



Alterations of anionic charge and/or sites of the glomerular basement membrane in the heterologous phase of passive Heymann nephritis

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: 新井, 隆己 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1403

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 126号	学位授与年月日	平成 4年 7月 3日
氏名	新井隆己		
論文題目	Alterations of anionic charge and / or sites of the glomerular basement membrane in the heterologous phase of passive Heymann nephritis (受身ヘイマン腎炎の heterologous phase における糸球体基底膜陰荷電物質の局在と荷電量の変化について)		

医学博士 新井隆己

論文題目

Alterations of anionic charge and/or sites of the glomerular basement membrane in the heterologous phase of passive Heymann nephritis

(受身ヘイマン腎炎の heterologous phase における、糸球体基底膜陰荷電物質の局在と荷電量の変化について)

論文の内容の要旨

目的

血液中の高分子蛋白への尿中への通過は、腎糸球体基底膜 (glomerular basement membrane : GBM) により規定されている。GBM に存在する陰荷電物質は血清蛋白の GBM 透過に影響し、蛋白尿発現下では陰荷電性が低下しているとの報告もある。GBM の陰荷電性の評価は、GBM に陽荷電物質を結合させ、電子顕微鏡により陽荷電物質を顆粒状に捉え、その数を測定することでなされてきた。しかし顆粒の不規則性等により、必ずしも陰荷電性の指標にならないとの指摘があった。そこで陽荷電物質の一つであるルテニウム赤 (ruthenium red : RR) を使用し、GBM 結合ルテニウム量を原子吸光光度計にて定量する方法を考案し、GBM の陰荷電性の指標とした。さらにこの方法と従来の方法 (半定量) を用いて、ヒト膜性腎症の動物モデルとされる受身ヘイマン腎炎 (passive heymann nephritis : PHN) の蛋白尿出現前後における陰荷電物質の変化と蛋白尿との関連を検討した。

方法

ラット Fx1A を Edgington らの方法により抽出した。雄の SD ラットにヒツジ抗ラット Fx1A IgG 40mg を腹腔注射し PHN を作製した。対照群として正常ヒツジ IgG 40mg を投与した。抗体投与 1, 2, 3, 4 日後、Kanwar らの方法に準じて、左腎を RR 溶液で灌流染色した。左腎皮質の一部を、karnovsky 固定液にて固定し、オスミウムによる後固定後、Epon 包埋し電子顕微鏡用検体とした。GBM 単位長さあたりに結合した RR 顆粒数を、免疫複合体沈着物質の存在する部分と存在しない部分とで、電子顕微鏡を用いて観察、測定した (半定量)。一方、左腎の残存部分より、メッシュによるふるい分け法と超音波にて GBM を単離した。組織溶解剤 : Tetramethylammoniumhydroxide (TMAH) を単離 GBM に添加し、GBM を溶解し、GBM 結合ルテニウム量を原子吸光光度計にて測定した。GBM 単位蛋白中の結合ルテニウム量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ GBM 蛋白) を GBM 陰荷電性の定量的指標とした。GBM 蛋白量は Lowry 法にて測定した。

尿中アルブミン量は一元免疫拡散法にて測定した。腎より透過電子顕微鏡用と蛍光抗体用の組織標本を得た。蛍光抗体観察には、抗ラット IgG、抗ラット C3、抗ヒツジ IgG を用いた。

結果

尿中アルブミン量は、抗 Fx1A IgG 投与 3 日目より有意に増加した。電子顕微鏡による観察では、抗体投与 1 日目より糸球体上皮下に免疫複合体沈着物質を認め、以後増加増大した。抗体投与 1 日目よりヒツジ

IgG、2日目よりラット C3 が糸球体係蹄壁に顆粒状に認められた。ラット IgG は認められなかった。

定量法：GBM 結合ルテニウム量は、対照群に比し PHN 群で3日目以後有意に低下した(3日目：46.28 ±4.14 μg Ru/mg GBM 蛋白 vs. 56.22±9.91 μg Ru/mg 蛋白 p<0.05、4日目：43.97±6.49 μg /mg 蛋白 vs. 56.09±10.25 μg Ru/mg GBM 蛋白 p<0.05)。

