

原著

## マウス血清の補体活性測定法の確立

- ザイモザン活性化による reactive lysis を利用した方法の検討 -

北野 悦子<sup>1)</sup> 畑中 道代<sup>2)</sup> 北村 肇<sup>3)</sup>New Hemolytic Assay for Mouse Serum Complement Activity  
- application of zymosan-mediated reactive lysis -Etsuko KITANO<sup>1)</sup>, Michiyo HATANAKA<sup>2)</sup>, and Hajime KITAMURA<sup>3)</sup>

## SUMMARY

Serum complement activities of human and several experimental animals are usually estimated by the hemolytic assay using sensitized sheep erythrocytes and/or unsensitized rabbit erythrocytes. However, it is well known that these erythrocytes are hardly lysed by incubation with mouse serum and that mouse serum complement activity cannot be measured easily by hemolytic or any other assay. The present study deals with a new hemolytic assay for complement activities of mouse serum, in which the activity is estimated from the degree of hemolysis of unsensitized sheep erythrocytes after incubation of serum in the presence of zymosan. It was confirmed that serum complement activation is responsible for the hemolysis, since the hemolysis was not observed when erythrocytes were incubated i) in buffer containing EDTA, ii) by heat-inactivated serum, iii) by C5-deficient mouse serum or iv) in the absence of zymosan. The mechanism of hemolysis is so-called the reactive lysis (deviated lysis, bystander lysis), in which erythrocytes are lysed when serum complement activation proceeds not on the erythrocyte membrane but in the fluid phase close to the erythrocytes. Since this assay is simply and easily handled, and does not require any special reagent or treatment of serum and cells, the method may contribute widely to experimental biology.

キーワード：マウス補体価測定 reactive lysis、ザイモザン、CH50、ACH50

## はじめに

補体系は約30種類以上の蛋白質より構成される生体反応系である。通常は血清中に不活性化形で存在しているが、生体に異物が侵入すると、①それを認

識し、②一連の連鎖的な活性化反応を起こし、③異物上に膜傷害複合体(孔)を形成し、④異物を破壊する。初期の①②の反応は、異物(活性化物質)の種類により、古典経路(免疫複合体で活性化)、レクチン経路(微生物の糖鎖で活性化)、副経路(細菌の細胞

1)保健科学部 医療検査学科

2)短期大学部 衛生技術科(保健科学部 医療検査学科)

3)関西福祉科学大学 健康福祉学部 福祉栄養学科

壁、リポ多糖、ザイモザンで活性化)と呼ばれる別々の経路を介して活性化される。どの経路によっても補体系の中心成分であるC3を活性化し、C3が切断されると、後期補体成分からなる膜傷害複合体(C5b6-9)が異物膜上に集合することで異物を破壊する(反応③④)<sup>1)-3)</sup>。

臨床的には、補体系の欠損は、異物である微生物や免疫複合体を処理できないために、時として反復する感染症や、自己免疫疾患など重篤な症状をもたらす<sup>4)-5)</sup>。また補体系の異常な活性化は宿主のヒトにも炎症を惹起する。このような病態では、血清の補体活性を測定することが必須となる。通常行われる検査としては、古典経路による補体の活性化能を、感作ヒツジ赤血球(EA)の溶血で測定する補体価(CH50)が一般的である。C1からC9のすべての補体成分の活性を一括して測定するものである。また、ウサギ血球で副経路による補体活性化能を測定するalterative pathway CH50 (ACH50)と呼ばれる方法もある。ヒトの補体活性の測定は主にこれらの方法により測定される<sup>6)-8)</sup>。

実験動物については、ラットではヒトと同様、感作ヒツジ赤血球を用いるCH50による補体活性測定が可能であるが、マウスについては補体価測定ができないことが報告されている<sup>9)</sup>。補体は異物を認識することから、種の違いを認識する。マウスでCH50が測定できない理由については、標的細胞である感作ヒツジ赤血球が、マウス補体によって異物として認識されにくい可能性が示唆されるが、詳細は不明である。マウスは、種々の病態解析や、新薬開発における動物実験段階などで最も汎用される動物で、病態での補体の関与や抗炎症薬の作用機序への補体の関与を検討する場合など、多方面でマウス血清の補体活性測定が必要とされている。

