馬杉腎炎に対する Pepsin 静注の影響

大 西 治 夫

持田製薬株式会社富士中央研究所*

(昭和58年5月7日)

要約: 抗腎血清を投与されたラットにおいて、尿蛋白、フィブリノーゲン、コレステロールおよび免疫複合体は著明に増加し、血清総蛋白質、イムノグロブリン G (IgG) および補体は著明に減少、糸球体内皮細胞の基底膜よりの剝離、基底膜の肥厚、糸球体足突起の融合および尿細管の硝子円柱の増加が観察された。また、抗腎血清に対するラット IgG の糸球体係蹄壁への沈着が観察された。これらの変化は、いずれもヒト pepsin 静注により抑制、または減弱された。その主たる作用機序として、免疫複合体の選択的分解にあることが示唆された。一方、抗腎血清を投与されたマウスにおいても、尿蛋白の著明な増加が観察された。この増加も、ヒトおよびマウス pepsin 静注により抑制されたが、マウス pepsin の作用は、マウスに対して異種のヒト pepsin 静注よりも強いようであった。

緒 言

著者は、pepsin が中性下免疫複合体を選択的に分解し (H. OHNISHI, リウマチ投稿中), MRL/1 マウスの自然発症腎炎が pepsin 静注により治療されることを見出した¹⁾。今回、ラットの馬杉腎炎に対する pepsin 静注の効果を検討し、その作用機序を解析するとともに、あわせて、マウス馬杉腎炎に対するヒトおよびマウス pepsin の効果を比較検討した。

実 験 材 料

1. 薬 物

前報²⁾に従い、ヒト pepsin をヒト尿より、マウス pepsin をマウス胃より抽出、精製した。Anson and Mirsky³⁾の方法に従って測定したヒトおよびマウス pepsin の比活性は、おののおの 1912 および 2150 units/mg 蛋白であった。また、これらの標品は SDS-polyacryl-amide gel 電気泳動で単一のバンドを示した。

2. 動 物

体重 195 ~ 240 g の Wistar 系雄ラットおよび体重 16 ~ 30 g の ddY 系雄マウス (静岡県実験動物農業協同組合) を用いた。

実 験 方 法

1. ラット馬杉腎炎におよぼす影響

荒川⁴⁾の方法に準じ、抗ラット腎ウサギ血清 10 ml/kg

をラット尾静脈内に注射した。10分および8時間後に、ヒト pepsin 150 もしくは 500 units/2 ml/kg を静注した。さらに、翌日より1日2回、ヒト pepsin 150 もしくは 500 units/kg を13日間静注した。抗腎血清投与 1, 3, 7 および 14 日後に採血および腎摘出を行った。得られた血清のイムノグロブリン G (IgG) を免疫拡散法⁵⁾、総蛋白質を Biuret 法⁶⁾、補体を Mayer 法⁷⁾、コレステロールを Zak-Henly 法⁸⁾ およびフィブリノーゲンをチロジン法⁹⁾によりそれぞれ測定した。さらに、免疫複合体を Arai and Shimizu¹⁰⁾の方法により、レーザネフェロメーターを用いて測定した。摘出した腎を10%中性緩衝 formalin 液で固定、パラフィン包埋ならびに hematoxyline eosin および periodic acid-Schiff 染色を行い、光学顕微鏡にて観察した。さらに、腎を 2.5% glutaraldehyde および 1% osmic acid で固定し、epoxy 樹脂包埋、uranium acetate および lead citrate で二重染色し、電子顕微鏡 (日立 H800) にて観察した。また、抗腎血清投与14日後に摘出した腎を直ちに液体窒素で凍結後、2 ~ 4 μ m の腎凍結切片を作成し、fluorescein isothiocyanate 標識抗ラット IgG ヒツジ抗体 (Capel) と1時間反応させた後、蛍光顕微鏡にて観察した¹¹⁾。実験期間中、24時間尿の蛋白量を測定した⁶⁾。各測定値の有意差検定は分散分析を用いて行った。

