

Immunohistochemical characteristics of membranous nephropathy in children

Yoshie SEGAWA ^{1,2)}, Satoshi HISANO ¹⁾, Misao MATSUSHITA ³⁾,
Teizo FUJITA ⁴⁾, Shinichi HIROSE ²⁾, Morishige TAKESHITA ¹⁾,
Hiroshi IWASAKI ¹⁾

*Department of*¹⁾ *Pathology and*²⁾ *Pediatrics, Faculty of Medicine, Fukuoka University, Fukuoka, Japan,*
³⁾ *Institute of Glycotechnology and Department of Applied Biochemistry, Tokai University, Hiratsuka,*
*Japan, and*⁴⁾ *Department of Immunology, Fukushima Medical University, Fukushima, Japan*

Abstract : The aim of our study is to clarify the association of IgG subclasses with complement activation in childhood idiopathic membranous nephropathy (MN). Immunofluorescence (IF) was performed on 20 children with idiopathic MN, 20 adult patients with idiopathic MN and 7 children with membranous lupus nephritis (LN). We used the following: antibodies against IgG, IgA, IgM, C1q, C3c, C4d, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, mannose binding lectin (MBL), C4-binding protein (C4-bp), factor B, C5b-9 and CD59. Based on the distribution of IgG along capillary loops by IF, two types of children's idiopathic MN were classified: segmental MN (S-MN; 7 cases) and global MN (G-MN; 13 cases). IF showed IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, C3c, C4d, MBL, factor B, C4-bp, C5b-9 and CD59 in patients with G-MN, whereas it show IgG1, IgG3, C1q, C3c, C4d, C4-bp, C5b-9 and CD59 in those with S-MN. Segmental MN was found in only 2 of 352 adult idiopathic MN cases. None of cases revealed segmental MN in the 7 children with membranous LN. There was no difference in the distribution of IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 between children with G-MN and adults with idiopathic MN. A higher deposition of IgG4 was found in cases with G-MN than with membranous LN. A greater deposition of IgG1, IgG2 and IgG4 was noticed in those with idiopathic MN and membranous LN than those with S-MN. Light microscopy showed a difference in mesangial cellularity between G-MN and S-MN. However, a greater increase of electron dense deposits in the mesangial area was observed in those with S-MN than in those with G-MN. Ehrenreich-Churg's stage electron microscopy classification was similar for both G-MN and S-MN. There was a higher deposition of IgG1, IgG2 and IgG4 in cases with G-MN than in those with S-MN, while the intensity of C1q deposits was higher in S-MN than in G-MN cases. In contrast, the intensity of factor B and MBL was greater in G-MN than in S-MN cases. We concluded first that segmental MN was found only in childhood idiopathic MN and that pathological and immunological findings in S-MN were different among adult idiopathic MN and membranous LN; and second, that S-MN showed the complement activation of the classical pathway associated with IgG1 and IgG3, whereas G-MN revealed the complement activation of both the alternative and lectin pathways associated with IgG2 and IgG4.

Key words : Membranous nephropathy, IgG subclass, Complement pathway, Lectin pathway

小児特発性膜性腎症における IgG サブクラスと 補体活性化経路の検討

瀬川 芳恵^{1,2)}, 久野 敏¹⁾, 松下 操³⁾,
藤田 禎三⁴⁾, 廣瀬 伸一²⁾, 竹下 盛重¹⁾,
岩崎 宏¹⁾

¹⁾ 福岡大学医学部病理学

²⁾ 福岡大学医学部小児科学

³⁾ 東海大学工学部生命科学科

⁴⁾ 福島医科大学免疫学

要旨：小児特発性膜性腎症には、蛍光抗体法で IgG が糸球体係蹄に全節性に沈着する症例（全節群）と分節性に沈着する症例（分節群）が存在する。全節群と分節群では IgG サブクラスの分布が異なっている。成人の特発性膜性腎症および小児の膜性ループス腎炎では全節群と分節群が認められるのか、IgG サブクラスに優位性があるのかは不明である。小児特発性膜性腎症と成人の特発性膜性腎症および小児膜性ループス腎炎において、IgG の分布と IgG サブクラスの相異に関して比較するとともに、小児特発性膜性腎症において全節群と分節群の IgG サブクラスと補体活性化経路の関係を明らかにするためにこの研究を行った。1994 年から 2010 年の間に病理診断された小児特発性膜性腎症 20 例、成人特発性膜性腎症 352 例のうち無作為に抽出した 20 例、膜性ループス腎炎 7 例を対象とした。IgG, IgA, IgM, C1q, C3c, C4d, fibrinogen, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, C4b-binding protein, C5b-9, CD59, Factor B, Mannose binding lectin (MBL) 抗体を蛍光抗体法で免疫染色を行った。小児特発性膜性腎症は全節群 13 例、分節群 7 例であった。全節群では IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 が糸球体係蹄に沈着し、分節群では IgG1, IgG3 が沈着していた。全節群は分節群と比較して、IgG1, IgG2, IgG4 が有意に沈着していた。成人の特発性膜性腎症は、352 例のうち 2 例のみが糸球体係蹄への IgG 沈着を分節性に認め、その他は全節性に沈着していた。膜性ループス腎炎では分節性に IgG が沈着する症例はなかった。全節群と成人の特発性膜性腎症の 2 群間において IgG サブクラスに有意差を認めず、全節群は膜性ループス腎炎と比較して、IgG4 が有意に沈着していた。成人の特発性膜性腎症および膜性ループス腎炎は分節群と比較して、IgG1, IgG2, IgG4 が有意に沈着していた。さらに、分節群は全節群と比較して、光顕でメサンギウム細胞増多を有意に認め、また、電顕におけるメサンギウム領域の高電子密度沈着物が有意に沈着していたが、病期分類には違いを認めなかった。免疫複合体沈着に引き続き生じる補体活性化に関して、全節群は分節群と比較して、Factor B および MBL が有意に沈着し、一方、分節群は全節群と比較して C1q が有意に沈着していた。臨床事項に関して、腎生検時の蛋白尿は全節群が分節群と比較して有意に多く、平均 70.5 ヶ月の観察期間において、血圧、尿異常および腎機能に 2 群間の有意差を認めなかった。結論：1) 特発性膜性腎症で分節性に IgG が糸球体係蹄に沈着するのは小児に特徴的であることを明らかにした。2) 小児特発性膜性腎症の全節群における IgG サブクラスは成人特発性膜性腎症と類似している。3) 小児特発性膜性腎症の分節群は、成人特発性膜性腎症および膜性ループス腎炎とも病理形態学的に異なっている。4) 小児特発性膜性腎症の分節群では IgG1, IgG3 に関連し、古典経路を介することが推測された。一方、全節群の IgG サブクラスは IgG2, IgG4 にも関連し、副経路およびレクチン経路による補体活性化が推測された。分節群は小児特発性膜性腎症に特有な病変で、全節群とは異なる一群の可能性がある。

キーワード：小児，膜性腎症，補体活性化経路，IgG サブクラス

はじめに

膜性腎症は、光顕で Spike 形成を伴う糸球体基底膜の肥厚、蛍光抗体法では糸球体係蹄に沿って IgG の微細顆粒状沈着および電顕で上皮下に高電子密度沈着物 (electron dense deposit: EDD) を認めることを特徴とする糸球体腎炎である。

膜性腎症において、蛍光抗体法で IgG は糸球体係蹄に沿って全節性に沈着を認めるが、糸球体係蹄に部分的な IgG の沈着を示す症例があることが報告されている。^{1) 2)} Obana らは、小児の特発性膜性腎症には IgG が糸球体係蹄に沿って、全節性に沈着する症例と分節性に沈着する症例があることを初めて報告した。分節群では蛍光抗体法で糸球体係蹄に C1q の沈着を示し、電顕ではメサンギウム領域に高電子密度沈着物を認めることから、分節群は別の一群である可能性を示唆した。¹⁾

