

# 小児腎疾患の進行に関する免疫学的研究

## 小児腎疾患の進行阻止に関する研究

## 進行阻止に関する免疫・遺伝・病態生化学的研究

清水 凡 生

培養臍帯血管内皮細胞の $Ca^{2+}$ 取り込みを指標としてリンパ球 ConA添加培養上清中の内皮細胞刺激因子を検討した。ネフローゼ症候群では活動期に高く、寛解に伴って減少する傾向にあるが、寛解期における値は、非頻回再発例では著しく低く、頻回再発例ではやや高値を保つことが示された。IgA腎症では、ネフローゼ型、軽症型いずれも本因子を認めなかった。これらの結果から、ネフローゼ症候群の頻回再発例のリンパ球は内皮細胞刺激因子の産生準備状態にあることが示唆される。

### 内皮細胞 リンパ球

#### 研究方法

末梢血から常法により単核細胞を分離し、120  $\mu$ g/mlのConAとともに3日間クラボウ製ヒト臍帯血管内皮細胞「エンドセル」をI型コラーゲンをコートした48穴培養プレートでコンフルエントの状態になるまで5日間培養した後、培養液を排除し温ハンクス液で1回洗浄後、2  $\mu$ M Fura-2 acetoxymethyl ester (Fura-2 AM)を加えたRPMI培養液 200  $\mu$ lを注入し、1時間培養した。培養後再び温ハンクス液で2回洗浄し、各wellにConA培養上清200  $\mu$ l、 $CaCl_2$ を3mM添加したRPMI培養液 100  $\mu$ lを注入し、1時間培養する。次いで各wellから排液した後温ハンクス液で3回洗浄する。その後ラウリル硫酸ソーダ液 1,000  $\mu$ lを注入し十分攪拌する。この溶液の蛍光光度を励起波長 339nm、蛍光波長 500nm、またスリット巾をそれぞれ6nmおよび10nmとした蛍光分光光度計で測定した。ConA培養上清の測定値を無添加培養上清のもので除して内皮細胞刺激指数 (Endothelial cell stimulation index : E.S.I.)とした。

#### 結 果

ネフローゼ症候群では発症時または再発時に内皮細胞刺激指数は著しく上昇し、寛解に伴って急

速に低下する。図1~4に非頻回再発例における変動を示したが、発症または再発時のリンパ球ConA培養上清は内皮細胞刺激指数が高値を示す寛解期には全く認めない。図5・6に頻回再発例の再発時を含む経過を示したが、寛解期においても内皮細胞刺激因子の完全消失が見られない。図7に頻回・非頻回再発例の発症・再発時と寛解期における内皮細胞刺激指数を示した。IgA腎症については図8に示すように培養上清中にネフローゼタイプを示す例も、軽症例ともに内皮細胞刺激因子を認めない。

#### 考 察

血尿・蛋白尿の発症機序として腎糸球体血管壁の透過性亢進が考えられる。血管壁透過性の亢進には 1)血管内外における静水圧差の変動、2)血管内外の膠質透過圧差の変動、3)血管壁透過性の亢進の3因子が考えられる。これらのうち血管壁等透過性の亢進には内皮細胞の変化が主因をなすと考えられている。内皮細胞には収縮蛋白アクチンやアクチンフィラメントなどの細胞骨格蛋白が存在し、細胞形態の維持、収縮などに関与している。血管壁透過性の亢進はこの内皮細胞の収縮による細胞間隙の増加によるといわれる。細胞収縮は細胞内の $Ca^{2+}$ 流入によって始

広島大学幼児保健学教室

Bonmi Shimizu

Hiroshima University, Department of Child Health

動するが、 $Ca^{2+}$ の流入は種々の因子によって規定される。その中に細胞膜に存在する受容体作動性チャンネルを介して行なわれるものがある。受容体はトロンピン、ヒスタミン、ブラチキニンなどに対するものが知られているが、その他にも種々存在することが推定される。

