

全身性エリテマトーデスにおける 補体による免疫複合体の可溶化能 に関する研究

— peroxidase を抗原に利用して —

第 1 編

可溶化能測定法の基礎的考察

岡山大学医学部第 3 内科学教室 (主任: 太田善介教授)

相 原 泰

(昭和58年9月5日受稿)

Key words: 可溶化現象
immune complex
alternative complement pathway
全身性エリテマトーデス

緒 言

1975年に Miller と Nussenzweig により発見された補体系による不溶性の免疫複合体 (IC) の可溶化現象は *in vitro* の現象であるが¹⁾, *in vivo* の病変, 特に免疫複合体病の病態形成に影響を及ぼしているのではないかと注目されている。この可溶化現象の病態形成への関与を明確にする為には, 患者血清の補体系による IC の可溶化能を測定し, 病変との関係を追求するという手段も有意義と考えられる。これらの観点から, 補体系による IC の可溶化能を isotope を使用せず安全かつ簡便に測定する為, IC の抗原に酵素である peroxidase を利用する測定法を考案し, その基礎的検討を行なった。

方法と材料

1. Buffer

- 1) PBS: pH7.4, 0.02M phosphate buffered saline
- 2) PBS-Ca⁺, Mg⁺ (PBS*): 0.00015M-CaCl₂, 0.0005M-MgCl₂-PBS
- 3) EGTA-Mg⁺-PBS: pH7.5, 0.03M-ethylene glycoltetraacetic acid-PBS (MgCl₂

の最終濃度は0.035M)

- 4) EDTA-PBS: pH7.5, 0.04M-ethylene diaminetetraacetic acid-PBS

2. Peroxidase (PO)

生化学用 horseradish peroxidase (和光純薬, 分子量約 4 万) を使用した。

3. 抗 PO 抗体

抗 peroxidase ウサギ IgG (Cappel社) を使用した。

4. 発色基質と酵素基質

発色基質は 5-aminosalicylic acid (ASA, 東京化成) を PBS にて 0.2% に溶解して不溶物を濾過後, 酵素基質 H₂O₂ を最終濃度 0.016 % となるように加えて使用した。以下 ASA(H₂O₂) と略す。

5. 被検血清

正常人 14 名, 慢性関節リウマチ 19 名, 全身性エリテマトーデス 30 名の新鮮血清を使用した。

6. Properdin を欠く血清 (RP) の作製

正常人新鮮血清 1 ml につき bentonite (石津製薬) 10 mg を浮遊し, 室温にて 60 分間振盪した後 3000 回転 15 分間遠沈後上清を分離して使用した²⁾。

7. Factor B を欠く血清 (RB) の作製

正常人新鮮血清を50℃30分間加温して使用した³⁾。

8. CH50

Mayer の原法を用いて測定した⁴⁾。

9. Alternative pathway による総溶血活性(A CH50)

ウサギ赤血球の溶血を利用する天野らの方法を用いて測定した⁵⁾。

結 果

1. 不溶性 IC の作製

PO 1 μ g と種々に希釈した抗 PO 抗体0.1ml をスピッツ内で混合し、37℃ 1時間更に4℃24時間反応後、PBS を加えて3000回転15分間遠沈し上清を静かに採り基質 ASA (H₂O₂) を加えて1時間発色させた後に1N-NaOH を加えて発色を止め、比色計にて吸光度 (OD450nm) を測定した結果が図1であり、上清の発色の最

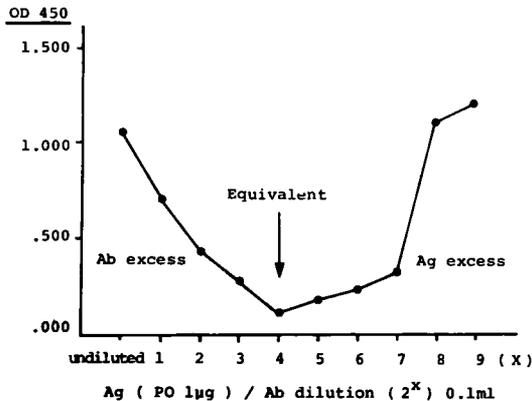


図1 Antigen-antibody ratio of PO-IC

も少ない抗原-抗体比を至適域 (矢印) と判定した。上記の如く至適域にて不溶性 IC を多量に作製し、PBS でよく洗滌して PBS* に浮遊させて使用した (PO-IC)。この PBS* に浮遊させた PO-IC 0.1ml には PO 0.1 μ g, 抗 PO 抗体 1 μ g を含んでいた。

