◆原 著◆

腎疾患児の末梢血単核細胞培養上清中および尿中 TNF- α
の臨床的意義について宮澤 廣文^{*1}・渡部めぐみ^{*2}・大川 雅子^{*3}・青塚 新一^{*3}

要 旨

腎疾患について尿中 TNF- α および末梢血中単核細胞培養上清中 TNF- α と腎症、特にネフローゼ症候群の経過及び治療との関連を検討した。単核細胞培養上清中 TNF- α は活動期に高値で、非活動期には低下する傾向が見られた。尿中 TNF- α は活動期、非活動期の差が認められず、単核細胞培養上清中の TNF- α との関連も認められなかった。治療後の単核細胞培養上清中 TNF- α と尿タンパク濃度は、治療前のそれに比較して、連動して低下する傾向が認められた。タンパク尿の再発時には単核細胞培養中 TNF- α は高値で、ステロイドと免疫抑制剤にてコントロールされると低下する傾向にあった。単核細胞培養上清中 TNF- α と尿タンパク濃度が、治療による動きと平行することから、TNF- α が腎における病態と関連している可能性が示唆された。以上のことから単核細胞培養上清中 TNF- α の測定は腎疾患の治療の指標になると考えられる。

はじめに

腎疾患患児において、その病態にサイトカインがどのように作用しているかは、いまだ不明な点が多い。近年、糸球体マクロファージから分泌される炎症性サイトカインである tumor necrosis factor- α (TNF- α) や IL-1 が、糸球体障害の重要な病原因子である可能性が提唱されている。TNF- α の病態への関与は、糸球体マクロファージのみならず、メサンジウム細胞、内皮細胞、上皮細胞をまきこむと報告されており¹⁾²⁾、これらの炎症性サイトカインが、腎疾患児における腎炎を媒介することが推測される³⁾。

今回、腎疾患患児の末梢血単核細胞培養上清中の TNF- α 、および、メサンジウム細胞、内皮細胞、上皮細胞よりの放出を反映する尿中 TNF- α を測定し、臨床データとの比較検討を試みた。また、経過を追って観察した症例では、治療との関連についても検討を加えた。

対象および方法

対象：

国立国際医療センターと三方ヶ原聖隷病院にて経過観察中の患児17例を対象とした。その内訳は、ネフローゼ症候群—微少変化群 (MCNS) 8 例、膜性増殖性糸球体腎炎 (MPGN) 1 例、巣状糸球体腎炎 (SFGS) 3 例、逆流性腎炎 (RN) 1 例、メサンジウム増殖性腎炎 (Mesangial PGN) 2 例、ウェジナー肉芽腫症 (Wegener's granulomatosis) 1 例、IgA 腎症 (IgA NP) 1 例である。

^{*1}国立国際医療センター 小児科
(〒162 新宿区戸山1-21-1)

^{*2}三方ヶ原聖隷病院 小児科

^{*3}国立国際医療センター 研究所臨床免疫研究室
Production of TNF- α by mononuclear cells and urinary TNF- α in glomerulopathies of childhood.

Hirofumi Miyazawa^{*1}, Megumi Watanabe^{*2}, Masako Okawa-Takatsuji^{*3}, Shinichi Aotsuka^{*3}

^{*1}Department of Pediatrics, International Medical Center of Japan

^{*2}Department of Pediatrics, Mikatagahara Seirei Hospital

^{*3}Division of Clinical Immunology, Research Institute, International Medical Center of Japan

Key Words : 腎疾患
TNF- α

図1 腎疾患患児の活動期、非活動期、安定期における、単核細胞培養上清中(A)および尿中TNF-α量(B)の比較。非活動期患児の単核細胞培養上清中TNF-α量は、活動期のそれに比較して、低下する傾向が認められた。

図2 腎疾患患児グループ別の単核細胞培養上清中および尿中TNF-α量の比較

方法：

患児17例から、のべ32回、末梢血および早朝尿を同時に採取した。末梢血から比重遠心法により単核細胞を分離し、無刺激で、37°C、5%CO₂インキュベーターで20時間培養した後、その上清を採取した。尿は採取後沈渣を除き、分子量10,000の限外ろ過フィルター（セントリセルキット、フナコシ社）を用いて約10～20倍に濃縮した。尿中TNF-α濃度は、濃縮した検体で測定し、原尿濃度は、算出して求めた。単核細胞培養上清中、お

よび尿中のTNF-αの測定は、ELISAキット（R&D社）で行ない、尿タンパク濃度やステロイド量との関連を検討した。

結 果

1) 単核細胞培養上清中、および尿中のTNF-α量
腎疾患患児（n=17）の単核細胞培養上清中TNF-α量は、 55.7 ± 52.9 （平均値±標準偏差）pg/ml、尿中のTNF-α量は、 0.45 ± 0.38 pg/mlであった。腎疾患患児

