

Immune Complex Arteritis 惹起の実験的試み

荒川 雅美

ゲラチンスポンジ塞栓下で家兎耳介動脈を用いて immune complex arteritis 惹起を試みた. horseradish peroxidase (HRP) で感作した家兎耳介動脈にゲラチンスポンジ 10 mg, HRP 10 mg, phosphate buffered saline (PBS) 0.5 ml の懸濁液を経皮的に動注し, 末梢塞栓部を経時的に観察, 生検した. 動注後 24時間, 72時間で動脈壁上にジアミノベンチジン陽性沈着物と, IgG, C₃ を同時に微細顆粒状に認めた. 抗原, 抗体及び補体の微細顆粒状沈着は動脈壁上での immune complex 形成を示唆している.

(昭和63年10月1日採用)

An Experimental Trial for Immune Complex Arteritis

Masami Arakawa

We attempted to induce immune complex arteritis on the rabbit auricular artery by means of an embolization with gelatin sponge powder. Albino rabbits were sensitized with horseradish peroxidase (HRP), and their auricular arteries were embolized with intraarterial injections of 10 mg gelatin sponge saturated with 10 mg HRP dissolved in 0.5 ml phosphate buffered saline (PBS). Biopsy specimens were obtained after 24 and 72 hours. There were diaminobenzidine positive products on the arterial walls, and immunofluorescent findings also revealed fine granular deposits of both IgG and C₃ on the walls. The presence of the fine granular depositions of antigen and, at the same time, antibody and complement suggests that immune complexes had formed on the arterial walls.

(Accepted on October 1, 1988) *Kawasaki Igakkaishi* 15(1): 1-5, 1989

Key Words ① Immune complex ② Arteritis

はじめに

1950年, Klemperer¹⁾ が膠原病として提唱したリウマチ熱, 慢性関節リウマチ, 結節性動脈周囲炎, 全身性エリテマトーデス, 皮膚筋炎, 強皮症の6疾患において共通した病理組織学的特徴は, 結合組織のフィブリノイド変性壊死であるとされている。また, これら膠原病にはお

おむね動脈病変の合併がみられ, 血管炎もその共通病変であるとし, Zeek²⁾ は壊死性血管炎という名称を提唱した。そして実験的血管炎や壊死性血管炎の血管壁に, 各種の免疫グロブリンと補体が同時に証明されることから immune complex の関与が重要視されている。^{3), 4)} しかしアルサス反応による細小静脈-毛細血管部位を主体とした実験的血管炎研究に比し, 小動

脈部位を場とした血管炎にはいまだ確立されたモデルはない。そこで、リベド血管炎などの皮膚を場とする小動脈炎が、しばしばその付随する症状として、うっ滞を伴っていること、また壊死性血管炎は血管分岐部に好発する傾向があることから、基礎に何らかの血流異常が存在すれば、動脈炎発現の可能性はより高くなると考え、ゲラチンスポンジ塞栓下に家兎耳介動脈での immune complex arteritis の惹起を試みた。

材料と方法

ゲラチンスポンジは抗原性はなく、組織内では1か月以内に吸収される。^{5)~7)} このゲラチンスポンジを粒状としたもの 10 mg を Phosphate Buffered Saline (PBS) 0.5 ml との懸濁液としこれを、フレニッシュジャイアント家兎、雌 (体重 2.5~3.5 kg) の Caudal auricular artery の intermediate branch に経時的に動注し (Fig. 1)、動注部末梢側ゲラチンスポンジ塞栓部を経時的に9週間目まで観察、生検し、hematoxyline-eosine (H-E) 染色標本を作製し、検討した。同様にして未処理家兎耳介動脈に、ゲラチンスポンジ-PBS 懸濁液に、in vitro で作製した horseradish peroxidase (HRP)-抗 HRP complex を加えたものを動注し生検した。次いで、HRP 5mg, Freund's incomplete adjuvant 0.5 ml, PBS 0.5 ml の

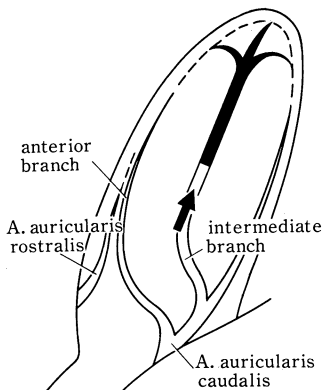


Fig. 1. The scheme for embolization of the rabbit auricular artery. An arrow shows the injection point.

