肝疾患の抗補体因子について

森 藤 隆 夫・渡 辺 一 雄

西 間 木 友 衛・吉 田 浩・粕 川 禮 司

Anticomplementary activity of liver disease sera

Takao Morito, Kazuo Watanabe,
Tomoe Nishimagi, Hiroshi Yoshida and Reiji Kasukawa

IInd Department of Internal Medicine, Fukushima Medical College

【Summary】

Anticomplementary activity (ACA) of five liver disease sera with no hemolytic complement activity and one IgG-myeloma serum was examined before and after heating at 56°C for 30 min.

The ACA of IgG-myeloma serum was found only in the heated sample. However, the ACA of liver diseases sera was found in both unheated and heated samples.

Since ACA of liver disease sera was inhibited by rheumatoid arthritis serum but not by normal serum, IgG antibodies combined with some antigen or aggregated IgG were suspected as factors eliciting the ACA.

They might participate also in decreasing of hemolytic complement activity in the cold, which was frequently found in chronic liver disease sera.

Key words: hemolytic complement activity, anticomplementary activity, liver disease, rheumatoid factor

I. は じ め に

抗補体活性 (Anticomplementary activity, 以下 ACA) とは, 56°C, 30 分加熱非働化された血清が, モルモット補体 (guinea pig complement, 以下 GPC) を活性消費する現象である。この現象がみられる疾患として, 骨髄腫, SLE, 肝疾患, 梅毒, その他の慢性炎症疾患などが知られているが, ACA 因子としてその性状が明らかにされたと思われるものは, 骨髄腫血清中の加熱変性した M-蛋白¹⁾, SLE 血清中の DNA-抗 DNA 抗体結合物²⁾などごく限られたものであり, それ以外の疾患についての ACA 因子の性状はまだ明らかにされていない。

今回, 著者らは, 低補体価を示す肝疾患患者につき 56°C 加熱処理前の血清が示す ACA を測定し, さらに, RA 患者血清 (リウマチ因子) による ACA 抑制試験を行い, 本疾患の ACA 因子に補体結合性 IgG が関与するか否かを検討した。

II. 対 象 と 方 法

福島医大第2内科に入院し, 非働化血清の ACA が陽性である慢性肝疾患患者で, 血清の溶血補体価が 2.0 CH50 以下であった慢性肝炎3例, 肝硬変症2例を対象とした。同時に, 低補体価を示し, 肝生検で正常肝であることを確認した IgG 型骨髄腫例を比較対照として検索に加えた。上記患者血清は, 型どおり早朝空腹時に採血, 室温2時間放置後分離し, すみやかに以下の検索に

表 1 ACA of unheated and heated sera

				ACA. Dilution of serum, 1 to							
patient	diagnosis	treatment		1	2	4	8	16	32	64	128
1	S.K.	LC ¹	A ³	— ⁵	—	—	—	—	±	+	+
			B ⁴	—	—	—	—	±	+	+	+
2	S.A.	LC	A	—	—	—	—	—	±	+	+
			B	—	—	—	—	±	+	+	+
3	M.Y.	CH ²	A	—	—	—	—	±	+	+	+
			B	—	—	—	—	±	+	+	+
4	Y.K.	CH	A	—	—	—	—	±	+	+	+
			B	—	—	—	±	+	+	+	+
5	Y.K.	CH	A	—	—	—	±	+	+	+	+
			B	—	—	±	+	+	+	+	+
6	M.T.	IgG-myelome	A	±	+	+	+	+	+	+	+
			B	—	—	—	—	—	—	±	+

1 : Liver cirrhosis, 2 : Chronic hepatitis, 3 : Unheated, 4 : Heated,
5 : — (no hemolysis), ± (partial hemolysis), + (complete hemolysis)

使用した。

1. ACA の測定

詳細は既報³⁾で述べているので簡単に記す。倍々希釈した被検血清の 50 μ l と、あらかじめ 4.0 CH50/ml に調整した GPC の 50 μ l を microplate の各 well に入れよく混和し、4°C overnight 反応させた。その後、溶血補体価測定に用いる感作血球 50 μ l を加えて 37°C 20 分反応させ、溶血、不溶血を判定した。そして約 50% 不溶血を示す血清の最終希釈倍数値を ACA 力価とした。

