

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

難治性ネフローゼ症候群分科会分担研究報告書

「全国アンケート調査の再検討およびステロイドと免疫抑制薬併用療法
多施設共同試験にむけて」

分担研究者 齊藤 喬雄

福岡大学医学部内科学第四講座教授

研究要旨

難治性ネフローゼ症候群の膜性腎症に関するコホート研究について詳細な再検討を行い、ステロイド等による治療効果をより明確化するとともに、長期予後の変化について考察し、国際誌に掲載した。ステロイドと免疫抑制薬の併用療法に関する多施設共同試験について計画案を具体化し、次年度より実施することとした。

A. 研究目的

前年度までの当研究班では、それまでの全国アンケート調査をもとに、難治性ネフローゼ症候群の成人例に対する診療指針を作成し、さらにそこで示された至適治療への根拠を示すための臨床研究を立案した。今年度は、診療指針にも示した膜性腎症の予後調査結果について、後ろ向きではあるが世界に類をみないコホート研究として広く世界にも発信すべきであると考え、詳細な再検討を行った。

また、昨年度立案した新たな臨床研究を次年度から多施設共同研究として実施できるように、計画の細部を決定して具体化し、体制の整備を図った。

B. 研究方法

1. 膜性腎症のコホート研究

全国の腎疾患専門施設から得られた約1000例にのぼる膜性腎症症例を、解析した結果、①Kaplan-Meier法による長期予後。②多変量解析による危険因子。③治療効果と予後の関係。④治療法の予後への効果の以上4点が、検討課題である。今回の国際誌への発表に当たっては、治療効果を従来わが国で用いられてきた完全寛解、不完全寛解Ⅰ型及びⅡ型、無効の4分類に分けて、より詳細に検討した。さらに、長期予後では15年以後の悪化が顕著となる点について、膜性腎症の発症が主に40歳以上であるので、40歳以上の巣状糸球体硬化症やメサンギウム増殖性糸球体腎炎症例との比較を統計学的に解析し、加齢による影響があるか否かを検討

した。

2. ステロイドと免疫抑制薬併用療法に関する多施設共同研究

昨年度の報告で、計画案の骨子を述べたプレドニゾン(PSL)とシクロスポリン(CyA)、およびPSLとミゾリビン(MZR)の多施設共同研究の実施に向けて、具体的な方法を決定した。

1) PSLとCyAの併用療法

〔対象〕ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群を呈する一次性膜性腎症および巣状糸球体硬化症成人例(16~75歳)である。

〔方法〕PSL 40~60mg/日を4週間投与後、インターネットにより症例登録を行う。その際、初期投与量3mg/kg/日朝夕2分割投与群と2mg/kg/日朝1回投与群の無作為化割付を行い、CyA投与を開始する。それぞれの群でのCyA投与は食前に行う。1回投与群は4週後に効果が認められなければ3mg/kg/日まで増加する。PSLは漸減し、CyA投与及び観察期間は1年とする。

〔評価項目〕主要評価項目は1日尿蛋白量であり、従来からのネフローゼ症候群治療効果分類により評価する。その他、クレアチニン・クリアランス(Ccr)や血清クレアチニン(Scr)を腎機能の指標とする。

〔観察項目〕血液一般検査や生化学的検査のほかに、CyA血中濃度を実施する。とくにC2(服薬後2時間)値を4週ごとに測定し、AUC0-4を投与開始当初と観察終了期に実施し、予測値より大幅に異なる場合には投与

量を調節する。

2) PSLとMZRの併用療法

〔対象〕ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群を呈する一次性膜性腎症成人例(16~75歳)である。

〔方法〕PSL 40~60mg/日を4週間投与後、インターネットにより症例登録を行う。その際、MZR 150mg 1日3分割投与群と朝1回投与群の無作為化割付を行う。それぞれの投与は食後に行う。PSLは漸減し、MZR投与及び観察期間は2年とする。

〔評価項目〕主要評価項目は1日尿蛋白量であり、従来からのネフローゼ症候群治療効果分類により評価する。その他、クレアチニン・クリアランス(Ccr)や血清クレアチニン(Scr)を腎機能の指標とする。

〔観察項目〕血液一般検査や生化学的検査のほかに、観察期間中にAUC0-4を実施し、予測値より大幅に異なる場合には投与量を調節する。

(研究の倫理面への配慮)

いずれの併用療法に関する多施設共同研究とも無作為化割付による介入試験であり、文部科学省および厚生労働省による「疫学研究に関する倫理指針」にしたがって実施されるように配慮した。とくに登録についてはインターネットを利用する関係上、登録前に参加各施設で連結不可能匿名化を厳格に行い、集計に当たっては個人が特定不可能なデータとなるようにした。また、研究内容の説明、同意書の作成にも十分な配慮

