

全身性エリテマトーデスにおける alternative pathway に関する研究

ウサギ赤血球溶血反応を利用して

第 1 編

alternative pathway 総溶血活性, properdin 活性, Factor B 活性測定法の基礎的考察

岡山大学医学部第三内科学教室 (主任: 大藤 眞教授)

宮 島 啓 人

(昭和56年8月18日受稿)

Key words: 全身性エリテマトーデス, 補体,
alternative pathway 総溶血活性,
properdin 活性, Factor B 活性

緒 言 方 法

全身性エリテマトーデス (SLE) の病態に補体系が関与するであろう事は臨床的, 血清学的及び組織学的検討^{1),2)}により明らかである。この補体系の関与は抗原抗体反応による classical pathway (CP) の活性化と理解されており, 補体系の測定は SLE の診断, 治療に重要な項目として広く応用されている。

一方, SLE における alternative pathway (AP) の関与も注目されており, AP の主要成分である properdin (P), Factor B (B), β_1 -H の病変部への沈着^{3),4),5),6)}, 血清中の活性^{7),8)}及び蛋白量^{9),10),11)}の減少, 生体内における代謝亢進等^{12),13),14)}につき明らかにされている。しかしながら CP を介する総溶血活性 (CH 50) と比較しうる AP 総溶血活性の測定方法については未だ簡単な方法が知られていない。

その為, 著者はウサギ赤血球¹⁵⁾を利用し AP 総溶血活性, P 活性及び B 活性の測定方法を考案し, SLE における AP の関与を明らかにしようとして試みた。以下本論文において, これら測定方法の基礎的検討を行う。

1. Buffer

a) 0.1 M-EGTA-Mg⁺ Buffer 保存液

EGTA (ethylene glycol tetraacetic acid, sigma 社)	38 g
MgCl ₂ ·6 H ₂ O	20.3 g
NaOH	約 7 g

以上を脱イオン水にて溶解し, NaOH 溶液で pH 7.5 に補正して 1 l とする。

b) 0.02 M-EGTA-Mg⁺ GVB

0.1 M-EGTA-Mg ⁺ Buffer	200ml
0.1 M MgCl ₂	5 ml
5×VB (Veronal Buffer)	180ml
2% Gelatine	50ml

c) 0.03 M-EGTA-Mg⁺ GVB

0.1 M-EGTA-Mg ⁺ Buffer	300ml
0.1 M-MgCl ₂	5 ml
5×VB (Veronal Buffer)	180ml
2% Gelatine	50ml

以上を脱イオン水にて 1 l とする。

2. 赤血球

a) ウサギ赤血球は使用直前家兔の耳朶より,

モルモット赤血球及びマウス赤血球は頸動脈より採血し、0.03 M-EGTA-Mg⁺ GVBにて3回洗滌後浮遊する。

b) 感作赤血球 (EA cell)

市販の羊赤血球 (E) を0.01 M-EDTA-GVBで1回洗滌後、GVB⁺で3回洗滌 (GVB⁺で1×10⁹/mlに浮遊し溶血素(北里研究所)にて40倍(ヘモリジン過量感作血球)及び1500倍(ヘモリジン適量感作血球)に希釈し感作した。

3. 被検血清

血清は、正常人肘静脈より採血後室温に1時間放置し分離した。

4. properdin を欠く血清 (RP) の作製

a) Bentonite 法¹⁶⁾

正常人新鮮血清 1 mlにつき bentonite (石津製薬) 10mgを浮遊し、室温にて60分間振盪した後3,000回転15分間遠心後上清を分離する。

b) Zymosan 法¹⁷⁾

正常人新鮮血清 1 mlにつき zymosan (Sigma社) 1 mgを浮遊し、17℃にて60分間振盪した後3,000回転15分間遠心後上清を分離した。

5. Factor B を欠く血清 (RB) の作製¹⁸⁾

RBは正常人新鮮血清を50℃、30分間加温し作製した。

6. CH 50及びC4, C3, Factor B (B) 蛋白質量の測定

CH 50は Mayer の原法を用いて測定した。C4, C3, Factor B (C3A)はそれぞれMeloy社 Hyland社, Behring 研究所製のプレートを使用し、single radial immunodiffusionにより蛋白質量を求めた。

