

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学教室

序 言

ウイルスにより種々の腎障害が生ずることは、比較的古くより興味もたれ、ウイルス学および免疫・組織学の進歩に伴い、ウイルスの腎炎惹起の可能性について論じられてきた。^{1,2)}

一方、IgA 腎症は急性気道感染症に引き続いて急性発症をみたり、メサングウムにIgAがdominantに染色されることより、ウイルス、特に気道あるいは腸管で増殖するウイルスが、その病因としての可能性を持っている。

私達は、カゼウイルスの代表の1つであり、腸管で増殖するCoxsackie B4 Virus (Cox. B4) を用いて、比較的簡単な手続きによって、マウスにIgA 腎症類似の病変を作成したので、その組織学的所見とIgA 腎症のモデルとしての可能性について報告する。

材料と方法

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: 仔ウシ血清添加MEM培養液で増殖させたVero細胞を、細胞が十分に増殖した時点で、その培養液をすて、3日間に亘り血清無添加MEM培養液で洗浄、置換した。このVero細胞に、Cox. B4 virusを接種し、50~70% cytopathic effect (CPE) が得られた時点で採取し、-80°Cで急速凍結した。これを室温で融解し、以後の操作はすべて0~4°Cで行い、この融解したウイルス液を3,000 rpmで20分間遠心した。上清をとり、Fluorocarbonと混和し、3,000 rpmで15分間遠心した。その上

清をとり、さらにFluorocarbonと混和し、同様操作を3~5回繰り返した。この上清を使用時まで-80°Cに凍結保存し、使用時に 10^5 TCD₅₀ / 0.1 mlに調整した。

b) 抗血清作成用ウイルス液: 接種用ウイルス液と同様にして増殖させたウイルス液を、シヨ糖濃度勾配法にて精製し、-80°Cに凍結保存して使用時 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Vero細胞培養液を、接種用ウイルス液作成時と同様の操作で処置し、上清を得た。これを使用時まで-80°Cに凍結保存し、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) FITC 標識抗 Cox. B4 virus

抗血清作成用ウイルス液を、家兎の耳静脈に 10^9 TCD₅₀ずつ、週2回、5週間に亘り接種して免疫し、中和抗体価が10,248倍の血清を得た。これを用いて硫酸塩析法でIgGをとり、FITCと反応させ、セファデックスG25, DEAEセルロースを通し、F/Pモル比1.2の分画をとった。コントロールマウス腎切片で非特異螢光の有無を検討し、Cox. B4 virus感染Vero細胞を用いて、ブロックテストおよび最適希釈倍数を求め、使用に供した。

V) 実験方法

ウイルス接種群(20匹)にはCox. B4 virus液0.2 ml (10^5 TCD₅₀ / 0.1 ml)と Freund完全アジュバンド0.2 mlを混和し、皮下注射した。その2週後にウイルス液0.2 mlを尾静脈より静注した。そして、24時間後に腎を採取した。コ

コントロール群 (10匹) には、コントロール液0.2 mlと Freund 完全アジュバンド 0.2 mlを皮下注射し、2週後にコントロール液を同量静注し、24時間後に腎を採取した。採取した腎は、光顕用は10%ホルマリン固定、蛍光抗体法用は凍結切片にした後、冷メタノール・エーテル固定、電顕用は、グルタール、1%オスミウム酸固定した。光顕的検討は、FITC-抗マウスIgG, IgA, IgM, C₃血清および FITC-抗 Cox. B4血清による直接法にて、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て行った。

結 果

コントロール群には、光顕、電顕では何ら異常を認めず、蛍光抗体法で mesangium に IgM が 1(+)~trace 程度に染色された。

ウイルス接種群では、光顕 (図1) で全例に mesangial deposits を認め、その程度の強いものでは半球状~球状の PAS 陽性沈着物としてみられた。mesangial area は沈着物によって軽度拡大しており、mesangial cell は segmental に軽度の増殖を認めた。なお、間質、尿細管には異常はなかった。電顕 (図2) では、paramesangium ~ mesangial area に大きな 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 (図3) では IgA, IgG, IgM が (++)~(+++), C₃ が (+) にいずれも mesangial pattern に染色された。しかし、Ag は染色されなかった。

