

## マウス補体第一成分の亜成分 C1q に関する研究

— IgG 2b 産生ハイブリドーマ移入による C1q 代謝への影響の解析 —

奈良県立医科大学細菌学教室

山田 秀樹

### STUDIES ON THE MOUSE COMPLEMENT SUBCOMPONENT C1q — BIOCHEMICAL ANALYSIS OF EFFECT OF TRANSFER OF IgG 2b HYBRIDOMA CELLS ON C1q METABOLISM —

HIDEKI YAMADA

Department of Bacteriology, Nara Medical University

Received September 22, 1994

**Abstract:** Serum C1q levels and C1q mRNA from peritoneal exudate cells and spleen cells were measured in BALB/c female mice treated intraperitoneally with IgG 2b hybridoma cells ( $2 \times 10^6/0.2$  ml) and/or pristane, as well as in untreated mice.

In the hybridoma treated mice, both C1q and IgG levels were significantly increased compared with pristane treated mice and/or untreated mice. Northern blot analysis of total RNA from peritoneal exudate cells and spleen cells of these mice showed one band of approximately 1.2 kb. The highest signal was found in RNA preparations of hybridoma treated peritoneal macrophage.

These results suggest that there may be some anabolic as well as catabolic interaction between C1q and IgG 2b syntheses.

#### Index Terms

biosynthesis of C1q, IgG, mRNA of C1q B-chain

#### 緒 言

補体系は、生体防御において重要な役割を担い、自己免疫病や免疫複合体病の病態にも深く関与することが知られている。本系は、約 20 種の血清蛋白質から構成され、通常は、これらの蛋白成分は非活性状態で存在しているが、生体内に異物が侵入した場合など酵素反応様式で活性化される。この活性化の様式には、古くから知られていた抗体を介する経路(古典経路)も 1970 年代の初めに明らかにされた抗体を必要としない経路(別経路)の二つがある。補体系の詳細に関しては、成書<sup>1)</sup>を参照されたい。

古典経路の活性化始動成分である補体第 1 成分(C1)の亜成分 C1q は、新鮮血清に免疫グロブリンを加えると

沈降物を形成する沈降係数 11 S の血清蛋白質として発見され、その後 C1 を EDTA で処理して生じる 3 つの亜成分(C1q, C1r, C1s)のうちの 1 亜成分と同一の成分であることが明らかにされている<sup>2)</sup>。C1q 分子は、抗原抗体複合体や変成免疫グロブリンの Fc 領域に結合し、酵素前駆体として存在している C1 の他の亜成分 C1r, C1s を活性化し、順次後続の補体成分を活性化させる。近年、細菌のリピド A<sup>3)</sup>、レトロウイルス<sup>4)</sup>など C1q に直接結合して抗体非依存的に補体系を古典経路で活性化する物質も報告されている。ヒト C1q は、Yonemasu と Stroud により初めて純化され、分子内にコラーゲン様構造を持つきわめて特異な球状蛋白質であることが明らかにされている<sup>5,6)</sup>。

C1q は、分子量 22-23 Kda のほぼ等しい A, B, C 鎖と

呼ばれる3種類のペプチド鎖が18本重合した分子量460 Kdaのきわめて特異な球状蛋白質で、血清蛋白でありながら結合組織に特有とされるコラーゲン構造を分子内に含有する分子である。A, B, C鎖は、N末端約半分がコラーゲン様部位で、残りのC末側はありふれた非コラーゲン様部位から成っている。各ペプチド鎖はN末側コラーゲン様部位でそれぞれ、小ラセン構造(minor helix)を造り、さらに、コラーゲンと同様、A, B, C鎖で三重ラセン構造(triple helix)をとり、C末側半分で球状構造をとっている。また、C1qは主に小腸の円柱細胞<sup>7)</sup>やマクロファージ-単球系の細胞により合成される<sup>8)</sup>といわれている。

血清中のC1qレベルは、Bruton型低ガンマグロブリン血症(Bruton-type hypogammaglobulinemia)の患者<sup>9)</sup>、正常種々系統のマウス<sup>10)</sup>や実験的にB細胞やT細胞の機能を抑制したマウスにおいても同一個体の血清中IgGレベルと強く相関すること<sup>11)</sup>が報告され、これまでC1qとIgGが血液中中で可逆的に重合し、IgGが増量するとこれと重合するC1qも増加し、結果として、異化率が低くなり循環血中に滞在する時間が長くなり、逆にIgGが減量するとC1qの異化率が高くなりC1qは低値になるとされている。しかし、Swiss型リンパ球減少性低γグロブリン血症(Swiss-type lymphopenic agammaglobulinemia)<sup>12)</sup>や比較的早期にファブリキウス嚢を摘出したニワトリ<sup>13)</sup>などでは、必ずしも血清C1qレベルはIgGレベルと相関を示さないことが報告されている。これらの場合では、血清中のIgGはほとんど検出されないのにC1q量は極端に減少はしているものの皆無ではない。

