



## 血清補体価(CH50)は補体第2経路(AP)活性化を反映するか?(自然科学系)

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2009-08-25 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 内堀, 恵美, 北野, 悦子, 村上, 能庸, 岩田, 博夫, 北村, 肇 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://doi.org/10.24729/00010816">https://doi.org/10.24729/00010816</a>

報 告

## 血清補体価 (CH50) は補体第 2 経路 (AP) 活性化を反映するか？

内堀恵美<sup>1)</sup>, 北野悦子<sup>1)</sup>, 村上能庸<sup>2)</sup>,  
岩田博夫<sup>2)</sup>, 北村 肇<sup>1)</sup>,

(<sup>1)</sup>大阪府立看護大学医療技術短期大学部臨床検査学科, <sup>2)</sup>京都大学再生医科学研究所)

### Influence of Alternative Pathway Activation on Serum CH50 Level

Emi Uchibori<sup>1)</sup>, Etsuko Kitano<sup>1)</sup>, Yoshinobu Murakami<sup>2)</sup>,  
Hiroo Iwata<sup>2)</sup> and Hajime Kitamura<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup>Department of Clinical Laboratory Science, Osaka Prefecture College of Health Sciences and  
<sup>2)</sup>Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University)

**Key words:** 補体 D 因子欠損血清; CH 50; 補体活性化; 補体第 2 経路

#### I. はじめに

血清補体価 (CH 50) は, 重要な臨床検査の 1 つで, 腎疾患や SLE を含む自己免疫疾患などの診断や治療経過の判断に頻用されている。CH 50 値は一般に, 感作赤血球 (EA) などの抗原抗体複合体による血清補体の活性化を検出しているため, 検体中の補体古典経路 (CP) に関わる補体成分の活性を反映していると考えられている。しかし, 1) EA 上にできる C3b によって (B 因子や D 因子が参加して) 同時に第 2 経路 (AP) も活性化される, 2) B 因子, D 因子あるいは properdin の欠損症患者の血清 CH 50 は正常人より低値である<sup>1)</sup>, 3) Bio-Rex 70 Resin を使って作成した D 因子欠損血清の CH 50 は NHS より低値である<sup>2)</sup>, 4) モノクローナル抗 P 抗体を血清に加えて反応させると CP 活性化による sC5b-9 形成が抑えられる<sup>3)</sup>, などの報告があることから, CH 50 値は, EA による古典経路活性化だけではなく, 同時に起こる AP 活性化をも反映しているという説が浮上してきた。

そこで, 今回新しい方法によって D 因子欠損血清を作成し, その CH 50 値を測定することによって AP 活性化の CH 50 値への影響を調べた。

#### II. 材料および方法

##### 1. 材料

正常人プール血清 (NHS): ボランティア健康人 14 人より血清を採取し混合後分注し,  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

試薬および抗体: スルホン酸基を有する poly (2-acrylamide 2-methylpropane sulfonate) をグラフトしたポリスチレンビーズ (PAMPS-beads)<sup>4)</sup>, Bio-Rex 70 Resin (Bio-Rad), Block Ace (大日本製薬), 0.05% Tween 20-PBS, コニカイムノステイン HRP-1000 (Konica), ヒツジ抗ヒト D 因子 (THE BINDING SITE), HRP 標識ヤギ抗ヒツジ IgG (DAKO) を使用した。

PAMPS-beads 処理血清の作成: 血清 1.0 mL に種々の濃度の PAMPS-beads を加え  $30^{\circ}\text{C}$  で 30 分反応させた後遠心し, PAMPS-beads を除いた上清を採取した。

##### 2. 方法

1) 補体溶血活性測定: マイクロプレート法で CH 50 値は EA を, ACH 50 値はウサギ赤血球 (E-rab) を用い測定した<sup>5)</sup>。

2) immunoblotting: NHS, 精製補体成分および検体を SDS-PAGE 後, ニトロセルロース膜に転写し間接酵素抗体法にて解析した<sup>6)</sup>。

連絡者: 北村 肇

本研究は, 第 38 回補体シンポジウム (2001 年) で口頭発表し, また臨床病理 (2002) 50: 815-819 へ論文発表した。

紀要委員会注: 本報告は, 平成 13 年度大阪府立看護大学医療技術短期大学部学長指定研究補助金を用いてなされた研究成果の報告である。

(受付日 2002 年 9 月 9 日, 受理日 2002 年 10 月 11 日)