本研究はリンパ球培養上清中の受容体に結合する因子の存在を細胞内 $Ca^{2+}$ の流入を指標として検討しようとするものである。

Fura-2は $Ca^{2+}$ とキレート結合すると蛍光を発生し、蛍光量は $Ca^{2+}$ 濃度に比例する。本剤は細胞膜を透過しないがそのカルボキシル基をアセトキシメチルエステルで置換したFura-2 AMは透過性にすぐれている。細胞内に取り込まれたFura-2 AMは細胞内のアセチルエステラーゼによって加水分解されて活性型Fura-2となる。従って内皮細胞内にFura-2 AMを取りに込ませておくと $Ca^{2+}$ チャンネルを介して細胞内へ流入した $Ca^{2+}$ に比例した蛍光を発生することになる。

リンパ球のConA添加培養上清に含まれる受容体結合性因子の活性をConA非添加培養上清のものと比較することにより指数として示したが、ネフローゼ症候群においては発症または再発時に高値を示し、寛解に伴って低下する。指数1はConAによって受容体結合性内皮細胞刺激因子が産生されないことを意味するが、非頻回再発例では寛解期は1前後になる。しかし、頻回再発例では寛解期にも1を上回る。即ち、ConA刺激によって内皮細胞刺激因子が産生されている訳である。頻回再発例のリンパ球は常に内皮細胞刺激因子の産生準備状態にあるといえる。

IgA腎症においては蛋白尿・低蛋白血症を示すネフローゼ型のものにおいても内皮細胞刺激因子は産生されない。蛋白尿の発症機序がネフローゼ症候群のものとは異なることが示唆される。

