

皮膚における Immune Deposit の 免疫組織化学的研究

川崎医科大学 皮膚科学教室

野 原 望

(昭和50年11月18日受付)

Immunohistochemical studies on immune deposits in the Skin

Nozomi Nohara

Department of Dermatology, Kawasaki Medical School

(Accepted on Nov. 18, 1975)

抗原抗体系に セイヨウワサビ・ペルオキシダーゼ—抗セイヨウワサビ・ペルオキシダーゼ系を用い、諸条件下に家兔に逆受身アルサス反応を起させ、顆粒状の沈着形態を示す免疫複合物の皮膚における局在を追求した。その結果、一定の相対的抗原過剰条件下では、この免疫複合物は皮膚細血管壁、その周辺、毛包周辺へとその分布を拡大し、更には膠原線維に沿い、また線維芽細胞壁に付着し、またさらには真皮表皮間基底膜部をも通過して表皮細胞層内まで沈着する像を明らかにした。

Applying the reversed passive Arthus reaction under various conditions, the author has demonstrated the granular immune deposits of horseradish peroxidase-antiperoxidase system in the skin, i. e. at the wall of venules or in the vicinity of them, in the perifollicular areas, along the collagen fibers and on the surfaces of fibroblasts, at the basement membrane of dermoepidermal zones and also within the lower epidermal layer.

1. はじめに

いわゆるアレルギー性疾患など、免疫に関係する皮膚疾患の中には、immune complex (免疫複合体) が関与しているであろうと推測される疾患が少なからず存在する。近年の内外の業績によれば、エリテマトーデス、Schönlein-Henoch 紫斑、皮膚アレルギー性小血管炎などの血管炎類のみならず、ジューリング疱疹状皮膚炎、類天疱瘡、菌状息肉症などについて表1

の如き報告があり、わたくしの教室においてもエリテマトーデス、類天疱瘡などについてこれらを追試確認し、また疾患ではないが、数種皮膚疾患において特異的に出現する Hyaline bodies について immune complex の沈着を初めて立証した。既に周知のように、エリテマトーデスでは表皮真皮境界部、毛包、細血管、汗腺などの周囲に顆粒状をなして免疫グロブリンと補体が証明される。また天疱瘡では抗表皮細胞間物質自己抗体が、類天疱瘡では抗基底膜

Table 1. Granular Deposits of Ig and Complement in the Skin.

1)	SLE and DLE	Dermo-Epidermal Junction	IgG, IgM, C1, C3
		Perivascular Spaces	
		Inter-Epidermal Spaces	
2)	Vasculitis		
	Purpura Schönlein-Henoch	Connective Tissue	IgA, C3
	Vasculitis allergica cutis	Perivascular Spaces	IgG, C
3)	Dermatitis herpetiformis	Sub-BM zones	IgA, C3
4)	Pemphigus vulgaris		
	Bullous pemphigoid	Perivascular Spaces	IgG, C
5)	Mycosis fungoides	Perivascular Spaces	IgG, C
		Connective Tissue	
6)	Hyaline bodies	Epidermal Zones	IgG, IgM, C3
		Papillary Layer	

物質自己抗体がそれぞれ認められるが、この臓器（皮膚を指す）特異的自己抗体とは別に、同時にこれら両疾患において稀れならず真皮乳頭層の毛細血管や細静脈壁に、やはり顆粒状をなして IgG と補体成分が証明される¹⁾。なおここに言う immune complex とは、現段階ではなお抗原の確認は極めて難しく、従って免疫グロブリンと補体の顆粒状態を呈しての結合併存の証明によって、一応それとするものである。ついで上記諸症の他に、諸種の皮膚血管炎においてもやはり免疫複合体の血管壁への沈着が報告されている²⁾。血管炎を一過性に伴う皮膚病変の種類は多く、ここではこの病変が果してアルサス型の反応によるものか、あるいは循環血液中の免疫複合体の沈着によるものか、またシュワルツマン現象によるものか、あるいはこれらが重なり合って起っているものか、と言う重要で複雑な問題を内包しているが、一応先ずわたくしは、皮膚細血管、特に細静脈の破壊、壊死をその特徴的な病理組織学的変化とするアルサス反応³⁾をとり上げ、この反応系を以ってヒト皮膚血管炎における immune complex 沈着の動態を追求して行こうとした。もちろん人体で実験的にアルサス反応を惹起させることは許されないから動物（家兎）を用いることとし、抗原としては西洋わさびペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase, 以下 HRP と略記) を撰んだ。HRP は分子量 4 万の低分子蛋白酵素であるが、家兎に対して強い抗原性を示し、

