

レクチン経路補体溶血活性の測定について

藤澤由美子, 坂本元子

The assay method of hemolytic activity through mannan-binding lectin pathway

Yumiko Fujisawa and Motoko Sakamoto

補体系の活性化経路として知られている古典的経路と第二経路の他に第三の経路、レクチン経路が発見された。血清中にあるマンナン結合蛋白 (MBP) と呼ばれる動物レクチンがカルシウム (Ca) 依存性に補体系を活性化する経路である。レクチン経路は古典的経路よりも古く発達した原始的な糖鎖認識機構に基づく活性化経路と考えられ、免疫機構が未発達な幼児期や易感染性の低栄養状態及び高齢者において特に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。MBP蛋白量の測定は酵素抗体法によりほぼ確立されているが、この経路による活性の測定は確立されていない。そこで古典的経路及び第二経路の活性測定法の原理を手がかりにレクチン経路の活性の測定を試みた。検討には補体源として健常成人の血清を用い、標的細胞としてウサギ赤血球を使用した。各反応経路の活性化に必要なイオンを含んだ緩衝液 (Ca、マグネシウム (Mg) 含有ゼラチンペロナル緩衝液 (GVB⁺⁺)、Mg含有エチレンジアミン四酢酸GVB、及びエチレンジアミン四酢酸GVBを準備し、ウサギ赤血球は抗体感作をしたもの (RaE-Ab)、未感作のもの (RaE)、マンナン処理を施したもの (RaE-M) それぞれに対する溶血の程度を観察した。また、各種糖類の各反応に及ぼす影響及び抗C1q抗体、抗MBP抗体を用いて各反応系における溶血活性を測定した。その結果RaE-GVB⁺⁺系はマンナンにより溶血反応が抑制されながらも抗MBP添加においてその溶血は抑制されないことから、レクチン経路のみを測定しているのではないことが明らかになった。RaE-M-GVB⁺⁺系はよりレクチン経路を測定していると考えられるが抗MBP添加による抑制は弱い結果であった。しかしながら、同一血球を用い、同一方法で測定することにより各経路の活性の変動がよりの確に把握できると思われる。

キーワード：補体、レクチン経路、マンナン結合タンパク、溶血活性

緒 言

補体系において第3成分C3は血清中に大量に存在し中心的な役割を演じている¹⁾。補体系の活性化の基本はC3がC3bに転換されることである。その活性化経路として従来から古典的経路と第二経路が知られているが、その他に第三の経路レクチン経路が発見された。即ち、血清中にあるマンナン結合蛋白(MBP)と呼ばれる動物レクチンがカルシウムイオン(Ca^{++})依存性にセリンプロテアーゼと結合しC4とC2を活性化する経路である²⁾。

古典的経路は抗原に結合したIgG、IgM抗体に Ca^{++} の存在下、補体成分C1がC1qを介して結合しC4とC2を活性化する系である。第二経路は抗体を介さないで、C3が Mg^{++} の存在下でBやDの作用で開裂を受ける系である。いずれの経路も連続的に反応が進行してC5b-C9複合体による膜障害複合体を形成し、補体の代表的な反応である膜溶解作用を発揮する。系統発生的には第二経路が古典的経路よりも原始的な反応経路と考えられているように、レクチン経路も先天的な系と考えられており、MBPが認識分子として働き、セリンプロテアーゼであるMBP-associated serine protease (MASP)により活性化される経路と言われている^{2,3)}。生理的条件下ではこれらの補体系の全経路が密接に関係して生体防衛や各種の免疫反応にあずかっていると考えられている。

MBPはある種のグラム陰性菌に結合後血清存在下で殺菌的に働くこと⁴⁾、HIVの高マンノース型糖蛋白質のgp120への結合によりHIVの細胞への感染を抑制すること⁵⁾などから、細菌表面上でのMBPによる補体系活性化反応はオプソニンであるC3bやiC3bの産生につながり食細胞の貪食能を高めると考えられ、生体防衛機構において重要な役割を果たしている可能性が示されている。MBPは川寄らによって発見され1987年に報告された⁶⁾。その後川寄ら^{7,8)}及びReidら⁹⁾により更にメカニズムが解明され、松下らによってMBPがMASPにより活性化される詳細が明らかにされた²⁾。これらの解明は以前に報告された現象^{10,11)}がMBPの作用と繋がっている可能性が示されていると考えられる。現在、多少問題はあるもののMBP蛋白量は酵素抗体法で定量する方法が確立されており¹²⁾、更にこの経路の活性が測定できれば全体像が明らかになり意義深いものと思われる。そこで古典的経路及び第二経路の活性測定法の原理を手がかりに簡便なレクチン経路の活性の測定を試みた。

