

腎尿細管の1特異抗原とその精製

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/2297/8979

腎尿細管の1特異抗原とその精製

金沢大学がん研究所病態生理部 (主任: 倉田自章教授)

本郷 忠彦

(昭和57年3月1日受付)

ウシ腎の不溶抽出物から作製したデオキシコール酸可溶化分画に対するモルモット抗血清により、免疫沈降反応でそれらの分画中の腎特異抗原の性質を明らかにした。この抗原を免疫吸収材を使用して精製した。免疫蛍光法では、この抗原は近位尿細管細胞にのみ局在し、膜結合抗原であることが示された。抗原は β_2 の泳動度を持ち、分子量約47,000でEdgingtonのrenal tubular epithelium (RTE- α_4)と交叉反応性をもつが、それと同一ではなかった。この抗原の粗製または精製標品による異種免疫では尿細管細胞に病変が生じたが、糸球体に障害は起らなかった。

Key words brush border antigen, bovine kidney-specific antigen, immunology, kidney, tubular epithelial antigen

正常組織特異抗原の研究は組織の発生・分化や自己免疫疾患の成立、臓器移植あるいは癌特異抗原の研究上欠くことのできない基礎的情報を提供する。腎臓の組織抗原については、nephritogenic antigenである糸球体基底膜抗原の分析と精製が進んでいるが¹⁾、同抗原は肺・大動脈その他にも相当量が分布していて、腎特異抗原の範疇には入らない。腎臓にもし特異抗原が存在するとすれば、その構造特異性から見ても尿細管上皮細胞にそれは求められるべきである。尿細管抗原の研究も古くから数多くなされているが^{2,3)}、それらを物質として同定し、抽出・精製に成功したのはEdgingtonら^{4,5)}である。しかし、彼らがラット腎について存在を認めた尿細管のbrush border抗原は小腸粘膜にも存在し、最近はより広い体内分布も明らかになって、^{6,7)}腎特異抗原としての地位はゆらいできている。そこで筆者は新しい抗原抽出法を用い、ウシ腎について特異抗原の存否を検討した結果、腎特異と思われる1抗原の存在と性状を明らかにし、その均質な標品を得ることができた。抗原はEdgingtonのrenal tubular epithelium (RTE- α_4)と交叉反応性をもつが、それと異なる性質を示した。

材料および方法

I. 粗抗原分画と抗血清の作製

屠場より水冷して運んだウシ腎の被膜を除去し、そのままあるいは皮質・髓質を切りわけ、使用時まで -20°C に保存した。

これらの材料から倉田・岡田の方法⁸⁾に従って不溶性リポ蛋白分画 (insoluble lipoprotein fraction: LPと略) を抽出した。LPに約5倍量の0.2%デオキシコール酸ソーダ (sodium desoxycholate: DOCと略) を加えてhomogenizeしたのち、 4°C 16時間攪拌し、 $10,000\times\text{G}$ 30分遠心して上清をとり、10倍量の冷アセトンを加え、 -20°C に一夜おく、生じた沈澱 (solubilized lipoprotein fraction: LPsolと略) を遠心で集め、少量の留水に溶かし、遠心した上清をSephrose 4B (Pharmacia) のカラムで、溜水を溶出液としてゲル透過した。図1のような溶出曲線が得られた。第二の分画 ("Pfr"と名づける) をプールしてpervaporationにより2-10 mg/mlに濃縮し、 -20°C に保存した。500 gのウシ腎から約200 mgのPfrが得られた。

上記と同様の方法で、ウシ各臓器、プールしたモル

Demonstration and Isolation of a Specific Renal Tubular Antigen. Tadahiko Hongoh, Department of Pathophysiology (Director: Prof. Y. Kurata), Cancer Research Institute, Kanazawa University.

モット腎, ウサギ腎, 剖検時入手した病変のないヒト腎から Pfr を作製した。なお, 比較のためウシ腎から Edgington らの方法⁴⁾により RTE- α_3 および RTE- α_4 の分画を作製した。

体重 450-600 g のモルモット (No. 1-No. 10) に 1 匹 1 回 7-10 mg のウシ腎 Pfr を Freund's complete adjuvant 以下 FCA と略) で乳化して肩甲骨下腔に注射し, 以後 2 週間隔で 3 回注射を繰返し, 最終注射の 1 週間後に心穿刺で全採血し, 血清を少量づつにわけて -20°C に保存した。この抗血清を以下 A-Pfr antiserum: A-Pfr と呼ぶ

A-Pfr から以下のようにして吸収抗血清を作製した。A-Pfr 1 ml に対し, ウシ肝 LP と脾 LP をそれぞれ 0.25 g (湿量) とグルタルアルデヒドで不溶化⁹⁾したウシ血清 0.5 ml を加えて homogenize し, 室温 2 時間静置後, 4°C 16 時間ローターで低速回転し, $10,000 \times G$ 10 分遠心した上清をとる。この操作を 3-4 回繰返し, 吸収抗血清がゲル拡散法で血清や肝・脾の Pfr と反応しないことを確かめてから使用した。なお, 抗血清の稀釈が障害にならない実験 (例えば蛍光抗体法) の一部にはウシ血清を不溶化しないで吸収に使用した。これらの吸収抗血清を以下 absorbed A-Pfr antiserum: A-Pfr-abs と呼ぶ。