しかもその酵素活性は抗体によって失活し難く、従ってこの酵素を抗原とした免疫複合体は顕微鏡下に明瞭な aggregate として観察できる利点があり、これを利用して家兎皮膚内での免疫複合体の沈着形態、局在分布、被貪食過程、消失など一連の動向を最も基本的な実験モデル下に、蛍光抗体法 (Fluorescein isothiocyanate, FITC 標識) の併施により追うこととした。中でも特に、この免疫複合体の成立には抗原と抗体との間の量的比率が密接に関連するものではないかとの観点から、ここに主眼を置いて実験計画を立てた。

2. 実験方法

表 2 に実験スケジュールと操作を示した。アルサス反応は、1) 先ず普通の型の能動アルサス反応系と、2) 次いで逆受動アルサス反応系の 2 者を相前後して行った。この両反応系における免疫複合体の局在および消長は、結果からみて著差は無かった。この実験は以後の実験の pilot study となるもので、その成績の一部は既に発表した⁴⁾⁵⁾。3) ついでこの複合体の成立を、抗原抗体比の面から追求する目的を果すためには、抗体を予め皮膚に投与して置き、ついで抗原を静注によって負荷する逆受動アルサス反応系を利用するのが適当であると考え、この量的比の観察を逆受身系で進めた。すなわち先ず抗原量は一定にし、抗体の側を原抗血清

Table 2. Materials and Methods.

-
- 1) Ag: HRP. type 2 and 6 (Sigma)
 - 2) Animals: albino rabbits (3~4 kg)
 - 3) Ab: 256 and 40960 units (passive haemagglutination)
 - 4) Active Arthus' Reaction
 Injected Ag: 1 mg/ml, 500 mcg, 250 mcg, 125 mcg.
 Biopsies: 30 min, 1 hr, 2 hrs, 4 hrs, 12 hrs, 24 hrs, 48 hrs, 72 hrs.
 - 5) Reversed Passive Arthus' Reaction
 Ab: 0.1 ml i. c.
 Ag: HRP 10 mg (type 2 and 6)
 - 6) In vitro Prepared Immune Complexes
 Soluble I.C., Insoluble I. C.
 - 7) Effects of Steroid Hormones on I. C. Deposits
 Dexamethasone: 2 mg and 8 mg i. c. 7 hrs interval
-

(agglutination titer: 10×2^{12}), pH 7.4 PBS 希釈抗血清 (同 titer: 10×2^{11} , 10×2^{10} , 10×2^9) の4段階の投与とした。4) 次に抗原抗体結合物を予め *in vitro* にて作成し, これを insoluble fraction (12,000g で沈殿) と soluble fraction (同上清を $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 処理) の2分画に分け, 前者は大型顆粒を, 後者は微細顆粒状を呈するが, この2者をそれぞれ別箇の家兎の皮膚に注射してその沈着状態と消長を追跡した。5) 最後に前記2) の逆受動アルサス反応での免疫複合体の動態に対するコルチコステロイド全身投与の影響を dexamethasone を用いて検討した。

3. 実験成績

1) 能動アルサス反応および逆受動アルサス反応の両反応系において, HRP を含む免疫複合体が, 真皮上層の細血管 (venule) の壁およびその周縁の部にほぼ局限して顆粒状形態を示して沈着する像をみた。その電顕所見では図1のように, この複合体は血管壁の内皮細胞膜の外側に密に接してペルオキシダーゼ反応陽性の, 電子密度の高い大小種々の顆粒として確認され, 一部では周辺に遊走出現してきたと思われる多核白血球の壁に沈着し, また更にはこの多核白血球の中に取込まれた像 (phagolysosome) も見出された。またこの周辺に介在する collagen fibril の間にもこの顆粒は散見さ

