

家兔急性血清病腎炎における抗原の
荷電の役割について

小林 正貴, 小山 哲夫, 稲毛 博実,
成田 光陽, 東條 静夫

The effect of antigenic charge on the glomerular deposition of
immune complexes in acute serum sickness of rabbits

MASAKI KOBAYASHI, AKIO KOYAMA, HIROMI INAGE,
MISTUHARU NARITA and SHIZUO TOJO

Department of Internal Medicine, Institute of Clinical Medicine,
University of Tsukuba, Ibaraki, Japan.

家兎急性血清病腎炎における抗原の 荷電の役割について

小林 正貴, 小山 哲夫, 稲毛 博実,
成田 光陽, 東條 静夫

The effect of antigenic charge on the glomerular deposition of
immune complexes in acute serum sickness of rabbits

MASAKI KOBAYASHI, AKIO KOYAMA, HIROMI INAGE,
MISTUHARU NARITA and SHIZUO TOJO

Department of Internal Medicine, Institute of Clinical Medicine,
University of Tsukuba, Ibaraki, Japan.

Key words: chemically modified cationic antigen, acute serum sickness nephritis,
avidity of antibody, in situ immune complex formation, circulating
immune complex deposition

We examined the role of antigenic charge on the deposition of immune complexes (IC) in rabbit glomeruli. Acute serum sickness nephritis was induced by injecting chemically modified cationic bovine serum albumin (BSA). Controls were immunized with native BSA. After 14 days, 25 mg/rabbit of same types of BSA was challenged into each group. Renal biopsy was performed before and after the second injection. In the former biopsy, neither IC nor antigen was detected in the glomeruli. After the challenge, rabbits given cationic BSA developed the deposition of IC in the glomerular capillary walls, whereas no IC deposition was found in rabbits given native BSA. Next we analyzed the properties of IC composed of cationic BSA and its antibody. We observed that the group immunized with cationic BSA produced low avidity and low-non precipitating antibody. The levels of precipitating antibody and avidity values in this group were significantly lower than those in the group immunized with native BSA ($p < 0.001$). The sucrose density gradient ultracentrifugation study showed the size of IC in cationic group was nearly 7S.

From the above results, we speculated that; 1) The IC deposition on the glomerular basement membrane (GBM) results from circulating IC. 2) The IC composed of cationic BSA effectively binds to the polyanion layer of GBM. 3) Chemically modified cationization alters the immunogenicity of BSA, therefore causing the formation of small sized IC.

I 緒 言

膜性糸球体腎炎は組織学的に免疫複合体の糸球体基底
膜上皮下への沈着を特徴とする典型的な免疫複合体腎炎

であり、その成因は従来、small size の circulating im-
mune complex (以下、CIC) の沈着によると考えられ
てきた^{1),2)}。しかし、近年、受身 Heymann 腎炎の解
積^{3),4),5),6)}に端を発し、さらに糸球体基底膜(glomerular

basement membrane, 以下 GBM) における陰性荷電層の存在⁷⁾との関連をも含め, GBM 上皮下への IC 沈着は陽性荷電抗原による in situ IC 形成によるとの報告^{6), 8), 9)}が注目されている。

筆者らは, 先にマウスを用いた受身血清病腎炎の実験系で, 陽性荷電抗原が糸球体内局在に及ぼす影響と IC の沈着機序を検討した。その結果, IC は末梢係蹄壁に沈着するが, この反応は抗原と抗体が同時に血中に存在する時のみ生ずることが明らかとなった¹⁰⁾。しかも, この陽性荷電抗原に対する抗体の親和性 (avidity) と沈降性はいずれも極端に低く, 形成された IC は small size であった¹¹⁾。以上の成績より, 陽性荷電抗原を用いた受身血清病腎炎における末梢係蹄壁の IC は small size の CIC 沈着であると考えられた。

今回, 筆者らは, さらに急性血清病腎炎 (active model) の実験系で, 陽性荷電抗原で免疫された家兎の抗体, IC の性状, 糸球体内局在ならびに沈着機序について検討した。

I 実験方法

1) 抗原の作成

非修飾抗原として牛血清アルブミン (bovine serum albumin, 以下 native BSA) を用い, 陽性荷電抗原として, 化学的修飾を加え等電点を高めた BSA (cationic BSA) を用いた。cationic BSA は 1-ethyl-3-[(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride] と anhydrous ethylenediamine を用いて, Hoare と Koshland の方法¹²⁾で作成した。

