

肝疾患における血清補体に関する研究

第二編

血清補体の変動因子に関する研究

岡山大学医学部第一内科学教室 (主任: 小坂淳夫教授)

須藤千鶴子 (旧姓・宮本)

[昭和47年9月22日受稿]

緒言

免疫現象に關する生体内蛋白として補体成分が生物物理学的ないし免疫病理学的に究明されつつある¹⁾一方、臨床的にその変動を觀察するとき、病態の推移に種々の免疫機序の介入が推測される症例がみられる。またSLE²⁾や腎炎³⁾では血清補体価の低下の一因が抗原抗体補体複合物形成による補体の消費によることが重視されて、その病態の解析や予後判定の上に考察が加えられている。

そこで著者は本編で、慢性肝疾患における血清補体の動態を檢討することにより、肝炎の慢性化機転に及ぼす免疫学的諸因子を分析し、その病態への關与につき若干の考察を加え、興味ある成績をえたので報告する。

実験方法

1. 血清補体の溶血活性: 第1編に詳述したごとく Mayer の50%溶血法^{4) 5)}に準じた。

2. 血清補体の immune-adherence による活性価: Nelson-西岡の Immune-Adherence Hemagglutination (IAHA) 法^{5) 6)}に従い、ヒツジ感作赤血球 (EA) に反応した補体成分C1423をO型ヒト赤血球を indicator とした凝集反応 (陽性終末+2) で觀察し補体活性を求めた。

3. Reagents による補体成分の測定: Pillemerらの方法に従いヒト血清を処理し、各力価を檢討して表1の方法で測定した。^{7) 8) 9) 10)}

4. Intermediate cells による補体成分の測定: EAC 4, EAC 14, EAC 1の各 intermediate cell は西岡らの実験法に従い作製し^{11) 12) 13)}成分力価檢定は試験管法 (63%溶血法—有効分子数測定) に準じた。すなわち

表 1

1) 補体測定 (CH 100)

5倍稀釈 ヒト血清 (ml)	0.08 0.10 0.12 0.14 0.16 0.18 0.20 0
GVB (ml)	0.42 0.40 0.38 0.36 0.34 0.32 0.30 0.50
1.25% EA (ml)	各 1.00

37°C 30分
判定: 完全溶血

2) reagents の測定

5倍稀釈ヒト血清 (ml)	0.2……倍数稀釈
reagent (2u) (ml)	0.2
GVB+ (ml)	0.1
1.25% EA (ml)	1.0

37°C 30分 後遠心

判定: 日立分光光度計 (54/m μ) にて溶血度測定
50%溶血をおこす血清濃度をもって各成分の値とした。

C 1 ; ヒト血清20ml を phosphate buffer solution (PBS) (i. s. 0.04, pH 0.75) で4°C, 12時間透析後10,000r. p. m, 30分間低温で遠心分離する。沈渣を PBS (i. s. 0.3, pH 7.5) に溶かし遠心し、滲過した上清を同条件で再び透析遠心して PBS (i. s. 0.3, pH 7.5) に溶解する。(原血清の γ 量—約2ml)。

この溶解液を遠心しその上清を精製C1として利用した。(—20°Cに保存)

C 2 ; Borsos の法¹⁴⁾に従ってヒト血清を DEAE セルロースカラム, CMセルロースカラムにかけ、檢定活性 1.2×10^4 effective molecule/ml のC2成分をえた。

C 3 ; モルモット血清を0.01MEDTA-GVBにて25倍に稀釈した。(C-EDTA)

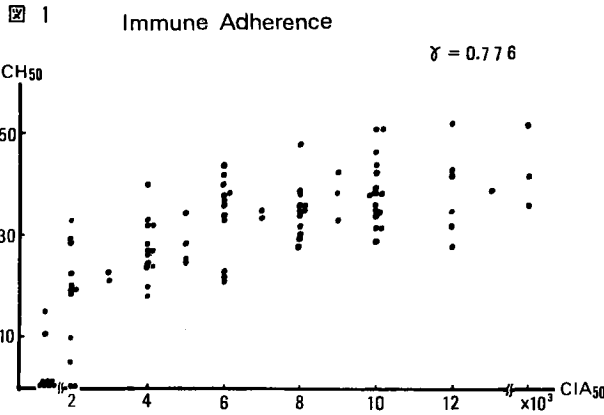
5. 抗補体力価の檢定¹⁵⁾: 被檢血清 (倍数稀釈) 0.8ml とモルモット血清 (3.0 CH₅₀/ml) 0.5ml をよ

く混和し0℃で24時間静置する。これにEA (2.5×10⁸/ml) 0.2mlを加えてよく振盪し37℃で60分間静置後その管底像より凝集度+2にて判定した。

6. Immune-adherence 法による抗体価の測定¹⁶⁾
 :被検血清(倍数希釈)0.5mlと抗原(ヒト肝抽出液)0.2mlを混和後、0℃で30分間静置する。次いで低温下で遠心し2回洗滌する。沈渣浮遊液(GVB⁺にて原量にもどす)0.7mlにモルモット血清(5.0 ch50/ml)0.2mlを加えて、37℃で30分間 incubate し、ヒトO型赤血球浮遊液(4×10⁸/ml)0.1mlを加える。これを37℃で10分間振盪後、さらに37℃60分間静置して血球が十分に管底に沈むのを待ち、管底像よりその凝集の程度を4+, 3+, 2+, 1+, 0と判定した。2+を示す血清の希釈度の逆数で力価を表わした。

成績

1. 血清補体IAHA法活性値



非常に鋭敏な反応である immune-adherence 法による補体活性測定(以下 CIA⁵⁰ と略す)で、C1, C4, C2, C3までの成分変化がどのように補体活性に反映されるかを補体全成分が反応にあずかる50%溶血法測定(以下 CH⁵⁰ と略す)と比較検討した。健常人20名の CIA⁵⁰ 値は6,000~10,000で安定しており、平均8,300をえた。CH⁵⁰ 値と CIA⁵⁰ 値の相関は0.776と高く、CIA⁵⁰ 値最高20,000(52.0 ch50/ml)をみたが、一方溶血法で測定不能例は、IAHA法では2,000以下を示し全く凝集の認められない例(CIA⁵⁰ = 0)と500倍希釈陽性例が含まれていた。

