

ネフローゼ症候群患児における血管透過性因子, とくに尿中 VPF に関する検討 (第3報)

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

富澤 滋・丸山健一・島袋直哉

要約: ネフローゼ症候群患児の活動期および寛解後の尿について VPF assay を行ない、活動期の尿がモルモットの皮膚の血管透過性を亢進させ、ラットの尿蛋白を増加させた。さらに、アフィニティカラムにて分離精製した活動期尿中アルブミンに、PI 5.5 以上の等電点の高い部分が存在することや、VPF 活性を増強させることが確認された。

key words: ネフローゼ症候群・血管透過性因子 (VPF)・尿中アルブミン・等電点

1. 序言

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, VPF) が存在すること及びこの培養上清がラット糸球体基底膜の陰性荷電を減少させ、尿蛋白を増加させることを既に報告した^{1),2)}。われわれは VPF が本症の発症に関与するものと推定しているが、本症患児の血清及び尿中の VPF 活性については明らかにされていない。

最近、本症の病因として血清及び尿中アルブミンの等電点の変化を想定する報告³⁾が見られ、特に尿中アルブミンでは等電点の高いもの (less anionic albumin) が著明に増加するとしている。今回は本症患児尿中アルブミンの等電点の変化と血管透過性因子の関連について検討を試みたので報告する。

2 対象及び方法

1) ネフローゼ症候群患児 6 例を対象とした。年齢は 3 歳より 14 歳で、男児 3 例、女児 3 例である。活動期の尿は 6 例より、寛解期の尿は 5 例より採取した。

2) 方法

a) VPF assay

雄の Hartly 系 Guinea-pig (BW 200~250g) を用いた。assay の前日に腹部を剃毛しておく。サンプルを 0.1 ml ずつ腹部に皮内注射し、5 分後に 1% Evans blue 1 ml を前足より静注、30 分後にモルをト殺し、腹部の皮を剥ぐ。皮内に漏出した Evans blue の面積 (bluing) を算定し、VPF 活性とした。

b) 患児尿のラットへの注入

雄の Wister 系ラット (BW 300~350g) を用いた。今回は 27G 針を用い、尾静脈より尿を注入した。同濃度の人血清アルブミン (HSA) 溶液をコントロールとした。ペントバルビタール (5 mg/100g) にて麻酔後、左大腿静脈より PE-50 カテーテルを挿入し、3 ml/hr の速度で生食を輸液した。更に、PE-90 カテーテルを膀胱に留置し、膀胱尿を採取することとした。尿及び HSA 溶液は 6 ml を 15 分間で注入した。採尿は 30 分毎に行ない、尿量、尿蛋白濃度 (ローリー法) を測定した。

c) アルブミンの分離精製

尿を平衡用バッファーにて透析後、Affi-Gel Blue gel, 50-100 mesh (バイオラドラボラトリー) を用いて尿よりアルブミンを吸着し、salt gradient にて溶出した。

d) 等電点電気泳動

群馬大学医学部小児科

Shigeru Tomizawa

Gunma Univ. school of Medicine, Dept. of Pediatrics.

1 mg/mlに調整した尿アルブミン50 μl を LKB社 Ampholine PAG plate にのせ、1500V, 30A, 50W にて2 h 泳動したあと、5℃に冷却し、染色した。

e)糸球体基底膜陰性荷電の検討

Polyethyleneimnin 静注法を用いた。

図 1

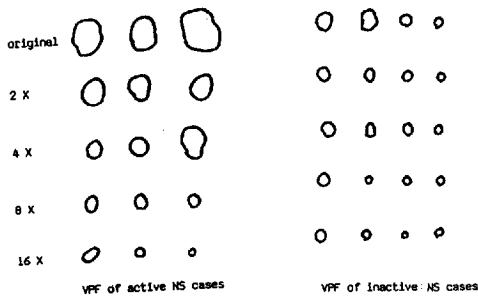
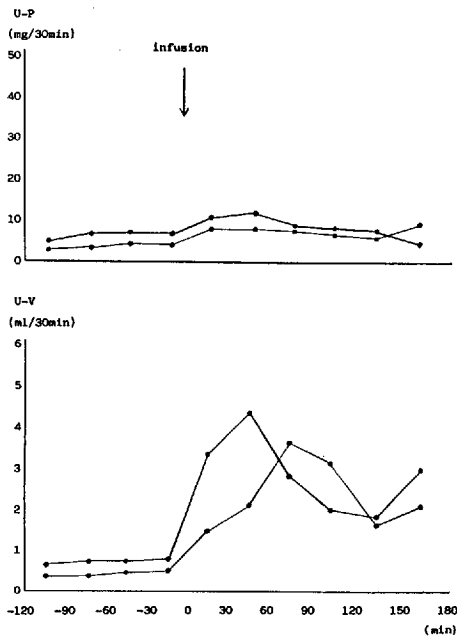


