

日本におけるC型肝炎ウイルス感染に伴う糸球体病変の臨床病理学的検討

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9220

日本におけるC型肝炎ウイルス感染に伴う 糸球体病変の臨床病理学的検討

金沢大学医学部医学科内科学第一講座 (主任: 小林健一教授)

大 田 聡

C型肝炎肝疾患患者連続100例の検尿所見および1132例の腎組織より得られたC型肝炎ウイルス (hepatitis C virus, HCV) 抗体陽性29例の腎組織 (生検例13例, 剖検例16例) について検討することにより, 日本における HCV 感染に伴う糸球体病変の特徴を明らかにした. HCV 抗体陽性連続100例中8例 (8%) が蛋白尿陽性を示し, このうち3例はインターフェロン療法に伴う一過性の蛋白尿であり, HCV 関連腎症は2例に認められた. また, 腎生検例中1.7%, 剖検例中15.7%が HCV 抗体陽性であった. これら HCV 抗体陽性例のうち5例はメサンギウム増殖性腎炎であり, 背景に慢性肝炎が認められた. また, 他の4例は膜性増殖性糸球体腎炎 (membranoproliferative glomerulonephritis, MPGN) の所見を呈し, いずれも中程度の蛋白尿および低補体血症を認めた. これら4例のうち3例は肝硬変を1例は慢性活動性肝炎を伴っていた. さらに, 10例に肝性糸球体硬化症を認め, これらはいずれも基礎に肝硬変を有していた. 4例にメサンギウム増殖を主体とした IgA 腎症を認めた. また, HCV 抗体陽性11例の腎組織について HCV コア領域に対するマウスモノクローナル抗体, HCV コアあるいはエンベロープ領域に対するウサギポリクローナル抗体を一次抗体とする間接蛍光抗体法により糸球体病変における HCV 関連抗原の局在を検討した. 11例中6例は HCV RNA 陽性で, 3例は HCV RNA 陰性, 2例は不明であった. HCV RNA 陽性6例中5例 (83.3%) に HCV コア抗原の糸球体係蹄壁にそった陽性所見を認め, HCV RNA 陰性あるいは不明の他の5例ではいずれも HCV コア抗原は陰性であった. エンベロープ抗原は全例において陰性であった. さらに免疫電子顕微鏡法による検討では HCV コア抗原が上皮下, 基底膜内あるいはメサンギウム領域の高電子密度沈着物に一致して認められた. また, 内皮下にクリオグロブリンに特徴的な細線維の沈着を4例に認めたが, 同部位への HCV 関連抗原の沈着は認めなかった. 以上より HCV 感染に伴う糸球体病変は HCV コア抗原を含む免疫複合体の沈着および内皮下へのクリオグロブリンの沈着により特徴付けられた. これらの HCV 関連腎症は, わが国においては比較的新まれであり, 臨床的にも肝疾患の進行に伴って見られる肝性糸球体硬化症あるいは他の一次性糸球体疾患と厳密に区別する必要があるものと思われる.

Key words hepatitis c virus, membranoproliferative glomerulonephritis, cryoglobulin

近年, C型肝炎ウイルス (hepatitis C virus, HCV) による慢性肝疾患患者においてクリオグロブリン血症を伴った膜性増殖性糸球体腎炎 (membranoproliferative glomerulonephritis, MPGN) の合併が注目されている^{1)~6)}. くわえて, 欧米においては本態性混合性クリオグロブリン血症 (essential mixed cryoglobulinemia, EMC) においてクリオグロブリンの産生と HCV 感染との密接な関連が報告されている^{8)~10)}. すなわち, 80%以上の EMC 患者に HCV 抗体が陽性であり, 寒冷沈降物中に血清の1000倍と高濃度の HCV RNA が検出されている. また, EMC および HCV 関連 MPGN に対しインターフェロン (interferon, IFN) 療法が有効との知見もあり, HCV 自体のかかるクリオグロブリン産生への関与が強く推測されている^{11)~13)}. しかし, HCV 感染に続発して認められる糸球体腎炎 (HCV 関連腎炎) における HCV 関連抗原の関与に関しては未だ明らかではない.

HCV 抗体陽性患者における EMC および HCV 関連腎炎の出現頻度には地域差があると考えられ, 南ヨーロッパにおいては比較的高頻度に認められる²⁰⁾. 一方, わが国において国民の約1.7%に HCV 抗体陽性を認めるが, EMC あるいは腎炎の合併の報告は少なく比較的稀と考えられている. しかし, これら合併の正確な頻度に関しては詳細な報告がない.

そこで, 今回著者は連続100例の HCV 抗体陽性例の蛋白尿・血尿の頻度ならびにその成因について検討するとともに, 過去5年間に得られた腎組織1132検体についてその HCV 抗体陽性率ならびに糸球体局所における HCV 関連抗原の局在について検討した.

対象および方法

I. HCV 抗体陽性連続100例における検尿所見

1993年4月より1994年3月に金沢大学第一内科へ入院した

平成8年3月6日受付, 平成8年5月16日受理

Abbreviations: Ag, antigen; AIN, acute interstitial nephritis; bp, base pair; bubble, bubble like appearance; CH, chronic hepatitis; DC, double contour; dUTP, deoxyuridine 5'-triphosphate; EMC, essential mixed cryoglobulinemia; F, female; FITC, fluorescein-isothiocyanate; HBV, hepatitis B virus; HCC, hepatocellular carcinoma; HCV, hepatitis C virus; hepatic GS, hepatic glomerulosclerosis; IF, immunofluorescent

HCV 抗体陽性患者連続100例 (男66例, 女34例, 年齢21歳から76歳, 平均年齢58歳) の検尿所見について検討した. 検尿はスクリーニングとしてマルチスティックス (マイルス・三共, 東京) を用い尿蛋白 1+ (アルブミン 30mg/dl) 以上の症例については沈渣所見ならびにピロガロールレッド法による尿蛋白定量を行った.

HCV 抗体の測定は第二世代酵素免疫法 (Abbott Laboratories, North Chicago, USA) により行った. 検尿異常例についてはその成因について臨床的に検討した.

II. HCV 抗体陽性29例の腎組織学的ならびに臨床的検討

1. 臨床的検討

1989年より1994年までに金沢大学第一内科ならびに関連施設において腎生検あるいは剖検により得られた腎組織1132例 (生検953例, 剖検89例) において, HCV 抗体陽性例は29例に認められ, うち生検例は16例, 剖検例は13例であった. この29例について以下の検討を行った.

1) 生化学, 血清学的検査

これら HCV 抗体陽性例 (男21例, 女8例, 年齢42歳から75歳, 平均年齢60歳) について検尿を施行するとともに, 血清クレアチンをクレアチニンアミドヒドロラーゼ法にて, 血清蛋白をビウレット法にて, 免疫グロブリン (IgG, IgA, IgM), 補体 (C3, C4) をレーザーネフェロメトリー法にて, 補体価 (CH50) をMayerの50%溶血法にて測定した. また, 9例について血清クリオグロブリンを寒冷沈澱法にて測定した.

