SLE 腎症における糸球体, 尿細管・間質浸潤細胞 のモノクローナル抗体による検討

明石 好弘・大 嶋 智・竹内 昭彦・久保田 孝雄
清 水 潤・清水 栄一・石田 亜希・中 林 巖
西 山 純一郎・田 沢 慶次・吉 澤 信 行

Jpn. J. Clin. Immun., 18 (5) : 545~551, 1995.

Identification and analysis of immune cells infiltrating into the glomerulus and interstitium in lupus nephritis

Yoshihiro Akashi, Satoshi Oshima, Akihiko Takeuchi, Takao Kubota,
Jun Shimizu, Eiiti Shimizu, Aki Ishida, Iwao Nakabayashi,
Junichiro Nishiyama, Keiji Tazawa and Nobuyuki Yoshizawa

Second Department of Internal Medicine, National Defense Medical College

【Summary】

This study was performed to investigate the role of cell-mediated immunity in lupus nephritis (LN). Frozen sections from 38 patients with LN were examined by indirect immunoalkaline-phosphatase labeling using monoclonal antibodies to identify the immune cells infiltrating into the interstitium and glomerulus. 14 patients showed minor glomerular abnormality (MGA), 9 had mesangial LN (MesLN), 12 had diffuse proliferative LN (DPLN) and 3 had membranous LN (MLN).

Monocyte/macrophage and helper/inducer T cells infiltrated in the interstitium predominantly, but intraglomerular infiltration of these cells was rare. Monocyte/macrophage and suppressor/cytotoxic T cell levels were significantly higher ($p < 0.05$) in the interstitium in DPLN patients and monocyte/macrophage level was significantly higher ($p < 0.05$) in MesLN patients than in MGA patients. In the interstitium, serum creatinine level was highly correlated with infiltrations of suppressor/cytotoxic T cell, monocyte/macrophage ($p < 0.01$), pan T cell and total leucocyte ($p < 0.05$). Clinical activity score was correlated with suppressor/cytotoxic T cell ($p < 0.001$), monocyte/macrophage and pan T cell ($p < 0.01$).

These results suggest that suppressor/cytotoxic T cell and monocyte/macrophage may play an important role in the progression of lupus nephritis.

Key words : lupus nephritis,
interstitial leucocyte,
macrophage/monocyte,
suppressor/cytotoxic T cell

【概 要】

腎生検を施行した全身性エリテマトーデス (SLE) 患者 38 例につき、糸球体および間質の浸潤細胞を染色し、組織型、検査値との関係を検討した。糸球体の浸潤細胞は、T cell はほとんど認められず、macrophage/monocyte がわずかに見られるのみで、組織型、検査値および組織学的、臨床的パラメーターとの相関は認められなかった。間質では、minor glomerular abnormality に比して、diffuse proliferative lupus nephritis (DPLN) の suppressor/cytotoxic T cell, macrophage/monocyte と、mesangial LN の macrophage/monocyte が有意な増加 ($p < 0.05$) を認めた。また、血清クレアチニン値と、間質の suppressor/cytotoxic T cell, macrophage/monocyte ($p < 0.01$), pan T cell, total leucocyte ($p < 0.05$) が有意な正相関を、臨床的活動性と suppressor/cytotoxic T cell ($p < 0.001$), pan T cell, macrophage/monocyte ($p < 0.05$) が有意な正相関関係を示した。以上の結果より、SLE の進展増悪に関して、間質の suppressor/cytotoxic T cell, macrophage/monocyte が関与していることが示唆された。

I. 緒 言

全身性エリテマトーデス (SLE) は、遺伝子、環境、内分泌因子の相互作用により免疫異常が生じ、発症する¹⁾といわれている。また、腎病変に関しては、たとえ尿所見が認められなくても腎生検を施行すると、多くの SLE 患者では、何らかの所見が認められている²⁾。

原発性糸球体腎炎および lupus nephritis (LN) 患者の腎生検組織につき、浸潤細胞の検討を行っている文献は今までに数多く報告されているが³⁻⁶⁾、LN の組織型による糸球体、間質の浸潤細胞の検討の報告はほとんどみられてはいない。

