

# 「ラット腎ミトコンドリアネフロトキシンによる 実験ネフローゼの免疫病理学的解析」

—とくに腎尿管ミトコンドリアの nephritogenic activity について—

金沢大学大学院医学研究科病理学第二講座(主任 石川大刀雄教授)

桜井 登

(昭和44年2月10日受付)

本論文の要旨は、1969年4月第58回日本病理学会総会において発表した。

近年、橋本甲状腺炎をはじめとして、多くの疾患がアレルギー、とくに自己免疫現象の立場から解析され、その疾患の発生機序、および背景がかなり明らかにされてきた。

腎疾患でも、その発生機序にアレルギーの関与する例があることは、以前から多くの事実により認められている。とくに Vorhander<sup>1)</sup>らは腎炎とアレルギーの関係に注目していたが、実験的には、わが国の馬杉<sup>2,3)</sup>が1934年に初めてネフロトキシン、すなわちある種族の腎で他動物を免疫してできた抗血清をもとの種族に注射することによる腎炎を報告し、腎炎にアレルギーの関与することをはじめて実証した。これはヒトの各時期の糸球体腎炎に類似した像を示した。その後この馬杉腎炎を起す本態は、腎のどの成分が抗原として働くかの検討が行なわれ、Cole<sup>4)</sup>はその解析にトリプシン消化超遠心法を取り入れた。さらにこれに澱粉電気泳動法を加味し純化を試みた柴田<sup>5)</sup>は、その本態は糸球体基底膜中の一種の glycoprotein と報告、これを「-3分画」と名付けている。

一方、能動免疫抗原関係では Heymann<sup>6)</sup>がラット腹腔内に同種腎エムルジオンと Freund の adjuvant を付加して免疫を行ない、ネフローゼ症候群を伴う慢性糸球体腎炎をつくることに成功した。本疾患の発生について、Dixon 一派<sup>7)</sup>や Okuda<sup>8)</sup>等の研究は、糸球体基底膜要素は関係なく、糸球体以外の所で発生した抗原-抗体-補体 complex がまず基底膜に局在し、次いでこの complex による基底膜障害で腎炎症状が発生するものとの考えを示した。事実

Dixon 一派の Edgington<sup>9)</sup>がラットの腎尿管上皮刷子縁に多く含まれる lipoprotein が、これと相対する抗体と反応して immune complex を作り、これが膜性糸球体腎炎を起すと報告、この抗原成分を RTE- $\alpha_5$  抗原と呼んでいる。

著者は、前記柴田の基底膜から純化したネフロトキシン抗原の「-3分画」と、Edgington らの尿管上皮から抽出した抗原成分 RTE- $\alpha_5$  との間の質的差を比較するために、尿管上皮の細胞下分画のうち、とくにミトコンドリア (以下 Mt. と略する) とミクロゾーム (以下 Mc. と略する)、ことに前者を取り上げた。Mt. を選んだ理由は、最近肝障害を細胞下分画の代謝レベルで検討する、例えばアルコール中毒<sup>10)</sup>、CCl<sub>4</sub> 中毒<sup>11)</sup> 時の肝変化生成機序での Mt. レベルの解析が行なわれ始めているからでもある。

腎 Mt. についても、肝臓同様の Mt. 内代謝障害で病変を起し得るのではなからうか、しかも Mt. は大部分尿管上皮に存在することから、現在もお定説のないネフローゼ症候群の発生機序解明についても一つの示唆を与えうるのであろうとの考えをもつようになった。ところで Munk<sup>12)</sup>、Fahr<sup>13)</sup>らは尿管の一次的変性をはじめてリポイドネフローゼと記載したわけであるが、Randerath<sup>14)</sup>、および Bell<sup>15)</sup>らはリポイドネフローゼの一次的変化の場は糸球体で、尿管変化はその二次的なものと主張し、現在も大勢はこの説にしたがっている。しかし激しい臨床症状の割りに電顕レベルでも糸球体変化が軽微な例も多く、事実、Freeman<sup>16)</sup>はネフローゼの蛋白尿は、糸球体

Immuno-pathological Study on Experimental Nephrotoxic Serum Nephrosis Induced by Rat Renal Mitochondria.—In Special Reference to Nephritogenic Activity of Renal Epithelial Mitochondria. Noboru Sakurai, Department of Pathology (II), (Director: Prof. T. Ishikawa), School of Medicine, Kanazawa University.

からの蛋白の異常漏出を必ずしも必要とせず、尿細管における蛋白再吸収能低下だけでも起りうると報じ、Ellis<sup>17)</sup>、諏訪<sup>18)</sup>、高木<sup>19)</sup>らも腎炎慢性化機序としての尿細管一問質系の重要さを示唆している。これ等のことからネフローゼ症候群の発生機序究明に当り、今日再び尿細管上皮に注目して検討を加える必要があると思われた。

著者は、尿細管上皮細胞性のMt.をネフロトキシン抗原として取り上げ、それを臨床的検査法、免疫拡散法、螢光抗体法、光顕・電顕法などで検索し、Mt.のnephritogenic activityを確かめた。一方では細胞膜のいわゆるunit membrane説<sup>20)</sup>を考慮しつつ、それとRTE- $\alpha_5$ との共通性も検討した。さらにネフローゼ症候群の発生機序にも一つの示唆を与えると考えられる所見を与たので、合わせて報告する。

実験材料および実験方法

I. Mt. の分離法

体重 120~150 g の呑電系正常ラットを無麻酔下で断頭、瀉血し腎臓、肝臓を剔出した。剔出した腎臓、肝臓は氷冷下で 3~5 mm<sup>3</sup> の細片として、蔗糖液 I (0.25 M 蔗糖, 0.01~0.02 M トリス緩衝液, 0.1 mM EDTA, pH 7.4) に浮遊し、その溶液を数回変えることにより血液成分をできるかぎり取り除いた。次にHogeboom-Schneider の変法<sup>21)</sup>により4倍量の蔗糖

液 I を加え、Potter-Elvehjem 型ガラスホモジナイザー、さらにテフロンホモジナイザーを用いて組織細片を20%ホモジネートにした。ついで、表1に示す方法でMt.分画を調整した。すなわち、50×g, 7分遠心して核成分を落とし、その上清を蔗糖液 II (0.34 M 蔗糖, 0.05 M トリス緩衝液, 0.1 mM EDTA, pH 7.4) に重層し、700×g, 10分遠心で、粗大夾雑物を除いた。この上層 2/3 をさらに 5,000×g, 10分遠心して、比較的顆粒の大きい Mt. 分画を得た。この Mt. 分画を蔗糖液 I に溶かし、6,000×g, 10分、続いて 7,000×g, 10分遠心洗浄した。最後にその沈渣を蔗糖液 III (0.25 M 蔗糖, 0.01 M トリス緩衝液, pH 7.4) に溶かし 9,000×g, 10分遠心し、沈澱した Mt. 分画を用いた。この Mt. を蔗糖液 III で蛋白量が 25 mg/ml になるように溶かして懸濁液を調整した。これを免疫抗原として使用時まで -20°C に凍結保存した。なお蛋白の定量には biuret 法<sup>22)</sup>を用いた。

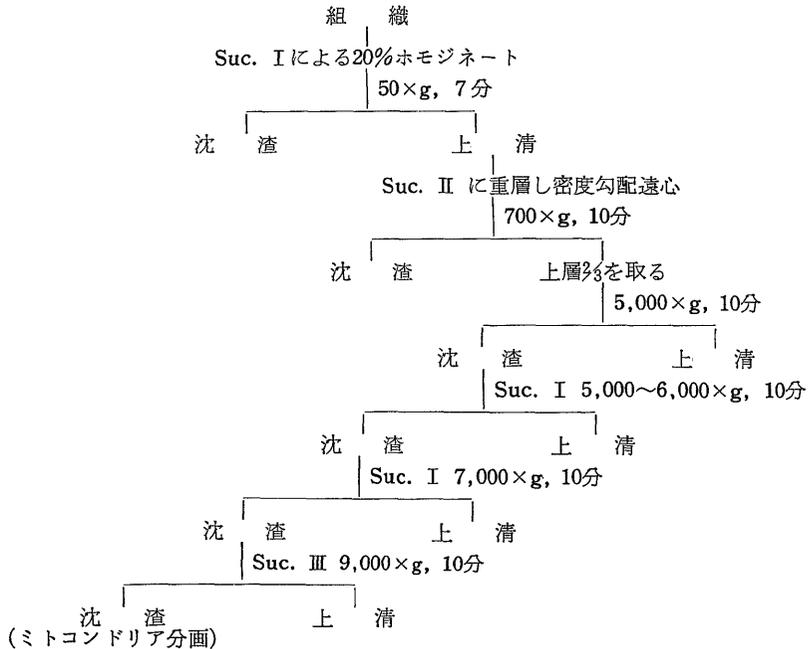
II. 柴田のいわゆる「-3分画」ネフロトキシン抗原の抽出法

柴田の方法<sup>23)</sup>にしたがった。

III. 抗血清のつくり方

白色家兎(体重 2.0~2.5 kg)を用い、蔗糖液 III で懸濁液とした 25 mg/ml の抗原液 2 ml に、同量の Freund の incomplete adjuvant (流動パラフィン 8.5 ml に、Arlacel 1.5 ml の割合に含む) とともに

表1 ミトコンドリア分離法



乳濁液として、肩甲骨下腔および後肢内側皮下または筋肉内に注射した。1週間隔で3回免疫し、その後3～4週目に1回追加免疫を行なった。最終免疫後10日目に試験採血を行なって、寒天ゲル平板上で抗体価を調べ、腎 Mt. で1/32稀釈以上、肝 Mt. は1/16稀釈以上に抗体価が上った場合に、それより1週以内に絶食、全採血を行なった。抗体価の上昇が不十分の場合はさらに1回追加免疫を行ない、その約2週後に採血した。採血分離した抗血清はいずれも使用時まで $-20^{\circ}\text{C}$ に保存した。

#### IV. 免疫学的検査方法

##### 1. 寒天内二重拡散法 (Ouchterlony法<sup>24)</sup>)

4%精製寒天ブロック 10g, 1mg/ml の EDTA と 1.7% に NaCl を含む 0.1M 磷酸緩衝液 (pH 7.6) 15ml, 1%  $\text{NaN}_3$  3ml, 蒸溜水 2ml の割合にまぜ加熱溶解し、その 15ml を  $8 \times 12$  cm のガラス板に流し、冷却後使用した。抗原抗体孔は、直径 6mm, 間隔 5mm を繁用したが、必要に応じ適当に変化させた。後述の方法で作製した試験抗原と  $20^{\circ}\text{C}$ , 湿状態で反応させ、沈降線が出揃ったとき (2～5日後) に写真撮影を行ない、0.9% 食塩水で洗浄、乾燥保存した。必要に応じ蛋白染色は 0.3% サイアジンレッド 2% 酢酸溶液で、脂肪染色はズダンブラック B・60% アルコール・アルカリ溶液で、多糖質染色には、Schiff 試薬による PAS 染色を行なった。

##### 2. 寒天内免疫電気泳動法<sup>25)</sup>

4%精製寒天ブロック 10g, ベロナール緩衝液 pH 8.2 (イオン強度  $0.1\mu$ ) 7.5ml, 0.1% マーゼニン液 3ml と蒸溜水 9.5ml を加熱溶解し、 $8 \times 12$  cm のガラス板に 15ml 流して寒天板を作製した。1×2mm<sup>2</sup> の抗原孔の抗原を 16mA, 定電圧 150V, 90分泳動後直ちに幅 1mm の抗体溝を抗原孔から 5mm のところにあげ、抗血清を入れ、以後二重拡散法と同様に処理した。

#### 3. 試験抗原

##### 1) deoxycholate (DOC) 可溶分画

0.035 M トリス緩衝液 (pH 8.2) に懸濁した核, Mt., Mc. の細胞下分画に DOC を終濃度 0.4% になるように加え、氷冷しながら泡のたたないように約 15分 ホモジナイズする。  $2^{\circ}\text{C}$ , 30分氷室で放置後、 $105,000 \times g$ , 90分間 Spinco L型超遠心機を用いて遠心し、その上清の 1/3 を DOC可溶分画とした。蛋白量は 15mg/ml に調整し、試験抗原として用いた。

