体反応の重要な調節因子と考えることができる。何故ならば、補体によって免疫反応物の分子量、分子組成、生物活性、そして抗原抗体反応の *primary bond* まで影響をうけるからである。遂に *In vitro* での可溶化現象の解析によって、生体内における複合体の挙動、生物活性、病理的意義を知ることも可能となる。

#### [文献]

- (1) Miller, G.W. and Nussengweig, V. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 72; 418, 1975
- (2) Takahashi, M. *et al.* *Transplant. Rev.* 32; 121, 1976.
- (3) Bianco, C., and Nussengweig, V. *Contemp. Topics Mol. Immunol.* 6; 145, 1977
- (4) Takahashi, M. *et al.* *Progress in Allergy*, in Press, 1979. Karger, Basel.
- (5) Takahashi, M., *et al.* *J. Exp. Med.* 145, 86, 1977.
- (6) Takahashi, M., *et al.* *J. Clin. Invest.* 62, 349, 1978.

図1. *Tetanus toxoid* - ヒトIgG 抗体よりなる免疫沈降物の、ヒト新鮮血清による可溶化。

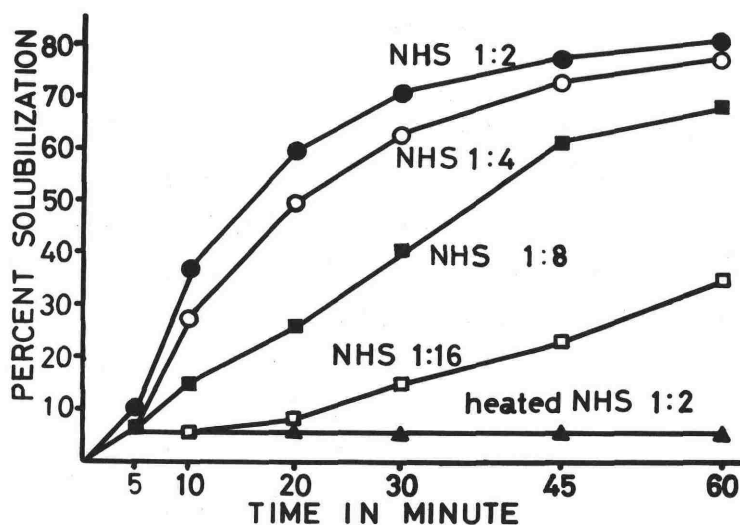
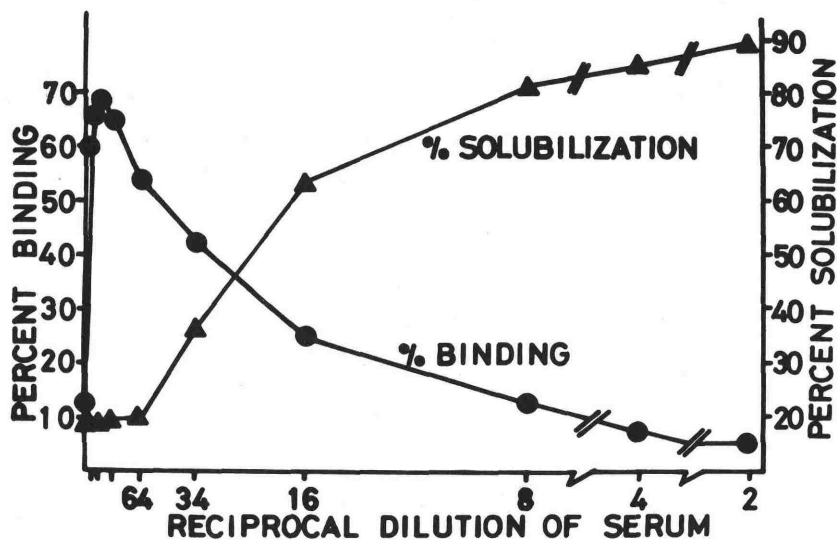


図2. 可溶化した複合体から免疫粘着反応性消失

*Tetanus toxoid* - *anti-tetanus toxoid* 抗体を、種々の濃度のヒト血清と37°C, 60分間インキュベートした後、溶液の一部をそのまま遠心して% Solubilization を決定し、一部は EDTA 存在下で O 型ヒト赤血球と更にインキュベートして、免疫粘着反応性を調べた。



45.

免疫複合体-補体反応におけるRFの影響について

広瀬俊一, 大浜用八郎, 行山康, 高橋守信\*

東大医学部 物内・\*金沢大がん研

〔目的〕 免疫複合体が補体により可溶化される現象は、高橋等により報告されている。IgG抗体よりなる免疫複合体は、一方でリウマトイド因子とも反応する。これらのことから、免疫複合体が存在する状態、および、その環境、さらに、補体、および、RFのあり方の如何が免疫複合体病変の惹起に関係してくるものと思われる。リウマトイド因子は、各種の自己免疫疾患、および、リウマチ性疾患において存在する。したがって、今回は、リウマトイド因子の存在が、補体による免疫複合体の可溶化、および、アナフィラトキシンの産生に、如何なる影響を及ぼすかについて検討し、リウマチ性疾患、特に、免疫複合体病の発生におけるリウマトイド因子、および、補体の役割について考察を試みた。

〔方法〕 沈降性免疫複合体の作製には、 $I^{125}$ でラベルしたDNP<sub>48</sub>-BSAを抗原として用いた。抗DNP-抗体には、DNP-Methyl化BSA、および、DNP-HGGを抗原として過免疫したウサギより得たIgG抗体を用いた。非働化した抗ウサギDNPウサギ血清に、DNP<sub>48</sub>-BSA $I^{125}$ を最適比に加え、37°C 2時間、さらに、4°C 3日間放置した後、その沈降物をリン酸緩衝液(P.B.S. pH 7.2 0.15 Mol)にて洗滌し、これをP.B.S.に再浮遊させたものを使用した。最終的に200  $\mu$ Ab/mlにしたものを0.025 (5  $\mu$ Ab) mlととり、これに1%ゼラチン加P.B.S. (GPB)の0.1 mlを加え、さらに、補体源として正常ヒト血清0.5 mlを加えて、37°C 60分放置した後、10,000 r.p.m. 20分遠心し、上清中における放射能活性の全体への比率を出し、CRA (Complex Release Activity) とした。血清による抑制の検討には、GPBの代りにRA血清、または、正常ヒト血清を0.05 ml加え、37°C 2時間放置反応させた後、洗滌した沈殿に、補体源としてのヒト正常血清0.5 mlを加えてCRAを判定した。リウマトイド因子の価は、RA-テスト試薬を用い、倍数稀釈を行って血清の最終陽性稀釈倍数をもって示した。

補体非結合性の免疫複合体がRFと結合した場合に、補体による可溶化が起こるか否かの検討を行った。すなわち、抗DNP-抗体を0.2 Mol 2 MEで還元後 (pH 8.2 0.5 Mol Tris buffer; 室温 2時間)、0.24 Mol モイヨードアセトアミドでアルキル化 (0°C 60分) したものをP.B.S.で透析し、

これは DNP<sub>49</sub>-BSA\*を最適比で加えた沈降性免疫複合体を作製する。このものには、補体を加えて CRA を測定したものと、RA 血清、NHS を加えて、前述と同じく反応させた後、補体を加え、CRA を測定したものとを比較した。RA 患者血清の分画は、Sephadex G-200 を用いて行い (P.B.S. にて) 19S 分画、7S 分画、および、アルブミン分画に分けて、CRA への影響を検討した。また、CRA とリンパ球数との相関の検討は、リンパ球の絶対数として算出した。

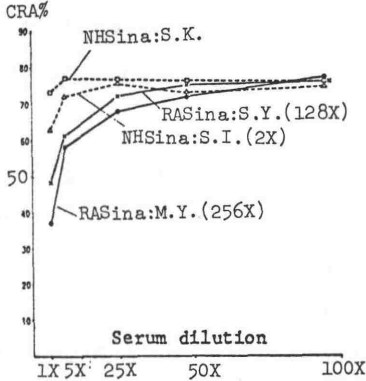
〔成績〕 図 1 に示す如く、RA 患者血清 M.Y. (RA-テスト 256X)、および、S.Y. (同 128X) では、原血清で強い CRA 抑制を示すが、稀釈によってその抑制は低下する。一方、NHS では、RA-テスト 2X を示す S.I. で原血清での軽度の抑制はみられるが、稀釈により低下する。何れの場合も用量曲線を示すが、50 倍、および、100 倍稀釈では、抑制はみられなくなる。図 2 にみられる如く、この抑制では、RA 血清と NHS の間に有意の差が存在する。(原血清間で  $P < 0.5\%$ ) この CRA の抑制は CRA% と RA-テストの価との関係は  $r = -0.7358$  で逆相関を示している。また、リンパ球数と CRA とでは  $r = -0.31$  の弱い逆相関を示した。この RA 血清中の抑制因子の存在は、Sephadex G 200 分画の  $\alpha_1$  分画、すなわち、19S 分画に存在し、そこには RF の存在が検出された。免疫複合体に対するこのような抗体が、CRA の抑制を起すか否かの検討に、免疫複合体を構成するウサギ IgG に対する山羊抗体を還元アルキル化し、補体非結合性にしたものを使用すると、RF と同じような強い抑制がみられた。(図 3) 免疫複合体が、ラット血清と反応して生ずるアチフィラトキシンの活性は、免疫複合体を RF と反応させると抑制される傾向を示した。また、還元アルキル化抗体で作製された免疫複合体は、RF と反応すると CRA を高め、また、ラット血清との反応によるアチフィラトキシンの産生を増強する傾向を示した。

〔考察〕 免疫複合体の補体による可溶化 (CRA) が RA 血清により抑制され、それが RA-テストの価と逆相関を示し、また、RA 血清の Sephadex G 200 分画によって 19S 分画にその抑制因子の存在が示された。このことは、RF が CRA の抑制因子として働いていることを強く示唆している。また、免疫複合体をつくるウサギ IgG 抗体に対する抗体を還元アルキル化して行った結果の CRA の抑制は、免疫複合体に対する抗体によって CRA への抑制されることを暗示している。このようなことから、免疫複合体の補

体による可溶性は、免疫複合体がRFと結合することによって抑制されると考えられる。この抑制が、免疫複合体の生物活性の一つであるアタファイラトキシンの産生にどのような影響を与えるかを検討したのでは、やはり、抑制される傾向を示した。一方、このRFは、還元アルキル化免疫複合体との結合によって、そのアタファイラトキシン産生を増強する傾向にあり、また、RF価の高いものではCRAを促進する。これらのことから、RFが必ずしも免疫複合体のCRAを抑制するだけでなく、補体結合能などある種の免疫複合体の弱い活性を増強することもあると考えられる。

このようなRFと免疫複合体の活性、特に、補体との関係については、免疫複合体病の病変惹起の原因究明と共に、免疫複合体の存在の様式について、また、その病因的意味づけについて、今後の問題として解明されなければならないものと思われる。

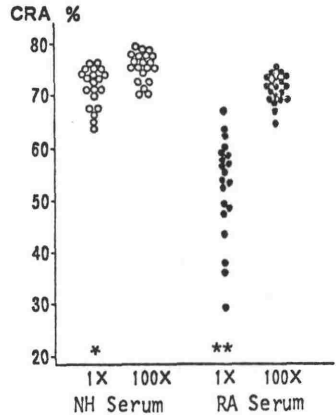
Dose's response curve of inhibitory effect on CRA by RA and normal serum



RASina: inactivated RA serum  
and NHS ina: inactivated NHS  
RA Test titer was indicated  
in parenthesis

図 1

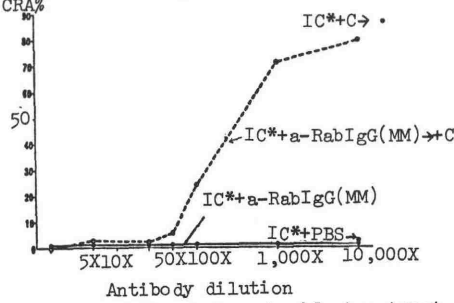
Inhibitory effect of RA and normal serum on CRA



\*\*\*:  $P < 0.05$     ○ NHS    ● RA Serum  
1X and 100X: indicate serum dilution

図 2

Effect of reduced and alkylated anti-Rabbit IgG Antibody on CRA



MM: 2-ME and Monoiodoacetamide treatment

図 3



FRIDAY, AUGUST 24, 1979

SESSION 1 : 14 : 00-15 : 25

Chairmen : H. Okada and S. Nagasawa

1. Serum Complement of *Suncus murinus*, A. Miyama, H. Ichikawa, H. Takahashi, S. Hirose and Y. Kawamoto.
2. Simple Methods for Preparing EAC<sub>1</sub>, 4b, 2a, 3b and EAC4b, 3b Using an Anticomplementary Compound, K-76 Monocarboxylic Acid, K. Hong, T. Kinoshita and K. Inoue.
3. Clinical Significance of TPIA Test, T. Suzuki, K. Madarame, S. Tanaka and K. Shimada.
4. A Simple Colorimetric Assay for Complement-Components Using Synthetic Substrate, M. Niinobe, Y. Hitomi, N. Ikari and S. Fujii.

WORKSHOP 1 : 15 : 45-17 : 25

Chairmen : S. Hirose and M. Takahashi

Clinical Topics : Immune Complexes and Nephritic Factor

5. Detection and Immunochemical Analysis of Circulating Immune Complexes in Viral Hepatitis Patients Using <sup>125</sup>I - Labelled Clq, K. Araki, T. Tsuji, K. Onoue, J. Inoue, T. Shinohara, M. Tsuchiya, H. Nagashima and K. Naito.
6. Circulating Immune Complexes and Complement Activation in Glomerulonephritis and Systemic Lupus Erythematosus, S. Nakayama, T. Sakurai, H. Koide, J. Ohno and N. Tamura.
7. Detection of Circulating Immune Complexes in Pathological Human Sera, M. Yasuda, I. Ezaki, K. Sakai, M. Nobunaga, T. Ota and K. Okochi.
8. Detection of Immune Complex in Liver Tissues From Patients with Chronic Active Liver Diseases by Direct Immunofluorescent Technique Used with FITC-Labelled Human Clq, T. Tsuji, K. Araki, J. Inoue,

- K. Onoue, M. Tsuchiya, T. Shinohara, H. Nagashima and K. Naito.
9. A Study of an Alternative Complement Pathway Activating Factor Detected in a Series of Renal Disease Patients, H. Ohi, H. Miyaji, M. Seki, R. Abe, K. Kanazawa, N. Nawa and M. Hatano.
  10. Complement Abnormalities in Partial Lipodystrophy (PLD), I. Nakanishi, Y. Akagaki, Y. Fujiwara, N. Ueda, A. Ando, H. Abe, Y. Orita, S. Inai and K. Nagaki.

SESSION 2 : 19 : 00-21 : 25

Chairmen : K. Inoue and K. Nagaki

11. Fractionation of the Components of Human Complement with Polyethylene Glycol, S. Tanaka, K. Madarame, F. Kitamura, T. Suzuki, K. Shimada and K. Nishioka.
12. Limited Proteolysis of C4b Isolation of a New C4b Derivative, S. Nagasawa, C. Ichihara and R. M. Stroud.
13. Purification of Mouse Serum Protein with Binding Activity for Human C4b, S. Kai, V. Nussenzweig and T. Fujita.
14. Cleavage of Cell-bound C3b, K. Iida, K. Nagaki and S. Inai.
15. The Isolation of a Low Molecular Weight Inactivator of the Alternative Pathway from Urine and Its Reaction Mechanisms, K. Nagaki, M. Matsumoto, E. Kitano and S. Inai.
16. Effect of Sugar on the Lysis of EACI-8, H. Kitamura and S. Inai.
17. C9 Hemolytic Activity of the Soluble C5b-9 Complex of Guinea Pig Complement, Analogous to Human SC5b-9, T. Kinoshita, K. Hong and K. Inoue.

