

IgA 腎症とループス腎炎におけるトロンボモジュリン,
プロテイン C, プロテイン C インヒビターの血中・尿中動態
およびトロンボモジュリンの糸球体内局在

奈良県立医科大学公衆衛生学教室

榎本 康博

PLASMA AND URINARY LEVELS OF THROMBOMODULIN, PROTEIN C,
PROTEIN C INHIBITOR AND INTRAGLOMERULAR LOCALIZATION OF
THROMBOMODULIN IN PATIENTS WITH IGA NEPHROPATHY
AND LUPUS NEPHRITIS

YASUHIRO ENOMOTO

Department of Public Health, Nara Medical University

Received May 29, 1992

Summary: The author investigated plasma and urinary levels of thrombomodulin (TM) antigen, protein C (PC) antigen, protein C inhibitor (PCI) activity and intraglomerular localization of TM antigen in IgA nephropathy (IgA-GN) and in lupus nephritis (LN).

The subjects enrolled in this study were 40 patients with IgA-GN, 20 patients with LN and 19 healthy volunteers as controls. Plasma and urinary levels of TM and PC antigen were measured by sandwich enzyme immunoassay. Plasma and urinary levels of PCI activity were expressed as inhibition activity for activated PC. Intraglomerular localization of TM antigen was detected by immunohistochemical methods using a polyclonal antibody for human TM.

Plasma TM levels in the advanced stage of IgA-GN and in diffuse proliferative LN were significantly higher than those in controls. On the contrary, urinary TM levels in the advanced stage of IgA-GN and in mesangial LN were significantly lower than those in controls. In IgA-GN there were significant positive correlations between the grade of mesangial proliferation and plasma levels of TM, PC or PCI. As for intraglomerular localization of TM, in IgA-GN the staining intensity of TM on endothelial cells of glomerular tufts was decreased according to mesangial proliferation. The staining intensity of TM was higher in mesangial LN than in diffuse proliferative LN.

These findings suggest that plasma TM, PC and PCI may be involved in progression of IgA-GN and that intraglomerular TM localization is influenced by the severity of glomerular lesions in IgA-GN as well as LN.

Index Terms

IgA nephropathy, lupus nephritis, protein C, protein C inhibitor, thrombomodulin

結 言

糸球体腎炎の進展には, 補体系, 凝固・線溶系, 血小板系, キニン・カリクレイン系, レニン・アンジオテンシン系など多くのメディエータが関与している. とりわけ, 糸球体腎炎における凝固・線溶系の関与について幾多の知見が重ねられており, 糸球体内血液凝固が糸球体腎炎の進展に重要な役割を果たしているとされている.

トロンボモジュリン(TM)は, 血管内皮細胞膜上でトロンピンと複合体を形成してトロンピンの凝固作用を不活化すると同時に, トロンピンのプロテインC(PC)活性化作用を亢進させる作用を有する. つまり TM は血管内血液凝固阻止における重要な物質といえる. また TM は血管内皮細胞膜上に存在するので, その血中濃度の上昇が血管内皮障害を反映するとされている¹⁾²⁾. しかし, 糸球体腎炎患者の血中・尿中 TM 抗原量について, その測定意義は十分に検討されておらず, 血中・尿中 TM 抗原量と糸球体病変の程度および糸球体内 TM 抗原局在の関係も不明であるのが現状といえる. また腎内 TM 抗原局在を電顕的に検討した報告もみられない. そこで今回著者は, IgA 腎症(IgA-GN)とループス腎炎(LN)を対象に血中・尿中 TM 抗原量を測定して血中・尿中 TM 抗原量と糸球体病変の程度および糸球体内 TM 抗原局在の関係を検討し, さらに腎内 TM 抗原局在について電顕的検討を加えた.

PC は, 血管内皮細胞膜上の TM と複合体を形成したトロンピンにより限定分解を受けて活性型 PC(APC)に変換される. APC は, 第 V a 因子と第 VIII a 因子を特異的に分解して失活させる. また APC は, プロテイン C インヒビター(PCI)と複合体を形成することにより失活する. 糸球体腎炎における PC の血中・尿中動態に関する報告は少なくないが³⁾⁻⁷⁾, ネフローゼ症候群を呈する糸球体腎炎患者を対象としたものが大半を占めている. また血中・尿中 PC 抗原量と糸球体病変の程度を対比した報告は見当たらない. 加えて, 糸球体腎炎における PCI の血中・尿中動態は現在まで検討されていない. そこで著者は, 上記の TM に加えて血中・尿中 PC 抗原量および PCI 活性を測定して PC と PCI の血中・尿中動態を解明するとともに, 糸球体病変と対比して糸球体腎炎の進展

に対する血中・尿中 PC および PCI の関与についても検討した.

対象と方法

1. 対象

対象は, 奈良県立医科大学第 1 内科に入院し腎生検を施行し得た IgA-GN 40 例と LN 20 例である. 対照には健康成人 19 例を用いた(Table 1). IgA-GN 40 例のうち 33 例は未治療例である. 残る 7 例には抗血小板薬が投与されていたが, 腎生検施行の 3 日前から中止した. LN 例では, 20 例中 16 例に副腎皮質ステロイド, 7 例に抗血小板薬, 3 例にワーファリンが投与されていたが, 腎生検施行の 3 日前から抗血小板薬とワーファリン投与を中止した.

2. 検体

(1) 採血: 対象例は腎生検実施日の早朝空腹時, 健康対照は早朝空腹時に採血した. 3.8%クエン酸ナトリウム 1 容と血液 9 容を混和し, 4℃, 15 分間, 3,000 rpm の条件下で遠心分離してその上清を被検血漿とし, TM 抗原量, PC 抗原量および PCI 活性の測定まで-70℃で凍結保存した.

(2) 採尿: 対象例は腎生検実施前日, 健康対照は採血前日に 24 時間冷蔵蓄尿した. その一部を 4℃, 15 分間, 3,000 rpm の条件下で遠心分離し, 上清を検体とした. 検体は, TM 抗原量, PC 抗原量および PCI 活性の測定まで-70℃で凍結保存した.