を行った。その上で、各施設の倫理委員会等で参加の可否をご検討いただくこととした。

C. 結果

1. 膜性腎症のコホート研究

長期予後の点について発症 15 年までは良好であるがそれ以降低下する傾向が明確となった。加齢との関係について、巣状糸球体硬化症や IgA 腎症などの高齢発症例では腎生存率が直線的に低下し、膜性腎症における弓状の低下とは異なったので、膜性腎症での治療後 15 年以降の予後の悪化は単に加齢によるだけではないことが考えられた。

治療効果と長期予後の関係については、完全寛解と不完全寛解 I 型の間に有意差はなかったが、これらの群より不完全寛解 II 型、不完全寛解 II 型より無効例の予後がそれぞれ有意に悪化していたため、治療効果が長期予後に反映されることをより明確に示すことができた。ステロイド単独投与の有効性を含め、以上の結果は *Kidney International* で発表することができた。

2. ステロイドと免疫抑制薬併用療法に関する多施設共同研究

方法で述べた PSL と CyA および PSL と MZR の併用療法に関する多施設共同研究について、当調査研究班に所属する内科系 25 施設に詳細な説明を行い、参加を呼びかけた。さらにそれらの施設を中心として全国の腎専門施設に加わっていただき、次

年度よりこの多施設共同研究を実施することとなった。

D. 考察

膜性腎症のステロイドの単独投与については、無作為対象試験(RCT)の結果から欧米ではその有効性に否定的な見解が多く、ガイドラインでも有用な治療とは認められていない。しかし、この点に関する RCT には古いものや不完全なものが多く、この見解には疑問がある。これに対して、当分科会での調査研究では、ステロイド単独投与の有効性を肯定するものであった。後ろ向きながらも多数の症例によるわが国の全国的な研究で、従来とは異なる見解が示され、国際的な学術誌に掲載される意義は大きいと思われる。

ステロイドにすぐれた免疫抑制薬を併用して、その予後の改善を図ることは、難治性ネフローゼ症候群に対する治療の大きな課題である。PSL と CyA および PSL と MZR の併用療法は、前者に関する欧米での治療成績、また後者に関するわが国での市販後調査結果から有効性が期待できる。ただ、その効果には CyA や MZR の血中濃度が大きく影響することが考えられるので、今回の臨床試験では、その測定を主要項目として取り入れた。従来のこのような試験で、薬物血中濃度について考慮が払われたものはほとんどないが、使用薬剤の性格から考えても、その測定は重要である。それぞれの併用試験において、

CyA や MZR 投与量は勿論保険適応として設定された用量内で行われ、1 回投与群と分割投与群のいずれが優位であるか現時点では予測不可能であるので、その比較は倫理的に問題はないと考えられる。また、それぞれの群の血中濃度の変化が予後にどのように影響するか、科学的にも今後の医療のためにも意義深い結果が期待できる。

E. 結論

膜性腎症のコホート研究の結果をさらに検討し、国際的にも通用できる内容として発表することができた。

効果の期待できるステロイドと免疫抑制薬の併用療法に関する多施設共同試験を、次年度より実施することとした。

F. 健康危険情報

研究結果に基づいて、難病情報センター・ホームページにおける難治性ネフローゼ症候群の一般利用者向け情報、医療従事者向け情報を平成 15 年 12 月に改訂した。

G. 知的所有権の出現登録状況

特になし

H. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shiiki H, Saito T, Nishitani Y, Mitarai T, Yorioka N, Yoshimura A, Yokoyama H, Nishi S, Tomino Y, Kurokawa K, Sakai H. Prognosis and

risk factors for idiopathic membranous nephropathy with nephrotic syndrome in Japan. *Kidney Int* 65(4): (in press)

2. 学会発表

- 1) 齊藤喬雄：難治性ネフローゼ症候群の現況と課題. 厚生労働省特定疾患事業「進行性腎障害に関する調査研究」公開シンポジウム. 第 47 回日本腎臓学会学術総会、宇都宮、2004 年
- 2) 齊藤喬雄：腎炎治療に関する未解決な問題、シクロスポリン. 第 33 回日本腎臓学会西部大会ワークショップ、名古屋、2003 年

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
各個研究報告書

「糖尿病性糸球体硬化症の組織学的進展における
最終糖化産物 AGE の関わり」

研究協力者 佐藤 博
東北大学病院腎・高血圧・内分泌科講師

研究要旨

腎生検組織標本を用いた免疫組織学的研究により、最終糖化産物AGEが、糸球体メサンギウム細胞・間質浸潤細胞の形質転換を通して糖尿病性糸球体硬化症の組織学的進展に関わっていることが明らかになった。

A. 研究目的

難治性ネフローゼ症候群を呈する疾患として、巣状糸球体硬化症、膜性腎症、糖尿病性糸球体硬化症、アミロイドシースなどがあげられる。今回、糖尿病性糸球体硬化症について、その組織学的進展における最終糖化産物 AGE の関わりを明らかにする目的で、ヒト腎組織を用いて免疫組織化学的検討を行った。

