

ウイルス性実験腎炎の研究

—IgA腎症のモデルとして—

小児腎臓疾患の進行阻止に関する研究 進行阻止に関する免疫・遺伝・病態生化学的研究

鈴木 仁、久米一成、加藤一夫、弓削田英知、鈴木順造、神山諭、赤間英典、熊田和夫

マウスに Cox. B4 ウイルスを1ヶ月に1度、5ヶ月齢まで静注し、その後無処置として1ヶ月毎に腎組織を観察した。8ヶ月齢をピークとするメサンギウム増殖、PAS陽性物質沈着、EDD沈着などの病変を得、また、10ヶ月齢でメサンギウムへのIgA 優位沈着を認めた。これらの組織像は、ヒトIgA腎症に類似した腎病変であると考えられた。

IgA腎症、Coxsackie B4 Virus, 実験的腎炎

〈研究方法〉

I 材料

- 1) 実験動物：Swiss albino マウス、1ヶ月齢、雌、70匹
- 2) 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 Coxsackie B4 (Cox. B4) ウイルスを接種し、50~70% cytopathic effect が得られた時点で採取し、-80℃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℃で行った。融解したウイルス液を3,000 rpmで20分遠心後、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。その後、-80℃に凍結保存し、使用時に 10^7 TCD₅₀/0.1 ml に調整した。
- 3) コントロール液：完全無血清培地で増殖させた Vero 細胞を、培養液ごと凍結・融解し、ウイルス液精製と同様の操作を行ない、上清を得た。これを使用時まで凍結保存し、コントロール液とした。
- 4) FITC 標識血清：FITC 標識抗マウス IgG、IgA、IgM、C3 ヤギ血清 (Cappel社製) を使用した。ウイルス抗原の検索は、蔗糖濃度勾配

法にて精製したウイルス液で免疫して得た家兎血清を一次抗体とし、FITC 標識抗ウサギ IgG ヤギ血清 (Cappel社製) を二次抗体とした。

II 方法

マウスに尾静脈より1ヶ月に1度ウイルス液 (35匹) およびコントロール液 (35匹) を0.3 ml ずつ静注した。1ヶ月齢から5ヶ月齢までは静注、その後は無処置で観察し、6ヶ月齢から12ヶ月齢まで1ヶ月毎に5匹ずつ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。腎組織は、光顕 (HE、PAS 染色)、蛍光抗体法 (IgG、IgA、IgM、C3、ウイルス抗原) および電顕 (酢酸ウラニルとクエン酸鉛の二重染色) にて検討した。心穿刺にて得られたマウス血清は、radial immunodiffusion plate (Serotec 社製) を用いて血清 IgG、IgA を測定、また、非働化後マイクロタイター法で中和抗体価を測定した。尿蛋白・潜血反応はマルチスティックス (マイルス・三共) によって検索した。

〈結果〉

I 組織学的所見

a) 光顕

6ヶ月齢では、5匹中4匹はびまん性、1匹は巣状でそれぞれ分節状にメサンギウムの増殖

福島県立医科大学小児科学講座

Hitoshi Suzuki, Kazunari Kume, Kazuo Kato, Eichi Yugeta,
Junzo Suzuki, Satoru Kamiyama, Hidenori Akama, Kazuo Kumada
Fukushima Medical College, Department of Pediatrics

2(+), 8、9ヶ月齢ではさらに強く3(+)で染色されたが、10ヶ月齢以降は次第に弱くなった。IgAは、6、7ヶ月齢でメサングウム領域に1(+), 8、9ヶ月齢で2(+), 10ヶ月齢で3(+)(Fig. 4), と次第に強く染色されたが、11ヶ月以降は減弱した。IgMは、全経過を通して(+)-2(+)で染色された。ウイルス抗原は、10ヶ月齢まで、主としてメサングウム領域に2(+)に染色され、以後、次第に減弱した。

コントロール群では、IgMの2(+)を除けばいずれも1(+)-以下、ウイルス抗原は経過を通して陰性だった。

II 血清IgG、A値の推移

血清IgG値は、コントロール群では、加齢とともに上昇するのに比し、実験群では、最初から高値であり、8ヶ月齢頃をピークとして以後徐々に低下した。コントロール群の血清IgA値は、IgG値と同様に加齢とともに上昇したが、実験群では、8~10ヶ月齢をピークとして以後低下した。8、9ヶ月齢では、コントロール群に比し、有意に高値だった($P < 0.05$)(Fig. 5)。

