

3. IV型ループス腎炎における Membrane Attack Complex (MAC) の酵素抗体法による観察

研究協力者 松本 脩三*
共同研究者 武越 靖郎*, 永田 康*,
伊丹 儀友*, 横丸 博幸*

〔研究目的〕

補体系の生物学的作用の一つとして細胞膜障害作用があり、その際細胞膜上に形勢されたC5b-9のdimerであるドーナツ形の Membrane attack complex (MAC) が膜の脂質2重層に陥入し、細胞の膨化破壊を起こすこと、また、補体系はその活性化過程においてC₃a, C₅a, C₃bなどのfragmentに分かれ、種々の生物学的作用を示すことも知られている¹⁾。従来、腎炎における補体の役割は間接的なものであり、主としてC₅aなどによる好中球の遊走促進や、C₃bを介しての免疫粘着現象などに続く好中球よりの proteolytic enzyme の放出が糸球体毛細血管壁に障害を与えると考えられていた。しかし、膜性腎炎ではC₃の明らかな沈着を認めるにかかわらず、細胞浸潤や細胞増殖に乏しいことより、そのような補体の役割によってだけでは説明が困難であり問題が残されていた²⁾。最近、動物実験を中心にMACには膜障害作用だけでなく、好中球の役割を介さずに直接毛細血管壁に作用し蛋白尿を発生させることを示唆する事実がいくつか報告され^{3,4)}、MACの新しい役割として注目されている。今回、我々は免疫複合体型腎炎の代表としてClass IVループス腎炎 (diffuse proliferative lupus nephritis) を対象に、MACの局在について酵素抗体法により観察し、その病態解明に資することを目的とした。

〔対象および方法〕

対象は、昨年度報告したClass IVループス腎炎の免疫電顕法による検討において使用した症例と同じものを用いた。対象の臨床像は表1のごとくで、発症時年齢は4歳から17歳で、全例が女子であった。経過中いずれかの時期に全例ネフローゼ症候群を呈したことがあり、高血圧は3例が、BUNの上昇は4例に認められている (表1)。これら5例の蛍光抗体法所見は、IgG, IgA, C1q, C₃, IgM, C₄がその強度に差はあったが、係蹄壁からメザンジウムにかけて顆粒状沈着を示している (表2)。

酵素抗体法は次のごとく行った。腎生検により採った組織の一部をPLP固定液にて、4℃4時間固定した後、sucrose濃度を段階的に上げたsucrose入りPBSにて洗浄し、液体窒素にて急速に凍結し-80℃に保存した。この凍結腎組織をcryostatにより6-8μに薄切し、ゼラチンおよびグルタルアルデヒドで処理したスライドガラスに載せ、10% sucrose入り冷PBSで洗浄後Poly C₉-MAにて室温で4時間incubateし、再び洗浄した。さらに、10%正常ウサギ血清を反応させた後、ウサギ抗マウスIgG血清 (DAKO社) で3時間incubateした。その後、2%グルタルアルデヒド-PBSにて30分間固定した。次で、冷PBSで洗浄しDAB溶液にて4℃30分間反応させ、その後DAB-H₂O₂溶液にて2-5分間反応させた。再びPBSで洗浄し、1%オスミウム酸にて15-30分間固定し、以後エタノール系列にて段階的に脱水後、epon 812に包埋し、LKBウルトラミクロトームにて70nmの超薄切片を作製し、無染色にて日立HU-12AおよびH-800にて

* 北海道大学医学部小児科学教室

表 1

Name	Age at onset	Sex	Duration of disease at biopsy	Follow-up period	Clinical findings		
					N.S. ^a	↑BP ^b	↑BUN ^c
1. S. K.	9 years	♀	1 month	1 year	+	-	-
2. H. M.	9 years	♀	1 month	1 year	+	+	+
3. A. K.	17 years	♀	2 years 6 months	3 years	+	+	+
4. N. M.	10 years	♀	7 years	8 years	+	-	+
5. A. S.	4 years (?)	♀	7 years	7 years	+	+	+

N.S.^a : Nephrotic Syndrome, (+) present, (-) absent

↑B.P.^b : Elevated blood pressure, present or absent

↑BUN^c : Elevated blood urea nitrogen

表 2

pl.	IgG	IgA	IgM	IgE	C1q	C3	C4	Properdin	Fibrinogen
1	+	+	+	+	+	+	+	+	±
2	+	+	+	±	+	+	+	±	+
3	+	+	+	-	+	+	±	±	±
4	+	+	+	-	+	+	±	-	-
5	+	+	+	-	+	+	+	±	+
Total	5/5	5/5	5/5	2/5	5/5	5/5	5/5	4/5	4/5

