

腹膜透析患者の難治性腹膜炎腹膜組織における膜補体制御因子の分布，および補体活性化産物の沈着について

水野正司*^{1,2} 福井聡介*² 尾関俊和*² 小島 博*^{1,2} 鈴木康弘*^{1,2}

*¹ 名古屋大学大学院医学系研究科腎不全システム治療学寄附講座 *² 同 腎臓内科

key words : 真菌性腹膜炎, 腹膜炎, 腹膜透析, 補体, 膜補体制御因子

要 旨

腹膜透析 (PD) 患者において、真菌性腹膜炎を含む難治性腹膜炎は予後不良であり、早期にカテーテル抜去を推奨、もしくは余儀なくされることが多い。これまでに我々は実験動物モデルを用いて、特に真菌性腹膜炎で膜補体制御因子の傷害と持続する補体の活性化産物の沈着により、腹膜に高度の傷害をきたす可能性を示した。本研究では、動物モデルで示した膜補体制御因子発現の傷害と補体活性化の亢進、腹膜組織傷害が、真菌性腹膜炎と難治性/再燃性グラム陽性菌によるヒト腹膜炎により、観察されるかどうかについて、PD カテーテル抜去時に得た腹膜生検組織を用いて検討した。対象には PD 患者において、腹膜炎以外の理由 (非腹膜炎) で PD カテーテルを抜去時に得た腹膜炎組織を用いた。結果は、真菌性腹膜炎を含めた腹膜炎症例では、非腹膜炎症例に比べると、腹膜炎症例、特に真菌性腹膜炎症例において、腹膜傷害、特に腹膜中皮細胞の傷害に関連して腹膜に発現している膜補体制御因子 (CD46, CD55 および CD59) の発現が低下する傾向を観察した。同時に補体活性化産物 C3b 沈着にも増加傾向を認めた。

今回の結果より、腹膜炎を合併した PD 患者の腹膜、特に真菌性腹膜炎症例の腹膜では、非腹膜炎 PD 患者の腹膜に比較して、腹膜の膜補体制御因子が傷害を受け、このため補体活性が亢進している可能性が示唆された。

緒 言

社会の高齢化が進む中で、在宅医療である腹膜透析 (PD) は重要な透析方法に位置づけられる。現在、PD で解決が望まれる問題として長期の治療継続困難があり、その主な原因の一つとして腹膜傷害がある。この腹膜傷害は PD の致死性合併症である被嚢性腹膜硬化症 (EPS) につながる可能性があり、腹膜傷害の病態解明、予知方法、治療方法、および予防方法の開発は重要な研究課題であると考えられる。

また、腹膜傷害の原因の一つとして重要であるのが腹膜炎であり、腹膜炎の急性期炎症とその後の腹膜の変化が重要であると考えられる。我々は補体系に注目して、これまでに様々な炎症性疾患の発症・進展への補体の関与の重要性を報告してきた¹⁾。腹膜炎は、難治化による PD 離脱や、腹膜傷害と致死的な EPS への進展の契機となりうる重要な PD の合併症である。中でも真菌性腹膜炎は特に重症例が多いことが知られている。

補体は自然免疫が役割の中心にあり、獲得免疫への橋渡しからその他役割と幅広く生体の維持に役立っているが、一旦活性系と制御系のバランスが崩れると様々な病態を生体にもたらす、いわば補体は生体にとって諸刃の刃である²⁾。

我々はこの補体系のバランスと腹膜傷害進展との関係に注目して研究を進めている。そして、これまでにラットに真菌由来成分のザイモザンを投与することで

補体活性増大による炎症反応が惹起され, 腹膜傷害が長期にわたり遷延することを示した³⁾. さらにラット腹膜において, C3 レベルで補体の活性化を制御するヒトの CD46 と CD55 の機能を併せ持つ Crry と, C5b-9 (膜侵襲複合体) レベルで補体の活性化を制御する CD59 の二つの膜補体制御因子の機能を同時に抑制することで急性の腹膜傷害が惹起され, 補体活性の非制御が腹膜傷害を増悪させることから, 腹膜に発現している膜補体制御因子の重要性を報告した⁴⁾.