図 2



Urinary protein excretion of the rat infused the HSA solution

3. 結果

a)尿のVPF assay

活動期及び寛解期の尿の希釈系列を作成し、各々についてVPF assay を行なった(図1)。活動期の尿では4倍希釈までbluingの増大が見られたが、寛解期の尿では各希釈系列において殆ど差を認めなかった。

b)患児尿のラット尿蛋白に対する影響

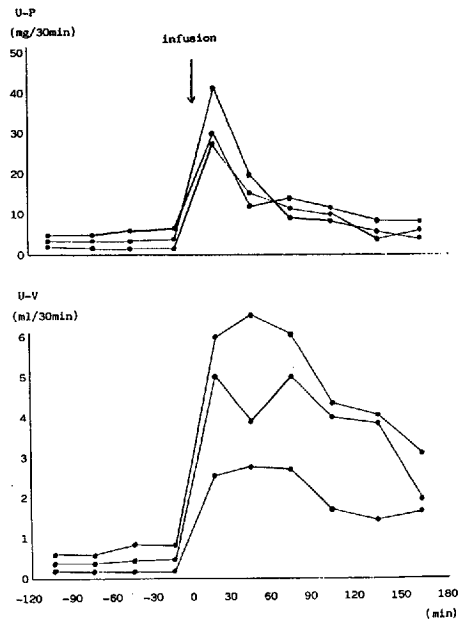
(図2)(図3)

患児尿及びHSA溶液の注入直後より尿量の増加が見られたが、HSA溶液注入群では注入の前後で尿蛋白の変動はなかった。患児尿注入群では一過性に5~7倍の尿蛋白の増加を認めた。

c)等電点電気泳動(図4)

活動期の6例の尿中アルブミンのうち4例にPI 5.5以上の less anionic albuminの存在が認められた。

図 3



Urinary protein excretion of the rat infused the patient's urine

図 4



Fig. 4 Isoelectric focusing pattern of urinary albumin in children with nephrotic syndrome. Tracks a,b,c,d,e,f show the pattern before steroid therapy and * show the marker of PI.

図 5

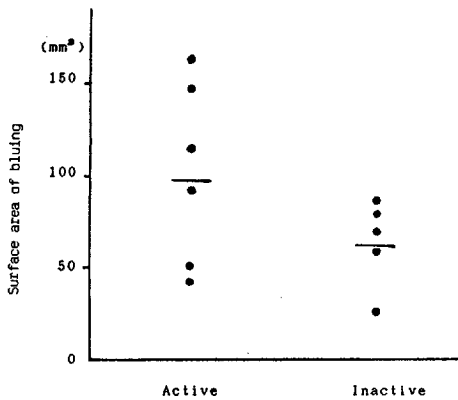


Fig. 5 VPF in urinary albumin from children with nephrotic syndrome

d)尿中アルブミンを用いたVPF assay(図5)

Affi-Gel Blue gelにより分離した尿中アルブミンを 1mg/ml の濃度に調整し、VPF assayを行なった。活動期の尿中アルブミンにおいて有意の bluing の増強が見られた。

e)ラット糸球体基底膜陰性荷電に対する患児尿の影響

活動期の尿を注入されたラットの糸球体基底膜陰性荷電は寛解期の尿を注入された群に比しやや減少していたが、Tリンパ球培養上清を注入された場合に比べると差は明らかではなかった。

4. 考察

ネフローゼ症候群患児Tリンパ球培養上清がラット糸球体基底膜陰性荷電を減少させ、尿蛋白を増加させることは既に明らかにした²⁾。しかし、VPFを本症の病因と仮定する場合、生体内でVPFが直接糸球体基底膜に作用して大量蛋白尿を招来するのか、或いは間接的に他のものを介して作用するのかは今のところ証明する方法はない。最近、本症患者の血清及び尿中アルブミンの等電点の変化について報告が見られ、血清中の less anionic albumin³⁾が糸球体基底膜の charge barrier を通過して尿中へ漏れるとしている。われわれはこの less anionic albuminの存在に注目し、VPFとの関連性について検討を試みた。

本症活動期の尿はモルモットの皮膚の血管透過性を亢進させ、ラットの尿蛋白を増加させることを確認したが、蛋白濃度、浸透圧、腎血流の変化などの因子の影響も考慮する必要があると思われた。そこでアフィニティカラムを作成し、尿中アルブミンのみを採取することにした。アルブミンの等電点の変化は6例中4例に見られた。VPF assayでは活動期の尿中アルブミンで bluing の増強を見たが、現時点では less anionic albuminとの相関は明らかではない。更に症例を重ねて、両者の関連を追求したい。

5. 結語

ネフローゼ症候群患児の活動期の尿はモルモットの皮膚の血管透過性を亢進させ、ラット尿蛋白を増加させた。更に、活動期の尿中アルブミンに等電点の高い部分が存在することを確認した。尿中アルブミンを用いたVPF assayでは活動期のものに bluing の増強を見た。

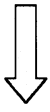
6. 文献

1) 富澤 滋他：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。厚生省昭和60年度小児慢性腎疾患の予防・管理・治療に関する研究業績報告書 P 71-74, 1986

2) 富澤 滋他：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）。厚生省昭和61年度小児慢性腎疾患の予防・管理・治療に関する研究業績報告書 P 67-70, 1987.

3) Ghiggeri, G.M. et al: Renal selectivity properties towards endogenous albumin in minimal change nephropathy, *Kidney Int.* 32: 69-97, 1987.



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:ネフローゼ症候群患児の活動期および寛解後の尿について VPFassay を行ない、活動期の尿がモルモットの皮膚の血管透過性を亢進させ、ラットの尿蛋白を増加させた。さらに、アフィニティカラムにて分離精製した活動期尿中アルブミンに、PI5・5以上の等電点の高い部分が存在することや、VPF 活性を増強させることが確認された。