2) 抗原の分析

等電点は polyacrylamide gel を用いて, LKB flat bedded electrofocusing unit で測定した。size は蔗糖濃度勾配超遠心分離法を用いて測定した。4.6 S, 7 S, 19 S のマーカーとして, それぞれ BSA, ヒト IgG, IgM を用いた。

3) 抗原の標識

各抗原にクロラミンT法を用いて, ¹²⁵I-Na を標識した。

4) 実験計画

実験動物として, 雄の家兎, 体重 3 kg 前後を用いた。cationic BSA 投与群 (n=11) と native BSA 投与群 (n=4) に分け, 各々の BSA 4 mg を完全フロイント・アジュバントとともに家兎に免疫した。免疫後14日目に採血, 腎生検を施行した。その直後, 各々の ¹²⁵I 標識 BSA 25 mg を耳静脈より注射し, 5分後に反対側耳静脈より採血し, さらに15分後, 14日後腎生検を施行した。

5) 抗体の性状の検索

免疫後14日目, 抗原静注前の採血で得られた血清で, その性状を検討した。

沈降抗体量は定量的沈降反応¹³⁾を用いて測定し, 総結合抗体量は, Minden と Farr による antigen binding capacity-33 (ABC-33) 法¹⁴⁾を用いて測定した。また, 親和性は ABC-33 における抗原希釈効果により測定した。

6) IC の性状の検索

免疫後14日目, 抗原静注後5分の採血で得られた血清を用いて, 蔗糖濃度勾配超遠心分離法で IC の size を測定した。

7) 組織学的検索

腎生検による組織を, 光学顕微鏡, 蛍光顕微鏡および電子顕微鏡で検索した。

光学顕微鏡的検索は, hematoxylin-eosin (H-E), periodicacid Schiff (PAS), periodicacid Schiffmethenaminesilver (PAM) および Masson-trichrome 染色法によった。蛍光抗体法は FITC 標識抗家兎 IgG による直接法を用いた。電子顕微鏡的検索は, 超薄切片作成後, 酢酸ウラン, 鉛の二重染色を施し, 電子顕微鏡 (日立 H-500) で観察した。

Ⅲ 実験成績

1) 抗原の分析 (Fig. 1)

等電点は cationic BSA 9.5 以上, native BSA 4.5~5.0 であった。いずれの BSA の size も 4.6S を中心に存在し, 荷電による size の変化はみられなかった。

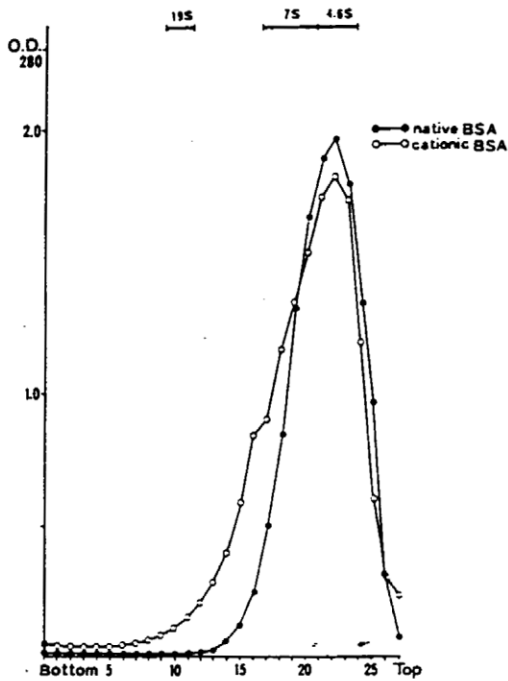


Fig. 1 Sedimentation patterns of sucrose density gradient ultracentrifugation of cationic and native BSA.

Table 1 Characterization of antibodies.

| group | n | QPT ($\mu\text{g/ml}$) | ABC-33 ($\mu\text{g-BSA/ml}$) | Avidity (%) | QPT/ ABC-33 |
|----------|----|-----------------------------|------------------------------------|--------------------|--------------------|
| Cationic | 11 | 150.2 ± 148.5 | 583.0 ± 436.9 | 4.06 ± 1.60 | 0.21 ± 0.14 |
| Native | 4 | 596.8 ± 271.5 | 1042.1 ± 550.0 | 45.7 ± 20.6 | 0.59 ± 0.08 |

P<0.01 P<0.2 P<0.001 P<0.001

Values are mean \pm SD.

