ループス腎炎の免疫学的研究

病変腎組織での nuclear ribonucleoprotein (RNP) 抗原の証明

岡山大学医学部第三内科教室（主任：太田善介教授）

倉　田　典　之

（昭和57年11月17日受稿）

Key words：全身性エリテマトーデス，ループス腎炎，
抗核抗体，抗 RNP 抗体，
抗原特異的免疫複合体

緒　　言

ループス腎炎は，血清病型腎炎，すなわち流血中の免疫複合体（以下 IC と略す）の腎組織への沈着により発生する腎炎と考えられている[1]．この免疫複合体の組成に関しては，二本鎖DNA (ds-DNA)，抗 ds-DNA 抗体が重要視されている[2~4]．

一方，全身性エリテマトーデス（SLF）患者の腎組織には，免疫グロブリンと補体成分が顆粒状沈着物（組織レベルでの IC）として証明される．この組織内 IC は，高頻度に検出されるが，その分布と組成の 2 点において，強い多様性を示す[5,6]．したがって，この多採な免疫病理所見を単一な病因，たとえば抗 ds-DNA 抗体をふくむ IC のみで説明することは困難である．

一方，SLE 患者の流血中，および腎組織での分析は，ds-DNA 系について若干の報告がみられるにすぎない[4]．血中 ds-DNA IC については，Harbecls ら[7]，腎組織での ds-DNA IC では Köfflerらによる報告があるが[4]，陽性の追試成績はほとんど報告されていない．

筆者らは，抗 ds-DNA 抗体以外の抗核抗体 (ANA)，すなわち nuclear acidic protein(Sm)，nuclear ribonucleoprotein (RNP) 抗原に対する抗体も，病因論的に重要であることを報告してきた[8]．この所見を，より確実にするために，本論文では病変腎組織において RNP 抗原の直接的証明を試みた．

対 象 と 方 法

腎組織：50例の SLE 患者から得た，生検腎組織を対象とした．SLE の診断は，アメリカリウマチ協会の診断予備基準に[9] したがった．ループス腎炎の分類は，Baldwin ら[10]のものにしたがった．対象50例の腎組織分類のうちわけは，mesangial lupus nephritis (Mes LN) 13例，membranous lupus nephritis (M LN) 7 例，diffuse proliferative lupus nephriti (DPLN) 30例であった．

対照として25例の原発性糸球体腎炎を検査した．25例の組織学的分類は，membranous glomerulonephritis (MGN) 10例，Ig A glomerulonephritis (Ig A GN) 13例，membranoproliferative glomerulonephritis (MPGN) 2 例であった．

ループス腎炎，原発性糸球体腎炎の全例について，螢光抗体法による検索をおこない，全例の腎糸球体に IC を確認した．

ANA の分析：抗 ds-DNA 抗体は，既報のごとく radio immuno assay でおこない，% binding で測定した[11]．抗 Sm 抗体，抗 RNP 抗体の同定には，免疫二重拡散法，免疫電気向流法を用いた[12]．Sjögren syndrome (SS)-A 抗原，SS-B 抗原に対する沈降抗体は，免疫二重拡拡散法で検出した．その他，Mu, Sclero derma (Scl)-I 抗原に対する抗体などを検出した．

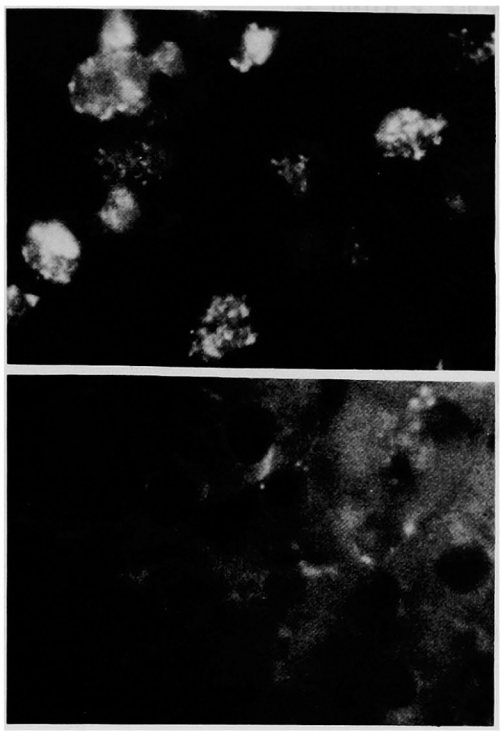

FIGURE LEGEND

Fig. 1. Nuclear staining of mouse kidney section produced by FITC labelled antibody to RNP.