##### 2) ラット各臓器 DOC 可溶分画

正常ラットの諸臓器 (肺, 心, 脾, 脾, 脳, 胸腺, 副腎)

ホモジネートも細胞下分画と同様の方法で DOC 可溶分画とし蛋白量 35mg/ml に調整した。

#### 4. 吸収抗血清作製

あらかじめ最適吸収抗原量を確認した後、抗腎 Mt. 血清に正常肝 Mt. DOC 可溶分画を最適吸収抗原量の 1/3 量加え、 $37^{\circ}\text{C}$  で 1時間反応後、 $4^{\circ}\text{C}$  氷室内に 2時間放置し、生じた沈澱を遠心除去する。再び同様に 1/3 量を加え同様の操作を行なう。最後に残り 1/3 の肝 Mt. 抗原を加え、1時間反応後 1夜氷室内に放置し、得た上清を吸収抗血清 (以下 A/K-L と略する) として用いた。

#### V. 螢光抗体法

##### 1. 螢光色素ラベル抗体の作製方法

Marshall 法を改良した浜島らの方法<sup>26)</sup>にしたがった。使用した抗血清は、抗ラット腎 Mt. 免疫家兎血清 (以下 Anti-Rat K. Mt. と略する), 抗家兎 Ig G 免疫羊血清 (以下 Anti-Rab と略する), 抗ラット Ig G 免疫家兎血清 (以下 Anti-Rat と略する) で、後二者は金沢大学癌研分子免疫学教室より提供を受けた。これ等の抗血清を 34% 飽和硫酸で  $\gamma$ -グロブリン化し、fluorescein isothiocyanate (FITC) で標識した後、セフアデックス G-25 のカラムを通した。次いでラット肝アセトン乾燥臓器粉末で非特異物質を除去し、風乾により濃縮し、蛋白量をほぼ 4～5mg/ml にした。

##### 2. ラベル抗体による染色と観察

Anti-Rat K. Mt. (ネフロトキシン) の証明に後述ラベル抗体静注法<sup>27)</sup> および間接法として Anti-Rab ラベル抗体染色法を行なった。ラット自己 Ig G の証明に直接法として Anti-Rat ラベル抗体、正常ラット腎の抗原性の証明に Anti-Rat K. Mt. ラベル抗体染色法を行なった。同時に Anti-Rat K. Mt. による阻止法も行ない比較した。観察に当たり Anti-Rab による間接法では経時的に、すなわち静注後 20分に始まり、30分、尿蛋白の出現する 4時間後、12時間後、24時間後、光顕上組織変化の現われ始める 3日後、9日後、半月体形成のはっきりする 20日後、さらに 1カ月後の像も追究した。後二者には Anti-Rat による直接法も併行した。

##### 3. ラベル抗体静注法

長沢らの方法<sup>27)</sup>にしたがい、Anti-Rat K. Mt. ラベル抗体中の  $\gamma$ -グロブリン量 4mg/ml として 1ml を尾静脈より静注し、20分後に観察した。20分を選んだわけは、注射されたネフロトキシンが、<sup>131</sup>I をラベルし静注観察した Pressman ら<sup>28)29)</sup> 等によると、18分以内で流血中から消失すると報告されているためで

ある。

以上は Nikon 螢光顕微鏡を使用し、BV 系フィルターを用い、100, 400倍率で観察した。

#### VI. オキシメーター (酸素電極法)

Mt. の酸素消費量を定量するため、反応液中に存在する酸素張力の変化を記録する酸素電極 (オキシメーター) として、Chance<sup>30)</sup>、萩原<sup>31)</sup> 氏考案による半閉鎖式回転白金電極を用いた。

#### VII. Anti-Rat K. Mt. および Anti-Rat L. Mt. の受動免疫

実験はすべて体重 120~150 g 前後の呑電系ラットを使用し、抗血清は尾静脈より静注した。接種時にラットはアナフラキシーを起さなかった。1. は各群30匹、2. 3は各々20匹について以下に示す間隔、量で行ない、最高3カ月まで経過を観察した。

##### 1. Anti-Rat K. Mt.

- 1) 0.2 ml を1週2回の間隔で最高14回静注した。
- 2) 0.02 ml を1) 同様に行なった。
- 3) 1.0 ml を初回1回のみ静注した。

##### 2. Anti-Rat L. Mt.

- 1) 0.2 ml を1週2回の間隔で最高14回静注した。
- 2) 0.4 ml を1) 同様に行なった。

##### 3. 無処置正常家兎血清

- 1) 0.2 ml を1週2回の間隔で最高14回静注した。

この間、原則として初回接種より1週間隔で尾静脈より部分採血するか、あるいは殺し、腎、肝各臓器は光顕、電顕あるいは螢光標本にまわし、血清は部分採血例と同様に後述諸種の臨床生化学的検査に使用した。

#### VIII. 組織学的検査法

1. 光顕標本材料は組織を10%ホルマリン固定、パラフィン包埋、ヘマトキシリン・エオジン染色を行なった。必要に応じ過ヨウ素酸 Schiff (PAS) 染色、およびズダンⅢによる脂肪染色を併行した。

2. 電顕的検査では、2%オスミウム酸緩液に酢酸ペロナル緩液、蔗糖を加えた Caulfield 液<sup>32)</sup> で1時間30分固定後、エタノール、プロピレンオキサライドで脱水、Luft 法<sup>33)</sup> によるエポキシ樹脂包埋を行なった。ガラスナイフで切った切片にウラニールおよび鉛の二重染色をほどこし、日立 Hu-11 P 型電子顕微鏡で観察した。

#### IX. 臨床的検査

1. 尿量、尿蛋白定性および定量、尿潜血反応

水を与えた状態でラットの24時間尿を蓄尿し、Esbach 氏法 または Ames 製品の albustex により定量し、定性にはズルフオサリチル酸法を行なった。潜血反応は hemastix (Ames 製品) により半定量を行ない、必要に応じ沈渣を鏡視した。

##### 2. 血清総蛋白および分画

日立蛋白計で総蛋白量を測定し、分画は濾紙電気泳動法にしたがった。

##### 3. 血清総コレステロール定量

Zak-Henly 法または Hartman-Leddon 社の Ferro-Ham 変法で定量した。

##### 4. 血中尿素窒素定量法

Urease-Nessler 法または Warner-Chilcott Lab. 製 U-Ni-Graph 紙で測定した。

##### 5. 血清トランスアミナーゼ測定

serum glutamic oxalacetic transaminase (s-GOT) および serum glutamic pyruvic transaminase (s-GPT) 活性の測定には Reitman-Frankel 法またはその変法による Iatron 社製品試薬を使用し、吸光度は Hitachi Perkinelmer 139 UV-vis spectrophotometer を用いて測定した。

### 実験成績

#### I. ラット Mt. 分画の吟味

##### 1. 腎 Mt. 分画と他の細胞下分画との関連性

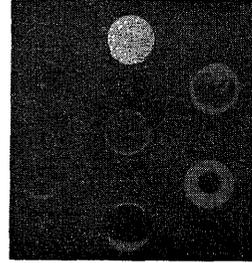
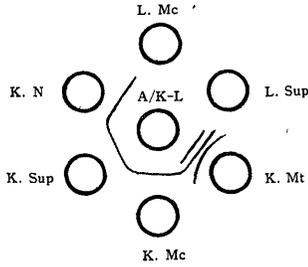
Mt. 分画の抗原分析を行なう場合、まず問題となるのは Mt. 分画における他の細胞構成成分の contamination である。著者の用いた Hogeboom-Schneider の変法<sup>21)</sup>はラット正常肝についての分画法であるが、同様な操作がそのまま腎組織の分画に適用されるかどうか合せて確かめる必要があった。後者については、電顕的検査およびヤーマスグリーン・ミトコンドリア染色を行なって、肝と同様に 5,000×g~9,000×g, 10分遠心沈殿部分を Mt. 分画として使用することが最も適当であることを確認した。

次いで各分画間の共通性を吟味するために、吸収抗血清 (A/K-L) を中心に Ouchterlony 法を用いた (図1)。肝 Mc., 肝上清とは勿論沈降線を生じないが、腎核、腎 Mc., 腎上清とは強弱の差はあるが一本の共通線を示した。

次に腎核、Mt., Mc., 上清の Anti-Rat K. Mt. に対する抗原活性の強弱の程度を調べると、図2に示すように、Mt. は1/16稀釈、Mc. は1/8、上清・核は1/2稀釈まで沈降線を生じる。つまり Mt., Mc., 上清・核の順に反応性を示す。

##### 2. 腎 Mt. 分画の抗原分析

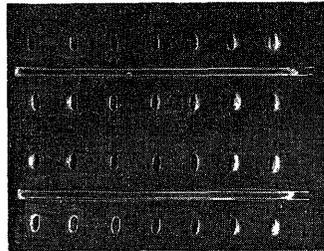
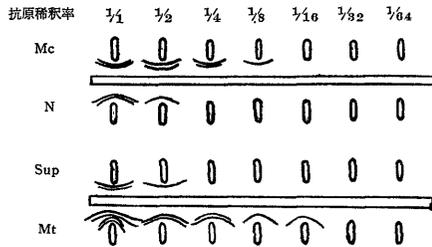
図1 腎 Mt. DOC-S と他の細胞下分画 DOC-S との比較



K.N: 腎核 DOC-S  
 K.Sup: 腎細胞質上清  
 K.Mc: 腎ミクロゾーム DOC-S  
 K.Mt: 腎ミトコンドリア DOC-S

L.Sup: 肝細胞質上清  
 L.Mc: 肝ミクロゾーム DOC-S  
 A/K-L: 肝 Mt. 成分吸収抗腎 Mt. 血清

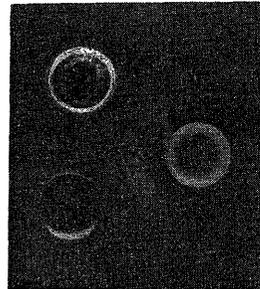
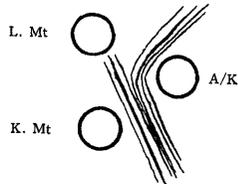
図2 抗腎 Mt. 血清に対する各腎細胞下分画の反応性



Mc: 腎ミクロゾーム DOC-S  
 N: 腎核 DOC-S

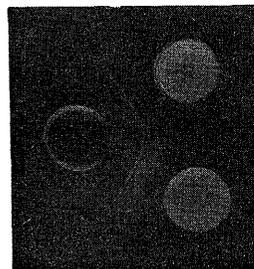
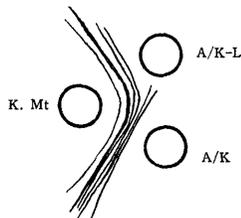
Sup: 腎細胞質上清  
 Mt: 腎ミトコンドリア DOC-S

図3 a 抗腎 Mt. 血清に対する腎・肝 Mt. 抗原の差異



L.Mt: 肝ミトコンドリア DOC-S  
 K.Mt: 腎ミトコンドリア DOC-S  
 A/K: 抗腎 Mt. 血清

図3 b 吸収抗腎 Mt. 血清を用いての腎 Mt. の特異性



A/K-L: 吸収抗腎 Mt. 血清  
 A/K: 抗腎 Mt. 血清

腎 Mt. DOC 可溶分画 (以下 K. Mt. DOC-S と略する) と肝 Mt. DOC 可溶分画 (以下 L. Mt. DOC-S と略する) を, Anti-Rat K. Mt. に対し, Ouchterlony 法により検索すると (図 3 a), 4 本の共通沈降線を生じたが, その他に腎 Mt. 分画にのみ強い 1 本と, それをはさんでやや弱い 2 本, さらに極く弱い 1 本の総計 4 本の腎 Mt. 特異の沈降線が認められた. さらに明確にするために A/K-L を用いると前述の所見が一層明瞭に示される (図 3 b).

免疫電気泳動法によると, この K. Mt. DOC-S は, ヒト血清の  $\alpha$ -グロブリン位に 3 本の沈降線を認

めた. すなわち腎 Mt. には  $\alpha$ -グロブリン位に相当する 3 つの特異抗原が存在する (図 4).

