





Proceeding of the Complement Symposium

Vol. 32 (1995)



会 期：平成7年7月13日（木）・14日（金）・15（土）

会 場：岡山東急ホテル

〒700 岡山市大供3-2-18、Tel：086-233-2411

集会長：岡山大学医学部・第一内科 辻 孝夫

〒700 岡山市鹿田町2-5-1

会長	岡田秀親
運営委員	北村 肇
	瀬谷 司
	藤田禎三
	大井洋之
	岡田則子
	木下タロウ
次期集会長	岡田秀親
監事	廣瀬俊一
	酒井好古
集会長	辻 孝夫
事務局長	藤田禎三

# 目 次

## [特別講演]

発作性夜間血色素尿症の分子病態 ----- 1

木下タロウ

[大阪大学微生物病研究所免疫不全疾患]

## [教育講演1]

臨床からみた補体学 ----- 5

近藤元治

[京都府立医科大学第一内科]

## [教育講演2]

キラーT細胞認識がん拒絶抗原ペプチド ----- 11

中山睿一

[岡山大学寄生虫学・免疫学]

## [ミニシンポジウム：肝炎と補体異常]

- 1) C型慢性肝疾患における血清補体Cold Activationの臨床的  
意義 ----- 17

安藤文英、下橋直也、澄井俊彦、佐々木 望、田中英介、古寺  
重喜<sup>1</sup>、山本政弘、酒井好古<sup>2</sup>

[<sup>1</sup>国立病院九州医療センター消化器科、<sup>2</sup>血液免疫科、  
同臨床研究部]

- 2) 慢性C型肝炎患者血清にみられる低補体価の臨床的・ウイルス学的  
検討 ----- 21

下村宏之、石井泰史、和唐正樹、辻 英之、藤尾耕三、近藤  
淳一、藤岡真一、岩崎良章、辻 孝夫

[岡山大学第一内科]

3) B型、C型慢性肝炎患者における赤血球Complement Receptor Type 1の解析 ----- 25

考藤達哉、林 紀夫、竹原徹郎、片山和宏<sup>1</sup>、加藤道夫<sup>2</sup>、  
秋山雅彦<sup>3</sup>、佐々木裕、笠原彰紀、房本英之、鎌田武信<sup>1</sup>

[<sup>1</sup>大阪大学第一内科、<sup>2</sup>国立大阪病院消化器科、<sup>3</sup>新千里  
病院内科]

4) 肝炎における補体cold activationとcryoprecipitate --- 28

竹村周平<sup>1</sup>、瀬戸信之<sup>2</sup>、中西貞信<sup>3</sup>、土井たかし<sup>3</sup>、小野寺秀記<sup>3</sup>、  
出口雅子<sup>4</sup>、上田正博<sup>2</sup>、近藤元治<sup>3</sup>

[<sup>1</sup>京都府立与謝の海病院、<sup>2</sup>金井病院、<sup>3</sup>京都府立医科大学  
第一内科、<sup>4</sup>京都第二赤十字病院]

5) コールドアクチベーションとリウマチ因子 ----- 32

中川俊正<sup>1</sup>、上田一仁<sup>2</sup>、中嶋秀人<sup>3</sup>、山本大助<sup>4</sup>、清水 章<sup>1,2</sup>

[<sup>1</sup>大阪医科大学病態検査学、<sup>2</sup>中央検査部、<sup>3</sup>第一内科、  
<sup>4</sup>医学情報処理センター]

[一般講演]

1) ヒト腎炎におけるC3 mRNAの発現 ----- 37

大澤 勲、大井洋之、藤田宜是、上松瀬勝男<sup>1</sup>、野中 勝<sup>2</sup>

[<sup>1</sup>日本大学板橋病院第二内科、<sup>2</sup>名古屋市立大学生化学  
第二]

2) ベーチェット病患者多核白血球(PMN)のC3d分泌について --- 40

陳 麗理、小暮美津子<sup>1</sup>、西川 恵、相川英三<sup>2</sup>、奥田智子<sup>3</sup>

[<sup>1</sup>東京女子医科大学眼科学、<sup>2</sup>東京女子医科大学解剖学・  
発生生物学、<sup>3</sup>東洋大学工学部化学科]

3) 潰瘍性大腸炎病変局所における補体活性化の免疫組織学的検討 43

上江洲篤郎、水野元夫、植木 亨、木曾尊彦、田中彰一、  
中川昌浩、松岡佳子、木原康裕、稲葉知己、柚木直子、

島田百利三、吉永文哉、那須淳一郎、岡田裕之、辻 孝夫

[岡山大学第一内科]

- 4) 間質性肺疾患におけるBALF中肺胞マクロファージ及びリンパ球補体  
関連膜蛋白 ----- 46  
中原梨佐、竹村周平、小野寺秀記、笠松美宏、瀬戸信之、  
一尾直子、土井たかし、中西貞信、岡本雅之、福田 亙、  
柳田国雄、上田正博、出口雅子、近藤元治  
[京都府立医科大学第一内科]
- 5) 慢性血液透析患者における関節液中の補体factor D濃度につい  
て ----- 50  
中西 功<sup>1</sup>、北野悦子<sup>2</sup>、林 晃正<sup>1</sup>、勝二達也<sup>1</sup>、岡田倫之<sup>1</sup>、  
椿原美治<sup>1</sup>、北村 肇<sup>2</sup>  
[<sup>1</sup>大阪府立病院腎臓内科、<sup>2</sup>大阪府立看護大学医療短大部]
- 6) ヒト補体C6欠損症の遺伝子解析 ----- 53  
西坂浩明、堀内孝彦<sup>1</sup>、福森泰雄<sup>2</sup>、長沢浩平<sup>1</sup>、林 健志<sup>3</sup>、  
仁保喜之<sup>1</sup>、John E. Volanakis<sup>4</sup>  
[<sup>1</sup>九州大学医学部第一内科、<sup>2</sup>大阪府赤十字血液センター、  
<sup>3</sup>九州大学遺伝情報研究施設ゲノム解析分野、<sup>4</sup>Division of  
Clinical Immunology and Rheumatology, Department of  
Medicine, University of Alabama<sup>a</sup>]
- 7) 慢性肝炎における可溶性補体レセプター (sCR1)の検討 -- 56  
岩崎良章、下村宏之、宮池次郎、藤尾耕三、辻 英之、和唐  
正樹、近藤淳一、藤岡真一、石井泰史、辻 孝夫  
[岡山大学第一内科]
- 8) 慢性肝疾患における赤血球の補体レセプター(CR1)の検討 - 61  
宮池次郎、岩崎良章、下村宏之、藤尾耕三、辻 英之、和唐  
正樹、近藤淳一、藤岡真一、石井泰史、辻 孝夫  
[岡山大学第一内科]

- 9) ヒト中枢神経系におけるC5a受容体の発現 ————— 65  
高橋三津雄、Lajos Baranyi、桜田 誓、山本孝之<sup>1</sup>、岡田則子、  
岡田秀親<sup>2</sup>  
[<sup>1</sup>野依福祉村病院長寿医学研究所、<sup>2</sup>名古屋市立大学分子  
医学研究所生体高分子部門]
- 10) フローサイトメトリーを用いた二重染色法による好中球・好酸球  
上のC5a受容体発現の測定と病勢判定への応用 ————— 69  
桜田二友<sup>2</sup>、阿部正義<sup>1</sup>、宮本康嗣<sup>1</sup>、原 信之<sup>2</sup>、古川達雄<sup>1</sup>  
[<sup>1</sup>福岡大学薬理学、<sup>2</sup>九州大学胸部疾患研究施設]
- 11) ヒト血漿中のCarboxypeptidase R(CPR)の活性測定法 — 74  
石川泰成、William Campbell、山本孝之<sup>1</sup>、郭曉燕、森岡章博、  
岡田秀親<sup>2</sup>  
[<sup>1</sup>野依福祉村病院長寿医学研究所、<sup>2</sup>名古屋市立大学分子  
医学研究所生体高分子部門]
- 12) 腸管虚血再灌流時のショックにおける血中carboxypeptidaseと補  
体の役割 ————— 78  
城 卓志、伊藤 誠、猪飼昌弘、岩田章裕、岡山直司、  
横山善文、武内俊彦<sup>1</sup>、岡田則子、岡田秀親<sup>2</sup>  
[<sup>1</sup>名古屋市立大学第一内科、<sup>2</sup>名古屋市立大学分子  
生物学研究所]
- 13) IFN $\gamma$ およびTNF $\alpha$ によるヒト表皮細胞のC3産生増強 — 80  
照井 正、田上八朗<sup>1</sup>、石井邦明<sup>2</sup>  
[<sup>1</sup>東北大学皮膚科、<sup>2</sup>東北大学薬理学第二]
- 14) C3変換酵素レベルでのラット膜補体制御因子機能を阻害するモノ  
クローナル抗体により惹起した局所の炎症反応 ————— 82  
西川和裕、松尾清一<sup>1</sup>、岡田則子、岡田秀親<sup>2</sup>  
[<sup>1</sup>名古屋大学第三内科、<sup>2</sup>名古屋市立大学分子医学研究所  
生体高分子部門]

- 15) 腎における補体制御膜因子の役割 ----- 86  
 野村 敦、西川和裕、湯澤由紀夫<sup>1</sup>、岡田則子、岡田秀親<sup>2</sup>、  
 Sara J. Piddlesden、B. Paul Morgan<sup>3</sup>、松尾清一<sup>1</sup>  
 [1名古屋大学第三内科、2名古屋市立大学分子医学研究所  
 生体高分子部門、3ウェールズ大学生化学]
- 16) ヒト老人正常脳組織における補体制御膜因子の発現 ---- 90  
 赤津裕康<sup>1,2</sup>、山田達夫<sup>3</sup>、岡田則子<sup>1</sup>、山階 学<sup>2</sup>、山本孝之<sup>2</sup>、  
 岡田秀親<sup>1</sup>  
 [1名古屋市立大学分子医学研究所生体高分子部門、2野依  
 福祉村病院長寿医学研究所、3千葉大学神経内科]
- 17) HIV感染細胞における補体制御膜因子の発現低下の解析 - 94  
 呉笑山、岡田則子、細川雅人、野中真弓、岡田秀親  
 [名古屋市立大学分子医学研究所生体高分子部門]
- 18) CD59による超急性拒絶反応の抑制 ----- 97  
 宮川周士、三方彰喜、種村匡弘、白倉良太<sup>1</sup>、寺戸敦子、  
 畑中道代、松本美佐子、瀬谷 司<sup>2</sup>  
 [1大阪大学臓器移植科、2大阪府立成人病センター免疫]
- 19) 発作性夜間血色素尿症(PNH)の病因遺伝子PIG-Aの遺伝子産物の  
 解析 ----- 99  
 渡辺玲香、木下タロウ<sup>1</sup>、山本章嗣、榎木龍一<sup>2</sup>、竹田潤二、  
 井上徳光<sup>1</sup>  
 [1大阪大学微生物病研究所免疫不全疾患研究分野、2関西  
 医科大学第一生理]
- 20) GPIアンカー生合成後期に関与するヒト及びマウス遺伝子のクロー  
 ニング ----- 103  
 大石一人、栗本康行、井上徳光<sup>1</sup>、遠藤雄一、藤田禎三<sup>2</sup>、  
 竹田潤二、木下タロウ<sup>1</sup>  
 [1大阪大学微生物病研究所免疫不全疾患、2福島県立医科  
 大学生化学第二]

- 21) GPIアンカー生合成後期に関与するPIG-B遺伝子産物の細胞内局在、機能部位に関与する考察 ----- 107  
 高橋 実、大石一人、井上徳光<sup>1</sup>、遠藤雄一<sup>2</sup>、竹田潤二、木下タロウ<sup>1</sup>  
 [1大阪大学微生物病研究所免疫不全疾患、2福島県立医科大学大学生化学第二講座]
- 22) C1インヒビターによるMASP活性制御 ----- 110  
 松下 操、藤田禎三  
 [福島県立医科大学大学生化学第二講座]
- 23)  $\alpha_2$ MのMBP associated serine protease (MASP) との結合および阻害 ----- 112  
 寺井 格<sup>1</sup>、小林邦彦<sup>2</sup>、松下 操<sup>3</sup>、藤田禎三<sup>3</sup>、松野一彦<sup>1</sup>  
 [1北海道大学臨床検査医学、2小児科、3福島県立医科大学大学生化学第二講座]
- 24) モルモットDAFの遺伝子解析 ----- 119  
 三輪隆史<sup>1</sup>、野中真弓<sup>1</sup>、岡田則子<sup>1</sup>、細川雅人<sup>1</sup>、野中 勝<sup>2</sup>、岡田秀親<sup>1</sup>  
 [1名古屋市立大学分子医学研究所生体高分子部門、2生化学第二]
- 25) Decay accelerating factor (DAF) の介するシグナル伝達メカニズムの解析 ----- 122  
 藏屋幹夫、藤田禎三  
 [福島県立医科大学大学生化学第二講座]
- 26) ヒト精巣より得られた新種のCD46(membrane cofactor protein) splicing product ----- 125  
 原とも子、松本美佐子、北村雅哉、畑中道代<sup>1</sup>、瀬谷 司<sup>1,2</sup>  
 [1大阪府立成人病センター研究所第6部、2新技術事業団さきがけ研究21]

- 27) 豚のMCPホモログの発現クローニングと機能解析 ----- 128  
 豊村浩司<sup>1,2</sup>、村上 博、重久 保<sup>2</sup>、井上徳光、竹田潤二、  
 木下タロウ<sup>1</sup>  
 [1大阪大学微生物病研究所免疫不全疾患、2日本ハム(株)  
 中央研究所]
- 28) 麻疹ウイルスレセプターとしての補体制御因子、CD46  
 (membrane cofactor protein) ----- 131  
 栗田光恵<sup>1</sup>、柳 雄介<sup>2</sup>、岩田和憲<sup>3</sup>、原とも子、松本美佐子<sup>1</sup>、  
 瀬谷 司<sup>1,4</sup>、長澤滋治<sup>3</sup>  
 [1大阪府立成人病センター研究部第6部、2東京大学細菌学  
 講座、3北海道大学薬学部衛生化学講座、4新技術事業団  
 さきがけ研究21]
- 29) 補体第一成分C1sの新しい機能と骨端軟骨組織における局在に  
 ついて ----- 135  
 中川晃一、崎山比早子、栗岩和子<sup>1</sup>、今井一志、岡田保典<sup>2</sup>、  
 加治和彦<sup>3</sup>、守屋秀繁<sup>4</sup>  
 [1放射線医学総合研究所生物影響研究部、2金沢大学がん  
 研究所分子免疫部門、3東京都老人総合研究所アイソトープ  
 研究室、4千葉大学整形外科]
- 30) アフリカツメガエルの発生過程における補体遺伝子 Bf、C3および  
 C4の発現 ----- 139  
 野中 勝、紀 新、佐々木 實<sup>1</sup>、栃内 新<sup>2</sup>  
 [1名古屋市立大学生化学第二、2北海道大学理学研究科  
 生物]
- 31) メダカ補体B因子(Bf)のクローニング ----- 142  
 黒田範行<sup>1</sup>、島田敦子<sup>2</sup>、嶋 昭紘<sup>2</sup>、佐々木 實<sup>1</sup>、野中 勝<sup>1</sup>  
 [1名古屋市立大学生化学第二、2東京大学理学部動物]

- 32) C3修飾による腫瘍細胞特異的免疫応答の検討 ————— 145  
大工原晴之、岡田則子<sup>1</sup>、L. Baranyi<sup>2</sup>、V. M. Holers<sup>3</sup>、  
岡田秀親<sup>1</sup>  
[<sup>1</sup>名古屋市立大学分子医学研究所生体高分子部門、  
<sup>2</sup>野依福祉村病院長寿医学研究所、<sup>3</sup>University of  
Colorado Health Sciences Center]
- 33) C3活性化分子M161抗原の発現機構の解析 ————— 149  
松本美佐子、栗田光恵、吉川聡美<sup>1</sup>、辻 祥太郎、長澤滋治<sup>2</sup>、  
瀬谷 司<sup>1,3</sup>  
[<sup>1</sup>大阪府立成人病センター研究部第6部、<sup>2</sup>北海道大学  
薬学部衛生化学講座、<sup>3</sup>新技術事業団さきがけ研究21]
- 34) アポトーシス死細胞におけるC3フラグメント受容分子の解析 152  
辻 祥太郎、松井広行、滝沢文健、長澤滋治  
[北海道大学薬学部衛生化学講座]

特別講演

発作性夜間血色素尿症の分子病態

木下タロウ

大阪大学微生物病研究所免疫不全疾患



# 発作性夜間血色素尿症の分子病態

木下タロウ

阪大・微研・免疫不全

Molecular pathology of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria.  
(Dept. of Immunoregulation, Research Institute for Microbial Diseases,  
Osaka University)

発作性夜間血色素尿症(PNH)は補体によって自己赤血球が破壊される疾患として長く補体研究者の興味を引きつけている。PNH患者赤血球でDAFが欠損している事が1983年頃に発見され、補体制御因子欠損症として病態が理解されるようになった。1986年頃には、PNHで同時に欠損している赤血球アセチルコリンエステラーゼ、好中球アルカリホスファターゼ、DAFがいずれもGPIアンカー型タンパク質である事が明らかになりPNHの異常の生化学的本質はGPIアンカーの生合成異常かペプチドの転移にあるだろうと考えられるようになった。PNH患者の異常血液細胞でGPIアンカーが合成されていない事が実験的に示されたのは1991年である。

本講演では、この頃から始まったPNHの異常の遺伝学的研究をたどり、PNHの最新の病態像と残された課題を検討したい。

主な項目と文献を以下に記す。

1. PNHの異常細胞では、GPIアンカー生合成の最初のステップが欠損している事の証明(文献 1-5)
2. PNHの異常細胞は、GPIアンカー生合成の最初のステップが欠損している3つのミュータントグループのうちクラスAのミュータントと同じ遺伝子に異常がある事の証明(文献 1, 2, 5)
3. クラスAのミュータントで変異している遺伝子PIG-Aのクローニング(文献 6-8)
4. PNHの異常細胞でPIG-Aに体細胞突然変異が起こっている事と劣性形質の変異が優性に発現するのはPIG-AがX染色体上に存在するためである事の証明(文献 9)

5. 日本、ヨーロッパ、アメリカ、タイのPNH患者のすべてでPIG-Aに変異が見いだされる事(文献 10-16)と他の遺伝子が原因の症例がない事の理由(文献 17, 本シンポジウム大石らおよび高橋ら)
6. PIG-A変異細胞が血液を占有するメカニズムの解明へ向けたアプローチ-----GPIアンカー欠損マウス(文献 18)

#### 文献

- 1 Armstrong, C. et al. J Biol Chem 267, 25347 (1992)
- 2 Takahashi, M. et al. J Exp Med 177, 517 (1993)
- 3 Hillmen, P. et al. Proc Natl Acad Sci USA 90, 5272 (1993)
- 4 Hidaka, M. et al. Biochem Biophys Res Commun 191, 571 (1993)
- 5 Norris, J. et al. Blood 83, 816 (1994)
- 6 Miyata, T. et al. Science 259, 1318 (1993)
- 7 Iida, Y. et al. Blood 83, 3126 (1994)
- 8 Bessler, M. et al. Lancet 343, 951 (1994)
- 9 Takeda, J. et al. Cell 73, 703 (1993)
- 10 Miyata, T. et al. N Engl J Med 330, 249 (1994)
- 11 Bessler, M. et al. EMBO J 13, 110 (1994)
- 12 Bessler, M. et al. Br J Haematol 87, 863 (1994)
- 13 Ware, R. E. et al. Blood 83, 2418 (1994)
- 14 Yamada, N. et al. Blood 85, 885 (1995)
- 15 Ostendorf, T. et al. Blood 85, 1640 (1995)
- 16 Pramoontjago, P. et al. Blood in press
- 17 Ware, R. E. et al. Blood 83, 3753 (1994)
- 18 Kawagoe, K. et al. Genomics 23, 566 (1994)

教育講演1

臨床からみた補体学

近藤元治

京都府立医科大学第一内科



# 臨床からみた補体学

近藤元治

京都府立医科大学第1内科

Clinical aspect of the complement system

Motoharu Kondo

The 1st Department of Internal Medicine,

Kyoto Prefectural University of Medicine

<はじめに>

わが国では、世界の補体研究の始まりに参画した研究者たちと、それを継承した若手の研究者の努力が、補体に限りない愛着を持たれた長老による推進と、さらには営利を無視してサポートされた多くの人たちのお蔭で、補体研究が急ピッチで、しかも途切れることなく進められ、数々の成果が上げられてきた。

歴史を振り返りながら、特に臨床における補体学を眺めるとき、「よくぞこゝ迄きた」という思いと、「まだこれからすることが山ほどある」という将来への展望が開けてくる。

臨床家の一人として長年かかわりを持ってきた補体について、出来得るならば若い研修医や、これから補体に関心を持つようとしている人たちに、お話をさせていただきたいと思う。

## 1・補体の測定で始まった臨床補体学

ウサギのアナフィラキシー・ショックに際して、血中補体価の低下があることが、ドイツ語で Komplementschwund として知られたのは随分昔のことである。それ以来、人間の病気でも補体価に変化があるのではないかと、各種の疾患で補体の測定が行われてきた。典型的なものは全身性エリテマトーデス(SLE)であり、なるほど免疫複合体による補体の古典経路(classical pathway)の活性化の結果として、誰にでも受け入れられたものである。

中でも、先天的な補体系因子の欠損として、家族性血管神経性浮腫(HANE)が有名になり、C1の活性化を阻害するC1-inhibitorの欠損が本体で、そのため限局性の浮腫を生じ、CH50やC4、C3の低値をとることが知られてきた。これにより、酵素系蛋白である補体系の「活性化」とその「制御」についての in vitro の知識が、in vivo においても当てはまる

ことが理解されたのである。

これに勇気づけられて、各種疾患での補体価測定が熱心に行われ、低補体や高補体など、さまざまな異常が見つかるようになった。だが、CH50は簡単に測定できても、9つの補体成分の測定には、感作赤血球に補体成分を付けたintermediate cellを使わねばならず、一部の専門の施設でないと難しい。そこで便宜上、C4とC3の抗血清を作成し、免疫拡散法やレーザーネフェロメトリー法での測定が普及した。

しかし、肝臓疾患に見られる低補体の多くが、採血後の *in vitro* での活性化として知られた「血清と血漿の補体解離」あるいは「cold activation」と呼ばれる現象であることが分かり、補体価の解釈には慎重でなければならないことも強調された。また、低補体を示す例には先天的な補体成分の欠損によるものがしばしば見られ、日本の研究者の残した功績は大きい。

ところがそうした補体の異常値が、従来の抗原と抗体による補体の活性化では説明出来ぬ場合が多いために、臨床家は大いに戸惑ったものである。それを解決してくれたのが、補体活性化の第2経路 (alternative pathway) の解明であった。いくつかの因子が複雑にからむので、詳しい活性化のメカニズムはなかなか理解しにくいものがあつた。ただ、低CH50にかかわらずC4が正常だったとしても、C3以降の成分に低値を見ればこの経路が活性化されたのだと考えられるから、臨床家も喜んだ。

そうした低補体とは逆に、高補体のメカニズムについては「補体産生の増加」や「代謝の抑制」といった漠然とした解釈しかなく、同じ自己免疫疾患の範疇に入るSLEの低補体と慢性関節リウマチでの高補体の差を、明確に説明することは出来なかった。そうなると、補体成分の体内動態を見る必要が生まれてくる。これは精製した補体成分にアイソトープをつけて患者に注射し、血中での消失速度を健常者と比較するものである。だが手間が煩雑で、簡単に出来るものではない。そこで考えられたのが、体内で補体が活性化される際に生じる「補体フラグメント(fragment)」の測定であった。C3やC5のフラグメントは好中球の遊走因子として知られてはいたが、それを測定することは困難だった。当初はC3などの成分が活性化を受けてC3aとC3bになると、免疫電気泳動のパターンに変化を見ることから、電気泳動で活性化の有無を調べようとしたものである。だが、*in vitro*の活性化を調べるにはこの方法は有用であっても、*in vivo*での変化は捕らえ難い。やがてC4、C3、C5などの補体成分のフラグメントに対する抗体が作られ、患者の血中での変化を調べることが出来るようになった。フラグメントが増えれば、とりもなおさずそれらの成分が体内で活性化を受けた証拠になる。経時的にこれらの変化を調べることで、病状の推移を知る事が出来た。

## 2・免疫組織学的な検討

蛍光抗体法という手技が普及すると、手術や生検で得られた組織に補体の沈着があるかどうかの検討が行われた。腎臓や皮膚が手頃な材料であり、どの成分が沈着しているか、また同時に沈着する免疫グロブリンの種類との関連から、どの補体経路の活性化が病気の成立に参与したかが推測出来た。蛍光抗体法も今では酵素抗体法に代わってきたが、臨床的に有力な手段である。

## 3・補体レセプター

組織レベルから細胞レベルに補体の研究が進むと、臨床家にとって補体がさらに病気と密接な関係を持っているとの認識が高まった。

一つは、単離細胞を蛍光抗体法や酵素抗体法で補体成分の染色を行い、補体の産生や細胞膜表面への沈着を見ることであった。これにより、感作赤血球の寒天内溶血で補体の産生を見た plaque formation を進歩させることが出来た。

もう一つが、細胞膜にある補体レセプター(receptor)の研究である。特定の細胞に補体成分を結合させる能力があることは以前から知られており、免疫粘着現象(immune adherence)として先ず霊長類の赤血球で研究された。当初は免疫複合体の感度の高い検出法として利用されたが、これがその後のレセプター研究の足がかりとなったのである。リンパ球の中で、T細胞とB細胞の区別にC3結合の赤血球を用いてロゼット形成を見た頃から、レセプターへの興味が増してきた。

特に、赤血球や白血球の持つCR1などの補体レセプターの存在は、生体防御との関連で注目されるだけでなく、各種の細胞機能の面から病因を解明し、あるいは病気の治療に役立てることさえ可能になってきている。たとえばSLE患者では赤血球のCR1が減少していたり、エイズ患者でもこのCR1が少ないのでCR1リッチな赤血球の輸血が病状を好転させるという事実などから、今後の応用範囲の広がる可能性を示している。

他方、生体内では絶えず補体の活性化が生じているのに、生体を構成する臓器や細胞が補体の活性化で必ずしも傷害を受けないのも、臨床家にとっては不思議でならなかった。おそらく進化の過程で、原始的な防御機構としての補体は、外来の病原体や体内の不要物に対して生体を守るようには働くが、一般の細胞にはダメージを与えぬように、何らかのコントロール機構が存在しているのであろうと推測されていた。

レセプターの研究は、細胞膜上に補体活性化を抑制して細胞を守る制御蛋白が存在することを明らかにした。DAF(decay accelerating factor)、MCP(membrane cofactor protein)などは、たとえ細胞膜上で補体の活性化が進行しても、その最終段階にいたる手前で活性

化をストップさせ、細胞を補体から守るものである。これがうまく行かぬ時、発作性夜間血色素尿症(PNH)などの疾患を惹起するのがわかった。

将来的な夢物語だが、臓器移植の急性拒絶反応への補体の関与を抑えるために、ドナーの臓器にこうした制御蛋白を遺伝子操作で発現させておく方法も、すでに考えられている。

#### 4・補体があっても働けないことはないか？

進行ガンの患者では、一般に血中補体価は高い。一部のガンでは、ガン細胞が補体成分を産生することもあるが、多くは慢性炎症と同じ意味あい、この高補体を説明している。一方、担ガン生体に見られる易感染性については、免疫能の低下で説明されているが、補体には無関係な出来事なのだろうか？

実は、高補体の患者では、C1 inhibitor やI(C3 inactivator)のレベルも高値なのである。感染に際して、補体は防御に働こうとするのだが、インヒビターのために十分に働けずに終わっているということはないのだろうか？

糖尿病でも、血中補体価は高くしかも易感染性がある。好中球の貪食能が低下しているという事実は一般に認められているが、補体は無関係なのだろうか？たとえば最近、糖尿病の合併症に「グリケーション」が注目されている。非酵素的な糖化反応(non-enzymatic glycosylation)のことで、高血糖の患者のC3がこの影響を受け、好中球のオプソニン作用を弱めるとの報告がある。

#### 5・おわりに

免疫学の分野では、サイトカインが花盛りである。補体の研究が或る程度進んだ頃、多くの免疫学者は「補体は難解だ」として避けて行った。そして、より特異的であるからというので、免疫グロブリンから細胞性免疫に向けての研究がもてはやされたものである。そして今、サイトカインは訳が分からぬと言うと叱られそうだが、複雑なネットワークで研究者を戸惑わせている。それに比べると、補体系の何と単純明快なことか！

補体という原始的な生体防御機構は、今日では多くの細胞の機能にも影響を及ぼしている事が明らかになりつつある。人間が生きていく上に不可欠の補体。やらねばならぬことが、山積している。

教育講演2

キラーT細胞認識がん拒絶抗原ペプチド

中山睿一

岡山大学寄生虫学・免疫学



# キラーT細胞認識がん拒絶抗原ペプチド

中山睿一

岡山大学医学部寄生虫学・免疫学講座

Eiichi Nakayama

Tumor rejection antigen peptides recognized by cytotoxic T-cells

(Department of Parasitology and Immunology,

Okayama University Medical School)

T細胞はMHC分子の溝の中に存在するペプチド断片を抗原としてMHC分子とともに認識する。腫瘍抗原も通常の抗原と同様にMHC分子と結合していると考えられる。このような腫瘍抗原ペプチドの同定には二つのアプローチがある。その一つは、抗原ペプチドの発現を支配する遺伝子をまず解析しようとするものであり、もう一つは、MHC結合ペプチドを抽出して直接アミノ酸配列を決定しようとするものである。前者の方法では、主にトランスフェクションによって腫瘍抗原の発現を支配する遺伝子を同定し、得られた遺伝子の塩基配列からペプチドを検索する。Boonら<sup>1)</sup>の研究グループはこのようにして、悪性黒色腫細胞にMAGE-1およびMAGE-3遺伝子を見出し、これらの遺伝子によってその発現が支配され、患者由来CTLによって認識されるペプチドを同定した。河上ら<sup>2,3)</sup>も、同様の方法で、やはり悪性黒色腫に、MART-1、gp 100遺伝子にコードされるCTL認識ペプチドを見出している。

一方、後者の方法は、MHC分子に結合しているペプチドを抽出して、それをHPLCによって分離回収できるというRammenseeら<sup>4)</sup>の報告に基づいている。得られるペプチド分画を直接エンドマン分解によって解析可能であるが、さらに、タンデム質量分析器を使えば、極微量ペプチドの解析が可能である<sup>4)</sup>。このような方法によって、悪性黒色腫にPmel 17<sup>5)</sup>が見出されたが、これはgp 100と同じであった。同じ方法で、マウスLewis肺癌のCTL認識ペプチドがコネキシン 37<sup>6)</sup>に由来することが見出された。われわれも、同様の方法でマウス白血病に特異的CTL認識ペプチドを見出した<sup>7)</sup>が、これは原がん遺伝子aktの非翻訳領域に由来するものであった。MAGE-1、3は、正常には発現しない遺伝子のがん化に伴って発現したものである。また、チロシナーゼ、gp 100のように正常の蛋白に由来するペプチドが、がん抗原になる場合もある。われわれの見出した、正常遺伝子の非翻訳領域ががん抗原になるマウス白血病ペプチドは、新しいカテゴリーのがん抗原である。

## 文献

- 1) Boon T. et al., *Annu. Rev. Immunol.* 12, 337 (1994)
- 2) Kawakami Y. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 3515 (1994)
- 3) Kawakami Y. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 6458 (1994)
- 4) Rammensee H.-G. et al., *Ann. Rev. Immunol.* 11, 213 (1994)
- 5) Cox A.L. et al., *Science* 264, 716 (1994)
- 6) Mandelboim O. et al., *Nature* 369, 67 (1994)
- 7) Uenaka A. et al., *J. Exp. Med.* 180, 1599 (1994)

## ミニシンポジウム：肝炎と補体異常



# 1 C型慢性肝疾患における血清補体 Cold Activation の臨床的意義

安藤文英、下橋直也、澄井俊彦、佐々木望、田中英介、古寺重喜<sup>1</sup>、  
山本政弘、酒井好古<sup>2</sup>

国立病院九州医療センター <sup>1</sup>消化器科、<sup>2</sup>血液免疫科、同臨床研究部

The clinical significance of serum complement cold activation  
of hepatitis C virus (HCV) associated liver diseases

(<sup>1</sup>Department of Hepato-Gastroenterology, <sup>2</sup>Hematology and Immunology,  
Clinical Research Institute of National Kyushu Medical Center)

## <はじめに>

血清補体のCold Activation現象(以下CCA)がC型肝炎ウイルス(以下HCV)感染と密接な関連性を有し、極めて高頻度かつ特異的に観察されることを報告してきた<sup>1, 2, 3, 4)</sup>。その発生機作においてはHCV血症の存在が必要条件であることを見いだした<sup>4)</sup>が、HCVそのものによるものであるのか或はHCV感染に派生する宿主の生体反応によるものかは不明である。また、in vitroの現象であるCCAが生体に与える影響の有無、即ちその臨床病理学的意義も明かではない。特にCCAを認める慢性肝疾患患者にCCAの臨床的表現があるのか否かは興味深い。このことを明らかにする目的で以下臨床的に検討した。

## <対象と方法>

1993年1月より1994年9月迄の、約20ヶ月間、当科で検査・治療を行ったC型慢性肝疾患患者261例、B型慢性肝疾患63名、その他の慢性肝疾患患者36名につき一般肝機能検査の他、CH50法による補体活性を測定した。同時に採取された血清とヘパリン血漿を4°Cでover night処理した後、両試料を同時に測定した。血清補体価(sCH50)と血漿補体価(pCH50)間で10U/ml以上の解離が認められた場合にCCA陽性と判定した。各種の自己抗体検出、C1q法・抗C3d抗体法・モノクロナールRF法による免疫複合体検出、クリオグロブリン(以下Cry.)、免疫グロブリン分画定量、補体蛋白C3・C4の定量も同時に行った。肝疾患の診断は原則的に肝生検による組織診断によったが、肝臓シンチグラフィ、肝臓エコー、CT、などの所見も参考にした。

全患者に対し肝外症状も含めた症状の有無とその内容につき詳細な問診を行った。これらの観察項目につき、CCA(+)群と、CCA(-)群との間で比較検討した。C型慢性肝疾患患者については CCAの有無に拘らず、寒冷処理sCH50の経時的観察を行った。インターフェロン（以下IFN）治療を行ったC型慢性活動性肝炎患者19例についても寒冷処理sCH50 その他の項目に付き治療前後で経時的観察を行った。推計学的検討にはStudent's t-test, Fisher's exacttestを用いた。

## < 結 果 >

C型慢性肝疾患患者全体の48%(124/261)に CCAを確認した。組織学的に確診を得た194症例による検討で、CPH 33%(6/18)、CAH 48%(48/101)、LC 59%(32/54)、HCC 48%(10/21)と疾患の進行と共にその頻度を増した。既報<sup>2,3)</sup>のごとくB型慢性肝疾患患者ではCCAを認めなかった。経時的に観察したC型慢性肝疾患患者のsCH50の推移は、初回測定でCCA(+)の患者は以降の測定時点においてもCCA(+)を維持し、同様にCCA(-)の場合も大方一定の傾向を示したが、一部症例ではCCA(+)からCCA(-)へ、CCA(-)からCCA(+)へとダイナミックな変化を示した症例もあり、必ずしも一定した現象でないことが観察された。つぎに、IFN投与を行った19症例における経時観察の結果、治療によるウイルス血症並びに臨床的改善にともない、治療前CCA(+)の16患者で CCAの消失が観察された。IFN著効4例では、CCAの消失が持続した。一方、一時的にCCAの消失或は消失傾向を示したもののCCAが再出現した9症例が観察され、その全てが無効ないし再燃例であり、治療の途上一旦は検出されなくなった HCV-RNAの再出現を認めた。IFN治療前にCCA(-)であった3症例は治療終了後もCCA(-)を持続しその全てが著効例であった。治療中も CCA(+)の儘推移した2症例はウイルス血症を持続し無効であった。

次に、肝外症状としての関節症状と CCA現象との密接な関連について既に報告した<sup>1,2)</sup>が、今回の臨床観察により、CCA陽性患者に腓腹筋の痙攣 所謂こむらがえり、或は頑固な肩凝りが頻発していることが示された。CCA(+)のC型慢性肝疾患患者の30%が誘因無し(特に就寝時)に頻発するこむらがえりを訴えた。CCA(-)では3%に過ぎなかった。B型慢性肝疾患患者では2%であった。項部の筋肉痛ないし頑固な肩懲りも CCA(+)では34%の患者が訴えたが、CCA(-)では6%に過ぎなかった。既報の諸関節痛とも併せ、以上の筋・関節症状(musculo-articular symptoms, MAS)はCCA(+)患者の65%に観察されたが、CCA(-)群では11%に過ぎず、CCAの有無とこれらの臨床症状との間には有意の関連性( $p < 0.001$ )が認められた。B型慢性肝疾患患者における

有症率は5%であった。IFN治療を受けた CCA(+)の慢性活動性肝炎患者で、治療前に認められた筋・関節症状が、CCAの出没にほぼ一致して消褪・再燃した症例も観察された。また、寒冷時に好発する患者も散見された。以上掲げた症状のほかにもCCA(+)との関連が示唆されるものとして、手の腫張感・こわばり、不整脈、皮膚色素沈着などがあった。

C型肝炎患者中Cry.を検出したものは180例の検索対象中32例で18%、免疫複合体は216例の検索対象中151例で70%、であったが、CCAとCry.の有無、免疫複合体の有無との間にも有意の関連性があった。しかし、以上の筋・関節症状の有無と免疫複合体の有無の間には関連性を見いだし得なかった。

### < 考 察 >

CCAの発生機作についての研究は比較的良好に行われてきた<sup>5, 6, 7, 8)</sup>が、その臨床的意義については明かではない。寧ろ CCAの成因とも深く関わっていると考えられているCry.によるリウマチ<sup>9)</sup>が疾病単位としても一般的に認知されており、最近 HCV関連肝疾患と病因論的に取り沙汰されている<sup>10, 11)</sup>程である。今回対象とした患者の中においても、特有の皮膚所見を有したた数例を認めた。そしてCry.を検出する場合ほとんどの症例でCCAが認められる。しかし、CCAの発生頻度に比し、Cry.は低頻度しか検出されない。Cry.とは別個に CCAを捉え、その臨床意義を検討すべきと考える次第である。

C型慢性肝疾患患者の48%に観察されるCCA現象の実に65%に何等かの筋・関節症状が認められ、これらの症状がCCA現象の臨床的表現である可能性(Cold Activation Associated Musculo-Articular Symptom, CAAMAS)を示した。

CCA陽性C型慢性肝疾患患者における筋・関節症状発症のメカニズムについては、CCAがあくまでもin vitroの現象であり、in vivoで同様の補体活性化現象が起こりうるものか不明であり、両者間の直接的な因果関係に言及することは困難である。かくのごとく CCAは試験管内の現象ではあるが、仮に生体内で発生すれば局所的ではあってもその影響はかなりの強さで表現されるものと想像される。補体の活性化産物であるMembrane attack complex (C5b9)による生体膜への少なからぬ障害、活性化の過程での分解産物による組織障害などが惹起されるであろう。かかる補体活性化は調節メカニズムの発動により全身的な発生は当然抑制されるものであろうが、CCAを認める患者では 発生準備状態下にあると見なされる。特に寒冷暴露を受け易い部位ではin vivoでのCCA現象もあり得るのではないかと推測する。

今回の検討では患者の訴える症状に的を絞り、筋・関節症状を主とした、一般的な事象について検討したが、他の様々な事象についての詳細な検討が期待される。

更に、インターフェロン治療に於て CCAがウイルス血症の改善と共に消失したことはIFN治療効果判定の一助としてCCA有無を経過観察することの臨床的意義を示唆するものと考える。

#### < 結 語 >

1. 慢性肝疾患患者360例に対する検討で、HCV関連患者261例中124例(48%)にCCAを認めたが、HBV患者36例をはじめ他の慢性肝疾患患者では観察されなかった。
2. CCAを示す患者で高率(65%)に肝外症状としての、関節・筋肉症状を訴えた。  
(Cold Activation Associated Musculo-Articular Symptom, CAAMAS)
3. IFN治療によるHCVの血中消失に一致しCCAの消失が認められた患者で、ほぼ時相を一致させて関節・筋肉症状の消褪を得た数例を経験した。
4. 以上の事実は、in vitroの現象であるCCAが体内でも起こり得る可能性を示唆すると考える。
5. IFNの治療効果とCCAとの間に関連があり、治療の効果判定におけるCCA確認の臨床的意義が示唆された。

#### < 文 献 >

- 1)安藤文英 他、リウマチ, 33, 685(1993)
- 2)安藤文英 他、第30回補体シンポジウム講演集, 67-70(1993)
- 3)安藤文英 他、肝臓, 36, (印刷中)(1995)
- 4)安藤文英 他、日本消化器病学会雑誌(投稿中)
- 5)天野哲基 他、臨床免疫. 7, 533-538(1975)
- 6)Kondo M et al., Immunol. 117, 486(1976)
- 7)Inai S. et al., Clin. Exp. Immunol. 25, 403-409(1976)
- 8)Kitamura H. et al., Clin. Exp. Immunol. 27, 34-37(1977)
- 9)菱谷好高ら, 日消誌76:205(1979)
- 10)Ferri C. et al., Clin. Exp. Rheumatol. 9, 621-624(1991)
- 11)Misiani R. et al., N. Engl. J. Med. 330, 751-756(1994)

