

モルモット腹腔細胞の Fc receptor を利用した 血清中免疫複合体の定量

第 1 編

免疫複合体測定方法の確立

岡山大学医学部第 3 内科学教室 (主任: 太田善介教授)

齊 藤 良 仁

(昭和58年 3 月19日受稿)

Key words: immune complex,
guinea pig peritoneal exudate cell,
Fc receptor

緒 言

生体は抗原への曝露に対してその抗原に特異的な抗体を産生し、免疫複合体 (immune complex; IC) の形成と、それに伴う抗原の中和および排除を行い、異物としての抗原を処理する。このようにして形成された IC が免疫応答調節に関与している可能性も示されているが^{1,2)}、ある条件下では生体にとって不利に作用することも知られている。その代表的なものとして IC により臓器障害を惹起した各種免疫複合体病が挙げられる³⁾。これらの疾患の発症過程における IC の重要性が明らかにされているが、これは組織および体液中の IC を検出する方法のめざましい進歩に負うところが大きい。体液中の IC を非特異的に検出する方法の多くは、IC の免疫生物学的作用を利用している。これらは IC と体液中で既に結合している補体成分を検出することによって IC を測定する方法、IC が *in vitro* で新しく添加した補体成分と反応し得ることを利用する方法、リウマチ因子等の anti-globulin による方法、抗体の Fc 部分の構造上、機能上の変化により Fc receptor または Staphylococcal Protein A との反応性が変わることを利用する方法の 4 つに大別される⁴⁾。そしてこれらはそれぞれ検出する IC の補体結合性、

抗原抗体比、検出の感度、測定に干渉する物質が異なり、それぞれの方法に関して長所、短所も研究されている⁴⁾。現在は Clq, Conglutinin, Raji 細胞、単クローン性リウマチ因子を利用する方法等が一般的に用いられている⁵⁾。しかしながら抗体の Fc 部分と、これに特異的に結合する Fc receptor または Protein A との反応性を利用する方法は、それぞれの方法に特有な欠点⁶⁻¹⁰⁾のために一般的な方法とはなっていない。筆者はこれらの欠点を出来るだけ取り除くよう努め、モルモット腹腔細胞の Fc receptor を利用して可溶性 IC を測定する簡便な方法を確立したので、その方法論および測定における最適な条件を中心に報告する。

材料および方法

1. 抗ウシ血清アルブミン (BSA) 家兎 IgG 抗体の作製

結晶 BSA (Sigma) を滅菌生理食塩水に 1% の濃度に溶解し、等量の complete Freund's adjuvand (Difco) と混和して抗原液のエマルジョンを作製した。この抗原液 4 ml を家兎の指掌部皮下および背筋に 0.1 ml ずつ分割して注射し、1 週後および 2 週後の 2 回、2 ml ずつを背筋に注射して追加免疫し、最初の注射から 3 週後に耳静脈より採血した。血清を遠沈分離し、

56°C30分間非働化した後、33.3%硫酸法を2回繰返して γ -globulin分画を得た。カラム(内径1.3cm)にDEAE Sephadex A-50 (Pharmacia Fine Chemicals)を19cmの高さに詰め、3mlの γ -globulin分画を重層し、トリス塩酸緩衝液(0.05M, pH 7.4)にて25ml/hrの速度で流し、IgG分画を得た。この抗BSA IgG抗体は、0.45% Agarose (Sigma)板で行ったOuchtarlony法で、BSAと沈降線を形成し、種々の稀釈のヒト血清および卵白アルブミン(OVA)溶液とは反応しなかった。抗体は分注して-70°Cで凍結保存した。

2. ^{125}I によるBSAの標識

chloramine T法¹¹⁾によりBSAに ^{125}I を標識した。即ちBSAの0.1% PBS (0.15M, pH 7.2)溶液10 μl と50 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ の ^{125}I (Amersham) 10 μl を混和し、PBSに0.5mg/mlの濃度に溶解したchloramine T (和光純薬) 10 μl を加え、30秒間混和反応させた後、0.62mg/mlのsodium metabisulfate (半井化学)を含むPBS 100 μl を加えて反応を停止した。次いでSephadex G-25 (Pharmacia Fine Chemicals)のカラム(内径1.3cm, 高さ20cm)によりvoid volume分画として流出する標識BSAを、結合していない ^{125}I から分画し、4°Cで保存した。

3. 標識BSAと抗BSA抗体による標識ICの作製および抗原抗体最適比の決定

標識BSAおよび抗BSA家兎IgGをそれぞれ0.02% NaN₃ (石津製薬)と0.3% OVA (Sigma)を含むPBSで稀釈した液を作製し、等量を混和して37°C60分間、さらに4°C24時間反応させたものを標識ICとして使用した。

50ng/mlの標識BSAと2~2¹⁰倍に稀釈した抗BSA IgGにより作製した標識ICのそれぞれに、等量の10% polyethylene glycol 6,000 (PEG, 和光純薬) PBS溶液を加えた。5分後に4°Cで2,000G, 20分間遠沈し、沈渣の放射活性をAuto Well Gamma System (Aloka, ARC 500)により測定した。16倍稀釈の抗体で作製した標識ICにおいて最高の沈降を示したため、この比率のICを最適比とした。

4. 標識ICの細胞への結合の測定

Epfendorf tube (Beckman, 1.8ml)に各種

細胞浮遊液100 μl と標識IC 100 μl を加えて反応させ、microfuge (Beckman)により10,000G 1分間遠沈して上清を吸引除去し、細胞に結合した放射活性を測定して結合率を算定した。全てduplicateで行い、平均の数値を測定値とした。

