

ラット単一ネフロン内 Xanthine oxidase と Superoxide dismutase の分布並びに実験ネフローゼにおける変動

遠藤 仁, 山田秀生, 高橋 剛

東京大学医学部薬理学教室

序 言

虚血状態の臓器内細胞ではスーパーオキシイドは主として Xanthine oxidase (XOD) により産生され¹⁾ Superoxide dismutase (SOD) により除去されるものと考えられている。

近年この活性酸素が他臓器(脳, 心臓, 腸管)におけると同様, 虚血性腎疾患においても重要な役割を担っていることが報告されている²⁾。更に, XOD は糸球体腎炎の発症にも関与しているとも考えられてきたが³⁾, その機序に関しては未だ不明である。従ってネフロンにおける XOD, SOD の分布を調べることはこの疑問を解くための重要な手がかりとなりうる。

ラットに Puromycin aminonucleoside (PAN) を投与するとネフローゼが発症することは良く知られている。このネフローゼは人間の微少変化群あるいは巣状糸球体腎炎のモデルと考えられている。Mynderse ら⁴⁾ は糸球体基底膜において, その陰性荷電を担いタンパク漏出を防いでいる Proteoglycan がこのモデルにおいて形態学的に減少している事を報告しているが, その原因は未だ不明である。

今回の実験の目的は, 先ず最初に正常ラットを用いて XOD, SOD のネフロン内分布を, つづいて PAN ネフローゼラットにおけるこれらの酵素の変化を調べ, ネフローゼ発症における活性酸素の役割を推定することにある。

対象・方法

「動物の処置」雄性 Sprague-Dawley ラット (150-180g) を用い, これを 2 群に分けた。一群には PAN を 80mg/kg 1 回皮下注射しネフ

ローゼを発症させた。他群は対照として生食を投与した。各ラットは尿採取のため metabolic cage で飼育した。

「ネフロンの単離」断頭したラットの左腎を in situ に氷冷した 0.1% collagenase. 0.1% 牛血清アルブミンを含む Hanks 緩衝液で灌流した。腎を摘出してスライスを作成し, 同緩衝液で 37 度, 30 分反応させた。洗浄したスライスを用いて, 実体顕微鏡下に以下のセグメントを単離した⁷⁾。即ち, 糸球体 (G1m), 近位尿細管起始部 (S1), 同中間部 (S2), 同終末部 (S3), 皮質部太いヘンレの上行脚 (TAL), 接合及び遠位尿細管 (DT), 皮質部集合管 (CCT) である。更に糸球体に関しては皮質表層部 (SF) と傍髄質部 (JM) にわけた。

「ネフロンセグメントの電気泳動」各ネフロンセグメントを 1% triton X-100 で可溶化し, 10 μ l capillary tube 内に作成した 4-40% 連続濃度勾配ポリアクリルアミドゲルの一端にのせ, 100V で 30 分間電気泳動した⁸⁾。

「XOD 活性の測定」Capillary tube より取り出したゲルを 0.16×10^{-3} M phenazine methosulfate, 0.43×10^{-3} M nitroblue tetrazolium, 0.2mM hypoxanthine を含むリン酸緩衝液内で 37 度 60 分間反応させた。ゲル内の XOD の分子に一致した部分に明らかな band が得られ, microdensitometer (Joyce-Loebl. MK III) で densitogram を作成した。標準 XOD を用いてその活性値と densitogram の area との間には良い相関がえられた。従って, この検量線を用いてネフロンセグメントの XOD 活性を算出した。