## 2 慢性C型肝炎患者血清にみられる低補体価の臨床的・ウイルス学的検討

下村宏之、石井泰史、和唐正樹、辻 英之、藤尾耕三、近藤淳一、藤岡真一、  
岩崎良章、辻 孝夫  
岡山大学医学部 第一内科

Clinical and virological study on serum hypocomplementemia observed in patients with  
chronic hepatitis C

Hiroyuki Shimomura, Yasushi Ishii, Masaki Wato, Hideyuki Tsuji, Kozo Fujio, Junichi  
Kondo, Shinichi Fujioka, Yoshiaki Iwasaki, Takao Tsuji  
(First Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School)

### 【目的】

慢性肝疾患患者では、従来より一部の患者で血清補体の cold activation あるいは補体価の血清血漿解離現象が認められていた<sup>1,2)</sup>。近年、C型肝炎の診断が可能となり、この現象が慢性C型肝炎に特徴的であることが知られるようになった<sup>3,4)</sup>。この現象の機序を明らかにするために、慢性C型肝炎患者における低血清補体価の臨床的・ウイルス学的背景を検討した。

### 【対象と方法】

当科に入院し組織学的検討をされたウイルス性肝疾患症例337例を含む388例を対象とした。(B型32例、C型298例、B+C型7例、非肝疾患51例)

血清CH50は、室温で血清分離後4℃下で2時間以上保存し、Meyer変法で測定された。血清C3、C4濃度測定は、免疫比濁法によった。

HCVの genotype は mixed primer PCR法<sup>5,6)</sup>で、HCV-RNA量は competitive RT-PCR法<sup>7)</sup>で測定した。

### 【結果および考察】

各疾患群ごとの血清補体価の分布をみた(図1)。C型慢性肝疾患では47%が補体価の低下を示し、28%は15 U/ml以下の極めて低値を示した。一方、B型慢性肝疾患では、47%が血清補体価の低下を、13%が15 U/ml以下であった。消化管疾患、心疾患など非

肝疾患では10%が低補体価を示した（図1a, 1b, 1c）。

C型慢性肝疾患患者の補体価と補体C3C4との相関では（図2）、低血清補体価を示す症例には、血清C3濃度あるいはC4濃度が低下しているものと、C3C4濃度に関係なく低補体価を示すものが認められた。前者は、肝硬変・肝癌症例を多く含み、進行した肝疾患により補体成分産生能低下により低下している可能性もあるため、以下の慢性肝炎についての検討では、血清C3C4濃度の正常なものを対象として検討した。

血清C3C4濃度が正常な症例を対象とすると、慢性C型肝炎では42%が低補体価であり、23%が15 U/ml以下を示したのに対し、慢性B型肝炎患者では19%が<30 U/mlを示したが、15 U/ml以下の低補体価を示す症例は見られず（図1d, 1e）、血清補体価の極めて低値を示す現象は、C型肝炎に特徴的であることが示されている。

慢性C型肝炎患者(C3, C4 正常)のうち低補体価（15 U/ml以下）を示す群と正常値を示す群の臨床像を比較した（表）。低補体価群の血清RA値が有意に高い値を示し（nonparametric法； $p<0.005$ ）有意に陽性率が高かった（Chi-square法； $p<0.005$ ）。慢性C型肝炎患者に、クリオグロブリン血症や慢性関節リウマチの合併が報告されており、血清中の免疫複合体やクリオプレシピテート中にHCV-RNAが検出されている<sup>8,9)</sup>。これらの現象に関連して、血清補体価低下がおきている可能性が示唆される。一方、両群間に、組織学的診断・HCV genotype・その他の臨床検査値の差は認めなかった。慢性肝炎の進行初期から低補体価を示すことは、血清補体価の低下が肝炎の病態との関連より、むしろウイルスの存在自体と関係しているように思われる。

Pawlotskyら<sup>10)</sup>は慢性C型肝炎における肝外免疫反応とHCV serotypeの間には関連がみられないと報告しており、HCVの主なgenotypeに共通の性状あるいはHCVに対する共通の反応に起因して起こる現象であると考えられる。血清中HCV-RNA量は、両群間に差を認めず、RNA量とCH50値の間に相関はなかった。

次に、インターフェロン(IFN)治療を行った慢性C型肝炎症例について治療前後の血清補体価の変動をみた。IFN治療に著効を示し肝機能が正常化し血中のHCV-RNAの陰性化した群では、血清CH50値の正常化が認められたが、non-responder群では治療前に25 U/ml以上であった8例中3例が12 U/ml以下に低下し、12 U/ml以下の4例中3例は

低値のままであった。このことは、患者血中のHCVの存在と血清補体価の低下が密接に関連していることを示していると考えられた。

慢性肝疾患患者血清には、低温保存により血清補体活性化が起こり、補体価の低下を示すものがあることが知られていた。正常血清への添加により、補体価を低下させる抗補体活性が慢性肝疾患患者血清中に認められていた<sup>11)</sup>が、その詳細な性状については不明であった。今回の検討により、HCVの存在と低温下での補体活性化や抗補体活性との関連性が強く示唆される。しかし、C型慢性肝炎の約1/2の症例で血清補体価が正常であることから、HCVウイルス血症がそれ自体で血清補体価の低下を来すのではないことは明らかである。今後、ウイルスの存在がリウマチ因子などの宿主因子とどのように関連して血清補体価の低下（低温下における補体活性化）に結びつくのか、さらなる検討が必要である。

#### 【結語】

慢性C型肝炎では、C型肝炎ウイルスの存在に何らかの因子が加わり低温下で血清補体の活性化が進むことによって、血清CH50値が低下すると考えられた。

#### 【文献】

1. Kondo M. et al., J. Immunol. 117,486 (1976)
2. Inai S. et al., Clin. Exp. Immunol. 25, 403 (1976)
3. Ueda K. et al., Ann. Clin. Biochem. 30, 565 (1993)
4. Itoh K. et al., Amer. J. Gastroenterol. 89, 2019 (1994)
5. Okamoto H. et al., J. Gen. Virol. 73, 673 (1992)
6. Chayama K. et al., J. Gastroenterol. Hepatol. 8 150 (1993)
7. Nakagawa H. et al., Dig. Dis. Sci. 39, 225 (1994)
8. Angello V. et al., N. Engl. J. Med. 327, 1490 (1992)
9. Hijikata M. et al., J. Virol. 67, 1953 (1993)
10. Pawlotsky J.-M. et al., Ann. Intern. Med. 122, 169 (1995)
11. 辻孝夫、他、医学と生物学 81, 155 (1970)

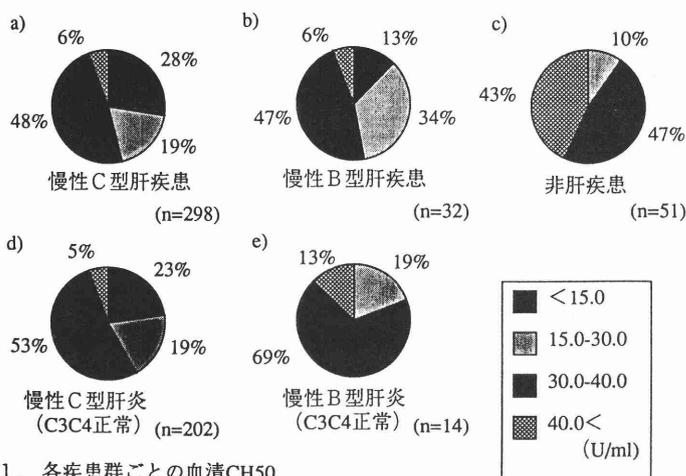


図1. 各疾患群ごとの血清CH50

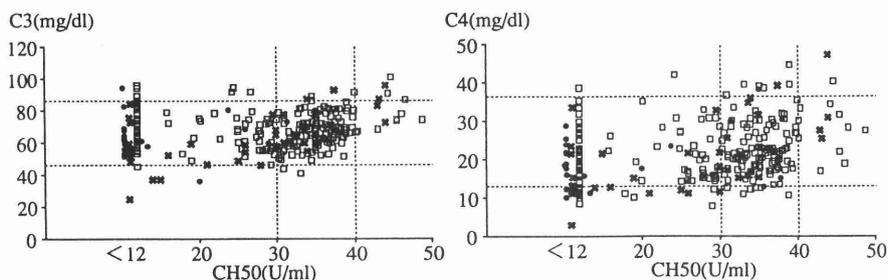


図2. 慢性C型肝炎患者の血清CH50とC3, C4

□ 慢性肝炎 ● 肝硬変 \* 肝癌

表. 慢性C型肝炎(C3, C4正常例)における血清CH50と臨床像

	CH50<15		30<CH50<40		p
年齢(歳)	51±12	(46)	50±12	(107)	n.s.
性(男/女)	30/16	(46)	68/39	(107)	n.s.
肝組織像					
CPH	12	(42)	28	(93)	n.s.
CAH2A	10		26		
CAH2B	20		39		
genotype					
1b	15	(24)	42	(63)	n.s.
2a	8		16		
2b	1		5		
HCV-RNA量 (log(copy/0.5 ml))	7.0±1.2	(10)	7.5±1.0	(33)	n.s.
ALT(IU/l)	106±103	(46)	95±65	(107)	n.s.
ZTT(KU)	13.5±3.9	(46)	13.1±4.1	(107)	n.s.
γ-GI(g/dl)	1.46±0.36	(46)	1.40±0.51	(107)	n.s.
RA(IU/ml)	38.7±71.0	(41)	16.1±17.1	(94)	
RA陽性率(%)	58.5	(24/41)	14.9	(14/94)	p<0.005
ANA陽性率(%)	20.0	(8/40)	25.5	(25/98)	n.s.

(n.s.; not significant)

### 3

## B型、C型慢性肝炎患者における赤血球 Complement Receptor Type1の解析

考藤達哉、林 紀夫、竹原徹郎、片山和宏<sup>1)</sup>、加藤道夫<sup>2)</sup>、  
秋山雅彦<sup>3)</sup>、佐々木裕、笠原彰紀、房本英之、鎌田武信<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>大阪大学第一内科、<sup>2)</sup>国立大阪病院消化器科、<sup>3)</sup>新千里病院内科

Flowcytometric analysis of erythrocyte complement receptor type1 (CR1) in chronic hepatitis  
B and chronic hepatitis C patients

Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, Tetsuo Takehara, Kazuhiro Katayama<sup>1)</sup>, Michio Kato<sup>2)</sup>,  
Masahiko Akiyama<sup>3)</sup>, Yutaka Sasaki, Akinori Kasahara, Hideyuki Fusamoto  
and Takenobu Kamada<sup>1)</sup>.

(<sup>1)</sup>First Department of Medicine, Osaka University Medical School, (<sup>2)</sup>Department of  
Gastroenterology, Osaka National Hospital, (<sup>3)</sup>Department of Internal Medicine,  
Shin-senri Hospital)

#### 〈背景、目的〉

我々はC型肝炎患者では抗体結合型HCV粒子(HCV-IC)が高率に検出され、肝障害が進展するにつれてHCV-ICが抗体非結合型粒子より量的に優位になることを報告してきた<sup>1),2)</sup>。この現象には単球、マクロファージなどの食細胞系によるHCV-IC処理能の低下が関与する可能性がある。赤血球Complement Receptor type1(E-CR1)は補体系活性化により生じるC3b/C4bをリガンドとし、C3b/C4b結合免疫複合体(C3b/C4b-IC)を肝脾の食細胞系に運ぶtransporterとしてICの処理に重要な役割を果たしている<sup>3)</sup>。本研究ではC型肝炎患者におけるHCV-ICの処理機構を明らかにするために、E-CR1の発現量と血中HCV-IC量、補体系、肝炎の程度との関連を検討し、B型肝炎と比較した。

#### 〈方法〉

対象は慢性C型肝炎患者(HC) 53人 [慢性持続性肝炎(CPH) 10、慢性活動性肝炎(CAH) 9、肝硬変(LC) 11、肝癌(HCC) 23]、慢性B型肝炎患者(HB)32人 [無症候性キャリア(C) 5、CPH 2、CAH 8、LC 12、HCC 5]、健康成人(N)20人である。採血後赤血球を分離し、抗CR1抗体とビオチン化抗マウスIgG1抗体を反応させ、PEラベルしたストロプトアビジンで染

色しFACScanで平均蛍光強度 (MFIs)を測定した。一次抗体にマウスIgG1精製抗体を用いたコントロール (MFic)との比(NFI=MFIs/MFic)でE-CR1を半定量した。HCV-IC、HBV-IC量は抗C1q、抗C3d抗体を固相化したELISA kit (Quidel社)によりC1q結合型IC(C1qIC)、C3d結合型IC (C3dIC)を測定した。またELISA反応終了後、plateからNaSCN処理によってC1qIC、C3dICを回収した後、nestedPCRを行いIC中のHBVDNA、HCVRNAを検出した。

#### 〈結果〉

E-CR1はHCで $23.1 \pm 7.9$ であり、HB、NV ( $26.1 \pm 5.6$ 、 $28.0 \pm 5.9$ )に比し低値であった ( $p < 0.01$ )。C3dICはHC、HB、NVで $13.6 \pm 9.8$ 、 $8.2 \pm 8.3$ 、 $6.1 \pm 2.7$ とHCで高値 ( $p < 0.05$ )、C1qICは $2.9 \pm 5.1$ 、 $2.5 \pm 3.1$ 、 $0.3 \pm 0.7$ とHC、HBで高値 ( $p < 0.05$ )であった。HC、HBともにC1qIC、C3dIC中にvirus genomeが検出された。E-CR1とIC量の相関では、HCでE-CR1とC3dICに負の相関を認めたが ( $r = -0.300$ 、 $p < 0.05$ ) C1qICには認めず、HBではC3dIC、C1qICともに相関を認めなかった。またIC量と補体系では、HCではC3dICとCH50、C1qICとC3、C4に負の相関を認め ( $p < 0.01$ 、 $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ )、HBではC1qICとC3、CH50に負の相関を認めた ( $p < 0.01$ 、 $p < 0.01$ )。肝障害とE-CR1との関連では、HCはCPH  $30.3 \pm 10.1$ 、CAH  $19.1 \pm 5.1$ 、LC  $23.0 \pm 6.2$ 、HCC  $21.5 \pm 6.9$ であり、CAH、LC、HCCでCPH、NVに比し低値であった ( $p < 0.01$ ) (図1)。一方HBではAC+CPH  $27.7 \pm 7.0$ 、CAH  $27.5 \pm 5.4$ 、LC  $23.9 \pm 5.1$ 、HCC  $25.3 \pm 4.2$ と各群に差を認めなかった (図2)。HCではE-CR1群 ( $< 23.0$ )は高E-CR1群 ( $\geq 23.0$ )に比しALT値、HAIscoreともに高値であった ( $p < 0.05$ )。

#### 〈結論〉

HC、HBともに血中でのvirus-IC形成が補体系を活性化しC1qIC、C3dICが増加するが、HCではC3dICの増加が顕著であった。これはHCV感染によりE-CR1の発現が低下し、C3b/C4b-ICの血中からのclearanceが低下するためと考えられた。HCではE-CR1の低下はCAHより認められ、IC clearanceの低下がHCVの持続感染の一因となり、肝炎、肝障害の進展に参与する可能性が示唆された。

#### 〈文献〉

- 1) Kanto T. et al. Hepatology 19, 296 (1994)
- 2) Kanto T. et al. J. Hepatology in press (1995)
- 3) Ahearn JM. et al. Adv. Immunol. 46, 183 (1989)



## 4

# 肝炎における補体cold activationと cryoprecipitate

竹村周平<sup>1</sup>、瀬戸信之<sup>2</sup>、中西貞信<sup>3</sup>、土井たかし<sup>3</sup>、小野寺秀記<sup>3</sup>  
 出口雅子<sup>4</sup>、上田正博<sup>2</sup>、近藤元治<sup>3</sup>

<sup>1</sup>京都府立与謝の海病院、<sup>2</sup>金井病院、<sup>3</sup>京都府立医科大学第一内科、<sup>4</sup>京都第二赤十字病院

Cryoprecipitates in sera with cold activation of complement  
 from patients with viral hepatitis

(S Takemura<sup>1</sup>, N Seto<sup>2</sup>, S Nakanishi<sup>3</sup>, T Doi<sup>3</sup>, H Onodera<sup>3</sup>  
 M Deguchi<sup>4</sup>, M Ueda<sup>2</sup> and M Kondo<sup>3</sup>)

<sup>1</sup>Kyoto Prefectural Yosanoumi Hospital, <sup>2</sup>Kanai Hospital, <sup>3</sup>First Department of  
 Internal Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine  
<sup>4</sup>Kyoto Second Red Cross Hospital)

<はじめに>

血液あるいは血清を低温に保存した後補体価を測定すると、時として異常な低値を示すことがある。この採血後の試験管内での補体価の低下は、37°Cでの血清分離、EDTAやチトラートの添加などにより阻止される事から、補体cold activationあるいは血清・血漿補体価解離現象と呼ばれている<sup>1,2,3)</sup>。慢性肝炎患で高頻度に認められるこの現象は、その他全身性エリテマトーデス、慢性関節リウマチなどの膠原病や肺結核症などの慢性感染症においても出現する。

この現象の原因として低温で抗体活性を示すリウマチ因子の関与が推測され<sup>4)</sup>、因子の一つとしてクリオグロブリンが推測されている<sup>5)</sup>。しかしクリオグロブリンの認められない症例も存在し、これらの例においてはクリオグロブリン類似の可溶性物質が推測されている<sup>6)</sup>。この現象の機序の解明が意欲的になされた1970年代後半には、ウイルス性肝炎の原因ウイルスはA型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルスの二種類のみが知られていた。1989年に輸血後非A非B型肝炎の原因ウイルスとしてウイルスの遺伝子断片が分離され、C型肝炎ウイルス(HCV)と命名された<sup>7)</sup>。

補体cold activationの原因因子が低温でポリエチレングリコール(PEG)存在下に出現する沈澱物中に存在することは明らかにされているが<sup>8)</sup>、この沈澱物とHCVを含むウイルスとの関

連性についてはほとんど検討されていない。そこで今回、C型慢性肝炎を含むウイルス性肝炎を対象に、この現象の原因因子がPEG存在下で得られた低温沈澱物に存在する事の確認を行った。さらに沈澱物とウイルスとの関わりを中心に現在検討中である。

## <対象と方法>

ウイルス性肝炎患者を対象に静脈採血し、一部をethylenediamine tetraacetate(EDTA)含有試験管に入れ血漿を分離し、残りを37°Cに保存し血清を分離した。補体cold activationの有無と低温沈澱物検出のための処理過程を図1に示した。

### 1. 補体cold activation

上記処理にて得られたEDTA血漿と4°Cに3時間静置した37°C分離血清の補体価をMayer変法で測定した。低温保存後の血清補体価を血漿補体価と比較し、低下の有無を検討した。

### 2. 低温沈澱物の分離と検討項目

Polyethylene glycol #6000(PEG)ならびにEDTAを含む0.01MPBS, pH7.4に、終濃度が2.5%PEG、10mMEDTAとなるように37°C分離血清を添加した。4°Cに3時間反応させた後、遠心分離にて沈澱物を得た。この沈澱物(PE-ppt)を2.5%PEG、10mMEDTAを含む0.01MPBSで洗浄した後、もとの血清と等量の0.01MPBSに浮遊させ37°C1時間放置後、再度遠心し不溶成分を除去した後、上清を低温沈澱物の37°C可溶成分(可溶PE-ppt)として以降の検討に用いた。

#### a. 抗補体活性の測定

上記処理にて得られた可溶PE-pptについて、37°Cならびに4°Cの2条件における抗補体活性を検討した。対照として検体の代わりに0.01MPBSを使用した。正常ヒト血清0.8CH50を補体源として用いた。抗補体活性は以下の式で計算した。

$$\text{抗補体活性(\%)} = \frac{(\text{対照溶血率}) - (\text{検体溶血率})}{(\text{対照溶血率})} \times 100$$

#### b. その他の検討

可溶PE-pptの蛋白濃度はFolin-Lowry法にて測定し、ウイルス学的検討はHBVに関しては、HBs抗原ならびに抗体、HBc抗体、HBe抗原ならびに抗体を測定した。HCVに関してはHCV抗体ならびにHCV-RNAの測定を行った。

## <結果>

### 1. クリオグロブリン陰性例におけるPE-ppt

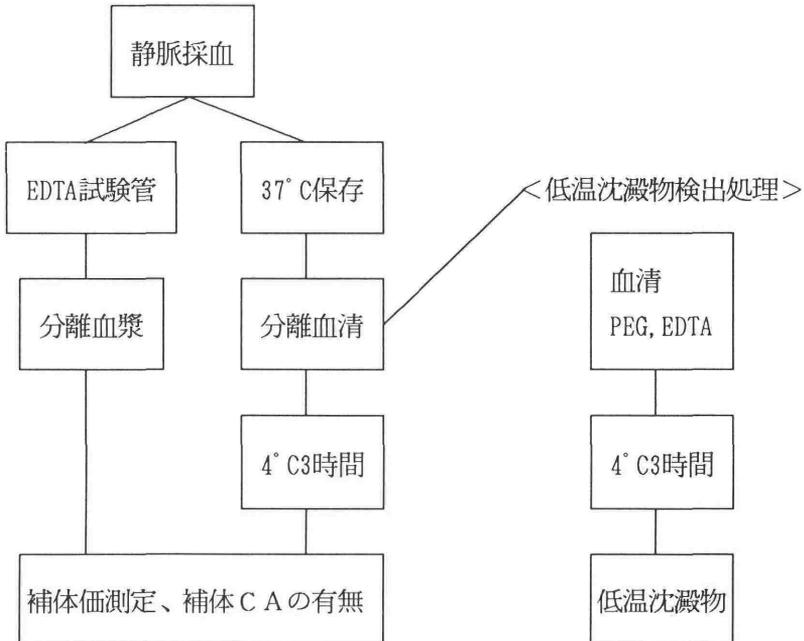
補体cold activationは認められるが、クリオグロブリンの認められない血清(Pt1)をPEG-EDTA溶液と混和後、4°Cに放置すると図2に示すように、肉眼的に認められる白濁沈澱物が生

じた。

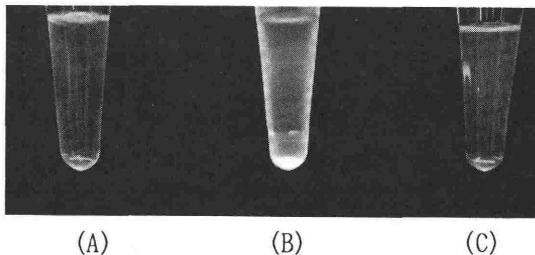
## 2. 抗補体活性

表1の如く、補体cold activation陽性の血清から得られた可溶PE-pptの抗補体活性は、37°Cよりも4°Cにおいてはるかに強く、この現象を認めない対照血清から得られた可溶PE-pptの抗補体活性とは異なった。

可溶PE-pptに関するウイルス面からの検討は現在進行中である。



<図1> 補体cold activationの有無と低温沈澱物検出のための検体処理



- (A) 37°C, PEG-EDTA存在下
- (B) 4°C, PEG-EDTA存在下
- (C) 4°C, 血清のみ

<図2> ポリエチレングリコール存在下での低温沈澱物の証明<sup>6</sup>

<表1> 可溶PE-pptの37°C、4°Cの抗補体活性<sup>8</sup>

	Precipitate ug/ml	% anticomplementary activity	
		37°C	4°C
Patient 1	300	2.4	95.8
2	576	37.5	>100
Control 1	84	2.0	0
2	53	1.6	0
3	232	3.1	0
4	106	0	0

文献

1. Kondo M, et al: Cold activation of complement. J Immunol 117, 486-490, 1976
2. Inai S, et al: Differences between plasma and serum complement in patients with chronic liver diseases. Clin Exp Immunol 25, 403-409, 1976
3. 竹村周平、他: 補体cold activation II. 抗凝固剤と補体cold activation、アレルギー - 27, 100-103, 1978
4. 竹村周平、他: 補体cold activation IV. Anti-IgGからみた原因因子、アレルギー 29, 63-67, 1980
5. 竹村周平、他: 補体cold activation III. Cryoglobulinおよび抗補体活性による原因因子の追求、アレルギー 29, 16-20, 1980
6. 竹村周平、他: 補体cold activation V. Soluble cryoglobulin-like substanceの証明、アレルギー 29, 103-107, 1980
7. Kuo G, et al: An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. Science 244:362, 1989
8. Takemura S, et al: Cold activation of complement. Arthritis & Rheumatism 25, 1138-1140, 1982

## 5 コールドアクチベーションとリウマチ因子

中川俊正<sup>1</sup> 上田一仁<sup>2</sup> 中嶋秀人<sup>3</sup> 山本大助<sup>4</sup> 清水章<sup>1,2</sup>

大阪医科大学 病態検査学<sup>1</sup>, 中央検査部<sup>2</sup>, 第一内科<sup>3</sup>, 医学情報処理センター<sup>4</sup>,

### Complement Cold Activation and Rheumatoid Factor

(Department of Clinical Pathology<sup>1</sup>, Central Laboratory<sup>2</sup>,

First Department of Internal Medicine<sup>3</sup>, Biomedical Computation Center<sup>4</sup>,

Osaka Medical College)

#### <目的>

我々は補体低温活性化現象（コールドアクチベーション）にC型肝炎ウイルス（以下HCV）感染が深く関与していることを報告した<sup>1</sup>）。これまでにコールドアクチベーションの成因としてクリオグロブリンとの共通点<sup>2</sup>）やリウマチ因子（以下RF）の関与<sup>3</sup>）が論じられている。また実際HCV抗体陽性例では、RFやクリオグロブリンの陽性率が高く<sup>4</sup>）、特異性や親和性の低い抗体およびRFがコールドアクチベーションあるいはクリオグロブリンを惹起している可能性が考えられる。今回我々は分子模倣機構により、HCV感染にともなってRFが産生される可能性を検討した。HCVの蛋白が自己抗原と抗原性が交差し、その自己抗原が免疫グロブリンの一部であり、RFが誘導されるという仮説を立て、ホモロジー解析を行ない、HCVと相同の蛋白を検索した。その結果、ヒト免疫グロブリン ラムダ鎖上に立体構造上において、抗原性が交差すると考えられるエピトープを発見した。さら

に、抗ラムダ鎖抗体価を調べたところ、HCV抗体陽性例で抗体価が上昇している例が高率にみられる事を示した。

#### <対象と方法>

ホモロジー解析：HCV J Tのアミノ酸配列をブラストサーバーによりデータベースを検索しホモロジー解析を行なった。相同を示した蛋白をクラスタルVを用いてマルチプルアラインメントを行ない検討した。

立体構造モデルの構築：QUANTA CHARm system（MSI社、米国）を用いて、ヒトモノクローナルラムダ鎖Mcgを元にして立体構造モデルを作製し、相同を示すアミノ酸をプロットした。

ELISA：ベンスジョーンズ蛋白由来精製ラムダ鎖を固相に標識しモノクローナル抗ヒトIgG/IgMを用いて常法によりELISAを行なった。

#### <結果>

HCVにヒト免疫グロブリンラムダ鎖（ヒト脾臓由来のc-DNAライブラリよりクローニングされ塩基配列が決定されたもの）と相同性の高い部分を発見した。一次構造上の相同率はそれ程高くないが、立体構造モデルにおいて分子表面に突出しているいくつかのアミノ酸が、HCVと強い相同である事が明らかとなった。次にラムダ鎖を抗原としてELISAを行なったところ、HCV抗体陽性例でリウマチ因子陽性例において高率にIgG抗ラムダ、IgM抗ラムダ抗体価の上昇がみられた。

#### <考察>

我々はHCVにラムダ鎖と立体構造上で抗原性を模倣するエピトープ（ミモトープ）を発見した。さらにHCV抗体陽性の血清中に高率に抗ラムダ鎖抗体価が上昇していることを見いだした。通常では、ラムダ鎖は自己抗体であるため、自己反応性クローンが排除され、抗体産生は誘導されないのに対し、

HCV感染においてはウイルス蛋白に対する抗体が抗原交差し、ラムダ鎖に対して反応する抗体となる。しかし自己反応性を有するためにアフィニティマチュレーションの破綻を来し、親和性の弱い抗体が過剰に産生されつづける。それがRFやクリオグロブリンとして検出されるのではないかと考えている。この特殊なRFが、インビトロや低温で補体を活性化しコールドアグチベーションへとつながるのではないかと考えている。

<参考文献>

- 1) Ueda K. et al., Ann. Clin. Biochem. 30. 565 (1993)
- 2) 竹村 他、アレルギー、29. 16 (1980)
- 3) 竹村 他、アレルギー、29. 108 (1980)
- 4) 中川 他、臨床病理、43.21 (1995)

# 一般講演



## ヒト腎炎におけるC3 mRNAの発現

大澤 勲、大井洋之、藤田宜是、上松瀬勝男、野中 勝\*

日本大学板橋病院 第二内科

\*名古屋市立大学 生化学第二

Demonstration of C3 mRNA in human diseased kidney by *in situ* hybridization

Isao Ohsawa, Hiroyuki Ohi, Takayuki Fujita, Katsuo Kanmatsuse and Masaru Nonaka\*

Internal Medicine II, Itabashi Hospital, Nihon University School of Medicine

\*Department of Biochemistry II, Nagoya City University. School of Medicine

## 【はじめに】

補体コンポーネントの産生は主に肝細胞において行われているが、*in vitro* においては、単球やマクロファージ<sup>1-7)</sup>などの培養細胞にもC3産生が可能であると報告されており、炎症局所における肝臓外の補体産生が起こっている可能性がある。

従来より、ヒト腎組織におけるC3の沈着は、その組織学的診断や、病勢の判定に重要である。マウスの実験ループス腎炎では、C2.C3.C4のmRNAが腎組織内で発現することが報告されている<sup>8)</sup>。ヒト培養尿細管上皮細胞におけるC3、C4の産生が、蛋白レベルのみならず、mRNAレベルにおいても確認され<sup>9)10)</sup>、さらに先頃、*in situ* hybridization法を用いたヒト尿細管上皮細胞のC4 mRNAの局在も報告された<sup>11)</sup>。また、各種の補体制御因子がヒト正常腎組織に存在することも報告されており<sup>12)</sup>、ヒトにおいても、腎臓局所における補体の産生が病態に関与している可能性がある。そこで我々は、ヒト腎炎組織内におけるC3の産生を確かめる為、各種腎炎組織に*in situ* hybridization法を行いC3 mRNAの発現を検討した。

## 【方法】

経皮的腎生検により採取した腎炎患者の腎組織4例に対し、C3 RNA probeを用いた*in situ* hybridization法を行った。ヒト肝細胞より抽出したTotal RNAよりPCR法を用い、C3 cDNAを増幅した。Bam H1 digestionにより213bpのinsertを切り出しpBluescriptIIに組み込んだ。大腸菌にて増幅後抽出し、213bpのジゴキシゲニン標識RNA probe (sens/anti-sens) を作製し使用した(DIG RNA labeling kit, Boeringer-Mannheim Biochemica, Mannheim, Germany)。

各検体に対しては、同時にHE染色、PAS染色、蛍光抗体法を行ない、ループス腎炎・微小変化群・IgA腎症・慢性腎炎(non-IgA)の診断を得た。

## 【結果】

ループス腎炎：近位尿細管上皮細胞、糸球体の内皮細胞・上皮細胞、間質の浸潤炎症細胞、動脈血管内皮細胞に強く C3 mRNA の発現を認めた。

微小変化群：近位尿細管上皮細胞、糸球体の内皮細胞・上皮細胞、動脈血管内皮細胞に強く C3 mRNA の発現を認めた。

I g A 腎症：近位尿細管上皮細胞に、ごく弱い C3 mRNA の発現を認めた。糸球体の細胞に発現は認められなかった。

慢性腎炎(non-IgA)：近位尿細管上皮細胞に、弱い C3 mRNA の発現を認めた。糸球体の細胞に発現は認められなかった。

sens probe：いずれの腎炎においても全く C3 mRNA の発現をみなかった。

## 【考察】

C3 mRNA の発現が認められた細胞は、尿細管上皮細胞、血管内皮細胞、糸球体上皮細胞、浸潤炎症細胞であり、メサングウム細胞には C3 mRNA の発現が認められなかった。

ループス腎炎症例においては動脈内皮細胞と血管周囲の浸潤炎症細胞にも C3 mRNA の発現が認められた。Aultらによれば、マウス実験ループス腎炎でも動脈周囲の浸潤炎症細胞に C3 mRNA の発現を認めており<sup>13)</sup>、我々の結果と一致する。ヒトのループス腎炎では、蛍光抗体法で、しばしば、動脈壁及びその周囲に C3 の沈着を認めることがあり、これは流血中から移行した C3 のみならず局所で産生された C3 を検出していると考えられ、血管炎の病態に関与している可能性がある。

微小変化群は、免疫グロブリンや補体の沈着の少ない腎炎とされていたが、糸球体内に C3 の分解産物である C3d の沈着が観察されるとの報告もあり<sup>14)</sup>、糸球体内の内皮細胞・上皮細胞に C3 mRNA の発現が認められたことと関係があるかもしれない。

I g A 腎症では、蛍光抗体法による尿細管・間質の C3 沈着の程度が予後に相関するとされており<sup>15)</sup>、近位尿細管上皮にのみ C3 mRNA の発現が認められたことは病勢との関連を示唆するものと考えられる。

Witteらは、*in situ hybridization*により、尿細管上皮細胞に C4 mRNA の発現を証明した<sup>11)</sup>。また、Ichidaらは、尿細管上皮細胞の細胞膜上に補体制御因子 MCP、DAF、HRF20 が存在することを明かにし<sup>12)</sup>、これらが尿細管内での補体活性化から尿細管上皮細胞自身を守る働きをしていると示唆している。我々の検討においても、尿細管上皮細胞に C3 mRNA が確認された。これらのことは尿細管における補体系の生体防御反応を示唆するものと考えられる。

## 【結論】

ヒト腎炎組織に *in situ* hybridization法を行い、C3mRNAの発現を確認することができた。同検出法は、従来のHE染色・PAS染色による光学顕微鏡所見また、免疫グロブリン・補体の蛍光顕微鏡所見に比して、より腎組織内の活動性を反映する可能性があり、今後症例を増やし検討する必要がある。

## 【参考文献】

- 1)Johnson E. et al., Scand.J. immunol. 27, 489 (1988)
- 2)Einstein L.P. et al., J. Clin. Invest. 60, 963 (1977)
- 3)Katz Y. et al., Arthritis and Rheumatism. 31, 1365 (1989)
- 5)Ueki,A. et al., Immunology. 61, 11 (1987)
- 6)Stunk RC., et al., J. Clin. Invest. 81, 1419 (1988)
- 7)Sacks SH. et al., Immunology, 79, 348 (1993)
- 8)Passwell J. et al., J. Clin. Invest. 82, 1676 (1988)
- 9)Brooimans R.A. et al., J. Clin. Invest. 88, 379 (1991)
- 10)Seelen M.A.J. et al., Kidney Int. 44, 55 (1993)
- 11)Witte D.P. et al., American J. Pathol. 139, 717 (1991)
- 12)Ichida S., et al., Kidney Int. 46, 89 (1994)
- 13)Ault B.H. et al., Immunology, 81, 655 (1994)
- 14)Doi T. et al., Kidney Int. 46, 986 (1994)
- 15)Giovanni M. et al., Kidney Int. 22, 184 (1982)

## 2

# ベーチェット病患者多核白血球(PMN)の C3d分泌について

陳 麗理、小暮美津子<sup>1</sup>、西川 恵、相川英三<sup>2</sup>、奥田智子<sup>3</sup>

<sup>1</sup>東京女子医科大学眼科学、<sup>2</sup>東京女子医科大学解剖学・発生生物学  
<sup>3</sup>東洋大学工学部化学科

The secretion of the complement fragment C3d by polymorphonuclear leucocytes  
in patients with Behçet's disease

Li-Li Chen, Mitsuko Kogure<sup>1</sup>, Megumi Nishikawa, Eizo Aikawa<sup>2</sup> and Tomoko Okuda<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>Dept. of Ophthalmology, <sup>2</sup>Dept. of Anatomy & Developmental Biology,

Tokyo Women's Medical College and <sup>3</sup>Faculty of Engineering, Toyo University)

### <目的>

ベーチェット病は多臓器侵襲性の原因不明の炎症性疾患で、約6割に眼症状が出現し、増悪と寛解を繰り返しながら遷延性経過をとる難治性疾患である。炎症局所には強い多核白血球(PMN)の浸潤が観察され、患者PMNには遊走能、活性酸素産生能亢進など種々の機能異常が認められる。また、補体系においては、血清補体価や補体レセプターの変動、補体制御因子の低下、房水中の補体分解産物の存在などが観察され、これらが炎症反応に重要な役割を果たすことが示唆されている。

我々は、ヒトPMNが補体第三成分を産生することに注目し<sup>1)~3)</sup>、ベーチェット病におけるPMNと補体系の関連を、今回は末梢PMNからのC3d分泌を測定して検討した。

### <対象と方法>

東京女子医大病院眼科通院中の眼症状を有するベーチェット病患者25症例(完全型12例、不全型13例)、患者群と性・年齢分布のほぼ等しい正常者14名を対象とした。ヘパリン加末梢血からフィコール二重比重遠心法により分離したPMN(mean purification 98.4%)を、細胞数 $2 \times 10^6$ /mlに調整後、10%FCS加RPMI-1640培養液に浮遊し、37℃ 5%CO<sub>2</sub>-incubatorで培養した。24時間後、培養上清中のC3dをサンドイッチELISA法(DAKO社)で測定し、同時にRT-PCR法でC3β鎖のexon 3からexon 8部分、543bpの部位

を増幅し、C3mRNAの発現を観察した。また、ヒトPMNのC3分泌機構には protein kinase C および calmodulin 系の関与が示唆されているため、各々の activator として TPA10ng/ml、カルシウムイオノフォアA23187 100ng/mlを添加した培養群も作製し、同様に上清中のC3dならびにC3mRNAの発現を調べ、比較検討した。

### <結果>

PMN24時間培養後の上清中C3d値は、ベーチェット病患者群は健常対照に比べて有意に高値であった(Fig.1)。患者PMNはTPA添加、A23187添加の何れの場合もC3d値は増加せず無刺激群とほぼ同様の値であったが、健常対照ではTPA刺激によるC3d分泌の増加が見られた(Fig.2)。C3mRNAの発現率は健常対照の約42.9%に対し、患者群では72%と高頻度にみられた。また、TPA 刺激によるC3mRNAの増強は健常対照のみにみられた(Fig.3)。

眼局所と全身の関わりを調べるために、眼症状、眼外症状をスコア化してC3d値との関係を検討したが相関は認められず、白血球数、PMN数、血小板数、血沈、CRP、血清補体価との間にも相関はなかった。採血時の全白血球数、全PMN数で算定したC3d値とこれらとの関係も調べたが、何れにも相関関係はみられなかった。そこで、眼発作の時期が明らかな症例のみを検討したところ、発作後の経過日数と培養上清中のC3d値との間に、明らかな負の相関( $r=-0.837$   $p=0.036$ )がみられた(Fig.4)。このように検討した場合の眼スコアとPMNからのC3d値の間にも強い相関がみられた。

### <考察>

今回の検討で、正常ヒトPMNはC3dを産生し、TPA刺激によって、その分泌が増加することが確認された。ベーチェット患者PMNのC3dが健常対照に比べ高値であり、蛋白レベルでも遺伝子レベルにおいてもTPA刺激に低反応性を示したことから、患者PMNが *in vivo* でプライミングされている可能性が考えられた。眼発作直後にPMNからのC3d分泌が増加し、経過に伴い低下し、これが眼スコアにも相関したことは、眼発作前後の補体系の変動にPMNも関与していることを示唆するものと考えた。

PMNから分泌されたC3の分解産物であるC3dは、CR2、CR3、CR4などと結合して種々の免疫担当細胞に働き<sup>45)</sup>、その結果、これらの細胞から産生されるサイトカインを介するオートクラインの機序で、PMN活性化が行われる可能性がある。

<結論>

ベーチェット病の炎症反応には、PMNから産生される補体系を介する免疫異常が、病態形成の一端を担っていると考えられた。

<文献>

- 1) H. F. Faried et al : Scand. J. Immunol. 37, 19-28 (1993)
- 2) T. Okuda et al : Int. Immunol. 4, 681-690 (1992)
- 3) M. Botto et al : J. Immunol. 149, 1348-1355 (1992)
- 4) A. Erde et al : Immunology Today 12, 332-337 (1991)
- 5) F. Melchers et al : Nature 317, 264-267 (1985)

