MRL/l マウスにおける自然発症腎炎に及ぼす MS-932 の効果

藤沢 広・吉田博次・柴田芳久*¹⁾、佐藤 茂*²⁾、安倍千之・広瀬俊一・塩川優一*³⁾

Effect of MS-932 on glomerular lesions in MRL/l mice We examined the effect of MS-932(p-acetylamino phenylacetic acid) on the development of glomerular lesions and lymphoma for which abnormalities of immunological functions are responsible in MRL/l mice. MS-932 was administered orally 6 times a week from 8 to 20 weeks of age. MS-932 at doses of 3, 10, 30 and 100 mg/kg suppressed the development of proteinuria, and at a dose of 3 mg/kg, it lowered the level of increased BUN. MS-932 at doses of 1, 3, 30 and 100 mg/kg suppressed the spontaneous production of anti-dsDNA antibodies in the serum. By the histopathological examination of kidneys, it was found that MS-932 at doses from 1 to 100 mg/kg reduced the glomerular lesions. The immunofluorescence studies revealed that IgG deposition in the glomerular capillary membrane and mesangium was slightly reduced by the treatment of MS-932. Furthermore MS-932 at doses of 1, 10 and 30 mg/kg suppressed the enlargement of cervical lymph nodes. Such effects caused by MS-932 might be due to the results of the improvement of disordered immunoregulatory system in MRL/l mice.

Hiroshi Fujisawa・Hirotugu Yoshida・Yoshihisa Shibata*¹⁾

Shigeru Sato*²⁾, Chiyuki Abe・Shun-ichi Hirose・Yuichi Shiokawa*³⁾

*¹⁾ Research Laboratories, Nippon Shinyaku Co., Ltd.

*²⁾ Bioscience Laboratories, Mitsubishi Chemical Industries, Ltd.

*³⁾ Department of Medicine and Rheumatology, Juntendo University School of Medicine

key words: MRL/l mouse, MS-932, glomerular lesion, lymphoma

p-acetylamino phenylacetic acid(MS-932)は、抗リウマチ剤として開発された化合物である(図1)。MS-932は、ラットアジュバント関節炎における2次炎症に対して抑制作用を示した¹⁾。また、自然発症自己免疫疾患モデルマウスの一つであるMRL/lマウスにおいて、その関節病変に対し治療効果を示すことについては、すでに報告した²⁾。一方、MS-932はアジュバント関節炎における1次炎症に対して、抑制作用を示さず、また、ラットカラゲニン足浮腫などの急性炎症モデルにおいて、いわゆる抗炎症作用を示さなかった¹⁾。さらに、本化合物には、種々の免疫応答モデルにおいて、免疫機能を改善する作用のあることが認められている^{1,3)}。

以上、MS-932は、免疫系に作用し、免疫機能の異常を改善することが示唆された。そこで今回筆者らは、この点をより明確にするため、MRL/lマウスを用い、免疫異常により惹起するといわれている腎病変、およびリンパ節腫大に対する作用を検討したので報告する。

図1 chemical structure of MS-932

方法

(1) 動物

Jackson 研究所より購入し、日本新薬中央研究所で繁殖、飼育した雄性MRL/MpJ-*lpr/lpr* (MRL/l) マウスを使用した。

(2) 被験薬投与

MS-932を蒸留水に溶解あるいは懸濁し、MRL/lマウスに8週齢より20週齢まで12週間、1日1回、1週6回経口投与した。

(3) 測定項目

① 尿蛋白：尿蛋白をプロテインプレテスト®(和光純薬)で測定し、一〜卅(それぞれプロテインプレテストで30以下, 100, 300, および1,000 mg/dl以上)の尿蛋白値を示したもの)の4段階にわけてスコアリングした。

② 血中尿素窒素(BUN)：20週齢時に得られた血清について、BUNをウレアーゼ・インドフェノール法で

*¹⁾ 日本新薬株式会社中央研究所

*²⁾ 三菱化成工業株式会社総合研究所生化研究所

*³⁾ 順天堂大学医学部膠原病内科学教室

図2 effect of MS-932 on the development of proteinuria in MRL/l mice

The ordinate is expressed as % of animals which showed proteinuria assessed from the severity (—, +, ++, +++). The columns show the doses of MS-932 at the ages.

significantly different from controls, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ (RIDIT analysis). For further explanations see text.