今回われわれは、腎生検を施行した SLE 患者に対し、糸球体および間質中の浸潤細胞を染色し、細胞性免疫の立場から LN の発症、進展に浸潤細胞が関与しているかどうかを検討した。

II. 対象および方法

1. 対 象

1983~1988 年の間に、当科において、腎生検を施行した 38 例の SLE 患者につき検討した。患者は、全例アメリカリウマチ協会による SLE の診断基準⁷⁾を 4 項目以上満たしていた。腎生検組織は、WHO のループス腎炎の分類⁸⁾に従い分類した。すなわち、WHO I minor glomerular abnormality (MGA),

WHO II mesangial lupus nephritis (MesLN), WHO III focal segmental lupus nephritis, WHO IV diffuse proliferative lupus nephritis (DPLN), WHO V membranous lupus nephritis (MLN) である。ただし、WHO III 型は、患者数が少ないため対象外とした。患者の内訳は、MGA 14 例、MesLN 9 例、DPLN 12 例、MLN 3 例であった。また、明らかに薬剤性の腎障害が考えられる症例は、今回の対象外とした。

2. 方 法

(1) 染 色

生検腎組織よりクリオスタットにて、厚さ 4 μ m の凍結切片を作製し、間接免疫アルカリフォスファターゼ (ALP) 法⁹⁻¹¹⁾により、腎浸潤 leucocyte を染色した。

凍結切片をゼラチンスライドに貼布し、15 分間風乾後、4% パラホルムアルデヒド/フォスフェイトバッファーにて固定した。その後、1 次抗体として、表 1 に示すヒト白血球表面抗原に対するマウス monoclonal antibody (MoAb) (Bekton Dickinson 社) を使用し、室温 moist chamber 内で 4 時間反応させた。PBS にて洗浄後、2 次抗体として、ラビット抗マウス Immunoglobulin, ALP 標識 (DAKO, Kyoto, Janan) を使用し、同条件にて、さらに 1 時間反応させた。ALP 呈色反応には、naphthol AS-bi-

表 1 Characteristics of the monoclonal antibodies

Cluster No.	Monoclonal antibody	Ig subclass (mouse)	Specificity
CD 8	Leu 2 a	Ig G 1	T suppressor/cytotoxic cells
CD 4	Leu 3 a	Ig G 1	T helper/inducer cells
CD 3	Leu 4	Ig G 1	pan T cells
CD 11	Leu M-5	Ig G 2 b	monocyte/macrophage
CD 57	Leu 7	Ig M	NK cells
CD 20	Leu 16	Ig G 1	pan B cells
CD 45	HLe-1	Ig G 1	Leucocytes
	HLA-DR	Ig G 1	B cells, monocytes/macrophages, activated T

表 2 Quantitation of leucocyte subsets in the glomeruli of patients with lupus nephritis

	MGA	MesLN	DPLN	MLN
Leu 2 a	0	0	0.13±0.453	0
Leu 3 a	0.018±0.064	0.063±0.165	0.08±0.266	0
Leu 4	0.089±0.261	0.109±0.222	0.269±0.933	0
Leu M-5	0.139±0.438	0.316±0.501	0.564±1.422	0
HLe-1	1.141±1.543	1.4±1.132	1.563±2.218	2.7±2.65

cells/mm² (mean±SD)

phosphate および first red TR-salt を用い、内因性 ALP のブロックを目的としてレバミゾールを加えた。最後に、核染をヘマキシリン（マイヤー法）にて実施した。なお、1 次抗体の希釈倍率は、malignant lymphoma 患者のリンパ節組織の染色性により、200 倍に決定した。さらに、コントロールとして、2 次抗体のみで切片を染色して、発色しないことを確認した。

(2) 糸球体、間質浸潤細胞の定量

1) 糸球体：切片中の全糸球体につき、糸球体内全陽性細胞をカウントし、糸球体 1 個当たりの陽性細胞数として示した。

2) 尿細管・間質：高速カラー画像解析装置により、糸球体および大血管を除いた腎組織の全面積を算出し、そこに浸潤している全陽性細胞数を、算出した面積で除し、単位面積あたりの陽性細胞数 (cells/mm²) として示した。