III. 結 果

1. PAMPS-beads 処理によるD因子欠損血清の作成

種々の濃度の PAMPS-beads と反応させた NHS (PAMPS-beads 処理 NHS) について調べた。まず、ACH 50 値を測定したところ、Fig.1 に示すように PAMPS 濃度に応じて低下し、2.5 mg/mL 以上で 0 u/mL になった。次に D 因子について immunoblotting で調べたところ、精製 D 因子と同じ位置にバンドが観察されたが、PAMPS の量が多くなるにつれてバンドが薄くなり、PAMPS 2.5 mg 以上では消失した (Fig.2)。また、PAMPS-beads 処理 NHS に D 因子を加え ACH 50 値を測定したところ、ほぼ完全に値が回復した (Fig.3 A)。

以上より、PAMPS-beads 処理 (2.5 mg/mL 以上) によって D 因子欠損血清が作成されることが判明した。

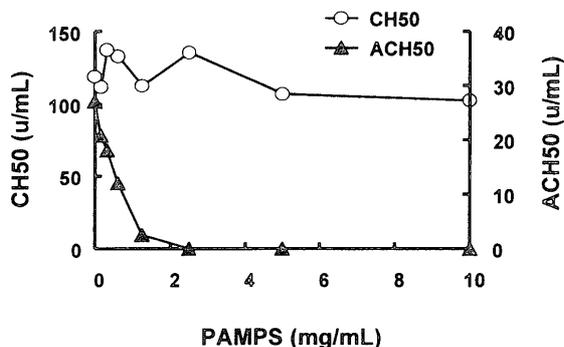


Fig.1 CH50 and ACH50 levels in PAMPS-beads-treated NHS. NHS, treated with various amounts of PAMPS-beads, were assayed for CH50 (○) and ACH50 (△).

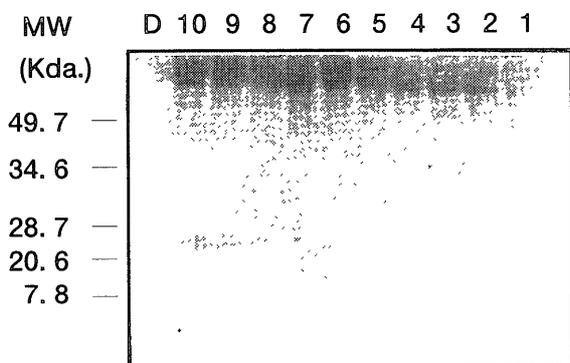


Fig.2 Immunoblot analysis of factor D in PAMPS-beads-treated NHS. NHS treated with 40 (lane 1), 20 (lane 2), 10 (lane 3), 5 (lane 4), 2.5 (lane 5), 1.25 (lane 6), 0.625 (lane 7), 0.312 (lane 8), 0.156 (lane 9) or 0 (lane 10) mg of PAMPS-beads/mL NHS were subjected to SDS-PAGE, transferred and blotted to detect factor D. Isolated factor D (lane D) was also treated similarly.

2. PAMPS-beads 処理によるD因子欠損血清の CH50 値  
PAMPS-beads 処理 NHS の CH50 値は、処理前の値を 100% とすると、PAMPS-beads 量が 2.5 mg/mL のとき

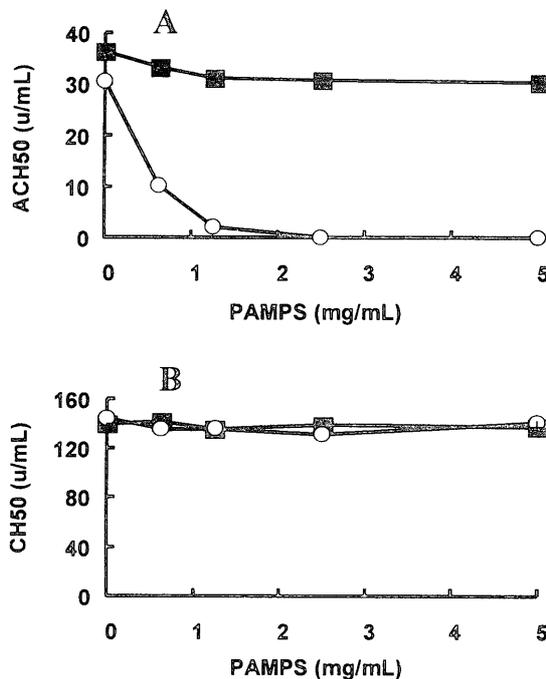


Fig.3 Addition of factor D to PAMPS-beads-treated NHS. Isolated factor D (■) or buffer alone (○) as a control was added to PAMPS-beads-treated NHS, followed by the assay for ACH50 (A) and CH50 (B).

