ラットBSA腎炎におけるcobra venom factor(CVF)投与の影響

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9014

金沢大学十全医学会雑誌 第91巻 第5号 848－858 (1982)

ラット BSA 腎炎における cobra venom factor (CVF) 投与の影響

金沢大学医学部内科学第一講座（指導：服部 信教授）

友 杉 直 久

（昭和57年10月14日受付）

コブラ毒（cobra venom factor：CVF）により惹起される低補体血症が，ラット慢性 BSA 腎炎の糸球体障害に与える影響を検討した．慢性 BSA 腎炎は，4週齢の雄性 Wistar ラットに牛血清アルブミン（bovine serum albumin：BSA）を皮下免疫し，その8週後より BSA 1 mg を週6回静脈内に投与することにより作製した．尿蛋白の出現した時点でラットを2群に分け，I群の12匹には 320 U/kg の CVF を隔日，腹腔内へ投与し，血清補体価（50% hemolytic unit of complement，以下 CH 50）を投与前値の10%以下に維持した．またII群の12匹は，CVF を投与しない群で，I群の対照群とした．尿蛋白出現後も BSA の投与を続け，両群とも6日後に屠殺した．II群の尿蛋白量は直線的に増加し，6日間で 174±27 mg/day にまで達したが，I群での尿蛋白増加は有意に抑制されていた（74±18 mg/day，$P<0.05$）．光顕的に観察すると，I群ではメサンギウムの増殖が有意に抑制されており，かつ多核白血球の浸潤もほとんど認められなかった．また免疫蛍光抗体法（FITC-標識抗 BSA，抗ラット IgG，抗ラット C3 を使用）では，II群が係蹄壁優位の免疫複合体（immune complex：IC）沈着パターンを呈したのに対し，I群ではメサンギウムにおける沈着が優位であった．なお，I群では IC の沈着はほとんどみられなかった．蔗糖密度勾配超遠心法により流血中 IC の分析を行ったところ，II群では IC の多くは 19 S 近傍に認められたが，I群では 19 S を越える高分子 IC が増加していた．以上の所見は，in vitro で証明されている補体系の免疫沈降抑制機能が，in vivo においても作用していることを示唆している．つまり，CVF 投与群では，CVF により惹起された低補体状態により補体機能が抑制され，その結果として流血中に高分子の IC が形成されたものと考えられる．また，CVF 投与群で尿蛋白が抑制されたのは，IC の高分子化に伴い沈着パターンが係蹄壁からメサンギウムパターンに変わったこと，ならびに多核白血球による糸球体障害が抑制されたことによるものと考えられる．

Key words BSA nephritis, cobra venom factor, hypocomplementemia

ヒト糸球体腎炎および実験腎炎が，糸球体を反応の場とする抗原抗体反応の結果として生ずること[1)2)]，また，この糸球体障害に，補体系・キニン系・凝固系・血小板・多核白血球・マクロファージあるいはリンパ球などの種々の mediator が関与しており，中でも補体系が重要な役割を担っていることについては，すでに多くの報告がみられる[3)~9)]．腎炎における補体系の mediator としての作用については，おもにネフロトキシン腎炎（nephrotoxic nephritis：NTN）を中心に研究がなされてきたが，それによると，NTN の時相やネフロトキシンを作製した動物およびそれを投与された動物種などの違いにより，糸球体障害の発生・進展における補体依存性も異なるといわれている[10)~12)]．一方，免疫複合体型腎炎の発生・進展過程においても補体系が重要な作用を有しているものと考えられるが，この点に関する研究は少ない．Salant ら[13)]によると，Heymann 腎炎では，多核白血球を介さず補体が直接糸球体基底膜を障害する可能性が指摘されており，さら

Effect of cobra venom factor (CVF) on chronic bovine serum albumin (BSA) nephritis in rat. **Naohisa Tomosugi,** Department of Internal Medicine (I), (Director: Prof. N. Hattori), School of Medicine, Kanazawa University.

にはHenson ら[14]のように，急性血清病腎炎においても，その進展過程に補体がほとんど関与していないとする報告もみられる．このように，糸球体腎炎の進展における補体の関与については，用いる実験系により異なった成績が報告されており，一致した結論がえられるまでにはいたっておらず，腎炎に対する補体関与の多様性が推測される．

近年，Miller & Nussenzweig ら[15]および Takahashi ら[16]により，in vitro では，補体が免疫沈降物を解離させる作用（IC 可溶化現象）を有することが明らかにされており，さらに，Shifferli ら[17)~19)]は，in vitro での IC 形成時に補体が免疫沈降を抑制することを報告している．しかし，in vivo において，補体が IC の分子量におよぼす影響については，いまだ報告がみられない．そこで，われわれはこの点について検討する目的で，低補体状態下の慢性ラット BSA 腎炎における IC の変化について検討したところ，より高分子領域の IC が増加するという成績をえた．これは，in vivo においても，補体が IC 分子量に影響を与えている可能性を示しているものであり，以下にその詳細を報告する．

対象と方法

I．IC 型腎炎の作製

ラット BSA 腎炎は，山本ら[20]の方法に従い，第 4 週齢の雄性 Wistar ラットに，BSA（Miles Lab.）1 mg を complete Freund's adjuvant（Difco Lab.）と共に皮下へ 1 回免疫し，その 8 週後より BSA 1 mg を週 6 回静脈内に投与することにより作製した．

1．ラット BSA 腎炎発生率

BSA 静注開始より 5 週間後に屠殺した 23 匹について，尿蛋白の出現状況を検討した．

2．ラット BSA 腎炎に対する低補体の影響

1 日尿蛋白量が 10 mg を越えたラットを尿蛋白出現群とし，これを尿蛋白出現順に無作為に次の 2 群に分けた．

I 群（12 匹）：尿蛋白出現時点より CVF（Cordis Lab.）320 U/kg を 2 日ごとに 3 回腹腔内投与し，投与開始日より 6 日後に屠殺した群．

