

抗ヒト腎モノクローナル抗体を用いた 疾患腎における抗原性の変化の検討 第1編

味埜 泰明

Study on the change of glomerular antigenicity in various renal diseases with anti-human renal monoclonal antibodies

YASUAKI MINO

The Third Department of Internal Medicine, Okayama University
Medical School, Okayama, Japan
(Director: Prof. Zensuke Ota)

Key words: monoclonal antibody, human kidney antigen, GBM, mesangium, glomerular epithelial cell

We produced 22 different kinds of monoclonal antibody (Mab) by immunizing mice with human GBM antigens. In these Mabs, Mab-G1 to G5 recognized only GBM in the glomerulus, Mab-E1 and E2 recognized only glomerular epithelial cells, and Mab-M1 to M4 recognized mainly mesangium.

The reactions of these Mabs with known GBM antigens such as type IV collagen, fibronectin and laminin were negative by immunoblotting.

Using Mab-G1, Mab-E1 and Mab-M1, changes in the antigenicity of antigens recognized by Mabs were examined on kidney sections from the patients with various renal diseases by the indirect immunofluorescence test.

When Mab-G1 recognizing GBM was used, there was no particular change of antigenicity in minimal change nephrotic syndrome (MCNS) and IgA nephropathy (IgA), whereas in membranous nephropathy (MN) thickened GBM was found to maintain antigenicity and the region of deposits was observed as negative punched-out region. In type I and III of membranoproliferative glomerulonephritis (MPGN), GBM was observed only outside of subendothelial deposits without showing double contour. In type II MPGN, GBM showed a double linear pattern and antigenicity of GBM in regions of dense deposits was not detected. When Mab-E1 recognizing glomerular epithelial cells was used, there was no change of antigenicity in the renal diseases. Further, in crescentic glomerulonephritis, the region of the cellular crescents was not stained. When Mab-M1 recognizing mesangium was used, extensive staining was observed in the increased mesangium in IgA, MPGN, and diabetic nephropathy.

We feel that it is of significance in elucidating the pathogenesis of renal diseases to study the changes of glomerular antigenicity in diseased kidneys by using anti-human renal monoclonal antibodies.

緒 言

腎疾患特に糸球体腎炎の研究において免疫組織学的手

法が取り入れられて以来、腎炎発症機序について多くの免疫学的障害機序が検討されてきた。また腎障害に伴う腎組織レベルでの腎構成成分の変化についても免疫組織

学的手法で種々の検討が行われてきた。その手法の多くは腎構成成分の出来る限りの精製純化と、精製抗原の免疫により得られたポリクローナル抗体を用いてのものであった¹⁷⁻¹⁹。しかし抗原の純化には限界があり、また純化された抗原の免疫によりたとえ monospecific な抗体が得られたとしても、純化抗原内の微細な変化を知ることにはポリクローナル抗体を用いては困難であった。この困難性を打破するものとして近年 Köhler, Milstein⁸⁾ により開発された細胞融合法によるモノクローナル抗体の作製がある。今回我々はこの細胞融合法を用いて各種腎構成成分に対するモノクローナル抗体を作製し、免疫組織学的に腎構成成分の詳細な分布を知ると共に、種々疾患におけるこれらモノクローナル抗体認識抗原の変化について検討を行った。

材料と方法

1. モノクローナル抗体の作製

1) 免疫抗原の作製

(1) コラーゲナーゼ可溶化糸球体基底膜抗原 (c-GBM)

ヒト剖検腎2個より皮質部分145gを、冷生食中にてハサミで細切し Spiro⁹⁾の方法に準じて湿重量2.2gの分離糸球体を得た。これを1500rpmにて10分間遠沈し、1N NaClを加え氷冷下にて断続的に5分間sonicationを行った。3000rpm 20分間遠沈し上清をすて、沈渣に1N NaClを加えさらに2回同様の手技をくり返した。次に1N NaClを蒸留水に置換し、sonication、遠沈を3回行った。以上より得られた沈渣を位相差顕微鏡にて観察しGBMが細切されていることを確認した後、0.01M CaCl₂添加0.05M Tris HCl Buffer pH 7.5 30ccに、collagenase (SIGMA type 1A) 10mgを加え37°C 24時間incubationした。17000rpm 45分間遠沈の後、上清を凍結乾燥した。乾燥重量は256mgであった。得られたGBM抗原をSephadex G100にて分画し、分子量約5~7万のピークを取り出した。これを凍結乾燥し35mgのc-GBMを得た。

(2) N-Octyl-β-D-glucoside 可溶化 GBM 抗原 (o-GBM)

c-GBMの場合と同様に Spiro⁹⁾の方法を行い湿重量200mgの分離糸球体を得た。これをN-Octyl-β-D-glucoside (和光純薬) 120mgと30分間incubationした後PBSにて2日間透析しo-GBMとした。

2) GBM 抗原の免疫

c-GBMはマウス1匹あたり乾燥重量2mgを、またo-GBMは蛋白量100μgをcomplete Freund's adjuvant 0.25ccと共に免疫した。c-GBMは3匹のBALB/cマウスの、o-GBMは2匹のBALB/cマウスのfood padと、背部数ヶ所に免疫した。免疫時には同時に百日咳菌浮遊液(武田薬品)0.1ccを生食にて0.5ccにして皮下に注射した。追加免疫は1週ごとに2度行った。