3) 各データは、平均値±標準偏差 (SEM) として示し、データ間の有意差検定には、student-t 検定および Wilcoxon-U 検定を用いた。

(3) 臨床学的活動性および組織学的活動性

臨床学的活動性は、Morimoto ら¹²⁾の報告に準じ、スコア化した。すなわち、発熱、倦怠感、血圧、関

節痛、漿膜炎、血管炎、紅斑、口腔内潰瘍、脱毛、中枢神経障害、眼症状をそれぞれスコア化し、合計を最大 50 として計算した。また、組織学的活動性は、Austin ら¹³⁾の報告に準じ、活動性を表す組織病変 (activity index : AI) と慢性の硬化あるいは線維化を表す組織病変 (chronicity index : CI) に大別し、スコア化した。

III. 結 果

全組織において、NK cell, pan B cell は、糸球体および間質内にはほとんど認められなかったため、以後の検討は上記 2 種類以外の陽性細胞にて行った。

1. 各組織病型間での浸潤細胞の比較

糸球体内浸潤細胞は、各組織病型間にて、有意な差は認めなかった (表 2)。糸球体内には、T cell はほとんど認められず、わずかに monocyte/macrophage, leucocyte が認められるのみであった。間質浸潤細胞では、DPLN の suppressor/cytotoxic T cell, monocyte/macrophage と、MesLN の monocyte/macrophage が MGA に比して有意な増加を認めた ($p<0.05$) (表 3)。その他の浸潤細胞には、有意な差異は認められなかった。図 1 に、DPLN

表 3 Quantitation of leucocyte subsets in the interstitium of patients with lupus nephritis

	MGA	MesLN	DPLN	MLN
Leu 2 a	0.48±1.61	0.98±1.85	2.63±2.95*	0
Leu 3 a	0.39±0.58	1.14±1.26	10.28±15.64	6.52±5.31
Leu 4	1.95±2.25	3.83±3.7	22.27±30.64	14.7±18.63
Leu M-5	0.12±0.29	0.96±0.98*	7.69±10.7*	1.64±2.32
HLe-1	25.6±11.34	26.23±23.07	62±63	41.82±19.67

cells/mm² (mean±SD)

*p<0.05 vs MGA

図 1 Immunoalkaline phosphatase staining of Leu 2 a (A, ×460), Leu 3 a (B, ×460), Leu M-5 (C, ×920) and HLe-1 (D, ×230) from the patient with DPLN.

の患者にて、組織染色の結果を示す。

2. 浸潤細胞と臨床検査所見との関係

間質に浸潤した細胞に関しては, suppressor/cytotoxic T cell, monocyte/macrophage ($p<0.01$), pan T cell, total leucocyte ($p<0.05$) が, 血清クレアチニン値と有意な正相関を示し, suppressor/cytotoxic T cell ($p<0.001$), pan T cell, monocyte/macrophage ($p<0.05$) が, 臨床的活動性と有意な正相関を示した (表 4)。しかしながら, 血清補体価, 抗 DNA 抗体価, 1 日尿蛋白量とは有意な関係は認められなかった。また, 糸球体内の浸潤細胞に関しては, 上記パラメーターとの有意な関係は見

いだせなかった。

3. 浸潤細胞と組織学的活動性との関係

糸球体浸潤細胞と AI, CI との間に明らかな関係は見いだせなかった。間質浸潤細胞では, suppressor/cytotoxic T cell と AI が, 相関傾向を示したが ($p<0.07$), その他の細胞とは明らかな相関関係は認められなかった (表 5)。CI≤1 と CI≥2 とに分けて間質の浸潤細胞の検討を行ったところ, CI≥2 の症例の各浸潤細胞数は CI≤1 に比して多い傾向ではあったが, 有意差は認められなかった。また, Leu 3 a/Leu 2 a の値は, CI≤1, CI≥2 にてそれぞれ 4.25, 3.77 と, 明らかな差異は認められなかった。

表4 Correlation between interstitial leucocyte infiltration and serum creatinine level and clinical disease activity

	Leu 2a	Leu 3a	Leu 4	Leu M-5	HLe-1
S-Cr	0.493**	0.386	0.468*	0.51**	0.382*
clinical activity index	0.602***	0.29	0.406*	0.449*	0.106

