

小児腎疾患における溶連菌成分に対する免疫 応答性の免疫遺伝学的解析 —第1報—

新潟大学小児科学教室 (主任: 堺 薫教授)

佐 藤 敬以子

Immune Responsiveness to Streptococcal Antigen in Children
with Renal Disease — First Report —

Keiko SATOH

Department of Pediatrics, Niigata University School of Medicine
(Director: Prof. Kaoru SAKAI)

Recent experience indicates that familial occurrence of renal disease is considerably more common than has been recognized hitherto. At the same time, it has been suggested that susceptibility to develop poststreptococcal acute glomerulonephritis (PSAGN) may be a familial trait. Association between PSAGN and HLA specificities has been demonstrated. Immune responsiveness to streptococcal antigen may thus play a role in the pathological process of a majority of patients with progressive glomerulonephritis. The purpose of this study was to investigate the immune responsiveness to streptococcal antigen in patients with renal disease. Families of index patients with hematuria, who was found by mass urine screening of school children, were studied. As a result of blocking experiments carried out with the addition of various antibodies, the immune response of peripheral blood lymphocytes to SLO was revealed to be monocyte-dependent T cell proliferation. Immune responsiveness to SLO was measured in families with familial hematuria detected by mass urine screening of school children. The intensity of the immune response was divided into two groups. Family study indicated that high response to SLO was a dominant trait.

Key words: streptococcal antigen, lymphocyte transformation HLA.

溶連菌成分, リンパ球芽球化反応, HLA.

Reprint request to: Keiko SATOH,
Department of Pediatrics, Niigata
University School of Medicine
Niigata City, 951 JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学医学部小児科学教室
佐藤敬以子

I. 緒 言

近年、学校検尿により発見された腎疾患の病型分類より、遺伝性腎炎として Alport 腎炎の外に、良性家族性血尿¹⁾の家系が比較的多く存在することが分かってきた。一方、溶連菌感染後急性糸球体腎炎のような、病因のはっきりしている腎炎で、特定の HLA 型との相関が報告されている²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾。筆者はこれらの疾患の惹起抗原に対する宿主の免疫応答性を検討することは、発症のメカニズムを理解し、予防法を検索していく上で重要なことであると考え、学校検尿で発見された血尿患児とその家族について、溶連菌成分に対する免疫応答性を調べた。

II. 対 象

昭和61年10月から昭和63年4月の間に新潟大学医学部附属病院小児科を受診した家族性血尿の患者33名を発端者としてその家族49名について HLA タイピングを行い、in vitro で溶連菌菌体外酵素 (Exoenzyme) に対するこれら対象の末梢血リンパ球の免疫応答性を調べた。患児の臨床所見は表 1 にまとめた。

III. 方 法

1) リンパ球の分離および培養

家族性血尿の患児とその家族およびその他の腎疾患患児の末梢静脈血を採取し、Ficoll-Conray 比重分離法でリンパ球を分離した。捕獲したリンパ球を PBS で3回洗浄後、10%ウシ胎児血清 (Fetal calf serum; FCS) 加 RPMI 1640 を用い $5 \times 10^5/\text{ml}$ になるように調整した。リンパ球浮遊液 0.2ml を含む well に Streptolysin-O (SLO) (栄研) を種々の濃度で添加し、triplicate で 5% CO₂ 37℃ で培養し、リンパ球芽球化反応 (Lymphocyte transformation: LTF) をみた。5日間培養後、³H-Thymidine (³HTdR) 0.25μCi を各 well に添加し、さらに24時間培養してリンパ球の DNA 合成をみた。培養終了後、ガラスフィルター上に harvest し、³HTdR up take を液体シンチレーションカウンターでカウントし、dpm で表現した。また、その自然対数値をとって、ln dpm で表現した。

2) HLA 型の判定
Terasaki らの microdroplet lymphocyte cytotoxicity test⁸⁾に従った。HLA 抗血清は、9th International Histocompatibility Workshop で公認された血清およびそれらに相当する local 血清を使用した。HLA-A locus 抗原12種、-B locus 抗原24種、-C locus 抗原4種、DR locus 抗原9種、及び DQ locus 抗原2種の検索を行った。HLA-DR, DQ locus typing のためのB細胞の分離は、nylon wool column 法⁹⁾を用いた。