Fig. 1 Secretion of C3d by PMNs

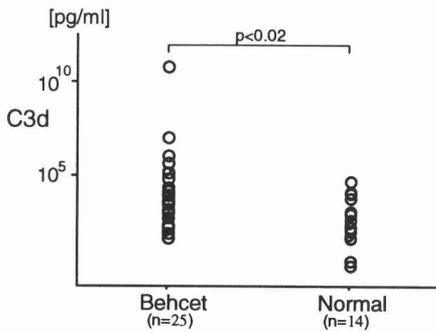


Fig. 2 Effects of TPA and A23187 on C3d secretion by PMNs

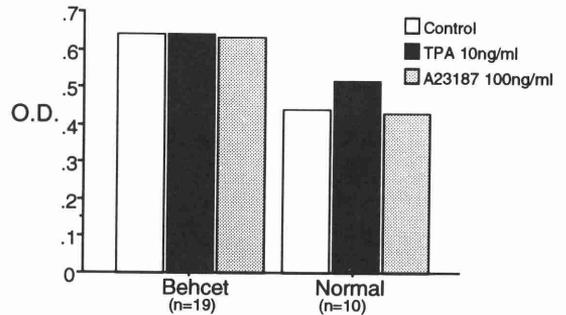


Fig. 3 C3mRNA expression in PMNs

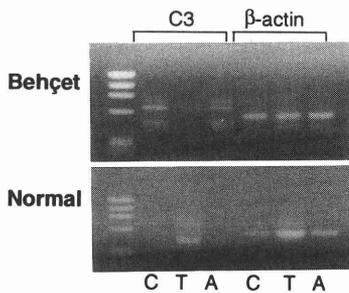
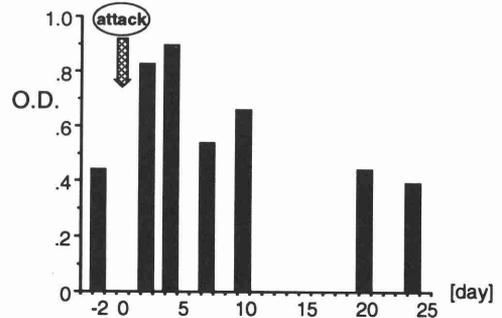


Fig. 4 Ocular attack and C3d change



### 3

## 潰瘍性大腸炎病変局所における補体活性化 の免疫組織学的検討

上江洲篤郎、水野元夫、植木 亨、木曾尊彦、田中彰一、中川昌浩、松岡佳子、木原康裕、稲葉知己、柚木直子、島田百利三、吉永文哉、那須淳一郎、岡田裕之、辻 孝夫  
岡山大学医学部 第一内科

Distributions of Activated and Degraded Fragments of Complement C3 (C3b and iC3b/C3dg) in  
Colonic Mucosa of Ulcerative Colitis

(First Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School)

#### <はじめに>

最近、液性免疫の主なエフェクターである補体の活性化を制御する種々の分子がヒト細胞膜上に存在することが明らかとなった。我々はすでに正常大腸粘膜および大腸癌における膜性補体制御因子の局在について検討し、発癌に伴うこれら分子の発現の変化を報告した<sup>1)</sup>。また、その発症機序に補体を介する免疫学的応答が関与していることが推測される潰瘍性大腸炎 (UC) 粘膜においてもこれら膜性補体制御因子が発現が著しく変化することを明らかにした<sup>2)</sup>。今回、UC粘膜局所における補体活性化と病態との関連をさらに明らかにするために、補体活性化経路において中心的役割を果たすC3の活性化成分であるC3bおよび不活性化成分であるiC3b/C3dgの局在を、免疫組織学的に検討したので報告する。

#### <対象と方法>

UC病変粘膜および虚血性腸炎、感染性腸炎などのUC以外の大腸炎の病変部粘膜、またスクリーニング目的で大腸内視鏡検査を行った健常者大腸粘膜の生検組織をPeriodate-lysine-paraformaldehyde液<sup>3)</sup>にて固定後、凍結切片を作成し、1次抗体にC3b、iC3b/C3dgに対するモノクローナル抗体(福島県立医大、藤田禎三教授より供与)<sup>4)</sup>およびTerminal complement complex (TCC)に対するモノクローナル抗体(Dako)、Decay accelerating factor (DAF,福島県立医大、藤田禎三教授より供与)<sup>5)</sup>、Membrane cofactor protein(MCP, IMMUNOTECH)、Homologous restriction factor20 (HRF20,名古屋市大、岡田秀親教授より供与)<sup>6)</sup>、CR1 (CD35,Cosmo Bio)などの補体制御因子および炎症細胞のマーカーとして

Mac-1  $\alpha$  chain (Bear-1, Nichirei)に対するモノクローナル抗体を1次抗体に用いた酵素抗体間接法により染色し、光顕および電顕下に観察した。

## <結果>

### 1. 正常大腸粘膜

正常大腸粘膜ではC3bとiC3b/C3dgおよびTCCの沈着はほとんど認められなかった。DAF、HRF20は上皮のapical側にわずかに発現し、MCPは上皮のbasolateral側に強い発現を認めた。また、CR1の発現は認められなかった。

### 2. 活動期UC粘膜

活動期UC粘膜では、C3bとiC3b/C3dgの主に上皮の基底膜に沿った沈着が認められた。C3bとiC3b/C3dg沈着は、正常粘膜に比べ、UC病変部粘膜の炎症の程度に相関してより強く認められた。連続切片による観察ではTCCの沈着はほとんど観察されず、また、C3bとiC3b/C3dgの沈着部周辺の粘膜固有層には、Mac-1陽性細胞の強い浸潤が認められた。免疫電顕による観察では、C3bとiC3b/C3dgは主に上皮の基底膜、基底膜下の結合織および上皮のbasolateral側の一部にその沈着が認められた。強拡大ではこれらのC3成分の顆粒状の集簇が基底膜に沿った上皮下の結合織に認められた(Fig. 1)。

既に報告したように、DAFとHRF20は上皮のapical側に著明な発現の増強を認め、また、上皮の基底膜側にはMCPの発現が正常粘膜と同様に認められた。CR1は上皮には発現を認めなかった。

### 3. 炎症コントロール粘膜

以上の活動期UC粘膜で認められた所見は、虚血性大腸炎などの他の大腸炎組織でもほぼ同様に認められた。

## <考案>

UC病変局所では、粘膜上皮基底膜部とその直下にC3bとiC3b/C3dgの沈着が観察され、同部における補体の活性化が明らかとなったが、補体活性化はC3レベルで制御されTCCの形成は認められなかった。この補体活性化の制御には、今回検討した膜性補体制御因子のうち大腸粘膜上皮細胞の基底膜面に局在の観察されたMCPがもっとも関与しているものと思われたが、免疫電顕による詳細な観察では、活性化補体とMCPの局在の微妙な差異も認められ、MCP以外を介する機序による補体活性化制御の可能性も示唆された。

また、今回の所見から、潰瘍性大腸炎における粘膜病変形成への補体活性化の関与

は、TCC形成による直接的な粘膜障害機序の関与の可能性は少ないものと考えられた。むしろ、C3の活性化過程で形成されるC3aアナフィラトキシンの放出などを介した炎症細胞の活性化などの機序の関与が今後検討されるべき課題と思われた。

さらに、C3bとiC3b/C3dgの沈着は潰瘍性大腸炎に特異的な所見でなく種々の大腸炎において共通に認められたことから、補体活性化を介する炎症の誘導は種々の大腸炎の炎症の発症機序に関与している可能性が示唆された。

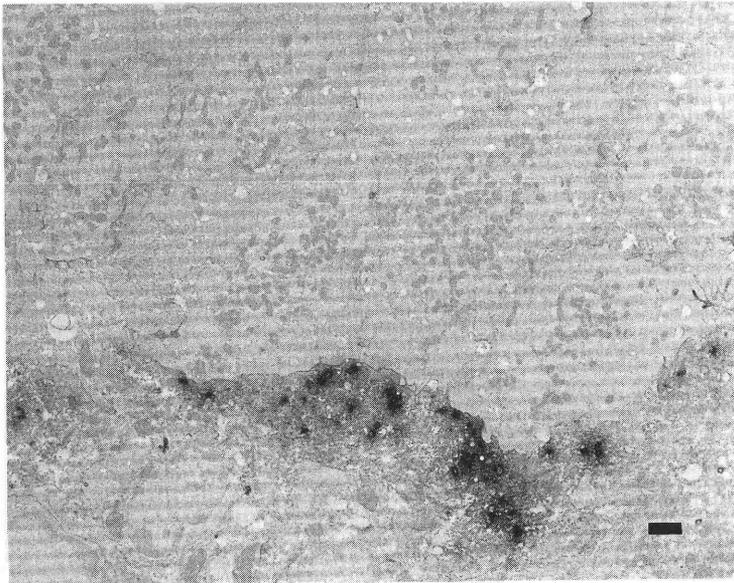
## 文献

- 1) Inoue H. et al., *Acta Med Okayama* 48, 271 (1994)
- 2) Uesu T. et al., *Lab Invest* 72, 1 (1995)
- 3) McLean I.W. et al., *J. Histochem. Cytochem.* 22, 1077 (1974)
- 4) Iida K. et al., *Immunology* 62, 413 (1987)
- 5) Fujita T. et al., *J. Exp. Med.* 166, 1221 (1987)
- 6) Okada N. et al., *Int. Immunol.* 1, 205 (1989)

## Figure 1

免疫電顕による潰瘍性大腸炎粘膜におけるC3bの局在

C3bの顆粒状の沈着が基底膜に沿った上皮下の結合織に強く認められる。(bar=1  $\mu$ m)



#### 4 間質性肺疾患におけるBALF中肺泡マクロファージ及びリンパ球補体関連膜蛋白

中原梨佐、竹村周平、小野寺秀記、笠松美宏、瀬戸信之、一尾直子、  
土井たかし、中西貞信、岡本雅之、福田互、柳田国雄、  
上田正博、出口雅子、近藤元治  
京都府立医科大学第一内科

(はじめに)

間質性肺疾患は、病因の特定された疾患群と病因不明の疾患群に大別される。こうした病因の相違によって生じる生体の免疫応答の多様性から、肺の線維化機転は様々に研究されてきた。一方、補体系は、肺の線維化に関与する因子とされ、近年補体レセプターとサルコイドーシスの関連等の報告が散見される。我々は、さらにMCP, DAFなどの補体制御膜蛋白を検討に加えて、BALF中肺泡マクロファージ並びにリンパ球補体関連膜蛋白を測定し、疾患群毎に比較検討したので報告する。

(対象と方法)びまん性肺疾患12症例と対照8症例を検討の対象とした。その内訳は、特発性間質性肺炎を中心とした線維化性肺疾患(以下IP群)6症例、肉芽腫性肺疾患(以下Gr群)3症例、好酸球性肺炎(以下EP群)3症例である。対照(以下MISC)としては健康者や肺癌患者の健側肺から得られた検体を用いた。気管支鏡下に気管支肺泡洗浄液を採取し、採取したBALF細胞を、 $1.5 \times 10^4$ 個に調整し、一次抗体としてCR1, CR3, MCP, DAFのマウス抗ヒトモノクローナル抗体、更に二次抗体としてFITCでラベルしたヤギ抗マウスIgG抗体を反応させ、flowcytometerでマクロファージ分画並びにリンパ球分画の平均蛍光強度(MFI)を測定した。また、BALF中の補体分解産物(C4d, Bb, iC3b, SC5b-9)をELISA法にて測定した。

(結果)

1) 各症例の臨床所見と疾患活動性(表1): 疾患活動性は、BAL施行時と病状安定時の患者の呼吸困難の程度, PaO<sub>2</sub>, %VC, LDH, ESR, 胸部X線, Gaシンチ、以上7項目のパラメーターの変動を数量化して求めた。

表1 BAL施行時における臨床所見と疾患活動性

No	Sex	Age	Dyspnea	PaO <sub>2</sub>	%VC	LDH	ESR	CXP	Ga-scinti	point	ACT <sup>1)</sup>
IP1	M	70	HJ I <sup>2)</sup>	74.0	78.3	389	118	++	++	8/14	2
IP2	F	19	HJ I	96.5	88.8	327	11	++	++	4/14	1
IP3	F	20	HJ III	52.8	87.9	528	9	+++	++	11/14	3
IP4	M	68	HJ I	69.0	110.0	403	46	+	+	3/14	1
IP5	M	71	HJ III	50.3	ND	404	22	++	++	10/12	3
IP6	F	69	HJ I	89.5	105.8	357	100	+	-	1/14	1
Gr1	M	45	HJ II	79.6	69.9	353	124	++	++	11/14	3
Gr2	M	45	HJ I	86.4	ND	221	102	+	++	5/12	2
Gr3	M	71	HJ I	84.7	81.7	335	54	++	++	4/12	1
EP1	M	25	HJ II	79.5	102.2	559	7	++	ND	8/12	2
EP2	F	26	HJ III	92.6	106.6	296	5	++	ND	5/10	2
EP3	F	45	HJ I	81.2	107.7	496	24	++	ND	6/12	2

<sup>1)</sup> ACT1; point 0 - point 0.35, ACT2; 0.36-0.70, ACT3; 0.71-1.0

<sup>2)</sup> HJ; Hugh-Jonesの呼吸不全分類

2) B A L F 上清中補体分解産物(Fig1) : IP群とGr群の比較において、IP群ではiC3bの増加傾向( $p=0.05$ ), Gr群ではC4dの有意な増加( $p=0.03$ )を認め、肺局所における補体の活性化が示唆された。

3) 肺胞マクロファージ上の補体関連膜蛋白(Fig2) : 補体レセプターでは、CR3の発現がGr群においてIP群との比較で増加傾向を示した。補体制御膜蛋白では、DAFの発現が、Gr群において増加傾向を示した。

4) B A L F 中リンパ球上の補体関連膜蛋白(Fig3) : 補体レセプターでは有意差は認められなかった。補体制御膜蛋白では、MCPの発現がIP群とGr群の比較において有意にGr群で増加していた。又、DAFの発現もGr群で両群の比較において増加傾向を示した。

5) 各蛋白と疾患活動性の検討(Fig4) : 肺胞マクロファージ上のCR1に有意な正の相関( $p=0.01$ )を認めた。リンパ球上の補体関連膜蛋白では疾患活動性と相関は認めなかった。

(考案)

補体レセプターCR1, CR3は免疫複合体や病原微生物等の貪食に寄与し、その発現の増強は異物のクリアランスの効率を高まりを意味する。今回の検討では、肉芽腫性肺疾患でCR3の発現の増加傾向が示された。即ち、肉芽腫性肺疾患では肺胞マクロファージの貪食能は亢進し、肉芽腫形成の成因に関与しているものと考えられる。又、補体制御膜蛋白は、肺胞マクロファージ、リンパ球両者とも肉芽腫性肺疾患でMCP, DAFの発現が増加していた。以上より、肉芽腫形成時には肺局所で何らかの免疫反応が起こっていると考えられるが、その際CR3, MCP, DAF等の補体関連膜蛋白を増加させるサイトカインが放出されていることが推測される。実際我々は、*in vitro*で末梢血単球を用いMCSFがCR3, DAFを増加させる結果を得た。このように、疾患の炎症像の違いが補体関連膜蛋白の発現の差として把握出来る可能性があり、今後はこれら補体関連膜蛋白の発現調節機構を考慮しながら各疾患の成立機序を検討すべきと考える。

Fig.1 ng/ml

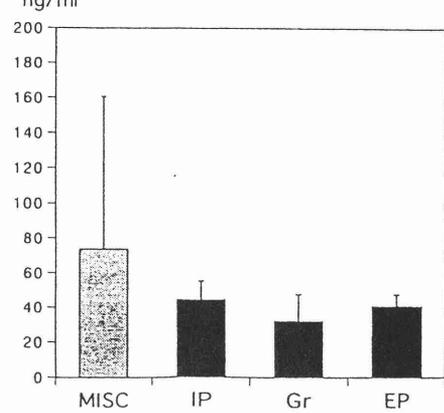
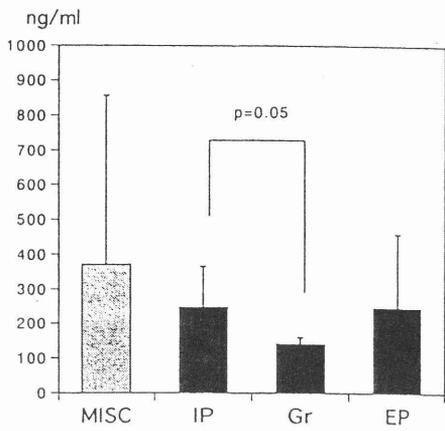
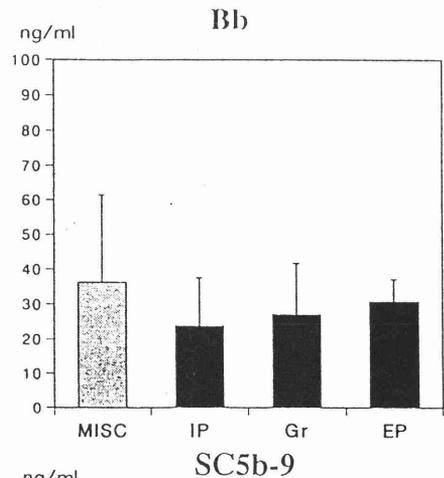
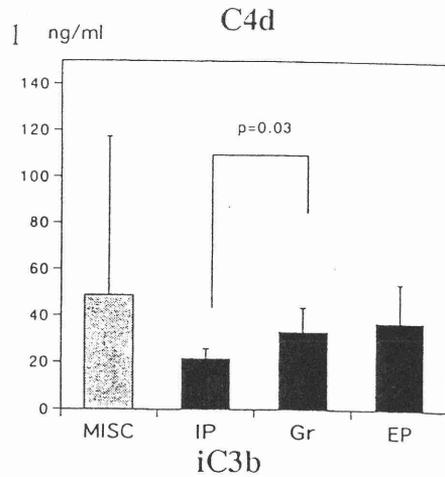


Fig. 2

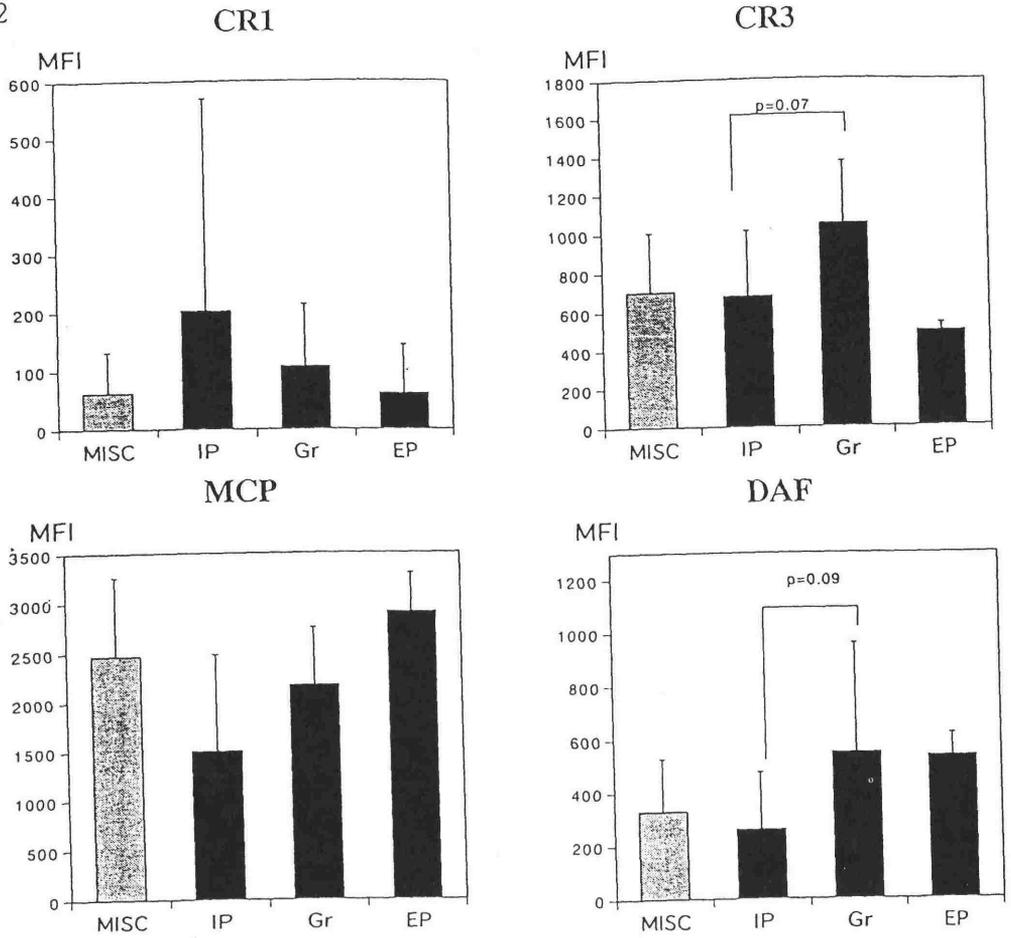


Fig. 4

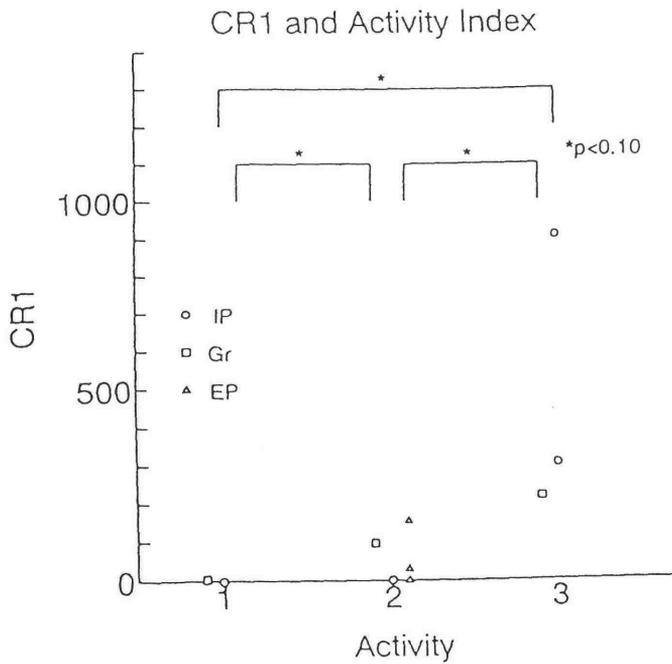
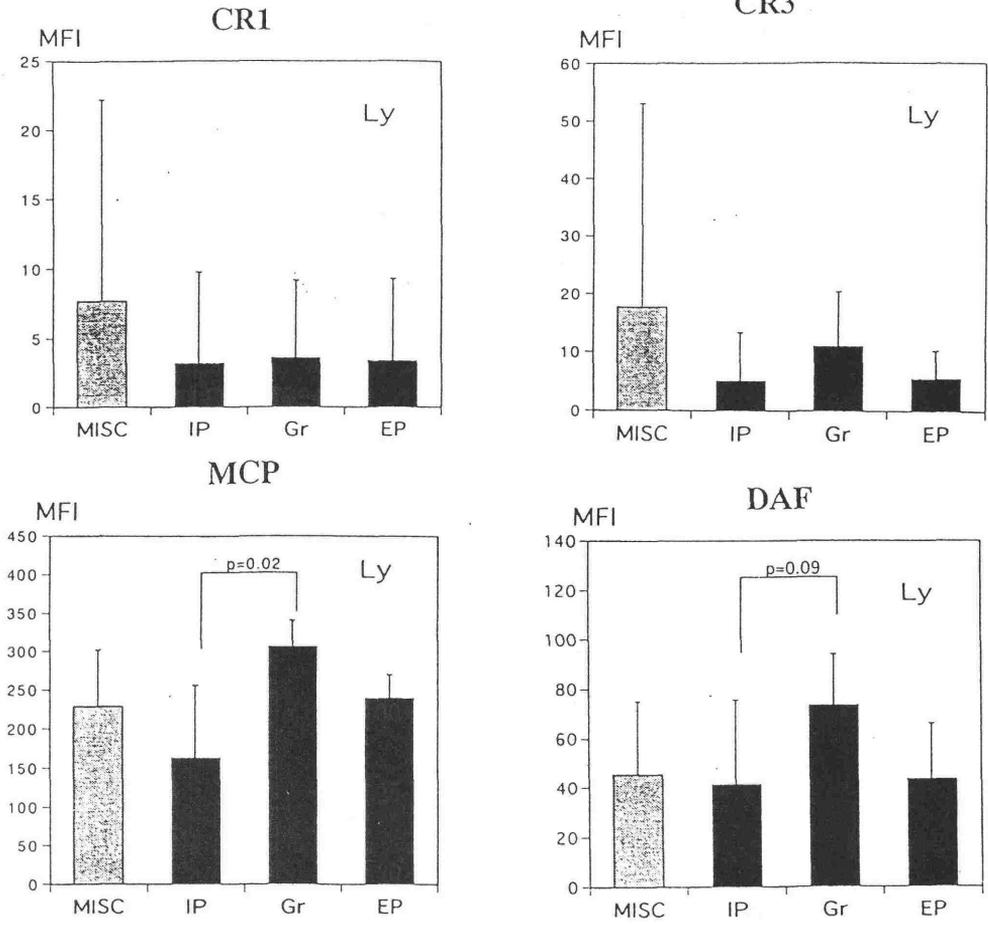


Fig. 3



(文献)

- 1)小野寺秀記、竹村周平、近藤元治、他：びまん性汎細気管支炎における補体レセプター、日本胸部臨床、50, 10, 798-803(1991)
- 2)I. Striz. et al. :Expression of alveolar macrophage adhesion molecules in pulmonary sarcoidosis, Chest, 102, 882-886(1992)
- 3)H. B. PETERSEN. et al. :Phagocytosis of Agarose Beads by Receptors for C3b(CR1) and iC3b(CR3) on Alveolar Macrophages from Patients with Sarcoidosis, Scand. J. Immunol. 32, 669-677(1990)

## 5 慢性血液透析患者における関節液中の補体factor D 濃度について

中西 功<sup>1</sup>、北野悦子<sup>2</sup>、林 晃正<sup>1</sup>、勝二達也<sup>1</sup>、岡田倫之<sup>1</sup>、椿原美治<sup>1</sup>、北村 肇<sup>2</sup>  
大阪府立病院 腎臓内科<sup>1</sup>、大阪府立看護大学医療短大部<sup>2</sup>

Factor D levels in joint fluids of hemodialysis patients.

1)Department of Nephrology, Osaka Prefectural Hospital

2)Osaka College of Health Science,

<はじめに>

透析患者では factor D の血中濃度が健常人に比べ約 10~20 倍と著しく増加し、生体に種々の悪影響を及ぼすことが報告されている<sup>1)</sup>。一方、 $\beta_2$ -microglobulin( $\beta_2$ -MG)も透析患者では血中濃度が著しく増加し、透析アミロイドーシスの原因物質となることは周知のとおりであり、関節局所での $\beta_2$ -MG の組織学的検討などの多くの報告がなされている<sup>2)</sup>。しかしながら、透析患者の関節局所における factor D の検討については報告はない。そこで、今回、慢性血液透析(HD)患者における関節液中の factor D 濃度につき $\beta_2$ -MG 濃度と比較検討したので報告する。

<対象と方法>

対象：関節病変を有するHD患者13名（男3名；女10名、平均年齢59.8歳、平均透析暦12.5年）で、controlは変形性膝関節症の非透析患者19名（男5名；女14名、平均年齢63.3歳）である。これら患者の膝関節より採取した関節液を検体として用いた。

方法： factor D活性は深山らの方法<sup>3)</sup>に基づき、Cobra Venom factorを用いたモルモット赤血球の溶血法で測定した。factor D蛋白濃度の測定には2種類の抗体（sheep anti-factor D IgG, rabbit anti-factor D IgG）を使用し、新たに確立したサンドイッチELISA法にて測定した。 $\beta_2$ -MG濃度はELISA法にて測定した。

## <結果>

### 1) HD 患者血清中の factor D 濃度と $\beta_2$ -MG 濃度

factor D 濃度は  $22.9 \pm 4.2 \mu\text{g/ml}$  (正常範囲 1~2  $\mu\text{g/ml}$ )、 $\beta_2$ -MG 濃度は  $33.5 \pm 13.2 \text{ mg/L}$  (正常範囲 0.8~2.0  $\text{mg/L}$ )と、いずれも健常人の 10 倍以上であった。しかし、両者の間には有意の相関関係は認められなかった。

### 2) 関節液中の factor D 濃度と $\beta_2$ -MG 濃度 (図 1)

非透析患者の関節液中の factor D 濃度は  $3.8 \pm 1.5 \mu\text{g/ml}$  であるのに対し、HD 患者の関節液中の factor D 濃度は  $16.0 \pm 6.5 \mu\text{g/ml}$  と有意の高値 ( $p < 0.0001$ ) を示した。一方、HD 患者の関節液中の  $\beta_2$ -MG 濃度は  $23.6 \pm 9.5 \text{ mg/L}$  で、非透析患者 ( $2.3 \pm 1.1 \text{ mg/L}$ ) に比べ、有意の高値 ( $p < 0.0001$ ) を示した。しかし、関節液中の factor D 濃度と  $\beta_2$ -MG 濃度の間には有意の相関関係は認められなかった。

### 3) 関節液中の factor D 濃度と factor D 活性の相関

HD 患者の関節液中の factor D 活性は  $9137 \pm 3290 \text{ U/ml}$  であり、健常人プール血清の factor D 活性 ( $1000 \text{ U/ml}$ ) の約 9 倍の値を示した。患者血清と同様、関節液中の factor D 蛋白濃度と factor D 活性の間には有意の正の相関関係 ( $r = 0.934, p < 0.0001$ ) が認められた。

### 4) 透析年数と関節液中の factor D 濃度

透析年数と関節液中の factor D 濃度との間に有意の正の相関関係 ( $r = 0.601, p < 0.05$ ) が認められた。

## <考察>

長期透析患者の増加に伴い、骨・関節病変を主体とする透析アミロイドーシスの合併はますます重要な問題となっている。近年、この透析アミロイドーシスの原因物質として advanced glycation end-product 化された  $\beta_2$ -MG が注目されており、多数の研究がなされている<sup>4)</sup>。一方、factor D の蓄積を主因とする補体系の活性化を介する骨・関節病変の可能性も示唆されているが<sup>4)</sup>、関節局所よりのアプローチはまったくなされていない。我々の検討により、HD 患者の関節液中に、 $\beta_2$ -MG と同様、活性を持った factor D 蛋白が高濃度に存在することが明らかとなった。しかしながら、今回の成績のみでは、関節液中の factor D が患者の骨・関節病変とどのように関係するかについてはまったく不明である。今後、症例数を増やすとともに、手術摘出標本での factor D の免疫組織学的検討などを行う予定である。

<結論>

非透析患者に比し、慢性血液透析患者の関節液中には factor D が高濃度に存在することが明らかとなった。

<文献>

- 1) Miyata T et al., Nephron 59, 409 (1991)
- 2) 本間則行 他、腎と骨代謝 2, 403 (1989)
- 3) Miyama A et al., Biken's J 18, 193 (1975)
- 4) 前田憲志 他、透析会誌 27, 1119 (1994)

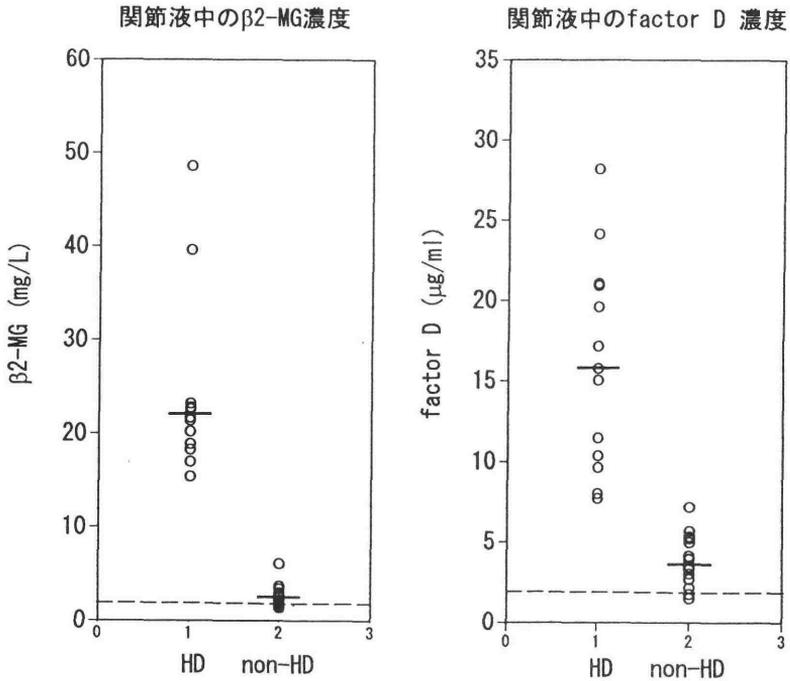


図1 透析患者および非透析患者の関節液中の factor D 濃度とβ<sub>2</sub>-MG 濃度

西坂浩明<sup>1</sup>、堀内孝彦<sup>1</sup>、福森泰雄<sup>2</sup>、長沢浩平<sup>1</sup>、林 健志<sup>3</sup>、  
仁保喜之<sup>1</sup>、John E. Volanakis<sup>4</sup>

<sup>1</sup>九州大学医学部 第一内科、<sup>2</sup>大阪府赤十字血液センター、

<sup>3</sup>九州大学遺伝情報研究施設 ゲノム解析分野、

<sup>4</sup>Division of Clinical Immunology and Rheumatology, Department of Medicine,  
University of Alabama at Birmingham, AL

Molecular basis for human complement 6 (C6) deficiency

(<sup>1</sup>First Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine,

<sup>2</sup>Osaka Red Cross Blood Center,

<sup>3</sup>Research Institute for Genetic Information, Kyushu University,

<sup>4</sup>Division of Clinical Immunology and Rheumatology, Department of Medicine,  
University of Alabama at Birmingham, AL)

#### <はじめに>

ヒト補体C6欠損症は、他の補体後期成分欠損症と同様に、細菌性髄膜炎を合併することが知られているが、その遺伝子異常についての報告はみられない。

今回我々は、補体C6欠損症患者である白人男性1名、日本人男性1名について、PCR SSCP 法を用いて検討したので報告する。

#### <対象と方法>

患者1は、42歳白人男性で、細菌性髄膜炎を繰り返している。患者2は37歳日本人男性で、献血者の中から発見された。ともにSRID assay及びC6欠損血清を用いた溶血活性測定にて、C6は完全に欠損していた。

17個のそれぞれのexonを含むようにprimerを設定し、各exonについてPCR-SSCP解析を行った。DNAは患者末梢血単核球より精製した。Normal controlと泳動度の異なるbandをゲルから切り出し、これより得られたDNAを再増幅し、Cycle sequencingにより塩基配列を決定した。

#### <結果>

(1) 患者1. PCR-SSCP解析の結果、exon 12にNormal controlと泳動度の異なるbandを認めた(Figure. a)。患者1にはNormal controlと同じbandが認められず、ホモのパターン(bandが2本)であった。また、母親はNormal controlと泳動度の母親は同じbandと患者1と同じbandをもつヘテロのパターンであった。これらをすべて切り出してCycle sequencingにより塩基配列を決定したところ、患者1のbandすべてに一塩基の欠失(1937delG)が認められた(Figure. b)。これによりframeshiftが起これ、この後の4個目のcodonが終止codonとなることがわかった(Figure. c.)。

(2) 患者2. PCR-SSCP解析の結果、exon 2にNormal controlと泳動度の異なるbandを認めたが、SSCP上ヘテロのパターン(bandが4本)であった。すべてのbandについ

でsequencingを行ったところ、Normal controlと泳動度の同じ2本のbandは塩基配列も正常であったが、異なる2本のband (mutant allele) には一塩基の欠失(292delC/293delC/294delC/295delC)を認め、この後に終止codonが生じることがわかった。もう一方のalleleの異常は検索中である。

#### <考察>

患者1ではexon 12の一塩基欠失(1937delG)を認め、SSCPの泳動パターンよりホモの異常であると考えられた。これによりframeshiftが起こってこの後の4個目のcodonが終止codonとなり、C6タンパクのtruncationによるinstabilityあるいはtransport defectが生じることによりC6タンパクの欠如が生じたと考えられる。また、small deletionは繰り返し配列の周辺に生じやすいとされているが、本例でも欠失塩基の周囲にATGATGATGの繰り返し配列が認められた。

患者2では一方のalleleには一塩基欠失(292delC/293delC/294delC/295delC)が認められ、患者1の場合と同様にこのalleleからはC6タンパクは産生されないが、もう一方のalleleの異常はexon 2には存在せず、またexon 12にも存在しなかった(sequencingにより確認した)。intron内の異常やpromoter領域の異常が考えられるが、PCR-SSCP解析は、300 bp以下のPCR productでは90%以上の感度があるが今回の解析では一部のexonは300 bp以上であり、exon内の異常であっても今回行った方法では同定できなかった可能性もある。

#### <総括>

ヒト補体C6欠損症遺伝子異常を初めて同定したので報告した。白人の一例はexon 12のホモの一塩基欠失(1937delG)であり、日本人の一例は、一方のalleleはexon 2の一塩基欠失(292delC/293delC/294delC/295delC)であったが、もう一方のalleleの異常はまだ不明である。



## 7

# 慢性肝炎における可溶性補体レセプター (sCR1) の検討

岩崎良章、下村宏之、宮池次郎、藤尾耕三、辻 英之、  
和唐正樹、近藤淳一、藤岡真一、石井泰史、辻 孝夫  
岡山大学医学部 第一内科

Analysis of soluble C3b receptor (CR1) in sera of patients with  
chronic hepatitis

Yoshiaki Iwasaki, Hiroyuki Shimomura, Jiro Miyaike, Kozo Fujio, Hideyuki Tsuji,  
Masaki Wato, Junichi Kondo, Shinichi Fujioka, Yasushi Ishii and Takao Tsuji  
(First Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School)

### <はじめに>

CR1 (CD35, C3b/C4b receptor)は、免疫粘着反応、貪食反応、補体制御反応などの免疫系の調節に重要な内因性膜糖蛋白である<sup>1)</sup>。近年、血中のsCR1の存在とin vitroにおける活性が示されている<sup>2)</sup>。前回、われわれは、各種肝疾患における血中のsCR1について検討し、病型によるsCR1レベルの違いについて報告した<sup>3)</sup>。今回、慢性肝炎、特に、C型慢性肝炎を中心に、経過および治療に対する反応性を含めたsCR1の臨床的意義について検討したので報告する。

### <対象と方法>

当科に入院し、腹腔鏡下肝生検を施行し診断した、B型慢性肝炎(CH-B)21例、C型慢性肝炎(CH-C)39例、および、インターフェロン(IFN)治療を行ったCH-C15例(いずれも初回投与例)を対象とした。

IFN治療例については、IFN投与終了後6ヶ月以上経過観察し、s-ALTの持続正常化およびHCV-RNAの持続陰性化を認めた症例を有効群(CR: 7例)、その他を無効群(NR: 8例)とし、IFN投与前後の血清について検討した。

sCR1の測定には、CD35 bead assay kit (T Cell Diagnostics)を、補体価の測定には50%溶血法(CH50)を、C3, C4の定量にはレーザーネフロメーター法を用いた。HCV-RNAの検出には、5'-non coding regionを標的としたnested PCR法を用いた。

### <成績>

血中sCR1濃度(mean±SD ng/ml)はCH-B $90.3 \pm 37.8$ , CH-C $59.2 \pm 16.8$ であり、CH-CがCH-Bに比較して有意に低値を示した ( $p < 0.0001$ )。CH-BはCH-Cに比べ、s-ALTが有意に高値を示した ( $p < 0.03$ ) ため、s-ALTが100 IU/L以下の症例 (s-ALTは両群間で有意差無し) について比較したが、やはりCH-CではCH-Bに比べてsCR1は有意

に低値を示した ( $p < 0.0002$ ) (図1)。

CH-C9例において、sCR1を血清と血漿について同時に検討したが、両検体間に有意な差を認めなかった。CH-Cの補体価別にsCR1を比較すると、C3, C4が正常にもかかわらずCH50が20未満の群では30以上の群に比べて高値を示した ( $p < 0.05$ )。

血中sCR1と各種血清のパラメーターとの相関についての検討すると、CH-Bではs-ALTおよびC4と各々正および負の弱い相関を示したが (各々 $r = 0.543, p < 0.04, r = -0.526, p < 0.05$ )、CH-Cでは相関を認めなかった。

CH-CのIFN治療例15例について、IFN投与前後のsCR1を比較すると、投与後ではsCR1の有意な低下が認められた ( $p < 0.02$ )。sCR1の低下率についてCRとNRで比較すると、CRではNRに比べてより低下が認められた ( $p < 0.05$ ) (図2)。IFN治療例の経過では、s-ALTは、IFN投与により低下し、中止後再上昇を認めた。sCR1はs-ALTとほぼ同時か、若干遅れて変動したが、s-ALTに先行する場合も認められた (図3)。

#### <考察>

血中のCR1の約95%は赤血球膜に存在する。sCR1は主としてCR1の蛋白分解により、白血球あるいは赤血球から放出されるとの報告がある<sup>4,5)</sup>。また、血中sCR1の腎臓による代謝が考えられている<sup>6)</sup>。しかしながら、肝疾患を含め、臨床的意義に関する報告はほとんど無い。

我々の検討では、前回の報告と同様に、CH-CではCH-Bとは対照的に比較的軽度の上昇にとどまっていた。CH-BはCH-Cに比べ、s-ALTが有意に高値を示し ( $p < 0.03$ )、s-ALTとの正の相関を認めたため、s-ALTが100 IU/L以下の症例 (s-ALTは両群間で有意差無し) について比較したが、やはりCH-CではCH-Bに比べてsCR1は有意に低値を示した ( $p < 0.0002$ ) (図1)。