***p<0.001 **p<0.01 *p<0.05

4. 腎生検施行時期と浸潤細胞との関係

SLE発症早期（診断から1年以内）に腎生検を施行している症例と、1年以上たった時点で腎生検を施行している症例で間質の浸潤細胞を比較した場合、各浸潤細胞数には有意差は認められなかった。

IV. 考 察

現在までにLupus nephritis (LN)をはじめ、多くの原発性腎炎、2次性腎炎に関して、糸球体および間質の浸潤細胞を染色した文献は数多く認められる³⁻⁶⁾。LNと正常人との比較や、他の腎疾患との比較検討が多いが、LNのなかで、組織型による浸潤細胞の比較検討はあまり報告がない。今回われわれは、LNの組織型による糸球体、および間質の浸潤細胞の差異を明らかにし、また、浸潤細胞が臨床的パラメーター、組織学的活動性と関連性があるかどうかにつき検討を行った。

以前の報告¹¹⁾と同様に、糸球体、間質内には、B cell, NK cellはほとんど認められず、今回の検討からは除外した。また、HLA-DRの検討も試みたが、ほぼ全例で、糸球体では、capillary loop内皮側にべったりと染まってしまい、細胞の同定が困難なことや、間質では、毛細血管内皮、単核球、dendritic cellかどうかの判断が困難なため、今回の検討から除外している。

LN全般的には、糸球体内にはほとんど浸潤細胞はみられず、間質では、helper/inducer T cell 有意のT cell細胞増加、monocyte/macrophage, total leucocyteの増加が認められた。WHO分類では、間質細胞浸潤にて、macrophage/monocyteがMesLN, DPLNにて、また、suppressor/cytotoxic T cellがDPLNにおいて、MGAに比して有意な高値を示した。臨床検査所見との相関では、間質の浸潤細胞で、血清クレアチニン値と、suppressor/cytotoxic T

表5 Correlation between interstitial leucocyte and histological activity index

	Leu 2a	Leu 3a	Leu 4	Leu M-5	HLe-1
histological activity index	0.369*	0.227	0.274	0.268	0.134

*p<0.07

cell, pan T cell, monocyte/macrophage, total leucocyteが有意な正の相関を示し、臨床的活動性とsuppressor/cytotoxic T cell, pan T cell, total leucocyteが有意な正相関を認めた。全般的にはhelper/inducer T cellの数が多く認められたが、クレアチニン値、臨床学的活動性と相関が認められたのはsuppressor/cytotoxic T cellであったのは興味深い。

D'Agatiら³⁾は、26例のLNの組織を検討し、間質の細胞はT cellが主体で、OKT 4/OKT 8比は1以下が多く、histological activityと強い相関を示し、他の腎炎と比べOKT 4/OKT 8は有意に低値を示し、OKT 4/OKT 8比と組織学的活動性は有意な正相関を示し、他の腎炎とは違った機序で腎障害をきたしている可能性を示唆している。ただし、血中のOKT 4/OKT 8比との相関は認められていない。Castiglioneら⁴⁾は、18例のLNの組織を検討し、糸球体内では、macrophageの有意な増加を認め、間質では、OKT 8, macrophageの有意な増加を認め、それらは、組織学的活動性と有意な相関関係を認めた、としている。また、Hookeら⁵⁾は、13例のLNの組織を検討し、OKT 4/OKT 8=1.9±0.7と他の報告に比べOKT 4/OKT 8比がやや高い結果となっている。糸球体の浸潤細胞は、正常人と有意差はなかったが、間質にて、leucocyte, T lymphocyteの有意な増加を認め、血清Cr値とは、糸球体、間質のleucocyte, monocyte, 間質のT lymphocyteが有意な正相関を認めている。Alexopoulosら⁶⁾は、35例のLNの組織を検討し、糸球体病変とは無関係にhelper/inducer T cellとmonocyte/macrophageの間質への浸潤が著しく、その数は尿管、間質の硬化度とよく相関し、CD 4/CD 8は、正常腎組織より小さかったが、1以上であったと報告している。また、AIと糸球体、間質浸潤細胞とは有意な関係はなかったが、CIとは、間質のpan T cell, helper/inducer T cell, monocyte/macrophageが有意な相関関係を示し、血清Cr値とは、間質のpan T cellが有意な正の相関関