懸濁液を未処理家兎に皮内注射し、2週間後、4週間後に HRP 3 mg で追加免疫を行い、採取血清にてオクタロー法を施行し、感作の成立を確認した。この感作家兎にゲラチンスポンジ 10 mg, HRP 10 mg, PBS 0.5 ml 懸濁液を同様にして耳介動脈に動注し、3日後まで塞栓部位を生検した。採取組織は2分し、一方は 10%ホルマリン固定後、パラフィン切片を作製し、H-E 染色を施行した。残りは直ちに -80°C で凍結後、 $4\mu\text{m}$ の凍結切片を作製し、一部は無固定下に PBS で 30分洗浄後、FITC 標識抗ウサギ IgG ヤギ血清 (MBL), FITC 標識抗ウサギ C_3 ヤギ血清 (MBL) (PBS で 20 倍希釈) を室温で 30分間反応させ、さらに PBS で 30分間洗浄し、グリセリン-PBS (1:1) で封入、Nikon-Fluophoto (UV 330~380, フィルター 410 W) で抗体及び補体を検索した。残りの凍結切片は PBS で 30分洗浄後、95%エタノールで 25分固定し、さらに PBS で 15分洗浄、その後 HCl-3, 3'-ジアミノベンチジンでペルオキシダーゼ呈色反応を施行し、蒸留水で 10分間洗浄後ヘマトキシリンでカウンター染色を行い、95%エタノール・キシレン固定、エンテランニューで封入、抗原を検索した。各々の資料は1耳介より1資料とし、3検体以上を観察した。また対照として未処理家兎にゲラチンスポンジ 10mg, HRP 10 mg, PBS 0.5 ml を同様に動注し、組織を採取した。

結 果

未処理家兎耳介動脈にゲラチンスポンジ-PBS 懸濁液を動注すると、動注直後に耳介はチアノーゼを呈し、数分で静脈叢の著明な怒張がみられた。このうっ血状態は3~5日間持続し、その後貧血状態となった。そして3週間から5週間で動脈の弾力性や、血流の再開が認められた。経時的組織変化としては、動注1~8時間後、動脈腔内のゲラチンスポンジが塞栓し、周辺静脈の拡張がみられ、内弾性板はその形態を失い内皮細胞はほとんど脱落しているが、壁への細胞浸潤はない。24時間後、海綿状となった

ゲラチンスポンジ内に赤血球と多核白血球がみられた。血管壁及び血管周囲に軽度から中等度の多核白血球浸潤が認められた。3日～1週間後、吸収されはじめたゲラチンスポンジ内に多核白血球、赤血球がみられるが、血管壁及び血管周囲では線維芽球が増加し、ムチン沈着が著明となり、2週間後にはゲラチンスポンジは完全に吸収された血栓に置換された。3週間後、内弾性枝はその形態をとり戻し、その内側で内膜は平滑筋細胞様細胞による細胞性肥厚を呈し、その中に多数の新生血管がみられた。9週間後にはこれらの再疎通血管は1本となり、1層の内皮細胞を有する管腔を形成した。この一連の血管再疎通過程での組織変化の詳細は既報にて述べた。⁸⁾ またこの組織修復過程でのフィブロネクチンの局在についても別報に詳細した。⁹⁾ 未処理家兎耳介動脈に *in vitro* で作製した HRP-抗 HRP complex-ゲラチンスポンジ 動注 24 時間後の同部組織では動脈壁から壁周囲にかけて非常に稠密な多核白血球浸潤が認められた。HRP 感作家兎耳介動脈にゲラチンスポンジ 10 mg, HRP 10 mg, PBS 0.5 ml を動注した場合、動注 24 時間後の組織では、内皮細胞の脱落と、血管壁及び血管周囲に中等度以上の多核白血球浸潤がみられた。3日後には、血管周囲に線維芽球の増殖を認めた。FITC 標識抗ウサギ IgG 抗体の沈着は、内腔に塞栓したゲラチンスポンジ周囲、及び血管周囲結合組織間では、1時間後、4時間後、8時間後、24時間後、72時間後のすべてで認められた。しかし、動脈壁中膜部への明らかな沈着は、24時間後、72時間後でのみ、微細顆粒状にみられた (Fig. 2)。また同時期に同部には抗ウサギ C₃ 抗体の微細顆粒状沈着も認められた (Fig. 3)。HCl-3, 3'-ジアミノベンチジン呈色反応では、1時間

