

第8回補体シンポジウム

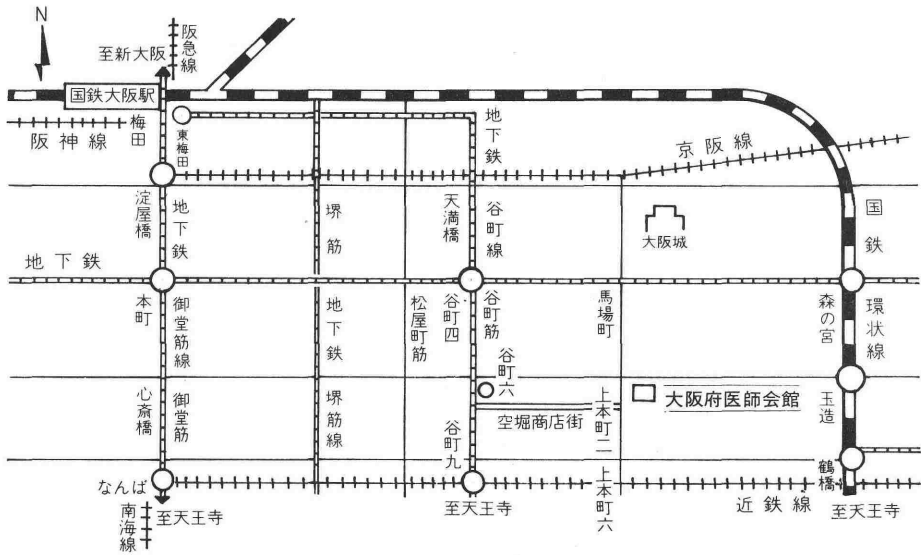
予 講 集

場 所 大阪府医師会館

期 日 昭和46年11月28日～29日

1. 日時 第1日 昭和46年11月28日(日)午後1時～5時30分
第2日 昭和46年11月29日(月)午前9時30分～午後5時45分

2. 会場 大阪府医師会館
大阪市天王寺区上本町3丁目1-9
TEL (768) 1451
地下鉄 谷町線、谷町6丁目下車
空堀商店街を歩いて徒歩5分



お知らせとお願い

1. 各演題の講演時間は15分です。
2. 幻灯器は35mm用を1台用意します。
3. 30分前までにスライドを会場受付に提出して下さい。

世話人 大阪府立成人病センター 稲井真弥

第 1 日

午後 1:00~3:00

座長 高橋 守信

1. 赤血球沈降速度促進因子に関する研究(第1報) 1
都立大久保病院 河島敏夫、大山俊郎、津田文男、
宮沢政栄、
国立がんセンター研究所 関根暉彬 西岡久寿弥
2. Single radial immunodiffusion 法による日本人血清の β 1C/1A-globulin お
よび β 1E-globulin値について、 3
大阪府立成人病センター 平松誠一、北村肇、永木和義、
飯田恭子、笠井よし子、寺井たみ子、
稲井眞弥

座長 眞弓 忠

3. 発作性夜間血色素尿症と補体 5
北海道大学第二内科 今野孝彦、大橋晃、渡辺武史、
安河内太郎、
4. 若年性関節リウマチにおける補体系の動向 7
都立豊島病院整形外科 松浦美喜雄
ハーバード大学R.B.Brigham病院 Shaun Ruddy, J.S.Stillman,
K.F.Austen.
5. 腎移植患者における血清補体価の変動 9
都立大久保病院内科 倉田要、
慶応義塾大学病院内科 大久保充人、田村寿夫、井垣嘉之、
丸茂菊男
東京電力病院泌尿器科 中村宏

3:30~3:45 休憩

3:45~5:30

座長 橘 武彦

6. SLEの補体(抗補体性を中心に) 11
岡山大学医学部第三内科 天野哲基、森田実、西下駿三、
河野勝昭、大藤真

7. 蛋白尿中の補体成分及びそのinactivatorについて	13
大阪府立成人病センター	北村肇、笠井よし子、稲井眞弥
座長 岡田 秀親	
8. Non-functional C1 inactivatorを有する血管神経性浮腫の一症例	15
九州大学医学部心療内科	手嶋秀毅、井上貞久
大阪府立成人病センター	永木和義、飯田恭子、稲井眞弥
9. ヒト、リンパ球のE, EAC4C3結合性とその起源	17
国立がんセンター研究所	
東邦大学医学部小児科	橘武彦、矢田純一、西岡久寿弥

第 2 日

午前 9:30~10:45

座長 田 村 昇

10. IgGの熱によるPolymerizationとPolymerized IgGの補体結合性	19
東京大学物療内科	横張龍一
11. C1エステラーゼおよびプロC1sの精製	21
徳島大学医学部酵素生理	村松睦、須見洋行、岡村和子、 藤井節郎
徳島大学医学部皮フ科	白石聡
12. ヒト C1とC1 inactivatorとの反応について	23
大阪府立成人病センター	永木和義、飯田恭子

10:45~11:00 休憩

11:00~12:15

座長 永 木 和 義

13. 補体第1成分と第4成分との間の反応に及ぼすTAMe及びATEeの影響についての比較	25
国立がんセンター研究所ウィルス部	島田彰子、田村昇
14. C1INHに関する研究	27
京都府立医科大学増田内科	近藤元治、細川計明

15. C1 inactivator を欠如したモルモット血清 29
 国立がんセンター研究所 田村昇、奥田智子
 東京大学医科学研究所 成内秀雄、臼井美津子
- 12:15~1:30 昼食
- 午後 1:30~2:45
- 座長 井上 公蔵
16. Dithiothreitol (DTT) による GPC3 の特異的結合能の阻害 31
 金沢大学がん研究所分子免疫部 高橋セイ、田中清子、河野寛一、
 高橋守信
17. モルモット補体第3成分の構造と活性 33
 国立がんセンター研究所ウィルス部 奥田智子、山主公子、西岡久寿弥
 東京大学理学部生物化学 高橋健治
18. Ghost ヒツジ血球を用いた Immune Adherence の定量的解折 35
 国立がんセンター研究所ウィルス部 西岡久寿弥、奥平陽一、奥田智子
- 2:45~3:00 休憩
- 3:00~4:15
- 座長 西岡 久寿弥
19. (Fab')₂ による Cytotoxicity 37
 国立がんセンター研究所 岡田秀親
20. 免疫溶血反応の終末反応段階に及ぼす soluble ATPase の作用 39
 奈良県立医科大学細菌学教室 上田浩、深山昭雄
21. 免疫溶菌による大腸菌菌体成分の変化について(第2報) 41
 大阪大学医学部細菌学教室 井上公蔵、矢野健一、高見沢昭久、
 天野恒久
- 4:15~4:30 休憩
- 4:30~5:45
- 座長 近藤 元治

22. PCA反応の免疫組織化学的研究		43
横浜市立大学形成外科	西岡久寿樹	
横浜市立大学第二病理	田中俊夫	
23. 創傷治癒とPCA反応		45
横浜市立大学第二病理	田中俊夫	
同 形成外科	西岡久寿樹	
24. Passive Mucocutaneous Anaphylaxis (PMA)		47
(第1報)		
横浜市立大学形成外科	西岡久寿樹	
同 第二病理	田中俊夫	

赤血球沈降速度促進因子に関する研究 (第一報)

都立大久保病院

河島敏夫 大山俊郎 津田文男 宮沢政榮

国立ガンセンター

関根暉彬 西岡久寿弥

赤血球沈降速度(以下血沈と略称)については古くから極めて多くの研究報告があり 今日では臨床上最も手近かな検査として日常広く利用されている。しかしこの反応の意味づけは必ずしも明らかでない。われわれは免疫反応の立場から 血沈と補体との関係に注目し 検索を続け 多少の知見を得たので第一報として報告する。

被験者及び測定方法: 被験者として諸種アレルギー性皮膚疾患, SLE をとりあげた。即ちこれら疾患患者で血沈値の亢進している症例を選択し、又対照として健康成人血液を用い型の如くクエン酸ソーダを加え Westergren 法によつた。補体価は血清補体価(以下F価にSCH50と略記)、更にクエン酸ソーダを加えたプラズマの補体価(以下PCH50と略記)を測定した。

I. 血清補体価(SCH50)と血沈値

各種アレルギー性皮膚疾患及びSLE患者50例につき SCH50と血沈値との相関をみると、両者の間には全く相関関係が見られなかった。しかしSLE患者で、同一症例につき経時的に SCH50と血沈値の変動を追求すると両者の間に極めて密接に関連しなから変動する pattern を得た。(Fig 1)

II. 血沈の交換試験

SLE患者血液とこれと homo(同一血液型)の健康成人血液を用いて実験を行った。それぞれの3.8% クエン酸ソーダを加えた血液をプラズマと赤血球に分離し、赤血球は $\frac{1}{200}$ M P.B.S で 2000 rpm, 10分, 4°C の条件下に3回 wash したものを用いた。それぞれのプラズマと赤血球を交換して血沈を測定すると SLE プラズマでは健康人赤血球の沈降も著明に亢進させたが SLE 赤血球と健康人プラズマではそれが見られなかった。(Fig 2)

又 Myositis 患者血液を用いての auto(即ち同患者の血沈亢進時期の血液と血沈軽快時血液)の交換実験にても同様の事実が得られた。(Fig 3)

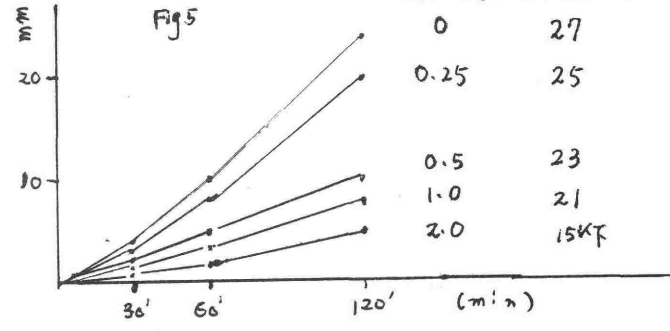
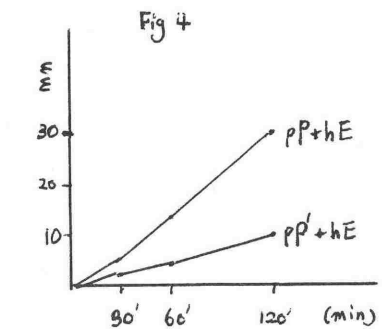
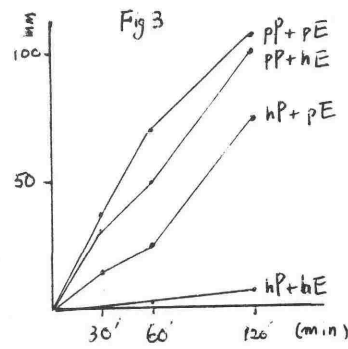
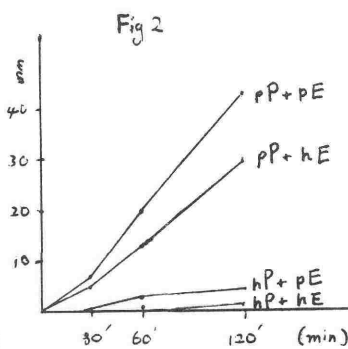
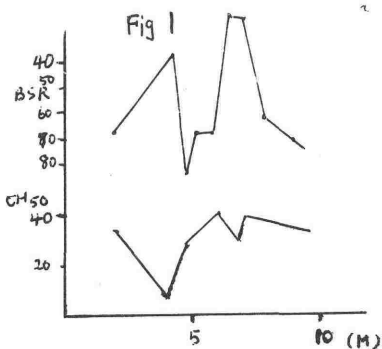
III. homo 健康人赤血球による血沈促進因子の吸収

上述 SLE患者プラズマ中には血沈を促進させる factor の存在が考えられこの factor と赤血球との関係が検討された。即ち 予の homo 健康人赤血球

と37°C, 30分インキュベーションせられたFLEプラズマは、その血沈促進能が失われた。(Fig 4). 更に血沈促進能の低下は、加える赤血球の量に従い (Fig 5) の如き結果を得た。

IV. 吸収後の プラズマ補体価 (PCH50) と赤血球上の補体
 IIIの吸収に用いたプラズマのPCH50は吸収に使用した血球量に応じて低下が見られた。吸収に用いた赤血球を蛍光抗体法により、抗C3, 抗C4 E検索したところ蛍光陽性を示す赤血球が partial に見られた。

以上の実験事実より 被験例の赤血球沈降速度促進因子が主にプラズマ側にあり、(赤血球側にも若干あり) その促進因子は健康者 homo 赤血球で吸収され、吸収後のプラズマの補体活性が低下すること、赤血球上に補体が認められることなど血沈促進因子の1つに補体が関与している可能性を得た。長尾らは動物の実験的アレルギー炎症にて血沈の亢進は見られないが諸種の動物の赤血球を用いて交換試験を行い、人赤血球のみが連鎖形成を成すことに人と動物との血沈の有無の原因を求めている。このことも血沈促進因子として 補体あるいはI.Aとの関係を追求しなればならない問題を提示している。



Single radial immunodiffusion 法による日本人血清の
 $\beta_{1C/1A}$ -globulin および β_{1E} -globulin 値について

大阪府立成人病センター

平松誠一, 北村 肇, 永木和哉,

飯田恭子, 笠井よし子, 寺井たみ子,

箱井真弥

近年, 血清蛋白分画の定量に免疫学的方法が応用されるようになり, これに, Mancini 法によって Single radial immunodiffusion 法が考案されて, 容易に血清中の微量の蛋白分画の定量が行われるようになった。すなわち, 免疫 globulin の定量に関しては, 内外の多くの報告があり, その変動の意義についても論じられているが, 一定した結論は得られていないようであるし, またその正常値についても報告者により区々である現状である。さらに, 免疫 globulin 以外の各種血清蛋白分画の免疫学的定量についての報告はまだまだ少なく, これに日本人のそれについては甚少ない。また, 免疫 globulin を含めて, いずれの分画値についても, 正常対象の撰び方に明確な説明のあるものが甚少なく, さらに, その例数が極めて少ないものが多い。

このことは, 血清 $\beta_{1C/1A}$ -globulin と β_{1E} -globulin 値についても言えるので, この観念に基づいて, 判定基準を設けて対象を撰び, これを性別, 年代別に, しかも各群の数を多くとってその標準値を出そうという試みを行った。

対象は, 日本赤十字社大阪血液センターに供血の目的で訪れ, 血液比重, 血清 GPT 測定, 血清梅毒反応, Au 抗原の検索の 4 項目の検査に合格した, 20 年代, 30 年代, 40 年代の男女各 50 名と, 50 年代の男子 50 名, 50 年代の女子 37 名, 総計 387 名の血清である。

測定は, Behringwerke 社製の Partigen[®] を用いて施行した。標準血清は, 同社で用意された $\beta_{1C/1A}$ -, β_{1E} -globulin 量既知のもの (Op. Nr. 570; $\beta_{1C/1A}$ 含有量 75 mg/dl, β_{1E} 含有量 18 mg/dl) のもので, 換量線の作成には, $\beta_{1C/1A}$ -globulin については, $\times 9$, $\times 5$, $\times 2$ と, β_{1E} -globulin については, $\times 6$, $\times 2$, $\times 1$ と生理食塩水を以て希釈して使用し, 被検血清は, 何れも $\times 3$ に希釈して使用した。