方 法

簡便な方法でMBP経路の活性を測定するために、従来から行われている古典的経路及び第二経路の測定方法の原理をもとに溶血反応の組合せを考えた。各経路の活性化は反応液及びイオンの存在に依存する。古典的経路測定法(CH50)はヒツジ感作血球を用い、 Ca^{++} 、

Mg⁺⁺存在下、抗体を介しての補体溶血反応を測定している¹³⁾。第二経路測定法 (ACH50) は抗体未感作のウサギ赤血球を用いエチレンジアミン四酢酸 (EGTA) を加えてCa⁺⁺をキレートして古典的経路の影響を抑えMg⁺⁺存在下、第二経路を活性化させて測定している^{14,15)}。これらの従来の方法からGVB⁺⁺、EGTA-GVB-Mg⁺⁺の反応液を用いて未感作ウサギ赤血球の新鮮血清による溶血度を測定した。血清は健常成人の血清を用いた。

検討 1 : 各反応液と未感作ウサギ赤血球の反応

GVB⁺⁺、EGTA-GVB-Mg⁺⁺の溶液で 5 倍希釈血清を段階的に希釈し、それぞれの反応液で洗浄したウサギ赤血球 (日本バイオテスト研究所) を 1.5×10^8 /ml に調整して加え 37℃ で 40 分反応させた。反応終了後エチレンジアミン四酢酸 GVB (EDTA-GVB) を加えてよく混合し、遠心して上清のヘモグロビン量を 413nm で比色した。具体的な測定手順は表 1 に示した。GVB⁺⁺を反応液としたものがレクチン経路活性測定 (LH50')、EGTA-GVB-Mg⁺⁺を反応液としたものは第二経路の活性 (ACH50) を測定していると想定した。

併せて古典的経路の測定 (CH50) として、ウサギ赤血球を抗体で感作したのを用い同様に測定した¹⁶⁾。抗体感作のためにあらかじめ抗体の力価測定を行った上で感作血球を準備した。マイクロプレート上で倍々希釈した抗ウサギ赤血球ヤギ血清 (CAPPEL社) 25μl に 3.0×10^8 /ml に調整したウサギ赤血球を加え 37℃ で 30 分反応させた。反応後凝集が認められる最も低い濃度の 1/2 の濃度を抗血清の至適濃度として、 3.0×10^8 /ml に調整したウサギ赤血球液と 1 : 1 の容量で混和し感作した (37℃、30 分)。感作後 GVB⁺⁺ で洗浄し 1.5×10^8 /ml に調整して実験に供した。

いずれも Mayer 法¹³⁾ に準じて補体活性値を算出した。

表 1 溶血活性測定手順

(単位 : ml)

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|--|------|------|------|------|------|------|------|--------------------|
| Buffer | | | | | | | | (H ₂ O) |
| GVB ⁺⁺ | 0.25 | 0.25 | 0.21 | 0.19 | 0.17 | 0.15 | 0.13 | 0.50 |
| EGTA-GVB-Mg ⁺⁺ | | | | | | | | |
| Serum (5 × dil) | 0.1 | 0 | 0.04 | 0.06 | 0.08 | 0.10 | 0.12 | 0 |
| Rabbit E or Rabbit E-Ab (1.5×10^8 /ml) | 0 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 |

37℃ 40min

↓ ← 3 ml EDTA-GVB

2,500rpm 10min

↓

OD413nm (%hemolysis)

