

# 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

リンパ球の腎疾患発症への関与を検討する目的で、リンパ球ConA添加培養上清の血管内皮細胞に及ぼす影響を観察した。培養血管内皮細胞のCa<sup>++</sup>取り込みを指標として培養上清の内皮細胞刺激因子を測定すると、微小変化型ネフローゼ症候群では活動期に高く、寛解に伴って消失する。培養内皮細胞単層膜を用いて培養上清の膜透過性に対する作用を検討すると、本症候群の活動期には血管壁の透過性亢進が認められる。糸球体疾患にはこのような現象は見られない。

ネフローゼ症候群 リンパ球 血管内皮細胞 血管透過性

### 序

ネフローゼ症候群の発症に免疫機構の変容が関係していることは、すでに多くの報告が見られ、広く認められているところである。しかし、その発症に直接作用する機序については未だ不明である。一方、ネフローゼ症候群の主な症状は、著しい蛋白尿と浮腫である。これらはいずれも血管透過性の亢進によるものと考えられる。血管透過性は種々の因子によって規定されるが、内皮細胞機能も重要な役割を有している。しかし、ネフローゼ症候群についてこの方面の研究は余りみられない。そこで、免疫機構と血管透過性との関係を究明する意味で、リンパ球培養上清の血管内皮細胞に及ぼす影響について検討した。

### 研究方法

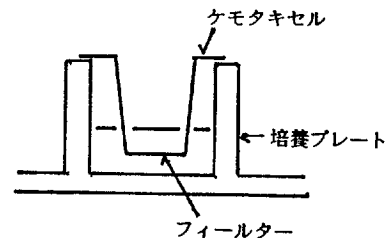
末梢血から常法により単核球を分離し、120 $\mu$ g/mlのConAを加えた10%牛胎児血清添加RPMI培養液中で3日間培養した後、その上清を分離した。

血管内皮細胞を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培養した後、Fura-2 Acetoxymethyl Ester (Fura-2 AM) を最終濃度 5 $\mu$ Mとなるように加え、30分培養した。培養後 pH 7.4 の温 PBSで3回洗浄した後、各wellに培養上清 100 $\mu$ lを注入し1

時間培養した。次いで各wellから排液後温 PBSで3回洗浄した。その後ラウリル硫酸ソーダ液 200 $\mu$ lを注入して十分攪拌した。この溶液の蛍光光度を励起波長 339nm、蛍光波長 500nmで測定した。ConA添加培養上清の示す測定値を無添加培養上清のもので除した値を内皮細胞刺激指数 (Endothelial cell stimulation index: E.S.I.) とした。

培養内皮細胞単層膜の透過性によるリンパ球培養上清中の透過性因子の検討には、倉敷紡績製のケモタキセルを用いた。(図1) このセルにはPolycarbonateのフィルターが付いているが、膜孔径5 $\mu$ mのものにI型コラーゲンを塗布したうえで内皮細胞を培養した。単層膜が形成された後、24穴培養プレートに装着しセル内にTrypan blue-Albumin複合体100 $\mu$ lを注入し色素の非特異的漏出のないことを確認した後培養上清 100 $\mu$ lを

図1



広島大学幼児保健学教室

Bommi shimizu

Hiroshima University, Department of Child Health

加えた。1時間静置後外側容器内の色素濃度を590 nmの波長における吸光度で測定した。ConA添加培養上清の示す値を無添加培養上清のもので除して透過指数 (Permiability index:P.I.) とした。

対象症例は、非頻回再発の微少変化型ネフローゼ症候群5例の発症時と完全寛解時、糸球体疾患として急性糸球体腎炎2例、血尿、蛋白尿を呈するIgA腎症2例、Alport症候群1例である。

