

逆流腎症への Tamm-Horsfall 蛋白のかかわりあい

小児腎疾患の進行阻止に関する研究

逆流性腎症と慢性腎盂腎炎の進行阻止に関する研究

白髪宏司, 伊藤克己

【要約】逆流腎症では間質および Bowman 嚢腔内に Tamm-Horsfall 蛋白が凝集し, ネフロン内の異常尿流動態を示す。この異常凝集物がいかに逆流腎症発生にかかわっているのかを, 実験モデルを通じ検討した。体液性免疫, 細胞性免疫機序ともに主たる役割を有する所見は乏しく, むしろ凝集した同蛋白による物理的濾過障害, 二次的な残存糸球体過剰濾過, またより腎毒性の強い物質の腎内逆流などが, 硬化性病変を来たす原因になりうると推察された。

【見出し語】 Tamm-Horsfall 蛋白, 体液性・細胞性免疫, 逆流腎症

【緒論】 Tamm-Horsfall 蛋白 (TH) は, 1950 年にウイルス血球凝集反応を阻止する尿中インヒビターとして分離された¹⁾。遠位尿細管 (thick ascending limb of Henle's loop および distal convoluted tubule) 上皮細胞より分泌される細胞膜表面糖蛋白である²⁾。正常尿中の主たる蛋白で, 成人では 50~100mg/日の排泄をみる。単分子量は 85,000~100,000 であるが, 以下の因子により凝集し, 数百万以上の分子量を呈しゼラチン状に変貌する^{2)~4)} すなわち 3 因子, 1) 同蛋白濃度, 2) 塩濃度, 3) 水素イオン濃度の上昇に伴い直ちに凝集し, 硝子円柱の形成として観察される^{5), 6)}。膀胱尿管逆流症や片側尿管閉塞 (UUO) 実験モデルのごとく, 尿流障害ひいては尿細管構築障害をも来たすと思われる病態では, 尿細管外に TH 凝集を認める。これらの異常 TH 凝集は臨床病理組織上でも (高頻度に認められる疾病としては, 逆流腎症, 逆流を伴う腎盂腎炎, 水腎症, medullary cystic disease などが知られる^{7), 8)} また実験モデルにおいても, 間質内さらには Bowman 嚢腔内に認められる。

図 1 に示されるように, 腎内での正常な TH 分布は明確にされているため^{2), 9)} 病的な TH 凝集部を検出すること自体, 腎内異常尿流動態を証明する優れた指標となる。尿細管外に漏出した TH が, 自己免疫, 細胞性免疫機序, さらに物理的障害などを介し, 間質性腎炎または巣状分節状糸球体硬化で代表される逆流腎症の発症に何らかの参与をしているのではないかという示唆は興味深いものであり¹⁰⁾ 過去 10 余年に渡り検討が加えられてきた。今回, これら異常凝集した TH がいかに逆流腎症の発症にかかわっているかを評価するため, TH の能動免疫, 抗 TH 抗体の受動免疫モデル, また片側尿路閉塞モデルを応用することによって検討した。

【研究対象】 1) ヒト逆流腎症に認められる異常 TH 凝集分布は, UUO モデルにおいても観察されるものと思われる。従って同モデルにおける TH 分布の変化, 付随する組織学的変化を観察することはヒト逆流腎症の尿流動態, 発症機序を理解する一助になると考えられる。 2) TH 自体および抗 TH 抗体の産生による腎組織障害

東京女子医科大学腎臓病総合医療センター小児科

Hiroshi Shiraga and Katsumi Ito

性は、THを動物に能動免疫する、もしくは異種抗TH抗体を受動免疫することにより、腎機能変化、免疫学的反応の観察から推察できるものと考えられる。3)異常分布を生じたTHが抗原としていかなる程度に体液性免疫機構を賦活させるかは、THの能動免疫群と、加えてUUOを施行し、間質内およびBowman嚢腔内への異常TH凝集分布を付加した動物群の両群で、抗TH抗体価を経過観察、比較検討することで判断できると考えられる。これら3者の考えに基づき以下の実験方法を用いて検討を加えた。

