

氏名(本籍)	伊藤清子(茨城県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博乙第944号		
学位授与年月日	平成6年1月31日		
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当		
審査研究科	医学研究科		
学位論文題目	補体制御因子 Decay-accelerating factor による C3 分解酵素の解離失活に対する Nephritic factor の影響		
主査	筑波大学教授	医学博士	深尾立
副査	筑波大学教授	医学博士	柏木平八郎
副査	筑波大学教授	医学博士	小山哲夫
副査	筑波大学教授	薬学博士	後藤勝年
副査	筑波大学教授	医学博士	中井利昭

## 論文の要旨

### <目的>

血清中補体が持続的に低値を呈する特異な腎炎患者が存在することが知られている。これは、なんらかの原因により活性化されて生じた C3 分解酵素に結合してこれを安定化させる C3 nephritic factor (C3 NeF) がこのような患者に存在し、血清 C3 を持続的に分離しているために起きた現象であると考えられている。

一方、やはり血清中補体が低値な腎炎患者に、C3 NeF に類似の性質を持つ C4 nephritic factor (C4 NeF) が発見された。これは、古典経路の C3 分解酵素である C4b2a 複合体に結合して、その解離失活を阻止することにより連続的に C3 を分解し続ける。この C4 NeF は、C4b2a 複合体に対する自己抗体であり、C3 NeF と同様に、補体制御因子の C4-bp, I 因子あるいは CRI などによる C4b2a 複合体の解離失活促進作用も阻止する。

これらの C3 分解酵素 NeF 結合体は、補体制御因子の C4-bp, H 因子, I 因子あるいは CRI などによる解離失活促進作用を受けにくいとされている。しかし、ほとんどの細胞膜上であって、細胞膜上に形成された C3 分解酵素にすばやく作用して、これら酵素の解離失活を促進させる補体制御因子のひとつである decay accelerating factor (DAF) が、C3 分解酵素 NeF 結合体にどのような影響を与えるのかは全く不明である。

本研究の目的は以下の4点である。①今回発見された2人の腎炎患者の血清補体が持続的に減少している原因が、C3 NeF と C4 NeF によるものであることを明らかにし、すでに報告されているそれら

との異同を検討する。②DAF が C3 分解酵素 NeF 結合体にどのような影響を与えるのか明らかにする。③細胞膜上に DAF が存在する時細胞膜上で C3 分解酵素が形成される際に、NeF と DAF の両者が C3 分解酵素形成に与える影響を明らかにする。④副次的目的として、NeF の一部が患者血中で C3 分解酵素 NeF 結合体を作り、これが持続的に C3 を分解しているという仮説を実証するために、C4 NeF が検出された患者血清から、C3 を持続的に分解する物質を精製し、この物質が C3 分解酵素 NeF 結合体であることを明らかにする。

#### <対象と方法および結果>

C4 NeF を慢性糸球体腎炎患者血清から QAE-sephadex, A50, protein A-sepharose 4 B, A / Fe-sepharose 4 B の各カラムを順次用いて精製した。

C3 NeF は、MPGN ・ Type I の患者血清から DEAE-sephacel, Sephadex G 200 の各カラムを順次用いて精製した。

得られた C4 NeF と C3NeF の同定は、ゲル内免疫沈降反応（オクタロニー法）と SDS-PAGE にて行なった。それらの活性（C4b2a 活性, C3bBb 活性）は、抗ヒツジ赤血球ウサギ抗体を結合した感作血球に補体を結合させた溶血中間反応体を使い溶血反応で求めた。

補体因子は、モルモット血清から精製した補体因子（C1, C2, C6, C7, C8, C9）とヒト血清から精製した補体因子（Cls, C4, C2, C3, C5, B 因子, D 因子, C4-bp, H 因子）、およびヒト赤血球膜から精製した DAF を使用した。対照として健康成人 20 人プール血清を用いた。