結 果

1. Alternative Pathway による総溶血活性 (ACH 50)

a) ウサギ赤血球 (Ra RBC) 及びEA cellの溶血における Buffer の影響

正常人血清を0.02 M, 0.03 M-EGTA-GVB⁺, 0.01 M-EDTA-GVB 各 Buffer で希釈し、Ra-RBC 及び EA cell の溶血を検討したところ図1の如く Ra RBCは0.02 M EGTA-GVB⁺, 0.03 M EGTA-GVB⁺では溶血するが、0.01 M EDTA-GVB⁺では溶血しなかった。

EAcellは0.02 M EGTA-GVB⁺で血清希釈2倍で63%, 2³倍で23%の溶血を示したが、0.03 M EGTA-GVB⁺では溶血しなかった。

b) RaRBC の溶血における血清の Zymosan, Inulin 処理及び熱非働化の影響(図2)

0.03 M EGTA-GVB⁺にて2倍希釈した血清に Zymosan 1 mg/ml及び2 mg/ml, Inulin 1 mg/mlを浮遊し20℃, 30分 incubate 後3,000回転15分間遠沈して得た上清にて RaRBC の溶血をみ

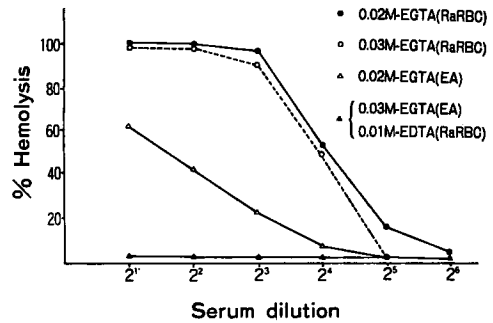


図1 Effect of buffer on RaRBC hemolysis

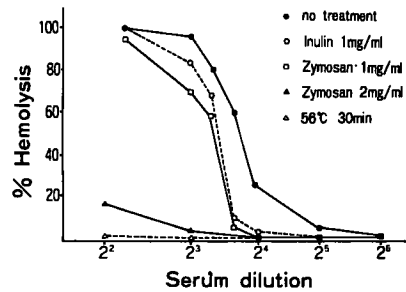


図2 Effect of zymosan, inulin and heat inactivation on RaRBC hemolysis

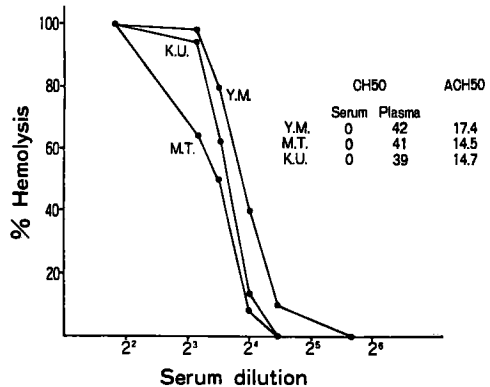


図3 Effect of C4 and C2 depleted serum on RaRBC hemolysis

	CH50	ACH50
Serum	0	42
Plasma	42	17.4
Y.M.	0	41
M.T.	0	39
K.U.	0	14.5

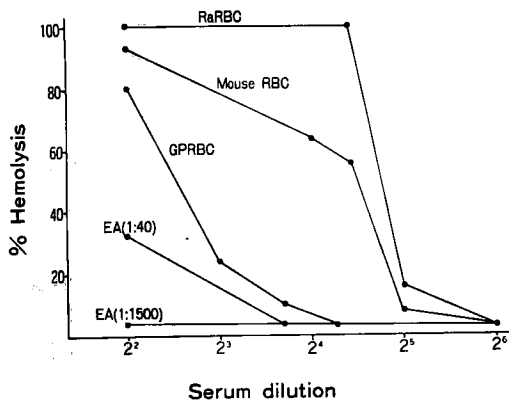


図4 Hemolysis of various RBC

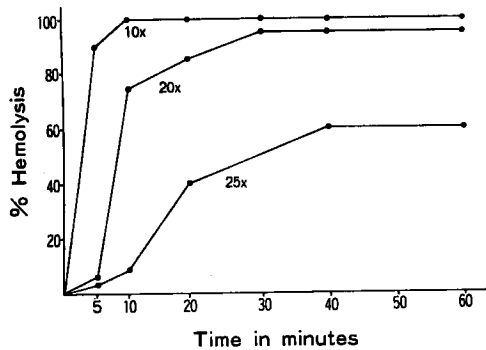


図5 Time of incubation on on RaRBC hemolysis

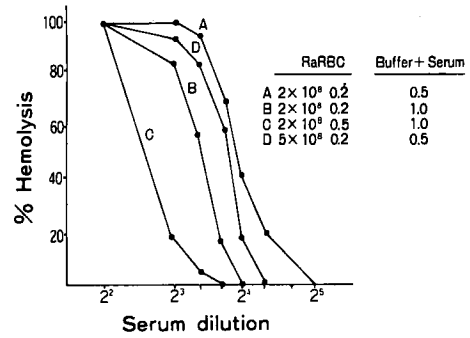


図6 Condition of RaRBC hemolysis

清3検体を使用し、RaRBCの溶血をみたところ図3の如くRaRBCの溶血を認めた。この3検体のCH50はいずれも0 u/mlであったがRaRBCの50%溶血をきたす希釈倍数は各々14.5, 14.7, 17.4倍であった。

d) 各種赤血球の0.03 M-EGTA-GVB⁺ Bufferにおける溶血の比較