SATURDAY, AUGUST 25, 1979

SESSION 3 : 8 : 30-10 : 35

Chairmen : M. Kondo and M. Torisu

18. Inhibition of Activation of Cls, M. Yoshida and A. Takada.
19. Effect of BCG, OK-432 (Picibanil) , PS-K (Krestin) and Levamisole on Guinea Pig Complement System in Vivo, H. Kato, H. Nishihori, Y. Wakamatsu, Y. Furukawa, N. Yokoe, K. Hosokawa and M. Kondo.
20. Effect of SSM (Specific Substance Maruyama) on Human Complement System in Vitro and in Vivo, N. Yokoe, Y. Furukawa, Y. Wakamatsu, H. Kato, M. Ikezaki, K. Hosokawa and M. Kondo.
21. Effect of SLE serum on  $O_2^-$  Generation by Human Polymorphonuclear Leukocytes : Possible Role of Complement Receptors, M. Shingu, K. Sakai and M. Nobunaga.
22. The Effect of Phagocytosis on the Production of Factor B by Mouse Peritoneal Macrophages, Y. Kawamoto, H. Ichikawa and A. Miyama.
23. Correlation between the Activation of Alternative Pathway of Complement and the Induction of Tumor Cytotoxic Macrophages by Lentinan, J. Hamuro, K. Kashima, K. Mitsugi, H. U. Schorlemmer, U. Hadding and D. Bitter-Suerman.

GUEST ADDRESS : 10 : 55-11 : 55

Chairman : K. Nishioka

Complement : Review of Regulator Activities, R. M. Stroud

SESSION 4 : 14 : 00-15 : 45

Chairmen : A. Miyama and T. Tsuji

24. Incorporation of  $^{14}C$ -L-Leucine into Complement in Experimental Infection of Rats in Various Nutritional Stages, M. Sakamoto, K. Nishioka and K. Shimada.



25. Detection of Tissue Clq and Existence of Liver HB Surface Antigen in Patients with Various Liver Diseases By Direct Immunofluorescent Double Staining Technique, J. Inoue, T. Tsuji, S. Araki, T. Shinohara, K. Onoue, M. Tsuchiya, H. Nagashima and K. Naito.
26. Inhibitory Effect of Anti-Complementary Agent (K-76) in Experimental Endotoxin-Induced Liver Injury, K. Onoue, T. Tsuji, K. Araki, T. Shinohara, M. Tsuchiya, J. Inoue, H. Nagashima and K. Naito.
27. Complement in Primary Hepatoma, H. Tagami, K. Watanabe, T. Yoshikawa, M. Kondo, N. Matsumura, K. Nishida and K. Hosokawa.
28. Quantitative Changes in the Protein of Complement Components in Patients with Malignant Tumors Treated with Immunopotentiator OK-432 (Picibanil), S. Funahashi, J. Kodama, A. Okazaki, T. Kawahara, N. Numata, M. Ozawa, H. Tamura, and S. Shimoe.

#### WORKSHOP 2 : 16 : 05-18 : 05

Chairmen : T. Tachibana and H. Kitamura

Phenotypes and Genetic Controls  
of the Complement System and Its Abnormalities

29. Dependence of C4 Activity in Molecular States on Different Hemolytic Assays, Y. Fukuoka, T. Okuda and T. Tachibana.
30. Genetic Mapping of the Locus Controlling Structural Variations of Murine C3 in the Chromosome 17, S. Natsume-Sakai, J. Hayakawa, S. Amano and M. Takahashi.
31. The Primate Complements. II. Immune Adherence Receptors on Erythrocytes and Platelets, T. Okuda, K. Takahashi and T. Tachibana.
32. Genetics and Some Characterization of C6 Deficiency in Rabbits, T. Abe, M. Komatsu, K. Yamamoto and S. Migita.
33. Study on C3 Polymorphism in the Japanese Population, H. Nishimukai, K. Sakata, K. Yamasawa, Y. Hyodo, K. Kosuge, T. Yazaki and H. Kitamura.
34. Hereditary Angioedema : A Case Report and Studies of the Mechanism of Episodic Edema, M. Kohno, T. Chimoto, A. Fujisaku, H. Himemiya and A. Mikami.
35. Hereditary C3 Deficiency in a Patient with SLE, Y. Hyodo, K. Kosuge, H. Kitamura, K. Nagaki and S. Inai.
36. Hereditary Deficiency of the Ninth Component of Complement (C9),

Y. Yukiyaama, T. Chihara, K. Tanimoto, S. Hirose and Y. Horiuch.

RECEPTION : 18 : 15-20 : 00

SUNDAY, AUGUST 26, 1979

SESSION 5 : 8 : 30-9 : 55

Chairmen : S. Shiraishi and H. Teshima

37. Concentrations of Complement Components of Clq and C3 in Sera and Synovial Fluids of Patients with Bone and Joint Diseases, M. Ueda, T. Sasaki, K. Yonemasu, S. Kashiba and T. Ochi.
38. Clq in Various Diseases Sera, H. Yoshida, Y. Hosokawa, K. Watanabe, S. Suzuki, M. Satoh, T. Morito and R. Kasukawa.
39. Elevated Level of Serum C5 and Manifestation of Atopic Dermatitis Symptoms, T. Kawashima, M. Koga, Y. Yasuki, K. Horiuchi, K. Shimada and K. Nishioka.
40. The Different Complement Profile in Both Attack and Remission of Urticaria, K. Kan, N. Nakajima and T. Sugisaki.

SESSION 6 : 10 : 15-12 : 00

Chairmen : Y. Yukiyaama and T. Amano

41. The Complement Profile in Systemic Lupus Erythematosus, K. Kan, N. Nakajima and T. Sugisaki.
42. Cold Activation of Complement : Usefulness of NaCl in Its Inhibition, T. Hotta, S. Takemura, M. Kondo, H. Nishihori, N. Matsumura, K. Nishida, M. Ikezaki and K. Hosokawa.

43. Cold Activation of Complement and Its Responsible Factors, S. Takemura, H. Tagami, K. Watanabe, T. Hotta, T. Yoshikawa, K. Hosokawa and M. Kondo.
44. Complement-Dependent Solubilization of Immune Precipitates Formed from Human Antibodies, M. Takahashi, M. Nonaka and S. Hirose.
45. Effects of Rheumatoid Factor on Interaction between Immune Complexes and Complement, S. Hirose, Y. Ohama, Y. Yukiama and M. Takahashi.

# ABSTRACT

Complement: Review of Regulator Activities  
Robert M. Stroud, M.D.

The complement system is not as complex as it seemed when there were only R reagents and 100% hemolytic units for assay purposes. In fact, the in-depth study of the complement proteins has recently facilitated understanding to such an extent that research emphasis has shifted from methodology and improved purification techniques to biochemical and physiological control of the remarkable activities of these proteins. The properties and activities of these control proteins will be discussed and new studies on the Clq inactivator will be described. This is another of the fascinating molecules that influence complement activities. Future directions of biochemical and biological research will be emphasized.





1.

Serum Complement of Suncus murinus

Akio Miyama, Hidetaka Ichikawa, Hisahide Takahashi,

Susumu Hirose and Yasuko Kawamoto

Department of Microbiology, Fujita-Gakuen University School of Medicine,

Toyoake, Aichi

Insectivora is an order of mammals said to be the direct lineal ancestors of primates and to have a closer affinity with primates than any other such order.

We have collected wild Suncus murinus, a species of insectivores, and successfully bred them for laboratory animalization. One of our purposes is to determine whether Suncus murinus are suitable as laboratory animals for the complement studies. We will report on the data concerning measurement of the complement of Suncus murinus.

Whole complement titer ( CH50 ) of serum obtained from Suncus murinus aging between 300 and 600 days was determined by the conventional method using EA. It was  $133 \pm 35$  and was considerably higher than human serum. When individual serum was pooled together and then frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ , its CH50 decreased remarkably by unknown reason. The first component of suncus complement (  $\text{C1}^{\text{sm}}$  ) could be measured only by the reagent composed of  $\text{EAC4}^{\text{gp}}$  or  $\text{EAC4}^{\text{hu}}$ ,  $\text{C2}^{\text{gp}}$  and EDTA-rat C. Replacement of  $\text{C2}^{\text{gp}}$  by  $\text{oxyc2}^{\text{hu}}$  resulted in a drop of C1 titer, indicating incompatibility between  $\text{C1}^{\text{sm}}$  and  $\text{C2}^{\text{hu}}$ . The measurement of suncus C4 was unsuccessful by the possible incompatibility between  $\text{C4}^{\text{sm}}$  and  $\text{C1}^{\text{hu}}$  or  $\text{C1}^{\text{gp}}$ . The hemolytic assay of  $\text{C2}^{\text{sm}}$  and  $\text{C3}^{\text{sm}}$  was also impossible. However, the reactivity of suncus serum with  $\text{EAC142}^{\text{gp}}$  was confirmed by the immune adherence reaction, giving a value within the limit of 1:3,200.

Protein profile revealed by cellulose-acetate electrophoresis demonstrated that suncus serum contained large amount of homogeneous protein which had a  $\beta$ -mobility and appeared to be a M component. Identification of this protein is under investigation.

2. Simple methods for preparing  $\overline{\text{EAC1,4b,2a,3b}}$  and  $\text{EAC4b,3b}$  using an anticomplementary compound, K-76 monocarboxylic acid

KYONGSU HONG, TAROH KINOSHITA and KOZO INOUE

Department of Bacteriology, Osaka University Medical School, Suita, Osaka

Simple methods will be presented for preparing  $\overline{\text{EAC1,4b,2a,3b}}$ ,  $\text{EAC4b,3b}$ ,  $\overline{\text{EAC1,4b,2a,3b,P}}$  and  $\text{EAC4b,3b,P}$  with either guinea pig or human complement components. The methods are based on the inactivation of C5 in serum or serum deficient in properdin (RP) with the anticomplementary compound, K-76 monocarboxylic acid (K-76 COOH).  $\overline{\text{EAC1,4b,2a,3b,P}}$  are readily obtained by incubating sensitized erythrocytes (EA) with whole complement serum pretreated with K-76 COOH,  $\overline{\text{EAC1,4b,2a,3b}}$  is obtained similarly using RP instead of the whole serum.  $\text{EAC4b,3b,P}$  and  $\text{EAC4b,3b}$  are obtained by removing C1 with ethylenediaminetetraacetate (EDTA) and incubating the mixture at 37°C to allow decay of C2a.

These intermediate cells can initiate the alternative pathway of complement activation in the presence of Mg ion and ethyleneglycol-bis (aminoethyl) tetraacetate (EGTA).

Guinea pig C5 is more effectively titrated with the intermediate cells  $\overline{\text{EAC1,4b,2a,3b}}$  or  $\overline{\text{EAC1,4b,2a,3b,P}}$ , containing guinea pig complement components, than with those containing human components; human C5 is more effectively titrated with the intermediate cells containing human components.

### 3. Clinical significance of TPIA test.

Takakazu Suzuki, Kimie Madarame, Shinobu Tanaka and Kooichi Shimada.

(Division of Complementology, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science.)

Immune adherence phenomenon was first described by R.A. Nelson in 1953. He employed *Treponema pallidum* (TP) as antigen in the test (TPIA test). The test has not been widely used for its technical complexity. Its usefulness for clinical investigations has not been well known.

In this meeting, we will report results obtained by TPIA test with which antibody titer in the sera from syphilitic patients were measured in the course of therapeutic treatment.

#### Materials and Methods.

The modified TPIA test was employed; 0.3 ml of TP antigen suspension, 0.05 ml of the test serum, 0.05 ml of guinea pig serum and 0.1 ml of 50% group O human red cells were incubated at 37°C for 30 minutes. 5 l of the supernatant was obtained by centrifugation at 1000 rpm for 3 minutes and the number of organisms was counted. The results were expressed as the IA index which was the ratio of the number of organisms in the supernatant between each sample and control.

#### Results and Discussion

##### 1. Comparison with other serodiagnostic method.

Using sera from 340 patients with syphilis, the TPIA test was compared with glass plate, TPHA, and FTA-ABS tests. In qualitative point, the results of the TPIA test agreed with those of the glass plate, TPHA and FTA-ABS tests in 65, 82 and 73% of the cases, respectively. In the quantitative, TPIA test showed no significant correlation with other methods. It indicates that TPIA test has different significances from the other tests. By gel filtration analysis, it was clarified that the test showed high sensitivity to IgM antibodies. The TPIA test may, therefore, be suitable for the detection of antibodies in the early stages of the disease. To assume this idea, other experiments were carried out as below.

##### 2. Clinical significance of the TPIA test and evaluation of therapeutic treatment.

Antibody titers were measured by the test in patients with clinical syphilis, and the relationship between the effect of the treatment and the changes of the TPIA titers was investigated.

In the TPHA test little change in antibody titer occurred after treatment while, in the FTA-ABS test, only a slight decrease occurred. The antibody titer in the TPIA test markedly decreased. The gel filtration analysis of the sera obtained from patients at different intervals after the treatment clarified that the decrease in antibody titers after treatment mainly depended on those in IgM antibodies. Because of the high sensitivity of the TPIA test to IgM antibody, the titer of the TPIA test is well correlative with the effect of treatment for syphilis.

#### 4. A Simple Colorimetric Assay for Complement-components Using Synthetic Substrate

Institute for Protein Research, Osaka University

Michio Niinobe, Yuji Hitomi, Nobuhiko Ikari and Setsuro Fujii

Complement-components are usually determined using hemolytic method or hydrolytic capacity to a synthetic substrate on the components had enzyme activity. Generally, hemolytic method is sensitive, whereas the procedure is complicated. On the other hand, in the case of synthetic substrate, though the procedure is simple, the sensitivity is low.

Recently, we developed new synthetic substrates for various proteases,  $\alpha$ -naphthylester derivatives such as acetyl-L-Tyr- $\alpha$ -naphthylester(ATNE), tosyl-L-Lys- $\alpha$ -naphthylester(TLNE), acetyl-Gly-L-Lys- $\alpha$ -naphthylester(AGLNE), tosyl-L-Arg- $\alpha$ -naphthylester, L-Pro-L-Phe-L-Arg- $\alpha$ -naphthylester, benzoyl-L-Phe-L-Val-L-Arg- $\alpha$ -naphthylester and D-Val-L-Leu-L-lys- $\alpha$ -naphthylester. We are now studying on the development of micro-assay on various proteases contained in tissues and body fluids using  $\alpha$ -naphthylester derivatives as substrates. In this symposium, we will have a presentation on micro-assay of Clesterase in serum level using ATNE as substrate.

First, the substrate specificities of Clesterase and Clr were studied using various  $\alpha$ -naphthylesters and alkylesters as substrates. As alkylester derivatives, acetyl-L-Tyr-ethylester(ATEE), acetyl-L-Arg-methylester(AAME), acetyl-Gly-L-Lys-methylester(AGLME), tosyl-L-Arg-methylester and tosyl-L-Lys-methylester were used. Esterolytic activities on  $\alpha$ -naphthylester derivatives were determined using a diazo-coupling reaction between  $\alpha$ -naphthol released by the enzyme reaction and a diazonium salt. On the other hand, esterolytic activities on alkylester derivatives were determined by hydroxamate-method. Consequently, Clesterase hydrolyzed in order of TLNE, AGLNE and ATNE, while in alkylesters hydrolyzed in order of AGLME, AAME and ATEE, respectively. Further, the results of comparison of sensitivity on both assay methods showed that in  $\alpha$ -naphthylester derivatives was more sensitive than in alkylester derivatives ; in Clesterase, increase of the sensitivity in ATNE hydrolysis was about 30-times as compared with that in ATEE hydrolysis. On the other hand, AGLNE was the best substrate in Clr ; this substrate showed increase of the sensitivity of about 40-times as compared with AGLME. These results demonstrate that this assay method is more sensitive than hydroxamate-method, and that is possible to detect the change in very small quantity of proteases in various pathological conditions.

