

逆流性腎症と Tamm-Horsfall glycoprotein との関連 についての研究

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

牧 淳, 宮田 曠, 山本 隆, 藤山忠清, 松井甲三

Tamm-Horsfall glycoprotein (THGP) に対する複数の monoclonal 抗体 (MoAb) を作製し, これを用いて THGP 抗原の腎組織内での局在ならびに尿中 THGP 排泄量を検討するとともに尿中細胞成分の由来を検討した。得られた MoAb は THGP に対して4つの異なる epitope を認識し, このうちの1つの MoAb は尿細管細胞以外にボウマン嚢に接した部分とも反応した。尿中 THGP/creatinine 値は vesico-ureteral reflux 患者の一部で低値を示し, 手術後に増加する例と低値を持続する例がみられた。細胞表面に THGP 抗原を認めた尿中細胞は, 上部尿路由来であった。

Tamm-Horsfall glycoprotein, monoclonal antibody, vesico-ureteral reflux

【研究方法】THGP は, Dawnay ら¹⁾の方法を一部改変して精製した。THGP に対する MoAb は, 生体免疫法で免疫した BALB/c mouse の脾細胞と PAI mouse myeloma cell とを融合した hybridoma から得た。MoAb が認識する epitope の解析は, それぞれの MoAb を感作したタンニン酸処理ヒツジ赤血球を用いた inhibition assay によって実施した。さらに, 各々の MoAb による腎組織内での THGP 抗原の局在を, 腫瘍摘出腎と reflux を認めない minimal change ネフローゼの生検腎組織を用いて蛍光抗体法で検討した。また, この MoAb を用いて vesico-ureteral reflux (VUR) 患者の尿中 THGP 排泄量を測定した。

対象は正常人および1歳から25歳までのII度以上のVUR患者で, 採取した新鮮尿を超音波処理とSDS処理で前処理し, 遠心して上清をPD-10 column (Pharmacia)にてcarbonate bicarbonate bufferに置換した後, 凍結保存した。THGPの定量は凍結融解尿およびcontrol THGPをmicroplateに固相化し, MoAbを第1抗体としたenzyme immunoassay (EIA法)で実施した。また, 得られたTHGP量を同時に測定した尿中

creatinine 比で比較した。

尿中血球成分の細胞表面THGP抗原の検討は, 各種腎・尿路疾患患者の新鮮尿を遠心して得られた沈渣をPBSで洗浄後, MoAbを第1抗体とする蛍光抗体法でおこなった。

【結果】single cell manipulationにて, 6株の抗体産生 hybridoma が得られた。これらが産生する MoAb の isotype はすべて $\mu\kappa$ 型で, Western blotting による検討では THGP と単一の band として反応した (図1)。inhibition assay では, 6株の hybridoma が産生する MoAb は THGP に対して相互に4種の異なる epitope を認識していた (図2)。これらの異なる epitope を認識する No. 1, 3, 5 の MoAb は, 摘出および生検腎の尿細管細胞にのみ反応を認めたが, No. 6 の MoAb は尿細管細胞以外にボウマン嚢の urinary space にも陽性所見を認めた。さらに, No. 1 の抗体を用いた EIA 法では, 10 ng から 1.1 μ g までの尿中 THGP の定量が可能であった (図3)。尿中 THGP/creatinine 値の検討では, 正常対象に比較して VUR 患者では VUR の grade に関係なく低値を示す例がみられた (図4)。また, 手術後も低値を持続する例と増加傾向を示す例とがみられた。各種腎・尿路疾患に

近畿大学医学部小児科学教室

Sunao Maki, Hiroshi Miyata, Takashi Yamamoto, Tadakiyo Fujiyama,
Kozo Matsui

Dept. of Pediat., Kinki Univ. School of Medicine

ともなう血尿・白血球尿における尿中細胞成分表面の THGP 抗原の検討では、急性糸球体腎炎やメサングウム増殖性腎炎、膜性増殖性腎炎および上部尿路感染症において THGP 陽性細胞の高値を認め、下部尿路感染症では低値を示した(表1)。

