

糖尿病性腎症における尿中 IgG 排泄量測定の意義

八 嵩 功 平山俊英 椎木英夫
金内雅夫 土肥和絃

Diagnostic significance of urinary immunoglobulin G in diabetic nephropathy

Isao YASHIMA, Toshihide HIRAYAMA, Hideo SHIIKI,
Masao KANAUCHI, and Kazuhiro DOHI

First Department of Internal Medicine, Nara Medical University, Nara, Japan

An early manifestation of diabetic nephropathy, increased excretion of albumin, is now generally believed to be sufficiently specific, particularly in subjects with diabetes mellitus, to predict the subsequent development of clinically overt diabetic nephropathy. However, certain other proteins besides albumin may also be excreted in abnormal amounts during this early phase of diabetic nephropathy. We evaluated the diagnostic utility of urinary immunoglobulin G (IgG) in patients with diabetic nephropathy by comparing the findings with the clinical stage and renal biopsy specimen. Using 24-hour urine samples, IgG was measured by an enzyme-linked immunosorbent assay. In addition, urine samples were assayed for albumin, transferrin, β_2 -microglobulin and N-acetyl- β -D-glucosaminidase. Serum IgG concentration and HbA_{1c} were also evaluated. A total of 197 patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus were enrolled in this study. Subjects were grouped according to the rate of urinary albumin excretion (clinical stage). Fifty of these cases were also divided into four groups according to the severity of diffuse glomerular lesions using Gellman's criteria. The urinary excretion of IgG was significantly increased in diabetic patients as compared with the healthy controls. Among diabetic patients, IgG level showed a significant increase with respect to the clinical stage of nephropathy and the progress of glomerular diffuse lesions. In the stage of normoalbuminuria, the urinary excretion of IgG showed a significant increase in parallel with the progress of glomerular diffuse lesions, whereas there was no relationship between the urinary excretion of albumin and the progress of glomerular diffuse lesions. While the excretion of IgG correlated with that of albumin and transferrin, there was no correlation between the excretion of IgG and the other laboratory indices evaluated. These findings indicate that measurement of urinary IgG may be more useful than albuminuria in detecting the early stage of diabetic nephropathy.

Jpn J Nephrol 1999 ; 41 : 787-796.

Key words : diabetic nephropathy, immunoglobulin G, renal biopsy

緒 言

糖尿病性腎症の早期診断指標としての尿中アルブミンの測定は、1987年にMogensen¹⁾が微量アルブミン尿に特徴づけられる初期腎症の概念を提唱してから臨床的に重要視されている。このような観点から本邦でも、厚生省糖尿病調査研究班の腎症病期分類²⁾は糖尿病性腎症の病期を尿中アルブミン排泄量から規定している。しかし、微量アルブ

ミン尿が出現する以前の腎症前期に糸球体病変を有する症例がみられることや、早期腎症とされる病期にも中等度の糸球体病変が確認されることも少なくない³⁻⁵⁾。したがって、微量アルブミン尿が出現する以前の腎症前期²⁾に腎病変の有無を正確に検出する方法の開発が望まれる。本研究は分子量、ストークス径(stokes radius)は同一であるが、等電点がそれぞれ異なる尿中IgGおよびIgG₄の尿中排泄量を測定するとともに、糸球体病変と対比し、微量アルブ

ミン尿が出現する以前の糸球体基底膜障害の指標として尿中 IgG 排泄量測定が有用か否かについて検討した。

対象および方法

1. 対象

対象は、奈良県立医科大学第1内科とその関連施設に通院あるいは入院中のインスリン非依存型糖尿病(NIDDM)患者197例(男性94例,女性103例,58±9歳)である。また、腎生検の必要性、方法、合併症などについて十分に説明してインフォームド・コンセントが得られた症例のなかで、厚生省糖尿病調査研究班による腎症病期分類²⁾の腎症前期に該当する50例(男性21例,女性29例,59±10歳)に腎生検を施行した。なお、非糖尿病性腎疾患、心不全合併例、および肝機能障害を有する例は対象から除外した。さらに、健康成人30例(男性18例,女性12例,42±8歳)を対照に選んだ。

2. 方法

1) 尿中 IgG 排泄量測定

検体は、診療スタッフにより採取方法を十分に説明され、過去に蓄尿による検体採取を3回以上経験した症例の24時間蓄尿の一部を用いた。検体の保存方法は、採尿後1週間以内であれば4°C保存、長期間の場合は-80°C保存が望まれる⁶⁾ことから、蓄尿中は冷暗所に保存し、24時間蓄尿後は速やかに-80°Cで保存した。尿中 IgG 濃度は、坪ら⁷⁾の方法によるサンドイッチ酵素標識抗体法(ELISA法)で測定した。その概略を以下に示す。0.1 M 炭酸緩衝液(pH 9.6)に溶解した抗ヒト IgG 抗体 [F(ab')₂ fragment goat anti-human IgG ; Cappel 社] の1,000倍希釈液0.1 ml をマイクロプレート(ポリスチレン製のEIAプレート, COSTER 社)の各ウェルに加え、2~8°Cで18時間静置、コーティング後、ウェル内液を廃棄した。次に、1.4 M NaCl 含有0.1 M リン酸緩衝液(PBS, pH 7.4)に Tween 20 (ナカライテスク社, 終濃度0.05%)およびウシ血清アルブミン(BSA, 和光純薬工業, 終濃度1%)を加えて調製した。1% BSA 緩衝液0.1 ml を各ウェルに加え、37°Cで2時間ブロッキングした。各ウェルを0.05% Tween 20 含有PBS 0.35 ml で3回洗浄し、各ウェルに IgG 標準液の希釈系列と希釈尿被検0.05 ml を分注後、4°Cで18時間、固相抗体と反応させてから0.05% Tween 20 含有PBS 0.35 ml で3回洗浄した。各ウェルに1% BSA 緩衝液で20,000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG 抗体(peroxidase conjugated F(ab')₂ fragment goat anti-human IgG,

Cappel 社)0.1 ml を分注し、室温で1時間反応させてから0.05% Tween 20 含有PBS 0.35 ml で3回洗浄した。基質液(o-フェニレンジアミン)0.2 ml を分注し4°Cで30分反応させた後、5 N-H₂SO₄ 0.1 ml を添加して酵素反応を停止させ、マイクロプレートリーダーで492 nmでの吸光度を測定し、同時に測定した検量線から IgG 濃度を算出した。

