

Proceedings of the Complement Symposium
Vol. 19, Matsuyama, 1982

第19回 補体シンポジウム

講演 抄録集

会 期 昭和57年6月3日(木)・4日(金)・5日(土)

会 場 松山市末町267 ホテル奥道後
電話0899—77—1111(代)

世話人 愛媛大学 白石 聡
〒791-02 愛媛県温泉郡重信町志津川
電話08996(4)—5111 内線2117

御 案 内

受 付

シンポジウム第1日（6月3日）正午より会場入口で行います。参加者は

年会費（抄録代、会場費） 4,000円

参加費（宿泊費、食費、懇親会費） 20,000円

を支払い、必ず名札をつけて御入場下さい。その際、抄録集をお受けとり下さい。

ご宿泊の部屋案内、朝食券、夕食券、懇親会券、予約金支払済みによる差引金などご確認下さい。

講 演

発表時間は1題10分、討論10分、計20分以内。スライドの枚数に制限はありませんが、時間厳守をお願い致します。

スライドは35mmサイズをご使用下さい。プロジェクターは1台です。

宿泊と食事

当日受付で宿泊の部屋をご案内いたします。（2人で1部屋、ツインルーム）。
食事は、6月3日夕食、4日朝・昼食および懇親会、5日朝食を用意致します。

懇 親 会

6月4日(金)シンポジウム第2日終了後行います。

運営委員会

6月4日(金)シンポジウム第2日昼食時に行います。場所は当日委員各位にご案

内致します。

会 場

ホテル奥道後 松山市末町267 電話0899—77—1111(代)

交 通

航空便 東京、名古屋、大阪、福岡、宮崎、鹿児島から松山空港行航空便があります。空港から松山市駅へはバスで250円、タクシーで1,300円。

新幹線 広島で下車、水中翼船かフェリーで松山観光港へ、観光港から市駅までバス400円、タクシー2,000円。

船 大阪、神戸、別府、大分、小倉から観光港行船便があります。
本州、九州から四国行カーフェリーがたくさんあります。

会場へ 空港、観光港からは直接会場（奥道後行）へ行く黄色いバスがありますが便数は少いです。松山市駅、国鉄駅からは20分ごとに奥道後行の黄色いバスがあります。

（空港、観光港からいったん松山市駅へ出るのが得策です）

市駅から会場までタクシーで約20分、1,700円前後。

同封の松山市内案内図をご参照下さい。

第1日 6月3日(木)

12:00～

受付開始

13:00

開会の挨拶

世話人 白石 聡

13:10～14:50

座長 稲井 真弥, 北村 肇

1. マイクロプレート光度計による溶血反応の簡易測定法

東北大・抗研・免疫

奥田 智子

○桑嶋 りつ

橘 武彦

2. Laser Nephelometer による native C3 の測定と C.C.I (Complement conversion index) の検討

高野病院・免疫生化学

中嶋 憲章

昭和大学・第1内科

韓 啓司

杉崎 徹三

3. 献血者における補体第9成分欠損者のスクリーニングについて

大阪府赤十字血液センター

吉村 敬次

南川 正

大軒 子郎

大久保康人

山口 英夫

田中 正好

大阪医大・病態検査

赤垣 洋二

稲井 真弥

4. C9 活性が低値を示す例が多数発見された C5 欠損症の家系について

福岡県赤十字血液センター

木下 幸子

深田 謙二

前田 義章

吉成 意之

大阪医大・病態検査

赤垣 洋二

稲井 真弥

5. 梅毒血清中の IgMs 抗体とその TPIA 活性について

臨床研・生体防衛

田中 忍

北村ふじ子

鈴木 貴和

嶋田 孝吉

都立大久保病院・皮膚科

河島 敏夫

14:50～15:20

Coffee Break

15:20～17:00

座長 近藤 元治, 行山 康

6. 脳脊髄液中の補体活性について

鹿児島大・第3内科

佐野 雄二

井形 昭弘

大阪府立成人病センター

北村 肇

永木 和義

7. 急性糸球体腎炎に於ける Alternative Complement Pathway Activator の検討

日本大・第2内科

藤田 宜是

宮地 秀尚

関 正人

栃原 啓子

大井 洋之

波多野道信

8. パルス療法の補体への近接効果

虎の門病院腎センター

鈴木 好夫	望月賀世子
内田 順子	岡崎 祐子
原 茂子	葛原敬八郎
二瓶 宏	三村 信英

9. 血液透析患者補体価の血清一血漿解離

虎の門病院腎センター

鈴木 好夫	望月賀世子
内田 順子	岡崎 祐子
原 茂子	葛原敬八郎
二瓶 宏	三村 信英

10. 各種疾患における補体の免疫複合体の可溶化能

岡山大・第3内科

相原 泰	桑島 紀夫
天野 哲基	太田 善介

17:00~17:20 Coffee Break

17:20~18:40

座長 吉田 浩, 天野 哲基

11. Clq とIgG との反応に関する検討

福島県立医大・第2内科

吉田 浩	渡辺 進
森藤 隆夫	粕川 礼司

12. 低温での補体の活性化 (cold activation) に関する検討

東京大・物療内科

行山 康	吉田 健三
広瀬 俊一	

13. ヒトIgG 抗体のF(ab')₂を含む抗原抗体複合体による補体第2経路の活性化について

大阪医大・病態検査

赤垣 洋二	稲井 真弥
-------	-------

14. 補体による沈降反応の阻害

大阪大・細菌

洪 卿秀	金光 直美
村上 良子	木下タロウ
井上 公蔵	

第2日 6月4日(金)

9:00~10:20

座長 白石 聡, 長沢 滋治

15. Selective Complete Deficiency of Clq in a Patient with Lupus Erythematosus-like Syndrome

Hiroshi Nishino, Kazuhiko Shibuya, Yoshihiko Nishida,
Mitsunori Mushimoto and Masaaki Kosaka.

Department of Internal Medicine, Matsuyama Red Cross Hospital,
First Department of Internal Medicine, Tokushima University.

16. C1 欠乏血清を用いた C1 溶血活性測定とその応用

浜松医科大・第2生理 高田由美子 高田 明和

17. BINDING OF PLASMA FIBRONECTIN TO Clq

Kono I, Sakurai T, Fujita T* and Tamara N*

Department of Internal Medicine, Institute of Clinical Medicine,
and

*Department of Immunology, Institute of Basic Medical Sciences,
The University of Tsukuba.

18. マウス IgG1 の C1 結合能について

愛媛大・細菌学教室

岡田真理子 高橋 和郎
内海 爽

10:20~10:40 Coffee Break

10:40~12:00

座長 永木 和義, 奥田 智子

19. ヒト補体第1成分 Clr の活性化機構の研究

—— 活性化中間体の生成 ——

北大・薬学・衛生化学

笠原 義典 高橋 和彦
長沢 滋治 小山 次郎

20. ヒト補体第一成分 C1 の活性化

大阪大・蛋白研・機能制御部門

新延 道夫 上野 佳彦
藤井 節郎

21. アミノ酸及び類似物質による C1 活性化抑制

浜松医科大・第2生理

高田 明和 高田由美子

22. 合成蛋白分解酵素阻害剤、FUT-175 とその抗補体作用

大阪大・蛋白研・機能制御部門

人見 裕司 本多 敏之
猪狩伸比古 藤井 節郎

12:00~14:00 昼 食 (運営委員会)

14:00~15:20

座長 橘 武彦, 鳥巢 要道

23. 活性化C2のC4b 非依存的なC3コンバーターゼ活性

北大・薬学部・衛生化学

山下 憲昭 長沢 滋治
小山 次郎

24. C3欠損症患者血清中のC3様物質について

大阪府立成人病センター
京都府立医大・法医学
鹿児島大・第3内科

北村 肇 永木 和義
西向 弘明
佐野 雄二

25. ニジマスのC3

I. 精製とその生化学的性質
金沢大・がん研・免疫生物

野中 勝 坂井俊之助
高橋 守信
岩城 正佳
山口 宣夫

26. ニジマスのC3

II. 二種のアイソタイプの存在
金沢大・がん研・免疫生物

野中 勝 坂井俊之助
高橋 守信
田部 一史

15:20~15:40 Coffee Break

15:40~17:00

座長 井上 公蔵, 深山 昭雄

27. 可溶化過程におけるC3とIgGの結合

筑波大・基礎医学系

高田 裕子 藤田 禎三
田村 昇

28. (1→3)- β -D-グルカンに結合するマウスC3の分解産物

国立がんセンター・化学療法部
ウイルス部

松下 操 佐々木琢磨
岡田 秀親

29. モルモットC8の構造と活性について

一分離精製した α - γ サブユニットと β 鎖からの再構成実験

大阪大・医・細菌

木下タロウ 洪 卿秀
井上 公蔵

30. グルタチオンによるC5b-9複合体のC9サブユニット間の架橋反応

金沢大・がん研・分子免疫部

山本 健一 川島 孝則
右田 俊介

17:00~18:30

Chairman Dr. Kusuya Nishioka

Prof. Irma Gigli (Univ. of. New York)

19:00~

懇親会

第3日 6月5日(土)

9:00~10:20

座長 高橋 守信, 岡田 秀親

31. CLEARANCE KINETICS OF SOLUBILIZED IMMUNE COMPLEXES IN MICE.

Nobuyoshi Takahashi, Teizo Fujita, and Noboru Tamura.

Institute of Basic Medical Sciences, The University of Tsukuba.

32. マウス株化マクロファージの補体B蛋白の合成・分泌

名古屋保健衛生大・医・微生物 森山 剛 川本 保子
深山 昭雄

33. マウス脾臓マクロファージのB因子産生

名古屋保健衛生大・医・微生物 川本 保子 森山 剛
深山 昭雄

34. Cobra venom factor を結合したConcanavalin A による細胞膜表面への補体活性化能の導入

国立がんセンター・ウイルス部

田中 博子 池之谷正克
岡田 秀親

10:20~10:40 Coffee Break

10:40~11:40

座長 田村 昇, 内海 爽

35. RSV誘発腫瘍細胞による補体の活性化

東大・医科研 甲斐知恵子 吉川 泰弘
山内 一也
国立がんセンター 岡田 秀親

36. Glycophorin による 喰反応抑制と補体代替経路抑制の相関について

愛媛大・医・細菌学教室 助川 鶴平 四宮 博人
岡田真理子 加納 誠
内海 爽

37. 血清中の補体第2成分(C2)蛋白量の測定と疾患時における変動

九州大・医・第1内科 上田 章 鉢嶺 一男
岩橋 徳二 草場 公宏
佐賀医科大・内科 木須 達郎

マイクロプレート光度計による溶血反応の簡易測定法

奥田智子・桑嶋りつ・橘武彦・東北大学抗研・免疫

目的： 補体活性の測定において感作ヒツジ赤血球の溶血反応を利用する方法は古くから用いられているものであるが、現在でもなお極めて重要な方法となっている。しかし試験管を用いて反応後、上清のヘモグロビンを分光光度計で測定する方法は手間もかかるし、多量の試薬を必要とする。またマイクロプレートを用いる簡便法があるが、これは血清学的な半定量法で余りに rough な結果しか得られない。最近酵素抗体法の普及に伴ってマイクロプレートで反応後、そのまま比色する分光計が市販されている。そこで溶血反応にもこれを利用できるかどうかを検討した。モデル実験としてヒト血清の補体価を測定した。

方法と結果：

1) マイクロプレートについて。 反応終了後溶血せずに残った血球を含んだまま分光器にかけるのでマイクロプレートの穴の形が重要な因子となる。U型、V型、平底、さらにディスポーザブル、リジット、パーマネントの種々の96穴のマイクロプレートについて検討した結果、U型でディスポーザブル型のものが感度、再現性の点で最も適切である事が分った。その中ではCook社、Costar社、和光社のいずれでも大差なく最も廉価な和光KW220-24Kを用いた。

2) ヒツジ赤血球 1×10^9 個を8mlの水で溶血させ、2mlの5VBを加えて作った完全溶血液とヒツジ赤血球浮遊液 (1×10^8 /ml) とを組合わせて種々の溶血率の標準液を作り、1滴づつマイクロプレートに入れる。さらに、GVB⁺ 2滴を加えて混和後1800 rpmで5分間遠心する。MTP-12型マイクロプレート光度計(コロナ電気)を用い、 $\lambda_1 = 405\text{m}\mu$ 、 $\lambda_2 = 650\text{m}\mu$ のフィルターを用いて吸光度を測定した結果を図1に示す。同一試料を12穴に入れそのばらつき範囲を縦線で示した。溶血率と吸光度とはよく相関している。50%溶血液を血球を含んだまま測定した吸光度は 0.410 ± 0.018 、また血球を除いて測定した場合は 0.383 ± 0.022 でいずれもばらつきは $\pm 5\%$ 程度であり両者の吸光度は誤差範囲で一致する。

3) ヒト血清補体価の測定。 いろいろな稀釈列を作るためにオ1列(表1のD)にGVB⁺Kを4滴、3滴、2滴入れ、C~Aには1滴づつ入れる。

試験管で血清を20倍稀釈したものをダイリューターで100倍稀釈すると、120、160、200、240、320、400、480、640、800倍稀釈列が得られる。別に100%溶血として20倍稀釈血清を1滴入れる。感作ヒツジ赤血球(EA、 $1 \times 10^8/\text{ml}$)を1滴づつ加え、37℃で60分振盪する。0.04M EDTA-GVBを1滴づつ加え、1800rpmで5分間遠心し、分光計で測定する。分光計の0.100調整をしてから、緩衝液のみのコントロールで吸光度0に合わせ、ついで100%溶血の穴を読みとらせてCONCモードでスキャンすると96穴の溶血率(%)が2分間で記録される。溶血率50%に最も近い稀釈倍数を求める。一方、メイヤー法の1/10のスケールで試験管を用いて得られた CH_{50} 値を横軸にとり、縦軸にプレート法で求めた50%溶血を示す血清の稀釈倍数をプロットすると図2のようになり、両者はよく相関している。

考察： マイクロプレートで溶血反応を行い、マイクロプレート光度計で吸収を測定し、50%溶血を示す稀釈倍数を求め、メイヤー法との相関を示す標準曲線を用いれば、メイヤー法に換算した CH_{50} 値を求める事ができる。この方法は試料が少なくて済むので、たとえばマウス補体系の研究などには極めて有効である。

表 1

各ウェルに入れるGVB⁺ (drops)

	1	2	3	4	5	6	7	...	12
A	1	1	1	1	1	1	1	...	1
B	1	1	1	1	1	1	1	...	1
C	1	1	1	1	1	1	1	...	1
D	4	3	2	4	3	2	4	...	2
E									
...									
H									

得られる血清稀釈倍数

	1	2	3	4	5	6	7	...	12
A	800	640	480	800	640	480			
B	400	320	240	400	320	240			
C	200	160	120	200	160	120			
D									
E									
...									
H									

図 1

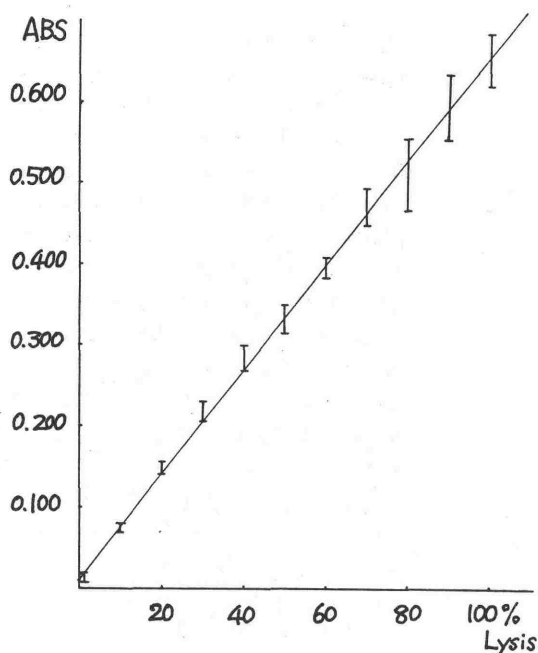
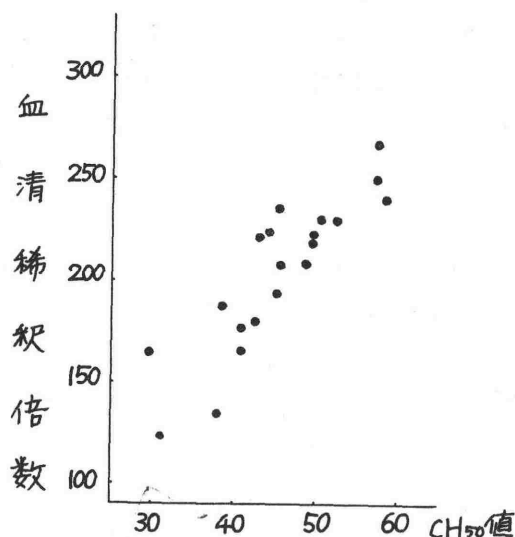


図 2



A simple method for the determination of hemolytic activity using microplate photometer

The Research Institute for Tuberculosis and Cancer, Tohoku Univ.
Tomoko Okuda, Ritsu Kuwashima and Takehiko Tachibana

The usual method for the determination of hemolytic activity in a test tube requires a large amount of reagents and takes a lot of time. On the other hand a microplate method gives too rough results. We investigated the possibility to use a two-wavelengths' spectrophotometer for microplate to determine the degree of hemolysis. As an example the determination of hemolytic activity of human sera was investigated. Various types of microplates were tested, because their selection is an important factor in this measurement. The disposable plates with U type bottom were found to be most suitable. Serial dilutions of sample were made in a microplate, one drop of sensitized sheep erythrocytes was added to each well, incubated at 37°C for 60 min. Afterwards one drop of 0.04M EDTA-GVB was added to all wells, mixed, and centrifuged at 1800 rpm for 5 min. The microplate was measured for its degree of lysis by a microplate photometer. The sample dilutions to give 50% hemolysis were obtained. On the otherhand, the CH_{50} of these samples were measured by Mayer's method in test tubes. The values obtained by this microplate method were plotted against Mayer's CH_{50} . A good correlation was observed between these values. Thus it is possible to measure CH_{50} and any other hemolytic activity semiquantitatively using a very small amount of reagents.

2

Laser Nephelometerによるnative C3の測定とC.C.I (Complement conversion index) の検討

高野病院免疫生化学

中嶋 憲章

昭和大学第一内科

韓 啓司

杉崎 徹三

I. 緒 言

近年、補体の研究の進歩と共に諸種疾患における補体の変動について多くの研究がなされ、臨床的意義が検討されて来た。補体成分値が異常である場合、その原因として補体の合成または異化の異常が推定される。従って、補体成分値の臨床的意義を検討する場合、その測定方法が問題となる。今回、我々はC3のconversionを利用したcomplement conversion index (C.C.I) の測定法を検討し、各種疾患についてその成績を考察した。

II. 対象及び方法

1) 対象：昭和大学第一内科、高野病院内科で診断されたARAの診断基準を満たすRA 18例、SLE 8例、種々肝疾患（肝硬変16例、急性肝炎7例、慢性肝炎18例）41例、剖検によって確認された悪性腫瘍13例、糖尿病患者（インスリン抗体陽性5例、陰性10例）、大動脈に石灰化を認める動脈硬化症12例、HANE 1例、20~40才までの健康人20名のEDTA加新鮮血漿について検討した。

2) 方法

① native C3 及び C3 の測定

native C3 (β_1 Cglobulin) の測定は抗 native C3 血清 (Kent 社 Lot. 1190 M1) を用い、C3 (β_1 C/ β_1 Agloblin) は Hyland 社 Laser Nephelometer 用 C3 キットを用い、Laser Nephelometer 法で測定した。尚、標準血清には QS 血清 (Hoechst 社) を 0.01 M、EDTA 加生理食塩水に溶解して用い、これを 100% として算定した。

② complement conversion index (C.C.I) の求め方 C.C.I は下記の式によって求めた。

$$\text{C.C.I}(\%) = \frac{\text{C 3}}{\text{native C 3} \times N} \times 100$$

N : 正常人 [C3 / native C3] の平均値 (0.72)

Ⅱ. 結 果

健常人(20~40才)男女20例の native C3 は平均値 $165.4 \pm 20.6\%$ であり、C3 は平均値 $120.0 \pm 11.7\%$ であった。native C3/C3 の平均は 0.72 であった。この値を C.C.I 100% として、各疾患の C.C.I を求めた。次に各疾患の native C3 値、C.C.I は SLE ($75.4 \pm 34.8\%$ 、 $162.1 \pm 32.3\%$)、肝硬変 ($89.9 \pm 17.6\%$ 、 $148.9 \pm 24.54\%$)、悪性腫瘍 ($132.8 \pm 19.41\%$ 、 $142.3 \pm 36.98\%$)、急性肝炎 ($110.1 \pm 26.3\%$ 、 $152.1 \pm 32.66\%$)、慢性肝炎 ($127.8 \pm 27.6\%$ 、 $132.8 \pm 19.41\%$)、RA ($128.8 \pm 17.6\%$ 、 $162.4 \pm 30.0\%$)、インスリン抗体陽性の糖尿病 ($136.8 \pm 23.0\%$ 、 $148.8 \pm 14.45\%$)、陰性の糖尿病 ($157.7 \pm 19.9\%$ 、 $112.0 \pm 7.92\%$)、動脈硬化 ($160.8 \pm 12.7\%$ 、 $109.6 \pm 14.45\%$)、HANE (154.2% 、 103%) であった。(表-1)

Ⅳ. 考 察 及 び 結 論

現在、補体活性の測定法として、最もよく用いられているのが CH50 であり、膠原病、自己免疫疾患の診断並びに病状把握に有効な手段となっている。CH50 に比し、最近一般化しつつある C4、C3 等の補体成分の測定は血清中の蛋白量を測定しているが故に、かならずしも病状と相関しないことが知られている。特に C3 については我々がすでに報告している如く、従来は β_1C/β_1A の両成分の総和を測定しているが故に C3 の活性と一致しない場合が多い。今回、この点を改良すべく native C3 を測定する検討を試み、L.N 法による測定が簡便かつ迅速、正確であることを証明した。そこで β_1C と β_1C/β_1A の比を求めることにより C3 の activation を指数化し、その臨床的意義の検討を試みた。今回の成績によると低補体を呈することが知られている SLE で C.C.I が上昇したのは immune complex により補体が activation され高値を示したと考えられたが、高補体を呈する RA で C.C.I が高値を示したことは大変興味ある所見である。すなわち、RA では C3 の conversion は行われているが、C3 の合成も亢進しているため C3 全体では高値となると推測された。その他の肝疾患、悪性腫瘍、インスリン抗体陽性の糖尿病で C.C.I が高値であることより、これらの疾患に於いても、何らかの機序により補体が活性化されている可能性があり、その意義について更に検討する必要があると考えられた。

表 - 1

	Native C3 %	C3 %	C. C. I
S L E	75.4±34.8	85.0±32.0	162.1±32.3
肝硬変	89.9±17.6	90.0±16.9	148.9±24.5
悪性腫瘍	132.8±19.4	90.5±29.4	142.3±37.0
急性肝炎	110.1±26.3	119.1±26.3	152.1±32.7
慢性肝炎	127.8±27.6	117.8±21.0	132.8±19.4
R A	128.8±17.6	148.9±22.8	162.4±30.0
糖尿病 インスリン抗体 (+)	136.8±23.0	146.0±22.7	148.8±14.5
糖尿病 インスリン抗体 (-)	157.7±19.9	127.1±15.5	112.0±7.9
動脈硬化	160.8±12.7	128.0±20.6	109.6±14.5
H A N E	154.2	115	103
正常人	165.4±20.6	120.0±11.7	100

Complement conversion index of C3 and native C3

measured by Laser Nephelometer on various diseases.

Noriaki Nakazima*, Keiji Kan and Tetsuzo Sugisaki.

* Div. of Immunochemistry, Takano Hospital.
 * Dept. of Int. Med. Showa Univ. School of Med.

Extensive studies have been performed on clinical significance of complement activity in various diseases. As it has been suggested, quantitative measurements of the complements, as a protein, measured by single radial immunodiffusion test is not always consistent with activities of the complements.

In the present studies reported here, complement conversion index (CCI), utilized C3 conversion, was studied in various diseases, including rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus(SLE), liver diseases, malignant tumors, diabetes mellitus(DM), arteriosclerosis, hereditary angioneurotic edema(HANE) and in healthy persons. Native C3(B1C globulin) and C3(B1C/B1A globulin) was measured by Laser Nephelometer (purchased from Hyland Co.). QS serum (purchased from Hoechst Co.) was used as standard serum which was calculated as 100% . CCI was calculated following formula;

$$CCI(\%) = \frac{C3}{\text{Native C3} \times N} \times 100$$

[N: mean of C3/native C3 of healthy persons (0.72).]

Results were indicated as described in Table 1.

Thus, C3 appears to be activated in the serum of the patients with rheumatoid arthritis, liver cirrhosis, malignant tumor, hepatitis, diabetes mellitus and SLE. The significance of these results require for further investigations.

Table 1.

Complements			
Diseases	Native C3 (%)	C3(%)	CCI(%)
SLE	75.4±34.8	85.0±32.0	162.1±32.3
Liver cirrhosis	89.9±17.6	90.0±16.9	148.9±24.5
Malignant tumors	132.8±19.4	90.5±29.4	142.3±37.0
Acute hepatitis	110.1±26.3	119.1±26.3	152.1±32.7
Chronic hepatitis	127.8±27.6	117.8±21.0	132.8±19.4
Rheumatoid arthritis	128.8±17.6	148.9±22.8	162.4±30.0
DM [anti-insulin A b (+)]	136.8±23.0	146.0±22.7	148.8±14.5
DM[anti-insulin A b (-)]	157.7±19.9	127.1±15.5	112.0±7.9
Arterio-sclerosis	160.8±12.7	128.0±20.6	109.6±14.5
HANE	154.2	115	103
Healthy persons	165.4±20.6	120.0±11.7	100

3

献血者における補体第9成分欠損者のスクリーニングについて

吉村敬次 南川 正 大軒子郎 大久保康人

山口英夫 田中正好 大阪府赤十字血液センター

赤垣洋二 稲井真弥 大阪医科大学病態検査学教室

〔目的〕 補体第9成分欠損症（以下C9欠損症と略す。）の第1例は1979年に稲井らが世界ではじめて報告した。それ以来多くのC9欠損例が知られており、日本でもっとも多い補体成分欠損症であることが明らかにされた。しかしその頻度に関しては未だ十分に研究されてはいない。また、1980年の第28回日本輸血学会総会において、大河内らはC9欠損症の輸血患者から抗C9抗体を検出し、輸血による抗C9抗体産生であろうと報告した。

今回、われわれは献血者におけるC9欠損者の頻度を知ること、さらに抗C9抗体保有者が輸血を受ける場合の適合血として、将来C9欠損者の登録システムを確立すること、以上のことを目的として、C9欠損者のスクリーニングを行った。

〔方法〕 当初、C9欠損者のスクリーニングは抗C9抗血清を用いた二重免疫抗散法（以下DD法と略す。）により行った。沈降線が認められない検体は、さらに向流免疫電気泳動法（以下IES法と略す。）を用いて再確認した。得られたC9欠損者に免疫学のおよび遺伝学的検討を加えた。CH50の測定にはMayerの変法を利用した。各補体成分の蛋白量および活性はSRID法並びにIntermediate cellにより測定した。各免疫グロブリンの定量はSRID法により行った。C9欠損者の血液型、HLA型、Gm型、Km型を同定した。さらに協力が得られたC9欠損者については家系調査を実施した。

次にC9欠損者のスクリーニングをSGVB⁺⁺浮遊EAを用いた溶血法により試みた。方法は、被検血清10 μ lにSGVB⁺⁺緩衝液50 μ lとSGVB⁺⁺浮遊EA（ 5×10^8 個/ml）25 μ lをUプレートにて37℃20分間反応させた。不溶血を示した血清についてはさらに詳しく以下の方法で検討した。まずGVB⁺⁺緩衝液とGVB⁺⁺浮遊EAを用いて上記と同様の方法で溶血の有無を確認した。同時にDD法、IES法によってC9蛋白を検索した。GVB⁺⁺で不溶血を示した血清についてはCold Activationによる異常が考えられたので、C3、C4の蛋白量ならびにC4活性をC4欠損モルモット血清（C4D）を用いて測定した。またAlternative Pathwayの反応

にあずかる蛋白およびC3～C8までに異常があるかを検討するためにウサギ赤血球溶血試験を行った。

〔成績〕 抗C9抗血清を用いたDD法およびIES法により、献血者10,000名を調査したところ6名の血清が沈降線を作らなかった。これら6名のCH50価を調べた結果、正常血清（AB型血清10名分プール）の $\frac{1}{3}$ 以下であった。さらにC1～C9の各補体成分について活性を測定したところ、C9活性のみが著明に低値を示すとともに、C9蛋白が検出されなかった（表1）。他の補体成分については異常が認められなかった。

以上の結果から、検出された6名の献血者はC9欠損者であることが明らかとなった。C9欠損者の検出頻度は0.06%であり、献血者約1,600名につき1名の割合で検出された。これらC9欠損献血者は、血液センターで日常実施されている問診、血液比重、生化学検査（GPT, ALP, TP, ALB, BUN, CHOL）、HBs抗原・抗体検査、e抗原・抗体検査、梅毒血清反応、すべてに異常なく、IgG、IgM、IgA、IgDの測定値もすべて正常値であった。また本人調査の結果、特筆すべき既応歴はなく、現在6名とも健康である。次に血液型、HLA型、Gm型、Km型を調べたところ、血液型ではB型形質を持つ者が5名であった。またHLA型ではB40を保有する者が4名であった。これらの傾向は例数が少ない為に、単純に結論を下すことはできないと考える。Gm型、Km型については特記すべき事がなかった。さらに協力の得られた2家系については家系調査を実施し、図1に示す結果を得た。H.T.家系の発端者の兄弟にC9欠損者が見い出され、その両親および子のC9蛋白が半分量を示した事実から、常染色体共優性遺伝形式と考えられる。

1981年に稲井らはSGVB^{††}緩衝液がC9欠損者の自然溶血を抑制する効果のあることを見い出した。この現象を利用して、われわれは献血者4622名についてスクリーニングを行ったところ、表2に示す結果を得た。

GVB^{††}緩衝液で溶血を示した9例のうち2例はC9蛋白が検出されなかった。残りの7例についてCH50価を調べたところ、低補体価を示した（表3）。またGVB^{††}緩衝液で不溶血を示した37例のうち1例はC9蛋白が検出されなかった。尚これら7検体はSGVB^{††}によるスクリーニングではわずかに溶血が認められた検体であった。残りの36例についてC3、C4の蛋白量とC4活性を測定した。その結果、全検体ともC3、C4の蛋白量は正常範囲内にあり、C4活性はNHSの1%以下であった。これらの検体はCold Activationによる異常であると考えられる。またこれらの検体はウサギ赤血球溶血試験ですべて完全溶血を示し、Alternative Pathwayの反応にあずかる蛋白およびC3～C8に異常がないことがわかった。

検出されたC9蛋白(+)の検体が示すCH50値は、表4の如く低補体価であった。3例のC9蛋白(+)の検体に関する各補体成分の測定は再来により実施する予定である。家系調査等についても現在検討中である。

表 1, 検出された6名のCH50, C9活性および蛋白量

Name	CH 50	C9活性(SFU/ml)	C9 蛋白量
T. I.	15.5	< 100	N. D.
H. T.	11.7	< 50	N. D.
Y. N.	17.8	< 100	N. D.
K. K.	15.9	< 50	N. D.
M. T.	17.6	< 100	N. D.
K. N.	19.3	< 100	N. D.
NHS	49.8	22600	100 %

表 2, SGVB で不溶血を示した検体のGVB での溶血反応とC9蛋白の検出

	SGVB 不溶血	C9 蛋白	
GVB ⁺⁺ 溶血	9	+	7
		-	2
GVB ⁺⁺ 不溶血	37	+	36
		-	1
Total	46	+	43
		-	3

表 3, 'GVB で溶血, C9蛋白(+)
を示した7例のCH50値

Sample No	CH50
(2/10)-9	30.2
(2/25)-5	17.1
(3/03)-4	15.2
(3/03)-7	19.0
(3/04)-1	21.4
(3/04)-5	19.4
(3/04)-7	21.0
NHS	48.8

図 1, C9欠損家系の2例

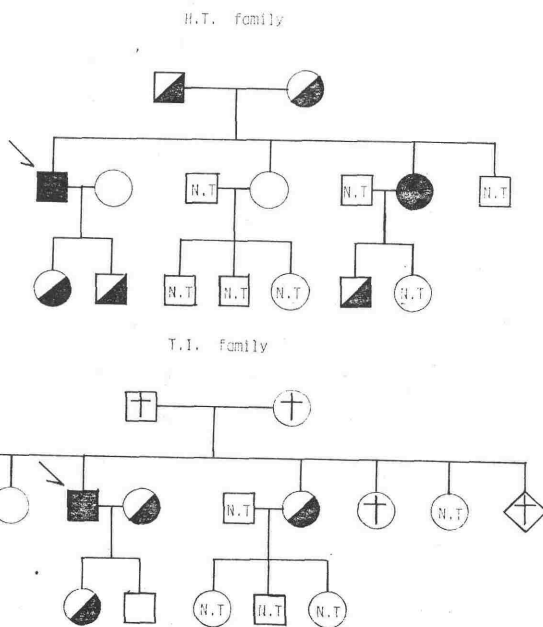


表 4, C9蛋白(+)を示した
3例のCH50値

Sample No	CH50
(2/03)-3	11.4
(2/10)-3	15.5
(3/04)-9	13.0
NHS	50.2

Summary. The frequency of C9 (the ninth component of complement) deficiency was determined in a population of 10,000 Japanese blood donors by Ouchterlony's double diffusion method. The incidence was 1:1600. Those C9 deficiencies found were retested by hemolytic assay and by immunochemical analysis. C9 of their sera was undetectable but all other components were normal. All C9 deficiencies were in the good health. From the results of family studies on C9 deficiency, the mode of inheritance of C9 deficiency could be explained as an autosomal co-dominant trait.

We tested 4622 blood donors by hemolytic assay using SGVB. Among 46 sera which didn't show any hemolysis in SGVB, 3 samples were determined as C9 deficiencies. Thirty six of 46 sera had very low complement activity in both SGVB and GV B. The decreased complement activity in both assays was due to cold activation, because their C3 and C4 protein levels were in the normal range but their C4 hemolytic activities couldn't be detected.