2. 補体成分の測定

表 2 reagents 法による補体成分の測定

	CH ⁵⁰	CH ¹⁰⁰	C 1	C 2	C 3	C 4
急性肝炎	CH50/ml	%	%	%	%	%
46才 女	45.0	123	122	150	133	200
23才 女	40.0	152	135	132	125	119
32才 女	38.0	135	125	139	129	149
慢性肝炎						
46才 女	42.0	121	108	124	142	189
50才 女	41.0	131	95	88	98	67.5
56才 女	0	0	27	16	176	0
前硬変						
33才 男	28.0	79	71	88	117	52
30才 女	19.0	64	62	69	121	18
36才 男	0	0	19	5	157	0
肝硬変						
44才 男	30.0	91	67	77	87	35
50才 男	17.5	30	48	29	136	0.5
49才 男	0	0	19	11	116	0

% : 対照健常者値を100とする。

Reagents を使用した測定結果を、同時に測定した健常者の値(対照)を100%として比較表現すると、Pillemer による100%溶血法CH¹⁰⁰とCH⁵⁰はよく一致した。補体活性低下時の補体成分はC1, C2, C4に減少が認められ、とくにC4の測定不能はCH⁵⁰(およびCH¹⁰⁰)価=0の成績をうる事がうかがわれた。C3は比較的活性を維持し、その変動は溶血活性へ影響することが少なかった。

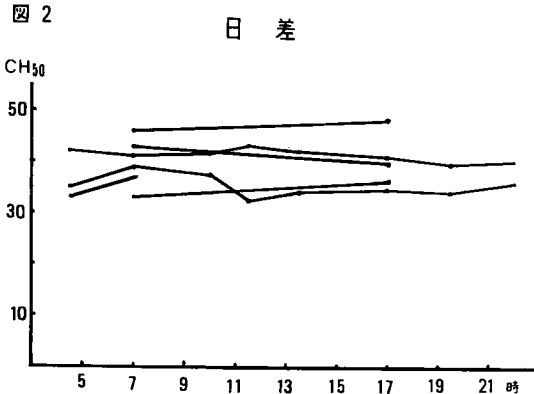
Intermediate cells により測定した各成分はともに増減を示したが、肝硬変ではC1およびC2の減少が著明である。EAC

表 3 intermediate cells による補体成分の測定

	CH50	C 1	C 4	C 2	(IAHA法) CIA ⁵⁰
急性肝炎	CH50/ml	CH63/ml	CH63/ml	CH63/ml	
25才 男	42.5	>16×10 ⁴	1050	390	10×10 ⁴
18才 女	42.5	>16	1200	320	9
49才 女	38.5	15.5	900	245	9
慢性肝炎					
32才 男	44.0	7.2	810	205	6
28才 男	36.0	11.0	620	225	6
59才 女	24.5	11.5	690	114	5
35才 女	21.0	15.5	430	200	3
前硬変					
45才 男	33.0	9.2	510	155	7
25才 男	25.0	16.0	450	195	6
肝硬変					
44才 男	23.0	5.6	430	70	3
63才 男	19.0	4.3	620	65	2
42才 女	14.5	4.4	530	63	2
健常者(8名)	38.5~30.0	16.0~14.5	1020~860	340~235	10~8

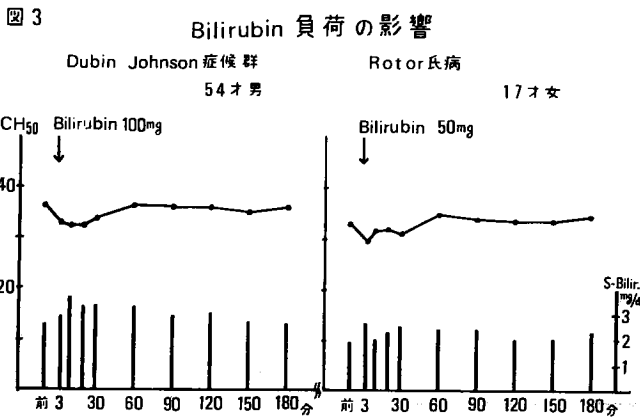
1423までの複合物形成によるIAHA活性は、間接的に、C1、C4、C2の各々の減少をよく反映していることが想像された。

3. 補体の日差変動



入院患者5名(糖尿病2例,慢性肝炎代償期2例,甲状腺機能亢進症1例)の日内変動を観察した。比較的安静を保たせ、早朝4時,朝食前,朝食後2時間,昼食前,昼食後2時間,夕食前,夕食後2時間,就寝前(22時)に各々採血して,血清を4℃に保存の上翌日同時測定をおこなった。各例とも5.0 ch50/ml以内の変動で時間的な有意差は認められなかった。

4. 血清ビリルビンの影響



体質性黄疸2例にビリルビン負荷試験¹⁷⁾を実施し,血清ビリルビン値の変動とCH⁵⁰値の変動を観察した。Dubin-Johnson症候群例(54才男)では負荷前の血清ビリルビン値2.60mg/dl(うち直接型2.20)に対し負荷10分後に3.65mg/dl(直接型2.90)の最高値をえた。CH⁵⁰値は負荷前に36.5ch50/mlであり,

ビリルビン停滞期に一致して32.5ch50/mlまでの一過性の低下を認め,ビリルビン負荷60分後には前値に復した。Rotor氏病(17才女)においても負荷60分後までに前値33.0ch50/mlが29.5ch50/mlまでに一過性の低下を示した。

5. 摘脾の血清補体に及ぼす影響

摘脾を受けた7症例(溶血性黄疸3例,肝硬変4例)の摘脾前後のCH⁵⁰値の変動について検討した。このさい摘脾後については手術侵襲の直接影響を考慮して術後第3ないし4病週についての測定値をもってした。その結果,全例において術後1ヶ月前後で5.0~10.5ch50/mlの上昇を認めた。溶血性黄疸例では術前正常値以下であったCH⁵⁰活性が,摘脾後正常範囲に復する傾向がみられた。肝硬変症例では,術後2ヶ月以上を経て再検すると,術前の値に再び低下する例とほゞ安定した値を維持する例(2年間の臨床経過良好)が認められた。

6. 薬剤の血清補体に及ぼす影響

1) 糖質コルチコステロイド

(a) prednisolone 負荷

糖質コルチコステロイド服用末経験の入院患者4名(肝硬変1例,急性肝炎回復期1例,軽症糖尿病1例,甲状腺機能亢進症1例)にprednisolone 20mgを空腹時経口的に投与してCH⁵⁰値を経時的に測定した。4例とも投与前値に対し投与2時間後には4.0~5.0 ch50/mlの上昇を認めたが,その後の3時間の観察では著明な上昇を認めなかった。

