

腎糸球体基底膜における in situ immune complex 形成に関する研究

本田西男, 藤垣嘉秀, 木村正人, 菱田 明

塩基性フェリチン(F)による in situ immune complex (IC)モデルにて腎糸球体基底膜(GBM)内のICの動態,特に抗原,抗体の緻密層内存在様式を免疫電顕にて検討した。ICはGBM内皮下で形成された後,上皮側へ移動しelectron dense depositを形成した。抗原(F),抗体(金コロイド標識)のGBM内での同一分布所見,緻密層内での隣接所見,また抗原単独投与に比し,本モデルで抗原の緻密層内通過遅延が示唆されたことより,緻密層内をICの状態で通過する可能性が考えられた。

In situ immune complex, 腎糸球体基底膜

【研究方法】動物は,雄ウイスター系ラット(100g~120g)を使用した。

実験群は,塩基性フェリチン(F, pI>10.0)を4mg/100g体重,静注し,15分後にウサギ-抗ネイティヴ・フェリチン抗体(IgG分画)を5mg静注した。

対照群は,抗体にかえ正常ウサギ IgGを5mg静注した群(A),及び抗体の非特異的な腎糸球体基底膜(GBM)への結合の有無を検討する為, PBS静注,15分後に抗体(IgG分画)を5mg静注した群(B)を作製した。

実験群及び対照群(A)は, IgG静注後,15分,2,6,12,24,48時間,1,2,4週に各5匹屠殺し,対照群(B)は, IgG静注後15分,48時間,1週に屠殺した。

免疫電顕法:腎皮質をperiodate lysine paraformaldehyde 溶液¹⁾で浸漬固定後,脱水し,-30度でLowicryl K4Mに包埋,紫外線重合した。超薄切片上で,金コロイド標識ヤギー抗ウサギ IgG抗体(φ 10nm)を5時間反応させ酢酸ウラン染色を施行し電顕観察した。

形態解析:標識金コロイドはφ 10nmでφ 5.5nmのF粒子と電顕上識別は容易であり,最終倍率8万倍の電顕写真上で,GBM各層(図7に示す如く内皮細胞膜から上皮足細胞膜間をGBM厚とし10分割した。)及び,スリット膜直下のフェリチン(F)と金粒子(G)の数を計測した。実験群では,GBM各層内のF及びGの割合をヒストグラムにて表示し(図7),又実験群と対照群(A)で,GBMを内皮側より3:4:3に分割しそれぞれ内透明層,緻密層,外透明層相当部位とし,各層の長さ1μm当たりのF数を計算しFの動態を比較した(図8)。

【結果】定性所見:実験群では,殆どどのF及びG粒子は,15分後はGBM内皮下に存在し(図1),ICはまずGBM内皮下で形成されることが示唆された。以後経時的に,F及びG粒子は,上皮下及びスリット膜直下に認められるようになり(図3a,4b),上皮下electron dense depositを形成した(図4a)。又,GBM緻密層内には,F及びGの隣接所見をしばしば認めた。Gは,超薄切片の表面に抗原状

定基が露出している抗体しか標識できない為、切片内にはなお標識されていない抗体が多数存在すると考えられる。しかし、少くとも標識された抗体からみると、抗体は抗原と共に存在し、ICの状態で緻密内を移動していることが示唆された。

対照群(A)は、GBM上に有意なGを認めず、electron dense depositも形成しなかった(図3b)。対照群(B)は、GBM上に有意なGを認めず、作製抗体自体は、殆んどGBMに結合しないと考えられた。

図5に示す如く、糸球体上皮細胞のvacuole内には、F及びGの共存所見を認め、これらは上皮側に到達した抗原、抗体の一部が、上皮細胞内に取り込まれ処理されている事を示唆している。

一方、メサンギウム領域では、F及びGを含むelectron dense depositが、少なくとも48時間後より認められ、2週後をピークとした(図6)。諸家の報告より、投与抗原、投与ICは少なくとも1週後は流血中より消失するとされ、又、最近の槇野らの報告では、GBMへ沈着したICがメサンギウム領域へ移動する可能性を示唆しており²⁾、これらを考慮すると、このメサンギウム領域の抗原、抗体は、血中由来と考えるより、むしろGBMより移動沈着したとする方が考えやすい。