3. 腎 Mt. 分画と他臓器 DOC 可溶分画との関連性

Anti-Rat K. Mt. を用いて検索すると, 肝 Mt. とは前述のように 4 本の弱い共通沈降線を持つ. その他肺臓に 3 本, 脾・心臓に 2 本, 副腎に 1 本の弱い共通沈降線を示したが, 脾臓, 脳, 胸腺とは共通因子を持たなかった (図 5 a). 一方 A/K-L で検討すると, 肺と心臓にのみ弱いが共通沈降線を認める (図 5 b). すなわち腎 Mt. は肝, 肺, 脾, 心臓, 副腎と共通の

図 4 腎 Mt. 抗原の寒天免疫電気泳動

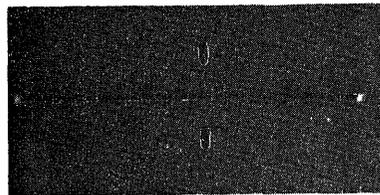
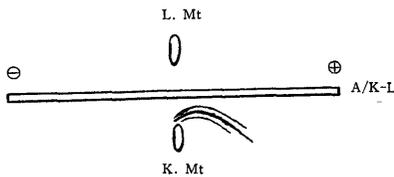
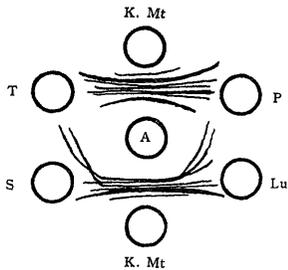
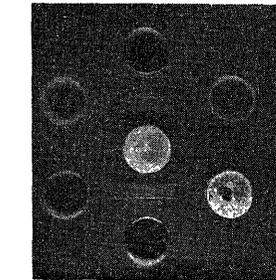


図 5 腎 Mt. DOC-S とラット諸臓器 DOC-S との比較

a. 非吸収抗腎 Mt. 血清例

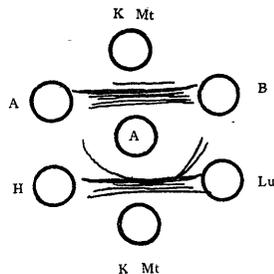


T: 胸腺 DOC-S  
S: 脾臓 DOC-S  
P: 膵臓 DOC-S

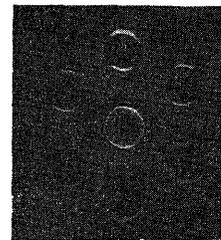


Lu: 肺臓 DOC-S  
A: 抗腎 Mt. 血清  
(心臓, 副腎, 脳は省略した)

b. 吸収抗腎 Mt. 血清例

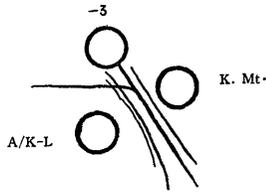


A: 副腎 DOC-S  
H: 心臓 DOC-S  
B: 脳 DOC-S

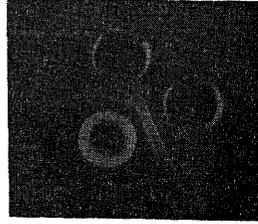


Lu: 肺臓 DOC-S  
A': 吸収抗腎 Mt. 血清  
(胸腺, 脾臓, 膵臓は省略した)

図6 腎 Mt. DOC-S と柴田の「-3分画」との比較



-3: 「-3分画」  
K.Mt: 腎 Mt. DOC-S



A/K-L: 吸収抗腎 Mt. 血清

抗原成分を含み、肝成分を吸収した腎 Mt. は肺、心臓と共通抗原成分を持っている。

#### 4. K. Mt. DOC-S と柴田の「-3分画」との比較

吸収抗腎 Mt. 血清を用いて両者の関連性をみると、「-3分画」にあらわれる唯一の沈降線は、腎 Mt. の最も強い沈降線と共通性を示した(図6)。

### II. 蛍光抗体法

#### 1. Anti-Rab ラベル抗体による間接法

Anti-Rat K. Mt. (ネフロトキシン) 静注20分後のラット腎を Anti-Rab ラベル抗体で染色(間接法)した像(写真1)では、特異蛍光は糸球体基底膜に一樣に、ほぼ線状の蛍光を示した。さらに詳細に観察すると、基底膜周辺の上皮あるいは内皮細胞と思われる部分にもやや薄い特異蛍光を示すが、Bowman 氏嚢(以下ボ氏嚢と略する)や尿細管には認められない。しかし経時的に観察すると、ネフロトキシン静注、30分、4時間、12時間、24時間、3日、9日、20日後と日をおってさらに一部の尿細管基底膜および尿細管細胞質にも徐々に特異蛍光がおよぶ傾向を示す(写真2, 3, 4, 5)。

対照として、Anti-Rat L. Mt. または無処置家兎血清その他の異種  $\gamma$ -グロブリン血清についても同様の方法を試みたが、いずれも糸球体基底膜には局在せず、一部に糸球体全般に不規則点状凝集の型で弱い蛍光を認める例もみられたが、前述 Anti-Rat K. Mt. の例とは明らかに区別された。

#### 2. Anti-Rat ラベル抗体による直接法

Anti-Rat K. Mt. 静注20日後、1カ月後のいずれにも自己 IgG の特徴的蛍光像は認められなかった。

#### 3. ラベル抗体静注法

1. の蛍光像とはほぼ同じであった。とくに係蹄末端部で幾分固有の基底膜にのみ線状均質に見出される傾向を示したが、両者には本質的な差異は認められない。

#### 4. 正常ラット腎の抗原性の検索

正常ラット腎を Anti-Rat K. Mt. ラベル血清で染色すると(写真6)、腎尿細管細胞質とその基底膜が強度に、ボ氏嚢、血管壁に中等度、糸球体基底膜とその上皮、内皮に軽度の特異蛍光を発する。Anti-Rat K. Mt. による阻止法では上述蛍光は完全に阻止された。すなわち Anti-Rat K. Mt. の中には Mt. の存在する尿細管細胞質とその基底膜に対する抗体ばかりでなく、前述の特異蛍光を示した各成分それぞれに対する抗体も含まれている。

### III. 受動免疫による経時的組織変化

1. Anti-Rat K. Mt. 注射を行なった前述実験方法VII. の1. 1), 2), 3) 3群の組織変化を、3. の対照群の所見を考慮しながら経時的に追求した。表2, 3, 4に示すように、一般に2), 3) 群は1) 群に較べて組織変化がやや軽度である。したがってここでは1) 群を主体に述べる。

第1病日: 1. 1). 2) 群では肉眼的にも光顕、電顕的にも殆んど変化を認めなかったが、3) 群で軽度の係蹄腫大、近位尿細管上皮の水腫、混濁腫脹を認めた。

第2病日: 1), 2) 群ともに近位尿細管上皮の混濁腫脹を認め、前者ではさらに蛋白円柱の出現を見る。電顕的には係蹄上皮細胞 (podocytes) 腫大と足突起の融合傾向(写真7)、3) 群ではわずかに電子密度の高い deposit が基底膜と内皮細胞の間に淡く出現する。尿細管上皮内では Mt. の膨化傾向を認める(写真8)。

第3病日: 肉眼的にも腎の腫大傾向を示し、第5病日になると、1) 群の係蹄基底膜のび慢性肥厚傾向と富核が PAS 染色標本で確かめられる。同傾向は数日遅れて他の群にも認められる。電顕上は上皮足突起の癒合傾向は一層強くなる。

第7病日でとくに注目されるのは上述組織変化が一時的改善傾向を示すことで、臨床的に尿蛋白の一時的改





正常の約3倍にも達する。光顕上の変化は一層強度となり、糸球体の係蹄基底膜肥厚、腫大、乏血、富核、分葉化、血管極 Fibrinoid 物質沈着、半月体形成が著明となり、ボ氏囊との癒着、囊腔内 Fibrinoid 物質浸出も目立つ(写真14)。また数例は硬化性変化を示した(真写15, 16)。尿細管では係蹄基底膜同様に尿細管基底膜の部分的肥厚傾向で、とくに注目されるのはこの肥厚尿細管基底膜の周囲に形質細胞を中心とした円形細胞浸潤である(写真17)。これは前述の螢光抗体法でこの尿細管基底膜と思われる部分が強い特異螢光を示したことと関連して意義深い点である。その他尿細管のやや強い混濁腫脹、水腫、萎縮、拡張、著明な蛋白円柱を認める。以上の光顕所見はヒトの増殖性変化と膜性変化の混合したいわゆる混合性慢性糸球体腎炎の像に一致する。電顕上注目されるのは、尿細管上皮内 Mt. の腫大、内部構造の粗胞化、二重膜の破壊などで、いわゆる黒沢の分類<sup>34)</sup>でのIV型にほぼ相当する(写真18)。これは光顕上の混濁腫脹、水腫に相当する変化であろう。その他刷子縁の迷入、糸球体基底膜の蛇行性肥厚および上皮側の不規則突出(写真19, 20)と尿細管基底膜の部分的肥厚像にも注目される。

第2カ月～3カ月病期：肉眼的に腎は蒼白だが、1カ月前に比較してやや縮小傾向を示し、光顕上も糸球体の変化は乏血、基底膜肥厚、分葉化、尿細管でも萎縮、基底膜肥厚、その周囲の円形細胞浸潤を認めるが、その他の活動性変化は一応治まった印象を与える。

以上の腎以外の臓器、例えば肝臓での変化は、対照群とはほぼ同程度の軽い肝細胞腫脹と星細胞増生などに止まった。

2. Anti-Rat L. Mt. 群, すなわちVII. の2.1), 2)群では表5, 6. に示すように1カ月頃よりグ鞘

に中等度のリンパ球、形質細胞よりなる円形細胞浸潤と、小葉周辺より始まり、経過とともに中間層にもおよぶ脂肪変性があり、1.5カ月から2カ月後にはズダンⅢ脂肪染色で著明な脂肪変性像を示す。ただしグ鞘の線維化傾向はほとんど認めなかった。

IV. 臨床的検査成績

1. 尿検査所見

1. の各群ともに、静注後早い例では3時間、遅くとも12時間後には全例に尿蛋白を定性的に認めた。実験方法VII. の1. の各群の定量経過を述べる(図7)。

1) 群: 日々漸増するが、開始1週間後に一時減少傾向を示す。これと同傾向の現象は他の2), 3)群にも認められる。以後は段階的に増強し、3週後には最高値10.0%に達した。しかしその後は6~7.0%台に固定した。尿沈渣、とくに赤血球、潜血反応の変化もほぼ尿蛋白の変動に準じたが、一般にその程度は軽微であった。尿量は、とくに1)群で7週病期をピークとする明らかな多尿像を示した(図8)。

2) 群: 1)群とはほぼ同傾向の尿蛋白定量曲線を描く。ただしその絶対量は最高値2.6%で1)群最高値の約1/4量に相当する。潜血、尿量に関しても、さらに軽度ながら1)群に準じた。

3) 群: 前2群よりは早い時期、すなわち1週後で最高値8.1%に達し、前2群同様に1~2週間で一時減少、2週後半で一時上昇、その後は漸減し、2.0%台に固着する。この群では、4週前後までに潜血中等度陽性例が比較的多かった。

なお Anti-Rat L. Mt. 例では、1), 2)群ともに4週以後に一部に0.3~0.8%と、1.群に比べてはるかに軽度の尿蛋白を認め、3.群の無処置家兎血清例でも多くて0.3%量を認めるにすぎなかった。

2. 総コレステロール定量

図9に示すように、1. 1)群では比較的早期より

表5 抗肝 Mt. 血清 0.2 ml, 週2 表6 抗肝 Mt. 血清 0.4 ml, 週2  
回分注法による肝組織変化 回分注法による肝組織変化

	10 D	20 D	1 M	"	1.5 M	2 M	2.5 M	3 M	4 M	5.5 M	1 M	"	52 D	2 M	2.5 M	82 D	3 M
染色性不同	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
混濁	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
腫脹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
空胞化	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
脂肪化	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
核大小不同	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+
星細胞増生	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
グ鞘細胞浸潤	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+