II. 精製抗原分画と抗血清の作製

Pfr には血清蛋白とくにアルブミンや臓器共通抗原が混在するから, DEAE-Sephacel (Pharmacia) や Blue Sepharose CL-6 B (Pharmacia) のクロマトグラフィーなどで前者を除去したのち, 家兎抗血清(1)のグロブリンを結合させた Sepharose 4 B カラムを使用する affinity chromatography (以下 AFCG と略) で混在物を除き, 特異抗原の精製分画 purified "Pfr": P-Pfr を得た。一部の实验では, DEAE-Sephacel クロマトグラフィー後に再度家兎抗血清(2)のグロブリンによる AFCG を行って血清成分を完全に除去し, ついで

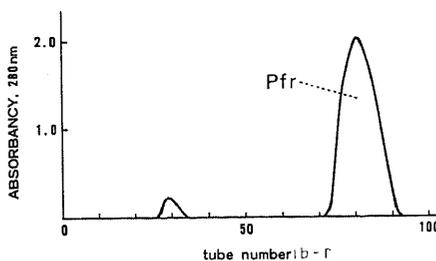


Fig. 1. Protein elution profile measured at 280 nm of a bovine kidney "Pfr" from a Sepharose 4B column (2.3×45 cm). The fraction size was 2.5 ml.

家兎抗血清(1)のグロブリンによる AFCG を行って P-Pfr を作製した。なお, 脱血清蛋白操作を省略して家兎抗血清(3)のグロブリンによる AFCG を繰返しても P-Pfr が得られたが通常は DEAE-Sephacel クロマトグラフィー後に AFCG を行った。

DEAE-Sephacel クロマトグラフィーは塩化ナトリウム 0-0.5 M の linear gradient による溶出を行い(図 2), 最初のピーク部分を濃縮して以下の操作に供した。

AFCG には 40 ml の吸収家兎抗血清のグロブリン分画 (硫酸アンモニウム 50%飽和による) を透析後, ブロムシアン活性化 Sepharose 4B¹⁰ 80 ml に結合させ, エタノールアミン処理後に 1.5×45 cm のカラムにつめ, 結合グロブリン蛋白量の 1/20 (約 20 mg) 以下のウシ腎 Pfr を負荷し, 4°C で 3 日以上かけて流出させた。得られた精製標品 P-Pfr は濃縮後, ゲル拡散法で非特異沈降線の消失を確かめ, 吸収不完全な場合は洗滌した上記カラムまたは新しいカラムを使用して再度 AFCG を行った。

AFCG に使用した家兎抗血清(1)(2)(3)は家兎 (体重約 3 kg) を以下のように処理して作製した。(1) 抗ウシ肝・脾・血清抗血清: ウシ肝・脾の LP をそれぞれ 0.7 g (湿量), 血清 1.5 ml を FCA で乳化して肩甲骨下腔に注射, 以後 2 週間隔で 3 回注射, 1 週間後に全採血, (2) 抗ウシ血清抗血清: ウシ血清 1 ml を FCA と共に 2 週間隔 5 回注射後 1 週目の血清, (3) ウシ肝・脾・脾の各 LP 0.3 g, 心・肺の各 LP 0.15 g づつを FCA で乳化して 2 週間隔 4 回注射後 1 週目の血清。抗血清はすべて使用時まで -20°C に保存した。

ウシ腎 P-Pfr を 2.2 mg/匹/回, FCA で乳化してモルモット (No. 56-No. 58) の肩甲骨下腔に 2 週間隔で 4 回

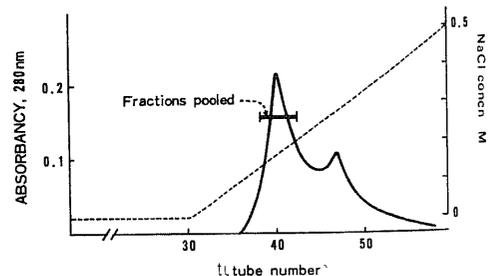


Fig. 2. DEAE-Sephacel chromatography of solubilized lipoprotein fraction (LPsol) from bovine kidneys. Amount of LPsol applied, 35 mg; column size, 1.5×45 cm; solid line, optical density at 280 nm; eluent, 5 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0); a gradient from 0 to 0.5 M sodium chloride (dotted line), fraction size, 5 ml.

注射し、最終注射の1週後に全採血し、抗血清 purified A-Pfr antiserum: A-P-Pfrを得た。

III. 免疫学的分析法

ゲル拡散法 (Ouchterlony 法) は 1.3% の寒天板使用、免疫電気泳動法は 1-1.3% の寒天板に 0.05 M ベロナル緩衝液、pH 8.6 (イオン強度 0.06) を用い、抗原液は 2-5 mg/ml、抗血清は稀釈せずに使用した。

蛍光抗体法は間接法によった。新鮮ウシ腎を snap-freezing 後、cryostat 切片を作り、1/32 稀釈抗血清で室温 1 時間処理後、FITC 標識抗モルモット IgG (MBL, Japan) の 5 倍稀釈液で 30 分反応させた。オリンパス蛍光顕微鏡 BHF の落射蛍光で、FITC 干渉フィルターセットを用い観察を行った。

