

IV. 研究成果の刊行物

《ネフローゼ症候群の診断》 小児における問題点

吉川 徳茂*

小児ネフローゼ症候群の診断●

ネフローゼ症候群の主要な病態は、糸球体障害の結果起こってくる、糸球体基底膜から尿中への大量のタンパク漏出と低タンパク血症である。その結果、浮腫、高脂血症、血液凝固の亢進などが起こる。

小児ネフローゼ症候群の診断は、Table 1の診断基準によるが、現在は国際小児腎臓病研究班の診断基準が使われている。

小児ネフローゼ症候群の分類●

小児のネフローゼ症候群は種々の原因により発症する。原因による分類をTable 2に示す。一次性ネフローゼ症候群(原因が明らかでないもの)と、二次性ネフローゼ症候群(原因や基礎疾患の明らかなもの)とに分類される。小児のネフローゼ症候群の90%は一次性である。

微小変化型ネフローゼ症候群●

微小変化型ネフローゼ症候群は、臨床的にネフローゼ症候群を呈し、病理学的に微小糸球体変化を示す疾患である。

小児の一次性ネフローゼ症候群のうちの約80%は微小変化型である。2~6歳の小児に多く、男女比は2~2.5:1と男児に多い。

1. 臨床像

本症候群の主要な臨床像は糸球体糸球壁の透過性亢進による高度のタンパク尿と低タンパク血症

Table 1. 小児ネフローゼ症候群の診断基準

厚生省特定疾患調査研究班

1. タンパク尿
3.5 g/day, または 0.1 g/kg/day, または早朝起床第一尿で 300 mg/100 ml 以上の尿タンパクを持続する。
2. 低タンパク血症
総タンパク量として
学童: 6.0 g/100 ml 以下
幼児: 6.0 g/100 ml 以下
乳児: 5.5 g/100 ml 以下
アルブミンとして
学童: 3.0 g/100 ml 以下
幼児: 3.0 g/100 ml 以下
乳児: 2.5 g/100 ml 以下
3. 高脂血症
血清総コレステロール量として
学童: 250 mg/100 ml 以上
幼児: 220 mg/100 ml 以上
乳児: 200 mg/100 ml 以上
4. 浮腫

【注 意】

1. 尿タンパク量、低タンパク血症は本症候群診断のための必須条件である。
2. 高脂血症・浮腫は本症候群のための必須条件ではないが、これを認めればその診断はより確実となる。
3. タンパク尿の持続とは3~5日以上をいう。

国際小児腎臓病研究班

1. タンパク尿
尿タンパク量: 40 mg/hr/m²以上
2. 低アルブミン血症
血清アルブミン量: 2.5 g/dl 以下

であるが、その結果、浮腫、高脂血症、血液凝固能の亢進などが起こる。持続性の血尿を認めるものはまれで、通常、血圧、腎機能は正常である。浮腫はネフローゼ症候群の主要症状である。過

* N. Yoshikawa (教授): 和歌山県立医科大学小児科。

Table 2. 小児ネフローゼ症候群の分類

1. 一次性糸球体疾患による
・微小変化型
・巣状分節性糸球体硬化症
・メサンギウム増殖性腎炎
・膜性糸球体腎炎
・膜性増殖性糸球体腎炎
2. 全身性疾患に伴う
・全身性エリテマトーデス
・Henoch-Schönlein 紫斑病
3. 遺伝性疾患による
・Alport 症候群
・先天性ネフローゼ症候群
・乳児ネフローゼ症候群
4. その他
・移植腎
・膀胱尿管逆流現象

剰な細胞外液は重力依存性に軟部組織に蓄積する。最初は眼瞼に出現し、朝によく目立つ。やがて浮腫は下肢、男児では陰囊にも出現し腫張する。腹水、胸水も蓄積する。

2. 診 断

確定診断のためには腎生検が必要であるが、小児の一次性ネフローゼ症候群で血尿を認めず、血圧、腎機能が正常な場合には腎生検を施行せず、微小変化型ネフローゼ症候群として治療する。

3. 病理所見

1) 光学顕微鏡所見：糸球体はほぼ正常である。

2) 蛍光抗体法所見：免疫グロブリンや補体の沈着を認めないことが多いが、IgM のメサンギウムへの軽度の沈着はよくみられる。

3) 電子顕微鏡所見：糸球体上皮細胞の足突起の癒合、糸球体上皮細胞の腫大を認める。

4. 治 療

小児の微小変化型ネフローゼ症候群の90%はステロイド治療によく反応し、完全寛解する。ステロイド抵抗性の症例も cyclophosphamide, cyclosporin などの免疫抑制薬の投与により多くは寛解導入が可能である。予後も良好である。しかし、約30%の症例はステロイドの減量、中止に

より頻回に再発を繰り返し、長期ステロイド使用による成長障害、骨粗鬆症などの重篤な副作用が大きな問題となる。

ステロイド反応性頻回再発型ネフローゼ症候群でステロイドの副作用が問題となった場合、再発防止の目的で免疫抑制薬を投与する。免疫抑制薬の第一選択は cyclosporin と考えられる。ステロイドの発育障害についてはとくに思春期男児の場合、長期ステロイド治療により最終身長の下下をもたらすため、2年間の cyclosporin 治療によりステロイドからの離脱を図り、身長発育の catch-up を期待する。

1) cyclosporin : 3~5 mg/kg/day, 分2, 朝夕食後、で開始し、血中トラフレベルを 100 ng/ml に維持し6ヵ月間、その後トラフレベルを 60~80 ng/ml に維持して18ヵ月間投与する。

筆者らはステロイド依存性頻回再発型ネフローゼ症候群 35 例に、6ヵ月間の cyclosporin 治療を行った。治療前6ヵ月間の平均再発回数は 2.2 回/患児であるのに対し、使用中は 0.06 回/患児と再発抑制効果は明らかであった。さらに 33 例がステロイド治療から離脱した。しかし、6ヵ月間で cyclosporin を中止した 16 例はその後 90% が再発し、再発抑制効果は cyclosporin 依存性と考えられた¹⁾。

より長期にわたる寛解維持効果を期待し、6ヵ月間の初期投与で寛解を維持していた 19 例に、2.5 mg/kg/day, 1年間の長期少量維持投与を試みたところ、再発抑制効果を認めた。また cyclosporin の長期投与を行った症例では、プレドニン(prednisolone)の副作用による低身長と肥満の改善を認めた。18ヵ月投与を行った7例に治療終了後、腎生検を施行したが、慢性腎障害は認めなかった²⁾。

さらに寛解維持率の向上を図る目的で、13例に血中トラフレベルを 100 ng/ml に維持するようにして cyclosporin を 24ヵ月間投与した。cyclosporin 治療中、全例腎機能、尿中 β_2 ミクログロブリン(BMG)値は正常であった。13例全例に2

年間の治療終了後、腎生検を施行したところ、7例に慢性腎障害を認めた³⁾。

cyclosporin には、多毛症、高血圧、肝機能障害などの多くの副作用があるが、大部分は可逆性である。しかし、慢性腎障害は不可逆的障害のため、最大の問題である。軽度な慢性腎障害では腎機能、尿中 BMG、*N*-アセチル-β-D-グルコサミダーゼ (NAG) などは正常であるため、診断には腎生検が必要である。cyclosporin 投与中に再発を繰り返す症例は慢性腎障害を起こしやすく⁴⁾、再発時にはタンパク尿が消失するまで一時 cyclosporin を中止する。

ステロイド依存性ネフローゼ症候群では2年間の cyclosporin 治療終了後、腎生検を行っている。慢性腎障害の有無にかかわらず、cyclosporin 中止後1年間の再発は prednisolon のみで治療を行っている。cyclosporin の中止により慢性腎障害が回復する症例もある⁵⁾。cyclosporin 中止後1年経過してもステロイド依存性の頻回再発を認める場合、慢性腎障害のなかった症例、回復した症例では、1回目と同じ方法で cyclosporin の再投与を行っている。

巣状分節性糸球体硬化症●

一部の糸球体(巣状)の、しかもその糸球体の一部分に局限した(分節性)硬化が特徴の腎疾患では、臨床的には全例にタンパク尿がみられ、ネフローゼ症候群を呈することが多い。小児の一次性ネフローゼ症候群の約10%を占め、ステロイド抵抗性で腎不全に進行することが多く、小児腎不全の主要な原疾患である。

欧米の巣状分節性糸球体硬化症の症例で、ポドシン(podocin)遺伝子の変異が報告されているが、日本人では変異を認めない⁶⁾。

1. 臨床像

発症年齢は2~10歳に多く(平均6.6歳)、男女比は1:0.88でやや男児に多い。約80%の症例がネフローゼ症候群を示す。約10%に一過性の高血圧、腎機能の低下を認める。



