

腎疾患における補体終末因子活性化の検討

武越靖郎¹⁾, 楠幸博¹⁾, 飽津泰史¹⁾, 伊丹儀友¹⁾, 栃丸博幸¹⁾, 永田康¹⁾, 長沢滋治²⁾

補体Terminal Complement Complex(TCC)に特異的なモノクロナル抗体と抗C7抗体を組み合わせたELISAを用いて, 各種腎疾患における血中および尿中TCCレベルを測定した。血中TCCではSLE, MPGNで増加傾向を認めたが, IgA腎炎, FGS, MCNSなどでは正常範囲であった。尿中TCCでは蛋白尿の高度例で検出され, 特にFGSの全例で排泄増加がみられたが, MCNSでは一例も検出されなかった。以上より腎疾患の一部では補体終末因子活性化の存在が示唆された。

補体終末因子, Terminal Complement Complex(TCC), ELISA

【研究方法】正常人24名, 北大小児科および関連病院でfollow up中の腎疾患と北大第二内科でfollow up中のSLE24例について補体終末因子の活性化を検討するため血中および尿中のTerminal Complement Complex(TCC)レベルを測定した。測定にはELISAのsandwich法を用い, TCCに対して特異的なモノクロナル抗体1B4¹⁾をELISA plateにcoatingし1%OAでblockingを行なった。このようにして出来たwellにsampleを加え, detection anti bodyとしてgoat anti-C7抗体を用い, HRPO標識anti goat IgG, 基質としてABTSの順に反応させた。最終的に発色の程度をEIA readerを用い405 nmの吸光度で測定した。Standard curveを作成するためには, 精製したTCCの代わりにzymosan-activated serumを用いた。zymosan-activated serumはヒト血清にzymosanを10mg/mlで加え2hr 37°C stirringして作成し, 分注した後, 使用時まで-70°Cで保存した。Standard curveは図1のようになり, 10,000倍希釈でもbackgroundと有意差を認めた。zymosan-activated

serum中に存在するTCCを200 AU/mlとしてsample中の濃度を決定した。

次に採血時の条件によってTCC値に差があるかどうか検討するため, 正常人4名(N1, N2, N3, N4)から同時に採血したserumおよびEDTA plasmaについて希釈液を変えて検討した(図2)。左側のbar(serum)がserumをPBSで5倍希釈した場合, 2番目(serum/EDTA)がserumをEDTA入りPBSで希釈した場合, 3番目(plasma)がEDTA plasmaをPBSで希釈した場合, 4番目(plasma/EDTA)がEDTA plasmaをEDTA入りPBSで希釈した場合である。EDTA plasmaは希釈液の違いでTCC値に差はなかった。serumの場合EDTA入りPBSで希釈した場合でもEDTA plasmaを用いたときに比べて有意に高値を示した。この結果からserumでは室温放置でTCCが形成されると考えられ, この非特異的な補体の活性化を避けるため測定はすべてsampleにfinal 10mMのEDTAをいれて採取し直ちに4°C以下で保存した。

【結果】図3はplasma中のTCC値を示している。

1) 北海道大学医学部小児科, 2) 同薬学部衛生化学

正常人は 0.259 ± 0.117 AU/ml で上限 (+3 SD) は 0.610 AU/ml であった。次に蛋白尿との関係を知るために蛋白尿 100mg/dl 以上のグループを (+) としてそれより少ないグループを (-) として分けて示した。SLE および MPGN において血中 TCC の上昇を認めた。SLE では蛋白尿が 100mg/dl 以上のグループで高値の傾向がみられたが、MPGN では蛋白尿の程度とは無関係に多い傾向を認めた。他の腎疾患である IgA 腎炎, FGS, steroid 反応性ネフローゼ症候群および minimal change などではほぼ全例が正常範囲であった。