Bright speckled nuclear staining was obtained when mouse kidney section was incubated with FITC labelled antibody to RNP(a). This staining was completely inhibitted by preincubation of the section with non labelled antibody to RNP(b).

抗 RNP 抗体：抗 RNP 抗体は，mixed connective tissuc disease（MCTD）患者血清から分離した．すなわち，抗 RNP 抗体単独陽性を示す MCTD 患者血清を用い，家兎胸腺アセトン粉末（ペルフリーズ社製）の phosphate buffered saline（PBS），PH 7.4 による抽出液（RTE）を抗原として，試験管内で抗原抗体複合物を作成した．この反応は，抗原抗体至適域でおこなった．上記沈澱物は，冷 PBS で3回洗滌後，0.01M HCl 液に融解し，56°C, 30分間反応させた．

上記反応物に対して，25%硫安となるように飽和硫安を加え，その沈澱物を除去し，上清を最終50%硫安濃度とし沈澱物を得た．待られた沈澱物を，PBS にて透析し，少量 PBS に溶解した．この溶解液は，免疫電気泳動では IgG のみが検出され，免疫二重拡散法では，抗 RNP 抗体活性を示した．この様にして得られた RNP 抗体は少量であるため，下記のごとくして得た fluorescent isothiocyanate（FITC）標識抗 RNP 抗体の blocking test に供した．

FITC 標識抗 RNP 抗体は，次のごとく作成した．すなわち，前述 MCTD 患者血清を33%硫安法にて処理し，粗 IgG 分画を得た．これを DEAE カラムにより精製し，型通り FITC を標識した．標識抗 RNP 抗体のうち，F/P 比が1.0～1.6のものを実験に使用した．

FITC 標識 RNP 抗体の特異性：標識抗 RNP 抗体は，マウス凍結腎切片と反応させると，その核を speckled pattern に染色した(Fig Ia)，この染色は，RNP IC より誘出した末標識抗 RNP 抗体による前処理で完全にブロックされた（Fig Ib）．また，マウス腎切片を RNase で処理することによっても，この染色は消失した．FITC 標識抗 RNP 抗体は，免疫二重拡散法で検査すると，RTE に対して一本の沈降線を生じ，この沈降線は，MCTD 患者血清と RTE 間に生じた抗 RNP 抗体の沈降線と完全に一致した（Fig 2）．

FITC 標識抗 RNP 抗体を用いた腎組織内 RNP 抗原の検出は，螢光抗体直接法によった．この際，腎組織固有の細胞核に RNP 抗原が存在するため，speckled の核染色を呈し，IC としての RNP 抗原の判定は困難であった．そこで Fig 3 に示す操作を加えた．

腎組織核の RNP 抗原は，高張食塩水による室温20分の処理で，ほぼ完全に誘出，除去できた．高張食塩水処理後切片を PBS にて，室温15分中和後，FITC 標識抗 RNP で染色した．細胞核からの RNP 抗原の除去には，1M Nacl も 2M Nacl も同様の効果がみられた．凍結組織からクリオスタットによる 4μ の切片を作成後，24時間以上低温保存した場合には，上述の高張食塩水処理による細胞核からの RNP 抗原の誘出，除去は不完全となる傾向がみられた．しかし，speckled の核染色自体は，著明な低下を示した．