3) 外来抗原：溶連菌 exoenzyme (streptolysin-O ; SLO)

抗原として用いた SLO (栄研) は10倍濃度、50倍濃度、100倍濃度になるようにリンパ球浮遊液に添加した。Lot No. 58013, 6X014, 77110 のものを使用した。50倍濃度での検討で、高反応者と低反応者が最も明確に認められたので、以下の実験は、おもに50倍濃度で行った。

4) 外来抗原：溶連菌 exoenzyme (streptolysin-O ; SLO)

抗原として用いた SLO (栄研) は10倍濃度、50倍濃度、100倍濃度になるようにリンパ球浮遊液に添加した。Lot No. 58013, 6X014, 77110 のものを使用した。50倍濃度での検討で、高反応者と低反応者が最も明確に認められたので、以下の実験は、おもに50倍濃度で行った。

IV. 結 果

A) リンパ球芽球化反応で測定した SLO に対する免疫応答性

表 1 Clinical data of 33 patients with familial hematuria

Sex	12 males, 21 females
Age	5-19 years (median age 12.4 years)
Prospective follow up	0-7 years (mean 3.4 years)
Hypertension (BP > 160mmHg)	0 patient (0%)
Urinary protein excretion proteinuria > 100mg/dl	19.7 ± 43.6 mg/dl 1 patient (3%)
Serum IgA level	135.8 ± 68.5 mg/dl
Serum C3 level	77.7 ± 17.3 mg/dl
Serum ASLO level	196.2 ± 148.3 Todd

溶連菌菌体外毒素のひとつ Streptolysin-O に対するリンパ球の免疫応答が、遺伝的に支配されていることを以下の実験を行い、証明した。

Streptolysin-O による LTF は、抗原刺激により T 細胞が増殖する際に必要とされる IL-2 レセプターに対する抗体 (anti-IL2 receptor Ab) によって 95.4% まで抑制された。さらに、この Streptolysin-O による LTF は、recombinant-IL-2 (rIL-2) の添加により、23.5% 増強された。一方、この反応は、B 細胞増殖因子 (human B-cell growth factor: BCGF) の添加の影響を受けなかった (図 1)。

以上より、Streptolysin-O によるリンパ球幼若化反応が T 細胞の反応であることを確認した。

次に、抗原特異的の反応においては、マクロファージ上に表現される HLA-DR 抗原に対する抗体 (Ia 抗体) が免疫反応を特異的に抑制するとされているが、Strep-

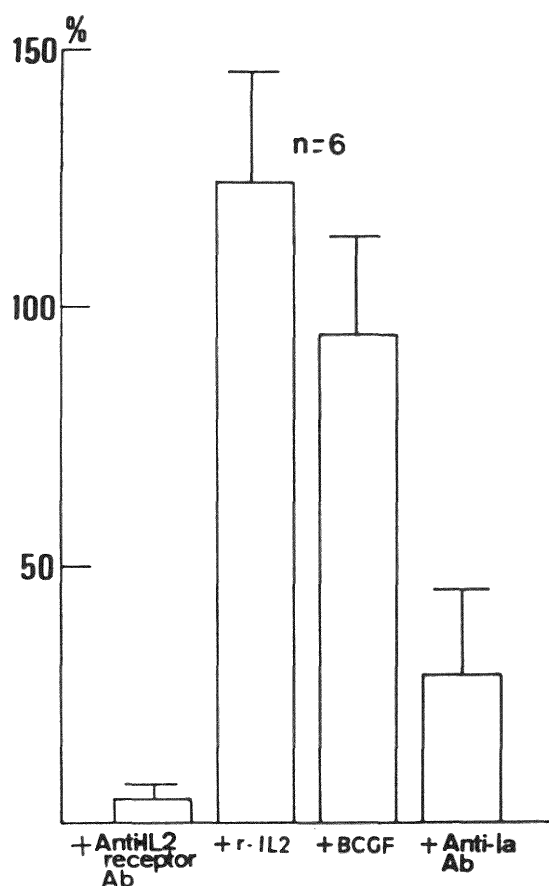


図 1 Effect of monoclonal antibodies and lymphokines on SLO-induced LTF

tolysin-O によるリンパ球芽球化反応 (LTF) は、Ia 抗体の希釈系列において Ia 抗体 5 から 50 μ l/ml の範囲で 71.5% から 93.5% 抑制された (図 2)。

