

学位論文題名

小児期膜性増殖性糸球体腎炎 I 型における  
糸球体障害の成因に関する研究

学位論文内容の要旨

I. はじめに

膜性増殖性糸球体腎炎 (membranoproliferative glomerulonephritis ;MPGN)は低補体血症を呈すると共に糸球体にメサンギウム増生による毛細血管係蹄壁の二重化や分葉化などを認めることが特徴で、3型に分けられている。現在、腎炎の多くは病因不明であるが何らかの免疫複合体 (IC)の関与により発症すると考えられている。実験的IC型腎炎ではICが糸球体へ沈着する際、ICと毛細血管係蹄壁との静電氣的相互関係が重要であり、沈着したICが補体系を活性化すると、生物活性因子が生じ、多形核白血球 (PMN)をはじめとする炎症細胞の浸潤やmediatorの産生を促進し、糸球体障害が惹起されることが明らかされている。また、糸球体障害の重要な指標である蛋白尿の発症には主に糸球体基底膜 (GBM) に存在する陰性荷電barrierの破綻が関与していることも示唆されている。

従来、MPGNは主に低補体血症が注目され検討がなされてきたが、本研究においては実験腎炎における糸球体障害の発症機序に関するいくつかの事実を踏まえ、MPGN type Iにおける糸球体障害の成因について検討する。

II. 対象

昭和48年4月より昭和63年3月までの15年間に腎生検によりMPGN type Iと診断された小児の症例は26例であった。それらのうち腎組織の利用が可能な症例を対象とし以下の検討を行った

III. 方法

1. 臨床検査 ; 腎生検前および経過中に検尿、血清学的検査、生化学的検査などを定期的に行った。
2. 光顕観察はHE,PASおよびPAMの各標本について行った。さらに、18症例につ

いてはHE 標本にて1糸球体あたりのPMNを数えた。

3. 蛍光抗体法はcryostatにより薄切した4uの凍結切片をIgG,IgA, IgM,C3,C4,C1q, およびFibrinogen に対する各FITC標識抗体 (Boehring社,あるいはCappel社) を用い染色し蛍光顕微鏡にて観察した。さらに、IgGの糸球体への沈着強度が1+以上の5症例ではヒトIgGのサブクラスについて蛍光抗体間接法により観察した。一次抗体にはWHOより提供された各サブクラスのマウスモノクローナル抗体 (MoAB) であるIgG1MoAB(HP6069)、抗IgG2MoAB(HP6014)、抗IgG3MoAB(HP6051)、抗IgG4MoAB(HP6101)を用い、二次抗体にはFITC標識ヤギ抗マウス $\gamma$ -globulin 抗体 (Cappel社) を用いた。
4. 通常電顕観察のために腎組織を2%グルタルアルデヒド液と1%オスミウム液で固定後エタノール脱水およびアセトン置換をしEpon812に包埋した。超薄切切片を作製し、酢酸ウラニウムとクエン酸鉛の二重染色をし電顕で観察した。
5. GBMにおける陰性荷電部位 (anionic sites:AS)観察のためにPLP固定組織を用い、0.5% polyethylenimine(PEI,M.V.1200,Polyscience社) — 0.1 M cacodylate buffer(pH7.4, 400mOsm)にてSchurerらの方法に準じて4℃30分間染色し、その後通常電顕と同様の方法でブロックを作製し、超薄切片をクエン酸鉛で染色後電顕にて観察した。GBMのAS数は50000倍拡大写真において、各症例最低14視野以上の外透明層におけるAS数について測定し、最終的にGBM1000nmあたりのAS数として表現した。
6. 血清IgG サブクラス濃度は19例の腎生検時血清について蛍光抗体法に用いたのと同じIgG サブクラスに対するMoABを使用しELISA(石坂らによる方法) で測定した。

#### IV. 結果

1. 血清C3の値は腎生検時、25例中15例が低下を示した。全経過では26例中25例(96%)が低下示した。
2. 1糸球体におけるPMN数は発症後1年未満に腎生検が実施された11症例では $3.6 \pm 2.6$ ケ (mean + S.D.)であり、発症後1年以後腎生検が行われた7症例の $1.1 \pm 1.3$ より有意に増加していた ( $p < 0.05$ )。また、1糸球体あたりのPMN数と血清C3の値との間に有意の負の相関を認めた ( $r = -0.62, p < 0.05$ )。
3. 蛍光抗体法の実施できた26例全例にC3の糸球体における沈着が認められ、その強度と血清C3値との間には有意の負の相関を認めた( $r = -0.64, p < 0.01$ )。また、1糸球体あたりのPMN数とC3の沈着強度との間には有意の正の相関を認めた ( $r = 0.48, p < 0.05$ )。
4. IgGの沈着強度が1+以上であった5症例ではIgG3だけがIgGと同様の沈着所見を示し、他のサブクラスは陰性ないし痕跡であった。
5. 血清IgGサブクラスの値ではIgG3が $170 \pm 128$  mg/dlと正常対照群の $78 \pm 29$  mg/dlに比し高値の傾向を示し、19例中8例(42.1%)は正常対照の+2SDより

