

17%、腎硬化症 13%など、末期腎不全患者は除外)、高精度超音波ドプラ計測を行い頸動脈壁の壁弾性特性を計測した。腎機能およびその他の臨床的パラメータとの相関について検討した。

### C. 結果

腎機能 (eGFR) の低下とともに弾性特性 Er が高値を示し ( $r=-0.34$ ,  $p=0.0038$ )、多変量解析でも唯一 eGFR が Er と有意に相関することが示された (standard regression coefficient:  $-0.24$ , 95%CI:  $-0.321$  to  $-0.007$ ,  $p<0.05$ )。原疾患別の検討では全体的に糖尿病性腎症の患者の Er 値が高い傾向にあり、eGFR が比較的保たれている時期でも既に高値を呈している例が散見された。eGFR < 30ml/min 以下を対象として原疾患毎の Er 値の比較を行うと、糖尿病性腎症群  $66.3\pm 16.5$ 、慢性腎炎群  $52.0\pm 13.9$ 、腎硬化症群  $52.4\pm 15.0$  であり慢性腎炎群に比較して糖尿病性腎症群で有意に高値を示した ( $p<0.01$ )。

### D. 考察

本手法を用いることで IMT の肥厚がみられない早期の動脈硬化病変や腎不全特有のメンケベルク型中膜石灰化病変を描出することが可能であった。今回の結果より慢性腎不全患者の血管病変の評価に際して、高精度超音波ドプラ法による弾性特性の計測が非常に有用と考えられた。特に糖尿病性腎症患者での高度の動脈硬化病

変が確認され、早期病変が検出可能である本手法を用いる事で更なる病態解明の可能性が示唆された。

### E. 結論

慢性腎不全患者において、高精度超音波ドプラ法を用いた頸動脈壁弾性特性の計測が、腎不全と関連した動脈硬化病変を評価するのに極めて有用と考えられた。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 知的所有権の出現登録状況

なし

### H. 研究発表

#### 1. 論文発表

準備中

#### 2. 学会発表

- 1) 杉浦章, 佐藤寿伸, 佐藤博, 伊藤貞嘉, 小岩喜郎, 加藤豪, 下川宏明: 慢性腎不全患者における頸動脈壁弾性特性の計測. 第8回みやぎ末梢循環障害フォーラム, 仙台, Sep 27, 2007
- 2) Sugiura A, Sato T, Nakayama K, Sato H, Ito S, Koiwa Y, Kanai H: A novel method for evaluating carotid artery elasticity in patients with chronic kidney disease. 40<sup>th</sup> annual meeting of American Society of Nephrology, San Francisco, Oct 31 - Nov 5, 2007

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
各個研究報告書

「膜性腎症における電顕所見と予後に関する前向き研究」

研究協力者：横山 仁

共同研究者：吉本敬一\*，和田隆志\*，木田寛\*\*

所属：金沢大学医学部附属病院腎臓内科・血液浄化療法部（助教授）

金沢大学腎臓内科\*，国立病院機構金沢医療センター-内科\*\*

研究要旨

特発性膜性腎症の予後と免疫複合体の沈着パターンが重要なかわりを持つことをこれまで報告したが、この分類に基づいた前向き観察研究を行った。対象と方法：1985年より特発性膜性腎症と診断し、電顕ならびに臨床経過観察を行った77例を解析対象とした。成績：50例が均一型、27例は混合型に分類され、混合型で発症から腎生検までの観察期間が長く、高血圧の合併が高かった。不完全寛解I型への達成率と期間は、均一型で有意に高く、短時間であったが、治療法による差は見られなかった。また、腎機能保持ならびに生命予後は、均一型で良好であった。Cox比例ハザードモデルにおいて電顕分類均一型は、腎予後ならびに生命予後に対して有意な改善因子であったが、加齢は生命予後に対する不良因子であった。

結論：膜性腎症において電顕観察によって判断された免疫複合体沈着パターンは、前向き観察においても最も重要な予後規定因子であった。

A. 研究目的

ヒト特発性膜性腎症は成人領域ネフローゼ症候群の原因疾患の約1/3を占める重要な疾患である。その予後は多様であり、日本人ではネフローゼ症候群を呈する症例の約40%が発症20年以内に末期腎不全に陥るか合併症により死亡する。一方、約25%の症例は自然寛解するが、その予後規定因子については必ずしも明らかではない(1-2)。そこで我々は初回腎生検を用いてヒト特発性膜性の予後推測因子を検討し、電子顕微鏡観察による免疫複合体の沈着パターンが

特発性膜性腎症の予後と重要なかわりを持つことを明らかにした(3)。すなわち、複数の異なる時相にわたって高電子密度沈着物が存在する混合型は、同一時相の高電子密度沈着物で形成される均一型に比べて高率に末期腎不全に陥り、予後も不良であった。さらに、混合型を呈する症例の末期腎不全に陥る要因として間質病変の進展とこれに関連した炎症性および走化性ケモカインである monocyte chemo-attractant protein-1 とその受容体 chemokine receptor 2 の発現を報告した(4)。今回この電顕分類に基づい

た前向き観察研究の臨床成績をまとめた。

## B. 研究方法

1985年から2005年までの間に膜性腎症と診断した77例について電子顕微鏡観察により、上皮高電子密度沈着物のパターンより均一型と混合型に分類し、臨床観察を行った。さらに寛解後に再発した6例ならびに寛解が遷延した12例に対して再腎生検を行ない組織型の変化を観察した。1日尿蛋白1.0g以下の不完全寛解I型への到達率、腎死あるいは血清クレアチニン値の2倍化率 (Primary outcome) ならびに末期腎不全あるいは個体死 (Secondary outcome) についてKaplan-Meier法により検討し、さらにこれらに影響する各種臨床病理学的因子に関してCox比例ハザードモデルを用いて解析した。

## C. 結果と考察

症例背景を表1に示す。50例が均一型、27例は混合型に分類され、混合型で発症から腎生検までの観察期間が長く、高血圧の合併が高かった。治療法については、両群間に差はなかった。