図7 尿蛋白定量 (Esbach または Albustex) 1群4~10匹の平均値を示す。

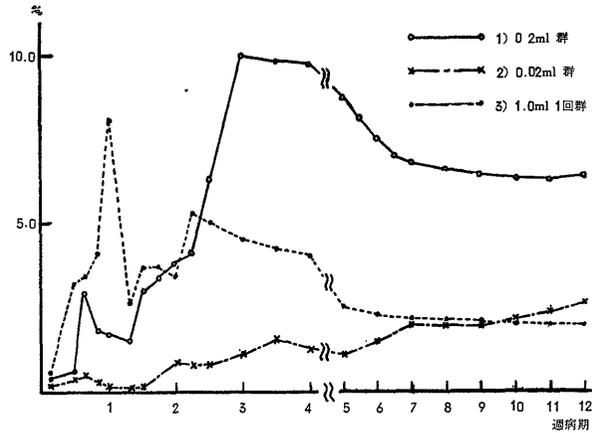
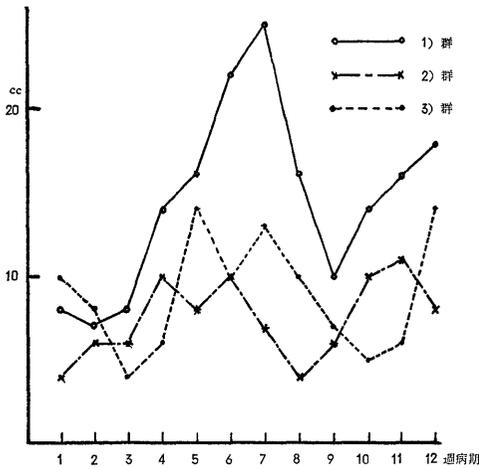


図8 1日尿量  
1群4~10匹の平均値を示す。



上昇傾向を示し、1~2週後には 160mg/dl、5週後には 312mg/dl、9週後には 368mg/dl、3カ月後には 456mg/dl にも達し、その間ほぼ漸増傾向を示した。これに対し2)群は、4週まで正常値 100mg/dl 以下であったが、以後軽度の増加を示し、7週で最高値 180 mg/dl に達し、以後固着状態を示した。3)群では、1週後より軽度の増加傾向を示し、8週で最高値 210 mg/dl を示し、以後は2)群同様に横バイ状態を示した。

2. 3. 群には有意の差を認めなかった。

3. 血中尿素窒素定量

1. 1) 群は2週後半より上昇し、3週で 45 mg/dl、4週で一時的低下したが、5週で最高値 57 mg/dl を示した。3週と5~6週間に計4匹が極度に衰弱死亡

図9 血清総コレステロール定量  
(ZaK-Henly 法または Ferro-Ham 変法)  
1群3~5匹の平均値を示す。

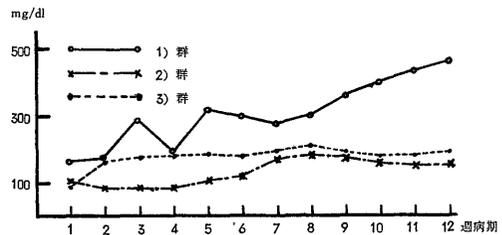
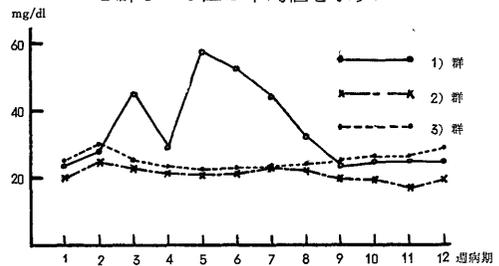


図10 血中尿素窒素定量法  
(Urease-Nessler 法または U-Ni-Graph)  
1群3~5匹の平均値を示す。



し、90 mg/dl 前後にまで達した例もあった。この例の腎組織所見は硬化性糸球体腎炎像を示した(写真15, 16)。大部分の生存例では5週以後漸減し、9週以後にはほぼ正常値範囲の 24 mg/dl 前後を示した(図10)

2) 群は全経過ほぼ正常値範囲にとどまる。

3) 群では2週後に 30 mg/dl を示したが以後はほぼ正常値範囲にとどまった。

2. 3. 群には病的上昇を認めなかった。

4. 血清総蛋白および分画

1. 1) 群は図11のように、2週前後より減少傾向を示し、3週で最低値 5.1%、その後は徐々に増加傾向を示したが、観察期間内には注射前の値にまでは回復しなかった。

2) 群では有意の差は認められなかったが、

3) 群で2週に軽度の減少傾向を認めた。

一方蛋白分面に関しては、1) 群でとくに2~6週にかけて著明なアルブミン減少と、 $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  グロブリンの相対的增加傾向を認めたが、他群ではその程度は

軽微であった。

2), 3) 群では特別な異常所見は確かめられなかった。

5. 血清トランスアミナーゼ測定

1. 3. 群では各々いずれの群にも有意の差は認めなかった。しかし2. 群では1), 2) ともに程度は強いものではないが後半、つまり1~2カ月になってとくに S-GPT 値の50単位前後の上昇傾向を認めた。

V. オキシメーター

抗肝および抗腎 Mt. 血清は、補体の存在下で、正常肝および腎 Mt. に対しては図12に示すように、酸化的磷酸化能の低下と、呼吸の促進作用を示す。これは加える抗 Mt. 血清の量に比例するが、呼吸阻止の作用はない。したがって Mt. の呼吸酵素系に対する直接作用とは考えられず、各酵素系反応の場である膜障害が推定される<sup>35)</sup>。このことは小田島ら<sup>36)</sup>の同じ系での電気的性質の測定結果からも支持されている。

また、抗肝および抗腎 Mt. 血清と、それぞれの Mt. 間の臓器特異性については、肝成分を吸収した抗腎

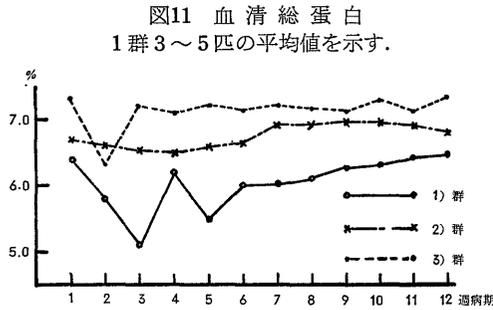
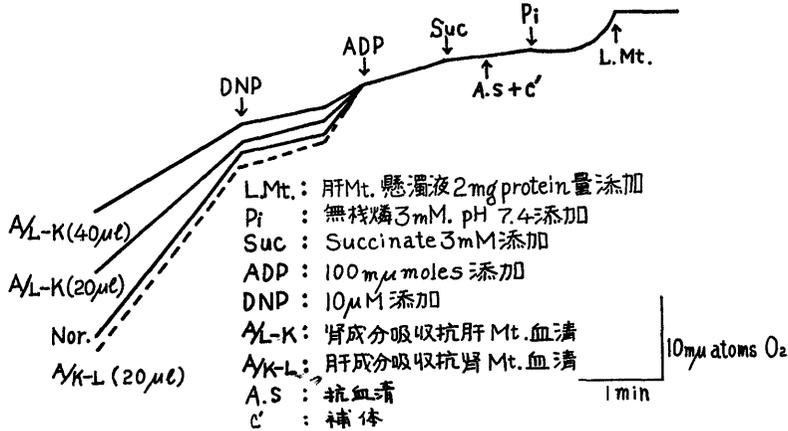
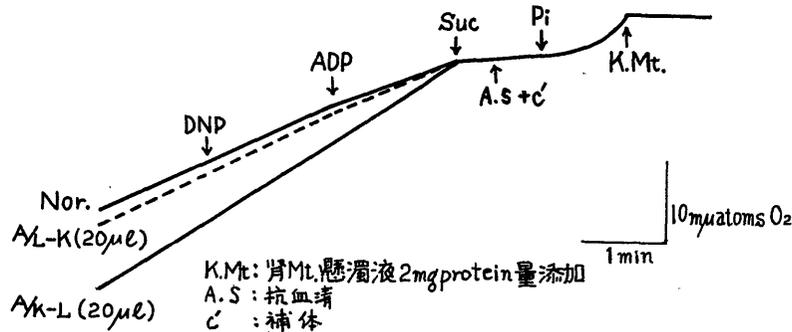


図 12

a. 正常ラット肝ミトコンドリアに対する抗体の作用



b. 正常ラット腎ミトコンドリアに対する抗体の作用



Mt. 血清 (A/K-L) は正常肝 Mt. に対して影響を示さないが、腎 Mt. に対しては著明に呼吸を促進する。

同じように腎成分を吸収した抗肝 Mt. 血清 (A/L-K) は、腎 Mt. に対して作用を示さない。このような事実は、肝・腎のそれぞれの Mt. に臓器特異性があることを示すものである。

## 考 察

近年肝障害における病理学的、生化学的変化を細胞下分画の代謝レベルで検討したものが多くなってきている。そのうちで Mt. 関係だけでも、例えば Lieber<sup>ら</sup><sup>10)</sup> のアルコール中毒による脂肪肝生成機序の Mt. レベルでの解折や、Davis<sup>ら</sup><sup>37)</sup> の抗ラット肝 Mt. 抗体が Mt. 内酵素活性を阻止する実験、Walker<sup>ら</sup><sup>38)</sup> の原発性胆汁性肝硬変時の患者血清中の抗体は Mt. に由来するとの報告、あるいは Scheiffarth<sup>ら</sup><sup>39)</sup> の細胞下レベルでの慢性肝炎病因研究、さらには Pinckard<sup>ら</sup><sup>41)</sup> は CCl<sub>4</sub> 中毒時の Mt. の役割について述べている。われわれの教室でも須山<sup>ら</sup><sup>40)</sup>、清水<sup>ら</sup><sup>41)</sup> が肝 Mt. の病変を暗示する報告を行なっている。

これ等肝 Mt. の障害は、恐らく最も選択的に肝 Mt. を感作抗原とした抗原抗体反応で引き起されるものであろう。Mt. が障害されれば、Green<sup>ら</sup><sup>42)</sup> の指摘するように、Mt. の脂肪酸酸化の障害により脂肪蓄積が起る。あるいは Lieber<sup>ら</sup><sup>10)</sup> の報告にしたがえば、Mt. 基質の TCA cycle の回転が平滑さを欠き、脂肪酸の蓄積が起るなどと説明されている。

事実著者の実験でも、Anti-Rat L. Mt. による受動免疫でラット肝に Anti-Rat K. Mt. にほとんど見られない著明な脂肪変性を作り得た。それでは腎 Mt. 障害についても同様の機作が期待できるのではないか。とくにその大部分が存在する尿細管上皮内の Mt. で上述肝 Mt. と同様の代謝障害が十分に予想されよう。以上の観点から著者は腎尿細管上皮 Mt. を中心に検討を試みた。

まず Mt. 腎の特異性、ことにその他の腎核、Mc., 細胞質上清などの細胞下分画との関係を、二重拡散法を用い、吸収血清すなわち A/K-L との反応性により検討した。それらに共通性なものとして各分画ともに 1 本の共通沈降線を示した。これには Hess<sup>ら</sup><sup>43)</sup> の contamination 説も無視できないが、後述“membrane subunit 説”<sup>44)45)</sup>、つまり膜の共通性も考慮される。

腎細胞下各分画の nephritogenic activity の抗原強度に関しては、小玉<sup>ら</sup><sup>46)</sup> は、ラット腎皮質を抗原としてラットに注入し自己免疫腎炎を発症させ、腎炎ラッ

トの腎細胞下分画と抗腎抗体の反応性を BDB 反応<sup>47)48)</sup>、Oudin 法で検討した結果、上清分画、ついで核分画にとくに高い反応性を認め、これらの部分に多くの抗原成分が含まれているとしている。しかし著者の場合は、これに対し正常ラット腎 Mt. を家兎に免疫して作製した抗血清と正常ラット腎細胞下分画との反応性で検討し、Mt., Mc., 上清・核の順で、とくに Mt. と Mc. に強い nephritogenic な抗原性を認めた。この問題に関して、Heymann<sup>ら</sup><sup>49)</sup> は Mt. の高い nephritogenic な抗原性を認め、Hess<sup>ら</sup><sup>43)</sup> は、核や Mc. にも活性抗原成分は含まれているが、これは Mt. の混入によるもので、活性因子は Mt. にあるとしている。さらに Edgington<sup>ら</sup><sup>9)</sup> も、membrane subunit の考えからこの説を支持している。