一方、ミエロマ細胞やハイブリドマ細胞を移入したマウスの血清C1qレベルの高低は、移入された免疫グロブリンのアイソタイプの種類で大きく左右され、ハイブリドマ(γ2b, κ)を投与したマウスでは、著しいC1qの増加が認められることはすでに著者らが明らかにしているところである<sup>14)</sup>。

したがって、本研究では、ハイブリドマ(γ2b, κ)をマウスに投与し、同一個体の循環血中のC1q量とIgG量を定量すると同時にC1q合成細胞でのC1q mRNAの発現量を測定し、循環血中C1qレベルとIgGレベルの相関が蛋白合成のレベルでおこされるのか、従来いわれてきたように異化率の変化によるものかを明らかにすることを目的として行われたものである。

## 材料及び方法

### 1. 実験動物および処理

1 グループ2-5匹からなるBALB/cマウスは大阪大学微生物病研究所(吹田, 大阪)より譲与され、本学細菌学教室で自家繁殖させた雌マウス(3カ月-6カ月齢)を使用した。実験群は、アイソタイプ(IgG 2b; γ2b, κ)の免疫グロブリンを産生しているハイブリドマ細胞(本教室佐々木隆子助手より供与)2×10<sup>6</sup>/0.2 mlおよびプリスタン0.5 mlを腹腔内に投与した。投与後10-14日目に麻酔下に頸動脈より採血、血清を遊離し、同時に腹腔内浸出細胞と脾細胞を無菌的に採取した。対照群として、無処置およびプリスタンのみを腹腔内投与した2群を用い、同様に血清および細胞を採取した。採取した血清は組成ならびにC1qおよびIgG量の定量に、細胞はmRNAの発現量測定に使用した。これらの処理は時期を変え、合計5-6回繰り返した。

### 2. アガロースゾーン電気泳動

1%アガロースをBarbital-acetate buffer, pH 8.6に溶解して作製したゲルプレート(7.5 cm×5 cm)に直径0.5 mmの穴をあけ、2 μlのマウス血清を入れ、30 mA/7.5 cm長辺の条件で、1時間電気泳動を行った。泳動後Triple stain液でゲルを染色した後、1%酢酸で数回脱色後、乾燥した。

### 3. 血清C1qおよびIgG定量

Manciniらの単純放射免疫拡散(single radial immuno-diffusion)法<sup>15)</sup>により行った。ウサギ抗マウスC1q抗血清は自家作製し、ウサギ抗マウスIgG抗血清は生化学工業株式会社(東京)より購入した。これらの方法による検出限界は、それぞれ約2 μg C1q/ml, 10 μg IgG/mlであった。

### 4. 腹腔内浸出細胞および脾細胞のマクロファージ細胞数の測定

#### (1)腹腔内浸出細胞

Hanks液(阪大微研, 吹田, 大阪)5 mlを腹腔内に注入、洗浄後、洗浄液を回収した。洗浄液を4℃, 160×g, 7.5分で遠心し、上清は吸引除去した。

沈殿した細胞は1 mlのHanks液で懸濁し懸濁液50 μlに9容量のチュルク液(和光純薬工業株式会社, 京都)を加え、白血球数を計測した。これと平行して、懸濁液の一部は、大塚アッセイ研究所(徳島, 徳島)のマニュアルに従いペルオキシダーゼ活性染色を行い、マクロファージの数を計測した。

#### (2)脾細胞

摘出した脾臓を一對のすりガラス付きスライドガラスの間ではさみ、破碎しながら0.15 M NaCl/0.01 M phosphate buffer(PBS)中に分散させた。4℃, 160×g, 10分間遠心後、沈殿した脾細胞をPBS(-)1 mlに懸濁