2) HCV RNA の同定

8例について HCV RNA の同定を「アンプリコア HCV」(日本ロッシュ, 東京)²¹⁾ を使用し, 逆転写 PCR 法にて行った. すなわち, 血清 100 μ l を溶解試薬 400 μ l で処理し, ウイルスから RNA を放出させ, イソプロピルアルコールで沈殿させた. 沈澱をエタノールリンスし, 得られたペレットを検体希釈液 1ml に再溶解し, 50 μ l を PCR に用いた. 逆転写反応および PCR は逆転写および DNA ポリメラーゼ両酵素活性を合わせ持つ rTth DNA ポリメラーゼ, PCR バッファー, dATP, dCTP, dGTP, デオキシウリジン三リン酸 (deoxyuridine 5'-triphosphate, dUTP), およびプライマーとして HCV ゲノムの 5'非翻訳領域を標的としたビオチン化プライマー (5'-GCA-GAAAGCGTCTAGCCATGGCGT, 5'-Biotinyl-CTCGCAAGC-ACCCTATCAGGCAGT) を含んだ試薬を用いて行った. PCR 反応は40サイクル行った. 増幅 DNA はマイクロプレートハイブリダイゼーション法による非放射性抽出系²²⁾ を用いたキットで検出した. すなわち, ミクロウェルの底部にあらかじめ固相化した増幅 DNA 特異的な補足プローブで増幅 DNA を固定化し, アビジン-ペルオキシンダーゼコンジュゲートを加え, その5'端のビオチン分子と反応させ発色反応を行い, HCV RNA の有無を判定した.

2) ウイルス遺伝子型検査

さらに, 8例について Okamoto らの方法²³⁾ に従いウイルスの遺伝子型を決定した. 血清サンプルより酸-フェノール法により RNA を抽出した. 次に, HCV 遺伝子中のコア領域由来のプライマー [5'ATGTACCCCATGAGGTGGGC3';ヌクレオ

チド (nucleotide, nt) 391 to 410] を用い, モロニーマウス白血病ウイルス逆転写酵素 (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase) にて逆転写反応を行い, cDNA を合成し, PCR にて増幅反応を行った. すなわち, 抽出した RNA にプライマー, 10mM dGTP, 10mM dATP, 10mM dTTP, 10mM dCTP, 逆転写酵素, RNase インヒビター, 10xPCR バッファー, MgCl₂, 滅菌蒸留水を加え逆転写酵素反応を行った. 次に90 $^{\circ}$ C 1分間にて逆転写酵素を失活させた後, コア領域由来のプライマーを用いて合成 cDNA に対する鎖伸長反応を行った (1st PCR, 図 1). すなわち, 逆転写反応を終了させたチューブに AmpliTaq DNA ポリメラーゼ, 10xPCR バッファー, 25mM MgCl₂, 滅菌蒸留水を混合した後, 一次増幅として HCV コア領域に特異的なプライマーを加え PCR 反応を行った. PCR 反応は35サイクルを行った. その後二次増幅として型特異的なプライマーを用いて PCR 反応を30サイクル行った. PCR 産物は 2%アガロースゲルを用いた電気泳動を行った後, エチジウムブロマイドにより染色し, 塩基対 (base pair, bp) 数の確認を行い HCV 遺伝子型を決定した (図 1). 予想される PCR 産物のサイズはそれぞれ図 1 に示すごとくタイプ I が 49bp (nt 148-196), タイプ II が 144bp (nt 148-291), タイプ III が 174bp (nt 148-321), タイプ IV が 123bp (nt 148-270) で検出された.

2. 病理組織学的検討

1) 光学顕微鏡 (光顕) 観察

腎組織を10%リン酸緩衝ホルマリン (pH7.2) で固定後, 4 μ m のパラフィン切片とし, HE, 過ヨウ素酸シッフ染色 (periodic acid Schiff, PAS), 過ヨウ素酸メセナミン銀染色 (periodic acid silver methenamine, PAM) およびマロリーアザンの各染色を行なった. メサンギウム細胞および基質の増殖の程度は以下のようにスコア化した. 0, 微小変化; 1, 軽度のメサンギウム細胞および基質の増加; 2, 係蹄の末梢までおよぼメ

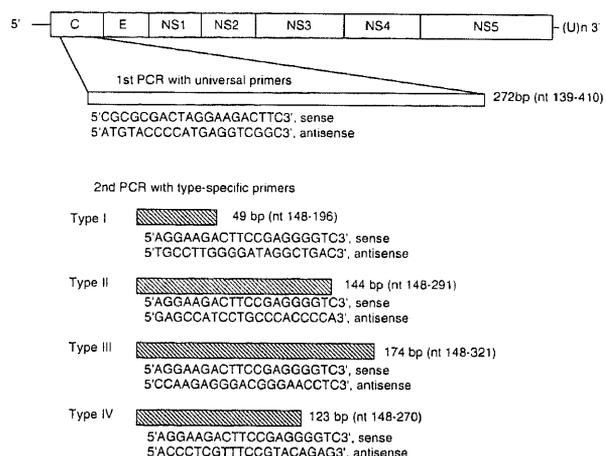


Fig. 1. Strategy for typing hepatitis C virus (HCV) by PCR with type-specific primers. The upper part of the figure shows the structure of HCV genome and amplified region by 1st PCR using core region specific primers. The lower part of the figure shows type specific primers used on 2nd PCR.

microscopy; IFN, interferon; IgAN, IgA nephropathy; LC, liver cirrhosis; M, male; MES, mesangial; mes-p, mesangial proliferation; MN, membranous nephropathy; mesPGN, mesangial proliferative glomerulonephritis; MPGN, membranoproliferative glomerulonephritis; nd, not done; NSRH, non-specific reactive hepatitis;

サンギウム細胞および基質の増加; 3, 係蹄腔の狭小化を伴う著明なメサンギウム細胞および基質の増加とした。さらに, 係蹄の二重化, 泡状病変, スパイク形成の有無について検討した。

2) 免疫蛍光抗体法

29例中25例より得た新鮮標本は, ドライアイス・アセトンで -70°C に冷却した n-ヘキサンにより凍結後, クリオスタット Tissue-Tek II システム (Miles, Naperville, USA) により $6\mu\text{m}$ に薄切した。ついで, イソシアニ酸フルオロセイン (fluorescein-isothiocyanate, FITC) 標識抗ヒト IgG (γ 鎖)・IgA (α 鎖)・IgM (μ 鎖) ヤギ IgG/F (ab')₂ 抗体および FITC 標識抗ヒト・C3-C1q ヤギ IgG 抗体 (Cappel, West Chester, USA) を用いた蛍光抗体直接法により観察した。

3) 電子顕微鏡 (電顕) 観察

29例中12例において腎組織標本の一部を, 2.5% グルタルアルデヒドおよび4% オスミウム酸により二重固定後, エポン (エポック812, 応研商事, 東京) に包埋した。これより, ウルトラ・マイクロトーム (LKB-III, Bromma, Sweden) にて $0.1\mu\text{m}$ の超薄切片を作製し, 酢酸ウラニルとクエン酸鉛で二重染色し, 電子顕微鏡 (日立 H1600 型, 日立, 東京) 下で観察した。

