

# 酵素抗体法による腎疾患の研究

岡山大学医学部第三内科（主任：大藤真教授）

松 本 光 仁

（昭和52年2月17日受稿）

## I 緒 言

免疫組織学は1941年 Coons ら<sup>1)</sup>により開発された蛍光抗体法によって画期的な進展を遂げたことは周知の事実である。

本法は極めて優れた方法であるが、永久標本が作れぬこと、暗視野であるために周囲の組織が認識しにくいこと、電子顕微鏡による観察が不可能である等の欠点も有している。これらを改善するために Pressman ら<sup>2)</sup>の放射性同位元素標識抗体法（1948年）、Singer ら<sup>3)</sup>の Ferritin 抗体法（1959年）、さらに金属による抗体標識法<sup>4)</sup>等が考案されたが、手技の複雑さ、抗体価の低下等のため Ferritin 抗体法を除いてあまり実用化されていないのが現状である。

1966年 Nakane ら<sup>5)</sup>は抗体を酵素によって標識する酵素抗体法を考案し、この方法によれば光顕的にも電子顕微鏡的にも観察出来ることを示し、特異性も高いことを証明した。

本法はすでに内分泌臓器<sup>6)</sup>やウイルス<sup>7)</sup>の研究に応用されているが、腎疾患の研究に利用された報告は著者らの研究グループの報告<sup>8)10)</sup>を除いて知る限りではなく、今回はその後得られた新しい光顕的ならびに電子顕微鏡的成果について報告する。

## II 実験材料および実験方法

### a) 実験材料

光顕的酵素抗体法ならびに蛍光抗体法の対象は当科ならびに当科関連病院に入院中の患者19例、のべ22検体、電顕的酵素抗体法の対象は当科入院患者5例、5検体である。各々の患者の年令、性、病名、腎生検時の投薬は表1に示す通りであって、その診断は臨床症状、臨床諸検査成績、腎生検材料の組織学的検討ならびに蛍光抗体法および一部の例では電子顕微鏡による検索の結果決定した。

腎組織の採取は経皮的腎生検によって Silverman 針で行い、組織片は多くの症例で2コ少数例で1あ

るいは3コ得た。

使用した材料に含まれていた腎糸球体の数は通常病理組織標本では約10コ、蛍光抗体法および酵素抗体法では約5コ、電子顕微鏡標本で約2コであった。

### b) 実験方法

1. 経皮的腎生検法：多くの症例では放射線科にてレントゲン透視下に腎生検を行った。

まず透視台に患者を背臥位に寝させ、ペンタゾシン15~30mgを筋注後DIP用コンラキシンL100mlを約10~20分間で点滴静注し、終了後腹臥位にさせレントゲン透視下で穿刺最適部位（通常は左腎下極部）を決定し肉筆で朱印しておく。朱印した皮膚の周辺を消毒した後1%キシロカインで皮下を麻酔し、次いで皮膚に垂直にカテラン針を立て腎に到達するまでの組織を麻酔しておき、レントゲン透視を行い針が穿刺最適部位を刺していることを確かめる。

次にメスで朱印部の皮膚を約3mm切開し、Silverman 針を挿入し再度レントゲン透視を行い位置を確認し、呼吸を止めさせ腎組織を採取する。

原則として腎組織は2コを採取し、穿刺回数3回までとした。終了後は各自の病室で500~1000mlの輸液中に止血剤を混入して点滴した。

少数例では従来<sup>11)</sup>の坐位による blind の経皮的腎生検を行なった。

2. 組織学的方法：得られた材料は皮質部を選んで3コに分け、その一つを10%ホルマリン溶液で固定し、常法に従ってヘマトキシリン・エオジン染色、PAS染色、PAM染色と多くの場合マッソン染色を併用した。

3. 蛍光抗体法：得られた材料の一つを直ちにアセトン・ドライアイスで凍結し、教室で行っている常法<sup>12)</sup>に従って染色し観察を行った。染色に用いた抗体は抗ヒト IgG, IgM, IgA,  $\beta_2$  およびフィブリノーゲン家兔血清で Hyland 製である。

これらの検定は酵素抗体法と同様に行った。

4. 電子顕微鏡：通常の電顕的観察には得られた

表 1 症例別酵素抗体法と蛍光抗体法の成績

Case No.	Name	Age	Sex	Diagnosis	酵 素 抗 体 法										Pattern	Treatment	
					IgG	IgM	IgA	$\beta_2c$	Fib	IgG	IgM	IgA	$\beta_2c$	Fib			
1	K. K.	40	M	M N	+						+	-	-	+	-	Granular	non steroid
	K. K.	40	M	"	+	±	±	+	±	+	+	-	-	+	±	"	steroid
2	S. M.	42	M	"	+	+	±	+	-	+	+	±	±	+	-	"	steroid ISA
	K. K.	28	F	"	+	+	+	-	±	+	+	-	-	-	-	"	no
3	K. K.	28	F	"	+	+	+	-	±	+	+	-	-	-	-	"	steroid ISA
	H. F.	31	F	"	+	+	±	+	+	+	+	-	+	+	+	"	Steroid non steroid
4	M. K.	22	F	IgA · IgG Nephropathy	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	Mesangial	non steroid	
5	Y. N.	23	M	"	±	±	+	±	±	±	±	+	+	+	"	no	
6	Y. T.	31	F	"	+	-	+	+		+	-	+	+	-	"	no	
7	Y. K.	27	M	"	±	-	+	+	-	+	-	+	+	-	"	no	
	Y. G.	16	M	MPCN	+										Peripheral lobular	Steroid Steroid ISA	
9	Y. G.	16	M	"	+	±	-		+	+	-	-	+	+		no	
	T. U.	26	M	C G N	+					+	+	+	+	+		no	
10	J. H.	25	M	"	-	±				-	±	-	-	+		no	
11	H. K.	13	M	"	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		no	
12	K. T.	27	F	"	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		no	
13	T. O.	17	F	"	+	-	±	+	+	+	-	+	+	±		no	
14	H. K.	29	M	"	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-		no	
15	Y. M.	17	M	"	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	Linear	non steroid	
16	N. K.	12	M	"	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	Granular & Mesangial	no	
17	N. H.	33	F	Nephrotic Synd	±					±	-	±	+	±		steroid non steroid	
18	K. W.	24	M	Prader · Willi · Synd	±					±				+	Linear	no	

M N : 慢性腎症  
MPCN : 慢性腎症増殖性腎炎  
CGN : 慢性糸球体腎炎  
non steroid : 非ステロイド性消炎剤  
I S A : 免疫抑制剤

材料の一つを直ちに5%グルタルアルデヒドにて4℃で固定し、以下通常の方法<sup>13)</sup>に従ってエポン包埋し、超薄切片を作製して日立HS 8型電子顕微鏡または日本電子JEM 7型電子顕微鏡にて観察した。

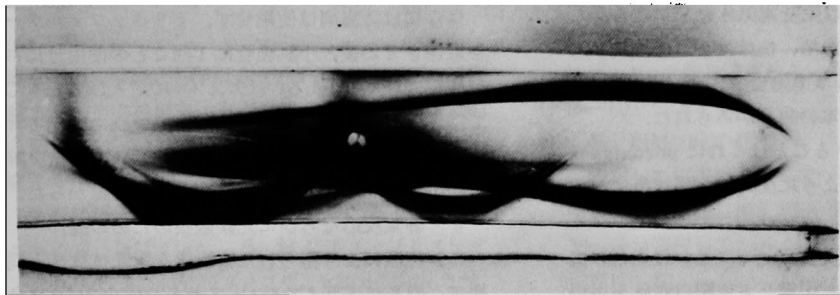
5. 光顕的酵素抗体法: Nakaneの酵素抗体法<sup>14)</sup>に準じて行った。その詳細は以下の如くである。

a. 酵素: 使用した酵素はHorseradish Peroxidase (以下POと略す)でその純度はRZ3.0の製品(Sigma Chemical type VI)であり、これをそのまま使用した。

b. 抗体: 正常ヒト血清のプールより常法<sup>15)</sup>に従ってIgGを分離し、これを家兎に注射して抗ヒトIgG家兎血清を得た。さらにその血清より非特異的