上記のように, 動物実験等で腹膜傷害と補体活性化経路の関連を明らかにしつつあることを受けて, 今回我々は, ヒト腹膜における真菌性腹膜炎と膜補体制御因子, CD46, CD55, および CD59 の発現と補体活性化産物の沈着について検討したので報告する.

1 目的

これまでに動物実験で, 補体の調整に膜補体制御因子が重要であること, 腹膜傷害が腹膜における膜補体制御因子に影響を与えていることを明らかにした. 本研究では, PD 関連の腹膜傷害の主な原因の一つと考えられるヒト腹膜炎, 特に重症化しやすい真菌性腹膜炎に着目して膜補体制御因子 (CD46, CD55, CD59) の発現への影響を検討した.

2 方法

名古屋大学医学部附属病院および関連病院に通院していた PD 患者において, PD 離脱時に行った PD カテーテル抜去時に施行したヒト腹膜生検組織を用いた.

腹膜炎症例として, 真菌性腹膜炎の診断により PD カテーテル抜去時を行った患者の腹膜組織 (真菌性腹膜炎群, Group 1 : G1) と, 再燃性もしくは難治性のグラム陽性球菌感染による腹膜炎で PD カテーテル抜去に至った PD 患者から採取した腹膜組織 (グラム陽性球菌腹膜炎群, Group 2 : G2) を用いた. また腹膜炎を起こしていない患者 (腹膜炎以外の理由で PD カテーテル抜去に腹膜生検を行った症例) について, G1 と G2 の症例と PD 治療期間の類似した症例を抽出し, PD カテーテル抜去時に採取した腹膜組織を腹膜炎に対するコントロール (非腹膜炎群, Group 3 : G3) とした.

各群間で腹膜組織の評価をし, 比較を行った. 得られた組織を用いて, 光学顕微鏡下に腹膜障害の評価と

して, fibrosis と fibrin の沈着, および浸潤細胞数の評価を行った. 腹膜の膜補体制御因子の発現について, 免疫染色により anti-CD46 抗体, anti-CD55 抗体, anti-CD59 抗体を用いて, 腹膜の膜補体制御因子 (CD46, CD55, CD59) の分布を調べた. さらに, 腹膜への補体活性化産物の沈着として, C3b の沈着を観察した. また, 使用した抗体の免疫染色のコントロールとして, isotype が同様の IgG を使用した. 腹膜の膜補体制御因子発現は腹膜表層の発現範囲を視野の % で, fibrosis は腹膜上の厚さで, fibrin の沈着と補体活性化産物沈着 (C3b) の程度は, それぞれ 0~3 点と 0~4 点に半定量化 (scoring) して評価した. 浸潤細胞は視野あたりの細胞数として評価した.

本研究は, 名古屋大学生命倫理委員会ならびに関連病院での倫理委員会の承認 (承認番号 : #2005-0299) と患者の同意のもとに行った.

3 結果

3-1 真菌性腹膜炎, グラム陽性菌性腹膜炎と非腹膜炎患者の fibrosis, fibrin の沈着と腹膜への細胞浸潤の比較
腹膜炎が原因でカテーテル抜去時に採取した腹膜組織を光学顕微鏡下で観察したところ, 腹膜炎組織では, 腹膜の肥厚, 腹膜表層に分布する腹膜中皮細胞の脱落が目立っていた (data not shown). また, 腹膜下層にも細胞浸潤を多く認めた. 腹膜炎の中では, 難治性もしくは再燃性のグラム陽性球菌腹膜炎感染でカテーテル抜去時の腹膜検体 (G2) に比べて, 真菌性腹膜炎群 (G1) の腹膜生検組織では, 腹膜の fibrosis や fibrin 沈着, 細胞浸潤が多い傾向を認めた (図 1A, B). 一方で, 非腹膜炎群 (G3) では, fibrosis や fibrin 沈着は, より軽度で腹膜表層の腹膜中皮細胞層はよく保たれており, 腹膜下層の細胞浸潤も乏しかった (図 1).