CH-Cでは、*in vitro*における低温での補体の活性化 (coldactivation) が起こりやすいことが知られている。そこで、C3, C4が正常にもかかわらず血清CH50が低値であり、coldactivationを示すと考えられる症例を含めて検討したが、sCR1の低下は認められなかった。すなわち、CH-CではCH-Bに比べて血中sCR1は低値を示したが、coldactivationによる直接の影響とは考え難いと言える。従って、CH-Cでは、少なくともCH-Bとは異なる補体の活性化、およびsCR1の分泌或いは代謝状態を呈する可能性が考えられる。

血中sCR1と他の血清パラメーターとの検討では、CH-Bでのみs-ALT及びC4との弱い相関が認められた。従って、CH-Cでは従来のパラメーターと異なり独特の動態を示すと考えられる。今後、分泌細胞の同定、詳細な分泌の機序およびそれに影響を与える各種サイトカイン、代謝の過程などの検討が必要と考えられる。

CH-CのIFN治療例での検討では、sCR1はIFN治療により低下を示しており、IFNに対する反応性の一つの指標になりうると考えられる。さらに、治療効果別についての検討では、CRでNRに比べてsCR1は有意に低下しており、IFN投与終了時の早

期の効果判定に有用であると考えられる。

CH-Cの臨床経過では、sCR1はs-ALTとほぼ同時か、若干遅れて変動した。CH-CにおいてsCR1が、s-ALTとの相関を示さない理由と考えられる。しかしながらsCR1の変動の機序に関しては、上記と同様に今後の検討が必要と考えられる。

#### <まとめ>

血中sCR1は、C型慢性肝炎ではB型慢性肝炎に比べて低値であった。また、C型慢性肝炎では従来 of 血清のパラメーターとは異なる動態を示し、特異的な病態を反映していると考えられ、また、IFN治療効果の予測にも有用である可能性が示唆された。

#### <文献>

- 1) Ross G. D. Current Topics Microbiol. Immunol. 178, 31 (1992)
- 2) Yoon S.H. et al., J. Immunol. 134, 3332 (1985)
- 3) 岩崎良章 他、第31回 補体シンポジウム 講演集, 52 (1994)
- 4) Danelsson C. et al., Eur. J. Immunol. 24, 2725 (1994)
- 5) Pascual M. et al., Eur. J. Immunol. 24, 702 (1994)
- 6) Pascual M. et al., J. Exp. Med. 179, 889 (1994)

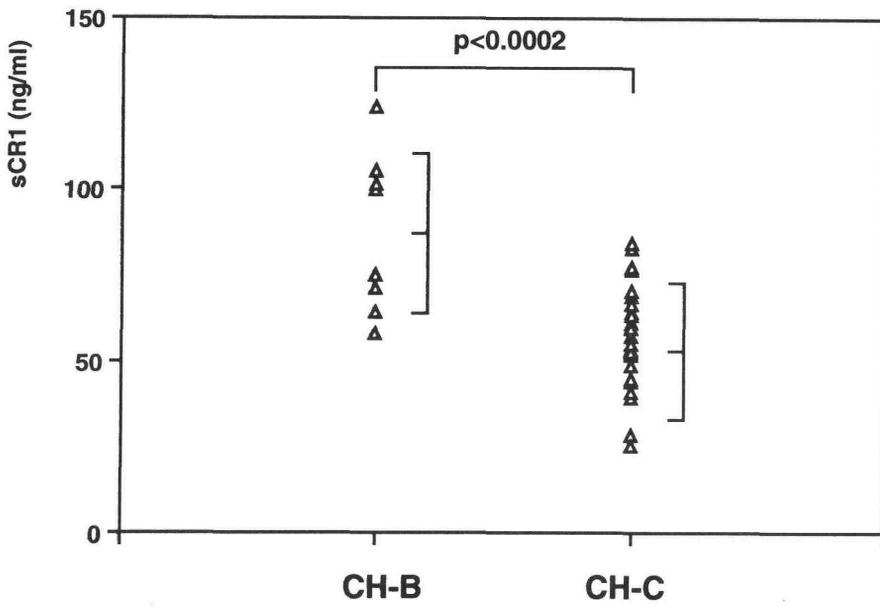


図1. B型およびC型慢性肝炎における血中sCR1の比較：s-ALTが100IU/L以下の症例での検討

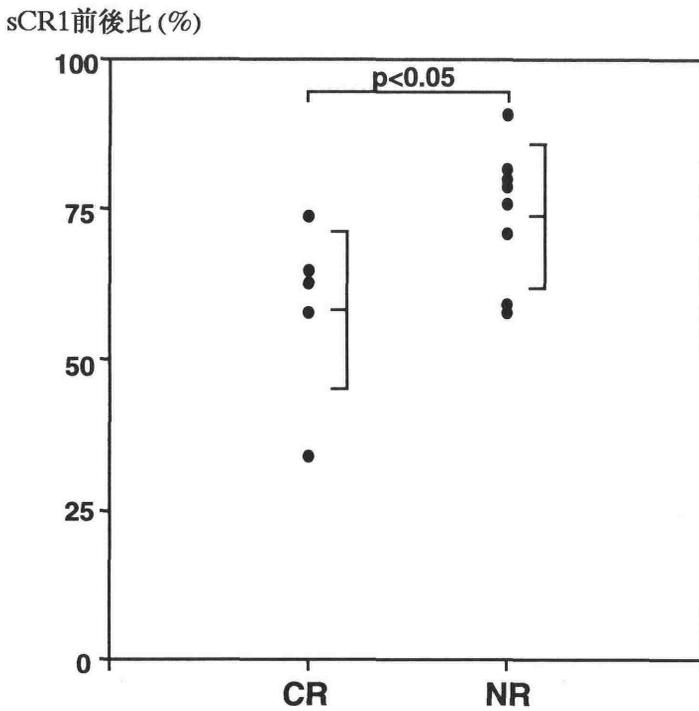


図2. IFN治療前後の血清sCR1比の比較

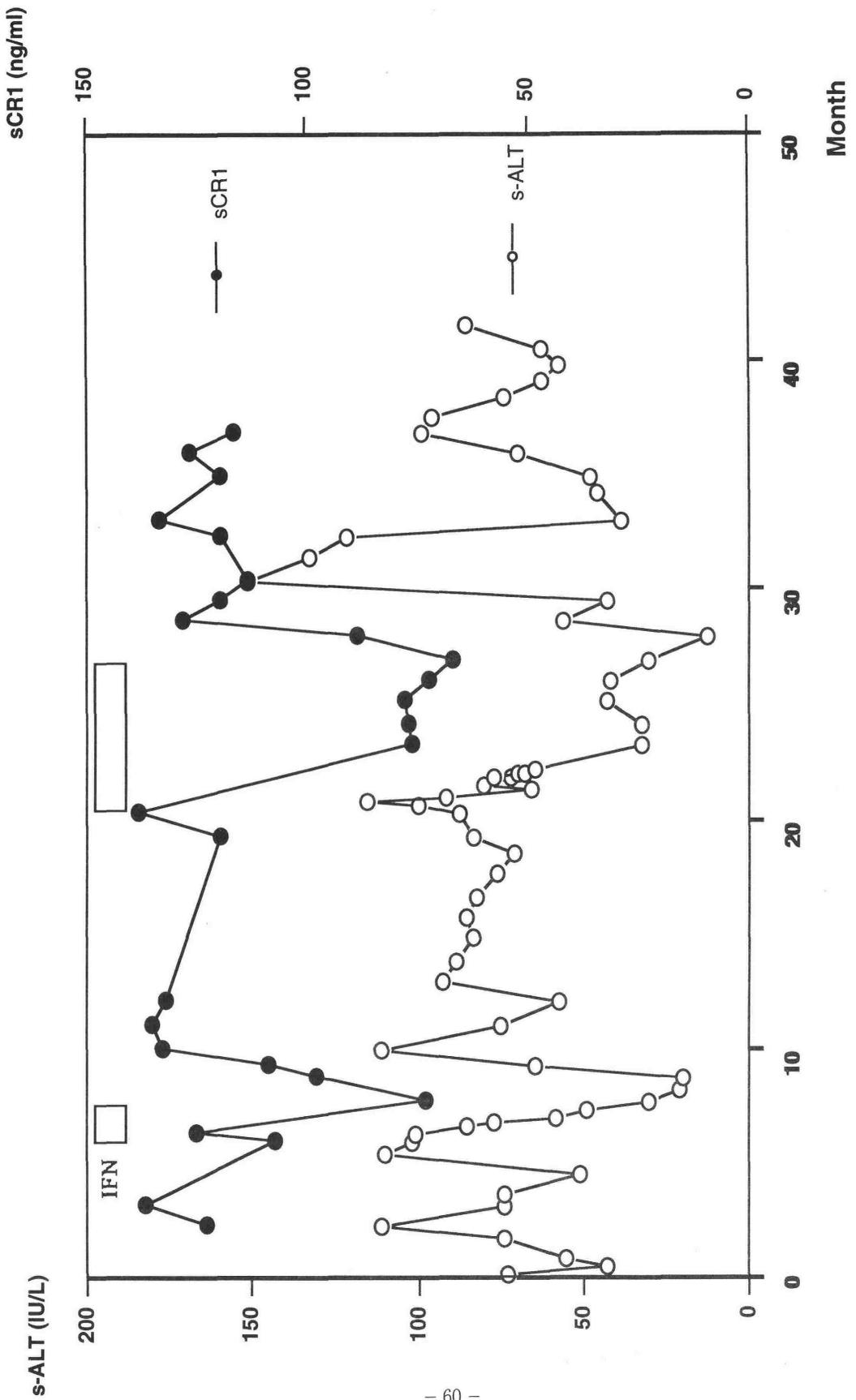


図 3. C型慢性活動性肝炎例のIFN治療経過 (55歳女性、組織：CAH2B)

## 8

# 慢性肝疾患における赤血球の補体レセプター (CR1) の検討

宮池次郎、岩崎良章、下村宏之、藤尾耕三、辻 英之、  
和唐正樹、近藤淳一、藤岡真一、石井泰史、辻 孝夫  
岡山大学医学部 第一内科

Quantitative analysis of C3b receptor (CR1) on erythrocyte from patients with  
chronic liver diseases

Jiro Miyaike, Yoshiaki Iwasaki, Hiroyuki Shimomura, Kozo Fujio, Hideyuki Tsuji,  
Masaki Wato, Junichi Kondo, Shinichi Fujioka, Yasushi Ishii and Takao Tsuji  
(First Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School)

### <はじめに>

現在までに、われわれを含めて各種肝疾患における血中の可溶性の免疫複合体 (circulating immune complex, CIC)の上昇が、報告されている<sup>1)</sup>。CICは、赤血球膜上の補体レセプター (C3b receptor (CR1) on erythrocyte, E-CR1) に結合することにより血中から排除されることが示されている<sup>2)</sup>。従って、E-CR1は血中のCICの異常にも関連すると思われるっており、例えばSLE、自己免疫性溶血性貧血、後天性免疫不全症候群などの免疫異常を示す疾患での低下が報告されている。しかしながら、肝疾患におけるE-CR1に関する報告は少ない。そこでわれわれは、慢性肝疾患においてE-CR1を定量し、可溶性のCR1 (sCR1) も含めて検討したので報告する。

### <対象と方法>

当科に入院し、腹腔鏡下肝生検を施行し診断した、慢性肝疾患 90例および、肝疾患の既往のない健常人16例を対象とした。慢性肝疾患 90例の内訳は、B型慢性肝炎 (CH-B) 12例、C型慢性肝炎 (CH-C) 41例、原発性胆汁性肝硬変 (PBC) 26例、自己免疫性肝炎 (AIH) 11例である。

E-CR1の定量には、抗CR1モノクローナル抗体 (31R<sup>3)</sup>、生化学工業) を用い、Wilsonら<sup>4)</sup>の方法に準じたRIA法で測定し、Scatchard analysisにより算出した。血清中のsCR1は、CD35 assay kit (T cell diagnostics)により測定した。

### <結果>

各種肝疾患における赤血球当たりの平均のCR1数(E-CR1, mean±SD)はCH-B 792±269, CH-C 640±160, PBC 655±226, AIH 671±362であり健常人では814±324であった(図1)。

健常人との比較では、いずれの慢性肝疾患においてもE-CR1の平均値は低かったが、CH-Cにおいて有意な低値を認めた( $p < 0.01$ )。また、肝疾患での比較では、CH-CはCH-Bと比較べて有意にE-CR1の低値を示した( $p < 0.02$ )。しかしながら、s-ALTを含む肝機能検査、KICG、 $\gamma$ -グロブリンの量、分画、補体価、C3、C4に両疾患群間で有意差は認められなかった。

E-CR1とsCR1の検討では、肝疾患全体で検討すると、有意な相関は認めなかった。E-CR1とその他の血清検査値との検討でも、有意な相関は認められなかった。

### <考察>

赤血球は、血中においてCR1を介してCICを接着し網内系に輸送することにより、その処理に関与していると考えられている。赤血球あたり平均のCR1は、950前後との報告があり、好中球やリンパ球に比べ非常に少ないが、絶対数が多いため赤血球のCR1が血中の95%を占めるとされている。従って、血中におけるCICの処理に、重要な役割を果たすと考えられる。肝疾患では血中にCICが検出されること多く報告されており<sup>1)</sup>、E-CR1との関連が注目される。

われわれの検討では、健常人でE-CR1は最も高値を示したが、個体によるばらつきが大きかった。これは、Wilsonら<sup>4)</sup>の報告とも一致しており、E-CR1の発現の遺伝的な制御<sup>5)</sup>との関連が考えられる。

一方、慢性肝疾患、特にCH-C、さらに有意差はないもののPBCにおいて、E-CR1が低値を示していた。今回検討した慢性肝疾患のうち、PBCおよびAIHについては、SLEと同様に遺伝学的な素因、即ちHLAとの関連が報告されている。従って、これらの肝疾患でのE-CR1の低下と、遺伝学的素因との関連の可能性は否定できない。しかしながら、CH-CにおけるE-CR1の低下は、後天的、すなわち慢性肝炎を発症したことにより生じたものと考えられる。急性肝炎での検討に関する報告では<sup>6)</sup>、急性期に低下したE-CR1が回復期に正常化しており、肝障害との関連が考えられている。

肝疾患ではCH-CとPBCのいずれにおいても、CICの出現が多く報告されており、E-CR1の低下との関連が考えられる。Inadaら<sup>7)</sup>によれば、E-CR1レベルと免疫複合体のレベルが相反するという。各種疾患におけるE-CR1の低下の原因については議論が多いが、網内系での除去、免疫複合体や変性 $\gamma$ -グロブリンあるいは抗CR1自己抗体による赤血球膜上のCR1のmaskなどが挙げられている。今後、CICや、赤血球に結合した免疫複合体、補体、 $\gamma$ -グロブリンを含めた検討が必要と考えられる。

CH-CとCH-BではE-CR1に有意差が認められたが、その他の検査所見では有意差は認められなかった。両疾患で、CICの量的、あるいは質的な相違が考えられるが、今後、症例を増やすとともに、これらを含め検討する必要がある。

E-CR1とsCR1との検討では、相関が認められなかった。Yoonら<sup>8)</sup>の報告でも、SLEではE-CR1とsCR1の相関を認めなかったという。sCR1は、主としてintactなCR1の蛋

白分解により生ずると考えられている。また、現在のところ、白血球および赤血球のいずれも、sCR1を放出する可能性が示されている<sup>9,10</sup>。sCR1の由来、病態と放出の程度との関係などを今後明らかにする必要がある。

<結論>

慢性肝疾患においてE-CR1を検討し、CH-Cにおいて低下を認めたが、CICや補体の活性化などの病型による相違が可能性として考えられた。

<文献>

- 1) Araki K. et al., Clin. Exp. Immunol. 47, 520 (1982)
- 2) Cornacoff J. B. et al., J. Clin. Invest. 71, 236 (1983)
- 3) Hara T. et al., British J. Haematol. 82, 368 (1992)
- 4) Wilson J.G. et al., New Engl. J. Med. 307, 981 (1982)
- 5) Wilson J.G. et al., J. Exp. Med. 164, 50 (1986)
- 6) Muraoka H. et al., Kansenshyougaku zasshi 67, 541(1993)
- 7) Inada Y. et al., Clin. Exp. Immunol. 50, 189 (1982)
- 8) Yoon S.H. et al., J. Immunol. 134, 3332 (1985)
- 9) Danielsson C. et al., Eur. J. Immunol. 24, 2725 (1994)
- 10) Pascual M. et al., Eur. J. Immunol. 24, 702 (1994)

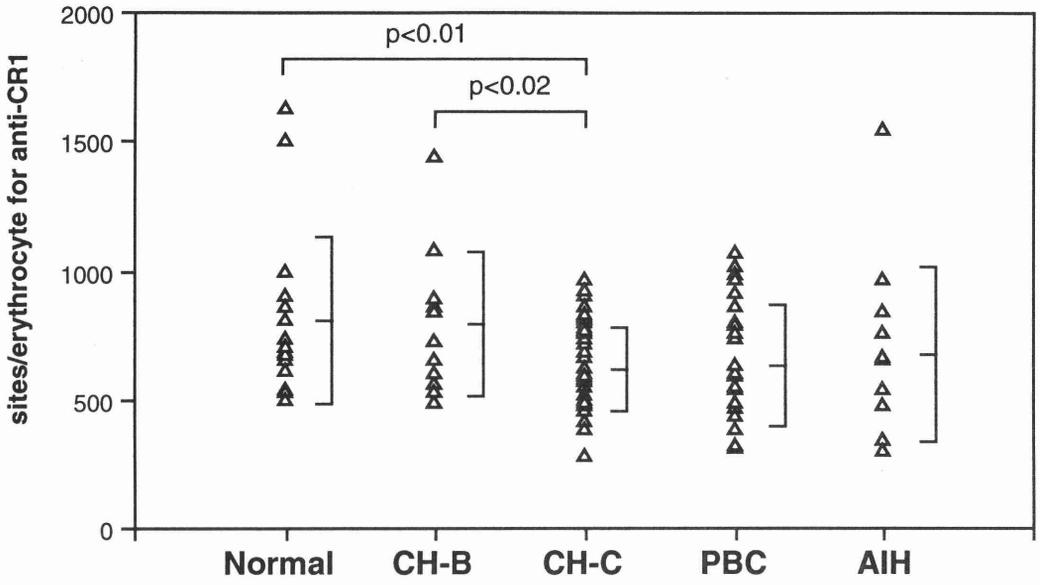


図 1 . 慢性肝疾患における赤血球CR1の比較

## 9 ヒト中枢神経系におけるC5a受容体の発現

高橋三津雄、Lajos Baranyi、桜田誓、山本孝之<sup>1</sup>、岡田則子、岡田秀親<sup>2</sup>

<sup>1</sup>野依福祉村病院長寿医学研究所、<sup>2</sup>名古屋市立大学医学部分子医学研究所生体高分子

Expression of C5a receptor in the central nervous system

Mitsuo Takahashi, Lajos Baranyi, Chikai Sakurada, Takayuki Yamamoto<sup>1</sup>, Noriko Okada,

Hidechika Okada<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Choju Medical Institute, Noyori Fukushi-mura Hospital,

<sup>2</sup>Department of Molecular Biology, Nagoya City University School of Medicine)

### 【はじめに】

最近中枢神経系内でC3が産生されているという報告が見られ、脳内での補体・補体関連因子の役割が注目されている。特に、炎症作用以外の神経細胞機能調節機構への影響に着目し、補体反応の結果生成される強力な生理活性ペプチドであるC5aに対する受容体の中枢神経系内局在を検討した。

### 【対象と方法】

野依福祉村病院での剖検脳10例(剖検時年齢 ; 81.4±9.4y)を用いた。正常対照(NC)4例(88.5±7.3y)、びまん性レビー小体病(DLBD)1例(82.0y)、アルツハイマー型老年期痴呆(SDAT)3例(72.7±9.5y)と脳血管性痴呆(VD)2例(80.0±4.2y)である。全ての剖検脳は、死後1～2時間以内(1.7±0.5h)に得られたものである。臨床一般神経病理学的詳細を表1に示す。

剖検時の新鮮凍結標本から海馬および前頭葉を選び、通常のAGPC法にて総RNAを抽出し、特異的primerを用いてRT-PCRを施行し、C5a受容体のmRNAを検索した。

免疫組織化学に用いた抗体は、C5a受容体のアミノ酸配列に基づいた合成ペプチドをウサギに免疫して得られたポリクローナル抗体である。その特異性は、多血小板血漿を試料としたウェスタンブロット、合成C5aペプチドフラグメントを用いた免疫吸収試験、ビオチン化C5aペプチドフラグメントを用いた受容体結合能によって評価した。

免疫組織化学に用いた脳組織は、剖検時2～3mm厚の板状にした組織を4%パラフォルムアルデヒド(PFA)で48時間浸漬固定したものをを用いた。部位は海馬(Hip)、上前頭回(F)、中心前回(PreC)、中心後回(PostC)、角回(P)、中側頭回(T)、後頭葉視覚連合野(O)、後頭葉1次視覚野(Vis)である。PFA固定後、15%ショ糖溶液に移し、クリオスタットにて20μmの切

片を作成し、通常の浮遊法による免疫組織染色を行った。中性赤による対比染色をした。

### 【結果】

RT-PCR法によるC5a受容体mRNAは、検索した各部位で明瞭に認められた(図1)。

血小板試料でのウェスタンブロットでは、図2に示すように約40kDに単一のバンドを認めた(H : homogenate、S : supernatant、P : pelletの各分画について示す)。免疫吸収試験では、図3に示すように合成C5aペプチド未添加での染色像(A)が、ペプチド添加により消退している(B)。ビオチン標識したC5aフラグメントを用いた受容体結合能では、Cに示す抗C5a受容体抗体の染色パターンときわめて類似したパターンが得られた(D)。

痴呆を伴わない生理的老化脳(NC)では、大脳皮質ⅢおよびⅤ層の錐体細胞が選択的に染色された(図4A)。このような錐体細胞の染色性は、基本的には海馬で認められるものと同ーであるが、その染色強度は低い。これに対して、海馬特にCA4領域において大型の錐体細胞がきわめて強く染色された(図4B、C)。グリアおよび血管壁は染色されなかった。CA1領域においては、このような細胞体の強い染色性はやや低下し、オタマジャクシの尾のような奇妙な神経突起の染色に変化した(図4D)。海馬支脚、海馬傍回ではこのような神経突起の染色は樹状突起に相当する部分にあった。SDATでは、検索した領域において神経細胞の染色は認めなかった。これに代わって、典型老人斑のアミロイド核の周囲に点状・斑状の染色が認められた(図4E)。これは、変性神経突起に対応する部位である。びまん性老人斑でも変性神経突起が染色された。

### 【考察】

C5aはその構造の類似性<sup>1)</sup>から中枢神経系内で神経伝達物質として作用することが想定される<sup>2)</sup>。C5aの脳実質内投与がノルアドレナリン類似の過食を引き起こすことが知られている<sup>3)</sup>。動物実験においてC5aがシナプス前に作用してノルアドレナリンの放出促進に働くという報告<sup>4)</sup>もある。このようにC5aは主にカテコラミン系の神経伝達物質の機構に関与しているようである。しかし、これまでにヒトの中枢神経系内でC5aがその特異的受容体を介して作用しているという報告はない。今回の検討で、正常老人脳の海馬において特に受容体の発現が強く認められ、痴呆の進行とともに減少していくことから、C5aは記憶形成のメカニズムに促進的に働くことが示唆される。ヒトにおいてβアドレナリン系を刺激すると、情動記憶が増強すること<sup>5)</sup>などと考え合わせると、補体成分の中枢神経系内の賦活作用が強く推測される。

### 【結論】

NCでは前頭葉、海馬ともにC5a受容体mRNAが認められた。ポリクローナル抗体を用い

た免疫組織化学では、NCでは海馬および大脳皮質の錐体細胞において広範にC5a受容体が認められた。VD、SDAT(DLBDも同様)では、上記染色性が低下していた。SDATでは、老人斑周囲の変性神経突起が染色された。補体自動活性化によって常時生成されるC5aに対する受容体が、特に正常海馬の大型錐体細胞に多く存在することは、記憶形成に関わる神経ネットワークに対して賦活作用を持つことが推測される。

**Table 1 Autopsied brain samples and clinical background of the cases examined.**

Case	Age/Sex	Pathological diagnosis	Weight	CVA	Dementia	Duration	Cause of death
9309	96/F	Normal aging	1000	±	-	15	Pneumonia
9310	90/M	Normal aging	1080	-	-	3	Pneumonia
9313	78/M	CI	1290	+	-	1	Pneumonia
9315	91/F	MCI	1060	+	±	0.5	Heart Failure
9312	83/F	VD	1100	++	+	0.5	Pneumonia
9322	77/M	VD	850	++	+	1	Renal Failure
9318	82/M	DLBD	1150	-	++	5	Pneumonia
9320	73/F	AD	1010	-	++	9	Heart Failure
9323	63/M	AD	1030	-	++	5	Heart Failure
9331	82/F	AD/CI	1080	+	++	4	Heart Failure

CI: Cerebral infarction, MCI: Multiple cerebral infarction, VD: Vascular dementia, AD: Alzheimer's disease, DLBD: Diffuse Lewy body disease. Weight: Whole brain weight in grams at autopsy. Duration: Disease duration in years from onset. CVA: Signs and symptoms of cerebro-vascular accident.

**Table 2 Immunohistochemical staining of the cases examined.**

Case	Pathological diagnosis	Hip	F	PreC	PostC	P	T	O	Vis
9309	Normal aging	++	+	#	#	#	-	++	+
9310	Normal aging	++	++	++	++	++	-	+	++
9313	CI	++	#	-	+	±	±	-	±
9315	MCI	++	±	+	±	+	+	+	++
9312	VD	±	-	+	+	++	+	±	+
9322	VD	-	-	-	-	±	-	-	-
9318	DLBD	-	-	±	+	+*	±*	+	-
9320	AD	±	±	+*	+	±	-	-*	±*
9323	AD	±	±	±	±	-	-	+	±*
9331	AD/CI	±	-*	±*	-*	-*	-	-*	-*

-, ±, +, ++: Neuronal staining, #: Not determined,

\*: Staining of dystrophic neurites surrounding the amyloid core of senile plaques.

【文献】

- 1) Meyerhof W. et al. DNA Cell Biol. 10, 689 (1991)
- 2) Hall NR. et al. Adv Exp Med Biol. 288, 13 (1991)
- 3) Schupf N. et al. J Neuroimmunol. 13, 293 (1987)
- 4) Schupf N. et al. Brain Behav Immun. 3, 28 (1989)
- 5) Cahill L. et al. Nature 371, 702 (1994)

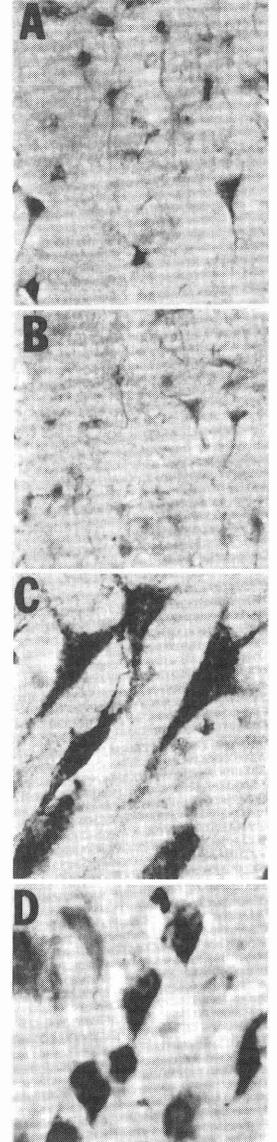
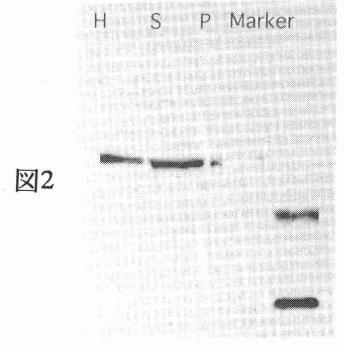
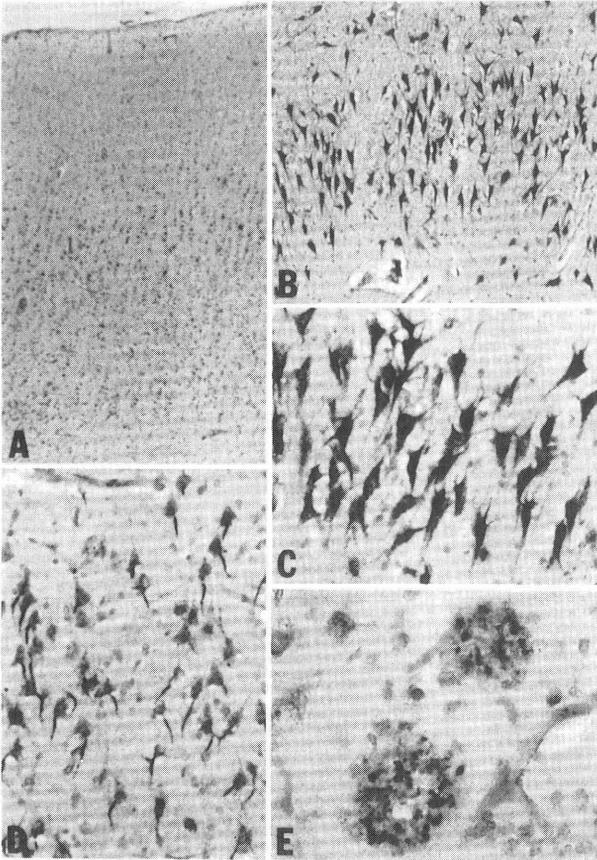
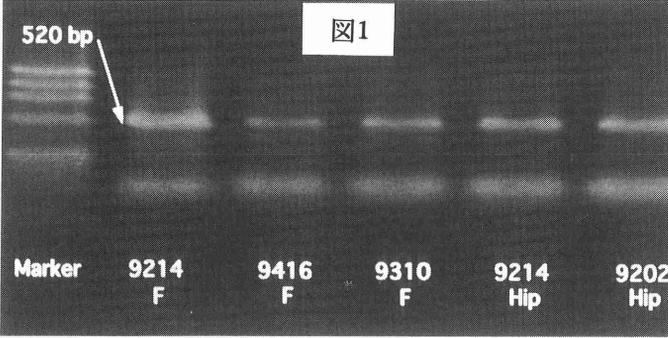


図3

図4

フローサイトメトリーを用いた二重染色法による  
好中球・好酸球上の C 5 a 受容体発現の測定  
と病勢判定への応用

櫻田二友<sup>2</sup>、阿部正義<sup>1</sup>、宮本康嗣<sup>1</sup>、原信之<sup>2</sup>、古川達雄<sup>1</sup>

<sup>1</sup>福岡大学医学部薬理学、<sup>2</sup>九州大学医学部胸部疾患研究施設

Evaluation of C5a receptor expression on eosinophils and  
neutrophils by flow cytometry with two-colour staining  
method and its application for estimating  
disease activity.

(<sup>1</sup>Department of Pharmacology, School of Medicine, Fukuoka  
University and <sup>2</sup>Research Institute for Diseases of the  
Chest, Kyushu University Faculty of Medicine)

(はじめに)

末梢血顆粒球である好酸球並びに好中球は、急性炎症性疾患において効果細胞として重要な役割を演じている。一方、補体活性化産物である C 5 a は顆粒球を標的細胞とし急性炎症のメディエーターとして、炎症の発症、進展に関与していることが想定される<sup>1, 2)</sup>。各炎症性疾患で好中球、好酸球上の C 5 a 受容体の発現がどの様に変化するかは極めて興味ある問題であるが、magnetic beads 法を用い C D 1 6 抗体で negative selection を行って好酸球を精製する等の手順が必要である。従って、大量の血液と、高価なビーズ更に長時間の操作を要し、臨床応用には難点がある。そこで、今回我々は直接に、かつ短時間に少量の血液で好酸球、好中球上の C 5 a 受容体発現をみることが出来る二重染色法を用いた、フローサイトメトリーで受容体発現量を測定する方法を考案し、臨床応用を試みているのでここに報告する。

### (対象と方法)

健常人 5 例、気管支喘息 5 例、慢性好酸球性肺炎 1 例でそれぞれ末梢静脈よりヘパリン加採血し、1 / 4 量の 6 % デキストラン生食を加えて室温で 4 0 分静置後、上層の buffy coat を同量の Ficoll Paque (Pharmacia, Uppsala, Sweden) に重層した。室温で 1500 rpm, 30 分間遠心後、細胞ペレットに採血量の 1 / 5 量の Hepes buffer (Hepes, GIBCO laboratories, USA) を加えた。採血量と同量の蒸留水を加え 1 0 - 2 0 秒間攪拌しながら溶血させ、次に同量の 1.8 % NaCl を加えて混和した。その後 4 °C, 900 rpm で 1 0 分間遠心分離した。上清を捨て、細胞ペレットに 5 % FCS 加 RPMI-1640 液を加えて浮遊させ、 $5 \times 10^5$  ずつ分注した。1 次抗体として抗ヒト C5a 受容体家兎 IgG 抗体<sup>3)</sup> 10  $\mu$ g/ml を加え、氷上で 6 0 分間反応させた。PBS で 2 回洗浄後、2 次抗体として 1 0 0 倍希釈の FITC 標識抗家兎 IgG - ヤギ F(ab)<sub>2</sub> 抗体 (Ceder Lane, Ontario, Canada) を加え 3 0 分間反応させた。二重染色は PE を用い、PE 標識抗ヒト CD 1 6 モノクローナル抗体 (Pharmingen, San Diego, USA) または PE 標識抗ヒト CD 9 モノクローナル抗体 (Pharmingen) を加えて氷上で 3 0 分間反応させた。PBS で洗浄後、1 ml の PBS に浮遊させ、Flow cytometer (Epics XL-MCL; Coulter, Hialeah, Florida) で  $2 \times 10^4$  個をカウントした。更に、好酸球と好中球をゲーティングしてそれぞれの細胞の C5a 受容体発現のヒストグラムを作製した。

次に、同一人の血液を用いて好酸球および好中球を精製し検討した。10  $\mu$ l の CD 1 6 モノクローナル抗体 (MG 3 8 クローン、ニチレイ、東京) を  $10^6$  好中球 / 0.5 ml に加え、また 20  $\mu$ l の CD 9 抗体 (TP 8 2 クローン、ニチレイ、東京) を  $10^6$  好酸球 / 0.5 ml に加え、4 °C, 30 分間反応させた後、magnetic beads ( $4 \times 10^8$  /ml) を 1 : 2 0 になるように加え、4 °C で 30 分間反応させた。その後強力磁石を用い 1 0 分間かけて negative selection を行なった。細胞を PBS に浮遊させ前述の様に抗 C5a 受容体抗体、抗 CD 1 6 抗体、および抗 CD 9 抗体と反応させ FITC および PE で各々標識し、Flow cytometer で受容体発現を調べた。抗 C5a 受容体抗体<sup>3)</sup> は Dr. Tony E. Hugli (スクリップス研究

所免疫)より後供与戴いた。

### (結果)

正常人の末梢血から Ficoll Paque を用いて顆粒球を分離し抗 C D 1 6 抗体 - P E で標識し、次に抗 C 5 a 受容体抗体 - F I T C 標識し Flow Cytometer で分析した。抗 C D 1 6 抗体で偏位する顆粒球の一群が好中球と考えられ、同時に抗 C 5 a 受容体抗体で二重染色すると正常の好中球は C 5 a 受容体を十分発現していることがわかった。次に抗 C D 9 抗体で偏位する一群が好酸球と考えられ、抗 C 5 a 受容体抗体で二重染色すると正常好酸球は C 5 a 受容体をあまり発現していないことがわかった。

次に、顆粒球に抗 C D 1 6 抗体を加えて反応させ、その後 Immuno-beads を加えた後、強力磁石を用いて negative selection を行い好酸球を高度に精製した。また抗 C D 9 抗体で同様に顆粒球より好酸球を negative selection し、高度に精製された好中球を得た。上記のように抗 C D 9 抗体または抗 C D 1 6 抗体と抗 C 5 a 受容体抗体で二重染色を行い、Flow cytometer で分析した。好酸球は抗 C D 9 抗体で偏位し同時に抗 C 5 a 受容体抗体で二重染色すると、やはり正常好酸球は C 5 a 受容体をわずかししか発現していないことがわかった。一方好中球を抗 C D 1 6 抗体並びに抗 C 5 a 受容体抗体とで二重染色すると、正常好中球は C 5 a 受容体を十分に発現していることが確認されたと同時に、前記の顆粒球から直接抗 C D 9 抗体で好酸球を、抗 C D 1 6 抗体で好中球を染め分け、同時に抗 C 5 a 受容体抗体で各々の C 5 a 受容体発現を測定する方法の信頼性が確認された。好中球と好酸球の C 5 a 受容体発現量を平均蛍光強度比で現わし二つの方法で求められた C 5 a 受容体発現量を比較すると negative selection 法で精製した後測定した場合、好酸球で 4 6 %、好中球で 3 2 % 低い値を示した。

### (考察)

好酸球増多症患者から好酸球をとりだすために magnetic beads を用いた negative selection 法は優れており、現在広く用いられている方法で

ある<sup>4)</sup>。しかしながら、大量の血液と高価な magnetic beads を要し、かつ長時間の操作が必要であり、迅速・簡便性を要求する臨床研究には適さないと思われる。また、絶対数が少ない正常人での好酸球のデータを得るのが困難なのも重大な欠点の一つと考えられる。これに対し、この二重染色法は上記の欠点を補い、また好酸球および好中球の分離が不要なため長時間操作による C 5 a 受容体自体の修飾も軽減される優れた方法と考える。

現在、顆粒球の二重染色法を用いて、多種の炎症性疾患患者からの末梢血好中球および好酸球の C 5 a 受容体発現量と病勢・病態との関連を検討している。

## 文献

- 1) Tony E. Hugli. Structure and function of the anaphylatoxins. Springer Semin Immunopathol. 7: 193-219, 1984.
- 2) Tony E. Hugli and Hans J. Mullur-Eberhard. Anaphylatoxins. C3a and C5a. Advances in Immunology. 26: 34-41, 1978.
- 3) Edward L. Morgan, Julia A. Ember, Sam D. Sanderson, Wolfgang Schortz, Robert buchner, Richard D. Ye, and Tony E. Hugli. Anti-C5a receptor antibodies. The Journal of Immunology. 151: 377-388, 1993.
- 4) Norman P. Gerard, Mark K. Hodjes, Jeffrey M. Drazen, Peter F. Weller, and Craig Gerard. Characterization of a receptor for C5a anaphylatoxin on human eosinophils. The Journal of Biological Chemistry. 264: 1760-1767, 1989.

## 11 ヒト血漿中のCarboxypeptidase R (CPR) の活性測定法

石川泰成、William Campbell、山本孝之<sup>1</sup>、郭曉燕、森岡章博、岡田秀親<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 野依福祉村病院長寿医学研究所

<sup>2</sup> 名古屋市立大学医学部分子医学研究所生体高分子部門

Measurement of the activity of Carboxypeptidase R (CPR) in human plasma

Yasushige Ishikawa, William Campbell, Takayuki Yamamoto<sup>1</sup>,

Guo Xiaoyan, Akihiro Morioka, Hidechika Okada<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Choju Medical Institute, Noyori-Fukushi-mura Hospital,

<sup>2</sup>Department of Molecular Biology, Nagoya City University School of Medicine)

### 【INTRODUCTION】

Complement components C3a, C4a and C5a are called anaphylatoxins because they induce the release of mediators from mast cells, which cause a rapid increase in vascular permeability characteristic of anaphylaxis. These anaphylatoxins possess a C-terminal arginine which is indispensable for activity. Carboxypeptidase (CP) removes C-terminal arginine from these molecules thereby inactivating them. CPN and CPR are the major CP's in blood. CPN was long considered to be the only CP in blood and was also known as "anaphylatoxin inactivator".

We previously showed that another CP is present in precursor form (pro-CPR) in plasma.<sup>1</sup>

Pro-CPR is activated by a trypsin-like enzyme, during blood coagulation. However at present it remains unknown what enzyme converts pro-CPR into CPR in vivo.

In patients with rheumatoid arthritis(RA), CPR activity is significantly lower than normal.<sup>2</sup>

We do not know whether this CPR activity results from or is one of the causes of RA. Therefore measurement of CPR activity in human blood may be useful for clinical diagnosis and may provide insight into mechanisms involved in rheumatoid arthritis. We now use human plasma containing pro-CPR to measure CPR activity after activation, because plasma is convenient for collecting in hospitals and since the enzyme is stable in precursor form, no activation and degradation will occur before assaying.

## **【MATERIAL AND METHOD】**

**Citrate Plasma** 1.8ml of blood was obtained by vacutainer<sup>R</sup> tube containing 0.2ml of 0.129M sodium citrate, and the samples were gently mixed at room temperature for 10-15 seconds followed by centrifugation at 3000rpm for 10min. The samples were then either kept on ice before the activity was measured or they were immediately stored at -80°C.

**Heparinized Plasma** After blood was obtained by syringe containing heparin, the samples were treated as above.

**Serum** After blood was obtained by venipuncture, the samples were incubated at 37°C in a water bath for 10min and then were kept at 4°C overnight. The samples were then centrifuged at 3000rpm at R.T. for 10min. The samples were then either kept on ice before the activity was measured or they were immediately stored at -80°C. We use a standard serum sample as a positive control of CP activity.

**Substrate solution** 30mM Hippuryl Arginine 50mM HEPES (pH 8.2).

Dissolve 1g Hippuryl Arginine (SIGMA) in 100ml 50mM HEPES buffer (pH 8.2).