再生検を行った均一型11例のうち寛解後の再発6例はいずれも新たな均一時相の高電子密度沈着物を認めた。一方、遷延化した5例では3例が深層型、2例が混合型へ移行した。混合型の7例はいずれもI-IV相の沈着物が認められた。

臨床的予後を表2に示す。均一型で腎機能保持が良好であり、腎死例はいずれも混合型であった。さらに個体死では、均一型では早期の感染症死、混合型では経過中の心血管障害あるいは悪性新生物による死亡が

認められた。

不完全寛解I型への達成率と期間は、均一型で有意に高く、短時間であったが、治療法による差は見られなかった。また、腎機能保持ならびに生命予後は、均一型で良好であった。

さらにCox比例ハザードモデルにおいて電顕分類均一型は、不完全寛解I型への達成率 (Harzard比 5.336, 95%信頼区間 2.189-13.0), 腎予後 (Harzard比 0.165, 95%信頼区間 0.32-0.856) ならびに生命予後 (Harzard比 0.358, 95%信頼区間 0.13-0.982) に対して有意な改善因子であったが、加齢は生命予後に対する不良因子 (Harzard比 1.083, 95%信頼区間 1.028-1.142) であった。

## D. 結論

膜性腎症において電顕観察によって判断された免疫複合体沈着パターンは、前向き観察においても最も重要な予後規定因子であった。

## E. 文献

- 1) Kida H, Asamoto T, Yokoyama H, et al: Long-term prognosis of membranous nephropathy. Clin Nephrol 25: 64-69, 1986
- 2) Shiiki H, Saito T, Nishitani Y, et al: Prognosis and risk factors for membranous nephropathy with nephrotic syndrome in Japan. Kidney Int 65:1400-1407, 2004
- 3) Yoshimoto K, Yokoyama H, Wada T, et al: Pathologic findings of initial biopsies reflect the outcomes of membranous nephropathy. Kidney Int 65:148-153, 2004
- 4) Yoshimoto K, Wada T, Furuichi K, Sakai N, Iwata Y, Yokoyama H : CD68 and

MCP-1/CCR2 expression of initial biopsies reflect the outcomes of membranous nephropathy. *Nephron Clin Pract* 98: c25-c34, 2004

## F. 健康危険情報

特記なし

## G. 知的所有権の出現登録状況

出願なし

## H. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Sakai N, Wada T, Furuichi K, Iwata Y, Yoshimoto K, Kitagawa K, Kokubo S, Kobayashi M, Hara A, Yamahana J, Okumura T, Takasawa K, Takeda S, Yoshimura M, Kida H, Yokoyama H: Involvement of extracellular signal-regulated kinase and p38 in human diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis* 45: 54-65, 2005

2) Higashide T, Wada T, Sakurai M, Yokoyama H, Sugiyama K: Macular abnormalities and optic disk anomaly associated with a new PAX2 missense mutation. *Am J Ophthalmol* 139: 203-205, 2005

4) 横山仁: 膜性腎症. 腎疾患・透析最新の治療 2005-2007. 南江堂. 2005, pp88-91

5) 横山仁: 腎生検病理診断標準化への指針 (日本腎臓学会・腎病理診断標準化委員会編). 2005, 24-30, pp152-155

### 2. 国際シンポジウム/学会報告

1) Hitoshi Yokoyama: Therapeutic approach to pauci-immune crescentic glomerulonephritis in clinical subtypes at onset. International symposium: Immunoglobulin therapy 2005

(Tokyo) 2005.

2) 横山仁, 和田隆志, 高澤和也: 成人難治性ネフローゼ症候群の治療戦略. 第35回日本腎臓学会西部学術大会ワークショップ [長崎] 2005.

3) Hitoshi Yokoyama, Takashi Wada, Kazuya Takasawa, Norihiko Sakai, Akinori Hara, Toshiya Okumura, Shyu-ichi Kaneko (Oral): Etiology and initial therapy define the renal outcome of focal segmental glomerulosclerosis. 3<sup>rd</sup> World Congress of Nephrology (Singapore), 2005.

Table 1: Case profiles in the prospective study (1985-2005)

	Idiopathic N=77	Homogenous N=50	Heterogenous N=27	<i>p</i> value
Age, years	55.4 ± 1.4	57.3 ± 1.6	51.9 ± 2.2	NS
Male/Female	50/27	31/19	19/8	NS
After onset, months	22.6 ± 4.8	11.3 ± 2.3	43.6 ± 12.2	p= 0.001
Follow-up, months	71.9 ± 6.4	69.8 ± 8.0	75.7 ± 10.8	NS
Nephrotic state (%)	83.1	86.0	77.8	NS
Hypertension (%)	36.4	24.0	59.3	p= 0.03
<b>Therapy</b>				
No or supportive	14	9	5	] NS
Steroid alone	4	3	1	
Steroid + IS	6	4	2	
IV IG ± steroid	30	15	15	
CyA ± steroids	23	19	4	

IS: immunosuppressive agents, IV IG: intravenous immunoglobulin, CyA: cyclosporine  
 NS: not significant

Table 2: Relation between final outcomes and EM classification

Outcome	Cases	EM types	
		Homogeneous	Heterogeneous
Normal renal function	68	48 (96%)	20 (74%)
Renal dysfunction	6	2 (4%)	4 (15%)
Renal failure (ESRF)	3	0 (0%)	3 (12%)
Death	15	8 (16%)	7 (26%)
Infection	4	4 (8%)	0 (0%)
Cardiovascular	4	1 (2%)	3 (11%)
Malignancy	4	2 (4%)	2 (7%)
Others	3	1 (2%)	2 (7%)