図 4 は尿中 TCC 値を示している。正常人 11 名については測定限界以下であった。次に患者において明らかに上昇を認めたものは SLE 33 例中 2 例, MPGN 7 例中 1 例, FGS 5 例中 5 例, minimal change nephrotic syndrome 13 例中 0 例, IgA 腎炎 11 例中 1 例, その他に含まれている Wilms tumor で片腎摘出した 1 例, Alport 腎炎 1 例であった。

【考案】これまで補体の活性化産物 (C3d, C4d, TCC など) の測定時に非特異的な補体活性化を避けるため EDTA 採血することの重要性が報告されている²⁾。今回も同様の結果が得られその重要性が確認された。TCC の測定にあたり sample 中に EDTA を入れることによって非特異的な補体の活性化を阻止し, in vivo に近い状態で測定できたと考えられた。

SLE において血中 TCC のレベルがその活動性と相関することが報告されているが³⁾、今回の成績でも血中および尿中の TCC の値が尿中蛋白排泄量と相関する傾向が認められたことから、これらの値が SLE の腎病変の程度を反映しているものと考えられた。一方、MPGN では蛋白尿の高度でない症例にも血中濃度が増加していたことから、TCC の増加には nephritic factor のような補体系を活性化する液相因子の関与も示唆された。また同じく蛋白尿の多い症例でも、FGS は minimal change に比して尿中レベルが圧倒的に高値であった。FGS では血中レベルが高値では血中レベルが高値でなかったことより selecti-

vity の低下が一因である可能性が示唆された。FGS では TCC の種々の segmental, global な沈着も認められることより、このような病変における TCC の何等かの関与が尿中排泄の増加につながったことも否定できなかった。

以上のように糸球体病変における TCC の役割について、それぞれの病型について今後検討しなければならない問題が多く残されている。今回の検討は腎生検時に採取した尿や血液を対象としたものではなく、また治療により既に症状が軽度になっている例も多くみられた。そのため TCC の糸球体における沈着と尿中および血中レベルとの関係について検討はしなかったが、今後この点も考慮しながら検討していく予定である。

【文献】

- 1) 楠幸博, 長沢滋治: Polymerized C9 を用いた Membrane attack complex に特異的なモノクローナル抗体の作製。日本免疫学会総会・学術集会記録第 18 巻 (1988) 766
- 2) Molles T E, Garred P and Bergseth G: Effect of time, temperature and anti-coagulants on in vitro complement activation: Consequences for collection and preservation of samples to be examined for complement activation. Clin. exp. Immunol. 73, 484-488, 1988
- 3) Gawryl M S, Chudwin D S, Langlois P F and Lint T F: The terminal complement complex, C5b-9, a marker of disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 31, 188-195, 1988

図1 標準曲線

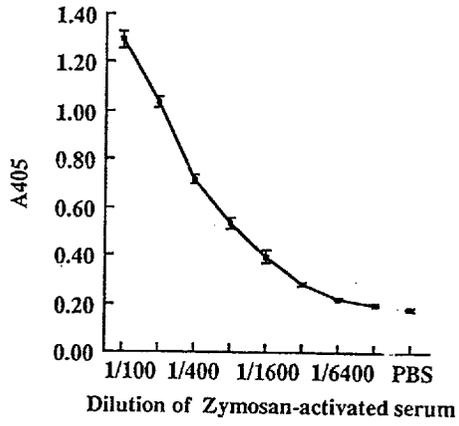


図2 採血条件による血中TCC濃度の差異

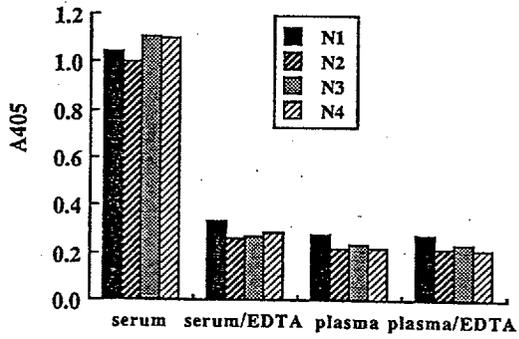


图3 血中 TCC (EDTA Plasma)