測定した。

③ 血中抗 dsDNA(double stranded DNA)抗体価：血中抗 dsDNA 抗体価については、眼窩静脈洞より採血して得られた血清を用いて、radioimmunoassay により測定した。

④ 病理組織学的検査：20週齢時に剖検を行い、腎を10%中性緩衝ホルマリンに固定した後、常法に従い、パラフィン包埋し、HE染色を施し検鏡した。糸球体病変の検索については、WHOの光顕的診断基準⁴⁾にほぼ準じて分類を行った。また、蛍光抗体法により、腎糸球体へのIgG, IgMおよびC3の沈着を観察した。

⑤ リンパ節腫大：頸部リンパ節の腫大度を触診により、下記の基準に従って判定し、スコアリングした。

- ：腫大のまったく認められなかったもの
- ＋：触診により明らかに腫大の認められたもの
- ++：肉眼的に腫大の認められたもの
- +++：肉眼的に明らかに腫大の認められたもの

(4) 統計学的解析

得られたデータの処理については、その種類により、Studentのt-testあるいはRIDIT解析を用いて行った。

成績

(1) 尿蛋白の増加に対する作用

腎炎の発症に伴う尿蛋白の増加に対するMS-932の効

表1 effect of MS-932 on BUN in MRL/l mice

drug		MS-932					
dose(mg/kg)		0	1	3	10	30	100
N		22	22	21	23	18	19
BUN (mg/dl)	mean	72	57	50*	50	61	57
	±SE	±8	±8	±7	±8	±11	±7

BUN was determined by the urease-indophenol method at 20 weeks of age.

*: Significantly different from control at $P < 0.05$ (Student's t-test)

果を検討した(図2)。この結果、MS-932は、尿蛋白の出現を抑制する作用のあることが示された。特に16週齢では、3, 10, 30, および100 mg/kg投与群において、また、20週齢では、3, および10 mg/kg投与群において、有意の($P < 0.01$ または $P < 0.05$)抑制作用が認められた。

(2) BUN値の上昇に対する作用

MS-932は、20週齢におけるBUN値の上昇を、3 mg/kg投与群において有意に($P < 0.05$)低下させ、また1, 10, 30, および100 mg/kg投与群においても低下させる傾向を示した(表1)。

(3) 血中抗 dsDNA 抗体価に対する作用

MS-932の血中抗 dsDNA 抗体価に対する作用を図3

図3 effect of MS-932 on the development of anti-dsDNA antibodies in MRL/l mice
The serum level of anti-dsDNA antibodies is expressed as % of mean of control at the ages.
significantly different from controls, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ (Student's t-test)

表2 effect of MS-932 on the glomerular lesions in the histopathological and immunofluorescence studies

group	dose (mg/kg)	glomerular lesions	types of glomerular lesions*1)				immuno- fluorescence*2)		
		positive/tested (%)	I	II	III	IV	IgG	IgM	C3
control	0	24/24 (100)	5	5	7	7	++	++	++
MS-932	1	20/23 (87)	4	7	6	3*	++	+	+
	3	19/23 (83)	4	6	7	2*	++	+	++
	10	21/24 (88)	4	6	9	2*	++	++	+
	30	18/22 (82)	4	4	7	3*	++	++	++
	100	21/23 (91)	6	6	5	4*	++	++	++

*1) Glomerulous lesions were divided into 4 classes(I : proliferative. II : membranoproliferative. III : membranous. IV : sclerosing).

*2) The degree of deposition of IgG, IgM and C3 was assessed from the severity (+ : slight deposit. ++ : moderate deposit. +++ : marked deposit).