QPT: quantitative precipitation test.

ABC-33: antigen binding capacity-33.

2) 抗体の性状 (Table 1)

各抗体の沈降抗体量は cationic BSA 投与群で 150.2 ± 148.5 ($\mu\text{g/ml}$), native BSA 投与群で 596.8 ± 271.5 ($\mu\text{g/ml}$) となり, その間に有意差を認めた。 ($p < 0.01$)

総結合抗体量は cationic BSA 投与群で 583.0 ± 436.9 ($\mu\text{g-BSA/ml}$), native BSA 投与群で 1042.1 ± 550.0 ($\mu\text{g-BSA/ml}$) となり, 有意差は認められなかった。 ($p < 0.2$)

抗体の親和性は cationic BSA 投与群で 4.06 ± 1.60 (%) に対し, native BSA 投与群では 45.7 ± 20.6 (%) となり, 明らかに有意差を認めた。 ($p < 0.001$)

沈降抗体量/総結合抗体量比は cationic BSA 投与群で 0.21 ± 0.14 , native BSA 投与群では 0.59 ± 0.08 と

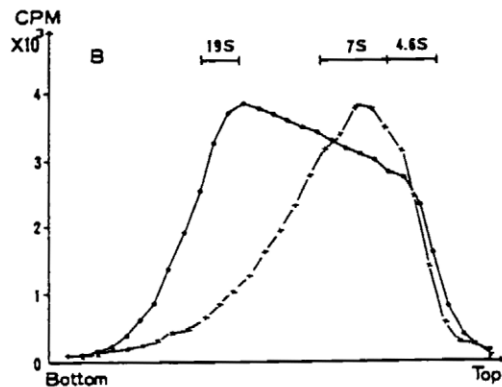
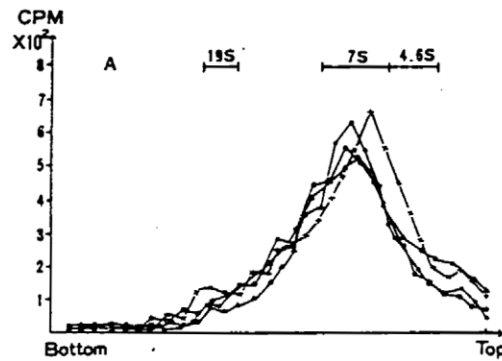


Fig. 2 Sedimentation patterns of sucrose density gradient ultracentrifugation of IC.

A. IC composed of cationic BSA. (n=4)

B. IC composed of native BSA. (n=2)

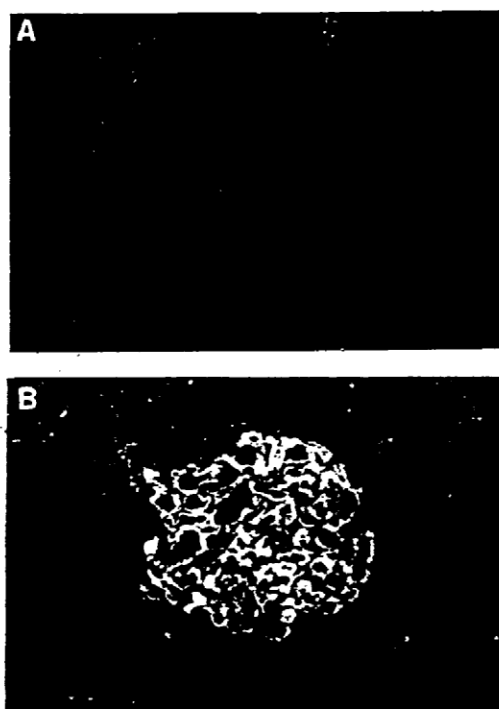


Fig. 3 Immunofluorescence micrographs of glomerular lesion in cationic BSA group. ($\times 200$)

- A. Before the second antigen injection.
B. At 15 minutes after the second antigen injection.

