

ウイルス性実験腎炎の研究

— IgA 腎症のモデルとして —

鈴木 仁、加藤 一夫、弓削田英知、鈴木 順造、神山 諭、

樋口 悦美、久米 一成、野沢ルリ子、川崎 幸彦

要約：マウスにCoxsackie B₄ ウイルスを1カ月に1度断続的に接種し、メサングウム増殖、メサングウム沈着、基底膜病変、半月体形成、間質の増殖を有する実験的慢性腎炎を作成した。その組織像はヒトIgA腎症に極めて類似しており、IgA腎症の病態解明に大きく寄与する実験モデルであると考えられる。

見出し語：IgA腎症、Coxsackie B₄ ウイルス、実験的腎炎

はじめに

私たちはこれまでCoxsackie B₄(Cox. B₄) ウイルスをSwiss albino マウスに投与し、IgA腎症のモデルになる可能性のある病変を得た。しかし、メサングウム増殖やメサングウム領域の沈着物は一過性の変化と考えられ、進行性の腎病理組織像は認められなかった。

今回は、1カ月に1度、マウスにウイルスを接種し、4カ月齢(3回接種)から9カ月齢(8回接種)まで経時的に腎組織を採取し、進行性の組織像が得られるかどうかを検討した。

材 料

I) 実験動物。

Swiss albino マウス、4週齢、雌、60匹。

II) ウイルス液とコントロール液。

a) 接種用ウイルス液：完全無血清培地(Cosmedium-001、コスモバイオ製)で増殖させたVero細胞にCox. B₄ ウイルスを接種し、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°C~4°Cで行った。融解したウイルス液を3,000 rpmで20分間遠心し、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-80°Cに凍結保存し、使用時に10⁷ TCD₅₀/0.1 mlに調整した。

b) 抗Cox. B₄ 血清作成用ウイルス液：接種用ウイルス液と同様に操作して得たウイルス液を、蔗糖濃度勾配法にて精製し、-80°Cに凍結保存し、使用時10⁸ TCD₅₀/0.1 mlに調整した。

c) コントロール液：血清無添加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、上清を得て使用時まで-80°Cに凍結保存し、コントロール液とした。

III) 抗Cox. B₄家兔血清。

抗血清作成用ウイルス液を家兔の耳静脈に10⁹ TCD₅₀ ずつ週2回、5週間にわたり接種して免疫し、中和抗体価10,248倍の血清を得

福島県立医科大学小児科学講座

Fukushima Medical College, Department of Pediatrics

た。

IV) FITC標識抗マウスIgG、A、M、C₃血清。

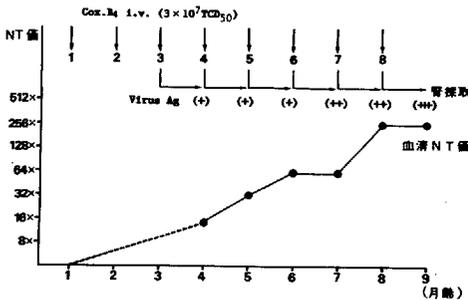
Cappel社製FITC標識抗マウスIgG、IgA、IgM、C₃ヤギIgG fractionを使用した。

V) 抗ウサギIgG血清。

Cappel社製FITC標識抗ウサギIgGヤギIgG fractionを使用した。

方 法

マウスに尾静脈より1カ月に1度ウイルス接種液を0.3 ml (10^7 TCD₅₀ / 0.1 ml) ずつ静注した。図1のスケジュールのごとく、4カ月齢(3回接種)から9カ月齢(8回接種)まで、いずれも最終接種後1カ月目にクロロホルム麻酔下で心穿刺にて採血後屠殺し、腎組織を採取した。光顕は20%ホルマリン固定後、HE、PAS染色にて検討した。電顕はグルタル、1%オスミウム酸固定後、酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛による二重染色にて検討した。蛍光抗体法は凍結切片を冷アセトン固定し、FITC標識抗マウス血清を用いて、IgG、A、M、C₃を直接法にて検索した。又、非働化した抗Cox. B₄家兎血清とFITC標識抗ウサギIgGヤギ血清を用いた間接法でCox. B₄ウイルス抗原を検索した。心穿刺にて得られたマウス血清は、非働化後中和抗体価を測定した。



(図1)