(b) 糖質コルチコステロイド投与の期間による影響

各種の糖質コルチコステロイド剤を長期に投与した15例(5~31週間,prednisoloneに換算して20mg/日,4日/週投与の間歇法による)の経過をみると,10週間までに副作用出現例や臨床的に無効例も含まれるが,

それ以上の継続投与例は慢性肝炎で活動型から非活動型に変化し安定した病状をとった症例である。CH⁵⁰値の変動は不定で中には抗補体作用の出現する症例(後述の症例II 図11)が観察された。

2) 6MP

(a) 投与量による影響

図 4

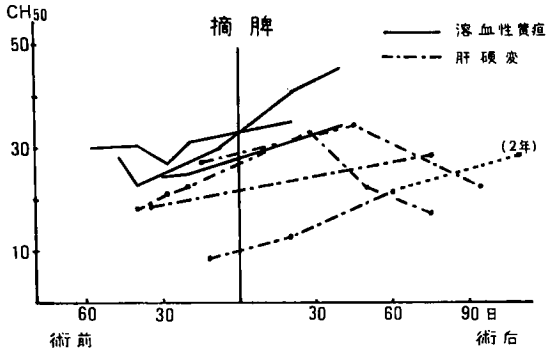


図 6 糖質コルチステロイド 投与 (期間)

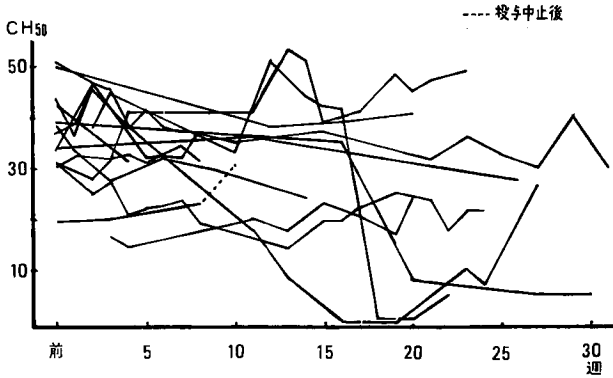
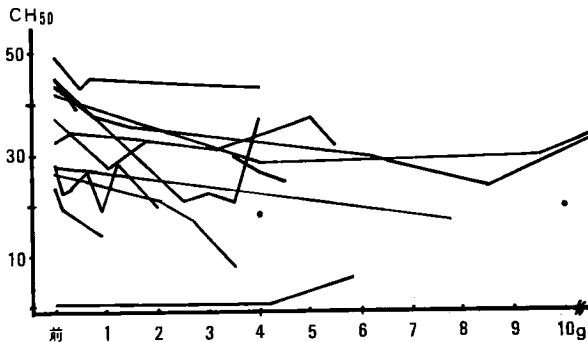


図 7(1) 6MP 投与 (投与量)

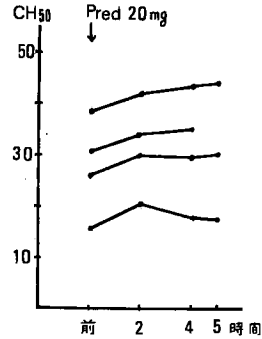


総量0.5~14.5gの6MP投与を受けた13例(50~75mg/日, 4日/週の間歇法による)の経時的観察では, 概してCH₅₀活性低下の傾向を示した。とくに500mg(投与開始後2~3週間)までの初期に5.0CH₅₀/mL以上の低下を示す例が多い。

(b) 投与期間による影響

図 5

Prednisolone 負荷の影響



5週間以上の6MP長期投与例(11例)を観察すると, CH₅₀活性は投与初期に一過性の低下を示すが以後その変動は少なくほぼ安定した。臨床所見より中止した2例の経過では, 投与中止後漸次CH₅₀値は上昇する傾向がみられた。

3) Imuran

(a) 投与量による影響

総量1.0~7.5gのImuran(azathioprine)を服用した50mg/日連日法, または50mg×4日/週の間歇法による)13例についての検討では, 一過性の抗補体作用出現例もあるが投与前に比べてとくにCH₅₀値への影響はみられなかった。

(b) 投与期間による影響

6MPのような一過性の低下は認められずCH₅₀値の変動はとくに目だたなかった。低補体症例の改善もみられない。

7. 抗補体因子に関する検討

1) 血清γ-グロブリン

補体溶血活性20.0CH₅₀/mL以下を示した時期のある症例は検索対象200例中50例であった。10.0CH₅₀/mL以下すな

わちルチーンの測定法では測定不能と表現すべき症例は表4に示すごとくで, 慢性肝炎(遷延性肝炎を含む)に限ると57例中5例(8.8%)である。

肝硬変におけるCH₅₀活性の低下には高γ-グロブリン血症による抗補体作用が想像されるが(第一編にて相関係数-0.350), 全症例で低補体価を示し

図 7(2) 6MP 投与 (期間)

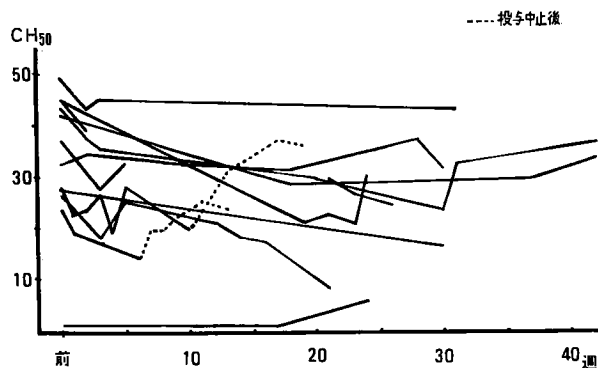


図 8(1) Imuran 投与 (投与量)

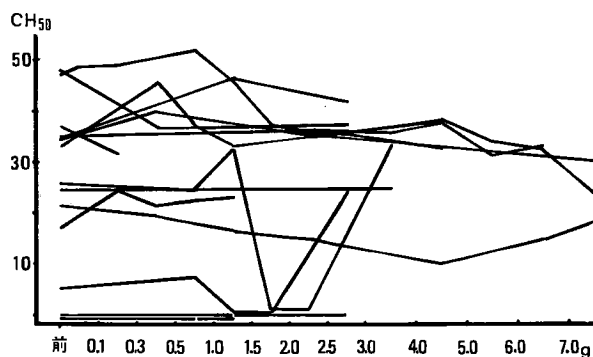
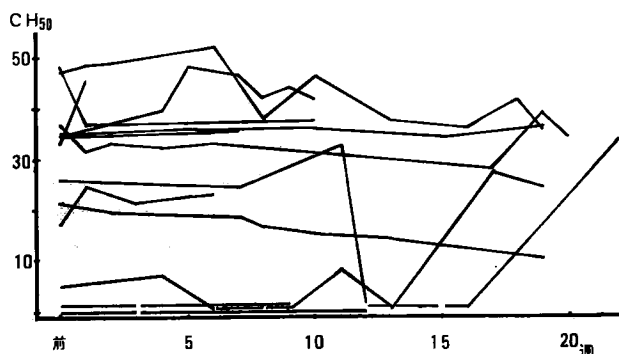


