

た (健常小児 0.7 ± 1.5 , 患者群 15.6 ± 2.8 , $p < 0.0001$). 尿沈渣ポドカリキシンは蛋白尿と正の相関を示し ($p < 0.0001$, $r = 0.682$), 3 + 以上の血尿を呈す群で有意に高値であった. また, 小児メサンギウム増殖性腎炎の急性期に高値を示した (急性期 29.8 ± 11.8 , 慢性期 2.4 ± 0.8 , $p < 0.05$). 組織学的には急性管外性病変のある症例で有意に高値であった (急性管外性病変を認める症例 37.4 ± 6.1 , 認めない症例 12.5 ± 6.5 , $p < 0.05$).

結論 尿沈渣ポドカリキシンの定量は小児メサンギウム増殖性腎炎の急性期マーカーとして, また急性管外性病変の指標として臨床的に有用である.

キーワード : podocalyxin, podocyte, mesangial proliferative glomerulonephritis, ELISA, ポドカリキシン, ポドサイト, メサンギウム増殖性腎炎

はじめに

糸球体上皮細胞 (ポドサイト) は糸球体基底膜のボウマン腔側に位置し, 糸球体濾過機構に重要な役割を演じている¹⁾²⁾. ポドサイトは高度に分化した細胞であり, 細胞回転の速度は著しく遅く, 細胞増殖も起こしにくいことが知られている³⁾⁴⁾. ポドサイトが傷害されるとスリット膜の消失, 足突起の癒合, ポドサイトの糸球体基底膜からの脱落などが観察される⁵⁾. ポドサイトが脱落し, 糸球体基底膜が裸の状態になると, 糸球体壁側上皮細胞が裸の部分进行を覆い, 部分的な糸球体硬化へ進んでいくとする報告もある⁶⁾. このようにポドサイトが傷害されるとその修復は困難であり, 糸球体の濾過機能が損なわれるだけでなく, 糸球体硬化への最初のステップの一つとしての意味ももっている. したがって, ポドサイトの障害の程度を把握することは病態の進行を予測する上で重要である.

ポドサイトの障害を正確に評価する最も良い方法は腎生検であるが, 侵襲的な方法であるため頻回に繰り返すことはできない. 蛋白尿はポドサイトの障害の指標として非常に有用であるが, 糸球体の障害全体を反映する検査でもあるために, 純粹にポドサイト障害のみを評価しているとはいえない. 原らは, 尿沈渣を蛍光抗体法で観察することによって糸球体から脱落したポドサイトを尿中に証明し, さらに尿中ポドサイト数は糸球体腎炎の病勢を反映することを見出した⁷⁾. ポドサイトが障害を受けても変化しにくい安定した糸球体上

皮細胞のマーカーとしてポドカリキシンが知られていることから^{7)–10)}, この研究では尿中に脱落したポドサイトのマーカーとしてポドカリキシンが使用された. しかし, この方法は尿沈渣の細胞診であるために検査に熟練を要すること, 手間がかかること, クレアチニン補正ができないことなどの問題点があった.

これらの問題を解決するために, 今回の研究では尿沈渣に含まれるポドカリキシンを enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 法で測定し, 臨床的有用性について検討した.

対象および方法

I. 対象

小児期 IgA 腎症患児55名, 紫斑病性腎炎患児17名, 健常小児135名. 対象の臨床的背景を表1に示す. このうち33名の尿中ポドサイト数と尿沈渣中ポドカリキシン陽性円柱の有無を測定し, 尿沈渣中ポドカリキシン値と比較検討した. また, 26名において組織学的検討を行った.

