

抗TBMモノクローナル抗体の作製および腎炎惹起

奥村 康*, 陳 香美*, 田中俊之*, 大河内悦子*, 小林 豊**, 重松秀一***
順天堂大学医学部免疫*, 北里大学医学部内科**, 信州大学医学部第二病理***

序 言

従来、尿管基底膜(TBM)の、同種および異種動物への免疫により、投与動物において、抗TBM抗体の産生と共に間質性腎炎が惹起されることが報告されている。この場合、産生された抗TBM抗体は、多様な抗原決定基に対応するポリクローナル抗体であり、間質性腎炎惹起抗原の詳細な解析は、しばしば困難である。

今回、我々は、間質性腎炎の惹起抗原を詳細に解析するために、抗TBM抗体産生ハイブリドーマの作製を試みた。その結果3種のハイブリドーマが得られ、これらのハイブリドーマを腹腔内に投与することにより、また、産生されたモノクローナル抗TBM抗体を静脈内に投与することにより、腎炎惹起を試みた。

材料と方法

【抗TBM抗体産生ハイブリドーマの作製】

Krakower and Greenspoon¹⁾の方法で Wistar ラットより糸球体のみを抽出し、完全フロイド・アジュバントと共に、6週齢のBALB/cマウスに免疫した。追加免疫は2週間間隔で5回行った。最終免疫後5日目に、マウスより脾臓を採取し、脾細胞を調製した。この脾細胞とミエローマ細胞(P3-X63-Ag8.U1)を通常の方法²⁾に従って融合させた。スクリーニングは、ラットあるいはマウスの腎切片を用いた蛍光抗体法で行った。腎切片と培養上清を反応させた後、FITCで標識したGoat anti-mouse κ chain (Cappel Laboratories)で螢

光染色し、TBMと反応する抗体を産生するハイブリドーマを選択した。また、クローニングは限界希釈法で行った。

【抗体クラスの決定】

得られたハイブリドーマの産生する抗体のクラスは、Rabbit anti-mouse IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgM (Miles Laboratories)を用いたOuchterlony法で決めた。

【反応抗原の決定】

得られたハイブリドーマの産生する抗体と、コラーゲンタイプIV, ラミニン, ヘパラン硫酸との反応性は、ELISA法を用いて調べた。各抗原をコートしたELISA用プレートに、培養上清あるいは抗体を含む腹水の希釈液を加えて反応させた後、peroxidaseで標識したRabbit anti-mouse immunoglobulins (Dako)を用いて反応性を調べた。

【抗TBM抗体産生ハイブリドーマの腹腔内投与による腎炎惹起】

1週間前にPristaneを腹腔に注射した6週齢の雌BALB/cマウスに、抗TBM抗体産生ハイブリドーマを 1×10^7 個腹腔内に投与し、投与後4日目、8日目、12日目、16日目に蛋白尿および腎組織の変化を検討した。コントロールとして、IgM抗体産生ミエローマであるMOPC 104Eを用いた。

【抗TBM抗体の静脈内投与による腎炎惹起】

3 mgの抗TBM抗体を含む腹水0.3 mlを6週齢

の雌BALB/cマウスに尾静脈投与し、30分後、1時間後、8時間後、24時間後、48時間後、72時間後、7日後に屠殺し腎臓を摘出した。コントロールとして、MOPC104Eの産生するIgM抗体を含む腹水を同量投与した群をとった。

【蛋白尿の解析】

尿蛋白排泄量はKnightらの方法³⁾で測定した。蛋白尿をSDS-PAGEにかけ、含まれる蛋白質の分子量を調べた。

【蛍光抗体法】

腎臓に於ける抗体とC3の沈着をみるために、腎組織をTissue-tek II O.C.T.Compound (Miles Laboratories)に包埋し、液体窒素で急速凍結した後、薄切し、FITCで標識したGoat anti-mouse IgMあるいはFITCで標識したGoat anti-mouse C3 (Cappel Laboratories)で蛍光染色した。この後、顕微鏡下 (Zeissスタンダード18)で観察した。

