

ゼラチンの抗補体作用の機序に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8613

ゼラチンの抗補体作用の機序に関する研究

金沢大学医学部内科学第三講座 (主任：服部絢一教授)

田 中 邦 美

(昭和51年1月12日受付)

哺乳類の生体防禦機構には、原始的な形態と考えられている貪食細胞や進化した形態としての細胞性及び液性免疫機構、及び補体系が主に考えられている。補体系は2つの経路すなわち classical pathway と alternate pathway によって活性化されて種々の免疫生物学的現象、例えば免疫貪食現象¹⁾、免疫粘着現象²⁾、白血球走化性³⁾、conglutination 反応⁴⁾、anaphylatoxin⁵⁾⁶⁾、lymphocytotoxicity⁷⁾、免疫溶血反応等を引きおこす。そしてまた補体系は抗原抗体複合物に作用し、その結果生じた複合物は貪食細胞やリンパ系細胞の膜表面に存在する補体レセプター⁸⁾を介して反応する。この過程は現在の免疫学に於て重要な意味を有するものとして考えられており、リンパ系細胞に結合した抗原・抗体・補体複合物は、抗体産生の“ひきがね”⁹⁾¹⁰⁾としてもとらえられている。

一方生体防禦機構は、本来の防衛の目的とは異なりその機構自体が病因となる事も明らかにされて来た。補体系も同様で、補体はその活性によって生体の感染防禦に重要な役割を果す反面、抗原抗体反応にもとずく細胞や組織の破壊を伴う病変の成立に關与している臨床例が数多く報告されている。例えば臓器移植に伴う拒絶反応、種々のアレルギー性疾患、さらには自己免疫疾患などであり、これらは現在の医学の重要な分野として考えられている。以上の様な疾患に対する治療は、生体防禦反応を抑制する事に主眼が置かれてきている。以上の観点から当然、生体防禦機構の1つである補体系の抑制の試みもなされている。補体成分 C1, C2, C5, C6, C7, 各成分を失活させる Cu-chlorophyllin¹¹⁾ が passive cutaneous anaphylaxis 及び Prausnitz-Küstner 反応の阻止¹²⁾、更には C3 H/He マウスにおける CFW マウスの移植片の拒絶反応の抑制¹³⁾をもたらしことが証明されており臨床応用への可能性を示している。

著者らは、Cunningham-Szenberg 変法¹⁴⁾によって溶血斑産生細胞 (plaque forming cell : 以下 PFC と略す) の形態学的観察を目的として、液層の

固定の為にゼラチンを使用して研究する中、一定濃度以上のゼラチン添加の場合、使用しない場合に比べて PFC 数が低下することに気付いた。ゼラチンは動物真皮中のコラーゲンより得られる分子量 15,000~250,000 から成る不均一物質であり、日常の補体価の定量には、溶血活性及び免疫粘着現象による力価測定において、ヒツジ赤血球の自然溶血を阻止し溶血反応を安定させるために、0.1%ゼラチンを含有する緩衝液が一般的に用いられている。ところで Jerne 原法¹⁵⁾での PFC 数の検出率が Cunningham 法¹⁶⁾に比べて約1/3と低いのは、Jerne 原法において使用された寒天の持つ抗補体性¹⁶⁾に起因すると報告されているが、著者らはゼラチンの場合にも同じ機序が働くものと考えた。そしてヒツジ赤血球の細胞膜の安定化因子ゼラチンが濃度の増加につれて免疫溶血反応を抑制するという結果を得たので若干の考察を加えて報告する。

〔略号〕ここで本篇の記述に現われる略号を一括して記す。

C, complement ; 補体全成分

C1, complement 1 ; 補体第1成分

C2, C3, …… C9; 同様に各々補体第2成分, 第3成分, …… 第9成分

C1^{gp}, guinea pig complement 1 ; モルモット補体第1成分

C1^{hu}, human complement 1 ; ヒト補体第1成分

GPC, guinea pig complement ; モルモット補体全成分

GPS, guinea pig serum ; モルモット血清

HuS, human serum ; ヒト血清

BSA, bovine serum albumin ; ウシ血清アルブミン

EA, erythrocyte-antibody ; ヒツジ赤血球にウサギ抗ヒツジ赤血球抗体を結合させた感作赤血球

EAC1, erythrocyte-antibody complement 1 ; 補体第1成分のみが結合している感作赤血球

Anticomplementary effects of gelatin. **Kunimi Tanaka**, Department of Internal Medicine(III), (Director : Prof. K. Hattori), School of Medicine, Kanazawa University.

PFC, plaque forming cell ; 溶血斑産生細胞
 VB, veronal buffer ; ベロナール緩衝液
 GVB⁺⁺, gelatin VB⁺⁺ ; 0.1%ゼラチンと至適濃度の Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ を含むベロナール緩衝液
 GVB^{Ca++} ; Ca⁺⁺ を含むゼラチン・ベロナール緩衝液
 gl-GVB⁺⁺, glucose GVB⁺⁺ ; 2.5% glucose を含む GVB⁺⁺
 EDTA ; ethylene diamine tetraacetate Na 塩
 EGTA ; ethylene glycole tetraacetate Na 塩
 C-EDTA, complement EDTA ; 0.04M EDTA-G VB で稀釈されたモルモット血清
 CH₅₀ ; 50%溶血力価
 IAHA, immune adherence hemagglutination ; 免疫粘着凝集反応
 S.F.U., site forming unit ; 有効分子数
 DFP ; diisopropyl fluorophosphate

材 料

I. ゼラチンの溶血斑産生細胞検出法に及ぼす影響

1. 被検リンパ節細胞浮遊液の作製

Hanks II 液で3回洗浄したヒツジ赤血球, 約 5×10^8 個を Wistar 系雄ラット (体重200g以上) の腹腔内に4日目毎に計4回注射し, 最終注射後4~5日目に左右の傍胸腺リンパ節2~3個を右肺門リンパ節も含めて取り出し, それらをシャーレ内で32メッシュの金網の上に持ち来たし, スパーテルで圧碎してリンパ節内の細胞をバラバラに遊離させる。遊離細胞を含む Hanks II 液を10mlの注射器に取り, ツベルクリン針を通してシャーレ内に勢い良く吹きつけて, 細胞群を一つ一つ単離させる。同じ操作を3回繰り返した後, ナイロンガーゼを通して試験管内に移し, 1000 rpm. 5分間遠沈し, 上清を捨て Hanks II 液を加えて洗浄する操作を3回繰り返す。予備実験で1ヶの chamber 内の PFC 数が数10~100個位になるように調整した細胞濃度の浮遊液を作製する。

2. ヒツジ赤血球遊浮液

緬羊保存血液 (日本バイオテスト研究所) を Hanks II 液で2000rpm. 10分間の遠心操作で3回洗浄後, 125×10^4 /mlとなるように, Hanks II 液に浮遊させた。なお本実験では, このヒツジ赤血球浮遊液にゼラチンを2.5, 5.0, 10%になるように添加した。

3. 補体

5~6匹のモルモットの血清をプールして-80°C以下に保存したものを用いた。ただし採血後2ヶ月以内のものに限った。

4. 抗ラット IgG 家兔血清

金大癌研分子免疫部右田俊介教授より御恵与を受けた。

5. ゼラチン : Bacto-gelatin (Difco, Lot No 501915, 588691, 590470)

6. 緩衝液 : Hanks II 液

7. 濾過用ナイロンガーゼ : 齊藤ら¹¹⁾の方法に従い作製した。

8. Cunningham-Szenberg 法の chamber 作製 齊藤ら¹¹⁾の方法に従い一枚のスライド上に, 2つのほぼ等しい容積をもつ chamber を備えたものを作製した。

9. パラフィン・ワゼリン等量混合物 chamber の四隅の封入用として, 使用時加熱溶解して用いた。

II. 溶血反応によるゼラチンの抗補体作用の検討

1. ヒト血清

正中静脈より採取した血液を約1時間室温に放置後, 更に1時間氷室内で静置し, 3000rpm. 15分間遠沈して血清を分離した。分離した血清は-80°Cに保存した。

2. 血清補体価の定量

1) 溶血素 (抗ヒツジ赤血球家兔血清)

金大癌研分子免疫部, 高橋守信助教授より御恵与を受けた。

2) ヒツジ血球浮遊液の調整

緬羊保存血液 (日本バイオテスト研究所) を0.01M EDTA-GVB で3回, 生理的食塩水で3回, GVB⁺⁺ で3回洗浄後, GVB⁺⁺ で約5%の血球浮遊液を作り, この血球浮遊液1mlを蒸留水14mlに溶かして溶血液のオキシヘモグロビン量を Beckman 分光光度計 波長541m μ で測定して Di を得た。実測吸光度 Di を次の式 $V_f = V_i \times D_i / D_s$ にあてはめて, 正確に 1×10^9 /mlのヒツジ血球浮遊液となるようにした。但し D_s は正確な血球計算の結果 1×10^9 /mlに合わせた血球浮遊液1mlを蒸留水14mlに溶血させた時の吸光度であり, ヒツジ血球の場合は541m μ で0.680の値である。 V_i は約5%の血球浮遊液の量であり, V_f は 1×10^9 /ml個相当の血球浮遊液の量である。

3) 感作ヒツジ赤血球 (EA)

GVB⁺⁺ で 1×10^9 /mlに調整したヒツジ血球浮遊液に, あらかじめ GVB⁺⁺ で最大溶血度を示す濃度に稀釈した溶血素の等量を加えて37°C, 60分間恒温槽内で静かに振盪しつつ反応させて, 5×10^8 /mlの EA を得た。

4) 血清の稀釈液ならびに反応系の緩衝液

i) 5×VB 保存原液；塩化ナトリウム85.0g, 5.5 ジエチルバルピタール酸ソーダ 3.75g, 5.5 ジエチルバルピタール酸5.75gに蒸留水1500mlを加え強く加温して溶かす。冷却後蒸留水を加えて全量を2000mlとする。

ii) GVB⁺⁺； 5×VB 保存原液200ml, 0.03M塩化カルシウム (CaCl₂) 5 ml, 0.1M塩化マグネシウム (MgCl₂) 5 ml, 2%ゼラチン50mlに蒸留水を加えて1000mlにする。GVB⁺⁺ は0.15Mの NaCl, 0.00015Mの CaCl₂, 0.0005Mの MgCl₂ を含むペロナール緩衝液である。

iii) gl-GVB⁺⁺； 5×VB 保存原液100ml, 0.03M CaCl₂ 5 ml, 0.1M MgCl₂ 5 ml, 2%ゼラチン50ml, glucose 25gに蒸留水を加えて全量を1000mlとする。

iv) GVB⁺⁺⁺； 5×VB 保存原液200ml, 2%ゼラチン50ml, 0.03M CaCl₂ 5 mlに蒸留水を加えて全量を1000mlとする。

v) 0.1M EDTA 保存原液； EDTA (半井化学) 3.72g, 水酸化ナトリウム3.73gを蒸留水で全量を1000mlとする。

vi) 0.01M EDTA-GVB； 5×VB 保存原液200ml, 0.1M EDTA 保存原液100ml, 2%ゼラチン50mlに蒸留水を加えて1000mlとする。

vii) 0.04M EDTA-GVB； 5×VB 保存原液200ml, 0.1M EDTA 保存原液400ml, 2%ゼラチン50mlに蒸留水を加えて1000mlとする。

5) コラーゲン； {SIGMA} Lot No53C-8140

6) EGTA (半井化学薬品)

Ⅲ. ヒト血清蛋白の定量

1. 抗血清 (表8に示した30種の抗血清)

抗アルブミン抗血清, 抗 IgG 抗血清, 抗 IgA 抗血清, 抗 IgG₃ 抗血清, 抗 C9 抗血清は金大癌研分子免疫部, 右田俊介教授より御恵与を受けた。残り25種の抗血清は市販 (ヘキスト) によった。

2. ヤトロン標準血清

3. ペロナール緩衝液 (pH8.6, $\mu=0.05$)； 5.5 ジエチルバルピタール酸ソーダ103.0g, 5.5 ジエチルバルピタール酸18.40gに蒸留水を加えて全量を5000mlとし, このペロナール緩衝液：蒸留水=1：1に混合して作製した。

4. アガロース溶液； アガロース (半井) 2% 溶液をペロナール緩衝液 (pH8.6, $\mu=0.05$) で作製した。

Ⅳ. 各補体成分 C1, C4, C2, C3, C3-9 に及ぼすゼラチンの抗補体作用の検討

1. C1^{hu}, C4^{hu} 分画の作製； 2.5mlのヒト血清に7.5

mlの20%硫酸ソーダ (Na₂SO₄) を加えて室温で20分間攪拌後, 20°C, 6000rpm.遠沈後, 沈殿に2.5mlの蒸留水を加えて C1^{hu} 分画を得た。上清に Na₂SO₄ (上清 1mlにつき50mg) を加え, 室温で20分間攪拌し, 20°C, 6000rpm. 15分間遠沈し沈殿に2.5mlの蒸留水を加え溶解して得られたものが C4^{hu} 分画である。

