

Coxsackie B4 virus による実験的腎炎

— IgA 腎症のモデルとして —

鈴木 仁, 加藤 一夫, 大原 信春, 鈴木 順造, 神山 諭, 久米 一成

福島県立医科大学小児科教室

序 言

ヒトのウイルス感染に際しては種々の腎障害が生ずる¹⁾なかでもIgA腎症では、気道感染症などにひき続いて肉眼的血尿を伴った急性発症をみたり、mesangiumにIgAがdominantに染色されることから、気道あるいは消化管で増殖するウイルスがその発症、増悪・進展の一因を担うものとして注目されている。

私達は、数あるかぜウイルスのなかで、主として腸管で増殖するEnterovirusに属するCoxsackie B4 virus(Cox. B4)をマウスに2週間の間隔で2回接種することによりヒトのIgA腎症に類似した腎病変を得、これはIgA腎症の病因としてウイルスが関与している可能性を示唆する所見であるとして昭和60年度本研究班業績報告書に報告した²⁾

今年度は、本実験をIgA腎症のモデルとして完成させるための一つのステップとして、同じ実験系を用い、この腎病変を得るための最適な接種間隔と2回目接種以後の経時的腎病変の推移を知ることが目的として検討を加えたのでその結果を報告する。

材 料

I) 実験動物

Swiss albinoマウス、4週齢、雌

II) ウイルス液とコントロール液

a) 接種用ウイルス液：既報²⁾の方法により精製したCox. B4を使用時に 10^7 TCD₅₀/0.1 mlに調整した。

b) 抗血清作成用ウイルス液：既報²⁾の方法により精製したCox. B4を使用時に 10^8 TCD₅₀/

0.1 mlに調整した。

c) コントロール液：血清無添加培養液を接種用ウイルス液作成時と同様の操作で処置し、その上清をコントロール液とした。

III) FITC標識抗マウス血清

Behring社製、FITC標識抗マウスIgG, IgA, IgM, C₃を使用した。

IV) ウイルス抗原の検索

抗血清作成用ウイルス液を、家兎の耳静脈に 10^9 TCD₅₀を週2回、5週間にわたり接種して免疫し得られた中和抗体価10,248倍の血清とCoo per社製、FITC標識抗ウサギ免疫グロブリンヤギIgGを用いた。

実験方法と成績

I) 最適な接種間隔を決めるための実験

a) 方法

接種間隔をそれぞれ1日、2日、3日、5日、7日、10日、14日、21日、28日とし、ウイルス接種群とコントロール群を5匹ずつ9群作成した。各群に接種液0.3 mlを尾静脈より静注し、2回目接種後36時間目にと殺して腎を採取した。採取した腎は、顕微鏡用は10%ホルマリン固定、蛍光抗体法用は凍結切片にした後、冷アセトン固定、電顕用はグルタル、1%オスミウム酸固定した。顕微鏡的検討は、HE, PAS染色にて、電顕的検討は、酢酸ウラニルおよび硝酸鉛による二重染色により行った。蛍光抗体法的検討は、FITC標識抗マウスIgG, IgA, IgM, C₃血清による直接法およびウイルス抗原に関しては抗Cox. B4ウサギ血清とFITC標識抗ウサギ免疫グロブリンヤギIgGを用いた間接法による。

b) 成績

mesangiumの増殖性変化は接種間隔が短いほど強く認められた。PAS陽性沈着物はウイルス1回接種ではほとんど認められないが、2回接種群では早期よりmesangium領域および血管極に明瞭に認められ、それは接種間隔を10日から21日おいた群に著明であった。コントロール群では変化を認めなかった。

