

スイッチバリエーションを用いた実験腎炎発症機序の解析

奥村 康*, 陳 香美*, 田中俊之*, 小林 豊**, 重松秀一***

順天堂大学医学部免疫学*, 北里大学医学部内科**, 信州大学医学部第二病理***

序 言

免疫複合体(IC)を介する組織障害の細胞性機序は、広く免疫病理学的な観点から研究されている。特に、*in vitro*で作製したICを投与することによってartificialに惹起した腎炎に関しては、多くの病理組織学的知見が得られている。ところが、現在までになされてきた実験系においては、ICを構成する抗体のアイソタイプの明確性および親和力の均一性を欠いており、アイソタイプ、親和力と組織障害との関連をはっきり知ることが不可能であった。そこで我々は、親和力が同じで、アイソタイプのみ異なるスイッチバリエーション由来のモノクローナル抗体を用いてICを作製し、アイソタイプの相違がいかに関与し、腎炎惹起能力に影響を及ぼすかを実験した。ここでは、classical complement pathwayのみで補体を活性化するIgG_{2a}クラスのモノクローナル抗体と、alternative complement pathwayのみで補体を活性化するIgEクラスのモノクローナル抗体を用いたICで腎炎を惹起させ、その免疫組織学的検索をおこなった。

材料と方法

【実験動物】BALB/cマウス、雌、6週齢(日本生物材料センター)。

【抗原】ダンシル化ウシ血清アルブミン(DNS₃₀-BSA)。作製方法は以下に示す通りである。

Bovine Serum Albumin (BSA; Sigma Chemical Co.)を10mg/mlの濃度で1M car-

bonate buffer (pH 9.5)に溶解し、これにあらかじめ80mg/mlの濃度でacetoneに溶解したDansyl Chloride (Sigma Chemical Co.)をBSA量に対して2%量加え、遮光して一夜攪拌し反応させた。反応生成物は、0.01M phosphate-buffered saline (pH 7.2)に対して透析し、未反応のDansyl Chlorideを除いた後、実験に用いた。

【抗体】抗ダンシルモノクローナル抗体。抗ダンシルモノクローナル抗体を産生するスイッチバリエーション・ハイブリドーマ*1の親株は、Stanford大学のL.A. Herzenberg博士より供与されたものであり、cell lineは、27-13.6 (IgG_{2a})と27-74.3 (IgE)である。抗体の産生は*in vivo*でおこなった。1~2週間前に0.5mlのPristaneを腹腔に注射した(BALB/c×C57BL/6)F₁マウスに、ハイブリドーマを1×10⁷個注射し、1~2週間後腹水を採取した。

【可溶性免疫複合体の作製】抗体を含む腹水(抗体濃度6mg/ml)と抗原液(抗原濃度9mg/ml)を等量混合し、37℃で1時間、4℃で一夜インキュベートしてICを作製した。

【可溶性免疫複合体の投与】上記に従って作製したICを1頭あたり1mg(抗体)、1日1回、14日にわたってBALB/cマウスに尾静脈投与し、2日目、8日目、14日目に屠殺し腎臓を摘出した。

【蛋白尿の検出】IC投与前とICを投与しはじめから2, 4, 6, 8, 10, 12, 14日目に採尿し、尿蛋白排泄量はKnightらの方法*2で測定し、mg%として示した。

【螢光抗体法】腎臓に於けるICとC3の沈着をみるために腎組織をTissue-Tek II O.C.T. Compound (Ames社)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Rabbit anti-mouse κ chainあるいはFITCで標識したGoat anti-mouse C3で螢光染色した。また、IgG2aを用いたIC (IgG2a-IC)を尾静注したマウスの場合、Goat anti-mouse IgGを用いて直接螢光抗体法にて染色をおこなない、IgEを用いたIC (IgE-IC)を尾静注したマウスの場合、Guinea pig anti-mouse IgEとFITC標識したPig anti-guinea pig IgGを用いて間接螢光抗体法による染色をおこなった。この後、顕微鏡下 (Zeissスタンダード18)でICとC3の沈着パターンを観察し写真撮影した。