3) 細胞融合

最終免疫後3日目に、免疫マウスの脾臓を摘出し、Köhler と Milstein⁸⁾の方法に準じて、マウスNS1 myeloma cell とポリエチレングリコール (PEG) 4000 (MERCK) にて細胞融合をおこなった。抗体のスクリーニングは、尿管癌手術時に得られた腎正常部分の凍結切片を用いた蛍光抗体間接法 (IIF) にて行った。二次抗体にはFITCラベル抗マウスIgG ヤギIgG (ラットと非交差、カペル社)を用いた。陽性コロニーは限界希釈法にて3回クローニングを行いMabを作製した。

2. モノクローナル抗体の認識する抗原の検討

1) 免疫酵素電顕 (IEM)

IEMはPreembedding methodで行った。即ち正常ヒト腎切片をPLP固定2時間の後クリオスタットで10μに薄切し、アルブミンスライドに付着させた。次にMab培養上清を4°C 12時間反応させ、続いてhorseradish peroxidase (HRP) 標識抗マウスIgG ヤギ血清 (TAGO) を4°C 6時間反応させた。1%グルタルアルデヒドにて10分間固定の後3, 3'-ジアミノベンチジン (SIGMA) で発色させた。2%オスミウム酸で1時間室温で後固定し、エタノール脱水を行ってエポキシ樹脂に包埋し、透過型電顕にて観察した。

2) 他種他臓器における抗原の分布

Mabの認識する抗原の、他種他臓器における分布を

IIFにて検索するために、ヒト、サル、ウサギ、ラット、マウスの腎、肺、肝、胃、筋の凍結切片を用いた。

3) 既知の抗原との反応

既知の GBM 抗原であるIV型コラーゲン (SIGMA type VI collagen), フィブロネクチン (SIGMA), ラミニン (SIGMA) について Mab との反応を immunoblotting 法にて観察した。即ちニトロセルロース膜 (BIO-RAD) にIV型コラーゲン, フィブロネクチン, ラミニンを各 5 μg を付着させ 20% calf serum にてブロックの後, Mab 培養上清と2時間反応させ HRP ラベル抗マウス IgG とさらに2時間反応させて4-クロロ-1-ナフトール (東京化成) で発色させた。

4) 疾患腎における抗原性の変化

各種腎疾患における Mab の認識抗原の変化を検討するために微小変化型ネフローゼ症候群 (MCNS) 8例, 膜性腎症 (MN) 13例, 膜性増殖性腎炎 (MPGN) type I, III 8例, type II, 1例, IgA 腎症15例, 半月体形成型腎炎5例の原発性腎疾患と糖尿病性腎症4例, SLE 16例, アミロイドーシス2例の続発性腎疾患の腎生検組織を用いて IIF を行った。また deposit と認識抗原の関係を観察するために二重染色を施行した。二重染色は腎凍結切片に Mab を反応させた後 FITC ラベル抗マウス IgG ヤギ IgG (CPL), テキサスレッド 標識抗ヒト IgG ヤギ血清 (E・Y) を同時に反応させた。観察は落射型蛍光顕微鏡 (オリンパス BHB-RFL-A) にて行った。

Table 1 Binding patterns of monoclonal antibodies against normal human kidney by indirect immunofluorescence.

	Monoclonal antibody (Mab)	Antigen	Glomerulus				Interstitium	
			GBM	Mesangium	Epithelial cell	Bowman's capsule	Vessels	TBM
1	G 1	c-GBM	+(L)	-	-	-	+	-
2	G 2	c-GBM	+(L)	-	-	-	+	-
3	G 3	c-GBM	+(L)	-	-	-	-	-
4	G 4	c-GBM	+(L)	-	-	-	-	-
5	G 5	c-GBM	+(G)	-	-	-	-	-
6	GT 1	c-GBM	+(L)	-	-	+	-	+
7	GT 2	c-GBM	+(L)	-	-	-	+	+
8	GT 3	c-GBM	+(L)	-	-	+	-	+
9	GT 4	c-GBM	+(L)	-	-	-	+	+
10	GT 5	c-GBM	+(L)	-	-	+	+	+
11	GT 6	c-GBM	+(L)	-	-	-	-	+
12	GT 7	c-GBM	+(L)	-	-	+	+	+
13	GT 8	c-GBM	+(L)	-	-	+	+	+
14	GT 9	c-GBM	+(L)	-	-	+	+	+
15	E 1	c-GBM	-	-	+	-	-	-
16	E 2	c-GBM	-	-	+	-	-	-
17	M 1	c-GBM	+(L)	+	-	+	+	+
18	M 2	c-GBM	+	+	-	+	+	+
19	M 3	o-GBM	+	+	-	+	+	+
20	M 4	o-GBM	+	+	-	+	+	+
21	TB 1	c-GBM	-	-	-	+	-	+
22	TB 2	c-GBM	-	-	-	+	-	+

c-GBM; collagenase-soluble GBM
 o-GBM; N-Octyl-β-D-glucoside-soluble GBM
 (L); linear staining pattern
 (G); granular staining pattern

結 果

1. モノクローナル抗体の作製

c-GBM と o-GBM を免疫し、計5回の細胞融合により22種の Mab が得られた。各の Mab の認識する抗原の IIF による腎内分布を Table 1 に示す (Table 1)。糸球体系蹄においては GBM のみを認識する Mab は

全部で14種であったがいずれも c-GBM の免疫により得られた。この14種の Mab の内5種は尿管基底膜 (TBM) とは反応せず GBM を特異的に染色し、Mab-G1~G4 は GBM を linear に染色し (Fig. 1a), Mab-G5 は GBM を granular に染色した (Fig. 1b)。残りの Mab-GT1~GT9 は総て TBM とも反応した (Fig. 1c)。糸球体内で糸球体上皮細胞を認識するものは Mab-

