

小児腎疾患における尿中安定化 フィブリン分解産物(XLFbDP)の動態に関する研究

第1報 尿中XLFbDP量と腎糸球体像について

奈良県立医科大学小児科学教室

松 永 健 司

STUDIES ON URINARY CROSSLINKED FIBRIN DEGRADATION PRODUCTS(XLFbDP) IN CHILDREN WITH RENAL DISEASES 1. URINARY LEVELS OF XLFbDP AND HISTOLOGICAL FINDINGS

TAKESHI MATSUNAGA

Department of Pediatrics, Nara Medical University

Received November 28, 1991

Summary: Urinary levels of crosslinked fibrin degradation products(XLFbDP) in children with various renal diseases were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using monoclonal antibodies, which were essentially monospecific for human D-dimer and other XLFbDP. The majority of the children with minimal change nephrotic syndrome or focal segmental glomerulosclerosis showed mild to moderately increased levels of fibrinogen degradation products(FgDP), but no excretion of XLFbDP. On the other hand, urinary excretion of XLFbDP was found in 35 of 100 patients with some type of proliferative glomerulonephritis, such as acute glomerulonephritis, membranoproliferative glomerulonephritis, rapidly progressive glomerulonephritis, lupus nephritis, purpura nephritis or IgA nephropathy, or in those with hemolytic uremic syndrome. Furthermore, in IgA nephropathy, significantly higher levels of urinary XLFbDP were found in patients with highly active proliferative lesions in their histology. Although the urinary XLFbDP levels did not correlate with the degree of intraglomerular fibrin deposits, measurement of urinary XLFbDP may provide a useful marker for active glomerular lesions such as crescents in pediatric nephritis.

Index Terms

glomerulonephritis, urinary fibrin/fibrinogen degradation products(FDP), D-dimer, cross-linked fibrin

緒 言

腎炎の進展, 増悪に免疫学的機序につづいて糸球体内凝固・線溶系因子の動態が関与していることは, 血中, 尿中凝固・線溶系因子の推移, 蛍光抗体法による糸球体内の各種凝固・線溶系因子の沈着態度などから明かにさ

れてきた^{1)~9)}. 尿中のフィブリン/フィブリノーゲン分解産物(fibrin/fibrinogen degradation products, FDP)の測定は腎局所での凝固・線溶の動態を推測しうるものとして今日必須の検査となっている^{3)4)10)~19)}. FDPの測定には通常, 抗ヒトフィブリノーゲン家兎血清を用いるが, この抗血清はフィブリノーゲン分解産物

(FgDP)とフィブリン分解産物(FbDP)のいずれにも反応するので両者を簡単には鑑別しえない。血中蛋白分解酵素の一つであるプラスミンはフィブリノーゲンあるいはトロンビンによりフィブリンモノマーに転化後その γ 鎖が第 XIII 因子によりクロスリンクした安定化フィブリンを限定分解し、前者からは X, Y, D, E フラグメントなどの FgDP が生じ、後者からは X', Y' の early product を経て最終的に D-dimer と E フラグメントの FbDP が形成される²⁰⁾²¹⁾。FgDP と FbDP の鑑別は D-dimer の有無によるが、従来、ゲル濾過法による溶出パターン²²⁾や二次元免疫電気泳動法²³⁾などで鑑別が行われてきたが手法が複雑で時間を要し、また FbDP 量の定量は困難であった。Elms ら²⁴⁾(1983)により D-dimer に対するモノクローナル抗体が作成され、D-dimer すなわち、クロスリンクしたフィブリンより生じた安定化フィブリン分解産物(crosslinked fibrin degradation products, XLFbDP)の測定が可能となった。

著者は尿中 XLFbDP の由来を知る目的で抗 D-dimer モノクローナル抗体による ELISA 法(enzyme-linked immunosorbent assay)で小児腎疾患患児の尿中 XLFbDP 量を測定し、腎組織における安定化フィブリン沈着度と対比較した。

検索対象および方法

1. 対象：昭和 60 年 4 月より平成 2 年 3 月までに奈良医大小児科および 10 関連施設小児科を受診した 3 歳から 15 歳までの微小変換型ネフローゼ症候群 22 例、巣状糸球体硬化症 8 例、膜性腎症 6 例、急性糸球体腎炎 7 例、膜性増殖性腎炎 6 例、急速進行性糸球体腎炎 3 例、ループス腎炎 7 例、紫斑病性腎炎 32 例、IgA 腎症 45 例、溶血性尿毒症症候群 3 例、thin basement membrane disease(TBMD)4 例の計 143 例を検索対象とした。143 例中、腎生検非施行の微小変換型ネフローゼ症候群 6 例、急性糸球体腎炎 2 例、溶血性尿毒症症候群 2 例の計 10 例については臨床診断によった。尚、対照として起立性調節障害で奈良医大小児科を受診し一般検尿で異常を認めなかった 20 例の早朝尿を用いた。

2. 被検尿：上記各種腎疾患患児の急性期、増悪期あるいは腎生検前の 24 時間蓄尿より尿 10 ml を採取し検索まで -70°C に保存した。

3. フィブリン/フィブリノーゲン分解産物の作成：Gaffney ら²⁵⁾の方法に準拠し安定化フィブリン分解産物(XLFbDP)を作成した。10 mg/ml に調整したヒトフィブリノーゲン製剤(ミドリ十字社)3 ml に 1 M CaCl_2 溶液 0.4 ml, 50 NIH u/ml トロンビン 1 ml, 3 u/ml XIII

因子製剤 1 ml を混和し、 37°C 2 時間放置により得られた fibrin clots を 500 u/ml の urokinase(ミドリ十字社)を含む 1 ml のリン酸緩衝液(PBS)に加え、1 時間または 24 時間後に 0.2 M aminocaproic acid で反応停止させ得られた、上清を各々 early XLFbDP, late XLFbDP として用いた。フィブリノーゲン分解産物 FgDP は 200 mg/dl ヒトフィブリノーゲン製剤に終濃度 500 u/ml の urokinase を溶かし 20 分後 0.2 M aminocaproic acid にて反応停止後、得られた上清を FgDP として用いた。