II. 尿沈渣ポドカリキシンの Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

1. 抗ヒトポドカリキシン単クローン抗体の作製とポドカリキシン測定系の確立

ELISA によるポドカリキシンの定量を施行するため抗ヒトポドカリキシン単クローン抗体の作製を行った. ヒト単離糸球体を Triton X-100 で溶解し, wheat germ agglutinin (WGA) カラムで精製し, BALB/c マウスに免疫した. 抗ヒト

表1 臨床的背景

	症例数	性(男:女)	年齢	蛋白尿 (mg/dl)	血清クレアチニン (mg/dl)	尿沈渣ポドカリキシン (ng/mg.Cr)
IgA腎症	55	29:26	13.9±0.7	122±49	0.61±0.03	17.9±3.5**
紫斑病性腎炎	17	12:5	10.1±0.7	34±14	0.50±0.04	9.3±3.3*
健常小児	135	69:66	11.0±0.3	4±2	—	0.7±1.5

"mean±SEM"にて表記。*P<0.001, **P<0.0001(健常小児と比較)。

ポドカリキシン抗体陽性のクローンのスクリーニングはヒト腎切片の間接蛍光抗体法での染色パターンとヒト単離糸球体の溶解物を用いたウエスタンブロッティングで行った。陽性対照として抗ヒトポドカリキシン単クローン抗体 PHM 5 を用いた。最終的に 22A 4, 3H11, 4D5 の三種のクローンが得られた。ELISA 測定系にはいくつかの組み合わせを試したうえで、22A 4 とアルカリフォスファターゼ標識 3H11 を選んだ。また、WGA カラムで精製したヒト単離糸球体可溶物を ELISA 測定系の標準品として用いた。図 1 に示すように、この測定系は 12.5 から 800 ng/ml で直線性を示し、測定限界は 6.25 ng/ml であった。測定値はクレアチニン補正を施行し、単位は ng/mg. Cr で表記した。

2. 尿サンプルの処理

検体には早朝第一尿 10 ml を用いた。尿を 3000 回転 5 分 (4℃) 遠心し、その沈渣を PBS で一回洗浄した。その後、沈渣を 100 μl の 0.2% Triton X-100 で溶解し、室温で 1 時間静置した。1500 回転 5 分 (4℃) 遠心し、その上清をポドカリキシン測定用の検体とした。

III. 尿中ポドサイトと尿沈渣中ポドカリキシン陽性円柱の評価方法

原らが報告した方法に基づき施行した⁷⁾。早朝尿を遠心し、スライドガラス上に尿沈渣を貼りつけ、抗ヒトポドカリキシン単クローン抗体 (PHM 5) と FITC 標識二次抗体で染色し、尿 10 ml 中のポドカリキシン陽性細胞数 (尿中ポドサイト数、

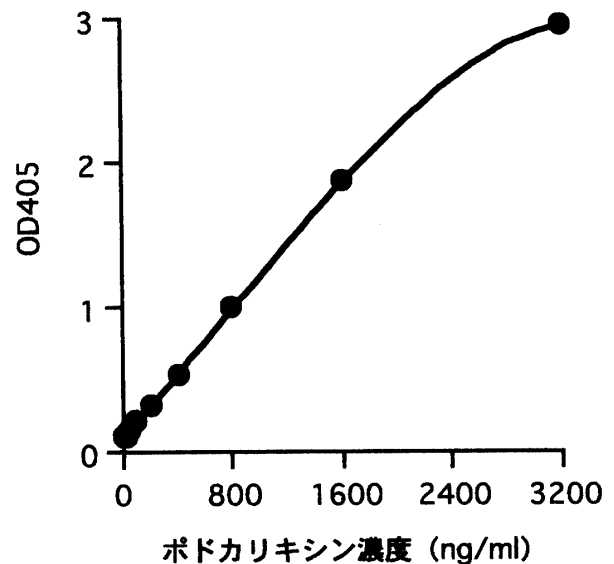


図1 ポドカリキシン測定系 (ELISA) の標準曲線

単位は個/ml) とポドカリキシン陽性円柱を数えた。ポドカリキシン陽性円柱は 0 ~ 1 /ml を陰性、1.1 /ml 以上を陽性として評価した。

IV. 組織学的検討

腎生検の前後 2 週間に尿沈渣ポドカリキシンを測定した 26 症例 (IgA 腎症 19 例, 紫斑病性腎炎 7 例) について、重松らの分類¹¹⁾ に基づいて、管外性病変 (急性, 慢性) の有無, メサングウムの増殖の程度, 間質の変化の有無を評価した。

V. 尿沈渣ポドカリキシンの経時的変化

尿沈渣ポドカリキシンの経時的な変化を 8 症例

(IgA 腎症 7 例, 紫斑病性腎炎 1 例) で検討した. 発症から 6 ヶ月未満を急性期, 6 ヶ月以上を慢性期として検討した.