【考察】THGP は Henle 係蹄上行脚や遠位尿細管に由来する糖蛋白で、尿円柱の主成分として知られている。しかし、THGP の生理的機能や意義については未だ十分には解明されていない。THGP の抗原性に関するこれまでの研究では、Brunisholz²⁾らが尿中 THGP に対する MoAb を作製し、7種の epitope が存在すると報告している。著者らの検討でも得られた MoAb の解析から、THGP には少なくとも4種以上の epitope が存在することが推測された。これらの認識する epitope の差によって、腎組織内での THGP 抗原の局在が異なったことは、THGP 抗原の由来を考える上で興味あることで、尿細管細胞のみに反応した MoAb は、尿細管細胞由来の THGP 抗原のみを認識していると考えられた³⁾。また、ボウマン囊の urinary space に No.6 の MoAb と反応する THGP 抗原を認めたが、尿中の THGP が intratubular urinary backflow によってボウマン囊腔内に浸潤した⁴⁾とは考えられないことから、これと反応した MoAb は尿細管細胞由来の THGP と共通抗原性を持つ非尿細管細胞由来の THGP 抗原を認識しているのではないかと推察された。

尿中 THGP 排泄の検討は、Lynn⁵⁾らも polyclonal 抗体を用いた測定法で腎疾患例について行なっているが、尿中 THGP の定量には様々な問題を解決する必要がある。著者らの今回の尿の前処理は測定結果の再現性を増した。VUR 患者での検討結果は、VUR に伴

う functional distal tubular cell の障害の程度を反映していると考えられた。さらに、尿中細胞成分の表面 THGP 抗原に関しては、赤血球や白血球の尿細管部分への通過に伴い THGP 抗原が細胞表面に付着すると考えられ⁶⁾、尿中細胞の THGP 抗原の有無により、その細胞が nephron segment 由来か否かを決定することが可能と考えられた。

【文献】

1. Dawnay A, et al.: The development of a radioimmunoassay for Tamm-Horsfall glycoprotein in serum. *Biochem J* 185, 679-687 (1980)
2. Brunisholz M, et al.: Characterization of monoclonal antibodies specific for human Tamm-Horsfall protein. *Kidney Int* 29, 971-976 (1986)
3. Sikri KL, et al.: Localization of Tamm-Horsfall glycoprotein in the human kidney using immuno-fluorescence and immuno-electron microscopical techniques. *J Anat* 132, 597-605 (1981)
4. McGiven AR, et al.: Tamm-Horsfall protein in glomerular capsular space. *J Clin Pathol* 31, 620-625 (1978)
5. Lynn KL, et al.: Excretion of Tamm-Horsfall glycoprotein in renal disease. *Clin Nephrol* 22, 253-257 (1984)
6. Christine K, et al.: Tamm-Horsfall protein coating of free cells in urine. *Amer J Kidney Disease* 9, 44-50 (1987)

Abstract

A Study of Tamm-Horsfall Glycoprotein in Reflux Nephropathy

A properties and utilization of monoclonal antibodies (MoAb) specific for human Tamm-Horsfall glycoprotein (THGP) have been reported. Six MoAb were produced, and recognized four distinct epitopes. One MoAb reacted with substance within the glomerular capsular space in the normal human kidney, and 3 MoAb reacted only with the surface of renal tubular cells. In some of the patients with vesico-ureteral reflux (VUR), the ratio of urinary THGP/creatinine concentration was lower than that in normal controls. After the operative healing of VUR, the secretion of THGP returned to normal levels in some cases. However, the secretion of THGP remained low in the rest of cases. The presence of THGP coating cells in urinary sediments indicated that these cells were derived from upper urinary tract.

