

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

巣状糸球体硬化症自然発症モデル BUF/Mna ラットに関する研究

研究協力者 吉村 吾志夫  
昭和大学藤が丘病院腎臓内科助教授

研究要旨

我々はBUF/Mna系ラットの蛋白尿発症感受性遺伝子Pur1がラット第13番染色体にあることを報告した。一方、ヒト先天性ネフローゼ症候群の原因遺伝子ポドシンをencodeするNPHS2がラット第13番染色体に存在することが示された。我々は、Pur1とNPHS2が互いにホモログの関係にあるか否かを明確にする目的にて、NPHS2のラットホモログ (Nphs2) のcDNA全長、及び、全3' UTRの塩基配列を決定し、蛋白尿発症BUF/Mna系ラットと非発症WKY/NCrj系ラットで塩基配列の比較をした。さらに、real-time PCRで両系統でのNphs2のmRNAの発現量を比較した。両系統で塩基配列とmRNAのサイズに全く差がみられなかった。Pur1とNphs2のmRNAの発現量の比は1:1.5であった。従って、Pur1はNphs2のホモログではないことが示された。Pur1は新たな蛋白尿発症感受性遺伝子である。

A. 研究目的

BUF/Mna 系ラットは巣状糸球体硬化症自然発症モデルラットであり高度蛋白尿を呈する。我々は Pur1 と命名した本ラットの蛋白尿発症感受性遺伝子がラット第 13 番染色体にあることを報告した。一方、ヒト先天性ネフローゼ症候群の原因遺伝子として NPHS1, 2 と ACTN4 の 3 つが現在同定されている。シンンテニー解析の結果、ポドシンを encode する NPHS2 のみがラットで第 13 番染色体に存在することが示された。本研究の目的は、Pur1 と NPHS2 が互いにホモログの関係にあ

るか、或いは、Pur1 は新たな蛋白尿発症感受性遺伝子かを明確にすることにあつた。

B. 研究方法

PCR direct cloning の手技を用いて、NPHS2 のラットホモログ (Nphs2) の cDNA 全長、及び、全 3' UTR の塩基配列を決定し、蛋白尿発症 BUF/Mna 系ラットと非発症 WKY/NCrj 系ラットで塩基配列の比較をした。さらに、real-time PCR の系 (LightCycler-Hybridization probe DNA テストシステム) を用いて両系統での Nphs2 の

mRNA の発現量を比較した。

(倫理面への配慮)

動物を飼育する部屋の適切な保湿を考慮した。また、脾臓やテールからの DNA 抽出などに際しての実験動物拘束時間は可能な限り短くすした。外科的手術は熟練した研究者が行った。無菌操作、麻酔に関しても十分な注意を払った。不必要なストレスを動物に与えないように細心の注意を払った。

### C. 結果

蛋白尿発症 BUF/Mna 系ラットと非発症 WKY/NCrj 系ラットで cDNA 全長、及び、全 3' UTR の塩基配列には全く差がみられなかった。また、BUF/Mna 系と WKY/NCrj 系とで mRNA のサイズに差はなく、Pur1 と Nphs2 の mRNA の発現量の比は 1 : 1.5 であった。以上の実験結果は、Pur1 は Nphs2 のホモログではないことを示している。

### D. 考察

本研究の副産物として、ラット Nphs2 (ポドシン) の cDNA 全長、及び、全 3' UTR の塩基配列を決定した。ラットポドシンの open reading frame (ORF) は 1149 個の塩基よりなり、383 個のアミノ酸をコードしていた。全 3' UTR は 417 個の塩基よりなっていた。これらの情報とエクソン・イントロン境界に関する情報の詳細は、GenBank Accession number AB091379、及び、AB094120-94124 にて知ることが可能である。ラットポドシンはマウスポドシンとはアミノ酸レベルで 94.0%の、

また、ヒトポドシンとはアミノ酸レベルで 85.1%のホモロジーを持っていた。いずれにしても、先に行ったシクシー解析と本研究結果より、Pur1 はヒトの先天性ネフローゼ症候群の原因遺伝子として同定された既知のどの蛋白尿原因遺伝子とも異なる遺伝子であることが明らかにされた。Pur1 の生物学的活性として蛋白尿惹起性を有していることは、Pur1 locus を WKY/NCrj 系ラットに transfer したコンジェニックラットの表現型の病理学的・生物科学的解析により確認された (投稿中論文)。

### E. 結論

Pur1 は新たな蛋白尿発症感受性遺伝子である。Pur1 のさらなる解析は、現時点では不詳であるヒト蛋白尿発症感受性遺伝子を同定していくうえで有益な情報を提供してくれるであろう。

### F. 健康危険情報

本研究遂行は健康にとって危険であるような特記事項を有さなかった。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Nakao N, Yoshimura A, Morita H, et al. Combination treatment of angiotensin-II receptor blocker and angiotensin-converting-enzyme inhibitor in non-diabetic renal diseases (COOPERATE): a randomized controlled trial. Lancet 361 117-