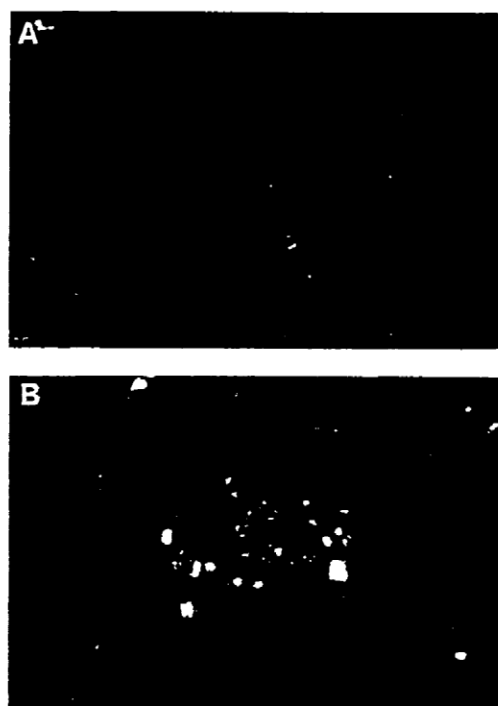


Fig. 4 Immunofluorescence micrographs of glomerular lesion in native BSA group. ($\times 200$)

- A. Before the second antigen injection.
B. At 15 minutes after the second antigen injection.

なり、明らかな有意差を認めた。(p<0.001)

以上より、抗 cationic 抗体の沈降抗体量と親和性は、抗 native 抗体のそれと比較して、極めて低値であることが明らかにされた。

3) IC の分析 (Fig. 2-A, B)

cationic BSA 投与群で形成された IC は、全例で 7S を中心とする small size であり、他方、native BSA 投与群における IC は 7S~19S にわたる size で存在した。

4) 組織学的検索 (Fig. 3-A, B, Fig. 4-A, B, Fig.

5)

光学顕微鏡所見では、免疫後 14 日目の抗原静注前では、cationic および native BSA 投与群のいずれも糸

球体に有意な所見は認められなかった。抗原静注後 15 分では、両群ともにメサンギウム領域での軽度の細胞増殖と毛細血管腔内の炎症細胞（好中球・単核球）の浸潤を認めた。しかし、両群とも膜性変化はいずれの時期にも認められなかった。

蛍光抗体法所見では、免疫後 14 日目の抗原静注前では、cationic BSA 投与群、native BSA 投与群ともに抗体、即ち IC の沈着を認めなかった。抗原静注 15 分後、cationic BSA 投与群では末梢係蹄壁に linear ないし fine granular に IC の沈着を認めた。他方、native BSA 投与群ではメサンギウム領域と毛細血管腔内に血栓の如き IC の沈着を認めた。

電子顕微鏡所見では、免疫後 14 日目の抗原静注後のい

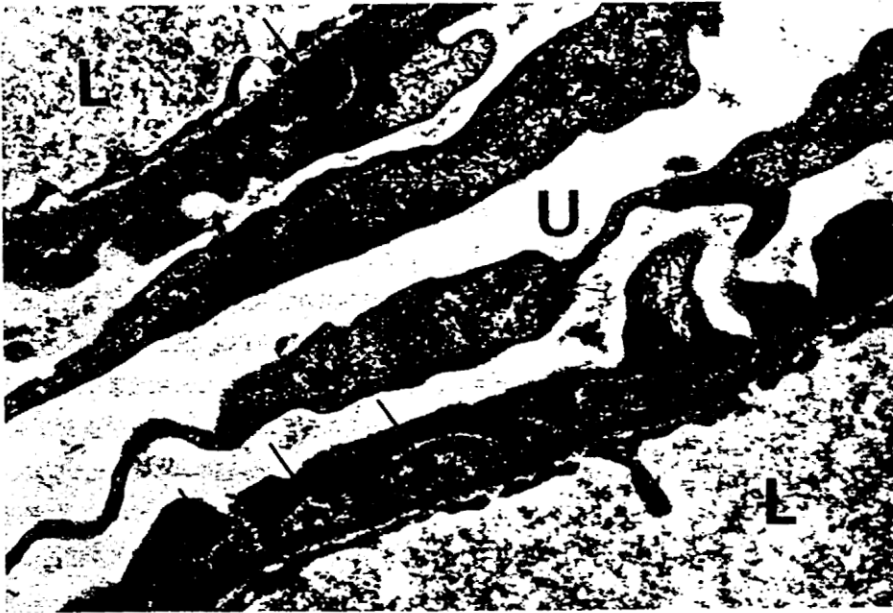


Fig. 5 Electron micrograph of glomerular basement membrane at 14 days after the second injection of cationic BSA. Arrows indicate subepithelial deposits. ($\times 23,000$)
L: capillary lumen, U: urinary space.