2) 尿中 IgG₄排泄量測定

尿中 IgG₄濃度は Aucouturier ら⁸⁾の方法によるサンドイッチ ELISA 法で測定した。その概略を以下に示す。0.05 M PBS(pH 7.4)に溶解した抗ヒト IgG₄モノクローナル抗体1,000倍希釈液0.1 ml をマイクロプレートの各ウェルに加え、4°Cで24時間コーティングした。次に、0.05 M PBS で3回洗浄後に0.5% BSA 含有PBS 0.1 ml を添加し、室温で2時間ブロッキングしてから0.05 M PBS で3回洗浄した。次に、0.1%ウシγ-グロブリン含有0.05 M PBS で希釈した尿検体0.05 ml を各ウェルに加え、4°Cで24時間固相抗体と反応させ、0.05 M PBS で3回洗浄後、1% BSA 緩衝液を用いて20,000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG 抗体0.1 ml を分注し、室温で2時間反応させてから0.05 M PBS で3回洗浄した。基質液(o-フェニレンジアミン)0.2 ml を分注し4°Cで30分反応させた。5 N-H₂SO₄ 0.1 ml を用いて酵素反応を停止させてから、マイクロプレートリーダーで490 nmでの吸光度を測定し、同時に測定した検量線から IgG₄濃度を算出した。

3) 他の測定項目

尿中アルブミン濃度、尿中・血中トランスフェリン濃度、尿中β₂ミクログロブリン濃度および血清 IgG 濃度はラテックス凝集反応、血清 IgG₄濃度は ELISA 法、尿中 N-アセチル-D-グルコサミニダーゼ(NAG)活性は mcp 比色法、HbA_{1c}は高速液体クロマトグラフ(HPLC)法で測定した。血清アルブミン濃度は電気泳動法による蛋白分画濃度比を用いて算出した。さらに血中・尿中クレアチニン値を酵素法で測定し、24時間法でクレアチニンクリアランス(Ccr)を算出した。

4) 糖尿病性腎症の臨床病期

厚生省糖尿病調査研究班の糖尿病性腎症早期診断基準⁹⁾で示された微量アルブミン尿の基準(15 μg/分以上, 上限は200 μg/分)を用いた糖尿病性腎症病期分類²⁾に基づき、腎症前期(1期:微量アルブミン尿陰性), 早期腎症期(2期:微量アルブミン尿陽性), 顕性腎症前期(3A期:1 g/日未満の持続性蛋白尿), および顕性腎症後期(3B期:1 g/日以上)の持続性蛋白尿)に区分した。なお、本研究は

Table 1. Clinical features of subjects

Items	Stage 1a	Stage 1b	Stage 2	Stage 3A	Stage 3B
Gender (M/F)	31/34	14/12	27/29	11/15	13/11
Age (years)	59±9	61±11	59±6	57±25	57±7
Duration of diabetes (years)	6.2±5.7	6.7±4.9	9.2±8.6*	10.5±5.6**	12.3±5.2**
Treatment modality (D/A/I)	31/24/10	15/8/3	18/29/9	6/11/9	4/8/12
HbA _{1c} (%)	7.1±2.7	7.0±2.4	7.2±3.2	8.4±3.8**	7.6±4.5**
Ccr (ml/min)	97.4±55.8	96.3±38.4	102.7±73.7	81.0±31.3	60.2*±29.1
SBP (mmHg)	124±26	131±28	128±36	142±24**	148±38**
DBP (mmHg)	74±11	76±16	72±14	84±28**	84±22**

Results are presented as mean±SD. Treatment modalities : D ; diet, A ; oral agent, I ; insulin

* p<0.05 vs Stage 1, ** p<0.01 vs Stage 1

1993年より継続しており、研究の経過において腎症前期の症例で尿中IgG排泄量が増加している症例が進行した糸球体病変を有することが示唆された。そこで、対照の尿中IgG排泄量の平均値+2標準偏差(4.7 mg/日)を正常上限とし、1期を尿中IgG排泄量正常群(1a期)と尿中IgG排泄量増加群(1b期)に区分した。

5) 各臨床病期における尿中蛋白排泄量比

尿中トランスフェリン排泄量/尿中アルブミン排泄量比(Tf/Alb)、尿中IgG排泄量/尿中トランスフェリン排泄量比(IgG/Tf)、尿中IgG₄排泄量/尿中トランスフェリン排泄量比(IgG₄/Tf)および尿中IgG排泄量/尿中IgG₄排泄量比(IgG/IgG₄)を算出した。

6) 腎生検所見

糸球体びまん性病変を Gellman ら¹⁰⁾の基準から、D₀(糸球体にほとんど変化がない)、D_I(一部にPAS染色陽性域の拡大を示す糸球体が散在する)、D_{II}(糸球体全域のPAS染色陽性域の拡大)、D_{III}(PAS染色陽性域の拡大の強大と血管腔の狭小化)およびD_{IV}(D_{III}病変に加えて硝子化様変化)に分類した。

3. 推計学的処理

測定値は平均値±標準偏差、正規分布を示さない各尿中蛋白排泄量比は中央値と四分位間の25%点、75%点の値で表記した。群間の検定は、各尿中蛋白排泄量については Spearman の順位相関、各尿中蛋白排泄量比については対数変換による等分散を検定してから一元配置分散分析によった。さらに、各尿中蛋白排泄量比については Bonferroni 法で p 値を補正する多重比較を用いて検定した。有意水準は危険率が5%未満とした。

成 績

1. 患者背景

糖尿病性腎症の臨床病期は、1a期が65例、1b期が26例、2期が56例、3A期が26例および3B期が24例であった。臨床病期別にみた性別、年齢、糖尿病罹病期間、治療法、HbA_{1c}値、収縮期血圧、拡張期血圧およびCcrをTable 1に示す。性別、年齢および治療法は各臨床病期の間に差がなかった。糖尿病罹病期間は、1a期および1b期に比して2期、3A期および3B期で有意に長かった。HbA_{1c}値は、1a期および1b期と2期の間には差がなかったが、1a期および1b期に比して3A期および3B期で有意に高値を示した。収縮期血圧および拡張期血圧は、1a期および1b期と2期の間には差がなかったが、1a期および1b期に比して3A期および3B期で有意に高値を示した。Ccrは、1a期、1b期、2期および3A期の間には差がなかったが、1a期、1b期、2期および3A期に比して3B期で有意に低値を示した。

2. 各臨床病期における測定項目

臨床病期別にみた尿中アルブミン排泄量、尿中トランスフェリン排泄量、尿中β₂ミクログロブリン排泄量、尿中NAG活性、血中アルブミン濃度、血中トランスフェリン濃度、血清IgG濃度および血清IgG₄濃度をTable 2に示す。尿中アルブミン排泄量と尿中トランスフェリン排泄量は、対照群と1a期および1b期との間に差がなかったが、対照群に比して2期、3A期および3B期の順に有意に増加した。尿中β₂ミクログロブリン排泄量と尿中NAG活性は、対照群と1a期、1b期、2期および3A期に差がなく、対照群に比して3B期で有意に増加したにすぎなかった。血中アルブミン濃度、血中トランスフェリン濃度、血清IgG濃度および血清IgG₄濃度は1a期、1b期、

