腎糸球体障害, 半月体形成に關与する CD8 陽性リンパ球の役割

川崎克俊・矢尾板永信・山本 格・木原 達*

The role of CD8 positive lymphocytes in glomerular injury and crescent formation

Masugi nephritis in WKY rats was compared with this nephritis in other strains. WKY rats developed severe proliferative glomerulonephritis with massive proteinuria and crescent formation when a small dose of anti-GBM sera was given. Immunohistochemical examination showed that rabbit IgG, but not rat IgG and C3, was stained in a glomerular capillary walls with a linear pattern, and that the infiltration of CD8 positive cells preceded the influx of monocytes/macrophages and crescent formation.

These data indicate that CD8 positive cells play a key role in the accumulation of monocytes/macrophages and urinary protein excretion, and subsequent crescent formation.

Katsutoshi Kawasaki・Eishin Yaoita・

Tadashi Yamamoto・Itaru Kihara*

key words: Masugi nephritis, crescent formation, CD8 positive lymphocyte, anti-GBM antibody

馬杉腎炎(抗糸球体基底膜型腎炎)は、ヒトの腎炎の発症機序を考えるうえで有用なモデルである¹⁾。典型的なラットの系では、沈着したウサギの抗体、ラットの補体に対して、第Ⅰ相(heterologous phase)では好中球が²⁾、さらにラットの抗体も沈着する第Ⅱ相(autologous phase)ではマクロファージ³⁾が、主体的に關与して基底膜の透過性を亢進させて蛋白尿を呈すると考えられている。しかし、リンパ球の關与の報告は少なく、CD4 陽性細胞の關与が報告されているにすぎない⁴⁾。

筆者らは、種々の系統のラットに馬杉腎炎を作成し疾患感受性を検討したところ、非常に感受性の強い系を見出した。すなわち、WKY ラットでは抗腎糸球体基底膜型腎炎を起こすと、微量の抗血清の投与で激しい細胞浸潤と半月体形成が起こり、細胞外基質も増加し、早期に糸球体荒廢が進

行することが判明した⁵⁾。このラットは従来より ADCC 活性や NK 活性が高いことが示されていることから⁶⁾、好中球、マクロファージと対比して、リンパ球の關与の有無を免疫組織化学的に検討した。

材料と方法

(1) 馬杉腎炎の作成

ラットから sieving 法で単離した糸球体を sonication により基底膜(glomerular basement membrane, GBM)に精製し、ウサギに免疫して得られた抗基底膜血清(anti-GBM sera: NTS)をネフロトキシンとして用いた。筆者らの研究室で維持している WKY(RT 1=k), SHR(k), F 344(lvl), Lewis(1), SD の各系統のラットに抗基底膜血清を種々の濃度で投与して、馬杉腎炎を作成した。

(2) 検査方法

抗基底膜血清投与 2 日前より経時的に採血し、血中の抗体価(ELISA 法)、血清補体価(CH 50)を検討した。検尿は 2 日前より経時的にそれぞれ代謝ケージにより 24 時間蓄尿し、尿蛋白を microplate reader(Model 3550, Bio-Rad)を用いて比色法(protein assay kit, Bio-Rad)により 595 nm の吸光度で定量した。濃度既知の BSA で検量線を引き、標準蛋白とした。実験に供したラットは day 3 または day 6 に片腎摘除し、day 14 に屠殺した。各時期の腎組織を光顕、蛍光抗体法用にそれぞれ作成した。光顕標本はホルマリン固定後、HE, PAS, PAM 染色により観察した。蛍光抗体法用標本は、一部の腎組織を急速凍結し、クリオスタットにて 4 μ m に切片を作成したのち、冷アセトンで 5 分処理して以下の染色を行った。

(3) 組織染色

腎組織は、FITC 標識抗ウサギ IgG, 抗ラット IgG, 抗ラット C3 で染色し、蛍光顕微鏡下で判定した。腎糸球体の細胞浸潤を以下のモノクローナル抗体により免疫組織化学的に検討した。好中

* Department of Pathology, Institute of Nephrology, Niigata University School of Medicine 新潟大学医学部腎研究施設病理形態学部門

図1 Urinary protein excretion of Masugi nephritis
—dose dependency in heterologous phase—

球は RP-3 (山形大, 仙道教授より供与の hybridoma 由来), 単球/マクロファージは ED 1 (大日本製薬), pan T cell は W 3/13 (大日本製薬), CD 4 陽性細胞は MRC-OX 38 (PHLS Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Salisbury, UK からの hybridoma 由来), CD 8 陽性細胞は MRC-OX 8 (PHLS Centre の hybridoma 由来)を用いて間接蛍光抗体法で検討した。

