immune complex に固着した多形核白血球の NBT 食食還元能

山本 格・木原 達*

NBT reduction by PMN adhered to immune complexes deposited in glomeruli NBT reduction by PMN adhered to glomeruli with immune complexes on kidney sections or PMN incubated with kidney homogenate was investigated. The localization of PMN increased in the reduction was exclusively on glomeruli in the sections and moreover, crossly similar to that of immune complexes defined by immunofluorescence. Homogenate of nephritic kidney with immune complex deposition significantly elevated the activity of PMN to reduce NBT in compariton to that of normal kidney. The elevation reached a peak 20 min after PMN encountered with the homogenate.

Tadashi Yamamoto・Itaru Kihara

Department of Pathology, Institute of Nephrology, Niigata University School of Medicine

多形核白血球 (PMN) は、急性炎症組織に浸潤し、その成立に一つの役割を演じていると考えられており、ヒトの急性糸球体腎炎や実験的急性糸球体腎炎でみられる糸球体毛細血管腔内やメサンギウム内の PMN も同様と考えられた。これら PMN は、糸球体に沈着した immune complex (IC) に血清成分が働いてつくりだされる種々の chemotactic factor に誘導されて炎症部位に集積し、PMN 上の補体リセプターや Fc リセプターを介し、IC を認識し食食や酵素放出などによりその処理を行うと同時に、周囲組織を障害していると思われる。

わたしどもは IC と PMN の相互作用を *in vitro* で検索するために PMN 固着反応 (PMN binding assay)^{1,2)}を行っている。それは実験的 IC 型糸球体腎炎であるラット BSA (bovine serum albumin) 腎炎³⁾の腎凍結切片と PMN を新鮮血清下で反応させると IC の沈着している糸球体に一致して PMN が固着するというもので、この現象の初期には補体リセプターを介した IC との結合が重要と思われるが糸球体に PMN が強く固着するには細胞外の Mg イオンに依存するステップが必要であった。

今回は、IC に接した PMN の内部機能の変化を検討するために糸球体腎炎を起こした腎臓のホモジェネートと PMN を反応させ、PMN の還元能に変化があるかどうかを nitroblue tetrazolium (NBT) を用いて検索した。

方 法

ラット BSA 腎炎と対照の正常腎組織の wet weight 100 mg 当り 10 ml の 0.01M Veronal buffered saline,

pH 7.6, 0.15 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂ 添加(VBS⁺⁺)をそれぞれ加え、ガラスホモジェナイザーで 100 strokes し、組織を破壊し、3,000 回転、10 分遠心後の沈渣にホモジェナイズに用いたのと同量の VBS⁺⁺ を加え腎ホモジェネートとした。

光顕観察用に腎組織の凍結切片をスライドガラスにとり、その両端に厚さ 0.2 mm の絶縁テープを貼り、その上に別のスライドガラスを重ねて簡易チェンバーをつくった。

PMN は、0.1% グリコーゲン生食水をラット腹腔に 20 ml 注射し、3~4 時間後に腹腔浸出液をとり、1,000 回転・10 分遠心後 VBS⁺⁺ に 2×10^7 /ml に浮遊して用いた。

NBT は 0.34 M 蔗糖液に 3 mg/ml になるよう溶かした。

NBT 還元能の検索には腎ホモジェネート 0.5 ml に 2×10^7 /ml PMN 浮遊液 0.5 ml, NBT 蔗糖液 0.1 ml, ラット新鮮血清 0.1 ml を加え、37°C の恒温槽中で 40 分反応後、1,000 回転・10 分遠心し、沈渣にピリジン 3 ml を加え、100°C に加温し還元 NBT を溶出しその量を OD₅₁₅ で測定した。

スライドガラスチェンバーには 2×10^7 /ml PMN 浮遊液 4 容に NBT 液 1 容, ラット新鮮血清 1 容を加えた液をパスツールピペットで流し込み、37°C・40 分反応させ、組織をアルコールで 10 分間固定し、ヘマトキシリン・エオジン染色した。

腎ホモジェネートによる PMN の NBT 還元量の検討では、反応時間 15~120 分までの time course, ホモジェネートの希釈の影響, 新鮮血清の必要性, PMN の濃度による差などを検索した。また、 2×10^7 /ml/PMN 液 0.5 ml, 腎ホモジェネート 0.5 ml, 新鮮血清 0.1 ml

* 新潟大学医学部腎研究施設病理部門

図1 the similar distribution of reduced NBT in PMN by PMN binding assay (left) and rat IgG defined by immunofluorescence (right)

図2 time course of NBT reduction by PMN incubated with nephritic (●—●) or normal (○—○) kidney homogenate

図3 NBT reduction of PMN incubated with serially diluted nephritic (●—●) or normal (○—○) kidney homogenate. (□: without kidney homogenate)

を 37°C で反応させておき、反応開始より 20 分ごとに 3 mg/ml NBT 液を 0.1 ml 加え、20 分後に 1 N の HCl 0.5 ml を加え反応を止め、遠心後の沈渣にピリジン 3 ml を加え還元 NBT を抽出し、腎ホモジェネートと接触後どれくらいで PMN の NBT 還元能がもっとも高まるか検索した。

結果

スライドグラス上の腎炎腎組織と PMN を反応させると、PMN は糸球体に多数集積し、還元された NBT は PMN の胞体中に暗紫色にみえる。この還元 NBT を多く含む PMN はほとんどが糸球体に集積した PMN であり、しかも、糸球体に集積した PMN 全部ではなく、線状に連らなって分布する PMN 群であった (図 1 左)。その分布は、蛍光抗体法で糸球体に証明されるラット IgG などの IC の成分の沈着部位に類似していた (図 1 右)。