【研究方法】THは標準化された0.58M NaClによる凝集、脱イオン水による溶出、透析の繰り返しにより精製した¹¹⁾。THの精製には正常ラットの尿を、兎抗ラットTH抗体、兎抗マウスTH抗体の作成にはNZW兎を、またUUOモデルの作成にはそれぞれ200~250gm、生後30~35日のSDラット(♂)、SWマウス(♂)を用いた。^{12),13)}マウスに対するTHの能動免疫は4週おきに2度(各々100 μ g、初回の免疫および2度目の免疫は、それぞれcompleteおよびincomplete Freund's adjuvantと共に)行なった^{13)~15)}、ラット(n=38)に対する兎抗ラットTH抗体(IgG)の受動免疫には、1カ月間隔でラットTHを免疫した兎のIgG(10mg)を経静脈投与した¹⁶⁾。UUOモデルは、ラット(n=50)、マウス(n=26)をそれぞれether, xylazine-ketamine麻酔下に、5-0 silkを用い左側尿管中央~近位 $\frac{1}{3}$ を5mmのPE 100チューブと共に(マウス)結紮することにより作成した。ラットのUUOは開放しなかったが¹²⁾、マウスのUUOは24時間後に開放した¹³⁾。なおTHの能動免疫に付加したマウスのUUOによる抗TH抗体価の相違をみる実験(全8週間)では、次のごとく4群に分けて検討した¹³⁾。I群。0、4週目に2度THを免疫する群(n=12)。II群。5週目にUUOのみを行なう群(n=12)。III群。I群と同様に2回のTH免疫を行なった後、1週後の5週目にUUOを加える群(n=14)。IV群。無処置群(n=12)。4群について0、4、6、8週目の抗TH抗体価をELISAを用い

て評価し¹⁵⁾、組織学的検討のためには4週目(I群)、6週と8週目(II~IV群)に半数の動物の腎摘出を施行した。formalin固定し、glycolmethacrylateに包埋、1 μ mの切片はPAS, hematoxylinにより染色した。-70 $^{\circ}$ Cのisopentaneに凍結し4 μ mに処理した組織は、FITC標識の兎抗マウスIgG、-IgM、-TH、兎抗ラットC₃、-THを、また二重染色のためにはrhodamine標識のヤギ抗マウスIgG、抗兎IgGを用いた。電子顕微鏡学的検討のためには組織の一部をmodified Karnovsky固定液で固定、処理した¹⁷⁾。

【結果】1)ラット、マウスにおけるUUOモデルは、THの異常凝集分布(間質内およびBowman嚢腔内)において、ヒト逆流症と同一のパターンを示した^{12),13)}。すなわちネフロン内での尿逆流、間質への尿漏出が生じていることが明確に示された。間質内に漏出、凝集したTHと間質への細胞浸潤の存在は、両者の一致を認める部位も散見されたが、むしろ存在部位の相関は得難い所見であった。すなわち、これらの異常TH凝集部と細胞浸潤部位の間に強い関連性は認められず、写真1に示すように強い細胞性免疫の賦活所見は乏しかった^{12),13)}。写真2にマウスUUOモデルに見られたBowman嚢腔内のTH凝集を示す。マウスの一時的閉塞モデルにおいては、示すようなTH凝集陽性の糸球体の頻度は、平均45%(24時間後~開放後1週目)から平均25%(開放後3週目)へと変化した¹³⁾。すなわち、24時間のみの閉塞においても、開放後も長期間にわたりBowman嚢腔内TH凝集の存在するネフロンが、高頻度に認められた。2)THの能動免疫、受動免疫においては、共に間質性腎炎を発症させ得ることが蛍光抗体法により示された^{14)~17)}。ただし、同モデルにおいては、糸球体および尿管細管機能の明らかな低下は認められなかった¹⁴⁾。3)4群に分けて比較検討した、マウスにおけるTH能動免疫/UUOによる抗TH抗体価[log₁₀ dilution $\times 10^{-3}$]の検討結果を図2に示す。0、4週目の2度のTH免疫(∇)のみのI群(\square)と、加えて5週目にUUO(\blacktriangledown , 24時間)