4. 尿中 FDP 量の測定：抗ヒトフィブリノーゲン抗体を用いたラテックス凝集法により測定した(帝国臓器)。本方法における最大感度は $0.1 \mu\text{g/ml}$ であった。

5. 尿中 XLFbDP 量の測定：2 種のモノクローナル抗体(DD-3 B 6, DD-4 D 2)を用いた ELISA 法により測定した²⁴⁾(DIMERTEST KIT, Mabco)。即ち D-dimer 等 γ - γ chain を有する XLFbDP に特異的に反応する DD-3 B 6 抗体溶液をプレート上の小穴にそれぞれ $50 \mu\text{l}$ 添加、24 時間 4°C 放置による coating の後洗浄、 $50 \mu\text{l}$ の D-dimer 標準物質または検体(原尿)を各小穴に添加、1 時間室温に放置した。D-dimer 標準物質は $1 \mu\text{g/ml}$ より希釈列を作成し各々のプレートで検体と同時に測定した。これらを PBS/Tween で洗浄後、2 次抗体としてベルオキンダーゼ標識 DD-4 D 2 抗体溶液 $50 \mu\text{l}$ を添加し、1 時間室温放置した。この 2 次抗体 DD-4 D 2 は D-dimer のみならずフィブリノーゲンや D, E を除く FgDP とも反応する性状を有している。次に 3% Hydrogen Peroxide $10 \mu\text{l}$ を加え、10 ml に調整した発色基質液を $100 \mu\text{l}$ ずつ各小穴に添加し室温で 20 分反応させた。反応終了後、反応停止液を $50 \mu\text{l}$ 加え、405-420 nm で吸光度を測定した。また予備実験として 3. で作成した early XLFbDP, late XLFbDP および FgDP の希釈列を検体として測定しその反応をみた。

尿中 XLFbDP 量/FDP 量は、 $\text{XLFbDP}(\text{ng/ml})/\text{FDP}(\text{ng/ml}) \times 100(\%)$ の計算式によった。

6. 組織光顕像：排泄性腎盂撮影下に経皮的腎生検により得られた腎組織片を Formol-Mercury 及び DuBosq-Brazil solution にて固定し、Haematoxylin eosin(H-E), Periodic acid Schiff(PAS), Silver methenamine and Masson trichrome(SM-MT)染色にて観察した。また IgA 腎症については Andreoli ら²⁶⁾の方法に準じ Activity Index(AI), Chronicity Index(CI)を求めた。AI は細胞性増殖(0:微小変化, 1:巣状軽度メサンギウム増殖, 2:びまん性軽度メサンギウム増殖, 3:びまん性中等度メサンギウム増殖), 壊死(0:-, 1:+), 間質単核細胞浸潤(0:-, 1:+), 細胞性半月体(0:0%, 1:

1-20%, 2: 21-50%, 3: >51%)の4項目, CIは線維性半月体(0: 0%, 1: 1-20%, 2: 21-50%, 3: >51%), 分節状糸球体硬化(0: 0%, 1: 1-20%, 2: 21-50%, 3: >51%), 球状硬化(0: 0%, 1: 1-20%, 2: 21-50%, 3: >51%), 尿管萎縮と間質線維化(0: -, 1: +)の4項目のスコアの合計とした。

7. 組織蛍光抗体像

i) IgG, IgA, IgM, C₃及びfibrin/fibrinogenの沈着: FITC標識抗ヒトIgG, IgA, IgM, C₃, fibrinogen家兎血清(Behringwerke社)を用いた直接法により各々の蛍光強度を観察した。

ii) 安定化フィブリンの沈着: 教室のKamitsuji et al⁸⁾が既に報告した1% Monochloroacetic acid(MCA, Sigma社)添加後のMCA-insoluble fibrin/fibrinogenの沈着像及びD-dimerの沈着像より観察した。即ち3µmの凍結切片に1% MCA液を滴下し, 37°C 60分間湿潤箱内にて保温後, リン酸緩衝液にて洗浄し, i)と同様にFITC標識fibrinogen家兎血清を用いてMCA-insoluble fibrin/fibrinogenの沈着像を観察した。またD-dimerの沈着像の観察は一次抗体としてD-dimerに対するモノクローナル抗体(DD-3B6)を, 二次抗体としてFITC標識抗マウスIgG抗体を用いた間接法により行った。これらの方法により観察した安定化フィブリンの沈着様式は以下の4段階に分類した。

Group 1: 安定化フィブリンの沈着を認めないもの

Group 2: 安定化フィブリンの沈着がメサンギウム領域または毛細管壁に軽度局所的に認められるもの

Group 3: 安定化フィブリンの沈着がメサンギウム領域から毛細管壁にかけて結節状またはび慢性に中等度認められるもの

Group 4: 安定化フィブリンの沈着がメサンギウム領域, 毛細管壁に中等度以上認められ, さらに管腔外にまで認められるもの

成 績

1. D-dimer標準物質および生成XLFbDP, FgDPのXLFbDP量の測定

D-dimer標準物質希釈列(1000, 500, 250, 125, 62.25, 31.125, 10 ng/ml)を作成し, 2種のモノクローナル抗体DD-3B6, DD-4D2を用いたELISA法でその感度を検討した。10-1000 ng/mlの間で良好な標準曲線が得られ, 感度は10 ng/mlであった。ヒトフィブリンノーゲン製剤にトロンビン, XIII因子製剤, CaCl₂を加えて作成したフィブリン塊をurokinaseで限定分解し, 1時間後得られたearly XLFbDP, 24時間後のlate XLFbDP