So we studied on the quantitative property of Clesterase in serum using ATNE as substrate. The assay was performed by the following method ; after activation of Cl by the addition of antigen-antibody complex, its complex was centrifuged and the resultant precipitate was washed with 50mM sodium phosphate buffer, pH7.0, several times (enzymes which hydrolyzed ATNE with the exception of Clesterase were removed by this procedure), and then the precipitate was suspended in the same buffer containing EDTA, and the suspension was centrifuged, and the supernatant was used as the enzyme source. ATNE hydrolyzing activity of the supernatant was almost inhibited by the antibody of Clesterase or Clesterase inhibitor. In this method, a minimal detectable amounts of serum on Clesterase was abouts 25 $\mu$ l.

These results suggest that the change of complement system in classical pathway can be detected easily in small amount of serum.

## 5. DETECTION AND IMMUNOCHEMICAL ANALYSIS OF CIRCULATING IMMUNE COMPLEXES IN VIRAL HEPATITIS PATIENTS USING $^{125}\text{I}$ LABELLED C1q

ARAKI,K.,TSUJI,T.,ONOE,K., INOUE,J., SHINOHARA,T., TSUCHIYA,M., NAGASHIMA,H.\* and NAITO,K.\*\* (\*First Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School, Okayama, Japan; \*\*Department of Internal Medicine, Kumayama Hospital, Okayama, Japan; )

Circulating immune complexes seem to play an important role in immune reactions in liver diseases. The  $^{125}\text{I}$ -C1q binding test is accepted as a reliable method for the detection of circulating immune complexes. The present study was attempted to detect circulating immune complexes and to analyse their antigens. C1q binding activities were relatively low in acute hepatitis, but significantly increased in type-B or non-B chronic hepatitis. A serial studies showed di-phasic increasing c1q bindingactivities in the acute exacerbation of the type B or non-B chronic hepatitis. The molecular size of circulating immune complexes examined using sucrose density gradient ultra-centrifugation was characterized as a molecule as large as, or larger than 19s and another as 7s molecule. Our last experiment is determination of the antigens of circulating immune complexes. The precipitates prepared using  $^{125}\text{I}$ -C1q binding test were radio-iodinated and dissociated in isotonic citrate buffer pH 3.2, then the preparative SDS-PAGE was followed. SDS-PAGE showed the four radio-active peaks. The fourth of them was detected as free  $^{125}\text{I}$ , and the third as IgG. The first peak was associated with hepatitis virus, e.g. HBsAg, in comparison with the pattern of SDS-PAGE of purified HBsAg (adr).

## 6. CIRCULATING IMMUNE COMPLEXES AND COMPLEMENT ACTIVATION IN GLOMERULONEPHRITIS AND SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS.

Syuei Nakayama, Tetsushi Sakurai, Hikaru Koido, Johji Ohno, Noboru Tamura.

Div. Nephrol., Dept. Int. Med., Juntendo Univ. School of Med., Tokyo., Div. Allergy, Dept. Int. Med., Tsukuba Univ. School of Med., Ibaragi.

Immune complexes are thought to exert a pathogenic role of many of the glomerulonephritis, but only limited data concerning their profile and the relation to complement system in those diseases is available. The purpose of this studies is to investigate the relationship between immune complexes, complement components and clinical activity.

Sera were obtained from 11 patients with minimal changes (MC), 13 patients with acute glomerulonephritis (AGN), 17 patients with membranous nephropathy (MN), 15 patients with membranoproliferative glomerulonephritis (MPGN), 18 patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and 14 patients with sarcoidosis.

Purified human Clq was prepared according to the method of Yonemasu et al. Immune complexes were measured by  $^{125}\text{I}$ -Clq deviation test of Sobel et al. Complement concentration was determined by single radial immunodiffusion.

Immune complexes were detected in 72% of patients with SLE, 53% of MPGN, 50% of AGN and 29% MN on the initial sample. The levels of immune complexes were significantly increased in patients with those diseases. In many patients with MPGN and active SLE, serial immune complexes levels correlated well with changes in complement profile, clinical status and biological results. Marked reduction of immune complexes was observed after prednisolone therapy in some patients with MPGN and active SLE. Regression analysis revealed a significantly negative correlation between immune complexes and C4, C3 in MPGN, and between immune complexes and Clq, C4, C3, properdin in SLE.

The present observations suggests that the detection of immune complexes are available for clinical evaluation, and that complement system is mainly activated through the classical pathway by immune complexes in SLE, while it is secondarily activated by C3b feedback cycle by C3b generated through the classical pathway in MPGN.

## 7. DETECTION OF CIRCULATION IMMUNE COMPLEXES IN PATHOLOGICAL HUMAN SERA

Masayuki Yasuda, M.D.<sup>\*</sup>, Ichiko Ezaki, Ph.D.<sup>\*</sup>, Kouko Sakai, M.D.<sup>\*</sup>,  
Masashi Nobunaga, M.D.<sup>\*</sup>, Toshiyuki Ota, M.D.<sup>\*\*</sup>, Kazuo Okochi, M.D.<sup>\*\*</sup>

<sup>\*</sup> Department of Internal Medicine, Institute of Balneotherapeutics,  
Kyushu University, Beppu 874, Japan.

<sup>\*\*</sup> Department of Clinical Laboratory, Kyushu University Hospital,  
Kyushu University, Fukuoka 812, Japan.

The results of attempts to detect circulating immune complexes( CIC ) in pathological sera by different four methods are described. The methods employed here are (1); Clq precipitation, (2); the inhibition of Clq binding to sensitized erythrocytes, (3); polyethylene glycol( PEG ) precipitation, and (4); the inhibition of agglutination of sensitized erythrocytes by human anti-antibody.

(1): Positive precipitation reactions with Clq by gel diffusion were obtained in 17 of 33 sera of systemic lupus erythematosus( SLE ), 3 of 17 sera of malignant rheumatoid arthritis( MRA ), and 1 of 47 sera of rheumatoid arthritis( RA ). 10 of 22 synovial fluid of RA gave positive results.

(2): Clq deviation test showed more than 5  $\mu$ g/ml in 10 of 15 sera of SLE with 7 cases showing more than 20  $\mu$ g/ml, all of which revealed positive Clq precipitation reaction in gel diffusion.

(3): Immune complexes in sera of MRA, RA and Sjögren's syndrome were detected in high percentage by PEG method, but only limited amounts were in SLE.

(4): High incidence of inhibitory sera among rheumatic diseases were shown by the anti-antibody test. This included the sera of 7 of 8 patients with MRA and 10 of 17 with RA.

The tests for CIC employed here are restricted in that they are based on only one biological characteristics of immune complexes. Efficacy of these methods to detect CIC were recognized in that to some extent relationships are found between the immune complexes and complement levels.

8. DETECTION OF IMMUNE COMPLEX IN LIVER TISSUES FROM PATIENTS WITH CHRONIC ACTIVE LIVER DISEASES BY DIRECT IMMUNOFLOUORESCENT TECHNIQUE USED WITH FITC-LABELLED HUMAN Clq

TSUJI, T., ARAKI, K., INOUE, J., ONOUE, K., TSUCHIYA, M., SHINOHARA, T., NAGASHIMA, H.\* and NAITO, K.\*\* (\*First Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School, Okayama, Japan; \*\*Department of Internal Medicine, Kumayama Hospital, Okayama, Japan)

Immune complex in liver specimens from 10 patients with chronic active liver diseases ( 2 cases of chronic persistent hepatitis:CPH, 3 cases of chronic aggressive hepatitis with moderate activity:CAH 2A, 3 cases of chronic aggressive hepatitis with severe activity:CAH 2B, and 2 cases of liver cirrhosis ) was detected by a direct immunofluorescent technique used with FITC-labelled human purified Clq ( FITC-Clq ). FITC-Clq was bound to nuclei of all cells, e.g. hepatic cells, infiltrated cells, Kupffer cells and fibrocytes, in liver tissue. But, positive nuclei were disappeared after a DNase treatment , and a few amounts of immune complex was detected at piecemeal necrosis in portal areas of the specimens from chronic hepatitis patients with active form. It is supported that immune complex bound newly to complement is a few amounts in liver organ, and complement has already bound to immune complex as a physiological process which enables rapid immune clearance.



9. A STUDY OF AN ALTERNATIVE COMPLEMENT PATHWAY ACTIVATING  
FACTOR DETECTED IN A SERIES OF RENAL DISEASE PATIENTS

Hiroyuki Ohi, Hidenao Miyaji, Masato Seki, Riichiro Abe,  
Kazutosi Kanazawa, Noriyuki Nawa and Michinobu Hatano

Second Department of Internal Medicine, Nihon University School  
of Medicine and Hamamatsu Medical Center

Six hundred serum samples collected from 200 patients were tested by the method proposed by C.A. Alper et al. using guinea pigs and also by the method of Vallota.

A result of these tests was the detection of a factor activating the alternative complement pathway in the serum samples of 7 patients. Table I The factor as detected in 3 patients with MPGN was identified as being thermostabiles, with persistent hypocomplementemia observed in these 3 patients during the course of their progress. The factor as detected in 2 patients with AGN and 2 patients with SLE was identified as being thermolabile, and was observed to transiently emerge when the patients were affected by serious renal symptoms along with hypocomplementemia. It was found that the factor was not absorbed when placed in 2 mg/ml of zymosan at 15-17°C or 37°C. (Fig 1)

An immunoadsorption test was carried out with, respectively, the thermostable factor and the thermolabile factor, using the sucrose gradient study and anti-IgG sephrose 4B. The results indicated that both the thermolabile and thermostable factor registered an almost similar sucrose gradient of 7s, could be absorbed by IgG sepharose, and also could be separated out as an eluate with acids. (Fig 2.3)

Abstract

1. The results obtained with Alper's method utilizing the blood cells of guinea pigs did not always coincide with those as determined by Vallota's method, but there was coincidence in the severity of symptoms regarding the stage at which both the thermolabile and thermostable factor were detected. The serum samples demonstrating this correlation between the two methods were used for this study.

2. The thermostable factor was detected only in those serum samples taken from patients with MPGN, which therefore implies a specificity as to the type of disease. Data on the factor further coincided with those of other reports, implying the possibility that it was IgG.

3. The thermolabile factor was detected transiently at the stage of hypocomplementemia in such diseases as AGN and SLE.

Further investigation is necessary to determine the exact identity of the detected factor.

## 10.

## COMPLEMENT ABNORMALITIES IN PARTIAL LIPODYSTROPHY (PLD)

Isao Nakanishi, Yōji Akagaki, Yoshihiro Fujiwara, Naohiko Ueda,  
Akio Ando, Hiroshi Abe, Yoshimasa Orita\*, Shinya Inai\*\*,  
Kazuyoshi Nagaki\*\*.

1st Dept. Int. Med., Osaka Univ. Medical School, Osaka.

\*3rd Dept. Int. Med., Shiga Univ. Medical Science, Shiga.

\*\*The Center for Adult Disease, Osaka.

The present study was aimed to investigate the complement abnormalities in the serum of PLD (10-year-old girl, no evidence of renal disease), and to know the reaction mechanisms of nephritic factor (NeF) in the complement system in vitro using partially purified NeF from her serum.

The hemolytic activities of the complement components were measured using intermediate cells. Alternative pathway C3/C5 convertase on the cell surface was generated on EAC43b by the addition of factor B and D.

- 1) The complement components profiles in her serum is shown in Table 1. The serum had markedly reduced CH50 and C3 activity, but other complement components were normal or slightly depressed.
- 2) After incubating the mixture of NeF positive serum and normal human serum (NHS), only C3 activity was markedly depressed and factor B conversion partially occurred, but C4, C2 and C5 activities were not depressed (Fig 1).
- 3) Partially purified NeF, as well as activated properdin ( $\bar{P}$ ), dose-dependently stabilized C3/C5 convertase (Fig 2). But  $\bar{P}$ -stabilized C3/C5 convertase was easily decayed by purified  $\beta$ 1H globulin, while NeF-stabilized C3/C5 convertase was resistant to  $\beta$ 1H globulin (Table 3).

In conclusion, it was suggested that the stable C3/C5 convertase may be generated when NeF binds to the cell surface  $C3bB$  complex, while in the fluid phase NeF generated only C3 convertase, but not C5 convertase, and this may be one of the mechanisms why only C3 and CH50, but not C5, are depressed in her serum.

# 11. Fractionation of the components of human complement with polyethylene glycol.

Shinobu Tanaka, Kimie Madarame, Fujiko Kitamura, Takakazu Suzuki,  
Kookichi Shimada and Kusuva Nishioka.

( Division of Complementology, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science )

Recently, the fractionation using polyethylen glycol (PEG) have been performed to prepare complement components. The method of fractionation with PEG have not, however, been established.

In this meeting, we analyse effects of pH, salt concentration and molecular weight of PEG on the fractionation of complement components.

## Materials and Methods.

Each 50g of PEG with different molecular weight (400 - 7500) was dissolved in phosphate buffer (PB) and filled up to 100ml (50% PEG) in 0.01 - 0.20M PB with pH 4.0 - 8.0. Sequential fractionation was employed and precipitate obtained at each step was referred as 5, 7, 10....30P, respectively. The precipitates were dissolved in 0.1M PB, pH 7.0, and the amounts of the components were estimated by hemolytic activity as well as gel diffusion and immuno electrophoresis.

## Results.

### 1. Effect of molecular weight of PEG.

As shown in Fig 1a, PEG with low molecular weight made much amounts of complement components precipitate at higher concentration, but , in the cases of high molecular weight PEG, the components were precipitated at lower concentration. However, PEG fractionation failed to separate the components of complement each other except C2. Because of technical reasons, PEG 4000 is recommended for the preparation.

### 2. Effect of salt concentration.

Salt concentration of the buffer showed marked influences on the activities and the fractionation of the components. In 0.01 and 0.05M PB, pH 7.0, the activities were reduced during dialysis. On the other hand, at the higher concentration, the larger amounts of PEG needed to precipitate the same quantities of the components. The results indicated that 0.1 - 0.15M PB are suitable for the PEG fractionation.

### 3. Effect of pH.

As shown in Fig.1c, the components were precipitated by lower PEG concentration in acidic condition but, in alkalin condition, they distributed in the fractions by higher PEG concentration. In the fraction obtained at pH 4.0 and 5, larger amounts of serum proteins were contaminated and, at pH 8.0, the amounts were yielded in more broad fractions. It was, therefore, concluded that the optimum pH for the fractionation was 6.0 - 7.0.

## Conclusion

For high recovery of complement components, PEG 4000 in 0.10 - 0.15M PB with pH 6 - 7 are recommended.

For the separation of each complement components, The fractionation with PEG by itself is not suitable.

## 12. Limited proteolysis of C4b ; Isolation of a new C4b derivative

Shigeharu Nagasawa and Chikako Ichihara (Hokkaido University)

Robert M. Stroud (University of Alabama in Birmingham, U.S.A.)

It is well known that C4b is cleaved into C4c and C4d by a plasma protease, C4b inactivator (C4bINA). We have reported that a macromolecular weight cofactor is essential for the cleavage of C4b by C4bINA.

In the present investigations, we re-examined in detail the process of cleavage of C4b into C4c and C4d.

It was found that the  $\alpha$  chain of C4b disappeared rapidly prior to the formation of C4c and C4d fragments. This suggested the formation of a nicked form of C4b, as in the case of cleavage of C3b and C5b.

