

Proceeding of the Complement Symposium

Vol. 22, Nagoya, 1985

## 第22回 補体シンポジウム

講演 抄録集

---

会 期 昭和60年 6 月27日(休)・28日(金)・29日(土)

会 場 愛知厚生年金会館

名古屋市千種区池下町 2 - 63

☎ 052 - 761 - 4181

世話人

藤田学園保健衛生大学  
医学部微生物学

深山昭雄

〒470 - 11 愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪 1 - 98

☎ 0562 - 93 - 2432

---



## 御 案 内

### 受 付

シンポジウム第1日（6月27日）正午より会場入口で行います。

会 場 費 3,000円

懇親会費 4,000円

なお、宿泊を申しこまれた方はホテルフロントで、午後3時よりチェックインの手続きをして下さい。

また、宿泊費、食事代などは各自御精算下さい。

### 演 説

発表時間は1題10分、討論5分、計15分とします。

プロジェクター1台を設置します。スライドは35mmサイズに限ります。

スライドの枚数に制限はありませんが時間を厳守して下さい。

### 懇 親 会

第2日（6月28日）午後の演題終了後午後6時より行います。

### 運営委員会

運営委員会を第2日（6月28日）、昼食時に別室にて開催します。

### そ の 他

年会費未納の方、および新規会員になられる方は、今年度は受付にて年会費納入の手続きは行いませんので、当日までに、補体シンポジウム事務局宛、振り込んで下さい。

郵便振替（福岡5 - 9895）補体シンポジウム事務局

年 会 費 5,000円

# 愛知厚生年金会館ごあんない図



## 交通機関

- 国鉄名古屋駅より地下鉄を御利用の方  
地下鉄東山線・池下（イケシタ）駅下車（名古屋駅より藤ヶ丘行・所要時間・約12分）
- 車を御利用の方  
東名高速名古屋 I.C. より西へ約 6 Km（所要時間・約25分）
- 空港バスを御利用の方  
名古屋駅（名鉄バスセンター）到着後，地下鉄御利用の場合と同様

## 第22回 補体シンポジウムプログラム

第1日 6月27日(木)

(13:35~14:45)

座長 酒井好古, 大井洋之

1. Membrane Plasma Separator 使用時における補体活性について  
高岡哲郎, 由良二郎, \*Y. Nōse, P. S. Malchesky  
(名市大・第一外科, \*Clevel. Clin. Found. Artificial Organs, U. S. A.)
2. 人工心肺下体外循環における血中補体の変動と, FUT-175 によるその抑制の試み  
宮本裕治, 広瀬 一, 松田 暉, 川島康生, \*北村 肇, \*永木和義  
(阪大・第一外科, \*府立成人病センター)
3. 透析膜による補体の活性化  
—臨床 C3a 動態の in vitro 実験による裏付け—  
酒井良忠, 国友哲之輔, \*菅野恒博, \*\*鈴木好夫,  
\*\*二瓶 宏, \*\*三村信英  
(東レ, \*東レリサーチセンター, \*\*虎の門病院・腎センター)
4. CAPD貯液中の補体系蛋白(第2報)  
—特に bactericidal activity について—  
中西 功, 椿原美治, 河島利広, 友淵 基, 横川明子, 飯田喜俊  
(大阪府立病院, 腎疾患専門診療科)

(14:45~16:40)

座長 米増國雄, 永木和義

5. 各種動物のACH50値測定法について  
田中 忍, 北村ふじ子, 鈴木貴和, 嶋田孝吉, 西岡久壽弥  
(東京都臨床研・免疫)
6. 補体第一成分(C1)を除いた血清(RC1)を用いるC1溶血活性の測定法  
永木和義, 坪井睦美, 松本美佐子, 北村 肇  
(府立成人病センター)
7. レーザーネフェロメーターによるC1qの定量法の開発  
\*新井加余子, 佐々木隆子, 米増國雄, 檜葉周三  
(\*阪大・中検, 奈良医大, 細菌)

—Coffee Break—

8. C1q solid phase ELISA による免疫複合体測定法の問題点  
\* 福田和雄, 木下康通, 須藤克彦, 堀籠郁夫, 清野 仁, 古山 隆  
(\* 山形済生館病院・内科, 東北大・第二内科)
9. 補体の活性化によって出現する補体成分複合体の ELISA による検出  
田村 昇, 伊藤清子, 藤田禎三  
(筑波大・医・免疫血清)
10. ELISA による新しい C3 NeF 測定法  
清野 仁, \* 福田和雄, 木下康通, 須藤克彦, 堀籠郁夫, 古山 隆  
(東北大・第二内科, \* 山形済生館病院・内科)

(16:40~17:50)

座 長 天野哲基, 行山 康

11. 全身性エリテマトーデス患者血清中の抗補体活性について (第二報)  
行山 康, 吉田健三, 宮本昭正  
(東大・医・物療内科)
12. C3 NeF とは異なる補体活性因子を認めた持続性低補体膜性増殖性糸球体腎炎患者の再検討  
大井洋之, 波多野道信, \* D. K. Peters  
(日大・医・第二内科, \* Royal Post Grad. Med., Hammersmith Hospital)
13. 膠原病における免疫複合体可溶化現象の検討  
友岡和久, 延永 正, \* 酒井好古  
(九大・生医研・内科, \* 国立福岡中央病院・第二内科)
14. 実験的免疫複合体腎炎における免疫複合体の可溶化能の検討  
天野哲基, 馬越由伸, 桑島紀夫, 山村昌弘, 太田善介  
(岡山大・第三内科)

第2日 6月28日(金)

(9:00~10:25)

座 長 長沢滋治, 藤田禎三

15.  $^1\text{H-NMR}$  による補体系第三成分の高次構造についての研究  
武藤 裕, \* 福元裕二, 荒田洋治  
(東大・理, \* 帝人・生医研)

16. C4b 分子中の C2・C4bp 結合部位の解析

長沢滋治, \*市原千嘉子, 小山次郎  
(北大・薬, \*応用生化学研究所)

17. 液相中における classical pathway を介する C3 非依存性 C5 活性化について

北村 肇, 坪井睦美, 永木和義  
(府立成人病センター)

18. EAC 142 と C5 $\beta$  の反応について

坪井睦美, 北村 肇, 永木和義  
(府立成人病センター)

19. C4 nephritic factor で安定化された classical complement pathway の C3 分解酵素に対する C4-binding protein 及び factor I の作用

伊藤清子, 藤田禎三, 田村 昇  
(筑波大・医・免疫血清)

—Coffee Break—

(10:40~11:50)

座 長 岡田秀親, 稲田進一

20. 担癌生体における血清補体価と補体系インヒビターの動態

谷川 徹, 加藤治樹, 上田正博, 谷川真理, 宮川晴雄, 金 竜起, 吉川敏一, 杉野 成,  
近藤元治  
(京都府立医大・第一内科)

21. 癌性腹水に対する OK-432 (ピシバニール) の効果, 作用機序に関する補体面からの検討

加藤治樹, 垣見依子, 吉田憲正, 山村義治, 竹村俊樹, 谷川真理, 金 竜起, 吉川敏一,  
杉野 成, 近藤元治, \*鳥巢要道  
(京都府立医大・第一内科, \*九大・医・第一外科)

22. リウマチ因子による変性 IgG の補体活性化作用抑制

神宮政男, 轟木 峻, 友岡和久, 延永 正  
(九大・生医研・内科)

23. 心筋細胞のマイクロゾーム画分によるモルモット赤血球の溶血反応

深山昭雄, 川本保子, 藤沢有紀, 雪竹 潤  
(藤田学園・医・微生物)

— 昼 食 —

(13:00~14:00) 運営委員会

(14:00~15:10)

座 長 飯田恭子, 奥田智子

24. 培養単球 CR2 の性状  
稲田進一, 鳥飼勝隆  
(藤田学園・医・内科)
25. モノクロナール抗 CR2 によるリンパ球増殖反応の増強  
飯田恭子, 藤田禎三, 田村 昇, \*成内秀雄  
(筑波大・医・免疫, \*東大医科研・アレルギー)
26. モノクロナール抗体を用いた補体B因子の生物学的役割における解析  
\*田中恵津子, 洪 卿秀, 小園晴生, 高田裕子, 竹田潤二, 木下タロウ, 井上公蔵  
(\*大阪医大・微生物, 阪大・医・細菌)
27. 単クローン抗体によるコブラ毒因子の機能の解析  
藤沢有紀, 川本保子, 深山昭雄  
(藤田学園・医・微生物)

— Coffee Break —

(15:25~16:35)

座 長 坂井俊之助, 徳永勝士

28. 日本人における C4 の遺伝的多型とコンプロタイプ, HLA-補体ハプロタイプについて  
徳永勝士, 尾本恵市, \*十字猛夫  
(東大・理・人類学, \*東女医大・輸血部, \*東大病院・輸血部)
29. ウサギ C3 cDNA の塩基配列の解析  
草野真夫, 崔 南虎, 富田基郎, \*山本健一, \*右田俊介, \*\*関谷剛男,  
\*\*西村 暹  
(昭和大, \*金沢大・がん研, \*\*国立がんセンター・生物)
30. マウス S1p の全一次構造解析  
野中 勝, 中山耕造, 柳 大烈, 高橋守信  
(金沢大・がん研・免疫生物)

31. マウス補体制御因子 CR-1 構造遺伝子座と H 因子構造遺伝子座の連関  
坂井俊之助, \* 佐藤 博, 海藤敏雄, 高橋守信  
(金沢大・がん研・免疫生物, \* ウイルス)

(18:00~20:00) 懇 親 会

第 3 日 6 月 29 日 (土)

(9:00~10:15) 座 長 北村 肇, 稲井真弥

32. 献血者集団より発見された C5, C6 欠損と C9 欠損の家系調査について  
福森泰雄, 吉村敬次, 大軒子郎, 山口英夫, 大久保康人, \* 赤垣洋二, \* 稲井真弥  
(大阪府赤十字血液センター, \* 大阪医大・病態検査)
33. SLE に合併した C7 欠損症の 1 例  
小嶋和英, 巽 典之, \* 丹羽 充, \*\* 北村 肇 \*\* 永木和義, \*\*\* 多田正義  
(大阪市大・医・臨床検査医学, \* 大阪市大・医・細菌学, \*\* 府立成人病センター,  
\*\*\* 大阪府立病院, HLA 研究室)
34. C9 欠損とシェーグレン症候群の合併症例  
鈴木和夫, 内田順子, 二瓶 宏, 三村信英, \* 杉本正毅, \* 西海正彦, \* 佐藤昭雄  
(虎の門病院・腎センター, \* 国立東京第二病院・内科)
35. 髄膜炎菌感染を契機に発見された遺伝性 C7 欠損症の一例  
小林正夫, 岡田道子, 相原克昭, 松浦良二, 臼井明己, \* 赤垣洋二, \* 稲井真弥  
(広島大・医・小児科, \* 大阪医大・病態検査)
36. 髄膜炎または髄膜炎を疑わせる症状を反復した C7 欠損症の一症例について  
伊藤節子, 楠 隆, 真弓光文, 三河春樹, \* 赤垣洋二, \* 稲井真弥  
(京大・医・小児科, \* 大阪医大・病態検査)
37. 髄膜炎菌感染症を反復した C6 欠損症例  
松井 光, \* 越智繁樹, \* 天津京子, \* 稲田弥生, \*\* 赤垣洋二, \*\* 稲井真弥  
(今治病院・小児科, \* 今治病院・検査, \*\* 大阪医大・病態検査)

— Coffee Break —

(10:30~11:40)

座長 白石 聡

38. 紫外線紅斑発現への補体の関与について  
西抜和喜夫, 田上八郎  
(東北大・医・皮膚科)
39. 乾癬患者鱗屑中の補体アナフィラトキシンの動態について  
大河内享子, 竹松英明, 田上八郎  
(東北大・医・皮膚科)
40. 遺伝性血管神経性浮腫家系のアナフィラトキシン活性  
佐山浩二, 白石 聡, 三木吉治  
(愛媛大・医・皮膚科)
41. SLEにおけるS-Proteinの動態に関する研究  
中嶋憲章, 韓 啓司, 杉崎徹三  
(昭和大・医・第一内科)

# 1 Membrane Plasma Separator 使用時における補体活性について

高岡 哲郎, 由良 二郎  
名古屋市立大学第一外科

Y, Nōse P. S. Malchesky

Cleveland Clinic Foundation Department of Artificial Organs, U. S. A.

## 〔 目 的 〕

人工透析などの体外循環中におきる一過性白血球減少は、1960年に水戸ら、1968年にKaplowらによって報告され、また1977年にCraddockらによりこの現象は透析膜と血液の接触による補体活性が一因をなしていると指摘されて以来、体外循環時における補体系の変動はBiocompatibilityの面からも重要な問題となっている。よって今回我々は、membrane plasma separator 使用時における補体系の変動について、白血球との関係をも含め詳細に検討を行ったので報告する。

## 〔 方 法 〕

Primary sclerosing cholangitis を基礎疾患とする38才、男性において、1回2,500～3,200 mlのmembrane plasma separatorによるplasma exchange (Replacementとして5% albumin)を施行し、経時的にmodule前(inlet blood)、module後(outlet blood)、discard plasma(outlet plasma)より採血し、白血球数、 $CH_{50}$ 、 $C_3$ 、 $C_5$ 、 $C_{3a}$ 、 $C_{5a}$ を測定した。抗凝固剤としてはHeparin 5,000uをplasma exchange開始5分前にone shot静注し以後3,400u/hr持続注入した。 $CH_{50}$ はMayer法、 $C_3$ 、 $C_5$ はnephelometry法、 $C_{3a}$ 、 $C_{5a}$ はradioimmunoassay法にて測定した。membrane plasma separatorは、polymethylmethacrylate (PMMA)、polyethylene (PE)、polyvinyl alcohol (PVA)、cellulose diacetate (CA)の4種のmoduleを使用した。

## 〔 結 果 〕

(1) Inlet Blood : 白血球数は4種のmoduleすべてにおいてPE開始後15分～30分(early phase of perfusion)をmaximumとする減少傾向を認めた。又、この白血球減少は特に好中球の減少によった。 $CH_{50}$ 、 $C_3$ 、 $C_5$ はすべてのmoduleにおいて経時的に減少傾向を示した。 $C_{3a}$ はすべてのmoduleにおいて白血球数変動と同じくearly phaseにMaximumとなる増加傾向を示し、特にC.A moduleにその傾向は著明であった。しかし、 $C_{5a}$ においては著明な変化は認められなかった。以上Inlet Bloodにおいては、白血球数と $C_{3a}$ との間に逆の間係が認められた。

(2) Inlet Blood と Outlet Blood との差 : 白血球数は両者間においてすべての

module に有意差は認められなかった。C<sub>3</sub> , C<sub>5</sub> は early phase において PMMA , PVA では 26 ~ 34 % , PE , CA では 8 ~ 16 % と PMMA , PVA において有意に減少が認められた。C<sub>3a</sub> , C<sub>5a</sub> は PVA , PE , CA において early phase では有意に増加を示したが PMMA では著明な増加を示さなかった。(3) Inlet Blood と Outlet plasma との差 : C<sub>3a</sub> , C<sub>5a</sub> 共に outlet blood よりも outlet plasma において著明な増加が認められた。

#### 〔 結 論 〕

- (1) membrane plasma separator による補体活性化は膜と血液との接触により early phase に生じ、その活性化の程度は module の素材により差異が認められた。
- (2) PMMA において perfusion 5 分後において、module 内にては活性化補体は増加を示さないにもかかわらず、全身的活性化補体の増加が認められた事より、補体活性化は膜と血液の接触（局所的活性化）のみならず全身的活性化が示唆された。
- (3) 白血球数の変動は全身的变化であり module 内で生ずる局所的变化ではない。
- (4) 補体系蛋白の deposition が module 内に生じている場合がある（PMMA）。
- (5) 補体活性化は白血球数変動の trigger となっている可能性が大である。

宮本裕治，広瀬 一，松田 暉，川島康生，北村 肇\*，永木和義\*  
大阪大学第一外科，大阪府立成人病センター研究所\*

### 《 目 的 》

心臓手術で用いる人工心肺下体外循環 (cardiopulmonary bypass : CPB) において血中補体が活性化され、その時出現するアナフィラトキシンが術後の肺，腎等の合併症の誘因となると言われている。腎不全における血液透析では血中補体は *alternative pathway* を介して活性化されることが知られている。CPB においてはその活性化のメカニズムは明らかでなく *classical pathway* あるいは *alternative pathway* がいかに関与しているかについても不明である。CPB 中の補体活性化を抑制し、ひいては術後の合併症を予防するためには先ずそのメカニズムを明らかにすることが必要である。そこで我々は、実験的に CPB のモデル回路において補体活性プロフィールを調べ、補体活性化阻害剤 FUT-175 (*natamstat mesilate*) の効果を検討した。さらに臨床的に CPB 中の補体活性プロフィールを調べ、ステロイド (*methylprednisolone*) の影響を検討した。

### 《 対象及び方法 》

実験的検討 ヒト新鮮凍結血漿より分離した血清 500 ml を用い、ローラーポンプと気泡型人工肺のみの閉鎖回路で 2 時間の循環を行なった。ヘパリンは用いず、温度は 37°C で一定とした。循環前と一時間後、2 時間後に *sampling* を行なった。実験は、血清のみの循環を 2 回と、血清 + FUT (3 mg/500 ml) での循環 2 回とを、それぞれ施行した。また 37°C で 2 時間放置した血清をコントロールとした。

臨床的検討 CPB 使用下に開心術を施行した 19 例を対象とした。平均年齢は 55.5 ± 8.5 で、CPB 時間は 59 ~ 219 分 (平均 136)，最低血液温は 19 ~ 32°C であった。8 例において *methylprednisolone* (30 mg/kg) を CPB 開始直前に投与した。回路充填には CPD 血 (400 ml) と 1600 ~ 2000 ml の乳酸リングル液を用いた。ヘパリンは 300 IU/kg を初期量として CPB 前に投与した。*sampling* は CPB 前と、CPB 後 10, 30, 60 分に施行した。

補体測定 CH50 は Mayer 変法を用いて測定し、各補体成分 (C4, C2, C3, C5) はその溶血活性を測定した。結果は前値に対する百分率 (%) で求めそれぞれを比較した。臨床例では希釈による影響をヘマトクリット値を用いて補正した。実験的検討

ではそれぞれ2回の平均値で比較し、臨床的検討での多群間の比較は Newman Keuls テスト及び Dunnett テストを用いた。

### 《 結 果 》

実験的検討 CH50の変化を図1に示す。FUT(-)群ではCH50は経時的に減少し1時間値で56%、2時間値で47%であったが、FUT(+)群では1時間値99%、2時間値91%であった。補体活性プロフィールを図2に示す。FUT(-)群では各補体成分は経時的に減少し、C4、C2はC3、C5よりも強く減少した。FUT(+)群では各補体成分は明らかに維持されており、C4、C2は2時間後でもそれぞれ95%、98%であっ

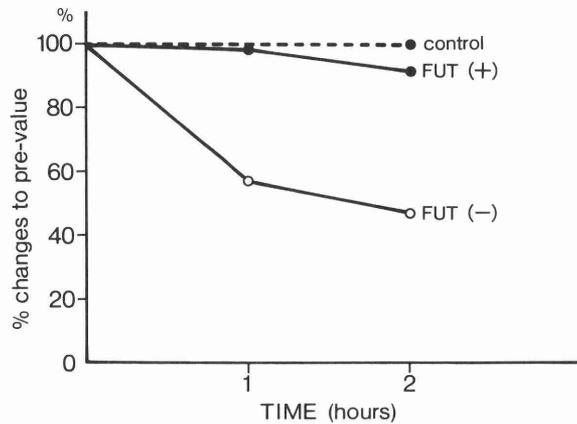


図1 モデル回路におけるCH50の変化

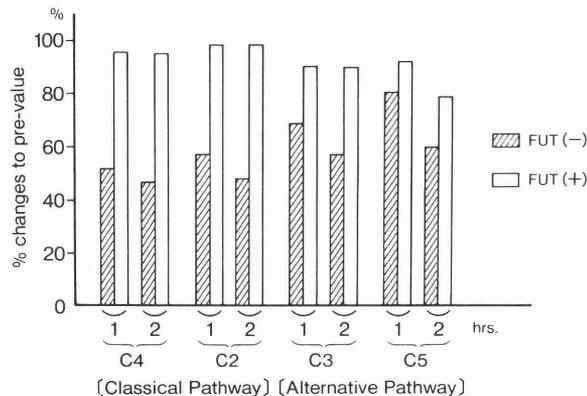


図2 モデル回路における補体活性プロフィール

た。しかし、C3, C5は2時間後でそれぞれ90%, 79%まで低下した。

**臨床的検討** CH50の変化を図3に示す。CPB後10分で有意に ( $p < 0.01$ ) 低下したが、以後は特に変化しなかった。methylprednisolone (MPS)の投与に関しては、MPS(+)群でMPS(-)群に比しCH50は高値に保たれる傾向にあったが、統計学的に有意差は認められなかった。 $(0.05 < p < 0.1)$  CPB中の補体活性プロフィールを図4に示す。MPS(-)群では各 sampling point において、C4, C2はC3, C5よりも低下傾向は強かったが、これらの間に統計学的な有意差は見られなかった。MPS(+)群ではC4, C2はC3, C5に比し有意に強く低下していた。 $(p < 0.01)$  次に各補体成分に対するMPSの効果を検討すると、C4, C2に関しては有意差は見られなかったが、

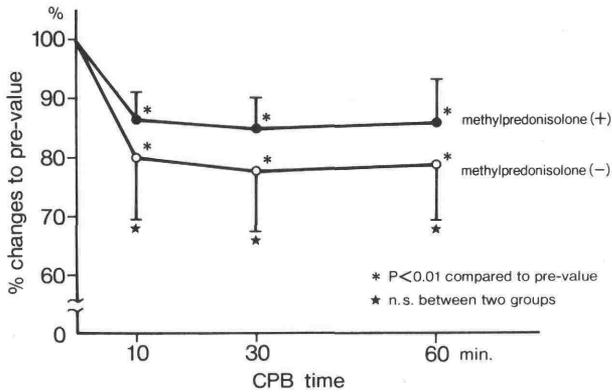


図3 CPB中のCH50の変化

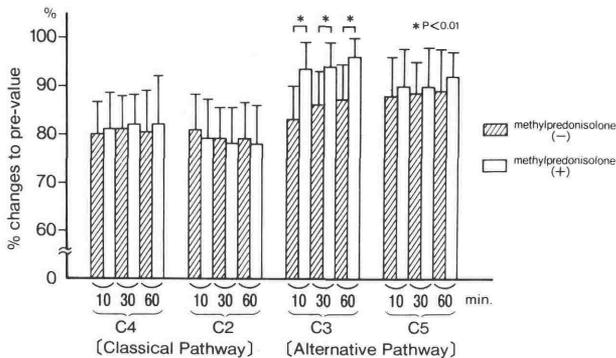


図4 CPB中の補体活性プロフィール

C3においてMPS(+)群が有意に高値であった。(p<0.01 unpaired T test) C5においてもMPS(+)群で高値の傾向を示した。

### 《考 案》

CPBにおける補体活性化に関する従来の報告は全て臨床例における検討であるが、臨床のCPBは低温でヘパリンを用いて行なっている。ところが低温では一般に補体活性化は起こりにくく、またヘパリンは強力な補体活性化抑制作用があることが知られている。またCPBに投与されるステロイドも抗補体作用があると言われている。そこで我々はこれらの要因を除外し人工肺と回路のみによる補体活性化のメカニズムを知ろうとして今回の実験を行なった。本実験では血清を使用することによりヘパリン等の薬剤を全く投与せず、また温度は37℃で一定にしており、補体活性化の最も起こりやすい条件下でCPB回路のみによる補体活性化を見ることができた。実験のFUT(-)群では両 pathway の活性化が見られたがC4, C2の方がC3, C5に比し活性化が強かった。つまりCPBにおいては本質的に両 pathway の活性化が起こるが classical pathway の方が優位であると考えられる。

臨床のCPBにおいても両 pathway の活性化がおこり classical pathway の方が優位であると考えられた。またMPSは alternative pathway を介する補体活性化を抑制していた。

FUT-175は新しく合成された蛋白分解酵素阻害剤であるが、抗凝固作用および抗補体作用の強いことが知られている。その生体内での半減期は8分で、投与を中止すると肝臓で代謝され、すみやかに血中から消失する。本実験においてもFUTは補体活性化を強く抑制した。特にC4, C2はほぼ完全に抑制することができた。以上の結果より、classical pathway を強く抑制するFUTは臨床のCPBにおける補体活性化を抑制するのに有用であろうと考えられる。

### 3 透析膜による補体の活性化

— 臨床C3<sub>a</sub>動態の *in vitro* 実験による裏付け—

酒井 良忠, 国友 哲之輔, 菅野 恒博\*  
 鈴木 好夫\*\*, 二瓶 宏\*\*, 三村 信英\*\*  
 東レ(株), \*東レリサーチセンター(株)  
 \*\*虎の門病院腎センター

〔はじめに〕

各種透析膜および再使用処理ダイアライザーを同一患者群で使用した時のC3<sub>a</sub>の推移について、われわれは昨年の本シンポジウムなどで報告してきた。そして、(1)セルロース(Cell.)中空糸膜とポリメチルメタクリレート(PMMA)中空糸膜との間で有意な(P<0.025)差異を認め、セルロース膜ではダイアライザー入口側(A)でのC3<sub>a</sub>が一過性に上昇するとともにA側に比べて出口側(V)でC3<sub>a</sub>が著しく増加すること(図1)、(2)セルロース膜ではホルマリン処理にてダイアライザーを再使用した時に補体の活性化が著しく抑制されること(図2)、が示された。また、膜やダイアライザー充填液と血清を *in vitro* 系で反応させた時の補体の挙動について、免疫電気泳動法や *intermediate cell* による溶血活性をみる方法などでのデータが報告されてきた。

このようなデータをより確実なもの、定量的なものとし、そのメカニズムの一端を明らかにする目的で、これらに対応する *in vitro* 実験を行い、交叉反応性の低い<sup>125</sup>Iラベル化

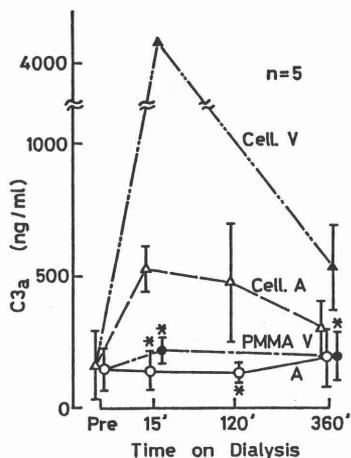


Fig.1 Comparison of C3<sub>a</sub> level during dialysis between cellulosic and PMMA membranes.  
 \* : P<0.025

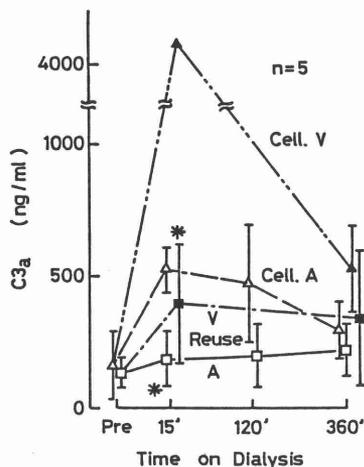


Fig.2 Suppressive effect of dialyzer reuse on complement activation during dialysis using cellulosic membrane.  
 \* : P<0.05

C3<sub>a</sub>, C5<sub>a</sub>分析キットを用いて分析した。またその際に、補体活性化を検討する上で必要となるいくつかの基礎実験も行ったので合わせて報告する。

#### 〔方法〕

血液：健常者血液を用い、主として血清を用いた。滅菌済みガラス遠心管へ採血して、速やかに遠心を開始し、フィブリンの析出が見られなくなるまで3～4回4℃下で繰り返した。全血実験ではヘパリン(終濃度5U/ml)を加えた。

膜サンプル：セルロース膜としては、市販ダイアライザー(蒸気滅菌品)から取り出した中空糸およびシート膜(Cuprothane PT-150, 膜厚20μ, 含水率40%, Enka)を、PMMA膜としては、市販ダイアライザー(γ線滅菌, 東レ)から取り出した中空糸および自製のシート膜(膜厚約100μ, 含水率約70%)を用いた。中空糸は1cm長に、シート膜は1cm角に切った。両素材膜とも一晩以上50倍希釈ホルマリン水にて滅菌処理後、0.02M-PBS(pH 7.4)にて5回洗浄した。

インキュベーション：膜に血清(血液)を加え37℃下でゆるく振盪しつつ60分間インキュベートし、終了後直ちに氷冷し、EDTA-2Na(終濃度0.01M)を加えた。

分析：C3<sub>a</sub>, C5<sub>a</sub>はUpjohn社の<sup>125</sup>Iラベル化キットを使用し、duplicateで同キット説明書に則って分析した。ガンマカウンターはアロカ社製JDC-751を用いた。

#### 〔結果〕

##### (1) 基礎条件検討

0.01M-EDTA-2Na添加, -80℃での保管では, C3<sub>a</sub>は3ヶ月間まで20%以下の変化であり, 一貫した上昇や低下は認められなかった。第2系路のみを反応させる実験で通常用いられるEGTA+Mg<sup>2+</sup>添加例(終濃度各10mM, 1mM)と無添加例(代りに同容量のPBS添加)をセルロース品充填液の濃縮液をサンプルとして比較したところ, C3<sub>a</sub>は無添加例で15000, 添加例で2400ng/ml(コントロール560ng/ml)となり, この添加条件では第2系路が充分活性化されない可能性が示された。そこで以下の実験は無添加系で実施した。

インキュベーション前の膜サンプル洗浄液の好ましい組成を知るために, 蒸留水, 生食, PBS各100μlへ血清100μlを加えて反応させたところ, C3<sub>a</sub>はそれぞれ13000, 3500, 1100ng/ml(コントロール240ng/ml)となり, 蒸留水や生食の混入で補体はかなり活性化されることが判明し, 洗浄液としては活性化傾向の最も少ないPBSを用いることにした。in vitro実験では試験管内膜サンプル量が限定されるので, インキュベーション用容器自体の補体活性化の程度や違いを検討したが, ガラス, ポリスチレン(栄研3号), ポリプロピレン(ファルコン2053)の試験管では, 著しいC3<sub>a</sub>の差を認めなかった。

補体のin vitro実験では血清を用いることが多く, 臨床の場ではヘパリン化全血が対象となる。1cm角のセルロース膜(表裏で2cm<sup>2</sup>)に対して, 血清1mlまたはヘパリン化全血

1.5 ml を加えて比較したところ、C3<sub>a</sub>、C5<sub>a</sub> は血清で 4200、30、全血で 2100、20 ng/ml となり、全血での反応性が低くなった。

## (2) 膜/血清系での補体活性化

血清 1 ml と膜を反応させた時の C3<sub>a</sub>、C5<sub>a</sub> を図 3、図 4 に示す。中空糸 (HF) であればシート膜 (Sheet) であれば、セルロース膜と PMMA 膜との補体活性化状況に明瞭な差が *in vitro* 実験系でも確認された。また、接触面積 (中空糸では外表面積、シート膜では表裏面積) が大きくなるにつれて、セルロース膜では補体活性化が著しく増大するのに対し、PMMA 膜ではやや低下 (C3<sub>a</sub>) あるいは不変 (C5<sub>a</sub>) との結果がえられた。従来 *in vitro* 系での報告では 10 cm<sup>2</sup>/1 ml 以上の膜/血清混合比であったのに対し、本分析法の感度が高いために、それ以下でも測定を行え、膜の重なりが少なくすむなど、より精度の高い実験が可能となった。

ダイアライザーの再使用  
対応実験では、表に示した  
ように臨床データの傾向を  
ある程度裏付けるものの、  
図 2 の結果とはかなりの相  
違がみられた。

Table. Complement activation in *in vitro* studies simulating dialyzer reuse. (ng/ml)

		New	Formalin-treated*	Remark
Sheet	C3 <sub>a</sub>	4200	3200	2 cm <sup>2</sup> /1 ml serum
	C5 <sub>a</sub>	30	20	
HF	C3 <sub>a</sub>	14100	7700	14 cm <sup>2</sup> /1 ml serum
	C5 <sub>a</sub>	260	110	

\* Whole blood/rinse/2.5% HCHO/rinse/serum

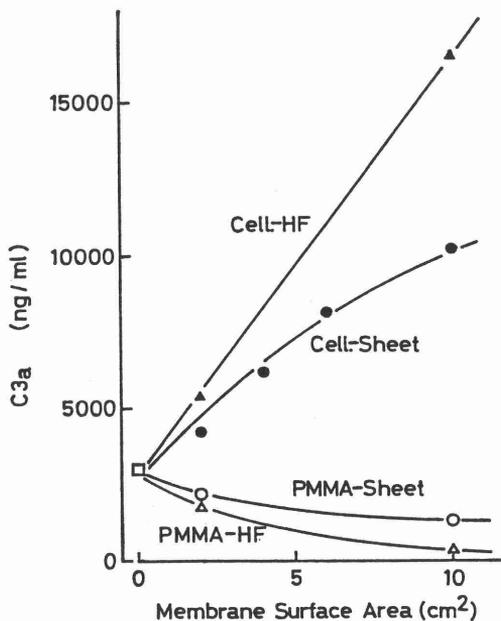


Fig. 3 Comparison of C3<sub>a</sub> level in serum incubated with cellulosic and PMMA membranes. Both hollow fiver (HF) and sheet membranes were used.

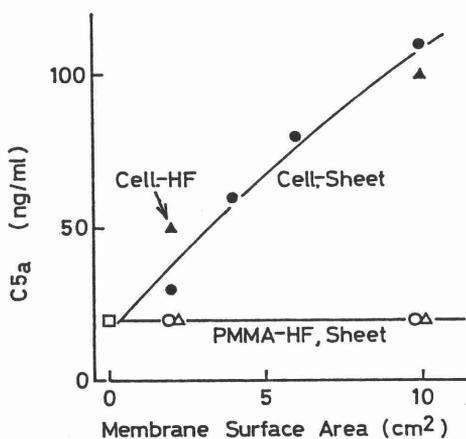


Fig. 4 Comparison of C5<sub>a</sub> level in serum incubated with cellulosic and PMMA membranes.

## 〔考 察〕

C3<sub>a</sub>, C4<sub>a</sub>, C5<sub>a</sub> が直接分析できるようになり, 従来の免疫電気泳動法や intermediate cell により溶血活性をみる方法などに比べて高感度で定量的な議論ができるようになった。透析膜種により補体の活性化に違いがあることは臨床的にかなり検討されているが, 血中の補体動態への生体側の寄与が大きいことが考えられ, メカニズム解析や定量的議論が複雑となる。そこで今回 *in vitro* 手法でどこまで臨床に対応するデータが得られるかを検討した。

膜種間差は *in vitro* 実験においても裏付けられたが, 臨床系との対応性では血清と全血とで補体活性化に差がみられ, また, ダイアライザー再使用対応実験でもかなり異なる結果が得られた。前者の問題は, 白血球の補体リセプターの関与, フィブリノーゲンの関与, 臨床例に比べれば約 10 倍のヘパリン量, などが原因と考えられる。白血球の関与については, 白血球に C3<sub>a</sub> リセプターがあるという報告はない。ヘパリンについては, 健常者血清へ 10U/ml まで加えた場合には C3<sub>a</sub> レベルに変化を認めなかった。後者の問題については, (1) 60 分の *in vitro* 系での血液接触では, 血小板, 白血球, 血漿蛋白の膜面付着が臨床例より少なくなる, (2) *in vitro* 系では洗浄が充分行えて付着成分がほとんど除去されてしまう, などが原因であろう。

血清系では血球のリセプターが共存しないので, C3<sub>a</sub> と C5<sub>a</sub> の絶対量や量比は補体反応だけで議論できるはずである。セルロース膜を用いた臨床系では C3<sub>a</sub> は一過性に大幅に増加するが, C5<sub>a</sub> はほとんど変化しないというのが一般的であり, 図 4 に示した *in vitro* データと異なるが, この差異は白血球の C5<sub>a</sub> リセプターの寄与を示すものであろう。

膜形態として中空糸とシート膜を同時に検討したが, 中空糸の外表面積とシート膜の表裏面積を同一にして比較するとかなり一致した結果が得られた (図 3, 4) ので, 補体活性化に対して膜の化学構造による差異が決定的な役割りをはたし, 表面構造の違いの寄与は少ないものと思われる。EGTA + Mg<sup>2+</sup> 添加により第 2 系路が充分活性化されないとの結果は, 添加量の至適化などの再検討が必要であることを示している。

## 〔結 論〕

*in vitro* 実験検体を <sup>125</sup>I ラベル化キットで分析し, 透析患者での補体活性化状況が裏付けられ, さらに過去の *in vitro* 実験データに比べて高感度かつ定量的なデータが得られた。より詳細な定量的議論を行うには条件検討を含めて, さらに検討が必要である。

## 文 献

- 1) 鈴木好夫ら, 補体シンポジウム抄録集, 第 18 回, 4 (1981), 第 20 回, 73 (1983), 第 21 回, 4 (1984).
- 2) 赤垣洋二ら, 医学のあゆみ, 112, (3), 144 (1980).
- 3) D. E. Chenoweth, Artificial Organs, 8 (3), 281 (1983).

## 4

### CAPD貯液中の補体系蛋白(第2報)

#### — 特に bactericidal activity について —

中西 功, 椿原 美治, 河島 利広,

友瀨 基, 横川 明子, 飯田 喜俊

大阪府立病院・腎疾患専門診療科

#### 〔目的〕

我々は第21回補体シンポジウムにおいて、CAPD(continuous ambulatory peritoneal dialysis : 連続的外来腹膜透析法)施行中の患者の腹膜透析液(ダイアニール)中に、免疫グロブリンと共に溶血活性を持ったC1~C9までの補体各成分が出現してくることを報告した。今回、透析液中の補体が細菌感染に対する腹腔内の防御機構の一員としての役割を演じているかどうかを明らかにする目的で、細菌による透析液中の補体の活性化の有無およびbactericidal activity(免疫殺菌活性)の有無につきE. coliを用いて検討した。

#### 〔方法〕

- 1) 検体：3カ月以上CAPD施行中の患者3名に1.5%ダイアニール(浸透圧：347mOsm/l) 1.5ℓを腹腔内に注入し、6時間貯留した後の透析液をsampleとした。なおACH50活性およびbactericidal activityの測定には、ウルトラフィルター(UK-10)にて50倍濃縮した透析液を使用した。
- 2) 補体溶血活性：CH50はone point法、ACH50はウサギ赤血球溶血法、C1~C9活性はintermediate cellとreagentsを用いて測定した。
- 3) 菌株と抗血清：E. coli B/SMを使用し、抗E. coli抗体(lysozyme-free)は大阪大学医学部細菌学教室より供与されたものを使用した。
- 4) 補体の消費：tripticase soy brothで一晩培養した菌を、TBS<sup>++</sup>(5mM Tris-HCl pH7.3, 0.85% NaCl, 0.15mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM MgCl<sub>2</sub>)で3回洗浄後、1×10<sup>8</sup>または1×10<sup>9</sup>/mlに調整し、透析液または血清に再浮遊させ、37°C60分反応後4000回転15分遠心し、上清のCH50, C4, C3活性を測定した。
- 5) bactericidal activity：井上らの方法にて測定した。すなわち、濃縮後の透析液または患者血清をmicrotiter plate上で2~128倍希釈し、TBS<sup>++</sup>または抗E. coli抗体を1滴加え、これに1×10<sup>4</sup>/mlに調整したE. coliを1滴加え、37°Cで一晩培養後、菌の増殖の有無を肉眼的に判定し、増殖阻止を示す希釈倍数をもってsampleのbactericidal activityとした。

#### 〔結果〕

- 1) 透析液中の補体活性およびlysozyme値(表1)

NHSにくらべ低値ながら、C1~C9溶血活性に加えACH50活性を持つことが確認された。また透析液中にはlysozyme蛋白も高濃度に存在することがわかった。なお透析液中のCH50, ACH50は

56°C 30 分加熱処理することにより消失した。

## 2) 菌による補体の消費

菌量に応じ透析液中の C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>3</sub> 活性の低下がみられ、C<sub>3</sub> よりも C<sub>4</sub> の低下が著しいことより classical pathway を介して補体活性化がおこるものと思われた(図 1)。なお透析液に EDTA (final 10mM) を加え、これに E. coli を 37°C 60 分反応させても C<sub>4</sub>, C<sub>3</sub> 活性の低下はみられなかった。次に抗体による影響をみるため、抗 E. coli 抗体を加えた透析液を E. coli (1×10<sup>9</sup>/ml) と反応したところ、透析液中の補体が増強されることがわかった(図 2)。

透析液のかわりに患者血清を E. coli (1×10<sup>9</sup>/ml) に反応させたが、C<sub>4</sub> よりも C<sub>3</sub> の低下が強く、透析液とは異なり血清では主として alternative pathway を介して補体が消費されるものと思われた。また反応系に抗 E. coli 抗体を加えることにより、透析液の場合と同様に補体の消費が増強された(図 3)。

## 3) bactericidal activity (表 2)

50 倍濃縮後の透析液は血清の 1/4 ~ 1/2 の bactericidal 活性を示した。またこの活性は E. coli 抗体を加えることにより増強し、56°C 30 分、加熱処理にて消失した。

### [ 考察 ]

CAPD は患者自身が 1 日 3 ~ 4 回透析液(ダイアニール)の交換を行なうが、操作テクニックの改善にもかかわらず腹膜炎が合併することが知られている。そこで CAPD 患者の腹腔内の host defence mechanism についても種々の検討がなされつつある。CAPD 患者の透析液の中に見い出される macrophage は末梢血中の monocyte と同様に食作用をもつことが明らかにされており、また透析液中の opsonic 活性の低いもの程腹膜炎に対する risk が高いという報告もなされている。

我々は補体系蛋白に注目し、溶血活性を持った C<sub>1</sub> ~ C<sub>9</sub> までの補体各成分が CAPD 透析液中に出現してくることを報告した。今回その意義をより明らかにする目的で、bactericidal activity について検討した。血清に較べ低値ではあるが透析液は E. coli に対して bactericidal activity を持つことが明らかになった。しかも 56°C 30 分加熱処理によりこの活性が消失することより、bactericidal activity は透析液中の補体によるものと考えられた。また透析液と E. coli との反応により C<sub>3</sub> が活性化されることが確認されたことより、透析液中の補体はオプソニンとしての作用を示す可能性も考えられた。

なお CAPD 患者の腹膜炎の起炎菌としては、E. coli などのグラム陰性菌よりもむしろ S. epidermidis, S. aureus などのグラム陽性菌の頻度が高らかに高いことが知られており、現在グラム陽性菌についても検討中である。

### [ 文献 ]

- 1) K. Inoue, et al. : Biken J., 17 ; 135, 1974.
- 2) S. I. Vas : Kidney International, 23 ; 83, 1983.
- 3) W. A. Keane, et al. : Kidney International, 25 ; 539, 1984.

表 1

Complement levels in dialysate effluents

patient	M.Y.	H.T.	K.K.	NHS*
protein (mg/dl)	54	59	110	7.300
lysozyme (mcg/ml)	2.4	4.6	2.8	10.2
CH50 (u/ml)	2.6	3.9	9.2	438
C1 (u/ml)	100	200	400	40.800
C4 (u/ml)	150	200	1.010	28.800
C2 (u/ml)	4	9	15	630
C3 (u/ml)	60	110	300	11.200
C5 (u/ml)	550	1.100	2.770	80.000
C6 (u/ml)	50	110	220	10.300
C7 (u/ml)	130	280	140	7.000
C8 (u/ml)	60	90	230	9.100
C9 (u/ml)	200	180	340	10.500
ACH50 (u/ml)	0.34	0.93	2.1	35

NHS : normal human serum.

表 2

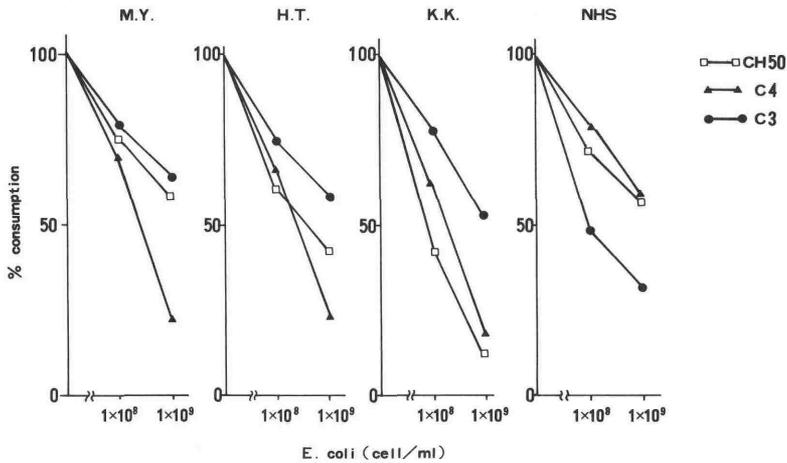
Bactericidal activities of dialysate effluents and patient's sera

	Dialysate effluent*			Patient's serum			NHS
	M.Y.	H.T.	K.K.	M.Y.	H.T.	K.K.	
no treatment	4	4	8	16	16	16	16
+ Ab**	8	8	16	32	32	32	32
56°C 30 min	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2

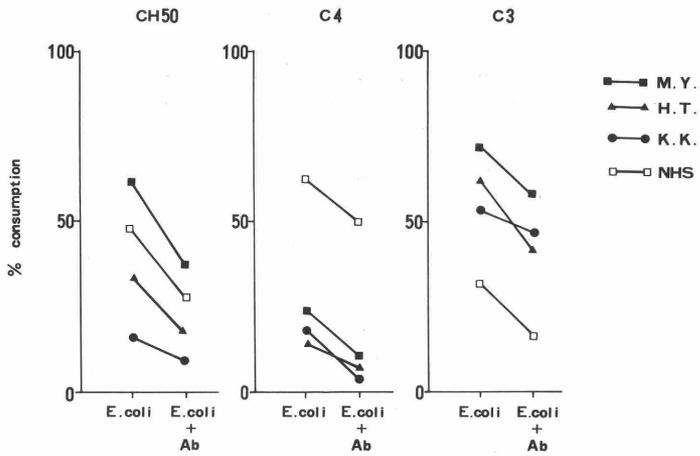
\* concentrated about 50 times with ultrafiltration membrane of M.W. 10,000 cut off

\*\* lysozyme-free antibody against E.coli B was added

图 1

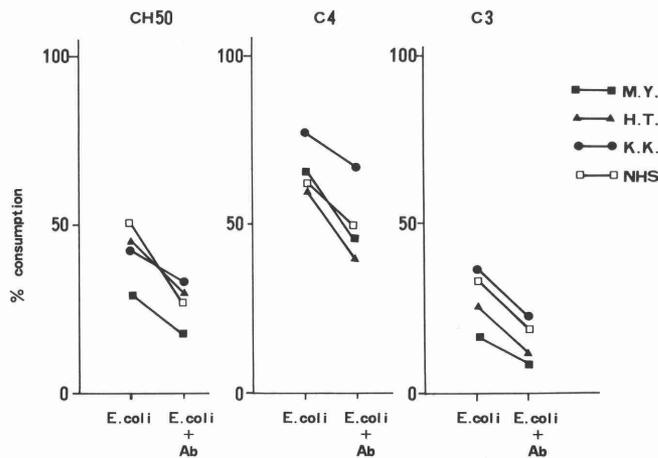


☒ 2



Ab: lysozyme-free antibody against E. coli B. was added

☒ 3



Ab: lysozyme-free antibody against E. coli B. was added

## 5 各種動物のACH50値測定法について。

田中忍、北村ふじ子、鈴木貴和、嶋田孝吉、  
西岡久壽弥

財団法人東京都臨床医学総合研究所 免疫

### (目的)

補体のalternative pathway (ACP) の活性測定法としてはウサギ赤血球 (RaE) をtarget cellとする溶血法が一般に用いられているが、本研究に示すとうり、RaEを用いた場合には一部の動物のACP活性は低値でしか与えられない。ところで、ヒトの場合、自然抗体がACP活性化の亢進を行うことが知られておりこのことはRaEに対する自然抗体の血中含量の少ない動物ではACP活性化が十分発揮されない可能性を示唆する。換言すれば、自然抗体が多く含まれる動物種の赤血球を選択することにより、上述の動物のACP活性を効率良く測定し得るものと考えられる。

そこで本実験では14種の動物の赤血球を用い、種々の動物のACH50値を測定することにより、これらの動物のACP活性を測定するには、どのような動物の赤血球を用いればよいかについて検討した。これと同時に、各種動物血清中に含まれるそれぞれの赤血球に対する自然抗体の力価を測定し、ACP活性と自然抗体の相関について調べた。なお、我々が先にマウスを例として報告した抗体感作RaE (RaE・Ab) をtarget cellとする方法(第14回 日本免疫学会総会)により、各種動物のCH50及びACH50値を測定した結果についてもふれる。

### (材料と方法)

1. 動物の赤血球と血清 ハムスター(7W, M, 5匹)、マウス(ddY, 7W, M, 20匹)の血液を心臓より採取した。スunks(6W, M, 5匹)、アカゲザルおよびカニクイザル(M, 各3-10匹)、ビーグル犬(M, 10匹)、モルモット(500g, M, 20匹)ラット(7W, M, 15匹)の血液は実験動物中央研究所 齊藤宗男、鈴木修三各先生より供与された。
2. 補体測定法 CH50値の測定はMayerの方法に従った。但し、CH50値測定の反応温度はラット 20°C、モルモットとヒト 30°C、ウサギ、マウス 35°Cで、またACH50値測定はモルモット 25°C、ウサギ、ラット 30°C、その他は37°Cで行った。
3. 赤血球凝集(HA)反応 25μlずつ2倍連続希釈した血清に  $1.5 \times 10^8$  cells/mlの赤血球浮遊液を加え、1晩放置後、再振盪し、凝集の有無を肉眼的に判定した。bufferは0.01M EDTA-GVBを用いた。

## (結果)

### 1. 各種動物のACH50値について。

種々の動物のACH50値を測定する場合、どのような動物の赤血球を用いたら効果的であるかを検討するため、14種の動物の赤血球を用い、各種動物のACH50値を測定した。表1に示すごとく、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウサギのACH50値の測定にはモルモット赤血球を用いた場合に、またカニクイザル、スンクスのそれに対してはウサギ赤血球が最も有効であった。ヒト、アカゲザル、ビーグル犬に対しては、夫々、マウス、ウマ、ブタの赤血球が最も高い値を示した。しかし、ラット、モルモット、マウス、ハムスター、ウマの場合、いずれの赤血球を用いても、十分なACH50値を得ることができなかった。そこで、次の実験として、マウスのACH50値の測定に効果的であったR a E・Abをtarget cellとして用いる方法(第14回日本免疫学会総会)が、これらの動物のACH50値測定に応用し得るか否かを検討した。その結果、ウシ、ヒト、アカゲザル、カニクイザル、ビーグル犬以外の動物では感作する抗体の量に依存して、ACH50値の増加が認められ、特に先の実験で、いずれの赤血球に対しても低いACH50値を示していたハムスター、ラット、マウス、ウマでは著しい上昇が認められた。本実験の結果より、各種動物のACH50値の測定にあたって最も適切と思われるtarget cellを表2に示した。

### 2. 自然抗体とACH50値との相関

14種の動物の赤血球を用いて各種動物のACH50値を測定した前項の実験の際に、同時に、これらの赤血球に対するHA価(表1の( )内の値)を測定し、ACP活性と自然抗体との相関性について検討した。これは、各種動物間に認められるACH50値の差異が、自然抗体の量に由来することを確認する為の実験である。

得られた成績を赤血球毎に(表1の縦の系列)スピアマン順位相関に基いて統計処理するとウサギ、ハムスター、ラット以外の赤血球の系列で両者の有意な相関が認められた( $p < 0.05$ )。(ただし、ウサギ赤血球の系列の場合は、自然抗体が低い割りに、高いACH50値を示すスンクスの値を無視すると両者の間に有意な相関が存在した( $p < 0.01$ ))。なお、ウシの赤血球の場合、すべての動物血清中のHA価もACH50値もほとんど検出限界以下であったため、統計対象から除外した。従って、両者の間に有意な相関が認められたのは、13例中10例であった。

一方、動物の血清毎に(表1の横の系列)HA価とACH50値を比較した場合、有意な相関を示したのはウサギ、アカゲザル、ビーグル犬の血清のみであった( $p < 0.05$ )。なお、ラット、ハムスター、モルモット、マウスの場合、種々の動物の赤血球に対する抗体活性や溶血活性が共に検出限界以下の物が多いため、統計対象より除外した。従って両者の相関が認められたのは10例中4例であった。このように、赤血球ごとの相関例に

比ベ血清ごとの相関例が低い理由については、ACPを介した溶血作用に対する抵抗性が赤血球種によって、異なっているためであり、従って、この点を考慮する必要があると考えられる。

注目すべきことに、マウス赤血球とアカゲザル血清、ハムスター赤血球とスunks血清の組合せに認められる如く、HA価が低くとも高いACH50値を示す例や、この逆にブタ赤血球とカニクイザル血清、ウサギ赤血球とウマ血清の組合せの如く、高いHA価にも拘らず、低いACH50値を示す例などがあった。前者は自然抗体の亢進作用に依存せず、十分にACPの活性化が進行すること、また後者は、ACP亢進作用を持たない自然抗体が存在することを示唆している。

#### 4. 各種動物のACH50値測定法について。

以上は種々の動物のACH50値についての実験であるが、本項では各種動物のCH50値測定法について報告する。我々は既に抗体感作ウサギ赤血球 (RaE・Ab) を用いてマウスのACH50値ばかりでなく、CH50値のも効果的に測定し得ることを示した (第14回 日本免疫学会総会)。そこで本実験では各種動物のCH50値をRaE・Abを用いて測定し、従来のEAをtarget cellとするMayer法と比較した。ヒトのCH50は両方のtarget cellとも同じ値を示し、また、RaE・Abを用いて測定したビーグル犬とモルモットのACH50値はEAを用いて得た値の夫々1/2と2/3であった。しかし、その他の動物では、EAで得られた値よりもRaEで得られた値の方が高く、特にEAでは非常に低いCH50値しか示さなかったカニクイザル、ウシ、ヒツジ、ウマ、マウスのそれは、RaE・Abを用いることにより著しい上昇が認められた。興味深いことにRaE・AbはウサギのCH50値測定にも有効であった。

以上の結果、カニクイザル、ウマ、マウスを除く全ての動物がヒトのCH50値を上回る値を持つことが分かった。

表2. 各種動物のACH50値測定に用いるtarget cell.

