

Table 1. Clinical and biochemical findings in Japanese patients with Dent's disease.

Family	1			2			3			Normal adult (child)
	I.1	II.1	II.2	II.3	I.1	II.1	II.2	II.3	II.4	
Patient	I.1	II.1	II.2	II.3	I.1	II.1	II.2	II.3	II.4	
Age (years)	41	12	9	6	33	6	3	6	1	
Sex	F	M	M	M	F	M	M	F	M	
Serum										
Cr (mg/dl)	0.5	0.5	0.3	NE	0.8	0.6	0.5	0.4	0.3	M: 0.5 - 1.2, F: 0.4 - 0.8 (4 - 14 years old: 0.3 - 0.8)
Ca (mg/dl)	8.7	9.8	9.3	NE	9.4	9.2	9.8	8.9	10.4	9.0 - 10.6
P (mg/dl)	2.2	3.3	3.9	NE	3.5	4.5	5.2	3.7	5.3	3.8 - 5.6
Urine										
β_2 MG (μ g/l)	191	117,800	50,300	270	54	112,000	138,000	100	113,000	< 250 (< 320)
α_1 MG (mg/l)	2.4	125.5	102.5	NE	4.9	139	181	1.2	112	> 10
RBP protein (mg/dl)	< 0.2	12.1	7.8	< 0.2	0.3	18.2	18.7	0.2	7.4	> 0.3
Occult blood	< 8	101	92	< 8	< 8	100	100	< 8	100	< 15
Ca/Cr (mg/mg)	-	±	±	-	-	±	±	-	-	-
Osmolality (mOsm/l)	0.11	0.15	0.37	0.05	0.09	0.15	0.45	0.06	0.90	< 0.20 (< 0.25)
or specific gravity	375	425	495	NE	NE	NE	NE	NE	NE	> 800
Nephrocalcinosis or nephrolithiasis	NE	NE	NE	1,025	1,030	1,030	1,025	1,025	1,030	> 1,025
	-	+	+	NE	-	-	+	-	NE	-

Cr = creatinine, Ca = calcium, P = phosphate, β_2 MG = β_2 -microglobulin, α_1 MG = α_1 -microglobulin, RBP = retinol binding protein, F = female, M = male; all values refer to those obtained on early morning samples after an overnight fast, + = present, - = absent, NE = not examined.

tions did not result in the gain or loss of restriction enzyme sites and the DNA sequence abnormality was confirmed by the DNA sequence analysis 2 times (Figure 3). The absence of each DNA sequence abnormality in 110 alleles from 56 unrelated normal Japanese individuals (54 females, 2 males) established that these abnormalities were mutations and not polymorphisms that would be expected to occur in > 1% of the population.

Discussion

Our results, which have identified 3 novel mutations of the *CLCN5* gene in 3 families with Japanese Dent's disease, expand the spectrum of such mutations that are associated with this renal tubulopathy. A single base "A" insertion at codon 100 between nucleotides 590 and 591 predicts to cause 6 amino acids frame shift and form a "TGA" termination codon at codon 106, which predicts truncated CLC-5 channel that lacks the 642 (86%) amino acids. The effect upon CLC-5 channel of this insertional mutation is likely to be a loss of function. The R28X mutation predicts to lead to a truncated CLC-5 channel that lacks the 718 (96%) amino acids. The effect upon CLC-5 channel of this nonsense mutation is also likely to be a loss of function. The G506R mutation predicts a disruption of charge distribution of CLC-5 protein. The similar mutation, G506E, was reported [Lloyd et al. 1996]. The effect upon CLC-5 of this missense mutation, which has been previously assessed, was a complete loss of function [Lloyd et al. 1996]. The G506E mutation is associated with the replacement of an uncharged and nonpolar amino acid (glycine, G) for a charged acidic amino acid (glutamic acid, E), while the G506R mutation represents a similar nonconservative amino acid exchange of an uncharged and nonpolar amino acid (glycine, G) and charged basic amino acid (arginine, R). Therefore, the effect upon CLC-5 of the G506R mutation is likely to be a loss of function.

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 [Reinhart et al. 1995, Scheinman 1997, Wrong et al. 1994]. In addition, heterozygous females rarely have symptomatic disease such as renal stone or moderate renal insufficiency [Hoopes et al. 1998]. However, heterozygous females sometimes have normal urinary excretion of β_2 MG, calcium to creatinine ratio and renal ultrasonography [Langlois et al. 1998, Lloyd et al. 1996, Reinhart et al. 1995] as was shown in our 3 female carriers. Norden et al. [2000] recently reported that new criteria assessing urine RBP could detect most carrier females (21 of 24) of Dent's disease. However, urinary excretion of β_2 MG, α_1 MG and RBP in these 3 mothers were normal. In contrast, a female carrier (Family 1, I.1) manifested hypophosphatemia (2.2 mg/dl) and decreased osmolality (375 mOsm/H₂O) in the early morning urine (Table 1). To elucidate the cause of hypophosphatemia and maximum urine concentration defect, evaluation of TmP/GFR (maximal tubular reabsorption of phosphate/glomerular filtration rate) and assessment of maximum urine osmolality after antidiuretic hormone loading are needed in the future. Hypophosphatemia due to hyperphosphaturia and maximum urine concentration defect are common manifestations in male patients with Dent's disease. However, such complications are not described in female carriers of Dent's disease. Maximum urine concentration defect was also seen in patients with medullary nephrocalcinosis [Wrong et al. 1992]. However, this female carrier did not manifest nephrocalcinosis. Although hypophosphatemia and decreased urine osmolality might be a hint to suspect the carrier state of Dent's disease, detection of female carriers is not always easy on clinical examination alone. The genetic mechanism underlying these variable expressions in female carriers is most likely to be due to the randomness of X-chromosome inactivation in the kidney. Moreover, de novo *CLCN5* mutations in the mothers of 3 different patients with *CLCN5* mutation were reported [Lloyd et al. 1997, Takemura et al. 2001]. Thus, normal results of clinical examinations in mother can not exclude the possibility of having a *CLCN5* mutation in male patients with Dent's disease. Molecular analysis of *CLCN5* is mandatory for the correct genetic counseling in the families with Dent's disease.

Acknowledgments

Support from this study was provided by the Ministry of Health and Welfare (H10-Kodomo-025). We are also grateful to the patients and their family members for participation.

References

- Akuta N, Lloyd SE, Igarashi T, Shiraga H, Matsuyama T, Yokoro S, Cox JPD, Thakker RV 1997 Mutations of *CLCN5* in Japanese children with idiopathic low-molecular-weight-proteinuria, hypercalciuria and nephrocalcinosis. *Kidney Int* 52: 911-916
- Cox JPD, Yamamoto K, Christie PT, Wooding C, Feest T, Flinter FA, Goodyer PR, Leumann E, Neuhaus T, Reid C, Williams P, Wrong O, Thakker RV 1999 Renal chloride channel, *CLCN5*, mutations in Dent's disease. *J Bone Miner Res* 14: 1536-1542
- Hoopes RR Jr, Hueber PA, Reid RJ Jr, Braden GL, Goodyer PR, Melnyk AR, Midgley JP, Moel DI, Neu AM, Vanwhy SK, Scheinman SJ 1998 *CLCN5* chloride-channel mutations in six new North American families with X-linked nephrolithiasis. *Kidney Int* 54: 698-705
- Igarashi T, Hayakawa H, Shiraga H, Kawato H, Kawaguchi H, Yamanaka T, Tsuchida S, Akagi K 1995 Hypercalciuria and nephrocalcinosis in patients with idiopathic low-molecular-weight-proteinuria in Japan: Is the disease identical to Dent's disease? *Nephron* 69: 242-247
- Igarashi T, Guter W, Sekine T, Inatomi J, Shiraga H, Takahashi S, Suzuki J, Tsuru N, Yanagihara T, Shimazu M, Jentsch T, Thakker RV 1998 Functional characterization of renal chloride channel, *CLCN5*, mutations associated with Dent's Japan disease. *Kidney Int* 54: 1850-1856
- Jentsch TJ, Guter W, Pusch M, Schwappach B 1995 Properties of voltage-gated chloride channels of CLC gene family. *J Physiol Lond* 482: 19S-25S
- Langlois V, Bernard C, Scheinman S, Thakker RV, Cox JPD, Goodyer PR 1998 Clinical features of X-linked nephrolithiasis in childhood. *Pediatr Nephrol* 12: 625-629
- Lloyd SE, Pearce SHE, Fisher SE, Steinmyer K, Schwappach B, Scheinman SJ, Harding B, Bolio A, Devoto M, Goodyer P, Rigden SPA, Wrong O, Jentsch TJ, Craig IW, Thakker RV 1996 A common molecular basis for three inherited kidney stone diseases. *Nature* 379: 445-449
- Lloyd SE, Pearce SHS, Guter W, Kawaguchi H, Igarashi T, Jentsch TJ, Thakker RV 1997a Idiopathic low-molecular-weight-proteinuria associated with hypercalciuric nephrocalcinosis in Japanese children is due to the mutations of renal chloride channel (*CLCN5*). *J Clin Invest* 99: 561-568
- Lloyd SE, Guter W, Pearce SHS, Thomson A, Bianchi ML, Bosio M, Craig IW, Fisher SE, Scheinman SJ, Wrong O, Jentsch TJ, Thakker RV 1997b Characterization of renal chloride channel, *CLCN5*, mutations in hypercalciuric nephrocalcinosis (kidney stones) disorders. *Hum Mol Genet* 6: 1233-1239
- Morimoto T, Uchida S, Sakamoto H, Kondo Y, Hanamizu H, Fukui M, Tomino Y, Nagano N, Sasaki S, Marumo F 1998 Mutations in *CLCN5* chloride channel in Japanese patients with low-molecular-weight-proteinuria. *J Am Soc Nephrol* 9: 811-818
- Nakazato H, Hattori S, Furuse A, Kawano T, Karashima S, Tsuruta M, Yoshimura T, Endo F, Matsuda I 1997 Mutations in the *CLCN5* gene in Japanese patients with familial idiopathic low-molecular-weight-proteinuria. *Kidney Int* 52: 895-900
- Nakazato H, Yoshimura J, Karashima S, Natsumoto S, Endo F, Matsuda I, Hattori S 1999 Chloride channel *CLCN5* mutations in Japanese children with familial idiopathic low-molecular-weight-proteinuria. *Kidney Int* 55: 63-70
- Norden AGW, Scheinman SJ, Deschodt-Lanckman MM, Lapsley M, Nortier JL, Thakker RV, Umwin RJ, Wrong O 2000 Tubular proteinuria defined by a study of Dent's (*CLCN5* mutation) and other tubular diseases. *Kid Int* 57: 240-249
- Reinhart SC, Norden AGW, Lapsley M, Thakker RV, Pang J, Moses AM, Frymoyer PA, Favus MJ, Hoepener JA, Scheinman SJ 1995 Characterization of carrier females and affected males with X-linked recessive nephrolithiasis. *J Am Soc Nephrol* 5: 1451-1461
- Scheinman SJ 1997 X-linked hypercalciuric nephrocalcinosis: clinical syndromes and chloride channel mutations. *Kidney Int* 53: 895-900
- Takemura T, Hino S, Ikeda M, Okada M, Igarashi T, Inatomi J, Yoshioka K 2001 Identification of two novel mutations in the *CLCN5* gene in Japanese patients with familial idiopathic low-molecular-weight-proteinuria (Japanese Dent's disease). *Am J Kidney Dis* 37: 138-143
- Thakker RV 1997 Chloride channel cough up. *Nat Genet* 17: 125-127
- Wrong O 1992 Nephrocalcinosis. In: Cameron JS, Davison AM, Grunfeld J-P, Kerr D, Ritz E (eds) *Oxford Textbook of Clinical Nephrology*. Oxford University Press, London, pp 1882-1905
- Wrong OM, Norden SGW, Feest TG 1994 Dent's disease, a familial proximal renal tubular syndrome with low-molecular-weight-proteinuria, hypercalciuria, nephrocalcinosis, metabolic bone disease, progressive renal failure and a marked male predominance. *Q J Med* 87: 473-493