特発性膜性腎症の IgG サブクラスでは主に IgG4 が糸球体係蹄に沈着する一方、ループス腎炎では IgG1, IgG3 が糸球体係蹄に沈着すると言われている。^{3) 4)} また、C1q, C4 の沈着を認めず、C3 が糸球体係蹄に沈着することから、特発性膜性腎症では補体活性系は副経路が関係していると考えられている。⁵⁾ 我々は、特発性膜性腎症の小児 16 例を IgG の沈着分布により全節群と分節群の 2 群に分類し、2 群における IgG サブクラスと補体活性化経路の相異を報告した。²⁾ 特発性膜性腎症の小児 16 例のうち、全節群の 10 例では IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 が糸球体係蹄に沈着し、補体活性化経路は副経路とレクチン経路が推測され、一方、分節群の 6 例では IgG1 と IgG3 が糸球体係蹄に沈着し、古典経路による補体活性化が関与していることが推測された。²⁾

小児特発性膜性腎症では糸球体係蹄に沈着する IgG の分布により、全節群および分節群に分類できることが明らかになった。^{1) 2)} しかし、分節群のような IgG 分布を示す症例は小児特有か、成人の特発性膜性腎症および二次性の膜性腎症ではこのような分節性の IgG 分布は認められないのか、また、成人の特発性膜性腎症および二次性の膜性腎症における IgG サブクラスの優位性について、依然として不明な点が多い。われわれは小児特発性膜性腎症と成人の特発性膜性腎症および二次性の膜性腎症において蛍光抗体法での IgG の分布および IgG サブクラスの構成パターンを比較するとともに、小児特発性膜性腎症の症例数を増やして、全節群と分節群において IgG サブクラスと補体活性化経路の関係を追試した。

対象と方法

対象：1994 年から 2010 年に福岡大学医学部病理学で診断された小児特発性膜性腎症 20 例 (男性 13 例, 女性

7 例, 発症年齢: 平均 11.5 歳 (2 歳～23 歳)), 成人膜性腎症 352 例のうち無作為に抽出した 20 例 (男性 12 例, 女性 8 例, 年齢: 平均 63.3 歳 (37 歳～81 歳)), 膜性ループス腎炎 7 例 (男性 2 例, 女性 5 例, 年齢: 平均 16.9 歳 (13 歳～25 歳)) を対象とした。

方 法

1) 光顕組織

光顕組織は、1-2 μm に薄切した切片に hematoxylin eosin (HE) 染色, periodic acid and Schiff (PAS) 染色, periodic acid-methenamine silver (PAM) 染色および masson trichrome (MT) 染色を行った。メサンギウム領域の細胞増多を IgA 腎症の Oxford 分類⁶⁾ に従って、4 段階に半定量で評価した: 0; メサンギウム細胞 < 4 個, 1; メサンギウム細胞 4-5 個, 2; メサンギウム細胞 6-7 個, 3; メサンギウム細胞 ≥ 8 個。メサンギウム細胞の半定量値の総計を全糸球体数で除して、それぞれの症例のメサンギウム細胞増多の半定量値とした。

2) 蛍光抗体法

全症例に対して 3 μm に薄切した凍結切片に FITC 標識 IgG, IgA, IgM, C3c, C1q および fibrinogen (Dako, Copenhagen, Denmark) を使用して、直接法で蛍光顕微鏡にて観察した。また、抗ヒトモノクロナル抗体 IgG1, IgG2, IgG4 (Chemicon, Temecula, CA), 抗ヒトモノクロナル抗体 IgG3 (Zymed Laboratories, San Francisco, CA), 抗ヒトモノクロナル抗体 C4d (Quidel, San Diego, CA), 抗 Factor B ポリクローナル抗体 (Biogenesis, Poole, UK), 抗ヒトモノクロナル抗体 C4-binding protein (C4-bp; 11-2D3; Fuji yakuhin, Toyama, Japan), 抗ヒトモノクロナル抗体 C5b-9 (Dako), 抗ヒトモノクロナル抗体 CD59 (Cosmobio, Tokyo, Japan), 抗ヒトモノクロナル抗体 mannose binding lectin (MBL; 3E7) をストレプトアビジン・ビオチン (LSAB) 法に従って、次のように免疫染色を行った。Tris-buffered saline (TBS) による洗浄後、非特異的反応を抑制するために、室温で 1% skim milk でブロッキングし、上記の一次抗体を 4℃で一晩反応させた。TBS 洗浄後、二次抗体としてビオチン化マウス抗体 (Vector Laboratories Inc. Burlingame, USA) を 60 分間反応させた。TBS 洗浄後、Streptavidin/fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗ヒト抗体 (DAKO, Denmark) を 60 分間反応させた。染色後、FluoromountTM (Diagnostic Biosystems, CA) で封入した。封入後、蛍光顕微鏡 (OLYMPUS BX 60) 下で切片の観察および写真撮影を行った。

ネガティブコントロールとして、免疫が関与しない正常血清または TBS を一次抗体として行った。^{7) 8)}

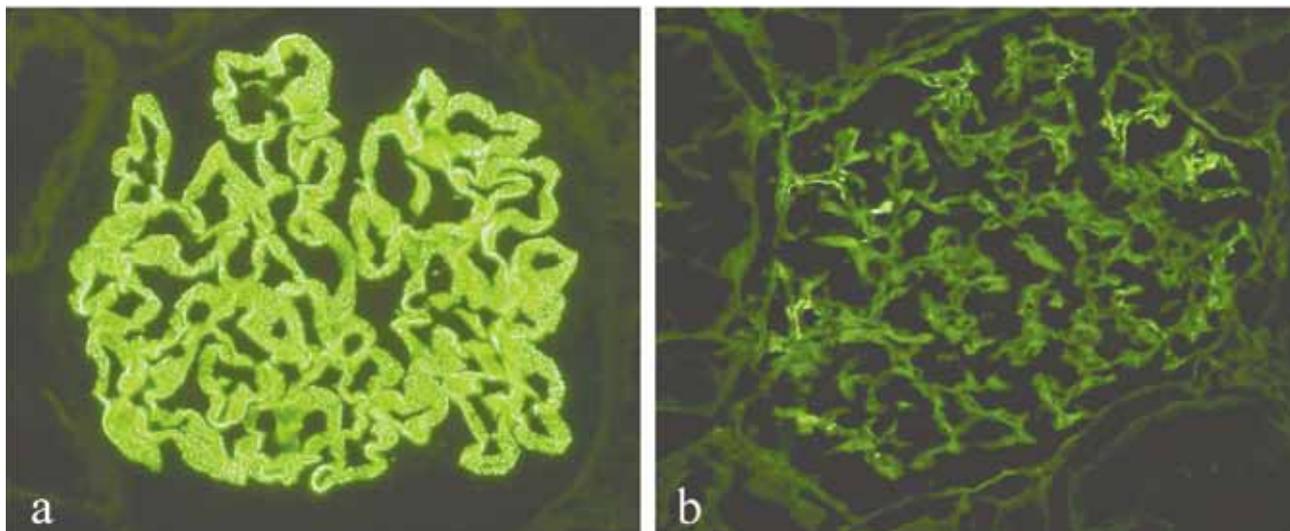


図1 全節群と分節群の糸球体係蹄に沿って沈着するIgG
a) 全節群のIgG, b) 分節群のIgG

1 症例につき平均5個の糸球体を観察し、糸球体係蹄に沈着するIgGの分布をループ腎炎のISN/RPS分類⁹⁾に準じて2群に分類した。糸球体係蹄の50%以上を占める症例を全節群(図1a)、50%未満である症例を分節群(図1b)と分類した。判定は沈着分布の割合により4段階に半定量で評価した:0; 係蹄全周の10%未満, 1; 係蹄全周の10-50%, 2; 係蹄全周の50-75%, 3; 係蹄全周の75%以上とした。