2. マウス馬杉腎炎におよぼす影響

Shigematsu¹²⁾の方法に準じ、抗ラット腎ウサギ γ -globulin を作製し、マウス一匹あたり 30 mg を生理食塩水に溶かして静注した。10分および8時間後に、ヒト

* 412 静岡県御殿場市神場字上の原722

pepsin あるいはマウス pepsin 500 units/5 ml/kg を静注した。さらに、13日間、1日2回、ヒト pepsin あるいはマウス pepsin 500 units/kg をおのおの静注した。実験期間中、24時間尿の蛋白量を測定した。尿蛋白の有意差検定は t 検定を用いて行った。

実験結果

1. ラット馬杉腎炎におよぼす影響

図1に示すように、抗腎血清投与後尿蛋白は増加し、4～13日後のそれは230～290 mg/day であった。この増加は、ヒト pepsin, 150 および 500 units/kg 投与により用量依存的に抑制された。図2に示すように、血清総蛋白質および補体は、抗腎血清投与後、急速に減少した後、回復の傾向を示し、フィブリノーゲンは増加した後、回復の傾向を示した。コレステロールおよび免疫複合体は、抗腎血清投与14日後においても増加し、また、IgG は減少しつづけていた。これらの変化はヒト pepsin 500 units/kg 静注により有意に軽減された。

図3および4に示すように、抗腎血清投与1日後にお

Fig. 1 Effects of human or mouse pepsin on urinary protein excretion rate in rat or mouse Masugi nephritis. Bars indicate the standard error around the arithmetic mean. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (vs control), ●: Control; □: Human pepsin, 150 units/kg; ○: Human pepsin, 500 units/kg; ■: Mouse pepsin, 500 units/kg.

Fig. 2 Effect of human pepsin on rat Masugi nephritis. Bars indicate the standard error around the arithmetic mean. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (vs control). ●: Control and ○: Human pepsin, 500 units/kg.

いて、尿管の硝子円柱の軽度増加および糸球体内皮細胞の基底膜よりの剥離が観察された。図5、6および7に示すように、抗腎血清投与3日および7日後には、糸球体基底膜の肥厚、メサンギウムの増生と内皮下への interposition, 糸球体足突起の融合および上皮細胞内のライソゾーム顆粒の増加、糸球体係蹄壁の軽度肥厚およびメサンギウム細胞の軽度増加が観察された。14日目には、糸球体基底膜の肥厚および糸球体足突起の融合が観察され、その他の炎症性反応はほとんど回復していた。

これらの抗腎血清投与による腎の微細構造の変化は、図8、9、10、11および12に示すように、ヒト pepsin 500 units/kg 静注により明らかに抑制された。しかし、ヒト pepsin 150 units/kg 静注の効果は明らかではなかった。

図13に示すように、抗腎血清投与14日後、ラット IgG が糸球体係蹄壁に線状に沈着していた。この IgG の沈着は、図14に示すように、ヒト pepsin 500 units/kg 静注により減弱された。

2. マウス馬杉腎炎におよぼす影響

図1に示すように、抗腎血清投与後、尿蛋白は増加した。この増加は、ヒト pepsin 500 units/kg 静注によ

Fig. 3 Photomicrograph of PAS-stained kidney of the control rat, sacrificed one day after the antiserum injection. Bar, 20 μ m.

Fig. 4 Electron micrograph of renal glomerulus of the control rat, sacrificed one day after the antiserum injection. Bar, 1 μ m.

Fig. 5 Electron micrograph of renal glomerulus of the control rat, sacrificed 3 days after the antiserum injection. Bar, 1 μ m.

Fig. 6 Electron micrograph of renal glomerulus of the control rat, sacrificed 7 days after the antiserum injection. Bar, 1 μ m.

Fig. 7 Electron micrograph of renal glomerulus of the control rat, sacrificed 14 days after the antiserum injection. Bar, 1 μ m.

Fig. 8 Photomicrograph of PAS-stained kidney of the rat given 500 units/kg of human pepsin, sacrificed one day after the antiserum injection. Bar, 20 μ m.

Fig. 9 Electron micrograph of renal glomerulus of the rat given 500 units/kg of human pepsin, sacrificed one day after the antiserum injection. Bar, 1 μ m.