し、この内の 50  $\mu$ l を 9 容量のチュルク液を加え、腹腔内浸出細胞と同様に細胞数を測定した。

#### 5. 腹腔内浸出細胞 RNA の抽出

チオグリコール酸培地 2.5 ml を腹腔内に注入, 3 日目に腹腔内浸出細胞を集め, Hanks 液 5 ml にて 2 回洗浄し, さらに RPMI 1640 (阪大微研, 吹田, 大阪) で洗浄した。細胞分画は 10 % FCS/RPMI-1640, 10 ml で懸濁し, 37°C 5 % CO<sub>2</sub> 下で 1 時間培養した。Hanks 液 6 ml を添加後, シャーレを振盪し, 浮遊細胞を吸引除去した。同操作は 5 回繰り返して行った。

Cell Scraper (Coster, Cambridge, MA, USA) を用い付着性細胞を剝離し回収後全 RNA は RNazol™ B (BIOTECX LABORATORIES, INC. Texas, USA) とクロロホルムを用いて抽出した。

#### 6. C1q cDNA の作製およびノーザンブロット (Northern blotting) 解析

##### (1) C1q cDNA の作製

マウス C1q の DNA 塩基配列<sup>16)</sup>より Asp<sup>85</sup> から Gln<sup>93</sup> に相当する 25-mer のオリゴヌクレオチドおよび Phe<sup>220</sup> から Ala<sup>228</sup> に相当する 25-mer のオリゴヌクレオチドをそれぞれ 5' 側および 3' 側のプライマーとして, DNA シンセサイザー (Applied Biosystems Japan, Mode 391) にて, 自家作製した。腹腔内マクロファージ mRNA は, オリゴ-dT-ラテックスビーズ (日本ロシユ株式会社, 東京) を用いて前述の方法により抽出した全 RNA 6  $\mu$ g より精製した。

精製 mRNA および合成したプライマー, 逆転写酵素を含む cDNA 合成キット (Amersham, Japan) に添加, キットに添付されているマニュアルにより cDNA を作製した。

この cDNA をテンプレートとし, Taq ポリメラーゼ (Takara BIOCHEMICALS, 東京) を用いて, ポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase chain reaction; PCR) 法により 430 bp の C1q cDNA を増幅した。これは, C1q の非コラーゲン様球状部位 Asp<sup>85</sup> から Ala<sup>228</sup> をコードする領域に相当する (Fig. 1)。増幅した cDNA の精製は, SpinBind™ Reagent DNA Extraction Unit (Takara BIOMEDICALS, 京都) を使用して行った。また, 増幅した cDNA を制限酵素 SmaI (NEW ENGLAND Biolabs, MA, U.S.A) または, PST 1 (GOBCO BRL LIFE TECHNOLOGIES, Inc. MD, U.S.A) により消化, 1.3 % アガロースゲル電気泳動により C1q cDNA の制限酵素切断断片<sup>16)</sup>に相当することも確認した。

##### (2) cDNA プローブの作製

マウス C1q cDNA (430 bp) およびラット  $\beta$ -アクトチン

(207 bp 本学公衆衛生学, 土井祥子助教授より供与) は, [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (第一化学薬品株式会社, 東京) とマルチランダムプライマー標識キット (multi-random primer labeling kit; Ready-To-Go™: Pharmacia 社) でそれぞれ標識した (比放射活性はどのプローブも約  $6 \times 10^8$  cpm/ $\mu$ g DNA)。なおラット  $\beta$  アクトチン cDNA は, マウス  $\beta$  アクトチン DNA の相当する領域と塩基配列で約 50 % の相同性であった。

##### (3) 全 RNA の抽出とノーザンブロット法

前述の材料及び方法 5 によって RNAzol B を用いて抽出した。腹腔内浸出細胞及び脾細胞の全 RNA 6  $\mu$ g ずつをホルムアルデヒドを含む 0.04 M 3-N-Morpholino Propanesulfonic acid/5 mM Sodium citrate/0.5 mM EDTA, pH 7.2 (MOPS) 中で 65°C, 15 分加熱変性させ, 5.3 % ホルムアルデヒドを含む 1.0 % アガロースゲル中で電気泳動した。泳動後アガロースゲルをエチジウムブロマイドで染色し, 28 S および 18 S のリボソーム RNA のバンドを確認し, ナイロンメンブランフィルター (Hybond-N+; Amersham Japan 社, 東京) に転移した。

<sup>32</sup>P cDNA プローブ ( $5 \times 10^4$  cpm) を添加した Quick Hyb™ 液 (Stratagene 社製 La, Jolla, CA, USA) の中に上記のナイロンメンブランを入れ, 68°C で 2 時間ハイブリット形成させた後, Stratagene 社添付のマニュアルに従って充分洗浄, イメージングプレート (Imaging plate) に 2 時間露光させた後, バイオイメージアナライザー (BAS 1000 MAC; 富士写真フイルム株式会社, 東京) で解析した。さらに, Kodak XO mat™ フィルム (Eastman Kodak, New York) に -80°C 下で 24 時間露光してオートラジオグラムを作製した。