II 群（12 匹）：CVF を投与しない群．I 群の対照群であり，同様に，尿蛋白出現後 6 日目に屠殺した．

III群（10 匹）：尿蛋白が出現しなかった群で，BSA の静脈内投与開始日より 4 週間後に屠殺した．

II．尿蛋白の測定

代謝ゲージを用いて 12 時間蓄尿し，Kingsbury - Clark 法[21]により蛋白を定量後，24 時間換算量として示した．

III．補体価の測定

BSA 静注開始日，尿蛋白出現日およびその後 2 日ごとに 2 回の計 4 回，尾静脈血 1 ml を採血し，血清を −70°C に保存した．血清補体価（CH 50）は，Mayer の 50% 溶血法[22]により同時に一括して測定した．CH 50 の推移は，BSA 静注開始日の CH 50 に対する百分率で表わし，1 日尿蛋白量が 10 mg を越えた時点を第 1 日として示した．

IV．抗体価の測定

抗 BSA 抗体価は，尿蛋白出現日の血清を用いて，Farr の方法[23]に従い，antigen binding capacity（ABC - 33）として算出した．

V．BSA -抗 BSA 免疫複合体の大きさの測定

I 群の 6 例，II 群の 5 例について検討した．屠殺日に ^{125}I -標識 BSA 1 mg/ml を尾静脈より注入し，10，60 分後に，それぞれ 0.5 ml 採血した．血清は生食で 2 倍に希釈した後，その 100 μl を 10～40% 蔗糖密度勾配超遠心法（40,000 RPM，18 時間，日立分離用超遠心器 70 P - 72）により 50 本に分画した．そのさい，7 S 標識にはヒト IgG（Miles Lab.）を，また 19 S 標識にはブタサイログロブリン（Sigma Chemical Co.）を用いた．

VI．病理学的検査

腎組織は，hematoxylin - eosin，periodic acid Shiff，periodic acid silver methenamine 法により染色し，光顕観察に供した．また，一部の組織は凍結切片とし，fluorescein isothiocyanate 標識抗ラット IgG・C 3 および抗 BSA 血清（Cappel Lab.）を用いて染色し，蛍光顕微鏡下で観察した．さらに，一部の組織は，3% グルタールアルデヒドおよび 1% オスミウム酸により 2 重固定した後，アルコール系列により脱水し，Epon 812 に包理した．これより超薄切片を作製し，酢酸ウラニルとクエン酸鉛により重染色し，電顕で観察した．

VII．統計的処理

推計学的検定には，Student の t 検定および Wilcoxon の W 検定をを用いた．

結　果

I．ラット BSA 腎炎の発生

BSA 静注開始後 5 週間で，23 匹中 14 匹（61%）に尿蛋白の出現をみた．出現時期は，BSA 静注開始後 2・3・4・5 週目が，それぞれ 5・2・7・0 匹であり，尿蛋白の出現には個体差がみられた（表 1）．なお，いずれも 1 日尿蛋白量が 10 mg を越えてからの 1 週間は，直線的に尿蛋白量が増加し，1 日 150～200 mg に達してからはほぼ一定した．

II．ラット BSA 腎炎に対する CVF の影響

1．CH 50 の推移

I群では，CVF 投与中の 6 日間にわたって CH 50 は 10%以下に低下した．一方，II群でも尿蛋白出現以後 40～50%に低下したが，両群の低下率のあいだには，図 1 に示すように明らかな差異が認められた（$P<0.005$）．なお，尿蛋白の出現しなかったIII群の屠殺日の CH 50 は平均 18%の低下を示したにすぎなかった．

Table 1. Appearance of proteinuria after intravenous injections of bovine serum albumin (BSA)

	No. of rats showing urinary protein excretion after BSA injection			
No. of rats	2	3	4	5 weeks
23	5	2	7	0

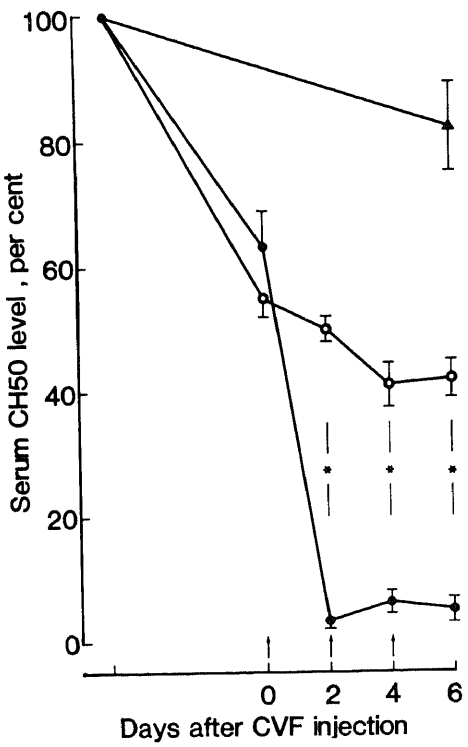


Fig. 1. Effect of three intra-peritoneal injections of cobra venom factor (CVF, arrows) at 48 hour intervals on 50% hemolytic unit of complement (CH50). Each point represents mean ± SEM. 100%: preinjection level of CH50
●: group I, ○: group II, ▲: group III
* $p<0.005$

2．尿蛋白

II群では，1 日尿蛋白量が 10 mg を越えると，ほぼ直線的に増加した．しかし，I群では尿蛋白量の増加は軽度であり，図 2 に示すようにその差異は有意なものであった（$P<0.05$）．

3．抗体価の測定

尿蛋白出現日の ABC－33 に関しては，I群・II群間に差異は認められなかった（図 3）．しかし，III群では全例が低値を示した．

4．光顕所見

II群の 12 匹では，11 匹（92%）に中等度ないし高度のメサンギウム増殖が認められ（表 2），かつ多核白血球の浸潤を伴っていた（図 4 b）．これに対し，I群では中等度病変のものが 2 例であり，他の 10 匹はせいぜい軽度のメサンギウム増殖を認めたにすぎず，II群に比べ，明らかにメサンギウム増殖が軽度であり（$P<0.001$），かつ多核白血球の浸潤もほとんど認められなかった（図 4 a）．なお，III群では糸球体に明らかな病変は認められなかった．