2. C1^{op} 分画の作製； 2.5mlの GPS に7.5mlの蒸留水を加え, 4°C, 20分間攪拌後 0°C, 30分間, 10000 rpm. で遠沈し, 沈殿を0.3M NaCl 溶液に溶解して得た。

3. 精製 C2^{op}, C3^{op}, C2^{hu}, C3^{hu}； 金大癌研分子免疫部高橋守信助教授に御恵与をいただいた。

4. 抗 C3 家兔血清, 抗 C4 家兔血清, 抗ヒト C3-activator 家兔血清, 同じく高橋守信助教授より御恵与を受けた。

方 法

I. ゼラチンの溶血斑産生細胞検出法に及ぼす影響

1. ゼラチンの PFC 数への影響

Cunningham-Szenberg のブランク法¹⁰⁾¹⁶⁾ に準じて行った。間接ブランク法の場合には, 小試験管内に Hanks II 液で最適濃度に稀釈した抗ラット IgG 家兔血清0.05ml, 2%ゼラチン含有 Hanks II 液に浮遊させたヒツジ赤血球 (125×10⁴/ml) 0.2ml, リンパ節細胞浮遊液0.2ml, 補体0.05mlを加え37°Cで充分混和後, あらかじめ37°Cに加温された chamber 内にピペットで添加してこれを満たし, 両側開放部分をパラフィン・ワセリン等量混合物で封じて後, 37°C, 30~60分間静置後, PFC 数を算定した。直接ブランク法の時には, ゼラチンを含有しない Hanks II 液または2%ゼラチン含有 Hanks II 液浮遊ヒツジ赤血球 (125×10⁴/ml) を0.25ml, リンパ節細胞浮遊液0.2ml, 補体0.05mlを混和後, 同様に PFC 数を算定した。

2. ゼラチン濃度と PFC 数との関係

Hanks II 液にヒツジ赤血球を125×10⁴/mlの濃度に浮遊させ, この中に, ゼラチン濃度がそれぞれ5.0%, 4.0%, 3.0%, 2.0%, 1.5%になるように添加したものを作製し, これらを抗原として間接ブランク法, 直接ブランク法の両法にて PFC 数を測定し, 比較検討した。

3. 補体により飽和処置¹⁰⁾されたゼラチンと PFC 数との関係

4.0%ゼラチン含有 Hanks II 液と GPS とを等量混和し45°C, 40分間反応させ, ついで56°C, 30分間で補体を不活化して後に, 45°Cに戻してヒツジ血球

0.1ml, 5.0%ゼラチン溶液1.0mlを混合し37°C, 60分間振盪後, 0.1M CaCl₂, 0.1M MgCl₂ の両方或は一方を0.1mlずつ加えて CH₅₀/ml を測定した.

ii) Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ 再添加による影響

ヒト血清0.8mlに0.1M EGTA, 5.0%ゼラチン溶液, 0.1M CaCl₂, 0.1M MgCl₂ を表2に従って加え, 37°C, 60分間振盪後, 各々欠如した2価陽イオンを加えて後 CH₅₀/ml を測定した.

Ⅲ. ヒト血清蛋白の定量

ヒト補体溶血力価に及ぼすゼラチンの抑制効果が個体差間で多少異なる(図4)のために, 補体成分も含めて30種のヒト血清蛋白の定量を一元免疫拡散によるBecker法²⁰⁾に準じて行った.

Ⅳ. ゼラチンの各補体成分に及ぼす影響

1. 補体各成分の溶血力価測定

測定しようとする補体各成分に応じた適当な intermediate cells と残りの補体成分を reagents と

して充分量反応させれば, 感作血球は測定しようとする補体成分の量に応じて溶ける. その溶血度から50%溶血に必要な補体各成分の溶血活性が測定される. 補体成分 C1, C4, C2, C3, C3-9 の測定に必要な intermediate cells と reagents とは表3に記した.

1) intermediate cells の作製

i) EAC1^{ap}; gl-GVB⁺⁺ で 1×10^9 /ml に調整した EA に 1×10^{12} s.F.u./ml の C1^{ap} を等量混合し, 0°C, 60分間振盪後 gl-GVB⁺⁺ で3回洗浄して得た. (注) s.F.u.: Mayerらの one hit theory によれば, ある補体成分 Cx が他の補体成分が充分に存在する条件下で作用した時に, Cx が1つも作用しない血球は溶けない. 最終的な段階まで反応して血球膜に障害を引き起こさせて血球を溶血させるために有効に作用した補体成分 Cx の分子のことを有効分子と呼ぶ. Cx と感作血球との反応は, Poisson 分布に従い, 血球1コあたりに m 個の有効分子が作用したとする

Table 2 Effects of Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺ on Inhibition of Immune Hemolysis by Gelatin.

NO	HuS	0.1M EGTA	saline	gelatine	Mg ⁺⁺	Ca ⁺⁺	37°C 60'		
							Mg ⁺⁺	Ca ⁺⁺	saline
A	0.8	0.1	-	0.9	0.1	0.1	-	-	0.1
B	0.8	0.1	0.9	-	0.1	0.1	-	-	0.1
C	0.8	0.1	-	1.0	0.1	-	-	0.1	-
D	0.8	0.1	1.0	-	0.1	-	-	0.1	-
E	0.8	0.1	-	1.0	-	0.1	0.1	-	-
F	0.8	0.1	1.0	-	-	0.1	0.1	-	-
G	0.8	0.1	-	1.0	-	-	0.1	0.1	-
H	0.8	0.1	1.0	-	-	-	0.1	0.1	-
I	0.8	-	0.2	1.0	-	-	-	-	0.1
J	0.8	-	1.2	-	-	-	-	-	0.1

Table 3 Intermediate Cells and Reagents for Titration of Each Component of Complement.

component of complement to be measured	intermediate cells	reagents
C1	C4	C2, C-EDTA
C4	C1	C2, C-EDTA
C2	C14	C-EDTA
C3	C142	C5-9

と、Cx の1コも作用していない血球の割合は e^{-m} となる。溶血度を y とすると、溶けなかった血球の割合は $1-y$ となり、 $1-y=e^{-m}$ が成立する。 $m=-\ln(1-y)$ となり実測値 y より有効分子数 m が求められる。ところで $-\ln(1-y)=1.0$ の補体成分の濃度下では血球1コあたりに平均1コの有効分子が作用しており、この血球には Cx の site が1 site 形成されていると考え、1有効分子を1 s.F.u ともいう。

ii) EAC1⁹⁹C4^{hu}; gl-GVB⁺⁺ で 1×10^9 /ml に調整した EAC1⁹⁹ に 1×10^{11} s.F.u/ml の C4^{hu} を加えて 0°C, 15分間反応後、gl-GVB⁺⁺ で2回洗浄して得た。

iii) EAC1⁹⁹C4^{hu}C2⁹⁹: 1×10^9 /ml の EAC1⁹⁹C4^{hu} に $2 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{12}$ s.F.u/ml の C2⁹⁹ を加えて 37°C, 20分振盪後 gl-GVB⁺⁺ で1回洗浄して得た。

iv) EAC4^{hu}: EAC1⁹⁹C4^{hu}C2⁹⁹ を 0.01M EDTA-GVB に浮遊させて 37°C, 20分間反応後 0.01M EDTA-GVB で2回、gl-GVB⁺⁺ で3回洗浄して得た。

2) 補体各成分の溶血活性の測定法

gl-GVB⁺⁺ で連続希釈された被検体 0.5ml に測定しようとする補体成分にかなった intermediate cell (1×10^8 /ml) 0.5ml と reagents を充分量加えて 37°C で一定時間反応させて後に全量が 7.5ml になる様に 0.01M EDTA-GVB を加えて 2500rpm, 7分間遠沈後上清の酸化ヘモグロビン量を Beckman 分光光度計波長 412m μ で測定し、機械的溶血、reagents 等の影響とを補正した後、完全溶血に対する溶血率 (y) を求め、 $1-y$ の負の自然対数 $-\ln(1-y)$ を求めた。血清の希釈倍数を横軸に、 $-\ln(1-y)$ を縦軸に両対数方眼紙上にプロットして得られた直線が $-\ln(1-y)=0.693$ を切る点の血清希釈倍数の逆数がその被検血清の CH₅₀/ml となる。

i) C1 の測定: 連続希釈された被検血清 0.5ml と EAC4^{hu} (1×10^8 /ml) 0.5ml を加え 37°C, 20分間加温振盪後 C2 ($2 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{12}$ s.F.u/ml) 0.5ml を加えて 37°C, 60分間反応させて後 1/12.5 C-EDTA 1.5ml を加えて 37°C, 60分間反応させ、つぎに 0.01M EDTA-GVB 4.5ml を加えて反応を停止させた後遠沈し、上清の O.D._{412m μ} を測定して CH₅₀/ml を測定した。

ii) C4 の測定: 連続希釈された被検血清 0.5ml に EAC1⁹⁹ (1×10^9 /ml) 0.5ml を加えて以下 C1 の測定と同様の操作を行って CH₅₀/ml を求めた。

iii) C2 の測定: 連続希釈された被検血清 0.5ml と EAC1⁹⁹C4^{hu} (5×10^7 /ml) 1.0ml を加え 37°C, 20分間加温振盪後 C-EDTA (1/12.5) 1.5ml を加え、以

下 C1 の測定と同様の操作で CH₅₀/ml を求めた。

iv) C3-9 の測定 (C-EDTA として測定): 0.01M C-EDTA で連続希釈された被検血清 1.5ml に 0.5ml の EAC1⁹⁹C4^{hu}C2⁹⁹ (1×10^8 /ml) を加え 37°C, 60分間加温振盪後 0.01M EDTA-GVB 5.5ml を加えて後、同様に CH₅₀/ml を測定した。

2. ゼラチンの各補体成分溶血力価に及ぼす影響

ヒト血清と等量の 5%ゼラチン含有生理的食塩水を混合し 37°C, 60分間反応させて後に、各補体成分 C1, C4, C2, C3-9 の溶血力価を前に述べた方法で測定した。

3. 免疫粘着現象を利用した補体成分の力価測定

抗原抗体複合物と補体の結合物が霊長類の赤血球又は非霊長類の血小板に粘着する現象を凝集反応の形に応用したのが immune adherence hemagglutination test (IAHA) である。この方法で測定しようする補体成分は C1, C4, C2, C3, であり、溶血力価の 10~20 倍の値が得られる。indicator cells は GVB⁺⁺ で3回洗浄後 2×10^8 /ml に調整されたヒト O 型赤血球である。IAHA 法での各補体成分の力価測定に必要な intermediate cells は溶血法と同様であり、reagents は溶血法の場合から C5 以下の補体成分を省いた成分である。階段希釈された被検血清 0.8ml に EAC1⁹⁹C4^{hu}C2⁹⁹ (1×10^8 /ml) 0.1ml を混合し、37°C, 20分間振盪後、ヒト O 型赤血球 0.1ml を加えて 37°C, 10分間振盪後 37°C, 1時間静置させて血球が管底に沈むのを待って、管底像より凝集の程度を 4+, 3+, 2+, 1+, 0 と判定し、これを示す血清希釈倍数の逆数をもって力価を表わし、単位は CIA₅₀/ml で示した。

ゼラチンの補体第三成分に及ぼす影響

ヒト血清と 5%ゼラチン含有生理的食塩水を等量混合して 37°C, 60分間振盪後、GVB⁺⁺ で階段希釈を行って後、CIA₅₀/ml を測定した。

4. 精製分離した補体成分 C2, C3 に及ぼすゼラチンの直接作用

あらかじめ精製分離された補体成分 C2⁹⁹, C3⁹⁹, C2^{hu}, C3^{hu} それぞれに等量の 5%ゼラチン含有生理的食塩水を混合し、37°C, 60分間加温振盪後、C2 は gl-GVB⁺⁺ で、C3 は GVB⁺⁺ で連続希釈を行い、C2 は溶血法により、C3 は IAHA 法によりその力価を測定した。

5. ゼラチンの C3-proactivator に及ぼす作用

ヒト血清と等量の 5%ゼラチン含有生理的食塩水を混合し、37°C, 60分間反応させて後、寒天内免疫電気泳動法を用いて、C3, C4, ヒト C3-proactivator の沈降線の変化をそれぞれの特異抗血清により調べ

た。

成 績

I. ゼラチンの溶血斑産生細胞検出法に及ぼす影響

1. ゼラチン濃度による PFC 数の変化

10⁶個あたりの胸腺傍リンパ節細胞中に出現する PFC 数は 0 ~ 6 × 10³個 (Wistar 系雄ラット 200 匹) と個体によりかなりの違いを認めた。

各ゼラチン濃度による PFC 数の変化を調べるために、最終ゼラチン濃度がそれぞれ 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5% になるようゼラチンを添加した。図 1 に示すように、間接法での PFC 数の減少率は、ゼラチン濃度 0.5% で 14.3 ± 7.5% (Mean ± S.D.), 1.0% で 39.0 ± 15.2%, 1.5% で 54.3 ± 11.1%, 2.0% で 63.6 ± 10.5%, 2.5% で 64.8 ± 12.2% となり、ゼラチン濃度の増加に伴って PFC 数は減少し、溶血斑の大きさ、ならびに鮮明度も低下した。直接法の場合にも、1 例ではあるが、図 2 に示したように、ゼラチン濃度の増加に伴い、PFC 数は漸減したが、直接法と間接法との間で、PFC 数の減少傾向やその程度に差異は認められなかった。なおゼラチン非添加時の PFC 数は直接法

では 1.0 × 10³/10⁶ cells, 間接法では 3.1 × 10³/10⁶ cells であった。

2. 補体により飽和されたゼラチンの PFC 数に及ぼす影響

ゼラチンがモルモットの補体成分を吸着することによって、PFC 数の減少が起こるのではないかと考え、あらかじめモルモット血清によって飽和処置を行ったゼラチン溶液を用いて、PFC 数を求めたが、その飽和の処置前後での PFC 数には差異を認めなかった。

II. 免疫溶血反応によるゼラチンの抗補体作用の検討

1. ゼラチンのモルモット血清及びヒト血清に及ぼす効果

モルモット血清の CH₅₀/ml に対するゼラチンによる減少率は、図 3 で示すように、最終ゼラチン濃度 0.5% では 0% であったが、1.25% では 2.9 ± 1.6% (Mean ± S.D.), 2.5% では 6.4 ± 1.5%, 5.0% では 12.4 ± 2.6% であった。一方、ヒト血清での CH₅₀/ml の減少率は、最終ゼラチン濃度 0.5% では 0% であったが、1.25%, 2.5%, 5.0% でそれぞれ 17.6 ± 5.2% (Mean ± S.D.), 25.8 ± 5.6%, 36.6 ± 6.9% となり、その減

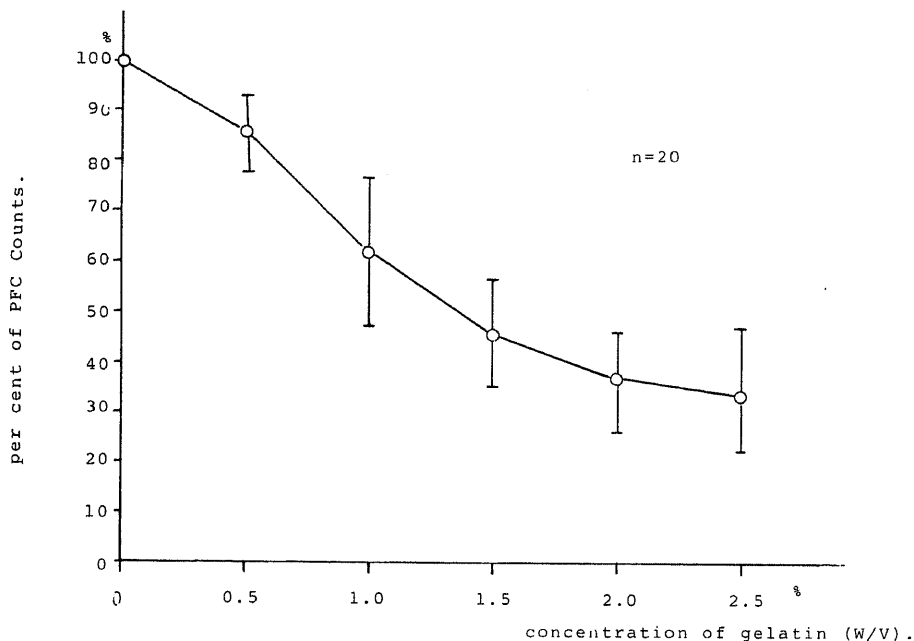


Fig. 1 Inhibiting Effect of Gelation on PFC Counts in the Cunningham's Indirect Method.

