

特発性膜性腎症における glomerular anionic sites の電顕的検討

1)岡田 要, 矢野一郎, 川上浩一郎, 香美祥二, 船井 守 2)追手 巍

1)徳島大学小児科 2)新潟大学腎研究施設免疫部門

序 言

蛋白尿の出現は GBM の charge selective barrier ないし size selective barrier の破綻により生ずることが明らかとなっている¹⁾²⁾。まず最初に、私達はポリエチレンイミン (PEI) を cationic probe として、種々の慢性腎炎における glomerular anionic sites の変化を電顕的に検討した³⁾。その結果、蛋白尿の強い症例では、明らかな anionic sites の減少が認められ、charge selective barrier の破綻が生じていることが示唆された。殊に、subepithelial deposits の存在は anionic sites の減少と深い関係があるのではないかと考えられた。そこで、今回は、特発性 MGN における anionic sites の変化をステージ毎に検討し、subepithelial deposits の anionic sites の傷害に果たす役割を明らかにしようとして試みた。

対象および方法

対象とした症例は、特発性 MGN 12例である。内訳は Table 1 に示したごとく、男 9例、女 3例で、その年齢は 8歳から 76歳であった。全ての患者に高度の蛋白尿がみられ、うち 10例はネフローゼ症候群を呈していた。組織学的検索の結果は、Table 1 に示したとおりである。対照として、benign adenoma あるいは腎結石で採取された腎組織の健常部を用いた。Anionic sites の電顕的検討は、Schurer の方法⁴⁾に準じて行った。腎生検組織は未固定のまま 0.5 mm²程度に細切し、0.5% PEI 溶液 (Polyscience 社製、分子量 1800 を使用、pH 7.4 に調整し 8.5% 蔗糖添加) にて 30分間、

immersion を行った。その後、0.05 M cacodylate buffer (pH 7.4, 8.5% 蔗糖添加) にて、10分間、3回洗滌し、0.1% glutaraldehyde - 2% phosphotungstic acid mixture (pH 7.4, 8.5% 蔗糖添加) にて 1時間、immersion を行った。続いて、cacodylate buffer で 30分洗滌し、2% オスシウム酸溶液にて 2時間、固定したのち、アルコール脱水しエポン包埋した。超薄切片は、未染のまま或いは酢酸ウラン 5分、クエン酸鉛 1分、3分、5分間、二重染色したものを、日立 HU-12 型電子顕微鏡にて観察した。

成 績

①対照腎；正常糸球体では、上皮細胞表面 (ESC), GBM の外透明層 (LRE), 内透明層 (LRI), 内皮細胞表面に PEI 粒子が存在した (Fig. 1)。とくに、LRE の PEI 粒子は規則正しい配列を示していた。他に、メサンギウム基質、尿細管基底膜にも PEI 粒子が広汎に認められ、間質のコラーゲンにも等間隔に存在した。

②特発性膜性腎症；ステージ I では、糸球体あるいは係蹄毎に subepithelial deposits の量や分布に差異がみられた。この時期には、小さな deposits がしばしば上皮の slits 下に存在していた (Fig. 2A)。PEI 粒子は deposits 内にはみられず、また、それを被う上皮細胞と deposits の境界部にもほとんど認められなかった。deposits がより多く存在する係蹄壁では、それらの変化に加えて、ESC のポリアニオンの減少と足突起の融合がみられた (Fig. 2B)。

Depositsの存在する係蹄壁では、LREのanionic sitesの明らかな減少がみられ、その配列がdepositsにより中断されていた。しかし、subepithelial depositsのみられない箇所では、LREのanionic sitesは正常にみえた。LRIのanionic sitesには、ほとんど変化がみられなかった。

ステージⅡでは、depositsはより多くみられるようになり、光顕のspikesに相当するGBMの突出がびまん性にみられた。PEIはGBMの突出部に沿って不規則に配列していたが、deposits内には存在しなかった(Fig. 3)。また、depositsとそれを被う上皮細胞との境界部にも、PEIはほとんど認められなかった。LREと上皮細胞表面のanionic sitesは著しく減少しており、足突起の融合も広汎に認められた。