生細胞膜免疫蛍光法には培養仔牛腎細胞 (Flow Laboratories Inc. USA) を用いトリプシン処理で浮遊細胞としたのち終濃度 1/16 の抗血清で 0°C 1 時間処理後、終濃度 1/6 の FITC 標識抗モルモット IgG で 0°C 30 分反応させた。なお、1 ml あたりウシ腎 Pfr (4 mg/ml) 0.25 ml を加え、室温 2 時間静置、4°C 16 時間回転後遠心する吸収操作を 3 回行った A-Pfr-abs で同時染色を行った。上記処理細胞の一部は 37°C に加温し、30 分後に再び観察した。

タンニン酸処理血球凝集反応は小西¹¹⁾の術式に従った。患者血清は富山市民病院患者より得られたもので、使用時まで -20°C に保存した。

IV. 病因性の病理組織学的検査

体重 450-600 g のモルモットに抗原液を FCA で乳化して肩甲骨下腔に 2 週間隔で表 1 のように注射した。

抽出腎は 10% フォルマリン固定を行い、パラフィン切片とし、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作って検鏡した。

V. 化学的分析法

抗原量は Gornall¹²⁾ のビュレット法に小改変を加えて測定した蛋白量で示した。なお、糖はフェノール硫酸法¹³⁾、総脂質は Frings and Dunn¹⁴⁾ の方法による測定を行った。

P-Pfr の脂質の同定には、濃縮した同標品からメタノール・クロロホルム (2:1) により抽出した脂質を減圧乾固し、TLC-plates Silica Gel (Merck) による 1 次元の薄層クロマトグラフィーと Whatman SG-81 珪酸固定濾紙による 2 次元クロマトグラフィー¹⁵⁾ および珪酸カラムクロマトグラフィーによる分画¹⁶⁾ についての 1 次元・2 次元クロマトグラフィーによる分析を行った。

抗原の degradation 実験には Wise ら¹⁷⁾ の方法に従い、Pronase E (科研化学) を終濃度 0.1% として pH 7.5, 37°C, 24 時間作用させた Pfr, Trypsin (11,000 単位/mg, Sigma) を終濃度 0.2% とし、pH 7.5 で 37°C, 2 時間反応後 Trypsin-inhibitor (Sigma) を添加した Pfr, 蛇毒 (Naja-haje annulifera, Sigma) を終濃度 0.6%, pH 7.0, 37°C, 24 時間作用させた Pfr, 過ヨード酸を終濃度 0.01 M で 25°C, 75 分作用させたのち冷室で溜水に対し透析した Pfr を作製した。これらの処理をした各 Pfr および 85°C の温浴に 10 分間加温した Pfr をゲル拡散法で A-Pfr-abs と反応させ、沈降線生成の有無を観察した。

Table 1. Treatment of guinea pigs with bovine kidney fractions, a fraction of guinea pig kidney or Freund's adjuvant

Guinea pig number	Antigen injected	Antigen dose injected each time (mg)	Injection times	Time of sacrifice*
No. 11-18 (8)	bovine kidney Pfr*	10	11	147
No. 31-34 (4)	bovine kidney cortex Pfr	10	6	77
No. 35-38 (4)	bovine kidney medulla Pfr	10	6	77
No. 51-53 (3)	bovine kidney P-Pfr*	1	5	63
No. 101-103 (3)	guinea pig kidney Pfr	10	7	91
No. 20, 21	adjuvant only		11	147
No. 40, 41	adjuvant only		6	77
No. 54, 55	adjuvant only		5	63
No. 104, 105	adjuvant only		7	91

* days after the first injection.

* Pfr, partially purified antigen fraction from bovine kidney.

* P-Pfr, purified antigen fraction by affinity chromatography.

ディスク電気泳動には7.5%ポリアクリルアミドゲルを用い、分離ゲルにはトリス-塩酸緩衝液 pH 8.9、濃縮ゲルには同緩衝液 pH 6.7 を使用して5 ma/tube で泳動した。ゲルの染色はCoomassie brilliant blue によった。一部のカラムについては糖染色¹⁹⁾や Sudan black B による脂質染色を行った。

SDS ポリアクリルアミド電気泳動は1% sodium dodecylsulphate (SDS), 1%メルカプトエタノール, 20%グリセリンを含む0.05 M トリス-塩酸緩衝液, pH 6.8, で100°C 2分間処理した標品を7.5%ポリアクリルアミドゲルにかけ、0.1% SDS を含む0.05 M ト

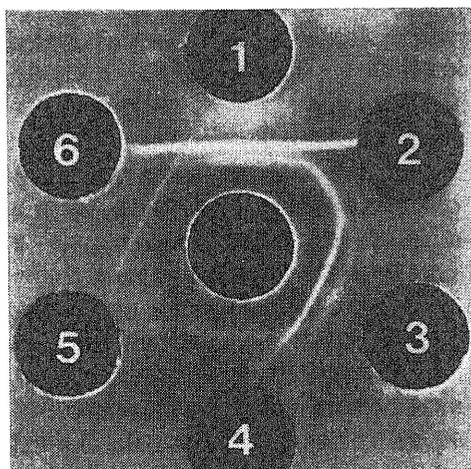


Fig. 3. Ouchterlony reaction patterns developed between unabsorbed A - Pfr antiserum and various "Pfr" preparations (5mg/ml). Center well, unabsorbed A - Pfr antiserum (No1); peripheral wells, (1) kidney "Pfr", (2) lung "Pfr", (3) heart "Pfr", (4) pancreas "Pfr", (5) spleen "Pfr", (6) liver "Pfr".

