

ス剤抵抗性ネフローゼ症候群における単球機能の研究 — Chemotactic Factor について —

鷹揚郷腎研究所 永田紀四郎
弘前大学小児科 貫井 清孝, 柿崎 良樹, 和賀 忍
国立療養所岩木病院小児科 黒沼忠由樹

1. 序言

我々はこれまで小児特発性ネフローゼ症候群(以下INS)患児の末梢血単球の遊走能, 食食能について検討し, 副腎皮質ステロイド剤(以下ス剤)感受性INS新鮮例では遊走能低下, 食食能亢進をみ, 逆に慢性増殖性糸球体腎炎(以下MPGN)を主体としたス剤抵抗性例で遊走能亢進, 食食能低下という結果を得た^{1),2)}。このときこれらの変化が, 何らかの患児血清中因子によりすでに修飾された単球の変化を反映している可能性を否定できず, 患者血清を用いた系にても検索する必要がある。今回我々は患児血清を遊走因子とした場合の正常者単球の遊走能を検索し, 考えうる内因性の遊走因子, すなわちINS患児末梢血単球をphytohemagglutinin(PHA)刺激培養上清(lymphocyte derived chemotactic factor, LDCF), 患児血清IgG, 補体C₅由来因子C_{5a} des Arg. を用いても検討を加えたので報告する。

2. 対象・方法

a. 対象. 症例はINS患児22例, このうちス剤感受性INS新鮮例14例, MPGNを主体としたス剤抵抗性例8例である。対照として正常者6例の血清を用いた。

b. 方法. 単球遊走能の測定. 48-well micro chemotaxis chamber (Neuroprobe社製)を用い, Falkらの方法に準じて測定した³⁾。5 μ m径の小孔を有するpolyvinyl pyrrolidone (-)のpolycarbonate フィルターでしきられた上層のwellに正常者同一人の単核球($1 \times 10^5 / 50 \mu$ l/well), 下層のwellに血清あるいは他の

遊走因子を加えた。37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂培養器内で90分間反応させ, 小孔を貫通してフィルター下面に遊走した単球をDiff-Quick(Harleco, ミドリ十字)にて染色した(図1)。トリプリケートについて400倍, 5視野を算定し, 平均実数を遊走値とした。遊走因子の作製. Lymphocyte derived chemotactic factor (LDCF)は, ス剤感受性INS新鮮例, ス剤抵抗性INS例, 各々の群の一部症例より得た末梢血単核球 $3 \times 10^6 / \text{ml}$ をPHA $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ で72時間刺激, 培養上清を20%稀釈したものを遊走因子として用いた。血清IgGの精製. protein A Sepharose CL-4B (pharmacia製)を用い, Hjelmら⁴⁾に準じIgGを単離した。速やかに中性pHとし, 0.01MPBSに対して透析, そのままポリエチレングリコールにて濃縮を行った。IgA, IgMの混入は, 比濁法により検定した。血漿C_{5a} des Arg.の測定. ス剤感受性INS新鮮例, ス剤抵抗性INS例を含む49例のINS患児について, Upjohn社製キットを用いてRIAにより測定した。

3. 成績

概知の遊走因子であるN-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin(FMLP)(Sigma社製)を用いて実験系を確認した。図2の如く, 10^{-8} - 10^{-7} molをピークとする遊走値が得られ, Falkら³⁾の報告と一致した。

a. 患児血清に対する正常者単球遊走能. 予備実験として0.1%から20%までの血清濃度で遊走能をみた際, 0.5%, 20%で高値となり5%で谷を形成する測定値のパターンがみられた(図3)。単一の遊走因子を加えたとき(図2)

