

ラット加速型馬杉腎炎における補体の役割

古 川 猛

信州大学医学部第2内科学教室
(主任: 古田 精市教授)

The Role of Complement in the Development of Accelerated Masugi Nephritis in Rats Takeshi FURUKAWA

*Department of Internal Medicine, Shinshu University School of Medicine
(Director: Prof. Seiichi FURUTA)*

To elucidate the role of complement in the development of nephritis, accelerated Masugi nephritis was produced experimentally in rats and the anticomplementary agent, FUT-175, was given to these rats to see if there is any inhibitory effect on the outcome of the nephritis.

Proteinuria, and kidney lesions such as glomerular cell proliferation, crescent formation, glomerular depositions of fibrin, rat IgG and duck nephrotoxin were found to be gradually alleviated when the rats were given a dose of 25mg/kg of FUT-175, twice daily from day -1 to day 14 after nephrotoxin administration. With administration of FUT-175, the depressed serum level of functional complement activity measured by CH_{50} was ameliorated, and the glomerular deposition of C3 was reduced in this experimental nephritis. When the rats were given a dose of 25mg/kg of FUT-175 once before nephrotoxin administration, the same results as described above were found at day 2, with the exception of the crescent formation, the glomerular deposition of rat IgG and the level of CH_{50} , but the reduction in glomerular deposition of nephrotoxin was observed only at day 14.

These results indicate that the inhibition of the complement activity by FUT-175 reduced the severity of the glomerular injury in accelerated Masugi nephritis. The reduction in glomerular deposition of nephrotoxin, which was related to the mitigation of glomerular injury in the early phase, did not alleviate the glomerular damage in the following phase without the continuous inhibition of the complement activity. *Shinshu Med. J.*, 36: 217-230, 1988

(Received for publication November 5, 1987)

Key words: complement, accelerated Masugi nephritis, FUT-175

補体, 加速型馬杉腎炎, FUT-175

I 緒 言

補体系がヒト糸球体腎炎の発症に関与していることは、ある種の糸球体腎炎で血清補体価の低下が認められ、また腎生検組織で補体成分の沈着がみられること

などの事実より明らかである¹⁾⁻⁴⁾。一方、腎炎モデルの馬杉腎炎でも補体が腎糸球体に沈着しており、腎炎発症・進展に補体に関与する可能性が述べられ⁵⁾、その第一相(投与する異種抗腎抗体によっておこる糸球体障害)は補体依存性の糸球体障害と報告されてい

る6)-8)。馬杉腎炎の第二相（投与した異種グロブリンに対する宿主の抗体産生によっておこる糸球体障害）についても血清補体価の低下や糸球体への補体沈着が認められることから、腎炎発症に補体関与していることが指摘されている9)10)。しかしながら、補体非依存性の糸球体障害との報告もあり11)12)、いまだ第二相の補体の役割は明らかになっていない。

最近藤井らにより開発された蛋白分解酵素阻害剤6-amidino-2-naphthyl 4-guanidino-benzoate (FUT-175) が、補体の classical pathway と alternative pathway の両方の初期段階で働く蛋白分解酵素を強力に阻害することが報告された13)14)。そこで著者は馬杉腎炎第一相をおこすことなく第二相を発症するタイプのモデルとして、抗ラット腎アヒル血清（以下 NDS と略）をラットに投与し、加速型馬杉腎炎を作製した。そして FUT-175 の連日投与で得られる長期の補体系作動抑制状態が、馬杉腎炎第二相の発症・進展に与える効果を調べ、第二相における補体の役割を検討したので報告する。

II 材料と方法

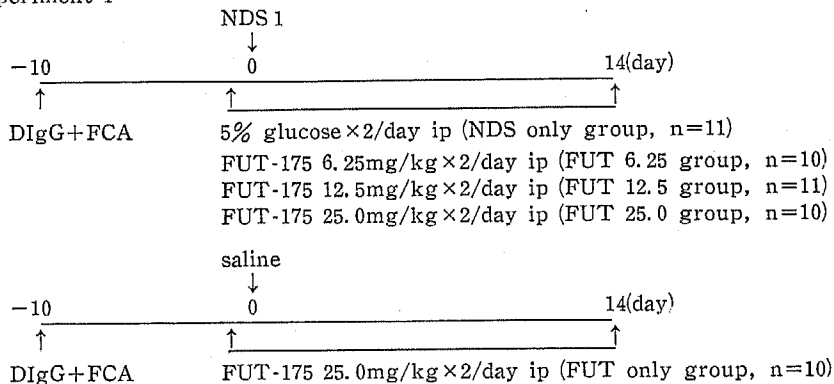
A 実験動物：6週齢のウィスター系雄ラット（静岡県実験動物協同組合）を91頭用いた。

B NDS の作製：Shibata らの方法¹⁵⁾に従って NDS の作製をおこなった。すなわち、ステンレスメッシュによるシービング法で、灌流したラット腎の皮質から糸球体を単離した。超音波破碎処理された単離糸球体を抗原として等容量の Freund's complete adjuvant（以下 FCA と略）（ヤマトンKK）とともに免疫し、2羽のアヒルより得られた NDS をおのおの NDS1, NDS2 とし、以下の実験に供した。

C アヒル IgG の作製：フェリチン 5mg (Cd free, ICN Pharmaceuticals Inc.) と FCA とともに2週間ごとに4回免疫したアヒルより採取した血液を血清分離後56°C, 30分間保温し、硫酸塩析法（33%飽和）にて IgG を精製した。

D 実験計画(図1)：長期の補体抑制状態を作製するため、FUT-175連日投与の実験と、第二相の発症早期

Experiment 1



Experiment 2

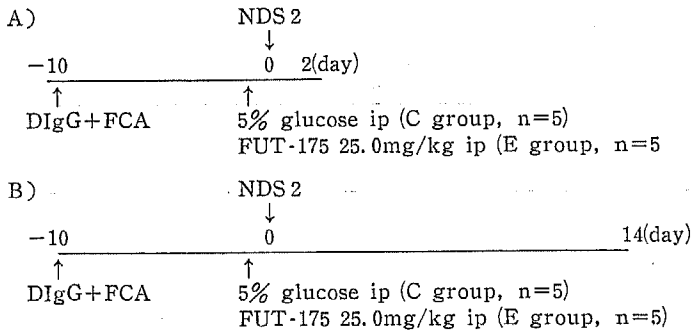


Fig. 1 Experiment protocol

DIgG: Duck IgG, FCA: Freund's complete adjuvant, NDS: Nephrotoxic duck serum

の補体の役割を検討するため、FUT-175 1回投与の実験を行った。使用した NDS1, NDS2 は、アヒル IgG 4mg を等量の FCA とともに前免疫したラットに投与後、14日目の時点で1日約500mgの蛋白尿を惹起させるように調節して、おのおの投与量を決定した。この NDS の投与量は単独でラットに静注しても有意な蛋白尿を、14日間は生じない用量であった。