ステージⅢでは、depositsがGBM内に埋もれ、新生されたGBM様物質によって被われていた。新生されたGBMの両側にはPEI粒子が配列し、tram-track様となり、LREのanionic sitesの回復がみられた(Fig. 4A)。しかし、その回復の程度は、糸球体あるいは係蹄毎に異なっており、依然として、LREのanionic sitesの減少が局所的にみられた。

Tangential sectionでは、intramembranous depositsとanionic sitesとの関係がより明瞭に認められた(Fig. 4B)。どのdeposits内にもPEI粒子はほとんど認められなかった。一部のdepositsはelectron lucentとなっていたが、同様に、deposits内にはPEI粒子はほとんどみられなかった(Fig. 4C)。また、多数のintramembranous depositsが集積したGBMでは、各々のdepositsは不規則なPEI配列によって、区分されていた(Fig. 4D)。このような部位では、ESCの足突起の融合とポリアニオンの消失が認められた。

考 察

本研究において、immune depositsと解釈されているsubepithelial deposits自身に

はcationic tracer (PEI)が結合せず、その存在部位でLREのanionic sitesの明瞭な減少と配列の中断がみられ、depositsを被うESCのanionic sitesも減少する事が明らかとなった。これらの結果から、特発性MGNの初期における蛋白尿にはnegative charge barrierの破綻が寄与している事が示唆された。

Subepithelial immune depositionと糸球体のanionic sitesの変化との関係は、動物実験でも検討されている。Schneebergerら⁵⁾は、ラットのautologous immune complex nephritisにおける糸球体のanionic sitesの変化をcationized ferritinを用いて検討し、類似の所見を得ている。彼らは、抗体がまず上皮細胞表面のglycoproteinとin situで結合し、immune complexを形成し、次第にLREに蓄積する結果、heparan sulfateに富むanionic sitesのdestructionあるいはmaskingが起り、anionic sitesが減少すると考えている。実際に、Kanwarら⁶⁾⁷⁾は、heparan sulfateやhyaluronic acidを含むglycosaminoglycansを酵素で消化すると、糸球体の透過性が亢進する事を報告している。これらの事実も考えあわせてみると、特発性MGNにおけるbarrier functionの障害も、Oiteら⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾が実験腎炎で述べているごとく、glycosaminoglycansに富むLREのanionic sitesと抗体もしくはimmune complexesとが反応する結果、生ずるのではないかと推測された。

結 論

特発性MGNについて、glomerular anionic sitesの変化を検討し、以下のことが明らかとなった。

- ①各時期を通じて、immune deposits内にはcationic tracer (PEI)が存在しなかった。
- ②GBMの形態変化のみられない初期(ステージⅠ)において、すでにLREとESCのanionic sitesの局所的な減少が認められた。ことに、LREではsubepithelial depositsに

より, anionic sites の規則的連続性が失なわれていた。③ステージⅡでは, GBM の著しい形態変化に加えて, LRE と ESC の anionic sites が著明に減少していた。④ステージⅢでは, 新生された GBM 様物質によって deposits が被われ, LRE の anionic sites の回復がみられた。しかし, その回復度は糸球体あるいは係蹄毎に異なり, 依然として anionic sites の局所的な減少がみられた。これらの所見から, immune reactants の上皮下への沈着は, GBM の anionic sites の focal loss 及び disorganization をもたらし, 糸球体の barrier function の障害をきたす事が示唆された。