と異なるパターンであり、患児血清の検討には、5%および20%を用いて測定をおこなった。血清濃度を5%としたとき、正常血清と比較して遊走値に差は認められなかった。20%としたとき、ス剤抵抗性INS例で低値をとるものが多く認められた。培地単独での測定値より下まわった例はいずれもMPGN例であった(図4)。

b. 患児血清IgGに対する正常者単球遊走能(表1)。4症例(ス剤感受性INS2例, A, C., ス剤抵抗性INS2例B, D)の血清IgGを用いた。正常者血清IgGにても生理濃度よりはるかに低い $200\mu\text{g/ml}$ の濃度で培養液単独による遊走値に比して高値であった。患児D(MPGN)例では正常者IgGによる遊走値に比して明らかに低値を示した。ス剤感受性INS新鮮例であるAでは低濃度IgG($200\mu\text{g/ml}$)に対する遊走能は亢進していたが、 $2,000\mu\text{g/ml}$ とすると差は認められなかった。

c. 患児LDCFに対する正常者単球遊走能(表2)。培養液単独による遊走値と比較すると、正常対照を含めて、遊走値の亢進が認められたが、症例間あるいは、正常対照と比較しても差は認められなかった。

4. 考察

INS患児血清を遊走因子とした正常者単球遊走能は、ス剤感受性INS新鮮例では、正常対照血清と比し、差を認めなかったがMPGNを主体とするス剤抵抗性例では、有意の低下が認められた。この変化は血清濃度20%とした場合にのみ認められた。既知の単球遊走因子であるFMLPを用いた時に、高濃度で遊走値が低下する現象は、諸家^{3),5)}の成績においても観察されており、chamber下層にある遊走因子が高濃度の場合、フィルターを通過しての拡散が大きくなり結果として遊走因子の勾配が減少するためと考えられる。しかし、図3に示した如く、血清を添加した系においてはむしろ2相性のパターンがみられ単一の遊走因子の多寡では説明できない。血清中にも存在する単球遊走因子として、リンパ球由来因子であるLDCF⁶⁾、補体誘導体C_{5a}des Arg.⁷⁾また林ら⁸⁾

のIgG類似物質(monoegressin)等が考えられる。今回の我々の検討では、正常リンパ球LDCF, 患児由来LDCF共に遊走能を亢進させたが、それぞれに差は認めなかった。Mitogenを用いたINSのリンパ球機能検索にては、患児血清の影響が大きく⁹⁾、今後はより生体内類似のLDCF産生条件のもとでの検索が必要と思われる。ここには示さなかったがC_{5a}Des Argを用いた遊走能の検討では、患児単球、正常者単球の遊走値は著明に亢進したが、正常、患児間に差は認められなかった。従ってC_{5a}又はC_{5a}des Arg.の産生が疾患群で認められるかどうか問題となると思われた。ス剤感受性INS新鮮例を含む49例のINS患児の血漿中C_{5a}des Arg.測定を行ったが、有意の増加を検出できなかった。C_{5a}の増加は、敗血症、アナフィラキシー等¹⁰⁾重篤な全身状態の際に観察されており、我々の症例においては、むしろ病変局所での検索が必要なのかもしれない。

林ら⁸⁾は慢性炎症局所より血清IgGと交叉反応性があり、単球遊走因子でもあるIgG類似分子を精製したが、我々はこれをヒントに、INS患児IgGと正常者IgGの単球遊走能に対する相違について検討した。IgG自体単球遊走因子となり得、MPGN症例から得られたIgGによる遊走値は、正常IgGに比しやや低値傾向であった。単なる蛋白の濃度、浸透圧勾配による変化を除外するためにヒトアルブミン添加による検討を行い、 $1,000\mu\text{g/ml}$ 以下では、遊走能に変化はなく、上述の変動はIgG自体によるものと考えた。このことは、局所において、IgGの関与する病態が惹起される場合、流血中IgGとの濃度勾配により単球の走化を促がすことが考えられ興味ある所見と思われた。