VI. 統計

統計処理には Stat View 4.5 を使用した. 成績は “平均 ± 標準誤差” で表記した. 有意差検定には Mann-Whitney U-test, Kruskal-Wallis test, Kolmogorov-Smirnov test, Wilcoxon’s rank test を使用した. 相関の検定には Spearman’s rank test を使用した. また検定結果は $p < 0.05$ を有意とした.

結 果

1. メサンギウム増殖性腎炎における尿沈渣ポドカリキシン (図 2)

尿沈渣ポドカリキシンは健常小児に比べて患者群で有意に高値であった (健常小児 0.7 ± 1.5 , 患者群 15.6 ± 2.8 , $p < 0.0001$, 図 2).

2. 尿沈渣ポドカリキシンと他の検査所見 (図 3)

尿沈渣ポドカリキシンと蛋白尿の間に正の相関を認めた ($p < 0.0001$, $r = 0.682$, 図 3 A). また尿沈渣ポドカリキシンは血尿が (3+) 以上の群で (-) と (++) の群に比して有意に高値であっ

た (血尿 (-) 0.7 ± 0.2 , 血尿 (+) 15.4 ± 14.6 , 血尿 (2+) 2.2 ± 1.5 , 血尿 (3+) 以上 25.7 ± 4.3 , (-) と (3+) 以上では $p < 0.0001$, (2+) と (3+) 以上では $p < 0.001$, 図 3 B).

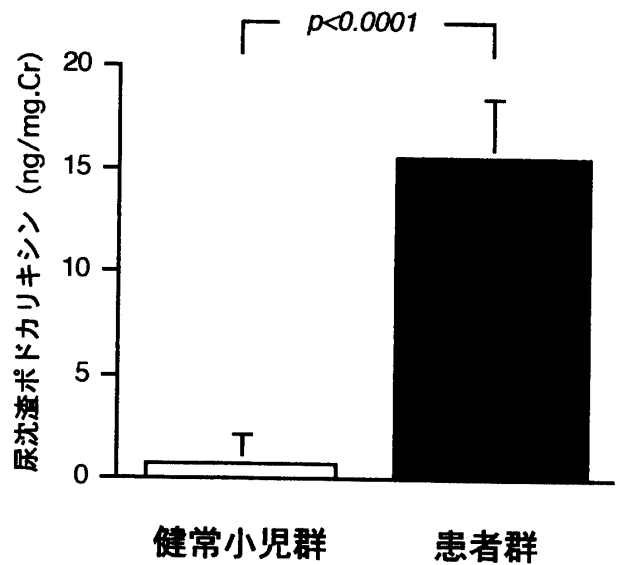


図 2 小児メサンギウム増殖性腎炎と健常小児における尿沈渣ポドカリキシン値の比較
小児メサンギウム増殖性腎炎患者群で尿沈渣ポドカリキシンは有意に高値であった.

