

厚生科学研究研究費補助金

特定疾患対策研究事業

白血球浸潤を標的とした進行性腎障害の進展抑制に関する研究

平成 13 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 名取泰博

平成 14 (2002) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告書	
白血球浸潤を標的とした進行性腎障害の進展抑制に関する研究	1
主任研究者 名取泰博	
II. 分担研究報告書	
1. 動物モデル及び臨床における白血球浸潤とケモカイン	12
主任研究者 名取泰博	
2. 腎実質上皮細胞のmacrophage化に関する研究	16
分担研究者 堀田修	
3. 糸球体腎炎の組織における白血球浸潤と長期予後に関する研究	20
分担研究者 斎藤喬雄	
4. 腎臓への白血球浸潤におけるケモカインの役割	25
分担研究者 今井俊夫	
III. 研究結果の刊行に関する一覧表	33

白血球浸潤を標的とした進行性腎障害の進展抑制に関する研究

主任研究者 名取 泰博 国立国際医療センター研究所 臨床薬理研究部長

研究要旨

進行性腎障害においては、疾患の種類にかかわらず間質への白血球浸潤が認められる。また糸球体への白血球浸潤も、炎症性の強い半月体性糸球体腎炎ばかりでなく、他の様々な糸球体疾患において観察されている。これらの浸潤白血球は疾患の進展に深く関わっていると考えられ、白血球の浸潤あるいは浸潤白血球の活性を抑制することが進行性腎障害の進展抑制につながると考えられる。本研究では白血球の遊走活性化因子であるケモカイン、糸球体や尿細管間質領域に浸潤した白血球や尿中白血球の性質について検討を加えた。

リンパ球及び NK 細胞に作用するケモカイン・リンフォタクチン (Ltn) は IgA 腎症、急性間質性腎炎、急速進行性糸球体腎炎、巣状糸球体硬化症、ループス腎炎、膜性増殖性糸球体腎炎の患者の腎間質や糸球体周囲及び尿細管上皮に検出されたが、膜性腎症や特発性血尿の患者では検出されなかった。また Ltn 陽性細胞数は間質の肥満細胞、CD8 陽性細胞、NK 細胞の数や尿細管間質病変の程度、血清クレアチニンレベルと良く相関した。これらの結果から Ltn は慢性の尿細管間質病変の進展に関与する可能性が示された。

またキラーリンパ球に対して特異的なケモカイン・フラクタルカイン (Fkn) の同定やその解析に有用な種々の抗体を作製した。さらに Fkn 受容体に対するイムノトキシンを開発し、これを用いて組織内で Fkn 受容体を発現したキラーリンパ球を特異的に破壊するシステムを確立した。これは今後腎疾患の治療に有用となる可能性があると考えている。

尿中に出現する大型のマクロファージ様細胞（我々は Giant Macrophage, GM と名づけた）は腎症の進行速度ならびに非選択的蛋白尿の尿中排泄の程度と有意な相関が認められた。同細胞は腎生検標本にも観察され、それらの形質的特徴や臨床的意義について検討した結果、この細胞は浸潤した単球由来ではなく、尿細管上皮細胞が形質転換した可能性が示唆された。そこで培養ヒト尿細管上皮細胞を用いて調べた結果、同細胞は種々の刺激により CD68 抗原やスカベンジャー受容体などのマクロファージのマーカーを発現するようになることがわかった。このことから腎症の進展過程において尿細管上皮細胞がマクロファージ様細胞に変化し、それが腎症の増悪因子を産生することが考えられ、この過程を標的とした治療法の可能性が示唆された。

一方、糸球体内の浸潤白血球については、進行性腎障害の代表的疾患である慢性糸球体腎炎において単球、顆粒球、マクロファージの浸潤が接着因子やインテグリンを介して腎障害に関わることが示された。またメサングウム細胞の増殖および α 平滑筋アクチンの発現などの形質転換を介して、病変の進展やを予後の悪化を招くことが明らかとなった。

以上の研究により、糖尿病性腎症を含む種々の進行性腎障害の治療の新しい標的として、白血球遊走活性化に関わるケモカインや白血球への形質転換する細胞の同定に成功した。今後、これらの活性を抑制することにより進行性腎障害に対する新しい治療法の開発が期待される。

分担研究者

堀田 修 仙台社会保険病院 部長
斎藤喬雄 福岡大学第4内科 教授
今井俊夫 カン研究所 所長

A. 研究目的

糸球体腎炎は難治性かつ進行性であり、やがて腎不全になり透析療法を必要とするものが少なくない。透析療法は腎不全患者の生命予後を延長する画期的な方法とはいえ、患者の社会復帰が難しく、また莫大な医療費を費やすなど、厚生行政上問題も多い。このため、厚生科学特定疾患対策研究事業のうち、進行性腎障害に対する調査研究では、IgA 腎症、急速進行性糸球体腎炎、難治性ネフローゼ症候群などの糸球体疾患が重点的に取り上げられている。さらに、糖尿病性腎症では、これらの腎炎をしのご勢いで末期腎不全に至る患者が増加しており、治療の対策が叫ばれている。

これらの腎疾患では白血球浸潤が観察される。間質への単球や T リンパ球の浸潤は多くの腎疾患で見られ、また半月体性糸球体腎炎など炎症性の強い疾患ではこれらの細胞の糸球体浸潤も観察される。さらに現在では、ほとんど炎症性変化がないと言われている腎疾患においてもその発症・進展に白血球が関与する可能性が考えられてい

る。また白血球浸潤から繊維化へと続く尿細管間質病変の進展を抑制することは腎機能維持に重要との認識が広まりつつある。本研究では糖尿病性腎症を含めた種々の腎疾患の進展、特に糸球体病変から二次的に起きる尿細管間質病変の進展過程における白血球及びケモカインの役割に関する解析と、これらの成果を踏まえた診断・治療への応用について研究を行っている。

ケモカインは白血球遊走活性化能を有するサイトカインファミリーであり、種々の急性及び慢性炎症における白血球浸潤に関与することが知られている。糸球体腎炎においても単球活性化因子-1 (MCP-1) など、いくつかのケモカインが関与することが動物モデル及び臨床検体を用いた研究から示されている。リンフォタクチン (Ltn) はリンパ球及び NK 細胞に作用するケモカインである。我々はこれまで半月体性糸球体腎炎の動物モデルにおいて糸球体へのリンパ球浸潤に伴って糸球体の Ltn mRNA 発現が増加することを報告した。さらに我々は IgA 腎症患者の Ltn mRNA レベルが高いこと、その程度は尿蛋白量や腎間質病変などの臨床・病理学的指標と相関することを報告した。そこで本研究では、他のヒト腎疾患における Ltn の発現の有無と、病勢との相関を調べる目的でヒト腎生検標品を用いて免

疫組織化学的な検討を行った。またエフェクターキラーリンパ球に特異的に作用する Fkn が種々の腎症において発現亢進するとの報告はあるが、解析に適当な抗体がないために、その詳細は明らかにされていない。特に疾患の進展機序の解明に必須である動物モデルを用いた解析にはマウスなどの齧歯類での発現解析が重要であるが、それに適した抗体はない。そこで Fkn の腎症への関与を調べるのに必要な種々の抗体などの調製を試み、マウスにおける Fkn 受容体の分布及び疾患への関与について検討した。