### 結 果

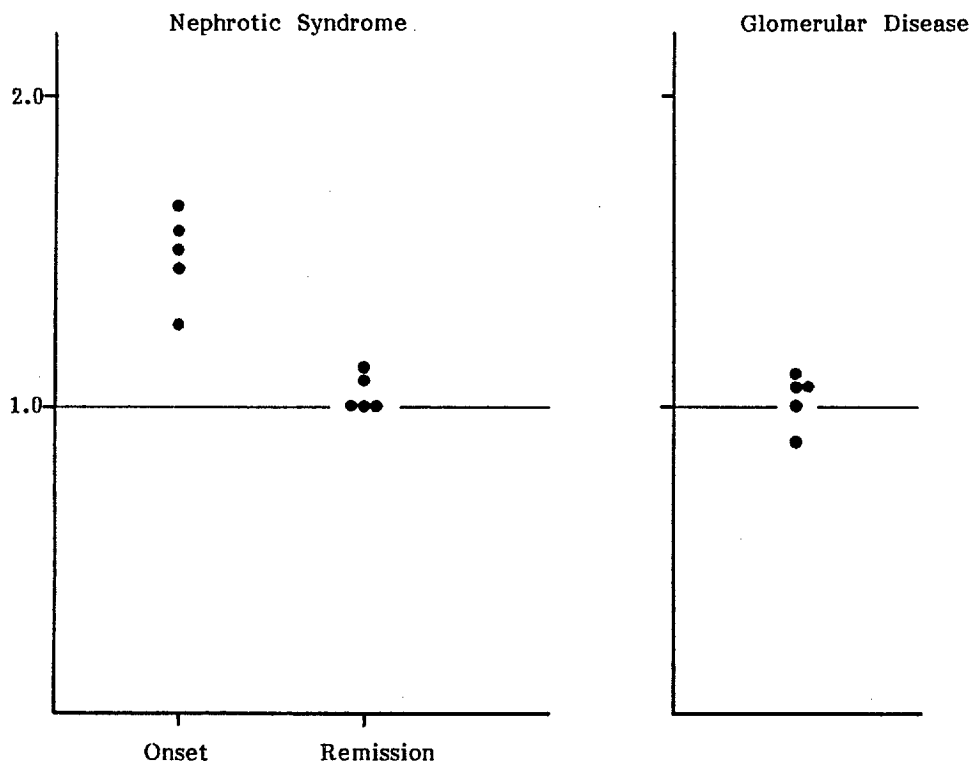
微少変化型ネフローゼ症候群では発症時のリンパ球ConA添加培養上清の内皮細胞刺激因子が高値

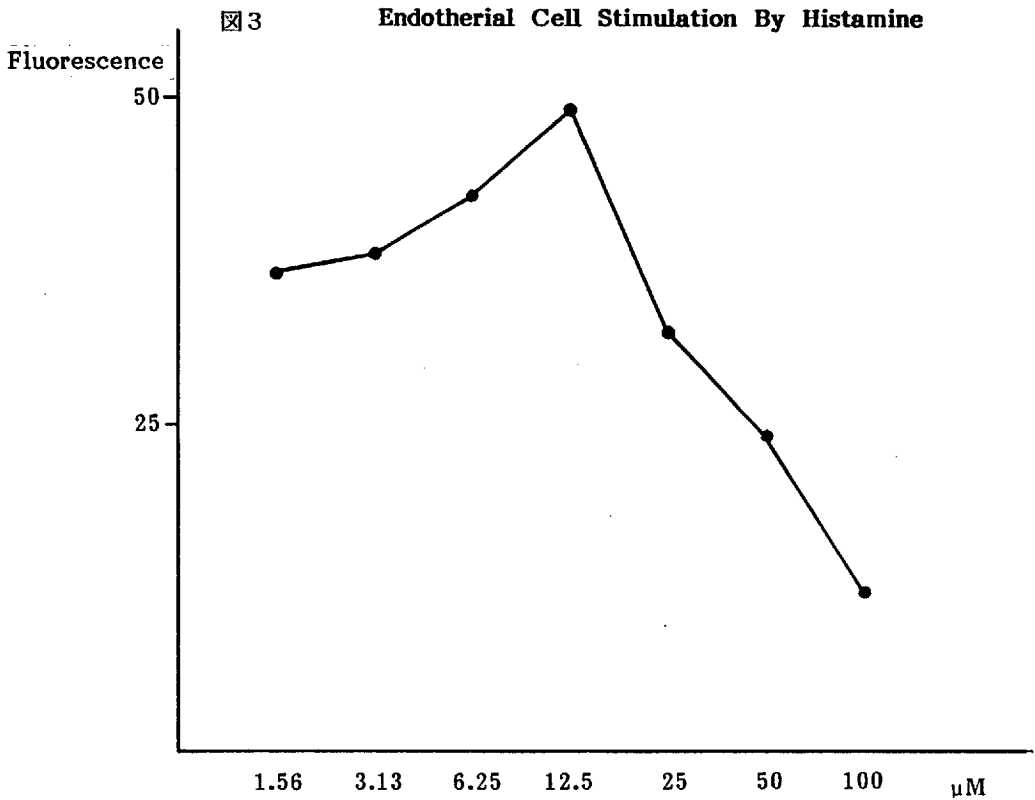
を示し、寛解に伴って低下、消失する。しかし、糸球体疾患患児のリンパ球にはこのような因子の産生はみられない。(図2)

