

小児 IgA 腎症の糸球体内 Cross-linked fibrin に関する研究

第一報：蛍光抗体法および免疫電顕法による観察

奈良県立医科大学小児科学教室

山下 隆 司

INTRAGLOMERULAR DEPOSITS OF CROSS-LINKED FIBRIN IN CHILDREN WITH IgA NEPHROPATHY I. IMMUNOFLUORESCENT AND IMMUNOELECTRON MICROSCOPIC OBSERVATION

TAKASHI YAMASHITA

Department of Pediatrics, Nara Medical University

Received November 21, 1995

Abstract: To elucidate the relationship between pathogenesis of glomerular damage and intraglomerular deposits of fibrin/fibrinogen-related antigen (FRA) in children with IgA nephropathy, the localization of FRA was determined by an immunohistopathological method using an anti-fibrinogen antibody capable of detecting FRA, an anti-D-dimer antibody capable of detecting cross-linked fibrin and its derivatives, and by a method using the effect of monochloroacetic acid treatment on kidney sections. The distribution of FRA deposits was divided into four types, and the predictable components were as follows: Type I, fibrinogen (Fg) and/or fibrinogen degradation products (FgDP); Type II, cross-linked fibrin degradation products (XLFbDP) and Fg or FgDP; Type III, a mixture of cross-linked fibrin (XLFb) and Fg, FgDP or XLFbDP; Type IV, XLFb predominantly.

In patients with Type III or Type IV, mesangial proliferation and/or IgA deposits were observed more intensively within the capillary wall and/or mesangial area than those with Type I or II, in agreement with the cross-linked fibrin deposits within capillary walls or mesangial area, and the degree of mesangial electron dense deposit (EDD), mesangial interposition or basement membrane thinning on electron microscope was apparently higher in these cases.

These findings suggest that intraglomerular coagulation in children with IgA nephropathy may cause glomerular damage.

Index Terms

cross-linked fibrin, intraglomerular coagulation, anti-D-dimer antibody, immunoelectron microscopy, IgA nephropathy

緒 言

IgA 腎症は 1968 年 Berger ら¹⁾により提唱されて以来、学校検尿の普及により小児科領域でも高頻度に見られる

ようになってきた。IgA 腎症は当初予後良好な疾患と考えられていたが、近年腎不全への移行例も報告され^{2)~5)}、本症の腎機能障害の進展機序についての研究が各方面から試みられている。他方、腎疾患の進展、増悪に腎局所

の凝固・線溶反応の関与することが³, Vassalli, Kincaid-Smithらの実験的, 臨床的事実より明らかにされ^{6)~8)}, 凝固・線溶系因子の血中・尿中あるいは糸球体内での動態と腎組織との関連が検討されるようになってきた。

教室の上辻は糸球体内の血液凝固反応をフィブリノゲン抗体やD-dimer抗体を用いた蛍光抗体法あるいはmonochloroacetic acid (MCA) 処理法により検討し, 微小変化群に比して増殖性変化の強い腎炎群ではcross-linked fibrinの沈着が係蹄壁のみならずメサンギウム領域へと浸潤, 拡張していく所見を得, 糸球体内凝固反応の増殖性変化への関与を報告した⁹⁾。

一方, 中島はprotein A gold法を用いた免疫電子顕微鏡(免疫電顕)にてfibrinogen-related antigen(FRA)の糸球体内局在を詳細に検討し, 各種腎疾患ではメサンギウムや内皮下および上皮下のelectron dense deposit(EDD)にFRAがIgA, IgGおよびC3などのimmunoglobulinや補体と同時に存在することから, FRA沈着への免疫複合体の関与を報告した¹⁰⁾。

IgA腎症はメサンギウム領域にIgA優位の沈着を認める疾患であり, 本症の糸球体病変の進展と増悪にはIgAを主体としたimmune complexが中心的役割をなすも, 上辻⁹⁾や中島¹⁰⁾らの成績より, FRAと安定化フィブリンの関与, すなわち, 糸球体内凝固の関与することが強く示唆される。

筆者は, 今回, 小児期IgA腎症患児の糸球体病変への糸球体内凝固の関与を明らかにする目的でcross-linked fibrinやFRAの動態と糸球体病変について蛍光抗体法および免疫電顕にて観察し, cross-linked fibrinは係蹄壁に存在し, 組織の活動性病変と密接に関係しているという知見を得たのでその成績を報告する。

対 象

昭和60年より平成5年までの8年間に奈良県立医科大学, 県立奈良病院, 県立三室病院, 県立五条病院, 国立療養所西奈良病院, 国立泉北病院, 星ヶ丘厚生年金病院および東大阪市立中央病院の各小児科で腎生検を施行し, IgA腎症と診断した73例を対象とした。IgA腎症の診断は, 蛍光抗体法でメサンギウム領域にIgAが優位に顆粒状沈着として認められるものとし, 臨床症状および血清学的検査でHenoch-Schönlein紫斑病性腎炎やループス腎炎およびHBs抗原陽性例は除外した。

方 法

1. 腎組織片の採取

腎生検については事前に家族および患児に病状や腎生

検の目的および実施法を説明し, インフォームドコンセントを得た。レントゲン線透視下でツルーカット針(Travenol laboratories, Deerfield, Ill)を用いた細片採取法で腎組織を採取し, これらの組織片は光顕, 蛍光抗体法, 一般電顕並びに免疫電顕に供した。

2. 光顕像

光顕像は, hematoxylin and eosin(H. E.), periodic acid-Schiff(PAS), Masson-trichromeおよびsilver methenamine and Masson-trichromeにより染色し, 検鏡した。各疾患のActivity index(AI)とChronicity index(CI)をAndreoliら¹¹⁾の方法に準じて求めた。AIは4項目, すなわち, 細胞性増殖を4段階(0:微小変化, 1:巣状軽度メサンギウム増殖, 2:びまん性軽度メサンギウム増殖, 3:びまん性中等度メサンギウム増殖), 壊死を2段階(0:-, 1:+), 間質の単核細胞浸潤を2段階(0:-, 1:+), 細胞性半月体を4段階(0:0%, 1:1~20%, 2:21~50%, 3:>51%)で評価し, 各々のtotal scoreより求めた。CIは4項目, すなわち, 線維性半月体を4段階(0:0%, 1:1~20%, 2:21~50%, 3:>51%), 分節状糸球体硬化を4段階(0:0%, 1:1~20%, 2:21~50%, 3:>51%), 球状硬化を4段階(0:0%, 1:1~20%, 2:21~50%, 3:>51%), 尿細管萎縮と間質線維化を2段階(0:-, 1:+)で評価し, 各々のtotal scoreより求めた。