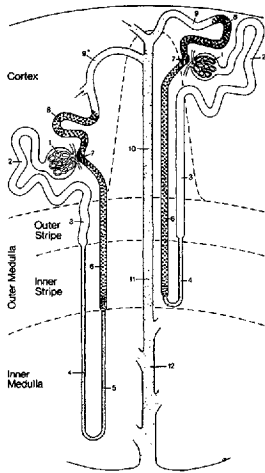


図1. Tamm-Horstall 蛋白の正常分布。■印で示される thick ascending limb of Henle's loop および distal convoluted tubule に TH の正常分布は限局する。

を施行した群(■)の間に、有意な抗 TH 抗体価の差は認められなかった。すなわち、間質、上皮細胞下などに異所性沈着、漏出を示す TH が抗原となり、更に強く体液性免疫を賦活している所見は乏しかった。なお、5週目にUUOのみを施行したII群、および無処置のIV群では共に抗体値の上昇を認めなかった(▲)。

【考察】TH 蛋白が正常尿中の主要蛋白として認識されて以来、すでに40年間近くを経るが未だその役割は明らかでない。殊に1985年、免疫抑制効果を有する尿中蛋白として分離報告された uromodulin が¹⁸⁾、1987年、TH 蛋白とアミノ酸配列が同一であり、両者は639のアミノ酸よりなる糖蛋白であると解明されたことも手伝って^{19), 20)}、その免疫学的役割が更に注目されている現状である。より具体的には、本蛋白が生体にとって防禦的に働いているのか、攻撃的に働いているのかも明確でない。尿路感染症とのかかわり合いにおいては、近年特に病原性 E. coli との相互作用が検討されているが、尿路移行上皮への E. coli の付着は、TH により阻害され、生体防禦的に作用している報告も^{21), 22)}、また濃度により不定である²³⁾、臨床例の検討では防禦

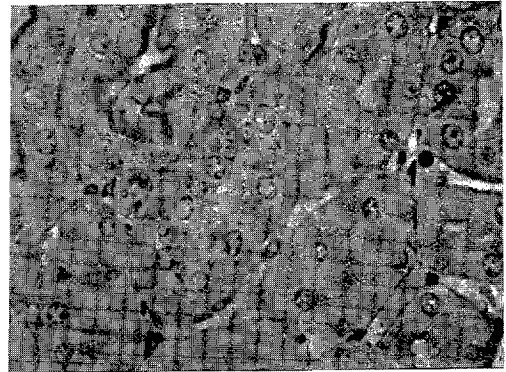


写真1. マウス片側尿管閉塞モデルにおける TH 凝集。遠位曲尿管基底膜上に広範な PAS 陽性沈着物を認める。この沈着物は蛍光抗体法にて TH 凝集部位に一致する。TH 凝集に対する周囲の細胞浸潤は著明ではない (PAS-hematoxylin, 550 X)。

効果は確定できなかったなど²⁴⁾、未だ結論づけられていない。その物理的構築的特異性からは、細菌侵入等に対し防禦的作用を有するのではないかと示唆される TH 蛋白が²⁵⁾、ネフロン内逆流に伴って、結果的に免疫能を賦活させるか、という疑問は逆流腎症発症の病態解明には重要であり、今回の検討を行った。抗 TH 抗体を用いた TH の異常分布検索は、ネフロン内異常尿流動態を見きわめられる、現在最も優れた方法として確立できた。TH の能動免疫、受動免疫による間質性腎炎モデルの成立機序は、抗 TH 抗体が尿細管基底膜を通過し、上皮下に正常に存在する TH と in situ に抗原抗体免疫複合物を形成することによったものと考えられるが^{16), 17)}、糸球体、尿細管の機能に対する障害性はほとんど認められない。加えて抗 TH 抗体価に注目した検討では、病的部位に漏出、凝集した TH が体液性免疫機序を介して腎障害、ひきつづく糸球体硬化に参与しているという支持所見は乏しい。さらには細胞性免疫の直接的関与も組織光顕レベルでは明らかでない。ひとたび腎硬化を来たしてしまった VUR では上昇することは少ないが^{26)~29)}、殊に上部尿路感染症