B. 研究方法

腎生検にて糖尿病性糸球体硬化症と診断された2型糖尿病 28 症例の組織標本を対象とし、代表的な AGE である CML, Pyrraline, Pentosidine について、細胞骨格蛋白 (α -smooth muscle actin:SMA, smooth muscle myosin:SMM, L-caldesmon:L-CLD, H-caldesmon:H-CLD, calponin:CLP) および浸潤細胞（全白血球、T細胞、顆

粒球、単球、マクロファージ）とともに免疫染色を行い、臨床像（尿蛋白量、BUN、血清クレアチニン；Ccr、血圧、血糖コントロール）との関連を調べた。AGE 抗体は熊本大学病態生化学分野・永井竜児先生より供与を受けた。コントロールとして、顕微鏡的血尿で腎生検を受け微小変化と診断された4症例を用いた。

（倫理面への配慮）

腎生検の実施および組織標本使用と研究内容について口頭・書面にて患者さんに説明し、同意を得て研究を行った。なお、本研究は遺伝子・ゲノムの解析に関わるものではない。

C. 結果

CML は、SMA、L-CLD とともに、糖尿病性糸球体硬化症のメサンギウム領域に染色され、いずれの染色強度も糸球体組織障害の程度と相関し

ていた。一方、Pentosidine は糸球体基底膜に染色され、糸球体組織障害度および尿蛋白量と相関していた。また、その染色強度は、SMA、L-CLD のメサンギウム染色強度とも相関していた。

尿細管間質系では、Pyrraline が尿細管基底膜に一致して沈着し、その沈着強度は、間質の SMA、L-CLD 染色強度、および間質の免疫細胞浸潤の程度と相関していた。また、これらは間質線維化指標(%IV)とも有意に相関していた。

D. 考察

今回の結果から、AGE の形成が、メサンギウム細胞の形質転換および免疫細胞浸潤を通して糖尿病性糸球体硬化病変の進行に関わる可能性が示唆された。とりわけ、糸球体基底膜における Pentosidine の形成が、メサンギウムの形質転換と細胞増殖を起こし、尿蛋白を増加させる要因と考えられた。また、間質では、Pyrraline が間質細胞の形質転換に関わり、糸球体病変とは独立して間質病変を進行させる可能性が示唆された。

E. 結論

AGE と糖尿病性糸球体硬化症の組織学的進行との関わりが明らかになった。

F. 健康危険情報

直接の健康危険情報とはならない

が、高血糖状態で産生される終末糖化産物 AGE が、糖尿病性腎症の進行に直接的に関わる可能性が示された。

G. 知的所有権の出願・登録状況

なし。

なお、本研究とは別に、今年度は、肥満関連巣状糸球体硬化症(O-FGS)について長期予後を含めた臨床調査を行った。その結果、これまでの文献的報告とは異なり、O-FGS の予後は一次性巣状糸球体硬化症(I-FGS)と比べて決して良好ではないことが判明した。O-FGS の治療法についてはさらなる基礎的・臨床的検討が必要である。

H. 研究発表

1. 論文発表

Mao Y, Ootaka T, Saito T, Sato H, Sato T, Ito S: The involvement of advanced glycation endproducts (AGEs) in renal injury of diabetic glomerulosclerosis: association with phenotypic change in renal cells and infiltration of immune cells. Clin Exp Nephrol, 7: 201-209, 2003

2. 学会発表

毛永輝、大高徹也、佐藤博、伊藤貞嘉、斉藤喬雄：糖尿病性腎症の糸球体・間質病変における AGE 沈着の関与。第 46 回日本腎臓学会学術総会、

東京、2003

齋藤陽孝、佐藤博、伊藤貞嘉、田熊
淑男、斉藤喬雄：肥満関連巣状糸球
体硬化症の臨床病理像の検討。第46
回日本腎臓学会学術総会、東京、2003

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
各個研究報告書

「ヒト尿細管上皮細胞内シグナル伝達におけるブラジキニンの作用」

研究協力者 椎木英夫、西野俊彦
奈良県立医科大学第1内科

研究要旨

ヒト培養近位尿細管上皮細胞(HKC-8)を用いてブラジキニンの尿細管に対する作用を検討する。ブラジキニン刺激直後から97kDの蛋白が濃度依存的にチロシンリン酸化された。ホスホリパーゼC γ (PLC γ)のリン酸化は投与直後から認められ、細胞内カルシウム濃度は一過性に増加した。ブラジキニン投与ではAktのリン酸化は認めなかったが、Erk1/2のリン酸化は投与直後から惹起され、20分後まで持続した。ブラジキニン投与48時間後におけるBrdUの細胞内取り込みは増加していた。ブラジキニンは近位尿細管上皮細胞において細胞内カルシウム濃度の上昇や細胞増殖に関与することが示唆される。

A. 研究目的

ブラジキニンは、腎血流の調節、水の再吸収、電解質の移送などに重要な働きをする生体内ポリペプチドである。腎炎治療に用いられる ACEI および ARB は、BK の代謝に作用して組織中の BK 濃度を上昇させるが、ブラジキニンの尿細管上皮細胞に対する影響は明らかでない。そこでヒト培養近位尿細管上皮細胞(HKC-8)を用いて検討する。