Table 2. Biochemical variables in subjects

Samples	Control	Stage 1a	Stage 1b	Stage 2	Stage 3A	Stage 3B
U-Alb(mg/day)	9.1±4.8	8.2±4.7	9.4±5.1	64.2±48.0**	532±192**	2,131±661**
U-Tf(mg/day)	0.8±1.4	0.7±0.4	0.8±0.5	5.1±3.7**	34.2±17.4**	199.8±62.7**
U-β ₂ MG(μg/day)	118.8±37.6	204.8±172.3	196.7±178.6	1,185.4±2,344.1	1,068.8±962.4	9,476.4±11,869.5*
U-NAG(U/day)	3.8±2.1	4.3±3.9	4.5±3.2	8.1±5.0	8.1±3.6	11.9±5.0*
S-Alb(g/dl)	4.2±1.4	4.5±1.2	4.3±0.9	4.2±1.3	4.3±1.1	3.9±1.6
S-Tf(mg/dl)	263.2±38.4	276.5±42.8	259.3±50.2	274.8±44.2	249.9±36.2	251.7±48.4
S-IgG(g/l)	10.9±2.3	11.4±3.8	11.6±4.1	9.9±3.6	12.1±2.7	10.8±5.4
S-IgG ₄ (mg/dl)	61.4±48.3	57.4±48.2	65.3±32.4	62.9±51.2	59.8±38.7	60.3±51.6

U- : urinary samples, S- : serum samples

Results are presented as mean±SD. * p<0.05 vs Control, ** p<0.01 vs Control

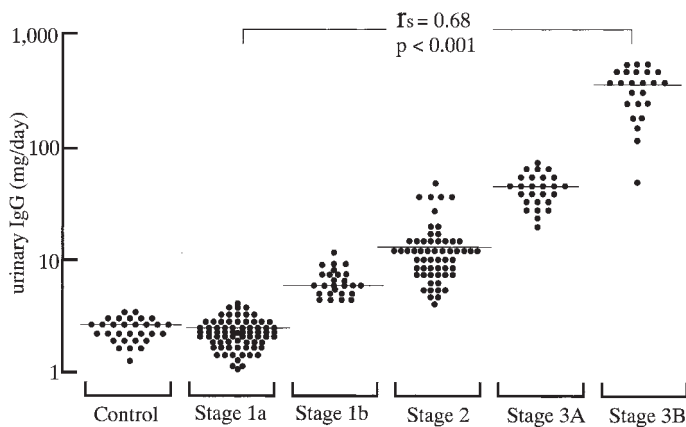


Fig. 1. Urinary excretion of IgG in diabetic patients and clinical stages of diabetic nephropathy

2期および3A期の間には差がなく、いずれも正常値を示した。尿中IgG排泄量は、対照群が 2.5 ± 1.1 mg/日、1a期が 2.3 ± 1.1 mg/日、1b期が 7.1 ± 2.1 mg/日、2期が 14.1 ± 9.8 mg/日、3A期が 45.2 ± 18.1 mg/日、3B期が 351.7 ± 194.8 mg/日であり、対照群と1a期の間に差がなく、1a期から1b期、2期、3A期および3B期の順に有意に増加した(Fig. 1)。尿中IgG₄排泄量は、対照群が 73.4 ± 67.4 μg/日、1a期が 75.4 ± 69.3 μg/日、1b期が 81.5 ± 79.6 μg/日、2期が 345.1 ± 264.7 μg/日、3A期が $1,261.5 \pm 634.9$ μg/日、3B期が $6,240.1 \pm 4,566.6$ μg/日であり、対照群と1a期および1b期との間には差がなかったが、2期、3A期および3B期の順に有意に増加した(Fig. 2)。

3. 腎生検所見と尿中蛋白排泄量

1期の腎生検所見は、10例(20%)がD₀、22例(44%)がD_I、18例(36%)がD_{II}に相当した。尿中IgG排泄量は、D₀を示す症例が 2.6 ± 2.1 mg/日、D_Iを示す症例が 3.2 ± 2.4 mg/日、およびD_{II}を示す症例が 6.4 ± 3.2 mg/日であり、糸球体びまん性病変の進展とともに有意に増加した。

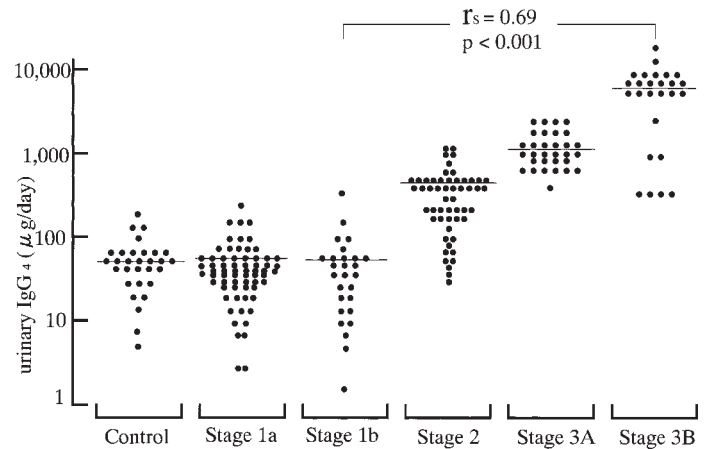


Fig. 2. Urinary excretion of IgG₄ in diabetic patients and clinical stages of diabetic nephropathy

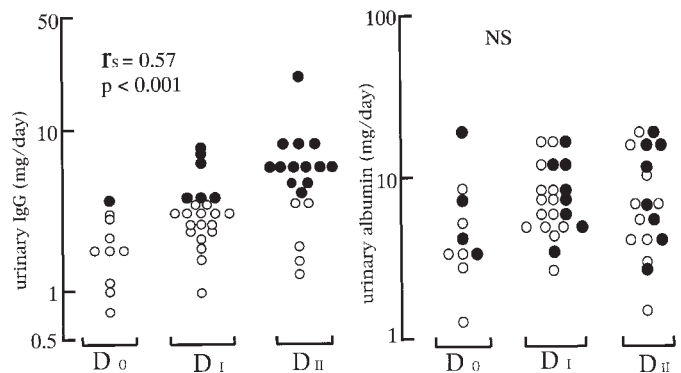


Fig. 3. Urinary excretion of IgG and albumin in patients with stage 1 and glomerular diffuse lesions

Open circles indicate stage 1a(n=30) and closed circles the stage 1b(n=20).

