

氏名(本籍) 須 藤 克 彦
す どう かつ ひと

学位の種類 医学博士

学位記番号 医第 1984 号

学位授与年月日 昭和 63 年 2 月 24 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

最終学歴 昭和 55 年 3 月
東北大学医学部医学科卒業

学位論文題目 Distribution of proteoglycans and other glomerular basement membrane components in experimental membranous nephropathy.
(膜性腎症実験モデルにおけるプロテオグリカン及びその他の腎糸球体基底膜構成因子の局在の検討)

(主査)

論文審査委員 教授 吉 永 馨 教授 今 野 多 助

教授 折 笠 精 一

論文内容要旨

〔目 的〕

近年、腎糸球体基底膜 (GBM) 構成因子の研究がさかんに行われるようになり、GBMは主として、Laminin, Collagen IV, Proteoglycan, Fibronectin などにより構成されていることが明らかになってきた。ことに Proteoglycan は、強い陰性荷電を持ち、GBM の negative charge barrier の保持に重要な役割を果たすとされ、GBM の荷電及び透過性の変化との関連性が議論されつつある。著者は、ネフローゼ症候群における、GBM 構成因子の果たす役割を明らかにするため、ネフローゼ症候群のモデルとして、ラット BSA 腎炎を作製し、この実験モデルにおいて、Laminin, Fibronectin, Heparan sulfate proteoglycan (HS-PG), Chondroitin sulfate proteoglycan (CS-PG) などの GBM 構成因子の局在を対照ラットと比較検討した。

〔方 法〕

(1) ラット BSA 腎炎の作製

Wistar 系ラットに陽性荷電化したウシ血清アルブミン (cationized BSA) 1 mg を皮下免疫し、6 週間より連日 4 週間 cationized BSA 2 mg を静注し作製した。この後屠殺し、腎の組織学的検討を加えた。対照群としては、溶媒のみを静注したものをを用いた。

(2) 抗体の作製

HS-PG はウシ糸球体より、4 M 塩酸グアニジンにて抽出、DEAE-cellulose 及び Sepharose CL-6B による column chromatography をくり返し精製分離した。これをウサギに免疫し抗体を作製した。CS-PG はブタ大動脈より、3 M MgCl₂ にて抽出、DEAE-cellulose 及び Sepharose CL-6B による column chromatography をくり返し、この後 anti-thrombin III に対する affinity chromatography を行った。antithrombin III に結合しない Proteoglycan IA と結合する Proteoglycan IB の 2 種類の CS-PG を精製分離し、各々に対する抗体をウサギに免疫し作製した。Fibronectin は、正常ヒト血漿より精製分離し、ウサギに免疫し抗体を作製した。抗 Laminin 抗体は、市販の E-Y 社製のものをを用いた。

(3) 蛍光抗体法

GBM 構成因子の局在の検討は、間接蛍光抗体法を用い行った。すなわち、一次抗体として、HS-PG, CS-PG, Laminin, Fibronectin などの GBM 構成因子に対する抗体を用い、二次抗体として、FITC をラベルにしたウサギ IgG に対する抗体を用いた。

(4) Ruthenium red 灌流腎の電顕観察

GBMの荷電の変化を検討するため、屠殺時にラット腎を ruthenium red を含んだ固定液で灌流し、電顕観察を行った。エーテル麻酔下でラットを開腹、腹部大動脈を穿刺し、腎動脈分岐部より近位側で大動脈を結紮し、0.1% ruthenium red と 1.25% glutaraldehyde を含んだ 0.1 M cacodylate buffer で腎を灌流した後、腎組織を採取した。1% OsO₄ による後固定、脱水、包埋の後に、電顕観察を行った。

〔 結 果 〕

(1) ラット BSA 腎炎の組織所見

光顕及び蛍光抗体法所見より、cationized BSAを用いたラット BSA 腎炎は、組織学的にはヒト膜性腎症に類似していた。

(2) GBM 構成因子の局在

Laminin は、対照群・BSA 腎炎群の両群において、主として GBM に線状に分布し、両群間でその局在に差を認めなかった。Fibronectin は、対照群では主として Mesangium に分布し、軽度ながら GBM にも分布を認めた。一方、BSA 腎炎群では両領域で増加していた。HS-PG、CS-PG (Proteoglycan IA, Proteoglycan IB) は対照群では Mesangium 及び、GBM に沿って線状に分布していたが、BSA 腎炎群では、HS-PG、CS-PG とも、GBM において減少・消失していた。これら Proteoglycan の GBM からの減少・消失の程度は、尿蛋白が多量なもの程、著明であった。

(3) Ruthenium red 灌流腎の電顕所見

対照群では lamina rara interna 及び externa に沿って ruthenium red 顆粒が規則的に分布していたが、BSA 腎炎群では、足突起の癒合及び上皮下の electron dense deposit を認めるのに加え、ruthenium red 顆粒が減少していた。これは、BSA 腎炎群の GBM における陰性荷電の喪失を示すものと考えられた。

〔 結 論 〕

Proteoglycan は、GBM における陰性荷電の保持、及びアルブミンなどの陰性荷電物質の GBM 透過性を制御する上で重要とされており、上記の結果は、GBM からの Proteoglycan の消失が GBM の negative charge barrier の破綻を引き起こし、BSA 腎炎における蛋白尿の出現に重要な役割を果たすことを示唆するものと考えた。

審 査 結 果 の 要 旨

腎糸球体基底膜 (glomerular basement membrane GBM) は laminine, collagen IV, proteoglycon, fibronectin などにより構成されている。Proteoglycan は強い陰性荷電を持ち、GBMの negative charge barrier の主体をなすと考えられている。ネフローゼ症候群においては、これらGBM構成成分に異常が生じ、多量の蛋白質の透過を許すに至ったものとされている。

須藤克彦はネフローゼにおけるGBMの異常を追求し、本症の成因を探ろうとした。ウシ血清アルブミンをラットに注射するとネフローゼ型の腎炎が発生することが知られ、BSA腎炎と呼ばれている。須藤はこのBSA腎炎ラットを利用して研究を行った。

結果は次のようであった。

1) ラットBSA腎炎の光顕所見、および蛍光抗体法による所見はヒト膜性腎症と類似していた。

2) Lamine はBSA腎炎において、対照ラットのそれと変化がなかった。Fibronectinは増加した。Proteoglycan は、正常ではメサンギウムとGBMに認められるが、BSA腎炎では、GBMにおいて著減、ないし消失していた。Proteoglycan の減少・消失の程度は、蛋白尿が多量なものほど著明であった。

3) Ruthenium red を含んだ液で腎を淮流・固定し、電顕観察を行うと、BSA腎炎では、ruthenium顆粒が有意に減少し、陰性荷電の消失も示す所見が得られた。

以上の結果から、次のように結論することができる。即ち proteoglycanは、GBMにおける陰性荷電の保持、およびアルブミンなどの陰性荷電物質の透過を阻げる働きをしている。BSA腎炎および、多分ヒトの膜性腎症における高度の蛋白尿は、proteoglycan の消失によって惹起される。

須藤克彦のこの研究は、ネフローゼ症候群の成因に1つの解釈を与えたものと言える。本論文は充分学位に相当するものとする。