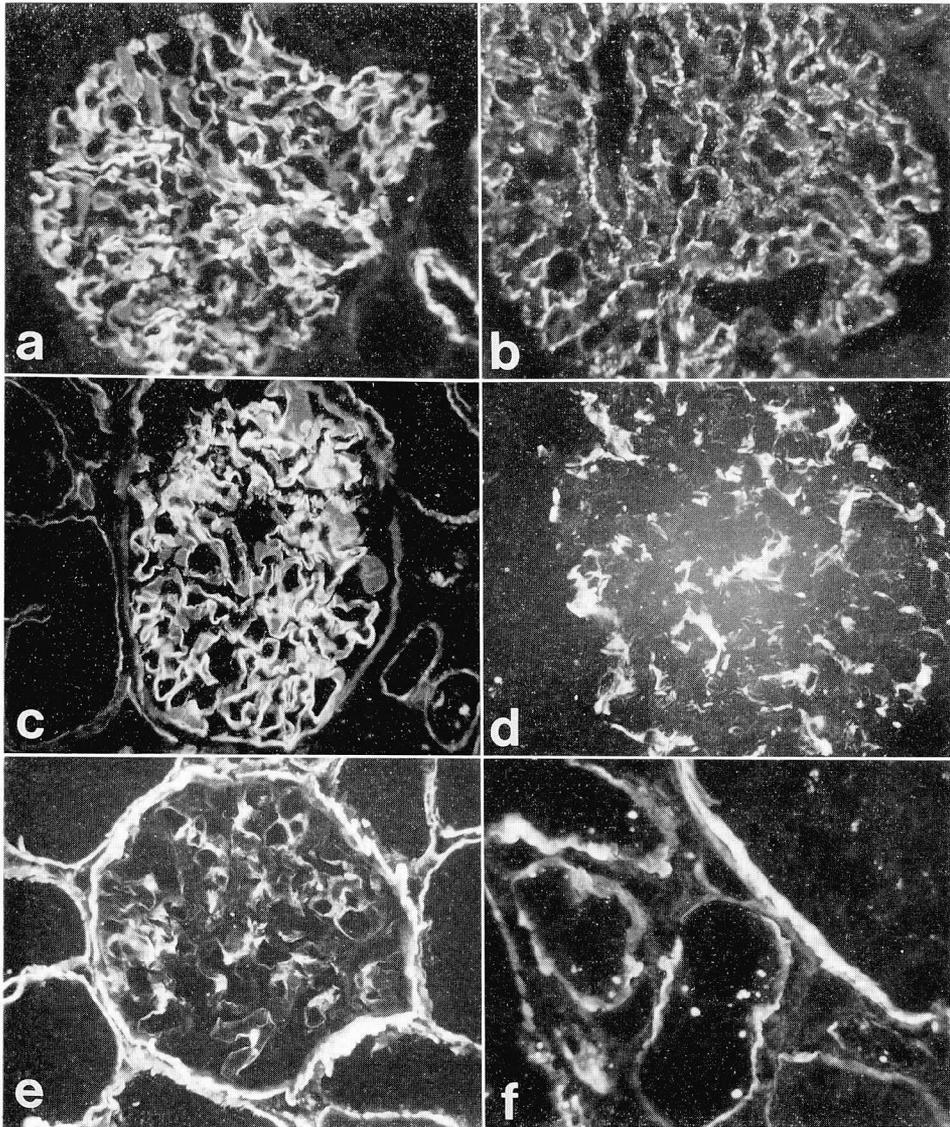


Fig. 1 Indirect immunofluorescence staining of monoclonal antibodies on normal human kidney sections. (a) Mab-G1, $\times 400$. (b) Mab-G5, $\times 400$. (c) Mab-GT1, $\times 400$. (d) Mab-E1, $\times 400$. (e) Mab-M1, $\times 400$. (f) Mab-TB1, $\times 400$.

E1～E2 の2種類得られた (Fig. 1d)。糸球体内で主にメサンギウム 基質と GBM を認識する Mab は Mab-M1～M4 の4種類得られこれらはすべて TBM やポーマンのうとも反応した (Fig. 1e)。糸球体ではポーマンのうとのみ反応し TBM とも反応する Mab は Mab-TB1～TB2 の2種類得られた (Fig. 1f)。

2. モノクローナル抗体の認識する抗原の検討

1) 免疫酵素電顕

Mab の認識する抗原のより詳細な分布を知るために、IEM を施行した。IEM は作製した Mab の内 Mab-G1, Mab-G2, Mab-G3, Mab-E1, Mab-M1 を用いた。Mab-G1 の IEM では糸球体上皮細胞、メサンギウム、内皮細胞は染色されず GBM のみが特異的に染色された。強拡大では GBM 全層にわたり微細顆粒状の染色を認

め、糸球体上皮細胞、内皮細胞に接している部分は幾分濃く染色された (Fig. 2a, b)。Mab-G2, Mab-G3 も同様の染色パターンを示した。Mab-E1 の IEM では GBM, メサンギウム、内皮細胞は全く染色されず糸球体上皮細胞のみが特異的に染色された。糸球体上皮細胞内の核や空胞は染色されず、細胞基質の部位が染色された (Fig. 2c)。Mab-M1 による IEM は GBM, メサンギウム、TBM、間質の毛細血管壁とコラーゲン繊維と 思われ繊維性物質が染色された (Fig. 2d)。