本研究では、マウス血清の補体活性の測定方法を確立することを目的として、種々の補体活性測定法を検討した。ヒトで用いられるCH50、ACH50は測定ができなかったため、新たな方法として、reactive lysis<sup>10)-12)</sup>といわれる反応系を利用した補体活性測定法を検討した。この反応では、血清をザイモザン(細

菌の細胞壁)、アガロースなど補体活性化物質で処理することにより血清中(液相中)にC5b6複合体が形成され、この複合体が共存する血球に取り込まれC5b6-9を形成し溶血を起こすと考えられている。傷害を受ける血球が活性化の異物本体ではないことからbystander lysisとも呼ばれる。ザイモザンを用いた反応を利用してマウス血清の補体活性測定法の確立を試みたのでここに報告する。

## 材料および方法

### 1. 検体血清

検体血清として種々のマウスの血清を用意した。

- 1) 正常マウス血清(normal mouse serum : NMS) : B10D2/nSnマウス15匹より採血し、血清分離後プールした。
- 2) C5欠損マウス血清(C5 deficient mouse serum : C5DMS) : 正常マウスと同系でC5のみを欠損するB10D2/oSnマウス10匹より採血し、血清分離後プールした。
- 3) 種々のマウス血清 : B10D2とは系の異なるマウスであるBALB/C、C57BL/6、DDY、ICR、C3H/ne、およびB10D2系C5D以外のC5DであるA/J、DBA/2、KSN neの8系についてそれぞれ3匹ずつから採血した。各々プール血清とはせずに個体ごとに血清分離した。
- 4) 正常ヒト血清(normal human serum : NHS) : 30人の健康人ボランティアより採血し、血清分離後プールした。

各血清は、分注し、使用時まで-70℃に凍結保存した。

### 2. 緩衝液

緩衝液は以下のものを使用した<sup>6)-8)</sup>。

- 1) VB(veronal buffer) : 0.14M NaClを含む25mM バルビタール緩衝液、pH7.5
- 2) GVB(gelatin veronal buffer) : 0.15mM CaCl<sub>2</sub>、1.0mM MgCl<sub>2</sub>および0.1%ゲラチンを含むVB
- 3) GGVB(glucose gelatin veronal buffer) : 2.5%グルコースを含むGVB

4) EDTA・GVB: CaCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub>の代わりに10mM EDTAを含むGVB

5) EDTA・GGVB: CaCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub>の代わりに10mM EDTAを含むGGVB

6) EGTA・Mg<sup>2+</sup>・GGVB: CaCl<sub>2</sub>の代わりに10mM EGTAおよび40mM MgCl<sub>2</sub>を含むGGVB

7) 低イオン強度GGVB: 4.0%グルコースを含むGGVB

以上の緩衝液はいずれも等張で、pH7.5である。グルコースを含む緩衝液では、VBの濃度を減少することにより等張に調整した。そのためにイオン強度は低くなっている。

### 3. 赤血球

ヒツジ赤血球 (Es) は、個体を指定して採血した無菌ヒツジ保存血 (日本生物材料センター) を使用した。ウサギ赤血球 (Erab) は無菌ウサギ保存血 (日本生物材料センター) を使用した。感作ヒツジ赤血球 (EA) はEsと抗ヒツジ赤血球抗体 (ヘモリジン (GIBCO)) を反応させ作製した<sup>6)-8)</sup>。

### 4. ザイモザン

ザイモザン (フナコシ) を生理食塩液で2回洗浄後 (12,000rpm、20分で遠心)、生理食塩液中で60分煮沸し活性化させた<sup>12)</sup>。活性化後、生理食塩液で1.0mg/mlの濃度に浮遊させ、使用時まで-70℃に凍結保存した。使用時にはGGVBで1回洗浄後、使用濃度に浮遊させた。

### 5. 補体活性の測定

マイクロプレート上で検体の希釈系列を作製し (1検体1列 (8穴または12穴) 使用)、反応後、マイクロプレートのまま遠心、溶血度測定までを行うマイクロタイター法で実施した<sup>6)-8)</sup>。それぞれ下記に示す活性測定法で反応後、混和し、2000rpm、10分間遠心し、マイクロプレート用分光光度計 ( $\lambda_1=415\text{nm}$ 、 $\lambda_2=630\text{nm}$ ) で比色した。赤血球あるいはEAの機械的溶血を示すCB (cell and buffer、赤血球またはEA 25  $\mu\text{l}$ +緩衝液75  $\mu\text{l}$ )、加えた赤血球