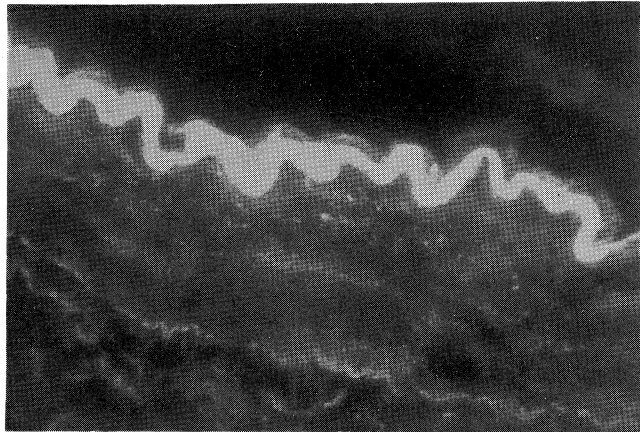


Fig. 2. Immunofluorescent findings showing the fine granular deposits of IgG (original magnification, $\times 400$).

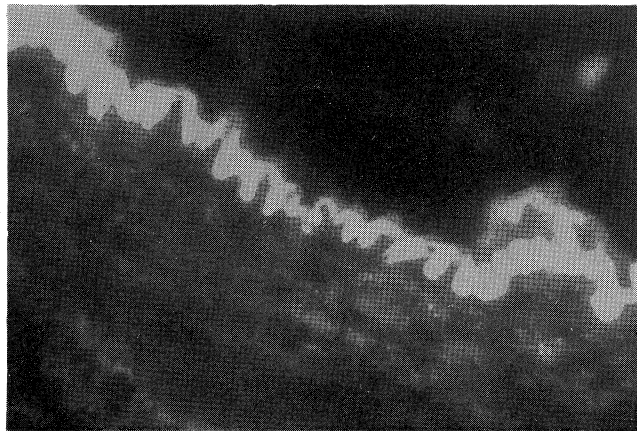


Fig. 3. Immunofluorescent findings showing the fine granular deposits of C₃ (original magnification, $\times 400$).

後、4時間後、8時間後、24時間後で内腔に塞栓したゲラチンスポンジ周囲に線状に、24時間後、72時間後には動脈壁及び血管周囲に微細顆粒状に HRP 沈着が認められた (Fig. 4)。以上の結果は表にし一括して示した (Table 1)。また未処理家兎耳介に HRP 10 mg, ゲラチンスポンジ 10 mg, 懸濁液を動注した際の 24 時間後の組織変化はゲラチンスポンジのみを動注した場合とほぼ同様であった。