124, 2003

2. 学会発表

Morita H, Yoshimura A, Nakao N, et al. Further analysis of a proteinuria susceptible gene, Purl, in Buf/Mna rat. 35<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Nephrology (Philadelphia, Oct 30–Nov 4, 2002)

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

各個研究報告書

ネフローゼ症候群の治療におけるシクロスポリン血中濃度モニタリング方法  
に関する研究

研究協力者 御手洗哲也（埼玉医科大学総合医療センター第四内科教授）

共同研究者 野入千絵、松村治、今澤俊之、永野忠相\*

（埼玉医科大学総合医療センター第四内科、\*同薬剤部）

研究要旨

ネフローゼ症候群患者でシクロスポリンの薬物動態パラメータを検討した結果、服薬後 2 時目の血中濃度が AUC<sub>0-4</sub> 値と相関性が高いことから、血中濃度のモニタリングに有用と思われる。

A. 研究目的

難治性ネフローゼ症候群（NS）に対する治療薬としてカルシニューリン阻害薬であるシクロスポリン（CSA）が使用されているが、CSA の十分な治療効果を得るためにも、また腎毒性をはじめとする副作用発現を抑制するためにも、血中濃度をモニタリングする方法を確立する必要がある。本研究では CSA 血中濃度のモニタリング方法として AUC<sub>0-4</sub> 値を測定し、服薬後 2 時間値（C<sub>2</sub> 値）の有用性を明らかにする。

B. 研究方法

十分なインフォームドコンセントを得て、ネフローゼ症候群の患者 19 例（微小変化型 6 例、膜性腎症 6 例、FSGS 5 例、MPGN、ループス腎炎、各 1 例；平均年齢、41 歳）を対象とした。検査当日は朝食摂取後に来院し

てもらい、服薬前（C<sub>0</sub>）採血後 200ml の水にて、CSA のマイクロエマルジョン製剤（ネオーラル）を含め、朝の薬全てを同時に内服し、服薬後 1 時間、2 時間、3 時間、4 時間の計 5 ポイントにおいて、EDTA 加全血採血を施行し、血中 CSA 濃度を FPIA 法にて測定した。AUC<sub>0-4</sub> 値は移植領域で使用されている回帰式から求めた値（推定値）と実測値（台形法にて算出）を同一患者において比較し、trough 値（C<sub>0</sub> 値）、C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>、C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub> 値との相関性を検討した。また、入院患者では血中 CSA 濃度の推移を、12 時間まで観察した。

C. 研究結果

入院患者にて CSA マイクロエマルジョン製剤服用後の血中濃度の推移から、薬物動態パラメータを検討した成績では、多くの症例で T<sub>max</sub> は 80 ～100 分であった。服薬後 4 時間目ま

での血中濃度の推移を検討した NS 患者 19 例については、多くの症例で 1 時間目または 2 時間目に血中濃度のピークが認められた。服薬前 (C0 値)、服薬後の C1, C2, C3, C4 値から推定した AUC0-4 値との実測値の相関を検討した結果、1 ポイントの血中濃度からの推定値で見ると、実測値との相関係数は、C0 値で 0.545、C1 値で 0.466、C2 値で 0.724、C3 値で 0.494 であり、C2 値による推定値が実測値と最も高い相関を示した。

頻回再発型 NS と難治性 NS の 2 群に分けての検討すると、頻回再発型 NS では C0 値による推定 AUC0-4 値の相関係数が 0.175 であるのに対し、C2 値による推定値の相関係数は 0.731 と、はるかに高い相関を示した。難治性 NS の場合も同様で、C0 値よりも C2 値による推定値の方が実測 AUC0-4 値に高い相関を示した。また、非寛解期と寛解期に分けて検討したが、いずれも C0 値よりも C2 値による推定 AUC0-4 値の方が実測値に高い相関性を示した。さらに、C0 値からの推定値は実測値に比べて高い傾向が認められた。

#### D. 考察

わが国では、1996 年から難治性ネフローゼ症候群と頻回再発型ネフローゼ症候群に対する治療薬として CSA が使用可能となり、2000 年 3 月からは腸管からの吸収を安定化させた CSA のマイクロエマルジョン製剤 (ネオーラル) が用いられるようにな

った。微小変化型と巣状糸球体硬化症に対する CSA の有効性は確立しており、膜性腎症に対しても、North American Nephrotic Syndrome Study Group から有効性を示唆する成績が報告されており、CSA が副腎皮質ステロイド薬に続く第二選択薬となりつつある。今回のわれわれの成績は、C2 値による血中濃度のモニタリングが最も AUC0-4 値を反映しており、臨床上的有用性が確認された。

