

各種小児腎疾患における尿中 IL-6, IL-1 β , TNF- α , sIL-2R 値および IL-2 産生能測定 of 臨床的意義

道 旗 巖

近畿大学医学部小児科学教室

抄 録

小児期の各種腎尿路系疾患患児109例を対象に尿中 interleukin (IL)-6, IL-1 β , tumor necrosis factor (TNF)- α , と soluble interleukin (sIL)-2R を測定し, さらに末梢静脈血単核細胞による IL-2 産生能について検討し, その臨床的意義を研究した. IL-6, IL-1 β , TNF- α , sIL-2R, それぞれの尿中値と血清中値の比較では, 両者に相関関係を認めず, 腎局所での産生の可能性が推察された. 尿中 IL-6, IL-1 β 値はメサンギウム増殖性腎炎患者尿で高値を示し, 尿中 IL-6, IL-1 β , TNF- α 値とは腎生検組織像の比較では, これらのサイトカインはメサンギウムの増殖性変化と相関を示した. 尿中 sIL-2R 値は minimal change nephrotic syndrome と acute pyelonephritis で尿中総蛋白濃度の増加に伴って高値を示し, 尿蛋白排泄との関連性が推測された. 末梢静脈血単核細胞の IL-2 産生能の亢進は IgA nephropathy 患者で観察され, 潜在的な T細胞過敏状態が示唆された.

Key words: interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), soluble interleukin-2 receptor (sIL-2R), interleukin-2 (IL-2)

緒 言

近年, 腎糸球体を構成する各細胞の培養法が確立され, それらを用いた検討から種々なサイトカインが腎炎の発症・進展に積極的に関与していることが明らかになってきている. サイトカインは糸球体の上皮細胞, 内皮細胞, メサンギウム細胞に免疫反応や炎症反応のメディエーターとして作用するだけでなく, これらの細胞によっても autocrine 的機序で産生され, 複雑なサイトカインネットワークを形成している. 今回, 著者は腎炎をはじめとする各種腎・尿路系疾患における IL-6, IL-1 β , TNF- α , sIL-2R の排泄動態と, これらの値がどのように各種腎・尿路系疾患の病態評価の指標となり得るかを検討した. また, 末梢静脈血単核細胞による IL-2 産生能や, 腎炎の発症・進展にこれらのサイトカインがどのように関与しているかを検討した.

対象および方法

1. 研究対象

1990年5月から近畿大学医学部附属病院小児科で腎・尿路系疾患にて精査, 治療を受けた109例(年齢1歳~23歳, 平均11.1歳, 男60例, 女49例)を対象とした. 疾患は, acute glomerulonephritis (AGN) 7例, minimal change nephrotic syndrome (MCNS) 15例, focal glomerulosclerosis (FGS) 5例, membranoproliferative glomerulonephritis (MPGN) 5例, IgA nephropathy (IgAN) 21例, mesangial proliferative glomerulonephritis excluded IgA nephropathy (N-IgAN) 20例, Henoch-Schönlein purpura nephritis (HSPN) 13例, lupus nephritis (LN) 5例, membranous nephritis (MN) 5例, および acute pyelonephritis (APN) 13例であった. 臨床診断による AGN, HSPN, APN 以外の腎炎・腎症群は全て腎生検による組織診断 (WHO 分類¹⁾) によった. AGN の診断は先行感染を伴い,

急性・初発で、血尿を必須とし、浮腫あるいは高血圧のいずれかを合併するという臨床症状によって診断した。さらに、発症より1週間以内の浮腫、高血圧などの主要症状を伴う期間を急性期とし、これらの臨床症状が消失した後、最低4週間以上経過した時期を寛解期とした。MCNSではネフローゼ症候群と診断され治療開始までの期間の急性期と、蛋白尿が消失して4週間以上を経過した寛解期に分けて検討した。HSPNの診断はHenoch-Schönlein紫斑病に合併した尿異常例(うち11例は腎生検像からISKDC分類² II型2例, III b型8例, IV b型1例と診断した)で、血尿や蛋白尿の出現時の急性期と、紫斑、関節痛、腹痛などの主要症状が消失し、腎炎の治療開始後4週間以上を経過した寛解期とに分けて検討した。LNの検討は治療開始前の急性期と、治療開始後、4週間以上を経過した寛解期に分けて行った。APNは排泄性腎盂撮影、尿所見、および臨床症状³から診断し、治療開始前の急性期と、尿所見や赤沈、CRPなどの検査所見の改善後2週間以上を経過した寛解期とに分けて検討した。他の疾患群については、治療開始前で少なくとも2週間以上病態に明らかな変動のない時期を対象とした。さらに、コントロールとして、頭痛や心雑音精査を目的に受診し、腎・尿路系に異常なく、感染症状も認めなかった18例(1歳-15歳, 平均10.2歳, 男11例, 女7例)を対照とした。

2. 研究方法

2.1. 尿および血液の前処理と保存

対象の早朝第1尿を採取し、ただちに2,500 rpmで10分間遠心後に上清を分離した。これをSystem 500 Microdialyzer (PIERCE, Rockford, USA)にSpectrapor 6 Molecular Weight Cut off 8,000 (Spectrum Medical Industries INC, Texas, USA)の透析膜を用いてDulbecco's phosphate buffered saline (PBS; Flow Laboratories, Oxford, UK)で、2時間、2回透析後に2分割し、1部を0.45 μm異物濾過フィルターマイレクス HA (日本ミリポアリミテッド, 東京)にて濾過し、IL-1β, TNF-α, およびsIL-2Rの測定まで-80°Cで凍結保存した。残部の透析尿は、さらにRPMI 1640培養液(阪大微研, 大阪)で2時間、1回透析後、前述のフィルターにて濾過し、IL-6測定まで-80°Cで凍結保存した。1部の症例では、尿と同時に5 mlのヘパリン加末梢静脈血を採取し、1,200回転で血漿を分離し、-80°Cで凍結保存した。