また、SLO を添加して培養する前に、単核球分画を分離してそこに Ia 抗体を加えて preincubation することによっても、この反応は抑制された (図 3)。

以上より、SLO による LTF は HLA-DR 陽性細胞 (マクロファージ) の存在のもと、SLO が抗原として T 細胞に提示されておこる T 細胞の増殖反応であると考

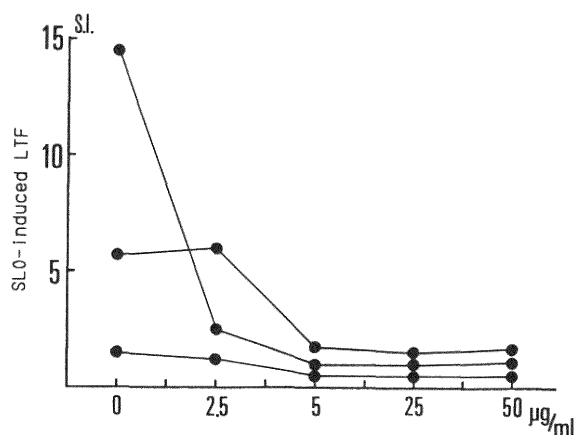


図 2 Effect of addition of Ia antibody on SLO-induced LTF

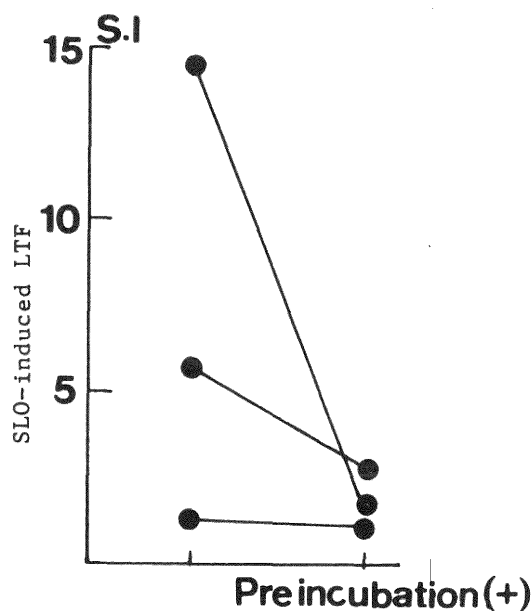


図 3 Effect of pre-incubation with anti-Ia antibody on SLO-induced LTF

えられた。

さらに、T細胞の抗原認識における Major histocompatibility complex (MHC) 拘束をあきらかにするために、HLA の異なる2名の健常人の単核球をT細胞と、プラスチック付着細胞として獲られたマクロファージに分離し、異系のマクロファージが LTF を SLO により同様に示すことが出来るか否かを検討した。

マクロファージが反応するT細胞と同系であるほうが、stimulation index で8.55, 6.46 と、異系である場合の3.58, 4.07 よりも強い反応をひきおこすことを確認した(図4)。

B) 血尿の患児、およびその家族の SLO に対する免疫反応の分布

学校検尿で発見された血尿の患児とその家族の群で、SLO に対する LTF を調べた。

$^3\text{HTdR}$ up take (dpm) 値の自然対数値をとるとそ

	TA	TB
MA	8.55	4.07
MB	3.58	6.46

T: T cell

M: Adherent cell

図4 Effect of allogeneic adherent cells on SLO-induced LTF (Stimulation index)

の分布のヒストグラムは、高反応者と低反応者の2群に分けられた(図5)。

このヒストグラムで、積分解析を行うと、高反応性と低反応性の cut off point は、9.2 (dpm 値=9900) であった(図6)。

この値を用いて、SLO に対する免疫応答性について、家系調査を行った。

22家系の調査から、両親の片方が high responder の家系及び両親ともに high responder の家系では、子供は high または low responder の両方存在する家系と、さらに high または low responder だけの家系の3種類の家系に分類された。両親ともに low responder の2家族の場合には、子供4名は全て low responder であった。これらのことから low response が劣性遺伝形質であることが推定された(図7)。