「SOD 活性の測定」ゲルを暗室内で 15 分間

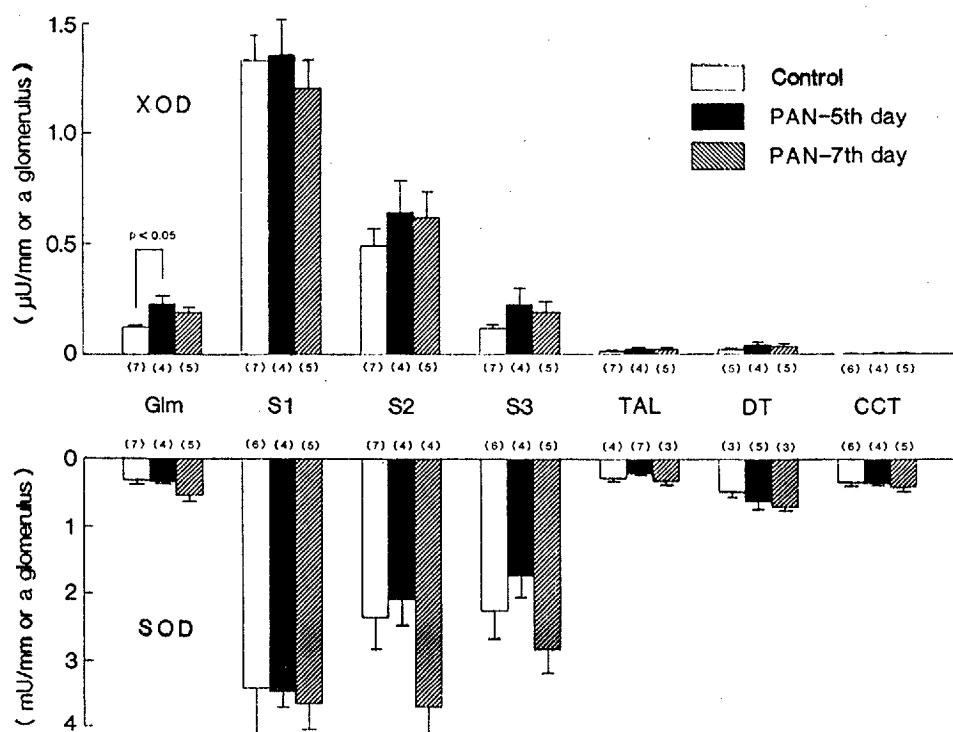


図1. ラット単離ネフロン内Xanthine oxidase (XOD), Superoxide dismutase (SOD) の分布と Puromycin aminonucleoside (PAN) による影響

表1. 正常対象及びPAN投与5日目のラット表在性 (SF) 及び傍髄質 (JM) 糸球体内XOD, SOD 活性分布並びにタンパク含有量の変化

	Control		PAN	
	SF	JM	SF	JM
protein content (ng/Glm)	66.5±5.1★††	86.0±5.1★★	87.5±4.6††	132.5±8.9
XOD activity (μU/Glm)	0.161±0.027	0.114±0.018★★	0.275±0.061	0.239±0.034
(μU/μg prot.)	2.517±0.540	1.313±0.171★	3.227±0.649	1.967±0.154
SOD activity (mU/Glm)	0.341±0.026	0.499±0.051	0.441±0.025†	0.758±0.122
(mU/μg prot.)	5.17±0.270	5.870±0.682	5.153±0.464	6.275±0.729

★ ; $p < 0.05$ ★★ ; $p < 0.02$ (vs PAN)

† ; $p < 0.05$ †† ; $p < 0.02$ (vs JM)

0.028 M tetramethylethylenediamine, 2.45×10^{-3} M nitroblue tetrazolium, 2.8×10^{-5} M riboflavin を含むリン酸緩衝液内で反応させた後、4000 lux の照明下に室温で60分間更に反応を行った。ゲルは全体が濃青色に染まったが、SODを含む部分だけは染色されずに透明に残った。このゲルをXODと同様にmicrodensitometerでdensitogramを作成して、SODの酵素活性を定量した。

「尿タンパク量の測定」尿中タンパク量はTCA-Lowry法により定量した。

「組織タンパク含量の測定」腎ホモジネイト並びにネフロンセグメントのタンパク量はLowryの方法を改良しておこなった。

「データの検定」全ての結果は平均±標準誤差で現した。又、二群間の有意差はpairedあるいはunpairedのStudentのt検定を用いた。三群間の有意差は分散分析により検定した。

成 績

図1の上段、白抜きカラムで示す様に、XOD活性はS1で最も高く、G1m, S2及びS3では中等度で、TAL, DT, CCT等の遠位側ネフロンでは極めて低値であった。SODの分布はXODと同様S1に最大で、次いでS2, S3となり、G1m及び遠位側ネフロンは低値を示した。

これらのネフロンの単位長さ当たりの酵素活性の分布は単位タンパク当たりに換算しても同様の傾向を示した。XOD/SODの比は、G1mやS1の方が、TAL, DT, CCTよりも高値であった。

「尿中タンパク量の経時的推移」

正常ラットの日尿中タンパク排泄量は20mg以下であったのに対し、PAN投与群では3日以降明らかな尿タンパクの増大が認められた。これはPANによりネフローゼが発症したことを意味する。電気泳動像ではアルブミン及び高分子タンパクの著明な増加が観察された。

「正常群とPAN投与群における各ネフロン

セグメント内XOD, SOD活性の比較」

正常群, PAN投与5日目群, 同7日目群の3群において、各ネフロンセグメントでのXOD, SODの活性を比較したのが図1である。XOD活性の有意な上昇はPAN5日目群のG1mのみであった。同7日目では有意の差が認められなかった。他方、SOD活性は3群間、何れのセグメントにも有意差は認められなかった。

