

ヒト糸球体病変における間質型コラーゲンと プロリン水酸化酵素の免疫組織学的研究

東田 万智

近畿大学医学部小児科学教室

Immunohistological studies of interstitial collagen and
prolyl hydroxylase in human glomerulonephritis

Machi Tohda

Department of Pediatrics, Kinki University School of
Medicine, Osaka, Japan

ABSTRACT

Immunofluorescent and immunoelectron microscopic studies were carried out to determine the correlation between the progression of glomerular injury and expression of interstitial collagen, types I and III, in various types of glomerulonephritis. In addition, the localization of prolyl hydroxylase, the key enzyme of collagen synthesis, was examined to identify the collagen-producing cells.

In normal human kidney specimens, monoclonal antibodies against interstitial collagen (types I and III) and prolyl hydroxylase did not react with any structure within the glomeruli. In various types of human glomerulonephritis, interstitial collagens were detected in the mesangial area, crescents and sclerosed glomeruli. The amounts and distribution of types I and III collagen in the mesangial area were associated with mesangial expansion. Type III collagen was stained in the moderately and severely expanded mesangium. Type I collagen was present only in the patients with severe mesangial expansion. In crescents and sclerosed glomeruli, type I collagen was colocalized with type III collagen. The staining intensity of type I collagen in these areas was generally stronger than that in the interstitium. Prolyl hydroxylase was colocalized with types I and/or III collagen by immunofluorescence. Immunogold staining revealed that prolyl hydroxylase was expressed in mesangial cells and glomerular epithelial cells. Observations on serially sliced specimens showed no evidence of migration of those collagens from interstitium through disrupted Bowman's capsule.

These findings indicate that production of type III collagen is predominant in the early phase of glomerular injury and the ratio of type I to type III collagen is shifted toward a type

I predominance during the progression of renal disease. Mesangial cells and glomerular epithelial cells play an important role in interstitial collagen synthesis in diseased glomeruli.

Key words: glomerulonephritis, collagen, prolyl hydroxylase, immunohistology

緒 言

慢性糸球体疾患の終末像である糸球体硬化は、腎の非特異的かつ不可逆的な形態学的反応で、腎病変の活動性と密接に関係している。したがって、糸球体硬化の状態を知ることは病態の把握、治療法の選択、ならびに予後の判定に重要である。近年、この病理学的過程において細胞外基質成分の役割が注目されている。腎糸球体で産生される細胞外基質としては、IV型コラーゲン、ラミニン、プロテオグリカンなどがあり、これらの蓄積が糸球体硬化と関連していることが知られている¹。

I型、III型コラーゲンは種々の組織に存在する間質型コラーゲンで、腎では正常の場合、腎間質や血管に分布するが、糸球体内には存在しない^{1,2}。コラーゲンは、細胞内で生合成されたプロコラーゲンが細胞外に分泌されてコラーゲンへと変わるが、その際に種々の酵素による修飾をうける。コラーゲン合成のkey enzymeの1つであるプロリン水酸化酵素は、コラーゲン分子の三重螺旋構造の安定化に参与する³と考えられており、種々の臓器の線維化とともに組織内の活性も増加する⁴⁻⁶ことが報告されている。従来、間質型コラーゲン線維は主にfibroblastが産生細胞であるとされてきたが、近年、種々の細胞により合成されることが報告されている。培養腎メサンギウム細胞もこれらのコラーゲンを合成するが、in vivoでの糸球体細胞によっては少なくとも正常な状態では合成されないものと考えられている²。コラーゲンは抗原性が弱く、また型別に精製することが難しいためにより抗体がえにくく、その免疫組織学的研究には議論の多い点があったが、生化学やモノクローナル抗体の進歩により高度な精製と良質な抗体の作成が可能となった。

本研究では、ヒトの糸球体硬化過程における形態学的アプローチとしてI型、III型コラーゲンのモノクローナル抗体を用いて糸球体内分布を検索し、さらに、これら間質型コラーゲンの産生細胞を検索する目的で、プロリン水酸化酵素に対するモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的検討も行った。

対象と方法

1. 対象

近畿大学附属病院小児科に入院し、腎生検を施行された計81例を研究対象とした。WHOの基準によって診断した各疾患の内訳は、IgA腎炎29例、メサンギウム増殖性非IgA腎炎20例、微小変化群ネフローゼ15例、紫斑病性腎炎6例、巣状糸球体硬化症4例、逆流性腎症3例、膜性増殖性腎炎2例、溶血性尿毒症症候群1例、急速進行性腎炎1例である。また、本院泌尿器科にて腎外傷、腎腫瘍、腎腫瘍の診断のもとで腎切石術や腎摘出術をうけた患者から腎組織を採取し、光顕、蛍光抗体法で異常を認めなかった3例を正常対照として使用した。

各組織片の一部はホルマリン固定、パラフィン包埋の後に薄切し、ヘマトキンリン・エオジン染色、PAS染色、メテナミン銀染色を施行した。これらの光顕標本を用いて、メサンギウム基質の増加の程度をPiraniら⁷の記載に従って、3段階（軽度、中等度、高度）に分類した。

2. 抗体

I型とIII型コラーゲンに対する抗体（ともに、マウスIgG）は和歌山医科大学第1病理学教室大島章教授より供与されたものを使用した。I型とIII型コラーゲンは、ヒト胎盤をペプシン処理し、酸性または中性の条件下にてdifferential salt fractionation法で分離・精

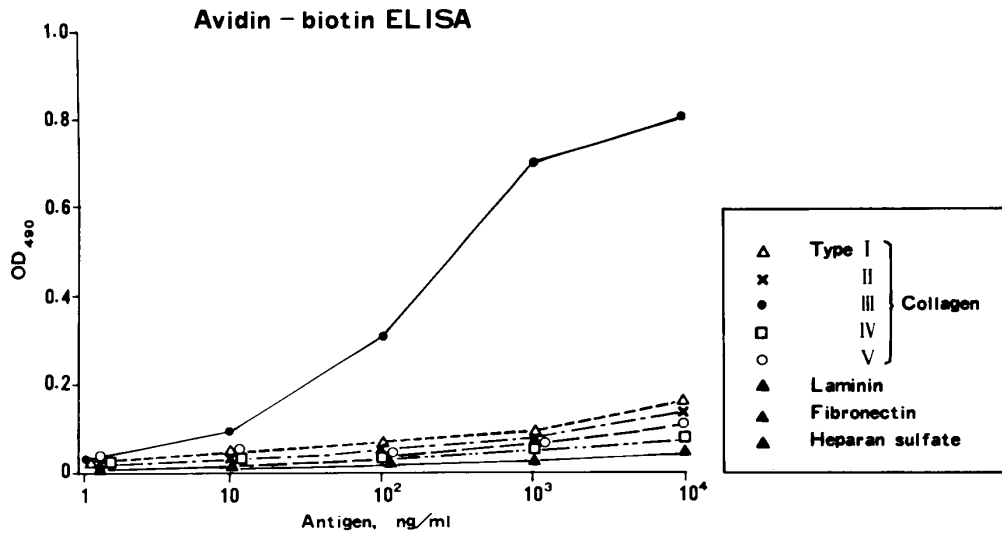


Fig. 1 Avidin-biotin ELISA data showing the monoclonal antibody reactivity with types I (Δ), II (\times), III (\bullet), IV (\square) and V (\circ) collagen, laminin (\blacktriangle), fibronectin (\blacktriangle), and heparan sulfate (\blacktriangle).