IgG精製法<sup>16)</sup>に従って抗ヒトIgG家兎IgGを分離した。すなわち塩析法にて抗血清より得た沈澱を0.005M, pH8.0のリン酸緩衝液(PB)で充分透析し、同じPBでDEAE-セルロースカラム(2×50cm)を通してその第1峰の前半をとり抗ヒトIgG家兎IgGとして使用した。また一部の抗ヒトIgG家兎免疫グロブリンと抗ヒトIgM, IgA,  $\beta_2c$ およびフィブリノーゲン家兎免疫グロブリンはDakoPaTTS製のものを使用した。

精製した抗ヒトIgG家兎IgGおよび製品の特異性は、免疫電気泳動法にて抗ヒト全血清を用いて沈降線が一本であることを確認した(図1)。



抗ヒトIgG家兎IgG

ヒト全血清

抗ヒト全血清

図1 抗ヒトIgG家兎IgGの精製されたことを示す曲線。

表2 Preparation of Peroxidase-labeled proteins

1	Dissolved 5 mg horseradish peroxidase in 1.0 ml (Nakane による <sup>13)</sup> ) of 0.3 M sodium bicarbonate
2	To above solution add 0.1 ml 1% 2,4-dinitrofluorobenzene in absolute ethanol
3	Mix gently in absolute ethanol
4	To above add 1.0 ml of 0.06M sodium periodate in distilled water
5	Mix gently for 30 min at room temperature
6	To the above solution add 1.0 ml of 0.16M ethylene glycol in distilled water
7	Mix gently for 1 hr at room temperature
8	Dialyze the solution vs. 0.01M carbonate buffer at pH9.5 for 1 day at 4℃
9	Add 5 mg of protein to 3 ml of the peroxidase aldehyde solution
10	Mix gently for 2-3 hr
11	Dialyze vs. 0.01M PBS pH 7.1 at 4℃ for over night
12	Separation of labeled protein from unlabeled protein by the use of Sephadex G 100 or G 200 column chromatography

c. 抗体のPO標識: 従来FNPS (p-p'-difluoro m, m'-dinitro diphenyl sulfone), <sup>16)</sup>グルタルアルデヒド等のbifunctional reagent<sup>17) 18)</sup>を用いて抗体とPOとを結合させる方法が行われていたが、本研究の大部分はNakaneの新しい方法<sup>14)</sup>に従った(表2)。

本法はfluoro dinitrobenzeneを用いてPOの側鎖をアルデヒド基化し、これと抗体のアミノ基を直接結合させる方法であって、その詳細は表2に示す。手技の最終過程において得られるものはPOで標識された抗体、未標識抗体、POの三者であり、反応の特異性と鋭敏度を得るため後二者を除去する必要

があった。

POは表2の11の過程による透析により一部を除くことが出来、さらにその残部と未標識抗体は未標識抗体の分子量が60,000以下の場合には Sephadex G 100で、分子量が60,000~160,000では Sephadex G 200で0.05M, pH7.2の PBS Column chromatography により除去され、PO標識抗体が分離精製された(図2)。図に示す如く OD 280 m $\mu$ と OD 403 m $\mu$ のカーブより PO/ $\gamma$ グロブリン・モル比を算出し、1.0に近いtube (No. 4~8)を使用した。

d. PO標識抗体の検定と保存：得られたPO標識抗体は抗体がPOで充分標識されていること、および充分な抗体活性を有することを確認する必要がある。これには免疫電気泳動法ならびに Ouchterlony 法を行った。図3は免疫電気泳動法により得た沈降線で抗原はヒト全血清、抗体はPO標識抗ヒトIgG,  $\beta_{1c}$ , およびIgA家兔免疫グロブリンで、純化されたことを示す一本の曲線がみられた。

POが標識されていることはこれに peroxidase 染色を行うと、図3のように沈降線が黒褐色になることより明らかである。

抗体が抗ヒトIgG家兔免疫グロブリンの場合は抗核抗体陽性患者の血清と正常ヒト末梢白血球を用いて、蛍光抗体法の間接法と全く同様の手技<sup>19)</sup>により抗核抗体陽性患者血清、PO標識抗体の順に染色し peroxidase 反応を行い、核が黒褐色に染色されることをもって、得られたPO標識抗体の特異性をさらに確認した(図4)。

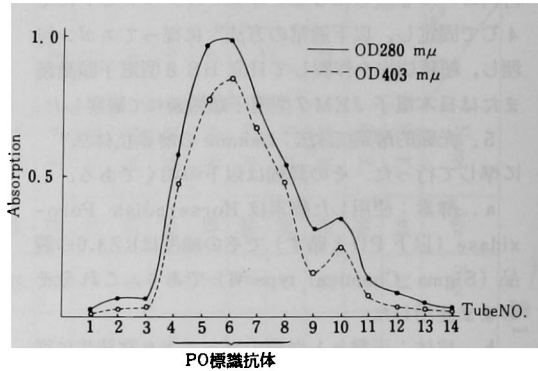


図2 peroxidase-IgG globulin conjugate の fraction pattern

保存には防腐剤は使用せず、ミリポアフィルターを通過させた後、小試験管に1回ごとの使用分にわけ凍結保存するかあるいはアンプルに封入して-4℃で冷蔵した。実験に使用する前にはマウス肝粉で非特異反応物質を除去した後使用した。一度凍結を解き使用した抗体は破棄し、二度と使用しなかった。

e. 酵素反応ならびに顕微鏡観察のための操作

I) 生検により得られた腎組織を蛍光抗体法と同様に、直ちにドライアイス・アセトン中のN-ヘキサンで凍結させ、クリオスタットで厚さ4~6 $\mu$ の切片にして0.05M, pH7.2のPBSで3回交換15分間洗滌する。

II) (1) 間接法：上記切片に家兔で作成した抗ヒトIgG, IgM, IgA,  $\beta_{1c}$  およびフィブリノーゲン血

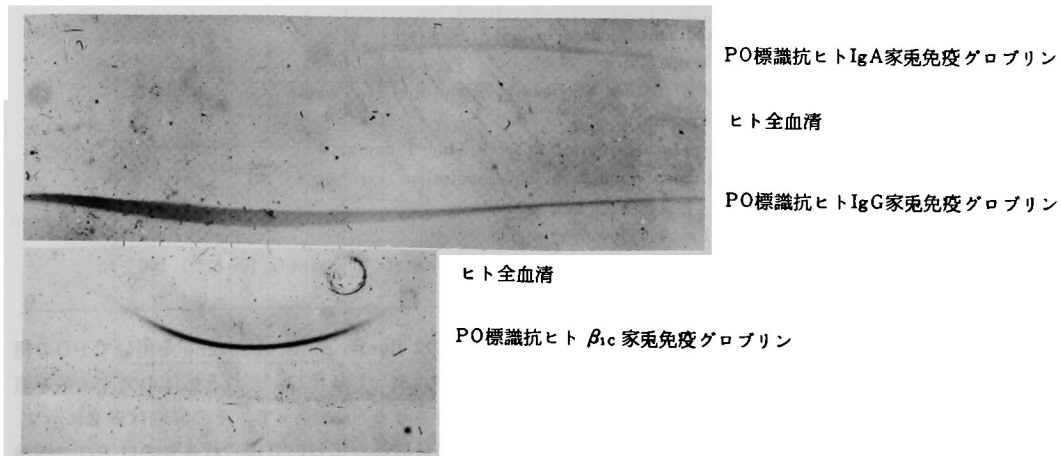


図3 PO標識抗体の純化を示す曲線。

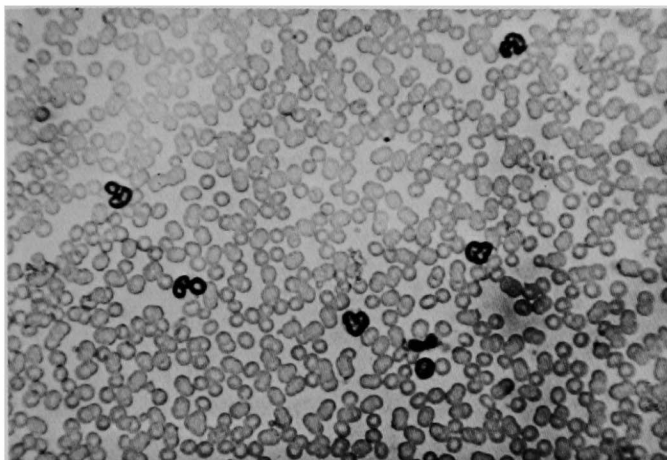


図4  
抗核抗体陽性患者の血清を用いた酵  
素抗体間接法。ヒト末梢白血球の核  
が陽性所見を呈している。

清を室温にて30分間作用させ、PBSで3回15分間洗滌する。その後湿室、室温にてPO標識抗家兎IgG白鳥免疫グロブリンを30分間作用させ、PBSで洗滌する。

(2)直接法：上記切片に湿室、室温にてPO標識抗ヒトIgG、IgM、IgA、 $\beta_{1c}$ およびフィブリノーゲン家兎IgGまたは免疫グロブリンを30分間作用させ、PBSで3回15分間洗滌する。