Each point represents mean value with standard deviation for 20 rats.

少の程度はモルモット血清に比較して著明に大きく、ゼラチンの抗補体作用が動物種間によって異なることが明らかとなった。このことは動物種間での補体の性質及び作用機転の違いを示唆しているものと考えた。更に個々のヒト血清における CH_{50}/ml の低下のバラツキと血清蛋白の動きを比較するために、個々の低下曲線を図4に示した。健康ヒト血清6例のいずれの場合にも、ゼラチン濃度の増加に伴い CH_{50}/ml は漸減し、最終ゼラチン濃度5.0%での低下率は23.0~44.0%であった。なお図4でプロットした点は二重測定間での中間値を示したものであり、二重測定間での低下率の差は10%以内であった。

2. ゼラチンのヒト血漿に及ぼす効果

一般に正常人では血漿と血清との補体価の間に、有意の差は認めないといわれる²¹⁾。ゼラチンの抗補体作用を血漿についてみると、図5に示すように、血清の場合と差異は認められず、このことからゼラチンの抗補体作用に対して、抗凝固剤の影響はないものとみなされた。

3. 低濃度ゼラチン溶液の抗補体作用

前項の実験中、図3に示したように、0.5%ゼラチン濃度では、抗補体作用は認められなかったが、これを確認するために、通常補体力価測定に使用される緩

衝液のゼラチン濃度(0.1%)で、補体価の抑制がもたらされるかどうかを検討した。対照として、最終ゼラチン濃度0%での CH_{50}/ml はヒト血清では28.5、ヒト血漿では28.0であったが、この値を100とした時、最終ゼラチン濃度0.125%、0.25%、0.5%、1.25%でのヒト血清の CH_{50}/ml は各々100、100、103、85であり、ヒト血漿の CH_{50}/ml はそれぞれ100、100、102、85.2であり、0.5%以下の最終ゼラチン濃度では、補体価の低下を来たさないことが確認された(図6)。従って、補体力価測定に使用される緩衝液中のゼラチンの0.1%濃度は、補体価に影響を与えないことが明らかにされた。

4. 粉末状態のゼラチン及びコラーゲンの補体溶液活性に及ぼす影響

図7に示す如く、固体か液体かのゼラチンの状態によっても CH_{50}/ml の値に差が認められた。粉末状態のままゼラチンを直接加えたものでは、大部分のゼラチンが膨潤した状態で管底に残っており、115°C、15分間でゾル状態にしたゼラチンに比べて CH_{50}/ml の減少は大きくなかった。ゼラチンの前駆物質であるコラーゲンを生の状態で直接加えた時も、コラーゲンは管底に線維状態で残っていたが、このコラーゲン浮遊液でもその濃度に比例して補体価は低下を示したが、

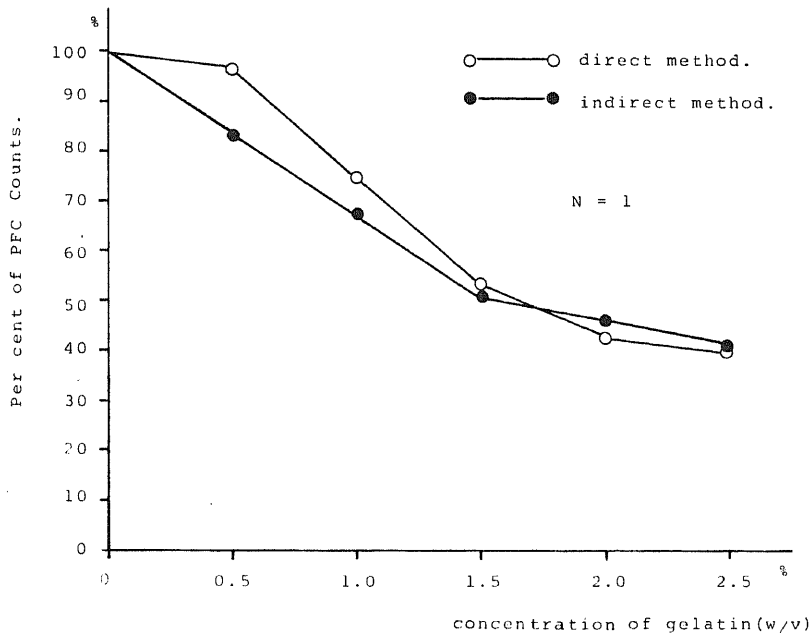


Fig. 2 Inhibiting Effect of Gelatin on PFC Counts.

Each point represents per cent of PFC counts.

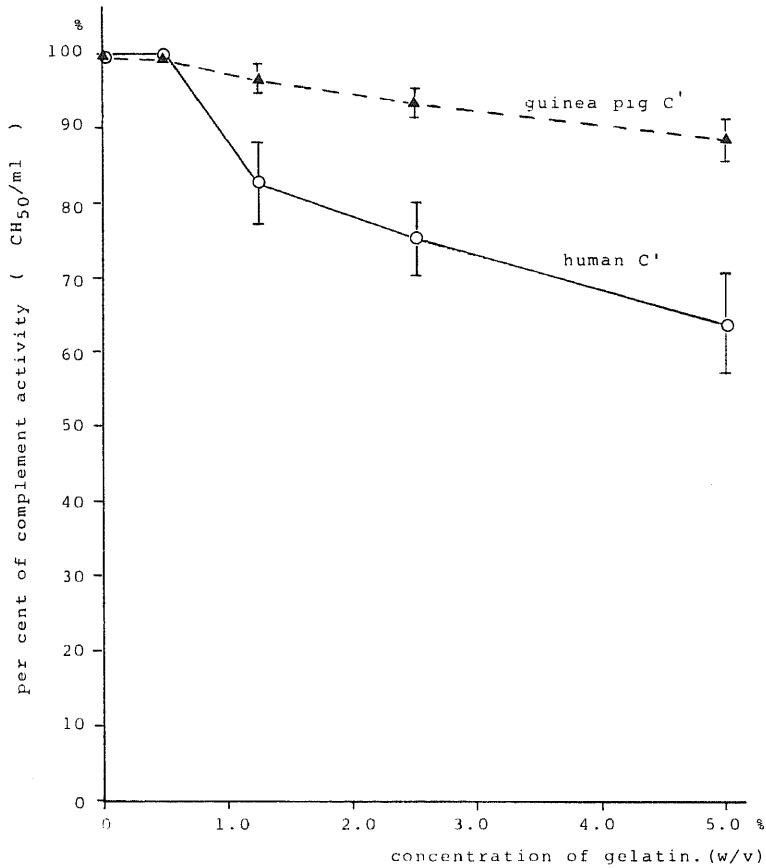


Fig. 3 Inhibiting Effect of Gelatin on Hemolytic Activity of Complements.

Each point represents mean value with standard deviation for 6 individual sera in human and for 4 pooled sera in guinea pig, except for that in 0.5% gelatin for 2 sera, respectively.

その低下の程度は、粉末状態のゼラチンによる補体価の低下の程度より更に少なかった。

5. 透析ゼラチンの補体溶血活性に及ぼす影響

ゼラチンの抗補体作用がゼラチン標品に混在する低分子物質による可能性を考え、溶解ゼラチンの透析処置前後での補体価に及ぼす変化を、ヒト血清の CH_{50}/ml の値で検討した。図8に示すように、透析後のゼラチンを作用させた時の補体価は17.6であり、透析前の場合の補体価15.6と比べ僅かに高かったが、ゼラチンを作用させない時の補体価38.0に比べると、透析前後での変化は僅差であり、ゼラチンによる補体溶血活性の低下がゼラチン標品に混在する低分子物質によるものではないことが判明した。

6. ゼラチンの抗補体作用に及ぼす温度の影響

ゼラチンを含まないヒト血清の37°C、3時間のフ置は、図9に示すように、補体価に対し何らの影響も与えなかったが、5.0%ゼラチン添加血清では、温度の影響が明かに認められた。即ち18°Cでは補体価の経時的な変化は僅かであるのに対し、37°Cでは30分で29、60分で25、180分で23と著明に低下し、ゼラチンの抗補体作用が温度に依存することが明らかとなった。

7. ゼラチンの抗補体作用に及ぼすキレート剤 (EDTA, EGTA) の影響

2価陽イオンのキレート剤であるEDTAは Mg^{++} 、 Ca^{++} のキレート剤、EGTAは主として Ca^{++} のキ

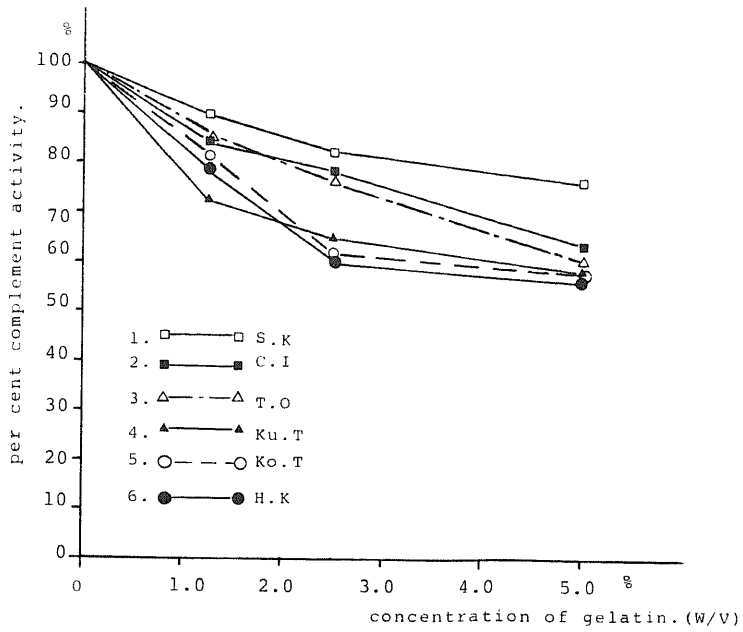


Fig. 4 Anticomplementary Effects of Gelatin upon Individual Subjects.
Symbols represent individual sera.

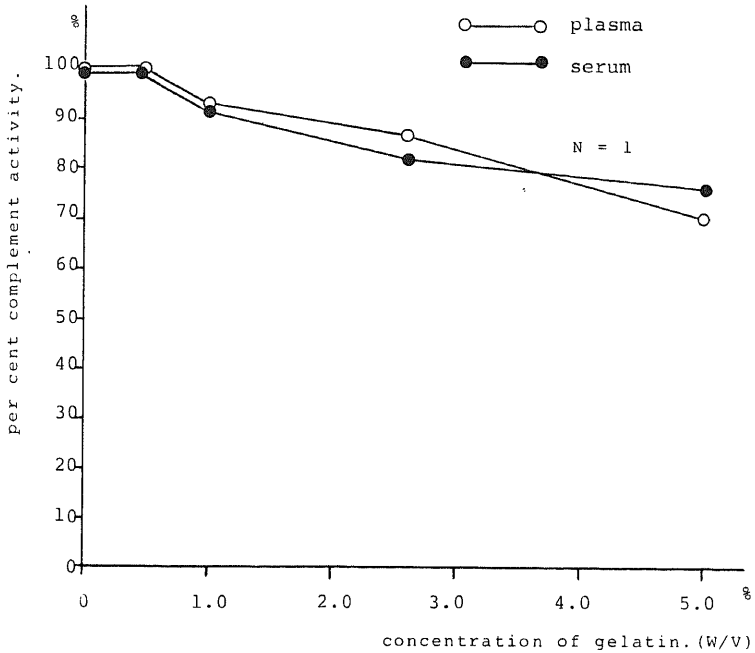


Fig. 5 Effect of Anticoagulants upon the Anticomplementary Activity of Gelatin.