2. RA 血清による ACA 抑制試験

Milgrom⁴⁾, Kasukawa⁵⁾ の方法に準じて行った。まず ACA 測定と同様に microplate 上で被検血清の倍々希釈系列を 2 列つくり、一方の希釈系列に非働化した健常人 AB 型血清 (N), 他方に非働化 RA 患者血清 (LFT 1,280 倍, ACA 陰性) のおのおの 5 倍希釈液 50 μ l を混和し、室温で 3 時間反応させた。その後 GPC を加え 4°C overnight 放置し、感作血球を加えて 37°C 20 分反応させ溶血、不溶血を判定した。そして RA 血清添加系列の ACA が、健常人血清添加系列の ACA より 3 管以上減弱している場合を ACA 抑制試験陽性とした。

III. 成 績

1. 肝疾患と骨髓腫血清の ACA (表 1)

同一肝疾患症例について未処理血清と非働化血清の ACA を測定すると、表 1, S.K. 例のごとく、未処理血清で 32 倍希釈まで、非働化血清で 16 倍希釈までと非加熱と加熱の両血清に ACA が認められた。他の 4 例の肝疾患においても未処理血清で 32~8 倍、非働化例で 16~4 倍の ACA が認められた。一方、IgG 型骨髓腫 (M.T.) 例においては未処理血清の ACA はまったく認められなかったが、非働化血清では 64 倍まで ACA が認められた。

2. RA 血清による ACA 抑制試験 (表 2)

肝疾患群では、未処理血清と非働化血清の両者に ACA が認められたことから両血清につき検討した。先の S.K. 例について具体的に示すと、未処理血清では健常人血清 (N) 添加で 32 倍希釈までみられた ACA 力価が、RA 血清 (RA) 添加により不溶血は 2 倍希釈までに減弱し、4 管の ACA 抑制がみられ、非働化血清でも 3 管の抑制がみられた。骨髓腫の非働化血清では、健常人血清添加では 64 倍までみられた ACA が、RA 血清添加でほぼ完全に抑制された。室温で分離された血清検体で溶血活性のみられない他の 4 例についても同様の検討を行い、

表 2 Inhibition test of ACA by RA serum

ACA sera	treatment	inhibiting serum	ACA, Dilution of serum, 1 to							
			1	2	4	8	16	32	64	128
S. K. (Liver cirrhosis)	unheated	N ¹⁾	—	—	—	—	—	±	+	+
		RA ²⁾	—	±	±	+	+	+	+	+
	heated	N	—	—	—	—	±	+	+	+
		RA	—	±	±	+	+	+	+	+
	heated	N	—	—	—	—	—	—	±	+
		RA	±	+	+	+	+	+	+	+

1 : Normal serum, 2 : Rheumatoid arthritis serum

表 3 Complement activity and ACA of liver disease sera inhibited by normal or rheumatoid sera

Sera (disease)	CH50		ACA, titer of unheated sera inhibited by serum of	
	RT	37°C	N	RA
Y. K. (CH)	<2.0	28.0	×8	0
M. Y. (CH)	<2.0	32.0	×16	×2
S. K. (LC)	<2.0	16.0	×32	×4
Y. K. (CH)	<2.0	<2.0	×16	×1
S. A. (LC)	<2.0	<2.0	×32	×2

その成績を表3にまとめた。5例中3例では、37°Cで血清分離を行うと、いずれも15 CH50以上の溶血活性が認められたが、他の2例では、室温分離例と同様に著明な溶血活性の低下が認められた。室温分離検体例では、いずれもACAが認められ、それは、S.K.例同様、いずれもRA血清加により抑制された。以上のことからACAをひきおこす因子は、補体結合性IgGであろうと考えられた。

IV. 考 案

肝疾患患者血清中にみられるACA因子として、immune complex (IC), cryoglobulin (Cryo), 変性 γ -globulin (aggr-gl)などが推定されている。ICについては、肝炎ウイルスに関連した種々の抗原、抗体系が知られるようになり、それにつれて、劇症肝炎や一部の急性・慢性肝炎、または、腎炎や関節炎などの、いわゆる、extra-hepatic syndromeの原因としてICが考えられるようになった^{6,7)}。Cryoについては、著者らは前報³⁾