糸球体内の浸潤白血球については以下の研究を行った。すなわち、進行する危険性が高い慢性糸球体腎炎にうち、類似の組織像を示しながら腎に限局して発症するとされる IgA 腎症と全身的な炎症の一症状と考えられる紫斑病性腎炎を対比して扱い、接着因子やそのリガンドであるインテグリンを有する白血球浸潤の関係、またとくに IgA 腎症においてはメサンギウム細胞や糸球体上皮細胞の形質転換について分析した。一方、糸球体疾患に特徴的な尿中マクロファージとして、大きさが末梢血単球と同じである CD16 抗原 (Fc γ RIII) 陽性マクロファージと、大型かつ CD68 抗原陽性でその多くが脂肪を含有するマクロファージ様細胞 (我々はこの細胞を giant macrophage, GM と名づけた) がある。前者は炎症惹起性マクロファージとの性格を有し糸球体急性炎症病変の形成に積極的に関与している。一方、GM に関してはその起源を含め臨床的意義についての検討はこれまでほとんどなされていない。本研究では GM の起源、病的意義を明らかにする目的で尿中細胞、腎生検標本等を用い種々の解析を加えた。

B. 研究方法

1. 腎炎における Ltn の発現に関する研究

腎疾患患者 47 名 (IgA 腎症 16 名、巣状糸球体硬化症 3 名、膜性腎症 6 名、膜性増殖性腎炎 3 名、急速進行性糸球体腎炎 4 名、ループス腎炎 4 名、高血圧性腎硬化症 3 名、急性間質性腎炎 3 名、特発性血尿 5 名) の腎生検標品を用いた。これらは全て、ステロイド剤や免疫抑制剤を投与する以前に採取されたものである。また免疫組織学的検索にはウサギ抗ヒト Ltn 抗体 (PeproTech 社製) など各種の市販抗体を用いた。また Ltn 陽性細胞の同定はミラーセクションを用いた。

2. Fkn 及び Fkn 受容体 (CX3CR1) に関する研究

allo 脾臓細胞移植による CTL の誘導のために、C57BL/6 マウスの脾臓細胞を BDF1 マウスに静注して、GVHD を惹起した。2~3 週間後に脾臓・肝臓を取り出して細胞を回収し、FACS 解析に用いた。GVHD 脾臓細胞の GVHD 肝臓への in vivo 浸潤実験と Fkn の効果判定の実験には GVHD 惹起後のマウスの脾臓から回収した細胞を CMTMR (Molecular Probe 社製) により蛍光標識し、マウス Fkn 15 μ g/ml で 37°C で 40 分脱感作した後に GVHD マウスに静注した。20 分あるいは 2 時間後のマウスより脾臓・肝臓を取りだし、分離した単核球細胞を我々が作製した抗 Fkn モノクローナル抗体を用いて染色して FACS 解析に用いた。Saporin 標識抗 CX3CR1 抗体による CX3CR1 発現細胞特異的増殖抑制の実験には親株の L1.2 あるいは CX3CR1-EGFP 発現 L1.2 細胞を saporin あるいは saporin 標識抗 CX3CR1 モノクローナル抗体 (2A9-1) とともに 2 日間培養を行った後、生細胞数を測定した。

3. IgA 腎症と紫斑病性腎炎における白血球浸潤に関する研究

年齢のマッチした IgA 腎症と紫斑病性腎炎それぞれ 49 例について、その腎生検標本に対する酵素抗体法にて、各種白血球表面抗原(CD3, CD15, CD68)、インテグリン(LFA1, CR3, CR4)、接着因子 (ICAM1、ICAM3) などのモノクローナル抗体を用い、糸球体におけるこれらの細胞や物質の発現を検討した。物質の発現は 4 段階評価、陽性細胞については糸球体毎に算定し、各症例で平均値を求めた。各症例の臨床的パラメータのほかに、組織上の糸球体障害指数(IGL)、間質容積(%IV)を計測し、免疫染色で得られた結果とそれぞれの値の相関を検討した。

4. 腎生検標本及び尿に存在する GM に関する研究

市販のヒト近位尿細管上皮由来の培養細胞を継代して実験に用いた。培養液に正常ヒト血清及び血清リポ蛋白や種々の増殖因子及びサイトカインを添加して同細胞を培養し、マクロファージのマーカーとして CD68 及びスカベンジャー受容体、上皮細胞のマーカーとして cytokeratin 及び E-カドヘリンの発現を蛋白質や mRNA レベルでそれぞれ、ELISA 法及び RT-PCR 法にて調べた。また尿中微量コレステロール (主体は HDL コレステロール) を測定し尿中 GM との関連や腎症の予後予測因子としての意義を検討した。

(倫理面への配慮)

ヒト検体 (腎生検標本、血液、尿) については患者の人権に十分に配慮してインフォームドコンセントを得てから採取し、動物モデルに関しては動物愛護に十分に配慮して実験を行った。いずれにおいても当該研究施設の規定にのっとり、倫理委員会等の承認を得る必要がある場合にはその審査を受けた。

C. 研究結果

1. 腎炎における Ltn の発現に関する研究

Ltn の多くは中央に核があり、細胞質の豊富な円形の細胞に検出された。Ltn 陽性細胞は腎皮質間質領域のうち、主に糸球体周囲、繊維化した領域、血管周囲に分布していた。また Ltn 陽性細胞はしばしばリンパ球浸潤の多い領域に見られた。また Ltn 陽性細胞の少なくとも一部は肥満細胞の特異的マーカーとされる tryptase も陽性であったことから、腎間質における Ltn 産生細胞の少なくとも一部は肥満細胞であることが示唆された。

Ltn の発現レベルを定量的に解析するために、間質領域にある Ltn 陽性細胞数を測定した。Ltn 陽性細胞は IgA 腎症 (10.3 ± 11.8 cells/mm²)、急性間質性腎炎 (14.2 ± 13.6)、急速進行性糸球体腎炎 (6.9 ± 6.4)、膜性増殖性腎炎 (5.1 ± 1.6)、高血圧性腎硬化症 (6.6 ± 6.8)、巣状糸球体硬化症 (4.2 ± 7.2)、ループス腎炎 (3.1 ± 5.5) の患者標品では検出されたが、膜性腎症及び特発性血尿患者標品には検出されなかった。

間質 Ltn 陽性細胞数と他の間質浸潤細胞数との相関を調べた結果、tryptase 陽性の肥満細胞数との相関が最も高く ($r=0.72$, $p<0.0001$)、CD8 陽性の suppressor/cytotoxic T 細胞 ($r=0.63$, $p<0.0001$) や CD45RO 陽性のメモリー T 細胞 ($r=0.61$, $p<0.0001$) との高い相関も見られた。CD57 陽性 NK 細胞 ($r=0.41$, $p<0.01$) や CD20 陽性 B 細胞 ($r=0.45$, $p<0.01$) との相関もあったが、CD68 陽性マクロファージや好中球との相関は見られなかった。