検討 2：各種糖類の溶血活性に及ぼす影響

検討 1 の測定系に及ぼす各種糖類の影響を検討した。多糖類であるマンナン、単糖類のマンノース、グルコース、及びN-アセチルグルコサミンについてそれぞれ反応液中の濃度を10%から段階的に倍々に変化させた時の溶血反応を検討した。各反応液で各糖類を溶解し、pHを7.2に調整して用いた。

検討 3：抗C1q抗体、抗MBP抗体添加の影響

検討 1 における各系列の測定系に抗C1q抗体、抗MBP抗体を添加し溶血反応の変化を観察した。抗C1q抗体は抗ヒトC1qウサギFITC標識抗体 (DAKO社：1.1mg/ml) を用い、抗MBP抗体 (1 mg/ml) は富士薬品工業株式会社から提供を受けた。各測定系列血清と赤血球の混合反応液に抗C1q抗体は20 μ l、抗MBP抗体は30 μ l添加し37 $^{\circ}$ Cで40分反応させた。反応終了後EDTA-GVBを加えて混合、遠心して上清を比色した。

検討 4：マンナン処理ウサギ赤血球の溶血活性測定

レクチン経路の活性化をより直接的に測定 (LH50) する目的で、ウサギ赤血球に塩化クロム法¹⁷⁾でマンナンを結合させて¹⁸⁾標的細胞として溶血活性を測定した。3.0 $\times 10^8$ /mlに調整したウサギ赤血球液 1 容に 5 mg/ml塩化クロム溶液 (CrCl₃) 1 容、200 μ g/mlマンナン 1 容を25 $^{\circ}$ Cで5分反応させ、等量のGVB⁺⁺ (氷冷)を加えた。GVB⁺⁺で洗浄し1.5 $\times 10^8$ /mlに調整して実験に供した。併せて抗C1q抗体、抗MBP抗体を添加し溶血反応の変化を観察した。

結 果

検討 1：各反応液と未感作ウサギ赤血球の反応

健常成人血清を用い、ウサギ赤血球に対する溶血の程度を測定した。抗体感作赤血球-GVB⁺⁺ (CH50) は40単位前後、未感作赤血球-EGTA-GVB-Mg⁺⁺ (ACH50) は10単位前後、未感作赤血球-GVB⁺⁺ (LH50') は25単位前後を示した。

検討 2：各種糖類の溶血活性に及ぼす影響

LH50' 測定系における各種糖類の影響を検討した結果を図 1 に示した。%溶血においてマンナンは濃度依存性に溶血を抑制したが、他の糖類ではマンノースがやや抑制する傾向を示したものの、大きな影響は認められなかった。

マンナンが未感作のウサギ血球と血清の溶血反応を阻止することが認められたので古典的経路及び第二経路に及ぼす影響を検討したところ、ヒツジ赤血球を用いたCH50もACH50も同じような溶血%を示す対照に対しその溶血%を阻止しなかった (表 2)。