図 8(2) Imuran 投与 (期間)



た血清についてγ-グロブリンとの関係を検討すると図9のごとく、γ-グロブリン3.0g/dl以上の血清において10.0CH₅₀/ml以上の補体活性をみ、1.5g/dl以下の慢性肝炎例で3例中2例ではCH₅₀価は測定

表 4 低補体血症例

	症例数	20.0CH ₅₀ /ml以下	10.0CH ₅₀ /ml以下
急性肝炎	35	0	(0)
急性肝炎遷延型	11	2	(2)
慢性肝炎	46	8	(3)
前硬変	15	9	(3)
肝硬変	48	28	(12)
亜急性黄色肝萎縮	3	3	(3)
中毒性肝炎	6	0	(0)

不能であった。これらのことから、γ-グロブリンの抗補体作用には量的変化よりもその質的变化が関与していることを推定させる。

2) 症例の検討

慢性肝炎活動型においてCH₅₀価の経時的測定中突然に測定不能の時期を呈し再びCH₅₀活性を回復する症例がある。表4の症例中5例に観察された(遷延性肝炎1例、慢性肝炎2例、前硬変2例)。その代表例を記載する。

症例 I 54才 男 会社員

飲酒家、肥満体であったが、入院2年前より脂肪食嫌悪感、全身倦怠感が目だってきた。1年前より黄疸が発現し治癒の傾向がないので当科に転科した。入院時、肝、脾を触知せず、肝機能検査では血清ビリルビン値0.95mg/dl、S-GOT 150k.u.、S-GPT 500k.u.、塩化コバルト反応R、CCF(±)硫酸亜鉛反応11.2、血清アルカリ性ホスファターゼ2.4 Besssey u.、血清コレステロール268 mg/dl.、血清鉄238 γ/dl.、血清蛋白量7.2 g/dl.、A/G 1.04であった。その後の経過では、黄疸の増強はみないが数回のシューブをくりかえして、血清γ-グロブリン値の増加持続、抗肝抗体陽性が続いた。CH₅₀価の変動は入院時55.0 CH₅₀/mlと高次シューブの時に低下の傾向をみて約1カ月余安定していたが、抗肝抗体強陽性となった時期に一致してCH₅₀価測定

不能の時期を呈した。その後漸次上昇の傾向をみていたが、自覚的に、臨床的にとくに変りない状態で再びCH₅₀活性を失い3カ月以上を経ている。肝の組織診断では広範肝壊死で、再検時にも次第に小葉

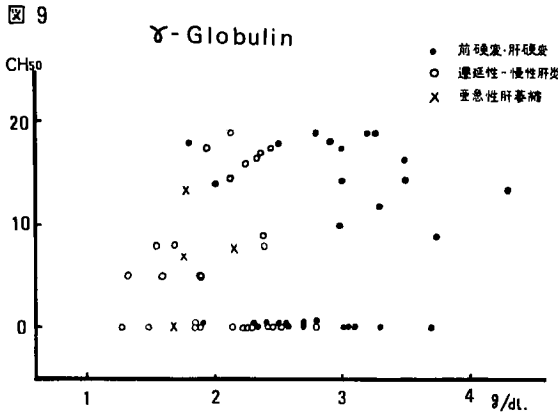


図10 慢性肝炎活動型 54才男

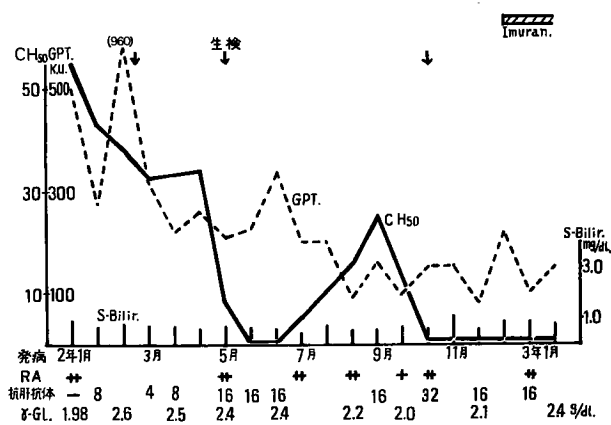
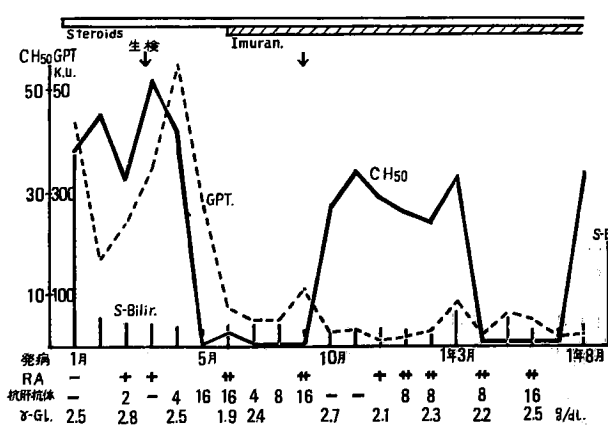