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
各個研究報告書

「妊娠高血圧症に伴うネフローゼ症候群における巣状分節性糸球体硬化病変」

研究協力者：横山 仁

共同研究者：和田隆志\*，大田 聡\*\*

所属：金沢医科大学腎機能治療学(腎臓内科)（教授）

金沢大学医学部附属病院腎臓内科\*，富山市民病院内科\*\*

研究要旨

妊娠高血圧症においてネフローゼを伴い出産後も蛋白尿の遷延する症例では，巣状分節性硬化(FGS)病変を生じることが報告されている．今回，妊娠高血圧症 27 例について，腎生検組織を含めた臨床病理学的所見を検討した．対象は 19-37 歳（平均 28 歳），初産婦 25 例，多胎妊娠 2 例であり，12 例(58%)にネフローゼを合併していた．腎生検組織では，10 例（37%）が endotheliosis のみであり，うち 1 例ずつに IgA 腎症，非 IgA メサンギウム増殖性腎炎，基底膜菲薄症が合併していた．一方，FGS 病変を 17 例（63%，cellular variant 1 例，collapsing variant 3 例，tip variant 8 例，perihilar variant 1 例）に認め，妊娠腎では，いずれの FGS 病変を生じることが確認された．免疫抑制療法を併用した 1 例を除いて出産後 6 ヶ月以内に蛋白尿は消失し，臨床経過は追跡可能の範囲で良好であった．また，2 例で再妊娠を確認したが，再発は認められなかった．

A. 研究目的

妊娠高血圧症においてネフローゼを伴い出産後も蛋白尿の遷延する症例では，巣状分節性硬化病変が生じることが報告されている．この成因として胎盤由来の可溶性 VEGF 受容体 1 (sFlt-1)による糸球体糸球体内皮細胞障害と VEGF 異常による上皮細胞障害が注目されている．今回，妊娠高血圧症性腎症について腎生検組織を含めた臨床病理学的所見を検討した．

B. 研究方法

金沢医科大学，金沢大学ならびにその関連施設において腎生検を施行した 27 例（年齢：19-37 歳，平均 28 歳；初産婦 25 例，多

胎妊娠 2 例）を対象に，臨床所見（妊娠経過，血圧，蛋白尿，腎機能）と病理学的所見を光顕，免疫蛍光抗体法ならびに電顕で検討した．巣状分節性硬化病変は，D'Agati らの分類に従って 1) collapsing variant, 2) tip variant, 3) cellular variant, 4) perihilar variant, 5) NOS (not otherwise specified)の 5 つの病型に分類した．また，巣状分節性硬化病変例の臨床所見と予後の特発例 44 例，遺伝性 4 例ならびに他の因子 7 例と比較した．

C. 結果

1. 臨床所見：いずれの症例も，妊娠第 3 期より高血圧あるいは蛋白尿を認めた．

HELLP 症候群を呈した 1 例を除き、他の 26 例は、純粹妊娠中毒症（現在の妊娠高血圧症候群）と診断された。

27 例全例が蛋白尿を示し、定量された 22 例では 1.0-14.5g/日（平均 6.3g/日）の蛋白尿を伴い、うち 12 例(全体の 58%)は出産時にネフローゼ状態を呈した。

その臨床経過をみると、免疫抑制療法を併用した 1 例を除いて出産後 6 ヶ月以内に蛋白尿は消失し、追跡可能の範囲で良好であった。また、2 例で再妊娠を確認したが、再発は認められなかった。

2. 腎生検病理所見：腎生検組織では、10 例 (37%) が preeclampsia に特徴的な糸球体係蹄内皮細胞の endotheliosis のみであり、うち 1 例ずつに IgA 腎症、非 IgA メサンギウム増殖性腎炎、基底膜菲薄症が合併していた。一方、巣状分節性硬化病変は 17 例 (63%) で観察された。その病型の内訳をみると cellular variant 1 例, collapsing variant 3 例, tip variant 8 例, perihilar variant 1 例が認められた。妊娠腎では、いずれの巣状分節性硬化病変を生じることが確認された。

3. 病因における臨床病理学的比較：

妊娠に伴う巣状分節性硬化症例における蛋白尿、硬化病変の頻度は、他の基礎疾患と同様であったが、間質病変を伴わない特徴があった (Table1)。さらに免疫抑制療法を行った 1 例を除き、妊娠に伴う巣状分節性硬化症例のいずれもが自然寛解を示した点が、他の病因による症例と異なっていた (Table 2)。

#### D. 考察

近年の分子機序の解明により妊娠高血圧症では、流血中の sFlt-1 などの生理活性物質

により、糸球体係蹄内皮細胞ならびに上皮細胞の機能障害を生じる。今回の検討により病理学的には、いわゆる endotheliosis を主体に、一部の症例では上皮細胞の器質的障害に伴う巣状分節性硬化病変を併発することが示された。但し、これらの病変は妊娠に伴うことより、出産後に速やかに臨床所見は改善するが、器質的障害の程度が強いと考えられた症例では、蛋白尿が遷延し、特発性など他の病因との鑑別を要した。しかし、妊娠腎の場合、最終的には全例が寛解しており、同じ病理像を示しても、予後が良好であることは、特発性あるいは遺伝性とは異なる上皮細胞障害機序を反映しているものと推測された。

#### E. 結論

妊娠腎では、従来より知られている endotheliosis に加えてすべての巣状分節性硬化症病変を併発するが、出産後は自然寛解し、その予後は他の原因による巣状分節性糸球体硬化症に比較して良好である。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 知的所有権の出現登録状況

特になし

#### H. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Saki N, Wada T, Furuichi K, Shimizu K, Kokubo S, Hara A, Yamahana J, Okumura T, Matsushima K, Yokoyama H, Kaneko S: MCP-1/CCR2-dependent loop for fibrogenesis in human peripheral CD14-positive monocytes. J

Leukoc Biol 79:555-563, 2006.

36 回日本腎臓学会西部学術大会, 2006.

2. Sakai N, Wada T, Yokoyama H, Lipp M, Ueha S, Matsushima K, Kaneko S: Secondary lymphoid tissue chemokine (SLC/CCL21)/CCR7 signaling regulates fibrocytes in renal fibrosis. PNAS 103(38): 14098-14103, 2006.

3. Wada T, Azuma H, Furuichi K, Sakai N, Kitagawa K, Iwata Y, Matsushima K, Takahara S, Yokoyama H, Kaneko S: Reduction in chronic allograft nephropathy by inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase. Am J Nephrol 26: 319-325, 2006.

4. Yamahana J, Wada T, Furuichi K, Sakai N, Yokoyama H, Kaneko S: TAK-603, an anti-inflammatory compound, reduces crescentic glomerulonephritis and preserves renal function in WKY rats. Nephrol Dial Transplant 21: 2736- 2744, 2006.

