



Intraglomerular fibronectin in rat experimental glomerulonephritis

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 米山, 孝 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1428

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 151号	学位授与年月日	平成 5年 5月 7日
氏 名	米 山 孝		
論文題目	Intraglomerular fibronectin in rat experimental glomerulonephritis (ラット実験糸球体腎炎における糸球体内フィブロネクチン)		

医学博士 米 山 孝

論文題目

Intraglomerular fibronectin in rat experimental glomerulonephritis

(ラット実験糸球体腎炎における糸球体内フィブロネクチン)

論文の内容の要旨

(はじめに)

フィブロネクチン (fibronectin : FN) は接着性の糖蛋白で、正常腎糸球体では主にメサンジウム (mesangium : M) 領域に分布するが病的状態では糸球体糸球壁にも分布することがある。この糸球壁に分布した FN の沈着機構を明らかにするため、膜性腎症の実験モデルであるヘイマン腎炎 (Heymann nephritis: HN)、糸球体細胞増殖を認める馬杉腎炎 (nephrotoxic serum nephritis: NSN) の2実験腎炎において、FNの糸球体内分布を検討した。

(方法)

実験腎炎作成: HNは不溶性腎尿管上皮細胞をラットに免疫し作成した。NSNはアヒル抗ラット糸球体基底膜抗血清をラットに静注し作成した。組織学的検討: 光学顕微鏡、蛍光抗体法、免疫電顕法にて検討した。蛍光抗体法は直接法にて、糸球体内 FN、免疫グロブリン G (immunoglobulin G: IgG) の局在を検討した。免疫電顕法は免疫グロブリン・金コロイド染色法を用いた。腎をペリオデイト・リジン・パラホルムアルデヒド液で固定、 -30°C で Lowicryl K 4 M 樹脂に包埋した。超薄切片を一次抗体のウサギ抗ラット FN、IgG 抗体で一時間反応、10nm 金コロイド標識ヤギ抗ウサギ IgG 試薬で室温30分反応、酢酸ウラニールで染色し観察した。尿中蛋白の測定: 尿中アルブミンは一次免疫拡散法で測定した。尿中 IgG、FN は酵素免疫測定法にて測定した。血中 FN の腎組織への結合に関する検討: 腎凍結切片に FITC 標識ラット血清由来 FN を 37°C 2 時間反応させ、糸球体糸球壁への FN の結合を観察した。

(結果)

HN では糸球体糸球壁にスパイク形成を認めたが細胞増殖は認めなかった。NSN では M 細胞増殖が見られた。蛍光抗体法所見では正常ラット糸球体で、FN は主に M 領域に分布した。HN、NSN では FN が糸球体糸球壁に瀰漫性に分布した。免疫電顕所見では、正常ラットでは FN は M 領域に分布し、糸球体基底膜の緻密層にも僅かに分布を認めた。NSN では糸球体糸球壁に M 介在現象を認め、介在した M 細胞周囲に FN の分布をみた。一方、HN では M 介在現象は認めないが糸球体基底膜が瀰漫性に肥厚し、肥厚した基底膜の内透明層、緻密層、外透明層にほぼ均一に FN の分布を認めた。尿中アルブミン、IgG、FN 排泄量は両腎炎で正常ラットと比較して有意に増加を認めた。FITC 標識 FN は HN でのみ糸球体糸球壁に線状に沈着を認めた。

(考案及び結論)

免疫電顕法所見から、NSN では M 介在現象を認めた部位で介在した M 細胞周囲に大量の FN を認め、この FN は M 細胞増殖を反映しているものと思われた。一方 HN では FN は糸球体基底膜の内透明層、緻密層、外透明層にほぼ均一に分布した。HN では M 細胞増殖を欠くため糸球体糸球壁の FN が M 細胞増殖を反映しているとは考えにくい。両腎炎において尿中アルブミン、IgG と同様尿中 FN 排泄も増加していた。このため、血中 FN が糸球体基底膜を通過する間に基底膜に結合する可能性がある。実際、FITC 標識 FN を用いた検討では、血中由来 FN が HN の糸球体糸球壁に結合し、

HN の糸球体基底膜が血中 FN に特異的な親和性を有する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

フィブロネクチンはヒト正常糸球体では、蛍光抗体法によるとメサンギウム間質にだけ証明されるが、糸球体に病変があると、糸球体系蹄壁にもその存在が明かになる。申請者は前報において、増殖性腎炎ではメサンギウム細胞の増殖につれてメサンギウムのフィブロネクチンが糸蹄壁へ移行する可能性を考えた。しかし膜性腎症では、メサンギウムに細胞増殖がみられないにもかかわらず、糸蹄壁にフィブロネクチンの沈着が認められ、この機構について疑問が残った。

これ故、申請者は本研究において、フィブロネクチンの分布を電顕を用いた半定量的な観察により、その沈着機構を明らかにしようと試みた。

本研究の特徴と主要な結果は、以下のとおりである。

1. ラットにおける膜性腎症モデルとしてヘイマン腎炎を、メサンギウム増殖を伴う腎炎モデルとして馬杉腎炎を用いた
2. 金コロイド免疫電顕法のために、periodate-lysine-paraformaldehyde による低温固定・低温樹脂包埋を行い、形態および抗原性の保持に留意した
3. 電顕観察によりフィブロネクチンは、正常糸球体ではメサンギウムと少量であるが基底膜緻密層に分布していたのに対し、ヘイマン腎炎では毛細血管基底膜の各層にびまん性に、馬杉腎炎では内皮細胞と基底膜間に介在するメサンギウム細胞の周囲、ことに内皮細胞とメサンギウム細胞の間に多量に認められた
4. 腎組織の凍結切片に FITC を標識したフィブロネクチンを反応させると、フィブロネクチンはヘイマン腎炎の糸球体系蹄基底膜と結合したが、馬杉腎炎や正常糸球体とは結合しなかった
5. このような所見に基づき、申請者はヘイマン腎炎において糸蹄基底膜に沈着するフィブロネクチンは血液由来と結論し、この腎炎では基底膜のフィブロネクチンに対する親和性が高まることで沈着の原因と考えた

本論文の審査委員会は以上について検討を加え、本論文が膜性腎症におけるフィブロネクチンの糸球体系蹄基底膜への沈着機構がメサンギウム増殖性病変の場合と異なることを具体的に示したものと評価した。論文審査の過程において以下のような問題について討議があった。

1. ネフロトキシン血清をアヒルで作った理由
2. 正常アヒル血清を用いた対照実験は必要ないか
3. 金コロイド法に用いた IgG の isotype は何か
4. メサンギウム細胞や内皮細胞にフィブロネクチン産生像は認められたか
5. ネフロトキシン腎炎でフィブロネクチンがメサンギウム基質に多い理由
6. メサンギウム細胞の増殖を標識チミジン法などで客観化する必要はないか
7. 血中フィブロネクチン濃度と糸球体沈着との関係をみたか
8. 糸球体におけるフィブロネクチンの沈着は病態といかに関係するか
9. 標識したフィブロネクチンを動物に投与して糸球体への分布をみる必要はないか
10. ヘイマン腎炎における糸球体系蹄基底膜肥厚の本体は何か
11. 用いた実験動物に関する諸条件の表示法は妥当か

これらに対する申請者の見解はおおむね適切であり、本論文が博士（医学）の学位授与に値する内

容を備えているものと、全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 白 澤 春 之

副査 教授 金 子 榮 藏

副査 教授 山 下 昭

副査 教授 河 邊 香 月

副査 助教授 西 村 正 彦