血清のマウス腎細胞 DPI 還元力に対する影響

(第 一 報)

日本医科大学附属医院産婦人科 (主任 真柄正直教授)

笠 原 孝 郎

Takao Kasahara

血清の腎毒性、腎融解性に対する最初の実験的研究は、Lindemann (1900)¹⁾に始り、その後、Pearce²⁾は家兎腎を抗原として作った抗家兎腎モルモット血清が、家兎に蛋白尿、円柱尿、血尿を起さしめ、また腎病理変化をももたらす事を知った。そしてこの抗腎血清は、腎に特異的であり、その注射前に腎エムルジョンと混合する事により、また腎細胞で吸収する事により、このような腎障害作用を防ぐ事が出来る³⁾⁴⁾⁵⁾。馬杉⁶⁾⁷⁾は抗マウス腎家兎血清を非動化し家兎に静注して、人の糸球体腎炎に以た病理変化を起さしめ、これを Nephrotoxin による病理変化とした。このような臓器特異的、種族特異的抗体は *in vitro* でも沈降反応⁸⁾⁹⁾、補体結合反応¹⁰⁾で証明出来る。放射性ヨードの使用により¹¹⁾¹²⁾¹³⁾、この特異性抗体はそれが腎に附着する事により、その効果を十分に現わし¹⁴⁾¹⁵⁾、その抗原性は糸球体毛細管の基底膜にあると言われる¹⁶⁾。

そして Burky¹⁷⁾は細菌毒素、或は細菌が、正常組織を自家抗原性に導くと言ひ、真柄¹⁸⁾は家兎胎盤エキスをブドウ球菌毒素を混じて家兎に注射すると、この家兎血清は家兎胎盤エキスと沈降反応及び補体結合反応を起す事を認めるが、その特異性は疑わしいと言ひ、そしてまた Schwentke¹⁹⁾は家兎の腎組織に、ブドウ球菌、連鎖球菌ワクチンを附加する事により、いわゆる自家抗体を産生せしめたと言ふ。

細胞の活性度の指標として dehydrogenase 活性をとり、その総和である 2,6-dichlorophenol Indophenol 還元能をもつて現わそうとする INK 法²⁰⁾²¹⁾を応用することにより、このような血清の Cytotoxin 作用を、直接に生化学的に測定せんとして以下の一連の実験を行つた。

一定細胞数の腎細胞を必要とする要求から、Trypsin により腎細胞を消化して²²⁾²³⁾、細胞を集め、YLE 培地、馬血清の使用により、その十分なる保生、即ち Indophenol 還元能力の維持をはかつた。

Trypsin 消化の比較的簡単なこと、また手近にあるという理由から、細胞としてはマウス腎細胞を使用し

た。

実験材料及び方法

1) 腎細胞保生メジウム、及び DPI 溶液²⁰⁾、腎細胞保生のためのメジウムとして、細胞の DPI 還元能力を最も良く維持する YLE 培地 (Earle 液に Yeastextract (Difco) と Lactalbumin enzymatic hydrolyzate を加えたものでデューブリザーで凍結保存する)を使用する。

保生腎細胞活生度の指標として用いる、Indophenol は 2,6-dichlorophenol-Indophenol 1:3000 培 PBS 溶液 (DPI 溶液)を使用する。

2) マウス腎細胞

健康マウスを放血により屠殺し、両腎を摘出し、2~3 mm³ に細切したのちこれを PBS 溶液 (Phosphate-buffered saline) にて数回洗い、血球を取り除く、37°C、0.25% Trypsin (Difco) PBS 溶液の約 20 ml を之に加え、数分間ピペティングして攪拌²⁴⁾したのち、600 rpm 2分間遠心沈澱し上清を取り氷水中にて冷却する。沈査には再び Trypsin 溶液を加え同様に攪拌を続ける。組織の消化の状態を鏡検しながら、8~10 回繰返し、集めた上清は 3000 rpm 5分間遠沈し、沈査に残つた腎細胞を再び PBS 溶液で数回洗い、Trypsin を取り除いたのち YLE 培地に浮遊させる。

結合組織は最後まで消化されずに残り、腎に附着した脂肪組織は最初の PBS 溶液に浮遊し、除く事が出来る。

細胞は白血球数測定と同方法で計算する。Trypsin 消化の進行は、一様ではないから全組織が個々の細胞に分解するまで消化を続けると活生度は非常に低下する、このため Thoma の計算板で算定出来る範囲内で消化を止める。