B. 研究方法

1) 細胞培養

ヒト近位尿細管上皮細胞由来の HKC-8 細胞(Jones Hopkins 大学 L Racusen 博士から供与)を使用した。

10% FCS 含有 DMEM/F12 培地を基本培地とした。90mm ディッシュに 5% CO₂、37°C の条件でサブコンフルエントになるまで培養した。無血清培地で 16 時間培養後の細胞を実験に使用した。

2) 細胞抽出液

細胞を 0.1~10nM のブラジキニンで刺激後、10mM Tris-HCl(pH 8.0), 5mM EDTA, 50mM NaCl, 30mM Na₂HPO₄, 50mM NaF, 100 μ M Na₃VO₄, 1% Triton-X100, 1mM PMSF の細胞溶解液で細胞抽出液を採取した。細胞抽出液を SDS-PAGE 法で展開し、リン酸化チロシン、リン酸化ホスホリパーゼ C γ (PLC γ)、リン酸化 Akt、リン酸化 Erk1/2 に対するモノクロナ

ール抗体を用いたウエスタンブロット法で解析した。

3) 細胞内カルシウム濃度の測定

HKC-8 細胞をトリプシンで単離し、DMEM/F-12 培地に浮遊させた。細胞浮遊液に $1 \mu\text{M}$ FURA-2AM を加えて 37°C で 10 分間培養後、 140mM NaCl, 5mM KCl, 0.9mM MgCl_2 , 1.8mM CaCl_2 , 25mM glucose, 16mM Hepes pH7.4 に調整した溶液に浮遊させた。石英キュベットに 2×10^6 個の細胞を浮遊させ、蛍光分光光度計(Perkin Elmer 社製 LS-50)で測定した。細胞内カルシウム濃度は励起波長 340nm および 380nm で得られる分光度の比から算出した。

4) 細胞増殖

HKC-8 細胞(2×10^4 個/ウェル)を 96 ウェル培養プレートに播き、 20nM のブラジキニンで 48 時間刺激後、BrdU を加えて 4 時間培養した。BrdU Cell Proliferation Assay Kit(Oncogene, USA) を用いて細胞に取り込まれた BrdU を測定した。

C. 結果

ブラジキニン刺激 10 分後に 97kD の蛋白がチロシンリン酸化された。このリン酸化はブラジキニン濃度依存的に上昇し、 5nM でプラトーに達した。ブラジキニン B2 受容体拮抗薬は 97kD の蛋白のリン酸化反応を阻害した。PLC γ のリン酸化はブラジキニン投与直後から認められ、5 分後に最高に達した。ブラジキニン投与では Akt のリン酸化は認めなかったが、Erk1/2 のリン酸化は BK 投与直後か

ら惹起され、20 分後まで持続した。細胞内カルシウム濃度は BK 投与直後に一過性に上昇し、この変化はブラジキニン B2 受容体拮抗薬で阻害された。ブラジキニン投与 48 時間後の細胞内への BrdU の取り込みは、非投与群に比して増加していた。

D. 考察

尿細管上皮細胞においてブラジキニンは 7 回膜貫通型 G 蛋白質共役受容体であるブラジキニン B2 受容体を介して、PLC γ および Erk1/2 を活性化して、細胞内カルシウム濃度の上昇および細胞増殖を惹起させた。ブラジキニン刺激で Akt のリン酸化が認められなかったことから、ブラジキニンは PI-3 キナーゼ系を活性化しないと考えられる。一方、G 蛋白質共役受容体に連動した PLC γ のリン酸化には PI3 キナーゼ系の関与が重要であるとされている。したがって、HKC-8 細胞における PLC γ の活性化には他のチロシンキナーゼの関与が考えられる。

ブラジキニンは尿細管上皮細胞において 97kD の蛋白をチロシンリン酸化させることが判明した。この蛋白についての報告はないが、 97kD の蛋白のチロシンリン酸が PLC γ 、Erk1/2 などの下流へのシグナル伝達に関与している可能性がある。

E. 結論

ブラジキニンは近位尿細管上皮細胞を刺激して、細胞内カルシウム濃

度の上昇や細胞増殖に関与する。

F. 健康危険情報

特記事項はない

G. 知的所有権の出願・登録状況

特記事項はない

H. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

第46回日本腎臓学会学術総会

ヒト近位尿細管上皮細胞における
ラジキニンの作用

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
各個研究報告書

「膜性腎症における補体活性経路の分析と臨床所見との関連
-classical そして lectin pathway からみて-

研究協力者 西 慎一¹⁾、今井直史²⁾、井口清太郎²⁾
Alchi Bassam²⁾、上野光博²⁾、下条文武²⁾
新潟大学医歯学総合病院血液浄化療法部¹⁾
新潟大学大学院医歯学総合研究科腎膠原病内科学²⁾

