

# 糸球体に沈着した免疫複合体と糸球体細胞外要素の相互関係

## 小児慢性腎炎の治療法の開発に関する研究

## 小児腎炎の病態病理に関する研究

木 原 達 \*

包埋後免疫電顕法で三種類の腎炎モデルの抗原, 抗体, 補体の結合部位, 糸球体細胞外要素との相互関係を調査した。細胞外要素の証明には IV collagen, laminin, fibronectin, GBM, heparan sulfate proteoglycan (HSPG) の各抗体を用いた。上皮, 内皮, メサンギウムに沈着する複合体は, 抗原, 抗体, 補体が証明され, 細胞外成分は含まない。肥厚・硬化は沈着物を取り囲み新しい細胞外成分が増加する修復であると結論された。

postembedding method, extracellular matrix, GBM thickening.

研究方法: 正常, ネフロトキシン腎炎, 慢性血清病型腎炎の極期と慢性期, 受身型ハイマン腎炎の抗原, 抗体, 補体と細胞外成分の位置関係を包埋後免疫電顕法で検索した。細胞外成分として IV collagen, laminin, fibronectin, HSPG, GBM に対する polyclonal antibody を用いた。薄切した切片はニッケルグリッドにのせ, 各抗体に反応した後, pAg 又は IGS 法で反応部位を有視化した。

結果: 1. 正常腎では anti-GBM, anti-laminin は基底膜全層を認識した。IV collagen は基底膜内側のみ, メサンギウム全域に陽性となった。anti-HSPG は基底膜内外の透明層に規則正しく配列していた。2. ネフロトキシン腎炎では補体は基底膜内側に強く証明された。3. 慢性血清病型腎炎では, 沈着している免疫複合体は抗原, 抗体, 補体のみが強く, 明瞭に証明されたが, 細胞外成分は全く認められなかつ

た。慢性期になって, 沈着物が部分的融解を示すようになると, かつて沈着があった所に新しく細胞外成分が増加し, 基底膜の肥厚, 硬化巣が出現してくる。かゝる部分は上述した細胞成分のうち, anti IV collagen, anti-fibronectin を除く成分が証明される。

考察: 1. ネフロトキシン腎炎では基底膜の内側に大量の補体活性化がみられ, 基底膜障害は内側で起こっている。2. 慢性血清病では免疫複合体は既存の基底膜成分を押しおける space occupying process で沈着が大きくなる。修復で増加する細胞外成分は laminin, anti-GBM と反応する物質で構成される。

文献: 1. Postembedding immunoelectron microscopic localizations of antibodies and complements in the rat with anti-GBM nephritis. Kihara I, Kawasaki K, Yaoita E and Yamamoto T Am J Pathol (in press)

Abstract

Itaru Kihara

In 3 models of glomerulonephritis, electron dense deposits contained solely antigen, antibody, complements and grow larger as space occupying process. Restoration takes place as deposits fade away and thickening of the GBM and sclerosis ensue.

\*新潟大学医学部腎研究施設

Kihara Itaru

Niigata Univ. School of Medicine, Institute of Nephrology

## 1. 序 言

糸球体に免疫複合体が線状、顆粒状に沈着した時、糸球体を構成する細胞外成分と沈着物の相互関係はどのようになっているか、基底膜の修復はいつ、如何にしてもとにもどるかを免疫電顕で検討する。

## 2. 方 法

正常、ネフロトキシン静注して4時間から7週まで、BSAを抗原とした腎炎で蛋白尿の極期、BSA投与を中止したが強い蛋白尿が続いている慢性期、受身型ハイマン腎炎5、12日目のラットを用意した。免疫電顕は包埋後証明法を用いた。すなわち、エーテル麻酔の下で開腹したラット腹腔大動脈から、左腎を灌流した後、PLP固定し、摘出した腎を細片とし、さらに4時間固定した。methyl formamideで脱水した試料を $-20^{\circ}\text{C}$ 、紫外線を照射しながら、メタクリレート系樹脂(GMA)に包埋した<sup>1)</sup>。超薄切片をニッケルグリットに載せ、糸球体細胞外成分として抗基底膜抗体(anti-GBM)、anti-laminin、anti-fibronectin、anti-IV collagen、anti-heparan sulfate proteoglycan、抗原、抗体、補体の証明として、anti-rabbit IgG、anti-rat IgG、anti-rat C3とC1qの各抗体と反応させた。反応部位の局在は20nmの金コロイドを結合させたanti-rabbit IgG(IGS)、protein A-gold(pAg)で検討した。各抗体の希釈は1,000倍から4,000倍で用いた。