半定量法：免疫複合体沈着物質近傍の外透明層 (Lamina rara externa : LRE) における、RR 顆粒数は抗体投与1日目より減少した。免疫複合体沈着物質の存在しない LRE での RR 顆粒数は不変であった。また内透明層 (Lamina rara interna : LRI) における RR 顆粒数も不変であった。免疫複合体沈着物質近傍での LRE における RR 顆粒数と、尿中アルブミン量とに負の相関を認めた。

$$Y = -0.18X + 17.40, r = -0.684, p < 0.001, N = 19$$

結 論

定量法における GBM 陰荷電量は PHN 3日目より減少し蛋白尿出現日に一致した。

半定量法における RR 顆粒数減少は PHN 1日目より認められ、免疫複合体沈着物質近傍の LRE に限定していた。LRE における免疫複合体沈着物質近傍での RR 顆粒数と尿中アルブミン量とに負の相関を認めた。

以上より、PHN heterologous phase において、免疫複合体沈着物質形成に伴う免疫複合体沈着物質近傍での陰荷電量減少が、蛋白尿発現に関与していることが示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

蛋白尿の発生が糸球体基底膜 (GBM) の陰性荷電低下と関連するという考えがある。本論文は GBM 中に形成される陽荷電物質の顆粒状沈着を電顕写真上で数える従来の半定量的荷電評価方法は必ずしも陰荷電の指標にならないとの見解があることを考慮し、ヒト膜性糸球体腎症の動物モデルとされているラットの受身ヘイマン腎炎 (PHN) において、蛋白尿と GBM の陰荷電との関係を検討した研究である。

本論文の特徴と主要な結果は以下のように要約できる。

1. 陽荷電物質としてのルテニウム赤 (RR) の原子吸光度計による定量方法を予め開発し、GBM 内沈着 RR を定量するとともに、電顕写真による半定量法において内外透明層の RR 顆粒を個々の免疫複合体沈着物に対する部位別に算定した。
2. 定量的には GBM 結合 RR は抗血清注射後3日以降有意に低下し、半定量的には外透明層免疫複合体沈着近傍に限局して RR 顆粒の減少が認められた。
3. 尿中アルブミン量は免疫複合体近傍の RR 顆粒数と逆相関することから、免疫複合体隣接部の陰荷電低下が蛋白尿の発生に関係すると推測した。

本論文審査委員会において、論文内容に関し以下のような事項について申請者との質疑応答を主体に検討が加えられた。

- 1) PHN 惹起に用いた抗体量決定の根拠
- 2) GBM の proteoglycan に RR が沈着していることを直接的に証明できないか
- 3) GBM 上にできる RR の顆粒状沈着は陰荷電特異的か
- 4) 試薬濃度の表現方法は適当か
- 5) 糸球体の sonication により GBM に沈着している RR や免疫複合体の変化は起こらないか
- 6) GBM の内透明層における RR の減少とアルブミン尿にも逆相関が存在しないか
- 7) 陰荷電低下と蛋白尿の相関をより直接的に証明できないか
- 8) 免疫複合体沈着物の GBM 中に占める比率または沈着物の大きさと蛋白尿に相関はないか
- 9) 膜性腎症における沈着物形成に血行力学的因子の関与はないか
- 10) 抗 FXIa 抗体投与により誘発される蛋白尿の原因を、この抗体の抗尿細管作用を無視して糸球体変化のみに帰してよいか

これらの質問に対する討議および申請者の説明から、本論文審査委員会は本論文が方法論的および結果の解釈において満足できるものと判断した。したがって、本論文は PHN 蛋白尿における GBM 陰荷電の低下を定量かすることに成功したものであり、同時に今後における研究の発展が期待できるものとして評価された。以上により審査委員会は本論文が博士（医学）の学位授与に値する内容を備えた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	河邊香月	副査	教授	南方陽
	副査	教授	山下昭	副査	助教授	菱田明