CSA は細胞内でシクロフィリンと結合し、カルシニューリン活性を阻害することで、IL-2 遺伝子の転写を抑制し、T 細胞機能を抑制すると考えられている。移植患者を対象に、血中 CSA 濃度とカルシニューリン活性との関係を検討した成績では、血中 CSA 濃度が高くなる 1~2 時間目にカルシニューリン活性が最も低下しており、カルシニューリン阻害作用のピークが血中濃度のピークと一致することが報告されている。ネフローゼ症候群に対する作用機序は明らかにされていないが、有効かつ副作用の少ない CSA 投与量の決定には、適正な薬物血中濃度のモニタリングが必要と思われる。従来 CSA 製剤 (サンディミュン) は吸収が不安定で安定した薬物動態が得られず、比較的再現性の高いトラフ値が血中濃度のモニタリングに使用されてきた。CSA のマイクロエマルジョン製剤が開発されてからは腸管からの吸収が安定化し、Tmax、Cmax の変動が従来 CSA に比べ明らかに減少し、CSA 血中濃度のモニタリング

が可能となった。我々の成績でもマイクロエマルジョン製剤の血中濃度時間曲線を見ると、投薬後4時間までの変動が最も大きく、トラフ値の変動は小さい。したがって、AUC<sub>0-4</sub>値は、吸収相・分布相の吸収量の違いを最も鋭敏に捉えており、移植領域と同様に薬物動態のパラメータとしてAUC<sub>0-4</sub>値が有用であることが推察される。

しかし、血中濃度のモニタリングに毎回5回も採血することは臨床上問題もあり、1~2回の採血で血中濃度をモニタリングする方法が検討され、移植領域では1ポイントで評価する場合は、AUC<sub>0-4</sub>値と最も相関性の高いC<sub>2</sub>値によるモニタリングが有用とされている。今回、NS患者を対象に検討した結果、NSにおいてもC<sub>2</sub>値がAUC<sub>0-4</sub>値と相関性が高いことが明らかにされた。NSの場合には、治療効果（蛋白尿の抑制）とCSAのリンパ球に対する薬理作用が直接関連するのかどうかは明確にされていないが、寛解導入と寛解維持に必要な血中濃度に違いがあることが予測されるため、今後、それぞれにおけるターゲットC<sub>2</sub>値やターゲットAUC<sub>0-4</sub>値を設定する必要があると考えている。

## E. 結論

CSA マイクロエマルジョン製剤を用いた場合、NS患者においてもC<sub>max</sub>は服薬後1~2時間に認められた。移植症例から得られた推定式を用

いた場合、トラフ値からの推定値は実測値に比べて明らかに高値を呈し、CSA血中濃度をoverestimateする危険がある。NS患者でのCSA血中濃度のモニタリング方法として、1ポイント採血の場合にはC<sub>2</sub>値が最も実測AUC<sub>0-4</sub>値を反映していた。

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

各個研究報告書

巣状糸球体硬化症に見られる糸球体上皮細胞の形質転換に関する研究

研究協力者 佐藤 博

東北大学医学部附属病院腎・高血圧・内分泌科講師

共同研究者 大高亮彦、大高徹也

研究要旨

進行性腎障害の原因になる糸球体硬化の初期病変に糸球体上皮細胞の形質転換が関わっていることを免疫組織学的に手法により明らかにした。

A. 研究目的

難治性ネフローゼ症候群では、糸球体上皮細胞に形質転換が起こり、それを、契機として以後の硬化病変が不可逆的に進行していく可能性がある。この形質転換の内容を明らかにし、硬化病変予防の手掛かりを探るのが本研究の目的である。

B. 研究方法

難治性ネフローゼ症候群の代表である巣状糸球体硬化症の腎生検例35例を対象とし、糸球体上皮細胞の分化に関わる転写因子 Pax2, WT1 の糸球体における発現状態を酵素抗体法による免疫組織学的手法で検討した。

（倫理面への配慮）

対象患者には腎生検標本を腎障害の発症・進展・治療に関わる研究に利用させていただくことを口頭・文書で説明し了解を得ている。なお、本研究

はヒトゲノム・遺伝子解析研究ではない。

C. 結果

巣状糸球体硬化症の初期に認められる上皮細胞成分の増殖（Cellular lesion=CL）部位では、通常胎生期の一時期にしか発現しないはずの Pax2 が陽性発現を示した。その一方、本来は成熟上皮細胞に強発現する WT1 の発現が減弱していた。

硬化が進行した部位では Pax2 の発現はほとんど見られなかった。

D. 考察

Pax2 は糸球体上皮細胞の分化に関わる転写因子であり、発生過程の一時期に上皮細胞に陽性発現を示すが、成熟した正常糸球体上皮細胞では発現が見られない。今回の研究で、巣状糸球体硬化症の初期には、WT1 から Pax2 への発現転換が起こり、これが