The nicked C4b, tentatively termed C4b', was isolated by a preparative Disc-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). C4b' is consisted of disulfide-linked  $\rho$  and  $\gamma$  chains and two fragments of  $\alpha$  chain. The apparent molecular weight and the mobility on Disc-PAGE of C4b' were the same as those of C4b. C4b' was cleaved by C4bINA in the presence of a macromolecular weight cofactor into C4c and C4d.

C4c and C4d were separated by isoelectric focusing. C4c gave a single band on Disc- and SDS-PAGE. Although C4d was found to be single polypeptide chain of 50,000 daltons, it gave multiple bands on Disc-PAGE, suggesting the microheterogeneity of C4d. The reported genetic polymorphism of C4 would be due to the microheterogeneity of C4d domain portion.

In addition, we established a simple and reproducible method for isolation of a macromolecular weight cofactor of C4bINA and investigated its physico-chemical properties. The molecular weight of cofactor was estimated to be 450,000 by SDS-PAGE and 1,000,000 by gel filtration on Biogel A-15m. The cofactor was found to be composed of disulfide-linked six polypeptide chains of molecular weight of 75,000. The cofactor was a glycoprotein of isoelectric point of 6.7.

### 13. Purification of mouse serum protein with binding activity for human C4b

Several regulators of the complement cascade have been recently purified and characterized, and it has been cleared that characteristics of C4-binding protein (C4-bp) are distinct from other those complement components.

We tried to purify mouse serum protein with binding activity for human C4b in order to contribute to the understanding of the decay of human C4b molecule.

AKR/J mice (S<sub>g</sub>-low strain) sera were precipitated and concentrated by PEG and separated with ion-exchangers; QAE-Sephadex A-50, CM-Sephadex C-50, and Sepharose 4B coupled with heparin column chromatographies. Rocket immunoelectrophoresis (RIE) was performed for monitoring of mouse C4-bp. From 91 ml of sera, 0.54 mg of purified C4-bp were obtained. The yield was 4% and purification index about 500.

The molecular weight of this material is about 77,000 or 70,000 daltons checked by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis or immunoprecipitation method. In EDTA-plasma, C4-bp is about 960,000 daltons. From these data it is indicated that C4-bp consists of several disulfide bounded protomers of 77,000 or 70,000 daltons.

The binding activity of this material for human C4b was proved in fluid phase and solid phase (for cell-bound C4b).

## 14.

### Cleavage of cell-bound C3b

Kyoko Iida, Kazuyoshi Nagaki and Shinya Inai

The Center for Adult Diseases, Osaka

It has been considered that the cell-bound C3b is cleaved by C3bINA into two small fragments, C3c and C3d, and that C3d remaining on cell does not have hemolytic activity but has agglutinability. Recently, Nagasawa *et al.* reported the mode of C3 cleavage in fluid phase in detail. They demonstrated that C3b was cleaved through two step reactions, first step with C3bINA and high molecular weight cofactor and second step with plasmin. On the other hand, Linscott *et al.* suggested the existence of transitional form of cell-bound C3 having agglutinability. We studied the release of C3 molecules from cell by isolated  $\beta$ 1H, C3bINA and plasmin, and the hemolytic, immune adhering (I.A.) and agglutinating activities of the cell.

#### Results

- 1) Table 1 shows the agglutinability of intermediate cells. Only EAC1-3k cell, made from EAC1-3b by the incubation with both  $\beta$ 1H and C3bINA, revealed the activity.
- 2) Varying the dose of  $\beta$ 1H and C3bINA, we made several intermediate EAC1-3k cells and studied the agglutinating, hemolytic and I.A. activities. Increasing the doses of  $\beta$ 1H and C3bINA, the agglutinating activity was enhanced and the hemolytic and I.A. activities were diminished.
- 3) By the reaction with plasmin, EAC1-3k cell lost its agglutinability.
- 4) Table 2 shows the release of  $^{125}$ I-C3 from the cell. In the first step, 17% of the C3 was released by the action of  $\beta$ 1H and C3bINA. Only 5% was released from control cell. In the second step, 67% of C3 was released by the action of plasmin to  $\beta$ 1H and C3bINA treated cell, while 15% of C3 remained on cell.
- 5) Fig 1 shows the kinetic study of C3 cleavage by plasmin. The release of C3 from EAC1-3k cell was 73% at 10', and reached the plateau at 85%. EAC1-3b cell slowly released the C3 molecules by plasmin. None of these intermediate cells but EAC1-3k showed agglutinability.

#### Discussion

By the action of  $\beta$ 1H and C3bINA, cell-bound C3b is cleaved to C3k. C3k has agglutinability but has no hemolytic activity. On the other hand, C3k has no receptor for  $\beta$ 1H (Nagaki *et al.*, IAAAI, 1976). From these results, the conformation of C3k may be completely different from that of C3b, although the two peptide chains,  $\alpha$  and  $\beta$ , of the C3k were still held together by the interchain S-S linkages. Plasmin cleaves cell-bound C3b. C3k may have adequate conformation to the action of plasmin, and so is cleaved rapidly. After treatment of cell-bound C3b with  $\beta$ 1H, C3bINA and plasmin, 15% of C3 molecules remained on the cell. Calculating from the M.W. of C3b as 180,000 daltons, the M.W. of remaining C3 molecule is 27,000 daltons, and this shows the good agreement with the M.W. of C3d.

The isolation of a low molecular weight inactivator of the alternative pathway from urine and its reaction mechanisms

Kazuyoshi Nagaki, Misako Matsumoto, Etsuko Kitano and Shinya Inai

The Center for Adult Diseases, Osaka

We isolated a low molecular weight inactivator (LMW-INA) of the alternative pathway from human serum and reported some of its characteristics at the 15th Complement Workshop in August, 1978. Because of the difficulty of its isolation from serum and of its low molecular weight nature, we tried to isolate LMW-INA from urine. This time, we will report the isolation method of LMW-INA from urine and the studies on its reaction mechanisms.

Results

1. Isolation of LMW-INA from urine. Two liters of freshly voided urine were collected from 10 healthy men. After addition of sod. azide (to 0.05%), PMSF (to 0.5mM), EDTA (to 10mM) and EACA (to 0.2M), urine was filtered through glass fiber filter to remove cellular constituents. Filtered urine was then ultra-filtered using Amicon UM 20 membrane and the filtrate was concentrated using UM 2 membrane. LMW-INA was purified from the concentrate by the following procedures. Sephadex G-25 (Fig 1; active fraction, between 70% and 80% of bed volume), DEAE (Fig 2; active fraction, between RSC 0.045 and 0.08), Sephadex G-15 (Fig 3; active fraction, between 50% and 55% of bed volume) and QAE Sephadex A-25 (Fig 4; active fraction, between RSC 0.19 and 0.22). Extinction coefficient ( $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ ) of LMW-INA was 0.05 at 260 nm and 13 at 230 nm. On amino acid analysis, only asparagine was demonstrated in an amount less than 10% of weight. Carbohydrate was not demonstrated by phenol-sulfuric acid reaction. The MW of LMW-INA was between 1,000 and 1,400.

2. The reaction mechanism

Fig. 5: Presence of LMW-INA during formation of  $\text{EAC43bB}$  (—●—) inhibited formation of  $\text{C3bB}$  and enhanced its decay.

Fig. 6: LMW-INA inhibited generation of C3 convertase on zymosan particle (ZX). It also inhibited regeneration of ZX from decayed ZX ( $\text{ZX}^d$ ).

Fig. 7:  $\beta\text{IH}$  was unable to inhibit formation of  $\text{CVF}\cdot\text{B}$  and to enhance its decay (Nagaki *et al.*, *Int. Archs Allergy appl. Immunol.*, 57:221, 1978). When LMW-INA was reacted with C3, D, B or CVF, it showed no effect on the activities of these substances. It also had no effect on  $\text{CVF}\cdot\text{B}$  formation and on preformed  $\text{CVF}\cdot\text{B}$ . But addition of LMW-INA at the activation step of  $\text{CVF}\cdot\text{B}$  to  $\text{CVF}\cdot\text{B}$  or to preformed  $\text{CVF}\cdot\text{B}$  made inhibition of  $\text{CVF}\cdot\text{B}$  activity. In this figure, // indicates the incubation at 37°C for 30 min and / at 37°C for 15 min. The amounts of protein used were C3:100ng, D:17ng, B:2.4  $\mu\text{g}$ , CVF:5.4  $\mu\text{g}$  and LMW-INA:300  $\mu\text{g}$ .

Fig. 8: LMW-INA showed the same dose-response effects on the formation of  $\text{EAC43bB}$  using  $\text{EAC43b}$  prepared with 40/cell (○—○), 200/cell (●—●) and 1,500/cell (▲—▲) of C3 inputs. The number of hemolytic sites per cell were 0.66, 0.64 and 0.62, respectively. This result indicates that LMW-INA has no effect on the B receptor of C3b.

Whole complement titer (CH50) of the serum from C9 deficient woman (C9D) was found to depend greatly on the buffer used for the assay. Further study was carried out and it was revealed that spontaneous lysis of EAC1-8 in the absence of C9 was inhibited by the action of sugar in the buffer.

Methods Buffers; Gelatin veronal buffer (GVB, ionic strength (i.s.)=0.147), sucrose gelatin veronal buffer (SGVB, i.s.=0.075) and glucose geratin veronal buffer (GGVB, i.s.=0.075) were prepared as usual. Various kinds of buffers containing sugars or other reagents with various i.s. were also prepared. All of these buffers were isotonic and pH were 7.3-7.5.

#### Results

1. CH50 titer of C9D serum. As shown in Table 1, CH50 of C9D serum was much lower when assayed in SGVB or GGVB than in GVB.
2. Number of C8 sites on EA by C9D serum. C9D serum was found to form C8 sites more effectively on EA in GGVB or SGVB than in GVB (Fig. 1).

Further study was carried out using EAC1-7 or EAC1-8, prepared by isolated human complement components, and purified C8 and C9, as follows.

3. Lysis of EAC1-8 in GVB, GGVB or SGVB. Fig. 2 clearly showed that the degree of lysis of EAC1-8 was the function of the amount of C8 on the cell and highly dependent on the constituents of the buffer.
4. Buffers for the preparation of EAC1-8. Lysis of EAC1-8 was dependent not on the buffer for the generation of EAC1-8 but on the buffer for the suspension of the cell (Table 2).
5. Lysis of EAC1-8 in various sugar buffers. 16 kinds of isotonic and low i.s. (i.s.=0.10) buffers containing various sugars were prepared. EAC1-8 were incubated in each of these buffers and the degrees of the lysis were estimated. As shown in Fig. 3, any of these sugars was found to inhibit lysis of EAC1-8. Di- or tri-saccharides inhibited more effectively than monosaccharides. Another experiment revealed that sugar had the dose dependent effect on the inhibition (not shown).
6. Other low i.s. buffers. Low i.s. buffers (i.s.=0.10) containing urea, ethylene-glycol (EG) or triethyleneglycol (TEG) instead of sugar were prepared and used for the experiment. In any of these buffers lysis of EAC1-8 was not inhibited (Fig. 3), indicating that the lysis of EAC1-8 was inhibited not by the action of low i.s. of the buffer but by that of sugar in the buffer.

#### Conclusion

- i) When CH50 was assayed in GGVB or SGVB, serum CH50 of C9D was much lower than that in GVB.
- ii) This was because of the inhibition of lysis of EAC1-8 which was formed by EA and C9D serum.
- iii) Lysis of EAC1-8 was inhibited by the action of sugar in GGVB or SGVB.
- iv) All sugars tested in this study inhibited the lysis of EAC1-8. Di- or trisaccharides inhibited more effectively than monosaccharides.



17. C9 hemolytic activity of the soluble C5b-9 complex of guinea pig complement,  
analogous to human SC5b-9

TAROH KINOSHITA, KYONGSU HONG and KOZO INOUE

Department of Bacteriology, Osaka University Medical School, Suita, Osaka

When guinea pig serum was treated with zymosan, hemolytic activity of C9 appeared in a macromolecular complex with a molecular weight of about 1,000,000 daltons as well as free C9. The complex was isolated by sequential gel filtrations and sucrose density gradient centrifugation. On immunodiffusion analysis the C5 and C9 incorporated into the complex showed loss of some antigenic determinants of the respective precursor proteins. Immuno-electrophoretic analysis revealed that the complex moved faster than free C9. Preliminary estimation of the subunit composition of the complex by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis showed that it contained similar proteins to those found in the human SC5b-9 complex. The complex seemed to contain one molecule each of C5b, C6, C7, C8 and protein corresponding to human S protein and three molecules of C9.

The C9 hemolytic activity of the complex was found to be very similar to that of free C9 both dose-dependently and kinetically. It was neutralized with antibody to free C9 in a first order fashion, but the antibody to C5 did not neutralize the hemolytic activity in spite of its ability to precipitate the complex. The complex showed C9 hemolytic activity and also slight C7 activity. However, no other hemolytic activity was found when assayed with all the intermediate cells along the classical pathway or when assayed as any other of the components of complement. On the other hand, the human counterpart, SC5b-9, showed no C9 hemolytic activity but competitively inhibited the hemolytic activity of free C9 as reported previously by Kolb and Müller-Eberhard (J. Exp. Med. 138: 438, 1972).

Masaya Yoshida	Maruzen Pharmaceutical Co., Ltd.
Akikazu Takada	Department of Physiology, Hamamatsu University School of Medicine

Inhibition of activation of C1s by various substances was studied by using the activation of C1 in diluted solution.

1) Among L-Lysine or its related substances, L-Lysine, Arginine and Ornithine had inhibitory activities, but  $\omega$ -Amino acids such as EACA or t-AMCHA did not have such activities.

2) Among Glycyrrhizin or its related substances, Glycyrrhetic acid, Dipotassium glycyrrhizinate, Glycyrrhetic acid hydrogen succinate and Testosterone had inhibitory activities. Steroid structure seems to be required for the inhibition of the activation of C1.

19. EFFECT OF BCG, OK-432 (PICIBANIL), PS-K (KRESTIN) AND LEVAMISOLE ON GUINEA PIG COMPLEMENT SYSTEM IN VIVO.: HARUKI KATO, HIDETSUGU NISHIHORI, YOSHIKAZU WAKAMATSU, YASUMASA FURUKAWA, NOBUYOSHI YOKOE, KEIMEI HOSOKAWA, and #MOTOHARU KONDO, Third Department and #First Department of Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto.

So-called immunopotentiators, BCG, OK-432 (Picibanil), PS-K (Krestin) and Levamisole were investigated for their abilities to increase serum complement levels in guinea pigs.

Three different concentrations, 10 mg/kg, 2mg/kg and 1 mg/kg of BCG and 0.2 mg/kg, 0.02 mg/kg and 0.002 mg/kg of OK-432 were subcutaneously injected every day for 30 days. 2000 mg/kg, 600 mg/kg and 60 mg/kg of PS-K and 100 mg/kg, 30 mg/kg and 3 mg/kg of Levamisole were orally administered for the same period. CH50 was determined by a standard assay method employing sensitized sheep erythrocytes (EA) and GVB<sup>++</sup>. ACH50 employing unsensitized rabbit erythrocytes (RaE) was determined by assaying hemolysis in the presence of 0.03M EGTA-GVB-Mg<sup>++</sup> as a medium for selective activity of the alternative pathway. The detection of concentration of complement components was measured by a SRID using specific anti-sera against guinea pig C4 and C3. Sera were collected before and every 10 days during the administration of these immunopotentiators by cardiac puncture.

