



補体蛋白D因子の新しい溶血活性測定法の開発(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: 北野, 悦子, 西垣, 雅子, 内堀, 恵美, 土居, 志鶴, 村上, 能庸, 岩田, 博夫, 北村, 肇 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24729/00010818

報 告

補体蛋白 D 因子の新しい溶血活性測定法の開発

北野悦子¹⁾, 西垣雅子^{1),*}, 内堀恵美¹⁾, 土居志鶴²⁾,
村上能庸³⁾, 岩田博夫³⁾, 北村 肇¹⁾

¹⁾大阪府立看護大学医療技術短期大学部臨床検査学科,
²⁾大阪府立成人病センター, ³⁾京都大学再生医科学研究所)

A Novel Assay for Factor D Activity

Etsuko Kitano¹⁾, Masako Nishigaki¹⁾, Emi Uchibori¹⁾, Shizu Doi²⁾,
Yoshinobu Murakami¹⁾, Hiroo Iwata³⁾ and Hajime Kitamura¹⁾

¹⁾Department of Clinical Laboratory Science, Osaka Prefecture College of Health Sciences,
²⁾Clinical Laboratory, Osaka Medical Center for Cancer and Cardiovascular Diseases
and ³⁾Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University)

Key words: 補体 D 因子; 補体活性; D 因子溶血活性; 活性測定法; D 因子除去血清

はじめに

補体蛋白 D 因子は、低分子量 (24,000)、血清中低濃度 (1~2 μ g/mL) を特徴とする第 2 経路の蛋白で血清中では活性型として存在し、臨床的には腎不全患者で血清中の D 因子濃度は正常の 10 倍にまで著増することが知られている¹⁾。その活性測定法は、①EAC 43 Bb 法²⁾、②BioRex-70 による D 欠損血清 (RD) 法³⁾、③CVF-B 法⁴⁾の 3 種があるが、いずれも、低感度、低再現性、試薬が入手困難、手技が煩雑、精製成分が必要、などの欠点を持ち、簡単で信頼に足る測定法の開発が必要となっている。今回、新しい方法で選択的に D 因子を除去した RD を作成し、それを利用して新しい D 因子活性測定法の開発を試みた。

材料および方法

1. 材料

- 1) ビーズ：ポリエチレンビーズにスルホン酸基を

有する高分子電解質 poly (2-acrylamide 2-methylpropane sulfonate)⁵⁾, poly (acrylic acid), poly (methacrylic acid) をそれぞれグラフトした PAMPS-beads, PA-beads, PM-beads の計 3 種のビーズを用いた。

2) 血清：ボランティア健康人 14 人より血清を採取して混合し、RD 作成用血清とした。ボランティア健康人 50 人より血清を採取し、混合後分注して健康人ヒトプール血清 (NHS) とした。また、精製 D 因子は Sigma 社より購入した。

2. 方法

1) ビーズ処理血清の作成：血清に種々の濃度のビーズを加え 30 $^{\circ}$ C で 30 分反応させた後、3000 rpm, 20 分間遠心しビーズを除いた上清を採取した。

2) 補体溶血活性測定：マイクロプレート法で CH 50 値⁶⁾は感作ヒツジ赤血球 (EA) を、ACH 50 値⁶⁾はウサ

⁴⁾ CH 50 および ACH 50 について

CH 50 は (血清) 補体価とも呼ばれ、血清中の補体の活性を一括して表す測定法で、被検体中の補体古典経路 (classical pathway) 活性化によって感作ヒツジ赤血球 (EA) を溶血させる活性として測定される。CH 50 の言葉の由来は complement hemolysis 50% で、元来は一定量の EA の 50% を溶血させる補体量を 1 単位として被検体中の補体活性を表現する単位として使われていたが、近年その測定 (検査) あるいは測定値を CH 50 と呼んでいる。一方、もう一つの活性化経路である第 2 経路 (alternative pathway) を介して溶血させる活性の場合は、alternative の a をつけて ACH 50 と呼ばれ、Mg²⁺ 存在下でウサギ赤血球を溶血させる活性として測定される。これらは臨床的には患者の血清補体の解析のためのスクリーニングとして使われる。また、各種の疾患の患者血清中でこれらの値が増減することが知られ、診断や経過観察に使われている。

* 現在、PL 病院中央臨床検査部
連絡者：北村 肇

本研究は、第 39 回補体シンポジウム (2002 年) および第 19 回国際補体ワークショップ (2002 年) で口頭発表した。
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共同研究補助金を用いてなされた研究成果の報告である。

ギ赤血球 (E-rab) を用い測定した。

結 果

1. RD の作成

1) RD 作成用のビーズの選択

3種のビーズを種々の濃度でヒト血清と反応させ、比較した。ビーズと反応後のヒト血清について、①CH 50値が低下せず、②ACH 50値が0 u/mLまで低下し、③精製D因子添加でACH 50値が100%回復する、の3点を検討した結果、PM-beadsではACH 50値の低下が不十分であり、PA-beadsではACH 50値の低下のためには20.0 mgを要した。PAMPS-beadsは最も低濃度(1.25 μg/mL以上)で効果があった(Fig. 1)。このことよりD欠損血清作成にはPAMPS-beadsを用いることとした。