* significantly different from control at $P < 0.05$ (RIDIT analysis)

に示した。縦軸の血中抗 dsDNA 量は、control 群における抗 dsDNA 抗体価の平均値を 100%とした場合の相対量で示した。12 週齢において、1, 3, 30, および 100 mg/kg 投与群で血中抗 dsDNA 抗体価の有意な ($P <$

0.01または $P < 0.05$)低下作用が認められた。また、20 週齢においては、1 および 3 mg/kg 投与群で 35~40% の低下傾向が認められた。

(4) 病理組織学的検討

図4 renal glomerulous at 20 weeks of age in MRL/l mice
a: control (HE, ×33)
b: MS-932 10 mg/kg (HE, ×33)

図5 effect of MS-932 on the development of lymphoproliferation in MRL/l mice

The ordinate is expressed as % of animals which showed lymphoproliferation assessed from the severity(—, +, ++, +++). The columns show the doses of MS-932 at the ages. significantly different from controls, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ (RIDIT analysis)

腎の糸球体病変に対する MS-932 の効果を, 病理組織学的に検討した(表 2, 図 4)。

control 群においては, 24 例全例に糸球体病変が認められたが, MS-932 投与群においては, 糸球体病変の発症率が低下する傾向が認められた。また, この糸球体病変を四つのタイプ, すなわち, 軽度の増殖性病変の認め

られるものを type I, 膜性増殖性病変の認められるものを type II, 膜性病変の認められるものを type III, および硬化病変の認められるものを type IV として, 4 段階のグレードにわけて評価した。この結果, MS-932 には各用量群において, 糸球体病変の有意な ($P < 0.05$) 軽減作用が認められた。

つぎに、蛍光抗体法により、腎の糸球体への IgG, IgM, および C3 の沈着に対する MS-932 の作用を検討したところ、MS-932 投与群においては、IgG 沈着がやや弱い傾向にあった。なお、データとしては示していないが、蛍光抗体法における発光部位がメサンギウム細胞と内皮下であることを、電子顕微鏡により確認した。

(5) 頸部リンパ節腫大に対する作用

図 5 に、MS-932 の頸部リンパ節腫大に対する作用を示した。MS-932 は、加齢とともに認められる頸部リンパ節腫大を抑制する作用のあることが示された。特に16週齢では、1, 10, および 30 mg/kg 投与群において、また、20週齢では、1 mg/kg 投与群において、有意の ($P < 0.01$ または $P < 0.05$) 抑制作用が認められた。

データには示していないが、20週齢における病理解剖学的検査でも、1 mg/kg 投与群において頸部リンパ節、腋窩リンパ節および腸間膜リンパ節の総重量の有意な減少が認められた。

考 察

MRL/l マウスは、Murphy & Roths⁵⁾ によって、AKR/J, C57BL/6J, C3H/Di, および LG/J の交配から純系化されたマウスで、ヒトの全身エリテマトーデス、特にループス腎炎に類似の疾患を自然発症する。また、ヒト慢性関節リウマチ (RA) 類似の所見も認められる⁶⁻⁹⁾。MRL/l マウスの第1の病理学的特徴は、急性ないし亜急性の腎炎である。MRL/l マウスの腎糸球体には、16~20週齢で、IgG クラスの抗体による免疫複合体が検出されるようになる¹⁰⁾。MRL/l マウスの死因の多くは、腎不全とされている。今回の実験においても、16週齢ころより尿蛋白が認められ、20週齢では約50%のマウスが重篤な蛋白尿を呈した。

MRL/l マウスの病理学的特徴として、つぎに全身性リンパ節腫大があげられる。今回の実験において、12週齢ですでに約50%のマウスに頸部リンパ節腫大が認められ、加齢とともに増加した。これは、白木らの報告¹⁰⁾と一致するところである。

この MRL/l マウスに、MS-932 を8週齢より20週齢まで長期連投することにより、尿蛋白の出現が抑制された。また、20週齢時における BUN 値の上昇を抑制した。血中抗 dsDNA 抗体価の上昇の抑制も認められた。病理組織学的にも腎炎の軽減が認められており、さらに蛍光抗体法により、腎の糸球体への IgG 沈着の軽減傾向も認められた。また MS-932 の投与により、頸部リンパ節腫大が抑制された。

MS-932 は、いわゆる抗炎症作用を有しないことも考え合わせると、今回の成績より、MS-932 は、MRL/l マウスにおける腎病変を中心とした免疫異常に対し、なんらかの免疫学的機序により、その発症を抑制する作用の