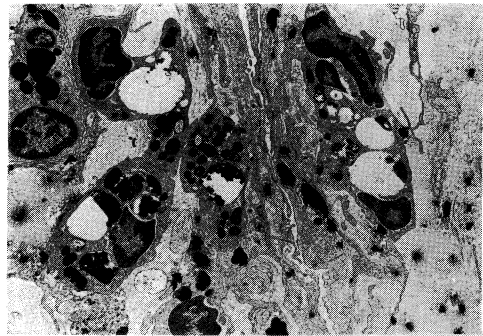


Fig. 1. Reversed passive Arthus reaction. Biopsy taken after 1 hour from rabbit ear skin. Many HRP-anti-HRP immune complexes are located within the wall and outside of a small blood vessel, some adhere to cell membranes and collagen fibrils, and a considerable number has been phagocytosed by neutrophils in which they seem to be digested. Original magnification: $\times 6600$.

れる。これらの所見は能動アルサス反応の場合でも, また逆受動アルサス反応の場合でもほぼ同様に観察される (一部既発表⁴⁾⁵⁾⁶⁾。

2) 逆受動アルサス反応における抗体稀釈系列による観察結果では, challenge (抗原投与) 後30分でペルオキシダーゼ反応陽性の immune deposit は真皮層に広く collagen fiber あるいは collagen fibril に一致して, 一定の配列をなした細顆粒として沈着し (図2), 一部では立毛筋線維にも沈着をみる。さらに抗体を稀釈 (agglutination titer 10×2^{10}) すると毛包基底

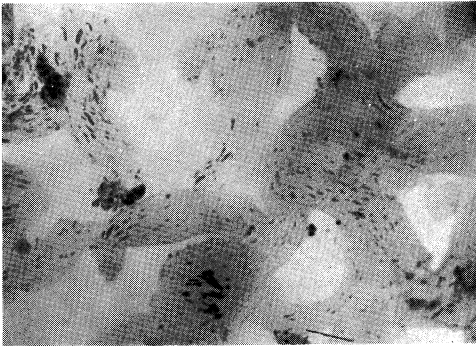


Fig. 2. Reversed passive Arthus reaction using the diluted antiserum (Agglutination titer: 10×2^{11}). 30 min. after the challenge. Fine granular peroxidase-positive substances located widely along the collagen fibers, and they are apt to be set in array with the stream of collagen bundles. Frozen section. Original magnification: $\times 400$.

膜の外側に、また一部毛包内にも分布をみるようになる。さらに稀積度を高めた場合(同 titer 10×2^9)では表皮真皮接合部すなわち基底膜の直下に同様顆粒の出現を認めた(惹起操作後30分. 図3)。この場合さらに経過を追うと、惹起後2時間の所見で、基底膜下での細顆粒の残

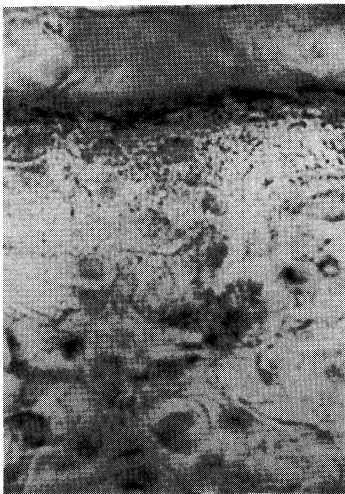


Fig. 3. 30 min. after the challenge. Using diluted antiserum (agglutination titer: 10×2^9). The fine or coarse granular substances are accumulated under the dermo-epidermal zones. Frozen section. Original magnification: $\times 400$.