By the administration of 0.2 mg/kg of OK-432, and 2000 mg/kg or 600 mg/kg of PS-K, CH50 and ACH50 in guinea pigs revealed marked elevation, while 0.02 mg/kg or 0.002 mg/kg of OK-432 and 60 mg/kg of PS-K showed depression. Subcutaneous injection of 10 mg/kg or 2 mg/kg of BCG also showed elevation of CH50 and ACH50, while 1 mg/kg of BCG did not show significant increase of complement. Oral use of Levamisole of 30 mg/kg revealed marked increase of CH50 and ACH50, while 3 mg/kg was not effective on serum complement. 100 mg/kg was lethally toxic. C4 protein revealed no specific tendency by the use of these four immunopotentiators, while C3 almost paralleled with the changes of CH50 and ACH50 during the observation.

The evidence that a certain dosage of these agents can increase CH50, ACH50, C4 and C3 protein concentrations, suggests that the elevation of hemolytic complement activity may be due to the increase of C3, and so-called immunopotentiators might have an additional function in potentiating the host-mediated immune response against malignant tumor via the complement system. The precise mechanism of the increase of CH50, ACH50 and complement components by the use of these four immunopotentiators is not known.

## 20. EFFECT OF SSM (SPECIFIC SUBSTANCE MARUYAMA) ON HUMAN COMPLEMENT SYSTEM IN VITRO AND IN VIVO.

Nobuyoshi YOKOE, Yasumasa FURUKAWA, Yoshikazu WAKAMATSU, Haruki KATO,  
Minoru IKEZAKI, Keimei HOSOKAWA and \*Motoharu KONDO.

(3rd and \*1st Dept. of Med., Kyoto Pref. Univ. of Med.)

The mode of action of immunopotentiators has been explained by restoring impaired immune response of the host, mainly its cellular immunity. In this experiment, so-called "Maruyama Vaccine" (SSM) extracted from human type tubercule bacilli, was investigated for its influence upon human serum complement either in vitro or in vivo.

Twelve aged patients without malignancy revealing negative response against intradermal injection of PPD and PHA, were selected as providing impaired cellular immune response. They received intramuscular injection of two different concentrations of SSM, 2  $\mu\text{g}$  (SSM-A) or 0.2  $\mu\text{g}$  (SSM-B) every two days, and the blood samples were venously obtained before and every other month during the treatment. The sera were stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until used.

Hemolytic assay of CH50 was measured by a standard method using sensitized sheep erythrocytes (EA) and ACH50 using unsensitized rabbit erythrocytes (RaE). The protein concentration of complement components and immunoglobulins was measured by a single radial immunodiffusion method (SRID) using specific anti-sera against human Clq, C4, C3, C5, C9, C3A, C1-INH and properdin.

For the in vitro activation of complement by SSM, two aliquots of fresh human serum were mixed with an equal volume of different concentrations of SSM diluted one in GVB<sup>++</sup> and the other in 0.03M EGTA-GVB-Mg<sup>++</sup>, and incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 1 hr. The mixtures were further diluted in GVB<sup>++</sup> for the measurement of the classical pathway and/or EGTA-GVB-Mg<sup>++</sup> for the assay of the alternative pathway of the complement.

It was concluded that SSM restored host-immune response in aged subjects during the administration by measuring diameters of PPD and PHA skin tests (Fig.1). It was also found that hemolytic complement activity CH50 and ACH50 was increased both in SSM-A and SSM-B groups to the same extent (Fig.2). Complement components C4, C3, C5, C9, C1-INH and Clq were also increased in SSM-B group, while not in SSM-A group except for Clq (Fig.3). No in vitro activation of complement was observed. The present evidence that SSM increases the serum complement level leads us to conclude that this drug might have an additional function in potentiating the host-mediated immune response through the complement system.

## 21. Effect of SLE serum on $O_2^-$ generation by human polymorphonuclear leukocytes.

Possible role of complement receptors.

Masao Shingu, Kōko Sakai and Masashi Nobunaga,

Institute of Balneo-therapy, Kyu-shu University, Beppu, Japan.

Fc receptor(FcR) or complement(C4, C3) receptors(C4R·C3R) of polymorphonuclear leukocytes have important roles on mediating phagocytosis of opsonized particles. There are few reports of receptor abnormalities of circulating lymphocytes in patients with connective tissue diseases and blood diseases. PMNs, when exposed to appropriate stimuli, generate significant amounts of  $O_2^-$  radicals( $O_2^-$ ) which are highly reactive. Non-phagocytosable stimuli such as immunoglobulins or complement also stimulate PMN to generate  $O_2^-$ . We studied the effect of SLE serum on PMN functions in relation to  $O_2^-$  generation and surface receptors. PMNs were isolated from heparinized venous blood of patients with connective tissue diseases, blood diseases and normal persons. FcR, C4R and C3R of PMNs were investigated according to rosette technique using antibody or complement coated sheep red blood cells. PMNs were preincubated with SLE or normal serum, followed by rosette technique. SLE serum was fractionated by Sephadex G-200, and serum fractions were collected. PMNs were preincubated with serum fractions, and rosette technique were performed. SLE serum was treated with polyethyleneglycol(PEG), and PMNs were preincubated with the pellet or the supernatant.

In patient with SLE, FcR-, C4R-,C3R-positive PMNs were  $40.3 \pm 11.9\%$ ,  $23.9 \pm 11.6\%$ ,  $26.3 \pm 12.2\%$  respectively, which were significantly low compared to those of normal persons.

C4R and C3R were inhibited by preincubation with SLE serum but not with normal serum.

The serum factor inhibiting C4R and C3R were found to be mainly in the first fraction by sephadex G-200 fractionation. The smaller molecular fractions of SLE serum also inhibited C4R and C3R, but this was less degree than larger fraction.  $O_2^-$  generation was assayed as follows.

PMNs, nitroblue tetrazolium(NBT), Con A, Cytochalasin E and serum, with or without superoxide dismutase(SOD) in Krebs Ringer's phosphate buffer(KRP) were incubated at  $37^\circ\text{C}$ , for 30 minutes, centrifuged and NBT reduction of supernatant was assayed at 0.0540. NBT reduction was seen by SLE serum stimulated-PMN but not by normal serum.

Serum factors stimulating PMN to generate  $O_2^-$  was mostly in the first fractions of SLE serum fractionated by sephadex G-200. These results suggest that immune complex plays a major role on influencing PMN functions, both in  $O_2^-$  generation and surface receptor occupancies.

Thus, immune complex-PMN interaction leading to release of  $O_2^-$  and lysosomal enzyme were discussed on the basis of its pathogenetical importance in immune complex diseases.

## The Effect of Phagocytosis on the Production of Factor B

by Mouse Peritoneal Macrophages

Yasuko Kawamoto, Hidetaka Ichikawa and Akio Miyama

Department of Microbiology, Fujita-Gakuen University School of Medicine,

Toyoake, Aichi

We found that the production of Factor B by mouse peritoneal macrophages ( M $\phi$  ) was enhanced when they were stimulated in vivo with LPS before harvesting or stimulated in vitro after harvesting.

Considering that Factor B probably played some roles in recognition of foreign substances and in immune response, we examined the effects of phagocytosis by M $\phi$  on the production of Factor B, acid phosphatase ( AcP ), lysozyme and lactic dehydrogenase ( LDH ). Zymosan sensitized with heated mouse serum ( Z ) and zymosan sensitized with fresh mouse serum ( ZC ) were employed as phagocytizing particles. Z-phagocytized macrophages ( Z-M $\phi$  ) and ZC-phagocytized macrophages ( ZC-M $\phi$  ) produced approximately twice amounts of Factor B as that of non-phagocytized macrophages. Comparison of B production by Z-M $\phi$  with that by ZC-M $\phi$  revealed that the initial rate of Factor B production by ZC-M $\phi$  was slightly less than that of Z-M $\phi$  but the amount of Factor B outdid that of Z-M $\phi$  on 4th to 5th day after phagocytosis.

Intra- and extracellular activities of AcP, LDH and lysozyme were compared with each others on both Z-M $\phi$  and ZC-M $\phi$ . Intracellular AcP and LDH increased remarkably after phagocytosis of Z or ZC, but Z-M $\phi$  produced much more enzymes than ZC-M $\phi$  until 3rd day. Thereafter, ZC-M $\phi$  outdid Z-M $\phi$  in regard to the production of intracellular enzymes. The release of lysozyme was depressed up to 3rd day by phagocytosis of ZC and then greatly accelerated, so that the final amount in the culture supernatant outdid that of Z-M $\phi$ . Intracellular lysozyme remained at a constant level. In general, phagocytosis of ZC caused an initial inhibition and then an enhancement of the production of Factor B and other enzymes. These effects may be explained by the fact that ZC was more effectively trapped than Z by M $\phi$ , but other explanation would be that complement proteins on zymosan particles control the activation of macrophages.

Correlation between the Activation of Alternative Pathway of Complement  
and the Induction of Tumor Cytotoxic Macrophages by Lentinan

J. Hamuro, N. Kashima, K. Mitsugi

( Central Res. Laboratories, Ajinomoto Co., Inc. )

H. U. Schorlemmer, U. Hadding, D. Bitter-Suermann

( Inst. für Medizinische Mikrobiologie der Universität Mainz )

Lentinan is well known to have inhibitory effects against some transplantable tumors in murine system, and as a T-oriented immunopotentiator. From the previous work it is known that lentinan stimulates or restores T-helper cells in antibody synthesis and augments both in vitro as well as in vivo the induction of cytotoxic T lymphocytes against alloantigens and hapten conjugated syngeneic lymphocytes.

To investigate the correlation between the activation of APC by lentinan and its effects on macrophage activation, the detailed functions of activated macrophages by lentinan and C3b was studied. Lentinan and the other 7 analogous Polysaccharides (PS) were found to be potent activators of APC, regardless of the potency of inhibition of S180 growth in mice. The turnover of C3, C5 and factor B showed no difference among these eight PS. The particles, isolated after the treatment of lentinan with C4dGPS for 2 to 4 min at 37°C, showed prominent C3 consuming activity. C3 consuming activity of these particulate enzyme (PX) disappeared during prolonged incubation. From this it follows that solid phase activation of APC may be relevant for the antitumor activity of lentinan.

We also investigated the effects of PS on the nonspecific cytotoxic activity of peritoneal exudate cells (Mφ) and found that macrophages of mice treated with PS were highly cytotoxic to a variety of tumor cells. The cytotoxicity emerged on day 3 after PS administration, and persisted for more than 25 days. None of the PS investigated could activate PEC Mφ in vitro, while almost all of the other immunomodulators could.

Since lentinan possessing APC activating potency could generate in vivo active complement components such as C3b, and since C3b in turn is capable of rendering macrophages cytotoxic, the activation of Mφ by lentinan might be explained by their APC activating effect. It was found that a neutral PS lentinan under in vitro conditions are incapable the Mφ dependent secretion of lysosomal enzymes which are required to amplify the activation of Mφ via C3b in vitro. This condition could explain why lentinan are incapable of rendering PEC Mφ in vitro cytotoxic. The facts that PEC Mφ induced by injection of lentinan showed increased content of lysosomal enzymes and raised level of lysosomal enzymes secretion lead us to the concept C3b generated in vivo in the vicinal region of tumor mass by activation of APC plays a relevant role in the rejection by lentinan of transplantable tumors in murine system.

The differentiation of activated Mφ by lymphokines produced by a T cell specific immune adjuvant lentinan and by C3b is now in progress.

24. Incorporation of [ $^{14}\text{C}$ ]-l-leucine into complement in experimental infection of rats in various nutritional stages

Motoko Sakamoto (Wayo Women's University)

Kusuya Nishioka, Kohkichi Shimada (Tokyo

Metropolitan Institute of Medical Sciences)

The complement biosynthesis was examined in the first complement response, that is elevation of complement level three days after staphylococcus aureus infection, since this elevation is considered to have a role in host defense mechanisms before antibody response.

[ $^{14}\text{C}$ ]-leucine was used as a labeled amino acid to examine the de novo synthesis of complement.

In the first complement response, the rats in the 0.5% protein group, both infected and non-infected group, showed significantly higher specific activity of newly synthesized complement activity than did the rats in the 18% protein group. Compared with the non-infected group, the infected rats also showed higher specific activity of de novo synthesized complement.

The infected rats showed much higher rates of synthesis of complement and this effect was more predominant in the low protein group.



25.

DETECTION OF TISSUE Clq AND EXISTENCE OF LIVER HB SURFACE ANTIGEN  
IN PATIENTS WITH VARIOUS LIVER DISEASES BY DIRECT IMMUNOFLUORESCENT  
DOUBLE STAINING TECHNIQUE

INOUE, J., TSUJI, T., ARAKI, S., SHINOHARA, T., ONOUE, K., TSUCHIYA, M.,  
NAGASHIMA, H.\* and NAITO, K.\*\* ( \* The First Department of Internal Medicine,  
Okayama University Medical School, Okayama, Japan;\*\* Department of Internal  
Medicine, Kumayama Hospital, Okayama, Japan )

Tissue localizations of a subcomponent of the first component of complement ( Clq ) were examined in 40 liver biopsy specimens ( acute hepatitis 2 cases, chronic persistent hepatitis 4 cases, chronic aggressive hepatitis( 2A ) 3 cases, chronic aggressive hepatitis( 2B ) 15 cases, liver cirrhosis 5 cases, lupoid hepatitis 3 cases, hepatocellular carcinoma 6 cases and other type 2 cases ). The direct immunofluorescent technique was used after fixation with 2 % paraformaldehyde in saturated ammonium sulphate or acetone fixation. For HB surface antigen ( HBs Ag ) positive specimens, double staining was carried out used with tetramethyl rhodamine labelled-anti HBs Ag and FITC-anti Clq. Clq on acute hepatitis and chronic persistent hepatitis specimens was found slightly in collagen fibers and the cytoplasm of fibroblasts in the connective tissues, on the contrary, an amount of Clq was detected as immune deposit-like substances in piecemeal necrosis of liver specimens from chronic hepatitis patients with active form. In these immune deposit-like parts, Ig G was localized. Positive Clq on the liver cell membrane was observed in 6 ( 26.0 % ) of 23 cases of HBs Ag positive liver diseases and in 3 ( 17.0 % ) of 17 cases of HBs Ag negative liver diseases. Membranous Clq localization was not related to localizations of HBs Ag in the hepatocytes. In the membranous Clq positive cases, Ig G was identified concomitantly in 2 of 5 cases of HBs Ag positive liver diseases, 1 of 3 cases of HBs Ag negative liver diseases, but Ig A, Ig M , C3 and C4 were not detected. It was supported that detection of Clq bearing to liver cell membrane was appeared in the abnormal conditions of liver cells in hepatitis patients with clinically active stages, and as one of the major mechanisms responsible for immunologic liver tissue injury.

## 26. INHIBITORY EFFECT OF ANTI-COMPLEMENTARY AGENT(K-76) IN EXPERIMENTAL ENDOTOXIN-INDUCED LIVER INJURY

ONOU, K., TSUJI, T., ARAKI, K., SHINOHARA, T., TSUCHIYA, M.,  
INOUE, J., NAGASHIMA, H.\*, and NAITO, K.\*\* (\*First Department of Internal  
Medicine, Okayama University Medical School, Okayama, Japan; \*\*Department  
of Internal Medicine, Kumayama Hospital, Okayama, Japan)

Endotoxin appears as one of the major mechanisms responsible for liver tissue injury in fulminant hepatitis. In the present experimental study, relationships between the function of reticuloendothelial system (RES), e.g. Kupffer cells and macrophages, and endotoxin peritoneally injected was examined. Furthermore, function of RES to an anti-complementary agent (K-76) was studied used with rats with endotoxin-induced hepatitis. A series of 120 rats was investigated. The histological diagnoses, liver function tests for sera and detection of tissue endotoxin LPS used with direct immunofluorescent technique were performed. LPS antigen in survival rats with endotoxin-induced hepatitis was detected mainly in Kupffer cells; on the contrary in mortal rats, mainly in sinusoidal spaces and in hepatic cells. Serum GOT levels of experimental rat groups were elevated, and its of rats peritoneally administered K-76 (5mg/body) were remained within normal limits. Furthermore, LPS antigen in the rats administered K-76 was not detected in hepatic cells, but detected in cytoplasm of Kupffer cells.

