

小児糸球体腎炎における糸球体基底膜陰荷電性の減弱

分担研究：小児腎疾患の進行阻止に関する研究

分担課題：進行阻止に関する免疫・遺伝・病態生化学的研究

鷺沢一彦¹⁾，重松秀一²⁾

小児各種糸球体腎炎31例につき電顕的HID-TCH-SP法を用いて糸球体基底膜外透明層の anionic sitesの半定量的検討を行った。多くの腎炎例の anionic sitesはコントロールに比較して減少していた。腎生検時蛋白尿量により3群に分けて比較すると、中等度、高度蛋白尿群でより強い減弱があり、その減弱の程度は末梢係蹄壁よりパラメサンギウム領域でより強かった。これら糸球体腎炎では anionic sitesが障害されており、これにより蛋白尿が発現することが示唆された。

糸球体基底膜，蛋白尿，陰荷電部位 (Anionic sites)

腎糸球体係蹄において、蛋白が血管内腔から尿腔へ漏出するのを防ぐ機序としては size-selective barrier と charge-selective barrier の存在が想定されている。size-selective barrier の主体となるのは type IV collagenを中心として構成された糸球体基底膜の三次元的構造によるものと考えられ¹⁾，charge-selective barrier の主体となるのは，lamina rara externa (LRE)あるいはLamina rara interna (LRI)に存在する heparan sulfate proteoglycan (HS-PG)からなる anionic sitesであると考えられている²⁾。今回われわれはHS-PGを特異的に染色する High-iron diamine thiocarbohydrazide-silver proteinate(HID-TCH-SP)法を用いて小児糸球体腎炎における蛋白尿発現と anionic sitesの減弱との関連性について検討した。

〈研究方法〉研究対象としたのは小児糸球体腎炎31例であり、4才から16才までの男児21例、女児10例である。組織学的診断はIgA腎症9例、紫斑病性腎炎6例、膜性増殖性糸球体腎炎3例、膜性腎症2例、巣状糸球体硬化症3例、微小変化型ネフローゼ症候群1例、遺伝性腎炎2例、minor glomerular abnormality 5例である。コントロールとして3例の摘出腎(腎細胞癌2例、

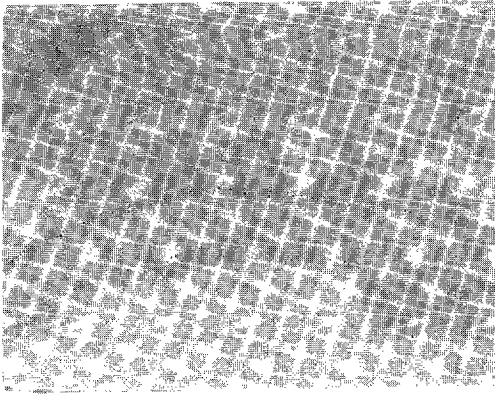
wilms腫瘍1例)の正常部腎組織を用いた。また、より基礎的検討として puromycin amino-nucleoside の連日皮下注法により作製したネフローゼラットにおいても同様の方法で anionic sitesを観察し、蛋白尿量の変化との関連性につき検討した。

得られた腎組織を細切し、2% glutaraldehyde/2% paraformaldehyde 混合液にて固定後、クリオスタットにて厚さ20μmに薄切した。薄切片をHID液中に23°C、18時間反応させ、洗浄後脱水、包埋した。それを gold-color の厚さに超薄し、金メッシュに載せ、2% TCHに40分間、次に1% SPに30分間反応させ、無染色で電顕的に観察した。基底膜が垂直に切断されており、上皮下 depositsのない部位で、糸球体毛細血管壁(C)4箇所、paramesangium領域(P)4箇所のLRE内の anionic sitesを写真撮影した。それぞれの部位でLRE 300 nmあたりの粒子数を測定し、その平均値をその症例の anionic sites数とした。また同時にP/C比を求めた。尿中蛋白量は、腎生検直前に24時間蓄尿法で測定した。糸球体腎炎例は蛋白尿量により3群に分けた。Group 1は10mg/kg/24h. 以下、Group 2は10~50mg/kg/24h. Group 3は50mg/kg/24h. 以上である。

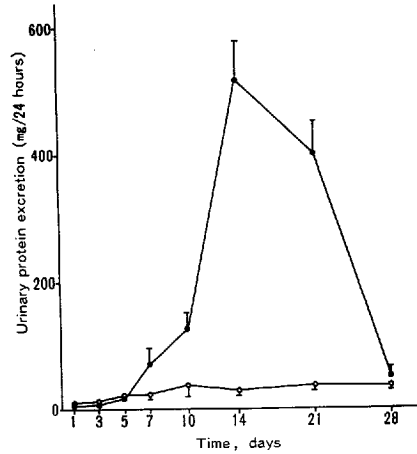
1) 信州大学医学部小児科，2) 同病理学

Kazuhiko Washizawa¹⁾， Hidekazu Shigematsu²⁾

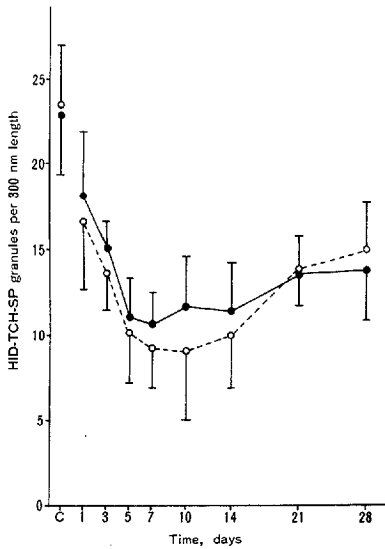
Shinshu University School of Medicine, Department of Pediatrics¹⁾ and Pathology²⁾