3. 蛍光抗体像

1)IgA, IgG, IgM, C3およびfibrin/fibrinogenの沈着:腎組織片をoptical cutting temperature(OCT)compound(Miles, Elkhart, Ill)に包埋し, クリオスタット(三共K. K., 東京)で約3 μ mの凍結切片を作製し, FITC標識抗ヒトIgA, IgG, IgM, C3あるいはfibrinogen家兎血清(Behringwerke, Germany)を用いて直接法で観察し, それぞれの蛍光の強度を上辻ら¹²⁾の記載に従って一から2+の4段階に分けた。すなわち, -は沈着が認められない, ±は軽度認められる, 1+は明確に認められる, 2+は強度に認められる, である。

2)安定化フィブリンの沈着:教室のKamitsujiら⁹⁾が既に報告した1% monochloroacetic acid(MCA, Sigma, Milwaukee, Wis)添加後のMCA-insoluble fibrin/fibrinogenの沈着像及びD-dimerの沈着像より観察した。すなわち, 3 μ mの腎組織の凍結切片上に1% MCA液を切片を十分に覆うように滴下し, 湿潤箱にて, 37°Cで1時間保温後, 0.05Mリン酸緩衝液(PBS, pH 7.4)で洗浄し, 残存するMCA非可溶性フィブリンの蛍光を蛍光抗体直接法で観察した。また, D-dimerの沈着像は, 一次抗体として抗ヒトD-dimerモノクローナ

ル抗体(DD-3 B 6, Mabco, Brisbane, Australia), 二次抗体として FITC 標識抗マウス IgG(Caltag laboratories, San Francisco, CA)を用い, 蛍光抗体間接法で観察した. これらの方法により観察した安定化フィブリンの沈着様式を Kamitsuji ら⁹⁾の分類に従って 4 つの Type に分類した(Table 1).

4. 一般電顕像

腎組織片を 1/2 Karnovsky 液で 4°C, 2 時間固定し, さらに, 1%オスミウム酸水溶液で 4°C, 2 時間, 後固定した. 型のごとくエタノール系列で脱水後, L. R. White resin(London Resin Company Ltd., London, UK)に 60°C で包埋後, 超薄切片を作製し, 日本電子 1200 EX 透過型電子顕微鏡で EDD の有無や量および部位や mesangial interposition を中心に観察した. mesangial /paramesangial EDD についてはその数と大きさの程度により-, 1+, 2+, 3+に分類した. すなわち 1個の

糸球体のすべてのメサンギウム領域を観察し, -は EDD が存在しない, 1+は EDD が軽度存在する. 2+は EDD が中等度存在する. 3+は EDD が高度存在する, とした (Fig. 1).

5. プロテイン A-金コロイド複合体を用いた IgA および FRA の免疫電顕像

1)プロテイン A-金コロイド複合体(PAG)の作製: Slot ら¹³⁾の方法ならびに Tanaka ら¹⁴⁾の方法に基づいた中島¹⁰⁾の方法により直径 15 nm の PAG 溶液を作製した.

2)PAG を用いた免疫電顕的観察: 中島の方法に準じて PAG 染色を行った. すなわち, 腎生検組織を periodate-lysin-paraformaldehyde(PLP)固定液にて, 4°C, 2 時間固定を行いエタノール系列で脱水後, L. R. White resin に 60°C で包埋した. ダイヤモンドナイフで約 60~70 nm の超薄切片を作製し, ニッケルグリッド

Table 1. Classification of fibrin/fibrinogen related antigen (FRA) deposits in glomeruli

	Immunofluorescent findings			Predictable components of FRA
	Before MCA treatment	FRA After MCA treatment	FRA reacting with anti D-dimer antibody	
Type I	+	-	-	Fg/FgDP
II	+	-	±~+	Type I and XLFbDP
III	+~+++	±~+	±~+	Type I, Type II and XLFb
IV	+	+	+	XLFb

Fg: fibrinogen, FgDP: fibrinogen degradation products, XLFbDP: cross-linked fibrin degradation products, XLFb: cross-linked fibrin, MCA: monochloroacetic acid.

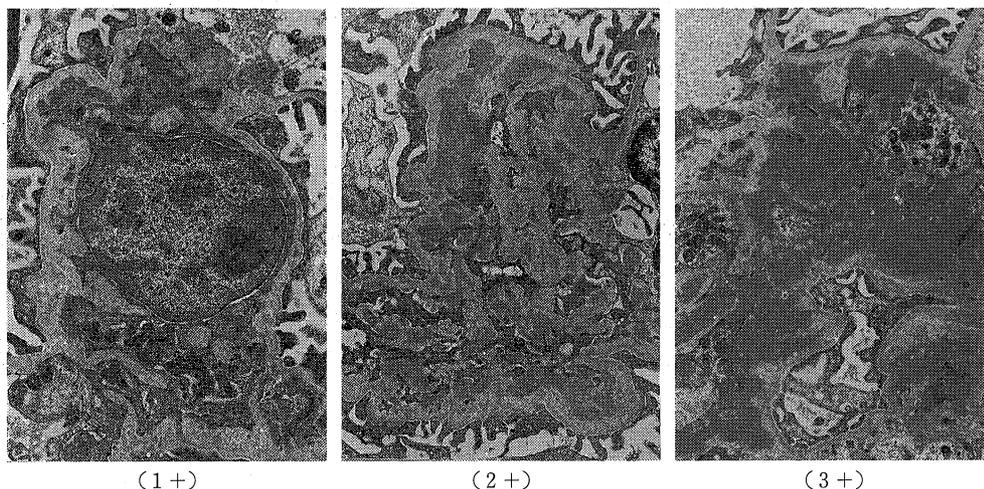


Fig. 1. (1+), (2+) and (3+) represent increasing degree of number and size of mesangial/paramesangial EDD mildly, moderately and severely, respectively.