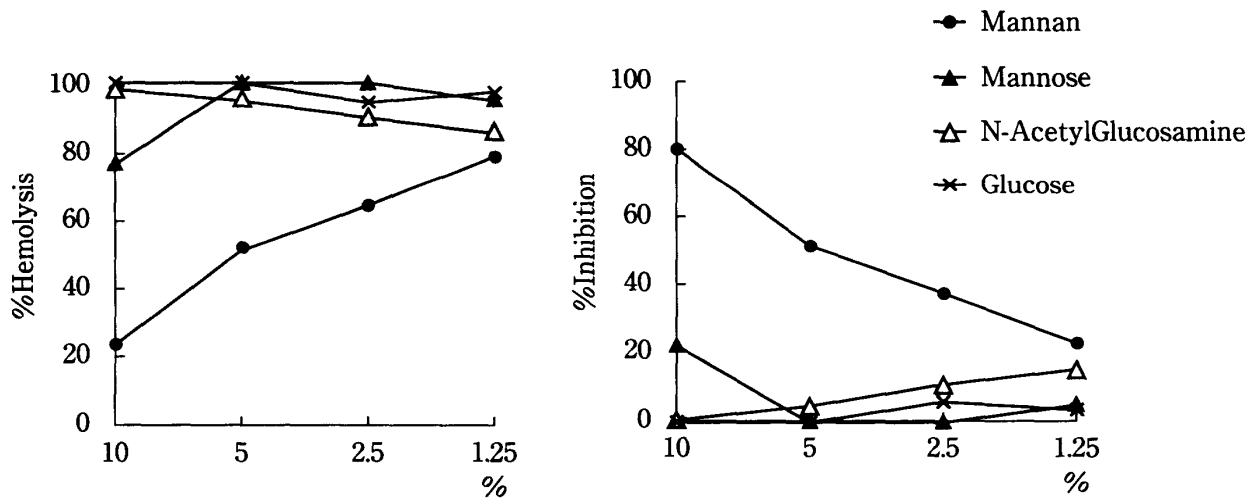


図1 未感作ウサギ赤血球-GVB⁺⁺系に及ぼす各種糖類の影響

表2 各補体活性経路に及ぼすマンナンの影響

| Erythrocytes | Buffer | Serum dil. | Serum vol. (ml) | Mannan conc. (%) | | | |
|--------------|-----------------------|------------|-----------------|------------------|------|------|------|
| | | | | 0 | 10 | 5 | 2.5 |
| RaE | GVB ⁺⁺ | 5× | 0.1 | 85.1 | 13.0 | 43.7 | 65.3 |
| RaE | EGTA-Mg ⁺⁺ | 2.5× | 0.1 | 88.3 | 90.5 | 89.1 | 87.3 |
| ShE-Ab | GVB ⁺⁺ | 10× | 0.1 | 80.8 | 77.4 | 75.4 | 80.3 |

表3 各補体活性経路に及ぼす抗C1q及び抗MBPの影響

| Erythrocytes | Buffer | %Lysis (%inhibition to Cont.) | | |
|--------------|-----------------------|-------------------------------|-------------|-------------|
| | | Cont. | Anti-C1q | Anti-MBP |
| RaE | GVB ⁺⁺ | 85.8 | 24.2 (71.8) | 81.5 (5.0) |
| RaE | EGTA-Mg ⁺⁺ | 76.9 | 76.2 (0) | 70.4 (8.5) |
| RaE-Ab | GVB ⁺⁺ | 96.7 | 7.8 (91.9) | 95.8 (0.9) |
| RaE-Mann | GVB ⁺⁺ | 89.4 | 16.9 (81.1) | 75.5 (15.5) |

検討3：抗C1q抗体、抗MBP抗体添加の影響

各測定系列に抗C1q抗体、抗MBP抗体を添加して溶血活性を観察した結果を表3に示した。抗C1q抗体添加により、CH50測定系及びLH50'測定系は顕著に溶血活性が抑制されることが認められた。ACH50測定系はほとんど影響が認められなかった。

抗MBP抗体添加の影響はいずれの活性経路測定系においても大きな変化は認められなかった。

検討4：マンナン処理ウサギ赤血球の溶血活性測定

ウサギ赤血球にマンナン処理を施したものをを用いて健常成人血清の溶血活性を測定した。LH50は20～30単位を示した。抗C1q抗体、抗MBP抗体添加の影響は表3に示したように、抗MBPによる抑制が15%程度でLH50'よりは大きい傾向が認められた。抗C1q添加による抑制も認められた。

考 察

補体系は現在16の補体成分と7つの補体レセプター、9つの制御因子が知られている。特にC3は血清中に1.3mg/mlも大量に存在し中心的な役割を果たしている¹⁾。その活性に到る経路にはこれまでに抗原抗体反応によるC1qrsがC4、C2を介して反応する古典的経路、自然経過でC3が細胞膜に付着して、B、Dを介して活性化される第二経路の2つがあげられてきた。さらに川寄らによって発見されたMBPがMASPによってC4、C2を介しC3を活性化することが証明され、第三番目の経路として登場してきた。このレクチン経路は第二経路とともに先天的な反応系と考えられ、後天的な反応系である古典的経路とともに初期の生体防衛に重要であると思われる。生体内においてはこれらの補体系の全経路が密接に関係して生体防衛や各種の免疫反応にあずかっていると考えられているので、第三の経路の活性測定も重要であると思われる。