ウサギ赤血球 (RaRBC), モルモット赤血球 (GP RBC), マウス赤血球 (Mouse RBC), E-Acell (1:1500)及び溶血素を過剰に感作したE-Acell (1:40)の0.03 M EGTA-GVB⁺ Buffer中における溶血を比較したところ、図4の如くRaRBCの溶血率が最も大きく、次いでMouse

表1 ACH50 assay

tube number (serum dilution)	1 (4x)	2 (8x)	3 (10x)	4 (13.3x)	5 (16x)	6 (20x)	7 (25x)	8*	9**
0.03 M-EGTA-Mg ⁺⁺ -GVB		0.25	0.3	0.35	0.375	0.4	0.42	0.45	0.5
serum (2x)	0.5	0.25	0.2	0.15	0.125	0.1	0.08	0.25	
RaRBC (2x 10 ⁸ /ml)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2		0.2

37°C, 40 min mix
↓
0.01 M-EDTA-GVB 6.3ml
↓
2000 G 5min centrifuse
↓
OD 414m μ (maximum hemolysis 0.650)

* color of sera.

** mechanical hemolysis.

るといずれも溶血は阻止される傾向を認めた。血清を56°C, 30分間非働化しRaRBCの溶血をみると、溶血は完全に阻止された。

c) C4, C2低値血清によるRaRBC溶血への影響

採血後にC4, C2のみが極端に低下¹⁹⁾する血

RBC, GP RBC, E-Acell (1:40)の順であった。E-Acell (1:1500)では溶血を認めなかった。

e) RaRBCの溶血における時間の影響

ヒト新鮮血清を0.03 M-EGTA-GVB⁺にて10, 20, 25倍に希釈し、RaRBCと混合後37°Cの恒温槽中で攪拌しつつ溶血率を経時的に測定した

表2 Reduction (%) of CH 50 and ACH 50 by RP

	CH50	ACH50
RP(B)	21.9	69.7
RP(Z)	32.8	46.2

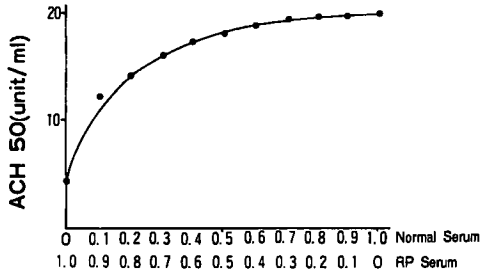


図7 Effect of properdin on RaRBC hemolysis

表3 Properdin activity (%)

$$\frac{ACH50(RP\ 0.7ml + Patient\ Serum\ 0.3ml) - ACH50(RP\ 1.0ml) \times 0.7}{ACH50(RP\ 0.7ml + Normal\ Serum\ 0.3ml) - ACH50(RP\ 1.0ml) \times 0.7} \times 100$$