III) 次いでKarnovsky法<sup>20)</sup>によりperoxidase染色を室温にて紫外線をしゃへいして10~20分間行い、tris bufferで10分間洗滌する。

IV) 光学顕微鏡で観察し、上記反応が弱ければ、1~2%オスミウム酸溶液で1~数秒間後染色を行い水洗する。

V) その後アルコール脱水、キシロール処理後グリセリン bufferで封入し永久標本とする。

背景が薄い場合には対染色として塩基性フクシンあるいは0.1%メチルグリーン水溶液で室温15~30秒間の染色を併用する。

対照としてはPO標識抗体を抗原で吸収し、陽性部位が抗原の増量に伴ない有意に減弱する吸収試験か、II)の前に非標識の同じ抗体液を作用させ、陽性部位が陰性化する阻止試験等を行って本反応が特異的であることを確認した。

#### 6. 電子顕微鏡的酵素抗体法

a. 固定：採取された腎組織の皮質部を選び、その一部を直ちに10% PBSホルマリン、4%パラホルムアルデヒド・5%グルタルアルデヒド混合固定液、2.0%パラホルムアルデヒド・2.5%グルター

ルアルデヒド混合固定液のいずれかの固定液で4℃、30~60分間固定した。

#### b. 組織切片の作製

固定した組織はPBSで一昼夜洗滌して充分固定剤を除去した後、10% dimethyl sulfoxideに0℃、30~60分間浸してからクリオスタットで5~10 $\mu$ の切片にした。

薄切した切片はこのままではスライドガラスに附着しにくいので、スライドガラスをアルブミンあるいはゼラチン<sup>22)</sup>で処理した後使用した。

c. 抗体液との反応(直接法)およびperoxidase染色。

本実験に使用した抗体は抗ヒトIgG家兎血清で、光顕的酵素抗体法で記したのと同様作製したものである。その特異性の検定、PO標識法、標識抗体の特異性の検討と保存等も光顕的酵素抗体法と同様である。

スライドガラスに附着させた材料とPO標識抗体の結合、PO染色等の手技は以下の如く行った。

I) スライドガラスに附着した組織を5分間PBSで浸す。

II) PO標識抗体液を1時間室温で反応させる。

III) PBSで3回各5分間洗滌する。

IV) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含有してない3-3 diaminobenzidine (DAB)液で30分間反応をさせる。

V) 0.005% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含有したDAB液で1分間染色する。

VI) PBSで3回各5分間洗滌する。ここで9:1 PBS/glycerol液でカバーガラスをかけ、あらか

じめ光学顕微鏡で PO 反応陽性を確認しておく。対照としては上記方法論の II) のところで PO 標識抗体液の前に非標識の同じ抗体液を作用させ、以下同様の操作を行う阻止試験を行った。

#### d. 脱水および包埋

PBS で洗滌後スライドガラス上の組織を 1% オスマウム酸溶液で室温 30 分間反応させて後固定を行い、蒸留水で 15 分間洗滌した。

エタノール脱水は 70%, 80%, 90%, 95%, 99% 各 10 分間、無水アルコールで 15 分間脱水後直ちにエポンで充満したゼラチンカプセルをスライドに逆に立て包埋し、60°C で 18~24 時間重合させた。エポン重合後スライドガラスはガスバーナーで熱してとらずした。

#### e. 電子顕微鏡観察

PO 反応陽性部位をトリミングして、LKB ウルトラミクロトーム 4802A 型で超薄切片を作成して無染色で日立 HS 8 型電子顕微鏡または日本電子 JEM 7 型電子顕微鏡で観察した。

### III 実験成績

#### a) 光顕的酵素抗体法による成績

##### 1. 正常ならびに病的腎材料の酵素抗体法による所見

正常腎において陽性反応が認められるのは好中球顆粒、赤血球膜、血管壁の弾性線維等であって褐色の微細顆粒の沈着が陽性反応として認識された。同様な反応は病的腎材料にも認められ、従ってこれら

の反応は内因性 peroxidase 等による反応と吸着による非特異的反応と考えられる。

検索した病的材料に特異的に認められる陽性反応は糸球体に殆んど限っておりこれは多くの症例では糸球体基底膜またはメサンギウムに一致して褐色ないし黒褐色の微細顆粒の集合体として認められた。しかしながら正常腎の場合には糸球体にかかる反応生成物を認めることが出来なかった。

#### 2. 酵素抗体法によって認められる反応生成物の pattern の分類

検索した症例に認められた糸球体の示す反応生成物の pattern は次の 4 型に分類可能であった。検索した材料では酵素抗体法も蛍光抗体法も 1 検体中に認められる糸球体は殆んどすべて同一の pattern を示し差はなかった。

a. Linear pattern : 糸球体基底膜のみが反応を示す場合で、定型的な場合基底膜は褐色の細い線となって染出される。しかし多くの糸球体では基底膜の染色は一樣ではなく、部位により陽性反応に差があった (図 5)。

この pattern を示す症例は表 1 の No. 16 の慢性糸球体腎炎の 1 例が IgG の沈着を、No. 19 の Praderwilli syndrome が IgG と  $\beta_{1c}$  の沈着を示した。

b. Granular pattern : 殆んどすべての糸球体基底膜に沿って連珠状に顆粒状に反応を示す場合で、表 1 の No. 1~4 までの膜性腎症にみられた (図 6)。4 例のうち IgG の沈着は全例に、IgM と  $\beta_{1c}$  は 3 例にみられた。