II) 2回目接種以後の経時的腎病変の推移を知るための実験

a) 方法

接種間隔を10日とし、2回目の抗原接種後早い時期の代表として36時間目、ある程度時間をおいた時期として4週目の時点で腎を採取し、光顕、電顕、蛍光抗体法の検討を加えた。

b) 成績

1) 36時間目の腎病変

光顕では、diffuseなmesangiumの軽度増殖を認め、それは大部分がmatrixの増加のみだが、一部では細胞の増殖も伴っており、PAS陽性沈着物は主として血管極に認められる傾向にあった。電顕では、mesangial matrixの増加を認めるのみだが、一部ではparamesangiumあるいはmesangiumに少量のelectron dense depositsを認めた。蛍光抗体法でウイルス抗原はfocal segmentalに、mesangiumあるいは血管極附近に染色された。IgA、IgG、C₃はほとんど染色されなかったが、IgMはコントロールに比較して強くmesangial patternに染色された。

2) 4週目の腎病変

光顕(図1)では、軽度のfocal segmental mesangial proliferationの像を呈し、mesangiumにPAS陽性沈着物を認め、一部では半球状～球状を呈していた。電顕(図2)では、paramesangium～mesangial areaにelectron dense depositsを認め、これは一部内皮下にも軽度ながら存在していた。しかし、基底膜、内皮細胞、上皮細胞には特変を認めなかった。蛍光抗体法で、ウイルス抗原(図3)はmesangiumに、5疋中2疋でdiffuseに、3疋でfocal segmental

に染色され、IgA(図4)は5疋中4疋がfocal segmentalに、1疋ではdiffuseに染色された。IgG(図5)の染色態度はIgAとまったく同様であって、IgAがdiffuseなものやはりIgMもdiffuseに染色された。C₃(図6)は全例においてdiffuseで、mesangiumに染色された。IgMもdiffuseで、mesangiumに染まったが、コントロールよりは強いものの36時間目のものに比較して弱い染色態度を示していた。

考 察

IgA腎症の成因究明をめざしていくつかの動物実験モデルが報告されているが、ヒトのIgA腎症に匹敵したものは未だない。一方、日常の臨床的経験より気道あるいは消化管などで増殖するウイルスが本症の発症、進展・増悪に何らかの役割を果していることは容易に予想される。この様な考えに基づいて私達はマウスにCox. B4を接種して実験腎炎を作成し、いろいろな角度からこれを検討してきた^{3) 4) 5) 6)}なかでもCox. B4腹腔内1回接種による増殖性腎炎³⁾免疫原性だけを有し感染性をもたないウイルス蛋白そのものである不活化Cox. B4投与により得られた腎病変⁴⁾はともにmesangium中心の腎障害所見であり、投与方法によっては軽度のsegmental mesangial proliferationと半球状～球状のPAS陽性沈着物を伴う糸球体変化が得られ、これはヒトのIgA腎症にみられる腎病変ときわめてよく類似していた。この一連の実験系について昨年はマウスにCox. B4を2週間の間隔で2回接種することによって生ずる糸球体変化について報告²⁾したが、その際、蛍光抗体法にてmesangial patternで染色されたIgG、IgA、IgMの染色態度がIgA dominantでなかったため、これをIgA腎症のモデルとして完成させるためには、IgA dominantな蛍光態度を示すこととそれが進行性病変であることの証明が今後の課題であることを指摘した。

そこで今年度の私達の研究目標を前述のごとき2点において実験した。その結果IgA腎症類

図1. 光顕 (PAS染色, × 400)
矢印はPAS陽性沈着物

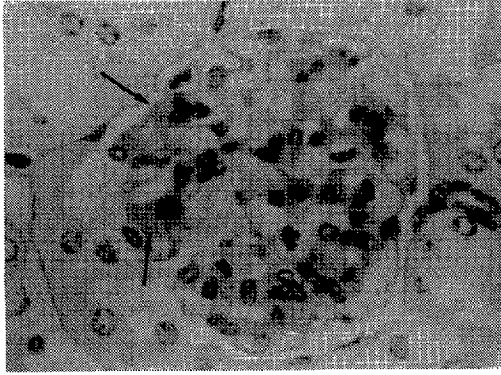


図2. 電顕 (× 3, 200)

