

Conglutinin Solid-phase Radioimmunoassayによる 血中 immune complex の検出

第 1 編

基礎的検討

岡山大学医学部第3内科教室 (主任: 大藤 真教授)

田 村 敬 博

(昭和55年5月29日受稿)

Key words: immune complex, conglutinin Radioimmunoassay,
Clq Radioimmunoassay, 免疫複合体

緒 言

conglutinin solid-phase radioimmunoassay (以下 Cong. RIA と略)は, 1977年, Casali 等¹⁾, Eisenberg 等²⁾により, soluble immune complex (以下 soluble IC と略)の検出方法の1つとして考案された。原理はウシ conglutinin (分子量75万の euglobulin に属する蛋白質)が, immune complex (以下 IC と略)や感作された赤血球に結合した補体の第3成分(C3d)と特異的に結合するが, 遊離のC3とは結合しないという性質を利用したものである。conglutinin RIA は, まず conglutinin を solid-phase に附着させ, ついで IC に結合した C3d が, conglutinin に特異的に結合し, 次に結合した IC 中の抗体(IgG)を¹²⁵I 標識 anti-IgG と反応させ, 反応した¹²⁵I 標識 anti-IgG をガンマカウンターで測定することによって, IC として定量するものである。現在文献的に conglutinin の精製方法や活性測定ならびに IC 定量成績に著しい差がみられるので, 今回, Zymosan と Sephadex G-200 と DEAE-cellulose の三者の組み合わせによる conglutinin の抽出精製と, EAC3 を用いた活性の測定, ついで in vitro で作製した soluble IC での検定を行い, あわせて他の検出法である Clq solid-phase radioimmunoassay (以下 Clq RIA と略)で検定を行った。

材料並びに方法

1. 牛 conglutinin の精製

Conglutinin の抽出精製は, Eisenberg²⁾や Lachmann³⁾等を参照して行なった。牛3頭より得た10ℓの全血から2ℓの血清を分離採取し, 56℃30分間加熱非働化した。ついで100℃10分間加熱処理した Zymosan 40g と室温で1時間攪拌反応させ, 1000G×20分間遠心して Zymosan を沈渣として採取し, Ca⁺⁺を0.0002M と Mg⁺⁺を0.0016M 含む phosphate buffered saline (PH7.2, $\mu=0.15$)で4回洗浄遠心を行った。次に Zymosan に結合している conglutinin を, 0.02MEDT A-3Na を含む PBS 500ml で1時間攪拌し, 遠心した上清に溶出させた。この上清を100ml に濃縮し, 0.01M phosphate buffer (PH5.5)で24時間透析し, 析出した euglobulin を1万2千G×30分間遠心し, 沈渣として採取した。沈渣を0.1M Tris-Hcl buffer, PH7.2(0.01M EDTA-3Na, 0.1M 2-ME を含む)に溶かし, 37℃1時間処理後, 食塩結晶を少量加え, euglobulin を充分溶解した後, 1000G×5分間遠心し沈渣を除去した。この上清を Sephadex G-200 カラムにて分画し, 第1ピークを集め粗 conglutinin を採取した。この際使用した buffer は, 0.01M EDTA-3Na と0.025M 2-ME を含む0.1M Tris-Hcl buffer (PH7.2)であった。ついでこの粗 conglu-

tinin を DEAE セルロースカラムで分画を行った。使用した buffer は、0.01M EDTA-3Na を含む 0.03M phosphate buffer (PH8.0) で、NaCl 濃度を 0.03M から 0.4M まで上昇させて溶出した。

2. conglutinin 活性の測定

conglutinin 活性は、Lachmann³⁾, Bienenstock⁴⁾等の方法を参照して以下の方法で測定した。羊赤血球を VBS-Ca⁺, Mg⁺ (0.0002M Ca⁺ と 0.00016M Mg⁺ を含む veronal buffered saline, PH7.2, $\mu=0.15$) で 3 回洗浄し、10% 浮遊液を作製 (10% E)。牛血清を 56°C 30 分間非働化し、2 ml ずつ倍々稀釈系列を作り、稀釈された各々の牛血清に、10% E を 0.2 ml ずつ加え室温で 1 夜反応させ、4 倍稀釈血清まで凝集がおきたので、Forssman 抗体価を ($\times 4$) とした。ついで Forssman 抗体価の 5 倍稀釈血清、すなわち非働化牛血清の 20 倍稀釈血清を感作用抗体 ($\times 20$) として使用した。10% E 1 ml と感作用抗体 A ($\times 20$) 10 ml を 37°C 30 分間反応させて EA とし、3 回洗浄後最終濃度 0.9% EA を作製。0.9% EA 3.5 ml と新鮮馬血清 (C) 0.5 ml (日本バイオテスト研究所) と VBS-Ca⁺, Mg⁺ 5.0 ml を加え、37°C 30 分間反応させて、EAC 3 (0.3%) を作製した。抽出精製した conglutinin を VBS-Ca⁺, Mg⁺ で 0.2 ml ずつの倍々稀釈系列をつくり、0.3% EAC3 を 0.2 ml ずつ加え、37°C 30 分間反応させ凝集反応を行ない、凝集の認められる最高稀釈倍数をもって凝集素価 (conglutinin 活性) とした。対照として新鮮馬血清のかわりに非働化馬血清を用いた場合と、VBS-Ca⁺, Mg⁺ のかわりに 0.01M EDTA-3Na を含む VBS を用いた場合とでともに凝集反応がおこらないことを確かめた。