【組織学的検討】

a) 光学顕微鏡による観察

摘出腎を10% formalinで固定後 paraffin包埋し、薄切後、切片にHE染色とPAS染色を施して観察した。

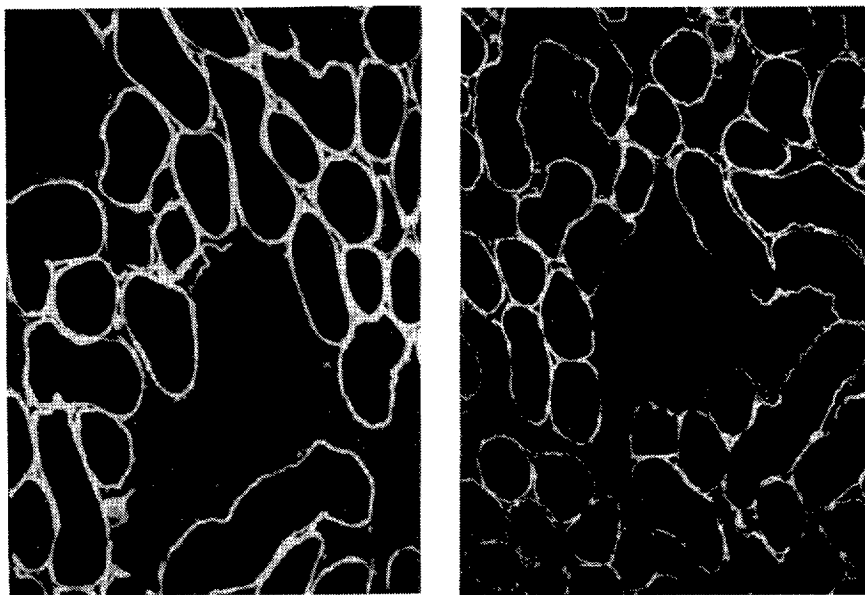
b) 電子顕微鏡による観察

摘出腎を1mm角にカミソリ刃で細切し、2.5% glutaraldehydeで4℃2時間前固定した後、2% osmium tetroxideで4℃1.5時間後固定した。ethanolによる脱水後、Polybed 812 (Polyscience)に包埋した。超薄切片を作製し、uranylacetateとlead citrateで各10分間染色し、電子顕微鏡下 (日立HU12A)で観察した。

結 果

1. 3種類のIgMクラスの抗TBM抗体を産生するハイブリドーマ(39-1, 39-4, 339-3)が得られた。それらはいずれも、近位尿細管基底

Fig. 1 抗TBM抗体 (339-3) の反応性 (左:ラット、右:マウス)



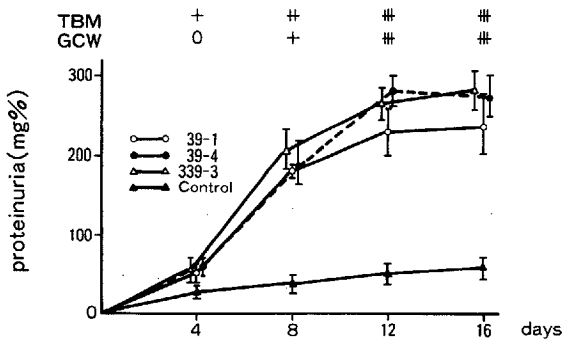


Fig. 2 抗TBM抗体腎組織沈着パターンと蛋白尿の経時的変化

膜とのみ反応し (Fig.1), コラーゲンタイプIV, ラミニン, ヘパラン硫酸との反応性は示さなかった。

2. 抗TBM抗体産生ハイブリドーマの腹腔内投与による腎炎惹起

ハイブリドーマ投与群では、投与後8日目から蛋白尿が認められた (Fig.2)。また、含まれる蛋白質は、投与後8日目では主に2万前後の低分子蛋白質であったが、12日目ではアルブミンも認められた (Fig.3)。蛍光抗体法の結果、IgMは、投与後8日目には主にTBMに局在していたが、投与後12日目にはTBMおよび糸球体糸状壁に沈着が認められた (Fig.2,4)。また、いずれにおいてもC3の沈着は認められなかった。光学顕微鏡による観察の結果、近位尿管上皮細胞の変性・壊死および間質に細胞浸潤が認められ、また、電子顕微鏡による観察の結果、近位尿管のTBMに沿って高電子密度沈着物が認められた (Fig.5)。