係を示した、と報告している。

このように、今までの報告でも一致していない場合があるが、我々の結果では、Leu 3 a/Leu 2 a の比は、1 以上を示していた。また、血中の Leu 3 a/Leu 2 a との相関も認められていない。今までの報告の OKT 4, OKT 8 と比較して Leu 2 a の陽性細胞の数は非常に少なかった。尾田ら¹¹⁾は、IgA 腎症、急性糸球体腎炎の患者で糸球体、間質の細胞に対し、Leu 2 a, Leu 3 a および OKT 8, OKT 4 の染色性を比較し、糸球体、間質両者とも Leu 2 a 陽性細胞が OKT 8 陽性細胞に比べ有意に低い値をとり、Leu 3 a, OKT 4 陽性細胞は染色性に有意差はなかったと報告している。一方では、Cohen ら¹⁴⁾は、OKT シリーズと Leu シリーズ間で、染色性に問題はなかったと報告している。今までの報告はほとんど OKT シリーズを使用したものであり、明確な比較は難しいと思われる。

Austin ら¹³⁾の報告によると、CI $\leq$ 1 の症例では、CI $\geq$ 2 の症例と比較して、有意に腎不全に移行する例が少ないと報告しており、両者間にて間質浸潤細胞に差異が認められるかを検討したが、明らかな有意差はなく、Leu 3 a/Leu 2 a 比もほぼ同じであった。また、SLE と診断されてから比較的早期 (1 年以内) に腎生検を施行された症例と、1 年以上後に腎生検を施行された症例とを比較しても、両者間では間質浸潤細胞には有意差は認められなかった。

T cell が腎障害を発症させることは、今までに報告があり、rat, chicken にて、tubulo-interstitial nephritis を引き起こす^{15,16)}、との報告がある。Gallo ら¹⁷⁾は、MRL/lpr mice の皮質部分の間質より T cell clone を樹立し、この細胞が腎組織に特異的に反応し、尿細管上皮、メサングウム細胞を増殖させ、尿細

管上皮に class II および ICAM-1 の発現を増強させることを報告した。この発現増強により、helper T cell に自己抗原を提示し、自己免疫反応が開始されると考えられ、T cell clone は、MRL/lpr mice の腎障害の発症機序に関与しているとしている。

Macrophage に関しては、Ferrario ら¹⁸⁾は、61 例の LN を検討し、MesLN に対し DPLN は有意に糸球体内に macrophage が増加しており ($p<0.0005$)、組織学的活動性と有意な相関がみられたと報告している。また、クリオグロブリン腎症、急性糸球体腎炎、半月体形成性腎炎、membranoproliferative glomerulonephritis 全例を通じて、糸球体内 macrophage 数と蛋白尿とが相関関係を示していた。そして、macrophage は、ただ糸球体内に沈着した免疫複合体を貪食するだけでなく、細胞性免疫を介した腎障害を引き起こしている¹⁹⁾、と示唆している。

このように、腎障害に関して、T cell, macrophage の関与は大きく、さらに両者は互いに活性化する cytokine を放出することや、macrophage の放出する IL-1 はメサングウム細胞を増殖させることが報告されている²⁰⁾。メサングウム細胞自体が IL-1 類似物を放出することと言われており²¹⁾、これらメサングウム細胞、macrophage, T cell の 3 者間で互いに cell to cell interaction が起こり細胞増殖、組織障害を惹起しているものと考えられる。

今回のわれわれの結果からは、DPLN にて、間質の suppressor/cytotoxic T cell, monocyte/macrophage が MGA に比して有意に高値であり、両者ともに血清 Cr 値、臨床学的活動性と有意な正相関を認めたことから、間質における上記 2 種類の浸潤細胞が、LN における腎障害の進展、増悪に関与していることが示唆された。