希釈された血清は, それぞれ $2\mu\text{l}$ を抗原孔に添加し, 恒温箱中で, 室温 ± 48 時間反応させたのち, 1 錠大量の生理食塩水で洗浄し, 翌日 0.05% の Amidoblack 10 B 溶液にて染色し, 形成された沈降輪の直径を計測した。

該蛋白の定量値の算定は, 標準血清のそれぞれの濃度のものの沈降輪の

直径の自乗をグラフ用紙の縦軸で、横軸の含有蛋白質量に対して *plot* して得た点を結んで検量線を作成し、これを用いて被検血清の蛋白質量の測定を行った。

以上の操作によって得られた蛋白質量は、下の表に示す通りで、性別、年齢別に各測定値と、 χ^2 検定によって正規分布の有無を判定し、正規分布であれば平均値、標準偏差を算出、もし正規分布でなければ、各値の対数について再び χ^2 検定を行ない、正規分布すれば対数正規分布として平均値、標準偏差を計算したので、平均値の真数と、平均値に標準偏差を加減した値の真数を算出し、前者を平均値、後者を範囲とした。すなわち、20才男子についてみると、 $\beta_{1C/1A}$ -globulin は、正規分布し、 86 ± 15 mg/dl であり、 β_{1E} -globulin は対数正規分布し、平均値が 30 mg/dl、その範囲は 23~40 mg/dl であった。なお、各年代間および各性別間の有意差は、t 検定または Cochran-Cox の近似法を用いてしるべ、有意差なき場合は一括して平均値、標準偏差または平均値、範囲を計算して表に示した。ただし、男女間の有意差については右端の欄に記入した。すなわち、 $\beta_{1C/1A}$ -globulin については、男子では年代間に有意差がなく、男女間の有意差は、40年代および50年代のみみられた。 β_{1E} -globulin に関しては、年代により分布状態が異なるので、有意差の検定に当たっては、何れも対数値によって行った。

以上の測定結果をみると、女子においては、 $\beta_{1C/1A}$ -globulin、 β_{1E} -globulin は共に高齢者に高値を示し、また β_{1E} -globulin は、男子と異った分布状態を示すことから、女子ではこれらの蛋白質が加齢により増加し、かつその産生機構に男子とはちがった機構が働いているものと想像される。即ち、従来いわれている α_2 macroglobulin の女子における高値、しかも年齢と共に増加することは、*hormonal* 要素が考えられているように、これらの蛋白質についても、その産生に内分泌的機構が関与しているのではないかと考えられる。

	年齢	例数	男子		女子		男女間の有意差
$\beta_{1C/1A}$ globulin (mg/dl)	20~29	50	82 ± 17	86 ± 15	88 ± 19	87 ± 17	なし
	30~39	50		79 ± 20		84 ± 19	なし
	40~49	50		79 ± 20		92 ± 21	$P < 0.05$
	50~59	37		82 ± 14		104 ± 21	$P < 0.05$
β_{1E} globulin (mg/dl)	20~29	50	29 (23~36)	30 (23~40)		29 (22~40)	なし
	30~39	50		29 ± 9	27 ± 9	なし	
	40~49	50		29 ± 8	29 ± 9	なし	
	50~59	37		30 (23~29)		37 ± 10	$P < 0.05$

発作性夜間血色素尿症と補体

北大2内 今野秀彦 大橋見 渡田武夫 安河内太郎

発作性夜間血色素尿症(pNH)は、抗体の関与しないう補体による溶血を特徴とする疾患であり、正常赤血球より、補体のpNHの赤血球への親和性がきわめて強いことが立証されている。血清補体価と溶血との関連については報告は少ない。今回、わかれわかれは、3例のpNHの血清補体価(CH50)を測定し、1例のCH50の値と著明なCH50の日内変動を認めた。本シンポジウムでは、1) 溶血とCH50、C3、C4の関係 2) 血清補体価を測定した1例の血清補体価の原因と、CH50の日内変動に影響を及ぼす因子について報告する。

(I) 材料。

症例1, 2, 3は各々 36才女子, 18才女子, 50才男子で、いずれも、Ham test, Cross Gy test 陽性、又赤血球膜の酵素学的異常により、pNHと診断された症例である。症例1は、CH50の低値を示し、この症例の血清を検査するうちに、低濃度のCryoglobulin を含んでいることが判明した。

(II) 研究方法。

- 1) 溶血素は、羊赤血球のstromaを認してえたFlorssman 抗原とMayer⁽¹⁾の方法により作製し、室温に室温してえた血清を用いた。
- 2) CH50 と免疫粘着現象による血清溶血(CIA50)は、各々Mayerの原法の1/2.5 変法 と西岡⁽²⁾の方法によった。
- 3) CH50の日内変動は、午前7時、10時 午後2時 6時 8時 10時の5回採血し、ただちに測定した。
- 4) 補体成分C1, C3の活性の測定は、東大物療内科より貸与されたIgG EA 1(ELU) 4(EL) cell, 精製C2を用いておこなった。C1は確酸ナトリウムで血清を塩析し、C3は免疫粘着現象を用いて測定した。
- 5) Cryoglobulin (Cryo)の精製は、堀内ら⁽³⁾の方法によった。
- 6) Cryoの溶血阻止作用は、CH50 = 34 U/mlの正常O型ヒト血清0.2mlを非的に稀釈した検体0.2mlを20%、一定時間 incubate 後、3 mlの4VB⁺⁺を20% (即ち2CH50と1) 5×10^8 mlの感作羊赤血球の溶血を防止する%で表現した。
- 7) C3, C4の定量は、血清 $\beta_1C/\beta_1A, \beta_1E$ (Behringwerke社)を用いて Mancini⁽⁴⁾の一定量免疫拡散法によった。又C1s inactivatorの半定量は、抗C1s inactivator血清 (Behringwerke社)を用いて零天内沈降反応で行なった。
- 8) Cryoの半定量は、Mackay⁽⁵⁾の方法によった。
- 9) 血清ハモグロビンは、 $\Sigma \text{アブ}$ 、 $\times \text{ト}$ ハモグロビンに等しいとせ、540nmの吸光度を日立139 分光光度計を用いて測定し $E_{540}^{1cm}(\text{Hb}) = 11.4 \times 1$ と計算した。

Ⅲ) 結果

(表2)

	AM7	AM10	PM2	PM6	PM10
Case 1	14.7	0	0	32.0	12.0
Case 2	5.0	51.5	49.0	46.0	42.0
Normal	36.0	34.5	32.0	35.0	33.0

(表1)

	CH50 (U/ml)	CIA50 (U/ml)	Hb (mg/dl)
Case 1	8.0	500	13.6
Case 2	46.0	5,000	17.9
Case 3	30.0	4,000	50.7
Normal	35.9±4.6	4,000 ~ 5,000	57±2.8

(表3)

	AM7	AM10	PM2	PM6	PM10
CH50 (U/ml)	4.6	46.5	36.0	0	29.4
C3 (mg/dl)	90.0	144.0	144.0	36.0	76.0
C4 (mg/dl)	17.6	21.2	31.6	17.2	18.0
Hb (mg/dl)	13.6	10.2	10.2	23.8	20.4
Cryocrit (%)	0.12	0.15	0.50	0.18	0.10

(表4)

	CH50	CIA50	C1	C3
①	8.0	500	13800	4.000
②	20.0	2,000	48,000	4.000
Normal	35.9±4.6	4,000 ~ 5,000	80,000 ± 15,000	4.000 ~ 5.300

(表5)

	Protein Conc (mg/ml)	Temp (°C)	Incubation Time (min)	Inhibition (%)
Serum	760	20	0	0
		37	30	0
		4	12 (hrs)	88.1
Super-natant	74.6	20	0	0
		37	30	0
		4	12 (hrs)	0
Cryo	2.85	20	0	0
		37	30	86.9
		4	12 (hrs)	88.0
Cryo	0.281	20	0	0
		37	60	0
		4	12 (hrs)	0

(1) 表1は、pNHの溶血(血清入E7"ロビン)とCH50、CIA50の関係を示してあるが、特別の相関関係は存在しない。

(2) 表2は、症例1と2のCH50の日内変動を示してあるが、症例1では、著明な日内変動を示すが、症例2では有意の変動を認めない。同時にC3、C4、血清Hbの定量を行ったが、相関関係も示さなかった。

(3) 別の日に症例1のCH50、C3、C4、血清Hb、Cryoの日内変動を測定した結果を表3に示してある。(2)の結果とは異なり、時間的変動があるが、CH50

は著明な変動を認めない。しかしC3、C4、血清Hb、Cryocritとは相関関係を認めない。(4) 表4は症例1のC1、C3法による2度測定した結果であるが、C1の活性はCH50値と平行して低値を示した。(5) C1s-inactivatorは血清内沈降反応で、正常人70-ル血清と同じ様式まで沈降を示した。

(6) 精製したCryoは、IgGとIgMの混合型であった。(7) Cryoの補体液有血清に対する阻止能を表5に示した。2.85 mg/mlのCryoは約90%の血清阻止を示し、その1/10量では血清阻止を示さず、又血清も認めなかった。

(8) CH50の時間的推移とSerial Thrombin Time, Fibrinogenを同時に測定したが、有意の関係を認めなかった。

以上の結果より症例1は、IgGとIgM Complexを主とする低補体価を示したと推察される。さらにCH50の日内変動との関係については考慮される。

文献) 1) Mayer: Experimental Immunochimistry 2nd ed 2) 西岡: 血液学雑誌 11, 1905 1966
3) 保内: 最新医学 16 233 1961, 4) Mancini: Immunochimistry 2, 235 1965 b) Mackay: Amer J. Med 18 567, 1956.

若年性関節リウマチにおける補体系の動向

松浦美喜雄 (東京都立豊島病院整形)

Shaun Ruddy, J. S. Stillman,

K. F. Austen (ハーバード大, R. B. Brigham 病院)

慢性関節リウマチ患者の関節液中で補体活性が低下していることは、1964年の Rekin, Zvaifler (米国) また Hedberg (北政) の報告によって明らかにされ、この疾患の炎症の場である関節において補体系が関与している証拠と考えられてきた。さらに、この補体活性の低下はC4活性の減少に伴なうということも、Fastropoulos, Austen (1965), 島美, 園崎 (1968), Ruddy, Austen (1970) により明らかになっている。しかしながら、いくつかの点で成人の慢性関節とは異なる若年性関節リウマチにおける補体系の動向については、それについての報告を、Hedberg のものを除いてはみない。

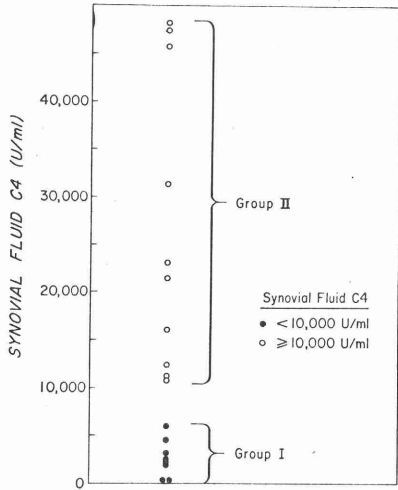
Boston にあるリウマチクリニックである Robert B. Brigham 病院において、1968年から1970年の間にあつめられた若年性関節リウマチの患者よりの血清、関節液について、それらの試料における補体系の活性を検討した。これらの試料は、16名の患者よりえられた、16組の同日採取された血清と関節液の Pairs であり、これにつき C1, C4, C2, C9 の活性を測定した。

若年性関節リウマチでは、RA 因子の出現率は約 20% といわれており、対象となつた患者群においてもわずかに3名の RA 因子陽性者を見るのみである。たゞ、このグループを関節液中の C4 活性によって2群にわけた。すなわち、関節液 C4 の低い群 (10000 単位/ml 以下, Group I) ならびに関節液 C4 の高い群 (10000 単位/ml 以上, Group II) とにわけた。(図1)

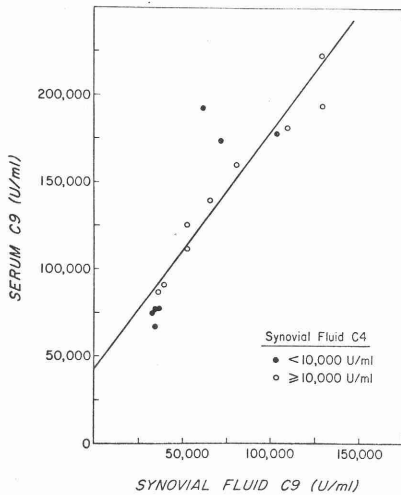
その結果、Group I には RA 因子の出現した患者3名が含まれ、Group II に比して病型が比較的重症 (polyarticular, systemic, pauciarticular の3型にわけた場合) で、発症年齢の平均も高いということが、観察された。抗核抗体は、Group I の4名 (うち3名は RA 因子陽性) Group II の1名に認められた。Group I では、関節液中の C1 活性、血清中の C4 活性の平均は、統計的処理により Group II のそれに比して、有意に低いことがわかった。

C9 活性については、血清中の C9 活性と関節液中の C9 活性とを対比すると、これらは高度の一次相関を示し、対象となつた患者群にあつては

C9活性という点からみた滑液膜の態度がほぼ定常かつ類似であることを推察させた。なお、これはRA因子陰性の慢性関節リウマチ患者においても観察された現象である。(図2)

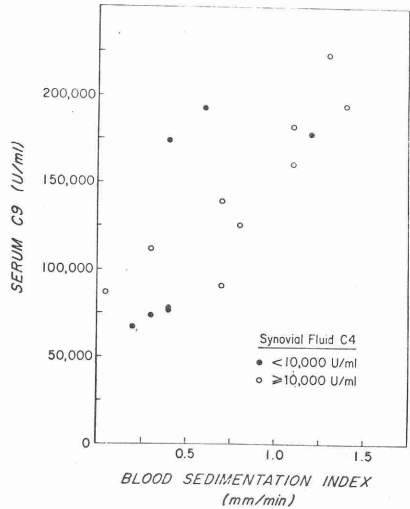


(図1)



(図2)

血清中のC9活性は、これらの患者にあっては、正常より高いニヒから、BSI値(Rourke-Ernsteinにより考案された血沈値)との相関を検討した。その結果、C9値とBSI値とは、対象患者にあっては、相関関係を示した。(P>0.02)これは、補体系の最終成分であるC9活性が炎症の動向とともに動くindicatorでありうる可能性を示唆するものかもしれない。



(図3)

腎移植患者における血清補体価の変動

都立大久保病院内科、倉田 要、

慶応義塾大学病院内科、大久保充人、田村寿夫、井垣嘉之、

九茂菊男、東京電力病院泌尿器科、中村 宏。

我々は、腎移植患者について、移植後の血清補体価の変動を経時的に観察して拒否反応との関係を検討した。既に才5回補体シンポジウムにおいて、1例報告を行ったが、その後慶大泌尿器科及び東京電力病院泌尿器科において施行された腎移植3例を加え併せて検討した。

(方法) Mayerの方法によりCH50を、Nelsonの方法によりC₁、C₄を、Radial immuno-diffusion法にてβ₁C-β₁A globulinを測定した。