次に、全家族構成員の HLA を検索し、HLA と免疫応答性の関係を検索してみると、図に示すように、HLA が完全に一致している同胞対では、免疫応答性が非常によく一致していることがわかった(図8)。図の横軸は HLA が完全に一致している同胞対の年長者の免疫応答性を示し、縦軸は若年者の免疫応答性を示している。相関係数は0.810であるが、 \ln dpm 9.20 (dpm=9900) を境に high responder と low responder とにわけると HLA が完全に一致している同胞対では、一方が high ならもう一方も必ず high, low なら low というように免疫応答性は完全に一致していた。

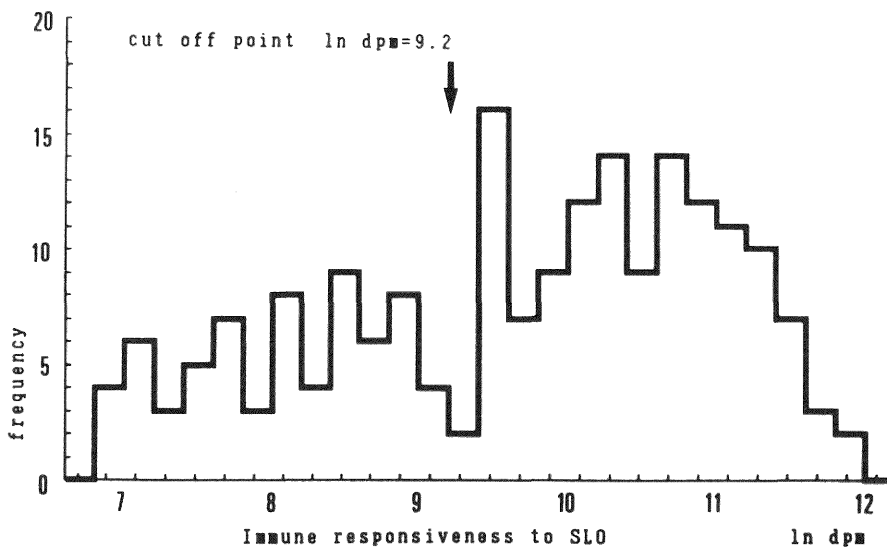


図5

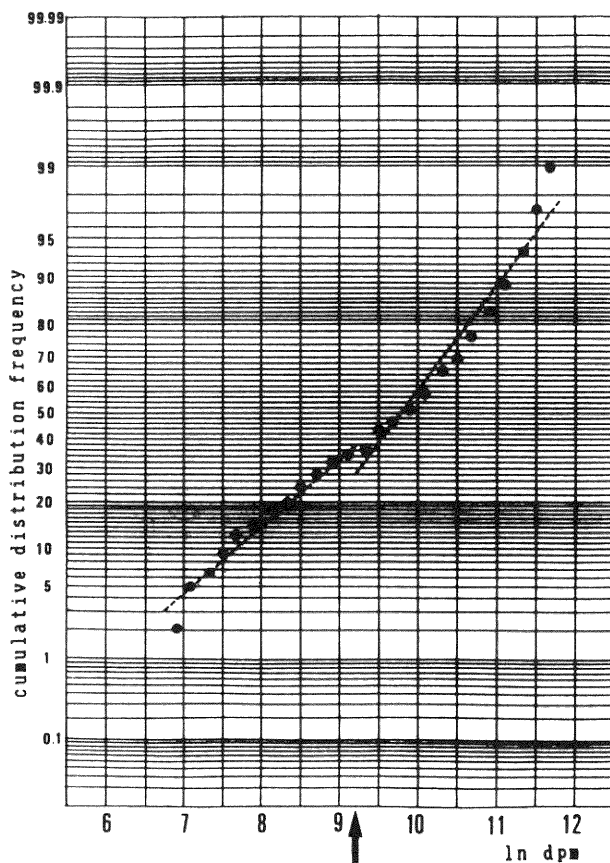


図6 Immune responsiveness to SLO