Fig. 1. 巣状分節性糸球体硬化症
一部の糸球体(巣状)の、しかもその糸球体の一部分に局限した(分節性)硬化を認める(矢印)。

2. 病理所見

診断は腎生検で行う。

1) 光学顕微鏡所見：一部の糸球体(巣状)の、しかもその糸球体の一部分に局限した(分節性)硬化が特徴である(Fig. 1)。そのほかの糸球体はほぼ正常である。

2) 蛍光抗体法所見：免疫グロブリンや補体の沈着を認めないことが多いが、IgM のメサンギウムへの軽度の沈着はよくみられる。

3) 電子顕微鏡所見：糸球体上皮細胞の足突起の癒合、糸球体上皮細胞の腫大、空胞変性を認める。

3. 治療・予後

臨床的特徴として、ステロイド治療に反応しないことがある。90%以上の症例がステロイド抵抗性で、予後は不良であった。最近、ステロイドパルス療法と cyclosporin 療法の併用により、予後は改善しつつある。

メサンギウム増殖性腎炎●

小児の一次性ネフローゼ症候群の約5%を占める。男児に多い。

高度のタンパク尿と低タンパク血症以外に、持続性の血尿を認めるものが多い。一過性の高血圧、腎機能低下もよく認める。



Fig. 2. メサンギウム増殖性腎炎

組織学的にはすべての糸球体に中等度のメサンギウム増殖を認める (Fig. 2)。蛍光抗体法ではメサンギウムに IgA の沈着はない。

約 50% の症例はステロイド治療によく反応する。残る 50% のステロイド抵抗性の症例も cyclophosphamide, cyclosporin などの免疫抑制薬の投与により多くは寛解導入が可能である。腎不全に進行するものはきわめてまれで、予後は良好である。

膜性糸球体腎炎 (膜性腎症) ●

小児の膜性糸球体腎炎には、病因が不明の一次性膜性糸球体腎炎と、B 型肝炎などに伴う二次性膜性糸球体腎炎がある。現在、B 型肝炎による膜性糸球体腎炎はきわめてまれである。

成人ではネフローゼ症候群の 25~40% を占めるが、小児では比較的まれな疾患で、ネフローゼ症候群の 1~2% にすぎない。発症年齢は幼児から中学生まで広く分布するが、全例にタンパク尿がみられ、多くの症例で顕微鏡的血尿を認める。

通常、発症時の血圧、腎機能は正常である。

1. 病理所見

1) 光学顕微鏡所見：糸球体係蹄壁はびまん性に肥厚する。PAM 染色では、糸球体基底膜のスパイク形成がみられる。

2) 蛍光抗体法所見：糸球体係蹄壁に IgG と

C3 のびまん性顆粒状沈着を認める。

3) 電子顕微鏡所見：糸球体基底膜の上皮細胞側に高電子密度沈着物がびまん性に認められる。

2. 治療・予後

小児の膜性糸球体腎炎に対する確立された治療法はないが、ネフローゼ症候群を呈する症例には prednisolone の長期隔日投与を行う。予後は比較的良好であるが、ネフローゼ症候群が持続する症例の中には腎不全に進行するものもある。

膜性増殖性糸球体腎炎 ●

膜性増殖性糸球体腎炎は、病理学的診断名で腎生検により診断される。糸球体係蹄壁の肥厚とメサンギウム増殖を特徴とし、電子顕微鏡所見により I 型、II 型の 2 つに分類されている。小児の膜性増殖性糸球体腎炎の 80~90% が I 型である。小児一次性ネフローゼ症候群の約 5% と報告されているが、過去 20 年間、膜性増殖性糸球体腎炎の頻度は減少してきている。小児の大部分の患者は 5~15 歳のあいだに発症し、性差はない。

1. 臨床像

約 50% の症例はネフローゼ症候群、約 30% は無症候性タンパク尿・血尿、約 20% は急性腎炎症候群で発症する。わが国の小児では、学校検尿の普及により、無症候性タンパク尿・血尿として発見されることが多い。約半数の症例で、上気道感染症が先行感染としてみられ、約 40% の症例は抗ストレプトリジン O 抗体 (ASO) 値の上昇など、溶連菌感染症を示唆する検査所見を示す。約 20% の症例で軽度の高血圧を認める。また発症時 15~20% の症例で腎機能の低下がみられる。

膜性増殖性糸球体腎炎のもっとも重要で特徴的な所見は、持続する低補体血症である。血清 C3 値の低下は I 型の 50%、II 型の 75% にみられる。C3 低下の程度は II 型のほうが強く、長期間持続する。血清 C4 値は正常のことが多いが、血清 C3 nephritic factor は I 型の 35%、II 型の 75% で陽性である。

2. 病理所見

1) 光学顕微鏡所見：メサンギウム増殖により糸球体は腫大し，糸球体係蹄壁は肥厚している。係蹄壁の肥厚は糸球体基底膜と内皮細胞間へのメサンギウム細胞の侵入(mesangial interposition)によるもので，PAM染色では二重に見える(double contour)。

2) 蛍光抗体法所見：C3の糸球体係蹄壁へのびまん性沈着がみられる。

3) 電子顕微鏡所見：I型とII型の鑑別には，電子顕微鏡による検索が必要である。I型は糸球体基底膜内皮下の高電子密度沈着物と，mesangial interpositionを特徴とし，II型は糸球体基底膜内の高電子密度沈着物の特徴とする。

3. 治療・予後

現在，治療としてはprednisoloneの長期隔日投与が行われている。prednisoloneの長期隔日投与だけでは十分な治療効果の得られない症例には，血漿交換，免疫抑制薬，パルス療法などの治療を行う。

膜性増殖性糸球体腎炎はゆっくりと進行し，発症から10年目までに約50%が腎不全に進行した。しかし，プレドニン(prednisolone)の長期隔日投与により予後は飛躍的に改善している。

先天性ネフローゼ症候群●

生後3ヵ月以内に発症するネフローゼ症候群は，3ヵ月以後に発症するネフローゼ症候群と臨床経過が大きく異なり，先天性ネフローゼ症候群として別に扱われている。先天性ネフローゼ症候群はフィンランド人に多くみられるFinnish-type先天性ネフローゼ症候群とびまん性メサンギウム硬化症(diffuse mesangial sclerosis)に分類されている。Finnish-typeは常染色体劣性遺伝し，第19常染色体長腕に存在するネフリン(nephrin)遺伝子の変異により起こる。しかし，日本人の先天性ネフローゼ症候群の患者では，ネフリン遺伝子の変異は少ない。diffuse mesangial sclerosisではWT1遺伝子の変異がよく報告されているが，

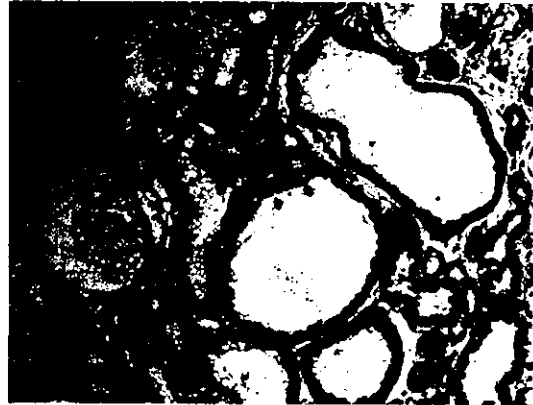


Fig. 3. Finnish-type 先天性ネフローゼ症候群
尿細管が拡張し，microcystを形成する。

原因遺伝子は不明である。

1. 臨床像

Finnish-typeの患児は，生後早期より，高度タンパク尿，低タンパク血症，全身浮腫を呈する。タンパク尿は，生下時すでに存在していると考えられている。出生時体重は低出生体重児が多く，巨大な胎盤(出生体重の25%以上)を特徴とする。タンパク尿は出生時または生後3ヵ月以内に出現し，腎機能障害は緩徐に進行し，生後3歳までに感染症で死亡することが多かった。diffuse mesangial sclerosisの患児は，生後3～11ヵ月のあいだにタンパク尿に腎機能障害を伴い発症し，通常，発症6ヵ月以内に末期腎不全に進行する。

2. 診断

生後早期のネフローゼ症候群の存在により診断されるが，腎生検を施行して病理組織学的に分類することが望ましい。病理組織学的には，microcystを伴うFinnish-type(Fig. 3)とdiffuse mesangial sclerosisに分類されるが，巣状分節性糸球体硬化症の組織像を呈するものも報告されている。