Fig. 10 Electron micrograph of renal glomerulus of the rat given 500 units/kg of human pepsin, sacrificed 3 days after the antiserum injection. Bar, 1 μ m.

Fig. 11 Electron micrograph of renal glomerulus of the rat given 500 units/kg of human pepsin, sacrificed 7 days after the antiserum injection. Bar, 1 μ m.

Fig. 12 Electron micrograph of renal glomerulus of the rat given 500 units/kg of human pepsin, sacrificed 14 days after the antiserum injection. Bar, 1 μ m.

Fig. 13 Immunofluorescent micrograph of a glomerulus stained with FITC-labelled anti-rat IgG of the control rat, sacrificed 14 days after the antiserum injection.

Fig. 14 Immunofluorescent micrograph of a glomerulus stained with FITC-labelled anti-rat IgG of the rat given 500 units/kg of human pepsin, sacrificed 14 days after the antiserum injection.

り有意に抑制された。マウス pepsin の尿蛋白減少作用は、ヒト pepsin のそれよりもやや強いようであった。

考 察

Masugi¹³⁾ によって、抗腎抗体の静注により実験的糸球体腎炎、いわゆる馬杉腎炎が惹起されることが報告されて以来、馬杉腎炎に関する多くの報告がある。馬杉腎炎発症の第一段階は、抗腎抗体と糸球体基底膜との抗原抗体反応であり¹⁴⁾、ヒトの糸球体腎炎の主たる発症機構とは異なると考えられている。しかし、馬杉腎炎は、腎炎発症の機序の解明や腎炎治療薬のスクリーニングおよびその作用機序の解明のために広く用いられている¹⁵⁻¹⁷⁾。

一方、著者は pepsin が中性下免疫複合体を選択的に分解し (H. OHNISHI, リウマチ投稿中), MRL/l マウスの自然発症腎炎が pepsin 静注により治療されることを見出した¹⁾。

そこで、馬杉腎炎に対する pepsin 静注の効果を検討し、あわせて、pepsin の抗腎炎作用の機序を考察した。

抗腎血清投与1日後より、ラット尿蛋白、コレステロール、フィブリノーゲンの著明な増加、血清総蛋白質、IgG および補体の著明な減少、糸球体内皮細胞の基底膜の剝離および尿細管の硝子円柱の増加が観察された。抗腎抗体と基底膜との直接的な抗原抗体反応は、補体を消費するとともに、即時型の炎症を引き起こし¹⁸⁾、IgG を含む血中蛋白分子を尿中へ漏出させる。血中 IgG の持続的な減少は尿中への漏出に加えて、新たに産生される IgG の一部が免疫複合体の形成により消費されることによるものと考えられた。すなわち、抗腎血清に対する抗体もしくは autologous な腎抗原に対する抗体が産生され、産生された抗体 IgG は血中に存在する抗原と直ちに免疫複合体を形成し、血中 IgG が減少するものと考えられる。事実、免疫複合体は抗腎血清投与14日後においても持続的に上昇しており、血中 IgG の変化と逆相関があるように思われる。

抗腎血清投与3日以降、補体が回復する傾向を示し、免疫複合体およびコレステロールの増加、基底膜の肥厚、メサングウム細胞の増加、糸球体足突起の融合などが観察された。また、抗腎血清に対して産生された抗体に由来すると思われるラット IgG の糸球体係蹄壁への沈着が認められた。免疫複合体の上昇は、前述のように、抗腎血清に対する抗体、もしくは autologous な腎抗原と、autologous な抗腎抗体との反応によるもので

あり、腎組織への沈着を介して、腎炎の進展に大きな役割を有するものと考えられる。

ラットの馬杉腎炎は、ヒト pepsin 静注により用量依存的に抑制された。pepsin は中性下、免疫複合体を選択的に分解することから (H. OHNISHI, リウマチ投稿中), pepsin の抗馬杉腎炎作用の機序として、抗腎血清と基底膜との免疫学的な結合の解離、もしくは、免疫複合体の選択的分解が考えられよう。事実、pepsin 静注により、抗腎血清に対して産生された抗体に由来すると思われる、ラット IgG の沈着が抑制され、また、免疫複合体の上昇も抑制されている。