3. 抗 conglutinin 血清の作製

牛の conglutinin の精製段階で、Sephadex G-200 カラムで分画して得た第 1 ピークを、DEAE セルロースカラムで分画し、500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の conglutinin を得、これを抗原とし等容量の Freund's complete adjuvant と emulsion を作り、家兎筋肉内に注射し、2 週間後再度筋注射し、初回免疫より 4 週間後採血し、抗 conglutinin 血清を得た。

4. conglutinin の免疫電気泳動

抽出した conglutinin (1 mg/ml) を 0.6% aga-

rose と、veronal buffer (PH8.6, $\mu=0.05$, 0.01 M EDTA-3Na を含む) を使用して、定電圧 (100 volt) 40 分間泳動し、作製した抗 conglutinin 血清と 48 時間反応させた。

5. 変性 IgG の作製

ヒト IgG は Cohn Fraction II を使用した。変性 IgG は、使用直前に Cohn Fraction II を 63°C 15 分間加熱処理して作製した。

6. 特異的抗ヒト IgG 家兎血清

家兎にて作製した抗ヒト IgG 血清より、33% 硫酸法にて粗グロブリンを採取し、ついで immuno-absorbent である CNBr-Sephadex 4 B (Pharmacia 社製) 1 g にヒト IgG 30 mg を結合させたものに特異的に吸着させ、0.2M グリシン塩酸 buffer PH2.8 (0.5M NaCl を含む) で溶出させ、ヒト IgG と特異的に反応する家兎グロブリンを精製した⁵⁾。

7. NaI¹²⁵での radiolabelling

精製した特異抗ヒト IgG は、chloramin T 法にて ¹²⁵I を標識した。特異抗ヒト IgG の 1 mg/ml PBS に 500 μCi ¹²⁵I Na/10 μl (0.5M phosphate buffer PH7.0) を加え、ついで 0.1 ml の chloramin T (600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ H₂O) を加え室温で 1 分間反応させた後、0.1 ml の sodium metabisulfite (1200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ H₂O) を加えて反応を停止させ、Sephadex G-150 カラムを通して分画し、第 1 ピークの後半部分を採取し、¹²⁵I 標識抗ヒト IgG として使用した。

8. conglutinin RIA

精製 conglutinin を 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度とし、buffer は VBS-Ca⁺, Mg⁺ (0.02% NaN³ を含む、この時のみ PH8.5 とする) を使用し、シオノギチューブに 500 μl ずつ注ぎ、37°C 3 時間 coating し、使用時まで室温に保存した。使用時は VBS-Ca⁺, Mg⁺, PH 7.2 (この時の洗浄の場合のみ 1.5% Tween-20 = polyoxyethylene sorbitan monolaurate, sigma 社製を含む) で 3 回洗浄して使用した。被検血清 50 μl に VBS-Ca⁺, Mg⁺ 50 μl を加え 37°C 20 分間反応後、VBS-Ca⁺, Mg⁺ 1000 μl を加え、その 450 μl ずつを duplicate で conglutinin で coat したチューブに注ぎ、室温で 1 時間反応させた後、VBS-Ca⁺, Mg⁺ で 3 回洗浄し、ついで 450 μl ¹²⁵I 標識抗ヒト IgG 3 万 cpm を加え、室温 4 時間反応後、3 回洗浄し、ガンマカウン