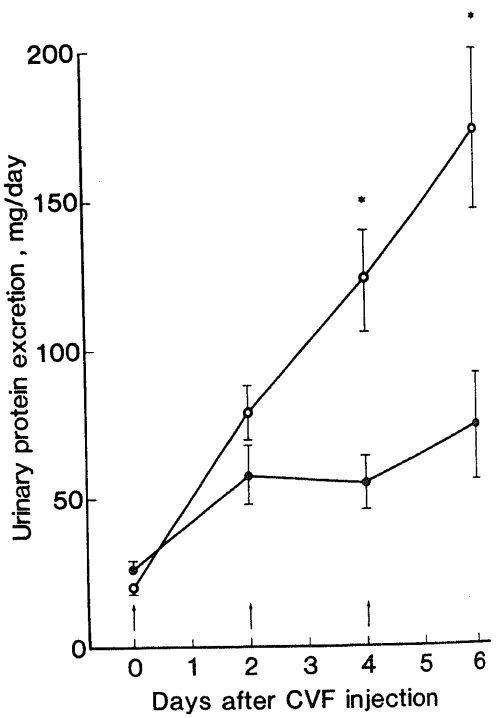


Fig. 2. Effect of three intra-peritoneal injections of cobra venom factor (CVF, arrows) at 48 hour intervals on urinary protein excretion. Each point represents mean ± SEM.
●: group I, ○: group II
* $p<0.05$

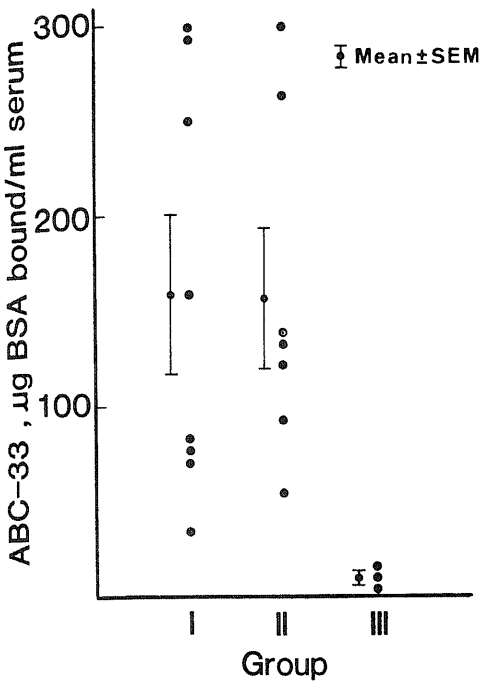


Fig. 3. Antigen binding capacity (ABC-33) against bovine serum albumin (BSA) just before the first injection of cobra venom factor.

5．免疫蛍光抗体法

II群では係蹄壁に IgG の強い顆粒状蛍光が認められたのに対し(図5b)，I群ではメサンギウム優位の IgG 沈着パターンを示しており（図5a)，両群間に有意差がみられた($P<0.001$，表3)．また，BSA も IgG と類似の沈着傾向を示した．C3 沈着は，II群で係蹄壁優位の顆粒状蛍光を認めたが，CVF を投与した I 群では，陰性ないし痕跡程度であった．なお，III群の2例では，メサンギウムに軽度の IgG 沈着を認めたが，他の8例では陰性であった．

6．電顕所見

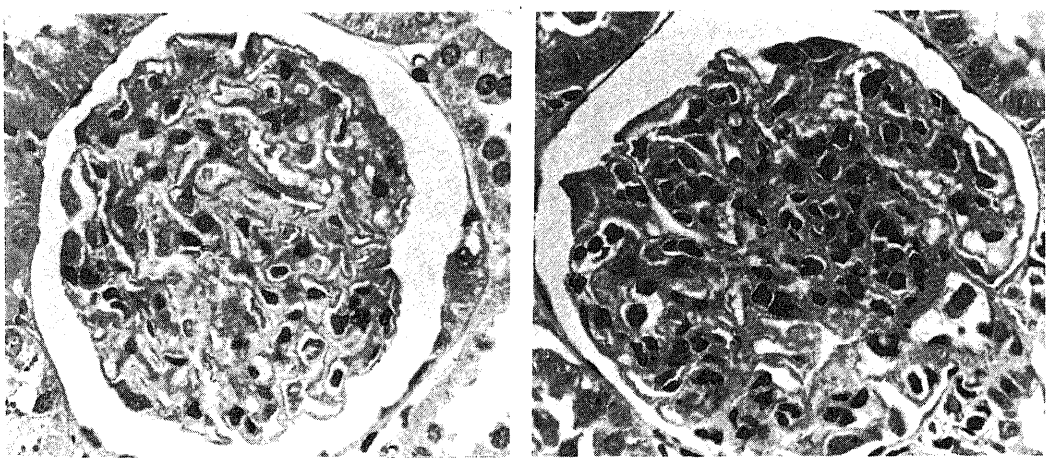
II群では，上皮下に多量の沈着物を認め，一部 hump 様にみえるものもあった（図6b)．一方，I群では，上皮下沈着物の量は少なく，主としてメサンギウム領域に認められた（図6a)．

7．BSA -抗 BSA 免疫複合体の大きさ

I群・II群ともに，7S・19S 近傍に大きなピークを認める点では一致していたが，I群では II群に比べ，19S 以上の高分子領域の IC の割合が多かった(図7)．また経時的な変化をみると，^{125}I -標識 BSA の流血中からの消失は，I群では II群に比べ速かった．

考　　察

今回の成績では，慢性 BSA 腎炎の進展過程で CVF を投与することにより，(1)高分子領域の流血中 IC の存在割合が増加すること，(2)糸球体への IC 沈着パターンがメサンギウム優位となること，(3)尿蛋白量の増加が抑制されることなど，CVF 非投与群における腎炎進展