2) 血清との反応条件(Fig. 2)

EDTAの有無や反応温度などについて検討したところ、30°Cで反応させるとCH 50値がやや低下し、4°Cで反応させるとACH 50値の低下が不十分であった。EDTAを加えて血清中の補体成分の消費を抑えた状態にすると温度に関係なくCH 50値が低下せず、ACH 50値が0 u/mLになったが、(-)コントロールのACH 50値が低い値を示した。そこで測定時にMg²⁺を加えると(-)コントロールのACH 50値は元の値となり、各ビーズと反応させた血清では0 u/mLのままであった。よってビーズとの反応条件は10 mM EDTA存在下で30°C 30分間とした。EDTA存在下で反応させるのが最も良かったので、以後、

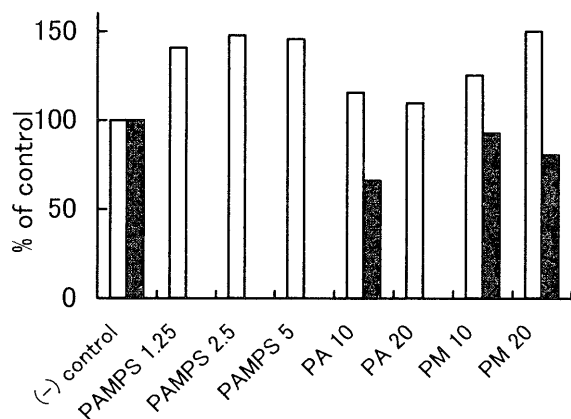


Fig. 1 CH 50 and ACH 50 levels of serum after treatment by various polyanion beads.

CH 50 (□) and ACH 50 (■) were assayed in NHS after incubation with various concentration (mg/mL) of PAMPS-beads, PA-beads or PM-beads at 30°C for 30 min. Each level was expressed as % of NHS treated similarly without any polyanion beads ((-) control).

RD 作成のためのヒト血清は EDTA plasma とした。

3) 検体測定時の RD 濃度 (Fig. 3)

PAMPS-beads 2.5 mg/mL plasma および PA-beads 20.0 mg/mL plasma で作成した 2 種の RD をそれぞれ 1.5 倍から 4 倍、および 4 倍に希釈し、D 因子と NHS の測定に適する濃度を検討した。PA-beads は 4 倍希釈では感度が低く、2 倍希釈では凝集を起こして測定できなかった。PAMPS-beads は 1.5 倍希釈では (-) コントロールの値が高く、4 倍希釈以上では感度が落ちるので、2 倍希釈を用いることとした。

2. 新しい D 因子活性測定法

1) 原理

E-rab に RD と D 因子を加えると、第 2 経路を介して溶血することを原理とする。

2) 手技

96 well のマイクロプレートを用い、緩衝液は EGTA-Mg-GGVB とした。手技は、①25 μL の検体連続希釈系列を作る、②1:2 希釈した D-depleted plasma (10 mM-Mg 添加) を 25 μL ずつ加え、③7.5 × 10⁵/mL の E-rab を 25 μL ずつ加え、④混合し、⑤37°C で 60 分間反応、⑥緩衝液を 25 μL ずつ加え、⑦混合、⑧プレートのまま遠心し、⑨上清の hemoglobin 濃度を photometer で読む (OD₄₁₅/OD₆₃₀)、とした。

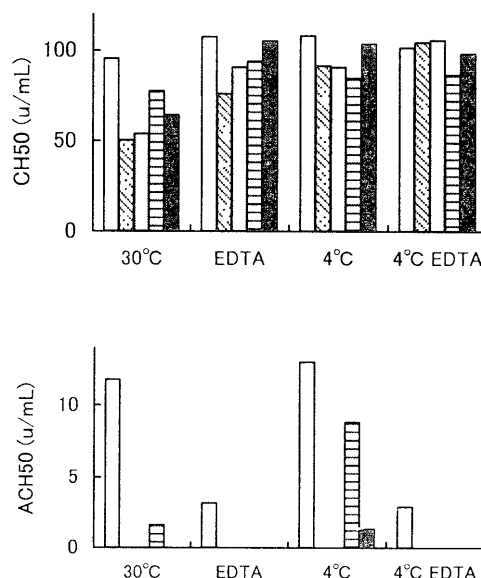


Fig. 2 Effects of temperature and EDTA in serum incubation with polyanion beads.

NHS was incubated with 2.5 mg (▨) or 5.0 mg (□) of PAMPS-beads/mL, 10.0 mg of PA-beads (▤) or 20.0 mg of PM beads (■) or without any polyanion-beads (□) in the presence or absence of EDTA at 30°C or 4°C. These sera were assayed for CH 50 and ACH 50.