【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。糸球体の病理組織学的なパラメータとして、糸球体における細胞増殖および多形核白血球の浸潤を指標とし、1切片あたり50個の糸球体を観察した。そして結果は各パラメータの出現率と病変の程度 (一~+++)として表した。

b) 電子顕微鏡による観察

摘出腎を1 mm角にカミソリ刃で細切し、2.5% glutaraldehydeで4℃3時間前固定した後、

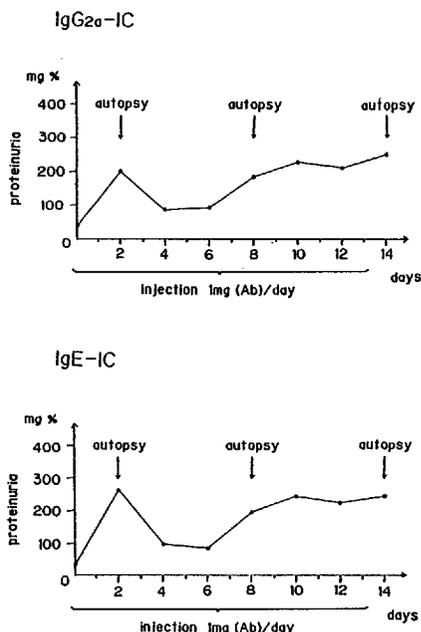


Fig. 1 Appearance of proteinuria

2% osmium tetroxideで12時間後固定した。ethanolによる脱水後Polybed 812 (Polyscience社)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。

Table 1 Summary of experimental results (1)

	injections	No. of mice	granular deposits of IgG2a or IgE				granular deposits of C3					
			mesangium		capillary wall		mesangium		capillary wall			
			-	+	++	+++	-	+	++	+++		
IgG2a-IC	0	6	6				6					
	2	6		6			6				6	
	8	6			1	5		6			6	
	14	11				11			5	6	6	5
IgE-IC	0	6	6				6				6	
	2	6		6			6				6	
	8	6			1	5		6			6	
	14	12				12			5	7	12	8

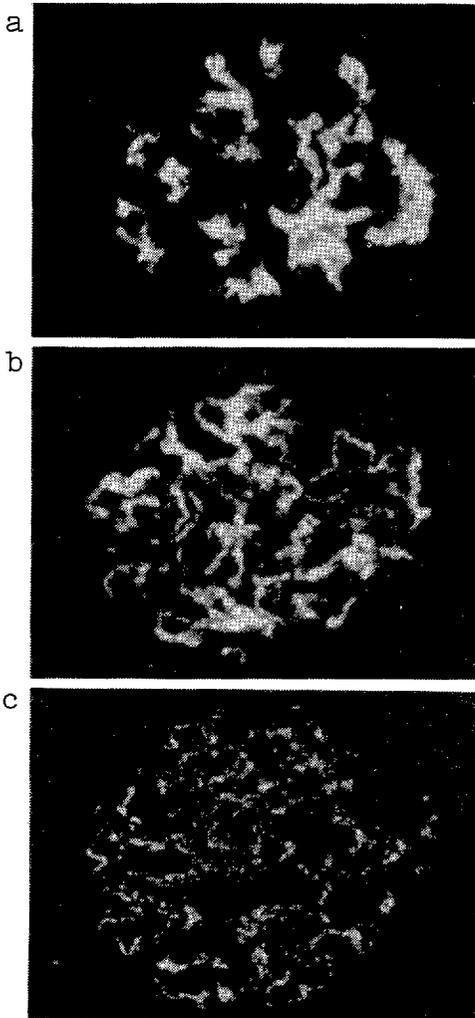


Fig. 2 Immunofluorescence

- a. IgG (day 8)
- b. IgG (day 14)
- c. C3 (day 14)

結 果

1. 尿蛋白量の経時的な変化は、Fig.1に示したように、IgG2a-IC投与群とIgE-IC投与群間で有意差は認められなかった。両群

	injections	No. of mice	hypercellularity				infiltration of PMN			
			-	+	++	+++	-	+	++	+++
IgG2a-IC	0	6	6				6			
	2	6	6				6			
	8	6	6				6			
	14	11		4	6	1	3	8		
IgE-IC	0	6	6				6			
	2	6	6				6			
	8	6	6				6			
	14	12		5	7		2	6	4	

Table 2 Summary of experimental results

ともまずIC投与後2日目にピークがみられ、その後減少し、再び6日目から増加する傾向を示した。

2. 蛍光抗体法

IgG2a-IC投与群では、まずメサンジウムにIgGの顆粒状沈着が認められ、日数をおうにつれて係蹄壁へと沈着が移行していくのが認められた (Fig. 2, Table 1)。

IgE-IC投与群でも同様な傾向が認められた (Table 1)。また、両群ともIC投与後8日目から、メサンジウムと係蹄壁に沿ってC3の顆粒状沈着が認められた (Fig. 2, Table 1)。

