実験的糸球体腎炎における免疫複合体処理能の検討

川崎克俊・宮崎 滋・矢尾板永信・木原 達*

Role of macrophages and polymorphonuclear leukocytes via Fc receptors on degradation of preformed soluble immune complexes Preformed soluble immune complexes (ICs) of various sizes were incubated with peritoneal macrophages (Mφs) and polymorphonuclear leukocytes (PMNs) from control and nephritic rats at 37°C for 1hr to 24hr and the rate of ICs degradation was studied.

Immune complexes, being soluble in antigen excess of double, five and twenty times were made of either heterologous (rabbit) antibodies or homologous antibodies with ¹²⁵I-labeled BSA.

In control cells, the degradation rate by either Mφs or PMNs reached the maximum when poorly soluble ICs of double antigen excess were used, and lower level at ICs of 5 times antigen excess. ICs of 20 times antigen excess were almost nondigestible and there was no difference with the control (BSA + normal rabbit sera). Optimal cell number and antibody concentration were those of more than 5.0×10^6 cell/ml and the amount larger than 35.0 μg/ml antibodies, respectively. As expected, addition of fresh autoserum or guinea pig complement to the test tubes resulted a two-fold increase in the rate of the degradation.

When cells were tested from rats at various points in the course of glomerulonephritis, both Mφs and PMNs were shown to degrade ICs in the way as same as the control. There was no evidence of less ICs digestibility among cells from rats with the severest glomerulonephritis. While, less degradation was shown with ICs made of homologous antibodies when Mφs and PMNs from the control rats were incubated with, further study is necessary.

These observations indicate that PMNs do digest large quantities of ICs through their Fc receptors just as same as Mφs *in vitro*. The results were the same when the source of PMNs not only from the control rats but also from rats with severe glomerulonephritis was used.

Katsutoshi Kawasaki・Shigeru Miyazaki・Eishin Yaoita・Itaru Kihara

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

key words: glomerulonephritis, immune complex, degradation, phagocytes, Fc receptor

慢性血清病型腎炎モデルは、ヒトの腎疾患を理解するうえで有用なモデルであると考えられている¹⁻³⁾。流血中の免疫複合体 (CIC) の大部分は mononuclear phagocyte system (MPS) で処理されているといわれている^{4,5)}。

筆者らは、ラットに BSA (bovine serum albumin) を抗原として慢性血清病型腎炎を作らせた際⁶⁾、肝・肺に大量の IC の局在と多数の多形核白血球 (PMNs) 浸潤が顕微鏡上観察されること⁷⁾、autoradiography で PMNs の胞体内に IC が貪食されていること⁸⁾を示した (図 1)。これらの成績から MPS のみならず、流血中の白血球による IC の処理も重要と考えられる。そこで腎炎惹起過程における IC の処理能を腹腔滲出細胞 (PMNs, macrophages), および buffy coats を用いて

in vitro で検討を加えたので報告する。

方 法

(1) BSA 腎炎の作製

8 週齢の雄性 SHR (spontaneous hypertensive rats) ラット 25 匹に BSA 1mg を complete Freund's adjuvant で免疫し、8 週目より 12 週目まで連日 BSA 2mg を静注して腎炎を作製した⁶⁾ (図 2)。各週 (8~12 週) のはじめに、BSA 静注後 24 時間目に 5 匹ずつ屠殺して、各細胞および血液を採取し、血清分離し、実験に供した。control 群は、正常ラットを毎週各 3 匹ずつ屠殺し、細胞と血清を採取し行った。

(2) IC の作製

BSA を chloramine T 法により ¹²⁵I で標識し、家兎に BSA を complete Freund's adjuvant と免疫して

*新潟大学医学部付属腎研究施設病理形態学部門

図1 肝光顕オートラジオグラフィー

Kupffer 細胞に多量の銀粒子を認める (★) はか多形核白血球上にも銀粒子の取り込みがみられる (✓). 9 週実験群 (HE染色, $\times 400$)

図2 experimental protocol

1mg BSA/CFA で prime した後, 8 週目より12 週目まで BSA 2mg を連日静注して腎炎を作製した. 尿蛋白の出現を“up”で示した. 各週のはじめに各細胞, 血清を sampling した.