2.2. IL-6活性の測定

大阪大学、バイオメディカル教育センター、平野俊夫教授より供与された、IL-6依存性マウスハイブ

リドーマ・クローンであるMH60・BSF2細胞とリコンビナントIL-6 (rIL-6)を用いた。供与されたrIL-6の特異活性はIL-6反応性Epstein-Barrウイルス感染細胞株であるSKW6-CL-4を用いた検討で 5×10^6 U/mgとされている。IL-6活性は上記のMH60・BSF2細胞に対する増殖促進効果⁴を指標としたバイオアッセイ法により測定した。すなわちcomplete mediumとして10%非働化ウシ胎児血清(Foetal Bovine Serum, Filtron PTY.LTD, Brooklyn, Australia), 2 mM-L-glutamin (GIBCO, NY, USA), 100 U/ml streptomycin (GIBCO, NY, USA), 60 μg/ml 抗PPL0 agent (GIBCO, NY, USA)を含むRPMI 1640培養液によって2倍希釈系列(1.9 pg/ml-960 pg/ml)を作製した。rIL-6あるいは検体を96穴平底プレート (Costar, Cambridge, USA)の各wellに100 μlずつ分注した。さらに、各wellに継代3日目の対数増殖期のMH60・BSF2細胞をcomplete mediumで洗浄後、 1×10^5 個/mlに希釈し、100 μlずつ分注した。プレートは炭酸ガス培養器(5% CO₂, 37°C)にて48時間培養した。MH60・BSF2細胞の増殖は3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT, Chemicon International INC, Temecula, CA)を用いた比色定量法⁵により行った。すなわち、培養終了4時間前にMTTをPBSにて5 mg/mlに調整し、各wellに20 μlずつ分注した。培養終了後、プレートを200 G, 5分間遠心し、上清を捨て余分な染色液や培養液をペーパータオルにて除去した。その後、各wellに酸性化イソプロピルアルコール(0.04N HCl isopropyl alcohol)を100 μlずつ添加した。完全に色素が溶出してからMTP-120-MICROPLATE READER(コロナ電気工業, 茨城)を用い、550 nmの波長で吸光度を測定した。IL-6活性はrIL-6により得られた標準曲線をもとに算出した。なお、標準曲線は5回測定を繰り返した。IL-6活性の回収率は異なるIL-6濃度の尿に20 pg/ml, 50 pg/mlのrIL-6を加えて検討した。さらに日差変動については、異なるIL-6濃度の尿を凍結保存後1日目と1週間目について検討した。

2.3. IL-1β, TNF-α, IL-2, およびsIL-2R値の測定

尿あるいは血漿中のIL-1β, TNF-α値は、IL-1β-EASIA, TNF-α-EASIA (Medgenix DIAGNOSTICS, SA, Belgium)キットを、IL-2値はInterstest-2X(R) (Genzyme Corporation, Cambridge, USA)キットを用い、酵素抗体Sandwich法で測定した。すなわち、スタンダード液あるいは検体を、anti-IL-1β抗体, anti-TNF-α抗体あるいはanti-IL-2抗

体でコーティングされた microtiter plate の各 well に加えた後、horseradish peroxidase (HRP) conjugate 抗体を反応させ、洗浄後に基質溶液 (TMB solution) を加えて発色させた。発色後、反応停止液 (IL-1 β , TNF- α は 1.8N H₂SO₄, IL-2 は 1M sulfuric acid) を加えて酵素反応を停止させ、Model 2550 EIA Reader (Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA) を用い、450 nm の波長で吸光度を測定した。sIL-2R 値は、セルフリー IL-2R (T Cell Diagnostics INC, Massachusetts, USA) キットを用いた competitive enzyme immunoassay 法で測定した。スタンダード液あるいは検体をポリスチレン試験管に加えた後、HRP conjugated anti IL-2R 抗体溶液と anti IL-2R 抗体被覆ビーズを加えて反応させた後に洗浄し、基質溶液 (塩酸オルトフェニレンジアミン溶液) を加えた。発色後、1N.H₂SO₄ 液で反応を停止させ、DOUBLE-BEAM SPECTROPHOTOMETER UV-190 (Shimadzu, 大阪) を用い、波長 492 nm で吸光度を測定した。

2.4. その他の尿中物質の測定

尿中 β_2 -microglobulin の測定はファルマシア β_2 -マイクロリア (Kabi Pharmacia, 東京)、尿中蛋白の測定はマイクロ TT-テストワコー (和光純薬工業, 大阪) によった。尿中クレアチニン値はクレアチニン-テストワコー (和光純薬工業, 大阪) にて測定した。

2.5. メサングウム増殖度の判定

IgAN, N-IgAN などのメサングウム増殖性腎炎の患者で、検体尿の採取時より 2 週以内で、この間の病状がほとんど変化していないと思われる 41 例の腎生検組織所見をメサングウム細胞の増殖の程度により、軽度 (mild)、中等度 (moderate)、高度 (severe) の 3 群に分けた。mild は 12 例、moderate は 15 例、severe は 14 例であった。なお、増殖の程度は、末梢メサングウム領域に 4 個以上のメサングウム細胞の増殖があるが比較的その程度の軽いものを mild、糸球体毛細血管内腔の狭小化が著明なほどにメサングウム細胞の増殖しているものを severe とし、その中間を moderate とした⁶。

2.6. 末梢静脈血単核球の PHA による刺激培養

5 ml のヘパリン加末梢静脈血を採取し、Lymphocyte Separation Medium (Organon Teknika Corporation, South Carolina, USA) を用いた比重遠心法にて peripheral blood mononuclear cells (PBMC) を分離した。分離した細胞を 10% 非動化ウシ胎児血清を含む RPMI 1640 培養液で、 1×10^6 個/ml に希釈調整し、Nunc 4 well Multidish (Nunc, Inc, Illinois, USA) に 980 μ l ずつ分注し、

終濃度 4 μ g/ml に調製した phytohemagglutinin (以下 PHA と略す) (HA16, Burroughs Wellcome Corporation, London, UK) 液 20 μ l を加え、48 時間刺激培養 (5% CO₂, 37°C) した。培養後、遠心によって上清を分離し、-80°C で測定まで凍結保存した。

測定は、全て duplicate で行った。なお、相関係数の算出および有意差の判定 (Students' unpaired t-test による) は Abacus 社の Statview (Version 4.0) を用いて行った。

結 果

1. IL-6 活性測定法についての検討

IL-6 の standard curve は 8-300 pg/ml 域で直線関係を認めた (Fig. 1)。異なる IL-6 濃度の尿に rIL-6 を 20 pg/ml および 50 pg/ml 添加後の回収率は 80.6-118.8% (平均 103.2%) であった。同時再現性は、検体尿の IL-6 濃度が平均 69.5 pg/ml であったものの変動係数は 9.5% (n=8)、平均 110.9 pg/ml であったものの変動係数は 6.5% (n=8)、平均 209.6 pg/ml であったものの変動係数は 6.3% (n=8) であった。日差再現性は検体尿を凍結保存後 1 日目と 1 週間目について検討し、変動係数は 7.0-9.1% (平均 7.8%) であった (Table 1)。

2. 正常対照での種々のサイトカイン関連物質の尿中濃度

IL-6, IL-1 β , TNF- α , sIL-2R, および IL-2 値の測定限界はそれぞれ 20 pg/ml, 10 pg/ml, 8 pg/ml, 16 U/ml, および 100 pg/ml であり、測定感度以下の値については、統計処理上、それぞれの 1/2 の値である 10 pg/ml, 5 pg/ml, 4 pg/ml, 8 U/ml, および 50 pg/ml とした。

