

2 補体第二経路活性（ACH₅₀）

原理 古典的経路の活性化は Ca²⁺および Mg²⁺の両イオンが必要であるが、第二経路の活性化には B 因子活性化のために Mg²⁺が必要となるが、Ca²⁺は不要とされ、この経路に関わる補体活性を総合的に測定するもので、ACH₅₀または APCH₅₀と呼ばれる。CH₅₀測定にはヒツジ血球が用いられるが、ACH₅₀測定には、C3 レセプターをもつウサギ血球が用いられる。しかし、ヒト血清中にはウサギ赤血球に対する自然抗体が存在するため古典的経路を介した反応も起こるので、Ca²⁺を除くキレート剤〔ethyleneglycol-bis-(β-aminoethyl ether) *N,N*-tetraacetic acid; EGTA〕を含んだ EGTA-Mg-GGVB 緩衝液を用いて 50%溶血法で実施される。ここでは、『補体学入門』（北村 肇：学際企画, p166-169, 2011）に記載された試験管法の ACH₅₀測定を紹介する。

試薬 ① 緩衝液（ストック液・緩衝液）（詳細は上述著書参照）

5VB（ストック液：ペロナールバッファー）

EGTA・Mg ストック液（0.1M EGTA & 0.002M Mg 溶液）

EGTA・Mg・GGVB（ゼラチン 1.0 g, デキストロース 25 g, 5VB 80 mL, EGTA・Mg ストック液 100 mL, 蒸留水全量 1,000 mL）

② ウサギ赤血球：同量の Alsever 液と混合し、無菌的に冷蔵保存し、使用時、生理食塩水で 3 回, EGTA・Mg・GGVB で 1 回洗浄後, EGTA・Mg・GGVB に 5×10⁷/mL に浮遊させる。5×10⁷/mL のウサギ赤血球浮遊液 0.2 mL を 2.8 mL の蒸留水に加え完全溶血させると、波長 415 nm での吸光度（OD）は 0.600 となる。

実施 ① 血清の希釈：検体を EGTA・Mg・GGVB で、正常と考えられる場合は 1：41、

表 9-11 ACH₅₀測定法

試験管 No.	1	2	3	4	5	6	CB	100%
希釈血清（mL）	0.70	0.65	0.60	0.55	0.50	0.45		H ₂ O 2.8
EGTA・Mg・GGVB（mL）	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.80	
ウサギ赤血球浮遊液（mL）	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
37℃ 60 分間反応								
EGTA・Mg・GGVB（mL）	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	
3,000 rpm, 10 分間遠心後、上清の OD（波長 415 nm）を測定								

低値が予想される場合は 1：21（または 1：31）に希釈する。

② 1 検体につき 6 本、ほかにコントロールとして機械的溶血対象（CB）と 100%溶血対象を 2 本ずつ用意し、表 9-11 にしたがって、血清希釈血清, EGTA・Mg・GGVB, ウサギ赤血球浮遊液を各試験管に分注する。

③ 37℃, 60 分反応させ、10 分おきに振とうし、ウサギ赤血球が沈殿しないように浮遊させる。反応 60 分後、氷冷した EGTA・Mg・GGVB を 2.0 mL ずつ加え反応を止める。

④ 混合後、3,000 rpm, 10 分間遠心し、415 nm で吸光度をそれぞれ測定する。

計算 ① 溶血率（y）の算出：各試験管の OD 値より、CB の OD 値を引き、100%OD 値に対する溶血率（y）を算出する。

$$y = \frac{(\text{検体の OD}) - (\text{CB の OD})}{(100\% \text{ の OD}) - (\text{CB の OD})}$$

② y/(1-y) 値の算出：0.1<y<0.9 でなければ除外する。

③ プロット：両対数グラフに希釈検体量を縦軸に、y/(1-y) 値を横軸にプロットし、それらを結ぶ直線を引く。そのグラフから直線の傾きを求める。ACH₅₀測定では、1/n 値は低く、ほぼ 0.1 になるとされる。

④ K 値と補体価の算出：直線と y/(1-y) =1 の線との交点より K 値を求め、K 値より元の検体の補体価を算出する。（K 値：1 ACH₅₀単位を含む希釈検体量）

算出例：41 倍希釈血清検体の K 値が 0.66 mL の場合、以下の計算式より ACH₅₀が求められる。

$$0.66 \text{ mL} / 41 : 1 \text{ 単位} = 1 \text{ mL} : x \text{ 単位} \quad x = 62.1 \text{ ACH}_{50} / \text{mL}$$

評価基準 ① 基準範囲：40～80 ACH₅₀/mL, ② 異常値：本法では、B, D, P, C3～C9, H, I などの異常を検出することができる。