Trypsin 処理した腎細胞は、YLE 培地内で 24 時間後も十分に DPI 還元能力を維持するが、使用する腎細胞はその都度 Trypsin 処理する。

Trypsin 溶液は凍結保存する。

3) 患者血清及び血清蛋白分劃

早朝空腹時に採血した患者血液より、血清を分離し凍結保存する。

血清蛋白分割は、低温アルコール分割法²⁵⁾ (deutsch) 及び硫酸ナトリウムによる塩析法²⁶⁾²⁷⁾ を使用し、低温アルコール法による r_2 -Globulin は濾紙電気泳動で確め、Michro-Kjeldahl 法で、窒素を定量し、 r_2 -Globulin 量を換算する。

4) 実験方法 (INK 法)

人の悪性腫瘍の各種制癌剤に対する感受性試験の一方法として考案された術式 INK 法を応用する。

$1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ のマウス腎細胞 (DPI 還元力価により細胞数を補正する) 浮遊 YLE 溶液の各 0.5 ml を、選定した小試験管に分注し、血清、或は血清分割 Globulin の一定量を加え、更に YLE 10 倍稀釈モット補体の各 0.5 ml を加える。対照として血清を加えぬもの 3 本を用意する。37°C の温水振盪器中に 3 時間保生せしめたのち、3000 rpm 15 分間遠沈して上清をすて、腎細胞のみを試験管底に残す。この血清に作用せしめた腎細胞の残存活生度を測定するため、前記 DPI 溶液の 0.1 ml を加え、DPI 還元力の十分なる発現の目的で馬血清の各 1 ml を更に加える。良く混合し腎細胞を再浮遊させてから、同様 37°C, 90 分間、振盪器内で Indophenol を還元せしめる。再び対照として、DPI 0.1 ml のみのもの、馬血清 1 ml と DPI 0.1 ml のものとを用意する。還元されずに残つた DPI を 3 ml のブタノールに抽出し光電比色計 ($\lambda = 634 m\mu$) で測定する。

実験結果

1) 血清のマウス腎細胞 DPI 還元力に対する影響

Ehrlich 腹水癌の細胞活性度を INK-Test する場合と同様に腎細胞活性度も、補体の存在に於いて良く維持されるようである。

急性糸球体腎炎、妊娠中毒症、正常人血清を倍数稀

図 1

図 2

稀 釈	10	20	40	80	160	320	640
患者血清 1	±	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-
3	+	+	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-
6	+	-	-	-	-	-	-
正常血清 1	+	+	±	-	-	-	-
2	+	+	-	-	-	-	-
3	+	+	+	-	-	-	-
4	+	+	+	-	-	-	-
5	+	+	-	-	-	-	-
6	+	+	+	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-
9	+	+	-	-	-	-	-

図 3 人血清マウス血球凝集反応

釈し、マウス腎細胞 400 万にて、前記 INK 法で DPI 還元力を測定した。

還元量(%)は比色計の Extinction. O を 100% とし、細胞なしで馬血清と DPI のみの対照試管の還元量を、0% とし換算したものである。(図 1)

血清稀釈 32 倍に於て、正常人血清に比較して、妊娠中毒症、腎炎血清とくに尿蛋白強陽性例に強い還元力低下作用を認める。また腎炎患者血清、及び正常人血清の 56°C, 30 分非動化せるもの及び

生血清を用い、同様細胞数 400 万で還元力を測定した場合、両血清の間に明らかな差が見られるが、非動化による血清の還元力に対する影響は見られない。

(図 2)

血清濃度の高いところでは、両者に判然とした差は見られないが、同血清によるマウス血球凝集反応による力価は、40 倍以下である。(図 3)

この DPI 還元力低下作用は、患者血清でも高度のものと、比較的正常人血清に近いものがあるが、患者血清では 320 倍、640 倍稀釈に於てなお低下作用を保持する。(図 4)

図 4 腎炎患者血清のマウス腎細胞 DPI 還元力に対する影響

2) 血清のマウス腎及び脳細胞に対する影響

血清の腎以外の細胞に対する影響については、脳、肝、肺を腎同様に Trypsin 処理して消化したが脳細胞以外では希望するような細胞が得られず、又活性度の腎との比較も出来なかつた。

脳細胞 DPI 還元力に対する影響は、腎細胞が明らかな活性度低下を示すに反して、対照との差が見ら

図 5 患者血清のマウス腎、及び脳細胞 DPI 還元力に対する影響

れず、血清稀釈による変動も少い。即ち血清の腎細胞に対する還元力低下作用は、脳細胞に対しては全く見られない。(図 5)

3) マウス血球による吸収血清の腎細胞 DPI 還元力に対する影響

YLE 20 倍稀釈血清に同量のマウス血球を加え、37°C、3 時間、作用せしめ、遠沈上清液を使用し、非吸収血清を対照として還元力を測定した。(図 6)

図 6 腎炎患者血清のマウス腎細胞 DPI 還元力に対する影響 (細胞数 400 万)