2. PO 活性に及ぼす抗 PO 抗体の影響

抗 PO 抗体の PO 活性に及ぼす影響を調べる為に、抗原である PO を変量して、それに一定量の抗 PO 抗体を加えたものと、抗 PO 抗体を加えず PO のみのものを ASA (H₂O₂) を加

えて発色させ吸光度を比較すると、図2の如く両者の吸光度には殆ど差を認めなかった。

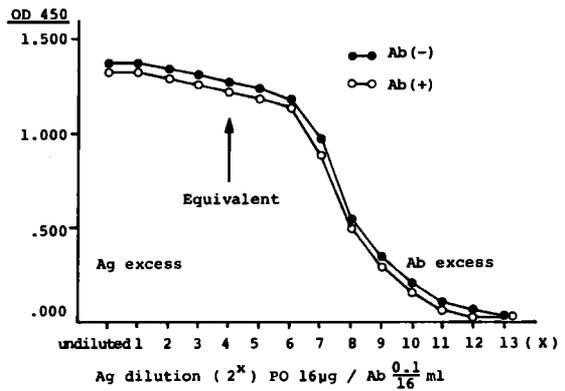


図2 Inhibitory effect of anti-PO antibody on PO activity

3. PO-IC の補体による可溶性

不溶性 PO-IC 0.2ml に PBS* で希釈した種々の量の正常人血清 (NHS: normal human serum) を補体として加えて、37℃ 1時間反応後 PBS を加えて3000回転15分間遠沈し、採取した上清に ASA (H₂O₂) を加えて発色させると図3に示す如く、加えた血清量に比して発色は増加する傾向が認められた。しかし原血清量が0.15ml 以上になると発色はむしろ低下した。更に PBS* のかわりに EGTA-Mg⁺-PBS で希釈した血清 (EGTA-NHS) で同一実験を行なうと PBS* の場合に比して遠沈上清の発色はやや低下し、EDTA-PBS で希釈した血清 (EDTA-NHS) や RB, RP では遠沈上清の発色は認められなかった。

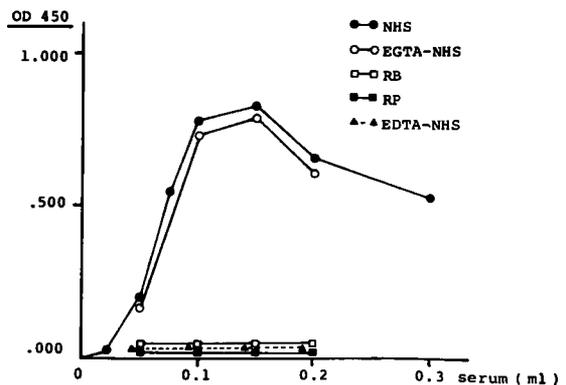


図3 Effect of complement on solubilization of PO-IC

4. 血清による PO 活性の抑制

上述の如く PO 活性に対して被検血清が多い場合には抑制的に作用することが認められたので、十分に可溶化が起こる範囲内でなおかつ PO 活性抑制の少ない被検血清量を決定する為に、血清による PO 発色の抑制効果を調べた。被検血清 0.1 ml を可溶化に用いる場合遠沈後採取した上清中に含まれる血清量は約 0.04 ml に減少する為、血清 0.04 ml における PO 活性への影響を検討した。新鮮正常人血清 0.04 ml に PO を変量して加え更に ASA (H₂O₂) を加えて発色させると図 4 に示す如く、血清を加えない PO のみの対照に比して両者の吸光度には殆ど差を認めなかった。以上より PO-IC の可溶化に使用する被検血清量を 0.1 ml と決定した。