ターにて測定した。被検血清は -30°C に保存し、正常血清と標準曲線作製用のヒト IgG は分注して -70°C に保存し、各検査毎に同一のものを対照とした。

9. Clq solid-phase radioimmunoassay (以下 Clq RIA と略)

Clq は米増らの方法⁷⁾で正常ヒト血清から抽出精製し、Clq RIA は Hay らの方法⁸⁾に準じて行った。精製 Clq を Phosphate buffered saline にて 1 mg/ml の濃度とし、シオノギチューブに 1 ml ずつ注ぎ、 4°C 2 時間 coating し、洗浄液 (0.3% NaCl, 1.5% Tween-20 と 0.5% bovine serum albumin を含む) で 3 回洗浄して直ちに使用した。被検血清は、 0.3% NaCl にて 50 倍稀釈血清とし、そのうち 1 ml を Clq を coating したシオノギチューブに duplicate で加え、 4°C 1 夜反応させた後、3 回洗浄し、次に ^{125}I 標識抗ヒト IgG (濃度 $0.1\mu\text{g/ml}$) を 1 ml 加え、室温 2 時間反応後、3 回洗浄してガンマカウンターにて測定した。被検血清の保存および、標準曲線作製用の変性 IgG の調整は cong. RIA の場合と同じである。

10. in vitro での immune complex の作製

抗ヒトアルブミンヤギ血清 (Hyland 社製) を VBS-Ca^{*}, Mg^{*} で $100\mu\text{l}$ ずつの倍々稀釈系列とし、その各々に ^{125}I ヒトアルブミン $100\mu\text{l}$ ずつ加えて 37°C 60 分間反応後、 4°C 5 日間放置後、 $1500\text{G} \times 30$ 分間遠心し、上清を conglutinin RIA または Clq RIA に使用し、沈渣は直ちにガンマカウンターにてカウント数を測定し、insoluble IC として表わした。

11. SLE 患者血清での IC の検出

ARA 予備診断基準を満たす SLE 56 症例について検索した。標準曲線作製のための正常ヒト血清 $50\mu\text{l}$ と変性 IgG の $50\mu\text{l}$ (濃度は $100\mu\text{g/ml}$ から $10\mu\text{g/ml}$ までの VBS-Ca^{*}, Mg^{*} による稀釈系列) を加えたもの、および SLE 患者血清 $50\mu\text{l}$ と VBS-Ca^{*}, Mg^{*} $50\mu\text{l}$ を加えたものを各々 37°C 20 分間反応させ、ついで VBS-Ca^{*}, Mg^{*} を $1000\mu\text{l}$ 加え、そのうち $450\mu\text{l}$ ずつ duplicate で conglutinin RIA に使用した。

結 果

1. Sephadex G-200 カラムによる conglutinin

の溶出曲線 (図 1 A)

図 1 A の矢印は第 1 ピークを示したものであるが、128 倍以上の conglutinin 活性は Fraction 3 から 17 まで認められ、ゲル内沈降反応では、抗 conglutinin 血清と Fraction 3 から 12 まで沈降線を認めた。

2. DEAE セルロースカラムによる conglutinin の溶出曲線 (図 1 B)

粗 conglutinin, すなわち Sephadex G200 カラムで得られた第 1 ピークを、DEAE セルロースカラムで分画すると、NaCl 濃度が 0.15M から 0.25M の間で溶出される分画のみが conglutinin 活性を示し、また抗 conglutinin 血清との間に沈降線の形成を認めた。

3. 精製 conglutinin の免疫電気泳動所見 (図 2)

精製した conglutinin と抗 conglutinin 血清との間に、 β 領域で 1 本の沈降線を認めた。牛血清に対して自家製抗 conglutinin 血清は β 領域に 1 本の沈降線を生ずるが、市販の抗牛血清 (Behringwerke 社製) では、それに相当する沈降線を認めないので、抗 conglutinin 抗体を含んでいないと考えられた。

4. RIA に使用する conglutinin の至適濃度 (図 3)

conglutinin 濃度を $10\mu\text{g/ml}$ から稀釈してゆき、それぞれシオノギチューブに coating し、 ^{125}I 標識変性 IgG $0.2\mu\text{g/ml}$ と新鮮馬血清を 37°C 20 分間反応させたものを $450\mu\text{l}$ (2 万 5 千 cpm) ずつ加え、1 時間室温反応後、結合したカウント数を測定した。conglutinin 濃度が $1.2\mu\text{g/ml}$ 以下になると、結合する変性 IgG 量が著しく減少したので以後 conglutinin RIA に使用する conglutinin 濃度は、 $2.5\mu\text{g/ml}$ とした。