(300メッシュ)に拾った。超薄切片の載ったニッケルグリッドを1%ウシ血清アルブミン(和光純薬, 大阪)加0.01 MPBS, pH 7.4(1% BSA-PBS)に室温, 5分間浮遊させて処理した後, 1% BSA-PBSで200倍希釈した抗ヒトフィブリノゲン家兎血清(DAKO Glostrup, Denmark)あるいは抗ヒトIgA家兎血清(DAKO, Glostrup, Denmark)と4°Cで一昼夜反応させた。その後1% BSA-PBSで室温にて5分間, 3回洗浄し, さらにPAG溶液と室温にて30分反応させた。1% BSA-PBSおよび蒸

留水にてそれぞれ室温にて5分間, 3回ずつ洗浄し, 乾燥後酢酸ウラニール(Mallinckrodt Chemical Work, St. Louis, Mo)にて15分間の電子染色を施し, 透過型電子顕微鏡で観察した。抗血清のかわりに正常家兎血清を用い, 同様の方法で染色したものを陰性対照とし, 沈着している金コロイドの数により陽性度を-, 1+: $\leq 100/\mu\text{m}^2$, 2+: $101\sim 200/\mu\text{m}^2$, 3+: $\geq 201/\mu\text{m}^2$ の4段階で表示した。

5. 統計学的処理: Wilcoxon test, χ^2 検定を用いた。

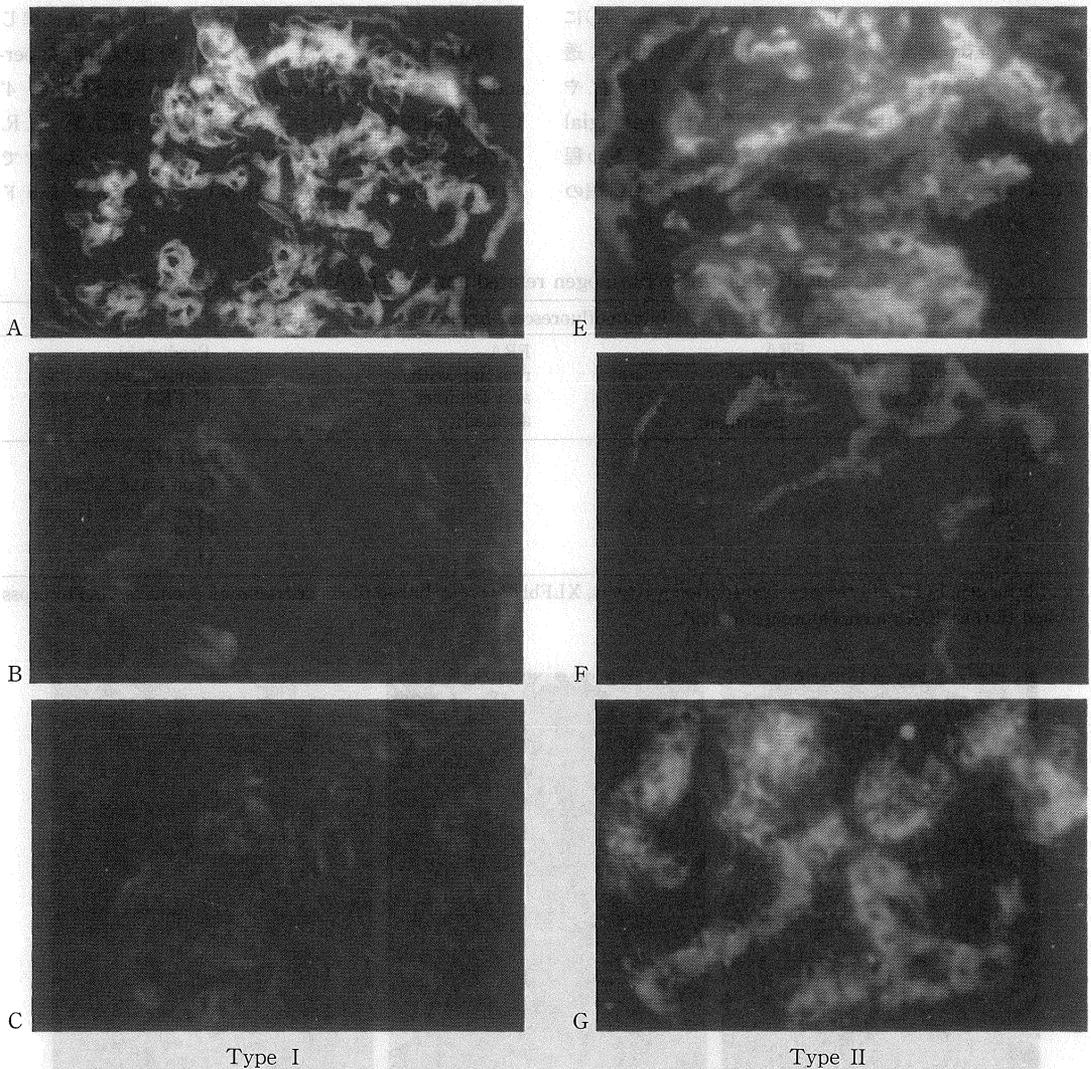


Fig. 2. Intraglomerular deposits of FRA before (A, E) and after (B, F) MCA treatment and FRA deposits reacting with anti-D-dimer antibody (C, G). (MCA-soluble FRA that did not react with anti-D-dimer antibody is observed mainly within mesangium (A, B, C) and that react with anti-D-dimer antibody is observed within mesangium (E, F, G).)

結 果

1. FRA 沈着像：対象表例 73 例のうち、69 例に FRA 沈着を認め、MCA 処理によるパターンにより、Type I から IV の 4 群に分類した。Type I：MCA 処理により FRA 沈着は消失し、抗ヒト D-dimer 抗体に反応しないタイプで、FRA が fibrinogen や fibrinogen degradation products と予想されるもの (Fig. 2)。Type

II：MCA 処理により FRA が消失するが、抗ヒト D-dimer 抗体に反応するタイプで Type I に加えて cross-linked fibrin degradation products と予想されるもの (Fig. 2)。Type III：MCA 処理によって FRA は一段階以上は減弱するも残存し、抗ヒト D-dimer 抗体に反応するタイプで、Type I、Type II に加えて cross-linked fibrin と予想されるもの (Fig. 3)。Type IV：MCA 処理によっても FRA は不変で、抗ヒト D-dimer 抗体に反応