について上記ELISA系で同様の測定を行ったところFDP量1000 ng/mlではearly XLFbDPが200 ng/ml, late XLFbDPが380 ng/mlのD-dimer量を示し, 同一蛋白量ではlate XLFbDPの方が反応するD-dimer量が多かった。また, FgDPの交叉反応を検討する目的でヒトフィブリンノーゲン製剤にurokinaseを反応させ得られたFgDPについて上記ELISAによる測定を行ったところFDP量が5 µg/mlを越えない濃度では全く反応を認めず, 10 µg/mlのFgDPではD-dimer 20 ng/mlに相当する吸光度を示した(Fig. 1)。

2. 健康小児および各種腎疾患患児の尿中FDP量ならびにXLFbDP量

健康小児20例の尿中FDP量は全例0.1 µg/ml以下, 尿中XLFbDP量は全例10 ng/ml以下であった。

微小変化型ネフローゼ症候群22例では11例に0.1-1.6 µg/mlの尿中FDPの出現がみられ, うち2例は14.0, 19.0 ng/mlのXLFbDP出現を認めた。巣状糸球体硬化症8例中2例に尿中FDP 0.1, 0.4 µg/ml出現し, 尿中XLFbDP量は全例10.0 ng/ml以下であった。膜性腎症6例中3例に0.1-3.2 µg/mlの尿中FDP出現を認めるもXLFbDP量は1例のみ25.0 ng/mlであった。

急性糸球体腎炎急性期7例では尿中FDP量は0.1-6.5 µg/mlと出現したが, 尿中XLFbDP量は4例に10-30 ng/mlと軽度出現するに過ぎなかった。

膜性増殖性腎炎では尿中FDP量は6例中4例が0.1-0.4 µg/ml, 尿中XLFbDP量は6例中3例が10.0-22.0 ng/mlとともに微量出現していた。

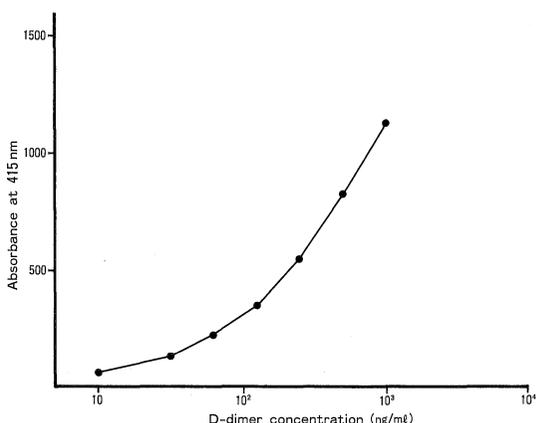


Fig. 1. D-dimer standard curve by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using monoclonal antibodies (DD-3B6, DD-4D2).

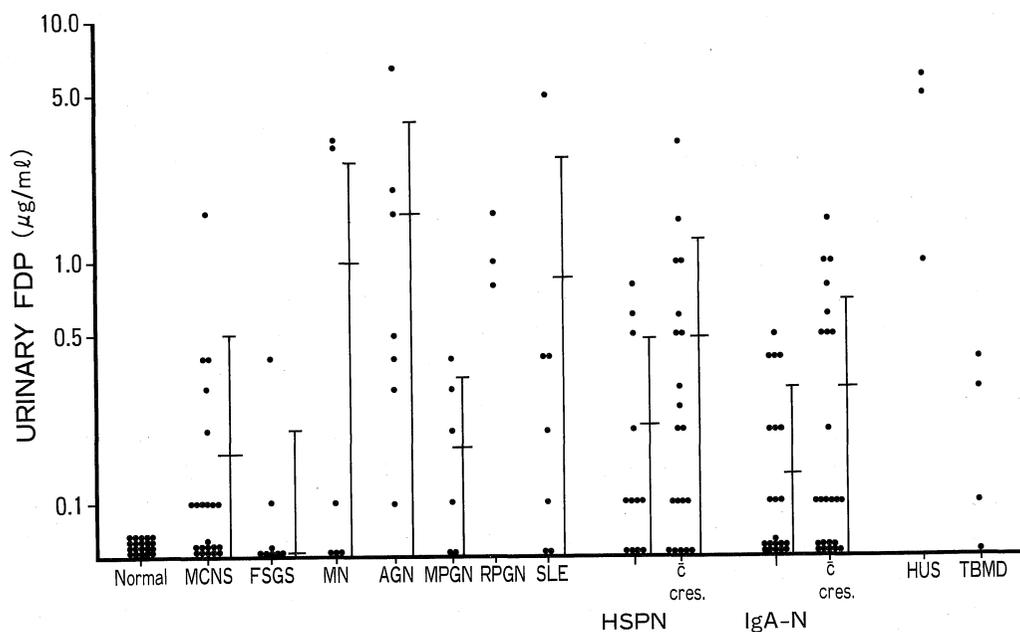


Fig. 2. Urinary levels of fibrin/fibrinogen degradation products (FDP) in normal subjects and patient groups with various renal diseases.

MCNS: Minimal change nephropathy, FSGS: Focal segmental glomerulosclerosis, MN: Membranous nephropathy, AGN: Acute glomerulonephritis, MPGN: Membranoproliferative glomerulonephritis, RPGN: Rapidly progressive glomerulonephritis, HSPN: Henoch-Schönlein purpura nephritis, c̄ cres.: with crescent, IgA-N: IgA nephropathy. HUS: Hemolytic uremic syndrome, TBMD: Thin basement membrane disease.