にて、慢性肝疾患の低補体価例にCryo陽性例が多いこと、Cryo抽出後血清のACAが抽出前血清のACAより低下していること、そのCryoは、ICに類似した生物学的活性を有することなどを報告した。一方、aggr-glについては、慢性肝疾患では、高 γ -globulin血症や異常膠質反応が多くみられること、さらに、これらの血清がACA測定に際し非働化されることなどから、骨髄腫と同様、 γ -globulinが*in vitro*で変性重合した結果、ACAが出現するものと推定されている⁸⁾。

従来、ACAを測定する場合に血清を非働化しているが、その理由は、被検血清自身の溶血活性を消費させなければ、指標とする補体(GPC)の活性を判定することができないためと考えられる。しかし、分離直後から溶血活性を示さない血清なら、加熱処理を要せずにACAの測定が可能であり、 γ -globulinの加熱処理による変性の可能性も無視できよう。このような理由から、今回、肝疾患の低補体価未処理血清につき、ACAを検討した。

リウマチ因子は、抗原と結合したIgG抗体や、加熱

その他の処理で変性した IgG 分子の Fc 部分と結合する抗体で、通常の方法で検出されるのは IgM に属する。リウマチ因子とこれら IgG がまえもって結合すると、IgG と補体との結合性は抑制されることが知られており¹⁾、この性質を利用して、血清中の補体結合因子が IgG か否かを検索できる (RA による ACA 抑制試験)。すなわち、被検血清とリウマチ患者血清 (RA) をあらかじめ反応させてから ACA を測定すると、ACA 因子が IgG である場合には、RF が IgG の Fc 部分に結合することによって後から加えられた補体の結合が抑制されて、補体が残存するため、感作血球の溶血の促進—ACA の抑制—がみられる。Kasukawa¹⁾ は、IgG 型骨髓腫血清の ACA が RA 血清で抑制されること、本血清と RA 血清を寒天内で反応させると沈降線が生じ、この沈降線は 63°C 加熱変性したヒト Fraction II と融合することを認め、骨髓腫血清中の ACA 因子は、加熱で変性した IgG 分子であることを明らかにしている。

今回、著者らは、溶血活性をもたない慢性肝疾患の未処理血清と非働化血清の ACA を測定し、さらに、RA 血清による ACA 抑制試験を行った結果、1. 低補体価を呈する肝疾患では、未処理血清でも ACA が認められること、2. 骨髓腫血清では従来いわれているごとく、加熱非働化されてからはじめて ACA が出現すること、3. 両疾患の ACA は RA 血清で抑制されること、などの成績を得た。

慢性肝疾患では polyclonal gammopathy, 異常膠質反応、自己抗体、異種抗体などが認められ、これら不安定な血清蛋白が血清分離後の凍結、融解、加熱などの処理でなんらかの影響を受けることは十分予想されよう。しかし、今回の検索に用いた肝疾患血清は分離直後の血清であり、加熱処理も加えられていない。それにもかかわらず ACA が認められ、それは RA 血清で抑制されたことは、肝疾患では血清分離直後から、たんに変性重合した IgG 分子であれ、抗原と結合した IgG 抗体であれ、補体結合性 IgG 分子が存在していることを示すものと考えられた。しかし、これら慢性肝疾患が、流血中においても補体結合性 IgG により低補体価の状態にあるのではないことは、血漿や 37°C 分離血清が正常域に近い溶血活性を示すことから明らかであり、採取された血液が *in vitro* で凝固する間に、IgG 分子になんらかの変化が生じ、補体結合性を得るようになったと考えるべきであろう。以前に著者⁹⁾らは、室温で分離した血清の補体価が低下しているにもかかわらず、血漿の補体

価が正常域にある症例でも、採血後血清を 37°C で分離した場合には、補体価の低下がみられないことを報告した。この現象の解釈として低温での補体結合性をもつ IgG 抗体がそれに類似した物質があるために、*in vitro* で補体が活性消費された結果、低補体価になると解釈した。そして、通常の室温でも 4°C 前後の低温に比べれば、程度は軽いが同様の機序で分離血清が低補体価を示すと推定された。このような考えから、肝疾患における被検血清と GPC の反応における温度条件を変えた場合の ACA を観察し、メルカプトエタノール処理前後の ACA の変化、cryo の性状、IC の有無などの成績^{10,11)}を発表してきたが、低補体価群と正常補体価群との間に、いずれも明確な差異は見い出せなかった。