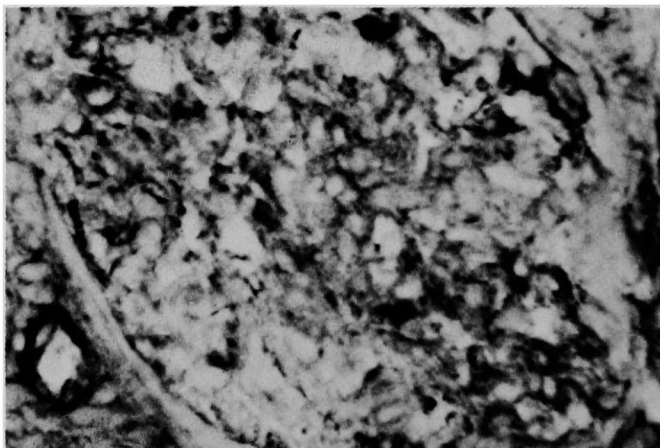


図 5  
慢性糸球体腎炎の腎糸球体。抗ヒト IgG 家兔血清染色により Linear Pattern を示している。

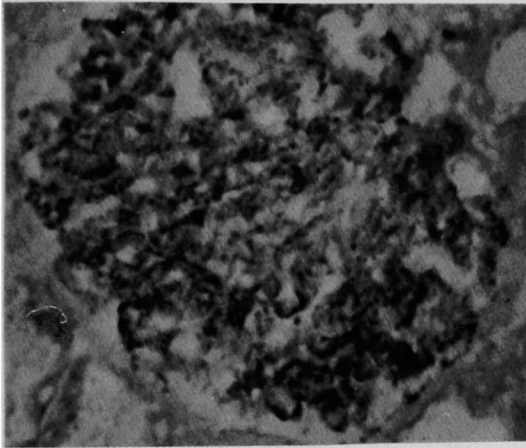


図6 膜性腎症の腎糸球体(酵素抗体法) IgGがGBMに沿ってGranular Patternに沈着している。

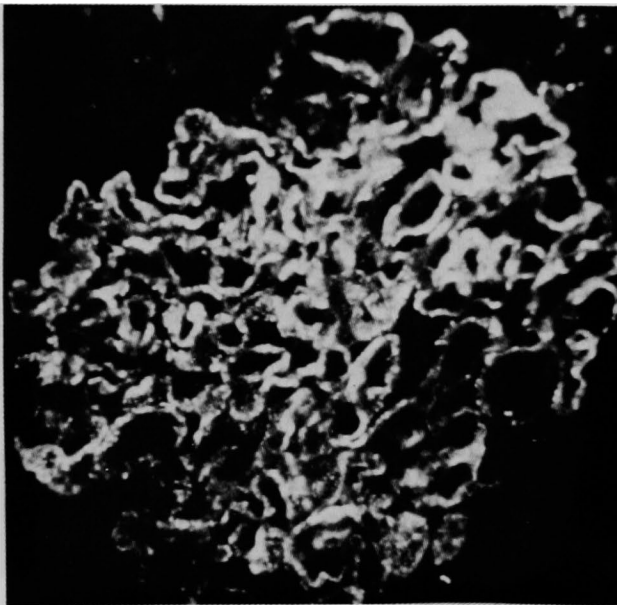


図7 膜性腎症の腎糸球体(蛍光抗体法) IgGがGBMに沿ってGranular Patternに沈着している。

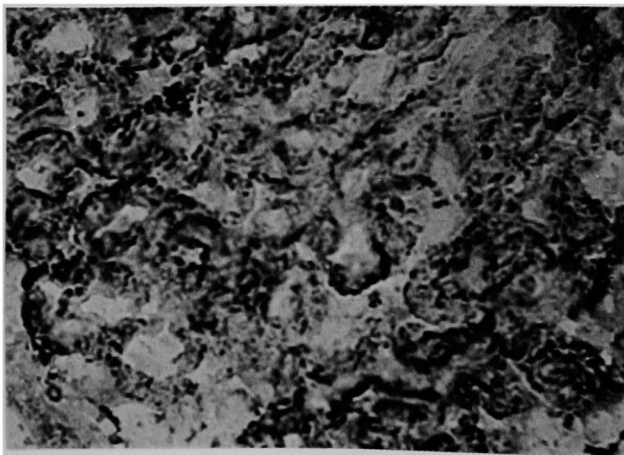


図8 膜性腎症の腎糸球体(酵素抗体法) IgG depositはSubepitheliumにみられる

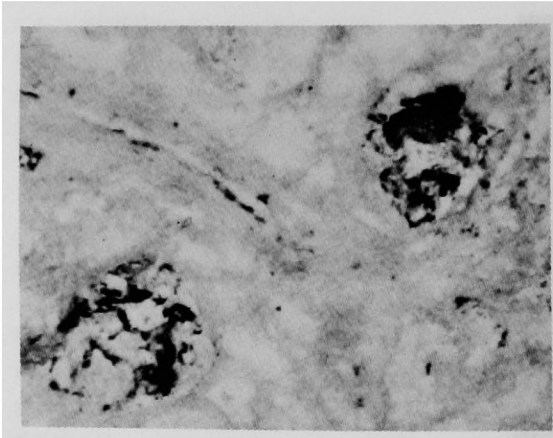


図9 IgA・IgG腎症の腎糸球体(酵素抗体法) IgAがMesangial patternに沈着している。2コの糸球体が見られる。

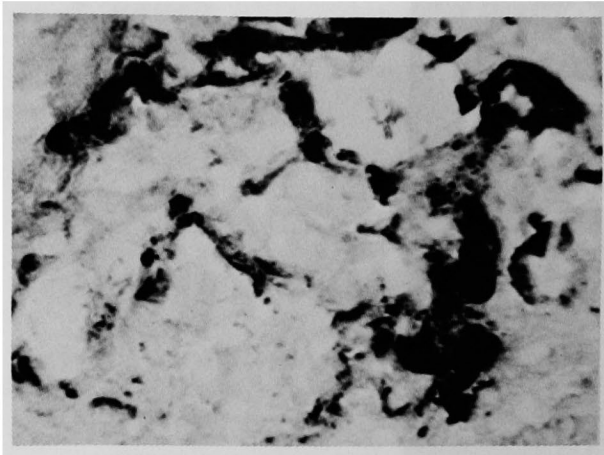


図10 IgA・IgG腎症の腎糸球体(酵素抗体法)の強拡大。IgAがメサンギウムに局限して見られる。

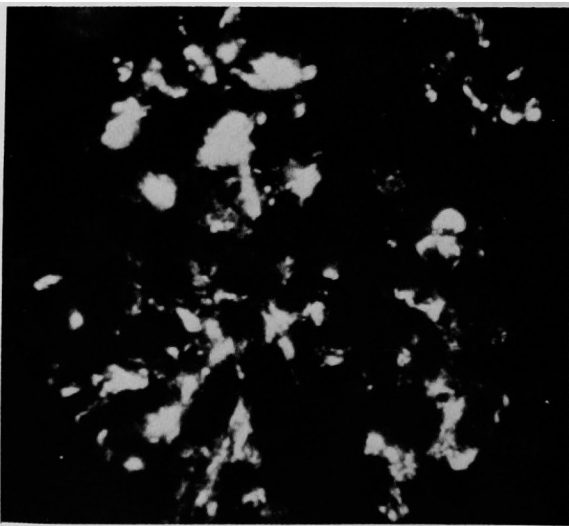


図11 IgA・IgG腎症の腎糸球体(蛍光抗体法)メサンギウムにIgAの沈着が見られる。



反応生成物の局在は蛍光抗体法では判定しにくい  
が、酵素抗体法では×1000倍で見るとかなりよく判  
る。これで判定すると granular pattern の depo-  
sit の位置は subepithelium であることが確認され  
た (図7, 8)。

c. Mesangial pattern : メサンギウムのみに限  
局して褐色の反応生成物が認められる場合で、直径  
5~20 $\mu$ 程度の粗大顆粒状となって観察された (図  
9, 10, 11)。この pattern を呈した症例は表1の  
No. 5~8 の IgA・IgG腎症の4例であった。

いずれも IgA の沈着が強く、このうち  $\beta_{1c}$  の沈  
着を認めたのは3例、IgGの沈着を認めたのは2例  
で、これらも同様 mesangial pattern を示していた。

d. その他の pattern : 表1の No. 9 の低補体性  
膜性増殖性腎炎の1例では IgG の沈着が、糸球体の  
loopの一部に限局して granular にみえ, peripheral

lobular pattern としてみられた (図12, 13)。本症  
の特徴ある光顕所見, 電顕所見は図14, 15に示す通  
りである。

慢性糸球体腎炎では抗 IgG 血清によってよく染色  
され, 他の抗血清ではあまり染色されなかったが,  
このような症例は8例中4例で残りの4例はいずれ  
の抗血清でも殆んど染色されなかった。IgG陽性4  
例中の1例は linear pattern を示し, No. 17 の1  
例には mesangial pattern と granular pattern の  
混在が認められた。

### 3. 酵素抗体法と蛍光抗体法の反応強度の比較

酵素抗体法ならびに蛍光抗体法により腎材料が示  
した反応の有無, ならびにその強度は表1に示す通  
りである。反応の強度の程度は酵素抗体法では  $\pm$ ,  
 $+$ ,  $\pm$ ,  $-$  の4段階に, 蛍光抗体法では  $\pm\pm$ ,  $\pm$ ,  
 $+$ ,  $\pm$ ,  $-$  の5段階に分類した。空白は検索の行わ

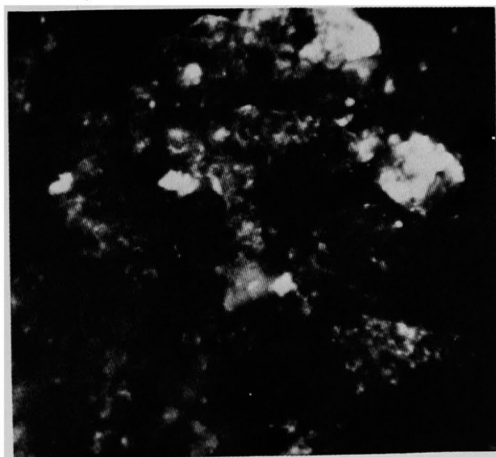


図12 膜性増殖性腎炎の腎糸球体(蛍光抗体法)  $\beta_{1c}$   
が peripheral lobular pattern に沈着している。

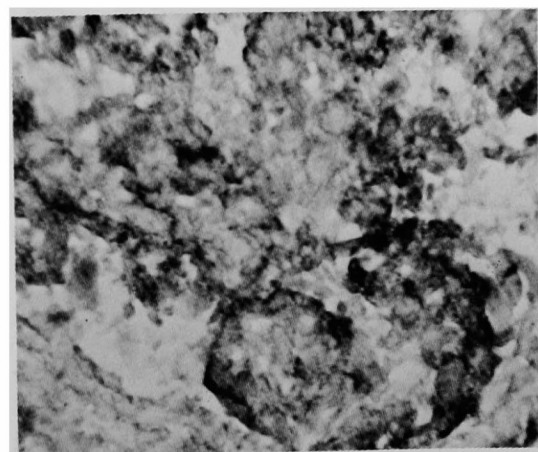


図13 膜性増殖性腎炎の腎糸球体(酵素抗体法)  
IgGが peripheral lobular pattern に沈着してい  
る。抗ヒトIgG家兎血清による間接法