#### 7. データの統計学的処理

血清 C1q および IgG レベル, 腹腔内浸出細胞および脾細胞中のマクロファージ数, ならびに C1q mRNA のイメージ分析値および標準偏差 (Standard deviation, SD) を計算すると同時に, 各実験群における平均値の有意差は, Mann-Whitney 検定法<sup>17)</sup>にて検定した。

## 結 果

### 1. 血清蛋白質のアガロースゾーン電気泳動による分析

Fig. 2 は, ハイブリドーマ ( $\gamma$ 2b,  $\kappa$ ), プリスタン投与マウスおよび無処置マウスの血清ゾーン電気泳動による染色パターンである。図に示されるように, ハイブリドーマ投与マウス (1, 4, 5) では, プリスタン投与マウス (2) および無処置マウス (3) と較べ, ハイブリド-



Fig. 1. The cDNA sequence of mouse Clq B-chain used as the probe. The bar represents annealing positions of the primer. This area corresponds to the C-terminal non collagenous globular region.

マが産生する免疫グロブリンによるものと思われるスポットが陰極側 $\gamma$ 領域で著しく増強されていることが分かる。一方、プリスタン投与マウス(2)および無処置マウス(3)では免疫グロブリンの易動する $\gamma$ 領域のスポットはほとんど認められないが、逆に $\beta$ 領域に易動度を持つ蛋白質によるスポットがハイブリドーマ投与マウス(1, 4, 5)に比べ、明らかに増量することが示された。

## 2. 血清 Clq 量および血清 IgG 量

ハイブリドーマ投与マウス、プリスタン投与マウス、および無処置マウスの血清 Clq 量及び血清 IgG 量を Table 1 に示した。Table 1 に示されるように、ハイブリドーマ投与群マウスでは血清 Clq 量は、プリスタン投与群マウスに比べ、4 倍以上もの著しい増加を示し、血清 IgG 量の増量は 10 倍以上にも昇る。また、プリスタン投与群マウスでは、無処置マウスに比べ、血清 IgG 量はほとんど同等であるのに血清 Clq 量は有意に減少する

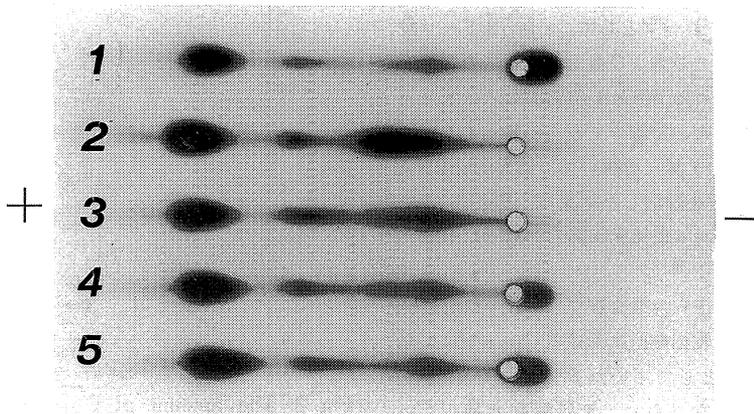


Fig. 2. Agarose-gel zone electrophoresis.  
 line 1: mouse sera carrying the hybridoma ( $\gamma 2b, \kappa$ )  
 line 2: mouse sera treated with pristane  
 line 3: normal mouse sera.  
 Anode is toward left.

Table 1. Mean serum levels of C1q and IgG in BALB/c female mouse (mean $\pm$ 1SD)

Mouse treated with	Number	C1q ( $\mu\text{g/ml}$ )		IgG (mg/ml)	
No treatment	32	41.47 $\pm$ 36.1	] P<0.05 ] (*)	1.99 $\pm$ 1.45	] NS ] (*)
Pristane	34	17.84 $\pm$ 8.6		2.04 $\pm$ 1.05	
Hybridoma	30	166.15 $\pm$ 110.06		21.29 $\pm$ 13.55	

mean values were checked statistically according to Mann-Whitney test.  
 NS: statistically not significant  
 (\*); P<0.05

Table 2. Mean numbers of peritoneal macrophages and spleen macrophages (mean $\pm$ 1SD) in ln (natural logarithm)

Origin of mouse	Number	Macrophage (ln) (mean $\pm$ 1SD)	
Pritoneal macrophage			
no treatment	15	14.39 $\pm$ 0.44	] P=0.0001 ] NS ] P=0.0004 ]
with pristane	17	16.21 $\pm$ 0.67	
with hybridoma	18	15.21 $\pm$ 1.04	
Spleen cell			
no treatment	5	16.41 $\pm$ 1.10	] NS ] NS ] NS ]
with pristane	11	16.80 $\pm$ 0.96	
with hybridoma	11	16.38 $\pm$ 0.42	

NS: statistically not significant.