ずれの時期においても cationic BSA 投与群では上皮下沈着を認め、特に抗原静注14日後にはほぼ全域の GBM 上皮下に観察された。他方、native BSA 投与群では、抗原静注後のいずれの時期にも上皮下沈着は認められず、メサンギウム領域と内皮下に沈着物が認められるのみであった。

IV 考 案

従来、GBM 上皮下への IC 沈着機序は、small size の CIC 形成によると考えられてきた^{11,12}。しかしながら、近年、腎尿細管上皮抗原 (renal tubular brush border antigen) に対する異種抗血清静注により惹起された腎病変、即ち、受身 Heymann 腎炎における GBM への IC 沈着は CIC 沈着では説明できないとの報告^{13,14}、さらに GBM における陰性荷電層の存在¹⁵などの知見がもたらされ、IC の上皮下沈着の新しい機序

として、陽性荷電抗原による in situ IC 形成説^{16,17,18}が登場し注目されている。

Vogt ら^{16,17}は、陰性荷電層を有した GBM と陽性荷電物質の親和性に着目し、化学的修飾を加え等電点を高めた種々の抗原 (cationic antigens) を用いて in situ IC 腎炎を惹起させ、抗原の等電点が 8.5 以上であると in situ IC 形成により膜性糸球体腎炎が招来されると報告している。ただし、この説に対しても、疑問点、不明な点は数多く残されている。即ち、①灌漑系を用いて、抗原ないし抗体さらには preformed IC を直接腎動脈より投与するという非生理的状況下で実験が行なわれている点、②外来性抗原において、一次応答の場合、抗体が産生されるまで抗原が腎に存続しうるものか、また、二次応答の場合、流血中抗体の存在下で、はたして腎に局在する抗原として結合しうるものか、③ヒト腎炎において、このような GBM に親和性を有する抗原が存在し

うるか、などの点があげられよう。

前述したように、先に筆者らがマウスを用いた受身血清病腎炎での実験成績からは、陽性荷電抗原は有効に IC を末梢系蹄壁に沈着させるが、その沈着様式は small size の CIC 形成によると考えられた^{10),11)}。今回、筆者らはさらに、家兎を用いた急性血清病腎炎 (active model) の実験系で、陽性荷電抗原の糸球体内局在に及ぼす影響と産生された抗体の性状および IC の性状、沈着機序を検討した。

cationic BSA 投与群では、免疫後 14 日目の抗原静注前の腎組織は、native BSA 投与群と同様にいずれの糸球体にも IC の沈着を認めなかった。この事実、抗体産生の高まった時期 (一次応答) において “planted antigen” としての抗原は存在せず、in situ IC は形成されないと考えられた。さらに、抗体既存下で抗原を静注すると、cationic BSA 投与群では末梢系蹄壁に linear ないし fine granular に IC の沈着を認め、電顕的にも上皮下沈着物が観察された。また、この際の抗 cationic 抗体は沈降性、親和性のいずれも極端に低値であり、IC の size も 7S を中心とする small size であった。この事実より、cationic BSA 投与群における上皮下沈着は small size の CIC 沈着であると考えられた。他方、native BSA 投与群では免疫後 14 日目抗原静注後、メサンギウム領域と毛細血管腔内に IC の沈着を認め、この際の抗 native BSA 抗体は抗 cationic BSA 抗体に比し、沈降性、親和性のいずれも高値であり、形成された IC も 7S~19S と幅広い分布を示した。この現象は、抗原に対する家兎の抗体産生能の質的、量的個体差により生ずるものと考えられ、さらに抗体過剰域にあることもその一因と考えられた。

1982年、Border らは灌流系を用いず、慢性血清病腎炎の実験系で cationic BSA 投与家兎に膜性糸球体腎炎を惹起させた。その際、IC が small size であるにもかかわらず、cationic BSA 投与量が抗原過剰域、抗体過剰域のいずれにおいても膜性糸球体腎炎が発生したとの