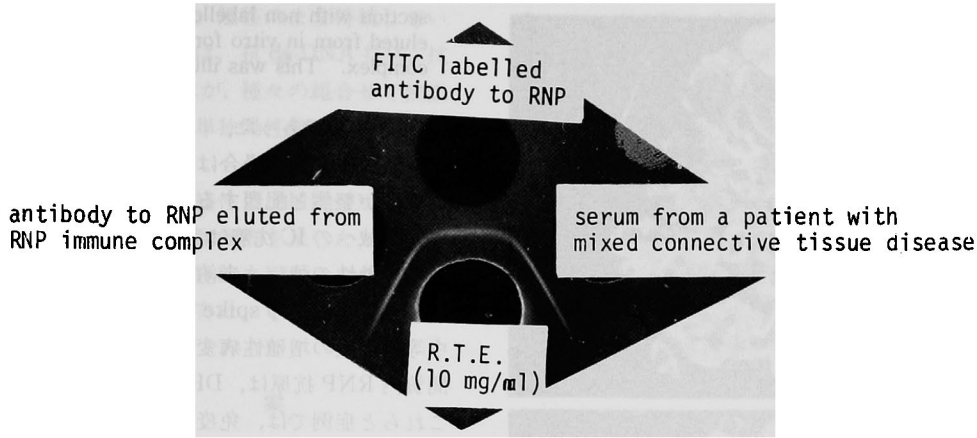

Fig. 2. Precipitin reaction of FITC labelled antibody to RNP against PBS extracte of rabbit thymus aceton powder(RTE) by double diffusion technique.
Top well contains FITC labelled antibody to RNP. Right well contains diluted serum from a patient with mixed connective tissue disease. Non labelled antibody to RNP eluted from in vitro formed RNP immune complex is in left well. Precipitins produced by 3 wells against RTE antigen (bottom well) showed complete identity.

kidney section(4 μ)
↓
incubation with 2M NaCl for 20 min.
↓
wash by PBS for 15 min.
↓
incubation with FITC labelled antibody to RNP
↓
wash by PBS for 15 min.
↓
immunofluorescent microscopy

Fig. 3. Procedure to demonstrate RNP antigen by modified immunofluorescent technique.

陽性7例中3例では，糸球体のみでなく，間質内にもRNP抗原が検出された．

RNP抗原陽性例の組織分類は，Mes LN 1，MLN 1例，DPLN 5例であった．DPLN 5例中3例で，間質内RNP抗原が検出された．

2）腎組織RNP抗原の特性

腎組織のRNP抗原は，免疫グロブリンや補体成分と同様に，顆粒状沈着物として検出され糸球体内RNP抗原の分布は，メサンギウム領域と毛細血管内腔側であった．この抗原分布は，IgGなどの免疫グロビリンおよび補体成分と基本的には同一であったが，量的にはやや少量であった．MLNの1例で，RNP抗原が陽性であった．この例では，RNP抗原はメサンギウム領域に限局しており，係蹄壁外側に突出した

Table 1. Incidence of positive deposition of RNP antigen in renal tissue.

	no. of positive glomerular RNP	no. of positive interstitial RNP
lupus nephritis	7/50	3/50
mesangial lupus nephritis	1/13	0/13
membraneous lupus nephritis	1/ 7	0/ 7
diffuse proliferative lupus nephritis	5/30	3/30
primary glomerulonephritis	0/25	0/25