3. 血中・尿中 TM 抗原量, PC 抗原量および PCI 活性測定

TM 抗原量は抗ヒト TM ウサギポリクローナル抗体とベルオキシダーゼ標識抗ヒト TM モノクローナル抗体を用いた 1 ステップサンドイッチ EIA 法(TDC-90, 帝人社製), PC 抗原量は抗ヒト PC ウサギポリクローナル抗体を用いたサンドイッチ EIA 法(Asserachrom Protein C, Diagnostica Stago 社製)により測定した. PCI 活性は合成基質法(Stachrom PAI 3, Diagnostica Stago 社製)により測定したが, 同法はヘパリン存在下で発色性合成基質を用いて APC に対する阻害活性を測定する方法である. なお, PC 抗原量および PCI 活性の単位は, 健康成人から作成したブルー血漿を標準として用い

Table 1. Sex and age distribution of subjects in this study

Subjects	Number	Age(Mean±SD)	Sex(Male/Female)
Healthy volunteers	19	35±14	8/11
IgA nephropathy	40	33±13	16/24
Lupus nephritis	20	38±14	2/18

て決定した。つまり1単位(U)のPC抗原量およびPCI活性は、プール血漿1 mlに含まれる量とした。

4. 尿蛋白と腎機能の測定

尿蛋白はピロガロールレッド法(和光純薬社製)、内因性クレアチニンクリアランス(Ccr)は24時間法、尿中 β_2 ミクログロブリン(β_2 MG)はサンドイッチEIA法(ダイナボット社製)で測定した。なおCcr 80 ml/分以上の腎機能を示す症例を糸球体機能正常例、100 μ g/日以下の尿中 β_2 MG排泄量を示す症例を間質機能正常例とした。

5. 組織学的検討

(1) IgA-GN: 上記の血中・尿中TM抗原量、PC抗原量およびPCI活性と糸球体病変との関係を検討するために、IgA-GNをPAS染色の光顕所見からメサンギウム増生の程度により次の3段階に分類した。

I: 軽微メサンギウム増生; メサンギウム細胞の増殖とメサンギウム基質の増加は軽微にとどまっており、メサンギウム増生の明らかでない糸球体も混在している。係蹄腔は狭細化を示さない。

II: 軽度メサンギウム増生; 大部分の糸球体は係蹄腔の狭細化を呈さない程度のメサンギウム増生を示す。

III: 中等度~高度メサンギウム増生; 大半の糸球体はメサンギウム細胞の増殖と基質の増加によって係蹄腔の狭細化を示す。

この分類に準ずれば、今回対象とした40例は、I群5例、II群14例、III群21例に分類された。

(2) LN: LNの光顕分類はWHO分類⁹⁾にしたがった。今回対象とした20例は、II型(メサンギウムループ腎炎)10例、IV型(びまん性増殖性ループ腎炎)10例に分類された。またLNの一部の症例には電顕的検討を加えた。

6. 免疫組織学的検討

腎内TM抗原の分布を免疫組織学的手法を用いて光顕的および電顕的に検討した。

(1) 光顕的検討: 標本には、腎生検組織をホルマリン固定後、パラフィン切片としたものを用いた。染色法は、Maruyamaら⁹⁾の方法を改変したストレプトアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合法を用いる酵素抗体法による。染色方法の概要を以下に記す。標本を脱パラフィン後、TBS(0.05 M Tris, 0.15 M NaCl, PH 7.6)で洗浄し、3% H₂O₂で内因性ペルオキシダーゼを阻止した。TBSで洗浄後、1% ウシ血清アルブミン(BSA, Sigma社製)加TBSで10 μ g/mlの濃度に希釈した抗ヒトTMウサギポリクローナル抗体(帝人社製)と4℃で20時間反応させた。TBSで洗浄後、ビオチン標識抗ウサギイムノグロブリン・ヤギ抗体(DAKO社製)と室温で

10分間反応させてからTBSで洗浄した。ついでペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン試薬(DAKO社製)と室温で15分間反応させた。TBSで洗浄後、0.3% H₂O₂加3% AEC(3-アミノ-9-エチルカルバゾール, DAKO社製)で発色させた。後染色にはマイヤーヘマトキシリン染色を用いた。

糸球体係蹄内皮のTM抗原の染色の程度は、次の4段階に分類した。

0: すべての糸球体においてTM抗原が係蹄内皮で染色されない。

1+: 50%未満の糸球体においてTM抗原が係蹄内皮で分節状に染色される。

2+: 50%以上の糸球体においてTM抗原が係蹄内皮で分節状に染色される。

3+: すべての糸球体においてTM抗原が係蹄内皮でびまん性に染色される。

(2) 電顕的検討: 腎生検組織をPLP固定液で固定後、段階的濃度の蔗糖加PBS(0.1 M リン酸緩衝液, 0.15 M NaCl, PH 7.2)で洗浄した。OCTコンパウンド(Miles社製)で包埋し、液体窒素中で急速凍結した。クリオスタットで薄切後、室温で30分間風乾した。染色方法は、光顕的検討で使用したストレプトアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合法を一部改変して用いた。標本をPBSで洗浄後、3% H₂O₂で内因性ペルオキシダーゼを阻止した。ついでPBSで洗浄後、1% BSA加PBSにより10 μ g/mlの濃度に希釈した抗ヒトTMウサギポリクローナル抗体と室温で2時間反応させた。PBSで洗浄後、ビオチン標識抗ウサギイムノグロブリン・ヤギ抗体と室温で10分間反応させた。PBSで洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン試薬と室温で15分間反応させてから1% グルタルアルデヒドで4℃, 30分間固定した。PBSで洗浄後、0.02% DAB(3-3'-ジアミノベンチジン4塩酸塩, ナカライテスク社製)溶液と室温で1時間反応させた。さらに0.005% H₂O₂加DAB溶液と反応させた。水洗後、室温で1時間2% オスミウム酸で固定した。PBSで洗浄後、エタノール系列で脱水してからエポキシ樹脂で包埋し、超薄切片を作成した。

7. 推計学的処理

推計学的検討は、Mann-Whitney検定とSpearmanの順位相関係数、およびFisherの直接確率法による。なお本文中における測定値は、中央値と四分位範囲(括弧内の値)で示した。

成 績

1. 血中・尿中TM抗原量

(1) IgA-GN：血中 TM 抗原量測定例は対象 40 例中 31 例であった。III群の血中 TM 抗原量は、20.8 ng/ml (10.7 ng/ml)であり、対照群の 13.8 ng/ml(6.0 ng/ml)，I群の 9.0 ng/ml(6.5 ng/ml)，II群の 9.6 ng/ml (5.4 ng/ml)に比して有意に高値を示した。他の群間では差が認められなかった。

尿中 TM 抗原量測定例は 30 例であった。III群の尿中 TM 抗原量は、29.9 μ g/日(24.8 μ g/日)であり、対照群の 56.0 μ g/日(37.0 μ g/日)に比して有意に低値を示した。他の群間では差が認められなかった(Fig. 1)。

(2) LN：血中 TM 抗原量測定例は対象 20 例中 11 例であった。IV型の血中 TM 抗原量は、23.5 ng/ml(4.0 ng/ml)であり、対照群の 13.8 ng/ml(6.0 ng/ml)に比して有意に高値を示した。他の群間では差が認められなかった。

尿中 TM 抗原量測定例は 11 例であった。II型の尿中 TM 抗原量は、23.2 μ g/日(14.6 μ g/日)であり、対照群の 56.0 μ g/日(37.0 μ g/日)に比して有意の低値を示した。またIV型の尿中 TM 抗原量は、対照群に比して低値を示す傾向にあった(Fig. 1)。

