

腎糸球体基底膜における in situ immune complex 形成に関する研究 —補体 C3 の動態に関して—

小児腎疾患の進行阻止に関する研究

進行阻止に関する免疫・遺伝・病態生化学的研究

本田西男, 藤垣嘉秀, 木村正人, 菱田 明

塩基性フェリチンを抗原として用いた passive in situ immune complex nephritis モデルでの上皮下免疫複合体形成過程における抗原抗体複合体(IC)のGBM内動態と、それに伴う C3 のGBM内局在を免疫電顕にて検討した。ICは内皮下でまず形成され同部位では、C3の沈着を伴う。しかしICが上皮側へGBM内を通過する際にはC3は、ほとんど認めず、ICとC3は行動を異にする可能性が示唆された。また上皮下に集積したICは、C3を再度活性化する可能性が示唆された。

In situ immune complex, GBM, C3

【研究方法】動物は、雄ウイスター系ラット(100-120g)を使用した。実験群は、塩基性フェリチン(pI>10.0) 500 μ gを左腎動脈に灌流し、血流再開15分後にウサギ抗フェリチン抗体(IgG分画)を7mg静注した。対照群は、抗体にかえ正常ウサギIgGを7mg静注した。IgG静注後、15分、2時間、1, 2, 7, 14, 28日目に各5匹屠殺し左腎組織を光顕、蛍光抗体法、免疫電顕にて観察した。また1日尿中アルブミン排泄量をsingle radial immunodiffusion法にて測定した。

光顕は、PAS, PAM染色を施行し、蛍光抗体法は、フェリチン、ウサギIgG、ラットIgG、ラットC3に対するFITC標識抗血清を使用し、係蹄壁のintensityを0, 1+, 2+, 3+で半定量的に評価した。

免疫電顕は、腎組織をPLP溶液で浸漬固定後、脱水し、-30度でLowicryl K4Mに包埋、紫外線重合した。超薄切片上でウサギIgG、ラットIgG、ラットC3に対しimmunogoldを標識物質に用い免疫染色をした。各immunogoldは、直径10nmのものを使用した。電顕写真撮影後、GBM上のウサギIgGとC3の経時的局在の観察の為、最終倍率4万倍の写真上で、GBMを内皮細胞膜から上皮足細胞膜間で10分割し、各層

内及びスリット膜直下の金粒子の数を計測した。

【結果】尿中アルブミン：実験群では、少なくとも1日目より対照群に比し有意なアルブミン尿が出現し(19.3mg $\pm$ 2.03 vs. 1.76mg $\pm$ 0.39, mean $\pm$ SE) 7日目にピークとなり(62.5mg $\pm$ 6.69 vs. 0.74mg $\pm$ 0.07), 以後減少し28日目迄持続した。

光顕所見：実験群の糸球体では、増殖性変化は殆どなく、7日目以降膜性変化を認めた。対照群は、有意な変化を認めなかった。蛍光抗体所見：実験群では、フェリチン、ウサギIgG、ラットC3は、共に15分後より係蹄壁への沈着を認め、線状から顆粒状に変化した。フェリチン、ウサギIgGは、経時的にintensityの減少を認めたが、C3は、2時間目と14日目に2つのピークを認めた。ラットIgGは、7日目より顆粒状に出現した。対照群では、フェリチンのみ15分後より線状に係蹄壁への沈着を認め、実験群より速く消失した(図1)。

免疫電顕所見：15分後よりGBM内皮下で抗原(フェリチン)及び抗体(ウサギIgG)の共存所見と同部位でのC3の沈着を認め、ICは、まず内皮下で形成され同部位で補体を活性化する可能性が示唆された(図2a, 図3a)。その後、抗原と抗体はGBM上ではほぼ同一な分布をとり、内

浜松医科大学第一内科

Nishio Honda, Yoshihide Fujigaki, Masato Kimura, Akira Hishida

1st Department of Medicine, Hamamatsu University, School of Medicine

皮側から上皮側へ順次移動し(図4), 上皮下ICを形成した。また緻密層内にも抗原, 抗体の隣接所見を多数認めた(図2)。一方C3は, 2時間目までは移動を認めず, 1日後より上皮側に僅かに出現しだし, これに伴い内皮下のC3沈着は減少したが, 経過中緻密層内には, 散見されるのみで, 抗原と抗体とは行動を異にする可能性が考えられた(図3, 図4)。上皮下に移動, 集積した抗原, 抗体はelectron dense depositを構成し, 同部位にC3も局存した。また, autologous antibodyであるラットIgGは7日後より出現し, 上皮下electron dense depositを構成した。対照群では, ウサギIgG, ラットIgGの沈着は認めなかった。15分後のみ, 一部の係蹄の内皮下フェリチン存在部位に限局的に, ごく僅かながらC3の沈着を認めたが, 同部位への非免疫学的沈着も考えられた。