5. Imai H, Hotta O, Yoshimura M, Konta T, Tsubakihara Y, Miyazaki M, Tomida C, Kobayashi M, Suzuki S, Shiiki H, Yamauchi A, Yokoyama H, Nose M.:Deoxyspergualin, an immuno- suppressant, in patients suffering from nephropathies with crescent formation: an open-label trial to evaluate safety and efficacy. Clin Exp Nephrol 10: 40-54, 2006.

## 2. 学会発表

1. Yokoyama H., S.Ohta, T.Wada: Glomerular lesions in preeclampsia can show every histologic variants of focal segmental glomerulo- sclerosis. ASN 39th Annual Meeting, 2006.

横山 仁, 和田隆志: 全身性疾患と腎障害 up to date ループス腎炎: 最近の知見. 第



Table 1 : Clinical profiles of subjects

	Idiopathic (N=44)	Hereditary* (N=4)	Preeclampsia (N=11)	Others** (N=7)
Age (y.o.)	38±3	33±9	28±2	50±8
Male:Female	30:14	3:1	0:11	4:3
Follow-up (month)	74±11	47±25	218±11	45±19
Mean BP (mmHg)	99±3	92±4	112±6	99±5
Proteinuria (g/day)	7.4±0.6	6.8±0.4	5.6±0.2	6.4±0.2
Serum T. prot (g/dl)	4.5±0.1	6.8±0.4	5.6±0.2	6.4±0.2
Serum Alb (g/dl)	2.1±0.1	4.0±0.2	ND	4.0±0.2
FGS lesions (%)	37±4	20±11	24±8	24±7
Interstitial fibrosis (score)	0.7±0.1	1.5±0.5	0.0±0.0	1.0±0.0

\*: Mitochondria A3243G abnormality 1, PAX-2 exon 9 C1566A substitution 1, Klinefelter syndrome 1, unknown etiology 1;  
 \*\*: Unilateral kidney 2, Obesity 4, Post-HUS 1

Table 2: Clinical outcome of each group

	Idiopathic (N=44)	Hereditary (N=4)	Preeclampsia (N=11)	Others (N=7)
Proteinuria at onset				
Nephrotic (>3.5g/day)	42 (95%)	2 (50%)	8 (73%)	1 (14%)
Moderate (3.5-1.0g/day)	2 (5%)	1 (25%)	3 (27%)	3 (43%)
Mild (<1.0g/day)	0 (0%)	1 (25%)	0 (0%)	3 (43%)
After treatment				
Remission	33 (75%)	0 (0%)	11 (100%)	7* (100%)
Partial	12 (27%)	0 (0%)	1 (9%)	6 (86%)
Complete	21 (48%)	0 (0%)	10 (91%)	1 (14%)
	(*:Dietary protein restriction + ACEi/ARB)			
Renal failure	14 (32%)	2 (50%)	0 (0%)	0
Alive on HD	4	1	-	-
Patients' death	17 (39%)	1 (25%)	0 (0%)	0 (0%)
Renal death	10	0	0	0
Non-renal death	7**	1***	0	0

(\*\*):Cancer 2, Apoplexy 2, AMI 2, Sepsis 1, \*\*\*: sudden death)

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

各個研究報告書

「免疫抑制治療反応性ネフローゼ症候群（微小変化型および巣状分節性糸球体硬化症）における寛解導入維持」

研究協力者：横山 仁 金沢医科大学腎機能治療学（腎臓内科）教授

共同研究者：藤本圭司，近澤芳寛，中川 卓，山谷秀喜，浅香充宏

金沢医科大学腎機能治療学（腎臓内科）

研究要旨

微小変化型ネフローゼ(MCNS)および巣状分節性糸球体硬化症(FSGS)に対するメチルプレドニゾロン・パルス療法(MPT)+低用量プレドニゾロン(PSL)・シクロスポリン(CyA)療法の寛解導入，ステロイド減量ならびに寛解維持効果に関して，MCNS14例(14-80歳)およびtip型FSGS(57歳)を対象に検討した．MPT+PSL(20mg/日)+CyA群(2-3mg/kg/日，trough 50-100 ng/ml)7例とMPT+PSL(40mg/日)群8例の2群間で寛解までの日数，PSL総投与量，治療開始から退院までの日数ならびに寛解維持期間を評価した．また，治療開始からの尿蛋白量，血清アルブミン(sAlb)，血清IgE値，尿蛋白選択性(SI)ならびに総コレステロール値の推移についても検討した．全例が6-33日で完全寛解した．寛解までの日数とPSL総投与量には2群間で差を認めなかったが，急性腎不全合併と治療開始前のsAlb低値が完全寛解までの期間を延長した．一方，退院までの日数はCyA群で有意に短縮され，Cox回帰分析でも最も有意因子であった．再発は，薬剤減量時の4例で10回認められ，CyA群では1例1回のみであり改善傾向を示した．

A. 研究目的

微小変化型ネフローゼ症候群(minimal change nephrotic syndrome, MCNS)は，腎炎所見を伴わない副腎皮質ステロイド感受性ネフローゼ症候群を特徴とする]. 発症年齢はや日本において小学校就学前後(3~7歳)をピークとするが，成人においても各年齢層で発症が見られ特発性ネフローゼ症候群の約1/3を占め，成人人口20万対年間1人程度の発生と推測されている．成人MCNSおよびこれと鑑別すべき巣状分節性糸

sclerosis, FSGS)に対する寛解導入ならびに維持療法に関しては未だ一定のプロトコルは確立していない．今回，メチルプレドニゾロン・パルス療法(Methylprednisolone pulse therapy, MPT)+低用量プレドニゾロン(prednisolone, PSL)・シクロスポリン(cyclosporine-A, CyA)療法の寛解導入，ステロイド減量ならびに寛解維持効果を検討した．