腹膜の細胞浸潤の評価については, 好中球, T 細胞, マクロファージともに G2・G1 の順で腹膜組織への炎症細胞の集積が多い傾向を示した (図 1C, D, E). 一方で, 非腹膜炎群 (G3) では, G1 や G2 と比較していずれも炎症細胞の集積が少なかった (図 1C, D, E).

3-2 真菌性腹膜炎, グラム陽性球菌性腹膜炎と非腹膜炎患者の腹膜の膜補体制御因子の発現と補体活性化産物の沈着の比較

真菌性腹膜炎群, グラム陽性球菌腹膜炎群, および

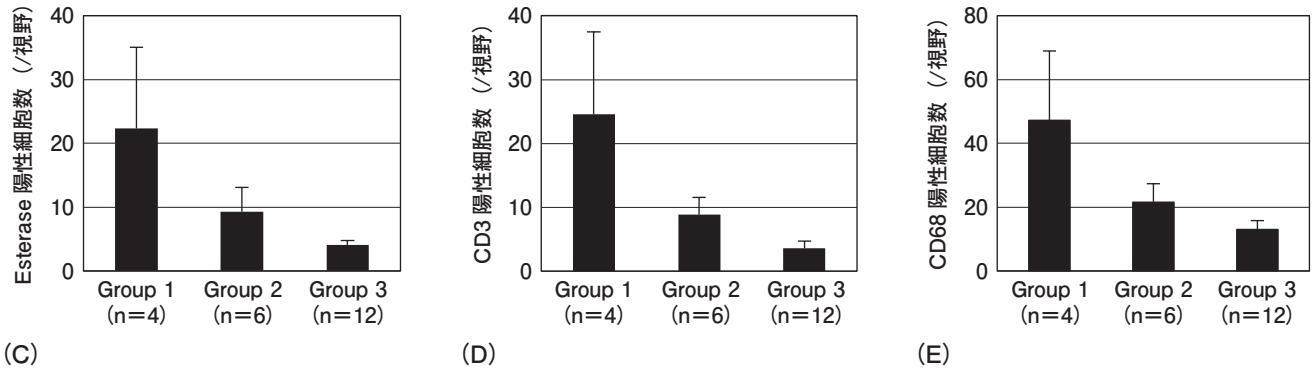
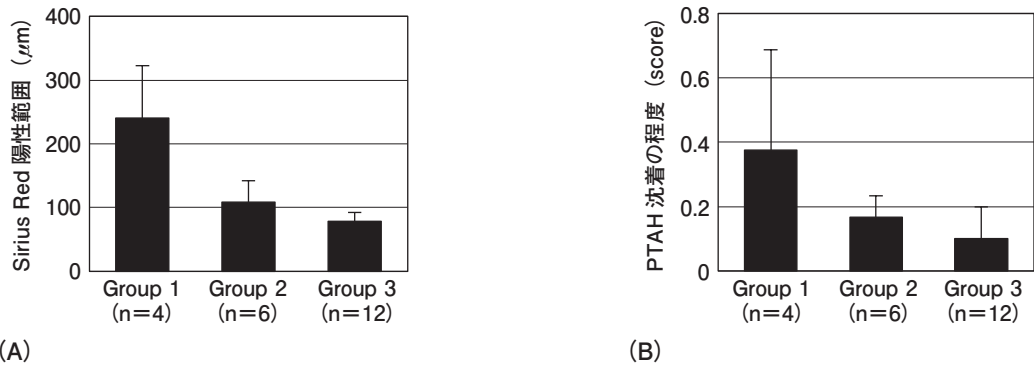