Species	Human	Mac.rh	Mac.fas	Bovine	Swine	Sheep	Horse
Target cell	Mouse E	Horse E	RaE・Ab	GP E	GP E	GP E	RaE・Ab
ACH50 (units/ml)	21	56	21	100	56	38	12
Species	Beagle	Rabbit	GP	Rat	Hamster	Mouse(BALB/c)	
Target cell	Swine E	GP E	RaE・Ab	RaE・Ab	RaE・Ab	RaE・Ab	
ACH50 (units/ml)	20	16	35	45	24	23	

表1. 各種動物のACH50値及びHA価

RBC Serum	Human O	Human A	Human B	Macaca Rhesus	Macaca Fascicularis	Bovine	Swine	Sheep	Horse	Beagle	Rabbit	Guinea pig	Rat	Hamster	Mouse Suncus (ddy)	r <sub>s</sub>
Human	-	-	-	nd (2)	nd (1.5)	nd (0)	nd (5.5)	3.0 (1)	2.2 (3)	2.3 (6)	18.4 (6.5)	11.6 (3)	8.8 (5)	8.6 (±)	21.0 (2)	10.6 (3)
Macaca Rhesus	nd (1)	nd (2.5)	nd (2)	-	nd (-)	nd (-)	nd (4)	2.6 (0)	56.0 (1)	2.5 (4)	20.6 (5.5)	3.5 (3)	2.7 (4)	nd (0)	14.8 (3)	nd (1)
Macaca Fascicularis	nd (2.5)	nd (5)	nd (7)	nd (-)	-	nd (1)	nd (8)	2.6 (5.5)	9.4 (2)	0.6 (5)	15.8 (10)	2.2 (2)	2.2 (4.5)	nd (2)	11.8 (4)	nd (3)
Bovine	45.0 (5)	39.0 (4)	39.0 (4)	18.0 (3)	23.4 (3)	-	nd (2)	3.6 (2)	15.8 (5.5)	0.7 (3)	43.0 (5)	100.0 (4.5)	19.8 (5)	59.0 (3.5)	44.6 (5)	26.6 (5)
Swine	8.9 (4)	11.6 (8)	7.1 (6)	16.2 (5)	20.0 (5)	nd (-)	-	4.3 (2)	10.7 (6.5)	3.8 (6)	13.6 (6)	56.0 (5)	16.4 (4.5)	4.0 (4)	23.0 (5)	30.0 (5)
Sheep	18.8 (4)	12.8 (3.5)	16.6 (4)	17.0 (4)	22.0 (4.5)	nd (1)	nd (2)	-	6.4 (6)	nd (1)	15.4 (4)	38.0 (3)	10.8 (5)	14.2 (4)	18.0 (5)	19.4 (4)
Horse	0.7 (5)	nd (4)	nd (4)	2.8 (2)	4.6 (3)	nd (0)	nd (2.5)	nd (-)	-	1.8 (6)	nd (4)	10.0 (3)	nd (6.5)	nd (4)	3.4 (6)	4.5 (4)
Beagle	2.8 (4.5)	3.7 (4.5)	2.3 (4)	8.1 (3.5)	9.3 (3)	1.7 (0)	20.4 (3.5)	5.8 (1)	6.4 (3)	-	14.4 (3)	14.6 (5)	14.0 (6)	13.8 (1.5)	16.6 (6)	3.5 (4.5)
Rabbit	5.8 (3)	5.4 (3)	5.4 (3)	4.9 (1.5)	7.0 (2)	nd (-)	nd (2)	nd (1)	3.6 (1)	nd (1.5)	-	15.6 (2)	4.7 (2.5)	2.2 (-)	4.3 (3)	9.0 (4)
Guinea Pig	nd (1)	nd (2.5)	nd (1)	5.1 (-)	? (2)	nd (-)	nd (-)	nd (±)	nd (0)	nd (1)	11.9 (2)	-	6.6 (1.5)	nd (-)	nd (1)	nd (-)
Rat	nd (0)	nd (±)	nd (±)	2.3 (-)	2.0 (-)	nd (-)	nd (-)	nd (-)	? (-)	0.5 (-)	4.5 (±)	7.4 (-)	-	nd (-)	nd (-)	? (-)
Hamster	nd (±)	nd (±)	nd (-)	1.7 (-)	1.5 (-)	nd (-)	nd (-)	nd (-)	nd (-)	0.7 (-)	5.0 (0)	nd (-)	nd (-)	-	nd (-)	nd (-)
Mouse (ddy)	nd (-)	nd (-)	nd (-)	nd (-)	nd (-)	nd (-)	nd (-)	nd (-)	nd (-)	nd (-)	1.8 (-)	nd (-)	nd (-)	nd (-)	nd (-)	nd (-)
Suncus	34.0 (3.5)	22.0 (1)	22.0 (1)	22.0 (1)	22.0 (1)	0.7 (4)	0.7 (4)	14.4 (4)	14.4 (4)	37.0 (-)	19.6 (-)	26.0 (3)	-	-	-	-
r <sub>s</sub>	**	*	*	*	**	*	*	**	*	**	*	**	**	*	*	**

\* : P < 0.05

\*\* : P < 0.01

nd : not detected

## 6 補体第一成分(C1)を除いた血清(RC1)を用いるC1溶血活性の測定法

永木和義, 坪井睦美, 松本美佐子, 北村肇  
大阪府立成人病センター研究所 第6部

### 《はじめに》

C1の溶血活性はこれまで EAC14 cell とC1を反応後, 過剰のC2を反応させ最後に EDTA 稀釈血清 (C-EDTA) を加える方法が用いられてきた。しかしこの方法では intermediate cell や精製補体成分を必要とするため一般的な方法とは云えない。もっと容易な補体成分定量法としてC2の定量にヒトC2欠損血清 (C2D)<sup>1)</sup>, C4の定量にモルモットC4欠損血清 (C4D)<sup>2)</sup>を用いる方法があるが, C1欠損血清 (C1q,r,s同時欠損) は存在しない。そこで人工的にC1を除いた血清を作るために Siegel等<sup>3)</sup>は Medicus等<sup>4)</sup>のC1精製の方法を利用した。すなわちヒト血清を p-nitrophenyl-guanidinobenzoate の存在下で IgG-Sepharose カラムに添加するとC1のみがカラムに吸着され, 非吸着画分を RC1 として用いることができる。しかしこの方法でもカラム操作が必要であり, ヒト血清中のC1の溶血活性も  $5 \times 10^{10}$  eff. mol./ml で EAC4cell で測定した時の  $1 \sim 2 \times 10^{13}$  eff. mol./ml よりもかなり低値である。

Neoh等<sup>5,6)</sup>はポリエチレングリコール (PEG) をヒト血清に加えてC1を沈殿させて RC1 を作る方法を報告している。しかし RC1 の必要量, 感作ヒツジ赤血球 (EA) との反応時間, RC1 中のC1以外の補体成分の溶血活性, 実際のC1溶血活性の測定方法などについてはまったく触れていない。我々はPEG沈殿法によるRC1の作り方について若干の検討を行ない, C1溶血活性測定の方法を開発したので報告する。

### 《材料と方法》

PEG 4,000 およびPEG 6,000 は和光純薬のものを使用した。PEGの35~40% (W/V) の stock solution はPEGを0.14M NaCl, 0.01M phosphate buffer, pH7.0 を用いて作製した。最終pHは7.7であった。

ヒト血清は約40人の健康人の血清をプールし,  $-80^{\circ}\text{C}$  に保存してあったものを用いた。

C1からC9までの補体成分の溶血活性は従来の intermediate cell を用いる方法で測定したが, C4はC4D血清とEAで測定した。またC-EDTAはモルモット血清に代えて40倍稀釈のヒト血清を使用した。

Pro-C1 およびC1は Gigli等の方法<sup>7)</sup>で精製した。

抗C1q, 抗C1r および抗C1s血清は Miles社のものを使用した。

補体成分および補体系蛋白の蛋白量は radial immunodiffusion 法で測定した。

PEGによるヒト血清中のC1の沈殿法: ヒト血清を  $0^{\circ}\text{C} \sim 2^{\circ}\text{C}$  に冷却し, かくはんしながら所要量のPEG stock solution をゆっくり滴下 (1mlのPEG溶液を3分位で) した。  $0^{\circ}\text{C}$ , 30分 かくはん後に低温で 18,000g, 30分 遠心してその上清をRC1とした。Oxidationを行う時はRC1を一旦室温まで加温したのち, 等量の  $1\text{mM I}_2$  in  $\text{KI}$ <sup>8)</sup>を加えて室温で10分放置し, その後100容の veronal buffered saline, pH7.4 で  $4^{\circ}\text{C}$ , 6時間透析後分注して  $-80^{\circ}\text{C}$  に保存した。

RC1を用いたC1溶血活性の測定法: 緩衝液は gelatin glucose veronal buffer (GGVB)を使用した。被検血清の稀釈液 0.2mlに適宜稀釈したRC1 0.2ml, EA ( $1.5 \times 10^8$ /ml) 0.2mlを加え  $37^{\circ}\text{C}$  で反応させた。EAとRC1, RC1とbuffer, EAとbufferのcontrolを同時に incubate した。反応終了後, 各試験管に冷却した生食水2.4mlを加えてかくはん後遠心して上清の吸光度を波長415nmで測定した。

Table 1 Hemolytic activities of complement and its components in PEG treated normal human serum (% of NHS)\*

		CH50	C1	C4	C2	C3	C5	C6	C7	C8	C9
PEG 4,000	4.0 %	5	<0.01	82	99	95	75	69	102	93	95
	5.0 %	0	0	60	95	60	26	70	76	66	94
PEG 6,000	3.5 %	0	0	56	91	58	30	79	60	66	94
	3.8 %	0	0	52	80	50	17	61	44	66	101
	4.0 %	0	0	45	90	46	11	62	52	53	82
	5.0 %	0	0	20	84	15	2	39	35	25	75

\*NHS: Pooled normal human serum. Hemolytic activities of complement and its components of NHS were: CH50, 42.0; C1, 120,000; C4, 394,000; C2, 1,200; C3, 18,400; C5, 303,000; C6, 24,900; C7, 16,500; C8, 47,800 and C9, 17,600 U/ml.

### 《結果》

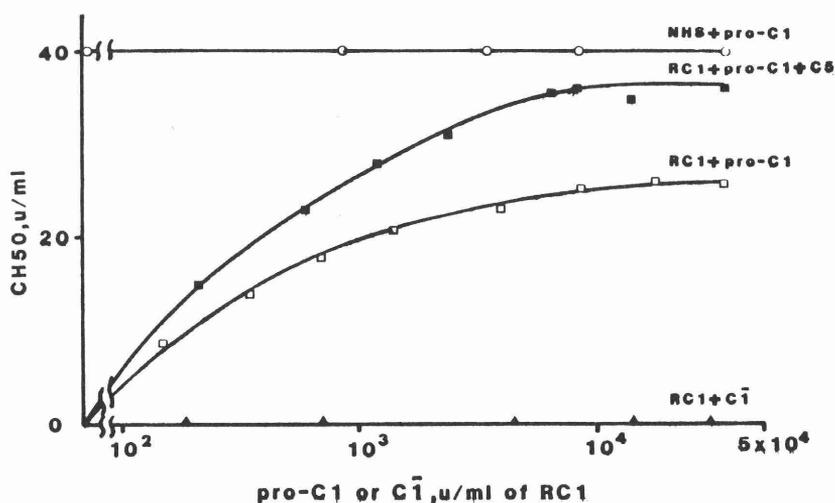
- PEGの終濃度をPEG 4,000の場合は4%と5%, PEG 6,000では3.5%, 3.8% (Neoh等の方法), 4%と5%で種々のRC1を作ってその補体成分溶血活性, 蛋白量を測定した(Table 1). C1の溶血活性はPEG 4,000, 4%で上清に9u/mlと微量残るが他の濃度ではすべて0.5u/ml以下であった. C2, C9, B および C1INHは殆んどすべて上清に残り, C4, C3, C6, C7 および C8も50%ないしそれ以上が上清に残っていた. しかしC5はPEG 4,000, 4%では75%上清に残るが, 5%では26%, PEG 6,000でも2~30%と上清への残存率は非常に低値であった.

蛋白量の測定でもほぼ同様の結果が得られた.

RC1はanti-C1q, anti-C1r, anti-C1sに対してオクタロニー法で沈降線を作らなかった.

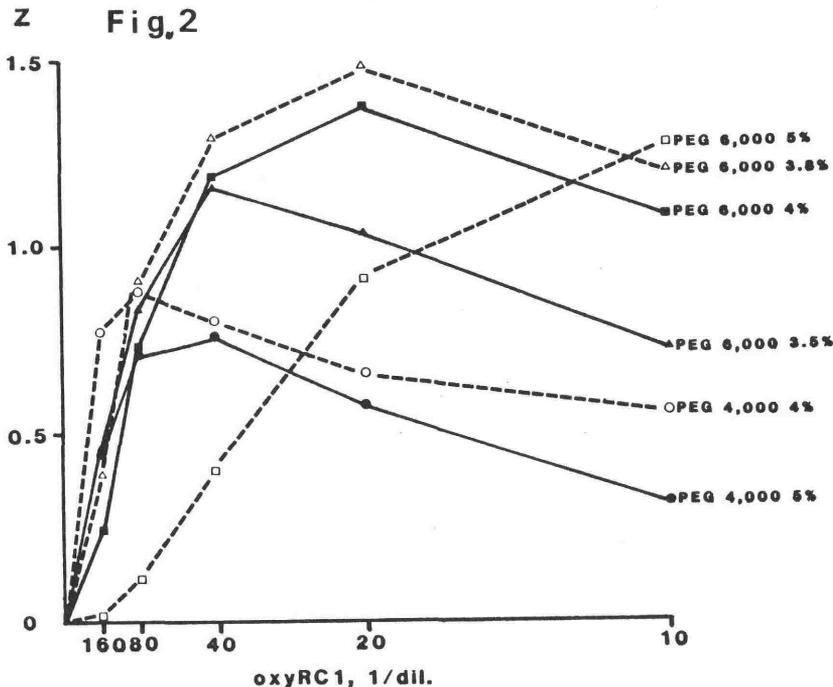
- Reconstitution: RC1にC1を添加して補体価が回復するかを検討した. Fig.1に示すようにRC1にC1を加えても補体価の上昇は全くみられなかった. しかしpro-C1を添加すると10,000u/mlRC1で補体価は24u/mlまで回復した.

Fig. 1



さらにC5を RC1 に 100,000 u/ml 添加することにより補体価は 36 u/ml となった。また精製した C1q(100 μg/ml), pro-C1s(30 μg/ml) をそれぞれ単独或いは同時に加えても RC1 の補体活性は回復しなかった。

3. Oxidation : RC1 について oxidation の効果を検討したところ, oxy化によりヒト血清 80,000倍稀釈液中のC1の溶血活性は約2倍に増強されたので以下の実験ではすべて oxyRC1 を用いた。
4. OxyRC1 の必要量をきめるために稀釈した oxyRC1 を用いて 80,000倍稀釈したヒト血清中のC1の溶血活性を測定した。Fig.2 に示すように oxyRC1 の稀釈が20倍ないし40倍のところで最高の溶血活性が得られたが, その値は各 RC1 によりかなりの差がみられた。  
 そこでC5が原血清の2%しか残っていないPEG 6,000,5%RC1 とC1が微量に残っているためEAと RC1 とでかなりの溶血を示すPEG 4,000,4%RC1 を除いた4種類の oxyRC1 を用いて実際にヒト血清中のC1を測定した。  
 まず溶血に必要な時間をPEG 6,000,3.5%RC1 を用いて検討したが, Fig. 3 に示すように37°Cで5時間反応させてもなお溶血は進行するので便宜上反応時間は37°C,3時間とした。またこの Fig.に示すように dose-response curve は横軸に凸の曲線でこれは EAC4 cell を用いてヒト血清中のC1を測定した時の dose-response curve と同じである。  
 Fig.4は oxyRC1 の稀釈を変えてヒト血清中のC1を測定したもので, oxy-RC1 の5倍稀釈では dose-response curve は両対数図表上で直線であった。しかし10倍および20倍稀釈ではC1の溶血活性は上昇するが dose-response curve は  $Z=1.5$  を越えたところで直線からはずれた。
5. RC1 を用いてヒト血清中のC1および精製した pro-C1 の溶血活性は測定できた



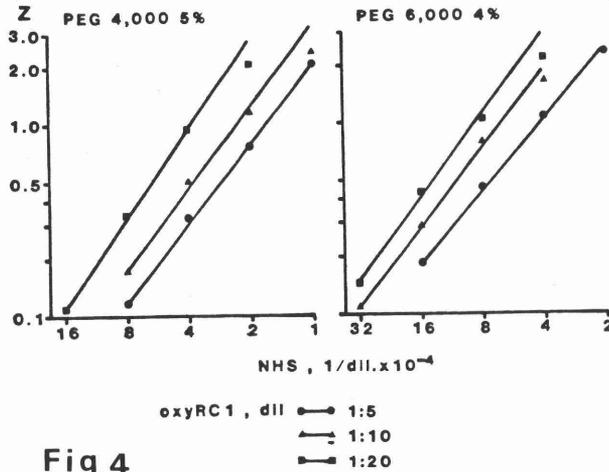
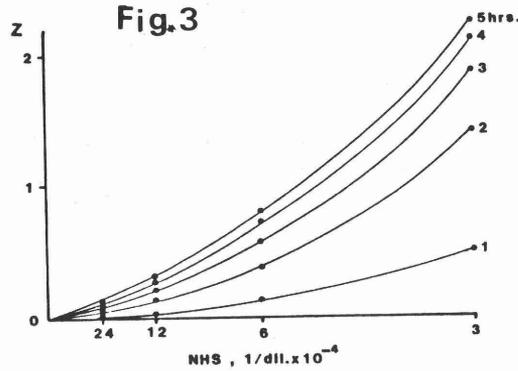


Fig. 4

が、 $\bar{C}I$ の溶血活性は測定できなかった。この現象を解明するために pro-CI を RC1 と  $0^{\circ}C$ 、30分反応させたのち pro-RC1の溶血活性を EAC4 cell で測定すると対照 (73,000 u/ml) とほぼ同じ値 (84,000 u/ml) を示した。しかし  $\bar{C}I$  を RC1 と  $0^{\circ}C$ 、30分反応させると対照の 58,000 u/ml から 3,000 u/ml にまで活性が低下した。これは  $\bar{C}I$  が RC1 中に存在する CIINH により不活化されたため、従って PEG沈殿法による RC1 を用いて  $\bar{C}I$  の溶血活性は測定できない。

《まとめ》

1. PEG沈殿法により血清からCIを除いた RC1 が作製できた。
2. RC1 を作るための最適のPEG濃度はPEG6,000の3.5%~4.0%であった。
3. RC1 は pro-CI の溶血活性の測定に使用できるが  $\bar{C}I$  の溶血活性は測定できない。

- 1) Ngan, B. et al., J.Immunol., 118:736, 1977.
- 2) Gaither, T.A. et al., J.Immunol., 113:574, 1974.
- 3) Siegel, R.C. et al., J.Immunol., 127:2447, 1981.
- 4) Medicus, R.G. et al., J.Immunol., 125:390, 1980.
- 5) Neoh, S.H. et al., Invest. Radiol., 16:152, 1981.
- 6) Neoh, S.H. et al., J. Immunol. Methods, 69:277, 1984.
- 7) Gigli, I. et al., Biochem. J., 157:541, 1976.
- 8) Polley, M.J., J.Immunol., 107:1493, 1971.

## 7 レーザーネフェロメーターによるC1qの定量法の開発

新井 加余子<sup>1</sup> 佐々木 隆子<sup>2</sup>  
米増 國雄<sup>2</sup> 檜葉 周三<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>阪大・中検 <sup>2</sup>奈良医大・細菌

### 【目的】

これまで、C1qの定量法としては、主として単純放射免疫拡散法(SRID)が用いられてきた。最近では、酵素免疫測定法(ELISA)でも行なわれるようになってきている。SRIDでは拡散に時間がかかること、また、ELISAでは操作が複雑であることが欠点であると考えられる。そこで、今回、短時間に簡単に行おうと、臨床検査で広く利用されるようになったレーザーネフェロメーターを用いてC1qの定量を試み、SRIDとの比較検討を行った。

### 【方法】

#### 1. 装置

ベーリング・レーザーネフェロメーター全自動化システムを用いた。このシステムは、モジュールI(レーザーネフェロメーター)、モジュールII(キュベットおよびトランスポーター)、モジュールIII(自動希釈装置および分注装置)とヒューレット・パッカード社のマイクロコンピューター YHP 9825Aから成っている。まず、試料は、モジュールIIIにより自動希釈・自動分注がなされる。次ぎにキュベットカセットをセットし、カセットのセンサーにより測定項目、試料の番号が識別され、希釈血清ならびに抗血清が分注されミキサーにより混合されて反応が行なわれる。設定した反応時間後、キュベットカセットは自動的にモジュールII, Iへと送られて、測定される。測定された散乱光度は、コンピューターにより処理されて濃度値として表示される。

#### 2. 試料

被検血清は、健康成人20例と阪大病院に来院した患者128例の血清を用いた。また、標準血清は、健康成人のプール血清を用いた。測定は、血清分離後、その日のうちに行った。

#### 3. 抗血清

純化ヒトC1qでラビットを免疫して得た抗ヒトC1q抗血清を用いた。

#### 4. 単純放射免疫拡散法(SRID)

自家製の抗血清を用いて、プレートを作製した。各wellに10 $\mu$ lずつ添加後、湿潤箱の中に入れ、2-3日室温に放置後、沈降輪の直径を読み、標準曲線よりC1q量を算出した。

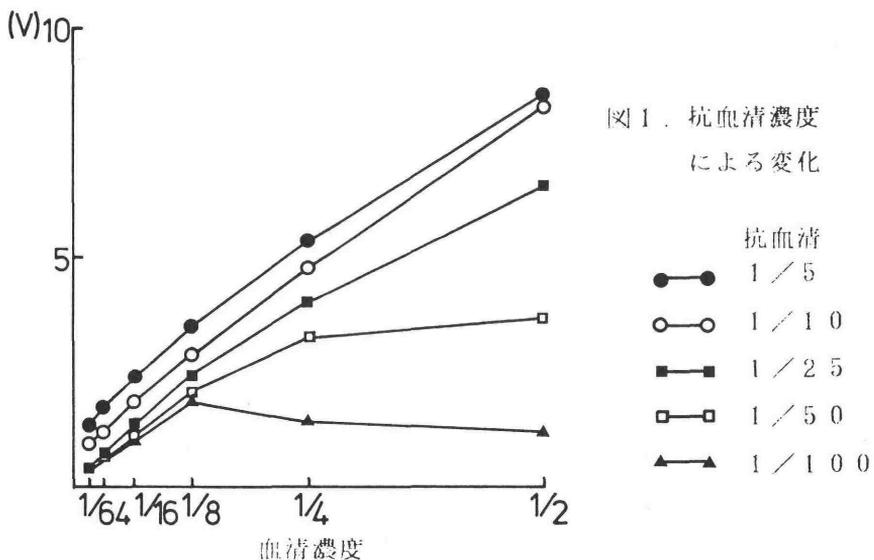
#### 5. Immune Complex(IC)の定量

C1qを定量する際に、血清中に存在するICが、影響するかどうかを知るために、抗熱凝集ヒトIgG抗体を用いレーザーネフェロメーターによりICを定量した。

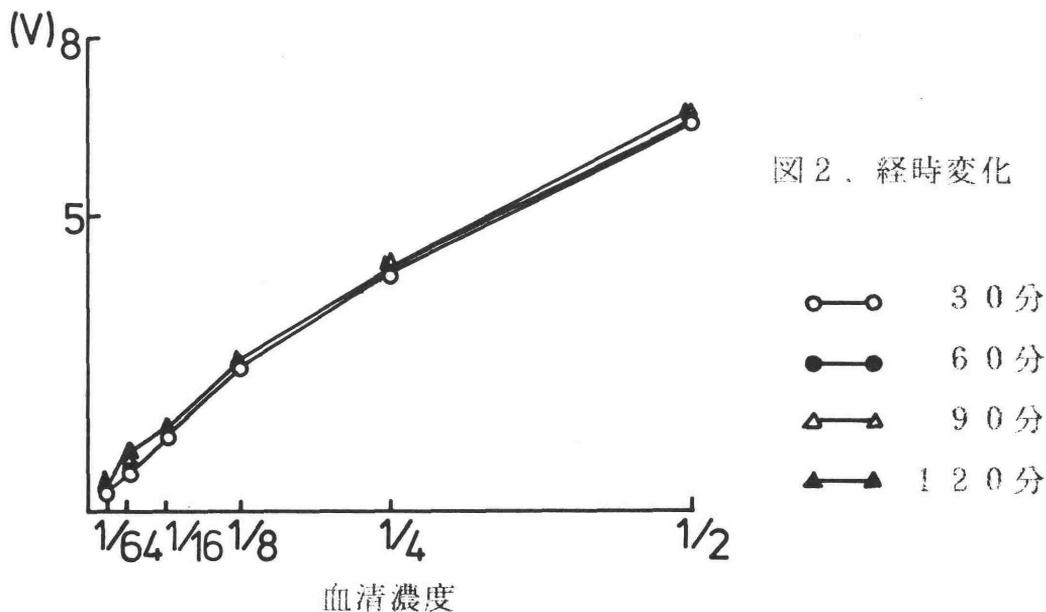
### 【結果】

#### 1. 測定条件の設定

階段希釈した被検血清に、種々の濃度の抗血清(1/5, 1/10, 1/25, 1/50, 1/100)を加え、各々について反応時間(30-120分)を変えて測定した。その結果をひとつにまとめると複雑でわかりにくくなるので、ここでは、反応時間が30分の時の抗血清の濃度による影響(図1)と、25倍希釈した抗血清を用いた時の時間の経過に伴う変化(図2)を示した。図1に示すように、抗血清が低濃度の場合、血清濃度の高いところでは抗原過剰となり、実際より低い値しか得られない。



また、図2からわかるように時間の経過による変化は、ほとんどみられなかった。



以上の結果より測定条件を下記のように決定した。

試料 200  $\mu$ l (血清を10倍に希釈したもの)

抗血清 50  $\mu$ l (抗血清を25倍に希釈したもの)

希釈液 50  $\mu$ l

を混合、30分間室温で反応後測定した。希釈液は、1 mM EDTAを含む生理食塩水を用いた。

## 2. 標準曲線

標準血清により作製した標準曲線を図3に示した。この方法では、50 - 800  $\mu$ l/mlの範囲が測定可能である。

## 3. SRIDとの相関(図4)

yをSRIDにより得られた値、xをレーザーネフェロメーターにより得られた値とすると、 $y = 0.71x + 77$ という関係が得られ、相関係数は、0.82であった。

## 4. ICの影響

IC量とレーザーネフェロメーターならびにSRIDにより定量されたC1q値との間には相関関係は見られず、この測定条件下では血清中に存在しているICは、C1q定量の際に影響しないと考えられた。

### 【考察】

C1qの定量に関して、レーザーネフェロメーターによる方法とSRID法との相関関係は、これまで種々の血清蛋白質(IgG, IgA, IgM, C3c, C4 etc.)についての報告に比べて低い。この原因として、今までに報告された蛋白質と異なり、C1qは、血清中に約150  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 存在している微量成分であるため、被検血清の状態により影響を受けやすいことが考えられる。現在、試料の保存方法ならびに保存時間による影響について検索中である。

以上のことから、まだ若干の測定条件等の検討は必要と考えられるが、自動化に伴う処理能力の増大ならびに検査の省力化により、レーザーネフェロメーターによるC1qの定量は、臨床検査に利用されるようになるであろう。

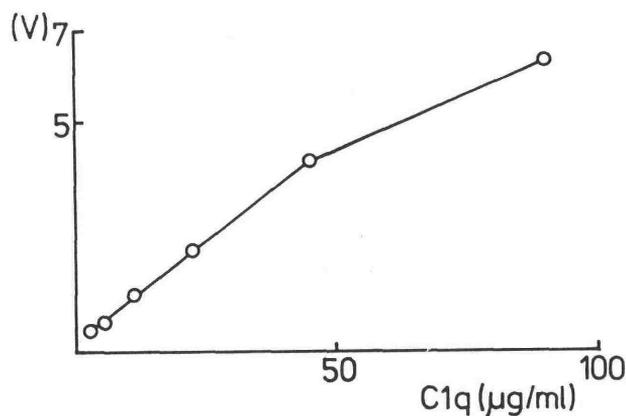


図3. 標準曲線

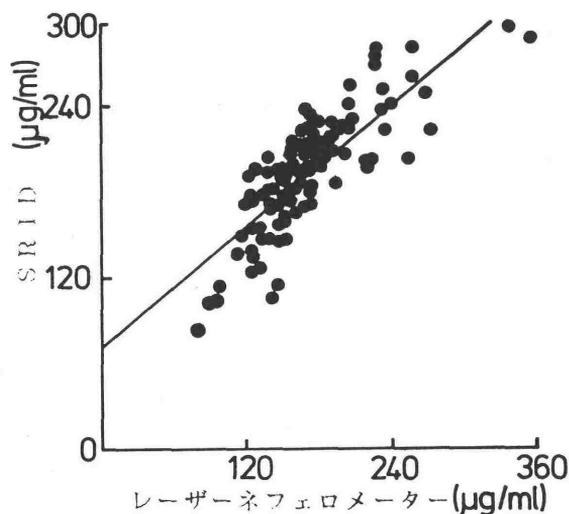


図4. SRIDとの相関

## 8 Clq solid phase ELISAによる免疫複合体測定法の問題点

福田和雄<sup>\*</sup>, 木下康通<sup>\*\*</sup>, 須藤克彦<sup>\*\*</sup>, 堀籠郁夫<sup>\*\*</sup>, 清野 仁<sup>\*\*</sup>, 古山 隆<sup>\*\*</sup>  
山形済生館病院内科<sup>\*</sup>, 東北大学第二内科<sup>\*\*</sup>

### 【はじめに】

血中免疫複合体 (CIC) の測定法として Clq solid phase ELISA (Clq 固相法) は, 信頼性の高い測定法のひとつとして広く用いられている。しかし, 蔗糖密度勾配法やゲル濾過法による分析で, 測定される CIC が 7S, 又は, IgG 分画に存在することがあり, Clq 固相法における CIC が真の CIC を表わしているかどうかの問題になっている。今回, 我々は熱処理し非働化した Clq も Clq 固相法に使用し, Clq 固相法による CIC 様物質の多くが非働化 Clq にも結合し, 真の CIC とは考えられなかったので報告する。

### 【対象・方法】

対象は SLE, 及び, 慢性糸球体腎炎患者で, Clq 固相法で CIC 高値を示した患者血清を使用した。

ウサギ, 及び, ヒト Clq はそれぞれウサギ, 及び, ヒト血清より Volanakis の方法により精製し, さらに ACA 22 のゲル濾過により精製した。

Clq 固相法: ウサギ, 及び, ヒト Clq を PBS で  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度とし,  $0^\circ\text{C}$ ,  $38^\circ\text{C}$ ,  $45^\circ\text{C}$ ,  $50^\circ\text{C}$ ,  $53^\circ\text{C}$ ,  $56^\circ\text{C}$ ,  $60^\circ\text{C}$  の各温度で 15 分間処理後, マイクロタイタープレートの各ウェルに  $100 \mu\text{l}$  毎加え,  $0^\circ\text{C}$  over night 静置し固相に付着させた。この固相の Clq に 12 倍希釈の被検血清, 及び, Aggregated human gamma-globulin (AHG) の希釈系列を  $100 \mu\text{l}$  毎加え,  $37^\circ\text{C}$ , 1 時間反応後洗浄し, 更に HRPO 標識抗 IgG 抗体 ( $\text{F}(\text{ab}')_2$ ) を  $100 \mu\text{l}$  毎加え,  $37^\circ\text{C}$ , 1 時間反応させる。再び洗浄後, O-phenylenedimnine の発色 (OD 492nm) により HRPO 活性を測定し, 抗 IgG 結合量 (CIC 値) とした。

又, CIC 高値の検体を Sephadex G-200 を用いゲル濾過し, 各分画の CIC 値を測定した。

さらに, CIC 高値の検体から DEAE Sepharose ( $0.01\text{M}$  リン酸緩衝液,  $2\text{mM}$  EDTA,  $\text{pH } 8.0$ ) を用い IgG 分画を得, 一部をペプシン処理し  $\text{F}(\text{ab}')_2$  フラグメントとして非働化 Clq との結合性を調べた。

### 【結果】

ウサギ Clq を各温度で 15 分間処理すると, ウサギ Clq は  $53^\circ\text{C}$  以上の加熱で失活し, AHG, 及び, HRPO-抗 HRPO 複合体 (6 倍抗体過剰) との結合性を失う (図 1-a)。これに対して, 検体中の CIC 様物質は  $53^\circ\text{C}$  以上の加熱で非働化した Clq にも結合するものが多く, 真の CIC とは考えられなかった (図 1-b)。

検体をゲル濾過にて分画すると、いわゆる CIC は高分子分画と IgG 分画にピークがみられる。高分子分画の CIC は非働化 Clq に結合しないのに対し、IgG 分画の CIC は非働化 Clq にも結合した(図 2)。すなわち、高分子分画の CIC は真の CIC と思われたが、IgG 分画の CIC は真の CIC ではないと思われた。

又、この非働化ウサギ Clq に反応する CIC 様物質は、ウサギ IgG と反応するリウマチ様因子ではなかった(図 3)。

Clq 固相法にヒト Clq を使用しても、ウサギ Clq の場合と同様に、非働化ヒト Clq に結合する CIC 様物質の干渉がみられた。

図 4 は、ヒト Clq を使用した Clq 固相法で CIC 陽性である 40 検体について、非働化ヒト Clq への反応性をみたものである。活性のある Clq への結合量と非働化 Clq への結合量の差を真の CIC と考えると、通常の Clq 固相法で陽性である 40 検体中 26 例(約 2/3)が CIC 陰性となり、14 例(約 1/3)のみが CIC 陽性であった。

検体の IgG 分画、及び、F(ab')<sub>2</sub> 分画の非働化 Clq への結合性をみると、IgG 分画は非働化 Clq に結合するのに対し、F(ab')<sub>2</sub> 分画の非働化 Clq への結合性は極めて弱い(図 5)。

#### 【考 察】

Clq 固相法で高値を示した検体の中で、ゲル濾過で分画すると、その CIC 値のピークが IgG 分画に位置するものがあり、更に、その IgG 分画にある CIC 様物質は非働化 Clq とも結合した。このことより、この CIC 様物質は液層の endogenous Clq とは結合しておらず固相の Clq、非働化 Clq などの変性 Clq と結合する、変性 Clq に対する自己抗体の可能性が示唆された。

又、フィブロネクチンは液層の Clq とは結合せず、固相、又は、凝集 Clq と結合し、CIC とも結合する。このことよりフィブロネクチンの干渉の可能性も考えたが、この CIC 様物質は固相のゼラチンとは反応せず、又、CIC 様物質と固相の Clq との結合はゼラチンで阻止されなかったこと、更には CIC 様物質が固相のフィブロネクチンとも反応しなかったことより、フィブロネクチンの干渉ではないと思われた。

又、リウマチ様因子の干渉でもなかった。

この CIC 様物質をペプシン処理すると非働化 Clq に対する結合が著明に減少することは、この結合が抗原抗体反応でない可応性も考えられる。

この点に関しては現在更に検討中であるが、いずれにせよ、Clq 固相法においては、Clq 活性を介さず Clq に結合する CIC 様物質が存在するので、測定の際には非働化 Clq をブランクとして使用する必要があると思われた。

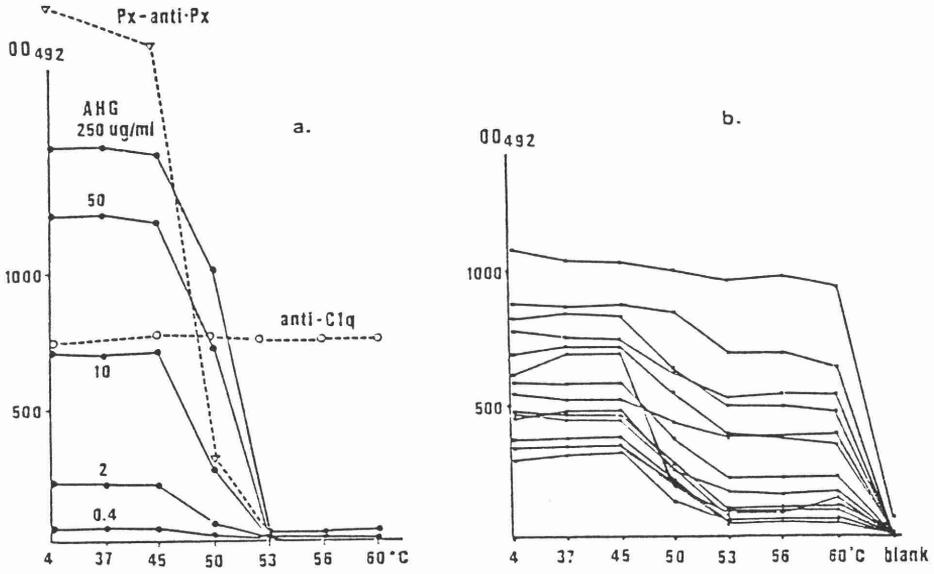


図 1. Clq 固相法において、各温度で15分間処理したウサギ Clq を使用した結果。 a : AHG, HRPO-抗 HRPO 複合体, 及び, 抗 Clq 抗体の加熱 Clq への結合性。 b : 検体中の CIC 様物質の加熱 Clq への反応性。

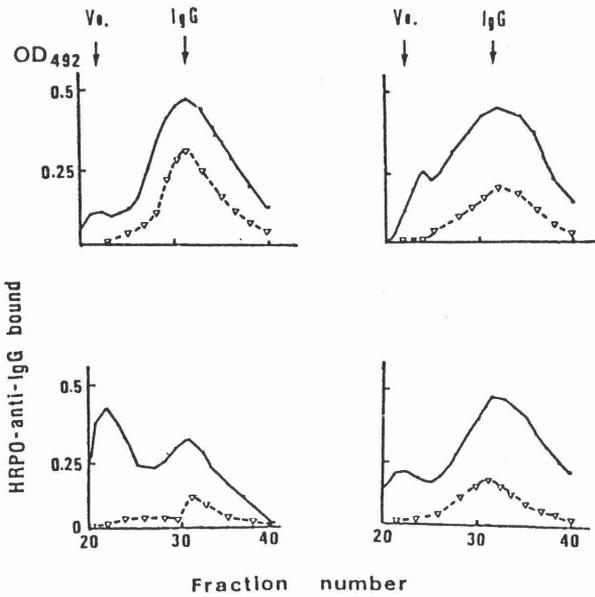


図 2. 検体の G-200 のゲル濾過後, 各分画の Clq (実線), 及び, 非働化 Clq (破線) への結合性。

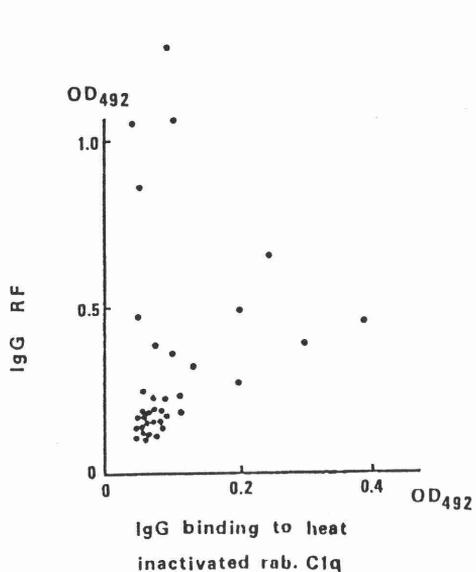


図 3. 非働化ウサギClqに結合する CIC 様物質とウサギ IgG に結合する IgG-RF

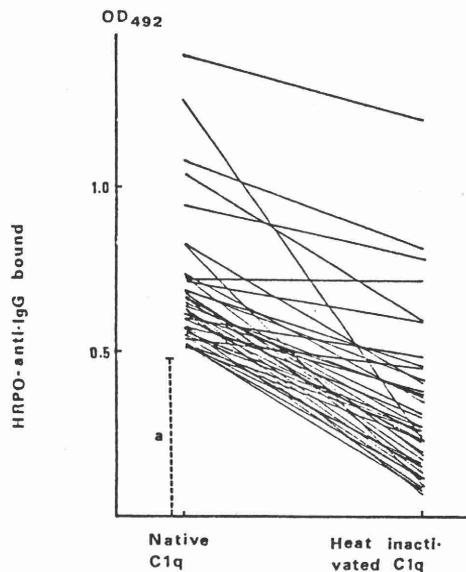


図 4. ヒト Clq を使用した Clq 固相法による CIC 値 (Native Clq) と非働化 Clq に結合する CIC 値 (Heat inactivated Clq) a: Clq 固相法における正常範囲

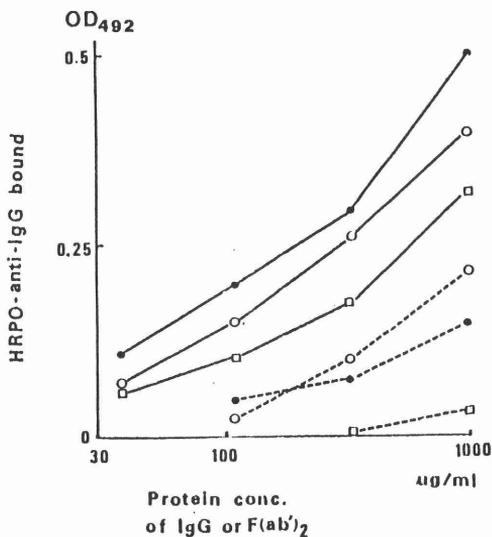


図 5. 検体の IgG 分画 (実線), 及び, F(ab')<sub>2</sub> 分画 (破線) の非働化ヒト Clq への結合性

## 9 補体の活性化によって出現する補体成分複合体のELISAによる検出

田村 昇、伊藤清子、藤田禎三  
筑波大学基礎医学系免疫血清

〔はじめに〕

補体関係の検査として通常行なわれている血清補体価の測定、C3やC4などの補体成分のタンパク量の測定からは、その正常値に幅があるため、それらの値に大きな変化があった時のみ、生体内で補体が反応しているといえるに過ぎない。しかし、もし補体が活性化したときに出現する変化のみを捕らえそれを測定することが可能であれば、補体の反応活性化がごく少なくとも、それを検出することが出来るであろう。補体の活性化にともなって出現する補体成分のフラグメントのみを測定する方法はその一方法であるが、Mayesら (J. Clin. Invest. 73:160-170, 1984)によって提唱されたC3b,Bb,PあるいはC3b,P複合体を測定する方法は臨床的にも有用であろう。我々はこの方法の妥当性を確かめるとともに、classical pathwayでの補体活性化にともなって出現するC4bとC4-結合蛋白(C4-bp)との複合体に着目し、その検出法について検討した。

〔材料と方法〕

### 1. 抗血清

補体成分に対する抗血清はアフィニティークロマトグラフィーで精製したものを、マウスの単クローン性抗体はIgGとして精製したものを、用いた。

### 2. C3b,Bb,PあるいはC3b,P複合体のELISAによる検出法

Mayesらの方法に準じて行った。5 $\mu$ g/mlの抗P100 $\mu$ lをエリザ用プレートS(住友ベークライト)に加え温室で一液放置。1%BSA-PBSで2回洗滌後、同液を加え37 $^{\circ}$ Cで1時間加温。10mM-PBS-0.05%Tweenにて洗滌した後、10mMEDTA-PBSで希釈した検体を加え37 $^{\circ}$ Cで2時間反応させた。3回洗滌後、過沃素酸ナトリウムでhorseradish peroxidaseを標識した抗C3を加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させ、洗滌後基質2,2-azino-di[3 ethylbenzthiazoline sulphonic acid]を加えて室温で通常30分発色させ、波長405nmで測定した。結果はOD405またはC3標準曲線に基づいてC3量で表した。C3標準曲線は、5 $\mu$ g/mlの抗C3をコートしたプレート穴に既知濃度のC3次に標識抗C3と基質を加えて作製した。

### 3. C4b, C4-bp複合体のELISAによる検出法

C3b, P複合体の検出法にほぼ準じた。一次抗体としては抗C4を20  $\mu$ g/mlで用い、二次抗体としては2種類の単クローン性抗C4-bp(TK1とTK5)を混合したものをを用い、このあとさらにhorseradish peroxidaseを標識したウサギ抗マウスIgG(Cappel)を反応させた。

#### [ 結果 ]

##### 1. 正常ヒト血清とzymosanあるいはウサギ血球との反応によるC3b, P複合体の形成。

正常ヒト血清に等量のzymosan 2.5mg/ml、ウサギ血球 $1 \times 10^8$ /mlあるいは緩衝液を加え、37°Cで加温、経時的にサンプルを取り出し10mM EDTA-PBSで5倍に希釈し、形成されたC3b, P複合体をELISAにより測定した。図1に示すように、正常ヒト血清とzymosanあるいはウサギ血球との反応によってできるC3b, P複合体は、約10分でピークに達したあと徐々に減少。C3b, P複合体の形成は、ヒト血清そのものを加温した時にもみられた。これらのC3b, P複合体の形成は、2.5mM  $Mg^{2+}$ -10mM EGTAの存在下でも同様に起きたが、10mM EDTA存在下では起きず、またヒト血清の代わりにプロパージン、B因子あるいはD因子を除いたRP, RBあるいはRD血清を用いた時にも起きなかった。したがって、この方法により検出されるものは、alternative pathwayの活性化によりできるC3b, PあるいはC3b, Bb, P複合体である。

##### 2. 正常ヒト血清と会合IgGあるいは感作ヒツジ赤血球との反応によるC4b, C4-bp複合体の形成。

図2はヒト血清と会合IgGとの反応により形成されるC4b, C4-bp複合体の推移を示したものである。ヒト血清の原液、1/10希釈液あるいは1/100希釈液に5mg/ml、0.5mg/ml、0.05mg/mlの会合IgGをそれぞれ等量加えて37°Cで反応させ、経時的に取り出したサンプルをヒト血清濃度で最終400倍になるように希釈してC4b, C4-bp複合体を測定した。図3はヒト血清と感作ヒツジ赤血球(EA)との反応によるC4b, C4-bp複合体の形成を示したものである。同じように、原液、1/10希釈、1/100希釈ヒト血清に $10^9$ /ml、 $10^8$ /ml、 $10^7$ /mlのEAを等量加えて反応させ、ヒト血清濃度で最終400倍になるように希釈して測定した。図2と3にみられるように、C4b, C4-bp複合体の形成はヒト血清濃度が薄い程著明であり、かつ一度形成された複合体はC3b, P複合体の場合と異なり速やかに消失していった。

#### [ 考察 ]

C3b, PあるいはC3b, Bb, P複合体が、プロパージンのもつ安定化作用のため比較的安定な複合体として血清中に存続し得ることは、予期の通りである。classical pathwayの活性

化により形成されるC4b,C4-bp複合体が、血清濃度の薄い程著明であり、かつ一度形成されたものが速やかに消失されていくのは、血清中のI因子の作用によるものであろう。このことは同時に、プロパージンに相当する因子はclassical pathwayには存在しないことを示すものであろうか。

なお現在、腎疾患患者などの血清中にこの二種類の複合体がどの程度に検出できるか、測定中である。

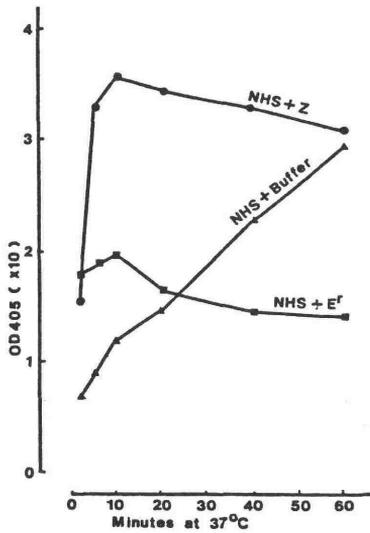


Fig. 1. Formation of C3b,P complex during interaction of human serum with zymosan or rabbit erythrocytes.

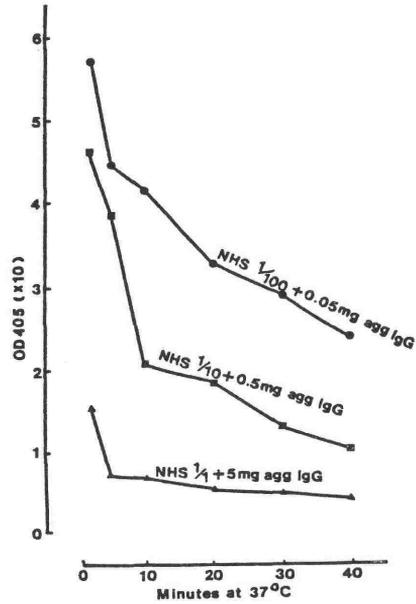


Fig. 2. Formation of C4b,C4-bp complex during interaction of human serum with aggregated IgG.

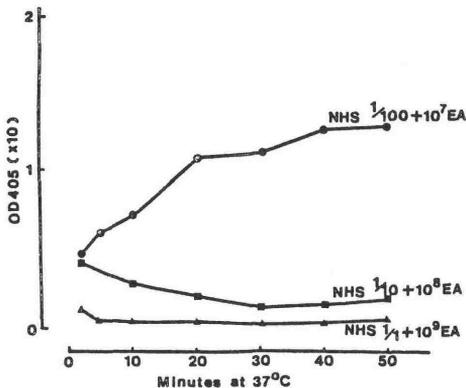


Fig. 3. Formation of C4b,C4-bp complex during interaction of human serum with sensitized sheep erythrocytes.