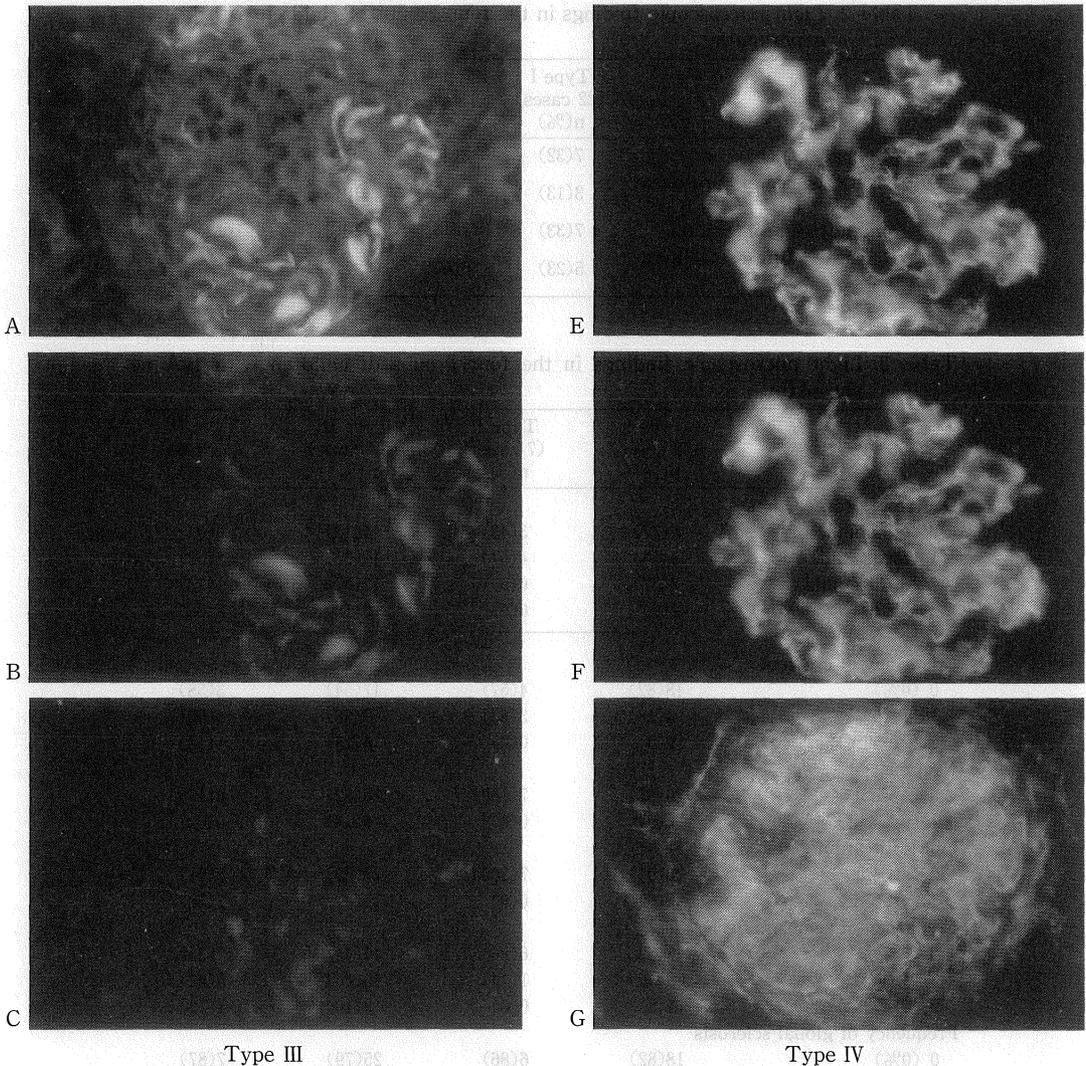


Fig. 3. Intraglomerular deposits of FRA before (A, E) and after (B, F) MCA treatment and FRA deposits reacting with anti-D-dimer antibody (C, G). MCA-insoluble FRA or FRA reacting with anti-D-dimer antibody is observed mainly within capillaries and MCA-soluble FRA within mesangium (A, B, C). MCA-insoluble FRA or FRA reacting with anti-D-dimer antibody is observed within capillaries and mesangium (E, F, G).

するタイプで, cross-linked fibrin と予想されるもの (Fig. 3, Table 1).

2. FRA 沈着像と光顕像

1)組織分類: Type I は 22 例で, その FRA は 1 例のみを除きメサンギウム領域に存在し, MCA 処理により溶解した. その光顕像は minimal change 7 例, focal/segmental proliferation 3 例, mild diffuse proliferation 7 例, moderate diffuse proliferation 5 例であっ

た. Type II は 7 例で, その FRA もすべてメサンギウム領域に存在し, minimal change 3 例, focal/segmental proliferation 3 例, mild diffuse proliferation 1 例であった. Type III は 32 例で, その FRA のうち cross-linked fibrin は係蹄壁に存在し, それ以外の FRA はメサンギウム領域に存在した. その光顕像は minimal change 5 例, focal/segmental proliferation 10 例, mild diffuse proliferation 10 例, moderate diffuse prolifera-

Table 2. Light microscopic findings in the four groups of children with IgA nephropathy

	Type I (22 cases) n(%)	Type II (7 cases) n(%)	Type III (32 cases) n(%)	Type IV (8 cases) n(%)
Minimal change	7(32)	3(43)	5(16)	0(0)
Focal / segmental proliferation	3(13)	3(43)	10(31)	4(50)
Mild diffuse proliferation	7(33)	1(14)	10(31)	1(13)
Moderate diffuse proliferation	5(23)	0(0)	7(22)	3(38)

Table 3. Light microscopic findings in the four groups of children with IgA nephropathy

	Type I (22 cases) n(%)	Type II (7 cases) n(%)	Type III (32 cases) n(%)	Type IV (8 cases) n(%)
Degree of proliferation				
0 (minimum)	8(37)	3(43)	4(13)	0(0)
1 (focal mild)	4(18)	4(57)	10(31)	4(50)
2 (diffuse mild)	8(37)	0(0)	12(37)	1(13)
3 (diffuse moderate)	2(9)	0(0)	6(18)	3(38)
*				
Frequency of crescent				
0 (0%)	18(82)	4(57)	17(54)	3(38)
1 (1-20%)	4(18)	3(43)	9(28)	4(50)
2 (21-50%)	0(0)	0(0)	6(18)	1(13)
Necrosis				
0 (absent)	20(91)	7(100)	26(82)	8(100)
1 (present)	2(9)	0(0)	6(18)	0(0)
Cell infiltration				
0 (absent)	20(91)	7(100)	22(69)	5(62)
1 (present)	2(9)	0(0)	10(31)	3(38)
Frequency of segmental sclerosis				
0 (0%)	12(55)	6(86)	14(44)	2(25)
1 (1-20%)	9(40)	1(14)	15(46)	5(62)
2 (21-50%)	1(5)	0(0)	3(10)	1(13)
Frequency of global sclerosis				
0 (0%)	18(82)	6(86)	25(79)	7(87)
1 (1-20%)	3(13)	1(14)	6(18)	1(13)
2 (21-50%)	1(5)	0(0)	1(3)	0(0)
Tubular atrophy				
0 (absent)	12(55)	5(71)	19(59)	4(50)
1 (present)	10(45)	2(29)	13(41)	4(50)