(結果) 症例1. Y.T. 28才男、慢性腎不全。(図1)

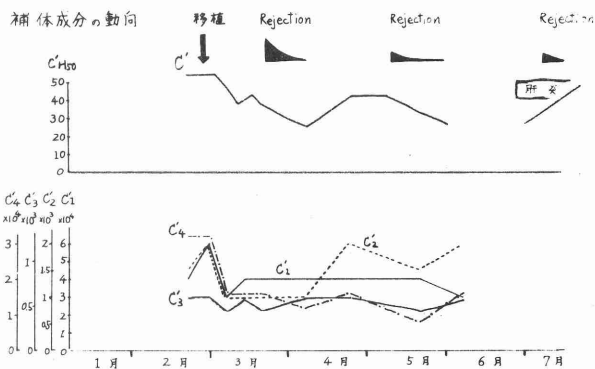
移植に備えて計13回の血液透析を施行、移植前日より、プロレドニン、イムラン投与を行って両側腎摘、次いで実弟より同種腎移植を受けた。移植後約2週間殆んど無尿状態を続けたが、以後漸次尿量増加した。移植後

1, 3, 5ヶ月目に rejection の徴候を認めたが、その都度免疫抑制剤を増量して防止に成功している。CH50は移植前後に高値を呈したがその後正常範囲迄低下している。才1回、才2回目 rejection の際、いずれも rejection に続いて正常範囲内の変動であるが、一時的な低下がみられた。才3回目の rejection は、時期的に肝炎の併発と一致するが、その際再度CH50は上昇を認めた。β₁A-β₁C (C₃)の推移はCH50とほぼ平行した。

症例2。(図2) O.K. 25才男、

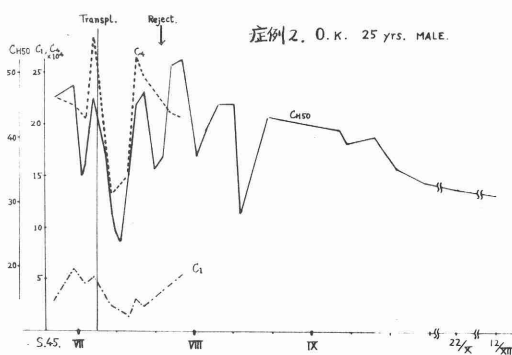
慢性糸球体腎炎、~~先~~先かじめ、抗リンパ球グロブリン(以下ALG)、イムランの投与を行ってから両側腎摘、脾摘に続いて実兄より同種腎移植を受けた。術後尿管壊死を併発した以外は順調な経過を辿り、尿量も一日2000~3000 mlに保たれた。ALGを減量する過程で rejection

症例1. Y.T. 28才男



<図1>

症例2. O.K. 25 yrs. MALE.

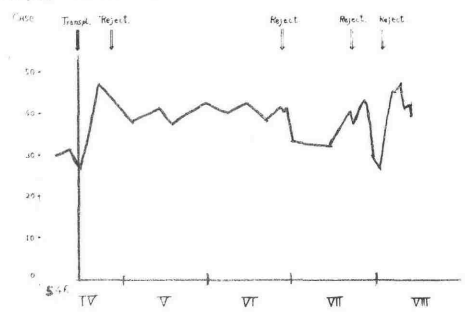


<図2.>

が疑はれたが、プレドニン投与により防止し得た。それ以後の経過は順調である。CH50は移植前、血液透析の影響もあるのか、変動を示し、移植直後には一旦低下を示している。rejectionの際には、一旦初期に上昇を示し、次いで低下を示し、それ以降はほぼ安定した値をとっている。C₃、C₁はほぼCH50と平行した変動を示した。

症例3. (図3) K.M. 15才男、慢性糸球体腎炎、型の如くALG、イムランを投与後、実父より同種腎移植を受けた。術前両側腎摘、脾摘を行った。本症例は他の症例に比し、組織適合性の点でやや劣っていた。術後、容易に利尿を認めず頻回にrejectionを起し、プレドニン等を併用して抑制につとめたが、才4回目のrejectionでついに抑え切れず高K血症で死亡した。CH50は移植後一旦低下し、才1回目のrejectionでは、初期に上昇した。その後しばらく安定した値を示したが才2回目のrejectionに続いて低下を認め、才3回目のrejectionの際には再び正常値迄上昇している。

症例3. K. M. 15 yrs. MALE.



<図3>

症例4. 10才男児、慢性糸球体腎炎、先かじめプレドニンとイムランの投与を行い、両側腎摘、脾摘に続いて、実兄より同種腎移植を施行、術後、尿漏を呈した以外は順調な経過を辿り、rejectionも認めていない。リンパ球細胞毒試験では完全な適合性を示した。本症例で数回にわたり、CH50を測定した結果いずれも正常値に安定していた。

(結論) 移植の直前、直後は一般に、血清CH50及び各補体成分の変動が強かった。その後は比較的安定した値を示すが、rejectionが起きると、その直前ないし、rejection初期にCH50の上昇を認め、続いて一時的に低下するのが認められた。順調な経過を辿っている症例では血清CH50の変動は少なくなっていく傾向がみられた。rejectionの際関与しているであろう補体の変動は、血清レベルである程度観察出来、血清補体価の変動を知ることは臨床的にも有意義であると考えらる。

演題(邦文) SLEの補体(抗補体性を中心として)

英文 Serum complement in patients with SLE

(with special reference to anticomplementary activity)

出題者名 天野哲基(TETUKI AMANO), 森田実(MINORU MORITA),
西下駿三(SYUNZO NISHISHITA), 河野勝昭(KATUAKI KONO),
大藤真(TADASHI OFUJI)

所属機関名 岡山大学医学部オニイ科

全身性エリテマトーデス(SLE)の低補体価の原因究明の一環としてCH50と各種自己抗体との関係について昨年の本シンポジウムにて報告した。今回はSLE血清が強い抗補体性を示すものが多い事に着目し、この抗補体性の原因、CH50との関係につき各種疾患と比較し考察してみた。

対象) SLE 52例、関節リウマチ 30例、橋本病 22例、ベーテト病 20例、その他慢性感染症、肝硬変症、多発性筋炎数例を対象とした。

方法) 抗補体活性(ACA)は非ゆ化血清とセルレット補体一定量を4°C、20時間感作し補体消費率を%で表した。DNA抗体価測定はActinomycin-D-DNA法によった。Immunoconglutinin 価はCoombs等の変法を用いて測定した。

結果) 自己免疫疾患その他のACAと γ -gl

先ずSLEその他の自己免疫疾患のACAは表Iに示すように肝硬変症、橋本病、関節リウマチ、SLEが高いACAを示した。次に γ -gl量とACAの関係を見ると上記疾患は、どれも高いACAを示したが、 γ -gl量の少ない多発性筋炎、ベーテト病はACAも低い。SLEでは表IIに示すように γ -gl量と相関する。免疫グロブリンでは特にIgGと関係が深い。

2) SLEのACAとDNA抗体との関係

SLEのACAとCH50は相関がみられるが、CH50 20以下で急性期のACAはCH50 50以上で寛解期に比して高値を示すものが多い。SLEのACAとDNA抗体価は $r=0.80$ にて正の相関を示す(表3)。しかもこれらはDNaseにより減少するものが多いが、特にDNA抗体価の高い血清に減少する率が高い。DNaseによりACAの減少するSLE血清の各蛋白分画のACAをみると γ -gl分画がもっとも高くDNaseに別減少する。以上よりSLE血清の抗補体性にDNA-DNA抗体複合物が関与していると考ええる。又DNA抗体価、ACAの高い例では低補体価を示すものも多く、これらの腎障害をみると高度なものも多く、SLEの腎障害の一因に補体結合性抗原抗体複合物が関与していると考えた。

3) SLEのACAとImmunoconglutininおよびRA factor

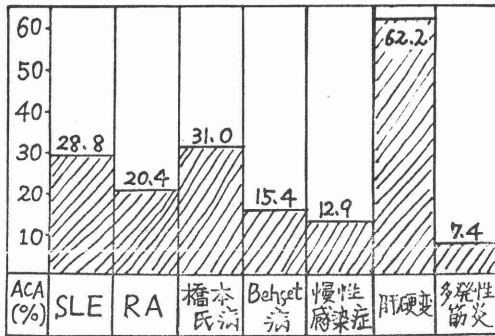
Immunoconglutinin (I.C)はその出現の意味は未だ不明であるが抗原抗体複合物等に補体が附着し、補体の抗原性を有してくる結果生ずる抗体ではない

かと考えられている。各種疾患のI-C価と比較してみるとSLE、関節リウマチは他疾患に比べて高値を示す。SLEのI-C価はACAとは相関しないが、長期観察例では急性期にI-C価が上昇し寛解とともに下降する傾向がみられCH50とは逆の相関を示す例が多い。RA factorとACAの関与はRA factorが強くなるに従ってACAも又高値を示した。

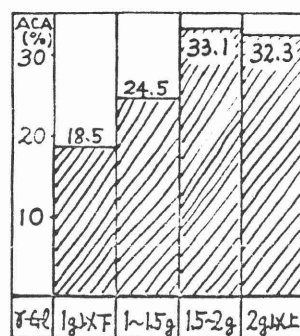
以上SLEのACAは γ -gl, IgG, エラにDNA・抗DNA complexを主体とするものと考えられる。SLEのImmunoconglutininはRA以上に高値を示しCH50と相関するがACAとは相関しない。このことよりSLEではI-C価、RA factorがともに高値を示し、これらとDNA抗体価と平行して変動することからSLE血中におけるimmune complexの存在が示唆せられる。

(表2)

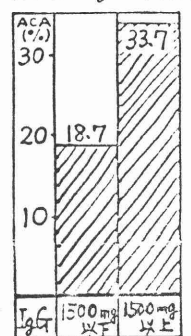
各種疾患のACA (表1)



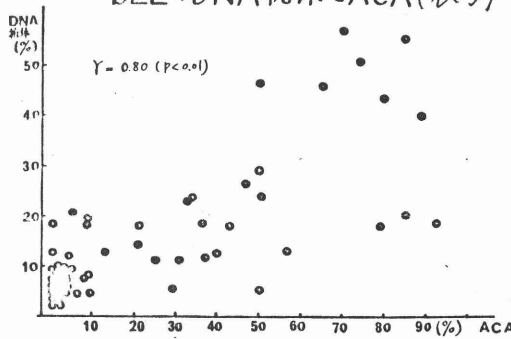
SLEの γ -GLとACA



SLEのIgGとACA



SLEのDNA抗体とACA (表3)



蛋白尿中の補体成分及びその inactivator について

北村肇 笠井よし子 稲井真跡

大阪府立成人病センター

尿中への補体成分の排泄は血清中の補体成分の変動の1つの因子として無視できないものと考えられる。われわれは1967年C4について尿中へ多量排泄されても必ずしも血清C4値は低下しないことを発表した。今回は蛋白尿中のC1~C9の溶血活性及びC1q, C1inactivator, β 1C-, β 1E-globulinの蛋白量について検討した。対象は蛋白濃度50mg/dl以上の尿(主として各種腎疾患患者尿)で、検体を遠心及び透析(一部は濃縮も)の後測定した。C1~C9の溶血活性はmicrotiter法で種々のintermediate cellとC1~C9のreagentを用いた。尚、このときEAC1.4.2はEAC1gpにC4huとC2huを, EAC7はEAC1gp4gpにヒトのC7cell reagentを加えて作った。C1q, C1inactivator, β 1C-, 及び β 1E-gl.の蛋白量はsingle radial immunodiffusion法で測定した。まず尿の13検体を測定してみると、溶血活性ではC4, C7, C8及びC9はほとんどの検体に、C2, C3, C5及びC6は約半数に検出され、C1は1例を除いて検出できなかった。又、C1qは全検体ともに検出できず、C1inactivatorは8例、 β 1C-gl.と β 1E-gl.は6例に検出された。このとき、蛋白濃度の低い検体では補体成分を検出できないものが多く、これは補体成分が存在していても微量のため検出できない可能性を考慮し、それ以後は尿を10~20倍に濃縮して測定した。[表1]は原尿蛋白濃度別にC1~C9の溶血活性について検出された検体数を示した。各Component別にみるとC7が一番多く44例中42例、次にC9 40例、C4 37例、C8 31例と多く、C2, C3, C5, C6は10例~19例で半数以下、C1は1例のみが検出された。尚、このC1が検出された例は60歳の糖尿病性腎症の男子で尿蛋白濃度は3.0gr/dlと大変多く、尿蛋白中にC1~C9すべての溶血活性、C1inactivator,

[表1] 蛋白尿中C1~C9溶血活性

原尿蛋白濃度 (mg/dl)	全検体数	C1	C4	C2	C3	C5	C6	C7	C8	C9
50 ~ 90	11	0	7	0	2	3	1	10	4	7
100 ~ 190	12	0	10	0	3	4	3	12	9	12
200 ~ 440	10	0	10	2	2	4	2	10	7	10
450以上	11	1	10	8	10	8	7	10	11	11
計	44	1	37	10	17	19	13	42	31	40

β1C- 及び β1E-gl. も検出された例である。又、この表から C1, C2 や C6 などの Component は原尿蛋白濃度がかたがり高くはない限り尿中へ排泄されにくいと考えられる。同一尿についてみると C7 だけ検出されたものから C1~C9 すべて検出されたものまで種々あるが、尿中蛋白濃度の高い検体ほど多種の Component が検出されることが多い。C1 inactivator 蛋白量については [表2] に示すごとく検出されたのは 19 例中 11 例で、200mg/dl 以上の蛋白濃度の高い検体のほとんどは 20% 以上で、最高値は尿蛋白 2.2g/dl の例で 74.8% であった。C1g は 19 検体すべて検出された。β1C- 及び β1E-gl. の蛋白量は [表3] に示した。検出されたのは 42 例中それぞれ 25 例、21 例で最高値は共に尿蛋白 6.0g/dl の例で β1C-gl. が 12mg/dl, β1E-gl. が 6.2mg/dl であった。β1C-gl. と C3 溶血活性及び β1E-gl. と C4 溶血活性の関係をみると β1C-gl. は検出されたも C3 溶血活性が検出されなかった例 (7 例) があつたのに反し β1E-gl. が検出されなかったが C4 溶血活性が検出された例が多岐 (18 例) あつた。以上より次の事が考えられる。① 尿中へは全補体成分が排泄され得る。② C7, C9, C4, C8 はほとんどの例に検出された。③ C1, C1g は検出されにくい。④ C3 溶血活性より β1C-gl. が、β1E-gl. より C4 溶血活性の方が検出されやすい。又、C8 溶血活性について、尿への排泄による血清中補体の変動についても検討する。

原尿蛋白濃度 (mg/dl)	全検体数	—	+	
			19%×下	20%×上
50~90	5	5	0	0
100~190	7	2	5	0
200×上	7	1	1	5
計	19	8	6	5

[表2] 蛋白尿中の C1 inactivator

* 正常血清に対する百分比

[表3] 蛋白尿中の β1C, 及び β1E-gl.