B. 研究方法

MCNS14例(14-80歳)およびtip型FSGS(57

歳)を対象とし、MCNS2例は急性腎不全 (ARF)を伴い、うち1例に血液透析を実施した。治療は、MPT(mPSL500mg/日・3日間/クール)+PSL(20mg/日)+CyA群(2-3mg/kg/日, trough 50-100 ng/ml)7例と MPT(mPSL500mg/日・3日間)+PSL(40mg/日)群8例の2群間で寛解までの日数、PSL総投与量、治療開始から退院までの日数ならびに寛解維持期間を評価した。また、治療開始からの尿蛋白量、血清アルブミン濃度 (sAlb)、血清IgE値、尿蛋白選択性(SI)ならびに総コレステロール (T-chol)値の推移についても検討した。

全例に治療開始時に治療内容と発表に関するインフォームドコンセントを実施し、了解を得た。

### C. 結果

治療開始時の年齢、T-Chol値、血清IgE値には両群間で有意差はなかったが、sAlb値はMPT+PSL+CyA群で有意に低値であった(MPT+PSL群:1.7±0.5g/dl, MPT+PSL+CsA群:1.2±0.4g/dl, p=0.03)。一方、SIはMPT+PSL群で低値を示し、選択性が良好であった(p=0.01)。全例が6-33日で完全寛解した。寛解までの日数とPSL総投与量には、2群間で差を認めなかったが、ARF合併と治療開始前のsAlb低値が完全寛解までの期間を延長した。一方、退院までの日数はMPT+PSL+CyA群で有意に短縮され(MPT+PSL群:68.1±14.5日, MPT+PSL+CsA群:35.7±11.0日, P=0.003)、Cox回帰分析でも、在院日数に対する最も有意因子であった。再発は、薬剤減量時の4例で10回認められ、CyA群では1例1回のみであり改善傾向を示した。Steroidによる有害事象(DM、感染症)はMPT

+PSL群で多い傾向を認めた。一方、MPT+PSL+CyA群では主にtrough値(C0)を指標にしながらCyA投与量を調節したが、全例でC0を50~150ng/mlの範囲でコントロールすることができ、腎機能障害などの重篤なCyAの有害事象は認めなかった。

### D. 考察

CyAはCD4陽性Tリンパ球に対する免疫抑制効果ならびに糸球体係蹄壁のサイズバリアの改善効果に加えて、ステロイド受容体の増強や薬剤抵抗性蛋白であるP糖蛋白の抑制によりステロイド感受性も上昇させると考えられる。実際、小児MCNSの頻回再発型においてステロイドとCyAを併用することでステロイドを減量または中止できることが示されており、成人領域においてもMPT・CyAの併用療法が早期寛解導入と寛解維持に有効であったとの報告がある。以上を踏まえて成人領域のMCNS・FSGSに対するMPT+PSL+CyA療法はMPT+PSL療法と比較してより少ないsteroid投与量で同等の寛解導入ならびに寛解導入維持ができると考えられる。今回の検討の結果では、少量ステロイドにCyA併用は少なくとも通常のPSL40mg/日と同等の寛解導入を認めるとともに、入院期間の有意な短縮とsteroidによる有害事象ならびに再発率の減少傾向を認めた。今後、成人領域でも小児と同様に早期社会復帰と長期寛解維持療法として期待できると考えられた。また、薬剤濃度はC0を指標としてCyA投与量を調節したが、CyAの重篤な合併症である腎機能障害は認めておらず、低用量CyA療法の安全性が確認できた。今後、さらに観察期間を延長して再発率を検証するとともにより少ない投

与量での有効性について C2, AUC0-4 を用いた確認が必要と考えられる。

#### E. 結論

成人 MCNS/FSGS (tip 型) に対する MPT+低用量 PSL+ CyA 療法は, MPT+PSL 療法と比較して同等の寛解導入効果と入院日数短縮ならびに再発の減少による QOL の改善が期待される。

#### F. 健康危険情報

特記なし。

#### G. 知的所有権の出現登録状況

特になし。

#### H. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 横山 仁, 浅香充宏, 山谷秀喜, 和田隆志: ネフローゼ症候群治療の進歩-成人領域. 日本腎臓学会誌 49 (2): 108-112, 2007.
- 2) 山谷秀喜, 左古ひとみ, 横山 仁: ネフローゼ症候群の食事療法. からだの科学 255: 128-132, 2007.
- 3) 横山 仁, 藤本圭司: 「EBM 腎臓病の治療 2008-2009」: 微小変化型ネフローゼ症候群のステロイド療法はどのように行なうのでしょうか? 中外医学社. (印刷中)

##### 2. 学会発表

- 1) Hitoshi Yokoyama, Takashi Wada: Application of lymphocytapheresis for nephrotic syndrome. Workshop 5: Clinical effects of apheresis in renal diseases, ISFA/WAA, Yokohama, 2007 年.
- 2) 藤本圭司: 当院における微小変化型ネ

フローゼ症候群に対する MPT+low dose PSL+low dose CsA 療法と MPT+PSL 療法の比較検討, 第 50 回日本腎臓学会総会, 浜松, 2007 年.

3) 横山仁: 難治性ネフローゼ症候群の治療の進歩-新しい治療の展望. 第 37 回日本腎臓学会西部学術大会教育講演, 福井, 2007 年.

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
各個研究報告書

「糸球体基底膜のグリコサミノグリカンとタンパク透過性に関する検討」

研究協力者：

吉村吾志夫（昭和大学藤が丘病院内科・腎臓 助教授）

共同研究者：

森田 博之（昭和大学藤が丘病院内科・腎臓 講師）

渡辺 励（昭和大学藤が丘病院内科・腎臓 助手）

乾 聖子（昭和大学藤が丘病院内科・腎臓 研究生）

研究要旨

Hspg2（パールカン）の主なるヘパラン硫酸鎖付加部位を除去したノックインマウス Hspg2 Δ3/Δ3 を作製し、Hspg のヘパラン硫酸鎖の糸球体濾過機能における役割を病理組織学的、超微形態学的、免疫組織学・免疫電顕的解析に解析した。Hspg2 Δ3/Δ3 の糸球体ではコンドロイチン硫酸の発現亢進が示唆された。パールカンのヘパラン硫酸鎖は糸球体基底膜の陰性荷電状況と無関係に大量蛋白質の尿中流失を抑制する機能を有すると考えられた。