正常対照の尿中 IL-6/Creat 値の幾何平均値は 6.37 pg/mg \cdot Creat (tolerance factor 1.60) (n=

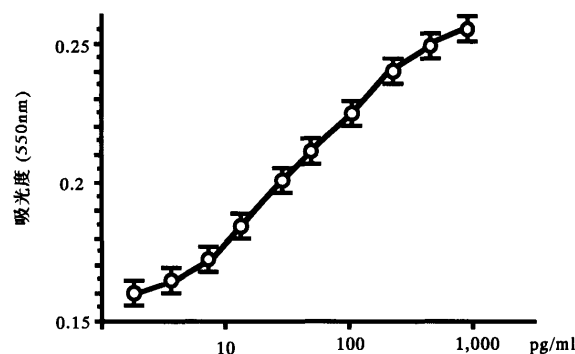


図 1 MH60・BSF2 細胞を用いた生物学的測定法による IL-6 測定の標準曲線
標準曲線は 5 回測定を繰り返し、各ポイントは、平均値 \pm 標準偏差を表す

表1 MH60・BSF2細胞を用いた生物学的測定法による尿中IL-6値について

IL-6活性の回収率 (MTTの比色定量法)			
尿検体(No)	実測値(pg/ml)	理論値(pg/ml)	回収率(%)
1	38	32	118.8
2	44	40	110.0
3	67	60	111.7
4	84	90	93.3
5	50	62	80.6
6	64	70	91.4
7	96	90	106.7
8	136	120	113.3
103.2平均回収率			
尿検体(No)	n	平均値(pg/ml)±標準偏差	変動係数(%)
1	8	69.5±6.6	9.5
同時再現性 [†]	2	110.9±7.2	6.5
	3	209.6±13.2	6.3
	1	5	242.6±17.0
日差再現性 [§]	2	241.4±17.3	7.2
	3	55.0±4.3	7.8
	4	55.8±5.1	9.1

[†]; 変動係数 (標準偏差/平均値) は, 3種の異なるIL-6濃度の尿検体について, 1検体につき8回測定を繰り返した

[§]; 変動係数 (標準偏差/平均値) は, 4種の異なるIL-6濃度の尿検体について1週間内に5回の測定を繰り返した

18) (Fig. 2), 尿中IL-1 β /Creat値では66.1 pg/mg・Creat (tolerance factor 2.05) (n=18) (Fig. 3), 尿中TNF- α /Creat値では16.6 pg/mg・Creat (tolerance factor 2.52) (n=18) (Fig. 4), 尿中sIL-2R/Creat値では117 U/mg・Creat (tolerance factor 2.45) (n=18) (Fig. 5)であった。

3. 尿中の種々のサイトカイン関連物質の血漿中濃度との比較

腎・尿路系疾患, コントロールの種々9例について尿中と血漿中の各々のサイトカイン関連物質の濃度を比較した。IL-6値は腎・尿路系疾患では $r=0.30$, $p=0.43$, コントロールでは $r=0.10$, $p=0.80$ と両者に相関関係は認めなかった。IL-1 β 値は腎・尿路系疾患では $r=0.24$, $p=0.53$, コントロールは $r=0.43$, $p=0.25$, TNF- α 値は腎・尿路系疾患では $r=0.37$, $p=0.33$, コントロールでは $r=0.45$, $p=0.22$, と両者の間に相関関係を認めなかった。さらに, sIL-2R値の比較でも, 腎・尿路系疾患は $r=0.02$, $p=0.97$, コントロールは $r=0.56$, $p=0.12$ と, 両者の間には相関関係を認めなかった。

4. 病型別の尿中IL-6, IL-1 β , TNF- α , およびsIL-2R値

尿中IL-6値は, AGN, HSPN, LN, APNの急性期, MPGN, IgAN, N-IgANの治療開始前にコントロールに比べて有意に高値を示した。なお, AGNとAPNでは寛解期には明らかに急性期よりも減少傾向を示した。LNでは治療後の寛解期に減少傾向を示した(Fig. 2)。尿中IL-1 β 値は, AGNの急性期, FGS, MPGN, IgAN, N-IgAN, APNの急性期および寛解期でコントロールに比べ有意に高値を示した。なお, AGNとAPNでは寛解期には急性期と比較して明らかに減少傾向を示した(Fig. 3)。尿中TNF- α 値は, AGNの急性期, APNの急性期にコントロールに比べ有意に高値を示した。なお, AGNとAPNでは寛解期には減少傾向を示した。LNの治療後の寛解期はコントロールより低値を示した(Fig. 4)。尿中sIL-2R値は, MCNS, LN, およびAPNの急性期にコントロールと比べ高値を示した。なお, これらは寛解期には減少傾向を示した(Fig. 5)。さらに, これらのサイトカイン関連物質の相互の排泄量の検討では, AGN, FGS, MPGN, IgAN, N-IgAN, LN (Fig. 6)においてIL-6値とTNF- α 値間に相関関係を認めた。しかし, 他の疾患群では尿中サイトカイン関連物質相互間に相関を認めなかった。

5. 尿中サイトカイン関連物質と尿中 β_2 -microglobulinの排泄値, および1日尿中蛋白排泄量との検討

IL-6, IL-1 β , TNF- α , およびsIL-2R値と尿中 β_2 -microglobulinの排泄値とを全症例において比較したが, 相関は認めず, また, 疾患別に関係を調べたが, 相関関係は認めなかった。また, 1日尿中蛋白排泄量についても全症例について比較したが, 相関は認めなかった。しかし, 疾患別にみるとMCNS, MPGN, MN, APN (Fig. 7)で, sIL-2R値と1日尿中蛋白排泄量間に相関関係を認めた。他の疾患では尿中サイトカイン関連物質と1日尿中蛋白排泄量間に相関を認めなかった。

6. IgAN, N-IgANにおけるメサンギウム細胞増殖の程度と各々の尿中サイトカイン関連物質の比較

尿中IL-6, TNF- α 値はmild, moderate, severe群の相互間に有意差がみられ($p<0.05$), また, 尿中IL-1 β 値はmild, moderate群とsevere群間に有意差がみられ($p<0.001$), 増殖性変化が強いほど高値をとる傾向を認めた。尿中sIL-2R値は群間に有意差は認めなかった(Fig. 8)。