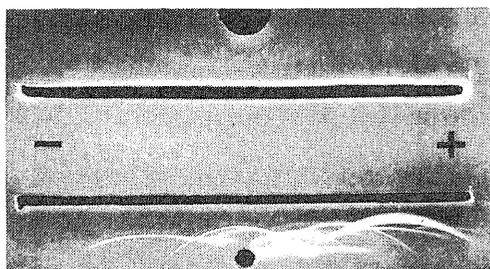


Fig. 4. Immunoelectrophoretic pattern of a kidney-specific antigen prepared from bovine kidney. Upper well, kidney "Pfr"; upper trough, absorbed A - Pfr antiserum (No8). Lower well, normal human serum; lower trough, anti - human serum horse antiserum (Behringwerke AG).

リス-塩酸緩衝液, pH 8.3, を用い, 3 ma/tube で泳動した。分子量マーカーには MW - Marker for SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Oriental Co. Ltd. Japan) を使用した。

なお, Davison 法¹⁹⁾による分子量測定も行った。

成 績

A - Pfr をゲル内拡散法でウシ各臓器 Pfr と反応させると, 図3のように腎 Pfr に対し強い1本の沈降線とやや弱い数本の沈降線を生じ, 他臓器 Pfr に対しても1-数本の沈降線を生じた。A - Pfr - abs で同様な反応を行ってみると, ウシ腎 Pfr に対しては1本の沈降線を生じたが, 同一個体または別個体のウシの他臓器 Pfr とは沈降線を作らず, ヒト・モルモット・ウサギの腎 Pfr に対しても沈降線を生じなかった。即ち, Ouchterlony 法の限度内で, ウシ腎 Pfr には種属特異性のある腎特異抗原が存在し, A - Pfr は monospecific な抗体を含むことが示唆された。

この腎特異抗原は免疫電気泳動では β_2 -グロブリンの泳動度を示した (図4)。腎 Pfr を Pronase あるいは

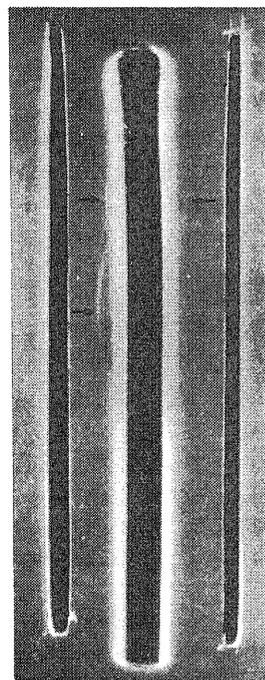


Fig. 5. Polyacrylamide disc gel pattern of kidney "Pfr". Center trough: a kidney "Pfr" preparation on gel; left trough, A - Pfr antiserum (No5); right trough, absorbed A - Pfr antiserum (No5). Arrows indicate arcs.

trypsin で処理すると腎特異抗原の沈降活性は消失し、熱処理 (85°C10 分) では沈降活性が弱化した。過沃素酸処理や蛇毒処理は影響が見られなかった。腎 Pfr を 7.5% アクリルアミドゲルでディスク電気泳動し、カラムを無処理のまま寒天板の槽内におき、平行した槽内にそれぞれ A-Pfr と A-Pfr-abs を加えてゲル拡散を行うと、前者は 2 本、後者は 1 本のアークを生じ、両者に共通の腎特異なアークは $R_f=0.25$ の位置にあった (図 5)。そこで泳動後の無処理カラムから同領域を切り出し、溜水抽出・濃縮して SDS-ポリアクリルアミド電気泳動を行い、分子量 47,000 D 相当のバンドを認めた。この値は Davison 法¹⁹⁾による腎 Pfr の分析結果とも一致した。

この腎特異抗原は既知の尿管抗原 RTE- α_3 ⁴⁾とは関係がなく、RTE- α_4 ⁴⁾と一致あるいは部分一致する抗原活性をもつことがゲル拡散で認められた (図 6)。

腎特異抗原の精製には DEAE-Sephacel クロマトグラフィーと抗ウシ血清家兎抗血清グロブリンによる AFCG 1 回で Pfr 中の血清成分を完全に除去したのち、抗ウシ肝・脾 LP・血清抗血清グロブリンによる AFCG を 1 回行うと、ディスク電気泳動で蛋白染色陽性・糖とリピン染色陰性の単一バンド ($R_f=0.25$) を与える P-Pfr 標品が得られた (図 7)。血清成分除去操作を省いても、抗ウシ肝・脾・膵・心・肺 LP 抗血清グロブリンによる AFCG のみで P-Pfr が得られたが、時にアルブミンの残存することがあり、その場合は再度抗ウシ血清家兎抗血清グロブリンによる AFCG か Blue Sepharose CL-6 B クロマトグラフィーによるアルブミン除去が必要であった。得られた P-Pfr 標品は約 0.3% の糖、1.6% の総脂質を含み、そのクロロホルム・メ