研究要旨

膜性腎症では、lectin pathwayが約半数(46.2 %)に関与していた。lectin pathwayの活性化と臨床的所見あるいは組織学的所見との関連は確認されなかった。C3 の尿細管基底膜(TBM)への沈着と尿蛋白量との関連が示唆されたが、補体活性経路の進行を示すか否か断定できなかった。しかし、C5b-9のTBMへの沈着と尿蛋白量との関連はなく、むしろ、補体活性経路とは独立した機序でTBMに沈着している可能性も考えられた。

A. 研究目的

近年、補体活性経路には、classical pathway、alternative pathway に加え、lectin pathway が存在していることが解明されている。膜性腎症は、糸球体基底膜に免疫複合体が沈着することにより発症する難治性ネフローゼ症候群である。本研究では、この腎炎の発症機序に関与する補体活性経路の特定と臨床像との関連を解析することを目的した。

B. 研究方法

当施設で 2003 年度に腎生検で確定診断された原発性膜性腎症 13 例を対象とした。男性 8 例、女性 5 例であ

った。平均年齢は 61.2±15.3 歳、平均尿蛋白 (UP) 3.7±3.1 g/day、平均 Cr 0.8±0.3 mg/dl、平均 TP 5.7±2.3 g/dl であった。

腎生検標本で、顕微鏡、蛍光抗体法、電顕を用いて組織確定診断を行なった。凍結切片を用いた蛍光抗体法、免疫組織化学法に関しては、抗 IgG、IgM、IgA、C3c、C1q、C4d 抗体の他に、lectin pathway の活性化を確認するために、抗 MBL、MASP1 抗体を利用した。また、補体最終産物である抗 C5b-9 (MAC) 抗体も用いた。

(倫理面への配慮)

腎生検を施行するに当たっては、患者さんに対して、腎生検の必要性

と危険性について十分に説明を行い、インフォームドコンセントを得た上で施行した。患者個人が特定できないように配慮しデータ作成を行なった。

C. 結果

膜性腎症では、lectin pathway の指標となる MBL、MASP1 が 13 例中 6 例 (46.2 %) で糸球体基底膜(GBM)に陽性であった。Classical pathway あるいは lectin pathway の活性化を示唆する C4d が全例(100%) GBM に陽性であった。その他の所見は図 1 の通りである。(図 1)。

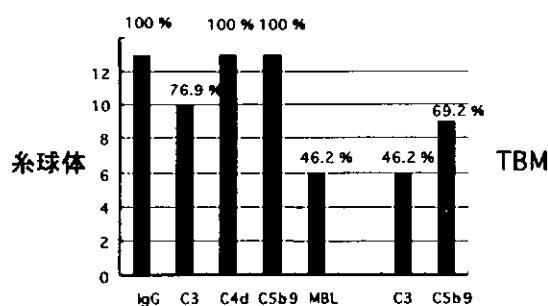


図 1. 膜性腎症における各種補体活性経路活性産物 糸球体基底膜上の IgG C3c C4d C5b-9 尿細管基底膜(TBM) の C3c C5b-9

lectin pathway に関与する MBL と MASP1 は、一方のみが陽性である症例はなく、陽性例は双方が同時に GBM に陽性であった。膜性腎症の GBM 沈着物に沿って陽性となっていると思われた(図 2)。



図 2. 膜性腎症の MBL 陽性所見

lectin pathway 陽性群(MBL、MASP1) と陰性群で、年齢、血清総蛋白、尿蛋白量、血清クレアチニン、血清免疫グロブリン、補体などを比較したが、両群に有意差はなかった。ただし、MBL、MASP1 陽性群の方が、尿蛋白量の平均値は大きい傾向があった。

lectin pathway の活性を示す MBL、MASP1 は、尿細管基底膜には、全て陰性であった。

C3c の尿細管基底膜(TBM)陽性群と陰性群の比較では、C3c 陽性群の尿蛋白量が陰性群より有意に多かった (5.5 ± 3.1 vs. 2.2 ± 2.8 g/day, $P < 0.05$) (図 3)。その他、年齢、血清総蛋白、尿蛋白量、血清クレアチニン、血清免疫グロブリン、補体などには、両群に有意差はなかった。一方、C5b-9 の TBM 沈着と上記の臨床所見の間には、有意な関連はなかった。

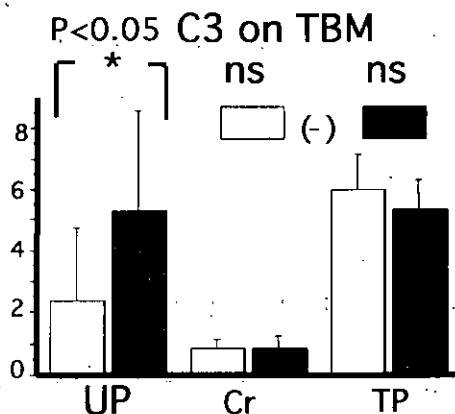


図 2. TBM の C3c 陽性群と陰性群の臨床所見の比較。(UP: 尿蛋白量 Cr: 血清クレアチニン TP: 血清総蛋白)