7. 末梢静脈血単核球のIL-2産生能についての検討

IgAN(n=12), N-IgAN(n=5), 急性期のMCNS

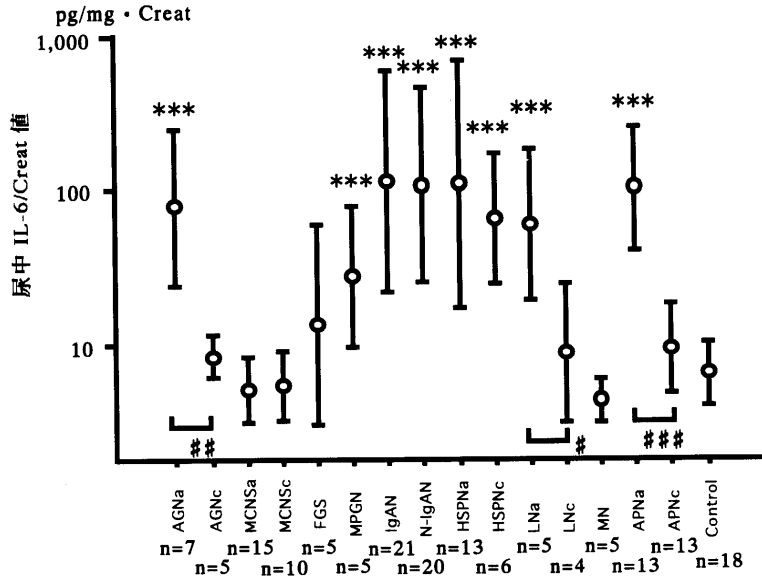


図2 各種腎疾患における尿中 IL-6/Creat 値
 各々の値は幾何平均値と tolerance factor で表示した
 コントロールとの比較；*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001
 各群間の比較；*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001
 病型別の幾何平均値 (tolerance factor) は、以下の通りであった；
 AGNa : 77.6 pg/mg · Creat (3.24), AGNc : 8.32 pg/mg · Creat (1.37), MCNSa : 5.07 pg/mg · Creat (1.62), MCNSc : 5.36 pg/mg · Creat (1.68), FGS : 27.5 pg/mg · Creat (4.49), MPGN : 114.8 pg/mg · Creat (5.27), N-IgAN : 109.6 pg/mg · Creat (4.23), HSPNa : 109.6 pg/mg · Creat (6.40), HSPNc : 66.1 pg/mg · Creat (2.67), LNa : 58.9 pg/mg · Creat (3.10), LNC : 8.71 pg/mg · Creat (2.81), MN : 4.29 pg/mg · Creat (1.37), APNa : 102.3 pg/mg · Creat (2.52), APNc : 9.18 pg/mg · Creat (1.95), Control : 6.37 pg/mg · Creat (1.60) a ; 急性期, 活動期 c ; 回復期

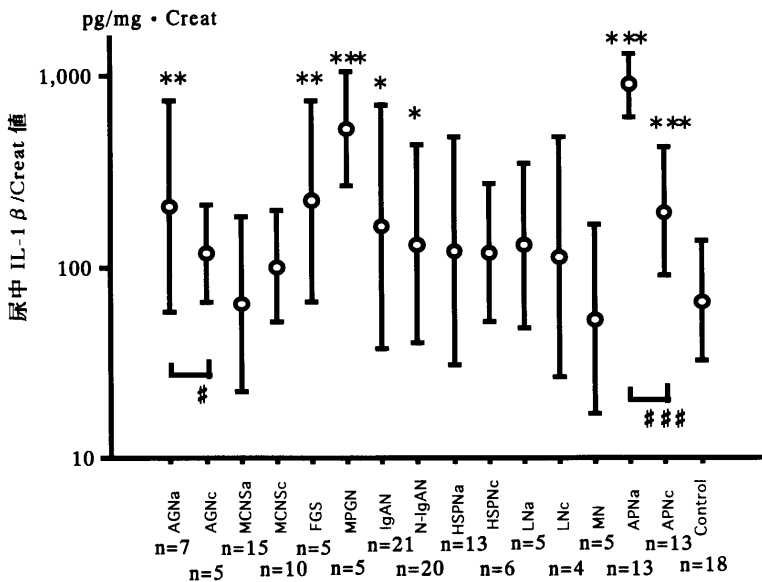


図3 各種腎疾患における尿中 IL-1β/Creat 値
 各々の値は幾何平均値と tolerance factor で表示した
 コントロールとの比較；*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001
 各群間の比較；*p<0.05, ***p<0.001
 病型別の幾何平均値 (tolerance factor) は、以下の通りであった；
 AGNa : 281.8 pg/mg · Creat (3.69), AGNc : 102.0 pg/mg · Creat (1.85), MCNSa : 64.6 pg/mg · Creat (2.86), MCNSc : 100.0 pg/mg · Creat (1.96), FGS : 524.8 pg/mg · Creat (3.37), MPGN : 162.2 pg/mg · Creat (4.35), N-IgAN : 131.8 pg/mg · Creat (3.26), HSPNa : 120.2 pg/mg · Creat (3.90), HSPNc : 117.5 pg/mg · Creat (2.29), LNa : 128.8 pg/mg · Creat (2.70), LNC : 112.2 pg/mg · Creat (4.23), MN : 52.5 pg/mg · Creat (3.12), APNa : 891.3 pg/mg · Creat (1.47), APNc : 195.0 pg/mg · Creat (2.16), Control : 66.1 pg/mg · Creat (2.05) a ; 急性期, 活動期 c ; 回復期

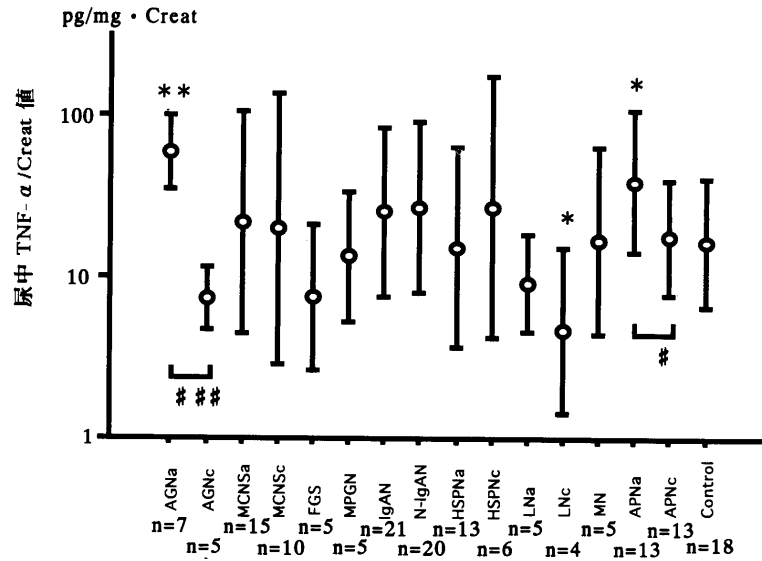


図4 各種腎疾患における尿中 TNF- α /Creat 値

各々の値は幾何平均値と tolerance factor で表示した
コントロールとの比較；* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

各群間の比較；* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

病型別の幾何平均値 (tolerance factor) は、以下の通りであった；

AGNa : 60.3 pg/mg·Creat (1.70), AGNc : 7.48 pg/mg·Creat (1.56), MCNSa : 21.9 pg/mg·Creat (4.88), MCNSc : 20.0 pg/mg·Creat (6.90), FGS : 7.55 pg/mg·Creat (2.86), MPGN : 13.5 pg/mg·Creat (2.54), IgAN : 25.7 pg/mg·Creat (3.35), N-IgAN : 27.5 pg/mg·Creat (3.39), HSPNa : 15.5 pg/mg·Creat (4.18), HSPNc : 27.5 pg/mg·Creat (6.47), LNa : 9.25 pg/mg·Creat (2.02), LNC : 17.0 pg/mg·Creat (3.79), MN : 17.0 pg/mg·Creat (3.79), APNa : 39.8 pg/mg·Creat (2.72), APNc : 17.6 pg/mg·Creat (2.36), Control : 16.6 pg/mg·Creat (2.52) a ; 急性期, 活動期 c ; 回復期