## 3. 成 績

### 1. 正常糸球体の細胞外成分の分布

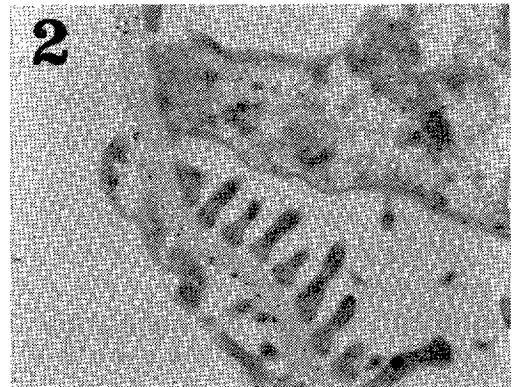
anti-GBMは糸球体基底膜の全層、メサンギウム基質の全域に均等に結合して証明された。anti-lamininの結合部位も基底膜、基質ともanti-GBMと同様であった(写真1)。anti-IV collagenはメサンギウム基質にはびまん性に結合していたが、基底膜は内皮細胞側の部分のみ陽性であった。この所見は蛍光抗体法所見と一致した。



anti-fibronectinはメサンギウム基質に強く陽性であったが、基底膜にはほとんど結合はみられなかった。anti-HSPGは糸球体基底膜の内側に規則正しく配列していた。

### 2. ネフロトキシン腎炎

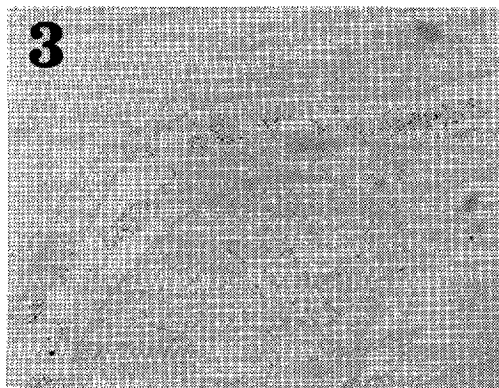
静注されたネフロトキシンは4時間ですでに糸球体基底膜全層に結合していた。IGSとsheep anti-rabbit IgG後のpAgの所見は一致した。2週間以降ではIGS、sheep anti-rabbit IgGと結合しない部分が2重化を起こしている肥厚した基底膜、上皮側に肥厚した上皮細胞の下に存在した。新しく生じた肥厚部分はanti-lamininが証明された。anti-rat C3とC1qは4時間、1日、3日目では基底膜の内側半分に強く、外側半分の3倍から5倍の金コロイド粒子数であった。(写真2)。電顕写真上、基底膜区域を上下均等の面



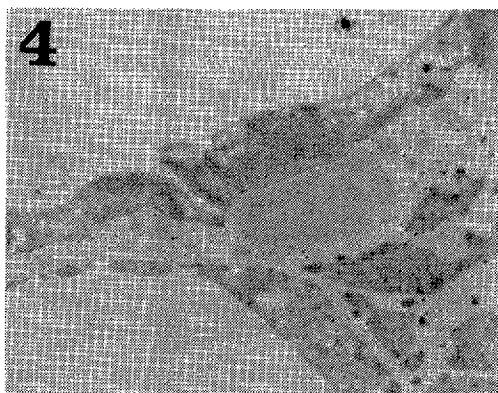
積に2分し、各区画に含まれる金粒子数をZeiss IBAS-2000で数えると、anti-rat C3, C1qは基底膜内側に集中して存在することが定量的に示された。これに対しanti-rabbit IgG, anti-rat IgGは均等に分けた基底膜上下区画にほぼ同数で証明されたり。7日、14日後の試料ではC3, C1qとも内皮側半分の優位な結合性は失われていた。anti-lamininの結合部位は4時間から7週まで、基底膜全層、メサンギウム基質全域に証明された。

### 3. 免疫複合型腎炎

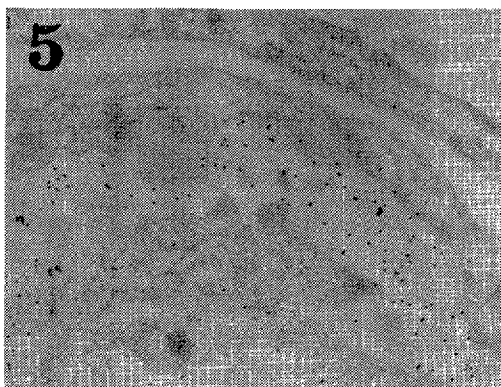
BSA抗原静注で大量の蛋白を尿中に排泄している時期では、メサンギウム、基底膜に電子密度の高い大きい沈着物が多数みられた。これらはanti-BSA, anti-rat IgG, anti-rat C3を夫々反応した後、pAgを行うと沈着物に一致して金粒子が結合していたが、沈着物以外の結合はみられなかった(写真3)。anti-HSPG



は内皮下の沈着では内皮側の結合が、上皮側の結合では上皮側の結合が失われていた(写真4)。anti-GBM, anti-lamininは沈着内には証明されず、沈着物以外の基底膜、基質にはびまん性に結合していた(写真5)。BSAの静注を中止しても強い蛋白尿は持続した。中止後4週、7週目の糸球体には沈着物が減少し、基底膜のスパイク形成を含む肥厚、メサンギウム基質の増加、ポーマン囊との癒着、半月体がみられた。沈着物は一部融解し明るくなっていた。anti-



