

小児微小変化型ネフローゼ症候群における 血液凝固・線溶動態

第3報 血中および尿中の可溶性トロンボモジュリンの動態

奈良県立医科大学小児科学教室

宮里 馨, 中島 充, 中河 いよう, 吉岡 章

奈良県立医科大学附属病院新生児集中治療部

高橋 幸博

奈良県立奈良病院小児科

上辻 秀和

HEMODYNAMICS OF COAGULATION AND FIBRINOLYSIS IN CHILDREN WITH MINIMAL CHANGE NEPHROTIC SYNDROME

III. CHANGES IN PLASMA AND URINARY SOLUBLE THROMBOMODULIN

KAORU MIYAZATO¹⁾, YUKIHIRO TAKAHASHI²⁾,
MITSURU NAKAJIMA¹⁾, HIDEKAZU KAMITSUJI³⁾,
IYOU NAKAGAWA¹⁾ and AKIRA YOSHIOKA¹⁾²⁾

1) *Department of Pediatrics, Nara Medical University*

2) *Division of Neonatal Intensive Care, Nara Medical University Hospital*

3) *Department of Pediatrics, Nara Prefectural Nara Hospital*

Received October 18, 1996

Abstract: Soluble thrombomodulin (sTM) is a novel marker of damaged endothelial cell and acts as an anticoagulant. Plasma and urinary sTM in patients with minimal change nephrotic syndrome (MCNS) in children are demonstrated in this report. In spite of normal blood creatinine levels, the plasma concentrations of sTM in cases of onset and relapse of MCNS were elevated as compared with healthy subjects {at onset 37.8 ± 14.9 TU/ml (Mean \pm SD), at relapse 21.8 ± 11.1 TU/ml, normal 9.0 ± 2.8 TU/ml}. The urinary concentrations of sTM, however, were almost within normal range, and there was no correlation between plasma and urinary concentrations of sTM. Plasma concentrations of sTM had a good correlation ($r = -0.742$) with serum albumin. From these results it is suggested that high plasma sTM concentration in patients with MCNS at initial episode and in the course of relapse is likely to act toward anticoagulation.

Index terms

thrombomodulin, minimal change nephrotic syndrome, children

緒 言

小児特発性ネフローゼ症候群の約80%を占める微小変化型ネフローゼ症候群 (minimal change nephrotic syndrome, 以下MCNS)はステロイド剤投与により速やかな寛解状態が期待できる。しかし、増悪期にはまれに血栓症を合併することがあり^{1,2)}、その発症機序には、従来から血小板機能の亢進や血液凝固系および線溶系異常の存在が注目されてきた^{3,4)}。特に血液凝固および線溶因子の変化の多くは、血中蛋白の尿中への漏出や低蛋白血症に由来した肝臓での蛋白合成の亢進が影響しており、これらの個々の因子の増減からは必ずしも凝固亢進を示唆するものと断定しうるものではなかった。

近年、凝固亢進の指標となるトロンビンとAT IIIの複合体(thrombin-antithrombin III complex, 以下TAT)のMCNSにおける上昇も知られる様になり、MCNS増悪期における血栓準備状態を示唆する有力な指標となっている^{5,6)}。我々もすでに第1報でMCNSの初発時および再発時にTATが高値を呈する事を報告した。しかし、一旦形成されたトロンビンの血管内皮細胞への影響についてはまだ明らかでない。そこでトロンビンの血管内皮細胞上のレセプターであるトロンボモジュリンのMCNSにおける動態を検索する目的で血管内皮細胞障害マーカーであり、かつ、抗トロンビン作用を有する血中および尿中の可溶性トロンボモジュリン (soluble thrombomodulin, 以下sTM)を小児MCNSの増悪期から回復期にかけて経時的に測定し、その意義を検討した。