図11 慢性肝炎活動型 59才女



改築が認められ、肝細胞の再生傾向弱く細胞の壊死や変性が著明であった。

症例II 59才女主婦

生来著患を知らない。子宮癌(初期)の手術時輸血400mlを受け、術後2カ月目に黄疸をきたして内科に転科した。転科時、肝機能検査では血清ビリルビン値7.45mg/dl. S-GOT 110k. u. S-GPT 440k. u. 塩化コバルト反応R。CCF (+) 硫酸亜鉛反応14.2血清アルカリ性ホスファターゼ3.4 Besseyu. 血清コレステロール282mg/dl. 血清鉄194 γ /dl 血清蛋白量7.2g/dl. A/G 0.75であった。発病初期より血清 γ -グロブリンの増加(2.48g/dl), S-GPTの変動が著明で発病3カ月目の肝生検では、急速な線維化の進行を指摘された。図11に示すごとくシュープ後(S-GPT 550k. u. まで上昇)CH₅₀活性は測定不能となった。その時期の血清学的所見は、RA (+) CRP (-) ASL O 50 Todd, Coombs 試験陰性, LE現象 (-) 寒冷凝集反応8倍, Paul-Bunnell 反応14倍, Wasserman 反応(-) 抗肝抗体(補体結合反応)4~16倍陽性である。その後一般状態は著変なく約4カ月後CH₅₀値は正常値に復した。Imuran 50mg/日, 週3日投薬と Paramesone 3.0mg/日, 週4日投薬を併用し続けるうちに再び血中抗肝抗体が出現し、次いで、CH₅₀値が測定不能の時期に入った。

3) 血清学的解析

前述した症例I(表5では症例A)のCH₅₀値測定不能期の血清を中心として、低補体価を示す典型的な肝硬変例(症例B)と亜急性黄色肝萎縮例(症例C)の血清について以下の検討を加えた。

(a) 新鮮モルモット血清を用いた場合
3.0 CH₅₀/mlのモルモット血清に対する抗補体価を井上ら¹⁸⁾の法に準じて、被検血清を未処理のまま、56℃30分間非働化した後とで測定した。症例Aには新鮮血清中に抗補体因子を有し、

表5 肝機能検査および血清学検査成績

	症例A*	症例B	症例C
	慢性肝炎 54才 男	肝硬変 52才 男	亜急性黄色肝萎縮 66才 男
血清総ビリルビンmg/dl	直接ビ 0.66(0.30)	5.50(3.80)	17.5(15.0)
S-GPT	123	22	2100
CCF	±	+	+
塩化コバルト反応	R _s	R _s	R _s
チモール混濁反応	7.7	11.3	7.1
硫酸亜鉛反応	12.1	17.0	8.5
血清アルカリフォスファターゼ Bessey u.	2.8	3.3	6.5
血清コレステロールmg/dl	230	159	165
血清鉄 γ /dl	174		225
赤血球 $\times 10^4$	460	456	460
白血球	7800	2600	8200
Hb (ザーリー法) %	95	85	88
赤沈 (1時間) mm	44	3	2
血清総蛋白 g/dl	7.0	6.8	5.4
アルブミン %	44.5	32.5	48.5
α_1 -グロブリン %	2.0	2.5	4.0
α_2 -グロブリン %	7.5	5.0	4.5
β -グロブリン %	15.5	12.0	12.0
γ -グロブリン %	20.5	48.0	31.0
A/G	0.80	0.48	0.94
Coombs 試験	-	-	直接(+), 間接(-)
RA-テスト	# (640倍)	# (320倍)	# (320倍)
CRP	-	-	#
Paul-Bunnell 反応	224倍	112倍	/
寒冷凝集反応	8倍	8倍	/
Waalser-Rose 反応	陰性	陰性	/
Wassermann 反応	-	定性(+), 定量(-)	/
cryoglobulin	-	-	-
Mantoux 反応 (mm)	10 \times 12	12 \times 15	/
LE 現象	-	-	-
抗肝抗体	32倍	16倍	-
抗腎抗体	16倍	8倍	-
(抗補体作用)	16倍	8倍	-
CH ₅₀	0	0	7.0
C1	2.5 $\times 10^4$	9.6 $\times 10^4$	
C4	0	0	
C2	0	0	
CI A 50	2000	500	

※ (図10) の症例

表6 抗補体作用

(a) 新鮮モルモット血清について				
	症例A	症例B	慢性肝炎*	
被検新鮮血清	128倍	64倍	-	
被検非働化血清	128倍	128倍	32倍	
※抗肝抗体陰性 CH ₅₀ : 26.0				
(b) 健常ヒト血清について				
	症例A	症例B	症例C	健常者
混和直後				
自己血清	5.0	0		38.0
ヒト血清+自己新鮮血清	24.0	28.5		38.0
ヒト血清+自己非働化血清	19.5	19.5		24.0
4℃ 24時間 incubate 後				
自己血清	0	0	6.5	40.5
ヒト血清+自己新鮮血清	0	34.0	23.0	41.0
ヒト血清+自己非働化血清	0	28.0	17.0	38.5

単位: CH₅₀/ml

他の対照例と異なって非働化してもその力価は不変であった。

(b) 健常ヒト血清を用いた場合

新鮮ヒト血清 (血液型O型Rh (+), 38.0CH₅₀/ml) に被検血清を未処理, 56℃30分間処理の別に等量づつ混合し, 混和直後と4℃24時間 incubate 後の検体 (遠心後), 50%溶血法で測定した。混和直後では症例A, 症例Bとも (患者補体価+健常者補体価) $\times 1/2$ 以上の値を示し, 新鮮血清および非働化血清ともに抗補体作用を示していない。一方, 24時間 incubate 後では症例A血清は対照に比べて著明な抗補体作用を示し, 健常者血清のCH₅₀価測定は不能となった。見かけ上同じくCH₅₀価測定不能の症例B, 症例Cには認められない現象である。

(c) 吸収処理の影響

表7 吸収処理の影響

処理後CH ₅₀	症例A	症例B	症例C	健常者
未処理	0	0	7.0	41.0
ヒツジ血球吸収血清	0	34.5	/	40.0
E A 吸収血清	0	37.5	37.5	42.0
Latex 吸収血清	0	38.0	34.5	43.0
2-ME 処理血清	33.0	33.0	/	36.0

単位: CH₅₀/ml

異好抗体 (-ヒツジ赤血球), ウサギ γ -グロブリン (-ヒツジ感作赤血球), ヒト変性 γ -グロブ

リン (- Latex 粒子) を各々吸収する目的で次の処理をおこなった。① 新鮮血清 + 5% ヒツジ赤血球液 ($1 \times 10^9 / \text{ml GVB}^*$) (以下ヒツジ血球吸収血清), ② 新鮮血清 + 10% ヒツジ感作赤血球 ($1 \times 10^9 / \text{ml GVB}^*$) (以下E A 吸収血清), ③ 新鮮血清 + Latex 粒子液 (Hyland 社製) (以下 Latex 吸収血清) 各々を当量づつ混合し, 37°C 30分間よく混和後 4°C で24時間静置し, $3,000 \text{ r. p. m}$ 10分間遠心後その上清の補体活性を50%溶血法で測定した。また, 2-ME (2-mercaptoethanol) 処理をおこなった血清²⁷⁾についても測定した。その結果, 表7のごとく症例B および症例C では各吸収処理によって補体活性の回復がみられたが, 症例Aの抗補体因子には影響を与えなかった。しかし, 2-ME 処理によって抗補体因子を破壊すると結合あるいは吸着されていた補体成分が遊出すると想像させられる結果をえた。