腎間質 Ltn 陽性細胞数と尿細管間質病変の程度との相関は全患者についての解析でも ($r=0.70$, $p<0.0001$)、IgA 腎症患者のみの解析でも ($r=0.82$, $p<0.01$) 有意に高かった。また IgA 腎症患者を組織学的な病変の

程度で3群に分けた場合でも mild IgA 腎症； 2.5 ± 3.0 、moderate IgA 腎症： 9.4 ± 10.4 、advanced IgA 腎症： 23.2 ± 12.2 と病変が強いほど Ltn 陽性細胞数も多かった。

腎間質 Ltn 細胞数は全患者 ($r=0.53$, $p<0.001$) 及び IgA 腎症患者 ($r=0.64$, $p<0.05$) のどちらでも血清クレアチニン値と有意な相関が見られたが、尿蛋白との相関はどちらの場合も見られなかった。

2. Fkn 及び Fkn 受容体 (CX3CR1) に関する研究

進行性腎障害の原因の解明や治療法の確立には、動物モデルを用いた解析・治療実験が必要となる。ところが CX3CR1 の発現はヒトとマウスでは異なり、マウスではリンパ球には CX3CR1 が発現していないとの報告がある。ヒト末梢血の解析結果から、マウスにおいても CX3CR1 はエフェクターキラー細胞で発現していることが推定されるが、SPF 環境下で飼育されたマウスでは、エフェクターキラー細胞の存在が希であるために、マウスでは CX3CR1 の発現がリンパ球に認められないのではないかと考えた。そこで、FACS を用いてマウス CX3CR1 の発現を解析するために、モノクローナル抗体の作製を試みた。マウス CX3CR1 の細胞外領域に存在する N 末端領域のペプチドをアルメニアハムスターに免疫して、ハイブリドーマを作製し、FACS 可能なクローンが 1 クローン (L2D11-7) が得られた。

次に allo 脾臓細胞移植により *in vivo* で CTL を誘導した場合の、キラーリンパ球上での CX3CR1 の発現の検討を行った。マウス CX3CR1 に対するモノクローナル抗体を用いて、FACS で解析を行った結果、SPF 環境下の BDF1 マウスでは、脾臓、肝臓のいずれにおいても、CX3CR1 の発現はほとんど認められなかった。ところが、C57BL/6

マウスの脾臓細胞を静注して GVHD を誘導した BDF1 マウスの脾臓、肝臓に存在する T 細胞には CX3CR1 の発現が確認された。これら CX3CR1 発現 T 細胞の多くは、移植した細胞由来の CD8 陽性 T 細胞であった。従ってマウスにおいても CX3CR1 はエフェクターキラー細胞に発現していると考えられる。

CMTMR で蛍光標識した GVHD マウス脾臓細胞を、未処理もしくはマウス Fkn での CX3CR1 の脱感作して、別の GVHD マウスに静注し、脾臓・肝臓への細胞浸潤を解析した。脾臓・肝臓での移入細胞中の CD8 陽性細胞におけるドナー (H2D 陰性)、レシピエント (H2D 陽性) 細胞を FACS により解析した。その結果、H2D 陽性と陰性の比率は、脾臓では 20 分後と 2 時間後で脱感作の有無による変化がみられなかったが、肝臓では 20 分後では変化が見られないもの、2 時間後ではマウス Fkn で脱感作していたものが、脱感作していないものに比べてドナー細胞、すなわちキラー細胞の存在比率が約半分に低下していた。これらの結果から、CX3CR1 はキラー細胞の GVHD 肝臓への浸潤に関与することが示された。

saporin 標識 2A9-1 抗体は、CX3CR1 発現細胞特異的に増殖抑制を示した。なお Graphpad Prism ソフトウェアで算出した IC_{50} は、saporin 標識 2A9-1 抗体の CX3CR1 発現細胞に対する値は 15 pM、saporin 標識 2A9-1 抗体の親株の L1.2 細胞に対する値は 12 nM、saporin の CX3CR1 発現細胞に対する値は 73 nM であり、CX3CR1 発現細胞に対する特異性は少なくとも 1000 倍以上あることが明らかとなった。したがって、Saporin などの毒素を標識した抗 CX3CR1 抗体はイムノトキシンとして有効であることが示された。

3. IgA 腎症と紫斑病性腎炎における白血球

浸潤に関する研究

紫斑病性腎炎、IgA 腎症のいずれにおいても糸球体 ICAM-1 発現は、糸球体 LFA-1 陽性細胞及び CR4 陽性細胞をはじめとする各種白血球浸潤と有意の正相関を示した。LFA-1 陽性細胞数は、CD3 陽性 T 細胞、CD15 陽性単球/顆粒球、CD68 陽性マクロファージのそれぞれと有意の正相関を示した。これらの結果により、いずれの疾患においても糸球体の白血球浸潤に ICAM-1/LFA-1 相互作用の関与していることが示唆された。糸球体沈着物に関しては、紫斑病性腎炎では IgA 腎症に比べ fibrin/fibrinogen 関連抗原 (FRA) 沈着が有意に高度であり、IgA 腎症では紫斑病性腎炎に比べ C3c 沈着が有意に高度であった。これら沈着物と各種インテグリン陽性細胞浸潤との関連では、紫斑病性腎炎では糸球体 FRA 沈着と CR4 陽性細胞の間に有意の正の相関が見られたが、C3c 沈着と CR4 陽性細胞の間には相関が見られなかった。これに対し、IgA 腎症では糸球体 C3c 沈着と CR4 陽性細胞数との間に有意の相関が見られたが、FRA 沈着と CR4 陽性細胞の間には相関が見られなかった。いずれの疾患においても、CR4 陽性細胞数は、CD68 陽性マクロファージと高度の相関を示し、連続切片による検討でも糸球体浸潤マクロファージのほとんどは、同時に CR4 を発現していることが確認された。また、CR4 陽性細胞数は尿蛋白量と有意の正相関を示した。

昨年度の研究結果のごとく、各平滑筋骨格蛋白は IgA 腎症および対照例の動脈中膜に均等に発現していた。しかし糸球体においては、対照例でメサンギウムに LCLD の発現のみが観察され、IgA 腎症ではその活動性に応じてメサンギウムに SMA の発現が、またメサンギウムの拡大に応じて LCLD

の発現が観察された。SMA および LCLD のメサンギウム発現の程度は、CD15 陽性単球/顆粒球や CD68 陽性マクロファージ、CR3 陽性細胞や CR4 陽性細胞の浸潤、IGL および臨床的に尿蛋白と有意の正相関を示した。LCLD 発現は糸球体上皮細胞における CR1 発現と有意の逆相関を示し、両者の二重染色では、メサンギウムの LCLD 発現高度の領域では明らかな CR1 発現の減弱が観察された。しかし検索したその他のパラメータとの間に相関はなかった。IgA 腎症経時生検例の改善群では、尿蛋白量、糸球体浸潤白血球、SMA や LCLD 発現の有意の減少が見られ、腎機能や糸球体 CR1 発現は変化なかったのに対し、悪化群では、尿蛋白量、糸球体浸潤白血球、SMA や LCLD 発現の持続が見られ、腎機能や糸球体 CR1 発現は有意に減少していた。