原尿蛋白濃度 (mg/dl)	全検体数	β1C-gl.				β1E-gl.			
		—	+ (mg/dl)			—	+ (mg/dl)		
			0.19×下	0.2~0.9	1.0×上		0.19×下	0.2~0.9	1.0×上
50~90	8	6	2	0	0	7	1	0	0
100~190	15	9	2	3	1	9	3	3	0
200~440	9	1	1	6	1	4	2	3	0
450×上	10	1	0	2	7	1	0	4	5
計	42	17	5	11	9	21	6	10	5

Non-functional C1 inactivator を有する
血管神経性浮腫の一症例

A case of angioneurotic edema with high content of
non-functioning C1 inactivator

○ 手嶋 秀毅 井上 貞久 (九州大学医学部心療内科)
永木 和義 飯田 恭子 稻井 真弥 (大阪府立成人病センター)

Hereditary angioneurotic edema (HANE) はその病態像に補体系の異常があらざることから Donaldson 等によって究明され、C1 の酵素学的作用、C1 inactivator の作用、更に補体系と線溶系、キニン系との関係が明らかに(てゆくやが)とて与えられた疾患として注目されて了。しかしながら、本邦において橋本、山本の一家系の報告があらざりてすまじい。

最近報告は、呼吸困難、腹痛発作、四肢の深部浮腫を以て classical な HANE の臨床症状を呈し、補体系に異常を認められた症例を報告したことがあった。

患者 K. T. 男子 43才 職業 土運業

主訴 呼吸困難及び腹痛

病歴 生来健康であったが、昭和34年より39年頃迄増に何々の浮腫を以てすわり込む様な腹痛発作があった。発作後1週内或いはそれ以上全身倦怠感及び食欲不振があったが呼吸困難はなかった。昭和43年、捻挫して入院中のことが痛くなり耳鼻科を受診して喉頭部の浮腫を認められ、治療を受けたが漸次増悪して呼吸困難を認められた。昭和45年5月より9月迄と昭和46年2月より5月迄の間が症状が強く、毎日の様に呼吸困難と腹痛があった。喘息の診断を受け治療し、ステロイドホルモンを服用したことがある。昭和46年7月、8月及び9月に血清補体系活性が全く認められず精査の爲九州大学医学部心療内科に入院した。

現在及び検査所見 呼吸数の増加、喘鳴及び四肢の浮腫(しむけ)があらざりて他に異常を認めない。検尿、検便、末梢血液像、止血材料、血清蛋白分画、肝機能、血清電解質等はすべて異常を認めず。梅毒血清反応(TPHA)は陰性であった。胸、腹部レントゲン、心電図、脳波に異常を認めない。

治療 Epsilon aminocaproic acid (イブシロン) の5%溶液 20 ml を今前中に投与すると夕方に呼吸困難は消失した。現在イブシロン 6g を四肢

中7. 呼吸困難は消失し、又四肢の浮腫もとれた。

補体系検査

1. CH50 昭和26年7月31日, 8月16日及び9月6日 何れも0.
10月10日(イグジニ>1角野理翌日) 25.3単位。

2. 補体成分活性

	正常	7/31	8/16	9/6	10/14
C1	169,000 x 1.5 x 10 ⁸	92,500 x 1.5 x 10 ⁸	58,700 x 1.5 x 10 ⁸	11,000 x 1.5 x 10 ⁸	
C4	64,000 "	63 "	40 "	32 "	
C2	1,060 "	64 "	47 "	6 "	
C3	800	800	800	800	
C3 (IA)	3,200				1,600
C5	25,600	25,600	25,600	25,600	
C6	25,600	25,600	25,600	12,800	
C7	12,800	12,800	12,800	12,800	
C8	102,400	102,400	51,200	102,400	
C9	3,200	6,400	3,200	6,400	

(C3~C9 活性は microtiter plate を用いて測定)

C1 inactivator 252,000 68,000 32,000 81,000

又、SIC Bw 31E の蛋白質量は正常7ある、このC1 inactivator の蛋白質量は正常のおよ2倍と著明に増加してゐた。

以上の様に、病々は classical な HANE の症状を有し、補体活性の消失、補体第一成分の第四成分活性の著明な低下、C1 inactivator 活性の低下及びC1 inactivator 蛋白質量の増加(大症例)を経験したことが報告された。

ヒト・リンパ球のE, EAC4C3 結合性とその起源

橋 武彦, 矢田純一, 西岡久寿弥

国立がんセンター研究所, 東邦大学医学部小児科

昨年のシンポジウムで西岡・橋らが報告したように, Burkittリンパ腫および上咽頭がんの生検材料由来の培養細胞はともにリンパ芽球様形態を呈するが, 抗原抗体複合物(EA)及び抗原抗体補体結合物(EAC4C3)との結合性に明らかな相違を示し, これが免疫学的な細胞のマーカーとなることを述べた。

今回我々はこれら培養細胞の起源をしらべるために, 細胞マーカーを用いてヒト小児のヒトリンパ球を中心にリンパ球のpopulationをしらべた。この間にヒト胸腺のヒトリンパ球はヒト赤血球と強く結合することを認めた。一方, 矢田らは既に蛍光抗体法により「ヒト胸腺リンパ組織抗原」と呼ぶ細胞質内抗原がヒト胸腺由来リンパ球に存在することを報告しており, この抗原の存在と上述の細胞マーカーとの関連性をしらべ興味ある成績をえたので報告する。

ヒト赤血球(E)はGV B⁺で3回洗い, 1×10^8 個/ml濃度で使用した。EAC4C3は至適濃度の抗ヒト赤血球ウサギIgM抗体で作った感作赤血球に血球1個当りC1^{8P}(1000 SFU), C4^{hu}(300 SFU), C2^{8P}(200 SFU)及びC3^{8P}(500 IA50)を型の如く逐次加えて反応させた後, EDTAおよび37°Cの温度処理として作製した。被検材料はすべて乳児及び小児から採取し, 各リンパ組織は生検又は剖検材料から集められた。反応は37°Cで1hr振とうし更に室温に1hr放置したのち上清を除き, 細胞を4%BSAを含むPBSに静かに再浮遊し, スライドグラス上に塗抹標本を作り急速乾燥した。塗抹標本はギムザ染色又は蛍光抗体法により染色を施した。Eとの反応は牛胎児血清中で行った。反応の判定は1検体300個以上のリンパ球について結合した赤血球の数および蛍光顕微鏡下に蛍光の有無を観察した。

実験結果を要約すると次の通りである。

(1) 各リンパ組織でみられる各マーカー陽性のリンパ球の百分率は表1に示した。胸腺抗原, E結合性に關しては胸腺リンパ球の大多数, 末梢リンパ組織では20-40%が陽性であった。EAC4C3結合陽性のものは末梢リンパ組織で20

表1 各種リンパ組織における各マーカー陽性リンパ球の百分率

	胸腺抗原	E結合*	EAC4C3結合*
胸 腺	94 (3)	73 (2)	—
脾	34 (3)	7 (3)	32 (4)
リンパ腺	39 (2)	22 (1)	24 (2)
扁桃	25 (3)	21 (2)	29 (4)
末梢血	36 (26)	16 (4)	18 (8)
骨 髄	1 (3)	2 (3)	3 (3)

() 検査例数; * 2個以上結合を陽性

-30%にみられた。骨髄リンパ球はいずれのマーカーについても陽性のものは極く少数であった。

(2) E結合性リンパ球は殆ど胸腺抗原陽性で、逆に胸腺抗原陰性のものはE結合性陰性であった(表2および表3)。従ってこの2つのマーカーは同一のリンパ球population (T cell?)の性質と考えられる。

(3) EAC4C3結合リンパ球は殆どすべて胸腺抗原陰性であり、胸腺抗原陽性細胞は殆どEAC4C3を結合しなかった(表4および表5)。従ってEAC4C3結合性はT cellとは異ったpopulationのリンパ球の性質と考えられる。

なお、EA結合性リンパ球については更に検討中である。

表2. 異った数のEを結合するリンパ球中胸腺抗原陽性細胞の百分率(未精リンパ組織3例の平均)

結合E数	0	1	2	3	4	5以上
陽性リンパ球(%)	29	59	82	90	87	100

表3. 胸腺抗原陰性リンパ球のE結合性

結合E数	0	1	2	3	4	5以上
陰性リンパ球(%)	86	9	3	1	1	0

表4. 異った数のEAC4C3を結合するリンパ球中胸腺抗原陽性のものの百分率

結合EAC4C3数	0	1	2	3	4	5以上
陽性リンパ球(%)	26	6	3	0	0	0

表5. 胸腺抗原陽性リンパ球のEAC4C3結合性

結合EAC4C3数	0	1	2	3	4	5以上
陽性リンパ球(%)	99	1	0	0	0	0

IgG の熱による Polymerization と Polymerized IgG の補体結合性

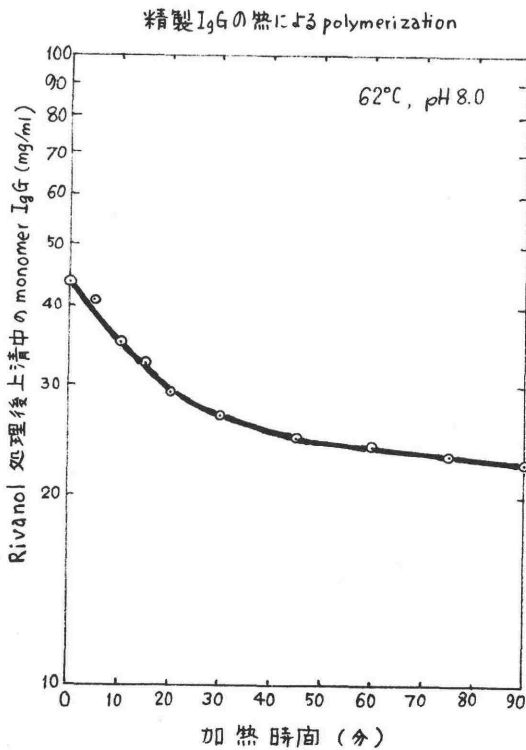
東京大学・物療内科 横張 龍 一

(1) Rivanol による polymerized IgG の沈澱

血清に rivanol を加えると、主として IgG を上清に残して他の血清タンパクが沈澱する。したがって、精製 IgG に rivanol を加えても変化はみられない。しかし、IgG を加熱して一部を polymerized したものに rivanol を加えると、混濁がみられる。これを遠沈によって取除くと、上清中には unpolymerized (monomer) IgG のみが残っていることが、上清の Sephadex G-200 によるゲル濾過で確かめられた。また rivanol による polymerized IgG の沈澱に際しては、unpolymerized IgG のまきこみはないことも、 I^{131} IgG を用いての実験で確かめられた。

(2) IgG の加熱による polymerization の Kinetics

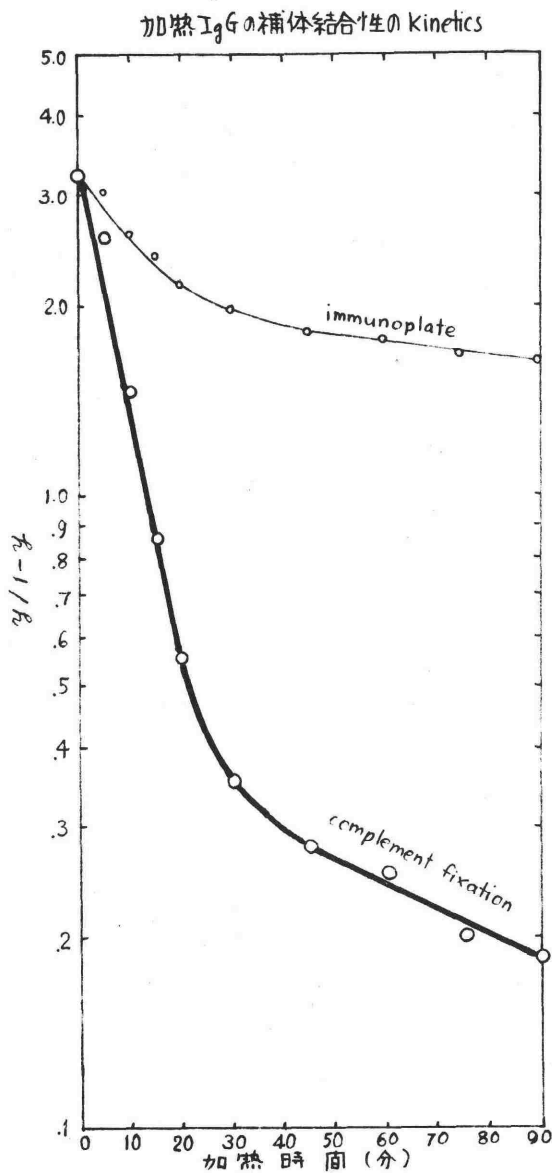
1% 前後の IgG 溶液 (pH 8.0 M/10 ベロナール緩衝液) を 62°C に加熱、0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 75, 90 分に sampling を行い、3.5 vol. の 0.5% rivanol を加えて遠沈、上清に残る unpolymerized (monomer) IgG の量を immunoplate を用いて測定した。この測定値の logarithm と加熱時間に対してプロットすると biexponential な曲線が得られた (図)。このことは、IgG の熱による polymerization が速いものと遅いものからなっていることを示している。換言すれば、IgG には熱に対する反応性という physicochemical な点で異なる 2 つの成分のあることが想定される。



このことは、IgG の熱による polymerization が速いものと遅いものからなっていることを示している。換言すれば、IgG には熱に対する反応性という physicochemical な点で異なる 2 つの成分のあることが想定される。

(3) Polymerized IgG の補体結合性

加熱した IgG を Sephadex G200 でゲル濾過を行うと、polymerized IgG と unpolymerized (monomer) IgG の 2 つのピークに分けられる。monomer IgG は補体と結合しないが、polymerized IgG は補体と結合する。色々な濃度の polymerized IgG に一定量の補体を加え、 37°C 、60分処理後 EA を加え、更に 37°C 、



60分 incubate して溶血を起させ、
 $\log(y/1-y)$ をプロットすると、
 polymerized IgG の量との間に直
 線関係が得られた。

(4) 加熱 IgG の補体結合性の Kinetics

上記の所見は、補体結合反応
 による polymerized IgG 測定を容
 易にしたので、IgG を 62°C に加
 熱、経時的に sampling を行い、
 その補体結合性を追ったところ
 図のような曲線が得られた。こ
 れも biexponential なものであり、
 immunoplate で測定された結果
 とよく平行する。

C1 エステラーゼおよびプロ C1s の精製

村松 睦, 須見洋行, 岡村和子, 藤井節郎 (徳大・医・酵素生理) 白石 聰 (徳大・医・皮フ科)

生体内において抗原抗体結合物が生じると、種々のプロ酵素が活性化されると云われている。補体系においては、C1が活性化され、C4, C2の存在下にC3およびC5から *Anaphylatoxin* を形成することが知られている。*Plasminogen* は *Plasmin* に活性化され、*Hageman* 因子は活性型になり、それは更に *Kallikreinogen* を活性化して *Kinin* 形成に關与すると云われている。Ratnoffらによると、C1s は C1t によつて活性化され、また *Trypsin* や *Plasmin* によつても活性化されるという。*Trypsin* および *Plasmin* はいずれも類似した基質特異性を有していることから、同じく似た基質特異性を有する *Kallikrein* もまた C1s の活性化に与かることが考えられる。さらに *C1esterase* には *Acetyl-L-tyrosine-ethyl ester* (ATE) のみならず、弱いながらも *Tosyl-L-arginine methyl ester* をも水分解するので、*C1esterase* による *Kinin* 形成も期待される。従つて、それぞれのプロ酵素を精製し、これら各種酵素の相互關係を明らかにすることは、生体内における蛋白分解酵素の制御機構を明らかにする上に重要なことと考えられる。われわれは先に、*Hageman* 因子は *Kallikreinogen* を活性化するが、*Plasminogen* の明確な活性化は認められず、*Plasmin* は *Kallikrein* を介することなく直接 *Kinin* を形成することを報告して來た。今回 *C1esterase* および C1s を単一にまで精製できたので、精製法およびそれらを用いて得られた結果について報告する。

