

腎疾患の病態を判断する手段としての

尿沈渣細胞測定の意義

や ま も と こ う じ ろ う
山 本 浩 仁 郎

(腎臓病学専攻)

防 衛 医 科 大 学 校

平成 2 5 年 度

第1章 緒言

各種腎疾患から末期腎不全、すなわち血液透析、腎移植へと進行する患者は持続的に増加し、1兆円を超す医療費の原因として重大な問題となっている。腎疾患の進行や活動性を評価することは腎疾患を治療するに当たり極めて重要である。現在、腎疾患治療法の最終判断は主に腎生検にゆだねられているが、腎生検は侵襲的な検査であり、しかも200万個といわれる糸球体のわずか10個前後の形態から全体を予測する方法自体に限界を指摘する者も多い。¹⁾

一方、尿は腎臓全体の状況を反映して変化するので腎疾患の診断・予後判定上の有用性が考えられる。^{2,3)} 尿沈渣細胞と腎疾患活動性との関連性を示唆する報告は、ポドサイト（糸球体足細胞、糸球体上皮細胞）のみ、マクロファージのみに関する報告が散見されるものの、尿沈渣中に出現する細胞を網羅的に評価した報告は見当たらない。

腎臓由来の尿沈渣細胞成分としては尿細管上皮細胞、ボウマン嚢上皮細胞とポドサイト、炎症細胞などがある。糸球体毛細血管のポドサイトの足突起と足突起の間にはスリット障壁がある。糸球体血管を流れる血液中の水、クレアチニン、カリウムなどの小さい分子は糸球体血管の血圧でこし出されボウマン腔へ移動するが、アルブミン、グロブリン、赤血球などは、スリット障壁があるために、血中からボウマン腔へこし出されない。⁴⁾

腎疾患においてボウマン腔へこし出されたアルブミン、グロブリンなどの尿蛋白は、一部尿細管上皮細胞で再吸収されるが、その時に炎症性サイトカインが生じ、腎間質の傷害をおこして腎機能障害をもたらす。⁵⁾ したがって、ネフリンなどのスリット障壁は間質傷害、腎機能障害を起こさないための「第1のバリア」と言われる（図1）。

一方、ボウマン嚢上皮細胞は、第1のバリアが傷害されてボウマン腔へ出てしまった蛋白が腎間質へ入っていかないようにするための「第2のバリア」と言える（図1）。⁶⁾ たとえば半月体を形成するような壊死性血管炎（ANCA 関連

血管炎) や IgA 腎症では糸球体基底膜が傷害され、糸球体血管が破たんする。破たんした血管内から血漿成分が流出し、糸球体基底膜周囲のボウマン嚢上皮細胞が増殖することで半月体が形成され则认为られている。^{7, 9)}

単層の上皮細胞においては隣り合う細胞膜の頂端側に細胞間接着装置複合体と呼ばれる、隣り合う細胞が強く接着する 3 つの領域があり、その最も頂端側に tight junction (TJ) が存在する。⁹⁾ ボウマン嚢上皮細胞には TJ 蛋白の一つであるクローディン 1 が特異的に発現する (図 1)。^{6, 10)}

クローディンは Furuse らにより報告された TJ を形成する 4 回膜貫通型の蛋白質であり、¹¹⁾ 2013 年現在、26 種類の報告がある。¹²⁾ Kiuchi-Saishin ら¹⁰⁾ により腎におけるクローディンファミリーの局在が報告されており、クローディン 1 は腎においてボウマン嚢上皮細胞に特異的に発現しているとされている (図 2)。^{6, 10, 13)}

そこで、私は、「尿沈渣中に出現する細胞と腎疾患の状態、活動性との関係を網羅的に評価することにより、また尿沈渣中の細胞のなかでもボウマン嚢上皮細胞の TJ 蛋白の一つであるクローディン 1 陽性細胞を尿検査でとらえ評価することができれば、2 回目以降の腎生検をしなくてもその症例における腎疾患の状態、活動性をとらえることができるのではないか」との仮説を立てた。この仮説を検証するために、腎生検目的で入院した患者 200 症例の早朝尿を集め、沈渣細胞を蛍光免疫染色で同定し、同定した尿沈渣中の各種細胞数の結果と、各種疾患、半月体形成など腎生検の組織所見、尿中赤血球数や尿蛋白量など臨床検査所見、また症例数の多かった IgA 腎症の組織分類との関係、および巣状糸球体硬化症 (focal segmental glomerulosclerosis : FSGS) と微小変化群

(minimal change nephrotic syndrome : MCNS) との関係を評価した。さらに尿沈渣細胞の mRNA の発現をリアルタイム reverse transcription (RT) -PCR 法で定量し、その結果と腎生検の組織所見との相関なども検討した。最後に、マクロファージのフェノタイプである M1、M2 マクロファージと関連するマーカー等の mRNA と腎生検の組織所見との相関を評価した。

第2章 研究方法

第1節 対象

平成20年5月から平成23年8月において当院へ腎生検のために入院した患者の早朝尿を対象に検討を行った。腎生検所見で糸球体が5個未満であった6症例は排除した。検討した患者背景は男性/女性 102/98名、年齢平均は44±18歳であった。診断は、臨床所見および腎生検の組織所見を合わせて決定した。疾患の内訳は、MCNS 15名、FSGS 22名、膜性腎症(membranous glomerulonephropathy : MN) 19名、膜性増殖性糸球体腎炎(membranoproliferative glomerulonephritis : MPGN) 1名、IgA腎症(IgA nephropathy : IgAN) 73名、non-IgA腎症(non-IgA nephropathy : non-IgAN) 5名、溶連菌感染後急性糸球体腎炎(acute poststreptococcal glomerulonephritis : APSGN) 4名、ヘノッホ・シェーンライン紫斑病(Henoch Schonlein purpura nephritis : HSPN) 10名、ANCA関連血管炎または半月体形成性糸球体腎炎(ANCA) 11名、ループス腎炎(lupus nephritis : LN) 9名、糖尿病性腎症(diabetic nephropathy : DMN) 8名、アミロイドーシス(amyloidosis) 5名、糸球体基底膜菲薄症(thin basement membrane glomerulopathy : TBM) 3名、尿細管間質性腎炎(tubule-interstitial nephritis : TIN) 6名、ファブリー病(Fabry disease : Fabry) 1名、腎硬化症(nephrosclerosis : NS) 2名、微小変化のみ(minor glomerular abnormality : MGA) 6名であった(表1)。全ての症例からヘルシンキ宣言に則った書面によるインフォームドコンセントをいただいた。また正常コントロールとして健常人5例(年齢28—51歳)における早朝尿の検討も行った。

第2節 腎組織における各種抗体に対する免疫染色

抗体の感度、腎臓の構成細胞を同定する上での特異性を評価するため、尿沈渣での解析に先立ち一部の症例の腎組織においてクローディン 1、サイトケラチン、シナプトポディンに対する蛍光免疫染色を行い、局在を確認した。

凍結した腎組織をクリオスタットで薄切した後、4℃で 10 分間アセトンによる固定を行った。10%ヤギ血清で 7 分間非特異反応のブロックングを行った後、表 2 に示す 1 次抗体、2 次抗体を使用し、既報の染色法¹⁴⁾ に準じて間接蛍光抗体法を実施した。1 次抗体および 2 次抗体はそれぞれ室温で 1 時間ずつ反応させた。

また、一部の症例の腎組織においてクローディン 1 およびサイトケラチンに対する免疫組織化学染色を行った。凍結した腎組織をクリオスタットで薄切した後、4℃で 10 分間アセトンによる固定を行った。スターティングブロック (PIERCE, Rockford, IL, USA) により 7 分間非特異反応のブロックングを行った後、表 2 に示す 1 次抗体を使用し、ENVISION キット (Dako, Glostrup, Denmark) の染色法に準じて免疫組織化学染色を行った。1 次抗体および 2 次抗体はそれぞれ室温で 1 時間ずつ反応させた。

第 3 節 尿検体の採取と処理

入院患者の腎生検当日の早朝尿を 40ml 採取し、このうち 30ml は遠心機を用いて 1500rpm で 7 分間遠心し、上清を除去後、PBS 30ml を加えて洗浄した。沈渣細胞を 0.2%BSA-PBS 600 μ l に浮遊させ、100 μ l ずつサイトスピン 4 (Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) を使用して 700rpm で 5 分間遠心を行い、6 枚のスライドガラス上にそれぞれ貼り付けた。使用するまで -80℃ の超低温槽で保存した。正常コントロールにおいても早朝尿を採取し同様条件でスライドを作成し保存した。

残りの尿 10ml 分の沈渣細胞は、上清を除去後 TRIzol Plus RNA isolation reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を使用し、プロトコールに従って

total RNA を抽出した。分光光度計を用いて 260nm における吸光度から、RNA を定量し、使用するまで-80℃の超低温槽で保存した。

第4節 尿沈渣細胞の各種抗体に対する蛍光免疫染色法

第2節の腎組織に対する蛍光免疫染色と同様の染色を表2に示す1次抗体、2次抗体を使用しておこない、尿沈渣の構成細胞を同定した。核染色にはHoechst 33342 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) を使用した。顕微鏡を使用し、100倍にて5視野デジタルカメラで写真撮影を行い、目視および細胞数の多い写真に関してはルミナビジョン (Mitani Corp., Fukui, Japan) を使用して陽性細胞数を計測し、平均を算出した。

第5節 リアルタイム RT-PCR 法

25ng の total RNA から Transcriptor Universal cDNA Master (Roche, Basel, Switzerland) を用いて cDNA を作成した。作成した cDNA をテンプレートとして使用し、StepOnePlus (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いてリアルタイム RT-PCR を実施した。今回使用したタックマン・プライマープローブ (Applied Biosystem) を表3に示す。補正には通常使用されるグリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: GAPDH) とともに、アクアポリン2 (aquaporin 2: AQP2) も保存時間や温度による検出差が少ない腎臓由来参照遺伝子として使用した。¹⁵⁾ 96 ウェルプレートに 10 μ l の Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)、1 μ l のタックマン・プライマープローブ (Applied Biosystems) 及び 9 μ l の cDNA を混和して PCR 反応を行った。反応条件は 50℃2 分、95℃10 分の preincubaton の後、95℃15 秒、60℃1 分を 60 サイクル反応させた。結果は、 $\Delta\Delta$ Ct 法を用いて解析した。 $\Delta\Delta$ Ct 法のコントロールは SLE の 1 症例を使用した。

解析を行った症例は GAPDH を検出できた 188 症例および AQP2 の検出できた 93 症例で、AQP2 を検出できた症例の内訳は表 1 のカッコ内に示している。

第 6 節 プロトコールと統計学的処理

(1) 尿沈渣中のクローディン 1、CD68、好中球エラスターゼ陽性細胞数と各種腎疾患との関係

尿沈渣中の各種陽性細胞数と各種疾患との比較について、平均値のグラフを作成した。平均値のグラフが高値であった ANCA を対照として多重比較を行うことを考え、ダネットの検定を行った。結果は平均±標準誤差で示した。

(2) 尿沈渣中のクローディン 1、CD68、好中球エラスターゼ陽性細胞数と半月体、尿蛋白、尿中赤血球、IgA 腎症の組織分類、治療効果との関係

半月体形成のある糸球体を 1 つでも認める症例を「半月体陽性」、半月体を認めない症例を「半月体陰性」と定義した。また、全節性硬化糸球体が全糸球体の 30% 以上の症例を「硬化糸球体高度」、全節性硬化糸球体が全糸球体の 30% 未満の症例を「硬化糸球体軽度」と定義し、尿沈渣中のクローディン 1、CD68、好中球エラスターゼ陽性細胞数との相関について、対応のない 2 群の t 検定を行った。また、半月体の性状を、細胞性半月体あり、線維細胞性半月体あり、線維性半月体あり、半月体なしの 4 群に分類し、ターキークレマー検定を行った。結果は平均±標準誤差で示した。

半月体形成に関しては、半月体の有無のみでなく、半月体形成率も検討した。半月体形成率は腎生検において採取された「全糸球体数に対する半月体を形成している糸球体数」として算出した。半月体形成率は 0、1、2 の 3 段階にクラス分けした。すなわち 0 : 0%、1 : 25% 未満 (0% を含まない)、2 : 25% 以上とした。尿沈渣中の各種陽性細胞数との関係をヨンクヒール・タプストラ傾向検定で検討した。

また尿沈渣中の各種陽性細胞数が半月体の有無をどれだけ予測できるかを評価するために、名義ロジスティック解析をおこない、receiver operating characteristic (ROC) 曲線を描き、ROC 曲線下面積 (area under the curve : AUC) およびオッズ比を算出した。

尿蛋白 (g/gCr) は 0、1、2、3 の 4 段階にクラス分けした。すなわち 0 : 0-0.15 g/gCr 未満、1 : 0.15-0.5 g/gCr 未満、2 : 0.5-3.5 g/gCr 未満、3 : 3.5 g/gCr 以上とした。クラス分けにおいて CKD ガイドライン 2012 の基準およびネフローゼ症候群の診断基準を参考にした。尿沈渣中の各種陽性細胞数との関係をヨンクヒール・タプストラ傾向検定で検討した。また尿蛋白のクラス分けが半月体の有無をどれだけ予測できるかを評価するために、名義ロジスティック解析をおこない、ROC 曲線を描き、AUC およびオッズ比を算出した。

尿中赤血球数は 0、1、2 の 3 段階にクラス分けした。すなわち 0 : 0-4 個/各視野まで、1 : 5-29 個/各視野、2 : 30 個/各視野以上とした。尿沈渣中の各種陽性細胞数との関係をヨンクヒール・タプストラ傾向検定で検討した。また尿中赤血球数のクラス分けが半月体の有無をどれだけ予測できるかを評価するために、名義ロジスティック解析をおこない、ROC 曲線を描き、AUC およびオッズ比を算出した。

尿沈渣中の各種陽性細胞数と腎生検における疾患の組織評価との関係を見るために IgA 腎症と診断された患者を坂口分類 (表 4) でクラス分けをしたものと尿沈渣中の各種陽性細胞数との関係を検討した。検定はヨンクヒール・タプストラ傾向検定を行った。

プレドニゾロンやシクロスポリン A による免疫抑制薬等で臨床的に腎炎の改善を認めた 14 例 (MCNS 2 名、MN 1 名、MPGN 1 名、IgA 腎症 2 名、non IgA 腎症 2 名、ANCA 関連血管炎 (半月体形成性糸球体腎炎) 5 名、LN 1 名) において、尿の再採取を行わせていただき、治療前と治療後の 2 群でウィルコクソンの符号順位和検定を行った。改善は、尿蛋白に関しては、完全寛解 (0.3g/gCr 未満) もしくは不完全寛解 1 型 (1.0g/gCr 未満) になった場合とした。血尿の程度に

関しては、0:0 以上 0-4 個/各視野、1:5-29 個/各視野、2:30 個/各視野以上の 3 段階に分けたクラスにおいて、1 段階以上改善した場合とした。腎機能に関しては、Cr の値が最大悪化時より 30%以上回復した場合とした。

ポドサイト傷害による糸球体硬化には、ボウマン嚢上皮細胞の傷害や過形成が関与すると報告されているので、¹⁶⁻¹⁸⁾ FSGS においてクローディン 1 陽性のボウマン嚢上皮細胞が尿中に排泄される可能性を考えた。そこで、FSGS および MCNS と診断された 2 疾患の患者群において、尿沈渣中の各種陽性細胞数との相関を評価した。検定は対応のない 2 群の t 検定を行った。結果は平均±標準誤差で示した。

(3) 各種 mRNA レベルと半月体との関係

クローディン 1、CD68 の mRNA レベルと半月体の有無および硬化糸球体の程度の関係について、対応のない 2 群の t 検定を行った。結果は平均±標準誤差で示した。

また尿沈渣中の各種 mRNA レベルが半月体の有無をどれだけ予測できるかを評価するために、名義ロジスティック解析をおこない、ROC 曲線を描き、AUC およびオッズ比を算出した。

マクロファージのフェノタイプとして M1 マクロファージと関連するマーカー {iNOS (誘導型一酸化窒素合成酵素)} やサイトカイン (IL-6)、M2 マクロファージと関連するマーカー {CD163 (ヘモグロビンスカベンジャー受容体)、CD204 (マクロファージスカベンジャー受容体 1)、CD206 (マンノース受容体、C タイプ 1)} やサイトカイン (IL-10) の mRNA レベルと、半月体の有無および硬化糸球体の程度の関係について、対応のない 2 群の t 検定を行った。結果は平均±標準誤差で示した。

最後に、尿沈渣中の M2 マクロファージと関連する mRNA レベルが半月体の有無をどれだけ予測できるかを評価するために、名義ロジスティック解析をおこない、ROC 曲線を描き、AUC およびオッズ比を算出した。

(4) 統計処理

解析は JMP ver. 10.0.2 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) および EZR (Saitama Medical Center, Jichi Medical University, Tochigi, Japan)¹⁹⁾ を使用した。有意差の有無は $p < 0.05$ をもって判定した。

第7節 倫理審査

本研究は防衛医科大学校倫理委員会の承認を得てから施行した（承認番号 934）。

第3章 結果

第1節 腎組織における免疫染色

MGA のみの患者の腎組織、および半月体形成性糸球体腎炎患者の腎組織におけるクローディン1とサイトケラチンおよびその患者のシナプトポディンとの免疫蛍光染色の二重染色を提示する（図3）。ボウマン嚢上皮細胞および半月体を形成していると考えられる部位に一致して、クローディン1陽性所見を認めた。クローディン1とサイトケラチンやシナプトポディンが二重染色される部位はほとんど認めなかった。免疫組織化学においてもクローディン1陽性細胞は、ボウマン嚢上皮細胞と考えられる部位に見られ、サイトケラチンの陽性部位とは分布が異なっていた。

しかし、症例の一部で遠位尿細管や集合管と考えられる部位でクローディン1が陽性に染色されている像を認めた。そのため検討した症例の尿沈渣細胞をサイトケラチンとクローディン1との二重染色を行った（図4）。ごくわずかの細胞で二重に染色されたものの、ほとんどの症例では二重染色されることはなかった。このため尿沈渣中のクローディン1陽性細胞の大半はボウマン嚢上皮細胞であると考えられた。

第2節 尿沈渣中クローディン1、CD68、好中球エラスターゼ陽性細胞数と半月体、尿蛋白、尿中赤血球、IgA腎症の組織分類、治療効果との関係

正常コントロールにおいてはクローディン1、CD68陽性細胞はほとんど認めず、好中球エラスターゼ陽性細胞も各視野4個程度出現していたのみであった。今回の検討における代表的な尿沈渣の蛍光免疫染色所見を図5に示す。半月体のない症例と比べて半月体のある症例では尿沈渣中にクローディン1、CD68、好中球エラスターゼ陽性細胞が著明に認められた。

図 6 A に示すように、尿中クローデイン 1 陽性細胞数は、ANCA において、IgAN、HSPN と比較して有意に多かった ($p < 0.05$, ダネットの検定)。

図 6 B に示すように、尿中 CD68 陽性細胞数は、ANCA において、他の疾患と比較して有意な差を認めなかった (ダネットの検定)。

図 6 C に示すように、尿中好中球エラスターゼ陽性細胞は、ANCA において、MCNS、FSGS、MN、IgAN、DMN と比較して有意に多かった ($p < 0.05$, ダネットの検定)。

一方、シナプトポディン、サイトケラチン、CD3 の免疫染色では 100 サンプルを終了した時点で評価を行ったところ、腎疾患の違いあるいは病状の違いによる有意な変化を認めなかったため、さらなる検討は中止した (図示せず)。

クローデイン 1、CD68、好中球エラスターゼ陽性細胞について、病理組織の診断名にかかわらず半月体の有無や糸球体硬化の程度により分類した 2 群ごとの評価を行った。半月体のある症例の内訳は、MCNS 1 名、FSGS 1 名、MN 3 名、IgAN 31 名、APSGN 1 名、HSPN 7 名、ANCA 11 名、LN 2 名、amyloidosis 1 名であった。糸球体高度の症例の内訳は、MCNS 1 名、FSGS 7 名、IgAN 6 名、non IgAN 2 名、APSGN 1 名、ANCA 3 名、LN 1 名、DMN 2 名、amyloidosis 2 名、NS 1 名であった。図 7 に示すように、クローデイン 1、CD68、好中球エラスターゼ陽性細胞数は、半月体のある症例において半月体のない症例と比較し、有意に増加していた。一方、クローデイン 1、CD68、好中球エラスターゼ陽性細胞数は、硬化糸球体が高度な症例と軽度な症例との間で有意な差を認めなかった。また半月体の性状ごとでは、クローデイン 1 陽性細胞数は、半月体なし症例と比較し、細胞性半月体症例において有意に増加していた。CD68 陽性細胞数は、半月体なし症例と比較し、細胞性半月体症例、線維細胞性半月体症例において有意に増加していた。好中球エラスターゼ陽性細胞数は、半月体なし症例と比較し、細胞性半月体症例において有意に増加していた。

図 8 に示すように、半月体形成率とクローデイン 1、CD68、好中球エラスターゼ陽性細胞数との関係では、半月体形成率の増加に伴い、有意に増加していた。

図 9 に示すように、半月体の有無を判断するために尿沈渣中クローディン 1、CD68、好中球エラスターゼ陽性細胞数が増えることで精度があがるか評価するため、ロジスティック解析を行い、ROC 曲線を描いた。クローディン 1、CD68、好中球エラスターゼ陽性細胞数と半月体の存在とのロジスティック解析においてそれぞれ $P=0.005$ 、 $P<0.001$ 、 $P<0.001$ と有意な所見であり、ROC 曲線の AUC はそれぞれ 0.603、0.699、0.655、オッズ比はそれぞれ 1.023、1.022、1.017 であった。この AUC は、検査の有用性を評価するための指標であり、半月体のある患者の陽性細胞数が、半月体のない患者の陽性細胞数よりも多い確率に等しい。オッズ比は、陽性細胞数が 1 増えることにより、半月体が存在する可能性が上がる倍数を示す。

図 10 に示すように、尿蛋白との関係では、クローディン 1 陽性細胞数が尿蛋白の増加に伴い、有意に増加していた。CD68、好中球エラスターゼ陽性細胞数は、尿蛋白の増加に伴う有意な増加を認めなかった。半月体の有無を判断するために尿蛋白のクラス分けが増えることで精度があがるか評価するため、ロジスティック解析を行い、ROC 曲線を描いたところ $P=0.482$ と有意な所見ではなかった（図示せず）。

図 11 に示すように、尿中赤血球数との関係では、クローディン 1、CD68、好中球エラスターゼ陽性細胞数が、それぞれ尿中赤血球数の増加に伴い有意に増加していた。半月体の有無を判断するために尿中赤血球数のクラス分けが増えることで精度があがるか評価するため、ロジスティック解析を行い、ROC 曲線を描いたところ $P<0.001$ と有意な所見であり、ROC 曲線の AUC は 0.710 であった。

図 12 に示すように、IgA 腎症の坂口分類との関係について、クローディン 1、CD68 陽性細胞数が組織分類に伴い、有意に増加していた。しかし、好中球エラスターゼ陽性細胞数は、組織分類と有意な関係を認めなかった。坂口分類 5、6 の症例は存在しなかった。

図 13 に示すように、プレドニゾロンやシクロスポリン A のような免疫抑制薬等あて臨床所見の改善を認めた 14 例（MCNS 2 名、MN 1 名、MPGN 1 名、IgA 腎症 2 名、non IgA 腎症 2 名、ANCA 関連血管炎（半月体形成性糸球体腎炎） 5