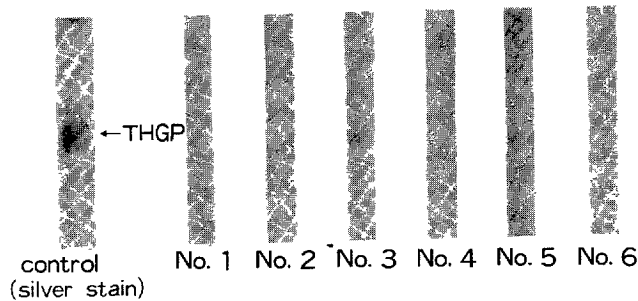


図1. 抗 THGP monoclonal 抗体と尿中 THGP 抗原との反応について Western blotting 法による検討

表1. 抗 THGP monoclonal 抗体感作 R-PHA cell による inhibition assay

R-PHA cell	No 1	No 3	No 5	No 6
Inhibitor				
No 1	+	-	-	-
No 2	-	-	+	-
No 3	-	+	-	-
No 4	-	-	-	+
No 5	-	-	+	-
No 6	-	-	-	+

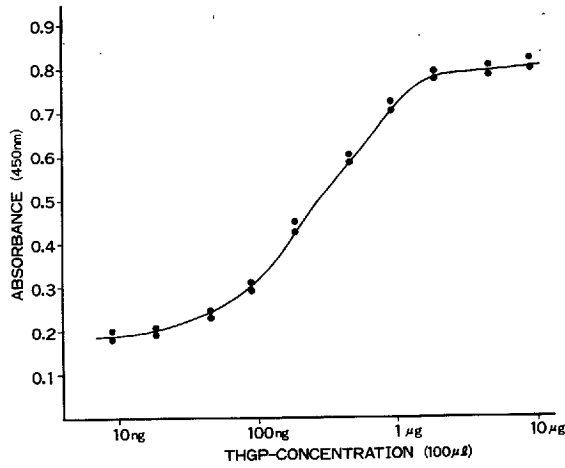
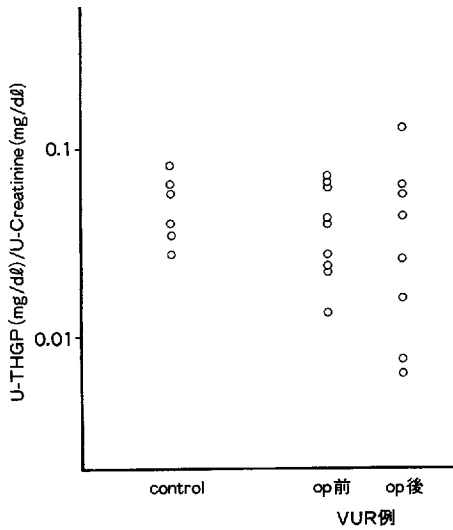


図2. EIAによるTHGP測定のstandard curve

表2. 各種腎・尿路疾患における尿中THGP抗原陽性細胞の検討



Disease	No.	THGP coating cells (%)
Acute GN	4	79 ± 10.6
Mesangial proliferative GN		
IgA nephropathy	9	79 ± 19.6
non IgA	11	82 ± 19.0
Henoch-Schonlein purpura nephritis	3	42 ± 38.0
Membranous nephropathy	2	0
Membranoproliferative GN	3	80 ± 17.4
Lupus nephritis	5	14 ± 11.8
Idiopathic hematuria	3	60 ± 43.5
Upper UTI	7	70 ± 23.6
Lower UTI	5	15 ± 35.8
Abacterial pyuria	8	6 ± 9.0

GN : glomerulonephritis
UTI : urinary tract infection

図3. 正常対象とVUR患者における尿中THGP/creatinine 排泄量の検討



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



Tamm-Horsfall glycoprotein (THGP) に対する複数の monoclonal 抗体 (MoAb) を作製し、これを用いて THGP 抗原の腎組織内での局在ならびに尿中 THGP 排泄量を検討するとともに尿中細胞成分の由来を検討した。得られた MoAb は THGP に対して 4 つの異なる epitope を認識し、このうちの 1 つの MoAb は尿細管細胞以外にボウマン嚢に接した部分とも反応した。尿中 THGP/creatinine 値は vesico-ureteral reflux 患者の一部で低値を示し、手術後に増加する例と低値を持続する例がみられた。細胞表面に THGP 抗原を認めた尿中細胞は、上部尿路由来であった。