今回対象とした低補体価を示した慢性肝疾患例では、全例において、未処理血清に ACA が認められ、その ACA は、IgG 型骨髓腫と同様、RA 血清により抑制される性質のものであった。これらの成績は、肝疾患の ACA 因子が補体結合性 IgG であることを示唆するものである。また、この 5 例中 3 例では、室温分離血清が低補体価を示すものの、37°C で分離した場合には、明らかな溶血活性が認められ、IgG 分子が 37°C より 4°C で CI を結合しやすいこと¹²⁾を考慮するなら、低温下で溶血補体価が減弱する現象にもこの補体結合性 IgG が、強く関与することが推察される。

一方、37°C 分離血清でも溶血活性がみられない症例については、上記 IgG 分子がより不安定であるため、流血中から *in vitro* に採り出されることのみで変性重合する可能性も推定されたが、血漿でも同様の低下がみられることから、骨髓腫例 (8) 同様、生体内ですでに変性重合し、補体活性化をひきおこしている可能性も考えられた。さらに、immune complex による活性化などの免疫学的機序の他に、IgG 以外の ACA 因子の関与、補体成分産生の低下などを考慮しての検索が必要であろうと思われる。

V. ま と め

低補体価を示す慢性肝疾患について、加熱処理前後血清の抗補体活性 (ACA) を測定し、さらに、RA 血清による ACA 抑制試験を行い、以下の成績を得た。

1. 肝疾患では、未処理と非働化の両血清に ACA が認められた。
2. この ACA が RA 血清により抑制されたことから、本因子は、補体結合性 IgG 分子と思われた。

文 献

- 1) Kasukawa, R., Yoshida, T. and Milgrom, F. : Inhibition of complement mediated hemolysis by rheumatoid arthritis sera studied in agarose gel. *Int. Arch. Allergy*, 38 : 168~174, 1970.
 - 2) 天野哲基 : 全身性エリテマトーデスの抗補体作用に関する研究, 第2編基礎的考察. *岡山医誌*, 90 : 527~535, 1978.
 - 3) 森藤隆夫・鈴木秀幸・西間木友衛・佐藤幹夫・大原守弘・正木盛夫・村井隆夫・吉田 浩・粕川禮司・吉田赳夫 : 肝疾患の抗補体活性に関する研究. *肝臓*, 19 : 362~370, 1978.
 - 4) Milgrom, F. & Schultz, R.T. : Serodiagnosis of rheumatoid arthritis based on inhibition of anticomplementariness of denatured Fraction II. *Int. Arch. Allergy*, 27 : 338~345, 1965.
 - 5) Kasukawa, R., Yoshida, H., Yoshida, T. & Milgrom, F. : Reaction of G-myeloma sera with rheumatoid arthritis sera. *Int. Arch. Allergy*, 38 : 590~597, 1970.
 - 6) Shulman, N.R. & Barker, L.F. : Virus-like antigen, antibody and antigen-antibody complexes in hepatitis measured by complement fixation. *Science*, 165 : 304~306, 1969.
 - 7) Alpert, E., Isselbacher, K.J. and Schur, P.H. : The pathogenesis of arthritis associated with viral hepatitis. *New Eng. J. Med.*, 285 : 185~189, 1971.
 - 8) 吉田 浩・森藤隆夫・亀田貞彦・粕川禮司・吉田赳夫 : 各種疾患患者血清における抗補体活性. *臨床免疫*, 8 : 311~320, 1976.
 - 9) 西間木友衛・森藤隆夫・吉田 浩・粕川禮司・吉田赳夫 : 寒天内溶血反応による補体の研究. *臨床免疫*, 8 : 939~943, 1976.
 - 10) 森藤隆夫・吉田 浩・粕川禮司・吉田赳夫 : 抗補体に関する研究. *臨床免疫*, 8 : 945~950, 1976.
 - 11) 森藤隆夫・佐藤幹夫・鈴木秀幸・吉田 浩・粕川禮司・吉田赳夫 : 肝疾患患者血清中の immune complex について. *肝臓*, 20 : 559~565, 1979.
 - 12) Tamura, N. & Nelson, N.R. : The purification and reactivity of the first component of complement from guinea pig, human and canine sera. *J. Immunology*, 101 : 1333~1345, 1968.
-