吸収、非吸収血清の間に変化は見られず、マウス血球による吸収血清の腎細胞還元力低下能力に変化を見る事は出来なかつた。

4) 患者血清静注によるマウス各臓器病理変化

健康マウス 14 匹に、強い DPI 還元力低下作用を有する患者血清、及び正常人血清の、0.1 ml を尾静脈に注入し、1 週間、10 日、2 週間目に屠殺、腎、肝、肺、脳、心臓、膀胱、及び腹膜リン節を鏡検したが、いづれも異常病理所見を認めなかつた。

5) 血清各分割の腎細胞 DPI 還元力に対する影響

図 7 血清各分割のマウス腎細胞 DPI 還元力に対する影響

強い還元力低下作用を認める患者血清の、硫酸ナトリウムによる塩析各分割、Euglobulin, Pseudo II

Globulin, Pseudo I Globulin, Albumin を、原血清量の生理的食塩水に溶解し、その原液を用いて、それぞれの腎細胞 DPI 還元力に対する影響を INK-Test する。(図7)

分割前全血清とこれらの各分割を比較すると、Eu-globulin, Albumin, Pseudo I Globulin は、対照と還元力の差が少く、稀釈による還元量の変動も見られないが、Pseudo II Globulin 分割に於て全血清と同様の還元力低下作用が保持されている事がわかる。

6) 各種血清 Pseudo II Globulin 分割の腎細胞に対する影響

実験5より、腎細胞 DPI 還元力低下作用は、血清の Pseudo II Globulin 分割に存在する事が考えられる。急性糸球体腎炎、妊娠中毒症、子宮癌、正常各月妊婦、健康人男女の各血清を塩析し、其の原液を0.5 ml/ 用いて腎細胞 400 万で還元力を測定する。(図8)

図 8

腎炎ではその全例に還元力低下作用が見られるが、その臨床症状特に尿蛋白の強陽性のものに、強い低下作用が認められるように思われる。妊娠中毒症に於ては、蛋白尿、高血圧を欠く前期妊娠中毒症の妊娠悪阻例では、其の還元力低下作用も軽度或は、正常血清と変わらず、後期妊娠中毒症の重症例では、腎炎と同様還元力低下作用も強い。

妊婦は、経産婦を除き妊娠3カ月以後のもの、及び分娩後1カ月までの血清を使用した、いずれも正常血清と同様に還元力低下作用は認められない。

子宮癌患者血清では、その2例に軽度の低下作用を示すものがあるが、腎炎症状を示す患者ではなく、全体に正常人血清と還元力に差は認められない。

少数例の子宮筋腫、絨毛上皮腫、胞状奇胎では、強い還元力低下作用を示す例はなかつた。

還元力低下作用を示す腎炎患者の臨床経過に於ける低下作用の変動は、入院時、10日後、20日後、退院時の間には、その臨床症状が好転せるにかかわらず、還元力に対する影響は変化が見られなかつた。子宮癌では先きに見られた軽度低下作用を示す例も、その後の追試例では見られず、またその手術前、及び手術後の経過に於ても、還元力に変動は見られなかつた。

(図9)

図 9

7) γ_2 -Globulin の腎細胞に対する影響、低温アルコール分割法により得られた。 γ_2 -Globulin の腎細胞 DPI 還元力に対する影響は、図10 に示す如く、10~15 ml/ の血清より得られた γ_2 -Globulin を2~3 ml/ の生理的食塩水に再溶解し、その0.5 ml/ を使

	例 1	例 2
腎 炎	20.5	25.0
正 常 人	42.0	41.5

還元量 (%)

図10 γ_2 -Globulin の腎細胞 DPI 還元力に対する影響

用したが正常人に比し腎炎患者血清 γ_2 -Globulin に強い還元力低下作用が示された。

考 按

腎細胞の DPI 還元能力を指標として現わした細胞活性度は、YLE 培地内で 24 時間後も十分に保持される。この状態の 3 時間保生後の還元能力を 100% とすると、人血清の存在により、患者血清、正常人血清を問わず一様に活性度は低下するが、正常人血清の存在に於いて示される還元量を、一応の基準とすると、腎炎、妊娠中毒症では更に強い還元力低下作用、即ち活性度低下作用を認める事が出来る。しかもこの作用は、血清の 56°C、30 分非動化処理によつても、マウス血球による吸収処理によつても変りなく維持される。

これら患者血清のこの作用は、腎以外の細胞に対しては全くその還元力低下作用を示さない。肝などに対する影響は知る事が出来なかつたが、かなり腎に特異的なものと思われる。