名、LN 1 名) において、治療後に尿沈渣中クロードイン 1 陽性細胞数および CD68 陽性細胞数は、治療前と比べて有意に減少した。好中球エラスターゼ陽性細胞数は有意な減少は認めなかったが、減少傾向が見られた。

図 1 4 に示すように、FSGS および MCNS との間で尿沈渣細胞中クロードイン 1、CD68、好中球エラスターゼ陽性細胞数に有意な差は認めなかった。

第 3 節 尿沈渣クロードイン 1、CD68 の mRNA と半月体との関係

病理組織の診断名にかかわらず半月体の有無や糸球体硬化率により分類した 2 群ごとの評価を行った。図 1 5 に示すように、GAPDH で補正した尿沈渣中クロードイン 1 mRNA レベル、CD68 mRNA レベルは、半月体の有無において有意な所見は認めなかった。しかし、AQP2 で補正した尿沈渣中クロードイン 1 mRNA レベル、CD68 mRNA レベルは、半月体のある症例において半月体のない症例と比較し、有意に高値であった。一方、GAPDH および AQP2 で補正した尿沈渣中クロードイン 1 mRNA レベル、CD68 mRNA レベルは、硬化糸球体が高度な症例と軽度な症例との間で有意な差を認めなかった。尿沈渣中の好中球エラスターゼ mRNA レベルは検出できなかったので図示していない。

図 1 6 に示すように、AQP2 で補正した尿沈渣中クロードイン 1 および CD68 mRNA レベルが半月体の有無をどれだけ予測できるかを評価するために、ロジスティック解析を行い、ROC 曲線を描いた。AQP2 で補正したクロードイン 1 および CD68 mRNA レベルと半月体陽性とのロジスティック解析においてそれぞれ $P = 0.037$ 、 $P < 0.001$ と有意な所見あり、ROC 曲線の AUC はそれぞれ 0.575、0.765、オッズ比はそれぞれ 1.047、3.365 であった。この AUC は、検査の有用性を評価するための指標であり、半月体のある患者の mRNA レベルが、半月体のない患者の mRNA レベルよりも高い確率に等しい。オッズ比は、mRNA レベルが 1 増えることにより、半月体が存在する可能性が上がる倍数を示す。

第4節 尿沈渣中マクロファージのフェノタイプと半月体の有無との関係

図17に示すように、尿沈渣のCD68 蛍光抗体染色においてみられるCD68 陽性マクロファージのサイズは、好中球より小さいものから尿細管上皮細胞より大きいものまで様々なバリエーションを認めた。マクロファージの分類はM1 マクロファージ、M2 マクロファージの少なくとも2種類存在し、M1 マクロファージは炎症組織傷害に関与するマクロファージ、M2 マクロファージは抗炎症作用があり修復に関与している(図18)。²⁰⁾ そこで、尿沈渣中のマクロファージのフェノタイプと半月体の有無および硬化糸球体との相関を検討した。

AQP2 で補正したM1 マクロファージと関連するiNOS、IL-6 mRNA レベルと半月体の有無および糸球体硬化の程度との関係を図19に示す。AQP2 で補正したiNOS、IL-6 mRNA レベルは半月体の有無では有意な差がみられなかった。また、糸球体硬化が高度の症例と糸球体硬化が軽度の症例との間でも有意な差がみられなかった。

AQP2 で補正したM2 マクロファージと関連するCD163、CD204、CD206、IL-10 mRNA レベルと半月体の有無および糸球体硬化の程度との関係を図20に示す。AQP2 で補正したCD163、CD204、CD206、IL-10 mRNA レベルは半月体がある症例で、半月体のない症例と比較して、有意に高値であった。AQP2 で補正したCD163、CD204、CD206、IL-10 mRNA レベルは、糸球体硬化が高度の症例と軽度の症例との間で有意な差がみられなかった。

図21に示すように、AQP2 で補正した尿沈渣中CD163、CD204、CD206、IL-10 mRNA レベルが半月体の有無をどれだけ予測できるかを評価するために、ロジスティック解析を行い、ROC 曲線を描いた。AQP2 で補正したCD163、CD204、CD206、IL-10 mRNA レベルと半月体陽性とのロジスティック解析においてそれぞれ $P<0.001$ 、 $P=0.029$ 、 $P=0.004$ 、 $P<0.001$ と有意な所見あり、ROC 曲線のAUCはそれぞれ0.747、0.722、0.698、0.697、オッズ比はそれぞれ1.023、1.010、1.140、1.926であった。

この AUC は、検査の有用性を評価するための指標であり、半月体のある患者の各種 mRNA レベルが、半月体のない患者の各種 mRNA レベルよりも高い確率に等しい。オッズ比は、各種 mRNA レベルが 1 増えることにより、半月体が存在する可能性が上がる倍数を示す。

第4章 考察

第1節 尿沈渣細胞と腎疾患活動性に関する先行研究

尿沈渣細胞と腎疾患活動性に関する報告は、ポドサイトに特異的にジフテリア毒素受容体を遺伝子導入したラットを使用し、ジフテリア毒素の投与によりポドサイトを傷害するとポドサイト構成蛋白の mRNA の尿中排泄が亢進するとする報告、¹⁵⁾ ピューロマイシン・アミノスクレオチド腎症モデルや抗 Thy 1.1 腎炎モデルや 5/6 腎摘モデルにおいて病勢と比例してポドサイトの尿中排泄が増加する報告がある。²¹⁾ 臨床においても糖尿病性腎症の活動性に比例してポドサイトの尿中排泄が増加する報告、²²⁾ FSGS やループス腎炎の活動性が高い時にポドサイトの尿中排泄が増加する報告、²³⁾ 小児腎炎患者におけるポドサイトの尿中排泄の報告、²⁴⁾ IgA 腎症や HSPN におけるポドサイトの尿中排泄の報告、²⁵⁾ 糖尿病性腎症、ループス腎炎、移植腎における尿沈渣中ポドサイトや炎症性サイトカイン由来の mRNA レベルの報告、²⁶⁻²⁸⁾ ループス腎炎における尿沈渣中 FOXP3 mRNA レベルの報告、²⁹⁾ 糖尿病性腎症における尿沈渣中ポドサイト関連 mRNA レベルの報告、^{30, 31)} FSGS、MN、MPGN の活動期にポドカリキシン陽性の壁側上皮細胞排泄が増加する報告³²⁾ 等多数みられる。しかし網羅的に尿沈渣中細胞を検討した報告は見当たらず、特に尿沈渣中クローディン 1 陽性細胞数や尿沈渣中好中球数を検討した報告は、私の検索しえた範囲では認められなかった。尿沈渣は、個人間において再現性を評価できるかは困難であり限界があると考えられる。今回は腎生検を行った同日の早朝尿を採取し検討を行い評価した。また膀胱炎等の炎症を完全に否定することはできていないが、腎生検をおこなう時点で重度の感染症は否定的であり、今回は尿路の炎症はない、もしくは軽度と考え検討した。

第2節 ヒトおよびマウス腎組織におけるクローディン 1 の分布

マウスの腎臓におけるクローデインの分布はよく調べられており、クローデイン 1 は腎臓においてボウマン嚢上皮細胞に特異的に発現している。^{6, 10, 13)} しかしヒトとマウスでは発現部位が異なり、ヒト腎組織においては遠位尿細管や集合管にもクローデイン 1 の発現がみられることが報告されている。³³⁾ 本研究においても集合管と思われる部位の一部に、クローデイン 1 は軽度に陽性であった。そのため、尿沈渣細胞のクローデイン 1 とサイトケラチンの二重染色をおこなった。一部の症例において、細胞が二重に染色する所見を認めたものの、ほとんどの症例では認められなかった。そのため、尿沈渣中におけるクローデイン 1 陽性細胞は主にボウマン嚢上皮細胞と考えた。

第 3 節 尿沈渣中クローデイン 1、CD68、好中球エラスターゼ陽性細胞と各種腎疾患

各種腎疾患ごとの特異性を判断するために、尿沈渣中のクローデイン 1、CD68、好中球エラスターゼ陽性細胞と各種疾患との関係について、平均値が高値であった ANCA を対照として多重比較を行うことを考え、ダネットの検定をおこなった。クローデイン 1 陽性細胞は、ANCA において IgAN、HSPN と比較して有意に多かった。CD68 陽性細胞は ANCA において有意な差を認めなかった。好中球エラスターゼ陽性細胞は、ANCA において MCNS、FSGS、MN、IgAN、DMN と比較して有意に多かった。しかし、ANCA において疾患特異性が高いとは言えなかった。理由としては、比較する疾患が多く、疾患それぞれにおいては数が少ないものもあったためと考える。各種陽性細胞数の平均値が比較的高値であった APSGN は腎生検の適応となるのが病態の活動性が高い症例であったり、LN は病態の活動性の低いものから高いものまで腎生検の適応があったりするため、腎生検時の尿沈渣細胞で疾患毎の特異性を判断することは難しいと判断した。しかし、半月体形成という病態の予想には役立つと考えた。

臨床的には治療という側面からすると疾患の鑑別よりも、むしろ、病態の評価、すなわち免疫抑制を必要とする状態かどうかの方が必要である。そこで、

病態における意義を認める可能性を考え、組織の活動性による評価をおこなった。

第4節 尿沈渣中クロードイン1陽性細胞の意義

尿中クロードイン1陽性細胞の存在が半月体形成を予測できるかを検討するために、クロードイン1陽性細胞と半月体形成の有無との相関を評価した。その結果、クロードイン1陽性細胞と半月体の有無に関して有意な相関を認めた(図7A)。また半月体の性状ごとでは、半月体なし症例と比較し、細胞性半月体症例において有意に増加していた(図7G)。硬化糸球体の程度とは相関を認めなかった。また半月体の形成率の増加に伴い尿中クロードイン1陽性細胞数が有意に増加していた(図8A)。さらに、クロードイン1陽性細胞数と半月体の存在とのロジスティック解析の結果から、尿沈渣中のクロードイン1陽性細胞数から半月体の存在をある程度予測できることを示した(図9A)。従って、血圧が高いことや安静を保てないなどの理由で腎生検が困難な症例や、過去に腎生検をしている症例の組織変化を評価するにあたり2度目以降の腎生検を行わなくても、尿沈渣中のクロードイン1陽性細胞を評価することで半月体の存在を予測できる可能性がある。さらに、臨床的治療効果があったと考えられる症例で腎炎の改善後の尿所見を検討したところ、尿中クロードイン1陽性細胞数の減少を認めた(図13A)。この結果もクロードイン1陽性細胞と半月体の存在との関係を強く示唆する所見と考える。

しかし腎生検所見で半月体を呈さない症例においても、尿沈渣中にクロードイン1陽性細胞が多い症例もあった。腎生検において半月体を認めないことが、必ずしも腎実質全体に半月体が存在しないことを意味しない。腎実質全体には半月体が存在するにもかかわらず、腎生検においては採取できていない可能性がある。¹⁾ そのことが、クロードイン1陽性細胞数と半月体との存在をみたロジスティック解析におけるROC曲線カーブのAUCが有意ではあったものの低値

であったことの原因の一つであると思われる。今後は糸球体数が多くとれた症例を集めて追加検討をすべきと考えている。

また蛍光免疫染色における陽性細胞数と尿蛋白の検討では、クローディン1陽性細胞数だけが有意な増加を認めた。クローディン1陽性細胞数はCD68陽性細胞や好中球エラスターゼ陽性細胞と異なり、炎症のみでなく、炎症の結果として傷害された糸球体基底膜から漏れ出した蛋白による壁側ボウマン嚢上皮細胞傷害を反映するものとする。

クローディン1陽性細胞数は、CD68陽性細胞数や好中球エラスターゼ陽性細胞数と同様に、尿中赤血球数の増加に伴い、有意に増加していた（図11A）。尿中赤血球は糸球体疾患と関連しており、³⁾ クローディン1陽性細胞を評価することが腎疾患の活動性を評価できることを示す結果と考える。

またクローディン1陽性細胞数は、CD68陽性細胞数と同様に、IgA腎症の坂口分類との関係においては組織分類に伴い、有意に増加していた。坂口分類とクローディン1陽性細胞との有意な関係を考えると、クローディン1を測定することはIgA腎症の組織予測につながる可能性が考えられた。IgA腎症の組織分類は日本においては日本腎臓学会が提唱する組織学的予後判定基準があり、最近ではオックスフォード分類が世界標準となっており、今後はそれぞれの組織分類における検討が必要と考える。

ポドサイト傷害による糸球体硬化には、ボウマン嚢上皮細胞の傷害や過形成が関与しており、¹⁶⁻¹⁸⁾ FSGSにおいてMCNSと比較してボウマン嚢上皮細胞が尿中に多く排泄されると予想した。そのため、FSGSおよびMCNSと診断された2群におけるクローディン1陽性細胞数を評価したが、有意な所見を認めなかった。有意な所見を認めなかったのは、ボウマン腔における尿蛋白が、疾患によらず壁側ボウマン嚢上皮細胞を傷害することが原因であったことによると考えた。クローディン1陽性細胞数は糸球体の炎症のみでなく尿蛋白のレベルにも強く規定されることが考えられる結果であった。

第5節 尿沈渣中 CD68 陽性細胞の意義

マクロファージの糸球体、尿細管、間質への浸潤は、各種腎炎においてみられ、その発症や進展への関与が考えられており、尿中マクロファージはヒトの MPGN、FSGS、DMN、急速進行性糸球体腎炎（rapidly progressive glomerulonephritis: RPGN）、IgA 腎症活動期、HSPN などで増多すると報告されている。^{3, 34-37)} 本研究において、CD68 陽性細胞は、クローディン 1 陽性細胞とともに、半月体の有無、特に細胞性、線維細胞性半月体の存在、半月体形成率、尿赤血球数の程度および IgA 腎症の組織分類と有意な関係を認めた。さらに、臨床的治療効果があったと考えられる症例で腎炎の改善後の尿所見を検討したところ、CD68 陽性細胞数の減少を認めた（図 1 3 B）。この結果も CD68 陽性細胞が半月体の存在との関係を強く示唆する所見と考える。

また尿沈渣中に出現する CD68 陽性細胞のサイズはごく小さいものから尿細管上皮程度の大きさまで様々なバリエーションがあった（図 1 7）。Oda らは活動性の高い IgA 腎症、RPGN、MPGN などで尿細管内や尿中に、成熟した胞体の大きいマクロファージ（ジャイアントマクロファージ）が出現すると報告している（図 2 2）。³⁸⁾ また腎臓の傷害が修復されるときにマクロファージのフェノタイプが変換されることや、³⁹⁾ 腎臓における感染や炎症、壊死において M1 マクロファージが誘導され、修復や線維化に M2 マクロファージが関与すると考えられており、⁴⁰⁾ 私も尿沈渣中に出現しているマクロファージのフェノタイプを評価した。

M1 マクロファージは、Th 1 細胞が産生する IFN- γ 単独あるいは IFN- γ と他のサイトカイン (TNF α , GM-CSF など) や細菌成分 (LPS など) との協同作用で誘導され、組織障害時、バクテリア、ウイルス、真菌類の感染時、腫瘍に対する防御など、とりわけ炎症の悪化にかかわるマクロファージである。それに対して、M2 マクロファージは、Th2 細胞が産生する IL-4 や IL-13 などのサイトカインにより誘導され、寄生虫感染、アレルギー応答、免疫調整、脂質代謝、創傷治癒、

癌転移、抗炎症作用、線維化促進因子の産生、とりわけ組織修復にかかわるマクロファージである。また M2 マクロファージには、M2a、M2b、M2c の 3 つのサブタイプがあり、M2a マクロファージは IL-4 や IL-13 で誘導され、M2b マクロファージ(別名 : Type II activated マクロファージ)は免疫複合体により Fc レセプターを介して、M2c マクロファージは IL-10 や糖質コルチコイドホルモンによって誘導される。²⁰⁾

本研究において、AQP2 で補正した M1 マクロファージと関連する iNOS、IL-6 は、半月体の有無で有意差を認めなかったのに対し、AQP2 で補正した M2 マクロファージのマーカーである CD168、CD204、CD206、M2 マクロファージが主に分泌する IL-10 mRNA は半月体の存在する症例において、半月体のない症例と比べて高値であった。そのため、半月体の存在と関連する尿沈渣中のマクロファージは M2 マクロファージが優位である可能性が考えられた。Oda ら³⁸⁾ は、活動性の高い腎炎時に尿中に出現しているジャイアントマクロファージは、M2 マクロファージのマーカーである CD163、CD204 が陽性であることを報告した(図 2 3)。さらに、今回の M2 マクロファージと関連する mRNA レベルと半月体の存在とのロジスティック解析の結果から、尿沈渣中の M2 マクロファージと関連する mRNA レベルは半月体の存在を予測できることが強く示唆された。

第 6 節 尿沈渣中好中球エラスターゼ陽性細胞の意義

尿沈渣中の好中球数と腎疾患の病態との関連に関する報告は、検索した範囲では見当たらなかったが、本研究で尿沈渣中の好中球エラスターゼ陽性細胞数と半月体の存在との関連が示された。好中球は腎組織の損傷において、特に半月体を形成する腎炎において、重要な役割を演ずることが考えられている。⁴¹⁾ 半月体形成性腎炎においては活性化された好中球を中心とした炎症細胞が産生するサイトカイン、活性酸素、蛋白分解酵素、補体、凝固系などを介して毛細血管壁の傷害や基底膜の断裂を生じる。⁴²⁾ また ANCA という自己抗体そのものが

血管内皮細胞を直接活性化して、接着分子やケモカインレセプターの発現を誘導して、好中球の浸潤に関与している。⁴³⁾ 本研究で腎炎における疾患活動性を予測する際に尿沈渣中の好中球をモニターすることは、病勢を評価することに有用であるという結果が得られた。

しかし、坂口分類のクラス分けとの関係や臨床上改善した症例の治療前後の比較においては有意な所見を認めなかった。そのため、好中球エラスターゼ陽性細胞での疾患活動性の評価は、クローディン1やCD68陽性細胞と比較してやや劣る可能性がある。

好中球に関連した mRNA の発現レベルについては Human ELANE (elastase, neutrophil expressed)、Human CEACAM8 (CD66b)、Human FCGR3A (CD16a)、Human MPO (myeloperoxidase) の 4 つのプライマープローブを使用して検討したが、検出できなかった。尿沈渣中の好中球には蛋白の産生能力が低い可能性が考えられた。

第 7 節 AQP2で標準化した理由

リアルタイム RT-PCR においては多数のプレートを使用するため、SLE の 1 症例をプレート間のコントロールとして使用した。健常者をコントロールとしなかった理由として健常者においてはほとんど検出されない mRNA の検出を行っていること、コントロールとした症例の尿沈渣細胞からの total RNA が他の症例と比較し多く抽出できたためである。しかし根本的な事項として、mRNA を相対比較としてではなく、むしろ絶対値での比較をすべきかもしれない点は今後検討すべき問題と考える。

また RT-PCR においてインターナル・コントロールとしては GAPDH の発現を調べることが一般的であり、本研究においても GAPDH をインターナル・コントロールとして RT-PCR を行ったものの有意な所見を認めなかった。原因として、尿沈渣中に腎実質由来でない尿路における尿管上皮や膀胱上皮などが出現し、そ

これらの細胞の GAPDH が結果を修飾している可能性が考えられた。そこで腎実質由来の細胞に発現する遺伝子としてすでに報告されている AQP2 での標準化も行った。¹⁵⁾ そのことにより、クロードイン 1 mRNA レベルと CD68 mRNA レベルの検討では蛍光染色での陽性細胞数での評価と同様の結果が得られ、直接に沈渣細胞数を計測しなくても疾患活動性を評価できる可能性が期待された。しかし、沈渣細胞が少なく RNA 抽出の限界もあり検討できた症例数が少なかったため、今後症例数をさらに増やして検討する必要がある。

第 8 節 今後の課題

腎疾患の予後を予測するために腎炎の活動性を評価することは重要であり、特に半月体の存在を評価することは重要である。今回の検討では尿中クロードイン 1、CD68、好中球エラスターゼ陽性細胞が半月体の有無、半月体の形成率との有意な関係を認めたものの、単施設の検討であり、ロジスティック回帰では AUC が尿中赤血球数のクラス分けの AUC より低値になっている点や、半月体の存在を評価する上での腎生検の限界など、多くの点で検討の余地がある。^{44, 45)} しかし今後症例数を増やし、糸球体数が多い症例での検討していくことや多施設での検討をおこなうことにより、糸球体における半月体の存在を診断できる可能性、腎生検ができない症例での治療判断に貢献できる可能性があり、本研究はそれなりの価値があると思われる。

第5章 結語

ボウマン嚢上皮細胞は、第1のバリアであるスリット障壁が傷害されてボウマン腔へ出てしまった蛋白が腎間質へ入っていかないようにするための、第2のバリアである。そのボウマン嚢上皮細胞が各種腎疾患により傷害され、尿中に出現する。そのため尿沈渣中のボウマン嚢上皮細胞に特異的に発現するクロードイン1陽性細胞数が、腎疾患の活動性、特に半月体形成、尿蛋白、尿中赤血球、IgA腎症の組織分類、腎疾患の治療効果と関係することを200症例の尿の解析から示すことができた。

マクロファージが発現するCD68陽性細胞数も同様に腎疾患の活動性、特に半月体形成、尿中赤血球、IgA腎症の組織分類、腎疾患の治療効果と関係することを示すことができた。AQP2で補正した尿沈渣中のクロードイン1 mRNA レベル、CD68 mRNA レベルにおいても糸球体における半月体形成と関係することを示すことができた。

またAQP2で補正した尿沈渣中のマクロファージのフェノタイプであるM2マクロファージと関連する mRNA レベルを測定することは、糸球体における半月体形成と関係することを示すことができた。

これらのことは、血圧が高いことや安静を保てないなどの理由で腎生検が困難な症例や、過去に腎生検をしている症例の組織変化を評価するにあたり2度目以降の腎生検を行わなくても、糸球体疾患の病態を評価でき、投与薬剤を選択、増減する際に有用である可能性が考えられた。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました防衛医科大学校内科学講座 1（腎臓内分泌内科）教授 熊谷裕生博士に感謝申し上げます。

また、御指導頂きました防衛医科大学校内科学講座 1（腎臓内分泌内科）准教授 尾田高志博士、講師 大島直紀博士に感謝申し上げます。

本研究の施行に際し、貴重な御助言、御協力を賜りました防衛医科大学校衛生公衆衛生学講座 教授 櫻井裕博士および佐藤弘樹先生、内科学講座 1（腎臓内分泌内科）ならびに内科学講座 2（消化器内科）教室員諸先生に深く感謝の意を表します。

引用文献

- 1) Hotta O, Taguma Y, Sudo K, Kurosawa K. Limitation of kidney biopsy in detecting crescentic lesions in IgA nephropathy. *Nephron*. 1993; 65(3): 472-473.
- 2) Hotta O, Taguma Y, Yusa N, Ooyama M. Analysis of mononuclear cells in urine using flow cytometry in glomerular diseases. *Kidney Int Suppl*. 1994; 47: S117-S121.
- 3) Hotta O, Kitamura H, Taguma Y. Detection of mature macrophages in urinary sediments: clinical significance in predicting progressive renal disease. *Ren Fail*. 1998; 20(2): 413-418.
- 4) Kawachi H, Miyauchi N, Suzuki K, Han GD, Orikasa M, Shimizu F. Role of podocyte slit diaphragm as a filtration barrier. *Nephrology*. (Carlton) 2006; 11(4): 274-281.
- 5) Zoja C, Benigni A, Remuzzi G. Cellular responses to protein overload: key event in renal disease progression. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2004; 13(1): 31-37.
- 6) Ohse T, Chang AM, Pippin JW, Jarad G, Hudkins KL, Alpers CE, et al. A new function for parietal epithelial cells: a second glomerular barrier. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009; 297(6): F1566-F1574.
- 7) Smeets B, Uhlig S, Fuss A, Mooren F, Wetzels JF, Floege J, et al. Tracing the origin of glomerular extracapillary lesions from parietal epithelial cells. *J Am Soc Nephrol*. 2009; 20(12): 2604-2615.
- 8) Sicking EM, Fuss A, Uhlig S, Jirak P, Dijkman H, Wetzels J, et al. Subtotal ablation of parietal epithelial cells induces crescent formation. *J Am Soc Nephrol*. 2012; 23(4): 629-640.
- 9) Farquhar MG, Palade GE. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol*. 1963; 17: 375-412.
- 10) Kiuchi-Saishin Y, Gotoh S, Furuse M, Takasuga A, Tano Y, Tsukita S. Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. *J Am Soc Nephrol*. 2002; 13(4): 875-886.