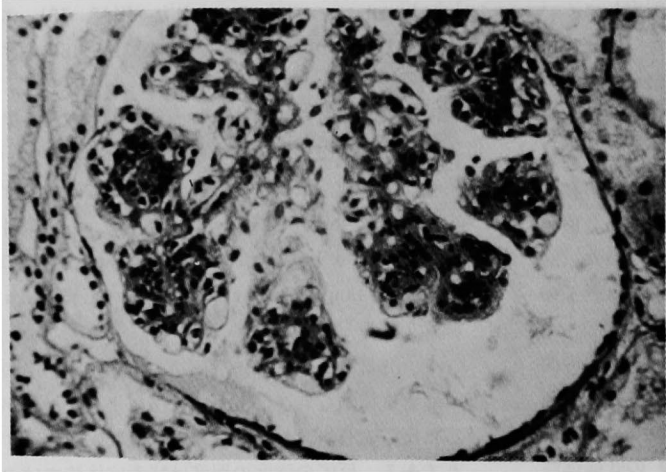


図14 膜性増殖性腎炎の腎糸球体 (HE 染色) 糸球体の腫大, 分葉化, メサンギウムの増殖が著明である.

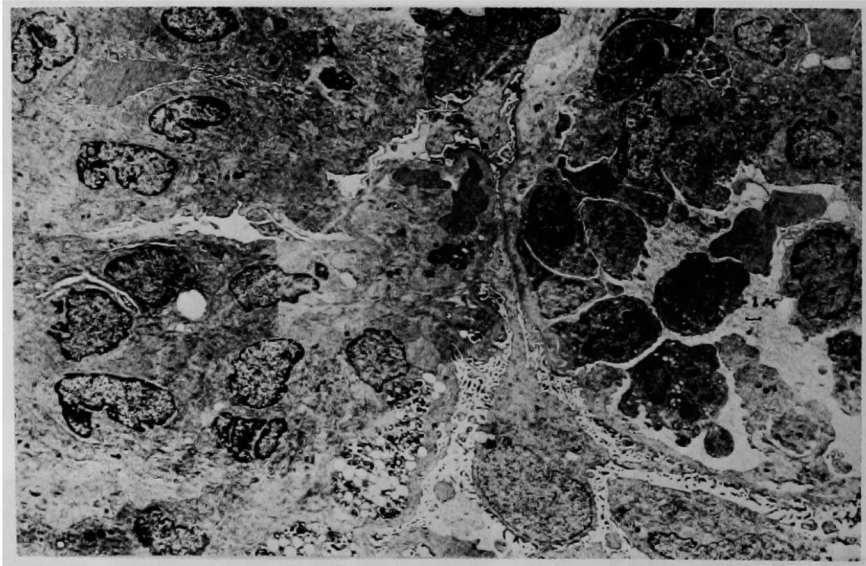


図15 膜性増殖性腎炎の腎糸球体の電顕像メサンギウムの増殖および血管内腔の好中球の浸潤著明

れなかったことを示す。

酵素抗体法においても非特異反応の出現はまぬがれず、特に標本の断端においておそらく抗体の非特異的吸着により生ずるとされる反応生成物が認められた。至適条件下における標本ではその反応の強度は上記の如く4段階に分類可能であり、この点は蛍光抗体法の5段階に比べて、反応の強度差が少ないといえる。

上記の如く反応強度の分類において酵素抗体法と蛍光抗体法の反応強度を比べてみると、すなわちそれぞれ卅, 卍, +, 土, -を比較してその一致率

をみると、82の総検体数中一致するもの60(73.2%)、一段階違うもの19(23.2%)、二段階違うもの3(3.7%)となる。このうち一致する60例と一段階違う19例を加えたものを一致するとみなすと82例中79例一致したことになり、その一致率は96.3%となる。

#### 4. 臨床症状と pattern との関係

腎炎、ネフローゼ症候群における臨床症状と各 pattern との関係は次の通りである。

a. Linear pattern : No. 16の慢性糸球体腎炎の1例にみられ腎機能、血圧は正常、尿蛋白土で顕

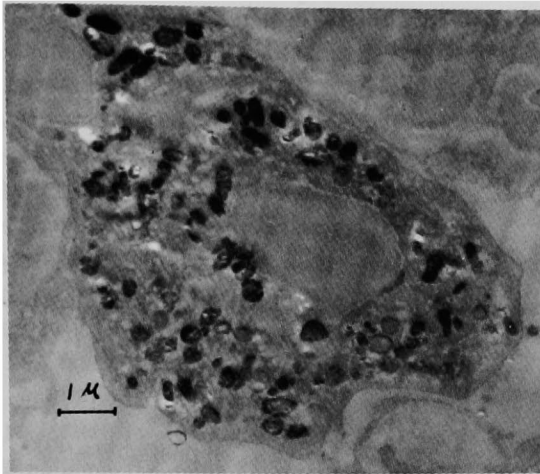


図16  
腎糸球体の血管内腔の好中球。顆粒がPO陽性である。

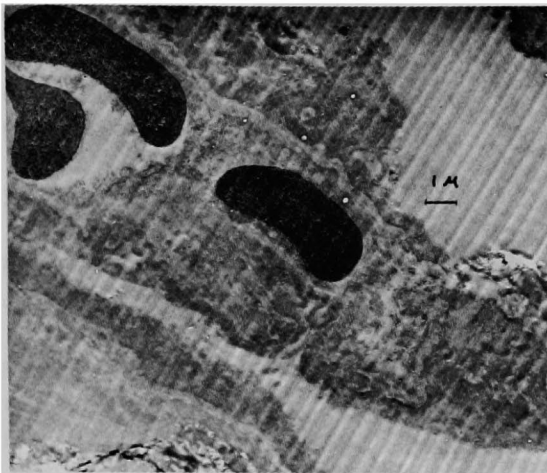


図17  
腎糸球体の血管内腔の赤血球。膜がPO陽性である。

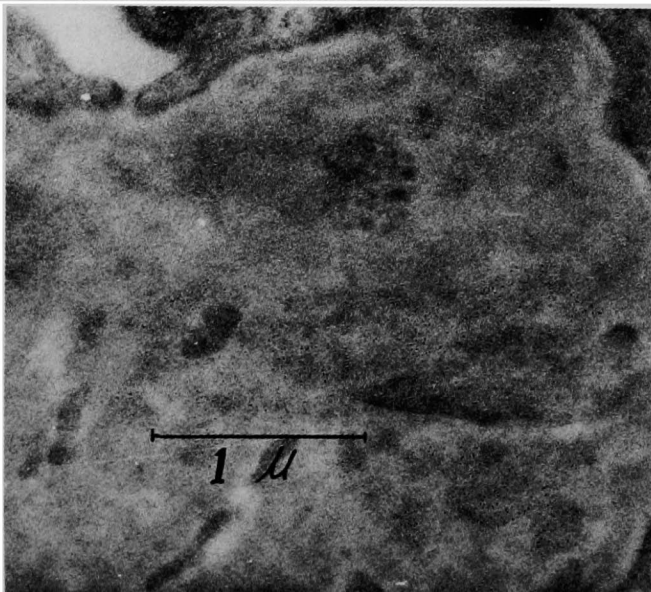


図18  
SLEの腎糸球体のメサンギウム内にみられるPO陽性顆粒 deposit 内に一致して微細顆粒が多数認められる。

微鏡的血尿が持続しているのみで、非ステロイド性消炎剤を使用しても変りはなかった。

b. Granular pattern : 膜性腎症 4 例にみられ腎機能正常が 3 例、軽度障害が 1 例で血圧は 1 例にのみ上昇が認められた。全例に顕微鏡的血尿が軽度みられ、ネフローゼ症候群を呈しており、ステロイドや免疫抑制剤あるいは非ステロイド性消炎剤によく反応した症例であった。

c. Mesangial pattern : No. 5~8 の IgA・IgG 腎症にみられ、いずれも主訴は軽度の蛋白尿か顕微

鏡的血尿 5~6/IGF から無数/IGF であった。腎機能は全例正常で蛋白尿は 1 日 1g 以下、血圧は No. 5 の 1 例に軽度の上昇をみたのみで、治療として非ステロイド性消炎剤の使用が試みられたが、いずれも効果はなかった。

d. その他の pattern : No. 9 の低補体性膜性増殖性腎炎の 1 例は peripheral lobular pattern を示し、低補体価特に C<sub>3</sub> の低下を認め、1 日 10g 前後の蛋白尿と顕微鏡的血尿 15~16/IGF、血圧上昇がみられ典型的なネフローゼ症候群を呈していた。ステ