観察した。これと同時に、1~2 μ切片も作製し、光顕にて観察した。

次に使用した抗血清、すなわち Poly C₉-MA (A monoclonal antibody to a neoantigen of the C₉ portion of the membrane attack complex of human complement) についての詳細は他に⁵⁾ ゆずるが、ここで若干ふれておく。この抗血清は collagenase 消化正常ヒト糸球体基底膜で、complete Freund's adjuvant と共に Bal b/c マウスを免疫し、その脾細胞を Bal b/c myeloma cell line P₃-Nsl-1-Ag 4-1 と polyethylene glycol で細

胞癒合させ、糸球体基底膜抗原のモノクローナル抗体を作製中に偶然発見されたものである。その特異性については、以下の検討がなされている。

ELISA により、正常ヒト血清では検出できない補体活性化血清中の抗原決定基と反応し、また 37 °C、64 時間で polymerized された purified C₉ と同様に補体処理したヒツジ赤血球膜から分離された purified MC₅b-9 とも反応したが、purified C₅b6, C₅b67, C₉ 或いは C₉ とは反応しなかった。poly C₉-MA は RIA で dose dependent に poly C₉ と反応したが、monomeric C₉ とは反応しな

かった。unlabelled poly C₉ または purified M C₅b-9 の増量は¹²⁵I poly C₉ RIA を同じように抑制した。

正常ヒト血清中で incubate した Zymosan 粒子は、poly C₉-MA と蛍光法体法により陽性に反応、しかし、C₃、C₅、C₆、C₇、C₈ あるいは C₉ の各コンポーネントを欠いた血清で Zymosan 粒子を incubate すると、poly C₉ は結合しないこと、さらに purified C₉ で C₉ 欠損症の血清を補足すると poly C₉-MA と反応するようになることなど、poly C₉-MA が MC₅b-9 および poly C₉ 上の neoantigen と特異的に反応することを示すいくつかの裏付けがなされている。

HRP 標識ウサギ抗マウス IgG 血清は、使用前に正常ヒト血清で吸収し用いた。

〔結 果〕

光顕による観察では、HRP 反応産物は糸球体の毛細血管係蹄壁からメザンジウム領域にかけて

非常に強く認められた。蛍光抗体法で C₃ や、Ig G などの決着が非常に弱かったボウマン嚢基底膜や尿細胞管基底膜にも HRP 反応産物が非常に強く認められた (写真1)。

電顕による観察では通常電顕により Electron Dense Deposit (EDD) として認められる部位に相応し、HRP 反応産物が認められた。すなわち、糸球体基底膜では上皮下、基底膜内、および内皮下 (写真2, 3)、さらには上皮細胞や内皮細胞が基底膜と接する部位、光顕でも明らかであったごとく尿細管基底膜 (写真4) や、ボウマン嚢基底膜 (写真5) などにも HRP 反応産物を認めた。そのような HRP 反応産物のあった部位を拡大して観察すると、直径 20 nm 前後の球状粒子が多数集積しているのが認められた。この粒子の一部のものは、中心部が明らかに lucent となっているものがあつた。また、この粒子は所により環状に連なっていることがあつたり、上皮細胞表面に並んで存在しているのが認められた (写真6)。