単球の活性化に関わるレセプターは無数に近いともいわれ、それらはまた独立した活性経路を有するとされる。従ってこれまでに我々が観察してきたINS患児の単球機能の変動は、今回検索した遊走因子が関与するレセプター以外の経路によるものかもしれない。しかしこれまでに種々腎疾患における局所への単球参画は確定的

となりつつあり、以上の様な機能に関わる解析が今後更に必要となると考えられる。

5. 結論

I. 0.1~20%濃度の血清を遊走因子として正常者単球の遊走能をみると、単一の遊走因子では説明できない2相性の変化を示した。

II. INS患児の20%稀釈血清に対する正常者単球遊走能測定で、MPGNを主体とした薬剤抵抗性INS群で有意に低値を示した。

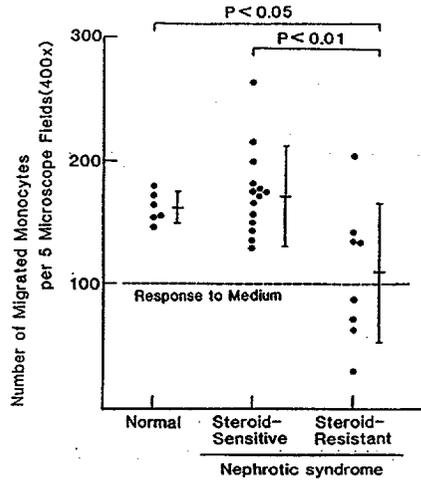
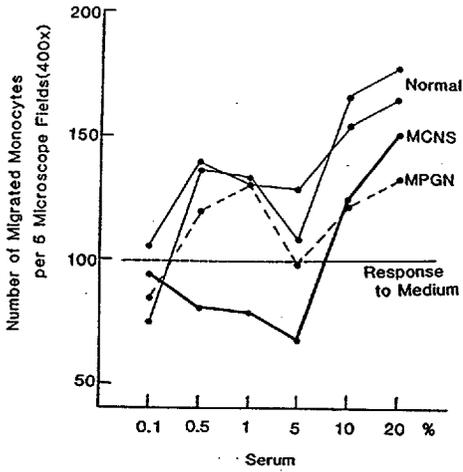
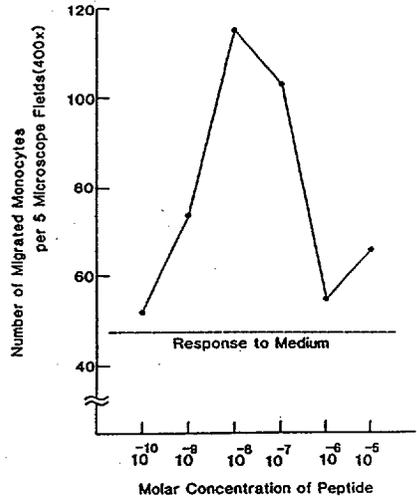
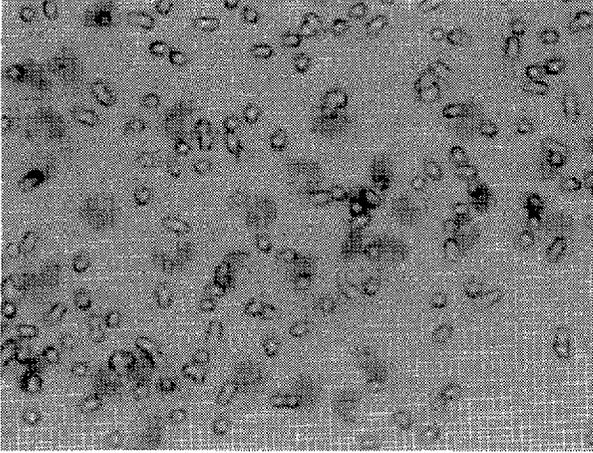
III. 患児および正常者血清IgGは共に、低濃度域(200 μ g/ml)においても、遊走因子となり得た。このことは、IgGの関与する局所病変を考える際重要な所見と考えられた。