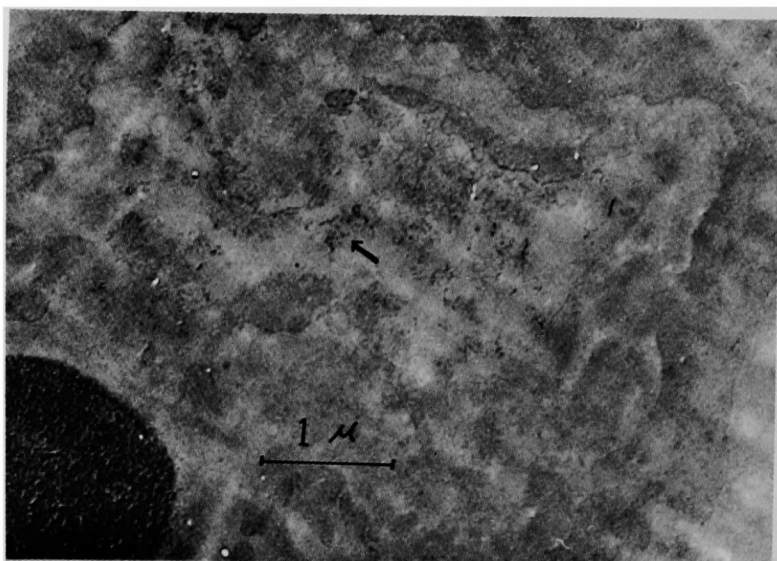


図19  
膜性腎症の腎糸球体の基底膜に沿いPO陽性顆粒がみられる(→)左下は赤血球。

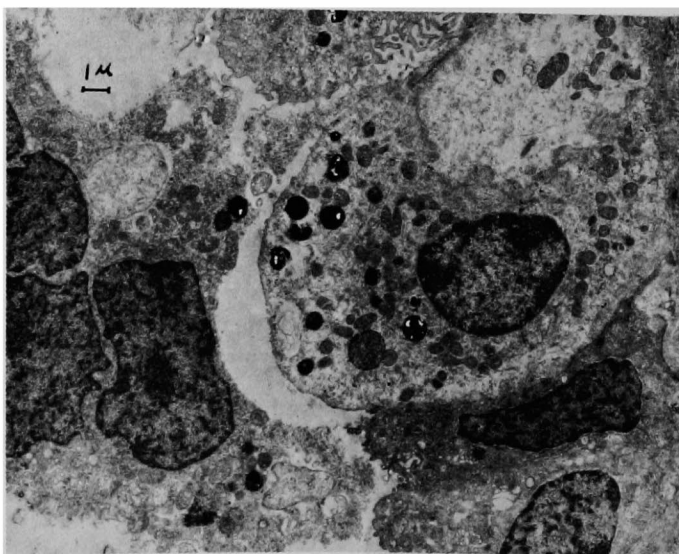


図20  
リポイドネフローゼの腎尿管上皮細胞内にPO陽性顆粒がみられる。(この切片のみはウラニールアセテート染色20分間施行)

ロイドや免疫抑制剤等の使用にもかかわらず、諸症状は改善せず腎機能は低下して行った。

その他の慢性糸球体腎炎の1例、すなわち mesangial pattern と granular pattern が混在していた No. 17 症例では、腎機能と血圧は正常で蛋白尿 1日 1g 以下、顕微鏡的血尿無数/IGF が持続していた。

他の慢性糸球体腎炎中 5例は殆んど免疫グロブリンは糸球体に証明されない例で、いずれも腎機能と血圧は正常で蛋白尿 1日 1g 以下、顕微鏡的血尿 5~10/IGF であった。

#### b) 電顕的酵素抗体法による成績

超薄切片を電子顕微鏡で観察すると、図16、17のように陽性部に一致して電子密度の高い微細顆粒の集団が認められる。倍率を十分高くして観察すると図18のようにいずれの顆粒もほぼ均一で、電子密度の高い円形顆粒が散在性に証明される。その直径は約10 $\mu$ m程度である。前述の如く内因性の PO も陽性反応が認められるが、出現する部位が好中球顆粒(図16)、赤血球膜(図17)等と決っているので区別可能である。

SLEの2例は蛍光抗体法では IgG, IgM, IgA と補体が腎糸球体基底膜およびメサンギウムに granular pattern として観察された例である。

これを電顕的酵素抗体法で観察すると糸球体基底膜内、メサンギウムの通常の電子顕微鏡法により認められる電子密度の高い deposit 内に PO 陽性顆粒がみられた(図18)<sup>23) 24)</sup>

膜性腎症の2例は SLE と類似した蛍光抗体法による所見を示したが、腎糸球体基底膜の subepithelium 特に足突起部の内に PO 陽性顆粒が多くみられ、(図19)多くの場合 PO 陽性顆粒の分布する範囲には通常の電顕法で認められる deposit が存在していた。

リポイドネフローゼの1例では糸球体には全く PO 陽性顆粒はみられなかったが、尿管上皮細胞内に内因性 PO 陽性顆粒が認められた(図20)。

以上観察した陽性症例では通常の超薄切片法で多数の deposit がみられるが、すべての deposit に PO 陽性顆粒が認められたわけではない。

PO 陽性顆粒の認められる deposit とそうでない deposit との間には、電顕上では殆んど区別は出来ない。後者は一見 deposit のように見えるが IgG は少くとも含まれていないと思われる。

#### IV. 考 按

#### a) 酵素抗体法について

Nakane が開発した酵素抗体法は初期には bifunctional reagent として FNPS を用いたため、得られる PO 標識抗体は少量でしかも力価が低かった。これを改良したのは Avrameas<sup>25) 26)</sup> らで FNPS の代りに高純度のグルタルアルデヒドを用いて、PO 標識抗体の力価をやや高めた。

しかしこの方法でも使用した抗体の約 2~3% の conjugate しか出来ず、酵素抗体法の欠点とされていたが Nakane<sup>24)</sup> は新しい方法を考案し(表2)、PO と抗体の失活率をそれぞれ約 4% と 10% にとどめ約 85% の使用可能な PO 標識抗体を得られるようにした。

著者もこれら 3 種の方法を試み、最後の方法が最も良いことを知り、以後これを使用して好結果を得た。この方法は手技も比較的簡単で高濃度の PO 標識抗体液が得られ、しかも反応は鋭敏で特異性を有し、抗体のみならず蛋白なら殆んど何にでも conjugate 出来る利点を有している。

#### b) 光顕的ならびに電顕的酵素抗体法の所見について

正常腎では光顕的に好中球顆粒、赤血球膜、血管壁の弾性線維等で、電顕的にはさらに尿管上皮細胞、ミトコンドリア、マイクロボディ、ライソソーム等の細胞内器管に PO 陽性反応が認められた。しかしよく知られているように<sup>25)</sup> 弾性線維を除いたこれらの血球あるいは細胞内器管には、内因性 PO が存在するので陽性に出たと考えられる。もちろん蛍光抗体法ではこれらの細胞には陽性反応は出ない。

酵素抗体法でも蛍光抗体法でも弾性線維は陽性所見を呈すが、これは弾性線維には PO がいないので非特異的吸着と思われる。

以上の細胞、線維は陽性結果を与えるが、病的腎材料の糸球体にみられる反応に比べると、陽性反応ははるかに弱く通常の条件下では、非特異的染色と思われる程度の染色である。

#### c) 光顕的酵素抗体法と蛍光抗体法との比較

鋭敏度においては酵素抗体法の方がやや劣り両者の一致率 96.3% となった。同様な報告は Davey<sup>27)</sup> の腎炎についての簡単な報告があるのみで、彼らによるとその一致率は 98.4% であった。また染色 pattern の差は殆んどなかった。

鋭敏度が低下する原因としては酵素抗体法では PO 標識抗体の非特異的吸着や、オスミウム酸の吸着によって生ずる背景の着色、蛍光抗体法に比べて PO による標識はより強く抗体活性を低下させること、お