- 11) Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol.* 1998; 141(7): 1539-1550.
- 12) Hou J. Lecture: New light on the role of claudins in the kidney. *Organogenesis.* 2012; 8(1): 1-9.
- 13) Angelow S, Ahlstrom R, Yu AS. Biology of claudins. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008; 295(4): F867-F876.
- 14) Kushiyama T, Oda T, Yamada M, Higashi K, Yamamoto K, Oshima N, et al. Effects of liposome-encapsulated clodronate on chlorhexidine gluconate-induced peritoneal fibrosis in rats. *Nephrol Dial Transplant.* 2011; 26(10): 3143-3154.
- 15) Sato Y, Wharram BL, Lee SK, Wickman L, Goyal M, Venkatareddy M, et al. Urine podocyte mRNAs mark progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2009; 20(5): 1041-1052.
- 16) Appel D, Kershaw DB, Smeets B, Yuan G, Fuss A, Frye B, et al. Recruitment of podocytes from glomerular parietal epithelial cells. *J Am Soc Nephrol.* 2009; 20(2): 333-343.
- 17) Kriz W, LeHir M. Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases-insights from animal models. *Kidney Int.* 2005; 67(2): 404-419.
- 18) Smeets B, Kuppe C, Sicking EM, Fuss A, Jirak P, van Kuppevelt TH, et al. Parietal epithelial cells participate in the formation of sclerotic lesions in focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol.* 2011; 22(7): 1262-1274.
- 19) Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZ' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant.* 2013; 48(3): 452-458.
- 20) Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004; 25(12): 677-686.
- 21) Yu D, Petermann A, Kunter U, Rong S, Shankland SJ, Floege J. Urinary podocyte loss is a more specific marker of ongoing glomerular damage than proteinuria. *J Am Soc Nephrol.* 2005; 16(6): 1733-1741.

- 22) Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, Hara M, Shimada N, Ebihara I, et al. Urinary excretion of podocytes in patients with diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2000; 15(9): 1379-1383.
- 23) Vogelmann SU, Nelson WJ, Myers BD, Lemley KV. Urinary excretion of viable podocytes in health and renal disease. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003; 285(1): F40-F48.
- 24) Hara M, Yanagihara T, Kihara I, Higashi K, Fujimoto K, Kajita T. Apical cell membranes are shed into urine from injured podocytes: a novel phenomenon of podocyte injury. *J Am Soc Nephrol*. 2005; 16(2): 408-416.
- 25) Hara M, Yanagihara T, Kihara I. Cumulative excretion of urinary podocytes reflects disease progression in IgA nephropathy and Schonlein-Henoch purpura nephritis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2007; 2(2): 231-238.
- 26) Wang G, Lai FM, Lai KB, Chow KM, Li KT, Szeto CC. Messenger RNA expression of podocyte-associated molecules in the urinary sediment of patients with diabetic nephropathy. *Nephron Clin Pract*. 2007; 106(4): c169-179.
- 27) Wang G, Szeto CC. Quantification of gene expression in urinary sediment for the study of renal diseases. *Nephrology. (Carlton)* 2007; 12(5): 494-499.
- 28) Wang G, Lai FM, Tam LS, Li KM, Lai KB, Chow KM, et al. Messenger RNA expression of podocyte-associated molecules in urinary sediment of patients with lupus nephritis. *J Rheumatol*. 2007; 34(12): 2358-2364.
- 29) Wang G, Lai FM, Tam LS, Li EK, Kwan BC, Chow KM, et al. Urinary FOXP3 mRNA in patients with lupus nephritis--relation with disease activity and treatment response. *Rheumatology. (Oxford)* 2009; 48(7): 755-760.
- 30) Wang G, Lai FM, Lai KB, Chow KM, Kwan BC, Li KT, et al. Intra-renal and urinary mRNA expression of podocyte-associated molecules for the estimation of glomerular podocyte loss. *Ren Fail*. 2010; 32(3): 372-379.
- 31) Zheng M, Lv LL, Ni J, Ni HF, Li Q, Ma KL, et al. Urinary podocyte-associated mRNA profile in various stages of diabetic nephropathy. *PloS One*. 2011; 6(5): e20431.

- 32) Johannes A, Michael M, Irini T, et al. Parietal epithelia cells in the urine as a marker of disease activity in glomerular diseases. *Nephrol Dial Transplant*. 2008; 23(10): 3138-3145.
- 33) Kirk A, Campbell S, Bass P, Mason J, Collins J. Differential expression of claudin tight junction proteins in the human cortical nephron. *Nephrol Dial Transplant*. 2010; 25(7): 2107-2119.
- 34) Hotta O, Yusa N, Kitamura H, Taguma Y. Urinary macrophages as activity markers of renal injury. *Clin Chim Acta*. 2000; 297(1-2): 123-133.
- 35) 齋藤 陽, 生駒 雅昭, 神山 智恵子, 土井 啓司, 小坂橋 靖. 小児腎疾患における尿中および腎組織浸潤 CD68 陽性細胞の検討. *日腎会誌*. 2002; 44(8): 798-805.
- 36) Maruhashi Y, Nakajima M, Akazawa H, Shimoyama H, Nishiguchi M, Yamoto Y, et al. Analysis of macrophages in urine sediments in children with IgA nephropathy. *Clin Nephrol*. 2004; 62(5): 336-343.
- 37) Sakatsume M, Gejyo F. Effector T cells and macrophages in urine as a hallmark of systemic vasculitis accompanied by crescentic glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant*. 2003; 18(3): 607-609.
- 38) Oda T, Hotta O, Taguma Y, Kitamura H, Sugai H, Onodera S, et al. Clinicopathological significance of intratubular giant macrophages in progressive glomerulonephritis. *Kidney Int*. 1998; 53(5): 1190-1200.
- 39) Lee S, Huen S, Nishio H, Nishio S, Lee HK, Choi BS, et al. Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair. *J Am Soc Nephrol*. 2011; 22(2): 317-326.
- 40) Anders HJ, Ryu M. Renal microenvironments and macrophage phenotypes determine progression or resolution of renal inflammation and fibrosis. *Kidney Int*. 2011; 80(9): 915-925.
- 41) Oda T, Hotta O, Taguma Y, Kitamura H, Sudo K, Horigome I, et al. Involvement of neutrophil elastase in crescentic glomerulonephritis. *Hum Pathol*. 1997; 28(6): 720-728.

- 42) Belmont HM, Abramson SB, Lie JT. Pathology and pathogenesis of vascular injury in systemic lupus erythematosus. Interactions of inflammatory cells and activated endothelium. *Arthritis Rheum.* 1996; 39(1): 9-22.
- 43) Nagao T, Matsumura M, Mabuchi A, Ishida-Okawara A, Koshio O, Nakayama T, et al. Up-regulation of adhesion molecule expression in glomerular endothelial cells by anti-myeloperoxidase antibody. *Nephrol Dial Transplant.* 2007; 22(1): 77-87.
- 44) Lemley KV. An introduction to biomarkers: applications to chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol.* 2007; 22(11): 1849-1859.
- 45) Siew ED, Ware LB, Ikizler TA. Biological markers of acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol.* 2011; 22(5): 810-820.

図 表

表1 患者背景

診断は臨床所見および腎生検による組織所見に基づいて行った。カッコ内はリアルタイム RT-PCR において AQP2 が検出でき、検討した症例数を示している。

性別（男性/女性）	102 名 /98 名
平均年齢	44±18 歳
平均血清クレアチニン（mg/dl）	1.15±0.99
平均血清アルブミン（g/dl）	3.44±1.25
平均尿蛋白（g/gCr）	2.09±3.27

診断。（ ）内は本研究における略称。	数（AQP2 検出数）	
微小変化群（MCNS）	15	(5)
巣状糸球体硬化症（FSGS）	22	(18)
膜性腎症（MN）	19	(9)
膜性増殖性糸球体腎炎（MPGN）	1	(1)
メサングウム増殖性腎炎：IgA 腎症（IgAN）	73	(32)
non-IgA 腎症（non-IgAN）	5	
溶連菌感染後急性糸球体腎炎（APSGN）	4	(2)
ヘノッホ・シェーンライン紫斑病（HSPN）	10	(5)
ANCA 関連血管炎（半月体形成性腎炎、ANCA）	11	(7)
ループス腎炎（LN）	9	(3)
糖尿病性腎症（DMN）	8	(5)
アミロイドーシス（Amyloidosis）	5	
菲薄基底膜病（TBM）	3	(1)
尿細管間質性腎炎（TIN）	6	(3)
ファブリー病（Fabry）	1	(1)
腎硬化症（NS）	2	
微小変化のみ（MGA）	6	(1)
計	200 名	(93)

AQP2：アクアポリン2（aquaporin 2）

表2 本研究で使用した抗体

抗体、クローン、標的細胞、メーカーを表記した。

	抗体	クローン	標的細胞	メーカー
1 次抗体	Rabbit Anti-claudin1		ボウマン嚢 上皮細胞	Bioworld Technology, MN, USA
	Mouse Anti-CD68	EBM11	マクロファージ	Dako, Glostrup, Denmark
	Rabbit Anti-Neutrophil Elastase		好中球	Calbiochem, La Jolla, CA, USA
	Mouse Anti-synaptopodin	G1D4	ポドサイト	Progen, Heidelberg, Germany
	Mouse Anti-cytokeratin	KL-1	尿細管上皮 細胞	IMMUNOTECH, Monrovia, CA, USA
	Rabbit Anti-Human CD3		T-細胞	Dako, Glostrup, Denmark
2 次抗体	goat anti-rabbit IgG AF594			Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
	goat anti-mouse IgG AF488			Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

表3 使用プローブ

リアルタイム RT-PCR に関するすべての検討においてタックマン・プライマー
プローブを使用した。

TaqMan Probes

Human CLDN1 (クローデイン1)	(cat. No. Hs00221623_m1)
Human ELANE (好中球エラスターゼ)	(cat. No. Hs00236952_m1)
Human CEACAM8 (CD66b : 好中球)	(cat. No. Hs00266198_m1)
Human FCGR3A (CD16a : 好中球)	(cat. No. Hs01569121_m1)
Human MPO (ミエロペルオキシダーゼ : 好中球)	(cat. No. Hs00924296_m1)
Human CD68 (マクロファージ)	(cat. No. Hs00154355_m1)
Human ISYNA1(iNOS : 誘導一酸化窒素合成酵素)	(cat. No. Hs01126940_gH)
Human IL6 (M1 と関連するサイトカイン)	(cat. No. Hs00985639_m1)
Human CD163 (M2 と関連するマーカー)	(cat. No. Hs00174705_m1)
Human CD204 (M2 と関連するマーカー)	(cat. No. Hs00234007_m1)
Human CD206 (M2 と関連するマーカー)	(cat. No. Hs00267207_m1)
Human IL10 (M2 と関連するサイトカイン)	(cat. No. Hs00961622_m1)
Human GAPDH (グリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素)	(cat.No.Hs99999905_m1)
Human AQP2 (アクアポリン2)	(cat. No. Hs00166640_m1)

表 4 IgA 腎症の組織分類 (坂口弘)

IgA 腎症の組織分類として元慶應義塾大学医学部病理学教授・坂口弘先生の分類を使用した。

坂口弘：「新腎生検の病理 腎臓病アトラス」(診断と治療社) 2003 年 P74 を引用。

IgA-1	微小変化 (minor)
IgA-2	微小巣状分節性増殖性変化 (minor focal segmental mild accentuation)
IgA-3	軽度びまん性増殖性変化 (diffuse proliferative mild)
IgA-4	軽度びまん性増殖性変化、中等度巣状分節性増殖性変化 (diffuse proliferative mild focal segmental moderate accentuation)
IgA-5	中等度びまん性増殖性変化 (diffuse proliferative moderate)
IgA-6	高度びまん性増殖性変化 (diffuse proliferative advanced)

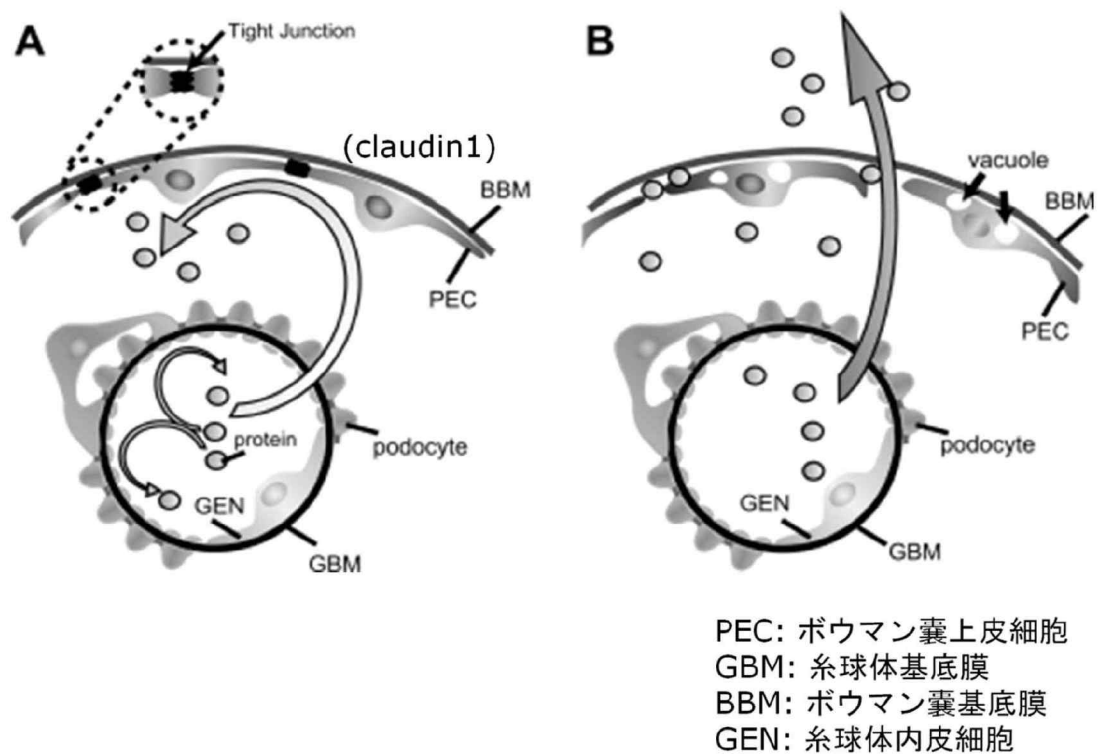


図1 ボウマン囊上皮細胞におけるクローディン1の部位と役割。

A 糸球体濾過障壁（第1のバリア）がポドサイト傷害などで破たんしても、ボウマン囊上皮細胞はtight junction (TJ) により強く結合しており（第2のバリア）、間質への蛋白の漏出はおこらない。

B 半月体を形成する疾患などでボウマン囊上皮細胞が傷害を受けた場合はTJも傷害され、蛋白が間質へ取り込まれ、間質の傷害が起こりうる。この時TJを構成する分子の1つであるクローディン1を含む細胞が尿中に現われうる。

Ohse T. et al. Am J Physiol Renal Physiol. 2009; 297:1566-1574.を引用。

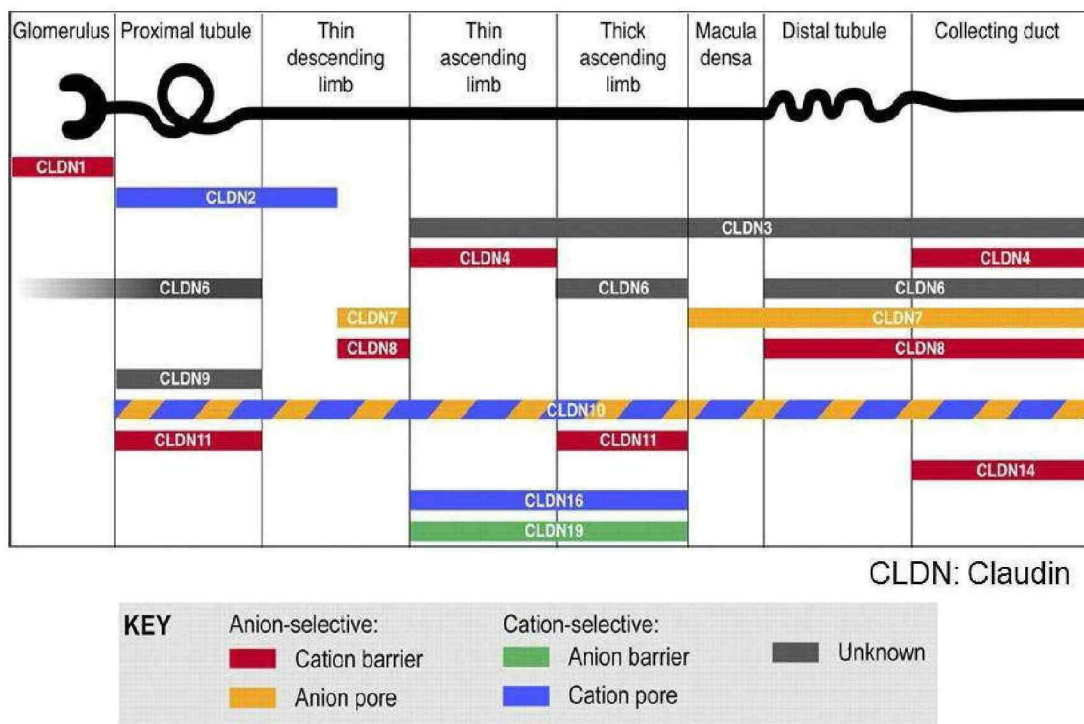


図2 マウス腎におけるクローデインの局在。

マウス腎臓におけるクローデインの分布は詳細に検討されており、クローデイン1はボウマン嚢上皮細胞に特異的に発現している。

Angelow S. et al. Am J Physiol Renal Physiol. 2008; 295: F867-F876.を引用。

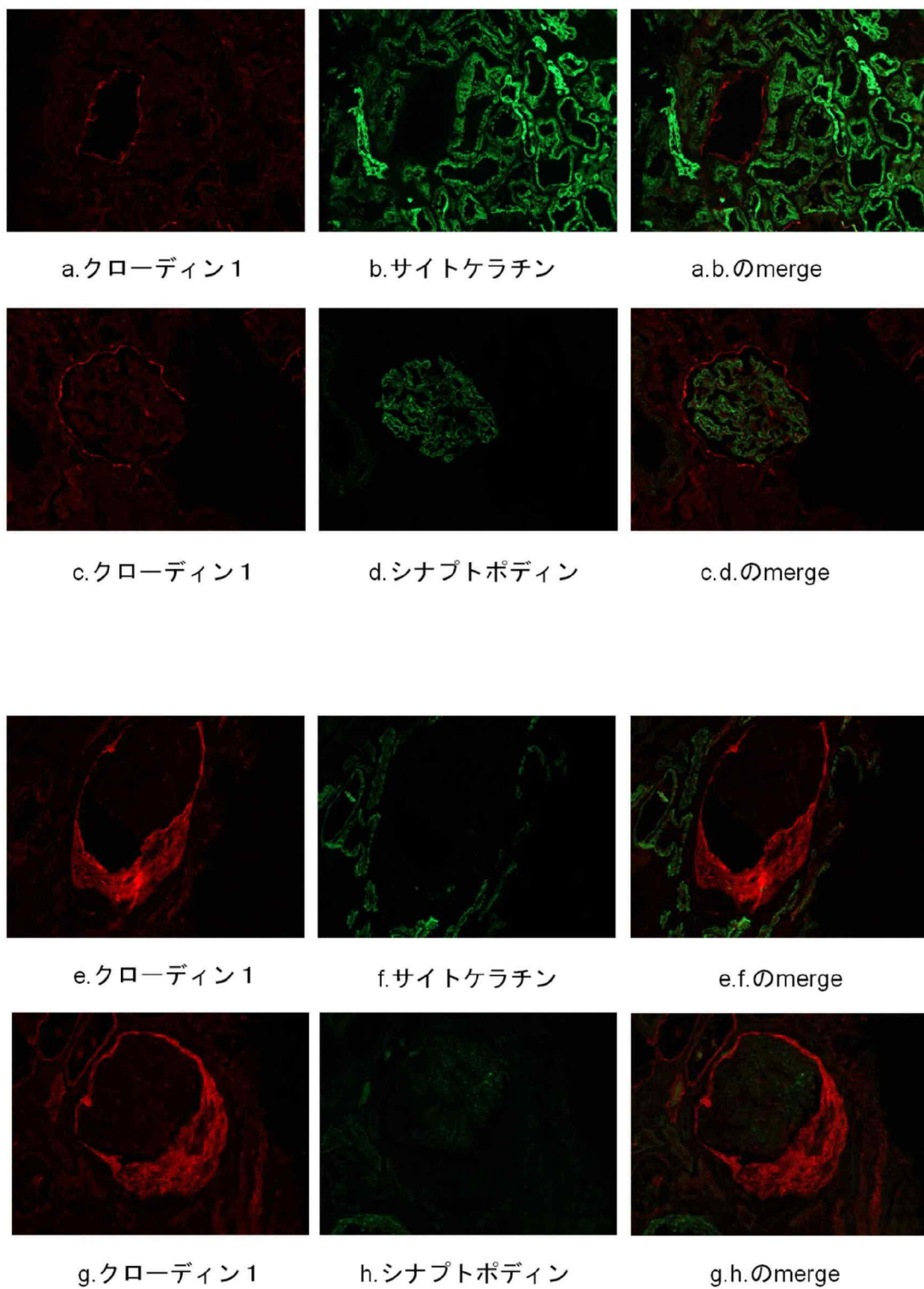
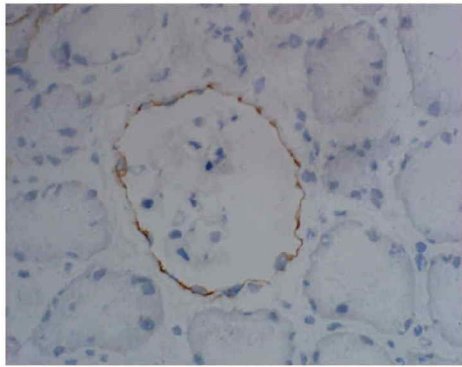
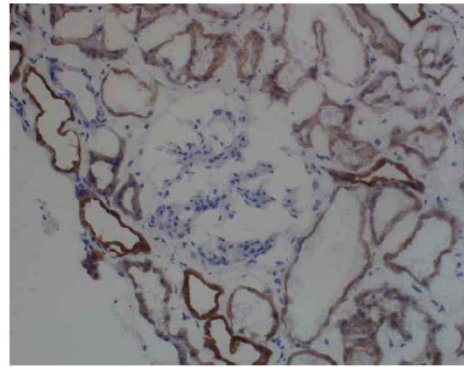