写真1

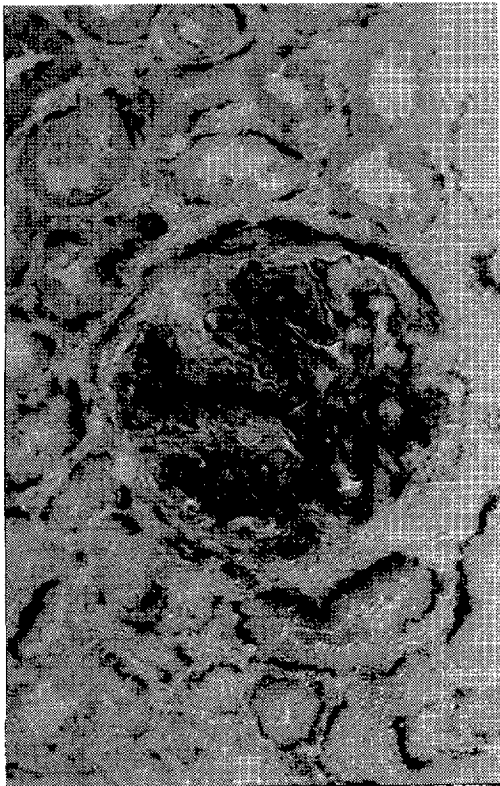


写真2



写真 5

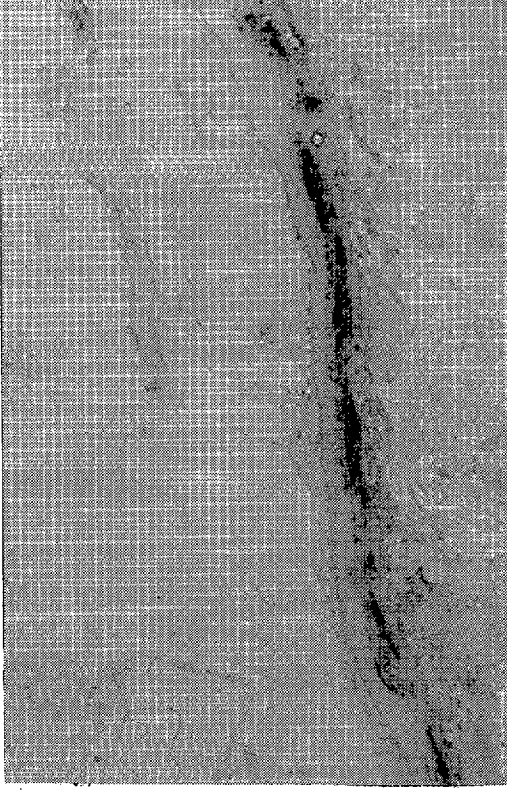


写真 6

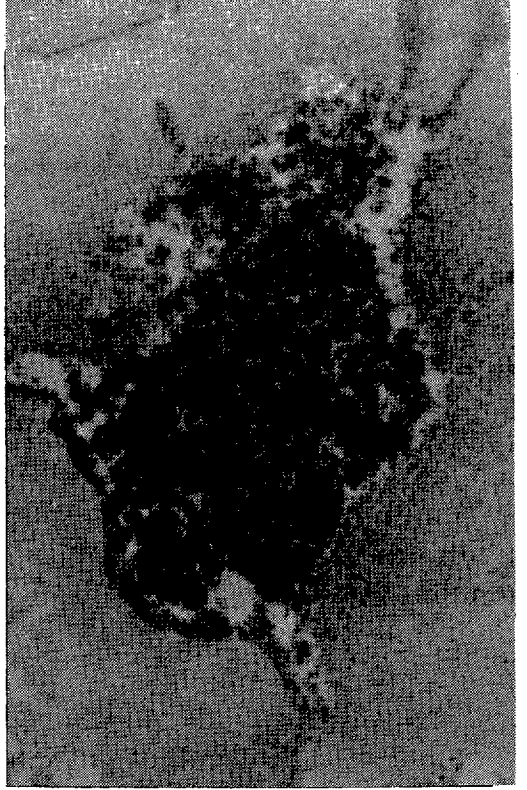


写真 3

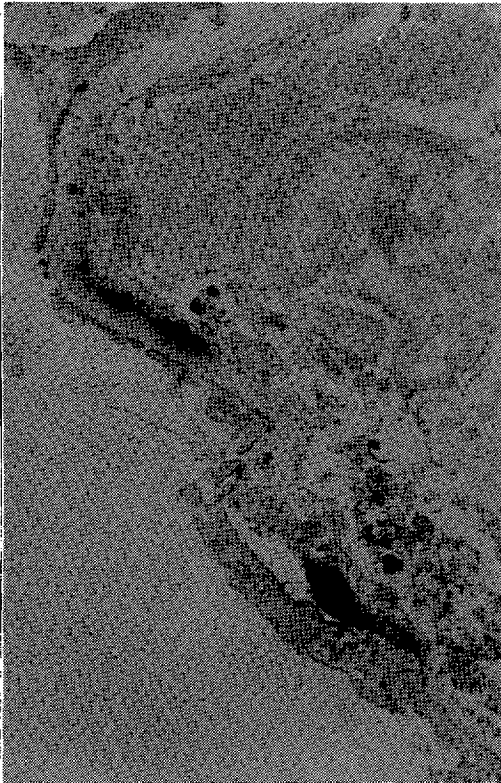
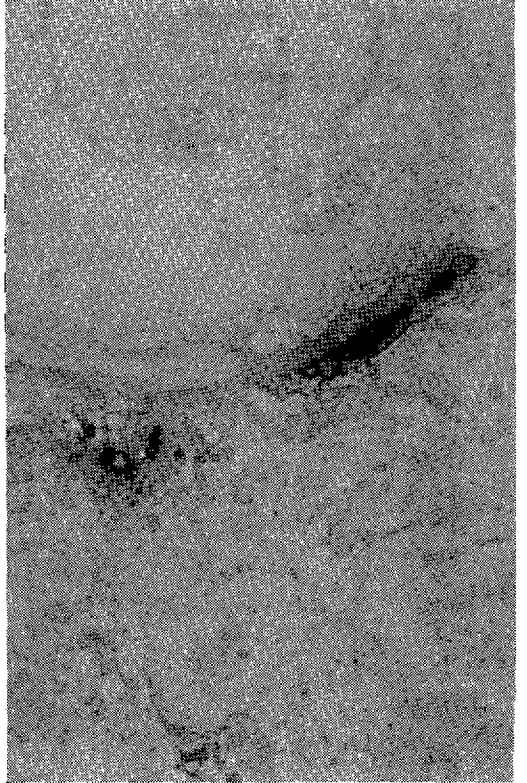