4

C 9 活性が低値を示す例が多数発見された C 5 欠損症の家系について

木下幸子 深田謙二 前田義章 吉成意之

福岡県赤十字血液センター

赤垣洋二 稲井真弥

大阪医大 病態検査学教室

C 5 欠損症は Rosenfeld らによっではじめて発見され、SLEを合併していたと報告されている。その後 C 5 欠損症で全身性の淋菌症を合併していた例や、髄膜炎菌による反復性髄膜炎に罹患していた例が報告されている。われわれは献血者の中から C 5 欠損症例を発見し、家系調査の結果、発端者を含め 3 名の C 5 完全欠損例を発見するとともに、この家系内に C 9 活性が正常値の 40~60%と低値を示す例が 10 名存在することがわかったので報告する。

(方 法)

献血者の中から補体成分欠損症を発見する方法としては、北村、稲井らが報告した SGVB を用いると C 9 欠損者の血清補体価も著しい低値を示すという事実を応用し、マイクロタイタープレートを用い次のように行った。プレートの各ホールに、被検血清、10 μ l、SGVB、50 μ l、最後に EA (5 $\times$ 10%/ml) を 25 μ l 加えて混和し、37 $^{\circ}$ C、20 分静置後、遠心して溶血の有無を見る。溶血を認めなかった血清について、Cold activation を除外するとともに、補体成分欠損症発見に必要な検査を行なった。

(成 績)

1) 発端者 (H.M) 45 才、男性、農業、幼児期によく「ひきつけ」をおこしたとのことであるが、その原因は不明である。2 年前、上部門歯の歯肉部の化膿性疾患にかかったが詳細は明らかではない。その後特に異常なく健康で農業に従事している。昭和 56 年 11 月、献血した時、血清のスクリーニング検査等で C 5 欠損症が疑われ、大阪医大において補体系の検索を行い、その結果 C 5 欠損症であることが確認された。

H.M. の血清補体価および補体成分活性は表 1 に、また補体系蛋白の測定値は表 2 に示した。これらの表でみられるように C 5 の活性および蛋白量はいずれも測定不能であった。C 9 の蛋白量、溶血活性はいずれも正常プール血清の値の約 60%であったが、その他の補体成分や蛋白には異常は認められなかった。

H.M.の血清に精製C5を変量して加えてみると、84,000 SFUのC5を加えたところで症例の補体価はほぼ正常値まで回復した。

この症例の血清について生化学的諸検査ならびに血清学的検査を行ったがRAテストが(+)であったほか異常は認められなかった。

2) 家系調査：図1に示すように、発端者の姉(T.M)と弟の1人(Y.M)はホモ接合体と考えられ、表1と表2に示したようにC5の溶血活性と蛋白量はいずれも検出不能であった。また他にヘテロ接合体と考えられるC5が正常値の約50%のものが母および弟1人をふくめ合計8名発見され、その遺伝形式は従来の報告の通り常染色体性共優性遺伝と考えられた。

家系調査により発見された2例のC5Dの既往歴等は次の通りである。

T.M. 47才、女子、主婦、10～11才の頃、敗血症のため入院し、ペニシリン治療により治癒している。また扁桃腺炎を繰返したという既往歴があり、3年前には健康診断で冠不全と診断されている。

Y.M. 40才 男子、会社員、24才頃、慢性扁桃腺炎に罹患した既往歴はあるが、現在は健康な日常生活を送っている。

表1、表2に示したように、この両名の補体系検査の結果は、C5が測定不能であったほか、発端者と同様、C9の溶血性はいずれも正常プール血清の値の約60～50%であった。

3) 家系内のC9異常者について：以上3名のC5欠損者にC9の異常が認められたことから、検索可能であった家族の全員について、C9の蛋白量と活性を測定したところ、この3名以外にC9の蛋白量、活性が正常プール血清の値の約60%のものが7名存在することがわかった。(図2参照)このようにC9の異常値を示す例が家系内に多数発見されたことは偶然とは考え難く、遺伝的なC9の異常者と考えられるが、現在引続き検討中である。

Table.1. Complement component profiles of C5D individuals

	H.M.	T.M.	Y.M.	NHS
CH50	<3.0 *	<3.0	<3.0	45.7
C1	96,000 (74.1)	124,800 (96.3)	160,000 (123.5)	129,600
C4	80,000 (97.3)	55,200 (67.2)	69,800 (84.9)	82,200
C2	950 (96.9)	850 (86.7)	1,000 (102.0)	980
C3	44,800 (73.7)	57,600 (94.7)	44,000 (72.4)	60,800
C5	N.D.	N.D.	N.D.	208,000
C6	28,800 (120.0)	32,000 (133.3)	29,600 (123.3)	24,000
C7	13,400 (81.7)	18,600 (113.4)	18,000 (109.8)	16,400
C8	34,000 (134.9)	42,000 (166.7)	38,000 (150.8)	25,200
C9	17,800 (60.1)	18,000 (60.8)	14,400 (48.6)	29,600

* SFU/ml and numbers in parenthesis are % of NHS

Table.2. The levels of complement proteins in C5D individuals

	H.M.	T.M.	Y.M.	NHS
C3 (mg/dl)	69	81	78	55-120
C4 (mg/dl)	20.2	15.2	20.2	13- 47
C5 (% of NHS)	N.D.	N.D.	N.D.	
C9 (% of NHS)	64.4	70.1	58.9	
β_1H (% of NHS)	92.5	100.9	95.3	
B (mg/dl)	15.4	16.6	14.2	10- 45
C3bINA (% of NHS)	99.3	91.4	91.4	
P (% of NHS)	85.5	98.5	94.0	

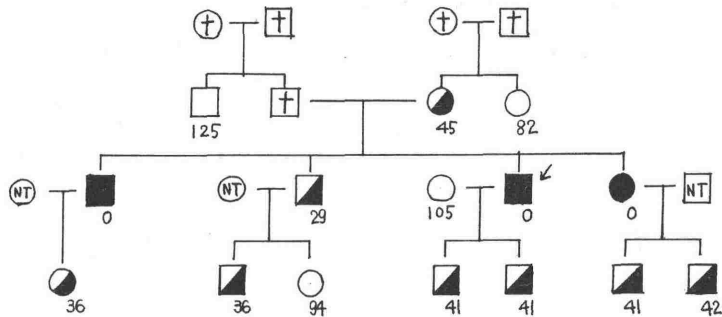


Fig.1. C5 levels (% NHS) in the C5D proband and his family.
NT : Not tested

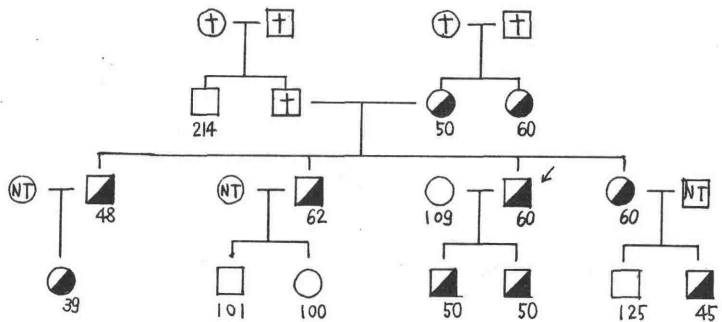


Fig.2. C9 levels (% NHS) in the C5D proband and his family.
NT : Not tested

Abstract

An individual with hereditary C5 deficiency (C5D) was found in the blood donors visited Red Cross Blood Center of Fukuoka. The C5D proband, a 47-year-old male farmer, is healthy and has no history of recurrent infection. As shown in Table 1 and Table 2, C5 was undetectable in his serum by both immunochemical and hemolytic assays, and the other C components were normal except about half normal level of C9. The pedigree of the C5D is shown in Fig 1. Sister (T.M.) and one brother (Y.M.) of the proband were confirmed as homozygous C5D (See Table 1 and Table 2), and the levels of C9 were also half normal in these two C5D. As shown in Fig 1, 8 of the tested family members, including mother and another brother of the proband, are apparent heterozygous for C5D. The C9 levels of all family members were measured by both immunochemical and hemolytic assays. As shown in Fig 2, 10 of the tested family members had about half normal levels of C9. It is reasonable to speculate that half normal levels of C9 of these 10 members are not accidental, but may be due to genetic deficiency.

梅毒血清中の IgM 抗体とその TPIA 活性について

田中 忍・北村ふじ子・鈴木貴知・嶋田孝吉・河島敏夫

(臨床研・主体防衛,*都立大久保病院・皮膚科)

種々の病期の梅毒患者について血中の TPIA 価の動態の検討を行った際に, 19S (IgM) と 7S (IgG) 画分の間にある 11S 画分にも TPIA 活性が認められることを見出し, さらにこの活性は主として IgM のサブユニットである IgMs に由来するとの結果を得たのでここに報告する。

材料および方法

梅毒血清; 都立大久保病院に通院する, 臨床的並びに血清学的に梅毒と認められた患者血清を用いた。血清学的検査法; TPIA 法をはじめとする種々の血清学的方法については第16回本シンポジウムなどで報告した方法に準拠した。血清の分画; 主として G3000 SW (東洋曹達社) を支持体とする高速液体クロマトグラフィーによる。免疫吸着法; 常法に従い, CNBr にて活性化したセファローズ 4B にそれぞれ抗 IgM および抗 IgA を結合させたものを支持体とした。溶出は 0.1 M グリシン緩衝液, pH 2.5 で行った。

成績

1. 11S 画分における TPIA 活性の分布およびその同定。

図1は二期梅毒の患者より得た血清をセファデックス G200 にて分画した時のフロマトグラムである。受身血球凝集反応である TPHA 反応 (○—○) を用いた場合, 主として IgG 画分にその抗体活性が検出されたのに対して,

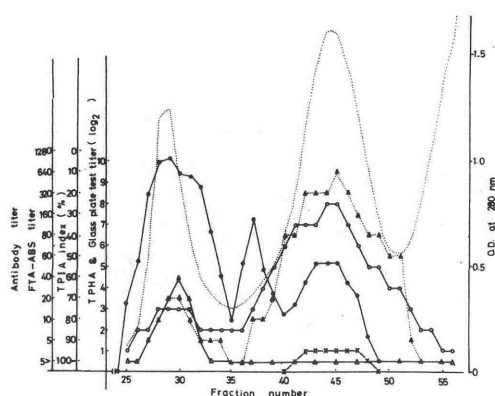


Fig.1, Antibody distribution in patient with early syphilis.

TPIA 反応 (●—●) では主として 19S (IgM) 画分に認められ, さらに 7S (IgG) 画分および両者の中間に位置する 11S 画分にも TPIA 活性が存在した。

この 11S 画分は分子量的には IgA に相当するが, IgA の補体活性化経路は alternative pathway であることや, TPIA 反応に対する効率などの点から判断すると, この画分の TPIA 活性は IgM のサブユニットである

IgMs に由来する可能性があった。そこで、血清をそれぞれ抗IgMおよび抗IgAカラムで吸収し、TPIA価の分布状態の変化について検討した(図2)。

図2左は未吸収血清におけるクロマトグラムと抗体分布であるが、特に本試料はIgGの影響を除外するため、IgG画分にTPIA活性の認められないものを選択した。従って図1に示した抗体価の分布状態とは異なり、主として19Sおよび11S画分にその活性が偏在した。この血清を抗IgMカラムに通すと19S画分の抗体活性は全く消失し、11S画分のそれも著明に低下したが、比活性はさほど高くなく、IgAの関与は少いと推定された。一方、抗IgAカラムに通した血清のクロマトグラムとその抗体分布が図2右端で

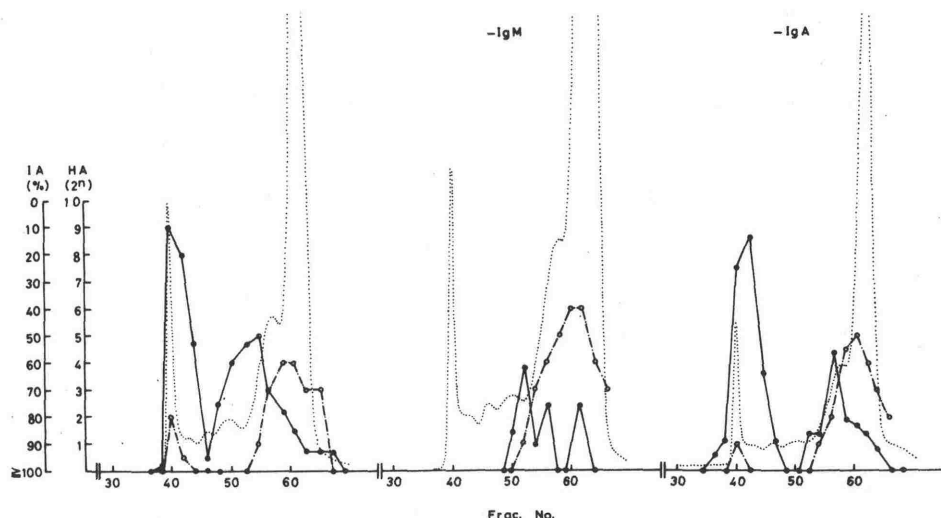


Fig. 3, Antibody distribution in syphilitic serum absorbed with ant-IgM and with anti-IgA column.

ある。19Sならびに11S画分の活性は殆んど変化なく残存しており(図に明らかなようにカラムへの添加量が、都合により他の例の半量である)、このことから11S画分の活性の主体はIgMs抗体に由来することが示唆された。現在、このIgMsは分離精製中であり、今回、これらの諸性質についても言及する予定である。

2. 11S画分におけるTPIA活性の加療に伴う変化。

梅毒の場合、IgM抗体は加療後著明に低下することを既に報告したが、今回はIgMs抗体が加療後、どの様に変化するかについて検討した。図3は、加療後の二期梅毒患者より経時的に採取した血清の分析結果を示した。

0日が加療開始時である。本例における TPIA 抗体(●—●)は特に 19S および 11S 画分に多く分布していたが、加療後 104 日目には 19S 画分の抗体価の減少が著しく、一方、11S 並びに 7S 画分のそれは殆んど不変であった。さらに加療後 233 日目には 11S 画分に TPIA 抗体は検出されなかったが、7S 画分には残存し続け、500 日目においてもこの抗体価は不変であった。このように 11S 画分の TPIA 価が 19S 画分のそれよりも持続すると言う成績は、他の症例でも観察された。また特に陳旧梅毒においては IgM_s 抗体が殆ど全例に見出されることが特徴であった。なおこれらのヒト梅毒での成績は実験家兔梅毒においても同様であり、従って、 IgM_s 抗体と IgM 抗体は生体中では可成り異った挙動を示すことが推定され、今後この抗体生物学的意義について検討を進める予定である。

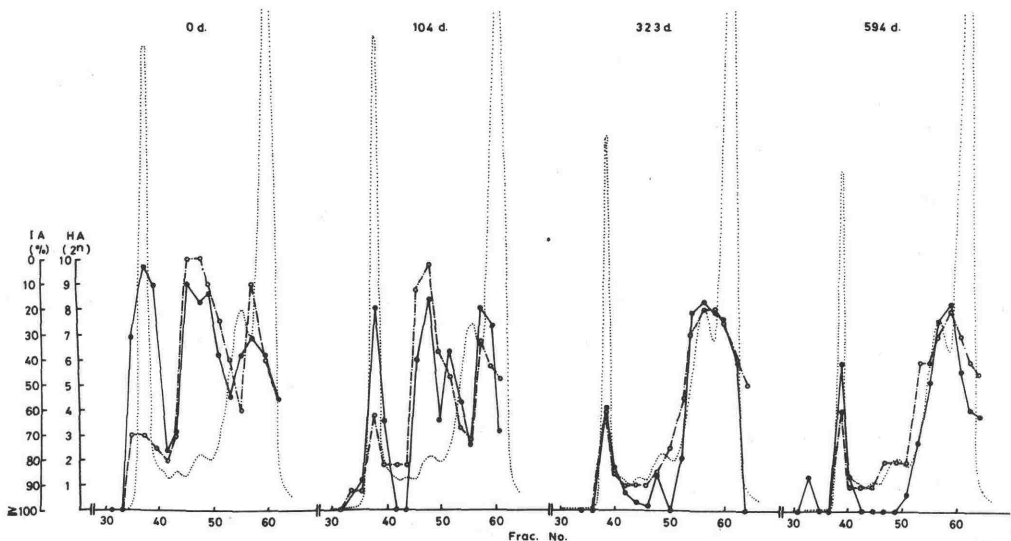


Fig. 3, Change in antibody distribution after treatment in patient with secondary syphilis.

Treponema immune adherence (TPIA) activity of IgM_s antibody in the serum of syphilitic patient.

In this symposium, we will discuss about IgM_s antibody, monomeric form of IgM molecule, which was demonstrated in the sera obtained from syphilitic patients.

The sera of syphilitic patients were fractionated with a gel permeation chromatography and the TPIA titers in those fractions were measured. As shown in Fig. 1, The TPIA activity (●—●) was distributed in 11S fraction as well as 19S and 7S fractions but the TPHA titer (○—○) was mainly found in 7S fraction.

It was supposed that IgM_s and IgA antibodies might be contained in the 11S fraction. To assume this, a syphilitic serum was applied on anti- IgM and IgA absorbent and then was fractionated by the chromatography as above. Fig 2 (left) shows the distribution of the TPIA (●—●) and TPHA (○—○) titers and the middle figure was those of the serum absorbed with anti- IgM column. It was clear that almost all of the TPIA antibody in 19S fraction was disappeared but some titer, which might be contributed by IgA antibody, were detected in 11S fraction. The titer in the serum absorbed with anti- IgA absorbent remained invariably in 11S fraction as well as 19S fraction (Fig. 2 right). It was therefore concluded that the TPIA titer in the 11S fraction depended mainly on IgM_s antibody.

Using sera obtained from the syphilitic patients after treatment at different intervals, the change of TPIA titers in 19S, 11S and 7S fractions were studied. The results indicated that the titer in 19S fraction reduced markedly after treatment and those in 11S fraction persisted considerably, whereas, the antibody titers in 7S fraction kept their value for long periods after treatment.

脳脊髄液中の補体活性について

佐野雄二、井形昭弘（鹿児島大，三内）

北村 肇、永木 和義（大阪府立成人病センター）

（目的）

脳脊髄液（髄液）は、中枢神経系の異常を直接に反映する資料として重要であり、近年は免疫異常を伴う神経疾患において、髄液中での免疫反応に関心が集っている。しかし、髄液中の補体に関する知見は乏しく、血中と同じく全補体成分が存在しているかどうか、十分に解明されていなかった。この原因として、測定上の問題点が幾つかあり、まず、血中に比べ、あまりに微量であるため Mayer 法がそのままでは適用し難いこと、次に、検体の採取量が数 ml と限られていること、 -80°C に保存しても成分によっては数日で失活してしまうことなどが、あげられる。その他、採取時に血液が混入しやすいことや、健常人から得難いことも問題点としてあげられる。

以上の問題点を鑑み、新しい System での補体価測定を検討し、微量の補体活性を検出でき、また gelatin 添加により、保存中の活性の安定化を試みた。これらの方法により、髄液中補体の測定が可能となり、補体価及び C1~C9 の補体成分の検索をすることができたので報告する。

（対象と方法）

対象は健常者及び各種神経疾患患者髄液であり、control としては健常者髄液及び脳硬塞患者で発症より三ヶ月以上経過し、髄液中蛋白が 40 mg/dl 以下の者の髄液を用いた。髄液を採取後直ちに遠心し、cell button が試験管底に認められたものを血液混入髄液として除外し、最終的に control として 7 検体が得られ、また異常髄液として 8 検体が得られた。これらの髄液について以下の検討を行った。

1) 髄液中補体活性の検討

髄液を稀釈せず原液のまま用い、Mayer 法に準じて溶血度を求めた。また 56°C 30 分処理及び、EDTA、コブラ毒因子処理髄液にても同じく溶血度を求めた。

2) 新しい System による補体価測定の検討

変量した髄液原液に GVB を加え総量 0.8 ml とし、さらに $\text{EA } 1 \times 10^8 / \text{ml}$ 0.2 ml 加え混和後 37°C 60 分反応させ、これに GVB 2 ml 加えた後、遠心し上清の吸

光度を測定し、Mayer法に準じて補体価を算出した。

3) 補体成分の測定

C1~C9については血清の場合と同様に各、intermediate cell と reagent を用いて測定した。

4) 保存条件の検討

髄液に終濃度1%となるように、gelatin を加え、-80°C に保存し、経時的に補体価、C2を測定した。

(結果)

以下はcontrol 髄液の結果のみ記した。

1) 添加髄液の増量に伴い溶血度も上昇し、かつ56°C 30分及びEDTA、コブラ毒因子前処理髄液では溶血が認められなかった。

2) 新しいSystem による補体価は、プール血清(NHS)が550 CH50u/mlであるのに対し髄液は平均1.26 CH50u/mlであった。なお、補体価算出過程において、このSystemでもvon Kroghの式の $\frac{1}{n}$ は0.2であった。

3) Gelatin 添加群、未添加群の経時的な補体価とC2の測定では、未添加群では数日で活性の著明な減少をみたが、添加群では大きな活性の変化は認められなかった。

4) C1~C9の測定結果を表に示した。また同時に測定したNHSの値との比を合せて記した。

(考案)

まず、EAが髄液で溶血することより、溶血活性の存在が確認され、この溶血活性が56°C 30分処理、及びEDTA、コブラ毒因子処理にて認められなくなることから、補体によるものであることを確認した。

次に、新しいSystemにより髄液中補体価の測定が可能となり、血中に比べ約 $\frac{1}{450}$ という微量な活性を検出できるようになった。今後この方法は神経疾患の病態をさぐる有用な武器となると思われる。

また、C1~C9の測定では、全成分が髄液中に存在することが確認できた。未だ、髄液中の全補体成分測定の報告はなく、全成分の存在が確認できたことは、髄液中の免疫反応に補体が関与していることを示唆するものといえる。またこれらの成分の由来は血中からの浸透と考えられるが、成分とNHSの比が各異なるのは、血液脳関門の透過性に各成分の分子量の差などが関係していると考えられ、血液脳関門の理解にも一つの資料を提供するものと思われる。

以上、髄液中補体について検討を加え報告した。

Table Complement Activities in CSF

	CSF (n=7) mean $\pm$ SD	NHS [#]	NHS/CSF
Hemolytic activities			
Total complement (CH50u/ml)	1.26 $\pm$ 0.29	550	436
C1	78.0 $\pm$ 18.7 [*]	51,300 [*]	658
C4	368 $\pm$ 180	66,000	179
C2	3.72 $\pm$ 0.91	683	184
C3	63.5 $\pm$ 11.0	17,300	272
C5	222 $\pm$ 42.8	116,000	523
C6	237 $\pm$ 79.5	114,000	481
C7	1262 $\pm$ 269	94,100	74.5
C8	111 $\pm$ 32.7	61,500	554
C9	107 $\pm$ 19.2	26,200	245

NHS : Pooled normal human serum

* Site forming units / ml

Study of complement activity in cerebrospinal fluid

Yuji Sano, Hajime Kitamura^{*}, Kazuyoshi Nagaki^{*}
and Akihiro Igata

Third Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine,
Kagoshima University.

* The Center for Adult Diseases, Osaka

Little is known about the complement system in cerebrospinal fluid (CSF). In 1978, Reis-Filho first reported the presence of total complement activity in the 20 fold-concentrated CSF . However, his method was not suitable for the clinical application, because of using amount of CSF . We devised the improved method for the determination of the total complement activity in CSF . We studied the complement activities in 7 normal subjects, using our method. The complement in CSF had about a $\frac{1}{450}$ fold hemolytic activities, compared with that in normal human serum.

Futhermore, we could assay the respective components of complement system in normal CSF .

日本大学 第2内科 藤田宜是 宮地秀尚 関 正人
 柄原啓子 大井洋之 波多野道信

—緒言—

急性糸球体腎炎(AGN)患者の多くは病初期に低補体価を示す事が知られてゐる。又、その血清中にはC3 Nephritic Factor (C3NeF)の様に、alternative complement pathway (ACP)を活性化する因子が出現する事が報告されてゐる。今回我々は、AGN患者血清を対象にAlperらのhemolytic diffusion plate assay及びVallotaのC3 conversionによる方法でACP activatorの検索を行なつた。さらにactivator陽性例について経時的な観察を行ない、AGNの臨床経過並びに補体系の変動について検討した。又、血清中よりACP activatorの分離を試み、その性状についても検討を行なつた。

—対象並びに方法—

日本大学板橋病院及びその関連病院に於いて腎生検を施行し組織学的かつ臨床的にAGNと診断された9例を対象とした。各検体の補体価はMayer法にて測定し、補体の各componentはSRID法で測定を行なつた。C3d及びC3 Breakdown Indexは第18回補体シンポジウムで発表した通り、Perrinらの方法に準拠し測定した。

ACP activatorの検出にはAlperらのhemolytic diffusion plate assayにより、 2×10^8 /mlのguinea pig erythrocyte 1mlと正常ヒト血清1mlを含んだ1.2% agarose EGTA- VB Mg^{2+} 15mlでgel plateを作成し、溶血輪を形成する検体を確認した。さらに陽性例に対してはVallotaの方法により、被検血清25 μ lをEGTA- Mg^{2+} 存在下に正常ヒト血清75 μ lに加えて37°Cで20分加熱後、免疫電気泳動を行ないC3のconversionを確認した。又、ACP活性化産物の測定や、分離過程に於けるACP activatorの存在するfractionの検定には図1に示す様に正常ヒト血清のウサギ血球溶血力に対する阻止産物を用いた。

上記の方法で検出されたAGNの一例より、図2に示す操作法でACP activatorの分離を試みた。即ち血清をzone electrophoresisにかけ、各blockに凍結融解を繰り返す事で得られたelutionのうちACP activatorの

存在する fraction を DE 52 column においた。さらに 0~0.4 M NaCl でイオン強度勾配を作成し elution study を行った。次に溶出した活性化能を有する fraction を sucrose density gradient ultracentrifugation にかけて比重による分離を行った。以上の様にして得られた ACP activator に対し、SDS-PAGE や Isoelectric focusing を施行し、分子量や pI を検討した。又、ACP activator に EDTA や加熱 (56°C 30分) 等の前処理を加え、その性状の変化を検討した。

Fig.2 ISOLATION PROCESS OF A C P ACTIVATOR

Fig.1

ASSAY FOR DETECTION & TITRATION OF A C P ACTIVATOR

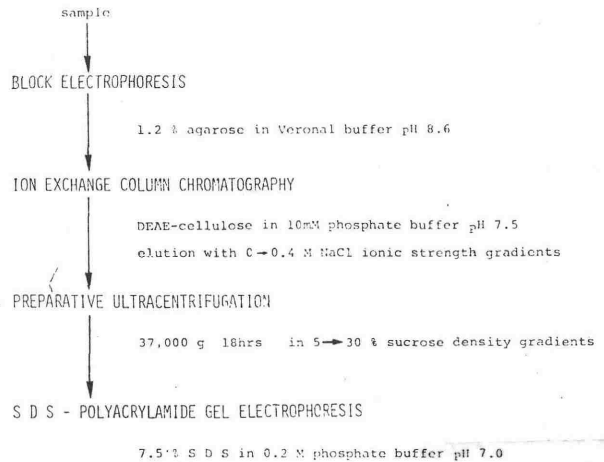
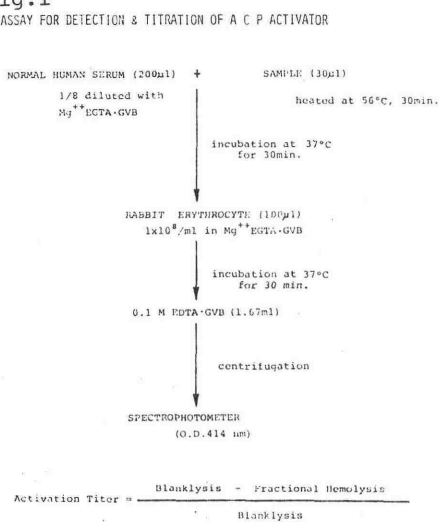
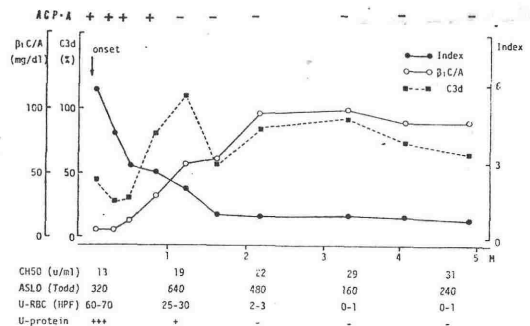
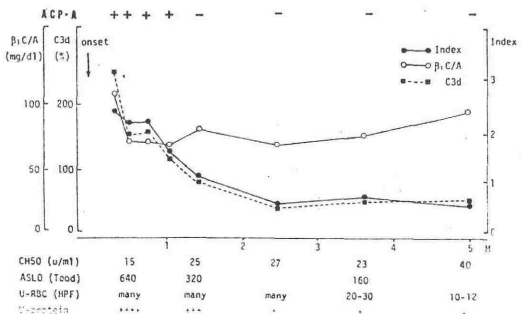


Fig.3

PATIENT M.O. 38Y. M. A G N



PATIENT H.I. 34Y. F. A G N



＝成績並びに考察＝

ACP activator は 9 例中 3 例に検出され、いずれも発症初期にその活性化能は強く、その後徐々に低下した。約 1 カ月後 ACP activator は感度以下となるが、その改善様式は病勢を反映すると思われる Breakdown Index と類似している。臨床症状や血清補体価も ACP activator の消失後、正常化する傾向がある。図 3 は今回検出された 2 例であるが、ACP activator が臨床経過と深いつながりのある事を示していると思われる。

今回検討した ACP activator の性状は図 4 に示す様に、pH 8.6, $\pi=0.06$

で電気泳動を行なうと β -mobility を有し、10mM Phosphate Buffer (pH 7.5) で DE52 に吸着した。さらに $U = 0.04$ で elution した。又、37.000 g 18 hrs の超遠心では沈降定数 S の I_{90} よりも低比重であった。この ACP activator は EDTA 存在下にも活性が阻害されず、56°C 30分加温しても失活化しなかった。

。図4に C3 NeF と比較対照した ACP activator の性状を示した。

AGN に於ける低補体の原因は現在まで明らかにされておらず、又、complement activating factor の存在を示唆する報告もあるが、C3 NeF の推定にその性状が明らかにされていゝるものはない。今回分離した ACP activator は AGN 全例に出現するわけではなく、熱に対する安定性や分子量、さらに電気移動度、EDTA の影響を受けない事から補体の component やその complex とは考えにくく、C3 NeF の様な自己抗体とも異なる物質であろうと思われる。しかし、臨床症状や血清補体価、Breakdown Index とその動向が一致する事から、AGN に於ける低補体血症の一因であろうと考えられる。

Fig.4

	ACP Activator in patient I.H.	C3 Nephritic Factor
Electrophoretic mobility	beta	gamma
DEAE-cellulose	absorption	through
Sedimentation constant	< 7S	7S
Molecular weight	60K—100K	160K
Heated at 37°C for 30 min.	stable	stable
0.1 M EDTA	not blocked	blocked

Studies of Alternative Complement Pathway Activators in Patients with Acute Glomerulonephritis

Serum factors activating the alternative complement pathway (ACP) were detected in three patients with acute glomerulonephritis (AGN). The serial samples from these patients were investigated to be compared with their clinical course. The ACP activators were detected at the samples collected from the early phase of AGN, and lost their capacity to activate the ACP, accompanying with the declining of the disease activity. Semi-purification and characterization of an ACP activator detected in one of the AGN patients were performed.

The data obtained in the present study revealed that ACP activators in the AGN patients' sera had different characters from the C3 Nephritic Factor and had the pararell property to the clinical course.

8

パルス療法の補体への近接効果

虎の門病院腎センター

鈴木好夫，望月賀世子，内田順子，岡崎祐子，原 茂子，葛原敬八郎，二瓶 宏，三村信英

〔はじめに〕

メチルプレドニゾロンパルス療法（以下パルス療法）は，難治性ネフローゼ，易再発性ネフローゼ症候群，SLEをはじめとする膠原病に用いられ，臨床上ある程度良好な成績を得ている。とくに低補体を示すSLEで，従来は副作用の点から副腎皮質ホルモンを大量長期使うことに問題を生じ，不十分なステロイド療法を続けなければならない症例にパルス療法を加え，よりよい補体・臨床症状の改善が経験され，低補体の持続するSLE治療にパルス療法は期待がよせられている。

しかし，パルス療法は，その適応を含めていまだ試行段階の面もあり，方法，効果の上でも確立されたものではない。なかでも補体に対する効果は，CH50，C3，C4が週あるいは月単位で上昇することが一様に報告されているが，その作用機序の詳細は未だはっきりしていない。そこで，この点を検討するために，持続的に強い低補体を示す膠原病5例（SLE 4例，MCTD 1例）にパルス療法を行ない，その直後から1週間以内の補体成分量の変化に対する近接効果の知見を得たので報告する。

〔対象〕

対象は表1の5例である。

	名 前	性	年令	疾患	CH50	腎症
1	Y. T.	F	37	SLE	18	(+)
2	M. K.	F	35	MCTD	17	(+)
3	K. M.	F	21	SLE	22	(+)
4	S. K.	F	43	SLE	18	(+)
5	N. M.	F	16	SLE	7	(-)

いずれも低CH50を示し，パルス療法に先立ち，プレドニゾロン20mg隔日ないし40mg連日使用していた症例である。又，免疫抑制剤は使用していない。

〔方法〕

Methylprednisolone sodium succinate (MPSS) 1.0又は1.5 g/日を5%ブドウ糖液300ml溶解し，隔日に3回，1回2時間かけて点滴静注した。使用前及びその後点滴静注なか日に隔日採血を行ない，補体を測定した。CH50はMayer法（N：30～50 u/ml），C1_q（N：100±26% NHS），C4（N：36±24 mg/dl），C3（63±27 mg/dl），B（N：16±8 mg/dl），C5（N：100±30% NHS）はBehring抗体-Mancini plate法で測定した。

〔結果〕

表2はパルス療法による補体価の動きである。表に示す如く，CH50の上昇は1週間の近接効果ではT. T. 及びM. K. 症例に認められるが他の3例では認められない。C4，C3，B，C5は増加の傾向は認められない。C1_qは前値71.4±3.6（M±SE，n=5），MPSS 各回点滴後翌日はそれぞれ820

名 前	方 法	日 付	CH50	C1 _q	C4	C3	B	C5
T. T.	2月16, 18, 20日 MPSS 1.0 g	56. 2.14	30	80	36	42	24.1	110
		2.17	26	128	39	51	33.8	168
		2.19	22	82	39	35	17.1	81
		2.21	21	105	15	39	18.2	101
		2.23	23	77	15	36	14.8	81
M. K.	3月19, 20, 23日 MPSS 1.0 g	56. 3.19	17	75	8	29	5.8	65
		3.20	15	55	7	25	6.8	86
		3.21	15	56	7	30	5.6	95
		3.23	16	60	6	29	5.2	86
		3.24	17	54	9	43	6.8	111
K. M.	8月4, 6, 8日 MPSS 1.0 g	56. 8. 4	22	65	9	26	8.0	124
		8. 5	21	80	14	33	9.9	100
		8. 7	20	102	8	34	8.6	113
		8.10	23	100	13	33	9.5	108
		8.11	21	89	13	34	8.6	96
S. K.	11月10, 12日 MPSS 1.0 g	56.11.10	18	59	11	43	9.0	91
		11.11	20	64	11	43	12.3	73
		11.12	20	100	10	37	6.8	79
		11.13	20	81	8	39	7.7	73
N. M.	12月7, 9, 11日 MPSS 1.5 g	56.12. 7	7	78	3	39	6.8	105
		12. 9	10	78	3	33	5.6	10
		12.10	10	86	2	31	4.8	10
		12.11	9	86	2	17	4.6	30
		12.14	10	70	2	30	4.0	25

± 11.0, 105.2±

11.9, 89.6±7.2,

後値(終了後2-3

日)73.8±5.2で,

前値に対する有意差

検定ではそれぞれ,

n. S, P<0.05, P

<0.1, n. Sであっ

た。尚, 同期間にIC

を測定した2例では,

パルス療法に従って

IC低下がみられた

例が1例, 不変が1

例であった。

[まとめ]

強い低補体を示す

5例にパルス療法を

行ない補体値に及ぼ

す近接効果を検討し

た。その結果, CH

50は既に1週間の

近接期間中に上昇す

る例が認められた。

しかし統計上, CH50,

C3, C4, C5, Bに

近接効果の上で有意

な変化はみられないが, C1_q はパルス療法期間中, 有意に上昇し, 終了後もとのレベルにもどることが判明した。

MPSS パルス療法の作用機序は免疫グロブリン産生抑制, リンパ球減少作用, 免疫複合体の減少などがあげられているが, 1週間の近接効果で, C1_q の一過性増加が認められ, その急性変化から, 補体の代謝あるいはリンパ球への作用が推測された。

Summary

Pulse therapy was used for the treatment of collagen diseases. But even including a indication, its effect and mechanism of action is not known.

The early effect of methylpredonisolone sodium succinate (MPSS) was discussed. For five hospitalized patients (four female SLE, one female MCTD), 1.0 or 1.5g MPSS was administered intravenously for three successive alternate day. Prior to the pulse therapy, all the patients had received conventional low-dose prednisolone therapy and none was receiving

immunosuppressive drugs.

Every next day to the pulse, blood sample was drawn for complement analysis.

As a result, CH50 of two patients rose slightly as early as within a week, but statistically, a change of average value in CH50, C3, C4, B, C5 dose not rise significantly.

C1_q, just next day after the first pulse, rose significantly as compared to initial value before the pulse and also rose succesively after the 2nd and 3rd pulse, but 2 or 3days after the last pulse, C1_q returned to the initial value.

During the pulse therapy, IC value of the two patients was measured and one of them, it lowered to a normal value but the another rested high.

With such a rapid change of C1_q value, the effect of MPSS seems to be resulted from direct effect on complement metabolism or lymphatic cell rather thar IC or immunoglobulin metabolism.

9

血液透析患者補体価の血清－血漿解離

虎の門病院腎センター

鈴木好夫，望月賀世子，内田順子，岡崎祐子，原 茂子，葛原敬八郎，二瓶 宏，三村信英

〔はじめに〕

室温又は4℃で分離した血清が低CH50を示し，37℃で分離した血清あるいはEDTA血漿は正常CH50を示す現象はよく知られている。それらのうち，血清とEDTA血漿のCH50の解離は血清－血漿解離（S－P解離）と呼ばれるが，成因論的には低温又は室温に血清を放置することによりおこるin vitroでの補体classical pathwayの活性化によって生じると考えられ，Cold activation(CA)と云われている。

CAは肝疾患に集中してみられるが，その他腎疾患，膠原病，健康人でも報告されている。

今回，血液透析患者を対象に低補体血症の頻度，原疾患名，S－P解離及びCAの頻度，その発症機序について検討を加えた。

〔対象及び方法〕

対象は当院腎センター定期血液透析患者199名で原疾患は慢性腎炎，糖尿病性腎症，多発性のう胞腎，膠原病，その他である。採血は透析日に行ない，2時間室温放置後血清分離し，-74℃に保存しCH50の測定検体とした。

CH50正常域（30－50 u/ml）以下を示した症例はあらためてEDTA（終末濃度3.6m mole），3.8%クエン酸Na（クエン酸Na－血液化1：9），ヘパリン（10 u/ml），37℃保温採血を行ない，S－P解離，CAを検討した。又，クリオグロブリン，IC（免疫複合体），免疫グロブリン（G，A，M，E）を測定した。

補体蛋白定量は，バルチグンプレート，又はベーリング抗体－Manciniプレート法で測定した。

〔結果〕

名 前	原疾患名	血 清 CH50	EDTA CH50	37℃ CH50	ク リ オ グロブリン	I C MCG/ml	IgE u/ml
IT	多発性のう胞腎	3	30	37	(+)IgG	1.5	32
KC	慢 性 腎 炎	2	33	37	(+)IgG	1.5↓	57
MS	慢 性 腎 炎	8	44	47	(-)	1.5↓	nd
SK	糖 尿 病 性 腎 症	3	19	36	(-)	1.5↓	nd
SK	乾 癬	3	60	nd	(+)IgG	1.5↓	2020
MK	慢 性 腎 炎	10	39	28	—	1.5↓	nd
HT	多発性のう胞腎	9	31	30	nd	1.5↓	nd*

低CH50を示した症例は199例中17例で8.5%であった。うちS－P解離を示した例は7例で全体の3.5%，低CH50症例の41%であった。表はS－P解離を示した7例の原疾患名（3慢性腎炎，2多発性のう胞腎，1糖尿病性腎症，1乾癬），室温分離血清CH50，EDTA血漿CH50，クリオグ

ロブリン, IC, IgEである。表に示す如くクリオグロブリン(IgG)陽性が3例, IgE高値が1例認められた。37℃保温採血でCH50が正常化した例は5例認められた。ICは7例とも正常値であった。

S-P解離を示さない低CH50例10例(4慢性腎炎, 2SLE, 1ウェゲナー肉芽腫疑, 1紫斑病性腎炎, 1MCTD, 1成人型ファンコニ症候群)のうち2例にIC高値, 1例にIgE高値を認めたがクリオグロブリン陽性例は認めなかった。

〔まとめ〕

血液透析患者の原疾患はもとより区々である。しかし透析症例全体として見た場合, 低CH50症例は8.5%, S-P解離は3.5%に認められ, これは肝疾患を除けば, 報告されている他疾患より高頻度である。S-P解離, CAの発生機序は他疾患の場合と同様クリオグロブリン, 免疫複合体の関与が示唆された。soluble cryoglobulinについては未検である。

高頻度に認められる理由として透析患者に多い輸血歴, 血液と透析膜の直接接触, 及び透析膜による毎回の補体活性化も検討さるべきである。

Summary

Hypocomplementemia is observed in SLE, MPGN, liver cirrhosis and so on. However at the same time, it is well known that a difference between serum-CH50 and plasma-CH50(S-P difference) was often seen with several diseases, i.e. mostly with liver disease.