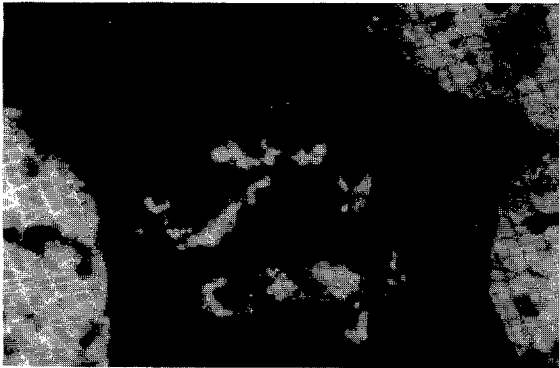


写真2. マウス片側尿管閉塞モデルにおけるTH分布。Ⅲ群マウス(2度の免疫に加えUUO施行)24時間尿管閉塞, 開放後1週目のTH凝集(Bowman嚢腔内および遠位直尿細管, 遠位曲尿細管基底膜上の顆粒状沈着)を示す。(FITC-抗マウスTH抗体, X550)。

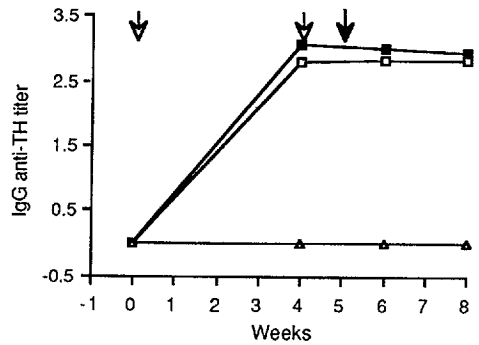


図2. 4群における抗TH抗体価の推移。2度のTH免疫(▽)のみのⅠ群(□)と, 更に5週目に24時間の一過性片側尿管閉塞(▽)を加えたⅢ群(■)に, 有意な抗TH抗体価の上昇の差はない。なお, コントロールⅣ群, 尿管閉塞のみのⅡ群では抗体価上昇はみられない。

活動期における抗TH自己抗体価上昇の報告²⁷⁾は³⁰⁾体液性免疫機序を通じた逆流腎症発症機序を理解するうえでも非常に興味深いものではあるが, この度の検討からは同抗体の役割を強く支持する所見は得られなかった。なお, 近年, 自己抗体の存在は検査技術上, 疑問視する報告も散見され^{31), 32)}加えて, 報告者自らも有熱者における同自己抗体価上昇の観察から, その非特異性の可能性を報告している³³⁾, Bowman嚢腔内のTH凝集を示す糸球体は, 既に濾過機能の障害された糸球体およびネフロンであると思われる。ただし, このTHの凝集が原因であったのか, 結果を見ているのかは定かでない。

【結論】逆流腎症発症におけるTHの役割は, 抗TH自己抗体による体液性免疫機序では考え難い。加えて異所性THに対する直接的細胞性免疫の賦活所見も乏しい。むしろBowman嚢腔内に凝集したTHによる持続的な糸球体濾過障害, ひきつづく機能的糸球体数の減少, 残存糸球体過剰濾過, ひいては他のより障害性の強い物質の腎内逆流などが, 糸球体硬化を来たす発端となり得るものとする。

【文献】

- 1) Tamm, I. and Horsfall, F.L. Jr. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 74:108-114, 1950.
- 2) Hoyer, J.R. and Seiler, M.W. Kidney Intern., 16:279-289, 1979.
- 3) Curtain, C.C. Austral. J. Exp. Biol., 31:255-265, 1953.
- 4) Wiggins, R.C. Clinica Chimica Acta, 162:329-340, 1987.
- 5) McQueen, E.G. J. Clin. Pathol., 15:367-373, 1962.
- 6) McQueen, E.G. and Engle, G.B. J. Clin. Pathol., 19:392-296, 1966.
- 7) Zager, P.A. et al. Lab. Invest., 38:52-57, 1978.
- 8) Resnick, J. S. et al. Lab. Invest., 38:550-555, 1978.
- 9) Hoyer, J.R. et al. Lab. Invest., 41:168-173, 1979.
- 10) Hodson, J. et al. Kidney Intern., 8:S-50-S-58, 1975.