(d) 補体結合反応について

表8 補体結合反応について (抗肝抗体)

	症例A	症例B	健常者
血清			
未処理	16倍(32)	8倍(8)	—
56°C 30分処理	64倍(32)	8倍(8)	—
65°C 20分処理	8倍(4)	4倍(2)	2倍(2)
ヒツジ血球吸収	32倍(32)	16倍(16)	4倍(4)
E A 吸収	64倍(32)	16倍(8)	4倍(2)
Latex 吸収	8倍(32)	16倍(8)	— (-)
2-ME 処理	2倍(2)	4倍(2)	/
血清 7 S 成分			
未処理	4倍(2)	4倍(-)	
56°C 30分処理	32倍(16)	64倍(32)	
65°C 20分処理	>64倍(>64)	>64倍(>64)	

(抗補体作用)

溶血阻止の抗補体作用は補体結合性抗体の測定時にも関与することが考えられる。そこで表8のごとく上記の血清処理を種々おこない, ヒト健常肝抽出液を抗原として補体結合反応によりこの抗補体作用を検討した。さらにDEAEセルロースで血清7S成分を分離し¹⁸⁾同様に補体結合反応をおこなった。

その結果表8のごとく, 新鮮血清中に含まれる抗補体因子は, 56°C 30分では不変であるが, 65°C 20分の熱処理では破壊されて抗補体作用は低下し, 2-ME 処理血清でも同様の低下をきたした。しかし, ヒツジ赤血球, ヒツジ感作赤血球, Latex 粒子では吸収されない。また分離した7S成分には抗補体作用

を認めず, 7S成分を熱処理すると抗補体作用の再現がみられるが, これは変性蛋白の非特異的反応と考えられる。

(e) RA 因子について

表9 RA 因子について

(RA テストスライド法)

	症例A	症例B	健常者
未処理	+	+	—
56°C 30分処理	+	—	—
ヒツジ血球吸収血清	±	—	—
E A 吸収血清	—	—	—
血清 7 S 成分	—	+	/

対象の3症例はともにRAテスト陽性で, 定量法では640倍までの凝集価を示したことからこれらの血清中の γ -グロブリンには質的变化が推定される。ところでこれらの血清につきヒツジ赤血球で吸収または感作赤血球で吸収をおこなわせると表9のごとくRAテストは陰性となった。また症例Bの肝硬変症血清から分離した7S成分では, RAテストは陽性であった。

(f) 抗肝抗体について

表10 抗肝抗体について

	症例A	症例B
(a) I A H A 法		
56°C 30分処理*	2048倍	512倍
血清 7 S 成分	256倍	32倍
7 S 成分 56°C 30分処理	512倍	128倍
※対照健常者血清 128倍		
(b) 三段法 (Rapp らの方法による)		
	4 倍	—

種々の非特異的因子の介入が抗肝抗体価の判定に支障をきたすことを考慮し, 抗補体作用を除去して抗肝抗体を測定するために Rapp らの三段法¹⁹⁾をこころみ, また抗体測定の感度を上げるためにより鋭敏な immune-adherence 法¹⁶⁾で検討した。その結果表10のごとく, 抗補体作用に影響される補体結合反応法を用いた成績と異なり, 抗補体作用のみられた症例Aにおいて抗肝抗体が明らかに検出された。

考 按

CH_{50} 価の生理的変動を明らかにし, 測定条件を一定にしようとして CH_{50} 活性の日差変動を検討し

てみると、その差は $5.0\text{CH}_{50}/\text{ml}$ 以内に止まり、大きい変動のないことを認めた。ところで荒田ら²⁰⁾の観察によれば、健常者の日常生活においては昼食前後に最低値をとる日内変動を示すという。そこで CH_{50} 値を比較検討するさいには、採血条件を一定にする必要があるので、著者は入院患者の採血を朝食前に一定して CH_{50} 値の測定を実施することにした。

さて肝障害時の過ビリルビン血症と CH_{50} 活性との関係については、第一編でも述べたように病期によって異なり明らかなでない。そこでさらに Bilirubin 100mg を静注負荷して CH_{50} 活性との関係をもと、血清ビリルビン値の上昇時に CH_{50} 値は一過性にやや低下を示すが、その後は短時間で前値に復した。このことからビリルビンによる抗補体作用は考えがたいが、さらに閉塞性黄疸や中毒性肝炎で高ビリルビン血症を伴う例では急性肝炎より高い CH_{50} 活性が認められることから生体内ではビリルビンによる抗補体作用は明らかなでないといえる。

次に溶血性黄疸や Banti 氏症候群を含む肝硬変にみられる脾機能亢進が CH_{50} 活性に与える影響は網内系の機能という点で無視できないので、摘脾例について経時的に観察をおこなった。その結果 CH_{50} 値は、術前に低値を示した溶血性黄疸や脾機能亢進を伴う肝硬変ではともに術後1カ月前後で正常範囲にまで回復し、予後良好な症例ではそのまま正常値を保っている。藤川²¹⁾、酒井²²⁾らも同様な傾向を観察している。ただし肝硬変ではその病態に応じて摘脾後再び低補体価を示すものも見受けられた。

次に抗炎症剤あるいは免疫抑制剤として糖質コルチコステロイド剤(以下ステロイドと略す)、6-mercaptopurine (6 MP) および azathioprine (Imuran) が慢性肝炎活動型や前硬変症例に投与される。これらの治療効果は症例により異なり、容易には結論づけられないが長期連用例の経時的観察では、6 MP 投与では開始初期(第2~3週)に CH_{50} 値の低下を示すことが特徴的で、Imuran 投与ではその低下は認められなかった。さらに6 MP 投与を中止した症例では中止の後に CH_{50} 値の上昇がみられた。そこで6 MP によるこの現象が補体産生臓器に与える影響か、免疫反応にあずかる細胞への抑制作用²³⁾によるものかは明らかなでないが、6 MP がステロイド剤および Imuran よりも補体抑制作用を示したとも考えられた。すでに Gewurz²⁵⁾らは一連の実験からステロイド剤の免疫反応抑制作用は細胞膜に対するよりも、抗補体作用による点を重視してい