図 3



i. クローディン 1



j. サイトケラチン

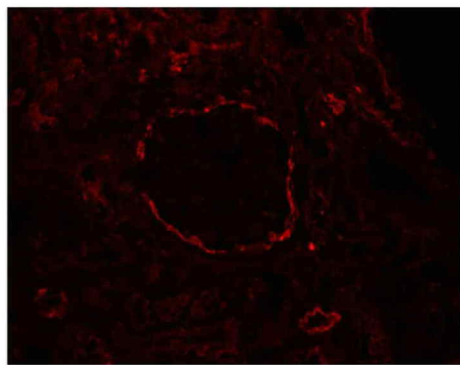
図3 微小変化のみ（MGA）を呈する患者の腎組織、および半月体形成性糸球体腎炎患者の腎組織におけるクローディン1とサイトケラチンおよびシナプトポディンとの免疫蛍光染色の二重染色とクローディン1およびサイトケラチンの免疫組織化学染色。

a-d. MGA 患者の腎組織における免疫蛍光染色。a. c. クローディン1、b. サイトケラチン、d. シナプトポディンによる染色。a. b. および c. d. の merge を右端に示した。a. と c. のようにボウマン囊上皮細胞と考えられる部位にクローディン1の陽性所見が得られた。一方、サイトケラチンおよびシナプトポディン染色と二重に染色される所見はほとんど認めなかった。

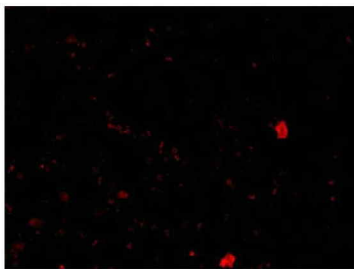
e-h. 半月体形成性糸球体腎炎患者の腎組織における免疫蛍光染色。e. g. クローディン1、f. サイトケラチン、h. シナプトポディンによる染色。e. f. および g. h. の merge を右端に示した。半月体を形成している部位にクローディン1染色の陽性所見が得られた（e. と g. ）。一方、サイトケラチンおよびシナプトポディン染色とクローディン1が二重に染色される所見はほとんど認めなかった。

i. j. 微小変化のみ（MGA）を呈する患者の腎組織の免疫組織化学染色においても、クローディン1陽性細胞（i.）は、ボウマン囊上皮細胞と考えられる部位に見られ、サイトケラチンの陽性部位（j.）とは分布が異なっていた。

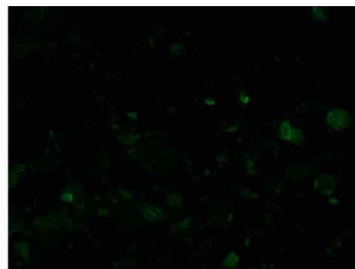
（写真は顕微鏡において a-h. 400 倍，i. j. 200 倍で撮影。）



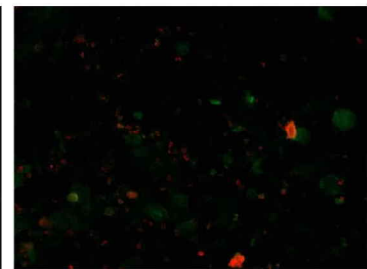
a. クローディン 1



b. クローディン 1



c. サイトケラチン



b.c. の merge

図4 微小変化のみの患者の腎組織におけるクローディン 1 染色、およびその患者の尿沈渣のクローディン 1 およびサイトケラチン陽性細胞。

a. 微小変化のみの患者腎組織におけるクローディン 1 染色 (400 倍)。クローディン 1 染色においてボウマン囊上皮以外に遠位尿細管や集合管と思われる部位に染色がみられる。

b. サイトスピンを行った尿沈渣細胞のクローディン 1 染色 (100 倍)。c. サイトスピンを行った尿沈渣細胞のサイトケラチン染色 (100 倍)。b. c. の merge を右端に示す。ほとんどの症例で二重染色されることはなかった。

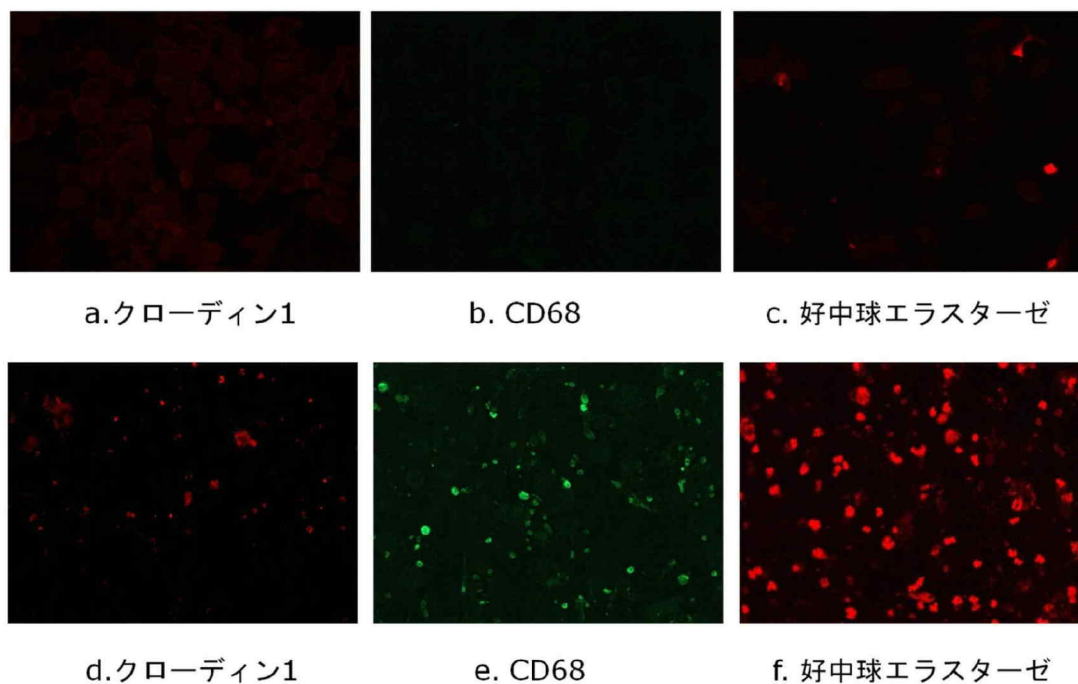


図5 尿沈渣細胞の蛍光免疫染色の代表例。

a-c. 糸球体に半月体形成を認めない症例の代表的な尿沈渣細胞免疫染色。a. クローディン1、b. CD68、c. 好中球エラスターゼ。

d-f. 糸球体に半月体形成を伴う症例の代表的な尿沈渣細胞免疫染色。d. クローディン1、e. CD68、f. 好中球エラスターゼ。

糸球体に半月体形成を伴う症例でクローディン1陽性細胞、CD68陽性細胞、好中球エラスターゼ陽性細胞が増多している所見を得た。

(写真はすべて顕微鏡において100倍で撮影。)

A クローデイン1 陽性細胞

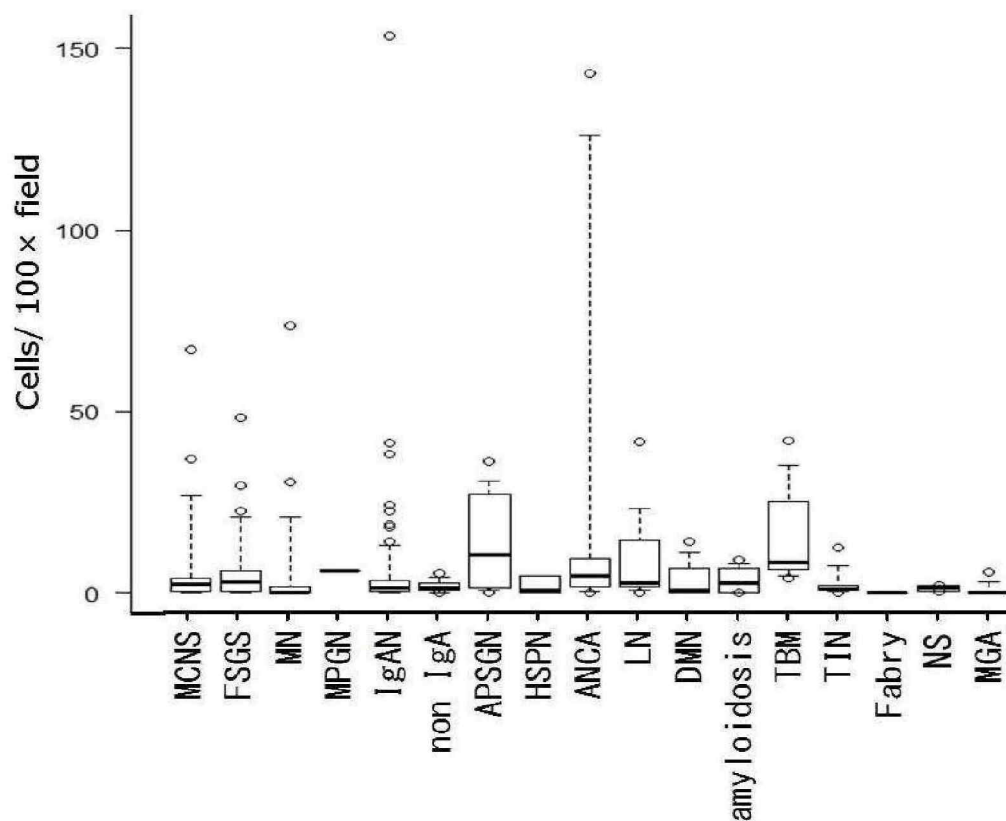


図6 臨床所見および腎生検で診断した疾患ごとのクローデイン1 陽性細胞数の検討

MCNS：微小変化群、FSGS：巣状糸球体硬化症、MN：膜性腎症、MPGN：膜性増殖性糸球体腎炎、IgAN：IgA腎症、non-IgAN：non-IgA腎症、APSGN：溶連菌感染後急性糸球体腎炎、HSPN：ヘノッホ・シェーンライン紫斑病、ANCA：ANCA関連血管炎（半月体形成性糸球体腎炎）、LN：ループス腎炎、DMN：糖尿病性腎症、Amyloidosis：アミロイドーシス、TBM：糸球体基底膜菲薄症、TIN：尿細管間質性腎炎、Fabry：ファブリー病、NS：腎硬化症、MGA：微小変化のみ

A：尿中クローデイン1陽性細胞数は、ANCAにおいて、IgAN、HSPNと比較して有意に多かった（ $p < 0.05$ ，ダネットの検定）。

B CD68 陽性細胞

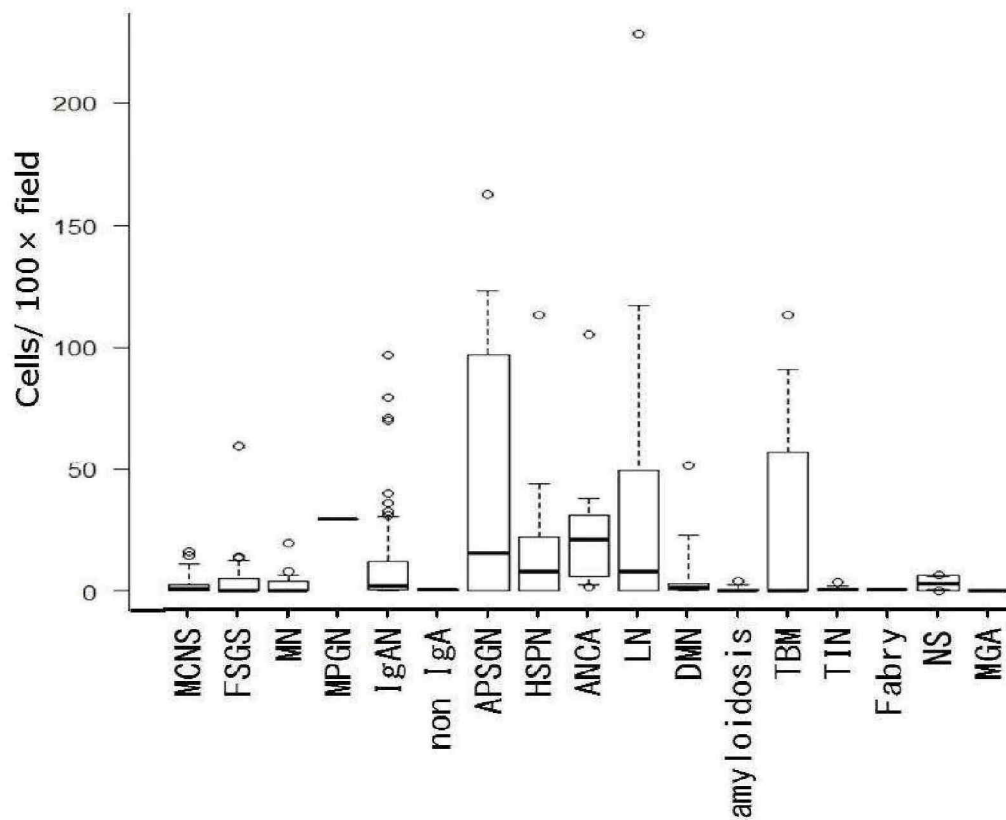


図6 臨床所見および腎生検で診断した疾患ごとのCD68陽性細胞数の検討

B:尿中CD68陽性細胞数は、ANCAにおいて、他の疾患と比較して有意な差を認めなかった（ダネットの検定）。

C 好中球エラスターゼ陽性細胞

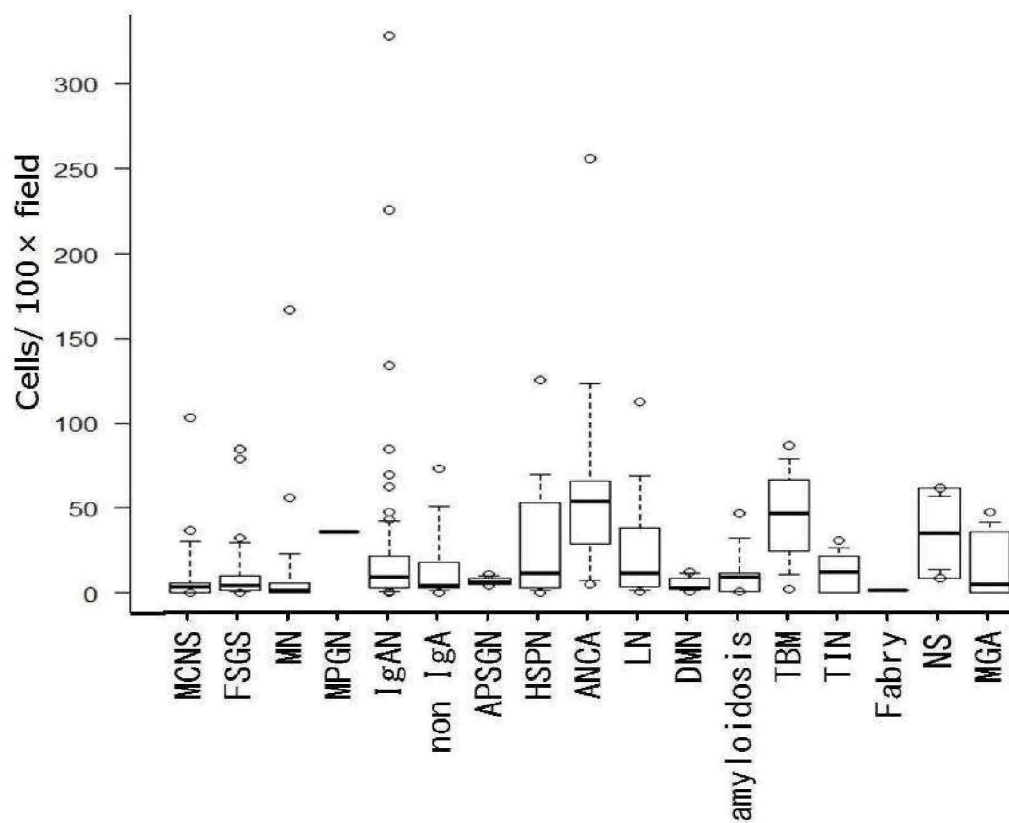
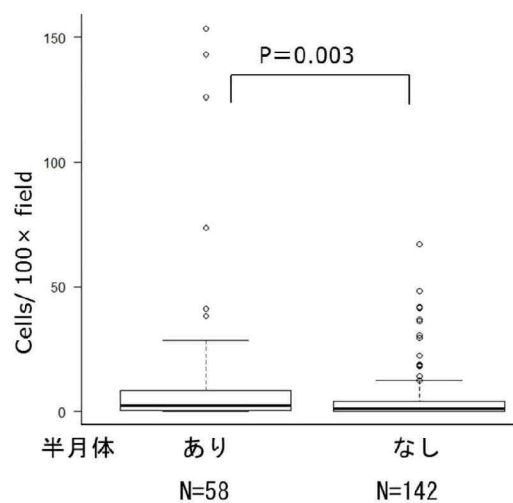


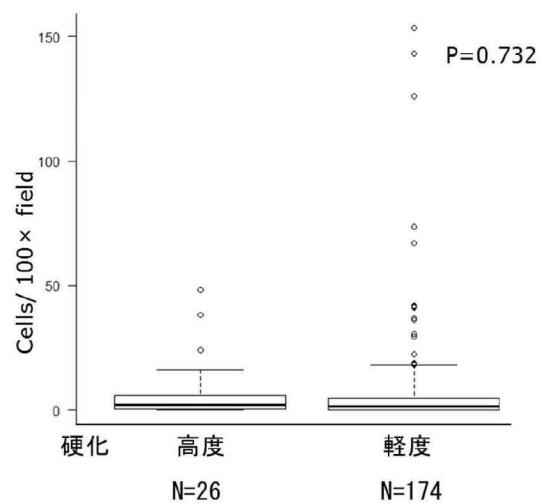
図6 臨床所見および腎生検で診断した疾患ごとの好中球エラスターゼ陽性細胞数の検討。

C:尿中好中球エラスターゼ陽性細胞は、ANCAにおいて、MCNS、FSGS、MN、IgAN、DMNと比較して有意に多かった（ $p < 0.05$ ，ダネットの検定）。

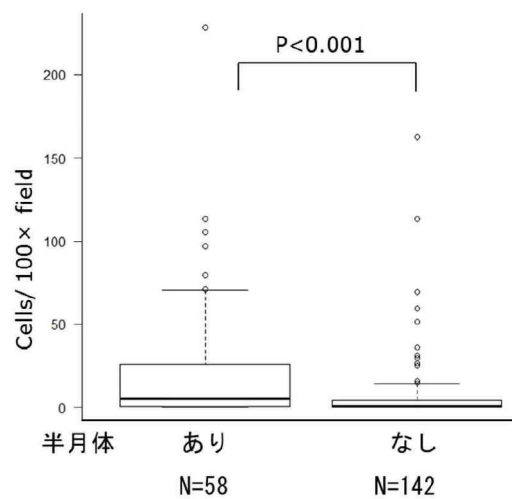
A 半月体の有無と
クロロディン1陽性細胞数との関係



B 糸球体硬化の程度と
クロロディン1陽性細胞数との関係



C 半月体の有無と
CD68陽性細胞数との関係



D 糸球体硬化の程度と
CD68陽性細胞数との関係

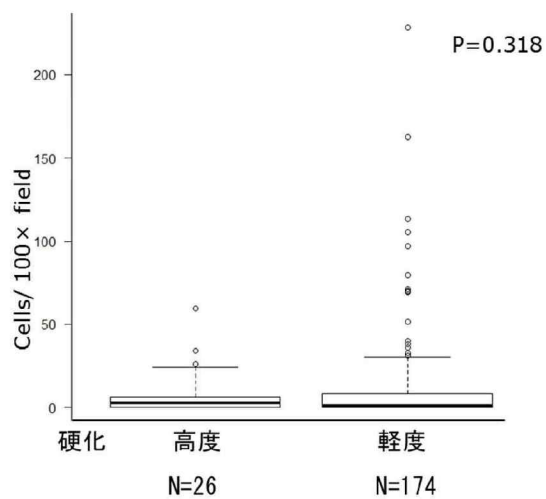
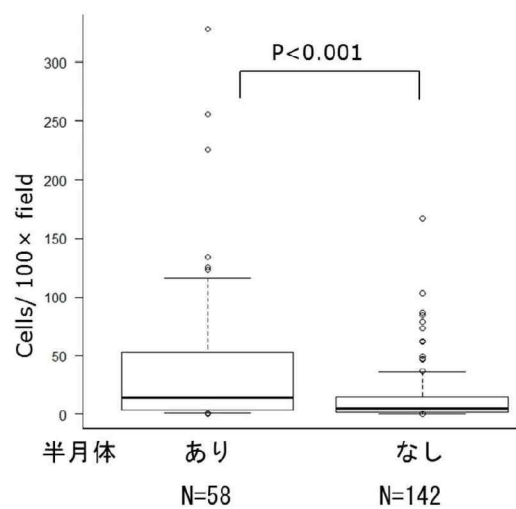
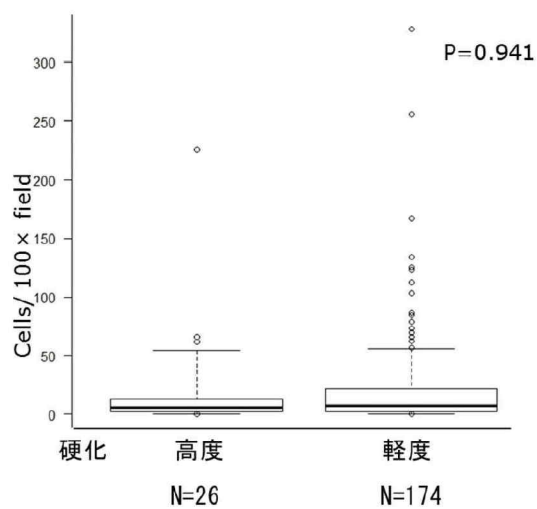