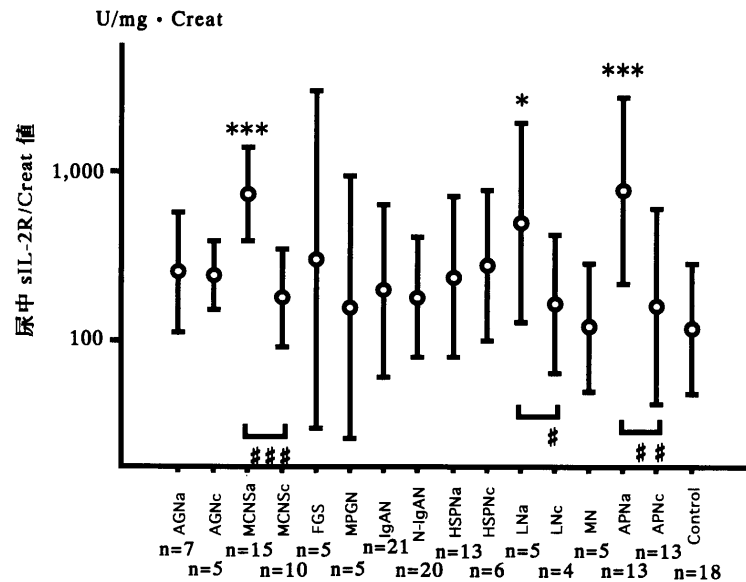


図5 各種腎疾患における尿中 sIL-2R/Creat 値

各々の値は幾何平均値と tolerance factor で表示した
コントロールとの比較；* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

各群間の比較；* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

病型別の幾何平均値 (tolerance factor) は、以下の通りであった；

AGNa : 251.2 U/mg·Creat (2.25), AGNc : 239.9 U/mg·Creat (1.60), MCNSa : 741.3 U/mg·Creat (1.90), MCNSc : 177.8 U/mg·Creat (1.95), FGS : 302.0 U/mg·Creat (10.0), MPGN : 158.5 U/mg·Creat (6.00), IgAN : 199.5 U/mg·Creat (3.24), N-IgAN : 182.0 U/mg·Creat (2.27), HSPNa : 240.0 U/mg·Creat (2.99), HSPNc : 281.8 U/mg·Creat (2.82), LNa : 487.5 U/mg·Creat (3.77), LNC : 140.1 U/mg·Creat (2.30), MN : 120.2 U/mg·Creat (2.40), APNa : 794.3 U/mg·Creat (3.60), APNc : 182.0 U/mg·Creat (3.98), Control : 117.5 U/mg·Creat (2.45) a ; 急性期, 活動期 c ; 回復期

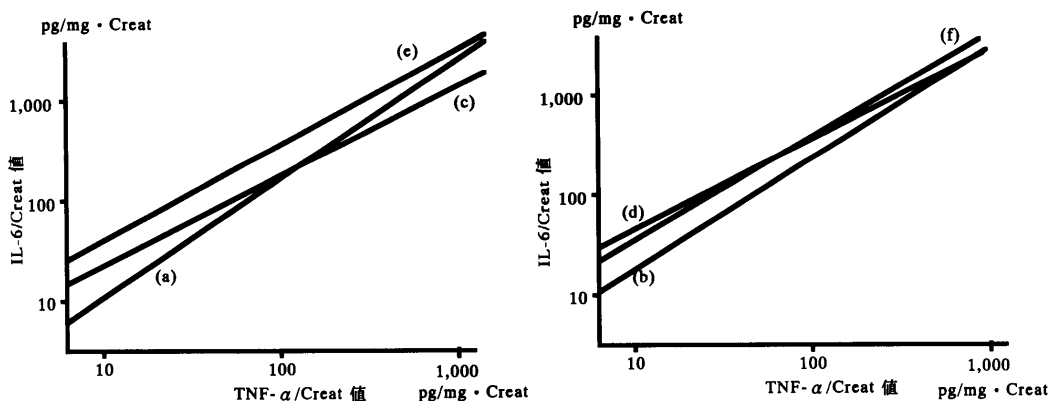


図6 各種腎疾患における同一尿の尿中IL-6/Creat値(Y, pg/mg・Creat)と尿中TNF-α/Creat値(X, pg/mg・Creat)との比較

- a : AGN $\log Y = -0.07 + 1.11 \log X$, $r = 0.90$, $n = 12$
- b : FGS $\log Y = 0.05 + 1.23 \log X$, $r = 0.86$, $n = 5$
- c : MPGN $\log Y = 0.56 + 0.78 \log X$, $r = 0.69$, $n = 5$
- d : IgAN $\log Y = 0.79 + 0.90 \log X$, $r = 0.66$, $n = 21$
- e : N-IgAN $\log Y = 0.59 + 1.01 \log X$, $r = 0.85$, $n = 20$
- f : LN $\log Y = 0.54 + 1.04 \log X$, $r = 0.68$, $n = 9$

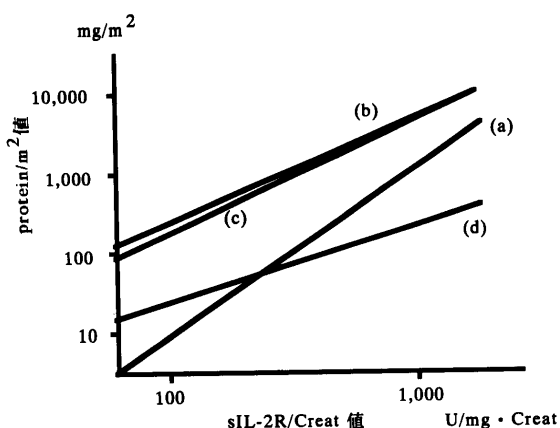


図7 各種腎疾患における同一尿の尿中総蛋白排泄量(／体表面積)(Y, mg/m²)と尿中sIL-2R/Creat値(X, U/mg・Creat)との比較

- a : MCNS $\log Y = -3.2 + 2.10 \log X$, $r = 0.67$, $n = 12$
- b : MPGN $\log Y = -0.33 + 1.34 \log X$, $r = 0.93$, $n = 5$
- c : MN $\log Y = -0.59 + 1.44 \log X$, $r = 0.62$, $n = 5$
- d : APN $\log Y = -0.51 + 0.97 \log X$, $r = 0.73$, $n = 6$

(n=5)のPBMCのPHA刺激によるIL-2産生値は、IgAN患者では、コントロールに比べ有意に高値を示した。また、MCNS患者はコントロールに比べ有意に低値を示した(Fig.9)。なお、これらの対象の血漿中のIL-2値はすべて測定感度以下であった。