C1-esteraseの精製: ヒト血清より Lepow らの方法によつて *Euglobulin* 分画を得、それを pH 7.4, $\mu=0.15$, 37°, 15分間加温して活性化した後、0.057M リン酸緩衝液, pH 7.4 で平衡化した DEAE-cellulose カラムに吸着させた後、0.25M の食塩を含む同じ緩衝液で勾配溶出を行う。ついで、pH 6.8, 0.05M のリン酸緩衝液で平衡化した *Hydrargylopate* のカラムに吸着させ、0.25M の緩衝液で勾配溶出する。更に 0.02M *Glycine* 緩衝液 pH 9.0 で平衡化した TEAE-cellulose カラムに吸着させ、0.5M の NaCl を含む同じ緩衝液で勾配溶出を行った。Table I に精製過程の結果を示した。得られに標品は超遠心, Disc 電気泳動により単一であり、 $S=4.3$, 分子量は約11万と推定された。C1-esteraseによるキニン形成: ヒト血漿より *Kininogen* I および II を分離し、精製 *C1-esterase* のキニン形成能を調べた。Fig. 1 および 2 に示すごとく、*Trypsin* によるキニン形成が数分間で最大に達するのに対し、*C1-esterase* によるキニン形成は、極めて後序であることがわかった。

C1s の精製: 前と同様 *Euglobulin* 分画を得、pH 7.4, $\mu=0.15$, 1mM EDTA を含む

Table I PURIFICATION OF Cl-ESTERASE FROM HUMAN PLASMA

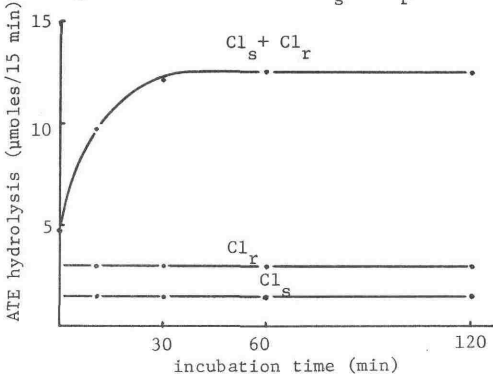
	total protein	total activity	specific activity	yield	ATE/TAME
Euglobulin	3330mg	21645	6.5	100	2.50
DEAE-cellulose	80	12970	162	59.9	3.80
Hydroxylapatite	10.4	7912	761	36.6	3.89
TEAE-cellulose	2.9	3350	1155	15.5	3.89

Table II

PURIFICATION OF PROCl-ESTERASE FROM HUMAN PLASMA

	total protein	total activity	specific activity	yield
Euglobulin	1400mg	11500	8.2	100
Ist DEAE-cellulose	42	4860	118	42.3
IIInd DEAE-cellulose	12.6			
Hydroxylapatite	2.8	1250	446	10.9

Fig.3 ACTIVATION OF PROCl_s BY Cl_r



リン酸緩衝液で平衡化したDEAE-cellulose

カラムを用い、0.5M NaClを含む同じ緩衝液で勾配落出する。Trypsin で活性化し、ATE 水解能を有する分画を集め、pH7.4, $\mu=0.15$, 2mM EDTA および0.1 M NaCl を含むリン酸緩衝液で平衡化したDEAE-cellulose カラムに吸着させ、0.5M NaCl を含む同じ緩衝液で勾配落出する。非吸着の分画はCl_rを含む分画として集める。ついで0.05M リン酸緩衝液, pH7.4 で平衡化したHydroxylapatite カラムに吸着させた後、緩衝液の濃度を段階的に上げると、0.15 M で落出された。各精製過程の結果をTable IIに示した。得られた標品は、超遠心, Disc 電気泳動, 免疫電気泳動により単一であった。S₂₀ = 6, 分子量は約16万と推定された。Fig3に示すごとく、Cl_rと思われる分画を加えると活性化が起こるが、Cl_s 単独での活性化はみられなかった。Plasmin, Kallikrein によるCl_s の活性化: 精製したPlasminogenをStreptokinaseで活性化したPlasmin およびAcetoneで活性化したKallikreinによるCl_sの活性化について調べた結果をFig4に示した。弱いながらも活性化がみられた。

Fig.1 KININ FORMATION FROM KININOGEN I

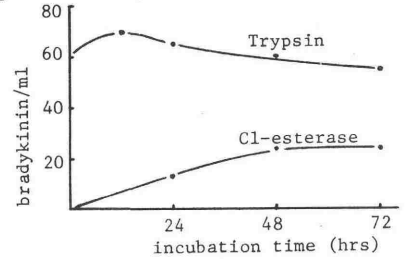


Fig.2 KININ FORMATION FROM KININOGEN II

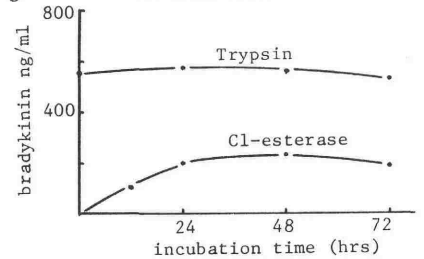
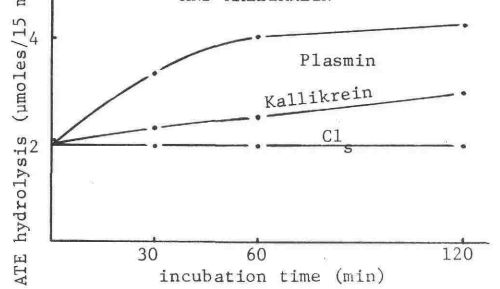


Fig.4 ACTIVATION OF PROCl_s BY PLASMIN AND KALLIKREIN



ヒト CI (CI hu) と CI inactivator (CI INA)

との反応について

Interaction of human CI and CI inactivator

大阪府立成人病センター

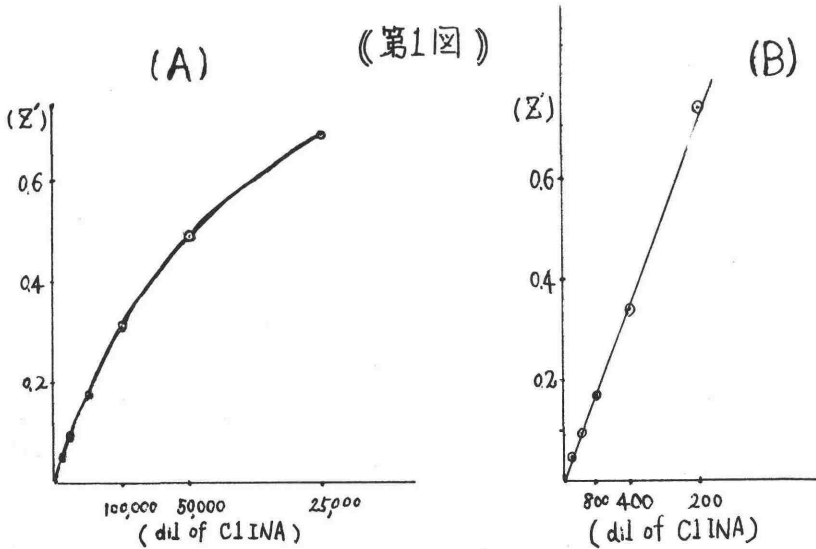
○永木 永義

飯田 恭子

CI hu と CI INA との反応については 1962 年の *Labor* 号の報告 (始末) 番号 5 の記事がなされた。Gigli 号は 1968 年、それによって CI と CI INA と fluid phase と反応させて CI INA の stoichiometric に deplete されたことを報告してゐる。我々はこれと一致しない結果を得たので報告する。

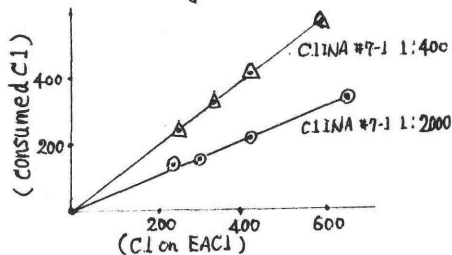
CI hu は Nelson 号の中性沈澱を得たものを更に Sephadex G-200 から 2 回通したものを用いた。CI INA は中性沈澱を除いた上清より精製した。CI hu と CI INA との反応は 37°C 30 分に反応してゐる。

I. CI hu と CI INA と fluid phase と反応させた時の CI INA と CI hu との dose-response curve は外一図 A に示す如くである。Gigli 号の報告してゐる結果 stoichiometric に反応する。これに及して CI INA と CI hu との反応は外一図 B に示す如く stoichiometric となる。即ち CI hu と CI INA の反応は CI hu と CI INA との反応型式と全く異なつたものと考へられる。

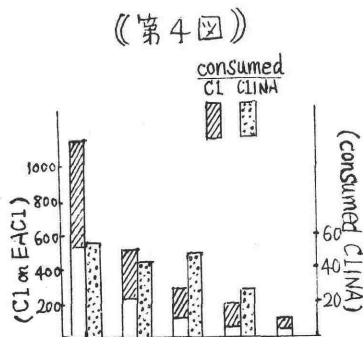
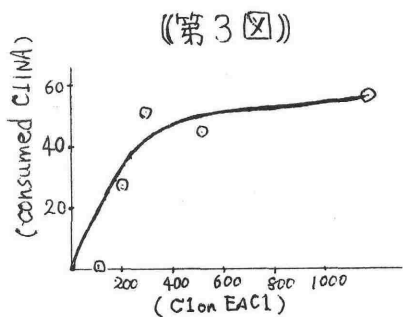


II. EA CI cell に CI INA を一定量作用させたので、初めに cell とある CI の量と CI INA によつて消費された CI の量を plot すると

第2回のように原点を通る直線関係が成立する。即ち、一定量のC1とILN Aは cell 上に何分のC1が fix されてもその一定の割合のみを消費(7リ)。(第2図)



次に第2回と同様の実験で、初めに cell 上にある C1 の量と消費される C1:ILNA の量とを plot すると第2回のように直線関係が成立する。第3回、第4回の5回5回の測定、cell fixed の C1 が反応能以上増加すると C1:ILNA の消費は増加せず一定になる。逆に一定量の C1:ILNA が消費されても cell 上の C1 は減少せず、消費される C1 の絶対量は大きくなる(第3回、第4回)。



以上の事実より、C1 と C1:ILNA との間は単なる stoichiometric 反応ではなく、可逆的種族体系を介しての反応と見られる。両者の protein-protein complex を作るか、或いは enzymatic 反応であるかは不明である。

補体成分1成分と成分4成分との間の反応に及ぼす

TAME及びATEEの影響についての比較

島田彰子, 田村昇 (国立がんセンター研究所 ウイルス部)

TAME及びATEEはヒト又はモルモットのCIによって加水分解される。このCIの酵素活性が補体溶血反応に関与している事は、Stroudらによって示唆されている。つまりEAC14とC2の反応において、CIの合成基質であるTAMEが本来の基質であるC2と拮抗的に反応して、SAC142の形成を阻害するという報告である。そこで我々は、ATEEについても同様の実験を試みたところ、図1に示すごとく、ATEEはSAC142の形成には全く影響しないという結果を得た。さらに我々は、CIとさう一つの本来の基質

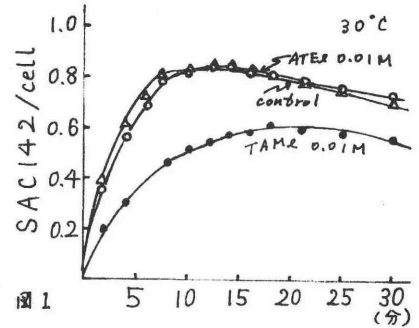


図1

である。ATEEについても、同様の実験を試みたところ、図1に示すごとく、ATEEはSAC142の形成には全く影響しないという結果を得た。

さらに我々は、CIとさう一つの本来の基質であるC4との反応に、TAMEとATEEがいかに影響を及ぼすかを比較検討してみた。まず、EAC1とC4の反応による、SAC14の形成においては、図2に示すごとく、TAMEはEAC1に対してC4と拮抗的に作用してSAC14の形成を阻害している。これに反して、ATEEの存在下では

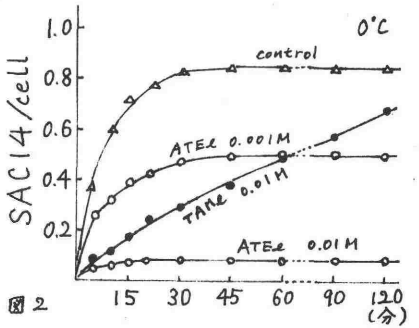


図2

あるか否か、反応性の低いEAC1、あるいは、より低濃度のC4を用いた場合はSAC14の形成曲線が得られた。次にSAC14の形成中におけるC4の消費はどのようになっているかを検討してみた。図3に示すごとく、TAMEでは、SAC14の形成の遅れと一致して、C4の消費速度が遅延される。ATEEでは、SAC14の極大形成量と対照に比して著しく低いにもかかわらず、反応液中のC4の消費は対照とほぼ同程度である。更に、液相中のCIによるC4

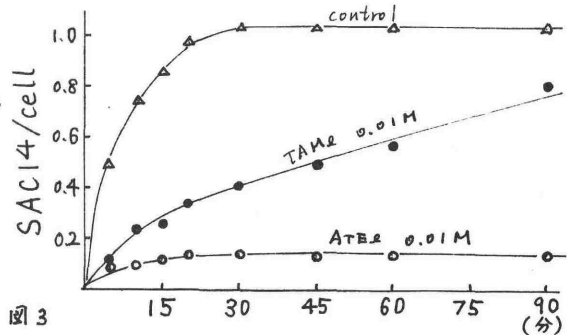
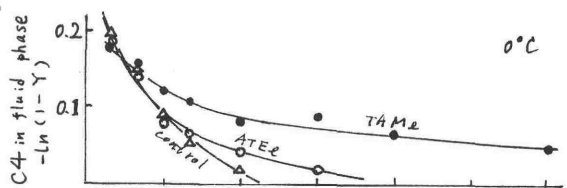


図3

の不活性化に対する TAME と ATE の影響は、図 4 に示すごとくである。TAME は C1 による C4 の液相での不活性化を阻害しているが ATE はほとんど影響を及ぼさない。なお EAC1 が C1 と同様に TAME と ATE とを加水分解することは、図 5 に示すごとくである。モルモットに関しては、C1 でも EAC1 も TAME の方が ATE より、よく分解するが、EAC1 では、その差