以後の糸球体組織障害の進展に関わっている可能性が示唆された。

#### E. 結論

難治性ネフローゼ症候群の代表である巣状糸球体硬化症では、その早期に糸球体上皮細胞の形質転換（上皮細胞の形質が胎生期に戻るような転換）が起こっている。

#### F. 健康危険情報

本研究と直結した危険情報はない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

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: 475-485, 2002

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
各個研究報告書

ネフローゼ症候群における尿中 interleukin-17 の検討

研究協力者 松本 絃一  
日本大学医学部内科学講座内科 2 部門教授

研究要旨

ネフローゼ症候群の病態には細胞性免疫の関与が深く関与していることが指摘されている。Interleukin-17 (IL-17) は主に CD4<sup>+</sup>T 細胞から産生される分子量 20-30KD の多彩な生物学的作用を有するサイトカインであり、特に T 細胞の情報を単球・マクロファージに伝達する作用が注目されている。今回我々はネフローゼ症候群の病態を解析する目的で患者尿中の IL-17 (uIL-17) を測定した。ネフローゼ症候群患者の uIL-17 は正常者に比較して有意に高値を示し、ステロイド治療により病態が寛解すると減少した。IL-17 は基礎疾患の病型よりもネフローゼ症候群の病態に関与している可能性があり、また uIL-17 は疾患の活動性を反映している可能性が示唆された。

A. 研究目的

ネフローゼ症候群の病態におけるサイトカイン産生の異常の関与が報告されてきたが、未だその詳細は不明である。IL-17 は T cell 依存の免疫応答の early initiator であり、また免疫系と造血系を繋ぐサイトカインネットワーク要素の一つである。今回我々はネフローゼ症候群における IL-17 の役割を解明する目的で患者尿中の IL-17 (uIL-17) を測定して若干の知見を得たので報告する。

B. 研究方法

対象は微小変化型ネフローゼ症候群 (MCNS) 19 例、巣状糸球体硬化症

(FGS) 15 例および IgA 腎症 (IgAN) 患者 20 例であり、正常者 20 例をコントロールとした。uIL-17 は anti-human IL-17 monoclonal antibody (R&D Systems, Minneapolis, MN) を使用した ELISA 法で測定し、各種の臨床検査成績と比較した。この際ステロイド剤服用前後の uIL-17 も同時に測定した。

C. 結果

- 1) ネフローゼ症候群患者の uIL-17 は正常者に比較して有意に高値を示した。
- 2) ネフローゼ症候群患者の uIL-17 は病態の活動期には高値を示し、病態が寛解すると減

少した。

- 3) ネフローゼ症候群の基礎疾患の間における uIL-17 の有意差はみられなかった。

ステロイド治療により uIL-17 は有意に減少した。

#### D. 考察

IL-17 は主に活性化された CD4<sup>+</sup>T cell から産生される新規のサイトカインであり、*in vivo* においてマクロファージに作用し、免疫応答の開始と維持に、中心的な役割をしている事が示唆されている。我々は IgA 腎症患者における IL-17 の関与を検討しているが、*in vitro* の系で IL-17 は単球・マクロファージの IL-1 $\beta$  および TNF- $\beta$  の産生を促進し、逆に IL-4 と IL-10 はその産生を抑制することを報告してきた。最近、IL-17 と CD40 は共同的に作用して近位尿細管上皮細胞を刺激して、IL-6、IL-8、MCP-1、PANTES の産生を増加させることが報告されている。ネフローゼ症候群の病態における IL-17 の作用機序は現在解析中であるが、その病態の進展における関与が示唆される。尿中の IL-17 の排泄機序に関しても現在研究が進行中である。

#### E. 結論

IL-17 は基礎疾患の病型よりもネフローゼ症候群の病態に関与している可能性があり、また uIL-17 は疾患の活動性を反映している可能性が示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Matsumoto K, Kanmatsuse K: Increased urinary excretion of interleukin-17 in nephrotic patients. *Nephron* 91: 243-249, 2002.
- 2) Matsumoto K, Kanmatsuse K: Interleukin-17 stimulates the release of pro-inflammatory cytokines by blood monocytes in patients with IgA nephropathy. *Scand J Urol Nephrol* 37, in press, 2003.

##### 2. 学会発表

- 1) Matsumoto K, Kanmatsuse K: Increased urinary levels of interleukin-17 in patients with minimal-change nephrotic syndrome. 2001 ASN/ISN World Congress of Nephrology, San Francisco, 2001, 10 (*J Am Soc Nephrol* 12: 732A, 2001).
- 2) 松本紘一、上松瀬勝男：微小変化型ネフローゼ症候群患者における尿中 interleukin-17 の検討、第 45 回日本腎臓学会学術総会、大阪、2002. 5. (*日本腎臓学会誌* 44:199、2002)
- 3) 松本紘一、上松瀬勝男：IgA 腎症患者における interleukin-17 の検討、第 46 回日本腎臓学会学術総会、東京、2003. 5 (*日本腎臓学会誌* 45: 196、2003)