写真 4



[考 察]

補体系が classical pathway または alternative pathway により活性化され、 C_5 が分解され C_5b が生ずると、MAC 形成が始まる。この C_5b は C_5 と、次で C_7 と反応し C_5b-7 複合体が生ずる。 C_5b-7 複合体は脂質 2 重層の膜に結合することができるが、 C_8 が結合することにより、極めてゆっくりと細胞溶解が始まり、 C_9 が結合することにより MAC 形成が完全する。 C_5b-7 複合体は流血中では不安定であるが、Sprotein と結合し、 SC_5b-7 複合体を形成し、さらに C_8 、 C_9 が結合し、 SC_5b-9 が形成される⁷⁾。

Mayer⁸⁾ は補体による膜障害機序として C_5b-9 複合体が膜上で成長してゆく際、環状ないし円筒状に凝集し、各成分蛋白のコンフォメーションが変わり、複合体外周部に疎水基が、中空の内壁に親水基が配列し、その疎水性外壁により膜の脂質 2 重層へ沈下し、強固なドーナツ状の管状通路 (transmembrane channel) を形成し、この親水性内壁を通してイオンの出入および水分の流入が起こり、細胞の膨化破壊を来すと考えた。このドーナツ状構造の内径は 100 Å、外径は 200 Å であるといわれている⁹⁾。MAC は C_5b-9 の dimer より成り、 C_5b-9 複合体当たりの C_9 の数により transmembrane channel の大きさは規制されると言われている⁹⁾。

従来、補体系は抗体の沈着の認められる糸球体病変において、mediator としての役割が明らかにされている。抗基底膜型腎炎においては尿中蛋白は糸球体における好中球の数に比例し、好中球を減少させると、尿中蛋白も消失する。また、補体を減少させる好中球の浸透を減じ、尿蛋白を少なくすることができる⁹⁾。このような好中球の働きを介しないで補体の直接的役割を示す第一の根拠に、実験的膜性腎炎の場合があげられる⁹⁾。この場合、糸球体に IgG や C_3 の強い沈着を認め、蛋白尿が認められているにもかかわらず、炎症性細胞浸潤が認められていない。また、Salant ら³⁾ は cobra venom factor (CVF) により、 C_3 を正常の 5% 以下に維持し、passive heyman nephritis

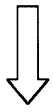
において、糸球体には control と同様に抗体の沈着を認めているにもかかわらず、尿蛋白を著明に減少するのに成功している。Groggel ら⁴⁾ は、 C_3 欠損のウサギにおいても、BSA 抗原や抗体の沈着は control と同時に認められるのに、尿蛋白が著明に減少していることを認めた。このように主として基底膜の上皮下に immune deposit を認める膜性腎炎においては補体系、特に MAC の直接作用による蛋白尿の発生を示唆する事実も多い。今回の我々の症例においては、好中球の浸潤もあり、当然それらより放出される proteolytic enzyme による毛細血管壁の障害を考慮しなくてはならないが、上皮下の immune deposit の部位や足突起表面に MAC の局在を認めたことより、MAC による上皮下細胞の障害、あるいは基底膜の障害の関与も全く否定出来なかった。また、今回の検討では、蛍光抗体法で C_3 や IgG などの沈着のそれ程強く認められなかった尿細管基底膜や、ボウマン嚢基底膜にも MAC の沈着を認めた。MAC は糖尿病、高血圧症、腎奇形などの腎にも沈着を認めるといわれ、特に sclerosis の強い部位への沈着が強い傾きがみられている。また、胎児腎には沈着を認めなかったが正常でも高齢者には沈着を認めることがあるといわれている¹⁰⁾。ループス腎炎においては、尿細管基底膜やボウマン嚢基底膜に immune deposit を認めることがあり、免疫学的機序の関与も一部考えられるが、障害された腎細胞が C_3 を活性化させ、terminal complement component までをも活性化させるとも言われており¹⁰⁾、免疫学的機序とは無関係に何らかの原因により腎組織が障害され、本来 immune deposit の存在していない部位にも MAC の沈着を来すことも考えられる。今回、MAC の沈着部位を強拡大の電顕により観察すると、直径約 20 nm の球状粒子の集積により成っていることが明らかになった。この粒子は、サイズから MAC のドーナツ構造にほぼ一致しており、今後別な角度より、その裏付けのため検討が必要と思われる。