5. 標識ICと最も結合率の高い細胞の選択

ヒトBリンパ球由来の培養細胞であるRaji細胞、ハムスターの単球由来の培養細胞であるSP(以上岡山大学第2内科の御好意により供与)、ヒト単球由来の培養細胞であるJ-111(大日本製薬)、およびモルモット腹腔細胞(Peritoneal exudate cell; PEC)について標識ICの結合率を測定した。

PECはモルモット(350~450g)の腹腔内に滅菌流動パラフィン10mlを注射し、4日後に断頭脱血し、腹腔をmedium RPMI 1640(Gibco)で洗浄して採取した。細胞をmediumにより2回洗浄し、Ficoll-Conray液(比重1.078)に重層して400G 20分間遠沈し、赤血球と多核白血球を除去した。PECはさらに3回洗浄して、0.02% NaN₃と0.3% OVAを含むmediumに浮遊して細胞数を調整した。PECは非特異的エステラーゼ染色¹²⁾(エステラーゼ染色キット、武藤化学薬品)により99%以上が強陽性であった。

それぞれの細胞をmediumに5 $\times 10^6$ /mlの濃度に浮遊し、その100 μl と、可溶性にするために抗原3倍過剰で作製した標識IC 100 μl (約20,000 CPM)を4°Cで90分間振盪しつつ反応させ、結合率を測定した。

6. 熱変性ヒトIgG (Agg IgG)の作製

Cohnのfraction II (Sigma)をPBSに10mg/mlに溶解し、63°C20分間の熱処理を行い、2,000Gで30分間遠沈してその上清を使用した。0.02% NaN₃と0.3% OVAを含むPBSにより必要な濃度に稀釈した。

結 果

1. 細胞の選択

標識ICと各種細胞の結合率を測定した結果、Raji細胞、SP、J-111、PECにはそれぞれ加えた放射活性の2.0%、25.4%、18.2%、56.0%が結合した。PECへの結合率が最も高く、本法にはPECを選択した。

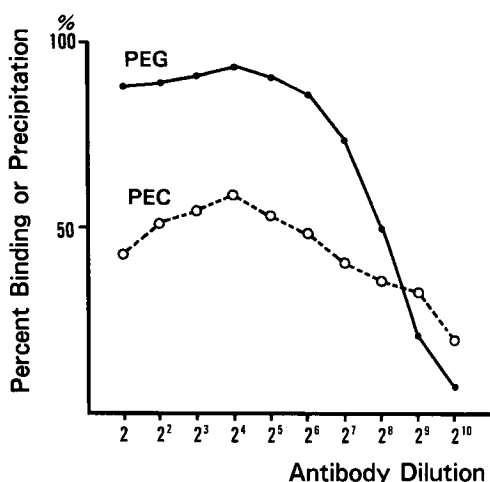


Fig. 1 Polyethylene Glycol Precipitation and Binding to PEC of ¹²⁵I BSA-antiBSA Immune Complex Formed at Various Antigen Antibody Ratio.

の実験には可溶性 IC として抗原 3 倍過剰, 即ち 50ng/ml の標識 BSA に対して 48 倍稀釈抗 BSA 抗体を等量加えて作製したものを使用した。抗原 3 倍過剰の標識 IC の PEC への結合率は 48 % であり, これは最適比で作製した IC の 86% に相当する。

3. PEC と標識 IC の結合に対する Agg IgG および正常ヒト血清の影響

PEC と標識 IC を反応させる際に, Agg IgG または正常ヒト血清を同時に加えると, Agg IgG と血清のいずれによっても同様の抑制が起こった (Fig. 2.a)。一方 PEC を Agg IgG またはヒト血清で 4 °C 30 分間前処置した後 3 回洗浄し, その後に標識 IC を加えたところ, Agg IgG で前処置した場合には PEC への標識 IC 結合の抑制が起こったのに対し, 正常ヒト血清ではほとんど抑制されなかった (Fig. 2. b)。即ちヒト血

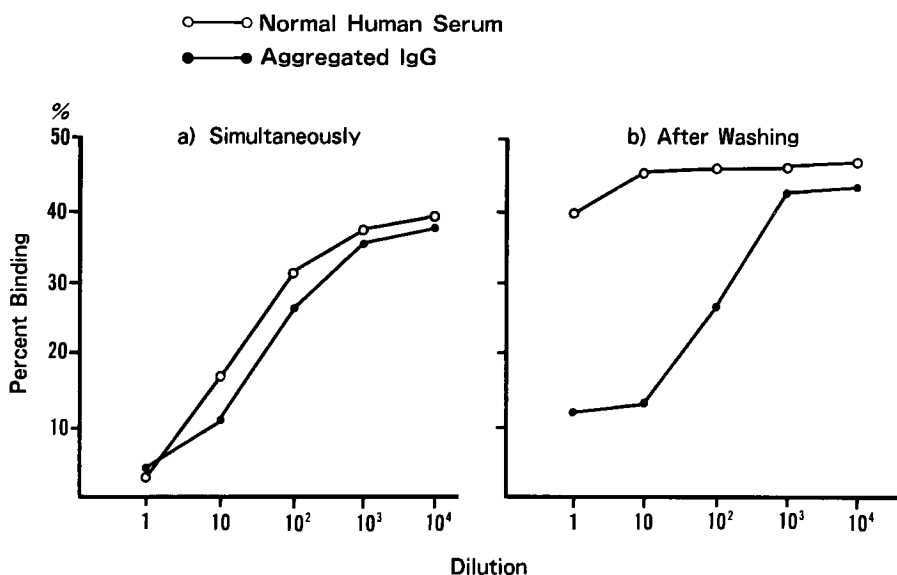


Fig. 2 The Difference of Binding Activity to Surface of PEC between Aggregated and Monomeric IgG.