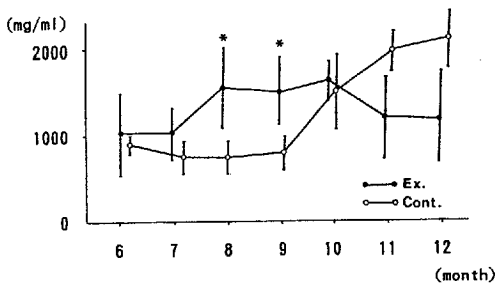


Fig. 5 Comparison of s-IgA level between exercised and control groups of mice. * $p < 0.05$

III ウイルス抗体価の推移 (Fig. 6)

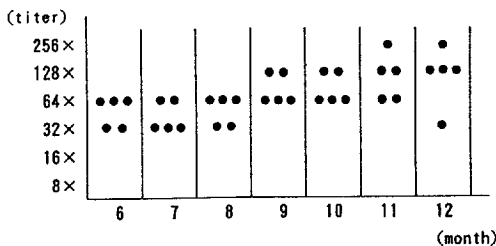


Fig. 6 Neutralization titer of sera of exercised mice

血清中和抗体価は、ウイルス接種群では、6

~8ヶ月齢では32~64倍であり、以後次第に上昇し、11ヶ月齢では256倍に達する例もみられた。12ヶ月齢になると32倍に低下する例も存在した。コントロール群では、いずれの月齢においても、2倍以下であった。

IV 尿蛋白・潜血反応

屠殺時のスポット尿で行った蛋白及び潜血の定性反応では、6ヶ月齢より潜血と蛋白が明らかに陽性となり、以後持続した。コントロール群では7~8ヶ月齢より、軽度の蛋白尿がみられたが、明らかな血尿はなかった。

〈考察〉

IgA腎症の成因となり得る抗原系に関しては、従来より食物抗原、ウイルス、細菌、自己免疫などが検討され、種々の実験モデルが報告されてきた。私達はウイルス感染がIgA腎症の成因に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て得られる腎の組織学的所見について報告1)~4)してきた。その結果、本ウイルスを1ヶ月に1回静脈内接種することにより、3) 5ヶ月齢頃からメサングウム増殖、さらに時期が進むと半月体形成、基底膜病変、間質増殖などを伴う進行性の糸球体腎炎の像を得たが、蛍光所見では、IgAとIgGはほぼ同程度の染色態度であり、IgA優位の所見は得られなかった。一方、1ヶ月毎の腹腔内接種4)では、IgAが優位に染色されるものの、光顕上の変化は静脈内接種群に比し軽く、また、接種回数がふえる9ヶ月頃より、アミロイド沈着もみられるようになった。そこで今回は、1ヶ月に1度ずつ静脈内接種を行い、腎病変が明らかになる5ヶ月の時点で接種を中止し、以後は無処置で観察することにより、その後の腎病変の経時的推移を検討した。

その結果、光顕上の腎病変はウイルス投与中止後2~4ヶ月に最も強くなり、抗原刺激中断後も一定期間は、腎病変が進行することを知った。ウイルス中和抗体価がウイルス投与中止後も徐々に上昇することを併わせて考えると、反復投与されたウイルスは、投与中止後も数ヶ月

性変化を呈し、5匹中4匹にメサングウム領域のPAS陽性沈着物を認めた。7ヶ月齢では増殖性変化は、6ヶ月齢とほぼ同程度であったが、5匹中4匹にメサングウム領域および係蹄内皮側にPAS陽性沈着物を認め、6ヶ月齢に比し、数も多くより大型となった。

8ヶ月齢では、全例にメサングウムの増殖が認められ、一部の糸球体には係蹄壁のdouble trackを認めた(Fig.1矢印)。メサングウム領域及び係蹄内皮側には、さらに大型で多量のPAS陽性沈着物が見られた(Fig.2矢印)。

9、10ヶ月齢では増殖性変化は次第に改善してきたが、PAS陽性沈着物は、その数は減じたものの依然として大型で存在した。11、12ヶ月齢になると増殖性病変はほとんど見られず、沈着物もあまり目立たなくなった。