A. 研究目的

Hspg2（パールカン）のヘパラン硫酸（HS）鎖は糸球体基底膜陰性荷電の分子の実態と考えられる。我々は、Hspg2 第1ドメインのHS鎖付着部位を除去したノックインマウス“Hspg2Δ3/Δ3”を作成した。Hspg2Δ3/Δ3は腹腔内BSA大量負荷で野生株マウスに比して尿中のBSA排泄量が有意に増加していた。本研究の目的はこの結果の機序を考察することにあった。

コサミノグリカン鎖付着状況の生化学的に分析した。グリコサミノグリカン鎖を特異的に消化するヘパリチナーゼ、及び、コンドロイチナーゼで精製パールカンを消化した後にコア分子に対する抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。3. 糸球体基底膜におけるHS、CSなどのグリコサミノグリカン組成を各種抗体を用いた免疫染色実験によって解析した。

B. 研究方法

1. Hspg2Δ3/Δ3の糸球体基底膜の陰性荷電をPEI染色を用いて電顕的に評価した。  
2. Hspg2Δ3/Δ3由来の初代培養繊維芽細胞よりパールカンを精製し、コア分子へのグリ

（研究の倫理面への配慮）

実験動物に外科的処置、及び、安楽死を施す際には余分の苦痛を与えないよう、定法に従って各種の倫理的配慮を行った。

## C. 結果

1. Hspg2 $\Delta$ 3/ $\Delta$ 3 と野生株の間には糸球体基底膜の陰性荷電状況（糸球体の単位長さにおける dot 数）に有意の差を認めなかった。2. 培養繊維芽細胞のグリコサミノグリカン分析では、Hspg2 $\Delta$ 3/ $\Delta$ 3 由来のパールカンで、コア分子にコンドロイチン硫酸鎖が明らかに付着していた。これに対して野生株コントロールではヘパラン硫酸のみが付着していた。3. Hspg2 $\Delta$ 3/ $\Delta$ 3 ではヘパリチナーゼ消化後に出来る  $\Delta$ DiOS of CS を特異的に認識する抗体を用いた免疫染色で糸球体の染色性が増強した。

## D. 考察

我々は単純な私たちで、陰性荷電仮説の是非を問うことは出来なかった。しかしながら、今回の一連の研究結果は Hspg2 の HS 鎖が大量蛋白の尿中流失を抑制する可能性を示している。HS は細胞外基質構成分子と特異結合しており、大量蛋白尿抑制には GBM 陰性荷電量総和でなく正常な GBM 構成分子の assembly が重要な役割を担うであろう。

## E. 結論

パールカンの HS は基底膜の精緻な分子ネットワーク構築に係わりつつタンパク透過性を制御している可能性が考えられた。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 知的所有権の出現登録状況

特になし。

## H. 研究発表

### 1. 論文発表

Morita H, Yoshimura A, Inui K, Ideura T, Watanabe H, et al :Heparan sulfate of perlecan is involved in glomerular filtration. *J Am Soc Nephrol* 16:1703-1710, 2005

### 2. 学会発表

森田博之、他 2 名：シンポジウム“結合組織疾患—分子基盤と新規治療戦略—”腎疾患と細胞外基質—パールカンの糖鎖に焦点をあてて。第 37 回日本結合組織学会, 2005, 5, 富山。

森田博之、乾聖子、長谷川毅、小向大輔、広瀬真、渡辺秀人、Karl Tryggvason、吉村吾志夫：ノックインマウス Hspg2 $\Delta$ 3/ $\Delta$ 3 の糸球体濾過機能。第 48 回日本腎臓学会学術総会、2005, 7, 新潟

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
各個研究報告書

「パールカンのヘパラン硫酸鎖変異マウスにおける大量タンパク負荷時のポド  
サイトアクチンに関する解析」

研究協力者： 吉村吾志夫

共同研究者： 森田 博之、渡辺 励、井上 嘉彦、田山 宏典、小向 大輔、  
乾 聖子、中山 隆弘、山本 弓月、永山 恭嘉、原 恭子、  
正路 久美、小岩 文彦  
昭和大学藤が丘病院 内科腎臓

研究要旨

本研究の目的は、ポドサイトアクチン細胞骨格系の大きな異常を呈さずに大量タンパク尿が出現する病態を示すことにあった。パールカンヘパラン硫酸変異マウス腹腔内に大量のアルブミン負荷を施すと大量のタンパク尿を呈する。今回、光顕レベルにおいてファロイディン染色を、電顕レベルにおいてタンニン酸染色、及び、抗アクチン抗体を用いた免疫電顕を用いてアクチン細胞骨格系の評価を行った。本実験系では足突起と足突起のアクチン発現は保たれていた。また、家族性 FSGS の動物モデルで報告されているポドサイト胞体内タンニン酸濃染部位（アクチンに富む）は稀にしか観察されなかった。結論的に、本実験系では大量タンパク尿はポドサイトアクチン細胞骨格系の異常以外の機序を介して起きている可能性が高い。糸球体基底膜の分子構築が傷害されているので、機序のさらなる解析とヒトで同様の現象が起きているか否か調べるのが望まれる。

A. 研究目的

スリット膜構成分子は、種々の分子を介してアクチン細胞骨格系と結びついている。スリット膜構成分子の遺伝子変異で大量のタンパク尿が出現し、足突起融合に代表されるポドサイトアクチン細胞骨格系の異常を呈することは近年大いに着目されている。しかしながら、アクチン細胞骨格系の著明な異常を伴わず大量タンパク尿が出現する病態に関する解析は遅れている。本研究の目的は動物実験モデルを用いてこの病態の

存在を示すことにあった。

B. 研究方法

大量タンパク尿を呈する実験系として、パールカンヘパラン硫酸鎖変異マウス腹腔内大量のアルブミン負荷を用いた。アクチン細胞骨格系の評価は光顕レベルではファロイディン染色、電顕レベルではタンニン酸染色、及び、抗アクチン抗体を用いた免疫電顕を用いて行った。