(a)　　(b)

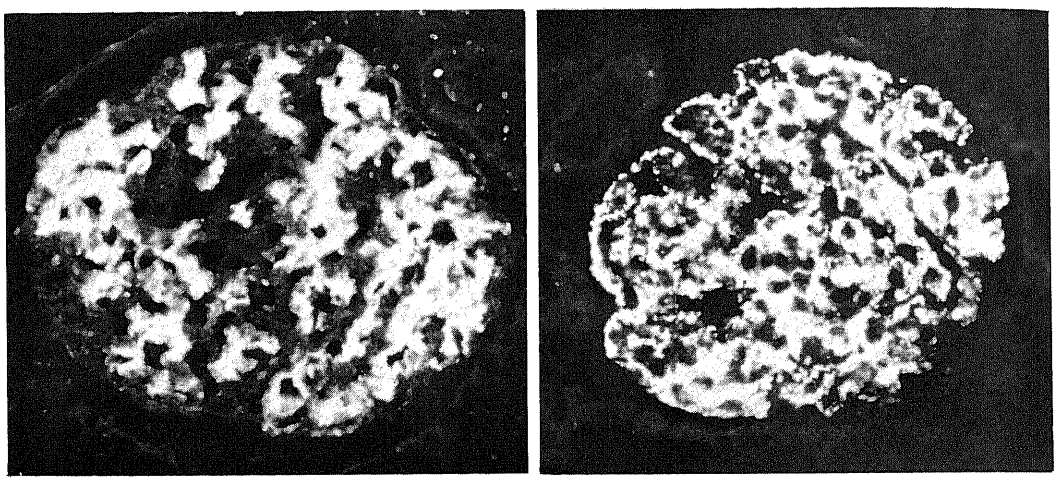
Fig. 4. Light micrographs of a glomerulus from rats with bovine serum albumin nephritis, stained with hematoxylin and eosin. No mesangial proliferation is observed in group I (a) but hypercellularity and neutrophil infiltration are observed in group II (b).

Table 2. Incidence of light microscopic findings

Group	No. of rats	No. of rats showing mesangial proliferation			
		normal	mild	moderate	severe
I	12	5	5	2	0
II	12	0	1	6	5
III	10	10	0	0	0

I vs II: * ; II vs III: ** ; I vs III: *

* $p<0.001$, ** $p<0.05$



(a) (b)

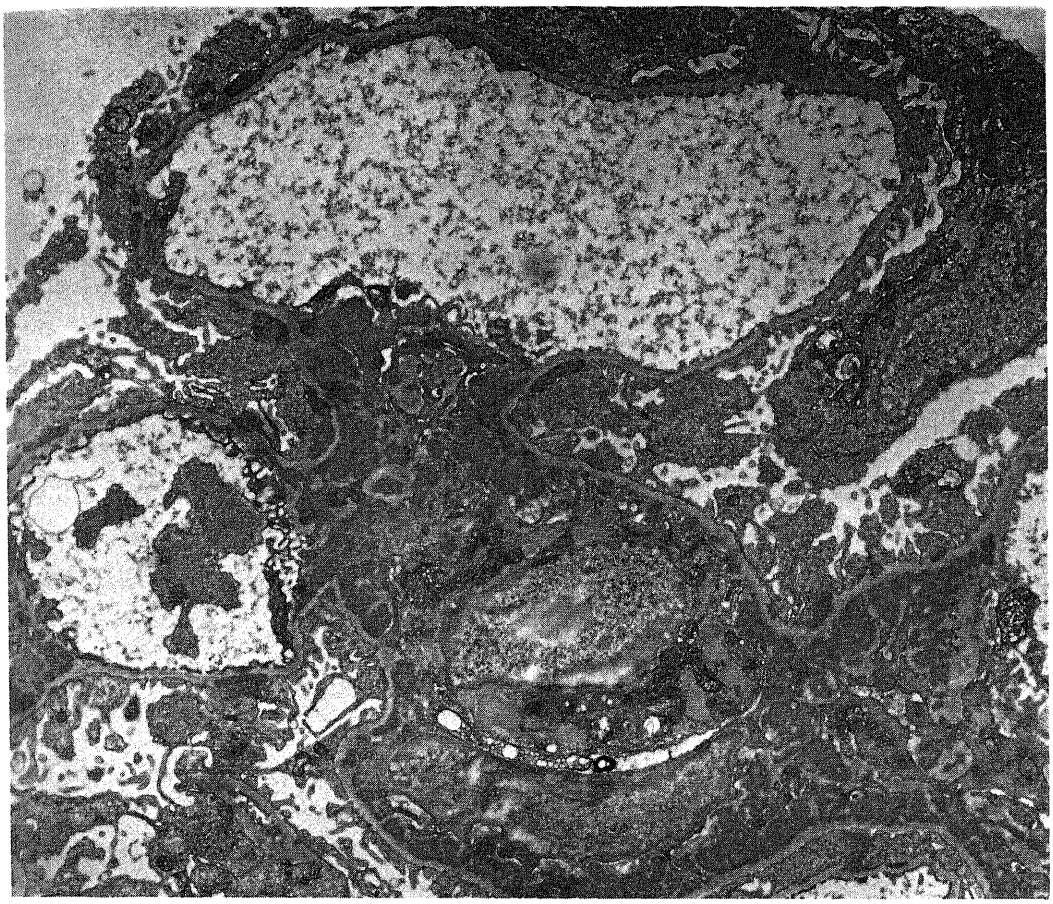
Fig. 5. Immunofluorescence localization of a glomerulus from rats with bovine serum albumin nephritis. Deposition of rat IgG is mesangium-dominant in group I (a) and capillary-dominant in group II (b).