図 7

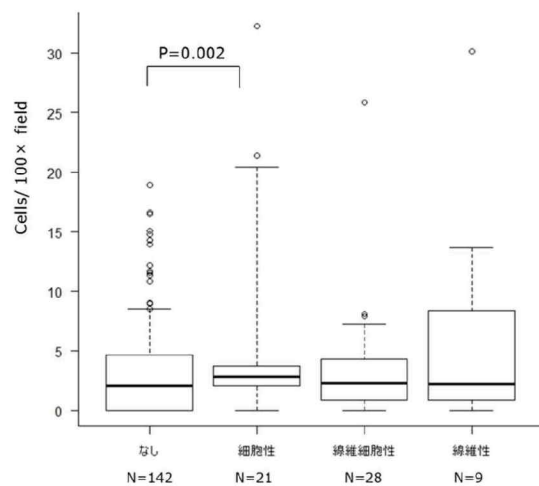
E 半月体の有無と
好中球エラスターゼ陽性細胞数との関係



F 糸球体硬化の程度と
好中球エラスターゼ陽性細胞数との関係



G 半月体の性状と
クロロディン1陽性細胞数との関係



H 半月体の性状と
クロロディン1陽性細胞数との関係

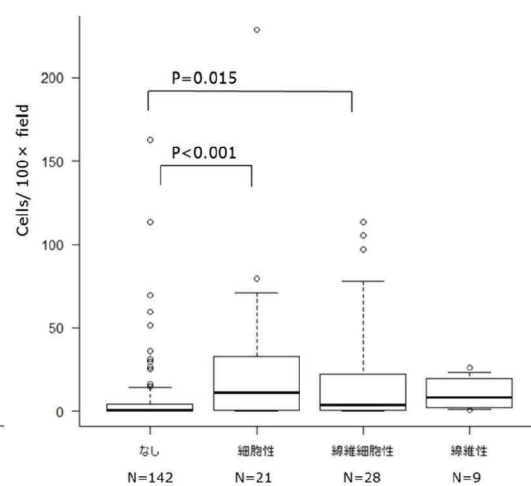


図 7

I 半月体の性状と

好中球エラスターゼ陽性細胞数との関係

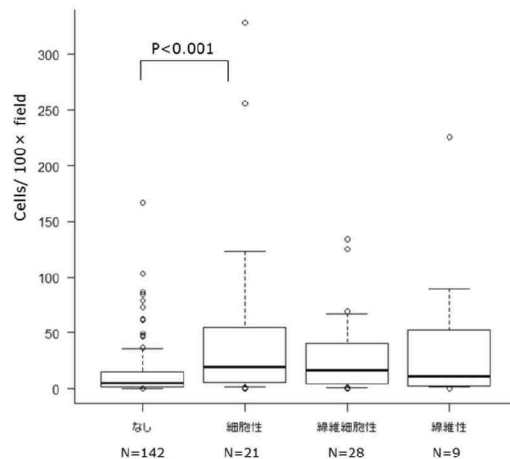
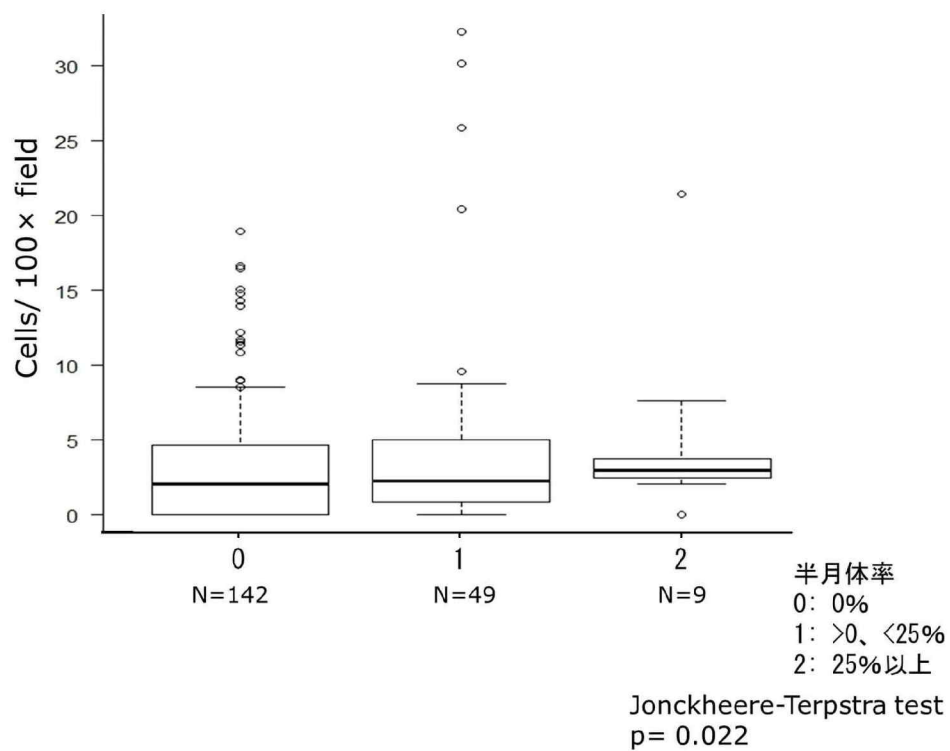


図7 尿沈渣中クローデイン1、CD68、好中球エラスターゼ陽性細胞数と、半月体の有無および性状、糸球体硬化の程度との関係。

クローデイン1 (A)、CD68 (C)、好中球エラスターゼ陽性細胞数 (E) は半月体がある症例で、半月体のない症例と比較して、有意に多かった。一方、クローデイン1 (B)、CD68 (D)、好中球エラスターゼ陽性細胞数 (F) は、糸球体硬化が高度の症例と軽度の症例との間で有意な差を認めなかった。

また半月体の性状ごとでの検討では、クローデイン1 (G)、好中球エラスターゼ陽性細胞数 (I) は、半月体なし症例と比較し、細胞性半月体症例において有意に増加していた。CD68 陽性細胞数 (H) は、半月体なし症例と比較し、細胞性半月体症例、線維細胞性半月体症例において有意に増加していた。

A クローデイン 1 陽性細胞



B CD68 陽性細胞

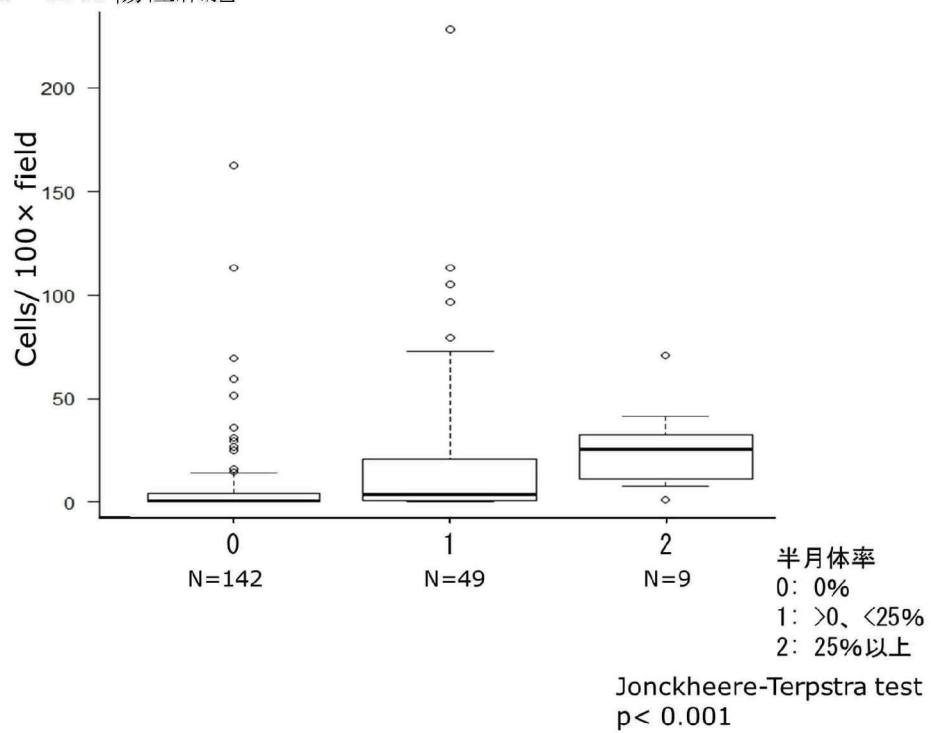


図 8

C 好中球エラスターゼ陽性細胞

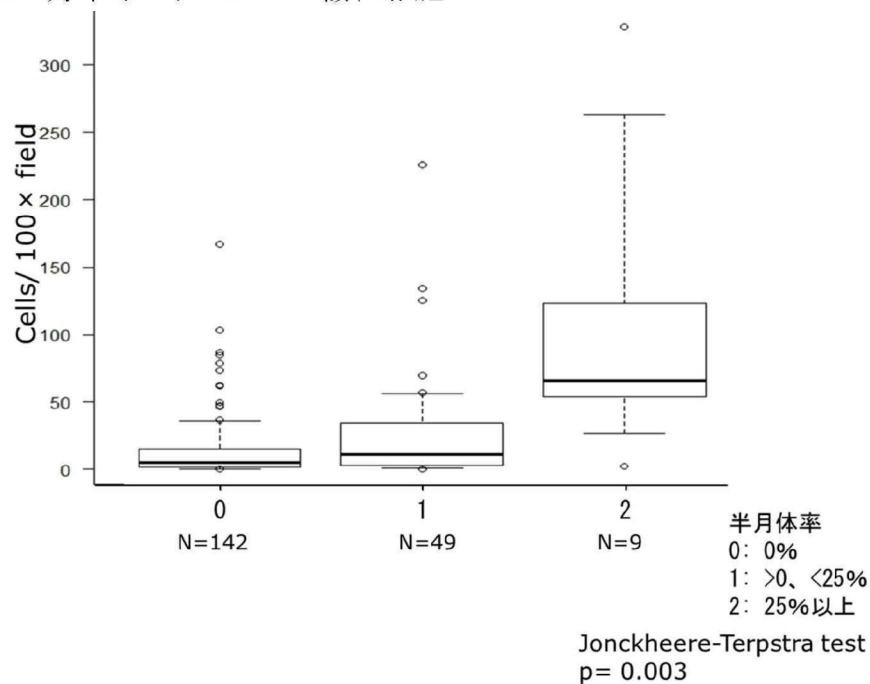


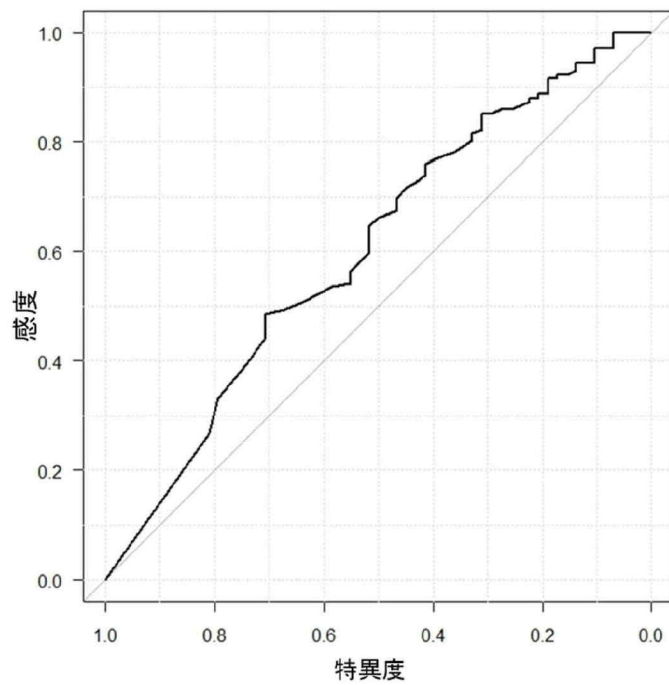
図8 尿沈渣中クロロディン1、CD68、好中球エラスターゼ陽性細胞数と腎組織における半月体形成率との関係。

A：クロロディン1、B：CD68、C：好中球エラスターゼ陽性細胞数と半月体形成率。

半月体形成率は、腎生検において採取された「全糸球体数に対する半月体を形成している糸球体数」として算出した。また半月体形成率により 0：0%、1：25%未満（0%を含まない）、2：25%以上の3段階にクラス分けした。

それぞれの陽性細胞数は半月体形成率のクラス分けで、有意な増加傾向を示した。

A クローデイン1陽性細胞



B CD68 陽性細胞

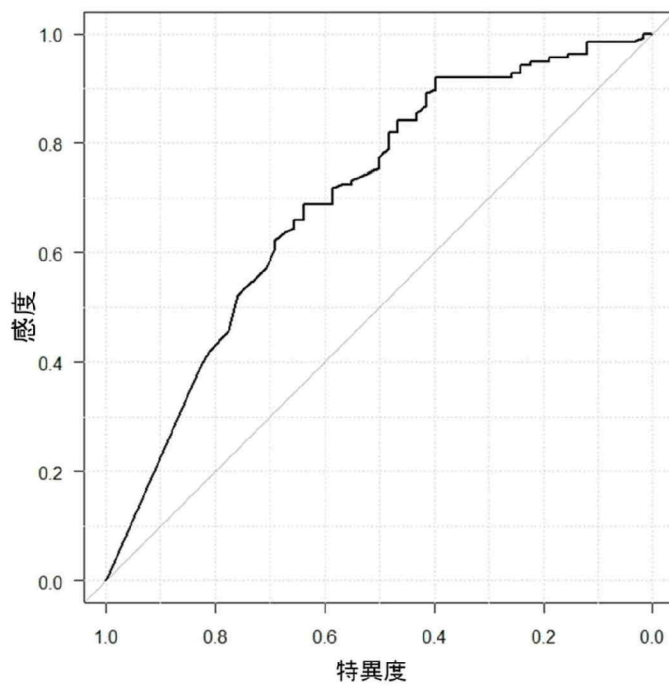


図 9

C 好中球エラスターゼ陽性細胞

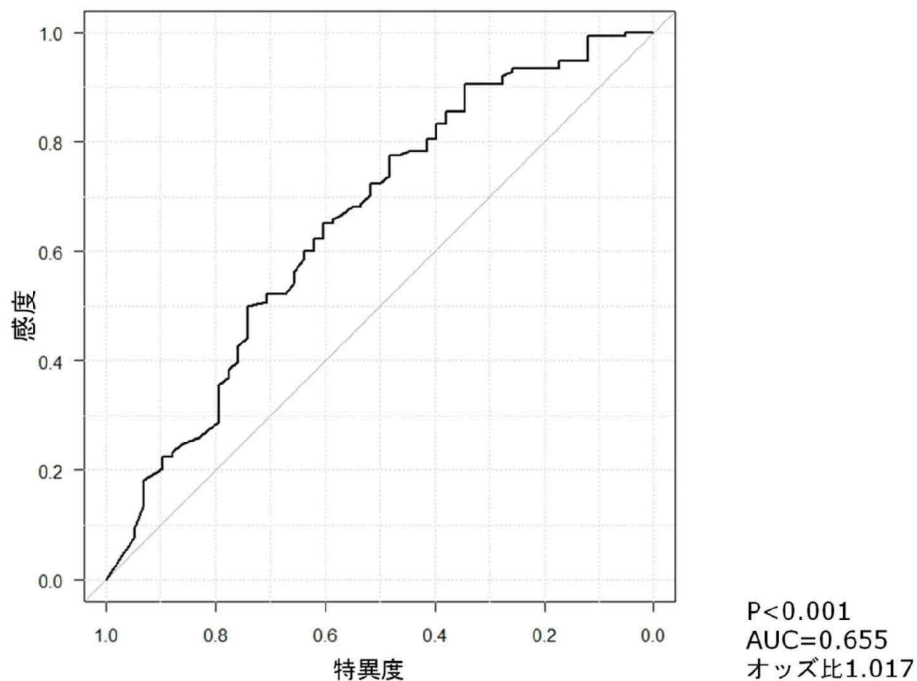


図9 尿沈渣中クローディン1、CD68、好中球エラスターゼ陽性細胞数と半月体の有無との関係のロジスティック解析。

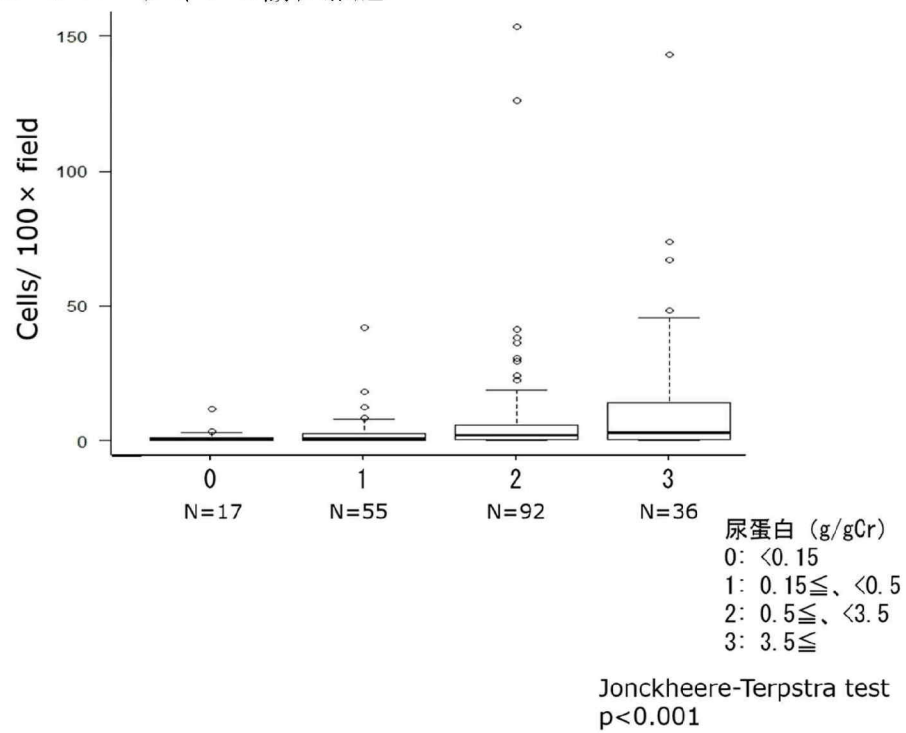
A:尿沈渣中クローディン1陽性細胞数が半月体の有無をどれだけ予測できるかを評価するために、ROC曲線を描いた。クローディン1陽性細胞数と半月体の存在とのロジスティック解析において $P=0.005$ と有意な所見であった。ROC曲線のAUCは0.603で、オッズ比は1.023であった。

B:尿沈渣中CD68陽性細胞数が半月体の有無をどれだけ予測できるかを評価するために、ROC曲線を描いた。CD68陽性細胞数と半月体陽性とのロジスティック解析において $P<0.001$ と有意な所見であった。ROC曲線のAUCは0.699、オッズ比は1.022であった。

C:尿沈渣中好中球エラスターゼ陽性細胞数が半月体の有無をどれだけ予測できるかを評価するために、ROC曲線を描いた。好中球エラスターゼ陽性細胞数と半月体陽性との名義ロジスティック解析において $P<0.001$ と有意な所見であった。ROC曲線のAUCは0.655、オッズ比は1.017であった。

ここにおけるAUCは、検査の有用性を評価するための指標であり、半月体のある患者の各種陽性細胞数が、半月体のない患者の各種陽性細胞数よりも多い確率に等しい。オッズ比は、各種陽性細胞数が1増えることにより、半月体が存在する可能性が上がる倍数を示す。

A クローデイン 1 陽性細胞



B CD68 陽性細胞

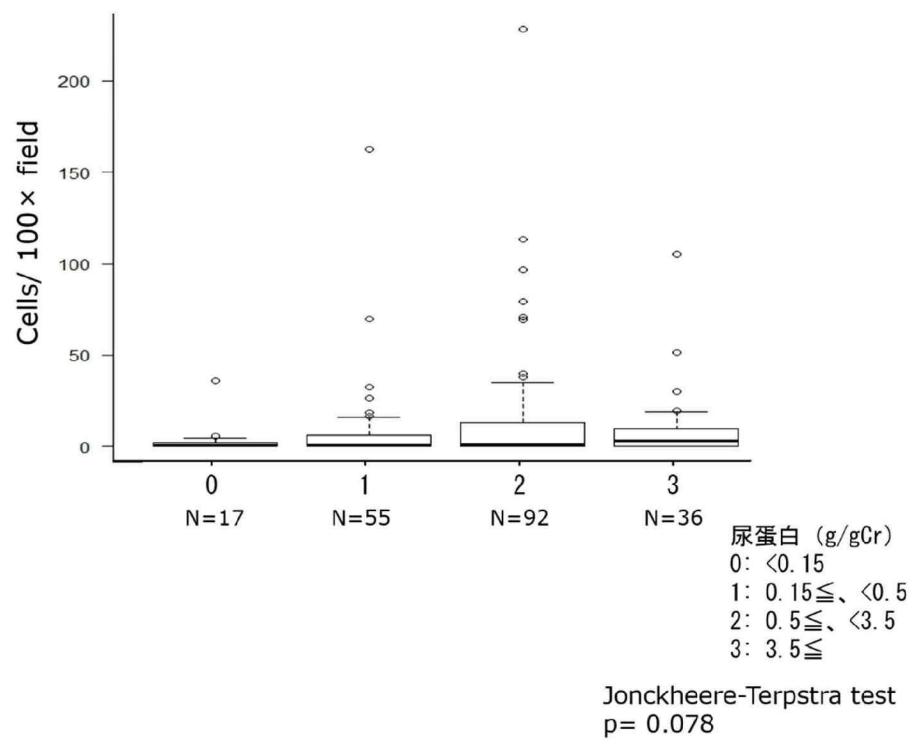


図 10

C 好中球エラスターゼ陽性細胞

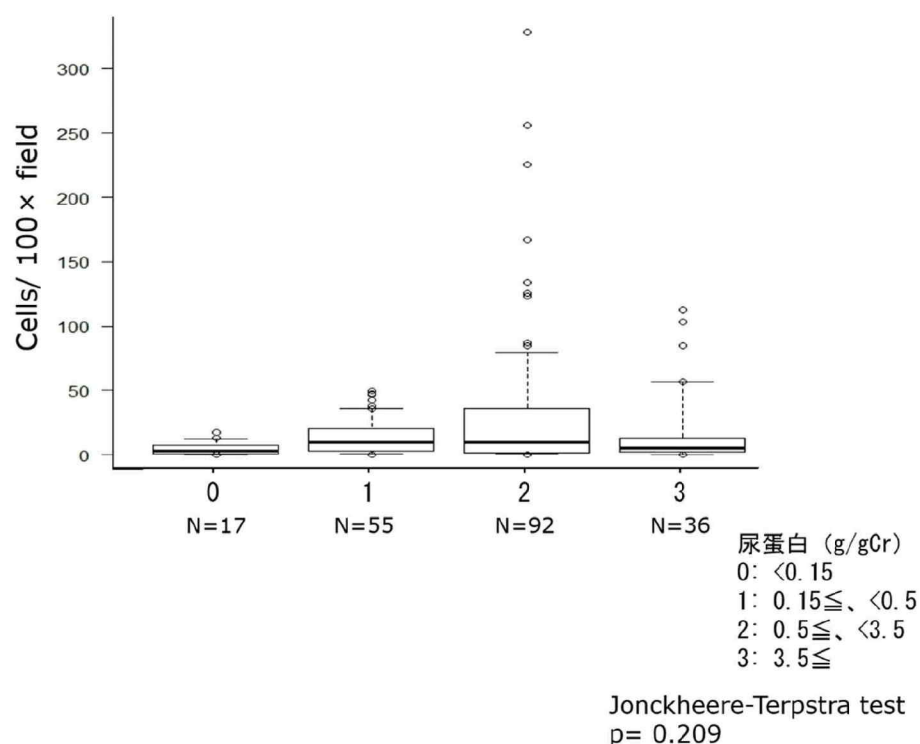


図10 尿沈渣中クローディン1、CD68、好中球エラスターゼ陽性細胞数と尿蛋白量との関係。

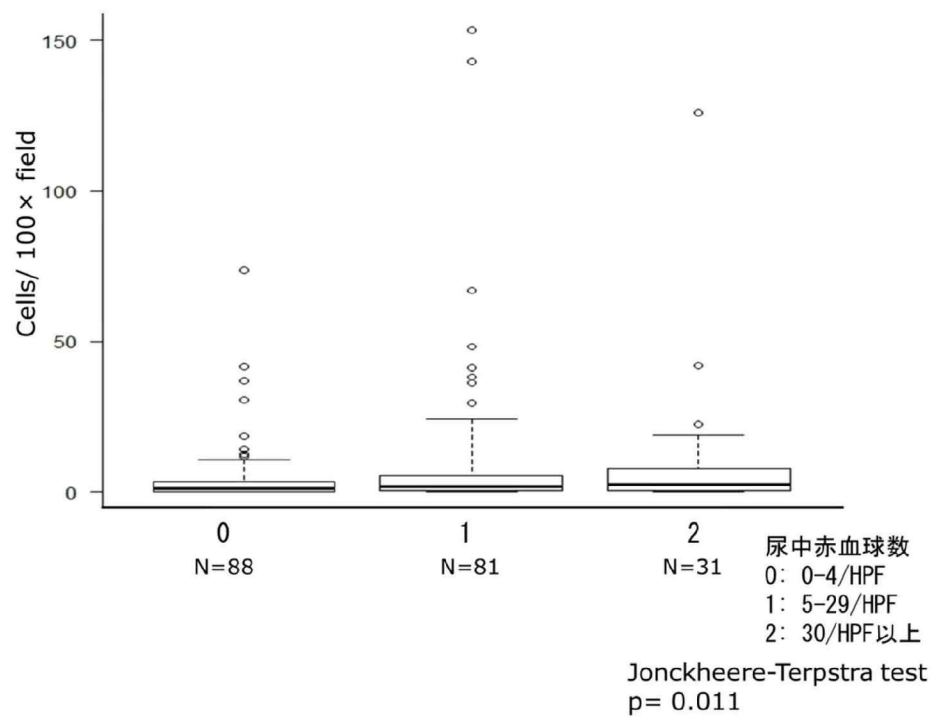
A：クローディン1、B：CD68、C：好中球エラスターゼ陽性細胞数と尿蛋白との関係。