今回の動物実験は昭和大学で正式に承認された。倫理面において格別問題はない。

### C. 結果

腹腔内に大量のアルブミン負荷を施したパールカンヘパラン硫酸鎖変異マウスの足突起と足突起のアクチン発現は良く保たれていた。家族性 FSGS の一部とその動物モデルで報告されているアクチンを多く含むポドサイト胞体内タンニン酸濃染部位は変異マウスにおいて稀にしか観察されなかった。

### D. 考察

変異マウス腹腔内アルブミン負荷の系においてポドサイトアクチン細胞骨格系の著明な異常は形態学的に認められなかった。本実験系の大量タンパク尿はポドサイトアクチン細胞骨格系の異常以外の機序を介して起きている可能性が高い。変異マウスは糸球体基底膜の分子構築が傷害されているので、基底膜の高次分子構築異常によってタンパク尿が生じるか否か、さらなる解析を試みる価値がある。さらに、ヒトにおける高度タンパク尿でも、基底膜の高次分子構築異常が認められるか調べる価値があるであろう。タンパク尿は広い病態を包含するので、スリット膜やポドサイトアクチン細胞骨格系の異常のみでその分子機序を解明することに無理があるように思われる。スリット膜異常とは異なる機序を解明することは、将来、個々の症例の病態生理に応じた治療戦略を立てる一助につながるかもしれない。

### E. 結論

パールカンヘパラン硫酸鎖変異マウス腹腔内に大量のアルブミン負荷を施して惹起させた大量タンパク尿の動物実験モデルでは、ポドサイトアクチン細胞骨格系の異常が(免疫)形態学的に認められなかった。

### F. 健康危険情報

特記事項なし。

### G. 知的所有権の出現登録状況

特になし。

### H. 研究発表

#### 1. 論文発表

Morita H and Yoshimura A: Glomerulonephritis in sarcoidosis (editorial). Clin Exp Nephrol 10: 85-86, 2006

Morita H, Yoshimura A (他6名): Heparan sulfate of perlecan is involved in glomerular filtration. J Am Soc Nephrol 16:1703-1710, 2005

#### 2. 学会発表

Hiroyuki Morita, Yasuharu Numata, Kiyotaka Akiyama, Kiyoko Inui, Mutsushi Matsuyama, Ashio Yoshimura: Laminin alpha chain is mutated in the BUF/Mna strain, a spontaneous rat model for focal and segmental glomerulosclerosis (FSGS) ASN's 39th Annual Renal Week Meeting of the American Society of Nephrology, 2006



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
各個研究報告書

「タンパク尿自然発症 BUF/Mna ラットの Impg1 遺伝子変異」

昭和大学藤が丘病院内科腎臓 吉村 吾志夫

研究協力者 （昭和大学藤が丘病院内科腎臓）森田博之、渡辺励、井上嘉彦、  
田山宏典、乾 聖子、小向大輔、廣瀬 眞、山本弓月、永山嘉恭、河嶋英里、  
和田幸寛、森永 潤、正路久美、真田大介、西脇宏樹、小岩文彦

研究要旨

疾患自然発症モデル”BUF/Mna ラット”のタンパク尿発症感受性遺伝子Pur1のmodifier gene同定を本研究の目的とした。[(BUF/Mna x WKY/NCrj)F1 x BUF/Mna] 退交配F2コホートをを用いてphenotype（尿タンパク）とDNA marker genotype間の相関関係を見た後に、modifier geneが存在する候補領域を選び出す目的で、QTL解析を行った。Ensembl data baseにて候補領域にある遺伝子をretrieveしBUF/Mna、WKY/NCrj、BN間で多型がある遺伝子の同定をめざしてc DNAを鋳型としたPCR direct sequencingで塩基配列を調べた。その結果、第8番染色体上のD8Mit5、及び、AcpH間を候補領域（81.6-86.6 Mb）とした。候補領域に30個の遺伝子が存在した。全長cDNA塩基配列解析でInterphotoreceptor matrix proteoglycan 1 (Impg1)のみBUF/Mnaにてロイシン・プロリン置換を伴う点変異が判明した。結論として、Impg1遺伝子の変異がPur1遺伝子のmodifier geneである可能性が示唆された。

A. 研究目的

種々の疾患時にみられるタンパク尿発症・進展に遺伝的背景（ie 複数個の感受性遺伝子の組み合わせ）が関与するが、ヒトの common disease では未だタンパク尿発症・進展感受性遺伝子は同定されていない。感受性遺伝子同定はタンパク尿を減少・制御させる本質的治療法に繋がるポテンシャルを持つ。我々は疾患自然発症モデル”BUF/Mna ラット”のタンパク尿発症感受性遺伝子について報告してきた。第13番

染色体上の Pur1 は同定に成功した疾患感受性遺伝子である（Mamm Genome 2008, 19:41-50）。本モデルでは gene-gene interaction によって massive proteinuria が発症する。Pur1 の modifier gene 同定を本研究の目的とした。

B. 研究方法

タンパク尿自然発症ラット BUF/Mna 系と非発症の WKY/NCrj 系を用いて、[(BUF/Mna x WKY/NCrj)F1 x BUF/Mna] 退交配 F2 コホ

ートを作成した。コホート内で phenotype (尿タンパク) と genotype (DNA マーカーの多型) 間の相関関係を t 検定にて見た後に、modifier gene が存在する染色体上における候補領域を選び出す目的で、QTL 解析を行った。候補領域に存在し、Ensembl data base に登録されている遺伝子をすべて retrieve した。それら総てについて BUF/Mna、WKY/NCrj、BN 間で多型がある遺伝子の同定をめざして c DNA を鋳型とした PCR direct sequencing で coding sequence の塩基配列を調べた。

(研究の倫理面への配慮)  
実験動物に不必要な苦痛を与えないよう、倫理的配慮がなされた。

### C. 結果

QTL 解析を行った結果、ラット第 8 番染色体上の microsatellite marker である D8Mit5、及び、AcpH 間を候補領域 (81.6-86.6 Mb) とみなすことが出来た。Ensembl data base によれば、本候補領域には 30 個の遺伝子が存在した。Genomic DNA を template とする PCR direct sequencing 法による全長 coding sequence 塩基配列解析で Interphotoreceptor matrix proteoglycan 1 (Impg1) のみ BUF/Mna にてロイシン・プロリン置換を伴う点変異が存在することが判明した。