IV. 患児、正常者単核球より得たlymphocyte derived chemotactic factor(LDCF)による正常者単球遊走能亢進には差を認めなかった。また、INS患児血漿中C_{5a} des Arg.は有意に検出されなかった。

6. 文献

- 1) Nagata, K., Takahashi, Y., Waga, S., Fujita, M., Kuronuma, T. and Aoyama, R.: Monocyte function in idiopathic nephrotic syndrome in childhood. *Tohoku J. exp. Med.* 135;413-417, 1981.
- 2) Waga, S., Takahashi, Y., Fujita, M., Nagata, K., Kuronuma, T. and Aoyama, R.: Monocyte function in idiopathic nephrotic syndrome in childhood-Report 11. *Tohoku J. exp. Med.* 141;295-303, 1983.
- 3) Falk W., Goodwin R. and Leonard E.: A 48-well micro chemotaxis assembly for rapid and accurate measurement of leukocyte migration. *J. Immunol. Methods* 33;239-247, 1980.
- 4) Hjelm H., Hjelm K. and Sjoquist J.: Protein A from *Staphylococcus aureus*. Its isolation by affinity chromatography and its use as an immunosorbent isolation of immunoglobulins. *FEBS Lett.* 28;73-76, 1972.
- 5) Schiffmann E., Corcoran A. B. and Wahl M. S.: N-formyl-methionyl peptides as chemoattractants for leukocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72;1059-1062, 1975.
- 6) Syndermann R. and Mergenhagen E. S.: Chemotaxis of macrophage, in *Immunobiology of the macrophage*, edited by Nelson S. D., Academic Press p. 333-336, 1976.
- 7) Marder R. S., Chenoweth E. E., Goldstein M. I. and Perez D. H.: Chemotactic responses of human peripheral blood monocytes to the complement-derived peptides C_{5a} and C_{5a} des Arg. *J. Immunol.* 134;3325-3331, 1985.
- 8) Ishida M., Honda M. and Hayashi H.: In vitro macrophage chemotactic generation from serum immunoglobulin G by neutrophil neutral seryl protease. *Immunology* 35;167-176, 1978.
- 9) 黒沼忠由樹: 小児特発性ネフローゼ症候群における末梢血リンパ球subpopulationおよびmitogen反応性について, *弘前医学*, 33; 129-143, 1981.
- 10) 木下美登里, 上塚奈保子, 和頼房代, 渡辺晴雄, 内田裕子, 北村 諭: 各種肺疾患における血中補体C_{3a}, C_{5a}値の変動について. *日胸疾会誌* 24;145-149, 1986.

図 1	図 2
図 3	図 4
表 1	表 2

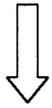


	No. of Migrated Monocytes	
	2000 µg/ml	200 µg/ml
IgG		
1. Normal	465	328
2. NS		
Patient A	466	413
B	405	237
C	392	385
D	316	265
3. Medium only	187	

LDCF	No. of Migrated Monocytes
1 Normal 1	203
2 Normal 2	243
3 T.S.	184
4 J.K.	282
5 M.M.	184
6 J.K.	252
7 K.O.	199
8 T.O.	199
9 K.K.	201
10 T.K.	172



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

.0.1~20%濃度の血清を遊走因子として正常者単球の遊走能をみると,単一の遊走因子では説明できない2相性の変化を示した。

.INS 患児の 20%稀釈血清に対する正常者単球遊走能測定で,MPGN を主体としたス剤抵抗性 INS 群で有意に低値を示した。

.患児および正常者血清 IgG は共に,低濃度域(200 μ g/ml)においても,遊走因子となり得た。このことは,IgG の関与する局所病変を考える際重要な所見と考えられた。

.患児,正常者単核球より得た lymphocyte derived chemotactic factor(LDCF)による正常者単球遊走能亢進には差を認めなかった。また,INS 患児血漿中 C5s des Arg は有意に検出されなかった。