結　　果

1）腎組織でのRNP抗原の検出(Table 1)．

腎組織におけるRNP抗原は，ループス腎炎50例中7例で陽性であり，対照とした25例の原発性糸球体腎炎では，全例陰性であった．

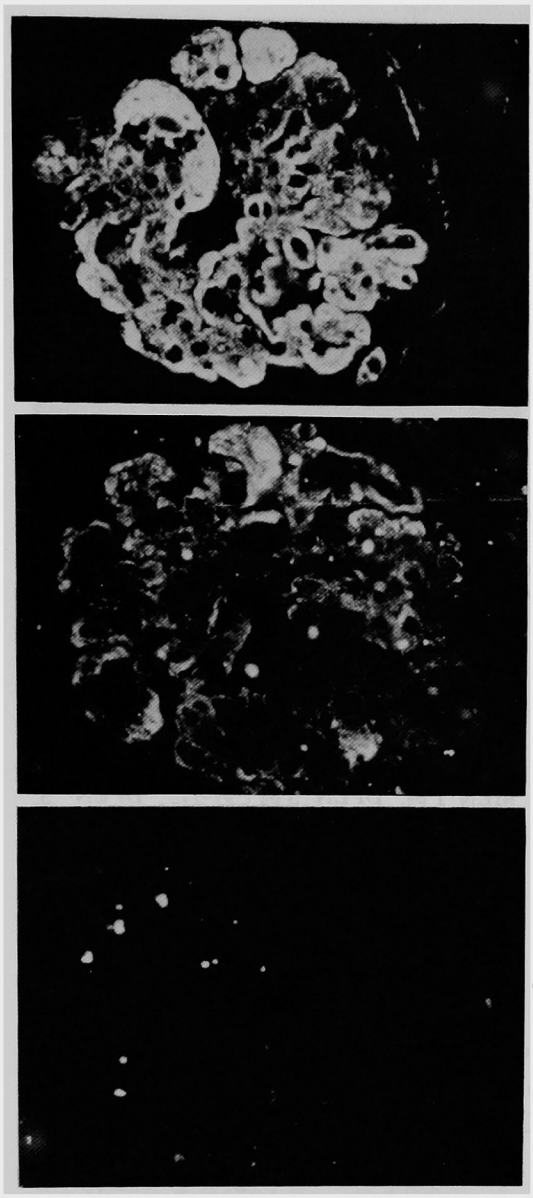

Fig. 4. Demonstration of glomerular RNP antigen in a patient with systemic lupus erythematosus.

Direct immunofluorescence showed massive deposition of Clq in a glomerus(a). As shown in middle(b), granular deposition of RNP antigen was demonstrated in glomerulus of serial section. The distribution of RNP was mainly subendothelial site of capillary tuft and mesangium. Pretreatment the section by high mollar sodium chloride cause no reaction of EITC labelled antibody to RNP with cell nuclei. The staining was completely inhibitted by preincubation of the section with non labelled antibody to RNP eluted from in vitro formed RNP immune complex. This was illustrated in bottom(c).

ICには陰性であった.

一般にMLNの場合は，係蹄壁外側に突出したIC が整然と配烈するのが特徴で，メサンギウム領域へのIC沈着は乏しい．本例は，免疫学的活動性の強い，未治療SLEであり，組織学的にも，び慢性のspike formationに加えて，中等度以上の増殖性病変がみられた.

間質内RNP抗原は，DPLNの3例でみられた．これらと症例では，免疫グロブリンおよび補体成分は，尿細管基底膜，毛細血管壁，結合組織内に大量に認められた．RNP 抗原はより少量であるが，ほぼ同様の分布を示した.

DPLNを呈した2例について，blocking test，酵素処理による変化を検討した．このうち1例，TM例を図示する(Fig 4)．Fig. 4-a は，TM例の C_1q 染色による糸球体である．係蹄内腔側およびメサンギウム領域に大量の C_1q が顆粒状沈着を示す．Fig. 4-bは，TM例のRNP 抗原である．係蹄壁および係蹄内腔側に，RNP 抗原の顆粒状沈着がみられる．その他，メサンギウム領域にもRNP抗原の沈着がみられる.

TM例の連続切片の1枚について，FITC 未標識抗RNP抗体を反応させ，その後に標識抗体で染色したものをFig 4-Cに示す．RNP 抗原は，上記の操作により，完全に陰性化している.

しかし，このRNP 抗原の染色は，組織切片のRNase 処理では消失しなかった.

3）RNP抗原性例の臨床免疫学的特徴

7例全例で，急性期SLEの臨床症状がみられ，腎生検は，未治療時または，治療開治後短期間内におこなった.

全例で著明な低補体血症がみられ，血中ICは5例で異常高値を示した．他の2例の血清は，採取後3ヶ月以上，−20°Cに凍結されたものであり，保存期間内にIC活性が低下した可能性が強い.

血中抗RNP抗体は5例で陽性であった．うち1例，TM例では，治療によりこの抗体は1ヶ月後に陰転化し，以後4年間陰性が持続している．抗RNP 抗体陰性の2例は，腎生検後，

1～2年の観察期間中，陰性のまま持続している．他のANAとしては，抗ds-DNA抗体，抗Sm抗体，抗ss-A抗体が，種々の組合せで検出された．抗RNP抗体単独陽性例は，1例のみであった．

臨床的腎症状は，持続性蛋白尿陽性が6例で，うち3例がネフローゼ症候群を呈した．Mes LNの1例では，顕微鏡的血尿がみられたにすぎなかった．腎機能障害は，1例で高度，3例で中等度，3例で正常であった．