* : $p < 0.05$, χ^2 test

tion 7例であった。Type IVは8例で、そのFRAはcross-linked fibrinよりなり、メサンギウム領域から係蹄壁にかけて存在した。その光顕像はfocal/segmental proliferation 4例, mild diffuse proliferation 1例, moderate diffuse proliferation 3例であった(Table 2)。

2)Activity index : IgA腎症の組織所見として、AIにそれぞれスコアをつけ検討した(Table 3)。メサンギウム増殖の程度は、Type Iでは0点が8例、1点は4例、2点は8例、3点は2例であった。Type IIでは0点が3例、1点は4例であった。Type IIIでは0点が4例、1点は10例、2点は12例、3点は6例であった。Type IVでは1点は4例、2点は1例、3点は3例であった。以上より、Type IVがType Iに比しメサンギウム増殖の程度が有意に強い傾向にあった(p<0.05)。細胞性半月体は、Type Iでは0点が18例、1点が4例であった。Type IIでは0点が4例、1点が3例であった。Type IIIでは0点が17例、1点が9例、2点が6例であった。Type IVでは0点が3例、1点が4例、2点が1例であった。以上より、Type IIIとType IVがType IとType IIに比し細胞性半月体形成の頻度が高い傾向にあるも、有意差はなかった。壊死や間質の細胞浸潤は各群間に有

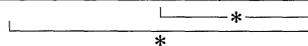
意差はなかった。

メサンギウム増殖の程度、細胞性半月体、壊死および間質の細胞浸潤のそれぞれのスコアを合計したAIについて検討した。Type Iでは0点が7例、1点が2例、2点が6例、3点が4例、4点が2例、5点が1例で、平均1.8点であった。Type IIでは0点が3例、2点が4例で、平均1.1点であった。Type IIIでは0点が4例、1点が5例、2点が6例、3点が6例、4点が4例、5点が5例、7点が2例で、平均2.8点であった。Type IVでは1点が2例、2点が2例、4点が2例、5点が2例で、平均2.3点であった。Type IやType IIに比しType IIIやType IVのAIは高い傾向にあった(Table 4)。以上の成績より、cross-linked fibrinがメサンギウム領域から係蹄壁にみられるType IIIとType IVにAI、とりわけ、メサンギウム増殖の程度が強い傾向にあった。

3)Chronicity index : CIについても同様に検討した。各因子では、segmental sclerosisの頻度はType IVがType IIに比し多い傾向にあったが、有意差はなかった。線維性半月体の頻度やglobal sclerosisの頻度、tubular atrophyは各群間に有意差はなかった(Table 3)。線維性

Table 4. Activity index in the four groups of children with IgA nephropathy

Total score of activity index	Type I (22 cases) n(%)	Type II (7 cases) n(%)	Type III (32 cases) n(%)	Type IV (8 cases) n(%)
0	7(33)	3(43)	4(13)	0(0)
1	2(9)	0(0)	5(16)	2(25)
2	6(26)	4(57)	6(18)	2(25)
3	4(18)	0(0)	6(18)	0(0)
4	2(9)	0(0)	4(13)	2(25)
5	1(5)	0(0)	5(16)	2(25)
6	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
7	0(0)	0(0)	2(7)	0(0)
Mean±ISD	1.8±1.5	1.1±1.1	2.8±1.9	2.3±1.4



* : p<0.05, Wilcoxon test

Table 5. Chronicity index in the four groups of children with IgA nephropathy

Total score of chronicity index	Type I (22 cases) n(%)	Type II (7 cases) n(%)	Type III (32 cases) n(%)	Type IV (8 cases) n(%)
0	8(36)	4(57)	9(28)	3(38)
1	6(26)	2(29)	7(22)	2(25)
2	5(23)	0(0)	7(22)	0(0)
3	1(5)	1(14)	8(25)	3(38)
4	1(5)	0(0)	1(3)	0(0)
5	1(5)	0(0)	0(0)	0(0)
Mean±ISD	1.3±1.4	0.7±1.1	1.5±1.2	1.4±1.4

半月体や segmental sclerosis, global sclerosis および tubular atrophy のそれぞれのスコアを合計した CI については, Type I は平均 1.3 点, Type II は平均 0.7

点, Type III は平均 1.5 点, Type IV は平均 1.4 点, と各群間に有意差はなかった (Table 5).

3. 蛍光像

Table 6. Immunofluorescent microscopic findings in the four groups of children with IgA nephropathy

	Type I (22 cases) n(%)	Type II (7 cases) n(%)	Type III (32 cases) n(%)	Type IV (8 cases) n(%)
IgA deposition				
1+m	16(73)	3(43)	14(44)	0(0)
1+m~gc	1(5)	0(0)	1(3)	0(0)
2+m	5(23)	2(29)	12(37)	3(38)
2+m~gc	0(0)	2(29)	5(16)	5(62)
IgG deposition				
-	16(73)	2(29)	16(50)	0(0)
±m	4(18)	3(43)	12(37)	2(25)
1+m	2(9)	2(29)	1(3)	2(25)
1+m~gc	0(0)	0(0)	2(7)	2(25)
2+m	0(0)	0(0)	0(0)	1(13)
2+m~gc	0(0)	0(0)	1(3)	1(13)
IgM deposition				
-	11(50)	0(0)	10(31)	2(25)
±m	6(26)	6(86)	14(44)	3(38)
1+m	4(18)	1(14)	2(7)	1(13)
1+m~gc	1(5)	0(0)	6(18)	2(25)
C ₃ deposition				
-	12(55)	0(0)	7(22)	1(13)
±m	6(27)	3(43)	15(46)	1(13)
1+m	3(13)	4(57)	7(22)	4(50)
1+m~gc	0(0)	0(0)	1(3)	2(25)
2+m	1(5)	0(0)	2(7)	0(0)
FRA deposition				
m	21(95)	7(100)	21(71)	1(13)
m~gc	1(5)	0(0)	11(29)	7(87)

m : mesangium, m~gc : mesangium and glomerular capillary wall

Table 7. Electron microscopic findings in the four groups of children with IgA nephropathy

	Type I (20 cases) n(%)	Type II (6 cases) n(%)	Type III (32 cases) n(%)	Type IV (7 cases) n(%)
Electron-dense deposits				
mesangial/paramesangial				
-	0(0)	0(0)	1(3)	1(14)
1+	3(15)	0(0)	5(16)	2(29)
2+	6(30)	3(50)	6(18)	1(14)
3+	11(55)	3(50)	20(63)	3(43)
subendothelial	4(20)	0(0)	6(18)	3(43)
subepithelial	1(5)	0(0)	3(9)	2(29)
intramembranous	0(0)	0(0)	1(3)	1(14)
Mesangial interposition	2(10)	0(0)	3(9)	2(29)
Splitting	2(10)	1(17)	3(9)	0(0)
Thinning	0(0)	0(0)	4(13)	2(29)
Gap	1(5)	0(0)	1(3)	0(0)