It is supported that decrease of function of Kupffer cells in experimental rats lead an outbreak of endotoxin-induced hepatitis, and administration of K-76 as an anti-complementary agent inhibits its outbreak.

HIROKI TAGAMI, KOICHI WATANABE, TOSHIKAZU YOSHIKAWA, MOTOHARU KONDO, \*NAOYUKI MATSUMURA, \*KOICHI NISHIDA and \*KEIMEI HOSOKAWA

First Department and \*Third Department of Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, 602.

Numerous data have shown that serum complement level increases in patients with malignancy following the growth of neoplasm, low complement level has been reported in hepatoma. This decreased serum complement has been explained by impaired synthesis of complement protein by the liver, and partly possible participation of immune reaction in hepatoma patients. However, in these observations "cold activation of complement", that in some patients with liver diseases serum hemolytic complement decreases during the storage of the sample in the cold, have not been taken in account.

Eighteen patients with primary hepatoma were investigated for their serum complement level using sensitized sheep erythrocytes (EA) for the classical complement pathway activity (CH50) and unsensitized rabbit erythrocytes (RaE) for the alternative pathway activity (ACH50), and complement components by single radial immunodiffusion. Their serum samples obtained in the usual manner revealed decreased CH50 in all cases, while normal in ACH50. When sera were separated at 37°C and stored by the increasing ionic strength to  $\mu=0.53$ , all these patients maintained high CH50 and ACH50, indicating that patients sera provided high complement level when cold activation of complement was prevented. Analysis of complement components revealed high C1q and C5, and relatively high C1INH and C9.

It is concluded that serum complement levels in hepatoma patients showed high serum complement levels as seen in other malignant tumors.

Quantitative changes in the protein of complement components  
in patients with malignant tumors treated with immunopotentiator,  
OK-432 (Picibanil)

Shuji Funahashi, MD, Junzo Kodama,<sup>1</sup> MD, Akira Okazaki,<sup>2</sup> MD, Tutomu Kawahara,<sup>2</sup> MD,  
Norio Numata,<sup>2</sup> MD, Mituru Ozawa,<sup>3</sup> MD, Hiroaki Tamura,<sup>3</sup> MD and Shoji Shimoe,<sup>4</sup> MD.

Osaka National Hospital, Department of Clinical Laboratory,<sup>1</sup> Dep. of  
Surgery<sup>2</sup>, Dep. of Obstetrics and Gynecology<sup>3</sup>, Dep. of Urology<sup>4</sup>,  
National Cardiovascular Center, Dep. of Clinical Laboratory and  
Investigation<sup>1</sup>

Previously we have studied the changes in immunological Parameters, such as skin test, lymphocyte population, MIF, immunoglobulins and CH50 titer in 40 patients with malignant tumors treated with non-specific immunopotentiator, OK-432 (PIC). It is assumed that PIC administration could enhance the functions of not only cellular but also humoral immunity as well as complement system in those patients.

#### [Materials and methods]

In those patients, quantitative analysis was performed in the complement components, such as Clq, Cls, C4, C3c, C5, C9, C1-INH, C3b-INH, properdin and C3-activator. Of these 40 patients, 10 had had stomach-, 8 uterine-, 4 lung-, 4 bladder-, 4 kidney-, 2 breast-, 2 ovary-, 2 oesophageal carcinoma as well as 2 leukemia, 1 lymphosarcoma and 1 immunodeficiency. Nine of them were treated with only PIC. Others were treated with chemotherapy and radiation therapy together with PIC. PIC was administered principally s.c. with an initiating dosage of 0.2 KE followed by gradual increase to the maintenance dosage of 2 KE.

Quantitative measurements of proteins of the complement components were performed by means of the single radial immunodiffusion method using anti sera to Clg, Cls, C5, C9 (Behring werke), anti sera to properdin, C3b-INH (Kent Lab.). C3c, C3-activator and C4 were measured using M Partigen plate (Behring werke). The results were represented as percentage of the values obtained using QS standard serum as 100 percent.

#### [Results]

1) The proteins in the complement components of these patients with cancer increased definitely in comparison with the those of healthy adults, with exception of properdin. High values of proteins were observed in C9, C5, Cls, C4, C1-INH and C3-activator in this sequence. However, the properdin remained in the normal range or rather decreased.

2) Following PIC administration, proteins in the complement components increased generally. The rate of increase was marked in properdin but not significant in C1-INH.

3) Comparison of complement components between patients with decreased CH50 titer and those with increased CH50 titer, proteins in the components increased more markedly in the group with increased CH50 titer. Properdin in the group with decreased CH50 titer remarkably decreased in comparison with those with increased CH50 titer.

4) Changes of C1-INH correlated relatively well with the changes in C4 and C9. The same correlation was observed between properdin and C3b-INH as well as C3-activator and C9.

29.

Dependence of C4 activity in molecular states on different hemolytic assays

Yoshihiro Fukuoka, Tomoko Okuda and Takehiko Tachibana

Res. Inst. Tuberculosis and Cancer, Tohoku Univ.

There are two methods for hemolytic titration of C4. The one using EAC1<sup>gp</sup>, oxyC2<sup>hu</sup> and EDTA-C<sup>gp</sup> (E-C method) was reported by us in this symposium in 1977 and the other using EAC1<sup>gp</sup>, oxyC2<sup>hu</sup> and C4D<sup>gp</sup> (C4D method) was recently reported by Nussenzweig et al. We obtained the different results on C4 hemolytic activity measured by the two methods. This discrepancy does not come from the difference in the sensitivity of both methods.

As for BALB/c and DDI (Ss<sup>h</sup> C5<sup>+</sup>), C4 activity was higher in serum than plasma by the E-C method, while the opposite results was obtained by the C4D method. But B10.D<sub>2</sub>/o and DDD (Ss<sup>h</sup> C5<sup>-</sup>) showed neither hemolytic activity in plasma by both methods nor in serum by the C4D methods. The DDI serum was gel-filtered on Sephadex G-200 with VBS<sup>++</sup> and C4 activity of each fraction was measured by the two methods. C4 activity appeared in the first and the second protein peak by the E-C methods, while it was only detected in the second protein peak by the C4D method. This difference does not depend on the participation of guinea pig C2 supplied from C4D serum.

30. GENETIC MAPPING OF THE LOCUS CONTROLLING STRUCTURAL VARIATIONS OF MURINE  
C3 IN THE CHROMOSOME 17.

Shunnosuke Natsuume-Sakai, Jun-Ichiro Hayakawa, Shigetoyo Amano and Morinobu Takahashi. The Department of Immunobiology, Cancer Research Institute, Kanazawa University and the Institute of Experimental Animals, Kanazawa University School of Medicine.

Backcross progeny, (NC x TF/GnLe) $F_1$  x TF/GnLe, was tested for the C3 allotype controlled by C3-1 locus and the expression of mutant gene tf, repeated loss and regrowth of hair. The recombination frequency between these two loci both located in chromosome 17 of the mouse was 24.0 %. Taken together with our previous linkage data, C3-1 is now localized to a position 11 centimorgans more distal than the S region of H-2 on the chromosome 17.

### 31. The Primate Complements. II. Immune Adherence Receptors on Erythrocytes and Platelets.

Tomoko Okuda<sup>1</sup>, Kenji Takahashi<sup>2</sup> and Takehiko Tachibana<sup>1</sup>

<sup>1</sup>. Res. Inst. Tuberculosis & Cancer, Tohoku Univ.

<sup>2</sup>. Primate Res. Inst., Kyoto Univ.

Immune adherence (IA) receptors are said to be found on primate erythrocytes and non-primate platelets. To know if it is true, we examined the IA receptors on erythrocytes and platelets from 11 non-human primates in various stages of evolution.

The IA receptors were detected by rosette formation with EAC( E: sheep erythrocytes, A: IgM fraction of rabbit anti-sheep erythrocytes antiserum, C: complements of various species ).

Using EAC1423<sup>gp</sup> or EAC1423<sup>hu</sup> the IA receptors were detected on the erythrocytes from the Old World monkeys but not from the New World monkeys or the Prosimiaes. The IA receptors on the erythrocytes from the New World monkeys were detected using EAC made from the monkey complements. But we could not detect IA receptors on the erythrocytes from the Prosimiaes even though many species complements were used. From these results it is clear that the detection of IA receptors on erythrocytes is strongly affected by the sort of complements used.

The IA receptors on platelets were found only in the case of grand galago and squirrel monkey.

Rabbits and guinea pigs have IA receptors on their platelets and also on their erythrocytes to some extent.

Tsuneo Abe <sup>1)</sup>, Masanori Komatsu <sup>1)</sup>, Ken-ichi Yamamoto <sup>2)</sup>, and Shunsuke Migita

1) Dept of Animal Genetics, National Institute of Animal Industry, Chiba 280

2) Dept of Molecular Immunology, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa, Japan 920

Since Rother et al., (1961, 1966) discovered C6 deficiency in a strain of rabbits in Germany, two other strains of C6-deficient rabbits have been described, one originating in Mexico, the other in Cambridge. We have also found another C6 deficiency in a strain of Angora rabbits reared in Japan.

The family data were consistent with an autosomal recessive form of inheritance. This and the previous reports indicate that C6 deficiency must be fairly widespread in rabbits reared under normal conditions and thus the total lack of hemolytic complement activity cannot be any serious survival importance. Certainly these deficient rabbits appeared healthy and had normal fertility.

Alloimmunization of C6 deficient rabbit with a normal rabbit serum produced a specific antibody, which gave a clear precipitin line to normal rabbit sera, but not to C6 deficient rabbit sera. The data of inhibition tests using with this alloantiserum indicate that the antibody inhibits specifically C6 activity of not only rabbit serum but also other animal sera. This result may prove the antibody to be C6 protein specific.

This antibody also cross-reacted against other animal sera; human, cattle, sheep, goat, pig, dog, guinea pig and mouse serum, but not to horse, hamster and chicken. This fact suggests the antiserum may be useful for the measurement of C6 protein in some other animals including human and for detecting the allotypes of C6 protein.

The distribution of C6 level, measured by single radial immunodiffusion method using with the alloantiserum, in the sera of Angora rabbits were divided into three groups; normal, about a half and null level. The C6 level in the sera of F1 rabbits (N/d) of cross between C6 deficient Angora rabbit (d/d) and normal New Zealand White rabbit (N/N) were about a half of normal level. These results suggested that the level of C6 in the sera of the rabbits were under the dosage effect of the recessive gene (d) or the dominant gene (N).



## Study on C3 polymorphism in the Japanese population

H.Nishimukai, K.Sakata, K.Yamasawa, Y.Hyodo\*, K.Kosuge\*, T.Yazaki\*, and  
H.Kitamura\*\* (Kyoto Pref.Univ.Med., Kanagawa Childrens Medical Center\*,  
Fujita Gakuen Univ.Med.\*, The Center of Adult Dis. Osaka\*\*)

Over twenty genetic variants of C3 in normal human sera have been detected by the techniques of high voltage starch or agarose gel electrophoresis and antibody fixation. The most common C3 is designated C3-S (controlled by  $C3^S$  gene) and the less common of the two most prevalent forms is C3-F (controlled by  $C3^F$ ). Besides the homozygous C3 deficiency (genotype  $C3^-/C3^-$ ;  $C3^-$  is the silent gene on the C3 locus) and hypomorphic variant (phenotype C3-fS; f form was controlled by  $C3^f$  which synthesizes the decreased C3-F protein (Alper et al. 1971, McLean et al. 1978)) were described. The purpose of the present study was to investigate the C3 polymorphism in the Japanese population.

## (1) Population study

C3 typing was carried out by the high voltage agarose gel electrophoresis (Teisberg 1970; the pattern is shown in Fig.1) and antigen antibody crossed electrophoresis. The sera of unrelated healthy 1,092 individuals were examined; 1,082 of SS, 9 of FS and one  $SS_{slow}$ . The gene frequency of  $C3^S$  was 0.995, which value is extremely higher than that of Caucasians (0.75, by Alper & Propp 1968).

## (2) C3 deficiency

Genetic analysis of a family with C3 deficiency was performed after the measurement of C3 protein, functional hemolytic assay of C3 and CH50 titration in all sera were carried out (see another subject). The proband (IV-22) and his niece (IV-21) with no C3 protein were genetic homozygous C3 deficiencies ( $C3^-/C3^-$ ); father and mother of each had half-normal level of C3-S ( $C3^S/C3^-$ ). No other variant, e.g. C3-F, could not be detected. Partial pedigree of the kindred with C3 deficiency is shown in Fig.2.

Another family with a child who had no C3 protein was discovered. As his father, mother and a sibling had half-normal level of C3-SS, he seemed to be the genetic controlled C3 deficiency. But he was suffering from MPGN and it was suggested that C3-NeF was contained in his serum experimentally, the genotype could not be affirmed the homozygous  $C3^-$  (Fig.3).

## (3) Hypomorphic variant of C3

A Japanese female (52 y.) with hypomorphic variant of C3 was discovered. She was apparently in good health and had no history of serious illness. C3 level and CH50 in her serum were 69.5% of NHS and 32u (NHS=41u), respectively. C3 phenotype was tentatively designated f\*S because a) the S portion contained about half-level of normal C3-SS and the f\* contained more decreased C3 protein (about 1/2 of her S portion), b) the f\* had C3 hemolytic activity, but lower than the S, c) the electrophoretic mobility of f\* was not corresponded to the normal Japanese C3-F (situated between F and S). This pattern was observed repeatedly in her fresh serum.

There are few variants of C3 in the Japanese population. Although some authors reported the association between the  $C3^F$  gene and diseases (atherosclerotic vascular diseases by Sørensen & Dissing 1975, cystic fibrosis by Schiøtz et al. 1978), it is difficult to study on this theme in Japan; in fact, when we performed the C3 typing in 400 of Japanese atherosclerotic vascular diseases, no genetic variant was detected.

### 34. Hereditary Angioedema

A case report and studies of the mechanism of episodic edema

Michifumi Kohno, Takehisa Chimoto, Atsushi Fujisaku, Hideyuki Himemiya, and  
Akio Mikami\*

2nd Department of Internal Medicine, Hokkaido University

\*Department of Internal Medicine, Sapporo Hospital of Japan  
National Railways

A 16 year-old girl was admitted because of swelling of forearms and colicky abdominal pain recurrent since the age of 6 years.

She was found to have low total complement level. Of the complement components, C4 was markedly decreased, and C2 to a mild degree. The levels of CH50, C4, and C2 showed no differences between at the attack and in remission. Other complement components, C1, C3, and C5 were all normal.

Of the family members her mother showed low levels of C4 and C1INH, but she had no clinical symptoms.

The protein amount of C1INH was low, 32% at the attack and 36.5% in remission. By functional assay, C1INH activity was 14.2% in remission. At the attack the activity was not detected.

This may correlate to the hemideficiency hypothesis of Weiller. In our study, C1INH activity was remaining in remission. By some unknown cause it was used up, which led to the attack.

## Hereditary C3 Deficiency in a Patient with SLE

Yukio Hyodo, Keiji, Kosuge,  
Hajime Kitamura\*, Kazuyoshi Nagaki\*,  
and Shinya Inai\*

Kanagawa Childlen's Medical Center,

\* The Center for Adult Diseases, Osaka

A 14-year-old female patient with SLE was found to lack C3 by Immunochemical and hemolytic assays. Pedigree study revealed another C3 deficient subject, 15-year-old healthy boy, and many individuals with C3 levels approximetely half-normal. It seems that these 2 subjects are hemozygous for C3 deficiency. Studies were carried out on hemolytic activities and immunochemical protein concentrations of complement components, immune adherence and bactericidal activities in their sera, etc.

