

Title	モルモット補体成分C'3についての研究
Author(s)	米増, 國雄
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/29689">http://hdl.handle.net/11094/29689</a>
DOI	
rights	
Note	

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名・(本籍)	米 増 國 雄 よね ます くに お
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 1 6 6 1 号
学位授与の日付	昭 和 4 4 年 3 月 2 8 日
学位授与の要件	医 学 研 究 科 病 理 系 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	モルモット補体成分 C <sub>3</sub> についての研究
論文審査委員	(主査) 教 授 天 野 恒 久 (副査) 教 授 米 田 正 彦 教 授 深 井 孝 之 助

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 〔目 的〕

C<sub>3</sub> は、免疫溶血現象において、C<sub>2</sub> の作用後 C<sub>3</sub> の働く前に作用し、免疫粘着現象 (IA) に必要な成分であることが知られている。従来モルモット C<sub>3</sub> として使用されたものは、純化されたと言われるものでも C<sub>3</sub> 以外の補体成分活性を含まない所謂機能的に純化されたもので、物質として高度に純化されたものとは言い難い。著者はモルモット C<sub>3</sub> を高度に純化し、その性質を検討した。また免疫溶血反応における C<sub>3</sub> 反応段階の解析を行ない、中間生成体 (SAC'<sub>1a,4,2a,3</sub>) の形成と崩壊の過程を解明した。

#### 〔方法ならびに成績〕

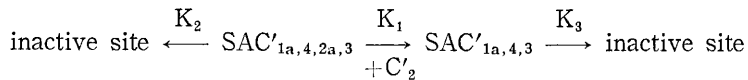
1. C<sub>3</sub> の純化：40ml モルモット血清を  $\mu=0.10$ , pH 5.6 にて沈殿を除き、さらに上清を蒸留水に透析して生成した沈殿を得る。これを等張のベロナール緩衝食塩水 (VB-saline) に溶解し、Sephadex G-200 column でゲル濾過を行なう。溶出した C<sub>3</sub> 画分を集め CM-cellulose column に吸着させ、0.02M 酢酸緩衝食塩水 ( $\mu=0.15$ , pH 5.0) で C<sub>2</sub>, C<sub>7</sub> を流出させ、同緩衝食塩水で  $\mu=0.15$  から 0.26 までの linear gradient で溶出する。溶出した C<sub>3</sub> 画分を集め DEAE-cellulose column に吸着後 0.005 M Tris-HCl 緩衝食塩水 ( $\mu=0.045$ , pH 7.5) で C<sub>6</sub>, C<sub>5</sub> を流出させて同緩衝食塩水で  $\mu=0.045$  から 0.21 までの linear gradient で溶出する。この段階で C<sub>3</sub> 画分は他の補体成分を含まないが、わずかに albumin などの蛋白性不純物を含む。これを集め濃縮して再度 Sephadex G-200 column でゲル濾過を行ない溶出した C<sub>3</sub> 画分を集めて C<sub>3</sub> 標品とした。この C<sub>3</sub> は euglobulin 分画の蛋白量の 3.54% に当り C'IA<sub>50</sub>/ml 活性は 592% に当る。

2. 精製 C<sub>3</sub> の Disc Electrophoresis, Immuno-diffusion を用いての解析：disc electrophoresis で精製 C<sub>3</sub> は  $\beta_1$  領域に唯一の zone を示した。Ouchterlony 法を用いたゲル内沈降反応で、精製 C<sub>3</sub> は

抗モルモット全血清家兎抗体に対しても抗モルモット C<sub>3</sub> 家兎抗体に対しても 唯一の沈降線を示し、他方モルモット全血清は抗モルモット C<sub>3</sub> 家兎抗体に対して唯一の沈降線を示した。免疫電気泳動でも β<sub>1</sub> 領域に唯一の沈降線を示し、この免疫電気泳動を行なった plate 上に EAC'<sub>1a,4</sub> と過量の C'<sub>2</sub>, C'<sub>5</sub>, C'<sub>6</sub>, C'<sub>7</sub>, C'<sub>8</sub> および C'<sub>9</sub> を含む寒天を重層すると、明瞭な溶血斑が β<sub>1</sub> 領域に出現し、その抗体溝側への拡散は沈降線により阻止された。

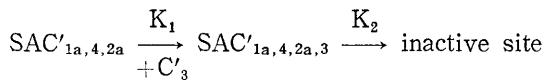
3. 抗モルモット C<sub>3</sub> 家兎抗体の性質 : Microtiter-plate を用いた実験で、抗モルモット C<sub>3</sub> 家兎抗体は精製 C<sub>3</sub> の溶血活性および IA 活性を阻止し、EAC'<sub>1a,4,2a,3</sub> を凝集した。