参考文献

- 1) Brenner, B. M., Hostetter, T. H. & Humes, H. D.: The molecular basis of proteinuria of glomerular origin. *N. Engl. J. Med.*, 298: 826-833, 1978.
- 2) Rennke, H. G., Patel, Y. & Venkatachalam, M. A.: Glomerular filtration of proteins: clearance of anionic, neutral and cationic horseradish peroxidase in the rat. *Kidney Int.*, 13: 278-288, 1978.
- 3) 川上浩一郎, 岡田要, : 各種の糸球体腎炎における glomerular anionic sites の電顕的検討, *日腎誌*, 27: 1385-1395, 1985.
- 4) Schurer, J. W., Hoedemaeker, PhJ. & Molenaar, I.: Polyethyleneimine as tracer particles for (immuno) electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.*, 25: 384-387, 1977.
- 5) Schneeberger, E. E., Stavarakis, G. &

- McCarthy, K.: Alteration in glomerular anionic sites in autologous immune complex nephritis. *Lab. Invest.*, 49: 445-452, 1983.
- 6) Kanwar, Y. S., Linker, A. & Farquhar, M. G.: Increased permeability of the glomerular basement membrane to ferritin after removal of glycosaminoglycans (heparan sulfate) by enzyme digestion. *J. Cell Biol.*, 86: 688-693, 1980.
- 7) Rosenzweig, L. J. & Kanwar, Y. S.: Removal of sulfated (heparan sulfate) or nonsulfated (hyaluronic acid) glycosaminoglycans results in increased permeability of the glomerular basement membrane to I¹²⁵-bovine serum albumin. *Lab. Invest.*, 47: 177-184, 1982.
- 8) Oite, T., Batsford, S. R., Mihatsch, M. J., Takamiya, H. & Vogt, A.: Quantitative studies of in situ immune complex glomerulonephritis in the rat induced by planted, cationized antigen. *J. Exp. Med.*, 155: 460-474, 1982.
- 9) Oite, T., Shimizu, F., Kihara, I., Batsford, S. R. & Vogt, A.: An active model of immune complex glomerulonephritis in the rat employing cationized antigen. *Am. J. Pathol.*, 112: 185-194; 1983.
- 10) Oite, T., Shimizu, F., Suzuki, Y. & Vogt, A.: Ultramicroscopic localization of cationized antigen in the glomerular basement membrane in the course of active, in situ immune complex glomerulonephritis. *Virchows Arch. [Cell Pathol.]*, 48: 107-118, 1985.

Table 1. Summary of clinical and pathological findings in MGN

Patient No.	Age	Sex	Urinary protein(g/day)	T.P. (g/dl)	Alb. (g/dl)	H.S.	Light microscopic changes	Immunofluorescopy	Electron microscopic stage
1.	63	M	10-15	4.3	2.5	(+)	Minimal	IgG(3+), C3(1+)	I
2.	21	F	3-5	4.5	2.4	(+)	Spikes	IgG(3+), C3(2+)	I-II
3.	44	F	7-9	5.9	2.4	(+)	Spikes	IgG(3+), C3(2+)	I-II
4.	58	M	15-20	4.0	2.3	(+)	Spikes	IgG(3+), C3(2+)	II
5.	76	M	20-25	3.7	1.9	(+)	Spikes	IgG(3+), C3(2+)	II
6.	46	M	15-20	4.7	2.5	(+)	Spikes	IgG(3+), C3(2+)	II
7.	57	F	5-10	5.0	2.4	(+)	Thick GBM	IgG(3+), C3(1+)	II-III
8.	8	M	3-5	5.4	2.5	(+)	Thick GBM	IgG(3+), C3(1+)	II-III
9.	76	M	35-40	3.5	1.6	(+)	Thick GBM	IgG(3+), C3(1+)	II-III
10.	15	M	2-3	7.2	3.9	(-)	Thick GBM	IgG(3+), C3(2+)	II-III
11.	39	M	25-30	4.1	1.7	(+)	Thick GBM	IgG(3+), C3(2+)	III
12.	47	M	4-6	5.2	2.8	(-)	Thick GBM	IgG(3+), C3(1+)	III



Fig.1 (Control, x41,000)



Fig.2A (MGN.stage I, x30,000)