ところ、図5の如く各希釈血清の溶血率は40分以内でplateauに達した。

f) RaRBCの溶血における血球量、血清量、Buffer量の影響

Bufferにて希釈した血清量を0.5ml, 1.0mlの2種, RaRBC $2 \times 10^8/ml$, 0.2ml及び0.5ml, $5 \times 10^8/ml$, 0.5mlの3種を組合わせて溶血率を測定したところ図6の如く全体量が少ないほど溶血率は高値であった。

g) ACH 50測定法

以上の検討を参考にして被検血清のAP総溶血活性(ACH 50)測定の為の希釈系列は表1の如く行った。

2. Properdin 活性

a) bentonite 法, zymosan 法による RP の比較(表2)

RPにおけるCH 50の減少率はbentonite 法21.9%, zymosan 法32.8%, ACH 50の低下はbentonite 法69.7%, zymosan 法46.2%であった。

b) RP (bentonite) とヒト新鮮血清の種々の混合比における ACH 50の値

RP とヒト新鮮血清を種々の比で混合し、総量を1.0mlとしACH 50を測定すると図7の如く、ヒト新鮮血清の割合が増加するに従いACH 50

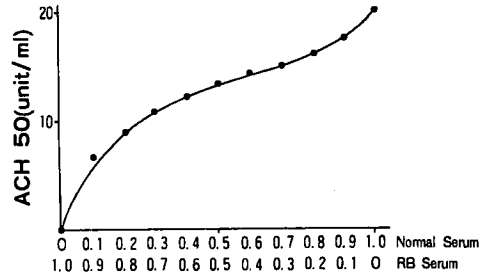


図8 Effect of Factor B on RaRBC hemolysis

表4 Factor B activity (%)

$$\frac{ACH50(RB\ 0.5ml + Patient\ Serum\ 0.5ml)}{ACH50(RB\ 0.5ml + Normal\ Serum\ 0.5ml)} \times 100$$

増加し、RP とヒト新鮮血清の比が8対2から6対4までは直線的な上昇を示した。

c) Properdin 活性測定法

以上の検討を参考としてRP とヒト新鮮血清あるいは被検血清の比を7対3とし、表3の如くP 活性を測定し、正常人との比を%で表した。

3. Factor B 活性

a) RB における ACH 50, CH 50

RBのCH 50, ACH 50はいずれも0 u/mlであった。

b) RB とヒト新鮮血清の種々の混合比における ACH 50の値

RB とヒト新鮮血清を種々の比で混合し、総量を1.0mlとしてACH 50を測定したところ図8の如くヒト新鮮血清の割合が増加するに従いACH 50は sigmoid curve を描き上昇した。

c) Factor B 活性測定法

以上の検討を参考としてRB とヒト新鮮血清、あるいは被検血清の比を1対1とし、表4の如くB 活性を測定し、正常人との比を%で表した。

考 按

alternative pathway(AP)は1954年Pillemer²⁰⁾らにより発見されたものであり、それ迄知られていた classical pathway (CP) に比してより原始的で、抗体の関与しない生体防御機構であるとされており、C3, Factor D (D), Factor B (B), Properdin (P) の4種の蛋白と、C3b INA, β_1 H の2種の control proteinにより構

成されている。

この AP の SLE への関与については P.B. β_1 -H の腎、皮膚病変部組織への沈着、血清中蛋白量及び活性の低下、生体内での代謝亢進、B の分解産物の証明²¹⁾等、主として個々の蛋白について報告されている。一方 AP の機能的測定法としては Cobra Venom Factor (CoVF) を使用する CoVF AH 50²²⁾、還元グルタチオン (GSH) 処理赤血球溶血反応²³⁾、Chemotaxis を利用する方法²⁴⁾等が報告されているが、いずれも臨床応用には難点があり、簡易な方法により機能的な測定ができるならば、生体内における AP の変動を知る上でより役立て得ると思われる。同様に B.P. についても、活性を測定すれば蛋白量の測定に比しより正確に生体内における変動を知り得ると思われる。