5. 補体の可溶化反応における PO-IC 量の決定

可溶化現象は少量の抗原・抗体複合物に対して認められる補体の反応である為、被検血清量を 0.1 ml とした場合の PO-IC 量を検討した。補体価の異なる 3 検体に変量した PO-IC を加えて可溶化した PO-IC の発色を測定した。図 5 に示す如く、各検体共に PO-IC 量に比例して発色が増加するが、PO-IC 量が更に増加すると発色は逆に低下し可溶化能が減少する傾向が認められた。この為、高補体価検体でも正常補体価検体でも発色の低下が認められない PO-IC 量として 0.2 ml と決定した。

6. PO-IC と血清の反応時間

PO-IC 0.2 ml と新鮮正常人血清 0.1 ml とを 37

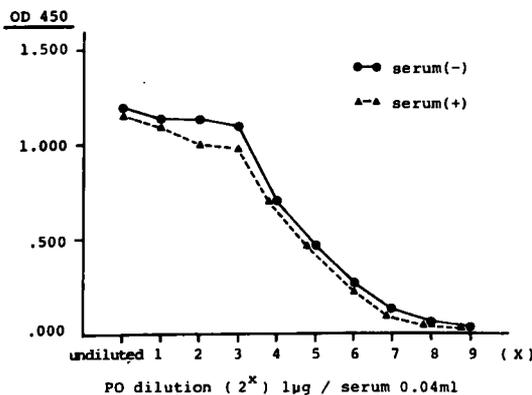


図 4 Inhibitory effect of human serum on PO activity

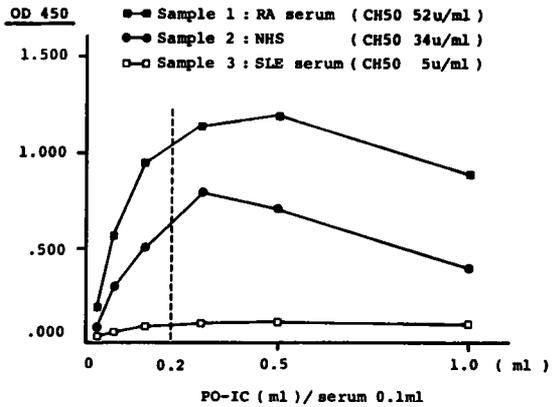


図 5 Effect of PO-IC dosage on solubilization

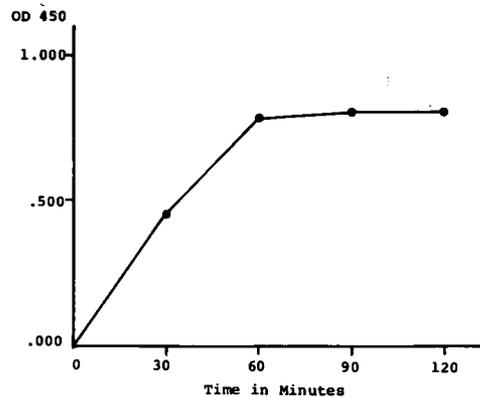


図 6 Solubilization and incubation time

℃で混合し、上清の可溶化した PO-IC の発色を経時的に観察すると 60 分で plateau に達した (図 6)。この為、反応時間は 60 分と決定した。

7. 補体系による PO-IC の可溶性能 (complex-release activity : CRA) の測定法

以上の検討から補体系による不溶性 PO-IC の可溶性能を表 1 の如く決定した。即ち、被検血清 0.1 ml と PO-IC 0.2 ml (PO 0.2µg, 抗 PO 抗体 2µg を含む) をスピッツグラス内で 37℃ 1 時間反応させた後に PBS 1 ml を加えて 3000 回転 15 分間遠沈後、上清 0.5 ml を静かに別の試験管に採り、ASA (H₂O₂) 0.4 ml を加えて 37℃ 1 時間反応させて発色させた後に 1 N-NaOH 0.1 ml を加えて反応を止め、更に PBS 3 ml を加えて比色計にて吸光度 (OD450 nm) を求め CRA 値とした。この際の血清の色は約 100 倍に