ことが示された。

3. 腹腔内滲出細胞及び脾細胞中のマクロファージ数

Table 2 に示すように、プリスタン投与マウスでは、無処置あるいは、ハイブリドマ投与マウスと比較して、腹腔内滲出細胞中のマクロファージの数は、著明に増加

していた。(前者に対して p=0.001, 後者に対しては p=0.004) 一方、脾細胞中のマクロファージ数は、ハイブリドマ投与群および無処置マウスにおいて、ほぼ同数であり、有意差は認められなかった。

4. ノーザンプロット法による解析

<sup>32</sup>P 標識マウス B 鎖 Clq cDNA および <sup>32</sup>P 標識ラット β アクチン cDNA をプローブとして、ハイブリドーマ投与、プリスタン投与マウスおよび無処置マウスの腹腔内浸出細胞と脾細胞における mRNA 発現量をノーザンハイブリッド法で解析した。X 線フィルムに感光する前にバイオイメージアナライザーを用いて、特異的 mRNA によるスポットの強度を計測した結果は、Fig. 3, 4 に、ひき続き Xomat フィルムに感光印画した結果は Fig. 5 に示している。

Fig. 3 は、ハイブリドーマおよびプリスタン処理後経時的に採取した腹腔内浸出細胞における Clq mRNA 発現量をコントロールとして用いた β アクチン mRNA 発現量で補正した値をさらに、無処置群の補正 Clq mRNA 発現量で除して、比として示したものである。図に示すように、ハイブリドーマ処理群マウスの Clq mRNA 発現量は処理後 11 日をピークとして有意に増加したが、プリスタン単独処理群では、有意な増加は見られなかった。

Fig. 4 は、脾細胞における Clq mRNA 発現量を Fig. 5 と同様にして補正後、比として示したものである。この図から明らかなように、プリスタン処理の両群において、Clq mRNA の発現に有意差は認められなかった。

Fig. 5 は、ハイブリドーマおよびプリスタン処理後 10 日目のマウスの腹腔内浸出細胞と脾細胞における Clq mRNA および β アクチン mRNA 発現を X 線フィルムに感光したものである。

図中 C の電気泳動パターンに示されるように、腹腔内浸出細胞および脾細胞の全 RNA は、抽出過程にほとんど分解されていないことがうかがえた。腹腔内浸出細胞においては、図中 I-B に示されるようにハイブリドーマなどの投与で影響を受けないとされる β アクチン mRNA (1.2 kb) のスポットの強さには、これら 3 群のマウス間でほとんど差がないにもかかわらず、図中 I-A に見られるように、Clq mRNA (1.2 kb) の発現量は、プリスタン単独投与マウスに比べ、ハイブリドーマ投与マウスにおいて、著明に増量していた。

一方、脾細胞においては、図中 II-B および II-A に示されるように、1.2 kb の β アクチン mRNA の発現量および Clq mRNA の発現量とも、これら 3 群のマウスにおいて大差は認められなかった。

### 考 察

本研究は、BALB/c 系マウスの腹腔内に IgG (γ 2 b, x) を産生するハイブリドーマ細胞を移入し、血清中 Clq レベルの上昇が起こる現象を、血清 Clq を合成するとき

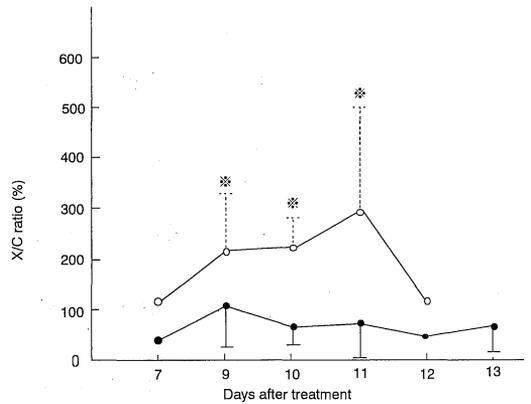


Fig. 3. The amount of Clq mRNA expressed in peritoneal exudate cells on the 7th, 9, 10, 11, 12 and 13th day after treatment with hybridoma, or with pristane. The vertical-axis represents ratios of Clq mRNA of these treated mice to those of normal mice. Each amount of Clq mRNA has been corrected with the amount of β actin mRNA. Vertical bars show one standard deviation. ○: mice treated with hybridoma; ●: mice treated with pristane, \*: statistically significant at the level of p < 0.05.