4. 腎生検標本及び尿に存在する GM に関する研究

正常腎組織には見られない GM は非選択的蛋白尿を有する症例において尿細管腔内を中心に観察された。症例の一部では尿細管上皮細胞の一部、Bowman's capsule の一部、糸球体上皮細胞の一部にも CD68 の陽性所見が認められた。腎組織の GM は CD68、25F9、vimentin 陽性で cytokeratin 陰性、細胞内にしばしばオイルレッド O 陽性の脂肪が観察された。一方、尿中 GM の大半は脂肪を含有し CD68 に加え 25F9、vimentin 陽性であり、cytokeratin 陰性であったが、一部の GM は CD68 と cytokeratin の両者が陽性であった。腎組織中の単位尿細管腔数当たりの GM 数及び尿中 GM の排泄量は非選択的蛋白尿の程度と相関した。また大量の尿中 GM 排泄が認められる症例は腎機能の低下速度が速いことがわかった。培養ヒト尿細管上皮細胞には CD68 の発現を認めら

れ、ヒト血清を添加して培養するとその発現量が増加した。さらにマクロファージのマーカーの一つであるスカベンジャー受容体の発現増加も観察された。一方、上皮細胞のマーカーである *cytokeratin* などの発現は減少した。これらの結果から、尿細管上皮細胞は培養の条件によってはマクロファージの形質を持つように *transdifferentiation* することが示された。

GM が細胞内に脂肪を蓄えていたことから、尿中脂質の量が尿中 GM と関連する可能性が考えられた。そこで尿中コレステロール（主に HDL コレステロール）の微量定量系を開発し、その尿中排泄の程度と尿中 GM 数を調べたところ、両者の間に有意な相関があることがわかった。また尿中コレステロールを毎月 *prospective* に測定した Cr1.5mg/dL 以上の慢性腎不全患者 70 例 8 例において 6～12 月間の観察期間中に Cr 値が前値 1.5 倍以上の上昇を認めた（進行例）。尿中コレステロール/Cr(mg/gCr) 値の 2.0、3.0、4.0 および 5.0 を cut off 値とした場合進行例を診断する *efficiency* は 82.9%、88.6%、91.4% および 92.9% であった。一方、TP/Cr、Alb/Cr、NAG/Cr では *efficiency* が 90% 以上になる cut off 値は存在しなかった。これらの結果から、尿中コレステロールの測定は尿中総蛋白、尿中アルブミン、尿中 NAG の測定と比較して、腎機能低下を予測するのに最もよい診断法であることがわかった。

D. 考察

本研究から、Ltn の発現亢進は IgA 腎症だけでなく様々な腎疾患において起きることがわかった。調べた患者の中で Ltn 発現亢進の見られた疾患は腎機能低下が起き得る疾患（急性間質性腎炎、急速進行性糸球体腎炎、高血圧性腎硬化症、巣状糸球体硬

化症）や増殖性腎炎（IgA 腎症、膜性増殖性糸球体腎炎、ループス腎炎）であり、膜性腎症や特発性血尿患者では見られなかった。これらの結果から、腎間質における Ltn 発現亢進は腎疾患の種類によることが示唆された。また Ltn 陽性細胞数の測定による定量的解析の結果、Ltn 発現の程度は腎疾患の増悪の程度と相関することがわかった。IgA 腎症において Ltn 発現が間質障害の程度や他の組織学的及び臨床的指標と良く相関することは、我々が以前に Ltn mRNA の測定により得た結果と良く一致した。本研究から腎間質における Ltn の発現は他の様々な腎疾患においても組織学的及び臨床的指標と相関することが示された。これらの結果から、Ltn の発現亢進は腎疾患の種類に関係なく、慢性的に進行する尿細管間質病変に共通して起きる現象であることが示唆された。また Ltn 陽性細胞数は間質の浸潤細胞数、特に T 細胞や NK 細胞と良く相関したことから、Ltn のこれらの細胞種に対する遊走活性化能が間質への細胞浸潤に寄与した可能性が示唆された。またこれらの細胞種や肥満細胞が Ltn を産生することが培養系で示されており、それが相関に関する結果の理由の一部でもあることが考えられた。

ヒトにおいてエフェクターキラーリンパ球に特異性を示すケモカイン・Fkn はある種の腎症で発現が増加するとの報告がある。進行性腎障害の原因の解明や治療法の確立には、動物モデルを用いた解析・治療実験が必要となるが Fkn についてはこれまで動物実験に適した抗体がなく、またマウスにおける Fkn 受容体 (CX3CR1) 陽性細胞の性質が明らかにされていなかった。本研究により、マウスにおいてもヒトと同様に、CX3CR1 は、エフェクターキラーリンパ球

に発現していることが示唆された。したがって、CX3CR1-Fkn 系の腎疾患における役割を、マウスをモデル動物として用いて解析・治療実験を実施することは妥当であると考えられた。またエフェクターキラー細胞の GVHD マウスの肝臓への浸潤が、Fkn を用いた CX3CR1 の脱感作で選択的に阻害されたことより、キラー細胞が関与するマウスの腎疾患モデルでの Fkn の治療効果は、十分期待できる。さらに抗 CX3CR1 イムノトキシンによって、CX3CR1 発現細胞を選択的に破壊する方法は、キラー細胞の除去に有用と考えられた。

紫斑病性腎炎では IgA 腎症と同様、白血球浸潤に ICAM-1/LFA-1 相互作用の関与していることが示された。一方、CR4 陽性マクロファージに関して、IgAN 腎症では C3bi/CR4 相互作用が作動している可能性が示されるのに対し、紫斑病性腎炎では fibrinogen/CR4 相互作用が作動している可能性が示され、紫斑病性腎炎と IgA 腎症との間で免疫担当細胞、特にマクロファージの浸潤機序が異なる可能性が示唆された。しかしいずれの疾患においてもこれらマクロファージは糸球体障害(蛋白尿)発現に関与していると考えられる。また IgA 腎症において、昨年度の研究報告および今年度研究結果から、単球/顆粒球、マクロファージのうちで CR3 陽性細胞、CR4 陽性細胞の浸潤が、SMA 発現および LCLD 発現増強に強く関与していると考えられる。従来の実験腎炎モデルやヒト腎組織での検討結果を考慮すると、糸球体に浸潤したこれらの細胞から放出されるサイトカインがメサンギウムの増殖やその形質転換を誘導している可能性が考えられる。さらに、これら収縮性蛋白の発現が予後と相関する IGL や尿蛋白量とも密接な関係があることから、病変の進展過程で

今回の研究における SMA、LCLD 発現に示されたようなメサンギウム形質転換は重要な要因と考えられた。SMA 等の平滑筋収縮蛋白の発現は、アンジオテンシン (A) に対するメサンギウムの反応性亢進を示唆する所見といわれているが、今回の上皮細胞障害指標(CR1)との関連から、このような糸球体内微小循環動態の変化がメサンギウムのみならず、上皮細胞障害を介した糸球体破壊に関与している可能性が示唆された。これらの結果は、近年報告が相次いでいる ACE 阻害薬や A 受容体拮抗薬の腎保護作用とも関係づけられる可能性がある。