表1 CRA assay

CRA (complex-release activity of complement) assay
 ---Using Peroxidase (PO)-anti-PO Immune Complex---

| | |
|---|-----------------------|
| PO-IC 0.2 ml (PO 0.2 μ g/Ab 2 μ g/PH 7.4-0.02 M-PBS-Mg ⁺⁺ ,Ca ⁺⁺) | |
| Serum 0.1 ml | |
| ↓ incubation, 37°C, 1 h, | |
| add PBS ⁺⁺ 1 ml | |
| ↓ centrifuge, 3,000 rpm, 15 min, | |
| Supernatant 0.5 ml | |
| 5-Aminosalicylic Acid (200mg/dl) | } 0.4 ml |
| H ₂ O ₂ | |
| ↓ incubation, 37°C, 1 h, | |
| add 1N-NaOH 0.1 ml | |
| ↓ | |
| add PBS ⁺⁺ 3 ml | |
| ↓ | |
| read O.D. 450 nm | 1.500 (O.D. 450 nm) |

| | |
|---|--------|
| PO-IC | 0.1 ml |
| 5-ASA (H ₂ O ₂) | 0.4 ml |
| PBS ⁺⁺ | 3.5 ml |

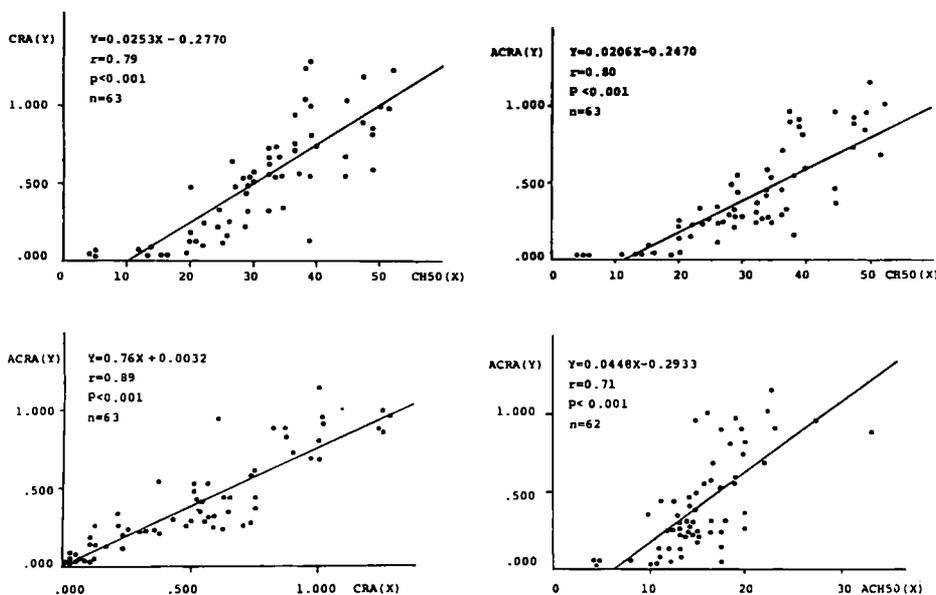


図7 Relation among CRA, ACRA, CH50 and ACH50

希釈されている為無視しうるものと考えた。対照は被検血清のかわりに PBS⁺⁺を入れたもの即ち不溶性 PO-IC の機械的混入を 0.000 とした。PO-IC 0.1 ml に ASA (H₂O₂) 0.4 ml, PBS 3.5 ml を混合した場合の吸光度は 1.500 であった。

8. Alternative pathway のみによる CRA (A CRA)

alternative pathway のみによる可溶性の測定は EGTA の最終濃度が 0.015 M となるように 0.03M-EGTA-Mg⁺⁺-PBS を使用して上記と同様に求めた CRA を ACRA 値とした。

9. 種々の検体の CRA, ACRA と CH50, ACH50

図 7 に示す如く、正常人、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスの種々の検体 (n=63) における CRA と CH50 ($r=0.79$, $p<0.001$), ACRA と CH50 ($r=0.80$, $p<0.001$), ACRA と CRA ($r=0.89$, $p<0.001$), ACRA と ACH50 ($r=0.71$, $p<0.001$) との間には各々密接な相関関係が認められた。