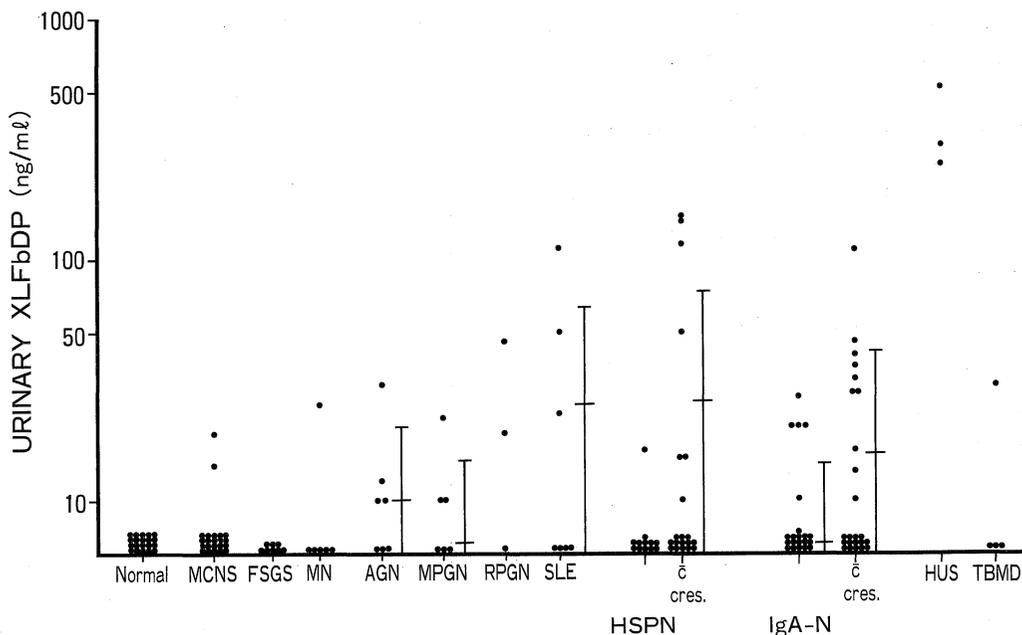


Fig. 3. Urinary levels of crosslinked fibrin degradation products (XLFbDP) in normal subjects and patient groups with various renal diseases.

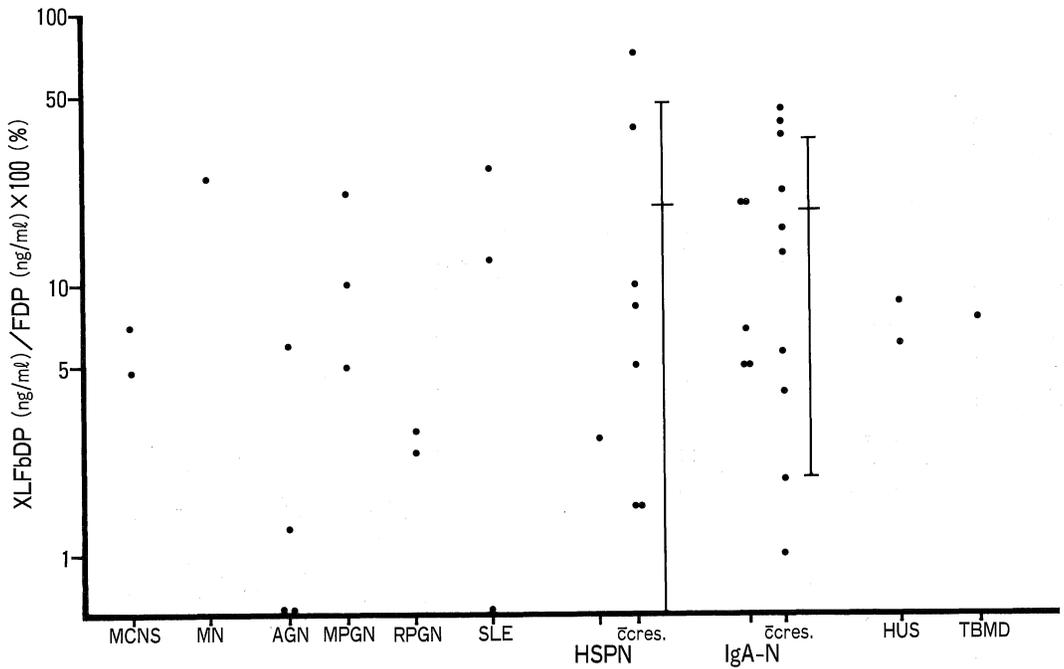


Fig. 4. Ratio of urinary crosslinked fibrin degradation products (XLFbDP) to fibrin/fibrinogen degradation products (FDP) in patient groups with various renal diseases.

急速進行性糸球体腎炎で腎機能低下を認めた3例では尿中FDP量は0.8-1.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で、うち2例は19.0, 46.0 ng/ml の尿中XLFbDP出現を認めた。

ループス腎炎7例中尿中FDPは5例に0.1-5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 出現し、うち3例はXLFbDPが23.0-110.0 ng/ml 認められた。

紫斑病性腎炎では32例中23例に0.1-3.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の尿中FDP出現がみられ、うち8例には10.0-150.0 ng/ml の尿中XLFbDPがみられた。これら8例中7例は半月体を有していた。

IgA腎症では尿中FDPは45例中25例に0.1-1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 出現し、そのうち15例は10.0-110.0 ng/ml の尿中XLFbDPの出現が認められた。これら15例中半月体は10例にみられその尿中XLFbDP量は半月体を有しない5例に比して有意($P < 0.05$)に増加していた。

溶血性尿毒症症候群急性期3例では尿中FDP量は1.0-6.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、尿中XLFbDP量は250.0-520.0 ng/ml とともに著しく高値を示した。

家族性血尿でthin basement membrane disease (TBMD)と診断した4例では尿中FDP量は3例に0.1-0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 出現したが、尿中XLFbDP量は1例にのみ