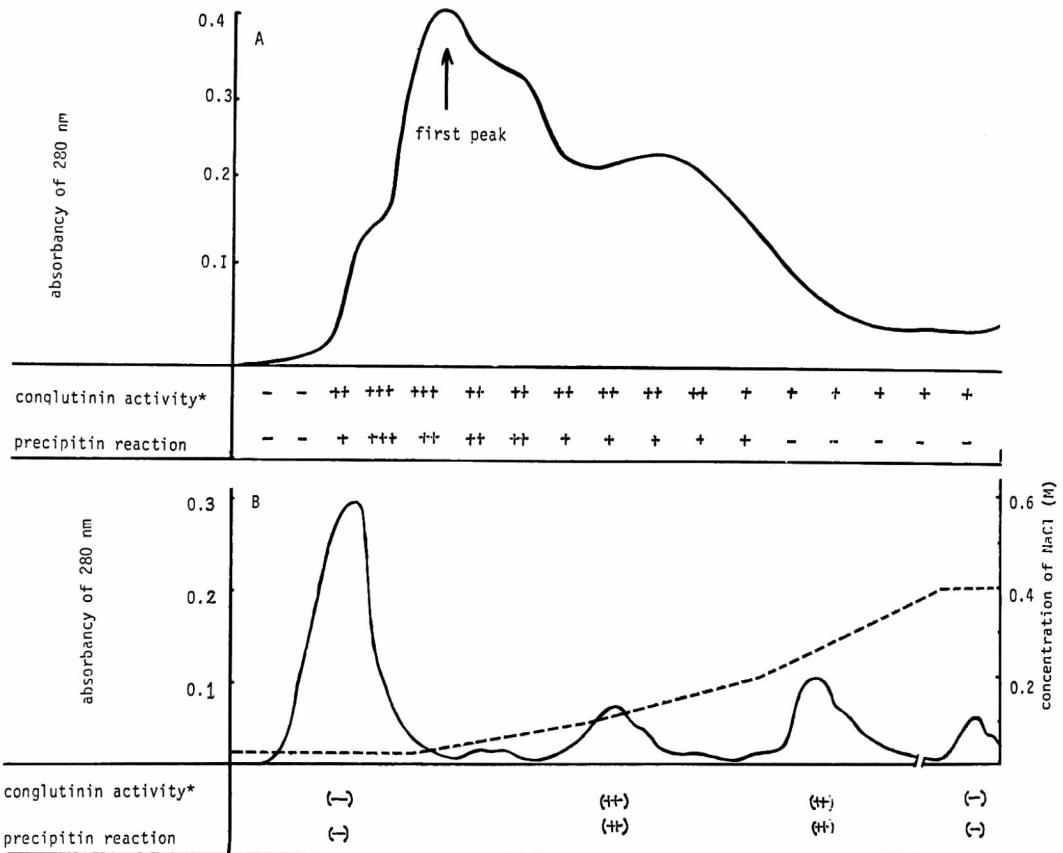
5. 補体源の検討 (図 4)

変性 IgG を $1000\mu\text{g/ml}$ から、VBS-Ca^{*}, Mg^{*} で倍々稀釈し、正常ヒト血清 (●印) または新鮮馬血清 (○印) と、 37°C 20 分間反応させた後、 ^{125}I 標識抗ヒト IgG を加えて conglutinin RIA を行った。変性 IgG の $62\mu\text{g/ml}$ 以下の低濃度部分では、補体源としてヒト血清を用いた場合は、馬血清を用いた場合に比してカウント数が高かった。以上よりヒト血清中の IC 測定の場合の補体源としては、ヒト血清を用いるべきことが明らか

図1. Purification of conglutinin

A. Purification of crude conglutinin through Sephadex G-200

B. Further purification of the first peak of Sephadex G-200 chromatography through DEAE-cellulose



※conglutinin activity, (+++) over 1 : 2048, (++) from 1 : 512 to 1 : 1024, (+) from 1 : 128 to 1 : 256, (-) under 1 : 64.

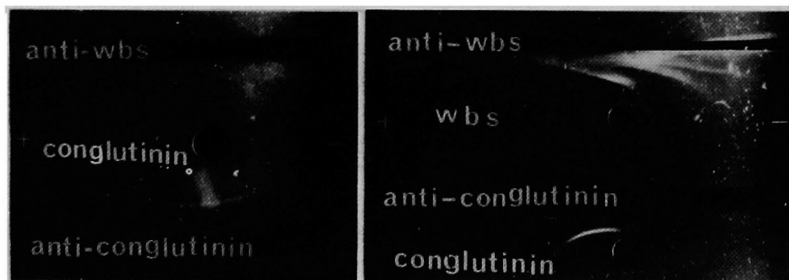


図2. Immunelectrophoresis of purified conglutinin and whole bovine serum (WBS)

かとなった。さらに56℃30分間非働化ヒト血清 (□印)または0.01M EDTA-3Na を含む VBS (■印)を使用した場合、変性 IgG の conglutinin