1 実験1：前免疫としてアヒル IgG 4mg を等量の FCA とともにラット足蹠と背部皮下に分注した。10日後、NDS 1 を静脈内に0.6ml、腹腔内に0.2ml 投与した。FUT-175 は NDS 1 投与30分前より NDS 1 投与14日目の屠殺5時間前まで、1日2回腹腔内に投与した。FUT-175の1回投与量により、ラットを6.25 mg/kg投与群 (n=10), 12.5mg/kg 投与群 (n=11), 25.0mg/kg投与群 (n=10) (以下おのおの FUT 6.25 群, FUT12.5群, FUT25.0群と略) の3群に分けた。FUT-175のかわりに5%ブドウ糖を投与した群 (n=11) (以下 NDS only 群と略) と、NDS 1のかわりに生食を投与し、FUT-175 は1回投与量25.0mg/kg 投与した群 (n=10) (以下FUT only 群と略)、および無処置の正常ラット (正常群) を対照とした。

2 実験2：実験1と同様に前免疫した後、10日目にFUT-175 25.0mg/kg (n=10) (以下E群と略) 又は5%ブドウ糖 (n=10) (以下C群と略) を腹腔内に1回のみ投与し、その30分後に NDS 2 を静脈内に0.3 ml、腹腔内に0.2ml投与した。NDS 2 投与後2日目と14日目におのおの半数を屠殺した。

E 尿蛋白検査：連日代謝ケージで24時間蓄尿をし、Kingsbury-Clark 法¹⁶⁾により尿蛋白定量を行った。

F 血液検査：FUT-175 の最終投与後約5時間でネンブタール麻酔下に屠殺し、腹部大動脈より血液を採取し、総蛋白 [T.P. (ビウレット法)], アルブミン [Alb (免疫拡散法)], BUN (ウレアーゼ UV 法), クレアチニン [Cr (アルカリピクリン酸法)], 血清補体価 [CH₅₀ (メイヤー法)] を測定した。

G FUT-175の血中濃度：腹腔内投与法によるFUT-175 の血中濃度は、本剤のトリプシン阻害作用を応用した微量定量法¹⁷⁾により測定した。FUT-175 10mg/kg を腹腔内投与すると、血中濃度は15分で870.7±406.6ng/ml, 30分で440.3±100.5ng/ml, 60分で138.0±17.4ng/ml, 120分で17.3±2.9ng/ml, 240分で6.3±4.0ng/ml であった。その結果 FUT 25.0群では補体の classical pathway の活性化を約4時間、alternative pathway の活性化を約1時間阻害できる有効血中濃度¹³⁾¹⁴⁾が得られた。

H 糸球体光顕観察：摘出腎を10%ホルマリンで固定後、パラフィン包埋し、3μm の切片を作製、ヘマトキシリン・エオジン染色、過沃素酸シッフ染色 (PAS), リンタングステン酸ヘマトキシリン染色を行った。組織学的評価は光学顕微鏡により、各組織標本中50個の糸球体について、細胞増生、フィブリン沈着、半月体形成の3つのパラメーターについて行った。細胞増生は1切片1糸球体あたりの細胞核数として表した。フィブリン沈着の程度を、まったくないもの0点、1—2箇所に限るもの1点、3箇所以上のもの2点とし、半月体形成の程度を、まったくないもの0点、半周以下のもの1点、半周以上のもの2点として、それぞれ半定量法的に評価した。

I 蛍光抗体法による糸球体観察：OCT-Compound (Lab-Tek) に包埋した腎組織をアセトン—ドライアイスで冷やした n-ヘキサン中で瞬間凍結した。厚さ4—5μmの凍結切片を蛍光抗体直接法により、FITC 標識抗ラット IgG ヤギ IgG (Cappel), FITC 標識抗ラット C 3 ヤギ IgG (Cappel), FITC 標識抗ラットフィブリノーゲンヤギ IgG (Cappel), FITC 標識抗アヒル免疫グロブリンウサギ IgG (Nordic) とそれぞれ反応させ、落射型蛍光顕微鏡 Orthoplan (Leitz) で観察した。蛍光染色の強さと分布の程度を—++ までの5段階に分けて評価した。

J 糸球体電顕観察：腎組織を1mm角に細切し、2.5%グルタルアルデヒドに浸漬固定、1%オスミウム酸で後固定後、Epon 812 に包埋した。ウルトラミクロームにて超薄切片を作製し、酢酸ウランとクエン酸鉛の二重染色をおこない、透過型電子顕微鏡 (日立 HS-8) で観察した。実験1の NDS only 群, FUT 25.0群と、実験2の各群における糸球体上皮下沈着物¹⁸⁾を中心に観察した。

K 抗補体剤：FUT-175 (6-amidino-2-naphthyl 4-guanidinobenzoate) は鳥居薬品から提供を受けた。

L 統計学的処理：実験結果の数値は mean±SD で表示し、統計学的有意差は一元配列分散分析を用い、p<0.05をもって有意差とした。

III 結 果

A 実験1：FUT-175 の連日投与による加速型馬糸腎炎の発症・進展に与える効果

1 尿蛋白量 (図2)：NDS only 群はNDS 1 投与翌日より、尿蛋白が増加し始め、9日目には平均約500 mg/日に達し、11日目の600mg/日台を除き以後14日

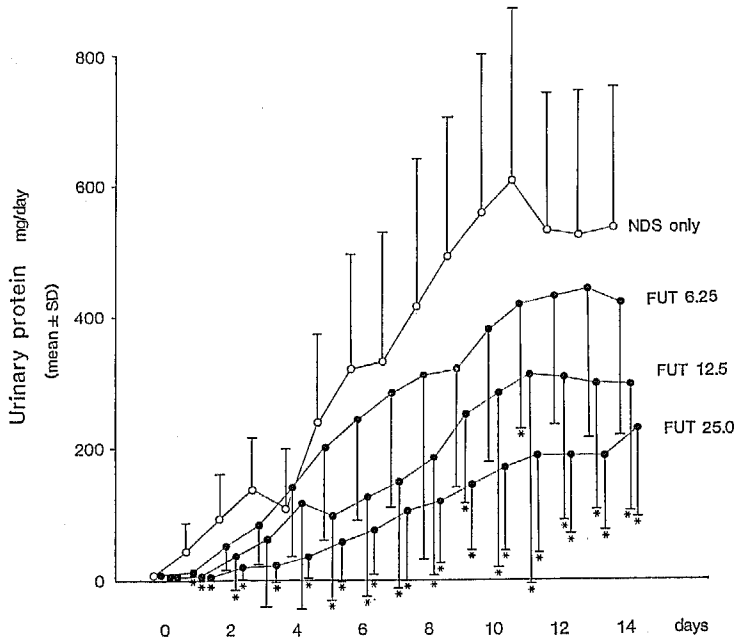


Fig. 2

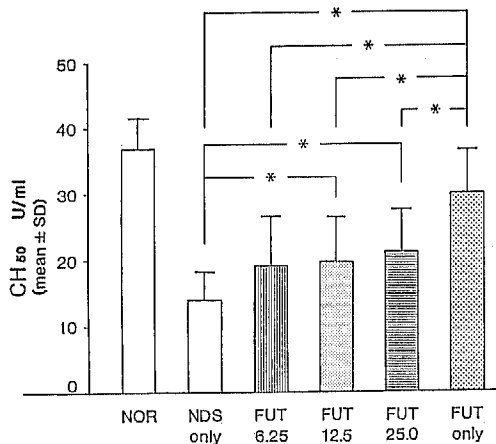
Twenty-four-hour urine protein excretion in four groups following administration of NDS1 at day 0 in experiment 1.