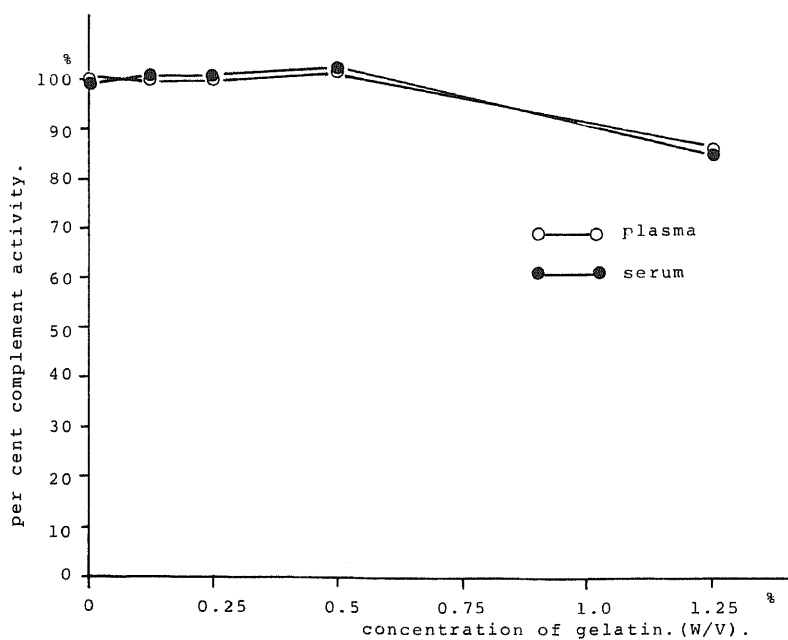


Fig. 6 Inhibiting Effect of Lower Gelatin Concentration on the Hemolytic Activity.

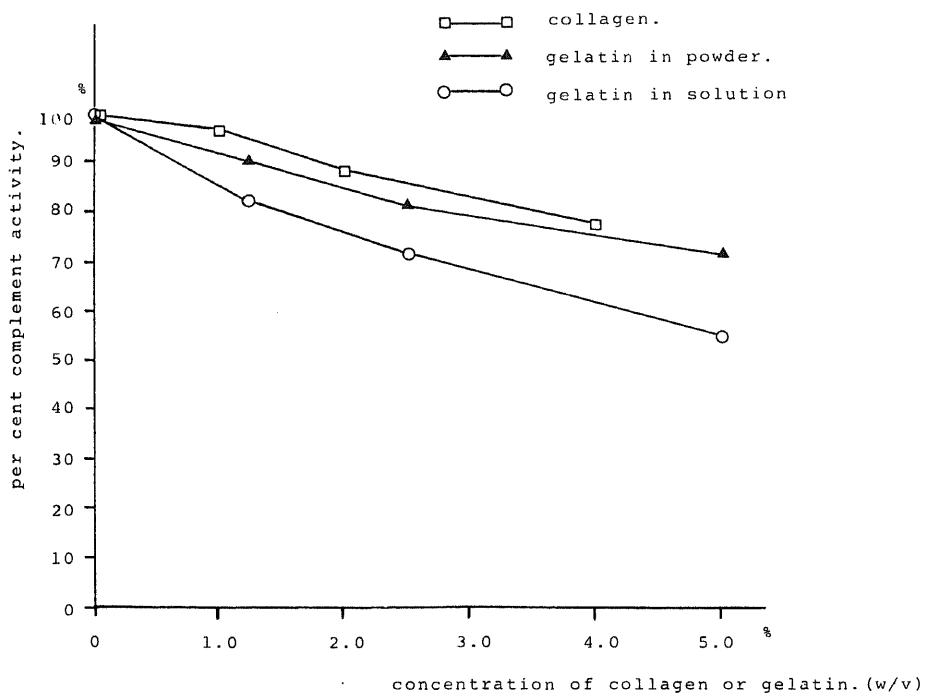


Fig. 7 Inhibitory Actions of Gelatin and Collagen on the Hemolytic Activity.

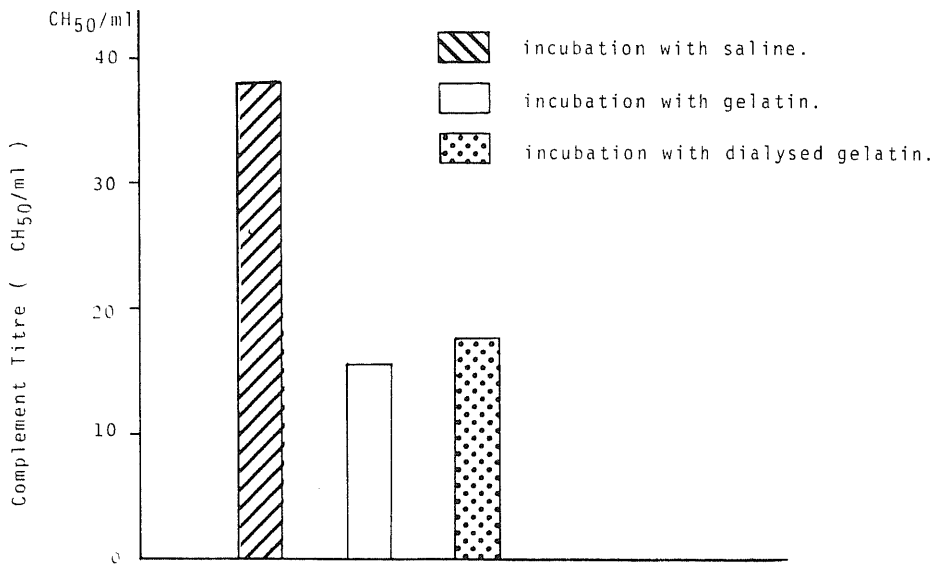


Fig. 8 Effect of Dialysis of Gelatin Solution on Anticomplementary Action.

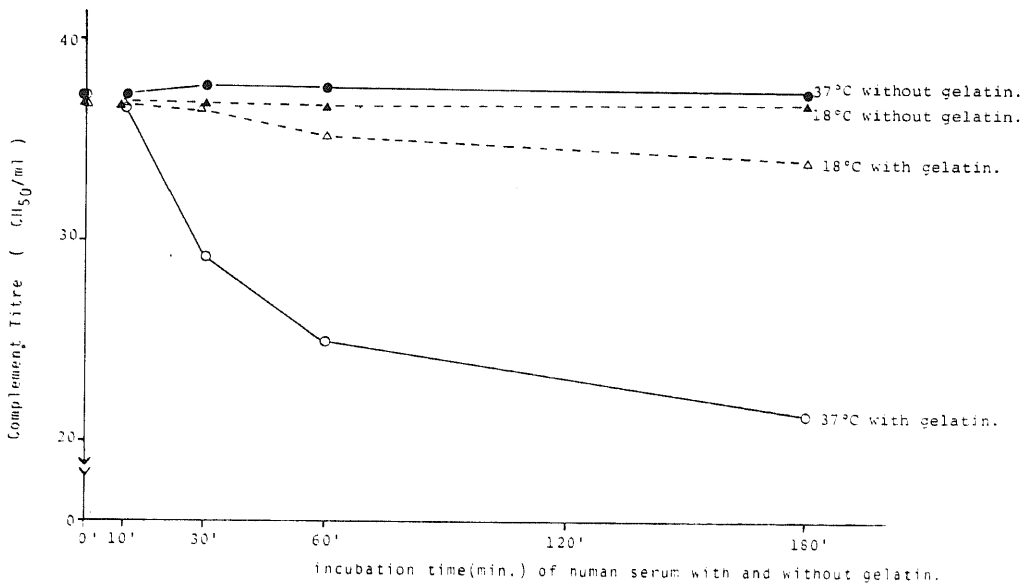


Fig. 9 Effect of Length of Incubation Period at 37°C and 18°C on Gelatin-Induced Inhibition of Human Complement.

レート剤である。図10は5%ゼラチン添加ヒト血清にキレート剤を加えて1時間反応させて後に、 Mg^{++} 、 Ca^{++} の両方又は Ca^{++} のみを加えて直ちに CH_{50}/ml を測定してキレート剤による違いを検討した成績であり、これによると、EDTA、EGTAの何れもゼラチンの抗補体作用を抑制し、2価陽イオンを欠くとゼラチンの抗補体作用が発現されないこと、さらにキレート剤による違いのないことが明らかとなった。図11はEGTAと同時に Mg^{++} 、 Ca^{++} のいずれか一方、或は両方を加えた後に1時間反応させて CH_{50}/ml を測定した成績であり、EGTAを加えてもなおかつ対照と同程度に溶血活性の低下を認めたものは、図中の

チンの抗補体作用が発現されないこと、さらにキレート剤による違いのないことが明らかとなった。図11はEGTAと同時に Mg^{++} 、 Ca^{++} のいずれか一方、或は両方を加えた後に1時間反応させて CH_{50}/ml を測定した成績であり、EGTAを加えてもなおかつ対照と同程度に溶血活性の低下を認めたものは、図中の

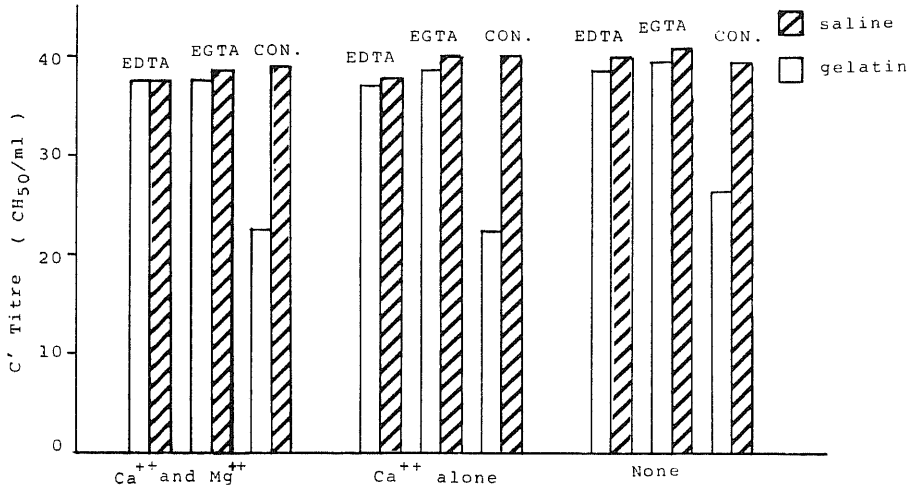


Fig. 10 Influences of EDTA and EGTA on Anticomplementary Action of Gelatin.

The serum and gelatin with and without EDTA or EGTA were incubated for 1 hour at 37°C, and then added with Ca^{++} and/or Mg^{++} , and tested for hemolytic activity.

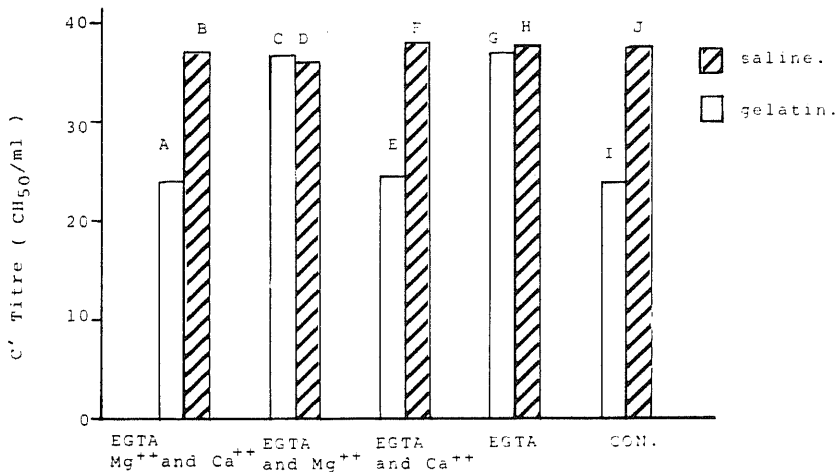


Fig. 11 Effects of Ca^{++} and Mg^{++} on Anticomplementary Action of Gelatin.

The serum, gelatin and EGTA with and without Ca^{++} and/or Mg^{++} were incubated for 1 hour at 37°C, and then tested for hemolytic activity.