## 10 ELISAによる新しいC3 NeF測定法

清野 仁<sup>1)</sup>、福田和雄<sup>2)</sup>、木下康通<sup>1)</sup>、須藤克彦<sup>1)</sup>、堀籠郁夫<sup>1)</sup>、古山 隆<sup>1)</sup>

1) 東北大学 第二内科, 2) 山形市立済生館病院 内科

【はじめに】 持続性低補体血症を呈する膜性増殖性糸球体腎炎（以下MPGN）においては、C3 nephritic factor（以下C3 NeF）の存在が病因との関連で注目されている。C3 NeFは補体 alternative pathwayのC3 convertase（C3b, Bb）に対する自己抗体で、IgGであり、C3b, Bbを安定化する機能をもつことが知られている。

これまで、これらの性質を利用したいくつかのC3 NeF測定法が報告されているが、今回われわれは酵素抗体法（ELISA）を用いた新しいC3 NeF測定法として、C3-Bf-IgG（C3 NeF）複合体を測定する方法を考案し、既存の方法とも合致する結果を得たので報告する。

### 【対象および方法】

a) 症例は Table I に示す如く、東北大学第二内科または関連病院において腎生検を施行し光顕または電顕においてMPGNと診断し、さらに低CH50、低C3値および正常C4値を示す7例を選んだ。電顕上、case AはMPGN type II（dense deposit disease）を示し、1例を除く他の5例はtype Iまたはtype IIIであった。

b) C3 NeF測定に用いる検体は採血後1時間室温放置、1時間水冷後遠心して得られた血清または、患者血清よりDEAE Sephadex A50にて精製したIgGを用いた。

c) CH50はMayerの方法、AH50は家兎赤血球を用いる方法、C3、C4は一次元免疫抗散法にそれぞれ測定した。

d) C3 conversion能の測定は検体と正常ヒト血清を5 mM Mg-10 mM EGTAまたは、20 mM EDTA存在下で37°C15分間反応させ、二次元免疫電気泳動法にて行なった。

e) C3b, Bb安定化能は患者血清よりDEAE Sephadex A50にて分画したIgGをEAC 4b3b Bbに加えて37°Cで反応させ、経時的に溶血活性を測定して得た。

f) ELISAによるC3 NeF測定法（Fig. 1）

検体と正常ヒト血清の各200 $\mu$ lを5 mM Mg-10 mM EGTAまたは20 mM EDTAの存在下で37°C、15分間反応させた後、リウマチ因子、free C3、free Bfなどの干渉を除くため、5% PEGの沈殿を得、1 mlのPBS-Tween-EDTA-BSA緩衝液に溶解したものをELISAにて測定した。ELISAは一次抗体としてアフィニティークロマトグラフィーで精製した抗ヒトC3抗体または抗ヒトBf抗体を用い、二次抗体としては、ペルオキシダーゼ標識F(ab')<sub>2</sub>-抗ヒトIgG抗体、F(ab')<sub>2</sub>-抗ヒトC3抗体を用いて、それぞれC3-IgG、Bf-C3、Bf-IgG複合体を測定した。各複合体とも高値である場合、

C3-Bf-IgG 複合体が形成されたと判定した。

## 【結果】

### a) 既存の方法による C3 NeF の確認

Fig.2 は 7 人の症例の中でも特に著明な低補体血症を示した case A および B について、二次元免疫電気泳動法にて C3 conversion 能をみたものである。case A では Mg-EGTA 存在下で著明な conversion が認められたが、B では軽度に過ぎなかった。EDTA 存在下では両者とも conversion は認められていない。case C~G も B と同様の結果であった。

次に Fig. 3 は EAC 4b 3b Bb に対する患者検体 (IgG) の安定化能をみたものであるが、C3 conversion 能と同様に case A が著明な安定化能を示したのに対して、case B~G は、やはり、軽度ないし、中等度の安定化能を示すに過ぎなかった。これらの結果は、case A に多量の C3 NeF が存在し、また同様に低補体血症を呈する他の症例においては、少量の C3NeF または、C3 NeF 様因子が存在することを示唆するものと考えられた。

### b) ELISA による C3NeF 測定法の検討

Fig.4 に患者血清の C3-Bf-IgG 複合体の形成能を示した。患者検体の 2 倍希釈系列と正常血清を Mg EGTA 存在下で反応させることにより、case A では dose dependent に Bf-C3, C3-IgG, Bf-IgG の各複合体が形成された。又、図には示していないが、case A より得られた IgG も同様に Mg-EGTA 存在下で各複合体形成能を示した。一方 case B, G は極く軽度の複合体形成能が認められるに過ぎなかった。case C~F も図には示していないが、B, G と同様の結果であった。検体と正常血清を EDTA 存在下で反応させた場合は、複合体の形成は全く認められなかった。また対照として用いた著明な低補体血症を呈した SLE より得られた検体および正常ヒト血清より精製した IgG も各複合体形成能は陰性であった。これらの結果は、補体 alternative pathway のみが作動する Mg-EGTA 存在下で患者検体中の C3NeF (IgG) と正常ヒト血清中の C3b, Bb が C3-Bf-IgG 複合体を形成することを示すものと考えられた。

## 【考案】

case A より得られた血清は著明な C3 conversion 能, C3b, Bb 安定化能とともに、dose dependent に C3-Bf-IgG 複合体形成能を示し、C3-Bf-IgG 複合体の測定が新しい C3NeF 測定法であることを示したが、C3NeF (IgG) が C3b, Bb に対する自己抗体であること、また EDTA 存在下では形成されず、alternative pathway のみが作動する Mg EGTA 存在下においてはじめて複合体が形成されること、さらに患者血清の IgG 分画に同様の活性があることなどから信頼できる C3NeF 測定法であると考えられる。はじめ、われわれは、患者血中に既に C3-Bf-IgG 複合体が存在するものと考え、直接、検体を ELISA にて測定したが、Bf-C3, C3-IgG, Bf-IgG のいずれの複合体も認められなかった。これは、患者血清中の C3 が著明な低値であるため複合体が存在しても微量

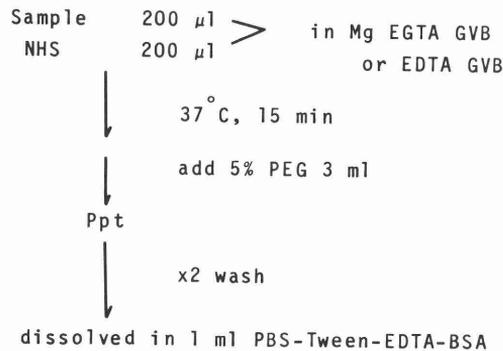
であるか、あるいは形成された複合体は処理されるか組織に沈着する為ではないかと考えられた。

case B～GはAと同様に低補体血症を呈する MPGN であるが、複合体形成能だけでなく、C3 conversion 能、C3b, Bb 安定化能も低値であった。これまで、C3NeF は MPGN の各 type で認められるという報告があるが、case A (type II) でみられた活性が真の C3NeF で、B～G (type I or III) では C3NeF 様因子あるいは他の補体活性化機序の存在が考えられた。

Table 1. 被検症例のプロフィール

Case	Sex	Age	Onset	CH50 (30-45)	AH50 (6-12)	C3 (50-100)	C4 (15-40)	EM
A	F	16	7	14.4	2.3	6	40	II
B	M	25	24	10.7	2.7	9	28	III ?
C	M	16	9	13.2	4.2	6	15	I
D	F	13	11	17.8	6.4	24	15	I
E	F	12	11	15.1	2.7	13	15	ND
F	M	15	11	17.3	4.1	13	17	I
G	F	22	18	16.6	3.5	14	13	I

1) Pretreatment



2) ELISA ( Sandwich assay )

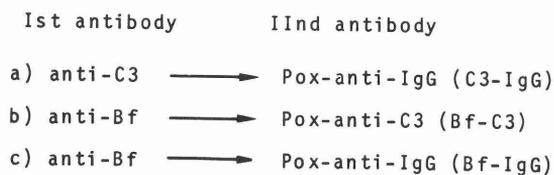


Fig 1. ELISA による C3-Bf-IgG 複合体測定法

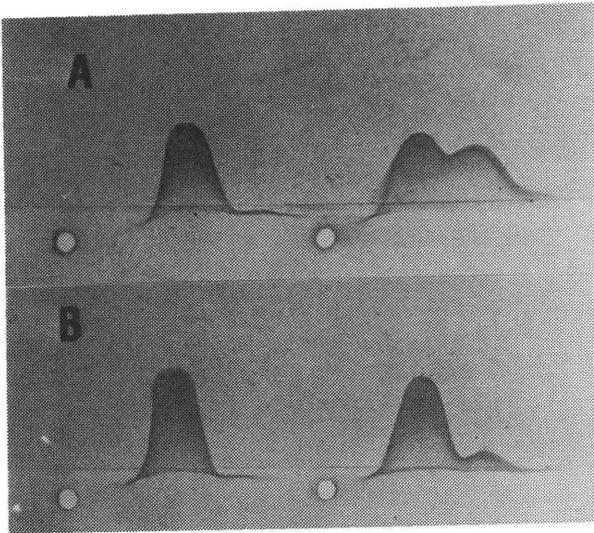


Fig 2. 二次元免疫電気泳動による C3 NeF の測定  
 上段は case A, 下段は case B。左は EDTA, 右は Mg-EGTA 存在下で反応させたのちに電気泳動を行なった。

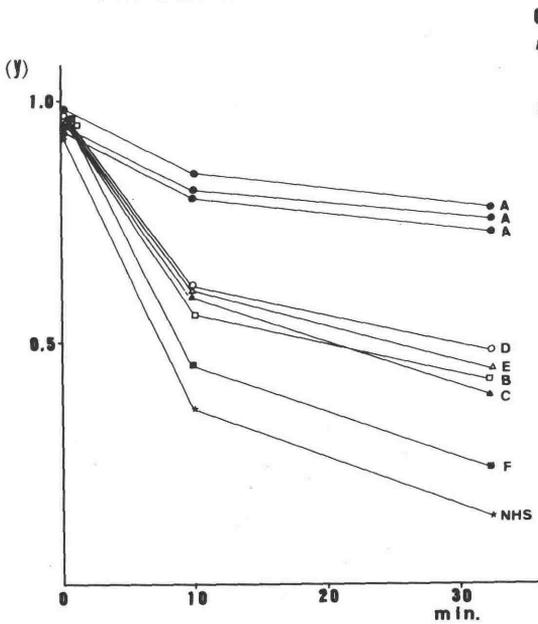


Fig 3. EAC 4b3bBb の安定化能による C3 NeF の測定

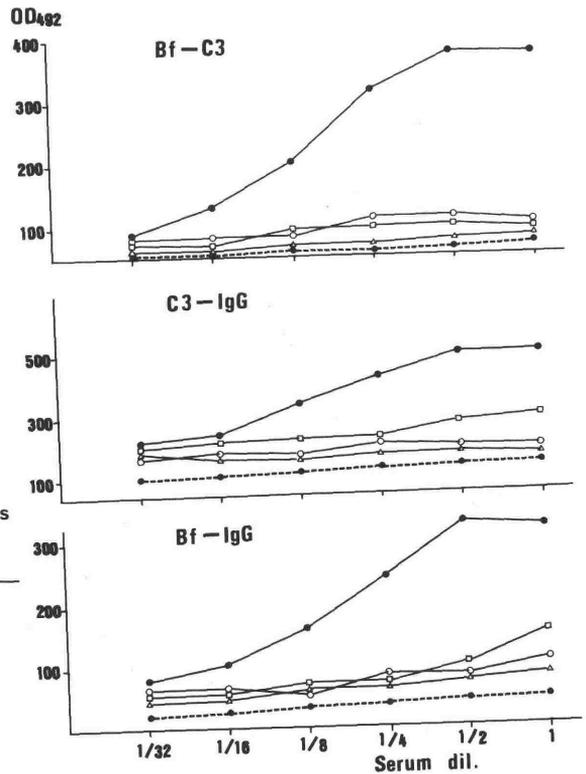


Fig 4. ELISA による Bf-C3 C3-IgG, Bf-IgG 各複合体形成能の測定

● case A, ○ case B, □ case G, △ SLE  
 実線は Mg-EGTA 存在下, 破線は EDTA 存在下で反応させた。

# 11 全身性エリテマトーデス患者血清中の抗補体活性について ( 第二報 )

行山 康、吉田 健三、宮本 昭正  
東京大学医学部物療内科

## 〔はじめに〕

全身性エリテマトーデス(以下SLE)患者の血清中には各種の自己抗体特に細胞核成分にたいする抗体が検出される、循環免疫複合体が検出される、補体が低下する、といった免疫学的異常に関連した特徴がある。我々はSLE患者血清中には抗補体活性があり、それは必ずしも免疫複合体に由来するものではないことを報告してきた。すなわち活動期SLE患者血清を Sephadex G-200 で分画すると、void volume に出現する19S分画を中心とした部分のほかにアルブミン分画付近にも抗補体活性が存在し、前者は正常者コントロールでも認められるのに対し、後者はSLEの血清にしか認められなかった。今回、我々はSLE血清を Polyethylen glycol (PEG) にて分画し抗補体活性を検討することにより興味ある結果をえたので以下に報告する。

## 〔材料及び方法〕

東大病院物療内科に通院または入院の活動期SLE患者17名、各種疾患コントロール12名、正常者コントロール10名の血清を検討材料とした。

PEG(Sigma . mean mol.w. 4000) は燐酸緩衝化食塩水(PBS ,pH 7,5) に25%(W/V) に溶解した。

PEGによる分画は血清150 $\mu$ l、0.1M EDTA 50 $\mu$ l、25% PEG 25 $\mu$ l を4 $^{\circ}$ C、60分反応後、2500rpm 10分遠心し、沈さと上清に分離した。沈さは冷やした2.8% PEG-PBSで2回洗浄後、PBS pH 7.2に溶解し、PEG Iとした。上清の200 $\mu$ lに25% PEG 200 $\mu$ lを加え4 $^{\circ}$ C60分後遠心、沈さを14.0% PEG-PBSで2回洗浄しPBS pH 7,2の1.0 mlに溶解し、PEG IIとした。この時生じた上清をPEG IIIとした。以上より検体血清はPEGによって

I、2.8%以下の沈降蛋白

II、2.8-14.0%の沈降蛋白

III、14.0%以上の上清蛋白

に分画され、これらについて抗補体活性を検討した。PEG IIとPEG IIIはあらかじめ56 $^{\circ}$ C30分の処理をして実験にもちいた。

抗補体活性の測定はヒトまたはモルモット血清を補体源としてゼラチン

加ベロナール緩衝化食塩水 (GVB ; 0.15 mM Ca, 0.5 mM Mg , pH 7.5) を緩衝液とした。マイクロタイターのひとつの well あたり GVB 25  $\mu$ l、検体希釈液 25  $\mu$ l、1.8 CH50 u の補体 25  $\mu$ l を加えて 37°C 30分、攪伴、加温し感作ヒツジ赤血球 (EA)  $1 \times 10^8$  /ml を 50  $\mu$ l 加えさらに 37°C 60分反応させた。遠心後、コロナMTP 12マイクロタイター分光光度計にて O. D. 405m $\mu$  を測定、蒸留水で溶血させたものより機械溶血を引いたものを 100% として %溶血を計算した。抗補体活性は検体を加えない補体のみの溶血% に対する阻止率% であらわした。

### [結果]

PEG I (<2.8%) による沈降物の抗補体活性は正常者群 20.0 $\pm$ 4.9 (mean  $\pm$  S.E、以下同じ)、SLE群 54.5 $\pm$ 6.1、疾患コントロール群 39.7 $\pm$ 6.7 で SLE群 が高く、次に疾患コントロール群、正常者群の順序であった。正常者上限より高い活性を示した者は SLE群 で 55.5%、疾患コントロール群で 16.7% であった。疾患コントロール群で正常者上限より高い活性を示したものは RA 及び HANE のそれぞれ 1例ずつであった ( 図 1 )。次に 2.8% PEG による沈降物の量を変えて活性変化をみると、量を増加させるにしたがって活性は増した ( 図 2 )。原血清からの希釈で比較すると、SLE群、疾患コントロール群、正常者群の順に抗補体活性の高低が認められこの傾向はすべての希釈においてかわらなかった。

PEG II (2.8-14.0%) 分画では SLE群、疾患コントロール群、正常者群のいずれも抗補体活性を示さなかった ( 図 3 )。

PEG III (14%<) 分画では SLE群、疾患コントロール群、正常者群の順に活性が高かった ( 図 4 )。PEG III の量を変えて活性変化をみると図 5 のごとくなり検体の高濃度では三群に差がなくなり、また低濃度でも急勾配で差がなくなった。すなわち、検体濃度のせまい範囲 SLE群 に特異的な抗補体活性をみとめた。

SLE患者の一例について PEG III 分画を Sephadex G-200 でゲルろ過して抗補体活性を検討した ( 図 6 )。おもに Albumin より前に溶出されるものとあとに溶出されるものの二つにわかれ、この結果は前回 PEG によって分画しないで血清をゲルろ過した結果に一致した。

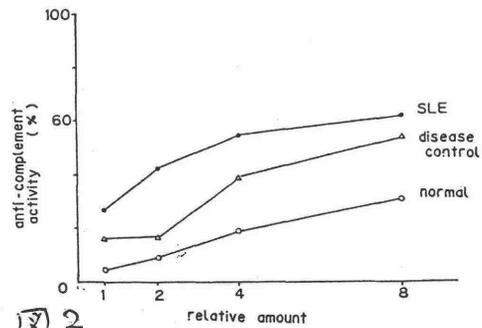
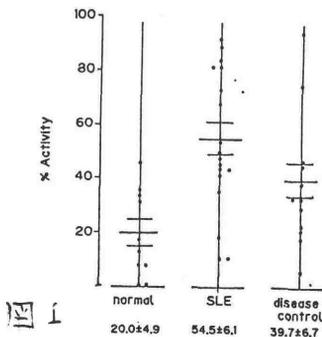
### [考察及び結論]

一般に自己免疫疾患の液性免疫の異常として、自己抗体の出現、免疫複合体の検出等が問題とされることが多い。これらの変化は多クローン

性Bリンパ球の活性化、サプレッサーTリンパ球の機能低下、マクロファージ機能の異常等、細胞性免疫の異常によってもたらされると考えられる。SLEや一部の自己免疫疾患にみられる補体異常は、一応、液性免疫の変化に由来すると考えるとその変化に相応する物質が循環血に出現する可能性がある。この観点からSLE患者血清をSephadex G-200でゲルろ過し、補体に影響を与える分画を検索したところvoid volumeにあらわれる高分子分画とalbumin分画付近に活性を認め、このことを昨年の本シンポジウムで報告した。

今回、我々はpolyethylen glycol (PEG) によって多数例の患者血清を分画してそれらの補体活性に与える影響を検討した。PEG I分画では凝集したIgGとか免疫複合体が沈降するとされているがこの分画の沈降物に確かに強い抗補体活性を認めた。SLEで特に強い活性を認めることからこの分画にみられる抗補体活性はおもに免疫複合体であると考えられる。免疫電気泳動では抗ヒト全血清にたいし4-5本の沈降線を認めIgG, IgM, IgAなどが同定された(図省略)。PEG II分画では抗補体活性を認めなかった。この分画にはほとんどのグロブリンがふくまれるが特に検体を56℃30分処理しても活性はわずかであった。

PEG III分画では検体の高濃度では抗補体活性に差がなく非特異的と考えられた。検体を希釈してゆくとSLEに特異的な抗補体活性を認めSephadex G-200ゲルろ過の結果と考えあわせると分子量3万前後の単量体及び重合体がこの抗補体活性に関与しているとおもわれた。この物質のSLE患者血清での増加がいかなる意味をもつのか、正常人に微量に存在するものが増加してきているのか、免疫異常にともなった現象なのか、例えばリンパ系組織に感染しているウィルスのゲノムより新たに翻訳される蛋白なのか、等については今のところ推測の域をでない。今後、SDS-PAGE, 二次元電気泳動、抗体の作製、等を通じてさらに検索をすすめる予定である。



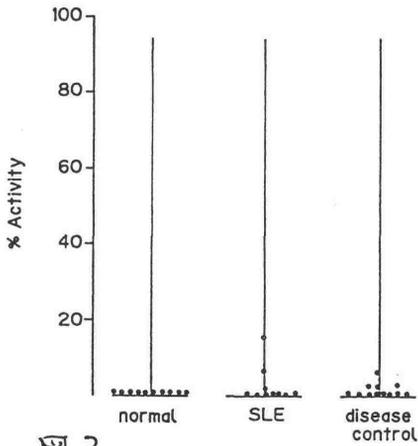


图 3

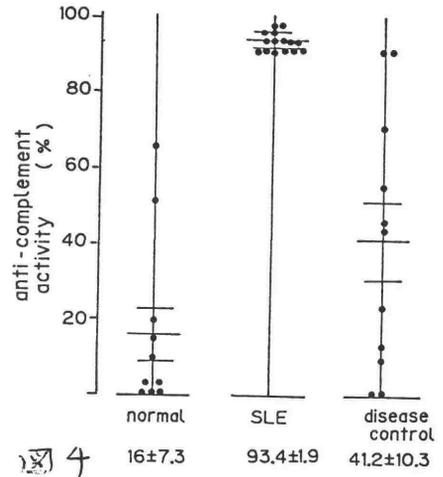


图 4

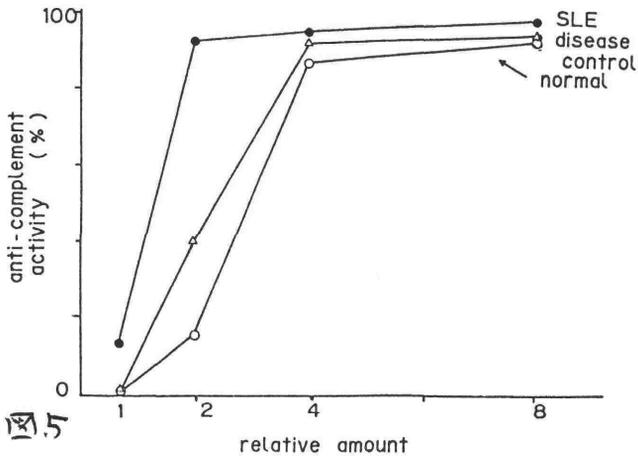


图 5

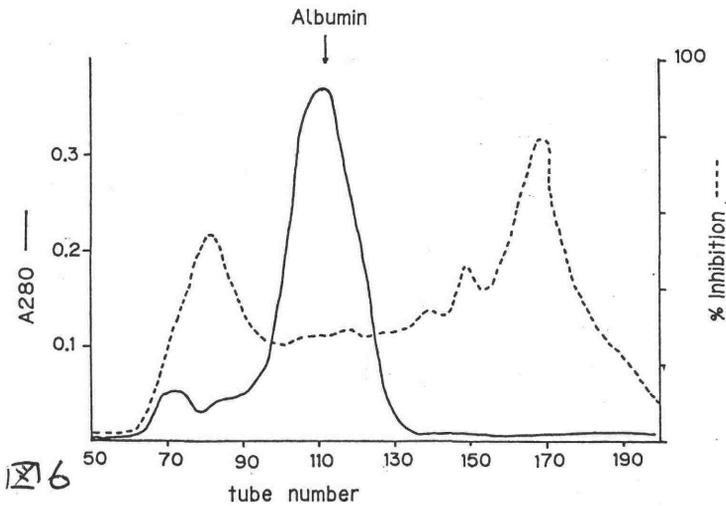


图 6

## 12 C3 NeF とは異なる補体活性因子を認めた持続性低補体膜性増殖性系球体腎炎患者の再検討

大井洋之, 波多野道信, D. K. Peters.

日本大学医学部 第2内科

Royal Post Graduate Medical  
school, Hammersmith Hospital

〔はじめに〕

我々は第20回補体シンポジウムにおいて C3 3% C5 5% と異常低値を呈した M P G N 患者 (Type I) 血清中に C3 NeF とは異なる alternative pathway activating factor を見出し報告した。この因子は C3 NeF と異なり液相中で C5 convertase を形成する IgG を含む 18~19 S のものである。今回従来使用していた方法とは異なるモルモット R 3 を使用した方法で C3 NeF の有無を再検討したところ, IgG fraction 中に C3 NeF 活性を検出することが出来た。そこでこの C3 NeF は他症例の C3 NeF と性質を異にするのか, 又 C3 NeF とともにやはり 19 S の補体活性因子が存在するかどうかを明らかにする目的で検討を加えた。

〔方法〕

C3 NeF IgG は DEAE ion exchange chromatography と CM cellulose により純化した。C3 activator の測定は: Sample と NHS を 37°C 30分反応後 Two dimensional IF により C3 の conversion の面積を全体に対する % で表わした。補体成分の純化 B. D. C 2. C 3. H. I. 及び gp C 1 C 2 は P. J. Lachmann の方法により純化した。従来の C3 NeF assay で使用した EAC 4 b 3 b は gp C 1 gp C 2 EDTA NHS と human C3 により作製した。今回使用した EAC 4 b gp 3 b hu は Lachmann の方法に順じ gp R 3 と EA を 37°C 5分反応し EAC 14 b 2a を作製し human C3 を 37°C 15分反応させ後 EDTA 中で decay させ 1% の cell とした。C3 は Chloramin T method により I<sup>125</sup> をラベルした。ラベルした C3 はマーカーとして NHS を加え C3 の conversion を行い C3 と C3c の部位を切り出し Count し。C3 I<sup>125</sup> が失活化していないことを確かめた。

〔結果〕

従来の方法により作製した EAC 4 b 3 b を使用した C3 NeF assay では陰性であったが, gp R 3 を使用した assay では C3 NeF を検出することが出来たことより limited number の C3 b Bb では安定化出来ず higher number の C3 b Bb lytic site があると検出することが出来る可能性を考えた。そこで gp R 3 より作製した EAC 4 b 3 b を

使用し C3NeF の one step assay と two step assay を行ってみた。one step assay は EAC 4b 3b と B. D. Mg. Sample と同時に反応させその後 EDTA を加え反応後 C-EDTA を加えて60分後 lysis をみた。Two step assay は EAC 4b 3b. B. D. Mg と反応させ5分後 EDTA とともに sample を加え反応後 C-EDTA を加えて反応させ lysis の程度をみた。

C3NeF では one step assay 及び two step assay で差を認めなかったが、MG (患者)・IgG では明らかな C3bBb 安定化能に差を認めた。(Table 1) Two step assay で factor B を dilution してみると高濃度の factor B では C3NeF. MG IgG はともに 100% lysis を示すが MG IgG は  $1/16$  ですでに lysis の低下を示した。(Fig D) 患者 IgG fraction 中には C3NeF とともに 18~19s の補体活性因子が存在することを確かめる為に IgG fraction が液相中で C3 を活性化する能力と cell 上の C3bBb の安定化能が一致するかどうかを検討した。MG IgG の C3bBb 安定化能及び C3 conversion の値を 1 として他の C3NeF IgG の値を出しそれぞれの Ratio 値をとると C3NeF はそれぞれ約 2 倍となり、MG IgG 中にはやはり C3NeF 以外に他の活性因子の存在が考えられた。(Table 2).

C3NeF IgG は C3 の存在なしに B. D. Mg. と 37°C 5 分反応し後純化した C3 と EDTA を同時に加えても C3 の conversion はおこらないが MG IgG は C3 の存在なしでも C3 と EDTA を加えた後反応すると C3 の conversion を認めた。(Table 3) G200 で患者 IgG fraction を各 fraction に分けたものについて検討してみると 7s peak に C3bBb 安定化能を認めた。又 exclusion peak において Table 3 と同様 B. D. Mg と反応後 C3 と EDTA を加え反応すると C3 の conversion を認めた。(Table 4). C3I<sup>125</sup> は B. D. Mg MG IgG と反応後 saclose density gradient で検討すると control に比較し明らかな shift を認めた。(Fig 2)

〔まとめ〕

C3 と C5 の異常低値を示した MPGN 患者血清中には C3NeF と IgG を含む 18~19s の因子が存在することがわかった。従来の assay で C3NeF を検出することが出来なかったのは one step assay では明らかに安定化するが two step assay では弱いことや B の濃度を上げることより明らかに検出出来ることよりこの患者 C3NeF は他の C3NeF と比較し C3bBb に対する affinity や avidity が異なっている可能性が考えられた。他の実験成績より患者 IgG fraction 中には C3NeF とともに 18~19s の補体活性因子が存在すると思われた。

Fig.1

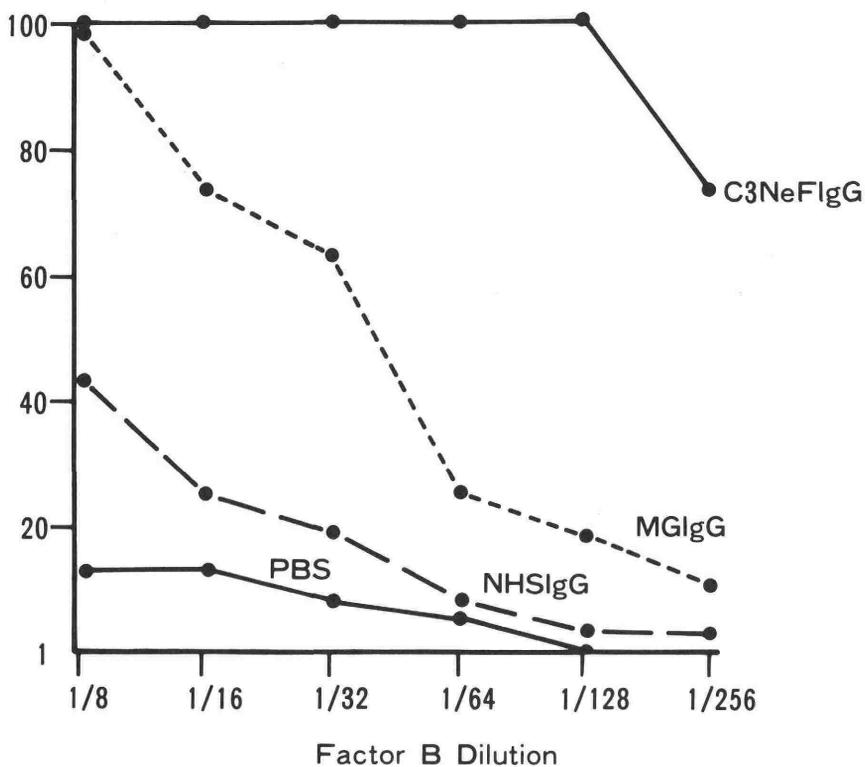


Fig.2

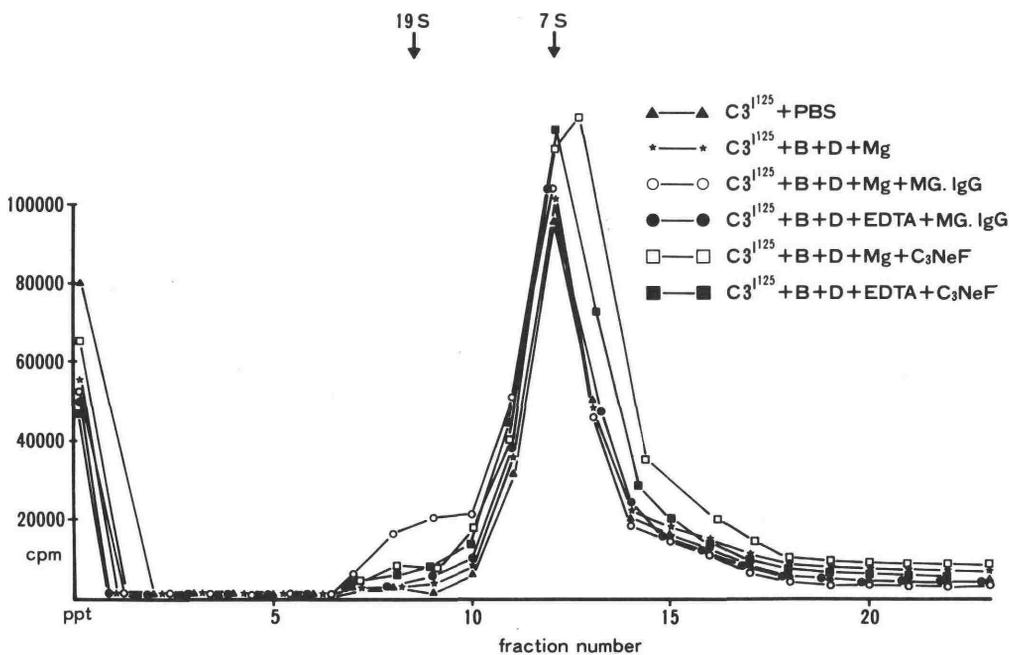


Table.1

Sample	C3bBb Stabilization : Lysis after 60 mins decay		C3 conversion
	One step assay	Two step assay	Sample + EGTA Mg NHS 37° x 30 mins
C3 NeF IgG	95%	100%	100%
MG IgG	85%	21%	95%
NHS IgG	25%	11%	0%

Table.2

Sample	Relative Potency (MG = 1)		Ratio (a/b)
	a) C3bBb stabilization	b) C3 conversion	
MG IgG	1	1	1
C3 NeF <sub>1</sub>	3.9	2.26	1.72
C3 NeF <sub>2</sub>	8.9	5.28	1.68

Table.3

Reaction Mixture (37°C 5 min)	C3 conversion
B, Mg <sup>++</sup> , MG IgG	10%
B,D,Mg <sup>++</sup> , MG IgG	60-80%
B,D,Mg <sup>++</sup> , H,I, MG IgG	10%
B, Mg <sup>++</sup> C3 NeF IgG	5%
B,D,Mg <sup>++</sup> C3 NeF IgG	5%

add  
C3 EDTA  
37° x 30 mins

Table.4

Assay	Fractions from G200 fractionation (mol. weight)			
	>250,000 exclusion peak	200-250,000	135-200,000 75 peak	90-135,000
C3bBb stabilization	-	-	+	-
C3 conversion in NHS	35%	20%	60%	0%
formation of C3 convertase with B, D in absence of C3: C3 conversion	25%	0%	0%	0%

# 13 膠原病における免疫複合体 可溶化現象の検討

九州大学生体防御医学研究所 内科  
友岡 和久, 延永 正  
国立福岡中央病院 第二内科  
酒井 好古

## 【はじめに】

沈降性免疫複合体(沈降性 I C)の血清による可溶化現象(complex-release activity: C R A)は, Miller および Nussenzuweig, 高橋らによって補体のもつ新しい生物活性として注目されている. 今回, 慢性関節リウマチ(R A), 悪性関節リウマチ(M R A)および全身性エリテマトーデス(S L E)における C R A について検討したので報告する.

## 【対象】

対象は当科入院あるいは外来通院中の R A 28 例, M R A 22 例および S L E 16 例出会った.

## 【方法】

C R A 測定に際して使用した沈降性 I C の抗原は牛血清アルブミン(B S A: カッペル社)で, これに chloramin T 法により  $^{125}$  I を使用した. 同じく抗体は抗 B S A 抗体(カッペル社)を使用した. 上記沈降性 I C は Nussenzuweig ら, Baatrup らの方法に準じ作成し, C R A を測定した.

補体溶血活性は, Mayer ら, Kent らの方法を, また A l t e r n a t i v e p a t h w a y は P l a s s - M i l l s & I s h i z a k a の変法によって測定した. C 4 および C 3 血中濃度は一次元免疫拡散法(M B L 社, ハイランド社)によって測定した. 血中免疫複合体(C I C)の測定は, C 1 q-固相法によって測定し, リウマチ因子(R F)の測定は L F T (ヘキスト社)をレーザー・ネフェロメトリーにて測定した.

## 【結果】

### 1) 疾患における C R A

Fig. 1 に示すごとく, 正常人血清 C R A は  $93.7 \pm 2.1\%$  であった. R A においては  $89.0 \pm 4.9\%$ , M R A においては  $46.8 \pm 22.5\%$ , S L E においては  $61.5 \pm 30.2\%$  で, 3 疾患とも正常コントロールに比し有意の低値を示した.

## 2) 疾患におけるCRAと血清補体成分ならびに活性との相関性

各疾患の血清補体成分および活性は、RAにおいてはCH50 (191.2±57.8 U/ml), AH50 (39.4±6.2 U/ml), C4 (47.3±20.8 mg/ml), C3 (115.1±34.1 mg/ml), MRAにおいてはCH50 (139.6±72.0 U/ml), AH50 (27.2±8.2 U/ml), C4 (30.6±16.5 mg/ml), C3 (100.2±34.9 mg/ml), SLEにおいてはCH50 (93.7±46.6 U/ml), AH50 (18.2±9.9 U/ml), C4 (17.2±10.7mg/ml), C3 (59.6±13.5mg/ml)であった(Table 1).

CRAとの相関性では、RAにおいてCH50, C4, C3, との間にそれぞれ $p < 0.05$ と有意の相関性を認めたが、AH50には相関がなかった。MRAにおいてはCH50, AH50との間に、それぞれ $p < 0.01$ , またC4, C3との間に、それぞれ $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ の有意の相関性を示した。SLEにおいてはCH50, AH50との間に、それぞれ $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ , またC4, C3との間に、それぞれ $p < 0.05$ の有意の相関性を認めた(Table 2).

## 3) 疾患におけるCRAとCICとの相関性

各疾患のCICは、RAにおいて $2.4 \pm 2.7 \mu\text{g/ml}$ , MRAにおいて $11.5 \pm 14.6 \mu\text{g/ml}$ , SLEにおいて $3.9 \pm 3.9 \mu\text{g/ml}$ であった。CRAと各CICの相関性は、RAにおいて $p < 0.05$ , MRAにおいて $p < 0.01$ , SLEにおいて $p < 0.05$ の有意の相関性が認められた(Fig. 2).

## 4) RAおよびMRAにおけるCRAに対するRFの影響

RAおよびMRA症例を以下のごとく分類した。

A群:  $\text{LFT} \geq 500 \text{ IU/ml}$ ,  $\text{CH50} \geq 150 \text{ U/ml}$

B群:  $\text{LFT} < 500 \text{ IU/ml}$ ,  $\text{CH50} < 150 \text{ U/ml}$

C群:  $\text{LFT} \geq 500 \text{ IU/ml}$ ,  $\text{CH50} < 150 \text{ U/ml}$

D群:  $\text{LFT} < 500 \text{ IU/ml}$ ,  $\text{CH50} < 150 \text{ U/ml}$

その結果、A群におけるCRA  $67.9 \pm 23.7\%$  ( $n=10$ )、B群におけるCRA  $87.9 \pm 6.8\%$  ( $n=25$ )、C群におけるCRA  $28.6 \pm 18.7\%$  ( $n=8$ )、D群におけるCRA  $52.2 \pm 30.8\%$  ( $n=7$ )であった。

## 【結語】

今回我々は、RA, MRA, SLEにおけるCRAを検索し、補体活性および成分との関係を検討した。またCRAとCICならびにLFTとの関係についても検討した。

参考文献

1. Miller, G.W., and V. Nussenzweig.: A new complement function: solubilization of antigen-antibody aggregates. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72:418-422. 1975.
2. Takahashi, M., J. Czop, A. Ferreria, and V. Nussenzweig.: Mechanism of solubilization of immune aggregates by complement. Transplan. Rev. 32:121-139. 1976.
3. Fujita, T., Y. Takata, and N. Tamura.: Solubilization of immune precipitations by six isolated alternative pathway protein. J. Exp. Med. 154:1743-1751. 1981.
4. McConahey P.H., Dixon FJ.: A method for trace iodination of proteins for immunologic studies. Int Arch Allergy Appl Immunol 29:186-189, 1966.
5. Baatrup, G., I. Petersen, S. Svehag and I. Brandslund.: A standardized method of quantitating the complement-mediated immune complex solubilizing capacity of human serum. J. Immunol. meth. 59:369-380, 1983.
6. Kent, J.F. & Fire, Jr. E.R.: Precise standardization of reagents for complement fixation. Am. J. Trop. Med. Hyg., 12:103-116, 1963.
7. 中山秀英, 小出 輝, 田村 昇,: Alternative pathwayを介する補体活性の測定法, 臨床免疫, 10:505-509, 1978.
8. 中村 敏男, 横田 博, 中沢 恵子,: C1q solid-phase EIA法による流血中 Immune complex の測定法. SRL宝函, 4, 28-33, 1980.

Table 1 Complement activity and components in RA, MRA and SLE

	R A (28)	M R A (22)	S L E (16)
CH50 (U/ml)	191.2±57.8	139.6±72.0	93.7±46.6
C4 (mg/ml)	47.3±20.8	30.6±16.5	17.2±10.7
C3 (mg/ml)	115.1±35.1	100.2±34.9	59.6±13.5
AH50 (U/ml)	39.4±6.2	27.2±22.8	18.2±9.9

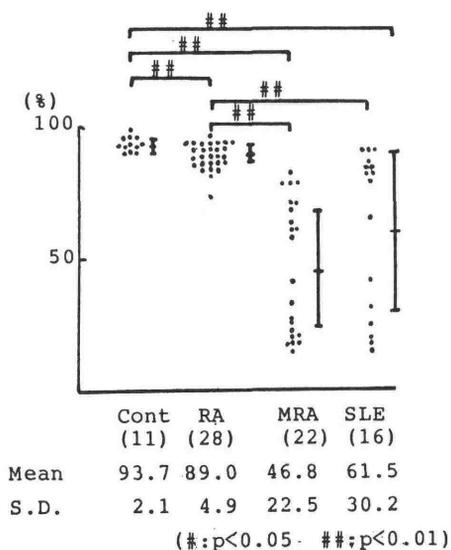
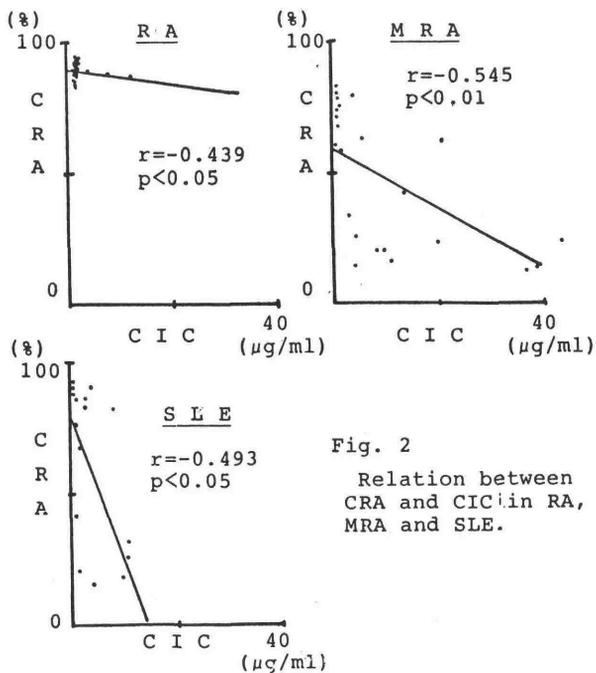


Table 2 Relation between CRA and complement activity in RA, MRA and SLE

	R A (28)	M R A (22)	S L E (16)
CH50	0.601**	0.756**	0.367
C4	0.411*	0.704**	0.607*
C3	0.277	0.517*	0.517*
AH50	0.171	0.547*	0.571**

(\*:p<0.05   \*\*:p<0.01)

Fig. 1 Complex-release activity in RA, MRA and SLE



天野哲基, 馬越由伸, 桑島紀夫

山村昌弘, 太田善介

岡山大学第三内科

## 〔目的〕

補体による免疫複合体(IC)の可溶化は *in vitro* の現象として発見されたものであり *in vivo* における意義は不明である。しかし、日常、全身性エリテマトーデス(SLE)の腎病変を観察していると、ICの可溶化能が早期に回復する症例においては、予想以上に腎糸球体のICが消失している事が認められる為、我々はICの補体による可溶化現象が *in vivo* でも起っている可能性があるとして報告してきた。今回、この点を更に明らかにする為に実験的IC病変である acute serum sickness(ASS)及び chronic serum sickness(CSS)を作成した後に一群はCVFにより補体によるICの可溶化能を低下させ、他群はTurpentine oilで可溶化能を上昇させ、経時的に腎生検を施行して、腎局所におけるICの消長を観察した。

## 〔方法〕

ASSは図1の如くウサギに-4 dayにBSA 3 mgとFCAで免疫後、0 dayにBSA 500 mg/kgを静注し、血中からBSAが消失し、抗BSA抗体が出現する10 day前後に腎生検を施行し、Ag(BSA), Ab(ウサギIgG), C3(ウサギC3)を蛍光抗体法で染色した。糸球体にICを証明しえたウサギの内、一群にはCVF(Cordis)500 unit/rabbit/w, i. p., 他群にはTurpentine oil 2 ml/rabbit/w, i. m.を注射し、1週間毎に腎生検を続けた。Ag, Ab, C3の沈着の程度は蛍光顕微鏡下で陰性, ±, +, ++と判定し、それぞれを0, 1, 2, 3と表示した。ウサギの補体価はEA  $1 \times 10^8$  の50%溶血法で求め、前値(-4 day)の百分率で表した。ウサギのICの可溶化能(CRA)はヒトの場合よりかなり低値の為、我々のPO活性を利用する方法では血清による阻害を受ける為、<sup>3</sup>HをラベルしたPO-ICを利用して測定し、補体価同様、前値の百分率で表した。

CSSは図2の如くAriszの方法でFisher雌ラットにBSAを免疫しつづけると腎炎が作成されたものは80 day前後で蛋白尿が出現してくる。この時期に腎生検を施行すると糸球体に均一にAg(BSA), Ab(ラットIgG), C3(ラットC3)が証明される。腎炎が出来た後、BSA静注を止め、1週間放置後、CVF 50 unit/rat/w, i. p.を続ける群と無処置群を分け、3週間後より、毎週6週間後迄、腎生検を施行した。(腎生検と採血の為、大部分は死亡する為、同一ラットの腎生検は施行していない。)

## 〔結果〕

### I. ASS rabbit

BSA 500 mg/kgを投与したウサギ19羽の内、Ag, Ab, C3のいずれかが証明されたものは13羽、陰性2羽、死亡4羽であった。陽性例の内訳は(Ag + Ab + C3)が9羽、(Ag + C3)が1羽、C3のみが3羽であり、Ag陽性の計10羽をIC陽性と判定し、Agの沈着が同程度となるよう5羽ずつ2群に分けた。

#### 1) ASS rabbitのCH50とCRA

ASS rabbitのCH50はASSの形成と共に低下し、第1回目の腎生検後、Turpentine oil注射群では急速に前値以上に回復した。CVF群はTurpentine oil群より低下する傾向は認められるが有意な低下は21 dayのみであり、28 dayではCVFの効果は認められなかった。(図3)無処理で腎生検のみを行った場合もTurpentine oil群と同様の補体価の回復が認められるが、これは腎生検及びその後の炎症によるものと考えられた。CRAもCH50と同様の傾向を示したが、CH50の場合と異りCVF群では14 dayと21 dayで明らかな低下が認められ、28 dayでは上昇した。

#### 2) ASS rabbitのICの消長

ASS rabbitのTurpentine oil群とCVF群の腎糸球体上のAg, Ab, C3の消長をscoreの平均値で表すと図4の如くなる。即ち、第1回目の腎生検ではTurpentine oil群のAg 1.8, Ab 1.6, C3 2.2に対し、CVF群のAg 2.0, Ab 1.6, C3 2.0とほぼ同様であるがTurpentine oil群のAg, Abはその後、それぞれ3週間後、1週間後には消失する。しかしCVF群ではAgは3週間後も1.0であり、Abは2週間後で0.8であった。又、C3は共に3週間後も陽性であるがTurpentine oil群1.0に比してCVF群は2.3と高値であった。

### II. CSS rat

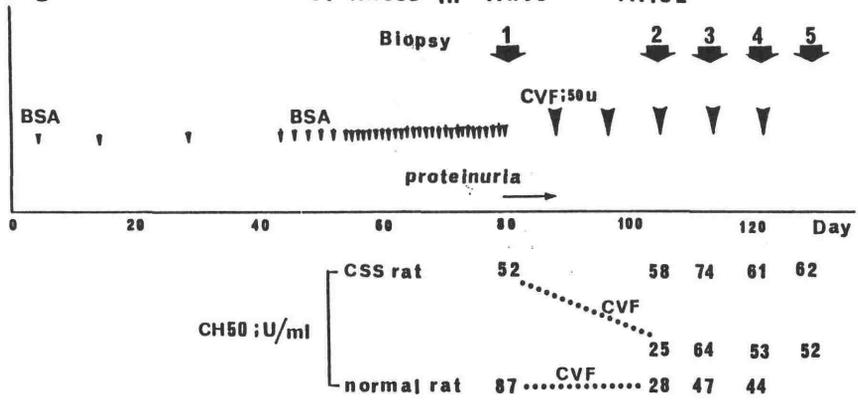
図2の如く、CSS ratのCH50はCVF投与により2週間後では低下するがその後はCVFの効果は認められなかった。CSS ratの腎糸球体上のICは無処理群ではAgが3週間以後では殆んど陰性となり、C3は(±), Abは(±)~(+)と消失傾向であるのに比し、CVF群ではAg, Ab, C3共(+)~(++)で持続した。尚、正常ラットにCVFを投与した場合は腎糸球へのAb, C3の沈着は認められなかった。

## 〔考察〕

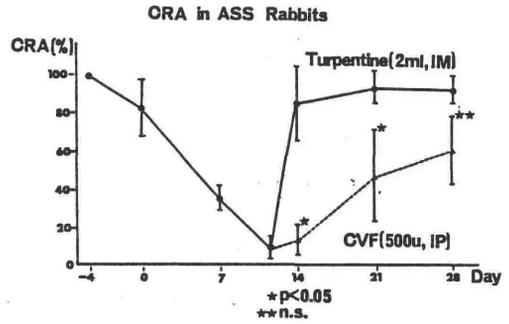
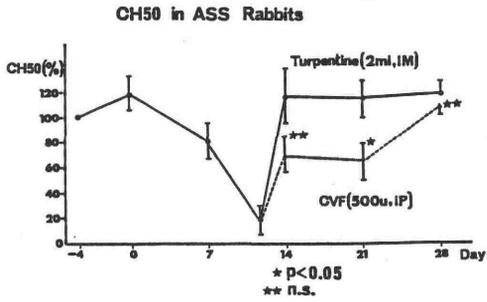
ASS rabbitはBSAの投与量を従来の方法の倍量である500 mg/kgで作成したが、それでも生検腎へのBSAの沈着は少量でありICの消長の判定はやや困難であったが、CVF投与によりCH50やCRAが低下した群ではICの沈着が持続している傾向が認められた。ASS rabbitに比してCSS ratのICの沈着は明瞭で観察には適しているが、腎生検等で大部分が死亡するので、同一個体におけるICの消長を観察する事が出来ないと



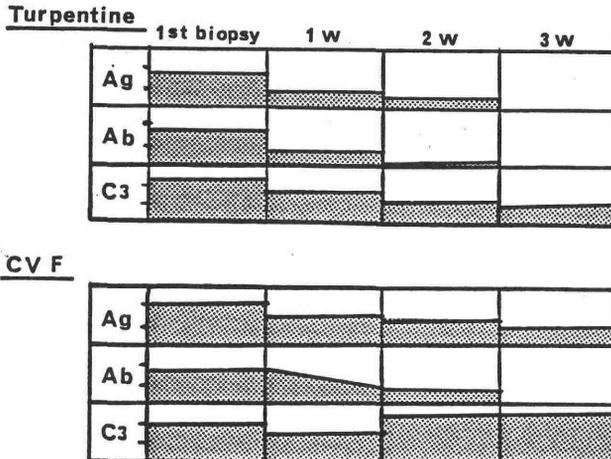
**Fig 2 Chronic Serum Sickness in Rats — Arisz**



**Fig 3**



**Fig 4 Immune Deposits in ASS Rabbits**



## 15 <sup>1</sup>H-NMRによる補体系第三成分の高次構造についての研究

武藤 裕, \*福元裕二, 荒田洋治  
東大 理, \*帝人 生医研

### 【はじめに】

補体系は、生体内で、異物の排除に重要な役割を果たしている、液性免疫系であり、補体系第3成分であるC3は、その中でも中心的な役割を果たしている。C3は、分子量約18万の血清糖たんぱく質で、分子量11万6千の $\alpha$ 鎖と分子量7万の $\beta$ 鎖から構成されている。C3の活性化では、まずC3転換酵素により $\alpha$ 鎖のN末端から77残基で構成されるC3a部分が、限定加水分解を受ける。これにより(1)残りのC3b部分に高次構造の変化が起こり、分子内に存在するチオールエステル結合が、反応性の高い状態に移行し、(2)エステル交換反応により、異物と共有結合で結合する。C3をメチルアミンなどの求核試薬で処理することにより、チオールエステル結合を切断しても、C3分子は、C3a部分を残したまま同じような構造変化を起こすことが知られている。しかし、この場合の構造変化は、きわめてゆっくりしたものである(50mMメチルアミン存在下、37°Cで構造変化の半減期=520min) [1]。このような事実から、C3a部分のC3分子中における高次構造上の位置づけを行うことは、興味深い問題である。

また、C3a自身もアナフィラトキシン活性を持ちその水溶液中での構造と生理活性の相関に興味を持たれている。我々は、このような問題に対し、<sup>1</sup>H-NMRが、有効な手段になるものと考え、ヒトC3及び、ヒトC3aのC末端のArg77を欠いたC3a des-Argについて種々の測定を行った。今回は特にC3aとC3bの接続部分について議論したい。

### 【方法】

ヒトC3の精製は、plasmaを材料とし、Heparin-Sepharoseを用いる長沢らの方法 [2] に準じて行った。精製中のC3とC5の分離は、溶血活性の測定により確認し、精製したC3については免疫電気泳動及び、SDS-PAGEにより純度の確認を行った。ヒトC3は、Toyo-ultrafilterを用いて、限外ろ過を繰り返すことで不純物を除く。このあと、Toyo-microultrafilterを用いて、適当なイオン強度を持つ重水のリン酸緩衝液により重水置換を行った。ヒトC3a des-Argは、Hugliらの方法 [3] に準じて精製したものをを用い、凍結乾燥により重水置換を行った。<sup>1</sup>H-NMR測定は、25°Cで行い、Bruker社製400MHz <sup>1</sup>H-NMRの装置を用いた。また、pH値は、23°Cで測定した。

### 【結果】

<1>アミノ酸76残基からなるC3a des-Argのスペクトルには、Fig. 1に示すように分離したシグナルが、いくつも見られる。これらのシグナルのアミノ酸残基ごとのグループ分けを行うため(1) pH滴定, (2) decoupling, (3) 過酸化水素によるMetの酸化を試みた。(1), (2)より2個のHis, 2個のTyr, 4個のAla, 3個のThrに由来する特徴あるシグナル

を、(3)により3個のMet-Sメチルのシグナルを確認できた。  
 <2> 次に、これらのグループ分けをもとにシグナルの帰属を行ったが、今回は特にC3aとC3bの接続部分についての情報を得るため、C3a des-Arg にカルボキシペプチダーゼYを作用させ、そのスペクトルの経時変化を追跡した。試料のC3a des-Arg に重量比にして1/2000のカルボキシペプチダーゼYを加え、pH 6.5, 25°Cの条件で反応を行った。この実験の解釈のためFig. 2には、ヒトC3aの一次配列を示す[4]。