定量所見：実験群では、F及びGは、各時間共GBM上ではほぼ同一分布をとり、上皮側に分布する粒子の割合が経時的に増加した(図7)。実験群では、対照群に比し、Fは内透明層より離れにくく(図8a)、この為、内透明層より緻密層へのFの侵入が実験群では少ないことが予想されるにもかかわらず、6時間目以降、緻密層内でFを多く認めた事より緻密層内通過遅延が示唆された(図8b)。又、外透明層では、実験群で48時間から2週後で有意に多くFを認め(図8c)、Fの上皮側への到達遅延及び上皮側での長い停滞の反映と考えられた。

【考察】従来、塩基性フェリチンを用いた in

situ immune complex 形成モデルでは、Fが電顕上可視である為、Fの動態観察より推測し、ICはまず内皮下に形成された後、GBM内を移動し、上皮側ICを形成すると考えられている。しかし、ICがGBMを通過する際、緻密層内をICのまま通過するのか、或いは抗原、抗体が一旦、単一分子に遊離し上皮下で再結合するのかは、明らかにされていない³⁾。我々は、抗フェリチン抗体を超薄切片上で、金コロイドで標識することにより、抗体の局在を評価可能とし、GBM上での抗原と抗体の動態の同時観察を試みた。これにより、これまでの報告通り、本モデルでは、GBM内皮下にまずICが形成された後、上皮側へ移動、集積し上皮下ICを形成することが示された。また、緻密層の抗原と抗体の存在様式に関しては、実験群で抗原、抗体がGBM内で経時的に、ほぼ同一分布をとり、緻密層内で、FとGの隣接像を認めたこと、さらには、緻密層内の抗原は、抗原単独投与の対照群(A)に比し、通過遅延が示唆されたことより、ICの状態でGBM内を通過している可能性が考えられた。

一方、GBMに沈着した抗原、抗体の一部は上皮細胞へ取り込まれ、また一部は、メサンギウム領域へ移動、沈着し、GBMより処理されていることが示唆された。

【文献】

- 1) Ian W. Mclean et al. . J.Histochem. Cytochem. 12;1077-1083, 1974.
- 2) H. Makino et al. . Kidney Int. 34;209-219, 1988.
- 3) A. Vogt et al. . Kidney Int. 22 ; 27-35, 1982

【図説明】

図1. 実験群15分後のGBMの免疫電顕像 (IEM)。フェリチン(F, 矢頭)。金粒子(G, 矢印)は、殆んど内皮下に存在する。US: 尿腔, CL: 毛細血管腔。