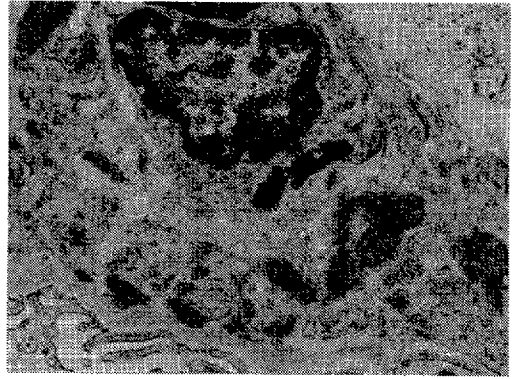


図3. 蛍光抗体法 (ウイルス抗原, × 400)

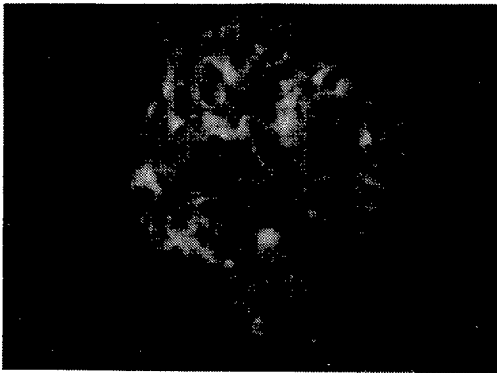


図4. 蛍光抗体法 (抗マウスIgA, × 400)

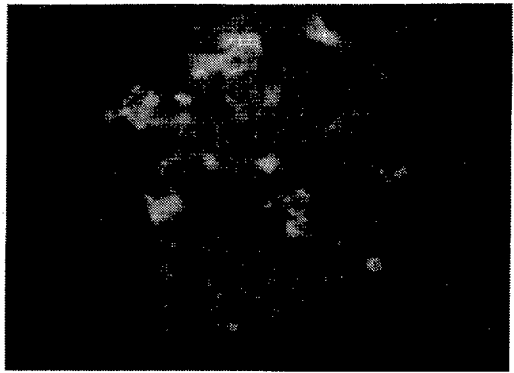


図5. 蛍光抗体法 (抗マウスIgG, × 400)

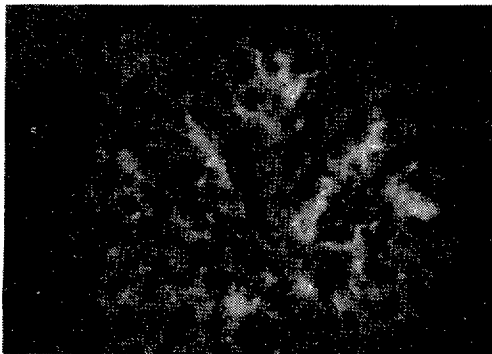
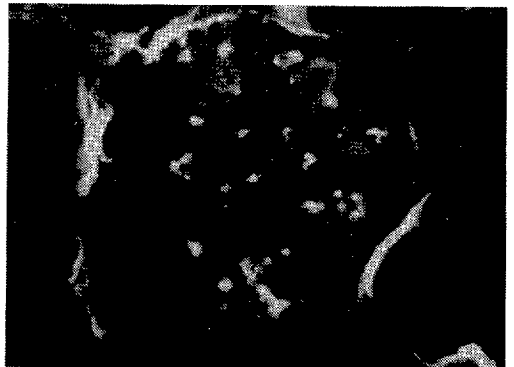


図6. 蛍光抗体法 (抗マウスC₃, × 400)