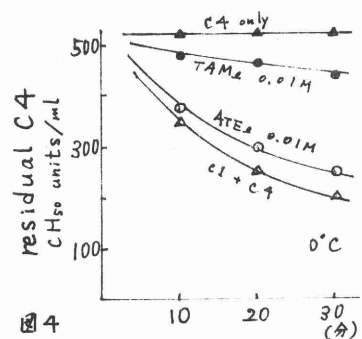


図 4

が小さくなる傾向が常にみられる。これについては目下検討中である。

以上の諸反応における TAME と ATE の差異を説明する手立ての一つとして、それぞれのエステル残基のあるトシル

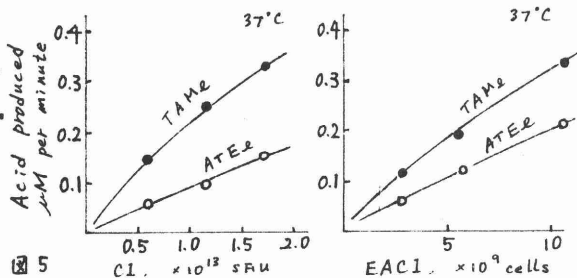


図 5

アルギニンとアセチルチロシンについて、各反応における影響を調べてみたところ、トシルアルギニンは、すべての反応に対して、全然影響を及ぼさないが、アセチルチロシンは、ATE と全く同様の作用を及ぼす。この事実が前述の実験結果より、TAME はそのエステル部分が C1 と C4 との反応に対して拮抗阻害剤として働くが、ATE はそのエステル部分が影響を及ぼすとしても、極くわずかである。主としてアセチルチロシンが、C1 と C4 との反応に影響を及ぼすものと考えられる。ATE の存在下では、SAC1 の形成が低いにもかかわらず、対照と同じように C4 が消費されるということは、ATE は C1 の C4 に対する作用を阻止しないが、C1 の作用を受けた C4 が、血球膜あるいは免疫グロブリン上に存在すると仮定されているレセプターに結合するのを阻止すると考えれば、説明できよう。

- 1) Becker, E.L.: Concerning the mechanism of complement action. II. The nature of the first component of guinea pig complement. J. Immunol., 77; 469, 1956.
- 2) Lepow, I.H., Ratnoff, O.D. and Pillemer, L.: Elution of an esterase from antigen-antibody aggregates treated with human complement. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 92; 111, 1956.
- 3) Stroud, R.M., Austen, K.F. and Mayer, M.M.: Catalysis of C'2 fixation by C'1a. Reaction kinetics, competitive inhibition by TAME, and transferase hypothesis of the enzymatic action of C'1a on C'2, one of its natural substrates. Immunochemistry, 2; 219, 1965.

CTINH の関する研究

京都府立医科大学 増田内科

近藤元治 細川計明

CTINH (C1-esterase inhibitor) は、補体系1成分のみならず、plasmin, kallikrein に対する inhibitor として、その作用機序の関心が向けられて来た。CTINH は、C1 β の EAC1 等の活性 C1 の enzymatic active center に結合して、C1 の natural substrate C4, C2, 或は synthetic substrate の分解を阻止する事が知られて居る。

CT と CTINH の関連につき、2, 3 の知見を得たので報告する。

1) CT は、異なる濃度の CTINH と incubate した後、C4, C2 β C-TAME (AAME) に対する CT の residual activity をみる。CTINH の濃度の増加に伴い、CT の hemolytic activity, C2 β C-TAME に対する作用が著しく低下したのに対して、C4 β C-AAME に対する作用は、比較的障害されにくい。この事は、CTINH による CT の enzymatic activity の dissociation は、CT を 52°C に加熱した時、hemolytic activity, C2 β C-TAME 破壊作用が速く失はれ、C4 β C-AAME に対する作用が障害されにくく、同様の解離現象を示さないと考えられる。CT の enzymatic site, 或は CT molecule の conformational change の問題を、解決の糸口を与えると思われる。

2) CTINH の CT inhibition は、1 molecule 対 1 molecule の結合であるから、stoichiometric に CTINH の処理が出来ると報告されて居る。しかし、CTINH と CT の反応は、夫々の濃度の影響を受け、又温度や時間の影響もある事が明らかとなり、単なる site と site の結合だけではない、何らかの enzymatic process が働いている可能性が出て来た。

3) CTINH は、電泳泳動的に α_2 -globulin とされて居る。 α_1 -antitrypsin deficient serum は、凍結保存中の C4 β C-C2 の titer が極度に低下し、同時に CTINH の活性も著しく低下する事が判明した。これは、 α_1 -antitrypsin の欠除が起因する何らかの factor により CT の活性化が起り、これが C4, C2 を破壊、更に CTINH の活性を奪い去る、と考えられる。この血清は、更なる電泳泳動により、CTINH の沈降線が β 領域に延び、CT と結合したものが、或は CTINH の分解が起り、と考えられる。CTINH に対する各種処理の影響につき検討中である。

C I inactivator を欠如したモルモット血清

国立がんセンター研究所 田村 昇, 奥田 智子
 東京大学医学部研究所 成内秀雄, 臼井美津子

C I inactivator の欠如が先天性血管神経性浮腫 (HANE) の病因であることは、すでに知られているが、我々は C I inactivator を欠如していると思われたモルモット血清を見出した。

補体血清を得る目的で全採血したモルモット血清の中に全く溶血活性のないものがあり、その血清について補体成分の溶血活性を調べると、表1のように、C4とC2の活性は $\frac{1}{2}$ 希釈でも全く認められなかった。また C I inactivator の活性も $\frac{1}{20}$ 希釈でも全く検出されなかった。

Immunolyso-electrophoresis法で、C I の溶血活性をみると、図1のように、正常モルモット血清では C I は、SとMの2つの溶血帯に分かれるが、この血清では、C I はSとMとFの3つの溶血帯に分かれた。これは HANE に特有な像として、橋らによりすでに認められているものである。

C I inactivator は C I のエステラーゼ活性を阻止する。表2は、この血清が C I のエステラーゼ活性を阻止するか否かと、正常血清と比較検討した結果である。正常血清の 0.3 ml は C I (約 25 万 C_1H_{50} 単位) のもつエステラーゼ活性を完全に阻止する。これに反してこの血清の 0.3 ml は全く阻止しないばかりでなく、それ自身でもわずかにあるがエステラーゼ活性がある。

なお、抗 C4 血清で検出できる C4 分子はこの欠如血清にも存在している。従ってこの C4, C2 の溶血活性の低下は HANE の場合と同様に、C I inactivator の欠如によるものであろうと考えられる。

表1. 補体成分と C I inactivator の活性

	正常血清	欠如血清
C1	12000	4000
C4	24000	<2
C2	6000	<2
C3	12000	12000
C5	64000	64000
C6	8000	12000
C7	128000	64000
C8	256000	256000
C9	64000	64000
C I inact.	16000	<20

図1. Immunolyso-electrophoresis

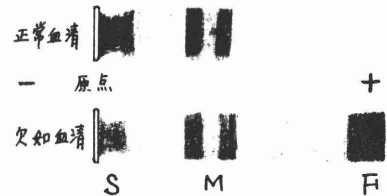


表2. C I エステラーゼ活性の全血清による阻止

C I	正常血清	欠如血清	ATE ₂ 分解活性*
1.0 ml			1.94
1.0	0.1 ml		0.51
1.0	0.3		0
1.0	0.5		0
	0.5		0
1.0		0.3 ml	2.10
		0.3	0.24

* 全量 3 ml, ATE₂ 最終濃度 0.01 M, 37°C での 20 分間に産出された 尿酸の総量 (μM)

Dithiothreitol (DTT) による GPC3 の特異的結合能の阻害

金沢大学がん研究所分子免疫部

高橋セイヤ 田中清三 河野寛一 高橋守信

昨年ホウ回補体ジンボジウムにおいて、西岡らは、DTT が C3INA の活性を阻害すること、また、bound C3 (EAC43) に対しては DTT を処理した後、アルキル化することによって、C3 の溶血活性が、阻害されると発表された。

われわれは、西岡らの追試を行っている過程で、DTT の液相における C3 への直接作用を見出した。即ち、

1. DTT が、EAC142 cell と C3 との反応を阻害する。

2. このような C3 活性の阻害は、膜表面への結合を阻害することによる。したがって、C3 の膜表面への結合には、1 個以上の labile な -SS- 結合が必要であると思われる。

材料及び方法 モルモット C3 の精製その他の補体研究用 reagents の調製は、全て既報の通りである (アレルギー, 19(12) (1970))。DTT (羊井化学) は、全て使用直前に溶解したものを使用した。ウサギ抗 GPC3 血清は、国立がんセンター、田村先生から分与されたもので、GPC3 に対して、monospecific であった。

成績 (1) DTT 存在下で EAC142 と C3 との反応が、阻害される。マイクロタイターに DTT を GVB⁺ で階段希釈した後、C3 (1200 CIA₅₀/ml) の 1/10, 1/40, 1/100, 1/400 に希釈したものをそれぞれ 1 滴づつ各列に加え 37°C 15' 反応させた後、EAC142 cell (1 × 10⁸/ml) を 1 滴加え、更に、37°C 20 分間反応させる。その後、HuE (1 × 10⁸/ml) を 1 滴づつ加えて 37°C 30 分 (くらい)、90 分静置して IA pattern をみるところ、C3 IA titer は著しく低下した。

C3 (1200 CIA ₅₀ /ml)	IA pattern									
	DTT の濃度									
	150	75	37.5	18.75	9.37	4.68	2.34	1.17	0.58	0
1/10	lysis	lysis	3	4	4	4	4	4	4	4
1/40	lysis	lysis	1	3	4	4	4	4	4	4
1/100	lysis	lysis	trace	2	3	4	4	4	4	4
1/400	lysis	lysis	lysis	1	1	1	2	3	3	4

しかし、西岡らの成績と一致して、bound C3 (EAC43 cell) の IA 活性には、ほとんど阻害が認められなかった。

(2) DTTによるC3活性の阻害は可逆的であって、透析によって、DTT阻害作用はほとりのどかれ C3活性はほぼ元のレベルまで回復した。

DTT濃度	Residual C3 titer (CIA ₅₀ /ml)	
	C3 + DTT	C3 + DTT / 透析
15 mM	256	720
5	818	720
1	946	720
Phosphate Buffer	1127	720

(3) しかし、DTT処理後、ヨードアセトアミドによるアルキル化を行なえば、透析によってもC3活性の回復は認められなかった。

- A. C3 + DTT, 15mM / 37°C 15' / + ヨードアセトアミド, 15mM / 37°C 15' // 透析 80 (C3 CIA₅₀/ml)
- B. C3 + DTT, 15mM / 37°C 15' / + Phosphate Buffer / 37°C 15' // 透析 480
- C. C3 + DTT, 15mM / 37°C 15' / + Phosphate Buffer / 37°C 15' // 透析 600

(4) DTTの作用機序としては、C3のEAC142 cellへの特異的結合を阻止するに効果が示された。DTTの存在下で、EAC142 cellとC3 (1200 CIA₅₀/ml) と反応させた後、washしてから再浮遊しC3がEAC142 cellに結合しているかどうかを、AntiGPC3を用いて調べた。

	Anti C3による凝集 pattern						
	抗体希釈						
	2	4	8	16	32	64	128
EAC142 + C3 400 + DTT 15mM	0	0	0	0	0	0	0
EAC142 + C3 400 + DTT 5mM	0	0	0	0	0	0	0
EAC142 + C3 400 + DTT 1mM	0	0	0	0	1	2	2
EAC142 + C3 400 + GVB ^{††}	0	trace	2	3	4	4	4

(5) DTTを作用させたあとのC3をポリアクリルアミドゲル電気泳動法で調べたが、分子量の変化や移動度の変化は認められなかった。

結論 これらの実験成績から、DTTは、C3分子の-SS-結合を断裂し、その結果、C3分子のconformationの変化が起ることで、C3分子がEAC142 cellへの結合を阻止するに効果がわかった。このことから、C3のEAC142 cellの特異的結合には1個以上の-SS-結合が重要な役割を果たしていることが示唆される。

モルモット補体C3成分の構造と活性

奥田智子* 高橋健治† 山主公子* 西岡久寿彌*

* 国立がんセンター研究所ウイルス部

† 東京大学理学部生物化学

補体C3成分は種々の生物活性を有し、生体にとって有利な反応にも不利な反応にも関与していることが知られている。これらの多様な反応がどのような構造に由来し、どのような機構で起るかを調べることは極めて興味ある重要な問題である。我々はC3に様々な化学試薬を作用させ、C3の溶血活性とImmune Adherence (IA) 活性への影響を調べ、その際の分子の変化を考察した。

C3を同容の化学試薬とpH 7.5で30°Cに90分反応させ、反応混合物を透析した後、残存する溶血・IA活性を測定した。C3の活性に影響のみられなかったものには、モノヨード酢酸、ヨードアセトアミド (IAA)、無水コハク酸、PCMB, DNFB, グリオキサール, システイン, シスタミン, TPCK, DFPがある。すなわちSH基, NH₂基の修飾試薬や弱いS-S試薬では影響がない。またEAC1423はキモトリプシンと類似の基質特異性を示すが、トリプシンやキモトリプシンのinhibitorはC3の活性に影響を与えなかった。活性の低下が見られたものを表1に示す。

7回補体シン

表1

ポジウムで西岡は血球に結合したC3にDTTを作用させるとC3の溶血活性は失われるが、IA活性は影響を受けない、C3 Inactivatorの作用も受けなくなることを報告したが、液相で試薬を作用させた場合は溶血、IAいずれの活性も低下することがわかった。

化学試薬		残存活性	
		HL	IA
ジチオスレイトール + IAA (DTT)	1.5 mg/ml	24%	16%
	1.0	32	50
	0.2	57	100
	0.04	74	100
アセチルイミダゾール (AI)	6.0	42	24
	3.0	80	100
テトラニトロメタン (TNM)	4.0	70	100
ヒドロキシルアミン	1.0	65	100
	0.5	89	100
N-ブロムコハク酸イミド (NBS)	0.008	1	1
	0.004	5	24
クロラミンT	0.015	36	

表1の結果から DTTによる S-S結合の切断, AI, TNMによるチロシンの修飾, NBSによるトリプトファン, チロシンまたはメチオニンの修飾, あるいは結合の切断が活性部位に影響を与えるのであろうと推定される。

C3を封管中で加水分解 (6N-HCl, 110°C, 24時間) した場合のアミノ酸組成を表2に示す。DAB法でトリプトファンを定量すると25エ3であるが, NBSで処理して活性を失ったC3はトリプトファン含量が著しく減少している。C3を過ギ酸で酸化した後, システイン酸として定量すると S-S は約12個である。

C3をNBSで処理するとEAC142に結合しなくなることがC3を¹²⁵Iで標識することによって確かめられた。EAC1423にNBSを作用させるとその量に対応してEAC1423の溶血活性が低下するが, IA活性の低下は見られなかった。

EAC1423をNBSで処理した後, C3 Inactivator を作用させてもEAC1423のIA活性の低下は見られなかった, すなわち非常に微量のNBSで処理することによって, DTTの場合と同様EAC1423はC3 Inactivatorの作用を受けなくなる。NBS処理によってEAC1423-¹²⁵Iから低分子量のC3フラグメントが脱離してくることが示唆された(図1)。