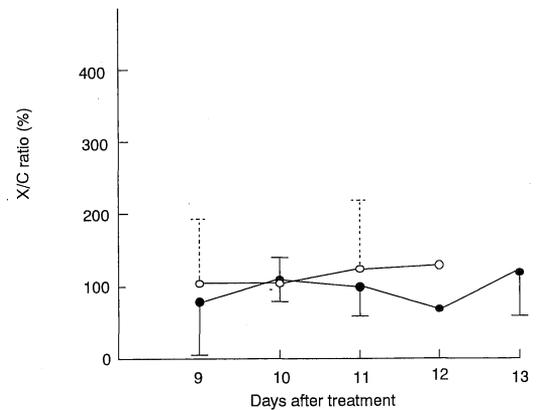


Fig. 4. The amount of Clq mRNA expressed in spleen cells on the 9th, 10, 11, 12, and 13th day after treatment with hybridoma, or with pristane. The vertical-axis represents ratios of Clq mRNA of these treated mice to those of normal mice. Each amount of Clq mRNA has been corrected with the amount of β actin mRNA. Vertical bars show one standard deviation. ○: mice treated with hybridoma; ●: mice treated with pristane.

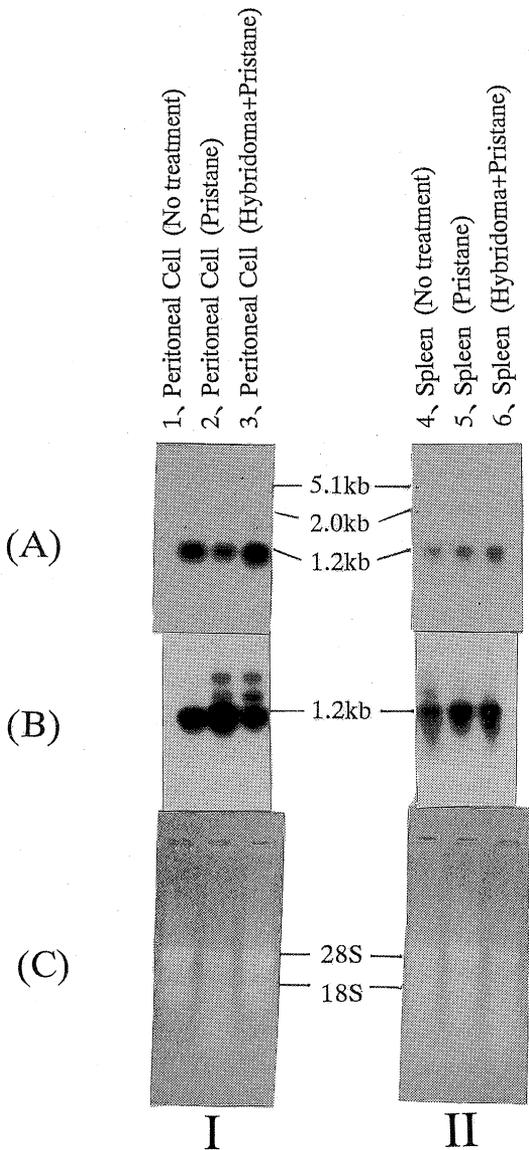


Fig. 5. Northern blot analysis of mouse C1q B chain mRNA on the 10th day after treatment. Total RNA (6 $\mu$ g) was loaded on each lane. RNA transferred to a nylon filter was hybridized with  $^{32}$ P-labeled 0.12 kbp cDNA for mouse C1q B chain (A).

Autoradiographic exposure was carried out for 24h.

The mRNA levels of rat  $\beta$  actin was shown to normalize the amount of RNA (B). Electrophoresis of these denatured RNAs, stained with ethidium bromide (C). Ribosomal RNAs of 28S and 18S are indicated as 28S and 18S, respectively.