作製した抗体を用いて, 当量 (抗体量 = $35.0 \mu\text{g}/0.5 \text{ml}/\text{tube}$), 5 倍抗原過剰, 20 倍抗原過剰の IC を作製した. すべての実験は抗原量を一定 ($20 \mu\text{g}/0.5 \text{ml}/\text{tube}$) 下で行い, $10,000 \sim 20,000 \text{cpm}/\text{tube}$ になるよう ^{125}I -BSA の割合を調整した. 抗 BSA 抗体価は, 定量沈降反応法により, 親和性は ABC-33法により検討した.

一方, 腎炎惹起過程のラット血清を用いて, homologous IC を *in vitro* で同様に作製した. なお, IC の size は抗体価のもっとも高い9 週の血清で当量となるよう調整した. したがって, 他の週は抗原過剰の IC とするが, どの週も抗原量を一定にして作製した.

図3 incubation protocol

図4 IC の size の検討

(3) 細胞の調整

0.1% glycogen 刺激後, 4 時間目のラット腹腔より採取した non adherent cell を PMNs として, 4 日目の adherent cell を macrophages として用いた. また heparinize した血液から遠心して得られた buffy coat も実験に供した.

(4) IC の処理・測定

おのおのの細胞を $5.0 \times 10^6/\text{ml}$ に調整し, 作製した

図5 細胞数の検討

図6 至適濃度の検討

図7 補体の検討

IC と 0.5 ml ずつポリスチレンチューブに混合し, 37°C 恒温槽内で 1・3・6・9 (or 12)・24 時間 incubate した. incubate 後, Hanks 液で 2,000 rpm 20 分遠心して 3 回洗い, 細胞成分を沈渣として分離し, 上清に trichloroacetic acid を最終濃度 5.0% になるよう調整し, 再び 2,000 rpm 20 分遠心して 2 回洗った後, 上清と沈

渣を分離した. 各上清および沈渣中の ^{125}I のカウントを γ カウンターで測定後, 図 3 のごとく degradation の割合を計算し, degradation index とした. sampling はすべて triplicate で行い, 平均値で表示した.

結果

(1) IC の size の検討

図 4 に macrophages と PMNs の IC の処理能を示した. 両者とも当量の poorly soluble IC でもっとも高い degradation を示した. 24 時間では macrophages 26.5%, PMNs 37.2% で PMNs のほうがより高い傾向を示した. 5 倍抗原過剰の IC では, それぞれ 7.0%, 8.8%, 20 倍過剰では, 4.0%, 3.6% で degradation は IC の size すなわち lattice が小さくなるにつれて減少し, macrophages, PMNs の間にも差はなかった. なお, 抗体ではなく normal rabbit sera を等量入れて作製した control 群では, macrophages 2.9%, PMNs 3.5% と非常に低く, 20 倍抗原過剰 IC と同様の degradation を示した.

(2) 細胞数の検討

図 5 に PMNs の例を示した. $1.0 \times 10^5/\text{ml}$ 以下では有意な処理がみられなかったため, $5.0 \times 10^5/\text{ml}$ 以上の例を示した. dose dependency がみられるが, 5.0×10^6 と $1.5 \times 10^7/\text{ml}$ では有意差はみられなかった. なお, この実験も含めて cell viability は trypan blue dye exclusion test で 95% 以上で行った.