似の糸球体変化としてのmesangial depositsが生ずるための最適な接種間隔は10日から3週間であったので、10日の接種間隔を以て2回接種した後の経時的腎病変の推移を検討した。光顕、電顕にてmesangial matrixは2回目の抗原接種後早期に増加したが、これは一過性であり、のちには軽度ながらfocal segmental proliferationの像を呈していた。一方、蛍光抗体法では、2回目接種後の経過時間が長くなるにつれてmesangiumにIgA, IgG, C₃が染まるようになり、ウイルス抗原も同様の部位に染色された。これはIgA腎症の病因の一つとしてウイルスが関与している可能性が大きいことを示唆する重要な所見であると思われるが、これら得られた腎病変が循環免疫複合体の沈着によるのか、in situ免疫複合物形成によるのかなど現時点で結論づけることは難かしいと思うし、これがIgA腎症のモデルであると言える程の結果を得ることはできなかった。しかし、Coxsackie B₄による実験腎炎で私達が現在までに得た諸成績は、これに何らかの手を加えることにより、将来的にIgA腎症の実験モデルにまで発展させ得る可能性を秘めた基礎的病変にはなり得るものであると考ええる。

以上より次年度の検討課題として、まずは腎病変の成り立ちを検討するための実験として今年度実施した2回目接種後36時間目と4週目との間をさらに細かく区分して経時的腎病変の推移をみることに、4週目以降をさらに長期にわたって経過観察した際の免疫グロブリンの動向を検討し、あわせて進行性病変の確認を予定しているが、その他にこの実験系においてIgAがmesangiumに出現した時に同じウイルスによる弱い抗原刺激を頻回に加えることによりヒトが自然界で受けると同じ状況が作られるのではないかと、その場合の腎病変はどうかなども興味ある検討事項になると考える。

結 論

1) 人為的におこさせた2回のウイルス血症

後、ウイルス抗原は、早い時期ではfocal segmentalに、mesangiumあるいは血管極附近に染色され、4週目では、早期に染色されたよりも強くmesangial patternで認められた。

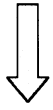
2) IgA, IgG, C₃は、早い時期ではほとんど染色されなかったが、4週目ではmesangial patternで染色された。

3) IgMは、コントロールに比較して強く染色されたが、4週目と比較した場合、早い時期の方が強い染色態度を示した。

4) これをIgA腎症のモデルとして完成させるためにはさらに検討を要するが、今回の成績はIgA腎症にまで発展させ得る基礎的病変として価値ある所見であると考ええる。

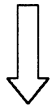
参 考 文 献

- 1) 鈴木 仁：ウイルスと腎臓，小児科，27(7)：883—889，1986。
- 2) 鈴木 仁，加藤一夫，大原信春，鈴木順造，神山 諭，久米一成：Coxsackie B₄ virusによる実験腎炎—IgA腎症のモデルとして—，厚生省心身障害研究「小児慢性腎疾患の予防・管理・治療に関する研究」昭和60年度研究業績報告書，総合班長石丸隆治，P 141—144，1986。
- 3) 加藤一夫：Coxsackie B₄ virusによる実験的腎炎，日腎誌，22(3)：233—247，1980。
- 4) 弓削田英知：Coxsackie B₄ virusによる実験的腎炎—不活化ウイルスが腎に与える影響について—，福島医誌，30(1—2)：71—85，1980。
- 5) 佐藤康次：Coxsackie B₄ virusによる実験的腎炎—増殖に用いた細胞の相違によるウイルスの病原性の差について—，福島医誌，30(1—2)：53—70，1980。
- 6) 大原信春：Coxsackie B₄ virusによる実験的腎炎—ウイルス血症に伴う一過性糸球体増殖性変化—，日腎誌，28(4)：351—361，1986。



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



結論

- 1)人為的におこさせた 2 回のウイルス血症後, ウイルス抗原は, 早い時期では focal segmental に, mesangium あるいは血管極附近に染色され, 4 週目では, 早期に染色されたよりも強く mesangial pattern で認められた。
- 2) IgA, IgG, C3 は, 早い時期ではほとんど染色されなかったが, 4 週目では mesangial pattern で染色された。
- 3) IgM は, コントロールに比較して強く染色されたが, 4 週目と比較した場合, 早い時期の方が強い染色態度を示した。
- 4)これを IgA 腎症のモデルとして完成させるためにはさらに検討を要するが, 今回の成績は IgA 腎症にまで発展させ得る基礎的病変として価値ある所見であると考ええる。