れているマクロファージを用いて、mRNA レベルおよび血清蛋白質レベルにて解析し、IgG2b 移入が C1q の合成および異化のどの段階で影響するものかを調べたものである。

ハイブリドーマ投与群マウスでは、当然の結果として、免疫グロブリン量は、著増したが(21.29 $\pm$ 13.55 mg/ml)、これと同時に血清 C1q 量もプリスタン投与群および無処置群マウスに比較して著しい増加(166.15 $\pm$ 110.06  $\mu$ g/ml)を示すことが明らかにされ、しかも同一マウス血清において IgG レベルと C1q レベルに高い相関がみられた。

血清中 C1q は主に腹腔内浸出細胞および脾細胞中のマクロファージで合成されているといわれている。本研究では、特に腹腔内浸出細胞での C1q mRNA が有意に増加しているが、脾細胞での C1q 合成はハイブリドーマ細胞投与であまり影響されないことが明らかにされた (Fig. 3, 4, 5). こうしたハイブリドーマ細胞の投与の影響が腹腔内細胞と脾細胞とのあいだで異なるのは、血清型 C1q の合成が主として脾細胞マクロファージよりも腹腔内マクロファージによるおこなわれるという報告<sup>10)</sup>と関係するかもしれない。さらに本研究では、ハイブリドーマ移入によるマクロファージ中 C1q mRNA の増量が、C1q 合成細胞であるマクロファージ数の増加によらず、マクロファージ一個あたりでの C1q mRNA の合成量の増加によることも明らかにされた (Table 2).

血清中 C1q レベルは、Bruton 型低ガンマグロブリン血症の患者、正常な種々の系統のマウスにおいて同一個体の血清中 IgG レベルと強く相関することが報告され、これまで C1q と IgG が血液中で可逆的に重合し、IgG が増量するとこれと重合する C1q も増加し、結果として、異化率が低くなり循環血中での半減期が長くなり、逆に IgG が減量すると C1q の異化率が高くなり C1q の半減期が短くなり C1q も低値を示すといった具合に、代謝における異化段階のみ IgG と C1q が相互作用すると考えられていた。一方、古くは、Swiss 型リンパ球減少性低  $\gamma$  グロブリン血症の患者などでは必ずしも血清 C1q レベルは同一血清 IgG レベルと相関を示さないことが報告<sup>12)</sup>され、さらに、我々による実験的に免疫グロブリンの合成をほぼ完全に抑制するためサイクロホスファミド投与マウスやファブリキウス嚢を摘出したニワトリなどにおいても C1q が血清中に検出されるなどの事実が報告され、ただ単に代謝の異化段階のみで IgG と C1q が相互作用するというだけでは説明され得ないものもある。本研究は、IgG2b 産生ハイブリドーマを直接マウス腹腔内に移入して、血清 C1q レベルが正常の 3-4 倍にも著

増すること、さらに C1q 合成細胞での C1q mRNA が著増することを実験的に初めて明らかにしたもので、血清中 C1q レベルがただ単に異化段階においてのみならず、合成段階でも IgG に影響される可能性を示したものである。

勿論、本研究では、IgG2b を産生するハイブリドーマ細胞が合成分泌するサイトカインなどの生物活性物質の何かがマクロファージでの C1q 合成を促進するのか、また、マクロファージにおいて、マクロファージが合成分泌する生物活性物質を非特異的に増加させるか、それとも C1q 合成のみ特異的に増加させるかなどの解明は今後の研究を待たねばならない。また、系統発生においても個体発生においても IgG より原始的とされる C1q が、血清中 IgG レベルにどのような影響を果たすのか、これらの影響がどのような機作で起こるのかも現時点では不明である。

## 結 語

ハイブリドーマ( $\gamma 2b, \kappa$ )細胞をマウスに投与して、同一個体の循環血中の C1q 量と IgG 量を定量とすると同時に C1q mRNA の発現量を測定し、他の処理群と比較検討することで以下の結果を得た。

1. ハイブリドーマ( $\gamma 2b, \kappa$ )を投与したマウス血清のゾーン電気泳動においては、対照群と比較して、ハイブリドーマが産生する免疫グロブリンと思われるスポットが陰極側  $\gamma$  領域で認められた。

2. ハイブリドーマ( $\gamma 2b, \kappa$ )投与マウスの循環血中の C1q 量および IgG 量は、対照群と比較して、著しく増加していることが認められた。

3. ハイブリドーマ( $\gamma 2b, \kappa$ )を投与したマウスの腹腔内マクロファージ数と無処置マウスの腹腔内マクロファージ数は、有意差が認められなかった。