3. 治療・予後

先天性ネフローゼ症候群には，ステロイド治療，免疫抑制薬治療は無効であり，致死的な疾患であった。しかし近年，小児腎不全治療の進歩によ

り先天性ネフローゼ症候群の生命予後は劇的に改善した。

文 献●

- 1) Kitano Y et al : Ciclosporin treatment in children with steroid-dependent nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 4 : 474, 1990
- 2) Tanaka R et al : Long-term ciclosporin treatment in children with steroid-dependent nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 7 : 249, 1993
- 3) Inoue Y et al : Benefit and chronic nephrotoxicity of 2-year ciclosporin treatment in children with steroid-dependent minimal change nephrotic syndrome : a prospective study. *Pediatr Nephrol* 13 : 33, 1999
- 4) Iijima K et al : Risk factors for cyclosporine-induced tubulointerstitial lesions in children with minimal change nephrotic syndrome. *Kidney Int* 61 : 1801, 2002
- 5) Hamahira K et al : Recovery from cyclosporine-associated arteriopathy in childhood nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 16 : 723, 2001
- 6) Maruyama K et al : NPHS 2 mutations in sporadic steroid-resistant nephrotic syndrome in Japanese children. *Pediatr Nephrol* 18 : 412, 2003

INFORMATION

DDW-Japan 2004

—第12回 日本消化器関連学会週間—

日 時 2004年10月21日(木)～24日(日)

会 場 福岡国際会議場, 福岡サンパレス, マリンメッセ福岡

参加学会・会長

第46回日本消化器病学会大会 沖田 極(山口大学消化器病態内科)

第68回日本消化器内視鏡学会総会 幕内博康(東海大学消化器外科)

第8回日本肝臓学会大会 清澤研道(信州大学内科)

第42回日本消化器集団検診学会大会 今村清子(横浜市立市民病院がん検診センター)

第35回日本消化吸収学会総会 大槻 眞(産業医科大学第三内科)

プログラム プログラム情報はホームページをご覧ください(<http://www.ddw.jp/ddw2004/>)

・医療研修会：第5回医療研修会パネルディスカッション

I：専門医制度の現状と今後の課題

II：DPC(diagnosis procedure combination)に基づく包括支払い制度の現状と問題点

・教育講演：消化器疾患最新のトピックス

・特別企画：プライマリケアにおける消化器臨床のあり方

・アンサーパット：診断と治療のコンセンサス—症例から学ぶ消化器病学—この症例をどう診断・治療するか？—

参加登録費 20,000円

登録するとすべての学会に参加できます。

登録の方法は各学会誌およびホームページを参照下さい。

問合先 ☎ 104-0061 東京都中央区銀座8丁目9番13号 銀座オリエントビル9階

DDW-Japan 事務局 Tel 03-3573-1254 Fax 03-3573-2198

IgA 腎症に対する治療方針を教えてください。

吉川徳茂*

Norishige Yoshikawa

わが国では、IgA 腎症は小児でも成人でも最も頻度の高い慢性糸球体腎炎であり、その多くが学校検尿、職場検診などで無症候性血尿、蛋白尿として発見されている。成人では IgA 腎症は慢性腎不全の主要原因となっている。

これまで小児期発症の IgA 腎症の予後は良好であると考えられていたが、最近、長期予後は不良であることが明らかになってきた。自験例の検討では、発症後 15 年目で、57%の症例は尿所見正常化しているが、9%は腎不全に進行し、34%の症例で血尿蛋白尿が持続していることが明らかになった。その後は尿所見正常化する症例は少なく、血尿蛋白尿持続例の多くが将来腎不全に進行すると考えられる (図)。

筆者らは 1990 年より全国の多施設によるランダム化対照試験を実施し、小児の IgA 腎症は発症早期に治療を行えば、腎炎の進行を阻止できることを明らかにしてきた。本稿では、このランダム化

対照試験の結果に基づき、小児 IgA 腎症の治療指針を示す。

1. 小児 IgA 腎症の進行機序

IgA 腎症は糸球体メサンギウムへの IgA 沈着により診断するが、組織学的にはメサンギウム増殖を特徴とする。メサンギウム増殖はメサンギウム細胞の増加とメサンギウム基質の増加からなる。メサンギウム細胞の増加は可逆的変化であるが、メサンギウム基質の増加は不可逆的変化である。小児の IgA 腎症の発症 1 年以内の病初期には、メサンギウム基質の増加は軽度である。時間経過に伴い、メサンギウム基質は増加してゆく。発症後 4, 5 年経過すると、メサンギウム基質の増加が著明となり、硬化病変が形成される。メサンギウム基質の増加が著明となった症例では、治療のいかににかかわらず蛋白尿が持続し、腎病変は進行し

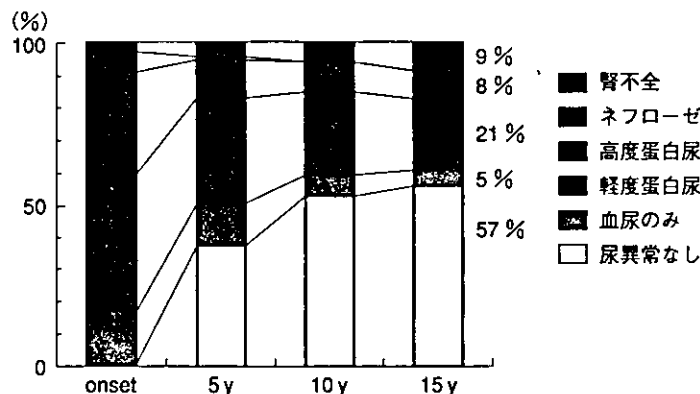


図 小児 IgA 腎症の長期予後

* 和歌山県立医科大学小児科 (〒641-8510 和歌山市紀三井寺 811-1)
TEL 073-441-0632 FAX 073-441-9055 E-mail: nori@wakayama-med.ac.jp

てゆく。したがって、小児のIgA腎症は発症早期に治療すべきである。

II. 小児 IgA 腎症の予後不良因子

腎生検後2年以上経過観察しているIgA腎症小児200例を対象に、臨床病理所見と予後の関係を検討した。

腎不全進行例を予後不良群とすると、性、発症年齢、血清IgA値、腎生検時の年齢、発症様式と予後とは関係を認めなかった。

初回腎生検時に持続性の1g/日/m²体表面積以上の高度蛋白尿を認めた症例の予後は不良であった。

病理所見と予後との関係では、メサンギウム増殖の程度が強いほど予後は不良で、びまん性メサンギウム増殖を示す症例の予後は不良であった。

このように小児IgA腎症では病初期の腎生検所見から正確な予後の予測が可能である。びまん性メサンギウム増殖を示す症例は腎生検後11年目には36%が末期腎不全に進行し予後不良であるため、強力な治療が必要である。

III. びまん性メサンギウム増殖症例の治療

1990～1995年、全国の多施設によるランダム化対照試験を行った¹⁾。

1. 方法

小児IgA腎症で、びまん性メサンギウム増殖の症例を、封筒法によりプレドニゾロン+アザチオプリン+ワーファリン+ジピリダモールによるカクテル治療(多剤併用治療)群とワーファリン+ジピリダモールによる抗凝固血小板治療群に分け2年間治療した。

2. 治療効果

カクテル治療群40例、抗凝固血小板治療群38例で治療研究を行った。

平均発症年齢は11歳で、約70%の症例が学校検尿で尿異常を発見された。治療開始時の臨床病理所見はカクテル治療群、抗凝固血小板治療群と

表 小児IgA腎症の治療指針(2003年)

びまん性メサンギウム増殖の症例	
4剤の多剤併用治療	
1) プレドニゾロン	2.0 mg/kg/日(分3)(最大80 mg/日)×1月 2.0 mg/kg/2日(分1)×1月, 1.5 mg/kg/2日(分1)×1月 1.0 mg/kg/2日(分1)×21月
2) アザチオプリン	2 mg/kg/日(分1)×24月 または プレディニン 4 mg/kg/日(分2)(最大150 mg/日)×24月
3) ジピリダモール	6～7 mg/kg/日(分3)(最大300 mg/日)×24月
4) ワーファリン	トロンボテストが30～50%になる量を投与×24月
巣状メサンギウム増殖の症例	
柴苓湯またはリシノプリル	
柴苓湯	体重>40 kg 3包分3, 20～40 kg 2包分2, <20 kg 2包分2
リシノプリル	0.4 mg/kg/日(分1)(最大20 mg/日)×24月

もほぼ同じであった。腎生検時の平均年齢は約12歳で、発症から腎生検までの平均期間は11か月であり、早期に腎生検が施行されていた。

治療終了時、カクテル治療群では治療開始時に比し、一日尿蛋白量、血清IgA値は有意に減少した。一方、抗凝固・抗血小板薬治療群では、蛋白尿、血清IgA値の改善は認めず、1例は腎不全へと進行した。