図1 ヒト腹膜生検組織を用いた、腹膜炎と非腹膜炎における腹膜の fibrosis, fibrin 沈着、および細胞浸潤の比較

腹膜障害として、fibrosis の程度を Sirius Red 染色陽性領域、fibrin 沈着は PTAH 染色陽性の程度を 0~3 に scoring して行った。また、浸潤細胞数について、好中球は esterase 染色陽性細胞で、T 細胞は CD3 陽性細胞、マクロファージは CD68 陽性細胞として細胞数を求めた。Group 1 は真菌性腹膜炎群、Group 2 は難治性もしくは再発性のグラム陽性球菌による腹膜炎、Group 3 は腹膜炎以外の理由で PD を中止して PD カテーテル抜去を行った症例（腹膜炎の既往無し）。

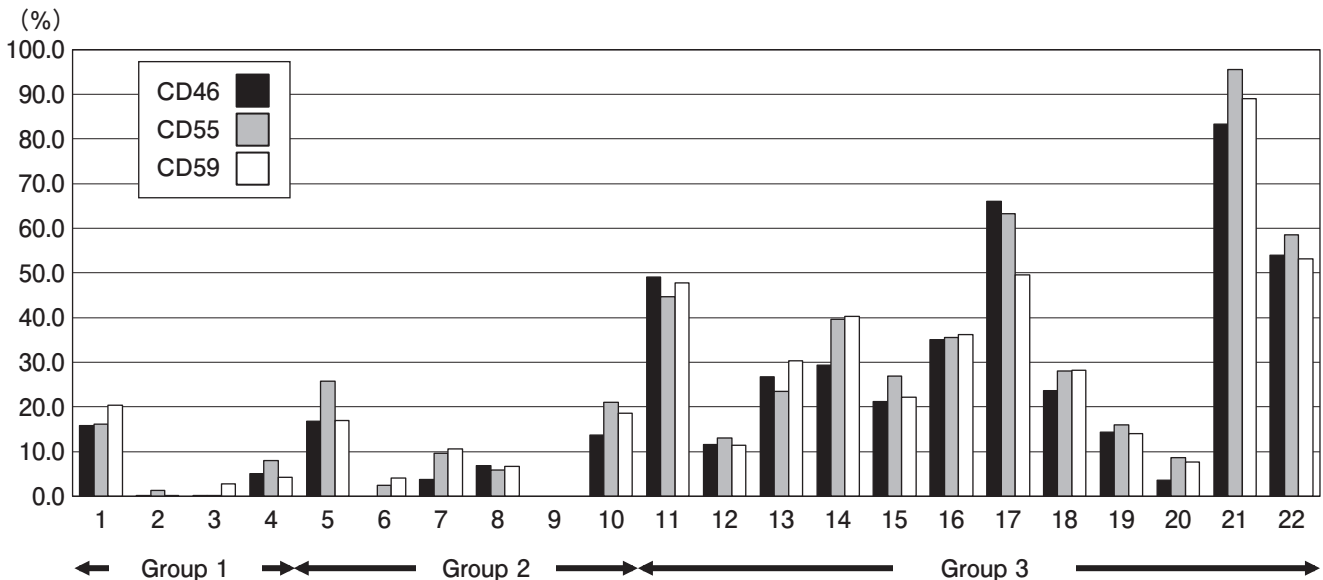


図2 ヒト腹膜生検組織を用いた、腹膜炎と非腹膜炎における腹膜の膜補体制御因子の発現症例数が少ないため、個々の症例における膜補体制御因子、CD46, CD55, および CD59 の腹膜表層での発現を比較検討した。Group 1 は真菌性腹膜炎群、Group 2 は難治性もしくは再発性のグラム陽性球菌による腹膜炎、Group 3 は腹膜炎以外の理由で PD を中止して PD カテーテル抜去を行った症例（腹膜炎の既往無し）。数字は、各症例を示す。