考 察

腎疾患が各種の感染症を契機に増悪することは古くから知られている。近年の分子生物学的研究法により各種サイトカインが糸球体の上皮細胞、内皮細胞、メサンギウム細胞で産生されるばかりでなく、これらの細胞にautocrineあるいはparacrineに作用して種々の炎症メディエーターを放出させ⁷⁻¹⁰、生体内で複雑なネットワークを形成していることが、実験腎炎で証明されている。また、人のメサンギウム増殖性腎炎における増殖性変化度と尿中IL-6活性との関連性¹¹も指摘されるようになった。しかし、これらの報告は組織学的研究による結果が多く、人での経日的な動的観察は未だ充分とはいえない。そこで、著者は各種の腎・尿路疾患において尿中へのIL-6をはじめとする各種サイトカイン関連物質の排泄量を測定してサイトカインが腎炎・腎症の発症、進展にどのように関与し、相互に作用しているのかを検討した。

尿中にはさまざまな夾雑物質が存在しており、塩分濃度やPHも一定でなく、凍結保存や融解操作によって容易に蛋白の変性や凝集を生じる。そこで、これらの影響を出来るだけ少なくすることを目的として検体尿を凍結保存する前に全て透析処理を加えた。これまでは、IL-6測定にはMH60細胞の³H-TdR取り込みで分裂能を測定する方法が広く行われてきたが、著者のMTTを利用した測定方法は、RIを使わず、一度に多検体の測定が可能で、測定感度や回収率などの正確性についてもRI法¹¹に劣ら

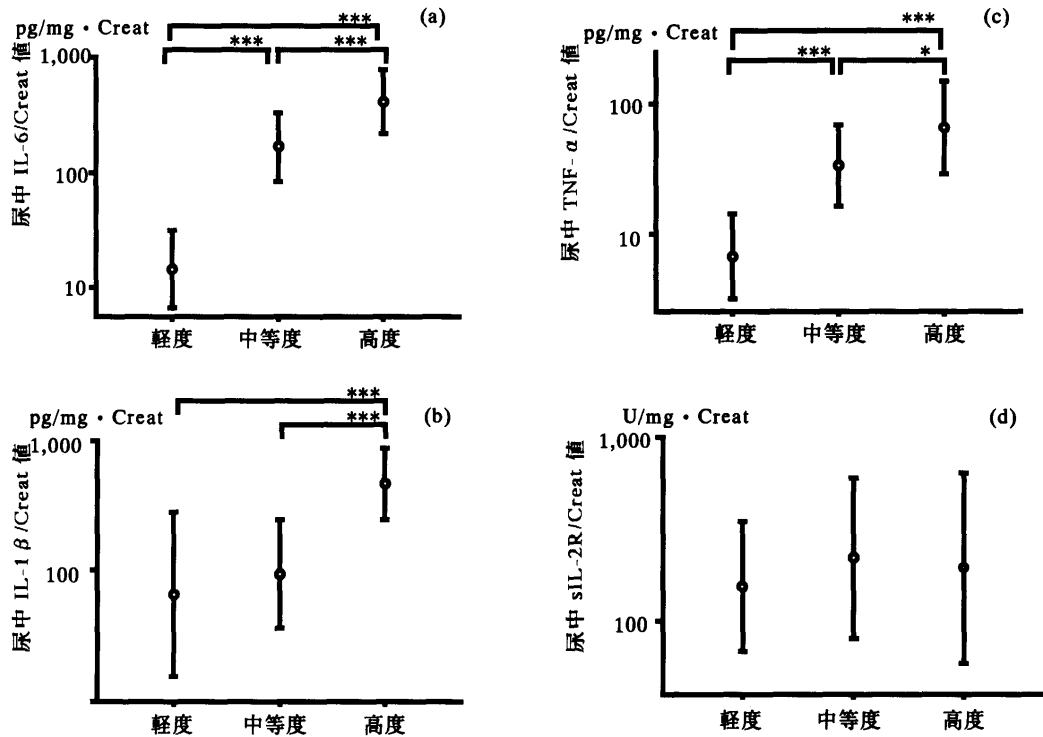


図8 メサングウム増殖性変化の程度と尿中IL-6/Creat, IL-1 β /Creat, TNF- α /Creat, およびsIL-2R/Creat値との比較

各群間の比較; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

幾何平均値と (tolerance factor) は以下の通りであった;

- (a): 軽度 14.6 pg/mg \cdot Creat (2.19)
 中等度 167.1 pg/mg \cdot Creat (2.01)
 高度 413.0 pg/mg \cdot Creat (1.89)
- (b): 軽度 66.8 pg/mg \cdot Creat (4.26)
 中等度 94.6 pg/mg \cdot Creat (2.61)
 高度 465.6 pg/mg \cdot Creat (1.88)
- (c): 軽度 6.73 pg/mg \cdot Creat (2.13)
 中等度 33.7 pg/mg \cdot Creat (2.05)
 高度 66.7 pg/mg \cdot Creat (2.28)
- (d): 軽度 154.5 U/mg \cdot Creat (2.23)
 中等度 220.3 U/mg \cdot Creat (2.74)
 高度 194.1 U/mg \cdot Creat (3.29)

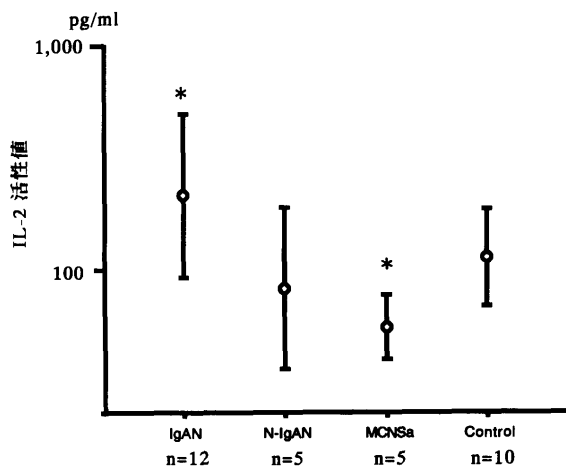


図9 末梢静脈血単核細胞を phytohemagglutinin で刺激後の IL-2 活性値

各々の値は、幾何平均値と tolerance factor を表す

コントロールとの比較; * $p < 0.05$

幾何平均値と (tolerance factor) は以下の通りであった;

- IgAN : 207.5 pg/ml (2.22) N-IgAN : 83.8 pg/ml (2.20) MCNSa : 57.4 pg/ml (1.36)
 Control : 113.2 pg/ml (1.61)

a ; 急性期, 活動期

ず、良好な結果であった。

今回測定した尿中サイトカイン関連物質の由来は、糸球体基底膜で濾過を受けた血液由来、あるいは腎局所由来などが推測されるが、今回のIL-6, IL-1 β , TNF- α , およびsIL-2Rの尿中と血漿中濃度を比較したところ、両者の間には有意な相関関係は認められなかった。したがって、尿中濃度は必ずしも血漿中濃度には依存せず、血液中から尿中への漏出は完全には否定できないものの、これらの尿中サイトカイン関連物質の変動は大部分が腎・尿路系における免疫応答に関係した局所由来を反映していると推測された。