考 察

ウイルスが引き起こす腎障害については、比較的古くから検討されており、^{1,2)} 臨床においては、現在まで数種のウイルスによる腎炎の報告がある。^{3~7)}

IgA 腎症では、気道感染などに引きつづき、肉眼的血尿を伴って急性発症するものがあることや、メサンギウムに IgA が dominant に染

色されることから、気道あるいは消化管などで増殖するウイルスが本症発症に何らかの役割を演じている可能性が大きい。

私達が実験で使用した Cox. B4 は、主として腸管で増殖する Enterovirus に属し、脂質を持たない最も小さな RNA ウイルスである。蛋白粒子としてみた場合直径 270~280 Å, 分子量 2×10^6 dalton と巨大であるが、ウイルスが形成される際に同時に作られる表面蛋白の平均分子量は $2 \sim 4 \times 10^4$ dalton である。

さて私達は、先に Cox. B4 virus をマウス腹腔内に1回投与することによって、2回の viremia にひき続いて mesangial deposits を伴った増殖性腎炎が生ずることを報告した。⁸⁾ この腎炎は、16週間に亘る観察よりほとんどが一過性の経過を示すことから、紫斑病性腎炎に類似のものと考えた。しかし、一部は進行性であったため、IgA 腎症に対するウイルスの関与の可能性も類推された。そこで、ウイルス蛋白そのものが腎炎惹起性を有するかどうかを、不活化ウイルスを用いて検討し、一定のウイルス量で、2回投与を行なうことによって、増殖性病変を伴わない mesangial deposits を生ずることを明らかにした。⁹⁾ すなわち、ウイルス蛋白とそれに対する抗体によって mesangial deposits が生ずることが確認されたが、腎炎を生ずるには、生きたウイルスの生物活性が何らかの役割を演じていることが示唆された。

今回の私達の検討では、生ウイルスを2週間の間隔で2回接種することによって、軽度な segmental mesangial proliferation と半球状~球状の PAS 陽性 mesangial deposits を伴う糸球体変化を得た。この変化は光顕、電顕的にはまさにヒト IgA 腎症の組織像であった。このように、比較的単純な手続きによってヒト IgA 腎症同様の組織変化が生ずることは、IgA 腎症の病因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していると考えられる。しかし、蛍光抗体法では、IgG, A, M が mesangial pattern で染色されるものの、決して

図1. 光顕 (PAS 染色, $\times 400$)

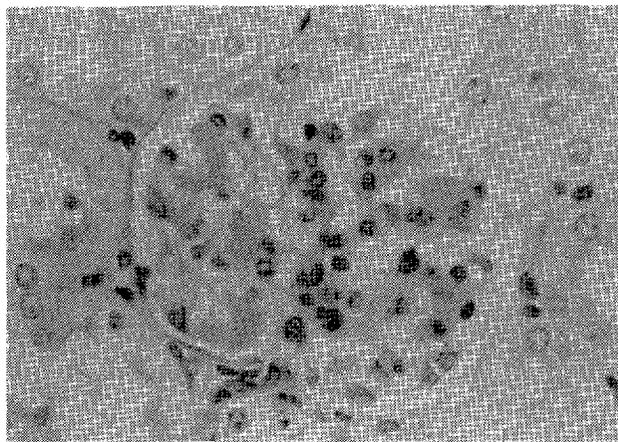


図2. 蛍光抗体法 (抗マウスIgA, $\times 400$)

