

糸球体腎炎の進展と安定化フィブリン, マクロファージおよび membrane attack complex

牧 淳, 竹村 司, 吉岡加寿夫, 赤野則久, 宮本博介

1. 序言

糸球体腎炎の発症・進展増悪機序におけるマクロファージ (以下Mφと略) やT細胞の関与が注目されている。一方, 糸球体腎炎の進展に対する糸球体内凝固機構の関与は, 多数の動物実験や臨床面での抗凝固療法の有用性から, その存在が確信されている。また最近, 補体終末因子のC5b-9 complexであるmembrane attack complex (以下MACと略)の各種糸球体腎炎に対する関与も考え始められている。

今回我々は, これらの諸因子の各種糸球体腎炎の進展増悪との関係, 特に蛋白尿, 組織障害との関連性, またステロイド (以下ス剤と略) 抵抗性ネフローゼ症候群 (以下ネ群と略) におけるこれら諸因子の関与について検討した。

2. 対象・方法

1) 対象

ス剤抵抗性のネ群として巣状糸球体硬化症 (以下FGSと略) 5例とnon-IgAメサンギウム増殖性腎炎 (以下non-IgA腎炎と略) 5例の計10例, ス剤反応性のネ群として微小変化群 (以下MCNSと略) 20例, 非ネ群として, IgA腎症68例, 紫斑病性腎炎 (以下HSPNと略), non-IgA腎炎23例などを対象として比較検討した。

2) 方法

(1) 抗体: 各種免疫担当細胞の同定に使用した抗体を表1に示した。FITC標識のヤキ抗マウスIgG (Cappel社)あるいはヤキ抗マウスIgM (Cappel社)を2次抗体として用いた。また, 3次抗体にはFITC標識ウサギ抗ヤキIgG (Cappel社)を使用した。

安定化フィブリンおよびその分解産物 (以下

XFbと略)の証明にはモノクロナール抗体DD-3 B 6/22 (マウスIgG, MA6CO, Brisbane, Australia)を使用した。この抗体は, フィブリンおよびその分解産物とのみ反応し, フィブリンノーゲンおよびその分解産物とは反応しない抗体であり, 我々もELISA法にて, その特異性を検討し, 確認した¹⁾。

MACの沈着の証明には, MACに対するモノクロナール抗体 (Minnesota大学 Michael教授より供与)を使用した。2次血清にはXFb, MACとともに正常ヒト血漿で吸収処理したFITC標識ヤキ抗マウスIgGを使用した。

(2) 染色法: 免疫担当細胞の同定はPlatt²⁾の記載した蛍光抗体法三層染色法によった。また, 多形核白血球 (以下PMNと略)の同定はFITC標識抗ヒトlactoferrinを用いた蛍光抗体直接法にて行なった。反応終了後, ethidium bromideにて核染色を施行した。XFb, MACの証明は上記のモノクロナール抗体を使用した蛍光抗体間接法によった。また一部の症例には蛍光抗体二重染色法をも使用した。

(3) 免疫担当細胞の算定および統計学的処理: 既報³⁾のごとく, 糸球体上および間質の蛍光色素陽性細胞の数をパーセントで表現した。有意差の検定および統計学的処理には, student t-test およびYadtsの補正を用いた。

3. 成績

1) 免疫担当細胞の関係について

正常腎4検体の検討ではMφ, T細胞, B細胞はいづれも糸球体内には存在せず, 間質には0.02~0.08%の頻度で認められた。前述した各疾患群における分析結果では, IgA腎症, HSPNとと

もに糸球体内へのMφ, T細胞, B細胞, PMNの浸潤を認めたが, 特にMφは他の細胞と比較して有意 ($P < 0.05$) に高値であった。しかし間質では各細胞間に差は認められなかった。また, 非ネ群 non-IgA腎炎やMCNSにおいても糸球体内, 間質へのMφ, T・B細胞, PMNの浸潤を認めたが, IgA腎炎やHSPNと比較して少数であった。また, ス剤抵抗性ネ群7例の検討では, IgA腎炎やHSPNと同様に, 糸球体内に浸潤している免疫担当細胞はMφが優位であり, IgA腎症, HSPNとはほぼ同数存在し, ス剤反応性MCNSと比較して高値を示した。