一方、抗腎血清投与マウスにおいても、血清投与1日後より尿蛋白が増加した。この増加も、ヒト pepsin もしくはマウス pepsin 静注により抑制されたが、マウス pepsin の作用はヒト pepsin のそれよりも強いようであった。この結果は、マウス pepsin が馬杉腎炎マウスにおいて、異種であるヒト pepsin よりもより生理学的な役割を有している可能性を示唆するものと思われる。

文 献

- 1) Ohnishi, H.: Life Sciences **33**, 1641 (1983)
- 2) 大西治夫: 日薬理誌 **81**, 451 (1983)
- 3) Anson, M.L. and Mirsky, A.E.: J. Gen. Physiol. **16**, 59 (1932)
- 4) 荒川正昭: 日腎誌 **8**, 143 (1966)
- 5) Mancini, G., Carbonara, A.O. and Heremans, J.F.: Immunochemistry **2**, 235 (1965)
- 6) Gornall, A.G., Bardawill, C.J. and David, M.M.: J. Biol. Chem. **177**, 751 (1948)
- 7) Mayer, M.M.: Experimental Immunochemistry, Edited by Kabat, E.A., 2nd Edition, p. 133, Charles C. Thomas, Springfield, Illinois (1961)
- 8) Zak, B.: Am. J. Clin. Pathol. **27**, 583 (1957)
- 9) Quick, A.J.: Hemorrhagic Disease, p. 379, Lea and Febiger, Philadelphia (1957)
- 10) Arai, K. and Shimizu, A.: Clin. Exp. Immunol. **46**, 541 (1981)
- 11) Makker, S.P. and Moorthy, B.: Lab. Invest. **44**, 1 (1981)
- 12) Shigematsu, H.: Virchows Arch. [Cell Pathol.] **5**, 187 (1970)
- 13) Masugi, M.: Beitr. Pathol. Anat. **91**, 82 (1933)
- 14) Unanue, E.R. and Dixon, F.J.: J. Exp. Med. **119**, 965 (1964)
- 15) Fujimoto, T.: Masugi Nephritis and Its Immunopathologic Implications, Edited by Okabayashi, A. and Kondo, Y., p. 1, Igaku-Shoin, Tokyo (1980)
- 16) Bone, J.M., Valdes, A.J., Germuth, F.G. Jr. and Lubowitz, H.: Kidney Int. **8**, 72 (1975)

- 17) Penchas, S., Charuzi, I. and Boss, J.H.: Eur. J. Clin. Invest. 9, 161 (1979) Disease of the Kidney, p.373, Little, Brown and Co., Boston (1971)
- 18) Fish, A.J., Michael, A.F. and Good, R.:

Abstract—Haruo OHNISHI (Fuji Central Research Laboratory, Mochida Pharmaceutical Co., Ltd., 722 Jimba-aza-Uenohara, Gotemba, Shizuoka 412, Japan). The effects of human and mouse pepsin on Masugi nephritis. *Folia pharmacol. japon.* 83, 105~114 (1984)

The effects of intravenous administration of human or mouse pepsin were investigated on Masugi nephritis in rats and mice, which is an experimental model of glomerulonephritis in humans. Injection of anti-kidney serum to rats significantly increased the urinary protein excretion, serum levels of fibrinogen, cholesterol and immune complex, significantly decreased serum immunoglobulin G and complement levels, and caused histopathological changes such as detachment of endothelial cells from basement membrane, thickening of basement membrane, fusion of foot process and increase in hyaline cast in renal tubuli. Deposit of anti-rat IgG on glomerular capillary wall was also observed. All of these changes were ameliorated or showed a tendency to be ameliorated by intravenous administration of human pepsin, and the mechanism responsible for these effects was suggested to be selective decomposition of immune complex. Marked increase in urinary protein excretion was also observed in mice that intravenously received anti-kidney serum. This increase was suppressed by intravenous administration of human or mouse serum, the latter showing a stronger effect.