対 象

1988年11月から1996年2月までに奈良県立医科大学附属病院、奈良県立奈良病院、天理市立病院および星ヶ丘厚生年金病院に入院した11か月から15歳まで(平均 6.7 ± 3.7 歳)のMCNS患児35例であった。このうち初発例は25例、再発例は26例で、計35例(重複例16例を含む男23例、女12例)であった。ネフローゼ症候群の診断は1974年の厚生省研究班の診断基準によった⁷⁾。また、MCNSの診断は臨床経過により、通常ステロイド剤(以下ス剤)治療[初発例ではプレドニン換算で 60 mg/m^2 を4週間投与する。再発例では約1週間の内服投与およびパルス療法施行例を含む。]で速やかに寛解状態が得られ、その後の漸減投与を含む1クルールの治療の後、6か月以内の再発を認めないものとした。再発は有意の蛋白尿(40 mg/hr/m^2 以上、またはウロラプスティック[®](バイエル・三共、東京)で+++以上)が3日以上続くものとした。

検体の採取時期は、初発例ではス剤投与前に、再発例ではス剤再投与前または増量前に行った。以後1週間毎に約8週目まで採取した。正常対照として健常児(4歳~15歳)91名の血漿と20名の尿の測定値を用いた。

方 法

血漿は、静脈より採血した全血を9容に対し、3.8%クエン酸ナトリウム1容を混和後、3,000 rpmで10分間遠心分離し、その上清を速やかに -80°C で凍結保存した。測定の際は 37°C で速やかに解凍した。尿は24時間蓄尿または早朝尿を1,500 rpmで5分間遠心した上清を -30°C で凍結保存した。測定の際は 37°C で速やかに解凍した。

sTMの測定はポリスチレンボール固定抗ヒト thrombomodulin ポリクロナール抗体と酵素標識抗ヒト thrombomodulin モノクロナール抗体を用いた one-step sandwich EIA kit(TMテスト「テイジン」[®] Teijin Inc. 東京)を用いて測定した。すなわち、検体 $50 \mu\text{l}$ を検体希釈液(ウシ血清アルブミン液)で5倍に希釈し、酵素(西洋ワサビペルオキシダーゼ)標識抗ヒト thrombomodulin 抗体(KA-4)液を $200 \mu\text{l}$ ずつ追加し、軽く振とうした。次いで抗ヒト thrombomodulin 抗体(sTMのすべての分子種を認識する)固定ボールを各試験管に加え、振とう後、 37°C で90分間反応させた。反応液を吸引除去後、洗浄し、発色液(基質液は過酸化水素、リン酸クエン酸緩衝液、発色剤は3,3',5,5'-テトラメチルベンチジン二塩酸塩)液を $400 \mu\text{l}$ ずつ添加し、振とう後 37°C で30分間反応させた。さらに硫酸を加えて反応を停止させ充分混和し、吸光度を450 nmで測定した。測定値(ng/ml)は帝人が設定した単位(TU/ml)で示した。sTM標準物質として3.1~200 TU/mlの希釈系列を作成し、検体の測定に際し同時に測定した。尿中sTMの測定には尿の上清を希釈も濃縮もせずを用いた。尿中sTM量を比較するにあたり、尿中sTM量を、同時に測定した尿中クレアチニンで除した尿中sTM/尿中クレアチニン(TU/mgCr)で示した。尿中クレアチニンの測定は酵素法によった。von Willebrand Factor antigen(以下vWF:Ag)の測定はtwo-step sandwich EIA kit(アセラクロムvWF[®], Boehringer Mannheim, Mannheim, ドイツ)を用いて測定した。得られた成績の統計学的処理法については、相関はPearson法で $r > 0.7$ かつ $p < 0.05$ を有意な相関とし、有意差はt検定により $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

成 績

1. MCNS 患児の血中 sTM

1) 血中 sTM の推移

血中 sTM は、MCNS の初発例および再発例ともス剤投与前または増量前にはそれぞれ 37.8 ± 14.9 TU/ml (平均値 \pm SD), 21.8 ± 11.1 TU/ml と、正常対照 9.0 ± 2.8 TU/ml に比して有意に高値であった(図 1)。そしてス剤による加療とともに減少し、初発例ではス剤治療開始後 3 週目に、再発例では 2 週目にそれぞれ 10.7 ± 3.3 TU/ml, 11.1 ± 4.6 TU/ml と正常化した(図 2)。