またはEAが完全溶解を示す100%溶血 (赤血球またはEA 25  $\mu\text{l}$ +蒸留水75  $\mu\text{l}$ ) をコントロールとして同様に反応させた。

#### 1) 補体価 (CH50) の測定

古典経路を介する補体活性の一括測定法で、Caイオン及びMgイオンを含む緩衝液 (GVB) 中で一定量のEAと変量した被検血清を37℃で1時間反応させ、その溶血を吸光度で測定するものである。検体の連続2倍希釈系列各25  $\mu\text{l}$ 、EA (1.5 $\times 10^8$ /ml) 25  $\mu\text{l}$ 、およびGVB 50  $\mu\text{l}$ を混和後37℃で1時間反応させ、遠心後上清の吸光度を測定した<sup>6)-8)</sup>。

#### 2) 補体価 (ACH50) の測定

副経路を介した補体一括測定法で、緩衝液EGTA・Mg<sup>2+</sup>・GGVB中で一定量のErabと、変量した被検血清を37℃で1時間反応させ、その溶血を吸光度で測定するものである。検体の連続2倍希釈系列各25  $\mu\text{l}$ 、Erab (7.5 $\times 10^7$ /ml) 25  $\mu\text{l}$ を混和後37℃で1時間反応させ、反応終了後にEGTA・Mg<sup>2+</sup>・GGVB 50  $\mu\text{l}$ を加え、遠心後上清の吸光度を測定した<sup>6)-8)</sup>。

#### 3) Reactive lysisによる測定

本法は補体測定用緩衝液中 (GGVB) で、変量した被検血清を一定量のザイモザン浮遊液で活性化し、共存させた一定量の未感作ヒツジ赤血球 (Es) の溶血を吸光度で測定するものである。検体の連続2倍希釈系列 (8倍から1024倍/GGVB) 各25  $\mu\text{l}$ を作り、GGVBに浮遊させたEs (1.5 $\times 10^8$ /ml) 25  $\mu\text{l}$ 、およびザイモザン浮遊液を25  $\mu\text{l}$ ずつ加えてよく混和後、37℃で反応させた。反応終了後にGGVB 25  $\mu\text{l}$ を加え、遠心後上清の吸光度を測定した。

### 6. 補体価算出法

上記の各方法で測定した吸光度より、溶血率y ( $y = [\text{検体の吸光度} - \text{CBの吸光度}] / [100\% \text{の吸光度} - \text{CBの吸光度}]$ ) を求め、縦軸に溶血率yを、横軸に血清濃度をプロットすることにより溶血曲線を描き、それより血球またはEAの50%を溶血させる血清量 (1 CH50単位) を求めた。補体価は1.0mlの検体中に存在するCH50単位数 (CH50 U/ml) として表した<sup>6)-8)</sup>。

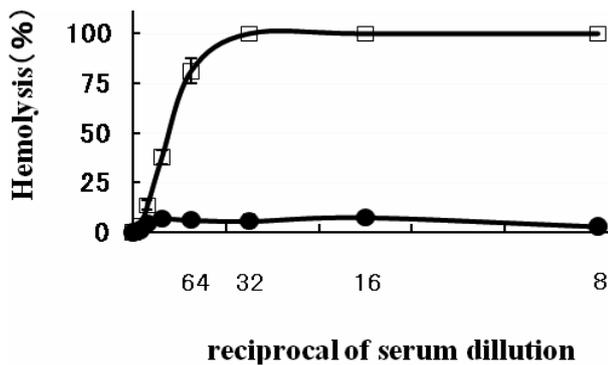


図1. 古典経路による補体活性の測定  
連続2倍希釈したNHS(—□—)およびNMS(—●—)とEAを37℃、1時間反応させた後の溶血率を測定した(n=6)。

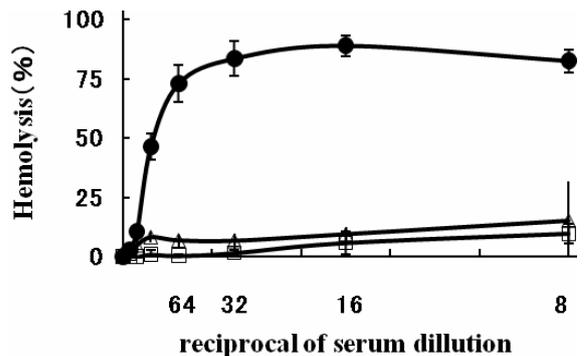


図3. Reactive lysisによる補体活性の測定  
連続2倍希釈したNMSとザイモザンおよびEs(—●—)を37℃、3時間反応させた後の溶血率を測定した(n=6)。同時に古典経路による溶血率(—△—)、副経路による溶血率(—□—)を示した。