存沈着と共に、さらに表皮細胞層内にも同様の細顆粒が出現してくることを見出した(図4)。ただしこの immune deposit と表皮細胞膜との関係は光顕下では明らかでない。なおこのほか惹起注射30分後の時点で、真皮の組織球、線維芽細胞、血管内皮細胞、同外皮細胞などにおいても、それぞれその細胞膜に顆粒状の deposit が接着している像を認めた。

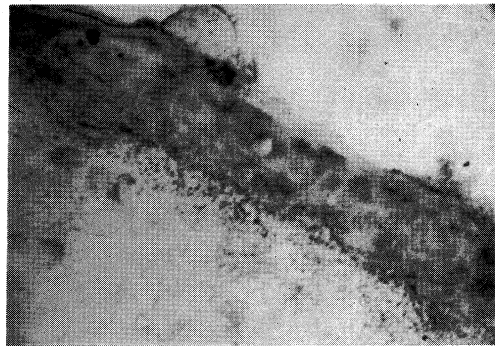


Fig. 4. 2 hours after the induction. The granular deposits are found in the dermo-epidermal zones and also in the lower part of the epidermis. Agglutination titer of the diluted antiserum: 10×2^9 . Frozen section. Original magnification: $\times 200$.

3) in vitro で作成した抗原(HRP)・抗体(anti-HRP)結合物のうち、不溶性画分の皮注投与では、真皮内に顆粒状をなして出現してくる immune deposit は注射後4時間を最頂期として主に好中球に貪食される像を示し、24時間後には著しく減少消失してくるがなお残存する。これに対し可溶性画分の皮注では、惹起後早くも30分後にて単核球壁に沈着する所見が認められ、4時間後には既にほとんど顆粒を認めず、24時間後では全く消失した。なお不溶性画分による皮膚内沈着物は顆粒が大きく(lumpy)、可溶性画分によるそれは明らかに小さい。

4) コルチコステロイド投与の影響は、Dexamethasone 2 mg/kg 注では対照との間に有意差はなら認められなかった。8 mg/kg (7時間おき、惹起前日より惹起後3日間連日)では、惹起操作後30分、1時間、4時間において

血管壁, 真皮結合織内, および単核細胞膜への顆粒状沈着物の出現は対照に比してやや少なく, 好中球による該沈着物の貪食は対照と差無く(4時間後で共に最高), 一方局所皮膚における肉眼的浮腫は投与群において明らかに抑制されるのをみた。以上の所見からコルチコステロイドの逆受動アルサス反応に対する影響は, Immune deposit に関しては極めて大量の投与によってのみ僅かに抑制が認められる程度のものであると考えられた。

4. 考 察

抗原刺激に対応して生成された抗体が, その抗原と血管内や組織間隙において抗原抗体複合物をつくり, これが主に血管壁を中心に沈着蓄積して血管障害をもたらすことに始まるアレルギー性の炎症は第Ⅲ型のアレルギーとして知られ, 動物でのアルサス反応, ヒトでの血清病がその典型とされている。この沈着した抗原抗体複合物は補体を活性化していわゆる chemotaxis を起し, 多核白血球の集積を招き, 種々の炎症誘起物質や組織傷害性の lysosome 内容物を遊離して一定の病変をそこに発生させるものとみられている。しかし一方, 生成された immune complex が, 常に組織障害に直結するものとは限らず, むしろ多くの場合, 全身の網内系貪食細胞系により, 何ら病変発生に至らぬうちに処理されうるものと推測される。従って immune complex による組織障害性は, immune complex 自体の免疫化学的組成, 溶解性, 抗原抗体量比, 濃度, 絶対量, それにかかわる生物学的活性などと共に, host 側の immune complex に対する感受性, 処理機能, 標的組織の性質などにより, その様相や障害程度がおのずから異ってくるものと考えられ, このように特定の病変発生に関与する直接的間接的要素は極めて複雑である。またアルサス反応以外にも流血中の抗原抗体補体結合物が何らかの要因によって血管壁に沈着をきたす可能性もあり, あるいはシュワルツマン現象などにおいてもやはり炎症性血管障害を呈して多核