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
各個研究報告書

膜性腎症の補体 C3 の臨床病理学的意義に関する研究

研究協力者 西 慎一

新潟大学医学部附属病院血液浄化療法部助教授

研究要旨

非ネフローゼ膜性腎症(MN)の予後予測因子を探索した。完全完解に至る症例は補体C3が高いことが判明した。C3高値、これに関連背景因子が予後影響因子であると推測された。

A. 研究目的

非ネフローゼ症候群膜生腎症(MN)の予後予測（完全完解、非完全完解）をする上で腎生検時のデータの中に有用なマーカーが存在するか否か検討した。

非ネフローゼ症候群MNの治療法は確立されておらず、完解予後が予測可能であれば、過剰な免疫抑制療法を回避可能と思われる本研究を実施した。

B. 研究方法

腎生検で膜性腎症と診断された症例の中で、非ネフローゼ症候群例 89 例を対象とした。これらの症例の予後は、完全完解 39 例、非完全完解 50 例であり、この結果により 2 群に分類した。

（倫理面への配慮）

腎生検に関する同意と予後調査に関する同意を対象症例より頂いた。

C. 結果

腎生検時の臨床データとして尿蛋白量血清総蛋白、BMI、S-Cr、Ccr、総コレステロール、C3、C4、C50、IgG、IgA、IgM を選択し 2 群間で比較した。唯一、C3 が完全完解群で有意に高いという結果が得られた。(p<0.05 92.1 ±22.9 vs. 80.9±21.3 mg/dl)。次に上記の検査データの中で、C3 と関連のある因子を求めた。唯一、BMI が有意な正相関を示した (p < 0.05)。(図 1 参照)

D. 考察

完全完解に至る非ネフローゼ膜性腎症は補体C3が高いことが分かった。補体 C3 は、他の臨床データとの相関において、BMI と正相関があることも判明した。

このデータから推測されることは、栄養状態が非ネフローゼ膜性腎症の完全完解予後に影響している可能性

があるということである。具体的に C3 が高値であること、栄養状態が良いことが、完全完解に結びつく機序を検討することはできなかったが、今後、これらの背景にある要因と完全完解との関連を更に検討していく価値があると考えられた。

#### E. 結論

完全完解に至る非ネフローゼ膜性腎症は、補体 C3 が高い。C3 高値は完解予測因子として重要である。

#### F. 健康危険情報

特に発生なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 西 慎一他：膜性腎症の治療戦略 ACE 阻害薬 腎と透析 第 50 巻 P159-164, 2001

2) Nishi S. et al : Prognosis of Japanese membranous nephropathy patients with nephritic syndrome. Kidney Int Vol 52, pS-117-178, 1997

##### 2. 学会発表

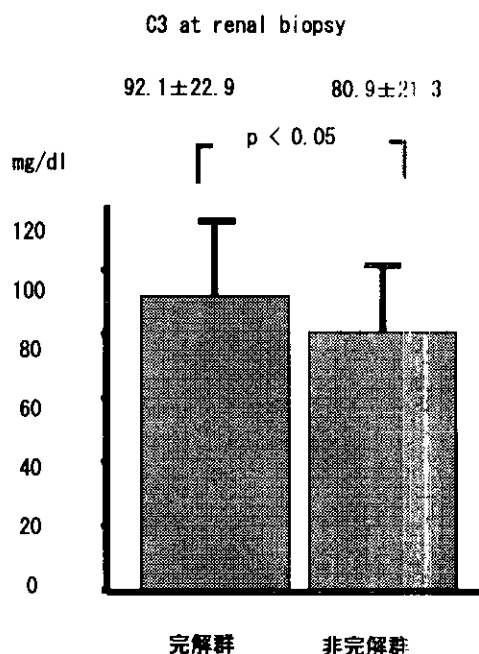
第 30 回日本腎臓学会東部部会 W1-6 ステロイド薬と付加治療 西 慎一、下条文武 新潟大学医学部附属病院血液浄化療法部

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

出願予定なし。

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録
3. その他  
なし

図 1.



厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

各個研究報告書

IgA 腎症における fibroblast specific protein 1 (FSP1) 陽性細胞の検討

研究協力者 椎木 英夫（奈良県立医科大学第1内科講師）

共同研究者 西谷喜治, 岩野正之, 山口通雅, 原田幸児, 西野俊彦, 斎藤能彦  
バンダービルト大学内科 Eric G Neilson

研究要旨

IgA腎症患者の腎生検組織を用い、抗fibroblast specific protein 1 (FSP1) 抗体による酵素抗体法を実施した。FSP1陽性細胞は、間質線維化領域に主に認められた。FSP1陽性細胞数は、間質線維化面積および腎機能と正相関を示した。予後予測因子の検討では、高度の蛋白尿・高血圧・FSP1陽性細胞数高値が危険因子であった。

