

論 文 内 容 要 旨

糸球体腎炎及び膠原病の病変の成立に補体系は強く関与しており、その診断と治療、および病態の解明において血中補体の検索が行われている。しかし、一般的に行われている補体の溶血活性の測定や、補体成分の蛋白量の測定は、補体の産生と消費の両者に影響され、補体の活性化そのものを直接測定してはいない。そこで補体の活性化の動的な状態を評価する為に、主に補体の alternative pathway の活性化によって生ずる C3b と H 因子の複合体 (C3-H complex) を検出する、新しい測定法 (C3-H assay) の開発を試みた。また、既に報告されている C3-P complex の測定 (C3-P assay) に関しても若干の改良を加え、C3-H complex と共に腎炎や SLE の患者などで測定し、C3-H assay, C3-P assay の臨床的意義について検討した。

C3-H assay は平底 96 穴のマイクロプレートを用い、抗 C3 抗体とペルオキシダーゼ標識抗 H 抗体のサンドイッチ法による enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) で行った。即ち、マイクロプレートの各穴にアフィニティー精製抗 C3 抗体を入れ、壁面に抗体を吸着させる。壁面の蛋白非吸着部分を BSA により覆った後、各穴に検体を添加。抗 C3 抗体と検体中の C3-H complex を反応させた後、ペルオキシダーゼ標識抗 H 抗体を加え反応させ、更に基質液を加え、その呈色を吸光度計で測定することにより C3-H complex の量を測定した。なお検体は 5% polyethylene glycol (PEG) 6000 で検体中の C3-H complex を沈澱とし、それを PBS 緩衝液に溶解して ELISA 用検体とした。この PEG 処理により検体中の monomeric な C3 の 99% 以上を除くことができ、測定感度を増加することができた。C3-P assay は C3-H assay と同様の手順で行い、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗 P 抗体を使用した。

C3-H complex, C3-P complex のモデルを作成し、C3-H assay, C3-P assay で検出を試みた。即ち、血清に加熱凝集人 IgG (AHG) を加え、37°C で加温、AHG 上または液相に遊離して形成される C3-H complex または C3-P complex を C3-H assay, または C3-P assay で測定した。両 complex とも dose dependent に測定することができた。更に両 complex は MgEGTA 存在下でも形成され、EDTA 存在下では形成されなかったことなどから、その形成には補体の活性化が必須で、主に alternative pathway を介しているものと考えられた。また両 complex とも活性化物質なしの血清のみの加温によっても形成された。これは alternative pathway では自発的に初期転換酵素が形成されており、それが加温により促進され、両 complex が増加したものと考えられた。又、一度形成された complex が短時間に崩壊するのか否かを検討したが、complex は短時間では崩壊しなかった。

C3-H complex の存在をより明らかにする為にショ糖密度勾配超遠心法を行った。C3-H

complex は10S 前後の比較的均一な complex, C3-P complex は広い分布を持つ不均一な complex であった。更に、活性化した血清より抗C3抗体結合セフェロースにて、C3-H complex を分離し、SDS-PAGEとウエスタンブロッティング法でC3とHの存在を確認した。

次にC3-H assay, C3-P assay を臨床に応用し、全身性エリテマトーデス (SLE), 膜性増殖性糸球体腎炎 (MPGN), IgA腎症等の患者EDTA血漿で両 complex を測定した。C3-H complex はSLEで51例中23例, MPGNで11例全例, IgA腎症で14例中5例と増加していた。また、SLEではC3-H complex はC3-IgG complex と良く相関した。これより、SLEではC3-H complex は補体のみから形成されているものだけでなく、免疫複合体の形のものがある可能性が考えられた。SLEではC3-H complex はC3d値と良い相関を示すなど、血中での補体の実際の活性化を示す良い指標と考えられた。MPGNでのC3-H complex の著明な上昇は非常に特徴的で、MPGNの診断の補助になるものと思われた。

C3-P complex は予想に反し正常人に対し有意に増加している疾患は無かった。しかし、SLEでは有意に低下していた。このことはSLEでは補体の活性化にも関わらず、液相中の alternative pathway のC3転換酵素が低下していることを示していると考えられた。

活動性のSLE症例で、経時的にC3-H complex を測定した。増加していたC3-H complex は疾患の鎮静化に伴い正常化した。又、透析での微妙な補体の活性化をC3-H complex, C3-P complex の測定により検出できた。

C3-H assay, C3-P assay は補体の活性化を直接評価する測定法であり、又、マイクロプレートとELISAを利用することにより、多量の検体をラジオアイソトープを用いずに、高感度に測定できることから、様々な補体の活性化の検出、及びSLEやMPGNでの病態の解明に有用であると思われる。

審 査 結 果 の 要 旨

糸球体腎炎や膠原病は免疫系の異常ないし変調によって発生すると考えられている。これらの疾患において、抗原、抗体反応のほかに、二次的に補体系が活性化され、病態の成立、進展に複雑な影響を与えているものと考えられている。

そこで以前から、補体系の測定が行われてきたが、繁雑の割りに特異性が低い方法しかなかった。そこで本論文の著者木下は、 C_3b とH因子の複合体 (C_3-H complex) を検出する新しい測定法 (C_3-H assay) の開発を試みた。また、既に報告されている C_3-P complex の測定法 (C_3-P assay) についても若干の改良を加えた。

マイクロプレートの各穴に精製抗 C_3 抗体を入れ、壁面に抗体を吸着させた。壁面の蛋白非吸着部分を BSA で覆った後、各穴に検体を加えた。抗 C_3 抗体と検体中の C_3-H complex を反応させた後、ペルオキシダーゼ標識抗 H 抗体を加えて反応させ、基質液を加え、その呈色を吸光計で測定して C_3-H complex を測定した。

C_3-H complex は SLE 51 例中 23 例、membranoproliferative glomerulonephritis (MPGN) 11 例全例、IgA 腎症 14 例中 5 例で増加していた。SLE では C_3-H complex と C_3d 値とはよい相関を示した。 C_3-P complex は予想に反して、いずれの疾患でも増加していなかった。SLE ではむしろ低い値が得られた。

以上 C_3-H assay, C_3-P assay は、マイクロプレートを用い、アイソトープを用いず、多数の検体を高感度に測定できるものであり、各種免疫異常疾患の病態の解明に有用なものであることが分った。

木下康通のこの研究は、補体の一面を明瞭にとらえ、各種病態において応用することのできる新しい方法を開発したところに意義がある。よって本研究は学位に相当するものと認める。