NeF が存在する患者血清の持続的 C3 低下現象が、NeF に結合した C3 分解酵素によるものであることの証明は、患者血清から 2 種のカラムクロマトグラフィーを使って C3 を不活性化する C3 分解複合体を精製し、これに 125I を標識し、ヒト IgG 抗体と反応する免疫沈降物を SDS-PAGE にて解析した。

#### <結果>

##### 1. C4 NeF 存在腎炎患者血清の性状

1. 患者血清を正常ヒト血清および精製 C3 に加え反応させた後に残る C3 活性は、加えた患者血清の濃度に依存して不活化された。

2. 患者血清と EAC14b2a を反応させ、補体を加えて EA 上に残る C4b2a の溶血活性を測定すると、患者血清は C4b2a 活性を減少させないことから、患者血清中には C3 分解酵素である C4b2a 複合体の解離失活を阻止し安定化する C4NeF の存在が示唆された。

3. 患者血清の C4b2a 複合体の解離失活阻止効果は加える患者の量に比例した。

##### 2. C4NeF の精製とその性質

1. C4NeF の C4b2a 安定化作用（C4NeF 活性）を指標に患者血清から精製した C4NeF は、ゲル内沈降反応と SDS-PAGE にて IgG 3 抗体と同定できた。

2. この精製 C4NeF は EAC14b2a によってのみ吸収されたことから、C4NeF は C4b2a 複合体と特異

的に結合する物質であることが分った。

3. EAC14b2a と精製 C4NeF を反応させても、C4b2a の活性が減少しないことから、C4NeF は EAC14b2a 上の C4b2a と結合して、その解離失活を阻止して安定化させることが分った。

4. 液相中で精製 C4NeF 存在下に C4, C2, Cls を反応させ、ついで C3 と反応させて、C3 の残存溶血活性をみると、C4NeF が存在すると C4b2a 複合体の C3 活性不活化能力は減弱しなかった。

### 3. C3NeF の性質と特徴

1. 血清 C3 が検出限界である MPGN・Type I 腎炎患者の血清は精製 C3 の溶血活性をいちじるしく低下させ、この血清から精製した C3 不活性化物質は SDS-PAGE にて IgG 抗体と同定できた。なお本血清中に C4NeF は存在しないことはあらかじめ確認されている。

2. EAC4b3bBb にこの精製 IgG 分画を加えて、EA 上の C3bBb の残存活性を溶血反応にてみると、精製 IgG 分画の濃度に依存し C3bBb の解離失活が阻止され安定化したことから、この分画に C3NeF が存在すると推察された。

### 4. DAF による C3 分解酵素の解離失活促進作用に対する NeF の効果

#### 4-A. C4NeF で安定化された C4b2a 複合体に対する DAF の影響

1. EAC14b2a に C4NeF を結合させた EAC14b2aNeF に DAF を作用させ、EA 上の残存 C4b2a 活性を溶血反応にて測定したところ、EAC14b2aNeF は DAF の作用を全く受けなかった。

2. EAC14b2aNeF に C3 を作用させ EAC14b2a3bNeF を作成し、これに DAF を作用させた。この結合物に C5 を作用させたところ、C4 NeF で安定化された EAC14b2a3b と C5 の反応に DAF は影響を与えなかった。すなわち、C4NeF は C5 分解酵素に対する DAF の作用も阻止した。

#### 4-B. C3NeF で安定化された C3bBb 複合体に対する DAF の影響

1. EAC4b3b に C3NeF と B 因子および D 因子を反応させて EAC4b3bBbNeF を作成し、これに DAF を反応させ残存 C3bBb 活性を溶血反応にて測定したところ、活性は若干失活した。したがって、C3NeF は DAF の C3bBb 複合体に対する解離失活促進作用を部分的に阻止することが明らかとなった。

5. EA にあらかじめ組み込ませた DAF が、C4NeF 存在下における C4b2a 複合体形成、あるいは C3NeF 存在下における C3bBb 複合体形成に与える影響。

1. EAC14b あるいは EAC4b3b に DAF を反応させ、EDAFAC14b あるいは EDAFAC4b3b を使って検討した。EDAFAC14b では C4NeF が存在しても C4b2a 複合体の形成がかなり低下し、EDAFAC4b3b では C3NeF が存在しても C3bBb 複合体形成は著しく低下した。したがって、細胞膜にすでに DAF が存在する時には、NeF は DAF の作用を阻止できないことが明らかとなった。