30.0 ng/ml を認めるに過ぎなかった(Fig.2およびFig.3)。

3. 尿中XLFbDP量/FDP量

10 ng/ml 以上の尿中XLFbDPの出現がみられたネフローゼ群3例、腎炎群35例はいずれも0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上のFDP出現がみられ、これらの症例について尿中XLFbDP量/FDP量を検討した。その結果微小変化型ネフローゼ症候群やthin basement membrane diseaseの患児のXLFbDP量/FDP量は4.8-7.5%と10%以下であるのに対して半月体を有するIgA腎症や紫斑病性腎炎では平均18.9%と高値を認めた。またループス腎炎、溶血性尿毒症症候群にも高値例が観察された(Fig.4)。

4. IgA腎症における尿中XLFbDP量と光顕所見との関係

IgA腎症45例の光顕所見より組織学的検討を行い、Activity Index(AI)、Chronicity Index(CI)を尿中XLFbDP量と対比検討した結果AI高値例に尿中XLFbDP量が高値を示す例が多くみられた。とりわけAIが3以上の21例の尿中XLFbDP量はAIが2以下の24例に比し有意($P < 0.05$)に高値を示していた(Fig.5)。

5. 尿中XLFbDP量と安定化フィブリン沈着度との関

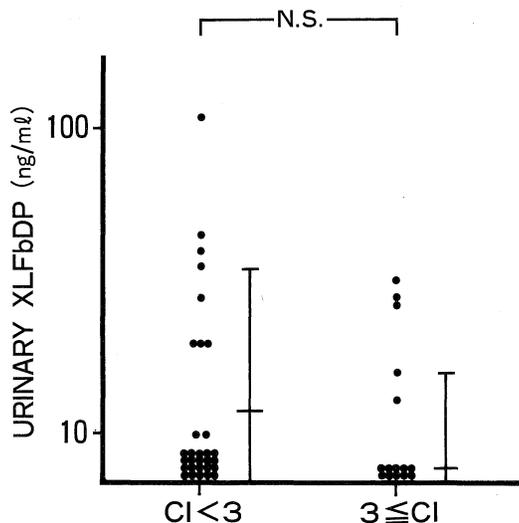
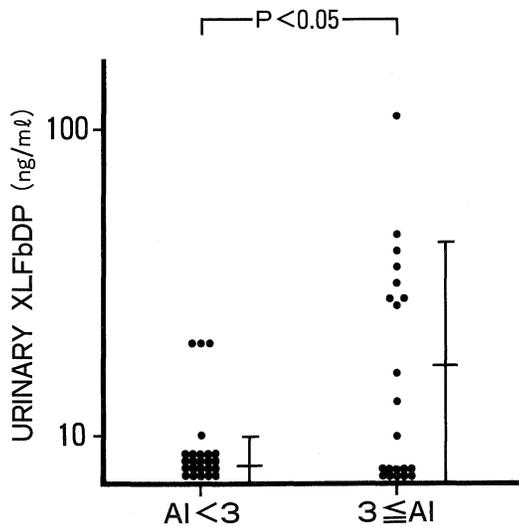


Fig. 5. Relationship between urinary levels of crosslinked fibrin degradation products (XLFbDP) and Activity Index (AI) or Chronicity Index (CI) in children with IgA nephropathy. N. S.: not significant

係

143 例中 95 例について安定化フィブリンの沈着度により 4 群に分け各群の尿中 XLFbDP 量を検討した。安定化フィブリンの沈着を認めなかった Group 1 は微小変化型ネフローゼ症候群 7 例, 巣状糸球体硬化症, 膜性腎症が各 1 例, 軽度のメサンギウム増殖を認めた IgA 腎症 3 例及び thin basement membrane disease 4 例の計

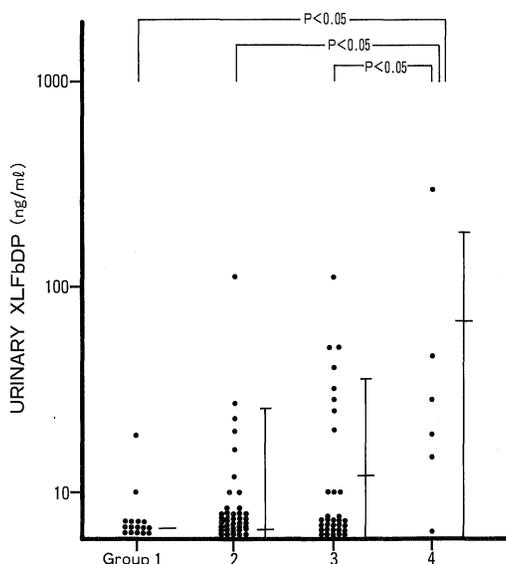


Fig. 6. Urinary levels of crosslinked fibrin degradation products (XLFbDP) in different groups based on the degree of XLFb deposits.

16 例で, 尿中 XLFbDP 出現は乏しく 2 例に 10.0, 19.0 ng/ml 認めるのみであった。安定化フィブリンをメサンギウム領域または毛細管壁に軽度認めた Group 2 は軽度一中等度メサンギウム増殖を認めた IgA 腎症 21 例, 紫斑病性腎炎 9 例, 急性糸球体腎炎 3 例, 膜性増殖性腎炎 3 例, ループス腎炎(Class V)2 例, 巣状糸球体硬化症 2 例の計 40 例で, この群では 8 例(20%)に 10.0-110.0 ng/ml の XLFbDP 出現を認めた。メサンギウムから毛細管壁にかけてび漫性に沈着を認めた Group 3 は細胞性半月体や中等度メサンギウム増殖を認めた IgA 腎症 16 例, 紫斑病性腎炎 11 例, ループス腎炎(Class IV)2 例, 膜性増殖性腎炎 2 例, 膜性腎症 2 例の計 33 例で 11 例(33%)に 10.0-110.0 ng/ml の XLFbDP 出現を認めた。メサンギウム領域, 毛細管壁に中等度以上, さらに管腔外まで沈着を認めた Group 4 は細胞性半月体を 10-20%の糸球体に認めた IgA 腎症, 紫斑病性腎炎各 1 例, 急速進行性糸球体腎炎 3 例, 溶血性尿毒症症候群 1 例の計 6 例で, この群では尿中 XLFbDP は高値例が多く, 5 例(83%)に 15.0-300.0 ng/ml の XLFbDP 出現を認めた。

各群間の比較では尿中 XLFbDP 量は安定化フィブリンの沈着が管腔外にまで認められる Group 4 において有意($P < 0.05$)に高値をとる傾向が得られた(Fig.6).