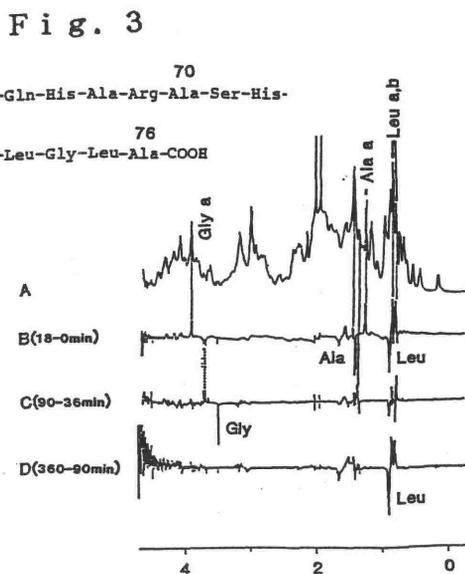
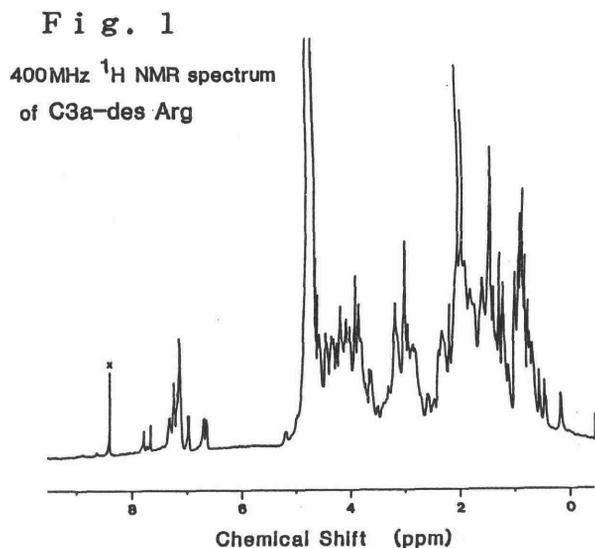


Fig. 4

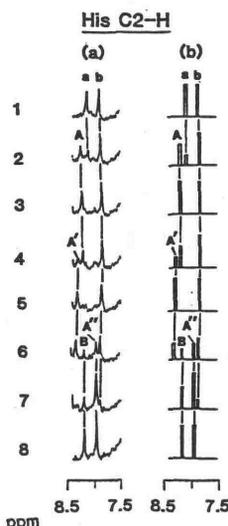


Fig. 5

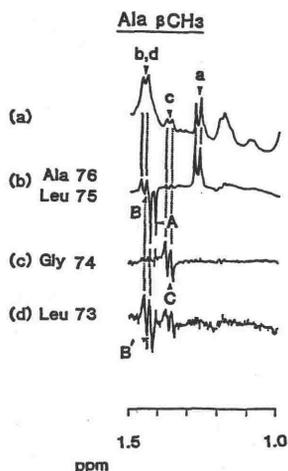


Fig. 2

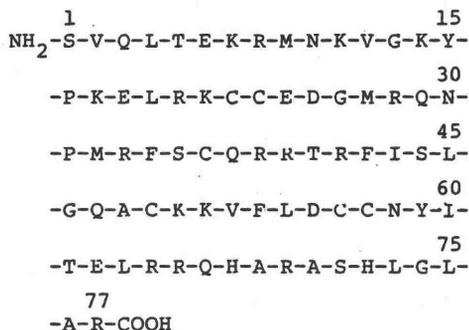


Fig. 3は、その反応の初期の変化を差スペクトルをとることにより明らかにしたもので、例として0.0から4.0 ppmの領域を示している。Aは、反応前のスペクトル、Bは反応開始後18分後と反応前の差スペクトル、Cは、90分後

と36分後、Dは360分後と90分後の差スペクトルである。これらの差スペクトルから、BではAla-76, Leu-75, CではGly-74, DではLeu-73が切断されているのがわかる。同時にこの結果から、Ala-76, Gly-74, Leu-75, 73に由来するシグナルについて帰属をつけることができた。

ヒトC3a des-Argには2個のHis (His-72, 67)があるが、そのC2-プロトンはカルボキシペプチダーゼYの反応が進行するにつれ、Fig. 4のような経時変化を示した。これによるとpeak aは、Gly-74 (1~3の変化), Leu-73 (3~5の変化)が切断されるごとにpeak A, peak A'へとシフトして最後にアミノ酸のHisとして切りだされているのがわかる (peak A'')。これに対し、peak bは5の段階まで、その化学シフトに変化が表れなかった。このことからpeak aがHis-72に、peak bがHis-67に由来することがわかった。

次にAlaのβメチルプロトンシグナルの変化をFig. 5に差スペクトルで示した。(b)は、Ala-76, Leu-75が切断されていくところで、先程示したように、Ala-76がアミノ酸として切りだされている。この時、同時にAla-bがAla-Bにシフトしているのがわかる。(c)はGly-74、(d)はLeu-73が切断される場所に対応しているが、これによりAla-cがAla-Cに、Ala-BがAla-B'にシフトしている。これに対し、Ala-d (pH 6.5ではAla-bと重なっている)は、Ala-76, 70が切断され、Ala-68がC末端に露出するまで反応が進んでもシフトを起さなかった。このことからAla-dは、Ala-48であることがわかる。

カルボキシペプチダーゼYによる分解は、以上述べたシグナルの帰属のほかに、このC末端部分の水溶液中での構造についていくつかの知見をあたえる。Leu-75やGly-74の切断により4, 5残基も離れたAla-70, 68にシフトが生じるのは、このGly-74からAla-68の部分に規則的な構造があることを示唆している。また、HuberらのX線結晶解析 [3] の実験からC3aには、Tyr-15からTyr-59までで構成されるrigidなcoreの存在が確かめられている。Leu-73までの切断では一次構造上つながった数残基先のアミノ酸のNMRシグナルにしか影響が表れないことから、このAla-76からLeu-73の部分はcoreから突きでた位置にあるものと考えられる。

### <3>ヒトC3のH-NMRスペクトル

ヒトC3のH-NMRスペクトルの芳香環プロトン領域をFig. 6に示す。ここで示されるように2個のHis C2プロトン由来のシグナルが観察できる。

600 mM NaCl存在下で重量比にして1/100のtrypsinを加えるこの2個のシグナルに代わって、2個の鋭いシグナルを観察することができる (Fig. 6)。これはC3a部分にあるHis-72とHis-67に由来するシグナルであり、このことからC3で観察されるHisのシグナルは、C3a部分に存在するHisのものであると考えられる。

400 mM NaCl存在下でpH滴定を行ったところpeak 1のみがpH 5.5から8.5の間で観察でき、peak 2は、pH 6.0から7.0の間では広幅化のため観

察できなかった。このpH滴定の結果を、C3a des-Arg のHisのpH滴定曲線とあわせてFig. 7に示す。peak 1のHis (以下、His-(1)と略)は、 $pK_a = 6.52$ で limiting shift = 8.60, 7.66 ppmであった。これは、IgG1分子中のヒンジ領域に存在するHisのものとはほぼ一致する。このことはHis-(1)が、溶媒中に露出し、そのイミダゾール環が比較的自由に運動できることを示している。また、trypsinによる切断実験によってHis-(1)は、C3a中のHis-72に対応すると考えられるが、この場合切断前後で化学シフトに変化がないこと及び、両者のpH滴定曲線が、一致することからこのHis-72の存在する領域は、C3中でも同じ環境にあるものと考えられる。

Fig. 6

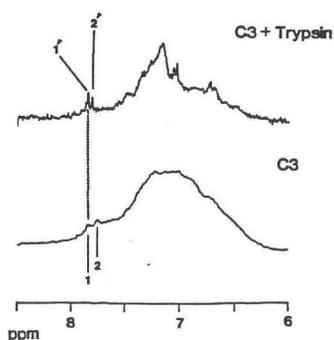
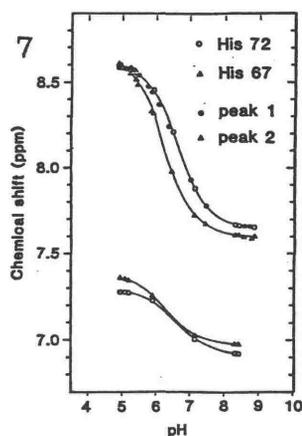


Fig. 7



【まとめ】

C3a des-Arg についてカルボキシペプチダーゼYを用いることにより、C末端数残基の帰属を確定した。また、C3a des-Arg のC末端部分 (Ala-76からLeu-73までの部分) が、水溶液中でもcoreと呼ばれる部分から突き出て、ある規則的な構造をとっていることがわかった。C3で観察された2個のHisのpH滴定曲線は、C3a des-Arg の対応するものとはほぼ一致しているため、C3中でもこの部分は、C3a des-Arg 中と同じ状態にあると考えられる。また、この2個のHisのある部分は、C3中で溶媒に露出し、特にHis-72のイミダゾール環は、比較的自由に運動できる状態にあると考えられる。

【謝辞】

御指導いただきました東京都臨床医学総合研究所の西岡久壽彌先生、鈴木貴和先生、北村ふじ子先生及び、C3の精製法について御教授いただきました北海道大学薬学部の長沢滋治先生に深く感謝致します。

【文献】

- [1] Iseman *et. al.* (1981) *Biochemistry* 20, 4458.
- [2] Nagasawa *et. al.* (1977) *Immunochemistry* 14, 749.
- [3] Hugli *et. al.* (1976) *J. Immunology* 117, 1688.
- [4] Hugli *et. al.* (1978) *Adv. Immunol.* 26, 1.
- [5] Huber *et. al.* (1980) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 361, 1389.

# 16 C4b分子中のC2・C4bp結合部位の解析

長沢滋治、市原千嘉子<sup>4)</sup>、小山次郎  
北大 薬学部、<sup>1)</sup>応用生化学研究所

【目的】 古典的経路の C3 convertase (C3ase) はC4とC2から活性化されるが、この反応は i)  $C4 \rightarrow C4a + C4b$ 、ii)  $C4b + C2 \rightarrow C4b,2$ 、iii)  $C4b,2 \rightarrow C4b,2a + C2b$  の3段階からなる。i)の反応でC4 $\alpha$ 鎖がC1sにより切断されると、C4b分子上に異物結合性の不安定結合部位のほか、C2とC4bpに対する結合部位も形成される。このうち、不安定結合部位は、チオエステル結合をした活性型グルタミン酸残基であることが証明されているが、C2およびC4bp結合部位の位置、構造、相互関係等については明らかでない。また、C2a結合部位とC2結合部位の異同についても分かっていない。

今回、我々はC4b分子上のC2およびC4bp結合部位に関する知見を得ることを目的に、種々のC4bフラグメントとC2、C2a、C2b、C4bpおよび単クローン性抗C4b抗体との反応性を検討したので報告する。

【材料と方法】 補体成分はヒト血漿から既報の方法により精製したものをを用いた。C4b'(C4bの分解反応中間体)、C4c、C4dはC4bとI/C4bpの反応液をdisc PAGEにかけることにより分離した(図1参照)。C4bの $\alpha$ - $\beta$ 鎖体は、C4bを変性剤非存在下でDTTで部分還元したのちdisc PAGEにかけることにより分離した。

C4bフラグメントとC2、C2b、C4bpの反応性はdisc PAGEにより、C2aとの反応性はTSK G3000SWを用いたHPLCにより解析した。また、C4bとC2、C4bpの反応性に対する単クローン抗体の影響はEAC4bを用いて解析した。

## 【結果と考察】

1) 単クローン性抗C4b抗体、Ab242とAb463の特異性 Ab242はC3aseの活性化を阻害するほか、C3aseの解離失活化を促進した。一方、

Ab463 はC3ase を安定化（半減期約30分に延長）した。興味深いことに、Ab242 は C4b、C4b'、C4c、 $\alpha$ - $\beta$ 鎖と複合体を形成するが、native C4 や還元した $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 鎖とは反応しない（図 2）。これは、Ab242が C4  $\rightarrow$  C4b 変換に伴う高次構造変化により形成されるネオ抗原を認識することを示唆している。一方、Ab463は還元した $\beta$ 鎖とも反応することから $\beta$ 鎖上の特定の一次構造を認識する抗体と考えられる。

2) C4bフラグメントとC2・C4bとの反応性 C4b'は C4bと同様にC2と複合体を形成するが、C4c、C4dは複合体を形成しない。また、C4b'をC2、C1s と反応後、HPLCにかけると、C3aseのピークが検出されるが、C4cやC4d では C2aとの複合体に相当する新たなピークは検出されなかった。これは、C4bの $\alpha$ 鎖はI/C4bpにより 2ヶ所で切断をうけるが、第 1の切断（C4b'の生成）が起こってもC2や C2aとの結合部位は保持されているが、第 2の切断（C4cと C4dの生成）が起こるとC2/C2a結合部位が消失することを意味している。

一方、 $\alpha$ - $\beta$ 鎖体はC2と複合体を形成するところから、C2結合部位は $\alpha$ - $\beta$ 鎖上に位置していることが分かる。しかし、 $\alpha$ - $\beta$ 鎖体をC2、C1sと反応後HPLCにかけた場合、 $\alpha$ - $\beta$ -C2aに相当する新たなピークは検出されなかった。これは、 $\gamma$ 鎖はC2結合部位には直接関与していないが、C2a結合部位の形成には関与している可能性を示唆する。しかし、部分還元による C4bのコンフォメーション変化により、C2a結合部位が失活した可能性も否定しえない。

C4bpは C4b、C4b'、 $\alpha$ - $\beta$ 鎖と複合体を形成するが、C4cや C4dとは複合体を形成しない。この結果は、C2の C4bフラグメントに対する結合性と良く符合した。

### 3) C4bと C2・C4bpの結合反応に対する単クローン性抗 C4b抗体の影響

Ab242 は C4bとC2およびC4bpの結合反応を阻害したが（図 3）、C4b、C2複合体(EAC4b,2) からC2を解離させる活性は示さなかった。一方、Ab463 は C4bとC2およびC4bpの結合反応には影響を示さなかった。C2は C2bドメインを介して C4bと結合すると考えられているが、C2bは Ab242と C4bの

結合反応やC4bpと C4bの結合反応を阻害した。これらの結果は、 Ab242に対するエピトープは C2(C2b)結合部位およびC4bp結合部位と一部重複していること、さらに両結合部位も同一か一部重複している可能性を示唆している。

Ab463が C4bβ鎖に結合すると C3aseが安定化されるという今回の知見は、 C3aseの不安定性が従来考えられているように単に C2a分子中の C4b結合部位の短寿命性によるばかりでなく、 C4b分子上に制御部位（ Ab463に対するエピトープで、 Ab463が結合することにより抑制）が存在し、C3aseの解離失活現象を速めている可能性を示唆している。また、 Ab463はC4bpによる C3aseの解離失活を抑制する活性も示した。このβ鎖上のAb463に対するエピトープの性質についてさらに検討を進める予定である。

最後に、上記の結果を表 1にまとめた。

Table I. Interaction of C4 derivatives with C2, C4bp, and monoclonal anti C4b antibodies

	C2 (C2b)	C2a	C4bp	Ab 242	Ab 463
C4	-	-	-	-	+
C4b	+	+	+	+	+
C4b <sup>1</sup>	+	+	+	+	+
C4c	-	-	-	+	+
C4d	-	-	-	-	-
α-β	+	-	+	+	+
β				-	+

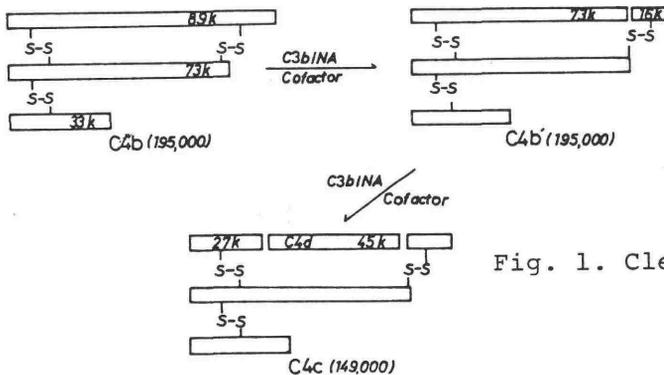


Fig. 1. Cleavage of C4b by C3b1NA and C4bp

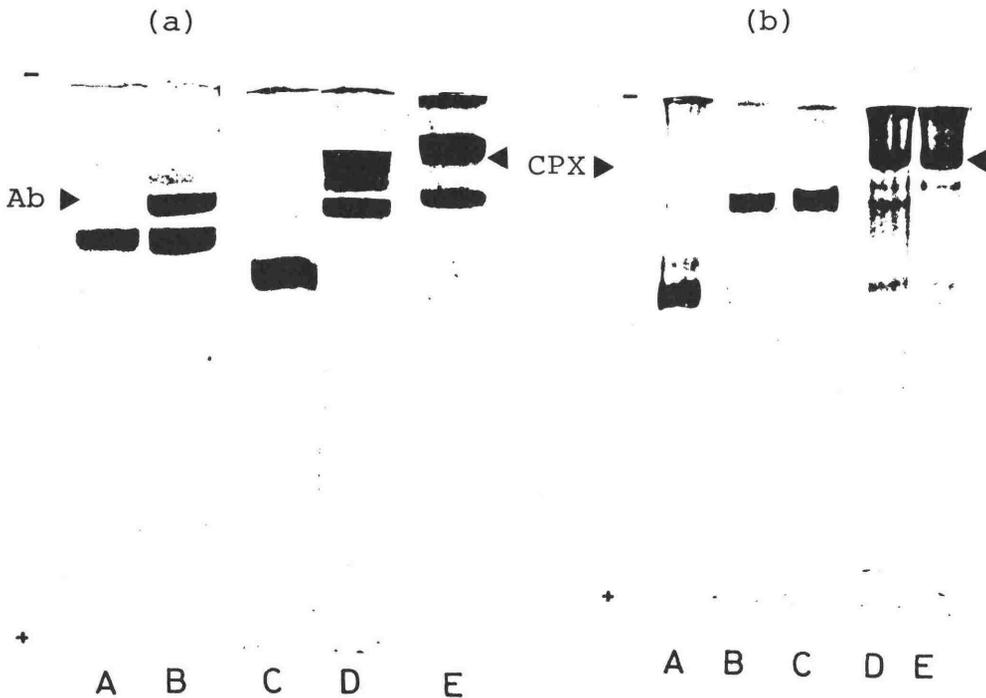


Fig. 2. Binding of Ab 242 and 463 with C4 and C4b (a) and with  $\alpha$ - $\beta$  complex (b). (a) A, C4; B, C4 and Ab 242; C, C4b; D, C4b and Ab 242; E, C4 and Ab 463 (b) A,  $\alpha$ - $\beta$  complex; B, Ab 242; C, Ab 463; D,  $\alpha$ - $\beta$  complex and Ab 242; E,  $\alpha$ - $\beta$  complex and Ab 463 disc-PAGE with 5.6% acrylamide gels.

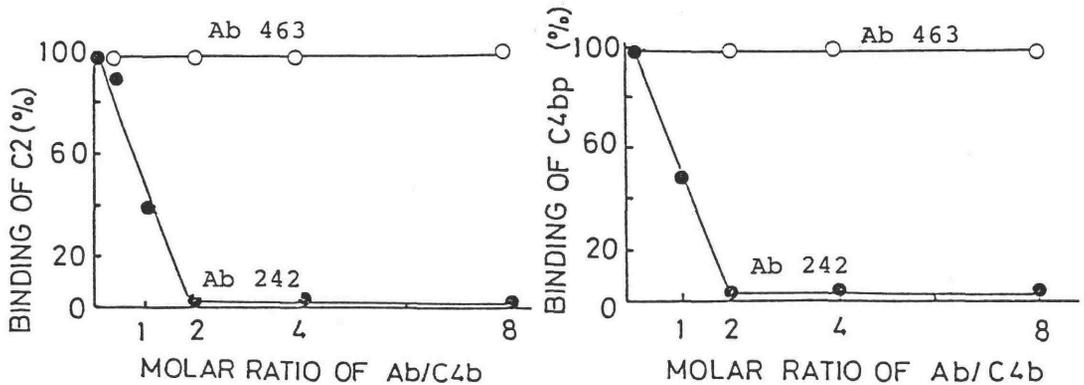


Fig. 3. Effect of Ab 242 upon binding of C2 and C4bp with C4b.

# 17 液相中におけるclassical pathwayを介するC3非依存性C5活性化について

北村肇, 坪井陸美, 永木和義  
大阪府立成人病センター研究所 第6部

## 〈はじめに〉

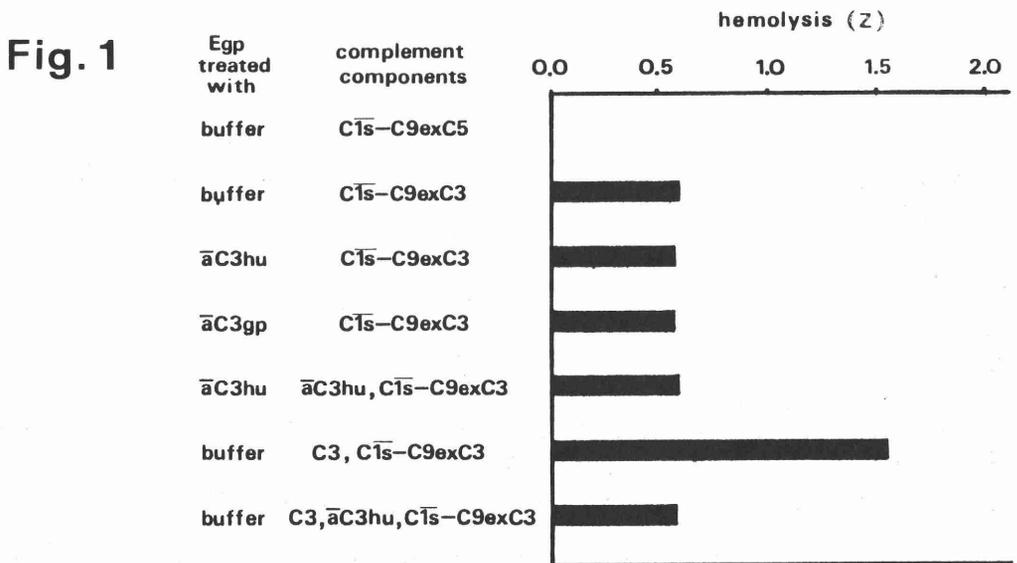
私達は昨年の補体シンポジウムで, モルモット赤血球 (Egp) の精製した9種のヒト補体成分, すなわちC1s, C4, C2, C3, C5, C6, C7, C8およびC9 (C1s-C9), による溶血反応について検討した結果, そのメカニズムはC1s~C6の反応液中に形成されるC56によるreactive lysisであることを報告した. 今回は同様の現象がC3非存在下でも起り得ることを示すデータを得たので報告する.

## 〈方法〉

補体はすべて精製したヒト補体成分を用いた. C56もヒト血清から精製した. 抗C3はCappel社製の抗ヒトC3のF(ab')<sub>2</sub>成分あるいは抗モルモットC3のIgG分画を用いた. 抗C4はDAKO社製の抗ヒトC4のIgG分画を, 抗C5および抗C6はCappel社製の抗ヒトC5および抗ヒトC6を用いた. 溶血系は原則として, oxyC2 (1200 eff. mol./cell), C4 (600), C5 (800), C6 (400), およびC7 (45) を含む0.2mlのGGVBに抗C3 0.1ml, Egp (7.5 × 10<sup>7</sup>/ml) 0.1mlおよびC1s (1000) 0.1mlを加え, 30°C 15分間反応させた後, C8 (400) およびC9 (1000) を含む0.5mlのEDTA・GGVBを加え, 37°C 60分間反応させ, 溶血を測定した.

## 〈結果〉

1. C1s, C4, C2, C5, C6, C7, C8およびC9 (C1s-C9exC3) によるEgpの溶血



EgpはC1s-C9exC3によって溶血した。Egpを抗ヒトC3あるいは抗モルモットC3で前処理し、抗ヒトC3存在下で反応させた場合も溶血率は低下しなかった(図1)。

2. Mg++およびC1s-C9exC3各成分の必要性

EgpのC1s-C9exC3による溶血は、Mg・EGTA・GGVB中では起るがEDTA・GGVB中では起らなかった。また、溶血にはC1s-C9exC3の8種の成分すべてが必要であった。このことは、用いた反応系にC3bBbやC56が混在していないことを示す。

3. C5変量による影響

C5以外の成分の量を一定にし、C5を変量すると、溶血はC5に応じて増加し、dose-response curve (Z対C5量)は原点を通る直線が得られた(図2)。また、3200 eff.mol./cellのC5を加えてもプラトーに達しなかった。

4. C42変量による影響

C4およびC2以外の成分の量を一定にし、C4とC2を変量すると、溶血はC4とC2の量に応じて増加した(図3)。

5. C3添加の影響

上記の反応系において抗C3の代わりに精製ヒトC3を変量して加えると、C3量に応じて溶血は増加した。dose-response curve (Z対C3量)は用いたC5量にかかわらず直線になったが、C5量を増すとy軸切片だけでなく直線の傾きも増加した。

6. C1s, C4, C2, C5およびC6反応液中における溶血活性物質の形成

C1s, C4, C2, C5およびC6を反応させた後、EgpとC7~C9を加えると溶血したが、C1s, C4, C2, C5, C6およびC7をEgpを加える前に反応させると溶血率は著しく低下した(表1)。このことはC56によるreactive lysisの反応に類似していた。

Fig. 2

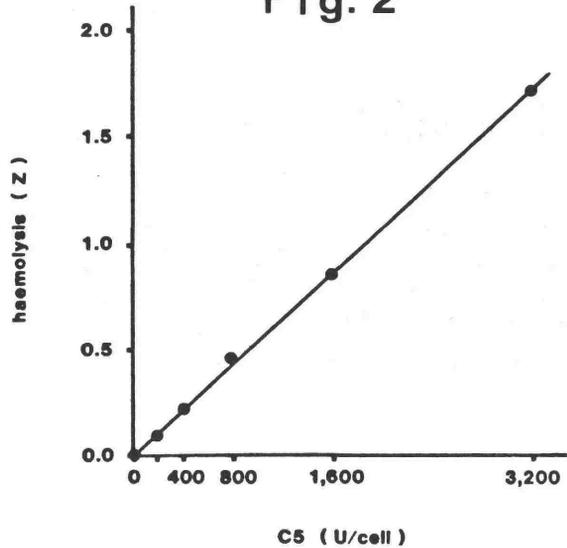
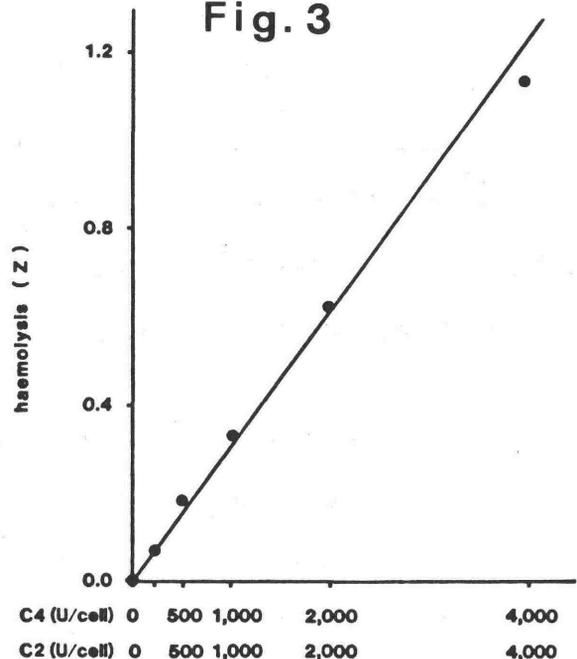


Fig. 3



7. 溶血活性物質のEgpへの結合段階

C1s, C4, C2, C5, C6とEgpを反応させた後洗滌し, C7~C9を加えても溶血しなかったが, C1s, C4, C2, C5, C6, C7とEgpを反応させた後洗滌し, C8とC9を加えると溶血した(表2)。この点においてもC56による reactive lysis に類似していた。

8. 抗C4, 抗C5, および抗C6の影響

C1s, C4, C2, C5およびC6の反応液に抗C4を反応させた後EgpとC7~C9を加えると溶血したが, 抗C4の代りに抗C5あるいは抗C6を用いると溶血しなかった(表3)。以上よりC1s, C4, C2, C5およびC6の反応液中にC56が形成されることが示唆された。

《結論および考察》

以上の実験結果より, EgpはC3非存在下でclassical pathway を介して溶血し, そのメカニズムは, C1s, C4, C2, C5およびC6によって形成されたC56がC7と共にEgpに結合し, C8とC9によって溶血する, すなわちC56による reactive lysis であると考えられた。このことは, 液相中でC3の関与なしにclassical pathway を介してC5が活性化され得ることを示す。また, 私達は第19回補体シンポジウム以来C3非依存性免疫溶血反応について報告してきたが, 今回のデータはそのC5活性化のメカニズムは, C42が直接C5に働いて活性化することをさらに示すものと考えられる。

Table 1 Generation of a lytic factor in the reaction mixture of C1s, C4, C2, C5 and C6.

	haemolysis (%)
C2, C4, C5, C6, C1s, Egp / 37° / C7, EDTA / 37° / C8, C9 / 37° 15' / 30' / 60'	0.703
C2, C4, C5, C6, C1s / 37° / Egp, C7, EDTA / 37° / C8, C9 / 37° 30' / 15' / 60'	0.699
C2, C4, C5, C6, C7, C1s / 37° / Egp, EDTA / 37° / C8, C9 / 37° 30' / 15' / 60'	0.191
C56, Egp, C7, EDTA / 37° / C8, C9 / 37° 15' / 60'	0.475
C56, Egp, EDTA / 37° / C7 / 37° / C8, C9 / 37° 15' / 15' / 60'	0.494
C56, C7, EDTA / 37° / Egp / 37° / C8, C9 / 37° 15' / 15' / 60'	0.020

**Table 2** Binding step of a lytic factor generated in  $C1\bar{8}$ ,  $C4$ ,  $C2$ ,  $C5$  and  $C6$  to  $Egp$ .

	haemolysis ( Z )
$C2, C4, C5, C1\bar{8}, Egp / 37^\circ / 30' / W / C6, C7 / 37^\circ / 15' / C8, C9 / 37^\circ / 60'$	0.000
$C2, C4, C5, C6, C1\bar{8}, Egp / 37^\circ / 30' / W / C7 / 37^\circ / 15' / C8, C9 / 37^\circ / 60'$	0.010
$C2, C4, C5, C6, C7, C1\bar{8}, Egp / 37^\circ / 30' / W / C8, C9 / 37^\circ / 60'$	0.140
$C5\bar{6}, Egp / 37^\circ / 15' / W / C7 / 37^\circ / 15' / C8, C9 / 37^\circ / 60'$	0.012
$C5\bar{6}, C7, Egp / 37^\circ / 15' / W / C8, C9 / 37^\circ / 60'$	0.356

**Table 3** Effect of anti- $C4$ , anti- $C5$  or anti- $C6$  on the generated lytic factor in the reaction mixture of  $C1\bar{8}$ ,  $C4$ ,  $C2$ ,  $C5$  and  $C6$ .

	haemolysis ( Z )
$C2, C4, C5, C6, C1\bar{8} / 37^\circ / 30' / Egp, C7, C8, C9 / 37^\circ / 60'$	0.710
$C2, C4, C5, C6, \bar{a}C4 / 37^\circ / 15' / C1\bar{8} / 37^\circ / 30' / Egp, C7, C8, C9 / 37^\circ / 60'$	0.078
$C2, C4, C5, C6, C1\bar{8} / 37^\circ / 30' / \bar{a}C4 / 37^\circ / 15' / Egp, C7, C8, C9 / 37^\circ / 60'$	0.403
$C2, C4, C5, C6, \bar{a}C5 / 37^\circ / 15' / C1\bar{8} / 37^\circ / 30' / Egp, C7, C8, C9 / 37^\circ / 60'$	0.005
$C2, C4, C5, C6, C1\bar{8} / 37^\circ / 30' / \bar{a}C5 / 37^\circ / 15' / Egp, C7, C8, C9 / 37^\circ / 60'$	0.003
$C2, C4, C5, C6, \bar{a}C6 / 37^\circ / 15' / C1\bar{8} / 37^\circ / 30' / Egp, C7, C8, C9 / 37^\circ / 60'$	0.003
$C2, C4, C5, C6, C1\bar{8} / 37^\circ / 30' / \bar{a}C6 / 37^\circ / 15' / Egp, C7, C8, C9 / 37^\circ / 60'$	0.004

# 18 EAC142とC56の反応について

坪井睦美, 北村肇, 永木和義  
大阪府立成人病センター研究所 第6部

## 《はじめに》

私達は第19回及び第20回の補体シンポジウムでC3非依存性の免疫溶血反応について報告した。その後C3非存在下におけるC5活性化機能及び膜侵襲複合体形成の機構について解析してきたが、今回、C56とEAC142の反応に関して興味あるデータを得たので報告する。

## 《材料と方法》

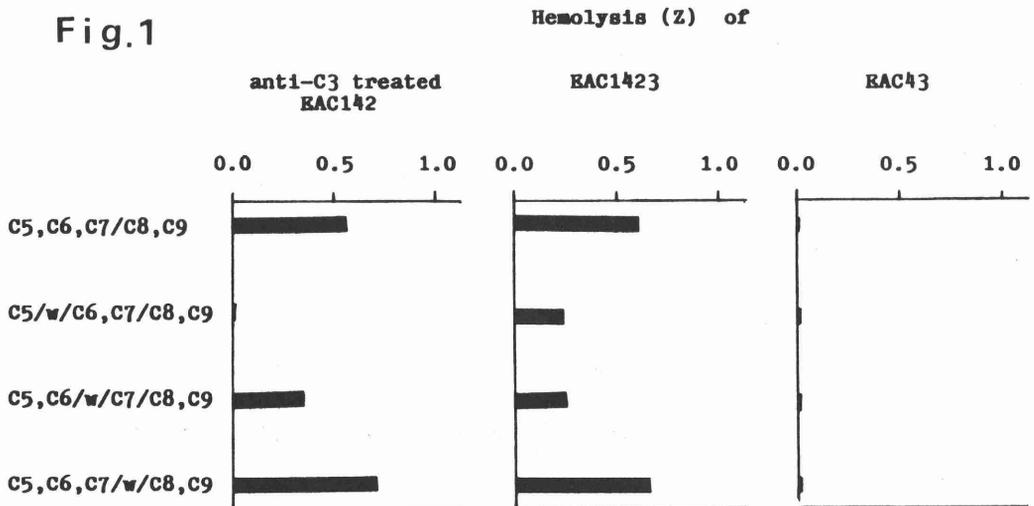
C1~C9の補体成分及びC56は正常ヒト血清(NHS)より精製し、C6-9はモルモット血清より作製した。EAC142はEAとNHSよりTTHA法で作製したEAC14とoxy化した精製C2を反応させて作製した。微量混在しているC3の影響を除くため抗C3としてCappel社の抗ヒトC3のF(a b')<sub>2</sub>成分を用いた。緩衝液は通常のGVB, GGVBの他に低イオン強度( $\mu=0.030$ )のGGVBを用いた。

## 《結果》

### 1. EAC142へのC5, C6, C7の結合

抗C3で前処理したEAC142はC5~C9によって溶血するが、この時C5を反応させた後洗滌するとC6~C9を加えても溶血しないが、C5とC6を加え反応させた後洗滌し、C7~C9を加えると溶血した(図1)。一方、EAC1423の場合は、C5を反応させ洗滌し、C6~C9を加えると溶血した。以上より、EAC142はEAC1423と異りC5と結合しないが、C56と結合する可能性が考えられた。

Fig.1



2. EAC142とC56の反応

EAC142あるいはEと精製C56との反応をみたところ、C56はC7が共存しないとEへ結合しないが、EAC142へはC56だけで結合することが判明した。

3. 各種 cell へのC56の結合

E, EA, EAC1, EAC4, EAC14, EAC142および抗C3処理EAC142に一定量のC56を加え反応させた後、洗滌しC7~C9を加え溶血をみた(図2)。C56はE, EA, EAC1, EAC4, EAC14には結合しないが、EAC142及び抗C3処理EAC142には結合することが明らかになった。以上より cell 上のC2はC3と同様にC56の acceptorであると考えられた。

4. EAC142のC56の結合における条件

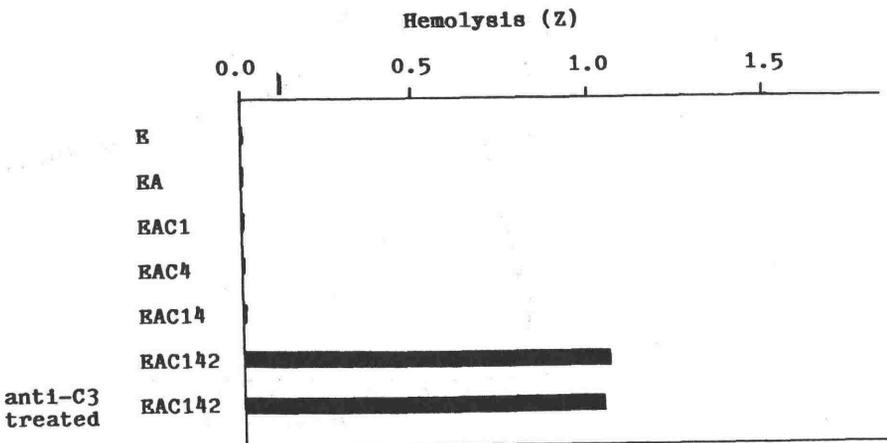
EAC142へのC56の結合反応における緩衝液のイオン強度、温度及び反応時間について検討した。C56と cell との結合は EAC142とC56を抗C3存在下で反応させた後洗滌し、C6-9を加えて測定した。

- a) 緩衝液のイオン強度：種々のイオン強度のGGVB( $\mu=0.030\sim0.150$ )中における反応をみたところ、C56のEAC142への結合は緩衝液のイオン強度によって大きく変わり、イオン強度0.030~0.150の範囲では低イオン強度の方がよく結合した(図3)。
- b) 温度：4°C~37°Cの範囲で反応をみたところ、21°C~30°Cが効果的であった。
- c) 時間：EAC142とC56を混合してから、洗滌までの時間を0分~120分に変えて反応をみたところ図4に示すように20分~30分でピークを示し、30分以上になると溶血は減少した。このことはC56はEAC142に結合した後decayすると考えられた。

以上より以下の実験ではEAC142とC56との反応は低イオン強度GGVBを用い、30°C 20分とした。

cells, C56 / wash / C7 / C8, C9

Fig. 2



5.  $\overline{C56}$  変量による溶血への影響

上記の実験条件下で  $\overline{C56}$  を変量すると図5に示すように  $\overline{C56}$  量に応じて溶血は増加し、原点を通る直線 (Z対 $\overline{C56}$ 量) が得られた。

6.  $C2$  変量による溶血への影響

$\overline{C56}$  を excess とし, EAC142 上の  $C2$  量を変量して溶血をみると, 図6に示すように  $C2$  に応じて溶血は増加し, 原点を通る直線 (Z対 $C2$ 量) が得られた。

Fig.3

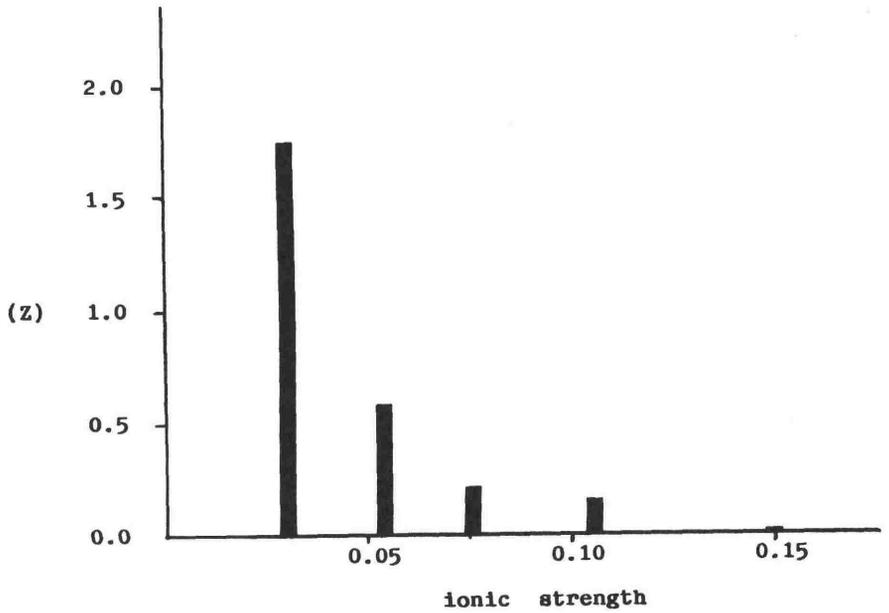
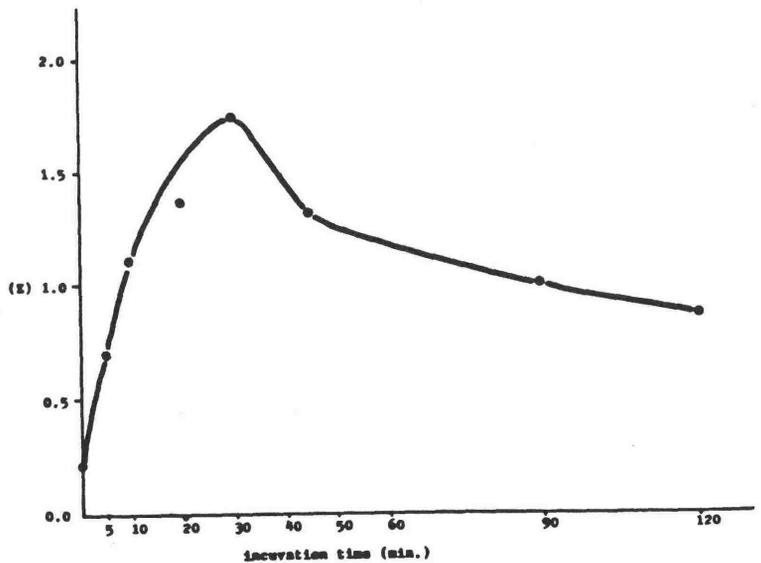


Fig.4



《結論及び考察》

以上よりC56はEAC142上のC2に結合し、C7~C9を加えることによって溶血することが判明した。但しC56のcell上のC2への結合力は既に明らかにされているcell上のC3bと比較すると弱いようである。また以上のことからC3非依存性の免疫溶血反応、即ちEAC142 cellのC5~C9による溶血のメカニズムはcell上のC42がC5をactivateし、液相中で形成されたC56がcell上のC2に結合することによってEAC14256を形成し、C7~C9によって溶血するものと考えられた。

Fig.5

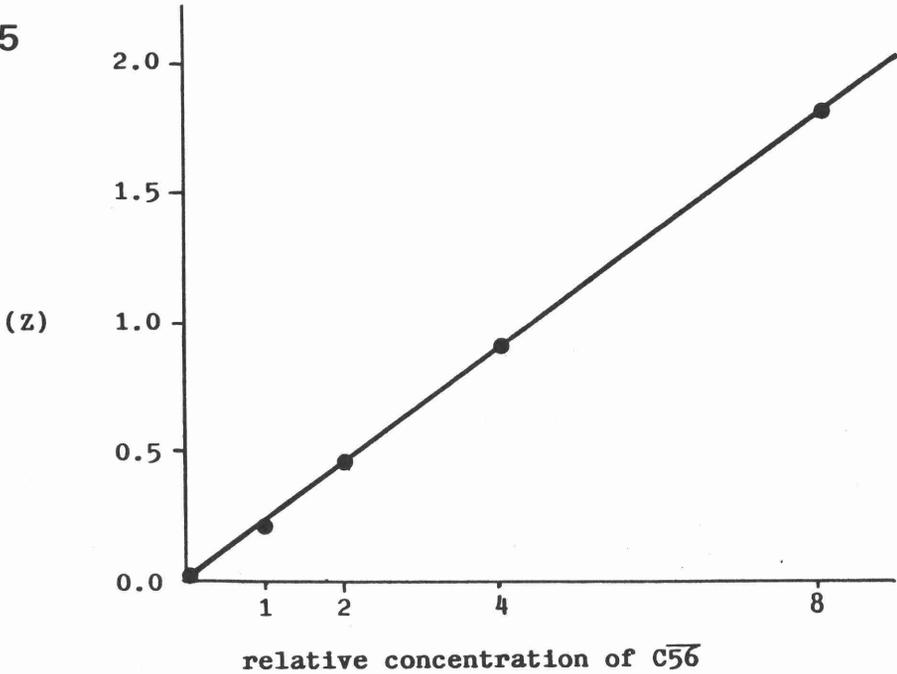
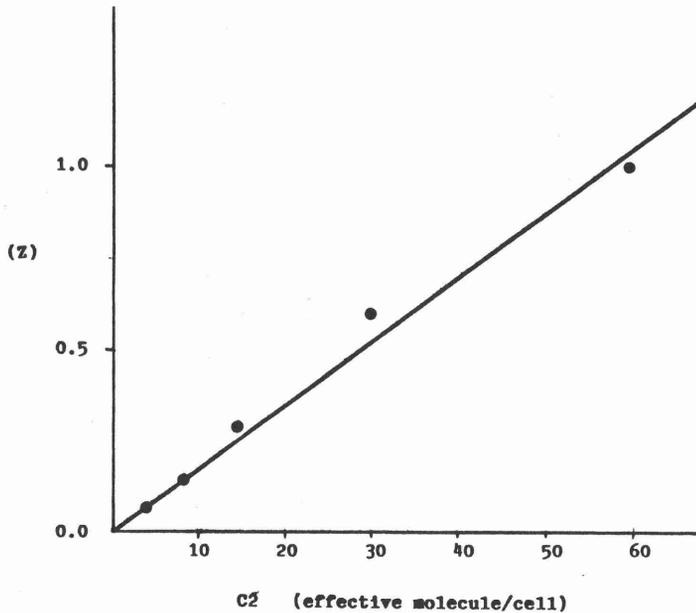


Fig.6



## 19 C4 nephritic factorで安定化されたclassical complement pathway のC3分解酵素に対するC4-binding protein及びfactor Iの作用

伊藤清子、藤田禎三、田村 昇  
筑波大学基礎医学系

〔はじめに〕

Classical complement pathwayを制御する因子として、C4 binding protein(C4-bp)とfactor I (I) の2つの蛋白が知られている。これらの蛋白は、classicalのC3分解酵素、C4b,2a複合体に作用して、C4b,2aからのC2aの解離失活を促進したり、C4b,2aのC4bを分解したりして、C4b,2a複合体のC3分解活性能を(-)の方向に制御していることが明らかとなっている。

近年、これらの制御因子とは反対に、C4b,2a複合体の活性を(+ )の方向に制御する因子が腎炎やSLEの患者血清中に見いだされ、F-42あるいはalternative pathwayのC3 nephritic factor (C3NeF)に対して、classical pathwayのC4 nephritic factor(C4NeF)と呼ばれている (Daha et al. 1980年、Halwachs et al. 1980年、伊藤ら、1981年)。

これらの因子はいずれもC4b,2a複合体に結合して、そのC3分解活性能を安定化する作用を示し、C4b,2a複合体に対する自己抗体と考えられている。しかし、これらの因子によって安定化されたC4b,2a複合体、C4b,2a(NeF)、に対するIやC4-bpの作用に関しては、必ずしも同一の結果が得られているわけではない。我々が低C3値を示す慢性腎炎患者血清に見いだしたC4NeFも、この点では、すでに報告されているものとは異なることが明らかとなったので、これらの点について報告する。

〔材料と方法〕

1. C4NeFの精製 慢性腎炎の患者血清中より、QAE-sephadex A-50、protein A-sepharose 4B及びA/FC-sepharose 4Bカラムを用いて精製した(第18回補体シンポジウム抄録参照)。得られたC4NeFは、SDS-PAGEにより分子量が60KのH鎖と25KのL鎖からなるIgGでしかも、Ochterlony法等により、H鎖の分子量の大きいIgGのsubclass IgG 3であった。さらに、このC4NeFは、EAC142上及び液相のC3分解酵素に結合して、C4NeFの量に応じてC4b,2aからのC2aの解離失活をおさえ、C4b,2aのC3分解活性能を安定化した。

2. C4NeF活性の測定 100コのカ2 siteをもつEAC142と同量の倍々希釈したC4NeFを含む sampleを37℃、30分間反応させてから、C-EDTAを加え、その溶血活性を測定した。溶血活性はsampleの量に応じて増加したので、Z=1を示す希釈倍数をC4NeF活性の1単位として表した。

〔結果〕

1. EAC1,4b,2a(NeF)に対するC4-bpの影響 C4NeFで安定化したC3分解酵素、EAC1,4b,2a(NeF)、に対するC4-bpのC2a解離促進効果を次のように検討した。2コのカ2 siteを持つEAC1,4b,2a(NeF)を30℃にあたためておいたC4-bpあるいはEDTA-GVB中に加えたあと、経時的にsampleをとりだして、C-EDTAを加えて37℃、60分反応させて残っているC4b,2a siteを測定した。対照として、EAC1,4b,2a(NeF)のかわりにEAC1,4b,2aを用いて、同様にC4-bpによる解離促進効果を検討した。その結果は図1に示すように、C4NeFで安定化されてないEAC1,4b,2aはC4-bp(8μg/ml)で瞬時にC2aが解離失活されてしまうのに対して、C4NeFで安定化したEAC1,4b,2aはC4-bp量を320μg/mlと増やしても、C2aの解離失活は全くみられなかった。

2. EAC1,4b,2a(NeF)へのC4-bpの結合 C4NeFは、EAC1,4b,2aに作用して、C4-bpによるC2aの解離促進効果を妨げることが明らかとなったので、次はEAC1,4b,2a(NeF)にC4-bpが結合するかどうかを検討した。EAC1,4bにexcessのカ2とC4NeFを反応させて、EAC1,4b,2a(NeF)を作り、このcellをI<sup>125</sup>を標識したC4-bpと37℃、30分反応させて、洗浄後に結合放射活性を測定した。対照として、EAC1,4b,2a及びEAC1,4b, EAを用いて、同様にI<sup>125</sup>C4-bpと反応させて結合放射活性を測定した。その結果は図2に示すように、EAC1,4b,2a(NeF)、EAC1,4b,2a及びEAC1,4bのいずれに対してもI<sup>125</sup>-C4-bpはcellの量に応じて同じように結合して、I<sup>125</sup>-C4-bpの結合量にはほとんど差は見られなかった。故に、C4NeFにより安定化されたEAC1,4b,2aに対してC4-bpによる解離促進効果がみられないのは、C4-bpが結合しないためではないことが明らかとなった。

3. factor IによるEAC1,4b,2a(NeF)のC4bの分解 C4-bpはEAC1,4b,2aと同様に、EAC1,4b,2a(NeF)に対しても結合することが明らかとなったので、C4bが分解されるかどうかを検討した。I<sup>125</sup>を標識したC4を用いてEAC1,4bを作製した。このEAC1,4bにC2とNeF及びC2のみを反応させてEAC1,4b,2a(NeF)とEAC1,4b,2aを作製した。このEAC1,4b,2a(NeF)とEAC1,4b,2aをI単独であるいはIとC4-bpで37℃60分処理した後、遠心して得られる上清と洗浄した

cellについてそれぞれ放射活性を測定し、上清に遊離してきた $I^{125}$ -C4bの割合を計算した。同時にこのcellを2% SDS, 6M Urea, 10% glycerol, 10% 2MEで可溶化し、この可溶化物と上清についてSDS-PAGEを行い、RadioautographyによってC4bの分解の程度を調べた。その結果は表1に示すように、EAC1,4b,2a(NeF)及びEAC1,4b,2aからI単独またはIとC4-bpの作用により同程度の $I^{125}$ C4bが遊離された。SDS-PAGEによる解析でもEAC1,4b,2a(NeF)

及びEAC1,4b,2a上のC4bはI単独またはIとC4-bpでC4c( $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\beta$ と $\gamma$ )とC4d( $\alpha 2$ )まで同程度に分解された。この実験に用いたEAC1,4b,2a(NeF)は多数のC4b siteをもつEAC1,4bにexcessのC2とC4NeFを作用させて作製したものであるが、このEAC1,4b,2a(NeF)上にはC4NeFと反応してないC4b siteあるいはC4b,2a siteがあり、それがIの作用で分解されて、このような結果が得られたという可能性は否定しきれない。それ故に次の実験を行った。

4. EAC1,4blimit,oxy2a(NeF)のC4-bpとIによる不活化 約0.8コのC4b,2a siteを持つEAC1,4b,2aをlimitのC4とexcessのoxyC2をEAC1に順次反応させて作製した。このEAC1,4blimit,oxy2aに50unitのC4NeFを作用させてEAC1,4blimit,oxy2a(NeF)を作製した。このcellをC4-bp単独、I単独あるいはC4-bpとIとで37°C, 30分処理し、洗浄後C-EDTAを加えて37°C, 60分反応させてその溶血活性を測定した。対照として、EAC1,4blimit,oxy2aを用いて同様に処理してから溶血活性を測定した。その結果は表2に示した。EAC1,4blimit,oxy2a(NeF)はC4-bp単独では全く影響をうけないが、IとC4-bp及びI単独でC3-C9との反応性が阻害された。対照として用いたEAC1,4blimit,oxy2aはC4-bp単独でもその反応性が阻害された。

#### 〔考察〕

我々が慢性腎炎の患者より得たC4NeFはC4b,2a 複合体と結合してその解離失活を阻止するばかりでなく、C4-bpによる解離失活促進作用からもC4b,2a 複合体を守ることが明らかとなった。この点はDahaら及びGigliらが報告したC4NeFの作用と同じである。ところが、C4NeFで安定化されたC4b,2a 複合体、C4b,2a(NeF)、に対するC4-bpやIの作用は表3にまとめられたように異なっていた。これはおそらく我々のC4NeFがC4b,2a の複合体を認識する部位がこれまで報告されてきたC4NeFのそれらと異なるためか、あるいはアフィニティーの違いによるものと考えられる。

#### 〔参考文献〕

1. M.R. Daha and L.A. van Es, J. Immunology 125:2051, 1980
2. I. Gigli et al. J. Exp. Med. 154:1, 1981

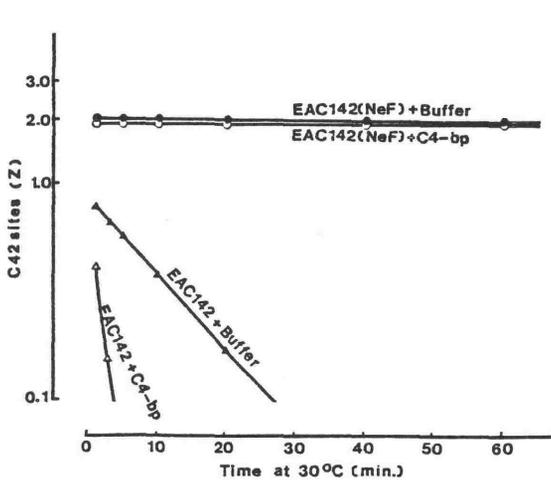


Fig. 1 Effect of C4-bp on the decay of EAC142(NeF) and EAC142.