観点より、この際の GBM 上皮下への IC 沈着は in situ IC 形成によると報告している。しかしながら、筆者らの実験で明らかのように、抗 cationic BSA 抗体の沈降性、親和性は極端に低値であり、たとえ抗体過剰域においても small size の CIC が形成され、その結果、上皮下沈着をおこし得ると考えることがより妥当であると考えられた。

今回の実験結果より明らかであるように、抗 cationic BSA 抗体と抗 native BSA 抗体とはその免疫学的性状に大きな差異があり、これは抗原の化学的修飾によるものと考えられた。1959年、Ram と Maurer¹⁵⁾ は BSA の遊離カルボキシル基のエステル化が50%以上になると沈降性を失なうと報告しており、さらに最近、稲毛ら¹⁷⁾ は BSA のカルボキシル基をメチル化して陽性荷電化した methylated BSA を用いた preformed IC 投与による受身血清病腎炎の実験系で、末梢系蹄壁に IC 沈着を認めたと報告している。本実験で用いた cationic BSA も BSA のカルボキシル基に化学的修飾を加えたものであり、抗原のカルボキシル基に対する化学的修飾が、末梢系蹄壁に CIC を沈着させる条件、即ち、沈降性、親和性の極端に低い抗体を産生させるものと考えられた。Gallo ら¹⁸⁾ も、種々の preformed IC を用いた受身血清病腎炎の実験系で、末梢系蹄壁に沈着する IC を検討した結果、化学的修飾を加え等電点を高めた陽性荷電抗原で作成した IC のみが GBM に沈着すると報告しており、このことは筆者らの考えを支持するものと思われる。以上のように、抗原の化学的修飾による陽性荷電化は、陰性荷電層を有する GBM と効率よく反応するだけでなく、抗原の性状をも変化させ、IC が GBM 上皮下に沈着するための条件である small size の CIC 沈着を惹起させるものと考えられる。

従って、化学的修飾を加えた陽性荷電抗原で作成された膜性糸球体腎炎は、臨床的にはかなり特殊な状況でしかおこりえない。かかる観点からも、臨床的には抗原に対する免疫反応のある未知の条件下に、沈降性、親和性

の低い抗体が産生され、small size の CIC が上皮下に沈着した場合に膜性糸球体腎炎が生ずると考えるのが妥当であろう。

V 結 語

IC の糸球体内局在を左右する因子として陽性荷電抗原が注目され、IC の沈着様式が再検討されている。筆者らは陽性荷電抗原で家兔を免疫し、急性血清病腎炎 (active model) の実験系で、抗原の陽性荷電化が糸球体内局在に及ぼす影響と産生された抗体、IC の性状および IC の沈着機序を検討し、以下の結果をえた。

- 1) cationic BSA で免疫後、抗体の産生された時期において、IC の糸球体内沈着は認められない。
- 2) 抗体の存在下では、cationic BSA 投与により IC は速やかに糸球体末梢係蹄壁に沈着する。
- 3) この際生じた抗 cationic BSA 抗体の沈降性、親和性は極端に低値であり、形成された IC は small size である。

以上より、化学的修飾を加え陽性荷電化した抗原は陰性荷電層を有する GBM と効率よく反応するのみならず、抗原の性状をも変化し、IC が GBM 上皮下に沈着する条件である small size の CIC 沈着をおこす。