白血球の遊走集積, 免疫グロブリン沈着をみる事が知られている。ヒトにおいて抗生物質などによる薬剤アレルギーや, また虫刺症など日常遭遇する月並の疾患においてしばしば一過性の血管炎を伴うのを見るが, さらにそれ以外にも結節性紅斑や結節性血管炎, アレルギー性皮膚小血管炎など原因尚不明の皮膚疾患においても, 一過性の, あるいは再発性の血管炎を伴うものは少なくない。これらの皮膚血管炎類において, アルサス反応あるいはこれと類似の機序が起っている可能性は十分に存在すると考えられ, この場合抗原の側の問題と抗体の側からの問題があるが, 疾患特異性をつきとめるためには抗原成分の確認が最も重要な課題であろう。既に Parish²⁾ は動物実験的に作成した連鎖球菌抗原とその抗体との結合物により, ヒト血管炎類似の病変を起させることに成功したとし, このことからヒトの血管炎においてもアルサス型の発症機序を想定しているが, 実際には現在までのところヒト皮膚血管炎については抗原成分の確認は果されておらず, この点は(抗原確認が非常に難しい理由は)生体側の抗原処理機構に密接な関係があるものと考えられる。一方病変の場である皮膚の側の問題, すなわち target organ としての皮膚の側での, immune complex 沈着を招き, 病変を誘起させる条件もまた重要な問題となる。既に序文で表1を掲げて述べたように, immune complex は血管炎類に限らず種々の皮膚疾患で, しかも種々の部位に分布沈着するものであることが当教室を含む内外の研究で次第に確かめられつつある。従って次の課題はこの immune complex が, それぞれの皮膚疾患の発生に, どのように特異的なかかわりを持つものであるかを追求しなければならないが, 前述のように immune complex の組織障害性に関与する要素は非常に多岐に亘るものであるから, 当教室ではこの複雑な課題にアプローチして行くために, 先ず単純で紛れの少ない動物実験モデルとして, 抗原抗体系に HRP-anti HRP 系を利用したアルサス反応によって, 皮膚中に出現してくる immune complex の動向を種々の方向から観

察して行く方法を専らとってきた。本報告もその一連のものであり、実験スケジュールは表2に示した通りである。すなわち本篇での観察の中心課題は抗原抗体比の変化、特に相対的抗原過剰条件下での、逆受動アルサス反応における immune complex の出現状況、形態、局在、被貪食性、消失経過、およびステロイド投与の影響に対する検討である。

HRP は分子量4万程度の低分子量の蛋白であるから、これを静注すると非結合状態のものでは極めて速かに容易に血管壁を通過し、結合織、毛包壁、真皮表皮間基底膜をも同じく非常に急速に通過して消失して行く。この場合の HRP は明瞭な顆粒形態を形成することはなく、び漫性に見出され、固定前に PBS で洗えば簡単に消失し、組織や細胞との親和性は全く認められない。次に *in vitro* で immune complex を作成し、これを直接皮膚に注射してみたところ、その不溶性分画を用いた場合は沈着する顆粒は大型で、団塊状をなすものさえあり、炎症反応も可溶性分画の場合に比べて明らかに顕著であり（多核白血球の浸潤）、注射後4時間を頂期として該顆粒が多核白血球に旺んに貪食される所見を示すのに対し、可溶性分画の場合は炎症性反応は極めて微弱で、沈着顆粒は微細、注射後30分で単核球細胞膜に付着する像が見出され、以後急速に顆粒は消失する。この両者間の相異は、明瞭な炎症性血管障害を起す前段階（程度、時期）において、immune complex に対する少くとも二様の、あるいは二相の組織・細胞反応が存在しうることを示唆するもので、前者（不溶性分画）の場合はこれをアルサス反応の典型に類似の現象として理解することができるが、後者（可溶性）の場合は、immune complex に対する排除機能が果して単核球によって演じられるものであろうかという興味ある問題を提起しているものと考え、この点は現在さらに検討を進めつつある。

次に逆受動アルサス反応において、抗原量を一定にし、抗体量を逡減して段階的に相対的抗原過剰の状態を起させてみた実験成績の結果からみると、皮膚に出現してくる immune de-