2) 他種他臓器における認識抗原の分布

Mab の認識する抗原の、他種他臓器における分布を Table 2 に示す (Table 2)。

サル腎においてはすべての Mab がヒトと同様の抗原分布を示したが、ウサギ、ラットの順に腎内の認識抗原

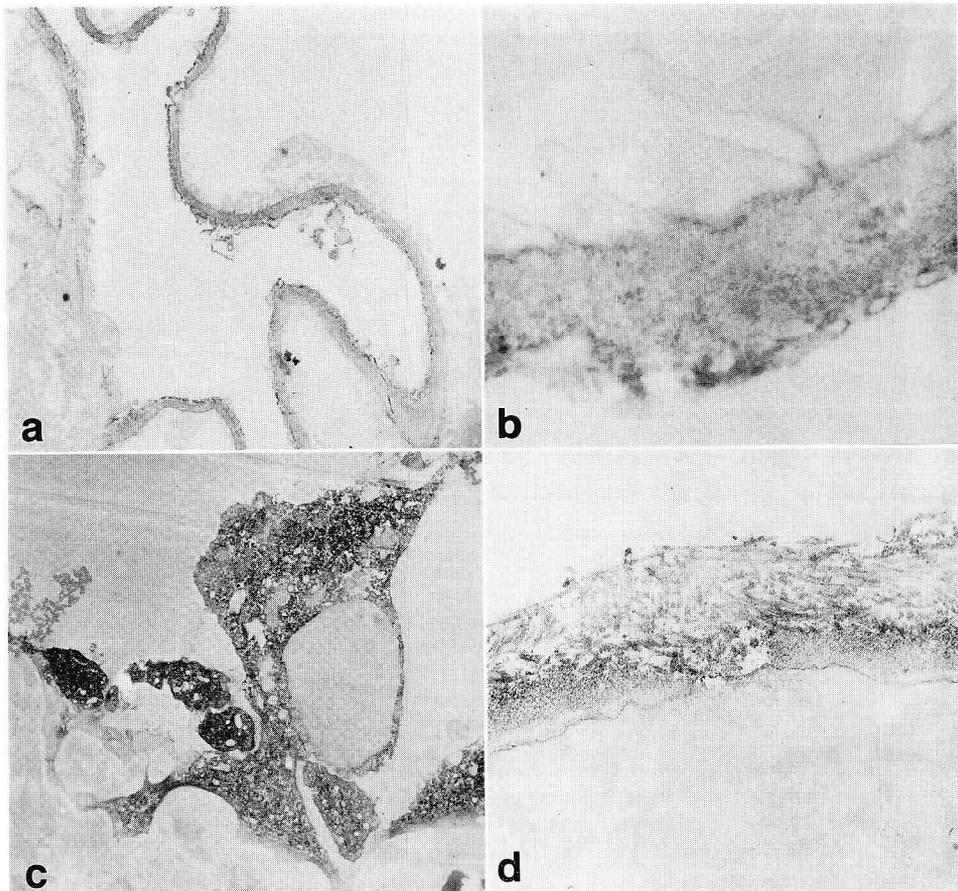


Fig. 2 Immunoelectron microscopy of monoclonal antibodies on normal human kidney sections. (a) Mab-G1, $\times 3000$. (b) Mab-G1, $\times 10000$. (c) Mab-E1, $\times 10000$. (d) Mab-M1, $\times 10000$.

Table 2 Binding of monoclonal antibodies to the different organs or different species by indirect immunofluorescence.

Mab	Human	Monkey					Rabbit					Rat					Mouse					
	K	K	Lu	Li	S	M	K	Lu	Li	S	M	K	Lu	Li	S	M	K	Lu	Li	S	M	
G 1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G 2	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G 5	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-
GT1	+	+	/	/	/	/	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GT2	+	+	/	/	/	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GT3	+	+	/	/	/	/	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
E 1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M 2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TB1	+	+	/	/	/	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TB2	+	+	/	/	/	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: positive, -: negative, /: not done,