Fusako Komoda · Takashi Sekine · Jun Inatomi ·
Atsushi Enomoto · Hitoshi Endou · Toshiyuki Ota ·
Takeshi Matsuyama · Tsutomu Ogata ·
Masahiro Ikeda · Midori Awazu · Koji Muroya ·
Isamu Kamimaki · Takashi Igarashi

The W258X mutation in *SLC22A12* is the predominant cause of Japanese renal hypouricemia

Received: 4 August 2003 / Revised: 29 December 2003 / Accepted: 30 December 2003 / Published online: 31 March 2004
© IPNA 2004

F. Komoda · T. Sekine (✉) · J. Inatomi · T. Igarashi
Department of Pediatrics, Faculty of Medicine,
The University of Tokyo,
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113–8655, Japan
e-mail: sekinet-ty@umin.ac.jp
Tel.: +81-3-38155411
Fax: +81-3-38164108

A. Enomoto · H. Endou
Department of Pharmacology and Toxicology,
Kyorin University School of Medicine,
Tokyo, Japan

T. Ota
Department of Pediatrics,
Hiroshima Prefectural Hospital,
Hiroshima, Japan

T. Matsuyama
Department of Pediatrics,
Fussa General Hospital,
Tokyo, Japan

T. Ogata
Department of Endocrinology and Metabolism,
The National Center for Child Health
and Development Research Institute,
Tokyo, Japan

M. Ikeda
Department of Nephrology,
Tokyo Metropolitan Kiyose Children's Hospital,
Tokyo, Japan

M. Awazu
Department of Pediatrics,
Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan

K. Muroya
Department of Pediatrics,
Tokyo Dental College Ichikawa General Hospital,
Chiba, Japan

I. Kamimaki
Department of Pediatrics,
National Saitama Hospital,
Saitama, Japan

Abstract Recently, a urate transporter, hURAT1 (human uric acid transporter 1) encoded by *SLC22A12*, was isolated from the human kidney. hURAT1 is presumed to play the central role in reabsorption of urate from glomerular filtrate. In the present study, we analyzed *SLC22A12* in seven unrelated Japanese patients with renal hypouricemia whose serum level of urate was less than 1.0 mg/dl, and their family members. We performed direct DNA sequencing of the exon and exon-intron boundaries of *SLC22A12* using genomic DNA. Six of the seven patients (86%) possess mutations in *SLC22A12*. In five patients, a homozygous G to A transition at nucleotide 774 within exon 4 of *SLC22A12*, which forms a stop codon (TGA) at codon 258 (TGG), was identified (W258X). In one patient, the C to T transition within exon 3, which changes threonine at codon 217 to methionine (T217 M), and the W258X mutation were found (compound heterozygote). Thus, among 12 mutational alleles in six patients, 11 were the W258X mutation (92%). Family members with the heterozygous W258X mutation (carriers) show relatively low levels of serum urate. The present study demonstrates that homozygous W258X mutation is the predominant genetic cause of idiopathic renal hypouricemia in Japanese patients.

Keywords Renal hypouricemia · Urate transporter · hURAT1 · W258X mutation

Introduction

Since humans have lost hepatic uricase activity in the process of evolution [1, 2], urate is the end product of purine metabolism. Urate produced in the liver is excreted mainly into the urine by glomerular filtration followed by reabsorption in the proximal tubule. A secretory pathway for urate has been also suggested [3, 4, 5, 6]. Thus, urate is transported bidirectionally in the proximal tubule. In humans, reabsorption is predominant, and normally less

than 10% of filtrated urate is excreted into the urine. The serum level of urate is mainly regulated by the kidney.

Hereditary renal hypouricemia is a congenital defect of urate transport in proximal tubular cells. Patients with renal hypouricemia manifest low levels of serum urate (less than 2.0 mg/dl) without any underlying renal or systemic diseases, such as Fanconi syndrome, Wilson disease, or drug-induced tubulopathy [3].

Nephrolithiasis, hypercalciuria, and hematuria are relatively common complications in renal hypouricemia [3], while many of the patients are clinically silent. The reason why these complications accompany renal hypouricemia is not clear. A possible mechanism is that a high rate of renal excretion of urate results in stone formation followed by hematuria. Although not frequent, acute renal failure (ARF) after exercise is a potential complication of this disorder [7]. Previously healthy young adults with renal hypouricemia manifest nausea, vomiting, and loin pain after mild exercise, and may develop non-oliguric ARF. Contrast computed tomography of the kidney demonstrates wedge-shaped defects, suggesting patchy renal vasoconstriction. In general, the prognosis of ARF in patients with hypouricemia after exercise is good. More than 80% recover without dialysis therapy. Recently, many cases of ARF after exercise have been reported, almost exclusively from Japan [7, 8, 9, 10]. The mechanism of ARF after exercise remains unclear. A proposed mechanism is that since urate is a strong endogenous antioxidant, the free radicals produced in hypouricemic patients during exercise may not be cleared as readily as under normal conditions, leading to constriction of renal vessels and damage to the kidney [7, 11]. Another hypothesis is that uric acid nephropathy is the main cause of ARF [12, 13].

Recently, hURAT1 (human uric acid transporter 1) was identified [14]. hURAT1 is a member of the organic anion transporter family (the OAT family), which plays pivotal roles in the transepithelial transport of various organic anions in the kidney [15, 16]. hURAT1 is a membrane protein consisting of 553 amino acid residues with 12 putative membrane-spanning domains. hURAT1 is encoded by *SLC22A12*, which is localized on human

chromosome 11q13. hURAT1 is expressed specifically in the kidney and is localized in the luminal membrane of the proximal tubular cells. hURAT1-mediated transport of urate is inhibited by typical uricosuric drugs, such as probenecid and benzbromarone. An angiotensin II receptor antagonist, losartan, also inhibits hURAT1-mediated transport of urate. hURAT1 is an exchanger of urate with intracellular inorganic and organic anions, such as chloride, lactate, pyrazinoic acid (PZA), and nicotinate. These substances accelerate the hURAT1-mediated urate uptake into cells. These functional characteristics of hURAT1 are mostly identical to those of the urate/anion exchanger responsible for tubular reabsorption of urate from the glomerular filtrate. In addition, Enomoto et al. [14] identified several mutations of *SLC22A12* in Japanese patients with renal hypouricemia. However, genetic analyses of *SLC22A12* in renal hypouricemia patients have not been performed systematically, and the prevalence and types of mutations of *SLC22A12* in renal hypouricemia remain to be determined.

In the present study, we analyzed exon and exon-intron boundaries of *SLC22A12* in patients with idiopathic renal hypouricemia in seven unrelated Japanese families. We identified the W258 stop mutation in six of the seven patients (86%).

Materials and methods

Informed consent for participation in this study was obtained from the patients and their family members after the purpose, methods, and potential risks of the study were thoroughly explained. This study was approved by the ethics committee for analyses of the human genome at Tokyo University Hospital.

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes. Polymerase chain reaction (PCR) amplification and DNA sequencing of the exon and exon-intron boundaries of *SLC22A12* were performed using primers listed in Table 1. *SLC22A12* consists of 10 exons. Exons 3, 4, and exons 5, 6 were amplified using the same primers.

All exons and exon-intron boundaries except exon 7 were amplified under the following conditions. PCR was performed in 50 μ l of solution containing 15–20 ng of template genomic DNA, 10 pmol of sense and antisense primers for each exon, 5 μ l of dNTP mix, 3 μ l of 25 mM MgCl₂, 5 μ l of 10 \times gold buffer, and 0.3 μ l of

Table 1 Primers used for the polymerase chain reaction (PCR) amplification and sequencing of *SLC22A12* with genomic DNA

Exon 1	Sense	5'-CCTCACGCGGCTCAGGGCCCAGTT-3'
	Antisense	5'-GGGTCCCTCCCAGGACTGGACCTTT-3'
Exon 2	Sense	5'-CTGCCTCTCTGCTGGGGCTCTCCCAA-3'
	Antisense	5'-CCCACACCCAGCAAGTAGGGCGCTT-3'
Exon 3, 4	Sense	5'-CCGCCTCAGCTCAGCGGGCAAGCAT-3'
	Antisense	5'-CCCCCGGTGGAGAGTGGGCAGGAT-3'
Exon 5, 6	Sense	5'-GCCAGGCACTGGGGGCCACAGGCAAT-3'
	Antisense	5'-CCGTGTGCCAGCGAGAGCCCCGATT-3'
Exon 7L	Sense	5'-GCCAAACCCAAAGGGAAGCCATGCTGGCAAGG-3'
	Antisense	5'-GCCACACCCACAATCTGCTCCACGCTCAGACAC-3'
Exon 7	Sense	5'-CCTGAGCCCCACCGCCATTGTT-3'
	Antisense	5'-CCTGCTCTAGTCCAGCACCTCCAA -3'
Exon 8	Sense	5'-GCCCCCACCAAGCTCACTA-3'
	Antisense	5'-GGGAGAAGCCAGTCCCTGCT-3'
Exon 9	Sense	5'-GGCACACAGACCAGGCGCTT-3'
	Antisense	5'-CCCTGTGCTAGGGTTCTCTGGT-3'
Exon 10	Sense	5'-TCCGCACCCCAAGACACACC-3'
	Antisense	5'-TCCTCTGACCGTCCCATCGC-3'

Ampli Taq Gold (Ampli Taq Gold kit, Perkin Elmer). Thirty-five cycles of reactions were performed in a thermal cycler. Each cycle consists of 30 s of denaturation at 94°C, 30 s of annealing at 64°C, and 1 min of extension at 72°C, and 30 min of final extension at 72°C.

For exon 7, two steps of nested PCR were carried out. Firstly, PCR was performed using Takara Pyrobest DNA polymerase R/2-step PCR in 50 µl of solution containing 15–20 ng of template genomic DNA, 10 pmol of sense and antisense primers for exon 7L, 4 µl of dNTP mix, 5 µl of 10× Pyrobest Buffer II (Takara), and 0.25 µl of Takara Pyrobest DNA polymerase. Thirty-five cycles of amplification were performed in a thermal cycler. Each cycle consists of 10 s of denaturation at 98°C, 1 min of annealing and extension at 72°C, and 3 min of final extension at 72°C. The second nested PCR was performed using TaKaRa Ex Taq HotStart Version. PCR was performed in 50 µl of solution containing 1 µl of primary PCR product at a 1:50 dilution, 10 pmol of sense and antisense primers for exon 7, 4 µl of dNTP mix, and 5 µl of 10× Ex Taq Buffer (Takara), and 0.25 µl of Takara Ex Taq HS version DNA polymerase. Thirty-five cycles of amplification were performed. Each cycle consists of 10 s of denaturation at 98°C, 30 s of annealing at 64°C, 1 min of extension at 72°C, and 3 min of final extension at 72°C. After confirming that each PCR product showed a single band following agarose gel electrophoresis, each DNA sequence was determined using a Big Dye Terminator cycle sequencing kit according to the manufacturer's instructions using the ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer). Each sequence was determined with sense and antisense primers used in PCR.