2. PEC と各種抗原抗体比で作製した標識 IC の結合率

50ng/ml の標識 BSA と種々の抗 BSA 抗体により作製した標識 IC と PEC の結合率は, PEG による沈降の場合と同じく, 16 倍稀釈の抗体による IC が最高の結合を示した (Fig. 1)。以後

清中の monomeric IgG と Agg IgG はいずれも PEC と結合するが, その親和性が異なり, 洗浄によって monomeric IgG を除去できることが判明した。また Agg IgG による抑制は濃度依存的に起こっており, monomeric IgG が混在しても前処置 PEC を洗浄することによ

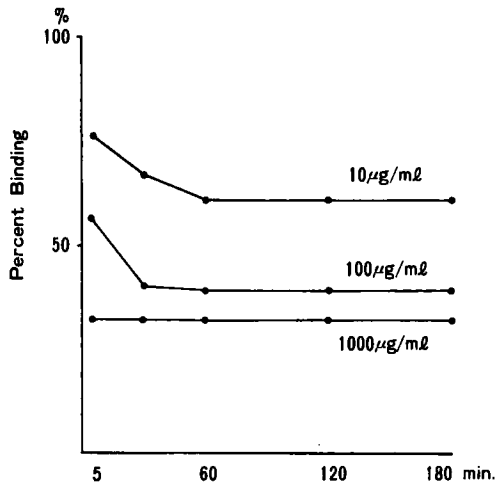


Fig. 3 Optimal Incubation Time for Binding of Aggregated IgG to PEC.

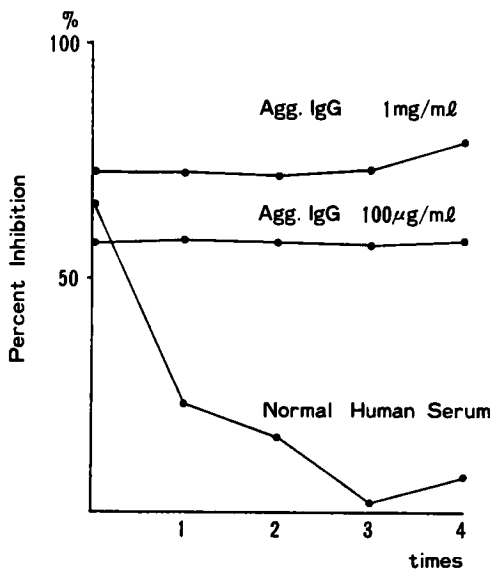


Fig. 4 Effect of Washing on Blocking Activity by Normal Human Serum or Aggregated IgG.

て未知の濃度の Agg IgG を定量できることが明らかになった。

さらに monomeric IgG が、結合した PEC から洗浄によって除かれることを直接的に証明するために、 ^{125}I で標識した IgG を PEC と 4°C 60 分間反応させた後 3 回洗浄し、PEC に残存した放射活性を測定した。その結果、わずか 1.3

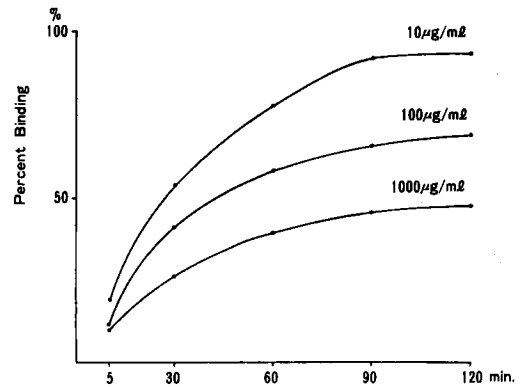


Fig. 5 Kinetic Curve of Labelled Immune Complex Binding to PEC.

% が残存しているのみであり、これは PEC に標識 BSA のみを加え遠沈後上清を捨てた対照、あるいは細胞を入れず標識 IgG のみを入れて吸引除去した対照と差が無く、monomeric IgG が洗浄により除かれていることが明らかになった。

4. 本法実施上の最適条件の検討

実際に臨床応用の段階まで進めるために、PEC と種々の濃度の Agg IgG または被検血清を反応させた後、細胞を洗浄し、それに標識 IC を加えて PEC への結合率を測定する系において、反応時間、洗浄回数等について最適条件の検討を行った。

a) PEC と被検液の反応時間の検討

PEC を Agg IgG で前処置する場合の最適反応時間を決定するために、10, 100, および 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度の Agg IgG を PEC と種々の時間反応させ、3 回洗浄後、これに標識 IC を加えてその結合を測定した。Fig. 3 に示す如く、高濃度の Agg IgG で PEC を処理するほど標識 IC の PEC への結合の抑制に必要な反応時間は短かく、低濃度でも 60 分間で最大の抑制が起こった。そこで PEC と被検液との最適反応時間を 60 分間とした。

b) 被検液処理後の細胞洗浄回数

被検血清処理後の PEC を洗浄する回数につき検討した (Fig. 4)。Agg IgG または正常ヒト血清と PEC を反応させた後、0.02% NaN_3 、0.3% OVA を含む medium RPMI 1640 で 1 ~ 4 回洗浄し、それに標識 IC を加えて結合率を