IL-6の産生細胞は、メサングウム細胞をはじめ線維芽細胞、単球/マクロファージ、T細胞、B細胞、血管内皮細胞、滑膜細胞、脳アストログリア細胞、皮膚ケラチノサイト、各種腫瘍細胞などが知られている¹²。今回の検討では、尿中IL-6排泄はAGN, APNやMPGN, IgAN, N-IgAN, HSPNなどのメサングウムの増殖を伴う疾患でコントロールに比べて高値を示し、これらの尿中IL-6の値は局所の炎症性細胞浸潤の程度やメサングウム増殖の程度を反映しているのではないかと推察された。今回の尿中IL-1 β の検討では、AGN, FGS, MPGN, IgAN, N-IgAN, APNにおいて、コントロールと比較して、尿中排泄量は高値を示した。IL-1 β は、原始的生体防御機序として主として活性化マクロファージから分泌される炎症の中心的メディエーターであるとともに広い範囲の細胞からも産生され、各種の慢性炎症に対して病態発生の因子として働くことが知られている。AGNでは、腎組織所見にて血管内皮細胞の増殖や多核白血球の浸潤を認め¹³、FGSは流液中から単球やマクロファージが糸球体内に集積することが知られ¹⁴ており、さらに、APNでも単球、マクロファージのような炎症性細胞の組織内への浸潤が特徴と言われている。これら腎局所に浸潤した好中球やマクロファージなどの炎症性細胞からIL-1 β が炎症に伴って反応性に産生され、これが尿中IL-1 β 排泄の高値に関係したと考えられた。一方、MPGN, IgAN, N-IgANでも尿中IL-1 β が高値を示したが、これらの疾患にはメサングウム増殖が認められており、IL-1 β はメサングウム細胞において、IL-6のmRNAの発現を介して増殖を誘導するとの報告¹⁵や、IL-1 β 自体が直接的に増殖を誘導するとの報告¹⁶があり、さらに、刺激を受けたメサングウム細胞自体がautocrine的機序でIL-1 β を産生するとも言われている^{8,9,17,18}。したがって、今回の結果はこれらの疾患の組織へ浸潤した炎症性細胞あるいはメサングウム細胞由来の物質として尿中へ排

泄されていることが示唆された。

尿中TNF- α も、IL-1 β の結果と同様に、AGN, APNにおいて、コントロールに比較して尿中排泄量が高値を示し、腎局所の炎症に伴って浸潤したマクロファージから分泌され、炎症性細胞の活性を反映していると考えられた。LNでは、ステロイドによる治療後、尿中TNF- α 値が低値を示した。SLEのin vitroでの末梢血単核細胞のマイトゲン刺激によるTNF- α 産生の検討で、活動期にTNF- α の産生能が低下していたとの報告¹⁹があるが、尿中TNF- α 排泄が治療後により低値を示した。今回の結果はLNの治療に投与したステロイド剤や免疫抑制剤によるマクロファージ機能の抑制の結果ではないかと推測している。他方、尿中TNF- α はIgANやN-IgANなどのメサングウム細胞増殖性腎炎では、IL-1 β と異なり、コントロールに比べて有意差を示さなかった。マクロファージから放出されたTNF- α がメサングウム細胞のphenotypeを変化させて細胞の増殖や細胞外マトリックス産生の亢進を生じるとの考え²⁰や、糸球体に放出されたTNF- α が内皮細胞に作用してprocoagulant活性を高め²¹て糸球体硬化を促進する可能性が考えられている。さらに、TNF- α はメサングウム細胞による活性酸素の産生を誘導し²²、糸球体障害を加速することも考えられている。このようにTNF- α や腎組織に対してより強力に作用するサイトカインであるとする報告は数多く知られているので、今回尿中への排泄にあまり変動を認めなかった結果は、TNF- α のturn overがIL-6やIL-1 β と異なっていたためかと推察している。

今回の検討では、sIL-2RはMCNS, LN, APNの急性期に高値をとった。このうちMCNSのIL-6, IL-1 β やTNF- α はコントロールと差を認めず、尿中sIL-2Rのみが高値を示した。T細胞の活性化に伴いIL-2Rの発現、さらにはsIL-2Rの増加がみられる²³ことから、MCNSに伴うT細胞系の変動についての報告と一致した結果と推察された。一方、LNでは尿中sIL-2R値は未治療時に高値をとり、治療後正常域を示したが、LNの活動期にある症例の約50%に血中sIL-2R値²⁴の上昇を認め、IL-2R陽性T細胞を認めるとの報告²⁵もあり、このために尿中へのsIL-2Rの放出がふえたものと考えられ、尿中sIL-2Rの高値はLNの活動性を表わす補助的な指標になりうるのではないかと考えられた。APNでsIL-2Rの排泄増加を示した報告は未だ認めないが、これは、細菌感染症がT-cellを賦活する結果ではないかと推察している。

IL-6が高値をとる疾患の中には、TNF- α との相

関関係を認めるものが多くみられた。TNF- α は、前述のように、培養メサンギウム細胞を増殖させ、メサンギウム増殖性変化が強いほど尿中 IL-6 活性が高くなるとの報告があり¹¹、TNF- α がメサンギウム細胞の増殖を介して尿中への IL-6 の分泌を誘導したと考えられた。

今回の検討では、MCNS において、尿中 sIL-2R 値が 1 日尿中蛋白排泄量と相関 ($r=0.668$) を認めたことから、糸球体での透過性亢進に関与した可能性が考えられた。また、尿中 sIL-2R 値は IgAN や N-IgAN ではコントロールと比較して有意差を認めず、他のサイトカインとやや作用を異にしていると考えられた。さらに、尿中 sIL-2 R は APN においても急性期に高値を示し、APN においても、MCNS と同様に、sIL-2R 値と 1 日尿中蛋白排泄量との間に $r=0.728$ の相関を認め、蛋白と連動して尿中に排泄されている可能性が示唆された。

MPGN, IgAN, N-IgAN では組織学的検査でメサンギウム細胞に増殖性変化が認められており、尿中 IL-6 値は IgAN, N-IgAN においてメサンギウムの増殖性変化の重症度に関連していた。さらに、IgAN, N-IgAN についてメサンギウム細胞の増殖度と尿中 IL-1 β 値との間に有意の関連を認めた。これまでの研究から、IL-1 β とメサンギウム細胞増殖に関して、さらに炎症の慢性的な持続に伴い、炎症細胞からの IL-1 β の刺激がメサンギウム細胞増殖へと導く過程も推察された。尿中 TNF- α は、IgAN や N-IgAN などのメサンギウム細胞増殖性腎炎では IL-1 β と異なり、コントロールに比べて有意差を示さなかった。しかし、これらの症例をメサンギウム細胞の増殖度に分けて検討したところ、尿中 TNF- α 値と増殖度との間には IL-1 β と同じく関連性が認められた。このことは前述したように TNF- α と IL-1 β の turn over の差によることを示唆する所見と考えられた。尿中 sIL-2R 値は、IgAN や N-IgAN では、コントロールと比較して有意差を認めず、メサンギウム細胞の増殖度とも相関性を認めなかったことから、他のサイトカインとやや作用を異にしていると考えられた。