1)IgA 沈着：Type I 22 例中 IgA 沈着がメサンギウム領域のみに認められる症例は 21 例で，メサンギウム領域から係蹄壁にかけて認められる症例は 1 例のみであった。Type II 7 例では，5 例はメサンギウム領域のみで 2 例はメサンギウム領域から係蹄壁にかけて観察された。Type III 32 例では，26 例はメサンギウム領域のみで，6 例はメサンギウム領域から係蹄壁にかけて認められた。Type IV 8 例では，3 例はメサンギウム領域のみで，5 例はメサンギウム領域から係蹄壁にかけて確認された。IgA 沈着部位は Type I や Type II に比し Type IV に係蹄壁への浸潤や伸展が多い傾向にあった。

2)IgG 沈着：Type IV が Type I や Type III に比し

IgG の沈着程度の強い傾向がみられたが，沈着部位に有意差はなかった。

3)IgM 沈着：Type II が Type I に比し IgM の沈着程度の強い傾向がみられたが，沈着部位に有意差はなかった。

4)C3 の沈着：Type III と Type IV が Type I に比し C3 の沈着程度の強い傾向がみられたが，沈着部位に有意差はなかった (Table 6)。

以上の所見から，IgA 沈着態度とりわけ沈着部位と cross-linked fibrin の沈着との間に類似性が認められた。

4. 電顕像

1)一般電顕：対象症例 73 例中，Type I 20 例，Type II

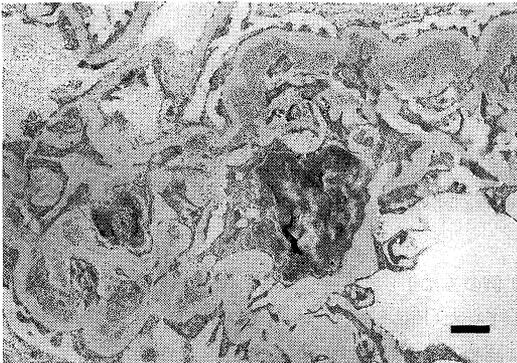


Fig. 4. Thin section of glomerulus with IgA nephropathy stained for FRA (Case of Type I). Numerous gold particles are seen over the mesangial electron-dense deposits.
Bar=1 μ m

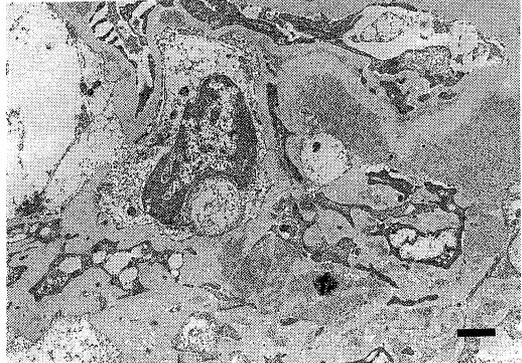


Fig. 5. Thin section of glomerulus with IgA nephropathy stained for FRA (Case of Type II). Numerous gold particles are seen over the mesangial electron-dense deposits.
Bar=1 μ m



Fig. 6. Thin section of glomerulus with IgA nephropathy stained for FRA (Case of Type III). Numerous gold particles are seen over the mesangial electron-dense deposits.
Bar=1 μ m

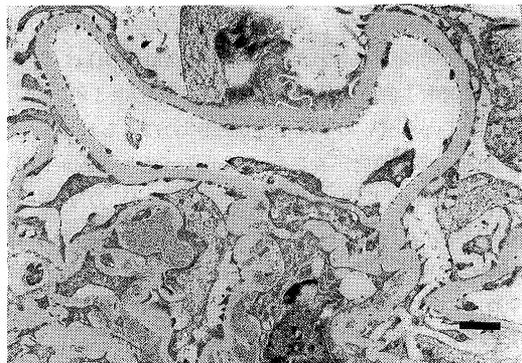


Fig. 7. Thin section of glomerulus with IgA nephropathy stained for FRA (Case of Type IV). Numerous gold particles are seen over the mesangial electron-dense deposits and some gold particles are seen over the glomerular basement membrane.
Bar=1 μ m

Table 8. Immunoelectron microscopic findings of intraglomerular deposition of FRA in the four groups of children with IgA nephropathy

	Type I (5 cases) n(%)	Type II (3 cases) n(%)	Type III (19 cases) n(%)	Type IV (5 cases) n(%)
Electron-dense deposits				
Mesangial				
1+	2(40)	1(33)	7(37)	1(20)
2+	1(20)	0(0)	8(42)	3(60)
Paramesangial				
1+	0(0)	0(0)	2(11)	0(0)
2+	1(20)	0(0)	2(11)	2(40)
Subendothelial				
1+	1(20)	0(0)	2(11)	1(20)
2+	0(0)	0(0)	1(5)	1(20)
Subepithelial				
1+	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
2+	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Mesangial matrix				
1+	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
2+	0(0)	0(0)	0(0)	1(20)
Glomerular basement membrane				
1+	0(0)	0(0)	0(0)	1(20)
2+	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)

(1+) and (2+) represent increasing degrees of positive labelling with ≤ 100 and 101-200 gold particles per μm^2 , respectively.

6例, Type III 32例, Type IV 7例の合計65例について検討した.

mesangial/paramesangial EDDはType Iの20例中11例(55%), Type II 6例中3例(50%), Type IIIの32例中20例(63%)およびType IVの7例中3例(43%)に3+認められ, cross-linked fibrinの沈着との間には一定の傾向はなかった. subendothelial EDDはType Iの20例中4例(20%), Type IIIの32例中6例(18%)およびType IVの7例中3例(43%)にみられ, Type IVに多い傾向がみられた. subepithelial EDDはType Iの20例中1例(5%), Type IIIの32例中3例(9%)およびType IVの7例中2例(29%)にみられ, Type IVにやや多い傾向がみられた. intramembranous EDDはType IIIの1例(3%)およびType IVの1例(14%)のみ認められた. mesangial interpositionやthinningについてもType IIIとType IVでやや多い傾向にあった. splittingやgapについては各タイプに有意差はなかった(Table 7).

