OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	モルモット補体成分 : C'3dに関する研究
Author(s)	森, 隆
Citation	大阪大学, 1967, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/29511
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【 6 】

氏名・(本籍)	森(もり)　隆(たかし)
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 1229 号
学位授与の日付	昭和42年4月28日
学位授与の要件	医学研究科外科系 学位規則第5条第1項該当
学位論文名	**モルモット補体成分：C'3d に関する研究**
論文審査委員	(主査) 教授 曲直部寿夫 (副査) 教授 天野 恒久　教授 米田 正彦

論文内容の要旨

〔目　　的〕

免疫溶血現象に関与する補体成分として現在9成分が認められている。C'3d はその最終段階に作用して感作血球を溶血させるが C'3a と共に補体結合反応には関与せず turn over する酵素様のものとされて来た。しかしその測定法に問題があったので，補体成分を精製し中間生成物 (a-cell) を作り，作用上他の成分を含まぬ C'3d を作用させて S* の形成様式を kinetical に解析し，測定法について考察した。

〔方法並びに成績〕

用いた Reagent は CM- 及び DEAE-cellulose column chromatographies によって精製した。Buffer は Gelatin を含む Veronal Buffered Saline (GVB), Sucrose Veronal Buffer, EDTA-Buffer を用いた。羊血球 (E) を兎抗血清で感作し (EA) 更にモルモット補体成分を順次作用させて EAC'1, 4, 2, 3c', 3b, 3e, 3f (f-cell) を作る。これに C'3a を作用させ a-cell なる中間生成物を作る。C'3d は免疫電気泳動法により β_1-globulin の位置に沈降線を生じ，a-cell を含む寒天と一部精製した抗モルモット血清兎抗体とを用いるとこの部位に溶血斑を生じ且つ沈降線を境として溶血が阻止される。故にこの沈降線が C'3d によることが同定された。a-cell と C'3d とによって E* (生理食塩水中で溶血する damaged cell……その site を S* で表わす) が形成されるが，その場合 Lysis curve は lag phase を示す。一方 generation curve は lag phase を示さない。これは E* ⟶Hb+Ghost に於て尚数段階の存在を示し Frank らの結果に一致する。S* 形成は温度及び C'3d 濃度を変えると，0°C でも速やかに進行し，30°C，37°C に比べて遜色を示さない。又0°C，30°C で時間を追って S* 形成が進行する条件に於て，37°C では C'3d の低濃度では時間と共に S* 形成が止まり数時間後の値に差を生じる。これは主として a-cell の Decay の差によると考えられる。

即ち30°Cでの半減期が約800分に比し37°Cでは200分と短縮され，a-site の減少が差を生じる主因と考えられる。0°C，0.09M・EDTA・B 中で作られた d-cell は30°Cに於て 0.09M・EDTA・B では溶血が抑制されるが，0.005M・EDTA を含む GVB では lag を以って Lysiscurve を示す。30°C，0.09 M・EDTA で incubate した後 GVB に希釈すると立ち上がりが速やかになり，d-cell (=E*precursor) の Lysis に於ける温度依存性段階に当ると思われる。0.09MEDTA で溶血を抑えられていた S* の溶血能力には Decay が認められない(30°C)。各イオン強度に於て，C'3d による S* 形成は著しく低いイオン強度では著明に抑制される。一方形成された S* の Lysis はイオン強度の高い側で著明に促進される。この時溶けずに残った S* の溶血能力は減少していない。溶血速度が血球膜内外の K^+～Na^+ 平衡の質的差異による可能性を考え NaCl を KCl に代えて見たが同様の結果を得た。従って S* の溶血速度は単にイオン強度に支配されると考えられ，溶血の抑制も d-site の崩壊によるものではない。30°Cで一定の C'3d により a-cell から S* 形成を行なうと初期には time linear の部分が得られ，これは a-cell 濃度に対応する。この初速度を以って C'3d 濃度を定量すると C'3d 濃度に対応して S* 形成が生じ，用いた a-cell の maximum a-sites/cell (Zmax) に応じても S* 形成が規定される。ここで C'3d の depletion を調べた。一定の C'3d を含む 0.09M・EDTA と各濃度の a-cell から S* を作り，Buffer を代えて溶血させると加えた a-cell に比例して S* が生じ，一方この上澄に残された C'3d を初速度を以って測定すると先に形成された S* 数に対応して直線関係を以って C'3d が減少している。更に C'3d を測定限界に迄希釈し a-cell 濃度を変えて S* を作り，上澄の C'3d を今度は30°C 3時間をかけて測定した。対照のE（各濃度）による吸収では全く C'3d の減少はないが，a-cell の場合は加えられた a-cell に応じて S* が形成されそれに対応して上澄の C'3d の活性に減少を認め，C'3d が前段階の中間生成物 (a-cell) によって明らかに deplete されることを確認した。尚 C'3d が a-cell に吸着された後ゆっくりと離れて再び作用する可能性を考えて S* から a-cell への C'3d の Transfer を調べたが Transfer は認められなかった。そこで30°C 3時間を以って極度に希釈した C'3d を測度すると，C'3d に比例した Dose response の直線が得られた。

〔総　　括〕

従来 C'3d は酵素様のもので deplete されないとされて来たが，補体成分を精製し a-cell なる中間生成物と精製 C'3d とを反応させて kinetics を行なうと S* 形成は温度依存性を示さず，turn over せず，更に a-cell によって明らかに deplete されることが確められた。従って C'3d の定量は，a-cell の安定な30°C以下で行い得る。その場合初速度法又は長時間法が可能である。

論文の審査結果の要旨

C'3d は免疫溶血現象の最終段階に与り，従来，補体結合反応には関与せず，turn over する酵素様活性物質であるとされて来た。しかし，この仮説は抗原抗体結合物で処理された全補体血清中の残存 C'3d が減少していないと云う予備的実験から導かれたものである。

著者はモルモットの C'3d を DEAE- および CM-cellulose column chromatographies によって分離精製し，その標品を用いて C'3d の定性とその作用段階の解析を行ない，次の結果を得た。

1) 免疫電気泳動法と EAC'1, 4, 2, 3c, 3b, 3e, 3f, 3a (a-cell) を含む寒天を組合わせて溶血斑を調べ，C'3d が β_1-globulin に属し，その溶血作用は抗体によって沈降線を境にして阻止されることを示した。また，抗 C'3d 抗体は遊離の C'3d の活性を中和するが，いったん形成された E* (damaged cell) の溶解を阻止することはできないことを明らかにした。

2) C'3d と a-cell からの E* 形成を解析した。S* 形成には lag period はなく，また 0°C においても速やかに進行する。

3) いったん形成された E* は，0.09M·EDTA 中で溶血しないが，その溶血能力は 30°C，5 時間の加温後にも減少を認めない。

4) S* の形成および溶解は，ともに低イオン強度領域で抑制される。

5) S* 形成の初速度を求め，これにより C'3d 濃度を測定する方法を考案した。それを用いて a-cell による C'3d の消費の有無を再検討したところ，従来の説に反して C'3d は a-Sites によって明らかに消費されることを認めた。かつ C'3d の S* から a-Site への転移は認められない。

6) この事実を基にして C'3d を定量する方法を考案し，C'3d 段階でも Mayer の one-hit theory が成立することを示した。