Table 3. Incidence and intensity of immunofluorescent findings

Group	No. of rats	No. of rats with glomerular deposits											
		rat IgG				rat C3				BSA			
		cap.		mes.		cap.		mes.		cap.		mes.	
		−	+	++	−	+	++	−	+	++	−	+	++	−	+	++	−	+	++
I	12	7	5	0	0	4	8	12	0	0	11	1	0	7	5	0	4	5	3
II	12	0	4	8	7	5	0	1	10	1	9	2	1	4	6	2	9	2	1
III	10	10	0	0	8	2	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0

I vs II: * ; II vs III: * ; I vs III: **

cap.: capillary
mes.: mesangium
* $p<0.001$, ** $p<0.05$



(a)

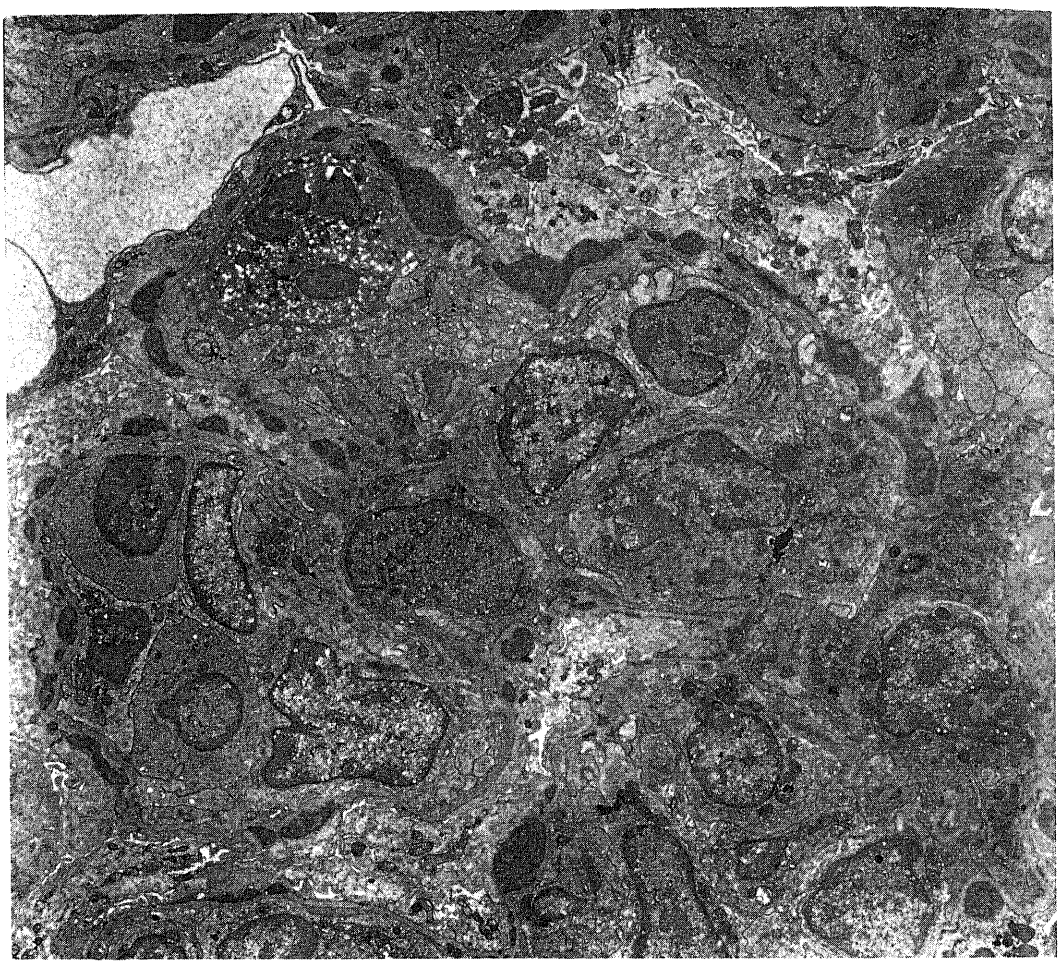
Fig. 6. Electron micrographs of a portion of a glomerulus from rats with bovine serum albumin nephritis showing mesangium-dominant dense deposits in group I (a, ×3500) and capillary-dominant in group II (b, ×2000). In group II intracapillary cellular proliferation and neutrophil infiltration are observed.

状態に比べ，明らかな違いが生じた．この違いは，低補体作用を有するCVF投与に起因するものであり，補体が慢性BSA腎炎の進展過程に大きく関与していることを示すものと考えられる．

従来，糸球体腎炎の発生・進展におよぼす補体の影響について，若干の報告がみられ，その作用は3点から論ぜられている．第1点は，補体のchemical mediatorとしての作用，つまりICにより活性化された補体から放出された白血球遊走因子により多核白血球がIC沈着部位に遊走し，ICを処理する過程で遊離したlysosomal enzymeにより，局所腎組織が障害される機序である．この点については，主としてNTNを用いた実験系により検討が進められており，これまでの報告をみると，CVFやzymosanあるいは凝集IgGの投与により惹起された低補体状態[3)7)24)25)]，あるいは補体非結合性抗体を用いた実験系[10)11)12)26)]，およびnitrogen mustardや抗多核白血球抗体の投与による多核白血球の減少した状態下[7)27)]では，腎炎の発生ならびに進展が抑制ないし阻止されることが明らかにされている．

第2点は，補体による糸球体の直接障害作用である．この点に関してSalantら[13)]は，糸球体障害に多核白血球の介在を認めないHeymann腎炎においても，低補体とすることにより尿蛋白の出現が抑制されることを指摘し，補体が直接糸球体基底膜を障害している可能性を報告している．

第3の補体の関与は，Bartolottiら[28)]が報告している



(b)

ように，in vivo における低補体状態下では，糸球体へ沈着したICの除去が抑制されることである．これは，Miller & Nussenzweig ら[15]の報告している補体のIC可溶化現象が，in vivo においても作動している可能性を示すものである．さらに，糸球体のC3bレセプター[29)30)]およびC4レセプター[31)]により，補体と結合したICが糸球体で捕獲されることも報告されている．