(3) 至適濃度の検討

当量の IC を用いて濃度を 10 倍ずつ段階希釈して, 抗体量に換算して $0.35 \mu\text{g}/\text{ml}$ ~ $350 \mu\text{g}/\text{ml}$ の幅で検討した. $0.35 \mu\text{g}$ 以下の希釈では, ^{125}I の濃度も下がり, 測定不能であった. 濃度の上昇につれ degradation は亢進し, $35.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ で最高値を示したが, さらに高濃度の $350 \mu\text{g}/\text{ml}$ では抑制を示した (図 6).

(4) 補体の検討

乾燥モルモット補体 (GPC) と autologous fresh sera を用いて当量 IC における degradation を検討した (図 7). GPC は lot により差を認めたが, 増強作用のある lot では autologous sera と同様に 2 倍程度の増強作用を示した.

(5) 腎炎惹起過程の各週の細胞における IC 処理の検討

macrophages の IC degradation は, 24 時間で 60 ~ 80% に達し, 10~11 週にやや高値の傾向を認めた (図 8). control 群は normal rat に IC を取り込ませたもので, 各週とも control 群と大きな差は認めず, 十分な処理能を示した.

なお, IC は当量の poorly soluble IC の degradation を図示してある. PMNs では 24 時間で 60% 前後の

図 8 腹腔 macrophages における IC 処理能の検討
家兎抗 BSA 抗体による IC を用いた例、各週の細胞とも著明な degradation を示している。

図 9 多形核白血球の IC 処理能の検討
家兎抗 BSA 抗体による IC を用いた例、どの週も著明な degradation を示している。

degradation を示し、やはり 10~11 週でやや高値の傾向を示したが、各週間の差は認められなかった (図 9)。buffy coat は macrophages PMNs にくらべ degradation は低く 24 時間で 25~50% の値を示した (図 10)。

(6) 腎炎惹起過程の各週の血清による IC 処理能の検討

図 10 buffy coat における IC 処理能の検討
家兎抗 BSA 抗体による IC を用いた例、PMNs macrophages にくらべ、degradation は低い傾向にあるが、週ごとに大きな差はない。

図 11 多形核白血球における IC 処理能の検討
各週の homologous sera を用いて、normal rat の IC degradation を測定した例。家兎抗体を用いた IC にくらべ、degradation は著明に低い。

ラットの homologous sera による IC を用いた系では、正常ラットの degradation を各週の IC を加えてみたが、図 11 に示すように、どの週も低く 9 週目では当量 IC にもかかわらず、20% 程度にとどまった。この傾向は、macrophages, buffy coat にもみられた。また、各週で IC の size が異なるにもかかわらず、週による差を見いだせなかった。

考 按

従来より流血中の IC の処理には、MPS が主体的に役割を演じていると考えられ、PMNs の役割については、いまだ報告が少ない。

筆者らは、慢性血清病型腎炎モデルにおいて PMNs の関与を *in vivo*^{7,8)} で検討してきたが、今回 *in vitro* においても macrophages と同様の IC 処理能を有してい

ることを呈示することができた。

すなわち、腎炎惹起過程の各週においても、PMNのIC処理能は十分に保たれており、低下は見出せなかった。これはPMNsの骨髓からの動員能とturn overの早さを反映するものであり、連日の抗原投与においても、ICを十分処理し、しかもその割合は、従来よりいわれてきたMPSのIC処理に匹敵するレベルを維持しているものと思われる。さらに、流血中にあるmonocyteとPMNsの比を考えるとPMNsによる処理は大きいものと考えられる。

一方、腹腔 macrophage も、PMNsに比べ生体内におけるturn overがながいにもかかわらず、各週で十分なIC処理能を示しており、Fcレセプター(FcR)の十分な機能が保たれていることを示している。西ら⁹⁾は、Rosette formationにより肝のKupffer cellのFcRとC₃レセプター(C₃R)機能を検討しているが、IC暴露後2時間でreceptor activityは最低となっているが、6時間目ですでに回復傾向を示し、24時間目には80%程度に回復していることより、筆者の実験系でもBSA静注後、24時間目に採取したmacrophagesの*in vitro*でのIC処理能は十分保たれていることを証拠づけるものと考えられる。