考　　案

ループス腎炎が，ICにより発生する腎障害であることは，ほぼ確実視されている．その理由の一つは，SLE患者の血中に，ICが高額度に検出される事実であり，他の一つは，腎組織におけるICの沈着が高率に認められる事実である．

血中ICの検出に関しては，数多くの方法が開発されているが，いずれの方法にも一長一短があり，厳密な意味でICのみを検出できる方法はない．これらの方法で検出されているのは，いずれもIC様物質である．

一方，腎に検出されるICに関しても，同様の事が指摘される．すなわす，免疫グロブリンと補体の顆類状沈着物をICとみなしているが，抗原の同定は，例外的にしかなされていない．

したがって，流血中であれ，腎組織内であれ，ICの組成の分析が重要な課題となってくる．換語すれば，抗原，または抗体特異的IC の証明が重要である．

この観点から，従来の報告をみると，核抗原の証明[4]とウイルス抗原の証明に関する若干の報告[13,14]がなされているにすぎない．核抗原の証明については，Köfferらが，病変部位にDNAを証明したが[4]，以後約10年間，陽性の追試は報告されていない．ウイルス抗原に関しては，SLE類似病変を自然発生するマウスでは証明されたが[15]，ヒトSLEについては，この知見は必ずしも十分に検討されていない．Panemらの報告[14]ではSLE腎の100%にウイルス抗原を証明しているが，その染色態度はIgGや補体と全く同一であり，特異性に疑問が残る．

今回筆者は，核抗原の一つであるRNP抗原を，ループス腎炎の病変部位において，ICの構成因子の一つとして証明した．この知見は，従来，他に報告をみないものである．

一般に，核抗原の病変部位における証明は，きわめて困難である．その最大の理由は，核抗原特異的抗体が，実験的に作成できない事と，組織固有の核にも同一抗原が含まれている事の2点にある．ある核抗原とのみ反応する特異抗体は，患者血清から得る以外には方法がないが，患者血清中には多種類のANAが混在する事が多く，厳密にmonospecificなANA を分離する事は困難である．

筆者は，MCTD患者血清から抗RNP抗体を分離した．すなわち，患者血清からIgGを分離し，FITC を標識後実験に供した．この標識抗体の特異性は，以下に記す理由により，きわめて高いと考えられる．①，患者血清中には，既知のANA活性は，抗RNP 抗体以外には認められなかった．②，抗RNP 抗体の力価は，受身凝集反応で100万倍以上の著明高値であったため，FITC 標識抗RNP抗体は，血清希釈で500～1000倍のものを使用できた．したがって，未知のANAを含めて，大半の抗体活性は，この希釈では失活していると考えられる．③，FITC標識抗体は，ラット肝の細胞核をspeckled に染色した．この染色は，ラット肝のRNase 処理により消失した．さらに，in vitroで作成したRNP ICから，溶出したmonospecific な抗RNP抗体により，この核染色は抑制された．

この抗血清を用いて，7例のSLE腎組織に対応抗原を証明したが，この染色は，RNase 処理ではほとんど抑制されなかった．この所見について，検討すべき点の一つは高張食塩水処理による影響である．1～2M Naclは，生体内ではあり得ない条件であり，腎に沈着したICに変化を与える可能性は否定できない．さらに高張食塩水処理により，細胞核のRNP 抗原のみが失活，除去され，IC中のRNP抗原は抗原性を継持できるか否かの疑問も生ずる．これらの点については，下記のごとく検討した．

①高張食塩水処理後の切片について，螢光抗体法では，免疫グロブリン，補体成分の抗原性は失活しなかった．②予備実験において，2M

Nacl処理は，腎組織に沈着したRNP ICの抗原性を失活させず，細胞核のRNP抗原は失活させた．予備実験は，in vitroで作成したRNP ICを，家兎の腎動脈に注入し，糸球体に沈着したRNP ICを用いておこなった．このRNP抗原もRNaseでは失格しなかった．

