ネフローゼ症候群患児Tリンパ球培養上清のラット腎に対する影響（第2報）

冨澤　滋，丸山健一，島袋直哉，福田利夫*
群馬大学小児科，*群馬大学第二病理

1. 序　言

微少変化型ネフローゼ症候群患児Tリンパ球培養上清中に血管透過性因子（Vascular Permeability Factor, 以下VPFと略す）が存在すること及びその性状については既に報告した。[1]

しかし、VPFがネフローゼ症候群の大量蛋白尿の原因であるのか、或いは一つの病態を反映した結果として存在するのか現在のところ結論は得られていない。VPFの腎に対する影響を検討したものとしては、わずかにBoulton Jonesの報告が見られるのみである。[2]

前回、われわれはネフローゼ症候群患児Tリンパ球培養上清をラット左腎動脈に注入し、同側の尿管尿の蛋白量の変化を検討したが、統計学的に有意差は見られなかった。[3] 今回はリンパ球培養上清を左腎動脈に注入した前後で代謝ケージを用いて蓄尿し、尿蛋白量の経時的変化を検討するとともに、リンパ球培養上清注入後1時間でのラット腎糸球体基底膜の陰性荷電の状態を観察した。

2. 対象・方法

1）対　象

6才から15才の微少変化型ネフローゼ症候群患児9例（男児5例、女児4例）を対象とした。同年齢の健康小児6例を正常コントロールとした。

2）方　法

a）Tリンパ球培養上清の作成

ネフローゼ症候群診断基準を満たした患児のステロイド使用開始前に末梢静脈血を採取した。採取した患児末梢血よりFicol－Conray gradient techniqueを用いて単核球を分離し、さらにE－rosette沈降法にてT-cell rich fractionを得た。これを10% FCS加RPMZ 1640にて1×10^6個/mlに調整し、Con－Aを10μg加えた。CO_2 incubatorにて24時間培養後、遠沈にて培養上清を採取し－80°Cに冷保した。

b）培養上清のラット腎動脈への注入

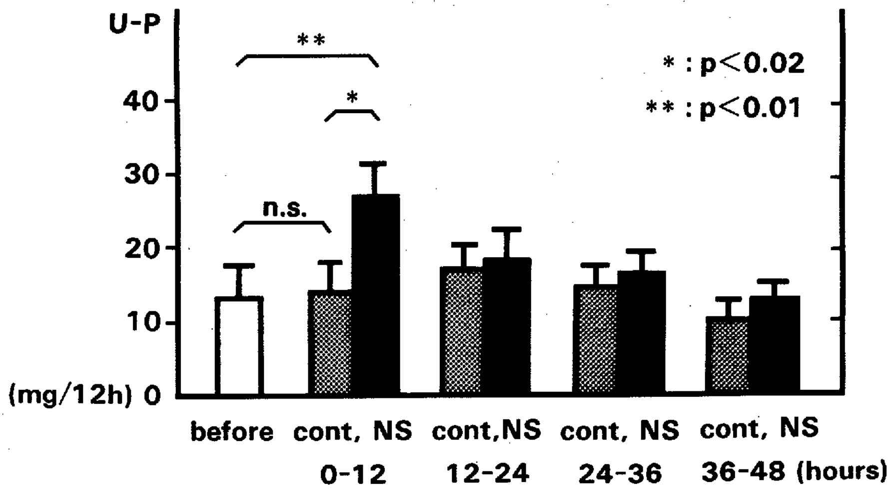
雄のウイスター系ラット（体重300〜350g）をペントバルビタールの腹腔内注射にて麻酔後、腹部正中切開を加え、左腎動脈を露出し慎重に剥離した。次いで30ゲージ針を腎動脈に刺入し、PE－10チューブを通じて、テルモ社製のインフュージョンポンプにて培養上清2mlを30分間で注入した。注入終了後は30ゲージ針を抜去し、腎動脈を圧迫止血した。腎への血流再開を確認後、絹糸にて腹部を縫合した。

採尿には代謝ケージを用いた。培養上清注入の72時間前より採尿を開始し、注入終了後48時間まで継続した。採尿は12時間毎に行ない、尿蛋白量はTCA比濁法にて測定した。

c）ラット糸球体基底膜の陰性荷電の検討

Schurerの方法[3]に従い、Polyethylene-imine（PEI, M.W. 40,000－60,000）をcationic probeとしてanionic sitesを染色した。リンパ球培養上清注入の1時間後にラット尾状脈より0.5% PEI solutionを0.2ml/100g B.W.の割合で静注し、15分後に腎組織を採取した。組織片は0.1% glutaral-dehide－0.2% phosphotungustic acid溶液にて固定及びPEIのタングステンイオンと結合して不溶性の粒子を形成することによる視

図1. ラット尿蛋白量の変化



before：培養上清注入前
cont：正常コントロールTリンパ球
培養上清注入群

NS：ネフローゼ症候群患児Tリンパ球
培養上清注入群

覚化を行ない、cacodylate buffer (0.2M. PH7.4)にて洗浄し、2% O_sO_4 溶液にて後固定を行なった後、電顕包埋をした。

3. 成　績

1）培養上清注入前後のラット尿蛋白量

培養上清注入前のラットの平均尿量は6.2 mℓ／12時間であった。注入後の最初の12時間では正常コントロールのリンパ球培養上清注入群の平均が7.6 mℓ、患児リンパ球培養上清注入群の平均が8.2 mℓであった。注入の前後で尿量に有意差はなく、更に注入後の両群間にも有意差は見られなかった。