S-P difference in hemodialysis patient was studied.

The incidence of hypocomplementemia was 17(85%) in 199 hemodialysis patients and 7 of these were found to show S-P difference(3.5%).

The original diseases of these 7 patients who had S-P difference were 3 chronic nephritis, 2 polycystic kidney, 1 diabetic nephropathy and 1 psoriasis. The remaining 10 hypocomplementemic patients who did not show this phenomenon consisted of 4 CN, 2 SLE, 1 MCTD, 1 suspect of Wegener's granulomatosis, 1 purpura nephritis and 1 Fanconi Syndrome.

As a cause of an S-P difference, cold activation(CA) was investigated and 5 of 7 S-P differences showed normal 37°C-serum-CH50.

IC was detected in 2 hypocomplementemic patients but not in S-P difference patient.

Cryoglobulin was found in 3 patients of S-P difference and all these cryoglobulins were revealed to be IgG type.

The causal substances of this phenomenon are not yet known but IC or cryoglobulin may be responsible.

High IgG titre was detected in 2 hypocomplementemic cases(one in S-P difference and another in non S-P difference). Further studies about, such as soluble cryoglobulin should be necessary.

The reason for high incidence of S-P difference of 3.5% in hemodialysis patient is not clear but a history of blood transfusion, a direct contact of blood with dialysis membrane and a complement activation at each dialysis shall be considered.

各種疾患における補体の免疫複合体の可溶化能

相原 泰・桑島紀夫・天野哲基・太田善介

岡山大学医学部第三内科

<目 的>

1975年にMillerとNussenzweigは不溶性免疫複合体が補体系により可溶化するという事実を発見した。この可溶化現象は生体内における抗原抗体反応が推察される自己免疫疾患や各種腎炎の病態に何らかの影響を及ぼしていると想像される。この為、簡便な免疫複合体の可溶化能の測定法として、昨年の本シンポジウムで発表した抗原に peroxidase を利用する方法を用い、各種疾患における可溶化能を測定し、病態形成との関連を検討した。

<対象と方法>

対象疾患はSLE30例、RA19例、PM(DM)4例、PSS9例、PN4例、MCTD11例、UCTD10例、Sjögren症候群8例、Behçet病16例、低補体性膜性増殖性糸球体腎炎(MPGN)1例、AGN2例とし、正常人14名を対照とした。

不溶性免疫複合体は horseradish peroxidase (PO) と抗POウサギ IgG を至適域で反応させて作製した (PO-IC)。このPO-ICを用いて各種疾患における可溶化能 (complex-release activity : CRA) を測定した。

<結 果>

1) 各種疾患のCRA (図1)

正常人のCRAに比較して、SLE、MCTDは有意の低値を示し、RAのCRAは有意の高値を示した。PM(DM)、PSS、PN、Behçet病、Sjögren症候群、UCTDでは正常人のCRAに比較して有意差は認められなかった。低補体性MPGN1例のCRAは常時異常低値を示し、AGNの2例も低値を示した。

2) SLEのCRAとCH50

SLEにおけるCRAとCH50との関係をみると図2の如く、両者の間には密接な正の相関関係 ($r = 0.69$, $p < 0.001$) が認められた。又、C4の低値が持続する為、CH50が仲々回復しなかった症例 (図3) では、CH50よりCRAの方が早く回復する事が認められた。

3) 低補体性MPGNのCRA

持続性低補体価でC3、Bが極めて低値を示し、腎生検にてMPGNと診断された本症例のCRAは常時低値を示した。この症例の血清と正常人血清を37℃30分間反応させ

た後にCRAを測定すると対照に比較して明らかな低値が認められた。又、この傾向は非働化した場合でも同様に認められた。更に、患者血清と正常人血清との反応をEGTA下で行なっても同様であった。

4) AGNのCRA

発症時低補体価を示した2症例とも、C4は正常であるがC3は著明な低値を示し、経過を観察するとCRAよりCH50の方が早く回復することが認められた。

<考 察>

各種疾患におけるCRAを測定してみるとSLEで低値であり、RAで高値が認められた。これは種々疾患のCH50の態度と一致する訳であるが、CH50はclassical pathwayの活性を表すものであり、CRAはalternative pathwayが主で、classical pathwayはこれを促進する効果があるという事が明らかとなっているので、この点は注目される。MCTDのCRAは低値であったが、今回対象としたMCTDにSLEの病像を呈するものが多かった事も原因と考えられるが、CH50に比較してCRAの低値が著明である症例も散見されたので、本症の病態にCRA低値の関与も考えられた。

SLEにおいてはCRAはCH50とよく相関した。しかし症例別に観察すると、CH50に比較してより早期にCRAが回復してくる症例が認められ、このような時点においては、生体内の免疫複合体の可溶化能力は正常に存在していることを示す訳であり、SLEの治療並びに予後判定にCRAは有用な指標になり得るのではないかと考えられる。

低補体性MPGN患者血清中にはalternative pathwayを活性化させるheat stableな因子即ちC3NeFの存在が示唆されCRA低値の原因と考えられた。又、C3NeFの検出法としては従来種々の方法が考案されているが、被検血清と正常人血清を混合してCRAの低下率を測定する方法は簡便で優れた方法と思われる。

AGN2症例においてはC4は正常であったがC3の低値が持続し、CRAに比較してより早期にCH50の回復が認められた。このことより、本症の補体系は低補体時のalternative pathwayの強い関与が推察され、本症の病態にalternative pathwayを強く活性化させる因子の存在が考えられる。

FIG. 1

CRA IN VARIOUS DISEASES

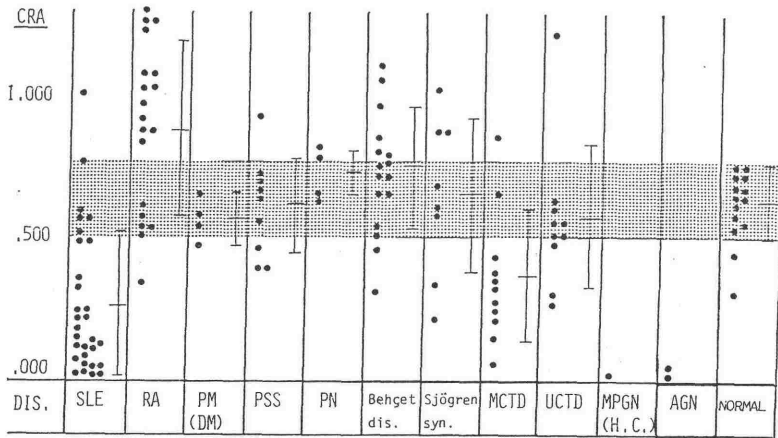
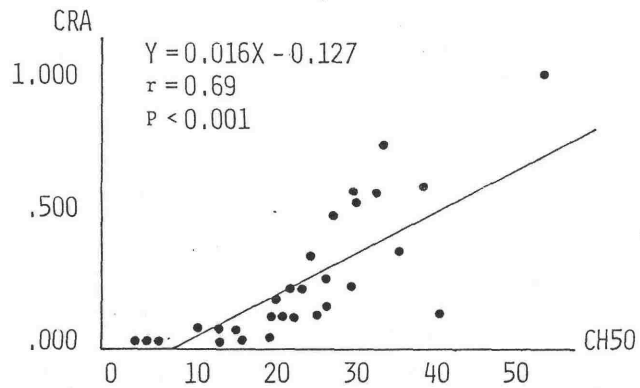
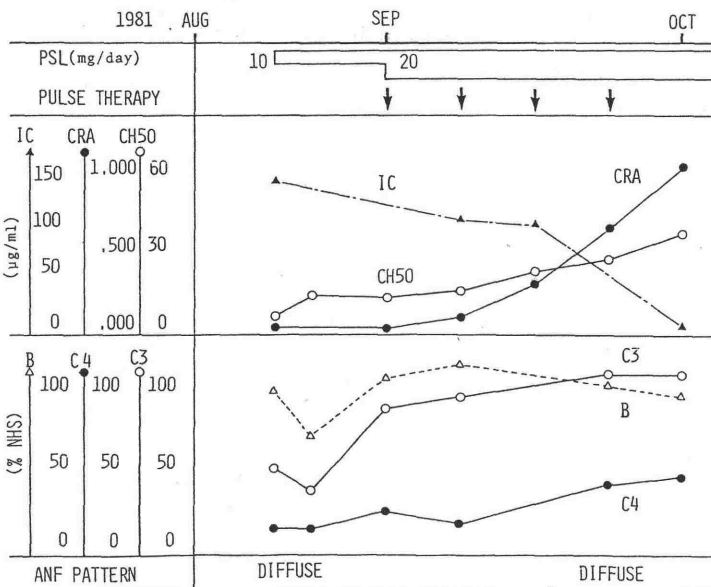


FIG. 2 RELATION BETWEEN CRA AND CH50 IN SLE

FIG. 3 I.M. F, 29Y.
1981 AUG

Complex-Release Activity of Complement in various Diseases

Yasushi Aibara, Norio Kuwajima, Tetsuki Amano and Zensuke Ota.
Third Department of Internal Medicine, Okayama University, Medical
School, Okayama.

Complex-release activity(CRA) of complement was measured in autoimmune diseases and hypocomplementemic glomerulonephritis (AGN, MPGN) by simple method using peroxidase as an antigen in immune complex. Low CRA was seen in SLE, MCTD and hypocomplementemic glomerulonephritis, and high CRA was seen in RA. In PM(DM), PSS, PN, Sjögren's syndrome, UCTD and Behçet's disease, CRA was within normal range. Reduction of CRA was more significant than that of CH50 in some MCTD patients. In SLE, CRA correlated well with CH50($r=0.69$, $p<0.001$). But in some persistent hypocomplementemic (low C4) SLE patients, CRA recovered soon after corticosteroid treatment. In two hypocomplementemic(low C3) AGN patients, recovery of CH50 was sooner than that of CRA. These observation suggests that the measurement of CRA is more useful than that of CH50 in some SLE and AGN patients. Low CRA continued in a hypocomplementemic MPGN patient. Heat inactivated serum from this patient was able to reduce CRA of normal serum in EGTA buffer. These indicate that this serum contains C3 nephritic factor(C3NeF) and this C3NeF participates the reduction of CRA in hypocomplementemic MPGN.

C1q と IgG との反応に関する検討。

吉田 浩, 渡辺 進, 森藤隆夫, 粕川礼司

(福島県立医大 オス内科)

【目的】: Classical pathway 活性化の引き金が C1q によりなされることは衆知のことであるが、抗体および補体の由来する動物種の違いによる差異や CH50 の変動との関連などについては不明のことも多い。今回、C1q と CH50 の γ -gl (IgG) との反応動態を知るべく若干の検討を行った。

【方法と成績】: ウサギ IgG とヒト補体との反応を行うため、2% フォルマリン処理したツジ赤血球に等量のヘモリジン(1/100)を混じ、1時間反応させ洗浄後、得た感作血球(FEA)と新鮮ヒト血清とを混じ反応させ、CH50 と C1q (蛋白量と凝集活性)を測定した。健常ヒトプール血清(NHS) (CH50 35.0 U/ml, C1q 凝集活性 16X, C1q蛋白量 100%) 0.2 ml に 1 ml の 2% FEA を遠沈して得られた沈渣を混じ、2時間反応後遠沈。上清の CH50 と C1q の測定成績を表 1 に示した。反応を 37°C と 4°C とで行い比べると、これらの低下は 37°C 群でより明らかであった。CH50 と C1q 凝集活性は並行して低下しているようだ。また、1 ml の 2% FEA を 3 分し、その各々を遠沈し、沈渣を得、その 1 つに血清を加え、40 分間反応後遠沈、さらに同様操作を 2 回くり返した。Insoluble immune complex (FEA) は、一定量にかかわらず 3 回 (40 分毎) の吸収法 1 回 (2 時間) の吸収と比べると、CH50 と C1q 凝集活性は 37°C 群、4°C 群のいずれもより著明に低下し活性はみられなくなった。C1q 蛋白量については 4°C 反応例では 1 回と 3 回の吸収例はどちらも 76% の差はみられなかったが、37°C-反応により 1 回吸収例では 80%, 3 回吸収により 40% と明らかな減少を見た。以上のようなウサギ IgG 抗体とヒト補体との反応は 37°C の方が 4°C よりも強く、また同一量の抗体と補体との反応を吸収法で検討すると 1 回よりも分割してくり返し吸収する方が補体の結合性(消費)は大であるといえよう。

次にヒト γ -gl 製品 [Cohn's FII (FII), γ -Venin (γ -V), γ -Globulin (G-S), Venoglobulin (Vg), Vg-I] の加熱による変化と補体結合性についての検討を行った。これらの 2% 溶液の種々稀釈液にモルモット補体 (1:100) を加え、37°C で 5 分および 15 分間反応後、感作血球を加え抗補体性の有無を検討した。FII は 37°C 15 分の反応では非加熱例、56°C 30 分加熱例で抗補体性は各々共に 4~8 倍、62°C 10 分加熱例では 16~32 倍を示した。他では 62°C 加熱 Vg-I が 1~2 倍を示したのみで、他はどれも認められなかった。しかし、37°C で 5 分間反応後に判定する

と、Vgt-IとG-Sの非加熱例では抗補体性は全く認められなかったが、62°Cの加熱により抗補体性は各々16~32倍、1~2倍を示した。γ-VとVglでは加熱の影響はほとんどみられなかった。ヒト補体との反応も溶血活性(hemolysis in gel 法)とC1q蛋白質量の測定により検討すると表2に示したごとく、非加熱FIIや56°C-加熱G-Sは溶血活性の著明な低下に比べC1q蛋白質量の低下は軽度である。FIIやVgt-Iで溶血活性が認められなくなった場合のC1q値の低下70%弱までである。γ-V, Vglは加熱により溶血活性の軽度低下をみたが、加熱条件の違いによるC1q蛋白質量の変動はみられなかった。以上のことから、FIIやG-Sについては、補体活性化に際してのC1qの必要量は少量で可能であり、また残存C1qは不活性化型として存在している可能性も考慮されよう。また、C1q蛋白質量の測定に際し(SRID法)、3日間室温に放置する間にIgGとC1qの解離がおこっている可能性も否定できない。

ヒトFIIとヒト血清および血漿(補体)とも37°Cで反応させ、CH50測定により活性化状況を検索した。CH50の低下はいずれにおいても認められたが、血清の方が軽度ながらより著明であった。

[まとめ]: ヒトヤモルソット補体とウサギγ-gl(IgG)とヒトγ-gl製品との反応も溶血補体活性およびC1qの測定を行うことにより検討した。補体の結合性(活性化)は抗体(immune complex)が一定の場合は少量に分けくり返し行うことがより有効である。ヒトγ-gl製品では溶血活性の著明な低下~消失にもかわらずC1q蛋白質量の低下は軽度の場合があり、γ-gl製品によっても差がみられた。機序解明は不十分であるが、C1q蛋白質量はその測定法について検討の余地を残すと共に、不活性化型C1qの存在も推定されよう。

Table 1. The effect of absorptions with sensitized formalinized-SRBC(F-EA) on CH50 and C1q of the pooled healthy serum.

	CH50(U/ml)	C1q agglutination titer, 1 :	protein (%)
Before incubation	35.0	16	100
Incubation for 3 h at 4°C,			
without absorption	34.0	16	100
absorption x 1	27.0	8	76
" x 3	no	≤4	76
Incubation for 3 h at 37°C,			
without absorption	25.8	16	100
absorption x 1	19.0	4	80
" x 3	no	4	40
Heated at 56°C for 20 min.	no	4	0

Table 2. Reactions of r-globulin preparations with human complement.

	Hemolysis in gel(%)	Clq protein (%)
NHS + GVB	100	100
" + 1% FII, native	0	96.4
, 56°C 30'	0	76.2
, 62°C 10'	0	69.9
+ 1% r-V, native	92.7	85.9
, 56°C 30'	90.3	85.9
, 62°C 10'	83.3	85.9
+ 1% Vgl, native	80.9	85.9
, 56°C 30'	63.9	85.9
, 62°C 10'	62.0	85.9
+ 1% Vgl-I, native	92.6	96.4
, 56°C 30'	80.9	92.9
, 62°C 10'	0	69.5
+ 1% G-S, native	92.7	96.4
, 56°C 30'	0	92.9
, 62°C 10'	0	

Reactions of Clq with Ig G. (Yoshida et al. Fukushima)

Reactions between complement(C) and immune complex and aggregated r-globulin were analysed by estimating the hemolytic activity and Clq. To examine the reaction of rabbit antibody with human C, the sensitized formalinized-SRBC(F-EA) was mixed with a human serum and incubated at 37°C or 4°C. The activation of C was more efficient in a case incubated at 37°C, and repeated incubations(absorption) accelerated the reduction of CH50 and Clq levels.

Human r-globulin preparations(F II, r-Venin, Globulin-S, Venoglobulin and Venoglobulin-I) were employed to analyse the reaction between human IgG and C of human and guinea pig origin. Reaction of guinea pig C was assayed by estimating anti-complementariness of these preparations. Both unheated and heated F II and Venoglobulin and Globulin-S heated at 62°C showed positive reactions. Reactions of human C with these were shown by estimating the hemolytic activity and Clq levels. Unheated preparations other than F II were demonstrated to activate C very slightly, however, slight to marked activation was shown in 62°C-heated samples. Differences in the grade of reduction of hemolytic activity and Clq levels could suggest the presence of Clq in an inactive form.

肝疾患を主とする諸疾患において, 血清を低温に保存すると補体系が活性化される現象(cold activation, 以下 CA と略)およびそのことに関連していると考えられる血清と血漿での補体価の解離現象が観察されている。この現象に関しては, 1975年(北村ら)以来多数の報告・検討がなされており, 竹村らはクリオ蛋白様物質の関与を示唆するデータを発表しているが, その本態に関しては未知の部分も多い。

我々はこの現象を解析することを目的として CA を示す血清の 2.5% PEG 沈降物と補体との反応および CA を示す血清の IgG 分画と補体との反応について検討した。その結果 C4 不活化は CA を示す血清より得た PEG 沈降物はコントロールに比して明らかに高く, また CA を示す血清の IgG 分画と正常ヒト血清を低温で反応させるとヒト補体が不活化されるという成績を得たので以下に報告する。

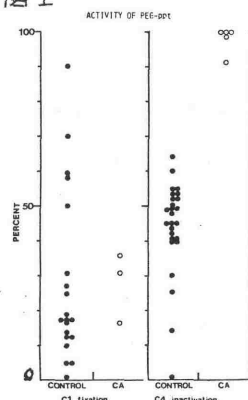
〔材料および方法〕 1) CA を示す血清は CH50 が低値で EDTA 加採血(終濃度 8mM)した血漿の CH50 が正常であるものを選び, 常温採血・低温保存により補体価が測定不能になることを確認したものを実験に用いた。その内訳は慢性肝炎(Y.K., Y.H.) 2例, 股関節の激痛・腫脹・発熱を主訴とし持続的低補体価を示す 1例(N.O.) および肺高血圧を示す 1例(H.K.) の 4例である。血清または血漿は常温で分離し -70°C の冷凍庫に保存した。 2) PEG 沈降物は血清 300 μl , 0.1M EDTA (pH 7.5) 100 μl , 12.5% PEG (polyethylenglycol, SIGMA, 平均分子量 4000) 100 μl を 0°C 30分反応後 2.5% PEG (PBS pH 7.5 に溶解) に 2 回洗滌, PBS (pH 7.5) 300 μl に溶解して用いた。 3) C1 結合反応は主として Augener ら (Immunochem. 8, 1011, 1971) の報告している方法に従った。すなわち検体 200 μl (PEG 沈降物溶解液で 10 μl), C1 (1.2 CH50 単位) 200 μl を加えて 0°C 30分, さらに EAC4 cell 2×10^7 個を加えて 0°C 20分反応させ, glu-GVB で 2 回洗滌後, C2 (100 CH50 単位) 30°C 10分, さらに 0.04M EDTA-GVB で $1/60$ に稀釈したモルモット血清 0.8 ml を加えて 37°C 60分反応させて溶血度を測定した。C4 不活化反応は PEG 沈降による検体 60 μl , GVB で $1/40$ に稀釈した正常ヒト血清 200 μl を 4°C 2時間反応させ, 残存 C4 活性を測定した。 4) CA を示す血清の IgG 分画の精製は, 血清を 37°C に加温後, 0.01M PB (pH 8.0) で平衡化した DEAE cellulose にかき, 通過してくる分画を集めて Amicon B 15 に 4~5 倍に濃縮し IgG 分画として使用した。このものは免疫電気

泳動にて抗ヒト全血清に対し1本の沈降線を示し、抗IgGとのみ反応した。

【結果および考察】 1) CAを示す血清では竹村らが報告しているごとく2.5% PEGにより、2白濁した沈降物が出現する。しかし沈降蛋白量に関しては正常人コントロールとも疾患コントロールとも差違がなかった。2.5% PEGにより沈降した蛋白のCI結合能は、CAを示す血清では 30.6 ± 9.8 , 正常人コントロール 39.9 ± 21.7 , 疾患コントロール 21.8 ± 20.5 (いずれも検体を加えないCIのみの溶血度を100とし、それに対する阻止率で表わしている)で、ばらつきは大きかったが特に差違はな

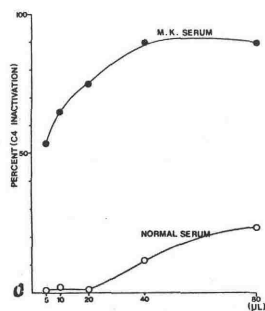
かった。(図1左、正常人および疾患コントロールは一括してプロットしてある) C4不活化反応ではCAを示す血清のC4不活化能は 98.0 ± 2.7 (検体を加えないC4活性に対する阻止率%, 以下同じ), 正常人 45.0 ± 23.2 , 疾患コントロール 47.3 ± 12.5 とは、きり差違を示して、CAを示す血清のC4不活化能が高い。(図1右、正常人および疾患コントロールは一括してプロット)。

図1



CAを示す血清(M.K.)のPEG沈降物によるC4不活化能のdose response curveは図2に示す様に5 μ l (native血清の5 μ lに相当)でも活性は保持されるが、正常人血清からのPEG沈降物は濃度が高い場合にのみC4不活化活性が認められた。

図2



2) DEAE celluloseで精製したIgG分画の5 μ lあるいは200 μ l (図4の対になったカラムの上段および下段)とGVB⁺で稀釈した正常ヒト血清600 μ l (1/200)とを0°C 4時間反応させた後、EA (1×10^8 /ml) 200 μ lを加えて37°C 1時間反応させ溶血度をみると正常ヒト血清より得たIgGに比してY.K., M.K., N.C., Y.K.などのCAを示す血清のIgG分画はより強く正常ヒト血清のEAに対する溶血を抑制した(図3)。

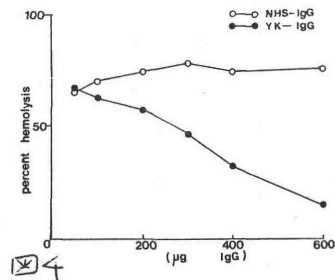
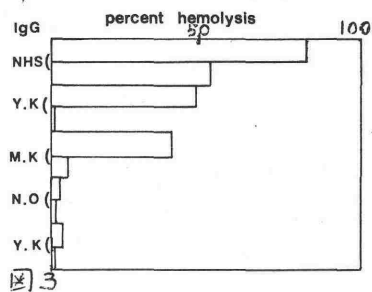
また0°C 4時間の反応ではIgGは補体を不活化しなかった(図略)。IgGを変量して補体不活化の度合をみると、図4に示すようにIgGを増量するにつれて補体は不活化される(図4●—●)が正常ヒト血清より得たIgGは補体を不活化しなかった(図4○—○)。なおCAを示す血清のIgG分画の補体不活化活性とそれぞれに含まれるIgG量とは相関せず(図略), IgGの一部に補体不活化作用があることが推定された。

次に精製したIgGを4°Cに保存すると白色の沈降物(cryoglobulin)がみ

られたことから CA を示す血清より得た IgG 分画を 4°C - 晩放置後、遠心して沈渣を除き、その上清について 0°C 4 時間における補体不活化活性を検討した。コントロール溶血に対する阻止率(%)であらわすと cryoglobulin を除いた IgG で 23.5 ± 18.0 (n=4), それと対になった処置を加えない IgG で 78.4 ± 24.8 (n=4), 諸疾患血清より得た IgG で 5.2 ± 7.6 (n=4) であった。

以上より CA を示す血清の PEG 沈降物は C4 を効率よく不活化すること, CA を示す血清の IgG 分画中には cryoglobulin 活性があり, これを除くと補体不活化能が失われることが判明した。

C4 不活化能に何故差違が生じるのか, IgG 分画中の cryoglobulin がどのような組成となっていていかなどが今後の検討課題である。



Activation of the complement system at low temperature

Yasushi Yukiya, Kenzo Yoshida, Shun-ichi Hirose
Department of Medicine & Physical Therapy, Faculty of Medicine,
University of Tokyo.

We studied the phenomena called the cold activation of the complement system which in sera from patients with chronic hepatitis and other various disease lose their hemolytic potency against sensitized sheep erythrocytes during storage in the cold. This is caused by the spontaneous activation of the classical pathway of complement and can be prevented in the presence of EDTA. Four sera from two patients with chronic hepatitis, one with possible vascular occlusion of hip joint region and one with pulmonary hypertension were selected for study because they showed extremely low titer of hemolytic complement while plasma collected in the presence of EDTA showed normal values. Precipitate from those sera by 2.5 percent polyethylenglycol (PEG) were incubated with reference normal human serum at 4°C for two hours and residual C4 titers were assayed. Four sera under study caused more effective C4 inactivation than those from normal or disease control. However fixation of limited amount of C1 by PEG precipitate did not show any difference between cold activation sera and control, which suggested those sera under study effectively utilized C4 in the cold condition. IgG from those sera purified by DEAE cellulose chromatography contained the complement inactivating capacity in the cold and also cryoglobulin which did not appear in the original serum condition. Removing cryoglobulin from IgG resulted in abolition of complement inactivating capacity of IgG, which indicated the cryoglobulin like substance was responsible for the phenomena of activation of complement system in the cold.

ヒト IgG 抗体の $F(ab')_2$ を含む抗原抗体複合体による補体第 2 経路の活性化について

赤垣 洋二、稲井 真弥

大阪医科大学、病態検査学教室

第 2 経路を経て補体を活性化する免疫グロブリンとしてウサギ IgG・ $F(ab')_2$ 、モルモット γ_1 ・ $F(ab')_2$ などが知られている。一方、正常ヒト血清あるいはヒト骨髓腫蛋白より精製した IgG・ $F(ab')_2$ が補体を活性化しないという Spiegelberg らの報告により、ヒト IgG 抗体の $F(ab')_2$ による補体第 2 経路の活性化は否定的であった。しかし、ヒト IgG 抗体の $F(ab')_2$ を含む抗原抗体複合体を用いた実験報告はなかったので、われわれは高単位の抗テタヌストキシン抗体価をもつヒト γ -グロブリンから IgG・ $F(ab')_2$ を分離し、ヒト IgG・ $F(ab')_2$ を含む抗原抗体複合体を作り、この複合体が第 2 経路を経て補体を活性化することを明らかにしたので報告する。

(材料と方法)

抗テタヌストキシンヒト IgG・ $F(ab')_2$ の精製は抗テタヌストキシン抗血清の γ -グロブリン分画（ヘキスト）をペプシン消化し、DEセルロース、Sephadex G-150 にかけ、抗 γ -chain 抗体に反応し、抗 Fc 抗体に反応しない第 2 分画の後半部分を集めて行った（図 1）。この IgG・ $F(ab')_2$ をテタヌストキソイドと最適比で 37°C 、1 時間反応させた後、 4°C 、48 時間静置し、Immune precipitate (Ippt) を得た。Ippt の蛋白量はヒト IgG 量を標準として、Folin 法にて測定した。補体としては正常ヒトプール血清および C4 欠損モルモット血清 (C4D gps: コーデイス社製) を用いた。補体価は Mayer の方法に準じて測定し、補体成分活性は永木らの方法に準じて測定した。

(結 果)

1) Ippt と血清との反応

GVB で洗淨した種々の量の Ippt に GVB で 2 倍希釈したヒト血清 0.5 ml を加え、 37°C 、1 時間反応させ、上清の CH50、C1～C5 活性を測定した。その結果、表 1 に示す様に、Ippt の量に従い、CH50、C3、C5 の活性低下がみられたが C1、C4、C2 活性の低下はほとんどみられなかった。

2) Ippt と C4Dgps との反応および Mg^{++} EGTA 存在下でのヒト血清との反応

古典経路の C3 転換酵素による C3 活性低下を除外するため、Ippt を C4Dgps あ

るいは Mg^{++} EGTAを含むヒト血清に加え、反応させC3、C5活性の低下を検討した。その結果、いずれの場合もC3、C5活性の低下がみられ（表2）、加えたIppt量に対するC3、C5活性の低下は1)で述べた実験結果とほぼ同程度であった。

3) Immune Adherence (I.A.)

I.A.はマイクロタイター用U型プレートを用いて行った。まずプレートの各孔にGVBを1滴入れ、ヒト血清、C4Dgps 2倍より4096倍まで希釈し、その後、Ippt ($2.0 \mu gN/ml$) を入れ、 $37^{\circ}C$ 、1時間反応させた後、O型ヒト赤血球 ($1.0 \times 10^8/ml$) を1滴入れ、さらに $37^{\circ}C$ 、1時間反応させ、凝集像を観察した。その結果、ヒト血清、C4Dgpsでは256倍までI.A.陽性であった。

4) Ippt上のC3転換酵素形成 (FX formation) の Kinetics

$375 \mu gN$ のIpptを Mg^{++} EGTAで洗浄後、 Mg^{++} EGTAで2倍希釈したヒト血清に $1.5 ml$ に加え (final $250 \mu gN/ml$)、 $37^{\circ}C$ で反応させ、一定時間毎に一定量の反応液をくみ出した。遠沈によりIpptを分離し、冷 Mg^{++} EGTA $2 ml$ で洗浄したIpptにC3 ($200 SFU/ml$) $0.3 ml$ を加え、 $30^{\circ}C$ 、30分反応させた後、遠沈し、上清のC3活性を測定した（図2）。FX formationのTmaxは約5分～10分で、時間の経過とともにその活性は低下し、60分ではその活性はほぼ0となった。

(結 論)

ヒトIgG・F(ab')₂を含む抗原抗体複合体をヒト血清と反応させた場合の補体価、補体成分活性の低下のプロフィールやFX formationの Kineticsを検討した結果は藤田らの報告したウサギIgG・F(ab')₂を含む抗原抗体複合体を用いた実験結果とよく一致した。これらの結果とともにC4Dgpsを用いた実験成績からヒトIgG・F(ab')₂を含む抗原抗体複合体は第2経路を経て補体を活性化することが明らかにされた。

文献

Fujita, T., Takiuchi, M., Iida, K., Nagaki, K and Inai, S. :
The activation mechanisms of the alternative pathway of the human complement system by the immune precipitate formed with F(ab')₂ of rabbit IgG antibody: The generation of C3- and C5- cleaving enzymes on the immune precipitate, Immunochemistry, 14: 25-30, 1977.

Table.1 CH50 and complement component profiles of NHS reacted with Ippt.

NHS Ippt	activity loss, %					
	CH50	C1	C4	C2	C3	C5
8.1 ugN/ml	9.3	0	0	4.1	14.8	3.2
16.2	13.1	8.1	3.7	6.1	25.9	11.6
32.4	21.4	0	3.5	2.2	28.8	17.1
64.8	26.6	0	2.5	3.3	38.5	18.7
162.0	31.2	0	0	0	53.8	23.0
324.0	33.3	0	0	8.9	60.6	24.4

Table.2 Loss of C3 and C5 activities in C4D gps or Mg⁺⁺-EGTA NHS reacted with Ippt.

C4D Ippt	gps	activity loss, %		Mg ⁺⁺ -EGTA NHS	activity loss, %	
		C3	C5		C3	C5
8.1 ugN/ml		2.0	2.9	64.8 ugN/ml	35.2	25.5
16.2		5.0	5.1	324.0	46.2	29.8
32.4		8.0	11.8			
64.8		26.7	16.2			
162.0		37.5	20.6			
324.0		52.0	23.5			

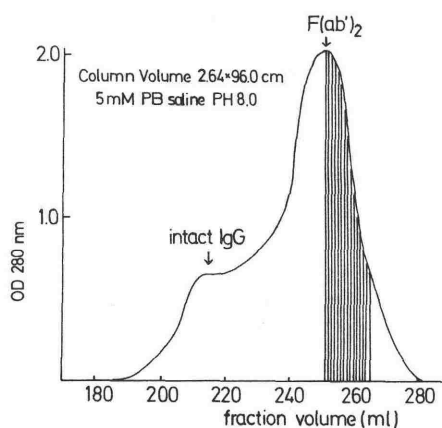


Fig.1
Purification of F(ab')₂
by gel filtration

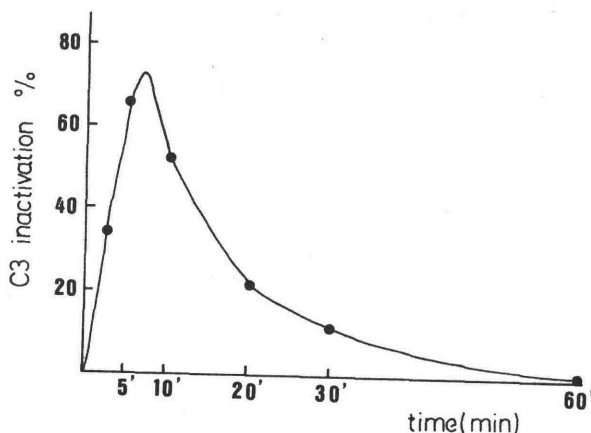


Fig.2
Kinetics of formation of the alternative
pathway C3 convertase

Abstract

We examined the ability of immune precipitate (Ippt), formed between tetanus toxoid and the F(ab')₂ fragment of anti tetanus toxin human IgG, to trigger the alternative pathway of complement activation. As shown in Table 1, dose dependent consumption of CH50, C3 and C5 activities without significant loss of C1, C4 and C2 was observed in normal human serum (NHS) by the reaction with Ippt. Similar consumption of C3 and C5 activities was observed in C4 deficient guinea pig serum (C4Dgps) and Mg⁺⁺-EGTA containing serum treated with Ippt (Table 2). Immune adherence was positive when Ippt interacted with NHS or C4Dgps. When Ippt (F) is incubated with NHS, a complex of complement proteins (X) on the F is formed (FX formation). FX is the C3 and C5 convertase of the alternative complement pathway. As further studies, kinetics of FX formation was investigated and FX having maximal activity to cleave C3 was obtained by incubation of Ippt with serum for 5-10 min (T max) (Fig.2). These results indicate that Ippt formed with F(ab')₂ fragment of human IgG antibody has the ability to activate the alternative complement pathway.