以上から，腎組織のRNP ICのRNP抗原が，RNase処理で失活しなかった理由は，抗原抗体反応による両者間のinteractionによる結果と解釈した．さらに，2症例での検討ではあるが，2M Nacl処理切片を使用したRNP抗原の染色は，monospecificな抗RNP抗体により完全に抑制されたことから，高張食塩水処理後もIC中のRNP抗原は失活しないことがうかがえる．この点に関して，より詳細な検討が望まれるが，生検で得られる腎組織には量的制限があり，方法論的に困難であった．

次の問題点は，腎にRNP抗原陽性を呈した7例中2例で，血中の抗RNP抗体が検出されなかった事である，この解釈はむつかしく，現在，明解な説明はできない．最も妥当な可能性は，生検時には，抗RNP抗体はICを形成し，その大半が血中から消失し，大量ステロイド剤投与などにより，抗体産生が抑制されたとする説明である．この可能性を検討するためには，血中IC中にRNP抗原または抗体を検出する必要があるが，それは今後の課題である．

従来，ループス腎炎と抗ds-DNA抗体の密接な関係が指摘されてきた．しかし，生検腎の組織像，免疫病理像は強い多様性を示すことも事実である．さらに，未治療時から長期間の経過観察にもかかわらず抗ds-DNA抗体が終始陰性の症例も存在する．以上の知見に加えて，剖検腎を用いての各種抗体溶出実験の結果では，抗ds-DNA抗体以外に抗Sm抗体，抗RNP抗体が高率に検出された．

以上の事実から，筆者らは，本症の病因に関して以下の仮説を持つに至った[16]．すなわち，ループス腎炎を発生さすICは多種類あり，ANAを含むICは，その一つである．ANAICのうち，ds-DNA ICは，主要因子の一つであるが，RNP IC, Sm ICなど他の系のICも病困論的に重要である．これら多種類のICの量的質点差異が，本症患者の免疫病理像，組織象の多様性の主因であろう．今回の成績は，上記仮説の一部を立証したものと考える．

結　　語

ループス腎炎の腎病変部位において，RNP抗原の証明を試み，下記の結論を得た．

①50例中7例のループス腎炎患者の糸球体に，ICの組成としてRNP抗原を証明した．7例中3例では，間質内にもこの抗原が検出された．対照の原発性糸球体腎炎では，全例陰性であっ