〔おわりに〕

IV型腎炎の5症例について、poly C₉-MAを用いて腎におけるMACの局在について、酵素抗体法により観察を行った。MACは、通常電顕により観察される糸球体のEDDの部位をはじめ、尿細管基底膜およびボウマン嚢基底膜、糸球体上皮細胞および内皮細胞の表面などにも局在を認めた。蛋白尿の成因とMACの沈着との関連について若干の考察を行った。

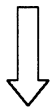
§ 文献

- 1) Biesecker, G. : Biology of Disease : Membrane attack complex of complement as a pathologic mediator. *Lab. Invest.*, **49** : 237-249, 1983.
- 2) Couser, W. G., Baker, P. J., and Adler, S. : Complement and the direct mediation of immune glomerular injury : A new perspective. *Kidney Int.*, **28** : 879-890, 1985.
- 3) Salant, D. J., Belok, S., Madaio, M. P., Couser, W. G. : A new role for complement in experimental membranous nephropathy in rats. *J. Clin. Invest.*, **66** : 1339-1350, 1980.
- 4) Groggel, G. C., Adler, S., Rennke, H. G., Couser, W. G., Salant, D. J. : Role of the terminal complement pathway in experimental membranous nephropathy in the rabbits. *J. Clin. Invest.*, **72** : 1948-1957, 1983.
- 5) Falk, R. J., Dalmaso, A. P., Kim, Y., Tsai, C. H., Scheinman, J. I., Gewurz, H. and Michael, A. F. : Neoantigen of the polymerized ninth component of complement, characterization of a monoclonal anti-body and immunohistochemical localization in renal disease. *J. Clin. Invest.*, **72** : 560-573, 1983.
- 6) Mayer, M. M. : Mechanism of cytolysis by complement. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **69** : 2954-2958, 1972.
- 7) Boyle, M. D. P., and Borsis, T. : Studies on the terminal stages of immune hemolysis. *J. Immunol.*, **123** : 71-76, 1979.
- 8) Cochrane, C. G., Weigle, W. D., Dixon, F. J. : A role of polymorphonuclear leukocytes and complement in nephrotoxic nephritis. *J. Exp. Med.*, **122** : 99-116, 1965.
- 9) Arnaut, M. A., Rennke, H. G., Cotran, R. S. : Membranous glomerulonephritis. *Contom Issue Nephrol.*, **9** : 199-235, 1982.
- 10) Baker, P. J., Osofsky, S. G. : Activation of human complement by heat-killed human kidney cells grown in cell culture. *J. Immunol.*, **124** : 81-86, 1980.



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



〔研究目的〕

補体系の生物学的作用の一つとして細胞膜障害作用があり,その際細胞膜上に形勢された C56-9 の dimer であるドーナツ形の Membrane attack complex(MAC)が膜の脂質 2 重層に陥入し,細胞の膨化破壊を起こすこと,また,補体系はその活性化過程において C3a,C5a、C3b などの fragment に分かれ,種々の生物学的作用を示すことも知られている 1)。従来,腎炎における補体の役割は間接的なものであり,主として C5a などによる好中球の遊走促進や,C3b を介しての免疫粘着現象などに続く好中球よりの proteolytic enzyme の放出が糸球体毛細血管壁に障害を与えたと考えられていた。しかし,膜性腎炎では C3 の明らかな沈着を認めるにかかわらず,細胞浸潤や細胞増殖に乏しいことより,そのような補体の役割によってだけでは説明が困難であり問題が残されていた 2)。最近,動物実験を中心に MAC には膜障害作用だけでなく,好中球の役割を介さずに直接毛細血管壁に作用し蛋白尿を発生させることを示唆する事実がいくつか報告され 3)4),MAC の新しい役割として注目されている。今回,我々は免疫複合体型腎炎の代表として Class ループス腎炎(diffuse proliferative lupus nephritis)を対象に,MAC の局在について酵素抗体法により観察し,その病態解明に資することを目的とした。