培養上清注入前の各12時間のラットの平均尿蛋白量は13.5 mgであった。患児リンパ球培養上清注入群では最初の12時間の尿蛋白量は28.0±3.9 mg (Mean±S.E.) であり、その後尿蛋白量は漸減した。一方、正常コントロールのリンパ球培養上清注入群では、最初の12時間の尿蛋白量は14.0±3.5 mgであった。患児リンパ球培養上清注入群では注入前より有意に尿蛋白量が増加しており($p<0.01$)、更に正常コントロールのリンパ球培養上清注入群に比しても有意の尿蛋白量の増加が認められた($p<0.02$)。(図1)

モルモットのskinを用いたVPF assayの結果とラットの尿蛋白量の間には有意の相関は見られなかった。

2）ラット糸球体基底膜の陰性荷電

正常コントロールのリンパ球培養上清を注入したラットの糸球体基底膜ではLamina rara interna, Lamina rara externaにおいてPEIの平行な配列が認められた（図2）。これは無処置の正常ラットに見られるのと同様の所見であった。

患児リンパ球培養上清を注入したラットの糸球体基底膜ではPEIの配列が不整であり、Lamina rara internaにおいてはPEIの減少が認められた（図3）。足突起の癒合は見られなかった。

4. 考　察

Lagrueの報告[4]以来、ネフローゼ症候群患

図 2

(×26,000)

図 3

(×26,000)

者のリンパ球培養上清中にＶＰＦが存在することは衆知の事実である。しかし、VPF assayはモルモットの皮膚を用いたものであり、VPFとネフローゼ症候群の大量蛋白尿との関連については不明であった。1983年Boulton Jones[2]がラットの大動脈よりPE-50を挿入し両側腎動脈に自己血清を含むネフローゼ症候群患者リンパ球培養上清を注入し、足突起の癒合及びcolloidal ironにより染色された糸球体基底膜の陰性荷電の減少を初めて報告した。

近年、糸球体の選択的濾過作用を調整するものとしてsize-selective barrierに加えcharge-selective barrierが注目を集めている。anionic siteとしては上皮細胞表面、slit-membrane, 内皮細胞表面を被う陰性荷電物質が知られているが、最近では特に糸球体基底膜のlamina rara interna及びlamina rara externaに規則正しく配列するheparan sulfate proteoglycan (HSPG) が注目されている。[5)6)] 糸球体基底膜のHSPGに含まれるanionic siteはPEIを用いても明らかにされている。[7)]

今回の我々の成績ではネフローゼ症候群患児Ｔリンパ球培養上清を注入することによりラットの尿蛋白量の増加及び糸球体基底膜のlamina rara internaのanionic sitesの減少を認めた。培養上清中のVPFがanionic sitesを減少させ、蛋白尿を増加させた可能性が強いと思われる。足突起の癒合は明らかでなかったが、これは培養上清の注入量の問題とも考えられる。

モルモットの皮膚を用いたVPF assayの結果とラットの尿蛋白増加量の間には有意の相関は見られなかったが、その評価については今

後の検討を待ちたい。しかし、今回のわれわれの成績は、ネフローゼ症候群患者における細胞性免疫異常と大量蛋白尿の関連において、Tリンパ球培養上清中のVPFが重要な意味を持つことを再確認したものと考える。

今後とも症例を重ね、本研究を進める予定である。

5. 結　論

ネフローゼ症候群患児Tリンパ球培養上清をラット腎動脈に注入することにより、尿蛋白量が増加することを確認した。その原因としては、ラット糸球体基底膜の陰性荷電の減少が考えられた。

6. 参考文献

1) Tomizawa, S.; Maruyama, K.; Nagasawa, S.; Suzuki, S.; Kuroume, T.: Studies of vascular permeability factor derived from T lymphocytes and inhibitory effect of plasma on its production in minimal change nephrotic symdrome. Nephron 41 ;157-160, 1985.

2) Boulton Jones, J.M.; Tulloch, I. ;Dore, B.; Mclay, A.: Changes in the glomerular capillary wall induced by lymphocytes products and serum of nephrotic patients.

3) Schurer, J.W.; Kalicharan, D.; Hoedemaeker, PH.J.; Molenaar, I.: The use of polyethyleneimine for demonstration of anionic sites in basement membranes and collagen fibrils. J.Histochem, Cytochem.26;688-689,1978.

4) Lagrue, G; Xheneumont, S.; Branallec, A.; Hirbec, G.; Weil, B.A.: Vascular permeabilility factor elaborated from lymphocytes.I. Demonstration in patients with nephrotic syndrome. Biomedicine 23;37-40, 1975.

5) Kanwar, Y.S.; Linker, Y.S.; Farquhar, M.G.: Increased permeability of the glomerular basement membrane to ferritin after removal of glycosaminoglycans (heparan sulfate) by enzyme digestion. J.Cell.Biol. 86;688-693,1980.

6) Rosenzweig, L.J.; Kanwar, Y.S.: Removal of sulfated (heparan sulfate) or nonsulfated (hyaluronic acid) glycosaminoglycans results in increased permeability of the glomerular basement membrane to 1251-bovine serum albumin. Lab. Invest.47;177-184,1982.

7) Vernier, R.L.; Klein, D.J.; Sisson, S.P.; Mahan, J.D.; Oegema, T.R.; Brown, D.M.: Heparan sulfate-rich anionic sites in the human glomerular basement membrane. Decreased concentration in congenital nephrotic syndrome. N.Engl.J.Med.309; 1001-1009,1983.

8) 冨澤　滋，丸山健一，島袋直哉：ネフローゼ症候群患児Tリンパ球由来血管透過性因子のラット腎に及ぼす影響，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，昭和60年度研究業績報告書。

検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用
論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります

5.結論

ネフローゼ症候群患児Tリンパ球培養上清をラット腎動脈に注入することにより、尿蛋白量が増加することを確認した。その原因としては、ラット糸球体基底膜の陰性荷電の減少が考えられた。