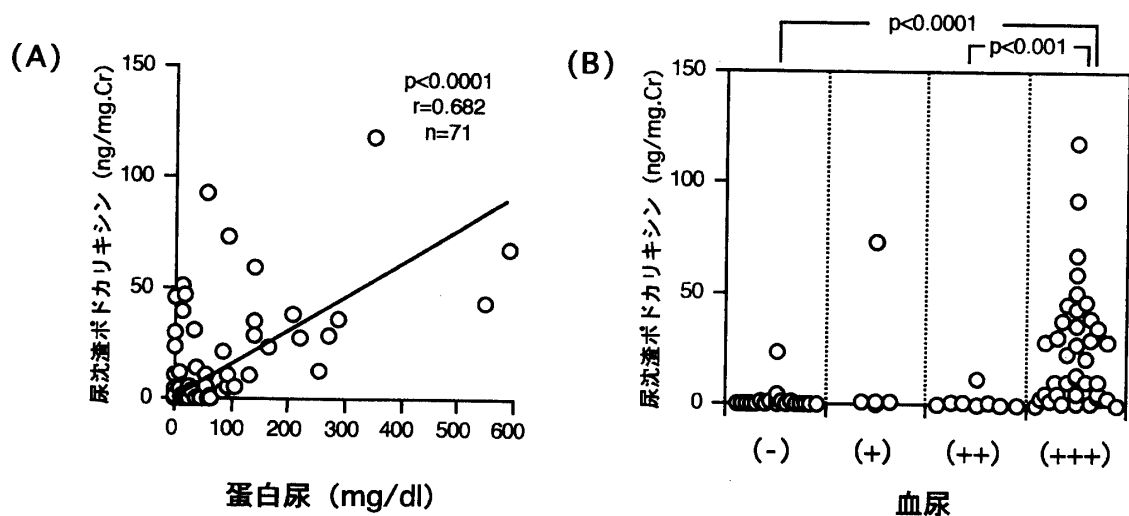


図 3 蛋白尿, 血尿と尿沈渣ポドカリキシン値の比較
(A) 尿沈渣ポドカリキシンと蛋白尿の間に正の相関関係を認めた. (B) 尿沈渣ポドカリキシンは血尿の (+++) の群で (-) と (++) の群に比較して有意に高値であった.

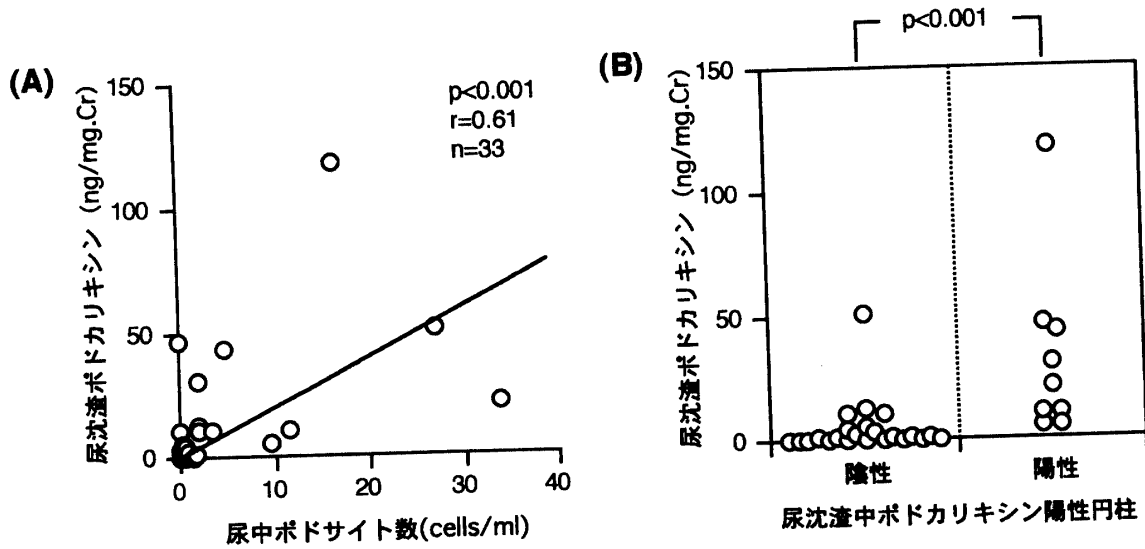


図4 尿中ポドサイト数, 尿中ポドカリキシン陽性円柱と尿沈渣ポドカリキシン値の比較
 (A) 尿沈渣ポドカリキシンと尿中ポドサイト数の間に正の相関を認めた. (B) 尿沈渣ポドカリキシンは尿中ポドカリキシン陽性円柱の陽性の群で有意に高値であった.