2)免疫電顕: FRAの局在をType I 5例, Type II 3例, Type III 19例およびType IV 5例の合計32例について検討した. Type Iでは, FRAは5例中3例だけに認め, その3例の程度はmesangial EDDとparamesangial EDDに1+~2で, うち1例のみsubendothelial EDD内に1+認めた(Fig. 4). Type II 3例では, FRAは

1例のみに1+認め, その局在はmesangial EDDに一致していた(Fig. 5). Type IIIでは, FRAは19例中15例に認め, その局在は11例がmesangial EDDに, 4例がmesangial/paramesangial EDDに, うち3例はsubendothelial EDDにも1+~2+認めた(Fig. 6). Type IVの5例中, FRAは4例に認め, その局在はmesangial EDDに一致しており, うち2例がparamesangial EDD, 2例がsubendothelial EDDに1+~2+認めた. EDD以外の部位ではType IVの1例のみmesangial matrixに2+, glomerular basement membraneに1+認めたのみであった(Fig. 7, Table 8).

考 察

IgA腎症はIgA型の免疫複合物が糸球体メサンギウム領域を中心に沈着することを特徴とする慢性糸球体腎炎である. IgA型免疫複合物が糸球体に沈着すると補体系の活性化が起こり, 一連の血液凝固や線溶系が働き, 種々の糸球体病変を起こすことが知られている⁶⁾⁻⁸⁾. 今回, 小児期IgA腎症に対し, 糸球体内血液凝固の成立, すなわち, 糸球体内にフィブリンの沈着することをMCA溶解性に基づく組織化学的分析と抗D-dimerモノクローナル抗体を用いた免疫組織学的分析法により証明し, 併せてその糸球体内局在や糸球体病変との比較検討を行った. 糸球体内フィブリン沈着の観察には, factor

XIII や von Willebrand factor と FRA の沈着像より検討する方法¹⁵⁾, 5 M 尿素あるいは MCA 添加による不溶性フィブリン検出法⁹⁾, プラスミン分解により不溶性フィブリンから特異的に出現する D-dimer を免疫組織学的に検出する蛍光抗体法⁹⁾および FRA の存在する組織にプラスミンを添加せしめ D-dimer の出現より確認する方法¹⁶⁾等がある。しかし、検査材料が微量であることや形態保持が困難であること等の問題点も多く、確立された方法はほとんどない。教室の楠本は、正常ヒト血漿および先天性第 XIII 因子欠乏血漿より安定化フィブリン塊と非安定化フィブリン塊を *in vitro* で作成し、それぞれの切片に MCA 処理をして溶解性の有無および FRA, 第 XIII 因子の蛍光所見を観察、比較した。そして正常血漿由来のフィブリンのプラスミン処理後の溶解液のドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル-交叉免疫電気泳動による像が cross-linked fibrin に一致し、他方は non cross-linked fibrin に一致することを確認した。また、*in vivo* では DIC 患児の腎組織の FRA は MCA 処理にても変化せず、FRA と第 XIII 因子の重染色で cross-linked fibrin の像と一致する所見を報告した^{17), 18)}。以上の結果をふまえ、著者は MCA 処理で非可溶性の FRA は cross-linked fibrin であることを改めて確認し、不可溶性の FRA および D-dimer の沈着像より cross-linked fibrin の局在性を検討した。

今回の検索では、沈着する FRA が MCA 処理により消失し、抗ヒト D-dimer 抗体とも反応しない Type I では、FRA の構成成分は fibrinogen や fibrinogen degradation products と予想され、これらはメサンギウム領域を中心に認められた。そして、その光顕像は minimal change が多く、メサンギウム増殖の程度も軽度で、電顕像でも基底膜病変の程度も軽い傾向にあった。MCA 処理により FRA 沈着は消失したが、抗ヒト D-dimer 抗体に反応した Type II の FRA は cross-linked fibrin degradation products と予想され、これらもメサンギウム領域中心に観察された。また、光顕像は Type I と同様、メサンギウム増殖や基底膜病変の程度も軽い所見を呈していた。これに対して、cross-linked fibrin が存在する Type III や Type IV ではその局在は係蹄壁を中心にみられ、メサンギウム増殖に一致してメサンギウム領域へのフィブリンの伸展が認められた。さらにこれらの症例では、細胞性半月体、壊死像や間質の細胞浸潤などの AI が高い傾向にあった。また、IgA 沈着は係蹄壁からメサンギウム領域にみられ、一般電顕では subendothelial EDD や mesangial interposition が多い傾向にあった。かかる所見から、糸球体内に存在する cross-linked fi-

brin は組織の活動性病変や糸球体基底膜の損傷の結果と予想され、糸球体内凝固と組織の活動性病変や糸球体基底膜の病変との密接な関係が示唆された。

cross-linked fibrin はメサンギウム領域に比して係蹄壁に多く認められたが、この報告は Takemura ら¹⁹⁾の報告とも一致していた。この機序として Takemura らは、免疫複合体により活性化した補体が糸球体基底膜を傷害し、コラーゲンを露出させ、血小板凝集とそれに引き続く凝固因子の活性化を引きおこし、フィブリン形成に至っている。また、Marcum らは内皮細胞には凝固活性を抑制する、heparin-like molecules 等が存在し、それらが内皮細胞の傷害により減少するためフィブリンを形成させると述べている^{20)~23)}。

係蹄壁の cross-linked fibrin に比して、メサンギウム領域には non cross-linked fibrin, fibrinogen や fibrinogen degradation products が多く認められたが、これら FRA は免疫電顕像にて EDD 内に IgA と共に観察された。この所見は、教室の中島¹⁰⁾も報告しているように、血中の FRA, fibrinogen や fibrinogen degradation products が IgA を中心とする immune complex と共にメサンギウムに取り込まれて存在する可能性を示唆している。すなわち、Type I や Type II の mesangial/paramesangial EDD および subendothelial EDD に存在する FRA は、血中の fibrinogen や fibrinogen degradation products が電気的結合等により非特異的に EDD と結合することによると思われた¹⁹⁾。Type III や Type IV の mesangial/paramesangial EDD および subendothelial EDD に FRA が存在したことより、immune complex の沈着後におこる血管内血液凝固反応の結果、糸球体基底膜に沈着した cross-linked fibrin はメサンギウム細胞によって immune complex と共に処理される可能性が示唆された。

電顕所見では係蹄壁の EDD やその中の FRA の出現頻度が蛍光所見に比して少なかったのは、観察した糸球体が異なっていたこと以外に、電顕での固定や包埋の過程で FRA 等の抗原性を失活させることが予想された。

今回の成績より小児 IgA 腎症においては cross-linked fibrin が係蹄壁を中心に存在し、増殖性変化、とりわけ、AI の強さと比例してその沈着程度は強く、メサンギウム等への拡大がみられた。このことは IgA 腎症の腎傷害への糸球体内血液凝固の関与を強く示唆するものである。今後、抗凝固療法等による推移と臨床的な成績とも合わせて検討する課題である。