食細胞のICの処理能は、従来よりFcR¹⁰⁻¹⁵⁾とC₃R¹⁶⁻¹⁹⁾を介すると考えられている。GPCと新鮮ラット血清によるICのdegradation増強作用がある場合を示したが、*in vivo*でICの処理が補体で増強されない報告^{13,20)}や、*in vitro*でもstimulated macrophagesでは補体による増強作用がみられない場合²¹⁾も存在することが知られており、今回は、腎炎におけるIC処理能をみる系では、FcRの関与のみにしぼって行った。

preliminaryの検討で当量、5倍、20倍抗原過剰のICの3段階でdegradationを調べたが、腎炎の存在下では、光顕による細胞内沈着物の観察、電顕上dense depositsの観察結果から、*in vivo*ではpoorly soluble～insoluble ICが組織内に生じていることが考えられ、degradationの割合も高かった点を考慮し、今回はpoorly solubleのICで腎炎惹起過程のIC処理能を検討した。このICのsizeは、HawkinsとPeetersの報告²²⁾にもあるように、白血球からのenzyme releaseがもっとも効果的に起こるsizeであり、処理をみるうえでよいmarkerと考えられる。

*in vivo*では、肝・肺のICの分布が腎炎惹起過程の早期に強く起こる²³⁾ので、PMNs, macrophagesのほか、組織固着 macrophagesの処理能の検討も必要であろう。Dahaとvan Es²⁴⁾は*in vitro*でmonocyteにくらべ、peritoneal macrophageとKupffer cellが10倍もICのdegradationが高いことを報告している。しかも、補体の影響については、分離したKupffer cell

の場合、fresh seraで抑制され、40時間のincubate後では、C₃bRが再び表出され、はじめて補体レセプターを介する処理が亢進すると報告している。腎炎惹起過程で検討の必要を感じる興味ぶかい報告である。

今回の実験では、homologous ICを用いたIC degradationが非常に低く、有意な貪食能を示しえなかった。濃度の検討に問題がある可能性があるが、10倍濃縮ICを用いても同様の結果を得た。これは家兎抗BSA抗体にくらべ、ラットの抗体では抗体価・親和性が低いことによりdegradationをみるうえでの最適のICを作製できなかった可能性が強い。この点に関しては、さらにICの量、sizeなど性状の再検討が必要であると考えている。さらに、BSA静注直後の循環中にあるICを取りだし、実験に用いる方法も考慮中である。

なお、本研究の一部は文部省昭和60年度科学研究費補助金(奨励研究(A))No. 60770266により行った。

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: 257-282, 1953.
- 2) Dixon, F.J., Feldman, J.D., Vazquez, J.H.: Experimental glomerulonephritis: The pathogenesis of a laboratory model resembling the spectrum of human glomerulonephritis. *J. exp. Med.* 113: 899-920, 1961.
- 3) Brentjens, J.R., O'Connell, D., Albini, B., Andres, G.A.: Experimental chronic serum sickness in rabbits that received daily multiple and high dose of antigen: a systemic disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 254: 603-613, 1975.
- 4) Haakenstad, A.O., Mannik, M.: Saturation of the reticuloendothelial system with soluble immune complexes. *J. Immunol.* 112: 1939-1948, 1974.
- 5) Hoffsten, P.E., Sverdin, A., Bartel, M., Hill, C.L., Venverloh, J., Brotherson, K., Klahr, S.: Reticuloendothelial and mesangial function in murine immune complex glomerulonephritis. *Kidney Int.* 15: 144-159, 1979.
- 6) Yamamoto, T., Kihara, I., Morita, T., Oite, T.: Bovine serum albumin (BSA) nephritis in rats. I. Experimental model. *Acta Pathol. Jpn.* 28: 859-866, 1978.
- 7) Miyazaki, S., Kawasaki, K., Yaoita, E., Yamamoto, T., Kihara, I.: Bovine serum albumin nephritis in rats. V. Kinetic studies of antigen localization in various organs and the phagocytic role of polymorphonuclear leukocytes. *Am. J. Pathol.* 119: 412-419, 1985.
- 8) Kawasaki, K., Miyazaki, S., Yamamoto, T., Kihara, I.: Identification and quantitation of cells that process immune complexes in ne-