3. 組織学的検討

IC投与後8日目、糸球体はやや腫大し、メサンジウム領域が膨化し、一部で係蹄構造の不規則化がみられる。明らかな白血球の浸潤はなく、細胞増殖もめだたない。

糸球体における細胞増殖と多形核白血球の浸潤は、Table 2に示したように、両群ともIC投与をはじめてから14日目に認められたが、IgE-IC投与群では多形核白血球の浸潤が著明であった (Fig. 3)。

電子顕微鏡所見は、多形核白血球と単核球の遊走があり、メサンジウムと上皮下に高電子密度沈着物が認められた (Fig. 4)。あるいは一部分上皮細胞足突起の癒合が認められた。

考 察

補体を classical complement pathway で

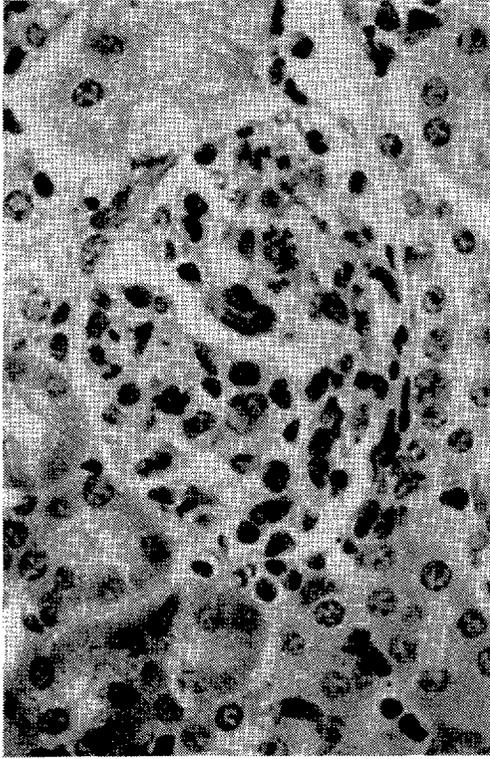


Fig.3 Hypercellularity due to the accumulation of PMNs in the glomeruli (×340)

活性化するIgG2aよりなるICによる糸球体腎炎は、モノクローナル抗体を用いた場合も、従来のウサギ等異種の抗体で作製したICと同様細胞浸潤を伴う典型的な血清病型の腎炎を惹起することができた。このIgG2aと全く同じ親和力を持ち、ほぼ同じ大きさのICを構成しているIgEよりなるICを用いた場合も、IgG2aの場合と同様の継時変化を持つ強い血清病型の腎炎を起こさせることが明らかになった。すなわち、*in vivo*での炎症惹起能力は、補体の活性化経路は異なるにせよ、免疫グロブリンのアイソタイプの違いに影響されないことが判明した。本実験においては急性腎炎についてのみそのアイソタイプの相違を観察したのであるが、この実験を用いることによってさらに慢性に経過す



Fig.4 Electronmicrograph shows a massive dense deposit in the subepithelial space (×8000)

する腎炎においてもアイソタイプの相違を検討することが可能であり、ヒトの慢性腎炎と免疫グロブリンアイソタイプの関連を明らかにすることも可能である。

参 考 文 献

- *1. Dengl, J.L., Parks, D.R., Oi, V.T. & Herzenberg, L.A. : Rapid isolation of cloned isotype switch variants using fluorescence activated cell sorting. *Cytometry* 2 : 395-401, 1982.
- *2. 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

免疫複合体(IC)を介する組織障害の細胞性機序は、広く免疫病理学的左観点から研究されている。特に, *in vitro* で作製した IC を投与することによって artificial に、惹起した腎炎に関しては、多くの病理組織学的知見が得られている。ところが、現在までになされてきた実験系においては、IC を構成する抗体のアイソタイプの明確性および親和力の均一性を欠いており、アイソタイプ、親和力と組織障害との関連をはっきり知ることが不可能であった。そこで我々は、親和力が同じで、アイソタイプのみ異なるスイッチバリエーション由来のモノクローナル抗体を用いて IC を作製し、アイソタイプの相違がいかに腎炎惹起能力に影響を及ぼすかを実験した。ここでは、classical complement pathway のみで補体を活性化する IgG2a クラスのモノクローナル抗体と、alternative complement pathway のみで補体を活性化する IgE クラスのモノクローナル抗体を用いた IC で腎炎を惹起させ、その免疫組織学的検索をおこなった。