一方、尿中アルブミン排泄量は、D₀を示す症例が 6.0 ± 6.1 mg/日、D_Iを示す症例が 8.6 ± 9.4 mg/日およびD_{II}を示す症例が 8.9 ± 9.2 mg/日であり、糸球体びまん性病変の進展と関連を示さなかった(Fig. 3)。

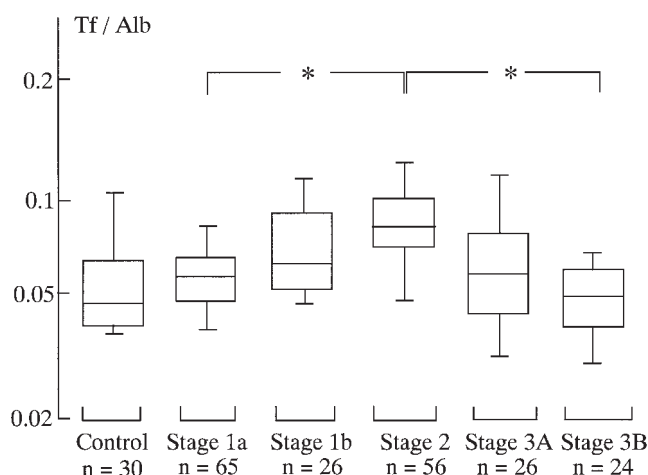


Fig. 4. Box plots indicating the overall range (error bars), 25~75% range boxes, and median value (horizontal lines) of Tf/Alb ratio in diabetic patients with clinical stages of diabetic nephropathy

* $p < 0.005$

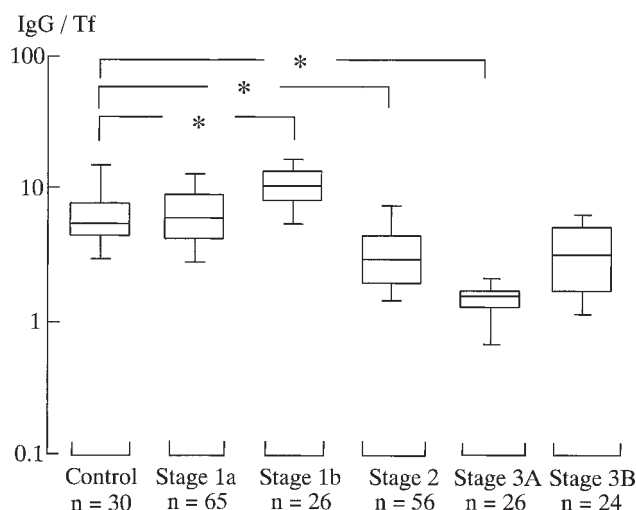


Fig. 5. Box plots indicating the overall range (error bars), 25~75% range boxes, and median value (horizontal lines) of IgG/Tf ratio in diabetic patients with clinical stages of diabetic nephropathy

* $p < 0.005$

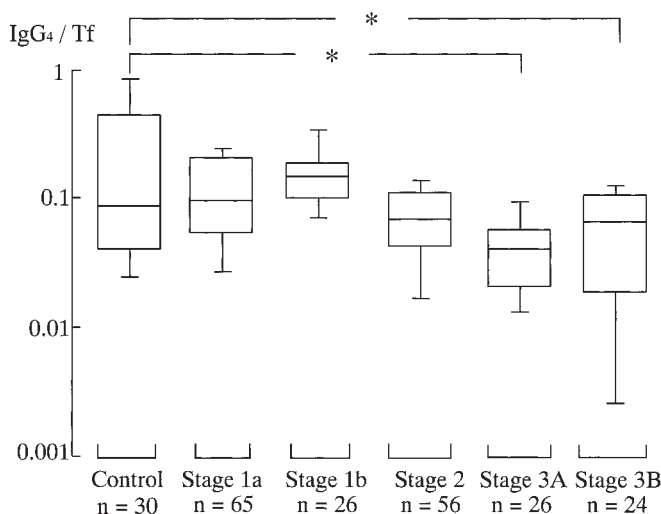


Fig. 6. Box plots indicating the overall range (error bars), 25~75% range boxes, and median value (horizontal lines) of IgG₄/Tf ratio in diabetic patients with clinical stages of diabetic nephropathy

* $p < 0.005$

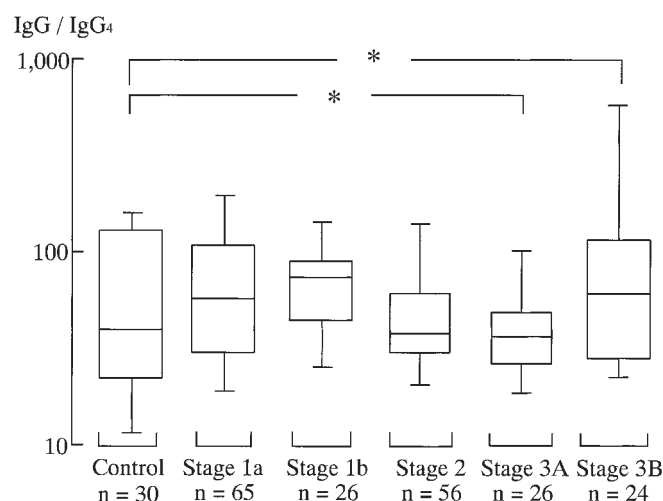


Fig. 7. Box plots indicating the overall range (error bars), 25~75% range boxes, and median value (horizontal lines) of IgG/IgG₄ ratio in diabetic patients with clinical stages of diabetic nephropathy

* $p < 0.005$

4. 各臨床病期における尿中蛋白排泄量比

1) Tf/Alb

Tf/Alb は、対照群が 0.047(0.039~0.064), 1a 期が 0.056(0.048~0.069), 1b 期が 0.062(0.052~0.076), 2 期が 0.081(0.070~0.100), 3A 期が 0.057(0.043~0.079), 3B 期が 0.048(0.039~0.060) であり、対照群と 1a 期および 1b 期との間には差がなかったが、1a 期に比して 2 期で有意に高く、2 期に比して 3 B 期で有意に低かった (Fig. 4)。

2) IgG/Tf

IgG/Tf は、対照群が 5.174(4.354~7.574), 1a 期が 6.640(4.190~9.006), 1b 期が 11.106(8.200~12.878), 2 期が 2.888(1.917~4.175), 3A 期が 1.508(1.268~1.714), 3B 期が 3.210(1.727~5.027) であり、対照群と 1a 期の間には差がなかったが、対照群に比して 1b 期で有意に高く、2 期と 3 A 期で有意に低かった (Fig. 5)。