2) 血中 sTM と臨床検査所見との相関(表 1)

i) 血中 sTM と血清クレアチニンおよび BUN との相関

血清クレアチニン値は、ス剤投与前または増量前から 8 週目にかけて、いずれも正常域内(<1.0 mg/dl)を推移し、血中 sTM と血清クレアチニンとの間に有意な相関はなかった。

BUN は、ス剤投与前または増量前に 22 mg/dl 以上の高値を示したものが、検査した 42 例中 3 例(7%)あったが、39 例(93%)では正常域内であった。ス剤投与後 1 週にはいずれも正常域内となった。血中 sTM と BUN との間に有意な相関関係はなかった。

ii) 血中 sTM と血清総蛋白および血清アルブミン

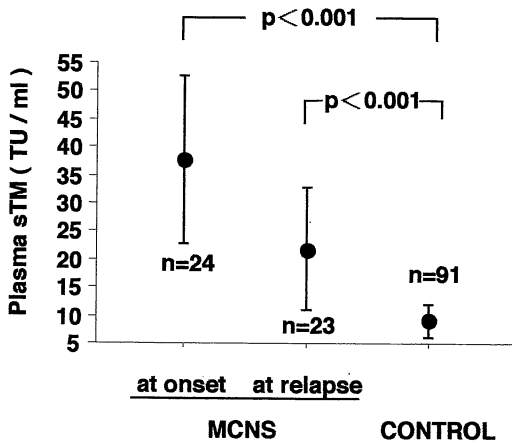


Fig. 1. Comparison of plasma soluble thrombomodulin (sTM) between the patients with minimal change nephrotic syndrome (MCNS) at onset time or at relapse time and normal control subjects.

● : mean \pm SD

Table 1. Correlation between plasma soluble thrombomodulin (sTM) and other blood chemistry and urinary parameters in patients with minimal change nephrotic syndrome

Variable	n	r
Creatinine (mg/dl)	233	-0.161*
BUN (mg/dl)	206	0.221**
Total protein (g/dl)	239	-0.715***
Albumin (g/dl)	221	-0.742***
Total cholesterol (mg/dl)	229	0.510***
Triglyceride (mg/dl)	143	0.380***
Urinary volume (ml/day)	182	-0.322***
Urinary protein (g/day)	110	0.088
vWF: Ag (%)	80	0.571***

* p < 0.05

** p < 0.01

*** p < 0.001

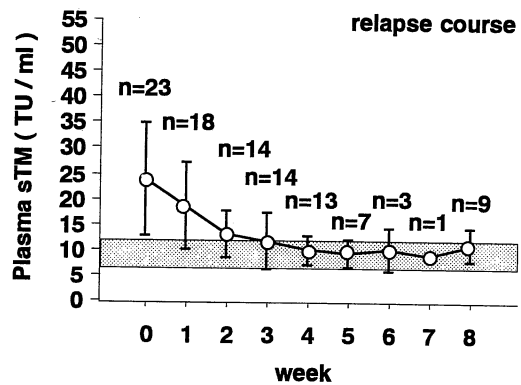
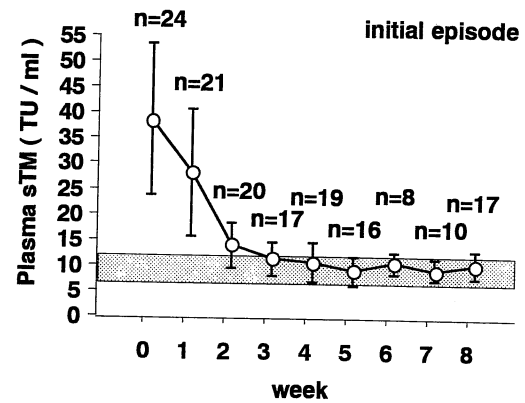


Fig. 2. Changes of plasma sTM in patients with minimal change nephrotic syndrome in initial episode and in relapse course.