本論文の要旨は第26回日本腎臓学会総会(1983年10月)において発表した。また、本研究費の一部は厚生省特定疾患「進行性腎障害」調査研究費によった。

文 献

- 1) Germuth, F. G.: A comparative histologic and immunologic study in rabbits of induced hypersensitivity of the serum sickness type. *J. Exp. Med.*, 97: 257-293, 1953.
- 2) Dixon, F. J., Feldman, J. D. & Vazquez, J. J.: Experimental glomerulonephritis. The pathogenesis of a laboratory model resembling the spectrum of human glomerulonephritis. *J. Exp. Med.*, 113: 899-937, 1961.
- 3) Fleuren, G. J., Lee, R. V. D., Greben, H. A., Van Damme, B. J. C., & Hoedemaeker, P. J.: Experimental glomerulonephritis in the rat induced by antibodies directed against tubular antigens. IV. Investigations into the pathogenesis of the model. *Lab. Invest.*, 38: 496-501, 1978.
- 4) Van Damme, B. J. C., Fleuren, G. J., Bakker, W. W., Vernier, R. L., & Hoedemaeker, P. J.: Experimental glomerulonephritis in the rat induced by antibodies directed against tubular antigens. V. Fixed glomerular antigens in the pathogenesis of heterologous immune complex glomerulonephritis. *Lab. Invest.*, 38: 502-510, 1978.
- 5) Fleuren, G., Grond, J., & Hoedemaeker, P. J.: In situ formation of subepithelial glomerular immune complexes in passive serum sickness. *Kidney Int.*, 17: 631-637, 1980.
- 6) Couser, W. G. & Salant, D. J.: In situ immune complex formation and glomerular injury. *Kidney Int.*, 17: 1-13, 1980.
- 7) Caulfield, J. P. & Farquhar, M. G.: Distribution of anionic sites in glomerular basement membranes: Their possible role in filtration and attachment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 73: 1646-1650, 1976.
- 8) Batsford, S. R., Takamiya, H., & Vogt, A.: A model of in situ immune complex glomerulonephritis in the rat employing cationized ferritin. *Clin. Nephrol.*, 14: 211-216, 1980.
- 9) Batsford, S. R., Oite, T., Takamiya, H., & Vogt, A.: Anionic binding sites in the glomerular basement membrane: Possible role in the pathogenesis of immune complex glomerulonephritis. *Renal Physiol.*, 3: 336-340, 1980.
- 10) 太田義章, 小山哲夫, 成田光陽, 東條静夫: Immune Complex の腎糸球体内局在に関する研究—抗原の荷電の影響について—。日腎誌, 26: 1029-1036, 1984.
- 11) 小山哲夫, 太田義章, 稲毛博実, 石田 裕, 成田光陽, 東條静夫: 受身血清病腎炎における抗原の荷電の影響について。日腎誌, 26: 1037-1044, 1984.
- 12) Hoare, D. G. & Koshland, D. E.: A method for the quantitative modification and estimation of

- carboxylic acid groups in proteins. *J. Biol. Chem.*, 242 : 2447-2453, 1967.
- 13) Kabat, E. A. & Mayer, M. M. : *Experimental Immunochemistry*. 2nd Ed., (ed) Charles C. Thomas, Publisher, Spring-Field, Illinois, USA. p. 72-78, 1961.
- 14) Minden, P. & Farr, R. S. : Ammonium sulphate method to measure antigen-binding capacity. In *Handbook of Experimental Immunology*. Blackwell Scientific Publication. Oxford, England. 3rd edition. 1 : 13.1-13.22.
- 15) Border, W. A., Ward, H. J., Kamil, E. S., & Cohen, A. H. : Induction of membranous nephropathy in rabbits by administration of an exogenous cationic antigen. *J. Clin. Invest.*, 69 : 451-461, 1982.
- 16) Ram, J. S. & Maurer, P. H. : Modified Bovine Serum Albumin. VII. Studies on the role of free carboxyl groups of the protein in the interaction with its antibodies. *Arch. Biochem. Biophys.*, 83 : 223-232, 1959.
- 17) 稲毛博実, 小山哲夫, 小林正貴, 成田光陽, 東條静夫 : 低親和性抗体による immune complex の糸球体内局在について。第26回日本腎臓学会総会(口演), 1983.
- 18) Gallo, G. R., Caulin-Glaser, T., & Lamm, M. E. : Charge of circulating immune complexes as a factor in glomerular basement membrane localization in mice. *J. Clin. Invest.*, 67 : 1035-1313. 1981.
- 19) Kuriyama, T. : Chronic glomerulonephritis induced by prolonged immunization in the rabbit. *Lab. Invest.*, 28 : 224-235, 1973.
- 20) Germuth, F. G., Rodriguez, E. R., Lorelle, C. A., Trump, E. I., Milano, L. L., & Wise, O. : Passive immune complex glomerulonephritis in mice : Models for various lesions found in human disease. II. Low avidity complexes and diffuse proliferative glomerulonephritis with subepithelial deposits. *Lab. Invest.*, 41 : 366-371, 1979.