製し、これらで免疫した BALB/C マウスの脾細胞とマウス・ミエロマ細胞とで免疫後、ハイブリドーマを形成させ、抗体をえたものである。抗 I 型コラーゲン抗体の特異性は、inhibition enzyme-linked immunoassay によって確めた。また、抗 III 型コラーゲン抗体の特異性は enzyme-linked immunoassay により検討した。すなわち、microtiter plate に精製された抗原（コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、ヘパラン硫酸）を coat し、既報⁸に従って avidin-biotin system で反応させたところ、本抗体は III 型コラーゲンを認識していることが明らかになった (Fig. 1)。また、I 型、IV 型コラーゲンやラミニン、フィブロネクチン、ヘパラン硫酸との反応はみられなかった。抗プロリン水酸化酵素抗体は、ヒト胎盤より精製したプロリン水酸化酵素 β 鎖のモノクローナル抗体（マウス IgG, 富士薬品 KK, 富山）を用いた。また、2 次抗体には fluorescein-isothiocyanate (FITC) 標識あるいは peroxidase 標識のアフィニティー精製ヤギ抗マウス IgG (Cappel, Malvern, Pennsylvania, USA) を使用した。

3. 蛍光抗体法

組織採取後、アセトン・ドライアイスにて OCT compound 内に凍結包埋し、使用直前ま

で -70°C に保存した。3 μm に薄切した腎組織を、アルブミン塗布スライドガラスに貼布し、風乾後、50 mM phosphate buffer-0.15 M NaCl, pH 7.4 (以下 PBS) で洗浄し、抗 I 型コラーゲン抗体 1 : 20, 抗 III 型コラーゲン抗体 1 : 200, 抗プロリン水酸化酵素抗体 1 : 20 と希釈し、これら 1 次抗体を室温で 45 分間組織上で反応させた。PBS で洗浄後、2 次抗体を室温で 45 分間反応させて観察した。2 次抗体は正常ヒト血漿で吸収して、非特異的反応のないことを確認後に使用した。また、コントロールとして、1 次抗体にこれらとは関連のないマウスモノクローナル抗体を使用し、2 次抗体による非特異染色のないことを確認した。

4. 免疫電顕法

4.1. 酵素抗体法

組織を periodate-lysine-paraformaldehyde 液の中に入れ、 4°C で 4 時間固定した。固定後、PBS で洗浄し、sucrose 加 PBS 中に入れ、濃度を順次 10%, 15%, 20% にあげ、組織を脱水した。その後、アセトン・ドライアイスあるいはイソペンタン液体窒素内で OCT compound 内に凍結包埋した。4 μm の切片を作製し、風乾、PBS で洗浄後、内因性 peroxidase による非特異的反応を阻止する目的で、

組織を 5 mM periodic acid に10分間, 3 mM 水酸化硼素酸ナトリウム溶液に30分間それぞれ浸透させた. PBS で洗浄後, moist chamber 内で1次抗体(抗Ⅲ型コラーゲン抗体, 1:200~400)を4°C, 16時間反応させ, 次いで peroxidase 標識のヤギ抗マウス IgG を2次抗体として室温で45分間反応させた. その後1% glutaraldehyde にて組織を前固定し, 次いで1% dimethylsulfoxide 加 3,3'-diaminobenzidine-hydrochloric acid 20 mg/100 ml 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.6) で30分間処理し, 0.005% 過酸化水素水を含む同液にて発色させた. 2% オスミウム酸で2時間組織を後固定し, その後, 脱水してエポンに包埋した. Microtome で 60~80 nm の超薄切片を作製後, 未染色で日立 HU-12A 型電子顕微鏡で観察した.

4.2. 金コロイド法

4.2.1. Pre-embedding method

組織を4% paraformaldehyde 液の中に入れ, 4°Cで2時間固定した. 固定後, PBS で洗浄し, sucrose 加 PBS 中に入れ, sucrose 濃度を順次10%, 15%, 20%に上げ, 組織を脱水した. その後, アセトン・ドライアイスで OTC compound 内に凍結包埋した. 6 μ m の薄切切片を作製し, 風乾後に使用した. PBS で洗浄後, moist chamber 内で1次抗体を室温で1時間反応させ, 次いで金コロイド(粒子直径: 15~20 nm) 結合の2次抗体(抗マウス IgG, E-Y Laboratories, Inc, California, U.S.A.) を室温, 30分間反応させた. PBS で洗浄後, 1% glutaraldehyde で後固定した後, 2% オスミウム酸で2時間組織を再固定し, その後に脱水し, エポンに包埋した. microtome にて 60~80 nm の超薄切片作製後, 酢酸ウラニルにて5分間染色後, 電子顕微鏡(日立, HU-12A 型, 東京)にて観察した.

4.2.2. Post-embedding method

組織を4% paraformaldehyde 液にて4°Cで2時間固定し, PBS で洗浄後, -30°Cのエタノールにて徐々に脱水し, Lowicryl K4M

(Chemische Werke Lowi, Waldkraiburg, Germany) 樹脂で包埋した. 樹脂の重合は-20°Cで行い, 紫外線下で一晩おき, その後, 室温で紫外線下に一晚重合を行い, microtome で 60~80 nm の超薄切片を作製し, nickel grid にマウントした. 染色法はすべての処理をパラフィルムの滴下した水滴に浮かべて次のごとく行った. まず0.5% bovine serum albumin で処理し, 1次抗体を室温で1時間反応させ, PBS で洗浄後, 金コロイド標識の2次抗体を室温で30分間反応させた, cacodylate buffer (pH 7.6) で洗浄後, 蒸留水で洗い, 酢酸ウラニルで5分間染色後, 電子顕微鏡(日立, HU-12A 型, 東京)で観察した.

5. 一般電顕法

電顕観察用の試料は, 2% glutaraldehyde で前固定し, ついで2% オスミウム酸で後固定した後, 漸増エタノール系列で脱水, プロピレンオキサイドで浸透後, Epon 812 に包埋して超薄切片を作製し, 矢島⁹の方法に準じた PAM 染色を行った. まず, 切片を1% 過ヨウ素酸で15分間酸化後, 温蒸留水で洗浄し, ついでメチナミン銀液で60°C, 1時間染色した. 途中15分後, 30分後に標本を鍍銀液から引き出し, 出てきた気泡を除いた. 温蒸留水で洗浄後, 5% ハイポ液に3秒間反応させ, 乾燥後, 電子顕微鏡(日立, HU-12A 型, 東京)で観察した. 以上の染色操作は, 染色皿を用いての浮かし鍍銀式の方法をとった.

結 果

1. 正常腎での検討

I 型, Ⅲ型コラーゲン およびプロリン水酸化酵素の蛍光抗体法による染色像をそれぞれ Figure 2A および Figure 2B に示した. コラーゲンはいずれも正常糸球体内には観察されず, 間質および糸球体外小血管壁に分布していた. 間質では, Ⅲ型コラーゲンは I 型コラーゲンに比べて強い染色性を示した. プロリン水酸化酵素も正常糸球体内には存在せず, 一部の尿細管上皮に軽度に染色されたのみであった(Fig.2C).