D. 考察

Endo¹⁾らは、IgA 腎症では約 25%の症例に、lectin pathway が関与しており、若年齢で関与が高いことを証明している。IgA 腎症では、扁桃摘出も治療法として有効性が期待されているが²⁾、若年者の扁桃感染と lectin pathway 活性化との関連も推測される。なぜなら、Lectin pathway は、細菌の外膜糖タンパク質が抗原となりうるからである。

一方、膜性腎症では、Lhotta³⁾らが、少数例ではあるが、MBL の陽性率を検討している。彼らの検討では、原発性膜性腎症の GBM に、MBL が陽性であったのは 66.7%であるとしている。彼らの検討においては、MBL 陽性所見と臨床所見との関連は検討されていない。

今回の我々の検討では、原発性膜性腎症で lectin pathway が約半数 (46.2%)の症例に関与していることが

判明した。しかし、臨床的所見の重症度とは関連が認められず、lectin pathway が臨床的重症度に寄与しているとは考えられなかった。

ただし、MBL、MASP1 陽性群の方が、尿蛋白量の平均値は大きい傾向があった。今回、対照とした使用例は 13 例であり、今後症例数を増やすことで、lectin pathway が関与している症例と非関与例との間に臨床的所見の有意差が認められる可能性も示唆された。

また、総ての症例で、C4d が GBM に陽性であり、alternative pathway 単独で発症している膜性腎症ないと考えられた。従って、C4d の陽性所見に関しては、classical pathway あるいは alternative pathway のどちらかの関与があったことを示唆していると考えられた。

C3c が TBM に陽性であると、尿蛋白量が有意に多かったが、TBM への C5b-9 沈着とは関連せず、補体活性経路の促進による尿細管障害とは断定できなかった。尿細管上皮細胞自身が補体産物を産生することでも知られており、補体活性経路とは独立した沈着機序も考えられた。

E. 結論

膜性腎症における lectin pathway の関与は、臨床的重症度との関連は認められなかった。C3c の尿細管基底膜への沈着は、尿蛋白量と関連があるが、尿細管上皮細胞の障害あるいは尿細管上皮細胞の免疫学的活性化を

示唆するものではないかと推測された。

参考文献

1. Endo M, Ohi H, Satomura A, Hidaka M, Ohsawa I, Fujita T, Kanmatsuse K, Matsushita M, Fujita T.: Regulation of in situ complement activation via the lectin pathway in patients with IgA nephropathy. Clin Nephrol 55:185-191, 2001
2. Xie Y, Nishi S, Ueno M, Imai N, Sakatsume M, Narita I, Suzuki Y, Akazawa K, Shimada H, Arakawa M, Gejyo F. : The efficacy of tonsillectomy on long-term renal survival in patients with IgA nephropathy. Kidney Int 63:1861-1867, 2003
3. Lhotta K, Wurznner R, Konig P: Glomerular deposition of mannose-binding lectin in human glomerulonephritis. Nephrol Dial Transplant 14:881-886, 1999

F. 健康危険情報

特になし

G. 知的所有権の出願・登録状況

特になし

H. 研究発表

1. 論文発表

Xie Y, Nishi S, Ueno M, Imai N, Sakatsume M, Narita I, Suzuki Y, Akazawa K, Shimada H, Arakawa M,

Gejyo F : The efficacy of tonsillectomy on long-term renal survival in patients with IgA nephropathy. Kidney Int 63:1861-1867, 2003

2. 学会発表

- 1) 2003年 国際腎と扁桃研究会で発表
- 2) 2003年 第47回日本腎臓学会で発表予定

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
各個研究報告書

「巣状糸球体硬化症患者における尿中 MIF の臨床的意義」

研究協力者 松本 紘一
日本大学医学部内科学講座内科 2 部門教授

研究要旨

Macrophage migration inhibitory factor(MIF)は活性化されたT cell、単球、内皮細胞およびメサングウム細胞から産生される分子量12KDの代表的な炎症性サイトカインであり、マクロファージの活性化や遅延型アレルギー反応への関与が示唆されている。今回我々は原発性巣状糸球体硬化症(FGS)患者の病態におけるMIFの関与を解析する目的で尿中MIFを測定した。FGS患者の尿中MIFは特に疾患の活動期に高値を示し、ステロイド治療により病態が寛解すると低下傾向を示した。尿中MIFの値と糸球体および間質の浸潤マクロファージ数の間には正の相関がみられた。尿中MIFの値はFGS患者の臨床的および組織学的活動性を反映している可能性が示唆された。

A. 研究目的

巣状糸球体硬化症(FGS)はネフローゼ症候群全体の5-10%を占めており、臨床的にステロイド抵抗性の難治性ネフローゼ症候群を呈することが多い。FGSの病因は未だ不明でありその病因および進展因子の解明が急務である。Macrophage migration inhibitory factor (MIF)は主にT cell およびマクロファージから産生される代表的な炎症性のサイトカインであるが、近年メサングウム細胞や尿細管上皮細胞からも産生されることが報告されている。今回我々は原発性FGS患者の尿中MIF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・方法