4) 糸球体における HCV 関連抗原の局在についての検討

i. 免疫蛍光抗体間接法

11例の HCV 抗体陽性糸球体腎炎患者について糸球体局所における HCV 関連抗原の局在を免疫蛍光抗体間接法により検討した。HCV ゲノム上のコア領域 330-818nt 由来のリコンビナント蛋白 (コア2抗原) およびエンベロープ領域 906-1481nt 由来のリコンビナント蛋白 (エンベロープ抗原) に対するウサギポリクローナル抗体²⁴⁾を一次抗体とし FITC 標識抗ウサギ IgG ヤギ IgG/F (ab')₂ 抗体 (Cappel) を二次抗体とした蛍光抗体間接法を行なった。加えて抗 HCV コア・マウスモノクローナル抗体 (No.1851, Viro stat, Portland, USA) により認識される抗原 [コア (mono) 抗原] の局在も同様に間接蛍光抗体法にて検出した。すなわち, 抗 HCV コア・マウスモノクローナル抗体を一次抗体とし, FITC 標識抗マウス IgG ウサギ IgG/F

(ab')₂ 抗体を二次抗体とした蛍光抗体間接法を行ない蛍光顕微鏡 (Zeiss, Oberkochen, Germany) 下で観察した。また, 抗体の特異性はウサギの免疫に使用した HCV コア2抗原で抗体を吸収し確認した。すなわち, コア2領域に対する抗体に $10\mu\text{g}$ のリコンビナントコアタンパク (コア2抗原) を加え, 37°C 2時間混和した後, $10,000\times\text{g}$ 1時間遠沈後の上清を回収しコントロールとした。

ii. 免疫電顕法

糸球体局所における HCV コア2抗原の局在について免疫電顕法 (前包埋法) にて観察した。腎組織新鮮標本を2-4%の過ヨウ素酸塩リジン・パラホルムアルデヒド溶液にて 4°C , 4時間固定後, 10%, 15%, 20% ショ糖溶液にそれぞれ4時間ずつ浸水し脱水を行ない, O. C. T コンパウンドに包埋後, ドライアイス・アセトンで -70°C に冷却した n-ヘキサンにより凍結し, ウルトラ・マイクロトームにより薄切した。アビジンおよび抗体の非特異的な結合をブロックする目的で凍結切片をアビジン/ビオチン・ブロッキング溶液, 正常ヤギ血清にて処理した。その後抗 HCV コア2ウサギポリクローナル抗体を 4°C にて一晚反応させ, ビオチン化ヤギ抗ウサギ IgG 抗体およびアルカリフォスファターゼ標識アビジン・ビオチン複合体 (Vectastatin ABC-AP kit, AK-5002, Vector Laboratories, California, USA) を反応させた。さらに, アルカリフォスファターゼ基質キット (SK-5002) にて発色後, 1% 四酸化オスミウムにて固定, アルコールにて脱水後 Epok 812 に包埋し, $0.1\mu\text{m}$ に薄切後, 電子顕微鏡 (日立-H1600, 日立) にて観察した。

III. 統計処理

各群間の比較は対応のない t-検定ならびに χ^2 -検定で行った。数値は平均±標準誤差で示した。

成 績

I. C型慢性肝疾患患者連続100例における検尿異常

100例の内訳は肝硬変55例, 慢性肝炎38例, 非特異的肝炎 (non-specific reactive hepatitis, NSRH) 3例, 不明4例であっ

Table 1. Laboratory findings of proteinuria-positive patients with chronic HCV infection in 100 consecutive patients

Case no.	Sex	Age (years)	Liver pathology	IFN administration	u-prot		u-OB ^{c)}	TP (g/dl)	Cr (mg/dl)	C3 (mg/dl)	C4 (mg/dl)	CH50 (U/ml)	IgA (mg/dl)	Etiology of proteinuria
					Multi-stics ^{a)} test	Pyrogallol red test ^{b)} (g/day)								
1	F	40	CH	β -IFN	+	1.5	-	8.5	0.6	86	23	34	236	IFN
2	F	40	CH	β -IFN	+	2.6	-	6.7	0.6	72	19	36	301	IFN
3	F	33	CH	β -IFN	+	nd	-	8.3	0.6	nd	nd	nd	92	IFN
4	M	62	LC+HCC	nd	#	2.0	+	8.2	1.5	72	19	49	479	Diabetic nephropathy
5	M	63	LC+HCC	nd	#	nd	+	8.6	10.2	54	30	35	148	mesPGN
6	M	62	LC+HCC	nd	+	0.8	-	6.7	1.1	nd	nd	nd	nd	Hepatic GS
7	M	75	LC+HCC	nd	+	0.5	#	5.9	1.9	41	15	nd	433	MPGN type III
8	M	47	NSRH	nd	+	0.7	±	7.1	0.9	nd	nd	nd	233	Unknown

HCV, hepatitis C virus; M, male; F, female; CH, chronic hepatitis; LC, liver cirrhosis; HCC, hepatocellular carcinoma; NSRH, nonspecific reactive hepatitis; IFN, interferon; nd, not done; u-prot, urinary protein; u-OB, urinary occult blood; TP, total protein; mesPGN, mesangial proliferative glomerulonephritis; hepatic GS, hepatic glomerulosclerosis; MPGN, membranoproliferative glomerulonephritis.

a) Test for qualitative analysis of urinary protein. +, 30 mg/dl; #, 100 mg/dl; ##, 300 mg/dl of albumin.

b) Test for quantitative analysis of urinary protein.

c) Test for qualitative analysis of urinary occult blood. -, negative; ±, pseudopositive; +, weakly positive; #, moderately positive.

nt, nucleotide; PAM, periodic acid silver methenamine; PAS, periodic acid Schiff; SEP, subepithelial; SEN, subendothelial; spike, spike formation; TP, total protein; u-prot, urinary protein; u-OB, urinary occult blood; 光顕, 光学顕微鏡; 電顕, 電子顕微鏡

た。検尿上、定性にて1+ (アルブミン 30mg/dl) 以上の蛋白尿を認めた症例は8例で、このうち2例は血尿を伴っていた。さらに1例で血尿のみが認められた。8例の臨床データを表1に示す。症例1, 2, 3の3例はβ型 IFN の投与後に一過性の蛋白尿を認めた症例であり、いずれも投与中止後、蛋白尿は改善した。症例5, 7のみ剖検により組織学的診断が得られ、症例5は血液透析施行中であり臨床的には持続的な蛋白尿および血尿を認め、メサンギウム増殖性糸球体腎炎 (mesangial proliferative glomerulonephritis, mesPGN) であった。症例7はMPGN III型で低補体血症も認めた。症例4については十数年にわたる糖尿病歴と糖尿病性網膜症の存在より糖尿病性腎症と考えられた。症例6、については1g/日以下の蛋白尿であり尿沈渣所見上、活動性の腎炎を示唆する所見はなく背景に肝硬変が存在することから肝性糸球体硬化症と診断した。NSRHの症例8については蛋白尿の成因を特定し得なかった。以上よりHCV抗体陽性肝疾患100例中HCV関連腎症合併例と考えられた症例は症例5および症例7の2例(2%)であった。