GM は成熟型マクロファージの形質を有するが、本研究からその由来は protein-loading cytopathy (HDL が関与?)を受けた上皮細胞(尿細管上皮細胞、Bowman 嚢上皮細胞、糸球体上皮細胞)である可能性が示された。これまでこれらの上皮細胞がマクロファージ関連抗原を有するようになることが臨床及び動物を用いた研究から報告されているが、本研究によりこれらの現象が疾患の進展と関連する可能性が示され、診断や治療の標的となり得ることが示唆された。また実際、尿中 GM や同細胞の生成に深く関与すると考えられる尿中コレステロールの解析は非選択的蛋白尿に伴う protein-loading cytopathy の指標となり得ることが本研究から明らかとなり、予後の推定、治療効果の評価に有用であると考えられた。

E. 結論

進行性腎障害の病態解析の一環として、Ltn が様々な腎疾患において産生され、その発現の程度が病勢と相関することを明らかにし、Ltn が診断及び治療の新しい標的となる可能性を示した。また GM 及び尿中コレステロールの解析から上皮細胞がマク

ファージ様細胞に形質転換することが腎症の進展及び腎機能低下に深く関与する可能性を示し、さらに尿中コレステロールの測定が予後の推定は治療効果の判定に有用であることを明らかにした。病理組織学的に共通性の極めて多い IgA 腎症と紫斑病性腎炎について、糸球体白血球浸潤機序という病態での相違点があることが明らかとなった。ある種の腎疾患への関与が示唆されているキラリンパ球に特異的なケモカインとして Fkn について、ヒトと同様にマウスにおいても Fkn 受容体・CX3CR1 がエフェクターキラ細胞に発現していること、エフェクターキラ細胞の GVHD マウスの肝臓への浸潤が、Fkn を用いた CX3CR1 の脱感作で選択的に阻害されることを明らかにした。

以上のように、白血球浸潤の分子機構に関与する様々な因子の解析研究を行った結果、進行性腎障害に共通する新たな診断及び治療法の標的を見いだすことに成功した。今後、本班研究の成果を実用化すべく、さらに研究を発展させる予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Ou ZL, Hotta O, Natori Yu, Sugai H, Taguma Y, Natori Y: Enhanced expression of C chemokine lymphotactin in progressive IgA nephropathy. *Nephron*, in press
2. Ito Y, Kawachi H, Morioka Y, Nakatsue T, Koike H, Ikezumi Y, Oyanagi A, Natori Yu, Natori Y, Nakamura T, Gejo F, Shimizu F: Fractalkine expression and the recruitment of CX3CR1+ cells in the prolonged mesangial proliferative glomerulonephritis. *Kidney Int*, in press
3. Ou ZL, Nakayama K, Natori Y, Doi N, Saito T, Natori Y: Effective methylprednisolone dose in experimental crescentic glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis*, 37:411-417, 2001.
4. 堀田 修: IgA 腎症と粘膜免疫 医学のあゆみ 2001:199:99-102
5. Uesugi N, Sakata N, Horiuchi S, Nagai R, Takeya M, Meng J, Saito T, Takebayashi S: Glycooxidation-modified macrophages and lipid peroxidation products are associated with the progression of human diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis* 38(5):1016-1025, 2001
6. Mochizuki S, Moriya T, Naganuma H, Narasaka T, Ueno Y, Sato H, Sasano H, Saito T: Significance of fat stains in serial sections from Epon-embedded tissue samples for electron microscopy in renal diseases. *Clin Exp Nephrol* 5(4):240-245, 2001
7. Ohtaka A, Ootaka T, Sato H, Soma J, Sato T, Saito T, Ito S: Significance of early phenotypic change of glomerular podocytes detected by Pax2 in primary focal segmental glomerulosclerosis. *Am J Kidney Dis*, 39(3):475-485, 2002.
8. Jin S-L, Ootaka T, Soma J, Sato T, Sato H, Ito S, Saito T: The role of beta2 integrins in glomerular leukocytes in Henoch-Schoenlein purpura nephritis: An age-matched comparative study with IgA nephropathy. *Nephrology*, 2002, in press.
9. 金 世蘭、大高徹也、相馬 淳、佐藤 寿伸、佐藤 博、伊藤貞嘉、斉藤喬雄: 紫斑病性腎炎白血球浸潤過程における beta2-インテグリンの関与：年齢をマッ

チした IgA 腎症との比較検討. 東北大医
短紀要 11(1)、2002 年、印刷中

10. Umehara H, Bloom E, Okazaki T, Domae N, Imai T: Fractalkine and vascular injury. *Trends Immunol.* 22(11): 602-607, 2001.
11. Umehara H, Imai T: Role of fractalkine in leukocyte adhesion and migration and in vascular injury. *Drug News Perspect.* 14(8): 460-464, 2001.
12. Yoshie O, Imai T, Nomiyama H: Chemokines in immunity. *Adv. Immunol.* 78: 57-110, 2001.
13. Umehara H, Goda S, Imai T, Nagano Y, Minami Y, Tanaka Y, Okazaki T, Bloom ET, Domae N :Fractalkine, a CX3C-chemokine, functions predominantly as an adhesion molecule in monocytic cell line THP-1. *Immunol. Cell. Biol.* 79(3): 298-302, 2001.
14. Harrison JK, Fong AM, Swain PA, Chen S, Yu YR, Salafranca MN, Greenleaf WB, Imai T, Patel DD :Mutational analysis of the fractalkine chemokine domain. Basic amino acid residues differentially contribute to CX3CR1 binding, signaling, and cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 276(24):21632-21641, 2001.
15. Patel DD, Koopmann W, Imai T, Whichard LP, Yoshie O, Krangel MS: Chemokines have diverse abilities to form solid phase gradients. *Clin. Immunol.* 99(1): 43-52, 2001.
16. 今井俊夫: 薬物ターゲットとしてのケモカイン受容体、*ファルマシア* 37(4): 302-306, 2001.
17. 今井俊夫: ケモカイン受容体、別冊・医学のあゆみ 7 回膜貫通型受容体研究の新展開, 医歯薬出版: 90-95, 2001.
18. 今井俊夫、梅原久範: フラクタルカイ

ンによる細胞遊走機構、*免疫・Immunology Frontier* 11(1): 30-35, 2001.