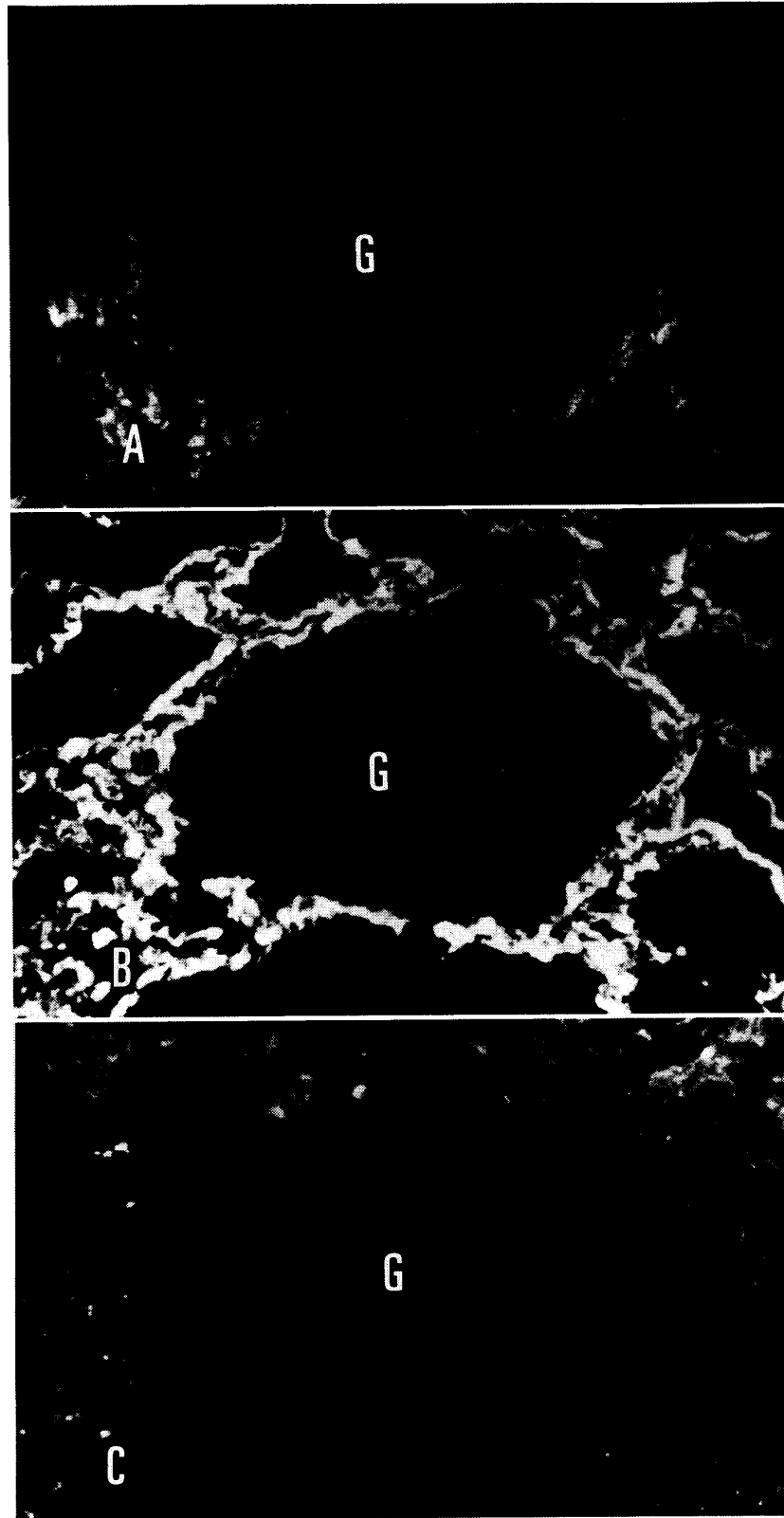


Fig. 2 Indirect immunofluorescence of normal human glomeruli stained with monoclonal antibody to type I (A), type III (B) collagens and prolyl hydroxylase (C). Glomerulus contained no type I or type III collagen or prolyl hydroxylase. However, types I and III collagen were present in the interstitium, and prolyl hydroxylase in tubular epithelial cells. Original magnification : $\times 400$ (A-C). G : glomerulus.

Table 1 Glomerular localization of type I and type III collagens and prolyl hydroxylase in human kidney diseases

Disease	Mesangial matrix increase	No. of total patients	Localization												
			Mesangium		Crescent		Sclerosed glomeruli		Sclerosed glomeruli						
			I (+) ¹	III (+) ²	P (+)/P ³	I (+) ¹	III (+) ²	P (+)/P ³	I (+) ¹	III (+) ²	P (+)/P ³				
IgA nephritis	+	6	0	0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
	++	15	2	4	0/4	3/4	3/4	1/2	1/2	1/3	1/3	1/3	0/2	0/2	0/2
	##	8	6	7	1/2	3/5	3/5	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	0/2	0/2	0/2
Mesangial proliferative	+	4	0	0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
GN without NS	++	12	0	3	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/2	1/2	1/2	0/0	0/0	0/0
with NS	++	4	0	1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0	0/0
Minimal change NS		15	0	2	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Henoch-Schönlein purpura nephritis		6	0	5	3/6	2/4	2/4	1/4	1/4	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
Focal glomerular sclerosis		4	2	3	2/4	0/0	0/0	0/0	0/0	1/2	1/2	1/2	0/2	0/2	0/2
Reflux nephropathy		3	1	3	1/2	0/0	0/0	0/0	0/0	0/3	0/3	0/3	0/2	0/2	0/2
Membranoproliferative GN		2	1	2	2/2	0/0	0/0	0/0	0/0	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
HUS		1	0	0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Rapidly progressive GN		1	1	1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1
Total		81	13	31	10/21	9/14	9/14	4/9	4/9	5/17	5/17	5/17	1/12	1/12	1/12

1,2 : The number of patients demonstrating positive immunofluorescence for types I or III collagen

3 : The number of patients demonstrating positive immunofluorescence for prolyl hydroxylase / the total number of patients examined by immunofluorescence for prolyl hydroxylase

Abbreviations. GN=glomerulonephritis, NS=nephrotic syndrome, HUS=hemolytic-uremic syndrome

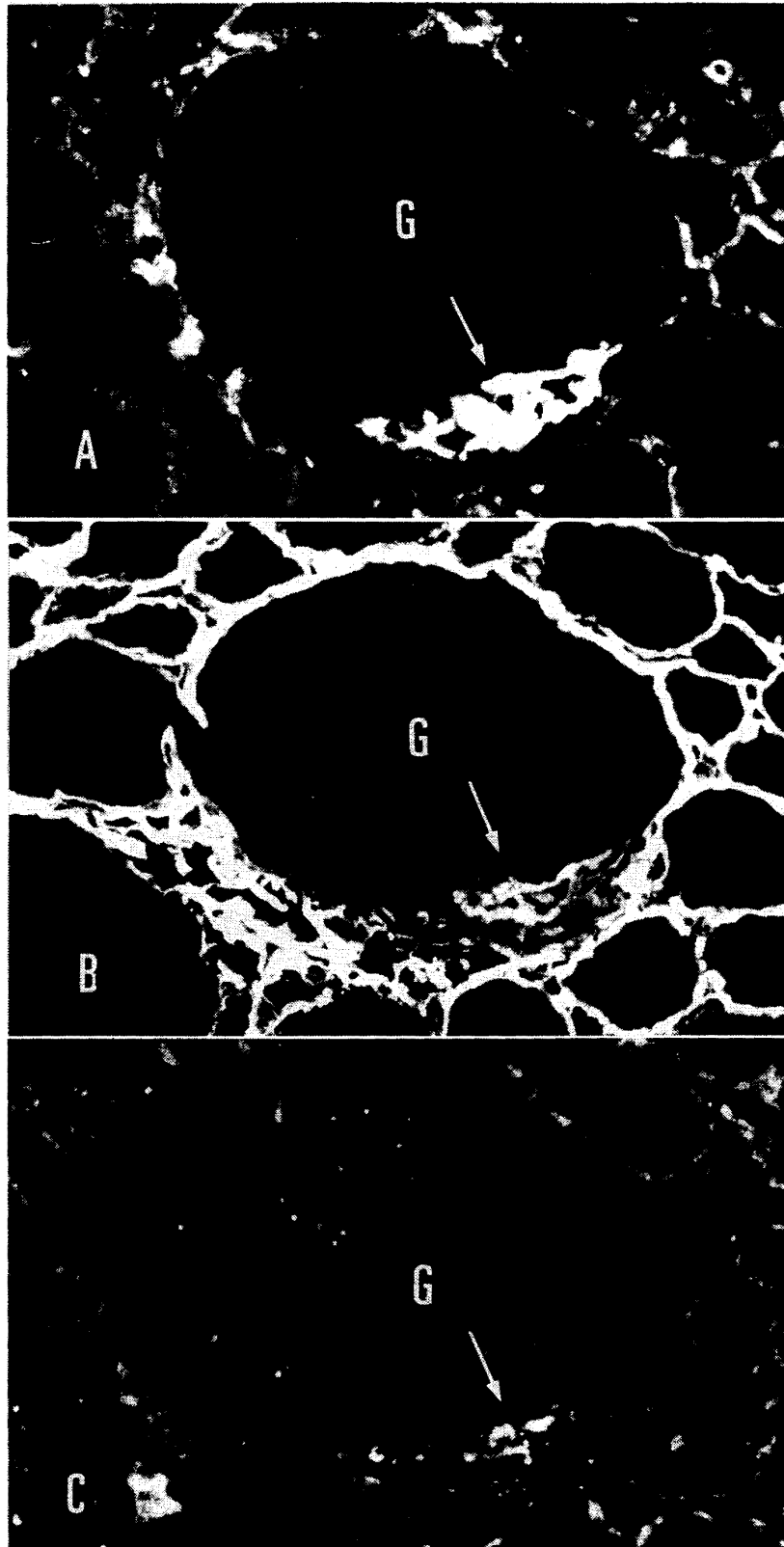


Fig. 3 Immunofluorescent staining for type I collagen(A), type III collagen(B), and prolyl hydroxylase (C) in the glomerular crescent of a patient with Henoch-Schönlein purpura nephritis(A, B, C).

Note the intense staining for types I and III collagen, especially the former, in the crescent, and positive staining for prolyl hydroxylase in the same locus. Original magnification : A-C, $\times 400$. G: glomerulus.

2. 各種腎疾患での検討

2.1. 蛍光抗体法による観察

各種糸球体腎炎81例でのⅠ型, Ⅲ型コラーゲンおよびプロリン水酸化酵素の観察結果を Table 1 に示した. IgA 腎症におけるコラーゲンの出現は, メサンギウム基質の増加程度と関連していた. メサンギウム増殖性非 IgA 腎炎は, ネフローゼ症状合併の有無にかかわらず, 陽性例が少なく, 微小変化ネフローゼにおいても出現頻度は低い. 紫斑病性腎炎はこれらの病型のうち最もコラーゲン陽性頻度が高かった. 巣状硬化症, 逆流性腎症, 膜性増殖性腎炎, 急速進行性腎炎ではⅠ型も出現していた. Ⅰ型およびⅢ型コラーゲンは, 間質と糸球体外血管壁に加えて, 糸球体内に観察される場合があり, それらは, メサンギウム, 半月体, 硬化糸球体に分布していた. 半月体 (Fig. 3A, 3B) と硬化糸球体 (Fig. 4A, 4B) では, Ⅰ型とⅢ型コラーゲンが

同部位に観察され, その染色性はⅠ型が間質よりも強いのに対し, Ⅲ型の染色性は半月体と間質とほぼ同程度であった.