**Trypsin solution** 1mg/ml trypsin 1mM HCl

**Trypsin Assay** Heparinized plasma is used for this assay. An appropriate concentration of trypsin can convert pro-CPR to its active form "CPR". Without addition of trypsin, the carboxypeptidase activity in plasma reflects that of CPN only. Therefore determination of CPR activity is based on the difference between total CP activity of plasma and total CP activity of trypsin treated plasma. 20ul of heparinized plasma, 20ul of 1.0mg/ml trypsin solution and 40ul of Substrate solution are mixed and then incubated at 37°C for 45min. After incubation, 20ul of 2.5M HCl is added to stop the enzyme reaction. After ethyl acetate extraction and evaporation, the residue is dissolved in H<sub>2</sub>O and the OD<sub>253</sub> of the product (hippuric acid) is measured. 20ul of 1mM HCl is added to a control tube instead of the 1mg/ml trypsin solution.

**Citrate-Ca Assay** Citrated plasma is used for this assay. An appropriate concentration of Ca ion initiates coagulation and results in conversion of pro-CPR to its active form "CPR". Without addition of calcium, the carboxypeptidase activity in plasma reflects that of CPN only. Therefore determination of CPR activity is based on the difference between total CP activity of plasma and total CP activity of Ca treated plasma. 20ul of Citrated plasma and 0.8ul of 2.0M CaCl<sub>2</sub> solution are mixed and then incubated at 25°C for 10min. After incubation, 40ul of Substrate solution is

added to this tube and incubated at 37°C for 45min. 20ul of 2.5M HCl is added to stop the enzyme reaction. After ethyl acetate extraction and evaporation, the residue is dissolved in H<sub>2</sub>O and the OD253 of the product (hippuric acid) is measured. 0.8ul of saline is added to a control tube instead of 2.0M CaCl<sub>2</sub>.

Mini Column Assay Heparinized plasma is diluted 7 times with 0.01M PBS and applied to a small column containing about 2ml DEAE-Sephadex in 0.01M PBS. The pass through fractions are collected and OD280 is determined. When the OD280 value approaches 0, the buffer is changed to 0.5M NaCl/0.01M PBS (elution buffer) from 0.03M PBS. Fractions are also collected. The pass through fractions contain pro-CPR, and the eluate contains CPN. CP is determined by the trypsin activation method.

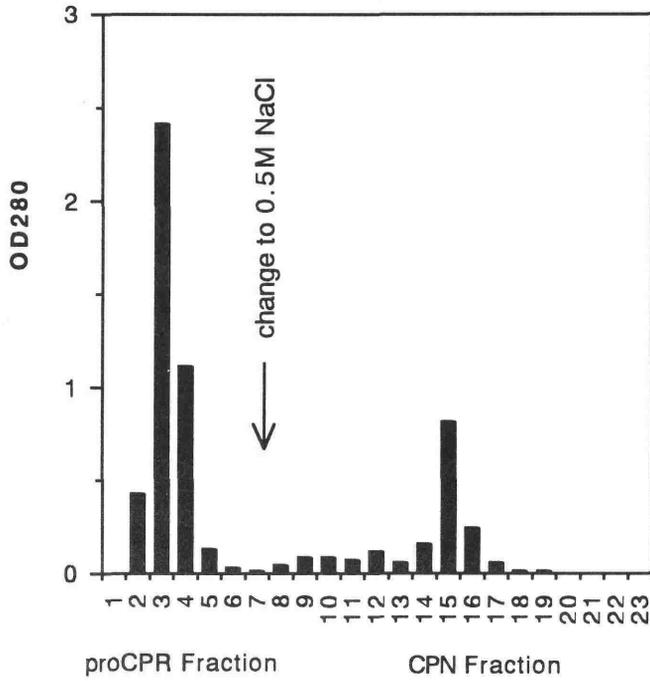
#### **【RESULT AND DISCUSSION】**

CPR is unstable and difficult to measure reliably. Each assay presents some problems. When we use trypsin, two problems occur. 1) Trypsin can activate not only pro-CPR but also CPN. Therefore separation is necessary (i.e. pro-CPR from CPN). 2) Plasma contains trypsin inhibitors, therefore trypsin activity is different in each sample. For example,  $\alpha$  2-macroglobulin can bind trypsin strongly. Other proteins may also bind trypsin. The overall protein concentration may be too high resulting in competition with pro-CPR as substrate. In spite of these problems, we can now estimate the level of pro-CPR by separating pro-CPR from CPN on a small DEAE sephadex column and assay activity using the trypsin method. Further experiment are continuing in order to ensure that the assay system is reliable, reproducible and convenient for routine assays of clinical samples.

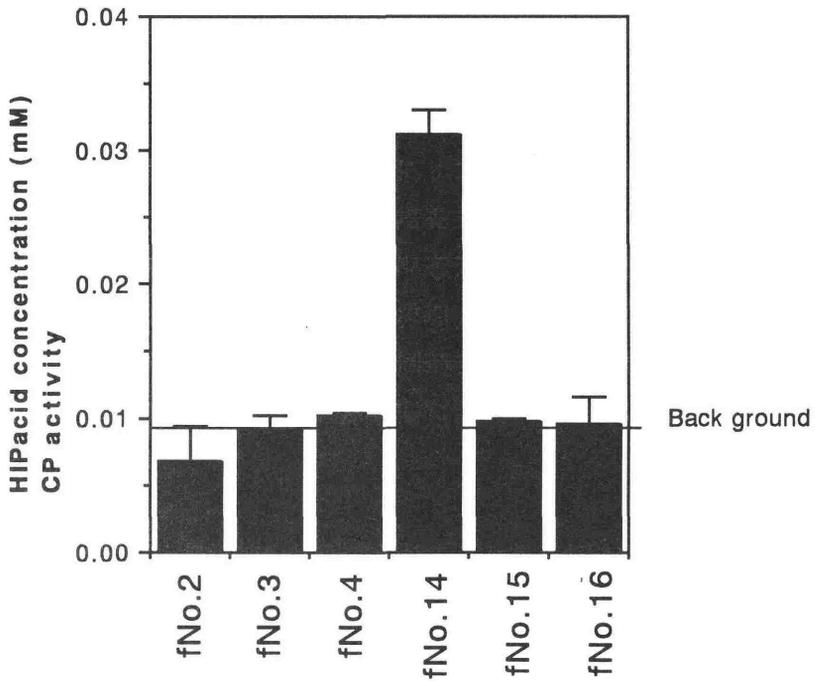
#### **【REFERENCES】**

- 1) W.Campbell et al., Biochem. Biophys Res Comm 162,933-9 (1989)
- 2) W.Campbell et al., J Lab Clin Med 115, 610-2 (1990)

### DEAE small Column Assay



### DEAE small Column Assay



## における血中carboxypeptidaseと補体の役割

城 卓志, 伊藤 誠, 猪飼昌弘, 岩田章裕, 岡山直司,  
横山善文, 武内俊彦<sup>1</sup>, 岡田則子, 岡田秀親<sup>2</sup>

<sup>1</sup>名古屋市立大学第一内科, <sup>2</sup>同 分子生物学研究所

Role of complement and carboxypeptidase in the  
systemic shock induced by intestinal ischemia

Takashi Joh, Makoto Itoh, Masahiro Ikai,  
Fumihiko Iwata, Naotsuka Okayama, Yoshifumi  
Yokoyama, Toshihiko Takeuchi<sup>1</sup>, Noriko Okada,  
and Hidechika Okada<sup>2</sup>

<sup>1</sup>1st Dept of Internal Med. and <sup>2</sup>Dept of Mol. Biol.  
Nagoya City Univ. Medical School

## &lt;はじめに&gt;

補体(C3a、C5a)は、ショック時の血圧低下に重要な役割を担っているが、血中carboxypeptidase(CP)により迅速に不活性化されることが知られている。今回我々はラットの前腸間膜動脈を30分クランプし解放した際(IR)にみられる血圧低下(ショック)においてCPと補体系の役割をcarboxypeptidase inhibitor(CPI)および補体を枯渇化するcobra venom factor(CVF)を用い検討したので報告する。

## &lt;方法&gt;

一晩絶食にした雄性SDラット(250-300g)を麻酔下に仰臥位に固定し、右大腿動脈よりポリエチレンチューブをカニューレーションし圧トランスデューサーにて持続的に動脈圧を測定した。腹部正中切開し前腸間膜動脈を盲腸より3-5cmの部位で30分間クランプした後解放した。

血中CP活性はhippuryl arginineを基質としてHPLCにて測定した。CPI(DL-2-mercaptopometyl-3-guanidinoethyl thiopropanoic acid)は100mg/kgを虚血15分前に腹腔内に投与した。CVFはDEAE sephadexおよびelectrofocusingにて精製し50units/ratを実験15-20時間前に腹腔内に投与した。

### <成績>

腸管IRのみで14.3%(2/14)のラットが死亡した。また、CPI+IR群の死亡率は57.1%(8/14)と増加した。さらに、血圧の変化を生存ラットで比較すると、CPI+IR群ではIR群に比べ再灌流時に著しい低下を認めた( $P < 0.05$ )。一方、CVFを腹腔内に前投与し、補体を枯渇化しておくると、IRやCPI+IR群でも血圧の低下はみられず死亡例も認めなかった。

### <結論>

腸管虚血再灌流によるショックには補体系が大きな役割を演じており、CPはその重要なregulatorの一つである。

照井 正、田上八朗<sup>1</sup>、石井邦明<sup>2</sup><sup>1</sup>東北大学医学部 皮膚科、<sup>2</sup>東北大学医学部 薬理学第二

IFN  $\gamma$  and TNF  $\alpha$  enhance C3 production by human epidermal keratinocytes  
(<sup>1</sup>Department of Dermatology, Tohoku University School of Medicine,  
<sup>2</sup>Second Department of Pharmacology, Tohoku University School of Medicine)

## &lt;はじめに&gt;

皮膚は私たちの体を被うバリアーであり、外界からの異物の侵入や物理化学的な刺激から体を守っている。皮膚に異物が侵入すると炎症反応が惹起され、好中球やリンパ球の浸潤とともに表皮細胞の増殖が促進し、異物を体外へ排出する。このような表皮細胞は補体の活性化に必要な不可欠なC3を産生することは報告されているが、その産生がどのように調節されているかの詳細は分かっていない。ヒト表皮細胞の産生するC3が、炎症反応に伴って表皮細胞自体あるいは浸潤細胞が産生するサイトカインによってどのように調節されているのか明かにすることを目的としてこの研究を行った。

## &lt;方法&gt;

ヒト表皮細胞を無血清培地で培養し、表皮細胞ならびにリンパ球が産生することが知られている一連のサイトカインを加えて48時間後に培養上清を採取し、sandwich ELISA法を用いて産生C3量を測定した。ヒト肝臓cDNAをテンプレートとして、PCR法で作製したC3 DNA probeを用いて、サイトカイン添加に伴うC3 mRNAの変化をNorthern blot法を使って観察した。PKC やPTK の抑制剤を反応系に加えて、表皮細胞によるC3産生に関連する刺激伝達系について解析した。

## &lt;結果&gt;

培養ヒト表皮細胞はサイトカインを無添加の状態でもわずかであるがC3を放出した。これに炎症性サイトカインとして知られるIL-1およびIFN  $\gamma$ 、TNF  $\alpha$  を加えるとC3の産生は増強した。IL-1は2~3倍に増強したが、IFN  $\gamma$  とTNF  $\alpha$  は10~20倍と著明にC3産生を促進した。IFN  $\gamma$  とTNF  $\alpha$  による刺激に伴ってmRNAも増加することか

ら、これらがtranscriptional level で産生の調節をしていることが分かった。次にC3産生につながるsignal transductional pathway を明らかにするため以下の実験を行った。PKC 阻害剤 (H7, staurosporin) で前処理するとIFN $\gamma$  とTNF $\alpha$  によるC3産生増強は完全に抑制された。また、PTK 活性を拮抗的に阻害するgenistein やtyrphostinで処理すると同様に抑制されたが、src 型のPTK を特異的に阻害するherbimycin Aで前処理すると、予想に反してIFN $\gamma$  およびTNF $\alpha$  刺激によるC3産生はさらに増強した。また、IFN $\gamma$  とTNF $\alpha$  はお互い相乗的にC3産生を増強することが分かった。

#### <考察>

本研究の結果、炎症性サイトカインであるIFN $\gamma$  とTNF $\alpha$  が表皮細胞によるC3の産生、放出を増強することが分かった。その増強に関与する刺激伝達系はPKC およびPTK 依存性であり、かつsrc 型PTK により抑制的に制御されていることが分かった。さらに、IFN $\gamma$  とTNF $\alpha$  は相乗的にC3産生を増強したことから、異なるtranscription factorを介してC3産生に影響を及ぼしていることが明かとなった。

#### <結論>

免疫反応は侵入してきた微生物から体を守ることを目的の一つとしている。その中でも最も原始的ではあるが、第一線の防御能を発揮するのが補体の活性化に伴う反応である。今回の実験結果は炎症反応局所でサイトカインの影響を受けた表皮細胞はC3を著明に産生し、外敵に備えるということを強く示唆するものである。このことから皮膚の炎症局所で産生されたサイトカインを介して、経済的かつ効果的に補体の活性化反応が進むような微小環境が作られるのであろうと考えた。

## ラット膜補体制御因子機能を阻害する モノクローナル抗体により惹起した局所の炎症反応

西川和裕、松尾清一<sup>1</sup>、岡田則子、岡田秀親<sup>2</sup>

<sup>1</sup>名古屋大学医学部 第三内科、<sup>2</sup>名古屋市立大学医学部 分子研・生体高分子

Local inflammation caused by a monoclonal antibody

which blocks the function of the rat membrane inhibitor of C3 convertase

(<sup>1</sup>Third Department of Internal Medicine, Nagoya University School of Medicine,

<sup>2</sup>Department of Molecular Biology, Nagoya City University School of Medicine)

はじめに

Ⅱ型アレルギーは、細胞膜への自己抗体の沈着とそれにひき続く補体活性化により引き起こされる反応である。しかしながら、この反応は自己の補体活性化を抑制する膜補体制御因子によって阻害されている可能性がある。ヒトでは、膜補体制御因子にはC3変換酵素のレベルではたらくDAFとMCP、MAC形成の最終段階ではたらくHRF20 (CD59) がある。マウスではDAFやMCPに相当する分子は発見されておらず、両者の機能をあわせ持つCrry/p65があり<sup>1)</sup>、ラットではモノクローナル抗体5I2<sup>2)</sup>の抗原がこれに相当する<sup>2,3)</sup>。そこで、ラットをもちいて局所で5I2抗原とCD59の機能をそれぞれに対するモノクローナル抗体で抑制し、惹起される反応を観察し、補体依存性の炎症反応におけるこれら制御因子の関与につき考察した。

方法

5I2抗原の機能を抑制するモノクローナル抗体5I2<sup>2)</sup>、CD59を認識しCD59の機能を抑制するモノクローナル抗体6D1<sup>4)</sup>をラットに皮内注射し、惹起される反応を観察した。コントロールには、ラットと反応しないモノクローナル抗体H38および生理食塩水を用いた。いずれの抗体もマウスIgG1サブクラスで、F(ab')<sub>2</sub>のかたちで使用した。コブラ蛇毒因子であらかじめ補体成分を枯渇、あるいはサイクロフォスファミドで白血球を著しく減少させたラットにも同様に皮内注射を行った。2時間、6時間、

24時間後にラットを屠殺し、皮内注射前に静注したエバンスブルーによる着色で血漿蛋白の漏出を、皮膚の組織標本にて細胞浸潤を定量的に評価した。免疫蛍光染色でC3の皮膚組織への沈着を観察し、局所での補体活性化の指標とした。皮膚組織での5I2抗原とCD59の分布、および皮内注射した抗体の組織への結合についても免疫蛍光染色で観察した。

## 結果

5I2抗原とCD59は、真皮の血管、線維芽細胞、線組織にほぼ同様に分布しており、皮内注射した抗体の結合は抗原の分布にほぼ一致していた。コブラ蛇毒因子やサイクロフォスファミドの投与は5I2抗原やCD59の分布に影響しなかった。

正常ラットに5I2を20 $\mu$ gあるいは2 $\mu$ g皮内注射すると図1に示すように時間経過とともに著明な血漿蛋白の漏出がおき、6D1やH38あるいは生理食塩水を皮内注射しても有意な変化はおきなかった。5I2の皮内注射によっておこる蛋白の漏出は、補体枯渇ラットでは完全に、白血球減少ラットでも著しく抑制された(図2)。

正常ラットでは5I2を皮内注射した部位の皮膚組織にのみ図3に示すように時間経過とともに好中球の集積を認め、一部に出血巣も見られた。補体枯渇ラットおよび白血球減少ラットでは好中球の浸潤は殆どみられず、出血巣も無かった(図4)。

正常ラットでは5I2を皮内注射した部位にのみC3沈着は見られ、白血球減少ラットに5I2を皮内注射した部位にも同様のC3沈着を認めたが、補体枯渇ラットではC3沈着は全く認めなかった。

## 考察

補体は異物の侵入や抗原抗体反応に引き続き活性化されるほか、常に少しずつ自発的に活性化されるが、多くの場合、液性のあるいは細胞膜上の補体制御因子により不活化される。膜補体制御因子は種特異性があるため、補体活性化刺激が相対的に弱い場合は膜補体制御因子をもつ自己の細胞膜上では補体活性化は起こりにくい。補体系は、この膜補体制御因子により自己と非自己を区別し、非自己の細胞を選択的に攻撃することができる<sup>5)</sup>。II型アレルギーの様に自己の細胞膜に抗体が反応する場合、膜補体制御因子が存在することで補体活性化は起こりにくい状況であると考えられ、クームス陽性赤血球が多くは溶血しないのは膜補体制御因子の存在で説明

可能であろう。

この実験では局所的にC3変換酵素のレベルでの膜補体制御因子（5I2抗原）の機能を抗体により阻害することで補体依存性の炎症反応を惹起した。F(ab')<sub>2</sub>と云えどもそれ自体が補体の活性化刺激となる可能性はあるが、5I2抗原とほぼ同様な分布を示すCD59に対する抗体（6D1）を投与しても反応が起こらなかったことから、この反応は5I2抗原の機能阻害により起こったと推察された。いわゆるII型アレルギー反応の成立には、C3変換酵素のレベルではたらく膜補体制御因子の機能を上回る補体活性化刺激があるか、あるいはこれらの膜補体制御因子の機能不全が必要条件となるように思われた。

この実験で得られた皮膚の炎症反応は、補体成分の枯渇により完全に抑制されたことと病態の特徴から、主にC5aをはじめとするアナフィラトキシンの作用によると推察された<sup>6)</sup>。さらに、白血球減少ラットでC3の組織への沈着は見られたにもかかわらず、細胞浸潤ばかりでなく血漿蛋白の漏出が抑制されておりアナフィラトキシンにより活性化された局所の白血球作用がこの炎症反応の完成に必須であると考えられた。

## 結論

皮膚局所でC3変換酵素のレベルではたらく膜補体制御因子（5I2抗原）の機能を阻害することで、補体活性化にひき続き炎症反応が惹起された。自己の細胞上の補体活性化による炎症反応は、C3変換酵素のレベルではたらく膜補体制御因子の機能低下により起こりやすくなり、炎症反応の完成には白血球の作用が必要であると考えられた。

## 文献

- 1) Kim Y-U. et al., J.Exp.Med. 181,151 (1995)
- 2) Takizawa H. et al., J.Immunol. 152,3032 (1994)
- 3) Sakurada C. et al., Biochem.Biophys.Res.Comm. 198,819 (1994)
- 4) Hughes T.R. et al., Biochem.J. 284,169 (1992)
- 5) Okada H. et al., Eur.J.Immunol. 13,340 (1983)
- 6) Gerard C. et al., Annu.Rev.Immunol. 12,775 (1994)

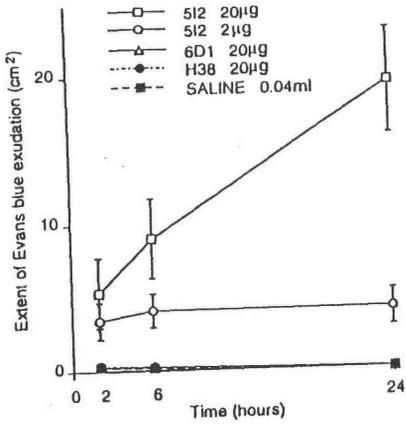


図 1、抗体皮内注射部位の血漿蛋白漏出

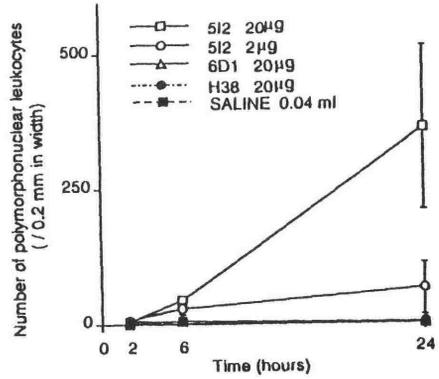


図 2、抗体皮内注射部位の浸潤多核白血球数

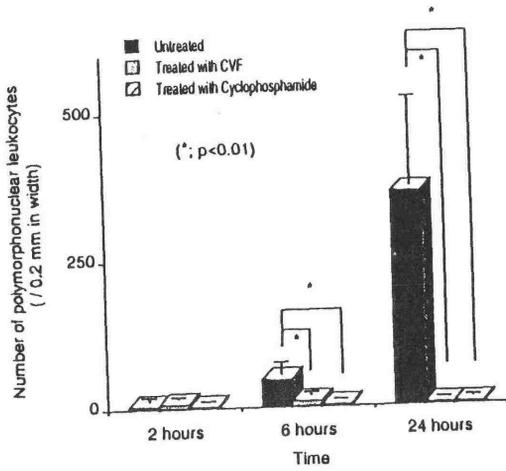


図 3、血漿蛋白漏出への抑制効果

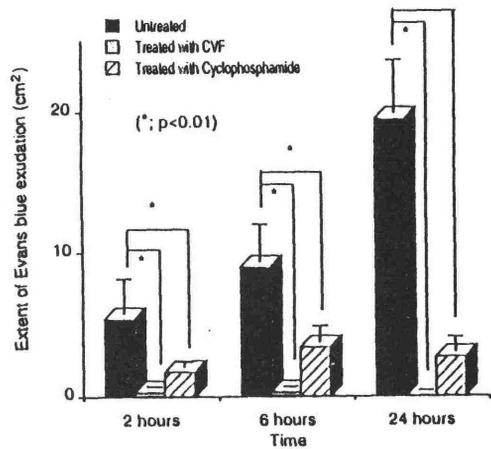


図 4、多核白血球浸潤への抑制効果

野村 敦<sup>1</sup>、西川和裕<sup>1</sup>、湯澤由紀夫<sup>1</sup>、岡田則子<sup>2</sup>、岡田秀親<sup>2</sup>、

Sara J. Piddlesden<sup>3</sup>, B. Paul Morgan<sup>3</sup>, 松尾清一<sup>1</sup>

<sup>1</sup>名古屋大学医学部第三内科、<sup>2</sup>名古屋市立大学医学部分子医学研究所、

<sup>3</sup>ウェールズ大学医学部生化学

The Role of Cell Membrane-Associated Complement Regulators in The Kidney

(<sup>1</sup> Third Department of Internal Medicine, Nagoya University School of Medicine,

<sup>2</sup> Department of Molecular Biology, Nagoya City University School of Medicine,

<sup>3</sup> Department of Medical Biochemistry, University of Wales College of Medicine)

[はじめに]

補体制御膜因子は生体において自己補体による障害から自らを防御し、生体の恒常性維持のため重要な働きをしていると考えられている。腎においても補体制御膜因子は十分に発現されている<sup>1)</sup>。腎においては免疫複合体の沈着や高濃度のアンモニアの存在など補体活性化刺激が常に存在し、補体による組織障害が注目されてきた。正常の腎臓で補体による組織障害が惹起されない理由の一つは腎に存在する補体制御膜因子の働きによると考えられるが、これまでそれを直接証明した研究はない。

一方、ラットにおいて最近相次いで二種類の補体制御膜因子がクローニングされそれらの機能を抑制する単クローン抗体が産生された。一つは5 I 2 抗原<sup>2)</sup>で、さきにマウスでクローニングされたC r r y / p 6 5<sup>3)</sup>に相当するものである。C r r y / p 6 5はC 3 レベルで補体の活性化を制御する膜貫通型蛋白でヒトのM C PおよびD A Fの両方の機能を合わせ持つ<sup>4)</sup>。単クローン抗体5 I 2はこの5 I 2 抗原(ラットC r r y / p 6 5)の機能を抑制する<sup>5)</sup>。いま一つはラットC D 5 9であり、M A C形成を抑制するG P I アンカー型膜蛋白である<sup>6)</sup>。単クローン抗体6 D 1はラットC D 5 9の機能を抑制する<sup>7)</sup>。

今回の研究では、これら二つの抗体を用いてラット腎における補体制御膜因子の機能を抑制することにより、同因子の役割を検討した。

## [対象と方法]

雌ウィスターラット（体重約270グラム）を用いた。実験には以下に述べる腎灌流モデル<sup>8)</sup>を用いた。ネンプタール麻醉下でラットの左腎動静脈を露出しそれぞれにポリエチレンチューブを挿入した。抗体を含む灌流液をポンプを用いて分速2ccの速度で灌流した。灌流液はすべて静脈のチューブから廃棄し、抗体が全身の血流に入らないようにした。灌流後チューブを抜去し、顕微鏡下で血管の修復を行い再び左腎の血流を再開した。血流再開後、抗体の結合部位を確認するため一部のラットを15分後に屠殺して蛍光抗体法で抗体の局在を観察した。また、この時のC3およびMACの沈着も観察した。

ラットを5群に分け実験を行い、プロトコールは表1に示す通りである。血流再開後、1日、4日、7日でラットを屠殺して左腎を組織学的および免疫組織学的に観察して障害度を検討した。

## [結果]

5I2灌流（I、II群）15分後、抗体は尿細管周囲の毛細血管、尿細管および血管束に明瞭に結合していた。また、糸球体にも結合が見られた。この同じ部位に比較的大量のC3の沈着が見られた。結合した抗体はその後時とともに減弱し、それとともに補体の沈着も減少した。腎組織への細胞浸潤（図1）や尿細管の障害の程度はI、II群では4日をピークとして観察された。コブラ毒因子（CVF）を用いて補体を枯渇させたIII群では抗体の結合はI、II群と同様であったが、補体成分の沈着は見られず尿細管の障害や細胞浸潤もコントロール抗体を灌流したIV群と比べ差は見られなかった。6D1を灌流したV群では抗体の結合はI、II群とほぼ同じ様に観察されたが補体の沈着や細胞浸潤、尿細管障害は見られなかった。

## [考察]

補体制御膜因子は血球以外にも臓器組織に広く発現されており、それぞれの部位において自己補体による障害から自らを防御する働きをしているものと推測されている。5I2抗原およびラットCD59の分布も全身の臓器にわたっている<sup>9)</sup>。我々は最近滝沢らによって作成された単クローン抗体5I2をラットに静脈注射することにより全身への影響を見たところ、補体依存性に一過性のショックを引き起こすことを見いだした<sup>10)</sup>。この反応はFab分子でも起こすことができ、また血管内皮に抗体が補体成分C3とともに沈着し

ていること、かつまたシクロホスファミドで予め白血球を枯渇させておいたラットでも同様に観察されること、などから血管内皮細胞膜上で5 I 2抗原の機能が抑制されることによって自己補体が内皮細胞膜上で活性化されショックになったと考えられた。本実験ではラット腎臓においてC 3レベルで補体の活性化を制御する5 I 2抗原の機能を単クローン抗体5 I 2の灌流によって抑制することにより間質性腎炎が惹起されることが明らかになった。腎臓の間質尿細管においては高濃度のアンモニアが存在し、何らかの原因で腎の実質が減少すると残った腎組織ではアンモニア濃度はより一層上昇することが知られている<sup>11)</sup>。アンモニアはアミダーションにより補体成分C 3を変化させて補体副経路を活性化させることが知られており、このことが腎障害の自律的な進行のメカニズムの一つと考えられている<sup>12)</sup>。本実験の結果から、腎におけるC 3レベルの補体制御膜因子の機能や発現の相対的な低下があれば有意な組織障害が惹起される可能性があらたに示された。

#### [文献]

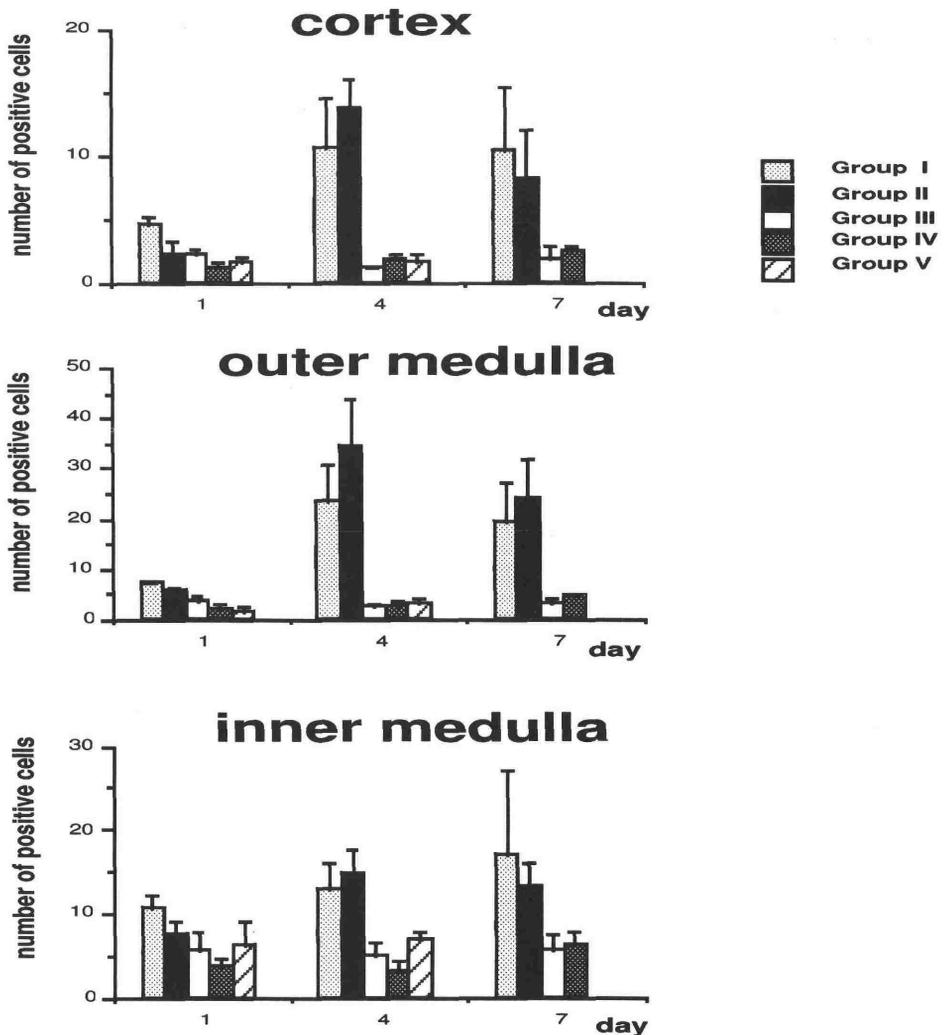
- 1) Ichida S, et al., *Kidney Int.* 46, 89 (1994)
- 2) Sakurada C, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198, 819 (1994)
- 3) Molina H, et al., *J. Exp. Med.* 175, 121 (1992)
- 4) Kim YC, et al., *J. Exp. Med.* 181, 151 (1995)
- 5) Takizawa H, et al., *J. Immunol.* 152, 3032 (1994)
- 6) Rushmere NK, et al., *Biochem. J.* 304, 595 (1994)
- 7) Hughes TR, et al., *Biochem. J.* 284, 169 (1992)
- 8) Matsuo S, et al., *Kidney Int.* 46, 191 (1994)
- 9) Funabashi K, et al., *Immunology* 81, 444 (1994)
- 10) Matsuo S, et al., *J. Exp. Med.* 180, 1619 (1994)
- 11) Nath KA, et al., *Am. J. Kid. Dis.* 20, 1 (1992)
- 12) Hostetter MK. *J. Lab. Clin. Med.* 122, 491 (1993)

表1 プロトコール

群	CVF処置	灌流
I	なし	5 I 2、IgG1
II	なし	5 I 2、F(ab') <sub>2</sub>
III	あり	5 I 2、F(ab') <sub>2</sub>
IV	なし	H 3 8、F(ab') <sub>2</sub>
V	なし	6 D 1、F(ab') <sub>2</sub>

(H 3 8はラット組織と反応しない I g G 1 クラスの単クローン抗体でコントロールとして使用した)

図1 L C A 陽性細胞（白血球）の浸潤



## 16 ヒト老人正常脳組織における補体制御膜因子の発現

赤津裕康<sup>1) 2)</sup>、山田達夫<sup>3)</sup>、岡田則子<sup>1)</sup>、山階学<sup>2)</sup>、山本孝之<sup>2)</sup>、  
岡田秀親<sup>1)</sup>

1) 名古屋市立大学・分子研・生体高分子、 2) 野依福祉村病院・長寿医学研究所、  
3) 千葉大学・神経内科

Distribution of complement regulatory proteins in normal senile human brain  
Hiroyasu Akatsu, Tatsuo Yamada, Noriko Okada, Manabu Yamashina,  
Takayuki Yamamoto, and Hidechika Okada

(<sup>1</sup>)Department of Molecular Biology, Nagoya City University School of  
Medicine, <sup>2</sup>)Choju Medical Institute, Noyori-Fukushimura Hospital,

<sup>3</sup>)The Department of Neurology, Chiba University School of Medicine,)

<はじめに>

近年、Alzheimer病、多発性硬化症などの中枢神経系疾患での補体成分の沈着が報告されている<sup>1)2)</sup>。特に、脱髄疾患においては、補体活性がミエリン障害に重要な役割を演じているであろう点はほぼ定説となった<sup>3)</sup>。こうした補体活性に伴い、脳内で産生されている可能性のある補体が、様々な因子で制御されている可能性は十分に考えられる。

ヒトの補体は、様々な制御因子でコントロールされており、それらには液性因子と膜因子がある。補体制御膜因子は、C3/C5コンベルターゼを不活するDAF (CD55), MCP (CD46), やMAC阻害因子であるHRF 20 (CD59) が知られている。これら、補体制御膜因子は、血球系をはじめ様々な臓器での発現解析が認められている<sup>4)5)6)7)</sup>。脳組織における発現は、培養細胞を中心とした進められてはいるが<sup>8)9)</sup>、正常組織での特異的な発現は未だ報告されていない。

今回我々は、正常脳組織及び末梢神経において、補体制御膜因子であるDAF, MCP, HRF 20を、免疫組織学的手法を用いて解析し、HRF 20 (CD59)の有髄繊維での局在を認めただので報告する。

## <方法>

### 1) 材料

本研究では、臨床的に痴呆が無く、主に肺炎で死亡した非神経疾患、5剖検脳（男性4、女性1、平均年齢84.6才）を用いた。検体は、病理学的に検索し、加齢性変化以外所見が無い事を確認した。解剖は死後、平均3時間で施行された。検体は片側脳から、10箇所（frontal, temporal, parietal, occipital, precentral 及び postcentral lobes, visual cortex, cerebellum, hippocampus, 及び mesencephalon）を2cm 四方程度のブロックとして切り出して使用した。後根部の末梢神経も同様に使用した。

### 2) Western-blotting

凍結保存組織を、lysis buffer (10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 140 mM NaCl, 2% Nonidet P-40, pH 8.2) と共にホモジナイザーでつぶし遠心の後、上清を12% SDS-PAGE にて泳動しPVDF 膜に転写後、anti HRF 20 (1F5) を用いてWestern blot 解析をおこなった。

### 3) 免疫組織学的解析

死後、平均約3時間後に、4% パラフォルム/PBS にて48時間固定し15% シュークローズ/PBS に保存の後、クリオスリットにて20 $\mu$ m に薄切し、一次抗体と72時間、4°Cで反応させた（anti DAF として 1C6；福島県立医大 藤田教授より供与、anti MCP として M75；大阪成人病センター 瀬谷博士より供与、anti HRF 20として1F5の各モノクローナル抗体）。二次抗体は、ビオチン化抗マウスmAb (Vector 社) を使用し、ABC 法にて発色した。

また、発色部位を同定するために、免疫組織染色の後、Luxol Fast Blue を用い二重染色を行った。

## <結果>

1) 免疫化学的解析では、赤血球膜で認められたのと同様に、20kDa 周囲にバンドを認め、脳内でも、HRF 20 (CD59) が発現している事が確認された。

2) 免疫組織学的解析では、MCP は血管内皮組織に染色を認め、DAF は血管内血球のみに染色が認められ、MCP やDAF は中枢神経の特異的な組織に発現が認められなかった。

HRF 20 は、個体差が認められるものの、脳のあらゆる部位（上述10箇所）で、神経繊維が強く染め出された。大脳においては、皮質3層以下が強く、Luxol Fast Blue との二重

染色によって、それらが、有髄繊維である事が確認された。白質は、diffuse に染色された。小脳においても髄質が鮮明に染め出され、末梢神経も髄鞘がHRF 20 陽性であった。

#### <考察>

1) これまで、Alzheimer病での神経原繊維変化がHRF 20 陽性であったとの報告はあるが<sup>10)</sup>ヒトの正常脳組織において補体制御膜因子の特異的な染色性は報告されていない。しかし、髄鞘にMAC 制御因子であるHRF 20 のみが染め出されたことは、非常に興味深い。即ち、脳内ではBBB があるため、通常は血漿成分である抗体の移行は妨げられ、それらの反応は起こらないと考えられている。補体反応においても、脳微小血管で、DAF ,MCP が発現していれば、補体が活性化される事は殆ど無いと考えられる。しかし、BBB が破壊された場合、あるいは、脳内で補体が産生されるような場合には<sup>11)</sup>、脳組織内でも補体を制御する必要が生じる。この働きをHRF 20 が担っている可能性は十分考えられる。

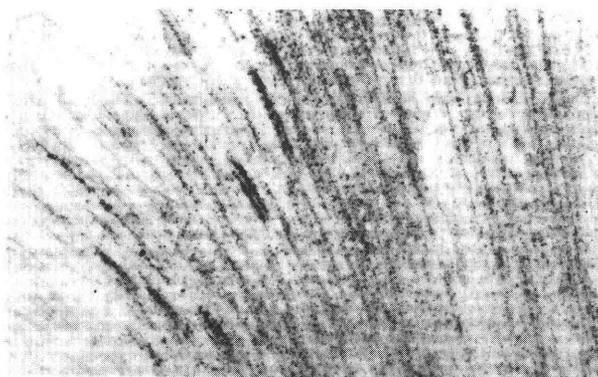
2) これまで、1F5を用いて、正常脳組織での非染色性の報告がある。我々の今回の結果との不一致は脳組織の死後変化などに起因する可能性があるが、今後解決すべき問題点である。

#### <結論>

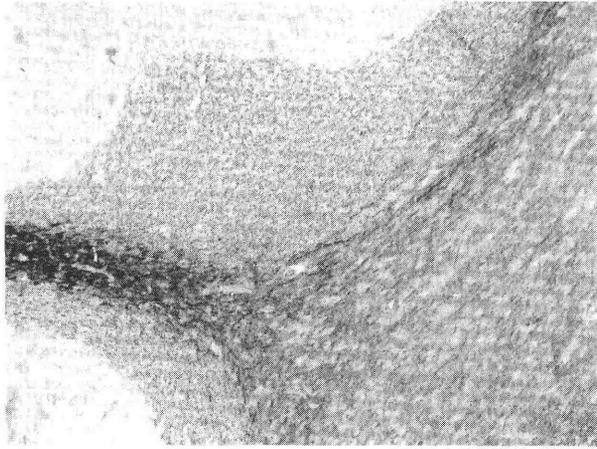
中枢及び末梢神経共に有髄繊維で、補体制御膜因子HRF 20 が発現している事は疾患の病態や発症機序に、HRF 20 が深く関わっている可能性が十分考えられる。

図1 ヒト老人正常脳組織でのHRF 20 の発現

a)前頭葉組織では、第3層以下に強い染色性が認められる。(ニュートラルレッドにより核染)



b)小脳では、髄質繊維が強く染色された。(ニュートラルレッドにより核染)



<参考文献>

- 1) P.L.McGeer, et al.,Neuroscience Letters, 107, 341-346 (1989)
- 2) D. A. S.Compston.,Neuropathology and Neurobiology,15, 307-316, 1989
- 3) Alastair Compson.,TINS, 14,175-182, 1991
- 4) Simpson K.L.,et al.,Immunology, 81/3, 452-461,1994
- 5) Scoazec J.-Y., et al., Gastroenterology, 107/2, 505-516,1994
- 6) Ichida S., et al., Kidney int., 46/1,89-96,1994
- 7) Simpson K.L.,et al.,Immunology, 80/2, 183-190, 1993
- 8) David L. Gordon, et al.,Journal of Neuroimmunology, 36, 199-208, 1992
- 9) C. Vendeler, et al., Immunology, 82, 542-547, 1994
- 10) P.L. McGeer, et al., Brain Res., 544. 315-319, 1991
- 11) M. Levi-Strauss, et al., The Journal of Immunology, 139, 2361-2366, 1987

# 17 HIV 感染細胞における補体制御膜因子の発現低下の解析

呉笑山、岡田則子、細川雅人、野中真弓、岡田秀親  
名古屋市立大学医学部分子医学研究所生体高分子部門

Decreased expression of complement regulatory membrane factors on HIV-infected human T cell lines