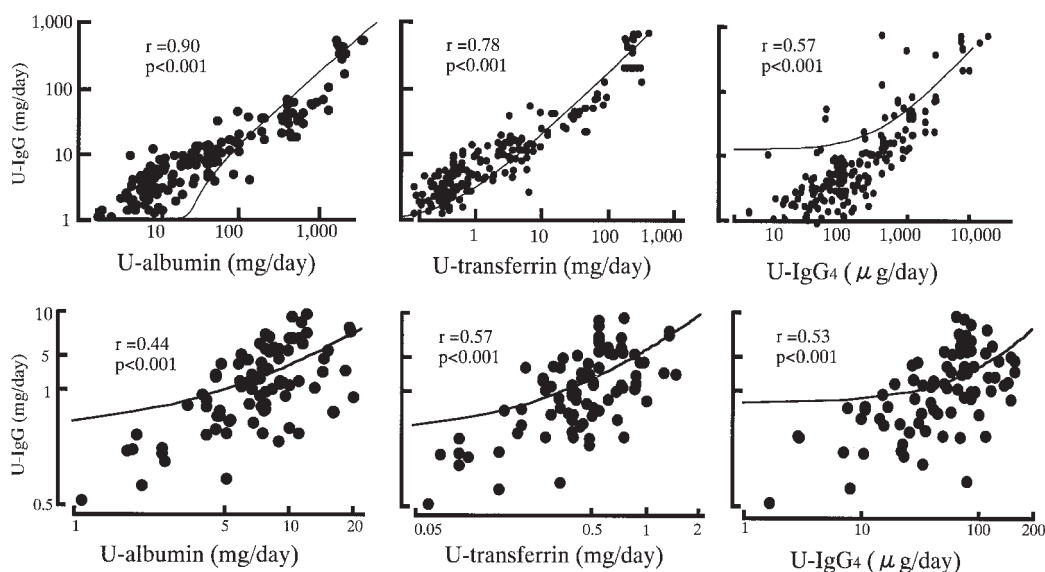


Fig. 8. Relationships between urinary excretion of IgG and other laboratory parameters in all subjects (upper panel) and in patients with stage 1 (lower panel)

3) IgG₄/Tf

IgG₄/Tf は、対照群が 0.085 (0.040~0.434), 1a 期が 0.110 (0.056~0.211), 1b 期が 0.147 (0.099~0.171), 2 期が 0.069 (0.041~0.112), 3A 期が 0.039 (0.021~0.056), 3B 期が 0.065 (0.019~0.103) であり、対照群と 1a 期, 1b 期および 2 期との間には差がなかったが、対照群に比して 3A 期および 3B 期で有意に低かった (Fig. 6)。

4) IgG/IgG₄

IgG/IgG₄ は、対照群が 37.929 (21.700~124.327), 1a 期が 55.914 (30.134~105.673), 1b 期が 76.095 (44.099~87.569), 2 期が 37.685 (29.590~60.382), 3A 期が 35.768 (26.373~48.089), 3B 期が 60.427 (28.222~113.527) であり、対照群と 1a 期, 1b 期および 2 期の間には差がなかったが、対照群に比して 3A 期で有意に低く、3B 期で有意に高かった (Fig. 7)。

5. 尿中 IgG 排泄量と他の測定項目との相関

全例で、尿中 IgG 排泄量は尿中アルブミン排泄量および尿中トランスフェリン排泄量と強い正相関、尿中 IgG₄ 排泄量と弱い正相関を示した。しかし、1 期の症例では、尿中 IgG 排泄量と尿中アルブミン排泄量、尿中トランスフェリン排泄量、および尿中 IgG₄ 排泄量の相関係数はいずれも全例の相関係数より低値を示した (Fig. 8)。一方、尿中 IgG 排泄量と尿中 β₂ マイクログロブリン排泄量、尿中 NAG 排泄量および血清 IgG 値の間には、全例でも 1 期の症例でも有意の相関を示さなかった。

考 察

1. 糸球体基底膜の蛋白漏出機序

正常糸球体基底膜の微細構造は、規則的な六角形の構造を持つ細線維から成る網目構造を呈しており¹¹⁾、孔径 (pore size) が 55 Å¹²⁾ である。糸球体基底膜は、内皮細胞、内透明層、緻密層、外透明層、および上皮細胞足突起から成り、内皮細胞の間隔、糸球体基底膜の網目構造、上皮細胞足突起の間隔が大分子の濾過に寄与している。一方、糸球体基底膜は全体として陰性に荷電しているが、特に内透明層と外透明層は強く陰性に荷電している。その構成成分は、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、IV 型コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンなどである。これらの内透明層と外透明層の陰性荷電物質および接着蛋白に加えて、内皮細胞と上皮細胞足突起の表面に含まれるシアル酸が糸球体基底膜の陰性荷電物質の濾過に寄与している。

腎症の合併で糸球体から漏出される主な血漿蛋白は、アルブミン、トランスフェリンおよび IgG である。アルブミンは、分子量が 69 kD、ストークス径が 36 Å、等電点が 4.9 であり、陰性に荷電している。トランスフェリンは分子量が 77 kD、ストークス径が 38 Å、等電点が 5.7 であり、陰性荷電を有している。IgG には IgG₁, IgG₂, IgG₃, および IgG₄ の 4 種のサブクラスが存在するが、分子量 (156 kD) とストークス径 (55 Å) には差がない。血清 IgG は、等電点が 7.3 の中性の荷電を持つ IgG₁, IgG₂ および IgG₃ が約 96% を占めている。したがって、本研究で

はIgG排泄量をIgG₁、IgG₂およびIgG₃排泄量の指標に代用した。一方、IgG₄はIgG₁、IgG₂およびIgG₃と分子量(156 kD)、ストークス径(55 Å)は同一であるが、等電点が5.5の陰性荷電を有している。

血漿蛋白が糸球体から漏出する機序として、糸球体基底膜のsize barrierの破綻とcharge barrierの消失が考えられている^{11,13,14}。size barrierの破綻とは、糸球体基底膜の微細構造が変化し、糸球体基底膜を透過しえなかったストークス径の血漿蛋白が漏出してくることである。一方、charge barrierの消失とは、陰性に荷電している血漿蛋白と陰性に荷電している糸球体基底膜が互いに反発して血漿蛋白の漏出を阻止していた状態が、ヘパラン硫酸プロテオグリカンやシアル酸などの減少で糸球体基底膜の陰性荷電が減弱または消失することによって血漿蛋白が漏出してくることをさす。Vibertiら¹⁴)は、IgGとアルブミンの選択性(selectivity index: SI)を検討し、尿中アルブミン排泄量が45 mg/日以下ではSIに変化がないという。しかし、アルブミン排泄量が45 mg/日を超えた場合にはIgGの排泄量が増加しないので、SIは低下すると述べている。したがって、アルブミン排泄量が45 mg/日を超える時期がcharge barrierの減弱が出現する時期に該当するといえよう。ただし、尿中アルブミン排泄量が200 mg/日以上になると、アルブミンとIgGの両者が排泄されており、size barrierの障害も出現すると考えられている¹⁴。同様に、微量アルブミン尿の出現する時期ではcharge barrierの障害、顕性蛋白尿の出現する時期以降ではsize barrierの障害が出現するとの報告が散見される^{15~17}。Myersら¹⁸)は、中性荷電を持ったデキストランのクリアランスを検討しており、微量アルブミン尿の出現から顕性蛋白尿の出現までの時期がcharge barrierの障害に該当し、この時期には糸球体基底膜の孔径に変化がないことを明らかにしている。また、同様に中性デキストランを用いた実験では、46 Å以上のデキストラン分子の濾過が顕性蛋白尿の出現する時期以降に増加するので、この時期には糸球体基底膜にシャント経路が出現することが推測されている^{18,19}。これらの報告は、微量アルブミン尿の出現する時期にまずcharge barrierが障害され、次いで腎症の進行とともにsize barrierに不可逆性の障害が加わるとしている。そこでわれわれは、分子量、ストークス径および荷電が異なる血漿蛋白の尿中排泄量を測定し、微量アルブミン尿の出現する時期以前の糸球体基底膜障害指標について腎生検所見を加味して検討することにした。