A, Eの場合で、いずれも Ca^{++} を補足した場合で、ゼラチンの抗補体作用の発現には、少くとも Ca^{++} が関与することを示している。

8. ゼラチンの各補体成分C1, C4, C2, C3, C3-9に及ぼす影響

ヒト血清と等量の5%ゼラチン含有生理的食塩水を混合し、37°C、60分間振盪後、連続希釈を行い、これらに各補体成分測定に必要な intermediate cells (表3) を加えて、C1, C4, C2, 測定の場合には37°C、20分間、C3-9測定の場合には37°C、1時間反応させ、更に必要とする reagents (表3) を加えて、C1, C4, の場合には37°C、20分間反応後、残りの reagents を加えて37°C、1時間反応させ C2, C3-9 の場合には37°C、1時間反応させて後、0.01M EDTA-GVB で全量を7.5mlとし、上清の酸化ヘモグロビン量を O.D._{412 mμ} で測定し、実測値 O.D. をそのままプロットしたのが図12~15である。それによると、各補体成分C1, C4, C2, C3-9 のいずれの場合にも、5%ゼラチンと反応させたヒト血清では対照に比べて溶血活性が抑制される傾向を示した。図12~15で示された O.D. より、機械的溶血、reagents 等の影響を補正して後、完全溶血に対する溶血率を求め、方法Ⅳの2) で前述したように、負の自然対数 $-1n(1-y)$ を縦軸に、血清の稀釈倍数を横軸に両対数方眼紙上にプロットし、その

結果得られた直線が0.693を切る点の血清稀釈倍数をもって各被検血清の CH_{50}/ml を得た。各成分への5%ゼラチン溶液の影響を CH_{50}/ml で比較すると、ゼラチンと反応させたヒト血清では、対照に比して C1 の CH_{50}/ml は59.6% (N=1), C4 では58.2% (N=1), C2 では53.4±5.5% (Mean±S.D) (N=7), C3-9 では56.2±3.0% (N=3) であった。他方免疫凝集法で測定した C3 活性の抑制度は表4に示すように60.0±8.0%で、これを要するに測定した C1, C4, C2, C3, C3-9のいずれでも、ゼラチン添加によりその溶血活性に低下を認めた。

9. 分離精製した補体成分C2, C3, に対するゼラチンの直接作用

あらかじめ分離精製された補体成分C2^{pp}, C3^{pp}, C2^{hu}, C3^{hu} に等量の5%ゼラチン溶液を37°C、60分間反応させて後に、C2 の場合には EAC1^{pp}C4^{hu}, C3 の場合には EAC1^{pp}C4^{hu}C2^{pp} の intermediate cells を用いて、それぞれの溶血力価を測定した。図16は C2 に対するゼラチンの影響をみたもので、ヒトの場合は図上段に示すようにゼラチン添加群で活性の低下(対照の55.7%)が認められたのに、モルモットでは図下段に示すように活性の低下はあまり認められなかった。表5は C3 の結果であるが、ここでも精製 C3^{pp} の低下度は対照の40%であったのに、C3^{pp} 活性の低下はほ

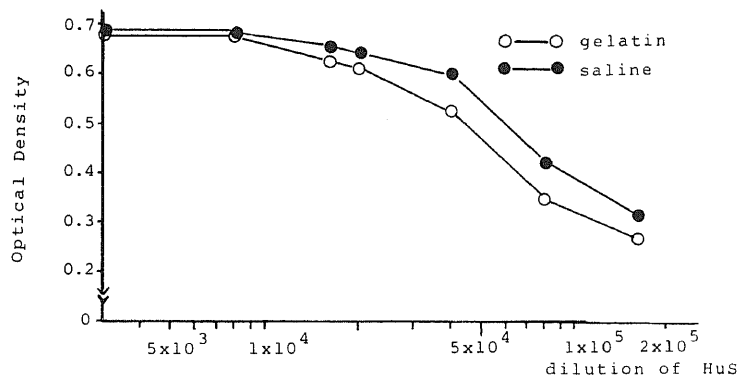


Fig. 12 Effect of Gelatin on HuC1 activity.

HuS was preincubated with equal volume of 5% gelatin solution for 60 minutes at 37°C. To varied dilutions of such-treated serum was added $1 \times 10^5/ml$ EAC4(0.5 ml), incubated for 20 minutes at 37°C, and then added with 1.5 ml GPC-EDTA and incubated for 60 minutes at 37°C. Cold EDTA-GVB as a stopper was added to each tube, and hemolytic activity of the supernatant was determined spectrophotometrically.

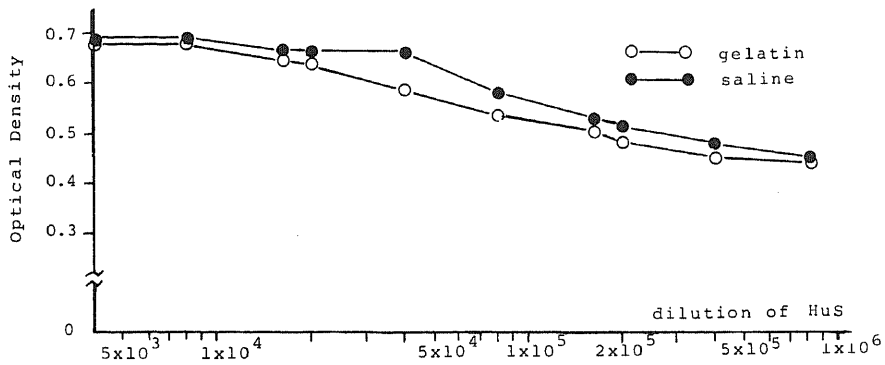


Fig. 13 Effect of Gelatin on HuC4 Activity.

HuS was preincubated with equal volume of 5% gelatin solution for 60 minutes at 37°C. To varied dilutions of such-treated serum was added 1×10^8 /ml EAC1(0.5 ml), incubated for 20 minutes at 37°C, and then added with C2(0.5 ml) in excess and incubated for 20 minutes at 37°C, and GPC-EDTA(1.5 ml) was added and incubated for 60 minutes at 37°C. Cold EDTA-GVB as a stopper was added to each tube, and then hemolytic activity of the supernatant was determined spectrophotometrically.

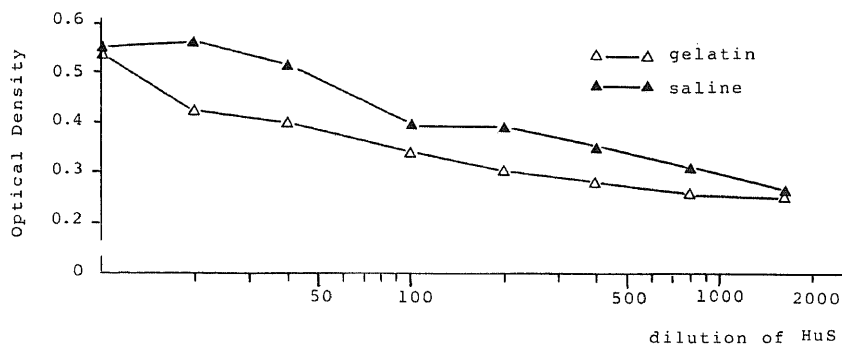


Fig. 14 Effect of Gelatin on HuC2 Activity.

HuS was incubated with equal volume of 5% gelatin solution for 60 minutes at 37°C. To varied dilutions of such-treated serum was added 1×10^8 /ml EAC14(0.5 ml), incubated for 20 minutes at 37°C, and then added with 1.5 ml GPC-EDTA to each tube and incubated for 60 minutes at 37°C. Cold EDTA-GVB as a stopper was added to each tube and hemolytic activity of the supernatant was determined spectrophotometrically.

とんど認められなかった。因みに、ヒト全血清にゼラチンを作用させたあとの C2, C3 成分の活性は対照に比してそれぞれ 47.2%, 70.0% であった。即ち C2, C3 成分に関して、動物種間で違いのあること、単離精製された C3^{hu} にゼラチンを作用させた時の活性の低下の程度と、ヒト血清にゼラチンを作用させた時の C₃ の活性の低下の程度に僅かではあるが差のあることが認められた。

10. ゼラチンのヒト C3-proactivator に及ぼす影響

寒天内免疫電気泳動法により C3^{hu}, C4^{hu}, ヒト C3-proactivator に及ぼすゼラチンの影響を検討した成績は図17に示されている。C3 (β_{1c} -globulin) は不活化されると β_{1A} -globulin へとその易動度²²⁾ を変えることが知られているが、ゼラチン処理ヒト血清では、C3 は β_{1A} - 及び β_{1c} -globulin の位置に連続し

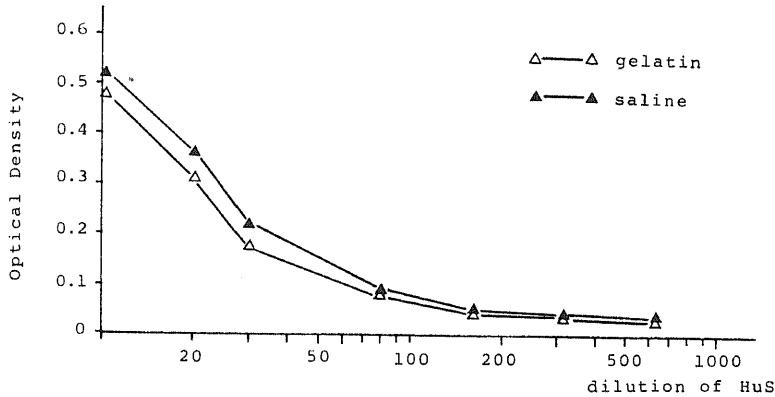


Fig. 15 Effect of Gelatin on HuC3 Activity (as HuC-EDTA).

HuS was preincubated with equal volume of 5% gelatin solution for 60 minutes at 37°C. To varied dilutions of such-treated HuS added 1×10^8 /ml EAC142 (0.5 ml), incubated for 60 minutes at 37°C, and then added with cold EDTA-GVB as a stopper. Hemolytic activity of the supernatant was determined spectrophotometrically.

Table 4 Effect of Gelatin on HuC3 Activity as measured by Complement Immunoaderence.

dilution	1/960	1/2400	1/3200	1/3800	1/4800	1/6400	1/9600	1/19200
HuS with gelatin	—	3	2	2	1	0	0	0
HuS with saline	—	4	4	3	2	0	0	0
HuS with gelatin	4	4	—	—	2	0	0	0
HuS with saline	4	4	—	—	4	3	2	0

HuS was preincubated with 2.5% gelatin solution at 37°C for 1 hour, to 0.8ml of varied dilutions of such-treated HuS, 0.1ml EAC142 (1×10^8 /ml) was added and incubated for 20 minutes at 37°C. To these mixtures, 0.1ml HuS (2×10^8 /ml) was added, shaken at 37°C for 10 minutes. After making them to stand at 37°C for 1 hour, the degree of hemagglutination was read from the pattern of agglutination of each tube.

た沈降線に変化した。又 C3-proactivator (glycine-rich- β -glycoprotein, GBG, β_2 -glycoprotein II) の場合にもゼラチン処理により C3-proactivator より C3-activator への転換による連続した沈降線を確認した。先の実験で、ゼラチンには C1, C2, C3 と複数の補体成分を抑制する作用があることが明らかにされたが、本実験で C3-proactivator にも作用することが判明した。C4 の易動度にも変化が認められているが C1 不活化に引きつづいてもたらされた変化とも

考えられ、C4 に対するゼラチンの直接作用とは言いきれない。C3 の易動度の変化についても、同じく3つの可能性が考えられる。1つには、ゼラチンが C3 に直接作用してこれを不活化する場合であり、2つには classical pathway を経て C3 を不活化する場合であり、最後に alternate pathway を介して C3 を不活化する場合である。

以上よりゼラチンは、少なくとも C1, C2, C3, C3-proactivator 更には恐らく C4, C3-9 にも直接作用し

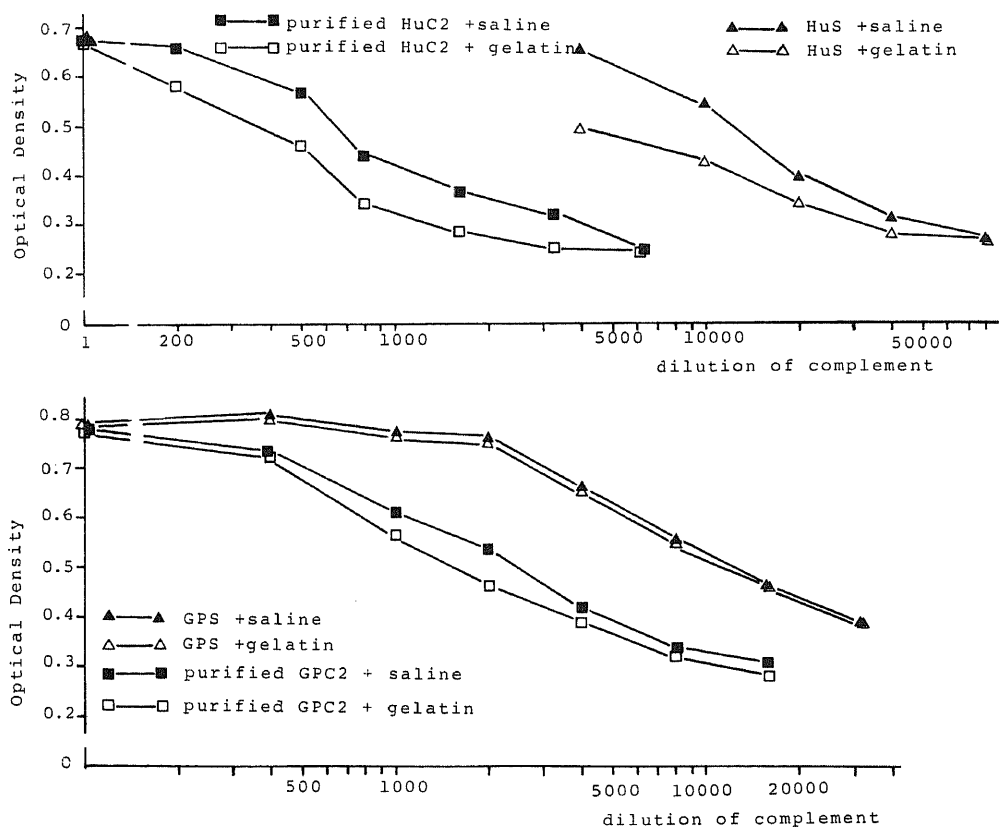


Fig. 16 Direct Effect of Gelatin on Purified C2 Activity.

After the mixtures of 2.5% gelatin solution and either GPS, purified GPC2, HuS, or purified HuC2 had been preincubated at 37°C for 1 hour, to varied dilutions of such-treated mixtures, 0.5 ml EAC14 (1×10^8 /ml) was added and incubated at 37°C for 20 minutes. Then to these mixtures, 1.5 ml of C-EDTA was added and incubated at 37°C for 1 hour. Cold EDTA-GVB was added to each tube as a stopper. The supernatant of each tube obtained by centrifugation was read spectrophotometrically for hemolytic activity.