著者は、Platts-Mills & Ishizaka がウサギ赤血球 (RaRBC) が AP を介して溶血する事を報告¹⁵⁾したのに着目して、RaRBC を用いて AP 総溶血活性、P 活性、B 活性の測定方法を検討した。

血清の AP 活性を測定する為には、CP の活性化を完全に阻止する事が絶対条件であり、その為 Ca^{2+} をキレートする事により C1 の活性化阻止作用を有する EGTA を含む Buffer を用いた。C1 活性化阻止作用が出現する EGTA の濃度は 0.01 M であるとされているが²⁵⁾、EAccl で検討したところ図 1 の如く 0.02 M EGTA-GVB⁺ で 2 倍に希釈した血清では EAccl の溶血率は 63% であり、0.03 M EGTA-GVB⁺ で EAccl の溶血は阻止された。RaRBC は 0.02 M 及び 0.03 M EGTA-GVB⁺ では 16 倍希釈血清で約 50% の溶血率であった。以上から 0.03 M EGTA-GVB⁺ 中では CP 活性化は完全に阻止され、この条件における RaRBC の溶血は AP を介するものであると考えられた。更に RaRBC の溶血が AP を介するものである事を検討すると (図 2) AP 活性化物質である zymosan, inulin で処理し AP を不活化した血清、あるいは 56°C、30 分熱非働化した血清で RaRBC の溶血をみたところいずれも溶血が阻止、ないし阻止される傾向を認めた。次に採血後に C4、C2 のみが極度に低下し、CH 50 が 0 u/ml となる血清を用い

て RaRBC の溶血をみると図 3 の如く正常人と同様の溶血を認め、RaRBC の溶血には CP の early component である C4、C2 を必要としない事を認めた。

RaRBC の他に AP を活性化する血球が存在するか否かを検討する為、マウス赤血球、モルモット赤血球につき溶血をみたところ図 4 の如くいずれの赤血球も溶血したが RaRBC が最も溶血率が高く、かつ採血し易いので AP 測定法には RaRBC を用いることにした。

RaRBC により AP の活性化が開始し、溶血が完了するまでの時間及び血球量、Buffer 量、血清量については図 5、図 6 の如く溶血は 40 分以内で一定に達し以後増加しない事が認められた。血球数及び血清、Buffer 量は総量が少ない程溶血率が高く、液相中の補体が RaRBC と結合し易いと考えられた。以上より AP 総溶血活性測定方法を表 1 の如く考案し RaRBC 2×10^8 個/ml、0.2 ml の 50% 溶血に必要な血清の希釈倍数を AP 総溶血活性単位とし ACH50 と表現した。

ACH 50 が C3 以下 C9 に至る CP と共通の terminal components に影響されるのではないかという疑問があるが、C3 以下の活性が残存していると考えられる RB の ACH 50 が 0 u/ml であり、さらに第 2 編²⁶⁾で述べる如く ACH 50 と Factor B 蛋白量の相関係数が高値である事、症例 b において ACH 50 と Factor B 蛋白量の変動がよく一致している事等より否定できると思われる。

AP による RaRBC の溶血の機序としては、RaRBC 膜シアル酸含有量が少なく²⁷⁾、シアル酸が少ない事により膜上に結合した C3b に B が結合する際 β_1 H による競合を受けにくく、膜表面に AP C3 convertase である $\overline{C3bBb}$ complex が形成され、次いで C3 以下の terminal component の活性化が進行する^{28), 29)}と考えられている。さらにヘモリジンを過剰に感作した EAccl でも AP により溶血する事が認められ、抗体が多量に存在する場合には抗体による AP の活性化も推察された。

AP を構成する蛋白の一つである Properdin (P) は $\overline{C3bBb}$ と結合し $\overline{PC3bBb}$ となり β_1 H、C3b INA による C3b と Bb への解離及び Bb、