補体による沈降反応の阻害

洪 卿秀・金光 直美・村上 良子・木下 タロウ・井上 公藏
(阪大・医・細菌)

目的

補体による抗原抗体複合体の可溶化現象は、最初、Nussenzweig 等により解明され、その後、藤田等により、精製された *alternative pathway* の 6 成分によって起こることが明らかになった。この実験 system では、抗原抗体複合物を補体非存在下に作成して、この複合体に対する補体の作用を見ている。我々は、今回、抗原と抗体と補体を同時に反応させた時も同じように可溶化が起こり、又、同じメカニズムで可溶化するのかを検討することを目的として実験を行ない、種々の興味ある結果を得た。

方法

抗原として破傷風トキソイドを用い、フロラシント法によって ^{125}I を標識して使用した。抗体は乾燥抗破傷風ヒト免疫グロブリン(テタノブリン、ミドリ十字)と、ウサギ抗破傷風抗血清を使用した。

補体成分: factor B は、正常ヒト血漿より PMSF 存在下に、12-20% polyethylene-glycol 4000 で沈殿し、溶解後、QAE-Sephadex A-50, CM-Sephadex C-50, Bio-Gel A-1.5M の順に chromatograph して精製し、SDS-PAGE で均一な蛋白であることを確認した。

50°C, 15分熱処理して作成した factor B を欠く血清(RB)の残存B活性は33%, C1活性は91%, C4活性は81%, C2活性は81%, C3活性は83.5%であった。

Classical pathway を阻止し、Alternative pathway だけを活性化するために、MgEGTA を最終濃度が10mMになるように血清に加えて使用した。

沈降反応: 一定量の抗体に変量した抗原(^{125}I で標識)と、ヒトまたはモルモット補体血清を同時に加えて、37°Cで60分反応させた、反応後3000rpm 10分遠心して、沈殿した抗原の量を表した。

可溶化した複合体の分子量の測定: Sepharose CL-2Bカラムを用いて行ない、Blue dextran 2000 を用いて void volume を決定した。

結果

図1に示すように、ヒト血清により破傷風トキソイドとヒト抗破傷風抗体との沈降反応の阻害が見られ、最適比か、または抗体過剰の所で補体による著明な阻害が見られた。

Fig.1 Inhibition of ^{125}I -tetanus toxoid-human anti-tetanus toxoid precipitate by NHS

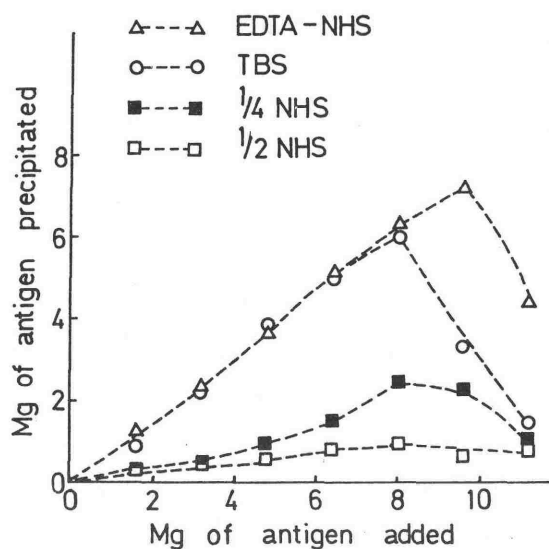
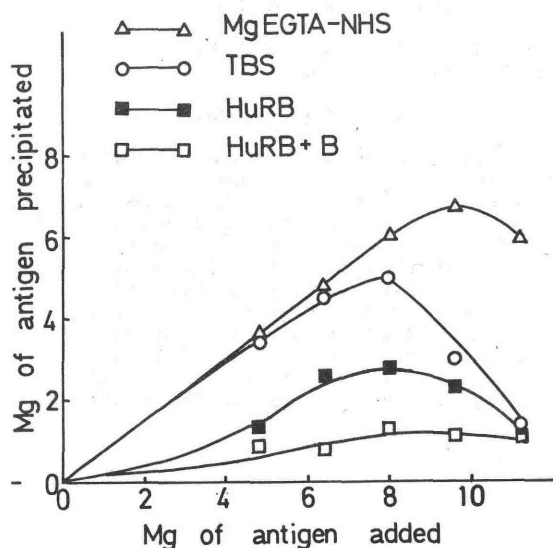


Fig.2 Inhibition of ^{125}I -tetanus toxoid-human anti-tetanus toxoid precipitate by huRB or MgEGTA-NHS



EDTA処理した血清では阻害が見られなかった。

また、この補体の阻害が *classical pathway* によって起こるのか、または、*alternative pathway* によって起こるのか、その両方の *pathway* が必要なのかを調べるために、MgEGTA血清とRB血清を使って調べて見た。

図2に示すようにMgEGTA血清では、沈降反応の阻害が見られず、RB血清では最適比の所では約40%、抗体過剰域では約45-60%の阻害が見られ、さらに精製したfactor Bを加えると、ほとんど完全に沈降反応の阻害が生じた。この結果から、

alternative pathway のみでは阻害は起こらないが、RBにfactor Bを加えると沈降反応の阻害が増大する事から、*alternative pathway* の成分も必要であることがわかった。

次に、補体による沈降反応の阻害が時間的にどのように変化するかを調べて見ると、37℃で、60-120分までは補体の阻害は維持されるけれども、その後の時間的経過に応じて補体の阻害能力が減少し、23時間後には完全に低下し、沈降物が生じた。

さらに、補体血清により可溶化された抗原抗体複合物の分子量を測定するために、Sepharose CL-2Bのカラムを使用して測定した所

void volume に抗原抗体複合体成分がくることが明らかになり、分子量は 4×10^7 以上と考えられる。EDTA 血清、非働化血清存在下では、void volume の所に見られず、沈殿物となっていた。

次に、モルモット血清においても、破傷風トキソイドとヒト抗破傷風抗体の反応を阻害するかを調べてみたが、ヒト血清の場合とは逆に阻害がみこらなかった。しかし、補体結合反応はモルモット、ヒト両補体血清共に同様に起こった。また、ウサギ抗破傷風抗血清を用いた実験でも、ヒト補体血清では阻害が起こるが、モルモット補体血清では起こらなかった。この問題に関しては、現在、追求中である。

考察

補体による抗原抗体複合体の可溶化現象が、*alternative pathway* の 6 成分により起こる事が現在明らかとなっているが、我々が上に示した実験系、すなわち、抗原・抗体・補体を同時に加えて反応させた系では、*alternative pathway* の成分だけでは、沈降反応の阻害は起らず、両方の *pathway* が必要である事がわかったが、*classical pathway* の成分だけでも阻害が生ずるかどうかは、現在、検討中である。また、ヒト補体血清では阻害が生じ、モルモット補体血清は阻害は起らないけれども、共に補体結合反応を起すという現象について、この反応系だけに生ずるものなのか、または、*incompatibility* の問題によるものなのか、さらに追求中である。

INHIBITION OF IMMUNE PRECIPITATION BY COMPLEMENT

KYONGSU HONG, NAOMI KANAMITSU, YOSHIKO MURAKAMI,
TAROH KINOSHITA, and KOZO INOUE

Department of Bacteriology, Osaka University medical School

Precipitin reaction between ^{125}I -labeled tetanus toxoid and human or rabbit antitetanus-toxoid antibodies was inhibited by human complement serum but not by guinea pig complement serum, although the antigen and the antibodies fixed well both human and guinea pig complement. The soluble immune complexes were observed in the supernatant from the complement-inhibited toxoid-antitoxoid reaction mixture, and their size was estimated as more than 4×10^7 daltons by gel filtration through a Sepharose CL-2B column. The inhibition of the precipitation by human complement serum did not occur in the presence of Mg-EGTA. The human complement serum partly deficient in factor B (RB) inhibited the precipitation to a certain extent, and the addition of factor B restored completely the inhibitory activity. When toxoid, complement serum and antitoxoid were incubated further, precipitation occurred gradually, perhaps as the complement activity was lost.

Selective Complete Deficiency of Clq in a Patient with Lupus Erythematosus-like Syndrome

Hiroshi Nishino*, Kazuhiko Shibuya**, Yoshihiko Nishida*, Mitsunori Mushimoto** and Masaaki Kosaka*

* First Department of Internal Medicine, School of Medicine, University of Tokushima

** Department of Internal Medicine, Matsuyama Red Cross Hospital

A 37-year-old Japanese man in previously good health was hospitalized because of swelling of the auricles and discoid erythema of the face. Clinical and laboratory findings satisfied the diagnostic criteria for systemic lupus erythematosus proposed by the American Rheumatism Association. However, serologic studies showed weakly positive antinuclear factor and absence of anti-DNA antibody and lupus erythematosus cells.

Total classical-pathway hemolytic activity(CH50), as measured by a modification of Mayer's method, was completely absent(less than 4 CH50 units). Serum hemolytic complement activity for the alternative pathway, as measured by the method of Nakayama and colleagues, was 26 U/dL (normal control, 21 U/dL), indicating that late components of complement were intact. Serum C3 and C4, as detected by laser nephelometry with monospecific antisera, were 140 mg/dL(normal, 64 to 163 mg/dL) and 29 mg/dL(normal, 20 to 60 mg/dL), respectively. The C1 inhibitor was 89 mg/dL(normal control value, 34 mg/dL) by radial immunodiffusion. The C1s subcomponent of C1, as measured by Laurell's method, was above the control value. Serum C5, C9, and C3 activator were also elevated by radial immunodiffusion. The Clq subcomponent, however, was not detected - that is, less than 1 ug/mL-by usual radial immunodiffusion. Complete deficiency of Clq was confirmed by Ouchterlony's double immunodiffusion and Laurell's method. When concentrated serum was used for radial immunodiffusion, a very low concentration of Clq protein(about 0.4 ug/mL) was detected. Hemolytic complement was reconstituted by addition of highly purified Clq, as prepared by the method of Yonemasu and Stroud. The Clq protein values of the family members were as follows:mother, 113 ug/mL; sister, 150 ug/mL; daughter, 117 ug/mL; and son, 148 ug/mL (normal, 136±25.0 ug/mL). Clq precipitin was not detected by the method of Agnello and associates. The patient's serum was not anticomplementary.

Direct and indirect immunofluorescent staining of the skin failed to show deposits of IgG, IgM, or C3.

C1 欠乏血清を用いた C1 溶血活性測定とその応用

高田由美子、高田明和 浜松医科大学 第二生理

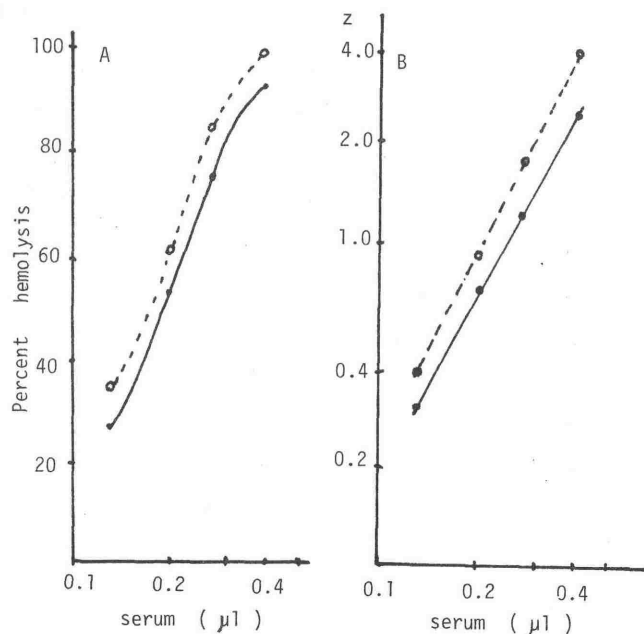
C1 溶血活性は Rapp & Borsos の方法にもとずき EA04 cell に稀釈 C1 を加え、さらに C2 を加えて EA0142 cell を作成し、これに C3-9 を加えて溶血を見る方法が用いられている。最近 Siegel ら (1981) は C1 欠乏血清を用いて C1 溶血活性を測定する方法を開発した。我々はこの方法を modify し、これを C1 活性化抑制物質の検索に用いようと試みた。

方法：C1 欠乏血清のとり方 (Medicus & Chapuis, 1980)：ヒト血清を NPGB の存在下で IgG-セファロースを通した。この Pass-thru を C1 欠乏血清として用い、C1 は 0.4M NaCl を含む VB でさらに溶出すると得られる。

C1 溶血活性の測定：C1 溶血活性は Siegel (1981) の方法によった。 5×10^7 EA/ml を含む溶液の 0.2ml に倍数稀釈した C1 溶液 1.2ml を加えさらに 0.1ml の 4 倍稀釈した C1 欠乏血清を加えた。コントロールとしては C1 欠乏血清のみを加えた。 37°C で 30 分間インキュベートした後に冷却し、遠沈後に上清の OD_{412} を測定した。図 1 が正常血清 2 例の溶血と血清濃度の関係である。

C1 欠乏血清のない時には最低稀釈 (700 倍) で正常血清は溶血を示さなかった。

C1 溶血活性抑制：上記の系の相対的濃度は変化させずに全量を増して assay しやすくした。EA の 63 % を溶血させるような稀釈血清 0.4ml を 0.2ml の inhibitor と混じ、 37°C で 10 分間インキュベートした。この状態における inhibitor の濃度を最終濃度としてあらわす。その後 0.4ml の EA ($5 \times 10^7/\text{ml}$) と 20 倍に稀釈した C1 欠乏血清 1.0ml を加え 37°C で 30 分インキュベートした。 OD_{412} で吸光度を測定した。EA と結合して溶血を開始出来るフリーの C1 の量は



A: % hemolysis vs log serum

B: log z vs log serum

図 1

$$Z = -1 \ln (1 - y)$$

$$y = (\% \text{ 溶血}) / 100$$

と定義される。Inhibitor と稀釈血清をインキュベートした後に残る C1 活性の % は $100Z/Z_0$ として計算され、 Z_0 は inhibitor のない時の稀釈血清による y から計算される。

アミノ酸及びペプチド：アミノ酸は C1q と結合する C1r2 のフラグメントの内 282-292 で C1q との結合に重要とされるリジン (Lys)、アルギニン (Arg)、ヒスチジン (His) と 289-292 のペプチド (tuftsin)、316-340 の内グリシン (Gly)、グルタミン酸 (Glu)、セリン (Ser)、スレオニン (Thr) を用いた。またリジン類似物質としてイブシロンアミノカプロン酸 (EACA)、トラネキサム酸 (t -AMCHA= t -x) を用いた。

結果

(1) 種々アミノ酸の C1 溶血抑制作用

図 2 に示すように C1 溶血活性抑制作用は Lys、Arg が最も抑制が強く、次いで Glu であった。His、Gly もやゝ抑制があったが、Thr、Ser はほとんど作用がなかった。一方 Lukas らの主張する tuftsin は 50 % 抑制が 2mM 位で Lys の 50 % 抑制が 3mM にくらべて特に抑制が強いとは云えなかった。

(2) リジン類似物質の C1 溶血抑制と低イオン強度における C1 活性化抑制

EACA、 t -x 共に ϵ -アミノ酸である。これは低イオン強度における C1 活性化に対しては $\text{Lys} > \text{EACA} > t\text{-x}$ であるのに C1 溶血に対しては $\text{Lys} > t\text{-x} \geq \text{EACA}$ であった。また既に活性化された C1 (C1s) に対してはいずれも全く抑制作用はなく、これらの効果は C1 活性化に対する作用であることがわかる。

考察

C1 は C1q が IgG の C1r2 と結合することより活性化される。この活性化の過程は次の 4 つにわけられる。(1) C1q と C1r2 との結合、

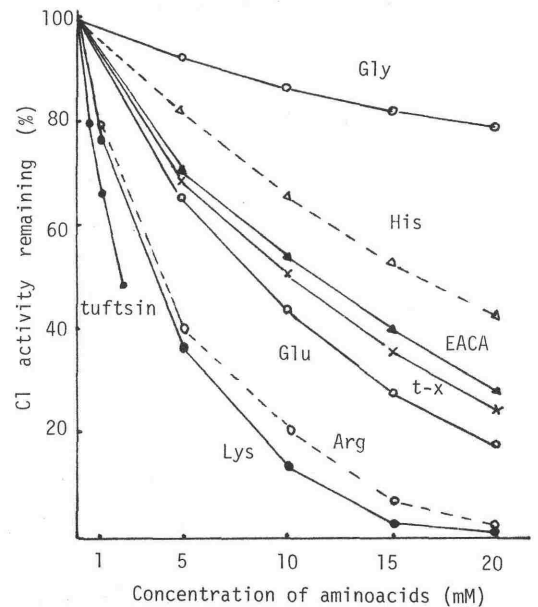


図 2

表 1

Effects of ω -aminoacids on the activation of C1

	C1 hemolysis		At low i.s.		C1s
	10 mM	20 mM	30 mM	60 mM	60 mM
	%	%	%	%	%
Lys	86.6	100.0	69.8	97.0	2.0
Arg	78.9	98.1	23.2	80.9	0
EACA	45.0	71.8	3.5	20.5	1.5
t-AMCHA	48.7	75.7	2.3	11.4	2.0

Complete inhibition was taken as 100 %.

(2) C1q の構造変化、(3) C1r の限定分解による C1 $\bar{r}$ の形成、(4) C1 $\bar{r}$ による C1s の限定分解、である。今回他の報告にも示したように C γ 2 のペプチドの中でリジンは C1q との結合に最も大切と考えられている。Lukas らは C1 溶血活性の抑制からみて、C γ 2 のペプチドの内 282-292 が C1q との結合部位と主張している。我々は Siegel らにより開発された C1 欠乏血清を用いた C1 溶血活性測定法を用いて図 2 に示すように Lys が種々アミノ酸のうちでは最も C1q と EA の結合を阻害することを示した。また C1 溶血の 50 % 抑制を比較すると 289-292 の tuftsin は 2mM で Lys の 3mM 位とくらべ特に抑制作用がつよいとも考えられなかった。

一方 C1 は低イオン強度で活性化されるが、これは C1q が低イオン強度で立体構造を変化する故と考えられる。Lys は低イオン強度で C1q の構造変化を抑制するがこの類似物質である。アミノ酸を比較すると、Lys > EACA > t-x の順である。興味深いことに t-x は低イオン強度における C1 活性化にはほとんど作用がないが C1q と EA の結合は阻害する (表 1)。これは C1q と agg-IgG を用いた実験でも同様に t-x は C1q と agg-IgG の反応を阻害した。このことは C1q と C γ 2 との反応と C1q の立体構造を分離して測定しうる可能性を示す。即ち EACA や t-x は C1q と結合して agg-IgG と C1q との結合を阻害出来るが C1q の立体構造の変化の抑制はあまり強くない。

結 論

- (1) C1 欠乏血清を用いた C1 溶血活性測定法により C1q と C γ 2 (C μ 4) との反応を阻害する物質の研究が可能である。
- (2) アミノ酸のうちでは Lys と Arg が最も抑制作用がつよく、Glu がこれにつぐ。Gly、His の作用はよわい。
- (3) EACA や t-AMCHA は C1q と C γ 2 との結合はよく抑制するが、低イオン強度における C1 の活性化阻害は少ない。

Summary

C1 hemolysis in use of C1 depleted serum could be used to screen substances to inhibit the binding of C1q with C γ 2 of IgG. Lysine and arginine were most effective in inhibition. EACA or tranexamic acid was effective in inhibition of the binding of C1q with C γ 2 but not so much on the activation of C1 at low ionic strength.

BINDING OF PLASMA FIBRONECTIN TO Clq

Kono I, Sakurai T, Fujita T* and Tamura N*

Department of Internal Medicine, Institute of Clinical Medicine,
and* Department of Immunology, Institute of Basic Medical Sciences,
The University of Tsukuba.

INTRODUCTION

Fibronectin, a high molecular weight glycoprotein, is found in cells, connective tissues, and plasma. The plasma fibronectin is composed of two subunits of 220,000 dalton which are held together by one or two disulfide bonds. Specific binding of fibronectin to fibrin, cells, and proteoglycan is primary characteristics of this protein. It also has a high affinity for collagen, and has been demonstrated to have a specific collagen-binding site (1).

On the other hand, Clq which has been known to interact with immune complexes, has an unusual macromolecular structure. Approximately 40% of the molecule is collagen-like in the amino acid sequence and the structure (2). Therefore, we examined the possibility that a collagen-binding site of fibronectin had an affinity for a collagen-like portion of Clq.

MATERIALS AND METHODS

Purification of fibronectin Plasma fibronectin was purified by the methods described by Engvall et al. using a gelatin-Sepharose (3). ACD-plasma was applied to the gelatin-Sepharose column, and fibronectin was eluted with 4 M urea in 50 mM Tris buffer, pH 7.5. Phenylmethylsulphonylfluoride (10^{-4} M) was added to all buffers.

Purification of Clq Clq was purified by the methods of Tenner et al. (4). In brief, fresh serum was applied to a Bio-Rex 70 column equilibrated with 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.3, containing 82 mM NaCl and 2 mM EDTA. After washing, the column was eluted with NaCl gradient. Fractions containing Clq were further purified by gel filtration.

Binding assay The binding of fibronectin to Clq was assessed using enzyme-linked immunosorbent assay in microtiter wells coated with 5 μ g/ml of Clq. Fibronectin diluted in 50 mM Tris buffer, pH 7.5, containing 100 mM NaCl and 20 mM CaCl_2 was incubated in coated wells for 90 min at 37°C. After vigorous washing, bound fibronectin was quantitated by incubation with peroxidase-labelled antibody to fibronectin for 90 min at 37°C. After washing again, o-phenyldiamine was added to the wells as enzyme substrate and the mixture was further incubated for 30 min at 37°C. The enzyme reactions were stopped with 4 N H_2SO_4 , and the absorbance at 492 nm was measured.

To determine the effect of divalent cations, various amounts of Ca^{++} or Mg^{++} were added to a 50 mM Tris buffer, pH 7.5, containing 100 mM NaCl. In addition, to determine the effect of ionic strength, various amounts of NaCl was added to a 50 mM Tris buffer, pH 7.5.

To investigate the specificity of binding of fibronectin to Clq, decreasing amounts of IgG antibody to Clq was incubated with a constant amount of coated

Clq for 90 min at 37°C before binding assay.

RESULTS

Binding of fibronectin to Clq Fibronectin was found to bind to wells coated with Clq in a dose-dependent fashion but not to wells coated with bovine serum albumin (Figure 1). The binding of fibronectin to wells coated with Clq was increased when Clq was heat-denatured.

Effect of divalent cations Figure 2 illustrates the effect of divalent cations, Ca^{++} and Mg^{++} , on the binding of fibronectin to wells coated with Clq. The binding was enhanced by Ca^{++} but not Mg^{++} .

Effect of ionic strength The binding of fibronectin to wells coated with Clq was markedly dependent on ionic strength, as indicated in Figure 3. As the ionic strength was increased, the binding was decreased.

Blocking of binding of fibronectin to Clq The binding of fibronectin to wells coated with Clq was blocked by Ig G antibody to Clq (Figure 4). Normal rabbit Ig G did not block the binding.

DISCUSSIONS

The results show that fibronectin binds to Clq. The binding of fibronectin to Clq is enhanced by Ca^{++} and low ionic strength. Fibronectin is found to bind not only to native Clq but also to heat-denatured Clq. These results are consistent with the report of Menzel et al. that fibronectin interacts with a collagen-like fragment of Clq (5).

It might be difficult to assign biological significance to the binding of fibronectin to Clq because very little free Clq is present in normal serum. However, recent evidence indicates that Clr and Cls are rapidly dissociated from Clq by Cl INH when Cl was activated in normal serum, exposing Clq alone bound to the activator such as immune complexes (6). Therefore, the binding of fibronectin to Clq could be biologically important in events involving the activation of Cl.

SUMMARY

Fibronectin, a high molecular weight glycoprotein, has been demonstrated to have a specific collagen-binding site, and Clq has been shown to have a collagen-like portion. We evaluated the binding of fibronectin to Clq using enzyme-linked immunosorbent assay. Fibronectin was found to bind to Clq. The binding was dependent on Ca^{++} and ionic strength and was increased when Clq was heatdenatured. This binding could be of biological importance in events involving Clq, since Clr and Cls are rapidly dissociated from Clq on Cl activation exposing Clq bound to the activator.

REFERENCES

1. Balian G et al. J. Biol. Chem. 254:1429-1432, 1979
2. Porter RR et al. Nature 275:699-704, 1978
3. Engvall E et al. Int. J. Cancer 20:1-5, 1977
4. Tenner AJ et al. J. Immunol. 127:648-653, 1981
5. Menzel EJ et al. FEBS Letters 129:188-192, 1981
6. Ziccardi RJ et al. J. Immunol. 123:788-792, 1979

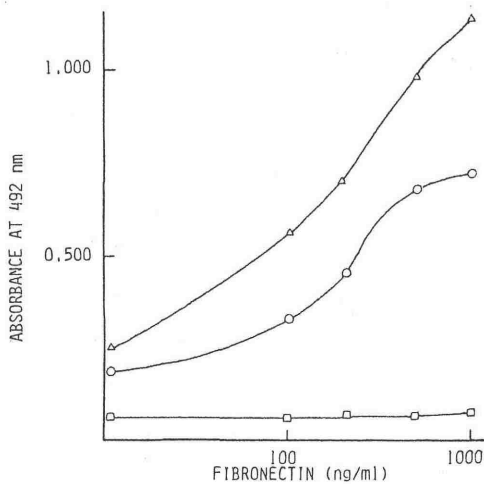


Figure 1. Binding of fibronectin to wells coated with Clq (o), heat-denatured Clq (Δ) and BSA (□)

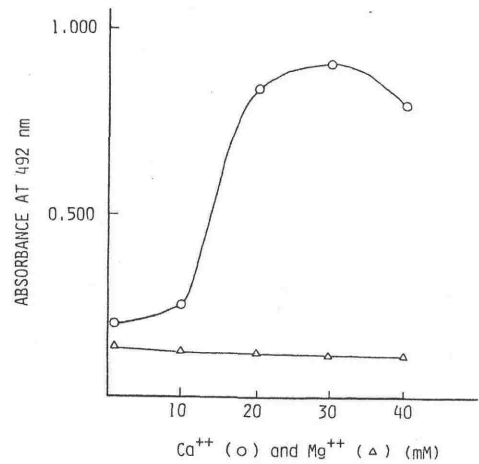


Figure 2. Effect of divalent cations

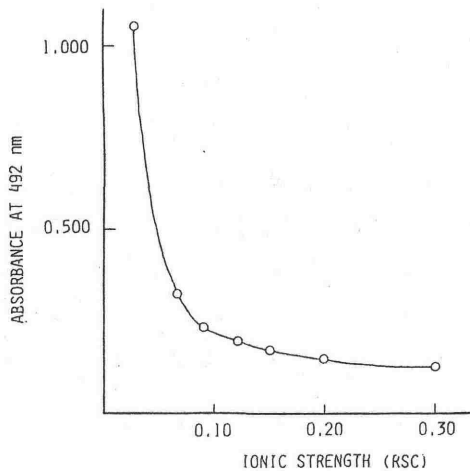


Figure 3. Effect of ionic strength

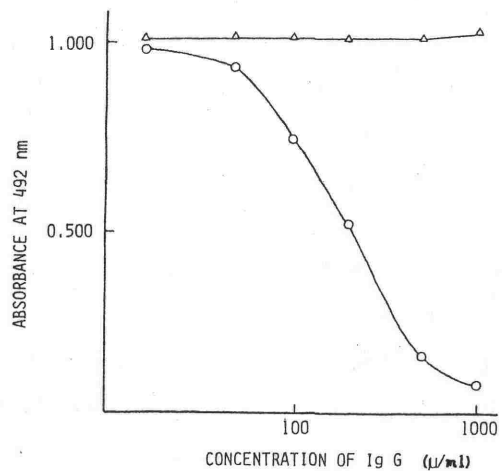


Figure 4. Blocking of binding of fibronectin to Clq by IgG antibody to Clq (o) and normal rabbit IgG (Δ)

マウス IgG 1 の C1 結合能について

岡田真理子・高橋和郎・内海爽

愛媛大学医学部細菌学教室

マウス IgG 1 は Nussenzweig⁽¹⁾ らの報告以来、補体非結合性としていたが、最近 Ey⁽²⁾ らによってマウス IgG 1 には補体結合性と非結合性の2つの subclass が存在するという、マウス H 鎖遺伝子の研究結果とは矛盾する報告がなされた。我々は2種の抗 DNP モノクローナル IgG 1 抗体と、血清 IgG 1 抗体について、それらの補体 C1 結合能を種々の条件下で検討し、はたして IgG 1 に subclass が存在するのか、あるいは IgG 1 の性質が他の補体結合性とする IgG と比べて差があるのかを調べた。

〈材料・方法〉

Balb/c 抗 TNP 産生細胞と SP2/O-AG14 細胞のハイブリドーマ IgG 1 産生株 A3 と、東大医・免疫学教室より分与された IgG 1 産生株 D03-2G6 を用い、培養上清又は腹水から、抗体を DNP-AE-Sepharose を用いて特異的に精製、更に Protein A-Sepharose のアフィニティークロマトグラフィーにより IgG 1 として精製した。プール免疫血清よりの IgG 1 抗体も同様に精製した。TNP-SRBC は Borate buffered saline (pH 8.5) に浮遊した SRBC ($4 \times 10^8/\text{ml}$) 1 容に 同一緩衝液中に溶解した TNBS ($200 \mu\text{g}/\text{ml}$) または ($20 \mu\text{g}/\text{ml}$) を 1 容加え 37°C, 8 分間反応させて、前者を高エピトープ密度、後者を低エピトープ密度の血球として調製した。各種 C1 は新鮮血清からウサギ IgG-Sepharose を用いて分離した。溶血反応に用いる補体として GVB⁺⁺ ($\mu = 0.15$) 又は S-GVB⁺⁺ ($\mu = 0.065$) に希釈した大過剰の C1 と C2 以下の成分として 3.2 mM Mg EDTA-VBS で 1/5 に希釈したモルモット新鮮血清を用いた。IgG と C1 の親和性は、EA _{μ} (ウサギ IgM ヘモリジンで至適感作した SRBC) と C1 との反応系に検体 IgG モノマーの変量を加え、EA _{μ} C1 site 形成阻害活性で測定した。C1-fixation and transfer test は Borsos らの方法に従った。

〈結果〉

抗体の TNP-SRBC に対する hemolysin 活性を調べる際、C1 との反応を イオン強度 $\mu = 0.15$ と $\mu = 0.065$ の二種類の条件で行った。高エピトープ密度の TNP-SRBC では 全ての IgG 1 抗体について、 $\mu = 0.15$, $\mu = 0.065$ の両イオン強度で hemolysin 活性は陽性であった (Fig 1)。

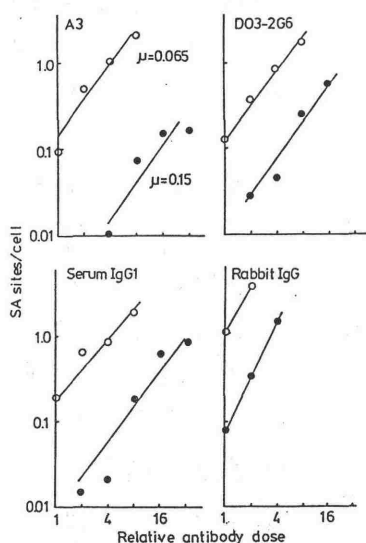


Fig.1. Hemolytic dose-response curves of anti-TNP IgGs on high epitope-TNP-SRBC

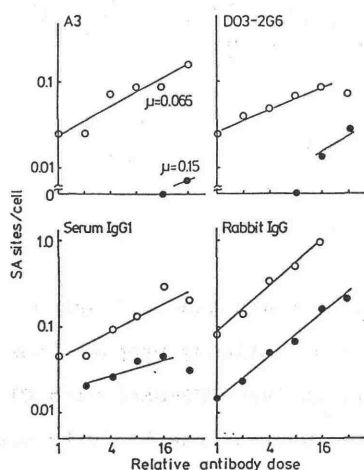


Fig2. Hemolytic dose response curves of anti-TNP IgGs on low epitope-TNP-SRBC

尚、D03-2G6 は平山らにより C1 非結合性とした株由来である。

エピトープ密度の低い TNP-SRBC では IgG1 抗体は $\mu=0.065$ ではある程度の溶血活性を示したが、抗体量を増加しても形成される SA site 数は プラトーに達する傾向がみられた。(Fig. 2) 特に $\mu=0.15$ では IgG1 抗体の溶血活性は著しく低かった ($Z < 0.05$)。ウサギ IgG 抗体は低エピトープ密度の TNP-SRBC に対しては高密度 TNP-SRBC に対してと同様にイオン強度にかかわらず dose-dependent なヘモリジン活性を示した。

更にマウス IgG1 の C1 との親和性を調べるために次の二つの実験を行った。まず IgG モノマーによる EAC1 と C1 による EAC1 site 形成阻害を $\mu=0.15$ と $\mu=0.093$ で調べた。50% 阻害を示す IgG 濃度の逆数が溶液中での C1 と IgG との親和力を表す目安となるが、ウサギ IgG の場合は $\mu=0.15$ では $\mu=0.093$ の約 40% に低下する(モルモット C1, マウス C1 と同)が、マウス IgG1 の場合、イオン強度による親和の低下は著しく $\mu=0.15$ では $\mu=0.093$ の数%という値を得た。

次に至適条件でマウス IgG1 抗体で感作した TNP-SRBC ($^{TNP}EA_{IgG1}$) による C1

fixation と、 $EA_{\mu C4}$ への C1 transfer を測定した。コントロールとして用いたウサギ IgG 抗体で感作した TNP-SRBC と同様、加えた C1 に応じて C1 fixation を示したが、 $EA_{\mu C4}$ への transfer は後者に比べて高く、 $^{TNP}EA_{IgG1}$ からは極めて容易に C1 が解離することがわかった。両者で結合 C1 量に差がないことは 0.5M NaCl-VB で処理すると同程度の C1 が溶出されることから確認した。

<考察>

限られた標品数ではあるが、調べた限りにおいてマウス IgG1 に C1 結

合性に関する不均一性は認められず、そのC1親和性のイオン強度感受性の高さに不均一性が認められた。IgG1抗体がエピトープ密度の低い標的上では生理的条件下で有効に補体を活性化できないことが従来の知見に混乱を生じさせた原因であろう。

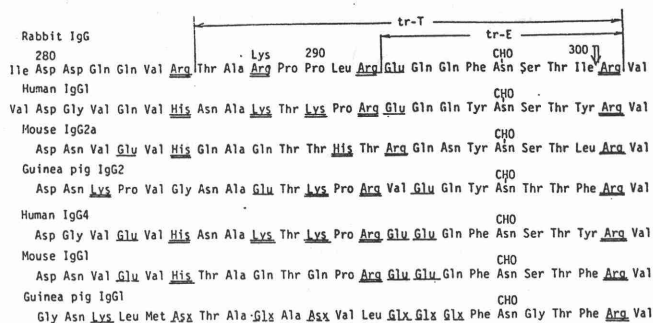


Fig. 3 推定C1結合部位

一方、我々は C1 結合領域を Fig. 3 の様に推定してきたが、以上の成績は、IgG-C1 相互作用がイオン結合を主体とするものであり、かつ、複数の塩基性残基の共同に帰因することを強く示唆する。従来から補体結合性

とされてきたIgG1は、アミノ酸残基(280)-(300)までの間に、塩基性残基は3~4個存在するが、いかなる条件でも補体を結合しないモルモットIgG1は1個しかない。マウスIgG1はそれが2個でウサギIgGなどに比べてC1親和性が低いという結論とよく一致する。

〈文献〉

- (1) Nussenzweig, R. S., C, Merryman, & B, Benacerraf
J. Exp. Med. (1964) 120 315-328
- (2) Ey, P, L., G, J, Russell-Jones, & C, R, Jenkin
Molecular Immunol. (1980) 17 699-710

Summary

Ability of mouse IgG1 to fix complement was examined using two monoclonal and one serum IgG1 anti-TNP antibody preparations. All of these preparations were able to lyse TNP-SRBC with C1 and C-Mg EDTA at low ionic strength, whereas the activity was diminished at the physiological ionic strength. The ability of IgG1 antibody to bind C1 in solution, as assayed by the inhibition of EAC1 formation, was also demonstrable only at low ionic strength. It was also found that TNP-SRBC sensitized with IgG1 antibody could bind as much C1 as cells sensitized with rabbit IgG antibody, but C1 fixed on the former cells was transferred to EA₁C4 more easily than that fixed on the latter cells. The results indicate that, although the affinity of IgG1 antibody for C1 is low and extremely labile to salts, the mouse IgG1 subclass is functionally homogenous.