2. 各臨床病期における尿中蛋白排泄量と腎生検所見

われわれの成績では、尿中IgG排泄量は対照と1a期の間には差がなかったが、対照に比して1b期以降の病期のすべてで有意に増加しており、しかも1b期、2期、3A期および3B期の順に有意に増加した。一方、尿中IgG₄排泄量は対照と1a期および1b期の間には差がなかったが、1a期および1b期が最も少なく、2期以降に有意に増加した。つまり、これらの成績は、糸球体基底膜のsize barrierが微量アルブミン尿の出現する以前から障害されていることを示唆している。

1期の症例に施行した腎生検所見の検討では、尿中IgG排泄量は糸球体びまん性病変の進展とともに有意に増加したが、尿中アルブミン排泄量と糸球体びまん性病変の進展の間には有意の相関が認められなかった。つまり、尿中IgG排泄量の測定は、微量アルブミン尿が出現する以前の糸球体基底膜障害の指標として有用といえる。

3. 各臨床病期での尿中蛋白排泄比

1期での尿中IgG排泄量が糸球体びまん性病変の進展とともに有意に増加したことから、1期を尿中IgG排泄量正常群(1a期)と尿中IgG排泄量増加群(1b期)に区分し、Tf/Alb、IgG/Tf、IgG₄/Tf、およびIgG/IgG₄を算出し、size barrierおよびcharge barrierの障害について検討した。本研究では、Ccrと各蛋白の血中濃度は1a期、1b期、2期、および3A期の間で差がなかったことから、排泄量比を用いて検討した。

トランスフェリンは、アルブミンに比し分子量がわずかに大きい、ストークス径がほぼ同一で、弱い陰性荷電を帯びている。われわれの成績では、Tf/Albは1a期と1b期では対照群と差を示さないが、対照群に比して2期で有意に上昇していた。つまり、2期では弱い陰性荷電を帯びているトランスフェリンの排泄量がアルブミンに比して増加していることになり、charge barrierの障害が2期から出現していることを示唆している。

IgGは、トランスフェリンに比して分子量とストークス径が大きく中性荷電を帯びている。われわれの成績では、IgG/Tfは1a期では対照群と差がないが、1b期では有意に上昇し、2期では有意に低下していた。つまり、1b期では糸球体基底膜の孔径とストークス径が同等のIgGの排泄量が増加していることになり、1b期でsize barrierの障害が出現していることを反映している。2期では尿中IgG排泄量が対照群に比して有意に増加しているにもかかわらず、IgG/Tfが低下していることから、2期ではcharge barrierがsize barrierよりも優位に障害されている

ことが示唆される。

一方、IgG₄は分子量とストークス径がIgGと同一であるが、中性荷電のIgGとは異なってトランスフェリンと同等の陰性荷電を持つ。IgG₄/Tfは対照群と1a期、1b期および2期の間に差がなかった。1b期では前述のIgG/Tfの成績からsize barrierの障害が示唆されたが、size barrierが障害された場合にはIgGと分子量およびストークス径が同一のIgG₄も排泄量が増加するので、IgG₄/Tfも上昇するはずである。しかし、IgG₄/Tfは対照群と1b期の間には差がなかった。この理由として、IgGは中性荷電であるのでcharge barrierの影響を受けないが、IgG₄はcharge barrierの影響を受けるために糸球体基底膜で濾過されないからと考えられる。つまり、この時期はsize barrierが障害されているが、charge barrierは保持されていると推測される。

IgGとIgG₄は分子量とストークス径が同一であるが荷電が異なることから、IgG/IgG₄の低下はcharge barrierの障害を反映するといえる¹⁷⁾。size barrierが障害されてcharge barrierが保たれている場合は、IgG/IgG₄は上昇すると考えられる。しかし、われわれの成績では、IgG/IgG₄は1a期と1b期では対照群と差がなく、2期で低下傾向を示し、3A期で有意に低下したが、3B期には有意に上昇した。つまり、IgG/IgG₄は、上昇すると予測される1b期に変化がなかったことになる。この点については今後の課題となろう。2期以降の結果は、charge barrierの障害は2期から存在するが、3B期にはsize barrierの障害も加わることを意味している。このIgG/IgG₄が3B期で有意に上昇した事実は、3B期にはcharge barrierよりもsize barrierの障害の影響が大きいことを意味しているのかもしれない。

Gallら²⁰⁾は、NIDDM患者を尿中アルブミン排泄量が300 mg/日以上(腎症群)と30 mg/日以下(非腎症群)に区分し、IgG/AlbとIgG/IgG₄を検討している。その成績では、IgG/Albは健常対照に比して腎症群で有意に低下していたが、IgG/IgG₄は3群間に差を示さなかったという。また、Deckertら¹⁶⁾は、IDDM患者を尿中アルブミン排泄量からD1群(30 mg/日未満)、D2群(30~100 mg/日)、D3群(101~300 mg/日)、D4群(301 mg/日以上)およびD5群(腎不全期)の5群に区分し、IgGとIgG₄のクリアランス分画、IgG/AlbおよびIgG/IgG₄を検討している。D1群は、健常対照群に比してIgGのクリアランス分画およびIgG/Albが有意に高値を示したが、IgG₄のクリアランス分画には健常対照群と差を示さなかった。

D2群はIgGのクリアランス分画にはD1群と差を示さなかったが、D1群に比してIgG₄のクリアランス分画が有意に増加、IgG/Albが有意に低下していた。D3群およびD4群は、D2群に比してIgGとIgG₄のクリアランス分画が有意に増加、IgG/Albが有意に低下していた。つまり、Gallら²⁰⁾の成績は、尿中アルブミン排泄量が30~100 mg/日を示す時期からcharge barrierが障害され、次いで尿中アルブミン排泄量の増加とともにsize barrierの障害が出現することを示唆している。われわれの1a期と1b期は、Deckertら¹⁶⁾の成績のD1群に相当するので、彼らの説に従うとcharge barrierもsize barrierも障害されていないことになる。しかし、微量アルブミン尿陰性期の症例でもしばしば腎組織所見から糸球体基底膜障害の存在が示唆される。われわれの成績では、1期での糸球体基底膜障害はcharge barrierではなくsize barrierによるものと推測される。2期にはsize barrierの障害にcharge barrierの障害も加わるが、後者が優位であると考えられる。3期では、2期の状態に加えさらに新たなsize barrierの破綻も加わるものと推測される。