「正常群とPAN投与5日目群における皮質表層(SF)と傍髄質(IM)糸球体のXOD, SOD活性」

図1の結果をより詳細に分析する意味で糸球体をSFとJMに分けて採取した。表1に示す様に、正常ラットにおいてSFに比べてJMのG1mのタンパク含量は有意に高かった。PAN投与によりJM-G1mのXODは正常に比し有意に増大し、PAN投与によるタンパク量の増加を考慮しても有意差がみとめられた。これに反し、SF-G1mではPANによる変化は見られなかった。

考 察

組織内XOD活性の測定は通常の方法では不可能である。何故ならば、組織内に存在するSODが測定系を阻害するからである。しかるに今回用いた方法では、予め試料を電気泳動することによりXODとSODの分子を分離し、各々の活性測定系に相手の酵素が関与出来ない状態で完全に独立した系を作って、従来の方法の欠点を改良した。従って、ラット腎内XOD活性は既に報告されている値よりも高い比活性が得られた。この研究結果はネフロン内XOD, SODの活性分布を明らかにした最初の知見であり、腎の代謝特に病態代謝の解明に意義ある端緒を示している。

近位尿管や糸球体にXOD, SOD両者の活性が高く分布している事はこの部位での僅かな代謝の変化が容易にXOD優位に転化し、活性酵素の産生を引き起こし障害の発症につながる可能性を示している。

PAN投与によるネフローゼモデルは古くから良く知られているが、その発症病理は未だ不明である。本研究により発症初期の糸球体内XOD活性の有意な上昇が認められたことは、PANネフローゼの発症にXODが関与している可能性を強く示唆している。更に、腎皮質内の糸球体の存在部位によってXODの誘導が表層部(SF)には無く、傍髄皮質(JM)に特異的であった事実はヒトの腎硬化症の発症部位と良く一致し、興味深い。

PANによるネフローゼの発症にはXODの誘導の他に、糸球体でのタンパク量の増加が観察された事はPANネフローゼの発症病理の複雑さを物語っている。腎糸球体基底膜での限外ろ過機能の維持にとって重要な要素の一つであるproteoglycanが牛の軟骨で活性酸素により産生の抑制がみられたという報告^{5,6)}もあり、糸球体での同様の実験が強く望まれる。

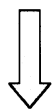
本研究で得られた知見は多くはXODに限局されたが、SODによる過酸化水素の産生と病態についても更なる追求が待たれる。

結 論

ラットネフロン内XOD, SODの分布は近位尿細管に高く、次いで糸球体、遠位側ネフロンであった。PANによるネフローゼラットでは傍髄質糸球体内XODの活性上昇が特異的に認められ、ネフローゼ発症に活性酸素の関与が強く示唆される。

参考文献

- 1) Mc Cord, J.M.: Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New Engl.J.Med.* 312:159-163, 1985.
- 2) Hansson, R., Jonsson, O., Lundström, S., Pettersson, S., Schersten, T. and Waldenström, J.: Effects of free radical scavengers on renal circulation after ischemia in the rabbit. *Clin. Sci.* 65:605-610, 1983.
- 3) Rehan, A., Johnson, K.J., Kunkell, R.G. and Wiggins, R.C.: Role of oxygen radicals in phorbol myristate acetate-induced glomerular injury. *Kidney Int.* 27:503-511, 1985.
- 4) Mynderse, L.A., Hassell, J.R., Kleinman, H.K., Martin, G.R. and Martinez-Hernandez, A.: Loss of heparan sulfate proteoglycan from glomerular basement membrane of nephrotic rats. *Lab. Invest.* 48:292-302, 1983.
- 5) Butes, E.J., Lomther, D.A. and Handley, C.J.: Oxygen free-radicals mediate an inhibition of proteoglycan synthesis in cultured articular cartilage. *Ann.Rheum.Dis.* 43:463-469, 1984.
- 6) Butes, E.J., Johnson, C.C. and Lomther, D.A.: Inhibition of proteoglycan synthesis by hydrogen peroxide in cultured bovine articular cartilage. *Biochim.Biophys.Acta* 838:221-225, 1985.
- 7) Endou, H., Nonoguchi, H., Takehara, Y., Yamada, H. and Nakada, J.: Intraneuron heterogeneity of ammoniogenesis and gluconeogenesis in rats. *Contr.Nephrol.* 47:98-104, 1985.
- 8) Endou, H. and Neuhoff, V.: Kinetic studies on microsomal glucose dehydrogenase in rat liver. *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.* 356:1381-1396, 1975.



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



結論

ラットネフロン内 XOD, SOD の分布は近位尿細管に高く, 次いで糸球体, 遠位側ネフロンであった。PAN によるネフローゼラットでは傍髄質糸球体内 XOD の活性上昇が特異的に認められ, ネフローゼ発症に活性酸素の関与が強く示唆される。