への結合は認められなかった。

6. 必要補体量の検討(図5)

conglutinin RIA が補体依存性の検査法であ

図3. Binding Activity of ¹²⁵I-labelled Aggregated IgG to solid-phase Coated with Various Am- of Conglutinin

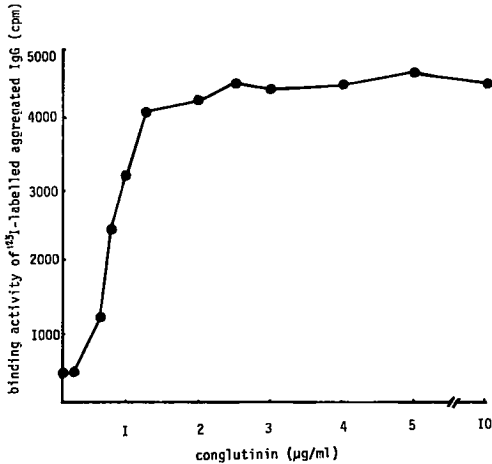
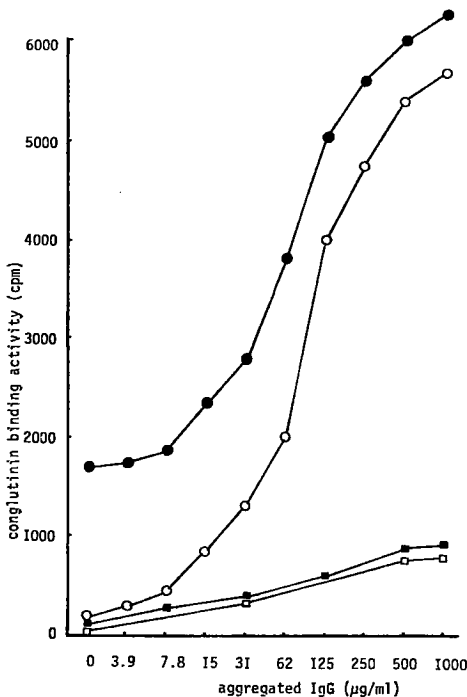


図4. Selection of Complement Source for Binding Activity of Aggregated IgG to Conglutinin



Various amounts of aggregated IgG were diluted with fresh normal human serum(NHS)(●), NHS heated at 56°C for 30min. (○), NHS containing 0.01M of EDTA (■), and fresh horse serum(○).

ることから補体の必要量を検討した。変性 IgG 200 µg/ml と正常ヒト血清(CH50=35)200 µl から倍々稀釈したものと反応させ conglutinin RIA を行った。図5のように血清の量で示すと、正常ヒト血清25 µl 以上を加えるとプラトーに達するので最小限必要な補体量は正常ヒト血清25 µl に相当することが明らかとなった。

7. conglutinin RIA で検出可能な最大変性 IgG 量(図6)

正常ヒト血清25 µl を使用した場合の検出可能な変性 IgG 量を調べた。図6のように変性 IgG 量が320 µg/ml 以上になるとプラトーに達するので、最大検出量は約320 µg/ml であることが明らかとなった。

8. 標準曲線の作製(図7)

変性 IgG 100 µg/ml より正常ヒト血清で稀釈系別をつくり, conglutinin RIA を行った。測定されたカウント数(Y cpm)と変性 IgG の蛋白量(X µg/ml)とは、 $Y = 20X + 1680$ の直線関係で相関が認められた。また検出可能な最小変性 IgG 量は 5 µg/ml と考えられた。

9. in vitro で作製した BSA-抗 BSA-IC の検出(図8)

沈渣の ¹²⁵I-標識アルブミンのカウント数を測定し, insoluble IC を代表するものとする、抗原抗体等量域で最も量が多いことが示された。ついで上清中の IC と変性 IgG (0.2 µg/ml) を競合させ inhibition test を行って、間接的に IC を測定すると, conglutinin RIA においても Clq RIA においても抗原過剰域および抗体過剰域とで soluble IC の測定が可能であった。

考 按

conglutinin は各種哺乳動物血清中に存在するがヒト血清中には存在しない蛋白質であり、EAC3 を凝集する性質を有する

図 5 . Effect of Human Complement on Binding Activity of Aggregated IgG to Conglutinin Aggregated IgG (200 μ g/ml) were previously incubated for 20min. at 37°C with various amounts of normal human serum.