3. 抗TBM抗体の静脈内投与による腎炎惹起

蛍光抗体法の結果、IgMは、投与30分後には

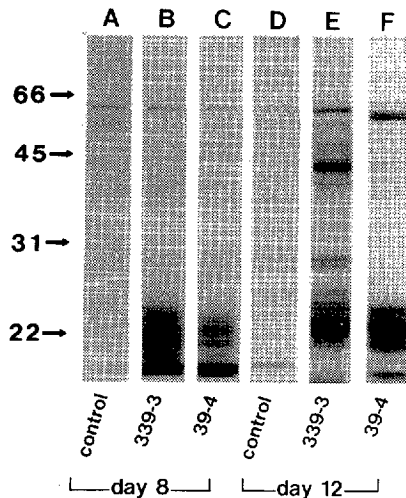


Fig. 3 蛋白尿に含まれる蛋白質の経時的変化

主にTBMに沈着が認められ、8時間・24時間後にはTBMおよび糸状壁に沈着が認められた (Fig.6)。また、72時間後には、主に糸球体に沈着が認められた。

考 察

ラットあるいはマウスのTBMとのみ反応する抗体を産生するハイブリドーマが3種類得られ、それらをマウスの腹腔内に投与することによって、低分子蛋白質を含む蛋白尿および組織変化を伴う間質性腎炎が惹起された。これらの抗体は、既知のTBM抗原であるコラーゲンタイプIV, ラミニン, ヘパラン硫酸とは反応性を示さないため、これらに対する抗原を調べることによって、間質性腎炎の惹起抗原が明らかになると考えられ、現在検討中である。また、抗TBM抗体の静脈内1回投与では、明らかな組織変化を伴う間質性腎炎が惹起できなかったことから、投与する抗体量および投与期間が腎炎惹起に重要であることが明らかになった。

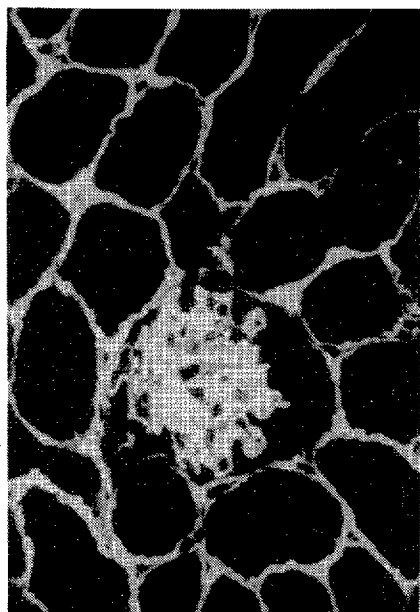


Fig. 4 投与後12日目の抗TBM抗体の沈着

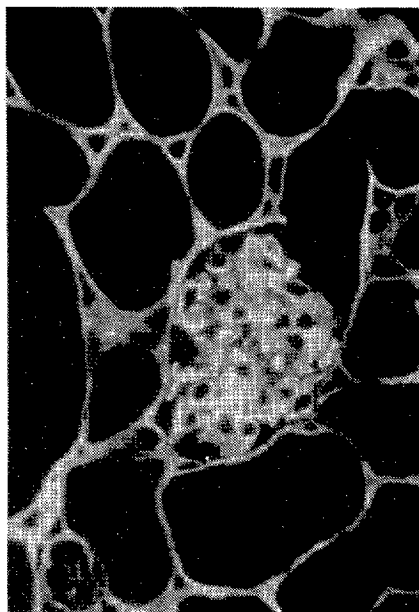


Fig. 6 投与24時間後の抗TBM抗体の沈着

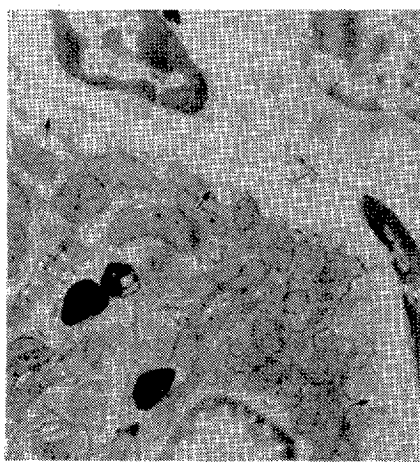


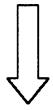
Fig. 5 高電子密度沈着物の存在

参 考 文 献

- 1) Krakower, C.A., & Greenspoon, S.A.: Localization of the nephrotoxic antigen within the isolated renal glomerulus. *A.M.A. Arch. Path.* 51 ; 629-639, 1951.
- 2) Oi, V.T., & Herzenberg L. A. ; In "Selected Methods in Cellular Immunology", eds. B.B. Mishell & S.M. Shiigi, pp 351-372, W.H. Freeman Company, San Francisco, 1980.
- 3) Knight, J.G., Adams, D.D., & Purves, H.D. : The genetic contribution of the NZB mouse to the renal disease of the NZB × NZW hybrid. *Clin. exp. Immunol.* 28 ; 352-358, 1977.



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用
論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



序言

従来,尿細管基底膜(TBM)の,同種および異種動物への免疫により,投与動物において,抗 TBM 抗体の産生と共に間質性腎炎が惹起されることが報告されている。この場合,産生された抗 TBM 抗体は,多様な抗原決定基に対応するポリクローナル抗体であり,間質性腎炎惹起抗原の詳細な解析は,しばしば困難である。

今回,我々は,間質性腎炎の惹起抗原を詳細に解析するために,抗 TBM 抗体産生ハイブリドーマの作製を試みた。その結果 3 種のハイブリドーマが得られ,これらのハイブリドーマを腹腔内に投与することにより,また,産生されたモノクローナル抗 TBM 抗体を静脈内に投与することにより,腎炎惹起を試みた。