ヒスタミンの血管内皮細胞刺激作用を検討したところ、12.5 $\mu$ Mまではほぼ濃度に比例してCa<sup>++</sup>の取り込みが増加した。高濃度でかえって取り込みが低下するのはヒスタミンが細胞毒として作用するためであろう。(図3)

培養上清の培養内皮細胞単層膜の透過性に及ぼす影響については、微少変化型ネフローゼ症候群の発症時に透過指数が高値を示すものが多いが、高値を示さない例もある。完全寛解期においても多くの症例は低値であるが、やや高値を示すも

図2 Endothelial Cell Stimulation Index (Ca<sup>++</sup> Elicitation Index)





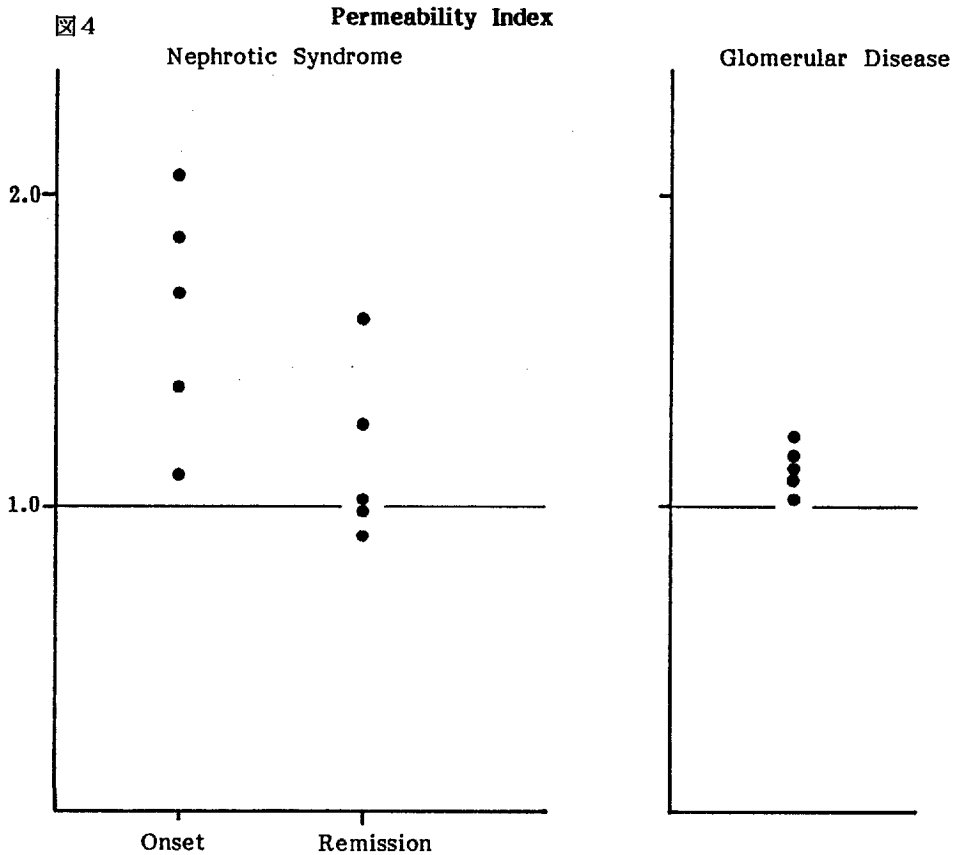
のもある。糸球体疾患では培養内皮細胞単層膜の透過性を亢進させる因子の産生はみられない。(図4)

