

# 小児期腎疾患患児血清の培養メサンジウム細胞増殖に与える影響

## 小児慢性腎炎の治療法の開発に関する研究 ステロイド剤抵抗性ネフローゼ症候群に関する研究

永田紀四郎<sup>\*</sup>, 貫井清孝<sup>\*\*</sup>, 和賀 忍<sup>\*\*</sup>

**要約:** IgA腎症17名, MPGN5名, lupus腎炎2名, INS17名, 正常者14名の血清を用いて, これら血清の培養ラットメサンジウム細胞増殖に及ぼす影響について検討した。増殖細胞の検出には抗PCNA抗体を用いた。IgA腎症, MPGN活動期, 及び一部のINS患者血清添加により有意のPCNA陽性細胞の増加が認められた。患児血清中には正常者ではみられないメサンジウム細胞増殖因子が存在することが示唆され, 由来の解析, 臨床経過との関連につき検討の必要がある。

**見出し語**  
(key words): IgA腎症, ネフローゼ症候群患者血清; 培養メサンジウム細胞増殖因子; PCNA陽性細胞

**研究方法:** 腎炎の発症, 進展の機序解明のため種々実験腎炎が作成され成果があげられている。ヒト腎炎においても実験腎炎と同様に腎炎惹起性物質の糸球体に対する作用は, その直接作用と免疫機構を介する作用の総和として働いていることが考えられる。この両者を個別に検討することは特にヒト腎炎においては困難であるが, これを克服する方法の1つとして培養糸球体細胞を用いた系での検索が有用であり, これまで多くの施設において特にメサンジウム細胞を利用した詳細な実験がなされている<sup>1) 2) 3)</sup>。今回我々は各種小児腎疾患々児血清を用い, 培養ラットメサンジウム細胞に対する増殖効果について検討した。1.対象: IgA腎症17名(男児5, 女児12, 年令6~16才), 膜性増殖性糸球体腎炎(MPGN)5名(男児2, 女児3, 年令13~15才), lupus腎炎2名(女児2, 年令12~15才), 特発性ネフローゼ症候群(INS)17名(男児13, 女児4, 年令1才11カ月~15才), 尿に異常を認めない健常人14名(男7, 女7, 年令9~35才)の血清を用いた。IgA腎症患児の臨床所見は表1の如くであり, 治療により寛解した1例を除き, 全例血尿+蛋白尿を呈し, 腎機能は正常であった。MPGNは3例が活動期

で2例は治療により寛解していた。lupus腎炎2例のうち1例は活動期, 他例は寛解期であり腎機能は正常であった。INS症例(表2)は1例を除き活動期の血清である。血清採取は採血後2時間室温放置, 分離後-80℃に保存した。2.方法: a. 継代ラットメサンジウム細胞の調整。4週令雄ウィスター系ラットを麻酔下に断頭, 両腎を摘出し, #60-100-200ステンレスメッシュで段階的にsievingし糸球体を単離, 20%非働化fetal calf serum(FCS), 20mM HEPES含有RPMI 1640で培養, 4週目にoutgrowthした細胞を継代した。これらの継代細胞は, D-valine抵抗性, Desmin(+), Vimentin(+), Cytokeratin(-), Collagen I, III, IV, V(+))にてメサンジウム細胞と同定した<sup>4) 5)</sup>。b. 腎疾患々児血清のメサンジウム細胞増殖に与える影響。20世代の継代メサンジウム細胞を採取, 20%FCSを含む定常培地で72時間培養後0.5%FCS濃度とした培地に変換48時間培養した。細胞数を $3 \times 10^4$ コ/mlに調整後これに患者血清が20%となるように添加, さらに48時間培養を続けた。回収した細胞はCytospin(Shandon)にてスライドガラスに塗布, 以下の増殖細胞検出に供した。c. 増殖細胞の検出。Systemic

\* 鷹揚郷腎研究所, \*\* 弘前大学医学部小児科

Kishiro Nagata<sup>\*</sup>, Kiyotaka Nukii<sup>\*\*</sup>, Shinobu Waga<sup>\*\*</sup>

Ohyokyo Kidney Institute<sup>\*</sup>, Hirosaki Univ. Sch. of Med. Pediatrics<sup>\*\*</sup>

lupus erythematosus (SLE) 患者血清より得られ, late G<sub>1</sub>, S 期細胞核に特異的に結合することが確立されている抗 proliferating cell antigen (PCNA) 抗体<sup>6)</sup> を一次抗体とする間接蛍光体法にて検出, 100 個のメサンジウム細胞のうち PCNA 陽性細胞を算定した。