NDS only group (n: 11): NDS only, FUT 6.25 group (n: 10): FUT 6.25, FUT 12.5 group (n: 11): FUT 12.5, FUT 25.0 group (n: 10): FUT 25.0 *p<0.05

Table 1 Serum laboratory data in five groups of experiment 1 (at day 14)

	T. P. (g/dl)	Alb (g/dl)	BUN (mg/dl)	Cr (mg/dl)
NDS only group (n=9)	3.5± 0.8	1.3± 0.3	47.4±27.3	0.47±0.12
FUT 6.25 group (n=9)	4.0± 0.5	1.5± 0.2	34.6±12.1	0.43±0.09
FUT 12.5 group (n=8)	4.2± 0.8 *	1.5± 0.2 *	31.9±15.6 *	0.41±0.08
FUT 25.0 group (n=8)	4.2± 0.6	1.5± 0.2	28.9±10.6	0.35±0.09
FUT only group (n=10)	5.0± 0.3	2.0± 0.1	17.9± 2.0	0.36±0.05

*: p<0.05

Fig. 3 Effect of various doses of FUT-175 on functional complement activity measured by CH₅₀ in experiment 1 (at day 14).

NDS only group (n: 11): NDS only, FUT 6.25 group (n: 10): FUT 6.25, FUT 12.5 group (n: 11): FUT 12.5, FUT 25.0 group (n: 10): FUT 25.0, Normal group (n: 9): NOR, FUT only group (n: 10): FUT only *p<0.05

目まではほぼ 500mg/日台が持続した。NDS only 群と比べて、FUT 6.25群では1日目と11日目を除き、有意差がみられず、FUT 12.5群では3日目、4日目を

除き、有意に低値であった。FUT 25.0群では14日間通して NDS only 群に比べて尿蛋白排泄量は有意な低値を示した。FUT only 群では蛋白尿はみられな

った (data not shown)。

2 血液生化学・血清検査：各群における14日目屠殺時の血清中 T.P., Alb, BUN, Cr 値および CH_{50} の値を表1と図3に示した。NDS only 群では FUT only 群に比べ T.P. と Alb がともに有意な低値を示し, BUN は有意な高値を示した。NDS only 群と比べ, FUT 6.25群, FUT12.5群, FUT25.0群は T. T. と Alb の低下抑制, BUN の上昇抑制がみられたが, いずれも有意差は認められなかった。Cr については, FUT only 群に比し NDS only 群では上昇がみられ, また FUT 投与群では NDS only 群に比べて低下傾向がみられたが, 各群間に有意差はなかった (表1)。14日目の血清補体価については, NDS only 群と比較し, FUT 12.5群, FUT 25.0群では有意な低下の抑制が認められたが, FUT 6.25 では有意差がなかった。また, FUT only 群に比べ, NDS only 群, FUT6.25群, FUT 12.5群, FUT25.0群の血清補体価はいずれも有意に低下していた。正常群と FUT only 群との間には有意な差はなかった (図3)。

3 糸球体光顕所見：各群ラットの実験処理14日目の糸球体細胞数を検討した成績を図4に示した。FUT only 群に比べ, NDS only 群, FUT 6.25群, FUT 12.5群, FUT 25.0群のいずれにおいても糸球体細胞数は有意に増加していた。FUT only 群と正常群 (48 ± 11) の間には差は見られなかった。NDS only 群と比べ, FUT 12.5群, FUT 25.0群においては細胞増生は有意に抑制されていた (図4)。

フィブリン沈着と半月体形成は, FUT only 群では

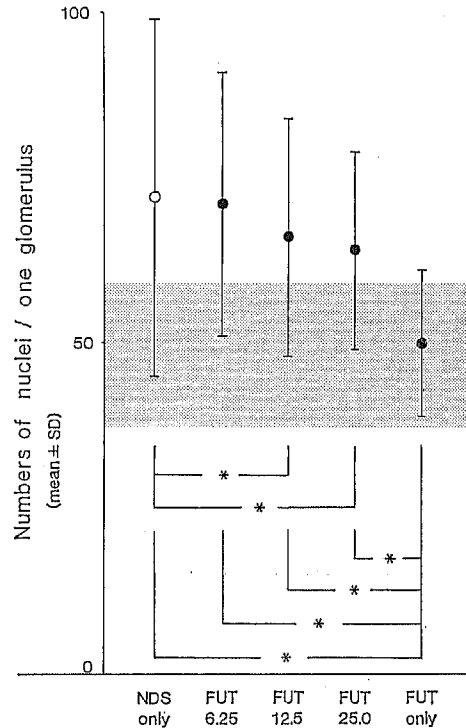


Fig. 4 Effect of various doses of FUT-175 on glomerular cell proliferation in experiment 1 (at day 14). The stippled area represents the number of glomerular cell nuclei in normal group (n: 10).

NDS only group (n: 11): NDS only, FUT 6.25 group (n: 10): FUT 6.25, FUT 12.5 group (n: 11): FUT 12.5, FUT 25.0 group (n: 10): FUT 25.0, FUT only group (n: 10): FUT only * $p < 0.05$

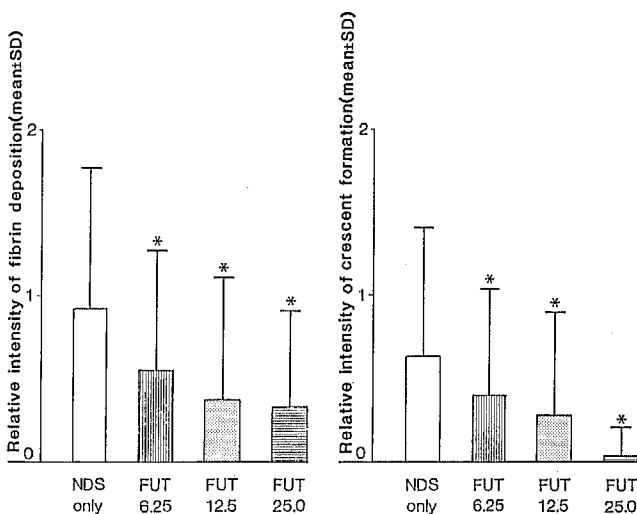


Fig. 5

Effect of various doses of FUT-175 on glomerular fibrin deposition and crescent formation. Grades are represented semiquantitatively, in experiment 1 (at day 14).

NDS only group (n: 11): NDS only, FUT 6.25 group (n: 10): FUT 6.25, FUT 12.5 group (n: 11): FUT 12.5, FUT 25.0 group (n: 10): FUT 25.0

* $p < 0.05$

Table 2 Immunofluorescence findings of the kidneys in four groups of experiment 1 (at day 14).