ヒト補体第1成分C1rの活性化機構の研究 ——活性化中間体の生成——

笠原義典, 高橋和彦, 長沢滋治, 小山次郎
(北大, 薬学部, 衛生化学)

(目的)

補体第1成分C1に抗原抗体結合物がC1qを介して結合すると, 1本のポリペプチド鎖から成る酵素前駆体C1rが限定水解をうけ, 2本のポリペプチド鎖構造をもつ活性型C1rへと変換する。C1qにはプロテアーゼ活性がないことから, C1rがどのような機構で限定水解をうけC1rへと活性化するかは, いまだ明らかではなく興味ある問題点である。一方, C1rの活性化に際し, 活性部位を露出した中間体がコンホメーション変化を伴って生成すると想定されている(1, 2)が, この様な中間体の存在を直接証明した報告はない。そこで今回, 我々はC1rの自発的活性化反応におけるC1r分子のコンホメーション変化を, 蛍光性疎水領域探索試薬; MBD[7-(p-methoxybenzylamino)-4-nitrobenzoxadiazole]を用いる方法(3)と, 放射性ヨウ素標識法により, 経時的に追跡した。その結果, 自発的活性化の初期に1本鎖構造を保っているが, C1rと異なったコンホメーションをもつ分子種が生成することを見出したので以下に報告する。

(実験方法)

C1rはヒト血清を出発材料に, IgG-Sepharose, DEAE cellulose DE-52, Sephadex G-200, の3段階操作で精製した。C1rは既報(4)の方法により精製した。C1r→C1rへの変換率の定量は, 試料を還元後, SDS-PAGEを行ないcoomassie brilliant blue染色量をクロマトスキャナーにより測定し行なった。

蛍光スペクトルの測定 MBD(4 μ M)と, C1r, C1r(40 μ g/ml)との反応はトリス塩酸緩衝液, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 中で行ない, 励起波長490 nmにおける500-600 nmの蛍光スペクトルを測定した。

放射性ヨウ素標識法 C1rの¹²⁵I標識はIodogen法により行なった。標識後, 37℃で自発的に活性化させ, 還元後SDS-Disc-PAGEを行ない, H鎖に標識された比率(H鎖cpm/H鎖cpm+L鎖cpm)を求めた。

(結果)

蛍光性疎水領域探索試薬によるClrのコンホメーション変化の解析

ClrにMBDを作用させると、MBD単独と比較して著しく蛍光強度が増大し、極大波長も約20nm短波長側へ移動した(図1)。一方CTrの場合はこのような変化は見られなかった。このことは、Clr分子上にCTrにはないMBDと結合する疎水性領域が存在することを示唆している。この方法で、ClrをpH7.4、37℃で反応させた場合のコンホメーション変化を経時的に追跡しClr→CTrの変換反応と比較した(図2)。CTrの生成量はシグモイド曲線を描いて増大し、自己触媒的反応であることを示している(5)。他方、MBDとの結合による蛍光強度は反応初期にすみやかに減少し、以後変化しなかった。これらの結果は、CTrが生成していない反応初期にClrと異なるコンホメーションをもつ活性化中間体が生成していることを強く示唆している。Clrを37℃で反応し、ただちに0℃に冷却した後MBDとの結合による蛍光強度を測定すると、反応初期では蛍光強度の回復が見られたが、10分以上の反応時間では見られなかった。

従ってこの中間体の生成反応は、温度に依存した可逆的反応であることが明らかとなった。

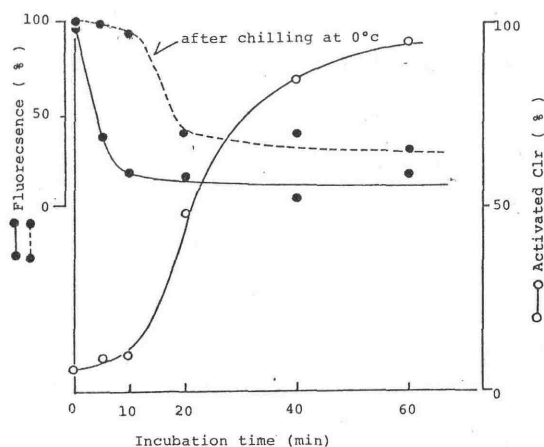
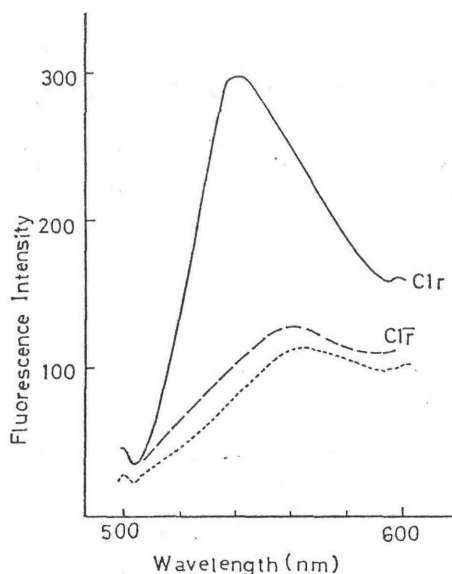


図1, MBDの蛍光スペクトル

図2, MBDの蛍光強度の経時変化

放射性ヨウ素標識法によるClrのコンホメーション変化の解析

Clr, CTrのH鎖への標識率は、それぞれ58%, 40%で、両者のコンホメーションの違いを反映していると思われ、Chloramin T法を用いたBauerらの報告(6)とよく似た傾向を示している。この方法を用いClr→CTrへの自発的活性化反応を経時的に追跡したところ、H鎖への標識率は反応開始直後、約75%にまで増大し以後減少した(図3)。このこと

は、反応初期に C_{Ir} や C_{Tr} と異なるコンホメーションをもつ分子種が生成していることを示唆しており、MBDを用いてコンホメーション変化を解析した結果と一致している。

(考察)

以上より C_{Ir} が C_{Tr} へ活性化する過程に、活性化中間体(以下 C_{Tr} と呼ぶ)の生成することが明らかとなった。

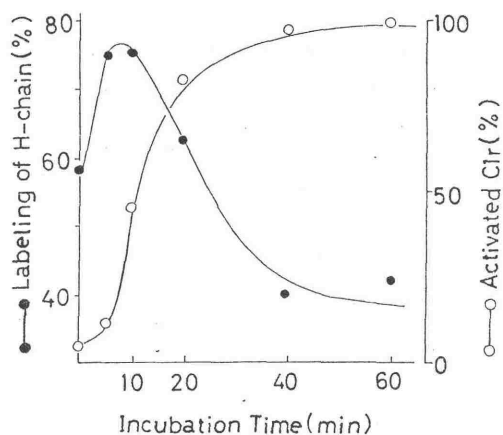
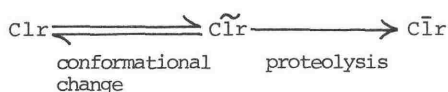


図3, H鎖標識率の経時変化

C_{Tr} は C_{Ir} と異なるコンホメーションをもち、1本鎖でありながら弱いプロテアーゼ活性を有しており C_{Tr} を限定水解し、生じた C_{Tr} は更に C_{Tr} を活性化すると考えられる。このような2段階反応は、シグモイド型の活性化曲線を描く自己触媒的反応をよく説明することができる。しかし、 C_{Tr} にプロテアーゼ活性があるか否かは、現在明らかではない。 C_{Tr} や種々の阻害剤を添加したときの活性化反応について速度論的な解析を進めつつあり、この中間体 C_{Tr} の性質を明らかにしたいと考えている。

References (1) Dodds, A.W., Sim, R.B., Porter, R.R. & Kerr, M.A. (1978) *Biochem. J.*, 175, 383 (2) Arlaud, G.J., Villiers, C.L., Chesne, S. & Colomb, M.G. (1980) *Biochim. Biophys. Acta*, 616, 116 (3) Kenner, R.A. & Aboderin, A.A. (1971) *Biochemistry*, 10, 4433 (4) Takahashi, K., Nagasawa, S. & Koyama, J. (1975) *FEBS lett.*, 55, 156 (5) Takahashi, K., Nagasawa, S. & Koyama, J. (1976) *FEBS lett.*, 65, 20 (6) Bauer, J. & Valet, G. (1981) *Biochim. Biophys. Acta*, 670, 133

The mechanism of autoactivation of Clr. Kasahara, Y., Takahashi, K., Nagasawa, S. & Koyama, J. Fac. Pharm. Sci., Hokkaido Univ., Sapporo.

The addition of Clr to a fluorescent hydrophobic probe, 7-(p-methoxybenzylamino)-4-nitrobenzadiazole (MBD), was found to induce a marked increase of a fluorescent intensity of MBD, while $\bar{\text{C}}\text{lr}$ failed to induce any significant change in the fluorescent spectrum of MBD. These results suggested that a hydrophobic area able to bind with MBD in Clr becomes disrupted upon proteolytic activation. Then, we investigated a conformational change occurring during autoactivation of Clr by using MBD and by radio-labeling method.

Upon incubating of Clr at 37°C, proteolytic activation of Clr proceeded showing a sigmoidal curve with a lag-phase of 10 min. On the contrary, a conformational change, as judged by MBD-binding assay, rapidly occurred without any lag-phase and reached its plateau during the first 10 min of activation. These results suggests that a novel form of Clr, which is a single chain but is devoid of a MBD-binding hydrophobic area, is produced as an intermediate of autoactivation of Clr. The conformational change to produce an intermediate was reversible and the MBD-binding hydrophobic area was fully refolded upon chilling at 0°C.

Formation of a conformationally altered Clr, $\tilde{\text{C}}\text{lr}$, was supported by investigation with radio-labeling method. Approx. 60% of the label was found in the H-chain, if Clr was labeled with ^{125}I and activated. When $\bar{\text{C}}\text{lr}$ was labeled, the label in the H-chain was found to decrease to 40%. On the contrary, the label in the H-chain was found to increase to 75% when radio-labeling was performed after Clr had been incubated for 10 min at 37 °C.

Based on these evidence, it was proposed that autoactivation of Clr is a two-step reaction; the first rapid conformational change to produce an intermediate $\tilde{\text{C}}\text{lr}$ and the subsequent limited proteolysis of $\tilde{\text{C}}\text{lr}$ to generate a two-chain activated $\bar{\text{C}}\text{lr}$.

ヒト補体第一成分 C1 の活性化

新延道夫、上野佳彦、藤井節郎

大阪大学蛋白質研究所機能制御部門

補体反応における Classical pathway の活性化機構については多くの研究がなされているのにもかかわらず、まだ不明な点が多い。とくに、単離した C1r は 37°C、インキュベーションすることにより自己触媒的に活性化されることが認められているが、常に 37°C の条件下である血中では、いかなる機構により活性化が抑制されているのか興味深い。我々は、この抑制機構について検討しているが、昨年の本シンポジウムでは、EDTA 及び C1 $\bar{I}$ インヒビターの抗体で処理したヒト血清の遠心後の上清をインキュベーションすることにより、上清に含まれる C1r 及び C1s が活性化されること、また、単離した C1r の 37°C、インキュベーションによる活性化が C1 $\bar{I}$ インヒビターの共存下抑制されることより、C1 $\bar{I}$ インヒビターが血中における C1 の自己触媒的活性化の抑制因子として最も重要であることを報告した。

今回は、単離精製した各成分による再構成 C1 の 37°C、インキュベーションあるいは aggregated IgG による活性化に対する C1 $\bar{I}$ インヒビターの抑制効果について検討を加えた。

Clq, C1r 及び C1s の精製は Gigli らの方法に基づき、ヒト血清の euglobulin 画分について、CaCl₂ 存在下、セファロース 6 B によるゲルろ過を行ない、C1 complex として得た後、EDTA 存在下、CM-セファデックスを用いて各成分を単離した。Clq については、さらに BioRex70 を用い、C1r 及び C1s については BioGel A1.5m を用いて精製を行なった。C1 $\bar{I}$ インヒビターはヒト血清の 12% ポリエチレングリコール分画上清について、DEAE-セルロース、Con A セファロース、セファデックス G-150 及びヘパリンセファロースを用いて精製した。aggregated IgG はヒト IgG を 63°C、10 分加熱し遠心した上清を用いた。

まず、再構成系 C1 の活性化の条件について検討を加えた。Clq, C1r, C1s のモル比を等モルから Clq を希釈することによって 1:8:8 までとし、37°C、インキュベーションによる活性化を Ac-Gly-Lys- α -naphthylester を基質として調べたところ、1:2:2 のモル比で最も強い活性化が認められた。また、C1r 単独あるいは C1r-C1s complex の場合よりも Clq 共存下においてより強い活

性化が見られた。 つぎに、1:2:2のモル比の条件にて、aggregated IgG 添加及び非添加の系で、37°C インキュベーションによる再構成 C1 の活性化に対する C1 $\bar{I}$ インヒビターの影響を SDS 電気泳動により調べてみた。 その結果、aggregated IgG 非添加の系では C1r に対して2倍モル量の C1 $\bar{I}$ インヒビターの共存下で C1 の活性化が完全に抑制された。 一方、aggregated IgG 添加の系では C1 $\bar{I}$ インヒビターによる抑制効果が認められなかった。

昨年の本シンポジウムでは、C1r の37°C、インキュベーションによる活性化が約7倍モル量の C1 $\bar{I}$ インヒビターの共存下で抑制されることを報告したが、今回の再構成 C1 complex の場合は2倍モル量で完全に抑制されることが認められた。 この相違については明らかではないが、一つの可能性としてはフリーの C1r と complex 形成時の C1r の conformation の変化に起因することが考えられる。 また、aggregated IgG 共存下では、C1 $\bar{I}$ インヒビターによる抑制効果が認められなかったが、これは aggregated IgG が C1q 及びそれに付随して C1r の conformation を変え、C1r が極めて活性化されやすい状態になるためなのか、あるいは aggregated IgG が C1q に結合することにより、プロ体としての C1r と C1 $\bar{I}$ インヒビターとの interaction が何らかの原因で消失することによるのか、あるいは、他の機序によるものなのか、現在検討中である。

Activation of C1, the First Component of Human Complement

Activation mechanism of the classical pathway is unclear. Especially, although the isolated C1r is activated spontaneously with an incubation at 37°C, it is unknown why spontaneous activation of C1 complex in blood which is under the condition at always 37°C don't occur.

In this symposium of the last year, we presented the significant role of C1 inhibitor in the suppression mechanism of the spontaneous activation of C1 complex in blood from the results as follows ; Ac-Gly-Lys- α -naphthylester hydrolytic activities of C1r and C1s in the supernatant after centrifugation of the serum treated with EDTA and anti-C1 inhibitor-IgG increased with an preincubation at 37°C, and also activation with an incubation at 37°C of the isolated C1r was suppressed by C1 inhibitor.

In this symposium, we will present on the effect of C1 inhibitor to the activation with an incubation at 37°C of the reconstituted C1 complex in the presence or absence of aggregated IgG.

21

アミノ酸及び類似物質による C1 活性化抑制

高田明和、高田由美子 浜松医科大学 第二生理

我々は従前から種々物質の補体抑制作用を研究して来た。アミノ酸及び類似物質のうちではリジン (Lys)、アルギニン (Arg) が最もよく C1 活性化を抑制した。最近 Burton らは IgG の Cγ2 の domain の内 316-340 迄が C1q との結合部位であると報告し、この内でもリジン残基を修飾すると Cγ2 と C1q の反応は抑制されると述べている。一方 Lukas らは Cγ2 のペプチドの内 282-292 が結合部位であり Lys、Arg、ヒスチジン (His) が重要であるとしている。我々は今回これらのアミノ酸の C1 活性化に対する作用をしらべた。

方法：C1 のとり方：血漿を稀釈し pH5.5 で沈澱させ、沈渣を RSC=0.3 のバッファーにとかすか、pH7.4 で稀釈し遠沈後沈渣を溶解して用いた。前者は不活性の C1 を、後者は活性の C1 を与える。

CH50 の抑制：0.5ml の稀釈血清と 0.5ml の抑制物質 (Lys 等) を混じ、10 分間インキュベートし、EA を加えて 60 分インキュベート後、溶血をしらべた。

C1(5.5) と aggregated IgG の反応：pH5.5 で得た C1(5.5) は aggregated IgG を加えると活性化され、C1s が出来る。これを ATHe の水解で測定する。

Aggregated IgG による補体消費の抑制：0.05ml の血清、0.1ml の抑制物質、0.05ml の aggregated IgG を混じ、30 分 37°C でインキュベートし、これを稀釈して溶血の系に加え、CH50 を測定した。

アミノ酸：C1q との結合に関与すると云われているアミノ酸及びその類似物質を用いた。

結果：(1) 低イオン強度における C1 活性化抑制

C1(5.5) を種々の RSC の溶液に溶解してインキュベートすると $RSC \leq 0.2$ では完全に活性化されるが、 $RSC \geq 0.3$ ではほとんど活性化されない。アミノ酸の中では 60mM の Lys が $RSC=0.2$ における C1 の活性化をほぼ完全に抑制した。 $RSC=0.1$ では C1 の活性化を抑制するアミノ酸はなかった。

(2) CH50 の抑制

種々アミノ酸を溶血系に加えて CH50 を測定すると Lys、Arg は共に 50mM で約 50 % 抑制するが、他のアミノ酸はいずれも 20 % 以下の抑制しか示さなかった。

(3) Aggregated IgG による C1 活性化抑制

C1(5.5) を $RSC=0.3$ の溶液に溶解すると C1 は自発的には活性化されない。この時 aggregated IgG を加えると C1 は活性化されて来るので、これに対

する抑制をしらべた(図1)。

Lys が最も抑制し、Arg がこれに次いだ。またω-アミノ酸をしらべると EACA より t-AMCHA (t-X) の方が抑制作用が強く、t-X は 14mM で 50 % 抑制する。グルタミン酸 (Glu)、グリシン (Gly) はほとんど作用がなかった。

(4) Aggregated IgG による補体消費の抑制

Aggregated IgG を正常血清に加えると C1 が活性化され補体が消費されるので第2段階の EA の溶解がおこらない。抑制物が C1 活性化を阻止すれば溶血がおこる。図2に示すように 2mg の aggregated IgG を 1ml の血清に加えると補体活性は 100 % 失われる。Lys は 50 mM の濃度で補体消費を 50 % 抑制する。

(5) Crossed-Immunoelectrophoresis による C1 活性化の検討

血清に aggregated IgG を加えて二次元の免疫電気泳動を行うと $C1s \rightarrow C1\bar{s}$ 転換を見ることが出来る。図3Aは正常 EDTA 血漿の泳動図で純化の $C1s-C1\bar{s}$ の混液と比較すると $C1s$ の部に2つの峰がある。血清に Lys を加え aggregated IgG を加えインキュベート後に EDTA を混じ泳動しても泳動像に変化はない(図3C)。

Lys を加えないと峰が陽極側に大きくずれる。抗体として抗 $C1INA$ を用いて $C1INA$ の泳動像をしらべると3Eの如くになり、Lys のない時は $C1\bar{s}$ と $C1INA$ が complex を作っていることが推察される。

考察

補体の活性化は $C1q$ の globular head が IgG の $C\gamma 2$ (IgM の $C\mu 4$) と結合することにより開始する。 $C1$ はまた低イオン強度でも活性化されるがそれは $C1q$ が低イオン強度で立体

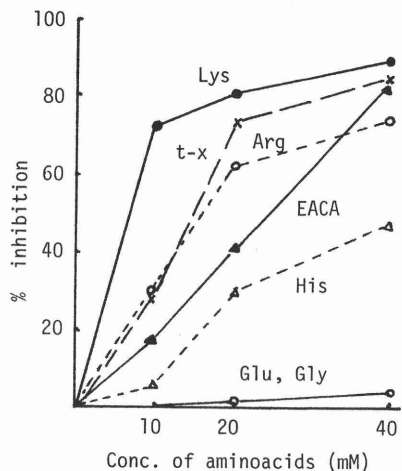


図 1

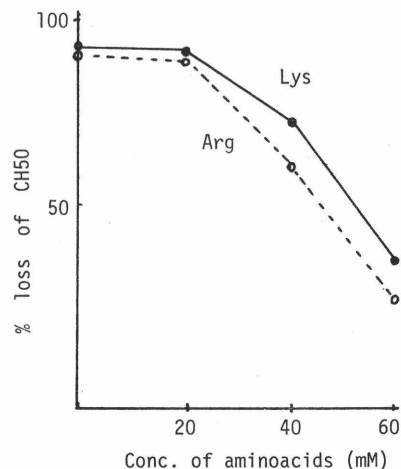


図 2

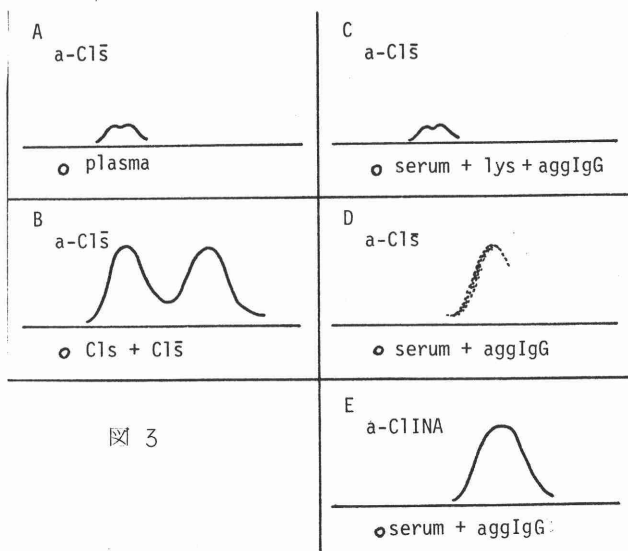


図 3

構造に変化を生じ、C1の活性化がおこると考えられる。C1を低イオン強度にする時にLysが存在するとC1は活性化されにくくなる。種々アミノ酸を比較するとLys>Arg>EACA>t-Xの順であり、t-Xにはほとんど抑制作用がない。即ち α 、 ϵ -diアミノ酸は ϵ -アミノ酸より立体構造の変化抑制に効果があると云うことである。序に述べた如くBurtonらもLukasらもLysの重要性を述べており、さらにArg、His、Glu、Gly、Ser、ThrもC1qとの結合に関与すると云われる。我々はLysのC1活性化抑制効果はLysがCr2とC1qとの結合部位に結合し、C1qの低イオン強度による変化とC1qとCr2との結合を阻害すると考えた。不活性型C1(5.5)をRSC=0.3の溶液に溶解し、aggregated IgGを加えた際のC1の活性化をLysは抑制する。また血清にaggregated IgGを加えると補体は消費されるが、Lysを加えると消費が抑制される。さらに他の演題に示すようにC1溶血をLysは抑制する等のことから上記の可能性は大きいと考える。他のアミノ酸をしらべるとArgがLysについて抑制作用が強く、ついでHis、Gluで、Gly、Ser、Thr等は抑制作用はほとんどない。興味深いことに低イオン強度におけるC1活性化抑制はLys>EACA>t-Xの順でt-Xはほとんど作用がないが、Cr2とC1qとの反応阻害はLys>t-X>EACAでt-Xにはかなりの抑制作用がある。このことはC1qの立体構造に対する ω -アミノ酸の作用とC1qとCr2との反応を抑制する ϵ -アミノ酸の作用が異なることを示唆する。

結論

- (1) C1の低イオン強度における活性化、aggregated IgGによる活性化のいずれもLysが抑制し、Argがこれについだ。His、Gluはやゝ抑制を示し、Gly、Ser、Thrはほとんど抑制しなかった。
- (2) EACAやt-XはC1の低イオン強度における活性化は抑制しなかったが、aggregated IgGとC1との反応はかなり抑制した。
- (3) 免疫電気泳動でもLysの存在下でC1s $\rightarrow$ C1s $\bar{}$ の抑制が示された。

Summary

The activation of C1 at low ionic strength or by aggregated IgG (aggIgG) was inhibited in the presence of lysine or arginine. The interaction of C1 with aggIgG was inhibited by EACA or tranexamic acid. Histidine had some effects but other aminoacids had little effects on the inhibition of C1 activation by aggIgG.

合成蛋白分解酵素阻害剤、FUT-175とその抗補体作用

人見裕司、本多敏之、猪狩伸比古、藤井節郎

大阪大学・蛋白質研究所・機能制御部門

FUT-175 (6-amidino-2-naphthyl-4-guanidinobenzoate·dimethanesulfonate) は、新しい合成蛋白分解酵素阻害剤であり、補体第一成分である Clr , Cl エステラーゼを強力に阻害することが特徴である。本阻害剤の各種蛋白分解酵素に対する、酵素活性 50% 阻害濃度は、 Clr , Cl エステラーゼ、トロンビン、血漿カリクレイン、プラスミン、及びトリプシンに対して、それぞれ、 $2.1 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、 $5.1 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、 $3.3 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、 $3.1 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、 $4.1 \times 10^{-7} \text{ M}$ 及び $1.9 \times 10^{-8} \text{ M}$ であった。更に補体溶血反応における 50% 阻害濃度は、Classical pathway の場合、 $6.9 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、Alternative pathway の場合、 $5.1 \times 10^{-7} \text{ M}$ であった。Classical pathway における阻害は、 Clr 及び Cl エステラーゼに対する阻害と考えられたが、Alternative pathway に対する阻害は、Factor $\bar{\text{D}}$ 及び Factor Bb に対する阻害と考えられた。すなわち、Factor Bb の合成基質 (Leu-Ala-Arg- α -Naphthylester) に対する水解作用に対しては、 $1.2 \times 10^{-4} \text{ M}$ で 50% の阻害を示し、Factor $\bar{\text{D}}$ に対しては、CVF 共存下における Factor B の分解を SDS 電気泳動で検討した結果 $1.4 \times 10^{-4} \text{ M}$ で 50% 分解を阻害すること等による。

以上の成績より、我々により開発された FUT-175 は、従来にない強力な抗補体作用が示されたので、Coombs と Gell らによる、I 型から IV 型の生体におけるアレルギー反応、また、現在、補体の関与が考えられている、エンドトキシンショック、更に、急性炎症モデルとしてのカラゲニン足浮腫に対して、本阻害剤を用いて、それらの反応における、補体の関与を検討した。

アレルギー反応としては I 型はモルモットを用いた PCA 反応、II 型はフォルスマン反応、III 型はラットを用いたアルサス反応、IV 型にはマウスを用いた塩化ピクリル接触性皮膚炎の各実験モデル。エンドトキシンショックは E. Coli 0127 B8 の Lipopolysaccharide を腹腔内に投与して惹起、致死せしめる実験モデル、カラゲニン足浮腫は、ラットの足蹠にカラゲニンを注入して惹起せしめる実験モデルを各々用いた。阻害剤は、経口投与の場合、反応惹起 1 時間前に、腹腔内投与の場合、反応惹起 30 分前にそれぞれ投与を行った。

結果は、PCA 反応に対しては、弱い抑制傾向を、フォルスマン反応に対しては、 12.5 mg/Kg i. p. で生存例が認められる等、強力な抑制作用を示した。

ルサス反応に対しても、Hydrocortisoneと同程度の強い抑制効果が認められ、 25mg/Kg i. p. 及び、 250mg/Kg p. o. において抑制効果が示された。塩化ピクリル接触性皮膚炎においても、抑制効果が認められた。エンドトキシンショックに対しては、 25mg/Kg i. p. 及び 250mg/Kg p. o. で、致死防禦効果を認め、その効果は、Hydrocortisoneと同程度であった。又、エンドトキシンとして、*S. minnesota*.あるいは、*S. marcescens* の各々の Lipopolysaccharide を用いた場合、Hydrocortisone の効果より、強い致死防禦効果が認められた。カラゲニン足浮腫に対しても、本阻害剤は阻害効果を認めた。

以上の成績より、生体のアレルギー反応において、Ⅱ型及びⅢ型については、補体の関与の重要性が確認された。Ⅰ型及びⅣ型における本阻害剤の抑制効果は、本阻害剤が急性炎症に対しても抑制効果を認めており、Ⅰ型及びⅣ型のアレルギー反応発現時の炎症反応に対しての抑制効果の結果とも考えられたが、しかし、現在、Ⅰ型及びⅣ型においても、補体及びその生成フラグメントによる関与が考えられており、興味ある現象であった。又、エンドトキシンショックにおいては、その致死作用が、カリクレイン-キニン系、補体系、凝固系等の複雑に絡みあった作用と考えられていたが、本阻害剤の防禦効果は、非常に強力なものであり、致死作用発現に対する補体の関与の重要性が示唆された。

FUT-175 は生体における種々のアレルギー、及び炎症反応を抑制した。このことは、生体反応における補体の重要性を示唆するものである。

Concentrations of FUT-175 for 50% Inhibition of Esterolysis and Complement-mediated Hemolysis

Enzymes	Substrates	50% Inhibition Concentration (M)				
		10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	
C1r	AAME					2.1×10^{-7}
C1esterase	ATEE					5.1×10^{-8}
Plasma Kallikrein	TAME					3.1×10^{-7}
Pancreatic Kallikrein	TAME					8.4×10^{-6}
Thrombin	TAME					3.3×10^{-7}
Plasmin	TAME					4.1×10^{-7}
Trypsin	TAME					1.9×10^{-8}
Classical Pathway						6.9×10^{-8}
Alternative Pathway						5.1×10^{-7}

A new synthetic protease inhibitor and its anti-complement activity
Yuji Hitomi, Toshiyuki Honda, Nobuhiko Ikari and Setsuro Fujii
Division of Regulation of Macromolecular Function, Institute for
Protein Research, Osaka University

FUT-175 (6-amidino-2-naphthyl 4-guanidinobenzoate-dimethanesulfonate), a new synthetic protease inhibitor, inhibits the activities of various proteases. The concentrations of FUT-175 required for 50% inhibition of the enzyme activities of trypsin, plasma kallikrein, plasmin, thrombin, $\text{Cl}\bar{\text{r}}$ and Cl esterase were $1.9 \times 10^{-8}\text{M}$, $3.1 \times 10^{-7}\text{M}$, $4.1 \times 10^{-7}\text{M}$, $3.3 \times 10^{-7}\text{M}$, $2.1 \times 10^{-7}\text{M}$ and $5.1 \times 10^{-8}\text{M}$, respectively. FUT-175 strongly inhibited complement-mediated hemolysis via the classical and alternative pathway. The concentrations of FUT-175 required for 50% inhibition of complement-mediated hemolysis by the classical and alternative pathway were $6.9 \times 10^{-8}\text{M}$ and $5.1 \times 10^{-7}\text{M}$, respectively. Accordingly, FUT-175 also inhibited Factor D and Factor B in the alternative pathway of complement activation, and the concentrations of FUT-175 required for 50% inhibition of the enzyme activities of purified Factor D, Factor B and CVFBb were $1.4 \times 10^{-4}\text{M}$, $1.2 \times 10^{-4}\text{M}$ and $1.5 \times 10^{-4}\text{M}$, respectively. In these, inhibitory effects of FUT-175 on complement system were strongest of all known synthetic inhibitors. The effects of FUT-175 on various immunological reactions in vivo were studied. The minimal effective dose of FUT-175 in systemic Forssman shock in guinea pig were 12.5 mg/kg i.p. and 25 mg/kg p.o. In passive Arthus reactions in rats, the effective concentration were 25 mg/kg i.p. and 250 mg/kg p.o. FUT-175 also improved other immunological reactions, such as passive cutaneous anaphylaxis and delayed hypersensitivity. Furthermore, at a dose of 25 mg/kg i.p. it strongly protected mice from death by endotoxin shock and strongly suppressed carrageenin edema in rats.

活性化C2のC4b非依存的なC3コンベルターゼ活性

山下憲昭, 長沢滋治, 小山次郎

(北大, 薬学部, 衛生化学)

古典的経路のC3コンベルターゼは, i) Mg^{2+} イオン存在下でC2とC4の活性化フラグメント, C2aとC4b, とが分子集合したもので, ii) 活性中心はC2aフラグメント上にあり, iii) 半減期約10分で解離失活し, 一度解離したC2aはC4bと結合してC3コンベルターゼを再構成する活性を失っていることなどが明らかにされてきた。

C2aがC4bと分子集合してC3コンベルターゼ活性を発現する機構として, i) 分子集合により初めてC3コンベルターゼとしての活性部位(電荷リレー系)が完成する, ii) C2a単独でも弱いながらC3コンベルターゼ活性があり, C4bとの結合によりその活性が増強される, などの可能性が考えられるが, その活性発現の分子機構はいまだ明らかでない。

C3コンベルターゼによりC3がC3aとC3bに限定水解されるとC3のチオールエステル結合も同時に開裂して, 1モルのチオール基がC3b上に遊離するところから, 我々は蛍光性SH試薬ジメチルアミノクマリルマレイミド(DACM)を用いたC3コンベルターゼ活性の蛍光測定法を開発し, この方法を用いてC3コンベルターゼの活性化機構の解析を試みた。その結果, 低イオン強度では, 活性化C2単独でもC3コンベルターゼ活性を発現することを見い出したので報告する。

(実験方法)

補体成分の精製

C2はQAE-Sephadex, CM-Sephadex, C4b-Sepharose アフィニティークロマトグラフィーを用いることによりヒト血漿から精製した。¹⁾

C3²⁾, C4³⁾, C5⁴⁾はヒト血漿から, それぞれ既報の方法により精製した。

C3コンベルターゼ活性の測定法

C3(50~100 μ g)をC4₂あるいはC2と反応させたのち, C3の2~3倍量(モル比)になるように2% DACMアセトン溶液と1mlの0.1% SDS, 酢酸緩衝液pH6.5を同時に加えることにより反応を停止させ, 15分間室温で放置してから励起波長385nm, 蛍光波長482nmで蛍光強度を測定した。

(結果と考察)

活性化C2単独($C\bar{2}$)のC3コンベルターゼ活性

C2 $1.5\mu\text{g}$, C3 $480\mu\text{g}$, CTs $0.3\mu\text{g}$, 10mM Mg^{2+} , 0.15M NaCl ベロナール緩衝液 pH7.5 の反応系において C4b ($18\mu\text{g}$) 添加, 非添加時の C3コンベルターゼ活性を経時的に DACH法により測定した。22°C で反応させた場合, Dodd が報告しているように, 活性化C2単独(C4b非添加)ではプロテアーゼ活性は全くみられなかったが (Fig.1), 37°C では, ごく弱い活性が活性化C2単独($C\bar{2}$)でも検出された。

一方, 反応液の食塩濃度を 0.05M NaCl と低くし, 37°C で反応させると, $C\bar{2}$ 単独でもC3コンベルターゼ($C\bar{42}$)とほとんど同程度のC3水解活性を示すことが分った (Fig.2)。C2単独のC3コンベルターゼ活性は塩濃度により著しく影響を受け, 0.05M NaCl では, $C\bar{2}$ 単独と $C\bar{42}$ はほぼ同じコンベルターゼ活性を示すが, 高食塩濃度になるにつれて, $C\bar{2}$ 単独の活性は $C\bar{42}$ に比べて著しく低下することが分った (Fig.3)。以上より, 従来C4b存在下でC2を活性化した時初めて生成するとされていたC3コンベルターゼ活性は, 低食塩濃度においてはC4bが存在しなくても $C\bar{2}$ 単独で発現することが初めて明らかになった。

$C\bar{2}$ 単独のC3コンベルターゼ活性における Mg^{2+} イオンの必要性とEDTAの阻害効果

C4とC2から $C\bar{42}$ を活性化させる反応は Mg^{2+} が必須で, EDTAにより活性化反応は阻害されるが, いったん $C\bar{42}$ が活性化されるとEDTA存在下でもC3コンベルターゼ活性を発現することは良く知られている。 $C\bar{2}$ 単独のC3コンベルターゼ活性の場合, EDTA存在下でC2をCTsで活性化してもまったくC3コンベルターゼ活性は発現しない。また, あらかじめ $C\bar{2}$ に活性化したのちEDTAを添加すると, $C\bar{42}$ の場合と異なりC3コンベルターゼ活性は100%阻害された (Fig.4)。これらの結果は, $C\bar{2}$ 単独の場合, C3コンベルターゼ活性の触媒部位の形成・保持に Mg^{2+} が不可欠なことを示唆している。

C2をヨード処理した $C\bar{2}^{\text{oxy}}$ では, $C\bar{42}$ のコンベルターゼ活性が安定化されることが知られている。 $C\bar{2}^{\text{oxy}}$ 単独でも $C\bar{2}$ よりもやや強いC3コンベルターゼ活性を示した。

以上, 活性化C2単独でみられたC3コンベルターゼ活性は, i) 温度依存性で, 22°Cではほとんど活性がみられず, ii) イオン強度依存性で, 0.05M NaCl 以上になると, 顕著な活性阻害がみられ, iii) Mg^{2+} 依存性で, EDTAを添加したC3に対してはコンベルターゼ活性を示さない, などの諸点で, いわゆるC3コンベルターゼ, $C\bar{42}$, の活性と相違している。

以上の結果から、C3コンバーターゼ活性に必要な触媒装置 - 電荷リレー系は、C2の限定水解に伴って完成されるが、不安定なため、高イオン強度やEDTA存在下では、活性化C2のコーホメーションが変化し、電荷リレー系も機能しなくなるものと考えられる。一方、C4bとの分子集合体形成により、その活性部位が安定化され、生理的食塩濃度やEDTA存在下でも充分な活性を発現しうるものと推定される。

- 1) Nagasawa, S. & Stroud, R.M. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 2998.
- 2) Nagasawa, S. & Stroud, R.M. (1977) Immunochemistry 14, 749
- 3) Nagasawa, S., Ichihara, C., & Stroud, R.M. (1980) J. Immunol. 125, 578
- 4) Takahashi, K., Nagasawa, S., & Koyama, J. (1975) FEBS lett. 50, 330

Fig.1 Time Course of C3 Cleavage by $\overline{C42}$ and $\overline{C2}$

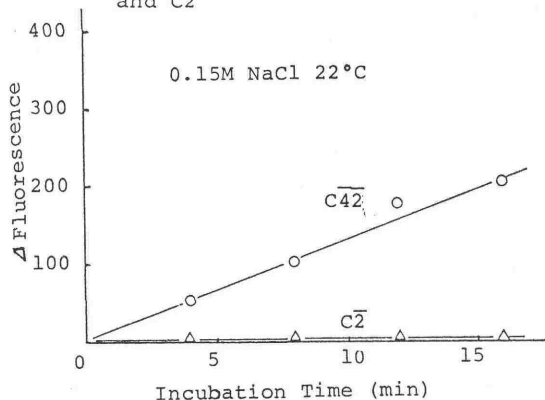


Fig.2 Time Course of C3 Cleavage by $\overline{C42}$ and $\overline{C2}$

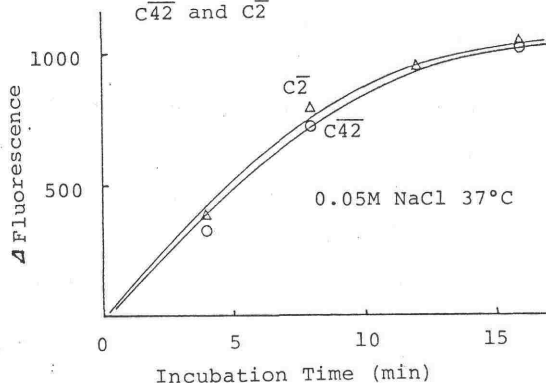


Fig.3 Effect of NaCl Concentration on C3 Convertase Activity of $\overline{C42}$ and $\overline{C2}$

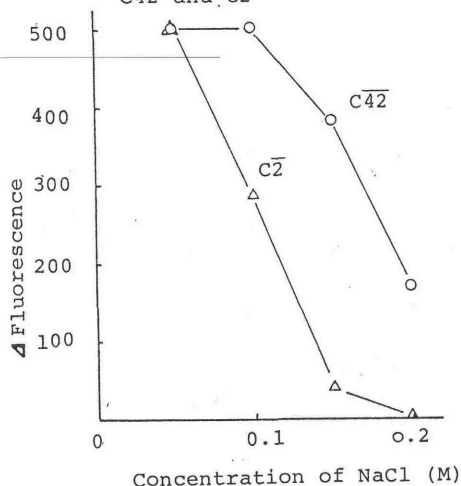
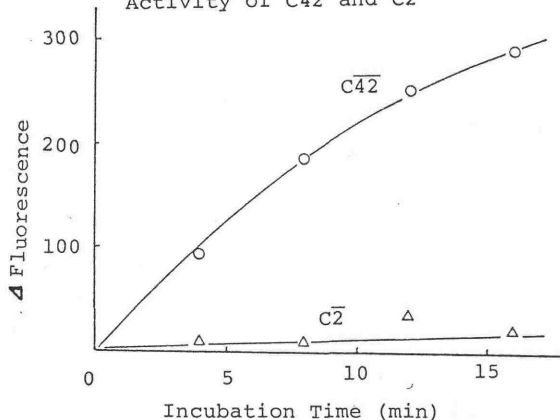


Fig.4 Effect of EDTA on C3 Convertase Activity of $\overline{C42}$ and $\overline{C2}$



C4b-independent C3 convertase activity of activated C2
Noriaki Yamashita, Shigeharu Nagasawa, and Jiro Koyama
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University

It was generally accepted that C3 convertase activity was generated only when activated C2 and C4b formed a molecular complex, $\overline{C4,2}$.