■ : normal range

○ : mean \pm SD

血清総蛋白はス剤投与前または増量前には検査した51例中38例(74.5%)で低値(<6.0g/dl)であったが、8週目にはいずれも正常域まで上昇した。血中sTMは血清総蛋白と有意に逆相関した(図3)。

血清アルブミンは、ス剤投与前または増量前には48例中26例(54%)で低値(<3.0g/dl)であったが、3週目にはいずれも正常域内となった。血中sTMは、血清アルブミン値と有意に逆相関した(図3)。

iii) 血中sTMと血清総コレステロールおよび血清トリグリセリド

血清総コレステロールは、ス剤投与前または増量前には48例中32例(67%)で240mg/dl以上の高値を示し、治療とともに減少したが、24例中3例(13%)では8週目にもなお高値であった。血清トリグリセリドは、ス剤投与前または増量前には31例中19例(61%)で160mg/dl以上の高値を示し、治療とともに減少したが、16

例中5例(31%)では8週目にも高値であった。血中sTMと血清総コレステロールおよび血中sTMと血清トリグリセリドとの間には有意な相関関係はなかった。

iv) 血中sTMと一日尿量および一日尿蛋白量との相関

一日尿量は、ス剤投与前または増量前には455±248

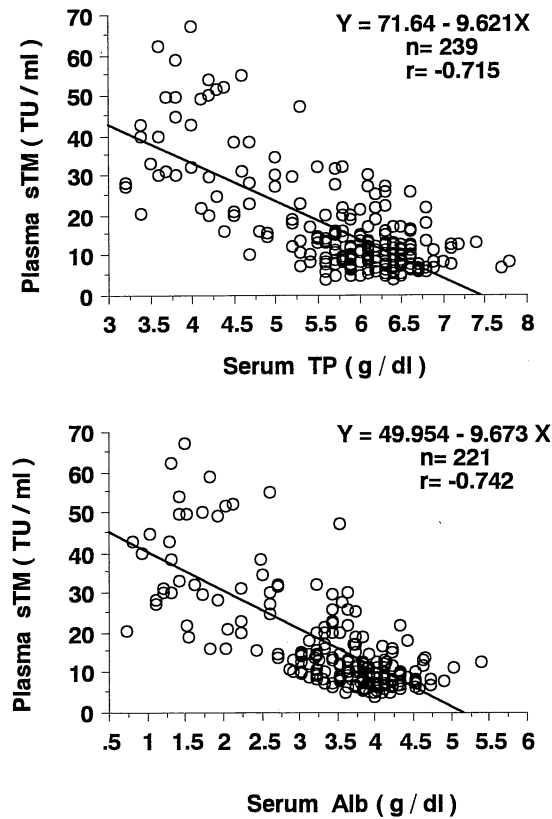


Fig. 3. Correlation between plasma sTM and serum total protein (TP) or serum albumin (Alb) in patients with minimal change nephrotic syndrome.

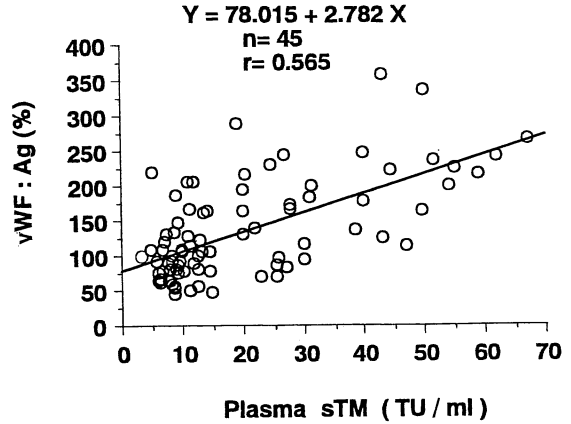


Fig. 4. Correlation between plasma sTM and plasma von Willebrand Factor antigen (vWF: Ag) in patients with minimal change nephrotic syndrome before steroid therapy.