あることが示された。

ところで、MRL/l マウスでは interleukin-2 (IL-2) 産生能および IL-2 に対する反応性が低下していることが知られている^{11,12)}。また、MS-932 には MRL/l マウスにおける低下した IL-2 産生能を回復させる作用が認められている¹³⁾。これらのことから、MS-932 の MRL/l マウスにおける疾患発症に対する作用には、IL-2 が関与している可能性が示唆されており、これら作用機序に関しては、今後の検討課題と思われる。

結 論

抗リウマチ剤として開発された MS-932 の、MRL/l マウスにおける作用を腎病変を中心として検討し、つぎの結果を得た。

- ① 腎炎に伴う尿蛋白の出現を抑制した。
- ② 上昇した BUN 値を低下させた。
- ③ 血中抗 dsDNA 抗体価のレベルを低下させた。
- ④ 病理組織学的検討において、糸球体病変の軽減作用が認められた。また、蛍光抗体法による検討において、腎の糸球体への IgG 沈着が、やや軽減される傾向が認められた。
- ⑤ 頸部リンパ節腫大を抑制した。

文 献

- 1) 佐藤 茂, 柴田芳久: 未発表データ。
- 2) 吉田博次, 柴田芳久, 安倍千之: MRL/l マウス自然発症関節炎におよぼす MS-932 の効果。第29回日本リウマチ学会総会抄録(福岡), 1985, p 140。
- 3) 西村健志, 小野尚彦, 小松靖弘, 安倍千之, 広瀬俊一: Influenza virus hemagglutinin が誘導する IV 型アレルギー反応と IL-2 および免疫調節剤 MS-932 第14回日本免疫学会総会記録(大阪), 1984, p 432。
- 4) 坂口 弘: 糸球体疾患の分類。日本臨床 42:1246-1247, 1984。
- 5) Murphy, E.D., Roths, J.B.: Autoimmunity and lymphoproliferation: Induction by mutant gene *lpr*, and acceleration by a male-associated factor in strain BXSB mice. "Genetic control of autoimmune disease". ed. Rose, N.R., Bigazzi, P.E., Werner, N.L., Elsevier North-Holland Inc., New York, 1978, p 207-221。
- 6) Andrews, B.S., Eisenberg, R.A., Theofilopoulos, A.N., Izui, S., Wilson, C.B., McConahey, P.J., Murphy, E.D., Roths, J.B., Dixon, F.J.: Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. J. Exp. Med. 148: 1198-1215, 1978。
- 7) Abe, C., Mitsunaga, K., Shiokawa, Y.: Spontaneous polyarthritis in MRL/l mice. The Ryumachi 20: 233-239, 1980。

- 8) 安倍千之, 塩川優一: 関節炎自然発症モデル MRL/l, MRL/n の対比研究. 第26回日本リウマチ学会抄録(岡山), 1982, p 162.
- 9) Hang, L., Theofilopoulos, A.N., Dixon, F.J.: A spontaneous rheumatoid arthritis-like disease in MRL/l mice. J. Exp. Med. 155: 1690-1701, 1982.
- 10) 白木正紀, 片桐拓也, 藤原道夫: ヒト SLE のモデル動物としての MRL/l マウス. 臨床免疫 15 (suppl. 7): 15-25, 1983.
- 11) Altman, A., Theofilopoulos, A.N., Weiner, R., Katz, D.H., Dixon, F.J.: Analysis of T cell function in autoimmune murine strains, Defects in production of and responsiveness to interleukin 2. J. Exp. Med. 154: 791-808, 1981.
- 12) Wofsy, D., Murphy, E.D., Roths, J.B., Dauphinee, M.J., Kipper, S.B., Talal, N.: Deficient interleukin 2 activity in MRL/Mp and C57BL/6J mice bearing the *lpr* gene. J. Exp. Med. 154: 1671-1680, 1981.
- 13) 塩川優一, 安倍千之: 免疫療法の新しい展開—インターロイキン-2をめぐって—, IL-2 の誘導物質. 第5回日本炎症学会シンポジウム(東京), 1984.