表3. EAC1423*とNBS, DTTの反応

	Sup, cpm	Ppt., cpm	% Liberated
NBS 10 γ /ml	9110	16248	36
6 γ /ml	5380	15472	26
DTT 20mg/ml	2606	16042	14
10mg/ml	2162	13649	14
buffer (PBS)	1400	17781	8

表2. アミノ酸組成

Lys	119
His	29
Arg	72
Asp	158
Thr	94
Ser	96
Glu	176
Pro	93
Gly	119
Ala	114
Val	130
Met	35
Ileu	83
Leu	132
Tyr	56
Phe	49
Cys ₂ H	24
Trp	25

Ghost ヒツジ赤血球を用いた IMMUNE ADHERENCE の 定量的解析

ロンドンセンター 研究所 イラスト

西岡久壽房、奥平陽一、奥田智子

Immune Adherence 反応 (IA) は、抗原、抗体、補体活性を測定する高度の感度をもつた反応として血清診断の上に、また各種の免疫現象の解析に利用されて来ている。反応の最終結果の判定は ① 粒子抗原のヒツジ赤血球 (HuE) への粘着 ② 上清より粒子抗原の消失の顕微鏡的観察及び ③ HuE 凝集像の肉眼的判定によつて来た。

この反応機構をさらに免疫化学的に解析するたぐにもより精度の高い簡便な定量的方法が求められている。さらに井上(雅)らは牛血清アルブミンを標識した抗原として用いる IA の定量法を試み、南根はさらに高度にラベルした微量の牛血清アルブミンを用いる Radioimmune adherence 法の確立に成功した。

補体成分、とくに C3 の IA 又は溶血活性と構造の関係を追究して行く目的には、免疫溶血系と同じヒツジ赤血球 (E) - ウサギ抗体と抗原抗体系に用いた定量 IA 法を樹立することが少くあり、あわせて、鼻咽頭癌、伝染性単核球病由来の培養細胞をリンパ系の B 細胞等の IA Receptor の迅速な定量法を企図して以下の実験を遂げた。

① 各種 Intermediate 産生血球の Ghost 化と IA 反応性

I^{125} でラベルしたウサギ IgM 抗体 (M^*) で感作した E を抗原抗体系とし、1000 SFU の C1, 300 SFU の C4, C2; 300 CIA₅₀ の C3 を 1 個の細胞あたり反応させた各段階の中間反応体をつくり、GVB⁺⁺ を洗って生理食塩水で滲血し、5倍等長の VB 食塩液を加えて増殖化 (以下 Ghost Cell とする)、ヒツジ赤血球培養細胞 N-37, P3HR1 を 37°C 30分反応させ、10ml の冷GVB⁺⁺ を加えて 750 × 9 10分遠心すると、IA 反応性をもつた EM* の中間反応体が IA Receptor をもつた細胞としてに吸着するのでその I^{125} を Auto-γ で測定するのが一般原理である。この系ではヒツジ赤血球、N-37 細胞のみが EM* C1-23 と反応し、他の組合せにおいて Back Ground 値 (EM* のみで約 10% 以下) と反応し、上述の細胞と非特異的に反応する) 以上の放射活性を示さない。

② 形成された EM* C43 とヒツジ赤血球の反応

3×10^7 の Ghost EM* C43 に $1.25 \times 10^7 - 2 \times 10^8$ までの HuE を増培して加え 37°C 30分反応させると、 1×10^8 までの HuE の数に依る直線関係に近い Dose-Response を示し、それ以上は plateau となる。

限量の C3 で感作した Ghost EM* C43 3×10^7 と HuE 2×10^8 を反

おさせると 37°C 15分で peak に達するが、2°C では反応速度が極めて遅く 4 時間でもなお peak に達しない。

③ Ghost EM* に対するヒト血清の IA 反応性の測定

4×10^7 の Ghost EM* に $1/1500$ の新鮮ヒト血清を加え過時的に 37°C で反応させ、 2×10^8 の HuE を加えてさらに 37°C 15分反応させて、HuE と反応する EM* 補体結合物を測定すると、ヒト血清と EM* の反応時間は、37°C 5分で plateau に達している。

以上の実験にともなう、ヒト血清の IA 反応性を測定する方法を組立てた。GVB⁺ メジウ 42、 2×10^7 の Ghost EM* 0.2ml に希釈血清 0.2 ml を加え 37°C 5分反応。HuE 2×10^8 (0.2ml) を加え、37°C 15分後、冷や VB⁺ 10ml を加え、750 X g 10分遠心して HuE と結合した反応の EM* を測定する。補体量の Back Ground (40% ~ 15%) を差し引き、Ghost EM* の HuE と反応した割合 y を計算すると、補体量 (x) は免疫溶血反応に示された von Knopff の実験式 $x = \left(\frac{y}{1-y}\right)^{1/n}$ に従っている。両項を対数方眼紙に plot すると、 $1/750$ 以上の血清希釈では直線性を示し、 $1/n$ は健康成人では 0.24 ~ 0.26、 $1/y = 10$ を示す CIA 50 のこの系では $1/1200 \sim 1/1800$ の値を示している。

④ 結合 C3 の IA 活性と溶血活性の比較

Ghost EM* C14 4×10^7 (0.2ml) に C2 0.1, 希釈した C3 0.2 ml を加え 37°C 30分後 HuE 2×10^8 (0.2ml) を加え 15分後に冷や VB⁺ を加え 750 X g 10分遠心して HuE に結合した EM* C1423 を測定する。一方同じ lot の同量の EM* C14 に C2, C3 を同濃度同量加えて、C5-9 を過剰に加え溶血活性を比較測定した。Specific に HuE に結合して反応する EM* C1423 を加えた C3 の量に対して plot すると、溶血反応で測定した C3 の Hemolytic site/cell と C3 の量の dose-response とほぼ一致し、高濃度の C3 で若干低下する反応曲線を示した。

このように限量の C3 で作成した EM* (C4) の C3 site を 1mg から 3mg の dithiothreitol 及び 3%, 4%, 5% の N-プロピルピロリジン酸イミドで 37°C 60分処理すると、溶血活性は、C3 の反応基の数と不活化剤の dose に依って破壊されるが、IA 活性は変化をうけない。

以上の事実から、これらの不活化剤の IA 活性と溶血活性に対する反応の差異は、溶血反応と IA 反応の速度の差によるものではなく、EM* 142 に結合して生成された C3 の溶血反応基と IA 反応基とが異なるものであることが確認された。

(Fab')₂ による Cytotoxicity

国立がんセンター研究所 岡田秀親

血清補体価を、感作ヒツジ赤血球の溶血反応で測定した場合、モルモット血清の補体価は、ウサギ血清のそのほゞ5倍の力価を示す。これに対し、有核細胞、例えば、腹水形腫瘍細胞と抗体で感作し、これに新鮮血清を添加して Cytolysis をおこす系に於ては、溶血反応系の場合とは逆に、ウサギ血清の方が、モルモット血清よりも効率が良いことが知られている。

この理由については、有核細胞膜には、赤血球膜にはない何らかの構造があり、これを破壊するには、補体の成分以外に、例えば殺菌作用における Lysozyme の様な何らかの酵素が必要であり、モルモット血清中には、それが欠乏している為に、Cytotoxic activity が低いのではないかというような推測もなされている。しかし、今までの所、そのような酵素を明確に立証する実験結果は知られていない。

最近、Osler 等のグループから、補体系の活性化が Fc 部分でなされる旧来の反応様式の他に、Fab 部分でも補体系の活性化がなされ、この場合には、C1, C4, C2 等を介さずに C3 以下の補体成分と反応するところが報告された。Fab 部分と C3 とが直接反応するのではなくて、その間を仲介する因子が血清中に存在すると考えられている。(それは、Lipopolysaccharide による Alternate pathway の系で、Mayer 等が Cx と呼んでいる因子と同様なものだと考えて以下、仮に Cx と呼ぶことにする)

演者は、上述の Ag=(Fab')₂:Cx による反応系路が、Fc 部分で活性化される旧来の補体反応系と比較して、有核細胞の Cytolysis に効率高く働くのではないかと、そして Cx の量が、ウサギ血清中には、モルモット血清中のそれに比して、比較的多い為に、最初に挙げた様な現象がみられるのではないかという仮説を立ててみた。

この仮説を検討する為に、C3H/He マウスの腹水形腫瘍の MM102 に対するウサギの抗血清から得た IgG (γG) 分画を Pepsin 消化して (Fab')₂ を作製した。これを MM102 に作用させ、MM102:(Fab')₂ complex をつくり、これにウサギ血清を加えることによつて起る Cytotoxicity と、その complex を 1/500 に稀釈したモルモット血清に加えた時に起る補体結合性 (37°C 60分 反応させた後に EA を添加し、その EA の溶血度を測定) とについて実験を行い、これを MM102:γG complex の場合と対比させてみたのが、表 1 に示したものである。(Fab')₂ は Cytotoxic activity は持っているが、補体結合反応 (CFT; この場合、Cx は dilute out されていると考えられる)

は、陰性であり、現在の所、先に挙げた仮説を肯定する結果であると考えられる。

表1. 細胞障害性と補体結合性.

Sensitizer	Cytotoxicity*		CFT (%hemolysis)**
	Exp1	Exp2	
(Fab') ₂			
1:1		66.9	98.7
1:2			101.6
1:3		53.1	
1:5	39.2		100.5
1:9		36.9	
1:10	21.7		
1:20	12.9		
1:27		2.5	
YG			
1:40	97.7		1.3
1:80	88.4		0.8
1:100		90.3	
1:160	81.0		5.8
1:300		87.5	
1:320	81.8		65.0
1:640	33.3		85.7
1:900		16.7	

* $(X-B) \times \frac{100}{100-B}$, X; % cytolysis of a sample, B; % Cytolysis without sensitizer
B for Exp 1 and Exp 2 were 12,1% and 33.1 % respectively

** 0.5 ml of 1/500 GPS was used when 0.2 ml of the dilution showed 87.5 % hemolysis.

なお、Cytotoxicity testは

$\left\{ \begin{array}{l} 2 \times 10^6 / \text{ml} \text{ MM102 } 0.2 \text{ ml} \\ + \\ 8 \text{ } \mu\text{g or (Fab')}_2 \text{ Fr. } 0.2 \text{ ml} \end{array} \right\}$

↓ 37°C 20 min

+ 0.2 ml of NRS (1/10)
(ウサギ血清)

↓ 37°C 60 min

+ 0.1 ml of 1% Tripa
blue

の術式で行い、染色された Cell の割合を観察

した。

CFT は、以下のごとく行った。

$\left\{ \begin{array}{l} 2 \times 10^6 / \text{ml} \text{ MM102 } 0.2 \text{ ml} \\ + \\ 8 \text{ } \mu\text{g or (Fab')}_2 \text{ Fr } 0.2 \text{ ml} \\ 1/500 \text{ GPS } 0.5 \text{ ml} \end{array} \right\}$

↓ 37°C 60 min

+ 0.2 ml of $1 \times 10^8 / \text{ml}$ EA

↓ 37°C 60 min.

+ 4.0 ml of EDTA-GVB
c5g, 2000rpm, 10min.

上清の OD414 を測定

演題 免疫溶血反応の終末反応段階に

及ぼす soluble ATPase の作用

(Inhibition of lysis of
terminal intermediate cells
by soluble ATPase)

出題者名

上田 浩, 深山昭雄

Hiroshi Ueda and Akio Miyaama

所属

奈良県立医科大学 細菌学教室

ヒト赤血球の免疫溶血反応で、血球膜 ATP-ATPase 系が溶血反応と密接な関係にあることを示し、その影響が E*transformation の step で現れるという実験結果を過去に示した。一方羊赤血球では、同じような ATP の効果が見られず、E*transformation に及ぼす ATP-ATPase 系の反応を人赤血球を用いて詳細な解析をすることが困難であったから、今回我々は、soluble ATPase を用いて羊赤血球の溶血反応に及ぼす影響を見た。Hoffman 等は、ヒト赤血球膜より Butanol 抽出により得た fraction が immune hemolysis を阻害することを示しているが、この方法は、M. lysodeikticus の cytoplasmic membrane より soluble ATPase を分離する方法と全く同じであること、又現在血球膜より soluble ATPase を分離する方法がないことから、我々は、soluble ATPase を M. lysodeikticus の cytoplasmic membrane より抽出精製して、それが immune hemolysis にどのような影響を及ぼすかを研究した。

材料: Bacterial ATPase は M. lysodeikticus の cytoplasmic membrane より Fukui 等の方法で得た。この ATPase は、cytoplasmic membrane に対する免疫血清と、免疫電気泳動上、陽極側に移動する二本の沈降線を示す。

使用した羊赤血球は、出来る限り新鮮なものを食塩水で洗浄後、イノシン、了子ニン存在下で岩返らせ、intermediate cell の作成に用いた。

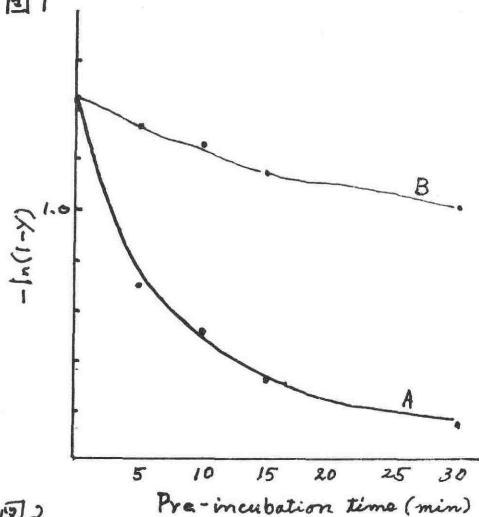
実験結果: Bacterial ATPase と gpc' を 37°C で 15 分間感作し、その補体価を対照に比較すると、ATPase 感作補体の補体価に変化は見られず、むしろ、やや高値を示すことから、用いた ATPase の抗補体作用はないといえる。又 C₁C₂ に対しては、この ATPase の阻害作用は認められなかった。

intermediate EAC₂ と ATPase 感作した後、C₈C₉ を加え、見られる溶血阻止は、その Preincubation time と共に増加することから (図 1)、ATPase による阻害は cellular level で起っていると考えられる。EAC₂ cell で C₇-site を変にした時の、C₈C₉ による lysis が、ATPase 作用によってどのようになるかを見ることが図 2 である。EAC₂ cell も又 ATPase の存在で、C₉ による lysis が阻害を受けるが、その程度は EAC₂ cell で見られるより小さい。