CKD ガイドライン 2012 の基準およびネフローゼ症候群の診断基準に従い、尿蛋白は 0：0-0.15 g/gCr 未満、1：0.15-0.5 g/gCr 未満、2：0.5-3.5 g/gCr 未満、3：3.5 g/gCr 以上と 4 段階にクラス分けした。

クローディン1 陽性細胞数は尿蛋白の増加に伴い有意に増加していた。CD68、好中球エラスターゼ陽性細胞数は尿蛋白の増加に伴う有意な増加は認めなかった。

尿蛋白量のクラス分けと半月体の有無におけるロジスティック解析においては有意な所見を認めなかった（図示せず）。

A クローデイン 1 陽性細胞



B CD68 陽性細胞

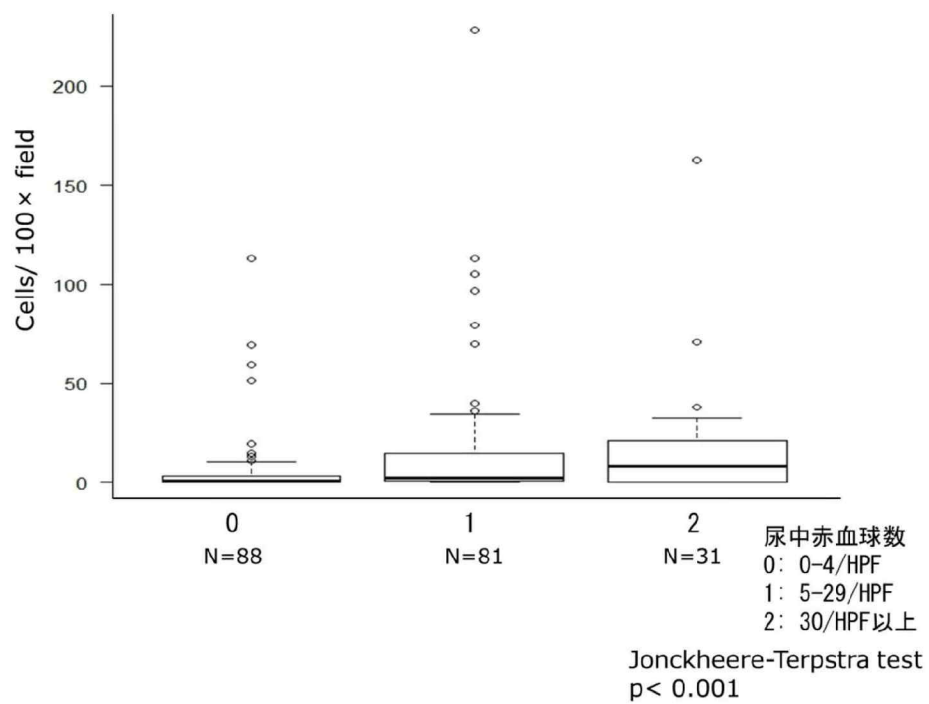
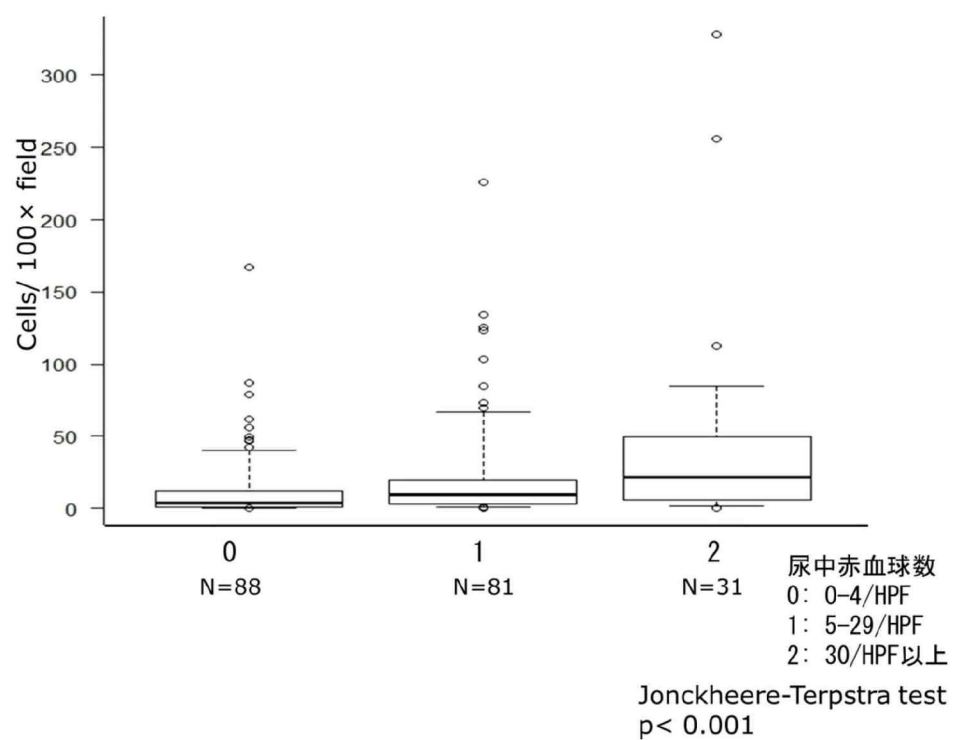


図 1 1

C 好中球エラスターゼ陽性細胞



D 尿中赤血球数

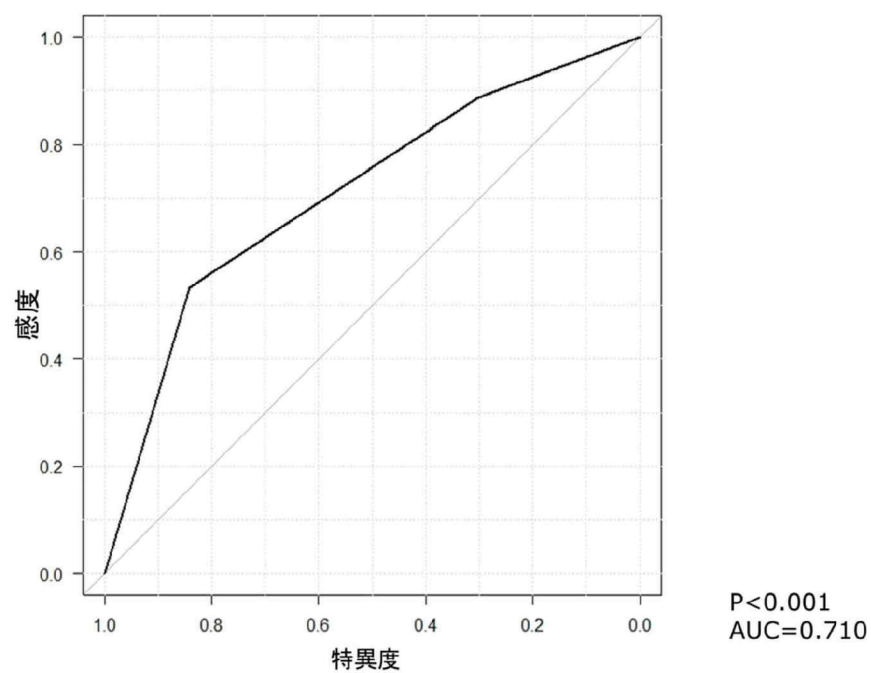


図 1 1

図 1 1 尿沈渣細胞中クローディン 1、CD68、好中球エラスターゼ陽性細胞数と尿中赤血球数の程度との関係および尿中赤血球数のクラス分けと半月体の有無との関係のロジスティック解析。

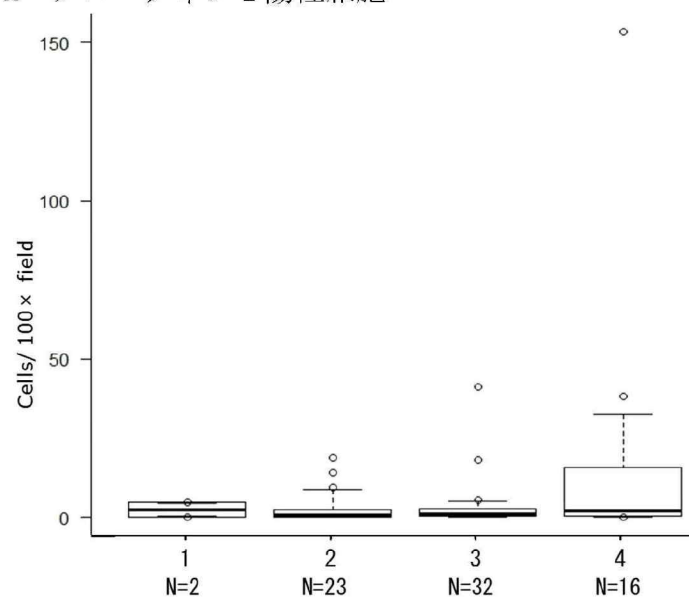
A：クローディン 1、B：CD68、C：好中球エラスターゼ陽性細胞数と尿中赤血球数との関係。

尿中赤血球数は 0：0-4 個/各視野、1：5-29 個/各視野、2：30 個/各視野以上の 3 段階にクラス分けした。

クローディン 1、CD68、好中球エラスターゼ陽性細胞数は尿中赤血球数の増加に伴い有意に増加していた。

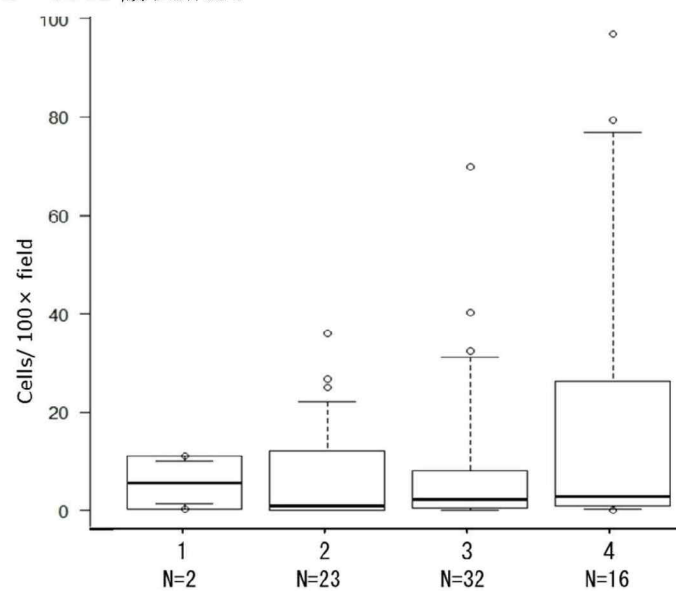
D：尿中赤血球数のクラス分けが半月体の有無をどれだけ予測できるかを評価するために、ROC 曲線を描いた。尿中赤血球数と半月体の存在とのロジスティック解析において $P < 0.001$ と有意な所見であった。ROC 曲線の AUC は 0.710 であった。

A クローデイン 1 陽性細胞



Jonckheere-Terpstra test
p= 0.004

B CD68 陽性細胞



Jonckheere-Terpstra test
p= 0.012

C 好中球エラスターゼ陽性細胞

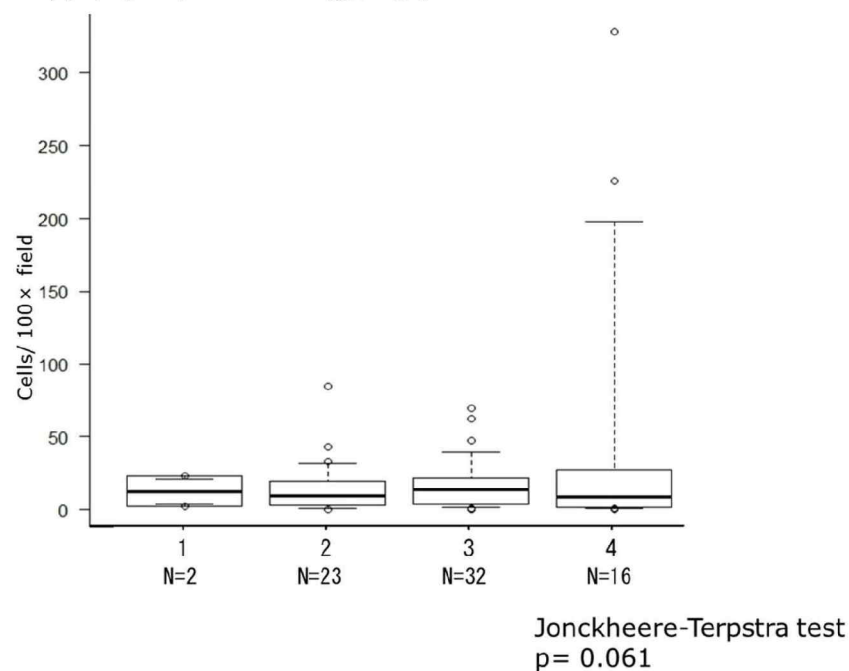
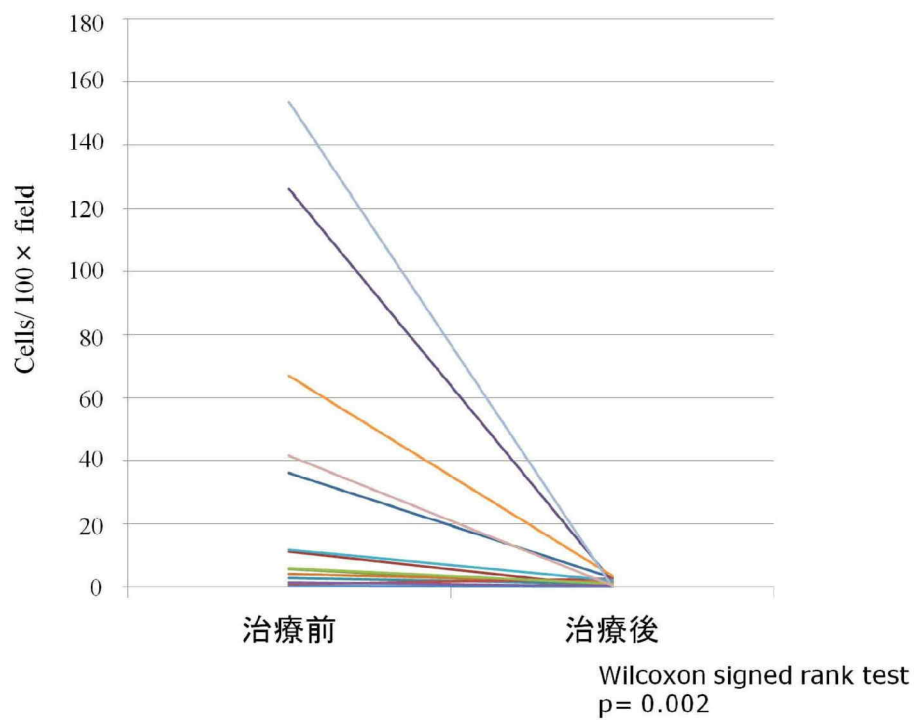


図 1 2 尿沈渣細胞中クローディン 1、CD68、好中球エラスターゼ陽性細胞数と IgA 腎症の組織分類との関係。

A: クローディン 1、B: CD68、C: 好中球エラスターゼ陽性細胞数と坂口分類。

クローディン 1、CD68 陽性細胞数は組織分類に伴い有意に増加していた。しかし、好中球エラスターゼ陽性細胞数は、有意な相関を認めなかった。坂口分類 5、6 の症例はなかった。

A クローデイン 1 陽性細胞



B CD68 陽性細胞

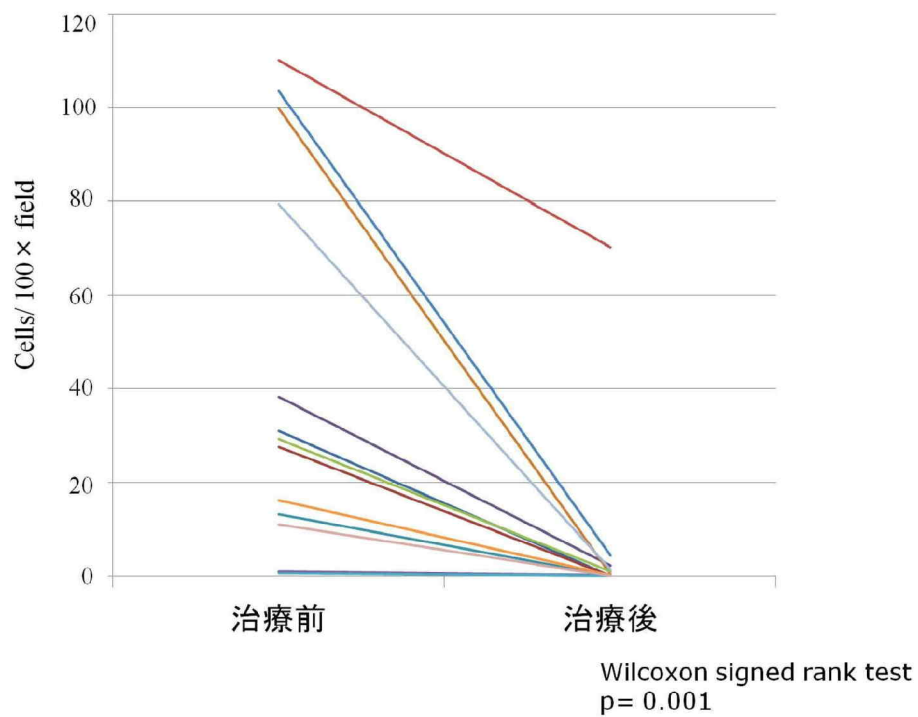


図 1 3

C 好中球エラスターゼ陽性細胞

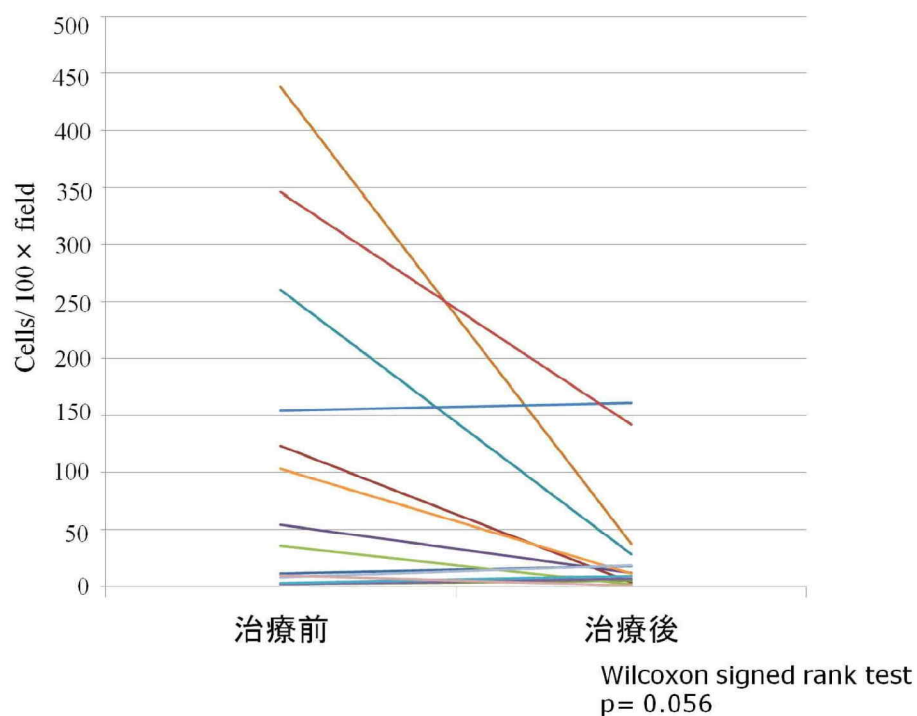


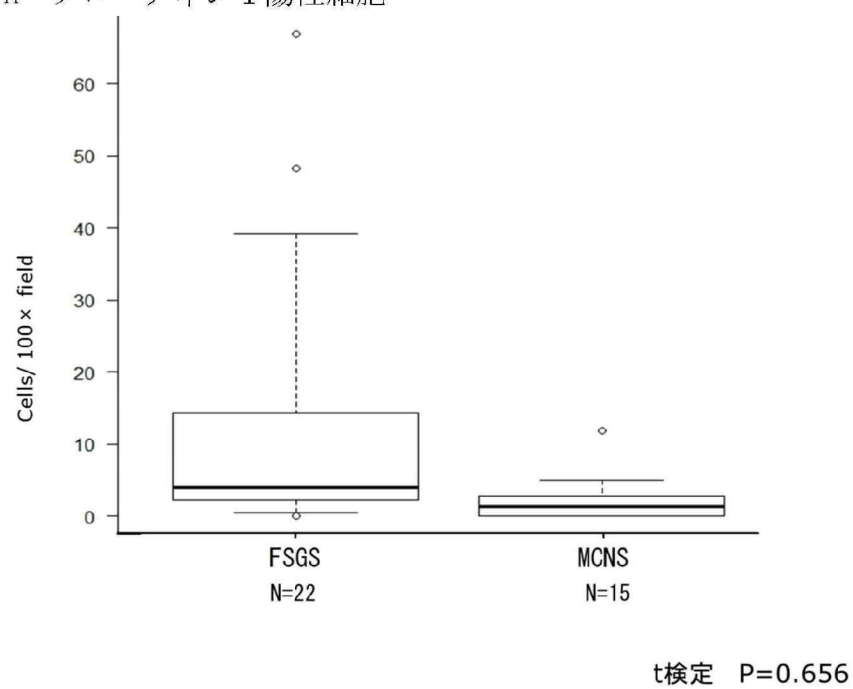
図13 尿沈渣細胞中クローデイン1、CD68、好中球エラスターゼ陽性細胞数の治療前後の比較