文 献

- 1) Alarcon-Segovia, D.: The pathogenesis of immune dysregulation in systemic lupus erythematosus: a trioka. J. Rheumatol., 11: 588~590, 1984.
- 2) Font, J., Torras, A., Cervera, R. et al.: Silent renal disease in systemic lupus erythematosus. Clin. Nephrol., 27: 283~288, 1987.
- 3) D'Agati, V., Appel, G.B., Estes, D. et al.: Monoclonal antibody identification of infiltrating mononuclear leucocytes in lupus nephritis. Kidney int., 30: 573~581, 1986.
- 4) Castiglione, A., Bucci, A., Fellin, G. et al.: The relationship of infiltrating renal leucocytes to disease activity in lupus and cryoglobulinemic glomerulonephritis. Nephron, 50: 14~23, 1988.
- 5) Hooke, D.H., Gee, D.C., Atkins, R.C.: Leukocyte analysis using monoclonal antibodies in

- human glomerulonephritis. *Kidney Int.*, 31 : 964~972, 1987.
- 6) Alexopoulos, E., Seron, D., Hartley, R.B. et al. : Lupus nephritis : Correlation of interstitial cells with glomerular function. *Kidney Int.*, 37 : 100~109, 1990.
- 7) Tan, E.M., Cohen, A.S., Fries, J.F. et al. : The 1982 revised criteria for the Classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, 25 : 1271~1277, 1982.
- 8) Churg, J., Sobin, L.H. : Renal disease : Classification and atlas of glomerular disease. Tokyo, Igaku-Shoin, 1982, pp. 127~149.
- 9) Cordel, J., Falin, B., Erber, W. et al. : Immuno-enzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase. (APPAP complexes) *J. Histochem. Cytochem.*, 32 : 219~229, 1984.
- 10) Yam, L., Jancklia, A.J., Epremian, B.E. et al. : Diagnostic significance of levamisole resistant alkaline phosphatase in cytochemistry and immunocytochemistry. *Am. J. Clin. Pathol.*, 91 : 31~36, 1989.
- 11) 尾田高志・吉澤信行・大嶋 智・他7名 : 糸球体腎炎における糸球体，尿細管・間質浸潤細胞のモノクローナル抗体による検討. *日腎誌*, 32 : 631~642, 1990.
- 12) Morimoto, C., Sano, H., Abe, T. et al. : Correlation between clinical activity of systemic lupus erythematosus and the amounts of DNA/anti-DNA antibody immune complexes. *J. Immunol.*, 129 : 1960~1965, 1982.
- 13) Austin, III H.A., Muenz, L.R., Joyce, K.M. et al. : Diffuse proliferative lupus nephritis : Identification of specific pathologic features affecting renal outcome. *Kidney Int.*, 25 : 689~695, 1984.
- 14) Cohen, C., Jimenes, J.F., Horn, H.V. : Monoclonal antibodies for detection of lymphocyte markers. *Am. J. Clin. Pathol.*, 85 : 438~444, 1986.
- 15) Bolton, W.K., Chandra, M., Tyson, T.M. : Transfer of experimental glomerulonephritis in chickens by mononuclear cells. *Kidney Int.*, 34 : 598~610, 1988.
- 16) Sugisaki, T., Yoshida, T., McCluskey, R.T. : Autoimmune cell-mediated tubulointerstitial nephritis induced in Lewis rats by renal antigens. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 15 : 33~43, 1980.
- 17) Gallo, C.D., Jevnikar, A.M., Brennan, D.C. et al. : Autoreactive kidney-infiltrating T cell clones in murine lupus nephritis. *Kidney Int.*, 42 : 851~859, 1992.
- 18) Ferrario, F., Castiglione, A., Colasanti, G. et al. : Role of monocytes in human glomerulonephritis : Histochemical study. *Contr. Nephrol.*, 45 : 131~140, 1985.
- 19) Bhan, A.K., Schneeberger, E.E., Collins, A.B. et al. : Evidence for a pathogenic role of cell-mediated immune mechanism in experimental glomerulonephritis. *J. Exp. Med.*, 148 : 246~260, 1978.
- 20) Lovett, D.H., Ryan, J.L., Sterzel, R.B. : Stimulation of rat mesangial cell proliferation by macrophage interleukin-1. *J. Immunol.*, 131 : 2830~2836, 1983.
- 21) Lovett, D.H., Ryan, J.L., Sterzel, R.B. : A thymocyte activating factor derived from glomerular mesangial cells. *J. Immunol.*, 130 : 1796~1801, 1983.