- 11) Hoyer, J.R. et al. Lab. Invest., 30:757-761, 1974.
- 12) Dziukas, L.J. et al. Lab. Invest., 47:185-193, 1982.
- 13) Fasth, A.L. et al. Clin. Immunol. Immunopathol., 47:47-61, 1988.
- 14) Hoyer, J.R., Kidney Intern., 17:284-292, 1980.
- 15) Fasth, A. et al. Am. J. Pathol., 125:555-562, 1986.
- 16) Friedman, J. et al. Kiney Intern., 21:575-582, 1982.
- 17) Seiler, M.W. and Hoyer, J.R. Lab. Invest., 45: 321-327, 1981.
- 18) Muchmore, A.V. and Decker, J.M. Science, 229:479-481, 1985.
- 19) Pennica, D. et al. Science, 236:83-88, 1987.
- 20) Hession, C. et al. Science, 237:1479-1484, 1987.
- 21) Fowler, J.E. Jr. et al. J. Urol., 138:446-448, 1987.
- 22) Dulawa, J. et al. Europ. J. Clin. Invest., 18:87-91, 1988.
- 23) Duncan, J.L. J. Infect. Dis., 158:1379-1382, 1988.
- 24) Israele, V. et al. AJDC, 141:1230-1234, 1987.
- 25) Bjugn, R. and Flood, P.R. Scand. J. Urol. Nephrol., 22:313-315, 1988.
- 26) Fasth, A. et al. Dis. Child., 52:560-562, 1977.
- 27) Fasth, A. et al. J. Pediatr., 95:54-60, 1979.
- 28) Fasth, A. et al. Acta Paediat. Scand., 69:709-715, 1980.
- 29) Fasth, A. et al. Kidney Intern., 20:500-504, 1981.
- 30) Hanson, L.A. et al. Lancet, 1:226-228, 1976.
- 31) Avis, P.J.G. Contr. Nephrol., 39:305-315, 1984.
- 32) Hunt, J.S. et al. Clin. Sci., 73:479-487, 1987.
- 33) Sandberg, T. and Fasth, A. Scand. J. Urol. Nephrol., 21:297-300, 1987.

ABSTRACT

INTERRELATIONSHIP OF REFLUX NEPHROPATHY AND TAMM-HORSFALL GLYCOPROTEIN

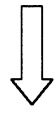
Pathologic aggregation of Tamm-Horsfall glycoprotein (TH) in the Bowman's space and interstitium has been observed in the renal sections of patient with vesicoureteral reflux, and in the animal model of unilateral ureteral obstruction (UUO). Contributions of humoral and/or cellular immunity for these pathologically located TH were evaluated using the models of active and passive immunization of TH and UUO models. Mice UUO models were divided into four groups (I. TH immunization, II. UUO, III. TH immunization and UUO, IV. control) and changes of anti-TH antibody titer were evaluated by ELISA. UUO models showed high prevalence of TH aggregation in the Bowman's space

and interstitium, but these foci failed to show strong relation⁶ to the surrounding cellular infiltrate. Active and passive immunization of TH led the morphologic studies to characterize interstitial nephritis, but there was not demonstrable deterioration of glomerular and tubular function. Compared to the group I, there was no significant further increment of anti-TH antibody titer in the group III, suggesting weak mediation of humoral immunity by the pathologically located TH. Pathogenesis of the lesions in reflux nephropathy can not be explained solely by the immunological reaction to the extravasated TH. Physical presence of aggregated TH and reflux of other more toxic substances should be taken into consideration.



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】逆流腎症では間質および Bowman 嚢腔内に Tamm—Horsfall 蛋白が凝集し、ネフロン内の異常尿流動態を示す。この異常凝集物がいかに逆流腎症発生にかかわっているのかを、実験モデルを通じ検討した。体液性免疫、細胞性免疫機序ともに主たる役割を有する所見は乏しく、むしろ凝集した同蛋白による物理的濾過障害、二次的な残存糸球体過剰濾過、またより腎毒性の強い物質の腎内逆流などが、硬化性病変を来たす原因になりうると推察された。