結 語

1. 小児 IgA 腎症 73 例のうち, 69 例に FRA 沈着を認め, その性状を MCA による溶解性と D-dimer 沈着の所見から 4 つのタイプに分けたところ, Type I 22 例, Type II 7 例, Type III 32 例, Type IV 8 例であった。

2. cross-linked fibrin が係蹄壁を中心にみられる Type III や Type IV で AI, とりわけメサンギウム増殖の程度が強い傾向にあった。

3. IgA 沈着部位をみると Type I, Type II に比し, Type IV では IgA の係蹄壁への沈着が多い傾向にあった。

4. 一般電顕では Type III と Type IV で subendothelial EDD, mesangial interposition および thinning が多い傾向にあった。

5. 免疫電顕では FRA の沈着部位は EDD に一致し, cross-linked fibrin が存在する Type III や Type IV で mesangial/paramesangial EDD および subendothelial EDD に FRA が強く沈着する傾向にあった。

本論文要旨は第 26 回日本小児腎臓病学会(平成 3 年 6 月, 札幌)において発表した。

文 献

- 1) Berger, J. : IgA glomerular deposit in renal disease. *Transplant. Proc.* 1 : 939-944, 1969.
- 2) Doyle, G. D., O'Dwyer, W. F., Carmody, M., Campbell, E. and Browne, O. : IgA nephropathy - An immunopathological study. *Ir. J. Med. Sci.* 145 : 292-303, 1976.
- 3) Lawler, W., Williams, G., Tarpey, P., Acheson, E. J. and Mallick, N. P. : IgA localization in glomerular disease. *J. Clin. Path.* 30 : 912-924, 1977.
- 4) Peet, J., Arisz, L., Brentjens, J. R. H., Marrink, J. and Hoedemareker, J. : The clinical course of IgA nephropathy in adults. *Clin. Nephrol.* 8 : 335-340, 1977.
- 5) Imbasciati, E., Colasanti, G., Barbiano di Belgioioso, G. Banfi G. Durante, A., Rangni, A., Ponticelli, C., Minetti, L. and D'Amico, G. : Long term follow up of IgA mesangial deposits glomerulonephritis. *Dialysis Transplant. Nephrol.* 14 : 472-477, 1977.
- 6) Vassalli, P. and McCluskey, R. T. : The pathogenic role of the coagulation process in rabbit masugi nephritis. *Am. J. Pathol.* 45 : 653-677, 1964.
- 7) Koffler, D. and Paronetto, F. : Immunoglobulins, complement, and fibrinogen in human disease. II. acute, subacute, and chronic glomerulonephritis. *J. Clin. Invest.* 44 : 1655-1671, 1965.
- 8) Kincaid-Smith, P., Saker, B. M. and Fairley, K. F. : Anticoagulants in "irreversible" acute renal failure. *Lancet* 28 : 1360-1363, 1968.
- 9) Kamitsuji, H., Kusumoto, K., Taira, K., Iida, Y., Nakajima, M. and Fukui, H. : Localization of intrarenal cross-linked fibrin in children with various renal diseases. *Nephron* 35 : 94-99, 1983.
- 10) 中島 充 : プロテイン A-金コロイド法による各種腎疾患の免疫電顕的観察. 第二報: フィブリノゲン関連抗原および第 XIII 因子 subunit A 抗原の糸球体内局在性について. *奈医誌.* 37 : 93-109, 1986.
- 11) Andreoli, S. P., Yum, M. N. and Bergstein, J. M. : IgA nephropathy in children : Significance of glomerular basement membrane deposition of IgA. *Am. J. Nephrol.* 6 : 28-33, 1986.
- 12) 上辻秀和, 楠本清明, 岡本裕宏, 沢井遵, 大村令子, 安居資司, 平 康二, 塚田周平 : 無症候性蛋白尿, 血尿患児の腎組織像と尿所見の推移について. *奈医誌.* 32 : 249-256, 1981.
- 13) Slot, J. W. and Geuze, H. J. : A new method of preparing gold probes for multiple-labeling cytochemistry. *Eur. J. Cell Biol.* 38 : 87-93, 1985.
- 14) Tanaka, H., Haga, S., Takatsuki, K. and Yamaguchi, K. : Localization of adult T-cell leukemia-associated antigen by the immunocolloidal gold method. *Cancer Res.* 44 : 3493-3504, 1984.
- 15) Miller, K. and Michael, A. F. : Coagulation and the kidney : hematologic and vasacular problems. *in* *Kidney disease* (McIntosh, R. W., Guggenheim, S. J. and Shrier R. W., eds.). New York, John Wiley and Sons, p3-28, 1977.
- 16) Yoshioka, K., Iseki, T., Akano, N., Uraoka, Y., Miyata, H. and Maki, S. : Urinary fibrinogen and fibrin fragments in children with renal disease. *Nephron* 32 : 135-139, 1982.
- 17) 楠本清明 : 小児各種腎疾患における糸球体内フィブリン. 第一報 : モノクロール酢酸処理による糸球体

- 内フィブリン・フィブリノゲン関連抗原の推移. 奈医誌. **37** : 12-21, 1986.
- 18) 楠本清明 : 小児各種腎疾患における糸球体内フィブリン. 第二報 : 糸球体内フィブリン沈着と第 XIII 因子 subunit-A 抗原およびフォン・ウイルブランド因子抗原との関係について. 奈医誌. **37** : 201-213, 1986.
- 19) Takemura, T., Yoshioka, K., Akano, N., Miyamoto, H., Matsumoto, K. and Maki, S. : Glomerular deposition of cross-linked fibrin in human kidney diseases. *Kidney Int.* **32** : 102-111, 1987.
- 20) Loskutoff, D. J. and Edgington, T. S. : Synthesis of a fibrinolytic activator and inhibitor by endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74** : 3903-3907, 1977.
- 21) Weksler, B. B., Marcus, A. J. and Jaffe, E. A. : Synthesis of prostaglandin I₂ (prostacyclin) by culture human and bovine endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74** : 3922-3926, 1977.
- 22) Esmon, N. L., Owen, W. G. and Esmon, C. T. : Isolation of a membrane-bound cofactor for thrombin catalysed activation of protein C. *J. Biol. Chem.* **257** : 859-864, 1982.
- 23) Marcum, J. A., McKenny, J. B. and Rosenberg, R. D. : Acceleration of thrombin-antithrombin complex formation in rat hindquarters via heparin like molecules bound to the endothelium. *J. Clin. Invest.* **74** : 341-350, 1984.