K: Kidney, Lu: Lung, Li: Liver, S: Stmach, M: Muscle

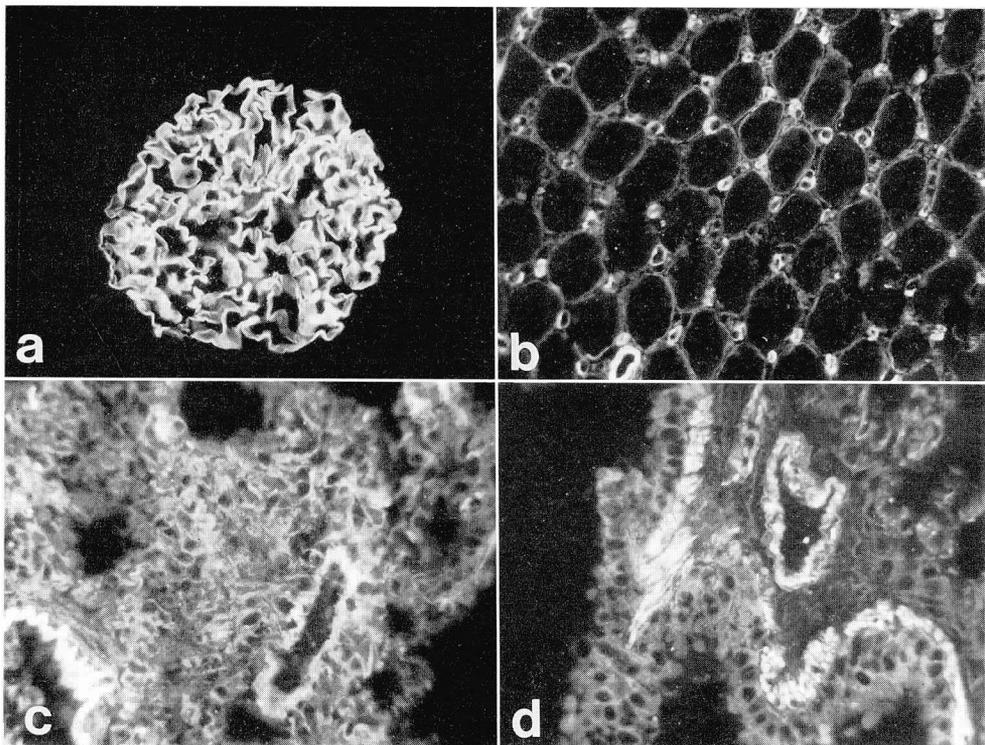


Fig. 3 Indirect immunofluorescence staining of monoclonal antibodies on the different organs or different species. (a) Mab-G1 staining on monkey kidney section. $\times 400$. (b) Mab-M1 on rabbit stomach section. $\times 400$. (c) Mab-G2 on rabbit lung section. $\times 400$. (d) Mab-G5 on mouse lung section. $\times 400$.

の出現量は減少しマウスでは総ての Mab で認識抗原は見い出されなかった。腎以外の臓器においては、肺、肝、胃、筋などを認識する Mab も認められた (Fig. 3a, b, c, d)。

3) 既知の抗原との反応

Mab とIV型 コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンとの反応を Mab-G1~G3, Mab-E1, Mab-M1~M2, Mab-GT1~GT6, Mab-TB1~TB2 において検索したがいずれも既知の抗原との反応は認めなかった。

4) 疾患腎における抗原性の変化

各種腎疾患患者の腎生検切片における IIF の結果について述べる。なお染色に用いた Mab は GBM を認識した Mab-G1 と糸球体上皮細胞を認識した Mab-E1 と主にメサンギウムを認識した Mab-M1 である。

GBM を認識した Mab-G1 で各種疾患の糸球体を観

察すると、MCNS においてはとくに変化を認めず、MN においては肥厚した GBM は抗原性を保ち deposit の部位は小孔状に無反応部位として観察された (Fig. 4a)。Mab とテキサスレッド標識抗ヒト IgG との二重染色では、先に小孔状の無反応部位として観察された deposit と考えられる部位にヒト IgG が染色された。MPGN type I, III では認識した GBM は内皮側の deposit の外側のみに観察され double contour としては認めなかった。また MPGN type II では GBM は double linear となり GBM 中央の dense deposit と思われる部位には GBM の抗原性は認められなかった (Fig. 4b)。

糸球体上皮細胞を認識した Mab-E1 で糸球体を観察すると、MCNS, MN, MPGN などの各種腎疾患で抗原性の消失などの変化は認められなかった。半月体形成型腎炎においては細胞性半月体の部位は染色されなかった

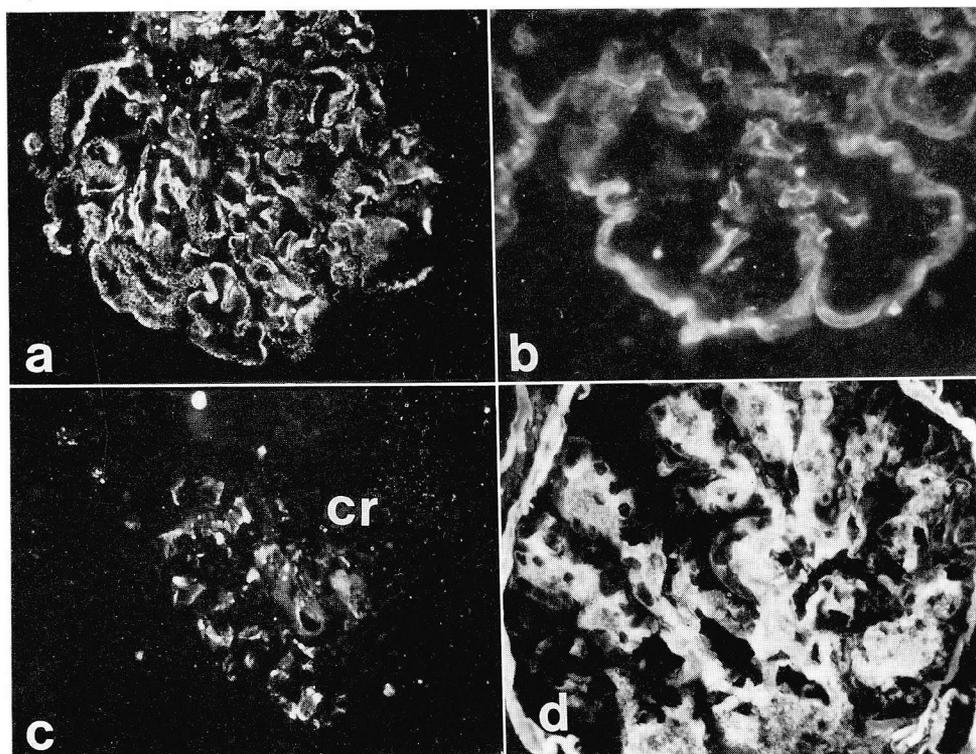


Fig. 4 Indirect immunofluorescence staining of monoclonal antibodies on human kidney sections in various renal disease. (a) Mab-G1 staining in membranous nephropathy. $\times 400$. (b) Mab-G1 in membranous proliferative glomerulonephritis type II. $\times 400$. (c) Mab-E1 in crescentic glomerulonephritis. $\times 400$. cr=crescent (d) Mab-M1 in diabetic nephropathy. $\times 400$.

