

# 小児尿路感染症における尿中、血中 Tamm-Horsfall protein の検討

## 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

富澤 滋、新井英夫、丸山健一

**要約：** Tamm-Horsfall protein (TH-P) の生物学的活性を明らかにする目的で IL-1 の lymphocyte activating factor (LAF) 活性に及ぼす TH-P の影響を検討した。TH-P は IL-1 の LAF 活性を抑制し、その濃度は 30~80  $\mu\text{g/ml}$  の範囲であった。ついで ELISA 法で小児腎疾患について尿中、血中 TH-P 濃度を測定した。その結果、腎盂腎炎では VUR(-) 群では VUR(+) 群や健康小児に比して尿中 TH-P 濃度は有意に高値を示した ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。IL-1 や TNF などの cytokine が集積しやすい腎臓の局所において TH-P が免疫学的に何らかの役割を果している可能性が示唆された。

見出し語 TH-P, IL-1, LAF 活性, 腎盂腎炎・VUR

### 対象・方法

I IL-1 の lymphocyte activating factor (LAF) 活性に及ぼす TH-P の影響

方法：1. C3H/HeJ mouse の thymus より thymocytes を分離し、10% FCS, glutamin,  $10^{-5}\text{M}$  2-ME を含む RPMI にて細胞を調整し、培養用マイクロプレート の各 well に  $1 \times 10^6$  の thymocytes を注入、さらに PHA-P 5  $\mu\text{g}$  を加えた。この LAF assay 系に倍々希釈した recombinant human IL-1 ( $\alpha$ ) (Collaborative Res. 社製、 $3.7 \times 10^5$  half maximal units/mg) を加え、さらに salt-precipitation method により抽出した TH-P について無添加群、5  $\mu\text{g/ml}$ 、50  $\mu\text{g/ml}$  の各 0.1/ml 添加群をつくり、各々について 48 時間培養を行なった。0.5  $\mu\text{Ci}$  の  $^3\text{H}$ -TdR を加えて、更に 18 時間培養後、cell harvester にかけて、counts 系をもってゆき、LAF 活性を測定した。

2. LAF assay 系に IL-1 濃度を 32 倍、64 倍、128 倍の 3 系列をつくり、各々の系に各種希釈した TH-P (1~100  $\mu\text{g/ml}$ ) を加えて、前述と同様の方法で LAF 活性を測定した。

II ELISA 法による尿中、血中 TH-P 濃度の測定

対象：小児各種腎疾患々児 30 例で、内訳は

ネフローゼ症候群 6 例、糸球体腎炎 9 例、慢性腎不全 2 例および腎盂腎炎 13 例であり、コントロールとして用いた健康小児は 10 例であった。

方法：PBS で 4,000 倍希釈した羊抗ヒト TH-P (ウロムコイド) 抗体 (Binding Site 社製) を 100  $\mu\text{l}$  immuno assay 96 well plate (Titertek 社製) の各 well に注入し、4  $^{\circ}\text{C}$  で一晩静置する。翌日 washing solution (0.5% BSA-0.2%  $\text{Na}_3\text{P}$ -PBS-0.05% Tween20) にて洗浄後、2,000 倍 or 4,000 倍に希釈した尿 sample を 100  $\mu\text{l}$  づつ入れて、室温で 1~2 時間インキュベート後洗浄した。なお、血清 sample の場合は 2、4、8 倍に希釈したものをを用いた。さらに二次抗体として 4,000 倍に希釈した抗ヒト TH-P モノクローナル抗体 (CEDAR LANE 社製) を 100  $\mu\text{l}$  加え、室温にて 2 時間インキュベート後洗浄した。つぎに三次抗体として 4,000 倍に希釈した alkaline phosphatase 標識山羊抗マウス IgG (TAGO 社製) を加えて、室温で 2 時間インキュベート後、洗浄した。最後に alkaline phosphatase substrate を加えて発色させ、ELISA reader で 405nm の吸光度を経時的に測定し、吸光度変化 ( $\Delta\text{OD } 405/\text{min}$ ) にて換算した。