Results

Clinical and laboratory data of patients and family members

Table 2 shows the clinical and laboratory data of the members of seven unrelated families. The proband of each family manifests extremely low levels of serum urate, ranging from 0.5 to 0.8 mg/dl. Fractional excretion of urate is very high in the patients, suggesting that hypouricemia is due to the defect of urate transport in the proximal tubule. Laboratory data and physical examination did not show any abnormalities indicating underlying renal diseases, such as Fanconi syndrome. Three patients

in families 1, 5, and 6 developed ARF after exercise. The patient in family 1 had ARF twice. Other relatively common complications, such as nephrolithiasis, hypercalciuria, and hematuria, were not observed in the patients examined in this study. The type of renal hypouricemia of these three patients was a pre-secretory reabsorption defect, as determined by the probenecid and pyrazinamide loading test. Family members also showed relatively low levels of serum urate.

DNA sequencing of *SLC22A12* of patients and family members

Direct PCR amplification and DNA sequencing of exon and exon-intron boundaries of the genomic DNA in the patients revealed a G to A transition at nucleotide 774 within exon 4 in six of the seven patients (Fig. 1, Table 1). In five patients, this mutation was homozygous. The G to A transition at nucleotide 774 in *SLC22A12* changes tryptophan at codon 258 to a stop codon (W258X) (Fig. 1). This nonsense mutation produces a truncated hURAT1 lacking the latter half of the protein, and the transport function of the mutated hURAT1 is abolished [14].

The patient in family 3 possesses a heterozygous C to T transition within exon 3, which changes threonine at codon 217 to methionine (T217 M), in addition to the W258X mutation (compound heterozygote) (Fig. 2). The T217 M mutation was shown to abolish the transport activity of the protein completely [14]. Genetic analyses of the members of this family revealed that each allele was derived from the patient's mother and father, respectively. Thus, both alleles of hURAT1 are mutated in this patient, and renal hypouricemia can be explained clearly by the complete loss of the function of hURAT1. No mutation in *SLC22A12* was detected in the patient of family 1.

Table 2 Clinical data and mutations of *SLC22A12* in the patients and the family members with idiopathic renal hypouricemia (FEUA fractional excretion of uric acid, ARF acute renal failure after exercise, NE not examined)

Family no.	Member	Age (years)	Sex	Serum urate (mg/dl)	FEUA (%)	Type ^a	ARF	<i>SLC22A12</i> mutation
1	Patient	17	M	0.7	48	Pre-secretory	2×	No mutation
2	Patient	17	M	0.6		NE	None	W258X, homozygous
3	Patient	6	F	0.7	105	NE	None	W258X/ T217 M
	Father	29	M	2.7	19.4			W258X, heterozygous
	Mother	28	F	2.5	23.5			T217 M, heterozygous
4	Patient	16	F	0.8	67	NE	None	W258X, homozygous
5	Patient	13	M	0.7	55	Pre-secretory	1×	W258X, homozygous
	Father		M	4.3	8.1			W258X, heterozygous
	Mother		F	1.7	18			W258X, heterozygous
	Brother		M	3.2	8.4			No mutation
6	Patient	13	M	0.5	35–46	Pre-secretory	1×	W258X, homozygous
7	Patient	3	M	0.7	50.6	NE	None	W258X, homozygous
	Father	38	M					W258X, heterozygous
	Mother	36	F	2.7				W258X, heterozygous
	Sister	5	F	2.5				W258X, heterozygous

^a Type of renal hypouricemia determined with pharmacological examination

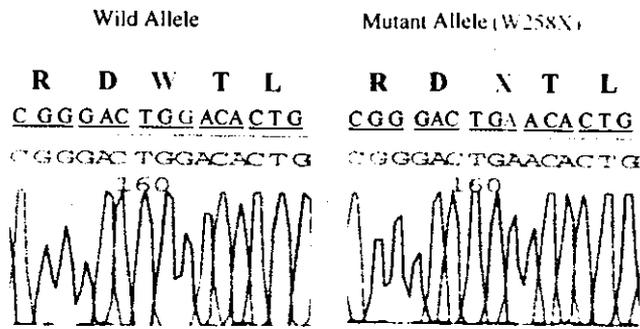


Fig. 1 DNA sequence analysis of *SLC22A12* from the patient in family 5 with idiopathic renal hypouricemia, indicating homozygous G to A transition at nucleotide 774 within exon 4 of *SLC22A12*, which changes tryptophan 258 (TGG) to a stop codon (TGA)

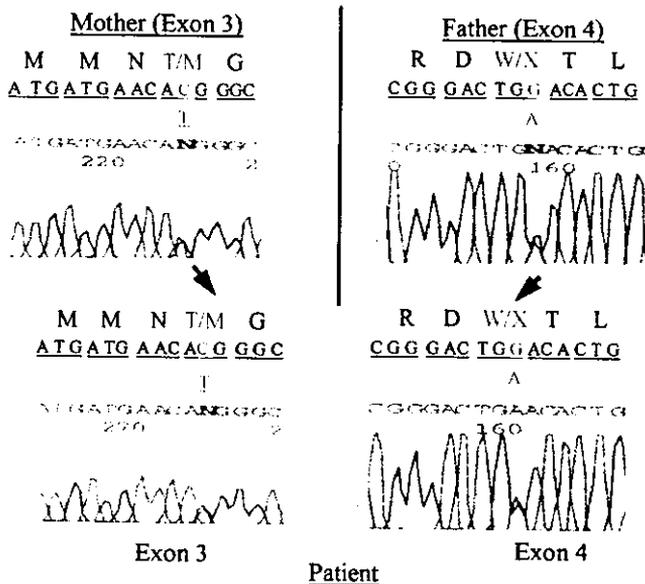


Fig. 2 DNA sequence analysis of *SLC22A12* from the patient in family 3, indicating a heterozygous C to T transition within exon 3, which changes threonine at codon 217 to methionine (T217 M), in addition to the W258X mutation: one allele each was derived from the mother and the father

The DNA sequence abnormality (W258X) was absent in the DNA obtained from 145 unrelated normal Japanese individuals.

Discussion

The present study demonstrates that six of the seven patients (86%) with renal hypouricemia in unrelated Japanese families possess mutations in *SLC22A12*, which impair hURAT1-mediated transport of urate and cause renal hypouricemia. Among 12 mutational alleles in six different patients, 11 were the W258X mutation (92%) and the homozygous W258X mutation was predominant (83%). All the patients manifest extremely low levels of serum urate, i.e., less than 1.0 mg/dl. The present result

clearly indicates that the homozygous W258X mutation is the major cause of renal hypouricemia in Japanese patients, at least among patients with serum levels of urate less than 1.0 mg/dl. The analysis of family members also suggests that the mode of inheritance is autosomal recessive. Regarding mutations in *SLC22A12* in renal hypouricemia patients, only three types, i.e., W258X, T217 M, and E298D have been described previously [14]. However, mutational analysis in a large population has not been reported to date and the frequency of each mutation remains to be elucidated. The present study demonstrates for the first time the prevalence of types of mutations in Japanese patients with renal hypouricemia.

hURAT1, encoded by *SLC22A12*, is a membrane protein consisting of 553 amino acid residues, with 12 putative membrane-spanning domains. As is the case with the other OAT family members, hURAT1 possesses a large extracellular loop between transmembrane domain (TM) 1 and TM2, and an intracellular loop between TM6 and TM7. Tryptophan 258 is in the intracellular loop at this codon produces largely truncated protein. Threonine 217 is in TM5. There is no consensus sequence around this region, and it remains to be elucidated why the T217 M mutation results in loss of function of hURAT1. Since there is trafficking of this mutated protein to plasma membrane [14], binding of urate to hURAT1 might be inhibited by this substitution.

At present, information on urate transporter molecules in humans is rather limited. hUAT, a human urate transporter/channel, has been proposed as the voltage-dependent urate channel/transporter presumably localized in the luminal membrane of proximal tubular cells [17, 18]. hUAT might also be responsible for the secretion of urate, while no information on the pathophysiological significance of hUAT1 in humans had been reported. Thus, demonstration of mutations in *SLC22A12* in patients with renal hypouricemia suggests the first possible genetic cause of abnormal renal handling of urate in humans.

The incidence of renal hypouricemia in Japan is between 0.12% and 0.20% [19, 20]. The majority of case reports are in specific ethnic groups (Japanese and non-Ashkenazi Jewish descendants) [3]. The present study shows that family members possessing the heterozygous W258X mutation (carriers) also manifest relatively low levels of serum urate, mostly less than 3.0 mg/dl. The levels of serum urate vary, and those with the heterozygous W258X mutation may occasionally show a serum urate level less than 2.0 mg/dl.

Previous physiological and pharmacological studies have suggested that urate is transported bidirectionally in the proximal tubule, and the four-component theory has been favored for a long time [3]. According to this theory, urate is nearly totally reabsorbed in the early proximal tubule after being filtrated from the glomerulus. Next, approximately 50% of reabsorbed urate is secreted, and then some of the secreted urate is reabsorbed in the late proximal tubule (post-secretory reabsorption). Thus, 6%–10% of filtrated urate is excreted into the urine. This

model is based on pharmacological studies using uricosuric (i.e., probenecid) and antiuricosuric (i.e., PZA) drugs. Probenecid inhibits urate reabsorption via urate/anion exchanger, while PZA inhibits secretion of urate. In addition, pharmacological analyses in patients with renal hypouricemia have classified this genetic disorder into five types [3]: (A) total transport defect (no reabsorption and no secretion), (B) total reabsorption defect, (C) pre-secretory reabsorption defect, (D) post-secretory reabsorption defect, and (E) increased secretion. However, recent studies by Roch-Ramel et al. [21, 22] using apical membrane vesicles of the human kidney demonstrated predominance of reabsorption of urate via urate/anion exchange. These studies indicated that the main target of PZA is not a separate secretory pathway, but the urate/anion exchanger. PZA enters the proximal tubular cells via the Na/anion cotransporter and accelerates urate reabsorption via the urate/anion exchanger from the intracellular side (*trans*-stimulation), resulting in decreased urate excretion. Roch-Ramel et al. [21, 22] proposed that reabsorption and secretion of urate coexists along the nephron segments, and reabsorption is mainly mediated by the urate/anion exchanger. In the present study, we demonstrated that six patients of seven in unrelated families with renal hypouricemia had mutations of hURAT1, the urate/anion exchanger. The very high incidence (86%) of mutational change of hURAT1 in patients with renal hypouricemia suggests that the transport mechanisms of urate in the human proximal tubular cells may not be as complicated as proposed by Roch-Ramel et al. [21, 22]. In the present study, pharmacological studies using probenecid and PZA were performed in only three of seven patients, all of whom have the pre-secretory defect. However, the patient in family 3 has a very high rate of fractional excretion of urate (>100%) and might have another type of defect, such as total transport defect. This patient also possesses the mutational changes in *SLC22A12*. Thus, it might be possible that several types of renal hypouricemia are due to a common molecular defect, i.e., hURAT1 mutation. Further genetic analyses of hURAT1 will indicate the relevance of the pharmacological classification in renal hypouricemia.

Renal handling of urate differs widely among species [5]. In humans and chimpanzees there is net urate reabsorption, while in rabbits, pigs, and goats net secretion occurs. This difference is partly because some species possess uricase activity, which converts urate to a more-soluble metabolite, allantoin, while others, including humans, do not. Because of this species difference, studies of urate transport using animal models, such as rodents, are not applicable to humans, and the precise mechanisms of renal handling of urate have long remained hypothetical. Identification of hURAT1 and genetic analyses of patients with renal hypouricemia in this study revealed one mechanism of tubular reabsorption of urate in the human proximal tubule under physiological and pathophysiological conditions. For secretion, urate must move from the interstitial plasma through the basolateral membrane and exit into the lumen across the apical

membrane. For each process, transporter molecules must be present in the membrane. Other members of the OAT family, to which hURAT1 belongs, are potential candidates for the urate transporter [15]. Identification of novel urate transporter molecules together with genetic analyses will accelerate the understanding of mechanisms of renal handling of urate.