Table.1 Release of  $I^{125}$ -C4b from EAC142(NeF) and EAC142 by I and C4-bp.

	Percent counts released
EAC142(NeF)+buffer	6.2
+I	36.5
+I+C4-bp	60.0
EAC142 +buffer	6.1
+I	35.9
+I+C4-bp	62.4

Table.2 Inactivation of EAC142(NeF) and EAC142 bearing limited  $C4^{oxy}_2$  sites by I and C4-bp.

	Residual $C4^{oxy}_2$ sites ( Z )	Inactivation ( % )
EAC142(NeF)+buffer	0.85	0
+C4-bp	0.86	0
+I+C4-bp	0.41	51.4
+I	0.70	17.9
EAC142 +buffer	0.79	0
+C4-bp	0.62	22.3
+I+C4-bp	0.38	52.4
+I	0.64	19.8

Table.3 Comparison of properties of C4NeF reported by 3 groups.

Reporters	The action of C4NeF on		
	decay of C2	acceleration of decay by C4-bp	cleavage of C4b by I
Gigli et.al.	inhibition	inhibition	inhibition
Daha et.al.	partial inhibition	partial inhibition	?
Ito et.al.	inhibition	inhibition	no inhibition

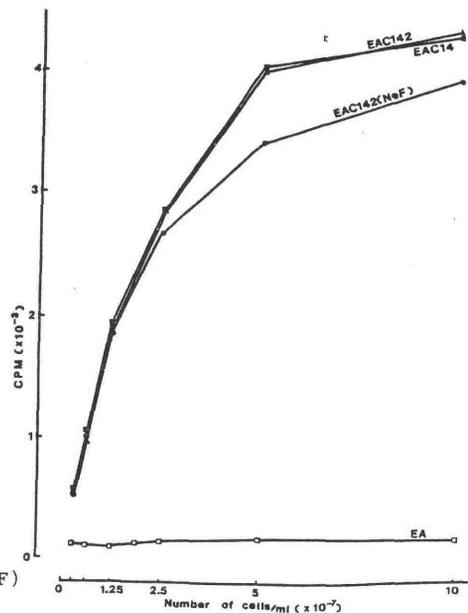


Fig. 2 Binding of  $I^{125}$ -C4-bp to EAC142(NeF) and EAC142.

## 20 担癌生体における血清補体価と補体系インヒビターの動態

谷川 徹，加藤治樹，上田正博，谷川真理，  
宮川晴雄，金 竜起，吉川敏一，杉野 成，  
近藤元治  
京都府立医科大学，第1内科

### 1. はじめに

生体の免疫機構の中で，補体系は重要な働きを演じており，腫瘍免疫においてもいろいろな機序で働いていると考えられている。担癌生体においては，癌の進行とともに血清補体価が上昇し，末期癌では低下する場合が多い。胃癌では Borrmann 分類のⅠ型からⅡ型，Ⅲ型，Ⅳ型にいたるにつれて CH50 が上昇することが知られており，肺癌においてもやはり Stage が進むにつれて CH50 の上昇がみられている。これは，腫瘍細胞による補体の活性化と，それに伴う補体消費に対する over response であるという解釈もある。一方では，癌患者免疫能の 6 期分類にみられるように，癌の進展に伴う血清補体価の上昇は，やはり担癌生体でみられる細胞性免疫能の低下を補うものであるとする考え方もある。また担癌生体の補体成分をみると，C4，C2，C3，C8，C9 などの増加がみられ，補体系インヒビターでは C1INH の増加することも知られている。このように補体の有効成分が増加し，インヒビターの中でも増加しているものもあり，高補体価を呈する担癌生体の補体が *in vivo* ではたして十分働いているのかどうかという疑問が生じてくる。そこで今回，担癌生体の血清補体価と補体成分，既知の補体系インヒビターとの関係について検討してみた。

### 2. 対象および方法

#### (1) 患者

京都府立医科大学附属病院および関連病院入院中の癌患者を対象とした。消化器癌，肺癌，線維肉腫，悪性リンパ腫の各 Stage を含んでいる。

#### (2) 血清補体価および補体成分，補体系インヒビターの蛋白量測定

血清補体価は Mayer 法変法によって測定した。補体系の蛋白量は C1 から C9 までと Properdin, Factor B, インヒビターは C1INH, C4Bp, C3bINA および  $\beta$ 1H を，それぞれに対する抗血清を用いて一元免疫拡散法で測定し % で表示した。抗ヒト C4Bp 血清は，筑波大学免疫血清学教室 藤田禎三先生より供与された。

### 3. 結果

#### (1) CH50と癌の stage との関係

諸種の癌の stage 別にCH50の値をみてみると、胃癌や肺癌ですでに示されているように、stageの進行に伴いCH50の上昇がみられた (Fig. 1)。

#### (2) CH50と補体成分との関係

CH50と補体成分との間にはC3, C4, C8 およびC9との間にそれぞれ正の相関がみられた。他の補体成分との間には相関は認めなかった。

#### (3) CH50と補体系インヒビターとの関係

CH50と補体系インヒビターとの間には、C1INH, C3bINA および $\beta$ 1Hとの間にそれぞれ相関がみられたが、C4Bpとの間には相関はみられなかった (Fig. 2, 3, 4)。

### 4. 考案

CH50の上昇はC4, C3などの補体成分の増加によると考えられるが、同時にインヒビターも増加しているため、担癌生体内では、これらの増加した補体が利用されにくい状態になっていることが想像される。さらに補体成分の増加そのものも、インヒビターの増加による補体のturn over低下による可能性も考えられる。補体成分および補体系インヒビターの蛋白量の増減だけから補体活性を論じるには多少の危険性があるかも知れないが、通常試験管内で補体価を測定する際には血清はかなり希釈されて用いられる。インヒビターの方も当然希釈されるわけで、このときのインヒビターの量がインヒビターとしての活性を十分に発揮できないのではないかと考えると、in vitroで測定される補体価は高く出てくることになる。

いずれにしても、担癌生体中で高補体価を呈する場合に、高補体価であるにもかかわらず補体系がインヒビターにより動きにくい状態にあることがあり、生体防衛上マイナスの状態にあるのではないかと考えられる。しかし、担癌生体においてなぜ補体成分や補体系インヒビターが増加するのかは、補体の産生、代謝の調節などにもかかわることで詳細は不明であるが、これらの問題を考えることは今後に残された重要な課題のひとつと考えられた。



Fig. 3

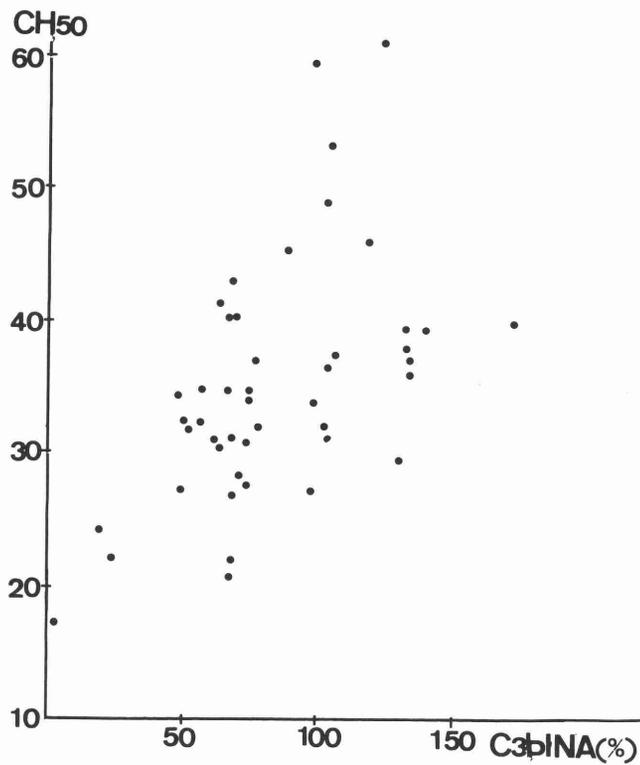
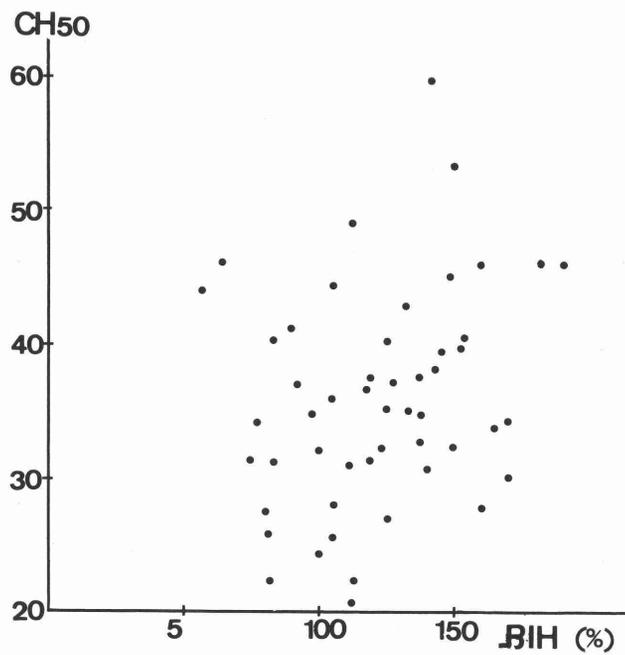


Fig. 4



## 21 癌性腹水に対するOK-432（ピシバニール）の効果， 作用機序に関する補体系からの検討

加藤治樹，垣見依子，吉田憲正，山村義治，  
竹村俊樹，谷川真理，金 龍起，吉川敏一，  
杉野 成，近藤元治（京都府立医科大学，  
第1内科）  
鳥巢要道（九州大学，医学部，第1外科）

〈はじめに〉

癌性腹水に対するOK-432の腹腔内投与の効果に，腹水中に遊出してくる好中球を主とする細胞の持つ抗腫瘍性が鳥巢らによって示された。この好中球遊出機序に関しては，補体系由来のchemotactic factorの関与が考えられている。一方，演者らはすでにOK-432がin vitroで補体系を活性化し，またin vivoにおいては血中補体系を上昇させることを報告してきたが，今回OK-432腹腔内投与に際して，その作用増強を目的としてOK-432と正常ヒト血清を同時に腹腔内へ投与し，OK-432単独腹腔内投与との比較検討を基礎的ならびに臨床的に行った。

〈材料および方法〉

### a) 血清およびOK-432処理

正常人より採血，分離したプール血清は使用時まで $-70^{\circ}\text{C}$ で保存し，融解後ただちにOK-432 1 KE/ml と $37^{\circ}\text{C}$ 60分間incubateしてマウスの腹腔内に投与した。ヒトには，採血，分離直後の同じ血液型の血清100 ml とOK-432 20 KEをやはり $37^{\circ}\text{C}$ 60分間incubateして腹腔内に投与した。

### b) 動物および腫瘍

CDF<sub>1</sub>（BALB/C × DBA/2）雄マウス（8週令）に，Meth A  $4 \times 10^5$  個/匹を腹腔内に移植した。

### c) CH50および補体系蛋白量の測定

CH50は長木らの方法で測定した。補体系蛋白量は一元免疫拡散法で測定した。

### d) C4a, C3a, C5aの定量

C4a, C3aおよびC5aは，ラジオイムノアッセイ法による定量用キット（Upjohn社製）を用いて定量した。

〈結果〉

### a) OK-432とヒト血清腹腔内投与による実験的抗腫瘍効果の検討

Meth A  $4 \times 10^5$  個/匹を移植した日より，OK-432とincubateしたヒト血清1ml/

匹を隔日に、12回にわたり腹腔内投与した。コントロールとしては、OK-432 1KE/匹のみ、ヒト血清1 ml/匹のみ、生食1 ml/匹のみをおいた。

Fig. 1 に示すように生存日数でみると、OK-432 と血清を同時に入れた群が一番延命率が良かったが、OK-432 単独投与群との間に有意差はなかった。これら両群は明らかに血清のみあるいは生食のみ投与された群よりは、生存日数が延長していたが、腹水が消失したものはなかった。腫瘍を腹腔内に移植して約1週間後より、明らかな腹水の貯留がみられる。この頃より4日毎に少量の腹水を採取して塗抹標本を作製し、腹腔内への遊出細胞を観察した。生食あるいは血清投与群では、好中球をはじめ遊出細胞はほとんどなかったが、OK-432 単独あるいはOK-432 と血清同時投与群では好中球の遊出がみられたが、両群間に明らかな細胞数の差はみられなかった。

#### b) OK-432 と新鮮ヒト血清腹腔内投与による癌性腹水の治療

症例は52才の男性で、昭和59年5月に胃癌を指摘され、胃全摘術を受けた。手術時にすでにダグラス窩への転移が認められており、その後化学療法を受けていたが、今年2月腹水の貯留をきたしたため再入院となった。腹水中に多数の癌細胞を認めたため、OK-432 とヒト新鮮血清を同時に腹腔内へ投与し、癌細胞の消長、腹水中への遊出細胞を経時的に観察した。Fig. 2 に示すように、腹水中の好中球はOK-432 と血清投与6時間後より著明に増加し、癌細胞周囲へのロゼット様の付着がみられた。癌細胞数は減少しはじめ、日を追って癌細胞塊の内部への好中球の侵食もみられ、変性した細胞数が増加していった。好中球の増加した状態は10日以上持続した。腹水は次第に減少し、投与10日後には穿刺できないほどにまで減少した。Table 1 に示すように、投与された血清中のCH50 は incubation によって低下し、逆にC4a, C3a, C5a は著明に増加している。しかし、投与量が100 ml であったためか、投与後の腹水中のそれらは多少増加したにとどまった。Fig. 3 に示すように、血清CH50 は投与後やや増加し、腹水中のそれも漸増した。

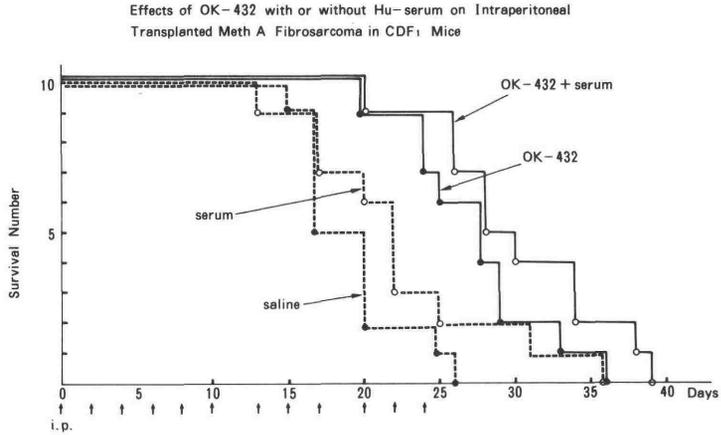
約1ヶ月後、再び腹水の貯留を認めたため、今度はOK-432 単独を腹腔内に投与した。投与6時間後より好中球を中心とした遊出細胞の著増をみたが、2日後には減少傾向になり、1週後には元に復した。癌細胞数については同じような減少傾向がみられた。

#### 〈考 察〉

C5a, C3a などのフラグメントは chemotactic factor として、好中球の遊走を助長することが知られている。OK-432 腹腔内投与により腹水中の補体が活性化されて、chemotactic factor が産生され、これが腹水中への好中球の遊出をうながすものと考えられるが、これらの好中球が腫瘍細胞を攻撃するに至る詳細な mechanism については不明の点が多い。OK-432 とヒト新鮮血清を同時に投与することで、腹水中の chemotactic factor の増加が期待され、また多少の増加がみられたが、遊出した好中球数は数の上でOK-432 単独の場合と差がなかった。ただ好中球数の増加している期間が著明に延長し、

この間好中球による腫瘍細胞の破壊が持続したと考えられる。今後はこの好中球の遊出から腫瘍細胞を攻撃するに至る過程への補体系の関与につきさらに検討を加えたい。

Fig. 1



OK-432 + Hu-serum incubated at 37°C for 60 min

	CH50 (u/ml)	C4a (ng/ml)	C3a (ng/ml)	C5a (ng/ml)
before	20.7	1329	1713	16.6
after	5 ↓	6733	2887	152.2

Fig. 2

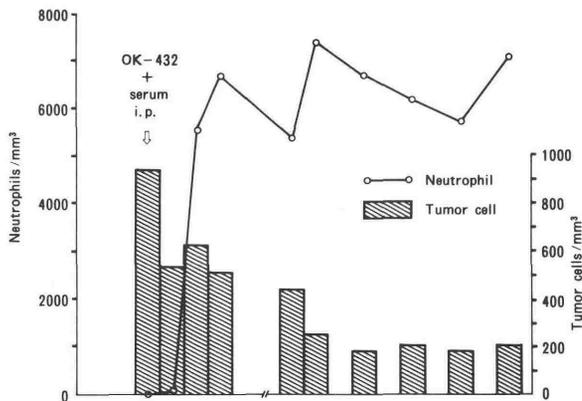
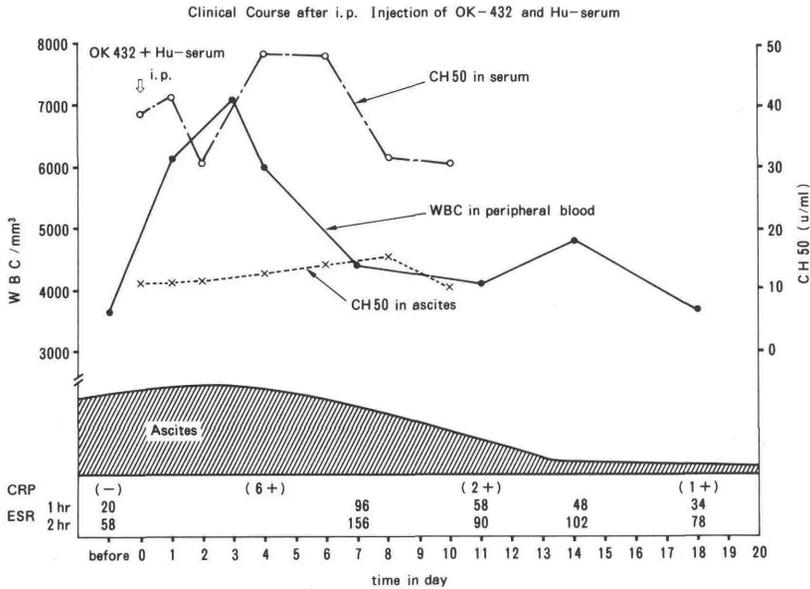


Table 1.

Effect of OK-432 on Complement *in vitro*

	incubation at 37°C for 60 min	
	before	after
CH50 (u/ml)	28.0	20.5
C4a (ng/ml)	90.4	5600.0
C3a (ng/ml)	337.6	2400.0
C5a (ng/ml)	3.4	72.8

Fig. 3.



## 22 リウマチ因子による変性IgGの補体活性化作用抑制

九大生医研内科

神宮 政男, 轟木 峻, 友岡 和久, 延永 正

(はじめに)

リウマチ因子(RF)は慢性関節リウマチ(RA)患者血清や関節液中に検出され、その病因的意義は大きいといわれている。一方、全身性エリテマトーデス(SLE)やRAでは免疫複合体(IC)の病因的意義は免疫担当細胞を活性化する他、補体活性化作用を有する点でも重要である。この補体の活性化はRFによっても惹起されることが示唆されているが、我々はICの補体活性化作用におよぼすRFの影響につき検討した。

(材料と方法)

ICのモデルとしてヒト変性IgG(A-IgG)を用いた。補体のソースとして健常者血清(NHS)を用いた。リウマチ因子はRA血清5 mlより、Nardellaらの法に従い、アフィニティクロマトにて分離、凍結乾燥、透析した。RFはELISAおよびレーダーネフェロメーターにて測定した。補体活性化はEA溶血阻止にて測定した。すなわち、NHS 0.05 mlにA-IgG 0.02 ml (12.5  $\mu$ g)を加え、37°C、30分反応、これを10~20x希釈したもの0.25 mlにEA(1  $\times 10^9$ /ml) 0.25 ml, GTB 0.25 mlを加え、37°C、60分反応、遠沈し、上清のOD541を読み取り(A)、一方、A-IgGのかわりにPBS(0.01M, 0.138mM NaCl, PH 7.4)を用いたものを対照(B)として、 $(B-A) \div B \times 100$ (%)をA-IgGによるNHS補体活性化の程度として示した。一方NHSのかわりにRA、および変性性関節症(OA)の関節液を用い、同様に行なった。RA血清28例よりRFを分離し、A-IgG 0.01 ml (12.5  $\mu$ g)にこのRF 0.01 ml (23.2 ng ~ 93 ng)を加え、30分間反応、これにNHS 0.05 mlを加えた後、37°C、30分間反応、これを前述のようにGTBで希釈し、EAに加え、その溶血を同様に読み取った(C)。RFのかわりにPBSを用いたものの溶血を(D)とすると、 $(C-D) \div D \times 100$ (%)をRFによる、A-IgG依存性補体活性化の抑制とした。

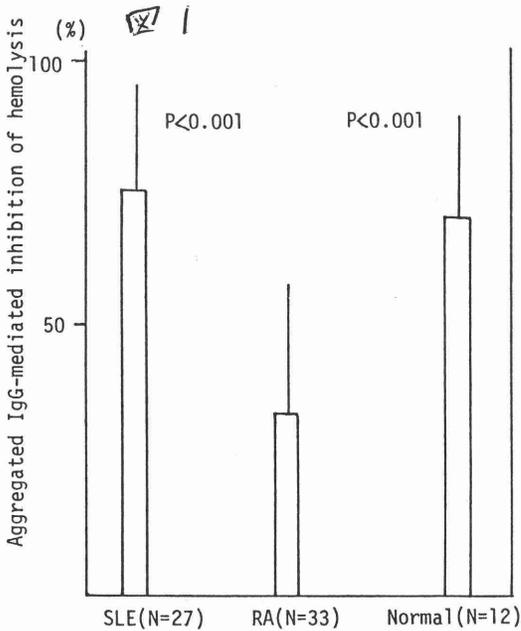
(結果)

A-IgGによる補体活性化はNHS(12例)やSLE(27例)に比べRA(33例)で最も低い(図1)。RA血清28例にて、レーダーネフェロメーターにて測定したRF値と補体活性化との関係は持たなく、SLEにおいて、RF陽性群(3例)と陰性群(23例)との間には補体活性化の差は認められなかった。OAに比べRA関節液で補体活性化は有意に低値を示した(図2)。このRA関節液28例において、RFと補体活性化との関係は負の相関傾向を示した( $r = -0.377$ ,  $P > 0.05$ )。A-IgGを単離したRFとあらかじめ反応させると、A-IgGのNHS補体活性化作用は抑制された(図3)。

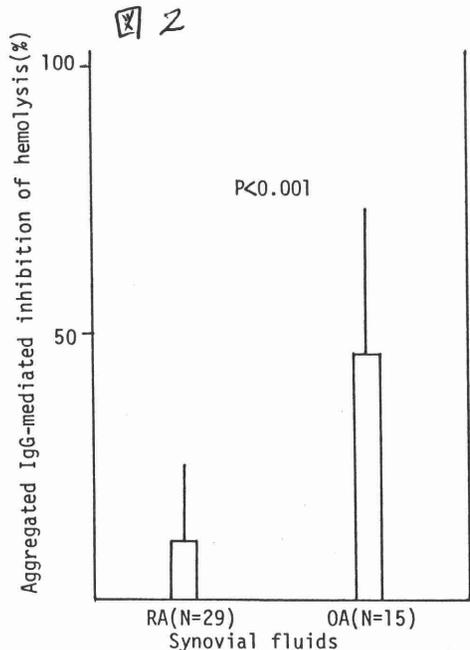
(考按)

以上より, RA患者血清やその関節液では, A-IgG による補体活性化はおこりにくいことが示唆される。RA血清や関節液がSLE血清やNHSと異なる点は高濃度のRFを有する点であろう。そこで, A-IgGの補体活性化におよぼすRFの影響をみたところ, 血清ではRFの関与は認められず, また, RA関節液では何らかの形で関与していることが示唆された。実際にRA血清より単離したRFはA-IgGの補体活性化作用を濃度依存性で抑制した。A-IgGをin vivoにおけるICのモデルとすると, RFはICの補体活性化作用を抑制することが示唆され, ICの生物学的活性はRFにより阻害されることが考えられる。また, A-IgGの補体活性化を抑制するRFの濃度は500 ng/ml以下であり, これは実際にRF自体が補体を活性化する濃度の約1/200であり, 我々が検討した結果でも, この濃度のRFでは補体活性化はみられなかった。どのクラスのRFが関わっているのかについては今後の検討が必要である。

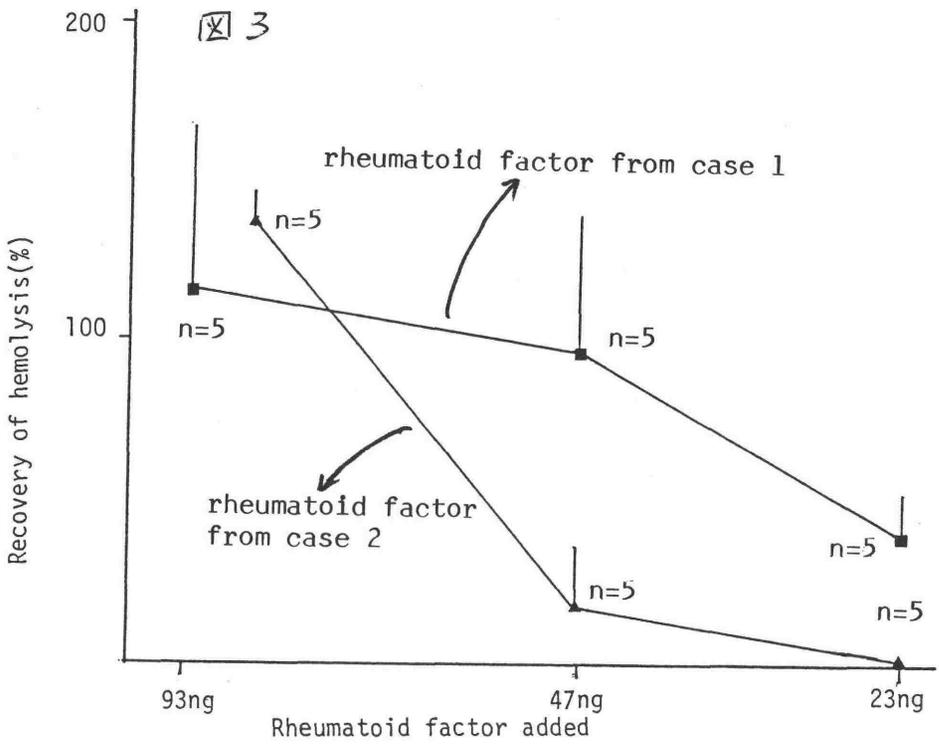
- (文献) 1) Brown PB, et al. Arthritis Rheum 25:1101,1982  
 2) Nardella FA, et al. J Exp Med 154:112,1981



Aggregated IgG-mediated inhibition of hemolysis in the sera from patients with SLE, RA and normal persons



Inhibition of aggregated IgG-mediated hemolysis in synovial fluids



Recovery by rheumatoid factor of aggregated IgG-mediated inhibition of hemolysis

## 23 心筋細胞のミクロゾーム画分による モルモット赤血球の溶血反応

深山昭雄、川本 保子、藤沢 有紀、雪竹 潤  
(藤田学園・医・微生物)

### 【はじめに】

Cytotoxic T Cell による細胞膜障害は、補体 C5b-9により形成される membrane lesion と極めてよく類似することが、Dourmashkin ら、Henkarts らの電顕所見により明らかにされ、その後、Podack らは、膜障害の effector function を担う活性物質はNK細胞に存在する高比重顆粒の膜に局在し、標的細胞との膜融合の結果、活性物質が標的膜内に注入されチャンネルを形成するというモデルを提唱している。また、NK細胞の顆粒による膜障害の電顕像は Polymerized C9 によって作られたものと類似するが、大きさには2種類存在することを示し、その各々を形成する顆粒上の活性物質を Perforin 1、Perforin 2 と命名している。

私達は、細胞膜に存在する補体成分およびその関連成分の解析の過程で、心筋の細胞分画中に、未感作モルモット赤血球を溶血する因子を持つ細胞顆粒の存在することを見出したので報告すると共に、既に Podack らにより報告された Perforin と本物質を比較しながら考察を加えた。

### 【材料と方法】

1) 心筋細胞および肝細胞の細胞分画。病理解剖体から得た新鮮な心臓と肝臓の各臓器片を用いた。約10グラムの臓器を細片にしたのち、血液成分を除去する為に生理食塩水中で浸漬・洗浄を繰り返した。冷却した 0.25 M蔗糖溶液あるいは PIPES 緩衝液(10 mM PIPES, 100 mM KCl, 3.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.25 mM EGTA)中で 0.5 mmに細切したのち、ポッターの細胞破砕器でホモジナイズした。ついで、通常の細胞分画法に従って顆粒成分を得た。すなわち、核成分を除去したのち、5,000 × g, 10分の遠沈上清を 24,000 × g, 10分遠心して得た沈渣をミトコンドリア画分とし、さらに、その上清を 54,000 × g, 60分遠心した沈渣をミクロゾームとした。

ミクロゾーム画分は、更に 30% Percoll Gradient Centrifugation にて顆粒の精製を試みた。

2) 溶血活性の測定には、モルモット赤血球を 0.01M EDTA-GVB で  $1 \times 10^8$ /ml に調整したものをを用いた。その 100  $\mu$ lと試料の100  $\mu$ lを37℃で90分間反応させたのち、3 mlの冷却した生理食塩水を加えて溶血度を測定した。

3) ミクロゾーム画分の蛋白量の決定、SDS-PAGEによる分析は、通常の方法に従った。ヒトB抗血清は自家製を、ヒトC3, C5, C9, IgG の抗血清(ヤギ)は市販のものを用いた。

#### 【結果】

1) 肝細胞から得た顆粒画分のいづれにも溶血活性は認められなかった。一方、心筋細胞より分離した顆粒画分のうち、ミクロゾームには強い溶血活性が存在していた。実験によっては、ミトコンドリアに低い溶血活性を認めることがあったが、これはミクロゾームの混入によると思われた。核成分や  $5,000 \times g$  沈渣、可溶性画分には溶血活性は全く認められなかった。

2) ミクロゾーム画分を Percoll 密度勾配遠心法で分画したところ、比重 $\sim 1.035 \sim 1.037$ の領域に溶血活性が見られ、活性のピークは比重 1.035 の層にあった。この層を画分1とし、比重 1.037 の層を画分2とした(図1)。画分1の溶血活性は、病理解剖材料(5体)の個々について異なり、 $Z > 3.0$ を示す値は、最も高いもので  $12 \mu g$ 、低いもので  $95 \mu g$ であった。

3) 画分1と2をSDS-PAGEで分析した結果を図2に示した。分子量 70,000 の位置に明瞭なバンドが認められ、その他にも数本の不明瞭なバンドが出現した。現在、溶血反応に関わる蛋白の同定を個々のバンドについて検討中である。

4) 血清補体成分に対する抗体による溶血の阻害実験。画分1 ( $950 \mu g/ml$ )と等量の抗血清(PBSで10倍希釈)を混和し、 $4^{\circ}C$ 、90分間反応させ、超遠心にて顆粒を2回洗浄した。超音波処理で均一な浮遊液としたのち、その  $95 \mu g$ を用いて溶血活性を測定した。抗C5、抗IgGで前処理した顆粒の溶血活性には、著しい低下は認められなかったのに対し、C9抗血清で処理した顆粒の活性は著しく低下した(図3)。又、抗B、抗C3抗血清ともに顆粒の溶血活性には全く影響しなかった。

#### 【考察】

ミクロゾーム画分によるモルモット赤血球の溶血反応には、C9抗原性物質の関与が考えられた。この物質が、細胞内の顆粒上に正常に存在しているのか、あるいは細胞の破壊・分画中に artefact として血中C9が膜成分の中に挿入されたのかについては、今のところ明らかではない。他の顆粒成分や肝細胞には同様の活性がないことから、artefact ではないとする可能性が示唆される。一方、心筋材料により溶血活性に著しい差があることは、後者の可能性を否定しえないものである。また、Podackらは、NK細胞の Perforin による membrane lesion の形成はCaイオン依存性であると報告している。ここで示したように、ミクロゾーム依存性の溶血はCaイオンを必要としない。この点で活性因子が Perforin と異なるのか、あるいは

Perforin を顆粒より放出するメカニズムに差があるのか、などが考えられる。

現在、モルモット赤血球の溶血の反応至適条件、血球膜の電子顕微鏡像などについて検討中である。

Figure 1

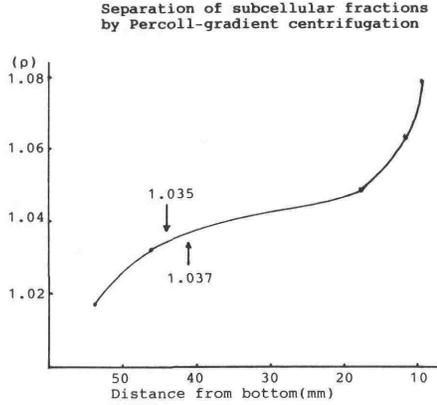


Figure 2

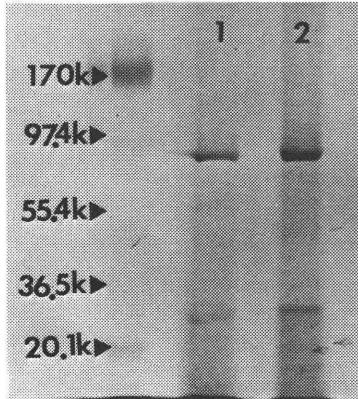
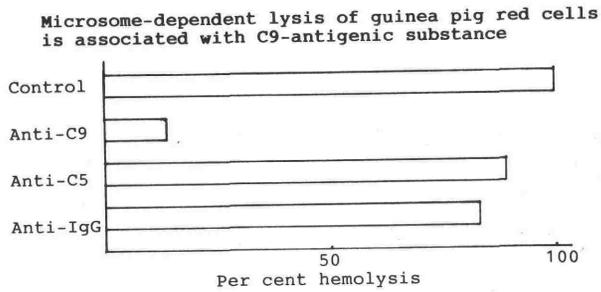


Figure 3



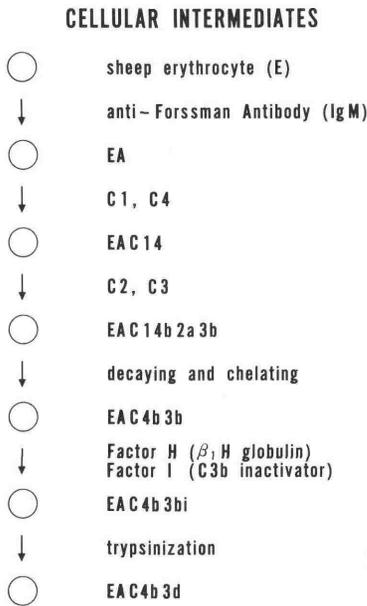
稲田 逸一, 島飼 勝隆

藤田学園保健衛生大学, 医学部, 内科学教室

〔目的〕

全身性エリテマトーデスの臓器障害機序は免疫複合体(IC)に原因が求められている。特にIC処理能低下例で腎炎が多いとされているが、その低下機序は不明である。筆者は既に、IC処理能に因与する単球補体受容体(CR)のうち、培養単球にCR2が検出されることを報告した。(PNAS, 80, 2351-2355, 1983) そこで、健康人培養単球CR2の性状ならびに貧食能における役割を追究することを目的とした。

〈図1〉

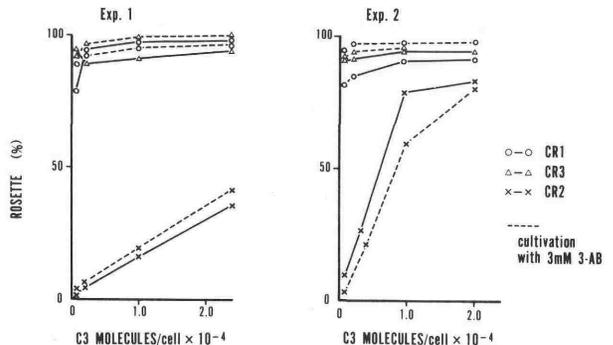


〔方法〕

①健康人末梢血より Ficoll/Hypaque 法, および Percoll 法を組み合わせて単球を分離した。②CRは補体感作羊血球を用いたロゼット法で検出した。各種補体感作羊血球は図1の様に順次作製した。③CR2の性状はa) 単球培養液中に添加した核酸代謝剤あるいは蛋白合成阻害剤の影響, b) 培養経過時間におけるCR2陽性細胞数の変化, c) 単球のIC貧食における免疫グロブリンFc部分に対する受容体(FcR)との協同作用の有無について検討した。

〈図2〉

Effect of 3-Aminobenzamide on C3R Expression of Cultivated Monocytes

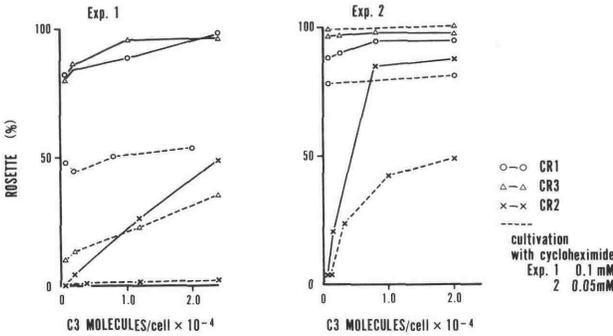


〔結果〕

末梢血単球培養中のCR2陽性細胞出現機序解明のために、培養液中に添加した3-Aminobenzamide (ホウ ADP-リボース合成阻害剤)の影響を調べた(図2) CR2陽性細胞数

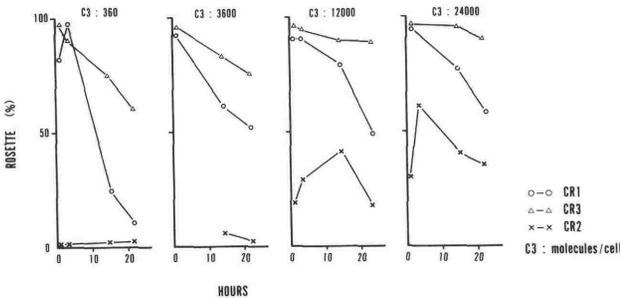
の減少はなかった。このことより CR2 発現に ADP-リボースの関与した分化は必要と考えられた。さらに、培養液中に添加した Cycloheximide の影響を調べた (図 3)

Effect of Cycloheximide on C3R Expression of Cultivated Monocytes



<図 3>

Kinetics of C3R Expression of Cultivated Monocytes



<図 4>

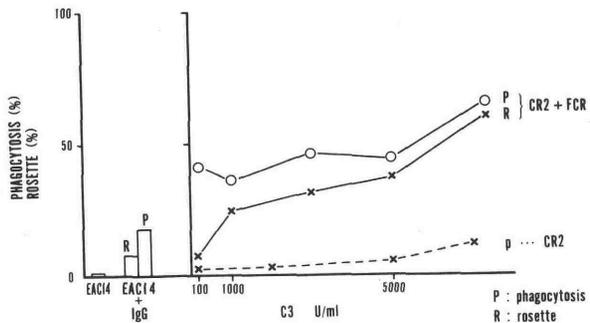
用の有差を調べた。(図 5)  
 標的細胞は EAC14 細胞作製後 IgG 抗 Florssman 抗体で感作した。FcR のみによるロゼット形成能、貪食能は対照として EAC14 細胞を同抗体で感作したもので調べた。図 5 の右に示された様に、CR2 のみによる貪食に比し、標的細胞の C3 分子数に容量反発的に、

図 3 の Exp 2 に示された様に、0.05 mM Cycloheximide 添加により、CR2 陽性細胞数は著減し、in vitro における CR2 出現には蛋白質合成が必要と考えられた。

次に、単球培養時の経過時間の変化に伴う各種 CR 陽性細胞数を検討した。(図 4)  
 図 4 は左より右り順に、標的細胞表面の C3 分子数が増加している。CR2 陽性細胞数は CR1、CR3 と異なり、培養数時間経たず 10 数時間迄は増加し、その後減少傾向を示した。  
 ここで、末梢血単球 CR2 の機能を明らかにするのために、貪食能における Fc 受容体 (FcR) と CR2 との協同作用

<図 5>

Effect of CR2 and FcR on Phagocytosis of Monocytes



ロゼット形成細胞および貪食細胞数が増加した。この英 Ehlenberger, Nussenzweig 等の報告 (JEM; 1977) と一致していた。

【考按】

*in vivo* では IC に結合した C3 付連物に Factor D および E, さらに種々の protease により不活性化されると考えられる。従って *in vivo* における網内系貪食細胞による IC 処理に, FcR と CR2 の協同作用の存在が示唆され, CR2 喫食は重要と考えられる。特に, 本研究では末梢血単球をガラス板に附着させ, さらに fetal calf serum 存在下で数時間培養させているが, この *in vivo* の網内系細胞により近似した状態を *in vitro* で作っていると考えられる。

## 25 モノクロナール抗CR2によるリンパ球増殖反応の増強

飯田恭子、藤田禎三、田村 昇  
筑波大学基礎医学系・免疫  
成内秀雄  
東京大学医科研・アレルギー

### 〔はじめに〕

補体第三成分の3種類のレセプターのうちの1つ、C3dレセプター(complement receptor type 2, CR2)は、分子量140K の1本鎖の糖タンパクでありB細胞上にのみその存在が認められている(Iida, et al., J. Exp. Med. 1983, 158)。また最近CR2がEBウイルスのレセプターとなっていることも明らかにされ(Fingeroth, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1984, 81)、B細胞活性化のシグナルを与えるレセプターとしての可能性が注目を集めている。我々は、CR2に対するモノクロナール抗体を数種類作製しそのうちレセプターのリガンド結合部位を認識していると思われるものを用いて、マイトゲンによるヒト末梢リンパ球増殖反応における、この抗体の効果について検討した。

### 〔材料と方法〕

#### 1)モノクロナール抗体

Bリンパ芽球細胞Raji cellの細胞膜より、Sephrose-C3によるアフィニティクロマトグラフィーで約70%純度のCR2を部分精製し、これをBALB/Cマウスに免疫した。この免疫マウス脾細胞を用いてハイブリドーマを作製し、抗CR2産生クローンを得た。今回用いた抗CR2(35C)はIgM, Kアイソタイプであった。<sup>125</sup>I表面標識Raji cell細胞膜を用いたimmune precipitationで、分子量140Kの分子を認識しており、また、Raji cellと指示細胞EAC3dによるロゼット形成を阻害する(表1)ことより、35Cは、CR2のリガンド結合部位あるいはその近傍を認識するモノクロナール抗体であると考えられた。コントロールとしてはモノクロナール抗体19(抗C4, IgM, Kタイプ)を用いた。実験には、精製IgMおよびペプシン分解によるF(ab')<sub>2</sub>フラグメントを用いた。

## 2) リンパ球増殖反応

ヒト末梢血液より、Ficoll-Conray重層法で単核球を分離し(PBL)、一部の試験では、これをさらにT細胞と、non-T細胞に分画した。T細胞は、ニューラミニダーゼ処理羊赤血球とのロゼット形成細胞を、Leu M3(抗モノサイト)とウサギ補体で処理したものを、non-T細胞は、Eロゼット陰性細胞をOKT3(抗T細胞)とウサギ補体で処理したものを用いた。リンパ球増殖反応は、マイクロウェル中で、 $10^5$ 個の細胞を10%非動化AB型血清を含むRPMI1640培養液200 $\mu$ l中で、マイトゲン、抗体の存在下で3日間培養後、0.5 $\mu$ Ci<sup>3</sup>H-チミジンを与え12時間のとりこみを測定した。

### 〔結果〕

微量のPHA(phytohemagglutinin, 1:12,000)刺激によるPBL増殖反応の系に35Cを投入すると、抗体量30 $\mu$ g/mlで、158%、100 $\mu$ g/mlでは211%と各々増強が観察された。whole IgMの代わりに、35CのF(ab')<sub>2</sub>を用いた時にも30 $\mu$ g/mlで125%、100 $\mu$ g/mlでは161%と増強されている(表2)。マイトゲンとして、PWM(pokeweed mitogen, 1ng/ml)を用いた時にも、同様の傾向が見られた。マイトゲンを加えない系では、抗体を増量しても有意な増殖反応は見られなかった。

次に35Cが、どの細胞分画に作用しているのかを知るために、PBLを、T細胞とnon T細胞の2つに分画したものをを用いて実験を行った。T細胞、non T細胞を各々、35CF(ab')<sub>2</sub>フラグメント50 $\mu$ g/mlで37 $^{\circ}$ C、1時間反応し、よく洗浄した後、2分画を等量ずつ混合して、マイトゲンを加え増殖反応を行った。結果は表3に示すごとく、non-T細胞を35Cで処理したグループに、増殖反応の増強効果が見られた。

### 〔結論と考察〕

35C抗体は、non-T細胞、おそらくB細胞上のCR2に結合することによって、マイトゲン刺激に対する免疫応答を増強していると考えられる。マイトゲンを与えないと、35C単独では、リンパ球増殖反応をひき起こすことはできなかった。このことから、CR2がT3抗原やFc $\gamma$ レセプターのように細胞膜上で修飾をうけた時に、それが細胞活性化のシグナルとなるようなものではなく、すでに抗原刺激をうけて活性化したB細胞に、C3dを担う免疫複合体が認識された時に、さらに増殖を促すシグナルを与えるという形で、免疫応答機構に関与している可能性が考えられる。

Table 1 Inhibition of EAC3d-rosette formation by a monoclonal antibody against CR2( 35C )

Antibody		rosette formation	
	ug/ml	%	( inhibition, % )
35C	200	6.9	( 84% )
	60	28.9	( 33% )
	30	34.7	( 19% )
medium control		42.8	

Table 2 Effect of anti-CR2 on the PHA-induced proliferation of human PBL. \*

Antibodies	ug/ml	<sup>3</sup> H-TdR incorporated	
		cpm x 10 <sup>-3</sup>	( % of control )
35C IgM	100	33.4 ± 7.2	( 211% )
	30	24.9 ± 4.3	( 158% )
	10	17.2 ± 1.1	( 109% )
35C F(ab') <sub>2</sub>	100	25.5 ± 4.4	( 161% )
	30	19.8 ± 3.2	( 125% )
19 IgM	100	19.1 ± 1.1	( 121% )
	30	16.5 ± 2.7	( 104% )
medium control		15.8 ± 1.2	

\* The final concentration of PHA was 1 : 12,000.

Table 3 Effect of pre-treatment of T cells and/or non-T cells with F(ab')<sub>2</sub> fragment of 35C monoclonal anti-CR2 on the PHA-induced proliferation.

Treatment*	<sup>3</sup> H-TdR incorporated	
	cpm X 10 <sup>-3</sup>	( % of control )
T <sub>Ab</sub> // + non-T	14.7 ± 1.3	( 102% )
T + non-T <sub>Ab</sub> //	23.1 ± 0.8	( 160% )
T + non-T + Ab	23.6 ± 3.2	( 164% )
T + non-T	14.4 ± 0.3	

\* T<sub>Ab</sub>// or non-T<sub>Ab</sub>// indicates that T cells or non-T cells were incubated with 50ug/ml of 35C F(ab')<sub>2</sub> for 1h at 37°C and washed twice before culture.