メサンギウム領域においては, Ⅲ型コラーゲンは81例中30例, Ⅰ型コラーゲンは81例中12例に認められた. それらの分布は focal で segmental であった. Ⅲ型コラーゲンはメサンギウムの中等度および高度増殖例にしばしば認められたが, Ⅰ型は主に高度増殖例にのみ観察され, 量的にも少ないものであった (Fig. 5A, 5B). メサンギウム領域では, Ⅲ型が単独で染まる症例がみられたが, 半月体と硬化糸球体では常にⅠ型とⅢ型コラーゲンの両方が同部位に認められた. また, いずれの症例においても, Ⅰ型が単独で染色されることはなく, Ⅲ型と同時に観察された.

糸球体内に沈着したコラーゲンと間質のコラーゲンの間には, 連続切片での観察において

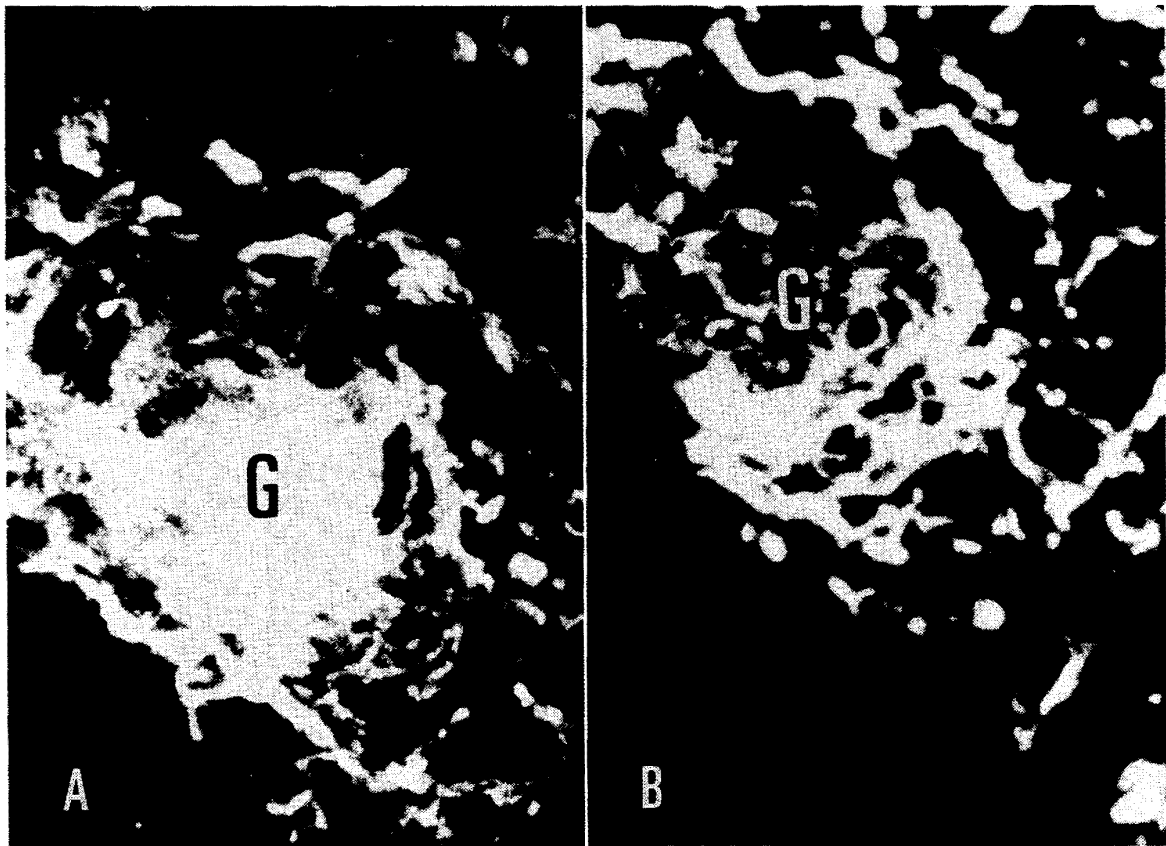


Fig. 4 Immunofluorescent staining for type I (A) collagen, and type III (B) collagen in a glomerulus showing global sclerosis in a patient with focal glomerular sclerosis. Original magnification : A-B, $\times 400$ G: glomerulus.

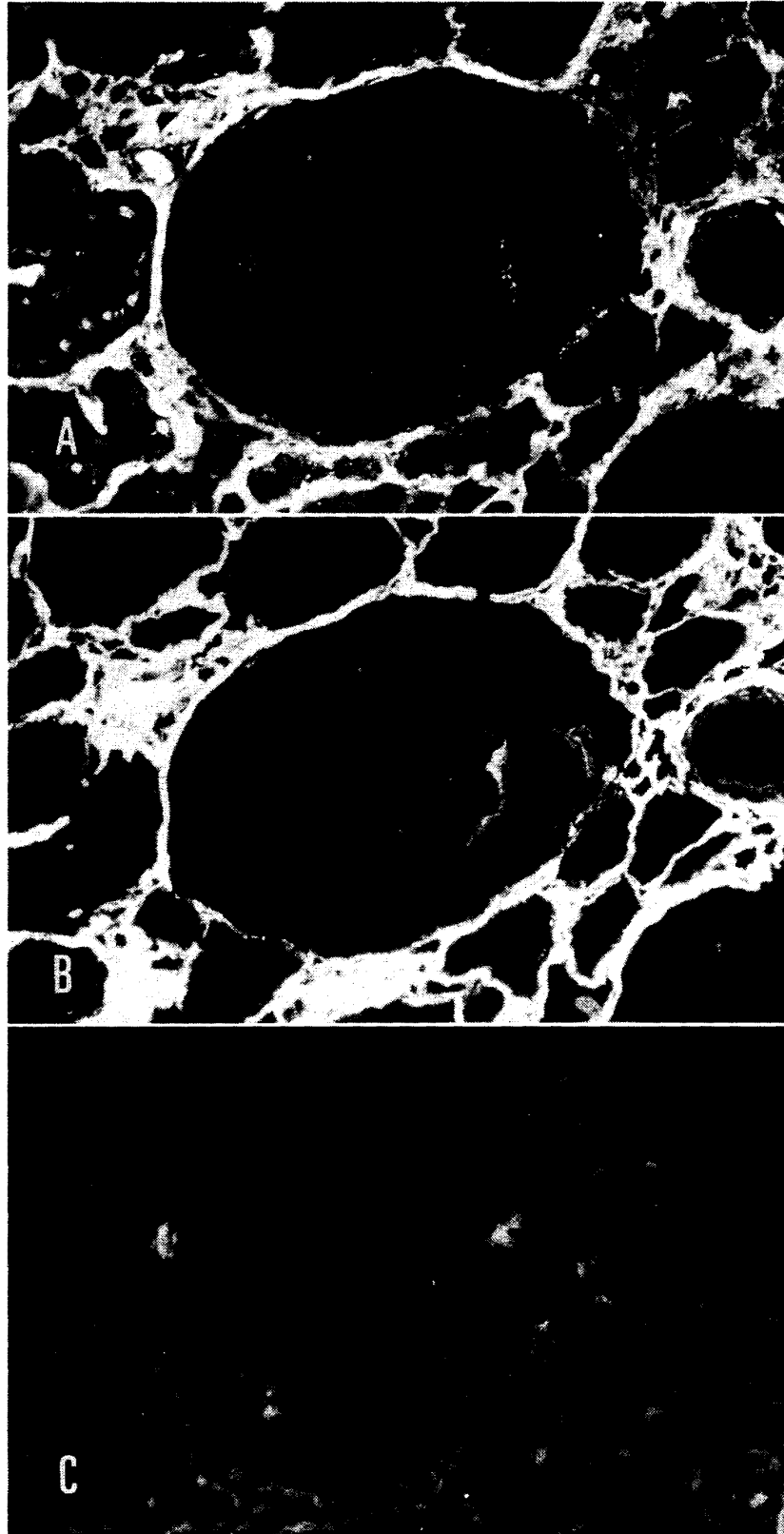


Fig. 5 Immunofluorescent staining for type I (A) collagen, and type III (B) collagen, and prolyl hydroxylase (C) in a patient with mild mesangial proliferation. In the mesangial area, there is positive staining for type III collagen, but negative staining for type I collagen. Note the positive staining for prolyl hydroxylase in the same locus. Original magnification : A-F, $\times 400$