血清のこのような作用は、濃度の高いところでは、異種抗体、その他の細胞障害作用のため、判然としなないが、稀釈をすすめていけば、患者血清はなお作用を残し、正常人血清では認められなくなる。そして血清の還元力低下の軽重はかなりその臨床症状、とくに尿蛋白の存在に関係があるようである。糸球体腎炎でも、また妊娠中毒症の妊娠悪阻例に於ても、尿蛋白陰性、血圧も正常の例では還元力低下作用も正常血清と変りがない。

患者血清の還元力低下作用は、硫酸ナトリウム塩析による Pseudo II Globulin 分割に低温アルコール法による γ_2 -Globulin 分割に存在することが示された。この Globulin による各種血清の還元力低下作用は、その生血清よりも判然とした差が見られた。

腎炎、妊娠中毒症の一部に於て認められるこの作用は、子宮癌、正常妊婦、正常男女、及び少数例の子宮筋腫、絨毛上皮腫、胞状奇胎患者血清には認められなかつた。

結 論

細胞活性度の指標として、細胞の DPI 還元力をもつて現わす INK 法により、マウス腎細胞活性度に対する人血清の影響について定量的に測定した。

1) マウス腎細胞の DPI 還元力は、人血清の存在により低下し、糸球体腎炎、妊娠中毒症の一部に於て更に著明な低下を認めるが正常妊娠、子宮癌、正常人血清には認められない。

2) マウス腎細胞に対するこの還元力低下作用は、マウス脳細胞には全く影響をあたえない。

3) 56°C 30 分非動化、マウス血球による吸収処理により血清の還元力低下作用は影響を受けない。

4) 患者血清のマウス腎細胞還元力低下作用は、塩析による Pseudo II Globulin 分割に、低温アルコール法による γ_2 -Globulin に存在する。

稿を終るに臨み終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました恩師真柄教授に衷心より感謝と敬意を捧げます。また絶えず御懇篤なる御指導を賜りました伝研西岡博士に深謝し、研究に協力を得た伝研五研及び教室員各位に感謝致します。

文 献

- 1) Lindemann, W.: Ann. Inst. Pasteur. **14**, 49 (1900)
- 2) Pearce, R.M.: Univ. Pennsylvania. Med. Bull. **16**, 217 (1903), **12**, 1 (1904)
- 3) Woltmann, H.: J. Exp. Med. **7**, 119 (1905)
- 4) Sata, A.: Beitr. Path. Anat. u. Allg. Path. **31**, 1 (1906)
- 5) Joseph, E., Smadel, M.D.: J. Exp. Med. **64**, 921 (1936)
- 6) 馬杉復三: 千大医学雑誌, **9**, 1142 (1931)
- 7) 馬杉復三: 千大医学雑誌, **10**, 289 (1932)
- 8) Joseph, E., Smadel, M.D.: J. Immunol. **32**, 75 (1937)
- 9) Joseph, E., Smadel, M.D.: Amer. J. Path. **15**, 199 (1939)
- 10) Simonson, M.: Acta. Path. Scand. **32**, 85 (1953)
- 11) Pressman, D. and Keighley, G.: J. Immunol. **59**, 141 (1948)
- 12) Pressman, D., H.N. Eisen, and P.J. Fitzgerald.: J. Immunol. **64**, 281 (1950)
- 13) Monte. Blau, Eugene. D. Day, and Pressman, D.: J. Immunol. **79**, 330 (1957)
- 14) Monte. Blou, Eugene. D. Day., Jakob. Platinsek, and Pressman, D.: J. Immunol. **79**, 334 (1957)
- 15) Wilson, G.W., and Oliver, J.: J. Exp. Med. **32**, 183 (1920)
- 16) Greenspon, S.A., and C.A. Krakower:

- Arch. Path. **48**, 291 (1950)
- 17) Burky. E.L.: J. Allergy. **5**, 466 (1934)
- 18) 真柄正直, 他: 台湾医学会雑誌, **43**, 725 (1944)
- 19) Schwentker. F.F., and F.C. Comploier: J. Exp. Med. **70**, 223 (1939)
- 20) 西岡久寿弥, 吉田武彦, 他: 日本臨床, **15**, 23 (1957)
- 21) 西岡久寿弥, 吉田武彦, 衣川湍水, 笠原孝郎: 第 17 回日本癌学会総会発表
- 22) Arthne. W. Frische. and Virginia. Jentoft. Proc. Soc. **82**, (1953)
- 23) J.S. Youngner. Proc. Soc. **85**, 202 (1954)
- 24) Dulbecco. M.D. and Marguerite. Vogt. M. D.: J. Exp.Med. **99**, 167 (1956)
- 25) 細菌学実習提要, 213
- 26) Method in Medical Reserch 291
- 27) C.B. Anfinsen. J.R. Advances in Protein Chemistry 387
-