posit の局在分布は明らかに変化を示した。すなわち本実験でのある一定の抗原抗体化（抗原血清：agglutination titer： 10×2^{12} ）の下では、顆粒状沈着は皮膚小血管およびその周辺に限って分布するのに対して、抗体を逡減するとその局在はさらに周辺皮膚組織に拡大し、膠原線維、毛包、真皮表皮境界部直下にまで広く及んでくる。これはあたかも抗原が、これと結合すべき相手の抗体を求めて流れ拡って行くかのように思われる現象である。しかも、前報⁵⁾では、その波及は真皮表皮境界部、すなわち基底膜の下部に留まるとしたが、さらに時間的経過を仔細に追跡した今回の観察では、図4に示すように顆粒状沈着物は明らかに基底膜を通過して表皮細胞層内に進入分布してくる。顕下では表皮細胞膜とこの顆粒との位置的關係を明確にしえないが、恰も膜に接着しているかのように観取され、果して表皮の細胞が immune complex に対する receptor を持つものであるのか、非常に興味ある問題がここにも提出されているように思われる。もっともこれらの所見（immune complex 分布範囲の拡大）は、能動アルサス反応において、抗原逡減による抗体過剰条件での実験成績（既報⁴⁾）でも同様に認められた。従って、この immune deposit の局在分布の変化は、単に抗原過剰、抗体過剰の何れかという背反対極的な条件ではなくて、一定の幅の中での抗原抗体比に規定されて生ずる変化であると考えるのが妥当であろう。なお能動アルサス反応での抗原逡減では、これに平行して顆粒の細小化が観察されたが、逆受動アルサス反応での抗体逡減ではこのことは認められなかった。

最後にコルチコステロイドの影響については、今回の観察に限り、甚しく大量の投与を反応惹起の前後を通じて行ってみても、immune complex の出現、被貪食性などに対する抑制効果は極めて乏しいものと判定せざるをえない成績であったが、あるいは他の薬剤、例えば抗ヒスタミン剤、DDS (Diaminodiphenylsulfone) などと対比して、改めて検討しなおす必要があるかもしれない。

5. ま と め

抗原抗体系に horseradish peroxidase-anti horseradish peroxidase 系を用い、実兔に逆受身アルサス反応を起させ、先に報告した能動アルサス反応の場合⁴⁾と比較しつつ immune deposit の局在の変貌を、特に抗原抗体比の面から検討し、段階的抗血清稀釈による相対的抗原過剰条件下では、immune complex がその分布を広く皮膚諸組織に拡大し、しかもこれが

真皮表皮間基底膜部をも通過して表皮細胞層内まで沈着するものであることを明らかにした。

この研究は川崎医科大学プロジェクト研究費 50204 号の補助を受け、かつ当教室の植木宏明助教授、久保美代子講師、および益田俊樹講師（川崎医大附属川崎病院）の協力をえて行われたものである。なお本論文の要旨は、昭和50年10月19日、日本皮膚科学会第27回西日本連合地方会における Presidential Address の一部として著者により発表された。

引 用 文 献

- 1) Cormane, R. H., van Joost, T. H.: Lupus erythematosus. Immunologic studies of the skin in "Immunopathology of the skin", edited by Beutner, E. H., Chorzelski, T. P., Bean, S., and Jordon, R. E. Stroudsburg, Pa., Dowden, Hutchinson and Ross, 1974, pp. 92-122.
- 2) Parish, W. E.: Cutaneous vasculitis. The occurrence of bacterial antigens with antibody and of abnormalities associated with chronic inflammation in "Immunopathology of the skin", edited by Beutner, E. H., Chorzelski, T. P., Bean, S., and Jordon, R. E., Stroudsburg, P., Dowden, Hutchinson and Ross, 1974. pp. 153-169.
- 3) Cochrane, C. G.: Immunologic tissue injury mediated by neutrophilic leukocytes. *Advanc. Immunol.*, 9: 97-162, 1968.
- 4) Ueki, H., Kubo, M., Hijiya, T., and Nohara, N.: Morphology and distribution of immune deposits in the skin. The active Arthus reaction using horseradish peroxidase as antigen. *Kawasaki Med. J.* 1: 1-8, 1975.
- 5) Masuda, T., Ueki, H., Nohara, N., and Tanioku, K.: Distribution of immune deposits in the skin of reversed passive Arthus reaction using horseradish peroxidase as antigen. (in preparation)
- 6) Weber, K., Ueki, H. and Braun-Falco, O.: Immunopathology of the passive Arthus reaction using horseradish peroxidase as antigen. *Virchows Arch. Abt. B Zellpath.* 14: 379-383, 1973.
- 7) 野原 望: 皮膚の場に向ける免疫学的アプローチ. 西日皮膚に投稿中