The kidney regulates the level of serum urate, and defects in transepithelial transport of urate in the proximal tubule lead not only to hypouricemia but also to hyperuricemia, a major cause of gout. A defect in the basolateral uptake of urate from the peritubular plasma and/or a defect in the luminal secretion result in hyperuricemia. Molecular identification of other urate transporters may also reveal the genetic cause of gout.

Acknowledgements This work was supported by grants from the Japanese Ministry of Education, Science, Sports, and Culture (grant 13671101 and 15591089), The Kidney Foundation Japan (JFK 02-5), and The Morinaga Hoshi-kai.

References

1. Wu XW, Lee CC, Muzny DM, Caskey CT (1989) Urate oxidase: primary structure and evolutionary implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:9412-9416
2. Wu XW, Muzny DM, Lee CC, Caskey C (1992) Two independent mutational events in the loss of urate oxidase during hominoid evolution. *J Mol Evol* 34:78-84
3. Sperling O (1992) Renal hypouricemia: classification, tubular defect and clinical consequences. *Contrib Nephrol* 100:1-14
4. Maesaka JK, Fishbane S (1998) Regulation of renal urate excretion: a critical review. *Am J Kidney Dis* 32:917-933
5. Pritchard JB, Miller DS (1993) Mechanisms mediating renal secretion of organic anions and cations. *Physiol Rev* 73:765-796
6. Halabe A, Sperling O (1994) Uric acid nephrolithiasis. *Miner Electrolyte Metab* 20:424-431
7. Ishikawa I (2002) Acute renal failure with severe loin pain and patchy renal ischemia after anaerobic exercise in patients with or without renal hypouricemia. *Nephron* 91:559-570
8. Ishikawa I, Sakurai Y, Masuzaki S, Sugishita N, Shinoda A, Shikura N (1990) Exercise-induced acute renal failure in 3 patients with renal hypouricemia. *Jpn J Nephrol* 32:923-938
9. Igarashi T, Sekine T, Sugimura H, Hayakawa H, Arayama T (1993) Acute renal failure after exercise in a child with renal hypouricaemia. *Pediatr Nephrol* 7:292-293
10. Hisanaga S, Kawamura M, Uchida T, Kondho H, Yoshida T (1994) Exercise-induced renal failure in a patient with hyperuricosuric hypouricemia. *Nephron* 66:475-476
11. Murakami T, Kawakami H, Fukuda M, Furukawa S (1995) Patients with renal hypouricemia are prone to develop acute renal failure—why? *Clin Nephrol* 43:207-208
12. Erley CM, Hirschberg RR, Hoefler W, Schaefer K (1989) Acute renal failure due to uric acid nephropathy in a patient with renal hypouricemia. *Klin Wochenschr* 67:308-312
13. Yeun JY, Hasbargen JA (1995) Renal hypouricemia: prevention of exercise-induced acute renal failure and a review of the literature. *Am J Kidney Dis* 25:937-946
14. Enomoto A, Kimura H, Chairoungdua A, Shigeta Y, Jutabha P, Cha SH, Hosoyamada M, Takeda M, Sekine T, Igarashi T, Matsuo H, Kikuchi Y, Oda T, Ichida K, Hosoya T, Shimokata K, Niwa T, Kanai Y, Endou H (2002) Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels. *Nature* 417:447-452
15. Sekine T, Cha SH, Endou H (2000) The multispecific organic anion transporter (OAT) family. *Pflügers Arch* 440:337-350

16. Russel FG, Masereeuw R, Aubel RA van (2002) Molecular aspects of renal anionic drug transport. *Annu Rev Physiol* 64:563–594
17. Lipkowitz MS, Leal-Pinto E, Rappoport JZ, Najfeld V, Abramson RG (2001) Functional reconstitution, membrane targeting, genomic structure, and chromosomal localization of a human urate transporter. *J Clin Invest* 107:1103–1115
18. Leal-Pinto E, Cohen BE, Lipkowitz MS, Abramson RG (2002) Functional analysis and molecular model of the human urate transporter/channel, hUAT. *Am J Physiol Renal Physiol* 283:F150–F163
19. Hisatome I, Ogino K, Kotake H, Ishiko R, Saito M, Hasegawa J, Mashiba H, Nakamoto S (1989) Cause of persistent hypouricemia in outpatients. *Nephron* 51:13–16
20. Kotake T, Miura N, Ito H (1993) Renal tubular hypouricemia and calcium urolithiasis. *Scanning Microsc* 7:417–421
21. Roch-Ramel F, Guisan B, Diezi J (1997) Effects of uricosuric and antiuricosuric agents on urate transport in human brush-border membrane vesicles. *J Pharmacol Exp Ther* 280:839–845
22. Roch-Ramel F, Guisan B (1999) Renal transport of urate in humans. *News Physiol Sci* 14:80–84

小児 I 型膜性増殖性糸球体腎炎における血中 Terminal Complement Complex の病態的意義

小林 靖明*¹ 長谷川 理*² 本田 雅敬*³

Clinical significance of the terminal complement complex in children with type I membranoproliferative glomerulonephritis

Yasuaki KOBAYASHI*¹, Osamu HASEGAWA*², and Masataka HONDA*³

*¹Division of Pediatrics, Ohtawara Red Cross Hospital, Tochigi, *²Department of Nephrology, Nishikubo Hospital, *³Tokyo Metropolitan Hachioji Children's Hospital, Tokyo, Japan

We measured the concentrations of terminal complement complex (TCC) in plasma (n=25) and urine (n=13) using an enzyme-linked immunosorbent assay in pediatric patients with type I membranoproliferative glomerulonephritis (MPGN). Frozen tissue from 18 renal biopsies was evaluated for the presence of TCC by direct immunoperoxidase staining. In the acute phase of the disease, TCC concentrations in plasma were elevated above 0.5 AU/ml in 14 of 25 patients (High TCC group), while the remaining 11 patients showed less than 0.5 AU/ml (Low TCC group). In the High TCC group, TCC was deposited more diffusely and intensely in the glomerulus, compared to that in the Low TCC group (p=0.034). Furthermore, urinary TCC concentrations in the High TCC group were higher than those in the Low TCC group (p=0.0001). The High TCC group showed not only a poorer response to steroid treatment, but also a poorer prognosis than the Low TCC group.

These results suggest that, in pediatric patients with type I MPGN, TCC in circulation may play a certain role in TCC formation in the glomerulus and in urine. The TCC concentration in plasma could be used as a marker of responsiveness to steroid treatment and long-term prognosis.

Jpn J Nephrol 2004 ; 46 : 419-425.

Key words : membranoproliferative glomerulonephritis, terminal complement complex, membrane attack complex, enzyme-linked immunosorbent assay

緒 言

I 型膜性増殖性糸球体腎炎 (Type I membranoproliferative glomerulonephritis : type I MPGN) は組織学的に糸球体係蹄壁のびまん性肥厚, メサングウム細胞の増殖およびメサングウム基質の増加を伴い, 血清学的に C3 の持続的な低値を特徴とする原発性糸球体腎炎である。腎の免疫組織学的所見では C3, 免疫グロブリンなどの沈着がさまざまな程度に見られる。したがって, その病態には免疫複合体の関与とともに, 持続的な低 C3 血症を伴うことで示

される補体の活性化が重要な役割を果たしていると考えられている。Hasegawa ら¹⁾ は type I MPGN 32 例の検討を行い, ステロイド剤 (以下, ス剤) に不応であった 12 例の血清 C5 値はス剤に反応を示した 20 例に比べ有意に低値であり, さらに血清 C5 低値例は血清補体後期反応成分も低値で長期的にも尿所見の改善がよくなかったことを報告した。また大井ら²⁾ は, MPGN のうち持続的低 C3 血症でしかも低 C5 血症が持続した症例では, 治療に反応せず予後不良のものがあつたと報告した。しかし今日なお, C5 以降の補体後期反応成分あるいは補体終末産物 (terminal

*¹ 大田原赤十字病院小児科, *² 西窪病院腎センター, *³ 都立八王子小児病院

(平成 16 年 4 月 23 日受理)

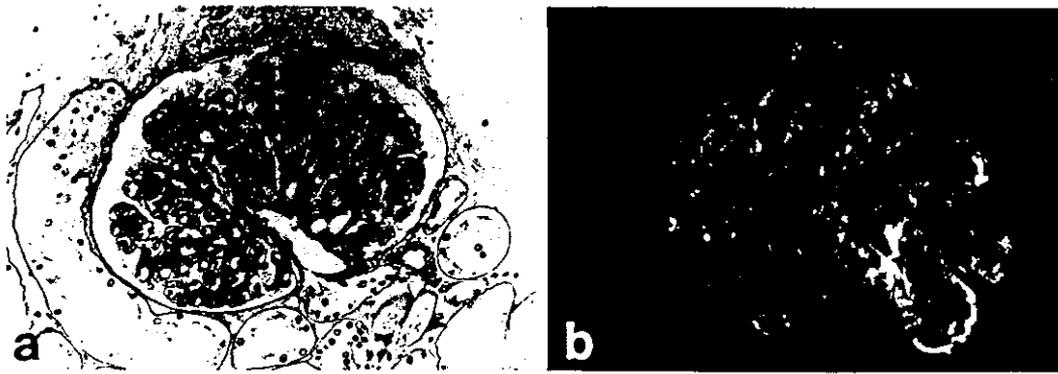


Fig. 1.

- a : Light microscopy of type I MPGN showing mesangial enlargement and thickening of capillary walls (PAS, $\times 400$)
 b : Immunofluorescence microscopy. Granular deposition of complement C3 in the glomerulus (fringe pattern) ($\times 400$)

complement complex : TCC) の本症病態への関与については明確でない部分が多い。そこでわれわれは、本症における TCC の病態的意義を知るために、小児期発症の type I MPGN 自験例についてその動向を検討し、本症の病態に果たす TCC の役割について考察を行った。

対象と方法

1. 対象症例

対象は、小児期発症の type I MPGN 25 例(男 14 例, 女 11 例。発症年齢 6 歳 11 カ月～14 歳 8 カ月, 平均 10 歳 11 カ月 \pm 2 歳 4 カ月)である。初発症状は血尿および蛋白尿 9 例, ネフローゼ症候群 16 例である。すべての症例において腎生検で光顕上係蹄壁のびまん性肥厚, メサンギウム細胞の増殖およびメサンギウム基質の増加がみられ, また, 蛍光抗体法では C3 の粗顆粒状沈着が係蹄壁に沿って強く認められ type I MPGN と診断した (Fig. 1)。発症時の血清 C3 は全例低値であった (平均 \pm SD = 15.7 ± 13.4 mg/dl)。

これら 25 例について, 病初期の血中 TCC の測定を後述の 2-A の方法により行った。このうち 18 例(男 9 例, 女 9 例)については腎組織上の TCC 沈着を後述の 2-B の方法で検討した。さらに 13 例(男 7 例, 女 6 例)については尿中 TCC の測定を 2-A の方法により行った。対照として, 低補体血症を伴わない小児無症候性血尿 (7 歳 10 カ月～13 歳 4 カ月) の血漿 (n=8), 尿 (n=5) 検体を用いた。また腎組織の対照群として, 低補体血症がなく腎組織上 C3 沈着を認めない 7 小児例の検体を用いた。