一方、腎 Mt. と他のラット諸臓器ホモジネートとの共通抗原成分の関連性を同じ Ouchterlony 法で検討したところ、肝、肺、脾、心臓、副腎に共通性を認めたが、膵臓、胸腺、脳には認めなかった。これは小玉<sup>ら</sup><sup>46)</sup> が抗腎抗体で試みた所見とほぼ一致している。さらに肝 Mt. 成分を除いたいわば腎 Mt. の特有成分との共通性では、肺、心臓のみに認められた (図 5)。腎 Mt. と肝 Mt. とは、図 3 に示すように 4 本の共通沈降線を持つが、その他に腎 Mt. には特有な強弱 4 本の沈降線がある。この両者の差異は著者が試みたオキシメーターの所見 (図 12)、および両抗血清による受動免疫での、腎、肝各臓器変化の著明な差でも明らかで、要するに Mt. の明らかな臓器特異性を証明している。

次にこのラット腎 Mt. を用いて家兎で抗血清を作製したが、一般に抗体産生促進のため添加物として、結核菌体を含む Freund の complete adjuvant が使用されるが、著者は予備実験の結果と少しでも純粋なかたちで、つまり結核菌体の不純物に対する抗体産生も起りうることを恐れ、菌体を含まない incomplete adjuvant を使用した。

受動免疫、すなわち家兎で作った抗血清を再びラットに返す方法は、抗腎 Mt., 抗肝 Mt. 両血清ともにまず分注法で行なった。ただ抗腎 Mt. 例では初回 1 回大量注射法も併せ行なった。分注法では、注射量を抗腎 Mt. 例で 1/10 量、抗肝 Mt. 例で 2 倍量と量を変えての実験群も同時に行なったが、結果としては一般に腎、肝臓ともに注射量にほぼ比例して進行する臨床像、組織変化を示した。しかし抗腎 Mt. 例で、分注大量例が臨床的に明らかなネフローゼ症候群を現わし、組織学的にも基底膜肥厚が著しかったが、少量例では、ネフローゼ症状に乏しく、組織変化も増殖性

糸球体腎炎像に留まった。このネフロトキシン注射量の差による発症程度の差についてはすでに Ehrlich<sup>50)</sup> はじめ数人の報告があり、本邦でも森内<sup>51)</sup>の研究に示されている。

一方初回大量1回注射群では、臨床および組織像で多少の違いはみせたものの、本質的には少量分注群との差異はほとんど認めなかった。実験としてはこの1回静注の方が、より理想的であろう。しかし、大量静注を行なうと異種蛋白による抗原-抗体-補体 complex による血清病腎炎を起す可能性がある<sup>52)</sup>。この場合電顕像では糸球体基底膜に complex に由来するいわゆる deposit 像が現われ<sup>53)</sup>、蛍光抗体法では糸球体係蹄に沿って顆粒状、連珠状、あるいは結節状に染色され、ネフロトキシン腎炎の場合の線状蛍光とは明らかに区別される。しかも臨床的症狀は時間とともに改善されるのが普通である。著者の行なった Mt. ネフロトキシン例は、電顕的に deposit の所見に乏しかった点、蛍光像が線状配列を示した点、臨床像の改善がなかった点などからネフロトキシン腎炎に、さらに血清病腎炎が付加されているとは考え難い。

抗腎 Mt. と抗肝 Mt. 両抗体での受動免疫では、臨床的にも組織的にも明らかな臓器特異性を認めた。すなわち抗腎 Mt. 抗体例では、大量の尿蛋白と、組織的にも明らかに高度の腎障害像を起したのに反し、肝臓の変化は軽微であった。一方抗肝 Mt. 抗体例では逆に臨床的に血清トランスアミナーゼの上昇、組織的に肝の高度の脂肪変性と、グ翰細胞浸潤像を示したが、腎の臨床的組織的变化に乏しかった。これ等両者の差異は、Dobias<sup>54)</sup>の実験結果とよく一致する。

抗腎 Mt. 抗体による受動免疫時、開始してほぼ1週目前後に臨床的にも組織的にも一時寛解傾向を認めた。この初期の病変は恐らく抗糸球体性抗体を中心とした糸球体基底膜への直接的結合と、非糸球体性抗体、つまり抗 Mt. 抗体による尿細管上皮、とくにその Mt. への直接的結合によるもので、第一相<sup>55)-57)</sup>の時相に相当すると考えられる。

これに対して、およそ1カ月後の尿管基底膜の部分肥厚と、その周囲に認める円形細胞、とくに形質細胞浸潤を主体とした時相は、第二相<sup>55)-57)</sup>の時期に相当するといえよう。

ところで、ヒト糸球体腎炎のうち Ellis II型と呼ばれ、病変発現機序の不明な例があるが、本症の進展、慢性化の機序が自己免疫性であろうと推察され、腎抗原に対する自己免疫機転により病変が進展、慢性

化する機序の研究が以前より数多く行なわれている。現在この研究の方法に大別して二つの流れがあり、一つは馬杉腎炎<sup>2)3)</sup>に始まるネフロトキシン抗原による研究で、現在も柴田<sup>5)</sup>らにより継続されている。今一つは、同種あるいは異種腎で直接に免疫してその個体に抗腎抗体を証明し、加えて腎炎を作ろうとするもので、Schwentker<sup>6)</sup>、Cavelti<sup>7)</sup>、Heymann<sup>8)</sup>、Stebly<sup>60)61)</sup>らにより研究され、本邦でも小玉<sup>46)</sup>、高木<sup>49)</sup>らの報告がある。とくに最近は、immune complex の概念を取り入れた Dixon<sup>62)</sup>により、tubular antigen として、いわゆる RTE- $\alpha_5$  抗原が抽出され注目されている。

柴田は馬杉のネフロトキシン抗原の純化を試み、Cole<sup>4)</sup>のトリプシン消化超遠心上清法と、澱粉電気泳動法を駆使して、糸球体基底膜から純化ネフロトキシン抗原を抽出、これを「-3分画」と呼び、本態は glycoprotein と考えている。この「-3分画」と、著者の用いた Mt. との関連性は、図6に示すように二重拡散法で共通沈降線を結び、それが PAS 染色でも確かめ得たこと、蛍光抗体間接法で両者ともに糸球体基底膜が一樣の明瞭な線状配列の蛍光を示す点、受動免疫での両者の腎炎の組織学的特徴、とくに増殖性変化の類似性などから推察されると思う。ただし、組織変化で、「-3分画」による像は増殖性腎炎といわれているが、Mt. の場合はさらに膜性変化が強い、いわゆる混合性変化 (mixed change) で、この点で柴田が非基底膜成分も含む腎粥を使う馬杉腎炎は膜性変化が強いが、純化した「-3分画」を用いると増殖性変化の腎炎になったと述べている<sup>63)</sup>点と考えると意味深い。一方能動免疫抗原の例ではあるが、Stebly<sup>60)</sup>および同種<sup>61)</sup>の糸球体基底膜のみでの免疫で増殖性糸球体腎炎を起したのに反し、非糸球体基底膜組成で免疫を試みた Heymann<sup>8)</sup>、Blozis<sup>64)</sup>、最近ではいわゆる RTE- $\alpha_5$  を用いた Dixon<sup>9)</sup> はネフローゼを伴う膜性糸球体腎炎をラットに起している。一方はネフロトキシン抗原での結果であり、他方は能動免疫抗原での例ではあるが、糸球体基底膜性、非糸球体基底膜性成分と、増殖性、膜性腎炎との相互の関係は興味深い問題を含んでいるといえよう。

さきに馬杉腎炎に代表されるネフロトキシンの問題点について述べたが、今一つの流れである能動的腎抗原の点について述べよう。

近年 Dixon<sup>9)</sup> が腎抗原性を持つ物質を腎尿細管上皮から抽出し、それがいわゆる第5分画からであったことから RTE- $\alpha_5$  と名付け、その本態は大きな分

子の lipoprotein で、この分子は恐らく刷子縁から intracellular membrane の細胞膜からの細胞単位膜 (cell membrane subunit) であろうと述べている。さらに彼等は、この subunit は Heymann ら<sup>49)</sup>、Hess ら<sup>48)</sup>等、および Neville<sup>65)</sup>、Davies<sup>66)</sup>らの指摘するように、同様の lipoprotein から成る Mt. 膜とも共通性をもつであろうと述べている。一方 Robertson<sup>20)</sup>の“unit membrane”説を始めとして、Roodyn<sup>67)</sup>、Klee ら<sup>68)</sup>等は細胞膜系は構造的に類似していると主張している。また波多野<sup>69)</sup>は、刷子縁の細胞膜が嵌入し、くびれて Mc. へ移行すると説明している。

これらの考え方にしたがえば、Mt. 膜と Mc. 膜、あるいはそれを介しての RTE- $\alpha_5$  とは共通の膜抗原組成を持つと考えられる。事実著者が Anti-Rat K. Mt. ラベル抗体を用いて腎抗原性部位を検索した時に、RTE- $\alpha_5$  の存在するといわれる刷子縁部も、尿管上皮細胞質の一部として特異蛍光を示した(写真6)。

また腎 Mt. 抗原成分を免疫電気泳動で調べた結果、血清の  $\alpha$ -グロブリン位に特異の沈降線を認めた(図4)が、RTE- $\alpha_5$  の位置も  $\alpha$ -グロブリン位にある<sup>9)</sup>点で一致する。

さらに著者がかって家兎腎 Mt. を Freund の complete adjuvant とともに、蛋白量で、総計 400 mg を分注して精力的に同種免疫した結果、3カ月後に RTE- $\alpha_5$  と同様の膜性糸球体腎炎を惹起し得た(写真21)。

以上より著者の取り上げた Mt. は、柴田らが純化した糸球体基底膜性要素である「-3分画」、および Dixon らが抽出した非基底膜性要素である RTE- $\alpha_5$  の両者に対して多少なりとも共通抗原組成を持つと考える。

ところで糸球体基底膜は、ボ氏囊、尿管基底膜、その他の臓器の collagenous fibril と共通抗原性を持つと Goodman ら<sup>70)</sup>は述べ、Hill ら<sup>71)</sup>もラット腎の臓器特異抗原性の分析を蛍光抗体法で行ない、糸球体および尿管基底膜はほぼ同じ相で反応したと報告している。長沢<sup>72)</sup>も aminonucleoside nephrosis と、「-3分画」ネフロトキシンの組合せを蛍光抗体法で検討し、糸球体と尿管基底膜の共通抗原性解決への足がかりを提示している。小玉<sup>40)</sup>も自己 Ig G の腎への固着を経時的に検索し、糸球体および尿管基底膜にほぼ同時期の特異蛍光を認めている。これ等の報告はいずれも糸球体基底膜と尿管基底膜は共通抗原性、すなわち一部に共通組成を持つと考えている。す

で Mt. と糸球体基底膜の共通性については述べたが、以上の点から Mt. はさらに尿管基底膜とも共通性を持つと推察される。著者の行なった蛍光抗体間接法でも両基底膜は Mt. の存在する尿管上皮とともに特異蛍光を示した(写真6)。

以上今まで述べた所見を念頭にして、著者が試みた抗腎 Mt. 血清によるネフロトキシ腎障害の発現機序を考えると、まず糸球体基底膜、次いで Mt. の存在する尿管細胞質、およびその基底膜がほぼ同じ相相で感作される。さらに糸球体上皮にも Mt. が少数ながら存在することや、Findley<sup>73)</sup>の報告にあるように糸球体上皮細胞と尿管上皮細胞とは発生学的に同一であるとの事実から、森内<sup>51)</sup>も暗示しているように発症に際して本質的に両者が同時に侵かされたと考えられる。つまり Mt. ネフトキシによる腎障害ネフローゼは、尿管と糸球体がほぼ同時に障害されて惹起されるのではないかと考えた。

もちろんヒト・ネフローゼ症候群の一次的変化の場として糸球体が関与し、尿管の変化、例えば上皮の混濁腫脹、硝子滴変性、あるいはリポイド変性が上皮の変性というより、二次的な積極的再吸収現象であるという現在広く信じられている説を否定するものではない。しかし、Fetterman ら<sup>74)</sup>の尿管の変化だけでも臨床的に明白なネフローゼ症状を呈する報告もあるように、少くとも著者の試みた動物実験による Mt. ネフトキシ実験ネフローゼでは、糸球体、尿管同時障害説を主張したい。