群馬大学医学部小児科

Shigeru Tomizawa, Hideo Arai, Kenichi Maruyama,

Dep. of Pediatrics, Gunma University School of Medicine

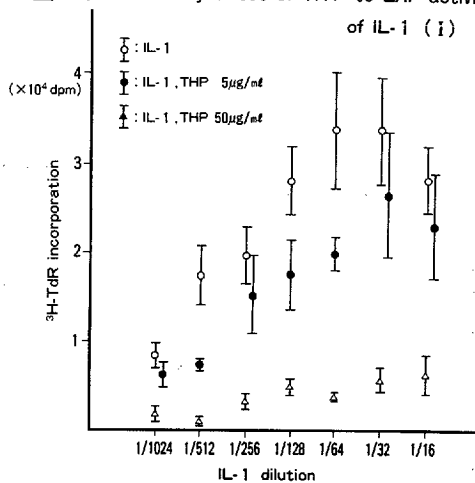
## 結果

### I IL-1のLAF 活性に及ぼすTH-Pの影響

1. LAF 活性はTH-P無添加の系ではIL-1の濃度(1/1024~1/16) dependentに高くなってゆき、64倍希釈でピークに達した。一方、IL-1にTH-P(50 $\mu$ g/ml)0.1mlを加えた系では、TH-P無添加の系に比して著明な抑制効果が認められた。またTH-P(5 $\mu$ g/ml)0.1mlを加えた系では、LAF 活性は両者の中間の値を取り、抑制はそれ程著明ではなかった。(図1)。

2. IL-1濃度を32倍、64倍、128倍の3系列をつくり、各々の系に各種希釈したTH-Pを加えてLAF活性を検討したところ、3系列ともにTH-Pの濃度に応じてLAF活性の低下がみられた。LAF活性を50%抑制するTH-P濃度はIL-1 128倍希釈では28.8 $\mu$ g/ml、64倍希釈で60.2 $\mu$ g/ml、32倍希釈では82.0 $\mu$ g/mlで、約30~80 $\mu$ g/mlの範囲であった(図2)。

図1 Inhibitory effect of TH-P to LAF activity of IL-1 (i)



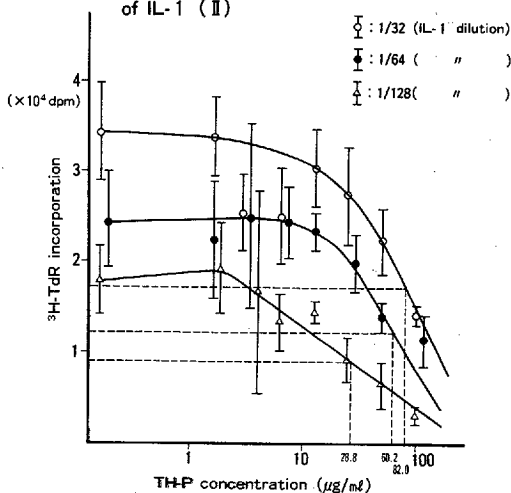
### II 腎盂腎炎を中心とする小児各種腎疾患および健康小児における尿中、血中TH-P濃度

1. TH-PのELISA standard curveについては、TH-P濃度が10~100ng/mlでlinealとなっており、この範囲で測定した。また測定によりえられた尿中TH-P濃度はmg $\cdot$ cr比で表わした。

2. 尿中TH-P濃度については、健康小児10例の平均は22.2 $\mu$ g/mg $\cdot$ crであった。一方慢性腎

不全患児2例では2.1と低値であった。ついで、6例のネフローゼ症候群では31.5、9例の

図2 Inhibitory effect of TH-P to LAF activity of IL-1 (II)



系球体腎炎では21.3であった。腎盂腎炎13例の平均は47.7とコントロールや他の腎疾患に比べてやや高値を示したが有意差はみられなかった(図3)。

3. 腎盂腎炎をVUR(-)とVUR(+)群に分けて尿中TH-P濃度を検討した。6例のVUR(+)群ではTH-P濃度の平均は25.5 $\mu$ g/mg $\cdot$ crで、やや高いものからコントロールより低いものもみられた。7例のVUR(-)群では、その平均は66.7で、コントロールやVUR(+)群に比して有意に高値を示した(P<0.01, P<0.05)(図4)。

4. 血清中TH-P濃度については、8例の健康小児の平均は104.9ng/mlであった。一方、2例の慢性腎不全患児では49.0と低値であった。4例のネフローゼ症候群は112.5、5例の系球体腎炎108.2、10例の腎盂腎炎では132.7であった。さらに腎盂腎炎についてはVUR(-)とVUR(+)に分けてみたが、VUR(-)では143.3VUR(+)では125.7で、いずれもコントロールに比して有意差はみられなかった(図5)。