よび途中の手技によって組織に附着した標識抗体の脱落あるいは、反応生成物の脱落等が推定される。

d) 臨床症状と pattern との関係について

腎炎、ネフローゼ症候群においては臨床症状と各 pattern との関係は、蛍光抗体法による報告<sup>27)</sup>とよく一致する。Linear pattern を示したのは慢性糸球体腎炎の 1 例のみで、非ステロイド性消炎剤等の治療にもかかわらず顕微鏡的血尿 2~3/IGF が持続していた。

Granular pattern を呈したのは膜性腎症の 4 例で、いずれもネフローゼ症候群を呈しており長期に経過しているが、ステロイドや免疫抑制剤等の併用によく反応した症例であった。膜性腎症は従来よりステロイド無効が多いとされていたが、最近 Rastogi,<sup>28)</sup> Ehrenreich<sup>30)</sup> らの報告の如くタイプによってはステロイド有効のことも多い。

Mesangial pattern を呈したのは IgA・IgG 腎症の 4 例で Davies,<sup>31)</sup> Levinus<sup>32)</sup> らの報告した如く全例腎機能正常で蛋白尿は 1 日 1g 以下、顕微鏡的血尿のみが主体をなしており非ステロイド性消炎剤は無効であった。

その他の pattern では低補体性膜性増殖性腎炎の 1 例が peripheral lobular pattern を示していた。この症例は初期に補体の低価特に C<sub>3</sub> の低価が著明で典型的なネフローゼ症候群を呈し、ステロイドや免疫抑制剤にも反応せず腎機能低下は進行性であり、2 度の腎生検での組織像でも著明な進展をみた症例であった。

膜性増殖性腎炎は Michael,<sup>33)</sup> Mclean,<sup>34)</sup> West<sup>35)</sup> らの報告により最近補体系特に alternate pathway が注目を浴びており、本症例もこの系が何らかの関与をしているものと思われる。

その他の慢性糸球体腎炎では 1 例が mesangial pattern と granular pattern を示しており、この症例の特徴は顕微鏡的血尿無数/IGF が持続していることであった。

e) 電顕的酵素抗体法について

電顕的酵素抗体法の特異性は光顕の場合と同様、阻止試験が陰性であることより十分に確かであろうと思われる。本法による陽性顆粒は電顕下では微細な電子密度の高い粒子として観察される。従って観察する組織の超微細構造をより明瞭にするために従来行われていた酢酸ウラニール、鉛等による電子染色は施行せずに観察した。これはこれらの電子染色時に生ずることのある汚染が陽性顆粒とまぎらわし

いためである。

従来蛍光抗体法で腎炎等の腎糸球体に認められる免疫グロブリンの正確な局在については、光学的顕微鏡の分解能や蛍光抗体法そのものの観察方法等のため、充分明らかでなかった。

一方これらの腎糸球体には超薄切片法による電顕的観察より、正常では認められない電子密度の高い deposit が認められることが知られている。そこで免疫グロブリンは deposit 内に存在すると考えられてはいるが、Andres ら<sup>36)</sup>、馬杉ら<sup>38)</sup> の Ferritin 抗体法による成績を除いて直接的な証明を欠いていた。Andres<sup>37)</sup> らは実験的腎炎であるネフロトキシン腎炎において、腎糸球体基底膜に一樣に抗基底膜抗体が沈着することを Ferritin 抗体法によって証明し、さらにヒト急性腎炎において腎糸球体に生ずる deposit 内、糸球体毛細血管内等にも 7 S $\gamma$ -グロブリンの存在することを同法により証明した。

また馬杉<sup>38)</sup> はヒト腎糸球体基底膜により反覆免疫されたウサギの腎糸球体毛細血管基底膜にウサギ自己 $\gamma$ -グロブリンの沈着していることを同じく同法により証明している。しかしながら SLE、膜性腎症等に関する電顕レベルの抗体法の報告はないようであり、またすべての deposit 内に IgG が存在するのではないことも本研究により初めて明らかにした。

本研究によって証明された IgG が deposit 内に証明されるという事実は、対象とした疾患には差異があり、Ferritin 抗体法により Andres ら<sup>36)</sup> がヒト急性腎炎で示した成績とよく一致するが、実験的腎炎についての報告された成績とは腎炎の成立機構が異ると考えられるので本研究と比較対照することは出来ない。

SLE では腎糸球体に DNA および抗 DNA 抗体が多量に沈着していることが知ら<sup>39)</sup>、<sup>40)</sup>、<sup>41)</sup>、<sup>42)</sup>、<sup>43)</sup> されており、この事実と本研究とを合わせ考えると SLE 腎糸球体に認められる deposit は IgG と DNA の immune complex であろうと推定出来る。なお IgG が証明されない deposit は IgM あるいは IgA 等より成る immune complex であろう。

## V. 結 語

Nakane の開発した Horseradish Peroxidase による酵素抗体法に準じて、ヒトの腎疾患の光顕的ならびに電顕的手段による免疫組織学的研究を行い、かつ蛍光抗体法による成績と比較検討し次の結果を

得た。

1. Nakane の開発した酵素抗体法を腎組織に適用するために、発表された各種の方法について比較検討した結果、抗体の Horseradish Peroxidase 標識には fluorodinitrobenzene 法が簡単で最も効率がよく、電顕的酵素抗体法にはスライドガラス法が最も反応良好で電顕観察に適していることを見出し、これらの方法を本実験に用いた。

2. 光顕的ならびに電顕的酵素抗体法のいずれの場合にも正常腎においては好中球顆粒、赤血球膜、血管弾性線維等が非特異的陽性反応を示した。

3. 光顕的酵素抗体による検索対象は慢性糸球体腎炎 8 例、膜性腎症 4 例、IgA・IgG 腎症 4 例、ネフローゼ症候群 1 例、低補体性膜性増殖性腎炎 1 例、Prader-willi 症候群 1 例で各症例について経皮的腎生検により得た材料を光顕的酵素抗体法で観察すると、糸球体の示す陽性所見の pattern は linear pattern, granular pattern, mesangial pattern およびその他の 4 型に分類することが出来た。

4. 糸球体の示す pattern を光顕的酵素抗体法と蛍光抗体法で比較した結果、両者の各 pattern の相違は殆んどなく一致率は 96.3% であったが、鋭敏度は蛍光抗体法の方が勝っていた。しかし酵素抗体法

は永久標本の作製可能な点、光学顕微鏡下で観察出来る点、同一切片上で二重、三重染色が可能な点<sup>4)</sup>等の利点が多くさらに局在性の判定は蛍光抗体法より秀れていた。

5. 臨床症状と光顕的酵素抗体法でみられた各 pattern との間には一定の相関関係がみられた。

6. 電顕的酵素抗体法の対象には膜性腎症 2 例、SLE 2 例、リポイドネフローゼ 1 例より得た腎生検材料を使用し、腎糸球体に認められる deposit 内に IgG の局在することを証明した。

deposit には IgG の証明されないものもあり、これらは他種の免疫グロブリンより成立するものと考えられる。deposit 内 IgG は少なくとも SLE では DNA と immune complex を形成しているであろうと推定される。

稿を終えるにあたり御指導御校閲を賜った大藤真教授、太田善介助教授、教室の諸氏ならびに電子顕微鏡の技術指導をして頂いた林信夫、才原登、大水敏代氏に対し厚く御礼申し上げます。

なお本論文の主旨は日本内科学会第 29 回中国四国地方会および第 16 回日本腎臓学会総会において発表した。

## 文 献

- 1) Coons, A. H., Creech, H. J. and Jones, R. N. : Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group, Proc. Soc. exp. Biol. Med., 47 : 200, 1941.
- 2) Pressman, D. and Keighley, G. : The zone of activity of antibodies as determined by the use of radioactive tracers. The zone of activity of nephrotoxic antikidney serum, J. Immunol., 59 : 141, 1948.
- 3) Singer, S. T. : Preparation of an electron-dense antibody conjugate, Nature, 183 : 1523, 1959.
- 4) Koike, M., Nagayama, A., Nakayama, H., Amako, K., Matsuo, T. and Takeya, K. : A new immunoelectron microscope technique with use of metal chelate antibody (MCA), J. Electron Microscopy, 13 : 133, 1964.
- 5) Nakane, P. K. and Pierce, G. B. Jr. : Enzyme-labeled antibodies ; Preparation and application for the localization of antigens, J. Histochem. Cytochem., 14 : 929, 1966.
- 6) Kawarai, Y. and Nakane, P. K. : Localization of tissue antigens on the ultrathin sections with peroxidase-labeled antibody method, J. Histochem. Cytochem., 18 : 161, 1970.
- 7) 亀谷徹 : 酵素抗体法, 臨床免疫 6 : 247, 1974.
- 8) 星野宗光 : 免疫電子顕微鏡によるがん研究へのアプローチ, 細胞, 2 : 50, 1970.