### 総括および結論

実験的腎炎を免疫組織学的に研究するのに、大別して次の2方法がある。

一つは、受動免疫によるネフロトキシ腎炎の研究で、馬杉腎炎に引続き柴田らの研究から、このネフトキシ抗原は糸球体基底膜成分にあると目される。

今一つは、腎抗原能動免疫による研究で、最近では Dixon らの報告から、非糸球体性要素、とくに tubular antigen が重視されている。

著者は tubular antigen として尿管上皮の細胞下分画、とくにミトコンドリア (Mt.) をとりあげ、その抗原分析を寒天内二重拡散法、オキシメーター法で吟味し、ことにその特異性を肝 Mt.、諸臓器ホモジネートとの比較において検討した。

次いで、腎 Mt. により家兎に作製した抗血清を受動免疫し、その特異的な腎炎原性活性を、主に肝 Mt. を対照として、組織学的検査、臨床的生化学検査により検討した。その結果、ミトコンドリアネフトキシ

実験ネフローゼでの「糸球体・尿管同時障害」説を得たので、その成績を次に要約する。

1. 寒天内二重拡散法 (Ouchterlony 法) で、ラット腎 Mt. は、肝 Mt. と計 4 本の共通沈降線を結ぶが、別に腎特有な 4 本の沈降線を示した。また、肝 Mt. との機能的相違がオキシメーター法で示された。

2. この腎 Mt. 特異抗原を免疫電気泳動法で調べると、いずれもヒト血清の  $\alpha$ -グロブリン位に泳動度を示す組成であった。

3. 腎 Mt. と他臓器ホモジネートの DOC 可溶分画との関連性を見ると、肝 Mt., 肺, 脾, 心臓, 副腎と共通した因子を持つが、膵臓, 脳, 胸腺とは共通性を持たなかった。さらに腎 Mt. より肝 Mt. 成分を吸収した腎 Mt. は、肺, 心臓にのみ共通因子を示した。

4. 蛍光抗体間接法では、抗腎 Mt. 血清静注後 20 分で糸球体基底膜を中心とした一様の線状配列特異蛍光を示し、他の異種  $\gamma$ -グロブリン、たとえば抗肝 Mt. 血清、無処置家兎血清による蛍光像とは明らかに区別された。経時的に観察すると、静注後、ほぼ 30 分頃より一部の尿管基底膜および細胞質にも徐々に特異蛍光が現われはじめ、日を追ってその範囲は広がり、20 日後には肥厚した尿管基底膜が、細胞質とともに明瞭な蛍光像を示した。

5. 抗腎 Mt. 蛍光ラベル血清により、正常腎の腎 Mt. 共通抗原組成を、阻止法を併用して行なったところ、尿管細胞質とその基底膜に強く、ボ氏嚢には中等度に、糸球体基底膜とその上皮 (podocytes) が弱く特異蛍光を示した。

6. 抗腎 Mt. 血清により受動免疫して、1 回、0.2 ml の分注大量注射により、臨床的にネフローゼ症状を呈し、肉眼的には腎は明らかな大白腎を示した。組織学的には、糸球体の増殖性変化と膜性変化の加味された、いわゆる混合性変化を起した。さらに、初期には尿管上皮の混濁腫脹、水腫、後期には萎縮、拡張、形質細胞浸潤を伴う尿管基底膜の肥厚を示す慢性糸球体腎炎を発生させ得た。1 回 0.02 ml、または初回のみ 1.0 ml の注射群では、ネフローゼ症状に乏しく、組織学的には膜性変化に乏しい増殖性糸球体腎炎像を呈した。また尿管の変化も軽度の混濁腫脹、水腫にとどまった。

電顕的变化では、第 2 病日より podocytes の腫大、足突起癒合、尿管上皮内 Mt. の膨化傾向を認めた。1 カ月後では、尿管上皮内の Mt. の分布が乱れ、その内部構造が粗胞化や二重膜の破壊など、いわゆる黒沢の IV 型変化と、刷子縁の迷入などを主変化

とした尿管上皮細胞変性と、糸球体基底膜の蛇行性肥厚および尿管基底膜の部分的肥厚を示した。一方肝臓の変化は、抗腎 Mt. 血清注射を受けた各群ともに軽微であった。

7. 受動免疫 1 週後に、臨床的にも組織学的にも一時寛解傾向を示す。これは 1 週以内は、糸球体基底膜のび慢性肥厚、尿管内の膨化で示される、いわゆる第一相の時相に相当すると考えられた。さらに、1 カ月後、尿管基底膜の部分的肥厚と、その周囲に主に形質細胞よりなる円形細胞浸潤が認められ、これは第二相の時相に相当すると判断された。

8. 抗肝 Mt. 血清による受動免疫で、1.5 カ月以後に肝小葉の著明な脂肪変性と、中等度のグ鞠円形細胞浸潤を認めた。しかし腎臓の変化は軽微であった。すなわち、抗肝 Mt. 血清では肝臓が、抗腎 Mt. 血清では腎臓が特異的に障害される。

9. 腎 Mt. は、Ouchterlony 法、蛍光抗体法、組織学的検査によると、柴田のネフロトキシン抗原「-3 分画」と共通した組成、すなわち基底膜性要素を持つと判断された。

一方、tubular antigen としての能動免疫抗原である、Dixon のいわゆる RTE- $\alpha_5$ 、および尿管基底膜とは、蛍光抗体、および免疫電気泳動法、免疫組織像などより、これら両者が腎 Mt. と共通抗原成分を持つと考える。

すなわち、腎 Mt. は、糸球体基底膜性要素と、tubular antigen としての要素の二つの抗原成分を合せ持つ。

10. 以上の点から、抗腎 Mt. によるネフロトキシンで惹起されたラット実験ネフローゼの発症機序に、podocyte を含む糸球体基底膜と、尿管上皮とその基底膜、この両者の同時障害説を提起した。

稿を終るにあたり、御懇篤なる御指導と御校閲を賜った恩師石川大刀雄教授に深く感謝いたします。また、多大なる御協力を頂きました小田島衛夫助教授に深謝するとともに、免疫学的立場より御指導いただきました本学癌研病態生理教室倉田自章教授、組織所見を中心に種々の御教示を頂きました武川昭男講師、臨床的立場よりの御助言を頂きました本学武内内科藤田講師に感謝の意を表します

さらに貴重な抗血清をお譲りいただきました本学癌研分子免疫教室右田俊介教授に対し厚くお礼申し上げます。最後に、常に温かく御協力いただきました教室員の皆さんに心から感謝いたします。

## 文 献

- 1) Vorhander, K. O. : Zschr. ges. exper. Med., 118, 352 (1952). 2) Masugi, M. : Beitr. path. Anat., 91, 82 (1933).
- 3) Masugi, M. : Beitr. path. Anat., 92, 429 (1934). 4) Cole, L. R., Cromartie, W. J. & Watson, D. W. : Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 77, 498 (1951). 5) Shibata, S. : Acta Path. Jap., 15, 419 (1965).
- 6) Heymann, W., Hackel, D. B., Harwood, S. H., Wilson, S. G. F. & Hunter, J. L. P. : Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 100, 660 (1959).
- 7) Watson, J. I. & Dixon, F. J. : Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 121, 216 (1966).
- 8) Okuda, R., Kaplan, M., Cuppage, F. & Heymann, W. : J. Lab. Clin. Med., 66, 204 (1965). 9) Edgington, T. S., Glassock, R. J. & Dixon, F. J. : J. Exper. Med., 127, 555 (1968). 10) Lieber, C. S. & Schmid, R. : J. Clin. Invest., 40, 394 (1961).
- 11) Pinckard, R. N. & Weir, D. M. : Clin. Dxp. Immun., 1, 33 (1966). 12) Munk, F. : Ztschr. klin. Med., 78, 1 (1913).
- 13) Fahr, Th. : Handb. spez. path. Anat. u. Hist. (Lubarsch u. Henke), VI/1, s. 222, Berlin, J. Springer, 1925. 14) Randerath, E. : Erg. allg. Path. u. path. Anat., 32, 91 (1937). 15) Bell, E. T. : Renal Diseases, 2nd ed., p. 206, Philadelphia, Lea and Febiger, 1950. 16) Freeman, T. & Jokes, A. M. : Acta med. Scand., 157, 43 (1957).
- 17) Ellis, A. : Lancet, 1, 1 (1942).
- 18) 諏訪紀夫 : 最新医学, 11, 2949 (1956).
- 19) 高木道生 : アレルギー, 16, 89 (1967).
- 20) Robertson, J. D. : Sci. Amer., 206, No. 4, 64 (1962). 21) Utsumi, K. : Acta Med. Okayama, 17, 259 (1963). 22) Dittebrandt, M. : Am. J. Clin. Path., 18, 439 (1948). 23) Shibata, S., Naruse, T., Nagasawa, T., Takuma, T. & Miyakawa, Y. : J. Immun., 99, 454 (1967).
- 24) Ouchterlony, O. : Acta Path. Microbiol. Scand., 26, 507 (1949). 25) Williams, C. A. & Grabar, P. : J. Immunol., 74, 158 (1955). 26) 浜島義博・京極方久 : 免疫組
- 織学, 第1版, 64頁, 東京, 医学書院, 1965.
- 27) 長沢俊彦・成清卓二・紫田整一 : アレルギー, 14, 43 (1965). 28) Pressman, D., Eisen, H. N. & Fitzgerald, P. T. : J. Immunol., 64, 281 (1950). 29) Pressman, D. & Sherman, B. : J. Immunol., 67, 15 (1951).
- 30) Chance, B. & Williams, G. R. : J. Biol. Chem., 217, 383 (1955). 31) Hagihara, B. : Biochim. Biophys. Acta, 46, 134 (1961).
- 32) Caulfield : J. Biophys. Biochem. Cytol., 3, 827 (1957). 33) Luft, J. : J. Biophys. Biochem. Cytol., 9, 409 (1961). 34) 黒沢利永 : 日腎誌, II, 463 (1960). 35) 小田島肅夫・石川大刀雄 : 日病理会誌, 56, 89 (1967).
- 36) 小田島肅夫・安念有声・武川昭男・石川大刀雄 : 日病理会誌, 57, 90 (1968). 37) Davis, IV, J. S. & Bollet, A. J. : J. Clin. Invest., 41, 2142 (1962). 38) Walker, J. G., Doniach, D., Roitt, I. M. & Sherlock, S. : Lancet, I, 827 (1965). 39) Scheiffarth, F., Warnatz, H. & Niederer, W. : Virchow. Arch. Path. Anat., 339, 358 (1965). 40) 須山忠和・小田島肅夫・石川大刀雄 : Medical Postgraduates, 4, (6), 1 (1966). 41) 清水蔵一 : 十全医会誌, 75, 327 (1967). 42) Green, J. L., Tischer, K. & Stein, A. : Biochim. Biophys. Acta, 62, 35 (1962).
- 43) Hess, E. V., Ashworth, C. T. & Ziff, M. : Ann. N.Y. Acad. Sci., 124, 323 (1965).
- 44) Benson, A. A. : 医学のあゆみ, 63, 708 (1967) より引用. 45) Green, D. E. & Hechter, D. : Proc. Natl. Acad. Sci., 53, 318 (1965). 46) 小玉正智 : 京府医大誌, 75, 322 (1966). 47) Stavitsky, A. B. : J. Immunol., 72, 360 (1954). 48) Arquilla, E. R. & Stavitsky, A. B. : J. Clin. Invest., 35, 458 (1956). 49) Heymann, W., Kmetec, E. P., Wilson, S. G. F., Hunter, J. L. P., Hackel, D. B., Okuda, R. & Cuppage, F. : Ann. N. Y. Acad. Sci., 124, 310 (1965). 50) Ehrlich, W. E., Sharma, G. P., Rajou, R. A., Bhamarapravanti, N. & Seifter, J. : Fed. Proc., 15, 514 (1956).
- 51) 森内正名 : 日腎誌, IV, 263 (1962). 52) Dixon, F. J., Vazquez, J. J., Weigle, W. O. & Cochrane, C. G. : Arch., Path., 65, 18