この阻害効果は、新鮮羊血球を更にイノシン、了子ニン存在下で岩返ら

せて使用した時に、特に著明であることから、膜の ATP-ATPase 系と何らかの関係があるのではないかと考え、更に検討中である。

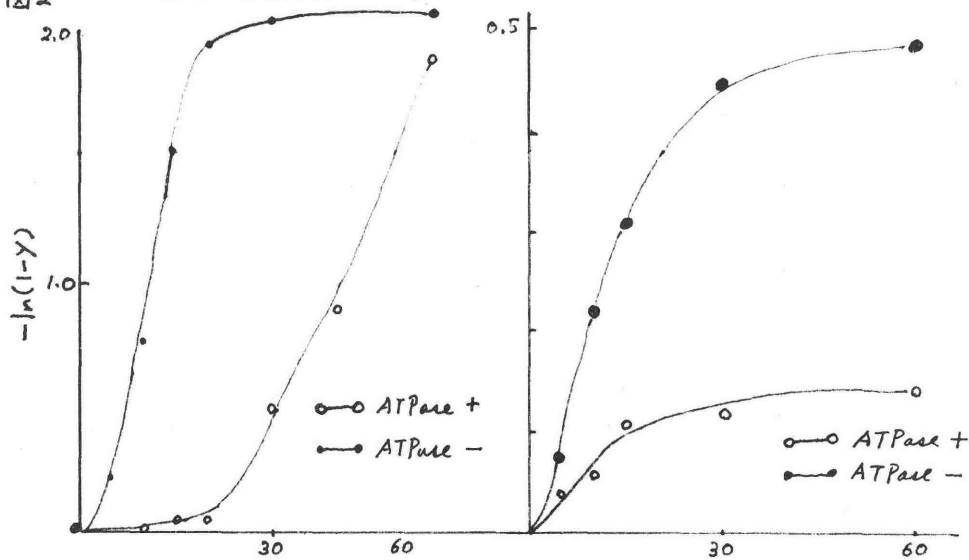
図1



A : soluble ATPase と EAC₇ を 37°C で横軸に示した時間加温し、過剰の C₈ 及び C₉ を加え、60 分後の溶血を求めた。

B : 対照として buffer と EAC₇ を 37°C で加温し、A と同じ処理をした。

図2



Lysis of EAC₇ by C₈ and C₉ in the presence of soluble ATPase

免疫溶菌による大腸菌菌体成分の
変化についで(才之報)

大阪大学医学部 細菌学教室 井上公藏, 矢野健一
高見沢昭久, 天野恒久

我々はさきに、抗体及び補体によつて、グラム陰性菌は殺されるが、*Spheroplast* 形成には更に *lysozyme* の関与が必要なることを見出し、

(*Biken J.* 2: 1-20, 1959)。更にこの際、補体9成分総てが必要であることも確かめた。(*Biken J.* 11: 203-206, 1968)。更に、抗体及び補体の作用によつて大腸菌は、光学顕微鏡下では形態変化を示さばいにもかかわらず、その菌体壁に蛋白分子を出入せしめるに足る "channels" 又は、"holes" が形成され、それを通つて菌の細胞質膜より外側に存在する、いわゆる *perienzymes* (e.g. *alkaline phosphatase*) が游出すること、又、*lysozyme* が共存する場合にはこの酵素はこの "channels" を通つて菌体壁内へ侵入し、その基質たる *mucopolysaccharide rigid layer* を破壊して *spheroplast* 形成を来たすことを明らかにした。(*Biken J.* 11: 193-201, 1968)。従つて、補体の侵襲点は *Muschell* らの考へる如く細胞質膜がはばい。即ち、抗体及び補体のみが "channels" は形成されるも、細胞質膜内に存在する菌体内酵素 (e.g., β -*D*-galactosidase) は游出して来ばい。*lysozyme* により *spheroplast* 形成が起り、菌体壁による機械的保護作用が失われると、細胞膜は破れて菌体内酵素が游出し始める。あるいは、菌体外に *plakin* (a phospholipase A from rabbit or horse platelets) を共存せしめると、この酵素は補体により形成された菌体壁の "channels" を通つて侵入し、細胞質膜を直接侵襲して破壊し、菌体内酵素は容易に游出する。(*Biken J.* 11: 193-203, 1968)。

このように抗体及び補体による菌体壁の "channel" 形成に伴う化学変化を知るために、我々は *E. Coli* B を ^{14}C -[II]-glucose を含む合成培地で培養し、この菌を抗体で感作し、*lysozyme* を除いたモルモット補体血清 (RL) を用いて免疫溶殺菌に伴う菌体成分の変化を追及し、前回の本ニニボジウムに於て、免疫溶殺菌に伴い菌体壁の *phospholipids*, 就中 *phosphatidylethanolamine* (PE) が補体作用に伴つて *lysophosphatidylethanolamine* (LPE) 及び游離脂肪酸 (FA) として反応上清の *lipid* 抽出物 (Chloroform 相) に見出し出されることを報告した。

今回は、本研究のその後の進展を報告する。

1). 補体作用により、感作菌からまずPEを含む成分が游出し、時間の経過と共に菌体外へのPEの増量は余りないが、LPE及びFAが反応上清中に増大する。

2). 反応初期に遠沈により上清と菌体とを分離し、後者は洗浄後更に緩衝液に再浮遊してincubateを続行すると、lipid成分の上清中への游出はみられるが、反応期間を通じても補体と共存せしめた系に比べて少ない。

3). 反応上清中に游出して来る¹⁴Cを、Sephadex G 50 或いは、G 200 columnによるgel filtrationにより分画し、更にchloroform-Methanol抽出により分画すると、Methanol-水相に来る成分は主として比較的分子量の小さいものであり、chloroform相に来るものは、反応上清中には、4S 蛋白程度の大きさの成分として存在する。

4). *E. coli* から分離精製せる¹⁴C-PEに補体あるいは、coldの感作菌と補体を加えどもLPE及びFAへの分離はみられない。

5). 比較のため、ハブ(*Trimeresurus flavoviridis*)毒より分離精製せるphospholipase Aを*E. coli*に作用させると、菌はこの酵素により、死は殺される。又菌体のPEはLPEとFAに分解されるが、菌体外へは放出せず菌体中に留まるといふ。

以上の結果から、補体の活性化に伴い、菌体壁のPEを含む、かなり大きな構成成分が切り出されて菌体外へ游出し、更にPEはLPE及びFAへと分解される。但しこの場合、phospholipase A作用による菌体壁内micelの変形及至崩壊が補体作用の本態であるのか、あるいは、上清中に見出されるLPE及びFAはむしろ補体作用により一次的に生じた構成物に、phospholipase Aが二次的に働いた結果生じたものかは明らかでない。更に、このphospholipase A活性が補体成分から由来したものか、補体以外の血清成分によるものか、あるいは、菌体由来のものなのかも現在不明である。又前記のplekin共存下の免疫溶菌実験の成績を念頭に置いて考えると、補体活性化に伴って生じたphospholipase Aは、たとえば、これが補体成分及至血清由来のものとしても、生じた"channels"を通過しないと考えられる。従って、このphospholipase Aは菌体外へ切り出されて来た構成成分のみに働くのか、あるいは、補体侵襲点(site)に留まり、菌体壁表層の極めて限局した部位にのみ働くのかも知れない。

PCA反応の免疫組織化学的研究
横浜市立大学形成外科 西園久寿樹
同 木下麻理 田中 俊夫

1958年E. Ovaryにより提唱されたPCA反応はpassiveに授与した抗体が組織固着というアレルギー反応の本質というべき重要な要素と本質とを以てこの反応が始まる事から、複雑なin-vivoにおけるアレルギー反応を解析していく上において絶好のモデルと云えよう。又モルモットの抗抗体がモルモットに對して自己抗体として作用を有することから注目された事もあり、一方最近になり、ようやくこの抗抗体と補体系の反応がいわゆる"alternative pathway"を介して反応することが明らかになるに及んで、homogenic systemの上で、抗抗体により生じるPCA反応は、抗抗体の組織固着におけるTarget Cell (or Tissue) の内数点、血管透過に際し補体系の関与の痕跡といふ、た重要な内数点を含んでゐる。昨年渡者は岡田ヒモにR.I.Eを用いてPCA反応を検討すべく定量的PCA法を報告し、さらに本年9月アレルギー学会総会において、抗抗体の組織固着の時間的推移及びPCA反応による血管透過性の変化の強さを定量的に解析し報告した。さらに今回組織形態学的に蛍光抗体法による抗Horse-radish Peroxidase (H.P.O)の抗体を製精し幾つかの知見を得たので報告する。

《方法及び結果》

まず蛍光抗体の精製法をHeterogenous to Rabbit抗BSA反応により生じさせた。PCA反応に生じさせ特異的傾向の存在がVenuleを中心とした血管壁に存在している事實を確かめ、次にRabbitにモルモットの β_2C を接種した得た抗 β_2C 血清を得、これに下I.T.Cを用いた homologous γ_1G , heterogenous γ_2G により一定時間反応させた後、及びPCA反応を生じた後において観察した結果抗 β_2C 血清と特異的に反応する蛍光像を得たもの、現在H.E染色と比較の上での局在性及び補体系成分との関連性について検討を加えてゐる。

一方さらに検討を加へ、Horse-radish Peroxidase Type II (SIGMA) を塩析し Sephadex G-50を通し抗原として比較的purifiedされたH.P.Oをウサギ及びモルモットに Freund の Complete Adjuvant と共に接種し抗HPO Rabbit血清、モルモット血清によるモルモットにPCA反応を生じさせる事に成功した。この失敗した α と β の局在性から得るモデルとして追跡中であるので報告する。

以上渡者は、PCA反応をin-vivoにおける極めて優れたアレルギー反応の解析モデルとして提唱し、その反応の場における補体系の関与が形態学的にも否定出来得る事と、本之を組織化学的方法論よりアプローチする事とを以て幾つかの内数点を提起したいと云ふ。

創傷治癒と P.C.A 反応

横浜市立大学第II病理学教室 田中俊夫
同 形成外科 西岡久寿衛

創傷治癒過程 (Wound healing process) は、臨床的にも外科領域において大前提である。組織修復における肉芽組織形成過程を探究するきわめて単純なモデルでありながらその掘り下げた研究は近年まで比較的少ない。

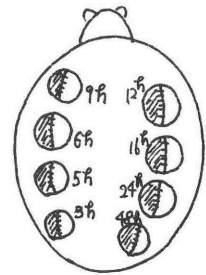
その種は外科的手術創や皮フ切開創の治癒過程において現在までに明らかになったところ。3 事實はまず機械的刺激を受けた組織の血管より血清タンパク、血球成分の滲出といった事實に始まるいわゆる「炎症」における Chain Reaction の一つとして考えらる事であり、又その組織反応の主体となす代表的細胞は、線維芽細胞、Macrophage 及び毛細血管内皮細胞の3種である。これらの細胞は、組織修復過程において極めて重要な役割をなしていると考えられ、特にその中でも毛細血管の新生において、血管内皮細胞の遊走および増殖分裂は極めて重要な役割をなしているといえる。

これらの細胞の活性化はいわゆる創治癒12時間頃より始まる増殖期において生じてくることである。この種は創修復の一連の過程において、至時的に PCA 反応を惹き、その反応の強さ及びそれに伴う組織像と比較検討したので報告する。

方法及び結果

この実験の目的には latent period の短かい抗体が好適であったため、家ウサギの抗 BSA 抗体よりモルモットの皮フ感作能を有する 2% fraction E D.E.A.E カウチンロマトグラーフ、燐酸濃度勾配法により分離した。

次に 300~400 gr の Hartley 雑系モルモットの背部に 1x1 cm の創を作成、6-0 タイロニ糸にて縫合後、24時間目から 5日目までの Time Course と比較、さらに他の群には Short Time Course として 3時間、5時間、9時間、12時間、16時間、24時間の Time Course と比較検討した。この場合図-1 に示す様に創の内側に抗体 (9-110 量 30 μ) を感作し、反対側には 0.15M NaCl を 0.1 ml 皮内注射し、30 箇所毎に、2.5mg/ml の BSA と 1% Evans Blue の等量混合液を各群毎に全身投与し、その activity を Evans Blue の描く青いスポットにより測定した。又その中の組織学的検索を述べた。その結果 3 時間から 5 時間の Time Course ではほとんど PCA 反応が生じなかったから 9 時間目から 12 時間目にかけて PCA 反応の亢進を認め、24 時間から 1 週間目の間は、



●: Ab. ○: Saline

その差をPCA反応における Evans Blueの滲出でほぼほとんど認められたので現在「定量PCA」により追跡中である。又組織学的には内皮細胞の増生を至時的に認め、それよりやや遅くは血管の透過性が亢進して来るとを認めた。又抗体感作液については、非感作液との組織学的所見ではH.Eのレベルでは著明な差を認める事は困難である。だが、当然の事ながら抗体感作液の群の方が Macrophage 及び PMNの滲出が多い印象を受けた。

以上創傷治癒過程においてPCA反応を発生させた結果、形態学的に内皮細胞の増生(過)時期にその亢進がほぼ一致して認められた事実は、PCA反応における抗体の Target cell としての内皮細胞系を来するべく興味ある知見といえよう。

Passive Mucocutaneous Anaphylaxis (PMA) 《ホ-報》
横浜市立大学形成外科 西岡久寿樹
同 病棟 田中 俊夫

Passive Cutaneous Anaphylaxis (PCA) をアレルギー反応の上での実験モデルとして著者らが重視するのは Passive に致した抗体がその組織(細胞)において一定時間後、被験動物の補体の作用を受け、血管壁及びその周囲の結合組織と密着する部分に Anchor する事である。又抗原全身致した後、血管の permeability change が生じた際アトマリン杯物質が関与している事案からも、in-vitro の段階で急速に分解の進歩した補体系の役割を in vivo に還元し再発性アレルギー性炎症を解析する一手段として極めて有効な方法論の一つと考へるからである。

従来 PCA 反応は其の名の通り杯に及ぶを感作組織として用いられて来たが今回著者はモルモットの口腔粘膜、胃粘膜、小腸粘膜、膀胱粘膜において其の感作能を有するモルモットの homologous Y₂ Fr. 及び B₂ Fr. の heterologous Y₂ Fr. (抗BSA抗体)を用い PCA 杯反応を生じさせることを試みたのである。これに Passive Mucocutaneous Anaphylaxis (PMA) と提唱し各粘膜組織における Latent period の差及び組織学的所見を PCA と比較検討し、さらには Arthus 反応との組織学的所見の差をも検討したので報告する。

方法及び結果

抗体はすべて抗BSAモルモットY₂ Fr. (Y₂ Fr.) 及び B₂ Fr. (Y₂ Fr.) を用いた。被験動物はモルモット(♂) 300g前後を用い、ネンブタール麻酔下に、口腔粘膜、膈膜、直視下に胃粘膜、小腸粘膜、膀胱粘膜に上述2種の抗体を約25~30mg/ml感作し、約4時間後に抗原を2.5mg/mlと Evans Blue (1%) の等量混合液を1ml 静脈内投与した。この際皮下にも同量の抗体を感作した。これによりモルモットを浮血位感作粘膜組織を肉眼的、組織学的に検査したので比較検討した。現在までの知見では各組織全体的に於いて、Y₂ Fr. による PMA 反応はより血管透過性は抗体によるものが強い。(同一時間の latent periods において)。Y₂ Fr. の場合、口腔粘膜、胃粘膜、小腸粘膜に著明な血管透過を認め、特に胃粘膜においては、浮腫、一部には出血を来してありその反応は極めて強い印象を受けた。膀胱粘膜は感作条件が一定でなく現在検討中である。又組織学的にも Submucous layer に赤血球、(1~2個) 一部 PMN の浸潤を認めた。胃粘膜における PCA 杯反応は2,3の報告を散見するが、著者は、今回、全身の粘膜において可及的に homologous Y₂ Fr. heterologous Y₂ Fr. を用いて感作し、その組織学的所見及び latent period を検討し、さらに Peritoneum においても興味ある PCA 杯反応を惹起せしめたので、これら報告する。