II. HCV 抗体陽性29例の臨床病理学的検討

1. 臨床病理学的検討

過去5年間の腎生検953例中HCV抗体陽性例は16例(1.7%)であり、これは、広島県での一般供血者のHCV抗体陽性率(78,318例中1324例, 1.7%)と有意差がなかった。また、953例中MPGNは12例認められ、そのうちHCV抗体陽性例は4例(33.3%)であり、一般供血者(chi-square, 78299.0, $p < 0.001$)および腎生検例(chi-square, 935.6, $p < 0.0001$)に比してMPGNにおいて有意に高率であることが判明した。29例の臨床検査所見を表2に、腎組織所見を表3に示す。5例は非IgAメサンギウム増殖性腎炎を呈し、いずれも慢性肝炎を基礎としており、平均年齢は49.4歳であった。4例はメサンギウム細胞および基質の増生に加え係蹄の肥厚、二重化像を認めMPGNと考えられ(表3, 図2)、うち3例に上皮下を主体とし、一部内皮下からメサンギウム領域にかけての高電子密度沈着物を認め、MPGN III型と診断した。他の1例は内皮下を中心とした高電子密度沈着物を認めMPGN I型と診断した。これら4例は平均年齢61.8歳であり、背景にある肝病変の状態は肝硬変へと進行し、いずれも低補体血症を伴っていたが、クリオグロブリンはいずれも陰性であった(表2, 3)。10例は軽度から中等度のメサンギウム基質の増加を主体とし、全例肝硬変の状態であったこととあわせて肝性糸球体硬化症と考えられた。血清IgAは10例中5例で上昇しており免疫蛍光抗体法で評価しえた7例全例にメサンギウム領域へのIgA沈着を認めた。この群の平均年齢は66.8歳と最も高かった。また、4例はIgA優位のメサンギウム沈着とメサンギウム細胞の増殖を主体とし、肝病変も進展していないことから原発性のIgA腎症と診断した。また、電顕観察を行った12例中4例に幅15から20nmの細線維沈着を内皮下に認め、クリオグロブリン沈着と考えられた。(図3, 表4)。

2. HCV 抗原の糸球体内局在についての検討

糸球体内HCV関連抗原の局在は、HCV抗体およびHCV RNA陽性6例中5例(83.3%)にHCVコア(mono)あるいはコア2抗原がIgG沈着と一致して糸球体係蹄壁に沿って観察された(表4)。しかし、HCV抗体陽性でHCV RNA陰性あるいは不明例では全例HCVコア(mono)あるいはコア2抗原は陰性であった。その局在を分類するとMPGN3例中2例において上皮下あるいは基底膜内にHCVコア(mono)あるいはコア2

Table 2. Laboratory findings in 29 patients with chronic HCV infection

Renal pathology of patients with chronic HCV infection	No. of patients	Age (years, $\bar{x} \pm \text{SEM}$)	No. of patients with			Proteinuria (g/day, $\bar{x} \pm \text{SEM}$)	Serum creatinine (mg/dl, $\bar{x} \pm \text{SEM}$)	Total protein (g/dl, $\bar{x} \pm \text{SEM}$)	No. (%) of patients with elevated s-IgA hypocomplementemia	No. of patients		
			LC	CH	Other					Tested for Cryo	Positive for Cryo	
mesPGN	5	49.4 ± 3.7	0	4	1	1.3 ± 0.3	0.8 ± 0.02	6.7 ± 0.4	1 (25)	2 (40)	4	0
MPGN	4	61.8 ± 5.1	3	1	0	1.7 ± 0.3	1.5 ± 0.5	6.0 ± 0.4	3 (75)	4 (100)	3	0
Hepatic GS	10	66.8 ± 2.1	10	0	0	0.4 ± 0.3	1.0 ± 0.1	7.2 ± 0.2	5 (50)	6 (60)	0	0
IgA nephropathy	4	57.3 ± 5.7	0	3	1	1.6 ± 0.9	1.1 ± 0.3	6.6 ± 0.4	4 (100)	2 (50)	2	0
Diabetic nephropathy	4	57.3 ± 7.2	2	1	1	nd	1.5 ± 0.2	6.3 ± 0.9	0 (0)	1 (25)	0	0
AIN	1	47	0	1	1	nd	1	7.7	1 (100)	0 (0)	0	0
Sclerosing glomerulopathy	1	64	1	0	0	0.5	10.2	8.6	0 (0)	0 (0)	0	0

HCV, hepatitis C virus; mesPGN, mesangial proliferative glomerulonephritis; hepatic GS, hepatic glomerulosclerosis; AIN, acute interstitial nephritis; No., number; LC, liver cirrhosis; CH, chronic hepatitis; s-IgA, serum IgA; Cryo, cryoglobulin.

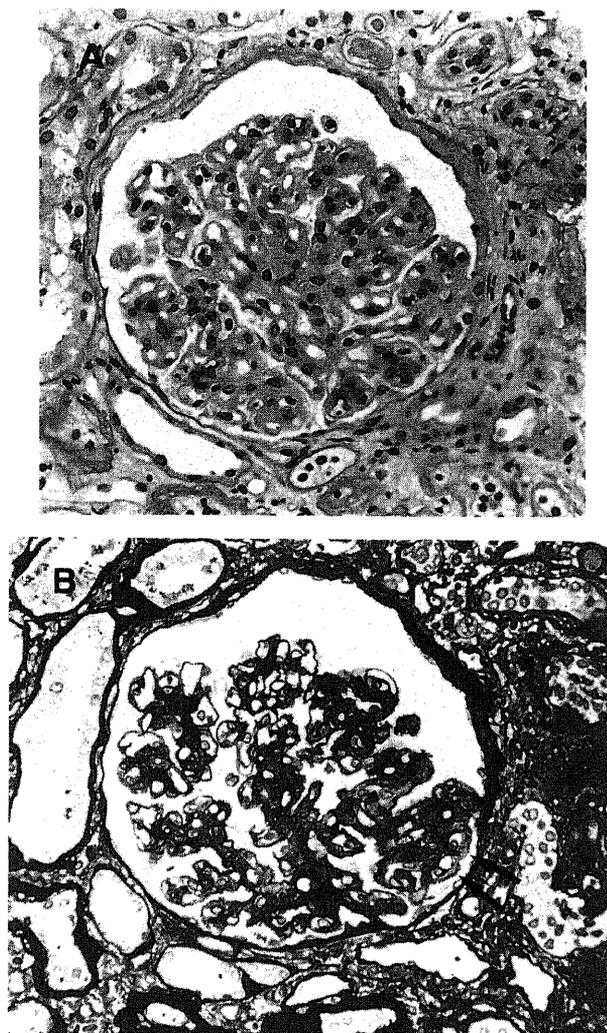


Fig. 2. Light microscopic findings in a representative patient with HCV related MPGN. (A) The glomeruli show marked mesangial cell proliferation, lobulation and thickening of the capillary walls (PAS, original magnification $\times 400$). (B) The capillary wall shows a double contour appearance (PAM, original magnification $\times 400$).