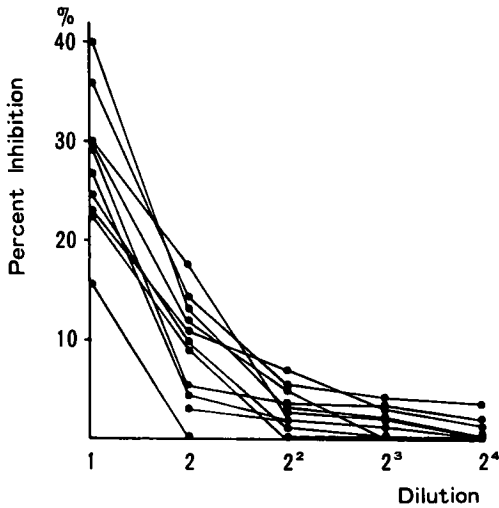


Fig. 6 Effect of Normal Human Serum Dilution of Labelled Immune Complex Binding.

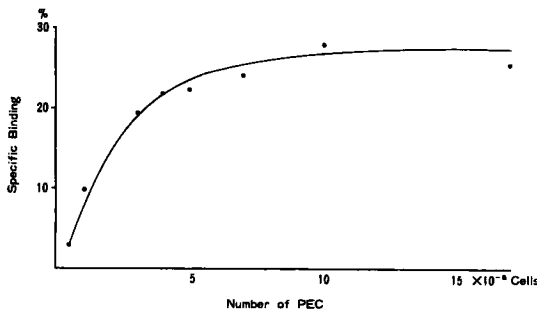


Fig. 7 Specific Binding of Labelled Immune Complex in Varying Cell Numbers.

測定し、これらの処置による標識 IC 結合の変動について検討した。その結果、Agg IgG は洗浄回数に関係なく標識 IC の結合を抑制したが、正常人血清は 3 回の洗浄により標識 IC の結合を抑制しなくなり、血清中の monomeric IgG は 3 回洗浄することによって除去できることが判明したので、それ以後洗浄は 3 回とした。

異好抗体としての抗 BSA 抗体が被検液中に含まれている可能性があるため、その影響を検討した。即ち、PEC を抗 BSA IgG で処理し、3 回洗浄後標識 IC の結合率を測定したが、何ら影響は見られなかった。

c) 被検液処理 PEC と標識 IC との最適反応時間

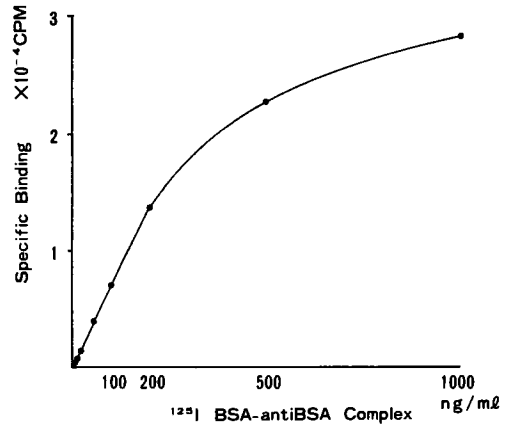


Fig. 8 Specific Binding in Varying Concentration of Labelled Immune Complex.

被検液と 60 分間反応させた PEC を洗浄した後、標識 IC を加え、反応時間と標識 IC の結合の割合について検討した。その結果、Fig. 5 のように 90 分間の反応で結合率はほぼプラトーに達したので、以後は反応時間を 90 分間とした。

なお、標識 IC が PEC と結合していないにもかかわらず非特異的に沈渣に含まれる可能性があるため、そこで PEC 浮遊液に標識 BSA のみを加えて遠沈した沈渣の放射活性と、標識 IC のみを試験管に入れ、吸引除去後の放射活性を比較しても全く差はみられず、この方法では特異的に結合していない標識 IC が沈渣に含まれる可能性は否定された。

d) 被検血清の最適稀釈度

血清中の monomeric IgG を始めとした種々の物質が PEC と反応するので、本法に対する影響を無視する血清稀釈度を求めた。正常人血清を適度に稀釈して、それにより PEC を処理し、各稀釈度における標識 IC と PEC の結合への抑制効果を測定した (Fig. 6)。その結果、2 倍稀釈までは抑制を起こす血清が存在したので、以後被検血清は本法への影響を無視し得る 5 倍稀釈を用いた。

e) 最適細胞数

PEC と標識 IC の結合を抑制する Agg IgG の濃度と抑制率の関係を示す濃度依存曲線を得るために最適な PEC の細胞数を検討した。そのために種々の細胞数の PEC に対する標識 IC