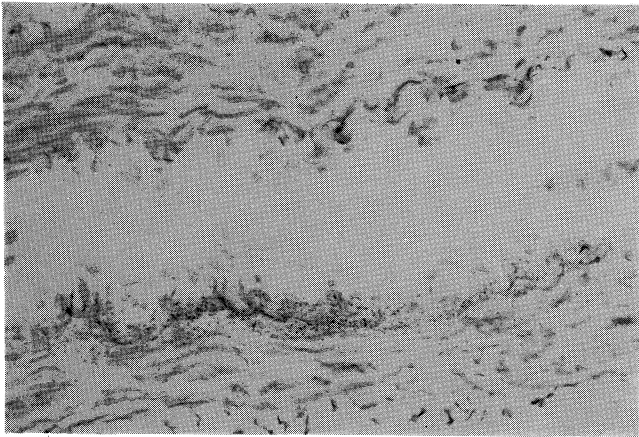


Fig. 4. Following peroxidase staining, the brownish products showing fine granular aggregates on the arterial wall (original magnification, $\times 400$).

Table 1. Localization of antigen, antibody and complement

沈着物	部位	1 時間			4 時間			8 時間			24 時間			72 時間		
		動脈腔内	動脈壁	動脈周囲	動脈腔内	動脈壁	動脈周囲	動脈腔内	動脈壁	動脈周囲	動脈腔内	動脈壁	動脈周囲	動脈腔内	動脈壁	動脈周囲
IgG		+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
		+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
		+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	±	+	+	+	+
HRP		+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+
		+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	±	+	-	±	+
		+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	±	+	-	±	+
C ₃		ND			ND			ND			±	+	±	±	+	±
		ND			ND			ND			±	+	±	±	+	±
		ND			ND			ND			±	±	±	±	+	±

考 按

血管炎とは「血管壁を場とする炎症」でありその罹患血管の太さによって生ずる変化は、幹動脈では肉芽腫型、中小筋性動脈では壊死型、毛細血管レベルではアルサス型が主体を成し、壊死型及びアルサス型血管炎の多くに自己免疫疾患、膠原病などの免疫異常が認められている。¹⁰⁾ また実験的血管炎や結節性動脈周囲炎の血管壁で IgG と同時に補体が証明されることが多く immune complex の関与が重要視されている。^{9), 11), 12)} これらの血管炎に際して

は好中球浸潤が著明である。Cochrane ら⁹⁾ はアルサス反応のような抗体過剰域で形成される immune complex は補体を結合してアナフィラトキシンを放出し、好中球の遊走が強く起こるとしており、これらの血管炎変化にⅢ型アレルギーが強く関与していることを示唆している。しかし、実際には、hyperimmune 状態の動物に抗原を注射しても、好中球浸潤を伴う毛細血管—細小静脈炎は生じるが、小動脈以上のレベルの血管に変化はみられない。また、hyperimmune 状態の動物のある程度以上の太さを持つ血管に直接抗原を注入しても、注射部に immune complex をとどめて炎症を惹起することはできない。そこで皮膚小動脈を場とする血管炎は血流うっ滞部に多く、血液粘稠度も高い傾向にあり、さらに壊死性血管炎の多くは血管分岐部の血流抵抗があり血流中の物質が“ひっかかりやすい”部位に生じやすいことに注目し、人工的に血流停滞を生じさせるべく、感作動物にゲラチンスポンジ塞栓ととも

に抗原 HRP を動注した。その動脈中膜部に抗原 HRP と抗体 IgG、補体 C₃ の微細顆粒状沈着を同時に認めたことから、目的部位に immune complex を沈着させることは可能であったといえる。また IgG が動注1時間後には既に動脈周囲に認められたことは、西川¹³⁾らの述べるように感作後産生された抗体が血中だけでなく動脈周囲にも分布していることを推測させた。一方 Ross¹⁴⁾らは、動脈硬化モデル実験として、内皮細胞をカテーテルで障害した大動脈では、内皮細胞の障害により著明な透過性の亢進、急性炎症が生じ、中膜平滑筋細胞増殖