A：クローデイン1、B：CD68、C：好中球エラスターゼ陽性細胞数。

プレドニゾロンやシクロスポリンAで臨床所見の改善を認めた14例（MCNS 2名、MN1名、MPGN 1名、IgA腎症2名、non IgA腎症2名、ANCA関連血管炎（半月体形成性糸球体腎炎）5名、LN 1名）において、治療後に尿沈渣中クローデイン1陽性細胞数およびCD68陽性細胞数は治療前と比べて有意に減少した。好中球エラスターゼ陽性細胞数は有意な減少は認めなかったが、減少傾向が見られた。

改善は、尿蛋白に関しては、完全寛解（0.3g/gCr未満）もしくは不完全寛解1型（1.0g/gCr未満）になった場合とした。血尿の程度に関しては、0：0-4個/各視野、1：5-29個/各視野、2：30個/各視野以上の3段階に分けたクラスにおいて、1段階以上改善した場合とした。腎機能に関しては、Crの値が最大悪化時より30%以上回復した場合とした。

A クローデイン 1 陽性細胞



B CD68 陽性細胞

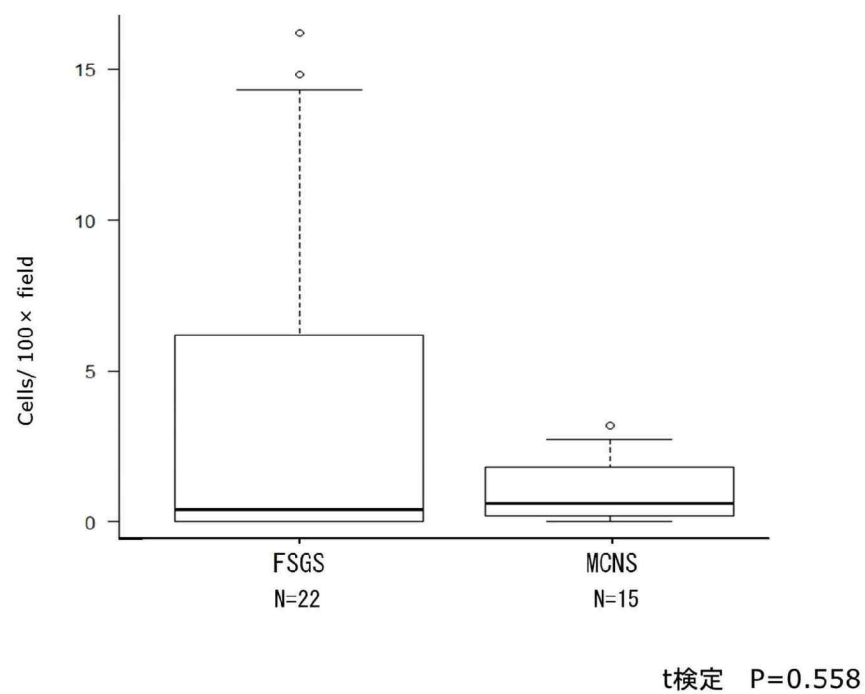


図 1 4

C 好中球エラスターゼ陽性細胞

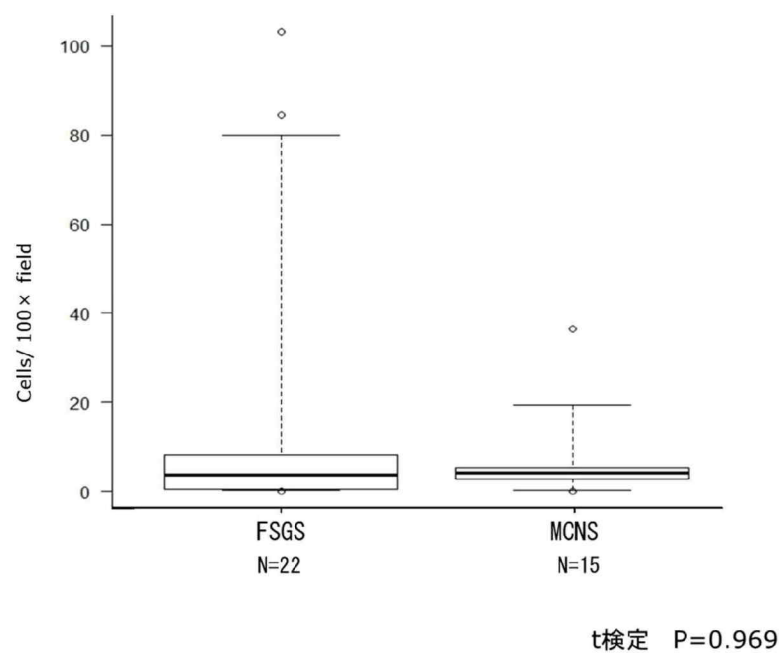


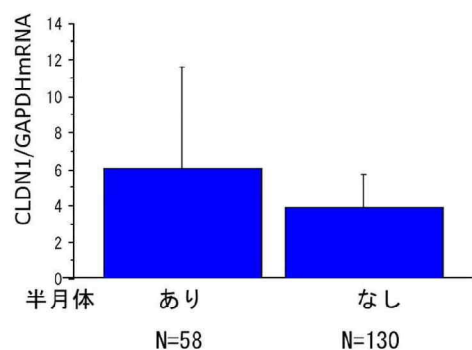
図 1 4 尿沈渣細胞中クローディン 1、CD68、好中球エラスターゼ陽性細胞数の FSGS と MCNS との間の比較。

A : クローディン 1、B : CD68、C : 好中球エラスターゼ陽性細胞数と FSGS および MCNS の相関。

それぞれの陽性細胞数について、FSGS と MCNS との間に有意な差を認めなかった。

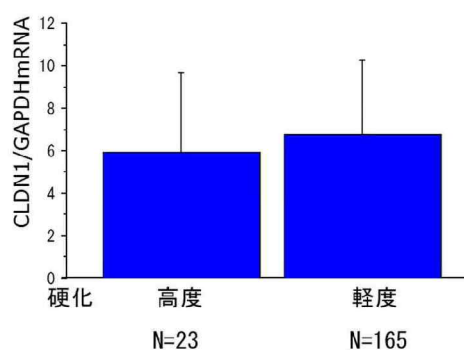
A 半月体の有無と GAPDH で補正した
クロードイン 1 mRNA レベルとの関係

P=0.644



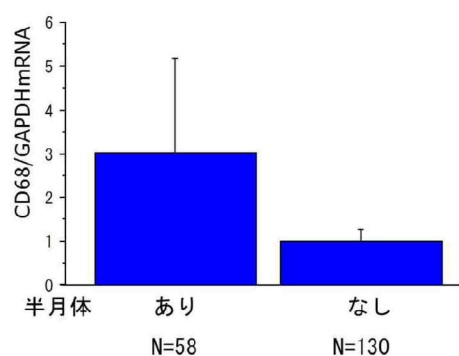
B 糸球体硬化の程度と GAPDH で補正し
たクロードイン 1 mRNA レベルとの関係

P=0.930



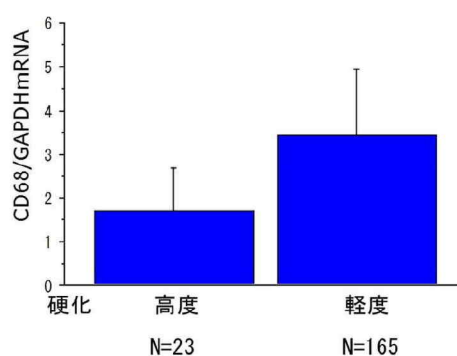
C 半月体の有無と GAPDH で補正した
CD68 mRNA レベルとの関係

P=0.169



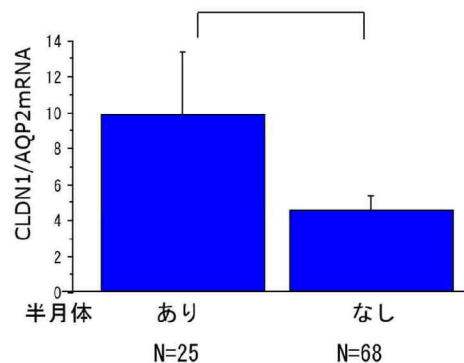
D 糸球体硬化の程度と GAPDH で補正した
CD68 mRNA レベルとの関係

P=0.675



E 半月体の有無と AQP2 で補正した
クロードイン 1 mRNA レベルとの関係

P=0.029



F 糸球体硬化の程度と AQP2 で補正した
クロードイン 1 mRNA レベルとの関係

P=0.411

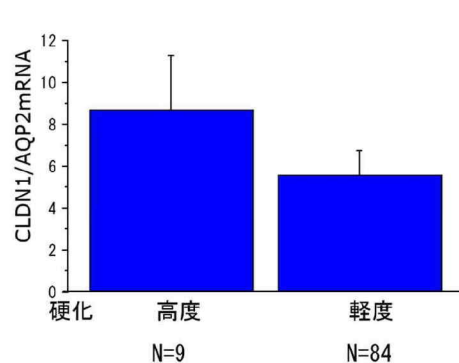
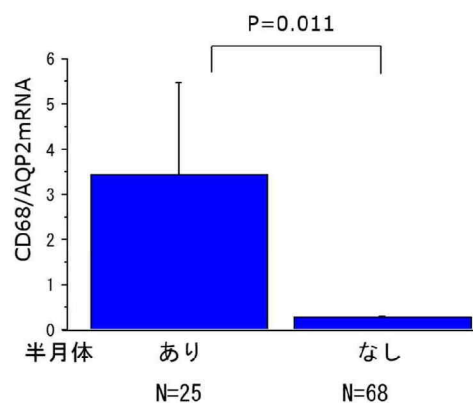


図 1 5

G 半月体の有無と AQP2 で補正した CD68mRNA レベルとの関係



H 糸球体硬化の程度と AQP2 で補正した CD68mRNA レベルとの関係

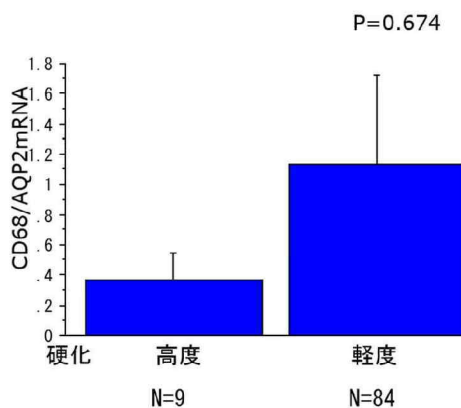


図 1 5 尿沈渣中クローデイン 1 mRNA レベル、CD68 mRNA レベルと半月体の有無および糸球体硬化の程度との関係。

GAPDH で補正したクローデイン 1 mRNA (A)、CD68 mRNA レベル (C) は半月体の有無で有意な差を認めなかった。

AQP2 で補正したクローデイン 1 mRNA (E)、CD68 mRNA レベル (G) は半月体がある症例で、半月体のない症例と比較して、有意に高かった。

糸球体硬化が高度の症例と軽度の症例との間で GAPDH および AQP2 で補正したクローデイン 1 mRNA (B、F)、CD68 mRNA レベル (D、H) は、有意な差がなかった。

尿沈渣中の好中球エラスターゼ mRNA は検出できなかった(図示せず)。

A クローデイン1 mRNA レベル

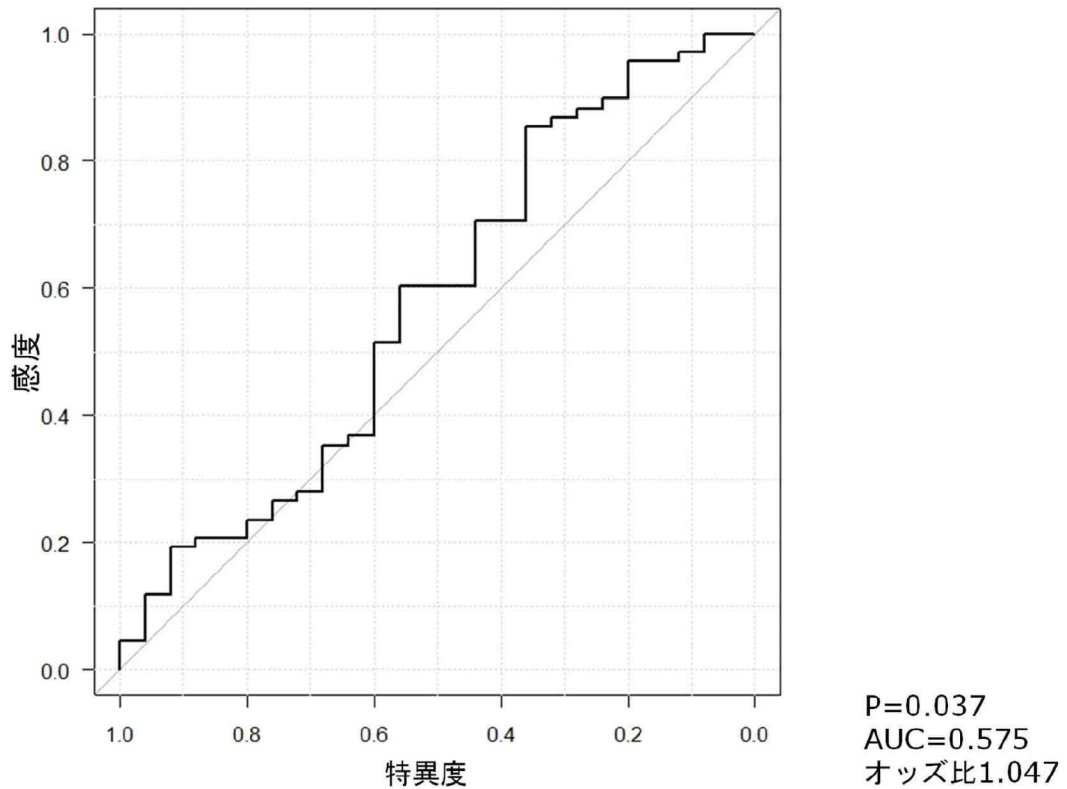


図16 AQP2で補正した尿沈渣中クローデイン1 mRNA レベル、CD68 mRNA レベルと半月体の有無との関係のロジスティック解析。

A:尿沈渣中クローデイン1 mRNA レベルが半月体の有無をどれだけ予測できるかを評価するために、ROC 曲線を描いた。クローデイン1 mRNA レベルと半月体陽性とのロジスティック解析においてP=0.037 と有意な所見であった。ROC 曲線のAUCは0.575、オッズ比は1.047であった。

このAUCは、検査の有用性を評価するための指標であり、半月体のある患者のクローデイン1 mRNA レベルが、半月体のない患者のクローデイン1 mRNA レベルよりも高い確率に等しい。オッズ比は、クローデイン1 mRNA レベルが1増えることにより、半月体が存在する可能性が上がる倍数を示す。

B CD68 mRNA レベル

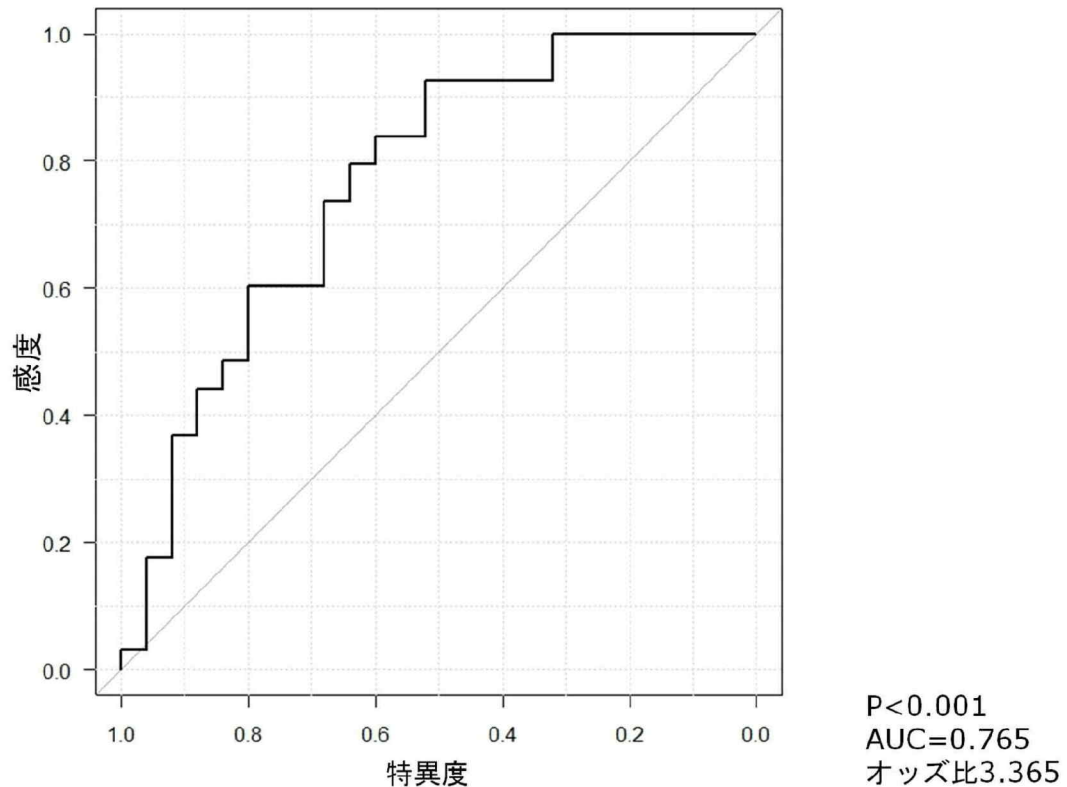


図16 AQP2で補正した尿沈渣中クローデイン1 mRNA レベル、CD68 mRNA レベルと半月体の有無との関係のロジスティック解析。

B:尿沈渣中 CD68 mRNA レベルが半月体の有無をどれだけ予測できるかを評価するために、ROC 曲線を描いた。CD68 mRNA レベルと半月体陽性とのロジスティック解析において $P<0.001$ と有意な所見であった。ROC 曲線の AUC は 0.765、オッズ比は 3.3649 であった。

ここにおける AUC は、検査の有用性を評価するための指標であり、半月体のある患者の CD68 mRNA レベルが、半月体のない患者の CD68 mRNA レベルよりも高い確率に等しい。オッズ比は、CD68 mRNA レベルが 1 増えることにより、半月体が存在する可能性が上がる倍数を示す。

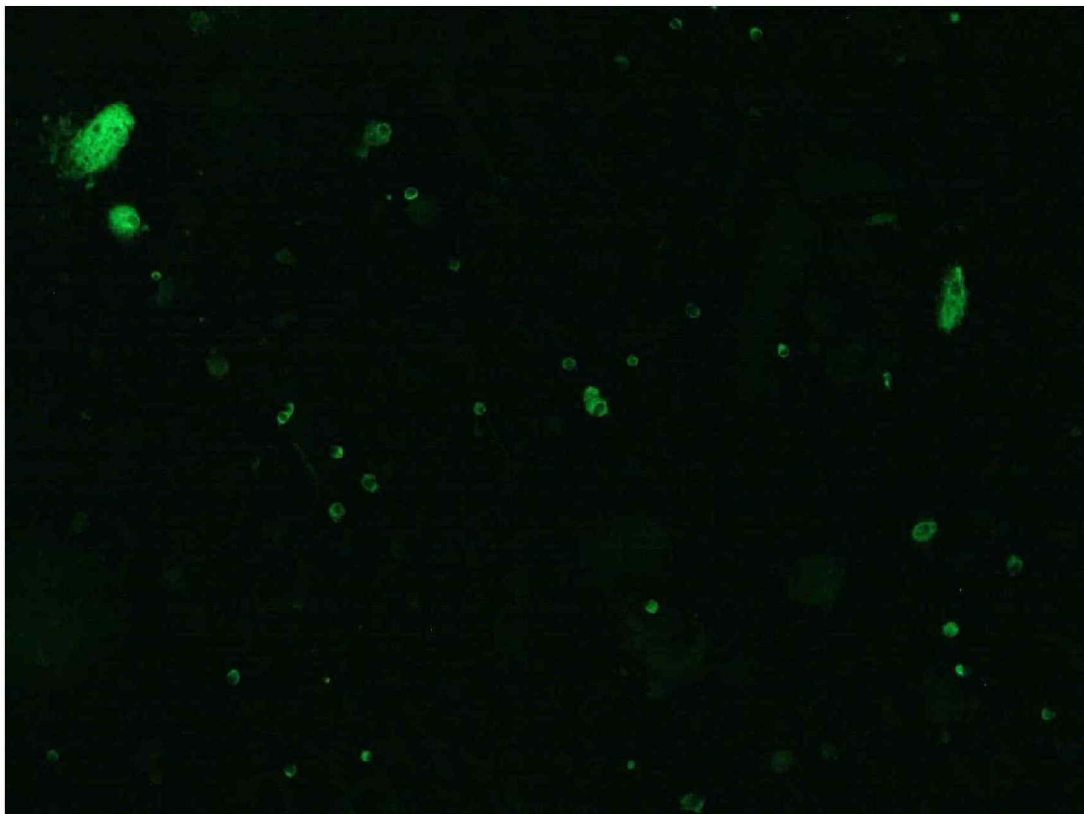
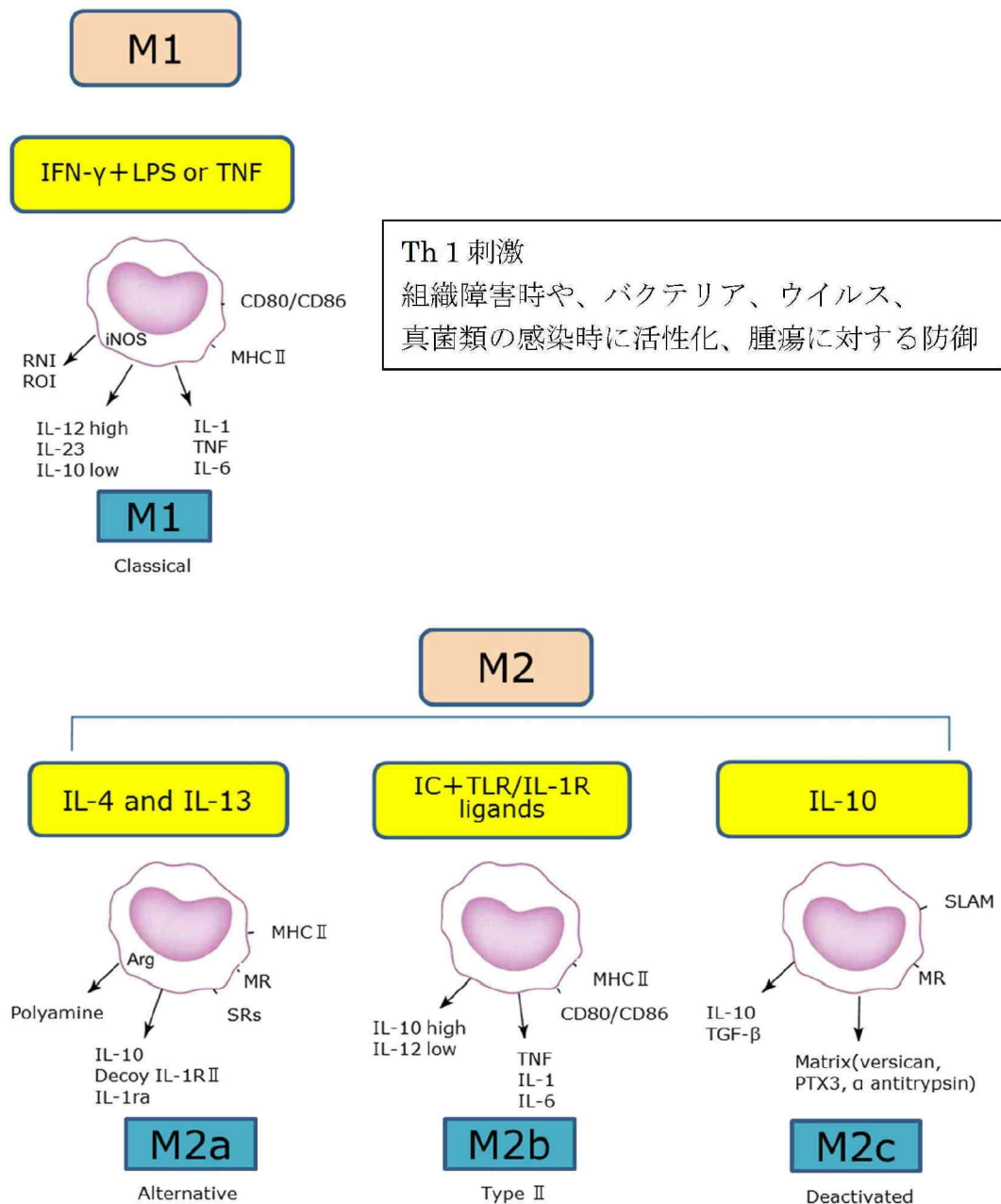