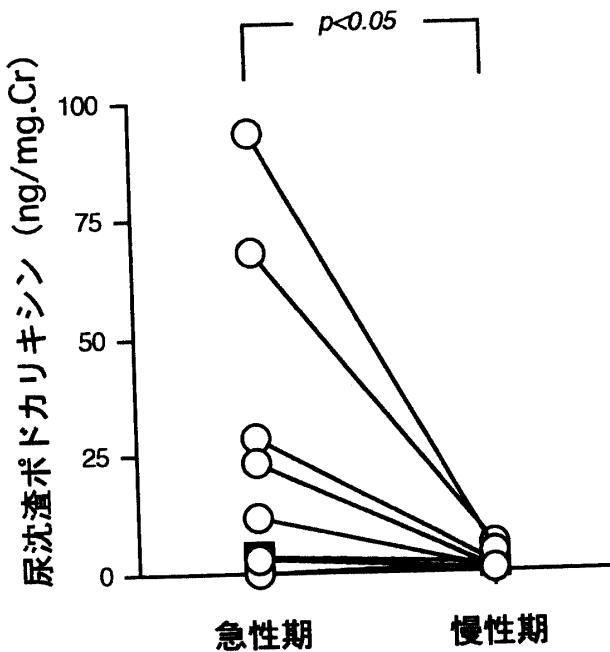


図5 急性期と慢性期で比較した尿沈渣ポドカリキシン値の変化

IgA腎症7例(○), 紫斑病性腎炎1例(□)で急性期と慢性期の尿沈渣ポドカリキシン値の変化を検討した. 急性期は慢性期に比較して有意に高値であった.

原らの方法による従来の尿細胞診との比較では, 尿沈渣ポドカリキシン値と尿中ポドサイト数の間に正の相関を認めた ($p < 0.001$, $r = 0.61$, 図4A). また, 尿沈渣ポドカリキシンは尿沈渣ポドカリキシン陽性円柱を認める群で有意に高値であった (尿沈渣ポドカリキシン陽性円柱あり 33.2 ± 10.1 , 円柱なし 4.7 ± 2.2 , $p < 0.001$, 図4B).

3. 尿沈渣ポドカリキシンの経時的変化

尿沈渣ポドカリキシンを急性期と慢性期で比較した. 尿沈渣ポドカリキシンは慢性期に比して急性期に有意に高値であった (急性期 29.8 ± 11.8 , 慢性期 2.4 ± 0.8 , $p < 0.05$, 図5).

4. 尿沈渣ポドカリキシンと組織所見 (図6)

尿沈渣ポドカリキシンは急性管外性病変のある群で有意に高値であった (急性管外性病変のある症例 37.4 ± 6.1 , ない症例 12.5 ± 6.5 , $p < 0.05$, 図6A). しかし, 慢性管外性病変の有無, メサングウム増殖の程度, 間質の変化の有無については有意な差を認めなかった (図6B, C, D).