田中恵津子<sup>1)</sup>、洪卿秀<sup>2)</sup>、小園晴生<sup>2)</sup>、高田裕子<sup>2)</sup>、竹田潤二<sup>2)</sup>、木下タロウ<sup>2)</sup>、  
井上公蔵<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>大阪医科大学微生物学教室

<sup>2)</sup>大阪大学医学部細菌学教室

### 〔目的〕

B 因子は、分子量 93,000 の 1 本鎖の糖蛋白で、Mg イオン存在下で、C3b と複合体をつくり、これに D 因子が作用して B 因子内の Arg-Lys 結合を切断し、Bb は C3b と結合したままで、C3 転換酵素の構成因子となり、Ba は遊離する。Ba は B 因子の N 末端側で、分子量は 33,000、Bb は C 末端側で分子量は 60,000、エステラーゼ活性をもつ。この B 因子についてさらに詳しく解析するために、これに対するモノクローナル抗体を 3 つ作製した。この抗体の 1 つについて調べてみたところ、大変興味ある結果を得たので報告する。

### 〔方法〕

1. モノクローナル抗体の作製 精製したヒト因子を Balb/C マウスに免疫し、脾細胞と骨髓腫細胞 P 3 U I を P E G で細胞融合させ、B 因子に対する抗体を産生するクローンを 3 つ得た。抗体産生クローンの検出には、E L I S A 法を行なった。抗体産生細胞をマウス腹腔で増殖させ、腹水を採取して得られた抗体を 5 0 % 硫酸沈澱したのち、D E A E - 5 2 カラムで精製し、S D S - P A G E で確認した。
2. Immune Blot 法による抗原の検索 Western Blotting 法に従って行なった。
3. 補体成分の精製 ヒト補体成分 C 1 は中性の低イオン強度で、沈澱して得、C 3、B 因子、Properdin は、従来報告されてきた方法で精製した。ヒト C 2、C 4 は、化血研で製造されたものを使った。ヒト D 因子除去血清 ( R D ) は、Sephadex G-75 を用いてゲル濾過を 2 回繰返して作製した。
4. E A C 4 b, 3 b cells の作製 精製補体成分を用いて E A C 1 - 3 b cells を作製し、E D T A 処理して C 1 を除き、3 7 ° C 2 ~ 3 時間 incubate して C 2 を除いて作製した。
5. B 因子の標識 Iodogen を用いて B 因子を <sup>125</sup>I で標識した。
6. モノクローナル抗体の生物学的活性の検索 1 0 m M の Mg - E G T A - G V B の存在下で、E A C 4 b, 3 b cells に精製した因子を抗体と同時に加え、3 7 ° C 1 0 分反応後、1 回洗浄したのち、ラットの C - E D T A 血清を用いて溶血を測定した。また、B 因子の解離は、E A C 4 b, 3 b cells に一定の B 因子と抗体、又は対照として B 因子

だけを用いて 37°C 10分反応後、1回洗条した後の cellsを用いて 30°C に incubate し、時間的にくみ出し、ラットの C-EDTA 血清の存在下で行なった。B 因子の結合と解離の実験は、<sup>125</sup>I 標識 B 因子、EAC4b、3b cells とモノクローナル抗体を加えた系、加えない系と、対照として EA との反応を行なった。結合は、37°C 10分の反応で、解離は、その後 30°C 30分 incubate して遠心し、その時の沈渣の radioactivity を測定した。

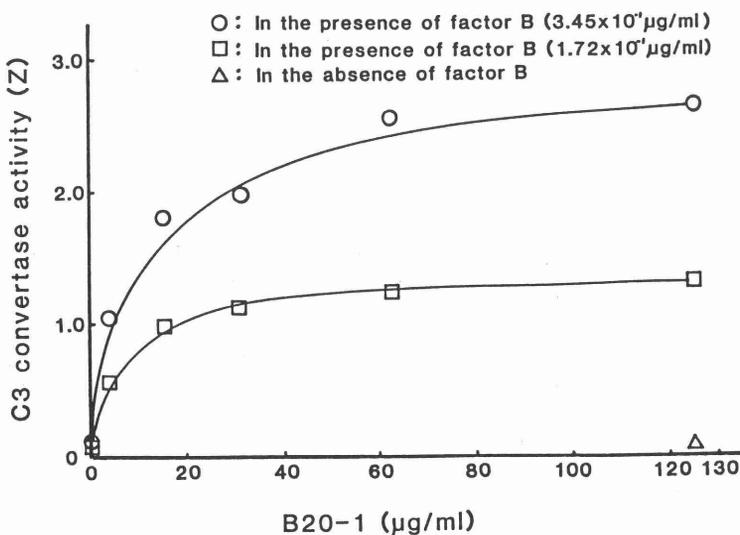
7. Autoradiography <sup>125</sup>I で標識した B 因子と、抗体と EAC4b、3b cells を 37°C で 10分間反応させたのち、RD を加えて 37°C 60分反応させ、100,000 rpm 30分間超遠心して、上清と沈渣に分けて、それぞれを SDS 処理して SDS-PAGE を行ない、その autoradiography をとった。

[結果]

Immune Blot 法により、この抗体 (以下 B20-1 と略す。) は、epitope が Ba, Bb のどちらにあるのかを調べたところ、Ba 部分に対するものであることがわかった。

生物学的活性を調べたところ、B20-1 と B 因子を同時に加えて反応させた時、(Fig. 1) B20-1 の濃度に依存して溶血活性が上昇し、しだいに plateau 値に達した。この plateau 値は、B 因子の濃度に依存した。しかし、EAC4b、3b cells と B 因子とを反応させ、洗浄したあと B20-1 を加え

Fig. 1 Dose-response of B20-1



て反応させた時は、溶血活性の上昇はおこらなかった。

また、B 因子の EAC4b、3b cells からの解離について解析してみると (Fig. 2)、B20-1 を加えた時は、B 因子の解離は促進された。特に、最初の 20 分では激しく、その後は B 因子の解離は、ややゆるやかな 2 相性を示した。B20-1 を加えない時は、図のようにほとんど B 因子の解離はおこらなかった。

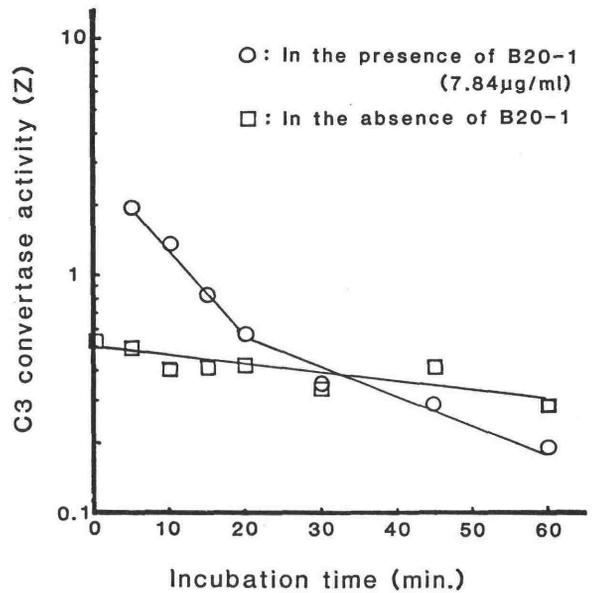
<sup>125</sup>I で標識した B 因子を使って、実際の B 因子の結合と解離をみてみると、確かに、B20-1 を加えない時と比べると、B 因子の EAC4b、3b cells 上の C3b への結

合は上昇し、解離も多いことがわかった。

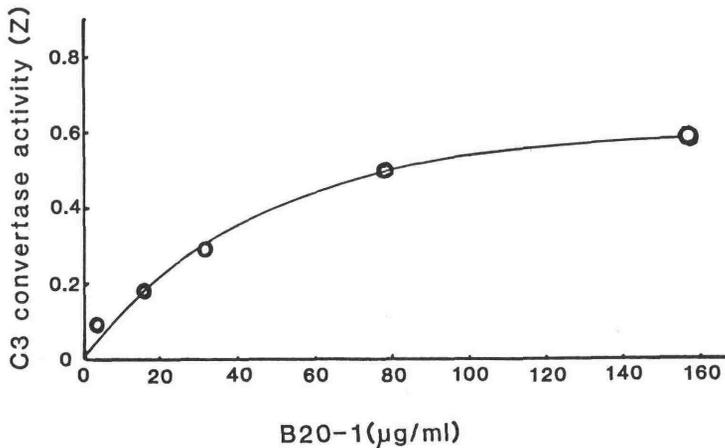
次に、properdin をこの反応系に加えると、溶血活性はさらに上昇し、properdin の濃度に依存した。B 因子の解離をみると、properdin を加えると 2 相性は変わらないが、B 因子の解離は抑制され、安定化された。

D 因子除去血清 (RD) で反応させると、(Fig. 3) B 20-1 を加えない対照では、ほとんど溶血がおこらず、B は分解されないままであり、用いた RD は充分 RD として機能していた。それにもかかわらず、B 20-1 を加えた系では、抗体の量に依存して、溶血活性が発現し、autoradiography の結果から、B 20-1 を加えて 100% 溶血がおこったものでは、B 因子は B a と B b とに分解されていた。

**Fig. 2 Decay of C3 convertase**



**Fig. 3 Dose-response of B20-1 incubation with RD**



[考察]

B 2 0 - 1 は、C 3 転換酵素の構成因子ではない B a に対するものであるにもかかわらず、溶血活性、B 因子の作用を高めたことは大変興味深い。この溶血活性の亢進の機序としては、 $^{125}$  I 標識 B 因子を使った結合と解離の実験および、R D による実験と auto-radiography により、(1) B 2 0 - 1 が結合することによって、B 因子に何か構造変化がおこり、E A C 4 b, 3 b cells 上の 3 b への結合が促進されること、および(2) D 因子に対する B 因子の感受性をこの抗体が増大することが考えられる。B 2 0 - 1 の結合による B 因子の変化について、さらに探求していこうと考えている。

## 27 単クローン抗体によるコブラ毒因子 の機能の解析

藤沢有紀, 川本保子, 深山昭雄

藤田学園保健衛生大学・医学部・微生物学教室

### 目的

コブラ毒因子 (CVF) は、補体第2経路の強力な活性化物質として知られているが、その作用機序はMgイオン存在下で補体B因子と結合し、D因子と反応してC3/C5転換酵素活性を持つ安定なCVF-Bbを形成することにある。このようにCVFは、脊椎動物のC3bに似た働きをするが、C3bBb複合体が極めて不安定なのに対し、CVF-Bbが非常に安定である理由については未だ明らかではない。Classical C3 Convertaseの成分であるC4bは3本鎖構造でCVFと似た構造であり、またコブラC3はCVFと共通抗原性をもつことなどから、これら補体分子の系統発生上興味を持たれている。今回、CVFとBbの結合様式を通してCVFによるBbの安定化の機構を明らかにする目的で、単クローン抗体を用いてCVFの解析を試みた。

### 方法

1) CVFの精製。 Sigma社のインドコブラ毒よりBallowらの方法に準じて行なった。

2) 単クローン抗体の作製。 精製CVF (10  $\mu$ g) を完全アジュバントと共にBalb/cマウスに腹腔接種し、20日後同様に追加免疫を行なった。最終免疫より3日後に、マウスの脾細胞と免疫グロブリン非分泌マウスミエロマ細胞P3-X63-Ag8-U1(P3U1)をポリエチレングリコール (PEG 4000) で融合した。HAT選択培地によりHybridomaを得、限界希釈法によるクローニングによりCVFに対する単クローン抗体を産生するクローンを得た。抗体のスクリーニングは酵素抗体法 (ELISA) で行なった。得られたクローンはプリスタンで前処理したBalb/cマウスの腹腔に接種し、その腹水を採取した。抗体は腹水を硫酸塩析後、Protein A-Sepharose affinity chromatographyにより精製した。

3) CVF、CVF-Bb活性の測定。 非感作モルモット赤血球の溶血活性で測定した。

4) Immunoblotting. 還元CVFあるいは、非還元CVFをSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離したのち、ニトロセルロース膜に電気泳動により転写し、一次抗体、ペルオキシダーゼ結合抗マウスIgG抗血清を順次反応させ、O-dianisidine を基質として結合バンドを検出した。

## 結果

1) 得られた一連のクローンより、ELISAでCVFと反応することが確認された4種類の抗体につき検討した。抗体のサブクラスはすべてIgG1であった。

2) CVF及びCVF-Bbに対する溶血活性阻害。4種類の抗体(20, 1D11, 8B2, 1H1)の溶血活性阻害を調べるとFig.1に示すように、20と1D11はCVF及びCVF-Bb共に溶血活性を阻害した。8B2, 1H1は溶血活性をほとんど阻害しなかった。

3) Immunoblotting 法による結合バンドの検出。CVFは還元状態では $\alpha$ (MW61000)、 $\beta$ (MW43000)、 $\gamma$ (MW25000)の3本鎖に分れる。CVFのそれぞれの鎖と抗体の結合について調べてみると20は非還元CVFならびに還元CVFの $\beta$ 鎖に結合した。1D11は還元CVF、非還元CVFのいずれにも結合しなかったがSDSを含まないPAGEで電気泳動したCVFに対しては結合した。8B2は、還元CVFのどの鎖にも結合しなかったが、非還元CVFには結合した。1H1は還元CVFの $\alpha$ 鎖に結合し非還元CVFにも結合した。(Table.1) なお、anti-CVFポリクローナル抗体は還元CVFの $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖にのみ結合した。

## 考案

抗体のCVFへの結合部位より、1D11はCVF分子の高次構造を認識している抗体であろうと考えられた。20と1D11の、CVF及びCVF-Bbの溶血活性阻害よりCVFにB因子が結合して溶血活性を発現するには、CVFの高次構造が重要な働きをしていると考えられ、その立体構造は主に $\beta$ 鎖を中心に形づくられていると考えられた。CVFのみでなくCVF-Bbの溶血活性も阻害されるのは、抗体が結合する事によりCVFに結合しているBb分子が追い出されるのか、あるいはCVFに結合したBbとC5の反応性が低下するなどの可能性が考えられる。現在これらの可能性についてくわしく検討中である。

Fig.1

Inhibition of MoAb against CVF and CVF-Bb

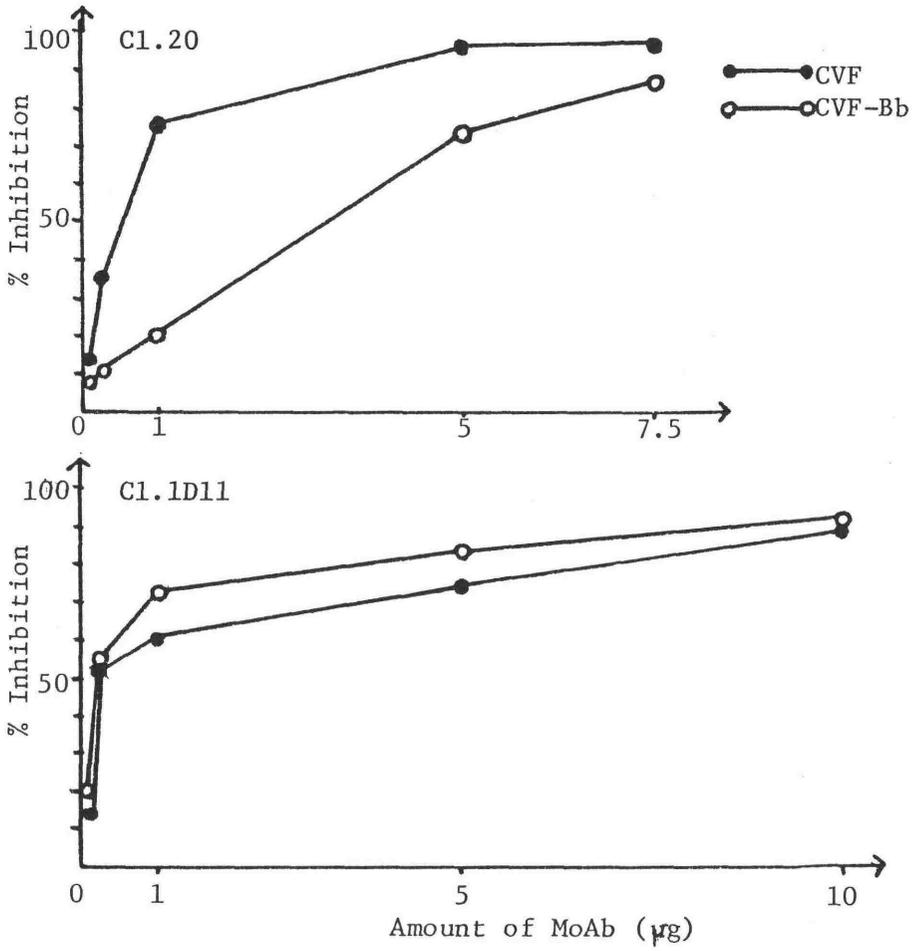


Table.1

Monoclonal antibody	20	1D11	8B2	1H1
Binding to CVF				
ELISA	+	+	+	+
SDS-PAGE:none reduced	+	-	+	+
:reduced	$\beta$	-	-	$\alpha$
Conventional PAGE	+	+	+	+
Inhibition of hemolytic activity				
CVF	+	+	-	-
CVF-Bb	+	+	-	-

## 28 日本人におけるC4の遺伝的多型と コンプロタイプ、HLA-補体ハプロ タイプについて

徳永勝士1)、尾本恵市1)、十字猛夫2)3)

1)東京大・理・人類学教室

2)東女医大・輸血部

3)東大病院・輸血部

### 【目的】

ヒト補体第4成分(C4)の多型は、近接する2つの遺伝子座C4AおよびC4Bによって支配される。これらは、C2およびB因子を支配する座とともに、第6染色体短腕上の主要組織適合性複合体(MHC)領域に位置する。近年の技術上の進歩に伴って、C4多型に関して、HLA抗原系にも匹敵する高度の変異性や、両座に高頻度の欠損遺伝子(QO)が存在することなどが確認されてきた。このことから、C4はMHCハプロタイプの特徴づけや、MHCと疾患との関連の機序を探るための重要なマーカーとなっている。我々は日本人家族試料を用いてC4の多型を調査し、対立遺伝子、ハプロタイプの頻度を求めるとともに、他のMHC内遺伝子座との間の連鎖不平衡や、BF-C2-C4ハプロタイプ(complotype)、HLA-補体ハプロタイプ(extended haplotype)についても分析した。

### 【方法】

**家族試料**：第8回日本HLAワークショップ(1982)で集められた家族試料から、83家族を選択して調査した。各家族には少なくとも3人の子供がいて、ほとんどの個体は健康である。

**HLA型判定**：HLA-A、-B、-C、-DR型判定は、上記ワークショップにて各々の参加研究室が行った。

**C4型判定**：ノイラミニターゼで前処理したEDTA血漿を試料とし、トリス/グリシン/バルビタール緩衝液系を用いたアガロースゲル電気泳動によって分離したのち、immunofixationおよび特異的溶血帯検出法を行った。

**統計分析**：各々のMHCハプロタイプは、各家族構成員の型判定結果より決定した。確定できた両親のハプロタイプのみを分析に用いた。対立遺伝子およびハプロタイプ頻度は直接カウントで求めた。2因子間の関連の有意性は、 $\chi^2$ 法またはFisherの直接確率計算法を用いて検定した。連鎖不平衡のパラメータ

であるデルタ値 (D) および相対デルタ値 (Dr) は標準法に従って求めた。

#### [結果]

C4対立遺伝子およびハプロタイプ頻度：C4A座では4種の頻度の高い対立遺伝子 (A3、A4、A2、AQO) と、数種の稀な型が観察された。うち1種はreference laboratoriesの1つ (Dr.Dawkins、Perth) によってA5と同定された。C4B座では4種の頻度の高い対立遺伝子 (B1、B2、B5、BQO) が観察された。B5は上記reference lab.によって同定された。各対立遺伝子頻度を Table 1 に示したが、B5の頻度が高いことが注目される。Table 2 には、各C4ハプロタイプの頻度を示した。A4B2、A2BQO、およびA3B5の頻度が高いことが特徴的である。

C4座と他のMHC座の間の連鎖不平衡：Table 3 には、C4ハプロタイプと、HLA-A、-B、-C、-DR、BF、またはC2対立遺伝子間に観察された有意な正の関連を示した。A座との間に4種、B座との間に7種、C座との間に5種、DR座との間に4種の関連が観察された (有意水準： $P < 0.001$ )。A2BQOとA24、Bw52、Cblank、DR2の間、A3B5とBw54、Bw59、Cw1、DR4の間、またA4B2とBw46の間に強い関連が認められた。BF座、C2座との間にも1種ずつの関連が観察された (有意水準： $P < 0.0025$ )。

コンプロタイプ頻度：BF-C2-C4A-C4Bハプロタイプの頻度をTable 4 に示した (実際にはBFとC2の遺伝子の配列順は逆)。最も多いSC31が41%を占め、このほか10種のコンプロタイプが1%以上の頻度で観察された。C4A4B2を持つハプロタイプのうち約8割がSC42であり、残りがSB42となる。C4A2BQOおよびA3B5は例外なくBFS-C2Cを伴った。多くのBFFはFC31を形成するが、C2ATやC2BHもまたBFF-C4A3B1を伴う。

HLA-補体ハプロタイプ：Table 5 には、日本人に特徴的なHLA-A、-C、-B、C4、BF、C2、HLA-DRハプロタイプを示した。8種のハプロタイプが2%以上の頻度で観察された。代表的なハプロタイプA24-Cblank-Bw52-C4A2BQO-BFS-C2C-DR2は11%の頻度で観察され、8種の合計頻度は37.5%に達した。

#### [考察]

最近報告のあるC4A座またはB座の重複例については、今回の調査では確認されなかった。また今回B5と分類したアロタイプについては、その名称に関して異論があり、名称統一が今後の課題の一つとなろう。

日本人におけるC4の対立遺伝子、ハプロタイプ頻度は、白人集団における値と異なるものが多い。この傾向は、コンプロタイプやHLA-補体ハプロタイプも考慮に加えることで一層明瞭となる。このような知見を集積することにより日本人の遺伝的特徴の理解や、疾患とMHCの関連においてprimaryな要因の解明にも重要な情報が得られるであろう。“extended haplotype”の形成とその生物学的意味に関するいくつかの仮説の検討にも役立つと考えられる。

Table 1. C4 allele frequencies (341 alleles)

C4A*3	0.686
C4A*4	0.132
C4A*2	0.106
C4A*Q0	0.067
C4A*Rares	0.009
C4B*1	0.587
C4B*2	0.167
C4B*5	0.088
C4B*Q0	0.158

Table 2. C4 haplotype frequencies (341 haplotypes)

C4A*3 B*1	0.513
C4A*4 B*2	0.114
C4A*2 B*Q0	0.106
C4A*3 B*5	0.088
C4A*Q0B*1	0.059
C4A*3 B*Q0	0.047
C4A*3 B*2	0.038
C4A*4 B*1	0.015
Rares	0.021

Table 4. Complotype frequencies (N=322)

BF C2 C4A C4B	Freq.
S - C - A3 - B1	0.410
S - C - A4 - B2	0.099
S - C - A2 - BQ0	0.096
S - C - A3 - B5	0.090
F - C - A3 - B1	0.078
S - C - AQ0 - B1	0.059
S - C - A3 - BQ0	0.037
S - C - A3 - B2	0.034
S - B - A4 - B2	0.022
F - AT - A3 - B1	0.016
F - BH - A3 - B1	0.012
Rares	0.047

Table 5. HLA-complement haplotype frequencies (N=307)

A C B C4 BF C2 DR	Freq.
24---52-A2BQ0- S - C - 2	0.111
11/24-1-54- A3B5 - S - C - 4	0.059
24-7-7 - A3B1 - S - C - 1	0.042
33---44- A3B1 - F - C - 13	0.042
11-4-62- A3B1 - S - C - 4	0.036
2 -1-46- A4B2 - S - C - 8	0.033
26-3-61- A3B1 - S - C - 9	0.029
2/24-1-59- A3B5 - S - C - 4	0.023
Total	0.375

Table 3. Positive linkage disequilibrium between C4 and the other MHC loci

<u>C4/HLA-A(N=341)</u>	HF	D	P	Dr
A4B2 - A2	0.050	0.024	$<10^{-3}$	0.46
A3B2 - A2	0.024	0.015	$<10^{-3}$	0.51
A2BQ0- A24	0.097	0.056	$<10^{-10}$	0.86
A3B1 - A26	0.085	0.031	$<10^{-3}$	0.60
<u>C4/HLA-B(N=338)</u>				
A3B1 - B7	0.053	0.025	$<10^{-4}$	0.89
A3B2 - B13	0.012	0.011	$<10^{-4}$	0.56
A4B2 - Bw46	0.033	0.028	$<10^{-8}$	0.76
A3B1 - B51	0.065	0.026	$<10^{-3}$	0.69
A2BQ0- Bw52	0.104	0.090	$<10^{-38}$	0.97
A3B5 - Bw54	0.056	0.048	$<10^{-25}$	0.60
A3B5 - Bw59	0.027	0.023	$<10^{-12}$	0.61
<u>C4/HLA-C(N=338)</u>				
A4B2 - Cw1	0.047	0.024	$<10^{-3}$	0.25
A3B5 - Cw1	0.083	0.065	$<10^{-23}$	0.92
A3B2 - Cw3	0.027	0.017	$<10^{-3}$	0.58
A3B1 - Cw4	0.047	0.020	$<10^{-3}$	0.77
A2BQ0- Cblank	0.101	0.063	$<10^{-13}$	0.91
<u>C4/HLA-DR(N=307)</u>				
A3B1 - DR1	0.068	0.031	$<10^{-5}$	0.91
A2BQ0- DR2	0.101	0.084	$<10^{-28}$	0.96
A3B5 - DR4	0.072	0.049	$<10^{-11}$	0.72
AQ0B1- DRw11	0.013	0.011	$<10^{-3}$	0.27
<u>C4/BF(N=325)</u>				
A3B1 - BFF	0.099	0.036	$<10^{-3}$	0.63
<u>C4/C2(N=331)</u>				
A4B2 - C2B	0.012	0.010	$<0.0025$	0.62

## 29 ウサギC3 cDNAの塩基配列の解析

草野 真夫<sup>1</sup> 崔 南虎<sup>1</sup> 富田 基郎<sup>1</sup> 山本 健一<sup>2</sup> 右田 俊介<sup>2</sup>  
関谷 剛男<sup>3</sup> 西村 暹<sup>3</sup>  
昭和大学<sup>1</sup> 金沢大学がん研<sup>2</sup> 国立がんセンター生物部<sup>3</sup>

### 【はじめに】

補体第二経路（APCと略す）における、異物認識機構については、いまだ不明の点が多い。細胞膜では、特殊構造領域の存在；シアル酸含量，グリコホリン，補体レセプター（CR-1），及びDAFの関与が知られている。しかしながらヒトAPCがウサギ赤血球を溶血し，逆にウサギAPCがヒト赤血球を溶血させることから，自己細胞膜上の因子のみではなく，補体側の因子も何んらかの識別を行なっていることが示唆される。

先のシンポジウムにおいて，ウサギ・ヒトの各APC因子について検討した結果，C3，Hにのみ溶血活性に種特異性がみられることを報告した。しかし，Hは膜上の因子等の識別を行なっているとは考えにくく，C3が，自己・非自己の赤血球識別の主役と結論された。よってヒトとウサギC3の構造と識別特異性の比較は，興味ある課題と思われた。C3のタンパク質レベルでの一次構造の解析はその分子量の大きさを考えると，mRNAの塩基配列より行なう方が有利である。そこでウサギ肝臓のmRNAよりcDNAを作製し，その塩基配列からウサギC3の部分アミノ酸配列を決定した。また最近発表された，FeyらによるヒトC3，及びTackらによるマウスC3の全アミノ酸配列との比較も報告する。

### 【方法】

ウサギ肝mRNAは，グアニジン・チオシアネート法により調製し，オリゴ（dT）セルロースカラムでPoly-A-rich RNAを分離した。

cDNAは，Okayama-Berg法の変法により行ない，ライブラリーを作製した。スクリーニングは野中 勝博士らが調製したマウスC3 cDNAプローブを用いて行ない，コロニーハイブリダイゼーションによりウサギC3 cDNAを含むクローンを得た。

cDNA塩基配列の解析は，M13 -Phage ジデオキシヌクレオチド法によりした。

### 【結果・考察】

挿入されたcDNAの長さは，約2.4Kbpであった。得られたcDNAクローンの制限酵素地図を図1に示す。

cDNAの塩基配列を図2に示す。

塩基配列より推定されたアミノ酸配列を対応するヒト・マウスC3のアミノ酸と比較した（図3）。

cDNAのcoding regionは、2182bp (TGAを含む)で、対応するアミノ酸数は、C末から726アミノ酸であり、その決定配列中にチオエステル部分を含んでいる。ヒト-ウサギ間でのアミノ酸レベルでの相同性は79%、同様にしてマウス-ウサギ間では79%、ヒト-マウス間では79%であった。よって3種で相同性に特に有意差はないようである。

次に高次構造を比較するために、ハイドロパシー (span=7) 分析を行なったが、ウサギ・ヒト・マウスで非常に似たパターンが得られた。

分子内ジスルフィド結合についてもCys 残基が3種間で保存されているので、高次構造もかなり似ていると推定される。

図3において、3種間にわたって相同性のない部位がクラスターを形成している。そのクラスター部位のアミノ酸配列 (196-205, 229-243, 246-280, 396-380, 427-459, 511-530) にかけて各種のハイドロパシーに対応させると、369-380以外の部分においては、すべて親水性を示しており、これらの部分がC3分子の外側に存在することが示唆された。よってこれらの部分がC3の種特異的識別反応に関与するのかもしれない。

なお、チオエステル構造領域は、3種間で極めて高い相同性を示す。

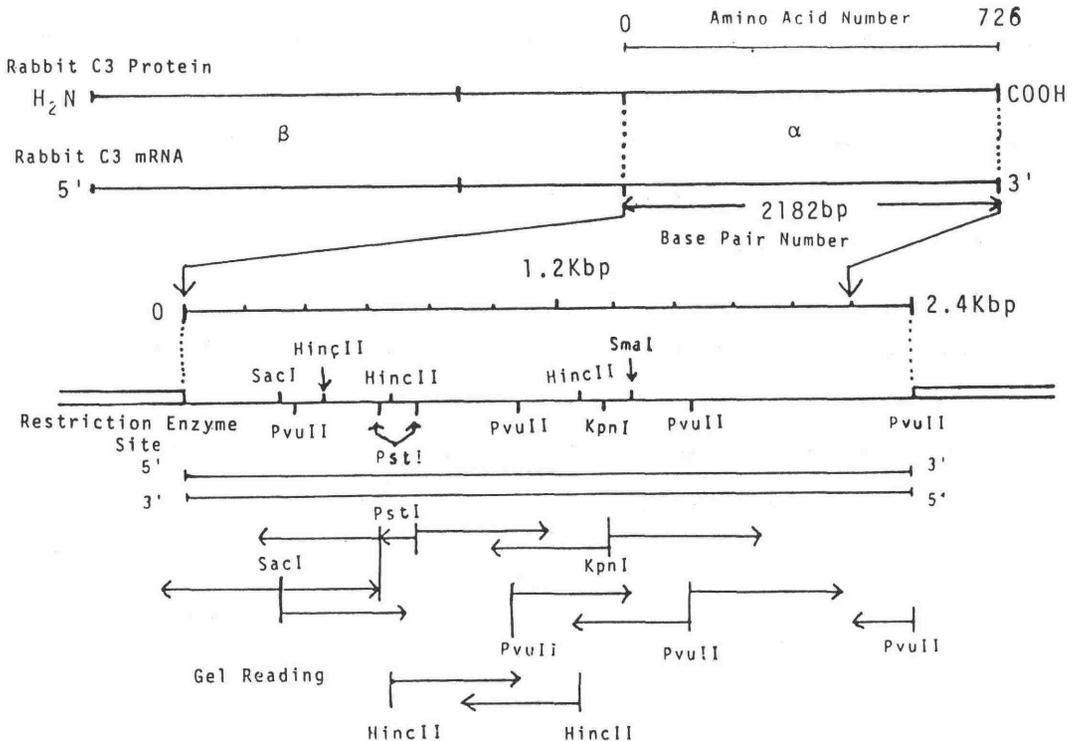


図1 Strategy used for sequencing Rabbit C3 cDNA

AATGAACAAAACCTGTGGCCGTTGAAACCCTGGACCCAGAGAACCTTGGCCAAAGGGGGCGTCCAGAAAGAGGAAATCCCCTCTGGGATATCAGTGACCAA 100  
 GTCCCAGGGACCGAGTCCGAGACAAAATCCTCCTGCAAGGGACCCCGTGGCCACAGATGACGGAGGATGCCATCGACGGCGAGCGGCTGAAGCACCTCA 200  
 TCGTGACCGGCTCCGGCTGCGGGGAGCAGAACATGATCGCCATGACGCACACGGTTCATCGCCGTGCACTACCTGGACCACCCGAGCAGTGGGACAAGTT 300  
 CTCCTGGAGAAGAGGAGGAGGCACTGGAGCTCATCAAGAAAGGCTACACCCAGCAGCTGGCCTTCAAGCAACCCAACCTCGGCCTATGCAGCCTTCTCG 400  
 AACAGGGCACCCAGCACCTGGCTGACCGCCTATGTGGTCAAGGTCTTCTCTCTGGCCGTCAACCTCATCGCCATCGACTCCCAGGTCTGTGTGGGGCCG 500  
 TGAAGTGGCTGATCATGGAGAAGCAGAAGCCGGATGGTGTCTTCCAGGAGGACGCACCTGTGATACACCAAGAAATGATCGGTGGCCAGCGGAACTCTGT 600  
 CGAGAAGGAACGGGCCCTCACCGCCTTCTGTTCTCATCGCCCTGCAGGAGGCTAGAGAGATTTGCGAGGAGCAAGTCAACAGCCTGGCAGCCAGCATCAAC 700  
 AAATCAAGGGACTTCTTGACCCAATTACATGAATCTGCAGAGACCTACAGTGTGGCCATCGCTGCGTATGCCTGGGCCAGCAGGACAAGCTACGGG 800  
 GAGCATTCTAAACAAATTCCTGAGCAAAGCCAAAGAAAGAAACCGTGGGAGGAGCCGGGTGAGAGGCTTACAACGTGGAGGCCAGTTCTCTACGCCCT 900  
 CCTGGCCCTGCTGCTGCTCAGAGACTTTGATTCGGTGCCTCCGGTTGTGGCTGGCTGAACGAGCAGAGATACTATGGCGGTGGCTACGGCTCGACCCAG 1000  
 GCCACCTTCATGGGTTTCCAGGCTCTGGCCCAATACCAAACCGATGTGCCTGACCACAAGGACTTGAACATGGTGGTGTCCATCCAGCTGCCAGCGCGA 1100  
 GCTCCCCGGTCAAGCACCGCATTGTCTGGGATCCGCCAGCCTCCTGCGGTGAGAAGAGACCAAGGAAAAACAGGGTTTCAGCCTAACAGCTCAAGGGAA 1200  
 AGGCCAAGGCACCTTATCGGTGGTGACAACCTACTTCGCCAAGGTCAAAGGCCAAAGTACCTGCAAGAAGTTTGACCTCAGGGTCAACATTAAGACAGCC 1300  
 CCTGAGACAGTGAAGAAGCCGAGGATGCTAAGAGCACAATGATCCTGGGACTGTACCAGGTACCTGGGAGACGAGGATGCCACCATGTCTATCCTCG 1400  
 ATATATCCATGATGACCGGCTTCGTCCCTGACACAGATGACCTCAACCTGCTGAGCACTGGTGTGGACAGATACATCTCCAAGTATGAACTGGACAAAGC 1500  
 CTTCTCCAACAAGAACACCCTCATCATCTACCTGGACAAGATCTCACACTCCCGGGAAGAATGCCTTGCTTCAAAGTCCACCAGTACTTCAACGTGGGG 1600  
 CTTATCCAGCGGGAGCTGTCAAGGTCTACTCCTACTACAACCTGGAGGAAACCTGCACCCAGTTCTACCACCCGGAGAAAGAGGACGGGATGCTGAGCA 1700  
 AGCTGTGTACAAGGAGATGTGCCGCTGTGCCGAGGAGAAGTCTTATCAGCAGCTGGATGAGAAGATCACCTGAACGACCGGCTGGACAAGGCTTG 1800  
 CGAGCCAGGCTTGGACTATGTGTACAAGACCAAGCTGGTCCAGGTGGAGCGGGCAGATGACTTCGATGAGTATCTAATGGTCGTGGAGAACCACCATCAAG 1900  
 TCAGGCTCCGACGAGGTGCAGGCGGGCAGCCAGCGCGTTTATCAGCCACATCAAGTGCAGAGACGCGCTGAAGCTGAAGGACGGGAAGCACTACCTCA 2000  
 TGTGGGGCTCTCCTCCGACCCTGTGGCGAGAAACCCACACCAGCTACATCATCGGCAAGGACACCTGGGTGGAGTTTGGCCCGAGAAGGAAGAATG 2100  
 CCAAGATGAGGAGAACCAGAAACACTGTGAGGACCTTGGAGCCTTCGCCGAGAGCATGGTGTCTTTGGTGGCCCAACTGA 2200

⊠2 Nucleotide sequence of rabbit C3cDNA

```

70
MNKTVAVRTLDPENLGQGGVQKEEIPSA DISDQVPGTESETKILLQGT PVAQMTEDAIDGERLKH LIVTG
-----R--RE-----D--P--L-----D-----R-----V-A-----P
I-----IH-----K-----VDV-A--L-----D-D--R-I--S--V--A--V-----P
140
SGCGEQNMIAMTHTVIAVHYLDHTEQWDKFSLEKRQEAL ELIKKGYTQQLAFKQPN SAYAFLNRAPSTW
-----G--P-----E--G-----G-----R--S--F--VK-----P
A-----G--P-----E--GI-----S-----N--P-----
180
LTAYVVKVFLAVNLIAIDSQVLCGAVKWLIMEKQKPDGVFQEDAPVIHQEMIGGQRNSVEKERALTA FV
-----L-----L--Nn--Dm-----
-----A-----H-----L-----G-----F--AK-ADVS-----
210
LIALQEARLCEEQVNSLAASINKSRDFLAANYMNLQRPYSVAIAAYAWAQD KLRGAFLNKFLSKAKEK
--S---KDI-----PG--T-AG---E-----S-T---G--L--MGR-K-PL-----TT--D-
-----DI--G-----PG-----AGEYIE-S-----T---G--L-LMN--E EPY-G---NI--DR
350
NRWEEPGQRLYNVEASSYALLALLLRDFDSVPPVVRWLNEQRYYGGGYGSTQATFMGFQALAQYQTDVP
--D--KQ-----T-----Q-K--F-----V-----K-A-
-----D-Q-----T-----K-----V-----
420
DHKDLNMVVS IQLPSRSSPVKHRIVWDS AALLRSEETKENQGFSLTAQGKQG TLSVVITYFAKVKGKVT
--QE--LD--L-----KIT---H-E--S-----E--TV--E-----M-H--A-DQL-
-----D--FH-----ATTF-LL-ENGN-----Q-EA---K---R-----AV-H--L-S--
490
CKKFDLRVNIKTAPETVKKPQDAKSTMI LGHCTRYLGD EDATMSILDISM MTGFVPD TDDLNLLSTGVDR
--N---K-T--P---E-R---N---EI---R--Q-----A-----KQ-AN---
-----S-RP---A---EE--N--F-EI--K---V-----A---K--E--AS---
560
YISKYELMKAFSNKNTLIIYLDKISHSREAC LAFKVHQYFNVGLIQPGAVKVYSY NLEETCTQFYHPEK
-----D--DR-----V--EDD-----E-----A-----S--R-----
-----MN-----E-----TE-D--T-----S-----S--R-----
630
EDGMLSKLCHKEMCRCAEENC FMQQLDEKITLNDRLDKACEPGLDYVYKTKLVQVERADDFDEYLMVVEN
---K-N---RD-L-----I-KS-D-V--EE-----V-----R--K-QLSN-----I-AI-Q
D-----S-----SQ---N--V-----V-----E--INIKLL-----T-TIQQ
700
TIKSGSDEVQAGQPAPFISHIKRDALKLKD GKHYLMWGLSSDPVGEKPN TSYIIGKDTWVEE WPEKEEC
-----V--QRT--P---E---EEK-----FW-----L-----H--ED--
V-----QRK-----N---QK--K-----LW-----H--A---
726
QDEENQKHCEDLGAF AESMVVFGCPN rabbit
-----Q-Q-----T----- human
--QKY--Q--E---T-----Y--- mouse

```

図3 Comparison of amino acid sequence of human and mouse C3 with the amino acid sequence of rabbit C3

【謝辞】

マウスC3 cDNAプローブを供与いただきました野中 勝, 高橋 守信 両先生 (金沢大がん研) に感謝いたします。

野中 勝, 中山 耕造, 柳 大烈, 高橋 守信

金沢大, がん研, 免疫生物部

[はじめに]

マウスの補体第4成分は, C4とS l p (テストステロンに誘導される為Sex-limited protein と呼ばれる) の2つのアイソタイプから成り立ち, それらの遺伝子はヒトと同様にMHC内部に重複して存在している。部分的な配列決定により, これらの2つのアイソタイプ間に高い相同性が認められているが, 溶血活性を持つのはC4のみで, S l p は溶血活性を持たず, またC l s によって分解されないと考えられている。

C4<sup>h</sup>の遺伝子型を示すマウスとC4<sup>l</sup>のそれを示すマウスの間には, C4の血中濃度において10~20倍の差があることが知られている。一方S l p ではテストステロンに誘導されるS l p<sup>l</sup>, constitutiveに発現されるS l p<sup>w7</sup>, 全く発現されないS l p<sup>0</sup>の3つの対立遺伝子型が知られており, H-2のS領域内にC4及びS l pの構造遺伝子のみならず, それらの遺伝子の発現調節部位をも含まれていると考えられている。

以上よりマウスC4とS l pのcDNA及び遺伝子の解析はタンパク質における構造と機能の関係, 進化の問題のみならず, 現在研究が始められたばかりである遺伝子発現の調節機構, 特にステロイドホルモンによる調節機構を理解するうえで重要である。我々はこれらの観点から既にp r o - C4の全構造を決定し発表した(1, 2)。引き続きp r o - S l pの全機構を決定したので報告する。

[方法]

cDNAライブラリーは岡山・バーグ法により, FM系マウス肝mRNAの>28S分画を用いて作成した。すでに得られていたマウスのcDNA(3)をプローブとして, 130万の独立したクローンを含むライブラリーのスクリーニングをおこなった。

遺伝子ライブラリーは, FM系マウス肝DNAを用い, Charon 28をベクターとして作成した。マウスC4及びS l p cDNAをプローブとして100万の独立したクローンを含むライブラリーのスクリーニングを行なった。塩基配列はM13ベクターを用い

て、サンガーのジデオキシ法により決定した。

[結果と考察]

得られた S l p c D N A クロンのうち最長のものは 5. 2 k b のインサートを有し p r o - S l p の N 末端から 8 0 アミノ酸に相当する部分を欠如していた ( 図 1 ) 。この欠如している部分の情報を得るため、5' 側をプローブとして遺伝子クローン ( 図 2 ) のサザンブロッティングをおこない、その後既に決定したマウス C 4 とのホモロジーを用いてエクソン及びイントロンの同定を行なった。c D N A の 5' 末端は 3 番目のエクソン中であつた。これらより p r o - S l p の全アミノ酸をコードする塩基配列を決定した。

この塩基配列と、我々が既に報告したマウス C 4 ( 1, 2 ) のそれとを比較したところ、P r o - S l p は 1 7 1 6 アミノ酸 ( 5 1 4 8 ヌクレオチド ) からなり、 $\alpha$  鎖に 3 アミノ酸からなる deletion が認められた。しかしそれ以外の deletion 及び insertion は認められず、アミノ酸で 9 4 %、ヌクレオチドで 9 6 % の高い相同性が認められた ( 表 1 ) 。

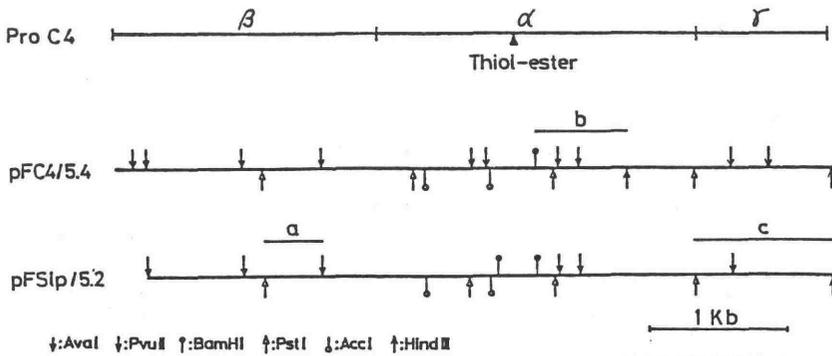


図 1 得られたマウス C 4 及び S l p c D N A の制限酵素地図

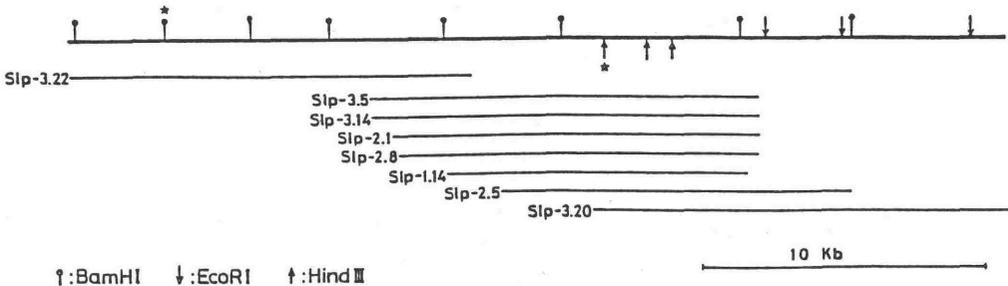


図 2 得られた S l p 遺伝子クローンとその制限酵素地図

Comparison	% homology	
	Nucleotide	Amino acid
Human C4A vs. Mouse C4	79	76
Human C4A vs. S1p	78	74
Mouse C4 vs. S1p	96	94

表1 マウスC4, S1p及びヒトC4A間のホモロジーの比較

システイン残基の位置および数はマウスC4のそれと完全に一致していた。また,  $\beta$ - $\alpha$ 及び $\alpha$ - $\gamma$  junction, チオールエステル部位もマウスC4と同じアミノ酸配列であった。マウスC4の場合N-グリコシド結合が可能な部位は $\beta$ 鎖に1ヶ所,  $\alpha$ 鎖に3ヶ所であるが, S1pにおいて $\alpha$ 鎖にさらに2ヶ所認められた。S1pはC1sにより切断されないとされているが図3に矢印で示した切断部位のArgはS1pにも保存されていた。しかしながらその下流では, 負電荷を持つ3アミノ酸の欠損を含む著しい相異が認められ, このことが立体構造に変化を与えC1s抵抗性になっている可能性が示唆された。C4dの切断部位(図4矢印)はマウスC4では, Arg-Thrであるのに対し, S1pではGln-Metとなっており, C4dと相同なフラグメントはS1pからは生じないことが示された。

C4:	Leu Ser Cys Cys Lys Phe Ala Glu Asp	Leu Arg Arg Asn Gln Thr Arg Ser Gln Ala His		
	TTG TCC TGT TGC AAG TTT GCT GAG GAC	CTT CGC AGG AAC CAG ACC AGG AGC CAG GCA CAC		
S1p:	TTG TCC TGT TGC AAG TTT GCT GAG GAC	CTT CGC AGG AAC CAG ACC AGG AGC CAG GCA CAC		
	Leu Ser Cys Cys Lys Phe Ala Glu Asp	Leu Arg Arg Asn Gln Thr Arg Ser Gln Ala His		
	↓			
C4:	Leu Ala Arg Asn Asn His Asn Met	Leu Gln Glu Glu Asp	Leu Ile Asp	Glu Asp Asp Ile
	CTT GCC CGA AAC AAC CAC AAC ATG	CTG CAG GAG GAA GAC	TTG ATA GAT	GAA GAC GAC ATT
S1p:	CTT GCC CGA AAG GTC CGG GAC ATG	GTG AAT - - -	TTG ATA GAG	GAA GAT GAC ATT
	Leu Ala Arg Lys Val Arg Asp Met	Val Asn - - -	Leu Ile Glu	Glu Asp Asp Ile
C4:	Leu Val Arg Thr Ser Phe Pro	Glu Asn Trp Leu Trp Arg Val	Glu Pro Val Asp Ser Ser	
	CTT GTG CGC ACC TCC TTC CCA	GAG AAC TGG CTC TGG AGA GTG GAA	CCT GTA GAC AGC TCC	
S1p:	CTT GTG CGC ACC TCC TTC CCA	GAC AAC TGG CTC TGG AGA GTG GAA	CCT GTA GAC AGC TCC	
	Leu Val Arg Thr Ser Phe Pro	Asn Asn Trp Leu Trp Arg Val	Glu Pro Val Asp Ser Ser	

図3 C1sによる切断部位の配列

	↓		
C4:	Leu Asp Pro Leu Asn Asn Leu Gly	Arg Thr	Leu Glu Ile Pro Gly Ser Ser Asp Pro Asn
	CTC GAC CCC CTA AAT AAC CTG GGT	CGG ACT	TTG GAG ATT CCT GGC AGC TCA GAT CCC AAC
S1p:	CTC GAC CCC CTA AAT AAC CTA GGT	CAG ATG	TTG GAG ATA CCT GGC AGC TCG GAT CCC AAC
	Leu Asp Pro Leu Asn Asn Leu Gly	Gln Met	Leu Glu Ile Pro Gly Ser Ser Asp Pro Asn

図4 C4d切断部位の配列

Beltraが報告したヒトC4Aと比較したところ、マウスC4とSlpではそれぞれアミノ酸で76%、74%またヌクレオチドで79%、78%とほぼ等しい相同性が認められた(表I)。前述のようにマウスC4とSlpとの相同性はこの値よりはるかに高いことから、ヒトとマウスのC4遺伝子の重複は両種の分化以後に独立に起こったか、分化以前に起った重複が協調進化をしているのかのいずれかであると考えられる。

既に発表されているH-2<sup>W7</sup>マウスのC4及びSlpの部分配列と比較したところ、Slpでは600b中僅か1ヌクレオチドのみにしか相異が見られず、C4より保存の程度が高いことがわかった。この結果はSlpは、活性を持たないとされており、Selective pressure から解放されていると考えられることに反していると思われる。

(文献)

- 1) 野中ら, (1984) 日本免疫学会総会
- 2) Nonaka M. et al. (1985) Submitted to J. B. C.
- 3) Nonaka M. et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6822
- 4) Nonaka M. et al. (1985) Immunol. Rev. : in press

## 31

# マウス補体制御因子 CR-1 構造遺伝子座と H 因子構造遺伝子座の連関

坂井俊之助<sup>1)</sup>、佐藤 博<sup>2)</sup>、海藤敏雄<sup>1)</sup>、高橋守信<sup>1)</sup>  
金沢大、がん研、免疫生物<sup>1)</sup>、ウイルス<sup>2)</sup>

〔目的〕マウス補体制御系蛋白 H 因子の構造遺伝子座は、マウス第 2 染色体上の Hc 遺伝子座（C5 産生調節遺伝子座）から約 16 センチモルガン単位動原体とは逆位置に存在し、Hc 遺伝子座と、 $\beta_2$ M 遺伝子座（ $\beta_2$  ミクログロブリン遺伝子座）の中間に位置する。H 因子（分子量約 160K）は液相で C3b に結合し、I 因子による C3b の分解過程で co-factor として作用する。また C3b レセプター（CR-1）は、細胞膜上に存在し、分子量は約 200K で、H 因子同様一本鎖蛋白でその作用機構は H 因子に類似する。補体系蛋白の遺伝的特徴の 1 つは、類似した作用特性を有する構成成分が各々遺伝子集合体を形成して存在することで、MHC に連関する C2、C4、B 因子の構造遺伝子座の存在様式は 1 つの典型的例である。本研究は、1) C3 コンベルターゼの構成成分の成立とその制御系蛋白の成立が遺伝的、進化的に類似した様式で成立した可能性を明らかにすることを目的とした。

### 〔方法と結果〕

1) H 因子の構造遺伝子座の同定と、染色体上の位置：マウス H 因子のアロタイプを 3 つの異なった方法で証明した。多数の近交系マウスの H 因子の電気泳動法は、近交系 STR、および MoA のそれに比べ陽極寄りに早く泳動され、両アロタイプの F<sub>1</sub> では、両親のいずれの H 因子とも発現される。また両アロタイプが一次構造上の相違に基づくことは、二次元微量ペプチドマッピング法により、両アロタイプ間に 2～3 個のペプチドの相違があること、また精製した H 因子を抗原とし、H 因子アロタイプが異なる BALB/c と STR で相互免疫することによって、アロ抗 H 因子血清が作製出来たことから証明された（図 1）。H 因子構造遺伝子座の位置を決定するため、BALB/c（H・1）と MoA（H・2）で交配実験を行い、既知の 14 の遺伝的マーカーと H 因子アロタイプとの連関をしらべた結果第 2 染色体上の Hc から 16 センチモルガン単位動原体とは逆位置に H 因子遺伝子座が存在した。以後の補体系制御蛋白群の遺伝的研究のため、H・2 アロタイプに関する BALB/c マウスを遺伝的背景にもつ congenic マウス BALB-H・2 を作出した。

### 2) H 因子と CR-1 構造遺伝子座の連関

作用機構、分子量、および分子構造の類似性から H 遺伝子座と CR-1 遺伝子座が近接して存在すると想定し、BALB/c マウスおよび BALB-H・2 マウスの脾細胞より CR-1 を精製した。精製 BALB/c マウス C3 より C3b を作製し、Sephrose CL-4B ゲルを用いてアフィニティカラムを作製した。アフィニティカラムに、脾細胞の可溶化透析液（10mM リン酸緩

衝液、50mM EACA、10mM EDTA、1mM エラスターゼインヒビター、1mM PMSF、0.5% NP-40 を含む液中で可溶化) を apply し、NP-40 を含まない上記 PBS でカラムを良く洗った後に、10mM リン酸緩衝液 (100mM NaCl) で CR-1 を含む分画をえた。精製 CR-1 で腹腔マクロファージを前処理すると、腹腔マクロファージの EAC ロゼット形成阻害作用が CR-1 単独で認められ、CR-1 と I 因子の代用として血清を混合して用いると、より効果的にロゼット形成阻害が認められた (図 2)。また精製 CR-1 の分子量は 195K であった。精製 CR-1 を用いてウサギ抗マウス CR-1 特異抗血清を作製し、IgG 抗体をえた。得られた抗血清が特異的であることは、IgG 抗体およびその Fab 抗体は、EAC ロゼット形成を阻害すること、BALB/c および BALB-H・2 の脾細胞可溶化液中の分子量 195K の蛋白とのみ反応すること、胸腺、赤血球、BALB/c マウス形質細胞腫 MOPC 31 C の細胞可溶化液には反応する蛋白が含まれなかったことから明らかである。次に CR-1 のアロタイプの検出を多数例の近交系マウスで行った。マウス脾細胞を lactoperoxidase 法で  $^{125}\text{I}$  で標識後、可溶化し、等電点電気泳動を行った。0.5% 濃度のアガロース液に LKB 社アンフオライン PH 3.5-9.0 を 3% で、NP-40 を 0.05% 濃度で混合し、4°C 条件下で泳動した。図 3 に示す様に BALB/c などの多数の近交系の CR-1 の P・I 値は、7.6-7.9 であったが、BALB-H・2 および STR のそれは P・I 値 7.8-8.1 に泳動された。BALB/c と BALB-H・2 の F<sub>1</sub> 仔では両親の CR-1 アロタイプが共に発現された。以上の結果は、CR-1 アロタイプをコードする遺伝子の遺伝子座は、H 遺伝子座近傍に存在することを示す。この結果は F<sub>1</sub> 仔を BALB/c に戻し交配した仔 25 匹中 CR-1・1 (BALB/c 型) が 11 例で全例 H・1 型で、14 匹は CR-1・½ 型で全例 H・½ 型で、CR-1 遺伝子座と H 遺伝子座間に染色体交叉例が存在しなかったことより確実である。

次に CR-1 アロタイプの相違が一次構造上の変化に基づくかを検討するため、BALB/c マウスに BALB-H・2 より精製した CR-1 (CR-1・2) を免疫し、CR-1・2 に対するモノクローナル抗体の作出を試みた。単クローン抗体の検出は、CR-1・2 を用いた ELISA 法で行い、陽性クローンを BALB/c nu/nu の腹腔に移植し、腹水から単クローン抗体の精製を行った。得られた単クローン抗体のうち MCR・2 と命名したクローンは、BALB-H・2 の腹腔マクロファージの EAC ロゼット形成を阻害しなかったが、MCR・7 と命名したクローンは効果的に EAC ロゼット形成を阻害した (図 4)。しかし両単クローン抗体とも BALB-H・2 の脾細胞中の 195K の蛋白と反応した (図 5)。

〔結論〕 マウス CR-1 の構造遺伝子座は H 因子構造遺伝子座に近接して存在し、CR-1 アロタイプ間には少なくとも 2ヶ所に抗原決定基の異なる部位が、アロ単クローン抗体の作製によって証明された。ヒトでは H 遺伝子座、C4bp 遺伝子座、CR-1 遺伝子座が遺伝子集合体を形成して存在することが、ごく最近発見され、本研究は、C3 コンベルターゼの構成成分と同様、制御系蛋白群の遺伝子座もヒトとマウスで極めて類似した遺伝子配列をと

3) り、これら制御系蛋白が遺伝子重複によって生じた可能性を示すものである。

Fig.1

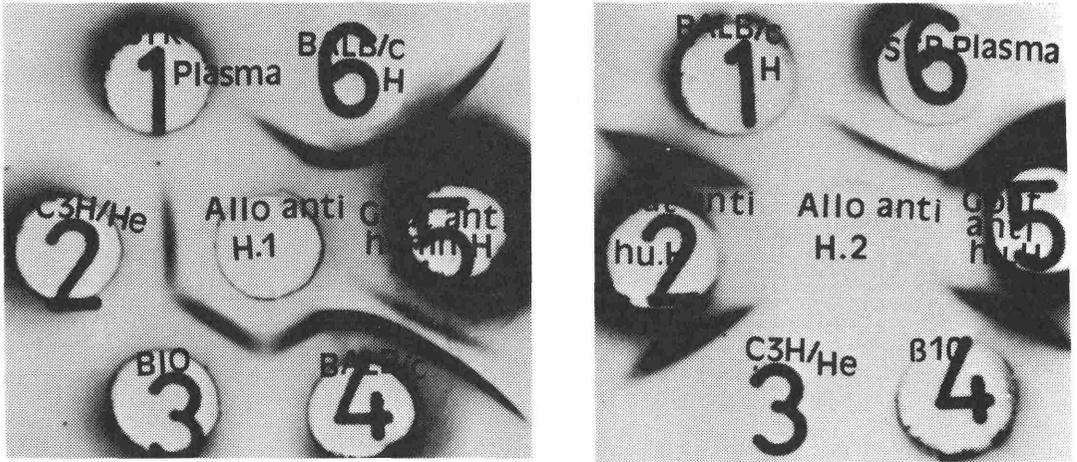
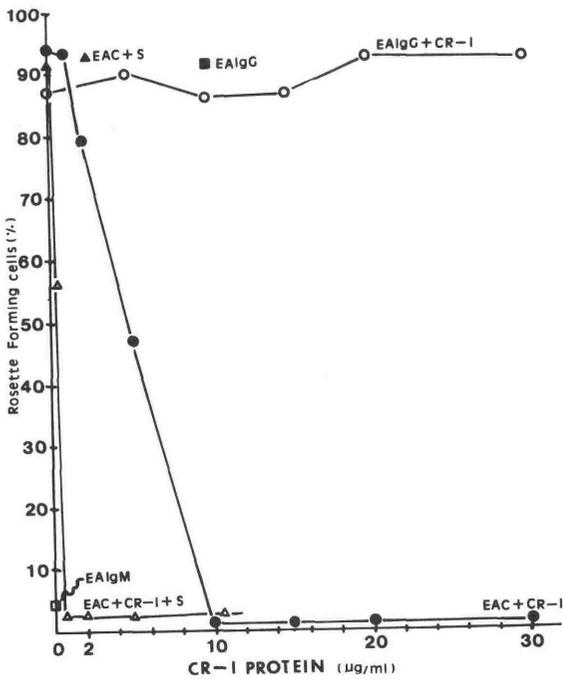
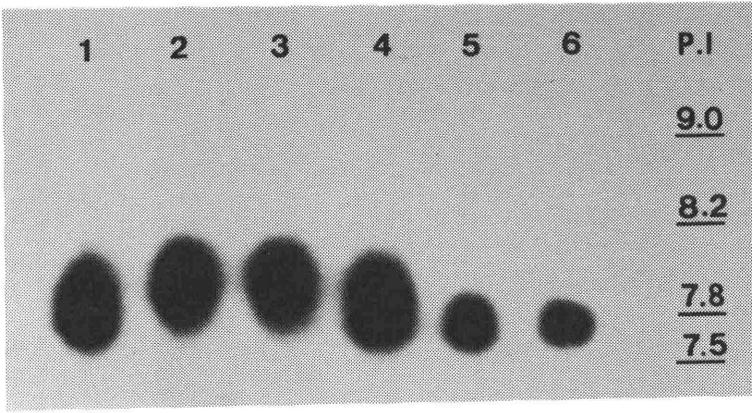


Fig 2

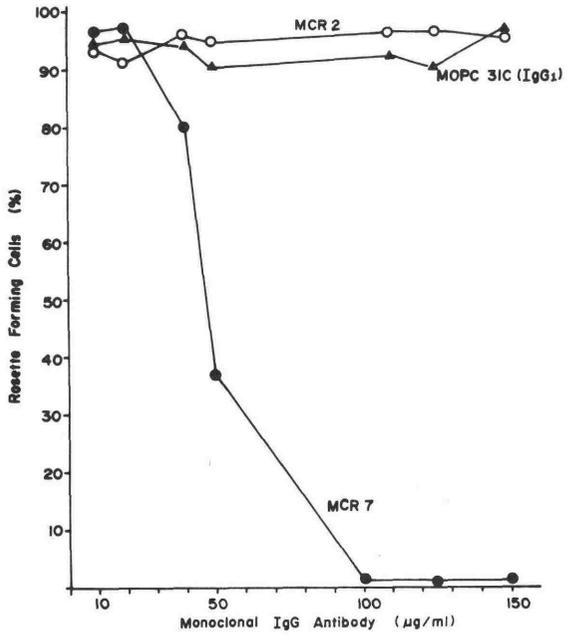


4

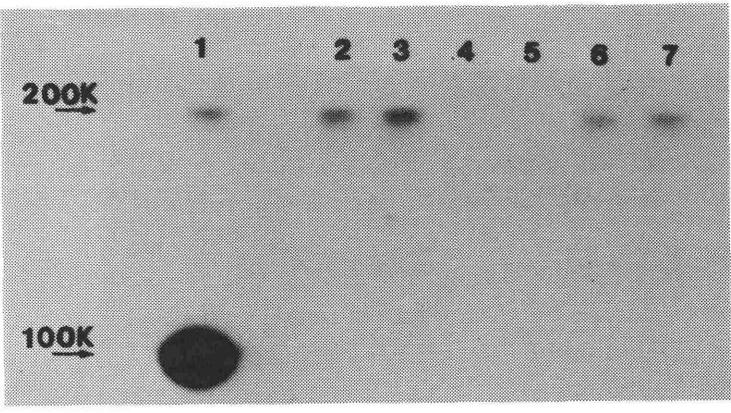


**Fig 3**  
 1,4: (BALB/c x  
 BALB-H.2)F1.  
 2,3: BALB-H.2  
 5,6: BALB/c

**Fig 4**  
 Inhibitory effect of  
 monoclonal antibody on  
 rosette forming activity  
 of macrophages of  
 BALB-H.2.