Xiaoshan Wu, Noriko Okada, Masato Hosokawa, Mayumi Nonaka and Hidechika Okada  
Department of Molecular Biology, Nagoya City University School of Medicine

<はじめに>

ヒトretrovirusである、HTLV-1及びHIV-1はヒト補体で溶解されないことが知られている。一方、Lederman<sup>(1)</sup>及びWeiss<sup>(2)</sup>らによってAIDS患者の末梢血リンパ球においてはGPI-アンカー結合型の補体制御膜因子であるDAF及びHRF20の発現低下が報告されているが、そのメカニズムは今だ不明である。今回、我々はHIV-1(HTLV-III<sub>B</sub>)感染培養系T細胞における補体制御膜因子の発現変化の検討を行ったので以下に報告する。

<方法>

## 1) HIV感染細胞

HIV-1持続感染系としてはHTLV-III<sub>B</sub>感染したMOLT-4およびCEM細胞、急性感染系としてはHTLV-III<sub>B</sub>感染したMT-4細胞を用いて実験を行った。

## 2) Flowcytometry解析

HIV-1感染及び非感染細胞に対して、1C6 (DAFに対するmAb、藤田教授より供与)、M177 (MCPに対するmAb、瀬谷博士より供与)、1F5 (HRF20に対するmAb)、anti-Fasあるいはanti-HLA-DRを反応させて直接法及び間接法にてそれぞれの膜抗原発現量をFACScanを用いて解析した。

## 3) Northern blot解析

HIV-1感染及び非感染細胞より得たtotalRNA5ugをグリオキサール法で変性させ電気泳動後、Hybond膜に転写した。各HRF20,DAF,MCP及びglyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH)のcDNAをプローブとしてバンド検出を行った。

## 4) GPI-アンカー結合膜蛋白放出実験

<sup>125</sup>Iラベルした Guinea pig DAF (gpDAF) を感染及び非感染細胞膜に37°C1時間のイン

キュベーションにより取り込ませた後、時間依存的に細胞から放出されるgpDAFの量を測定した。

#### <結果>

HIV-1持続感染系においては、感染MOLT-4の細胞上のHRF20、DAF及びMCPはそれぞれ非感染細胞の48%、80%及び83%であった。感染CEM細胞においてはそれぞれ非感染細胞の65%、90%及び80%であった。HIV-1急性感染系においては、感染MT-4細胞膜上のHRF20とHIVgp120抗原のtwo colour解析を行った結果、HIVgp120抗原陽性細胞でのHRF20の発現が特異的に低下した(図1)。

Northern blot法を用いてmRNAレベルを解析した。GAPDHに対する比率で比較検討したところ、感染MOLT-4細胞のHRF20、DAF及びMCPのmRNAレベルはそれぞれ非感染細胞の55%、80%及び83%であった。

膜に再構成されたGPI-アンカー結合膜蛋白<sup>125</sup>I-gpDAFの放出は、感染MOLT-4細胞で明らかな促進が認められた(図2)。

#### <考察>

HRF20(CD59)はC5b-9形成による細胞障害の抑制に重要な役割を果たしている。HIV-1感染細胞におけるHRF20発現低下の原因として、1) HIV-1感染によるmRNAレベルの低下、2) HIV-1感染によるGPI-アンカー結合膜蛋白の放出促進が確認された。さらに、HIV-1急性感染細胞においては、gp120抗原陽性細胞に特異的にHRF20の発現低下が見られることよりHRF20の発現低下がHIV増殖と密接に関連していることが強く示唆された。

#### <文献>

- (1). Lederman et al. J.virol. 62,2107 (1989)
- (2). Weiss et al. AIDS 6,379 (1992)

Fig. 1 Decrease of HRF20 (CD59) expression on MT-4 cells  
expressing gp120 detected by 0.5  $\beta$

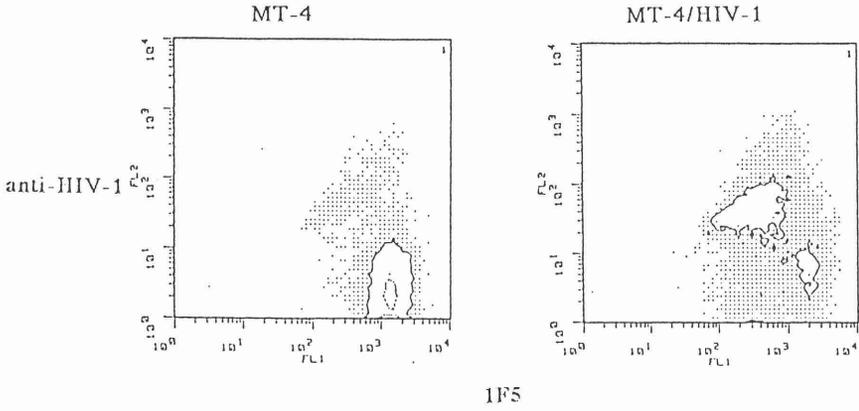
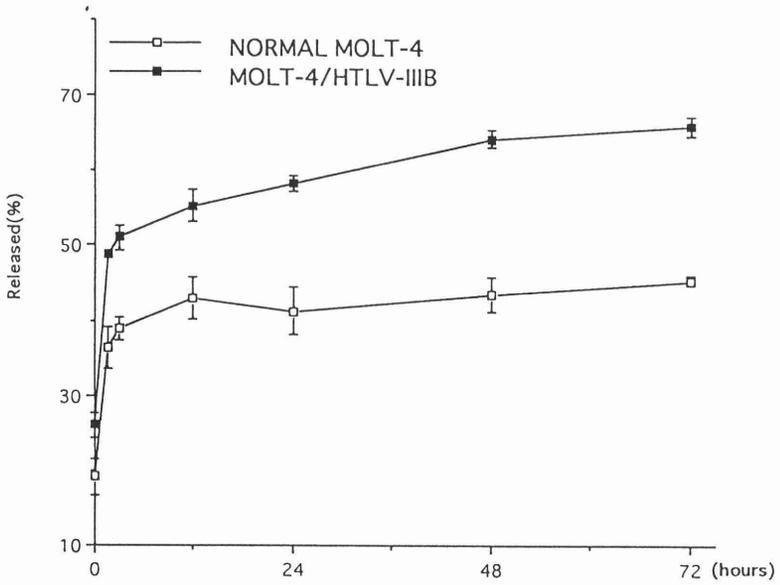


Fig. 2 Release of  $^{125}$ I-guinea pig DAF adsorbed to MOLT-4 cells  
and HIV-infected MOLT-4 cells following incubation



宮川周士<sup>1</sup>、三方彰喜<sup>1</sup>、種村匡弘<sup>1</sup>、白倉良太<sup>1</sup>、  
寺戸敦子<sup>2</sup>、畑中道代<sup>2</sup>、松本美佐子<sup>2</sup>、瀬谷司<sup>2</sup>

1。大阪大学 臓器移植科、 2。大阪府立成人病センター 免疫

Prevention of hyperacute rejection by CD59

S Miyagawa<sup>1</sup>, S Mikata<sup>1</sup>, M Tanemura<sup>1</sup>, R Shirakura<sup>1</sup>,  
A. Terado<sup>2</sup>, M Hatanaka<sup>2</sup>, M Matsumoto<sup>2</sup>, and T Seya<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Division of Transplantation, Osaka Univ. Medical School, and <sup>2</sup>Dept. of Immunol., Center for Adult Disease, Osaka)

(はじめに)

Discordant 異種移植に際し起こる超急性拒絶反応を防ぐために、これまで graft に DAF(CD55), MCP(CD46) を発現させることが有効であり、CD59に関しては、DAF やMCPと同じ程度の発現量では有効ではないことを報告した<sup>1,2)</sup>。

今回高発現CD59ブタ血管内皮cloneを使い、ヒト補体抑制効果について検討を加えたので報告する。

(方法)

細胞は、ブタの血管内皮を cell line 化したMYP30を使用した。CD59 の cDNA を発現 vector pCAGGS( chik b actin promoter) に組み込み、lipofectin法にて MYP30 に transfectionすることで cloneを得た。これらのcloneはFACS にてその発現量(mean shift 値)を調べた。抗体は5H8を用いた。

これらのcloneに自然抗体および補体ソースとして20%及び40%ヒト正常血清(NHS)を反応させ、補体抑制効果を LDH assay にて測定した。

次に、ブタの血管内皮のヒト補体 (C8, C9) に対する反応をC9欠損血清を用いて調べた。

#### (結果)

1. CD59 発現ブタの血管内皮 clone #108 (mean shift 値 108) 及び #111 (mean shift 値 105) の補体抑制効果は、それぞれ20%NHS に対してはControl の 62.0% と 62.4%、40%NHS に対しては 78.1% と 74.8% であった。

2. ブタの血管内皮はヒト補体のC5b-8 step で、C5b-9 step の83.0% の障害を受けた。

#### (考察)

Discordant異種移植に際し起こる超急性拒絶反応を防ぐためには、我々はC3 step での補体制御が必要と考えているが、今回CD59 の有効性のついて調べた。CD59 は MCP や DAF と同じ程度の発現量では有効性を示さないが、発現量をかなり上げることで Lysis の防止 (late step) には十分有効であった。しかし、DAF に比べると Lysis に関しても効果が劣るのにはブタの血管内皮のヒト補体に体するC5b-8 step 障害が関係すると思われた。

#### (文献)

- 1) Miyagawa et al., Transplantation (58:834, 1994)
- 2) Miyagawa et al., Transplant Proc (27: 328, 1995)

## 発作性夜間血色素尿症(PNH)の病因遺伝子 PIG-Aの遺伝子産物の解析

渡辺玲香<sup>1)</sup>、木下タロウ<sup>1)</sup>、山本章嗣<sup>2)</sup>、柁木龍一<sup>2)</sup>、  
竹田潤二<sup>1)</sup>、井上徳光<sup>1)</sup>

- 1)大阪大学微生物病研究所 免疫不全疾患研究分野、  
2)関西医科大学 第一生理

Localization and orientation of the PIG-A gene product  
in the endoplasmic reticulum.

- 1)Department of immunoregulation, Research  
Institute for Microbial Diseases, Osaka University ,  
2)Department of Physiology, and Cell Biology,  
Kansai Medical University.

[はじめに]

発作性夜間血色素尿症(以下PNHと略す。)は感染や就寝にともなう補体の活性化によって、溶血発作を起こす後天性の疾患である。PNH患者の血液細胞は、補体による攻撃から自己細胞を防御している補体制御因子、DAF(decay-accelerating factor)やCD59を欠損しており、自己補体に高い感受性を示す。これらの補体制御因子はGPIアンカー型蛋白質であり、GPIアンカーと呼ばれる糖脂質によって細胞膜上につながり止められている。PNH患者の異常細胞では、以上の補体制御因子を含め種々のGPIアンカー型蛋白質が欠損していることがわかっている<sup>1)</sup>。

我々の研究室ではこれまでに、GPIアンカーの生合成の初期のステップに関与するPIG-A遺伝子がすべてのPNH患者由来の異常リンパ球細胞株及び、多形核白血球で変異していることからPIG-A遺伝子がPNHの病因遺伝子であることを報告してきた<sup>2),3)</sup>。

今回このPIG-Aおよびそのミュータントの遺伝子産物について解析を行ったので報告する。

[材料及び方法]

PIG-AとGST(Glutathione-S-Transferase)の融合遺伝子を作成し細胞内で発現させ、その融合蛋白質についてGSTの特性を利用して精製を行い、また抗GST抗体を用いて解析を行った。融合遺伝子のコンストラクトは、発現す

る融合蛋白質のN末端にGST蛋白質がついているGST-PIG-Aと、C末端にGST蛋白質がついているPIG-A-GSTを作成した。またPIG-Aのdeletion mutantのコンストラクトについてはTable 1に示した。

#### FACS解析

GPIアンカー型蛋白質であるCD59の発現を、ビオチン化抗CD59抗体（昭和、富田基郎先生より恵与）を用いてFACSscanにて解析した。

#### 間接蛍光抗体法

HeLa cellにそれぞれのコンストラクトをトランスフェクションし、抗GST抗体、蛍光標識二次抗体で染色し、蛍光顕微鏡にて融合蛋白質の局在を確認した。

#### 免疫電顕法

COS 7 cellにそれぞれのコンストラクトをトランスフェクションし、抗GST抗体、金コロイド標識二次抗体で反応させ、透過型電子顕微鏡にて融合蛋白質の細胞内における局在を確認した。

#### 細胞粗分画法及びシヨ糖密度勾配細胞分画法

細胞粗分画法では、ホモジナイザーを用いて細胞を破碎し遠心、デタージェント処理、塩による抽出等を行い、核分画、膜分画、細胞質分画を得た。シヨ糖密度勾配細胞分画法では、ナイトロジェンキャビテーションポンプを用いて細胞を破碎し、不連続シヨ糖密度勾配遠心法にて分画し、それぞれのオルガネラを得た。

#### トポロジー解析

得られたミクロソーム分画をデタージェント存在、非存在化にてプロテイナーゼK処理を行い、PIG-AとGSTの融合蛋白質の感受性を調べた。消化後、融合蛋白質を抗GST抗体を用いたイムノブロッティングにより検出した。

#### [結果]

1. GST/PIG-A融合遺伝子産物は細胞内で融合蛋白質として存在し、全長のPIG-AとGSTの融合遺伝子産物はGSTが蛋白質のN末、C末のどちらに結合していても正常な活性を持つことが分かった。
2. 全長のPIG-A/GST融合蛋白質は間接蛍光抗体法で、核膜及び細胞内で網状に観察され、その染色パターンは小胞体に存在するプロテインジスルフィドイソメラーゼのそれと一致していた。免疫電顕法においても、主に滑面、粗面両小胞体膜面に局在が見られ、さらに細胞分画法で膜成分を分画し、イムノブロッティングで調べたところ、小胞体分画において融合蛋白質が確認された。
3. トポロジー解析からPIG-Aが、小胞体膜貫通型蛋白質でN末端から

45kDaの大きな部分が細胞質側に、C末端の15kDaの小さな部分が内腔側にあることがわかった。

4. PIG-Aのdeletion mutantとGSTの融合蛋白質では、その活性及び細胞内での局在が欠失しているアミノ酸数に相関して変化していた。

[考察]

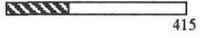
PIG-A蛋白質がGPIアンカー生合成の場である小胞体に存在し、ハイドロフォビシティープロットから予想されるように、蛋白質のほとんどの部分が細胞質側にあることが分かった。このこととPIG-A蛋白質は糖転移酵素のファミリーと相同な領域がある事、PIG-Aが関与しているGPIアンカー合成の初期過程の中間体が小胞体の細胞質側に存在することを考えあわせると、PIG-Aが酵素として直接的にアンカー生合成に関与していることが強く示唆された。

PIG-Aの小胞体内腔側に存在しているC末端部分が活性及び局在に関与していることが示唆された。このC末端部分が活性や局在にどのように作用しているのか、今後検討を進めていくつもりである。

[文献]

- 1) Kinoshita T. et al., Adv Immunol. in press (1995)
- 2) Takeda J. et al., Cell. 73, 703-711 (1993)
- 3) Yamada N. et al., Blood. 85, 885-892 (1995)

Table 1, Properties of GST/PIG-A fusion protein

construct	deduced protein	activity	localization	
			immunohistochemistry	subcellular fractionation
M1	 415	-	核膜及び細胞質に網状に見られる。	membrane に主に存在しているがcytosolにもみられる。
M2	 442	-		Golgi fraction.ER fraction ともに存在している。
M3	 450	+		ER fraction
M4	 466	++		ER fraction
GST-PIG-A	 484	++		ER fraction
PIG-A-GST		++		ER fraction

 : GST protein

■ : transmembrane domain

## GPIアンカー生合成後期に関与するヒト及び マウス遺伝子のクローニング

大石一人、栗本康行、井上徳光、遠藤雄一\*、藤田禎三\*、竹田潤二、木下タロウ  
大阪大学微生物病研究所 免疫不全疾患、\*福島県立医科大学 生化学第二

Cloning and characterization of human and murine genes that are involved in a late step of GPI-  
anchor synthesis pathway

Kazuhito Ohishi, Yasuyuki Kurimoto, Norimitsu Inoue, Yuichi Endo\*, Teizo Fujita\*,  
Junji Takeda, Taroh Kinoshita

Department of Immunoregulation, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University,  
\*Department of Biochemistry, Fukushima Medical College

(はじめに)

GPIアンカー型蛋白はGPI (glycosylphosphatidyl inositol)と呼ばれる糖脂質を介して細胞膜に結合している蛋白群であり、酵母、原虫から哺乳動物まで広く分布している。GPIアンカーの基本構造は種を越えて保存されており、多くの重要な膜分子がこのカテゴリーに含まれている。GPIアンカーの合成はER (endoplasmic reticulum)で行われており、その構造より多くのステップを経て合成されると考えられ、実際、それぞれのステップに異常のある細胞株が現在までに8種樹立されている。発作性夜間血色素尿症(PNH: paroxysmal nocturnal hemoglobinuria)は自己補体の活性化により赤血球が溶血する後天性の疾患であるが、その本質は血球上のGPIアンカー型補体制御分子であるCD59やDAFの欠損による補体感受性の増加である。これらの分子の欠損は蛋白そのものの異常ではなく、GPIアンカーの合成不全による細胞膜上への表出障害によるものである。われわれは、PNH患者より樹立された細胞株に於いて障害されているGPIアンカー生合成初期ステップに関与する遺伝子PIG-A (phosphatidylinositol glycan class A)をクローニングした<sup>1-2)</sup>。実際、今までに解析された全てのPNH症例に於いてPIG-Aの異常が見つかった<sup>2-5)</sup>。GPIアンカー型蛋白の欠損は生合成のどのステップが障害されても起こりうるにも関わらず、PNH症例に於いてPIG-A以外の遺伝子の異常は報告されていない。この理由としてGPIアンカーの合成不全が起こるに

は、X染色体上にある *PIG-A* は1度の突然変異で十分であるが、常染色体上にあると推測されるその他の遺伝子では、両方のアレルに突然変異が起こることが必要であり、このような事は非常に希にしか起こり得ないことが挙げられる<sup>2)</sup>。しかし、本当にGPIアンカー型蛋白の欠損のみでPNHが発症するのであろうか。実は *PIG-A* にはGPIアンカー生合成以外の機能があり、*PIG-A* の異常によるGPIアンカー型蛋白の欠損でしかPNHは発症しないのではないかという疑問が生じてくる。われわれはこのような点を明らかにするために、以前井上らがクローニングした生合成後期ステップに関与する遺伝子 *PIG-F*<sup>6)</sup> の遺伝子座の決定及び *PIG-A*, *PIG-F* のマウスホモログ *Pig-a*, *Pig-f* 欠損マウスを作成し比較、解析することを計画した。そのため *PIG-F* ゲノムと *Pig-f* cDNA 及びゲノムのクローニングと解析を行った。

#### (材料と方法)

*Pig-f* cDNA は C57BL/6 マウス 辜丸 cDNA ライブラリーから *PIG-F* cDNA をプローブとしてコロニーハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。5'-RACE は 5'-AmpliFINDER RACE kit (Clontech) を使い、マウス胸腺細胞腫 EL4 の mRNA をテンプレートとして行った。*Pig-f* cDNA の機能は、cDNA をポリオーマの複製開始点を持つ発現ベクター pME18Sf に組み込み、ポリオーマ large T 抗原と共にクラス F 変異細胞株 Thy-1<sup>+</sup>f 細胞に導入し、3日間培養後抗 Thy-1 抗体で染色し Thy-1 の発現回復の程度をフローサイトメトリーにより解析した。*PIG-F* 及び *Pig-f* ゲノムは、ヒト線維芽細胞及び 129SvJ マウス肝臓ゲノムライブラリー (Stratagene) をそれぞれ *PIG-F* 及び *Pig-f* cDNA をプローブとしてプラークハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。それぞれの遺伝子座は得られたゲノムクローンをプローブとして FISH 法 (Fluorescence *in situ* hybridization) により決定した。

#### (結果)

C57BL/6 辜丸 cDNA ライブラリーをスクリーニングして得られた *Pig-f* cDNA は 813bp で、ヒト *PIG-F* cDNA と比較すると翻訳開始コドンを含んでいなかったため、5'-RACE 法により 5' 側に 167bp 伸長し、合わせて 980bp の cDNA を得た。得られたマウス *Pig-f* cDNA はヒト *PIG-F* cDNA と全長にわたって高い相同性を有していた。この *Pig-f* cDNA は *PIG-F* cDNA と同じく 219 アミノ酸からなる蛋白をコードしており、そのアミノ酸配列はヒトと 88% 相同であった (Figure 1)。 *Pig-f* cDNA をクラス F 変異細胞株 EL4 Thy-1<sup>+</sup>f 細胞に導入すると GPI アンカー

型蛋白(Thy-1)の発現をヒト*PIG-F* cDNA導入時と同じ程度にまで回復させ、蛋白の機能面でもよく保存されていることがわかった(Figure 2)。

129SvJマウス肝臓ゲノムライブラリーより約30kbpのマウス*Pig-f*ゲノムを、ヒト繊維芽細胞ゲノムライブラリーより約40kbpのヒト*PIG-F*ゲノムを得た。両遺伝子とも6つのエクソンより構成され、第4イントロンがヒトでかなり長い他は同様な構築をしており、全てのエクソンの境界はcDNA上の相同な位置にあった (Figure 3)。さらにヒト*PIG-F*は2q16-21に、マウス*Pig-f*は17E4-5に存在していた。ヒト*PIG-F*ゲノムクローニングの際に得られた偽*PIG-F*遺伝子( $\psi$ *PIG-F*)は5q35に存在していた。

#### (考察)

今回クローニングしたマウス*Pig-f*cDNAは以前クローニングされたヒト*PIG-F*cDNAと高い相同性を有しており、そのコードする蛋白は構造、機能とも良く保存されていた。さらにゲノムの構築も両遺伝子に於いて保存されていた。ヒト*PIG-F*の存在する2q16-21はマウス*Pig-f*の存在する17E4-5に相当する領域であることが知られており、遺伝子座も保存されていた。最近、ヒト*PIG-F*cDNAを用いたinterspecific backcross mappingによりマウス*Pig-f*は17番染色体に存在していることが報告され、この結果よりヒト*PIG-F*は2番染色体に存在すると予想されていた<sup>7)</sup>。われわれの結果はこの報告と一致し、*PIG-A*以外のGPIアンカー合成遺伝子である*PIG-F*が常染色体に存在していることは、PNHにおける責任遺伝子の単一性を説明する上記の仮説を支持する結果である。

#### (文献)

- 1) Miyata, T. et al., *Science* **259**, 1318 (1993)
- 2) Takeda, J. et al., *Cell* **73**, 703 (1993)
- 3) Bessler, M. et al., *EMBO J.* **13**, 110 (1994)
- 4) Ware, R. E. et al., *Blood* **83**, 2418 (1994)
- 5) Yamada, N. et al., *Blood* **85**, 885 (1995)
- 6) Inoue, N. et al., *J. Biol. Chem.* **268**, 6882 (1993)
- 7) Ware, R. E. et al., *Blood* **83**, 3753 (1994)

<b>PIG-F</b>	MKDNDIKRLL	YTHLLCIPSI	ILSVFIPSLF	LENFSILETH	LTWLCICSGF	50
<b>Pig-f</b>	...T.....	..N...V...	F...F..V...	...V...A.	.....AS	50
	VTAVNLVLYL	VVKPNTSSKR	SSLSHKVTGF	LKCCIFFLMS	CFSFHVIFVL	100
	..T...LS..	.....V....	.....RA	...VC....	..LL...L...	100
	YGAPLIELAL	ETFLFAVILS	TFTTVPCCLC	LGPNLKAWLR	VFSRNGVTSI	150
	.....V.	.....	.....	.....	.....	150
	WENSLQITTI	SSFVGAWLGA	LPIPLDWERP	WQVWPISCTL	GATFGYVAGL	200
	.....	...T.....	F.....	.....	.....	200
	VISPLWIYWN	RKQLTYKNN				219
	.....	.....				219

Figure 1 Alignment of amino acid sequences of human PIG-F and murine Pig-f

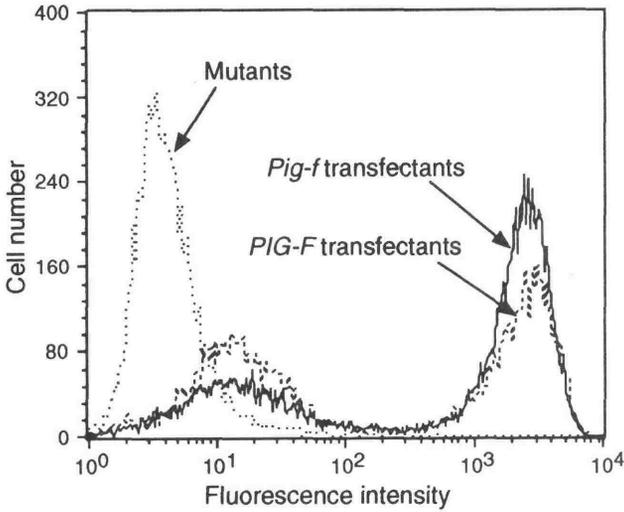


Figure 2 Restoration of surface expression of Thy-1 on a class F mutant, Thy-1<sup>f</sup> cells

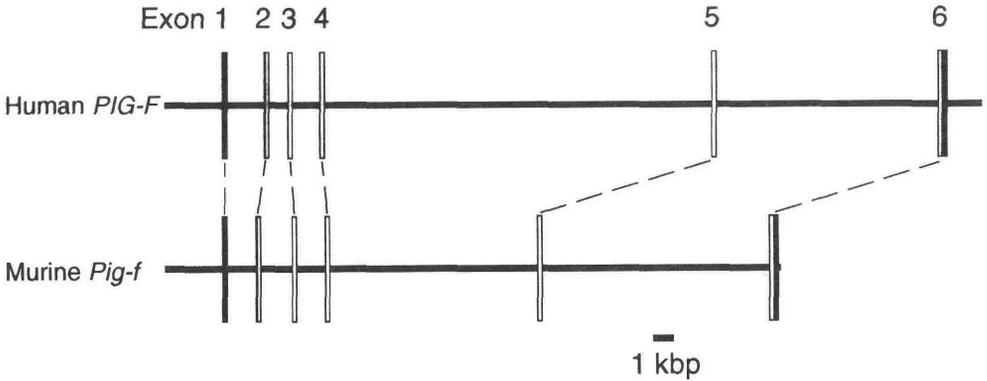


Figure 3 Gene organizations of human PIG-F and murine Pig-f

## GPIアンカー生合成後期に關与するPIG-B遺伝子産物の細胞内局在、機能部位に關する考察

高橋 実、大石 一人、井上 徳光、遠藤 雄一\*、竹田 潤二、木下タロウ  
 阪大・微研・免疫不全、福島医大・生化学第2

The intracellular localization of PIG-B protein and its function in biosynthesis of  
 glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor

Minoru Takahashi, Kazuhito Ohishi, Norimitsu Inoue, Yuichi Endo\*, Junji Takeda,  
 Taroh Kinoshita

Dept. of Immunoregulation, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

\*Dept. of Biochemistry, Fukushima Medical College

### 【はじめに】

発作性夜間血色素尿症 (PNH) はGPIアンカー生合成不全により補体制御因子であるCD59、DAFが欠損し、自己補体による溶血性貧血を呈する。我々はPNHの原因遺伝子である *PIG-A* のクローニングに成功し、実際に解析された全てのPNH患者で *PIG-A* 遺伝子に異常が見つかった<sup>1)</sup>。しかしGPIアンカー生合成系には10種類以上の遺伝子が関与しており、いずれのステップに異常が起こっても理論的にはPNHを発症する。*PIG-A* にしか異常が見つからないのは *PIG-A* のみがX染色体に存在し、他のGPIアンカー生合成関連遺伝子は全て常染色体に乗っているためと推測されている。事実、*PIG-H*、*PIG-F* (本シンポジウム、大石ら発表) は常染色体にあることが証明されている。

昨年の本シンポジウムにおいてGPIアンカー生合成後期過程に關与する遺伝子 *PIG-B* のクローニングを報告した。GPIアンカー生合成に異常のあるマウスT細胞株SIA-bは、その生化学的解析からアンカー生合成の第3番目のマンノースの付加に異常があることがわかっている。*PIG-B* cDNAはSIA-b株の異常を相補するので *PIG-B* 蛋白はそのマンノース転移酵素の活性を有することが期待できる。またGPI

アンカー生合成は小胞体膜上で行われるためにPIG-B蛋白質も小胞体に限局していると思われる。

今回、下記のようにPIG-B遺伝子の染色体マッピングとその翻訳産物の細胞内局在部位の決定を行ない、活性部位に関して考察を加えたので報告する。

## 【材料と方法】

### 1) PIG-B遺伝子の染色体マッピング

ヒトゲノムライブラリーからPIG-B cDNAをプローブとしてブランクハイブリダイゼーション法にて17 kbの不完全長PIG-Bゲノムをクローニングした。その中の3.4 kbと4.8 kbを用いてFluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法にてPIG-B染色体遺伝子座を決定した。

### 2) PIG-B蛋白質の細胞内局在

グルタチオン-S-転移酵素 (GST) のN末端、C末端にPIG-B蛋白質の結合した融合蛋白質 (それぞれGST-PIG-B、PIG-B-GST) を発現しているマウスT細胞株 (親株SIA-b) を樹立した。

GST-PIG-Bを恒常的に発現している株 (GST/B) のホモジェネートを遠心分離法にて、膜、細胞質各画分にわけた。またマイクロソーム分画をショ糖濃度勾配遠心で分離した。各画分は1% NP-40で可溶化した後、グルタチオン-ビーズでアフィニティー精製を行い、抗GST抗体でウエスタンブロッティングを試行した。

### 3) PIG-BのDeletion mutantsによる活性部位の解析

PIG-B蛋白質のC末端12アミノ酸残基はリジンに富む。この部位が小胞体へのリテンション シグナルとして働いている可能性が考えられたので、この部位を欠いたPIG-B遺伝子を人工的に作製した。これをクラスB変異株であるSIA-b株に導入し、Thy-1の発現回復をFACSで解析することにより、活性の有無を調べた。

## 【結果】

1) ヒトPIG-B遺伝子は15番染色体長腕21-22に存在していた。

2) GST-PIG-B、PIG-B-GST共にGSTの大きさ (26 kDa) に予想されるPIG-B蛋白質の大きさ (65 kDa) を加えた約90 kDaの大きさであった。またいずれの融合蛋白

質もクラスBの異常を相補し、活性を保持していた。

3) GST-PIG-Bは膜画分に存在し、さらにショ糖濃度勾配遠心による分離から小胞体膜の濃縮フラクションに局限していた。

4) リジンに富むPIG-B蛋白質C末端12アミノ酸を欠いたPIG-B cDNAをSIA-b株に導入すると正常型PIG-B cDNAと同程度までThy-1の膜発現が回復した。この結果はC末端12アミノ酸を欠いてもPIG-B蛋白質は活性を保持していることを示した。

#### 【考察】

PIG-B遺伝子もPIG-A以外の既知のGPIアンカー生合成関連遺伝子と同様に常染色体上(15q21-22)に位置づけられた。現在までにヒトでクローニングされたGPIアンカー生合成関連遺伝子4種(PIG-A, PIG-F, PIG-H, PIG-B)はPIG-A以外全て常染色体にあることが確認された。PIG-AのみがX染色体にあり、実質ハプロイド状態になっているためPNHにおいてPIG-Aのみに異常がみられるという仮説を指示する結果となった。

PIG-B蛋白質は小胞体膜に局限して存在している。このことはGPIアンカー生合成が小胞体膜でおこるということからPIG-B蛋白質が直接GPIアンカー生合成に関与している可能性を意味する。また最近マンノースを付加する後期ステップもNアセチルグルコサミンの付加する前期ステップと同様、小胞体膜細胞質側で行われていると報告されている。そこでPIG-B蛋白質の小胞体膜上でのトポロジーに関してもGST-PIG-B、PIG-B-GSTを用いて現在解析中である。

予想されるPIG-B蛋白質はN末付近の疎水性領域13残基(アミノ酸65-77)にPutative Dolichol Recognition Sequence (PDRS)と呼ばれるドリコールを認識すると推定される領域<sup>2)</sup>とホモロジーのある部位が存在する。GPIアンカー生合成のマンノースの付加にはDolichol-phosphate-Mannose (DPM)が供与体となる。よってPIG-B蛋白質中にPDRSがあり、ドリコールを認識していると予想される。実際にPIG-B蛋白質のアミノ酸65-77が活性に必須な部位であるかどうか検討中である。

1) Yamada, N. et al., *Blood* 85: 885(1995)

2) Albright, C. F. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 7366(1989)

松下 操、藤田禎三

福島県立医科大学・生化学第二講座

Regulation of MASP activity by C1 inhibitor  
(Department of Biochemistry, Fukushima Medical College)

〈目的〉

MBP (mannose-binding protein) は、マンノースやN-アセチルグルコサミンに結合する血清レクチンであり、これらの糖鎖をもつ微生物に対する生体防御因子として働いている。MBPは、C1r, C1s様プロテアーゼのMASP (MBP-associated serine protease) <sup>1,2</sup>と複合体を形成しており、糖鎖リガンドにMBP-MASPが結合すると、MASPが活性化されてC4とC2が限定分解を受け補体系が進行する。このレクチン経路<sup>2,3</sup>においても、C1r, C1sとの構造及び活性の類似性からMASP活性の制御にC1インヒビター (C1INH) が関与していることが推定された。そこで、今回C1INHのMASPに対する作用を検討した。

〈方法〉

1. MASP, MBP-MASP, 未活性型MASP(proMASP) 及びC1INHはヒト血清より精製した。
2. MASP活性は、C4消費とマンナン結合赤血球 (Emannan) 上での MBP-MASPによるC4/C2活性化を指標とした。C1INHのMASPへの作用は、これら2つの系においてC1INH存在下でのMASP活性で検討した。
3. <sup>125</sup>I-MASPまたはEmannan・MBP-<sup>125</sup>I-MASPをC1INHとインキュベート後、SDS-PAGEを行いMASP-C1INH複合体の形成を調べた。
4. proMASPのインキュベートによる自己活性化に伴う活性型MASPへの転換とそれに及ぼすC1INHの効果は、ウエスタンブロット法を用いて検討した。

#### 〈結果〉

1) C1INHはMASPによるC4消費活性を阻害した。またEmannanを用いたマンナン上でのMBP-MASPによるC4, C2活性化反応系においても、C1INHはMASPに対して阻害作用を示した。

2) 1) の2つの系において、 $^{125}\text{I}$ -MASPを用いたオートラジオグラフィー及び抗C1INH、抗MASPを用いたウエスタンブロット法から、C1INHはMASPと1 : 1の複合体を形成することが判明した。

3) MASPはC1rと同様に、インキュベートすることにより自己活性化を起こして活性型MASPに転換する。この系においてC1INHが共存するとMASPの自己活性化が抑制された。

#### 〈考察〉

古典的経路において、C1は血中でC1INHと非共有結合しており、C1が免疫複合体等の活性化物質を認識すると、C1INHがC1より遊離してC1rの自己活性化が起きる。更に、活性型C1r/C1sに対してC1INHはそれぞれ1 : 1で共有結合して両者を失活させる。レクチン経路においても、同様なC1INHによる活性化の制御機構が存在することが考えられる。

#### 〈文献〉

- 1) Matsushita, M. and Fujita, T. J. Exp. Med. 176, 1497 (1992)
- 2) Sato, T. et al. Int. Immunol. 6, 665 (1994)
- 3) Holmskov, U. et al. Immunol. Today 15, 67 (1994)

寺井 格<sup>1</sup>、小林邦彦<sup>2</sup>、松下 操<sup>3</sup>、藤田禎三<sup>3</sup>、松野一彦<sup>1</sup><sup>1</sup>北大医学部・臨床検査医学、<sup>2</sup>小児科、<sup>3</sup>福島県立医科大学・生化学第二 $\alpha_2$ -macroglobulin binds to and inhibits

## mannose-binding protein associated serine protease (MASP)

Itaru Terai<sup>1</sup>, Kunihiko Kobayashi<sup>2</sup>, Misao Matsushita<sup>3</sup>, Teizo Fujita<sup>3</sup> and Kazuhiko Matsuno<sup>1</sup><sup>1</sup>Dept. Laboratory Medicine, <sup>2</sup>Dept. Pediatrics, Hokkaido University School of Medicine,<sup>3</sup>Dept. Biochemistry, Fukushima Medical College

## 【はじめに】

マンノース結合蛋白 (mannose-binding protein : MBP) はC1qと構造的に類似したC型レクチンで、マンノースあるいはNアセチルグルコサミンを有する微生物に結合し、補体を介して異物排除に働く<sup>1)</sup>。MBPによる補体活性化のメカニズムについては、MBPが糖鎖リガンドに結合の際、未活性型C1r<sub>2</sub>-C1s<sub>2</sub>がMBPに結合してC1sの活性化を起こすとの報告もなされているが<sup>2) 3)</sup>、生理的条件下では、C1rやC1sとは異なるセリンプロテアーゼ(MBP associated serine protease: MASP)がMBPと複合体を形成してC4,C2活性化能を発揮していると考えれる<sup>4)</sup>。我々はMBP精製の過程で $\alpha_2$ マクログロブリン( $\alpha_2M$ )がMBPとassociateしていることを見いだした<sup>5)</sup>。 $\alpha_2M$ はprotease阻害活性を持つため、MBPとMASPの複合体におけるMASPの活性を制御している可能性が考えられる。今回は $\alpha_2M$ のMASP-MBPへの結合性ならびに阻害作用について解析を行なった。

## 【方法】

MBP, MASP,  $\alpha_2M$  間の結合性

結合性は各抗体を固定化し、ビオチン化した2次抗体で検出するサンドイッチELISA法で検索した。即ち、血清の希釈系列を固相化した抗MBPまたは抗MASP抗体に反応させ、CaあるいはEDTA存在下でのMBP, MASP,  $\alpha_2M$ の結合状態をELISAで検査した。

MBP-MASP- $\alpha_2M$  複合体の検索

ヒト血清からのMBP, MASP,  $\alpha_2M$ の分離は未修飾Sepharose 6Bのアガロースをリガンドとするaffinity column、および抗 $\alpha_2M$ 抗体affinity columnで行なった。

カラム溶出液からのMASPの検出はdot blottingにて行なった。プロテアーゼのエステル分解活性は人工基質BAPNA (benzoyl L-arginine p-nitroanilide hydrochloride)を用いて検出した。ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)はSDSと1%アガロースを含む3%PAGEを行なった。

MASPに対する $\alpha_2M$ の阻害活性

MASPによるレクチン経路活性化への $\alpha_2M$ の阻害能はマンナン結合ヒツジ赤血球 (E. mannan) の溶血活性により測定した。即ち、E. mannanとMBP-MASPをインキュベート

し、更に種々の濃度の  $\alpha_2M$  とインキュベート後、C4及び<sup>125</sup>I-C2を反応させC3コンベルターゼを形成させた後、C-EDTAを加えて溶血活性を測定した。

## 【結果】

### MBP, MASP, $\alpha_2M$ 間の結合性

MBP, MASP,  $\alpha_2M$  3者間の結合性について検索した。一次抗体が抗MBP抗体、二次抗体が抗MASP抗体のELISAを行うとEDTAにより発色が抑えられることよりMBPはMASPとCa依存性に結合していることがわかった (図1A)。同様に一次抗体が抗MBP抗体、二次抗体が抗 $\alpha_2M$ 抗体のELISAを行うとEDTAにより発色が抑えられることよりMBPと $\alpha_2M$ との結合もCa依存性であることがわかった (図1B)。ところが一次抗体が抗MASP抗体、二次抗体が抗 $\alpha_2M$ 抗体のELISAを行うとEDTAによっても発色が抑えられないことより、MASPと $\alpha_2M$ との結合はCa非依存性であることがわかった (図1C)。

### MBP-MASP- $\alpha_2M$ 複合体の検索

ヒト血清を塩化カルシウムを含む緩衝液で希釈し、未修飾のSephrose 6Bのアガロースをリガンドとするaffinity columnにかけた。マンノース溶出画分にはMBP, MASP,  $\alpha_2M$ のいずれもが検出された。この画分を濃縮し、塩化カルシウムを含む緩衝液で透析後、抗 $\alpha_2M$ 抗体を結合したSephrose 4Bのaffinity columnにかけた。アガロース部分に吸着した蛋白質はマンノースで溶出し、更にEDTAを含む緩衝液でCa依存性のレクチン結合を切断しカラムを充分洗った。抗 $\alpha_2M$ 抗体に結合した蛋白質はglycine-HClの酸性条件下で溶出し、溶出液を溶出直後にTrisの結晶粉末で中和した。マンノース溶出画分にはMBPとMASPが含まれプロテアーゼのエステル分解活性がみられたが、酸溶出画分には $\alpha_2M$ とMBPとMASPの三者が含まれエステルの分解活性はみられなかった。マンノース溶出画分を濃縮し、EDTAを含む緩衝液で透析後、同緩衝液で平衡化したFPLC Superose 6のゲル濾過カラムにかけた。マンノース溶出画分からはMBPが高分子側に、MASPが低分子側に分離して溶出された。分子量はMBPが650KDa、MASPが85KDaといわれているのでMBPとMASPはEDTAの作用により結合がはずれて溶出されたものと考えられた。この画分には分子量720KDaの $\alpha_2M$ は検出されなかった。抗 $\alpha_2M$ 抗体結合Sephrose 4B affinity columnからの酸溶出画分もEDTAを含む緩衝液で透析後、同緩衝液で平衡化したFPLC Superose 6のゲル濾過カラムにかけた。酸溶出画分からはMBPとMASPと $\alpha_2M$ が高分子側のほぼ同一の位置に溶出された。特にMASPは低分子側には検出されず、void volume直後からの極めて高分子量の位置に出現することよりMASPはMBP-MASP- $\alpha_2M$ 複合体の形で存在するものと考えられた。また、MBP-MASP、MASP- $\alpha_2M$ 、 $\alpha_2M$ -MBP複合体のいずれにおいてもそのピークは高分子量の同一位置に出現した。カラム溶出液をvoid volume以降、各フラクションに分けて濃縮し、SDSと1%アガロースを含む3%ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) ならびにwestern blottingを行なった (図2)。この場合もMASPは低分子としては検出されず、MASPと $\alpha_2M$ が高分子側の同一の位置に確認された。