考 案

ポドカリキシンはポドサイトの膜表面に存在す

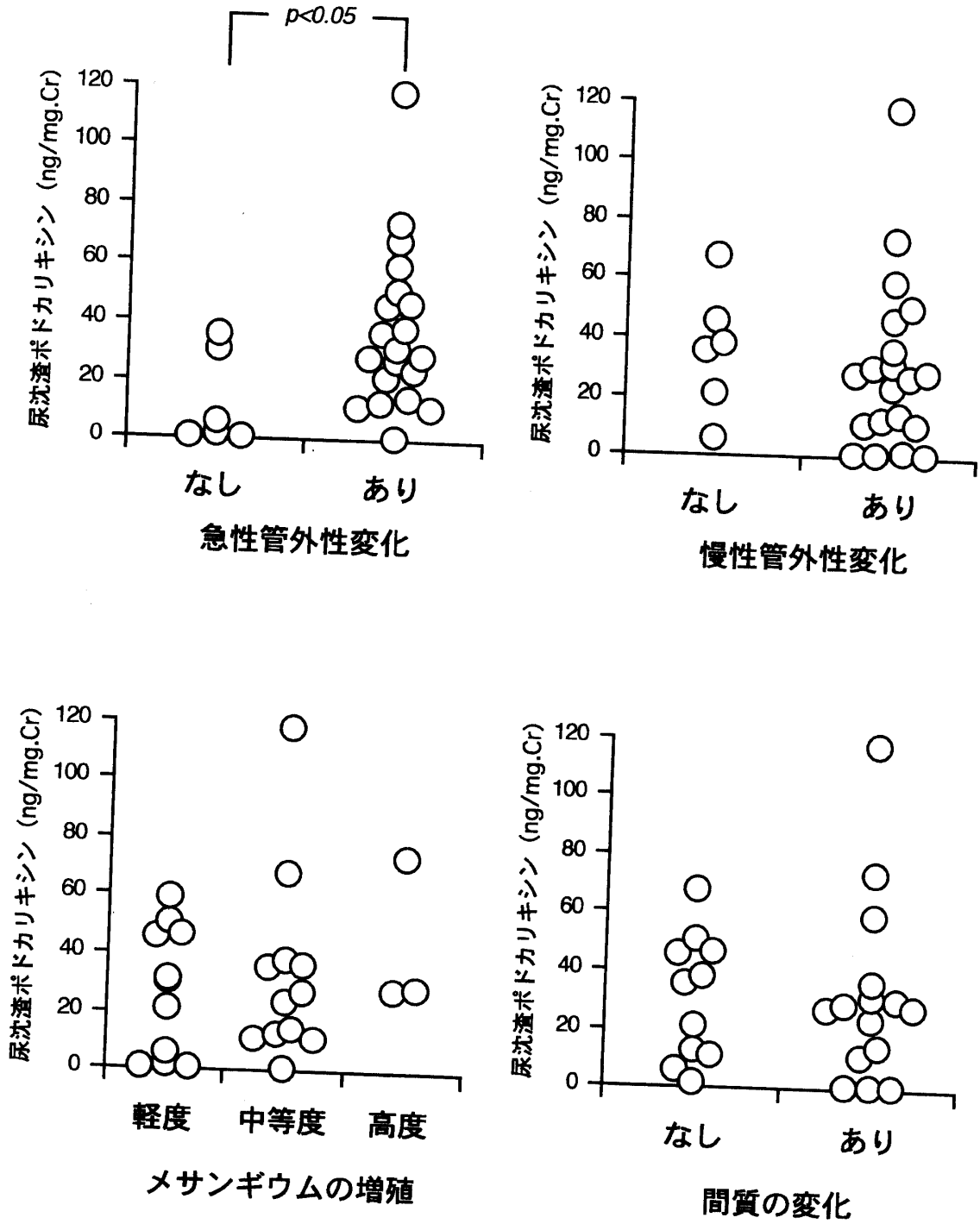


図6 尿沈渣ポドカリキシン値の組織学的検討

IgA腎症例、紫斑病性腎炎例について組織学的検討を行った。尿沈渣ポドカリキシンは急性管外性変化を認める群で有意に高値であった。

る糖蛋白であり、シアル酸に富んだ構造をもち、糸球体上皮細胞の陰性荷電に重要な役割をはたしている⁹⁾¹²⁾¹³⁾。また、その発現は糸球体上皮細胞が障害を受けても変化しにくいことから糸球体上皮細胞の有用なマーカーとして使われている⁹⁾¹⁰⁾¹²⁾。原らは、この性質を利用して、尿沈渣の抗ヒトポドカリキシンモノクローナル抗体の蛍光抗体法を用いて、糸球体腎炎患者の尿沈渣中にポドカリキシン陽性細胞が認められることを報告した。また、尿沈渣中のポドカリキシン陽性細胞数は、腎炎の急性期に高値となり、組織学的には急性管外性病変の有無と相関すると報告した⁷⁾¹⁴⁾¹⁵⁾。しかし、この方法は尿の細胞診であるために、検査に時間と労力が必要であること、検査技師の能力によって結果に差が生じる可能性があること、クレアチニン補正ができないことなどの問題があった。さらに、尿沈渣中に出現するポドカリキシン陽性円柱の評価が困難であることも問題であった。そこで今回の研究では、より簡便かつ客観的に尿沈渣中のポドカリキシンを評価する方法としてELISAを用いた。その結果、従来の評価方法である尿中ポドサイト数と今回のELISA法を用いた尿沈渣ポドカリキシンは極めて良好な相関を示した。

今回の研究では、尿沈渣ポドカリキシンは小児メサンギウム増殖性腎炎の急性期に高値を示し、組織学的には細胞性半月体の形成を中心とした急性管外性病変を認める群で高値であった。この結果は、原らの報告と一致している⁷⁾¹⁴⁾¹⁵⁾。以上からELISAによる尿沈渣ポドカリキシンの定量法は、従来の方法の欠点を改善した方法であり、小児メサンギウム増殖性腎炎の病勢を反映する有用な検査法と考えられる。