結 果

(1) 抗基底膜血清(NTS)の有効量と系統差

WKY, SHR, F 344, Lewis, SD ラットでは, 0.5 ml/100 g BW の NTS の静注で全例に蛋白尿が出現した。この投与量では大部分のラットに第 I 相が出現した。この量では, WKY ラットでは激しい細胞浸潤と半月体形成があるため, つぎに量の検討を試みた。図 1 に示すように WKY ラット以外, たとえば SD ラットでは, 0.3 ml で第 II 相がはっきりしなくなり, 0.1 ml では第 I 相も出現しなくなった。しかし, WKY ラットではこの量でも 200 mg/day 以上の蛋白尿を呈し(図 2), 激しい組織学的変化が観察された。そこで蛋白尿を惹起させる NTS の濃度を検討した。WKY ラットでは, 図 3 に示すようにわずか 0.025 ml でも 100 mg/day の蛋白尿が出現し, 増殖性変化, 半月体形成が認められた。

(2) WKY ラットの特異性

上記の検討から以下の検討は, 0.025 ml/100 g

図2 Urinary protein excretion of Masugi nephritis
—susceptibility of disease by genetic backgrounds—

BW の NTS 静注における結果を示した。

WKY ラットでは, 蛋白尿の出現に第 I 相はみられず, day 6 より有意な蛋白尿が出現した。免疫組織学的検索では, 他の系統と同様にウサギ IgG は線状に基底膜に沈着していたが, ラット IgG, C3 はほとんど検出されなかった。day 1 より CD 8 陽性リンパ球(MRC-OX 8 陽性)の浸潤が, 糸球体内と Bowman 嚢に沿って有意に増加していた。そのピークは day 3 であった(図 4a)。単球/マクロファージ(ED 1 陽性)は day 6 から急増し, そのピークは day 6 から day 11 にみられた(表 1, 図 4b)。しかし, CD 4 陽性(MRC-OX 38 陽性)リンパ球は増加していなかった(表 1)。

経時的に検討すると, 一過性の RP-3 陽性好中球の出現(他の系統にくらべ浸潤は少ない)のあと, CD 8 陽性リンパ球が浸潤し, その後, 単球/マクロファージが急激に増加して半月体形成, 糸球体硬化へと進んでいった。

光顕的には day 3 ですでに管内増殖性変化と PAS 陽性の物質の沈着が糸球体に観察された(図 5a)。day 6 では増殖性変化に加え, 浸出性変化, 破壊性変化が著明となり(図 5b), 半月体形成も

図 3
Urinary protein
excretion of Mas-
ugi nephritis in
WKY rats
—estimation of
optimal dose of
NTS—

図 4 間接蛍光抗体法
a: MRC-OX8 陽性細胞 (CD8 陽性細胞)が、
糸球体内に有意に増加している。day 3 (original
magnification $\times 400$)
b: ED1 陽性単球/マク
ロファージの糸球体内浸
潤。day 9 (original
magnification $\times 400$)

多くみられるようになった。

考 察

従来、抗糸球体基底膜型腎炎モデルをはじめとした種々の腎炎の糸球体障害の機序に、好中球、macrophages、補体、凝固系の関与していると考えられる多くの証拠が提出されている¹⁻³⁾が、リンパ球、特に CD8 陽性リンパ球の関与は報告

がない。このモデルでは、わずか 0.025 ml/100 g BW の抗基底膜血清で激しい病変が形成されることから、従来からいわれている機序であるラットの抗体、補体の関与は非常に少ないと考えられる。実際に、糸球体にはラットの抗体、補体の沈着はほとんど検出されず、血中の抗体価も、補体消費も非常に少なかった(data not shown)ことから、まったく異なる障害機序を考えなくてはなら

図5 WKY ラットの馬杉腎炎における糸球体病変
a: day 3 で PAS 陽性物質が糸球体内に認められ、管内性増殖も観察される。
b: day 6 では PAS 陽性物質の析出も著明となり、正常の係蹄壁を保っている糸球体はほとんどなくなる。PAS 染色 (original magnification $\times 400$)

表1 Frequency of intraglomerular lymphocytes and macrophages

time	stains		
	MRC-OX 38	MRC-OX 8	ED 1
0	0.2 $\pm$ 0.1*	0.2 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.7
4 hrs	0.1 $\pm$ 0.4	1.1 $\pm$ 1.3	5.0 $\pm$ 2.6
day 1	0.2 $\pm$ 0.5	5.6 $\pm$ 3.9	10.7 $\pm$ 5.4
day 3	0.2 $\pm$ 0.5	10.1 $\pm$ 5.2	19.5 $\pm$ 7.6
day 6	0.3 $\pm$ 1.1	6.1 $\pm$ 3.2	36.8 $\pm$ 11.4
day 11	0.4 $\pm$ 1.1	3.2 $\pm$ 2.8	35.6 $\pm$ 5.2

*: Expressed as number of stained cells per glomerular cross section. mean $\pm$ 1SD. One hundred glomeruli were examined in each of four rats.