タノール抽出物には globoside I が同定されたが、リン脂質・中性脂肪は認められなかった。

P-Pfr は A-Pfr-abs のみならず、未吸収 A-Pfr に対しても 1 本の沈降線を生じるが、その沈降線は Pfr が A-Pfr に対して作る主沈降線と完全一致像を示した。

A-P-Pfr を各 2 mg/ml のウシ肺・心・膵・脾・肝の Pfr 標品とゲル内拡散法で反応させると、腎 Pfr のみが 1 本の沈降線を示したが、他臓器 Pfr は反応せず (図 8)、抗原量を 5 mg/ml にしても結果は変らなかった。さらに甲状腺・睾丸・胸腺・脳・副腎の各 Pfr 標品も反応を示さなかった (図 9)。

Snap-freeze したウシ腎の cryostat 切片について、A-Pfr-abs あるいは A-P-Pfr を使用して間接蛍光抗体法を行うと、近位尿管上皮細胞が強陽性に染色され、糸球体・間質・血管は陰性であった。陽性尿管細胞は brush border 部分がとくに強く染まるが、他の細胞質部分も多少とも染色され、核は陰性であった (図 10 a)。なお、同時に染めた小腸には粘膜に陽性の

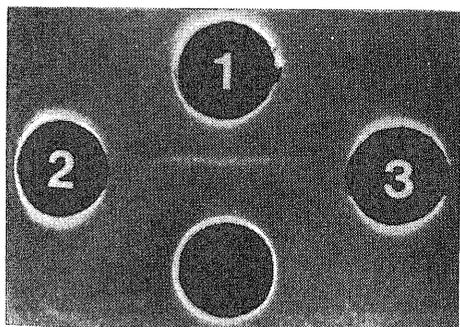


Fig. 6. Ouchterlony reaction patterns developed between absorbed A-Pfr antiserum against "Pfr" "RTE- α_3 " and "RTE- α_4 ". (1) kidney Pfr (7mg/ml), (2) RTE α_3 (6mg/ml), (3) RTE- α_4 (7mg/ml). Lower well, absorbed A-Pfr antiserum (No.2).

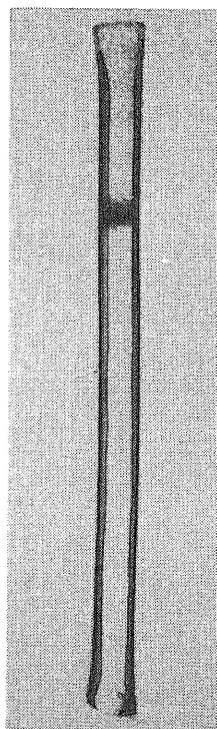


Fig. 7. Disc electrophoretic pattern of a purified "Pfr" preparation. Approximately one hundred and fifty μ g of purified "Pfr" was applied in 7.5% acrylamide gel. The anode is at the bottom. Gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R 250.

上皮細胞は認められなかった (図 10 b).

A - Pfr - abs を使用し LCMF で培養仔牛腎細胞を染めると、細胞膜のリング状または微細顆粒状染色が見られ (図 11 a)、腎 Pfr で吸収した A - Pfr - abs や adjuvant control の血清では染色は起らなかった (図 11 b). 37°C, 30 分おくと著明に patching が起こり (図 11 c)、一部の細胞は capping を起した (図 11 d).

ウシ腎 Pfr 長期免疫群のモルモット腎には間質に多少とも淋球様細胞の浸潤があり、拡張・萎縮を示す尿細管、あるいは好塩基性を増した細胞質と大型核を持つ再生尿細管小集団が散在性に出現し、2 例では尿細管の拡張・萎縮病変が皮質全体あるいは広い部分に及んでいた。ウシ腎皮質 Pfr 免疫群では 4 例中 2 例に間質線維増生を伴う高度の尿細管拡張・萎縮病変があり (図 12 a)、他の 2 例にも尿細管病変の小巣が多発していた。髄質 Pfr 免疫群は変化が軽く、尿細管変化の微少病巣が散在するだけであった。P - Pfr 免疫群では 3 例中 2 例に間質細胞浸潤と好塩基性尿細管小集団の多発が見られた (図 12 b)。モルモット腎 Pfr による同種免疫では腎に有意な病変は認められなかった。全群を通じ糸球体には明らかな病変は認められなかった。なお、adjuvant control 群の腎には軽度の細胞浸潤例があった以外に著変は見られなかった。

ヒト腎 P - Pfr 標品を使用し、タンニン酸処理赤血球凝集反応で患者血清の抗腎特異抗原抗体の抗体価 (血清最大稀釈倍数) をしらべた。ネフローゼ症候群 4 例

はそれぞれ 8, 4, 4, 0, 慢性腎不全 2 例は 4, 0, SLE 2 例は 4, 4, Sjögren 病 1 例は 4 で、糸球体腎炎・亜急性肝炎・肝癌各 1 例と正常人 4 例はすべて 0 であった。

考 察

腎から可溶成分を繰返し抽出・除去したあとの残渣を DOC で可溶化し、Sephrose 4 B カラムの第 2 の分画 (Pfr) をとると、そこには腎特異な抗原の存在することが、同分画に対する異種抗血清を使用した免疫学的分析から認められた。Pfr には血清蛋白とくにアルブミンや臓器共通抗原が混在しているので、それらに対する異種抗血清グロブリンを結合させた Sephrose 4 B カラムで affinity chromatography を行うと、ディスク電気泳動上単一の精製分画 (P - Pfr) が得られる。