次にIgA腎症, HSPNについて糸球体内へのMφの浸潤と1日尿蛋白量, 組織所見, 発症より生検時までの期間との関係について検討した。図1に尿異常の発見から生検までの期間とMφの比率との関係を示した。IgA腎症ではMφの浸潤と生検時期との間には明らかな関連性は認められなかったが, HSPNでは発症から生検時期までの期間が短い症例ほどMφの比率は高値を示した。組織所見とMφとの関係であるが, 両疾患を対比するため, 便宜上, IgA腎症もHSPNのISKDC分類に準じて分類し, 比較検討したが, 明らかな関係は認められなかった。また, 生検時の1日尿蛋白量との相関性も認められなかった。

2) X Fbの関与について

図2にX Fbの蛍光染色像を示す。〔A〕はIgA腎症の腎組織を抗ヒトフィブリノーゲン血清にて染色したものであり, fibrin/fibrinogen related antigen (以下FRAと略)の沈着像を示す。〔B〕は二重染色法で観察した同一糸球体上のX Fbの沈着像を示す。糸球体内の沈着パターンは類似しているが, FRAが糸球体内だけでなく, 間質, ボーマン嚢にも存在しているのに対し, X Fbはそれらの部位には陰性であった。〔C〕と〔D〕はス剤抵抗性のFGSのFRAとX Fbの二重染色像を示す。FRAが糸球体内にびまん性に存在しているのに対し, X Fbはまったく陰性であった。各種腎疾患75症例中の34症例においてX Fbの糸球体上への沈着が認められた。特にIgA腎症,

HSPN, Lupus腎炎, HUSでX Fb陽性例が高頻度であった。しかし, ス剤抵抗性ネ群では, 検討した5例中, X Fb陽性例はnon-IgA腎炎の1例のみであった。次に症例数の比較的多いIgA腎症とHSPN症例について, X Fbの沈着と生検時1日尿蛋白量, 組織像, 発症より生検までの期間とについて比較検討した。X Fbの沈着と発症から生検までの期間との間には, 明らかな関係は認められなかったが, 生検時の1日尿蛋白量とX Fbの沈着頻度との比較では, 両疾患ともに尿蛋白量が高度な症例ほどX Fb陽性例の占める割合が高いという傾向が認められた (図3)。また, ISKDC分類に基づく組織所見とX Fbとの関係では両疾患ともに重症度の高い症例にX Fb陽性例が多い傾向が認められた。

3) MACの関与について

図4にIgA腎症におけるMACの蛍光抗体染色像を示す。MACは糸球体内ではメサンギウム領域と基底膜に沿って沈着が認められ, また糸球体以外では小血管壁と尿細管基底膜に沿って顆粒状の沈着が認められた。また, 他の補体成分と沈着部位の異同を検討したが, MACは糸球体内ではC3, C5, C9とほぼ同一部位に沈着していたが, 尿細管基底膜ではC5, C9とは一致し, C3とは一致する場合と一致しない場合が認められた。またMACは, 上記2疾患でも, MPGN, MN, Lupus腎炎などの病型や硝子化した糸球体に認められた。

次に, IgA腎症17例, HSPN7例について, MACの沈着と1日尿蛋白量の程度との関係を検討したが, 明らかな関連性は認められなかった。また5例のス剤抵抗性ネ群の検討でもMACの沈着と尿蛋白量は相関せず, またス剤反応性ネ群と比較しても沈着頻度に差は認められなかった。

4. 考 察

ラットの抗GBM腎炎においてMφがhypercellularityと蛋白尿に関連しているという報告⁴⁾があるが, ヒト糸球体腎炎でのMφの役割については不明な点が多い。