C3bの不活を抑制する作用を有し、 $\overline{C3bBb}$ のAP C3 convertase作用を安定化、増強化するとされている³⁰⁾。従ってAPが活性化された場合Pも同時に活性化され血清中のP蛋白量及び活性の低下を来すと考えられる。しかしながら蛋白量を測定した場合は活性化されたP (\overline{P})も同時に測定している可能性が考えられるので、P活性を測定すればより正確にPの生体内における動態を知ることができると考えられる。

P活性の測定にあたり、先ずPを欠く血清(RP血清)を作製し、これと被検血清あるいは正常人血清を一定の割合で混合した後ACH 50を測定し正常人血清に対する比で表わす事とした。正常人血清に対する比で表わす事とした。

RP血清の作製は bentonite法及びzymosan法により行い、両法により得られたRPを比較したところ表2の如く bentonite法はzymosan法に比しACH 50の低下は大きく、CH 50の低下は小さいという結果が得られたのでRPの作製には bentonite法を用いる事とした。bentonite法によるACH 50の低下は69.7%で約30%の活性が残存していた。この理由として先ず、bentoniteによるproperdinの吸着及び除去が不十分である事、次に bentoniteによりほぼ完全にPが除去されていてもB, D, C3によりRaRBCはある程度溶血するのではないか³¹⁾という2点が考えられた。しかしながらRPのCH 50の低下は軽度であるのでRPとしては使用可能であると考えた。

RPにヒト新鮮血清を変量して加えると、そのACH 50は増加する為この増加は血清中のPによるものと考えられ、RPと被検血清の比(7対3)によって表3の如くP活性の測定を行うこととした。

Factor B (B)もAPを構成する蛋白の一つでありAP活性化の過程でBは \overline{D} により活性化され \overline{B} (Bb)となり液相中ではC3b INA, β_1H により不活化されるが、zymosan, inulin, RaRBC等のAP活性化物質の表面ではこれらにより不活化されずC3bと結合しAP C3 convertaseである $\overline{C3bBb}$ あるいは $\overline{PC3bBb}$ を形成する³²⁾。従ってB活性を測定すれば蛋白量の測定に比しより正確にAPの活性化を知りう

ると考えた。

B活性は Goodkufski らの報告に基づき、血清を50℃30分非働化する事によりRBを作製しRBと正常人血清あるいは被検血清を一定の比で混合し、ACH 50を測定することにより測定可能であると考えた。RBのCH 50は0 u/mlであり、50℃30分非働化によりC2が不活化された為と考えた。ACH 50及びC3A蛋白量の低下は各々100%、54%であり、B蛋白量は残存していても活性は消失しておりRBとして使用可能と考えられた。RBとヒト新鮮血清を種々の比で混合しACH 50を測定すると、ヒト新鮮血清の割合を増加するに従いACH 50は sigmoid curveを描いて増加し、この増加はB dependentなものと考えRBと被検血清の比を1対1とし表4の如くB活性の測定を行うこととした。

結 語

血清の alternative pathway 総溶血活性、properdin 活性、Factor B 活性測定法の基礎的検討を行ない、次の結論を得た。

1) CPの活性化を完全に阻止し、APのみを活性化する為のbuffer中EGTA濃度は0.03 Mであった。

2) ウサギ赤血球は0.03 M-EGTA-GVB* buffer中において、正常人血清及びC4, C2を欠く血清で溶血を示し、inulinあるいはzymosanで不活化した血清では溶血を示さない事から、ウサギ赤血球の溶血はAPを介するものである事が明らかとなった。

3) alternative pathway 総溶血活性はウサギ赤血球 2×10^8 個/ml 0.2mlの50%溶血に必要な血清の希釈倍数を単位とし、ACH 50と表現した。

4) properdin 活性は bentonite法によりRPを作製し、RPと正常人新鮮血清あるいは被検血清の比を7対3としてACH 50を測定し、正常人との比を%で表した。

5) Factor B 活性は正常人新鮮血清を50℃30分間加温しRBを作製し、RBと正常人新鮮血清あるいは被検血清の比を1対1としてACH 50を測定し、正常人との比を%で表した。