NDS only group	DuIg	RIgG	Fib	C3	FUT 6.25 group	DuIg	RIgG	Fib	C3
1	++	++++	++	+	11	+++	++++	++	++
2	+++	++++	++	+	12	++	+++	+	+
3	++	++++	++	+	13	++	+++	+	+
4	+++	++++	++	+	14	++	+++	+	+
5	++	+++	+	++	15	+++	++++	++	++
6	++	+++	++	++	16	+++	++++	++	++
7	++	+++	+	+	17	+++	++++	++	++
8	+++	++++	+	+	18	++	+++	+	+
9	++	++++	++	++	19	+	++	++	+
10	++++	++++	+	+	20	+++	+++	+	+

FUT 12.5 group	DuIg	RIgG	Fib	C3	FUT 25.0 group	DuIg	RIgG	Fib	C3
21	+++	++++	+	+	32	++	+++	+	+
22	+++	+++	+	+	33	++	+++	+	+
23	+++	++++	+	++	34	+	++	+	+
24	++	+++	+	+	35	++	+++	+	+
25	+	++	+	+	36	+	+++	+	+
26	+++	++++	+	+	37	++	+++	+	+
27	+++	++++	+	+	38	++	++	+++	+
28	++	+++	+	+	39	+	++	+	+
29	+++	+++	+	++	40	+	++	+	+
30	+	++	+	+	41	+	+	+	+
31	+	++	+	+					

DuIg : Duck immunoglobulin
 RIgG : Rat IgG
 Fib : Rat fibrinogen
 C3 : Rat C3

認められなかった (data not shown) が, NDS only 群ではおのおの 0.92 ± 0.85 , 0.63 ± 0.78 と著明であり, FUT 6.25 群 (0.55 ± 0.72 , 0.40 ± 0.64), FUT 12.5 群 (0.37 ± 0.64 , 0.28 ± 0.62), FUT 25.0 群 (0.33 ± 0.58 , 0.03 ± 0.18) ではいずれも有意に抑制されていた (図 5)。

4 蛍光抗体法による糸球体所見 (表 2, 図 6) : NDS only 群では, アヒル免疫グロブリン (以下 DuIg) が ++~++++, ラット IgG (以下 RIgG) が ++~++++ の程度にそれぞれ線状パターンに染色され, ラットフィブリノーゲン (以下 Fib) は +~+++ , ラット C3 (以下 C3) は +~++ と顆粒状パターンに染色された。

FUT 6.25 群では NDS only 群とほぼ同様の所見が認められた。FUT 12.5 群は NDS only 群に比べ, DuIg と C3 はほぼ同様であったが, RIgG と Fib はやや軽度であった。FUT 25.0 群では, DuIg, RIgG, Fib, C3 がおのおの ++~+, ++~+, ++~+, + と, NDS only 群に比較すると軽度であった。

5 糸球体電顕所見 : NDS only 群と FUT 25.0 群の 2 群について実験処理 14 日目の腎を検討した。NDS only 群では, 観察したすべての糸球体で基底膜上皮下に, 電子密度の一定しない沈着物の存在が散在性に認められた (図 7 の A)。FUT 25.0 群では, 上皮下沈着物がより少なかった (図 7 の B)。

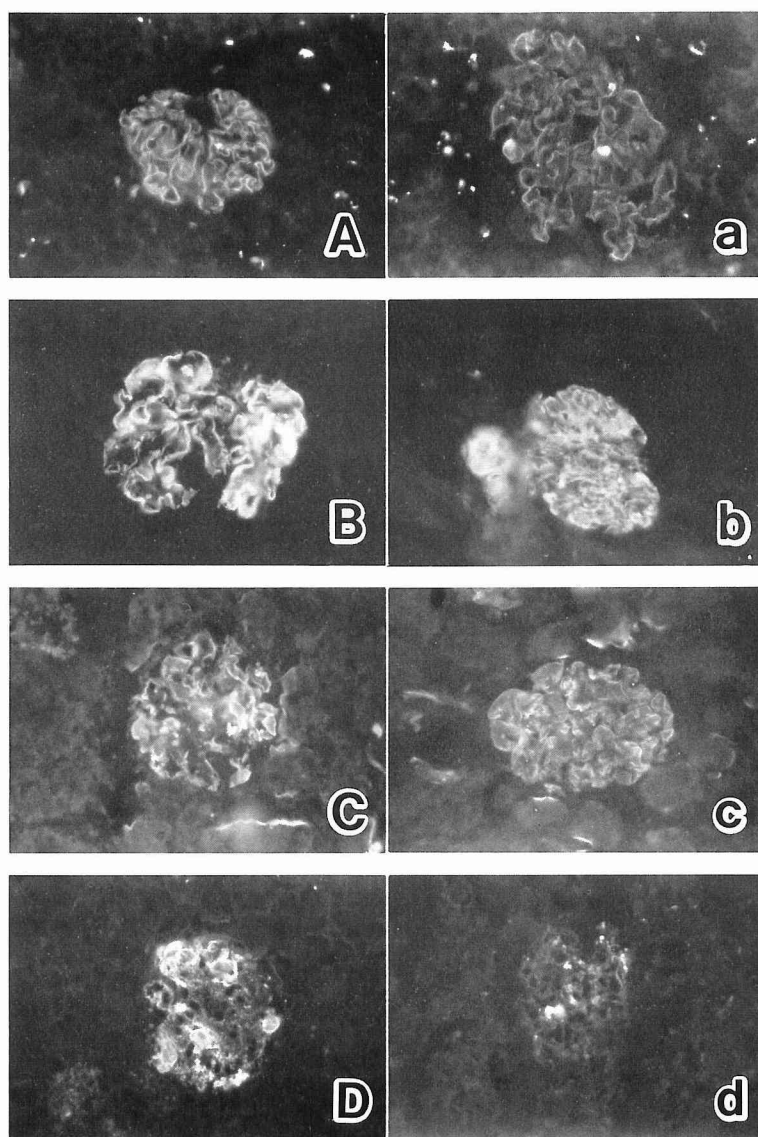


Fig. 6 Immunofluorescence staining of rat glomerulus in NDS only group (A, B, C, D) and FUT 25.0 group (a, b, c, d) 14 days after NDS injection. A, a: Duck immunoglobulin, B, b: Rat IgG, C, c: Rat C3, D, d: Rat fibrinogen. It is judged that A, B, C and D are +++, +, ++ and ++ respectively, while a, b, c and d are ++, +, + and + respectively. ($\times 150$)