も高値であった。他のサブクラスでは高値を認めなかった。

6. GBM1000nm 当たりのAS数は $18.4 \pm 2.8$ ケで正常対照群の $21.6 \pm 1.6$ ケに比し有意に減少していた( $p < 0.01$ )。また、PMNが直接に接していたGBMにおけるAS数は $16.8 \pm 2.9$ ケであったのに対し、接していないGBMにおいては $18.9 \pm 2.6$ と有意に減少していた ( $p < 0.01$ )。

## V. 考察

血清C 3 値と糸球体のC 3 の沈着強度との間に有意の負の相関を認めたことはC 3 の沈着が血清C 3 の低下に関与している可能性が考えられた。また、C 3 の沈着強度と1糸球体あたりのPMN数と間に有意の正の相関を認めたことは補体活性に伴いPMNが走化性因子と免疫粘着作用により炎症局所に集積するという実験腎炎の成績に対応する結果と考えられた。IgGのサブクラスのうちIgG3が圧倒的優位に糸球体に沈着し、血清IgG3は増加傾向を示した。Ig G3はpIが8.2-9.0とcationicであり、補体結合能を有する。一方、PMNや単球の表面にはIg G3のreceptorが存在している。これらのことから、本症で何らかの抗原刺激により産生されたIg G3を抗体とするICは、anionic moietyに富むGBMへの沈着に有利であり、また補体の活性化やPMNなどの炎症細胞の浸潤により組織障害を惹起しうることが推測された。また、本症の患者でGBMにおけるAS数が有意に減少していたことはMPGN type 1の蛋白尿の発症にGBMのAS数の減少が関与していることが示唆され、PMNが直接接しているGBMにおけるAS数がさらに減少していたことはPMNがより直接的にGBMのcharge barrierを障害しているのを示唆している所見であると考えられた。以上のようにMPGN type 1の糸球体障害の発症においても実験腎炎で明らかにされた障害発症機序が関与している可能性が示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 本 脩 三

副 査 教 授 吉 木 敬

副 査 教 授 小 池 隆 夫

## 学 位 論 文 題 名

### 小児期膜性増殖性糸球体腎炎 I 型における

### 糸球体障害の成因に関する研究

膜性増殖性糸球体腎炎I型(MPGN type I)は低補体血症を呈すると共に、病理組織学的にはメサングウムの増生による糸球体毛細血管係蹄の分葉化とmesangial interpositionを特徴とする。これまで病因との関連で主に低補体血症について検討がなされ、その糸球体障害機序についての検討は少なかった。今回の伊丹氏の研究は実験的増殖性腎炎において明らかにされている免疫複合体の沈着につづき補体の活性化とそれに伴う多形核白血球の浸潤などがヒトMPGN type Iの糸球体障害に関与しているか否かを明らかにするために行なわれたものである。また、糸球体の直接障害所見の一つとして蛋白尿の原因として重要である糸球体基底膜のcharge barrierの障害の有無についても検討が行われた。腎生検所見(光顕、電顕、蛍光抗体法)と臨床検査所見によりMPGN type Iと診断した26例を対象とし、そのうち18症例についてはHE標本により1糸球体あたりのPMNを数えた。糸球体のIgGの沈着が1+以上の5症例について一次抗体にIgGサブクラスのマウスモノクローナル抗体(WHOより提供)を、又二次抗体にFITC標識ヤギ抗マウス $\gamma$ -globulin抗体を用い蛍光抗体間接法で観察した。糸球体基底膜1000nmあたりの陰性荷電部位数はPLP固定腎組織について0.5% polyethylenimineにて4℃30分間染色し、電顕写真上で測定した。血中IgGサブクラスは上記のマウスモノクローナル抗体を用いELISA法で測定した。

糸球体のC3沈着強度が強いほど血中C3は低下の傾向を示し、1糸球体あたりの多形核白血球数は増加の傾向を示した。IgGサブクラスのうちIgG3のみが糸球体に沈着し、血清IgG3は増加傾向を示した。また、糸球体基底膜における陰性荷電部位数は有意の減少を示し、多形核白血球が直接接している糸球体基底膜における陰性荷電部位数がさらに減少を示した。また、陰性荷電

部位数が減少を示した症例では陰性荷電部位の染色性の低下を示す傾向が認められた。これらの結果からヒトMPGN type 1において、IgG 3を抗体とする免疫複合体の沈着に基づく補体の活性化と多形核白血球の浸潤による糸球体基底膜におけるcharge barrierの障害が存在することが示され、本病型における糸球体障害機序の解明に一石を投じたものと考え、学位に値する研究と判断された。副査の小池、吉木両教授並びに小林教授との間で各数問の質疑が交わされ、更に副査の両教授とは個別的に内容の検討が行われたが、いずれに関しても合格と評価された。