- 9) 松本光仁, 佐藤昌史, 中務育子, 太田善介, 大藤真: 慢性腎炎の酵素抗体法による研究, 日内会誌, 63: 1232, 1974.
- 10) 松本光仁, 佐藤昌史, 中務育子, 太田善介: 慢性腎炎の酵素抗体法による観察, 日腎誌, 16: 146, 1974.
- 11) 松本光仁, 中務育子, 橋本浩三, 太田善介: 教室で行われた腎生検の検討, 内科, 29: 954, 1972.
- 12) 大藤真, 宮脇昌二, 倉田典之, 西村隆夫: 全身性エリテマトーデスの皮下出血部位の蛍光抗体法所見, 臨床免疫, 1: 777, 1970.
- 13) 串田弘: 超薄切片法, 電子顕微鏡 (復刊), 9: 57, 1974.
- 14) Nakane, P. K. and Kawaoi, A.: Peroxidase-labeled antibody a new method of conjugation, J. Histochem. Cytochem., 22: 1084, 74.
- 15) 中村弘, 尾上薫: 抗体の精製, 蛋白質・核酸・酵素, 臨時増刊, 11: 181, 1966.
- 16) Tawde, S. S. and Sri Ram, J.: Conjugation of antibody to ferritin by means of p, p'-difluoro-m, m'-dinitrodiphenylsulphone, Arch. Biochem. Biophys., 97: 429, 1962.
- 17) Avrameas, S.: Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies, Immunochemist., 6: 43, 1969.
- 18) Clyne, D. H., Norris, S. H., Modesto, R. R., Pesce, A. J. and Pollak, V. E.: Antibody enzyme conjugates the preparation of intermolecular conjugates of horseradish peroxidase and antibody and their use in immunohistology of renal cortex, J. Histochem. Cytochem. 21: 33, 1973.
- 19) 宮脇昌二, 倉田典之, 西村隆夫, 大藤真: 抗核抗体の Staining Pattern に関する研究, アレルギー, 19: 282, 1970.
- 20) Graham, R. C. and Karnovsky, M. J.: The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney; Ultrastructural cytochemistry by a new technique, J. Histochem. Cytochem., 14: 291, 1966.
- 21) Ahlquist, J. and Andersson, L.: Methyl greenpyronin staining: effects of fixation; Use in routine pathology, Stain Technol., 47: 17, 1972.
- 22) Mazurkiewicz, J. E. and Nakane, P. K.: Light and electron microscopic localization of antigens in tissues embedded in polyethylene glycol with a peroxidase-labeled antibody method, J. Histochem. Cytochem., 20: 969, 1972.
- 23) 太田善介, 松本光仁: 電顕の酵素抗体法による Lupus Nephritis の研究, 日本臨床電子顕微鏡学会誌, 4: 893, 1971.
- 24) 大藤真, 太田善介: 酵素抗体法による電顕の免疫組織学, 日本臨床, 30: 1330, 1972.
- 25) 岡本耕造, 上田政雄, 前田隆英, 水谷昭: 顕微鏡の組織化学, 医学書院, 東京, P 583, 1965.
- 26) Davey, F. R. and Busch, G. J.: Immunohistochemistry of glomerulonephritis using horseradish peroxidase and fluorescein-labeled antibody; a comparison of two technics, Am. J. Clin. Path., 53: 531, 1970.
- 27) Hadley, W. K. and Rosenau, W.: Study of human renal disease by immunofluorescent methods, Arch. Path., 83: 342, 1967.
- 28) 長沢俊彦, 柴田整一: Nephrotic Syndrome の研究—とくに光顕と蛍光抗体法の組合せによる解析—, 日本臨牀, 27: 1931, 1969.
- 29) Rastogi, S. P., Hart-Mercer, J. and Kerr, D. N. S.: Idiopathic membranous glomerulonephritis in adults: Remission following steroid therapy, Quarterly J. Med., 151: 335, 1969.
- 30) Ehrenreich, T. and Churg, T.: Pathology of membranous nephropathy, Pathol Ann, 3: 171, 1968.
- 31) Davies, D. R., Tighe, J. R., Jones, N. F. and Brown, G. W.: Recurrent haematuria and mesangial IgA deposition, J. Clin. Path., 26: 672, 1973.



- 32) Levinus, B. A. v. d. P., Guy Brutel, d. l. R. and Peter, J. C. u. B. V. : Recurrent or persistent hematuria ; Sign of mesangial immune-complex deposition, *N. Engl. J. Med.*, **290** : 1165, 1974.
- 33) Michael, A. F., Westberg, N. G., Fish, A. J. and Vernier, R. L. : Studies on chronic membranoproliferative glomerulonephritis with hypocomplementemia, *J. Exper. Med.*, **134** : 208, 1971.
- 34) Mclean, R. H. and Michael, A. F. : Properdin and C<sub>3</sub> proactivator : Alternate pathway components in human glomerulonephritis, *J. Clin. Invest.*, **52** : 634, 1973.
- 35) West, C. D. : Membranoproliferative hypocomplementemic glomerulonephritis, *Nephron*, **11**: 134, 1973.
- 36) Andres, G. A., Accinni, L., Konrad, C. H., Zabriskie, J. B. and Seegal, B. C. : Electron microscopic studies of human glomerulonephritis with ferritin conjugated antibody, *J. Exp. Med.*, **123** : 399, 1965.
- 37) Andres, G. A., Morgan, C., Hsu, K. C., Rifkind, R. A. and Seegal, B. C. : Electron microscopic studies of experimental nephritis with ferritin-conjugated antibody. The basement membranes and cisternae of visceral cells in nephritis rat glomeruli, *J. Exp. Med.*, **115** : 929, 1962.
- 38) 馬杉洋三, 杉崎祐一, 畠中洋一, 大網弘 : ヒト慢性糸球体腎炎例における糸球体結合性の抗腎基底膜活性 IgG の存在について, *日本腎臓学会誌*, **14** : 341, 1972.
- 39) Schur, P. H. and Sandson, J. : Immunologic factors and clinical activity in systemic lupus erythematosus, *New Engl. J. Med.*, **278** : 533, 1968.
- 40) Craf, M. and Koffler, D. : Elution of glomerular bound antibody in systemic lupus erythematosus, *Fed. Proc.*, **23** : 309, 1966.
- 41) Krishnan, C. and Kaplan, M. H. : Anti-nuclear activity in acid eluates of glomeruli from lupus nephritis kidneys, *Fed. Proc.*, **25** : 309, 1966.
- 42) Keffler, D., Schur, P. H. and Kunkel, H. G. : Immunological studies concerning the nephritis of systemic lupus erythematosus, *J. Exp. Med.*, **126** : 607, 1967.
- 43) 大藤真 : SLE 腎症の免疫病理学的研究, *西日本皮膚科学会誌* **34** : 404, 1972.
- 44) Nakane, P. K. : Simultaneous localization of multiple antigens using the peroxidase-labeled antibody method : A study on pituitary glands of the rat, *J. Histochem. Cytochem.*, **16**:557, 1968.

**Studies on renal disease by enzyme-labeled antibody method**  
**by**

**Mitsuhito MATSUMOTO**

**The Third Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School**

**(Director : Prof. Tadashi Ofuji)**

Light microscopic and electron microscopic observations were performed on the kidney of patients with lupus nephritis, membranous nephropathy, IgA-IgG nephropathy and chronic glomerulonephritis by means of the horseradish peroxidase labeled antibody method described by Nakane in order to demonstrate immunoglobulin directly in the tissue of the renal glomeruli.

The following results were obtained. The light microscopic enzyme-labeled antibody method showed the same results as the immunofluorescent antibody method on the staining patterns and intensities. Electron microscopic observation demonstrated that fine, electron-dense granules indicating the localization of IgG were present within many deposits in and around the glomerular basement membrane of the renal glomeruli of lupus nephritis and membranous nephropathy. It was presumed that these deposits were antigen-antibody complex.