て、これらを不活化することが明らかにされた。

Ⅲ. 各ヒト血清蛋白の定量

各血清蛋白量の数値(%)はヤトロン標準血清の値を100として表6に示した。血清のナンバーは図4のナンバーと一致させてある。測定した各補体成分 C1-inhibitor, C3, C4, C5, C9, C3-proactivator の値と図4で示されたゼラチンによる CH_{50}/ml の低下の程度との間には、はっきりとした関連性は認められなかったが、図4で補体価の低下率の少ないNo. 1の血清では、C3, C3-proactivator が他の人に比べて、比較的高値を示した。

考 察

免疫された動物体内で、抗体産生に關与する細胞を定量的に表わそうとする試みは、免疫現象の解明に重要なことであり、Jerne ら¹⁵⁾の寒天を用いた antibody-plaque 法はこの糸口となった。寒天のかわりに agarose^{23,24)} や carboxymethylcellulose²⁵⁾ が用いられた報告も見られる。続いて、寒天を除いた Cunningham の単層法¹⁶⁾ が開発され、寒天の抗補体作用がなく、より鋭敏な方法として適用され、顕微鏡、蛍光抗体法の併用等により単一レベルでの抗体産生細胞の形態学的研究も可能となった。

著者らは Cunningham-Szenberg 法¹⁴⁾¹⁶⁾¹⁷⁾ に準じ

て PFC の形態学的観察を行うことを目的として、液層の固定の為に使用したゼラチンが PFC 数の減少や溶血斑の大きさの減少、ならびにその鮮明度の低下をもたらすことを見つけた。Milgrom ら¹⁸⁾ は 2% 寒天溶液と等量の 1/2 モルモット血清稀釈液を 45°C, 40 分間反応させることによって寒天の抗補体作用を除去しており、著者らもこの寒天飽和の操作に従って、あらかじめ飽和処置を行ったゼラチンで PFC 数を検討したが、I の 3 にのべたように、未処置のそれと差異がなく、著者らはゼラチンの抗補体作用は寒天のそれとは異なる機序にもとづくものと推定した。

ところで今日、血清補体価の定量は Mayer ら¹⁹⁾ によって確立され、秀れた再現性を有する 50% 溶血法で行われている。50% 溶血法で使用される緩衝液は 0.1% 濃度のゼラチンを含有する。当初 Mayer らが 1946 年に補体の測定に用いた緩衝液は生理的食塩水²⁶⁾ であり、続いて 1948 年より veronal bicarbonate buffer²⁷⁾ となった。免疫溶血反応には Mg^{++} , Ca^{++} の両イオンが必須であると同時に各々のイオンには至適濃度がある²⁸⁾ ことが明らかにされ、その至適濃度下での緩衝液の pH の安定性を保つために、重炭酸ナトリウムが除去され 0.00015M CaCl_2 , 0.0005M MgCl_2 を含むペロナール緩衝液 (VB) が一般的となった。その一方で、赤血球の自然溶血を防ぐ目的で 1948 年よ

Table 5 Direct Effect of Gelatin on Purified C3 Activity as measured by Complement Immuno adherence.

dilution	1/24	1/48	1/96	1/240	1/480	1/960	1/2400	1/4800	1/9600	1/24000	1/48000	1/96000	CIA50/ml
GPS with gelatin	4	4	4	4	4	4	3	3	3	1	0	0	16800
GPS without gelatin	4	4	4	4	4	4	4	4	2	1	0	0	9600
purified GPC3 with gelatin	3	3	3	3	4	2	1	0	0	0	0	0	960
purified GPC3 without gelatin	3	3	3	3	3	2	1	0	0	0	0	0	960
HuS with gelatin	3	3	3	4	3	3	3	2	3	1	0	0	16800
HuS without gelatin	3	4	4	4	4	3	4	4	2	2	0	0	24000
purified HuC3 with gelatin	2	2	2	2	2	2	1	0	0	0	0	0	960
purified HuC3 without gelatin	4	2	2	3	3	2	2	1	0	0	0	0	2400

After the mixtures of 2.5% gelatin solution and either purified HuC3, HuS, purified GPC3, or GPS had been preincubated at 37°C for 1 hour, to 0.8ml of varied dilutions of such-treated mixtures, 0.1ml of intermediate cell suspension (1×10^8 EAC142/ml) was added and incubated at 37°C for 20 minutes. Then, to these mixtures, 0.1ml of 2×10^8 HuE/ml was added, shaken in incubator of 37°C for 10 minutes and made to stand for 1 hour. Thereafter the degree of hemagglutination was read.

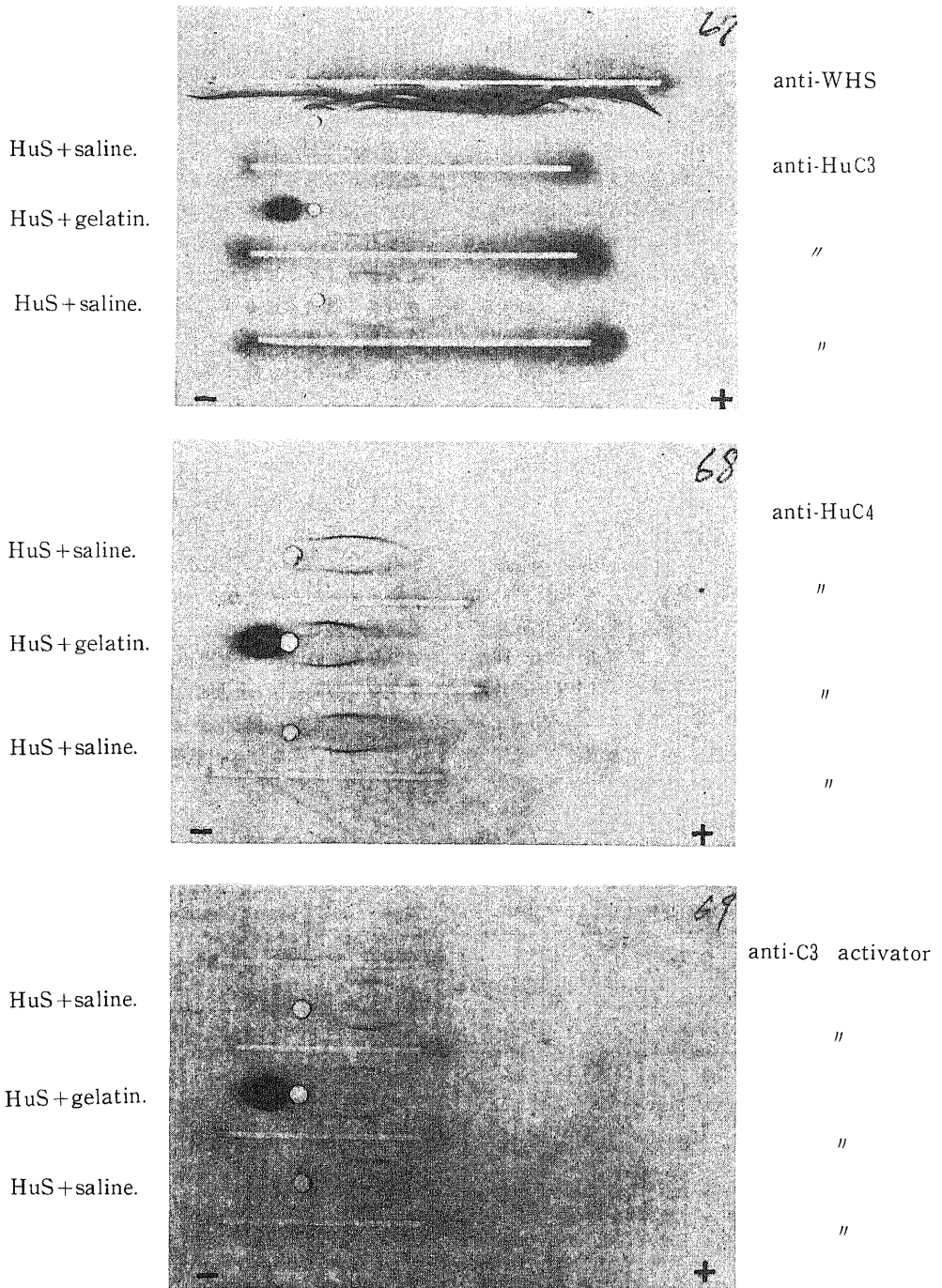


Fig. 17 Conversions of C3, C4 and C3-proactivator by Gelatin on Immunoelectrophoresis.

HuS and 2.5% gelatin solution were incubated at 37°C for 1 hour. Immunoelectrophoresis on the such-treated serum was performed in 1% agarose using veronal buffer. (pH=8.6, $\mu=0.05$)

Table 6 Human Serum Proteins in Individual Sera tested

human serum proteins	Con.	1	2	3	4	5	6
prealbumin	100	100	76	104	100	80	90
albumin	100	100	132	95	115	85	90
α_1 -antitrypsin	100	108	96	74	81	77	100
α_1 -acidglycoprotein	100	61	61	—	104	87	95
α_1 B-glycoprotein	100	85	95	100	105	94	94
α_1 -antichymotrypsin	100	95	58	80	100	86	95
inter- α -trypsin inhibitor	100	94	79	100	89	84	79
zn-binding α_2 -glycoprotein	100	78	78	94	88	88	57
α_2 -HS-glycoprotein	100	113	100	124	100	100	124
haptoglobin	100	121	26	53	81	95	90
ceruloplasmin	100	95	70	100	105	105	109
α_2 -macroglobulin	100	100	108	100	133	108	88
α_2 -antithrombin III	100	65	107	100	100	107	90
C1-esterase inhibitor	100	68	83	93	119	94	74
C9	100	100	70	84	70	100	100
C5 (β_{1F} -globulin)	100	100	124	100	100	100	124
haemopexin	100	100	111	112	88	96	108
β_2 -glycoprotein III	100	111	75	100	100	101	100
plasminogen	100	106	82	100	100	106	77
transferrin	100	104	62	124	129	95	109
β -lipoprotein	100	—	137	147	147	114	92
C3 (β_{1C} -globulin)	100	141	136	109	114	136	100
C4 (β_{1E} -globulin)	100	74	52	100	94	79	73
C3-proactivator	100	100	81	100	71	90	90
β_2 -glycoprotein I	100	100	88	127	100	125	113
IgM-globulin	100	100	133	118	423	100	83
IgG-globulin	100	126	53	89	100	76	100
IgG ₃ -globulin	100	121	100	100	80	—	100
IgA-globulin	100	95	95	135	100	95	169
IgD-globulin	100	100	100	100	100	100	93

(unit : %)

り既に0.1%結晶牛血清アルブミンや0.1%ゼラチンが使用されていた²⁷⁾。しかしヒト血清がアルブミンと反応する抗体を含み補体価の正しい定量が行い得ない²⁹⁾という点、25~30%高濃度のBSAが赤血球膜両側の浸透圧を変化させ安定させる³⁰⁾ことによって免疫溶血反応の最終段階を阻害する³¹⁾ということ、ゼラチンは安価であり stabilizing agent としてきわめて優れているという点などで、0.1%ゼラチンを含むVBが緩衝液として使用されるようになったのは1960年代に

なってからである。ゼラチンは蛋白質誘導物の一種であり、動物の真皮中にあるコラーゲンや骨に存在するオsein ossein から得られる。コラーゲンからゼラチンを取り出すには、真皮中より、アルカリの状態ではアルカリ可溶性蛋白ゼラチン等を除く。この際に脂肪類も石灰石鹼となり除去される。水洗後塩酸で中和し、再び水洗によって中和された酸を除き、続いて65°Cの温湯でコラーゲンを抽出し濃縮冷却後ゲル化し、ついで乾燥して得られるのがゼラチンである。その平

均分子量は15000~250000であり、アミノ酸組成はオキシプロリン、オキシリジンを含みシスチン、システインを含まないのを特徴とする。ゼラチンが抗補体作用を有するという報告は著者らの知る限りでは見あたらない。Mayer法の緩衝液のゼラチン濃度0.1%では図6のように抗補体性が見られず、1%以上にそれが見られて濃度依存性が認められたので、ここにその作用を明らかにしようとした。

ところで、補体系抑制物質の作用機序に関する研究は、従来、複雑な一連の補体反応系の解析の一つの糸口であった。例えば、DFPの補体抑制の機序の研究³²⁾により、補体第一成分にエステラーゼ活性のあることが明らかとされ、EDTAによる補体抑制機序の研究³³⁾により免疫溶血反応系には、 Mg^{++} 、 Ca^{++} の両イオンの存在が必要であることが判明し、cobra venom³⁴⁾、zymosan³⁵⁾等の抗補体作用の研究によって、C3を活性化するnew pathway即ちalternate pathwayの存在が明らかにされたように、抗補体作用物質の検討は、補体研究の一役をになっていた。その結果、多くの抗補体作用物質が知られるようになった。その作用は、補体のある成分を直接不活化するか、或は補体成分の結合を阻止することにより発現される。

代表的な抗補体作用物質の抑制部位について述べると、C1の不活化物質としては、凝集IgG、IgM³⁶⁾、cellulose-sulfate³⁷⁾、chloroquine³⁸⁾、carrageenan (CRG)³⁹⁾、aminocaproic acid⁴⁰⁾、 Ca^{++} のキレート剤(EDTA、EGTA)³¹⁾、クエン酸、ピロリン酸、polyinosinic acid⁴¹⁾が知られている。C1 esterase活性の阻害物質としては、phosphonate ester⁴²⁾、DFP³⁾⁴³⁾、N-acetyl-L-tyrosine ethyl ester (ATEE)⁴³⁾⁴⁴⁾、N-tosyl-L-arginine methyl ester (TAME)⁴⁵⁾⁴⁶⁾やある種のアミノ酸⁴⁶⁾、benzamidines誘導體⁴⁷⁾⁴⁸⁾、p-nitrophenylureido phenoxypropoxy benzamidine (NPUPPB)⁴⁹⁾、pentosan-polysulfoester⁵⁰⁾、heparin⁵¹⁾などがある。

C4不活化物質にはヒドラジン等の1級アミン⁵²⁾、アンモニア⁵³⁾、polyinosinic acid⁴¹⁾、mercaptoethanol⁵⁴⁾、chloroform⁵⁵⁾、polyvinylalcohol sulfate (PVS)⁵⁶⁾などがあり、C2の不活化物質としてはCu-chlorophyllin¹¹⁾、polyvinylalcohol sulfate (PVS)⁵⁶⁾、p-hydroxymercuribenzoate⁵⁷⁾、iodoacetate⁵⁸⁾などがある。