3) 電顕組織像

電顕で上皮下, 基底膜内, 内皮下およびメサンギウム領域のEDDを観察した。上皮下および基底膜内のEDDについてはEhrenreich-Churgの病期分類¹⁰⁾に準じてStageを分類した。また, メサンギウム領域のEDDを以下の通りに4段階に半定量で評価した; 0, 沈着なし; 1, メサンギウム全領域の<25%にEDDを認める。; 2, メサンギウム全領域の25-50%にEDDを認める; 3, メサンギウム全領域の50%以上にEDDを認める。

統計学的解析

測定値は平均値±標準誤差 (Mean ± SE) で表し, 統

計処理に Mann-Whitney *U* test, カイ二乗検定を用いた。P<0.05を統計学的に有意と判定した。

結 果

1) 全節群と分節群の糸球体沈着 IgG サブクラスの比較

小児特発性膜性腎症は全節群13例, 分節群7例であった。図2に小児特発性膜性腎症のIgG1, IgG2, IgG3, IgG4の糸球体係蹄への沈着を示す。糸球体沈着IgGサブクラス平均値の2群間の比較を表1に示す。全節群はIgG1, IgG2, IgG3, IgG4すべてに高度な沈着がみられ, いずれのサブクラスも分節群より多く沈着していた。分節群ではIgG1, IgG3優位な沈着パターンで, IgG2は1例を除いて沈着を認めず, IgG4も沈着した症例はなかった。

2) 全節群と成人特発性膜性腎症および膜性ループ腎炎とのIgGサブクラスの比較

成人の特発性膜性腎症は, 1994年から2010年の16年間で352例中2例のみに, IgGが分節性に糸球体係蹄

表1 全節群と分節群の糸球体沈着 IgG サブクラスの比較

	全節群	分節群	P-value
IgG1	3.0 ± 0.0	1.3 ± 0.4	0.002
IgG2	2.4 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.0004
IgG3	2.4 ± 0.2	1.4 ± 0.4	0.06
IgG4	2.8 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.0009