図3 腎疾患患児における単核細胞培養上清中および尿中 TNF- α 量(A), 尿タンパク濃度(B), ステロイド投与量(C)との関連。○は MCNS, ●はその他の腎疾患。

図4 腎疾患患児における尿中 TNF- α 量と尿タンパク量 (A), ステロイド投与量(B)との関係。○は MCNS, ●はその他の腎疾患。

を活動期, 非活動期, 安定期にグループ分けし, 単核細胞培養上清中 TNF- α 量と尿中の TNF- α 量を, 図1に示した。単核細胞培養上清中 TNF- α 量は, 活動期患児 ($n=4$) で, 80.5 ± 83.1 pg/ml, 同患児の非活動期で, 11.9 ± 5.3 pg/ml, 安定期患児 ($n=13$) で, 52.4 ± 38.5 pg/mlであった。活動期と非活動期の単核細胞培養上清中 TNF- α は, paired T test で有意の差が認められた ($p < 0.05$)。一方, 尿中 TNF- α は, 活動期患児 ($n=4$) で, 0.13 ± 0.07 pg/ml, 同患児の非活動期では, 0.22 ± 0.10 pg/ml, 安定期患児 ($n=13$) では, 0.33 ± 0.32 pg/mlで, 活動期と非活動期の尿中 TNF- α は差が認められなかった。

2) 診断別の単核細胞培養上清中, および尿中 TNF- α 量

単核細胞培養上清中, および尿中 TNF- α 量を診断別に示した (図2)。単核細胞培養上清中 TNF- α が 100 pg/ml以上の高値は, MCNS 1例, SFGS 1例, RN 1例に認められた (図2-A)。尿中 TNF- α が 0.5 pg/ml以上の高値は, MPGN 1例, SFGS 2例, Mesangial PGN 1例, Wegener's granulomatosis 1例に認められた (図2-B)。MCNS では, 尿中 TNF- α 量が低値を示した。

3) 単核細胞培養上清中 TNF- α 量, 尿中 TNF- α 量, 尿タンパク濃度, ステロイド投与量の関連

図5 腎疾患患児における単核細胞培養上清中 TNF- α と尿タンパク濃度の治療の前後の動き。矢印の先は、治療後を示す。

単核細胞培養上清中 TNF- α 量と、尿中 TNF- α 量、尿タンパク濃度、ステロイド投与量との関連を見るため、MCNS 8 例、およびその他の群 9 例に層別して、図 3 に示した。単核細胞培養上清中 TNF- α 量と尿中 TNF- α 量との間には、全く関連が認められなかった。単核細胞培養上清中 TNF- α 量と尿タンパク濃度には、正に関連する傾向を認めた。単核細胞培養上清中 TNF- α 量とステロイド投与量は、負に関連する傾向を示し

た。図 4 に示したように、尿中 TNF- α 量と尿中タンパク濃度、および尿中 TNF- α 量とステロイド投与量は、負に関連する傾向を示した。

4) 腎疾患患児における単核細胞培養上清中 TNF- α と尿タンパク濃度の治療の前後の動き

治療の前後の単核細胞培養上清中 TNF- α と尿タンパク濃度の動きを示した (図 5)。対象症例は、MCNS 6 例、RN 1 例、IgA NP 1 例であった。治療により、尿タンパク濃度の減少と単核細胞培養上清中の TNF- α 量の減少が、一致して動いている傾向が確認された。

5) 症例の臨床経過と単核細胞培養上清中および尿中 TNF- α 量の変化

頻回再発型ネフローゼ症候群の 2 例について、検討した。

症例 1 (RF) : 本例では、初発入院時とステロイド減量後の尿タンパク再現時の培養上清中 TNF- α 量と尿中タンパク定量値との動きを検討した (図 6)。初発入院時、ステロイドの投与で疾患活動性はコントロールされ、培養上清中 TNF- α 量は低下した。尿タンパク再現時には、培養上清中 TNF- α 量も再び増加したが、ステロイドと免疫抑制剤の投与で、培養上清中 TNF- α 量は低下した。

症例 2 (UT) : 本例では、初回再発および 2 回目の再発時とステロイド減量後の尿タンパク再現時の培養上清中 TNF- α 量と尿中タンパク定量値との動きを検討し

図6 腎疾患患児 (症例 1 : RF, MCNS) の臨床経過および治療と、単核細胞培養上清中および尿中 TNF- α 量の変動。
Cycloph : cyclophosphamide, Pred : predonine.