Y. Yukiama, T. Chihara, K. Tanimoto, S. Hirose and Y. Horiuchi

Department of Internal Medicine and Physical Therapy  
University of Tokyo

The discovery of complement deficient state will much contribute to understand the pathophysiology of complement function *in vivo*. Here we describe a case of the ninth component of complement (C9) deficiency, which is the second case in Japan.

Case summary: H.O., a 52-year-old male, was admitted to Tokyo University Hospital, Department of Internal Medicine and Physical Therapy with intermittent fever up to 40°C. At 22 years of age, he had gastroduodenectomy because of duodenal ulcer. A week later intestinal obstruction developed and he was reoperated three times in order to detach adhesion and resect the fistel. After that he had been healthy in twenty years. In 1971, he experienced high fever up to 40°C with chill, which lasted for one or two days and developed once a month. He had suffered from this attack for 6 months and was administered with antibiotics in successive 6 months. After antibiotic treatment, he had no fever for another four years. In 1975, intermittent fever again developed. An attending physician administered 10 to 15 mg of prednisolone per day for over two years. Febrile attack, however, continued which was successfully treated with antibiotics. In 1979, he visited to our hospital because of fever and withdrawal syndrome of steroid. On admission he was well nourished and had no lymphadenopathy. Lungs and heart are intact and liver and spleen are unpalpable. Laboratory findings showed within normal limit except low complement titer (10.0 CH50 vs. 25-40 CH50 of normal). Because of no febrile attack he was discharged. After two weeks he readmitted with high fever and nausea. Laboratory findings showed white blood cell 18200 with neutrophilia, mild anemia, C reactive protein 2(+) and moderately elevated erythro-sedimentation rate. Plain X-P of abdomen revealed incomplete intestinal obstruction, which disappeared in two days with conservative treatment. Hemolytic complement titer again showed low level and the complete absence of C9 was found.

Methods: Total hemolytic complement titration (CH50) was done by using  $4 \times 10^7$  EA cell in one-fifth reaction volume of Mayer's original method. Human C1, C4 and C2 were functionally purified according to the methods described. C3, C5, C6, C7, C8 and C9 were purchased from Cordis Co.. Individual complement component titration was done by using  $2 \times 10^7$  EAC14 or EAC4 cells in one ml. reaction volume. C4 and C6 were assayed by C4 deficient guinea pig sera and C6 deficient rabbit sera. One of anti-sera to C9 was purchased from Hoechst Co. and another was the gift from Dr. M. Takahashi, Cancer Institute of Kanazawa University.

Results: Complement titration (control or normal range); CH50, 72 (90-320); C1,  $2.85 \times 10^4$  ( $1.14-5.10 \times 10^4$ ); C4,  $4.14 \times 10^4$  ( $1.28-5.46 \times 10^4$ ); C2, 2670 (2900-4700); C3, 50000 (16000) C5, 52500 (37700); C6,  $1.62 \times 10^3$  ( $0.55-4.4 \times 10^3$ ); C7,  $3.2 \times 10^4$  ( $2.6 \times 10^4$ ); C8,  $4.0 \times 10^4$  ( $3.2 \times 10^4$ ); C9  $< 250$  ( $7.3 \times 10^4$ ); C3-C9 total activity 96 (357-610); C9 titer of H.O. showed less than one-three hundredth of control sample.

Immunochemical analysis: There were no precipitin line between H.O. sera and anti-C9 sera from either Hoechst Co. or Dr. M. Takahashi in Ouchterloney analysis. In contrast, control sample applied to the well adjacent to H.O. straightly reached the H.O. well. Immunochemical determination of C9 by Mancini method showed no precipitin ring in H.O. sera, while in control samples they ranged from 53-124  $\mu\text{g/ml}$ .

Family study: Three siblings (I.O., S.O., M.O.) showed low complement titer but C4 and C6 levels were within normal range. Ouchterloney analysis disclosed that all of I.O., S.O. and M.O. made no precipitin line against anti-C9 sera, which suggested all four brothers had C9 deficiency. C9 levels of I.O., S.O. and M.O. were all undetectable by Mancini method. Therefore, it seems highly probable that the type of heredity in C9 deficiency is autosomal dominant rather than autosomal codominant or recessive ( $(1/2)^4$  vs.  $(1/4)^4$ ).

Discussion and conclusion: It is uncertain whether pyrexia might be due to the defect of complement system or not. At least bactericidal activity in H.O. sera should decrease because of the absence of C9.

Heredity of C9 resembles that of C1 inhibitor in autosomal dominant trait. However, it produces detectable protein in the case of latter, which differs from this case of C9 deficiency.

In conclusion, a case of 52-year-old Japanese male proved to be the complete absence of C9 in the criteria of hemolytic assay and precipitation reaction in gel.

37. CONCENTRATIONS OF COMPLEMENT COMPONENTS OF Clq AND C3 IN SERA  
AND SYNOVIAL FLUIDS OF PATIENTS WITH BONE AND JOINT DISEASES

\*MASANAGA UEDA, TAKAKO SASAKI, KUNIO YONEMASU, SHUZO KASHIBA

\*\*TAKAHIRO OCHI

\*Department of Bacteriology, Nara Medical University

\*\*Department of Orthopaedics, Osaka University School of Medicine

The amount of complement components (Clq and C3) were measured immunochemically in sera and synovial fluids from patients with various bone and joint diseases. Clq levels were conspicuously elevated in rheumatoid arthritis, but the fluctuations of C3 level were not conspicuous. Values of Clq and C3 in synovial fluids were also expressed as ratios to that of albumin in the same specimens and such appeared to be more reliable index for reflecting pathological conditions.

### 38. Clq in various disease sera.

H. Yoshida, I. Hosokawa, K. Watanabe, S. Suzuki, M. Satoh, T. Morito  
and K. Kasukawa.

The Second Department of Internal Medicine, Fukushima Medical College  
( Fukushima ).

Clq in sera of patients with various diseases was estimated by means of a single radial immunodiffusion, and the correlation with immune complexes in some sera was discussed.

Sera were obtained from patients in our clinic and were stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until used. The amount of Clq in various sera were compared with that of pooled healthy serum of 100 %.

RESULTS & DISCUSSIONS : Clq concentration was the highest of  $168.3 \pm 40$  % in sera of patients with liver cirrhosis and higher in sera of patients with liver diseases including acute hepatitis, chronic hepatitis, hepatoma and intraneptic cholestasis, chronic nephritis and/or uremia and esophageal cancers.

It seemed obvious that Clq was produced in some organs other than the liver, as the higher levels of Clq and the markedly lower level of CH50, C3 and C4 were obtained in sera of patients with liver cirrhosis and fulminant hepatitis. The significance of higher concentration of Clq in sera of patients with advanced liver diseases was still unknown, and the possibility of either the acceleration of production or the deceleration of decaying was suggested.

In some IgG, lower levels of Clq were observed, and heating them at  $45^{\circ}\text{C}$  or  $50^{\circ}\text{C}$  induced decreases of Clq significantly. Increased anticomplementary activity of such sera by heating indicated that the heat-labile monoclonal Ig G caused the increased binding of Clq or activation of complement system.

In the end, the amount of immune complexes were detected by means of a solid phase radioimmunoassay in sera of patients with SLE, malignant RA and liver cirrhosis, and the correlation with serum Clq levels was discussed. Possible counter-correlation between the amount of immune complexes and Clq suggested the different significance of Clq between SLE and LC sera.

### 39. Elevated level of serum C5 and manifestation of atopic dermatitis symptoms

Dermatologic department of Okubo Metropolitan Hospital : Toshio Kawashima,  
Michiyuki Koga, Yoshihiro Yasuki, Kayoko Horiuchi. Tokyo Metropolitan clinical  
Laboratory : Kohkichi Shimada, Kusuya Nishioka.

Increases of Ig E level and eosinophilia as well as local infiltration of eosinophils in lichenified areas are considered to be characteristic pattern of the atopic dermatitis. Serum levels of whole complement activity and components of complement were measured in various stages of this disease and the relation with manifestation of the characteristic patterns of this disease as described above was analysed. It was found that serum complement titer and complement components quantities correspond with the progress of the skin lesions. Changes of serum level of complement system observed in these patients in various stages of the disease were analysed to see the relationship with clinical manifestation such as increased Ig E level, eosinophilia and degree of skin lesions.

This time, we studied 59 cases about the serum CH50 and the quantities of Clq, C4, C3, C5, C9 and C3PA and relation with their skin lesions, progresses, serum immunoglobulins and peripheral WBC counts was analysed.

The consequences follow.

(1) The CH50 titer were  $40.2 \pm 4.8$  unit/ml, and were high in severe skin lesion cases. The levels of complement components also distributed in broad, and varied in disease processes. Especially the mean C5 quantity was high, and paralleled with progress of the skin lesion and its variation was wide.

(2) Among immunoglobulins, Ig E was high and paralleled with skin lesion progress in many cases. Other immunoglobulins were not recognized to have any relationship. The eosinophilia, on the otherhand, was recognized in most peripheral blood study, especially in severe skin lesions cases.

(3) We studied the relationship among C5, Ig E, eosinophilia and skin lesions. As shown in the table, in 11 cases with severe, wide spread skin lesions, all showed high Ig E level, 10 high C5 level and 6 eosinophilia.

In 10 cases with severe skin lesions, 6 high Ig E, 7 high C5 level and 5 eosinophilia.

In 13 cases with moderate skin lesions, 9 high Ig E, 6 high C5 and 7 eosinophilia.

In 10 cases with mild lesions, 8 high Ig E, 4 high C5 and 1 eosinophilia. In 15 convalescent cases, only 3 high Ig E and 3 high C5. To summarize, prevalence of high level of Ig E and C5 corresponds well to the degree of skin lesions, however in some cases with moderate or mild lesions Ig E level still showed high level even when level of C5 returned to normal level.

(4) Clinical follow up studies, on the level of C5, Ig E, eosinophilia and skin lesions were carried out. It is noteworthy that level of C5 returned to normal level in the course of convalescence preceding to the healing of clinical symptoms and return to the normal level of Ig E. Therefore, measurement of complement level especially C5 will give an appropriate marker to determine the prognosis of clinical symptoms of atopic dermatitis.

40. The different complement profile in both attack and remission of urticaria.

Dept. of Int. Med. School of Med., Showa Univ.

Keiji Kan, Noriaki Nakajima, Tetsuzo Sugisaki.

The pathogenesis of urticaria have been generally believed that atopic mechanism could play a major role. In the last symposium of this congress, we reported that sera from patients suffering from attack of urticaria demonstrated significant low levels of C3 and C5, but not in remission, suggesting complement system also involve for the development of urticaria. In this symposium, in order to elucidate this problem, more various components of complements and the associated factors were investigated. For quantification of these complements, including Clq, Cls, C4, C3, C5, C9, C3a, Factor B, C3bINA, ClINH and properdin, laser immunoassay was performed by using specific antisera against each component in Laser nephelometer (Hyland Comp.). In addition of this, the presence of conversion reaction of C3 and Factor B was determined by crossed immunoelectrophoresis.

Results

Fifteen of 21 patients with attack of urticaria showed lower serum levels of C3, C5 and properdin and rise of C3a and Factor B levels. The conversion reaction of C3 to C3c, not of Factor B were also demonstrated. No changes of Clq, Cls, C4 and C3bINA were observed. No patients showed decreased levels of ClINH.

Two patients who developed urticaria after injection of contrast medium (urographine) showed decreased levels of C5, C9, properdin and rise of Factor B level. It was also observed positive conversion reaction in C3, but not in Factor B. Sera from patients with urticaria in remission reacted in vitro with the contrast medium showed the conversion of C3, but not of Factor B.

Discussion

We found that about 70% of patients with urticaria in attack, not in remission, showed the activation of C3 and low level of C5. The activation could result increase of C3a and C5a anaphylatoxins. Simultaneously, the sera also showed decreased level of properdin and no evidence of activation of Clq, Cls, C4 and Factor B. These two evidences suggested that activation of C3 could initiated by alternative pathway.

Therefore, further investigation is required for search of initiating factor(s) of properdin in the patients with attack of urticaria.



# 41. The complement profile in systemic lupus erythematosus.

Dept. of Int. Med. School of Med., Showa Univ.

Keiji Kan, Noriaki Nakajima, Tetsuzo Sugisaki.

Various components of complement and the associated factors in sera from patients with SLE were investigated. Pathway of complement activation was also studied.

## MATERIAL AND METHODS

Forty-six sera from 24 patients with SLE which satisfied more than 4 criteria of ARA were investigated. The complements and the associated factors, including Clq, C1s, C4, C5, C9, C3a, Factor B, C3bINH, C1INH and properdin were quantified by specific antisera against each components in Laser nephrometer (Hyland Comp.). QS serum (Hoechst Comp.) was used as a standard serum and scored as 100% for each sample. In addition of this, presence of C3 and factor B conversion reaction in fresh serum was investigated by using crossed immunoelctrophoresis.

## RESULTS

In 21 out of 24 cases with SLE, all components of the complements were proportionally depressed, whereas in the remained 3 cases, the early components were not depressed, but the terminal components including C3 were depressed. The serum levels of properdin, Factor B and C3bINA which were known as the associated factors in alternative pathway amplification loop were highly correlated with either C4 or C3 (between C4 and P:  $r=0.699$ , and B:  $r=0.707$ , and C3bINA:  $r=0.734$ , between C3 and P:  $r=0.809$ , and B:  $r=0.688$ , and C3bINA:  $r=0.795$ ). The cases which showed depressed level in both C3 and the terminal components also showed depressed level of properdin, Factor B and C3bINA. Cases with depressed level of C1s showed increase of C1INA. Reversed correlation between C1s and C1INH was observed ( $r=-0.569$ ), whereas the case with no change of C1s remained within normal range of C1INH. The level of C3 were significantly correlated with the level of C3a ( $r=0.815$ ). Presence of the positive conversion reaction of C3 and Factor B was confirmed by crossed immunoelectrophoresis.

## CONCLUSION

Activation by classical pathway were observed in 21 out of 24 patients with SLE, interestingly the remained 3 patients showed alternative pathway. It was also shown that amplification loop also involve in the classical pathway. The low level of C3 and C3a was observed and closely correlated, which was particularly seen in active stage of SLE.

42. COLD ACTIVATION OF COMPLEMENT—Usefulness of NaCl in its inhibition —  
Tadahiro HOTTA, Shuhei TAKEMURA, Motoharu KONDO, \*Hidetsugu NISHIHORI, \*Naoyuki  
MATSUMURA, \*Koichi NISHIDA, \*Minoru IKEZAKI and \*Keimei HOSOKAWA.

(1st and \*3rd Dept. of Med., Kyoto Pref. Univ. of Med., Kyoto, 602)

Clinical investigations on the complement have provided valuable informations in the analysis of several diseases. However, since the report that the sera with some patients showed decreased hemolytic complement titer while normal in EDTA-treated or heparinized plasma, attention has been focused on the activation of the complement system in vitro. Kondo et al reported the similar incidences in patient with chronic liver diseases, in which the reduction of the serum complement was temperature dependent and they called this phenomenon "Cold activation of complement". The causes of cold activation of complement are not known yet. Cryoglobulin has been thought to be one of the possible factors. The present data demonstrate that the increasing ionic strength prevents either the cold activation of the complement or the formation of cryoprecipitates in vitro.

1) Effect of ionic strength on the cold activation of complement

Aliquots of 0.5 ml of patient's serum separated at 37°C were mixed with 0.1 ml of different concentrations of NaCl, to bring the final ionic strength of the mixture from  $\mu=0.33$  to 1.13, and with physiological saline as a control, and were incubated at 4°C. At the time intervals, the samples were removed and the hemolytic complement activity (CH50) was titrated immediately. The ionic strength above  $\mu=0.53$  showed a complete inhibition of the cold activation of complement for 24hr.