(3) 血中 TM 抗原量と尿中 TM 抗原量の関係

IgA-GN 群、LN 群および対照群のいずれの群においても、血中 TM 抗原量は尿中 TM 抗原量と有意の相関を示さなかった。

2. 血中・尿中 PC 抗原量

(1) IgA-GN：血中 PC 抗原量測定例は 31 例であった。III群の血中 PC 抗原量は、104 U/dl(23 U/dl)であり、対照群の 90 U/dl(18 U/dl)に比して有意に高値を示した。他の群間では差が認められなかった。

尿中 PC 抗原量測定例は 29 例であった。尿中 PC 抗原量は、各群間で差を示さなかった(Fig. 2)。

(2) LN：血中 PC 抗原量測定例は 11 例であった。IV型の血中 PC 抗原量は、136 U/dl(34 U/dl)であり、対照群の 90 U/dl(18 U/dl)に比して有意に高値を示した。II型の血中 PC 抗原量は、対照群に比して高値を示す傾向にあった。

尿中 PC 抗原量測定例は 10 例であった。尿中 PC 抗原量は、各群間で差を示さなかった(Fig. 2)。

(3) 血中 PC 抗原量と尿中 PC 抗原量の関係

IgA-GN 群、LN 群および対照群のいずれの群においても、血中 PC 抗原量は尿中 PC 抗原量と有意の相関を示さなかった。

3. 血中・尿中 PCI 活性

(1) IgA-GN：血中 PCI 活性測定例は 31 例、尿中 PCI 活性測定例は 29 例であった。血中 PCI 活性は、III群が I 群に比して高値傾向を示し、尿中 PCI 活性も III群が対照群に比して低値傾向を示したにすぎなかった(Fig. 3)。

(2) LN：血中・尿中 PCI 活性測定例は 11 例であった。血中 PCI 活性と、尿中 PCI 活性は共に IV群が対照群

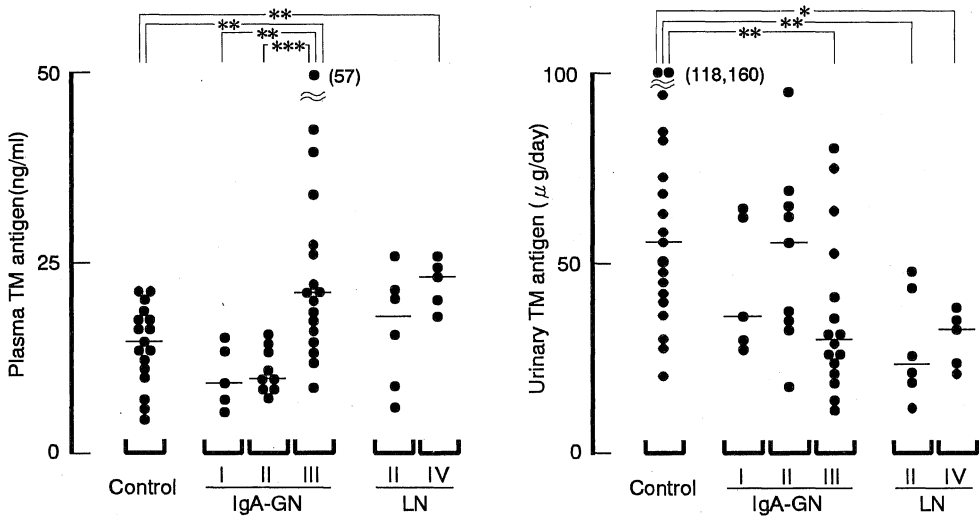


Fig. 1. Plasma and urinary TM levels in controls and patients with IgA-GN or LN. IgA-GN I ; minimal mesangial proliferation, IgA-GN II ; mild mesangial proliferation, IgA-GN III ; moderate to severe mesangial proliferation, LN II ; mesangial lupus nephritis (WHO II), LN IV ; diffuse proliferative lupus nephritis (WHO IV). The solid lines represent median values. *, p < 0.05, **, p < 0.01, ***, p < 0.001.

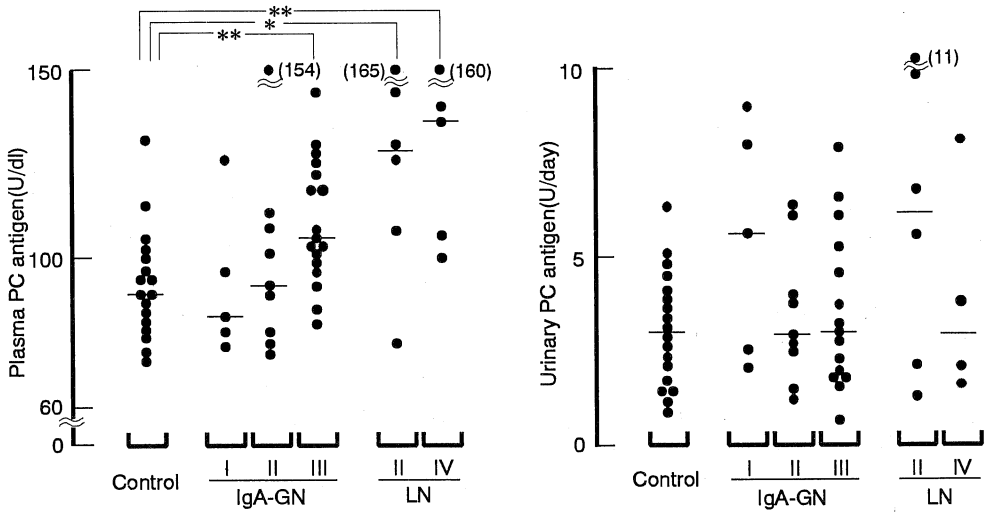


Fig. 2. Plasma and urinary PC levels in controls and patients with IgA-GN or LN. The solid lines represent median values. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$.

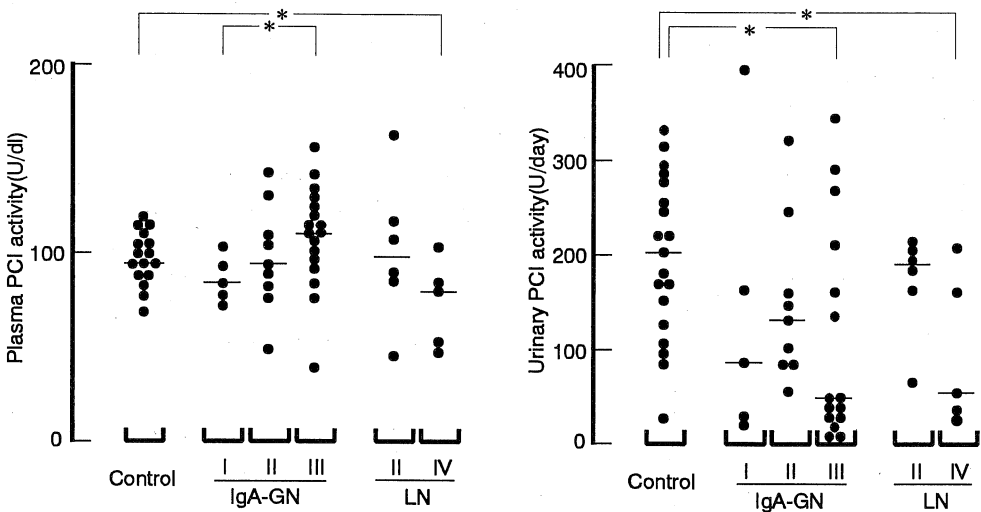


Fig. 3. Plasma and urinary PCI levels in controls and patients with IgA-GN or LN. The solid lines represent median values. *, $p < 0.05$.