(1958). 53) Feldmann, J. D. : J. Exp. Med., 108, 957 (1958). 54) Dobias, G. & Balazs, M. : Immunology, 12, 389 (1967). 55) Kay, C. F. : J. Exp. Med., 72, 559 (1940). 56) Feldman, J. D., Hammer, D. & Dixon, F. J. : Lab. Invest., 12, 748 (1963). 57) 岡林 篤 : 総臨, 15, 507 (1966). 58) Schwentker, F. F. & Comploier, F. C. : J. Exp. Med., 70, 223 (1939). 59) Cavelti, P. A. & Cavelti, E. S. : Arch. Path., 40, 158 (1945). 60) Stebley, R. W. : J. Exp. Med., 116, 253 (1962). 61) Stebley, R. W. : Fed. Proc., 24, 693 (1965). 62) Unanue, E. R. & Dixon, F. J. : J. Exp. Med., 125, 149 (1967). 63) 柴田整一・長沢俊彦・訖摩武英・成清卓二・宮川侑三・北村潔 : 日臨, 26, 1056 (1968). 64) Blozis, G. D., Spargo, B. & Rowley, D. A. : Amer. J. Path., 40, 153 (1962). 65) Neville, D. M. : J. Biophys. Biochem. Cytol., 8, 413 (1960). 66) Davies, D. A. L. : Transplantation, 1, 562 (1963). 67) Roodyn, D. B. : Biochem. J., 85, 177 (1962). 68) Klee, C. B. & Sokoloff, L. : Science, 144, 564 (1964). 69) 波多野道信 : 日腎誌, 3, 65 (1961). 70) Goodman, M., Greenspon, S. A. & Krakower, C. A. : J. Immun., 75, 96 (1955). 71) Hill, A. G. S. & Cruickshank, B. : Brit. J. Exp. Path., 34, 27 (1953). 72) 長沢俊彦・成清卓二・柴田整一 : アレルギー, 14, 651 (1965). 73) Findley, T. : Amer. Heart J., 61, 822 (1961). 74) Fetterman, G. H. & Feldman, J. D. : Amer. J. Dis. Child., 100, 319 (1960).

### 写真説明

写真1. 抗ラット腎 Mt. 静注20分後を, 抗家兎 Ig G ラベル抗体による間接法で観察.

特異蛍光は糸球体基底膜に, 一様にはぼ線状の配列を示す. さらに詳細に観察すると, 基底膜周辺の上皮あるいは内皮細胞と思われる部分も, 弱い蛍光を示す. (×400)

写真2. 静注30分後.

一部の尿細管基底膜にも特異蛍光が認められる. (×400)

写真3. 静注24時間後.

一部尿細管基底膜および細胞質にも特異蛍光が出現. (×400)

写真4. 静注3日後.

細胞質の蛍光は, 写真3よりさらに強くなる. (×400)

写真5. 静注20日後.

糸球体基底膜の他に, 尿管基底膜の部分的肥厚部, および, 尿管細胞質にも強い特異蛍光像を示す. (×400)

写真6. 抗腎 Mt. ラベル血清による正常ラット腎染色.

尿管細胞質と, その基底膜が強度に, ボ氏嚢は中等度に, 糸球体基底膜は軽度の蛍光を示す. (×100)

写真7. 抗腎 Mt. 血清 0.2ml. 静注第2病日.

係蹄上皮細胞腫大と足突起の融合傾向を示す.

CL: Capillary Lumen

Fp: Foot processes

Ep: Epithelium (Podocytes)

BM: Basement Membrane

Bs: Bowman's space

En: Endothelium

写真8. 写真7と同じ, 第2病日.

尿管上皮内 Mt. の膨化傾向を示す.

N: Nucleus

Mt: Mitochondria

写真9. 第10病日.

半月体形成. (H-E 染色, ×300)

写真10. 第10病日.

糸球体係蹄腫大, 富核, 乏血, 細胞浸潤, 基底膜肥厚, およびボ氏嚢内 Fibrinoid 物質を認める.

(PAS 染色, ×300)

写真11. 第10病日.

係蹄内 Fibrinoid 物質沈着. (PAS 染色, ×300)

写真12. 第10病日.

糸球体基底膜肥厚, 上皮 (podocytes) 腫大, 足突起癒合は一層強くなる.

写真13. 受動免疫1カ月後の腎.

K: 抗腎 Mt. 血清による受動免疫腎.

N: 無処置血清による受動免疫腎.

Kは, 表面蒼白, 微細顆粒状. 割面浮腫状, 皮髓境界不分明. 重量 1.5g (正常値平均 0.5g)

写真14. 1カ月病期.

糸球体腫大, 乏血, 細胞浸潤, 基底膜の強い肥厚, 半月体形成, ボ氏嚢と係蹄との癒着. (PAS 染色, ×300)

写真15. 5週病期.

尿細管内蛋白円柱と、とくに曲尿細管およびヘンレ係蹄の萎縮、拡張が著明。(H-E 染色, ×100)

写真16. 写真15の強拡大.

ボ氏嚢肥厚、係蹄との癒着が著明。尿細管の部分的肥厚と、その周囲の主に形質細胞浸潤。(H-E 染色, ×300)

写真17. 1.5カ月病期.

尿細管基底膜の著明な肥厚と、その周囲の形質細胞を中心とした円形細胞浸潤。(PAS 染色, ×300)

写真18. 1.5カ月病期.

尿細管上皮内 Mt. の分布の乱れ、腫大、内部構造の粗胞化、一部 Mt. 内2重膜破壊 (Mt'.) を示す。左方に刷子縁の迷入も認める。

BB: Brush border

E: Erythrocyte

Mt': Mt. of IV type

写真19. 1.5カ月病期.

上皮内 Organelles, Vesicle が目立ち、足突起癒合著明、基底膜上皮側の不規則突出も強く認める。

Ve: Vesicles

写真20. 写真19と同じ所見の、強拡大像.

写真21. 家兎 Mt. による同種能動免疫 3カ月後像.

糸球体基底膜の肥厚と、尿細管基底膜肥厚およびその周囲の形質細胞を中心とした円形細胞浸潤。(PAS 染色, ×300)

### A b s t r a c t

There have been two ways of immuno-histological investigation as to the study of experimentally induced glomerulonephritis.

The one is the study of nephrotoxic serum nephritis induced originally by Magsugi which was produced by passively introduced heterologous renal antibody. This work has recently been followed by Shibata et al, And they claim that the glomerular basement membrane components exerts the main nephritogenic activity.

The other is the work of Dixon et al, which is concerned with the active immunization of rat renal antigen. They reported isolation of nephritogenic substance derived from the renal tubular epithelium.

In regard to nephritogenic renal antigens, the author considered the importance of the mitochondria (mt.) in the course of respiratory pathways and oxidative phosphorylation, and succeeded in producing glomerulonephritis in rats by introducing heterologous serum to the rat renal mt.

The nephritogenic antigen analysis and the organ specificity of subcellular fractions of the rat renal tubular epithelium were investigated by the Ouchterlony method and the oxymeter.

Experimentally induced nephrotic rats were followed clinically by biochemical tests and histological examinations were performed on the renal tissue as well as on other related organs.

The results were summarized as follows and the concept of simultaneous impairment of the renal glomerulus and the tubular epithelium was postulated as to the etiologic mechanism of mitochondrial nephrotoxic serum glomerulonephritis.

1) The rat renal mt. exhibited four specific precipitation bands on the double agar gel diffusion plates besides other four bands in common with the liver mt.

The organ specificity & the mode of immunologic injury were detected with oxymeter compared with the liver mt.

2) The DOC-soluble rat renal mt. showed electrophoretic mobility comparable with the  $\alpha$ -globulin of serum.

3) The rabbit antiserum to rat renal mt. showed common immuno-diffusion reactivity to the liver mt., lung-, spleen-, heart-, and the adrenal homogenates, and had no common component to the pancreas-, brain-, thymus homogenates.

The rabbit antiserum to rat renal mt. absorbed with liver mt. still showed common reactivity with the lung and heart homogenates.

4) Immunofluorescent micrograph stained by the indirect method demonstrated diffuse positive staining on the glomerular basement membrane after 20 min. of venous injection of antiserum to rat renal mt.

After 30 min. of injection, there appeared gradual development of positive fluorescence also on the cytoplasm and the basement membrane of the renal tubular epithelium. After 20 days, the thickened tubular basement membrane and the cytoplasm showed distinct positive staining.

5) The results of immuno-fluorescent study by antiserum to rat mt. with the blocking test showed the presence of a common element in the rat mt. markedly in the tubular cytoplasm & the basement membrane, moderately in the Bowman's capsule, mildly in the glomerular basement membrane & the podocytes.

6) The nephrotic syndromes were produced in the rats into which antiserum to rat renal mt. was injected. The clinical course was followed by biochemical tests. The kidneys of the diseased rats which had large doses of antiserum injected showed a distinct picture of "large white kidney." The histologic examination of the renal tissue presented mixed features of proliferative & membranous glomerulo-nephritis together with cloudy swelling & hydropic change of the renal tubular epithelium in the early stage and atrophic tubular dilatation and thickening of the tubular basement membrane surrounded by plasma cell infiltrations in the late stage.

The groups which got injections of smaller doses showed less prominent nephrotic syndromes clinically and the renal histology demonstrated pictures of rather pure proliferative glomerulonephritis with mild tubular cloudy swelling and hydropic change.

Electron microscopic findings were the swelling of the podocytes, fusion and the flattening of the epithelial foot processes and the swelling of the tubular mt. on the second day after injection. The tubular epithelium presented after one month an irregular distribution of the mt. with vesicular and homogeneous internal structures and displacement of the brush border. Those mitochondrial changes were comparable to the IV type change of Kurosawa<sup>34)</sup>.

The glomerular basement membrane was irregular and thickened and the tubular basement membrane showed focal thickening. The liver showed nothing remarkable.

7) The clinical syndromes and the renal histologic findings showed a temporal remission after one week of passive immunization. The initial stage was considered the first phase<sup>55) 57)</sup> of the immunization and the rest was considered the second phase<sup>55) 57)</sup> with interstitial cell infiltration.

8) The rats which had antiserum to rat liver mt. injected showed a marked fatty change of the liver with portal cell infiltration after one and a half months. The kidney showed no change. Therefore, the mode of action in regard to the organ specificity of antisera was specific to the renal as well as to the liver mt.

9) The rat renal mt. showed common component with " -3 fraction " of Shibata, i. e., component of the glomerular basement membrane. At the same time, the rat mt. has common antigenic element with RTE- $\alpha_5$  and the tubular epithelial basement membrane. Consequently, the renal mt. holds biphasic (double) antigenic activity in common with the glomerular basement membrane & the tubular epithelium.

10) The concept of simultaneous impairment of the renal glomerulus and the tubular epithelium was postulated from the above findings as to the etiologic mechanism of experimentally induced mitochondrial nephrotoxic serum glomerulonephritis.