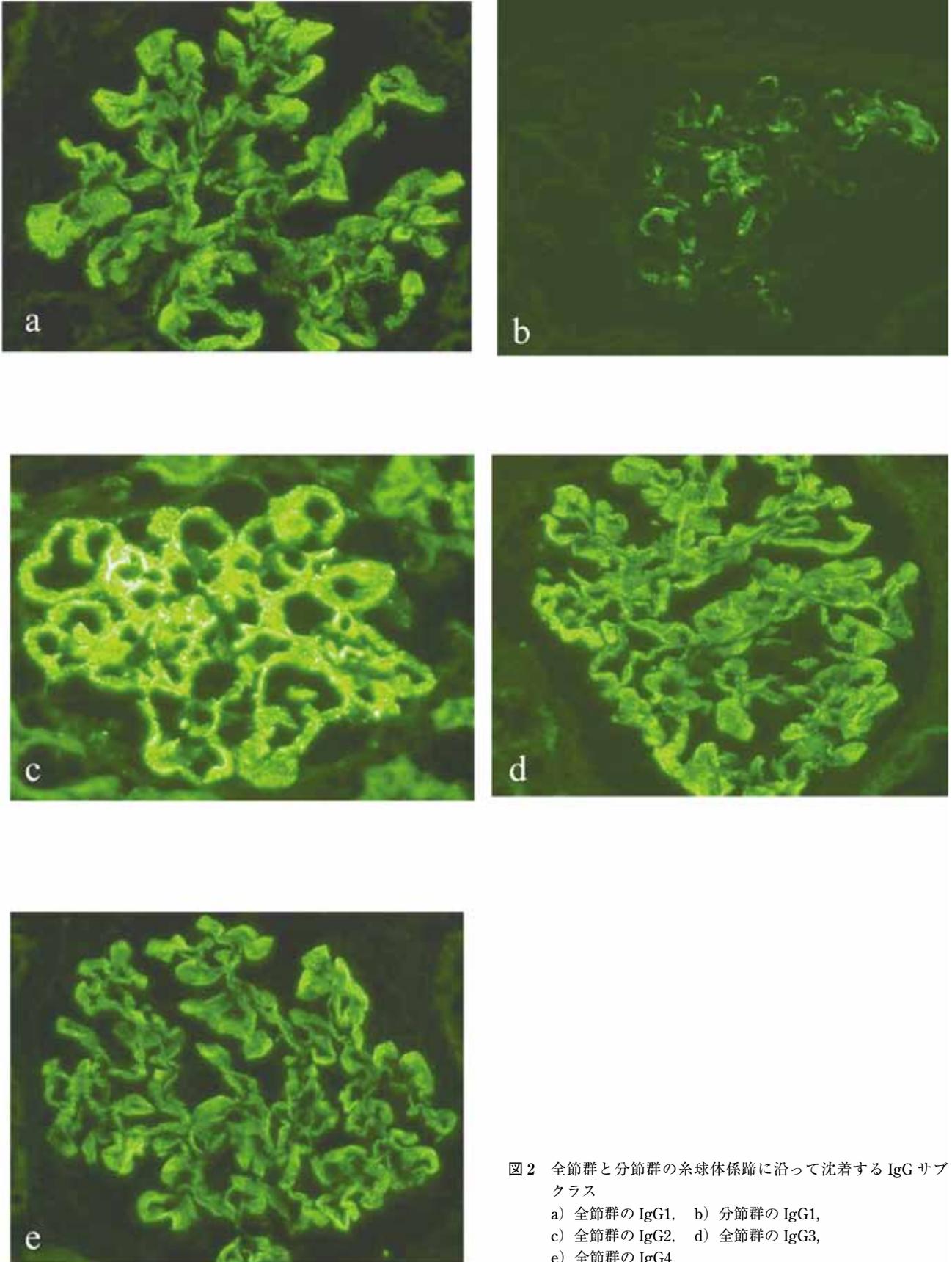


図2 全節群と分節群の糸球体係蹄に沿って沈着する IgG サブクラス

- a) 全節群の IgG1, b) 分節群の IgG1,
- c) 全節群の IgG2, d) 全節群の IgG3,
- e) 全節群の IgG4

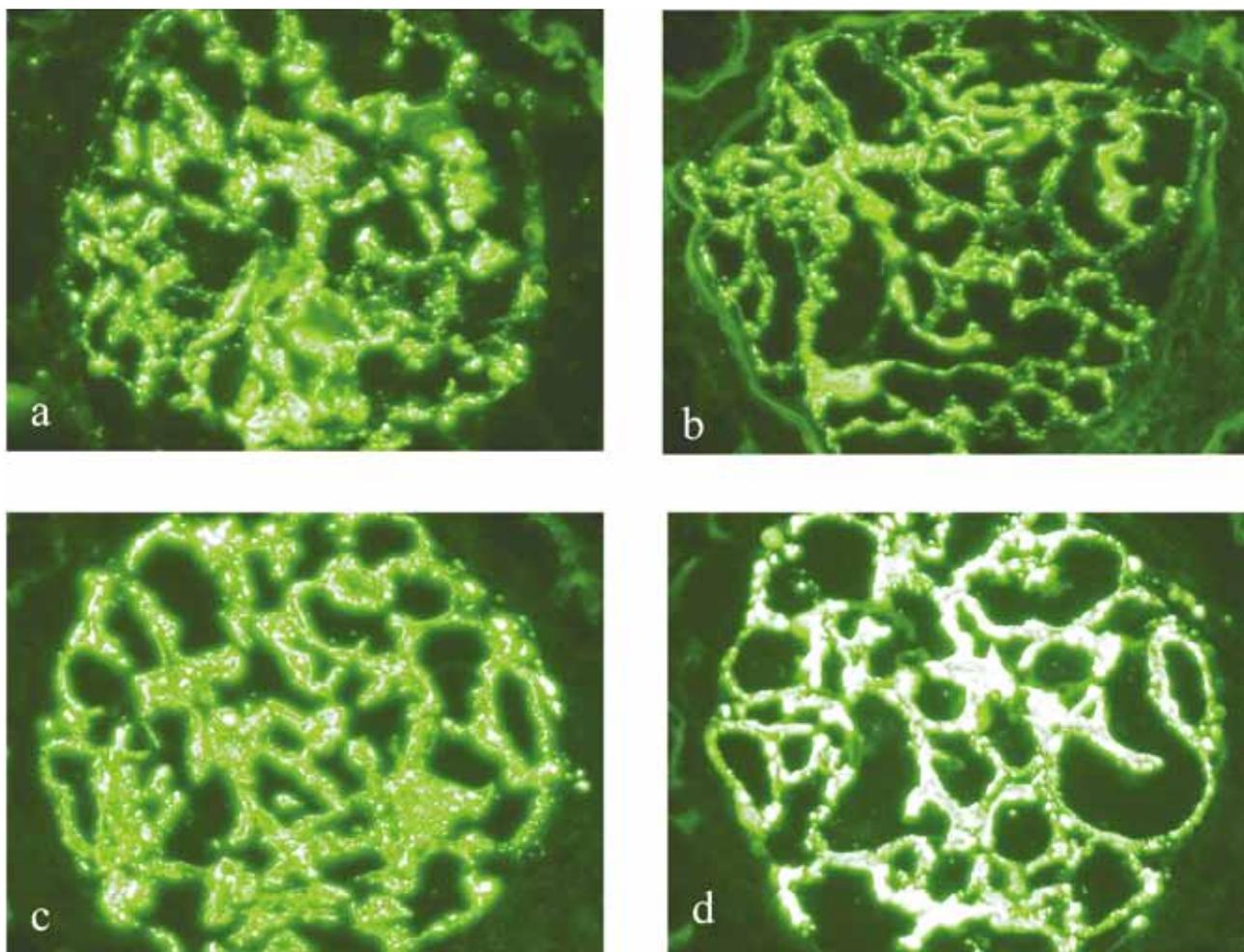


図3 成人特発性膜性腎症の糸球体係蹄に沿って沈着するIgGサブクラス
 a) IgG1, b) IgG2,
 c) IgG3, d) IgG4

表2 全節群と成人特発性膜性腎症のIgGサブクラスの比較

	全節群	成人特発性膜性腎症	P-value
IgG1	3.0 ± 0.0	2.4 ± 0.2	0.15
IgG2	2.4 ± 0.2	2.9 ± 0.1	0.06
IgG3	2.4 ± 0.2	2.1 ± 0.3	0.66
IgG4	2.8 ± 0.2	3.0 ± 0.0	0.71

表3 全節群と膜性ループス腎炎のIgGサブクラスの比較

	全節群	膜性ループス腎炎	P-value
IgG1	3.0 ± 0.0	3.0 ± 0.0	n. s.
IgG2	2.4 ± 0.2	2.7 ± 0.2	0.43
IgG3	2.4 ± 0.2	2.1 ± 0.5	0.75
IgG4	2.8 ± 0.2	1.1 ± 0.3	0.0089

n. s.; not significant

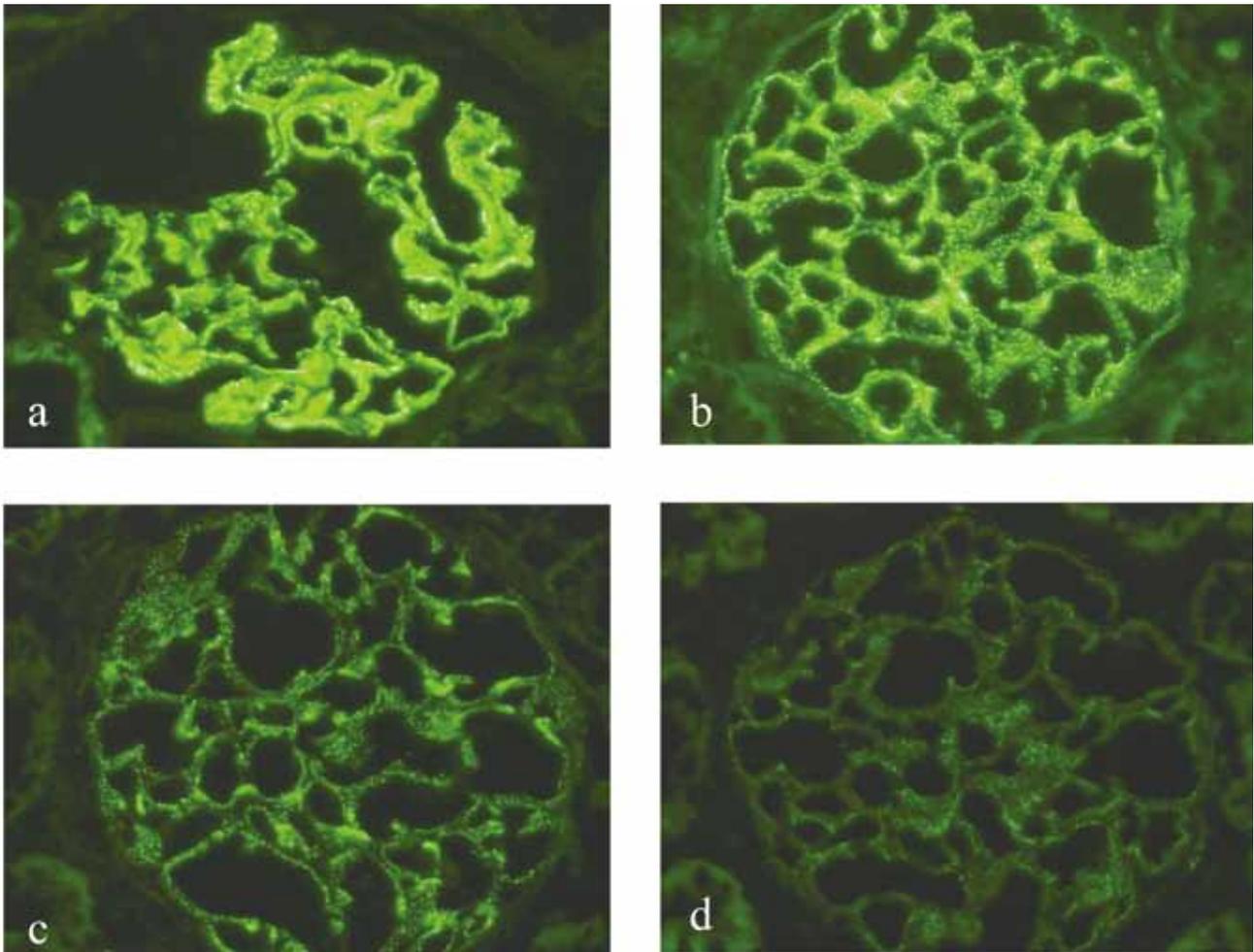


図4 膜性ループス腎炎の糸球体係蹄に沿って沈着する IgG サブクラス
 a) IgG1, b) IgG2,
 c) IgG3, d) IgG4

へ沈着し、他は全節性に沈着していた。膜性ループス腎炎には分節性に IgG が沈着する症例はなかった。図 3 に成人特発性膜性腎症の IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 の糸球体係蹄への沈着を示す。また、図 4 に膜性ループス腎炎の IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 の糸球体係蹄への沈着を示す。全節群と成人特発性膜性腎症における糸球体沈着 IgG サブクラス平均値および全節群と膜性ループス腎炎における糸球体沈着 IgG サブクラス平均値の 2 群間の比較をそれぞれ、表 2, 3 に示す。成人の特発性膜性腎症では、IgG サブクラスのすべてが全節群と同様に高度に沈着していた。膜性ループス腎炎は全節群に比較して、IgG4 の沈着量が少なかった ($P=0.0089$)。IgG1, IgG2, IgG3 は全節群と膜性ループス腎炎で有意差を認めなかった。