このように，糸球体腎炎の進展には，補体が重要な役割を演じているが，さらに今回の実験で，低補体状態により流血中ICの分子量の大きさに変動が認められたことは，流血中でのIC形成時点で，その分子量の決定に補体が関与している可能性を示すものと考えられる．Schifferli ら[17)~19)]は，in vitro でのIC形成時，補体が十分に存在している正常ヒト血清中では，免疫沈降物の形成が抑制され，その作用機序に classical pathway が必要であること，また in vitro の実験であるが，CVF を添加されたヒト血清中では，C3が低下するため免疫沈降物の形成を抑制する効果がほとんど認められなくなることを報告している．今回のわれわれの実験系では，CVF 投与により CH 50 が低下し，かつ高分子領域の流血中IC分布が増加したが，このことは，Schifferli らが，in vitro の実験で認めたのと同様の機序が，in vivo の低補体状態下においても作用していることを示すものと考えられる．

以上のように，IC形成時の補体の有無によりIC分子量が影響をうけることは，糸球体へのIC沈着パターンが異なっていたことからも裏付けられる．ICの分子量と，その糸球体における局在部位との関係についての Germuth ら[32)]のウサギ慢性BSA腎炎を用いた成績によれば，抗体産生能の低い場合には分子量50万～70万

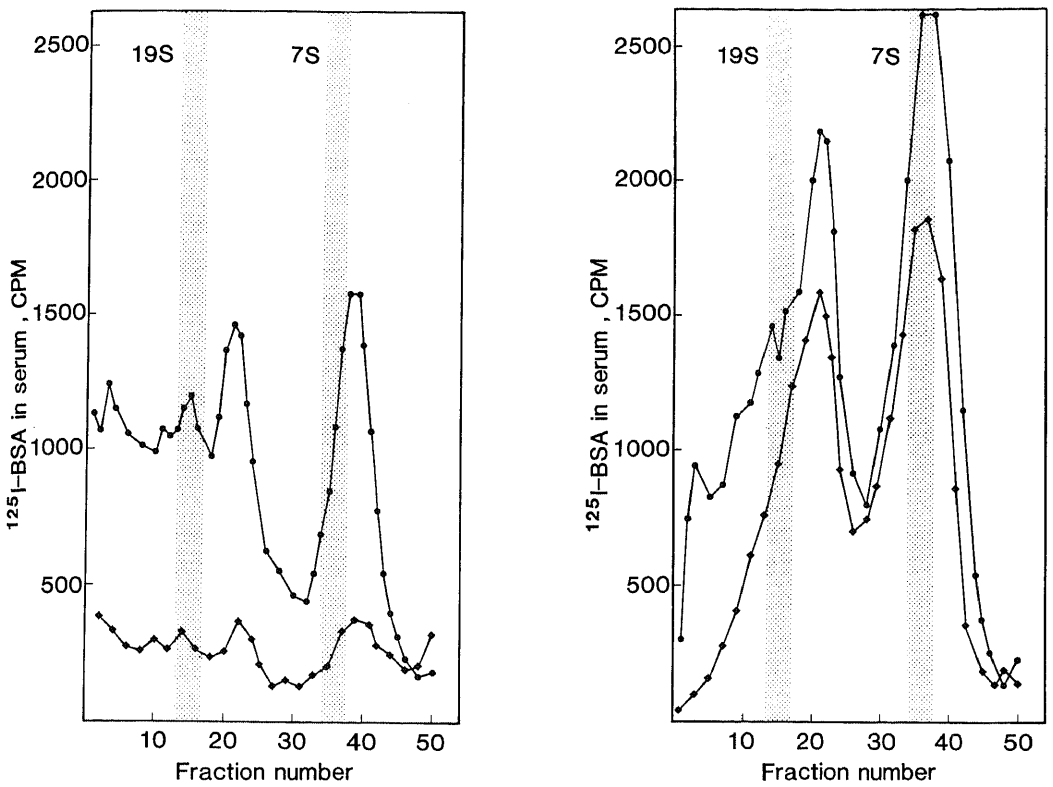


Fig. 7. Sucrose density gradient ultracentrifugation patterns of ^{125}I-labelled bovine serum albumin (BSA) in sera of group I (a) and group II (b) rats.
●: 10 minutes after ^{125}I-BSA injection
◆: 60 minutes after ^{125}I-BSA injection

ダルトンの小さなICが形成されて糸球体係蹄壁に沈着し，一方，中等度の抗体産生能を示す場合には，50万～数百万ダルトンの大きなICが形成され，おもにメサンギウムに沈着するといわれている．またKoyamaら[33]は，抗体のaffinityや抗原のvalencyおよび抗原抗体比などにより，形成されるICの分子量が規定され，Germuthらの報告と同様に，その分子量が糸球体におけるICの沈着部位を決定していることを報告している．つまり，今回の実験において，CVFを投与した低補体群でメサンギウム優位のIC沈着を認めたことは，これらのICが流血中では高分子量であったことを意味しており，蔗糖密度勾配超遠心法で，高分子領域の分布割合が多かったこととも一致する．

CVF投与群で認められた，尿蛋白量増加の抑制に対しても，低補体により高分子量のICが形成されたことに影響されている可能性が考えられる．つまり，Germuthら[32]や山本ら[20]も指摘しているように，蛋白尿の出現は，糸球体沪過に関与する係蹄壁へのIC沈着によるものと考えられるが，今回の成績でCVF投与群では係蹄壁への沈着が軽く，メサンギウム優位のIC沈着パターンを呈したことは，沈着のパターンが，尿蛋白の出現しにくい状態へと変化したことを意味するものと解される．しかしながら，前述した多核白血球を介してのlysosomal enzymeによる障害機序や，Salantらのいう補体の糸球体基底膜への直接障害作用は，いずれも補体依存性であり，このようなIC沈着後の障害機序も，今回のCVF投与による低補体状態下では抑制されていたことが考えられる．