図 1 7 尿中 CD68 陽性細胞染色の 1 例。

尿中出现するマクロファージのサイズは、好中球より小さいものから尿細管上皮細胞より大きいものまで様々なバリエーションを認めた。(100倍。)



Th 2 刺激

寄生虫感染、アレルギー応答、免疫調整、脂質代謝、創傷治癒、癌転移等に寄与
抗炎症作用、線維化促進因子を産生

図 1 8

図18 マクロファージのM1およびM2フェノタイプ

IFN- γ , interferon- γ , インターフェロン γ

LPS, lipopolysaccharide, リポ多糖類

TNF, tumor necrosis factor, 腫瘍壊死因子

iNOS, inducible nitric oxide synthase, 誘導型一酸化窒素合成酵素

RNI, reactive nitrogen intermediates, 活性窒素種

ROI, reactive oxygen intermediates, 活性酸素種

Arg, arginase, アルギナーゼ

MR, mannose receptor, マンノース受容体

SRs, scavenger receptors, スカベンジャー受容体

IC, immune complex, 免疫複合体

TLR, toll-like receptor, トールライク受容体

SLAM, signaling lymphocytic activation molecules, 免疫グロブリンスーパーファミリーに属する糖蛋白質、生体内のレセプター分子、CD150

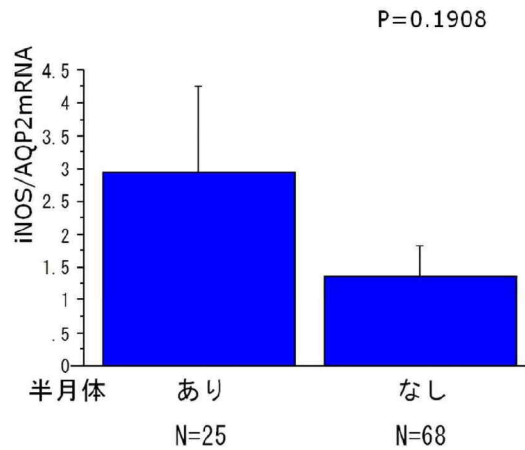
PTX3, pentraxin 3, ペントラキシン3

M1 マクロファージは、Th1細胞が産生する IFN- γ 単独あるいは IFN- γ と他のサイトカイン(TNF α 、GM-CSF など)や細菌成分(LPS など)との協同作用で誘導され、組織障害時、バクテリア、ウイルス、真菌類の感染時、腫瘍に対する防御など、とりわけ炎症の悪化にかかわるマクロファージである。

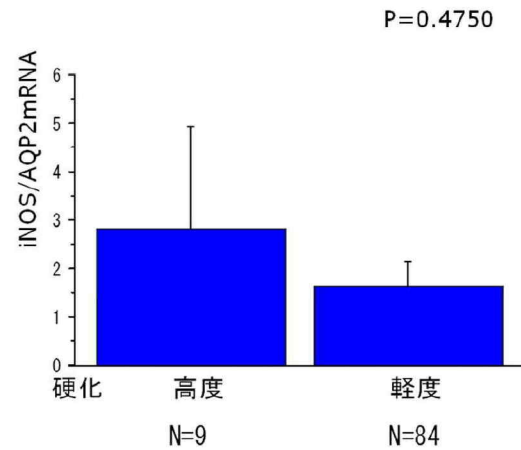
それに対して、M2 マクロファージは、Th2細胞が産生する IL-4 や IL-13 などのサイトカインにより誘導され、寄生虫感染、アレルギー応答、免疫調整、脂質代謝、創傷治癒、癌転移、抗炎症作用、線維化促進因子の産生、とりわけ組織修復にかかわるマクロファージである。また M2 マクロファージには、M2a、M2b、M2c の3つのポピュレーションがあり、M2a マクロファージは IL-4 や IL-13 で誘導され、M2b マクロファージ(別名: Type II activated マクロファージ)は免疫複合体による Fc レセプターで誘導され、M2c マクロファージは IL-10 や糖質コルチコイドホルモンによって誘導される。

Alberto M. et al. Trends Immunol 2004; 25(12): 677-686.を引用。

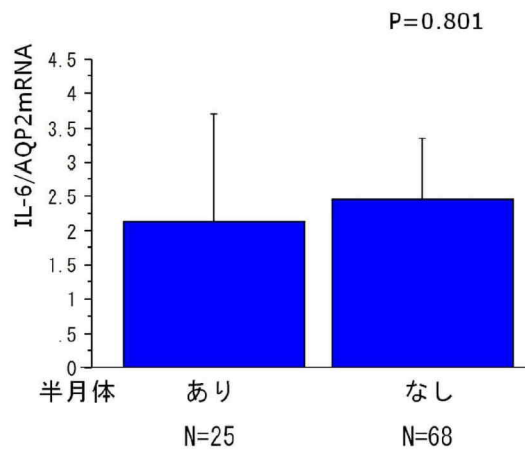
A 半月体の有無と
iNOS mRNA レベルとの関係



B 糸球体硬化の程度と
iNOS mRNA レベルとの関係



C 半月体の有無と
IL-6 mRNA レベルとの関係



D 糸球体硬化の程度と
IL-6 mRNA レベルとの関係

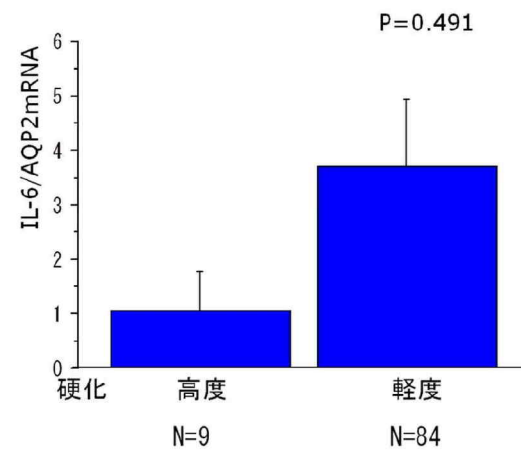
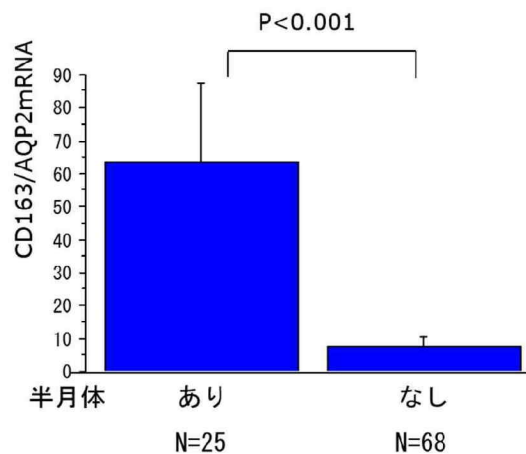


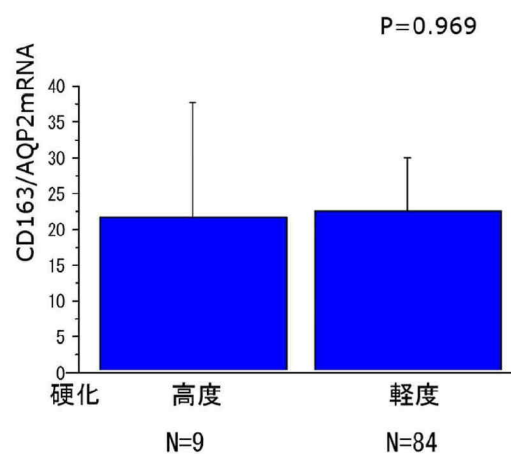
図19 AQP2で補正した尿沈渣中M1マクロファージと関連するIL-6 mRNAレベルと半月体の有無および糸球体硬化の程度との関係。

iNOS (A)、IL-6 mRNA レベル (C) は半月体の有無と有意な差はなかった。iNOS (B)、IL-6 mRNA レベル (D) は、糸球体硬化が高度の症例と軽度の症例との間で有意な差がなかった。

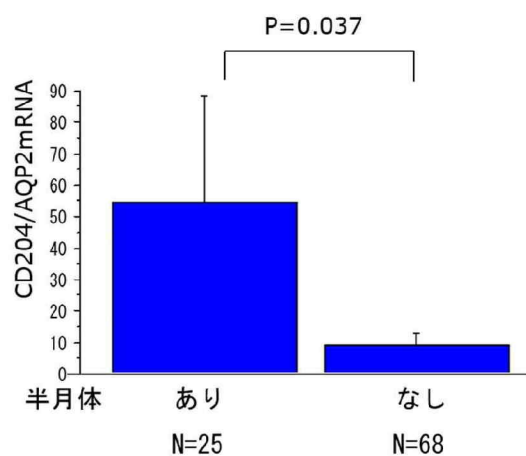
A 半月体の有無と
CD163 mRNA レベルとの関係



B 糸球体硬化の程度と
CD163 mRNA レベルとの関係



C 半月体の有無と
CD204 mRNA レベルとの関係



D 糸球体硬化の程度と
CD204 mRNA レベルとの関係

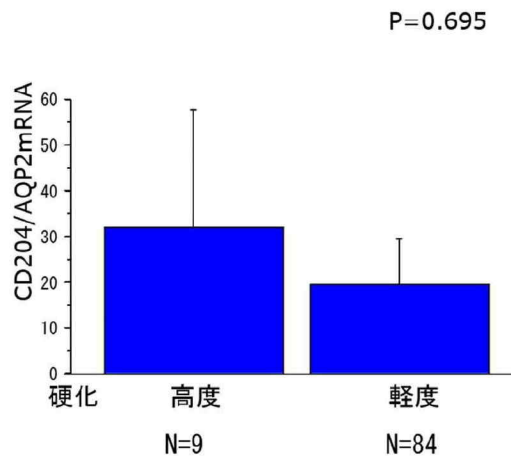
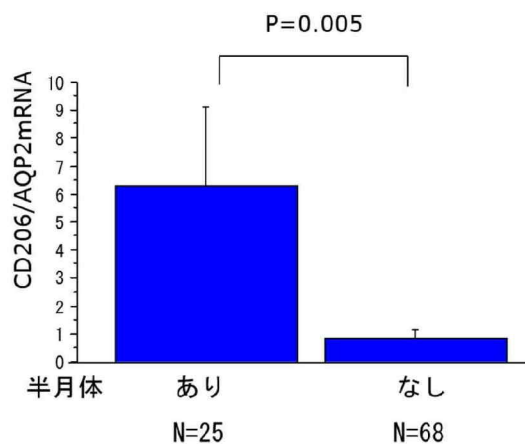
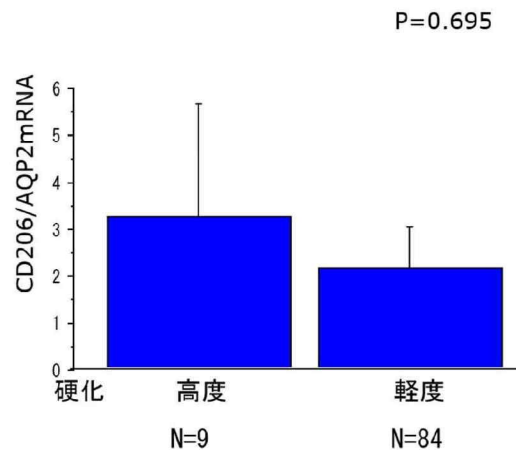


図 2 0

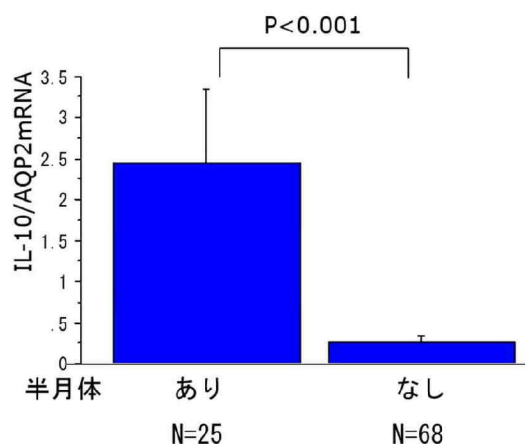
E 半月体の有無と
CD206 mRNA レベルとの関係



F 糸球体硬化の程度と
CD206 mRNA レベルとの関係



G 半月体の有無と
IL-10 mRNA レベルとの関係



H 糸球体硬化の程度と
IL-10 mRNA レベルとの関係

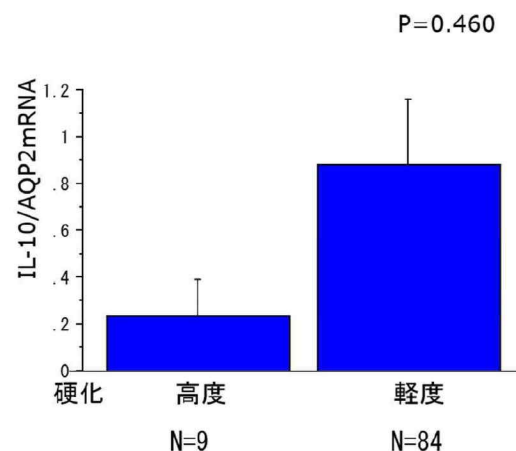


図 2 O AQP2 で補正した尿沈渣中 M2 マクロファージと関連する CD163、CD204、CD206、IL-10 mRNA レベルと半月体の有無および糸球体硬化の程度との関係。

CD163 (A)、CD204 (C)、CD206 (E)、IL-10 mRNA レベル (G) は半月体がある症例で、半月体のない症例と比較して、有意に高値であった。CD163 (B)、CD204 (D)、CD206 (F)、IL-10 mRNA レベル (H) は、糸球体硬化が高度の症例と軽度の症例との間で有意な差がなかった。

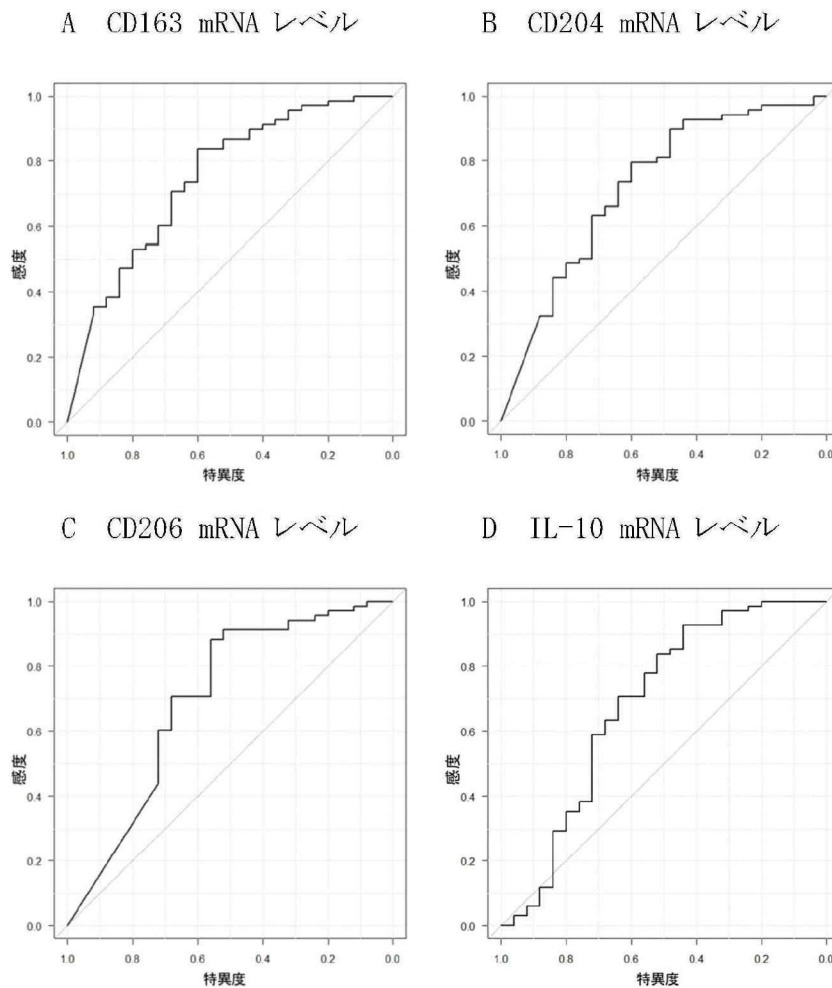


図 2 1 AQP2で補正した尿沈渣中M2マクロファージと関連するCD163、CD204、CD206、IL-10 mRNA レベルと半月体の有無のロジスティック解析。

A: CD163 mRNA レベルと半月体陽性とのロジスティック解析において $P < 0.001$ と有意な所見であった。ROC 曲線の AUC は 0.747、オッズ比は 1.023 であった。

B: CD68 mRNA レベルと半月体陽性とのロジスティック解析において $P = 0.029$ と有意な所見であった。ROC 曲線の AUC は 0.722、オッズ比は 1.010 であった。

C: CD206 mRNA レベルと半月体陽性とのロジスティック解析において $P = 0.004$ と有意な所見であった。ROC 曲線の AUC は 0.698、オッズ比は 1.140 であった。

D: IL-10 mRNA レベルと半月体陽性とのロジスティック解析において $P < 0.001$ と有意な所見であった。ROC 曲線の AUC は 0.697、オッズ比は 1.926 であった。

この AUC は、検査の有用性を評価するための指標であり、半月体のある患者の各種 mRNA レベルが、半月体のない患者の各種 mRNA レベルよりも高い確率に等しい。オッズ比は、各種 mRNA レベルが 1 増えることにより半月体が存在する可能性が上がる倍数を示す。

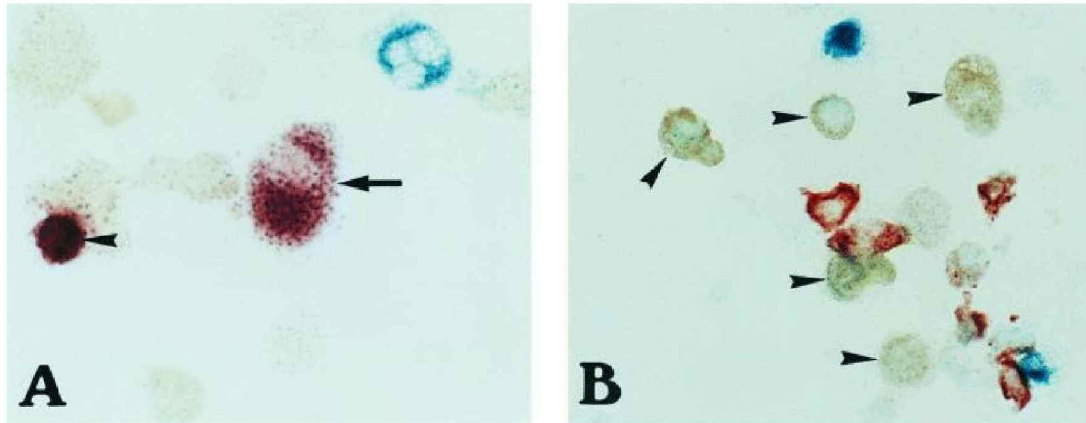


図 2 2 急速進行性糸球体腎炎患者の尿沈渣細胞染色

A:好中球（青）とマクロファージ（赤）。矢印はジャイアントマクロファージ、矢頭は成熟していないマクロファージ。B:マクロファージ（茶）、尿細管上皮細胞（赤）、好中球（青）による三重染色。

A と B に示すように、マクロファージは好中球より小さいものから尿細管上皮細胞より大きいものまで存在している。

Oda T. et al. *Kidney Int.* 1998; 53(5): 1190-1200. より引用。

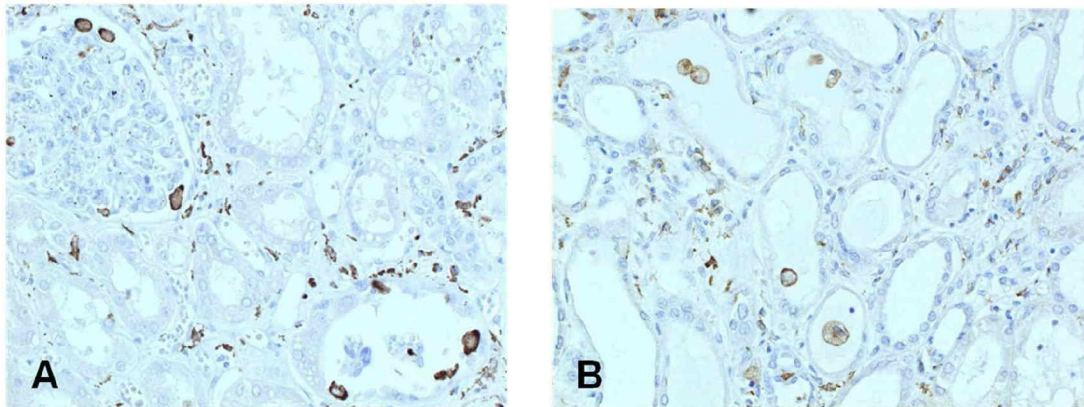


図 2 3 ボウマン腔や尿細管内に認めるジャイアントマクロファージ

A:急速進行性糸球体腎炎患者組織における CD163 染色。B: IgA 腎症患者における CD204 染色。

活動性の高い腎炎においてボウマン腔や尿細管内に増加するジャイアントマクロファージは、M2 のマーカーである CD163、CD204 陽性である。

尾田高志「進行性糸球体腎炎における尿細管内 Giant Mφ に関する検討 II」
第 46 回日本腎臓学会学術総会発表 2003 年から引用。