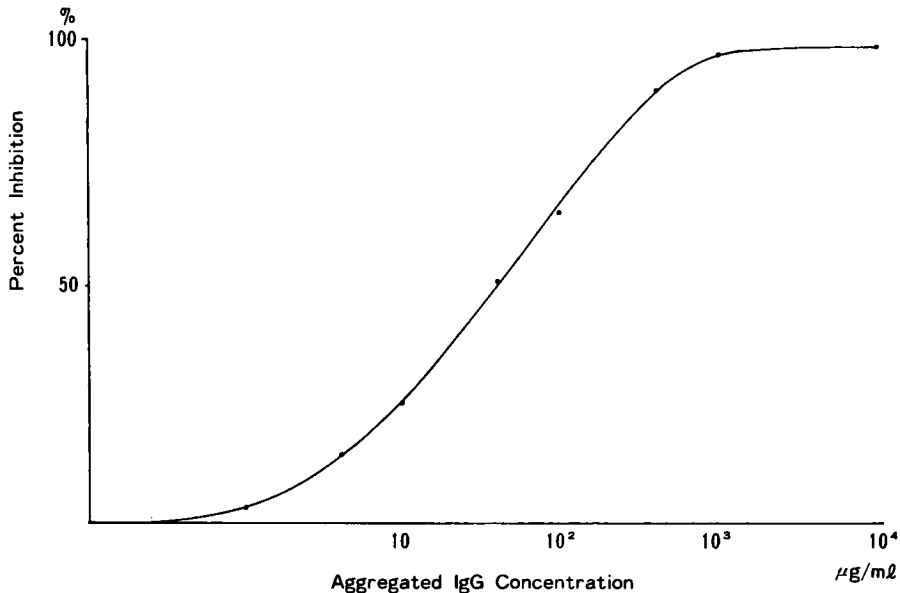


Fig. 9 Binding Inhibition Curve with Varying Amounts of Aggregated IgG

の特異的結合を測定した。即ち、種々の細胞数の PEC 浮遊液 100 μ l に、標識 IC 100 μ l を加えて PEC への結合値を測定した。さらに十分に高濃度の Agg IgG (10mg/ml) を添加した場合に認められる標識 IC の PEC への結合値を求め、これを非特異的結合と考えた。上で求めた数値から、この非特異的結合値を差引いた数値を特異的結合としてグラフを作製した (Fig. 7)。その結果、細胞数が 1×10^5 から 4×10^5 の間ではほぼ直線が得られ、これより中央の 2.5×10^5 を至適細胞数と決定した。

f) 標識 IC の添加至適量

上記の濃度依存曲線を得るために、次に至適な標識 IC の濃度を検討した。抗原 3 倍過剰の標識 IC を、標識 BSA が 5~1,000 ng/ml になるように調整し、それぞれの 100 μ l を 2.5×10^6 /ml の PEC 浮遊液 100 μ l と反応させて、特異的結合を測定した (Fig. 8)。200 ng/ml 以下の広い範囲で直線となったため、中央付近の 50 ng/ml の濃度を採用した。

5. 標準曲線の作製

Agg IgG の各濃度と、それによる PEC と標識 IC の結合を抑制する率の濃度依存曲線、即

ち IC 様物質に対する標準曲線をこれまでに決定した条件で作製した (Fig. 9)。条件をまとめると、 2.5×10^6 /ml の PEC 100 μ l と各種濃度の Agg IgG 100 μ l ずつを混和し、4 $^{\circ}$ C 60 分間振盪しつつ反応させ、medium により 3 回洗浄し、標識 BSA を 50 ng/ml 含む抗原 3 倍過剰の標識 IC 100 μ l を加えて 4 $^{\circ}$ C にて 90 分間振盪しつつ反応させた。反応終了後、10,000 G 1 分間遠沈して沈渣の放射活性を測定した。標準曲線は 4 μ g/ml から 400 μ g/ml までが直線となり、1 μ g/ml から 1,000 μ g/ml までの Agg IgG の PEC 結合能に相当する結合能をもった IC の測定が可能であることが判明した。

全操作終了時の PEC は trypan blue dye exclusion test にて 95% 以上の生存率を示した。

6. in vitro で作製した IC による標識 IC 結合阻害

抗原 3 倍過剰で作製した BSA と抗 BSA 抗体による IC を用いて PEC と標識 IC の結合抑制を検討したところ、濃度依存的に抑制効果の増強が見られ、IC のモデルとしての Agg IgG だけではなく、IC そのものの測定もできることが明らかになった (Fig. 10)。

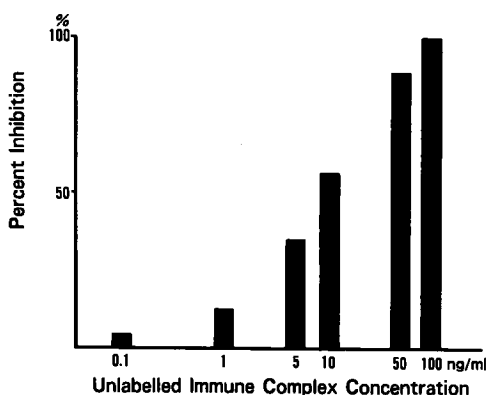


Fig. 10 Binding Inhibition Activity with Varying Amounts of Unlabelled Immune Complexes.

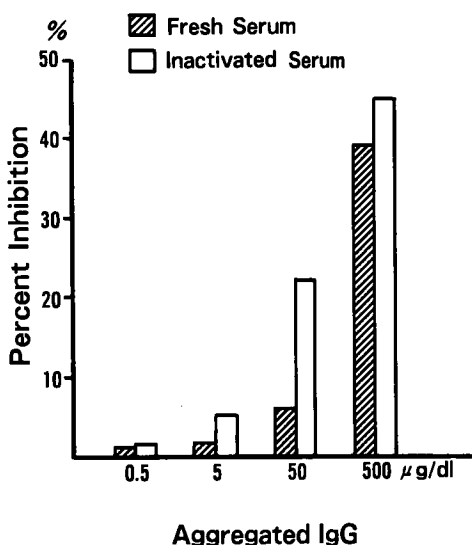


Fig. 11 Effect of Complement on Inhibitory Activity of Aggregated IgG.