We found that under low ionic strength and at 37°C, activated C2 alone was able to function as C3 convertase.

The C3 convertase activity of activated C2 was characteristically different from that of the classical C3 convertase, $\overline{C4,2}$, in the points that the activity of activated C2 was inhibited by increasing ionic strength and by addition of EDTA.

These results suggest that the catalytic site for cleavage of C3 would be generated in activated C2 molecule and become stabilized by forming a complex with C4b.

Also, a new method for determination of C3 convertase activity was developed by using a fluorescent thiol reagent, N-(7-dimethylamino-4-methylcoumarinyl)maleimide, DACM.

C3欠損症患者血清中のC3様物質について

大阪府立成人病センター 北村 肇、永木和義
 京都府立医大 医学部教室 西向弘明
 鹿児島大学医学部 第三内科 佐野雄二

私達が経験したC3欠損症患者(C3D)は、homozygousのC3欠損症であるにもかゝらず、血清補体価は5.8 CH50/mlであり、血清中のC3溶血活性は微量ながら検出された(40~100 SFU/ml, cf. NHS: $2 \times 10^4 \sim 4 \times 10^4$ SFU/ml)^{ref.1}。今回、このC3D血清中のC3溶血活性をもつ物質(C3 like factor)について種々の検討を加え、興味あるデータを得たので報告する。

[方法]

C3D血清は鹿児島大学第三内科で発見されたC3D姉妹例の妹より採取したものを用いた。抗C3はヘキスト社のもの、抗C5は自家製のものを用いた。抗C3あるいは抗C5によるC3やC5の中和反応は、血清あるいは精製補体成分と抗体をEDTA存在下で30°C, 30分間反応させたのち、C3あるいはC5の溶血活性を測定した。ゲル内溶血反応は、1.0%アガロースにサンプルを添加、20V/cmで50分間泳動させたのち、EAC1_{hu}4_{hu}^{oxy}2_{hu} + C5_{hu} + C6-9_{gp}あるいはEA + C3D血清を含む0.8%アガロースを重層させ、約1時間後、溶血bandを観察した。

[結果]

1. C3D血清を種々の処理をしたときのC3 like factorの変化
 - i) 非働化; C3D血清を56°C, 30分処理するとC3溶血活性は消失した。
 - ii) EDTA; EDTA血漿中のC3活性は血清中のそれと同じ溶血活性を示したが、EDTA存在下ではC3D血清はEAを全く溶血させなかった。
 - iii) G-200分画; C3D血清をSephadex G-200にapplyすると、NHSをapplyしたときのC3の溶出位置と同じ場所に、明らかなC3溶血活性のpeakを示した。すなわち、C3 like factorは

图 1.

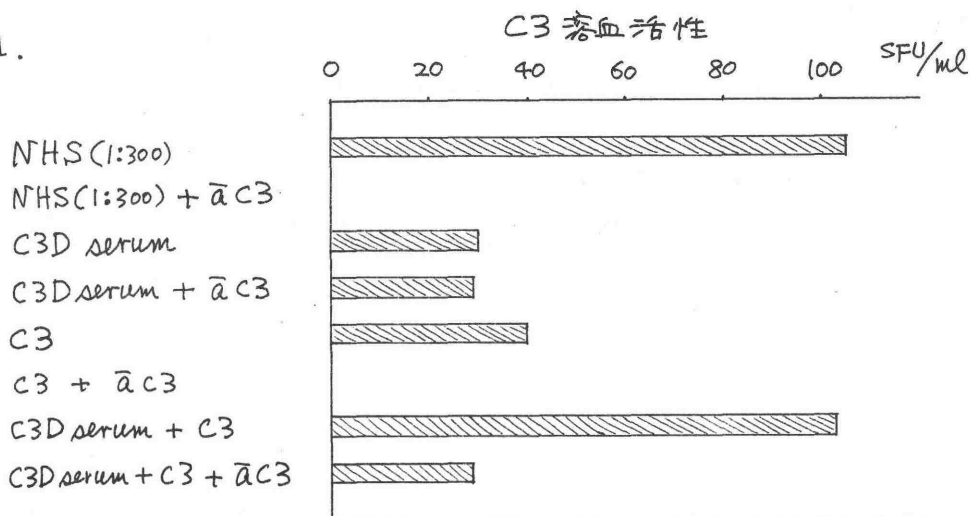


图 2.

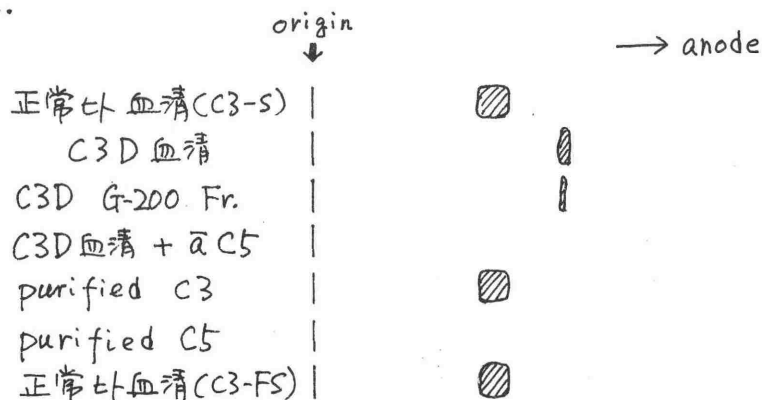


表 1.

	C3 activity (SFU/ml)			C5 activity (SFU/ml)		
	+Buffer	+ $\bar{a}C5$ 15 μ l	+ $\bar{a}C5$ 30 μ l	+Buffer	+ $\bar{a}C5$ 15 μ l	+ $\bar{a}C5$ 30 μ l
NHS	26,000	24,600 (94.6%)	23,800 (91.5%)	255,000	10,900 (4.3%)	0 (0%)
C3D serum	43.0	0.5 (1.2%)	0 (0%)	269,000	21,300 (7.9%)	0 (0%)

分子量 20 万前後のものと考えられた。

以上のことから、C3D 血清中に微量の C3 活性として検出されるものは、いわゆる non specific な溶血によるものではなく、C3 様物質として存在するものであることが判る。

2. 抗 C3 の C3 like factor への影響

図 1 に示すごとく、抗 C3 は NHS 中の C3 や精製した C3 の C3 溶血活性を低下させるが、C3D 血清中の C3 活性には影響しないことが判明した。このことから C3 like factor は C3 の抗原性を持たないものであると考えられた。

3. 抗 C5 の C3 like factor への影響

表 1 に示すごとく、抗 C5 は NHS および C3D 血清中の C5 を中和し、NHS の C3 活性には影響しない。このとき、C3D 血清中の C3 溶血活性を低下させることが明らかになった。すなわち、C3 like factor は C5 の抗原性をもつことが示唆された。

4. C3 like factor の電気易動度

ゲル内溶血反応を用いて C3 like factor の電気易動度を調べた。

図 2 に示すごとく、① C3 like factor は、通常の C3 (NHS の main の溶血 band や精製 C3 の溶血 band) の位置より陽極寄りに泳動し、② C3 like factor による溶血 band は、C3D 血清を抗 C5 と中和することにより消失する、③ C3 like factor の位置は、同時に、行った immunofixation 法によって C5 の位置に一致する、ことが判明した。これらのことから、C3 like factor は C5 の抗原性と易動度をもつことが示唆された。

[結論]

C3D 血清中に微量に存在する C3 溶血活性を示すものは、C5 由来のものであることが推察された。

ref.1. Sano et al., Arthritis and Rheumatism 24, 1255, 1981

Further Study On C3 Deficiency

Hazime Kitamura, Kazuyoshi Nagaki, Hiroaki Nishimukai and
Yuzi Sano.

The Center For Adult Diseases, Osaka.

ニジマスのC₃ I. 精製とその生化学的性質

野中 勝, 岩城正佳*, 山口宣夫**, 坂井俊之助, 高橋守信

(金沢大・がん研・免疫生物, *滋賀医大・ホー生化, **金沢医大・血清)

〔目的〕補体系の進化上の起源を明らかにする為には, 哺乳類の補体成分と祖先を共有する蛋白の, 下等動物に於ける存否を明確にすることが必須と思われる。我々は才17回本シンポジウムに於て, 硬骨魚ニジマスの血清中にC₅が存在すること及びその性状が哺乳類のものに酷似していることを報告した。今回, ニジマス血清中よりC₃を同定, 分離したので, その性状について報告する。C₃の α , β 鎖のN末端アミノ配列の決定により, 一次構造レベルでの哺乳類と硬骨魚の補体成分の相同性が明らかになった。

〔方法と結果〕抗C₃血清の作製 ニジマス正常血清と保温したザイモザンをウサギに免疫したところ, ニジマス血清と数本の沈降線を形成する抗血清が得られた。その内, 最も強い β 領域の沈降線を残して他の血清のDEAE分画で吸収した。この抗血清は以下の理由でニジマスC₃に対するものであることが示された。①この抗血清から調整したIgGは, ニジマス血清中の溶血活性を阻害した。②同様にこのIgGは, ニジマス腹腔マクロファージによるニジマスIgM補体感作羊赤血球貪食作用を阻害した。③この抗血清は, ニジマス血漿より哺乳類C₃と同様の分子構造を有するタンパクを沈殿させた。④後に述べる如く, この抗体をもとにニジマス血漿より精製されたタンパクのN末端アミノ酸配列は, 哺乳類C₃のそれと相同性を示した。

ニジマス血清中には, この抗血清と反応するタンパク質が2種類存在し, 我々は量の多い方をC₃-1, 少ない方をC₃-2と名づけた(次演題参照)。

C₃-1, C₃-2の精製 300 mlのニジマス血漿から5~15% PEG沈殿画分を得, これをDEAE-セファロースカラムにかけた。i.s. = 0.04でC₃-2が, 0.05でC₃-1が溶出され, 各々の分画の濃縮後, G-200, 7ロマトフォーカシングにより別々に精製された。C₃の検出はすべて抗C₃血清によるロケット法によった。C₃-1は17%の収率で70 mg, C₃-2は収率12%で19 mg得られ, スラブSDS-PAGEで測定した分子量はC₃-1が α 鎖128K, β 鎖74K, C₃-2が α 鎖128K, β 鎖72Kであった(図1)。次いで, 約50 mgのC₃-1を還元アルキル化し, Tackらの方法に従ってSDS存在下のセファロース4Bによるゲルろ過を行ない, α , β 鎖を分離した。溶出パターンと各分画のスラブSDS-

PAGEの結果を図2に示す。 α 鎖はこのまま、 β 鎖は同じカラムで再フロマト後、以後の分析に用いた。

アミノ酸分析とN末端アミノ酸配列 C3-1, 及びその α , β 鎖のアミノ酸組成を調べた。またN末端アミノ酸配列を α 鎖の29残基, β 鎖の23残基について決定した。 α 鎖の配列をヒトC3, C4, C5のそれと比較した場合, いずれとも25~30%程度のhomologyが認められ, 15番目のTyr残基, 23, 24番目のCys残基はこれら4つのタンパクのすべてにおいて保存されていた。一方, β 鎖はモルモットのC3とやはり同程度のhomologyを示したが, C4, C5については哺乳類での情報が不足しており, 十分な比較はできなかった。

[考察] ニジマスC3-1の α , β 鎖のN末端アミノ酸配列の決定は, このタンパクが哺乳類補体タンパクと共通の祖先をもつことを明確に示し, 同時に配列中に脊椎動物の進化の歴史を通じて保存されている部位が存在することを明らかにした。一方, ヒトC3, C4, C5の α 鎖のN末端部分は, 塩

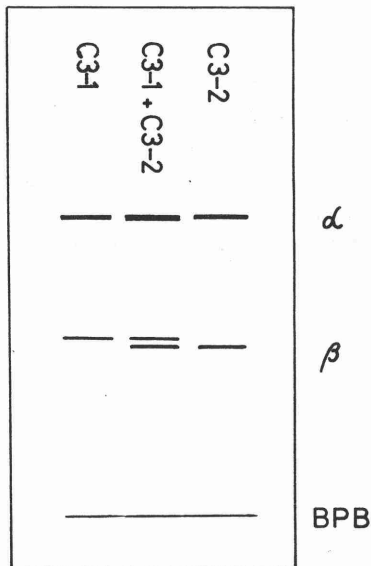


Fig. 1

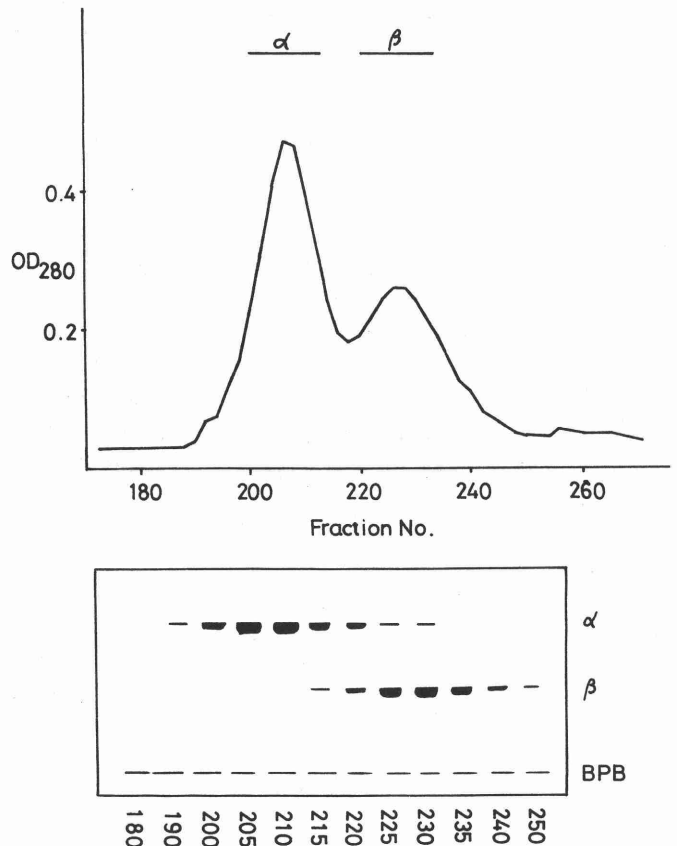


Fig. 2

基性残基に富んでいるが、ニジマス C3- α 鎖では29番目までに Arg が一つ存在するのみで、この違いは、機能との関連に於て興味を持たれた。

ニジマスに於ける C3 の同定は、以前報告した C5 の存在と合わせて、C3 と C5 の分化が硬骨魚と哺乳類の分化より先に生じたことを示した。一方、ニジマス C3 の N 末端アミノ酸配列が哺乳類 C3, C4, C5 のいずれともほぼ同程度の相同性を示した事実は、これら2つの分化の間には長い時間の経過が無かったことを示唆していると考えられた。

[Summary] Rainbow trout C3 I. Purification and biochemical characterization

An antiserum against rainbow trout C3 was raised by immunization of a rabbit with zymosan incubated with rainbow trout serum. By an absorption of weak contaminating antibodies this antiserum was made monospecific and by the following evidences it was identified as anti-C3. 1) An IgG fraction from this antiserum inhibited the hemolytic activity in rainbow trout serum. 2) It also inhibited the phagocytosis of sheep erythrocytes sensitized with rainbow trout IgM and complement by rainbow trout macrophages. 3) This antiserum precipitated a single protein from rainbow trout serum, which showed the same subunit structure as that of human C3. 4) The N-terminal amino acid sequence of the protein purified from rainbow trout plasma using this antiserum showed the homology with that of human C3. Upon immunoelectrophoresis, this antiserum detected two types of C3 in rainbow trout serum. The fast moving major one and the slow moving minor one were designated as C3-1 and C3-2, respectively. C3-1 and C3-2 were separated with DEAE-Sepharose column chromatography and were purified with succeeding G-200 gel filtration and chromatofocusing. Seventy milligrams C3-1 and 20 mg C3-2 were obtained from 300 ml normal rainbow trout plasma. The molecular weights of α and β subunits were 128 K and 74 K for C3-1, and 128 K and 72 K for C3-2, respectively. For amino acid sequence analysis, about 50 mg C3-1 was reduced and alkylated. Then, α and β chains were separated with the Sepharose CL-4B column in the presence of 0.2 % SDS. The N-terminal sequences of both chains were determined by automated Edman degradation. These amino acid sequences were compared with the corresponding ones of mammalian C3, C4 and C5, and 25-30 % homologies were observed in each case.

ニジマスのC₃ II. 二種のアイソタイプの存在

野中 勝, 田部一史*, 坂井俊之助, 高橋守信

(金沢大・がん研・免疫生物, *愛知がんセンター・生化学)

〔目的〕 免疫電気泳動によりニジマス血清中に認められた二種のC₃は各々純化され, その分子構造は良く類似していることが示された(前演題参照)。これら二種のC₃について, さらに, 抗原性, ペプチドマッピングの比較, 及び遺伝学的な検討を行なった結果, 両者がかなり高い相同性を有するアイソタイプであることが明らかになったので報告する。

〔方法と結果〕 抗原性 精製したC₃-1, C₃-2をウサギに免疫して得られた抗血清を各々, aC₃-1, aC₃-2とした。ニジマス血清との免疫電気泳動に於て, aC₃-1は2本の沈降線を形成したが, より陽極側の方がC₃-1との, 陰極側の方がC₃-2とのものであり, 前者は後者に対してスパーを形成した(図1)。抗血清にaC₃-2を用いた場合には, スパーの向きが逆転した。この抗原性の関係は, 精製したC₃-1, C₃-2を用いたOuchterlony testでも確認された。また, aC₃-1をC₃-2で完全に吸収することにより, C₃-1に特異的な抗血清(aC₃-1sp.)が得られた。同様に, aC₃-2sp.はaC₃-2をC₃-1で吸収して得た。以上の結果は, C₃-1とC₃-2とがかなりの抗原性を共有する一方, 各々独自の抗原性を保有していることを示した。

ペプチドマッピング C₃-1, C₃-2の類似度を検定する為, Elderらの方法によりペプチドマッピングを行なった。まず, C₃-1, C₃-2を還元しスラブSDS-PAGEを行ない, 染色後, α, β鎖のバンドの一部を切り出した。これをクロアミンT法で¹²⁵I標識し, トリプシンによる完全分解を行な

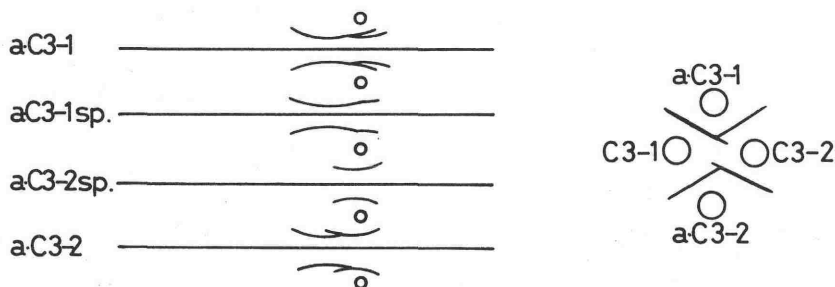


Fig. 1

た後、シリカゲルプレート上で、一次元目・高圧電気泳動、二次元目・TLCのマッピングを行ない、オートラジオグラフィーでスポットを検出した(図2)。その結果、 α 、 β 鎖共に、80%程度の共通スポットと、20%程度のC3-1、C3-2に各々独自のスポットが検出され、抗原性のデータと合わせて、この両者は「C3とその分解産物」あるいは「C3とそのprecursor」の関係では無く、かなりの相同性を有する別種のタンパクであることが示唆された。

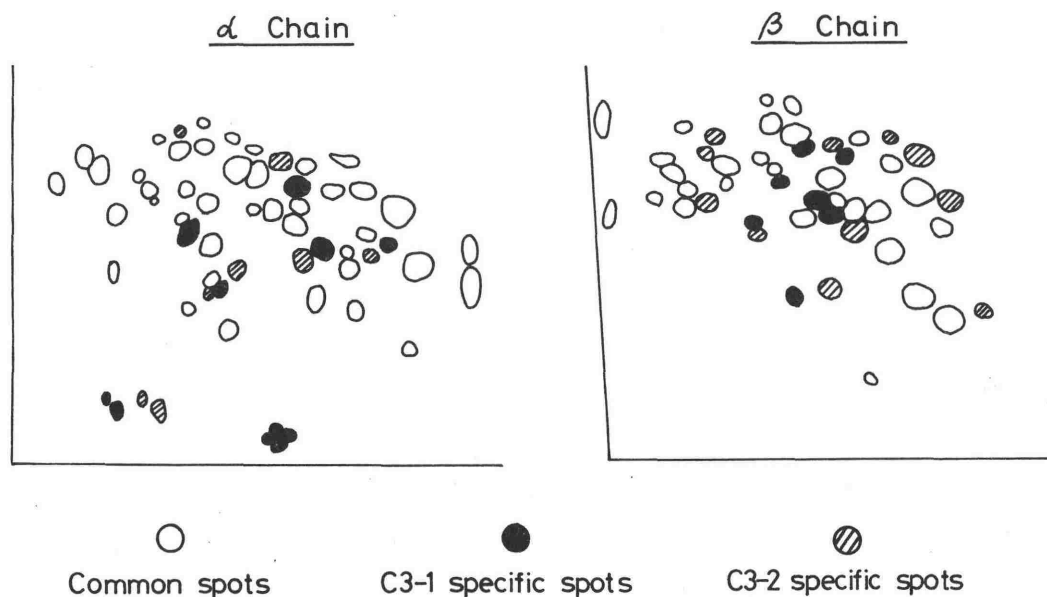


Fig. 2

C3-1, C3-2はアイソタイプである C3-1, C3-2の関係について、単一の遺伝子座によってコードされるアロタイプか、別々の遺伝子座に存在するアイソタイプかを、親子関係の判明しているニジマス集団を用いて検討した。親集団からの50匹、子集団からの50匹の血清について、 α -C3-1 sp, α -C3-2 spを用いたOuchterlony法で調べた結果、全ての個体がC3-1, C3-2を共に有することが判明し、この両者はアイソタイプの関係にあることが示された。また、35匹の成魚を用いて血清中の含量を測定したところ、C3-1は $1480 \pm 640 \mu\text{g/ml}$, C3-2は $372 \pm 168 \mu\text{g/ml}$ であった。

【考察】ヒト、マウスのC4に加えてニジマスC3に於てもアイソタイプが発見された事実は、補体系の遺伝子の構成を考へる上で重要な事と思われる。ニジマスC3-1とC3-2は、抗原性の比較、ペプチドマッピングの結果より、非常に類似度の高い蛋白であることが示され、比較的最近生じた遺伝子重複の産物と考えられる。一方、補体系の成立する過程では、C3, C4, C5の

例に示される如く，遺伝子重複が重要な役割を果たしたことが示唆されており，ニジマス C3-1, C3-2 の構造，機能両面での更なる比較検討により，補体系の分化，発展の様子を理解する手がかりが得られるものと期待される。

[Summary] Rainbow trout C3 II. Characterization of two isotypes; C3-1 and C3-2

An immunological relationship between C3-1 and C3-2 was analysed using rabbit antisera raised against purified C3-1 (anti C3-1) and purified C3-2 (anti C3-2). In Ouchterlony analysis, the precipitin line made between anti C3-1 and purified C3-1 formed a spur over the precipitin line between anti C3-1 and purified C3-2. On the contrary, the precipitin line between anti C3-2 and C3-2 formed a spur over the precipitin line between anti C3-2 and C3-1. A C3-1 specific antiserum was obtained by the perfect absorption of anti C3-1 with C3-2, and a C3-2 specific antiserum was obtained from anti C3-2 with C3-1 absorption. For the peptide mapping analysis, α and β chains of C3-1 and C3-2 were separated with slab SDS-PAGE under reducing condition, stained and cut out from the gel. The proteins in the gel were radiolabelled with ^{125}I and digested perfectly with trypsin. Trypsin digests were applied onto a Silica gel plate, and electrophoretic (1st dimension) and thin layer chromatographic (2nd dimension) separations were performed. After autoradiography, mapping patterns were compared between C3-1 and C3-2. In both α and β chains, about 80 % of common and about 20 % of unique spots were detected. These results showed that C3-1 and C3-2 were separate components having high degree of homology. Genetic analysis showed that C3-1 and C3-2 were not allotypes coded for at a single locus, but isotypes coded for at separate loci.

可溶化過程における C3 と IgG の結合

高田裕子 藤田禎三 田村 昇

筑波大学 基礎医学系

〔はじめに〕

昨年シンポジウムに於いて、我々は精製した alternative pathway の 6 因子によって、immune precipitates の可溶化が起こり得ることを報告し、可溶化過程において、IgG 分子と C3 が特異的に結合することを明らかにした。一方 C3 分子の結合反応機構が明らかになるにつれ、IgG 分子と C3 分子との結合様式にも興味を持たれてきた。Gadd & Reid (1) は C3・IgG 複合体が、アルカリ処理、ハイドロキシルアミン処理によっても分解しないので、その結合がアミド結合であろうと推測している。他方、Pfaffenbach ら (2) は、ハイドロキシルアミン処理により C3・IgG 複合体が分離することから、その結合がエステル結合であることを示唆している。今回我々は、可溶化過程における抗体と C3 の反応を解析し、C3 分子の α -65 鎖が、IgG 分子の Fd 部にエステル結合しているという結果を得たので報告する。

〔材料と方法〕

- immune precipitates……ウサギ抗卵白アルブミンをアフィニティークラムにより、IgG 分画に精製した。それをペプシンで分解し、F(ab')₂ 抗体を得た。IgG, F(ab')₂ それぞれを、クロラミン T 法により ¹²⁵I で標識し、抗原と最適比で反応させて immune precipitates を作成した。
- 可溶化の kinetics……血清中の 1/4 の濃度の精製 alternative pathway 6 成分 (C3, C3b INA, β 1H, B, D, P) と immune precipitates を 37 °C で反応させ、時間毎に小量組み出し遠心し、その沈殿と上清の放射活性を測定した。
- 可溶化抗体の SDS-PAGE による解析……immune precipitates を alternative pathway 精製 6 成分で可溶化させ、遠心後上清に抗ウサギ IgG 抗血清を加え、次いで Staphylococcus aureus を加えて可溶化された IgG 分子を集め、それを還元して、5-15% gradient gel の SDS-PAGE で分析した。
- 2 次元電気泳動による解析……C3 をラクトパーオキシダーゼ法により、¹³¹I で標識した。この標識 C3 を含む精製 alternative pathway で

immune precipitates を可溶化し、可溶化したものを上記のように集め、SDS-PAGE にかけた。そのゲルを切り出し、Law & Levine (3)の方法に従い、ヒドロキシルアミン処理して、2次元電気泳動を行ない、C3とIgG分子との反応を解析した。

〔結果〕

はじめに、IgG抗体で作成したimmune precipitatesとF(ab')₂で作成したimmune precipitatesの可溶化のkineticsを比較した。図1に示すように精製alternative pathway 6成分を用いた時、F(ab')₂抗体で作成したimmune precipitatesは可溶化され、その程度はIgG抗体のものと同様であった。また全血清を用いた場合には、IgG抗体で作成したものの可溶化は著しく促進されたが、F(ab')₂のそれは精製6成分による可溶化とはほとんど変わらなかった。これらのことより、immune precipitatesによるalternative pathway活性化とそれに続く可溶化は、IgG、F(ab')₂ immune precipitatesともに同じ機構でおこり、抗体のFd部分が関与する反応と思われる。

図 1

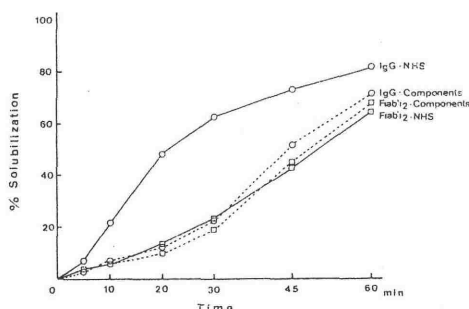
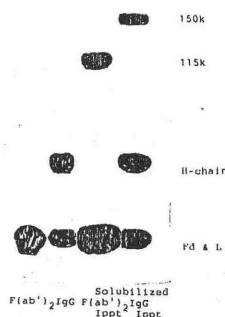


図 2



そこで、¹²⁵Iで標識した抗体を含むimmune precipitatesを精製6成分を用いて可溶化させ、immune precipitates中のIgG、F(ab')₂の分子の変化をSDS-PAGEに解析した。図2に示すように、IgGではH鎖、L鎖の他に分子量15万のバンドが出現し、F(ab')₂では、Fd鎖、L鎖の他に、11.5万のバンドが出現した。この新たに出現した15万と11.5万のバンドの性質を明らかにする為に次の様な実験を行なった。

¹²⁵Iで標識したIgG、F(ab')₂両immune precipitatesを可溶化させ、2次元電気泳動で解析した。図3に示したように、上記の分子量15万と11.5万のバンドは、ヒドロキシルアミン処理することにより、それぞれC3α-65鎖とIgG H鎖、C3α-65鎖とFd鎖に分かれた。即ち、C3と抗体との結合がエステル結合であることが示唆される。

〔考察〕

F(ab')₂ immune precipitatesでは、血清あるいはalternative

pathway の 6 成分と反応 図 3

させることにより同じよう
に可溶化が起こった。しか

も、それは、IgG immune
precipitates の al-

ternative pathway 成
分のみによる可溶化と、同

様な kinetics curve を F(ab')₂ immune precipitates

示した。その事により、可溶化が Fc 部を含まない Fd 部分関与の反応であ
ることが示唆される。

可溶化された immune precipitates に結合した C3 は、C3b INA と
β1H の作用を受けてすでに iC3b となり、その α-65 鎖が、IgG とは 15 万
の、F(ab')₂ では 11.5 万の複合体を作っている。これらの複合体はハイド
ロキシルアミン感受性であるので、C3 と IgG との反応も、Law & Levine
によって明らかにされた赤血球やザイモザンとの反応と同様、エステル結
合と考えられる。

C3 がエステル結合する受容体の 1 つとして、糖鎖が考えられているが、
ウサギ抗体は、hinge 部に 2 つの糖鎖を持ち、1 つは Fd 部に、1 つは Fc
部に所属する。今回の我々の実験から、Fd 部分の糖鎖に C3 がエステル結
合していることが考えられるが、詳細は不明である。

〔参考文献〕

- (1) Gadd, K. J. & Reid, K. B. M. (1981) Biochem. J. 195, 471
- (2) Pfaffenbach, G., Lamm, M. E. & Gigli, I. J. Exp. Med. 155, 231
- (3) Law, S. K., Fearon, D. T. & Levine, R. P. (1979) J. Immunol.
123, 1388

***** Summary *****

F(ab')₂ immune precipitates were solubilized by the 6 isolated alternaive
pathway proteins as effectively as IgG immune precipitates. Substitution of
the isolated proteins for human serum did not change the rate of solubilization,
indicating that the activation of the alternative pathway by F(ab')₂ and IgG
immune pricipitates and the subsequent solubilization dose not involve the Fc
portion of IgG molecule. Analysis of the solubilization products by SDS-PAGE
revealed that iC3b was covalently bound to IgG or F(ab')₂. Further analysis
by two-dimentional electrophresis shwed that α-65 chain of C3 is linked to
H chain or Fc portion of IgG by ester bond.

(1→3)- β -D-グルカンに結合するマウス C3 の分解産物

国立がんセンター・研 化学療法部 松下 操, 佐々木 琢磨
ウイルス部 岡田 秀親

[目的]

Alcaligenes faecalis var. *myxogenes* IFO 13140 の産生する平均重合度 540 の (1→3)- β -D-グルカン (TAK) は抗腫瘍性を有し, *in vitro* で *Alternative complement Pathway* の *activator* である¹⁾。我々は TAK がゲル化する事に着目し, これを吸着体とする *Affinity chromatography* を行ない, マウス血清中の TAK に吸着する成分を検索した。それらの一つとして C3 の抗原性を有する成分 (C3X と仮称) を見出し, 精製, 単離して, その性状を検討した。

[実験方法]

材料 C3X の精製には ICR マウス血清を, C3 の精製は C3H/He の EDTA-血漿を出発材料とした。 活性測定 ヒツジ赤血球をタンニン酸処理して crude な C3 を吸着させ, 抗マウス C3 血清による受身凝集反応の阻止試験より C3 抗原量を測定した。用いた抗マウス C3 血清は金沢大学がん研高橋研究室より提供された。 C3X の精製 ICR マウス血清より次の 3 つの *chromatography* を行った。①. TAK column を用いた *Affinity chromatography* ; 10mM phosphate Buffer で吸着させた後, イオン強度を上げて溶出した。②. CM-Sephrose column *chromatography* ; 20mM Acetate Buffer, 5mM EDTA, pH 5.0 で吸着させた後, 0.45M NaCl までの連続的溶出を行った。(Fig. 1.) ③. DEAE-Sephacel ; 5mM phosphate Buffer, 5mM EDTA pH 7.8 で吸着させ 0.1M NaCl までの連続的溶出を行った。(Fig. 2.) C3 の精製 C3H/He の EDTA-血漿の 5-15% PEG4000 沈殿から OKada & OKada の方法²⁾に準じて行った。 C3 のトリプシン分解 C3 をトリプシン (0.2% 0.1M phosphate Buffer pH 7.2) で 37°C, 10 分間反応後, 10M urea で反応を止め, SDS-PAGE へ供した。 抗 C3X 血清の作製 C3X をウサギに免疫して抗血清を得た。これは, ゲル内沈降反応によりマウス血清に対する *monospecific* な抗血清であった。 FITC-抗 C3X の調製 抗 C3X 血清を 10mM phosphate Buffer pH 7.0 で平衡化した DEAE-Sephacel column に通し, 素通りを IgG 画分として次の FITC 化反応に用いた。FITC 化は 50mM Na₂CO₃-NaHCO₃ Buffer 中で行ない, 室温・2 時間反応後, Sephadex G-25 により FITC-抗 C3X を得た。

[結果]

(1). 3段階のクロマト操作により精製・単離して得た C3X は SDS-PAGE で単一のバンドを示した。分子量は約 140 K であった。2-メルカプトエタノール (2-ME) で還元することにより分子量 70K, 40K, 30K の 3 本鎖に分れた。一方、C3 は分子量 210 K であり、2-ME 処理により α 鎖 140K と、 β 鎖 70K とに分れた。C3X と C3 とを比較すると、C3X は β 鎖を有しているが 140K の α 鎖は無かった。(Fig. 3.)

(2). C3X と C3 を Ouchterlony 法により抗 C3 血清および抗 C3X 血清と反応させると前者の抗血清に対しては、沈降線の間 *spur* を形成するが、後者と反応させた時には融合 (*fuse*) した。

(3). C3 をトリプシンで分解すると、SDS-PAGE 上、C3X と同じ位置にバンドが見られた。

(4). TAK と C3X とを *in vitro* で反応後、FITC-抗 C3X で処理すると、TAK がケイ光ラベルされているのが観察された。

[考察]

今回得た結果を総合すると、C3X は C3 の分解産物であることが以下のことから推定される。

(1). C3X は C3 よりも低分子量 (2). 免疫学的抗原性 (3). C3 のトリプシン分解による SDS-PAGE 上 C3X 類似バンドの出現

C3X の構造は C3 の β 鎖を有しているが、 α 鎖の一部を欠損している。このことは、C3X と C3c との類似性を示唆している。

EDTA-血漿について、血清と同様に TAK の Affinity chromatography を行ったところ、C3 の抗原性を持った蛋白は吸着されなかった事、及び EDTA 存在下の血清中でも TAK に C3X が吸着される事などの知見を得た。これらの結果は C3X はマウス血清中において、C3 より分解されて生成したものと考えられる。

C3 が C3X になると、TAK に吸着するようになり、その吸着は EDTA 中でも起こることが判った。これは、FITC-抗 C3X を用いたケイ光抗体法により C3X は TAK に *direct* に結合することからを確かめられた。この現象の生物学的意義については現在検討中である。

1) 本多進・et.al. 第18回補体シンポジウム講演抄録集 pp49-51 (1981)

2) H. Okada & N. Okada. Jap. J. Exp. Med. 44 301-310 (1974)

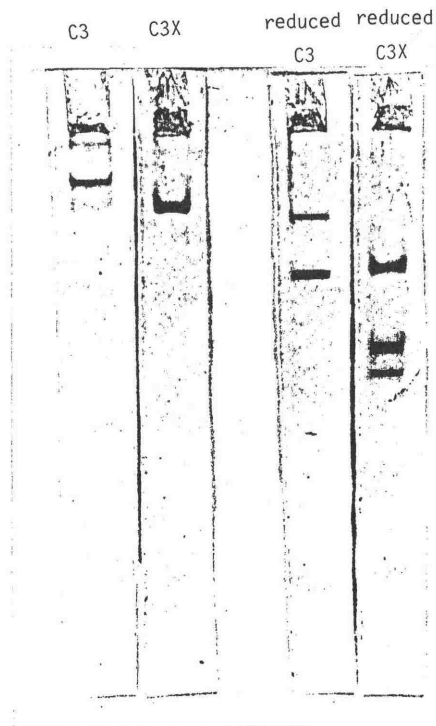
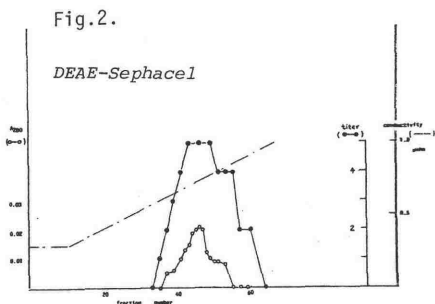
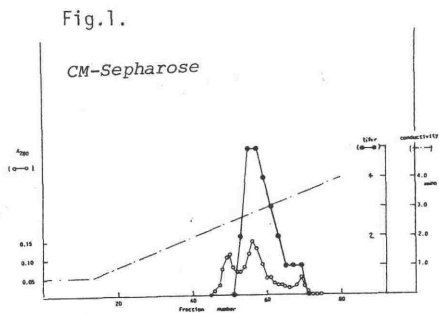


Fig.3.