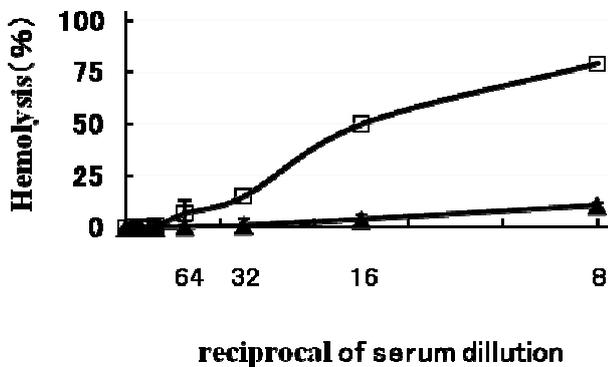


図2. 副経路による補体活性の測定  
連続2倍希釈したNHS(—□—)およびNMS(—▲—)とErabを37℃、1時間反応させた後の溶血率を測定した(n=6)。

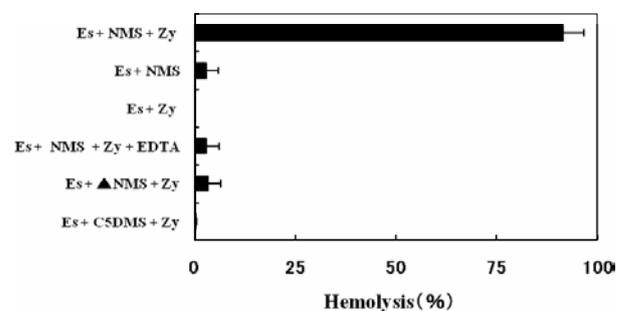


図4. Reactive lysisによる溶血での2価金属イオン、補体およびザイモザン(Zy)の必要性  
NMSを種々の条件下で37℃、5時間反応させた後の溶血率を測定した(n=6)。MNS希釈倍率128倍での値を示した。  
▲NMS: 非働化(56℃、30分処理)NMS

## 結 果

### 1. 古典経路による補体価(CH50)の測定

GVBで連続希釈したヒト血清(NHS)あるいはマウス血清(NMS)と感作ヒツジ赤血球(EA)を反応させたところ、NHSでは血清量に依存して溶血活性が認められた。一方、マウス血清では血清量を多くしても溶血がほとんど認められなかった(図1)。マウスの血清補体の活性は、通常のCH50法では測定できないことが明らかとなった。

### 2. 副経路による補体価(ACH50)の測定

EGTA・Mg<sup>2+</sup>・GGVBで連続希釈したヒト血清(NHS)及びマウス血清(NMS)とウサギ血球(Erab)を反応させたところ、NHSでは血清量に依存した溶血が認められた。一方、マウス血清では血清量を多

くしても溶血がほとんど認められなかった(図2)。マウスの血清補体の活性は、通常のACH50法では測定できないことが明らかとなった。

### 3. Reactive lysisによる測定

ザイモザンでマウス血清補体を活性化し、同時にEsを存在させ、その溶血を測定するreactive lysisによる方法では、血清量に依存した溶血が認められた。CH50、ACH50に比較して、溶血率は高く32倍希釈血清で85%<sup>6)・8)</sup>、64倍希釈血清で72%、128倍希釈血清でも溶血率は47%認められた。(図3)。