**Fi.5**  
 2 BALB-H.2 + MCR7.  
 3 BALB-H.2 + MCR2  
 4 BALB/c + MCR7.  
 5 BALB/c + MCR2.



## 献血者集団より発見された C5、C6 欠損と C9 欠損の家系調査について。

福森 泰雄, 吉村 敬次, 大軒 子郎, 山口 英夫, 大久保 康人  
 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

(はじめに)

われわれは、過去3回の補体シンポジウムにおいて、大阪地区の献血者集団を対象に補体欠損スクリーニングを行い、その成果を報告してきた。その概要は、献血者約10万人をSGVB溶血法を用いて調査し、C5欠損(疑い) 2名、C6欠損 2名、C7欠損 5名、C8 $\alpha$ - $\gamma$ 欠損 2名、C9欠損 100名を見出したことである。今回は、前回からのまとめとして、前回報告したC5欠損(疑い) 2名について家系調査による確認を行い、またC6欠損者の家系調査において一家系内より発端者の妹にC6欠損が発見されたので報告する。さらに、C9欠損者の頻度の高い2家系の家系調査を行ったので報告する。

(材料と方法)

血清 補体欠損スクリーニング及びその精査には、採血後24時間経過した血清を用いた。そして最終的な補体欠損の確認には本人より直接採血した血清を用いた。またその保存は $-70^{\circ}\text{C}$ で行った。

方法 献血者の中から補体欠損症を発見する方法は、まず第一段階として、バッファーとしてSGVBを用いるとC9欠損者の血清補体価が著しく低値を示すという北村らによって報告された事実を利用し、マイクロタイタープレートを用いて行った。すなわち、U型プレートの各ウエルに被検血清 $10\mu\text{l}$ 、SGVB $50\mu\text{l}$ 、SGVB浮遊EA ( $5 \times 10^8/\text{ml}$ )  $25\mu\text{l}$  を加えて混合、 $37^{\circ}\text{C}$ 、20分間静置後、遠心して溶血の有無を調べた。この方法で不溶血を示した血清について、第二段階として、C3、C4、C9の各補体のタンパク量をSRID法で測定し、さらに、ウサギ血球溶血試験、及びCH50価、C4活性(C4欠損モルモット血清を用いる方法)の測定を行い、これらの検査結果からCold Activationによる不溶血血清を除外し、C9欠損及びその他の補体成分欠損症を疑う検体を選び出し、各補体成分の活性とタンパクの定量を行い、補体成分欠損症の仮判定を行った。以上の検体に対しては、本人の再来を依頼し採血直後の血清を用いて上記と同様の検査を行い、補体成分欠損症の確認を行った。また同時に家系調査を行う様努めた。

(結果)

C5欠損 T. I. (女 39歳 主婦) 本例の血清補体価は 9.8、C5タンパク検出不能、C5活性は $430\text{SFU}/\text{ml}$  (0.1% of NHS) で補体価が比較的高く、従来報告と比較して、C5欠損症であることに疑いがもたれていた。今回、発端者の両親と兄弟を調査することができ、図1に示す結果を得た。すなわち、両親及び兄弟の一人はC5のタンパク量、活性ともに正常血清の約半量で、ヘテロ接合体と考えられた。こ

のことからT. I. は遺伝性のC5欠損症であると結論された。

N. K. (男 32歳 教師) は補体価 19.8、C5タンパク検出不能、C5活性 12000 SFU/ml (2.7% of NHS) であった。その家族は小家族であり、しかも発端者の兄のみしか調査できなかった。兄は、C5活性 51.6% タンパク量 45%と、正常の半量のヘテロ接合体らしく、本例も遺伝性のC5欠損症である可能性が強い。さらに、N. K. は、その後行った、補体欠損スクリーニングの中で、再び不溶血血清として捉えられており、先天性のC5欠損症であることはまちがいないであろう。さらに確認を行うにはその

子供の調査を待たねばならない。以上のように、前回報告した2例のC5欠損(疑い)者はいずれも家系調査の結果から遺伝性のC5欠損症であると考えられる。

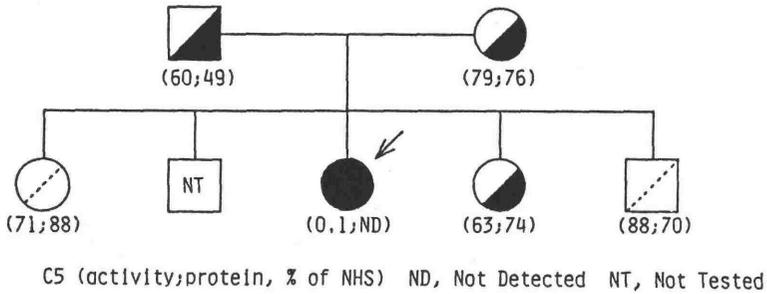


図1. T. I. (C5欠損) の家系図。

C6欠損 前回報告したC6欠損者 M. N. (男 31歳 会社員)、Y. N (女 36歳 主婦) はいずれも、家系調査を行っており、その結果より遺伝性のC6欠損症であると判定された。今回、Y. N. 家系についてより広範な調査を実施することができたのでその結果を示す(図2)。これより両親はヘテロ接合体、発端者の妹はC6完全欠損

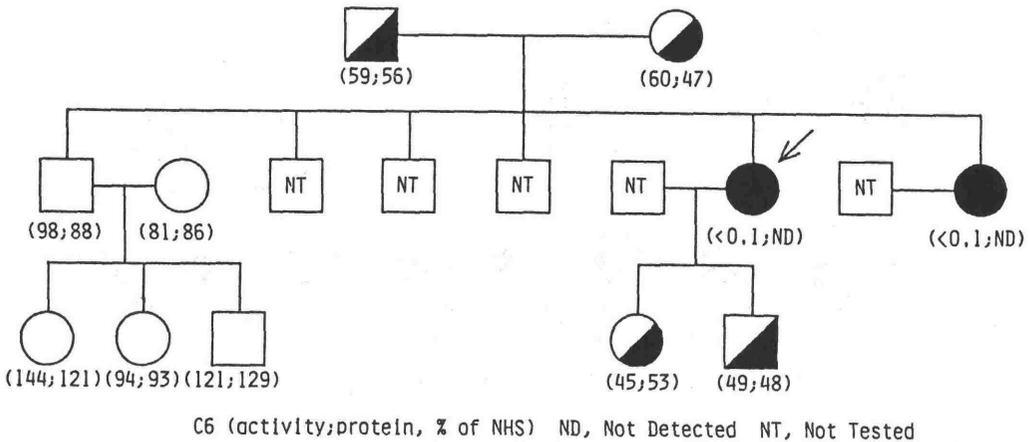
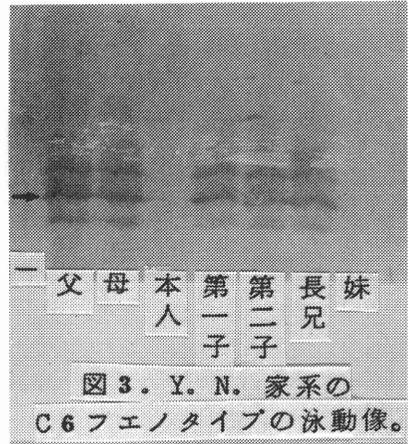


図2. Y. N. (C6欠損) の家系図。

であることが見出された。そしてこの妹も姉同様健康であり、特筆すべき既往歴はない。また長兄及びその子供は正常であった。より詳細な検討のため、さらにC6の多型性を調

査した。方法は、徳永らによって報告されているアガロース等電点電気泳動 (pH 5-8) とニトロセルロース膜を用いたウエスタン、ブロットイング法によった。図3にその泳動像を示す。Y. N. の両親はいずれもC6のフェノタイプはC6Bであった。それを基に各人のゲノタイプを決めると (但し欠損遺伝子をQ0と記す)、両親は (C6B, Q0)、長兄は (C6B, C6B)、発端者及びその妹は (Q0, Q0)、発端者の子供は二人とも (C6B, Q0) であると判定された。



**C9欠損** C9欠損家系については第19回、第20回の補体シンポジウムでも報告しているが、今回、比較的大きな家族構成でかつC9欠損者の頻度の高い家系を調査したので報告する。

**K. U. 家系。** 発端者は4年前より十二指腸かいようで服薬中であるが、それ以外に既往歴はない。また両親に血縁関係はない。その結果を図4Aに示す。発端者の兄、妹いずれもC9欠損であったが2名とも健康であり特記すべき既往歴はなかった。長兄及び妹の子供がすべてヘテロ接合体であったので、長兄及び妹の配偶者は、未調査であるが、どちらも正常と考えられた。

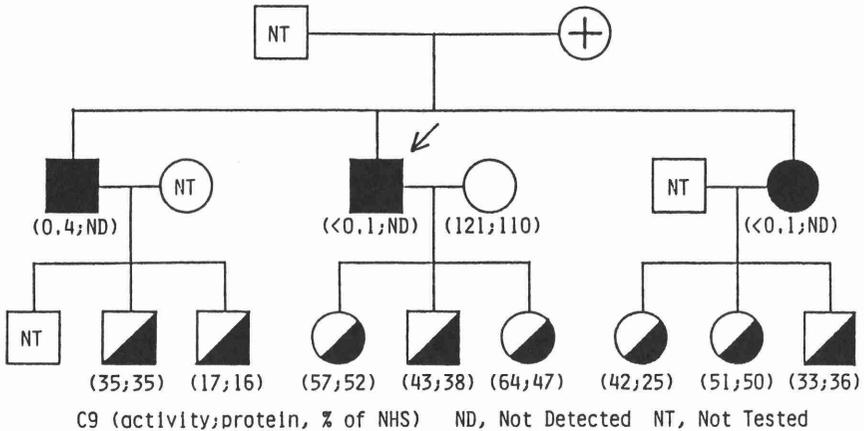


図4A. K. U. (C9欠損)の家系図。

**K. K. 家系。** 高知県の山村出身、過去においてその親族内で比較的高い頻度で血族結婚が行われたと聞いている。但し、K. K. の両親はいとこ婚ではなく、血縁関係はあるらしいが、はっきりしない。その家系図を図4Bに示す。発端者の兄弟は二女を除いてすべて調査しており、8人兄弟中5人がC9完全欠損であり残り2人がヘテロ接合体であった。その結果から、発端者の両親は、長兄夫妻と同様なC9欠損のホモとヘテロ同志の結

婚であると考えられる。なお発端者を含めC9欠損の5名は全員健康であった。とにかく、K. K. 家系の結果から、同一地域内での血族婚の繰り返しがこのように高い頻度のC9欠損者を生んだと考えられる。そして、この2家系のC9欠損の遺伝形式は従来の報告どおり常染色体性の共優性遺伝に合致している。

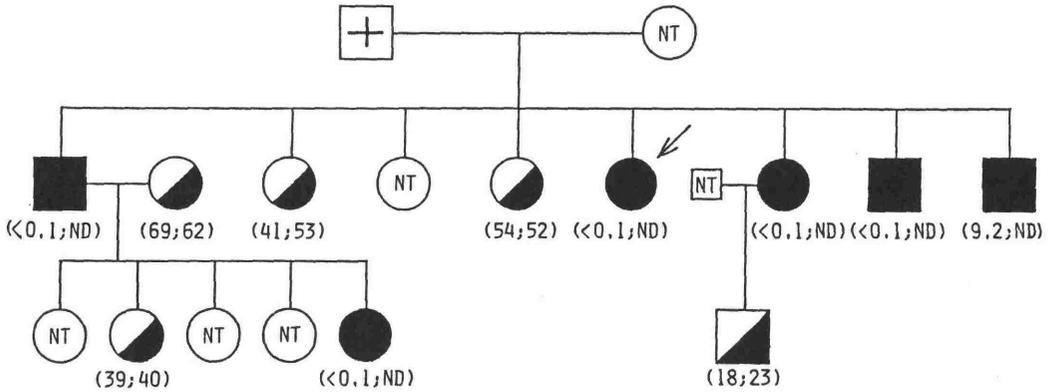


図 4 B. K. K. (C9 欠損) の家系図。

(まとめ)

われわれは、過去3年間の補体シンポジウムで大阪の献血者約10万人の中から、C5欠損(疑い)2名、C6欠損2名、C7欠損5名、C8 $\alpha$ - $\gamma$ 欠損2名、C9欠損100名を見出したことを報告した。今回、前回報告したC5欠損(疑い)2名の家系調査を行い、それらが遺伝性のC5欠損であることに確信を持った。このことより、従来の報告とは異なる比較的、補体価やC5活性の高いC5欠損症のあることが明らかになった。また、C6欠損者の一家系において発端者の妹にC6完全欠損を見出したことは、このC6欠損症の遺伝性がよりはっきりしたといえる。さらにこの家族の構成員が正常かヘテロ接合体かの判定をより確実にするためウエスタン、プロットィング法によるC6多型の調査を試みた。しかし、Y. N. 家系では両親のフェノタイプが同一であったため、活性及びタンパク量の値によりホモ接合体かヘテロ接合体かを判定した。またこの調査結果より、C6欠損者は正常なC6タンパクと抗原性を同じにする他のタンパクは産生していないことがわかった。最後に、C9欠損者頻度の高い2家系の発見は我が国のC9欠損者頻度の高さを裏づけるものであった。

小嶋 和英<sup>1)</sup>、巽 典之<sup>1)</sup>、丹羽 充<sup>2)</sup>、北村 肇<sup>3)</sup>

永木 和義<sup>3)</sup>、多田 正義<sup>4)</sup>

大阪市立大学医学部、臨床検査医学教室<sup>1)</sup>

大阪市立大学医学部、細菌学教室<sup>2)</sup>

大阪府立成人病センター、研究所第6部<sup>3)</sup>

大阪府立病院、HLA研究室<sup>4)</sup>

#### 〔はじめに〕

C7単独欠損症は諸外国で約10例報告され、わが国では献血者集団より発見された5症例と、流行性脳脊髄膜炎に罹患した1例の合計6例が報告されている。今回、われわれはSLECSYSTEMIC LUPUS ERYTHMATOSUS)の診断を受けた症例においてC7単独欠損症を経験し、遺伝学的、免疫学的、細菌学的に若干の検討を行ったので報告する。

#### 〔症例〕

症例は40才女性。主訴：両手指関節痛、両下腿腫張、熱発、顔面浮腫。既往歴；特記すべきことなし。家族歴；姉が強皮症の診断を受け他施設にて加療中、両親は血族結婚（4親等）である。現病歴；昭和58年6月21日より38℃台の熱発、顔面浮腫、両手指関節痛が出現し、近医受診し消炎鎮痛剤の投与を受け症状改善。同年10月28日より同様症状出現し当院入院となる。入院時；両手指腫張、顔面浮腫、ほほの発赤、下腿腫張、体温37.5℃、左右顎下、左小指部にリンパ節腫張を認める。入院時検査成績；末梢血液において、白血球数3300/mm<sup>3</sup>、リンパ球1350/mm<sup>3</sup>と軽度低下、LE細胞陽性。白血球分類、出血凝固検査には異常を認めなかった。他の生化学諸検査においても異常はなかった。

#### 〔免疫学的検査〕

抗甲状腺抗体；25600倍、抗マイクロゾーム抗体；1638400倍、抗核抗体；640倍、抗RNP抗体；256倍、RNA<sub>SE</sub>感受性；1638400倍、RNA<sub>SE</sub>抵抗性；40倍、DsIgG；2u/ml、SsIgG；19u/ml、RAHA；1280倍、CH50；2.5u/ml以下であった。上述の所見および検査成績より患者をSLEと診断した。またCH50が2.5u/mlであったため補体各成分の活性、蛋白量の測定を行ない表1に示した。C7は活性、蛋白質ともに検出不能であり、C7完全欠損症と診断した。

#### 〔遺伝学的検索〕

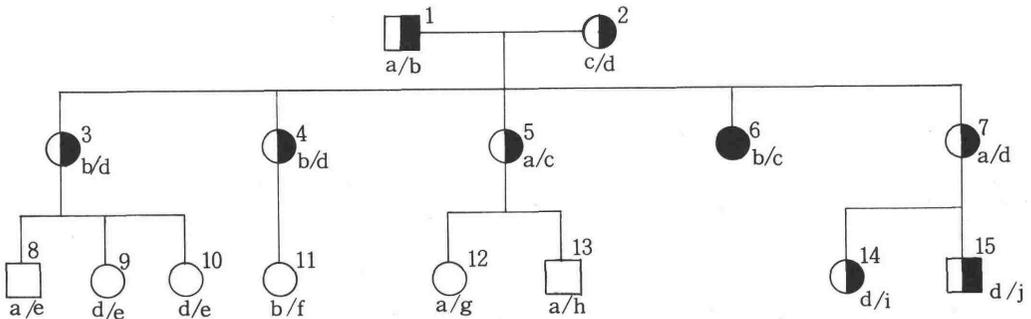
患者の両親、姉妹、甥、姪のC7活性と蛋白量の測定ならびにHLA系の検査を行った。(表2と図1) C7活性と蛋白量が正常の約半分であるヘテロ接合体の者が、両親、すべての

Table 1. Complement profile of the Pt.

	Hemolytic Activities		Protein Concentrations	
	PTS*(%NHS)	NHS*	Pt.	Normal Range
Total Complement (CH50)	○	42.7		
C 1	145,500 (100.3)	145,000	C 1q (%)	100
C 4	57,600 (130.9)	44,000	C 4 (mg/dl)	30.6 28.6
C 2	1,147 (125.8)	912	C 3 (mg/dl)	73.5 60
C 3	57,000 (131.9)	43,200	C 5 (%)	108.8
C 5	258,000 (107.9)	239,000	C 1-INA (%)	104.4
C 6	15,200 ( 90.5)	16,800	B (%)	77.5
C 7	not detected	15,600		
C 8	33,000 ( 73.3)	45,000		
C 9	34,800 (145 )	24,000		

⊗ NHS = normal human serum. \* PTS = Patient serum.

Figure 1. Family pedigree of the C7D Patient.



○, □; normal C7, ●, ■; heterozygous for C7D

●; homozygous for C7D = Patient

HLA Haplotype

- |   |   |
|---|---|
| a : A <sub>1</sub> B <sub>37</sub> Cw <sub>6</sub> DR-                      | b : AW <sub>24</sub> BW <sub>54</sub> C-DR <sub>4</sub>               |
| c : AW <sub>33</sub> BW <sub>44</sub> C-DRw <sub>3</sub>                    | d : A <sub>2</sub> BW <sub>51</sub> C-DR <sub>5</sub>                 |
| e : (A <sub>2</sub> or A-) TS <sub>1</sub> Cw <sub>3</sub> DRw <sub>9</sub> | f : A <sub>26</sub> BW <sub>51</sub> C-DR-                            |
| g : A <sub>26</sub> BW <sub>35</sub> Cw <sub>3</sub> DR-                    | h : AW <sub>24</sub> BW <sub>55</sub> Cw <sub>1</sub> DR <sub>5</sub> |
| i : AW <sub>33</sub> BW <sub>44</sub> C-DR-                                 | j : AW <sub>24</sub> BW <sub>55</sub> Cw <sub>1</sub> DR <sub>2</sub> |

姉妹、甥1人、姪1人の計8名に発見され、遺伝形式は常染色体共性優性遺伝と考えられた。図1に示す様にHLAの検索も行なったが、HLA座と遺伝性C7欠損症との間には何ら関連性は認められなかった。

Table 2. Complement profil of the family

(families )	CH50	C7 hemolytic activity	C7 protein concentration
No. 1	37.8 88.5%	7,730 49.6%	41.2 (%)
2	36.3 85.0%	5,400 34.6%	30.0
3	35.3 82.7%	6,560 42.1%	25.0
4	34.4 80.6%	6,060 38.8%	33.8
5	31.1 72.8%	5,880 37.7%	32.5
7	31.8 74.5%	6,100 39.1%	33.8
8	31.8 74.5%	14,000 89.7%	67.5
9	33.1 77.5%	14,000 89.7%	91.3
10	35.3 82.7%	11,400 73.1%	85.0
11	40.3 94.4%	18,900 119.2%	140.0
12	34.6 81.0%	7,600 48.7%	61.3
13	32.0 74.9%	13,100 84.0%	82.5
14	34.6 81.0%	8,080 51.8%	33.8
15	32.1 75.2%	7,070 49.8%	32.5
N. H. S	42.7	15,600 100%	100

〔細菌学的検査〕

患者血清を用い Endotoxin 不活化作用ならびに E coli に対する殺菌作用を検索した。Endotoxin不活化作用に関しては、30分間のインキュベーションタイムの後に測定した結果正常人血清に対し有意の差は見られなかった。E coli に対する殺菌作用は血清添加前の菌体数に対し30分間インキュベーション後の菌体数の%で比較すると、正常人 0.18%に比して患者では 54.9%と有意の差が見られた。この実験により患者血清は E coli に対する殺菌作用の低下が認められた。

〔C7添加実験〕

C7添加による容血を確認するために、EA ( $5 \times 10^8/ml$ ) + GVB 2.6 ml + 患者血清にC7添加し37°C60分間インキュベーションの後吸光度(OD)により比較実験を行なった。Controlとして、EA + Serum + GVBを用い、比較のためにC6, C8, C9の添加実験も施行した。結果、ControlのOD=0.005, Control+C6=0.005, Control+C7=0.113,

Control + C 8 = 0.008, Control + C 9 = 0.005 で, C 7 添加時のみ容血が認められた。

〔結論〕

S L E の診断を受けた患者において C 7 完全欠損症が発見された。家族調査において、遺伝形式は常染色体性共性優位遺伝であることが判明したが、H L A 座との関連は認められなかった。細菌学的に E coli に対する殺菌作用の低下が認められたが、患者の既応に易感染性を示すところはなく非常に興味深いと思われる。

鈴木好夫・内田順子・二瓶宏・三村信英

杉本正毅(※)・西海正彦(※)・佐藤昭雄(※)

虎の門病院腎センター

国立東京第二病院内科(※)

〔はじめに〕

C9欠損症は稲井らによって第15回本シンポジウム(1978)において世界第1例が発表され、その後の報告とあわせて本邦に比較的多い補体因子欠損症として知られる。C9欠損症は一般に健常な生活をおくっているとされるが、今回我々は、微熱とSicca Syndromeを呈する低補体価の症例がC9欠損症であることが判明したので報告する。

〔症例〕

発端者はS. S.。昭和9年11月23日生まれ。やせた小柄な女性。主婦。

<主訴> 微熱、体重減少、関節痛、目・口の乾燥症状

<既応歴> 日光過敏症、脱毛

<現病歴>

昭和58年2月3日、心窩部痛にて国立東京第二病院初診。上部消化管レントゲン造影にて特変なく胃炎の診断にて通院・加療していたが、37.4℃～38℃の微熱あり。体重も1年に10kgの減少し、その精査のため同年4月8日入院した。

<入院後の経過>

入院時よりの微熱はその後も続いており体重も40kgより増えない。消化器系検査にて、胃潰瘍、軽度の膵機能異常あり。易再発性膀胱炎あり。唾液、涙の出にくさを指摘された。

検査結果：

入院時より頸部リンパ節、鼠頸部リンパ節の腫大あり、2回の生検の結果とも悪性の所見は得られず Dermatopathic Lymphadenitis と組織診断された。

WBC 3,600 (好中球47%、リンパ球47%、単球2%、好酸球3%、好塩基球1%、異常細胞なし)

RBC 350万、ヘモグロビン 10.7g/dl、ヘマトク

リット 31.6%、ALP 5.7、GOT 29、GPT 53、LDH 32.6、LAP 202、 $\gamma$ -GTP 19、総ビリルビン 0.2 (直値 0.1)、BUN 13.1、クレアチニン 0.6、総蛋白 6.8g/dl (alb. 66.7%、アルファ1 2.7%、アルファ2 7.2%、ベータ 9.2%、ガンマ 14.2%) IgG 1307mg/dl、IgA 248、IgM 246、CH50 5~18u/ml、C3 72mg/dl、C4 47mg/dl、CRP (-)、血沈 10~30mm (1時間)、尿蛋白 時に (+)、沈査RBC (-)、沈査WBC 10-37/HPF、経静脈的腎盂造影 異常なし、LE細胞、DNA抗体 とも1回のみ陽性。その他 ウィルス抗体、自己抗体、骨髓穿刺検査等に異常を認めない。

血中免疫複合体 (IC) 陰性 Shirmer test 陽性、Rose-bengal 試験 (3+)、蛍光試験 (3+)、ガム試験 11 cc /10分。耳下腺造影 正常、口唇腺生検 正常、唾液腺シンチグラム 正常

Complement profiles of patient SS

hemolytic assay

CH50	15 (38%N)	u/ml
C1INH	4,224 (150%N)	SFU/ml
C1	20,000 (36%N)	SFU/ml
C4	77,000 (64%N)	SFU/ml
C2	500 (79%N)	SFU/ml
C3	31,000 (131%N)	SFU/ml
C5	35,000 (107%N)	SFU/ml
C9	0	SFU/ml
C3T	0	SFU/ml

proteins

C1INH	n.t	mg/ml
C1q	102%N	
C4	17 (77%N)	mg/ml
C3	70 (108%N)	mg/ml
C5	92%N	
C9	0%N	
B	11 (69%N)	mg/ml
P	n.t	

n.t : not tested

%N : %NHS

補体学的検索；

発端者 S. S. の CH50 15は正常値の38%、血漿 CH50も低値であり、C9欠損症がまず見当つけられた。表1はS. S. の補体プロフィールを溶血活性と蛋白量にわけて記した。蛋白定量 溶血活性ともC

表 1

9は検出できなかつた。C9蛋白定量はヘキスト社のC1～C9を用い、C9溶血活性については、EAC1-7+C8huとS.S.血清の希釈から測定した。C3T (C3 total activity) も検出できなかつた。

ファミリースタディは以下の如くである。

S. Y. 24才、長男。6才時リウマチ熱でステロイドを服用した。風邪をひき易い。

S. I. 22才、次男。

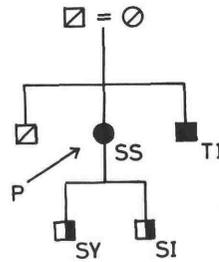
T. I. 34才、発端者の弟。扁桃腺炎をくり返す。

図1に家系図を示した。発端者S.S.の弟T.I.もC9溶血活性、蛋白定量ともに検出できなかつた。長男S.Y.次男S.I.のC9溶血活性、蛋白定量はそれぞれ正常の約半量であった。

C9再構成テストを行なったところ、S.S.検体に乾燥C9粉末を加えC9溶血活性の回復を見た。C9を100単位加えたところCH50はほぼ正常に回復した。

〔考案およびまとめ〕

C9欠損症は既に多くの報告がなされ、文献レビューもされ(稲井真弥、C9欠損症、臨床免疫、14:281-287, 1982)、本邦に3万～5万人のC9欠損症がいると推定されている。したがっ



- P : proband
- ● : homozygous C9 deficiency
- ○ : heterozygous C9 deficiency
- ◻ ◯ : not investigated

Pedigree of C9 deficient family S

図1

てC9欠損症自体は稀有な症例とはいえないが、今回我々は Sicca syndrome の合併をみたC9欠損症とその家族例を報告した。C9欠損者は他の補体因子欠損症と異なり、一般に健常な生活を送っているとされるが、第16回本シンポジウム(1979)において行山によって発熱をくりかえすC9欠損症が報告され、天野によって(内科学会誌 70:1072, 昭和56)、慢性関節リウマチを合併した補体第9成分欠損症、菰田によって(日腎誌 23:1627, 1981)、補体第9成分欠損症を伴った糸球体腎炎の1例が報告されている。C9欠損症は真に健常ではなく、他の因子欠損症と同様 Compromised host となりうると考えられる。

発端者S. S. 及びその弟T. I. は完全欠損であり、長男、次男は部分欠損で遺伝形式は不明であった。

## 35 髄膜炎菌感染を契機に発見された遺伝性C7欠損症の一例

小林正夫<sup>1</sup>，岡田道子<sup>1</sup>，相原克昭<sup>1</sup>，松浦良二<sup>1</sup>，臼井明己<sup>1</sup>，赤垣洋二<sup>2</sup>，稲井真弥<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 広島大学医学部小児科    <sup>2</sup> 大阪医大，病態検査

補体欠損症にNeisseria属感染を合併することはよく知られている。今回、我々は髄膜炎菌感染を契機に発見された遺伝性C7欠損症を経験したので報告する。

### I 症 例

症例は7歳男児。主訴は発熱，痙攣，意識障害。既往歴では易感染性は認められず，予防接種歴にも異常なく，その他特記すべきことはなかった。家族歴にも特記すべきことはなかった。現病歴：昭和59年5月1日早朝より発熱，前頭部痛，嘔吐あり，近医受診中に全身の強直性痙攣を認め，次第に意識混濁となり当科緊急入院となる。入院時意識レベルは300（3-3-9度方式）。頻脈，多呼吸，血圧低下，全身皮膚の多数の点状出血斑を認めた。軽度の項部硬直とケルニッヒ徴候も陽性であった。入院時検査成績：白血球数 $3,900/\text{mm}^3$ で好中球の左方移動あり，血小板数 $56,000/\text{mm}^3$ と減少していた。血液凝固系では，出血時間は4分であったが，プロトロンビン時間27%，活性化部分トロンボプラスチン時間57.1秒と著明に延長，ヘパプラスチンテスト35%と低下，血中FDP $80\mu\text{g}/\text{dl}$ と高値を示した。CRPは5（+），GOT，GPT，LDH，CPK，BUN，クレアチニンはすべて高値であった。血糖，アンモニア，免疫グロブリンは正常であった。脳脊髄液では，細胞数28/3，蛋白 $5\text{mg}/\text{dl}$ ，糖 $67\text{mg}/\text{dl}$ ，塗沫，培養では菌を検出することは出来なかった。以上より，敗血症，DIC，肝不全を疑いICUで呼吸・循環管理のもとに強力な抗生物質療法と交換輸血を施行した。第4病日には第1病日の血液培養よりNeisseria meningitidisが分離されたため，髄膜炎菌による敗血症にDICを合併したものと考えられた。以後，約1ヶ月間の抗生物質の投与とリハビリテーションにより，知能，運動とも後遺症なく軽快した。

### II 補体検索

交換輸血前のCH 50は $2.5\text{U}/\text{ml}$ 以下であり補体各成分の活性・蛋白の測定を行った。表1に示すように，C7は活性・蛋白ともに検出不能であったが，その他の補体成分は正常であった。患者血清に種々の濃度のヒト精製C7を添加したところ，CH 50は濃度依存性に上昇した（図1）。このことより患者血清にはC7に対する阻害因子は存在しないと考えられ，C7欠損症と診断した。

可能な範囲での家族の補体検査より，兄・両親・父方伯父・母方叔母・母方従兄の6名が，C7活性・蛋白が正常の約50%であるヘテロ接合体と判明した（図2）。遺伝型式は従来の報告どおり，常染色体性共優性遺伝と考えられた。

### III 免疫学的検索

患者好中球機能検査では，NBT還元能試験，chemiluminescence（化学発光），走化能はすべて正

常であった。患者血清のオプソニン活性を Zymosan を用いた chemiluminescence で検討したが、正常コントロールとの間に差は認められなかった。オプソニンに補体の late component は必要ないものと考えられた。患者血清の走化因子産生能を Agarose plate 法による正常好中球の chemotaxis で検討した。血清と Zymosan を 37°C で incubation し経時的に、走化因子活性をみたところ、患者血清では明らかな走化因子産生能低下が認められた (図 3)。患者血清に正常血清を種々の濃度で添加すると、低下した走化因子活性が正常に復することより、この走化因子産生能の低下が C7 に依存している可能性が示唆された。

補体由来の走化因子には、C5a, C3a, C567 が知られているが、前二者が主である。C567 の走化因子活性については、C6 欠損血清で正常な走化因子産生がみられることより疑問視されているが、今回の我々のデータより、C7 の走化因子活性への関与が推測される。今後精製 C7 を用いた詳細な検討が必要と考えられる。

患者リンパ球の表面マーカーでは SRFC, Smlg, OKT3, 4, 8 はすべて正常であったが NK 活性を示す Leu 11 の著明な低値を認めた。リンパ球の PHA, ConA, PWM による芽球化反応, PWM による免疫グロブリン産生能は正常であった。K562 を標的細胞としたリンパ球の NK 活性を図 4 に示す。患者では NK 活性の著明な低下がみられ、ヘテロ接合体である母親は正常と患者の中間値を示した。Leu 11 陽性細胞の減少と合わせ、患者のリンパ球の NK 活性の障害が示唆されるが、C7 欠損との因果関係は明らかでなく、今後の課題と思われる。

Tab.1

Complement profile of a patient with C7D (S.K.)

Hemolytic activities			Protein concentrations		
	S.K. (% of NHS)	NHS		S.K.	NHS
CH50 (U/ml)	<2.5	35.5	C4 (mg/dl)	23	17-34
C1 (SFU/ml)	86,400 (108.0) *	80,000	C3 (mg/dl)	67	50-80
C4	32,800 (71.3)	46,000	C5 (%)	79	
C2	1,350 (117.4)	1,150	C6 (%)	100	
C3	64,000 (121.2)	52,800	C7	not detected	
C5	364,800 (96.6)	377,600	C8 (%)	100	
C6	17,200 (95.6)	18,000	C9 (%)	136	
C7	not detected	10,500	H (%)	125	
C8	16,400 (85.4)	19,200	B (mg/ml)	20	
C9	86,400 (145.9)	59,200	P (%)	84	
			I (%)	94	

\* Numbers in parentheses are % of NHS.  
NHS; normal human serum.

Fig.1

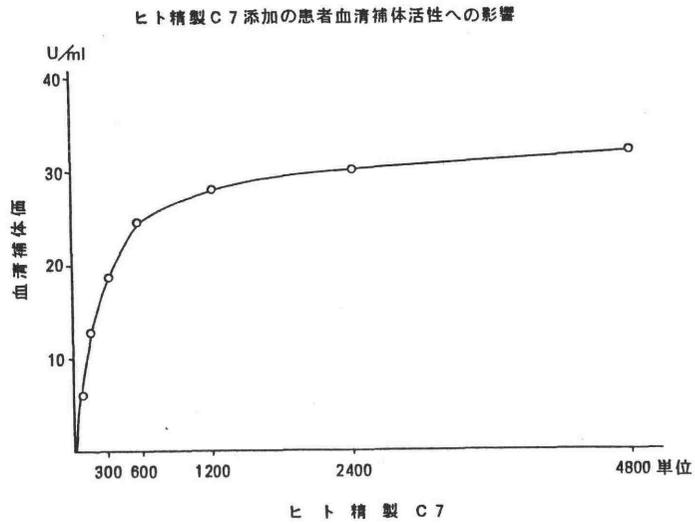


Fig.2

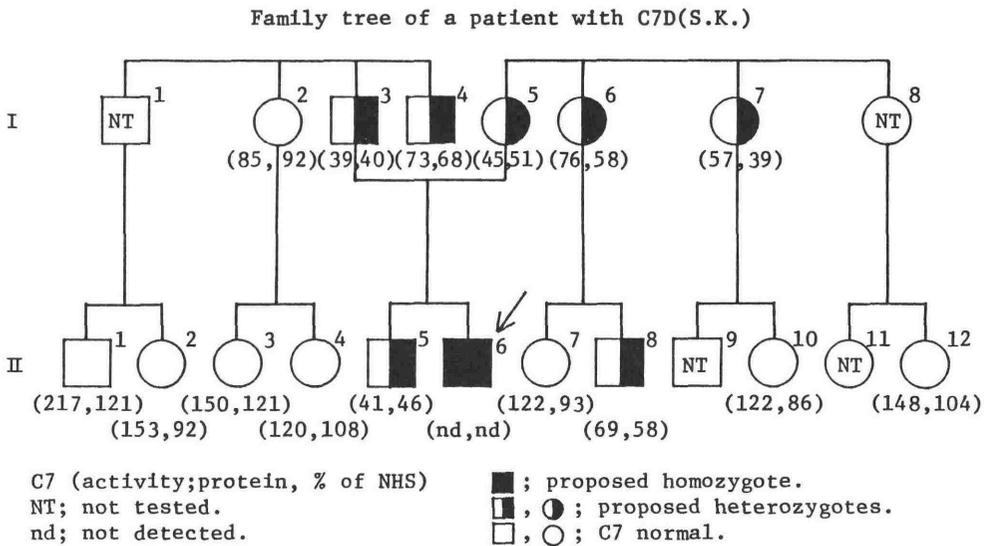


Fig.3 Generation of Chemotactic Activity from Sera

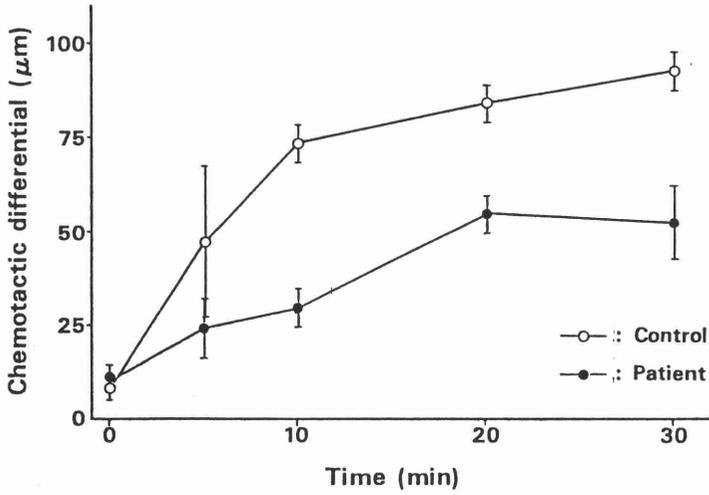
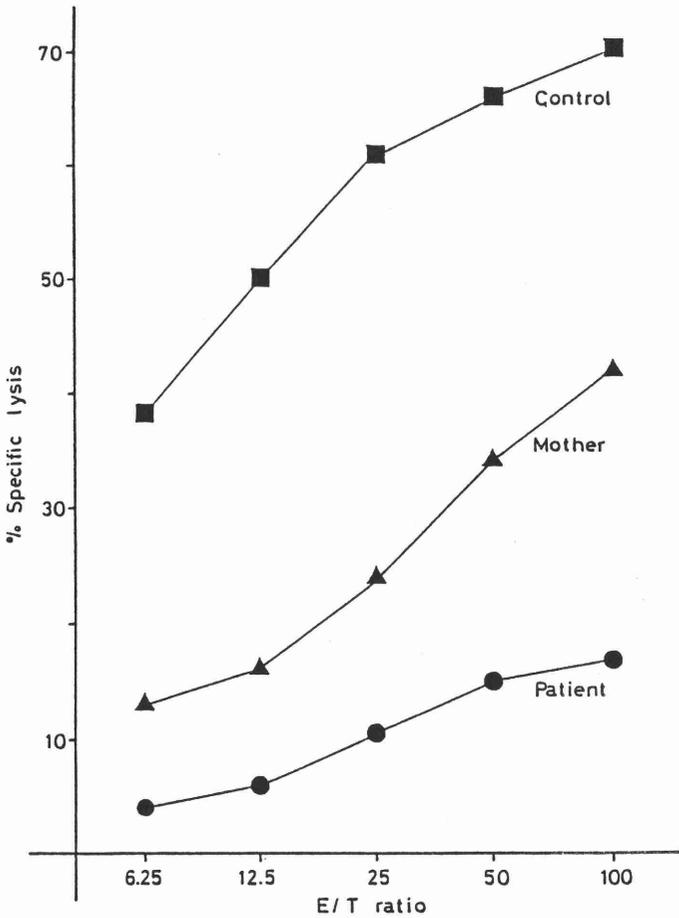


Fig.4 NK activity of MNC



## 36 髄膜炎または髄膜炎を疑わせる症状を反復したC7欠損症の一症例について

伊藤節子<sup>1</sup>，楠 隆<sup>1</sup>，真弓光文<sup>1</sup>，三河春樹<sup>1</sup>，赤垣洋二<sup>2</sup>，稲井真弥<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 京都大学医学部小児科， <sup>2</sup> 大阪医科大学病態検査

今回、われわれは髄膜炎または髄膜炎を疑わせる症状を反復したC7欠損症の1症例を経験したので報告する。

### I 症例：

本例は紫斑を主訴として入院した11才女児で家族歴では易感染性を示すものはない。妊娠中および分娩時に異常はなく、発育歴にも特記すべきことはない。既往歴として4才時に水痘、5才時に流行性耳下腺炎に罹患したがその経過には異常はなかった。各種ワクチンの接種時にも特記すべきことはなかった。昨年12月15日（入院49日前）、41°Cの発熱と悪心、嘔吐のため、近医を受診し、抗生剤と解熱剤の投与をうけたが、翌日、頸部、前胸部、背部、上肢に紫斑が出現した。この時、著明な白血球数増多を伴い、炎症反応も強陽性を示していた。12月25日（入院39日前）にも前回と同様の発熱、悪心、嘔吐、紫斑などの症状が出現した。本年1月29日（入院4日前）、夕方より39°Cの発熱を伴った悪心、嘔吐が出現し、近医にて解熱剤と合成ペニシリンの投与を受けた。翌日も悪心、嘔吐が続き、頭痛と前胸部、腹部、背部に出血斑が出現したため、2月1日に本院小児科へ紹介され、緊急入院した。

入院時所見；入院時には悪心、嘔吐および頭痛はすでになく、機嫌もよかった。体温は36.7°Cで体格は大、栄養は普通であった。咽頭に発赤を認め、また両側顎下リンパ節に直径1cmの腫脹を各1ヶずつ触知し、圧痛（+）であった。心、肺に異常を認めなかった。腹部および背部の皮膚に直径2～4mmの出血斑を多数認めた。腹部では肝、脾とも触知しなかった。神経学的所見として項部硬直（-）、Kernig徴候（-）、皮膚描記症（-）、腹壁反射（+）、深部腱反射亢進（左右差なし）足間代（-）、膝蓋間代（-）、Babinski反射（-）、Hoffman反射（+）、左腋窩～側背部にParesthesia（+）であった。

入院時の検査所見；表1に示したごとく、赤沈の著明な亢進、CRP強陽性、 $\alpha_2$ グロブリンの増加、後骨髄球の出現、左方移動を伴った好中球増多症がみられた。血小板数は16.4万/mm<sup>3</sup>であり、凝固系ではFibrinogenの増加がみられた。生化学的検査では、BUNがやや高値を示した以外には異常が認められず、CPK値も正常であった。免疫グロブリン値、C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub>の蛋白量は正常範囲内であったが、CH 50は、2.5U/ml以下であった。尿所見にも異常はみられなかった。

入院後の経過；入院後発熱はみられず、項部硬直、Kernig徴候も陰性であったが、血液検査所見により重篤な細菌感染症が唆され、翌日になってもparesthesiaが続いたため、髄液検査を行った。細胞数1790/3で、多核球優位で蛋白が増加していたが、糖は、51mg/dlであった。以上の結果から

化膿性髄膜炎を疑い、CMZ 1500mg、ABPC 1500mgの8時間毎の静注を開始した。その後の髄液所見の経過を表2に示した。CRP 2.0 mg/dl, ESR (1°/2°) 46/86, 2月6日には、白血球数 5,400/mm<sup>3</sup> (N. Band 6, N. Seg 41, Lym 40, Mo 10, Eo 2), CRP 0.6mg/dl, ESR (1°/2°) 24/60, 2月8日には、白血球数 5,700 (N. Band 3, N. Seg 53, Lym 30, Mo 12, Eo 2), CRP 陰性となり、その後も、血液検査および髄液所見に悪化がみられず、14日に退院となった、CH 50の低値と、髄膜炎の存在より、C 7欠損症を疑い、補体系の検査をすすめた。

## II 補体系検査

補体系検査の結果を表3に示す。補体価は2.5単位以下、補体各成分ではC 7活性、蛋白とも測定不能であった以外、他の補体成分や蛋白に異常はなかった。

## III 家系調査 (図1)

家系調査の結果、C 7活性、蛋白が正常血清の約半分でヘテロ接合体と考えられる者が発症者の両親、母方伯父、母方叔父にみられ、その遺伝形式は従来の報告の通常染色体性共優性遺伝と考えられた。

## IV C 7添加による血清補体の再構成 (図2)

発症者の血清にC 7を変量して加えた結果、3600単位のC 7添加により補体価は約37単位まで回復した。

## 結論

本症例は初回発症時、重篤な感染症あるいは髄膜炎を疑わせる症状があり、抗生剤投与により一時軽快したがその直後に再発している。さらに1ヶ月後に同様の症状を反復し、諸症状と各種検査の結果、化膿性髄膜炎と診断された。本症例は3回目の発症時に補体系の異常に気付き精査の結果、C 7欠損症であることがわかった。

C 7欠損症では髄膜炎に反復罹患し、また発症するとその治癒が遷延し、抗生剤による治療が不十分な場合、再発しやすいことが示唆された。

Tab.1

## Laboratory findings on admission

RBC	499 x 10 <sup>4</sup> /mm <sup>3</sup>	GOT	30 IU/1
Hb	13.6 g/dl	GPT	19 IU/1
Ht	40.5 %	LDH	407 IU/1
Plt	16.4 x 10 <sup>4</sup> /mm <sup>3</sup>	ALP	91 IU/1
WBC	39,400 /mm <sup>3</sup>	BUN	23 mg/dl
N.metamyel.	1 %	Glu	70 mg/dl
N.band.	16 %	CPK	19 IU/1
N.seg.	69 %	T.P.	8.0 g/dl
Mo.	5 %	alb.	52.2 %
Lym.	9 %	$\alpha_1$ -glob.	6.0 %
PT	12.1 sec	$\alpha_2$ -glob.	14.6 %
APTT	36.5 sec	$\beta$ -glob.	10.4 %
Fib.	606 mg/dl	$\gamma$ -glob.	16.8 %
FDP	125 ng/ml	IgG	1,092.9 mg/dl
ESR(1')	72 mm	IgM	271.3 mg/dl
(2')	110 mm	IgA	174.2 mg/dl
CRP	24.7 mg/dl	C3	65.0 mg/dl
		C4	42.5 mg/dl
		CH50	<2.5 U/ml

Tab.2

## CSF findings

	Feb.2	3	6	13
Cell number	1,790/3	448/3	44/3	13/3
Glucose(mg/dl)	51	50	44	57
Protein(mg/dl)	92	116	65	63

Tab.3

## Complement profile of C7D (M.I.)

	Hemolytic activities		Protein concentrations	
	M.I.	NHS	M.I.	NHS
CH50(U/ml)	<2.5		C4(mg/dl)	45.5 17-34
C1(SFU/ml)	118,400 (96.1)	123,200	C3(mg/dl)	78.0 50-80
C4	110,000(137.5)	80,000	C5(%)	87.0
C2	1,260(121.2)	1,040	C6(%)	114.0
C3	66,400(123.0)	54,000	C7	not detected
C5	300,800 (94.9)	316,000	C8(%)	84.0
C6	15,600(130.0)	12,000	C9(%)	103.0
C7	not detected	11,800	H(%)	121.0
C8	22,400 (98.2)	22,800	B(mg/ml)	18.5
C9	28,800(135.8)	21,200	P(%)	90.0
			I(%)	134.0