A cleavage product of mouse C3 adsorbable to (1→3)-β-D-glucan

TAK, (1→3)-β-D-glucan produced by *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*, possesses an antitumor activity and is an activator of the alternative complement pathway. Fractionation and purification of mouse serum with the use of affinity chromatography on a TAK column and ion exchange chromatographies gave a protein which was precipitated by anti-mouse C3 serum. The molecular weight of this protein (designated as C3X) was approximately 14,000 daltons, and consisted of β chain of C3 (70,000 daltons) and the other two chains (40,000 and 30,000 daltons). The trypsinolysis of C3 gave a band similar to C3X on SDS-PAGE. A spur was formed between the precipitin lines of C3 and C3X developed against anti-C3 serum, while the precipitins against anti-C3X fused. The electrophoretic mobility of C3X was faster than that of C3 on agarose gel. These results suggest that C3X is a cleavage product of C3 and structurally similar to C3c. C3X was not adsorbed to TAK in EDTA-plasma, but was adsorbed in serum even in the presence of EDTA. Therefore, it seems that C3X is preformed in serum through nonspecific activation of complement and that the preformed C3X has a capacity to bind to TAK even in the absence of bivalent cations.

モルモット C8 の構造と活性について
— 分離精製した α - γ サブユニットと β 鎖からの再構成実験 —
木下 タロウ・洪 卿秀・井上 公藏 (阪大・匠・細菌)

目的 C8 は, α (MW 60K), β (MW 60K), γ (MW 24K) の 3 ペプチド鎖で構成されている。 α と γ は互いにジスルフィド結合して α - γ サブユニットを形成しており, この α - γ サブユニットが β 鎖と非共有結合している (Fig. 1)。 Sodety のグループは, ヒト C8 の α - γ サブユニットと β 鎖を SDS で分離して精製し, SDS を除去した後, 両者から C8 を 95% の回復率で再構成する事に成功した (Steckel et al., J. Biol. Chem., 1980, 255, 11997)。 さらに, β 鎖は単独で, SC5b-7 あるいは EAC1-7 に結合して SC5b-7, β , EAC1-7, β となり EAC1-7, β に α - γ と C9 を加えると溶血する事を示した (Monahan & Sodety, J. Biol. Chem., 1980, 255, 10579, 1981, 256, 3258)。 この事からヒト C8 では, β 鎖に C5b-7 との結合部位が局在すると結論された。

今回我々は, モルモット C8 の α - γ と β を Steckel らの方法に準じて精製し, 再構成実験を行なって彼らの結果と比較した。 その結果, モルモット C8 の場合には, α - γ , β それぞれ単独では C5b-7 と効率よく結合する事はできず, 両者をともに反応させた時結合する事が明らかになったので報告する。

方法 モルモット C8, α - γ サブユニット, β 鎖の精製: C8 は既に報告した方法 (Kinoshita et al., Mol. Immunol., 1982, in press) により精製した。 α - γ と β の精製は, Steckel らがヒト C8 に用いた方法に準じて以下のように行なった。 4mg の C8 を 0.2% SDS で 37°C で 60 分間処理して α - γ と β に分離した後, 室温で 0.1% SDS-0.1M NH_4HCO_3 で平衡化して Sephacryl S-300 (1.8 $\times$ 143cm) でゲルろ過した。 α - γ はさらに 1 回, β はさらに 2 回同じカラムでゲルろ過して精製した。 得られた α - γ と β は, 室温で 6M 尿素—0.05M ナリソ酸緩衝液, pH 7.0 に透析後, 同じ buffer で平衡化して Amberlite CG-400 (0.5 $\times$ 4cm) に通して SDS を除去した。 最後は 5mM Tris HCl, pH 7.4—1mMEDTA—145mM NaCl に氷室で透析した。 収量は, α - γ , 186 μg , β , 237 μg であった。

・C8 の溶血活性測定: サンプルを 1×10^7 個の EAC1-7 と 5×10^8 effective molecules のモルモット C9 と共に全量 500 μl の EDTA-GVB 中で 37°C で 60 分間反応させ, 溶血率をもとめた。

・C8, α - γ , β の蛋白質量の測定: それぞれの溶液の OD₂₈₀ を測定し, OD₂₈₀ が 1.0 の時, 1.0mg/ml の蛋白濃度であると仮定して計算した。

・ α - γ と β からのC8再構成： α - γ と β を， α - γ は4.5~79.0 $\mu\text{g/ml}$ ， β は3.7~28.2 $\mu\text{g/ml}$ の最終濃度で混ぜあわせ，室温で15分放置して再会合させた。

・ α - γ ， β のEAC1-7への結合測定： α - γ と β を Enzymobeads (Bio-Rad) を用いて ^{125}I ラベルした。 ^{125}I - α - γ 単独， ^{125}I - β 単独， ^{125}I - α - γ を cold β と再構成後， ^{125}I - β を cold α - γ と再構成後，それぞれ 3×10^8 個の EAC1-7，EA と 400 μl の EDTA-GVB- 5 mg/ml OVA 中で 37℃ で 60 分間反応させた。遠心 (3,000 rpm, 15 分) 後，2 回洗浄した後，血球に結合した放射活性を測定した。EAC1-7 の値から EA の値を差引いて，C5b-7 への結合量とした。 ^{125}I - α - γ と ^{125}I - β は，直前に 13,000 rpm で 15 分間遠心して沈降物を除去してから用いた。

結果 ・ α - γ ， β の溶血活性：72.3 ng の α - γ (第2図， Δ)，28.2 ng の β (口) をそれぞれ単独に C8 の溶血活性測定系に加えても溶血しなかった。28.2 $\mu\text{g/ml}$ の β に， α - γ を 4.5~72.3 $\mu\text{g/ml}$ ままで変量して加えて再構成した後，28.2 ng の β を含む量を用いて溶血活性を調べると， α - γ の量に応じて活性が出現した (○)。

・再構成による溶血活性の回復率： α - γ ，79.0 $\mu\text{g/ml}$ ， β ，28.2 $\mu\text{g/ml}$ で再構成後溶血活性を測定し，C8 の活性と比較した。C8 は 0.14 ng，再構成系では， β が 1.67 ng で $Z=1$ であった。0.14 ng の C8 中には，0.058 ng の β が含まれているから，活性の回復率は 3.5% であった。

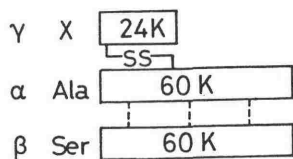
・ α - γ と β を順に反応させた場合の溶血活性：第1段階を，1) α - γ 単独，2) β 単独，3) α - γ と β 共存の3通りで EAC1-7 と反応させ，遠心後2回洗浄した後，第2段階を，1) には β 単独，2) には α - γ 単独，3) には buffer をそれぞれ加えて反応させ，遠心後2回洗浄してから第3段階で C9 と反応させ，溶血率を調べた。第3図に示したように， α - γ と β を同時に加えた時 (○) のみ効率よく溶血した。 α - γ と β を順に加えた場合，どちらの順序でも (Δ ，口) 少し溶血し，これは片方だけを反応させた対照 ($\blacktriangle$ ， $\times$) の和よりも高かったもので， α - γ ， β 単独でも C5b-7 に弱い affinity を持っていると考えられた。

・ α - γ ， β の EAC1-7 への結合測定： ^{125}I - α - γ ， ^{125}I - β をそれぞれ単独で EAC1-7 に反応させてもほとんど結合しなかった。(第4図， Δ ， $\times$)。再構成後に調べると， ^{125}I - α - γ (○，●)， ^{125}I - β (口，■) とともに結合した。EAC1-7 が過剰の領域で， ^{125}I - α - γ の約 7%， ^{125}I - β の約 9% が結合したので，それぞれ少なくとも 7% と 9% は結合活性を回復したと考えられる。

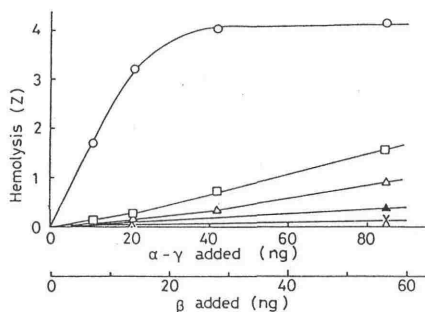
考察 ヒト C8 の 95% の溶血活性を回復する α - γ ， β の精製法に準じてモノセット C8 の α - γ と β を精製した。しかし，溶血活性の回復率が 3.5%，C5b-7 への結合活性が， α - γ で 7%， β で 9% であった。これは Sepharose

S-300 での分離が完全でなく、再ゲル通過したため、SDS 除去までに10日
要しているの、変性が進みすぎた結果であると考えられた。

この標品を用いた限りでは、モルモット C8 の場合には、 α - γ 、 β の片方に
C5b-7 との結合部位が局在し、かつ他領域の影響を受けないと考えるより
も、両方にまたがって存在するか、あるいは再構成することによつて
conformational change が起こり、はじめに結合部位が形成されると考える
方がよいという結果であった。

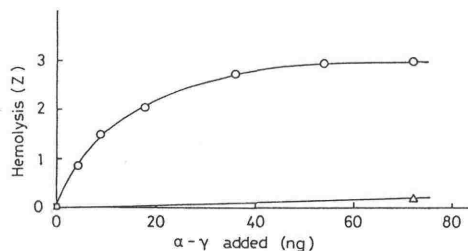


※1図, C8の構造



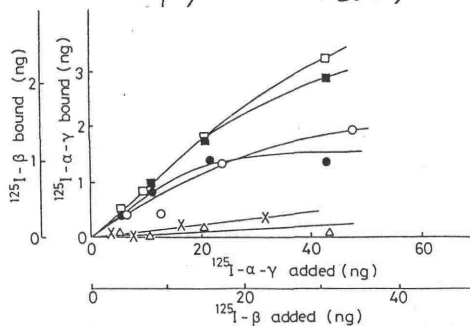
※3図, α - γ と β を順に反応
させた時の溶血

○: α - γ , β /buffer, Δ : α - γ / β
□: β / α - γ , $\blacktriangle$: α - γ /buffer
×: β /buffer



※2図, α - γ と β から C8 の再構成

○: α - γ + β , Δ : α - γ solo, □: β solo



※4図, ^{125}I - α - γ , ^{125}I - β の結合
○, ●: ^{125}I - α - γ + cold β (○ α - γ / β = 3/1, ● 1/1)
□, ■: ^{125}I - β + cold α - γ (□ α - γ / β = 3/1, ■ 1/1)
 Δ : ^{125}I - α - γ solo X: ^{125}I - β solo

STRUCTURE AND ACTIVITY OF THE EIGHTH COMPONENT OF GUINEA PIG COMPLEMENT:
RECONSTITUTION OF C8 MOLECULE FROM ITS SEPARATED α - γ SUBUNIT AND β CHAIN

TAROH KINOSHITA, KYONGSU HONG, and KOZO INOUE
Department of Bacteriology, Osaka University Medical School

The α - γ subunit and β chain were separated and purified from guinea pig C8 according to a method similar to that of Steckel et al. (1980).

Neither α - γ nor β showed C8 hemolytic activity, but a short incubation of both subunits restored the C8 activity. The ratio of the reconstituted activity was calculated as 3.5%. When EAC1-7 cells were incubated with either subunit, centrifuged, washed and then incubated with another subunit, a little C8 activity appeared on the cells regardless of the order of subunit added. However, neither radiolabeled subunit combined alone significantly with EAC1-7 cells, while 7% of ^{125}I - α - γ and 9% of ^{125}I - β combined with the intermediate cells when added in the mixture with the cold counterpart subunit.

These results suggest that the combining site on guinea pig C8 molecule to C5b-7 does not reside independently at either subunit but is formed as the result of combination of both subunits.

グルタチオンによるC5b-9複合体 のC9サブユニット間の架橋反応

山本健一, 川島孝則, 右田俊介

金沢大学がん研究所分子免疫部

補体の膜傷害性複合体(C5b-9二量体)の構造及び機能上C9は重要な役割を果たしている。今回我々は、グルタチオンを用い、C5b-8複合体にC9分子がclusterとなつて結合し、そしてこれらの多分子C9がC5b-9複合体内においてお互いに近接して存在していることを示す実験結果を得たので報告する。

実験方法: C5b-6複合体(1,2), C7(3), C8(4), C9(5)の精製はそれぞれ既に報告されている方法で行なった。C8及びC9の¹²⁵I、あるいは¹³¹IでのradioiodinationはIODOGENを用いて行なった(6)。人工脂質二重膜(リポソーム)に結合したC5b-8複合体は、dimyristoyl phosphatidyl cholineを用いて作製したりポソームに順次C5b-6複合体、C7, ¹²⁵I-C8を反応させ、不連続30%糖密度勾配超速心法にかけて作製した(2)。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動はWeberとOsbornの方法で行なった。

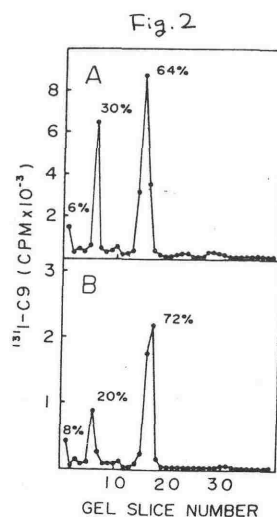
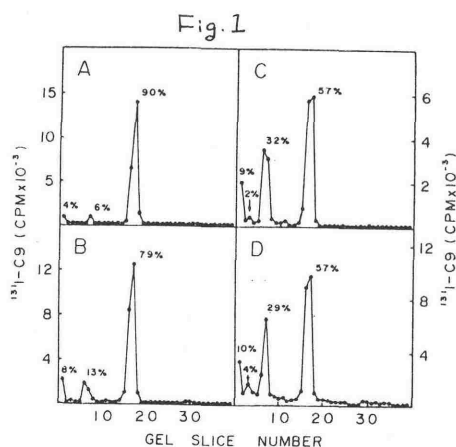
結果: リポソームに結合したC5b-8複合体(11 µg)と¹³¹I-C9(23 µg)を種々の濃度(0.1 mM, 1 mM, 10 mM)の還元型グルタチオン存在下で37°C、20分間反応させ、生成したC5b-9二量体を不連続30%糖密度勾配超速心法で分離し、還元剤非存在下でSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ない分析した。Fig 1Aに示すように、グルタチオン非存在下で生成したC5b-9二量体中の大部分のC9は7.6万のC9単量体の分子量を示した。一方グルタチオン存在下で生成したC5b-9二量体では、C9サブユニットの二量体(15.1万)及び三量体(20万)の形成が認められた(Fig 1, B-D)。還元剤存在下でSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析を行なうと、これらのC9 oligomerは認められず、グルタチオンによるC9 oligomer形成はC9間のジスフィド結合を介して起ったと考えられた。

次に、C5b-9複合体内におけるC9間の架橋反応が結合したC9分子数に依存しているかどうか調べた。11 µgのC5b-8複合体に1.4 µgあるいは23 µg

の ^{131}I -C9を加え、1mMグルタチオン存在下で37℃、20分間反応させた。23 μg のC9を加えた場合には、C5b-8 1分子当り、平均5.3分子のC9が結合し、生成したC5b-9複合体は33Sの沈降系数を示すC5b-9二量体であった。一方、1.4 μg のC9を加えた場合には、C5b-8 1分子当り、平均0.9分子のC9の結合が起こり、生成したC5b-9複合体はC5b-9単量体及び二量体の両方を含んでいた。これらのC5b-9複合体を還元剤非存在下でSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ分析すると、平均5.3分子のC9を結合した33SのC5b-9二量体では、そのC9サブユニットの約半がC9二量体の形で存在していた(Fig 2A)。また、平均0.9分子のC9しか結合していないC5b-9複合体では、そのC9サブユニットの約半がC9二量体になっていた(Fig 2B)。

考 察: C5b-8 1分子当り、平均1分子以下のC9しか結合していない場合でもC9間の架橋反応が起こることから、C9はC5b-8複合体にclusterとなって結合すると考えられた。さらに、C5b-9複合体内において、グルタチオンによる架橋反応によりC9 oligomerの形成が起こることから、多数のC9分子がC5b-9複合体内においてお互いに近接して存在していると思われる。

引用文献: (1)Yamamoto, K., and H. Gewurz. J. Immunol. 120:2008, 1978.
(2)Yamamoto, K. J. Immunol. 125:1745, 1980. (3)Podack, E.R., W.P. Kolb, and H.J. Müller-Eberhard. J. Immunol. 116:263, 1976. (4)Kolb, W.P., and H.J. Müller-Eberhard. J. Exp. Med. 143:1131, 1976. (5)Biesecker, G., and H.J. Müller-Eberhard. J. Immunol. 124:1291, 1980. (6)Fraker, P.J., and J.C. Epeck, Jr.. Biochem. Res. Comm. 80:849, 1978.



Glutathione-Catalyzed
Disulfide-Linking of C9
in the Membrane Attack
Complex of Complement

Ken-ichi Yamamoto , Takanori Kawashima,
and Shunsuke Migita

Department of Molecular Immunology
Cancer Research Institute
Kanazawa University
Kanazawa, Japan

SUMMARY

The membrane attack complex of complement (the dimeric C5b-9 complex) is a multimolecular assemblage of five proteins (C5b, C6, C7, C8, C9) which are held together by noncovalent forces. We found that C9 molecules in the complex can be covalently cross-linked (disulfide-linked) by glutathione. In this experiment, the tetramolecular C5b-8 complex bound to phospholipid vesicles was first prepared from purified C5b-6, C7 and C8. The vesicle-bound C5b-8 complex was then incubated (37°C; 20 min) with an excess of ^{131}I -C9 in the presence of 1 mM glutathione: an average of 5.3 molecules of C9 per C5b-8 were bound and the C5b-9 complex formed was predominantly a dimeric C5b-9 complex. About one-third of C9 in this C5b-9 complex was found to be in a disulfide-linked dimeric form. The C5b-9 complex having only an average of 0.9 molecules of C9 per C5b-8 was also prepared in the presence of glutathione : this C5b-9 preparation contained both monomeric and dimeric C5b-9 complexes, and about one-fifth of the C9 subunits was in a cross-linked dimeric form. By contrast, C9 in the absence of the C5b-8 complex was not significantly cross-linked by glutathione. These results indicate that C9 has a unique property to associate with each other upon reaction with the C5b-8 complex.

CLEARANCE KINETICS OF SOLUBILIZED IMMUNE COMPLEXES IN MICE

Nobuyoshi Takahashi, Teizo Fujita, and Noboru Tamura.

Institute of Basic Medical Sciences, The University of Tsukuba.

The role of complement in solubilizing preformed immune precipitates has been clearly defined *in vitro* (1,2,3). However, *in vivo* relevance of this complement function is as yet unclear. For this reason, we studied the *in vivo* clearance and processing of immune complexes which had been solubilized by complement *in vitro*.

Materials and Methods

Ag and Ab: Chicken ovalbumin (OA) was used as an antigen. Rabbit IgG Ab to OA was purified with immunoabsorbent techniques, followed by gel filtration on Sephadex G-200. The effluent containing only IgG monomer was pooled for use. The IgG was iodinated using Enzymobeads.

Immune complexes: Immune precipitates for solubilization was prepared by mixing OA with ^{125}I -labeled IgG antibody to OA at equivalence. Soluble immune complexes were prepared at 6-fold antigen excess.

Solubilization of immune precipitates: The immune precipitates containing 4 μg of complexed Ab were added to 500 μl of a 1:2 dilution of fresh C57BL/6 serum. After incubation at 37 °C for 60 min, the reaction mixture was centrifuged at 5000 g for 15 min. 90% of the radioactivity was found in the supernatant, which was used as solubilized immune complexes.

Clearance study: Solubilized immune complexes, Ag excess soluble immune complexes, or antibody alone containing 1.5 μg (5×10^5 cpm) of IgG in a volume of 200 μl was injected into the tail vein of 8- to 12- week-old C57BL/6 male mice. From the contralateral tail vein 10- μl -blood samples were obtained with a calibrated micropipette at 1,3,7,15, and 30 min and 1,2,4,8, and 24 hr following injection, and the radioactivity in the sample precipitable by 10% TCA was counted. The radioactivity in each sample for a given mouse was calculated relative to zero time value of radioactivity, which was determined by extrapolation of the log counts per 3 min at 1,3, and 7 min. The mean of the values for each sampling time was calculated from three or more mice receiving the same sample. The size distribution of complexes in the injected material was determined by gel filtration on 1.6 x 60 cm column of Sepharose 6B.

Results

Fig. 1 shows the clearance of soluble immune complexes at 6-fold Ag excess, solubilized complexes, and Ab alone from the circulation of mice. The disappearance curve of the soluble immune complexes is composed of three phases. The complexes were removed rapidly in the first phase, at an intermediate rate in the second, and slowly in the third. In solubilized complexes-injected mice, however, the curve was composed of only rapid and slow phases, and had no intermediate phases. In both cases the first phase had the same half-life. With this half-life 55% of the radioactivity was eliminated from the circulation

in *soluble* immune complexes, and 45% in *solubilized* complexes. Half-lives of the slow phase were similar in both complexes.

When *solubilized* complexes and *soluble* immune complexes were applied to a Sepharose 6B column separately, three major peaks appeared in the same position. They are corresponding to mol. wt. of > 1,000,000, 400,000, and 150,000, respectively. In *solubilized* complexes, 48% of radioactivity was eluted in the first peak, 31% in the second peak, and 21% in the third peak (Fig. 2). In *soluble* immune complexes, 15% of radioactivity was eluted in the first peak, 62% in second peak, and 23% in third peak (Fig. 3).

Discussions

Previous studies (4) have shown that the disappearance curve of soluble immune complexes from the circulation was composed of three exponential components. The first, second, and third components are concluded to reflect an extravasation of complexes due to increased vascular permeability, a removal of phagocytatable complexes by Kupffer cells, and a catabolism of remaining complexes in the circulation, respectively. As shown in Fig. 1, indeed, our disappearance curve of *soluble* immune complexes was composed of three components. Of note in present study is that the second component was absent in *solubilized* complexes-injected group, suggesting diminished phagocytosis of *solubilized* complexes by Kupffer cells. This may be further supported by previous *in vitro* studies (2) that demonstrate abolished affinity of solubilized complexes for Fc and C3 receptors.

In addition, we found an initial rapid disappearance of the radioactivity after injection of labeled *solubilized* complexes into mice, that is, 45% of the radioactivity were cleared within 15 min from the circulation. We considered at least two possible mechanisms responsible for this rapid removal of *solubilized* complexes. First, vascular permeability may have increased with the administration of *solubilized* complexes. Second, substantial portion of *solubilized* complexes with mol. wt. of > 1,000,000 may have sufficient structure to be entrapped or deposited nonspecifically within some organs. The latter may be compatible with our results that the percentage cleared within first phase is very close to the proportion of complexes with mol. wt. of > 1,000,000 in *solubilized* complexes as shown in Fig. 2. Additional studies on this aspect are currently under investigation.

References

1. Miller GW & Nussenzweig V 1975. A new complement function: solubilization of antigen-antibody aggregates. Proc Natl Acad Sci USA 72, 418.
2. Takahashi M, Takahashi S & Hirose S 1980. Solubilization of antigen antibody complexes: a new function of complement as a regulator of immune reactions. Proc Allergy 27, 134.
3. Fujita T, Takata Y & Tamura N 1981. Solubilization of immune precipitates by six isolated alternative pathway proteins. J Exp Med 154, 1743.
4. Haakenstad AO & Mannik M 1976. The disappearance kinetics of soluble immune complexes prepared with reduced and alkylated antibodies and with intact antibodies in mice. Lab Invest 35, 283.

Fig. 1

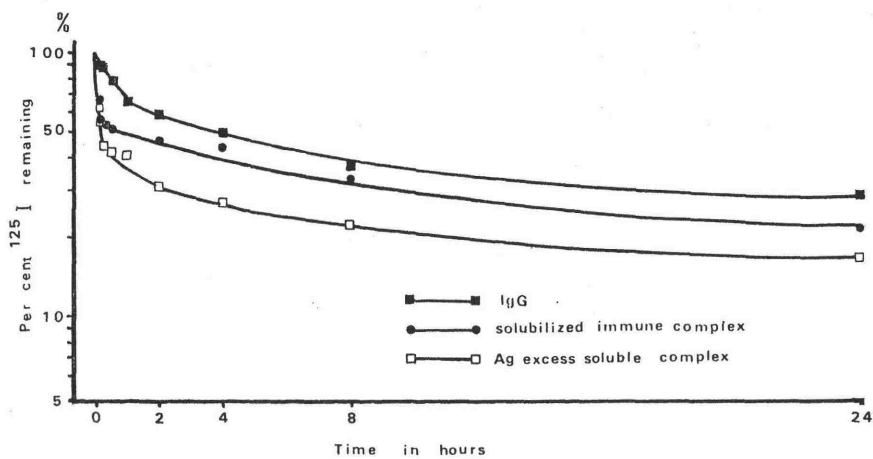


Fig. 2

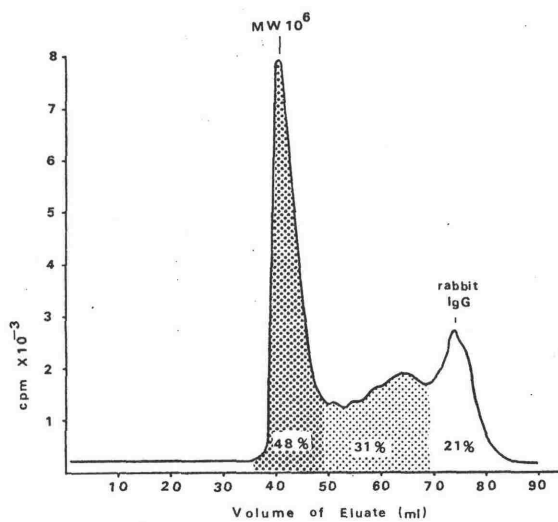
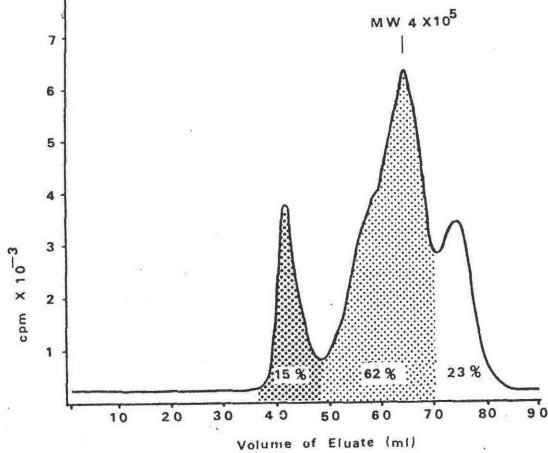


Fig. 3



マウス株化マクロファージの補体B蛋白の合成・分泌

名古屋保健衛生大・医・微生物

森山 剛・川本保子・深山昭雄

マクロファージ系細胞で、各種補体成分の合成・分泌が確認されている。我々は以前より、種々の刺激を加えた培養マウス腹腔マクロファージが、補体活性化因子Bを少量に分泌することを明らかにし、免疫反応との関係を検討してきた。そこで、Bを合成・分泌する細胞の分化の程度、細胞内で合成されたBの性状などを明確にしようとした。

材料と方法

1、マクロファージ(Mφ)の培養 正常マウス(C3H/HeN)の腹腔細胞を既報の方法で採取し、L-細胞培養上清25%含有5%牛胎児血清加MEMで培養した。株化MφであるMIT, Mkl及びMml細胞は、京大・増田先生より分与載いたものを使用し、各々の培養法も増田らの記載に従った。

2、B溶血活性及び諸酵素活性の測定 Bの溶血活性、リゾチーム、酸性ホスファターゼ及び乳酸脱水素酵素活性は、既報の方法により測定した。

3、免疫沈降反応 細胞培養開始後一定時刻に、培養液中に $0.5\mu\text{Ci}/\text{ml}$ の ^{14}C -蛋白質加水分解物を加え、一定期間培養した。細胞内のBは細胞を1%-トリトンX-100で可溶化したものについて、細胞外のBは、培養上清を Mg^{2+} 加ベロナル緩衝液に 4°C 、一晩透析したものについて測定した。各被検液に担体として一定量のマウス血清と牛血清アルブミン(BSA)を加えた後、測定系には、予め最適比を検定したウサギ抗マウスB抗体を、対照系には、同様にウサギ抗BSA抗体を加え、その沈降物中の ^{14}C -放射活性を測定した。

4、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE) SDS-PAGEは、沈降物を可溶化したものについて常法に従って行なった。泳動終了後、2mm厚に薄切したゲルを 1ml の1%- $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NCS}$ (1:1)溶液に移し、 37°C 、12時間加温後、液体シンチレーション・カウンターで測定した。分子量は、既知標準蛋白と比較し決定した。又、Birchler社のMACRO PAGEを用いての分取精製用ポリアクリルアミドゲル電気泳動(MACRO SDS-PAGE)も行なった。

実験結果

1. M1細胞のB産生と分泌 マウス腹腔Mφは、多くのBを合成・分泌するが、in vitroの系に於いては代謝活性が弱く、合成・分泌の実験系としては好ましくない。株化MφであるM1⁻、Mk1及びMm1細胞のB産生能を比較・検討した。どの細胞も、B蛋白合成能は指数関数的に増加し、特に分化型Mm1細胞に於いては、細胞分裂期とB合成期が完全に同調していた。尚、各細胞の2倍数期は、17.0時間(M1⁻細胞)、12.0時間(Mk1細胞)及び19.0時間(Mm1細胞)であった。一方、合成されたBは経時的に分泌されたが、その溶血活性はMm1細胞の培養5日目以降にのみ発現した。又、このB産生はde novoの合成であることが、蛋白質合成阻害剤サイクロヘキサマイド(0.2 µg/ml)により確認してある。

2. 産生されたBの分子量 各細胞が生合成した細胞内のBは、SDS-PAGEによる分析から、分子量100,000の単一成分であることがわかった。しかし、同時に、分子量20,000付近にも¹⁴Cの取り込みを認めた。そこで、Mm1細胞の細胞外被検液についても同様の検討をしたところ、やはり分子量20,000を中心とする幅広の¹⁴C-取り込みを確認した。この抗マウスB抗体沈降性の未知蛋白を追求する為、MACRO SDS-PAGEを行なった。幅広の¹⁴C-放射活性は小さな4つのピークから構成されていることがわかり、各々の分子量は、25,000(ピークI)、28,000(ピークII)、33,000(ピークIII)及び35,000(ピークIV)であった。

3. B合成・分泌におよぼす種々薬剤の影響 分泌性蛋白の分泌能に影響を与えることが知られている試薬を用いて、Bの合成・分泌を検討した。M1⁻細胞をクロロプロマジン(0.01 mM / plate)の存在下で培養すると、B合成は対照の20%に、分泌量は50%に減少した。又、免疫応答に重要な役割を果たすリポ多糖体; LPSを5 µg/mlで用いると、分化型Mm1細胞でBの合成・分泌を顕著に増加させた。他に、癌誘発物質であるPMAや、カルモジュリン・アンタゴニストであるW-7も作用させたが、有意な変化は認められなかった。

考察

マウスBはSDS-PAGEの結果から、細胞内で一本のポリペプチド鎖として生合成され、その分子量は血清中のマウスBと同じであった。しかしながら、抗マウスB抗体沈降性の未知蛋白の存在も確認した。このことは、株化細胞M1が生合成したB蛋白のdegradation、あるいは、SDS-PAGE条件下に於ける未知蛋白の解離のいずれかによるものと思われる。そこで、MACRO SDS-PAGEで分取精製した低分子量のピークI~ピークIVとB

の分属 (ピーク V) とを試験管内で一定時間反応させたところ、ピーク I 及びピーク II がピーク V と結合し得ることがわかった。その結合の比は、計算上、B / 分子に対して約 3 分子であった。

現在、これらの物質が細胞内で、どのように B 蛋白の *post-translational regulation* をしているかについて検討中である。

Biosynthesis and secretion of factor B by mouse-established cell line cells.

MORIYAMA, TAKESHI KAWAMOTO, YASUKO and MIYAMA, AKIO

Department of Microbiology, Fujita-Gakuen University School of Medicine, Toyoake, Aichi.

M1 cells including M1⁻, Mkl and Mml were labelled with ¹⁴C-protein hydrolysate. Total factor B protein synthesized in short term culture increased concomitantly with multiplication of 3 types of the M1 cells. However, the secretion of hemolytically active factor B was detected after the first 3 days in the culture of Mml cells which were possessing some characteristics as mature scavenger macrophage. Factor B protein synthesized by M1⁻ and Mkl cells was detected intracellularly but not extracellularly so far as cell viability was kept more than 80% throughout cultivation. Analyzing the immunoprecipitates obtained from cell lysate of M1⁻, Mkl and Mml by SDS-PAGE, 2 peaks were observed at the positions of 100,000 and 25,000 to 35,000 daltons. Slow-moving peak was the same as seen on extracellular sample obtained from the culture of peritoneal macrophages, and its molecular weight was identical with that of serum factor B. Fast-moving peak was unique for intracellular samples of M1 cells and also L cells. We isolated fast-moving proteins from L cell lysate using preparative SDS-PAGE. It became clear that the fast-moving protein of immunoprecipitate could be separated to 4 distinctive peaks, at the positions of 25,000, 28,000, 33,000 and 35,000, respectively. Possible explanation for these proteins would be that 1) they are degradation-products of factor B and 2) they are antigenically unrelated to but proteins coprecipitated with factor B. Details are under investigation.