#### 1) 補体活性化による溶血の確認

32倍希釈したNMSを5時間反応させた場合、90%程度の溶血率が認められた(図4)。この溶血反応がマウス血清中の補体による溶血であること

ionic strength

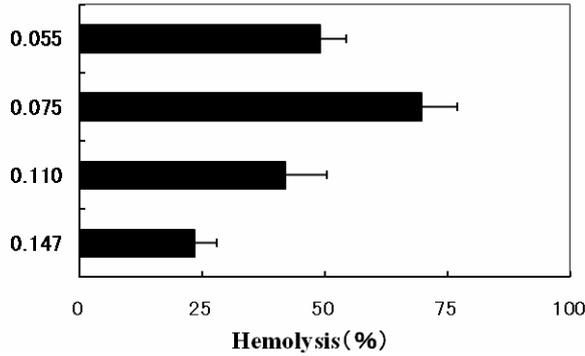


図5. Reactive lysisによる溶血での緩衝液のイオン強度の影響

4種の異なるイオン強度の緩衝液を作製し、各々の緩衝液中で37℃、5時間反応させた後の溶血率を測定した(n=6)。MNS希釈倍率128倍での値を示した。

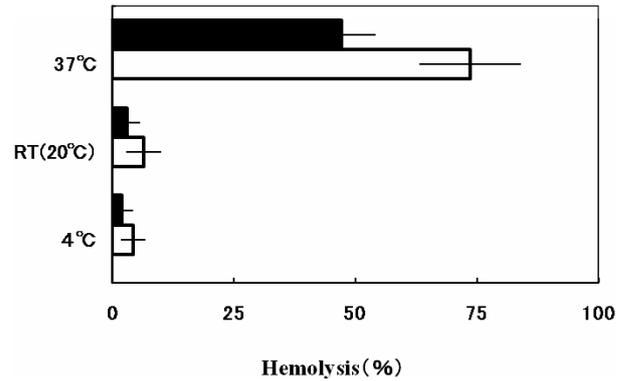


図7. Reactive lysisによる溶血での反応温度の影響

128倍希釈のNMSとザイモザンとEsを3種の異なる温度で5時間(□)あるいは3時間(■)反応させた後の溶血率を測定した(n=6)。

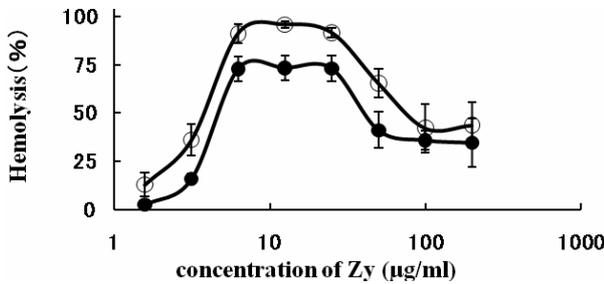


図6. Reactive lysisによる溶血でのザイモザン濃度の影響

64倍希釈(○)あるいは128倍希釈(●)のNMSと種々の濃度のザイモザン(Zy)とEsを37℃、5時間反応させた後の溶血率を測定した(n=6)。

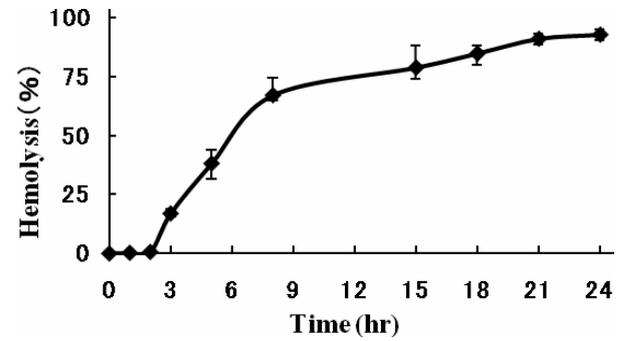


図8. Reactive lysisによる溶血の経時変化

NMSとザイモザンおよびEsを37℃で各時間反応させた後の溶血率を測定した(n=6)。

を確かめるために、種々の条件下で反応を行った。図4に示すように、NMS非存在、ザイモザン非存在の対照では溶血は認められなかった。また、溶血は補体の活性化を阻害するEDTAを含む緩衝液中、あるいはNMSの代わりに非働化(56℃ 30分処理で補体を失活させること)したNMSでは溶血はほとんど認められなかった。また、補体C5を欠損するマウス血清(C5DMS)を用いた時、溶血はほとんど認められなかった。これらのことから、この溶血反応はNMS中の補体活性化による溶血と考えられた。そこでこの方法を用いてマウス血清補体価を測定するための条件について以下の検討を行った。

2) 緩衝液のイオン強度の検討

イオン強度の異なる4つの緩衝液、低イオン強度GGVB(イオン強度0.055)、GGVB(イオン強

度0.075)、GVB・GGVB等量混合液(イオン強度0.110)、及びGVB(イオン強度0.147)を作製して、各々の緩衝液を用いてNMSによる溶血を測定した。溶血率は図5に示すようにイオン強度0.075のところピークを示した。このことから、測定用緩衝液はイオン強度0.075のGGVBを用いることにした。