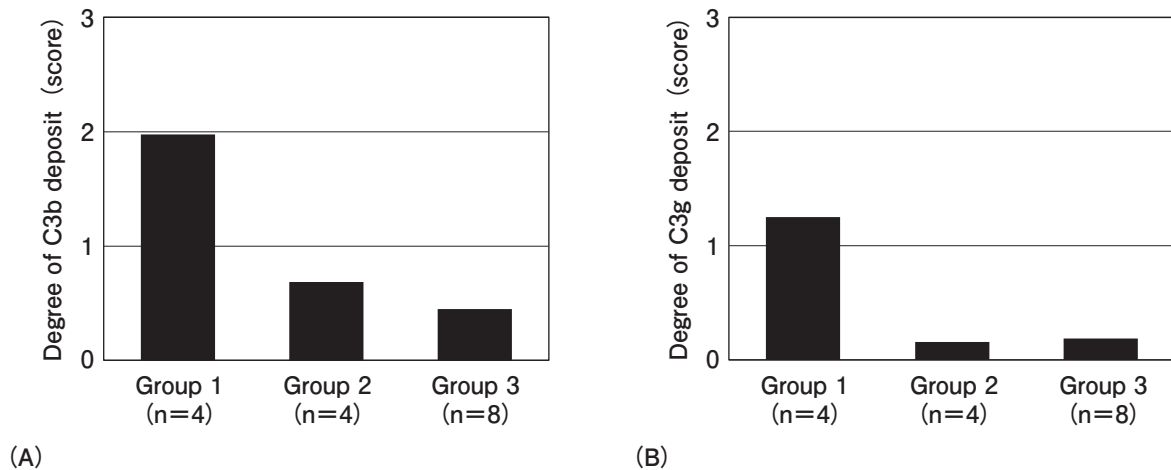


図3 ヒト腹膜生検組織を用いた、腹膜の補体活性化産物の沈着
 腹膜組織における補体活性化産物、C3b(A) および C3g(B) 沈着を示す。Group 1 と 2 と比較して、Group 1 で C3b および C3g 沈着が多い傾向を示した。Group 1 は真菌性腹膜炎群、Group 2 は難治性もしくは再発性のグラム陽性球菌による腹膜炎、Group 3 は腹膜炎以外の理由で PD を中止して PD カテーテル抜去を行った症例（腹膜炎の既往無し）。

非腹膜炎群の3群 (G1, G2, G3) について同じ組織を免疫染色で膜補体制御因子、CD46, CD55 および CD59 の分布を調べたところ、腹膜炎で、その中でも特に真菌性腹膜炎群 (G1) では、腹膜表層の CD46, CD55 および CD59 の発現の低い傾向が見られた (図2)。また、観察した CD46, CD55 および CD59 は中皮細胞と腹膜血管に強く見られた。CD46, CD55 および CD59 発現の減少は、中皮細胞の脱落部位と関連しており (data not shown), 腹膜表層の中皮細胞が障害されたことにより、存在すべき CD46, CD55 および CD59 発現の減少していることが考えられた。

腹膜への補体活性化産物沈着を補体活性系の early pathway の活性化を示す C3b および C3g の沈着を評価したところ、腹膜炎組織、特に真菌性腹膜炎の腹膜組織で、腹膜表層を中心に強い沈着を認めた (図3)。特に真菌性腹膜炎組織では、グラム陽性球菌性腹膜炎の腹膜組織と比較すると、より多くの沈着を認める傾向を示した。

4 考察

我々の結果から、真菌性腹膜炎では腹膜炎非罹患患者や細菌性腹膜炎患者から採取した腹膜組織と比較して、中皮細胞の脱落がより高度であり、腹膜の傷害の程度 (fibrosis, fibrin 沈着, 細胞浸潤) と同時に腹膜表面の膜補体制御因子の発現も低下が確認され、補体活性化に腹膜が障害を受けやすい状況になっている可能性が示唆された。

これまでに我々は、動物モデルにて真菌由来のザイモザン投与により腹膜炎を誘導した結果、腹膜の膜補体制御因子が傷害を受けると補体活性が亢進して腹膜傷害が惹起されることを証明してきた³⁾。さらにこのモデルにおいて、腹膜の残存膜補体制御因子の機能の抑制や過剰な補体活性の誘導で腹膜傷害がより増悪すること⁵⁾を報告した。また炎症誘発目的の腹腔内ザイモザン投与を終了した後も経時的に腹膜傷害が進行することを示した³⁾。これらの結果は、真菌性腹膜炎では腹膜中皮細胞およびそこに発現する補体制御因子が傷害を受けることで局所での補体活性化が遷延し、これが腹膜傷害の進展に大きく関わっている可能性を示唆した。さらに我々は、PD 患者から採取した腹膜中皮細胞の初代培養細胞を用いた結果より、PD 治療により腹膜中皮細胞上の膜補体制御因子、CD46, CD55 および CD59 の発現低下が発生し、中皮細胞自体が補体活性化の影響を受けやすくなっている可能性も示した⁶⁾。