②RNP抗原の沈着部位は，メサンギウムと係蹄内腔側であった．間質のRNP抗原は，尿細管基底膜，毛細血管壁に認められた．

③RNP抗原陽性例は，組織学的には，DPLN 5例，M LN 1例，Mes LN 1例であり，増殖性病変とこの抗原の関連が認められた．

④RNP抗原陽性例は，いずれも活動性の免疫血清学的異常を示した．

⑤RNP抗原を含むICも，ループス腎炎惹起因子の一つとして病因論的に重要である．

稿を終えるにあたり，岡山大学第三内科前主任，大藤　眞教授の御指導に深謝する．

なお，本論文の要旨は，第24回日本腎臓病学会(1981，於東京)および第15回国際リウマチ学会(1981，於パリ）で発表した．

本研究の一部は，厚生省特定疾患，腎糸球体障害調査研究班の研究費によりおこなった．

文　　献

1. Dixon, F.J.: The pathogenesis of glomerulonephritis. *Am. J. Med.* **44**, 493—498, 1968.
2. Tan, E.M., Shur, P.H., Carr, R.I. and Kunkel, H.G.: Deoxyribonucleic acid(DNA) and antibody to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* **45**, 1732—1740. 1966.
3. Shur, P.H. and Sandoson, J.: Immunologic factors and clinical activity in syste ic lupus erythematosus. *N. Engl. J. Med.* **278**, 535—538, 1968.
4. Koffler, D., Shur, P.H. and Kunkel, H.G.: Immunological studies concerning.the nephritis of systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.* **126**, 607—623, 1967.
5. Koffler, D., Agnello, V., Carr, R.I., and kunkel, H.G.: Variable patterns of immunoglobulin and complement deposition in the kidneys of patients with svstemic lupus erythematosus. *Am. J. Pathol.* **56**, 305—311, 1969.
6. Kurata, N. and Ofuji, T.: Immunopathological study on lupus pephritis. In *Systemic Lupus Erythematosus. ed.* Japan Med. Res. Found. Univ. of Tokyo press. Tokyo, pp. 331—335, 1978.
7. Harbreck, R.J., Dradana, E.J., Kohler, P.F. and Carr, R.I.: DNA: anti DNA complexes: Their Their detection in systemic lupus erythematosus sera. *J. Clin. Invest.* **52**, 789—795, 1975.
8. Kurata, N., Hara, I., Kinashi, M., Akita, H. and Ofuji, T.: The correlation of antibodies to nuclear ribonucleoprotein(RNP) and nuclear acidic protein(Sm) with nephritis in pat ents with systemic lupus erythematosus(SLE). *Contrib. Nephrol.* **9**, 17—24, 1978,
9. Conen, A., Reynolds, W.E., Franklin, E.C., Kulka,J.P., Ropes, M.W., Snulman, L.E. and Wallace, S.I.: Preliminary criteria for class ficat on of systemic lupue erythematosus. *Bull. Rheum. Dis.* **21**, 643—648, 1978.
10. Baldwin, D.S., Gluck, M.C., Lowenstein, J. and Gallo, G.R.: Lupus nephritis. clinical course as related to morphologic forms and their transitions. *Am. J. Med.* **62**, 12—30, 1977.
11. 西村隆夫，宮脇昌二，倉田典之，垂水檀直，大藤　眞：Actinomycin D-(^{3}H)-DNA (AM-DNA) 法による DNA 抗体の検索．リウマチ，**11**，328—335，1971.
12. Kurata, N. and Tan, E.M.: Identification of antibodies to nuclear acidic antigens by counter immunolectrophorzsis. *Arthritis Rheum.* **19**, 578—580, 1976.
13. Mellors, R.C., and Mellors, J.W.: Antigen related to mammalian type-C RNA viral P30 proteins is located in renal glomeruli in human systemic lupus esythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **73**, 233, 1976.
14. Panem, S., Ordonez, N.G., Katz, A.I., Spargo, B.H. and Kirstein, W.H.: Viral immune commune complexes in systemie lvpus erythembtosus. Specificity of C type viral complexes *Lab. Invest.* **39**, 424—420, 1978.
15. Yoshiki, T., Mellors, R.C., Stand, M. and August, J.T.: Uhe viral envelope glycoprotein of murine lzukemia virus and the pathogensis of immune complex glomerulonzphritis of New Zealand mice. *J. Exp. Med.* **140**, 1011—1027, 1974.
16. Kurata, N., Hara, I., Miyawaki, S. and Ofiji, T.: Heterogeneity of glomerular immune complexes in pafients with systemic lupu eryhematosus. *Arthritis Rheum.* (abs). **22**, 632, 1979

Immunological study of lupus nephritis: Demonstration of nuclear ribonucleoprotein(RNP) in diseased kidney from patients with systemic lupus erythematosus.

Noriyuki KURATA

The Third Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School. Okayama 700, Japan.

(Directors; Ex-Prof. T. Ofuji and Prof. Z. Ota.)

Renal tissue from 50 patients with systemic lupus erythematosus(SLE) and 25 with primary glomerulonephritis were tested for the presence of nuclear ribonucleoprotein (RNP) by an immunofluorescent technique. Antibody to RNP was obtained from a patient with mixed connective tissue disease. Fluorescent isothiothianate(FITC) was labelled on purified IgG from the serum. Bright speckled nuclear staining was obtained when the tissue section of mouse kidney was incubated with this conjugate. The staining was completely inhibited when the section was preincubated with non labelled antibody to RNP eluted from RNP immune complex formed in vitro.

Granular deposition of RNP antigen in glomeruli was found in 7 of 50 SLE kidneys. The antigen was distributed mainly in the subendothelial site of the glomerular basement membrane and mesangium. The staining was completely inhibited by preincubation of the section with non-labelled antibody to RNP. Deposition of RNP was also found along the tubular basement membrane in 3 of 7 SLE. None of the kidneys from primary glomerulonephritis patients showed positive staining of RNP irrespective of the presence of immunoglobulins and complements in glomeruli.

The present observations support the hypothesis that antibody to RNP besides antibody to double stranded DNA might also be of importance in the pathogenesis of renal disease in SLE.