3) ザイモザンの濃度の検討

一定濃度のNMS(64倍希釈、128倍希釈)、Esに、変量したザイモザン浮遊液を加え、ザイモザン濃度が反応系に及ぼす影響を検討した。図6に示すように、ザイモザンの濃度には至適濃度が存在した。ザイモザンの使用濃度は、溶血率が高い値を示し、安定した値が得られる12.5 µg/mlとした。

4) 反応温度の検討

次に反応時の温度について検討した。Es、ザイ

モザン、および128倍希釈したNMSによる反応系を3つのマイクロプレートに作成し、4℃、室温(20℃)、あるいは37℃で反応を行ったところ、NMSによる溶血率は、37℃では3時間で47%、5時間で74%であったのに対し、4℃及び室温では5時間でも数%しか溶血が認められなかった(図7)。このことから、測定反応温度は37℃とした。

5) 反応時間の検討

数枚のマイクロプレートを用いて37℃で反応を開始し、時間毎にプレートを取り出し、吸光度を測定し、溶血率を求めた。160倍希釈したNMSでは反応開始後1時間ではほとんど溶血を認めなかったが、2時間からは溶血が認められ、3時間で17%、5時間で38%、8時間まで急速に溶血反応は進んだ。しかし、反応は24時間でもプラトーに達しなかった(図8)。測定の便宜上、反応時間は5時間とした。

2)~5)の検討により、reactive lysisを用いたマウス血清補体価測定は、緩衝液としてGGVBを用い、連続2倍希釈の検体25μl、Es(1.5×10<sup>8</sup>/ml)25μl、およびザイモザン浮遊液(12.5μg/ml)25μlを混合し、37℃で5時間反応させることとした。

6) 種々の系列のマウスの補体活性の測定

以上の方法で、血清補体価を測定すると表1に示すようにB10D2/nSnマウス血清では147U/mlの値を得た。他の系のマウスの血清補体活性についても測定を行ったところ、BAL B/Cマウス血清では167U/ml、C57BL/6マウス血清では184U/mlの値が得られ、この方法によりマウス一般に補体の活性が測定できることが明らかとなった。B10D2/nSnと同系で補体C5を欠損するB10D2/oSnマウス血清ではほとんど活性を認めなかった。他の系のC5欠損マウスでも、B10D2/oSn同様補体価2U/ml以下となった。

考 察

マウス血清の補体は、容易にヒツジやウサギ血球を溶解しないことが知られている<sup>9)</sup>。今回の検討でも、ヒト血清で通常測定される古典的経路による

表1. 種々の系列のマウスの補体価

strain of mouse	CH50 (CH50U / ml)
B10D2/nSn	146.8 ± 6.9
BALB/C	166.9 ± 9.0
C57BL/6	184.0 ± 9.9
DDY	93.0 ± 3.6
ICR	161.9 ± 13.7
C3H/ne	43.7 ± 0.5
★ B10D2/oSn	0 (<2)
★ A/J	0 (<2)
★ DBA/2	0 (<2)
★ KSN ne	0 (<2)

プール血清ではなく各マウス個体(n=3)から得た血清補体価の平均値を示す。

★: 補体C5欠損マウス

EAの溶血(CH50)、および副経路によるErabの溶血(ACH50)を起こさないことを確認した(図1、2)。補体は同種血球には作用せず、種の違いを認識して作用することが知られているが、これには血球上に存在する補体制御因子といわれる一連の蛋白質が関与している。血球上にはC3step(C3が反応系に参加していく段階)を制御するDAF、CR1、あるいは膜傷害複合体形成stepを阻止するCD59などの補体制御因子が存在し、同種(自己)補体の活性化を阻止し、血球細胞を自己補体による傷害から守っている。CH50、ACH50測定法ではマウスの血清は血球と同種ではないものの、血球上の補体制御因子が働くために、溶血が起こらない可能性が高いものと思われる。

一方、reactive lysisを利用する方法でヒツジ血球は容易に溶血した(図3)。i) EDTA存在下、ii) 56℃、30分の処理、iii) 補体C5欠損血清、iv) ザイモザン非存在下では認められなくなることから、溶血はマウス補体の活性化によるものであることが明らかとなった(図4)。溶血反応のメカニズムあるいは反応経路については、ザイモザンとヒト血清による系での検討<sup>12)</sup>で明らかにされている(図9)。まず、ザイモザン上でC5転換酵素(C3b・Bb・P)が形成され、これによりC5からC5bに転換される。次に液相中でC5b6複合体が形成され、C7と共にEsに結合し、最後にC8及びC9が結合して溶血に至るものと考えられている。ザイモザンは細菌の細胞壁の成分であり、した