BSA, anti-rat IgG, anti-C3は電子密度の高い沈着物の部分にのみ反応していることがpAgで証明された。anti-GBM, anti-lamininでみると新生された基底膜の肥厚部分を含めてびまん性の結合が証明されると同時に、沈着物の融解し明るくなった部分にも結合がみられた(写真6)。anti-HSPGは沈着物内には証明



されない。部分的に融解し、新しく形成された基底膜が出現し始めるとHSPGが再び証明されるようになった。anti-IV collagenは肥厚した基底膜の内側だけに存在したが、癒着部分ではポーマン囊と続く細胞外成分の中に大量に存在していることがわかった。

### 3. 受身型ハイマン腎炎

受身型ハイマン腎12日目には上皮下に沈着が

証明された。anti-rabbit IgGは沈着物のみに結合していたが、BSA腎炎のanti-BSAの結合と比較すると、沈着物全体に均一にみられなかった。anti-GBM, anti-lamininは沈着物を除く基底膜成分に一致して、びまん性の結合が証明された。

#### 4. 考 察

基底膜が抗原となっているネフロトキシン腎炎では、結合した異種抗体は基底膜全層、メサンギウム基質の全域に均等に結合していることがわかる。局所で生じた抗原抗体反応は、補体を直ちに活性化させていたが、補体の証明される部位は基底膜を内外の二層に分けると、内側半分で圧倒的に強い。この事実から、基底膜の障害されている部分は内側であることが明らかになった。障害部位を特定できたことは大きな進展であったと思われる。一方、基底膜の構成要素の一つanti-lamininはびまん性に証明されたことから、構成要素の欠落なしにネフロトキシンの結合が起こっていると推量される。

免疫複合体が顆粒状に沈着する腎炎では、循環している免疫複合体による腎炎であっても、局所で反応が生ずる腎炎でも、沈着物の中に構成要素は証明されない。換言すると、沈着物は構成要素を押しつけて、space occupyingの形で沈着していることがわかった。沈着がメサンギウム基質、内皮下腔、上皮下であっても同様であった。メサンギウム基質のみに沈着がみられる場合、蛋白尿は生じていない。内皮下腔、上皮下に沈着が加わった時のみ、蛋白尿が出現する。沈着は構成要素の配列を乱し、場をふさぐ形で生じているから、ネフロトキシン腎炎とは異なる特徴といえる。蛋白尿の持続についてネフロトキシン腎炎とは異なる一面があることを示すと思われた。基底膜の修復、すなわち肥厚や硬化が起こってくると新生した基底膜の構成成分は検索した限り、正常の構成成分と差がなかった。この事実は構成要素がばらばらに合成されるのではなくて、歩調をとって一諸に形

成されていることが考えられた。基底膜の障害に対する修復に大きな示唆を与えることができたといえよう。

#### 5. 結 論

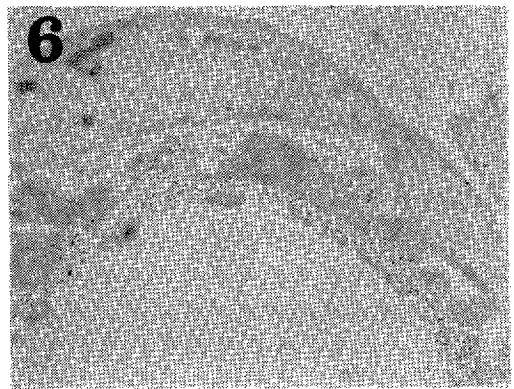
包埋後証明法による免疫電顕で、三種の糸球体腎炎で免疫複合体と構成要素の分布を検索した。その結果、1. ネフロトキシン腎炎の障害の部位は基底膜内側であることが明らかとなった。2. 顆粒状に免疫反応物が沈着する腎炎では、形成される機序が違っても、沈着は抗原、抗体反応物のみで、構成要素は含まれない。space occupying processである。3. 肥厚、硬化は正常と同じ成分の構成要素が加わって起こる。

#### 6. 文 献

1. Postembedding immunoelectron microscopic localizations of antibodies and complements in the rat with anti-GBM nephritis.

Kihara I, Kawasaki K, Yaoita E and Yamamoto T:

Am J Pathol (in press)





## 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



包埋後免疫電顕法で三種類の腎炎モデルの抗原,抗体,補体の結合部位,糸球体細胞外要素との相互関係を調査した。細胞外要素の証明には collagen, laminin, fibronectin, GBM, heparan sulfate proteoglycan(HSPG)の各抗体を用いた。上皮,内皮,メサンギウムに沈着する複合体は,抗原,抗体,補体が証明され,細胞外成分は含まない。肥厚・硬化は沈着物を取り囲み新しい細胞外成分が増加する修復であると結論された。