7. 測定系への補体の影響

補体の影響を検討するために、補体処理 Agg IgG と未処理 Agg IgG による標識 IC の PEC 結合への抑制効果を比較した (Fig. 11)。即ち、最終濃度 0.5µg/ml から 500µg/ml までの Agg IgG を、5 倍希釈した等量の新鮮血清または非働化血清と 37°C45 分間反応させ、それぞれの 100 µl による抑制効果を比較した。図のように補体を作用させた Agg IgG は Agg IgG のみに比べて標識 IC の PEC への結合を抑制する作用が減

少していた。両者による抑制効果の差は 5 ~ 50 µg/ml において著明であった。これより Agg IgG に補体が作用すると、PEC と標識 IC の結合を抑制する程度が減少することが判明した。即ち本法が主に補体を結合しない IC を検出していることが明らかになった。

考 察

マクロファージの細胞表面には IgG を結合する構造物が存在することは周知の事実であり、IgG の Fc 部分と結合するため Fc receptor と称されている¹³⁾。IgG が抗原と反応するか、または凝集することによって、IgG と Fc receptor の結合はより強固となり、解離に要する時間も長くなる¹⁴⁾。本法では可溶性 IC が PEC に結合する事実を利用したものであるが、Agg IgG または標識 IC を補体で処理しなくても強く結合するので、この結合は IgG の Fc 部分と PEC の Fc receptor の反応によるものと考えられる。IgG の Fc 部分を利用する IC の測定方法としては、これまでに血小板凝集法¹⁵⁾、Staphylococcal Protein A 結合法⁷⁾抗体依存性細胞介在性細胞傷害 (ADCC) 抑制法¹⁶⁾、リンパ球による Fc ロゼット形成抑制法⁸⁾、マクロファージ貪食抑制法¹⁷⁾等があるが、いずれも各方法に特有な欠点を有するために一般的な方法とはなっていない。即ち、血小板凝集法では monomeric IgG、RF、Clq、抗血小板抗体、myxovirus による干渉を受け、しかも血小板の提供者により感度の差が著しい⁶⁾。Protein A は IgG₁、IgG₂、IgG₄ の Fc 部分と結合するが、IgG₃ とは結合しない。また Protein A と IC の結合には monomeric IgG の干渉が著しく大きく、そのため測定にあたってはゲル濾過により被検血清から monomeric IgG を除いておく必要があり⁷⁾、さらに RF による干渉もある¹⁸⁾ため、Protein A 法も使用し難い。ADCC 反応は標的細胞に特異的に結合した抗体の Fc 部分に K 細胞が Fc receptor を介して結合し、標的細胞を傷害することによって起こる。この反応系に IC が介在すると K 細胞の作用が抑えられ、ADCC 反応は抑制される。従って ADCC の抑制程度によっても IC の定量が可能であるが、この方法も mo-

nomeric IgG の影響が大きいために被検血清の γ -globulin 濃度を一定にする必要があり¹⁰⁾, K 細胞に作用する抗リンパ球抗体が存在する血清の検討は無意味である⁴⁾. リンパ球による Fc ロゼット形成抑制法はリンパ球が抗体を感作した赤血球とロゼットを形成する反応を IC が抑制することを利用して IC を半定量する方法であるが, やはり monomeric IgG の影響が大きく, また抗リンパ球抗体の干渉があるために膠原病患者, 経産婦, 輸血の既往のある例では抗リンパ球抗体の存在が問題となる. さらに RF 陽性の被検血清により感作赤血球同志の凝集が起こって判定不能となることがある⁸⁾. マクロファージ貪食抑制法では RF が存在すると抑制ではなく逆に亢進が起こってしまうために RF 陽性血清の測定ができない⁹⁾. 前述の如く, 本法はこれらの欠点を補う実用的な IC 測定法であり, 測定の方法についての検討の結果を示した.

標識 BSA と抗 BSA 抗体の標識 IC は, その抗原抗体比により PEC への結合率が異なり, Fig. 1 の如く最大の結合は最適比のところで得られる. このことから本法では最適比の付近の IC を検出しているものと考えられる. Fc receptor を利用する他の方法でも同様の結果が得られており¹⁵⁾, 最適比付近の IC と強く結合するのは Fc receptor の一般的な性質である.

モルモットマクロファージの Fc receptor は monomeric な状態のヒト IgG に対しては, IgG₁, IgG₃ をよく結合し, IgG₂ とは結合が弱く, IgG₄ とは結合しないが, IC のモデルとしての Agg IgG に対しては全ての Subclass と反応する¹⁹⁾. 従って Protein A は IgG₃ と反応せず²⁰⁾, 補体の第 1 成分は IgG₄ と反応しない²¹⁾ので, Protein A 法および補体を利用する Clq 法²²⁾, Conglutinin 法²³⁾, Raji 細胞法²⁴⁾等に対して本法のより優れた点と考えられる.

反応はすべて 4°C で行ない, また medium に NaN₃ を加えて PEC による IC の貪食を防止した.

本法で用いる標識 IC は, その代用として一般に用いられている熱変性 IgG ではなく, in vitro で作製した BSA- 抗 BSA を使用した, IgG を熱変性させた場合, 変性が生じる割合と

変性した IgG の分子量は一定せず, そのため標準化するには熱変性 IgG のゲル濾過を行う必要がある. 本法では標識 BSA と抗 BSA IgG を一定の比率で反応させるため, 一定の標識 IC が得られ, 安定した成績を得ることができた. さらに抗原を標識しているため IgG の変性を考慮する必要がない.