5. 腎盂腎炎患児について、尿中および血清中のTH-P濃度について相関関係を検討したが、図6のごとく一定の傾向は認められなかった。

図 3

Urinary TH-P concentration in the patients with various renal diseases and healthy children

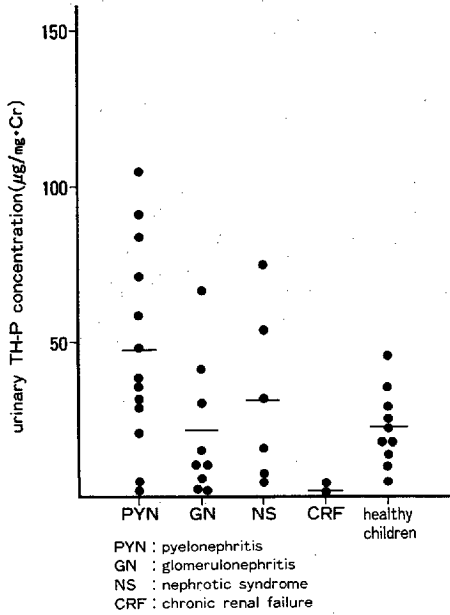


図 4

Urinary TH-P concentration in the patients with pyelonephritis with or without VUR.

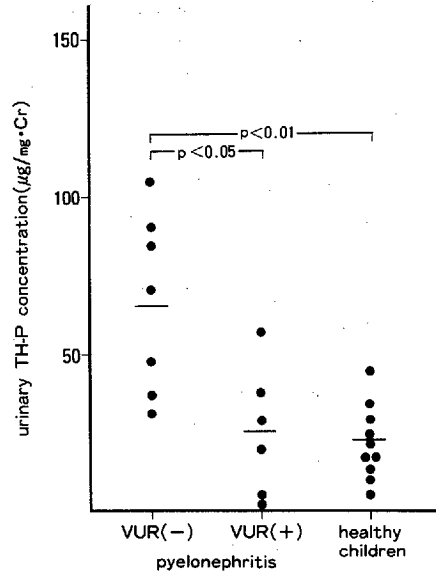


図 5

Serum TH-P concentration in the patients with various renal diseases and healthy children

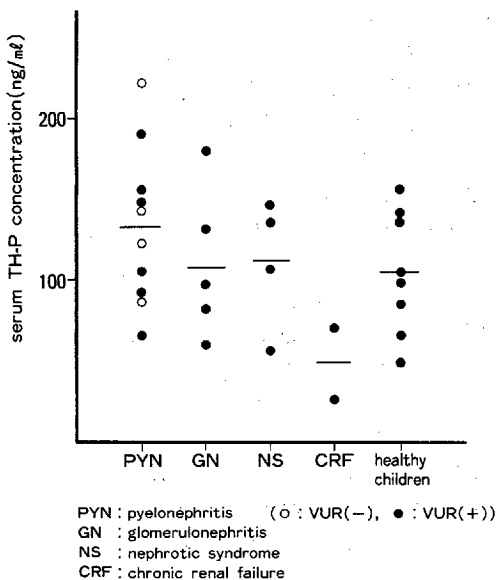
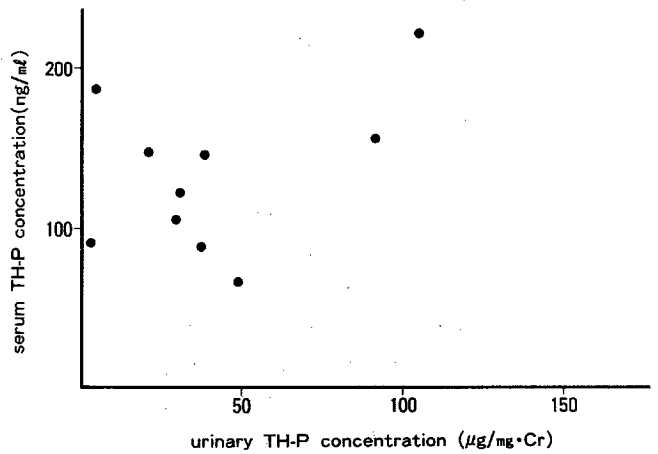


図 6

Correlation between urinary and serum TH-P concentration in the patients with pyelonephritis