この抗原はわづかの糖脂質を含む蛋白質で、抗原活性は蛋白部分にあり、泳動度は β_2 -グロブリンに一致し、分子量は約 47,000 であった。また、抗原は腎の近位尿細管細胞とくにその brush border 部分に濃厚に分布していた。生細胞膜免疫蛍光試験では仔牛腎細胞の細胞膜に抗原があり、温度をあげると patching や capping を起すことから、この抗原が細胞膜の integral protein であることが暗示された。

この抗原は既知の brush border 抗原 RTE - α_3 ⁹ とは

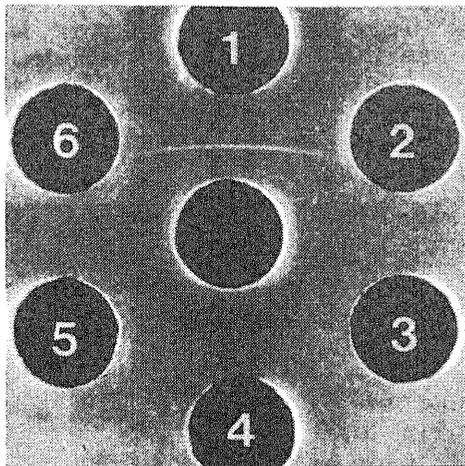


Fig. 8. Ouchterlony reaction patterns developed between purified A - Pfr antiserum (A - P - Pfr) and various "Pfr" preparations (2mg/ml). Center well, A - P - Pfr (No.56); peripheral wells, (1) kidney "Pfr", (2) lung "Pfr", (3) heart "Pfr", (4) pancreas "Pfr", (5) spleen "Pfr", (6) liver "Pfr".

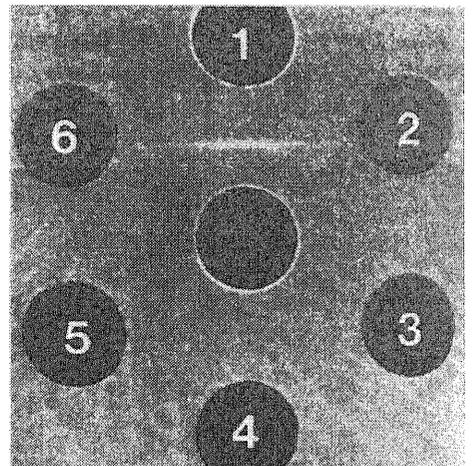


Fig. 9. Ouchterlony reaction patterns developed between purified A - Pfr antiserum (A - P - Pfr) and various "Pfr" preparations (5mg/ml). Center well, A - P - Pfr (No.56); peripheral wells, (1) kidney "Pfr", (2) adrenal gland "Pfr", (3) brain "Pfr", (4) thymus "Pfr", (5) testis "Pfr", (6) thyloid gland "Pfr".

抗原活性が一致せず、RTE- α_4 ¹⁾に近いが、一致する活性を示したが、それとは異って小腸粘膜細胞には分布しないし、分子量や電気泳動度の点でも差が認められた。しかしこの抗原がRTE- α_4 の活性部分である可能性はまだ残されている。なお本抗原と Centeno and Shulman²⁰⁾のウサギ腎特異抗原や Ahlmen ら²¹⁾のヒト腎特異抗原との関連は不明であるが、物理化学的性質は多少異なっている。

この腎特異抗原標品 (Pfr または P-Pfr) は nephritogenic activity を持たず、モルモットを長期間異種免疫しても糸球体病変を起さないが、淋球様細胞の浸潤を伴って腎尿管の萎縮・拡張、再生などの変化を起した。しかし、モルモット腎 Pfr による同種免疫では有意な病変は生じなかった。従って、このような抗原が自己免疫抗原として働く可能性は小さく、それが可能になるためにはウィルスなどによる抗原の異物化などの過程が必要であるかもしれない。実際、ヒト腎 Pfr でしらべたヒト腎疾患患者血中の抗腎特異抗原抗体価は全般に低く、腎疾患の成り立ちにこの抗原が積極的役割を果しているようには思われなかった。

結 論

腎の1特異抗原がウシ腎不溶分画のデスオキシコール酸可溶化分画 (Pfr) 中に存在することを異種抗血清を用いゲル拡散や免疫蛍光法で明らかにし、Pfr に混在する血清蛋白や臓器共通抗原を immunoaffinity その他の方法を利用して除去することにより高度精製標品 (P-Pfr) を得た。

この抗原は近位尿管上皮細胞の細胞膜にあり、 β_2 -泳動度と約 47,000 の分子量を持つ蛋白性抗原であった。また Edgington の brush border 抗原 RTE- α_4 と交叉反応性を示すが、腎特異性がより高く、化学的性質も異っていた。

ウシ腎 Pfr または P-Pfr によるモルモットの長期免疫では尿管障害が発生したが、糸球体は侵されなかった。モルモット腎 Pfr によるモルモットの長期免疫では腎病変は乏しかった。

ヒト腎疾患や免疫病患者血中にはヒト腎 Pfr に対する抗体の存在が見られたが、低値であった。

終りに御指導・御校閲を戴いた倉田自章教授、御協力戴いた岡田収司助教授ならびに教室員各位に深く感謝します。あわせて研究遂行に多大の便宜をお計り下さった富山市民病院副院長高柳尹立博士に深くお礼申し上げます。

文 献

1) 柴田整一：腎炎惹起物質 nephritogenoside につ

いて、蛋白質核酸酵素, 26, 1-15 (1981)0

2) Weiler, E.: Antigenic differences between normal hamster kidney and stilbestrol induced kidney carcinoma: complement fixation reactions with cytoplasmic particles. Brit. J. Cancer, 10, 553-559 (1956).