3) 分節群と成人特発性膜性腎症および膜性ループス腎炎との IgG サブクラスの比較

分節群と成人特発性膜性腎症における糸球体沈着 IgG サブクラス平均値および分節群と膜性ループス腎炎における糸球体沈着 IgG サブクラス平均値の 2 群間の比較をそれぞれ、表 4, 5 に示す。分節群は成人特発性膜性腎症および膜性ループス腎炎に比較して、IgG1, IgG2, IgG4 の沈着が有意に少なかった。

4) 全節群と分節群の臨床所見と病理組織学的特徴と比較

全節群と分節群の臨床病理学的特徴を表 6 に示す。腎生検時に高血圧を示した症例は全節群と分節群にそれぞれ 1 例ずつ (症例 3, 11) で、発見動機としてネフローゼ症候群を呈していた症例は全節群に 6 例 (症例 8-11, 13, 5) 認めた。分節群ではネフローゼ症候群を呈する症例はなかった。腎生検時に腎機能低下を認めた症例は分

表 4 分節群と成人特発性膜性腎症の IgG サブクラスの比較

	分節群	成人特発性膜性腎症	P-value
IgG1	1.3 ± 0.4	2.4 ± 0.2	0.03
IgG2	0.1 ± 0.1	2.9 ± 0.1	0.0001
IgG3	1.4 ± 0.4	2.1 ± 0.3	0.18
IgG4	0.0 ± 0.0	3.0 ± 0.0	0.0001

表 5 全節群と膜性ループス腎炎の IgG サブクラスの比較

	分節群	膜性ループス腎炎	P-value
IgG1	1.3 ± 0.4	3.0 ± 0.0	0.0073
IgG2	0.1 ± 0.1	2.7 ± 0.2	0.0017
IgG3	1.4 ± 0.4	2.1 ± 0.5	0.22
IgG4	0.0 ± 0.0	1.1 ± 0.3	0.0073

表 6 小児特発性膜性腎症の臨床項目と組織学的所見

対象	臨床項目						光顕			電顕			蛍光抗体所見					治療	観察期間 (月)	予後
	年齢 (歳)	血圧	血尿	蛋白尿	Mode	Ccr	Mes	Stage	Subepi	Mes.	IgG1/ IgG2	IgG3/ IgG4	C1q/ C3	C4d/ C4b-p	C5b-9/ CD59	FactorB/ MBL				
分節群																				
1	13	119/71	10-19	43	Asym	96	0.3	1	2	3	1/0	1/0	1/0	1/2	2/2	0/0	ARB	14	P+H	
2	9	110/70	0-1	20	Asym	86	0.47	3	3	3	2/0	1/0	1/0	3/2	2/1	0/0	unknown	34	N	
3	23	164/116	0-10	41	Asym	65	0.14	3	3	2	1/0	0/0	1/0	2/1	2/2	0/0	ACEI	62	RF	
4	12	104/40	20-29	10	Asym	202	0.11	1	3	0	1/0	2/0	2/0	3/1	2/2	0/0	unknown	unknown	unknown	
5	13	110/41	41-49	42	Asym	145	0.15	2	3	1	1/0	1/0	3/3	3/1	3/3	0/0	Pr+CyA+D+ACEI	51	N	
6	2	103/63	10-19	300	Asym	162	0.25	2	3	2	1/0	2/0	3/1	N.D./2	3/2	0/0	ACEI	27	N	
7	6	102/52	10-19	98	Asym	105.2	0.19	2	1	1	1/1	2/0	1/0	1/1	2/2	0/0	unknown	unknown	unknown	
全節群																				
8	19	104/60	50-100	430	NS	230	0.14	1	3	0	3/3	2/3	0/0	3/2	3/1	1/1	Pr+CyA+D	171	P	
9	19	100/62	20-30	530	NS	230	0.08	1	3	0	3/3	2/2	0/0	3/1	3/2	1/1	Pr+CyA+D	168	P+H	
10	16	134/70	1-2	800	NS	188	0.13	1	3	0	3/2	2/3	0/3	3/2	3/2	1/2	Pr+CyA	161	RF	
11	15	148/96	30-50	1100	NS	133	0.09	3	3	0	3/1	1/3	0/3	3/2	2/2	1/1	Pr+CyA+D	24	N	
12	9	110/70	5-10	20	Asym	180	0	2	3	0	3/1	3/3	1/2	3/2	2/2	1/1	unknown	unknown	unknown	
13	6	95/33	5-9	450	NS	152	0.05	2	3	0	3/1	3/2	1/3	N.D./2	2/2	1/0	Pr+CyA+ACEI	36	N	
14	6	106/58	30-39	314	Asym	133	0	2	3	0	3/1	3/3	0/0	3/1	2/1	2/1	Pr+D	119	N	
15	8	110/78	0-2	309	NS	120	0.1	1	2	1	3/3	3/3	0/3	3/1	3/3	1/1	Pr+CPA+ACEI	32	N	
16	7	103/55	6-10	45	Asym	168	0.02	1	2	1	2/0	1/3	0/0	N.D./1	3/3	1/0	ACEI	18	N	
17	12	119/70	10-19	482	Asym	198	0.09	1	3	0	2/1	0/3	0/0	3/1	2/3	1/1	unknown	unknown	unknown	
18	5	96/60	100	207	Asym	211.8	0.06	1	1	1	3/0	3/3	0/0	3/1	2/3	1/0	unknown	unknown	unknown	
19	12	95/57	20-29	175	Asym	132	0.05	1	2	0	3/3	2/3	0/1	3/1	3/2	1/0	unknown	unknown	unknown	
20	19	103/56	50-99	283	Asym	N.D.	0.09	2	1	0	3/0	2/0	0/1	3/1	3/2	1/1	unknown	unknown	unknown	

Ccr : creatinine clearance (ml/min/1.73 m²), Mes: mesangial hypercellularity (mesangial cells/glomerulus), subepi : subepithelial electron-dense deposits, mesa : mesangial electron-dense deposits, yrs : years, /HPF : red blood cells per high-power field, m : months, asympt : asymptomatic, NS : nephrotic syndrome, N.D : not done, ARB : angiotensin II receptor blocker, ACEI : angiotensin converting enzyme inhibitor, Pr : prednisolone, CyA : cyclosporin A,, D : dipyridamole, CPA : cyclophosphamide, N : normal examination, RF : renal failure