腎炎腎および正常腎ホモジェネートにより刺激された

図4 NBT reduction in serum-added (■) or serum-free (□) medium by PMN incubated with nephritic (GN) or normal (Nor) kidney homogenate or with VBS⁺⁺

PMN の還元 NBT 量を反応時間をかけて測定したのが図 2 である。腎炎腎、正常腎ともに反応時間がながいほど PMN 内の還元 NBT 量を増加させたが、腎炎腎では最初の 40 分ぐらいでその量は急増し、その後はほぼプラトーに達した。一方、正常腎による増加はおだやか

図5 effect of cell density on NBT reduction of PMN incubated with nephritic (●—●) or normal (○—○) kidney homogenate or in VBS⁺⁺ (□—□)

で、還元 NBT 量も対応する腎炎腎によるものの 1/2～1/3 であった。

ホモジェネートを VBS⁺⁺ で倍々希釈し PMN, NBT, 血清と反応させると、腎炎腎ホモジェネートでは還元 NBT 量は希釈とともに減少し、16 倍希釈でホモジェネートを入れないコントロールにほぼ等しくなった (図3)。正常腎でも量は少ないが同様の低下を示し、4 倍希釈でコントロールレベルになった。未希釈のホモジェネートで比較すると腎炎腎は正常腎の2.4倍 PMN の NBT 還元量を増加させ、希釈効果では未希釈正常腎ホモジェネートは4倍希釈腎炎腎のそれとほぼ等しく、また、コントロールレベルに達した希釈倍数も正常腎では4倍希釈、腎炎腎では16倍希釈とほぼ4倍の差が認められた。

ラット新鮮血清を加えた場合と加えない場合を比較したのが図4であるが、腎炎腎、正常腎ホモジェネート、コントロールとも血清を加えたほうが還元 NBT 量は多かったが、その差は非常に少なかった。

浮遊 PMN の濃度をかえて検索すると、 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 以下の PMN 濃度では有意の還元 NBT は測れず、その測定には $10 \times 10^6/\text{ml}$ 以上の PMN 濃度が必要であった (図5)。しかし、 $50 \times 10^6/\text{ml}$ 濃度ではホモジェネートを入れないコントロールでもかなりの還元 NBT が検出された。

つぎに PMN とホモジェネートとの反応液中に20分ごとと20分間 NBT をパルスし、その間に還元された NBT 量を測定した (図6)。

腎炎腎と反応した PMN は反応開始20分後から20分間 NBT をパルスしたときもっとも高い還元能を示し、以後は徐々に低下し、反応後80～100分の間に還元された NBT 量は相当する正常腎のものより低いほどであった。正常腎と PMN の反応でも反応20～40分に還元される NBT 量が増加したが、腎炎腎と比較するとその量は少なく、また、その後の20分間ずつのパルスで還元された NBT 量があまり低下しなかったのが腎炎腎と異なっていた。

図6 NBT pulse for 20 min at various incubation times in the mixture of PMN and nephritic (●—●) or normal (○—○) kidney homogenate

考 案

組織切片上で PMN を新鮮血清下で反応させると、組織に沈着した IC の補体活性能に応じて PMN がその部位に固着することをすでに報告した^{1,2)}。今回はこの PMN の還元能を調べるために腎ホモジェネートを用いて PMN の NBT 還元能を検討した。組織切片上の PMN の NBT 還元量は腎炎腎切片の糸球体に集積している PMN が極端に多かったことから、正常腎ホモジェネートと反応した PMN ではその還元能はあまり増加しないだろうと考えられた。しかし、予想に反し、正常腎でもかなりの PMN 還元能亢進作用があったことからその作用はホモジェネート作製過程で生ずる組織破壊産物中にあると考えられた。一方、腎炎腎には正常腎と比較しても2～4倍 PMN の還元能を高める作用があり、これにおそらく沈着している IC によるものと思われた。

PMN 固着反応では、新鮮血清を用いないと糸球体への PMN 固着数は用いた場合の1/5～1/10程度に減少したが、腎ホモジェネートによる PMN の NBT 還元活性には血清を加えても加えなくてもあまり差がなかった。これは PMN の固着は多くの補体リセプターが IC 上の活性補体成分と結合することが必要であるが、NBT 還元能を高めるにはそれほど多くの補体リセプターの関与は必要なく、IC 中に含まれる *in vivo* でつくられた活性補体成分との結合だけで十分ということかもしれない。

一方、PMN は Fc リセプターでも IC 中の IgG などの Fc 部分を認識していると考えられ、これによっても還元能が高まるのかもしれない。

NBT のパルス実験から腎炎腎ホモジェネートを接した PMN の還元能は、はじめの20～40分は亢進するが、接触時間がながくなると低下し、消耗などにより PMN の内部機能が時間とともに変化してゆくと考えられた。

文 献

- 1) Yamamoto, T., et al.: Attachment of polymorphonuclear leukocytes to glomeruli with immune deposits. J. Immunol. Methods 26 : 315-323, 1979.
- 2) Yamamoto, T., et al.: Role of divalent cations in binding polymorphonuclear leucocytes to glomeruli with immune complexes. Clin. exp. Immunol. 39 : 583-587, 1980.
- 3) Yamamoto, T., et al.: Bovine serum albumin nephritis in rats. I. Experimental model. Acta Pathol Jap. 28 : 859-866, 1978.