考 察

補体系により可溶化された IC は分子量が小さくなると共に、それ以上補体系を活性化する能力がなくなり、又、補体成分が IC に結合しているにも拘らず Fc レセプターや C3b レセプターとも反応しなくなることが明らかにされている⁶⁾。これらの現象が in vivo においても起こりうるとすれば、前者は生体内における補体系由来の炎症を抑制したり、局所に沈着した不溶性 IC を排除する等の生体に有利な現象のようにも理解できるし、後者は可溶化された IC が網内系のレセプターを介して捕捉されない為

に腎臓や皮膚等の排泄器官に沈着することにより storage disease 様の病態を惹起せしめるといふ生体に不利な現象とも理解できる。これらの可能性を追求するには患者の病態と共に、血中の補体系による可溶化能を観察することが必要と考えられる。

可溶化現象の証明には不溶性 IC の抗原又は抗体に isotope を標識する方法が利用されているが、日常可溶化能を測定するには isotope の取り扱いが不便である。その為、安価で取り扱いが簡単な酵素である peroxidase (PO) を利用することにした。この際、PO を IC の抗体に標識する方法も考えられたが、可溶化現象においては上清に可溶化した IC と共に free の抗体も出現することが認められているので⁶⁾、このように測定した場合には可溶化能は増幅した結果で表現される可能性がある。その為、PO を抗原に標識するか又は PO を抗原自身として使用することが考えられ最も簡便な方法として PO を IC の抗原として用いることとした。しかしながら、PO を IC の抗原に用いる場合に 2つの問題がある。1つは、PO に対する polyclonal 抗体を含む抗 PO 抗体が PO の酵素活性をどの程度抑制するかということであり、もう1つ問題は、PO の酵素活性が被検血清により非特異的に抑制されるということである。まず、抗 PO 抗体が PO と反応する場合にどの程度の酵素活性の抑制を示すかということを検討したのが図2である。この実験では抗原である PO を変量してそれに一定量の抗体を加えたものが、抗体を加えなかったものに比してどれだけ抑制されるかを検討したが、図2の如く両者の吸光度には殆ど差を認めず、又この際の PO 活性の抑制は 5%以下という報告もあるので⁷⁾、本法への抗原として PO の利用は妥当と考えられた。もう1つの問題である血清による PO 活性の抑制を検討したのが図4である。PO を変量してそれに一定量の血清を加えたものが、血清を加えなかったものに比してどれだけ PO 活性が抑制されているかを検討したが、図4の如く両者の間には殆ど差を認めなかった。更に種々の血清の可溶化能と補体価との間に密接な相関関係が認められ、第2編⁸⁾でも述べる如く可

溶化能は各補体成分ともよく相関するので、本法で使用する被検血清量では PO 活性には殆ど影響を及ぼさないものと考えられた。

可溶化能の測定法は通常、検査室で使用する比色計で測定しうる溶液量 (3 ml 以上) で更に PO の吸光度が最も鋭敏に判定できるように PO-IC 量、被検血清量、反応時間、ASA (H₂O₂) 量、発色時間を決定し、可溶化した PO-IC 中の PO の吸光度を可溶化能の値として表現した。このようにして求められた可溶化能は種々の検体において補体価等と密接な相関関係が認められたので現時点では妥当なものと考えられるが、one point の測定である為誤差が生じ易い難点がある。溶血補体価を求める際の von Krogh の式のように補体量と PO の吸光度との関係式が解明されれば、将来、可溶化能も補体価のように単位で表現することが可能と考えられる。

図3に示すように、可溶化は EDTA 加血清や alternative pathway の成分である factor B, properdin を欠く血清では起こらず、classical pathway のみをブロックした EGTA 加血清で起こったことより、PO-IC が補体系の alternative pathway を介して可溶化されていることが認められた。事実、可溶化現象は alternative pathway の精製 6 成分 (C3, factor B, factor D, properdin, factor H, factor I) のみで起こり⁹⁾ classical pathway はこれを促進させることが明らかにされているので¹⁾、可溶化能の測定は alternative pathway の機能測定法としても有用と思われる。そして、可溶化能の生体内における意義を明確にする為に、IC が病態形成に関与していると考えられている免疫複合体病の可溶化能並びに症例毎の可溶化能の変動を測定することが重要であると考えられる。