病理所見では硬化(線維化)糸球体はカクテル治療群では治療前、後で変化はなく腎炎の進行を認めなかったが、抗凝固・抗血小板薬治療群では治療前3.9%から治療後16.4%に有意に増加し、腎炎は進行した。

蛍光抗体によるIgA沈着の程度もカクテル治療群では有意に減少したが、抗凝固・抗血小板薬治療群では変化を認めなかった。カクテル治療群の7例では、IgAの完全消失を認めた。これらの症例ではメサンギウム増殖も軽減した。

3. カクテル治療の長期予後に及ぼす効果

今回カクテル治療を施行した40例では、現在までに(初回腎生検後12年目)、腎不全に至った症例はない。一方、コントロール群では、12年目ま

でに 33%が腎不全に進行した。

4. 結 論

びまん性メサンギウム増殖を示す重症な小児 IgA 腎症の治療法として、プレドニゾロン+アザチオプリン+ワーフアリン+ジピリダモールによる早期のカクテル治療は有効で、腎炎の進行を阻止し、長期予後を著明に改善する。その後の治療研究から、プレドニゾロン+プレディニン+ワーフアリン+ジピリダモールによるカクテル治療はアザチオプリンを使用したカクテル治療に比し、副作用が少なく、同等効果のあることが明らかになった。

IV. 巣状メサンギウム増殖症例の治療

巣状メサンギウム増殖を示す症例では、発症後 10 年目で、腎不全に進行した症例は 1%にすぎないが、尿所見正常化率は 60%で、残りの 40%の症例で血尿蛋白尿が持続していた。この血尿蛋白尿が続く患者の多くは、将来腎不全に進行すると考えられ、巣状メサンギウム増殖の症例も効果的な治療が必要である。

1. 方 法

巣状メサンギウム増殖の症例は、封筒法により柴苓湯群と対照群に分け、柴苓湯群の症例は柴苓湯を 2 年間投与し、対照群の症例は投薬をせず 2

年間経過観察した²⁾。

2. 治療効果

平均治療開始または経過観察開始年齢は 11 歳、男女比はほぼ同じで、約 80%の症例が学校検尿で無症候性蛋白尿、血尿として発見されていた。柴苓湯群の発症から治療開始までの平均期間は 16 か月で、早期に治療が開始された。尿蛋白、血尿の程度、腎機能、血清 IgA 値、病理所見は、柴苓湯治療群、対照群ともほぼ同じであった。

柴苓湯治療群では、治療終了時、治療開始時に比べて、一日尿蛋白量、血尿は有意に減少した。一方、対照群では、蛋白尿、血尿の改善は認めなかった。治療終了時、柴苓湯治療群では、46%の症例が尿所見正常化した。対照群では、尿所見正常化したのは 10%にすぎなかった ($p < 0.01$)。

その後の治療研究から、アンジオテンシン変換酵素阻害薬のリシノプリルは、柴苓湯と同等の効果のあることが明らかになった。

文 献

- 1) Yoshikawa N, Ito H, Sakai T, et al : A controlled trial of combined therapy for newly diagnosed severe childhood IgA nephropathy. J Am Soc Nephrol 10 : 101-109, 1999
- 2) 吉川徳茂, 伊藤 拓, 酒井 糾, 他 : 巣状・微小メサンギウム増殖を示す小児期 IgA 腎症における柴苓湯治療のプロスペクティブコントロールスタディ. 日腎会誌 39 : 503-506, 1997

* * *

治療終了後のIgA腎症は再発することが知られています。 再発した場合の治療方針を教えてください。

中西浩一*
Koichi Nakanishi

吉川徳茂
Norishige Yoshikawa

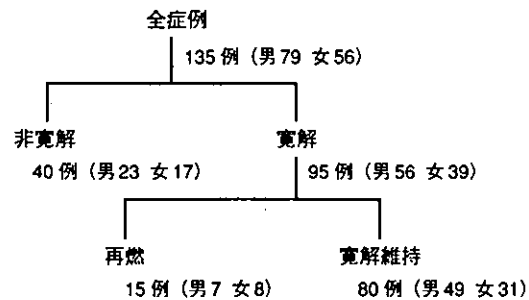
IgA腎症は小児，成人いずれにおいてもわが国では最も頻度の高い慢性糸球体腎炎で，その多くが無症候性血尿，蛋白尿で発見される。成人ではIgA腎症は慢性腎不全の主要原因である。これまで小児期発症のIgA腎症の予後は良好であると考えられていたが，最近，長期予後は不良であることが明らかになってきた。

IgA腎症は治療の有無や内容にかかわらず，尿所見正常化の後しばらくしてから再発することが知られている。自験例のIgA腎症135例の検討では，95例（70%）が2年以上尿異常を認めず（寛解），そのうち15例（15.8%）が2年経過後に尿異常が再出現し持続（再燃）した（図）。それらの再燃症例15例の予後は，高度蛋白尿2例（2例再生検：巣状メサンギウム増殖），軽度蛋白尿7例（1例再生検：巣状メサンギウム増殖），血尿のみ1例，尿異常なし5例であり，再燃症例の予後は比較的良好であった。本稿では，上述の内容および前章の小児IgA腎症治療指針をふまえ，小児IgA腎症再燃症例の治療方針を示す。

I. 小児IgA腎症再燃症例の治療方針

IgA腎症再燃症例における治療方針は，前章にある小児IgA腎症初発時の治療指針と基本的に同様である。再燃症例の予後は比較的良好であることも考慮し，早朝尿蛋白が100mg/dlまではアン

* 和歌山県立医科大学小児科
〔〒641-8510 和歌山市紀三井寺 811-1〕
TEL 073-441-0633 FAX 073-441-9055
E-mail : knakanis@wakayama-med.ac.jp



寛解：2年以上尿異常を認めない

再燃：2年以上尿異常を認めず，その後再び尿異常が持続

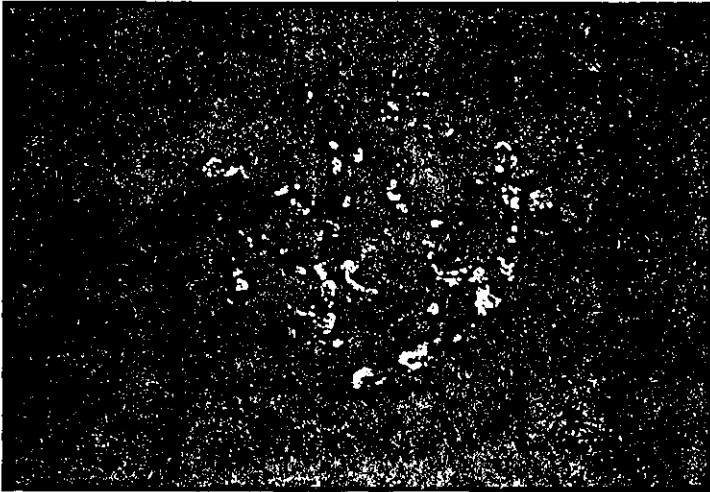
図 小児IgA腎症の寛解・再燃

ジオテンシン変換酵素阻害薬などを投与して経過観察し，早朝尿蛋白が100mg/dl以上持続する場合は予後不良である可能性も考慮して，腎生検を施行する。腎生検結果が，びまん性メサンギウム増殖か巣状メサンギウム増殖かにより，治療方法を選択する。

II: びまん性メサンギウム増殖症例の治療

びまん性メサンギウム増殖を示す症例は腎生検後11年目には36%が末期腎不全に進行し予後不良であるため，再燃症例においても強力な治療が必要であると考えられる。前章に詳細を示しているとおり，プレドニゾン+ブレディニン+ワーファリン+ジピリダモールによるカクテル治療（多剤併用療法）を行う¹⁾。場合によっては，カクテル治療を2回行うことにもなるが，その際には，プレドニゾンの副作用に十分注意する必要がある。

目でみる症例



肉眼的血尿、尿タンパク3(+)、眼瞼浮腫のため、某病院より紹介入院した。腎生検光顕所見(上)は、半月体形成を伴うびまん性メサンギウム増殖性腎炎であった。蛍光抗体法(下)にて、糸球体メサンギウム領域にびまん性のIgA沈着を認めた。