図2. 実験群6時間後のGBMのIEM像。緻密層内にF及びGの隣接像を認める(矢印)。

図3a. 実験群48時間後のIEM像。上皮下及びスリット膜直下にF, Gの集積を認める(矢印)。

3b. 対照群48時間後のIEM像。Gを認めない。

図4a. 実験群4週後の通常電顕像。矢印は、上皮下electron dense depositを示す。4b. 同IEM像。deposit内にF, Gを認める。

図5. 実験群6時間後のIEM像。上皮細胞のvacuole内にF, Gの共存所見を認める(矢印)。

図6. 実験群4週後のメサンギウム領域のIEM像。パラメサンギウムにF, Gを含むelectron dense depositを認める(矢印)。

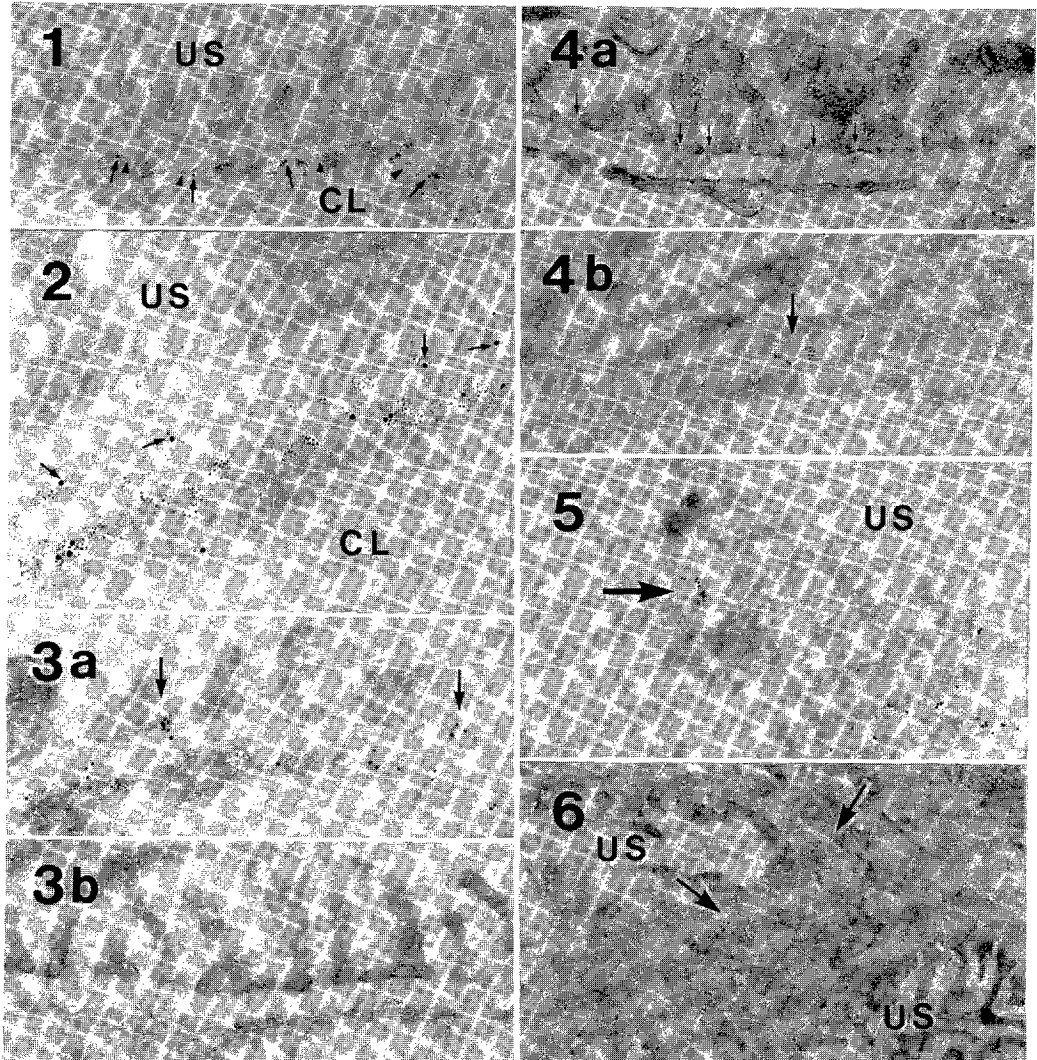


図7. GBM上のFerritin (F), Gold (G) の経時的局在