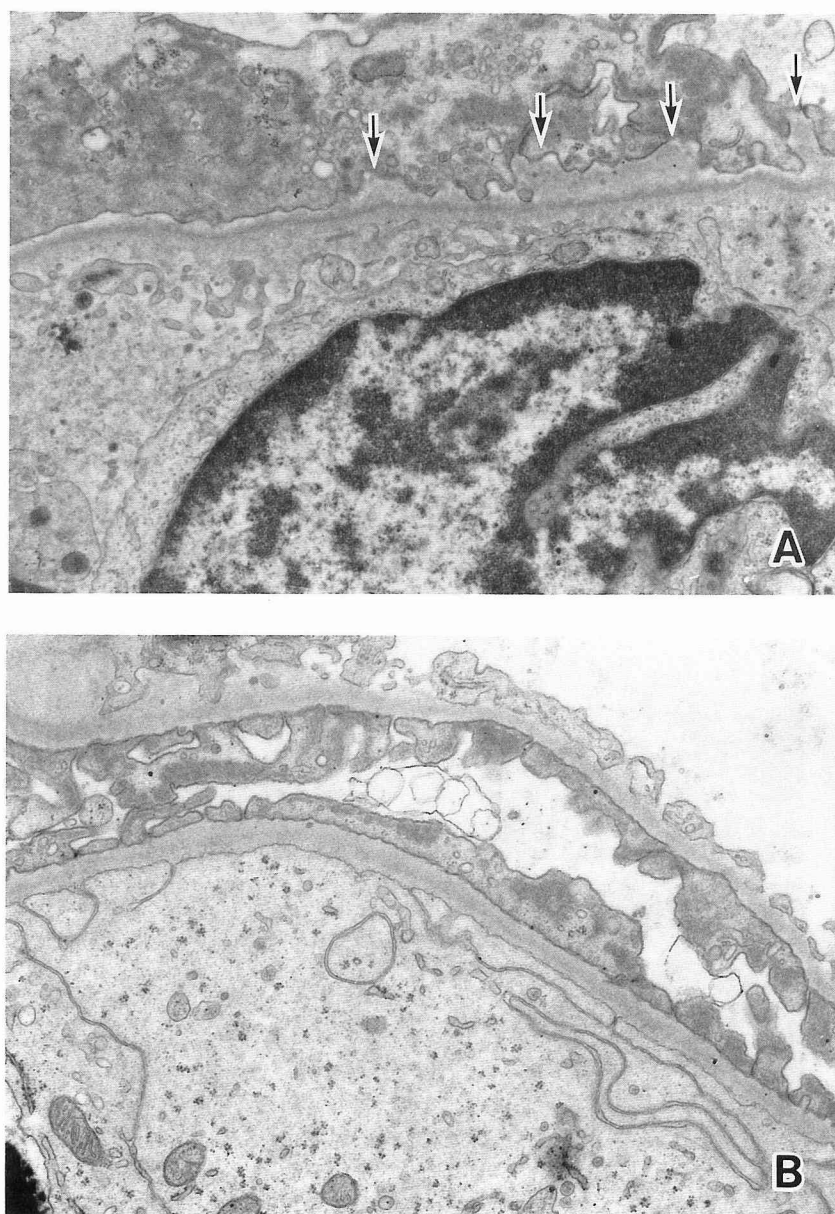


Fig. 7 Electron micrographs of a capillary wall from NDS only group (A) and one from FUT 25.0 group (B) in experimental 1 (at day 14). (A) Electron dense deposits (arrows) are located under the epithelium showing extensive loss of foot processes. (B) No subepithelial deposits are seen. ($\times 13,800$)

Table 3 Serum laboratory data in two groups of experiment 2 (at day 2 and at day 14)

day 2	T. P. (g/dl)	Alb (g/dl)	BUN (mg/dl)	Cr (mg/dl)	CH ₅₀ (U/ml)
C group (n=5)	4.0± 0.4	1.8± 0.3	19.2± 4.3	0.48±0.11	24.0±11.7
E group (n=5)	5.2± 0.5	3.2± 0.6	17.0± 3.8	0.46±0.05	37.0± 7.8

*: p<0.05

day 14	T. P. (g/dl)	Alb (g/dl)	BUN (mg/dl)	Cr (mg/dl)	CH ₅₀ (U/ml)
C group (n=5)	4.0± 0.9	1.3± 0.4	39.2± 5.2	0.72±0.08	23.6± 6.9
E group (n=5)	4.2± 1.0	1.6± 0.4	37.6± 5.7	0.74±0.09	22.3± 7.3

C group and E group are as described in Fig. 1.

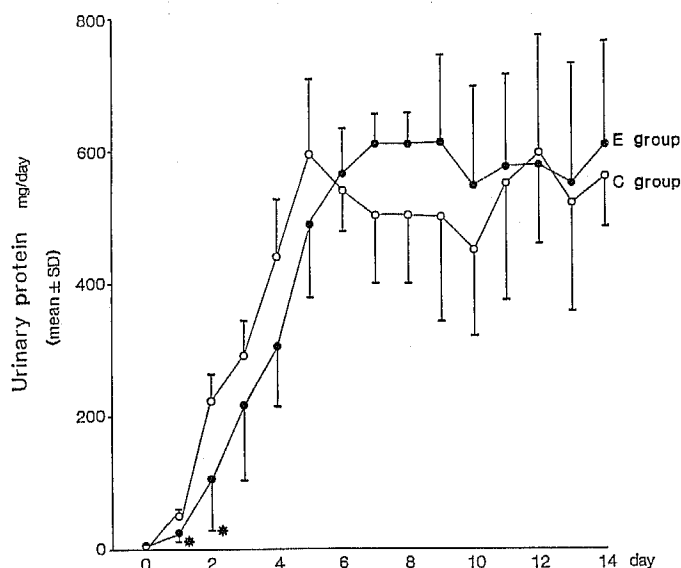


Fig. 8

Twenty-four-hour urine protein excretion in two groups following administration of NDS 2 at day 0 in experiment 2.

C group (n : 5), E group (n : 5)

*p<0.05

B 実験2 : FUT-175 の1回投与による加速型馬腎炎の発症・進展に与える効果

1 尿蛋白量 (図8) : 実験2において14日間観察した群では, NDS のみを投与したC群に比べ, NDS とFUT を投与したE群で, 1日目と2日目にのみ尿蛋白量の有意な低値を認めたが, 以後14日目までは両群間に有意差を認めなかった。

2 血液生化学・血清検査 : 実験2における2日目と14日目の血清中 T. P., Alb, BUN, Cr 値およびCH₅₀の値を表3に示した。NDS 2投与2日目ではT. P. とAlb はE群では, C群に比べて有意に低下の抑制がみられ, CH₅₀ はE群でやや低下の抑制傾向が見られた。しかし NDS 2投与14日目では T. P., Alb, BUN, Cr, CH₅₀ はいずれも両群間に有意差は認めら

れなかった。

3 糸球体光顕所見 (図9) : 半月体形成がいまだ見られない2日目における糸球体細胞増加とフィブリン沈着については, E群ではC群に比べて有意に抑制されていた。しかし14日目では, 糸球体細胞数, フィブリン沈着, 半月体形成とも両群間で有意の差は認められなかった。

4 蛍光抗体法による糸球体所見 (表4) : DuIg は2日目, 14日目ともにC群に比べE群では軽度であった。Fib は2日目でのみC群に比べE群で軽度であった。RiG とC 3 は, 2日目と14日目とも両群間で差はみられなかった。

5 糸球体電顕所見 : 2日目のC群とE群とも, 上皮下沈着物を認めなかった。14日目では実験1と同様, E

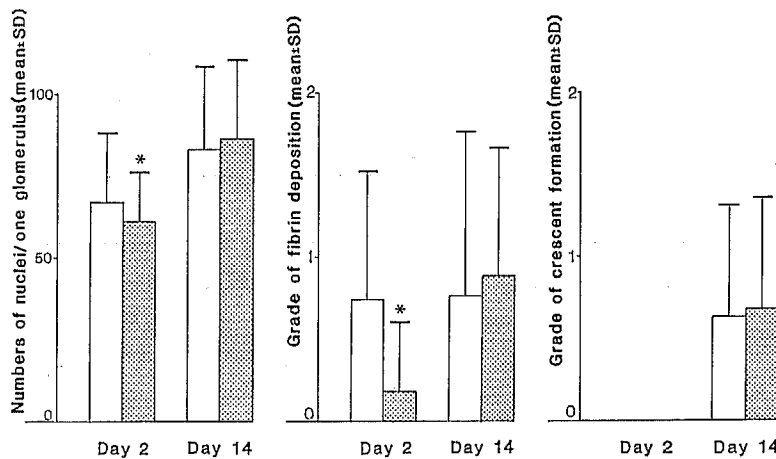


Fig. 9 Effect of FUT-175 on numbers of glomerular cell nuclei, fibrin deposition and crescent formation, graded semiquantitatively in experiment 2 at day 2 and at day 14. Open column for C group (n : 5) and dotted column for E group (n : 5).