国立成育医療センター腎臓科 飯島一誠
神戸大学大学院医学系研究科成育医学講座小児科学 野津寛大
和歌山県立医科大学小児科 吉川徳茂

内科Vol.93 No.5 (2000) 959



小児 IgA 腎症

国立成育医療センター腎臓科 ● 飯島一誠

神戸大学大学院医学系研究科成育医学講座小児科学 ● 野津寛大

和歌山県立医科大学小児科 ● 吉川徳茂

症 例：15 歳，男性

主 訴：肉眼的血尿，タンパク尿，眼瞼浮腫

既往歴・家族歴：特記すべきことなし。

現病歴：当科入院の5ヵ月前に急性上気道炎による発熱に伴い肉眼的血尿，眼瞼浮腫が出現し，急性糸球体腎炎と診断され某病院に入院した。安静のみで浮腫は消失し，尿所見も顕微鏡的血尿となったため，某病院入院の1ヵ月後に退院した。しかし，1週間前から再び急性上気道炎が発症し，それに伴い，肉眼的血尿，タンパク尿，眼瞼浮腫が出現した。某病院より診断・治療目的で，当科紹介入院となった。

入院時現症・入院時検査：眼瞼浮腫，および145/90 mmHg の高血圧を認めた。尿検査で肉眼的血尿を認め，尿タンパク 3(+) (838 mg/dl)，1日尿タンパク量 6.0 g であった。

血液検査で，総タンパク 4.4 g/dl，Alb 2.1 g/dl，BUN 21 mg/dl，Cr 0.9 mg/dl，IgG 431 mg/dl，IgA 201 mg/dl，IgM 83 mg/dl，C3 71 mg/dl，C4 35 mg/dl，CH50 48.3 U/ml，Ccr 71 ml/min/1.73 m² であった。

すなわち，臨床的にはネフローゼ症候群および急性腎炎症候群であったが，低補体血症は認めなかった。

腎生検所見は，光顕では，すべての糸球体に中等度以上のメサンギウム増殖を認め，24 個中 14 個の糸球体に線維細胞性半月体を認めた (Fig. 1)。

蛍光抗体法では，糸球体メサンギウムにびまん性に IgG の沈着 (2(+)) が認められ (Fig. 2)，IgG，



Fig. 1. 初回腎生検 PAS 染色 (×200)

C3 およびフィブリノゲンもメサンギウムに沈着していた。

診断・臨床経過：上記所見より，IgA 腎症と診断した。診断確定後ただちに，小児 IgA 腎症治療研究会 (代表幹事：吉川徳茂) のプロトコールにしたがって，prednisolone，azathioprine，heparin/warfarin，dipyridamole の多剤併用療法を開始したところ，尿所見は徐々に改善し，8ヵ月後には尿タンパクは消失，血清タンパクも正常化し，19ヵ月後には血尿も消失し，尿所見は正常となった。また，治療開始2ヵ月後には腎機能も正常化した。

なお，治療開始24ヵ月後に再生検が行われたが，ごく軽度のメサンギウム増殖を認めるものの，糸球体 30 個中，硬化糸球体や半月体はそれぞれ 1 個の糸球体に認められたのみであり，組織学的にも明らかに改善していた (Fig. 3)。また，IgA の沈着も 1(+) と減少していた。

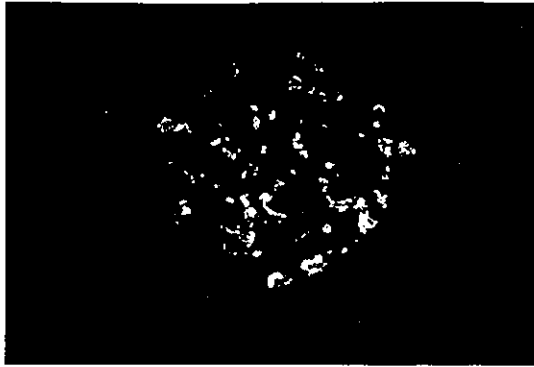


Fig. 2. 初回腎生検 IgA 抗体法



Fig. 3. 多剤併用療法後腎生検 PAS 染色(×200)

小児 IgA 腎症の診断

IgA 腎症は、SLE、血管性紫斑病などの全身性疾患を伴うことなく、糸球体メサンギウム領域に IgA がもっとも強く沈着することを特徴とする。わが国ではもっとも頻度の高い慢性糸球体腎炎である。わが国の小児期 IgA 腎症患者の約 60% は、学校検尿などで、顕微鏡的血尿・無症候性タンパク尿を発見される。肉眼的血尿での発症は 20~30% であり、約 10% の症例は、血尿・タンパク尿に高血圧・腎機能低下を伴う急性腎炎症候群や高度タンパク尿と、それに伴う低タンパク血症を呈するネフローゼ症候群で急性発症する。いずれの発症様式をとる場合でも、血尿(顕微鏡的あるいは肉眼的)は、ほぼ全例に認められる所見である。

IgA 腎症の確定診断には、腎生検による組織学的診断が必要である。すなわち、蛍光抗体法などで、糸球体メサンギウムへのびまん性の IgA の沈着を認めることが必須である。そのほか、IgG、IgM、C3、フィブリノゲンなどの沈着を認めることがあるが、IgA 沈着が優位である点が重要である。光学顕微鏡的には、メサンギウム増殖性腎炎であり、しばしば半月体形成を伴う。

小児 IgA 腎症の進展機序

前述のように、IgA 腎症の組織学的特徴はメサンギウム増殖であるが、メサンギウム増殖は、メ

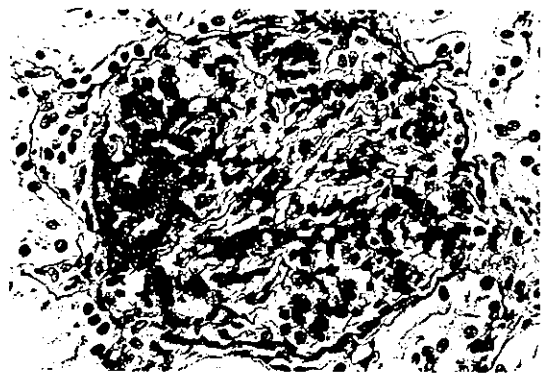


Fig. 4. 病初期の腎生検 PAS 染色(×400)

サンギウム細胞の増加とメサンギウム基質の増加からなる。メサンギウム細胞の増加は可逆的変化であるが、メサンギウム基質の増加は不可逆的な変化である。

IgA 腎症発症 1 年以内の病初期には、メサンギウム細胞の増加は著明であるが、メサンギウム基質の増加は軽度である(Fig. 4)。一方、時間の経過に伴って、メサンギウム細胞は減少し、メサンギウム基質が増加していく。発症後 4~5 年経過すると、メサンギウム細胞増加の程度は減少するが、メサンギウム基質の増加が著明となり、硬化病変が形成される(Fig. 5)¹⁾。

このようにメサンギウム基質が著明に増加した状態は、糸球体内で scar が形成されている状態と考えられ、もはやこの段階では治療のいかんにか

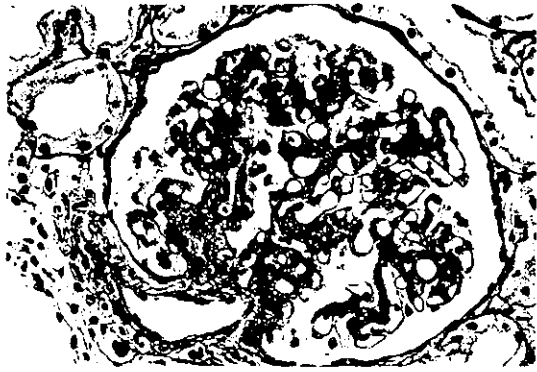


Fig. 5. 発症後長期経過した時点での腎生検
PAS染色(×200)

かわらずタンパク尿が持続し、腎病変は進行していく。したがってIgA腎症では、メサンギウム基質が増加して硬化病変を形成する前の発症早期の段階で、治療を開始する必要がある。

小児IgA腎症の予後因子

小児IgA腎症の治療方針を考えるうえで、まず、どのような症例が腎不全に進行していくのかを知ることが重要である。吉川らは、初回腎生検時に15歳以下、腎機能正常で、生検後2年以上経過観察しているIgA腎症小児200例を対象に、臨床病理所見と予後の関係を検討したところ、初回腎生検時に、持続性の高度タンパク尿を呈する症例、びまん性メサンギウム増殖を示す症例の予後が不良であり、これらの症例では、疾患活動性が強く、タンパク尿をはじめとする尿異常が持続し、やがて腎不全に進行していく可能性が高いと報告している²⁾。

メサンギウム増殖の程度が強いほど予後は不良で、びまん性メサンギウム増殖(80%以上の糸球体に中等度以上のメサンギウム増殖を認める)を示す症例の17%が、腎不全に進行した。巣状メサンギウム増殖(80%未満の糸球体に中等度以上のメサンギウム増殖を認める)を示す症例で腎不全に進行したのは0.8%にすぎないが、約10%の症例で高度タンパク尿が持続しており、予後は楽観で