表7 分節群と全節群における臨床病理組織学的所見の比較

	全節群 (n=13)	分節群 (n=7)	P-value
症例数	13	7	
年齢 (歳)	11.8 ± 1.5	11.1 ± 2.5	n.s.
発症から腎生検までの期間 (月)	5.5 ± 2.1	22.1 ± 11.9	n.s.
発見動機			
ネフローゼ症候群	6	0	0.05
無症候性	7	7	
血圧 (mmHg)			
腎生検時	109.5 ± 4.4	116.0 ± 8.3	n.s.
最終観察時	113.1 ± 5.8	110.3 ± 5.8	n.s.
メサンギウム細胞増多のスコア	0.07 ± 0.01	0.2 ± 0.05	0.0007
蛍光抗体法による補体活性化・制御因子			
C1q	0.2 ± 0.1	1.9 ± 0.3	0.0008
C3c	1.2 ± 0.4	0.6 ± 0.4	n.s.
C4d	3.0 ± 0.0	2.2 ± 0.4	n.s.
Factor B	1.1 ± 0.08	0.0 ± 0.0	0.0003
C4bp	1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.2	n.s.
C5b-9	2.5 ± 0.1	2.3 ± 0.2	n.s.
CD59	2.2 ± 0.2	2.0 ± 0.2	n.s.
MBL	0.8 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.01
メサンギウム領域の EDD	0.2 ± 0.1	1.7 ± 0.4	0.043
腎生検から最終観察時までの期間 (月)	91.1 ± 70.0	37.6 ± 19.1	n.s.
血尿 (RBC/hpf)			
腎生検時	31.8 ± 9.0**	16.9 ± 5.5*	n.s.
最終観察時	1.1 ± 0.9	1.9 ± 1.7	n.s.
蛋白尿 (mg/dl)			
腎生検時	395.8 ± 82.6***	79.1 ± 38.3	0.0055
最終観察時	35.1 ± 17.3	16.3 ± 9.1	n.s.
eGFR (ml/min/1.73m ²)			
腎生検時	173.0 ± 11.4	123.0 ± 18.3	0.04
最終観察時	155.0 ± 18.6	122.4 ± 28.8	n.s.

RBC/hpf, red blood cells per high-power field, eGFR; estimated glomerular filtration rate

* P=0.04 腎生検時 vs. 最終観察時, **P=0.0013 腎生検時 vs. 最終観察時, ***P=0.001 腎生検時 vs. 最終観察時, n.s.; not significant

節群に1例(症例3)で、その他の症例に腎機能低下は認められなかった。メサンギウム細胞増多は両群とも軽微であるものの、表7に示すように分節群では全節群と比較すると、有意なメサンギウム細胞増多を示していた。電顕所見でのEDDの沈着部位に関して、メサンギウム領域のEDDは、分節群では1例(症例4)を除いてすべての分節群に認められ、一方、全節群では3例(症例15, 16, 18)にメサンギウム領域のEDDが認められた。分節群で認められたメサンギウム領域のEDD沈着は全節群と比較して有意に多かった(表7)。しかし、病期分類に両群の差はなかった。

全節群と分節群の臨床病理学的特徴の比較を表7に示す。年齢、性差、発見時から腎生検までの期間および発

見動機は両群において有意差はなかった。図5に小児特発性膜性腎症例の補体成分および補体調節因子の糸球体係蹄への沈着を示す。全節群ではFactor BとMBLの糸球体係蹄への沈着が分節群より有意に認められた。一方、分節群ではC1qが全節群と比較して有意に多く沈着していた。他の補体成分および補体制御因子であるC4d, C3, C4d, C4bp, C5b-9, CD59の沈着は2群間に有意差を認めなかった。

表6に示すように、治療と経過観察を確認できた13例のうち8例(症例5, 8-11, 13-15)に副腎皮質ステロイド剤治療単独あるいは他の免疫抑制剤との併用療法が行われていた。平均70.5ヵ月の観察期間において、8例(症例2, 5, 6, 11, 13-16)の尿所見と腎機能は正常で、3例(症

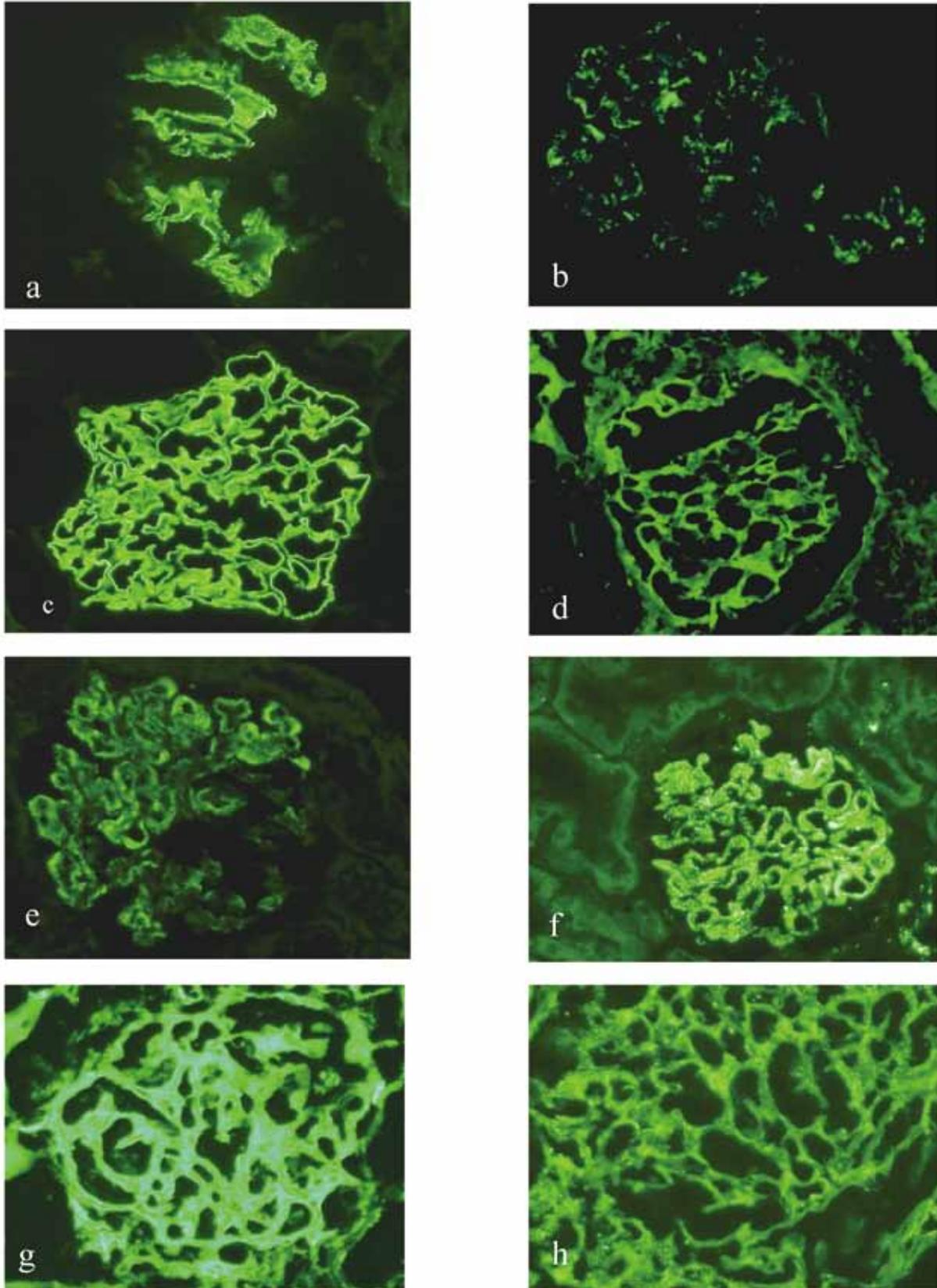


図5 全節群と分節群の糸球体係蹄に沿って沈着する補体と補体活性因子
a) 分節群の C1q, b) 全節群の C3c, c) 全節群の C4d, d) 全節群の Factor B, e) 全節群の C4bp,
f) 全節群の C5b-9, g) 分節群の CD59, h) 全節群の mannose binding lectin (MBL)

例 1, 8, 9) において血尿あるいは蛋白尿が持続し, 2 例 (症例 3, 10) が腎不全に至った. ネフローゼ症候群を呈した全節群の症例 10 については, 副腎皮質ステロイド剤と免疫抑制剤で治療されたが 161 ヶ月後に腎不全を示していた.