#### 考 察

血管壁の透過性は、血管壁を構成する各種成分の総合的機能として規定されるものである。従来は血管壁基底膜が重視され、特に陰性荷電の研究などがなされてきたが、最近内皮細胞機能が注目されている。内皮細胞は単に血管壁を構成する細胞成分であるだけでなく、抗血栓作用をもち、その他、炎症、免疫などにも関わり、プロスタグランジン、ロイコトリエンなどアラキドン酸代謝をもおこなう多機能性細胞であることが知られてきた。しかし、ネフローゼ症候群に関す

る内皮細胞の研究は未だ少ない。

内皮細胞を介する透過性については細胞の収縮による細胞間隙の増加と、Endocytosis または Transcytosisによる細胞内移動によるものが考えられている。前者の場合にはその変動を始動するのはCa<sup>++</sup>の細胞内流入であるという。また、始動させる因子には、細胞膜に存在する受容体作動性チャンネルを介するものがある。本研究で示されたリンパ球のConA添加培養上清によるCa<sup>++</sup>の細胞内取り込みは、内皮細胞の細胞膜に培養上清に存在する因子に対する受容体が存在すること、更に、ネフローゼ症候群の活動期リンパ球が受容体結合因子を産生していることを示唆させるものである。培養内皮細胞単層膜の色素結合アルブミン透過性の検討でも同様の結果が得られ



たことは、細胞収縮と透過性亢進の関係を直接証明したことになる。しかし、 $Ca^{++}$ 取り込み以上の透過性亢進を示す例もあり、細胞内移動も存在することを示唆している。これらの変化が糸球体病変にみられないことは、血管透過性の亢進がネフローゼ症候群と糸球体症では異なった機構によるものであることを示すものであろう。

これら因子の分析については未だできていない。今後、アラキドン酸、Cytokineなどを目標に検索を続ける必要がある。そのことが、ネフローゼ症候群の発症病理の解明につながるものである。

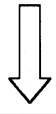
#### 結 語

微小変化型ネフローゼ症候群の活動期における

リンパ球のConA添加培養上清が、血管内皮細胞に作用して血管壁の透過性を亢進させることを示した。その因子の分析は未だできていないが、今後の検討によりネフローゼ症候群の発症病理の解明が期待される。

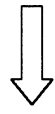
#### 文 献

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



## 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



リンパ球の腎疾患発症への関与を検討する目的で、リンパ球 ConA 添加培養上清の血管内皮細胞に及ぼす影響を観察した。培養血管内皮細胞の  $Ca^{++}$  取り込みを指標として培養上清の内皮細胞刺激因子を測定すると、微少変化型ネフローゼ症候群では活動期に高く、寛解に伴って消失する。培養内皮細胞単層膜を用いて培養上清の膜透過性に対する作用を検討すると、本症候群の活動期には血管壁の透過性亢進が認められる。糸球体疾患にはこのような現象は見られない。