#### d. 患者血清添加前の継代培養細胞の評価。

0.5% FCS 変換による培養メサンジウム細胞周期の変化は Flowcytometer FACS 440 (Becton Dickinson) を用い, propidium iodide による DNA ヒストグラムを作成し検討した。すなわち 20% FCS 定常培養条件においては G<sub>1</sub> 26.14%, S 55.17%, G<sub>2</sub>+M 18.6%, 0.5% FCS 変換後は G<sub>1</sub> 84.35%, S 10.9%, G<sub>2</sub>+M 4.75% であった。

#### 結果

PCNA 陽性細胞核は図 1 の様に fine speckled pattern を呈した。他の稀薄な均質に見られる核染色は, 長時間露出による非特異染色である。患者血清添加後の PCNA 陽性細胞率の変化は図 2 の如くであり, 48 時間後に 20% FCS, 1 部の患者血清添加検体にて, 0.5% FCS, 正常者血清添加検体に比して明らかな増加が観察された。このとき方法 d. で得られた FACS による増殖細胞% と PCNA 陽性細胞率は近似していた。各種腎疾患々児血清添加後の PCNA 陽性細胞率は (図 3), IgA 腎症患児血清添加群で  $21.47 \pm 9.94\%$  (m $\pm$ SD) で健常者血清添加群の  $4.53 \pm 5.58\%$  に比し, 有意に高値であった。また MPGN, lupus 腎炎の活動期例でも高値であり, INS では高値群, 低値群の 2 群がみられた。

#### 考察

各種腎疾患々児血清のラット培養メサンジウム細胞増殖に与える効果を検討した。一般に細胞増殖を検出する方法として直接細胞数を算定する方法, 3H-thymidine 取り込みを用いる方法が行われているがそれぞれ問題

点を有する。一方抗 PCNA 抗体は特異的に増殖細胞核に結合することが確立されており, 慢性骨髄性白血病の blast crisis の検出, 実験腎炎における系球体内細胞増殖の判定に応用されている<sup>7) 8)</sup>。我々の予備実験においても, radioisotope 使用を免れる, FACS での大量の血清, 細胞の使用を免れることから従来の方法に比し優利であった。

腎組織における増殖の定量化には確立した方法がなく今回の PCNA 陽性細胞率と患児腎組織所見との正確な関連は検討しえなかったが, メサンジウム増殖性腎炎である IgA 腎症患児血清で明らかに培養メサンジウム細胞の増殖効果が認められたことは興味ある所見と考えられる。INS においては難治性の症例で低値傾向, 治療に反応性の症例で高値の傾向があった。以上からこれら患児血清中に, 正常者にはないなんらかのメサンジウム増殖作用を有する体液因子が存在することが示唆された。今後この系を用い増殖因子の解析および臨床経過との関連についてさらに検討する必要がある。

#### 文献

- 1) Stahl RAK, Adler S, Baker PJ, Chen YP, Pritzl PM and Couser WG: Enhanced glomerular prostaglandin formation in experimental membranous nephropathy. *Kidney Int.* 31:1126, 1987.
- 2) Abboud HE, Poptic E and DiCorleto P: Production of platelet-derived growth factor like protein by rat mesangial cells in culture. *J. Clin. Invest.* 80:675, 1987.
- 3) MacCarthy EP, Hsu A, Ooi YM and Ooi BS: Modulation of mesangial cell proliferation by macrophage products. *Immunology* 56:695, 1985.
- 4) Striker GE, Lange MA, MacKay K,

- Bernstein K and Striker LJ: Glomerular cell in vitro. *Adv. Nephrol.* 16:169, 1987.
- 5) Kreisberg JI, Venkatachalam M and Troyer D: Contractile properties of cultured glomerular mesangial cell. *Am. J. Physiol.* 18:F457, 1985.
- 6) Miyachi K, Fritzler MJ and Tan EM: Antibody to a nuclear antigen proliferating cells. *J. Immunol.* 121:2228, 1978.
- 7) Takasaki Y, Robinson WA and Tan EM: Proliferating nuclear antigen in blast crisis cells of patients with chronic myeloid leukemia. *JNCI.* 73: 655, 1984.
- 8) Yamamoto T and Wilson CB: Complement dependence of antibody-induced mesangial cell injury in the rat. *J. Immunol.* 138:3758, 1987.

#### abstract

The effect of sera from the patients with various renal diseases in childhood on the proliferation of rat mesangial cells in culture.

Kishiro Nagata<sup>\*</sup>, Kiyotaka Nukii<sup>\*\*</sup> and Shinobu Waga<sup>\*\*</sup>

The effect of sera from patients with various renal diseases in childhood on the proliferation of rat mesangial cell in culture was examined, utilizing anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA) serum obtained from SLE patient as a detector of mesangial proliferation. Patients comprised of 17 cases of IgA nephropathy, 5 cases of MPGN, 2 cases of lupus nephritis and 17 cases of idiopathic nephrotic syndrome (INS). Fourteen of normal human serum were used as controls. Nutrition restricted mesangial cells with the change from 20 % FCS condition of medium to 0.5% FCS for 48 hours effectively reduced the cells of S phase as determined with flowcytometry. Fourty eight hours after the adding of sera at 20% concentration to these restricted cells, PCNA positive cells in 100 counts were evaluated under immunofluorescopy. Sera from most patients with IgA nephropathy, active stage of both lupus nephritis and MPGN, and a part of INS increased significantly the number of PCNA positive mesangial cells, suggesting that some biological factors stimulating the proliferation of rat mesangial cells were present in these sera.