に比して低値傾向を示した (Fig. 3).

(3) 血中 PCI 活性と尿中 PCI 活性の関係

IgA-GN 群, LN 群および対照群のいずれの群においても, 血中 PCI 活性は尿中 PCI 活性と有意の相関を示さなかった。

4. 血中・尿中 PC 抗原量と血中・尿中 PCI 活性の関係

(1) IgA-GN: 血中 PC 抗原量は血中 PCI 活性と有意の正相関 ($r=0.521, p < 0.01$) を示した。尿中 PC 抗原量は尿中 PCI 活性と有意の正相関 ($r=0.439, p < 0.05$)

を示した。

(2) LN: 血中 PC 抗原量は血中 PCI 活性と, 尿中 PC 抗原量は尿中 PCI 活性と有意の相関を示さなかった。

5. IgA-GN における血中・尿中 TM 抗原量, PC 抗原量および PCI 活性とメサンギウム増生の関係

IgA-GN の血中 TM 抗原量はメサンギウム増生の程度と有意の正相関 ($r=0.723, p < 0.001$), 血中 PC 抗原量は有意の正相関 ($r=0.454, p < 0.05$), 血中 PCI 活性も有意の正相関 ($r=0.457, p < 0.01$) を示した。一方, 尿中

TM抗原量, PC抗原量およびPCI活性は, メサンギウム増生の程度と有意の相関を示さなかった(Table 2).

6. 血中・尿中 TM 抗原量, PC 抗原量, PCI 活性と蛋白尿および腎機能の関係

(1) IgA-GN: 血中 TM 抗原量は蛋白尿と有意の正相関($r=0.604, p<0.001$), 血中 PC 抗原量は有意の正相関($r=0.452, p<0.05$), 血中 PCI 活性も有意の正相関($r=0.446, p<0.05$)を示した. また, 血中 TM 抗原量は Ccr と有意の負相関($r=-0.548, p<0.01$), 血中 PCI 活性は有意の負相関($r=-0.381, p<0.05$)を示した. 血中 PC 抗原量は Ccr と, 血中 TM 抗原量, PC 抗原量および PCI 活性は尿中 β_2 MG と有意の相関を示さなかった.

一方, 尿中測定項目については, TM 抗原量が Ccr と有意の正相関($r=0.635, p<0.01$), PCI 活性が Ccr と有意の正相関($r=0.451, p<0.05$)を示したにすぎなかった(Table 3).

(2) LN: LN では, IgA-GN の場合と異なり, 血中 TM 抗原量が蛋白尿と有意の正相関($r=0.648, p<0.05$), 尿中 TM 抗原量が Ccr と有意の正相関($r=$

$0.702, p<0.05$), 尿中 β_2 MG と有意の負相関($r=-0.817, p<0.05$)を示したにすぎなかった(Table 3).

7. 腎機能正常例における血中・尿中 TM 抗原量

(1) IgA-GN: 血中・尿中 TM 抗原量測定例 31 例中 21 例が腎機能正常例であった. III群の血中 TM 抗原量は, $19.5 \text{ ng/ml}(9.1 \text{ ng/ml})$ であり, II群の $9.5 \text{ ng/ml}(4.1 \text{ ng/ml})$ に比して有意に高値を示し, 対照群および I群に比して高値を示す傾向にあった. また, 腎機能正常例においても, 血中 TM 抗原量は, メサンギウム増生の程度と有意の正相関($r=0.679, p<0.01$)を示した. 一方, 尿中 TM 抗原量は, 各群間で差を示さなかった(Table 4).

(2) LN: 血中・尿中 TM 抗原量測定例 11 例中 7 例が腎機能正常例であった. 血中 TM 抗原量は, IV型が対照群に比して高値傾向を示したにすぎなかった. 尿中 TM 抗原量は, 各群間で差を示さなかった(Table 4).

8. 尿中 β_2 MG と腎間質病変の関係

(1) IgA-GN: 尿中 β_2 MG 測定 33 例中 20 例は正常範囲の尿中 β_2 MG 排泄量を示した. この 20 例中 8 例は

Table 2. Relationships between plasma or urinary TM, PC, PCI levels and grade of mesangial proliferation in IgA-GN

Parameter	Grade of mesangial proliferation
in plasma	
TM	0.723(31)***
PC	0.454(31)*
PCI	0.457(31)**
in urine	
TM	-0.170(30)
PC	-0.074(29)
PCI	-0.092(29)

Figures represent Spearman's correlation coefficients.
 *; $p<0.05$, **; $p<0.01$, ***; $p<0.001$, () ; number of subjects.

Table 3. Relationships between plasma or urinary TM, PC, PCI levels and urinary protein or renal function in IgA-GN and LN

Parameter	IgA-GN			LN		
	Urinary protein	Ccr	Urinary β_2 MG	Urinary protein	Ccr	Urinary β_2 MG
in plasma						
TM	0.604(31)***	-0.548(31)**	-0.135(25)	0.648(11)*	-0.589(11)	0.096(9)
PC	0.452(31)*	-0.093(31)	-0.269(25)	0.209(11)	-0.291(11)	0.000(9)
PCI	0.446(31)*	-0.381(31)*	-0.276(25)	-0.255(11)	-0.336(11)	0.483(9)
in urine						
TM	-0.239(30)	0.635(30)**	-0.109(24)	-0.102(11)	0.702(11)*	-0.817(9)*
PC	-0.059(29)	0.168(29)	0.157(23)	-0.527(10)	0.103(10)	-0.167(9)
PCI	-0.248(29)	0.451(29)*	-0.168(23)	-0.118(11)	0.300(11)	0.617(9)

Figures represent Spearman's correlation coefficients. *; $p<0.05$, **; $p<0.01$, ***; $p<0.001$, () ; number of subjects.