抗原の沈着が認められた (図 4). また, IgA 腎症 1 例を含む mesPGN6 例中 3 例において内皮下あるいはメサンギウム領域に電顕上高電子密度沈着物を認め, 蛍光抗体法にて IgG の沈着部位に一致してコア (mono) あるいはコア 2 抗原の沈着が認められた. また, コア 2 抗原とコア (mono) 抗原は同一組織切片上において糸球体内局在はほぼ一致して認められた. 免疫電顕法による観察では基底膜内あるいはメサンギウム領域の高電子密度沈着物に一致して HCV コア 2 抗原の局在が確認された (図 5). なお, 内皮下に細線維沈着を認めた部位には HCV 関連抗原の沈着は証明できなかった. また, エンベロープ抗原に関しては全例陰性であった.

3. HCV 遺伝子型の検討

HCV RNA 陽性 6 例の遺伝子型の検討では, 3 例は II 型, 2 例は III 型, 1 例は IV 型であり HCV 関連抗原の沈着との間に特定の関係を認めなかった (表 4).

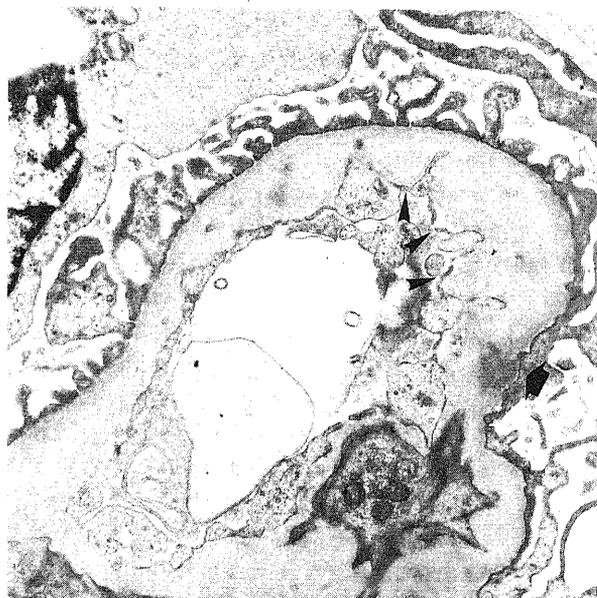


Fig. 3. Electron microscopy of glomeruli in the same case as fig. 2. Fibrillar deposits in the subendothelial space (arrow heads) and electron-dense deposits (arrow) in the glomerular basement membrane are observed (original magnification $\times 8000$).

Table 3. Histopathological findings in 29 patients with chronic HCV infection

Renal pathology of patients with chronic HCV infection	No. of cases	Mes-p score ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	Positive rate (%)			Positive rate (%) by IF				
			DC	Bubble	Spike	IgG	IgA	IgM	$\beta 1c$	C1q
mesPGN	5	1.0 \pm 0.0	0	0	0	75	0	75	25	25
MPGN	4	1.9 \pm 0.1	100	75	75	100	100	100	100	75
Hepatic GS	10	1.1 \pm 0.1	60	20	0	33	100	67	33	33
IgA nephropathy	4	1.5 \pm 0.3	0	0	0	0	100	25	75	0
Diabetic nephropathy	4	2.3 \pm 0.6	25	0	0	100	0	50	25	25
AIN	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sclerosing glomerulopathy	1	1	0	0	0	0	100	100	0	100

HCV, hepatitis C virus; mesPGN, mesangial proliferative glomerulonephritis; MPGN, membranoproliferative glomerulonephritis; hepatic GS, hepatic glomerulosclerosis; AIN, acute interstitial nephritis; N o., number; mes-p score, mesangial proliferation score, minor 0, mild 1, moderate 2, severe 3; DC, double contour; Bubble, bubble like appearance; Spike, spike formation; IF, immunofluorescent microscopy.

Table 4. Glomerular localization of HCV related antigens

Patient no.	Presence of electron dense deposits			Detection of fibrillar deposits	Detection of HCV-related antigen ^{b)}			HCV genotype
	SEP	SEN	MES		Core 2	Core (mono)	Envelope	
1	+	-	-	+	+	+	-	II
2	+	+	-	-	+	+	-	III
3	nd	nd	nd	nd	nd	+	nd	II
4	-	-	-	+	-	nd	-	III
5	-	+	+	-	nd	+	nd	IV
6	-	+	+	-	+	+	nd	II
7	-	+	-	-	-	-	nd	nd
8	-	-	+	+	-	nd	nd	nd
9	-	-	+	+	-	-	nd	-
10	+	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	+	-	-	-	-	-

HCV, hepatitis C virus ; SEP, subepithelial ; SEN, subendothelial ; MES, mesangial ; nd, not done ; +, present ; -, absent.

a) Glomerular localization of deposits or HCV related antigen.

b) Core 2, core (mono) and envelope antigens were detected by the indirect immunofluorescence methods with anti-core 2 rabbit polyclonal antibody, anti-core mouse monoclonal antibody and anti-envelope rabbit polyclonal antibody, respectively.

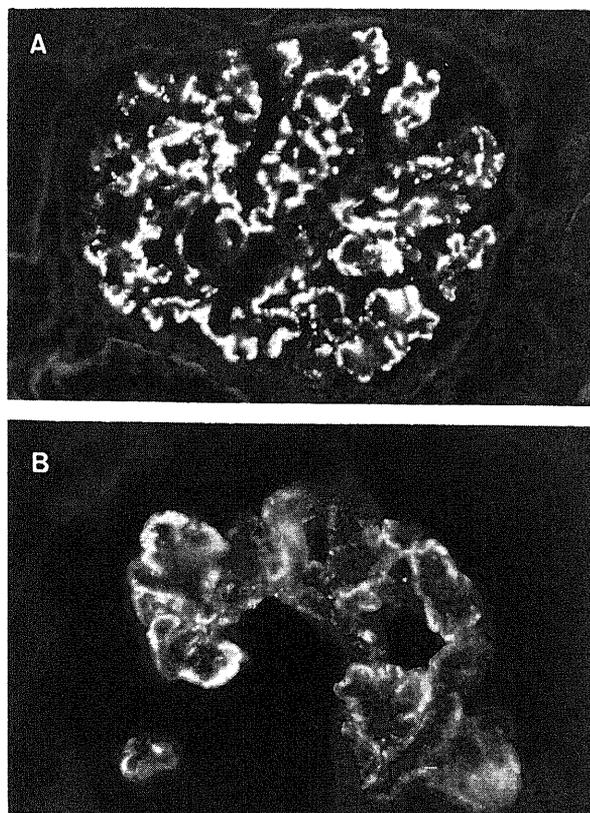


Fig. 4. Immunofluorescent microscopy in a representative patient with HCV related MPGN. (A) IgG is detected along the capillary walls. (B) Indirect immunofluorescent microscopy using rabbit polyclonal antibody to the HCV core2 antigen shows deposition of the HCV core antigen along the capillary walls (original magnification $\times 400$).