可溶性の IC は抗原 3 倍過剰で作製した, Arend ら²⁵⁾はヒトアルブミンと IgG 抗体の IC は IgG 抗体が 3 分子以上含まれている IC のみがマクロファージに結合し, 抗原 3 倍過剰で作製した IC の 20~25% がこの大きさに相当したと報告している. 今回の実験では, 抗原 3 倍過剰の IC の 46% が結合した.

種々の方法で問題になっている monomeric IgG の干渉について考えてみると, 本法では Fig. 4 のように PEC を 3 回洗浄することによって monomeric IgG を除去することができた. さらにこの操作により, 測定に影響を及ぼす恐れのある被検液中の他の因子, 例えば BSA に対する自然抗体や, 後で加える標識 IC と反応する RF も除くことができ, より特異性の高い測定方法となっている.

被検血清中には補体成分が含まれるため, 補体の関与も考える必要がある. マクロファージの表面には C3 receptor と呼ばれ, 補体の第 3 成分と結合する構造物が存在する²⁶⁾. 従ってマクロファージは IC と反応した補体を介して可溶性 IC を結合することができ, この IC により Fc receptor と別の IC の反応が立体阻害を受けることが考えられる. 一方, IgG 分子の Fc 部分のうち, 補体第 1 成分との反応は CH² domain²⁷⁾, Fc receptor への結合は CH³ domain²⁸⁾ を介して行なわれるが, CH² domain に補体が結合した IgG 分子の Fc 部分は Fc receptor に結合することはできない²⁹⁾. Arend ら²⁵⁾はヒトアルブミンと抗ヒトアルブミン抗体との IC を用いてマクロファージと IC との結合に補体の影響はないと報告しているが, 今回の成績では補体で処理した Agg IgG は未処理の Agg IgG に比較して PEC と標識 IC の結合に対する抑制効果が減弱していた. 補体処理 Agg IgG による抑制は Fc receptor に対する立

体阻害のためと考えられるので、この抑制効果が少ないということは C3 receptor と Fc receptor の距離が比較的遠いか、または C3 receptor の数が少ないためと考えられる。これより主な抑制効果は Fc receptor を介するものであり、本法は PEC の Fc receptor により主に補体を結合していない IC を検出していることが明らかになった。

結 語

Agg IgG または IC が PEC と標識 IC の結合を抑制することを利用して IC の定量を行なう方法を確立し、実施上の諸条件について検討し、IgG の Fc 部分を利用する他の方法論と比較してみた。

2.5×10^6 /ml の PEC 浮遊液 $100 \mu\text{l}$ に対して 50 ng/ml の抗原を含む抗原 3 倍過剰の ^{125}I 標識 BSA-抗 BSA IgG による標識 IC $100 \mu\text{l}$ を使用

した。被検液は 5 倍稀釈し、 $100 \mu\text{l}$ を使用した。PEC と被検液の反応は 4°C で 60 分間とし、3 回洗浄後、標識 IC を加えて 4°C で 90 分間反応させた。この方法において、Agg IgG による抑制が補体の存在により減少することから、主な反応は PEC の Fc receptor を介したものであることが明らかになった。本法は IgG の Fc 部分と Fc receptor の反応を利用する他の方法に比較して血液中の干渉物質の影響を受けにくい方法であり、臨床的にも応用価値の高いものと考えられる。

稿を終るにあたり御指導と御校閲を賜った恩師大藤眞学長ならびに太田善介教授に深甚の謝意を表します。また、終始多大の御指導と御援助をいただいた矢野啓介博士に深謝いたします。

なお、本論文の主旨の一部は、第 31 回日本アレルギー学会(1981年、8月、宇都宮市)において発表した。

文 献

1. Carvalho, E.M., Davis, J.S. and Horwitz, D.: Conditions required for Fc dependent Immune complex enhancement of antigen specific lymphocyte blastogenesis. *J. Immunol.* **124**, 565—570, 1980.
2. Oderbarnscheidt, J. and Kölsch, E.: Direct blockade of antigen reactive B lymphocytes by immune complexes. An 'off' signal for precursors of IgM producing cells provided by the linkage of antigen and Fc receptors. *Immunology* **35**, 151—157, 1978.
3. Cochrane, C.G. and Koffler, D.: Immune complex disease in experimental animals and man. *Adv. Immunol.* **16**, 185—264, 1973.
4. Theofilopoulos, A.N. and Dixon, F.J.: The biology and detection of immune complexes. *Adv. Immunol.* **28**, 89—220, 1979.
5. Border, W.A.: Immune complex detection in glomerular diseases. *Nephron* **24**, 105—113, 1979.
6. Myllylä, G.: Aggregation of human blood platelets by immune complexes in the sedimentation pattern test. *Scand. J. Haematol. (suppl.)* **19**, 1—56, 1973.
7. Hällgren, R. and Wide, L.: Detection of circulating IgG aggregates and immune complexes using ^{125}I protein A from *Staphylococcus aureus*. *Ann. Rheum. Dis.* **35**, 306—313, 1976.
8. Morito, T., Tanimoto, K., Hashimoto, Y., Horiuchi, Y. and Juji, T.: Fc-rosette inhibition by hypocomplementaemic systemic lupus erythematosus sera. *Ann. Rheum. Dis.* **35**, 415—421, 1976.
9. Onyewotu, I.I., Johnson, P.M., Johnson, G.D. and Holborow, E.J.: Enhanced uptake by guinea-pig macrophages of radio-iodinated human aggregated immunoglobulin G in the presence of sera from rheumatoid patients with cutaneous vasculitis. *Clin. Exp. Immunol.* **19**, 267—280, 1975.
10. Barkas, T., AL-Khateeb, S.F., Irvine, W.J., Davidson, N. McD. and Roscoe, P.: Inhibition of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) as a means of detection of immune complexes in the sera of patients with thyroid disorders and bronchogenic carcinoma. *Clin. Exp. Immunol.* **25**,