Vibertiら¹⁴⁾やDeckertら¹⁶⁾が報告したsize barrierの障害は3期以降のみにみられる現象であり、この障害は糸球体基底膜にシャント経路が出現したためのもの^{18~20)}と考えられる。一方、腎症前期にみられる尿中IgG排泄量の増加は糸球体過剰濾過が関与している可能性がある。GFRは糖尿病の初期には増加し²⁶⁾、腎症の進展とともに正常化し、徐々に減少していく。つまり、糖尿病発症初期から糸球体過剰濾過があり、糸球体内高血圧の状態にあるといえる。Parvingら²²⁾は、GFRの上昇と比例して幅広い分子量を持った中性のデキストランの尿中排泄が増加すると報告している。また、中等度の高血糖を呈した糖尿病ラットでは、糸球体内圧較差の上昇が認められるという報告^{23,24)}もある。中本ら²⁵⁾は、糸球体濾過圧亢進を反映するとされている濾過率(FF)と糸球体びまん性病変の程度を検討し、D₀からD_{II}までのFFが正常以上の高値を示したことから、腎症の早期には糸球体内高血圧が存在すると述べている。しかし、われわれの1a期と1b期は尿中IgG排泄量により区分されたものであり、1a期と1b期のCcrに差はなかった。つまり、糸球体内高血圧によって尿中IgG排泄量が増加すると考えるのは否定的である。われわれの成績から推測された1期から出現するsize barrierの障害は、不可逆的な破綻であるシャント経路ではなく、可逆的な要因によるものと考えることができよう。つまり、糸球体基底膜障害は、1期からsize barrierに可逆的な障

害が存在しており、3期以降になってsize barrierが不可逆的に破綻するものと推測される。Deckertら¹⁶⁾は1期にはsize barrierに破綻やcharge barrierに減弱がなく、むしろ非酵素的糖化で糸球体基底膜局所の陰性荷電が増加するので、陰性荷電物質が透過しにくくなり、中性荷電のIgGの排泄が相対的に増加するものと推測している。つまり、尿中IgGの排泄増加を示す1期の症例は、糸球体基底膜の非酵素的糖化によるびまん性病変が惹起されていると考えられる。われわれの成績は、1期の症例では尿中アルブミン排泄量と糸球体びまん性病変の間に有意の相関が認められなかった。正常アルブミン尿期は陰性荷電を有する血漿蛋白が糸球体基底膜を透過しにくい時期であると考えられ、この時期での糸球体びまん性病変を類推させる指標としては尿中IgG排泄量の測定が有用と考えられる。

4. 尿中IgG排泄量と他の測定項目との相関

尿中蛋白排泄増加の機序には、糸球体での過剰濾過および尿細管での再吸収低下が関与している。したがって、糸球体でのcharge barrierの障害を考察するには、尿細管の影響を無視することができない。Deckertら¹⁶⁾は、微量アルブミン尿陽性IDDM患者での β_2 マイクログロブリン排泄率の算出から、微量アルブミン尿期には尿細管障害のないことを明らかにしている。また、石橋²⁶⁾は、尿細管の影響をL-アルギニン負荷で除去した検討から、早期腎症のNIDDM患者ではcharge barrierに障害がみられたと報告している。近位尿細管細胞表面は陰性に荷電しており、低分子蛋白で陽性荷電のものほど尿細管細胞表面に結合しやすく、陰性荷電が弱い物質ほど再吸収されやすくなっている²⁷⁾。三崎ら²⁸⁾は、微量アルブミン尿を呈する糖尿病患者を血糖コントロール状態から適切群($HbA_{1c} < 8.0\%$)と不良群($HbA_{1c} \geq 8.0\%$)に区分してTf/Albを検討しており、Tf/Albが対照群に比して不良群で有意に高値を示したが、同時に測定した尿中 β_2 マイクログロブリン排泄量には差がなかったと報告している。つまり、トランスフェリンはアルブミンに比して尿細管での再吸収の影響を強く受け、特に高血糖が尿細管の再吸収能の低下に寄与していると考えられる。本研究では、2期のTf/Albは対照群に比して有意に上昇していたが、2期の血糖コントロール状態は三崎ら²⁸⁾の適切群に相当していることから、2期での尿細管再吸収能の関与は乏しいと推測される。また、佐藤ら¹⁷⁾は、糖尿病患者を対象としたIgGクリアランス/IgG₄クリアランスによるselectivity index(SI)を用いた検討で、正常アルブミン尿群ではSIが2.01、微量アルブミン尿群では0.97を示したが、尿中 β_2 マイクログロブリン排泄量は

両群間で差がなかったため、微量アルブミン尿群のSIの低下には尿細管障害より糸球体基底膜障害の影響が大きいと報告している。さらにTuckerら²⁹⁾が、ストレプトゾトシン糖尿病ラットでの尿中アルブミン排泄について、糸球体でのアルブミン過剰濾過と尿細管再吸収障害の両者の関与を論じている。この報告では、アルブミンの尿細管再吸収能が低下する原因として、罹病期間や血糖コントロール状況が寄与していると考えられている。また、尿中NAGは尿細管器質的障害を反映するとされているが、尿蛋白陰性例でもNAGの排泄増加がみられる報告があり、高血糖状態では尿細管上皮細胞のライソゾームの機能異常により尿中NAGの排泄増加が惹起されている可能性もある。しかし、本研究での尿中NAG活性は2期で明らかな変化を示さなかったし、2期の血糖コントロール状態も良好であった。つまり、2期での陰性荷電物質の排泄増加は、糸球体基底膜におけるcharge barrierの障害に起因することが強く示唆され、尿細管の関与は少ないものと思われる。

結 語

NIDDM患者197例を対象として尿中IgG・IgG₄・アルブミン・トランスフェリン排泄量、尿中 β_2 マイクログロブリン濃度、および尿中NAG活性と糸球体病変を対比し、微量アルブミン尿が出現する以前の糸球体基底膜障害の指標として尿中IgG排泄量測定が有用か否かについて検討した。

- 1) 尿中IgG排泄量は正常アルブミン尿期から増加していたが、尿中IgG₄排泄量は増加しなかった。
- 2) 正常アルブミン尿期での尿中IgG排泄量は糸球体びまん性病変の進展とともに有意に増加したが、尿中アルブミン排泄量と糸球体びまん性病変の進展の間には関連が認められなかった。