2) Effect of the addition of NaCl for the storage of normal human serum on CH50

As shown in table 1, addition of NaCl had no influence on the measurement of the hemolytic activity.

3) Effect of ionic strength on the formation of cryoprecipitates

Fig. 2 demonstrates that the higher the ionic strength, the less cryoprecipitation. When the ionic strength of the mixture was brought above  $\mu=0.73$ , no cryoprecipitation was observed in all cases.

As mentioned above increase of the ionic strength in patients sera completely prevented both the cold activation of complement and cryoprecipitation. It might be concluded that the cryoglobulin is proposed to be a possible factor for the cold activation of complement. Prevention of the cold activation of complement by the increase of ionic strength seems to be due to inability of the formation of the proposed factor in a cold environment. Addition of NaCl to serum at a final concentration above  $\mu=0.53$  is recommended for the measurement of complement titer, so as to avoid the cold activation of complement.

## Cold Activation of Complement and its Responsible Factors

Shuhei TAKEMURA, Hiroki TAGAMI, Koichi WATANABE, Tadahiro HOTTA,  
Toshikazu YOSHIKAWA, \*Keimei HOSOKAWA and Motoharu KONDO.

(1st and \*3rd Dept. of Med., Kyoto Pref. Univ. of Med.)

\*\*\*INTRODUCTION\*\*\* "Cold activation of complement" (CAC) has been reported to be a phenomenon that the complement titer of the serum decreased rapidly when serum was kept at the cold temperature. The factors for CAC are unknown. Cryoglobulin is supposed to be one of the factors, but only recognized in about 50% of the sera with CAC. In this report, anti-immunoglobulins reactive with human IgG were investigated.

\*\*\*MATERIALS & METHODS\*\*\* Four sera with CAC were obtained from the patients with liver diseases. Three of them contained cryoglobulin.

Serum anti-immunoglobulin assay; cross-linked immunoadsorbents of human IgG gained by DEAE ion exchange chromatography were mixed with serum sample and kept at 37°C for 1 hour then at 4°C for 20 hours. The immunoadsorbents were spun down and anti-immunoglobulins adsorbed to the immunoadsorbents were eluted with glycine-HCl buffer, pH 2.5. The anti-immunoglobulin concentration was measured by single radial immunodiffusion using LC-partigen (Behring-Werke) for the 3 major immunoglobulin classes.

Anticomplementary assay of anti-immunoglobulin-adsorbed serum with CAC; serum with CAC was heat inactivated, one part was used as unadsorbed serum, and the other was mixed with cross-linked human IgG. The mixture was kept at 37°C for 1 hour followed by the centrifugation to remove immunoadsorbents. The supernatant was used as an adsorbed serum. Adsorbed or unadsorbed serum was mixed with normal human serum and the mixture was kept at 4°C. After different time intervals the serum was picked up to determine complement hemolytic activity.

\*\*\*RESULTS\*\*\* Serum anti-immunoglobulin levels; all the sera with CAC showed high anti-immunoglobulin levels even in the serum without cryoglobulin. Three out of the four sera contained IgG anti-immunoglobulins (Table 1).

Anticomplementary assay of anti-immunoglobulin adsorbed and unadsorbed serum; the unadsorbed serum showed higher anticomplementary activity than that of the adsorbed serum at 4°C (Table 2).

\*\*\*SUMMARY\*\*\* All the sera with CAC showed high anti-immunoglobulin levels. Furthermore, the removal of anti-immunoglobulins from the serum with CAC clearly decreased the anticomplementary activity at 4°C. It could be concluded that the anti-immunoglobulins are the possible factors for CAC.

44. COMPLEMENT-DEPENDENT SOLUBILIZATION OF IMMUNE PRECIPITATES FORMED FROM  
HUMAN ANTIBODIES.

Morinobu Takahashi, Mayumi Nonaka and Shunichi Hirose.

The Department of Immunobiology, Cancer Research Institute, Kanazawa University and the Department of Internal Medicine and Physical Therapy, Tokyo University School of Medicine.

Immune complexes were formed from three different human antibodies and tested for solubilization by incubating with fresh human serum. Antigen-antibody complexes used were; 1) Tetanus toxoid-human IgG, 2) Blood type A substance-Human IgM, and 3) Blood type A substance-Human IgA. Immune precipitates were formed at the equivalence using  $^{131}\text{I}$ -labelled antibody globulins and the corresponding soluble antigens. When small amounts of the immune precipitates (up to 1 microgram) were incubated with low dilutions of human serum (up to 1:16 dilution), they were readily solubilized. The solubilization reaction was dependent on the presence of the components of the alternative pathway. In contrast, early components of the classical pathway was not essential for the reaction but they were required for efficient solubilization. Late complement components were not involved in the reaction. These complement requirements are essentially the same as the requirements for the solubilization reaction in general. After solubilization immune complexes formed from human antibodies completely lost the affinity for the membrane of human erythrocytes (immune adherence activity).

Effects of rheumatoid factor on interaction  
between Immune Complexes and Complement

S. Hirose, Y. Ohama, Y. Yukiya and M. Takahashi\*

Department of Internal Medicine and Physical Therapy,  
University of Tokyo, \*Department of Immunobiology,  
Cancer Research Institute, University of Kanazawa

Effects of rheumatoid factors (RF) on complement-dependent solubilization of immune complex and production of anaphylatoxin by immune complex were studied.

Immune Complexes were prepared from DNP48-BSA labeled with  $I^{125}$  and anti-DNP rabbit IgG antibody at the equivalent.

Mixture of 0.025 ml of immune complex suspension containing 5  $\gamma$  of antibody and 0.05 ml of inactivated rheumatoid arthritis (RA) serum or normal human serum (NHS) was incubated at 37°C for 2 hr. After centrifugation, the precipitate was washed once with GPE (gelatine phosphate buffer), and then half ml of normal human serum as complement source was added. After 60 min. at 37°C, it was centrifuged. Counting by autogamma counter, percentage of radioactivity in supernate to total radioactivity was calculated, which expressed as CRA (Complex release activity). Inhibition by inactivated RA sera on the solubilization of immune complex was significantly high in comparison with it by control sera, and degree of the inhibitory activity was correlated with RF titer in serum. Dose response curve between diluted RA serum and the inhibitory activity was shown.

When a reduced and alkylated anti-rabbit IgG goat antibody was used instead of RF, this antibody inhibited the solubilization of immune complex. An immune complex, which is unable to activate complement system, was prepared with a reduced and alkylated anti-DNP rabbit IgG antibody and DNP48-BSA $I^{125}$ . Such immune complex showed very little solubility by complement.

However, when such immune complex reacts with RF, the solubilization of it became higher than it of the immune complex itself. This result indicates that RF can accelerate the solubilization of such immune complex.

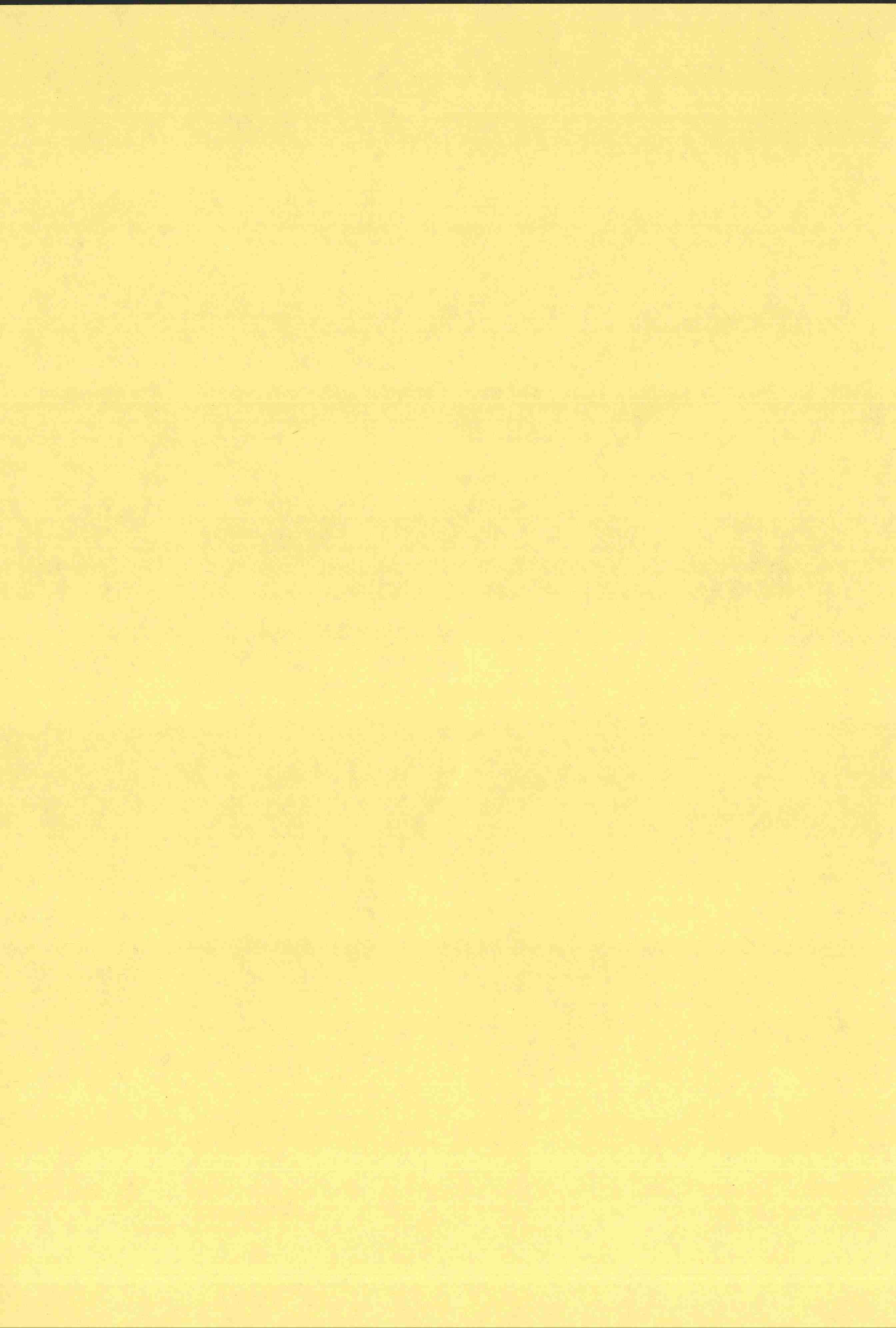
Generation of anaphylatoxin resulting from immune complex with rat serum was inhibited by pretreatment of immune complex with RA sera. When immune complex was prepared with a reduced and alkylated antibody and DNP48-BSA $I^{125}$ , RF on such immune complex is able to enhance a production of anaphylatoxin by such immune complex and rat serum.

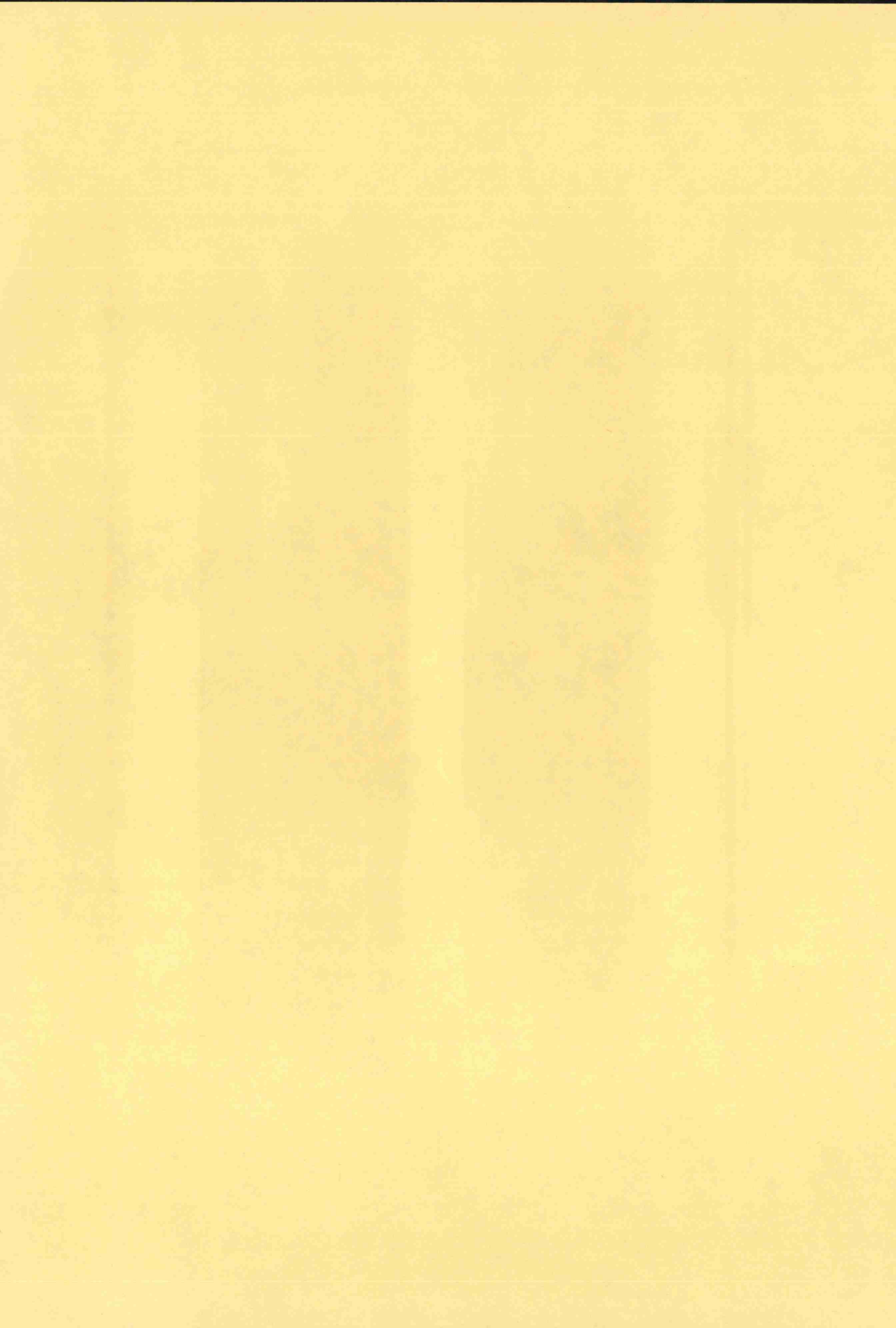
In conclusion, RF has two different effects on complement-dependent solubilization of immune complex.

- (1) RF can inhibit the solubilization of immune complex which can react with complement.
- (2) RF can enhance the solubilization of immune complex which is prepared with reduced and alkylated IgG antibody.

Similar effects were shown in the production of anaphylatoxin by the immune complexes.











第16回 補体シンポジウム講演集

昭和54年 8月11日 印刷  
昭和54年 8月24日 発行

編集代表者 第16回 補体シンポジウム 世話人・酒井好古

発行所 〒113 東京都文京区本駒込3丁目18番22号  
東京都臨床医学総合研究所内  
補体シンポジウム事務局 Ⅷ(03)823-2101

印刷所 〒874 大分県別府市富士見町10番20号  
合資会社 興 栄 社

頒布価格 3,000円



第16回 補体シンポジウム講演集

昭和54年 8月11日 印刷  
昭和54年 8月24日 発行

編集代表者 第16回 補体シンポジウム 世話人・酒井好古

発行所 〒113 東京都文京区本駒込3丁目18番22号  
東京都臨床医学総合研究所内  
補体シンポジウム事務局 TEL(03)823-2101

印刷所 〒874 大分県別府市富士見町10番20号  
合資会社 興栄社  
頒布価格 3,000円