患者および正常者の尿中MIFをanti-human MIF monoclonal antibody (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)を用いたenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法を使用して測定した。疾患コントロールとして、微小変化型ネフローゼ症候群(MCNS)および膜性腎症(MN)患者の尿中MIFも同時に測定した。この際FGS患者の臨床経過における尿中MIFの変動を測定すると同時に、各種臨床検査所見および腎組織所見との相関も解析した。

C. 結果

1) FGS 患者の尿中 MIF は正常者、MCNS および MN 患者に比較して有意に高値を示した。2) MCNS および MN 患者の尿中 MIF は正常者と比較して有意の差が認められなかった。3) FGS 患者の尿中 MIF は疾患の活動期に高値を示し、ステロイド治療により病態が寛解すると低下傾向を示した。4) 尿中 MIF の値と糸球体および間質の浸潤マクロファージ数の間には正の相関がみられた。

D. 考察

腎疾患の MIF の関与については主に実験腎炎で解析されてきた。しかしながら、ヒトのネフローゼ症候群における報告はみられない。本研究では初めて FGS 患者の病態に焦点を当て、MIF の関与を解析した。

MIF の作用の主なものとしては、マクロファージの機能制御、マクロファージからのサイトカインやケモカインの産生、T cell の活性化、メサングウム細胞への mitogen としての作用、遅延型過敏反応などの関与が挙げられている。実験腎炎の成績から、MIF は T cell の情報をマクロファージに伝達し、糸球体内および間質の炎症を増幅する可能性が示唆されている。

本研究においては、糸球体および間質にマクロファージの浸潤が著明な症例において尿中 MIF の値が高値を示す傾向にあった。この事実は尿中 MIF は糸球体および間質のマクロ

ファージの浸潤の程度を反映している可能性を示唆している。

尿中 MIF の由来も考察する必要がある。尿中 MIF は腎臓局所の障害を反映している可能性もあるが、尿中の MIF には糸球体基底膜の蛋白透過性および尿細管上皮細胞の再吸収が関与していることが予測され、尿中 MIF の由来を同定するには更なる解析が必要である。

E. 結論

尿中 MIF は FGS 患者の病態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 production of macrophage migration inhibitory factor by T cells in patients with IgA nephropathy. *Am J Nephrol* 21:455-464, 2001.
2. Matsumoto K, Kanmatsuse K: Elevated vascular endothelial growth factor levels in the urine of patients with minimal-change nephrotic syndrome. *Clin Nephrol* 55: 269-274, 2001.
3. Matsumoto K, Kanmatsuse K: Augmented production of interleukin-18 by peripheral blood monocytes in patients with minimal-change nephrotic syndrome. *Am J Nephrol* 21: 20-27,

- 2001.
4. Matsumoto K, Kanmatsuse K: Increased urinary levels of interleukin-18 in nephrotic syndrome. *Nephron* 88: 334-339, 2001.
 5. Matsumoto K, Kanmatsuse K: Transforming growth factor- β 1 inhibits vascular permeability factor release by T cells in normal subjects and in patients with minimal-change nephrotic syndrome. *Nephron* 87: 111-117, 2001.
 6. Matsumoto K, Kanmatsuse K: Increased urinary excretion of interleukin-17 in nephrotic patients. *Nephron* 91: 243-249, 2002.
 7. Matsumoto K, Kanmatsuse K: Urinary levels of macrophage migration inhibitory factor in patients with IgA nephropathy. *Nephron* 92: 309-315, 2002.
 8. 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: 164-171, 2003.
2. 学会発表
 1. 松本紘一、上松瀬勝男: IgA 腎症患者末梢血 T cell の macrophage migration inhibitory factor (MIF) 産生の検討、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: 304,2002)
 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. Matsumoto K, Kanmatsuse K: Elevated levels of macrophage migration inhibitory factor in the urine of patients with IgA nephropathy. 35th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, Philadelphia, PA, 2002,10 (*J Am Soc Nephrol* 13: 459A, 2002)
 4. 松本紘一、上松瀬勝男: IgA 腎症患者における尿中 MIF の臨床的意義、第 100 回日本内科学会講演会、福岡、2003,4 (日本内科学会雑誌 92(suppl):240, 2003)
 5. 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)
 6. 松本紘一、上松瀬勝男: IgA 腎症患者における尿中 macrophage migration inhibitory factor の臨床的意義、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: 20, 2003)
 7. 松本紘一: 教育講演; 腎疾患とサイトカイン、第 48 回日本透析医学会学術集会・総会、大阪、2003,6 (日本透析医学会雑誌

36(Suppl):636, 2003)