学会発表

1. Deenitchina SS, Hotta O, Kitamura H, Miyazawa S, Natori Yu, Sugai H, Taguma Y, Natori Y: Tubulointerstitial expression of lymphotactin in human glomerulonephritis. 34th ASN Meeting in San Francisco, October 13-17, 2001.
2. Miyazawa S, Deenitchina SS, Hotta O, Natori Y: Protective role of mast cells on renal fibrosis: use of mast cell deficient rats. 34th ASN Meeting in San Francisco, October 13-17, 2001.
3. Deenitchina SS, Hotta O, Kitamura H, Sugai H, Miyazawa S, Taguma Y, Natori Y: Tubulointerstitial Lymphotactin (Ltn)-positive Cells in Glomerulonephritis (GN). 第 44 回 日本腎臓学会総会 (東京) 5 月 27 日-29 日, 2001.
4. 宮澤しのぶ, 欧周羅, スザナ・デニチナ, 名取有美子, 堀田 修, 名取泰博: 腎間質繊維化における mast cell の役割: mast cell 欠損ラットを用いた検討. 第 44 回 日本腎臓学会総会 (東京) 5 月 27 日-29 日, 2001.
5. 宮澤しのぶ, 名取泰博. mast cell は巣状系球体硬化症モデルの間質線維化に抑制的に作用する. 第 31 回日本免疫学会総会・学術集会 (大阪) 12 月 11-13 日, 2001.
6. Jin S-L, Ootaka T, Soma J, Sato T, Sato H, Ito S, Saito T: The involvement of beta2 integrins in glomerular infiltration of leukocytes in Henoch-Schoenlein purpura nephritis: An age-matched comparative study with IgA nephropathy. A0387, 34th Ameri-

- can Society of Nephrology Meeting, 2001
7. 大高徹也、大高亮彦、木村朋由、佐藤 博、伊藤貞嘉、佐藤寿伸、斎藤喬雄：各種増殖性糸球体腎炎における糸球体細胞の転写因子発現について。P-490、第44回日本腎臓学会学術総会、2001年
 8. Nanki T, Imai T, Nagasaka K, Nonomura Y, Taniguchi K, Miyasaka N： Migration of CX3CR1+ T cells producing Th1- or Tc1-type cytokines and granzyme A, into the synovium of patients with rheumatoid arthritis: Lymphocyte subsets and chemokine receptors、第31回日本免疫学会総会・学術集会（大阪）12月11-13日, 2001.
 9. 西村美由希、村本賢三、今井俊夫： Fractalkine/CX3CR1 のマウスリンパ球における解析、第31回日本免疫学会総会・学術集会（大阪）12月11-13日, 2001.
 10. 米田 修、井上 博、西村美由希、今井俊夫、南 康博、堂前尚親、梅原久範： Fractalkine による NK 細胞の IFN- γ 産生能とその解析、第31回日本免疫学会総会・学術集会（大阪）12月11-13日, 2001.
 11. 久保井良和、村本賢三、菱沼宇春、西村美由希、今井俊夫： Fractalkine の concanavalin A-induced hepatitis (ConA 肝炎)における機能解析、第31回日本免疫学会総会・学術集会（大阪）12月11-13日, 2001.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

動物モデル及び臨床における白血球浸潤とケモカイン

主任研究者 国立国際医療センター研究所臨床薬理研究部 名取泰博

研究要旨

リンフォタクチン (Ltn) はリンパ球及びNK細胞に作用するケモカインである。我々はこれまでIgA腎症患者のLtn mRNAレベルが高いこと、その程度は尿蛋白量や腎間質病変などの臨床・病理学的指標と相関することを報告した。そこで本研究では他の様々な腎疾患におけるLtnの発現を免疫組織化学的に検討した。Ltnは腎間質、糸球体周囲及び尿細管上皮に観察された。また腎間質のLtn陽性細胞の一部は肥満細胞のマーカであるtryptaseも陽性であった。種々の腎疾患患者47名の腎生検標品について調べた結果、腎間質のLtn陽性細胞はIgA腎症ばかりでなく、急性間質性腎炎、急速進行性糸球体腎炎、巣状糸球体硬化症、ループス腎炎、膜性増殖性糸球体腎炎の患者にも検出されたが、膜性腎症や特発性血尿の患者では検出されなかった。腎間質のLtn陽性細胞数は間質の肥満細胞、CD8陽性細胞、NK細胞の数と相関が見られた。また腎間質Ltn陽性細胞数は尿細管間質病変の程度や血清クレアチニンレベルとも良く相関した。これらの結果から、これらの結果からLtnは慢性の尿細管間質病変の進展に関与する可能性が示された。果かたしたきんじャの臨床・病理学的指標と相関することがわかった

A. 研究目的

全ての慢性糸球体疾患において腎間質への白血球浸潤が観察され、その程度は糸球体への白血球浸潤の程度よりも腎機能の低下と良く相関することが知られている。また最近では白血球浸潤などの間質病変の進展は糸球体病変の単なる結果ではなく、その増悪因子でもあると考えられている。従って、間質病変の進展阻止は進行性の糸球体疾患の有効な治療となる可能性がある。

ケモカインは白血球遊走活性化能を有するサイトカインファミリーであり、種々の急性及び慢性炎症における白血球浸潤

に関与することが知られている。糸球体腎炎においても単球活性化因子-1 (MCP-1) など、いくつかのケモカインが関与することが動物モデル及び臨床検体を用いた研究から示されている。リンフォタクチン (Ltn) はリンパ球及びNK細胞に作用するケモカインである。我々はこれまで半月体性糸球体腎炎の動物モデルにおいて糸球体へのリンパ球浸潤に伴って糸球体のLtn mRNA発現が増加することを報告した。さらに我々はIgA腎症患者のLtn mRNAレベルが高いこと、その程度は尿蛋白量や腎間質病変などの臨床・病理学的指標と相関することを報告した。

そこで本研究では、他のヒト腎疾患における Ltn の発現の有無と、病勢との相関を調べる目的でヒト腎生検標品を用いて免疫組織化学的な検討を行った。

B. 研究方法

腎疾患患者 47 名 (IgA 腎症 16 名、巣状糸球体硬化症 3 名、膜性腎症 6 名、膜性増殖性腎炎 3 名、急速進行性糸球体腎炎 4 名、ループス腎炎 4 名、高血圧性腎硬化症 3 名、急性間質性腎炎 3 名、特発性血尿 5 名) の腎生検標品を用いた。これらは全て、ステロイド剤や免疫抑制剤を投与する以前に採取されたものである。また免疫組織学的検索にはウサギ抗ヒト Ltn 抗体 (PeproTech 社製) など各種の市販抗体を用いた。また Ltn 陽性細胞の同定はミラーセクションを用いた。

C. 研究結果

1. Ltn 陽性細胞の分布及び数

Ltn の多くは中央に核があり、細胞質の豊富な円形の細胞に検出された。Ltn 陽性細胞は腎皮質間質領域のうち、主に糸球体周囲、繊維化した領域、血管周囲に分布していた。また Ltn 陽性細胞はしばしばリンパ球浸潤の多い領域に見られた。また Ltn 陽性細胞の少なくとも一部は肥満細胞の特異的マーカーとされる tryptase も陽性であったことから、腎間質における Ltn 産生細胞の少なくとも一部は肥満細胞であることが示唆された。

Ltn の発現レベルを定量的に解析するために、間質領域にある Ltn 陽性細胞数を測定した。Ltn 陽性細胞は IgA 腎症 (10.3 ± 11.8 cells/mm²)、急性間質性腎炎 (14.2 ± 13.6)、急速進行性糸球体腎炎

(6.9 ± 6.4)、膜性増殖性腎炎 (5.1 ± 1.6)、高血圧性腎硬化症 (6.6 ± 6.8)、巣状糸球体硬化症 (4.2 ± 7.2)、ループス腎炎 (3.1 ± 5.5) の患者標品では検出されたが、膜性腎症及び特発性血尿患者標品には検出されなかった。