きない。

このように小児IgA腎症では、病初期の腎生検所見からの予後の予測が可能であり、びまん性メサンギウム増殖を示す症例の予後は不良であり、積極的な治療が必要である。また、巣状メサンギウム増殖を示す症例でも高度タンパク尿が持続している場合があり、長期予後は楽観を許さない。

腎生検の適応

急性腎炎症候群やネフローゼ症候群を呈する症例では、可及的速やかに腎生検を施行し、診断確定後ただちに治療を開始すべきである。無症候性血尿・タンパク尿症例では、早朝尿で尿タンパクが数ヶ月以上持続するような場合には腎生検の適応である。前述のごとく、IgA腎症は発症後4~5年経過するとメサンギウム基質が増加し、治療に抵抗性を示すので、持続性のタンパク尿を認める場合には、少なくとも1~2年以内には腎生検を施行し、診断確定後速やかに治療を開始すべきである。

微量血尿のみでタンパク尿を認めない場合には、一般には腎生検は行わず、経過観察すべきであろう。しかし、経過観察時には持続性のタンパク尿の出現に十分注意すべきであり、持続性タンパク尿が生じたなら速やかに腎生検を行うべきである。

十分な治療効果を得るためには、早期発見・早期治療が重要である。

小児IgA腎症の治療

1. 治療目標と治療効果判定

腎生検によって診断が確定した時点で、光顕所見に基づいて予後を推定し、治療法を決定する。とくに予後不良なびまん性メサンギウム増殖を示す症例では、治療効果の判定は腎生検により行うことが望ましいが、再生検を繰り返すことは現実的ではないため、日常診療においてはタンパク尿を指標に治療効果の判定を行う。

治療目標は、尿タンパクの陰性化である。タン

パク尿が続く限り、IgA腎症は進行すると考えるべきである。

2. 治療法とその効果

ここでは、小児IgA腎症治療研究会が行ってきた治療研究の結果に基づいて、その有効性が明らかにされている治療法を中心に述べる。

1) 巣状メサンギウム増殖あるいは微小糸球体変化を示す場合：巣状メサンギウム増殖あるいは微小糸球体変化を示す場合には、柴苓湯投与が有効である³⁾。柴苓湯を2年間投与した群(A群, n=46)と無治療群(B群, n=48)を比較すると、A群では治療終了時にはタンパク尿・血尿が有意に減少したのに対し、B群では尿所見の改善は認められなかった。実際、A群の46%が尿所見が正常化したのに比して、B群では10%に尿所見の正常化が認められたにすぎなかった。

また、最近では、アンジオテンシン変換酵素阻害薬が用いられることも多い。

2) びまん性メサンギウム増殖を示す場合：びまん性メサンギウム増殖を示す場合には、prednisolone, azathioprine, heparin/warfarin, dipyridamoleの多剤併用療法が有効である⁴⁾。上記の多剤併用療法を2年間施行した群(A群, n=40)とheparin/warfarinとdipyridamoleのみを2年間投与した群(B群, n=34)を比較すると、治療終了時にはA群ではタンパク尿は有意に減少したのに対し、B群ではタンパク尿は変化を認めなかった。また、血清IgA値もA群では有意に減少したのに対し、B群では変化を認めなかった。治療終

了時の腎生検所見は、A群ではIgAの沈着が有意に減少し、うち7例でIgAは消失したのに対し、B群ではIgAの沈着強度に変化を認めなかった。さらに、初回腎生検と比較して、A群では硬化糸球体数は変化が認められなかったのに対し、B群では硬化糸球体は有意に増加した。

なお、その後の検討で、heparinを使用せず最初からwarfarinのみを用いて上記の多剤併用療法を行った場合にも、同様の結果が得られることが明らかにされた。また、多剤併用療法とステロイド単独療法を比較すると、尿タンパクや血清IgA値は両群とも有意に減少するが、ステロイド単独療法では、治療終了後の腎生検で硬化糸球体数は有意に増加することから、組織学的にはその進行を防止することはできないと考えられる⁵⁾。

文 献

- 1) Yoshikawa N et al: Mesangial changes in IgA nephropathy in children. *Kidney Int* 32: 585, 1987
- 2) Yoshikawa N et al: Prognostic indicators in childhood IgA nephropathy. *Nephron* 60: 60, 1992
- 3) 吉川徳茂ほか：巣状・微小メサンギウム増殖を示す小児期IgA腎症における柴苓湯治療のプロスペクティブコントロールスタディ。 *日腎会誌* 39: 503, 1997
- 4) Yoshikawa N et al: A controlled trial of combined therapy for newly diagnosed severe childhood IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 10: 101, 1999
- 5) Yoshikawa N, Ito H: Prednisolone therapy versus combined therapy with prednisolone, azathioprine, warfarin and dipyridamole for newly diagnosed severe childhood IgA nephropathy: a controlled trial by the Japanese Pediatric IgA Nephropathy Treatment Study Group. *J Am Soc Nephrol* 11: A 430, 2000

Molecular and clinical studies of Dent's disease in Japan: biochemical examination and renal ultrasonography do not predict carrier state

T. Matsuyama¹, M. Awazu², T. Oikawa³, J. Inatomi⁴, T. Sekine⁴ and T. Igarashi⁴

¹Department of Pediatrics, Fussa Hospital, ²Department of Pediatrics, Keio University School of Medicine, ³Department of Pediatrics, Jikei University School of Medicine, ⁴Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

Key words

gene mutation – nephrocalcinosis – Dent's disease – proteinuria – β_2 microglobulin

Abstract. **Background:** Dent's disease is an X-linked renal tubular disorder characterized by low-molecular-weight-proteinuria, hypercalciuria, nephrolithiasis and renal failure. The disease is due to inactivation of a renal chloride channel gene, *CLCN5*. We have investigated 3 unrelated Japanese families for *CLCN5* mutations and assessed the carrier mothers biochemically and ultrasonographically to ascertain whether these clinical examinations can predict the carrier state of the disease. **Material and methods:** Twelve members from these families were studied biochemically and ultrasonographically. Leukocyte DNA from probands was used with *CLCN5*-specific primers for PCR amplification of the coding region and exon-intron boundaries, and the DNA sequences of the products determined to identify abnormalities in the gene. **Results:** Three novel *CLCN5* mutations consisting of a single base "A" insertion between nucleotides 590 and 591, a nonsense mutation (R28X) and a missense mutation (G506R) were exhibited. Hypophosphatemia was detected in 2 patients, β_2 -microglobulinuria, α_1 -microglobulinuria, and hyperretinol binding proteinuria in 6 patients, hypercalciuria in 5 patients, decreased urine osmolality in 3 patients, and nephrocalcinosis or nephrolithiasis in 4 patients. Biochemical analysis of the urine and the renal ultrasonography in each carrier mother were completely normal. **Conclusions:** Neither urinary low-molecular-weight-proteins, urinary calcium to creatinine ratio, nor renal ultrasonography was predictive of carrier state in the 3 families with this disease, although each carrier mother had *CLCN5* mutation. Hypophosphatemia and decreased urine osmolality might be a hint to suspect the carrier state of Dent's disease, although these findings are not found frequently.

Introduction

Four disorders of hereditary hypercalciuric nephrolithiasis that have been referred to as Dent's disease, X-linked recessive nephrolithiasis, X-linked recessive hypophosphatemic rickets and the idiopathic low-molecular-weight-proteinuria of Japanese children are associated with mutations of the X-linked renal specific voltage-gated chloride channel gene, *CLCN5* [Lloyd et al. 1996, 1997]. As all 4 of these diseases have features in common and they represent renal tubular disorders that are characterized by low-molecular-weight-proteinuria (LMWP), hypercalciuria, nephrocalcinosis, nephrolithiasis and renal failure [Lloyd et al. 1997, Igarashi et al. 1995, Wrong et al. 1994], these disorders are collectively referred to as Dent's disease [Akuta et al. 1997, Lloyd et al. 1997, Scheinman 1997]. Forty different *CLCN5* mutations, consisting of nonsense, missense, acceptor splice site, donor splice site, insertional and deletional mutations, have been reported in patients with Dent's disease [Akuta et al. 1997, Cox et al. 1999, Hoopes et al. 1998, Igarashi et al. 1998, Lloyd et al. 1996, 1997a,b, Morimoto et al. 1998, Nakazato et al. 1997, 1999]. The human *CLCN5* gene, which is located on chromosome Xp 11.22, has a 2,238 bp coding region that consists of 11 exons which span 25–30 kb of genomic DNA and encode a 746 amino acid channel, referred to as CLC-5. *CLCN5* belongs to the family of voltage-gated chloride channel genes (*CLCN1-CLCN7*, *CLCKa* and *CLCKb*) that have about