考 察

慢性肝疾患に伴う糸球体疾患として、これまでB型肝炎ウイルス (hepatitis B virus, HBV) 感染において小児では膜性腎症 (membranous nephropathy, MN) が⁵, 成人ではMPGNが合併

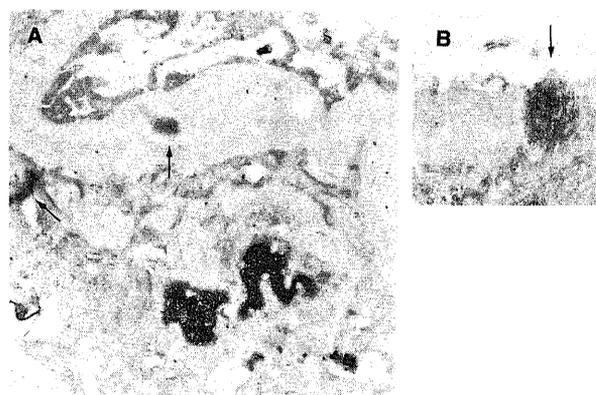


Fig. 5. Immunoelectron microscopy shows the HCV core2 antigen on the intramembranous and mesangial electron-dense deposits. (A) Original magnification $\times 3000$. (B) Original magnification $\times 5000$.

することはよく知られている^{25)~27)}. また、肝疾患の成因のいかににかかわらず進行した肝硬変においては肝性糸球体硬化症の合併が認められる²⁷⁾²⁸⁾. 近年 HCV 感染においても欧米を中心にMPGNの合併が報告されている¹⁾²⁾³⁰⁾³¹⁾. しかし、わが国において HCV 関連腎症の正確な発症頻度は未だ不明であった. 今回の検討において HCV 抗体陽性100例中9例に血尿あるいは蛋白尿を認めたが、HCV 関連腎症と考えられる症例はわずか2例(2%)にすぎないことが判明した. 一方、MPGNでは他の糸球体疾患患者および一般供血者に比較して HCV 抗体陽性率が有意に高値であったことより、欧米諸国と同様わが国においてもMPGNの病因として HCV 感染は重要であると考えられた.

ところで、HCV 関連MPGNの病因としてこれまで HCV 関連抗原および抗 HCV 抗体を含む免疫複合体とクリオグロブリンが深く関与していると考えられてきた. これまで、Horikoshi らが HCV 関連腎症患者のメサンギウム領域の高電子密度沈着物中にウイルス様粒子を認めたと報告しているが³⁾, 糸球体局所において HCV 関連抗原の沈着を証明した報告はほとんどなく、わずかに、Ohmuro らが、マウス・モノク

ローナル抗体を用いた間接蛍光抗体法により肝性糸球体硬化症および糖尿病性腎症によるネフローゼ患者の糸球体係蹄壁にそって HCV 関連抗原の局在を示している。しかし、Ohmuro らの抗体はその認識部位がどの抗原であるか明らかにされていない³²⁾。今回の検討では、HCV RNA 陽性の MPGN あるいは mesPGN 例の高電子密度沈着物中にコア抗原〔コア 2 抗原あるいはコア (mono) 抗原〕が検出されたが、エンベロープ抗原は検出されなかった。この事実より HCV 関連腎症の糸球体局所においては HCV のウイルス粒子そのものではなく、その一部の抗原 (コア抗原) と抗体との免疫複合体沈着が生じているものと推測される。ところで、同様の現象は HBV 腎症においても観察されている。一般にサイズが小さく陽性荷電を有する免疫複合体は陰性荷電を有する糸球体上皮下に沈着しやすいとされており³³⁾、HBV 腎症に關与する HBe 抗原ならびに IgG クラス抗体よりなる免疫複合体の分子量もそれぞれ 15,000Da, 240,000Da と比較的小さく、さらに、HBe 抗原を含む免疫複合体は陽性荷電を有するため流血中で形成されたこれらの複合体は糸球体基底膜を通過し上皮下に沈着すると考えられている²⁷⁾。HCV コア抗原の分子量は 22,000Da³³⁾ と HBe 抗原のそれと近似しており、HBV 腎症における HBe 抗原および IgG を含む免疫複合体と同様に HCV 関連腎症においても HCV コア抗原および IgG を含む免疫複合体が係蹄壁に沈着したものと推測された。また、HCV コア抗原および IgG がメサンギウム領域にも認められたが、HBV 腎症においても HBe 抗原および IgG の沈着がメサンギウム領域に確認されており³⁴⁾、生成された免疫複合体のサイズが抗原・抗体比によって異なってくることが考えられ、実験腎炎で知られるごとく大きな免疫複合体はメサンギウム領域を中心に沈着することが推測された³⁵⁾³⁶⁾。以上より HCV 関連腎症における係蹄ならびにメサンギウム病変の一部は HCV コア抗原および IgG よりなる免疫複合体が糸球体上皮下あるいは内皮下、メサンギウム領域に沈着することにより惹起されるものと考えられた。今後コア抗原を含む免疫複合体の分子量ならびに荷電状態を明らかにすることにより、さらに沈着のメカニズムが解明されると思われる。

今回内皮下のクリオグロブリンと考えられる細線維沈着が 4 例において認められたが、いずれの症例においても血清中においてはクリオグロブリンは検出されなかった。Johnson らはクリオグロブリンと考えられる糸球体内細線維沈着を認めた 31 例の HCV 関連 MPGN 中 13 例 (41%) にクリオグロブリン血症を認めなかったと報告しており¹⁹⁾、血清のクリオグロブリンのレベルが低すぎるために検出できなかった可能性が考えられる。また、Sansanno らは血清のクリオグロブリン量と血管炎の程度とは組織学的に相関しないと報告しており³⁷⁾、今回の検討からもクリオグロブリンは血清中に検出されずとも HCV 関連腎症の病因として重要であると考えられる。

ところで、今回内皮下の細線維沈着の部位には HCV 関連抗原が検出できなかったが、クリオグロブリンによる内皮下病変には HCV 関連抗原自体が関与しない可能性、あるいは抗原上のエピトープが特異抗体によりマスクされていた可能性が考えられる。この点、HCV 感染により IgM 型リウマチ因子であるクリオグロブリンが惹起される機序は明らかではないが、Schifferli らはリウマチ因子は抗原曝露をうけていない初期のリンパ球により産生され、その弱い抗原親和性よりおそらく CD5 陽性 B リンパ球由来のものであろうと推測しており、

HCV 関連抗原がかかるクリオグロブリンの産生に直接関与していない可能性を支持している³⁸⁾。一方、Sansanno らは酸電氣抽出法により HCV 抗原上のエピトープを露出させることにより皮膚および肝組織における HCV 関連抗原の免疫組織化学的検出感度を上昇しようと報告している³⁹⁾。今回の検討では酸電氣抽出法等の補助的な手技を用いずとも HCV 関連抗原を糸球体高電子密度沈着物中に検出することが可能であったが、クリオグロブリン沈着部位の HCV 関連抗原を検出する際に試みるべき方法と考えられた。また、今回は HCV コア抗原の検出にポリクローナルおよびモノクローナルな 2 種類の抗体をもちいた。その理由として、ポリクローナル抗体は抗原との親和性が高く、高感度という点では優れているが、検出の対象とする抗原以外の物質と非特異的な交叉反応を起こすおそれがある。一方、モノクローナル抗体は親和性ではポリクローナル抗体より劣るが交叉反応を示すことはなく特異性において優れている。今回の検討ではいずれの抗体を用いてもほぼ同様の結果が確認され、ポリクローナル抗体の特異性という点においても問題がないものと考えられた。今後は組織内ハイブリダイゼーションあるいは、糸球体よりの免疫複合体の抽出を行うことにより糸球体内の HCV 自体の局在や糸球体病変への HCV 関連抗原の関与についてより詳細な情報が得られるものと思われる。