(Fig. 4c)。

おもにメサンギウムを認識した Mab-M1 で糸球体を観察すると、IgA 腎症、MPGN、糖尿病性腎症でメサンギウム基質の増加に一致して広く染色を認めた (Fig. 4d)。

考 察

ヒト腎糸球体を構成する成分においては、古くは生化学的な分析法¹⁰⁾¹¹⁾によるアミノ酸、糖、リン脂質などの生化学的組成の研究にはじまり最近では、IV型コラーゲン²⁾¹²⁾、ラミニン⁶⁾、フィブロネクチン⁴⁾⁵⁾¹²⁾、プロテオグリカン¹³⁾、エンタクチン¹⁴⁾、amyloid P-component¹⁵⁾などいくつかの構成成分が同定されてきた。なかでも腎炎惹起性抗原として古くから注目されている Goodpasture 抗原 (GP-Ag) については、GBM 内存部位などかなり詳細な点まで明らかにされてきた^{1)16)~19)}。しかしながらその他の多くの腎構成成分についての研究は不明な点が多い。そこで今回、糸球体の多種多様な構成成分に対する Mab を作製し、腎における Mab 認識抗原の分布や腎疾患における変化を観察した。

作製した Mab の一部は既に報告²⁰⁾したが、今回は

新たに8種の Mab を加え全部で22種の Mab を用いて検討を行った。これらの内、c-GBM を免疫して得られたものは20種、o-GBM を免疫して得られたものは2種であった。

c-GBM を免疫した場合、得られた Mab は多くのものが GBM または TBM を IIF で linear に染色した。IIF にて類似の染色様式を呈し腎炎惹起抗原として知られている GP-Ag に関する研究によると、GP-Ag は c-GBM 中に存在するとの報告¹⁸⁾¹⁹⁾²¹⁾が多く、また Pressey などは c-GBM を抗原として作製した Mab の1つが GP-Ag を認識したものであることを報告¹⁹⁾²²⁾している。今回 c-GBM を免疫して作製した Mab が GP-Ag を認識するものであるか否かは不明であるが、IIF での検討では、作製した Mab は GBM のみを linear に染色するもの、GBM と血管を linear に染色するもの、GBM と TBM を linear に染色するもの、GBM と TBM とボウマン氏のうを染色するものなど種々のパターンに分類され、GBM 抗原が多様に存在することが明らかとなった。

一方腎疾患における GBM の抗原性の変化の有無を検討した報告では、Alport 症候群等で GBM の抗原性

Table 3 Comparative intensity of staining of GBM with Mab-G3 and another anti-GBM antibodies in various glomerular disease.

Antibody(Ab) Renal disease	Y. Mino(1989)	M. S. Schiffer(1981)		M. Hara(1986)
	Anti-human GBM monoclonal Ab	Anti-human GBM rabbit serum	Goodpasture Ab	Anti-human GBM rabbit serum
Normal, MCNS	linear	double linear	single linear (inside)	linear
IgA Nephropathy	normal			normal
Membranous Nephropathy	thickened, punched out	inside : normal outside : normal~↑	normal~↓	normal(thickened, punched out)
MPGN (Type I, III)	normal~↓	inside : normal~↓ outside : normal~↓	normal	normal~↓ (thickened)
MPGN (Type II)	double linear	inside : ↓ outside : normal~↓	double linear	
Crescentic GN	normal~↓			normal (collapsed)
Diabetic Nephropathy	normal	inside : ↑ outside : normal~↑		normal(thickened, bilaminar)

MCNS; Minimal change nephrotic syndrome

MPGN; Membranoproliferative glomerulonephritis

↑; increased ↓; decreased

が減弱ないし消失するとの報告²⁸⁾もみられるが、我々も Mab-G1 を用いて、これらの Mab の認識抗原の疾患腎における変化を観察した。疾患腎における GBM の抗原性の検討としては、ヒト GBM 抗原免疫のウサギポリクローナル抗体を用いて Schiffer²⁴⁾, Hara²⁵⁾ などにより報告されているが、Mab を用いた検討は我々の知る限りほとんど報告されていない。Schiffer 等²⁴⁾ は、GBM 免疫ウサギポリクローナル抗体を用いて正常腎を染色した場合、GBM の内、外透明層を double linear に染色し、GP-Ab では GBM の内層を single linear に染色しており、我々の作製した Mab の場合と GBM における染色態度は異なった。そこで疾患腎における Mab-G1 の染色性の変化を彼らの結果と比較して Table 3 に示した (Table 3)。我々の Mab-G1 における検討では MCNS, IgA 腎症, 糖尿病性腎症においては特に変化を認めず、MN においては肥厚した GBM は抗原性を保ち上皮側の deposit の部位は小孔状に抜けて観察された。また、MPGN type I, III では認識した GBM は内皮下の deposit の外側のみに観察され光顕で見られた double contour に相当する二重像は認められなかった。また、MPGN type II においては、GBM は double linear となり dense deposit と思われる部位は GBM の抗原性は認められなかった。以上の結果は Schiffer らの結果と幾分異なるが、これは用いた GBM 抗体の認識抗原の差異によると思われる。

今回の我々の検討においては、疾患腎における GBM の抗原性の変化は量的な変化が主体であった。質的な変化としては、MPGN type II において GBM が double linear に染色され GBM 中心部の抗原性が消失した点があげられるが、この変化が、GBM の変性によるものか、deposit の沈着によるかは不明である。