抑制機構が障害され、最終的には細胞線維性の内膜肥厚が完成するとしているが、これはゲラチンスポンジのみの塞栓で生じる血管変化と酷似している。また、この細胞線維性内膜肥厚は Arkin¹⁵⁾ の壊死性血管炎ステージ分類の中に提唱されている所見であり、壊死性血管炎に近接して生じる閉塞性動脈内膜炎の内膜細胞線維性肥厚とも類似している。このようにゲラチンスポンジのみで惹起される血管変化が、自己免疫因子による血管変化とある程度類似しているため、ゲラチンスポンジに抗原を加え、感作動物に動注した際に目的部位への immune complex 沈着は認められたが、その組織変化を immune complex 沈着による経時的変化

ととらえ、分析することには問題点がまだあると思われる。しかし、近年 IgG immune complex と IgA immune complex では動員される浸潤細胞が異なることや、¹⁶⁾ そのための free radicals 発生変化などが注目されてきていることから、今後、種々の immune complex の差による血管壁を場としての反応差異の比較検討などには、ゲラチンスポンジ塞栓による immune complex の血管壁への沈着は有意義に用いられるのでないかと考えた。

稿を終えるにあたり御指導、御校閲いただいた川崎医科大学皮膚科学教室 植木宏明教授と幸田 衛講師に深謝いたします。

文 献

- 1) Klemperer, P.: The concept of collagen diseases. *Am. J. Pathol.* 26: 505—519, 1950
- 2) Zeek, P. M.: Periarthritis nodosa: A clinical review. *Am. J. clin. Pathol.* 22: 777—790, 1952
- 3) Cochrane, C. G. and Koffler, D.: Immune complex disease in experimental animals and man. *Adv. Immunol.* 16: 185—264, 1973
- 4) Glass, D. and Sorter, N. A.: Rheumatoid vasculitis. *Arthritis Rheum.* 19: 950—951, 1976
- 5) Correll, J. T. and Wise, E. C.: Certain properties of a new physiologically absorbable sponge. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 58: 233—235, 1945
- 6) Correll, J. T., Prentice, H. R. and Wise, E. C.: Biologic investigations of a new absorbable sponge. *Surg. Gynecol. Obstet.* 81: 585—589, 1945
- 7) Jenkins, H. P. and Clarke, J. S.: Gelatin sponge, a new hemostatic substance, studies on absorbability. *Arch. Surg.* 51: 253—261, 1945
- 8) Arakawa, M., Kohda, M. and Ueki, H.: A light-microscopic observation of rabbit auricular artery embolization with gelatin sponge powder. *Kawasaki med. J.* 12: 191—197, 1986
- 9) 荒川雅美: ゲラチンスポンジ塞栓下での血管再疎通時におけるフィブロンectinの局在. *川崎医学会誌* 13: 303—307, 1987
- 10) 京極方久: 系統的血管病変, 3年間の研究のあゆみと今後の展望. 厚生省特定疾患血管病変調査研究班昭和54年
- 11) Pope, R. M.: Detection of immune complex and their relationship to rheumatoid factor in a variety of autoimmune disorders. *Clin. exp. Immunol.* 46: 259—267, 1981
- 12) Mackel, S. E.: Circulating immune complexes in cutaneous vasculitis. *J. clin. Invest.* 64: 1652—1660, 1979
- 13) Nishikawa, J.: Experimental allergic antigen in hyperimmunized rabbits. The role of preexisting periarterial specific antibody in the development of vascular lesion. *Jpn. J. Allergol.* 28: 339, 1979
- 14) Ross, R.: Atherosclerosis. A problem of the biology of arterial wall cells and their interactions with blood components. *Arteriosclerosis* 1: 293—311, 1981
- 15) Arkin, A.: A clinical and pathology of periarthritis nodosa. *Am. J. Pathol.* 6: 401—426, 1950
- 16) Oldman, K. T., Guice, K. S., Ward, P. A. and Johnson, K. J.: The role of oxygen radicals in immune complex injury. *Free radic. Biol. Med.* 4: 387—397, 1988