A. 研究目的

慢性腎不全の進展には間質の線維化が深く関与していることが知られている。また、腎生検組織での間質線維化病変の重症度は糸球体病変の重症度よりも腎機能予後の判定に有用であることが報告されている(Bohle A et al. Exp Nephrol 2:205-210, 1994)。さらに、線維芽細胞は、間質の線維化領域に浸潤し、タイプ I・タイプ III コラーゲンなどの間質型コラーゲンを産生することから、間質線維化の発症および進展に重要な役割を果たすことが示唆されている。1995年にNeilsonらは、線維芽細胞に特異的なマーカである fibroblast specific protein 1 (FSP1) をクローニングし、FSP1 遺伝子上流の解析から、線維芽細胞に特異的なプロモーター領域を同定した (Strutz F

et al. J Cell Biol 130:393-405, 1995)。岩野らは、FSP1 のプロモーター領域に thymidine kinase の塩基配列を繋いで構築した遺伝子を導入したトランスジェニックマウス(FSP1-TK マウス)を用い、間質線維化進展過程での線維芽細胞の役割を明確にした(Iwano M et al. Mol Ther 3:149-159, 2001)。われわれは、IgA 腎症患者の腎生検組織を用いて FSP1 陽性細胞の局在を検討し、臨床所見、腎生検所見、および予後と FSP1 陽性細胞数との関連について検討した。

B. 研究方法

IgA腎症 153 例の腎生検組織を用い、抗 FSP1 抗体による酵素抗体法を実施し FSP1 陽性細胞数を計測した。また、腎生検時に Scr 値が 1.4mg/dl 以下であ

った142例を選択し、平均5.5年間の経過を観察後に予後予測因子を検討した。

(倫理面への配慮)

腎生検施行前に腎生検組織および病歴の研究への使用を説明し、同意を得た。

### C. 結果

FSP1陽性細胞は、間質線維化領域に主に認められた。FSP1陽性細胞数は、年齢 ( $r=0.28$ ,  $p=0.0005$ )・1日尿蛋白量 ( $r=0.28$ ,  $p=0.0005$ )・総コレステロール値 ( $r=0.17$ ,  $p=0.04$ )・血清クレアチニン値 ( $r=0.73$ ,  $p<0.0001$ )・全筋状硬化 ( $r=0.57$ ,  $p<0.0001$ )・メサンギウム増殖 ( $r=0.50$ ,  $p<0.0001$ )・間質線維化面積 ( $r=0.80$ ,  $p<0.0001$ )と正の相関、クレアチニン・クリアランス ( $r=-0.55$ ,  $p<0.0001$ )と負の相関を示した。腎生検時にScr値が1.4mg/dl以下であった142例を対象とした検討では、Kaplan-Meier法による解析で、FSP1陽性細胞数高値群 ( $\geq 20$ 個/HPF)は、低値群 ( $< 20$ )に比して腎生存率が有意に低かった。予後予測因子の検討で、高度の蛋白尿 ( $\geq 3$ g/日: RR 6.30)、高血圧 (RR 23.3)、およびFSP1陽性細胞数高値 ( $\geq 20$ 個/HPF: RR 47.8)が危険因子であった。

### D. 考察

FSP1陽性細胞数は、間質線維化領域の拡大・腎機能の悪化とともに増加しており、FSP1陽性細胞が腎機能障害の進行に関与していると考えられ

る。さらに、Kaplan-Meier法による解析や多変量解析の結果から、FSP1陽性細胞数はIgA腎症の予後予測因子として有用であることが示唆される。

### E. 結論

FSP1陽性細胞数は、IgA腎症の予後予測因子として有用である。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

なし

#### 2. 学会発表

第100回 日本内科学会総会

### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

#### 1. 特許取得

なし

#### 2. 実用新案登録

なし

#### 3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
各個研究報告書

ネフローゼ症候群におけるシクロスポリンの血中濃度  
モニタリングに関する研究

研究協力者 頼岡 徳在  
広島大学大学院医歯薬学総合研究科病態制御医科学助教授  
共同研究者 正木崇生、勝谷昌平  
広島大学大学院医歯薬学総合研究科病態制御医科学

研究要旨

シクロスポリン (CyA) 投与中の糸球体疾患患者を対象にCyAの血中濃度モニタリングの有用性について検討した。投与2時間後血中濃度 (C2) と血清クレアチニン変化率には相関が認められたが、従来用いられているトラフ値 (C0) は個体内の変動が大きく、相関は認められなかった。さらに実測された投与後4時間の吸収量 (AUC0-4) とC0、投与1時間後血中濃度 (C1)、C2、投与3時間後血中濃度 (C3)、投与4時間後血中濃度 (C4) 各々から推定されたAUC0-4の検討ではC2が最も近似していた。以上より、1点のみのモニタリングではC2の有用性が高いことが示された。