- phritic rats induced with bovine serum albumin J. Leukocyte Biol.(in press)
- 9) Nishi, T., Bhan, A.K., Collins, A.B., McCluskey, R.T.: Effect of circulating immune complexes on Fc and C3 receptors of Kupffer cells *in vivo*. Lab. Invest. 44: 442, 1981.
 - 10) Berken, A., Benacerraf, B.: Properties of antibodies cytophilic for macrophages. J. exp. Med. 123: 119, 1966.
 - 11) Messner, R.P., Jelinek, J.G.: Receptors for human γ G globulin on human neutrophils. J. clin. Invest. 49: 2165, 1970.
 - 12) Phillips-Quagliata, J.M., Levine, B.B., Quagliata, F., Uhr, J.W.: Mechanisms underlying binding of immune complexes to macrophages. J. exp. Med. 133: 589, 1971.
 - 13) Arend, W.P., Mannik, M.: *In vitro* adherence of soluble immune complexes to macrophages. J. exp. Med. 136: 514, 1972.
 - 14) Leslie, R.G.Q., Alexander, M.D., Cohen, S.: Binding of immune complexes of guinea pig IgG2 to homologous exudate cells. Eur. J. Immunol. 6: 841, 1977.
 - 15) Knuston, D.W., Kijlstra, A., van Es, L.A.: Association and dissociation of aggregated IgG from rat peritoneal macrophages. J. exp. Med. 145: 1368, 1977.
 - 16) Lay, W.H., Nussenzweig, V.: Receptors for complement on leucocytes. J. exp. Med. 128: 991, 1968.
 - 17) Huber, H., Fudenberg, H.H.: The interaction of monocytes and macrophages with immunoglobulins and complement. Ser. Haematol. 2: 160, 1970.
 - 18) Mantovani, B., Rabinovitch, M., Nussenzweig, V.: Phagocytosis of immune complexes by macrophages. J. exp. Med. 135: 780, 1972.
 - 19) Kijlstra, A., van Es, L.A., Daha, M.R.: Enhanced degradation of soluble immunoglobulin aggregated by macrophages in the presence of complement. Immunology 37: 673, 1979.
 - 20) Arend, W.P., Mannik, M.: Studies on antigen-antibody complexes. II. Quantification of tissue uptake of soluble complexes in normal and complement-depleted rabbits. J. Immunol. 107: 63-75, 1971.
 - 21) Daha, M.R., van Es, L.A.: Complement-dependent inhibition of degradation of soluble immune complexes and immunoglobulin aggregates by thioglycollate-stimulated peritoneal macrophages. Immunology 50: 107, 1983.
 - 22) Hawkins, D., Peeters, S.: The response of polymorphonuclear leukocytes to immune complexes *in vitro*. Lab. Invest. 24: 483, 1971.
 - 23) Miyazaki, S., Kawasaki, K., Yaoita, E., Yamamoto, T., Kihara, I.: Bovine serum albumin (BSA) nephritis in rats: III. Antigen distribution in various organs. Clin. exp. Immunol. 59: 293-299, 1985.
 - 24) Daha, M.R. van Es, L.A.: Fc and complement receptor-dependent degradation of soluble immune complexes and stable immunoglobulin aggregates by guinea pig monocytes, peritoneal macrophages, and Kupffer cells. J. Leukocyte Biol. 36: 569-579, 1984.