C1-esterase活性を阻害する物質はC4と同様にC2の結合も阻害する。 Mg^{++} のキレート剤もC2を不活化する。C3の抑制物質には、ヒドラジン⁵²⁾、アン

モニア⁵³⁾、mercaptoethanol⁵⁴⁾、lipopolysaccharides (LPS)⁵⁹⁾、cobra venom³⁴⁾、zymosan³⁵⁾、inulin⁶⁰⁾、dextran sulfate⁶¹⁾などがある。

C3の結合を阻止するものには、salicyldomine (SALDOX)⁶²⁾、phlorizinをはじめとするglucosid inulin⁶³⁾、0.09M EDTA⁶⁴⁾、N-acetyl-L-tyrosine ethyl ester (ATEE)⁴¹⁾などがある。ATEEはC5も抑制する⁶⁵⁾。

C5、C6成分の阻害物質としてはCu-chlorophyllin¹¹⁾、p-nitrophenylureido phenoxypropoxy benzamidine (NPUPPB)⁴⁹⁾などがある。Cu-chlorophyllin¹¹⁾はC7も抑制する。

EAC1-9の溶血を阻害するものに0.09M EDTA⁶⁴⁾、25% BSA³⁰⁾がある。corticosteroid⁶⁶⁾、prednisolone⁶⁷⁾にも抗補体作用が報告され、その作用は補体に直接作用するのではなく、赤血球膜への作用によって発現されると考えられていたが、Gewurz⁶⁸⁾はhydrocortisone succinateが直接補体成分に働いて抗補体作用を呈することを報告した。

またheparinをはじめとする抗凝固物質(polyvinylalcohol sulfate (PVS)⁵⁶⁾、cellulose sulfate³⁷⁾⁶⁹⁾、diethylamine⁶⁹⁾、protamine⁶⁹⁾、hyaluronic acid⁶⁹⁾、chondroitin sulfate⁶⁹⁾、dextran sulfate⁶⁰⁾⁷⁰⁾⁷¹⁾、polysaccharides sulfonic ester⁷²⁾など)が抗凝固作用と同時に抗補体作用を示すことは広く知られているが、作用部位は各々様々である。ゼラチンの抗補体作用に関する著者らの実験では、ゼラチンの抗補体作用はC1、C2、C3、C3-proactivatorへ直接働いてこれらを失活させるものと考えられる。その理由は次の点からである。

Mayerら¹⁹⁾、高橋ら⁷³⁾⁷⁴⁾の免疫溶血反応系に関する諸要因、反応様式についての研究によれば、温度が重要な因子となる段階は、EAC1とC4よりEAC14が形成される過程、EAC142aよりC2aが崩壊する過程およびEAC142a3bにC5bが反応する過程である。一方 Ca^{++} 及び Mg^{++} の不可欠性に関してはLevine⁷⁵⁾⁷⁷⁾らの一連の2価陽イオンの実験がある。彼らはイオン交換樹脂やキレート剤の使用によって Ca^{++} 、 Mg^{++} の除去を行うと溶血反応が阻止されること、 Ca^{++} が Co^{++} 、 Ni^{++} 等の2価イオンで代用されることがないのに反して Mg^{++} は代用出来ること、 Ca^{++} はC1がEAに反応する段階に働き Mg^{++} はEAC14にC2aが反応する段階に作用すること、至適濃度が Ca^{++} では0.00015M、 Mg^{++} では0.0005Mであること等を確認した。

ゼラチンの抗補体作用がゼラチンの濃度(図3)、

反応時間と共に温度にも依存すること (図9), キレート剤で阻止された抗補体作用が Ca^{++} の添加により再び発現されるということ (図10, 図11), 更にゼラチンとヒト全血清を反応させて後に測定した C1 活性に低下が認められたこと (図12) は, ゼラチンの抗補体作用が C1 の不活化によることを示す。これが C1 に対する直接作用であるのか, 抗原抗体複合体によって classical pathway を介して補体系が活性化, 消耗された結果であるかについては, 今後検討されねばならない。

ゼラチンは長年抗原とは考えられていなかったが Maurer^{78)~80)}, Graber⁸¹⁾, Sela⁸²⁾ はゼラチン及びその誘導体が抗原性を有することを明らかにした。1915年に Hogen⁸³⁾ が6%ゼラチン溶液を血漿代用剤として臨床的にはじめて使用したが, 長く実用化されなかったのは煩雑な滅菌操作, 低い融点に加えて, その抗原性の為であった。ゼラチン及びその誘導体の抗原性の証明に関しては, Boyden の血球凝集試験⁸⁴⁾, Maurer のゼラチン抗体証明法⁷⁸⁾ のきわめて鋭敏な抗体証明反応を必要とする。Schwick ら⁸⁵⁾ はこれらの方法を用いて, 健康人血清中に天然ゼラチンに対する抗体の存在を証明した。健康人血清におけるゼラチン抗体の存在は, Maurer^{78)~80)}, Graber⁸¹⁾ らの報告とも一致する。Maurer⁷⁸⁾⁷⁹⁾ によれば健康人20人中13人(65%)にゼラチン抗体が証明され, 慢性多発性関節炎患者やその他の膠原病患者では, 正常血清に比較して明らかに多量にゼラチン抗体が認められるという。ゼラチン抗体の由来は, 1つは摂食物中に存在するゼラチンに対する抗体の生成であり, 他の1つは結合組織内コラーゲンの代謝によって生成されたゼラチン様物質への抗体の産生によると考えられている⁷⁹⁾。ゼラチン抗体はヒトのみならずモルモットをはじめとする種々の動物血清中にも証明されている⁸⁶⁾。ゼラチン抗体は種々の易溶性コラーゲン及び酵素によるコラーゲンの分解産物とも反応する。抗コラーゲン抗体がコラーゲンと反応する際には補体と結合するのに反して, ゼラチン抗体がゼラチンと結合する際には補体結合をおこさないとの報告⁸⁰⁾もある。正常人血清に対するゼラチンの抗補体性がヒトによっていくらか相違する点(図4)は, ゼラチンによる C1 の失活が抗原抗体複合物による C1 の消費にもとずくとも考えられるが, 同じ自然抗体があるといわれるモルモット血清では抗補体性が小さく, しかもヒトの場合においてもゼラチン濃度1%以上を要する点(図1~7)は, 抗原としては濃度が高すぎると思われる。以上の点からゼラチンの抗補体性の一つは, C1 に対する直接作用

と考えられる。

次にゼラチンの各補体成分への作用を検討した著者らの成績では, 測定した補体成分 C1, C4, C2, C3, C3-9 のいずれの成分にも, 補体活性の低下を認め, その低下の程度は各成分ともに同じ(図12~15)であった。これらより C4, C2, C3, C3-9 の各補体成分の活性の低下が C1 不活化にはじまる classical pathway によって順次不活化された結果とも考えられるが, しかし至適感作状態の血球に高稀釈のモルモット補体を加えた場合の溶血反応の kinetics は, 時間を追ってシグモイド曲線を示し, その反応温度が37°Cでは, 60~90分で最高の溶血値¹⁹⁾を示すのに比べて, ヒト補体では数時間を経ても反応は終末点に達しない⁷³⁾という点, しかもゼラチンが C1 へ直接作用して不活化をおこす場合には, 粒子状の抗原抗体複合物上の反応ではなく液相中での反応であり, それが C4, C2, C3 へと伝達されるには, 効率は抗原抗体複合物から始まる場合に比べて一段と低下すると考えられることから, 5%ゼラチン溶液と血清との反応時間を60分と限った著者らの実験において, 各補体成分の抑制程度がほぼ等しい値を示したことは, ゼラチンが C1 以外の成分, 即ち C4, C2, C3 に対しても直接に作用することを示唆する。C2, C3 成分へのゼラチンの直接作用は, 単離精製された C2, C3 成分を使用した実験(図16, 表5)より明らかである。そして分離精製された C2 成分がゼラチンによって直接抑制される程度が44.3%, ヒト全血清にゼラチンを作用させて測定した C2 成分の抑制の程度が52.8%と両者の間に僅かの差異が認められたが, この差は classical pathway を経て不活化される C2 成分を示していると思われる。

更に, 著者らの実験成績(図17)より, ゼラチンは C3-proactivator にも直接働くことが明らかになった。複雑な補体反応系にあってとりわけ alternate pathway が近年注目をあつめているが, この反応系は, 血清中の易熱性酵素 C3-proactivator convertase が C3-proactivator に働きかけてこれを C3-activator に変化させ, これが更に C3 を活性化して C3a と C3b とに分解する機構である。C3-proactivator convertase を活性化する物質は多々あり, 例えば cobra venom³⁴⁾, zymosan³⁵⁾, lipopolysaccharides (LPS)³⁹⁾, inulin⁶⁰⁾, モルモット 7Sr₁, 7Sr₂ の F(ab)₂⁶⁷⁾, 凝集 IgG⁶⁰⁾, 凝集 IgA₁ および IgA₂⁶¹⁾, 凝集 IgE⁶⁸⁾, agar⁶⁰⁾, dextran sulfate⁶¹⁾ 等である。著者はゼラチンと C3 および C3-proactivator とを反応させて免疫電気泳動法を施すと, その易動度に著明な変化が来ることを認めた(図17)が, これはゼ

ラチンが直接 C3 activator system へ関与することを示したものである。ところで C3 成分が抑制される場合には3つの経路が考えられる。1つは C3 成分に直接作用してこれを不活化する場合であり、1つは classical pathway を経ての不活化であり、もう1つは alternate pathway を経ての不活化の経路である。表5に示すように、分離精製したヒト補体第三成分の活性がゼラチンによって60%抑制されたのに、同時にヒト全血清にゼラチンを作用させて測定した C3 成分の抑制の程度は30%で、一見矛盾した結果が得られたが、これは alternate pathway へのフィードバック機構の関与とも考えられる。Alper⁸⁹⁾ は血清中の C3b inactivator が C3b の阻害因子としての作用の他に、C3-proactivator convertase の阻害物質としての作用も有することを明らかにした。alternate pathway は近年漸次明らかにされつつある複雑な機構であるので、ゼラチンの alternate pathway への関与と、ゼラチンの C3 への直接作用の程度については更に検討が必要であると考えられる。

更にゼラチンによる補体の失活効果が、全補体価 C2, C3 のいずれにおいても、ヒトとモルモット間で異なった著者らの成績(図3, 図16, 表5)は、動物種による補体の性質、作用の最適条件の差異、及び何らかの異なる反応機転の存在を推定させる。dextran sulfate の抗補体作用を検討した丸山¹⁰⁾ の報告にも、動物種間での補体の相違が示されており、著者らは、動物種により補体の性質に違いのあることも明らかにした。

今日、抗原性を考慮する必要のないゼラチン誘導体が Schmidt-Thomé ら⁹⁰⁾ により精製されて以来、ゼラチン溶液は有益な血漿代用剤として広く臨床的に使用されている。このゼラチン誘導体は、純粋な仔牛ゼラチンより得られたポリペプチドを diisocyanate と反応させて結合させた物質であり、その平均分子量は35000である。従来の抗補体作用物質のほとんどがその毒性の為に、免疫抑制という医学的課題に対して無益であったがその中であって進藤ら¹²⁾ の発見した Cu-chlorophyllin には、毒性が少ないという点、passive cutaneous anaphylaxis¹²⁾ 及び Prausnitz-Küstner 反応の阻止¹²⁾⁹¹⁾、更には同種移植片の生着期間の延長¹³⁾ が認められており、補体系抑制物質の臨床応用への可能性を示している。抗原性を考慮する必要がなく、しかも副作用の認められないゼラチン誘導体が *in vitro* および *in vivo* においても補体価の低下をもたらすかについては検討されていない

が、人の平均循環血液量を $90 \pm 10 \text{ ml/kg}$ として計算すると3.5%のゼラチンを平均1000-1500mlを注入することにより、循環血液量のゼラチン溶液を1%以上にすることは可能であり、ゼラチン溶液は血漿代用剤として有用であるばかりではなく、免疫抑制という点でも1つの可能性を示しているように思われる。

結 語

Cunningham-Szenberg 法を用いて抗体産生細胞の形態学的研究を行う目的でゼラチンを加えたところ、その一定濃度(1.0%)以上では、溶血斑産生細胞数が減少することがわかったので、本研究ではゼラチンの抗補体作用を、ヒト、モルモット血清を用いて検討した。

1. ゼラチン濃度による溶血斑産生細胞(PFC)数の変化を見るに、濃度の増加に伴って、とくに1%以上の濃度で、PFC 数は減少した。

2. Milgrom et al の寒天飽和法にならって、補体で飽和したゼラチンにも、同程度の PFC 数の抑制作用が認められた。

3. Mayer の50%溶血力価測定法によってゼラチンの抗補体作用をみるに、ヒト及びモルモットの全血清(全補体成分)に対しては、ゼラチン濃度0.5%以下では抗補体作用はみられないが、1.0%を越えると、濃度にほぼ比例して抗補体作用がみられた。しかし、モルモット血清に対する抑制は軽度であった。

作用温度及び時間について見ると、18°Cでは補体価の経時的変化は僅かであったのに、37°Cでは、30分ですでに27%の減少、180分では43%の減少を示した。

透析操作によりゼラチンに含有する低分子不純物を除去した後のゼラチンにも、同程度の抗補体作用が認められた。

EDTA 及び EGTA などのキレート剤による実験では、ゼラチンの抗補体作用に少なくとも Ca^{++} が必要であることが明かにされた。

又、ゼラチンの前駆物質であるコラーゲンにもヒト血清補体価を低下させる作用を認めた。

4. Nelson et al の方法により、ヒト各補体成分 C1, C4, C2, C3-9, Immuno-adhesion により C3 に対するゼラチンの抑制効果を見るに、各成分にどれもほぼ50%の活性の低下を認めた。単離精製された C2, C3 に対しては、ヒトでは活性の低下が認められたのに、モルモットでは抑制されなかった。Immuno-electrophoresis では、C3-proactivator はゼラチンの添加により C3-activator への変化が見られた。