HCV 関連腎症の治療法に関しては未だ確立されたものはないが、IFN 療法により HCV RNA の陰性化とともに肝機能および蛋白尿の改善する例が報告されている¹⁹⁾²⁰⁾³⁹⁾。今回の検討では HCV 抗体陽性腎組織において最も高頻度に認められた病変は肝性糸球体硬化症であった。また、基礎に HCV の関与しない主として IgA 腎症よりなるメサンギウム増殖性腎炎を認め、IFN 療法により一過性に蛋白尿あるいは腎機能障害を伴う例も認められた。一方、HCV 関連腎症はウイルスの増殖状態ならびに肝疾患の状態によりその臨床病理像が変遷する可能性が示された。すなわち、初期にはメサンギウム増殖性糸球体腎炎の像を主体とし、肝病変の進展とともに血中のウイルス量ならびに免疫複合体量が増加し³⁹⁾、それに伴いさまざまなサイズの免疫複合体が形成され、係蹄病変が加わってくるものと推測された。さらに肝硬変へと進展するに伴い従来より報告されている肝性糸球体硬化症としての病像が加わってくるものと考えられた。目下のところ臨床的には低補体血症を呈し、組織学的に内皮下への細線維沈着および HCV コア抗原、IgG よりなる免疫複合体の沈着により特徴付けられる MPGN を狭義の HCV 関連腎症と考え、これを対象に治療法を選択すべきと考えられた。よって、C 型慢性肝疾患患者において血尿、蛋白尿が認められた場合、組織学的検討も含めてこれらの病変を鑑別し、IFN 療法をはじめとする各種治療の適応を決定する必要があるものと思われる。

結 論

HCV 感染に伴う糸球体病変について臨床病理学的検討を行い、以下の成績を得た。

1. HCV 抗体陽性 100 例中 8 例 (8%) に蛋白尿を認め、うち 3 例は IFN 投与による一過性蛋白尿であり、2 例 (2%) に HCV 関連腎症を認めた。

2. 生検 953 例中 16 例 (1.7%) に HCV 抗体陽性を認め、うち MPGN では 12 例中 4 例 33.3% と有意に高率であった ($\chi^2=935.6$, $p<0.0001$)。

3. HCV 陽性29例の腎組織学的検討より, メサンギウム増殖性糸球体腎炎を5例(17%)に, MPGNを4例(14%)に, 肝性糸球体硬化症を10例(34%)に認めた. さらに1次性あるいは2次性疾患であるIgA腎症, 糖尿病性腎症の合併が認められた.

4. 糸球体係蹄に沿って上皮下を主体とする免疫複合体沈着部位に一致したHCVコア抗原ならびにIgGの沈着および内皮下へのクリオグロブリンと考えられる細線維沈着を認めた.

以上より, HCV感染に伴う糸球体病変はHCVコア抗原およびIgGよりなる免疫複合体の沈着および内皮下へのクリオグロブリンの沈着により特徴付けられ, かかるHCV関連腎症はわが国においては希な病変であり, 肝疾患の進行に伴って生じる肝性糸球体硬化症および一次性糸球体疾患の合併と治療上からも厳密に区別する必要があるものと考えられた.

謝 辞

稿を終えるに臨み, ご指導と御検閲を賜りました恩師小林健一教授に深甚なる謝意を捧げるとともに, 直接の御指導・御教授を賜りました金沢大学医学部附属病院血液浄化療法部横山 仁助教授に深謝致します. また, HCVコアおよびエンベロープ領域に対するポリクローナル抗体を御供与下さいました国立ガンセンター下遠野邦忠先生, 東京大学野本明男先生に感謝致します. さらに本研究に多大の御協力を賜りました金沢大学第一内科第3研究室の諸先生方ならびに研究助手の方々に感謝致します. 本論文の要旨は第37回日本腎臓学会総会(1994年12月, 於幕張)および第13回国際腎臓学会(1995年7月, 於マドリード)において発表された.

文 献

- Johnson, R. J., Gretch, D. R., Yamabe, H., Hart, J., Bacchi, G. E., Hertwell, P., Couser, W. G., Corey, L., Wener, M. H., Alpers, C. E. & Willson, R.: Membranoproliferative glomerulonephritis associated with hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.*, **328**, 465-470 (1993).
- Pasquariello, A., Ferri C., Moriconi, L., Civita, L. L., Longombardo, G., Lombardini, F., Greco, F. & Zignego, A. L.: Cryoglobulinemic membranoproliferative glomerulonephritis associated with hepatitis C virus. *Am. J. Nephrol.*, **13**, 300-304 (1993).
- Horikoshi, S., Okada, T., Shirato, I., Inokuchi, S., Ohmuro, H., Tomino, Y. & Koide, H.: Diffuse proliferative glomerulonephritis with hepatitis C virus-like particles in paramesangial dense deposits in a case with chronic hepatitis C virus hepatitis. *Nephron*, **64**, 462-464 (1993).
- Gonzalo, A., Barcena, R., Mampaso, F., Zea, A. & Ortuno, J.: Membranoproliferative glomerulonephritis and hepatitis C virus infection. *Nephron*, **63**, 475-476 (1993).
- Johnson, R. J., Wilson, R., Yamabe, H., Couser, W., Alpers, C., Wener, M. H., Davis, C. & Gretch, D. R.: Renal manifestation of hepatitis C virus infection. *Kidney Int.*, **46**, 1255-1263 (1994).
- Bloch, K. J.: Cryoglobulinemia and hepatitis C virus. *N. Engl. J. Med.*, **327**, 1521-1522 (1992).
- Casato, M., Taliani, G., Pucillo, L. P., Goffredo, F., Lagana, B. & Bonomo, L.: Cryoglobulinemia and hepatitis C virus. *Lancet*, **ii**, 1047-1048 (1991).
- Misiani, R., Bellativa, P., Fenili, D., Boreli, G., Marchesi, D., Massazza, M., Vendramin, G., Comotti, B., Tanzi, E. & Scudeller, G.: Hepatitis C virus in patients with essential mixed cryoglobulinemia. *Ann. Intern. Med.*, **117**, 573-577 (1992).
- Appel, G. B.: Immune-complex glomerulonephritis-deposits plus interest. *N. Engl. J. Med.*, **328**, 505-506 (1993).
- L'abbate, A., Cutrupi, S., Rognetta, M., Fabiano, C. & Craxi, A.: IgM and IgG antibodies to hepatitis C virus in patients with mixed cryoglobulinemia. *Clin. Exp. Immunol.*, **94**, 313-316 (1993).
- Durand, J. M., Lefevre, P., Harle, L. R., Boucrat, J., Vitvitski, L. & Soubeyrand, J.: Cutaneous vasculitis and cryoglobulinemia type II associated with hepatitis C virus. *Lancet*, **ii**, 499-500 (1991).
- Marcellin, P., Descamps, V., Martini-Peignoux, M., Larzul, D., Xu, L., Boyer, N., Pham, B., Crickx, B., Guillemin, L., Belaich, S., Erlinger, S. & Benhamou, J.: Cryoglobulinemia with vasculitis associated with hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*, **104**, 272-277 (1993).
- Ferri, G., Greco, F., Longombardo, G., Palla, P., Moretti, A., Marzo, E., Fosella, P. V., Pasero, G. & Bombardieri, S.: Antibodies to hepatitis C virus in patients with mixed cryoglobulinemia. *Arthritis Rheumatism*, **34**, 1606-1610 (1991).
- Pechere-Bertschi, A., Perrin, L., Saussyre, P., Widmann, J. J., Diostra, E. & Schifferli, J. A.: Hepatitis C: a possible etiology for cryoglobulinemia type II. *Clin. Exp. Immunol.*, **89**, 419-422 (1992).
- Galli, M., Monti, G., Monteverde, A., Invernizzi, F., Pietrogrande, M., Girolamo, M., Mazzaro, C., Migriaresi, S., Mussini, C., Ossi, E. & Renoldi, P.: Hepatitis C virus and mixed cryoglobulinemias. *Lancet*, **ii**, 989 (1992).
- Agnello, V., Chung, R. T. & Kaplan, L. M.: A role for hepatitis C virus infection in type II cryoglobulinemia. *N. Engl. J. Med.*, **327**, 1490-1495 (1992).
- D'Amico, G.: Hepatitis C virus and essential mixed cryoglobulinemia. *Nephrol. Dial. Transplant.*, **8**, 579-581 (1993).
- Johnson, R. J., Gretch, D. R., Couser, W. G., Alpers, C. E., Wilson, J., Chung, M., Hart, J. & Willson, R.: Hepatitis C virus-associated glomerulonephritis. Effect of α -interferon therapy. *Kidney Int.*, **46**, 1700-1704 (1994).
- Yamabe, H., Johnson, R. J., Gretch, D. R., Osawa, H., Inuma, H., Sasaki, T., Kaizuka, M., Tamura, N., Tsunoda, S., Fujita, Y., Sato, A. & Onodera, K.: Membranoproliferative glomerulonephritis associated with hepatitis C virus infection responsive to interferon- α . *Am. J. Kidney Dis.*, **25**, 67-69 (1995).
- Giuseppe, D. & Alessandro, F.: Cryoglobulinemic glomerulonephritis: a membranoproliferative glomerulonephritis induced by hepatitis C virus. *Am. J. Kidney Dis.*, **25**, 361-369 (1995).
- 白鳥康史, 横須賀 収, 佐田通夫, 林 紀夫, 小俣政男: PCR アッセイキットによる HCV-RNA の検出. 肝臓, **35**, 100-103 (1994).