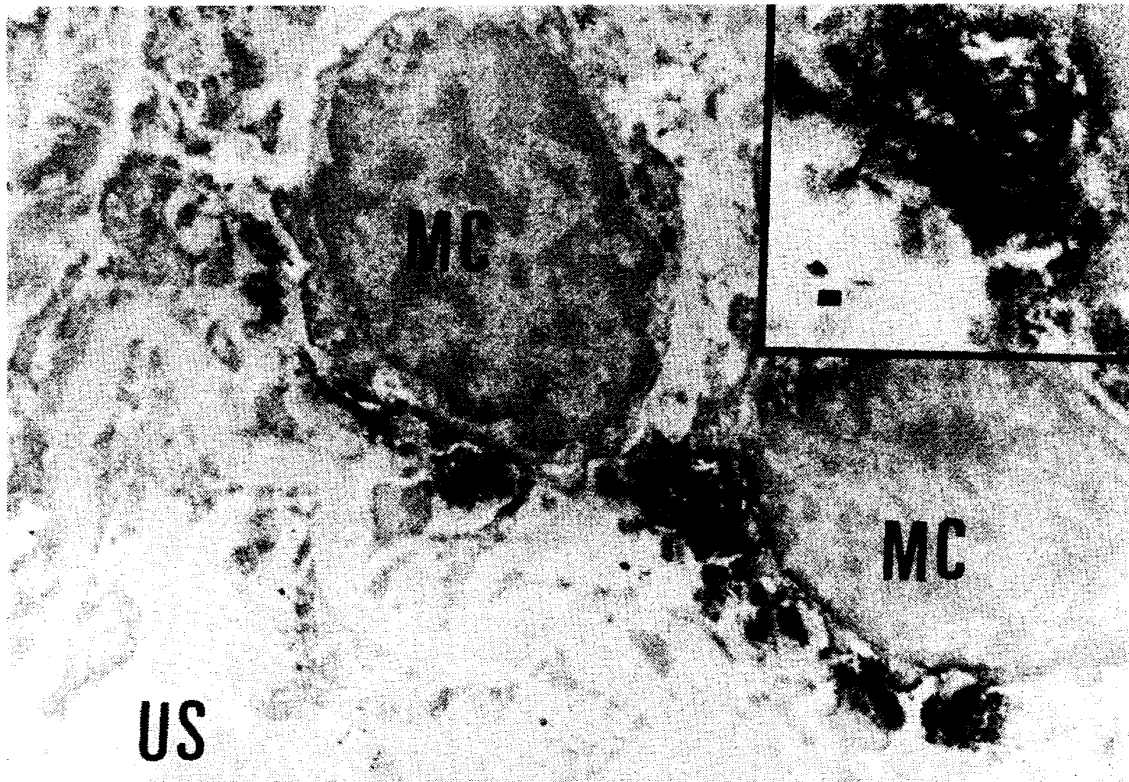


Fig. 6 Immunoelectron microscopy of a portion of a glomerulus in a patient with IgA nephritis with the indirect peroxidase staining for type III collagen. Reaction products are present around the mesangial cells. Inset; higher magnification of the reaction products in the mesangial area. Note thin non-banded fibrillar structures (arrows). MC: mesangial cell, US: urinary space. (Bar=100nm).

も、ポーマン囊からの侵入を示す連続性は認められなかった。

プロリン水酸化酵素はメサンギウム領域には21例中10例、半月体には9例中4例、硬化糸球体は12例中1例に観察された (Fig. 3C, 5C)。陽性部位は、間質型コラーゲンの陽性部位と一致していた。また、尿細管上皮にも軽度の染色性を認めた。

2.2. 免疫電顕による観察

I型、III型コラーゲンおよびプロリン水酸化酵素について、酵素抗体法にてIgA腎炎2例、紫斑病性腎炎2例、膜性腎症(3期)1例、膜性増殖性腎炎1例の計6例で行った。6例中4例がメサンギウム領域にIII型コラーゲン陽性を示した (Fig. 6)。また6例中2例において、半月体と硬化糸球体にも陽性所見を認めた。間質においても、半月体と硬化糸球体でみられたペルオキシダーゼ陽性のコラーゲン線維が同様に

観察された。

金コロイドを標識とした免疫電顕については、急速進行性腎炎1例、IgA腎炎1例、膜性増殖性腎炎1例、正常腎1例の計4例で施行した。

I型 (Fig. 7A)、III型コラーゲン (Fig. 7B) はメサンギウム基質内に陽性で、III型コラーゲンがより強い染色性を示した。プロリン水酸化酵素は、メサンギウム細胞 (Fig. 8A) と上皮細胞 (Fig. 8B) の細胞質に観察された。正常腎では、糸球体には観察されなかった。

2.3. 一般電顕による観察

IgA腎症2例、膜性増殖性腎炎I型1例、増殖性腎炎1例、急速進行性腎炎1例の計5例について、メテナミン銀染色にてコラーゲン線維を観察した。

メサンギウム基質の著しい増殖や膜性増殖性腎炎例では circumferential mesangial inter-

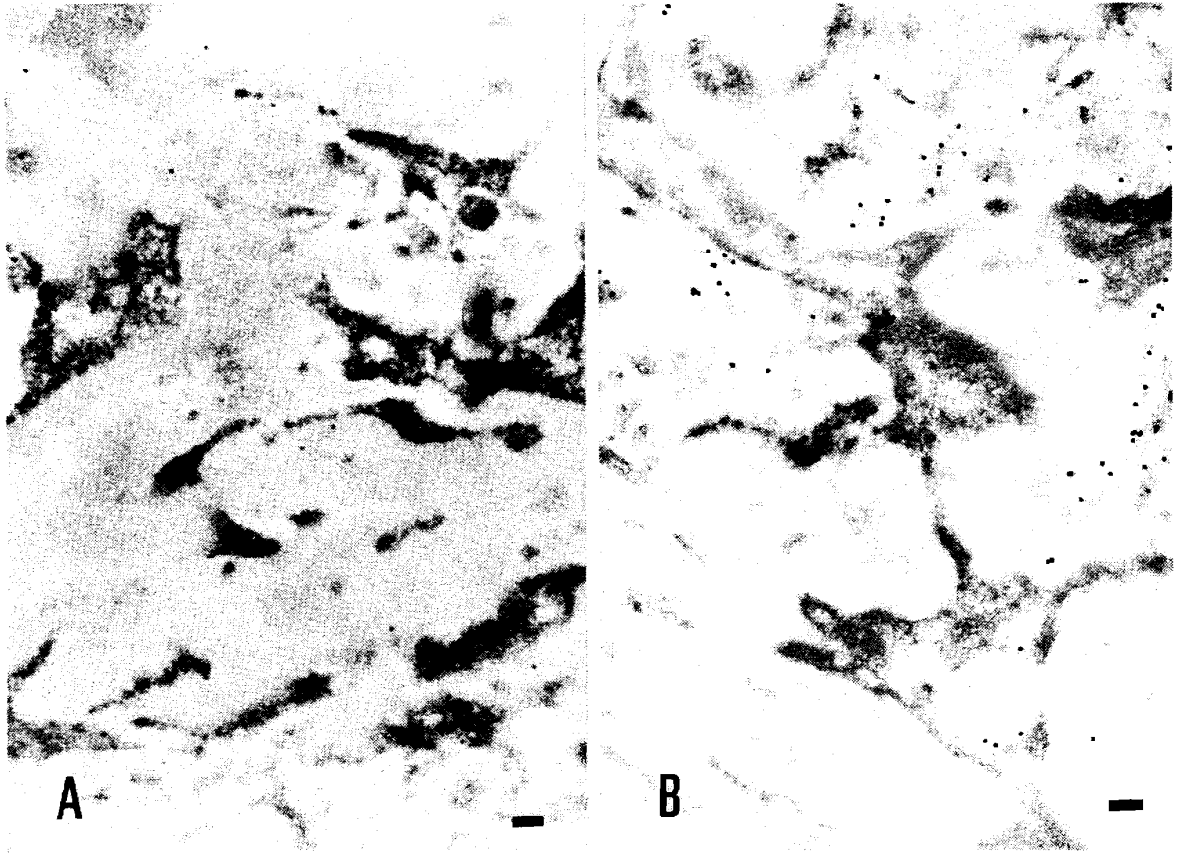


Fig. 7 Indirect immunogold staining for type I collagen(A). and type III collagen(B). Note the positive staining for types I and III collagen in the mesangium. Bar : 100nm.

position が認められたほか、PAM 染色で増殖したメサンギウム基質内に膠原線維の出現が 5 例中の 3 例において明瞭に観察された (Fig. 9).