謝 辞

稿を終るにあたり、本研究の御指導、御校閲を受

けた恩師大藤眞教授に深甚なる感謝の意を表します。
又、直接御指導を受けた天野哲基博士に感謝の意を
表します。

文 献

1. Schur, P.H.: Complement in lupus. *Clin. Rheum. Dis.* 1, 519—543, 1975.
2. 森田 実, 西下駿三, 天野哲基, 大藤 眞: SLE の血清補体価に関する研究. *アレルギー* 20, 159—169, 1971.
3. Westberg, N.G., Naff, G.B., Boyer, J.T. and Michael, A.F.: Glomerular deposition of properdin in acute and chronic glomerulonephritis with hypocomplementemia. *J. Clin. Invest.* 50, 642—649, 1971.
4. Jordon, R.E., Schroeter, A.L. and Winkelmann, R.K.: Dermalepidermal deposition of complement components and properdin in systemic lupus erythematosus. *Br. J. Dermatol.* 92, 263—271, 1975.
5. Carlo, J.R., Rothfield, N.F. and Ruddy, S.: Demonstration of β_1 H globulin together with C3 in the Dermal-Epidermal junction of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 22, 13—18, 1979.
6. Carlo, J.R., Ruddy, S., Savter, S. and Yount, W.J.: Deposition of β_1 H globulin in kidneys of patients with immune renal disease. *Arthritis Rheum.* 22, 403—411, 1979.
7. Gewurz, H.G., Pickering, R.J., Naff, G., Synderman, R., Mergenhagen, S.E. and Good, R.A.: Decreased properdin activity in acute glomerulonephritis. *Int. Arch. Allergy* 36, 592—598, 1969.
8. Wilson, M.R., Arroyave, C.M., Nakamura, R.M., Vaughan, J.H. and Tan, E.M.: Activation of the alternative complement pathway in systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* 26, 11—20, 1976.
9. Perrin, L.H., Lambert, P.H., Nydegger, V.E. and Miescher, P.A.: Quantitation of C3PA (properdin factor B) and other complement components in diseases associated with a low C3 level. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 2, 16—27, 1973.
10. Perrin, L.H., Lambert, P.H., and Miescher, P.A.: Properdin level in systemic lupus erythematosus and membranoproliferative glomerulonephritis. *Clin. Exp. Immunol.* 16, 575—581, 1974.
11. Whaley, K., Schur, P.H. and Ruddy, S.: Relative importance of C3b inactivator and β_1 H globulin in the modulation of the properdin amplification loop in systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* 36, 408—414, 1979.
12. Charlesworth, J.A., Williams, D.G., Sherington, E., Lachman, P.J. and Peters, D.K.: Metabolic studies of the third component of complement and the glycine-rich beta glycoprotein in patients with hypocomplementemia. *J. Clin. Invest.* 53, 1578—1587, 1974.
13. Ziegler, J.B., Rosen, F.S., Alper, C.A., Grupe, W. and Lopow, I.H.: Metabolism of properdin in normal subjects and patients with renal disease. *J. Clin. Invest.* 56, 761—767, 1975.
14. Charlesworth, J.A., Scott, D.M., Pussell, B.A. and Peters, D.K.: Metabolism of human β_1 H: studies in man and experimental animals. *Clin. Exp. Immunol.* 38, 397—404, 1979.
15. Platts-Mills, T.A.E. and Ishizaka, K.: Activation of the alternative pathway of human complement by rabbit cells. *J. Immunol.* 113, 348—358, 1974.
16. Inai, S., Kishimoto, S., Hirao, F., Yamada, T. and Takahashi, H.: Studies on adsorption of human serum components by bentonite. *Biken. J.* 2, 233—245, 1959.
17. Pillemer, L., Blum, L., Lepow, I.H., Wurz, L. and Todd, E.W.: The properdin system and immunity III. The zymosan assay of properdin. *J. Exp. Med.* 103, 1—13, 1956.