結　　論

慢性ラットBSA腎炎の尿蛋白出現時期にCVFを投与することにより，その発生・進展におよぼす低補体状態の影響を検討し，つぎの成績をえた．

(1) CVF投与群のCH 50は10%以下に低下したが，

CVF非投与群では50%程度の低下がみられたにすぎず，その差は有意であった（$P<0.005$）．

(2) 尿蛋白量の増加は，CVF投与群で有意に抑制されていた（$P<0.05$）．

(3) メサンギウム増殖の程度は，CVF投与群では非投与群に比べ軽度であり（$P<0.001$），かつ多核白血球の浸潤もほとんどみられなかった．

(4) 免疫蛍光抗体法で，CVF投与群がメサンギウム優位のIgG沈着パターンを呈したのに対し，CVF非投与群では係蹄壁への沈着が優位であり，その差異は有意なものであった（$P<0.001$）．なお，CVF投与群では，C3沈着はほとんど認められなかった．

(5) 蔗糖密度勾配超遠心法により，CVF投与群の流血中ICを分析したところ，19S以上の高分子領域の分布割合が増加していた．

以上の成績は，in vivoにおいても，補体がIC分子量に影響を与えている可能性を示しており，低補体状態下では，高分子ICが形成され易いものと考えられる．なお，このようなCVF投与により，腎炎の進行性あるいは組織型を変えうることが明らかとなった．

謝　辞

稿を終えるにあたり，御指導，御校閲を賜わりました恩師服部信教授に深甚なる謝意を捧げるとともに，直接の御指導，御教示を賜わりました木田寛講師に深謝致します．また，終始御助力および御助言載きました第1内科第3研究室の諸先生方に感謝の意を表します．なお，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（班長：武内重五郎教授）の研究費によってなされたものであることを付記し，感謝の意を表します．

本論文の要旨は，第24回日本腎臓学会総会において発表した．

文　献

1) **Wilson, C. B. & Dixon, F. J.**: The renal response to immunological injury, p 1237 - 1350. *In* B. M. Brenner & F. C. Rector, Jr. (ed.), The Kindney, 2d ed. W. B. Sannders Co., Philadelphia, 1981.

2) **Dixon, F. J. & Wilson, C. B.**: Immunological renal injury produced by formation and deposition of immune complexes, p 1 - 34. *In* C. B. Wilson & B. M. Brenner (ed.), Contemporary issues in nephrology 3, Immunologic mechanisms of renal disease, Churchill Livingstone, New York, 1979.

3) **Unanue, E. & Dixon, F. J.**: Experimental glomerulonephritis. IV. Participation of complement in nephotoxic nephritis. J. Exp. Med., **119**, 965 - 987 (1964).

4) **Glasser, R. J. & Michael, A. F.**: Urinary kallikrein in experimental renal disease. Lab. Invest., **34**, 616 - 622 (1976).

5) **Wardle, E. N.**: Fibrin in renal diseases: functional considerations. Clin. Nephrol., **2**, 85 - 92 (1974).

6) **George, C. R. P., Clark, W. F. & Cameron, J. S.**: The role of platelets in glomerulonephritis, p 19 - 65. *In* J. Hamburger, J. Crosnier & M. H. Maxwell (ed.) Advances in nephrology 5, Year book medical publishers, Chicago, 1975.

7) **Cochrane, C. G., Unanue, E. R. & Dixon, F. J.**: A role of polymorphonuclear leukocytes and complement in nephrotoxic nephritis. J. Exp. Med., **122**, 99 - 119 (1965).

8) **Kondo, Y. & Shigematsu, H.**: Cellular aspects of rabbit Masugi nephritis. I. Cell kinetics in recoverable glomerulonephritis. Virchows Arch. Abt. B. Cell Pathol., **10**, 10 - 50 (1972).

9) **Zabriskie, J. B., Lewshenia, R., Möller, G., Wehle, B. & Falk, R. E.**: Lymphocytic responses to streptococcal antigens in glomerulonephritis patients. Science, **168**, 1105 - 1108 (1970).

10) **Unanue, E. R. & Dixon, F. J.**: Experimental glomerulonephritis: immunological events and pathogenetic mechanisms, p 1 - 90. *In* F. J. Dixon, Jr. & J. H. Humphrey (ed.), Adwances in immunology 6, Academic press, New York, 1967.

11) **Simpson, I. J., Amos, N., Evans, D. J. Thomson, N. M. & Peters, D. K.**: Guinea - pig nephrotoxic nephritis. I. The role of complement and polymorphonuclear leucocytes and the effect of antibody subclass and fragments in the heterologous phase. Clin. Exp. Immunol., **19**, 499 - 511 (1975).

12) **Kobayashi, Y. Shigematsu, H. & Tada, T.**: Nephritogenic properties of nephrotoxic guinea pig antibodies. I. Glomerulonephritis induced by guinea pig IgG_1 antibody in rats. Virchows Arch. Abt. B. Cell Pathol., **14**, 259 - 271 (1973).

13) **Salant, D. J., Belok, S., Madaio, M. P. & Couser, W. G.**: A new role for complement in experimental membranous nephropathy in rats. J. Clin. Invest., **66**, 1339 - 1350 (1980).

14) **Henson, P. M. & Cochrane, C. G.**: Acute immune complex diseases in rabbits. The role of complement and of a leukocyte - dependent release

of vasoactive amines from platelets. J. Exp. Med., **133**, 554 - 571 (1971).

15) **Miller, G. W. & Nussenzweig, V.**: A new complement function: Solubilization of antigen - antibody aggregates. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S0 A., **73**, 418 - 422 (1975).

16) **Takahashi, M., Takahashi, S. & Hirose, S.**: Solubilization of antigen - antibody complexes: A new functinn of complement as a regulator of immune complex. p 134 - 166. *In* K. Ishizaka, P. Kallős, B. H. Waksman & A. L. de Weck (ed.), Progress in allergy 27, S. Karger, Basel, 1980.