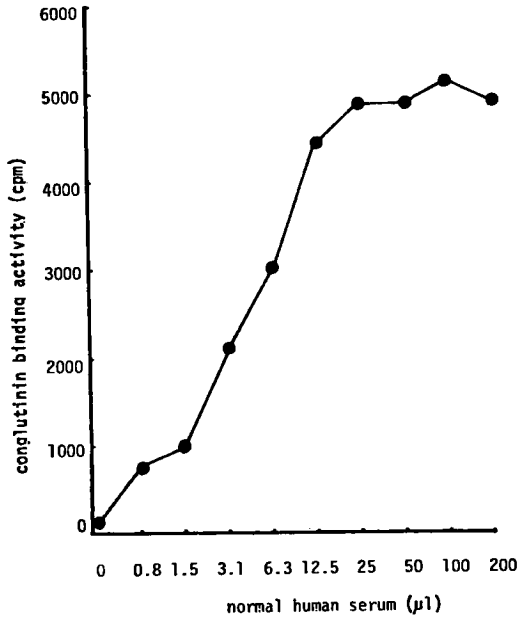


図 6 . Higher Limit of Sensitivity for Aggregated IgG which Could be Measured by Conglutinin Solid-phase Radioimmunoassay

Various amounts of aggregated IgG were previously incubated for 20min. at 37°C with 25 μ l of normal human serum.

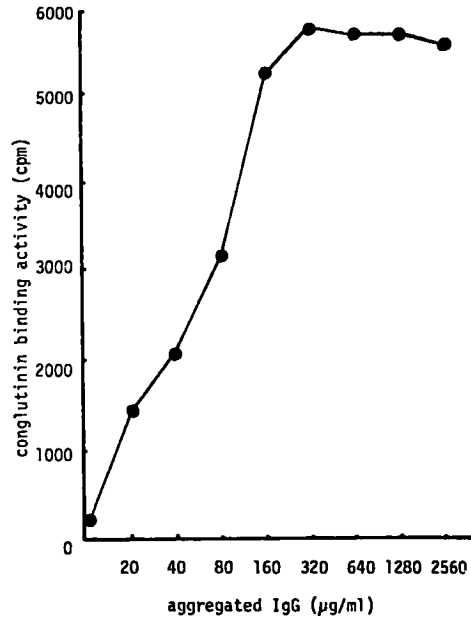


図 7 . Standard Curve of Conglutinin Solid-phase Radioimmunoassay Aggregated IgG (μ g/ml) were previously incubated for 20 min. at 37°C with fresh normal human serum.

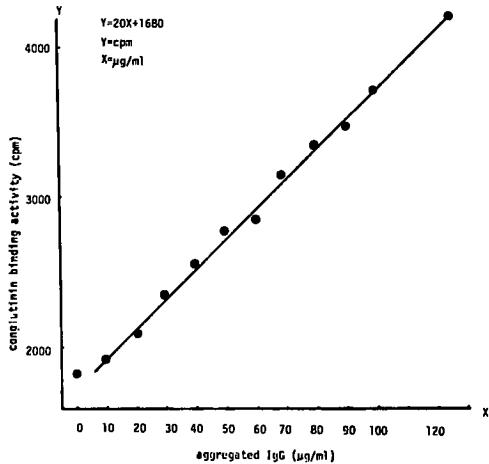
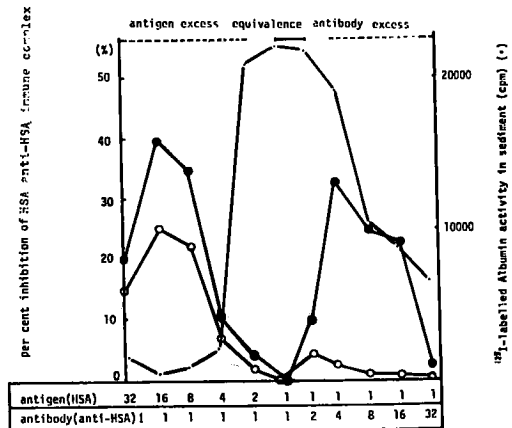


図 8 . Measurement of Human Serum Albumin (HSA)Anti-HSA Immune Complex by Conglutinin or Clq Solid-phase Radioimmunoassay



(-): ¹²⁵I-labelled Albumin in sediment which represents insoluble HSA immune complex
 (●): conglutinin solid-phase radioimmunoassay
 (○): Clq solid-phase radioimmunoassay