4. SAC'<sub>1a,4,2a,3</sub> の Decay と Generation : Borsos 法で調整した EAC'<sub>1a,4</sub> と C'<sub>2</sub> および精製 C<sub>3</sub> を用いて EAC'<sub>1a,4,2a,3</sub> を作り a) VB-saline 中で b) 過量の C'<sub>2</sub> 中で decay させ c) 系 a) より時間的に浮遊液を液をくみ出し充分量の C'<sub>2</sub> と反応させた後、それぞれの溶血度を適当な時間間隔で充分量の C'<sub>5</sub>, C'<sub>6</sub>, C'<sub>7</sub>, C'<sub>8</sub> および C'<sub>9</sub> を含む反応液 (C'<sub>5-9</sub> reagent) を加えて測定した。これより、SAC'<sub>1a,4,2a,3</sub> の decay は次の経路によって起ることが分った。



(K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>, K<sub>3</sub> は反応速度定数)

同様に調整した site 数の異なる EAC'<sub>1a,4</sub> を過量の C'<sub>2</sub> 存在下で、C'<sub>3</sub> 希釈液 2 系列に混和し振盪を続け、時間的に充分量の C'<sub>5-9</sub> reagent を加え、その溶血度を測定した。どの時点においても形成した SAC'<sub>1a,4,2a,3</sub> の値は、使用した C'<sub>3</sub> 量に比例し、その tmax (SAC'<sub>1a,4,2a,3</sub> 値が最高になるまでの振盪時間) は、C'<sub>3</sub> 濃度に無関係で SAC'<sub>1a,4,2a</sub> の値のみにより定められた。これより SAC'<sub>1a,4,2a,3</sub> の generation は、反応相に充分な C'<sub>2</sub> がある折は次の簡単な model が成り立つ。

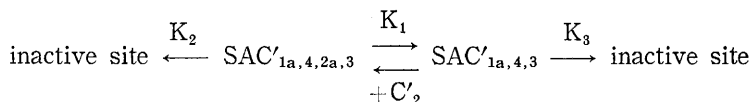


(K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub> は反応速度定数)

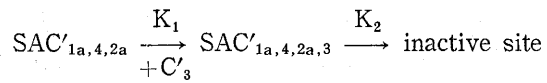
5. 中間生成体 (SAC'<sub>4,2a,3</sub> と SAC'<sub>4,3</sub>) の C'<sub>3</sub> の IA 反応性の decay : EDTA を含む VB-saline 中で SAC'<sub>4,2a</sub> を作り 3 枚の Microtiter-plate 上で倍数希釈を行なった C'<sub>3</sub> とで SAC'<sub>4,2a,3</sub> または SAC'<sub>4,3</sub> を作り、一枚の plate は直ちに、他は 2-4°C で、または 37°C で 22 時時放置後その IA 価を測定した。中間生成体に結合したモルモット C'<sub>3</sub> の IA 反応性は明らかに decay を示した。

〔総括〕

- 1) モルモット C'<sub>3</sub> は Sephadex G-200, CM-, DEAE-cellulose, Sephadex G-200 の 4 本の Column chromatography で完全に純化される。
- 2) 抗モルモット C'<sub>3</sub> 家兎抗体は C'<sub>3</sub> の溶血活性および IA 活性を阻止し EAC'<sub>1a,4,2a,3</sub> を凝集する。
- 3) SAC'<sub>1a,4,2a,3</sub> の decay は次の経路で行なわれる。



- 4) SAC'<sub>1a,4,2a,3</sub> の generation は、反応相中に充分な C'<sub>2</sub> が存在すれば次の model が成り立つ。



5) 中間生成体 (SAC'<sub>4,2a,3</sub> と SAC'<sub>4,3</sub>) の C'<sub>3</sub> の IA 反応性の decay はモルモット C'<sub>3</sub> でも認められる。

### 論文の審査結果の要旨

本論文はモルモット補体第3成分 (C'<sub>3</sub>) の精製純化方法を確立し、この精製 C'<sub>3</sub> 及びそれに対する抗体を用いて、免疫溶血反応及び免疫粘着反応に於ける C'<sub>3</sub> 反応段階を解析している。特にその生成中間物 SAC'<sub>1a,4,2a,3</sub> の崩壊過程に2経路が存在する事を明らかにし、免疫溶血反応経路の解明に多大の貢献をなした独創性と発展性に富んだ研究である。