### MASPに対する $\alpha_2M$ の阻害活性

図3に示すように、MBP-MASPが結合したE. mannanの溶血の程度は $\alpha_2M$ の添加量に応

じて減少したことより、 $\alpha_2M$ がMASPによる補体活性化を阻害していることが示された。このことは、MBPとMASP二者のみを含む画分にはプロテアーゼのエステル分解活性がみられるが、MBPとMASPの他に $\alpha_2M$ をも含む画分では活性がみられなかった前述の結果と一致している。

#### 【考察】

MBP, MASP,  $\alpha_2M$ の結合を見ると、MBPはMASPと $Ca^{2+}$ 依存性に結合し、 $\alpha_2M$ はMASPと直接結合して、全体的にはMBP-MASP- $\alpha_2M$ の順で結合した複合体を形成していると考えられた。また、カラムクロマトグラフィーとPAGEならびにwestern blottingによりMASP- $\alpha_2M$ 複合体が実在することが確認された。更に、MASPのプロテアーゼ活性は $\alpha_2M$ によって阻害されることが示された。このことより、protease inhibitorである $\alpha_2M$ がserine proteaseであるMASPをとらえ、MBPが補体系に参与するのを制御している可能性が類推された。

#### 【文献】

- 1)Turner M.W., Biochem. Soc. Trans. 22, 88 (1994)
- 2)Ohta M. et al., J.Biol.Chem. 265, 1980 (1990)
- 3)Lu J. et al., J.Immunol. 144, 2287 (1990)
- 4)Matsushita M. et al., J.Exp.Med. 176, 1497 (1992)
- 5)Terai I. et al., Biochem.Med.Metabol.Biol. 50, 111 (1993)

## 図の説明

- 図1 ELISAによるMBP, MASP,  $\alpha_2$ M間の結合性の検討  
aMBP-aMASP, aMASP-a $\alpha_2$ M, a $\alpha_2$ M-aMBPはそれぞれ前者を固相化、  
後者を二次抗体として行なった
- 図2 FPLC Superose 6 (酸溶出画分) カラム溶出液の、SDSと1%アガロースを含む  
3%ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)、ならびにwestern blotting
- 図3 MASP活性の $\alpha_2$ Mによる阻害

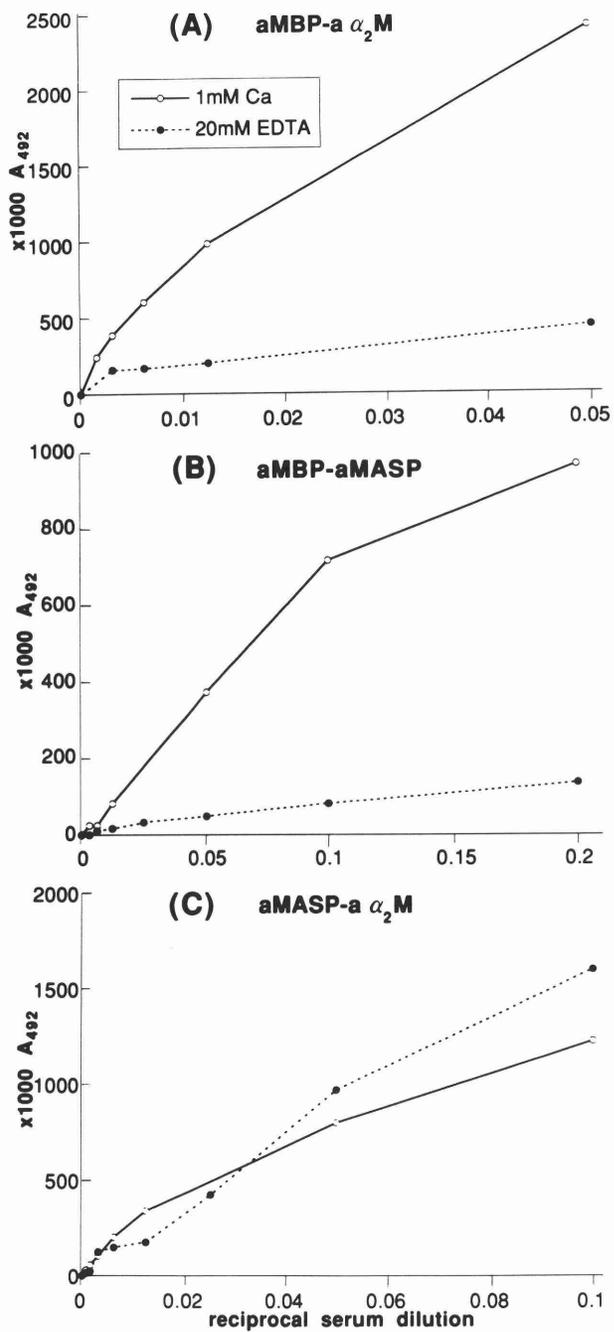


图1

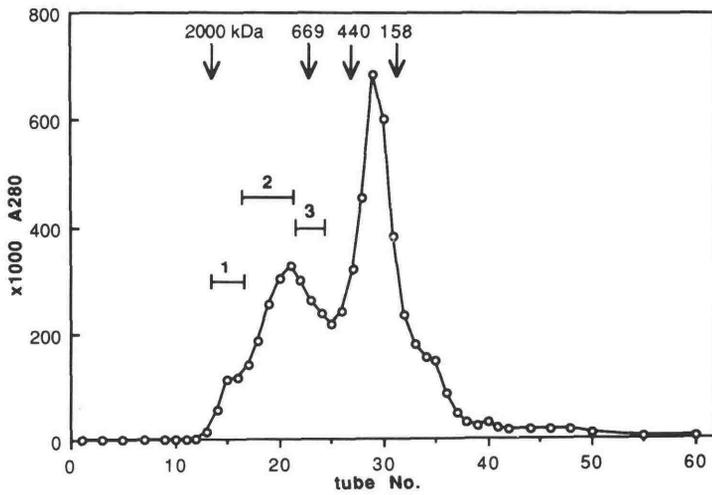
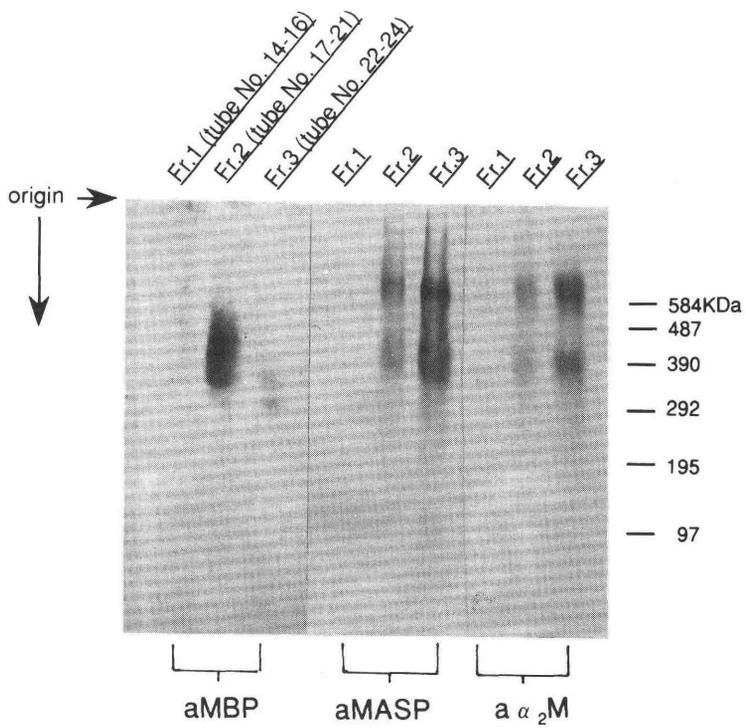


图2

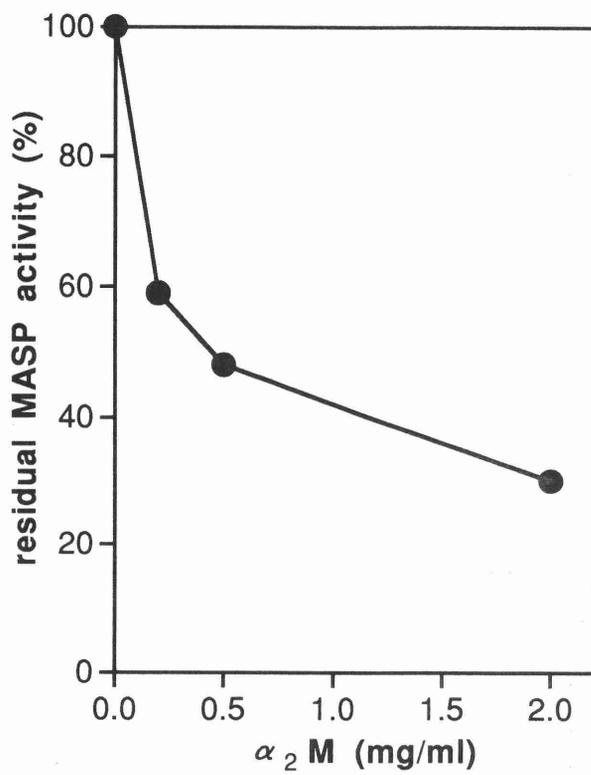


图3

三輪隆史、野中真弓、岡田則子、細川雅人、野中勝<sup>1</sup>、岡田秀親  
名古屋市大・医・分子研・生体高分子、<sup>1</sup>生化2

Gene Analysis of Guinea Pig Decay Accelerating Factor  
Takashi Miwa, Mayumi Nonaka, Noriko Okada, Masato Hosokawa  
Masaru Nonaka<sup>1</sup> and Hidechika Okada  
(Departments of Molecular Biology and<sup>1</sup> Biochemistry,  
Nagoya City University School of Medicine)

#### <はじめに>

我々は補体制御膜因子と疾患との関係及び異種移植における補体制御膜因子の役割を明らかにする目的で、ヒト及び実験動物（モルモット、マウス、ラット）における補体制御膜因子の研究を行ってきた。昨年の本シンポジウムにおいて、モルモットDAF cDNAクローニングについて報告した<sup>1)</sup>。その中でモルモットDAFには多数のアイソフォームが存在し、そのhydrophobicityパターンからヒトDAFでは見られない膜結合型DAFの存在を示唆する結果を示した（図.1）。今回我々はhydrophobicityパターンからGPIアンカー型、膜貫通型、分泌型と予想されたクローンが実際に膜上で発現するかどうか検討するために、各タイプのcDNAクローンをCOS-7に遺伝子導入し膜上での発現の有無を調べた。また多数のアイソフォームがalternative-splicingによるものなのかどうか検討するため、遺伝子クローニングを行いその構造を解析した。

#### <材料と方法>

##### 1. モルモットDAFcDNAクローンのCOS-7における発現

pCDM8発現ベクターに組み込んだモルモットDAFcDNAクローンをDEAE-デキストラン法によりCOS-7に導入し、発現されるDAF蛋白の存在様式について#44抗体<sup>2)</sup>（抗モルモットDAF抗体）を用いてFACSscanおよびWestern-Blotting法により検討した。また膜上での発現が認められたクローンは、PIPLC感受性についても検討した。

## 2. ゲノムDNAライブラリーのスクリーニング

ラムダEMBLファージモルモット肝ゲノムDNAライブラリーをモルモットDAFcDNAをプローブとしてスクリーニングを行った。その結果12個のポジティブクローンを得た。ファージDNAをEcoRI、BamHI、HindIIIの制限酵素で処理し、モルモットDAFcDNAでハイブリダイゼーションを行い、エクソンを含むゲノムDNAフラグメントを確認した。それをもとにモルモットDAFゲノムDNAの制限酵素地図を作製した。またエクソンを含むゲノムDNAフラグメントはpBluescriptIIsk(+)ベクター及びpGEM4ベクターにサブクローニングし、エクソンの塩基配列を確認し、エクソン・イントロンの境界を明らかにした。

### <結果と考察>

1. 前回得られたクローンをCOS-7に導入し、その発現及びPIPLC感受性を調べた結果、hydrophobicityパターンから予想されたGPIアンカー型、膜貫通型、分泌型の存在が確認された。特に、ヒトでは報告されていないドメイン e によりコードされる hydrophobic な21個のアミノ酸の部分が膜貫通ドメインとして機能するものと思われ、DAFの新しい存在様式として膜貫通型が存在することが明らかとなった。
2. モルモットDAF遺伝子は全長約30kbで12個のエクソンで構成され、すべてのエクソン・イントロンの境界でGT/AGの配列が保存されていた(図.2)。得られたゲノムDNAクローンの制限酵素地図からモルモットDAF遺伝子のコピーは1つであり、多数のアイソフォームはalternative-splicingによって生じたものであることが確認された。ST-a、ST-b、ST-cは1つのエクソンによってコードされ、そのエクソン内にあるスプライス部位の使われ方で長さの異なる Ser/Thr-rich region を形成していた。ST-d は2つのエクソンによってコードされ、それぞれヒトDAF遺伝子のST-B、ST-Cに対応していた。e、f は異なるエクソンでコードされ、膜結合様式決定に重要なエクソンであるが、これらのエクソンの選択はoptionalであり、eのみおよびe、fの両方が選択された場合は cytoplasmic 領域の異なる2種類の膜貫通型(図.1, TM1およびTM2)が生じ、fのみが選択された場合には分泌型となり(SEC)、どちらも選択されなかった場合にはGPIアンカー型(GPI)となることが明らかとなった。最後の最も長いエクソンは e および f の選択のされ方によりアミノ酸への翻訳のされ方が異なり、3通りのアミノ酸配列と全く翻訳されない場合が生じた。また、モルモット小腸 cDNA library より前回の報告には無かったGPIアンカー型で Ser/Thr-rich region に変異を持つクローン(GDaおよびGDabc)が得られており、Ser/Thr-rich region をコードするエクソンST-abcのスプライシングとエクソン e、f のスプライシングとの間には相

関性は無いと思われた。

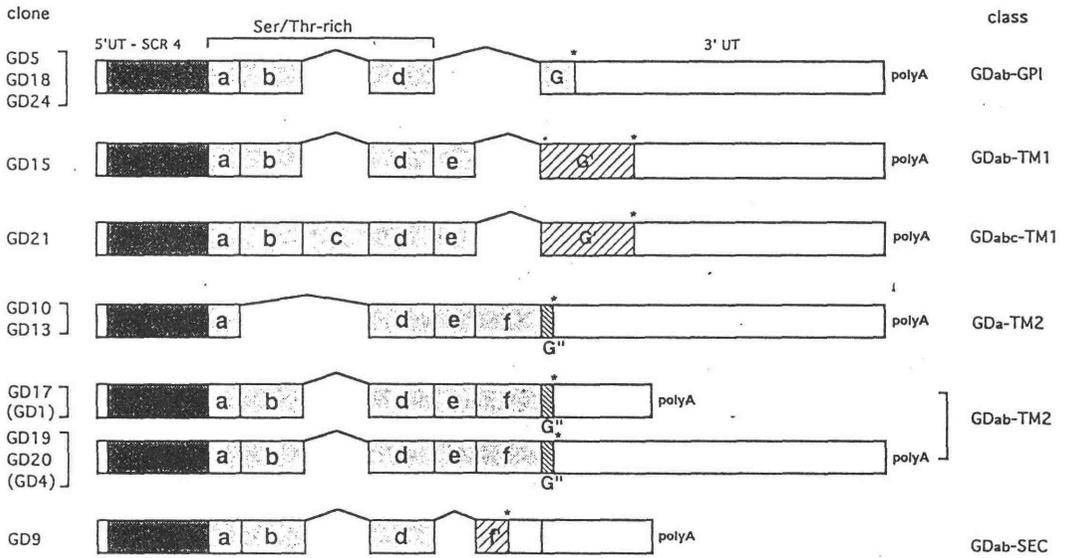


図.1 mRNAアイソフォームの模式図

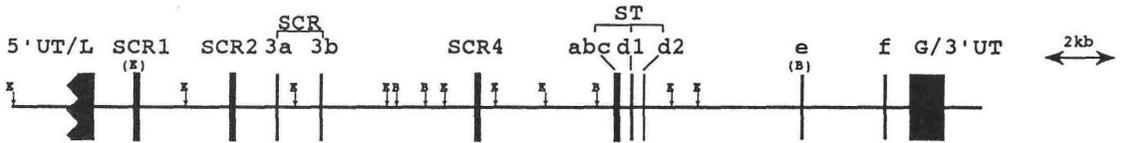


図.2 モルモットDAF遺伝子の構造

<文献>

- 1) 野中真弓 et al., 第31回補体シンポジウム講演集 15 (1994)
- 2) N.Okada et al., J.Immunol., in press (1995)

## Decay accelerating factor(DAF)の介する シグナル伝達メカニズムの解析

藏屋幹夫、藤田禎三

福島県立医科大学学生化学第二講座

**Analysis on Decay accelerating factor-carrying signal transduction**

**Mikio Kuraya and Teizo Fujita**

**(Department of Biochemistry, Fukushima Medical College)**

### [目的]

Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-アンカー型タンパク質は細胞質部分を持たないタンパク質であるが、特異的な抗体、あるいはリガンドにより、細胞の活性化が引き起こされる<sup>1)</sup>。このような GPI-アンカー型タンパク質が介するシグナル伝達の報告は数多くなされており、その過程で裏打ちタンパク質である src-ファミリーのチロシンキナーゼ (lck, fyn, lyn)がリン酸化されることも解っているが<sup>2)</sup>、依然、膜表面の GPI-アンカー型タンパク質とこれらチロシンキナーゼとの間で、どのようにシグナルが伝達されるのか不明なままである。我々はこのメカニズムを解明することを目的とし、作業仮説として膜貫通型タンパク質が GPI アンカー型タンパク質と会合することによって細胞外のシグナルが細胞内へと伝達されるものと想定した。この解析にあたって、GPI アンカー型タンパク質の一つで補体制御因子の DAF 分子をモデルとした。今回、免疫源として DAF 会合タンパク質を用いて得られたモノクローナル抗体が細胞膜表面の分子を認識すること、また、チロシンリン酸化を誘導することを見いだしたので報告する。

### [方法]

#### 1. DAF 会合タンパク質に対するモノクローナル抗体の作成

Burkitt lymphoma 由来 B 細胞株である Raji 細胞( $>2 \times 10^{10}$ )を  $N_2$  cavitation により破砕後、膜画分を回収し、1% NP-40-Tris-inhibitor 溶液にて溶解したものを抗 DAF 抗体結合アフィニティカラムにより、DAF および DAF 会合タンパク質を得た。この画分を免疫源とし、Western blotting にてスクリーニングして、モノクローナル抗体を作成した。

## 2. フローサイトメトリーによる 2E12-G7 抗原の発現スペクトル

反応性の良好な抗体 2E12-G7 を用いて、種々の細胞系[B 細胞系: Raji、Bjab、正常末梢血 B 細胞、T 細胞系: MT-2、Molt3、Jurkat、正常末梢血 T 細胞、前骨髄性単球系: U937、THP-1、正常末梢血単球、好塩基球系 KU812F、PNH 患者由来細胞株 JYm21.2 (阪大、木下タロウ先生より分与)]での発現を FACScan により検討した。

## 3. 膜表面タンパク質のビオチン化と免疫沈降

2E12-G7 抗原の分子サイズを決定する目的で、Raji 細胞を水溶の sulfo-n-hydroxylsuccinimide と 4°C で、30 分反応させ、ビオチン化した。この NP-40 可溶化溶液を 2E12-G7 抗体で免疫沈降後、SDS-PAGE を行い、さらに Immobilon-P に転写し、HRP 結合 Avidin を反応させ、Enhanced chemiluminescence kit(ECL)により発色後、X 線フィルムを感光させ、バンドを観察した。

## 4. 細胞刺激

細胞を 2E12-G7 抗体と 37°C で、10 分インキュベートし、直ちに、可溶化後、直接、あるいは抗ホスホチロシン抗体(PY20)にて免疫沈降したのち、SDS-PAGE を行い、Immobilon-P 膜に転写後、再度 PY20、続いてパーオキシダーゼ結合抗マウス抗体を反応させ、ECL により発色後、X 線フィルムを感光させ、バンドを観察した。

## [結果]

1. 作成したモノクローナル抗体は 2E12-G7、3H6-A4-B1、5B10-B1、6E5-B1、10E9-G1 の 5 クローンで、全て、IgM/k であった。この中で 2E12-G7、3H6-A4-B1、6E5-B1 が Raji 細胞と反応することがフローサイトメトリーにより確認できた。最も反応性の良好なクローンは 2E12-G7 であり、以後、この抗体を用いて解析を行った。

2. 2E12-G7 抗原は、Raji 細胞の他、Bjab、MT-2、Molt3、Jurkat および正常末梢血 T、B 細胞、単球で発現が認められた。一方、U937、THP-1 あるいは K812F では陰性であった。これは分化状態に依存して発現することを示唆するものであるかもしれない。また、DAF 完全欠損ではない(低レベルの DAF を発現している) PNH 患者由来 JYm21.2 細胞では、その DAF レベルと同程度の 2E12-G7 の発現が見られた。

3. 2E12-G7 で Raji 細胞を刺激すると、チロシンリン酸化された分子量約 80、70、56、53、44、42 kDa の分子が観測された。これは 2E12-G7 抗原が細胞外から細胞内へのシグナル伝達能を有することを示す。

4. NP-40 で可溶化したビオチン標識膜タンパク質を 2E12-G7 抗体で免疫沈降し、SDS-

PAGE、Electroblotting を行い、Avidin 結合 HRP で染色した結果、得られた特異的なバンドは還元下で、約 70、43-45kDa のサイズであった。現在、intact なサイズの 2E12-G7 抗原分子については検討中である。

#### [結論]

樹立した 2E12-G7 抗体の認識する分子は少なくとも一部は膜表面にあり、DAF に会合している。さらに 2E12-G7 抗体による刺激により、チロシンリン酸化が誘導されることから、DAF が介するシグナル伝達系のなかで、DAF 分子と src ファミリーのチロシンキナーゼとの間、即ち、DAF の直ぐ下流で、src ファミリーのチロシンキナーゼの上流に位置する分子であると推測される。

#### [文献]

- 1) Robinson P.J. Immunology Today, 12, 35 (1991)
- 2) Brown D. Curr. Opin. Immunol., 5, 349 (1993)

## ヒト精巣より得られた新種の CD46 (membrane cofactor protein) splicing product

原とも子<sup>1</sup>, 松本美佐子<sup>1</sup>, 北村雅哉<sup>1</sup>, 畑中道代<sup>1</sup>, 瀬谷 司<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>大阪府立成人病センター研究所 第6部, <sup>2</sup>新技術事業団 さきがけ研究21

A novel splicing product of CD46 obtained from the human testis

T.Hara<sup>1</sup>, M.Matsumoto<sup>1</sup>, M.Kitamura, M.Hatanaka<sup>1</sup> and T.Seya<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Immunology, Center for Adult Diseases, Osaka,

<sup>2</sup>PRESTO, Research Development Corporation of Japan)

### [背景及び方法]

精子はハプロイドの特殊な分化細胞で精巣内で精原細胞, 精母細胞から増殖・分化する。精子の表面抗原の種類及び分布は体細胞のそれと著しく異なり、メッセージも極めて限定される。精子には大量の CD46 が表現されるが、matured spermatozoa では inner acrosomal membrane (ゴルジ相同器官) に分布が限られる。精子 CD46 は卵との受精時 capacitation によって表面に現われ、卵との結合に関与すると考えられている。O-linked 糖鎖を欠く分子量 42kDa の特殊な CD46 variant であることが報告されている。一方、精漿中には微小膜構成物 (prostasome) に結合している分子量 60kDa の可溶性 CD46 があり、精子を女性生殖器内のアロ抗体や補体から守っていると考えられている。

我々はこの2種の semen-related CD46 を精製し、性質を調べてきた。60kDa の CD46 variant は他の膜型 CD46 と類似の糖鎖修飾を受けているのに対し、42kDa の精子膜上の CD46 variant は糖鎖を欠くせいで他の CD46 より著しく小さい分子量となる。シアル酸などの糖鎖を欠くことは CD46 が卵の ligand と結合するのに必要な性質と考えられている。この 42kDa variant の serine-threonine-rich domain (ST), transmembrane (TM), cytoplasmic tail (CY) の情報が不明で、異形の原因は明かでなかった。今回、我々は精巣より mRNA を調製し、3'-RACE 法と RT-PCR 法によって多数の CD46 variant の cDNA を得た。CHO cell の発現系で約 40kDa の小型の CD46 variant の発現に成功し、その性質を調べたので報告する。

## 【結果及び考察】

3'-RACE 法で得られた産物を DNA sequencing した。一種類特殊な TM と CY を持つ産物 (ST<sup>c</sup>/TM2/CY4) を得た。一般に既報の CD46 の TM は 2 つの exon (11, 12) でコードされるのに対し、この CD46 variant は exon 11 のみでコードされる短い TM (TM2) を持つこと、これまで報告にない CY (CY4) を持つことが判明した。類似のクローンが胎盤より得られており (図1 の CY3 variant)、これらは生殖器あるいは spermatozoa に特有なクローンの可能性がある。sequence の比較を図1 に示す。

CHO cell の発現系でこの cDNA は O-linked sugar を欠く分子量 40kDa を示し、精子上の CD46 variant と構造的に類似した。CHO cell は一般的に (他の ST domain を持つ CD46 variants を含めて) O-glycosylation する。また、CY2 variant は long tail で CY1 variant より細胞内滞留時間が長い。従って、CD46 では CY の性質がゴルジ (or inner acrosomal membrane) での滞留時間を決定する要因である可能性が高く、この点と CY4 の関連を検討する予定である。もしこの ST<sup>c</sup>/TM2/CY4 variant が精子 CD46 であれば、1) O-glycosylation を受けないのは ST 領域の変異のためや transferase 活性が精子にないためという可能性のみでなく、TM, CY の性質がゴルジでの糖鎖修飾に関与すること、2) TM2/CY4 が CD46 をゴルジに滞留させる要因の一つであることを示唆する。現在、これらの可能性を検証中である。さらに ST<sup>c</sup>/TM2/CY4 variant について補体制御能、麻疹ウイルス感染能などの機能を調べる予定でいる。

## References

1. Hara, T., S. Kuriyama, H. Kiyohara, Y. Nagase, M. Matsumoto, and T. Seya. 1992. Soluble membrane cofactor protein (MCP, CD46): its presence in normal human plasma, tears, and seminal fluid. Clin. Exp. Immunol. 89: 490-494.
2. Seya, T., T. Hara, M. Matsumoto, H. Kiyohara, I. Nakanishi, T. Kinouchi, M. Okabe, A. Shimizu, and H. Akedo. 1993. Membrane cofactor protein (MCP, CD46) in seminal fluid and on spermatozoa in normal and sterile subjects. Eur. J. Immunol. 23: 1322-1327.
3. Kitamura, M., M. Namiki, K. Matsumiya, K. Tanaka, M. Matsumoto, T. Hara, H. Kiyohara, M. Okabe, A. Okuyama, and T. Seya. 1995. Membrane cofactor protein (MCP, CD46) in seminal plasma is a prostasome-bound form with complement regulatory activity and measles virus neutralizing activity. Immunology (in press).



豊村浩司<sup>1, 2</sup>、村上博<sup>2</sup>、重久保<sup>2</sup>、井上徳光<sup>1</sup>、竹田潤二<sup>1</sup>、木下タロウ<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>大阪大学 微生物病研究所                      <sup>2</sup>日本ハム（株）中央研究所  
 免疫不全疾患研究分野

Expression cloning and functional analysis of pig homologue of MCP (pMCP)  
 KOHJI TOYOMURA<sup>1,2</sup>, HIROSHI MURAKAMI<sup>2</sup>, TAMOTSU SHIGEHISA<sup>2</sup>,  
 INOUE NORIMITSU<sup>1</sup>, JUNJI TAKEDA<sup>1</sup>, TAROH KINOSHITA<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Department of Immunoregulation, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, <sup>2</sup>Laboratory for Bio-Resource Sciences, Research and Development Center, Nippon Meat Packers, Inc.)

(はじめに)

近年、ヒト補体制御因子のトランスジェニックブタからの臓器を用いて、異種移植を行う事を目指した研究が進んでいる。現在のところ、このトランスジェニックブタ作成に使われているプロモーターはヒト補体制御因子のものが多いが、我々は、補体制御因子のブタでの発現にはブタ由来の補体制御因子のプロモーターがより有効ではないかと考えた。そこで、このプロモーターを獲得するため、ブタ補体制御因子のcDNAの発現クローニングを試みたところ、細胞にブタ補体に対する抵抗性を付与し、ヒトMCPに高い相同性を示すcDNAを獲得したのでここに報告する。

(方法)

ブタにおける補体制御因子高発現部位と考えられる血管内皮樹立細胞株（ルドウィヒ研究所 宮園浩平先生より供与）<sup>1</sup>よりmRNAを調整し、発現クローニング用cDNAライブラリー<sup>2</sup>を作成した。このcDNAライブラリーをヒトBリンパ芽球細胞株であるJY25（ $1 \times 10^8$ ）にエレクトロポレーション（ $960 \mu\text{F}$ 、 $250\text{V}$ ）した後、ハイグロマイシンB（ $400 \mu\text{g/ml}$ ）でトランスフェクタントをセレクションし、1週間後、ブタ補体（10%）によるセレクションを行った。セレクションは、PBSで2回洗浄した細胞

( $1 \times 10^7$ ) を直前に混合したセレクション用D.MEM (10%ブタ血清、抗HLA クラスI抗体、抗DAF抗体、抗MCP抗体を含むもの) に懸濁後、37°Cで2時間反応させて行った。反応後、1回D.MEMで洗浄した後、生細胞数をトリパンブルー染色で数え、D.MEM (20%FCS) で一日培養した。その後は、ハイグロマイシンBによるセレクションを細胞数が元に戻るまで(約1週間)行い、再びブタ補体によるセレクションを行った。このセレクションは、補体反応後の生細胞数が上昇するまで繰り返し行なった(今回は3回)。そして、生細胞数が20%となった細胞集団より、Hirt法によりプラスミドを回収した。この中からcDNAの長さおよび頻度より適当と考えられたcDNAを再度JY25にエレクトロポレーションしブタ補体に対する抵抗性を調べた。尚、抗MCP抗体(M-75)は、大阪府立成人病センターの瀬谷司先生、松本美佐子先生から供与された。抗HLAクラスI抗体はATCCから入手した。

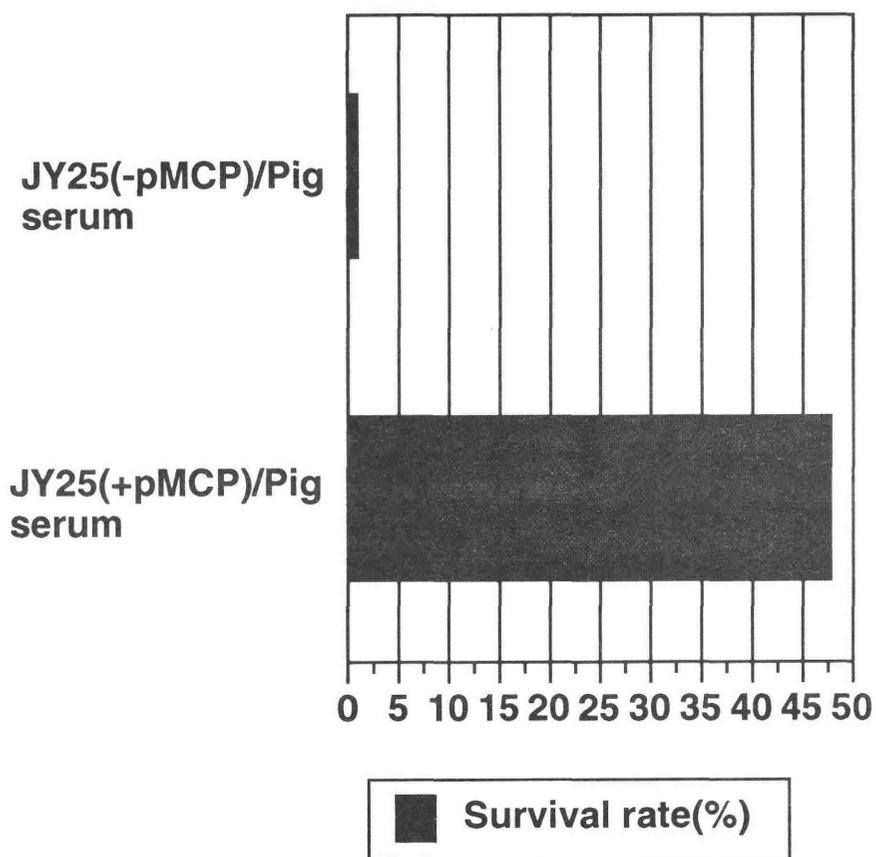
#### (結果)

得られたcDNAの一つはJY25にブタ補体に対する抵抗性を付与した(図.1)。このcDNAは5'UTからpolyAシグナルまでを含む1365bpの大きさで、そのうち約600bpの翻訳領域ではヒトMCPと高い相同性(約70%)を示した。予想される蛋白質は、全アミノ酸配列として363アミノ酸で、ヒトMCPの4つのSCRを形成している16個のシステインの位置は完全に保存されている。ヒトMCPとブタMCPとのアミノ酸レベルにおける相同性は約40%であった。また、ブタMCPは膜貫通ドメインを持っておりGPIアンカー生合成異常(PIG A欠損)細胞であるJY5に本cDNAをトランスフェクションした場合においても抵抗性を示した。更に、本蛋白質はブタ血清のみならずヒト血清に対しても抵抗性を示した。

#### (考察)

本蛋白質のコファクター活性の検討が必要であるが、これまでの結果より、本蛋白質は、MCPのブタホモログ(pMCP)といえるもので、霊長類を除けばヒト以外で初めてMCP様の補体制御因子が確認された例であると考えられる。本蛋白質は、そのシステインの配置の保存性およびヒト血清に対する抵抗性等、その機能はある程度保存されているものと考えられる。しかし、ヒトMCPとブタMCPとのアミノ酸レベルにおける相同性が40%であるなど全般的にはそれほど一致してはいない。今後は、本蛋白質のプロモーター領域の解析やブタ組織での分布などを更に検討する予定である。

- 1)Miyazono K. et al., EMBO J., 10, 1091 (1991)  
2)Miyata T. et al., Science, 259, 1318 (1993)



(図.1) pMCPのブタ補体に対する抵抗性

## 麻疹ウイルスレセプターとしての補体制御因子, CD46 (membrane cofactor protein)

栗田光恵<sup>1</sup>, 柳 雄介<sup>2</sup>, 岩田和憲<sup>3</sup>, 原とも子<sup>1</sup>, 松本美佐子<sup>1</sup>, 瀬谷 司<sup>1,4</sup>, 長澤滋治<sup>3</sup>  
<sup>1</sup>大阪府立成人病センター研究所 第6部, <sup>2</sup>東京大学医学部 細菌学講座,  
<sup>3</sup>北海道大学薬学部 衛生化学講座, <sup>4</sup>新技術事業団 さきがけ研究21

### CD46 : a measles virus receptor

M.Kurita<sup>1</sup>, Y.Yanagi<sup>2</sup>, K.Iwata<sup>3</sup>, T.Hara<sup>1</sup>, M.Matsumoto<sup>1</sup>, T.Seya<sup>1,4</sup> and S.Nagasawa<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Immunology, Center for Adult Diseases, Osaka,

<sup>2</sup>Department of Bacteriology, Tokyo University,

<sup>3</sup>Department of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University,

<sup>4</sup>PRESTO, Research Development Corporation of Japan)

#### [はじめに]

細胞融合はニューロンのシナプス形成、受精、感染などに見られる生命現象である。そのメカニズムには不明な点が多い。influenza virus の感染における細胞融合が最もよく研究されており、リガンド(ウイルスエンベロープ上の蛋白質(HA))がターゲット細胞上のreceptor(Glycophorinなどシアル酸含有蛋白質)と結合しfusionを誘起する。細胞内でウイルスはreplicateしbuddingやアポトーシスを引き起こす。近年、多くの補体制御因子がshort consensus repeat(SCR)からなるgene familyであること、その多くがvirus receptorとして機能することが判明した。CD46(membrane cofactor protein, MCP)も麻疹virus(MV)receptorとして機能することが明かになった。即ち、麻疹ウイルス上のH-proteinがCD46のSCR1,2と結合し、complexが細胞内にinternalizeされ、数日後に細胞融合を起こす。私達はwild type(ST<sup>C</sup>-CYT2)及びPI-anchor versionのCD46をCHO cellに発現させ、麻疹ウイルスの結合及び細胞融合を調べたところ、transmembrane(TM)、cytoplasmic tail(CYT)を欠くPI-anchor formでは細胞融合(合胞体形成)が著しく低下することを見出した。このメカニズムについて調べたので報告する。

#### [方法]

Virus binding は高濃度の MV と CD46 発現細胞 (CHO cell) を 0℃、2 時間 incubate し、細胞結合した麻疹ウイルスを抗 H モノクローナル抗体と flowcytometry で査定した。CD46 の internalization は  $^{125}\text{I}$  ラベルした M160 F(ab) $_2$  (麻疹ウイルス結合を阻害しない抗 CD46 抗体) をトレーサーとして細胞上・細胞内の CD46 量を求め、査定した。合胞体形成は 0.5 ~ 500 pfu のウイルスを 80% confluent の vero cell または各種 CD46 を発現させた CHO cell の monolayer に inoculate し、0.5% agarose を含む基本培地中で 96 時間 incubate した。形成された合胞体の数とウイルス濃度から感染効率を求めた。これらの手順は柳らの MV binding assay、plaque forming assay に準じた。各種 CD46 variant は岩田らによって報告されたものを用いた。蛍光抗体法を含む細胞生物学的手法は既報によった。

### [結果及び考察]

図 1 に示す ST<sup>C</sup> CYT2 の wild type、 $\Delta$ CYT (九州大学医学部柳先生より供与)、Ser/Thr-rich domain (ST 部分) が DAF の PI-anchor 型 MCP、ST 部分が MCP (ST<sup>C</sup>) の PI-anchor 型 MCP、ST 部分に DAF の 4 つの SCR を挿入した PI-anchor 型 MCP (hybrid) を作製し、MV 結合能、internalization、replication 及び合胞体形成能を調べた。

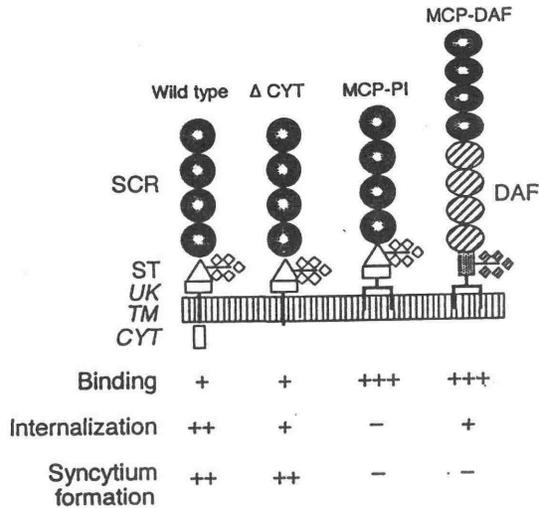
1. SCR1, 2, 3 をそれぞれ特異認識するモノクローナル抗体及び ST<sup>C</sup> を特異認識するポリクローナル抗体及び抗 DAF 抗体 (D17) を用いた flowcytometry によって CD46 の各種 variant が CHO cell 上に発現していることを確認した。mean fluorescence shift は 20 ~ 60 のものを選んだ。
2. Flowcytometry で MV の initial binding を anti-H を使って調べた。全ての CD46 variant に MV は結合した。一般に PI-anchor formの方が TM を持つ wild type、 $\Delta$ CYT に比べて高い binding shift を示した。
3.  $^{125}\text{I}$  ラベル M160 のトレーサー実験では TM、CYT の完全な CD46 で最も効果的な CD46 の internalization が観察された。internalization は 37℃で MV 結合後 3 時間から見られ、6 時間で最大になった。 $\Delta$ CYT でも同様の傾向が見られたが、取り込み効率は wild type ほど高くなかった。MCP-DAF hybrid の PI 型では僅かの取り込みが起きたが、PI-anchor 型では全く CD46 の entering は観察されなかった。

4. CD46 の surface expression 変化を調べると MV 刺激後 15 時間、21 時間で wild type のみで mean shift の低下が見られた。hybrid 及び $\Delta$ CYT では取り込みが見られたにも拘わらず、CD46 の表現量は不変かむしろ増加した。
5. Anti-H の蛍光染色で 72 時間後以降に MV の replicate が証明できた。wild type CD46 と $\Delta$ CYT で強い replication が見られたのに対し、hybrid、PI-anchor 型では蛍光は極めて弱くしか検知できなかった。
6. hybrid を含む 2 種の PI-anchor form で合胞体形成は高濃度のウイルスによっても起きなかったのに対し、wild type,  $\Delta$ CYT は全て効率よく合胞体を形成した。

以上の結果を図1にまとめた。PI-anchor 型は outer membrane のPI に integrate されており細胞内 (TM, CYT) domain を欠く。一方、 $\Delta$ CYT は CYT のほぼ全てのアミノ酸を欠く。MV binding は全ての CD46 variant で起きるのに対し、Internalization、replication、合胞体形成は PI-anchor form で全く起きず、 $\Delta$ CYT で wild type と同様に起きる。このことは MV binding に必須な domain は SCR のみであること、及び TM が感染の成立、合胞体形成に必須であることを強く示唆する。

これまで合胞体はウイルス側の H 及び F protein のみによって形成されうる細胞応答と考えられてきた。1993 年まで MV receptor (MV-H accepting molecule) は同定されてなかったため、ウイルス感染及び合胞体形成へのレセプターの関与は明かでなかった。本研究結果は CD46 の transmembrane の領域が MV の entry 以降の細胞応答の過程に深く関与することを示唆している。一般にウイルスの internalization は細胞内シグナリングから細胞骨格系の活性化によって促進される反応と考えられるので、現在 CD46 の TM にこれら一連のプロセスを引き起こす鍵になる分子が associate している可能性を考えている。CD46 は C3b/C4b のレセプターでもある。同様の internalization  $\rightarrow$  細胞応答が補体の活性化でも誘起されるか検討する予定である。

図1 MCP の細胞膜貫通領域及び細胞内領域の麻疹ウイルス感染に及ぼす影響



## References

1. Iwata, K., T. Seya, H. Ariga, S. Ueda, and S. Nagasawa. 1994. Modulation of complement regulatory function and measles virus receptor function by the serine-threonine-rich domains of membrane cofactor protein (CD46). *Biochem. J.* 304:169-175.
2. Yanagi, Y., H-L. Hu, T. Seya, and H. Yoshikura. 1994. Measles virus infects mouse fibroblast cell lines, but its multiplication is severely restricted in the absence of CD46. *Arch. Virol.* 138:39-53.
3. Iwata, K., T. Seya, Y. Yanagi, J. M. Pesando, P.M. Johnson, M. Okabe, S. Ueda, H. Ariga, and S. Nagasawa. 1995. Diversity of the sites for measles virus infection and for inactivation of complement C3b and C4b on membrane cofactor protein (MCP, CD46). *J. Biol. Chem.* (in press).
4. Seya, T. 1995. Human regulator of complement activation (RCA) gene family proteins and their relationship with microbial infection. *Microbiol. Immunol.* (in press).
5. Seya, T., M. Kurita, T. Hara, K. Iwata, M. Hatanaka, M. Matsumoto, Y. Yanagi, S. Ueda, and S. Nagasawa. 1995. Blocking measles virus infection by a recombinant soluble form of and monoclonal antibodies against membrane cofactor protein of complement (CD46). *Immunology* (in press).