Fig.1

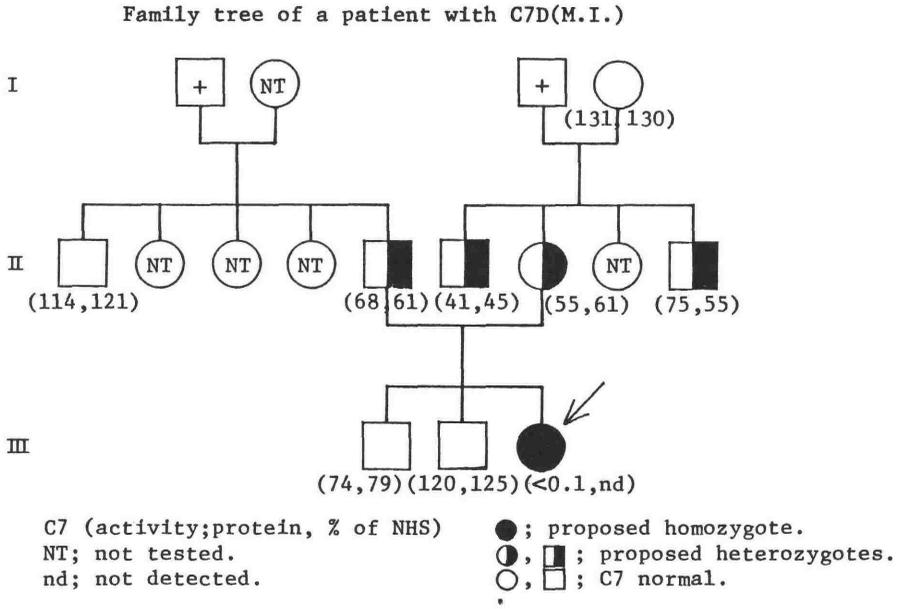
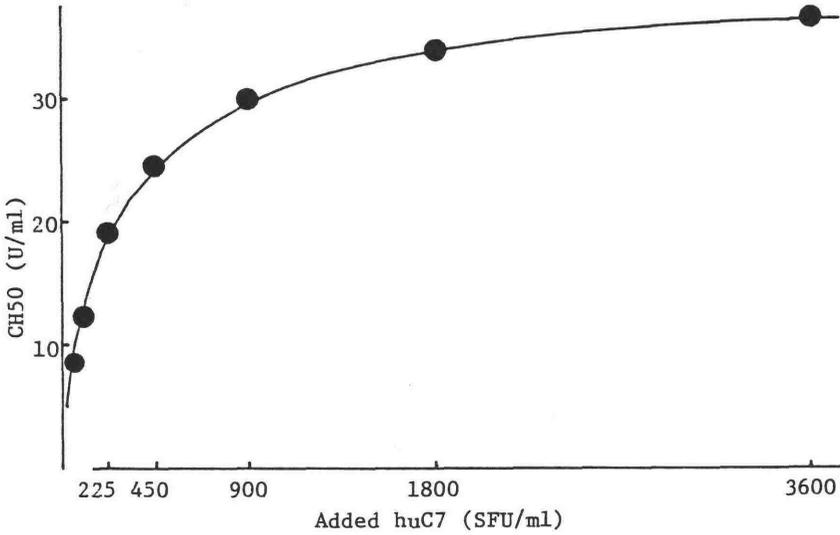


Fig.2

Reconstitution of hemolytic activity of C7D serum with purified C7hu



## 37 髄膜炎菌感染症を反復したC6欠損症例

松井 光<sup>1</sup>，越智繁樹<sup>2</sup>，大津京子<sup>2</sup>，稲田弥生<sup>2</sup>，赤垣洋二<sup>3</sup>，稲井真弥<sup>3</sup>

<sup>1</sup> 済生会今治病院小児科，<sup>2</sup> 済生会今治病院検査科，<sup>3</sup> 大阪医大，病態検査

先天性補体欠損症が、髄膜炎菌感染症に罹患しやすいことはよく知られており、すでに諸外国では同菌による髄膜炎などを繰り返した症例が多数報告されている。しかし本邦では、このような症例の報告はまだ少なく、特にC6欠損症は、福森らが献血者集団から2名発見したのみで、髄膜炎菌感染症を伴った症例の報告はない。今回われわれは、短期間に髄膜炎菌感染症を2度発症したC6欠損症を経験したので、遺伝学的検索と合わせて報告する。

### I 症例

発端者(S.Y.)は現在13才の男児。家族歴：家系に近親婚はなく、易感染性も見られない。既往歴：9才時、解熱剤で薬疹がみられた以外に特記すべきことはない。

現病歴：第1回入院(12才11ヶ月)

昭和59年11月27日早朝から発熱、頭痛、コーヒー残渣様嘔吐、軀幹、四肢の出血斑、左肩関節痛が出現したため、同日入院した。入院時、全身状態は不良で、体温は39.5°C、軀幹、四肢、咽頭、左眼球結膜に出血斑を認めた。左肩関節は軽度腫脹し、圧痛、運動制限が見られた。頭痛を強く訴えたが、意識は正常で、髄膜刺激症状もなく、腱反射も正常であった。入院時検査成績を表1に示す。血液培養よりY群髄膜炎菌が検出されたが、髄液検査は正常で、培養も陰性であった。以上より髄膜炎菌性敗血症と診断した。治療はABPC、AMKで開始し、後にCTMに変更した。第7病日より解熱、他の症状も軽快し、第18病日に退院した。第10病日および、第27病日(抗生剤中止5日後)の血液培養は陰性であった。

第2回目入院(13才2ヶ月)；

敗血症治癒後は発熱もなく、元気に通学していたが、約3ヶ月後の昭和60年3月1日午後から発熱し、同夜より頭痛、嘔吐を伴うようになった。嘔吐は頻回で、後に吐物はコーヒー残渣様となった。翌朝、不穏状態となり、約5分間の全身性強直性痙攣が出現したため入院した。入院時、体温は38.5°C、せん妄状態で、項部強直を認め、ケルニッヒ徴候も陽性であった。軀幹、四肢近位部に出血斑を認めた。入院時検査成績を表2に示す。髄液検査で、細胞数増多、蛋白増加、糖減少を認め、髄液培養にてY群髄膜炎菌が検出された。血液培養は陰性であった。以上より、髄膜炎菌性髄膜炎と診断した。治療は、ABPC、AMKで開始し、菌同定後はAMKを中止した。第6病日より解熱、第7病日には意識状態も正常化し、第51病日に退院した。

### II 免疫学的検査

第15病日にCH 50を測定したところ、1単位以下であったため、補体各成分の測定を行った。

その結果、表3に示すようにC6活性が0.1%以下、C6蛋白は測定不能であったが他の補体成分や蛋白に異常は認められなかった。その他、免疫グロブリン値、末梢リンパ球亜分画およびPHA、ConA、PWMを用いたリンパ球幼若化試験に異常を認めなかった。

### Ⅲ 家系調査 (図1, 表4)

家系調査の結果、発端者の弟 (T.Y.) はホモ接合体と考えられ、表3に示す通りC6活性が0.1%以下、C6蛋白が測定不能であった。また他にヘテロ接合体と考えられるものが発端者の両親を含め計7人発見され、その遺伝形式は従来の報告の通常染色体性共優性遺伝と考えられた。

### Ⅳ C6添加による血清補体の再構成 (図2)

発端者 (S.Y.) および発端者の弟 (T.Y.) の血清にC6を变量して加えた結果、2800単位のC6の添加により両者の補体価は約31単位まで回復した。

### 結 論

約3ヶ月の間にY群髄膜炎菌による敗血症、髄膜炎菌感染症を繰り返した13才の男児について補体各成分を測定した結果、C6欠損症であることがわかった。また、患児の家族調査を行ったところ、患児の弟もC6欠損症と診断された。患児については、今後も髄膜炎菌感染症を反復することが懸念され、嚴重な注意が必要であると思われる。また、弟は現在まで無症状であるが、今後、髄膜炎菌感染症に罹患する危険性があり、注意が必要であると考えられる。

表1. 第1回入院時検査成績

RBC	513 X10 <sup>4</sup> /mm <sup>3</sup>	T-prot.	7.0 g/dl	出血時間	3分30秒
HB	15.1 g/dl	Al	85.6%	凝固時間	8分00秒
Ht	45%	α 1-g1	2.9%	プロトロン時間	13.9秒
Plate.	15.8 X10 <sup>4</sup> /mm <sup>3</sup>	α 2-g1	9.0%	フィブリノーゲン	272 mg/dl
WBC	12,100/mm <sup>3</sup>	β -g1	9.0%	FDP	10 μg/ml以下
met	15%	γ -g1	12.7%	髄液検査	
myelo	3%	A/G	1.91	細胞数	13/3
st	60%	Ig G	940 mg/dl	蛋白	36 mg/dl
seg	19%	Ig A	148 mg/dl	糖	80 mg/dl
lymph	3%	Ig M	146 mg/dl	培養	陰性
ESR	1 mm/hr	GOT	32 IU/L	血液培養	Y群髄膜炎菌
CRP	3+	GPT	12 IU/L		

表2. 第2回入院時検査成績

RBC	564 X10 <sup>4</sup> /mm <sup>3</sup>	T-prot.	7.0 g/dl	出血時間	5分30秒
HB	15.6 g/dl	Al	58.7%	凝固時間	8分00秒
Ht	49%	α 1-g1	4.2%	プロトロン時間	13.8秒
Plate.	22.0 X10 <sup>4</sup> /mm <sup>3</sup>	α 2-g1	9.9%	APTT	30.8秒
WBC	24,700/mm <sup>3</sup>	β -g1	9.5%	フィブリノーゲン	395 mg/dl
met	4%	γ -g1	17.5%	FDP	10 μg/ml以下
st	28%	A/G	1.42	髄液検査	
seg	56%	Ig G	1380 mg/dl	細胞数	20240/3
lymph	5%	Ig A	200 mg/dl	蛋白	575 mg/dl
mon	7%	Ig M	244 mg/dl	糖	5 mg/dl
ESR	13 mm/hr	GOT	24 IU/L	培養	Y群髄膜炎菌
CRP	3+	GPT	14 IU/L	血液培養	陰性
血糖	189 mg/dl	CH50	1 U/ml以下		
血液アミラーゼ	16 mg/dl	抗核抗体	陰性		

Tab.3

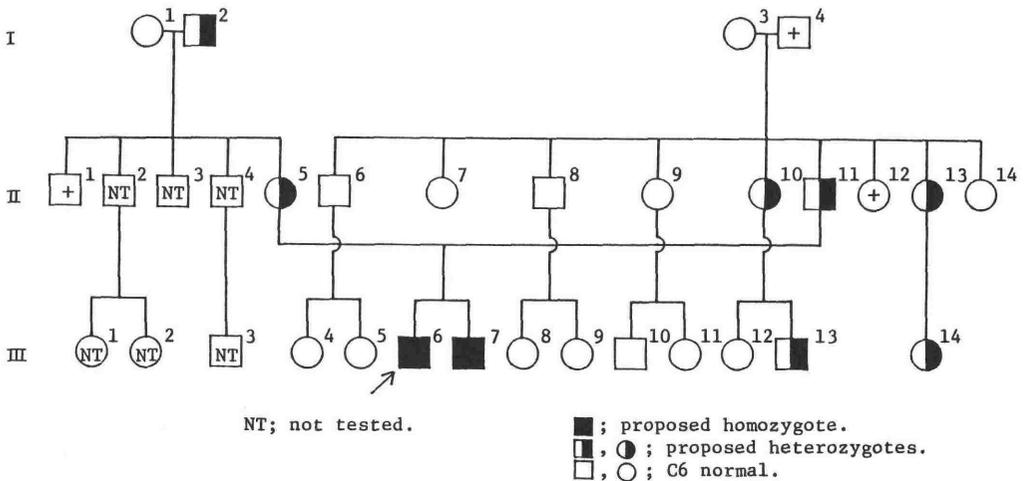
Complement component profiles of C6-deficient individuals

	C6D(S.Y.)	C6D(T.Y.)	NHS
<b>Hemolytic activities</b>			
CH50(U/ml)	<2.5	<2.5	42.7
C1(SFU/ml)	89,600 (83.6) *	158,000 (147.4)	107,200
C4	56,000 (94.6)	85,400(144.3)	59,200
C2	1,000 (85.5)	1,300(111.0)	1,170
C3	49,600(130.5)	50,300(132.4)	38,000
C5	185,600 (72.5)	229,000 (89.6)	256,000
C6	<10 (<0.1)	<10 (<0.1)	8,500
C7	9,800 (81.7)	11,400 (94.6)	12,000
C8	22,400(175.0)	13,900(108.7)	12,800
C9	60,800(194.9)	30,300 (97.2)	31,200
<b>Protein concentrations</b>			
C4(mg/dl)	23	41.5	17-34
C3(mg/dl)	67	55	50-80
C5(%)	79	47	
C6(%)	not detected	not detected	
C7(%)	67	59	
C8(%)	79	79	
C9(%)	77	80	
H(%)	93	96	
B(mg/dl)	15	13.5	
P(%)	84	90	
I(%)	112	96	

\* Numbers in parentheses are % of NHS.  
NHS; normal human serum.

Fig.1

Family tree of a patient with C6D



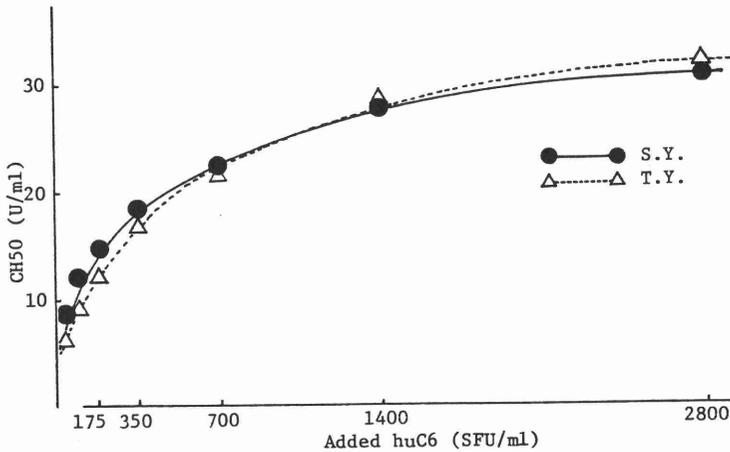
Tab.4

Serum levels of complement and functional and immunochemical C6 levels in the family members

Family member	CH50 (U/ml)	C6 concentrations	
		activities (SFU/ml)	protein (% of NHS)
I-1	53.5	9,600(106.7)	112
I-2	34.1	4,600 (51.1)	39
I-3	44.1	8,200 (91.1)	90
II-5	35.0	3,900 (43.3)	43
II-6	35.7	6,600 (73.3)	70
II-7	32.4	6,800 (75.6)	75
II-8	27.8	6,500 (72.2)	65
II-9	51.2	7,800 (92.0)	106
II-10	39.7	3,900 (43.3)	43
II-11	37.8	3,600 (40.0)	34
II-13	35.7	4,100 (45.6)	39
II-14	34.7	6,600 (73.3)	56
III-4	37.8	8,100 (90.0)	75
III-5	36.6	8,000 (88.9)	90
III-6	<2.5	<10 (<0.1)	not detected
III-7	<2.5	<10 (<0.1)	not detected
III-8	40.0	7,600 (84.4)	90
III-9	39.7	8,300 (92.2)	90
III-10	45.0	7,400 (87.0)	100
III-11	36.4	7,700 (91.0)	117
III-12	43.7	7,300 (81.1)	95
III-13	35.7	4,100 (45.6)	43
III-14	36.9	3,600 (40.0)	41
NHS	42.7	8,500	

Fig.2

Reconstitution of hemolytic activity of C6D sera with purified C6hu



西拔 和喜夫, 田上 八朗

東北大学医学部, 皮膚科教室

〔はじめに〕

紫外線紅斑発現のメディエーターについては種々の報告がある。ヒスタミン, プラスミン, プロスタグランディン, ブラディキニンなどである。さて, 補体由来のアナフィラトキシンも血管拡張・血管透過性亢進作用を有しており, 紫外線紅斑の発現へも関与している可能性が考えられる。我々は, 昨年の本シンポジウムで, ポルフィリン症の急性期光毒性反応に, 活性化された補体アナフィラトキシンが関与することを報告した。

今回は, 紫外線紅斑における補体系の役割について, Cobra Venom Factor 処置のモルモットを用いて, 皮膚表面の紅斑反応を経時的に観察した。さらに, 経時的に皮膚生検を行ない, 真皮上層の浸潤細胞を計算した。これらのデータを, cyclophosphamide 処理により leukopenic にしたモルモット, および生食処理群と比較検討した。また, モルモット血清へ紫外線を照射し, *in vitro* での補体活性化についても検討を加えた。

〔材料と方法〕

1. 光源 紫外線 (特に中波長紫外線; UV-B と略す) の光源として, デルマレイ I 型装着の健康線ランプ (FL20SE30) を使用した。照射率は 25 cm の距離で 2.0 mW/cm<sup>2</sup>。
2. 動物 体重 300~400 g の白モルモットを使用した。照射 4 日前に背部皮膚を抜毛し, 皮膚表面を露出させた。Decomplementation は, UV-B 照射 16 時間前に Cobra Venom Factor (Cordis Lab. 以下 CVF) 300 U/kg を腹腔注して作成した。第 2 群のモルモットには, cyclophosphamide (Aldrick Chemical Co. 以下 CY) 300 mg/kg を UV-B 照射 4 日前に腹腔注して, leukopenic な状態にした。第 3 群 (対照群) には生理的食塩水を注入した。
3. 経時的紅斑反応観察 UV-B 照射終了後, 次の各時間に上記 3 群の臨床的紅斑変化を観察した; 照射直後, 2, 6, 8, 12, 24, 48, 72 時間目。照射エネルギーは 1.8 Joule/cm<sup>2</sup>, 3.6 Joule/cm<sup>2</sup> で行なった。皮膚変化は次のようにスコアした (J. Invest. Dermatol 72; 59-63, 1979): 0 = no reaction, 0.25 = barely perceptible erythema, 0.5 = easily perceptible erythema with ill-defined borders, 1.0 = distinct erythema with sharp borders, 1.5 = erythema more intense than a 1.0 response but not maximal and with slight edema, 2.0 = maximal erythema with edema。各群における統計的処理は Wilcoxon's rank-sum test によった。
4. 真皮細胞浸潤 UV-B 照射前および照射後 4・8・16・24 時間目に各群の皮膚を 4 mm パンチ生検し, 真皮上層 (200 μm × 200 μm) の浸潤細胞を 400 倍率でカウントした。

統計的処理は Student's t-test により行なった。

5. *In vitro* 照射 モルモット腹大動脈より採血し分離した血清に, *in vitro* で UV-B を氷冷下に照射した。照射血清の CH50 を Mayer 法により測定した。さらに, 照射血清の好中球遊走活性を Boyden 変法により測定した。モルモット腹腔渗出液より採取した好中球を Hanks 液に浮遊させ ( $1 \times 10^6 / ml$ ), blind well chamber とフィルター ( $3 \mu m$ ) を使用し, 5%  $CO_2$  45分 ( $37^\circ C$ ) incubate 後, フィルター下面に到達した細胞数を数えた。

〔結果〕

1. UV-B 紅斑の Intensity と duration まず正常モルモットの UV-B に対する最少紅斑量 (MED) を測定した。8匹のモルモットを使用して MED を測定したところ, 平均  $540 m \text{ Joule} / cm^2$  であった。CVF 処理後の血清中の C3 蛋白量を SRID 法で測定してみると, 今回の実験時間内では著明に C3 蛋白量が低下しており (平均 8%), *decomplementation* の状態であった (図 1)。モルモット各群に UV-B を  $1.8 \text{ Joule} / cm^2$  照射したところ, CVF 処理群は対照群と比較して照射後 12-48 時間において弱い紅斑抑制がみられた。CY 処理群は照射後早期から強い紅斑抑制がみられた (図 2)。 $3.6 \text{ Joule} / cm^2$  照射においては, 対照群と CVF 処理群とにおいて紅斑反応に有意差はみられなかった。

2. 真皮細胞浸潤  $1.8 \text{ Joule} / cm^2$  照射前後において, 各 3 群における真皮浸潤細胞 (Leukocytes) をカウントした (図 3)。対照群と CVF 処理群では細胞数において経時的にみても差は生じなかった。しかし, CY 処理群では明らかに有意に細胞数が低値を示した。

3. *in vitro* 照射 正常モルモット血清に *in vitro* で UV-B を照射して, 照射前後での CH50 の変動・好中球遊走活性の変化をみたが, いずれも変化みられず, *in vitro* での補体活性化は生じていないと思われた (図 4, 表 1)。

〔考察〕

上記の *in vivo* の結果より, 補体由来 mediator は UV-B 紅斑の main mediator とは考え難く, むしろ late stage における enhancer として役割をなしていると考えられる。また, *in vitro* で chemotactic anaphylatoxin 生成がないにもかかわらず CVF 処理群で leukocytes 浸潤がみられることから, この leukocytes 浸潤は補体由来走化性因子によるものではないと推測される。CY 処理群 (leukopenic animals) の強抑制の結果を加味すると, UV-B 紅斑の 1 つの key role として leukocyte があると思われる。

(参考文献)

Photoimmunology (Edited by J.A.Parrish et al.) pp77-94, Plenum Medical Book Company 1983.

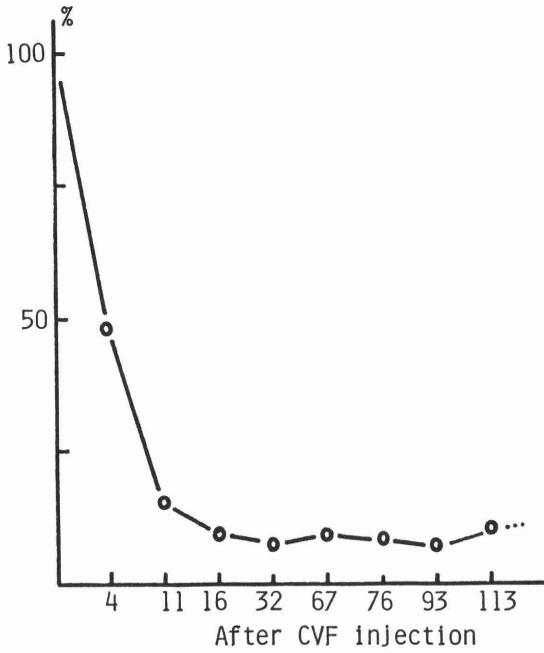


Fig.1. Change of C3 level after an intraperitoneal injection of CVF

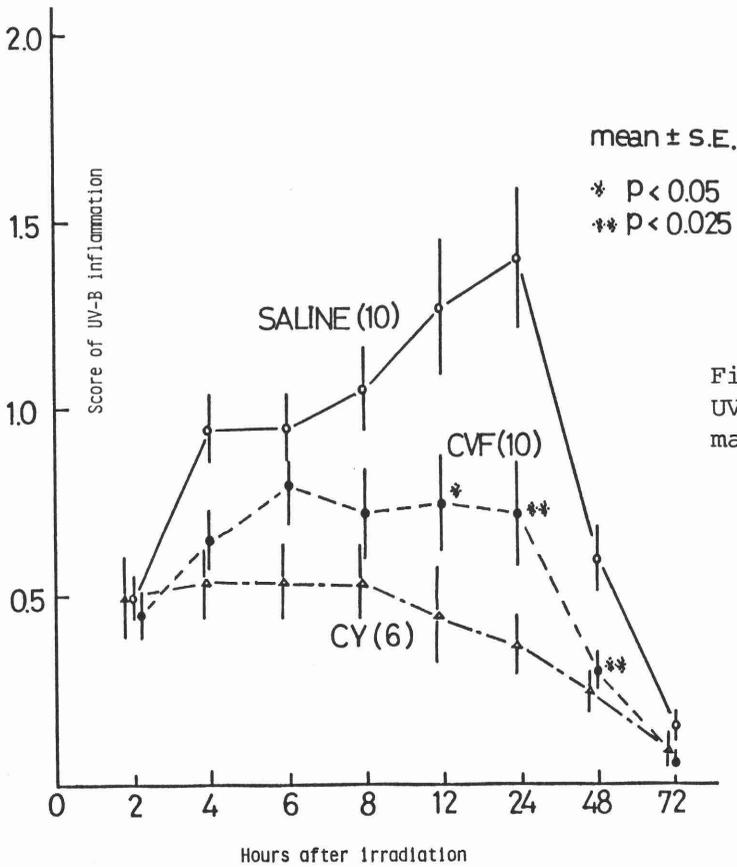


Fig.2  
UVB-induced inflammation in animals

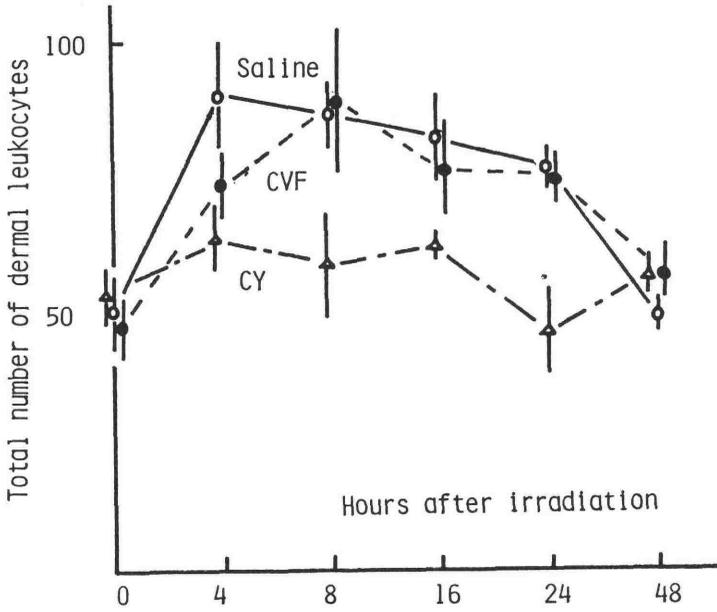


Fig.3  
The total numbers of dermal leukocytes before and at various times after UVB-irradiation of animals

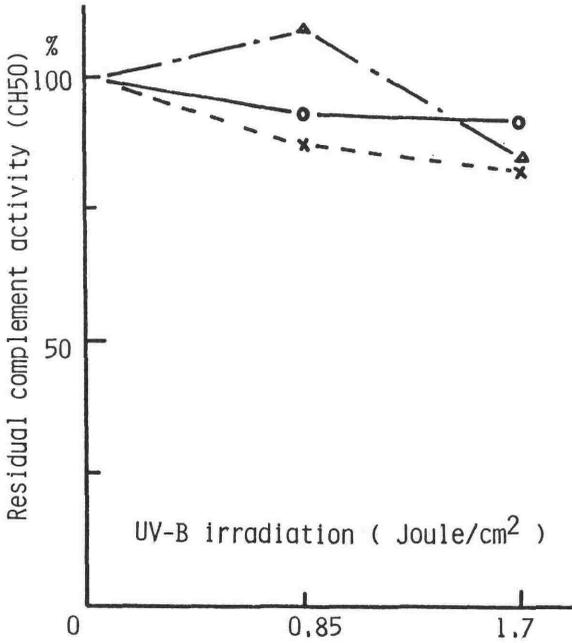


Fig.4  
Effect of UVB irradiation on CH50 activity in animal sera

	Chemotaxis ( cells/high power field )
nonirradiated serum	3 ± 2
1.8 J/cm <sup>2</sup> -irradiated serum	3 ± 1
Hanks solution (random migration)	4 ± 1

mean ± S.D.

Table 1  
Chemotactic activity in animal serum before and after UVB irradiation.

## 39 乾癬患者鱗屑中の補体アナフィラトキシンの動態について

大河内亨子, 竹松 英明, 田上 八朗

東北大学医学部皮膚科

### 【目的】

乾癬および無菌性膿疱性疾患においては、病変部の角層抽出液から、共通して分子量12,000 dalton前後の強い白血球走化性因子が認められ、これには補体由来のアナフィラトキシンであるC5aが存在していることが知られている。私達は、昨年の本シンポジウムで、乾癬患者血清ではC3aおよびC4a両者の上昇が認められることを報告したが、今回、さらに症例数をふやし、これら疾患の鱗屑中のC5a, C3a, C4aの動態を調べ、その補体活性化機構について検討したので報告する。

### 【方法】

#### 1. 材料

尋常性乾癬14例, 紅皮症性乾癬4例, 膿疱性乾癬12例, 掌蹠膿疱症8例, 対照7例(胼胝腫3例, 鶏眼2例, 魚鱗癬1例, 正常皮膚1例)の各病巣皮膚より鱗屑を採取し, 使用まで $-70^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存したものを材料として用いた。

#### 2. 角層抽出液の作製

鱗屑をPBS-SMで洗浄し乾燥させたのち, 乾燥重量の20倍のstreptomycin ( $100\mu\text{g}/\text{ml}$ )を含むPBS (pH 7.4)中で破砕, ホモジェナイズし,  $11,000g$ で15分遠心して得た上清を角層抽出液とした。

#### 3. radioimmunoassay

C3a, C3a des arginine, C4a, C4a des arginine, C5a, C5a des arginine (以下それぞれC3a, C4a, C5aと略す)についてHugli & Chenowethの方法により実施した。測定用キットはUpjohn Diagnosticsから入手した。

### 【結果】

#### 1. C5a (Fig. 1)

対照とした非炎症性皮膚においても若干のC5a ( $9.26 \pm 1.70 \text{ ng}/\text{ml}$ )が測定されたが, 乾癬をはじめとする炎症性膿疱性疾患では, 明らかな上昇が認められた。すなわち, 尋常性乾癬  $58.78 \pm 10.06$ , 膿疱性乾癬  $99.58 \pm 40.69$ , 掌蹠膿疱症  $33.26 \pm 5.20$ とこれらは対照と比べ統計学的に有意 ( $p < 0.001$ )にC5aの上昇が認められた。しかし, 紅皮症乾癬 ( $28.96 \pm 11.16$ )では有意差は認められなかった。

#### 2. C3a (Fig. 2)

対照に比べ, 尋常性乾癬 ( $p < 0.005$ ), 膿疱性乾癬 ( $p < 0.001$ ), 掌蹠膿疱症 ( $p < 0.001$ )

では有意に C3a の上昇が認められた。

### 3. C4a (Fig. 3)

C3a と同様に上記三疾患において有意の上昇が認められた。

### 4. C3a, C4a, C5a の相関 (Fig. 4, 5, 6)

C3a と C4a ( $r_s = 0.9465$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig. 4), C3a と C5a ( $r_s = 0.8805$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig. 5), C4a と C5a ( $r_s = 0.8746$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig. 6) のいずれの間にも, 正の相関関係が認められた。

### 【考察】

乾癬および類縁炎症性皮膚疾患では, 対照と比べ有意に, 角層中のアナフィラトキシン C3a, C4a, C5a の濃度が上昇していた。また, これらアナフィラトキシンの濃度は, いずれも相互に正の相関を示していた。これらの結果から, 乾癬をはじめ無菌性膿疱性疾患では, 病変部角層で補体が活性化されており, その機序は Classical pathway を介することが示唆される。

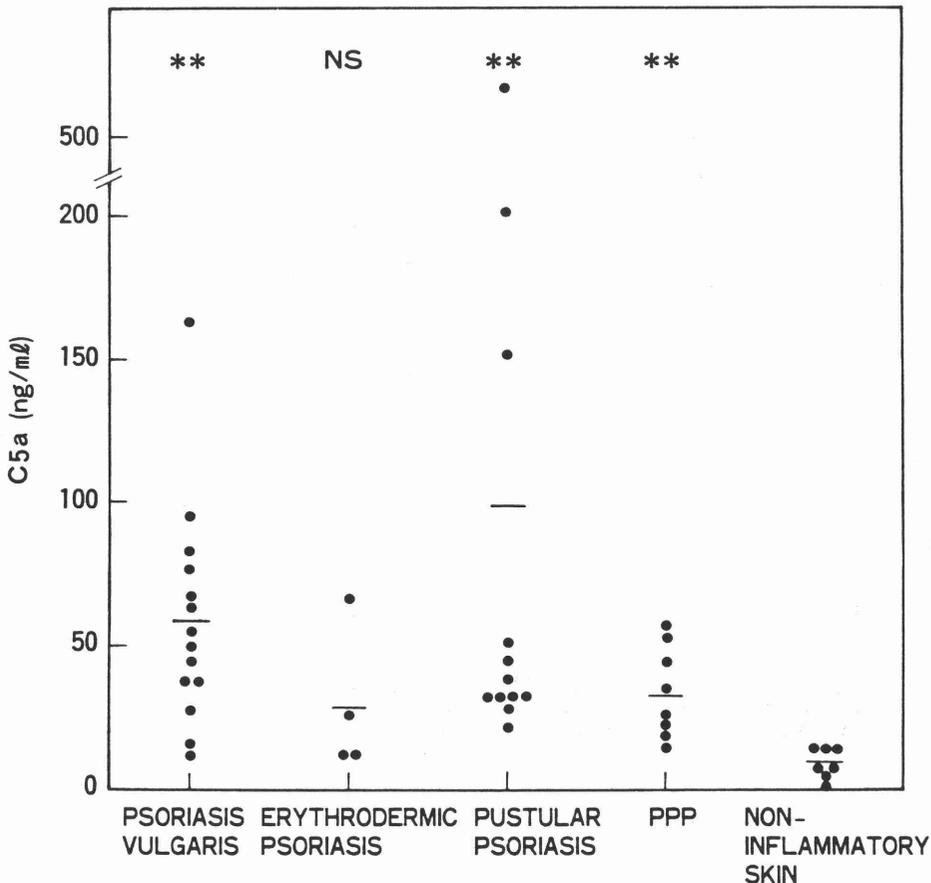


Fig.1. C5a in scale extracts

\*\*=  $p < 0.001$



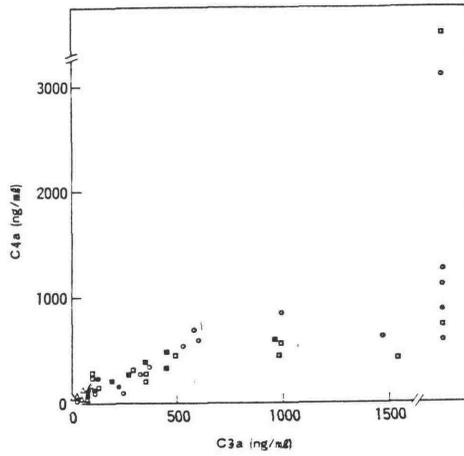


Fig.4. Relation between C3a and C4a

- : psoriasis vulgaris
- : pustular psoriasis
- △ : non-inflammatory skin
- : psoriatic erythroderma
- : pustulosis palmaris et plantaris

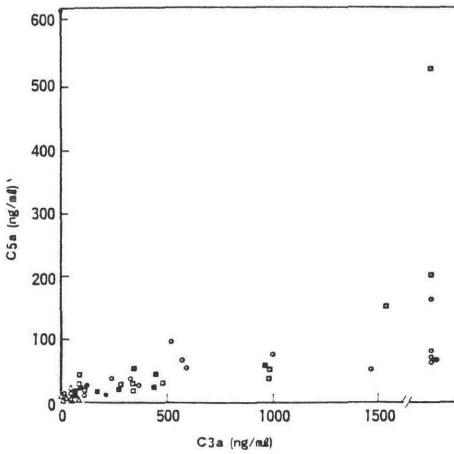


Fig.5. Relation between C3a and C5a

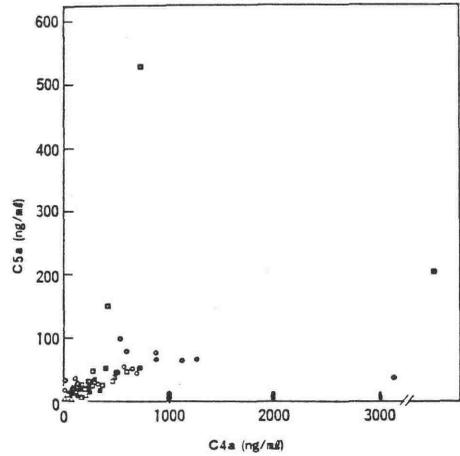


Fig.6. Relation between C4a and C5a

## 40 遺伝性血管神経性浮腫家系のアナフィラトキシン活性

佐山浩二, 白石 聡, 三木吉治  
愛媛大学医学部皮膚科学教室

〔はじめに〕

遺伝性血管神経性浮腫 (HANE) は C1 inhibitor (C1 INH) の欠損により、四肢の浮腫、呼吸困難、腹痛などを発作性に生ずる常染色体優性遺伝を示す疾患で、まれに全身性エリテマトーデス (SLE) 様症状を呈するものもある。本疾患の発生機序は補体の古典的経路の活性化で生ずる補体フラグメントもしくはキニン様物質によると推定されているが、その詳細なメカニズムは明らかでない。

そこで、我々は HANE 家系の補体成分とアナフィラトキシン (C4a, C3a, C5a) 活性の測定を行い、興味ある知見を得たので報告する。

〔材料と方法〕

SLE 様症状を呈する C1 INH 欠損症を含む 1 家系 8 例の血漿補体の測定を行い、この家系と関係のない正常人 20 例の値と比較した。

下肢に発作性浮腫を有する 1 例については浮腫期と非浮腫期の差、SLE 様症状を有する例についてはダナゾール治療前後の経時的変動について検討した。

補体成分の蛋白濃度は、single radial immunodiffusion 法を用いた。

溶血活性のうち、CH50 は Mayer 法、C3, C5 の溶血活性は intermediate cell を用い、C4 溶血活性は C4D guinea pig serum を用いて測定した。

C4a, C3a, C5a は Upjohn 社の des Arg radioimmunoassay kit を用いた。

〔結果〕

C1 INH の低下している 5 例 (Sub.No 1, 2, 3, 5, 6) では C4 の蛋白濃度はいずれも低下し、C4a の明らかな増加を認めたが、C5a の異常は認められなかった (表 1)。

SLE 様症状を呈する患者 (表 1, Sub.No 1) および下肢の浮腫発作中の患者 (表 1, Sub.No 5) では、C4a, C3a とともに増加していた (表 1, 2)。また、ダナゾール投与により SLE 様症状や腹痛発作の消失と共に C4a, C3a は減少した (表 3)。

表 1

Complement Profile in Pedigree of the Family

Subject No.	CIINH <sup>+</sup> (%)	C 4 <sup>+</sup> (%)	C 3 <sup>+</sup> (%)	C 5 <sup>+</sup> (%)	Anaphylatoxin		
					C 4a (ng/ml)	C 3a (ng/ml)	C 5a (ng/ml)
1 propositus	<5	<5	119	108	345	172	<5.0
2 half-sister	<5	<5	150	105	400	52	<5.0
3 daughter of No. 2	13	<5	126	118	370	43	<5.0
4 sister	103	173	150	105	78	63	<5.0
5 daughter	12	<5	115	95	276	55	<5.0
6 daughter of No. 5	25	27	116	108	350	53	<5.0
7 son of No. 5	122	150	119	108	88	52	<5.0
8 husband of No. 5	94	70	60	82	26	85	<5.0
NHP-pool	100	100	100	100	80	59	<5.0
mean±S.D.	—	—	—	—	106±80	79±31	13.4±5.6

<sup>+</sup>Percent of NHP-pool, calculated as 100%.

表 2

Complement Profile of Angioedema Attack and Attack-free Periods (Subject No. 5)

Period	CIINH <sup>+</sup> (%)	C 4 <sup>+</sup> (%)	C 3 <sup>+</sup> (%)	C 5 <sup>+</sup> (%)	Hemolytic activity				Anaphylatoxin		
					CH 50 (unit)	C 4 (SFU/ml)	C 3 (SFU/ml)	C 5 (SFU/ml)	C 4a (ng/ml)	C 3a (ng/ml)	C 5a (ng/ml)
Attack	<5	<5	106	111	6.4	80	14000	91700	328	708	<5.0
Attack-free	12	<5	115	95	19.7	1100	14700	113800	276	55	<5.0
NHP-pool	100	100	100	100	35.6	63400	14600	110000	36	57	<5.0

<sup>+</sup>Percent of NHP-pool, calculated as 100%.

表 3

Complement Profile Before  
and After Danazol Treatment  
(Subject No. 1)

Period	C1 INH <sup>+</sup> (%)	C4 <sup>+</sup> (%)	C3 <sup>+</sup> (%)	C5 <sup>+</sup> (%)	Anaphylatoxin		
					C4a (ng/ml)	C3a (ng/ml)	C5a (ng/ml)
Before danazol treatment	<5	<5	119	108	410	172	<5.0
After 60 days of danazol treatment	28	<5	111	100	330	84	<5.0
NHP-pool	100	100	100	100	59	80	<5.0

<sup>+</sup> Percent of NHP-pool, calculated as 100%.

## 〔考案〕

補体由来のペプチドC4a, C3a, C5a はアナフィラトキシンとも呼ばれ, 肥満細胞からのヒスタミンの遊離, 血管透過性の亢進, 平滑筋の収縮など種々の生物活性を持ち, 多くの免疫反応で重要な役割を果たしていると考えられている。

本研究ではHANE家系において C1 INH の低下例で C4aが増加し, かつ, 浮腫期には C3aの増加とともに C4aも増加していたが, C5a には変化がないことがわかった。また, ダナゾール投与により C1 INH, C4, CH50 が増加し, それに伴い C4a, C3a が減少し, 臨床症状も消失したことから, HANEでは C1 INH の先天的な低下ないし欠損により補体の古典的経路が活性化され, 生じた C4a, C3a により浮腫や SLE様症状や腹痛発作が起こるものと推察される。

# 41 SLEにおけるS-Proteinの動態に関する研究

中嶋 憲章、朝啓司、杉崎徹三  
昭和大学、医学部、第一内科

## 〔目的〕

補体の臨床医学的研究の目的は諸種疾患においてその発症に補体が関与する可能性を追究することである。SLEは補体の関与が最も明確な疾患と考えられており、CH50、C3、C4値が臨床症状と相関する代表的疾患である。

SLEの発症機転には immune complex が関与し、これにより補体が活性化され、形成される補体の生物学的活性物質により炎症及び組織の破壊を来すと考えられている。

我々はすでにSLEにおける補体の動態について classical pathway、alternative pathway、及び制御因子について検索し報告してきた。

最近 MAC (membrane attack complex) inhibitor として S-protein (S-P) の存在が注目されてきた。S-Pは C5b-7が膜リポイドと結合するのを SC5b-7を形成することにより阻害するとされている。したがって補体が活性化され形成される MAC が周囲組織を破壊するのを S-Pが阻止していると考えられている。S-Pが臨床病理学的に重要な意義をもつ可能性があるにもかかわらず、現在のところ S-Pの臨床研究成績の報告は極めて少ない。

今回我々は SLE患者について補体成分及び制御因子と S-Pの動態について検索し、補体活性及びその制御の面より検索したので報告する。

## 〔対象及び方法〕

昭和大学第一内科で診断されたARAの基準を満たすSLE 22例のEDTA加血漿を用いた。S-Pの測定は抗S-P血清(ヘキスト)を25倍に希釈し dilution bufferで更に2倍にする。この希釈血清1ccに対し、Sample量10 $\mu$ lを加え2時間放置し、Laser Nephelometer (L.N.; Hyland社製)で測定した。

C4、C3、C5、C9、C3b in A(I)、properdin (P)、 $\beta$ 1H(H)及び $\beta$ 1C only、complement conversion index (C.C.I)はすでに我々が報告した方法を用いた。CRPの測定にはL.N.用CRPキットを用いL.N.で測定した。

## 〔結果〕

SLE患者血漿中のS-PとC4、C3、 $\beta$ 1C only、C.C.I、C5、C9、P、I、H、CRPとの相関を検討したところ、C5とは負の相関を示し、C9とは正の相関を示した。またIとは正の相関を示し、Hとは最も高い正の相関を示した。(表)

## 〔考察及び結論〕

S-PはC5b-7が膜のリポイドと結合するのをC5b-7に競合して結合することにより阻止する。そして補体が活性化した場合血中に作り出されるMACIによって組織が損傷されるのを防止する機能をはたすと考えられている。したがってS-Pの作用として、①C5b-7に積極的に結合し、C5b-7が膜に結合するのを阻止する場合と②C5b-7が膜に結合せず血液中に存在する時これに結合してその活性を失わせる場合が考えられる。

SLE患者血中ではS-PはC5と負の相関を示した。

我々がすでに報告した成績ではSLEにおいては他の制御因子であるI, H, C3と正の相関を示し、C4bp, I がC4と正の相関を示したのとは異なり、CISとC1INAが負の相関を示した成績と一致する。CISとC1INAが負の相関を示す機序としてC1INAのC1不活化による消費に対して代償性の合成増大によるものと推測した。S-Pの場合もC5b-7の増大に対し、その不活化のために消費されるS-Pが肝において過剰合成される可能性があるものと思われる。

C9がSLEにおいて高値を示すのはacute phase reactantとして肝の合成が増大すると考えられているのでS-PとC9が正の相関を示すのはその為と思われる。

S-PとHが高い相関を示し、またIとも正の相関を示したが、このことはIがC3bのみならずC5bの不活化にも関与することに関連するのではないかと推測した。

Iは常に一定量のC3bを不活化し、その閾値を越えてC3bが形成された場合にC5以下の補体の活性化が成立する。さらにIは固相のC3bを不活化することができC3とIは正の相関を示す。これに比し、C1INAはCISかC4, C2を活性化し、残留するCISを不活化する。S-Pは恐らく、C1INAと同様に膜に結合せず遊離しているC5b-7を不活化するものが主たる働きであろうと推測された。

S-PとHが非常に高い相関を示したことは恐らくその合成の調節機構が類似していることを推測させるとともに異化の機序も近似したものであろうと推測した。

以上の如く今回の成績よりS-PはSLEにおける動態より分析するとその変動がC1INAと類似しIとは異なり、液相のC5b-7に結合するが、消費されず合成が促進され、その合成はHと同じ調節機構に支配されていると推測された。

- 〔文献〕
- 1) 中嶋憲章, 韓啓司, 杉崎徹三, 臨床病理29:171~174(1981)
  - 2) 中嶋憲章, 韓啓司, 杉崎徹三; 臨床免疫15:497~451(1983)
  - 3) 韓啓司, 中嶋憲章, 杉崎徹三; 補体シンポジウム18:34~36(1981)
  - 4) 韓啓司, 中嶋憲章, 杉崎徹三; 免疫薬理2:411~415(1984)

表 SLEにおけるS-Pと補体成分の相関

	C4	C3	$\beta_2C$ only	c.c.I	C5	C9	P	I	H	CRP
r	0.357	0.241	0.152	-0.050	** -0.747	** 0.661	0.293	0.450	** 0.903	** -0.223

n = 22 \* P < 0.05 \*\* P < 0.01

classical pathway

CIINA

C/S

C4

C2

C4b2a

C5

C3b

C3

C4bP+I

4bi

C3bBb

C5b

C6

C5b6

C7

C5b-7

C8

C5b-7

C8

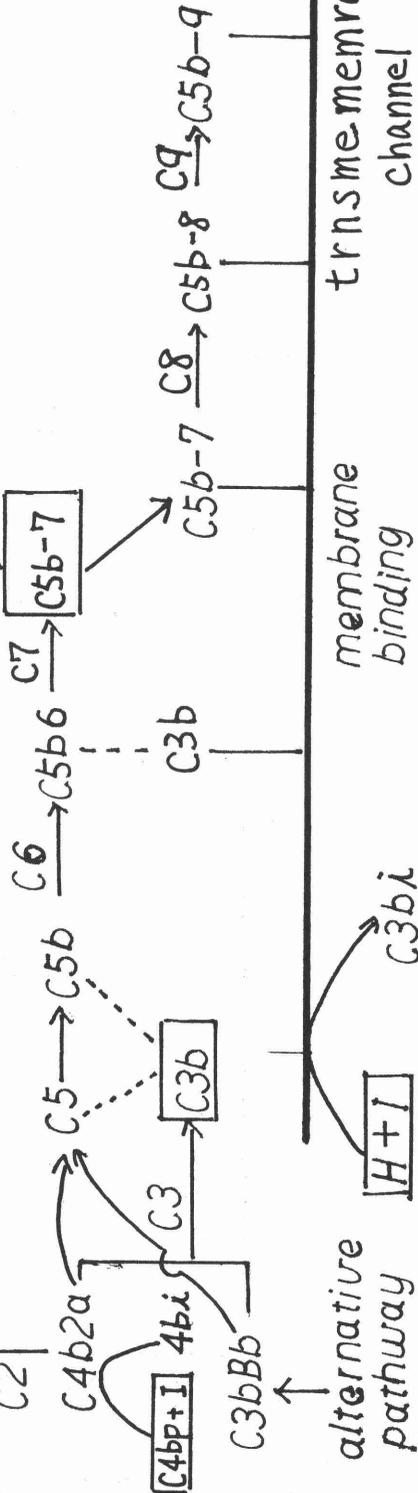
C5b-8

C9

C5b-9

S-Pと補体とMACの関係

S  $\Rightarrow$  SC5b-7  $\xrightarrow{C8}$  SC5b-8  $\xrightarrow{C9}$  SC5b-9



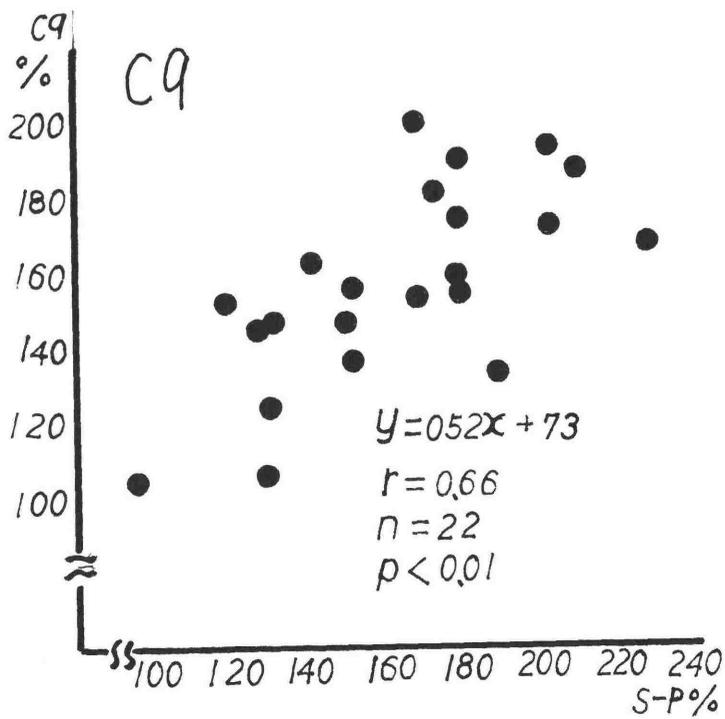
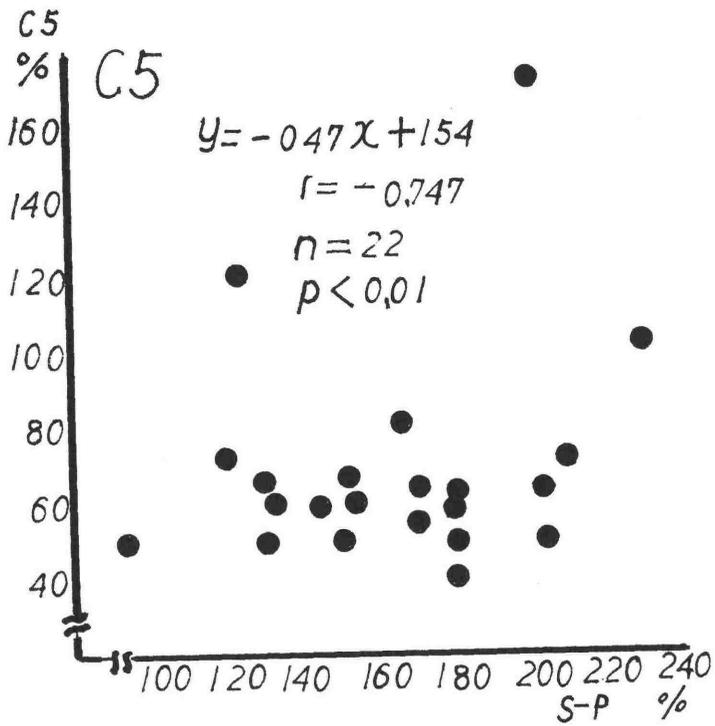


図- SLE患者血漿中におけるC5, C9とS-Pの相関

第22回 補体シンポジウム講演抄録集

昭和60年6月5日 印刷

昭和60年6月10日 発行

編集代表者 第22回 補体シンポジウム 世話人・深山昭雄

発行所 〒 814 福岡市城南区七隈34  
福岡大学医学部微生物学教室内  
補体シンポジウム事務局 ☎ (092) 801-1011

印刷所 〒 467 名古屋市瑞穂区亀城町2-5  
瑞穂印刷 ☎ (052) 872-0160