*p<0.05

Table 4 Immunofluorescence findings of the kidneys in two groups of experiment 2 (at day 2 and at day 14)

day 2									
C group	DuIg	RIgG	Fib	C3	E group	DuIg	RIgG	Fib	C3
1	++	++++	++	++	6	++	++++	+	++
2	+++	++++	+	++	7	++	++++	++	++
3	+++	++++	++	+	8	++	++++	+	++
4	+++	++++	++	++	9	+++	++++	+	++
5	+++	++++	++	++	10	++	+++	+	+

day 14									
C group	DuIg	RIgG	Fib	C3	E group	DuIg	RIgG	Fib	C3
11	+++	++++	++	++	16	++	++++	++	++
12	+++	++++	++	++	17	++	++++	++	++
13	+++	++++	++	++	18	+++	++++	++	++
14	+++	++++	++	++	19	++	++++	++	++
15	+++	++++	++	+	20	++	++++	++	++

DuIg : Duck immunoglobulin
 RIgG : Rat IgG
 Fib : Rat fibrinogen
 C3 : Rat C3

群で上皮下沈着物が減少していた (data not shown)。

IV 考 察

本研究では、馬杉腎炎第一相をおこすことなく第二相の障害をおこすことが知られている抗ラット腎アヒ

ル血清による加速型馬杉腎炎¹⁹⁾に、補体活性化を抑制する蛋白分解酵素阻害剤 FUT-175 を使用し、腎炎の発症進展に対する補体の役割を検討した。その結果、FUT-175 の連日投与により、尿蛋白増加の抑制、血清補体価の低下抑制が認められ、糸球体における細胞

増生・フィブリン沈着・半月体形成などの病変の軽減化、ラット IgG の糸球体沈着抑制、および電顕上で上皮下沈着物の減少などが認められ、馬杉腎炎第二相の糸球体障害が軽減されることが明らかになった。さらに腎炎発症直前に FUT-175 を 25mg/kg 1 回投与することにより、腎炎発症初期におこる糸球体基底膜への NDS の沈着は補体活性化の阻害によって抑制されることが明らかになった。

馬杉腎炎第二相の発症と進展に補体が影響を与えるかどうかという問題については、抗腎血清 1 回静注で発症する馬杉腎炎第二相や、抗ラット腎ヒツジ血清による加速型馬杉腎炎において、コブラ毒因子を用いた脱補体によっても、腎糸球体障害が軽減しないという成績などから、第二相の糸球体障害は補体非依存性であるとの報告がみられる¹²⁾²⁰⁾。しかしながら、抗腎血清 1 回静注で発症する馬杉腎炎第二相の発症時期は、4～11日後と個体間で違いが大きい²¹⁾、短期間しか脱補体状態が維持できないコブラ毒因子が適切な時期に投与されていたか疑わしいとの指摘がある¹²⁾。そこで発症時期を一致させるため、抗ラット腎ヒツジ血清による加速型モデルが採用されたが、このモデルでは同時に第一相の糸球体障害もおこることより¹²⁾、第二相のみを観察していない欠点がある。また両者の共通の問題点として、コブラ毒因子による脱補体状態は、アナフィラトキシンを産生・放出するおそれがあり²²⁾、また腎炎惹起と同時に脱補体の処置をすると腎炎が増悪する事実も知られており⁶⁾¹²⁾、そのため、脱補体状態の効果が打ち消されることも考えられる。そこで本研究では第二相の発症時期の個体差をなくし、かつ第一相の発症が通常の使用量ではおこらないような抗ラット腎アヒル血清による加速型馬杉腎炎¹⁹⁾を第二相の糸球体障害のモデルとして採用した。また今回使用した FUT-175 は、補体の消費による脱補体状態とは異なり、補体の活性化経路の初期に働く蛋白分解酵素を阻害し、アナフィラトキシンの産生・放出をおこさず補体活性抑制状態を作り出すことができる¹³⁾¹⁴⁾。そして、コブラ毒因子のような蛋白質とは異なるため長期投与が可能であり、長期間の補体活性抑制状態が得られる¹³⁾ことから、FUT-175 は本研究の目的に適った薬剤と考える。本研究で得られた FUT-175 の腹腔内投与による血中濃度から推定すると、FUT-175 25 mg/kg は補体の古典的経路を約 4 時間阻害できる¹³⁾と思われる。

本実験結果から、抗補体剤の 1 日 2 回投与をすると

血清補体価の低下が抑制された。これは、FUT-175 は補体の古典的経路の酵素 C1r, C1s を強力に阻害する薬剤である¹³⁾¹⁴⁾ため、古典的経路が初期の段階で阻害された結果、補体の活性化が抑制され、血清補体の消費が抑制され、血清補体価の低下抑制になったと考えられる。抗ラット腎アヒル血清による加速型馬杉腎炎における蛋白尿は糸球体基底膜の透過性亢進²³⁾と好中球・単球より放出されるライソゾーム由来の蛋白分解酵素による組織障害²⁴⁾の結果であるといわれている。補体活性化により生じた C5a が糸球体内に好中球・単球を集積させ、それらの産生・放出するロイコトリエン D4, C4 および platelet-activating-factor などの化学伝達物質²⁵⁾²⁶⁾が基底膜の透過性亢進に関与するといわれている。そして C3a, C5a 自体の作用²⁴⁾²⁷⁾²⁸⁾、C3b レセプターを介する血小板の免疫粘着現象により放出される血管作動性アミン²⁹⁾³⁰⁾、さらに補体の後期成分 C5b-9²⁴⁾ からなる膜侵襲複合体に関与するとされている。また、FUT-175 はこれら補体の古典的活性化経路の初期段階を抑制することにより、尿蛋白量の減少をもたらしたものと考えられる。なお FUT-175 投与群は NDS only 群に比べ血清総蛋白とアルブミンの低下抑制が認められたが、有意差はなかった。有意差でなかった理由として血清総蛋白とアルブミンの値の変動に尿蛋白量以外の因子(摂取蛋白量、肝での蛋白合成、腸管への蛋白漏出)の関与³¹⁾が考えられた。NDS only 群の Cr 値からみて、本実験で作製された腎炎は比較的軽度の腎機能障害であったために、NDS only 群と FUT-175 投与群との間に腎機能に有意差が認められなかったものと考えられた。しかしながら FUT-175 の用量依存的に Cr 値は低下する傾向がみられた。