写真 1

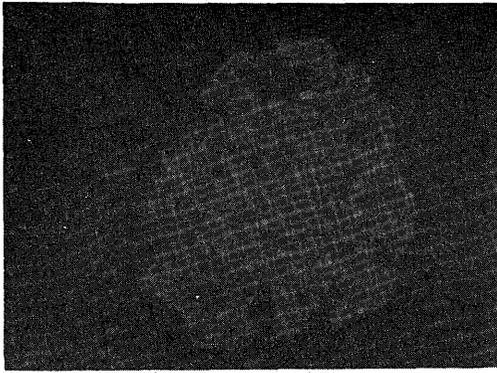


写真 2



写真 3

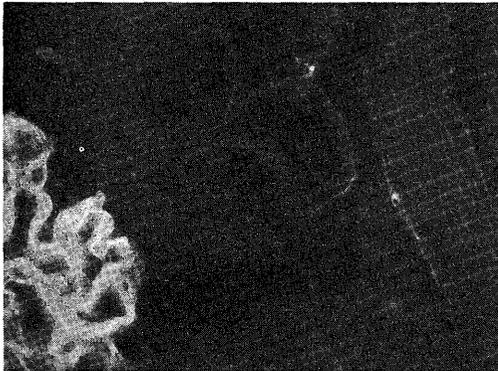


写真 4

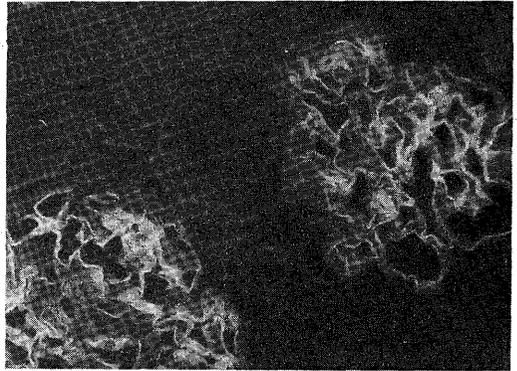


写真 5

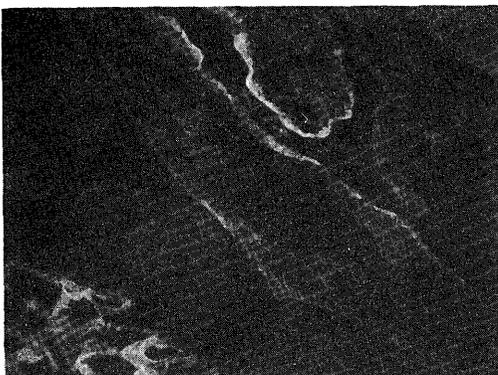


写真 6

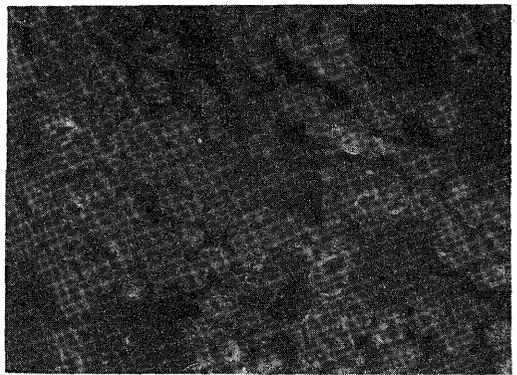


写真 7



写真 8

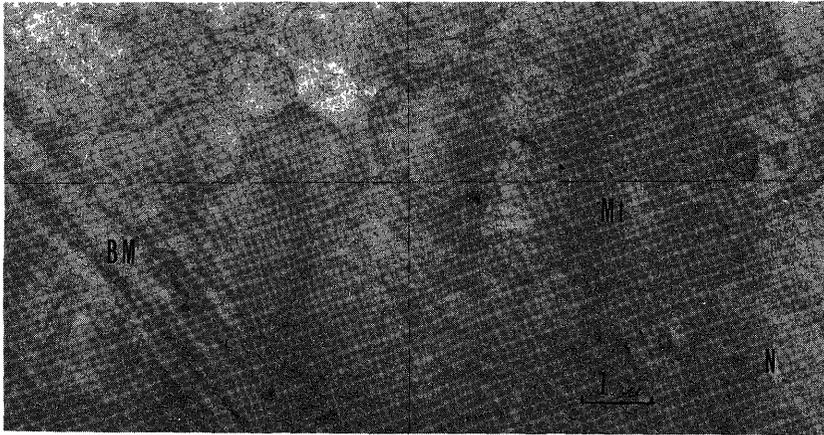


写真 12

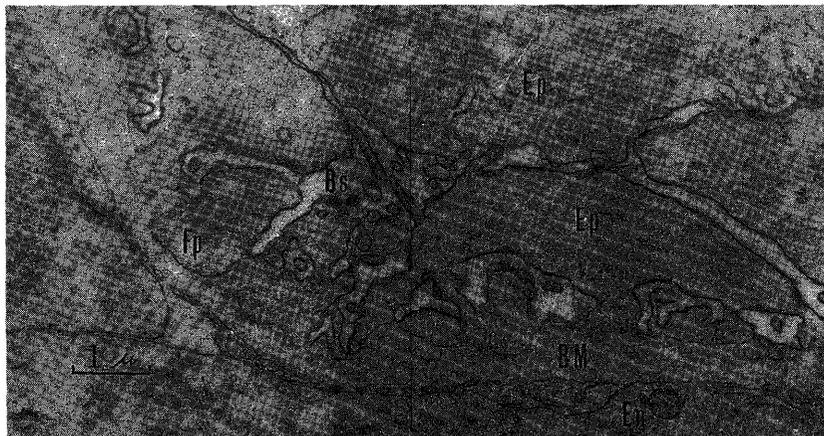


写真 18

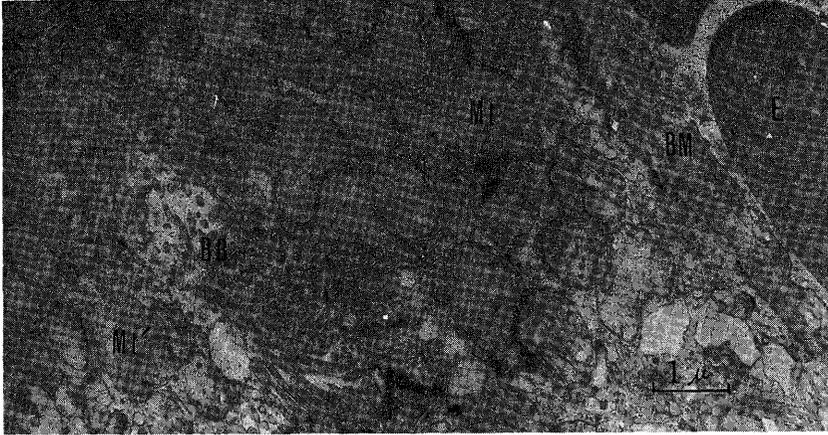


写真 19

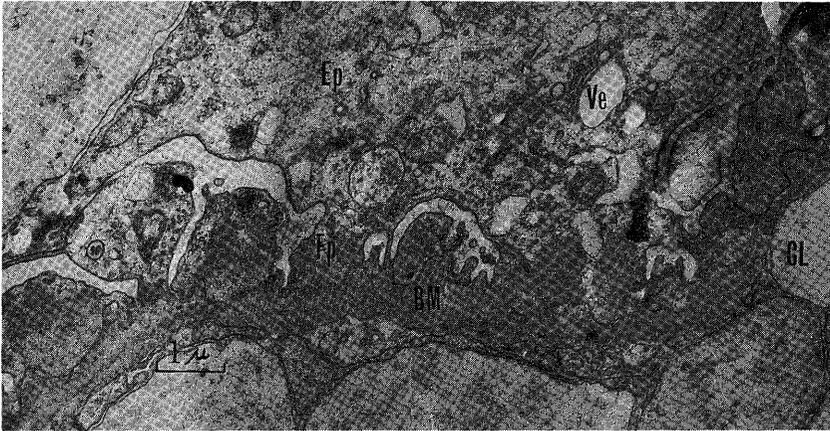


写真 20

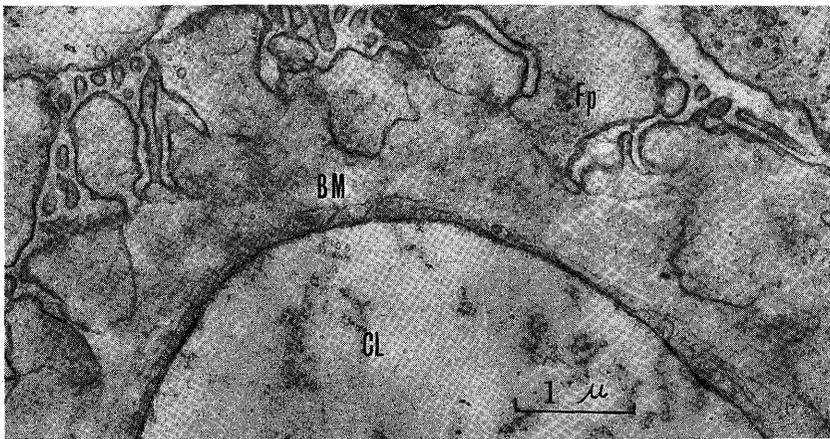


写真 9

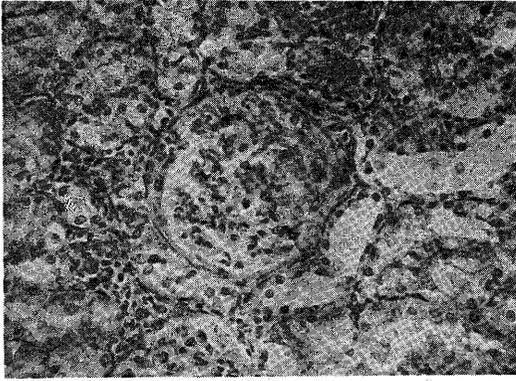


写真 10

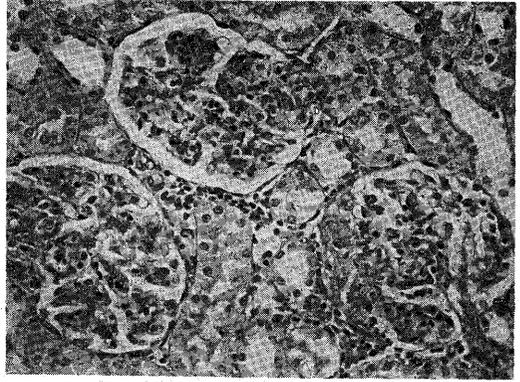


写真 11

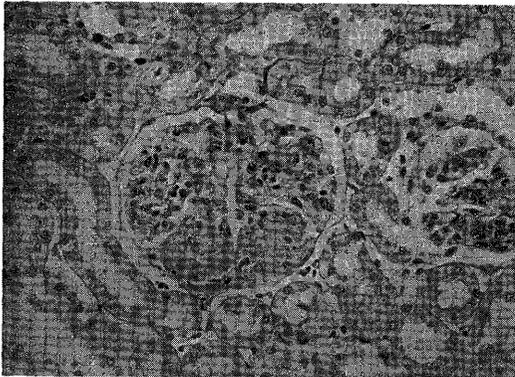


写真 13

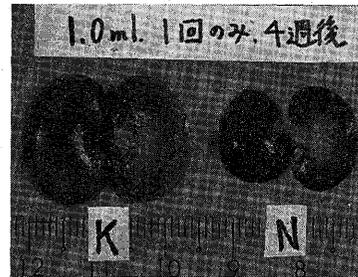


写真 14



写真 15

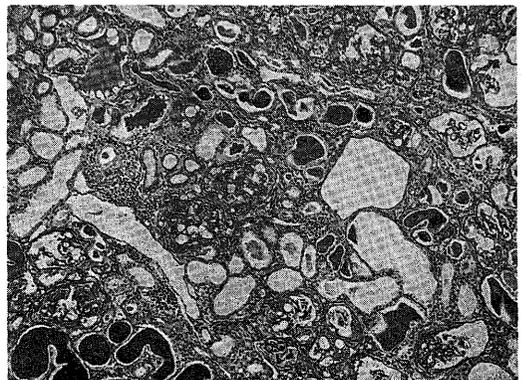


写真 16

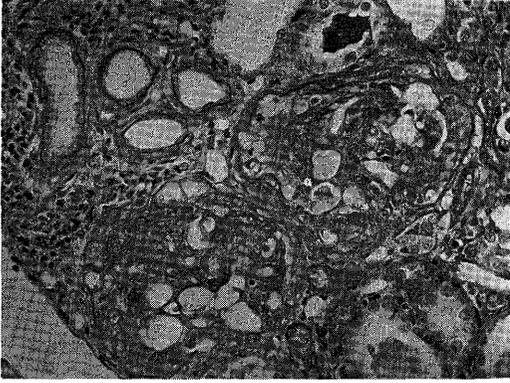


写真 17

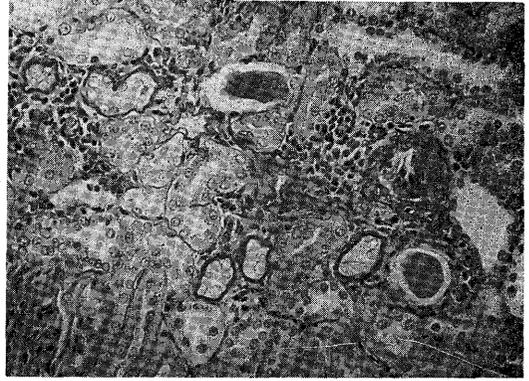


写真 21