## 考 察

TH-P は上行脚や遠位尿管の上皮細胞より分泌される糖蛋白である。TH-Pが逆流性腎症の発症に関与している可能性は示唆されているが、尿路感染症とくに膀胱尿管逆流現象(VUR)におけるTH-Pの意義は未だ不明な点が多く、とくに VURにおける尿中、血中TH-Pに関する詳細な報告はあまりみられていない。最近、TH-Pと構造式が等しい uromodulinが IL-1と結合するとの報告がみられているが、TH-Pのcytokineに対する影響をみた報告は少ない。

われわれは、TH-Pの生物学的活性を明らかにする目的で、IL-1の LAF活性に及ぼす TH-Pの影響を検討した。その結果TH-Pは IL-1の LAF活性を抑制し、その濃度が30~80 $\mu\text{g/ml}$ の範囲であった。妊婦尿から lectin columnを用いて抽出した immunosuppressive protein である uromodulinでは 0.75~3 $\mu\text{g/ml}$ の低濃度でLAF活性を抑制するとの報告がある。このような差は uromodulinが TH-P に比して糖鎖に富んでいることに起因するものと思われる。このように IL-1の LAF活性に対して TH-Pが uromodulin と同様に抑制的に働く事実は、TH-Pが IL-1と結合して、その活性を抑えることを意味するわけで、ヒトの生体内においてもこのような現象が起こりうる事が示唆される。

そこで、小児の腎盂腎炎を中心に各種腎疾患について尿中および血中のTH-P濃度を検討した。その結果、腎盂腎炎ではVUR(-)群ではVUR(+)群や健康小児に比して尿中TH-P濃度は有意

に高値を示した。さらに uveitisを伴った間質性腎炎(TINU)で急性期に尿中TH-Pが高値を示し、臨床経過の改善とともに減少した例も経験している。しかし、血中TH-Pは一定の傾向を示さなかった。従来より尿中および血中TH-P濃度については renal cell massを表わしているとの報告もあり、実際にわれわれのdataでも2例の腎不全では両者ともに低値であった。しかし、VUR(-)群の腎盂腎炎や TINUの急性期で尿中TH-Pが高値を示したことは、IL-1や TNFなどの cytokine が集積しやすいといわれている腎臓の局所において TH-Pがこれらの cytokineを regulateする意味で何らかの役割を果している可能性が示唆された。

## 文 献

- 1) Brown, K.M., Muchmore, A.V. et al: Uromodulin, an immunosuppressive protein derived from pregnancy urine, is an inhibitor of interleukin 1. *Immunology* 83: 9119-9123, 1986.
- 2) Hession, C. et al: Uromodulin(Tamm-Horsfall Glycoprotein): a renal ligand for lymphokines. *Science*. 273: 1479-1484, 1987.
- 3) Tomizawa, S., Kjellson, B., Fasth, A., Hanson, L.A.: Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against Tamm-Horsfall protein in acute pyelonephritis. *Int. Archs Allergy appl. Immun.* 85: 302-307, 1988.

## Abstract

In order to clarify the biological activity of TH-P, the effect of TH-P to the activity of lymphocyte activating factor (LAF) by IL-1 has been studied. TH-P inhibited the LAF activity by IL-1 and its concentration was 30-80 $\mu\text{g/ml}$ . Urinary and serum TH-P concentration in renal diseases with children has been estimated by ELISA. Urinary TH-P concentration was significantly higher in the children of pyelonephritis without VUR than in those with VUR or in healthy control ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ).

These results suggest that TH-P will have some roles to regulate cytokines such as IL-1 in pyelonephritis.



## 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: Ta mm— Horsfall protein (TH-P) の生物学的活性を明らかにする目的で IL-1 の lymphocyteactivating factor (LAF) 活性に及ぼす TH-P の影響を検討した。TH-P は IL-1 の LAF 活性を抑制し、その濃度は 30~80  $\mu\text{g/ml}$  の範囲であった。ついで ELISA 法で小児腎疾患について尿中、血中 TH-P 濃度を測定した。その結果、腎盂腎炎では VUR(-) 群では VUR(+) 群や健康小児に比して尿中 TH-P 濃度は有意に高値を示した ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。IL-1 や TNF などの cytokine が集積しやすい腎臓の局所において TH-P が免疫学的に何らかの役割を果している可能性が示唆された。