Fig. 1

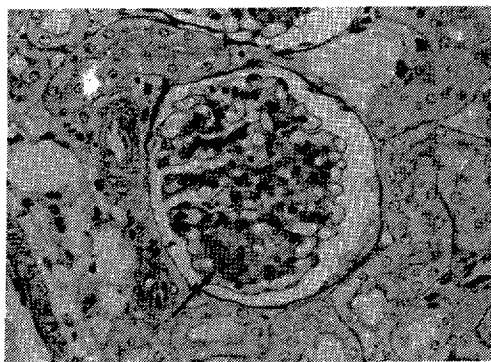


Fig. 2

b) 電顕

7ヶ月齢では、メサングウム領域からパラメサングウム領域にかけて多量の electron dense

deposits (EDD)が存在し、一部上皮下にも認められた(Fig.3)。8ヶ月齢では、EDDは、さらに大型となり、メサングウム~パラメサングウム~内皮下領域に多量に認められた。糸球体基底膜は部分的に不規則な肥厚を呈し、一部に内皮下腔の拡大を認めた。10ヶ月以降になるとEDDは減少した。



Fig. 3

c) 蛍光抗体法 (Table. 1)

IgGは6、7ヶ月齢でメサングウム領域に、

		6M	7M	8M	9M	10M	11M	12M
IgG	Ex.	2(+)	2(+)	3(+)	3(+)	2(+)	(+)	(±)
	Cont.	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(±)	(-)
IgA	Ex.	(+)	(+)	2(+)	2(+)	3(+)	2(+)	(+)
	Cont.	(-)	(-)	(±)	(-)	(±)	(-)	(-)
IgM	Ex.	(+)	(+)	2(+)	2(+)	2(+)	2(+)	(+)
	Cont.	(+)	(+)	(+)	(+)	2(+)	2(+)	(+)
Cox.B ₄ Ag.	Ex.	2(+)	(+)	2(+)	2(+)	2(+)	(+)	(±)
	Cont.	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Table. 1 The summary of immunofluorescent findings obtained from exercised and control groups of mice.
(-):negative, (±):slight, (+):mild
2(+):moderate, 3(+):marked

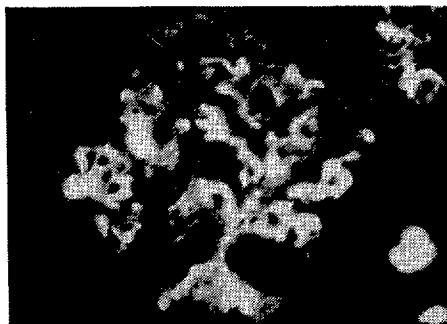


Fig. 4

間は免疫原性を有することが示唆された。

今回の実験で血清IgA値は8、9ヶ月齢でコントロール群に比し、有意に高値となり、また、10ヶ月齢でメサングウムへの優位なIgA沈着を認めたと、IgA腎症のモデルを確立させるには、IgA優位沈着がもっと早期に得られ、さらに、より活動的な病変が長期間持続するような条件設定を検索する必要がある。いずれにせよ、ウイルスの遷延感作という考えのもとに、自然界に広く存在する既知のウイルスを月に1回ずつ接種するという簡単な操作で以上のようなヒトIgA腎症に類似した病変が得られたことは意義深いと考える。

〈文献〉

- 1) 加藤一夫：Coxsackie B4 virus による実験的腎炎、日腎誌、22(3)：233-247、1980.
- 2) 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.
- 3) 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：ウイルス性実験腎炎の研究-IgA腎症のモデルとして-昭和63年度厚生省心身障害研究、小児腎疾患の進行阻止と長期管理のシステム化に関する研究、p 25 - 28、1989.
- 4) 鈴木仁、加藤一夫、弓削田英知、鈴木順造、神山諭、樋口悦美：ウイルス性実験腎炎の研究-IgA腎症のモデルとして-平成元年度厚生省心身障害研究、小児腎疾患の進行阻止と長期管理システム化に関する研究、p 14 - 17、1990.



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



マウスに Cox.B4 ウイルスを 1 ヶ月に 1 度、5 ヶ月齢まで静注し、その後無処置として 1 ヶ月毎に腎組織を観察した。8 ヶ月齢をピークとするメサングウム増殖、PAS 陽性物質沈着、EDD 沈着などの病変を得、また、10 ヶ月齢でメサングウムへの IgA 優位沈着を認めた。これらの組織像は、ヒト IgA 腎症に類似した腎病変であると考えられた。