17) **Schifferli, J. A., Bartolotti, S. R. & Peters, D. K.**: Inhibition of immune precipitation by complement. Clin. Exp. Immunol., **42**, 387 - 394 (1980).

18) **Schifferli, J. A., Woo, P. & Peters, D. K.**: Complement - mediated inhibition of immune precipitation. I. Role of the classical and alternative pathways. Clin. Exp. Immunol., **47**, 555 - 562 (1982).

19) **Schifferli, J. A. & Peters, D. K.**: Complement - mediated inhibition of immune precipitation. II. Analysis by sucrose density gradient ultracentrifugation. Clin. Exp. Immunol., **47**, 563 - 569 (1982).

20) **Yamamoto, T., Kihara, I., Morita, T. & Oite, T.**: Bovine serum albumin (BSA) nephritis in rats. I. Experimental model. Acta. Path. Jap., **28**, 859 - 866 (1978).

21) **Kingsbury, F. B., Clark, C. P., Williams, G. & Post, A. L.**: The rapid determination of albumin in urine. J. Lab. Clin. Med., **11**, 981 - 989 (1926).

22) **Mayer, M. M.**: Complement and complement fixation, p 133 - 240. *In* E. A. Kabat & M. M. Mayer (ed.), Experimental immunochemistry, 2nd ed. Charles C Thomas, Springfield, 1961.

23) **Minden, P. & Farr, R. S.**: Ammonium sulphate method to measure antigen - binding capacity. p 13. 1 - 13. 22. *In* D. M. Weir (ed.), Handbook of experimental immunology, 3rd ed. Blackwell scientific publications, Oxford, 1978.

24) **Cochrane, C. G., Müller - Eberhard, H. J. & 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).

25) **Hammer, D. K. & Dixon, F. J.**: Experimental glomerulonephritis. II. Immunologic events in the pathogenesis of nephrotoxic serum nephritis in the rat. J. Exp. Med., **117**, 1019 - 1043 (1963).

26) **Baxter, J. H. & Small, P. A., Jr.**: Antibody to rat kindney: in vivo effect of univalent and divalent fragments. Science, **140**, 1406 - 1407 (1963).

27) **Hawkins, D. & Cochrane, C. G.**: Glomerular basement membrane damage in immunological glomerulonephritis. Immunology, **14**, 665 - 681 (1968).

28) **Bartolotti, S. R. & Peters, D. K.**: Delayed removal of renal - bound antigen in decomplemented rabbits with acute serum sickness. Clin. Exp. Immunol., **32**, 199 - 206 (1978).

29) **Gelfand, M. C., Frank, M. M. & Green, I.**: A receptor for the third component of complement in the human renal glomerulus. J. exp. Med., **142**, 1029 - 1034 (1975).

30) **Gelfand, M. C., Shin, M. L., Nagle, R. B., Green, I. & Frank, M. M.**: The glomerular complement receptor in immunologically mediated renal glomerular injury. New Eng. J. Med., **295**, 10 - 14 (1976).

31) **Matre, R. & Tonder, O.**: C4 receptor in the human glomeruli. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., **63**, 312 - 316 (1980).

32) **Germuth, F. G., Jr. & Rodriguez, E.**: Immunopathology of the renal glomerulus. Immune complex deposit and antibasement membrane disease, p 15 - 43, Little, Brown and Company, Boston, 1973.

33) **Koyama, A., Niwa, Y., Shigematsu, H., Taniguchi, M. & Tada, T.**: Studies on passive serum sickness. II. Factors determining the localization of antigen - antibody complexes in the murine renal glomerulus. Lab. Invest., **38**, 253 - 262 (1978).

Effect of Cobra Venom Factor (CVF) on Chronic Bovine Serum Albumin (BSA) Nephritis in Rat Naohisa Tomosugi, Department of Internal Medicine (I), (Director: Professor Nobu Hattori), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 – J. Juzen Med. Soc., **91**, 848–858 (1982)

Key words: BSA nephritis, Cobra venom factor (CVF), hypocomplementemia

Abstract

The effect of hypocomplementemia induced by CVF on glomerular injuries of chronic rat BSA nephritis was studied. With a view to producing BSA nephritis, male Wistar rats were immunized subcutaneously by 1 mg of BSA with complete Freund's adjuvant and, after an 8-week interval, 1 mg of BSA was given intravenously 6 times a week. Immediately after development of proteinuria, rats with BSA nephritis were allocated alternately to the following two groups: 12 rats in group I were given three intra-peritoneal injections of 320 U/Kg of CVF every other day to maintain complement activity (50% hemolytic unit of complement, CH50) less than 10% of pretreated levels; 12 rats in group II were not treated with CVF as a control. Each was sacrificed on the day after development of proteinuria.

Urinary protein in group II increased linearly up to 174±27 mg/day during the 6 days. In group I, however, the rate of increment of urinary protein was apparently suppressed (74±18 mg/day, $p<0.05$). On histological examination, the grade of mesangial cell proliferation was significantly suppressed ($p<0.001$) and no infiltration of neutrophils was observed in group I. By the immunofluorescence microscopy using FITC labelled anti-sera against BSA, rat IgG and rat C3, C3 could scarcely be seen in group I, and immune deposits in group II tended to localize in the capillary walls, whereas those in group I were mainly found in the mesangial regions ($p<0.001$). Sucrose density gradient ultracentrifugation for sera revealed that most immune complexes (ICs) were found around 19S in group II, in contrast to bigger ICs than 19S found in a considerable amount in group I.

These findings suggest that complement system is responsible for inhibition of immune precipitation in vivo as well as in vitro. As a result of suppression of this function by CVF-induced hypocomplementemia, bigger ICs could be formed in circulation and deposit in mesangial regions, where large ICs were known to tend to localize. The inhibition of increase in urinary protein may be due to reduction of immune deposits to capillary walls and suppression of glomerular injuries induced by neutrophils.