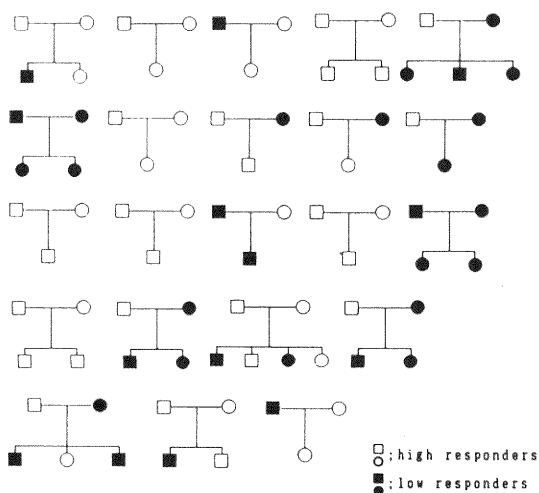
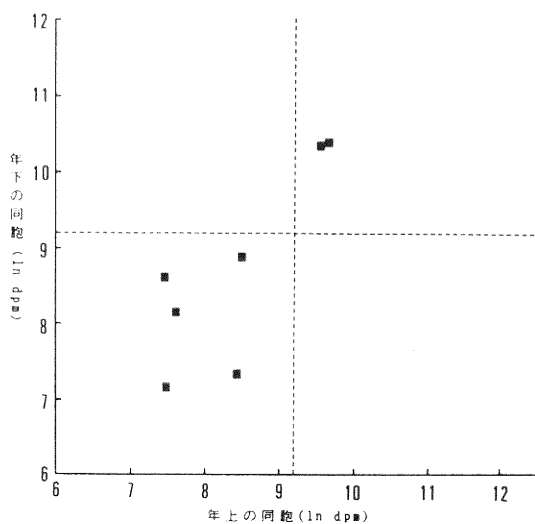
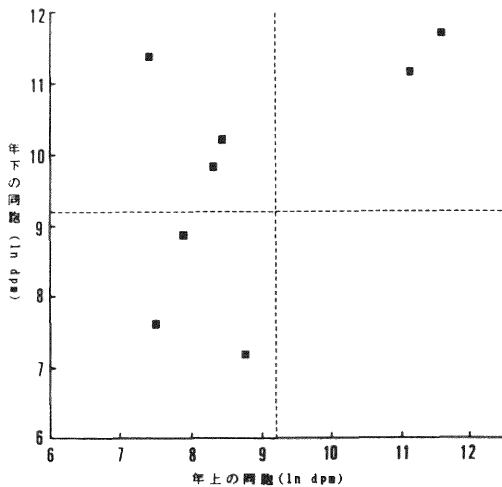
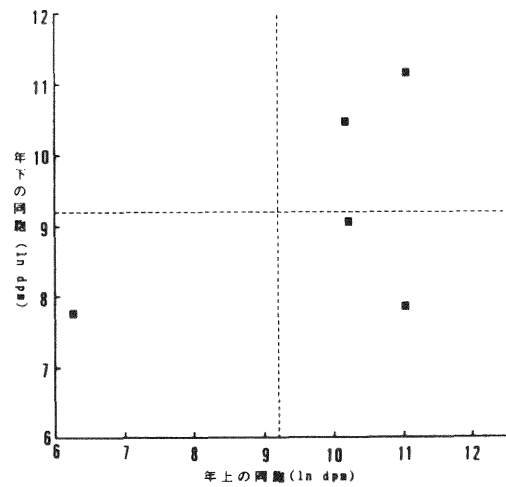


図7 Representative pedigree charts for the segregation of low and high immune responsiveness to SLO

図8 HLA ハプロタイプを2つとも共有する同胞間の免疫応答性の相関 (N=7, $r=0.810$)



HLA ハプロタイプを1つだけ共有する同胞間の免疫応答性の相関 (N=8, $r=0.520$)



HLA ハプロタイプを全く共有しない同胞間の免疫応答の相関 (N=5, $r=0.519$)