### D. 考察

今回の解析では coding sequence に着目し、アミノ酸配列の変化を伴う塩基配列変異を見つけ出そうという研究戦略をとった。遺伝子発現の違いという観点から候補領域に存在した 30 個の遺伝子を screening しなかった。(遺伝子のプロモーター領域の

塩基配列解析もしていない。) そのため、another candidate を見落とした可能性は完全には否定できない。しかしながらより重要な点は、ひとたび候補遺伝子を捕まえたら変異が機能異常を伴うか否か実験的に検討することにあると考える。今後は機能解析実験を進めていきたい。

尚、本研究は日本たばこ産業株式会社医薬探索研究所との共同研究である。

### E. 結論

Impg1 遺伝子の変異が Pur1 遺伝子のタンパク尿惹起能力を modify する可能性が示唆された。変異分子の機能解析実験が望まれる。

### F. 健康危険情報

本研究は動物レベルでの研究である。ヒトの健康に影響を与えない。

### G. 知的所有権の出現登録状況

知的所有権は今のところ出現していない。

### H. 研究発表

#### 1. 論文発表

Akiyama K, Morita H, Suetsugu S, Kuraba S, Numata Y, Yamamoto Y, Inui K, Ideura T, Wakisaka N, Nakano K, Oniki H, Takenawa T, Matsuyama M, Yoshimura A: Actin-related protein 3 (Arp3) is mutated in proteinuric BUF/Mna rats. *Mamm Genome* 19:41-50, 2008

Nagayama Y, Morita H, Komukai D, Watanabe S, Yoshimura A: Type B insulin resistance syndrome induced by increased activity of systemic lupus erythematosus in a hemodialysis patient. *Clin Nephrol* 69:130-134, 2008

症 BUF/Mna ラットの *Impg1* 遺伝子変異。第  
50 回日本腎臓学会学術総会。平成 19 年。

Morita H, Yoshimura A, Kimata K: The role of heparin sulfate in the glomerular basement membrane. *Kidney Int* 73:247-248, 2008

Kyoko Hara, Nakayama T, Yamamoto Y, Komukai D, Inoue Y, Watanabe S, Inui K, Morita H, Yoshimura A: Infiltration of activated macrophages and their disappearance are involved in the effect of tonsillectomy combined with steroid pulse therapy for patients with IgA nephropathy. *Contrib Nephrol* 157: 199- 200, 2007

## 2. 学会発表

Inui K, Chen H, Nakayama T, Hara K, Yamamoto Y, Morita H, Yoshimura A: Regulation of active inflammation in early phase of unilateral ureteral obstruction by eplerenone, novel selective aldosterone blocker, is critical for suppression of subsequent development of fibrosis. 2007 Annual Meeting of the American Society of Nephrology (San Francisco, 2007)

Hiroyuki Morita, Yasuharu Numata, Kiyotaka Akiyama, Seiko Kuraba, Yoshihisa Yamamoto, Kiyoko Inui, Mutushi Matsuyama, Ashio Yoshimura. Mutation of interphotoreceptor matrix proteoglycan (*Impg1*) in a rat model of focal segmental glomerulosclerosis (FSGS). 2007 Annual Meeting of the American Society of Nephrology (San Francisco, 2007)

森田博之、乾聖子、相沢 純子、原恭子、  
中山隆弘、小向大輔、井上嘉彦、渡辺励、  
松山睦司、吉村吾志夫。タンパク尿自然発

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
各個研究報告書

「ステロイド依存性ネフローゼ症候群患者への  
シクロスポリン A 併用の有用性」

研究協力者 松本絢一

日本大学医学部内科学講座腎臓内分泌内科部門教授

共同研究者 伊藤 謙、藤田宜是、里村厚司

日本大学医学部内科学講座腎臓内分泌内科部門

研究要旨

ステロイド依存性ネフローゼ症候群患者はプレドニゾロン (PSL) 量を容易に減量できないでいる。そして、常に頻回再発の危険性を内在している。今回、この群へのシクロスポリン A(CYA)併用効果を検討した。当院外来通院中で3ヶ月以上 CYA 併用歴のあるネフローゼ症候群患者 16 例全例を検討した。内訳は頻回再発型 4 例、ステロイド抵抗性 3 例、ステロイド依存性 9 例であった。CYA 併用後 3 ヶ月目から 2 年目までの PSL 最小量と、CYA 併用開始直前に起こった再発時の PSL 量を各群で比較した。頻回再発型では 4 例全例、ステロイド抵抗性では 3 例中 1 例、ステロイド依存性では 9 例中 8 例で PSL を減量できた。ステロイド依存性の患者にも CYA 併用の価値があることが示唆された。

A. 研究目的

プレドニゾロン(PSL)は、ネフローゼ症候群の治療の中心的な役割を担っている。今日では免疫抑制薬も使われるようになってきている。その一つである CYA も頻回再発型およびステロイド抵抗性ネフローゼ症候群の治療に認可され各医療施設で利用されている。ステロイド依存性ネフローゼ症候群患者も PSL 維持量を容易に減らす事ができず、頻回再発の危険性を常に内在している。今回、この群の患者に対しての CYA 併用効果について検討した。

B. 研究方法

外来通院中で3ヶ月間以上の CYA 併用歴

のあるネフローゼ症候群患者は、合計 16 例であった。内訳は頻回再発型 4 例、ステロイド抵抗性 3 例、ステロイド依存性 9 例であった。ネフローゼ症候群への CYA 併用期間は 2 年間以内を目安としている。したがって、併用開始後 3 ヶ月目から 2 年目までの期間に着目した。この期間中の PSL 最小投与量と CYA 併用開始直前の再発時 PSL 投与量とを比較した。

C. 結果

1) 16 例全体で、男性 11 例と女性 5 例、年齢  $39 \pm 13$  歳、組織型に関しては微小変化型 13 例、メサングウム増殖性糸球体腎炎 1 例、膜性増殖性糸球体腎炎 1 例、腎生