コントロール群も同様のスケジュールでコントロール液を接種し、同様の処置を行い検

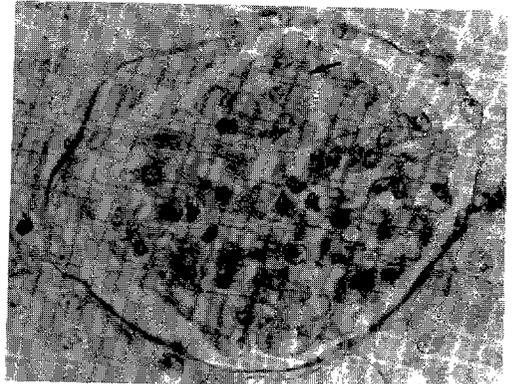
討した。

結 果

I. 血清中和抗体価 (NT 価) は図1に示したごとく、4カ月齢(3回接種)で16倍であり、以後しだいに上昇し、8カ月齢(7回接種)および9カ月齢(8回接種)で256倍であった。

II. 組織学的所見

a) 光顕: 4カ月齢(3回接種)ですでに軽度のfocal segmental なメサンギウム基質の増加と、メサンギウム領域にPAS陽性の沈着物を認めた。経過とともに沈着物はglobalにその量を増し、一部の糸球体では半球状~球状の巨大なものも認められるようになった(図2)。係蹄壁は9カ月齢(8回接種)で不規則にPASに濃染する部分やcollaps が存在した。

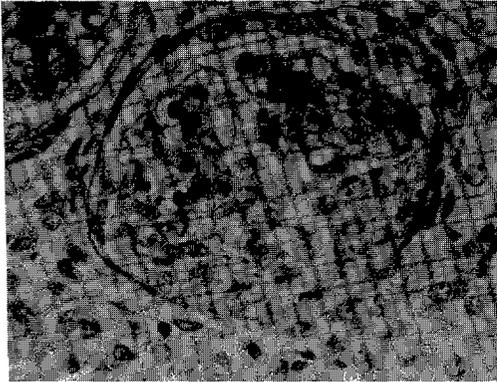


(図2)

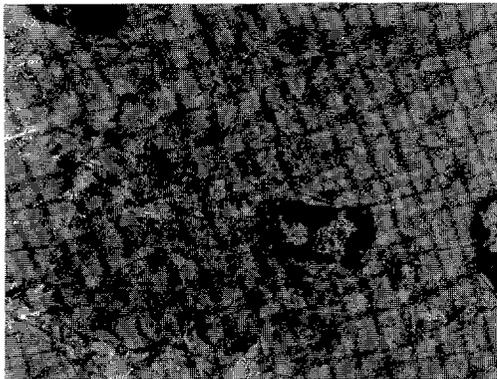
又、6カ月齢(5回接種)でcrescentの初期像と考えられるBowmanのう上皮の立方化が認められ、9カ月齢(8回接種)では1/2周におよぶcellular crescentを生じた(図3)。尿管の萎縮や単核球の浸潤などの間質の変化は、6カ月齢(5回接種)より部分的に認められ、castも散見された。

b) 電顕: 光顕所見に応じて、初期にはmesangial proliferationとmesangial electron dense depositを認めた。後期にはelectron dense depositは大量となり、一部はpar-

amesangium から内皮下に、ごく一部は上皮下にも存在していた (図4)。又、GBM の部分的な肥厚、菲薄化などの変化も認められた (図5)。



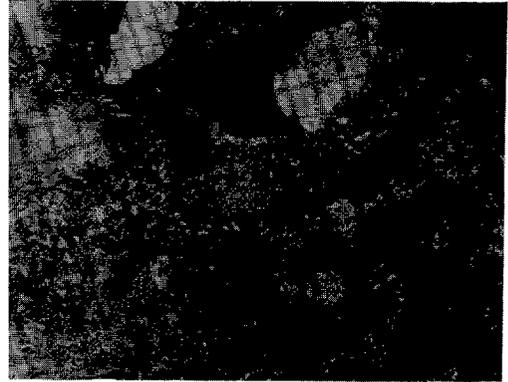
(図3)



(図4)

c) 蛍光抗体法所見 (図6) : IgG は4カ月齢 (3回接種) より2 (+) と優位に染色され、6カ月齢 (5回接種) から8カ月齢 (7回接種) で3 (+) と最も強く染色された。IgA は4カ月齢 (3回接種) では (-) であったが、5カ月齢 (4回接種) で1 (+)、7カ月齢 (6回接種) で2 (+)、9カ月齢 (8回接種) で3 (+) と (図7)、IgG と同等に染色されるようになった。図には示さなかったが、IgM は全経過を通じて1 (+) ~ 2 (+) に染色され、コントロール群よりも強く染色された。C₃ は各々の月齢のマウス群の一部のメ