図 9

これに対し、HLA haploidentical な同胞対や HLA が全く異なる同胞間では、免疫応答性の相関は認められなかった (図 9)。

以上より HLA と SLO に対する免疫応答性とは密接な関わりがあることがわかった。

すなわち、HLA と密接な関わりをもつ遺伝子が SLO に対する免疫応答性を支配しており、この場合 high response が優性、low response が劣性遺伝形質となっていると考えられた。

V. 考 案

マウスにおいては、その主要組織適合性抗原である H-2 complex の I 領域に、種々な抗原に対する免疫応答遺伝子が存在することが知られている¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾¹³⁾。このことは、ヒトの MHC の産物である HLA においても免疫応答遺伝子との連鎖が存在しうる可能性を示している。

Greenberg¹⁴⁾¹⁵⁾ らは in vitro の芽球化反応モデルによって A 群溶連菌の精製菌体外抗原に対する反応を制御する主要遺伝子座を解析した。この抗原に対する反応は、常染色体性優生遺伝を示し、HLA に連鎖する 2 つの対立遺伝子によって制御されていることを示した。

一方、笹月¹⁶⁾ は、溶連菌細胞壁抗原に対する免疫応答を抑制する HLA に連鎖する免疫抑制遺伝子を証明した。

腎疾患の患者の溶連菌成分に対する反応性に関する報

告では、Zabriskie ら¹⁷⁾ は、進行性糸球体腎炎患者 30 名のリンパ球で、溶連菌の細胞膜、細胞壁抗原添加後の DNA 合成が、対照の非添加群に比し、2～10倍の高値を示すことを報告した。このリンパ球の hypersensitivity は、健康対照群にも、他の疾患患者にもみられなかったことから、この hypersensitivity を病因と結びつけようとしている。

一方、日本人では、倉繁¹⁸⁾ が、各種疾患患児の末梢血白血球の SLO に対する反応性を調べた。急性腎炎、rheumatoid arthritis は PHA に対する反応と同程度の SLO 感受性を示した。筆者の成績では、家族性血尿の患児と家族の群で検討し、SLO に対する in vitro の芽球化反応は優生遺伝し、HLA と密接な関係を持つことが示された。

Lea ら¹⁹⁾ は、精製 SLO を用いてリンパ球増殖能を調べた。抗 HLA-DR 様抗原抗体は、SLO 反応を約 30% 抑制することを観察し、精製 SLO による芽球化反応は、抗原特異的反応と mitogen 反応からなりたっていると述べた。筆者の成績では、SLO に対する LTF は、抗 IL2-receptor 抗体、抗 Ia 抗体等の添加実験の結果、T 細胞の増殖反応であることを確認した。その反応は、HLA-DR 抗原陽性細胞 (マクロファージ) の存在のもと、Streptolysin-O が抗原として T 細胞に提示されておこる T 細胞の増殖であることが分かった。この結果は、Lea らの観察と一部一致している。一部が相違した理由として、筆者は、リンパ球の刺激に用いた抗

原の濃度や純度の違いによるものと推測している。

今後、各種の腎炎や溶連菌感染後合併症を起こしている家族において、この SLO や他の溶連菌成分に対する免疫応答性を検討することは、病因や病像の修飾のメカニズムを解明するうえで、免疫遺伝学的基盤を知るための一助になると思われ興味を持たれる。

VI. 結 語

腎疾患患児のリンパ球芽球化反応を種々の濃度の SLO の添加実験を行い、次のことを確認した。

- 1) SLO に対するリンパ球芽球化反応はT細胞の増殖反応であることを確認した。その反応は、HLA-DR 抗原陽性細胞（マクロファージ）の存在のもと、SLO が抗原としてT細胞に提示されておこるT細胞の増殖であることがわかった。
- 2) 学校検尿で指摘された血尿の患児とその家族のリンパ球の、SLO に対する芽球化反応をみると、高反応の者と低反応の者があることが認められた。その家系調査を行い、高反応性は優生遺伝であると判断された。