考 察

血中蛋白分解酵素の一つであるプラスミンの限定分解により生じたフィブリノーゲン分解産物はX, Yの早期産物から順次D, E分画が生じ、一方フィブリノーゲンの γ 鎖間がクロスリンクした集合体のフィブリンよりの分解産物としては最終的にD-dimerとE分画が形成されている。D分画とD-dimerは抗フィブリノーゲン家兎血清や抗D分画家兎血清と反応し、両者の鑑別は容易ではなかった。

近年, Elms et al²⁴⁾(1983)により開発されたD-dimerを認識するモノクローナル抗体は、10 mM CaCl₂存在下に0.15 M トリス酢酸緩衝液中安定化フィブリンとプラスミンを18時間反応させ、得られたXLFbDPより純化したD-dimerをマウスに免疫し得られたものである。そのうちDD-3 B 6はD-dimer等 γ - γ chainを有するXLFbDPとmonospecificに反応しフィブリノーゲンに対してはD-dimerに対する反応の4%, FgDPに対しては3%と極めて僅かしか反応せず、他方DD-4 D 2はXLFbDPのみならずフィブリノーゲンやD, Eを除くFgDPとも反応する性状を有している。Rylattら²⁷⁾の成績によるとDD-3 B 6をcapture antibodyとして用いた場合、tag antibodyとしては5種のモノクローナル抗体の中でDD-4 D 2が最もD-dimerに対する反応が強く適していた。

著者はこのD-dimerに対するモノクローナル抗体DD-3 B 6とDD-4 D 2を用いてELISA法で小児各種腎疾患患児の尿中XLFbDP量を測定し、尿中FDP量、組織所見、尿所見等を対比較検討した。

正常小児では尿中のFDP量は0.1 μ g/ml以下、XLFbDP量も10 ng/ml以下で、いずれも測定感度以下であった。

小児腎疾患で尿中FDP量が0.1 μ g/ml以上出現したものは、微小変化型ネフローゼ症候群22例中11例(0.1-1.6 μ g/ml)、巣状糸球体硬化症8例中2例(0.1-0.4 μ g/ml)、膜性腎症6例中3例(0.1-3.2 μ g/ml)、急性糸球体腎炎急性期7例全例(0.1-6.5 μ g/ml)、膜性増殖性腎炎6例中4例(0.1-0.4 μ g/ml)、急速進行性糸球体腎炎3例中3例(0.8-1.6 μ g/ml)、ループス腎炎7例中5例(0.1-5.0 μ g/ml)、紫斑病性腎炎32例中23例(0.1-3.2 μ g/ml)、IgA腎症45例中25例(0.1-1.5 μ g/ml)、溶血性尿毒症症候群急性期3例中3例(1.0-6.0 μ g/ml)、thin basement membrane disease 4例中3例(0.1-0.4 μ g/ml)であった。

XLFbDPが尿中に10 ng/ml以上出現したのはネフ

ローゼ症候群では微小変化型2例(14.0-19.0 ng/ml)、膜性腎症1例(25.0 ng/ml)のみであったが、一方、腎炎群では、急性糸球体腎炎4例(10.0-30.0 ng/ml)、膜性増殖性腎炎3例(10.0-22.0 ng/ml)、急速進行性糸球体腎炎2例(19.0-46.0 ng/ml)、ループス腎炎3例(23.0-110.0 ng/ml)、紫斑病性腎炎8例(10.0-150.0 ng/ml)、IgA腎症15例(10.0-110.0 ng/ml)でFDP出現例の約半数であった。その他では溶血性尿毒症症候群急性期3例全例に150.0-520.0 ng/mlと高値を認め、thin basement membrane diseaseでは1例に30.0 ng/mlの出現を認めるのみであった。

尿中に出現したXLFbDP量もFDP量との比をとると10%以下が27例、11-25%が8例、26-50%が5例、75%1例で、小児腎疾患の尿中FDPの主体はFgDPに由来するものと考えられた。

尿中XLFbDPが腎糸球体内凝固・線溶反応の結果生じたフィブリンのプラスミン分解産物か、あるいは血中に生じたフィブリン由来であるかを知る目的で腎糸球体組織光顕像、糸球体内の安定化フィブリンの沈着度を観察した。

微小変化型ネフローゼ症候群、巣状糸球体硬化症、膜性腎症等のネフローゼ症候群では安定化フィブリンの沈着が認められないGroup 1が大部分であった。メサンギウム領域あるいは毛細管壁に安定化フィブリンの沈着が軽度に認められ、Group 2に属していたのは、巣状糸球体硬化症2例、急性糸球体腎炎3例、膜性増殖性腎炎3例、ループス腎炎(Class V)2例および軽度-中等度のメサンギウム増殖を有する紫斑病性腎炎9例、IgA腎症21例であった。中等度メサンギウム増殖とさらに細胞性半月体を伴った管外性増殖を認めたIgA腎症、紫斑病性腎炎では安定化フィブリンも結節状、び漫性に中等度認められGroup 3に属していた。急速進行性糸球体腎炎3例、細胞性半月体が10-20%の糸球体に認められた紫斑病性腎炎、IgA腎症各1例および溶血性尿毒症症候群の1例では、安定化フィブリンがメサンギウム領域、毛細管壁に中等度以上認められ、さらに管腔外にもみられGroup 4であった。