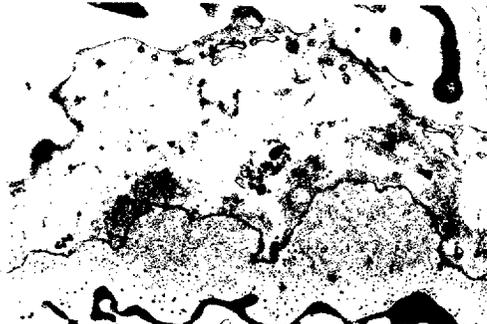


Fig.2B (MGN.stage I, x17,000)



Fig.3 (MGN.stage II, x13,000)

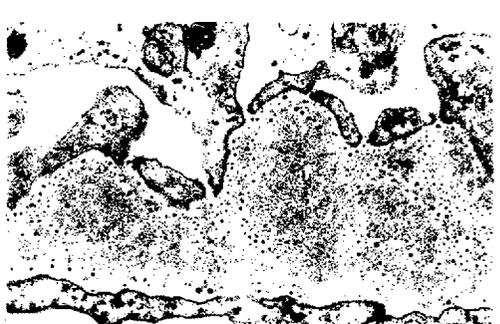


Fig.4A (MGN.stage III, x23,000)

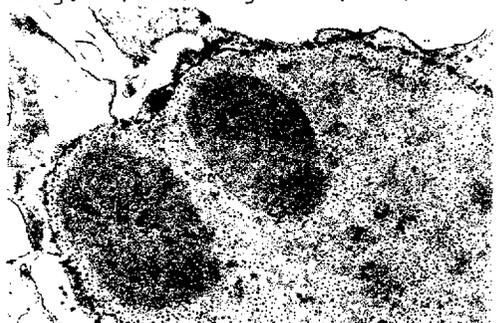


Fig.4B (MGN.stage III, x12,000)

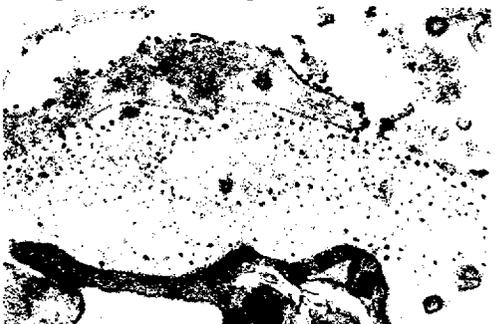


Fig.4C (MGN.stage III, x36,000)

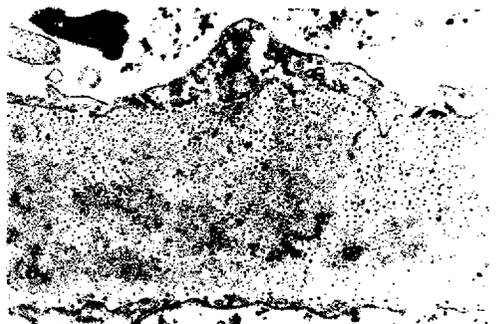


Fig.4D (MGN.stage III, x19,000)



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

特発性 MGN について, glomerular anionic sites の変化を検討し, 以下のことが明らかとなった。

各時期を通じて, immune deposits 内には cationic tracer (PEI) が存在しなかった。

GBM の形態変化のみられない初期(ステージ 1)において, すでに LRE と ESC の anionic sites の局所的な減少が認められた。ことに, LRE では subepithelial deposits により, anionic sites の規則的連続性が失なわれていた。ステージ 2 では, GBM の著しい形態変化に加えて, LRE と ESC の anionic sites が著明に減少していた。ステージ 3 では, 新生された GBM 様物質によって deposits が被われ, LRE の anionic sites の回復がみられた。しかし, その回復度は糸球体あるいは係蹄毎に異なり, 依然として anionic sites の局所的な減少がみられた。これらの所見から, immune reactants の上皮下への沈着は, GBM の anionic sites の focal loss 及び disorganization をもたらし, 糸球体の barrier function の障害をきたす事が示唆された。