3) Nairn, R. C., Ghose, T., Fothergill, J. E. & McEntegart, M. G.: Kidney specific antigen and its species distribution. Nature, 196, 385-387 (1962).

4) Edgington, T. S., Glasscock, R. J., Watson, J. I. & Dixon, F. J.: Characterization and isolation of specific renal tubular epithelial antigens. J. Immunol., 99, 1199-1210 (1967).

5) Edgington, T. S., Glasscock, R. J. & Dixon, F. J.: Autologous immune complex nephritis induced with renal tubular antigen I. Identification and isolation of the pathogenic antigen. J. Exp. Med., 127, 555-571 (1968).

6) Miyakawa, Y., Kitamura, K., Shibata, S. & Naruse, T.: Demonstration of human nephritogenic tubular antigen in the serum and organs by radioimmunoassay. J. Immunol., 117, 1203-1210 (1976).

7) Naruse, T., Fukasawa, T., Hirokawa, N., Oike, S. & Miyakawa, Y.: The pathogenesis of experimental membranous glomerulonephritis induced with homologous nephritogenic tubular antigen. J. Exp. Med., 144, 1347-1362 (1976).

8) 倉田自章・岡田収司：免疫実験操作法 A, (日本免疫学会編), 第4版, 390-393頁, 金沢, 日本免疫学会, 1979.

9) Avrameas, S. & Ternynck, T.: The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoadsorbents. Immunochemistry, 6, 53-66 (1969).

10) Kato, I. & Anfinsen, C. B.: On the stabilization of ribonuclease S-protein by ribonuclease S-peptide. J. Biol. Chem., 244, 1004-1007 (1969).

11) 小西奎子：抗肝細胞膜系抗体について、臨床免疫, 2, 103-107 (1970).

12) Gornall, A. G., Bardawill, C. J. & David, M. M.: Determination of serum proteins by means of biuret reaction. J. Biol. Chem., 177, 751-766 (1949).

13) Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. & Smith, F.: Colorimetric method for determination of sugars and related substances.

Anal. Chem., 28, 350 - 356 (1956).

14) Frings, C. S. & Dunn, R. T.: A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfo-phospho-vanillin reaction. Am. J. Clin. Path., 53, 89 - 91 (1970).

15) Wuthier, R. E.: Two-dimensional chromatography on silica gel-loaded paper for the microanalysis of polar lipids. J. Lipid Res., 7, 544 - 550 (1966).

16) 牧田 章: 生物化学実験法VII 脂質実験法(蛋白質核酸酵素別冊), 106 - 128 頁, 共立出版, 東京, 1966.

17) Wise, K. S., Allerton, S. E., Trump, G., Powars, D. & Beierle, J. W.: A fetuin-like antigen from human nephro-blastoma. Int. J. Cancer, 16, 199 - 210 (1975).

18) Zacharius, R. M., Zell, T. E., Morrison, J. H. & Woodlock, J. J.: Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. Anal. Chem., 30, 148 - 152 (1969).

19) Davison, P. F.: Proteins in denaturing solvents; gel exclusion studies. Science, 161, 906 - 907 (1968).

20) Centeno, E. R. & Shulman, S.: Physicochemical characterization and isolation of rabbit kidney-specific autoantigens. Immunology, 24, 911 - 924 (1973).

21) Ahlmén, J., Haglid, K., Rönnbäck, L. & Bucht, H.: Partial purification of human kidney antigens. Int. Archs Allergy appl. Immun., 56, 351 - 357 (1978).

Demonstration and Isolation of a Specific Renal Tubular Antigen Tadahiko Hongoh,
Department of Pathophysiology (Director; Prof. Y. Kurata), Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa, 920 - J. Jusen Med. Soc., **91**, 341-351 (1982)

Key words: brush border antigen, bovine kidney-specific antigen, immunology, kidney, tubular epithelial antigen.

Abstract

Characterization of a kidney-specific antigen was conducted by precipitin immunoreactivity, using guinea pig antisera against the desoxycholate-solubilized fractions prepared from the insoluble extracts of bovine kidneys. Purification of the antigen was accomplished by immunoadsorption. Immunofluorescent study revealed that the antigen was localized exclusively at the cells of the proximal tubules and was membrane-bound. Further study disclosed that the antigen had β_2 -mobility on immunoelectrophoresis and was of an approximate mol. wt. of 47,000. The antigen was cross-reactive to Edgington's renal tubular epithelium RTE- α_4 , but not identical with it. Xenogenic immunization with the crude or purified preparation of this antigen developed abnormalities of tubular cells but not glomerular lesions.