る。すなわち彼らは溶血反応のみならず補体関与の immune-adherence 反応, phagocytosis などを抑制し、モルモット血清とステロイド剤の preincubation をおこなった反応系ではC 1, C 2, C 3, C 4 の著明な減少が認められるとした。また直接には抗補体作用を示さない程度の低濃度のステロイド剤が aggregated γ -グロブリンの抗補体作用を抑えるという成績を発表している。著者の成績ではステロイド剤による補体系への作用を認めなかったが、6 MP では認めたとはいえよう。

次に慢性肝炎の経過中には特異的に CH_{50} 活性の低下をきたす症例があることを指摘したが、臨床的にはこの低補体価を示す時期に自覚的および他覚的にも著変はなく、血清学的にはR A 因子陽性、血清 γ -グロブリンの高値、補体結合性抗肝抗体の出現を認めるが、 CH_{50} 値の変動をみない他の慢性肝炎活動型の経過ととくに差異を認めていない。ところで血清中に出現する抗補体因子として、 γ -グロブリン^{26) 27)}、R A 因子^{28) 29) 30)}、cryoglobulin^{31) 32)}、臓器崩壊物質、抗原抗体複合物の生成などがあげられている。そこで上記の抗補体作用を示す血清(症例I)と抗肝抗体陽性(CH_{50} 値測定不能)の肝硬変症例の血清について血清学的検討をおこなってみると、症例Iの抗補体因子は① 健常ヒト血清の補体を吸着し、② ヒツジ赤血球、ヒツジ感作赤血球、Latex 粒子で吸収されず、③ 2-ME 処理で破壊される。④ 血清7S 成分に含まれることは少ないなどの成績をえている。これに反し、肝硬変症例の血清では① 健常ヒト血清の CH_{50} 値低下をおこさず、② ヒツジ赤血球、ヒツジ感作赤血球、Latex 粒子で吸収される因子を含む。③ 2-ME 処理で抗補体作用を失う。④ 血清7S 成分には補体結合性抗肝抗体は殆ど含まれないが、R A テストで証明される変性成分が含まれる。⑤ 抗原抗体複合物で吸収後、抗肝抗体は証明され難くなるなどの成績をえた。そこで慢性肝炎症例で低補体価を示す血清は抗原抗体反応による補体の消費ないし soluble complex による補体吸着が考えられ、著明な蛋白代謝異常を伴う肝硬変症例で低補体価を示す血清とは明らかに質的に相違していることが認められる。

抗補体作用を呈する機序については、Weigle ら^{33) 34)}は、新鮮血清(補体)を加えた場合にみられる反応系(抗原抗体補体複合物-Ag. Ab. C complex と略す)で補体の窒素量には増減はないが、溶血活性のみには抑制をおこす抗補体現象を① Ag. Ab.

C complex 中の補体または抗体が抗補体として作用する。② 加えた新鮮な補体中の非窒素成分が Ag·Ab·C complex に附加して活性を失う。③ Ag·Ab·C complex が新鮮補体中の C 2, C 4 を不活性化する^{35) 36)}。④ Ag·Ab·C complex の解離がおり新鮮補体中の成分を加えて再結合がおこると想像している。一方、補体活性低下の原因として、特定の補体成分の著減、補体 inhibitor の活性化および turn-over などがあげられる。また臨床的に観察しえたところでは補体成分 C 1, C 2, C 3, C 4 に関しては、C 2, C 4 の値がより鋭敏に全補体価測定に反映しているようである^{37) 38) 39)}。

補体の関与する免疫現象を生体防衛反応の立場から E A C 1423 までが結合する immune-adherence, immune phagocytosis と補体全成分の結合による細胞障害性の immune cytotoxicity, immune hemolysis について考察すると、経過中に現われる補体活性低下ないし測定不能という現象の臨床的な意義は複雑である。Monton ら⁴⁰⁾ は γ -グロブリンの抗補体作用は soluble Ag·Ab·complex に補体が作用するのを妨げることによるとし、Davis²⁸⁾ や Milgrom ら²⁹⁾ は R A 因子が補体と拮抗作用を示すとし、いずれも補体の関与する組織障害性を抗補体因子で抑制ないし中和しようとする生体反応の一つの現われと解釈している。また、補体を消費する Ag·Ab·C complex (soluble) の形成は phagocytosis の促進⁴¹⁾ や網内系による clearance の一助になって⁴²⁾ Ag·Ab 代謝亢進の一端を担っていることも想像される。さらに慢性化疾患の病的状態においてのみならず、Silverstein³⁷⁾ や鳥巣ら⁴³⁾ は何ら所見のない健常者の中に低補体価を示す例を報告し、補体の生体内での役割については今後の多角的な研究に期待がもたれる。

結 論

肝疾患において血清補体の変動におよぼす諸因子を検討し、次の結論がえられた。

1) 低補体価血清の補体成分は C 1, C 4, C 2 の減少が著明で、C 3 の活性は比較的保持されていた。C H₅₀ 価と C I A₅₀ 価は正の相関を示した ($\gamma = 0.776$)。

2) 比較的安静な状態 (入院) では、C H₅₀ 価の日差変動は殆ど認められない。

3) 高ビリルビン血症における生体内でのビリルビンによる抗補体作用は認め難い。

4) 脾機能亢進例では、C H₅₀ 価は低下の傾向を示し、摘脾後その値は正常範囲に復帰した。

5) 慢性肝炎活動型 72 例中に C H₅₀ 価測定不能の時期を呈した症例を 5 例経験した。

6) この C H₅₀ 価測定不能時の血清は、新鮮ヒト血清およびモルモット血清の補体を不活化し著明な抗補体作用を示した。そのさい、抗原抗体補体複合物の形成による影響が推定された。

7) 肝硬変症例における血清の抗補体作用は蛋白代謝異常による非特異的な因子の関与が考えられた。

8) 糖質コルチコステロイドの長期投与および azathioprine の服用例では、C H₅₀ 価の特異な変動はみられなかった。

9) 6 MP 投与例では、一般に C H₅₀ 活性の抑制傾向がみられ、服用中止後 C H₅₀ 価の上昇が認められた。

稿を終るにあたり御指導、御校閲を賜った小坂淳夫教授に深謝するとともに、本研究にさいし直接御指導を頂いた熊本大学医学部第三内科学教室長島秀夫教授に厚く感謝の意を表します。

(本論文の要旨は第16回、第17回日本アレルギー学会総会において発表した。)