2. 間質浸潤細胞との相関

間質 Ltn 陽性細胞数と他の間質浸潤細胞数との相関を調べた結果、tryptase 陽性の肥満細胞数との相関が最も高く ($r=0.72$, $p<0.0001$)、CD8 陽性の suppressor/cytotoxic T 細胞 ($r=0.63$, $p<0.0001$) や CD45RO 陽性のメモリー T 細胞 ($r=0.61$, $p<0.0001$) との高い相関も見られた。CD57 陽性 NK 細胞 ($r=0.41$, $p<0.01$) や CD20 陽性 B 細胞 ($r=0.45$, $p<0.01$) との相関もあったが、CD68 陽性マクロファージや好中球との相関は見られなかった。

3. 組織学的及び臨床的指標との相関

腎間質 Ltn 陽性細胞数と尿細管間質病変の程度との相関は全患者についての解析でも ($r=0.70$, $p<0.0001$)、IgA 腎症患者のみの解析でも ($r=0.82$, $p<0.01$) 有意に高かった。また IgA 腎症患者を組織学的な病変の程度で 3 群に分けた場合でも mild IgA 腎症 ; 2.5 ± 3.0 、moderate IgA 腎症 ; 9.4 ± 10.4 、advanced IgA 腎症 ; 23.2 ± 12.2 と病変が強いほど Ltn 陽性細胞数も多かった。

腎間質 Ltn 細胞数は全患者 ($r=0.53$, $p<0.001$) 及び IgA 腎症患者 ($r=0.64$, $p<0.05$) のどちらでも血清クレアチニン値と有意な相関が見られたが、尿蛋白との相関はどちらの場合も見られなかった。

D. 考察

本研究から、Ltn の発現亢進は IgA 腎

症だけでなく様々な腎疾患において起きることがわかった。調べた患者の中で Ltn 発現亢進の見られた疾患は腎機能低下が起き得る疾患（急性間質性腎炎、急速進行性糸球体腎炎、高血圧性腎硬化症、巣状糸球体硬化症）や増殖性腎炎（IgA 腎症、膜性増殖性糸球体腎炎、ループス腎炎）であり、膜性腎症や特発性血尿患者では見られなかった。これらの結果から、腎間質における Ltn 発現亢進は腎疾患の種類によることが示唆された。

Ltn 陽性細胞数の測定による定量的解析の結果、Ltn 発現の程度は腎疾患の増悪の程度と相関することがわかった。IgA 腎症において Ltn 発現が間質障害の程度や他の組織学的及び臨床的指標と良く相関することは、我々が以前に Ltn mRNA の測定により得た結果と良く一致した。本研究から腎間質における Ltn の発現は他の様々な腎疾患においても組織学的及び臨床的指標と相関することが示された。これらの結果から、Ltn の発現亢進は腎疾患の種類に関係なく、慢性的に進行する尿細管間質病変に共通して起きる現象であることが示唆された。また Ltn 陽性細胞数は間質の浸潤細胞数、特に T 細胞や NK 細胞と良く相関したことから、Ltn のこれらの細胞種に対する遊走活性化能が間質への細胞浸潤に寄与した可能性が示唆された。またこれらの細胞種や肥満細胞が Ltn を産生することが培養系で示されており、それが相関に関する結果の理由の一部でもあることが考えられた。

E. 結論

T 細胞や NK 細胞に作用するケモカイン・Ltn が様々な腎疾患において産生さ

れること、その発現の程度が病勢と相関することがわかった。これらの結果から Ltn が診断及び治療の新しい標的となる可能性が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ou ZL, Hotta O, Natori Y, Sugai H, Taguma Y, Natori Y: Enhanced expression of C chemokine lymphotactin in progressive IgA nephropathy. *Nephron*, in press
2. Ito Y, Kawachi H, Morioka Y, Nakatsue T, Koike H, Ikezumi Y, Oyanagi A, Natori Y, Natori Y, Nakamura T, Gejo F, Shimizu F: Fractalkine expression and the recruitment of CX3CR1+ cells in the prolonged mesangial proliferative glomerulonephritis. *Kidney Int*, in press
3. Ou ZL, Nakayama K, Natori Y, Doi N, Saito T, Natori Y: Effective methylprednisolone dose in experimental crescentic glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis*, 37:411-417, 2001.

2. 学会発表

1. Deenitchina SS, Hotta O, Kitamura H, Miyazawa S, Natori Y, Sugai H, Taguma Y, Natori Y. Tubulointerstitial expression of lymphotactin in human glomerulonephritis. 34th ASN Meeting in San Francisco, October 13-17, 2001.
2. Miyazawa S, Deenitchina SS, Hotta O, Natori Y. Protective role of mast cells on renal fibrosis: use of mast cell deficient

- rats. 34th ASN Meeting in San Francisco, October 13-17, 2001.
3. Deenitchina SS, Hotta O, Kitamura H, Sugai H, Miyazawa S, Taguma Y, Natori Y. Tubulointerstitial Lymphotactin (Ltn)-positive Cells in Glomerulonephritis (GN). 第44回 日本腎臓学会総会 (東京) 5月27日-29日, 2001.
 4. 宮澤しのぶ, 欧周羅, スザナ・デニチナ, 名取有美子, 堀田修, 名取泰博. 腎間質繊維化における mast cell の役割 : mast cell 欠損ラットを用いた検討. 第44回 日本腎臓学会総会 (東京) 5月27日-29日, 2001.
 5. 宮澤しのぶ, 名取泰博. mast cell は巣状糸球体硬化症モデルの間質線維化に抑制的に作用する. 第31回 日本免疫学会総会・学術集会 (大阪) 12月11-13日, 2001.
- H. 知的財産の出願・登録状況
なし

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

腎実質上皮細胞の macrophage 化に関する研究

分担研究者 堀田 修 仙台社会保険病院腎センター部長

研究要旨

尿中に出現する大型の macrophage 様細胞（我々は Giant Macrophage, GM と名づけた）の形質的特徴、ならびに臨床的意義について検討した。尿中 GM は CD68、25F9 陽性で成熟型 macrophage の形質を有する。また、GM は細胞質に脂肪を含みいわゆる脂肪球と相同である。一方、GM の一部は上皮細胞の形質である cytokeratin 陽性である。尿中落下細胞から得た尿細管上皮細胞は culture 状態下で CD68 抗原の発現を認める。正常腎組織では GM は存在しないが、非選択的蛋白尿を有する進行性糸球体疾患では主に尿細管腔内に存在し、一部の尿細管上皮細胞、Bowman's capsule 上皮細胞、糸球体上皮細胞陽性である。臨床的には腎症の進行速度ならびに非選択的蛋白尿の尿中排泄の程度と有意な相関を認めた。以上より、GM は protein-loading cytopathy にともない、上皮系細胞が形質転換し成熟型 macrophage の形質を有するに至ったものと考えられる。また、コレステロールの高感度アッセイ系を用い、尿中微量コレステロール（mCHO）を測定した結果、尿中 mCHO は尿中 GM 細胞数ならびに腎機能低下速度と正相関した。GM もしくは mCHO の解析は protein-loading cytopathy の評価に役立つ。