そこで簡便な方法で溶血活性を測定することを試みた。健常成人血清の各ウサギ赤血球に対する反応液を変えた溶血活性値は抗体感作ウサギ赤血球-GVB⁺⁺ (CH50) >未感作ウサギ赤血球-GVB⁺⁺ (LH50') >未感作ウサギ赤血球-EGTA-GVB-Mg⁺⁺ (ACH50) の順であった。補体価の測定は標的細胞により大きく変化することが知られていることから¹⁵⁾、今回の検討でCH50、LH50'がACH50測定法を基準にして同様に測定できることが明らかになり意義深いと考えられる。

MBPはマンナンやマンノースに結合するレクチンであり、種により結合しやすい糖類に差があることが認められていることから¹⁹⁾、溶血反応液に各種糖類を添加してその活性の変化を観察した。今回検討に用いた糖類のヒトMBPに対するの結合力の強さはN-アセチルグルコサミン>マンノース>グルコースの順である¹⁹⁾。レクチン経路活性測定系と想定したRaE-GVB⁺⁺において多糖類であるマンナンの測定系への添加は濃度依存性に溶血活性を抑制したが、他の糖類については顕著な抑制は認められなかった。しかしながら各糖類1.25%濃度添加では文献データ¹⁹⁾と同じくN-アセチルグルコサミン>マンノース>グルコースの順で程度は低いものの抑制が認められた(図1)。生体内の濃度を考えれば妥当な結果である

と考えられる。RaE-GVB⁺⁺測定系で糖類の影響が認められたことはレクチン経路の測定を裏付けるものと思われるが、抗MBP抗体添加では殆ど抑制が認められなかった(表3)。ただ、MBPがMASPにより活性化されるだけでなくそれ自体が古典的経路^{7,8)}及び第二経路²⁰⁾を活性化させることが解っていることから、RaE-GVB⁺⁺系はレクチン経路のみを測定しているのではないことが確認された。そこで、RaEにマンナンを結合させたものを標的細胞としてその溶血活性(LH50)を測定した。溶血活性はLH50'とほぼ同様の値を示し、抗MBP添加によりやや抑制される傾向が認められた。抗C1qで強い抑制が認められたことから、RaE-GVB⁺⁺系同様、レクチン経路のみを測定しているのではないことが確認された。未感作赤血球を用いても検体の中に自然抗体が存在し、MBPの作用による活性化だけでなく古典的経路の活性化がおこるものと考えられる。しかしながら、今回は各経路同様の溶血程度の比較をしたので、その溶血程度の違いや、抗MBP添加量による違いなど詳細な検討が必要であると思われる。改善の余地はあるものの、生体内においてはイオンの存在などどれかを制限するような状況があることの方が不自然なので、同一血球、同一方法で測定するこの各系は生体内における反応をよりの確に反映しており、一つの指標となりうると思われる。今後、栄養状態の変化や各病態におけるこの系による測定の変化を追跡することも重要な課題である。

要 約

補体活性化経路には抗体を介さない第二経路と抗体が引き金となる古典的経路が知られているが、これらとは別に独立した抗体を介さない第三の活性化経路レクチン経路があることが明らかになってきた。その新しい経路の活性を測定する方法を検討した。

1. RaE-GVB⁺⁺系の溶血活性はマンナンにより抑制を受けた。しかしながら抗MBPによる抑制は認められず、抗C1q添加で抑制された。
2. RaE-M-GVB⁺⁺系は抗MBPによる抑制がRaE-GVB⁺⁺系よりは認められレクチン経路を測定すると思われるが、抗C1q添加でも抑制され、自然抗体による古典的経路の活性分も含まれている可能性が認められた。
3. RaE-EGTA-GVB-Mg⁺⁺の第二経路、RaE-Ab-GVB⁺⁺の古典的経路と同時に測定することにより、生体内での各経路の活性が把握できると考えられる。