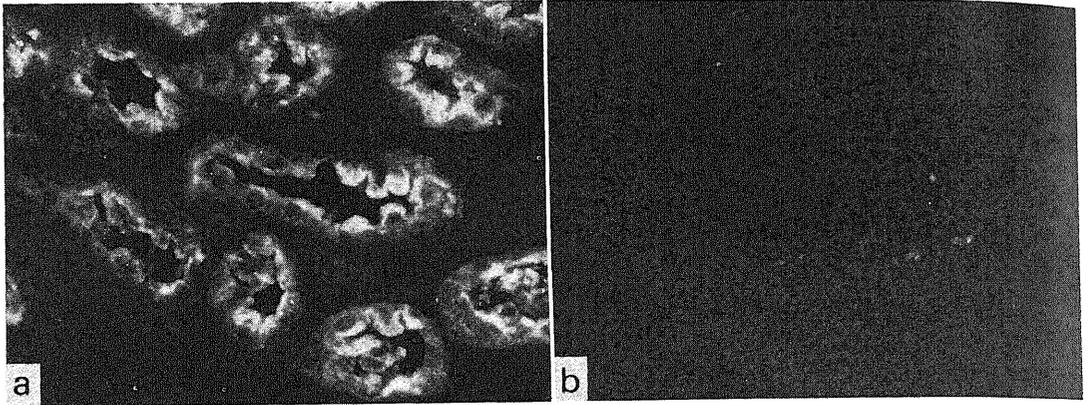


Fig. 10. Immunofluorescent photomicrographs of unfixed frozen sections of bovine kidney or small intestine treated with purified A - Pfr antiserum (No58) followed by FITC - anti-guinea pig IgG. (a) Intense staining of cytoplasm of proximal convoluted tubules. $\times 300$ (b) Unstained epithelial cells of small intestine. $\times 300$.

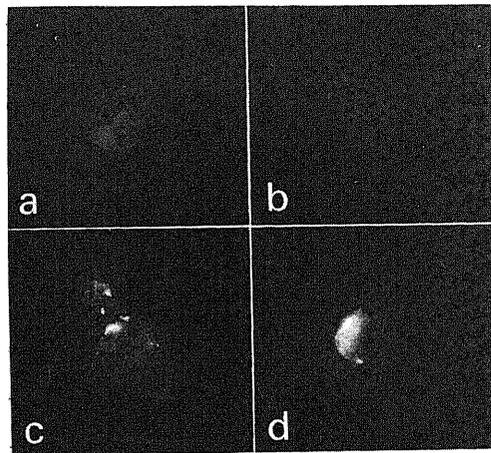


Fig. 11. Primary cultured calf kidney cells after incubation using absorbed A - Pfr antiserum (No1) and FITC - anti-guinea pig IgG.

(a) Cell showing full - surface speckled fluorescence.

(b) Cell showing no fluorescence after incubation with absorbed A - Pfr antiserum (No5) absorbed with kidney "Pfr".

(c) Cells with surface label distributed in patches.

(d) Cell with label in a capped configuration.

Calf kidney cells were purchased from Flow Laboratories and were grown in minimum essential medium with Eagle's salt containing 5% fetal calf serum.

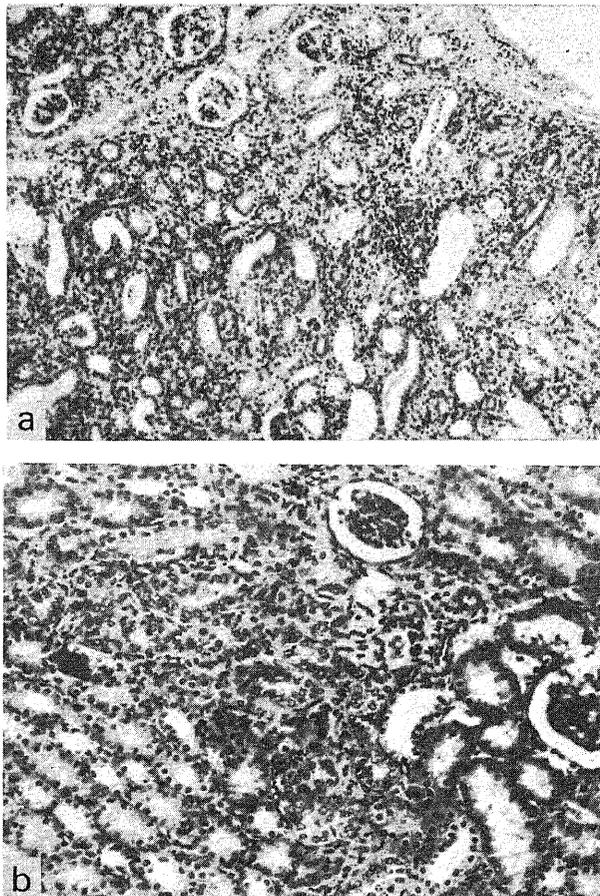


Fig. 12. Kidney histology of guinea pig immunized with six times ten mg "Pfr" of kidney cortex in FCA during 77days (No31) and with five times one mg purified "Pfr" of kidney in FCA during 63days (No53) .
(a)No31: sever tubular degenerative changes with irregular dilatation and atrophy. $\times 75$.
(b)No53: focal, tubular changes with a slight cell infiltration. $\times 125$.