Group 1では尿中XLFbDPの出現は16例中2例に10.0-19.0 ng/mlとごく僅かであったが、Group 2では40例中8例が10.0-110.0 ng/ml、Group 3では33例中11例が10.0-110.0 ng/ml、Group 4では6例中5例が15.0-300.0 ng/mlの出現を認めた。

各群間の比較では尿中XLFbDP量は安定化フィブリンの沈着が管腔外にまで認められたGroup 4において有意($P < 0.05$)に高い傾向が得られた。しかし、Group

1, Group 2, Group 3 の尿中 XLFbDP 量の間有意な傾向はなく、尿中 XLFbDP が必ずしも糸球体内安定化フィブリンを反映するとは限らないと考えられた。この原因としてはいくつかの事が推測される。第一の可能性はフィブリンの沈着部位による違いが挙げられる。これについては P. Naish¹⁴⁾ が尿中 FDP 量と糸球体内フィブリン沈着との対比検討で管腔外にフィブリン沈着を認めた例では尿中 FDP 量が有意に高値を示したがメサンギウム沈着例ではあまり高値を認めなかったと述べていることから支持される。即ち、毛細管、メサンギウム内のフィブリンはプラスミン処理後、血中あるいはメサンギウムより網内系での取り込みにより処理されるが、一方管腔外ではポウマン氏嚢より容易に尿中に排泄される。次にフィブリンに対する二次線溶の反応の強さの差が考えられる。半月体形成腎炎でも腎機能低下例では尿中 XLFbDP 低値が示されており⁹⁾、腎内での線溶能の低下はフィブリン沈着の遷延化をもたらし腎機能低下を増長させる。今回の検討では腎組織内線溶能は測定し得なかったが検討すべき点である。

また安定化フィブリン沈着が比較的新しいものか、あるいは活動期を過ぎ長期間経過したものかによる違いも興味をひかれる。今回の成績ではフィブリンの新旧をその性状より判断はできなかったが、一般に新しい糸球体内フィブリン沈着は active stage に形成されることより activity の指標となる Activity Index (AI) を IgA 腎症について検討し尿中 XLFbDP 量と対比検討した。尿中 XLFbDP 量は AI 高値例で出現が多く認められ、とりわけ AI が 3 以上の症例で有意 ($P < 0.05$) に高値を示した。このように activity の高い例で尿中 XLFbDP 出現がみられたことは、activity を示す代表的な光顕所見の細胞性半月体の成因の一つとして糸球体毛細管壁よりポウマン氏腔へ漏出したフィブリンが考えられた。

以上より小児腎疾患における尿中 XLFbDP は、腎炎群において増殖性変化の強い例及び溶血性尿毒症症候群で尿中 FDP の一部として出現、細胞性半月体や糸球体内血液凝固等の active lesion を反映すると考えられた。

結 語

小児腎疾患患児の尿中安定化フィブリン分解産物 (crosslinked fibrin degradation products, XLFbDP) 量を、D-dimer に対するモノクローナル抗体を用いた ELISA により測定し腎組織所見と対比検討した。

1. 微小変化型ネフローゼ症候群、巣状糸球体硬化症のネフローゼ群では、約半数に尿中 FDP 出現を認めたが、XLFbDP は計 30 例中 2 例に微量認めただけであった。

2. 急性糸球体腎炎、膜性増殖性腎炎、急速進行性糸球体腎炎、ループス腎炎、紫斑病性腎炎、IgA 腎症の腎炎群計 100 例中 35 例及び溶血性尿毒症症候群急性期全例に尿中 FDP とともに XLFbDP 出現を認め、細胞性半月体等 active lesion を有する例では高値を呈した。特に IgA 腎症における尿中 XLFbDP 量は、Activity Index の高いものに増加する傾向にあった。

3. 糸球体内安定化フィブリン沈着度との対比検討では、尿中 XLFbDP 量と安定化フィブリン沈着度との間に相関性は認めなかったが、管腔外に沈着を認めた例では尿中 XLFbDP 量は有意 ($P < 0.05$) に高値を示した。

4. 尿中 XLFbDP 出現例において XLFbDP の FDP に対する比率を検討した結果低値例が多く、小児腎疾患の尿中 FDP の主体は FgDP と考えられたが、半月体を有する IgA 腎症や紫斑病性腎炎等増殖性変化の強い例には高値例も認められた。

5. 小児腎疾患において尿中 XLFbDP 量は、細胞性半月体や糸球体内血液凝固等の active lesion をよく反映すると思われた。

本論文要旨は第 29 回日本腎臓学会総会(昭和 61 年 11 月, 東京), 第 91 回日本小児科学会総会(昭和 63 年 5 月, 神戸), 第 31 回日本腎臓学会総会(昭和 63 年 10 月, 奈良)において発表した。

文 献

- 1) Vassalli, P. and McCluskey, R. T.: The pathogenetic role of the coagulation process in glomerular diseases of immunological origin. *Adv. Nephrol.* 1: 47-63, 1971.
- 2) Kincaid-Smith, P.: Coagulation and renal disease. *Kidney Int.* 2: 183-190, 1972.
- 3) Clarkson, A. R., MacDonald, M. K., Petrie, J. J. B., Cash, J. D. and Robson, J. S.: Serum and urinary fibrin/fibrinogen degradation products in glomerulonephritis. *Br. Med. J.* 3: 447-451, 1971.
- 4) Briggs, J. D., Prentice, C. R. M., Hutton, M. H., Kennedy, A. C. and Mencil, G. P.: Serum and urine fibrinogen-fibrin related antigen (F. R.-antigen) level in renal disease. *Br. Med. J.* 4: 82-85, 1972.
- 5) Kamitsuji, H., Whitworth, J. A., Dowling, J. P. and Kincaid-Smith, P.: Urinary crosslinked fibrin degradation products in glomerular disease. *Am. J. Kid. Dis.* 7: 452-455, 1986.