18. Goodkofsky, I. and Lepow, I.H.: Functional relationship of factor B in the properdin system to C3 activator of human serum. *J. Immunol.* 107, 1200—1204, 1971.
19. 天野哲基, 西下駿三, 河野勝昭, 吉野内猛夫, 三橋康彦, 石田俊彦, 三好正規, 鈴木信也, 大藤 真: 凝固系による補体の活性化. *臨床免疫* 7, 533—538, 1975.
20. Pillemer, L., Blum, L., Lepow, I.H., Ross, O.A., Todd, E.W. and Wardlaw, A.C.: The properdin system and immunity: I Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena. *Science* 120, 279—285, 1954.
21. Perrin, N., Lambert, P.H. and Miescher, P.A.: Complement breakdown products in plasma from patients with systemic lupus erythematosus and patients with membranoproliferative or other glomerulonephritis. *J. Clin. Invest.* 56, 165—176, 1975
22. Brai, M. and Osler, A.G.: Cobra venom-induced hemolysis. Activity levels in sera of patients with neoplastic and other diseases. *J. Exp. Med.* 136, 950—955, 1972.
23. Kann, H.E., Jr., Mengel, C.E., Meriwether, W.D. and Ebbert, L.: Production of in vitro lytic characteristics of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria erythrocytes in normal erythrocytes. *Blood* 32, 49—58, 1968.
24. 吉野内猛夫, 天野哲基, 三橋康彦, 宮島啓人, 大藤 真: 全身性エリテマトーデスにおける alternative pathway について (chemotaxis を利用して). *アレルギー* 25, 784—790, 1976.
25. Fine, D.P., Marney, S.R., Colley, D.G., Sergeant, J.S. and Des Prez, R.M.: C3 shunt activation in human serum chelated with EGTA. *J. Immunol.* 109, 807—809, 1972.
26. 宮島啓人: 全身性エリテマトーデスにおける alternative pathway に関する研究, ウサギ赤血球溶血反応を利用して, 第2編, 臨床的考察. *岡山医学会雑誌* 93, 987—999, 1981.
27. Aminoff, D., Bell, W.C., Fulton, I. and Ingebrigtsen, N.: Effect of sialidase on the viability of erythrocytes in circulation. *Am. J. Hematol.* 1, 419—432, 1976.
28. Fearon, D.T.: Regulation by membrane sialic acid of β_1 H-dependent decay-dissociation of amplification C3 convertase of the alternative complement pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 1971—1975, 1978.
29. Pangburn, M.K. and Müller-Eberhard, H.J.: Complement C3 convertase: Cell surface restriction of β_1 H control and generation of restriction on neuraminidase-treated cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 2416—2420, 1978.
30. Fearon, D.T. and Austen, K.F.: Properdin: Binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. *J. Exp. Med.* 142, 856—863, 1975.
31. Medicus, R.G., Schreiber, R.D., Götze, O. and Müller-Eberhard, H.J.: A molecular concept of the properdin pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 612—616, 1976.
32. Fearon, D.T., Austen, K.F. and Ruddy, S.: Formation of a hemolytically active cellular intermediate by the interaction between properdin factor B and D and the activated third component of complement. *J. Exp. Med.* 138, 1305—1313, 1973.

**Studies on the Alternative Pathway in Systemic Lupus Erythematosus
Using Rabbit Red Blood Cells
Part 1. Fundamental Studies**

By

Hiroto MIYASHIMA

**Third Department of Internal Medicine, Okayama University,
Medical School, Okayama Japan**

(Director: Prof. T. Ofuji)

Methods of measuring the activity of the total alternative complement pathway, properdin and Factor B with rabbit red blood cells(RaRBC) were examined. The following results were obtained.

- 1) 0.03M EGTA-GVB permitted activation of the alternative complement pathway without activation of the classical complement pathway.
- 2) RaRBC were hemolysed by C4/C2 depleted serum as well as by normal serum. RaRBC were not hemolysed by inulin or zymosan treated serum.
- 3) The activity of the total alternative complement pathway was measured with 50% hemolysis of RaRBC in EGTA-GVB, designated as ACH50.
- 4) The activity of properdin or Factor B was measured with RaRBC and normal fresh human serum deficient in properdin(RP) or deficient in Factor B(RB).