さらに各種の腎炎患児やその家族のリンパ球に対する SLO の反応性についてみることは、固体の溶連菌に対する感受性を遺伝的に検討することとなり興味を持たれる。

参 考 文 献

- 1) Waldherr, R.: Familial glomerular disease. *Contr. Nephrol.*, 33: 104~121, 1982.
- 2) Tiwari, J.L. and Terasaki, P.I., (ed): *Urogenital diseases. "HLA and Disease Associations"* 1985, p 335~351, Springer-Verlag, New York.
- 3) Rodriguez-Iturbe, B.: Epidemic post-streptococcal Glomerulonephritis. *Kidney Int.*, 25: 129~136, 1984.
- 4) Naito, S., Kohara, M. and Arakawa, K.: Association of class II antigens of HLA with primary glomerulonephritis. *Nephron*, 45: 111~114, 1987.
- 5) Layrisse, Z., Rodriguez-Iturbe, B., Garcia-Ramirez, R., Rodriguez, A. and Tiwari, J.: Family studies of the HLA system in acute poststreptococcal glomerulo-nephritis. *Humann Immunology*, 7: 177~185, 1983.
- 6) Sasazuki, T., Hayase, R., Iwamoto, I. and

Tsuchida, H.: HLA and acute poststreptococcal glomerulonephritis. *New Engl. J. of Med.*, 301: 1185~1186, 1979.

- 7) 堺 薫, 大場正巳, 橋本謹也, 青海 仁: 小児慢性腎炎の免疫遺伝学的解析. 厚生省特定疾患進行性腎障害調査研究班昭和59年度研究業績, 77~82, 1985.
- 8) Terasaki, P.I., Bernoco, D., Park, M.S., Ozturk, G. and Iwaki, Y.: Microdroplet testing for HLA-A, B, C and D antigens. *Am. J. Clin. Pathol.*, 69: 103~120, 1978.
- 9) Danielovs, J.A., Ayoub, G. and Terasaki, P.I.: B lymphocyte isolation by nylon wool. *Histocompatibility testing 1980*, edited by Terasaki, P.I., UCLA tissue typing laboratory, Los Angels 1980, p287~288.
- 10) Benacerraf, B. and McDevitt, H.O.: Histocompatibility limited immune response genes. *Science*, 175: 273~279, 1972.
- 11) McDevitt, H.O. and Chinitz, A.: Genetic control of the antibody response: relationship between immune response and histocompatibility (H-2) type. *Science*, 163: 1207~1208, 1969.
- 12) Schreffler, D.C. and Chella, S.D.: The H-2 major histocompatibility complex and the immune response region: Genetic variation, function and organization. In "Advances in immunology" (edited by Dixon, F. J. and Kunkel, H.), Academic Press, New York. 1975, vol. 20: 125~195.
- 13) Yamamura, K., Kikutani, H., Folsom, V., Clayton, L.K., Kimoto, M., Akiro, S., Kashiwamura, S., Tonegawa, S. and Kishimoto, T.: Functional expression of a microinjected $E\mu$ gene in C57 BL/6 transgenic mice. *Nature*, 316: 67~69, 1985.
- 14) Greenberg, L.J., Chopyk, R-L., Bradley, P.W. and Lalouel, J.-M.: Immunogenetics of response to a purified antigen from group A streptococci. *Immunogenetics*, 11, 161~167, 1980.
- 15) Greenberg, L.J., Bradley, P.W., Chopyk, R.-L. and Lalouel, J.-M.: Genetic control

- of two HLA-linked complementary loci. Transplant, proc., 13: 992~994, 1981.
- 16) Sasazuki, T., Kaneoka, H., Nishimura, Y., Kaneoka, R., Hayama, M. and Ohkuni, H.: An HLA-linked immune suppression gene in man. J. Exp. Med., 152: 297~313, 1980.
- 17) Zabriskie, J.B. and Falk, R.E.: The reactivity of human lymphocytes to streptococcal antigens. Fed. Proc., 29: 306, 1970.
- 18) 倉繁隆信, 国富泰二, 林 洋光, 西林洋平, 奈須久美子, 喜多村勇, 平井俊太郎, 倉繁 迪: 各種疾患患児末梢白血球の SLO に対する反応性について. 小児科診療, 34: 672~682, 1971.
- 19) Lea, T., Michaelson, T.E. and Rasmussen, A.-M.: Characterization of the mitogenic and antigenic stimulatory properties of a purified streptolysin-O preparation. Clin. exp. Immunol., 50: 139~147, 1982.
- (平成元年1月30日受付)
-