- 270—279, 1976.
11. Hunter, W.M. and Greenwood, F.C.: Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature (Lond.)* **194**, 495—496, 1962.
 12. Koshi, I.R., Poplack, D.G. and Blaese, R.M.: In vitro methods in cell-mediated and tumor immunity, ed. B.R. Bloom and J.R. David. Academic Press, Newyork, pp. 359—362, 1976.
 13. Berken, A. and Benacerraf, B.: Properties of antibodies for macrophages. *J. Exp. Med.* **123**, 119—144, 1966.
 14. Leslie, R.G.Q.: The binding of soluble immune complexes of guinea pig IgG₂ to homologous peritoneal macrophages. Determination of the avidity constants at 4°C. *Eur. J. Immunol.* **10**, 317—322, 1980.
 15. Penttinen, K., Vaheri, A. and Myllylä, G.: Detection and characterization of immune complexes by the platelet aggregation test. I. Complexes formed in vitro. *Clin. Exp. Immunol.* **8**, 389—397, 1971.
 16. Jewell, D.P. and McLennan, I.C.M.: Circulating immune complexes in inflammatory bowel diseases. *Clin. Exp. Immunol.* **14**, 219—226, 1973.
 17. Onyewotu, I.I., Holborow, E.J. and Johnson, G.D.: Detection and radioassay of soluble circulating immune complexes using guinea pig peritoneal exudate cells. *Nature* **248**, 156—159, 1974.
 18. McDougal, J.S., Redecha, P.B., Inman, R.D. and Christian, C.L.: Binding of immunoglobulin G aggregates and immune complexes in human sera to Staphylococci containing protein A. *J. Clin. Invest.* **63**, 627—636, 1979.
 19. Inchley, C., Grey, H.M. and Uhr, J.W.: The cytophilic activity of human immunoglobulins. *J. Immunol.* **105**, 362—369, 1970.
 20. Kronwall, G. and Williams, R.C., Jr.: Differences in anti-Protein A activity among IgG subgroups. *J. Immunol.* **103**, 828—833, 1969.
 21. Augener, W., Grey, H.M., Cooper, N.R. and Müller-Eberhard, H.J.: The reaction of monomeric and aggregated immunoglobulins with Cl. *Immunochemistry* **8**, 1011—1020, 1971.
 22. Hay, F.C., Nineham, L.J. and Roitt, I.M.: Routine assay for the detection of immune complexes of known immunoglobulin class using solid phase Clq. *Clin. Exp. Immunol.* **24**, 396—400, 1976.
 23. Eisenbert, R.A., Theofilopoulos, A.N. and Dixon, F.J.: Use of bovine conglutinin for the assay of immune complexes. *J. Immunol.* **118**, 1428—1434, 1977.
 24. Theofilopoulos, A.N., Wilson, C.B., Bokisch, V.A. and Dixon, F.J.: Binding of soluble immune complexes to human lymphoblastoid cells. II. Use of Raji cells to detect circulating immune complexes in animal and human sera. *J. Exp. Med.* **140**, 1230—1244, 1974.
 25. Arend, W.D. and Mannik, M.: In vitro adherence of soluble immune complexes to macrophages. *J. Exp. Med.* **136**, 514—531, 1972.
 26. Lay, W.H. and Nussenzweig, V.: Receptors for complement of leucocytes. *J. Exp. Med.* **128**, 991—1007, 1968.
 27. Utsumi, S.: Stepwise cleavage of rabbit immunoglobulin G by papain and isolation of four types of biologically active Fc fragment. *Biochem. J.* **112**, 343—355, 1969.
 28. Yasmeen, D., Ellerson, J.R., Dorrington, K.J. and Painter, R.H.: The structure and function of immunoglobulin domains. IV. The distribution of some effector functions among the C_γ2 and C_γ3 homology regions of human immunoglobulin G. *J. Immunol.* **116**, 518—526, 1976.
 29. Kammer, G.M. and Shur, P.H.: Binding of circulating immune complexes to human peripheral blood lymphocytes: effect of complement. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **10**, 202—213, 1978.

**Measurement of circulating immune complexes using Fc
receptors of guinea pig peritoneal exudate cells.**

Part 1. Establishment of the method for measuring of immune complexes.

Yoshihito SAITO

The 3rd Department of Internal Medicine,

Okayama University Medical School

(Director: Prof. Z. Ota)

A new method for detecting circulating IgG immune complexes (IC) using guinea pig peritoneal exudate cells (PEC) has been established. Binding of ^{125}I BSA-anti BSA IgG IC to PEC was inhibited by serum containing IC in a dose dependent fashion. A 100 μl aliquot of PEC suspension (2.5×10^6 cells/ml) was preincubated with diluted five fold serum for 60 minutes at 4°C . After washing pretreated PEC 3 times, 100 μl of ^{125}I labelled 3 times antigen excess-IC was added and incubated for 90 minutes at 4°C . At the end of incubation, the suspension was centrifuged at 10,000G for 1 minute, and the radioactivity of the pellet was measured. This method mainly utilizes the reaction between Fc receptors on PEC and the Fc portion of the complexed IgG.