ない。この点に関しては Granados らが、WKY ラットでは ADCC 活性や NK 活性が高いことを報告している⁶⁾。

また、筆者らの検討では、MRC-OX 8 の *in vivo* 投与による depletion study により、これらの病変が完全に抑制されることを観察しており⁷⁾、やはり CD 8 陽性細胞がそのイニシエーションに係わっていることが判明している。さらに、この細胞が TCR $\alpha\beta$ を持っていない⁷⁾ことから特殊な subtype と考えている。これらの結果を考え合わせると、今後は、この CD 8 陽性細胞の機能分析、たとえば cytotoxic activity の有無の検討や、

cytokine による regulation の影響に対する検討を加える必要がある。

WKY ラットの感受性を考えるとき、その major histocompatibility (MHC) の違いによる免疫応答の差が考えられるが、RT 1 (ヒトの MHC に相当する) を検討すると、SHR (RT=k), F 344 (lvi), Lewis (l)SD でいずれの系でも病変に大きな差がない。WKY は SHR と同じ Wistar 系であり、しかもおなじ RT 1=k を持っていることから、RT 1 を介した免疫応答の差ではなく、むしろ上述の細胞の機能の違いと考えられる。この点に関しては、上述の CD 8 陽性細胞が TCR $\alpha\beta$ を持っていない点や、NK 細胞や LAK 細胞の可能性のあることから、糸球体内皮細胞と浸潤細胞の接着分子の発現を検討している (第21回免疫学会)。糸球体内皮細胞の ICAM-1 や class I 分子の発現の上昇、LFA-1 陽性細胞の浸潤をみており、この腎炎の障害機序の最初の段階にこれらの分子が大きく関与していることが考えられる。実際、接着分子の blocking study により蛋白尿の抑制、組織所見の改善をみている (論文準備中)。

以上の検討より、本モデルは、組織学的所見の類似性からヒトの半月体形成性腎炎 (急速進行性糸球体腎炎) のモデルとなりうると考えられる。本モデルにおける発症機序をさらに検討することにより、この種のヒト腎炎の治療、予防につながる

る機序が解明されるものと考える。

稿を終えるにあたり、モノクローナル抗体 RP-3 の hybridoma を提供して下さいました山形大学仙道教授に感謝致します。

なお、本論文の一部は第12回日本炎症学会総会、および第34回日本腎臓学会総会において発表した。

文 献

- 1) Masugi, M.: Über die experimentelle Glomerulonephritis durch das spezifische Antinierenserum. Ein Beitrag zur pathogenese der diffusen Glomerulonephritis. Beitr Pathol. 92: 426-466, 1934.
- 2) Wilson, C.B., Dixon, F.J.: The renal response to immunological injury. The Kidney 2nd ed. (ed. Brenner, B.M., Rector, F.C. Jr.), W.B. Saunders, Philadelphia, 1981, p 1237.
- 3) Holdsworth, S.R., Neale, T.J., Wilson, C.B.: Abrogation of macrophage-depleted injury in experimental glomerulonephritis in the rabbit. Use of antimacrophage serum. J. Lab. Clin. Med. 98: 195, 1981.
- 4) Tipping, P.G., Neale, T.J., Holdsworth, S.R.: T-lymphocyte participation in antibody-induced experimental glomerulonephritis. Kidney Int. 27: 530-537, 1985.
- 5) Kawasaki, K., Yaoita, E., Kihara, I., Yamamoto, T.: The depletion of CD 8 positive lymphocytes prevented glomerular injury and crescent formation in experimental anti-GBM glomerulonephritis. J. Am. Soc. Nephrol. (abstr.) 2: 548, 1991.
- 6) Granados, R., Mendrick, D.L., Rennke, H.G.: Antibody-induced crescent formation in WKY rats: Potential role of antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC) *in vivo*. Kidney Int. (abstr.) 37: 414, 1990.
- 7) Kawasaki, K., Yaoita, E., Yamamoto, T., Kihara, I.: Depletion of CD 8 positive cells prevents proteinuria and glomerular injury in nephrotoxic serum nephritis of WKY rat Kidney Int. (in press).