しかし、今回の方法にもいくつかの問題点があげられる。第一は尿のサンプリングである。尿沈渣を検査の対象としているため、尿コップに沈んでいる部分を取りこぼさないよう注意しなければならない。具体的には、患者が提出した尿コップから検査用のスピッツに尿を移すときには、尿コップ中の尿をよく攪拌する必要がある。これを忘れると偽陰性の原因になる。第二は尿中のポドカリ

キシンの由来についてである。ポドカリキシンは糸球体では糸球体上皮細胞のだけでなく、糸球体内皮細胞にも発現している⁹⁾¹²⁾。尿中に糸球体内皮細胞由来のポドカリキシンが混入している可能性を考慮して、われわれは尿沈渣を第Ⅷ因子やvon Willbrand因子などの内皮細胞のマーカーで染色し、尿沈渣中に糸球体内皮細胞の混入があるか検討してみたが、結果は陰性であった。また、内皮細胞は糸球体基底膜の内側に位置しているため、基底膜をのりこえてボウマン腔に入り、さらに尿沈渣中に出現するとは考えにくい。以上から、内皮細胞由来のポドカリキシンが尿沈渣中に混入している可能性は低く、混入していたとしても非常に微量で、測定値にはあまり影響しないのではないかと考えている。第三にポドサイトが形質変化をおこし、その膜表面からポドカリキシンが失われている場合には、尿沈渣ポドカリキシン値が糸球体のポドサイトの障害を反映しなくなる可能性があることである。近年、巣状糸球体硬化症やHIV関連腎炎において糸球体のポドサイトの形質変化がおこり、ポドサイトからマーカー蛋白であるポドカリキシンが失われると報告されている¹⁶⁾¹⁷⁾。しかし、今回の研究対象のIgA腎症と紫斑病性腎炎ではポドサイトの形質変化はあまり報告されていない。以上から、巣状糸球体硬化症やHIV関連腎炎においては問題になる可能性があるが、今回の研究ではポドサイトの形質変化の影響は考慮の必要はないと考えている。

今回の研究では、尿沈渣ポドカリキシンは急性管外性病変を認める群において有意に高値であった。小児メサンギウム増殖性腎炎における急性管外性病変、特に細胞性半月体の形成は腎炎の予後に関わる重要な所見である^{18)–22)}。糸球体の変化を評価する最も良い方法は腎生検であるが、侵襲的な検査であるため患者の負担が大きく、頻回に繰り返すことはできない。そのため尿検査で急性管外性病変の有無を予測することができれば、臨床的に大きな意味がある。現在、臨床的に汎用されている尿蛋白定量と尿沈渣鏡検は小児メサンギウム増殖性腎炎の検査として非常に優れているが、その値から糸球体の変化をすべて予測することは