Received
March 3, 2003;
accepted in revised form
August 12, 2003

Correspondence to
Dr. T. Matsuyama
Department of Pediatrics, Fussa Hospital,
1-6-1 Kamidaira,
Fussa city, Tokyo
197-8511, Japan
mattsu@
kf6.so-net.ne.jp or
matsuyama@
ghp.fussa.tokyo.jp

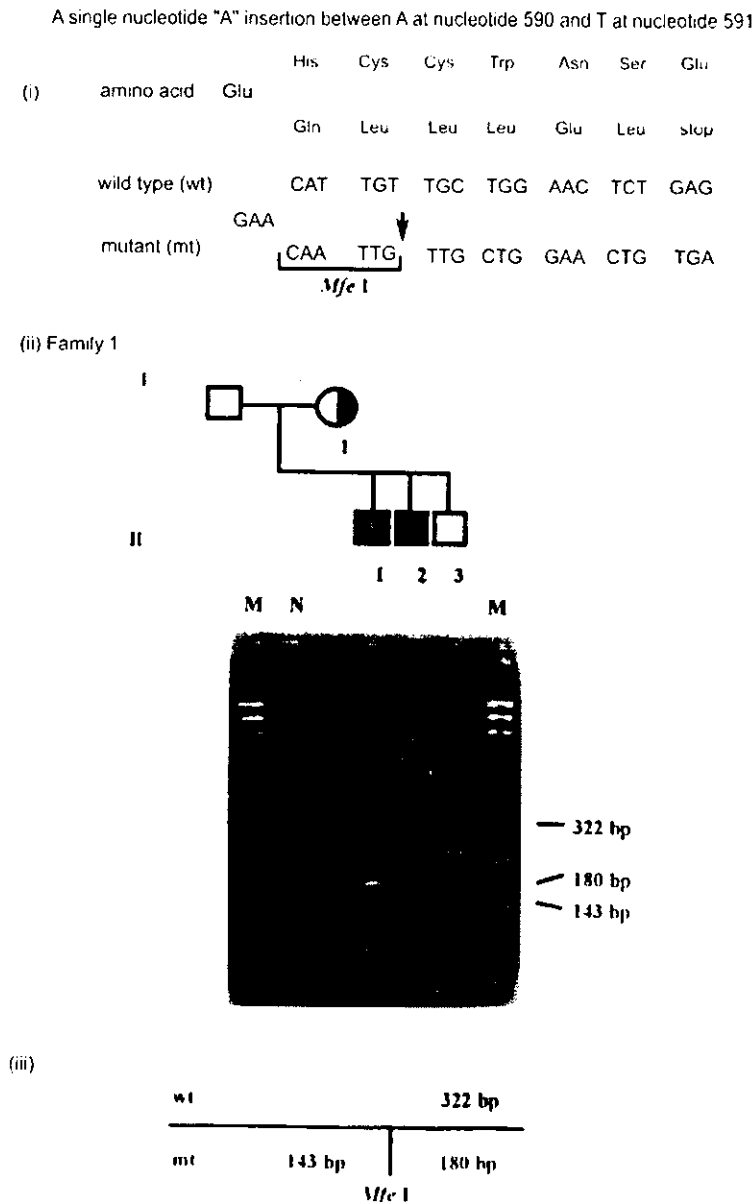


Figure 1. Detection of mutation in family 1, affected with Japanese Dent's disease, by restriction enzyme analysis. DNA sequence analysis of the affected male II.1 revealed an insertion of a single nucleotide "A" between "A" at nucleotide 590 and "T" at nucleotide 591, which predicts to cause 6 amino acids frame shift and form a "TGA" stop codon at codon 106. This insertional mutation also resulted in the gain of *Mfe* I restriction enzyme site (CAATTG^A). PCR amplification and *Mfe* I digestion would result in only 1 product of 322 bp from the normal sequence (N), but 2 products of 180 bp and 143 bp from the mutant sequence (II.1, II.2) as is illustrated in the restriction map. However, PCR amplification and *Mfe* I digestion would result in 3 products of 322 bp, 180 bp and 143 bp from the mother (I.1) indicating that she is the heterozygote of the normal and mutant sequence. PCR amplification and *Mfe* I digestion would result in 2 products of 180 bp and 143 bp in the second brother (II.2) and only 1 product of 322 bp in the third brother (II.3) indicating that the second brother is hemizygous of the mutant sequence and the third brother is hemizygous of the normal sequence. In addition, the absence of this insertional mutation in 110 alleles from 56 unrelated, normal Japanese individuals (54 females, 2 males) established that it is not a common DNA sequence polymorphism. Individuals shown are: male (square), female (circle), unaffected (open), affected (filled). The standard size marker in the form of Φ X174 *Hae* III digestion is indicated as M.

12 transmembrane domains [Jentsch et al. 1995, Thakker 1997]. These chloride channels have importance in the control of membrane excitability, transepithelial transport and cell volume [Jentsch et al. 1995, Thakker 1997]. Heterologous expression of wild-type *CLCN5* in *Xenopus* oocytes has revealed that *CLC-5* conducts chloride currents that are outwardly rectifying and time-independent, and similar expression of disease-associated *CLC-5* mutants demonstrated markedly reduced or absent currents [Lloyd et al. 1996, 1997a,b]. Female carriers of this X-linked recessive disease, who are heterozygous for the presence of a mutation in *CLCN5*, typically have moderate degrees of LMWP and may have hypercalciuria.

Patients and materials

The study protocol was in accordance with the standards of the Ethics Committee at Fussa Hospital, Keio University, Jikei University and The University of Tokyo, and all the parents of infant patients and the adult patients gave informed consent after the purpose, nature and potential risks of the study were explained to them. Because these families strongly desired a gene analysis even after we had notified them of our experience that *CLCN5* mutation was detected only in 70% – 80% of clinically diagnosed Dent's disease patients, we conducted the analysis.

Patients

In all cases, pregnancy and delivery were normal except for 1 case of cesarean section by cephalo-pelvic disproportion. There were no parental consanguinity and no family history of other renal diseases. Although they were referred to our hospitals because of accidentally detected proteinuria on regular urinalysis or by the family history, physical examination and growth were normal. Unlike the Dent's disease patients in UK, the patients in Japan do not show a sign of growth retardation or rickets at all in principle. The same applies to the case (infant patients and their mothers) of this research.

Twelve members of 3 Japanese families were clinically and biochemically assessed for patients with LMWP associated with