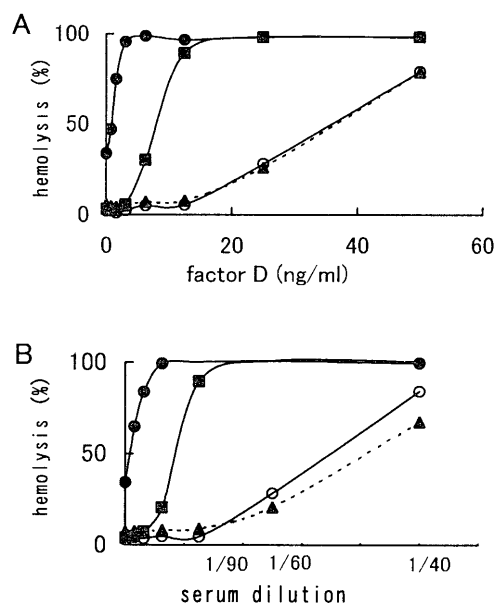


Fig. 3 Hemolytic curve by various amounts of factor D. Hemolytic ratio (%) of E-rab after incubation with isolated factor D (A) or NHS (B) by use of various D-depleted plasma were plotted against amounts of factor D.

- : 1:1.5 diluted D-depleted plasma prepared by 2.5mg/mL of PAMPS-beads
- : 1:2 diluted D-depleted plasma prepared by 2.5mg/mL of PAMPS-beads
- : 1:4 diluted D-depleted plasma prepared by 2.5mg/mL of PAMPS-beads
- ▲: 1:4 diluted D-depleted plasma prepared by 20.0mg/mL of PA-beads

3) D 因子活性測定値の表現法

精製 D 因子を検体として測定し、横軸に検体濃度、縦軸に溶血率 (y) をとってプロットすると、S 字状の曲線が描かれた (Fig. 3 A)。そこで補体価測定時の算出法と同じように、両対数グラフに y より算出した $y/1-y$ 値を横軸に、検体量を縦軸にプロットして結ぶと直線が得られた。血清を検体としても同様の結果であった (Fig. 3 B)。以上より D 因子活性値を 50% 溶血 CH50 単位 (u/mL) で表すことができた。

4) 新方法による血清中 D 活性測定結果

NHS を被検体として用いて D 因子活性を測定した結果、同時再現性は測定値平均 = 160.9 u/mL, SD = 17.4 u/mL, CV = 10.8% (n = 20) であった。また、7 人の健康人の血清および血漿を被検体とし D 因子活性を測定した。血清および血漿中の D 因子活性値に有意差はなく、どちらも測定可能であることがわかった (Fig. 4)。

考 察 と 結 論

PAMPS-beads で作成した RD を使って D 活性を簡単に

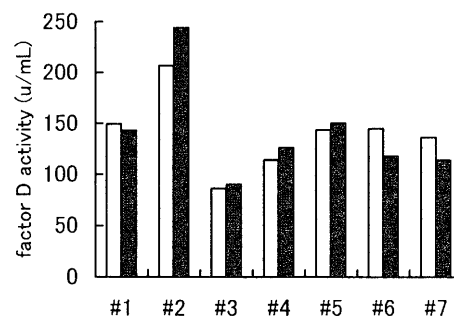


Fig. 4 Factor D activities in sera from normal subjects. Serum (□) and EDTA-plasma (■) from 7 normal subjects were assayed for factor D activity by the new method.

測定できることが判明した。この方法により、D 因子活性はこれまで報告されたどの方法よりも簡単に測定できると考えられる。なお、PAMPS-beads で D 因子が除去される機序は陰性荷電の PAMPS-beads と陽性荷電の D 因子蛋白の結合、すなわち静電作用である⁹⁾。

文 献

- 1) 北野悦子, 中西 功, 椿原美治, 佐川史郎, 北村肇 (1995) 補体第 2 経路蛋白 D 因子に関する研究—腎移植による血清 D 因子濃度への影響—. 大阪府立看護大学医療技術短期大学部紀要, 1: 9-15.
- 2) Whaley, K. and North, J. (1997) Haemolytic assays for whole complement activity and individual components, "Complement, A Practical Approach" (ed. by Woods, A.W. and Sim, R.B.), IRL Press, Oxford, p.41-43.
- 3) Praz, F., Roque Antunes Barreira, M.C. and Lesavre, P. (1982) One step procedure for preparation of classical (C1q) and alternative pathway (factor D) depleted serum. J. Immunol. Methods, 50:227-231.
- 4) Miyama, A., Kato, T. and Horai, S. (1975) Trypsin-activated complex of human factor B with cobra venom factor (CVF), cleaving C3 and C5 and generating a lytic factor for unsensitized guinea pig erythrocytes. I: Generation of the activated complex. Biken J., 18:193-204.
- 5) 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.