今回我々は, Mφと1日尿蛋白量や組織障害度

とを比較検討したが明らかな関係は認められなかった。しかし、尿異常の発見から生検までの期間と糸球体内のMφの数を比較してみると、IgA腎症では明らかな関係は認められなかったが、HSPNでは発症から生検時期までの期間が短い症例ほどMφの比率は高値を示した。このことはIgA腎症では免疫学的侵襲が持続的に生じているのに対し、HSPNでは病初期にのみ強く加わることによるのではないかと推察された。また、スネ抵抗性ネ群での検討でも、糸球体内に浸潤するMφの比率はMCNS、非ネ群non-IgA腎症と比較して高値を示したが、尿蛋白量、組織障害度とは明らかな関係は認められなかった。このような所見から、Mφの腎組織への浸潤が腎炎の病期や病型とも密接な関係があるのではないかと考えられた。また、糸球体内におけるMφの比率は、IgA腎症、HSPNで高値を示したが、Mφには組織内のICなどを貪食する役割や組織内でprocoagulantやprothrombinaseを放出して凝固系を活性化させるなどの多様な作用を有しており、どのような機序でMφが腎障害をもたらしているのかは今後多面的に考察してゆく必要があると思われる。

一方、腎炎の進展増悪に関与する糸球体内凝固機構の存在は以前より周知されていたが、蛍光抗体法で確認されるFRAは、フィブリノーゲン、フィブリンおよび両者の分解産物を含んでおり、糸球体内凝固機構の直接的な証明とはなり得なかった。しかし、今回我々は、フィブリンおよびその分解産物とのみ反応するモノクローナル抗体を使用し、糸球体内凝固を直接的に証明した。特に、IgA腎症、HSPN、Lupus腎炎、HUSなどの病型で高頻度にXFb陽性例が認められた。しかし、スネ抵抗性ネ群では、明らかな相関は認められなかった。IgA腎症とHSPN症例について、尿蛋白量が高度な症例ほどXFbの陽性例が多いという傾向が認められた。また組織所見との比較でも、両疾患ともに重症度の高い症例にXFb陽性例が多い傾向が認められた。

MACについては、尿蛋白量、組織障害と沈着

頻度との明らかな関係は認められなかった。

5. 結論

1) IgA腎症とHSPNでは、糸球体内に浸潤している免疫担当細胞はMφが優位でありnon-IgA腎炎、MCNSと比較して高値であった。

2) 糸球体内のMφの数は、IgA腎症、HSPNとともに、尿蛋白量、組織分類とは関係を認めなかったが、HSPNでは、発症早期な症例ほどMφの数が高値を示した。

3) XFbの糸球体内への沈着は、IgA腎症、HSPN、Lupus腎炎、HUSで高頻度に認められた。

4) XFbの沈着は、IgA腎症、HSPNにおいて、尿蛋白量や組織障害が高度な症例ほどXFb陽性例が多い傾向を示した。

5) スネ抵抗性ネ群でのこれらの諸因子の検討では、糸球体内に浸潤している免疫担当細胞は、IgA腎症やHSPNと同様にMφが優位であり、その数も高値を示した。しかし、XFb、MACとの明らかな関連性は認められなかった。

6. 参考文献

- 1) Takemura, T., Yoshioka, K., Akano, N., Miyamoto, H., Matsumoto, K. and Maki, S.: Glomerular deposition of cross-linked fibrin in human kidney diseases. *Kidney Int.* in press.
- 2) Platt, J., LeBiem, T. and Micheal, A.F.: Interstitial mononuclear cell population in renal graft rejection. Identification by monoclonal antibodies in tissue sections. *J. Exp. Med.* 155;17-30, 1982.
- 3) 竹村 司, 吉岡加寿夫, 赤野則久, 宮本博介, 牧 淳: ヒト腎組織における免疫担当細胞の同定. *日腎誌*, 掲載予定
- 4) Schreiner, G.F., Cotran, R.S., Pardo, V. and Unanue, E.R.: A mononuclear cell component in experimental immunological glomerulonephritis.