考 察

各種腎疾患の発症・進展過程における間質型コラーゲン (I 型および III 型) の変化とその産生細胞について、免疫組織化学的に検討した。間質型コラーゲンは、正常では糸球体内には観察されなかったが、各種腎疾患では蛍光抗体法でメサンギウム、半月体、硬化糸球体に認められた。メサンギウム領域においては、メサンギウムの中等度増殖例では III 型コラーゲンのみ、高度増殖例では I 型および III 型コラーゲンが同部位に存在した。半月体と硬化糸球体では、I 型および III 型コラーゲンが同部位にみられた。コラーゲン産成細胞についての検討では、コラーゲン合成系の key enzyme であるプロリン水

酸化酵素が、蛍光抗体法において、間質型コラーゲンの陽性部位に一致して観察され、免疫電顕ではメサンギウム細胞および糸球体上皮細胞にみられた。

種々の疾患において、組織構造や機能に障害を生じる組織内膠原繊維の質的・量的変化についての検討は、不可逆性病変形成のメカニズムを知るうえで、近年注目されている。今回の検討から、メサンギウム領域では基質の増加に伴って、まず、III 型コラーゲンが出現し、遅れて I 型コラーゲンも出現してくると考えられた。さらに、硬化が進行すると I 型主体へと変化するという過程を経て、糸球体硬化が進展するものと考えられる。組織中に出現、増加する間質型コラーゲンの III 型から I 型への switch は、肝硬変^{10,11}、肺線維症^{12,13} や創傷治癒機転¹⁴でも報告されている。また腎炎に関しては、Striker ら² は巣状糸球体硬化症や膜性増殖性腎炎の増殖したメサンギウムに IV 型コラーゲン、

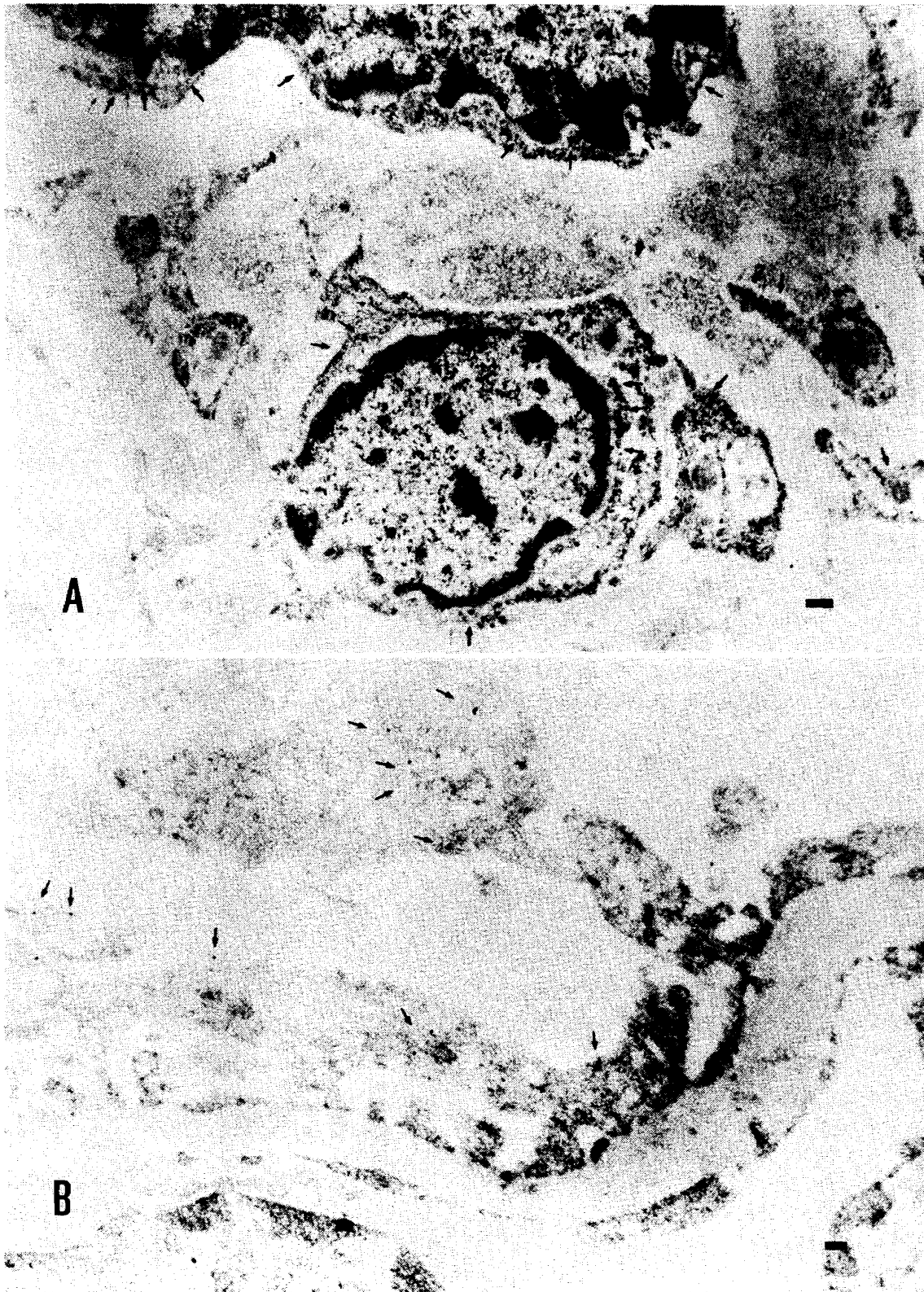


Fig. 8 Indirect immunogold staining for prolyl hydroxylase(A, B) in a patient with membranoproliferative type I glomerulonephritis.

Prolyl hydroxylase was stained in the stroma of mesangial cells and also epithelial cells. Bar : 100nm.

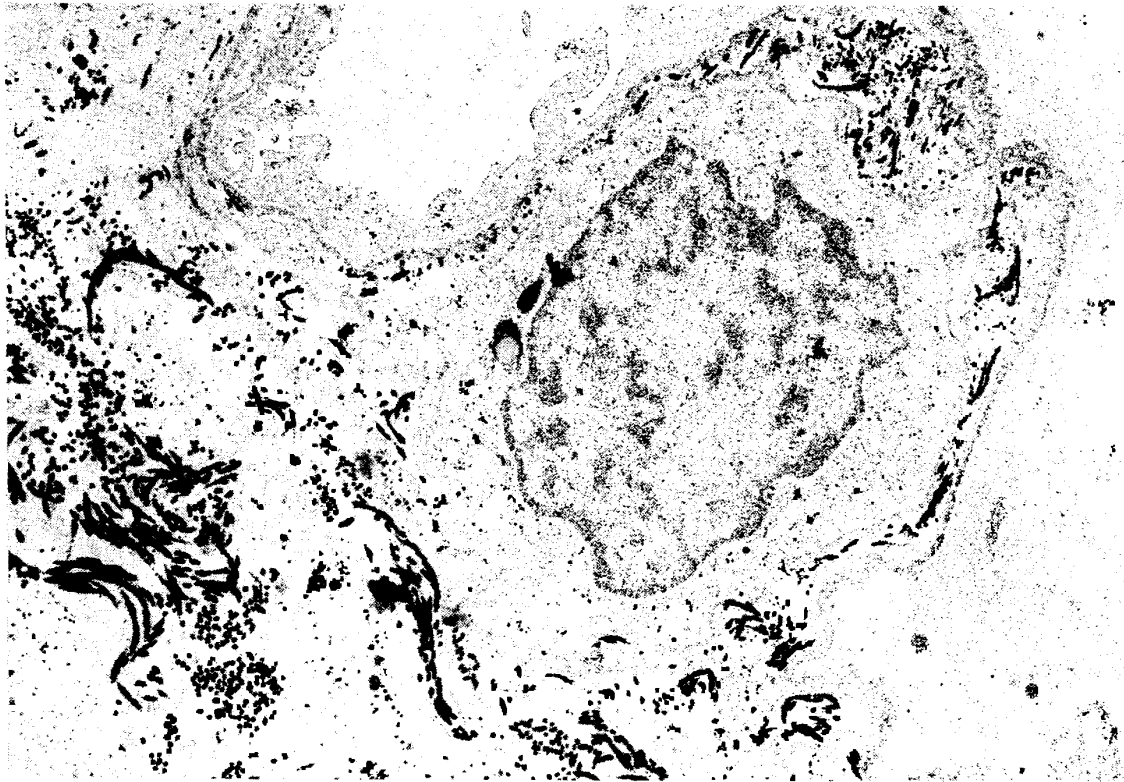


Fig. 9 Electron micrograph of a portion of a glomerulus in a patient with rapidly progressive glomerulonephritis.