光顕的に明らかな間質病変を示さなかったが、12例が軽度の間質病変を示した。尿中 β_2 MG 排泄量の増加(100 μ g/日以上)を示した13例中4例は光顕的に明らかな間質病変を示さなかったが、9例が軽度から高度の間質病変を示した。

(2) LN：尿中 β_2 MG 測定15例中3例は正常範囲の尿中 β_2 MG 排泄量を示した。この3例中2例は光顕上明らかな間質病変を示さなかったが、1例が軽度の間質病変を示した。尿中 β_2 MG 排泄量の増加を示した12例中4例は光顕上明らかな間質病変を示さなかったが、8例が軽度から高度の間質病変を示した。

9. 糸球体内 TM 抗原染色の程度と糸球体病変の関係

(1) 光顕的検討

1) IgA-GN：糸球体内 TM 抗原染色程度が低下するとともに、メサンギウム増生の進展を示す症例の頻度は増加した(p<0.001)(Table 5)。

2) LN：糸球体内 TM 抗原染色程度が低下するとともに、IV型の糸球体病変を呈する症例の頻度は増加した(p<0.01)(Table 5)。

(2) 電顕的検討

Table 4. Plasma and urinary TM levels in controls, IgA-GN and LN having normal renal function

Subjects	n	Plasma TM (ng/ml)	Urinary TM (μ g/day)
Control	19	13.8[6.0]	56.0[37.0]
IgA-GN I	5	9.0[6.5]	35.7[33.7]
	II 8	9.5[4.1]	58.8[31.8]
	III 8	19.5[9.1]	47.0[36.9]
LN	II 4	12.1[10.8]	34.4[22.4]
	IV 3	20.0,24.0,26.0	34.2,34.5,38.0

Figures represent median values with the interquartile range in the parenthesis except LN IV in which the data for three of all subjects were shown. *; p<0.05, **; p<0.01.

Table 5. Grade of TM staining in glomeruli by the stage of IgA-GN and LN

Subjects	Grade of TM staining				
	0	1+	2+	3+	
IgA-GN					
I	0	1	3	1	}***
II	1	2	7	0	
III	1	9	0	0	
LN					
II	1	0	4	5	}**
IV	4	4	2	0	

; p<0.01, *; p<0.001 by Fisher's exact test.

LN 例を対象に、係蹄内皮細胞の電顕所見と糸球体内 TM 抗原染色程度の関係について検討した。対象例は、TM 抗原染色程度3+の5例中3例、染色程度0の5例中2例である。染色程度3+の3例は電顕上係蹄内皮に明らかな変化を示さなかったが、染色程度0の2例は高

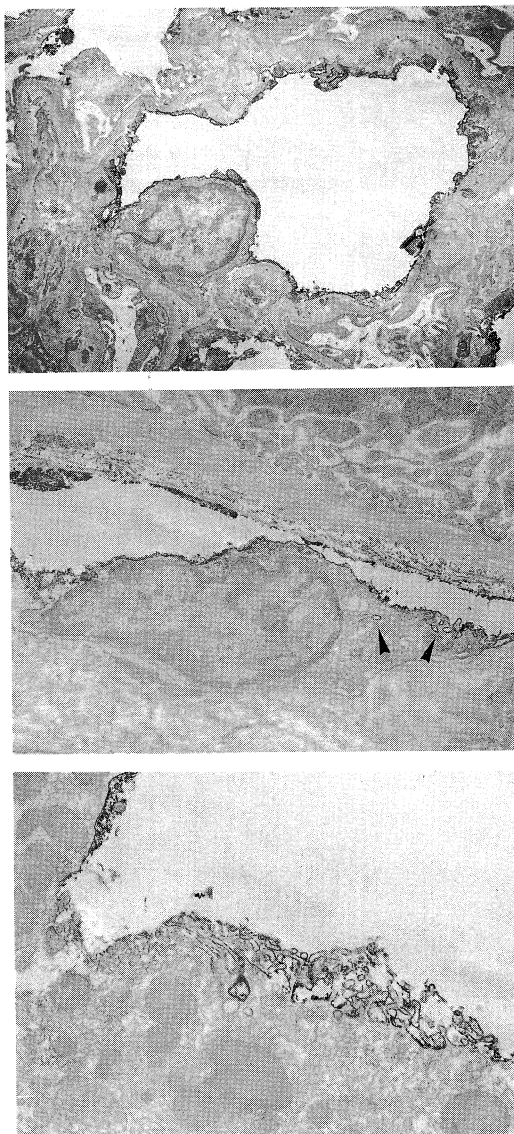


Fig. 4. (upper) Immunoelectron microscopic findings of TM. TM antigens were present along the cell membrane of the endothelial cell ($\times 4,000$). (middle) Note TM staining of rough endoplasmic reticulum in the endothelium (arrow)($\times 9,000$). (lower) Surface of brush borders in the proximal tubule showed positive for TM ($\times 11,000$).

度の内皮細胞浮腫性腫脹と内皮下腔拡大を示した。

10. 糸球体内 TM 抗原染色の程度と血中・尿中 TM 抗原量の関係

IgA-GN 17 例と LN 11 例の計 28 例には、血中・尿中 TM 抗原量測定時に免疫組織学的検討を実施した。糸球体内 TM 抗原染色の程度は、IgA-GN 群と LN 群の両群において血中・尿中 TM 抗原量と有意の相関を示さなかった。

11. 腎内 TM 抗原局在の電顕的検討

Fig. 4 の上段に糸球体係蹄内皮、中段に血管内皮、下段に尿管上皮の免疫電顕像を示す。TM 抗原は、糸球体係蹄内皮および血管内皮細胞表面に沿って染色されており、尿管細管刷子縁さらには血管内皮細胞粗面小胞体の一部にも観察された。しかし、腫大した係蹄内皮細胞表面には TM 抗原は認められなかった。

考 察

1. 血中・尿中 TM 抗原量および糸球体内 TM 抗原局在

TM は、主に血管内皮細胞膜表面に存在する糖蛋白であるが、リンパ管内皮細胞、胎盤の合体細胞⁹⁾、血小板¹⁰⁾さらに血中、尿中¹¹⁾にも存在する。石井ら¹²⁾は、血中 TM の由来について培養内皮細胞を用いた検討から、血中 TM が血管内皮細胞から分泌されたものではなく、血管内皮細胞の破壊により血中に遊離したものであるとしている。現在、この知見から血中 TM は血管内皮細胞障害の指標と考えられている。一方、血管内皮細胞膜の TM 抗原量は、培養内皮細胞を用いた検討から、炎症のメディエータである TNF(腫瘍壊死因子)やインターロイキン 1 の添加で減少することが報告されている¹²⁾¹³⁾。また丸山ら¹⁴⁾は、実験的 DIC ラットの腎糸球体では免疫組織学的に TM 抗原量の減少がみられたと報告している。さらに妊娠中毒症患者の胎盤合体細胞における TM 抗原量減少を明らかにした報告もみられる¹⁵⁾。これらの知見は、炎症性疾患あるいは血栓性疾患では血管内皮細胞膜 TM 抗原量が減少していることを示唆している。