- 30, 229-234 (1995).
- 22) **Joeffekholz, M. J., Lewinski, C. A., Silver, S. R., Purohit, A. P., Herman, S. A., Buonagurio, D. A. & Dragon, E. A.**: Detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical specimens by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 2847-2851 (1992).
- 23) **Okamoto, H., Sugiyama, Y., Okada, S., Kurai, K., Akahane, Y., Sugai, Y., Tanaka, T., Sato, K., Tsuda, F., Miyakawa, Y. & Mayumi, M.**: Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: Application to clinical surveys and tracing infectious sources. *J. Gen. Virol.*, **73**, 673-679 (1992).
- 24) **Muraiso, K., Hijikata, M. & Ohkoshi, S.**: A structural protein of hepatitis C virus expressed in *E. coli* facilitates accurate detection of hepatitis C virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **172**, 511-516 (1990).
- 25) **Lai, K. N. & Lai, F. M.**: Clinical features and the natural course of hepatitis B virus-related glomerulopathy in adult. *Kidney Int.*, **40**, S40-S45 (1991).
- 26) **Takekoshi, Y., Tochimaru, H., Nagata, Y. & Itami, N.**: Immunopathogenetic mechanisms of hepatitis B virus-related glomerulopathy. *Kidney Int.*, **40**, S34-S39 (1991).
- 27) **Johnson, R. J. & Couser, W. G.**: Hepatitis B infection and renal disease: Clinical, immunopathogenesis and therapeutic considerations. *Kidney Int.*, **37**, 663-676 (1990).
- 28) **Nakamoto, Y., Iida, H., Kobayashi, K., Dohi, K., Kida, H., Hattori, N. & Takeuchi, J.**: Hepatic glomerulonephritis: Characteristics of IgA glomerulonephritis as the major part. *Virchows Arch. (Pathol. anat.)*, **392**, 45-54 (1981).
- 29) **Iida, H., Nakamoto, Y., Kobayashi, K., Dohi, K., Hattori, N. & Takeuchi, J.**: Hepatic glomerulonephritis: Role of hepatitis B antigen (HBsAg). *Virchows Arch. (Pathol. anat.)*, **392**, 55-62 (1981).
- 30) **Rollino, O., Roccatello, D., Giachino, O., Basolo, B. & Piccoli, G.**: Hepatitis C virus infection and membranous glomerulonephritis. *Nephron*, **59**, 319-320 (1991).
- 31) **Davda, R., Peterson, J., Weiner, R., Croker, B. & Lau, J. Y.**: Membranous glomerulonephritis in association with hepatitis C virus infection. *Am. J. Kidney Dis.*, **22**, 452-455 (1993).
- 32) **Ohmuro, H., Tomino, Y., Horikoshi, S., Shirato, I., Inokuchi, S. & Koide, H.**: A case of nephrotic syndrome associated with hepatic glomerulosclerosis and diabetic nephropathy. *Jpn. J. Nephrol.*, **35**, 1259-1263 (1993).
- 33) **Bradley, D. W.**: Virology, molecular biology, and serology of hepatitis C virus. *Transfusion Med. Rev.*, **6**, 93-102 (1992).
- 34) **Takeda, S., Kida, H., Katagiri, M., Yokoyama, H., Abe, T. & Hattori, N.**: Characteristics of glomerular lesions in hepatitis B virus infection. *Am. J. Kidney Dis.*, **11**, 54-62 (1988).
- 35) 友杉直久: ラット BSA 腎炎における cobra venom factor (CVF) 投与の影響. *十全医会誌*, **91**, 848-858 (1982).
- 36) **Dixon, F. J., Wilson, C. B. & Marquardt, H.**: Experimental immunologic glomerulonephritis. *Adv. Nephrol.*, **1**, 1-10 (1971).
- 37) **Sansonno, D., Cornacchiulo, V., Inacobelli, A. N., Stefano, R. D., Lospalluti, M. & Dammacco, F.**: Localization of hepatitis C virus antigens in liver and skin tissues of chronic hepatitis C virus-infected patients with mixed cryoglobulinemia. *Hepatology*, **21**, 305-312 (1995).
- 38) **Schifferli, J. A., French, L. E. & Tissot, J. D.**: Hepatitis C virus infection, cryoglobulinemia, and glomerulonephritis. *Adv. Nephrol.*, **24**, 107-129 (1995).
- 39) **Araki, K., Nagashima, H. & Tsuji, T.**: Detection and characterization of circulating immune complexes during acute exacerbation of chronic viral hepatitis. *Clin. Exp. Immunol.*, **47**, 520-526 (1982).