Increased mesangial matrix contains fibrils. PAM staining. Magnification: $\times 84,000$

ラミニンが染色され、広範な癒着部や半月体にはⅢ型コラーゲンを認めたとしている。Falkら¹⁵は糖尿病性腎症でⅣ型コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンがみられるが、末期になるとそれらの染色性が低下したと報告している。Funabikiら¹⁶もIgA腎症、膜性増殖性腎炎、糖尿病性腎症でⅣ型コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンが拡大したメサンギウムに増殖し、硬化病変が進展するとⅠ型、Ⅲ型、Ⅴ型コラーゲンが出現し、硝子化に至るとⅠ型コラーゲン主体となるとしている。糸球体病変の進展過程では、数多くの細胞外基質成分の量的・質的变化が連続して進行し、病期により出現する細胞外基質成分が異なるものと推測される。Ⅲ型コラーゲンが出現し、次いでⅠ型も出現して最終的にⅠ型主体へと変化する過程以前に、すでにⅣ型コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンなど他の細胞外基質成分の増加が先行あるいは並行している可能性もある。半月体につい

ては、細胞性のものから器質化したものまで常にⅠ型とⅢ型コラーゲンが同時に観察された。Yoshiokaら¹⁷は細胞性・線維性半月体内にⅣ型、ラミニン、フィブロネクチンを観察したと報告している。

間質型コラーゲンは、全身の諸臓器の間質に広く分布する結合組織の主成分で、従来、主に線維芽細胞が産生細胞であるとされてきた。しかし、最近ではプロリン水酸化酵素の他、galactosyl hydroxylysyl glucosyltransferase (S-GGT), lysyl oxidase など線維マーカーが数多く開発された結果、平滑筋細胞¹⁸、肝細胞¹⁹、など多くの細胞がコラーゲン合成能をもつことが明らかになってきた。腎については糸球体の細胞培養実験により、Ardailouら²⁰はヒト上皮細胞は主にⅣ型コラーゲン、メサンギウム細胞はⅠ型を主にして、Ⅲ型、Ⅳ型コラーゲンを産生すると報告している。Creelyら²¹はラットの糸球体上皮細胞はⅢ型を主にⅠ型、Ⅳ

型, V型コラーゲンを産生するとしている. Haralson ら²² は, メサンギウム細胞による I 型を主体とした III 型, IV 型, V 型コラーゲンの産生を報告している. 福井²³ は STZ 糖尿病ラットの単離糸球体を用いて $\alpha 1(I)$ コラーゲン, ラミニン B1 mRNA レベルの上昇を報告している.

糸球体内に観察される間質型コラーゲンの由来については, 間質からの侵入と糸球体内での産生の可能性が考えられる. 今回, コラーゲン産生細胞を同定する目的で, ヒトプロリン水酸化酵素に対する特異抗体を用いて蛍光抗体法で観察した結果, I 型ないしは III 型コラーゲンに一致した部位に陽性所見を認め, さらに金コロイド法では, 上皮細胞とメサンギウム細胞に特異的に観察された. また, 一部尿細管上皮にも染色されたがその染色性は弱く, 間質で増生する線維芽細胞にはほとんど染色されなかった. これらの結果から, 糸球体上皮細胞およびメサンギウム細胞がコラーゲン合成を行っていることが確認された. Adler²⁴ や Striker ら² は, 糸球体内の間質型コラーゲンは, 病変の進展がボウマン囊の癒着や基底膜の破壊による間質からの侵入によるものとしている. しかし, 今回の我々の検討では, ボウマン囊障害とは無関係に糸球体内に I 型および III 型コラーゲンが観察された. また, 連続切片でも間質からの侵入像は認められず, 間質や糸球体外周よりも糸球体内の間質型コラーゲン (特に I 型) が強い染色性を示したことから, 糸球体内でのコラーゲン産生の可能性が強いと考えられた.

腎炎の発症, 進展については, 好中球, 単球, 血小板などの血液由来細胞が主に関与する急性相と, 糸球体構成細胞の量的・質的变化, および腎血行動態の異常をきたす慢性相に分けられる. ヒト腎炎の発症・進展には免疫系, 凝固系の関与が推定されているが, その要因のすべてが解明されたわけではなく, しかも発症すれば進行性の経過をたどることが多いが, この原因として糸球体構成細胞のもつ種々の潜在能がどのような機転で発現するに至るかが重要な点で

あると思われる. コラーゲン合成を調節する因子は, 各々のコラーゲン産生細胞について数多くのものが想定されるが, その 1 つとしてアラキドン酸カスケード関連物質 (エイコサノイド) が腎炎との関連において注目されている. *in vitro* では interleukin 1²⁵ や, prostaglandin E₂²⁶ などのエイコサノイドによる糸球体細胞のコラーゲン合成能の亢進が観察されており, また糸球体構成細胞によるエイコサノイドの産生も報告されている^{27,28}. 傷害を受けた糸球体に沈着した補体の membrane attack complex^{29,30} が細胞障害作用とともに prostaglandin E₂, thromboxan A₂, interleukin 1 などの産生も刺激する^{31,32}. 血液由来の細胞浸潤を欠く Heymann 型腎炎などの実験腎炎でも, prostaglandin E₂ と thromboxan A₂ の産生亢進が認められている²⁷. また, 傷害を受けた糸球体細胞からは platelet activating factor や platelet derived growth factor が産生され, これらもエイコサノイド産生刺激となり, さらにエイコサノイドによる platelet activating factor 産生刺激も生じ, 病態の一層の進展をきたすことになる^{33,34}. その他糸球体細胞には, transforming growth factor β ³⁵, epidermal growth factor^{36,37,38} や種々のサイトカインの産生能も推測されている. 腎血行動態に関しては, アンギオテンシン II 系が刺激される³⁹ ことにより prostaglandin E₂ の産生亢進をきたし, これに拮抗する²⁷ と考えられている. また同時に, 血液由来の細胞からもサイトカイン, platelet activating factor, 種々の酵素, エイコサノイドが分泌され^{34,40,41}, さらにこれらが相互に関連し合い, 腎病変を進展させるものと考えられる. コラーゲン合成についても, 腎炎の進行過程における一連の悪循環を促進させる因子として, 重要な役割を果たすものと考えられる. また, 膠原線維の形成存続は, コラーゲンの形成と分解吸収の平衡の上に立つことから, 線維化の進展および改善において, コラーゲンの吸収機転も切り離して考えることはできないものと考えられる.

結 論

1. 正常腎組織では、糸球体内にⅠ型、Ⅲ型コラーゲンおよびプロリン水酸化酵素はいずれも観察されなかった。
2. 各種腎疾患での検討では、メサンギウム領域、半月体、硬化糸球体に間質型コラーゲンを認めた。その染色性はメサンギウム増殖が高度になるに従って強くなり、中等度増殖例ではⅢ型コラーゲンのみが観察され、高度増殖例ではⅠ型とⅢ型コラーゲンがともに認められた。半月体と硬化糸球体ではⅠ型とⅢ型コラーゲンが同部位にみられ、Ⅰ型コラーゲンがより強い染色性を示した。
3. プロリン水酸化酵素は、蛍光抗体法において間質型コラーゲンに一致して観察され、免疫電顕法でメサンギウム細胞および上皮細胞に認められた。
4. 間質からのコラーゲン線維の侵入像は連続切片でも観察されなかった。
5. Ⅲ型とⅠ型コラーゲンでは産生される phase が異なり、前者は糸球体硬化過程の前期に、後者は後期に出現して増殖すると考えられ、その産生に関しては、メサンギウム細胞および上皮細胞が関与するものと考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った牧淳教授に深謝致します。また、直接の御指導、御助言を頂きました吉岡加寿夫講師と、本研究に御協力頂きました教室の諸先生に感謝致します。また、腎組織の提供に御協力頂いた本学泌尿器科学教室（栗田孝教授）の諸先生方、モノクロナール抗体の提供に御協力頂いた和歌山医科大学第1病理学教室、大島章教授に御礼申し上げます。