結 語

酵素の peroxidase (PO) を抗原とした不溶性の immune complex (PO-IC) を用いて、補体系による可溶化能を測定する方法を考案して、その基礎的検討を行ない、次の結果を得た。

- 1) PO-IC は補体系特に alternative pathway を介して可溶化した。
- 2) 可溶化した PO-IC に基質を加えて発色させ

ると、その吸光度は可溶化に要した血清（補体）量に比例した。

- 3) 全血清による可溶化能（complex-release activity : CRA）を発色の吸光度の値で表わすと、種々の血清の CRA は CH50 と密接に相関した。
- 4) Alternative pathway のみによる可溶化能（ACRA）と CRA, CH50, ACH50 との間にも密接な相関関係が認められた。

以上の結果より、peroxidase を用いる本法は immune complex の可溶化能の測定法として妥当であり、安全、安価、簡便である点は本法の有用性を示すものである。

稿を終るにあたり、御指導御高聞を賜った恩師太田善介教授に深甚の謝意を表するとともに、終始御懇篤なる御指導を賜った天野哲基博士に深謝します。

文 献

1. Miller, G.W. and Nussenzweig, V.: A new complement function. Solubilization of antigen-antibody aggregates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 418—422, 1975.
2. Inai, S., Kishimoto, S., Hirano, F., Yamada, T. and Takahashi, H.: Studies on absorption of human Serum components by bentonite. *Biken J.* **2**, 233—245, 1959.
3. Goodkofsky, I. and Lepow, I.H.: Functional relationship of factor B in the properdin system to C3 proactivator of human serum. *J. Immunol.* **107**, 1200—1204, 1971.
4. Kabat, E.A. and Mayer, M.M.: *Experimental Immunochemistry*. 2nd Ed., Thomas, C. Co, Springfield, pp. 133—240, 1961.
5. 天野哲基, 吉野内猛夫, 宮島啓人, 三橋康彦, 大藤真: SLE の alternative pathway. *臨床免疫*, **8**, 2 289—297, 1976.
6. Takahashi, M., Takahashi, S. and Hirose, S.: Solubilization of antigen-antibody complexes: A new function of complement as a regulator of immune reactions. *Prog. Allergy* **27**, 134—166, 1980.
7. Hess, M.W., Sordat, B., Stoner, R.D. and Cottier, H.: Quantitative titration of anti-horseradish peroxidase antibody in mouse serum. *Immunochemistry* **8**, 509—515, 1971.
8. 相原 泰: 全身性エリテマトーデスにおける補体による免疫複合体の可溶化能に関する研究—peroxidase を抗原に利用して—第 2 編 臨床的考察, *岡山医学会雑誌*, **96**, 69—76, 1984.
9. Fujita, T., Takata, Y. and Tamura, N.: Solubilization of immune precipitates by six isolated alternative pathway proteins. *J. Exp. Med.* **154**, 1743—1751, 1981.

**Studies on Complex-release Activity of Complement
in Systemic Lupus Erythematosus**

— Using Peroxidase as an Antigen in the Immune Complex —

Part 1. Studies on Measuring Complex-release Activity

Yasushi AIBARA

Third Department of Internal Medicine, Okayama

University Medical School, Okayama Japan

(Director : Prof. Z. Ota)

A simplified method of measuring the complex-release activity (CRA) of complement using peroxidase (PO) as an antigen in the immune complex was studied. PO-anti PO rabbit IgG immune complex (PO-IC) was solubilized principally via the alternative pathway in the sera. When substrates, H₂O₂ and 5-aminosalicylic acid, were added to solubilized PO-IC, absorbance of the mixture at O.D. 450nm increased with the amount of complement in a dose-dependent manner. The CRA of the complement in the sera was shown by the absorbance of the mixture. The CRA in various sera correlated with CH50. The CRA via the alternative pathway (ACRA) in sera also correlated with CRA, CH50 and ACH50.

The above results indicate that this method of measuring the complex-release activity of complement using peroxidase as an antigen is simple and useful.