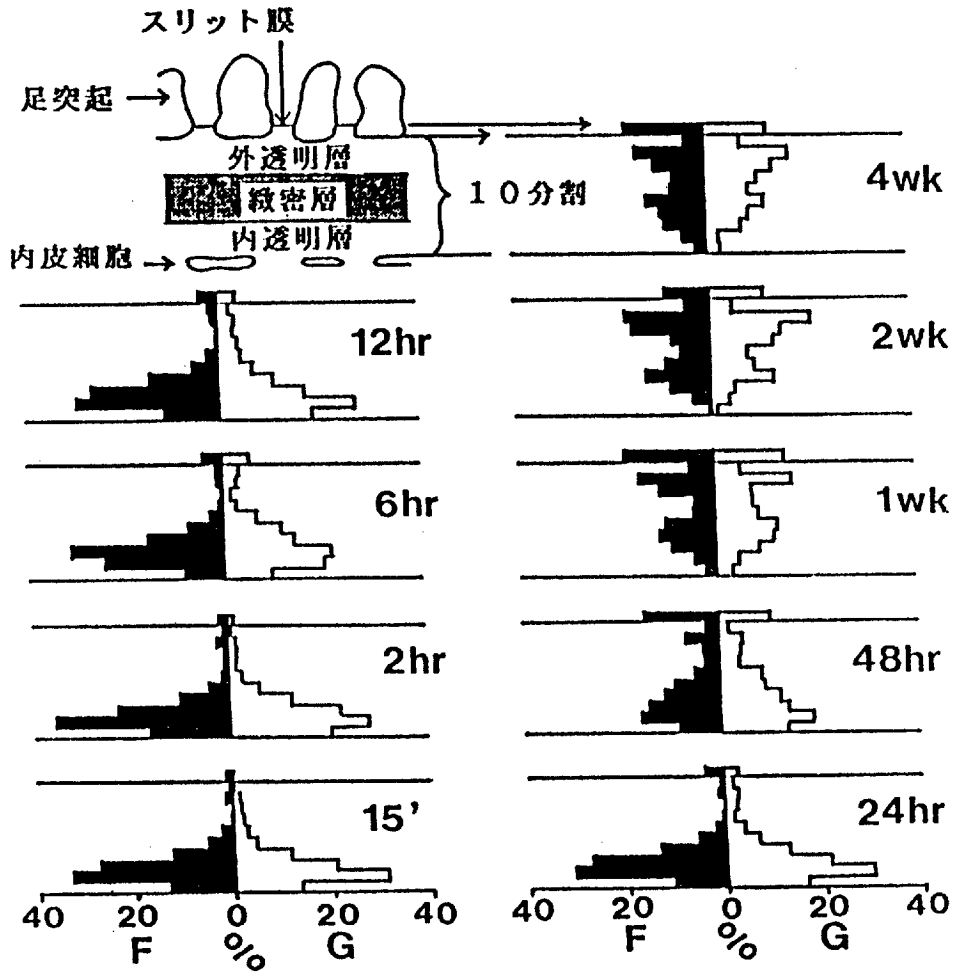
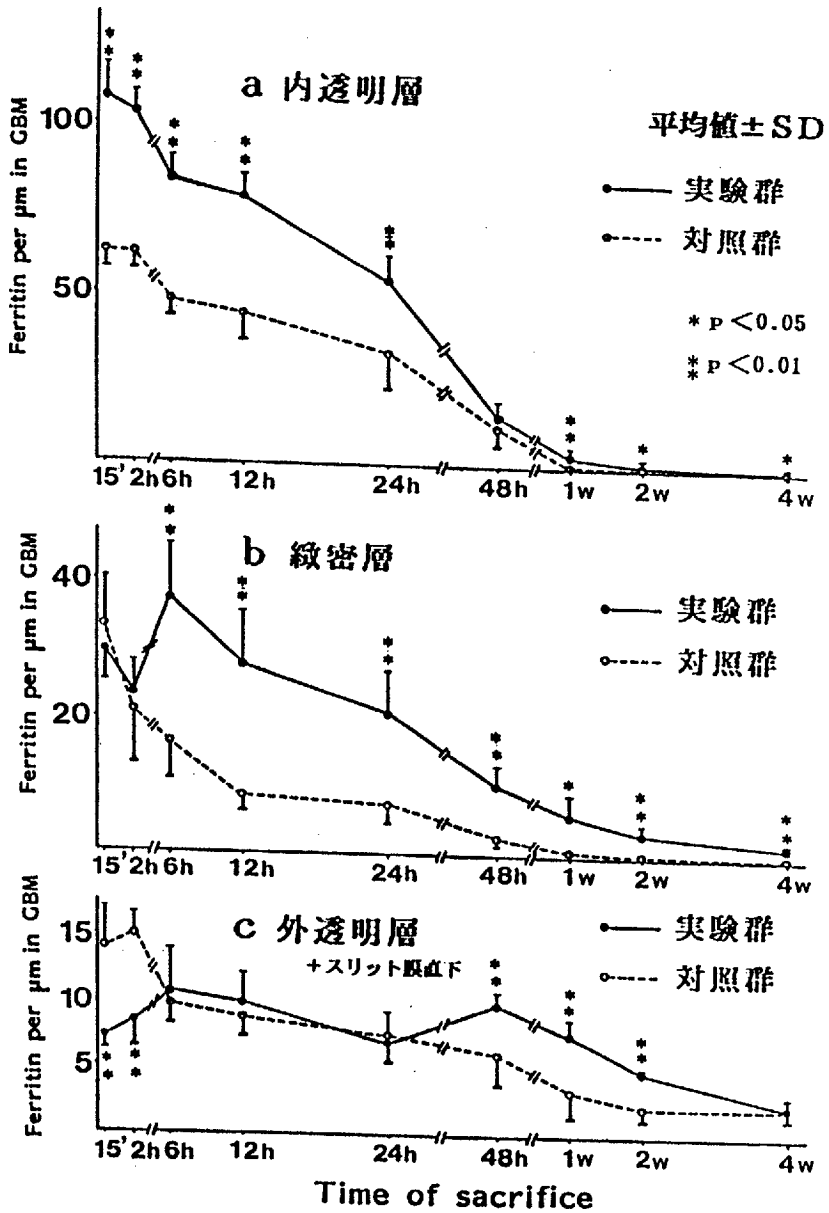


図8. GBM各層のFerritin 粒子数の経時的变化





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



塩基性フェリチン(F)による in situ immune complex(IC)モデルにて腎糸球体基底膜(GBM)内の IC の動態,特に抗原,抗体の緻密層内存在様式を免疫電顕にて検討した。IC は GBM 内皮下で形成された後,上皮側へ移動し electron dense deposit を形成した。抗原(F),抗体(金コロイド標識)の GBM 内での同一分布所見,緻密層内での隣接所見,また抗原単独投与に比し,本モデルで抗原の緻密層内通過遅延が示唆されたことより,緻密層内を IC の状態で通過する可能性が考えられた。