なお本研究は、厚生省特定疾患「進行性腎障害」調査研究班（班長：東條静夫名誉教授）、厚生省心身障害研究「小児慢性腎疾患の予防、管理、治療に関する研究班」（総合班長：石丸隆治）の調査研究費によるところが多く、深謝致します。

参 考 文 献

1. Striker LM, Killen PD, Chi E, Striker GE. The composition of glomerulosclerosis I : studies in focal sclerosis, crescentic glomerulonephritis, and membranoproliferative glomerulonephritis. *Lab Invest* 1984 ; 51 : 181-192.
2. Yoshioka K, Tohda M, Takemura T, et al. Distribution of type I collagen in human kidney diseases in comparison with type III collagen. *J Pathol* 1990 ; 162 : 141-148.
3. Kivirikko KI, Majamaa K. Synthesis of collagen: chemical regulation of post-translational events in fibrosis. London: Pitman, 1985 ; 34-64.
4. Takeuchi T, Kivirikko KI, Prockop DJ. Increased protocollagen hydroxylase activity in the livers of rats with hepatic fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1967 ; 28 : 940-944.
5. Fuller GC, Langner RO. Elevation of aortic proline hydroxylase: a biochemical defect in experimental arteriosclerosis. *Science* 1970 ; 168 : 987-989.
6. Mussini E, Hutton JJ Jr, Udenfriend S. Collagen proline hydroxylase in wound healing, granuloma formation, scurvy, and growth. *Science* 1967 ; 157 : 927-929.
7. Pirani CL, Salinas-Madriral L, Koss MN. Evaluation of percutaneous renal biopsy. In: Sommers SC, ed. *Kidney pathology decennial*: New York: Appleton-Century-Crofts, 1975, 109-163.
8. Yoshioka K, Takemura T, Tohda M, et al. Glomerular localization of type III collagen in human kidney disease. *Kidney Int* 1989 ; 35 : 1203-1211.
9. 矢島権八. 糸球体の過ヨウ素酸—メテナミン銀染色法. *臨床検査* 1976 ; 20 : 14-19.
10. Seyer JM, Hutchinson ET, Kang AH. Collagen polymorphism in normal and cirrhotic human liver. *J Clin Invest* 1977 ; 59 : 241-248.
11. Rojkind M, Giambrone MA, Biempica L. Collagen type in normal and cirrhotic liver. *Gastroenterology* 1979 ; 76 : 710-719.
12. Seyer JM, Hutchinson ET, Kang AH. Collagen polymorphism in idiopathic chronic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 1976 ; 57 : 1498-1507.
13. Shoemaker CT, Reiser KM, Goetzman BW, Last JA. Elevated ratios of type I/III collagen in the lungs of chronically ventilated neonates with respiratory distress. *Pediatr Res* 1984 ; 18 : 1176-1186.
1. Striker LM, Killen PD, Chi E, Striker GE. The composition of glomerulosclerosis I : stud-

14. Shuttleworth CA, Forrest L. Pepsin-solubilized collagens of guinea-pig dermis and dermal scar. *Biochim. Biophys. Acta* 1974 ; 365 : 454-457.
15. Falk RJ, Scheinman JJ, Mauer SM, Michael AF. Polyantigenic expansion of basement membrane constituents in diabetic nephropathy. *Diabetes* 1983 ; 32 : 34-39.
16. Funabiki K, Horikoshi S, Tomino Y, Nagai Y, Koide H. Immunohistochemical analysis of extracellular components in the glomerular sclerosis of patients with glomerulonephritis. *Clin. Nephrol* 1990 ; 34 : 239-246.
17. Yoshioka K, Takemura T, Akano N, Miyamoto H, Iseki T, Maki S. Cellular and non-cellular compositions of crescents in human glomerulonephritis. *Kidney Int* 1987 ; 32 : 284-291.
18. Ross R. The smooth muscle cell. II : growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers. *J Cell Biol* 1971 ; 50 : 172-186.
19. Ohshima A. Immunohistochemical localization of prolyl hydroxylase in rat tissues. *J Histochem Cytochem* 1977 ; 25 : 1297-1302.
20. Ardaillou N, Bellon G, Nivez MP, Rakotoarison S, Ardaillou R. Quantification of collagen synthesis by cultured human glomerular cells. *Biochem Biophys Acta* 1989 ; 991 : 445-452.
21. Creely JJ, Commers PA, Haralson MA. Synthesis of type III collagen by cultured kidney epithelial cells. *Connect Tissue Res* 1988 ; 18 : 107-122.
22. Haralson MA, Jacobson HR, Hoover RL. Collagen polymorphism in cultured rat kidney mesangial cells. *Lab Invest* 1987 ; 57 : 513-523.
23. 福井光峰. 糖尿病ラットにおける糸球体基底膜成分およびI型コラーゲン mRNA レベルの変化 : インスリン治療の影響. *日腎誌* 1991 ; 33 : 51-57.
24. Adler S, Striker LJ, Striker GE, Perkinson DT, Hibbert J, Couser WG. Studies of progressive glomerular sclerosis in the rat. *Am J Pathol* 1986 ; 123 : 553-662.
25. Torbohm I, Berger B, Schönermark M, Von Kempis J, Rother K, Hänsch GM. Modulation of collagen synthesis in human glomerular epithelial cells by interleukin 1. *Clin Exp Immunol* 1989 ; 75 : 427-431.
26. Sraer J, Ardaillou N, Sraer JD, Ardaillou R. In vitro prostaglandin synthesis by human glomeruli and papillae. *Prostaglandin* 1982 ; 23 : 855-864.
27. Rahman MA, Stork JE, Dunn MJ. The roles of eicosanoids in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 1987 ; 32 (Suppl 22) : 40-48.
28. Patrono C, Salvati P. Thromboxane biosynthesis and pharmacologic modulation in progressive glomerulosclerosis. *Am J Nephrol* 1989 ; 9 (Suppl 1) : 13-16.
29. Miyamoto H, Yoshioka K, Takemura T, Akano N, Maki S. Immunohistochemical study of membrane attack complex of complement in IgA nephropathy. *Virchows Archiv A* 1988 ; 413 : 77-86.
30. Akano N, Yoshioka K, Aya N, et al. Immunoelectron microscopic localization of membrane attack complex and hepatitis Be antigen in membranous nephropathy. *Virchows Archiv A* 1989 ; 414 : 325-330.
31. Stahl RAK, Adler S, Baker PJ, Chen YP, Pritzi PM, Couser WG. Enhanced glomerular prostaglandin formation in experimental membranous nephropathy. *Kidney Int* 1987 ; 31 : 1126-1131.
32. Couser WG, Baker PJ, Adler S. Complement and the direct mediation of immune glomerular injury : a new perspective. *Kidney Int* 1985 ; 28 : 879-890.
33. Camussi G, Salvidio G, Tetta C. Platelet-activating factor in renal disease. *Am J Nephrol* 1989 ; 9 (Suppl 1) : 23-26.
34. Detlef S, Neuwirth R. Platelet activating factor and the kidney. *Am J physiol* 1986 ; 251 : 1-11.
35. Wrana JL, Sodek J, Ber RL, Bellows CG. The effects of platelet-derived transforming growth factor β on normal human diploid gingival fibroblasts. *Eur J Biochem* 1986 ; 159 : 69-76.
36. Yoshioka K, Takemura T, Murakami K, et al. Identification and localization of epidermal growth factor and its receptor in the human glomerulus. *Lab Invest* 1990 ; 63 : 189-196.
37. Harris RC, Hoover RL, Jacobson HR, Badr KF. Evidence for glomerular actions of epidermal growth factor in the rat. *J Clin Invest* 1988 ; 82 : 1028-1039.
38. Margolis BL, Bonventre JV, Kremer SG, Kudlow JE, Skorecki KI. Epidermal growth factor is synergistic with phorbol esters and vasopressin in stimulating arachidonate release and

- prostaglandin production in renal glomerular mesangial cells. *J Biochem* 1988 ; 249 : 587-592.
39. Klahr S, Schereiner G, Ichikawa I. The progression of renal disease. *N Engl J Med* 1988; 318 : 1657-1666.
40. Jalkanen M, Penttinen R. Enhanced collagen production by a macrophage derived factor. *Biochim Biophys Res Comm* 1982 ; 108 : 447-453.
41. Nathan CF. Secretory product of macrophages. *J Clin Invest* 1987 ; 79 : 319-326.