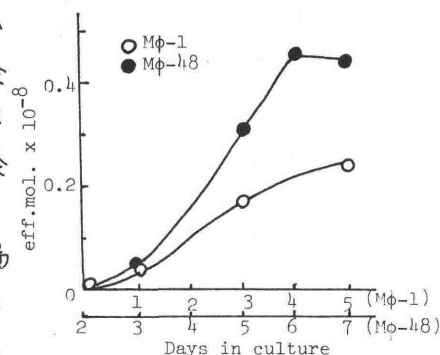
補体蛋白の多くが単核食細胞系の細胞により, 合成, 分泌されることはよく知られている。補体副経路の活性化に不可欠なB因子もその一つであり, ヒトでは血中単核球, マウス, モルモットでは腹腔マクロファージ(M ϕ)がB因子を合成, 分泌することが明らかにされている。

マウス腹腔M ϕ によるB因子の産生量が, in vivoあるいはin vitroの種々の刺激により変動することから, B因子が免疫反応に果たす役割は少ないと考え, 免疫応答の場である脾臓のM ϕ のB因子産生を検討した。

方法 1. マウス 4~8週令のB10.D2, あるいはC3H/HeNマウスを用いた。2. 脾臓M ϕ の培養 脾臓を無菌的に取り出し, MEMで洗浄後, ステレンスメッシュ上で細胞をほぐし, 単一細胞浮遊液とした。5%牛胎児血清加MEM (FCS-MEM)で洗浄後, 25% L細胞培養上清加FCS-MEM (LCM-MEM)に浮遊させ, $1 \sim 2 \times 10^7$ 個の細胞を35mmプラスチックシャーレで培養した。5% CO₂下, 37°C 1時間, あるいは48時間培養後, 非付着細胞を洗浄除去し, 付着細胞をM ϕ として, LCM-MEMで培養した。3. マウスの免疫 羊赤血球 1×10^8 個, *Salmonella typhimurium* の内毒素 (LPS) を50 μ g, あるいは *Yersinia enterocolitica* 生菌を約 3×10^6 個尾静脈より接種し, 4日後に脾臓細胞を採取した。4. 放射性同位元素によるM ϕ の標識 脾細胞培養直後, あるいは非付着細胞を洗浄除去後に, ¹²⁵I-蛋白加水分解物を1 μ Ci 加え, 1~5日間培養した。5. Immunoprecipitation ¹²⁵I-蛋白加水分解物で標識したM ϕ の培養上清は透析後, 細胞は1% Triton X-100で溶解後, キャリヤーとしてマウス血清, 牛血清アルブミンを加え, 抗マウスB抗体で沈降させ, 沈殿物の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。対照は抗アルブミン抗体を加えたものを用いた。6. B溶血活性の測定 M ϕ 培養上清を0.5mM Mg²⁺加VBSに透析後, コブラ毒因子依存性の溶血活性で測定した。7. 蛍光抗体法によるB因子の検索 M ϕ をPBSで洗浄後, グルタルアルデヒドで固定し, FITC標識抗ウサギIgG抗体と, 抗マウスBウサギF(ab')₂抗体を用いて間接法にて検索した。8. M ϕ の密度勾配による分画 等張のPercollと, 同量の0.15M NaCl溶液を混合し, 30,000 g 15分遠心して密度勾配を形成した。約 5×10^7 個の脾細胞を重層して, 400 g 20分遠心し, 管底より10滴ずつ分取した。MEMで洗浄後, 各分画の細胞数を測定し, $3 \sim 7 \times 10^5$ 個の細胞を2mlのLCM-MEMで培養した。

結果 1. M ϕ 培養上清中の溶血活性 脾細胞を37°C 1時間培養して得ら

れら付着細胞 (Mφ-1) は腹腔 Mφ に比べ、小型の円形細胞で形態的に未分化である。培養を続けると徐々に偽足を伸ばし、数日後には腹腔 Mφ 様に伸展した。脾細胞を 48 時間培養した場合 (Mφ-48) は、付着細胞がコロニーを形成することはよく知られている。この場合、Mφ-1 と異なり、大型の細胞で形態的に 2 種類、つまり突起を伸ばし、よく伸展した

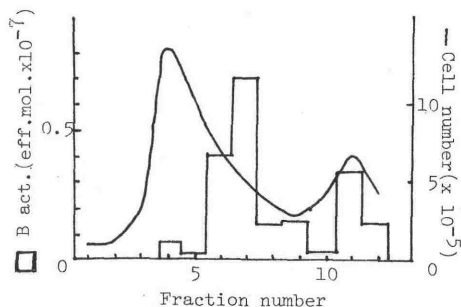


細胞と、核周辺に顆粒をもった円形細胞とが見られた。これらの細胞の培養上清中には、B 溶血活性が見出され、経時的に増加した (図 1)。コロニーを形成した Mφ-48 の方が常に高い活性を示した。2. 免疫刺激の影響 マウスを種々の抗原で免疫し、4 日後に脾臓細胞を培養し、Mφ-48 の B 産生を調べた。その結果、羊赤血球、LPS、*Yersinia enterocolitica* いずれの刺激においても培養上清中の B 活性の増加が見られ、腹腔 Mφ と同様の結果であった。免疫マウスの Mφ-48 は、対照にくらべコロニー形成能が高く、monolayer となる場合もあった。3. 脾臓 Mφ の B 蛋白合成量 培養上清中の溶血活性は図 1 から明らかのように常に Mφ-48 が Mφ-1 に比べ高かったが、B 抗原性を持った蛋白の分泌量は逆であった。しかし、細胞内に存在する B 蛋白は Mφ-48 > Mφ-1 で、細胞数の違いを反映したものと思われた。全合成量に関しては Mφ-48 が若干高い傾向が見られた。これは、免疫刺激を受けた場合でも、受けない正常マウスでも同様であった。Mφ-48 について、免疫の影響を調べると、溶血活性と同様、全合成量、細胞内に存在する量は増加したが、培養上清中に見出された蛋白は、LPS で刺激した場合、*Yersinia enterocolitica* VW+ 株と VW- 株で刺激した場合、溶血活性とは逆の関係が培養初期に見られた。従って、脾臓 Mφ が産生する B 因子は、B 抗原性を有するが何らかの理由で活性を持たない蛋白として分泌されている場合が多い事を示唆している。4. B 蛋白合成細胞 脾臓 Mφ は少なくとも形態的に 2 種類の細胞が区別される。これらの細胞の B 因子合成能を蛍光抗体法で調べたところ、いずれの細胞も、弱い細胞全体に蛍光が認められ、B 合成能を持つことが明らかとなった。Mφ-48 のコロニー形成の初期に見られる monoblast あるいは promonocyte 様の細胞は、既に Mφ 様に伸展した細胞に比べ、強い蛍光が観察され、合成能が大であることが示唆された。5. B 溶血活性の発現 Mφ-1 には、培養後 20 時間くらいで付着性を失って浮遊してくる細胞集団が含まれており、この中には、IgA 抗原を保有した樹状細胞 (DC) が多数含まれている。この細胞集団を洗浄除去すると、図 1 で見

られた溶血活性が発現してこなくなった。また、これらの細胞のみ培養しても同様であった。従って、活性発現には DC を含む細胞集団の存在、あるいはそれらが産生する液性因子が必要であると思われた。6. 脾細胞の亜集団 脾細胞を Percoll 密度勾配遠心により分画すると、リンパ球と思われる細胞のピークに続き、fraction 6, 7 に Mφ-1 様の細胞が得られ、fraction 11, 12 に培養初期に顕著な増殖を示す細胞集団が存在することを見出した。これらの細胞を数日培養したが、上清中には Mφ-1 あるいは Mφ-48 が示す活性の約半が見出されたにすぎなかった(図2)。

考察 脾臓 Mφ は B 因子を合成、分泌することになった。マウスに免疫刺激を与えると、培養上清中の溶血活性ならびに B 蛋白合成量が増加した。

脾臓には単核食細胞系の未分化な細胞が多数含まれており、蛍光抗体法で検索したところ顕著な B 蛋白合成能を持つことが示唆された。溶血活性を持った B 因子の分泌能は、形態的に分化するに従って上清中の活性が増加することから、恐らく分化型の Mφ において高いと考えられる。また、脾臓には、密度の低い、コロニー形成能を持つ細胞集団の存在が示唆された。免疫刺激は、何らかの経路でこれら未分化な細胞へ伝達され、その結果コロニー形成が顕著になると考えられる。



脾臓が分泌する B 因子は、不活性な形で存在している部分が多いと考えられる。Mφ-1 の中の、20 時間くらいで付着性を失う細胞集団の存在、あるいはそれらが産生する液性因子が B 溶血活性発現に不可欠ではないかと考えられ、現在検討中である。また、免疫応答の初期に Mφ より産生されるインターロイキン 1 が、活性発現の特定の段階に作用する可能性も考え、現在検討中である。

Factor B was found to be synthesized and secreted by mouse spleen macrophages. Immunization with various antigens resulted in enhanced synthesis and secretion of factor B by these cells. Besides these mature cells, immature spleen cells like monoblast or promonocyte could synthesize factor B. Morphological observation revealed that spleen macrophages consisted of at least 2 distinctive cell types, each carrying an ability to produce factor B. One of them was a cell-type which could spread well on plastic surface with a few pseudopods, and the other was a population containing large round cells with ruffling surface and perinuclear granules. Fractionation of spleen cells indicated also that there were at least 2 subpopulations separable by Percoll density gradient centrifugation. One consisted mainly of monocyte-like cells with a slow proliferation-rate, and they finally differentiated to mature macrophage during cultivation. Cells in the other subpopulation proliferated rapidly in early stage of culture and formed colonies consisting of large round cells with ruffling surface and perinuclear granules. In many cases, hemolytic activity of factor B secreted by these heterogeneous spleen macrophages did not coincide with the amount of factor B protein in culture supernatant. This fact, together with our observation that immature monocytic cell line cells but not peritoneal macrophages secrete hemolytically active factor B, suggests that the secretion of hemolytically active factor B by splenic macrophages is closely related to their differentiation process.

Cobra venom factor を結合した Concanavalin A による細胞膜表面への補体活性化能の導入

国立がんセンター研究所ウイルス部 田中博子、池之谷正克、岡田秀親

タンニン酸処理をした赤血球 (TE:tanned erythrocytes) に cobra venom factor (CoVF) を吸着させた TE-CoVF は、血清と反応させると、alternative complement pathway (ACP) を効率良く活性化し溶血反応を起こすことを知った。しかし、タンニン酸処理は、細胞膜表面に種々の修飾及び障害をおよぼし、細胞膜上に補体活性化能のみを導入しようという目的には適さない。特に、細胞膜上で ACP の活性化を trigger させ、これに対する細胞膜側の制御反応を検討する実験においては、細胞膜を native に近い状態に保っておく必要がある為、タンニン酸処理法は用い難いと考えられる。そこで、細胞に化学的処理をせずに CoVF を吸着させる方法としてレクチンの細胞膜吸着性を用いることを考案した。レクチンとしては、mannose 及び glucose に対して特異的結合性を持つ Concanavalin A (ConA) を用いた。mannose や glucose は細胞膜表面の糖鎖に存在するので、ConA を介して CoVF をどのような細胞にも簡単に吸着させることができると考えた。

実験計画としては、Sephadex の糖鎖に ConA を吸着させた Sephadex-ConA を作り、これにグルタルアルデヒドを反応させ、ConA にアルデヒド基を導入する。この際、ConA の糖結合部位は Sephadex と結合している為、グルタルアルデヒドから保護されると考えた。このようにして作成した Sephadex-ConA (CHO) に CoVF を作用させると、ConA 上のアルデヒド基と CoVF のアミノ基との間で Schiff-base ができ、Sephadex-ConA-CoVF が形成される。これを、グリシン緩衝液にて洗滌し余分なアルデヒド基をブロックしてから α -methyl mannose 等で処理すると、Sephadex-ConA-CoVF より ConA-CoVF が溶離できると期待した。

〔実験方法及び結果〕

1) 各種の Sephadex に対する ConA の結合性を検討した。Sephadex 1 ml に 1 mg/ml の ConA を等量加え、Sephadex への吸着率を測定した。

Sephadex G200, G100 等は、それぞれ 92%, 87% の吸着率を認めたが、G25 は 13%, G15 では 2.3% と吸着率が低かった (表1)。Sephadex G25

や G15 では、Sephadex 粒子内に ConA が入り込めない為、吸着容量が低いと推察された。又、

(表1) ConA の各種 Sephadex に対する吸着率と溶離率

Sephadex	G15	G25	G50	G75	G100	G150	G200
吸着率	2.3(%)	12.5	55.4	72.6	87.1	84.0	91.9
α -mG による溶解率	N. T.	N. T.	14.2(%)	13.1	10.2	9.3	N. T.
α -mM による溶解率	0.4(%)	0.7	41.5	71.8	69.1	81.9	82.4

脱離溶出剤として 0.1M α -methyl glucose (α -mG) と 0.1M α -

methyl mannose (α -mM) とを用いて検討したところ、 α -mM では効率良く溶離されるが、 α -mG はその効率は良くなかった。以上の結果を踏まえ、Sephadex G200 を以下の実験に用いることとし、溶離剤としては 0.1M α -mM を用いることとした。

- 2) ConA を ^{131}I で標識し、CoVF を ^{125}I で標識して実験に用い、その放射能活性により追跡を行い、ConA-CoVF Complex の回収率を検討した。

Sephadex G200 に ^{131}I -ConA を吸着させ、これに 0.1% グルタルアルデヒドを等容量加えて、室温にて 1 時間反応させた。未反応のグルタルアルデヒドを洗滌除去し、 ^{125}I -CoVF (1 mg/ml) を加え、室温、20 分間反応させた後、未吸着の ^{125}I -CoVF を ConA 緩衝液で洗滌除去し、さらに 0.1M グリシン溶液にて洗滌した。この Sephadex G200- (^{131}I) ConA- (^{125}I) CoVF に 0.1M α -mM を加え、室温、1 時間反応後、溶出液を得た。この方法により回収された ConA と CoVF は(表2)に示すとおりである。ConA

の回収率に比べ、CoVF の回収率は極めて低く、0.2% 程度であり、ConA との回収の比率で 100 倍前後の違いが認められた。

(表2) ConA-CoVF 画分への回収率

	Exp. I	Exp. II	Exp. III	Exp. IV
^{131}I -ConA 回収率(%)	26.0	13.5	23.4	21.5
^{125}I -CoVF 回収率(%)	0.1	0.19	0.36	0.23
ConA/CoVF 比	260	71	65	93

- 3) CoVF の回収率が低く、実験条件の改良が必要ではあるが、予備実験として、上記の方法で得た ConA-CoVF に、当初目的とした細胞膜への ACP 活性化能賦与能力が存在しているか否かを検討した。ヒツジ赤血球 ($1 \times 10^8/\text{ml}$) 100 μl に対し、ConA-CoVF (ConA 濃度として 1 mg/ml) を 50 μl 加え、37°C にて 20 分間反応後、赤血球を Mg^{++} -EGTA-GVB で洗滌、100 μl に浮遊させた。これにヒト血清やモルモット血清を Mg^{++} -EGTA-GVB で 1:4 に希釈したものを等量加え、37°C、1 時間反応させた後、溶血度を

検討した。その結果、75%程度の溶血が認められたが、ConAのみを処理したヒツジ赤血球の溶血は軽微であった。従ってConA-CoVF法による細胞膜へのACP活性化能賦与が期待したように可能であることが確かめられた。

〔考 察〕

ConA-CoVFを細胞膜に反応させることにより、細胞をACPに対して感作できることがわかった。しかし、ConA-CoVFの調製に当たり、CoVFの回収率が極めて低く、調製法の検討が必要である。例えば、グルタルアルデヒドの反応条件、CoVFの反応条件における濃度、温度、pH等の至的条件の追求が残されているので、これらの点について検討したいと考えている。又、Sephadex粒子中で、ConA-CoVFが形成されると、分子が大きくなる為粒子から溶離できなくなる可能性も考えられる。¹²⁵I-CoVFはSephadex G200に吸着したままで溶出されないものがinputの10%前後あり、このことから上記の可能性が示唆された。これを防ぐ為には、ConAもCoVFも粒子中には入れないSephadex G25を用いたり、又、ConAを分散させる為にSephadex容量をConA量に比べ高くすることが考えられ検討中である。なお、今回はConA-CoVF画分に共存するConAを除去してはいないが、今後は分離して検討したいと考えている。
(文部省科学研究費補助金及び成人病研究所記念財団研究助成金の補助を受けた)

Induction of complement activating capacity on cell membrane by Concanavalin A conjugated with cobra venom factor

Hiroko Tanaka, Tadakatsu Ikenoya and Hidechika Okada

Virology Division, National Cancer Center Research Institute, Tokyo 104

We have reported that tannic acid treated erythrocytes (TE) followed by conjugation of cobra venom factor (CoVF), (TE-CoVF) react effectively with the alternative complement pathway (Okada & Tanaka, J. Immunol. Meth. 46, 85, 1981). To limit chemical modification possibly produced on cell membrane by tannic acid treatment, we attempted to fix CoVF on cell membrane using concanavalin A (Con A) as a carrier.

Con A absorbed to Sephadex G200 was treated with glutaraldehyde and then incubated with CoVF to generate Con A-CoVF complex conjugated through Schiff base. Con A-CoVF was eluted from Sephadex G200 with 0.1 M α -methylmannose following washing with 0.1 M glycine buffer. The recovery of ¹³¹I-Con A and ¹²⁵I-CoVF in the eluate were approximately 20% and 0.2% respectively. Although the recovery of CoVF in Con A-CoVF fraction was poor, thus prepared Con A-CoVF could sensitize sheep erythrocytes to human and guinea pig complement. Studies to improve the recovery of Con A-CoVF is under progress.

RSV誘発腫瘍細胞による補体の活性化

甲斐知恵子¹, 吉川泰弘¹, 山内一也¹, 岡田秀親²

(1: 東大医科研, 2: 国立ガンセンター)

要約 ウズラC3(QC3)の分離と同定を行ない、得られた抗C3血清を用いてラウス肉腫ウイルス(RSV)誘発腫瘍細胞がウズラ補体の活性化を起こすことを確かめた。

ウズラ新鮮血清(FQS)蛋白から分離、精製した分子量184Kの蛋白は以下の性状を有していた。1) 184K蛋白に対する単特異的抗体(α -184K)はEAC^qを凝集させるがEA^qは凝集させない。2) 補体を活性化すると、 α -184Kを用いた交差免疫電気泳動(CIEP)で、沈降線は γ から β 領域へ移動する。3) 184K蛋白は110Kと73Kの2つのsubunitsから成り、活性化に伴い174K, 140Kの蛋白に開裂した。4) 184K蛋白とZymosan(Z)との結合は、NP40処理によっては解離しなかった。この蛋白が哺乳類のC3の性状と酷似していることからQC3と同定した。

ついで、 α -184Kを用い、RSV誘発腫瘍細胞がウズラの補体系を活性化することをin vivo, in vitro両面から検索した。1) in vitroではRSV誘発腫瘍細胞株は、いずれもFQS処理によってC3の沈着がおこり、また初代培養細胞においても、RSVでtransformさせるとC3沈着陽性を示した。2) in vivoでは血清中C3量が、腫瘍の増大に伴い増加し、腫瘍組織にC3の沈着が観察された。以上からin vivo, in vitroいずれも、RSV誘発腫瘍細胞が補体を活性化すると考えられた。

目的 RSV誘発ウズラ腫瘍の系で腫瘍免疫の機序についての研究を進めてきた際に、RSVでtransformしたウズラの1細胞株がFQSで溶解すること、担癌ウズラのCH₅₀が高値を示すことから、RSV腫瘍の免疫に補体の肉与の可能性が推察された。しかし鳥類の補体成分に関しては、これまで分離も同定もされていないので、我々は補体系の中心的役割を担うC3の分離、同定を試み、ついでQC3に対する単特異抗体を作成してRSV腫瘍細胞によるウズラの補体系の活性化について検討した。

方法と結果

[I] ウズラC3の分離と同定. (1) C3の候補となる蛋白の分離と同定: Zymosan complex (ZX) でウサギを免疫して抗血清(α -ZX)

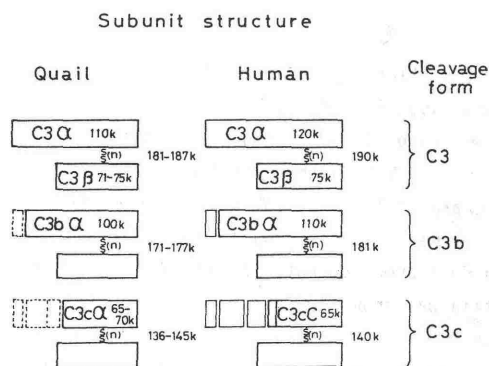
を得た。 α - Σ Xは agarose Bを用いたCIEPにより γ , β 領域にくる2つの蛋白を認識していたので、それぞれの沈降線を切り出しウサギで抗血清(α - γ , α - β)を作成した。この抗血清はウサギ血球をウズラの自然溶血素, 補体で処理したEAC⁺を1:6400以上で凝集させるが, EA⁺は凝集させなかったことから, γ , β の両蛋白は補体成分であることが示唆された。FQSを Σ か inulin で処理した場合, γ 蛋白は β 領域へ移動したのに対して, β 蛋白では移動はみられなかったことから, γ 蛋白をC3と考え α - γ を指標としてFQSからQC3の分離を試みた。まずFQSをNa₂SO₄で塩析し, α - γ と反応し, IgGの混入の少ない13-20% Na₂SO₄の分画を得た。ついで Sephadex G200 column でゲル濾過し, α - γ と反応するpeakを集めDE 52 cellulose column クロマトグラフィーで α - γ と反応する分子量184Kの蛋白をC3の候補として分離した。184K蛋白のみを含む分画をウサギに免疫して抗血清(α -184K)を得た。 α -184Kは α - γ と交差反応性をもち, inulinで処理したFQSとCIEPを行なったところより β 領域に至る1本の沈降線を示した。EAC⁺に対する凝集価は1:328000という高い価を示し, EA⁺に対しては1:10以下であった。

(2) 184K 蛋白の構造: α -184Kを用いた免疫沈降法, SDS-PAGEで解析すると, 184Kの蛋白は2ME処理により110Kと71-75Kの2つの蛋白に分かれた。また, LPS あるいは inulinで処理すると184Kは171-177K, 136-145Kと開裂をおとし, これらをDTT処理すると100Kと65-70Kに新たにbandをつくった。

(3) 184K 蛋白の Σ への結合: 10mM EGTA+2mM Mg⁺⁺ 存在下で作成した Σ Xは α -184Kを用いた間接蛍光抗体法(IFA)で陽性を示し, 1% NP40で2hr処理しても陽性であったことから184K蛋白の Σ への結合は疎水結合ではないことが確認された。

(4) 184K 蛋白の他の性状: 等電点はpH 5.4 $\pm$ 0.2で inulinで完全に開裂させると5.1 $\pm$ 0.1に移動した。また α -184Kは哺乳類のC3とは反応しなかったが鶏のそれとは交差反応性を示した。FQSはCVF(2,500 units/ml)処理によって溶血活性がおちなかった。

(Ⅱ) RSV誘発腫瘍細胞による補体の活性化. (1) ウズラ腫瘍細胞株7株についてFQS処理での溶解を検索したが, 1細胞株を除き溶解し



なかった。しかし FQS を 1.5 時間作用させ補体の活性化を C3 の沈着を指標として IFA で検索したところ、ウイルス産生の有無に拘らず RSV 誘発腫瘍細胞株は全て陽性を示し、メチルコラントレン誘発腫瘍細胞株 2 株は陰性であった。またウズラ 7 日胚の初代培養細胞に A 亜群トリ肉腫ウイルス、白血病ウイルス (SR-A, RAV-1) を接種した細胞、および非感染細胞の 3 種類について IFA で同様の検索を行なったところ、SR-A transformed cells のみ陽性を示した。これらの反応はいずれも Mg^{2+} -EGTA 存在下でも陽性であった。

(2) in vivo での補体の関与を調べるため 4~5 週齢ウズラに SR-A を接種し、経時的に腫瘍の大きさの消長を測定すると共に、血清中 C3 量を α -184K を用いた Rocket 免疫電気泳動法により測定した。腫瘍の大きさと血清中 C3 量とに相関の存在が示唆された。また腫瘍塊の凍結切片を作成し IFA で検索した結果、腫瘍組織中に C3 の沈着した細胞が観察された。

考察 腫瘍の形成期に腫瘍中に多数の好中球が浸潤し、ついでリンパ球の浸潤がおこることは、ウズラの RSV 腫瘍に対する免疫反応の誘導に補体の活性化が重要な役割を果たしている可能性を示唆している。今回の研究で、QC3 の分離、同定を行ない、また作成した単特異抗血清を用いて RSV 腫瘍細胞がウズラの補体を活性化することを見出した。本実験系は、腫瘍に対する防御反応における補体の役割と機構、transformed cell の補体の activator 等についての解析の好適なモデルと考えられる。

SUMMARY

Isolation and identification of the third component of quail complement (QC3) was performed and monospecific anti-QC3 serum was obtained. Subsequently, activation of quail complement by Rous sarcoma virus (RSV) induced transformed cells were confirmed using this antiserum.

One protein with molecular weight (m.w.) of 184,000 (184K) daltons isolated from quail serum has characteristics as follows. 1) monospecific antiserum (anti-184K) agglutinated EAC^Q but not EA^Q , 2) treatment of fresh quail serum with either inulin or zymosan resulted in conversion of precipitin line developed against 184K protein from γ to β regions in crossed immunoelectrophoresis, 3) 184K protein was shown to consist of 2 polypeptide chains of 110K and 73K linked by disulfide bonds. Furthermore 184K protein was cleaved to 174K and 140K proteins by activation of complement, and 4) 184K protein binding to zymosan was not eluted with NP40-treatment indicating that the binding was not hydrophobic one. These results suggest that 184K protein is a quail's equivalent of mammalian C3.

Activation of quail complement by RSV-induced transformed cells were studied in vivo and in vitro using anti-184K serum. 1) in vitro study; in all continuous cell lines transformed by RSV, C3 deposition on the cell surfaces was observed by treatment with fresh quail serum (FQS). Primary quail embryo cells transformed by RSV but not those infected with RAV-1 were positive for C3 deposition by the same treatment. 2) in vivo study; the amount of C3 in quail sera was increased in parallel to the growth of RSV induced tumor. C3 deposition was observed in tumor lesion. These results suggest that RSV transformed cells activate quail complement both in vivo and in vitro.

Glycophorinによる喰反応抑制と補体代替経路抑制の相関について

助川鶴平・田宮博人・岡田真理子・加納誠・内海爽
愛媛大学・医学部・細菌学教室

ヒト赤血球膜の主要糖蛋白であるglycophorin (GP) は、それを含む標的粒子の、ヒト好中球によるFcレセプター媒介性喰反応を抑制する¹⁾²⁾が、そのメカニズムはまだ明らかではない。一方、Austenらのグループ(Czop et al., 1978³⁾⁴⁾)は、オプソニンを介さない単球の喰反応(表面貪食)について、標的粒子の被貪食性が、その補体代替経路(APC)活性化能と密接に相関することを認め、両反応系に共通に作用する様な標的表面構造の存在を暗示した。トリプシンにきわめて感受性の高いレセプターがそのような喰反応を媒介するという。

われわれは、GPをDNP基と共に組込んだリポソーム(GP⁺-DNP-liposomes)を標的モデルとし、結合IgG抗体によって開始されるAPCの活性化がGP存在によりどう影響されるか、について調べ、GPによる自己貪食抑制とAPC抑制との間の相関関係について調べようと試みた。

＜材料と方法＞

GPはプールヒト赤血球膜より抽出、PAS-1, 2, 3を含む分画をSephadex G-150濾過でglycophorin AあるいはBに分けたものを用いた。C3Rの混入を除外するため、必要に応じてC3-Sepharoseカラムを通過した標品を使用した。C3はTack & Prahl⁵⁾(1976)の方法により調製、必要に応じてp-chloromercuribenzoate Sepharoseを通過したものを用いた。β2H1はHong⁶⁾らの方法に準じて精製した。Factor Bは、ヒト pseudoglobulin 分画のBio Rex 70, QAE-Sephadexカラムにより、properdinはQAE-Sephadexカラムにより、粗Factor DはSephadex G-75カラムにより、それぞれ調製した。C3INAはCordis社より購入した。

ヒト好中球のFc媒介性喰反応は、ウサギ抗DNP(IgG)で感作した標的リポソームに対するNBT反応により測定した。とり込みの測定には、Evans Blueを含む着色リポソームを用いて行った。IgG感作リポソーム上でのAPC活性化は、ウサギ抗C3を用いた二次元電気泳動免疫拡散法によるC3b測定により評価した。

〈結果〉

1. GP存在による、FcR媒介性反応の抑制は、好中球のトリプシン処理により影響されなかった。標的 GP⁺-DNP-liposome のトリプシン消化はその被食食能を恢復させる。
2. GPは、それを含む IgG感作リポソームのモルモット補体による膜侵襲を軽度抑制した (glucose 漏出反応による)。
3. GPは、それを含む IgG感作リポソームによる APC 活性化を著しく抑制した。

GPによる APC 活性化の抑制が、C3 convertase 生成の段階か、あるいは $\beta 1H$ による不活化の促進によるか、を検討中である。

〈考察〉

標的表面に組込まれた glycophorin は、その粒子の Fc レセプター-媒介性喰反応と IgG 媒介性の APC 活性化を共に抑制し、単球の表面貪食と APC の相関と類似の関係が Fc 媒介性反応系でも成り立つことが明らかになった。しかし、表面貪食と異なり、喰細胞のトリプシン感受性レセプターは関与していない様に思われる。GP による APC 阻害のメカニズムとして、C3 convertase の形成の阻害か、あるいはその $\beta 1H$ 感受性の増大か、について検討中である。

〈文献〉

- 1) 内海爽, 南純三郎, 加納誠, 園田俊郎, 山崎美枝子
日本免疫学会総会記録 (1979) 才9巻 265頁
- 2) 四宮博人, 内海爽
日本免疫学会総会記録 (1981) 才11巻 455頁
- 3) Czop, J.K., D.T. Fearon & K.F. Austen (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. 75:3831.
- 4) Czop, J.K., D.T. Fearon & K.F. Austen (1978) J. Immunol. 120:1132.
- 5) Tack, B.F. & J.W. Prahll (1976) Biochemistry 15:4513.
- 6) Hong, K., T. Kinoshita, Y. Dohi & K. Inoue. Submitted for publication.

Summary - The role of glycoprotein (GP), the major glycoprotein of human erythrocyte membranes, as an inhibitory signal for self-phagocytosis, has been studied by the use of DNP-liposomes carrying GP¹⁾²⁾. The phagocytic response of human PMN to IgG-opsonized liposomes was suppressed by incorporating GP into the liposomes, in a dose responsive manner. The capacity of IgG-coated liposomes to activate the alternate pathway of human complement (APC) was also suppressed by the presence of GP on the surface. The correlation between the observed effects of GP on the FcR-mediated phagocytosis and on the activation of APC is seemingly in keeping with the previous observation by Czop et al.³⁾⁴⁾ in the phagocytic responsibility of monocytes to APC-activators.

血清中の補体第2成分(C₂)蛋白量の測定と疾患時における変動

上田 章, 木須達郎*, 鉢嶺一男, 岩橋徳二, 草場公宏

九州大学医学部第一内科, 佐賀医科大学内科*

〔はじめに〕

従来, 補体第2成分(C₂)の測定はもっぱらその溶血活性測定によって行われてきたが, 測定法がやゝ頻雑なため大量の検体の測定には不向きである。一方, C₂欠損者に全身性エリテマトーデス(SLE)その他の自己免疫性疾患が高頻度に合併するとの報告がみられ¹⁾, このような症例を検索する際にはC₂蛋白量測定が不可欠であるが, C₂は微量成分であるため, その精製や抗体作成が困難であり, SLE患者におけるC₂蛋白量の検討はほとんどなされていない。

今回, 私どもは抗ヒトC₂家兔血清を作成することに成功したので, その特異性について検討し, さらに, 健康成人ならびにSLEその他の疾患時における血清中のC₂蛋白量の変動について報告する。

〔材料ならびに方法〕

SLE患者ならびにその近親, 各種疾患罹患者ならびに健康成人から採取した血清を対象とした。血清は-20℃あるいは-80℃に保存したものをを用いた。

ヒトC₂は長沢らの方法²⁾に準じて精製し, 精製したヒトC₂約100 μ gをFreundの完全アジュバントとともに家兔皮内に注射, 4週後に同量のC₂を再注射し, 7日後に全採血し, 抗ヒトC₂家兔血清を作成した。

この抗血清を2%の濃度に含む1%アガロース平板を作成し, ロケット免疫電気泳動法を用いて被検血清中のC₂蛋白量を測定した。すなわち, 血清を5 μ l入れて, 20V/cm, 5時間泳動し, 120人の健康成人プール血清中のC₂蛋白量に対する百分比で表わした。

血清補体価(CH₅₀)の測定にはMayer原法の1/2.5法を用いた。C₃およびC₄蛋白量はHoechst社製のイムノプレートを用い, single radial immunodiffusion (SRID)法によって測定した。またfactor B (Bf)はBoenischとAlperの方法³⁾に準じて精製したBfを家兔に免疫して作成した抗Bf血清を用いてSRID法により測定し, C₂同様健康成人プール血清に対する百分比で表わした。

〔結果ならびに考案〕

1. 精製 C 2 と抗 C 2 血清の特異性に関する検討

精製した C 2 は, SDS-ポリアクリルアミド電気泳動で単一バンドを示し, その分子量は約 112,000 であった。抗 C 2 血清はオフトロニー法および免疫電気泳動法により, その特異性を確認した。今回作成した抗 C 2 血清はオフトロニー法でヒト全血清および精製 C 2 と単一の沈降線を形成し, その沈降線が完全に隔合することが確認された。さらに, 免疫電気泳動法で C 2 が β グロブリン分画に属することが示された。

2. 健康成人における C 2 蛋白量の分布

133 名の健康成人血清中の C 2 蛋白量は, 平均値 100.8%, 標準偏差 $\pm 13.2\%$, 95% range 80~130% であった (図 1)。

3. SLE その他の疾患罹患者における C 2 蛋白量の変動

血清中の C 2 蛋白量の平均値および標準偏差はそれぞれ, 活動期 SLE 患者 $65.4 \pm 20.7\%$ ($n=50$), 寛解期 SLE 患者 $94.9 \pm 22.0\%$ ($n=67$), SLE 患者近親 $105.8 \pm 22.0\%$ ($n=105$), 他疾患罹患者 $104.1 \pm 24.5\%$ ($n=147$) であった (図 2)。

活動期 SLE 患者では, 寛解期患者に比べて C 2 蛋白量の低下をみるものが多かった。SLE 以外の疾患罹患者では, シェーグレン症候群, 悪性関節リウマチなどの自己免疫性疾患ならびに肝疾患の一部に C 2 蛋白量の低下を認めた。

4. SLE 患者血清中の C 2 蛋白量と他の補体成分との間の相関 (表 1)

C 2 蛋白量と他の補体成分との間の相関係数はそれぞれ, Bf 0.621, CH₅₀ 0.595, C4 0.575, C3 0.537 であり, いずれとも相関がみられたが, CH₅₀ との相関では C 2 よりも C 3 の方が高い相関を示した。また, Bf の濃度は, 活動期 SLE 患者で $69.1 \pm 22.1\%$ ($n=14$), 寛解期 SLE 患者で $108.4 \pm 28.7\%$ ($n=19$) であり, C 2 同様, 活動期での低下がみられた。

〔文 献〕

- 1) 草場公宏, 他: 補体の異常と疾患. 臨床と研究, 58:3210, 1980.
- 2) Nagasawa, S. and Stroud, R. M.: Cleavage of C 2 by C1s into the antigenically distinct fragments C2a and C2b: Demonstration of binding of C2b to C4b. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 2998, 1977.
- 3) Boenisch, T. and Alper, C. A.: Isolation and properties of a glycine-rich- β -glycoprotein of human serum. Biophys. Acta, 221: 529, 1970.

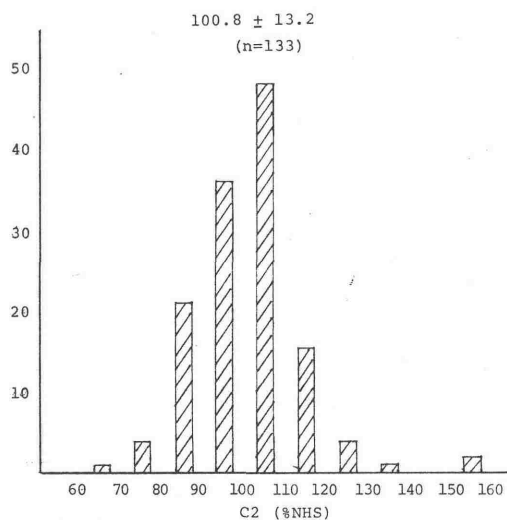


Figure 1. Distribution of C2 protein levels in healthy adults.

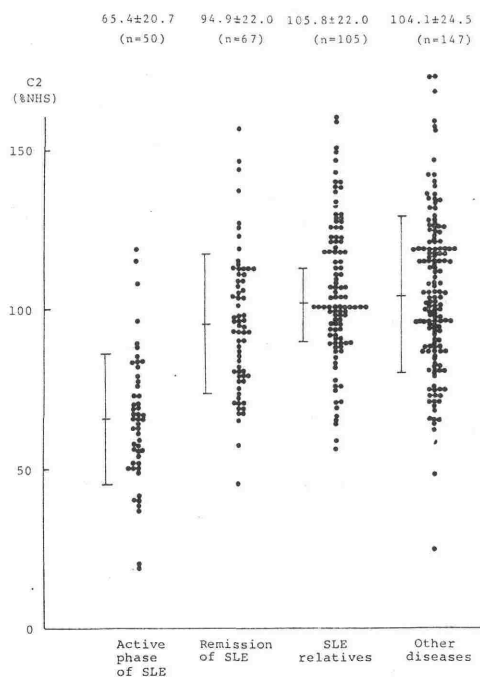


Figure 2. C2 protein levels in sera.

Table 1. Correlation between C2, factor B, C3, C4 and CH50 levels in sera from patients with SLE.

	C2	factor B	C3	C4	CH50
C2	*	0.621	0.537	0.575	0.595
factor B	0.621	*	0.528	0.313	0.397
C3	0.537	0.528	*	0.647	0.744
C4	0.575	0.313	0.647	*	0.622
CH50	0.595	0.397	0.744	0.622	*

Quantitation of serum C2 protein level and the complement profile
in systemic lupus erythematosus

Akira UEDA, Tatsuro KISU*, Kazuo HACHIMINE, Tokuji IWAHASHI
and Tomohiro KUSABA

First Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Kyushu University

*Department of Internal Medicine, Saga Medical School

Protein levels of the second complement component (C2) in sera from patients with systemic lupus erythematosus (SLE), their relatives, patients with other various diseases and healthy adults were studied.

Human C2 protein was purified by the method of Nagasawa et al. Rabbits were immunized subcutaneously with C2 emulsified in complete Freund's adjuvants. After absorption with immunoadsorbents, the specificity of the antiserum was tested by Ouchterlony test and immunoelectrophoresis. On immunoelectrophoresis, purified C2 showed a single precipitin arc in the β globulin region when developed with anti-C2. Molecular weight of C2 was estimated 112,000, approximately. C2 protein level in serum was measured by electroimmunoassay using barbitar buffer, 0.075 M at pH 8.6 and 5 μ l specimens were applied to each hole. Electrophoresis was carried out at 20 v/cm for 5 hours. The C2 values were given in percentage of the concentration in the standard pooled serum from 120 healthy adults.

The results obtained were as follows.

- (1) C2 protein levels were determined in 133 normal sera. The mean value, the standard deviation and the 95 per cent range were 100.8 %, $\pm$ 13.2 % and 80-130 %, respectively.
- (2) C2 protein levels in sera from patients with active SLE, inactive SLE, their relatives and other various diseases were 65.4 ± 20.7 % (n=50), 94.9 ± 22.0 % (n=67), 105.8 ± 22.0 % (n=105) and 104.1 ± 24.5 % (n=147), respectively.
- (3) In SLE sera, correlation coefficients between C2 and each of C4, C3, factor B and CH50 were 0.575, 0.537, 0.621 and 0.595, respectively.

第19回 補体シンポジウム講演集

昭和57年6月1日 印刷
昭和57年6月3日 発行

編集代表者 第19回 補体シンポジウム 世話人 白石 聡

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 TEL03- 823-2101

印刷所 〒790 松山市木屋町 1 丁目 5 番地 6
松山印刷有限会社

領布価格 3,000円

Methaphyllin / Homoclomin