こと、ならびにその抽出方法や抗血清作製等に関しては、種々の文献が存在する^{9,10,11)12)}。conglutininがICに結合したC3dと親和性を有する性質を利用したconglutinin RIAによるIC定量の試みは、1977年Casali等¹⁾とEisenberg等²⁾により初めて報告されている。この場合特にconglutininの可及的な精製とその活性の検討が重要であるが、この点に関して不明な点が多い事、Casali等の方法およびEisenberg等の方法は、ともにconglutininを使用した類似の検出法であるにもかかわらず測定値にかなりの違いがみられることから、今回著者は、conglutininの精製方法と活性測定を具体的に示し検討を加えた。ついで試験管内で作製したsoluble ICについて、測定可能なことを示し、さらにcong. RIAと他のIC定量法であるC1g RIAとを同時に行い、事実ICを定量している可能性が大であることを示した。なお抗原抗体等量域ではinsoluble ICは沈渣として除去した後は、検出されなかった。

conglutinin精製の場合、Casali等はSephacrose 4Bにconglutininを結合させ、ついで0.02 M EDTAで解離させているが、今回の実験では、conglutininはSephacrose 4Bに結合困難であったのでZyosanに結合させた。ついで精製に関してEisenbergらはSephadex G-200カラムを用いて第1ピークを得ているが、著者はこれを更にDEAEセルロースカラムで溶出し、多数の分画を得、そのうちconglutininはNaCl濃度が0.15Mから0.25Mの分画にのみ存在することを見出した。なお0.03Mで溶出される第1ピークは補体を介さずとも直接に変性IgGと結合する性質を有するので可及的に除去されるべきと考えられた。抽出した物質がconglutininであるか否かを決定する方法は、特異抗血清を有しない場合、EAC3を用いてconglutinin活性を測定することが唯一の方法と思われる。著者は羊赤血球を用いForssman抗体で感作し、補体は馬血清を用いてEAC3を作製し、それを凝集させる力価をもってconglutinin活性とした。ウシ血清のconglutinin活性は通常 1×32 から 1×64 程度にすぎないが、抽出精製したconglutininでは、 1×2048 以上の活性を示した。またconglutinin濃度を $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ に調製し、各種稀釈後、¹²⁵I標識変

性IgGとの結合性を調べたところconglutinin濃度 $1.25 \sim 2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ で変性IgGと結合性を有することが判明した。この結合力は補体を非働化した場合や、0.01M EDTAを使用した場合に阻止されることから、conglutininの性質を満たすものと考えられた。ついで、作製した抗血清との免疫電気泳動で β 領域に1本の沈降線を生じLachmannの報告³⁾と一致した。なおconglutinin活性について、浜島、吉田氏等¹³⁾は、Human R3を用いた系で測定しているが、著者らのサンプルの活性測定を両氏に依頼した結果、本法でもconglutinin活性が認められた。

conglutinin RIAの基礎的検討を行うにあたって、conglutinin濃度、反応時間、使用する補体量ならびに¹²⁵I標識抗ヒトIgG、標準曲線作製等が問題となる。Casaliら¹⁾の場合、conglutinin濃度は $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ であり、conglutininとICの反応時間は室温1時間、ついでIC中のIgGと¹²⁵I標識抗ヒトIgGとの反応時間は室温4時間、使用した補体量は正常ヒト血清 $25 \mu\text{l}$ 相当量、使用した¹²⁵I標識抗IgG量は $7.5 \mu\text{Ci}$ であった。一方Eisenberg²⁾等の場合、conglutinin濃度 $250 \text{ng}/\text{ml}$ ないし $500 \text{ng}/\text{ml}$ であり、conglutininとICの反応時間は 4°C 1夜ついで、IC中のIgGと¹²⁵I標識抗ヒトIgGとの反応時間は、 4°C 3時間、使用した補体量は正常ヒト血清 $75 \mu\text{l}$ 相当量、使用した¹²⁵I標識抗ヒトIgGは、 80万 cpm であった。しかしより具体的な記載がみられないので詳細は不明であるが、著者の方法は、Casali等の方法に近いと思われる。再現性は良く、IC測定の感度は文献的には、変性IgG換算量で $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ から $1000 \mu\text{g}/\text{ml}$ までといわれており¹⁾、著者の検討では補体量を正常ヒト血清で $25 \mu\text{l}$ 使用した場合、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ から $320 \mu\text{g}/\text{ml}$ までのIC測定が可能であった。

次にconglutinin RIAが、ICを測定し得るか否かを、in vitroで作製したHSA-抗HSA soluble ICを用いて検討し、抗原過剰域および抗体過剰域とで検出し得ることが示され従来の報告^{1,2)}と一致した。

結 論

conglutinin solid-phase radioimmunoassay

の基礎的検索を行ない次の結果を得た。

1. 牛血清より Zymosan と Sephadex G-200 カラムおよび EDTA セルロースカラムを使用して conglutinin の抽出精製を行った。
2. conglutinin 活性を羊赤血球に Forssman 抗体で感作し、馬補体を吸着させた EAC3d を使用して測定し十分な活性が認められた。
3. 抗 conglutinin 血清を家兎にて作製し牛血清または精製 conglutinin に対して 1 本の沈降線が得られた。
4. conglutinin solid-phase radioimmunoassay で IC を測定する場合、conglutinin 濃度 $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ で、正常ヒト血清 $25 \mu\text{l}$ 相当量の補体を使用して、変性 IgG 換算量で $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ から $320 \mu\text{g}/\text{ml}$ ま