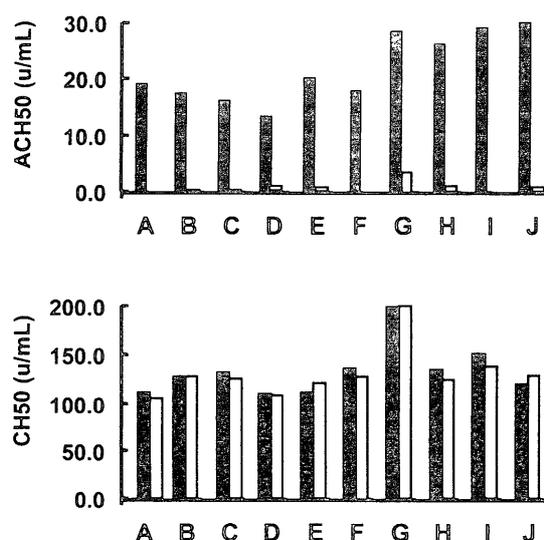


Fig.4 CH50 and ACH50 levels in PAMPS-beads-treated serum from normal subjects. CH50 and ACH50 were assayed in sera from 10 different normal subjects before (■) and after (□) treatment with 2.5 mg of PAMPS-beads/mL serum.

102.0±11.8% (n=6), 5.0 mg/mL のとき 96.6±11.6% (n=7) であり, 同処理により CH 50 値は低下しないと考えられた。

### 3. D 因子欠損血清の CH 50 値への D 因子添加の影響

PAMPS-beads 処理 NHS に D 因子を加え CH 50 値を測定したところ, D 因子添加前と値は変わらなかった。また, 無処理 NHS に D 因子を加えると ACH 50 値は上昇するが, CH 50 値は変わらなかった (Fig. 3B)。

### 4. 個々の健常人血清の PAMPS-beads 処理

健常人ボランティア10人について各個人の血清から PAMPS-beads 処理により D 因子欠損血清を作成し, 各々の CH 50 値および ACH 50 値を測定したところ, いずれの場合も ACH 50 値は 0 u/mL 近くまで低下したが, CH 50 値は低下しなかった (Fig. 4)。

### 5. Bio-Rex との比較

PAMPS-beads の代わりに, 従来の D 因子欠損血清作成試薬である Bio-Rex 70 を使って同様の方法で D 因子欠損血清を作成し, CH 50 値, ACH 50 値を測定したところ, PAMPS と比べて Bio-Rex は大量に入れても ACH 50 値が 0 u/mL にならず, CH 50 値では低下が見られた。また, immunoblotting で D 因子の確認を行ったところ, Bio-Rex の濃度が濃くなっても D 因子は残っていた。

## IV. 考察と結論

血清の PAMPS-beads 処理は新しい D 因子欠損血清作成法であることが判明した。この PAMPS-beads 処理して作成した D 因子欠損血清は, NHS から作成した場合も, 個々の健常人から作成した場合も, その CH 50 値は元の血清の CH 50 値と変わらなかった。また, NHS に精製 D 因子を添加すると ACH 50 値は上昇するが, CH 50

値は変わらなかった。これらのデータは CH 50 値は AP 活性化を反映しないことを示すと考えられた。

## 文 献

- 1) Hiemstra, P.S., Langeler, E., Compier, B., Keepers, Y., Leijh, P.C., van den Barselaar, M.T., Overbosch, D. and Daha, M.R. (1989) Complete and partial deficiencies of complement factor D in a Dutch family. *J. Clin. Invest.*, 84:957-961.
- 2) Zhang, Y., Suankratay, C., Zhang, X.H., Lint, F.L. and Gewurz, H. (1999) Lysis via the lectin pathway of complement activation: Minireview and lectin pathway enhancement of endotoxin-initiated hemolysis. *Immunopharmacology*, 42:81-90.
- 3) Gupta-Bansal, Parent, J.B. and Brunden, K.R. (2000) Inhibition of complement alternative pathway function with anti-properdin monoclonal antibodies. *Molec. Immunol.*, 37:191-201.
- 4) Murakami, Y., Iwata, H., Kitano, E., Kitamura, H. and Ikada, Y. (2001) Interaction of poly (2-acrylamido 2-methylpropane sulphonate)-grafted polystyrene beads with cationic complement proteins. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.*, 12:451-465.
- 5) 北野悦子, 北村 肇 (1997) 補体測定法, “免疫と生体防御 [I] 体液性免疫” 生物薬科学実験講座 第10巻 (長沢滋治, 豊島 聰 編), 広川書店, 東京, p.213-255.
- 6) Kitano, E. and Kitamura, H. (2000) Synthesis of factor D by normal human hepatocytes. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 122:299-302.