以上の結果は、ゼラチンが classical pathway のみならず alternate pathway を介して複数の補体成分に直接働いて、抗補体作用を呈することを示唆している。

本研究は昭和46年度文部省科学研究費(58835)によって行われた。

本稿を終るにあたり御懇篤なる御指導、御校閲をいただきました服部絢一教授および金沢大学癌研究所分子免疫部右田俊介教授に深謝いたします。さらに本研究に関し甚大なる御指導・御配慮を賜った金沢大学癌研究所分子免疫部高橋守信助教授と高橋セイ氏に心から感謝いたします。なお本稿の要旨は第35回日本血液学会総会において発表した。

文 献

- 1) Gigli, I and Nelson, R. A, Jr. : *Exp. Cell Res.*, **51**, 45 (1968).
- 2) Nelson, R. A, Jr. : *Science*, **118**, 733 (1953).
- 3) Ward, P. A., Cochrane, C. G. and Müller-Eberhard, H. J. : *Immunol.*, **11**, 141 (1966).
- 4) Lachmann, P. J. and Müller-Eberhard, H. J. : *Protides Biol. Fluid.*, **15**, 469 (1967).
- 5) Jensen, J. : *Science*, **155**, 1122 (1967).
- 6) Cochrane, C. G. and Müller-Eberhard, H. J. : *J. Exp. Med.*, **127**, 371 (1968).
- 7) Perlmann, P., Perlmann, H., Müller-Eberhard, H. J. : and Manni, J. A. : *Science*, **163**, 937 (1968).
- 8) Bianco, C., Patrick, R. and Nussenzweig, V. : *J. Exp. Med.*, **132**, 702 (1970).
- 9) Dukor, P., Dietrich, F. H., Gisler, R. H., Schumann, G. and Bitter-Suermann, D. : in *Progress in Immunology*, vol 3, p99, North-Holland, eds. Brent, L. and Holborow, J., 1974.
- 10) Feldmann, M. and Pepy, M. B. : *Nature*, **249**, 159 (1974).
- 11) Okada, H., Nishioka, K. and Sindo, T. : *Immunol.*, **16**, 473 (1963).
- 12) Sindo, T., Haga, K., Fujii, G. and Nishioka, K. : *Japan. J. Exp. Med.*, **36**, 489 (1966).
- 13) Fujii, G., Suzuki, M., Hirose, Y., Goto, S., Ishibashi, Y., Haga, K. and Sindo, T. : *Japan. J. Exp. Med.*, **36**, 499 (1966).
- 14) Cunningham, A. J. and Szenberg, A. : *Immunol.*, **14**, 599 (1968).
- 15) Jerne, N. K. and Nordin, A. A. : *Science*, **140**, 405 (1963).
- 16) Cunningham, A. J. : *Nature*, **207**, 1106 (1965).
- 17) 齊藤和久, 多田隈卓夫 : 免疫実験操作法(日本免疫学会編) 129頁, 金沢, 1971.
- 18) Milgrom, F. and Loza, U. : *J. Immunol.*, **96**, 415 (1966).
- 19) Kabot, E. A., and Mayer, M. M. : *Experimental Immunochemistry*, 2nd ed., p. 133, Springfield, Illinois, Charles C. Thomas, 1961.
- 20) 右田俊介, 山本和代, 広橋 憲, 山田哲次 : 第3回日本免疫学会総会記録, p. 122, 1973.
- 21) 鳥巢要道, 田中二郎 : *臨床科学*, **11**, 433 (1975).
- 22) 田村 昇 : *臨床科学*, **4**, 581 (1968).
- 23) Sterzl, J. and Riha, I. : *Nature*, **208**, 858 (1965).
- 24) Dressor, D. W. and Wortis, H. H. : *Nature*, **208**, 859 (1965).
- 25) Ingraham, J. S. and Bussard, A. : *J. Exp. Med.*, **119**, 667 (1964).
- 26) Mayer, M. M., Eaton, B. B. and Heidelberger, M. : *J. Immunol.*, **53**, 31 (1946).
- 27) Mayer, M. M., Croft, C. C. and Gray, M. M. : *J. Exp. Med.*, **88**, 427 (1948).
- 28) Mayer, M. M., Osler, A. G., Bier, O. G. and Heidelberger, M. : *J. Exp. Med.*, **84**, 535 (1946).
- 29) Osler, A. G., Strauss, J. H. and Mayer, M. M. : *Am. J. Syph., Gonorr. and Ven. Dis.*, **36**, 140 (1952).
- 30) Green, H., Barrow, P. and Goldberg, B. : *J. Exp. Med.*, **110**, 699 (1959).
- 31) Frank, M. M., Rapp, H. J. and Borsos, T. : *J. Immunol.*, **94**, 295 (1965).
- 32) Becker, E. L. : *J. Immunol.*, **84**, 299 (1960).
- 33) Levine, L., Cowan, Mayer, M. M. : *J. Immunol.*, **71**, 359 (1953).
- 34) Klein, P. G. and Wellensiek, H. J. : *Immunol.*, **8**, 590 (1965).
- 35) Thompson, R. A. and Rowe, D. S. : *J. Exp. Med.*, **131**, 629 (1970).
- 36) Marcus, D. M. : *J. Immunol.*, **84**, 273 (1960).

- 37) Eisen, V. and Loveday, C. : Brit. J. Pharmacol., 39, 831 (1970).
- 38) Neblett, T. R., Burnham, T. K. and Kay, N. : Arch. Derm., 92, 720 (1965).
- 39) Borsos, T., Rapp, H. J. and Crisler, C. : J. Immunol., 94, 662 (1965).
- 40) Taylor, F. B. Jr. and Fudenberg, H. : Immunol., 7, 319 (1964).
- 41) Yachnin, S. and Rosenblum, D. : J. Clin. Invest., 43, 1175 (1964).
- 42) Becker, E. L. and Austen, K. F. : J. Exp. Med., 120, 491 (1964).
- 43) Becker, E. L. : J. Immunol., 84, 299 (1960).
- 44) Shin, H. S. and Mayer, M. M. : Biochem., 7, 3003 (1968).
- 45) Stroud, R. M., Austen, K. F. and Mayer, M. M. : Immunochem., 2, 219 (1965).
- 46) Cushman, W. F., Becker, E. L. and Wirtz, G. : Immunol., 79, 80 (1957).
- 47) Baker, B. R. and Cory, M. : J. Med. Chem., 12, 1049 (1969).
- 48) Baker, B. R. and Cory, M. : J. Med. Chem., 12, 1053 (1969).
- 49) Glovsky, M. M., Cory, M. and Alenty, A. : Immunol., 26, 819 (1974).
- 50) Walb, D., Loos, M. and Hadding, U. : Z. Naturforsch., 266, 403 (1971).
- 51) Kaiser, E. and Raab, W. : Z. Immunitätsforsch., 134, 167 (1967).
- 52) Gordon, J., Whitehead, H. R. and Wormal, A. : Biochem. J., 20, 1028 (1926).
- 53) Gordon, J., Whitehead, H. R. and Wormal, A. : Biochem. J., 20, 2 (1926).
- 54) Frank, M. M., Borsos, T. and Rapp, H. J. : Science, 147, 742 (1965).
- 55) Toda, T. and Mitsuse, B. : Z. Immunitätsforsch., 78, 62 (1933).
- 56) Kozo Inoue, Masuo Takubo, Takashi Kurimura, and Tsunehisa Amano : Biken's Journal, 2, 187 (1959).
- 57) Leon, M. A. : Science, 147, 1034 (1965).
- 58) Polley, M. J. and Müller-Eberhard, H. J. : Science, 148, 1728 (1965).
- 59) Marcus, R. L., Shin, H. S. and Mayer, M. M. : Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A., 68, 1351 (1971).
- 60) Götze, O. and Müller-Eberhard, H. J. : J. Exp. Med., 134, 90s. (1971).
- 61) Hadding, U., Dierich, M., Köning, W., Limbert, M., Schorlemmer, H. U. and Bitter-Suermann, D. : Eur. J. Immunol., 3, 527 (1973).
- 62) Mills, S. E. and Levine, L. : Immunol., 2, 368 (1959).
- 63) Rodriguetz, E. and Osler, A. G. : J. Immunol., 85, 347 (1960).
- 64) Frank, M. M., Rapp, H. J. and Borsos, T. : J. Immunol., 93, 409 (1964).
- 65) Shin, H. S., Pickering, R. J. and Mayer, M. M. : J. Immunol., 106, 473 (1971).
- 66) Jennings, J. F. and Taylor, G. : Nature, 203, 661 (1964).
- 67) Fischer, H., Ferber, E., Fritzsche, W., Wosegien, F. and Spielmann, W. : Bibliotheca Haematol. (Basle), 12, 76 (1961).
- 68) Gewurz, H., Wernick, P. R., Quie, P. G. and Good, R. A. : Nature, 208, 755 (1957).
- 69) Walton, K. W., Ellis, H. A. and Taylor, C. E. D. : Brit. J. Exp. Path., 38, 237 (1957).
- 70) 丸山穂高 : 東邦医学会誌, 17, 133 (1970).
- 71) Ecker, E. E. and Pillmer, L. : J. Immunol., 40, 73 (1941).
- 72) Mutsaers, W. and Lison, L. : Ann. Inst. Pasteur, 74, 40 (1948).
- 73) 高橋守信, 真弓 忠, 古瀬礼子, 西岡久寿弥 : 補体 (I), Minophagen medical review, 9, 97 (1964).
- 74) 高橋守信, 真弓 忠, 古瀬礼子, 西岡久寿弥 : 補体 (II), Minophagen medical review, 9, 129 (1964).
- 75) Levine, L., Osler, A. G. and Mayer, M. M. : J. Immunol., 71, 374 (1953).
- 76) Levine, L. and Mayer, M. M. : J. Immunol., 73, 426 (1954).
- 77) Levine, L., Mayer, M. M. and Rapp, H. J. : J. Immunol., 73, 435 (1954).
- 78) Maurer, P. H. : J. Exp. Med., 100, 497 (1954).
- 79) Maurer, P. H. : J. Lab. Clin. Med., 52, 733 (1958).
- 80) Maurer, P. H. : Klin. Wschr., 38, 29

- (1960).
- 81) Grabar, P. : Ann. Inst. Pasteur, 88, 11 (1955).
- 82) Sela, M. and Arnon, R. : Biochem. J., 77, 394 (1960).
- 83) Hogen, J. : J. A. J. A., 64, 721
- 84) Boyden, S. V. : J. Exp. Med., 93, 106 (1951).
- 85) Schwick, G. and Freund, U. : Dtsch. Med. Wschr., 87, 737 (1965).
- 86) Maurer, P. H. : J. Exp. Med., 100, 515 (1965).
- 87) Sandberg, A. L., Osler, A. G., Shin, H. S. and Oliveira, B. : J. Immunol., 104, 329 (1970).
- 88) Ishizaka, T., Sian, C. M. and Ishizaka, K. : J. Immunol., 108, 848 (1972).
- 89) Alper, C. A., Rosen, F. S. and Lachmann, P. J. : Proc. Nat. Acad. Sci., 69, 2910 (1972).
- 90) Schmidt-Thomé, J., Mager, A. and Schöne, H. H. : Arzneim. Forsch., 12, 378 (1962).
- 91) Torisu, M., Sonozaki, H., Ito, K. and Schiraishi, S. : J. Immunol., 101, 1095 (1968).

Abstract

。 During a morphological study on antibody forming cells by the use of Cunningham's plaque method with the addition of gelatin, gelatin of over 1% was found to decrease the number of plaque forming cells remarkably as compared with those in the original method and preliminary work revealed that gelatin of such concentration possessed some inhibitory effects upon complement. In this present work, anticomplementary effects of gelatin on human serum and guinea pig serum were studied.

The gelatin, previously saturated with complements by the method of Milglom et al., also reduced the number of plaque forming cells to the same extent as did untreated gelatin.

Hemolytic total complement activity of the human and guinea pig serum, as assayed by Mayer's method, was significantly reduced in proportion to the gelatin concentration added in the system. The critical concentration of gelatin was approximately 1% and less than 0.5% of gelatin was of no such effect.

Furthermore, an obvious difference in the degree of the anticomplementary effect of the gelatin between the human and the guinea pig was noted, its effect upon the guinea pig being much milder.

As far as the temperature and time in reaction were concerned, complement depletion by gelatin at the room temperature was not so significant, whereas complement activity at 37°C was reduced to 73% of the original value by the first 30 min. and to 67% by the 3 hrs.

Dialysed gelatin also showed anticomplementary activity to the same degree, denying that the complement inhibition was due to any dialysable contaminants of gelatin sample tested.

Although the inhibitory activity of gelatin was completely removed by the presence of chelators, such as EDTA and EGTA in the reaction mixture, the addition of Ca⁺⁺ completely recovered its activity, —an evidence of Ca⁺⁺ requirement for the gelatin effect.

Using the same technique, collagen, which is counted for prototype of gelatin, was found to have the same anticomplementary effect.

With the addition of 2.5% gelatin, each hemolytic activity of C1, C4, C2 and

C3-9 was measured according to Nelson et al., and C3 activity was assayed by immune adherence test. Each of complement component activities fell to nearly 50%.

As for the gelatin effects on purified complement components, guinea pig C2 and C3 were not inhibited at all, whereas human C2 and C3 fell to nearly 50%.

Electrophoretic study revealed that the human C3-proactivator had changed into C3-activator after incubation of the human serum with gelatin at 37°C for 1 hr, —an evidence for an involvement of gelatin in the alternate pathway.

In conclusion, gelatin of more than 1.0% possessed anticomplementary effects, directly acting on a number of complement components via not only the classical, but also the alternate pathway.