がって、この反応は主として副経路を介した補体価ACH50を意味する。通常のACH50では、Erab上に補体成分が順次結合しC5b6が形成されるが、本法では血球上ではなく、液相中でC5b6複合体形成まで進行する点が特徴である。そのため、おそらくはC3stepに作用する血球上の補体制御因子の作用を受けないことで、溶血が起こるものと考えられる。

液相中に生じるC5b6複合体は、補体C5、C6のみで生じるのではなく、C3までの補体活性化反応がないと形成されないの、ヒト血清測定でCH50やACH50と同様に活性化経路のすべての補体関連蛋白の活性が反映される。古典経路ならC1、C4、C2およびC3、副経路ならB因子、D因子、P因子、C3が参加してはじめて溶血する。今回の実験ではザイモザンを使用しているの、副経路の全体としての活性を測定していると考えられる。また、ある種の病態

により古典経路活性化が進みC3やC5が低値である検体血清では、この reactive lysis による補体価も低下すると考えられる。したがって、本法により、副経路に参加するすべての補体蛋白の異常や病態による活性化、場合によっては古典経路の活性化を知ることが可能となる。

これまでマウス血清の補体活性測定については、CH50の変法として、EAとしてEsとマウス抗体を使う方法<sup>13)</sup>、Erabとモルモット抗体<sup>9)14)</sup>を使用する方法や、溶血ではなく標識した<sup>51</sup>Crの遊離で測定する方法<sup>15)</sup>などが報告されたが、いずれも煩雑な上に確定的なものではないため、現在ほとんど行われていない。補体反応の中心となるC3活性で代用される<sup>6)15)</sup>こともあるが、C3活性測定は補体全体の活性化をみているものではない。また、C3活性測定にはintermediate cellを必要とするため、手技が煩雑で