MCNS, IgAN, N-IgAN を対象に IL-2 の産生能の比較を試みたところ、MCNS の急性期は、コントロールに比べ、IL-2 産生能は低下し、IgAN では増加していた。MCNS の病態については、これまでにもリンパ球芽球化反応の抑制因子の存在、リンパ球の sub-population の異常、ならびに免疫グロブリン産生能の異常などが報告され、その発症に細胞免疫の異常が関与すると考えられており、今回の検討で IL-2 産生能がコントロールに比べて低下していた

ことは T 細胞系にも何らかの異常を伴っていることを示す所見と考えられた。さらに、IgAN については、Parera²³ も、著者の検討と同様に、患者の PBMC の IL-2 産生能が増加していたと報告し、さらに、helper T 細胞の活性亢進を認めたとも報告している。したがって、PBMC の IL-2 産生能の亢進は潜在的な T 細胞過敏状態を示していると考えられ、これが生体へのウイルス、細菌などの感染や食事性の抗原などによっても容易に activate され、これが局所の IL-2 産生を促し、糸球体障害を進展させると考えられた。以上、今回は、各種の腎・尿路疾患における尿中 IL-6, IL-1 β , TNF- α , および sIL-2 R の個々の変動について検討し、これらのサイトカインが腎局所の病態を敏感に反映していることを推定し得る所見が得られた。したがって、頻回に、容易に採取可能な尿から腎炎・腎症の炎症性メディエーターを観察することにより治療効果の指標となり得るか否かについて、今後は長期間の経日的観測を実施したい。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました恩師 牧淳教授に深甚の謝意を捧げます。また、本研究を遂行するにあたり直接の御指導、御助言を賜りました宮田曠助教授、山本隆講師、ならびに御協力いただいた教室員の皆様に心から感謝致します。

本論文の要旨は第97回日本小児科学会学術集会（平成6年5月、札幌）において発表した。

文 献

1. Churg J, Heptinstall RH, Olsen TS, Sobin LH, Bernstein J, Risdon RA. Renal disease. Classification and atlas. Tokyo: Igaku Shoin, 1987
2. Counahan R, Winterborn MH, White RHR, et al. Prognosis of Henoch-Schönlein nephritis in children. Brit Med J 1977; 2: 11-14
3. Miyata H, Kataoka S, Moriguchi N, et al. Antigenic phenotypes of Escherichia coli in urine from patients with urinary tract infections. Pediatr Nephrol 1994; 8: 267-269
4. Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T. Establishment of an interleukin 6 (IL6)/B cell stimulatory factor 2-dependent cell line and preparation of anti-IL6 monoclonal antibodies. Eur J Immunol 1988; 18: 951-956
5. Green LM, Reade JL, Ware CF. Rapid colorimetric assay for cell viability: Application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. J Immunol Method 1984; 70: 257-268
6. Pirani L, Salinas-Madrigal L, Koss MN. Evaluation of percutaneous renal biopsy, in Kidney Pathology Decennial. edited by Sommers S. New York: Appleton-Century-Crofts, 1975; 109-163
7. Mené P, Simonson MS, Dunn MJ. Physiology of the

- mesangial cell. *Physiol Rev* 1989; 69: 1347-1424
8. Sedor JR, Nakazato Y, Konieczkowski M. Interleukin-1 and the mesangial cell. *Kidney Int* 1992; 41: 595-599
 9. Baud L, Fouqueray B, Philippe C, Amrani A. Tumor necrosis factor alpha and mesangial cells. *Kidney Int* 1992; 41: 600-603
 10. Davies M, Martin J, Thomas GJ, Lovett DH. Proteinases and glomerular matrix turnover. *Kidney Int* 1992; 41: 671-678
 11. Horii Y, Muraguchi A, Iwano M, et al. Involvement of IL-6 in mesangial proliferative glomerulonephritis. *J Immunol* 1989; 143: 3949-3955
 12. 審良静男. IL-6 産生細胞と遺伝子発現. *実験医学* 1989; 7: 21-26
 13. Lévy M, Gonzalez-Burchard G, Broyer M, et al. Berger's disease in children: Natural history and outcome. *Medicine* 1985; 64: 157-180
 14. Brady HR. Leukocyte adhesion molecules and kidney diseases. *Kidney Int* 1994; 45: 1285-1300
 15. Abbott F, Ryan JJ, Ceska M, Matsushima K, Sarraf CE, Rees AJ. Interleukin-1 β stimulates human mesangial cells to synthesize and release interleukins-6 and -8. *Kidney Int* 1991; 40: 597-605
 16. Melcion C, Lachman L, Killen PD, Morel-Maroger L, Striker GE. Mesangial cells, effect of monocyte products on proliferation and matrix synthesis. *Transplant Proc* 1982; 14: 559-564
 17. Floege J, Eng E, Young BA, Johnson RJ. Factors involved in the regulation of mesangial cell proliferation in vitro and in vivo. *Kidney Int* 1993; 43: s47-s54
 18. Abbott F, Tam FWK, Ryan JJ, Rees AJ. Human mesangial cells synthesize interleukin 1 α but not interleukin 1 β , interleukin 1 receptor antagonist, or tumour necrosis factor. *Nephrol Dial Transplant* 1992; 7: 997-1001
 19. Malavé I, Searles RP, Montano J, Williams RC Jr. Production of tumor necrosis factor/cachectin by peripheral blood mononuclear cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1989; 89: 355-361
 20. 小出 輝. 腎炎とサイトカイン. *日腎誌* 1994; 36: 183-193
 21. Le J, Vilček J. Tumor necrosis factor and interleukin 1: cytokines with multiple overlapping biological activities. *Lab Invest* 1987; 56: 234-248
 22. Radeke HH, Meier B, Topley N, Flöge J, Habermehl GG, Resch K. Interleukin 1- α and tumor necrosis factor - α induce oxygen radical production in mesangial cells. *Kidney Int* 1990; 37: 767-775
 23. Parera M, Rivera F, Egado J, Campos A. The Role of Interleukin 2(IL-2) and Serum-Soluble IL-2 Receptor Cells in Idiopathic IgA Nephropathy. *Clin Immunol Immunopathol* 1992; 63: 196-199
 24. Manoussakis MN, Papadopoulos GK, Drosos AA, Moutsopoulos HM. Soluble interleukin 2 receptor molecules in the serum of patients with autoimmune diseases. *Clin Immunol Immunopathol* 1989; 50: 321-332
 25. Wigfall DR, Sakai RS, Wallace DJ, Jordan SC. Interleukin-2 receptor expression in peripheral blood lymphocytes from systemic lupus erythematosus patients: Relationship to clinical activity. *Clin Immunol Immunopathol* 1988; 47: 354-362