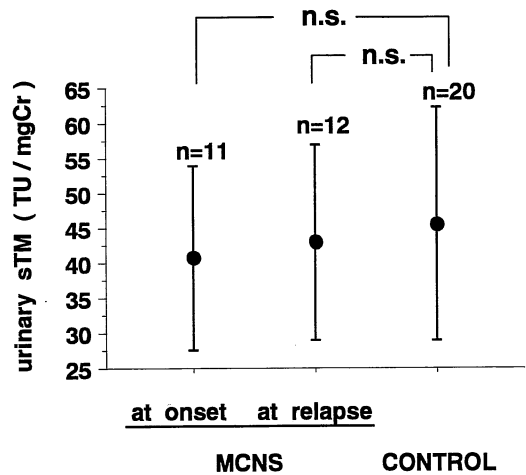


Fig. 5. Comparison of urinary soluble thrombomodulin (sTM) between the patients with minimal change nephrotic syndrome (MCNS) at onset time or at relapse time and normal control subjects.

● : mean ± SD

ml/day (平均値±SD)と少なく、1週目の利尿期には859±378 ml/dayと増加し、以後は正常範囲内であった。一日尿蛋白量はス剤投与前または増量前には15.7±6.2 g/dayと高値で、4週目には0.13±0.07 g/dayと正常(0.15 g/day以下)に復した。血中sTMと一日尿量および血中sTMと一日尿蛋白量との間に有意な相関関係はなかった。

3) 血中sTMと血漿vWF:Agとの相関

血漿vWF:Agは、ス剤投与前または増量前には147.0±61.6% (平均値±SD)と正常対照(87.1±34.4%)よりも有意に高値であった。この血漿vWF:Agと同時期の血中sTMとの相関関係はn=45, r=0.565, p<0.001 (図4)であった。

2. MCNS患児の尿中sTM

1) 尿中sTMの推移

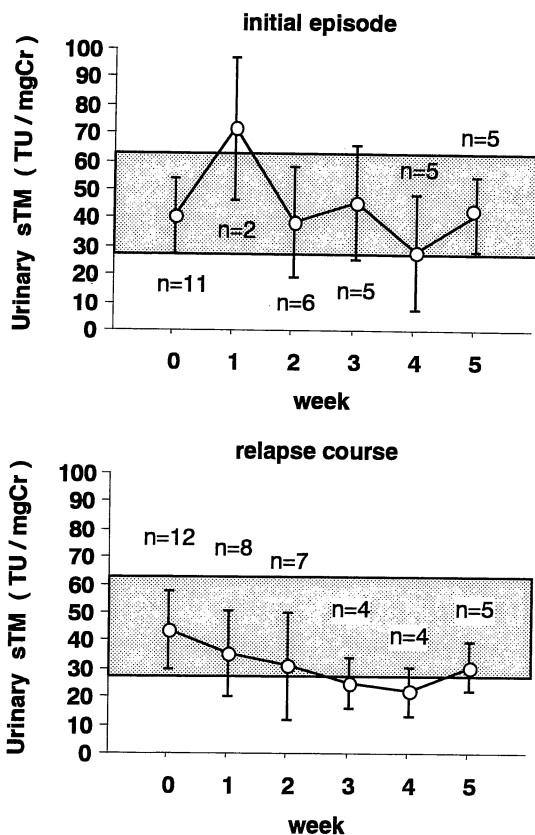


Fig. 6. Changes of urinary sTM in patients with minimal change nephrotic syndrome in initial episode and in relapse course.

■: normal range
○: mean±SD

血漿と同時に尿検体の得られたMCNS 24例で尿中sTMを測定した。初発例および再発例ともス剤投与前または増量前にはそれぞれ40.8±13.3 TU/mgCr (平均値±SD), 43.0±14.1 TU/mgCrと、正常対照(45.5±16.6 TU/mgCr)とは有意な差異はなかった(図5)。初発例におけるsTMは、2週目の一過性の上昇の他はス剤投与前から5週目にかけていずれもほぼ正常域値を示した。再発例のsTMは、ス剤増量後3週目と4週目に低値を示した他は正常域値であった(図6)。