8. Matsumoto K, Okada K, Higuchi T, Fujita T: Interleukin-17 stimulates the production of pro-inflammatory cytokines by blood monocytes in patients with IgA nephropathy. 36th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, San Diego, CA, 2003,11 (J Am Soc Nephrol 14: 376A, 2003)

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
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検討」

研究協力者 御手洗哲也、野入千絵、吉川賢、今澤俊之、長谷川元、松村治
埼玉医科大学総合医療センター第四内科

研究要旨

病態が安定している場合、シクロスポリン(CSA)の血中濃度・時間曲線は投与量が変更されても類似したパターンを呈した。腎機能障害が存在する場合、AUC0-4値が高値を示す傾向があり、腎機能障害者にCSAを使用する際には、一度はAUC0-4値を測定する必要があると思われた。CSA使用中にFEM gが次第に上昇する症例があり、FEM gがCSAの副作用モニターに有用な指標となるか、今後さらに検討する必要がある。

A. 研究目的

我々は、ネフローゼ症候群(NS)におけるシクロスポリン(CSA)の治療効果や副作用の予防をより適切に評価すること目的として、血中濃度のモニタリング方法を検討してきた。昨年度は服薬後の血中濃度・時間曲線から得られる AUC0-4 値を実測し、服薬前(トラフ値:C0 値)、1時間値(C1 値)~4 時間値(C4 値)から得られる推測値とを比較し、C2 値が AUC0-4 実測値と最も相関することを示し、C2 値による血中濃度モニタリング方法の有用性を報告した。本年度は、①同一患者における AUC0-4 値の再現性、②腎機能障害の程度が血中 CSA 濃度に及ぼす影響、③FEM g など腎間質障害の指標と血中濃度との関連

を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

研究への同意が得られたネフローゼ症候群患者 23 症例(頻回再発型 MCNS 8 例、MN 7 例、FGS 5 例、MPGN 1 例、SLE 1 例)を対象とした。シクロスポリンは保険診療で適応が認められているネオーラル(MEPC)を使用し、服薬前、服薬後 1~4 時間の 5 ポイントで血中濃度を測定した。検査当日は、朝食を食べてから来院、投与前(C0)採血後に 200ml の水にて朝の内服薬全てを同時に内服し、全ての採血が終了するまでは絶食とした。各採血ポイントにおいて EDTA 加全血採血を施行し、全血中 CSA 濃度を蛍光偏光免疫測定法(FPIA 法)にて測

定した。また、24 時間蓄尿による尿蛋白測定、クレアチニンクリアランス測定時に、FEMg も測定し、経時的変化を観察した。

(倫理面への配慮)

十分なインフォームドコンセントのもとに研究への参加は文書で同意を得た。また、連結可能な匿名化により、検査データからは個人が特定できないようにして、臨床研究を行った。

C. 結果

MEPC の平均投与量は $2.45 \pm 0.61\text{mg/kg}$ であった。同一患者における CSA 血中濃度・時間曲線は病態が不安定な寛解導入期には吸収速度に差が生じる例もあるが、寛解期には投与量に変更されても類似した血中濃度・時間曲線を呈した。

腎機能障害が存在する場合には、各時間での測定値から推定される AUC₀₋₄ 値に対して、実測 AUC₀₋₄ 値が高値を示す傾向が認められた。また、CSA 使用中に FEMg が次第に上昇する症例が存在し、腎機能が正常で FEMg が 2%以上の症例は、2%未満の症例に比べ実測 AUC₀₋₄ 値が高値であった。FEMg が次第に上昇する症例では CSA の腎毒性による副作用が出現している可能性があり、注意が必要と思われた。

D. 考察

腎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示し、CSA 血中濃度を overestimate する危険がある。昨年度の検討では、1 ポイント採血による CSA 血中濃度のモニタリングには C₂ 値を指標とした場合が最も実測 AUC₀₋₄ 値を反映しており、血中濃度のモニタリング方法として、C₂ モニタリングの有用性が確認されている。そこで、本年度は同一患者において寛解導入期と寛解期に複数のポイントでの CSA 血中濃度・時間曲線を比較検討した。その結果、CSA の血中濃度・時間曲線は病態が安定した場合は投与量に変更されても類似しており、AUC₀₋₄ 値の推測に C₂ モニタリングが十分に機能すると考えられた。次に、腎機能障害が血中濃度・時間曲線に及ぼす影響を検討した。その結果、腎機能障害が存在する場合には AUC₀₋₄ 値が高値を示す傾向があり、腎機能障害者に CSA を使用する場合には、一度は AUC₀₋₄ 値を測定することが必要と思われた。

一方、ネフローゼ症候群の患者に CSA を長期間使用する場合には、慢性の腎毒性を予防するための有用な指標を確立する必要がある。間質線維化の鋭敏な指標として、FEMg の有用性が報告されていることから、CSA の慢性腎毒性で最も問題となる間質線維化の指標として、経時的に FEMg を測定した。その結果、CSA 使用中に FEMg が次第に上昇する症例が存在し、AUC₀₋₄ 値も高値の傾向が認め