## 補体第一成分C1sの新しい機能と骨端軟骨組織 における局在について

中川晃一、崎山比早子、栗岩和子<sup>1</sup>、今井一志、岡田保典<sup>2</sup>、  
加治和彦<sup>3</sup>、守屋秀繁<sup>4</sup>

1 放射線医学総合研究所生物影響研究部、2 金沢大学がん研究所分子免疫部門

3 東京都老人総合研究所アイソトープ研究室、4 千葉大学医学部整形外科

Novel functions of the first component of complement C1s and its localization in  
epiphyseal cartilage

(<sup>1</sup> The Division of Biology and Oncology, National Institute of Radiological Sciences

<sup>2</sup> The Department of Molecular Immunology, Kanazawa University Cancer Research Institute

<sup>3</sup> The Department of Biochemistry Isotopes, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology

<sup>4</sup> The Department of Orthopaedic Surgery, Chiba University School of Medicine)

### <はじめに>

近年我々は、補体第一成分C1sが従来より知られている補体の古典経路の活性化以外に、I, II, IV型コラーゲン、ゼラチンの分解<sup>1</sup>や matrix metalloproteinase-9の活性化<sup>2</sup>といった新しい機能を持ち、細胞外基質の分解に関与している可能性があることを報告してきた。さらに、我々はC1sがII型コラーゲンを主成分とする軟骨組織にも存在することを見出した。長管骨の骨化中心周辺では、軟骨細胞は肥大軟骨細胞へと分化した後に崩壊する。同時にそれを取り囲む細胞外基質は急速に分解され、骨髄へと置き換えられる。軟骨細胞では肥大軟骨細胞への分化に伴ってC1sの産生が増加する傾向を示し、このことは培養系を用いても確かめられた<sup>3</sup>。今回は、骨端軟骨組織におけるC1sの生理的機能解明の一環として、軟骨細胞外基質中の小分子プロテオグリカンの一つであるデコリンに対する分解活性、および、軟骨代謝や血管新生に強い影響を持つbFGFに対する作用について検討した。また骨端軟骨組織におけるC1sの局在を免疫電顕法にてさらに詳細に観察し、C1sの生理的機能について考察した。

### <方法>

1、C1sによるデコリンの分解活性の測定

デコリンに活性型 C1s を加えて 37℃、24 時間インキュベーションした。コンドロイチナーゼ ABC にて処理した後、SDS-PAGE を行い、デコリン分解の有無を検討した。

## 2、C1s と b FGF の相互作用

活性型および非活性型の C1s を b FGF と 37℃、一晩インキュベートした後、SDS-PAGE を行い、C1s と b FGF 間の結合や b FGF 分解の有無について検討した。

## 3、C1s の b FGF 活性に及ぼす影響

b FGF 活性の測定には、b FGF 存在下においてのみ増殖するヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いた。活性型および非活性型の C1s を b FGF と 37℃、5～18 時間インキュベートした後 HUVEC 培養液中に添加し、4 日間培養後の細胞数を数え、BSA とインキュベートした b FGF を加えた対照群と比較した。

## 4、軟骨細胞外基質中の C1s および b FGF の検出

ハムスター骨端軟骨細胞 (HAC) は *in vitro* で培養すると培養皿中に細胞外基質を形成しながら増殖する。confluent に達した後に細胞を掻き取り、コラゲナーゼや種々のグリカナーゼで処理して、細胞外基質より遊離してくる C1s および b FGF をウエスタン・ブロット法にて測定した。

## 5、免疫電顕による骨端軟骨組織の観察

生後 11 日目ハムスターの骨端軟骨組織を、抗 C1s 単クローン抗体 P G 11 を用いた免疫電顕法にて観察した。

## <結果>

- 1、デコリンは C1s の濃度依存性に分解された。細胞外基質分解に関して、C1s はコラーゲン、ゼラチンの分解能に加えて、デコリンのコア蛋白に対する分解活性も有していることがわかった。
- 2、C1s は活性型、非活性型を問わず b FGF とインキュベートすることによりこれと結合し、巨大分子を形成した。これを還元下で調べると b FGF と C1s は分離した。さらに b FGF の一部は活性型 C1s により分解されていた。このように C1s と b FGF の分子間に相互作用がみられたことから、C1s が b FGF の活性に対して与える影響について調べたところ、C1s は b FGF の活性を、非活性型で 59.3 %、活性型で 67.1 % 抑制した。また、コラゲナーゼ、グリカナーゼ処理により、C1s および b FGF が軟骨細胞外基質より遊離されたことから、C1s と b FGF がともに軟骨細胞外基質中に存在していることが確認された。

3、免疫電顕による骨端軟骨組織の観察の結果、C1sは軟骨細胞の細胞質や細胞膜上だけでなく、細胞周囲の細線維上にも存在していた。また細胞外のC1sは肥大軟骨層の中でも特に骨髄に近い部分で、分解された基質の断片や細胞の断片の周辺に多く付着していた。

#### <考察>

C1sはI, II, IV型コラーゲン、ゼラチンの分解活性を有するなど、細胞外基質の分解に関与していると考えられるが、軟骨組織にをけるC1sの生理機能に関しては、未だ不明な点が多い。今回の結果は、C1sが軟骨組織において、サイトカインの活性の修飾作用を有していることを示唆した。今回C1sが分解活性を持つことがわかったデコリンは、細胞外基質中におけるTGF- $\beta$ の活性調節因子として知られている<sup>4</sup>。またbFGFは軟骨細胞に対する増殖促進や、肥大軟骨細胞への最終分化抑制作用<sup>5</sup>、さらに血管内皮細胞増殖促進による血管新生作用等、多彩な活性を持つ。C1sは骨端軟骨組織においてbFGF活性の抑制を介して、軟骨細胞の分化に関与している可能性が示唆された。また軟骨は血管を欠く組織であり、bFGFが存在するのに何故血管が形成されないのかは大きな問題である。血管新生抑制物質としてchondromodulin-1が知られているが<sup>6</sup>、C1sもbFGFの作用を抑制することにより、血管新生に影響を及ぼしている可能性がある。しかし、この点に関しては、今後更に検討する必要があると考えられる。

C1sが軟骨細胞外基質をコラゲナーゼ、グリカナーゼで処理することにより遊離してること、および免疫電顕の所見より、C1sは軟骨細胞外基質中でコラーゲン線維に直接あるいは間接的に結合して存在していることと考えられた。またC1sは肥大軟骨層のなかでも特に骨髄に近い部分（後期肥大軟骨層）において、細胞外基質中での存在が目立ち、それらは基質や細胞の断片上に見られた。このことから、骨端軟骨組織においてC1sは、後期肥大軟骨層で細胞外に遊離し、軟骨組織の分解に関与していると考えられた。

#### <結論>

- 1、C1sは、デコリンのコア蛋白に対する分解活性を有していた。
- 2、C1sとbFGFはともに軟骨細胞外基質中に存在し、C1sはbFGFの活性を抑制した。
- 3、免疫電顕の所見より、C1sは特に骨端軟骨組織分解の最終段階に関与していると考えられた。

<文献>

- 1 Yamaguchi, K. et al., FEBS Lett., 268, 206, (1990)
- 2 Sakiyama, H. et al., Cell Tissue Res., 277, 239, (1994)
- 3 中川晃一 他、補体シンポジウム講演集, 31, 91, (1994)
- 4 Yamaguchi, Y. et al., Nature, 346, 281, (1990)
- 5 Kato, Y. et al., J. Biol. Chem., 265, 5903, (1990)
- 6 Hiraki, Y., Intl. Symp. Cartilage Metab., Osaka, 37, (1994)

## 30 アフリカツメガエルの発生過程における補体遺伝子

### Bf, C3およびC4の発現

野中 勝<sup>1</sup>、紀 新<sup>1</sup>、佐々木 實<sup>1</sup>、柄内 新<sup>2</sup>

<sup>1</sup>名古屋市立大学医学部第二生化、<sup>2</sup>北海道大学理学研究科生物

Gene expression of the complement Bf, C3 and C4 genes during  
ontogeny of *Xenopus laevis*.

Masaru Nonaka<sup>1</sup>, Xing Ji<sup>1</sup>, Makoto Sasaki<sup>1</sup> & Shin Tochinali<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Nagoya City University Medical School

<sup>2</sup>Division of Biological Sciences, Graduate School of Science,

Hokkaido University

(はじめに) 補体遺伝子の初期発生における発現については、これまで十分な解析は行われておらず、わずかにマウスにおいてアロタイプの違いを用いた研究からC3が17日目の胎児においても発現していることが示されているにすぎない。そこで我々は受精時からの解析が可能で、しかも変態時における尾の短縮など補体の関与が疑われる興味ある発生経過を示すアフリカツメガエルを用いて、発生過程におけるBf, C3, C4遺伝子の発現を検討した。

(方法) 材料: アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)は近交系のJ系統を用いた。ノザン・プロッティング: RNAはIsogen(ニッポンジーン)を用いて抽出しtotal RNAのまま使用した。Bfプローブは5' 端に相当する600 bpのBam HI断片を(1)、C4プローブはアフリカツメガエル肝臓RNAからRT-PCRにより増幅されたチオエステル領域に相当する250 bpの断片(未発表)を用いた。C3プローブは報告された配列(2)に基づいて用意したプライ

マーにより、同様にRT-PCRによりタンパクコード領域の3'端付近700 bpを増幅して用いた。RNAはグリオキサール法により分離し、ナイロン膜に転写した後RNAプローブとハイブリダイズした。ハイブリダイゼーション、ウオッシングは標準的条件下で行ったが、リボソームRNAへの非特異的吸着が認められた際には75-80℃でウオッシングを行った。発現量は成体肝臓にたいする相対量で評価した。免疫組織染色：C3に対するモノクローナル抗体（3）を用いて、ABC法(Vector Lab)により免疫組織染色を行った。

（結果）まず成体の各組織（肝臓、卵巣、脾臓、腎臓、心臓、腸）でのBf, C3, C4mRNAの発現を検討したところ、いずれも肝臓で強い発現が認められ、他の組織での発現は明らかでないか、明らかな場合も肝臓より著しく弱かった。そこで肝臓の摘出が可能となるStage51から尾の短縮が完了するStage63にかけての肝臓におけるBf, C3, C4mRNAの発現を調べたところ、いずれも明らかな発現が認められ、特にStage60以降は成体のものと比較しうるレベルで発現していた。これらの発現はオタマジャクシ全体からRNAを抽出した場合にも十分に検出されたため、同様な方法を用いて、発生段階を遡ってみた。その結果、Stage10ではいずれのmRNAも検出されなかったが、Stage 20-40にかけてはBf, C3のmRNAが成体肝の数分の一のレベルで認められた。この両者の発現はStage 43-46にかけて検出できなくなり、再びStage51以降検出された。一方、C4はStage 20-40には検出されず、Stage51になって初めて検出された。Stage51以降に検出されたシグナルは前述の如く、肝臓で合成されたmRNAに由来するものと考えられたが、Stage 20-40のBf, C3のmRNAがどこで合成されているかを明らかにする目的で、C3に対するモノクローナル抗体を用いた免疫組織染色を行った。その結果、胚の表皮細胞が染色された。現在Bf, C3, C4のプローブを用いたin situ hybridizationでmRNAも胚の表皮細胞で合成されている否かを検討している。

（考察）以上の結果はアフリカツメガエルの発生過程において、肝臓が形成される以前に相当量の補体タンパクが合成され胚表面に局在していることを示している。その役割については未だ不明であるが、出現の時期が胚の孵化のタイミングとほぼ一致しているのは

興味深く、外界との接触に際しての最初の防御機構として働いている可能性が示唆される。また、後期の肝臓での発現はBf, C3, C4すべてに認められたのに対して、初期の発現は第二経路の成分であるBf, C3だけに認められた。後期の発現時期は、MHCクラスI, IIの出現時期とほぼ一致しており、この個体発生における発現経過は、系統発生において円口類で第二経路のみが、軟骨魚類以上で他の補体経路, MHCクラスI, II及び免疫グロブリンなどが認められる事実ときわめてよく一致している。

(文献)

- (1) Y. Kato et al. (1994) J. Immunol. 153:4546.
- (2) D. Grossberger et al. (1989) Proc. Natl. Aca. Sci. USA 86:132.
- (3) T. Nakamura et al. (1986) Zool. Sci. 3:1010.

## メダカ補体B因子(Bf)のクローニング

○黒田範行<sup>1</sup>、島田敦子<sup>2</sup>、嶋昭紘<sup>2</sup>、佐々木實<sup>1</sup>、野中勝<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>名古屋市立大学医学部第2生化、<sup>2</sup>東京大学理学部動物)

Molecular cloning of the *Oryzias latipes* complement factor B cDNA

Noriyuki Kuroda <sup>1</sup>, Atsuko Shimada <sup>2</sup>, Akihiro Shima <sup>2</sup>,

Makoto Sasaki <sup>1</sup>, Masaru Nonaka <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Nagoya City University Medical School

<sup>2</sup>Laboratory of Radiation Biology, School of Science, University of Tokyo

(目的) 哺乳類のMHCはクラス I、II、IIIの3種類の異なった領域から構成されている<sup>1</sup>。クラス I、II分子は構造的にも機能的にも関係が深く、同じ祖先から遺伝子重複によって生じたものと考えられている。一方、クラスIII領域には補体遺伝子Bf、C2、C4をはじめとして21-ヒドロキシラーゼ、HSP70、TNFなどクラス I、II分子とは構造的には無関係で機能的にも関連が明確でない遺伝子が存在している。我々はこれらクラスIII補体遺伝子間のリンケージ、およびクラスIII補体遺伝子とクラス I、II遺伝子との間のリンケージには何らかの生理的、又は進化的な意義が存在する可能性を検討する目的で、下等脊椎動物に於いてもこれらのリンケージが保たれているか否かを検討した。アフリカツメガエルでBf、C4のクローニングを行いMHCとのリンケージの解析を行った結果、アフリカツメガエルにおいてもBf、C4遺伝子はMHCとリンクしていることが明らかとなった<sup>2</sup>。しかしアフリカツメガエルのBf遺伝子はマウスなどと比較してイントロンが非常に長く、遺伝子のサイズが哺乳類の10倍以上であるためC4遺伝子との物理的なレベルでの連結などの物理的解析は困難であることが判明した。そこで下等脊椎動物としては、ゲノムサイズが小さく、又

遺伝的解析が可能なメダカ *Oryzias latipes* に注目しそのMHCクラスIII領域の解析をめざして補体Bf遺伝子のクローニングを行った。

(方法) 1) RNAの分離とRT-PCR: RNAは近交系メダカ (AA2) の肝臓よりISOGEN (ニッポンジーン) を用いて分離した。得られたRNAよりcDNAを合成しこれをテンプレートとして用いて、マウスBfとC2のセリンプロテアーゼドメインで2ヶ所のアミノ酸が完全に保存されている部位にPCR用のプライマーを作製しRT-PCRを行った。RT-PCRの条件は94℃ 0.5min、45℃ 1min、72℃ 1minを30サイクルで行った。

2) cDNAライブラリーの作製とスクリーニング: メダカの肝臓から得られたRNAをオリゴdTセルロースカラムで精製した。その後mRNAからcDNAシンセシス-システム-プラス (アマーシャム)、λZAP II ベクター (ストラタジーン)、Gigapack Gold (ストラタジーン) を用いてcDNAライブラリを作製した。RT-PCRで増幅されてきたものをプローブとして用いて、このメダカcDNAライブラリーをスクリーニングした。得られたクローンは373A DNAシーケンサーを用いて塩基配列を決定した。

(結果) マウスのBfとC2のセリンプロテアーゼドメインの部位で作製したプライマーでメダカのcDNAをテンプレートとして増幅したところ250bpのバンドが検出された。これをプラスミドにクローニングして塩基配列を決定した結果アミノ酸レベルでマウスBfと18/69=26.1%、マウスC2と22/71=31.0%の相同性を示した。これをプローブとして用いてcDNAライブラリーをスクリーニングして13個のクローンを得た。これらのクローンの塩基配列を決定すると最もインサートの長いクローンは全タンパクコード領域を含んでいた。これまでに決定されたアミノ酸配列はマウスBf、C2と各々36.2%、33.7%の相同性を示した。このことよりこのクローンはメダカのBfであると考えた。



RT-PCR amplification of Bf/C2 like serine protease domain from *Oryzias latipes*.

(文献)

- 1) Campbell et al., Immunology Today 14:349(1993)
- 2) Kato et al., The Journal of Immunology 153:4546(1994)

## C3修飾による腫瘍細胞特異的 免疫応答の検討

大工原晴之、岡田則子<sup>1</sup>、L.Baranyi<sup>2</sup>、V.M.Holers<sup>3</sup>、岡田秀親<sup>1</sup>

<sup>1</sup>名古屋市立大学医学部分子医学研究所生体高分子部門

<sup>2</sup>野依福祉村病院長寿医学研究所

<sup>3</sup>University of Colorado Health Sciences Center

Analysis of Immune Response to C3 targeted tumor cells

H.Daikuhara, N.Okada<sup>1</sup>, L.Baranyi<sup>2</sup>, V.M.Holers<sup>3</sup>, H.Okada<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Department of Molecular Biology, Nagoya City University School of Medicine

<sup>2</sup>Choju Medical Institute, Noyori-Fukushimura Hospital

<sup>3</sup>University of Colorado Health Sciences Center)

### <目的>

腫瘍細胞は、自己の正常細胞がウイルス感染や染色体の突然変異などにより自立的な増殖性を示すようになったものであり、しかも、免疫監視機構をすり抜けたものである。従って異端化細胞として免疫機構による排除は起こり難いと考えられる。その理由として抗原性の低さ、B70等のリガンド分子の欠落、Prostaglandin E2その他の免疫抑制因子の産生など種々のものが考えられる。しかも腫瘍細胞上には正常細胞と同様に自己補体の反応を防ぐ種特異的補体制御膜因子が存在するため、補体系の反応も腫瘍細胞に対して通常は起こらない。そこで、腫瘍細胞膜上の種特異的補体制御膜因子の働きを抑えて、補体反応を誘導すれば、腫瘍細胞周囲に炎症反応を惹起して腫瘍細胞に対する免疫応答を強めることができるかと期待される。このことを支持する知見としてワクシニアウイルスで処理した腫瘍細胞は免疫原性が高まるが、このときラットの種特異的補体制御膜因子である5I2抗原(ラットCrry)の発現低下が認められた<sup>1)</sup>。また5I2抗原の発現量の多寡で腫瘍細胞のサブクローンを作製すると5I2抗原発現の高い方が増腫瘍性が強かった<sup>2)</sup>。さらに5I2抗体で処理すると腫瘍細胞上にC3が沈着するようになるのでこのために免疫原性が高まったと考えられる。またC3と共有結合した抗原は抗原性が高まるという知見も得られている<sup>3,4)</sup>。そこで、我々は多種類の腫瘍細胞株の存在するマウスの実験系を用いてC3修飾細胞による

腫瘍細胞特異的免疫応答誘導のストラテジーを確立するための検討を行った。

#### <方法及び材料>

##### 1.抗マウスCrry/p65モノクローナル抗体<sup>5)</sup>の精製

抗マウスCrry/p65モノクローナル抗体産生ハイブリドーマである5D5 (University of Colorado Health Sciences Center Dr.Holersより分与された) の培養上清をProtein A Cellulofine(Pharmacia)カラムにて精製した。

##### 2.マウス補体及びマウスC3の精製

マウスから心臓採血によって得られた血液をMg<sup>++</sup>EGTA GVBと1:1に混和し、遠心後の上清を-80℃保存し補体とした。マウスC3は、マウスから心臓採血によって得られた血液をEDTA GVBと1:1で混和し遠心後の上清を、DEAE-Sepharose、Mono Q、 Superose 6 Heparin-Sepharose(Pharmacia)により精製した。

##### 3.C3標識腫瘍細胞の作成

1x10<sup>6</sup>個の細胞をPBS(-)で洗浄後、抗マウスCrry/p65モノクローナル抗体と4℃30分間またはSPDP(N-succinimidyl-3(2-pyridylidithic)propionate)と室温で30分間反応させ、さらに洗浄後上記で得られたマウスのEGTA血漿を37℃30分間あるいは、SPDP処理細胞に精製したマウスC3を直接反応させた後にEDTA GVBまたはPBS(-)を加えて遠心洗浄した。

##### 4.フローサイトメトリー

C3標識腫瘍細胞を1%BSA-PBS(-)で4℃10分間ブロッキングし、FITC 標識抗マウスC3と4℃30分間反応させた。PBS(-)で洗浄後、シース液に懸濁しFACScan(Becton Dickinson)で測定した。

#### <結果>

1.MM46,Meth A腫瘍細胞などには、マウスCrryが高発現していた。

2.SPDPは細胞毒性があり、あまり高濃度では使えないが、低濃度ではC3が沈着しない。その点マウスCrry/p65に対するモノクローナル抗体5D5処理では、腫瘍細胞に直接細胞傷害性が少なく、しかも効率よくC3bを沈着させることができた(Figure)。

3.in vivo増殖腫瘍細胞の方が、同じ処理を行ったin vitro培養腫瘍細胞に比べてより多くのC3bが沈着した。

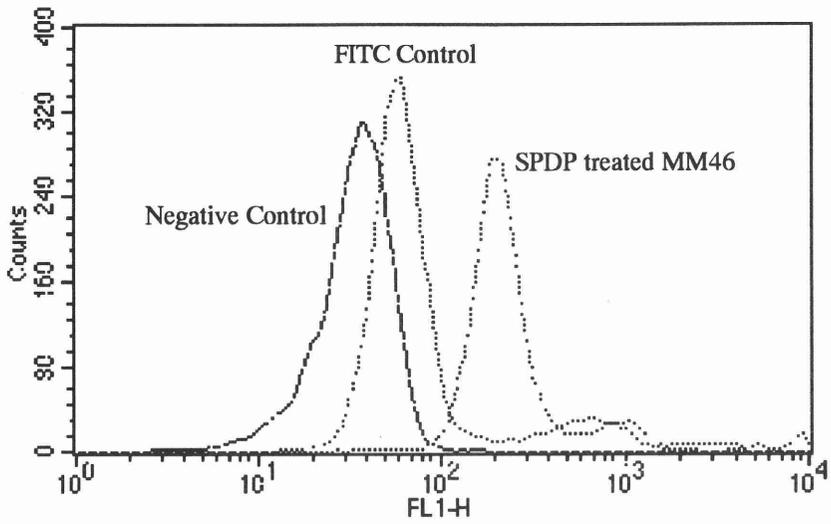
< 結論・考察 >

Crry/p65は主にリンパ球などでその発現が確認されていたが腫瘍細胞上でも強く発現されており、マウス脾臓細胞に比べて発現量が多い傾向が見られた。このことから腫瘍細胞の免疫原性を高めるために、補体制御膜因子に対するモノクローナル抗体で処理し、C3の沈着を促進することが有効であると思われる。

< 参考文献 >

- 1)Baranyi.L. et al., Immunol. 82, 522 (1994)
- 2)Baranyi.L. et al., Clin.Exp.Immunol. 98, 134 (1994)
- 3)Jacquier-Sarlin.M.R. et al., Immunol. 84, 164 (1995)
- 4)Rey-Millet.C.A. et al., Mol.Immunol. 31, 1321 (1994)
- 5)Li.B. al., J.Immunol. 151, 4295 (1993)

A



B

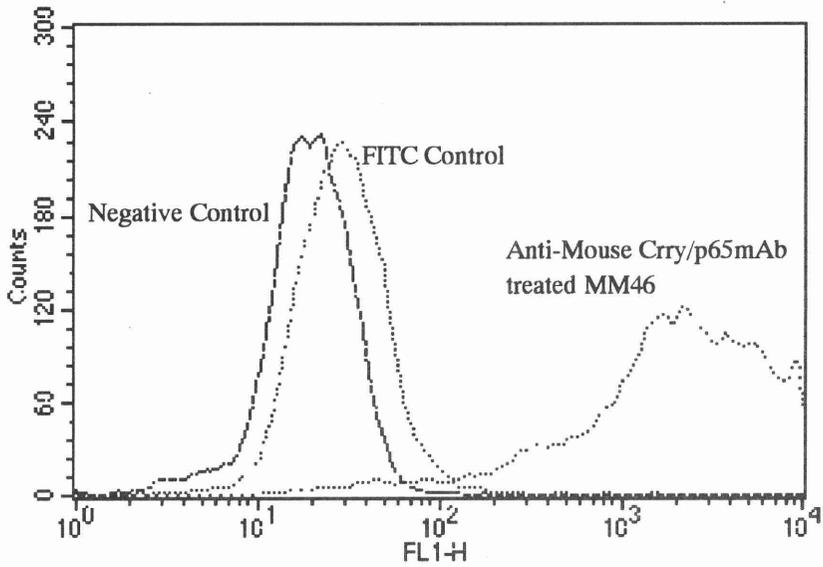


Figure. Deposition of Mouse C3

A : MM46 was treated with SPDP

B : MM46 was treated with anti-Mouse Crry/p65 mAb

松本美佐子<sup>1</sup>, 栗田光恵<sup>1</sup>, 吉川聡美<sup>1</sup>, 辻 祥太郎<sup>2</sup>, 長澤滋治<sup>2</sup>, 瀬谷 司<sup>1,3</sup>  
<sup>1</sup>大阪府立成人病センター研究所 第6部, <sup>2</sup>北海道大学薬学部 衛生化学講座,  
<sup>3</sup>新技術事業団 さきがけ研究21

Is M161 Ag a cell-death-related protein ?

M.Matsumoto<sup>1</sup>, M.Kurita<sup>1</sup>, S.Kikkawa<sup>1</sup>, S.Tsuji<sup>2</sup>, S.Nagasawa<sup>2</sup> and T.Seya<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Immunology, Center for Adult Diseases, Osaka,

<sup>2</sup>Department of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University,

<sup>3</sup>PRESTO, Research Development Corporation of Japan)

[はじめに]

M161 抗原はヒト骨髄性白血病細胞株 P39(+) から C3 活性化能を持つヒト遺伝子産物として新しく分離・同定された分子量約 43kDa の膜タンパク質である<sup>1)</sup>。M161 抗原陽性細胞は補体制御因子 (DAF, MCP) を表現しているにも拘わらず強い補体活性化能を示し、細胞表面へ多量の C3 沈着を誘起する。M161 抗原は正常末梢血液細胞には表現されず、細胞を積極的に補体系の標的化 (自己 C3 沈着の誘導) にすべき状況下に発現誘導されるものと考えられる。一方、M161 抗原陽性細胞は同種細胞凝集能を有し、M161 抗原は C3 活性化分子のみならずそれ自身接着分子として細胞間接着に関与することが示唆されている<sup>2)</sup>。今回、我々は M161 抗原の発現機構を解析するため、その発現分布・細胞上での機能などを明かにし、M161 抗原と細胞死との関連を調べたので報告する。

[方法]

各細胞における M161 抗原の発現はモノクローナル抗体 M161 を用いて、flowcytometry、immuno-blotting、免疫蛍光抗体法で調べた。M161 抗原陽性細胞上での M161 抗原と C3 フラグメント複合体の検出は辻らの方法に従って行った<sup>3), 4)</sup>。細胞を  $Mg^{++}$ -EGTA 存在下 25 % ヒト血清と 37°C, 20 分反応させた後、抗ヒト C3 ポリクローナル抗体と反応させ、細胞を可溶化後 protein A/G agarose を用いて C3 結合分子-C3 フラグメント複合体を単離した。還元条件下 SDS-PAGE を行い、ニトロセルロース膜へ転写し、C3b  $\alpha'$  鎖を認識するモノ

クローナル抗体による immuno-blotting で C3b 結合分子-C3b 複合体を検出した。M161 抗原の発現誘導は細胞を抗 Fas 抗体 (50 ng/ml) あるいは TNF- $\alpha$  (50 ~ 500 u/ml) で種々の時間刺激した後、トリパンブルーの取り込み、DNA ラダー形成の有無を調べるとともに M161 抗原の発現を flow cytometry と immuno-blotting で測定した。

### 【結果及び考察】

1. M161 抗原は骨髄性白血病細胞株 P39(+), K562, T 細胞白血病細胞株, Molt 4, HTLV感染 T 細胞株, MT2 などに表現される。P39(+), K562 では細胞質内にも M161 抗原が存在し、細胞表面への移行は P39(+) の場合血清因子を必要とする。
2. M161 抗原陽性細胞 (P39(+), K562) を Mg<sup>++</sup>-EGTA 存在下 25% ヒト血清と反応させると、分子量約 145kDa の C3b 結合分子-C3b  $\alpha'$  鎖複合体が検出され、ヒドロキシルアミン処理で消失した。複合体の分子量から細胞上の C3b 結合分子は M161 抗原と考えられた。
3. T 細胞株 Jurkat を抗 Fas 抗体で刺激し、アポトーシスを誘導すると C3 沈着が誘導された。細胞死に伴い M161 抗原の細胞質内発現が認められた。M161 抗原の発現は Fas 刺激後 6 時間までは検出されず、24 時間後 95% 以上細胞死の状態では blotting により検出された。しかし、死細胞表面への発現は認められなかった。
4. P39(+) を TNF- $\alpha$  で刺激すると M161 抗原の細胞表面への発現が増強された。

M161 抗原は白血病細胞株の一部、ある種のウイルス感染細胞、Fas 抗原刺激によりアポトーシスを誘導された細胞等に表現され、更に TNF- $\alpha$  により発現の上昇がみられることが今回判明した。TNF- $\alpha$  レセプターと Fas 抗原は分子ファミリーで、細胞質内に共通のアミノ酸配列 (death domain) を有しており細胞死を誘導すると考えられている。両者の刺激により M161 抗原の発現が誘導され、特に Fas 刺激で細胞死に伴い発現することから、細胞死のシグナル伝達経路のいずれかの時点で M161 抗原の発現が誘導されると考えられる。M161 抗原は細胞表面上では明らかに C3 活性化分子として機能し、C3b と安定な複合体を形成することにより C3 を活性化し、多量の C3 フラグメントを膜上に結合させる

と考えられ、その発現は C3/C3 レセプターを介した細胞のクリアランスを積極的に促進すると思われる。しかしながら、Fas 抗原刺激により発現される M161 抗原は細胞質内にとどまっており細胞表面へ移行しないことから、アポトーシス細胞の自己 C3 沈着との関連は今後解明すべき問題として残される。我々は、M161 抗原の産生に加えて、細胞質内から細胞表面への M161 抗原の translocation が補体系によるクリアランスを受けるために必要なプロセスと考えており、アポトーシスシグナルとのクロストークを含めて今後検討する予定である。

## References

1. Matsumoto, M., F. Yamashita, K. Iida, M. Tomita, and T. Seya. 1995. Purification and characterization of a human membrane protein that activates the alternative complement pathway and allows the deposition of homologous complement C3. *J. Exp. Med.* 181:115-125.
2. Matsumoto, M., and T. Seya. 1993. Homologous C3 Deposition and homotypic cell adhesion in a human myeloid cell line, P39. *Eur. J. Immunol.* 23:2270-2278.
3. Tsuji, S., K. Kaji, and S. Nagasawa. 1994. Activation of the alternative pathway of human complement by apoptotic human umbilical vein endothelial cells. *J. Biochem.* 116:794-800.
4. Matsui, M., S. Tsuji, H. Nishimura, and S. Nagasawa. 1994. Activation of the alternative pathway of complement by apoptotic Jurkat cells. *FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett.* 351:419-422.

辻 祥太郎, 松井 広行, 滝沢 文健, 長澤 滋治  
北海道大学 薬学部 衛生化学講座

Analysis of C3 fragments acceptor molecules on apoptotic cells.

Shoutaro Tsuji, Hiroyuki Matsui, Fumitake Takizawa,  
and Shigeharu Nagasawa

(Department of Hygienic Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences,  
Hokkaido University)

### <はじめに>

アポトーシスは細胞質と核の凝縮, それに続く核の断裂とアポトーシス小体の形成を特徴とする細胞死で, 様々な生理的要因により引き起こされる。生体内でアポトーシスを起こした細胞は細胞内容物を閉じ込めたアポトーシス小体へと分断し, 周囲の食細胞などに速やかに取り込まれ処理される。従って, 細胞内容物の流出による周囲の組織の破壊などを引き起こさない<sup>1)</sup>。一方, 補体の活性化によりC3フラグメントで標識された異物は, オプソニン効果によって食細胞に取り込まれ易くなる<sup>2)</sup>。我々はアポトーシスを起こした細胞のクリアランス機構と補体系の関係について着目し, これまでに本来自己細胞上での活性化を引き起こさない補体系がアポトーシスを起こした細胞上で活性化され, C3フラグメントが沈着することを明らかにしてきた<sup>3, 4)</sup>。今回, このC3フラグメント受容分子についての解析を行ったので報告する。

### <方法>

#### ○アポトーシス死細胞の調製

アポトーシス死細胞には, 抗Fas抗体処理によりアポトーシスを誘導されたヒトT細胞株のJurkatを用いた。

#### ○C3フラグメント-受容分子複合体の解析

血清処理したアポトーシス死細胞を, プロテアーゼ阻害剤を含む1% NP-40, TBSにより可溶化し, 抗C3抗体を用いて免疫沈降を行った。得られたC3フラグメント-受容分子複合体をSDS-PAGE後, そのままWestern blot, あるいはC3フラグメントと受容分子間のエステル結合を切断するヒドロキシルアミン処理を行って2次元目のSDS-PAGEを行い, Western blotまたはオートラジオグラフィを行った。なお, Western blotの1次抗体にはiC3bの $\alpha'$ 鎖のN末側68kDa ( $\alpha'_{N}$ )と反応する抗C3d抗体, あるいはiC3bの $\alpha'$ 鎖のC末側40 kDa ( $\alpha'_{C}$ )にエピトープを持つモノクローナル抗体を用いた。

## <結果>

### 1) C3フラグメント-受容分子複合体の解析

血清処理した死細胞から抗C3抗体を用いた免疫沈降によりC3フラグメント-受容分子複合体を分離後、還元してWestern blot解析することにより、C3フラグメントが数種の受容分子に共有結合していることが明らかとなった。この結合はヒドロキシルアミン処理によりほとんどが開裂することからエステル結合と推定された。また2次元SDS-PAGEのWestern blotから、解離するC3 $\alpha$ 鎖はほとんどすべてが $\alpha'$ 鎖N末側の68 kDa( $\alpha'$ <sub>N</sub>)であり、沈着しているC3フラグメントはほとんどがiC3bに変換されていることが明らかとなった。一方、C3bを安定に保持しているC3b-受容分子複合体は確認出来なかった。

### 2) iC3b-受容分子複合体の形成の経時的解析

死細胞の血清処理時間を変え、経時的にiC3b-受容分子複合体の形成を解析したところ、還元条件下のSDS-PAGEで155 kを示す $\alpha'$ <sub>N</sub>-受容分子複合体が最初に形成されることが明らかとなった。補体の活性化に伴い生成するC3bは、まず最も近傍の活性化分子自体に結合すると考えられることから、この155 kDaの複合体に同種補体活性化分子が含まれている可能性が考えられた。

### 3) C3フラグメント受容蛋白質の解析

[<sup>35</sup>S]-Met, Cysを用いて細胞蛋白質の標識を行い、この標識死細胞を血清処理しiC3b-受容分子複合体を免疫沈降して2次元SDS-PAGEを行い、オートラジオグラフィにより受容蛋白質の解析を行った。その結果、[<sup>35</sup>S]により標識された33 kDa, 48 kDa, 85 kDaなどの受容蛋白質が確認された。85 kDaの蛋白質は155 kDaの $\alpha'$ <sub>N</sub>-受容分子複合体に由来することから、この85 kDaの受容蛋白質が同種補体活性化分子の可能性があり、現在この分子の蛋白質化学的性質について解析を行っている。

## <考察>

現在までに同種補体を活性化する膜分子としてM161抗原<sup>5)</sup>とCR2<sup>6)</sup>が報告されている。M161抗原による補体の活性化では、M161抗原にC3bが共有結合しそのC3bが安定に保持される(iC3bに変換されない)ことによって活性化が起こることが示唆されており、CR2の場合にもC3bの共有結合とその保持が補体の活性化を引き起こす原因であると報告されている。しかし、死細胞における補体の活性化では特定のC3b-受容分子複合体は検出できず、沈着しているC3フラグメントはほとんどがiC3bに変換されていた。従って、死細胞による同種補体の活性化はM161抗原やCR2とは異なった活性化機構によるものと考えられる。

一方、経時的にiC3b-受容分子複合体の形成を解析したところ、85 kDaの細胞蛋白質を含む複合体が最初に形成されることが明らかとなった。補体の活性化に伴い生成するC3bは、まず最も近傍の活性化分子自体に結合すると考えられることから、この85 kDaの受容蛋白質が同種補体活性化分子である可能性が考えられ、現在この分子の蛋白化学的性質について解析を行っている。

<参考文献>

- 1) Savill, J. et.al. Immunol.Today 14,131-136 (1993)
- 2) Brown, E.J. et.al. Curr.Opin.Immunol. 3,76-82 (1991)
- 3) Tsuji, S. et.al. J.Biochem. 116,794-800 (1994)
- 4) Matsui, H. et.al. FEBS Lett. 351,419-422 (1994)
- 5) Matsumoto, M. et.al. J.Exp.Med. 181,115-125 (1995)
- 6) Mold, C. et.al. J.Immunol. 140,1923-1929 (1988)

賛助会員 (アイウエオ順)

エーザイ株式会社

株式会社 エー・イー企画

株式会社 エスアールエル

株式会社 三和科学研究所

株式会社 津村

株式会社 トミー精工

株式会社 パーキン・エルマー・ジャパン

株式会社 ビー・エム・エル

協和発酵工業(株) 医薬研究開発センター

田辺製薬株式会社

武田薬品工業株式会社

トーアエイヨー株式会社

鳥居薬品株式会社

富士薬品工業株式会社

明治製薬(株) 薬品総合研究所

和光純薬工業株式会社

第32回 補体シンポジウム 講演集

平成7年6月16日 印刷

平成7年6月22日 発行

編集者代表 第32回補体シンポジウム 集会長 辻 孝夫

発行所 〒700 岡山市鹿田町2-5-1

岡山大学医学部第一内科

第32回補体シンポジウム事務局

Tel. 086-223-7151 (内線2413)

印刷所 〒700 岡山市内山下2-10-3

旭総合印刷株式会社