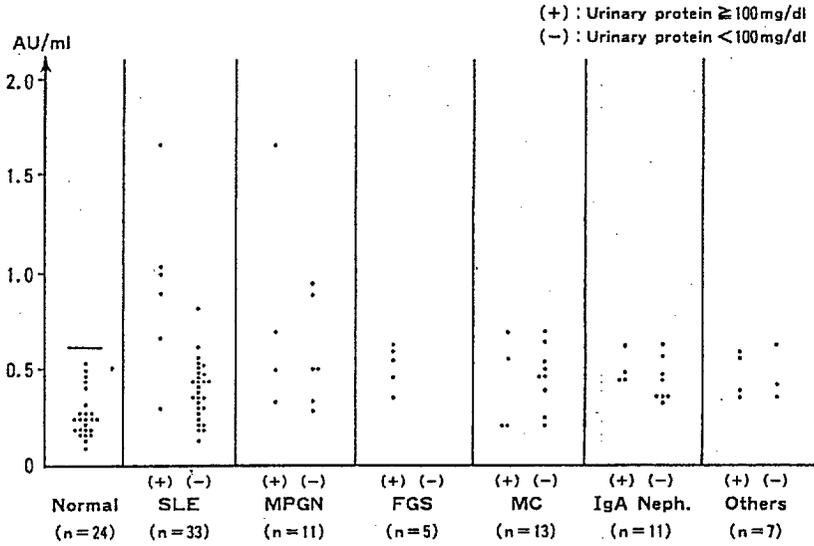
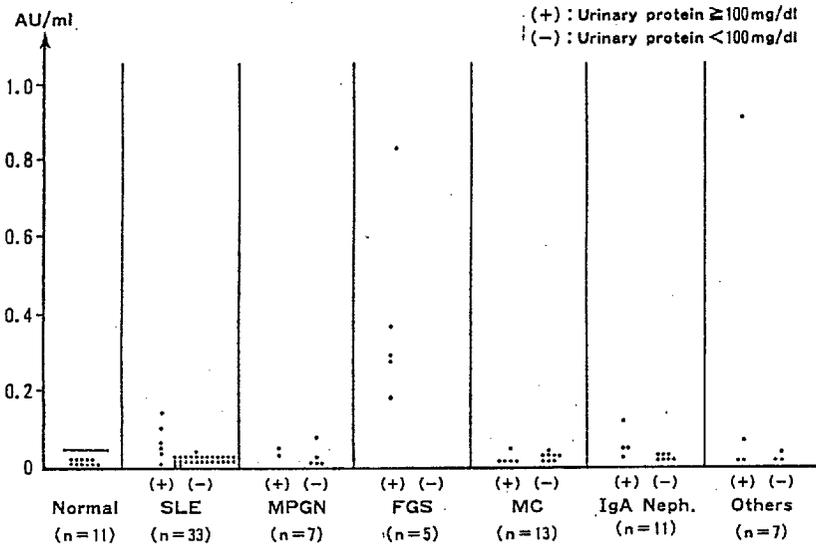


图4 尿中 TCC





検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



補体 Terminal Complement Complex(TCC)に特異的なモノクロナル抗体と抗 C7 抗体を組み合わせた ELISA を用いて、各種腎疾患における血中および尿中 TCC レベルを測定した。血中 TCC では SLE,MPGN で増加傾向を認めしたが,IgA 腎炎,FGS,MCNS などでは正常範囲であった。尿中 TCC では蛋白尿の高度例で検出され,特に FGS の全例で排泄増加がみられたが,MCNS では一例も検出されなかった。以上より腎疾患の一部では補体終末因子活性化の存在が示唆された。