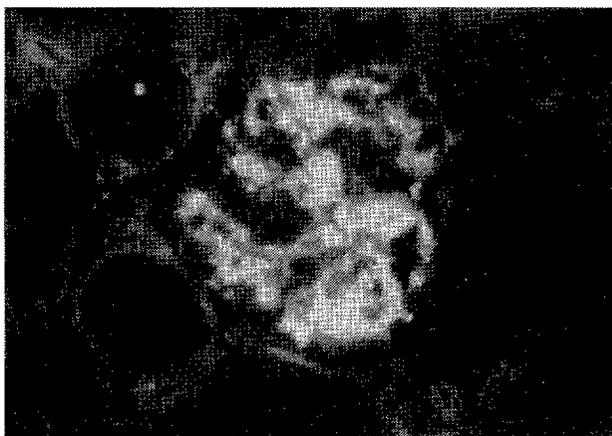


図3. 電顕 ($\times 3,200$)



IgA dominant ではない。本実験がIgA 腎症のモデルとして完成されるためには、IgA dominant の蛍光態度を示すことと、進行性の病変であることが必要であるが、これらの点に関しては、2回接種後の時間をおって現在検討中である。

結 論

1) Cox. B4 virus を Swiss albino マウスに2週間隔で2回接種することによって、軽度の Segmental mesangial proliferation と球状～半球状のPAS陽性 mesangial deposits を伴う糸球体変化が得られた。

2) これは、ヒトIgA 腎症と同様の組織像であり、IgA 腎症の病因としてウイルスが関与している可能性が大きいことが示唆された。

3) しかしこれは、IgA が強く染色されてはいるが、IgA dominant とは言えず、進行性の有無を含めてIgA腎症のモデルとして完成させるには、さらに検討を要する。

文 献

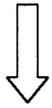
- 1) Morrison, W. L. and Wright, N. G. : Viruses associated with renal disease of man and animals, Prog. Med. Virol., 23: 22-50, 1977.
- 2) 鈴木仁, 加藤一夫, 弓削田英知: ウイルス性腎炎, 日本臨床, 42(6): 1328-1333, 1984.
- 3) 鈴木仁, 加藤一夫, 今野金裕, 三島博, 長尾貞紀, 本泉健: 耳下腺部腫脹を初発症状とし, 血尿および膿尿をきたした9症例—特にウイルス学的検討について—, 小臨, 27(12): 1522-1529, 1974.
- 4) 鈴木仁, 加藤一夫, 冠木幹夫, 松沢長子: 溶血性尿毒症性症候群の1例—特にウイルス学的検討について—, 小臨, 29(5):

785-790, 1976

- 5) 加藤一夫, 弓削田英知, 佐藤康次, 大原信春, 鈴木仁: Parainfluenza Type3 が病因と考えられた急性腎炎の1例, 小臨, 31(12): 2461-2464, 1978.
- 6) 細貝益男, 森秀樹, 弓削田英知, 大原信春, 加藤一夫: 水痘の潜伏期中に発症した急性腎炎の1例, 小臨, 36(10): 2211-2215, 1983.
- 7) Combes, B., Stastny, P., Shorey, J., Eigenbrodt, E. H., Barrera, A., Hull, A. R. and Canter, N. W. : Glomerulonephritis with deposition of Australia antigen-antibody complexes in glomerular basement membrane, Lancet, 2: 234-237, 1971.
- 8) 加藤一夫: Coxsackie B4 virus による実験的腎炎, 日腎誌, 22(3): 24-38, 1980.
- 9) 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: 71-85, 1980.



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)Cox.B4virus を Swiss albino マウスに 2 週間隔で 2 回接種することによって,軽度の Segmental mesangial proliferation と球状~半球状の PAS 陽性 mesangial deposits を伴う系球体変化が得られた。
- 2)これは,ヒト IgA 腎症と同様の組織像であり,IgA 腎症の病因としてウイルスが関与している可能性が大きいことが示唆された。
- 3)しかしこれは,IgA が強く染色されてはいるが,IgA dominant とは言えず,進行性の有無を含めて IgA 腎症のモデルとして完成させるには,さらに検討を要する。