図7 腎疾患患児 (症例2: UT, MCNS) の臨床経過および治療と、単核培養上清中および尿中 TNF- α 量の変動。
Cycloph: cyclophosphamide, Pred: predonine, Ciclosp: ciclosporine.

た。初回再発時、ステロイドの投与で疾患活動性はコントロールされ、培養上清中 TNF- α 量は低下した。ステロイド減量時に、2回目の再発があり、単核細胞培養上清中 TNF- α が再び増加したが、ステロイドと免疫抑制剤の投与で、培養上清中 TNF- α 量は低下した (図7)。

考 察

腎疾患におけるサイトカインの報告は多いが腎疾患への関与のメカニズムはまだ明確に解明されていない。今回我々の検討では、単核培養上清中 TNF- α は活動期に有意に高値であることが認められ、臨床症状とも関連することから、TNF- α が糸球体障害と関連することが示唆された。尿中 TNF- α のついてはその変動は有意差を示さないことからサイトカインの産生後、何らかのインヒビターが結合し、検出されなくなった可能性が考えられる。

ネフローゼ症候群の頻回再発型2例の症例検討では、その再発時の経時的単核培養上清中 TNF- α の動きは、その病態を良く反映しており単核細胞培養上清中 TNF- α 産生が多い時はステロイドと免疫抑制剤と多剤併用を余儀なくされた。単核細胞培養上清中の TNF- α を測定することは、治療の指標として有効と思われる。Bustos らはネフローゼ症候群 (微小変化群) において単核細胞の TNF- α 産生と蛋白尿との間に相関がみら

れ、その病態 (発症と寛解) の間に差がみられたと同様の報告を出している⁴⁾。

尿中サイトカインが病態を反映しているという報告は、IgA 腎症、MPGN, MC, 自己抗体に絡んだ腎炎等の報告があり¹⁾²⁾⁶⁾、血中、尿中濃度検査も含めて、これらのサイトカイン検査はIL-6, IL-1, IL-8, TNF 等についてウイルス、リケッチア、細菌、自己免疫疾患等、腎疾患の原因を考慮しながら検索する必要がある⁵⁾⁷⁾⁸⁾。

結 語

1) 単核細胞培養上清中 TNF- α は、活動期に高値で、非活動期には、低下する傾向が認められた。

2) 尿中 TNF- α は、活動期、非活動期の差が認められず、単核細胞培養上清中の TNF- α との関連も認められなかった。

3) 治療後の単核培養上清中 TNF- α と尿タンパク濃度は、治療前のそれに比較して、連動して低下する傾向が認められた。

4) タンパク尿の再発時には、単核細胞培養上清中の TNF- α は高値で、ステロイド剤やサイクロスポリンの投与で、臨床経過の改善と平行して、TNF- α 値も低下した。

5) 単核細胞培養上清中 TNF- α と尿タンパクが治療による動きと平行することから、TNF- α が糸球体障

害と関連する可能性が示唆された。

文 献

- 1) Ozen, S., Saatci, U., Tinaztepe, K., Bakaloglu, A., Barut, A. : Urinary tumor necrosis factor levels in primary glomerulopathies. *Nephron*. 66 : 291-294. 1994.
- 2) Lehto, T., Honkanen, E., Teppo AM., Meri, S. : Urinary excretion (CD59), complement SC5b-9 and cytokines in membranous glomerulonephritis. *Kidney Int.* 47 : 1403-1411. 1995.
- 3) Matsumoto, K. : Increased release of tumor necrosis factor- α by monocytes from patients with glomerulonephritis : *Clin Nephrol.* 40 : 148-154, 1993.
- 4) Bustos, C., Gonzalez, E., Muley, R., Alonso, J L., Egido, J. : Increase of tumour necrosis factor α synthesis and gene expression in peripheral blood mononuclear cells of children with idiopathic nephrotic syndrome : *Eur J Clin Invest.* 24 : 799-805, 1994.
- 5) Saxena, S., Mittal, A., Andal, A. : Pattern of interleukins in minimal-change Nephrotic Syndrome of childhood : *Nephron* 65 : 56-61. 1993.
- 6) Wada, T., Yokoyama, H., Tomosugi, N., Hisada, Y., Ohta, S., Naito, T., Kobayashi, K., Mukaida, N., Matsushima, K. : Detection of urinary interleukin-8 in glomerular diseases. *Kidney Int.* 46 : 455-460. 1994.
- 7) Matsumoto, K. : IL-8 release from cultured peripheral blood monocytes of patients with glomerulonephritis. *Clin Exp Immunol.* 99 : 106-111. 1995.
- 8) Mantovani, A., Bussolino, F., Introna, M. : . Cytokine regulation of endothelial cell function : from molecular level to the bedside. *Immunology Today.* 18 : 231-240. 1997.