### 6. NeF で安定化された C3 分解酵素に対する C4-bp および H 因子の影響

1. EAC14 b 2 aNeF に C4-bp を作用させても C4b2a 活性は全く影響を受けず、本研究で使用した C4NeF は C4-bp の解離促進失活作用を完全に阻止した。

2. H 因子は EAC4b3bBbNeF に対して影響を与え、本実験で使われた C3NeF は、他の報告と同様に、H 因子による C3bBb の解離失活促進作用を完全に阻止できなかった。

#### 7. 患者血清の C3 減少現象が NeF 単独ではなく C3 分解複合体によるものであることの証明

患者血清から精製した C3 を不活性化する分画（精製 C3 分解複合体）には、C4NeF の H 鎖と L 鎖、C4b の  $\beta$  鎖と  $\gamma$  鎖に相当する 4 本のバンドが検出された。C4b の  $\alpha'$  鎖と C2a に相当するバンドは確認できなかったが、患者血清中では C4NeF の一部が C4b2a 複合体に結合して、安定な C3 分解複合体を形成しているものと推測された。

#### <考察>

本研究で得られた C4NeF と C3NeF は、従来の報告と同様に、補体の活性化で生じた C3 分解酵素に結合し安定化させる自己抗体であった。そして、C4NeF の一部は、患者血清中で C3 分解酵素 C4b2a 複合体に結合して存在し、この複合体が血清補体を持続的に減少させている本態であると推測される。

これらの NeF は、従来の報告にある NeF と同様に、制御因子である C4-bp あるいは H 因子の C3 分解酵素に対する作用を阻止した。また C3 分解酵素に対する DAF の作用も阻止したが、あらかじめ細胞膜に DAF を組み込ませておくと、その膜上における C3 分解酵素形成は、NeF が存在してもいちじるしく抑制された。すなわち細胞膜上に形成された多くの C3 分解酵素に対して、細胞膜の DAF は NeF よりも先に作用して、これらの酵素の解離失活を促進させたと考えられる。形成された C3 分解酵素の一部が NeF によって安定化されるのは、NEF が DAF よりも先に C3 分解酵素と反応するためと考えられる。これらの結果から、NeF が血清中に存在する患者でも、DAF は正常に機能していると推察され、自己補体による反応から自己細胞を守っていると考えられる。

#### <結論>

①今回発見された 2 人の腎炎患者の血清補体が持続的に減少している原因は、血清中の自己抗体である IgG に属する NeF によるものであった。②それらの NeF は、従来の報告と同様の性状を備えた C3NeF として C4NeF であった。③DAF は C3 分解酵素 NeF 結合体に影響を与えなかった。④しかし細胞膜上に DAF が存在する時には、細胞膜上の C3 分解酵素形成は NeF が存在してもいちじるしく抑制された。⑤患者血中で NeF の一部が C3 分解酵素 NeF 結合体を作り、この結合体が持続的に C3 を分解するために患者血清補体が減少するのであって、NeF 単独では作用していないことが明らかとなった。

## 審 査 の 要 旨

本研究は、血清補体が持続的に低値を呈する特異な腎炎2症例の低補体の発生機序を追及したものである。この原因は、これまで報告されている類似疾患と同様に、NeFとして知られるIgGに属する自己抗体であることを詳細な免疫学的手法を用いて証明した。その上で、C3分解酵素と結合した一部のNeFが血清補体を減少させている本態であるとの仮説を実証した。また、DAFは血清中ではC3分解酵素NeF結合体に影響を与えないものの、細胞膜上のDAFはNeFが存在してもC3分解酵素形成をいちじるしく抑制することを明らかとした。このような新しい知見は、この分野の進歩に有意義なものであると高く評価できる。研究目的の設定から研究結果を得るに至る過程と、その結果の考察は、博士号の取得するに相応しいものと判断する。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。