【考察】本モデルでは, 蛍光抗体法にて示唆されたごとく, ICのGBM内移動に伴いGBM上でC3が2度活性化された可能性がある。即ち本モデルにおける最初の抗原抗体複合体の形成場所である内皮下でのC3の活性化と, 抗原,

抗体が上皮側へ移動, 集積した後の上皮下でのC3の活性化である。

内皮下での補体の活性化に関しては, 補体はin vitroで, ICを可溶化するとの報告^{1) 2)}や, 内皮下で形成されたICのGBM内通過にC3が必要であるとの報告³⁾もあり, 本モデルに於いても内皮下からのICの移動に対し補体がいかなる生物学的作用を担っている可能性を完全には否定できない。しかしGBM通過に際してIC(抗原, 抗体)の移動にC3が伴わなかった。その理由として, C3の活性化は, 内皮細胞膜上で生じICと結合していない可能性, 移動時にICと分離している可能性, ICと結合しているがC3の抗原性の変化の為に緻密層内で検出出来ない可能性等が考えられた。

1日後より上皮下に出現したC3は, 上皮下に凝集した抗原抗体複合体により活性化された可能性がある。また少なくとも1日目よりアルブミン尿を認めたことより上皮下での補体の活性化及び, これに伴う各種反応は, 上皮細胞やGBMへ作用しアルブミン尿出現と関係している可能性も考えられた。

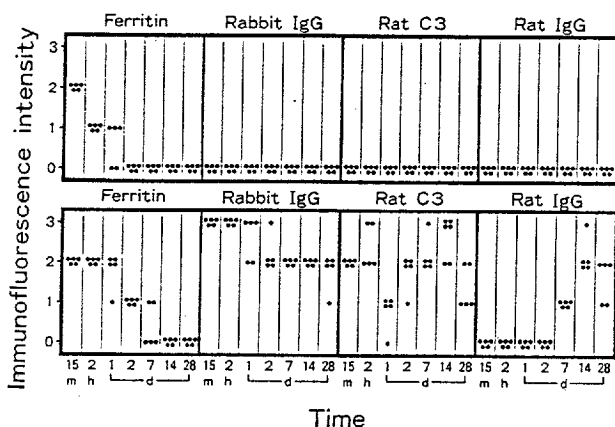


図1. 糸球体係蹄壁の蛍光抗体所見。上段は対照群, 下段は実験群を示す。

2a

US

3a

US

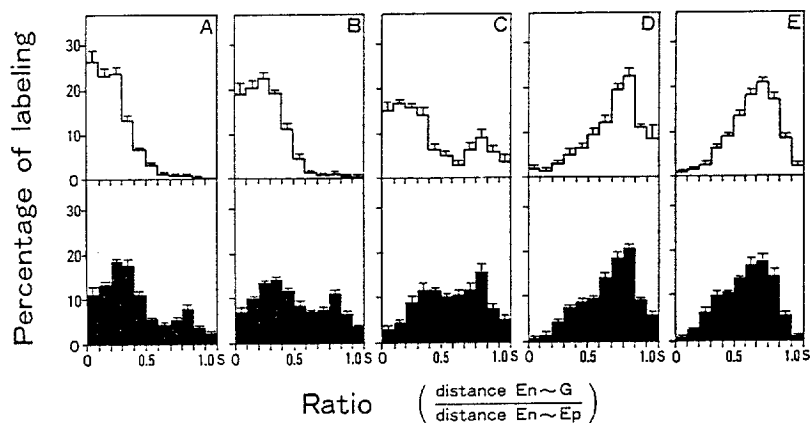
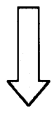


図4. ラットC3及びウサギIgGのGBM上の経時的局在。上段はラットC3, 下段はウサギIgGを示す。(A: 15min, B: 2h, C: 1d, D: 2d, E: 7d) S: スリット膜, En: 内皮細胞膜, Ep: 上皮細胞膜, G: 金粒子。

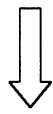
【文献】

- 1) G. W. Miller et al. . Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 72;418-422,1975.
- 2) J. A. Schifferli et al. . Clin. exp. Immunol. 42;387-394, 1980
- 3) N. M. Sawtell et al. . Lab. Invest. 58;287-293, 1988.



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



塩基性フェリチンを抗原として用いた passive in situ immune complex nephritis モデルでの上皮免疫複合体形成過程における抗原抗体複合体(IC)の GBM 内動態と、それに伴う C3 の GBM 内局在を免疫電顕にて検討した。IC は内皮下でまず形成され同部位では、C3 の沈着を伴う。しかし IC が上皮側へ GBM 内を通過する際には C3 は、ほとんど認めず、IC と C3 は行動を異にする可能性が示唆された。また上皮下に集積した IC は、C3 を再度活性化の可能性が示唆された。