A. 研究目的

慢性維持透析患者が年々増加し、医療経済を圧迫している現在、その原疾患の治療法確立は急務である。

ステロイド抵抗性、依存性ネフローゼ症候群やSLEなどの自己免疫疾患に免疫抑制薬であるシクロスポリン (CyA) の有効性が知られ、日常診療においても広く用いられるようになってきた。しかしながら、CyAの体内動態は個体間、個体内で変動が大きく、できるかぎり副作用が少なく適切な効果を得るためには血中濃度管理すなわち Therapeutic Drug Monitoring (TDM)

が必要とされている。このモニタリングに従来は次回投与直前の血中濃度 (トラフ値: C0) が用いられてきたが、その信頼性には疑問も多い。そこで CyA 投与中の患者において C0、投与2時間後血中濃度 (C2) の個体内変動および安全性に関する有用性について検討した。さらに近年、腎移植患者において C0 に比べ投与後4時間の吸収量 (area under the blood concentration curve: AUC0-4) が治療効果、安全性に最も相関する精度の高いモニタリングであることが示された。ただし、AUC0-4 を算出するには頻回の血中濃

度の測定が必要となり、日常診療には不向きである。ところで最近、AUC0-4を1回の採血にて推定できることが報告された。そこでAUC0-4と最も相関する採血ポイントを検討した。

## B. 研究方法

### 1. 対象

C0、C2の変動および安全性に関する有用性の検討にはステロイド薬とCyA（ネオーラル：1～3mg/kg）を併用投与中の安定期ループス腎炎8例、膜性腎症2例、巣状糸球体硬化症1例、IgA腎症1例を対象とした。性別は男性1例、女性11例であり、年齢は22歳から70歳（平均42歳）である。

AUC0-4の検討には難治性ネフローゼ症候群にてステロイド薬とCyA（ネオーラル：3～4mg/kg）を併用投与中の膜性腎症3例、ループス腎炎V型1例を対象とした。性別は男性2例、女性2例であり、年齢は44歳から70歳（平均58歳）である。

### 2. 方法

CyAの血中濃度測定にはFluorescence Polarization Immunoassay（FPIA法）を用いた。血中濃度変動および安全性に関する有用性の検討には健康保険適応範囲内で施行されているC0あるいはC2と測定前後の血清クレアチニン（Cr）変化率を求め、各々の相関を検討した。AUC0-4の検討にはC0および投与1、2、3、4時間後の血中濃度（C1、C2、C3、C4）を測定し、打田らが報告した

回帰式を用い推定AUC0-4を求めた。そして実測AUC0-4と各々の血中濃度から推定されたAUC0-4の相関を求めた。

### （倫理面への配慮）

AUC0-4の検討には広島大学倫理委員会の承認のもとに、すべての患者よりインフォームドコンセントを書面にて得た。

## C. 結果

### 1. 安全性に関する有用性

各症例から平均3回のC0値を測定したが、変動が大きく、血清Crの変化率とも有意な相関は認められなかった。一方、C2は変動が少なく、血清Cr変化率との間に有意の正相関が認められた（図1）。さらにC2：800ng/ml以下での安全性も確認された。

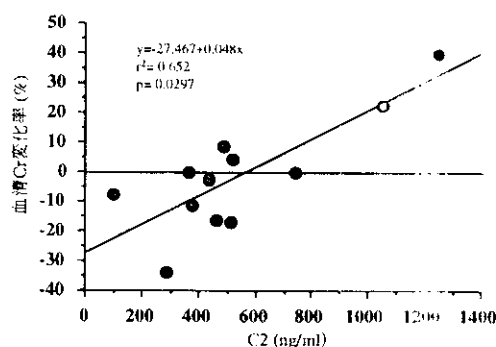


図1 CyA血中濃度（2時間値：C2）と血清Cr変化率との関係

### 2. AUC0-4に関する検討

AUC0-4は個人により変動が大きかったが（図2）、各々の測定値より算出した推定AUC0-4はC2からの推定値



と最も近似していた。

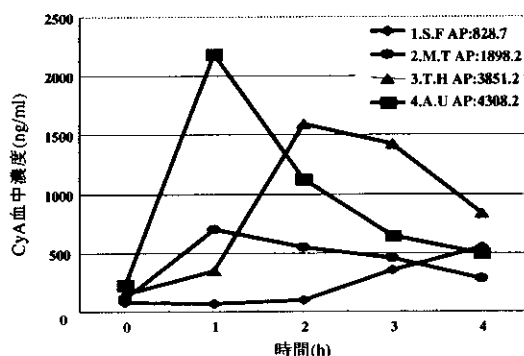


図2 CyA投与1ヶ月目のAUC0-4

#### D. 考察

CyA は骨髄抑制も少なく、使用しやすい免疫抑制薬であるが、副作用としての腎障害が問題となる。とりわけ腎疾患患者に対して投与する場合には、不可逆性の腎障害の惹起は避けなければならない。従来より、副作用とくに腎障害軽減のために血中濃度モニタリングが必要とされ、C0 が頻用されてきた。しかしながら、C0 は信頼性に乏しいことも指摘されていた。今回の我々の成績でも C0 は個体内変動が大きく、血清 Cr 変化率とも相関を示さなかった。一方、最近移植領域で提唱されている C2 は糸球体腎炎、ループス腎炎患者においても変動が少なく、血清 Cr 変化率と正の相関を示し、安全性のモニタリングに適していることが示された。