現在までに糸球体腎炎患者の血中・尿中 TM 抗原量を測定した報告¹⁶⁾や、糸球体内 TM 抗原局在を検討した報告¹⁷⁾は限られており、血中・尿中 TM 抗原量が糸球体病変の程度を反映するか否かは不明であり、また糸球体病変の程度と糸球体内 TM 抗原局在の関係についてもまだ検討されていない。そこで今回著者は、IgA-GN と LN を対象に血中・尿中 TM 抗原量を測定して糸球体病変の程度と対比し、さらに糸球体内 TM 抗原局在と糸球体病変の関係についても検討した。

(1) IgA-GN: 血中 TM 抗原量は、メサンギウム増生の程度と有意の正相関を示し、Ccr と有意の負相関を示した。つまり血中 TM 抗原量は糸球体病変の程度および腎機能の指標となることが示唆された。糖尿病性腎症、LN あるいは糸球体腎炎患者では、血中 TM 抗原量は腎機能の低下とともに増加したが、逆に尿中 TM 抗原量は減少したという報告がある¹¹⁾¹⁸⁾¹⁹⁾。今回の検討でも血中 TM 抗原量は腎機能と有意の相関を示した。つまり血中 TM 抗原量とメサンギウム増生の間に認められた正相関は、腎機能低下に伴う尿中 TM 抗原排泄量減少を反映したものにすぎない可能性がある。そこで腎機能正常例について血中 TM 抗原量とメサンギウム増生の関係を検討した。腎機能正常例に限った検討でも、血中 TM 抗原量は、メサンギウム増生の程度と有意の正相関を示しており、糸球体病変の悪化とともに増加することが明らかになった。

一方、尿中 TM 抗原量は、対照群に比して III 群(中等度～高度メサンギウム増生)が有意の低値を示した。しかし腎機能正常例における検討では両群間に有意差はみられず、III 群における尿中 TM 抗原量減少は腎機能低下によるものと考えられた。

糸球体内 TM 抗原局在と糸球体病変の関係については、糸球体内 TM 抗原染色の程度はメサンギウム増生の進展とともに低下しており、糸球体内 TM 抗原量はメサンギウム増生の進展とともに減少すると考えられる。既に述べたように実験的 DIC ラットの腎糸球体¹⁴⁾あるいは妊娠中毒症患者の胎盤合体細胞¹⁵⁾では TM 抗原量の減少していることが明らかにされている。DIC や妊娠中毒症²⁰⁾は過凝固状態にあり、腎糸球体あるいは胎盤合体細胞の TM 抗原量の減少には凝固能亢進が関与していると推察される。今回観察されたメサンギウム増生の進展に伴う糸球体内 TM 抗原量の減少にも糸球体内血液凝固亢進が関与しているものと推察される。また逆に、メサンギウム増生の進展に伴う糸球体内 TM 抗原量の減少は、TM を介する係蹄内皮の凝固抑制作用が糸球体病変の悪化とともに低下することを意味している。

(2) LN: 血中 TM 抗原量は、対照群に比して WHO IV 型で有意の高値を示し、腎機能正常例に限った検討でも対照群に比して IV 型が高値傾向を示した。血中 TM 抗原量は、LN においても IgA-GN と同様に糸球体病変の悪化とともに増加すると考えられた。

一方、尿中 TM 抗原量は、対照群に比して II 型で有意の低値、IV 型で低値傾向を示したが、腎機能正常例についての検討では対照群と II 型及び IV 型間に有意差を示さなかった。このことから、LN における尿中 TM 抗原

量の減少は、IgA-GNと同様に腎機能低下によると考えられた。またLNにおいては尿中TM抗原量は尿中 β_2 MGと負相関を示したことから、LNにおける尿中TM抗原量の減少には尿細管機能障害が関与していることが示唆された。LNにおける尿中 β_2 MG上昇が尿細管機能障害を反映しているか否かについては、尿中 β_2 MGの上昇を認めた症例は光顕的に間質病変を呈する頻度が高かったことから、LNにおける尿中 β_2 MG上昇は尿細管機能障害を反映すると考えられる。なお、IgA-GNでは尿中TM抗原量が尿中 β_2 MGと有意の相関を示さなかったが、今回検討したIgA-GNはLNに比して尿中 β_2 MG上昇例が少なかったことに起因しているものと考えられる。

糸球体内TM抗原局在と糸球体病変の関係については、WHO IV型の糸球体内TM抗原染色の程度が、II型に比して低下していた。また糸球体内TM抗原染色の程度を電顕所見と対比して検討した今回の成績では、糸球体内TM抗原染色の程度は係蹄内皮細胞の腫大が認められた症例において低下しており、係蹄内皮細胞障害の進展とともに糸球体内TM抗原量が減少することが示唆された。

2. 血中・尿中PC抗原量

糸球体腎炎の進展には凝固・線溶系の関与が大であるが、PCの血中・尿中動態についてはいまだ不明な点が多く残されている。今回著者は、血中・尿中PC抗原量を測定して糸球体病変の程度と対比することにより、糸球体腎炎の進展に伴うPCの血中・尿中動態を明らかにした。

(1) IgA-GN：ネフローゼ症状を呈する糸球体腎炎患者は、血中PC活性または抗原量の上昇あるいは増加を示すという報告が多い³⁻⁶⁾。それらの報告は、ネフローゼ症候群における血中PC抗原量増加の機序を肝の合成亢進によるものと推測している。今回の検討では、血中PC抗原量は腎機能および尿中PC抗原量と有意の相関を示さず、また尿中PC抗原量も対照群とI、II、III群の各群間に有意な差を示さなかった。以上のことから、メサンギウム増生の進展に伴う血中PC抗原量の増加は、腎機能低下に伴う尿中PC抗原排泄量の減少によるものではないことが示唆された。おそらく従来の報告と同様に肝における産生の亢進が関与しているものと推察される。

(2) LN：SLEの血中PC抗原量を測定した報告は多い²¹⁻²⁴⁾。しかし、血中PC抗原量が増加していたとする報告²¹⁾²²⁾と健常対照と差を示さないとする報告²³⁾²⁴⁾が混在しており、一定した見解が得られていないのが現状である。今回の検討では、血中PC抗原量は、対照群に比してWHO IV型で有意の高値、II型で高値傾向を示した。また

尿中PC抗原量はII型およびIV型の両群と対照群の間に有意差を示さず、さらに血中・尿中PC抗原量も腎機能と有意の相関を示さなかったことから、LNにおける血中PC抗原量増加は腎機能の低下に起因しないと考えられる。

一方、血中PC抗原量は副腎皮質ステロイド投与によって増加することが指摘されている²⁵⁾²⁶⁾。血中・尿中PC抗原量を測定した今回の症例は対象20例中11例にすぎないが、全例が副腎皮質ステロイド投与例であったことから、血中PCの上昇は、副腎皮質ステロイド投与による可能性が強い。