今回対象となった 25 例は, 腎生検にて type I MPGN

と確定診断後, ス剤治療としてメチルプレドニゾン 30 mg/kg/日を 3 日間静注の後プレドニゾン (PSL) 1 mg/kg を隔日経口投与で 2 年間用いた。治療前にネフローゼ症候群を呈した症例では蛋白尿が $1 \text{ g/m}^2/\text{日}$ 以下に減少したものの, 血尿および蛋白尿を有した症例では尿所見が正常化ないしは定性で (±) 以下に改善がみられたものをス剤治療反応例とした。反応例ではその後 PSL を 2 カ月毎に半減し中止とした。一方, 2 年間のス剤治療により寛解が得られなかった不応例は, PSL を 0.5 mg/kg あるいは 10 mg/kg 隔日投与まで減量してこれを維持量とし, 最長 120 カ月用いた。臨床的な予後については最終観察時点で異常尿所見の消失がみられた寛解例, 腎機能に異常はみられないものの血尿や蛋白尿が残存している異常尿所見例, 腎機能が悪化し透析治療が必要となった慢性腎不全例に分けた。

2. 測定項目と測定方法

A. 血中ならびに尿中 TCC 測定およびその方法

血漿ならびに尿中の TCC は, Kusunoki ら³⁾により作製され供与を受けた TCC の neoantigen に対する単クローン抗体 1B4 を用いて酵素免疫定量法 (ELISA サンドイッチ法) で測定した。すなわち, 0.05 M 炭酸緩衝液 pH 9.5 で希釈し $2 \mu\text{g/ml}$ とした 1B4 抗体 $100 \mu\text{l}$ を ELISA プレート (住友ベークライト) に 4°C で一晩固着させ, 0.05 % Tween 20 を含んだ 0.01 M リン酸緩衝食塩水 pH 7.4 で洗浄後 1 % 牛血清アルブミン (BSA) でブロッキングを行った。再び洗浄後プレートに検体を加え 37°C で 30 分反応させた。検出抗体として 1,000 倍希釈ヤギ抗ヒト C7 抗体 (ペーリンガー) $100 \mu\text{l}$ を 37°C , 30 分反応させた後に洗浄し, これに 1,000 倍希釈 horseradish peroxidase (HRPO) 標識抗ヤギ IgG 抗体 (タゴ) $100 \mu\text{l}$ を 37°C , 30 分反応させ

た。洗浄後、基質として ABTS (0.05 M クエン酸・0.1 M リン酸緩衝液で 0.18 mg/ml に調整したもの 150 μ l) を用いて室温で発色させ、405 nm の波長で吸光度を測定した。検体中の TCC 濃度を決定するため、ザイモサンで活性化した正常ヒト血清を以下のように作製し用いた。すなわち、新鮮血清をザイモサン 10 mg/ml で 37°C、2 時間攪拌して補体を活性化し、遠心した上清を 100 μ l ずつ分注して -70°C で測定時まで保存した。ザイモサン活性化血清に含まれる TCC を 200 AU/ml として検体中の濃度を決定した。また、血漿および尿検体は補体の非特異的な活性化を防ぐため、最終濃度が 20 mM になるよう EDTA を入れて採取し、低温 (4°C) 遠心分離後凍結して -70°C で測定時まで保存した。

B. 腎組織 TCC 沈着の検討

1) 1B4 抗体からの Fab 分画の抽出と酵素標識

吉村⁴⁾の方法に従い、TCC の neoantigen に対する単クローン抗体 1B4 1 ml に 0.01 M リン酸緩衝食塩水 1 ml、飽和硫酸液 1 ml を加え 4°C で 1 時間攪拌した。遠心分離 (10,000 回転, 10 分) 後、沈殿を取り、これを 1 ml のリン酸緩衝食塩水と 1 ml の飽和硫酸液に懸濁し 4°C で 1 時間攪拌、再度遠心分離した。この沈殿に 0.5 ml の Na-K phosphate buffer pH 7.5 を加え、さらに 0.1 ml の 50 mM EDTA-2Na, 0.25 ml の 0.1 M cystein-HCl, 1.4 ml の蒸留水, 1 mg/ml のパパイニン 0.15 ml を順次加えてよく混和した。これを 37°C で 20 時間加温し、0.1 ml の 0.5 M ヨードアセトアミド溶液を加え氷冷して 1 時間攪拌した。遠心分離して沈殿を取り除き Sephadex G-100 カラムにてゲル濾過し、280 nm での吸光度を測定し Fab を含む分画を集めた。次に、これを Protein-A sepharose カラム (ゲル 1 ml) に通し、未吸着分画を集め 280 nm での吸光度を測定した。回収された Fab を 4 mg/ml になるよう濃縮し、これを 2 l の 0.02 M 炭酸バッファー pH 9.5 で一晩透析した。

次いで、Wilson and Nakane⁵⁾の方法に従って過ヨウ素酸法による酵素標識を行った。すなわち、HRPO 6 mg を 1 ml の蒸留水に溶解し、0.1 ml の 0.15 M 過ヨウ素酸を加え室温で 20 分反応させた。これを 1 mM 酢酸緩衝液 pH 4.4 で一晩透析し、上述の Fab 溶液 1 ml を加え室温で 2 時間攪拌した。次いで氷水中で冷却しながら水酸化ホウ素ナトリウム溶液 0.1 ml を加え 6 時間攪拌した。これを Sephadex G-150 カラムにてゲル濾過し標識抗体を分離した。

2) 腎組織の酵素抗体染色 (直接法)⁶⁾

Periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) で固定された凍結腎生検検体をクリオスタットで 4 μ m に薄切し 30 分

室温で乾燥後、リン酸緩衝食塩水で 5 分間 3 回洗浄した。これに 1% BSA を含んだリン酸緩衝食塩水で 10 倍希釈した酵素標識 1B4 抗体を 0.2 ml 滴下した。室温で 1 時間反応させた後、リン酸緩衝食塩水で 15 分間、3 回洗浄を行った。これを DAB・H₂O₂ 発色液に室温で 5 分間置き、水洗したのち脱水・封入を行い鏡検した。組織染色強度は強陽性 (2+)、弱陽性 (+)、陰性 (-) の 3 段階に分け半定量的に評価した。

C. ロケット免疫電気泳動法⁷⁾ (Laurell 法) による血清 C5 の測定

50 ml のペロナール緩衝液 pH 8.6 に精製寒天 (アガー) とアガロースをそれぞれ等量混和し 1.2% とした。この寒天ゲルを高温溶解後 45°C に温度を下げ、抗 C5 抗体 0.5 ml を加えよく攪拌し、水平板上に載せた泳動プレートに流し固まらせた。寒天層中に直径 3 mm の小孔をあけ血漿検体ならびに正常人血漿を入れて 7 V/cm で 120 分泳動した。泳動後各検体のロケット先端と小孔間の距離を測り、正常人血漿のロケットの長さに対する比 (% normal) を求めた。

3. 統計手法

各測定値は平均値 ± 標準偏差で表した。また、統計学的手法として one-factor ANOVA, Scheffé 法, Mann-Whitney's U test, Pearson の相関係数, Fisher の直接確率計算法を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

結 果

1. 血中 TCC の測定結果

Type I MPGN 25 例の血中 TCC 値は 0.06~2.11 AU/ml に分布した。このうち血中 TCC 値が 0.5 AU/ml を超える 14 例を High TCC 群、それ以下の 11 例を Low TCC 群とした。High TCC 群の血中 TCC 値は 1.06 ± 0.57 AU/ml、Low TCC 群の血中 TCC 値は 0.15 ± 0.08 AU/ml であった。対照 8 例は 0.06 ± 0.04 AU/ml であった。血中 TCC 値に関し High TCC 群と対照群、High TCC 群と Low TCC 群の間にはそれぞれ有意差が認められた ($p < 0.0001$)。Low TCC 群と対照群の血中 TCC 値には有意差はみられなかった (Fig. 2)。

2. 腎組織への TCC 沈着

Type I MPGN 18 例における腎組織 TCC 沈着の結果を Table 1 に示す。High TCC 群 13 例全例と Low TCC 群 5 例中 4 例で、メサンギウム領域および糸球体係蹄壁に沿って TCC の沈着が認められた (Fig. 3)。沈着の程度は

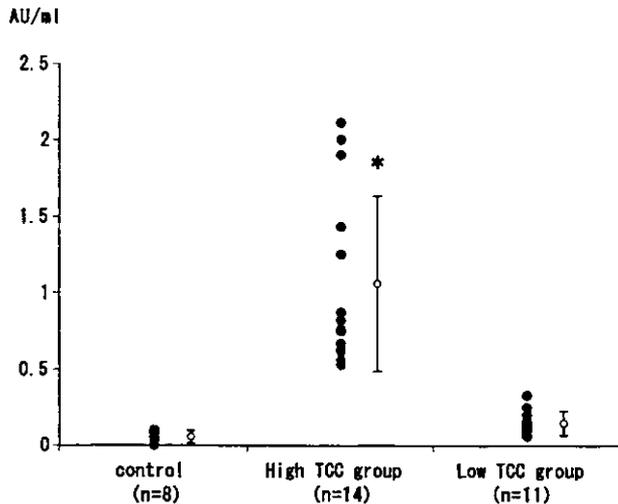
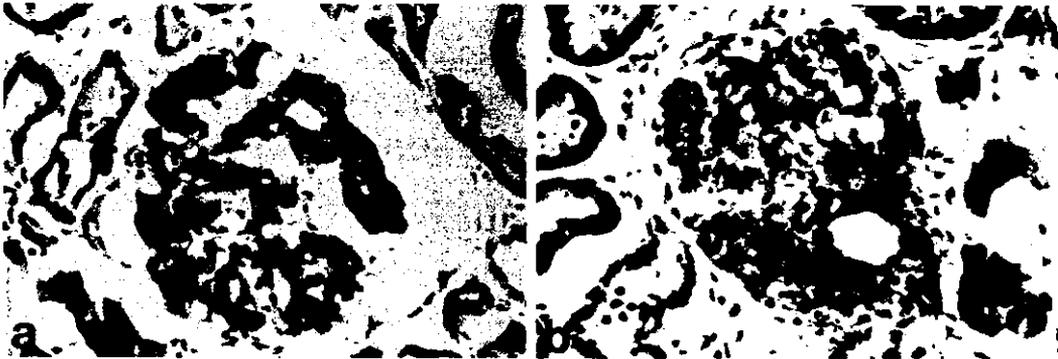


Fig. 2. TCC concentrations in plasma in patients with type I MPGN

* $p < 0.0001$ vs Low TCC group, Control



▼ Fig. 3. Direct immunoperoxidase staining with 1B4 (monoclonal antibody against a neoantigen of the human terminal complement complex)

a : strongly positive staining (2+) ($\times 400$)

b : weakly positive staining (+) ($\times 400$)

High TCC 群が Low TCC 群に比べ有意に強く染色されていた ($p = 0.034$)。対照群では 7 例全例が (-) であった。

3. 尿中 TCC の測定結果

Type I MPGN 13 例における尿中 TCC の測定を行い、High TCC 群の尿中 TCC は 0.73 ± 0.33 AU/ml, Low TCC 群では 0.03 ± 0.07 AU/ml であった。対照 5 例は 0.02 ± 0.04 AU/ml を示した。尿中 TCC に関して High TCC 群と対照群の間には有意差が認められた ($p = 0.0002$)。また、High TCC 群と Low TCC 群の間にも有意差がみられた ($p = 0.0001$)。一方、Low TCC 群と対照群の間には尿中 TCC に有意差は認められなかった (Fig. 4)。

4. 血中 TCC 値と血清 C5 値との関連

Type I MPGN 25 例における血中 TCC 値と血清 C5 値との関連を検討すると、両者の間には強い負の相関関係 ($r = -0.73$) が認められ、High TCC 群では Low TCC 群に比べ血清 C5 が低値をとる傾向がみられた (Fig. 5)。High TCC 群 ($n = 14$) の血清 C5 は $29 \pm 17\%$ 、Low TCC 群 ($n =$