2) 尿中sTMと一日尿量および一日尿蛋白量との相関

尿中sTMと一日尿量および尿中sTMと一日尿蛋白量との間に有意な相関関係はなかった(表2)。

3) 血中sTMと尿中sTMとの相関

血中sTMと尿中sTMの間には有意な相関はなかった(図7)。

考 察

トロンボモジュリン(以下TM)は血管内皮細胞上に

Table 2. Correlation between urinary soluble thrombomodulin (sTM) and other urinary parameters in patients with minimal change nephrotic syndrome

Variable	n	r
Urinary volume (ml/day)	54	-0.291*
Urinary protein (g/day)	40	0.059
Urinary sTM (TU/mgCr)	65	0.252*

* p<0.05

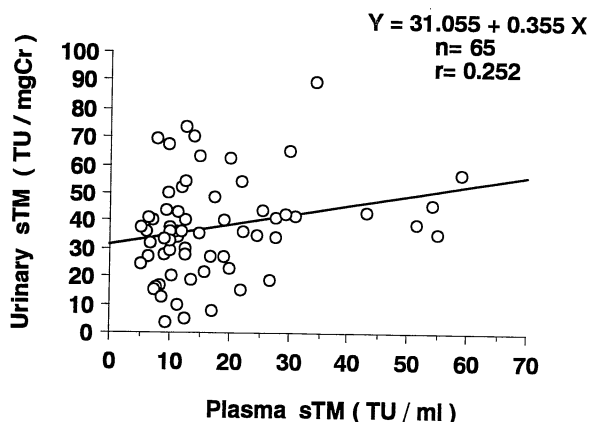


Fig. 7. Correlation between plasma sTM and urinary sTM in patients with minimal change nephrotic syndrome.

存在するトロンビンレセプターの一つで、トロンビンと強い親和性を持ち、1対1の複合体を形成することによってトロンビンの凝固活性を阻止する。さらにトロンボモジュリン-トロンビン複合体は抗血栓作用を持つプロテインC(PC)を効果的に活性化(APC)させる。Ishii & MajerusはこのTMが健康人の血中および尿中にも存在することを報告し、これをsTMと呼んだ^{8,9)}。この血中sTMは、血管内皮細胞上に存在するトロンボモジュリンが分泌反応で血中へ遊離したものでなく、内皮細胞の障害により蛋白分解酵素の作用を受けて、細胞膜貫通ドメインを残して分離放出されたものと推察されている¹⁰⁾。

今回のMCNS患児における血中sTMは急性期および増悪期に有意に増加し、回復期に正常に復した。この傾向は初発時の方が再発時よりも顕著であって、血清総蛋白や血清アルブミンと逆相関していた。さらに、血清総コレステロールや血清トリグリセリドとは弱い相関を示した。ネフローゼ症候群におけるsTMの動態については、Ohsawaら¹¹⁾成人のネフローゼ型腎炎で増悪期に増加すること、とりわけ血清アルブミンが3.0g/dl以下および尿中蛋白が3.5g/day以上では有意に増加すると報告したが、その機序はさだかでない。また、TMの局在性をみると血管内皮細胞のほか臓器別では肺臓に最も多く、ついで胎盤、脾臓、膵臓、肝臓、心臓、腎臓の順に分布している⁹⁾。今回のわれわれの小児MCNS症例の成績でみられるように、血中sTMが血清総蛋白やアルブミンとの間に逆相関を示したことは、血管の豊富な肝臓での蛋白合成亢進による影響も推定される。血中sTMが血清総コレステロールやトリグリセリドと弱いながらも正の相関を示したことはこの推論を支持するものと思われる。

一般に血中sTMは内皮細胞障害により上昇することがよく知られている。今回、他の血管障害マーカーと考えられているもののうちvWF:Agと比較したところ、 $r=0.565$ と弱い正の相関を示したことから、血管内皮細胞障害による上昇とも考えられる。しかし、一般的にMCNSの組織変化としては血管障害所見に乏しいことから血中sTMの上昇を血管内皮細胞障害のみに起因するとは考えにくく、さらに今後の検討が必要と考えられる。