文 献

- 1) Ciba Foundation Symposium: Complement, J. & A. Churchill, London. 1965
- 2) Seiichi Asano, Kiku. Marumo, Yoshiyuki Igaki, Eizo Toyozumi, Michihito Okubo, Toshio Tamura, Kaname Kurata & Kiyotaka Kawai: アレルギー, 17, 597, 1968
- 3) Lange, K., Wasserman, E. & Slobody, L. B.: Ann. Intern. Med., 53, 636, 1960
- 4) Kabat, E. A. & Mayer, M. M.: Experimental Immuno chemistry 2nd ed., p. 133, Charles C. Thomas, Springfield, Illinois. 1961
- 5) 高橋守信, 真弓 忠, 古瀬礼子, 西岡久寿弥: Minophagen Med., Review 9, 98, 1964
- 6) Nishioka, K.: J. Immunol., 90, 86, 1963
- 7) 山村雄一, 石坂公成: 免疫化学, p. 619, 朝倉書店, 東京. 1963
- 8) Ecker, E. E., Pillemer, L. & Seifler, S.

- : J. Immunol., **47**, 181, 1943
- 9) Pillemer, L., Blum, L., Lepow, I. H., Wurz, L. & Todd, E. W. : J. Exp. Med., **103**, 1, 1956
 - 10) Wedgwood, R. J. : Immunitätsforschung und experimentelle Therapie, **118**, 358, 1959
 - 11) 西岡久寿弥, 橋武彦, 岡田英親, 向島達, 鳥巢要道, 荒田学, 近江和夫, 上山陽子: 蛋白質核酸酵素, **11**, 1605, 1966
 - 12) Borsos, T., Rapp, H. J. & Cook, C. T. : J. Immunol., **87**, 310, 1961
 - 13) Austen, K. F. & Beer, F. : J. Immunol., **92**, 946, 1964
 - 14) Borsos, T., Rapp, H. J. & Cook, C. T. : J. Immunol., **87**, 330, 1961
 - 15) 井上雅晴, 岡田秀親, 古瀬礼子: アレルギー, **15**, 912, 1966
 - 16) 藤井源七郎, 後藤俊二, 石橋幸雄: アレルギー, **15**, 928, 1966
 - 17) 金井泉: 臨床検査法提要 22版, 金原出版, 東京. 1963
 - 18) Peterson, E. A. & Sober, H. A. : A variable gradient device for chromatography in a laboratory manual of analytical methods of Protein chemistry I, P.88, Pergamon Press LTD, London. 1960
 - 19) Rapp, J., Crisler, C. & Borsos, T. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **120**, 361, 1965
 - 20) 荒田学, 鳥巢要道, 園崎秀吉: アレルギー, **15**, 921, 1966
 - 21) 藤川克躬: アレルギー, **15**, 364, 1966
 - 22) 酒井好古: アレルギー, **16**, 635, 1967
 - 23) Borel, Y. & Fauconnet, M. : J. Exp. Med., **122**, 236, 1965
 - 24) Schwartz, R., Stack, J. & Dameshek, W. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **99**, 164, 1958
 - 25) Gewurz, H., Wernick, P. R., Quie, P. G. & Good, R. A. : Nature, **208**, 755, 1965
 - 26) Marcus, D. M. : J. Immunol., **84**, 273, 1963
 - 27) Cooper, R. G. : J. Lab. Clin. Med., **63**, 404, 1964
 - 28) Davis, J. S. & Bollet, A. J. : J. Immunol., **92**, 139, 1964
 - 29) Milgrom, F. & Witebsky, E. : Immunopathology IV, P. 337, Schwabe & Co Basei, New York. 1965
 - 30) Davis, J. S. & Torrigiani : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **123**, 958, 1967
 - 31) Balázs, V. & Fröhlich, M. M. : Amer. J. Med. Sciences, **251**, 89, 1966
 - 32) Meltzer, M. & Franklin, E. C. : Amer. J. Med., **40**, 828, 1966
 - 33) Weigle, W. O. & Maurer, P. H. : J. Immunol., **79**, 211, 1957
 - 34) Weigle, W. O. & Maurer, P. H. : J. Immunol., **79**, 319, 1957
 - 35) Stratton, F. & Gunson, H. H. : Nature, **198**, 554, 1963
 - 36) Willoughby, W. F. & Mayer, M. M. : Science, **150**, 907, 1965
 - 37) Silverstein, A. M. : Blood, **16**, 1338, 1960
 - 38) 荒田学: アレルギー, **18**, 245, 1969
 - 39) 藤川克躬, 永木和義, 平松誠一, 稻井真弥: アレルギー, **15**, 989, 1966
 - 40) Morton, J. I. & Deutsch, H. F. : Arch. Biochem. & Biophys., **64**, 26, 1956
 - 41) 表原弘, 長島秀夫: 日内会誌, **57**, 1137, 1968
 - 42) 魚脇路弘, 長島秀夫: 日内会誌, **57**, 1168, 1968
 - 43) 鳥巢要道, 荒田学, 園崎秀吉, 馬島尚: アレルギー, **15**, 1911, 1966

Studies on serum complement in liver diseases

Report 2. Examination to factors affecting the fluctuation of serum complement activity

Chizuko Sudo

The 1st Department of Internal Medicine
Okayama University Medical School
(Director : Prof. Kiyowo Kosaka)

Various factors to influence serum complement activity were studied in hepatic disorders. The results were as follows :

1) The definite correlation was observed between serum complement hemolytic activity (CH_{50}) and immune adherence activity (CIA_{50}). As to the complement components in sera with low level of CH_{50} , C 1, C 2 and C 4 activity were reduced and C 3 activity remained relatively normal.

2) CH_{50} levels in patients with hypersplenism were subnormal and returned to normal range after splenectomy.

3) In 5 cases out of 72 patients with active chronic hepatitis, CH_{50} levels in the normal range became suddenly unable to be measured by routine method and recovered normal after several weeks or months showing no change in the clinical features. The sera, at the stadium impossible to measure CH_{50} levels, inactivated the complement activity of fresh human serum and guinea pig serum, and showed anticomplementary activity suggesting of Ag—Ab—C complex formation.

4) Most of anticomplementary activities in liver cirrhosis were suspected to be non-specific reaction due to abnormal protein metabolism.

5) There was a tendency of the low CH_{50} level in cases of 6MP administration, while no influences on CH_{50} level fluctuation in clinical course were found with glucocorticosteroids or azathioprine administration.