今回の腹膜生検組織を用いた検討の結果も合わせて考えると、PD 関連腹膜炎、特に真菌性腹膜炎患者の腹膜組織にて強い中皮細胞と膜補体制御因子の異常を示す傾向を認めた。過去に動物モデルで証明してきた腹腔内に直接対峙する腹膜中皮の膜補体制御因子の重要性を支持し、腹膜中皮細胞の膜補体制御因子が障害を受けることにより、補体活性系の制御が乱れて腹膜傷害の進展、さらには EPS への進展に関わってくる可能性を示唆するものではないかと考えられた。今後、

さらに詳細な解析を進め、補体研究の観点から、腹膜傷害進展とEPS発症のバイオマーカーの探索、治療方法の開発につなげていきたい。

結 語

腹膜炎非罹患PD患者と比較して、PD患者における細菌性腹膜炎や真菌性腹膜炎では、強い腹膜中皮細胞と膜補体制御因子の発現低下が確認され、補体活性亢進を伴う腹膜傷害持続の経過を示すものと考えられる。

謝 辞

抗ヒトCD55およびCD59抗体は、今井優樹先生(名古屋市立大学)のご厚意で、抗ヒトC5b-9抗体は、Professor Morgan B.P. (Cardiff University, UK)のご厚意で使用させていただいた。

本研究の一部は、日本透析医会のご厚意による平成30年度日本透析医会公募研究助成によって施行された。研究内容の一部、もしくはすべてを、第62回日本腎臓学会学術総会、第63回日本透析医学会学術集会総会、第54回日本補体学会学術集会、The 27th International complement workshop、The 9th Asia pacific chapter meeting of International Society for peritoneal dialysisにて発表した。現在(本報告書作成時点で)、本研究内容について学術雑誌に、原著論文として投稿する作業を進めており、二重投稿となることを避けるため、本報告書では概要を記載した。

利益相反

水野正司、小島博、鈴木康弘は、バクスター(株)

に支援いただいている名古屋大学大学院医学系研究科腎不全システム治療学寄附講座に所属している。ただし、本論文の研究内容については、バクスター(株)による直接介入はありません。

文 献

- 1) Mizuno M, Morgan BP : The possibilities and pitfalls for anti-complement therapies in inflammatory diseases. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2004; 3 : 85-94.
- 2) Mizuno M, Suzuki Y, Ito Y : Complement regulation and kidney diseases : recent knowledge of the double-edged roles of complement activation in nephrology. *Clin Exp Nephrol* 2018; 22 : 3-14.
- 3) Mizuno M, Ito Y, Mizuno T, et al. : Zymosan, but not LPS, developed severe and progressive peritoneal injuries accompanied with complement activation in peritoneal dialysate fluid in a rat peritonitis model with mechanical scraping. *J Immunol* 2009; 183 : 1403-1412.
- 4) Mizuno T, Mizuno M, Okada N, et al. : Specific collaboration between rat membrane complement regulators Crry and CD59 protects peritoneum from damage by autologous complement activation in peritoneal dialysate fluid. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26 : 1821-1830.
- 5) Mizuno M, Ito Y, Mizuno T, et al. : Membrane complement regulators protect against fibrin exudation in a severe peritoneal inflammation model in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012; 302 : F1245-F1251.
- 6) Sei Y, Mizuno M, Suzuki Y, et al. : Expression of membrane complement regulators, CD46, CD55 and CD59, in mesothelial cells of patients on peritoneal dialysis therapy. *Mol Immunol* 2015; 65 : 302-309.