表 1

pt\exam	尿沉渣		肾活检的所见
	红细胞 ( /hpf)	尿蛋白 (mg/dl)	
K. M	25	70	DPGN with focal segmental accentuation
T. K	many	74	FSGN mild
T. M	10	94	DPGN moderate
M. M	many	310	DPGN moderate
E. K	many	30	DPGN moderate
M. F	12	81	FSGN moderate
M. Y	0.4	14	FSGN mild
T. N	40	84	DPGN mild
M. A	many	65	DPGN moderate
Y. K	43	41	DPGN mild
M. T	3.9	142	DPGN severe
M. S	numerous	150	DPGN mild
Sl. A	5.0	20	DPGN Moderate with focal accentuation
M. S	27	12	DPGN moderate
Sl. O	37	170	DPGN moderate
A. S	39	10	minor abnormality
Y. A	many	12	DPGN mild

DPGN:diffuse segmental proliferative glomerulonephritis  
 FSGN:focal segmental proliferative glomerulonephritis  
 MC:minimal change  
 FGS:focal segmental glomerulosclerosis  
 many:over 80/hpf  
 numerous:over 100/hpf

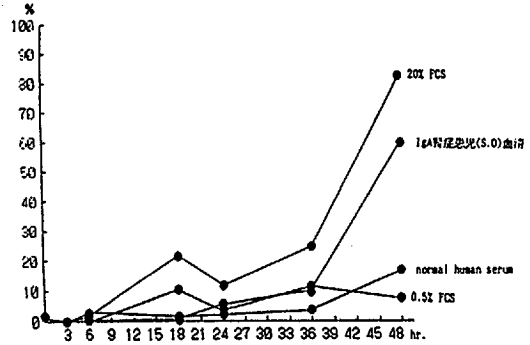
表 2

pt\exam	尿沉渣			肾活检的所见
	红细胞 ( /hpf)	尿蛋白 (mg/dl)	IP (g/dl)	
N. T	2.2	1000	4.3	DPGN mild
T. S1	0	210	5.2	MC
Y. H	0.5	595	3.0	MC
Y. S	2.2	1310	3.6	MC
Sa. A	1.0	1270	4.6	DPGN moderate
E. M		3.5g/day		MC
Ka. O	0	700	4.6	DPGN mild
K. K	0	0	6.2	MC
M. I	1.5	3010	3.4	DPGN mild
K. N	0	102	4.3	MC
J. K	1.2	1345	5.0	DPGN
D. N	3.0	8400	3.4	MC with interstitial nephritis
T. Y	0	200	4.7	DPGN mild
Ka. O	34	65	3.0	MC
T. Y	0	250	4.5	MC
H. M	0	4.2g/day	4.2	FGS
D. T	0.5	2000c	3.8	MC

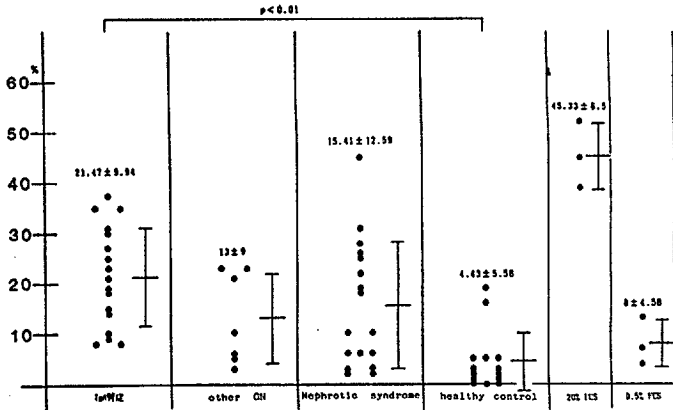
⊠ 1



⊠ 2



⊠ 3





## 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



要約: IgA 腎症 17 名・MPGN5 名・1upus 腎炎 2 名・INS17 名・正常者 14 名の血清を用いて・これら血清の培養ラットサンジウム細胞増殖に及ぼす影響について検討した。増殖細胞の検出には抗 PCNA 抗体を用いた。IgA 腎症, MPGN 活動期, 及び一部の INS 患者血清添加により有意の PCNA 陽性細胞の増加が認められた。患児血清中には正常者ではみられないメサンジウム細胞増殖因子が存在することが示唆され, 由来の解析, 臨床経過との関連につき検討の必要がある。