A. 研究目的

糸球体疾患に特徴的な macrophage として尿中には大きさが末梢血単球と同じである CD16 抗原（Fc γ RIII）の炎症惹起性 macrophage と大型で macrophage の形質である CD68 抗原を発現しその多くは脂肪を含有する macrophage 様細胞がある（我々はこの細胞を giant macrophage, GM と名づけた）。前者は炎症惹起性 macrophage との性格を有し糸球体急性炎症病変の形成に積極的に関与している。一方、GM に関してはその起源を含め臨床的意義についての検討はこれまでほとんどなされていない。今回、我々は GM の起源、病的意義を明らかにする目的で尿中細胞、腎生検標本等を用い種々の解析を加えた。さらにコレステロール高感度アッセイ法を用い尿中微量コレステロール（mCHO）を測定し臨床的意義を検

討した。

B. 研究方法

- 1) 各種腎疾患における腎生検標本を用い GM の存在の有無とその程度、ならびに GM の発現する抗原を検索した。
- 2) 各種腎疾患における尿中の GM の存在とその数、ならびに尿中 GM が発現する抗原について解析した。
- 3) 尿中落下細胞を培養し培養細胞における CD68 抗原の発現の有無を検索した。
- 4) 尿中微量コレステロール（主体は HDL コレステロール）を測定し尿中 GM との関連について解析した。
- 5) mCHO の腎症の予後予測因子としての意義を検討した。

(倫理面への配慮)

患者検体の採取に際しては、インフォームドコンセントを行った。

C. 研究結果

- 6) 正常腎組織には GM は存在せず、非選択的蛋白尿を有する症例において尿細管腔内を中心に GM をみとめた。症例の一部では尿細管上皮細胞の一部、Bowman's capsule の一部、糸球体上皮細胞の一部にも CD68 の陽性所見をみとめた。
- 7) 腎組織の GM は CD68、25F9、

vimentin 陽性で cytokeratin 陰性、胞体内にしばしば脂肪球を有する。腎組織中の単位尿細管腔数当たりの GM 数は非選択的蛋白尿の程度と相関した。

- 8) 尿中 GM の大半は脂肪を含有し CD68 に加え 25F9、vimentin 陽性であり、cytokeratin 陰性であったが、一部の GM は CD68 と cytokeratin の両者が陽性であった。
- 9) 尿中 GM の排泄量は非選択的蛋白尿の程度と相関し、大量の尿中 GM 排泄が認められる症例は腎機能の低下速度が速い。(Fig.1, Fig.2)

Fig. 1

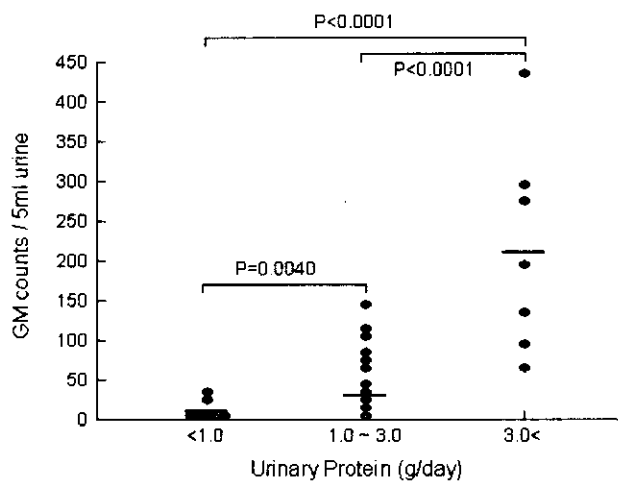
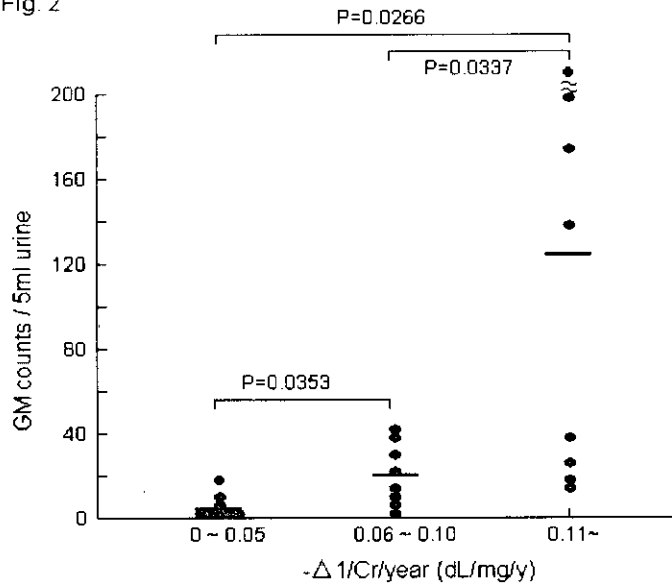


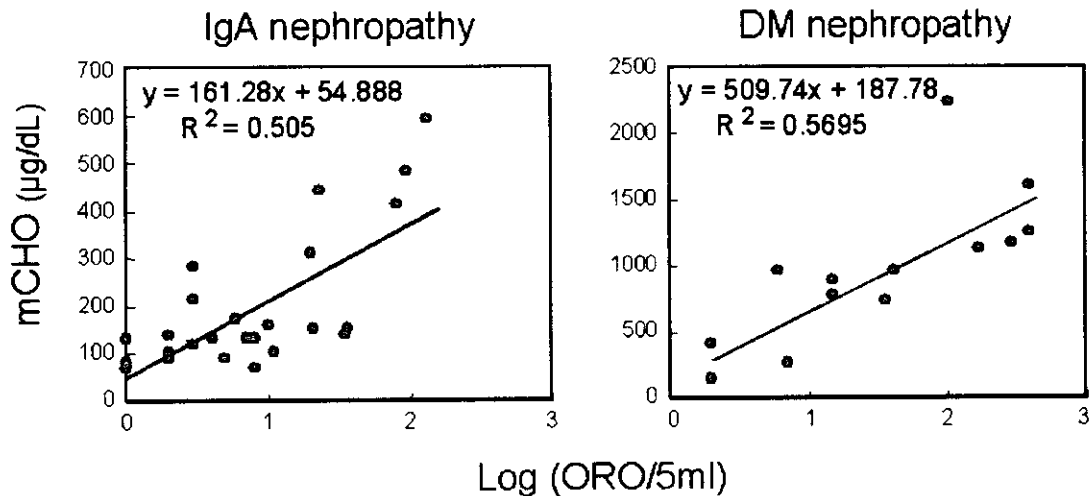
Fig. 2



- 10) 培養尿細管上皮細胞に CD68 の発現を認めた。
 11) 尿中微量コレステロール（主に HDL コレステロール）排泄の程度と
 Fig. 3

尿中 GM 数との間に有意な相関を認めた (Fig3)。

Correlation between mCHO and ORO counts



- 12) mCHO を毎月 prospective に測定した Cr1.5mg/dL 以上の慢性腎不全患者 70 例 8 例においてにおいて 6 ~ 12 月間の観察期間中に Cr 値が

前値 1.5 倍以上の上昇を認めた（進行例）。尿中 mCHO/Cr(mg/gCr) 値の 2.0、3.0、4.0 および 5.0 を cut off 値とした場合進行例を診断する