ところで最も信頼性の高いモニタリングである AUC0-4 の算出には5回の採血を必要とし、患者への侵襲、高コストなどより日常診療におけるモ

ニタリングには問題がある。そこで AUC0-4 と最も相関する採血ポイントを検討した。その結果、C2 から求めた推定 AUC0-4 が実測 AUC0-4 と最も近似していた。このことよりも、1点でのみのモニタリングであれば C2 が最も適切と考えられた。また今回の検討では C2 が 800ng/ml 以下であれば安全性が高い可能性も示された。ただし、今回の検討は症例数が未だ十分ではなく、今後より詳細な検討が必要と思われる。

#### E. 結論

CyA の血中濃度のモニタリングには C2 が適切であ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) Tanji C, Yamamoto H, Yorioka N, Kohno N, Kikuchi K, Kikuchi A; A-kinase anchoring protein AKAP 220 binds to glycogen synthase kinase-3  $\beta$  (GSK-3  $\beta$ ) and mediates protein kinase  $\alpha$ -dependent inhibition of GSK-3  $\beta$ . The Journal of Biological Chemistry, 277:36955-36961, 2002.

2) Yorioka N, Ito T, Masaki T, Ogata S, Asakimori Y, Tanji C, Kyuden Y, Komiya Y, Kumagai J, Taniguchi Y, Kohno N: Dose-dependent effect of an oral adsorbent, AST-120, in patients with early chronic renal failure.

The Journal of International Medical Research, 30:467-475, 2002.

3) Ito T, Yorioka N, Kyuden, Asakimori Y, Kiribayashi K, Ogawa T, Kohno N: Effect of glucose polymer on the intercellular junctions of cultured human peritoneal mesothelial cells. Nephron Clinical Practice 93: 97 - 105, 2003

4) Taniguchi Y, Yorioka N, Kyuden Y, Asakimori Y: Reiter's syndrome associated with HLA-B51: a case report. The Journal of International Medical Research 31 : 55- 57, 2003

## 2. 学会発表

1) Ogata S, Yorioka N, Kiribayashi K, Naito T, Kuratsune M, Kohno N(2002-7) Effect of lactate and bicarbonate on human peritoneal mesothelial cells, fibroblasts, and vascular endothelial cells, and role of basic fibroblast growth factor. XXXIX Congress of the European Renal Association European Dialysis and Transplant Association, Copenhagen

2) Nakashima A, Ago R, Doi S, Nishizawa Y, Yamashita K, Ueda C, Usui K, Fujita K, Shigemoto K, Harada S, Arita M, Yorioka N(2002-7) Effect of vitamin K2 on low turnover bone in hemodialysis patients. XXXIX Congress of the European Renal Association European Dialysis and Transplant Association, Copenhagen

3) Doi S, Nakashima A, Ago R, Nishizawa Y, Usui K, Yamashita K, Ueda C, Shigemoto K, Harada S, Arita M, Yorioka N, Fujita K (2002-7) 22-Oxacalcitriol suppresses secondary hyperparathyroidism without inducing low bone turnover in hemodialysis patient. XXXIX Congress of the European Renal Association European Dialysis and Transplant Association, Copenhagen

4) Ota K, Akiba T, Maeda T, Nakao T, Nakayama M, Yorioka N(2002-10) The use of icodextrin solution in japanese patients outcome from a double blind study. American Society of Nephrology, Philadelphia

5) Asakimori Y, Yorioka N, Kohno N, Takemasa A, Takasugi N(2002-10) Effect of polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase and apolipoprotein E gene on carotid atherosclerosis in hemodialysis patients. American Society of Nephrology, Philadelphia

6) Nakashima A, Ago R, Doi S, Yamashita K, Ueda C, Usui K, Fujita K, Shigemoto K, Harada S, Tanji C, Asakimori Y, Ogata S, Yorioka N(2002-10) Bone mineral density may be related to atherosclerosis in hemodialysis patients with non diabetic nephropathy. American Society of Nephrology, Philadelphia

7) Doi S, Nakashima A, Ago R, Yamashita K, Ueda C, Usui K, Fujita

K, Shigemoto K, Harada S, Arita M,  
Yorioka N(2002-10)Osteoprotegerin  
in hemodialysis patients with low  
bone turnover. American Society of  
Nephrology, Philadelphia

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

**多発性嚢胞腎分科会  
分担・各個研究報告**