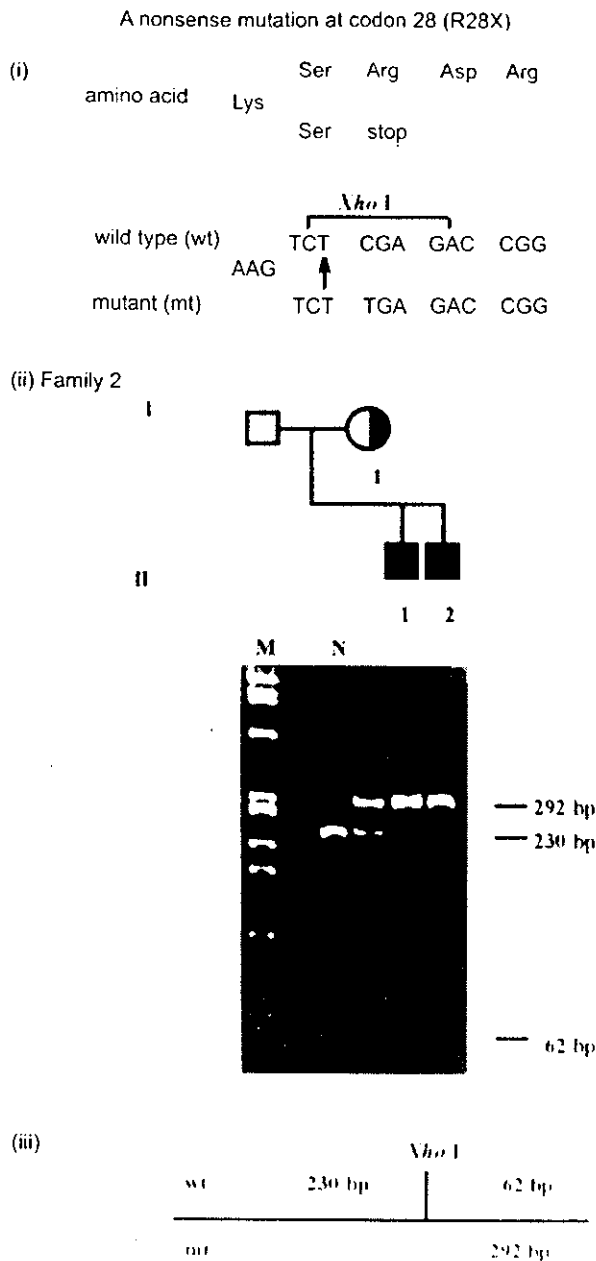


Figure 2. Detection of mutation in family 2, affected with Japanese Dent's disease, by restriction enzyme analysis. DNA sequence analysis of the affected male II.1 revealed a C to T transition at codon 28 (nucleotide 373), thus altering the wild-type sequence, CGA, encoding an arginine (R) to the mutant sequence, TGA, encoding a stop codon (X). This nonsense mutation (R28X) also resulted in the loss of a *Xho*I restriction enzyme site (C^ATCGAG). PCR amplification and *Xho*I digestion would result in 2 products of 230 bp and 62 bp from the normal sequence (N) but only 1 product of 292 bp from the mutant sequence (II.1, II.2) as is illustrated in the restriction map. However, PCR amplification and *Xho*I digestion would result in 3 products of 292 bp, 230bp and 62 bp from the mother (I.1), indicating that she is the heterozygote of the normal and mutant sequence. In addition, the absence of this R28X mutation in 110 alleles from 56 unrelated, normal Japanese individuals (54 females, 2 males) established that it is not a common DNA sequence polymorphism. Individuals shown are: male (square), female (circle), unaffected (open), affected (filled). The standard size marker in the form of ϕ X174 *Hae* III digestion is indicated as M.

hypercalciuria and nephrocalcinosis (Dent's disease), as described previously. All the urinary measurements were performed on early morning samples obtained with the patient fasting and after overnight water deprivation. Urinary β_2 -microglobulin (β_2 MG) of > 320 μ g/l and of > 250 μ g/l in children and adults, respectively, α_1 -microglobulin (α_1 MG) of > 10 mg/l, retinol binding protein (RBP) of > 0.3 mg/l, calcium to creatinine ratios (Ca/Cr) of > 0.25 mg/mg and of > 0.20 mg/mg in children and adults respectively, were taken to be elevated. Renal ultrasonography was performed to detect nephrocalcinosis and/or nephrolithiasis. The details of the 12 members from these kindred are summarized in Table 1. The serum levels of UN, creatinine, sodium, potassium, chloride, calcium, phosphate, uric acid, alkaline phosphatase, parathyroid hormone, venous pH, 1.25 vitamin D (3 patients), and bicarbonate were within normal limits. Urinary electrophoresis and/or sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) showed tubular proteinuria, and there was hypercalciuria but no glycosuria or aminoaciduria, in all pediatric cases. Renal biopsies were performed in 2 patients (Family 1, II.1, Family 3, II.1) which showed immature glomeruli (3/45 glomeruli) with occasional calcium deposition in the tubules (Family 1, II.1) and some global sclerosis (7/53 glomeruli) without tubulointerstitial lesion (Family 3, II.1). Two patients (Family 1, II.1, II.2) had hydrochlorothiazide therapy twice a day.

DNA sequence analysis of the *CLCN5* gene

Peripheral leukocyte genomic DNA was extracted from the 10 members of 3 families and used with *CLCN5* specific primers for PCR amplification utilizing conditions previously described [Lloyd et al. 1996, 1997]. The DNA sequences of the amplified genomic PCR products were determined by the use of *Taq* polymerase cycle sequencing and a Model 373A automated DNA sequencer (Perkins Elmer Japan Applied Biosystems Division) [Lloyd et al. 1996, 1997a,b, Wrong et al. 1994]. DNA sequence abnormalities were confirmed either by restriction endonuclease analysis of genomic PCR products

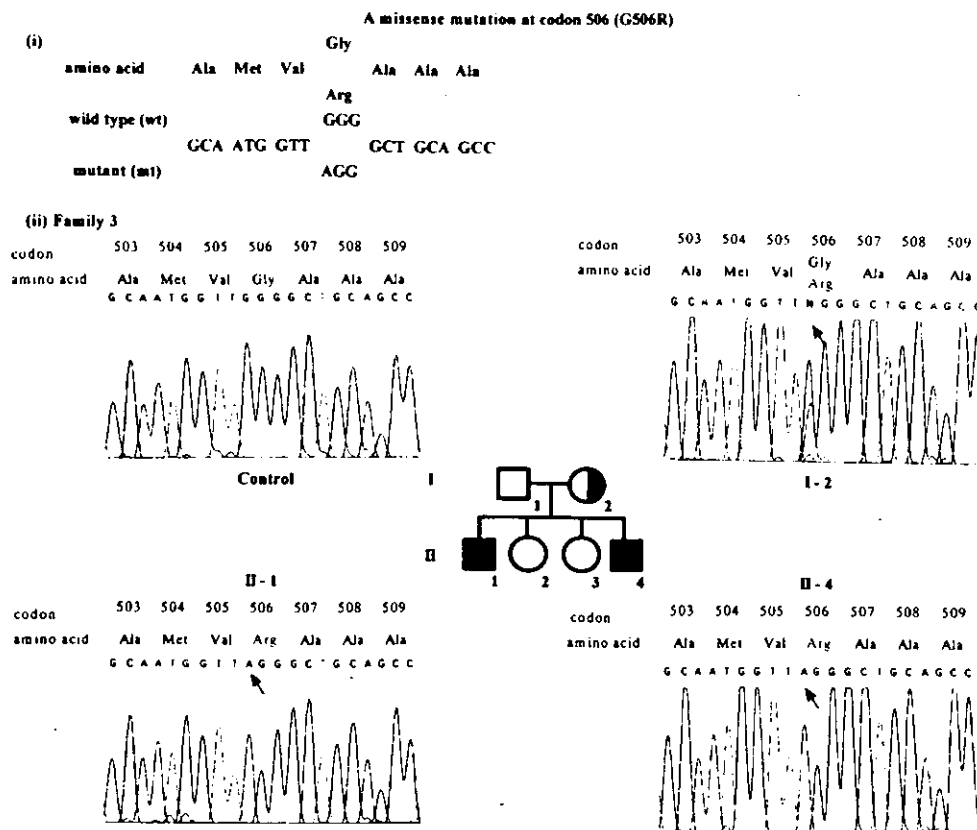


Figure 3. Detection of mutation in family 3, affected with Japanese Dent's disease, by DNA sequence analysis. DNA sequence analysis of the affected males II.1 and II.4 revealed a G to A transition at codon 506 (nucleotide 1828), thus altering the wild-type sequence, GGG, encoding Glycine (G) to the mutant sequence, AGG, encoding an arginine (R). This missense mutation (G506R) did not result in the gain or loss of restriction enzyme sites. Therefore, DNA sequence analysis was performed twice to confirm the mutation. DNA sequence analyses of the affected mother I.1 revealed G and A at nucleotide 1828 indicating that she is the heterozygote of the normal and mutant sequence. In addition, the absence of this mutation in 110 alleles from 56 unrelated, normal Japanese individuals (54 females, 2 males) established that it is not a common DNA sequence polymorphism. Individuals shown are: male (square), female (circle), unaffected (open), affected (filled).

obtained by use of the appropriate primers. DNA sequence abnormalities in 3 families were demonstrated to be absent as common polymorphisms by an analysis of 110 alleles from 56 unrelated normal Japanese individuals (54 females, 2 males).

Results

Patients

Hypophosphatemia was detected in 2 patients, elevated urine β_2 -microglobulin in 6 patients, elevated urine α_1 -microglobulin in 6 patients, elevated urine retinol binding protein in 6 patients, hypercalciuria in 5 patients, decreased urine osmolality in 3 patients, and nephrocalcinosis or nephrolithiasis in 4 patients.

DNA sequence analysis of the *CLCN5* gene

DNA sequence analysis of the entire 2,238 bp coding region and exon-intron boundaries of the *CLCN5* gene from 1 affected member of each of the 3 families with Japanese Dent's disease (Table 1) revealed the presence of 3 novel mutations that consisted of a single base "A" insertion between nucleotides 590 and 591 at codon 100, a nonsense mutation at codon 28 (R28X) and a missense mutation (G506R).

The insertional mutation resulted in the gain of a *Mfe I* restriction enzyme site which facilitates its confirmation (Figure 1). The R28X mutation resulted in the loss of a *Mfe I* restriction enzyme site which facilitated its confirmation (Figure 2). The G506R muta-