一方、c-GBM を免疫して得られた Mab の内、Mab-E1 と Mab-E2 は GBM を全く染色せず糸球体上皮細胞のみを染色したが、これは c-GBM 作製過程で混入した糸球体上皮細胞成分を認識した Mab と考えられた。ヒト糸球体上皮細胞に対する Mab これまでいくつかの報告²⁶⁾²⁷⁾が見られるが、それらのほとんどが糸球体

上皮細胞細胞膜を認識したものであり、今回我々の作製した Mab-E1 のような糸球体上皮細胞細胞質内を認識したものは非常に希であると思われた。

この Mab-E1 を用いた場合、疾患腎においては、ネフローゼ症候群の際に腫大した糸球体上皮細胞が巾広く染色された点を除くとその他の疾患では上皮細胞の染色態度には有意の変化は認められなかった。しかし半月体形成型腎炎 (RPGN 3例, MPGN 1例, Purpura N 1例) において、細胞性半月体の部分が染色されなかった点に注目されてみると、細胞性半月体の細胞の由来が糸球体上皮細胞であるか、ポーマン氏のう上皮細胞であるか、あるいはその他の細胞であるか異論のあるところであるが²⁸⁾、今回の結果からは糸球体上皮細胞の由来ではないという意見を支持するものと考えられた。

次に o-GBM を免疫して得られた Mab は Mab-M3 と Mab-M4 の2種であったが、これらは c-GBM による Mab-M1, Mab-M2 と類似の染色態度であり、いずれもメサンギウムが主体で、ごく一部の GBM も染色され、さらに TBM, ポウマン氏のう、間質も染色された。これらの染色態度は特にフィブロネクチンの分布³⁾⁵⁾¹²⁾に酷似すると思われるが、IV型コラーゲン²⁾³⁾¹²⁾やラミニン³⁾⁶⁾の分布とも類似している。しかしこれらの既知の抗原の分布は、報告者や用いた抗体によって、糸球体における厳密な局在はかなり相異がみられ、IIF のみでは同定が難しいと思われた。そこで、Mab-M1~M4 を用いて immunoblotting 法にて、既知の抗原である IV型コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンとの反応を観察したが、いずれの Mab もこれらの抗原を認識したものでなかった。以上より、糸球体には類似の分布を示すものの抗原性は異なった物質が数多く存在することが考えられた。

次に Mab-M1 を用いた疾患腎における染色では、IgA 腎症, MPGN, 糖尿病性腎症等のメサンギウムの肥厚する疾患において幅広く染色された。このことは、IV型コラーゲンに対するポリクローナル抗体とモノクローナル抗体を用いた IIF で糖尿病性腎症のメサンギウムが幅広く染色されるという報告²⁹⁾や、フィブロネクチンに

対するポリクローナル抗体を用いた IIF でメサンギウム増殖性腎炎や MN, MPGN で幅広く染色されるといふ報告⁴⁾⁵⁾等と同様の結果でありこの認識抗原もメサンギウムの肥厚と共に増加しておるものと考えられた。

以上、各種の抗ヒト腎モノクローナル抗体を作製しその認識抗原の性状や分布について検討を行ない興味ある知見を得た。さらに今後はこれらを用いて、GBM の発生的研究³⁰⁾, in vitro における、GBM 成分やメサンギウム基底膜様物質産生の研究、腎疾患における血中、尿中の認識抗原の測定などを行い腎疾患の病態解明の手段として行きたい。

結 論

腎疾患の発症と進展の機序を解明することを目的として、抗ヒト腎モノクローナル抗体 (Mab) を作製した。まず基礎的検討を行い、次いで疾患腎における抗原性の変化を観察し以下の結果を得た。

1. ヒト GBM 抗原をマウスに免疫することにより、22種の Mab を作製し得た。これらの内には GBM のみを認識するもの、糸球体上皮細胞のみを認識するものも含まれた。

2. 作製した Mab は、他種他臓器と反応するものも認められたが、既知の GBM 抗原であるIV型 コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンとの反応は認められなかった。

3. GBM を認識した Mab-G1 を用いた場合、膜性腎症においては、肥厚した GBM は抗原性を保ち deposit の部位は小孔状に抜けて観察された。MPGN type I, III においては、認識した GBM は deposit の外側のみに観察され double contour に相当する所見はみられなかった。MPGN type II では、GBM は double linear となり dense deposit と思われる部位には GBM の抗原性は認められなかった。

4. 糸球体上皮細胞を認識した Mab-E1 を用いた場合、半月体形成型腎炎においては細胞性半月体の部位は染色されなかった。

5. おもにメサンギウムを認識した Mab-M1 を用い

た場合、IgA 腎症、MPGN、糖尿病性腎症でメサンギウム基質の増加に一致して広く染色を認めた。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜った岡山大学第三内科教室太田善介教授に深謝致します。また終始懇切なる御指導と御助力をいただいた岡山大学教育学部高橋香代助教授、岡山大学第三内科平川秀三講師、岡山大学第三内科谷合一陽先生に感謝致します。