困難である。今回の成績から、血尿、蛋白尿の所見に加え尿沈渣ポドカリキシンを定量することによって、患者の病勢のよりの確な把握が可能になると考えられる。

結 論

小児メサンギウム増殖性腎炎における尿沈渣ポドカリキシンの定量は、腎炎の活動性の指標として、また急性管外性病変の指標として臨床的に有用であると考えられる。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、今回の研究全般にわたって直接御指導いただきました原 正則先生(新潟県立吉田病院小児科)、河内 裕助教授(新潟大学医学部腎研究施設分子病態学分野)、清水不二雄教授(新潟大学医学部腎研究施設分子病態学分野)、研究指導および論文の御校閲をいただきました内山 聖教授(新潟大学大学院医歯学総合研究所内部環境医学講座小児科学分野)に深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Oriyasa M, Matsui T, Oite T and Shimizu F: Massive proteinuria induced in rats by a single intravenous injection of a monoclonal antibody. *J Immunol* 141: 807-814 1998.
- 2) Daniels BS and Deen WM: Glomerular permeability barrier in the rat: Functional assessment by in vitro methods. *J Clin Invest* 92: 929-936 1993.
- 3) Nagata M, Yamaguchi Y, Komatsu Y and Ito K: Mitosis and the presence of binucleate cells among glomerular podocytes in diseased human kidneys. *Nephron* 70: 68-71 1995.
- 4) Nagata M, Yamaguchi Y and Ito K: Loss of mitotic activity and the expression of vimentin in glomerular epithelial cells of developing human kidneys. *Anat Embryol* 187: 275-279 1993.
- 5) Whiteside C, Prutis K, Cameron R and Thompson J: Glomerular epithelial detachment, not reduced charge density, correlates with proteinuria in adriamycin and puromycin nephrosis. *Lab Invest* 61: 650-660 1989.
- 6) Kriz W, Gretz N and Lemley KV: Progression of glomerular diseases: Is the podocyte the culprit? *Kidney Int* 54: 687-697 1998.
- 7) Hara M, Yamamoto T, Yanagihara T, Takada T, Itoh M, Adachi Y, Yoshizumi A, Kawasaki K and Kihara I: Urinary excretion of podocalyxin indicates glomerular epithelial cell injuries in glomerulonephritis. *Nephron* 69: 397-403 1995.
- 8) Hancock WW and Atkins RC: Monoclonal antibodies to human glomerular cells: a marker for glomerular epithelial cells. *Nephron* 33: 83-90 1983.
- 9) Kerjaschki D, Poczewski H, Dekan G, Horvat R, Balzar E, Kraft N and Atkins RC: Identification of a major sialoprotein in the glycocalyx of human visceral glomerular epithelial cells. *J Clin Invest* 78: 1142-1149 1986.
- 10) Hara M, Yanagihara T, Ito M, Matsuno M and Kihara I: Immunohistochemical and urinary markers of podocytes injury. *Pediatr Nephrol* 12: 43-48 1998.
- 11) Shigematsu H and Koyama A: Significance of first renal biopsy histology for therapeutic selection in IgA nephropathy. *Jpn J Nephrol* 36: 331-338 1993.
- 12) Kerjaschki D: Dysfunctions of cell biological mechanisms of visceral epithelial cell (podocytes) in glomerular diseases. *Kidney Int* 45: 300-313 1994.
- 13) Sawada H, Stukenbrok H, Kerjaschki D and Farquhar M: Epithelial polyanion (podocalyxin) is found on the side but not the sole of the foot process of the glomerular epithelium. *Am J Pathol* 125: 309-318 1986.
- 14) Hara M, Yanagihara T, Takada T, Itoh M, Matsuno M, Yamamoto T and Kihara I: Urinary excretion of podocytes reflects disease activity in children with glomerulonephritis. *Am J Nephrol* 18: 35-41 1998.

- 15) Okubo S: A study of urinary podocalyxin in children with IgA nephropathy. *Jap J Nephrol* 37: 357-365 1995.
- 16) Bariety J, Bruneval P, Hill G, Irinopoulou T, Mandet C and Meyrier A: Post transplantation relapse of FSGS is characterized by glomerular epithelial cell transdifferentiation. *J Am Soc Nephrol* 12: 261-274 2001.
- 17) Barisoni L, Kritz W, Mundel P and D'agati V: The dysregulated podocyte phenotype: A novel concept in the pathogenesis of collapsing idiopathic focal segmental glomerulosclerosis and HIV-associated nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 10: 51-61 1999.
- 18) Yoshikawa N, Ito H and Nakamura H: Prognostic indicators in childhood IgA nephropathy. *Nephron* 60: 60-67 1991.
- 19) Shigematsu H, Ito N, Ishigame H, et al: Age related character of glomerular lesions in IgA nephritis (2) Histological peculiarity in childhood onset. *Jap J Nephrol* 34: 33-39 1991.
- 20) D'amico G, Minetti L, Ponticelli C, Fellin G, Ferrario F, Barbiano di BG, Imbasciati E, Ragni A, Bertoli S and Fogazzi G: Prognostic indicators in idiopathic IgA mesangial nephropathy. *Quant Med* 228: 363-378 1986.
- 21) Rodford MG Jr, Donadio JV Jr, Bergstralh EJ and Grande JP: Predicting renal outcome in IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 8: 199-207 1997.
- 22) Shigematsu H: Histological grading and staging of IgA nephropathy. *Pathol Int* 47: 194-202 1997.

(平成14年1月10日受付)