全節群は分節群に比較して, 腎生検時蛋白尿が有意に多かった. 腎生検時の血圧, 血尿および腎機能には有意差を認めなかった (表 7). 平均 70.5 ヶ月の観察期間で, 最終観察期間時に血圧, 血尿, 蛋白尿および腎機能において両群に有意差を認めなかった. 経過観察し得た平均 70.5 か月間に分節群の症例で全身性エリテマトーデスを発症した症例はなかった.

考 察

小児特発性膜性腎症では, 蛍光抗体法で IgG が糸球体係蹄に全節性に沈着する症例 (全節群) と分節性に沈着する症例 (分節群) が存在する.^{1) 2)} 1994 年から 2010 年の間に診断された成人の特発性膜性腎症 352 例のうち, IgG が糸球体係蹄に分節性に沈着したのは 2 例, 他の症例は糸球体係蹄に IgG が全節性に沈着していた. また, 膜性ループス腎炎 7 例においても分節性に IgG が糸球体係蹄に沈着した症例はなかった. 今回の結果から, 糸球体係蹄に分節性に IgG が沈着する症例が存在するのは小児の特発性膜性腎症に特徴的であることを明らかにした.

成人の特発性膜性腎症では糸球体沈着 IgG サブクラスは IgG4 が主体で, 他のサブクラスの沈着頻度は少ないと報告されている.^{11) 12)} 今回の研究では, 成人の特発性膜性腎症は IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 すべてに沈着を認め, とくに IgG2 および IgG4 が比較的多く沈着していた. 従って, 成人の特発性膜性腎症では IgG4 が有意であるというこれまでの報告と相異はなかった.¹²⁾ 小児特発性膜性腎症の全節群も IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 が高度に糸球体係蹄へ沈着し, 成人の特発性膜性腎症と類似していた. 膜性ループス腎炎の糸球体沈着 IgG サブクラスは, IgG1, IgG3 が優位に糸球体係蹄に沈着するとの報告^{3) 4)} や IgG1, IgG2, IgG3 が優位に糸球体係蹄に沈着するとの報告がある.^{11) 12)} いずれにしても膜性ループス腎炎では IgG4 の沈着は少ないようである.^{3) 4) 11) 12)} われわれの検討でも膜性ループス腎炎は IgG4 の沈着が少なく, IgG1, IgG2, IgG3 の沈着程度は全節群とほとんど同等であった. 従って, 全節群と膜性ループス腎炎での比較では, IgG4 のみに有意差が認められ, IgG4 は両者の鑑別に有用と考えられる.

小児特発性膜性腎症の分節群は, 成人の特発性膜性腎症や膜性ループス腎炎の IgG サブクラス沈着パターン

とは異なっており, とくに IgG1, IgG2, IgG4 の沈着に有意差が認められた.

今回の結果では, 小児特発性膜性腎症における糸球体係蹄に沈着する IgG サブクラスは, 全節群で IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 が沈着し, 分節群では IgG1, IgG3 が沈着していた. 分節群において, 全節群と比較して IgG1 および IgG3 沈着が少ないことは, IgG の沈着分布を反映していると考えられる. 分節群では 1 例を除いて IgG2 の沈着を認めず, IgG4 においては分節群の全例に全く沈着を認めず, これは前回報告した結果²⁾ と同様であった.

分節群は特発性膜性腎症の初期病変, 不完全型あるいは異型とも考えられる. 分節群と全節群の相異について, 免疫複合体の大きさに違いがあり, 分節群の免疫複合体が全節群に比較して大きい場合, メサングウムに取り込まれて電顕でメサングウム領域の EDD として認められ, また, 分節群では反応性にメサングウム細胞増多を示すのではないかと考えられる. しかし, 上皮下および糸球体基底膜内の EDD には両群に差を認めず, 病期分類も互いに差を認めなかった. 従って, 免疫複合体のサイズのみで両群の形態学的な相異を説明できない. また, 分節群では全節群に比較して, C1q が有意に糸球体基底膜に沈着し, メサングウム領域に EDD を認めることから二次性の膜性腎症が疑われる. しかし, 分節群の 7 例中, 経過を観察することができた 5 例において経過中に全身性エリテマトーデスなどの全身性疾患を示す症例はなかった.

特発性膜性腎症では免疫複合体形成に引き続き生じる補体活性化に関して, 蛍光抗体法で C1q, C4 の沈着を認めず, C3 が糸球体係蹄に沈着することから, 特発性膜性腎症の補体活性化系は副経路が関係していると考えられている.⁵⁾ 補体系における初期反応には, 古典経路, 副経路およびレクチン経路の 3 つがある. C1q は古典経路の補体活性化系の early component である.¹³⁾ また, レクチン経路は MBL が微生物表面のマノース基に結合することで作動する.^{13) 14) 15)} Factor B は Factor D および properdin の存在下で副経路を作動する.¹⁶⁾ C4bp は factor I に対する cofactor として C4b を非活性化する.¹⁷⁾ C5b-9 は細胞膜傷害複合体ともいわれ, 補体活性化系の最終産物で, CD59 は C5b-9 形成に至る補体活性化後期反応の段階での膜制御因子である.¹⁸⁾ 今回の検討で, C1q, MBL, factor B, C3c, C4bp, C5b-9 および CD59 の糸球体係蹄への沈着が認められることから, 補体制御因子が糸球体において *in situ* に補体活性化作用を担っていることが推察される.

また, IgG1, IgG3 は古典経路の補体活性化を惹起すると報告され,^{5) 19)} 分節群で IgG1, IgG3, C1q が有意に糸球体係蹄に沈着していたことから, 分節群では IgG1 お

よび IgG3 に関連して古典経路の補体活性系が作動している可能性が示唆された。一方、全節群の補体因子は MBL, factor B, C3c および C4d が糸球体係蹄に沈着していた。分節群で有意に沈着した C1q に関して、全節群で沈着していたのは 2 例のみで、その沈着程度は分節群と比較して有意に少なかった。反対に分節群で沈着しなかった MBL および factor B の沈着が全節群で有意に認められた。このことから、全節群ではレクチン経路と副経路を介した補体活性化が推測された。

特発性膜性腎症における蛋白尿の出現には、免疫複合体による補体活性化により細胞膜傷害複合体が形成されることが関連すると考えられている。²⁰⁾ 全節群ではネフローゼ症候群で発症した症例が多く、それを反映して、腎生検時の蛋白尿が分節群に比較して多かった。また、全節群では IgG が全節性に糸球体係蹄に沈着しており、糸球体係蹄の全般に免疫複合体が沈着していることを意味する。従って、免疫複合体による補体活性化により、細胞膜傷害複合体が糸球体係蹄の全般に形成され、全節群では分節群に比較して蛋白尿がより多かった可能性が示唆される。しかし、C5b-9 の糸球体係蹄の沈着の程度に全節群と分節群で有意差はなかった。また、補体による組織傷害に防御的に作用して生体の恒常性の維持に大きく関与している膜制御因子である CD59 についても沈着量が多いという傾向は認めなかった。糸球体係蹄に認める量が関係しているのではなく、形成された細胞膜傷害複合体の質的な問題が関係しているのかもしれない。腎生検時において全節群が分節群に比較して蛋白尿が多かった機序を今回の結果から説明することはできない。特発性膜性腎症の発症メカニズムに関係する病因として、抗原や自己抗体産生の要因、補体系に加えて抗体産生に関係する免疫環境、²¹⁾ 組織傷害機序、遺伝的因子²²⁻²⁴⁾ などが関与している可能性があり、分節群と全節群に分類される小児特発性膜性腎症の糸球体病変との関連について更なる検討と症例の蓄積が必要である。