なお本論文の要旨の一部は昭和59年11月第27回日本腎臓学会総会、昭和60年4月第82回日本内科学会総会、昭和60年6月第13回日本臨床免疫学会にて発表した。

文 献

- 1) Fish AJ, Carmody KM, Michael AF: Spatial orientation and distribution of antigens within human glomerular basement membrane. *J Lab Clin Med* 94: 447-457, 1979
- 2) Scheinman JL, Foidart J-M, Michael AF: The immunohistology of glomerular antigens: V. The collagenous antigens of the glomerulus. *Lab Invest* 43: 373-381, 1980
- 3) Courtoy PJ, Timpl R, Farquhar MG: Comparative distribution of laminin, type IV collagen, and fibronectin in the rat glomerulus. *J Histochem Cytochem* 30: 874-886, 1982
- 4) Pettersson EE, Colvin RB: Cold-insoluble globulin (fibronectin, LETS protein) in normal and diseased human glomeruli: papain-sensitive attachment to normal glomeruli and deposition in crescents. *Clin Immunol Immunopathol* 11: 425-436, 1978
- 5) Ikeya M, Nagase M, Honda N: Intraglomerular distribution of fibronectin in primary glomerular diseases. *Clin Nephrol* 24: 53-59, 1985
- 6) Scheinman JL, Foidart J-M, Gehron-Robey P, Fish AJ, Michael AF: The immunohistology of glomerular antigens: IV. Laminin, a defined non-collagen basement membrane glycoprotein. *Clin Immunol Immunopathol* 15: 175-189, 1980
- 7) Schiffer MS, Michael AF, Kim Y, Fish AJ: Distribution of glomerular basement membrane

- antigens in diseased human kidneys. *Lab. Invest* 44: 234-240, 1981
- 8) Köhler G, Milstein C: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497, 1975
- 9) Spiro RG: Studies on the renal glomerular basement membrane.: Preparation and chemical composition. *J Biol Chem* 242: 1915-1922, 1967
- 10) Kefalides NA: The chemistry and structure of basement membranes. *Arthritis Rheum* 12: 427-443, 1969
- 11) Spiro RG: Search for a biochemical basis of diabetic microangiopathy. *Diabetologia* 12: 1-14, 1976
- 12) Hancock WW, Kraft N, Clarke F, Atkins RC: Production of monoclonal antibodies to fibronectin, type IV collagen and other antigens of the human glomerulus. *Pathology* 16: 197-206, 1984
- 13) Farquhar MG, Lemkin MC, Stow JL: Role of proteglycans in glomerular function and pathology. *Nephrology vol I*: 580-600, 1984
- 14) Bender BL, Jaffe R, Carlin B: Immunolocalization of entactin, a sulfated basement membrane component in rodent tissues, and comparison with GP-2 (laminin). *Am J Pathol* 103: 419-426, 1981
- 15) Dyck RF, Lockwood CM, Kershaw M, McHugh N, Duance VC, Baltz ML, Pepys MB: Amyloid P-component is a constituent of normal human glomerular basement membrane. *J Exp Med* 152: 1162-1174, 1980
- 16) McPhaul JJ, Dixon FJ: Characterization of human anti-glomerular basement membrane antibodies eluted from glomerulonephritic kidneys. *J. Clin Invest* 49: 308-317, 1970
- 17) Wieslander J, Bygren PG, Heinegård D: Human glomerular basement membrane: Heterogeneity of antigenic determinants. *Biochim Biophys Acta* 553: 244-254, 1979
- 18) Fish AJ, Lockwood CM, Wong M, Price RG: Detection of Goodpasture antigen in fractions prepared from collagenase digests of human glomerular basement membrane. *Clin Exp Immunol* 55: 58-66, 1984
- 19) Pusey CD, Dash A, Kershaw MJ, Morgan A, Reilly A, Rees AJ, Lockwood CM: A single autoantigen in Goodpasture's syndrome identified by a monoclonal antibody to human glomerular basement membrane. *Lab Invest* 56: 23-31, 1987
- 20) Mino Y, Hirakawa S, Ota Z: Production of monoclonal antibodies to human glomerular basement membrane. *Acta Med Okayama* 38: 483-486, 1984
- 21) Wieslander J, Kataja M, Hudson BG: Characterization of the human Goodpasture antigen. *Clin Exp Immunol* 69: 332-340, 1987
- 22) Pressey A, Pusey CD, Dash A, Peters DK, Lockwood CM: Production of a monoclonal antibody to autoantigenic components of human glomerular basement membrane. *Clin Exp Immunol* 54: 178-184, 1983
- 23) McCoy RC, Johnson HK, Stone WJ, Wilson CB: Absence of nephritogenic GBM antigen (s) in some patients with hereditary nephritis. *Kidney Int* 21: 642-652, 1982
- 24) Schiffer MS, Michael AF, Kim Y, Fish AJ: Distribution of glomerular basement membrane antigens in diseased human kidneys. *Lab Invest* 44: 234-240, 1981
- 25) Hara M, Mase D, Inaba S, Higuchi A, Tanizawa T, Yamanaka N, Sugisaki Y, Sado Y, Okada T: Immunohistochemical localization of glomerular basement membrane antigens in various renal diseases. *Virchows Arch [Pathol Anat]* 408: 403-419, 1986
- 26) Falkenberg FW, Müller E, Riffelmann H-D, Behrendt B, Waks T: The production of monoclonal antibodies against glomerular and other antigens of the human nephron. *Renal Physiol Basel* 4: 150-156, 1981
- 27) Hancock WW, Atkins RC: Monoclonal antibodies to human glomerular cells: A marker for glomerular epithelial cells. *Nephron* 33: 83-90, 1983
- 28) Salant DJ: Immunopathogenesis of crescentic glomerulonephritis and lung purpura. *Kidney Int* 32: 408-425, 1987
- 29) Scheinman JI, Tsai C: Monoclonal antibody to type IV collagen with selective basement mem-

- brane localization. *Lsb Invest* 50: 101-112, 1984
- 30) Michael AF, Yang J-Y, Falk RJ, Bennington MJ, Scheinman JI, Vernier RL, Fish AJ: Monoclonal antibodies to human renal basement membranes: Heterogenic and ontogenic changes. *Kidney Int* 24: 74-86, 1983