3. 血中・尿中PCI

PCIはAPCのヘパリン依存性抑制因子であり、APC以外にもトロンビン、第Xa因子、第XIa因子、血漿カリクレイン、ウロキナーゼや組織プラスミノゲンアクチベータを阻害する²⁷⁾²⁸⁾ことが知られている。血中PCI活性と抗原量は、DIC²⁹⁻³¹⁾や深部静脈血栓症³¹⁾で低値を示すことが明らかにされており、DICでは血中PC抗原量と正相関を示す³⁰⁾とされている。しかし前記の疾患以外を対象に血中・尿中PCIを測定した報告は少なく、糸球体腎炎におけるPCIの血中・尿中動態は不明である。そこで著者は、前記のPCに加えてPCIについても血中・尿中活性を測定して糸球体病変の程度と対比し、糸球体腎炎の進展に伴うPCIの血中・尿中動態を検討した。

(1) IgA-GN：I、II、III群の各群の血中PCI活性は対照群と有意差を示さなかったが、血中PCI活性はメサンギウム増生の程度と有意の正相関を示した。また血中PCI活性は、血中PC抗原量と有意の正相関を示した。つまり今回の成績から、血中PC抗原量とPCI活性の両者は、メサンギウム増生の進展とともに増加および上昇することが明らかとなったといえる。加えてIgA-GNでは尿中PCI活性は尿中PC抗原量とも有意の正相関を示した。以上を併せて考えると、IgA-GNではPCとPCIの両者は密に関連して変動しており、凝固・線溶能に重要な役割を演じているものと推測される。

(2) LN：血中PCI活性は、IgA-GNの場合と異なり高度の糸球体病変を呈するIV型で対照群に比して低値傾向を示した。またIV型の尿中PCI活性も対照群に比して低値傾向を示した。既に述べたように、LNでは副腎皮質ステロイド投与によると考えられる血中PCの著明な上昇が認められており、LNにおける血中・尿中PCIの低下には血中PC上昇に伴うPCIの消費亢進が関与しているものと考えられる。

4. 尿中TMの由来

すでに石井ら³²⁾は、家兎に静注した¹²⁵I-TMの尿中回

収量ごく微量であったことから、尿中 TM が血中のみならず腎にも由来する可能性の強いことを報告している。さらに彼らは³²⁾、免疫組織学的検討により腎尿細管に TM 抗原の染色が認められたことから、尿中 TM が腎尿細管に由来する可能性を指摘している。また田中ら³³⁾も、糖尿病性腎症における血中 TM 抗原量の増加の原因の 1 つとして腎尿細管機能障害を考えている。今回著者は、電顕的に腎内 TM 抗原局在を検討したが、TM 抗原は糸球体内皮以外に尿細管刷子縁にも局在しており、石井らの報告³²⁾と同様に、腎尿細管に TM 抗原の存在することが明らかになった。ただし尿細管上皮細胞内微小器官は染色されておらず、上皮細胞表面の TM 抗原の由来については明らかにしえなかった。すでに述べたように、今回の成績は、血中 TM 抗原量と尿中 TM 抗原量が有意の相関を示さず、LN においては尿細管機能障害の進展とともに尿中 TM 抗原量が減少することを明らかにしている。このことと電顕所見および過去の報告³²⁾³³⁾を考えると、腎尿細管が TM 抗原の尿中排泄に大きな役割を果たしていると考えられる。

結 語

IgA 腎症(IgA-GN)とループス腎炎(LN)を対象に血中・尿中のトロンボモジュリン(TM)抗原量、プロテインC(PC)抗原量、プロテインCインヒビター(PCI)活性と糸球体内 TM 抗原局在を検討し、以下の成績を得た。

1. TM 抗原量

(1) 血中 TM 抗原量: IgA-GN の血中 TM 抗原量は、メサンギウム増生の程度と有意の正相関を示した。また WHO IV型 LN の血中 TM 抗原量は、健常対照に比して有意の高値を示した。腎機能正常例での検討でも、IgA-GN の血中 TM 抗原量はメサンギウム増生の程度と有意の正相関を示し、WHO IV型 LN の血中 TM 抗原量は健常対照に比して高値傾向を示した。

(2) 尿中 TM 抗原量: 尿中 TM 抗原量は、中等度以上のメサンギウム増生を示す IgA-GN 例が健常対照に比して有意の低値を示した。また WHO II型 LN の尿中 TM 抗原量は、健常対照に比して有意の低値を示した。腎機能正常例での検討では、IgA-GN と LN の尿中 TM 抗原量は健常対照と差を示さなかった。

2. PC 抗原量および PCI 活性

IgA-GN の血中 PC 抗原量と血中 PCI 活性は、メサンギウム増生の程度と有意の正相関を示した。また IgA-GN では、血中 PC 抗原量は血中 PCI 活性と、尿中 PC 抗原量は尿中 PCI 活性と有意の正相関を示した。

3. 糸球体内 TM 抗原局在

糸球体糸球体内皮の TM 抗原染色の程度が低下するとともに、IgA-GN ではメサンギウム増生の進展を示す症例の頻度は増加し、LN では WHO IV型の糸球体病変を呈する症例の頻度が増加した。

以上の成績から、血中 TM 抗原量は IgA-GN および LN において糸球体内細胞障害の指標となることが示唆された。さらに糸球体内細胞障害の進展に伴う糸球体内皮における TM 抗原量の減少は、糸球体内血液凝固の亢進に関連していることが示唆された。

本論文の一部は第 14 回日本血栓止血学会(平成 3 年、秋田)において発表した。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました森山忠重教授に深甚なる謝意を捧げますとともに、御校閲の労を賜りました本学第 1 内科学教室石川兵衛教授、小児科学教室福井 弘教授に深謝いたします。さらに直接の御指導、御教示を賜りました土肥祥子助教授、第 1 内科学教室土肥和弘講師に感謝いたします。

最後に、抗トロンボモジュリン抗体を提供していただいた帝人生物医学研究所の諸兄に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 石井秀美, 内山浩之, 平石さゆり, 中野昌彦, 坪内二郎, 風間睦美, 田中 明: 血中トロンボモジュリン測定の意義. 臨床病理 37: 266, 1989.
- 2) Ishii, H., Uchiyama, H. and Kazama, M.: Soluble thrombomodulin antigen in conditioned medium is increased by damage of endothelial cells. Thromb. Haemostas. 65: 618, 1991.
- 3) Mannucci, P. M., Valsecchi, C., Bottasso, B., D'Angelo, A., Casati, S. and Ponticelli, C.: High plasma levels of protein C activity and antigen in the nephrotic syndrome. Thromb. Haemostas. 55: 31, 1986.
- 4) Pabinger-Fasching, I., Lechner, K., Niessner, H., Schmidt, P., Balzar, E. and Mannhalter, C. H.: High levels of plasma protein C in nephrotic syndrome. Thromb. Haemostas. 53: 5, 1985.
- 5) Grau, E., Oliver, A., Féllez, J., Barceló, P., Fernandez, C., Ballarin, J. A., Fontcuberta, J. and Rutilant, M. L.: Plasma and urinary heparin cofactor II levels in patients with nephrotic syndrome. Thromb. Haemostas. 60: 137, 1988.
- 6) Vaziri, N. D., Alikhani, S., Patel, B., Nguyen, Q., Barton, C. H. and Gonzales, E. V.: In-