表1. 各種免疫担当細胞の同定に使用した抗体

Antibodies			
Antibodies	Ig class	Specificity	Source
Mo 2	Mouse IgM	Macrophage/Monocyte	Coulter
FMC 32	IgG ₁	Macrophage/Monocyte	Australian Mo Development
T1B	IgG _{2a}	T cell	Coulter
T4	IgG ₁	helper/inducer T cell	Coulter
T8	IgG ₁	cytotoxic/suppressor T cell	Coulter
IL-2R	IgG ₁	IL-2R ⁺ cell	Becton-Dickinson
Leu 12	IgG ₁	B cell	Becton-Dickinson
anti-lactoferrin	Goat IgG	PMN	Cappel

Relationship between XFb deposition and proteinuria

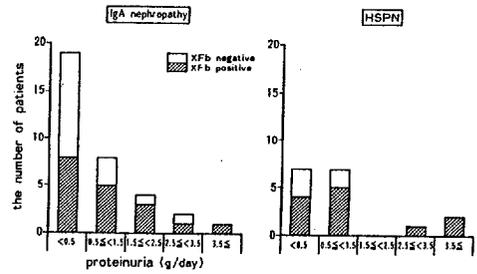


図3. 生検時の1日尿蛋白量とXFbの沈着頻度

Relationship between macrophage population and duration of illness before biopsy

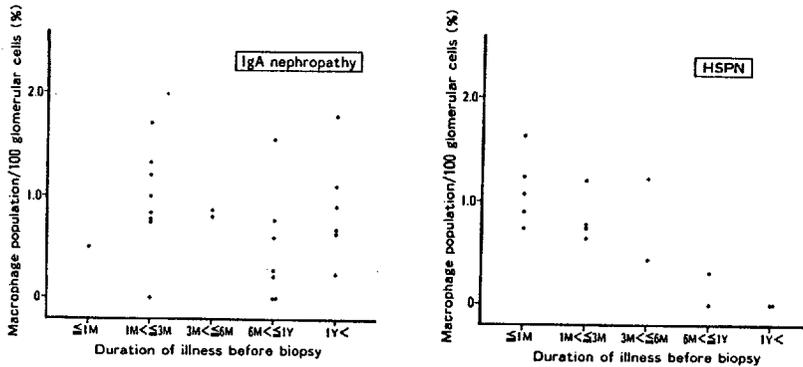


図1. 尿異常の発見から生検までの期間とマクロファージの数との関係

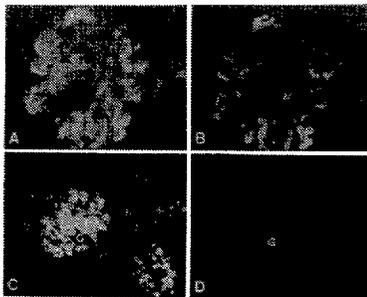


図2. XFbの蛍光染色像

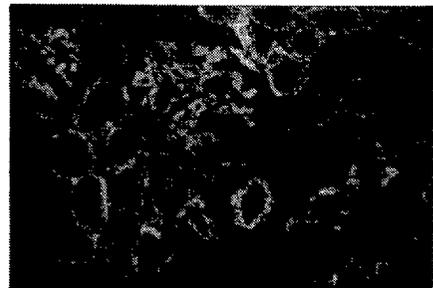
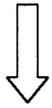


図4. MACの蛍光染色像



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



5, 結論

- 1) IgA 腎症と HSPN では, 糸球体内に浸潤している免疫担当細胞は M が優位であり non - IgA 腎炎, MCNS と比較して高値であった。
- 2) 糸球体内の M の数は, IgA 腎症 HSPN とともに, 尿蛋白量, 組織分類とは関係認めなかったが, HSPN では, 発症早期な症例ほど M の数が高値を示した。
- 3) XFb の糸球体内への沈着は, IgA 腎症, HSPN, Lupus 腎炎, HUS で高頻度に認められた。
- 4) XFb の沈着は, IgA 腎症, HSPN において, 尿蛋白量や組織障害が高度な症例ほど XFb 陽性例が多い傾向を示した。
- 5) ス齊低抗性ネ群でのこれらの諸因子の検討では, 糸球体内に浸潤している免疫担当細胞は, IgA 腎症や HSPN と同様に M が優位であり, その数も高値を示した。しかし, XFb, MAC との明らかな関連性は認められなかった。