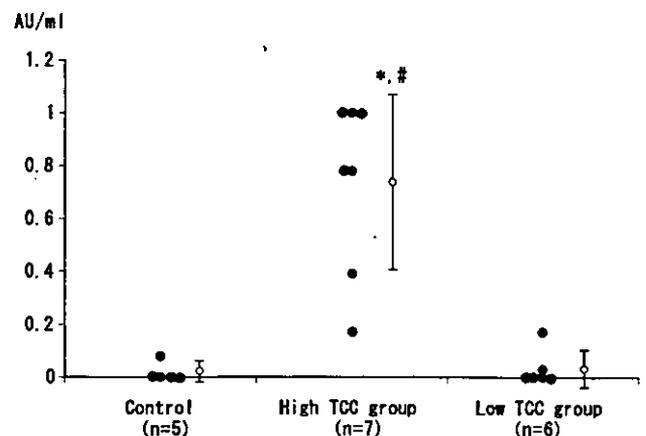


Fig. 4. TCC concentrations in urine in patients with type I MPGN

* $p = 0.0001$ vs Low TCC group

$p = 0.0002$ vs Control

11) の血清 C5 は $103 \pm 21\%$ であり、前者は後者に比べ血清 C5 が有意に低値をとった ($p < 0.0001$)。

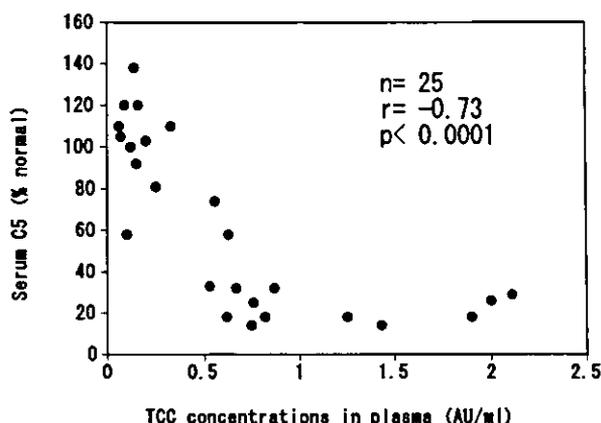


Fig. 5. Correlation between the TCC concentrations in plasma and the serum C5 levels in patients with type I MPGN

5. 血中TCC値と治療反応性ならびに予後との関連 (Table 2)

Type I MPGN 25例のうち High TCC 群は治療反応性が不良であり, Low TCC 群と比較すると治療反応性に明らかな差がみられた($p=0.007$)。また予後については High TCC 群と Low TCC 群の間には有意の差が認められた($p=0.013$)。すなわち, 前者では尿所見の改善が後者に比し有意に低いものであった。

考 察

古典経路または第二経路により進められる血清補体の活性化は C3 で合流し, さらに後期反応成分である C5 から C9 が順次活性化され, 最終的に分子量 1×10^3 kDa 以上の巨大な膜傷害性複合体(membrane attack complex: MAC) が形成される。C5b-9 の重合体である MAC, C5b-7 に液性制御因子である S-protein(分子量 8 万, 接着因子の vitronectin と同一の蛋白)が結合した soluble MAC は TCC と総称されるが, 膜結合能をもつ MAC は強い膜傷害作用を有するとされ, soluble MAC についても S-protein が離れると膜結合能が回復するといわれている。MAC は細胞膜を傷害して細胞融解を起こすとされており, 有核細胞においてはその機能を大きく変化させ⁸⁾, 白血球, 血小板や単球などでは活性酸素や各種のプロスタグランジンの産生が増加するといわれている。

ヒトの type I MPGN は持続する低 C3 血症を呈することから, その病態への補体の関与が想定されている。本疾患における TCC の動向に関しては, これまでメサンギウムや糸球体糸球壁へ MAC もしくは poly C9 の沈着が認め

Table 2. Correlation between TCC levels in plasma and response to steroid treatment (a), and long-term prognosis (b) in patients with type I MPGN

	High TCC group [§]	Low TCC group [¶]
No. of patients	14	11
(a)* Response	5	10
Non-response	9	1
(b) [‡] Remission	5	10
Abnormal urinalysis	5	0
Chronic renal failure	4	1

[§] TCC concentrations in plasma >0.5 AU/ml (follow-up period: 5.7~15.0 yrs, average: 9.5 yrs)

[¶] TCC concentrations in plasma ≤ 0.5 AU/ml (follow-up period: 2.7~27.0 yrs, average: 16.5 yrs)

* $p=0.007$, High TCC group vs Low TCC group

[‡] $p=0.013$, High TCC group vs Low TCC group

られたという報告^{9,10)}や, 本疾患の一部で血中 TCC 高値が確認されたという報告^{3,11)}がみられる。しかし小児期に発症した本疾患における TCC の動向, さらに TCC と臨床的予後との関連についての報告は少ない。このため, われわれは本疾患における TCC の病態的意義をより明らかにする目的で本研究を行った。

血中 TCC の正常値についてはこれまで以下のように報告されてきた。すなわち, Hugo ら¹²⁾は正常人の 2/3 では $0.1\sim 0.6 \mu\text{g/ml}$ の範囲にあり, 1/3 では検出限界以下であったと報告している。彼らはザイモサンで活性化した血清(ZAS)中には TCC が $220 \pm 40 \mu\text{g/ml}$ 存在したと述べた。また Kusunoki ら⁹⁾は 21 例の正常人の血中 TCC は $0.155\sim 0.525$ AU/ml であったとしたが, 彼らは ZAS 中の TCC を 200 AU/ml とし検体中の濃度を決定したため, これは $0.17\sim 0.58 \mu\text{g/ml}$ に相当する。一方, Matsell ら¹³⁾は正常成人の血中 TCC を $0.19 \pm 0.10 \mu\text{g/ml}$ と報告し, $+3$ SD である $0.49 \mu\text{g/ml}$ を超える値を高値とした。われわれの対照 8 例の血中 TCC は 0.06 ± 0.04 AU/ml ($0.066 \pm 0.044 \mu\text{g/ml}$) であり, 上述の報告に比べ低めであったが, これらのなかでは Matsell らの報告に近かった。このことから, 今回の検討では Matsell らに準じて血中 TCC の正常上限値を 0.5 AU/ml とし, これを超える値をとる例を High TCC 群, これ以下を Low TCC 群とした。

今回の検討から, 小児期発症の type I MPGN は病初期の血中 TCC 値により High TCC 群と Low TCC 群に分けられることが確認され, High TCC 群は Low TCC 群に比ベス剤治療への反応が不良で長期予後が悪いことが明らかになった。Type I MPGN の治療にス剤が用いられる

ようになってから尿所見や腎機能の改善が明らかになり¹⁴⁾、有効な治療法として広く用いられている。病初期の血中 TCC 値とス剤反応性との関連につき検討を行ったものはこれまでみられなかったが、今回の結果から、血中 TCC 値は小児期 type I MPGN におけるス剤反応性の指標になるものと考えられた。

次に、type I MPGN における血中 TCC 値と腎組織 TCC 沈着との関連性について検討した。今回の検討では、High TCC 群は Low TCC 群に比べ腎糸球体における TCC 沈着が優勢に認められた。腎組織上の TCC 沈着に関しては、これまでさまざまな糸球体腎炎での報告がみられる^{10,15,16)}。しかし、血中 TCC と腎組織上の TCC 沈着との関連については多くは論じられていない。Kusunoki ら³⁾はさまざまな腎炎における血中 TCC と糸球体上の TCC 沈着を検討し、血中 TCC については SLE や MPGN で高値を示す傾向がみられるものの、膜性腎症、巣状糸球体硬化症、IgA 腎症、微小変化群では正常範囲にあるとした。一方、糸球体における TCC の沈着は SLE や MPGN ばかりでなく、膜性腎症、巣状糸球体硬化症、IgA 腎症でも IgG などの免疫グロブリンや C3 など補体成分とほぼ同様のパターンで認められたと報告した。腎炎の種類により血中 TCC と糸球体の TCC 沈着との結果に相違がみられた理由として、彼らは、血中 TCC の半減期は短く組織沈着した TCC に比べ血中濃度が速やかに正常化する可能性を指摘した。さらに immune deposit が SLE や MPGN では糸球体毛細血管の内皮細胞下に、IgA 腎症ではメサンギウム領域に、膜性腎症では糸球体上皮細胞下に主に認められることから、補体が活性化される糸球体での部位が関係していると推察した。糸球体上に TCC が沈着する機序に関して、Okada ら¹⁷⁾は、TCC の分子量が約 1×10^5 kDa ときわめて大きく糸球体基底膜の size barrier を通過することは難しいため、糸球体上皮細胞下に TCC の沈着がみられる場合には循環血液中の TCC が trap されるのではなく、腎組織上で TCC が形成される可能性が高いと述べている。また Ogawa ら¹⁸⁾はヒト膜性腎症における上皮細胞下 vitronectin, C5b-9 および vitronectin receptor の沈着を検討し、vitronectin が C5b-9 に結合する部位は血中ではなく腎組織上の可能性が高いと述べた。したがって、膜性腎症のように上皮細胞下に免疫複合体の沈着がみられる腎炎では、TCC は主として腎組織上で形成される可能性が高いと考えられる。今回の検討で、High TCC 群は Low TCC 群に比べ腎糸球体の TCC 沈着が優勢に認められたが、これは、type I MPGN における

immune deposit 形成が基底膜の size barrier の影響を受けない内皮細胞下で主に行われていることと関係があると考えられる。すなわち、本疾患では腎組織で新たに形成される TCC だけでなく、循環血液中の TCC も腎組織での TCC 沈着に一定の役割を果たしている可能性が示唆される。

尿中 TCC についての今回の検討では、High TCC 群は Low TCC 群に比べより高値をとる傾向がみられた。尿中 TCC に関し Pruchno ら¹⁹⁾は、膜性腎症モデルである Heymann 腎炎では尿中に TCC が排泄されており、その量は糸球体への免疫複合体の沈着量に相関していたと報告した。尿中に TCC が排泄される機序として、膜性腎症モデルでは上皮下沈着物中の TCC が上皮細胞中の multivesicular body に集まり細胞内を移動し、その分解産物が尿腔側に exocytosis されることが証明されている²⁰⁾。一方、MPGN などヒトの腎炎における尿中 TCC の形成機序はまだ明らかではない。Kusunoki ら³⁾によれば SLE や MPGN のみならず、血中 TCC の上昇を認めなかった膜性腎症、巣状糸球体硬化症、IgA 腎症においても尿中 TCC が検出されている。TCC において血中濃度に対する尿中排泄の割合は、分子量が同程度の IgM に比べはるかに高いことから、彼らは尿中の TCC が糸球体内あるいはそれ以降の過程で形成される可能性を示唆した。今回、High TCC 群は Low TCC 群に比べ、腎組織への TCC 沈着が優勢で尿中 TCC の排泄も多く認められた。このことは膜性腎症モデルと同様、ヒトの type I MPGN においても腎組織上の TCC 沈着量と尿中 TCC の排泄量との間に関連があることを示すものと考えられる。

Type I MPGN における血清 C5 値と血中 TCC 値の関係については両者の間に有意の負の相関が認められた。これまで腎炎において血清 C5 と血中 TCC の関係を調べた報告は少ない。そのなかで Horigome ら¹¹⁾は、SLE や MPGN において CH50, C3, C5 などの血清補体価と血中 TCC 値の間に有意の負の相関がみられ、SLE では classical pathway が、また MPGN では alternative pathway の活性化が TCC 産生に重要な役割を果たしている可能性を指摘した。今回の検討では、type I MPGN において補体後期成分の出発点となる血清 C5 の活性化が血中の TCC 産生に結びついていることが確認された。