- creased levels of protein C activity, protein C concentration, total and free protein S in nephrotic syndrome. *Nephron* **49**: 20, 1988.
- 7) **Allon, M., Soffer, O., Evatt, B. L., Hixon, G. and Wideman, C. S.**: Protein S and C antigen levels in proteinuric patients: Dependence on type of glomerular pathology. *Am. J. Hematol.* **31**: 96, 1989.
 - 8) **Churg, J. and Sobin, L. H.**: Renal disease. Classification and atlas of glomerular diseases. Igaku-Shoin, Tokyo • New York, p 127, 1982.
 - 9) **Maruyama, I., Bell, C. E. and Majerus, P. W.**: Thrombomodulin is found on endothelium of arteries, veins, capillaries, and lymphatics, and on syncytiotrophoblast of human placenta. *J. Cell. Biol.* **101**: 363, 1985.
 - 10) **Suzuki, K., Nishioka, J., Hayashi, T. and Kosaka, Y.**: Functionally active thrombomodulin is present in human platelets. *J. Biochem.* **104**: 628, 1988.
 - 11) **Ishii, H. and Majerus, P. W.**: Thrombomodulin is present in human plasma and urine. *J. Clin. Invest.* **76**: 2178, 1985.
 - 12) **Moore, K. L., Esmon, C. T. and Esmon, N. L.**: Tumor necrosis factor leads to the internalization and degradation of thrombomodulin from the surface of bovine aortic endothelial cells in culture. *Blood* **73**: 159, 1989.
 - 13) **Nawroth, P. P., Handley, D. A., Esmon, C. T. and Stern, D. M.**: Interleukin-1 induces endothelial cell procoagulant while suppressing cell surface anticoagulant activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**: 3460, 1986.
 - 14) **丸山征郎, 岡留 格, 山本修司**: Recombinant thrombomodulin. *臨床病理 臨時増刊* **86**: 194, 1990.
 - 15) **松本隆史, 金丸恵子, 杉山陽一, 出口克己, 鈴木宏治**: 血管内皮とトロンボモジュリン—妊婦血の凝血学的特徴とヒト胎盤絨毛組織におけるトロンボモジュリンの局在について. *日血誌.* **51**: 1218, 1988.
 - 16) **永島佳代子, 中村一路, 森岡真知子, 宮島ゆかり, 桑原千枝子, 木下忠俊, 風間睦美, 中野昌彦, 石井秀美**: 血管内皮分子マーカー Thrombomodulin の各種腎疾患における測定意義. *日腎誌.* **30**: 585, 1988(抄).
 - 17) **出口文佐栄, 安藤亮一, 千田佳子, 戸村成男, 高見博弥, 立花 健, 井田 隆, 丸茂文昭, 青木延雄**: 慢性糸球体腎炎における糸球体内トロンボモジュリンの検討. *日内会誌. 臨時増刊* **80**: 169, 1991(抄).
 - 18) **Takaya, M., Ichikawa, Y., Kobayashi, N., Kawada, T., Shimizu, H., Uchiyama, M., Moriuchi, J., Watanabe, K. and Arimori, S.**: Serum thrombomodulin and anticardiolipin antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Rheumatol.* **9**: 495, 1991.
 - 19) **Tanaka, A., Ishii, H., Hiraishi, S., Kazama, M. and Maezawa, H.**: Increased thrombomodulin values in plasma of diabetic men with microangiopathy. *Clin. Chem.* **37**: 269, 1991.
 - 20) **McKay, D. G.**: Hematologic evidence of disseminated intravascular coagulation in eclampsia. *Obstet. Gynecol. Survey* **27**: 399, 1972.
 - 21) **Takahashi, H., Tatewaki, W., Wada, K. and Shibata, A.**: Plasma protein S in disseminated intravascular coagulation, liver disease, collagen disease, diabetes mellitus, and under oral anticoagulant therapy. *Clin. Chim. Acta* **182**: 195, 1989.
 - 22) **田中由美子, 川田 勉, 小野 仁, 太田川和美, 関 つぐみ, 芝 高子, 池田政勝, 市川幸延, 布施川久恵, 安藤泰彦**: Protein C 測定におけるアミド水分解活性法(Berichrom Protein C), ELISA 法, 抗凝固活性法の比較. *臨床検査* **34**: 231, 1990.
 - 23) **Hasselaar, P., Derksen, R. H. W. M., Blokzijl, L., Hessing, M., Nieuwenhuis, H. K., Bouma, B. N. and De Groot, P. G.**: Risk factors for thrombosis in lupus patients. *Ann. Rheum. Dis.* **48**: 933, 1989.
 - 24) **榎本 誠, 横尾康子, 榑原博一**: 腎疾患におけるプロテインC測定の臨床的意義. *衛生検査* **35**: 318, 1986(抄).
 - 25) **阪田敏幸, 片山善章, 松山辰男, 畑中 薫**: プレドニゾロン服用によりプロテインC異常高値を示したネフローゼ症候群患者の1例. *臨床病理* **38**: 1198, 1990.
 - 26) **Ueda, N.**: Effect of corticosteroids on some hemostatic parameters in children with minimal change nephrotic syndrome. *Nephron* **56**: 374, 1990.
 - 27) **Suzuki, K., Nishioka, J., Kusumoto, H. and**

- Hashimoto, S.** : Mechanism of inhibition of activated protein C by protein C inhibitor. *J. Biochem.* **95** : 187, 1984.
- 28) **España, F., Berrettini, M. and Griffin, J.H.** : Inhibition of fibrinolytic and coagulation factors by human plasma protein C inhibitor. *Thromb. Res.* **55** : 369, 1989.
- 29) **Marlar, R. A., Endres-Brooks, J. and Miller, C.** : Serial studies of protein C and its plasma inhibitor in patients with disseminated intravascular coagulation. *Blood* **66** : 59, 1985.
- 30) 風間嘉晶, 高橋 薫, 小熊 豊, 桜川信男 : DICにおけるプロテインCインヒビターの動態—ヘパリンコファクターII, α_2 -プラスミンインヒビターとの関連性について. *臨床血液* **29** : 344, 1988.
- 31) **España, F., Vicente, V., Tabernero, D., Scharrer, I. and Griffin, J. H.** : Determination of plasma protein C inhibitor and of two activated protein C-inhibitor complexes in normals and in patients with intravascular coagulation and thrombotic disease. *Thromb. Res.* **59** : 593, 1990.
- 32) 石井秀美, 中野昌彦, 内山浩之, 風間睦美 : Thrombomodulinの代謝. *臨床病理 臨時増刊* **81** : 143, 1989.
- 33) 田中 明, 前沢秀憲 : 尿中トロンボモジュリン. *日本臨牀 増刊号(糖尿病上巻)* **48** : 537, 1990.