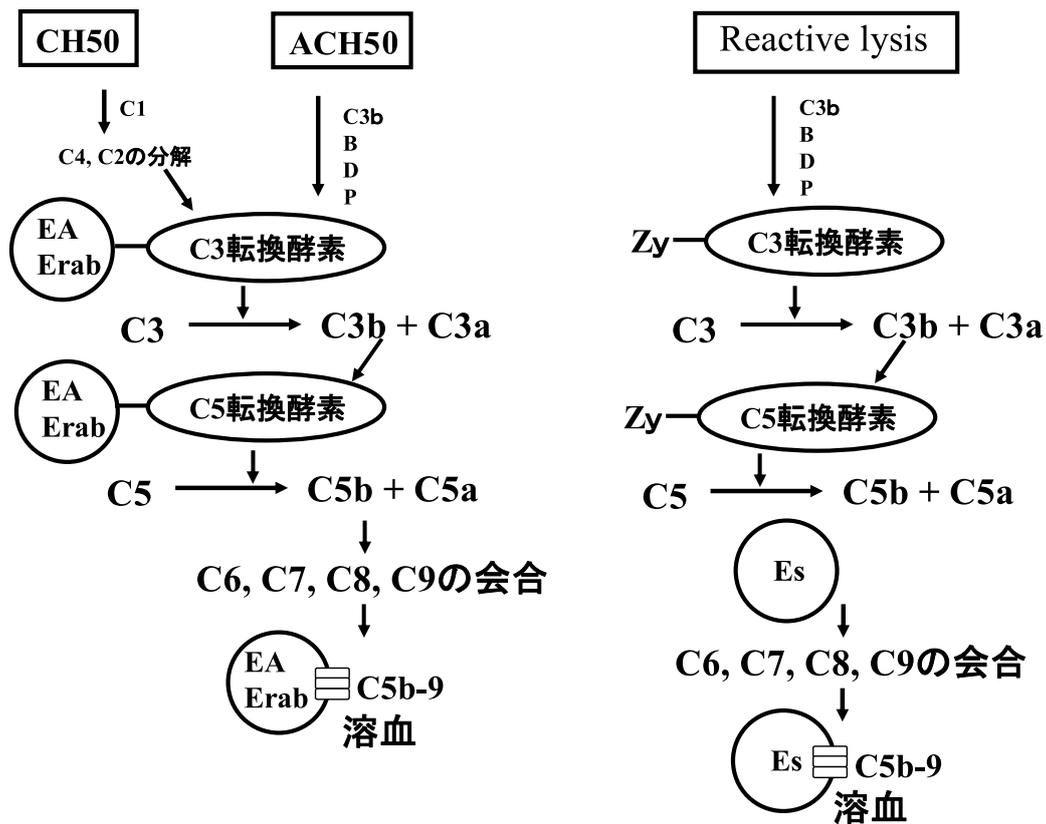


図9. 補体測定法の概要

CH50、ACH50の測定では、ターゲットとなる赤血球 (CH50ではEA、ACH50ではErab) が補体を活性化し、ターゲット上にC3転換酵素 (CH50ではC4bC2a、ACH50ではC3bBb) が形成される。C3転換酵素により生じたC3bはさらにC5転換酵素 (CH50ではC4bC2aC3b、ACH50ではC3bBbBb) を形成する。生じたC5bにC6、C7が結合するとこの複合体はターゲット膜に陥入するようになる。さらにC8、C9が会合しC9のポリマーによる孔が形成され血球は溶血に至る。reactive lysisではザイモザン (Zy) が補体を活性化し、C3転換酵素 (C3bBb) およびC5転換酵素はZy上に形成される。生じたC5bにC6、C7が結合するとこの複合体は共存させたターゲット細胞であるEsの膜に陥入するようになる。さらにC8、C9が会合しC9のポリマーによる孔が形成されEsは溶血に至る。

あり、大量のサンプルを処理するには適していない。今回確立した reactive lysis による方法は、特別な試薬やcellを必要としない簡便な方法であり、種々の系列のマウスにも応用できることから、今後、病態解析や薬剤の作用機序の解明など多方面でマウス血清補体活性測定に利用されることが期待される。

## 文 献

- 1) 稲井真弥、井上公蔵、田村昇：補体学－基礎・測定法・臨床－、17～91、医歯薬出版、東京、1982.
- 2) 北村肇：補体－補体学への手引き－、小児看護、6, 1178～1193, 1983.
- 3) Kinoshita, T. : Biology of complement. Immunol. Today, 12, 291～295, 1991.
- 4) Rother, K., Till, G. O. and Hansch, G. M. (eds) : Complement system, 1～232, Springer, Berlin, 1998.
- 5) Morgan B. P. : Complement – Clinical aspects and relevance to disease, 78～192, Academic Press, London, 1990.
- 6) 北村肇、北野悦子、(長沢滋治、豊島聡 編) : 免疫と生体防御 [I] 体液性免疫 (生物薬科学実験講座 第10巻) [第2章 補体 1. 補体測定法]、213～255、廣川書店、東京、1999.
- 7) 北野悦子、北村肇：補体価、日本臨床、63：増刊号7 広範囲 血液・尿化学検査・免疫学的検査－その数値をどう読むか－ (3) 第6版、47～51, 2005.
- 8) 畑中道代、北野悦子、北村肇：最近の補体測定法、医学書院、臨床検査、52, 911～916, 2008.
- 9) Tanaka, S., Kitamura, F. and Suzuki, T. : Studies on the hemolytic activity of the classical and alternative pathway of complement in various animal species. Complement, 4, 33～41, 1987.
- 10) Thompson, R. A. and Lachmann, P. J. : Reactive lysis : the complement-mediated lysis of unsensitized cells. I. The characterization of the indicator and its identification as C7. J exp. Med., 131, 629～641, 1970.
- 11) 北村肇：補体活性化機構の研究－その2 C3非依存性免疫溶血反応の補体活性化機構－成人病28, 33～36, 1988.
- 12) Kitamura, H., Nagano, A. and Kitano, E. : Hemolysis of normal human erythrocytes by autologous serum complement. Int. Archs Allergy Immunol., 100, 209～214, 1993.
- 13) Berden, J. H. M., Hagemann, J. F. H. M. and Koene, P. A. P. : A sensitive hemolytic assay of mouse complement, J. Immunol methods, 23, 149～159, 1978.
- 14) Tanaka, S., Suzuki, T., Nishioka, K., : Assay of classical and alternative pathway activity of murine complement using antibody-sensitized rabbit erythrocytes. J. Immunol. Methods, 86, 161～170, 1986.
- 15) Andrews, B. S. and Theofilopoulos, A. N. : A microassay for the determination of hemolytic complement activity in mouse serum. J. Immunol methods, 22, 273～281, 1978.