結 語

小児期発症 type I MPGN の血中 (n=25)、腎組織 (n=

18) および尿中(n=13)TCCを酵素免疫定量法ならびに酵素抗体染色を用いて検討した。

1) Type I MPGN 25例は、血中TCC値が0.5 AU/mlを超えるHigh TCC群14例と0.5 AU/ml以下のLow TCC群11例に分けられた。High TCC群はLow TCC群に比べ糸球体におけるTCC沈着が優勢で尿中TCCの排泄も多くみられた。

2) High TCC群はLow TCC群に比べステロイド治療に対する反応性が低く長期予後も不良であった。

3) Type I MPGN 25例の血清C5値と血中TCC値の間には負の相関関係が強く認められた。

以上の結果から、type I MPGNにおいて血中TCCは腎組織ならびに尿中でのTCC産生に一定の役割を果たすものと推察された。また、病初期の血中TCC値がステロイド治療への反応性や長期予後の指標になることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、IB4抗体をご供与いただきました北海道大学医学部小児科学 楠 幸博先生、武越靖郎先生に深謝いたします。

文 献

- Hasegawa O, Ito H. Methylprednisolone pulse therapy (MPT) for children with type I membranoproliferative glomerulonephritis(MPGN) : significance of complement profile on the therapy. In : Murakami K, Kitagawa T, Yabuta K, Sakai T(eds) Recent advances in pediatric nephrology. Amsterdam : Elsevier Science Publishers BV, 1987 : 247-252.
- 大井洋之, 渡辺静彦, 大森史彦, 関 正人, 波多野道信. 持続性低補体MPGNの臨床像と補体の変動 特に, C5値よりみて. 第23回補体シンポジウム抄録集, 1986 : 55-58.
- Kusunoki Y, Takekoshi Y, Nagasawa S. Using polymerized C9 to produce a monoclonal antibody against a neoantigen of the human terminal complement complex. J Pharmacobio-Dyn 1990 ; 13 : 454-460.
- 吉村眞一. 酵素標識法. 渡辺慶一, 中根一穂(編)酵素抗体法1巻. 東京 : 学際企画, 1992 : 19-37.
- Wilson MB, Nakane PK. Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In : Knapp W, Holubar K, Wick G (eds) Immunofluorescence and Related Techniques. Elsevier/North Holland Biochemical Press, 1978 : 215-225.
- 和泉伸一, 渡辺慶一, 小松遵至. 凍結切片による光顕的酵素抗体法染色. 渡辺慶一, 中根一穂(編)酵素抗体法1巻. 東京 : 学際企画. 1992 : 51-98.
- Laurell CB. Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. Anal Biochem

- 1966 ; 15 : 45-52.
- Morgan BP. Complement membrane attack on nucleated cells : resistance, recovery and non-lethal effects. Biochem J 1989 ; 264 : 1-14.
- Couser WG, Baker PJ, Adler S. Complement and the direct mediation of immune glomerular injury : A new perspective. Kidney Int 1985 ; 28 : 879-890.
- Ootaka T, Suzuki M, Sudo K, Sato H, Seino J, Saito T, Yoshinaga K. Histologic localization of terminal complement complex in renal diseases. An immunohistochemical study. Am J Clin Pathol 1989 ; 91 : 144-151.
- Horigome I, Seino J, Sudo K, Kinoshita Y, Saito T. Terminal complement complex in plasma from patients with systemic lupus erythematosus and other glomerular diseases. Clin Exp Immunol 1987 ; 70 : 417-424.
- Hugo F, Krämer S, Bhakdi S. Sensitive ELISA for quantitating the terminal membrane C5b-9 and fluid phase SC5b-9 complex of human complement. J Immunol Methods 1987 ; 99 : 243-251.
- Matsell DG, Wyatt RJ, Gaber LW. Terminal complement complexes in acute poststreptococcal glomerulonephritis. Pediatr Nephrol 1994 ; 8 : 671-676.
- McEnery PT. The effect of prednisolone in a high-dose, alternate-day regimen on the natural history of idiopathic membranoproliferative glomerulonephritis. Medicine 1986 ; 64 : 401-424.
- Rus HG, Niculescu F, Nanulescu M, Cristea A, Florescu P. Immunohistochemical detection of the terminal C5b-9 complement complex in children with glomerular diseases. Clin Exp Immunol 1986 ; 65 : 66-72.
- Murphy BF, Davies DJ, Morrow W, d'Apice AJF. Localization of terminal complement components, S-protein and SP-40, 40 in renal biopsies. Pathology 1989 ; 21 : 275-278.
- Okada M, Yoshioka K, Takemura T, Akano N, Aya N, Murakami K. Immunohistochemical localization of C3d fragment of complement and S-protein(vitronectin) in normal and diseased human kidneys : association with the C5b-9 complex and vitronectin receptor. Virchows Archiv A Pathol Anat 1993 ; 422 : 367-373.
- Ogawa T, Yorioka N, Yamakido M. Immunohistochemical studies of vitronectin, C5b-9, and vitronectin receptor in membranous nephropathy. Nephron 1994 ; 68 : 87-96.
- Pruchno CJ, Burns MW, Schulze M, Johnson RJ, Baker PJ, Couser WG. Urinary excretion of C5b-9 reflects disease activity in passive Heymann nephritis. Kidney Int 1989 ; 36 : 65-71.
- Kerjaschki D, Schulze M, Binder S, Kain R, Ojha PP, Susani M, Horvat R, Baker PJ, Couser WG. Transcellular transport and membrane insertion of the C5b-9 membrane attack complex of complement by glomerular epithelial cells in experimental membranous nephropathy. J Immunol 1989 ; 143 : 546-552.

総 説

小児末期腎不全の管理

東京都立八王子小児病院

本 田 雅 敬

キーワード：末期腎不全，透析，腹膜透析，腎移植

はじめに

小児末期腎不全治療は腹膜透析 (PD) 療法の導入、移植療法の進歩により、飛躍的な進歩を遂げてきた。

小児 PD 療法は 1981 年の CAPD の導入により、飛躍的に増加し、90 年頃より小児腎不全治療の第一選択として定着した。80 年前半頃までは乳児腎不全は死亡率が高い、生存したとしても著明な脳障害や成長障害が出現するため透析や移植をすべきではないとの考えもみられていた。しかし PD の導入、移植医療の進歩により、現在ではたとえ乳児腎不全といえども積極的に治療され、正常に近い社会生活が得られるようになってきた¹⁾。さらに PD の生存率、継続率も著しく改善し、欧米に比し良好で、腎移植と遜色がなくなった。一方腎移植も新たな免疫抑制剤の出現により良好な生存率が得られるようになってきたが、腎移植への移行が遅く、欧米では例をみない小児の長期 PD 患者が見られる。それと共に長期 PD 療法の最大の合併症である被嚢性腹膜硬化症の問題が見られてきた。

小児腎不全の治療は予後の改善により、身体的、心理的あるいは社会的なハンディを作らず正常に近い成人にするかが重要になってきている。そのためには先天性腎疾患の頻度が増加したため保存期の管理も重要である。さらに透析期、移植まで含めて常に将来を見据えた管理が重要である。将来の展望も話されないまま安易に透析に導入され、将来の社会復帰に著しい障害を起す症例も多く見られる。PD 療法は移植へのつなぎであり、また不幸にして移植できない症例でもその予後は良好で社会復帰を常に意識した治療が重要である。

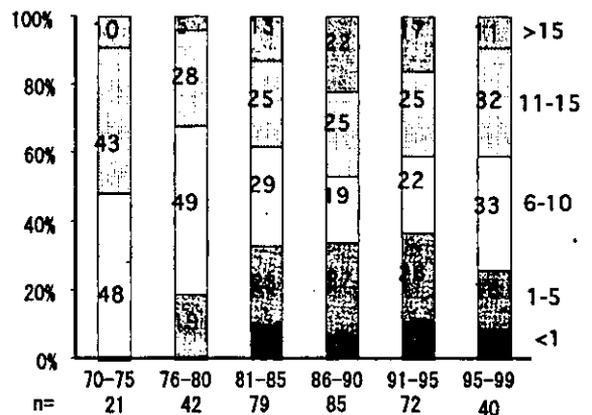


図1 透析導入年齢の変化 (清瀬)

小児末期腎不全治療の現状

末期腎不全患者 (15 歳未満) の調査では 98 年から 4 年間の 241 例の導入方法として腹膜透析 (PD) は 87% に選択され、直接の移植 (preemptive) は 8 例 (3%) と少ない²⁾。一方成人の 95% が導入されている HD は 10% と少ない。また欧米と比べて preemptive の移植が少ない³⁾。しかし、98 年末の末期腎不全の 15 歳未満のわが国の全生存小児例では 41% が移植後の症例⁴⁾で、ヨーロッパ 53%⁵⁾、米国 69%⁶⁾ に比し少ないが、わが国の献腎移植が少ない事を考えると少なくない。PD は 42%、血液透析 (HD) 17% となり HD の頻度が増加する。これらの結果は後述するように腎移植が遅い事、長期 PD が困難な事を意味する。以上から小児腎不全管理は PD、HD、腎移植のすべてに精通する必要がある。

透析導入症例の歴史的な変化は全国的なものが無く、清瀬小児病院の症例で年齢の変化を見る (図1) と、75 年までは 5 歳以下は見られず、76 年から 5 歳以下の導入が見られるようになってきた。しかし 1 歳未満の乳

連絡先住所：(〒193-0931) 八王子市台町 4-33-13

東京都立八王子小児病院

本田 雅敬

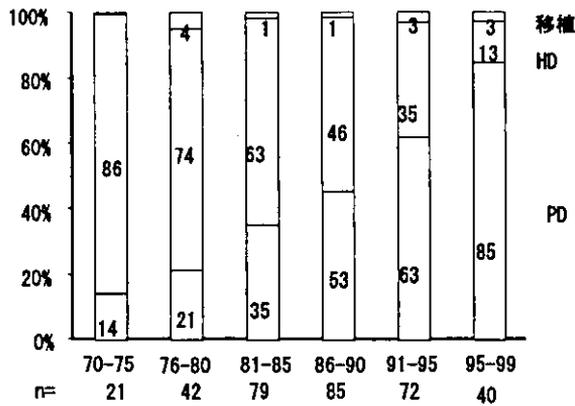


図2 透析導入方法の変化 (清瀬)

児が導入されるようになってきたのはCAPDが導入された81年からであり、それ以後透析患者の約10%を乳児がしめる様になり、同時に5歳以下の乳幼児も全体の26~37%と増加してきた。1カ月未満の新生児の導入は86年になってからであり、現在では導入患者の5%前後を占めている。導入時の治療として腹膜透析が選択される割合は年々増加し、86年以降全導入患者の50%を超え、95年以降では85%とほとんどの透析患者がPDで導入されている(図2)¹⁾。

この様な変化は第一には乳幼児の食事摂取量は体重あたり成人の2倍を超え栄養を犠牲にしない限り通常の血液透析ではコントロールが難しい事²⁾、92年以降機械を使用するAPDの導入により、年長児でもQOLの点からPDが選択される様になってきたためである。

preemptiveの移植はわが国では少ないが、北米(NAPRTCS)では全移植の24%をしめ³⁾、西欧(EDTA)でも16%をしめる³⁾。尚死体腎のしめる割合が多い西欧でもpreemptiveは約7割が生体腎から受けている。わが国のpreemptiveの移植が少ない理由として、医療費の負担がかからないため透析と移植の双方の費用の心配の必要がない、末期腎不全になってから移植を考えるため透析による治療が一時的に必要なになる、PDの生存率やQOLがそれほど悪くない事が考えられる⁴⁾。

末期腎不全患者の生存率は近年著しく改善してきた。透析医学会の最近のデータでは、15歳未満の5年生存率88%、10年生存率83%であり⁵⁾、米国の腎移植のデータを含めた最近の5年生存率は5歳未満80%前後、5歳以上90%前後、10年生存率は5歳未満75~80%、5歳以上80~85%である⁶⁾。清瀬小児病院では1980年末満の5年生存率は89%、10年77%、15年68%であったが、80年以降で見ると5年95%、10年92~94%、15年88%と予後の改善は大きく(図3)、