での IC が検出可能であった。なお conglutinin と IC の反応時間は室温 1 時間、IC 中の IgG と ^{125}I 標識抗ヒト IgG の反応時間は室温 4 時間であった。

5. conglutinin solid-phase radioimmunoassay では、in vitro で作製した soluble IC を抗原過剰域および抗体過剰域で検出可能であった。

謝 辞

稿を終るにあたり、本研究の御指導、御校閲を受けた恩師大藤真教授、宮脇昌二講師に深甚なる感謝の意を表します。

Human R3 での conglutinin 活性の測定をお願いした京都大学濱島義博、吉田治義両先生に深謝する。

文 献

1. Casali, P., Bossus, A., Nicole, Carpentier, A. and Lambert, P. H.: Solid-phase enzyme immunoassay or radioimmunoassay for the detection of immune complexes based on their recognition by conglutinin. *Clin. Exp. Immunol.* **29**, 342—354, 1977.
2. Eisenberg, R. A., Theofilopoulos, A. N. and Dixon, F. J.: Use of bovine conglutinin for the assay of immune complexes. *The J. of Immunology* **118**, No. 4, 1428—1434, 1977.
3. Lachmann, P. J.: A comparison of some properties of bovine conglutinin with those of rabbit immunoglobulin. *Immunology* **5**, 687—705, 1962.
4. Bienenstock, J., Bloch, K. J.: Some characteristics of human immunoglobulin. *J. Immunol.* **96**, 637—645, 1965.
5. Cuatrecasas, P.: Affinity chromatography. *Annu. Rev. Biochem.* **40**, 259—278, 1978.
6. McConahey, P. H. and Dixon, F. J.: A method for trace iodination of proteins for immunologic studies. *Int. Arch. Allergy* **29**, 185—189, 1966.
7. 米増国雄: Clq の精製法。免疫実験操作法(日本免疫学会編) pp. 951—955, 1976.
8. Hay, F. C., Ninem, L. J. and Roitine assay for the detection of immune complexes of known immunoglobulin class using solid phase Clq. *Clin. Exp. Immunol.* **24**, 396—400, 1976.
9. Lachmann, P. J. and Liske R.: the preparation and properties of alexinated intermediates that react with conglutinin. 1. Guinea-pig complement. *Immunology* **11**, 243—254, 1966.
10. Lachmann, P. J. and Liske, R.: The preparation and properties of alexinated intermediates that react with conglutinin. 2. Equine, rabbit and human complement. *Immunology* **11**, 252—262, 1966.
11. Lachmann, P. J.: A sedimentation pattern technique for measuring conglutinin. its application to demonstrating immunoglobulins C, 4. *Immunology* **11**, 263—271, 1966.
12. Lachmann, P. J.: Conglutinin and immunoglobulin. *Adv. Immunol.* **6**, 479—527, 1967.
13. 高橋勲, 吉田治義, 中井康二, 二上勝美, 濱島義博: conglutinin binding test とその新開拓法。最新医学 **33**, 1370—1378, 1978.

**Detection of circulating immune complexes
by the method of conglutinin solid-phase radioimmunoassay**

I. Experimental study

Takahiro TAMURA

The 3rd Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School

(Director : Prof. T. Ofuji)

Conglutinin solid-phase radioimmunoassay (conglutinin RIA) was utilized for detection of soluble immune complexes in sera. Crude conglutinin was obtained from whole bovine serum using Zymosan as an affinity absorbent. The further purification of crude conglutinin was performed through Sephadex G-200 and DEAE-cellulose column chromatography. The activity of purified conglutinin to haemagglutinate EAC3d was found to be more than 1 : 2048 in titer. Anti-conglutinin antisera raised in rabbit gave an identical precipitin line against bovine serum and purified conglutinin. Conglutinin RIA was performed using 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of conglutinin and 25 μl of fresh normal human serum as a source of complement. Serum samples were incubated with conglutinin coated on polystyrene tubes for 1 hour at room temperature, and incubated with ^{125}I -labelled anti-human IgG for 4 hours at room temperature. The amounts of immune complexes measurable by this method were in the ranges of 5 to 320 $\mu\text{g}/\text{ml}$ equivalent to aggregated IgG. Conglutinin RIA was applied to the detection of soluble immune complexes formed *in vitro* which could be detected both in antigen excess and antibody excess regions.