Fig.1 ALTERATION OF ENDOTHELIAL CELL STIMULATION INDEX

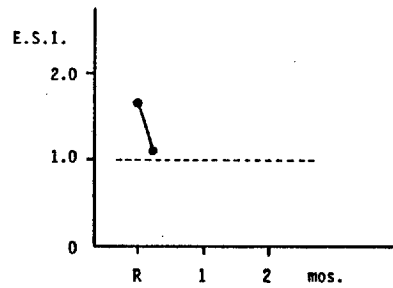


Fig.2 ALTERATION OF ENDOTHELIAL CELL STIMULATION INDEX

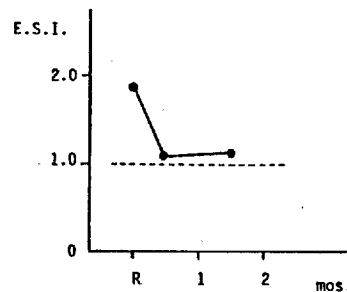


Fig.3 ALTERATION OF ENDOTHELIAL CELL STIMULATION INDEX

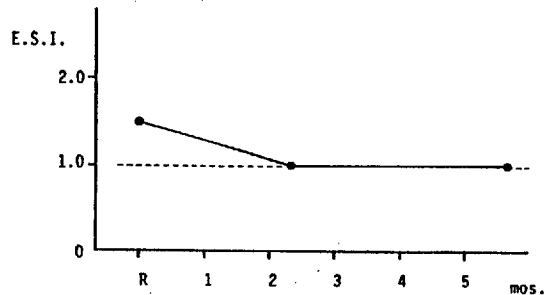


Fig.4 ALTERATION OF ENDOTHELIAL CELL STIMULATION INDEX

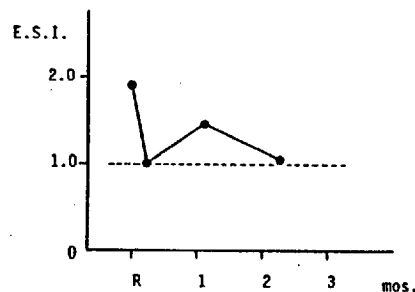


Fig.5 ALTERATION OF ENDOTHELIAL CELL STIMULATION INDEX

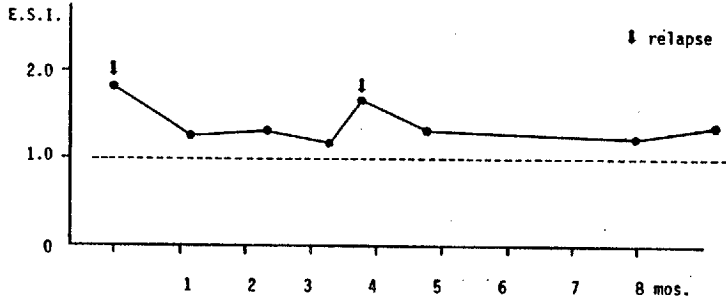


Fig.6 ALTERATION OF ENDOTHELIAL CELL STIMULATION INDEX

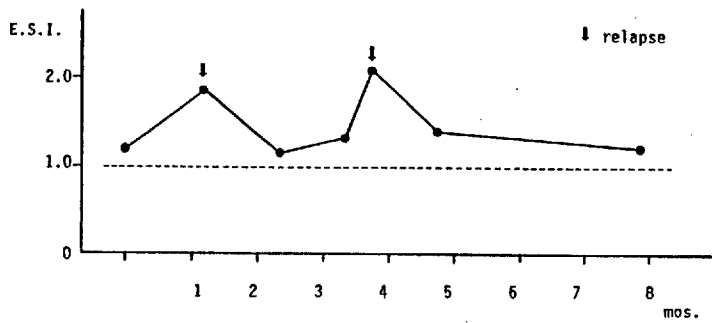
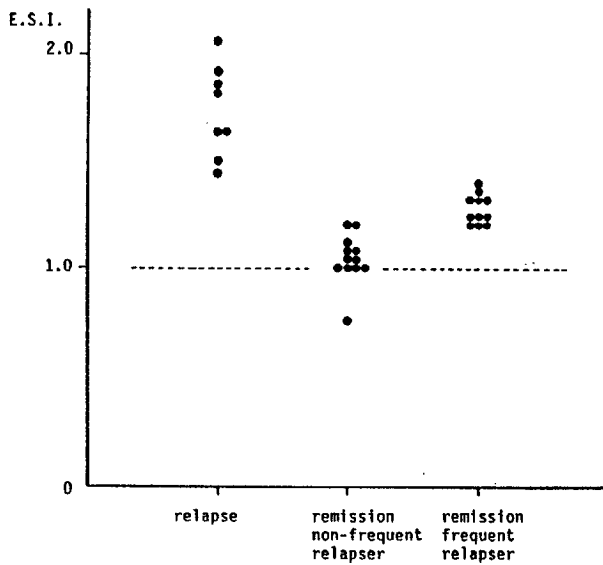
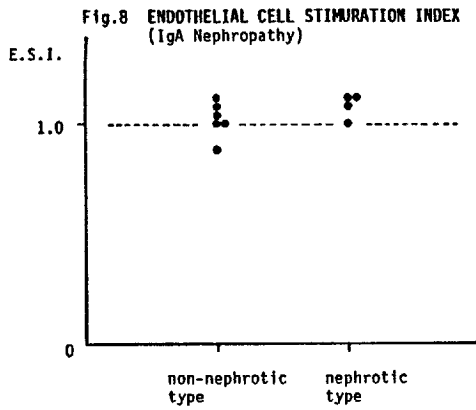


Fig.7 ENDOTHELIAL CELL STIMULATION INDEX (Nephrotic Syndorome)





文献

- Joris, I. et al, Endothelial Contraction in vivo: a Study of the Rat Mesentery, *Virchow Arch.* 12:73, 1972
- Pollock, W.K. et al, Inositol Phosphate Production and  $Ca^{2+}$  Mobilization in Human Umbilical-vein Endothelial Cells Stimulated by Thrombin and Histamine, *Biochem. J.* 256: 371, 1988
- Rotrosen, D. and Gallin, J.I., Histamine Type I Receptor Occupancy Increases Endothelial Cytosolic Calcium, Reduces F-Actin, and Promotes Albumin Diffusion Across Cultured Endothelial Monolayers, *J. Cell Biol.* 103: 2379, 1986
- Majno, G. and Leventhal, M., Pathogenesis of Histamine-type Vasucular Leakage, *Lancet* 2:99, 1966



## 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



培養臍帯血管内皮細胞の  $Ca^{2+}$  取り込みを指標としてリンパ球 ConA 添加培養上清中の内皮細胞刺激因子を検討した。ネフローゼ症候群では活動期に高く、寛解に伴って減少する傾向にあるが、寛解期における値は、非頻回再発例では著しく低く、頻回再発例ではやや高値を保つことが示された。IgA 腎症では、ネフローゼ型、軽症型いずれも本因子を認めなかった。これらの結果から、ネフローゼ症候群の頻回再発例のリンパ球は内皮細胞刺激因子の産生準備状態にあることが示唆される。