文 献

- 1) 西岡久壽彌：分子内カスケード—補体系と生体防衛担当細胞の相互作用—医学のあゆ

- み, 136, 903 (1986)
- 2) Matsushita, M., Fujita, T. : Activation of the classical pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1q-like serine protease. *J. Exp. Med.* **176**, 1467 (1992)
 - 3) 松下操 : マンノース結合タンパク (MBP) とMBP会合セリンプロテアーゼ (MASP) による補体活性化 *臨床免疫* **25**, 1530 (1993)
 - 4) Kuhlman, M., Joiner, K., Ezekowitz, R. A. B. : The human mannose-binding protein functions as an opsonin. *J. Exp. Med.* **169**, 1733 (1989)
 - 5) Ezekowitz, R. A. B., Kuhlman, M., Groopman, J. E., et al. : A human serum mannose-binding protein inhibits in vitro infection by the human immunodeficiency virus. *J. Exp. Med.* **169**, 185 (1989)
 - 6) Kawasaki, T., Mori, K., Oka, S., et al. : Binding protein specific for mannose and N-acetylglucosamine (mannan-binding protein, MBP). In *Vertebrate Lectins*/edited by Olden, K. & Parent, J. B. p.92 (1987) Van Nostrand Reinhold, New York
 - 7) Ikeda, K., Sannoh, T., Kawasaki, N., et al. : Serum lectin with known structure activates complement through the classical pathway. *J. Biol. Chem.* **262**, 7451 (1987)
 - 8) Ohta, M., Okada, M., Yamashina, I., et al. : The mechanism of carbohydrate-mediated complement activation by the serum mannan-binding protein. *J. Biol. Chem.* **265**, 1980 (1990)
 - 9) Lu, J., Thiel, S., Wiedemann, H., et al. : Binding of the pentmer/hexamer forms of mannan-binding protein to zymosan activates the proenzyme C1r2C1s2 complex, of the classical pathway of complement, without involvement of C1q. *J. Immunol.* **144**, 2287 (1990)
 - 10) 藤井絢子 : 正常血清の殺菌作用に関する研究 *日本衛生学雑誌* **10**, 131 (1955)
 - 11) 高木紹夫 : EDウイルスの新鮮マウス血清による不活化とProperdinの本態に関する一考察 *日本衛生学雑誌* **14**, 299 (1959)
 - 12) 小林邦彦, 寺井格 : ヒト血清マンノース結合蛋白 (MBP) の酵素抗体法 (ELISA) の確立と各種検体の測定 厚生省特定疾患免疫不全症調査研究班平成4年度研究報告書 146 (1992)
 - 13) Mayer, M. M. : Complement and complement fixation. In *Experimental immunochemistry*/edited by Kabat, E. A. & Mayer, M. M. 2nd ed. p133 (1961) C. C. Thomas Springfield
 - 14) 天野哲基 : Alternative pathway による溶血補体価 (ACH50) の測定 補体学—基礎・測定法・臨床—/稲井眞彌, 井上公蔵, 田村昇編 p134 (1982) 医歯薬出版, 東京
 - 15) 田中忍 : 補体と補体結合反応 役にたつ免疫実験法第2版 p116 (1994) 講談社サイエンティフィック, 東京
 - 16) Tanaka, S., Suzuki, T., Nishioka, K. : Assay of classical and alternative pathway activities of murine complement using antibody-sensitized rabbit erythrocytes. *J. Immunol. Methods* **86**, 161 (1986)

- 17) Osmand, A. P., Mortensen, R. F., Siegl, J., et al. : Interactions of C-reactive protein with the complement system. *J. Exp. Med.* **142**, 1065 (1975)
- 18) Suankratay, C., Zhang, X. H., Zhang, Y., et al. : Requirement for the alternative pathway as well as C4 and C2 in complement-dependent hemolysis via the lectin pathway. *J. Immunol.* **160**, 3006 (1998)
- 19) Holmskov, U., Malhotra, R., Sim, R. B., et al. : Collectins: collagenous C-type lectins of the innate immune defence system. *Immunol. Today* **15**, 67 (1994)
- 20) Schweinle, J. E., Ezekowitz, R. A. B., Tenner, A. J., et al. : Human mannose-binding protein activates the alternative complement pathway and serum bactericidal activity on a mannose-rich isolate of salmonella. *J. Clin. Invest.* **84**, 1821 (1989)

藤澤 由美子 (家政学部生活環境学科専任講師)

坂本 元子 (家政学部健康栄養学科教授)