本研究に用いた加速型馬杉腎炎の糸球体病変である細胞増生、フィブリン沈着、半月体形成²³⁾は抗補体剤投与により軽減化された。このことも、白血球の集積を促す C5a の産生を抗補体剤が抑制させた結果、加速型馬杉腎炎の糸球体病変が軽減化されたと考えられる。また糸球体病変の軽減に、抗補体剤が免疫複合体の糸球体沈着減少を生じさせ、白血球の集積を抑制させたことが関与した可能性もある。

今回の蛍光抗体法による糸球体の検討成績では、FUT-175 投与により NDS の糸球体沈着が抑制されていた。加速型馬杉腎炎の場合、ネフロトキシンが、糸球体基底膜に結合する様式に 2 通りの可能性が考えられる。すなわち流血中にすでに存在している抗アヒ

ル IgG 抗体と NDS が免疫複合体を形成してから、糸球体基底膜に沈着結合するものと、*in situ* で抗原である糸球体基底膜に NDS が直ちに結合するものである¹⁸⁾¹⁹⁾。前者の場合、流血中で形成された免疫複合体は補体の古典的経路の活性化をおこす。そして活性化された補体系が血小板、好中球、単球に働き、各種化学伝達物質を放出させ、血管の透過性を高め、その結果免疫複合体の糸球体への沈着を引きおこすといわれる²⁷⁾。この場合補体活性化の抑制により、補体による透過性亢進が阻害され、その結果、免疫複合体の糸球体沈着が減少し、網内系への取込みが増加すると考えられる³²⁾。ラットの血清病型腎炎に FUT-175 を投与した実験でも、著者の実験結果と同様免疫複合体の係蹄壁への沈着減少が報告されている³³⁾。NDS が *in situ* で糸球体基底膜に結合する場合では、補体が必要としないため、基底膜へのネフロトキシンの結合には抗補体剤の影響が少ないと思われる。したがって抗補体剤投与群で DuIg の沈着が NDS only 群に比べ減弱するものの、DuIg の沈着を認めることの一因として考えられた。本実験の糸球体組織において、蛍光抗体法でラット C3 の蛍光強度は NDS only 群と抗補体剤投与群とで著しい差を認めなかった。このことは、障害糸球体に対しては今回の FUT-175 の投与量では十分な補体活性化の障害ができなかったため、あるいはラット C3 の糸球体沈着量に差があるにしても、評価方法が半定量法であったために明確な差が認められなかった可能性もある。

また電顕的に FUT-175 投与群で認められた上皮下沈着物の減少は、循環由来免疫複合体の糸球体基底膜への沈着減少か、*in situ* で形成された、NDS と D IgG に対する抗体、または NDS と NDS に対する抗体よりなる免疫複合体の糸球体基底膜上皮下への転送障害を示唆するものと思われる¹⁸⁾。

第二相の発症早期の補体の役割を検討するため FUT-175 の 1 回投与を行った成績では、FUT-175 の 1 回投与は、加速型馬腎炎の発症初期 2 日目では NDS only 群と比べ NDS の糸球体沈着を減少させ、尿蛋白増加の抑制と糸球体の細胞増生・フィブリン沈着の軽減を認めた。しかしながら 14 日目では NDS only 群と比較し NDS の糸球体沈着減少を認めるも、尿蛋白と糸球体障害に差を認めなかった。それゆえ、FUT-175 1 回投与でみられた腎炎惹起性抗原であるネフロトキシンの糸球体沈着の減少は、発症初期の糸球体障害の軽減に関与する可能性があるが、その後 14

日目までの障害に影響を与えないことが明らかにされた。馬腎炎第二期では循環中でも *in situ* でもネフロトキシンの宿主の抗体の関与は持続的に続いているとされる³⁴⁾。本研究からも補体の活性化を持続的に抑制することが腎の組織障害の軽減化に必要であることが明らかになった。

馬腎炎の進展に血液凝固が関与することはすでに指摘されており³⁵⁾、FUT-175 は凝固系と血小板への直接の障害作用も持つといわれる³⁶⁾。したがって、補体を介さず直接に凝固系、血小板に働き、その障害作用で糸球体障害を軽減した可能性も考慮しなければならないと思われる。本実験では、FUT-175 の凝固系と血小板への障害作用については検討していないが、今後、腎炎の発症・進展への本剤の凝固系、血小板の直接的な関与の検討も必要と思われる。

ヒト慢性糸球体腎炎の治療に有効な薬剤は少ない。本実験で腎炎の発症・進展の軽減に有効性を示した抗補体剤が新たな治療薬として臨床応用されることが期待される。

V 結 語

馬腎炎第二相における補体の役割を研究するため、補体活性化の障害剤である FUT-175 を用いて、ラット加速型馬腎炎に対する作用を検討し、以下の結論を得た。

1 FUT-175 は加速型馬腎炎発症の初期にネフロトキシンの糸球体沈着を減少させ、糸球体障害を軽減した。

2 持続的補体活性抑制状態がないと、ネフロトキシンの糸球体沈着の減少は必ずしも腎炎進展の軽減につながらなかった。

3 初期以後の腎炎進展にも、FUT-175 の抗補体作用が抑制効果として働き、明らかに糸球体障害を軽減させた。

以上、補体活性障害実験の結果より、馬腎炎第二相において補体は重要な役割を果たしていると考えられる。

本論文の要旨は、第27回日本腎臓学会総会（1984年11月）、第3回アジア太平洋腎臓学会議（1986年10月）、第29回日本腎臓学会総会（1986年11月）において発表された。