小児のMCNS増悪期にはTATの上昇などhypercoagulabilityが存在するにもかかわらず、血栓症合併の報告は少ない。第1報で報告したように、MCNSの急性期ではTATが上昇することから血中にトロンビンが生成されていると考えられ、このトロンビンが血管内皮細胞上のレセプターであるTMと結合することでTMが

分解され、血中に増加することも考えられた。

一方、腎疾患における尿中sTM出現に関しては、腎機能低下例では正常人や腎機能正常例に比して低値であり、このことは腎機能低下例での血中sTM上昇の一因とされている¹¹⁾。MCNSは血清クレアチニンは正常であるが、血中sTMが増加したにもかかわらず、尿中sTMは正常対照と差はなかった。このことより、MCNSにおける血中sTMの上昇にはGFRの低下を含む腎の排泄機能障害の関与も考えられた。

以上の結果よりMCNS急性期および増悪期では低蛋白血症と連動した血中sTMの上昇がみられたが、TAT上昇と考え併せると血中sTM上昇はhypercoagulabilityに対して抑制的に働き、小児のMCNS増悪期における血栓症合併の予防に寄与している可能性も考えられた。

謝 辞

稿を終るにあたり、御校閲、御助言を賜りました本学第一内科学土肥和敏教授並びに泌尿器科学平尾佳彦教授に深く感謝いたします。さらに、本研究の遂行にあたって終始御助力をいただきました本教室の諸兄姉に感謝の意を表します。

本研究に際し、帝人株式会社より“TMテスト「テイジン」[®]”の供与を受けました。深謝いたします。

文 献

- 1) **Andrassy, K., Ritz, E. and Bommer, J.** : Hypercoagulability in the nephrotic syndrome. *Klin. Wochenschr.* 58 : 1026-1036, 1980.
- 2) **Llach, F.** : Hypercoagulability, renal vein thrombosis and other thrombotic complications of nephrotic syndrome. *Kidney Int.* 28 : 429-439, 1985.
- 3) **Barnett, H. L., Schoeneman, M., Bernstein, J. and Edelman, C. M. Jr.** : The Nephrotic Syndrome. *Pediatric Kidney Disease. Volume II* (Edelman, C. M. ed.) Little, Brown and Company, Boston, p 679-p 695, 1978.
- 4) **上辻秀和** : ネフローゼ症候群の凝固～線溶能—微小変化型ネフローゼ症候群を中心に—。腎と透析 30 : 527-531, 1991.
- 5) **岡島 馨, 山下隆司, 松永健司, 河原信吾, 中島 充, 平 康二, 上辻秀和** : ネフローゼ症候群に於ける血液凝固線溶動態について 第27回日本小児腎臓病学会抄録集 243, 1992.

- 6) 小林正之, 片山俊夫, 落合成正, 吉田真弓, 海渡健, 増岡秀一, 島田 貴, 西脇嘉一, 酒井 紀: ネフローゼ症候群におけるトロンビン・抗トロンビンIII複合体およびプラスミン・ α_2 -プラスミンインヒビター複合体の検討. 日腎誌 33: 653-658, 1991.
- 7) 山中文雄, 中野光郎: ネフローゼ症候群. 新小児医学体系第12巻 B 小児泌尿器病学II (小林 登, 多田哲也, 藪内百治編). 中山書店, 東京, p 111-p 138, 1987.
- 8) 若杉佳世子, 風間睦美: 血中尿中トロンボモジュリン測定 of 臨床的意義. Prog. Med. 12: 1401-1408, 1992.
- 9) Ishii, H. and Majerus, P. W.: Thrombomodulin is present in human plasma and urine. Thromb. Haemostas. 76: 2178-2181, 1985.
- 10) 石井秀美, 風間睦美: トロンボモジュリン. 血液と脈管 20: 496-505, 1989.
- 11) Osawa, I., Ohi, T., Fujita, T. and Kanmatsuse K.: Elevation of plasma thrombomodulin level in primary glomerulonephritis with heavy proteinuria. 日腎誌 38: 300-304, 1996.