結 論

1) 膜性腎症で分節性に IgG が糸球体係蹄に沈着するのは小児特徴的であることを明らかにした。2) 小児特発性膜性腎症の全節群において糸球体係蹄に沈着する IgG サブクラスは成人特発性膜性腎症と類似している。3) 小児特発性膜性腎症の分節群の IgG サブクラスは成人特発性膜性腎症および小児膜性ループス腎炎と異なっている。4) 小児特発性膜性腎症の分節群の IgG サブクラスは IgG1, IgG3 に関連し、古典経路の補体活性を惹起し、一方、全節群の IgG サブクラスは IgG2, IgG4 にも関連し、副経路およびレクチン経路の補体活性を惹起することが示唆された。分節群は小児特発性膜性腎症に

特有な病変で、全節群とは異なる一群の可能性がある。

文 献

1. Obana M, Nakanishi K, Sako M, Yata N, Nozu K, Tanaka R, Iijima K, and Yoshikawa N: Segmental membranous glomerulonephritis in children: comparison with global membranous glomerulonephritis. *Clin J Am Soc Nephrol* 1: 723-9, 2006.
2. Segawa Y, Hisano S, Matsushita M, Fujita T, Hirose S, Takeshita M, and Iwasaki H: IgG subclasses and complement pathway in segmental and global membranous nephropathy. *Pediatr Nephrol* 25: 1091-9, 2010.
3. Haas M: IgG subclass deposits in glomeruli of lupus and nonlupus membranous nephropathies. *Am J Kidney Dis* 23: 358-64, 1994.
4. Bannister KM, Howarth GS, Clarkson AR, and Woodroffe AJ: Glomerular IgG subclass distribution in human glomerulonephritis. *Clin Nephrol* 19: 161-5, 1983.
5. Cunningham PN, and Quigg RJ: Contrasting roles of complement activation and its regulation in membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 16:1214-22, 2005.
6. Roberts IS, Cook HT, Troyanov S, Alpers CE, Amore A, Barratt J, Berthoux F, Bonsib S, Bruijn JA, Cattran DC, Coppo R, D'Agati V, D'Amico G, Emancipator S, Emma F, Feehally J, Ferrario F, Fervenza FC, Florquin S, Fogo A, Geddes CC, Groene HJ, Haas M, Herzenberg AM, Hill PA, Hogg RJ, Hsu SI, Jennette JC, Joh K, Julian BA, Kawamura T, Lai FM, Li LS, Li PK, Liu ZH, Mackinnon B, Mezzano S, Schena FP, Tomino Y, Walker PD, Wang H, Weening JJ, Yoshikawa N, and Zhang H: The Oxford classification of IgA nephropathy: pathology definitions, correlations, and reproducibility. *Kidney Int* 76: 546-56, 2009.
7. Hisano S, Matsushita M, Fujita T, Endo Y, and Takebayashi S: Mesangial IgA2 deposits and lectin pathway-mediated complement activation in IgA glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis* 38: 1082-8, 2001.
8. Hisano S, Matsushita M, Fujita T, and Iwasaki H: Activation of the lectin complement pathway in Henoch-Schonlein purpura nephritis. *Am J Kidney Dis* 45: 295-302, 2005.
9. Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, Seshan SV, Alpers CE, Appel GB, Balow JE, Bruijn JA, Cook T,

- Ferrario F, Fogo AB, Ginzler EM, Hebert L, Hill G, Hill P, Jennette JC, Kong NC, Lesavre P, Lockshin M, Looi LM, Makino H, Moura LA, and Nagata M: The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *Kidney Int* 65: 521-30, 2004.
10. Ehrenreich: Pathology of membranous. *Pathol Annu* 3: 145-186, 1968.
 11. Imai H, Hamai K, Komatsuda A, Ohtani H, and Miura AB: IgG subclasses in patients with membranoproliferative glomerulonephritis, membranous nephropathy, and lupus nephritis. *Kidney Int* 51: 270-6, 1997.
 12. Kuroki A, Shibata T, Honda H, Totsuka D, Kobayashi K, and Sugisaki T: Glomerular and serum IgG subclasses in diffuse proliferative lupus nephritis, membranous lupus nephritis, and idiopathic membranous nephropathy. *Intern Med* 41: 936-42, 2002.
 13. Matsushita M, and Fujita T: Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. *J Exp Med* 176: 1497-502, 1992.
 14. Thiel S, Vorup-Jensen T, Stover CM, Schwaebler W, Laursen SB, Poulsen K, Willis AC, Eggleton P, Hansen S, Holmskov U, Reid KB, and Jensenius JC: A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature* 386:506-10, 1997.
 15. Takahashi M, Endo Y, Fujita T, and Matsushita M: A truncated form of mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP) -2 expressed by alternative polyadenylation is a component of the lectin complement pathway. *Int Immunol* 11: 859-63, 1999.
 16. Huang Y, Krein PM, Muruve DA, and Winston BW: Complement factor B gene regulation: synergistic effects of TNF-alpha and IFN-gamma in macrophages. *J Immunol* 169: 2627-35, 2002.
 17. Endo M, Ohi H, Ohsawa I, Fujita T, and Matsushita M: Complement activation through the lectin pathway in patients with Henoch-Schonlein purpura nephritis. *Am J Kidney Dis* 35: 401-7, 2000.
 18. Harris CL, Hanna SM, Mizuno M, Holt DS, Marchbank KJ, and Morgan BP: Characterization of the mouse analogues of CD59 using novel monoclonal antibodies: tissue distribution and functional comparison. *Immunology* 109: 117-26, 2003.
 19. Bindon CI, Hale G, Bruggemann M, and Waldmann H: Human monoclonal IgG isotypes differ in complement activating function at the level of C4 as well as C1q. *J Exp Med* 168: 127-42, 1988.
 20. Nangaku M, Shankland SJ, and Couser WG: Cellular response to injury in membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 16: 1195-204, 2005.
 21. Penny MJ, Boyd RA, and Hall BM: Permanent CD8 (+) T cell depletion prevents proteinuria in active Heymann nephritis. *J Exp Med* 188: 1775-84, 1998.
 22. Ogahara S, Naito S, Abe K, Michinaga I, and Arakawa K: Analysis of HLA class II genes in Japanese patients with idiopathic membranous glomerulonephritis. *Kidney Int* 41: 175-82, 1992.
 23. Stanescu HC, Arcos-Burgos M, Medlar A, Bockenhauer D, Kottgen A, Dragomirescu L, Voinescu C, Patel N, Pearce K, Hubank M, Stephens HA, Laundry V, Padmanabhan S, Zawadzka A, Hofstra JM, Coenen MJ, den Heijer M, Kiemeny LA, Bacq-Daian D, Stengel B, Powis SH, Brenchley P, Feehally J, Rees AJ, Debiec H, Wetzels JF, Ronco P, Mathieson PW, and Kleta R: Risk HLA-DQA1 and PLA (2) R1 alleles in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med* 364: 616-26, 2011.
 24. Kim S, Chin HJ, Na KY, Oh J, Chung W, Noh JW, Lee YK, Cho JT, Lee EK, and Chae DW: Single nucleotide polymorphisms in the phospholipase A2 receptor gene are associated with genetic susceptibility to idiopathic membranous nephropathy. *Nephron Clin Pract* 117: c253-8, 2011.

(平成 25. 7. 10 受付. 平成 25. 10. 10 受理)