サンギウム領域に1 (+) 程度に染色されたが、コントロール群のそれと比較して差は認められなかった。



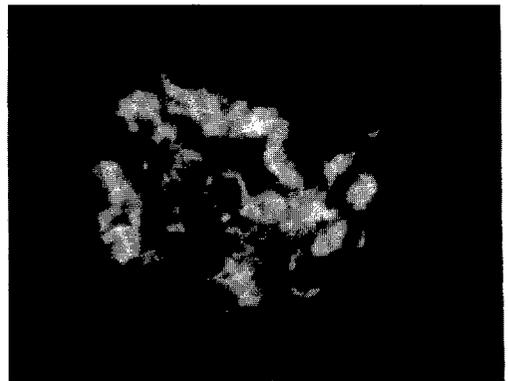
(図5)

蛍光抗体法所見

		Cox. B ₄ i.v. (3 × 10 ⁷ TCD ₅₀)								
		1	2	3	4	5	6	7	8	腎採取
IgG	Ex.			2+	2+	3+	3+	3+	2+	
	Cont.			-	-	-	+	-	+	
IgA	Ex.			-	+	+	2+	3+	+	
	Cont.			-	-	-	-	+	-	
B ₄ Ag	Ex.			+	+	+	2+	2+	3+	
	Cont.			-	-	-	-	-	-	

1 2 3 4 5 6 7 8 9 (月齢)

(図6)



(図7)

Cox. B₄ 抗原は4カ月齢 (3回接種) より

1 (+) にメサングウム領域に染色され、しだいにつよくなり、9カ月齢(8回接種)では3 (+) に染色された(図8)。

考 察

ウイルスは自然界に広く存在し、ヒトは常にその侵襲にさらされており、特に腎はウイルス親和性を有していると考えられることから、ウイルス血症を介して様々な影響をうける。一方 IgA 腎症の成因としての抗原の解明については、今まで自己免疫、ウイルス、細菌、食物抗原などが検討されているが、いずれも論議のあるところである。私たちはウイルス感染が IgA 腎症の成因あるいは増悪因子として大きく関与していると考え、これまで Cox. B₄ ウイルスをマウスに接種し、その病理学的所見について報告してきた。しかし、得られた組織像は IgA 腎症によく類似しているものの、蛍光抗体法で IgA 優位に染色されないこと、組織変化が進行性ではなく一過性と考えられることなどの問題点があった。

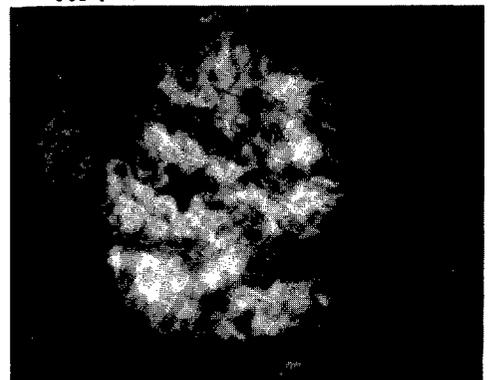
本実験ではこれらのことをふまえて、接種間隔を1カ月として繰り返しウイルス接種を行い検討した。その結果得られた病変は、多量のメサングウム領域への免疫複合体と思われる沈着物と、基底膜病変、半月体の形成、間質の増殖など進行性慢性糸球体腎炎の像であった。これらの変化は既知の慢性腎炎と比較すると、IgA 腎症に極めて類似しており、蛍光抗体法所見でも8カ月齢(7回接種)で IgA が IgG と同等に染色されることから、IgA 腎症の病態解明に大きく寄与する実験モデルであると考えられた。

本実験の特徴は、既知の広く自然に存在するウイルスを用いたこと、実験操作が非常に単純かつ簡単であること、得られる病変が程度の差はあるもののすべての実験群に生ずることである。今後の課題として残されていることは、IgA 優位の染色態度を早期より得るための条件検索と、血中および尿中のパラメーターの解析であり、現在検討をすすめてい

るところである。

文 献

- 1) 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、P 141—144、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61年度研究業績報告書、P 157—160、1987。
- 3) 鈴木 仁、加藤一夫、弓削田英知、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62年度研究業績報告書、P 146—149、1988。
- 4) 加藤一夫：Coxsackie B₄ virus による実験的腎炎、日腎誌、22(3)：233—247、1980。
- 5) 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



(図8)



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



要約:マウスに CoxB4 ウイルスを 1 ヶ月に 1 度断続的に接種し、メサングウム増殖、メサングウム沈着、基底膜病変、半月体形成、間質の増殖を有する実験的慢性腎炎を作成した。その組織像はヒト IgA 腎症に極めて類似しており、IgA 腎症の病態解明に大きく寄与する実験モデルであると考ええる。