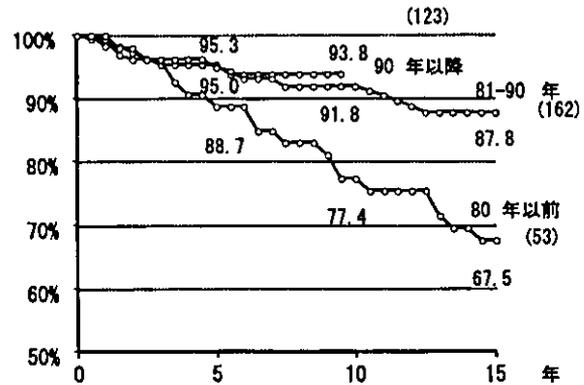


図3 生存率の変化 (清瀬)

10年で全国や米国のデータより10%程度良い。また清瀬小児病院での80年以降の5歳未満では5年で89%、10年で86%、15年83%であり、5歳以上の5年97%、10年95%、15年90%に比べ低いが、これも全米のデータより10%程度良く、今や乳幼児末期腎不全でも長期生存が可能になったと考えて良い⁴⁾。またこれらの成績は若年成人よりも良好である。

以上の様に末期腎不全になっても年長児では10年で80%以上の生存率が見られ、清瀬小児病院では15年で5歳未満でも80%以上の生存が得られており、小児腎不全といえども長期生存が可能になってきた。

原疾患の変化と保存期管理の重要性

20歳未満の症例で見ると1980~86年の全国調査で見ると糸球体腎炎は54%、先天性・遺伝性疾患は22%であったが⁷⁾、1998~2000年では糸球体腎炎は36%と減少し、先天性・遺伝性疾患は44%と増加している⁸⁾。小児PD研究会の15歳以下の91年以降の成績では原疾患は先天性、低・異形成腎が35%と最も多く、次いで巣状分節性糸球体硬化症18%、慢性糸球体腎炎8%、先天性ネフローゼ症候群7%が多かった⁹⁾。91年までの成績と比べると慢性糸球体腎炎が12%から減少し、低・異形成腎は27%から増加し、先天性腎疾患の頻度が50%以上に増加していた¹⁰⁾。その変化に伴って発見から透析までの期間が長い患者が増加し、清瀬小児病院では透析患者の低年齢化にも関わらず6年以上の患者が80年以前の29%から90年以降43%になり、保存期管理の重要性が増加している。すなわち保存期に成長や発達の遅れや様々な合併症を引き起こさない治療が重要になってきている。また一度遅れた成長や社会性の発達は取り戻す事が困難であり、その点十分な注意が必要である。

なぜ小児でHDの導入が少ないか

小児のHDではHD中に嘔気、嘔吐、腹痛、低血圧、ショックなどの症状が出現しやすい。特に体重30kg未満ではその症状の出現頻度は増加し、無尿の15kg未満では週3回4~5時間の透析では症状の出現なしに行うことは困難である³¹⁾。除水量でみると10ml/kg/hr以上で出現頻度が高くなる。透析間の体重増加が5%未満、透析前のBUN値を100mg/dl以下の場合透析中の症状の出現はほとんど見られない。小児は体重当たりの必要栄養量が多いため、最低限に水分、塩分を制限しても低年齢ほど体重当たりの水分摂取量は多くなる。30kg未満で1日体重増加は週3回透析では透析間に5% (25g/kg/day) を超える。また蛋白摂取が1.5g/kg/dayを超えると中一日でBUNは100mg/dlを超える (1.5g/kg/dayの摂取として2日で70mg/dl増加)。体重30kg未満では1.5g/kg以上の蛋白摂取量が必要となる³²⁾。以上から無尿の小児での透析は通常の週3回の透析法は困難である。もし行うとすれば、乳幼児では週4回以上の透析を厳重な食事制限下で行う必要があり、在宅治療が難しく、さらには発育発達上大きな問題となる。そのため慢性透析ではPDが絶対的適応となる。

乳児の体外循環による血液浄化

PDができない時あるいは急性腎不全では体外循環による血液浄化が必要になるが、特に乳児では難しい。この分野も近年機器類が整ってきたので簡単に触れる³³⁾。

乳児では十分な栄養を考えると100ml/kg以上の水分が必要である。そのために短時間の除水は激しい血圧変動を伴い通常の方法では不可能で、長時間の連日HD、あるいは持続血液濾過(CHF)、持続血液濾過透析(CHDF)を使用する。ダイアライザ(フィルタ)は血液濾過用の0.3m²以下のものを用いる。できれば回路まで含めて循環血液量の10%以下になるように設定する。ダブルルーメンのカテーテルをできれば内径静脈に入れる(大腿静脈は将来の移植時に、鎖骨下静脈は将来のHD時のシャント作成に問題)。カテーテル先端は心房まで入れると脱血不良が少ない。HDでは血液流量は3~5ml/kg/分、6時間以上連日で行う(尿素クリアランスは3~4ml/kg/分)。CHFやCHDFでは1~2ml/kg/分で行う。これらは持続的であり、特に血圧などの管理が難しい急性腎不全や十分な血液流量が取れない時、多量の輸液が必要な時に適している。CHFは10~20ml/kg/時の濾過量で行えば通常の慢性

腎不全では十分であるが、異化の激しいときは不十分であり、CHDFで透析液流量+血液濾過量が20~50ml/kg/時で設定する。東レTR525は最低血液流量1ml/分、最小透析液量あるいは濾過量10ml/時で可能であり、最小体外循環量は回路、フィルタを入れて44ml(清瀬小児病院では24mlのものを作成)、で新生児、未熟児でも可能である。なお体外循環量が循環血液量の10%を超えた場合はアルブミンあるいはFFP+濃厚赤血球で補充するが、最後は返血しない。

PD療法の現状と問題点

小児PD研究会では132施設から15歳以下の全国データを集積し、2001年末までには1,012例、男子563例(56%)、女子449例(44%)のデータが得られた。1991年以降の588例(平均導入年齢8.5歳、平均PD期間は3.2年)をそれ以前と比較し現状を検討した³⁴⁾。患者数は96年の300例から低下し、99年には200例を割っている。新規導入例は50~80例で86年より大きな変化はなく、96年以降長期例が減少してきた事による。長期PD患者は累積でみるとPDの歴史と共に増加し、5年超は29%、10年超は6%を占めるが、長期例の増加速度は減少している。しかし、わが国は長期例が多いのが特徴である。

腎移植への移行は90年以前50%移行するのが80年であったが、5.9年に短縮している。90年以前は4年までは増加し、その後の移植はあまり増加しなかったが、91年以降では年数と共に直線的に伸び、日本の移植は欧米に比べ遅いが(欧米では80%は2年以内)、ほとんどが腎移植を受けるようになった³⁵⁾。

1) PD患者の生存率と継続率

患者生存率及びPD継続率を表1に示した。導入が91年前後と比較すると5年生存率は91年以降の92%で82%より著しく改善し、5年継続率も82%と65%から著しい改善を示していた。しかし、91年以後の継続率は5年以降急に低下し7年でそれ以前とほぼ同様になり、8年で半数以下になることからPDは現時点では平均8年程度しか使用できない事が解る。生存率は6歳未満が5年で87%、6歳以上の5年95%に比べ有意に悪かったが、継続率はそれぞれ78%、80%と年齢によって差はなかった。6歳未満ではPDは死亡によって中止される事が多く、6歳以上ではHDに移行して中止される事が多い。これらは成人や欧米のデータに比べて良好で³⁶⁾、長期生存はPDだけでも可能となってきたと言える。特に乳幼児では生存率は0~1歳の5年で80%と2~5歳の93%に比し低いが、米国の0~4歳の腎移植が80%、0~4歳の透析³⁷⁾が60%に比しても、日本の乳児のPD患者の生存率は著し

表1 患者生存率及びPD継続率

患者生存率 (%)				
年	1	3	5	7
全例 (1,012)	97	92	87	83
導入時期**				
1990年以前 (424)	96	88	82	77
1991年以降 (588)	97	93	91	89
年齢 (91年以降)**				
6歳未満 (180)	94	89	87	80
6歳以上 (408)	99	96	95	87

PD継続率 (%)				
年	1	3	5	7
全例 (1,012)	95	84	72	56
導入時期**				
1990年以前 (424)	92	78	64	55
1991年以降 (588)	97	89	82	57
年齢 (91年以降)				
6歳未満 (180)	93	88	80	70
6歳以上 (408)	98	89	78	55

() = 患者数
 ** = p < 0.01 generalized Wilcoxon method

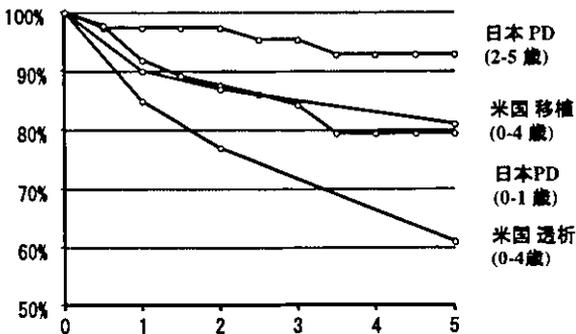


図4 乳幼児患者生存率

く良好である (図4)。

2) 死因と中止理由

死因を91年前後で比較すると90年以前の424例中72例の死亡に比し、91年以降は588例中40例であった。敗血症、腹膜炎、肺炎などの感染症が91年以前は23例(33%)に比し、91年以降は7例(18%)であった。この理由は腹膜炎の死亡が11例から0となり、敗血症の死亡が10例から3例に減少したことが大きい。一方心不全、肺水腫、高血圧性脳症、脳血管障害の心血管系の死因が19例(26%)から15例(38%)と相対的に増加している。これらの2大死因は北米の報告と同様であるが、感染による死亡が減少したのがわが国の特徴である。感染も心血管系死亡も6歳未満に多く、特に乳幼児の心血管系の死亡が多い事が問題である。これは溢水による高血圧、心不全などの合併症

のためと考えられ、循環血液量の適切な管理が最も重要と思われる。清瀬小児病院でみると91年以降では5年生存率は6歳以上100%、6歳未満91%であり、特に6歳未満は全国に比し有意に良い。清瀬小児病院の導入例では全体で143例中8例が死亡しているが、心血管系の合併症による死亡例は1例で宗教的な理由による中止例のみであり、PD導入前後の体重管理、血圧管理さえしっかりしていれば心血管系の死亡はかなり防げるものと思われる。他院から紹介されてくる乳児期からのPD患者に高血圧性心筋症が見られ、これらの症例では乳児でも血圧が150mmHg以上ある時期が長期に続いている事からも血圧及び体重管理が最も大切である。清瀬小児病院でPDに導入した患者の左室駆出率をみると1年以上経過(平均3年)を追えた52例中7例が導入時低下していたが、最終観察では2例を除いて改善し、血圧、体重さえ管理が良ければ長期PDでも問題ない事を報告した¹³⁾。

全国のデータで91年以降血液透析(HD)に移行した73例中32例(44%)が腹膜炎のためで、15例(21%)は除水不良のためであった。腹膜炎による中止の頻度が90年以前の64%からと減少しており、これがPDの継続率の改善に寄与している。一方除水不良は91年以降10から21%へと明らかに増加している。PD開始後5年未満の中止は58%が腹膜炎により、12%が除水不良に比し、5年以上では腹膜炎の26%を除水不良の32%が逆転している。すなわち長期例の増加と共に除水不良が増加し、後述する被覆性腹膜硬化症を