以上の成績から、尿中IgG排泄量の測定は、糖尿病性腎症の早期診断指標として有用であることが示唆される。

なお、本論文の要旨は、第37回日本糖尿病学会年次学術集会(1994年徳島)、第37回日本腎臓学会総会(1994年千葉)、第38回日本糖尿病学会年次学術集会(1995年大宮)、第38回日本腎臓学会総会(1995年東京)、および第16回国際糖尿病学会議(1997年ヘルシンキ)で発表した。

文 献

1. Mogensen CE. Microalbuminuria as a predictor of clinical diabetic nephropathy. *Kidney Int* 1987; 31: 673-89.

2. 繁田幸男, 田村忠雄, 中本 安, 土田弘基, 杉野信博, 木田 寛. 糖尿病性腎症に関する研究. 厚生省平成3年度糖尿病調査研究報告書. 東京: 厚生省, 1991: 317-20.
3. Chavers BM, Bilous RW, Ellis EN, Steffes MW, Mauer SM. Glomerular lesions and urinary albumin excretion in type 1 diabetes without overt proteinuria. *N Engl J Med* 1989; 320: 966-70.
4. Inomata S, Nakamoto Y, Inoue M, Itoh M, Ohsawa Y, Masamune O. Relationship between urinary albumin excretion rate and renal histology in non-insulin-dependent diabetes mellitus with reference to the clinical significance of microalbuminuria. *J Diabet Compl* 1989; 3: 172-8.
5. Kanauchi M, Ishihara K, Nishioka H, Nishiura K, Dohi K. Glomerular lesions in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus and microalbuminuria. *Internal Med* 1993; 32: 735-7.
6. 平林庸司, 石館武夫, 市原清志, 芝 紀代子, 五十嵐すみ子, 原島典子, 斉藤憲祐, 伊藤喜久, 河合 忠. 尿中蛋白定量測定のための尿の取り扱いに関する基礎的検討. *臨床検査機器・試薬* 1996; 19: 962-72.
7. 坪 茂典, 押川朋子, 鉢村和男, 船渡忠男, 大谷英樹, 斎藤正行. ELISA によるリンパ球培養上清中の微量 IgG の測定. *臨床病理* 1984; 32: 1247-52.
8. Aucouturier P. Measurement of serum IgG₄ levels by a competitive immunoenzymatic assay with monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* 1984; 74: 151-62.
9. 繁田幸男, 田村忠雄, 中本 安, 土田弘基, 杉野信博, 木田 寛. 糖尿病性腎症に関する研究. 厚生省平成2年度糖尿病調査研究報告書. 東京: 厚生省, 1990: 251.
10. Gellman DD, Pirani CL, Soothill JF, Muehrcke RC, Kark RM. Diabetic nephropathy; a clinical and pathologic study based on renal biopsies. *Medicine* 1959; 38: 312-67.
11. Makino H, Yamasaki Y, Haramoto T, Shikata K, Hironaka K, Ota Z, Kanwar YS. Ultrastructural changes of extracellular matrices in diabetic nephropathy revealed by high resolution scanning and immunoelectron microscopy. *Lab Invest* 1993; 68: 43-55.
12. Bearer EL, Orci L. Endothelial fenestral diaphragms a quick-freeze, deep-etch study. *J Cell Biol* 1985; 100: 418-28.
13. Scandling JD, Myers B. Glomerular size-selectivity and microalbuminuria in early diabetic glomerular disease. *Kidney Int* 1992; 41: 840-6.
14. Viberti G, Keen H. The patterns of proteinuria in diabetes mellitus relevance to pathogenesis and prevention of diabetic nephropathy. *Diabetes* 1984; 33: 686-92.
15. Pietravalle P, Morano S, Cristina G, Rossi MG, Mariani G, Cotroneo P, Ghirlanda G, Clementi A, Andreani D, Mario U. Charge selectivity of proteinuria in type 1 diabetes explored by Ig subclass clearance. *Diabetes* 1991; 40: 1685-90.
16. Deckert T, Kofoed-Enevoldsen A, Norgaard K, Feldt-Rasmussen B. Size and charge selectivity of glomerular filtration in type 1 diabetic patients with or without albuminuria. *Diabetologia* 1993; 36: 244-51.
17. 佐藤 賢, 横山宏樹, 武田将伸, 朝長 修, 高橋千恵子, 大森安恵. 早期糖尿病性腎症でみられる charge selectivity の障害—IgG/IgG₄ index による検討. *糖尿病* 1997; 40: 165-9.
18. Myers BD, Winetz JA, Chui F, Michaels AS. Mechanisms of proteinuria in diabetic nephropathy: a study of glomerular barrier function. *Kidney Int* 1982; 21: 633-41.
19. Nakamura Y, Myers BD. Charge selectivity of proteinuria in diabetic glomerulopathy. *Diabetes* 1988; 37: 1202-11.
20. Gall MA, Rossing P, Kofoed-Enevoldsen A, Nielsen FS, Parving HH. Glomerular size and charge selectivity in type 2 diabetic patients with diabetic nephropathy. *Diabetologia* 1994; 37: 195-201.
21. Christiansen JS, Gammelgaard J, Frandsen M, Parving HH. Increased kidney size, glomerular filtration rate and renal plasma flow in short-term insulin-dependent diabetes. *Diabetologia* 1981; 20: 451-6.
22. Parving HH, Rutili F, Granath K. Effect of metabolic regulation on renal leakiness to dextran molecules in short-term insulin-dependent diabetes. *Diabetologia* 1979; 17: 157-60.
23. Hostetter TH, Troy JC, Brenner BM. Glomerular haemodynamics in experimental diabetes mellitus. *Kidney Int* 1981; 19: 410-5.
24. Zatz R, Meyer TW, Rennke HG, Brenner BM. Predominance of hemodynamic rather than metabolic factors in the pathogenesis of diabetic glomerulopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 5963-7.
25. 中本 安, 猪俣茂樹. 早期糖尿病性腎症の病理. 繁田幸男, 海津嘉蔵編, 新・糖尿病性腎症. 東京: 医学書院, 1992: 160-9.
26. 石橋不可止. ミクロアルブミン尿を呈するインスリン非依存型糖尿病における諸種尿蛋白の糸球体濾過. *糖尿病* 1993; 36: 244-51.
27. Christensen EI, Rennke HG, Carone FA. Renal tubular uptake of protein: effect of molecular charge. *Am J physiol* 1983; F436-41.
28. 三崎盛治, 嶋 照夫, 江崎 淳, 住田安弘, 白山 究. II 型糖尿病患者における尿中トランスフェリン, アルブミン排泄量. *糖尿病* 1993; 36: 909-15.
29. Tucker BJ, Rasch R, Blantz RC. Glomerular filtration and tubular reabsorption of albumin in preproteinuric diabetic rats. *J Clin Invest* 1993; 92: 686-94.