4. ノーザンブロット法の解析によって、ハイブリドーマ処理群マウスの C1q mRNA の発現量は、処理後 11 日をピークとして、有意に増加した。

以上のことより、ハイブリドーマ処理マウスにおいては、腹腔内マクロファージ細胞一個あたりの C1q mRNA の発現量が他の処理群と比較して、増加していた。しかも、循環血中 C1q レベルと IgG レベルの相関が蛋白合成の段階においても影響されることが認められた。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導を賜りました細菌学教室榎葉周三教授、ならびに公衆衛生学教室米増國雄教授に深謝いたします。また、本研究の遂行

にあたって直接御指導、御助力をいただいた細菌学教室佐々木隆子博士に感謝いたしますとともに、日々の研究に御援助をいただいた細菌学教室喜多英二助教授をはじめとする細菌学教室の諸兄ならびに公衆衛生学教室の諸兄に感謝の意を表わします。

なお、本論文の要旨は、第 22 回日本免疫学会総会(平成 4 年 11 月)、第 2 回日本細菌学会中部関西合同支部総会(平成 5 年 11 月)に於て発表した。

## 文 献

- 1) Law, S. K. A. and Reid, K. B. M. : Complement IRL Press, Oxford, 1988.
- 2) Lepow, I. H., Naff, G. B., Todd, E. W., Pensky, J. and Hinz, C. F. : J. Exp. Med. 117 : 983, 1963.
- 3) Cooper, N. R. and Morrison, D. C. : Binding and activation of the first component of human complement lipid A region of lipopolysaccharides. J. Immunol. 120 : 1862-1868, 1978.
- 4) Bartholomew, R. W. and Esser, A. F. : Mechanism of antibody-independent activation of the first component of complement (C1) on retrovirus membrane. Biochemistry 19 : 2847-2853, 1980.
- 5) Porter, R. R. and Reid, K. B. M. : The biochemistry of complement. Nature 275 : 699-704, 1978.
- 6) Yonemasu, K., Stroud, R. M., Niedermeier, W. and Butle, W. T. : Chemical studies on C1q : a modulator of immunoglobulin biology. Biochem. Biophys. Res. Commun. 43 : 1388-1394, 1971.
- 7) Colten, H. R. : Biosynthesis of complement. Adv. Immunol. 22 : 67-118, 1976.
- 8) Tenner, A. J. and Volkin, D. B. : Complement subcomponent C1q secreted by cultured human monocytes has subunit structure identical with that of serum C1q. Biochem. J. 233 : 451-458, 1986.
- 9) Kohler, P. H. and Muller-Eberhard, H. J. : Complement - immunoglobulin relation : deficiency of C1q associated with impaired immunoglobulin G synthesis. Science 163 : 474-475, 1969.
- 10) Yonemasu, K., Sasaki, T., Hashimoto, H. and Tsukao, N. : Complement subcomponent C1q in various strains of mice ; its serum content correlates with that of immunoglobulin G. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 86 : 97-101, 1988.
- 11) Sasaki, T., Yamada, H., Yonemasu, K. and Kashiba, S. : Effects of administration of Cyclo-

- phosphamide and antithymocytoglobulin in serum levels of complements C1q and C 3 in mice. *J. Nara Med. Ass.* **45** : 67-76, 1994.
- 12) **Gewurz, H., Pickering R. J., Christian, C. L., Snyderman, R., Mergenhagen, S. E. and Good, R. A.** : Decreased C1q protein concentration and agglutinating activity in agammaglobulinemia syndromes : An inborn error reflected in the complement system. *Clin. Exp. Immunol.* **3** : 437-445, 1968.
- 13) **Sasaki, T., Ekio, S. and Yonemasu, K.** : Effect of bursectomy on serum levels of chicken complement component C1p. *Dev. comp. Immunol.* **16** : 257-261, 1992.
- 14) **山田秀樹, 佐々木隆子, 米増國雄** : 日本免疫学会総会・学術集会記録. vol.22, p336, 1992.
- 15) **Mancini, G., Cabonara, A. O. and Heremans, J. F.** : Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochimistry* **2** : 235, 1965.
- 16) **Petry, F., Reid, K. B. M. and Loos, M.** : Molecular cloning and characterization of the complementary DNA coding for the B-chain of murine C1q. *FBS letters* **258** : 89-93, 1989.
- 17) **市原清志** : バイオサイエンスの統計学. 南江堂, 東京, p90, 1990.