- 6) **Kamitsuji, H., Matsunaga, T., Taira, K., Nakajima, M., Whitworth, J. A. and Kincaid-Smith, P.** : Urinary crosslinked fibrin degradation products in glomerular disease with crescents. *Clin. Nephrol.* **29** : 124-128, 1988.
- 7) **Hoyer, J., Michael, A. F. and Hoyer, L. W.** : Immunofluorescent localization of antihemophilic factor antigen and fibrinogen in human renal diseases. *J. Clin. Invest.* **53** : 1375-1384, 1974.
- 8) **Kamitsuji, H., Kusumoto, K., Taira, K., Iida, Y., Nakajima, M. and Fukui, H.** : Localization of intrarenal crosslinked fibrin in children with various renal diseases. *Nephron* **35** : 94-99, 1983.
- 9) **Kamitsuji, H., Sakamoto, S., Matsunaga, T., Taira, K., Kawahara, S. and Nakajima, M.** : Intraglomerular deposition of fibrin/fibrinogen-related antigen in children with various renal diseases. *Am. J. Pathol.* **133** : 61-72, 1988.
- 10) **Chirawong, P., Nanra, R. S. and Kincaid-Smith, P.** : Fibrin degradation products and the role of coagulation in "persistent" glomerulonephritis. *Ann. Intern. Med.* **74** : 853-859, 1971.
- 11) **Naish, P., Evans, D. J. and Peters, D. K.** : Urinary fibrinogen derivative excretion and intraglomerular fibrin deposition in glomerulonephritis. *Br. Med. J.* **1** : 544-546, 1974.
- 12) **Hedner, U.** : Urinary fibrin/fibrinogen derivatives. *Thromb. Diath. Haemorrh.* **35** : 693-708, 1975.
- 13) **Hall, C. L., Pejhan, N., Terry, J. M. and Blainey, J. D.** : Urinary fibrin/fibrinogen degradation products in nephrotic syndrome. *Br. Med. J.* **1** : 419-422, 1975.
- 14) **Ekberg, M. and Pandolfi, M.** : Origin of urinary fibrin/fibrinogen degradation products in glomerulonephritis. *Br. Med. J.* **2** : 17-19, 1975.
- 15) **Hall, C. L., Blainey, J. D. and Gaffney, P. J.** : Origin of urinary fibrin-fibrinogen degradation products in renal glomerular disease. *Nephron* **23** : 6-9, 1979.
- 16) **Kamitsuji, H., Tani, K., Taniguchi, A., Masuyama, H., Iida, Y. and Fukui, H.** : Urinary fibrin-fibrinogen degradation products and intraglomerular fibrin-fibrinogen deposition in various renal disease. *Thromb. Res.* **21** : 285-294, 1981.
- 17) **Yoshioka, K., Iseki, T., Akano, N., Uraoka, Y., Miyata, H. and Maki, S.** : Urinary fibrinogen and fibrin fragments in children with renal disease. *Nephron* **32** : 135-139, 1982.
- 18) **平 康二** : 小児腎疾患におけるフィブリン・フィブリノーゲン分解産物(FDP)の動態に関する研究 : 第1報, 血中及び尿中 FDP 量とその分画について. *奈医誌.* **34** : 530-542, 1983.
- 19) **平 康二** : 小児腎疾患におけるフィブリン・フィブリノーゲン分解産物(FDP)の動態に関する研究 : 第2報, 糸球体内フィブリンと血中及び尿中 FDP との関連について. *奈医誌.* **35** : 438-447, 1984.
- 20) **Pizzo, S. V., Schwartz, M. L., Hill, R. L. and Makee, P. A.** : The effect of plasmin on the subunit structure of human fibrinogen. *J. Biol. Chem.* **24** : 7636-7645, 1972.
- 21) **Pizzo, S. V., Schwartz, M. L., Hill, R. L. and Makee, P. A.** : The effect of plasmin on the subunit structure of human fibrin. *J. Biol. Chem.* **24** : 4574-4583, 1973.
- 22) **風間睦美, 安部 英** : ゲル濾過法による FgDP と FDP の鑑別. *J. Med. Enzymol.* **1** : 679-685, 1975.
- 23) **平 康二, 塚田周平, 岡本裕宏, 楠本清明, 安居資司, 上辻秀和** : SDS-ポリアクリルアミドゲル交叉免疫電気泳動によるフィブリノーゲン, フィブリン分解産物の検出. *奈医誌.* **32** : 552-557, 1981.
- 24) **Elms, M. J., Bunce, I. H., Bundesen, P. G., Rylatt, D. B., Webber, A. J., Masci, P. P. and Whitaker, A. N.** : Measurement of crosslinked fibrin degradation products-An immunoassay using monoclonal antibodies. *Thromb. Haemostas.* **50** : 591-594, 1983.
- 25) **Gaffney, P. J., Joe, F. and Mahmoud, M.** : Giant fibrin fragments derived from crosslinked fibrin : Structure and clinical implication. *Thromb. Res.* **20** : 647-662, 1980.
- 26) **Andreoli, S. P., Yum, M. N. and Bergstein, J. M.** : IgA nephropathy in children : Significance of glomerular basement membrane deposition of IgA. *Am. J. Nephrol.* **6** : 28-33, 1986.
- 27) **Rylatt, D. B., Blake, A. S., Cottis, L. E., Massingham, D. A., Fletcher, W. A., Masci, P. P., Whitaker, A. N., Elms, M., Bunce, I.,**

Webber, A. J., Wyatt, D. and Bundesen, P. G. :
An immunoassay for human D dimer using mono-

clonal antibodies. *Thromb. Res.* **31** : 767-778,
1983.