稿を終わるにあたり、懇切なる御指導と御校閲を賜りました古田精市教授ならびに第1病理学教室の重松秀一教授に深甚なる謝意を表します。また直接御指導

御協力下さいました小口寿夫博士をはじめとする第2
内科腎臓班諸兄、伊藤信夫博士をはじめとする第1病
理学教室諸兄に深く感謝致します。さらに、標本作製

に御協力いただいた第1病理学教室山口真貴子技術補、
青島典子技能補、西沢朋子技官の諸氏に心から感謝申
上げます。

文 献

- 1) Wasserman, E., Schwarz, F., Wachstein, M. and Lange, K. : Diagnostic value of serum complement determination in hereditary glomerulonephritis. J Lab Clin Med, 65 : 589-599, 1965
- 2) West, C. D., McAdams, A. J., McConville, J. M., Davis, N. C. and Holland, N. H. : Hypo-complementemic and normocomplementemic persistent (chronic) glomerulonephritis : Clinical and pathologic characteristics. J Pediatr, 67 : 1089-1112, 1965
- 3) Glassock, R. J. and Cohen, A. H. : Secondary glomerular diseases. In : Brenner, B. M. and Rector, F. C. (eds.), The Kidney, 2nd ed., pp. 1493-1570, W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1981
- 4) Fish, A. J. and Michael, A. F. : Immunopathogenesis of renal disease. In : Early, L. E. and Gottschalk, C. W. (eds.), Strause and Welt's disease of the kidney, pp. 541-583, Little, Brown and Company, Boston, 1979
- 5) Wilson, C. B. and Dixon, F. J. : The renal response to immunological injury. In : Brenner, B. M. and Rector, F. C. (eds.), The Kidney, 2nd ed., pp. 1237-1350, W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1981
- 6) Unanue, E. and Dixon, F. J. : Experimental glomerulonephritis : IV. Participation of complement in nephrotoxic nephritis. J Exp Med, 119 : 965-982, 1964
- 7) Hammer, D. K. and Dixon, F. J. : Experimental glomerulonephritis : II. Immunologic events in the pathogenesis of nephrotoxic serum nephritis in the rat. J Exp Med, 117 : 1019-1034, 1963
- 8) Cochrane, C. G., Müller-Eberhard, H. J. and Aikin, B. S. : Depletion of plasma complement *in vivo* by a protein of cobra venom : Its effect on various immunologic reactions. J Immunol, 105 : 55-69, 1970
- 9) Vogt, A. and Kochem, H. G. : Immediate and delayed nephrotic nephritis in rats. Am J Pathol, 39 : 379-392, 1961
- 10) Kozima, K., Nakanoin, K. and Vogt, A. : Immediate and delayed nephrotic nephritis in rat induced by duck antibody. Correlation between onset of proteinuria and complement fixation in the glomeruli. Int Arch Allergy, 32 : 404-415, 1967
- 11) Cochrane, C. G., Unanue, E. R. and Dixon, F. J. : A role of polymorphonuclear leukocytes and complement in nephrotoxic nephritis. J Exp Med, 122 : 99-116, 1965
- 12) Thomson, N. M., Naish, P. F., Simpson, I. J. and Peters, D. K. : The role of C3 in the autologous phase of nephrotoxic nephritis. Clin Exp Immunol, 24 : 464-473, 1976
- 13) Fujii, S. and Hitomi, Y. : New synthetic inhibitors of C1f, C1 esterase, thrombin, plasmin, kallikrein and trypsin. Biochem Biophys Acta, 661 : 342-345, 1981
- 14) Ikari, N., Sakai, Y., Hitomi, Y. and Fujii, S. : New synthetic inhibitor to the alternative complement pathway. Immunology, 49 : 685-691, 1983
- 15) Shibata, N., Itoh, N. and Shigematsu, H. : Macrophages in glomerular injury. I. The kinetics of macrophages in accelerated Masugi nephritis in the rat. Acta Pathol Jpn, 35 : 9-22, 1985
- 16) Kingsbury, F. B., Clark, C. P., Williams, G. and Post, A. L. : The rapid determination of albumin in urine. J Lab Clin Med, 11 : 981-989, 1926
- 17) Aoyama, T., Sakaki, H., Shibuya, M. and Suzuki, Y. : Spectrofluorometric determination of FUT-175 (nafamstat mesilate) in blood based on trypsin-inhibitory activity. Chem Pharm

- Bull, 33 : 2142-2144, 1985
- 18) Shigematsu, H. and Kobayashi, Y. : The development and fate of the immune deposits in the glomerulus during the secondary phase of rat Masugi nephritis. *Virchows Arch Abt B Zellpath*, 8 : 83-95, 1971
 - 19) Satake, H. : An immunopathological study on nephrotoxic nephritis. *Kobe J Med*, 14 : 49-70, 1968
 - 20) Naish, P.F. and Peters, D.K. : Mediators of intraglomerular fibrin deposition in nephrotoxic serum nephritis. *Clin Sci Molec Med*, 46 : 16, 1974
 - 21) Fujimoto, T. : Pathology of Masugi nephritis. Forty years' progress and present status. In : Okabayashi, A. and Kondo, Y. (eds.), *Masugi nephritis and its immunopathologic implications*, 1st ed., pp.1-35, Igaku-Shoin, Tokyo, 1980
 - 22) Cochrane, C.G. and Müller-Eberhard, H.T. : The derivation of two distinct anaphylatoxin activities from the third and fifth components of human complement. *J Exp Med*, 127 : 371-386, 1968
 - 23) Benson, H.N., Brumfield, H.P. and Pomeroy, B.S. : Requirement of avian C1 for fixation of guinea pig complement by avian antibody-antigen complexes. *J Immunol*, 87 : 616-622, 1961
 - 24) Couser, W.G., Baker, P.J. and Adler, S. : Complement and the direct mediation of immune glomerular injury : A new perspective. *Kidney Int*, 28 : 879-890, 1985
 - 25) Samuelsson, B. : Leukotrienes : Mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science*, 220 : 568-575, 1983
 - 26) Camussi, G. : Potential role of platelet-activating factor in renal pathophysiology. *Kidney Int*, 29 : 469-477, 1986
 - 27) 高橋守信 : 補体の生物活性. 稲井真彌, 井上公蔵, 田村 昇(編), 補体学—基礎・測定法・臨床, 第一版, pp.78-93, 医歯薬出版株式会社, 東京, 1982
 - 28) Barnes, J.L. and Venkatachalam, M.A. : Enhancement of glomerular immune complex deposition by a circulating polycation. *J Exp Med*, 160 : 286-293, 1984
 - 29) Bianco, C. and Nussenzweig, V. : Complement receptors. *Contemp Top Mol Immunol*, 6 : 145-176, 1977
 - 30) Nishioka, K. : Components of guinea pig complement. I. Separation of a serum factor essential for immune hemolysis and immune adherence. *J Exp Med*, 118 : 767-793, 1963
 - 31) Bernard, D.B. : Metabolic abnormalities in nephrotic syndrome : pathophysiology and complications. In : Brenner, B.M. and Stein, J.H. (eds.), *Contemporary issues in nephrology*, Volume 9, pp.85-120, Churchill Livingstone, New York, Edinburgh, London and Melbourne, 1982
 - 32) 田中 均, 白井俊一 : Immune complex の糸球体内沈着機序, *医学のあゆみ*, 119 : 375-379, 1981
 - 33) 矢尾板永信, 川崎克俊, 山本 格, 木原 達 : ラット実験腎炎に対する抗補体剤 FUT-175 の効果. II. ラット BSA 腎炎. *日腎誌*, 26 : 157-161, 1984
 - 34) Pressman, D., Eisen, N.H. and Fitzgerald, P.J. : The zone of localization of antibodies. IV. The rate of localization of anti-mouse-kidney serum. *J Immunol*, 64 : 281-287, 1950
 - 35) Kondo, Y. and Shigematsu, H. : Fine structure of Masugi nephritis and immune complex nephritis. In : Okabayashi, A. and Kondo, Y. (eds.), *Masugi nephritis and its immunopathologic implications*, 1st ed., pp.96-161, Igaku-Shoin, Tokyo, 1980
 - 36) 越山良子, 尾関正之, 元吉明美, 藤田允信, 岩城正廣, 青山卓夫 : FUT-175 (nafamstat mesilate) の薬理学的研究. IV. 血液凝固系, 血小板, 線溶系に対する作用. *日薬理誌*, 84 : 417-428, 1984

(62. 11. 5 受稿)