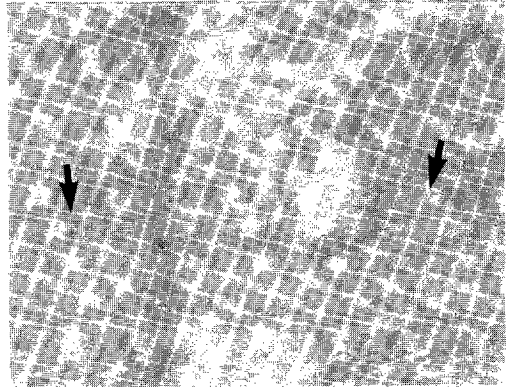
(図1) ヒトコントロール腎における電顕的HID-TCH-SP法所見。糸球体基底膜 lamina rara externa に小顆粒が特に密に存在している。



(図2) ネフローゼラットでの蛋白尿量の経時的变化。黒丸はネフローゼラット, 白丸はコントロールラットを示す。



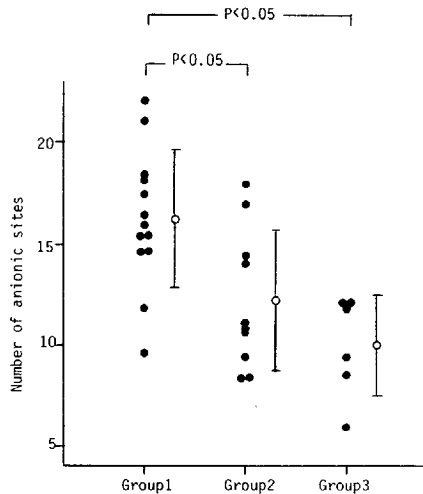
(図3) ネフローゼラットでの anionic sites 数の経時的变化。Cはコントロールラット, 黒丸は末梢血管壁, 白丸はパラメサンギウム領域の anionic sites 数を示す。



(図4) 膜性腎症の1例における電顕的HID-TCH-SP法所見。上皮下 deposits に占拠された部位では lamina rara externa の anionic sites は消失している (矢印)。

さらに組織病変と charge-selective barrier の障害との関連性を見る目的で, IgA 腎症 9 例, 紫斑病性腎炎 6 例での各種糸球体組織病変の相違と anionic sites 数を比較検討した。

<結果>図1にコントロール腎1例での anionic sites を示す。anionic sites はHID-TCH-SP法により直径3から10 nmの高電子密度粒子としてとらえられ, 糸球体毛細血管壁から

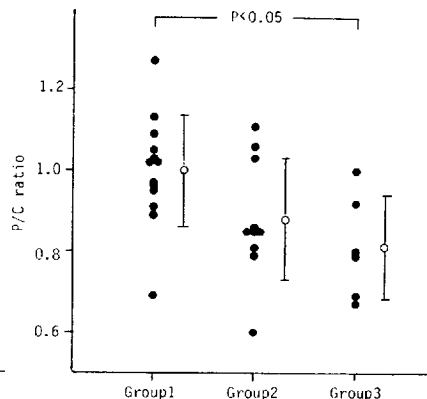


(図 5) 腎生検時蛋白尿量からみた平均 anionic sites 数 (lamina rara externa 300 nm あたり) の相違。中等度蛋白尿群 (Group 2) と高度蛋白尿群 (Group 3) は軽度蛋白尿群 (Group 1) に比べ有意に anionic sites 数が少ない。

Parame sangium 領域の LRE において帯状に規則正しく配列していた。染色性はこの部位に際立っており、ここに多量の HS-PG が存在し、charge-selective barrier の主体となっているものと思われた。

図 2 にはネフローゼラット蛋白尿量の経時的变化を示す。皮下注開始後 7 日目から蛋白尿が出現し、14 日で最大となり、その後減少している。図 3 はネフローゼラットにおける anionic sites 数の経時的变化を示す。anionic sites 数は皮下注開始後 24 時間後にすでに減少しており、蛋白尿が出現し始めた時期に一致して最小となっていた。これより anionic sites 数の減少は蛋白尿発現より先行して起こり、蛋白の漏出に関与していることが示唆された。

糸球体腎炎例の anionic sites の変化としては、膜性腎症例で著明な変化が認められた (図 4) 。上皮下 deposits に占拠された部位では LRE の



(図 6) 腎生検時蛋白尿量からみた P / C 比 (末梢血管壁 anionic sites 数に対するパラメサンギウム領域 anionic sites 数の比) の相違。高度蛋白尿群 (Group 3) の P / C 比は、軽度蛋白尿群 (Group 1) より有意に低下している。

anionic sites は完全に消失しており、膜性腎症においてはこのような anionic sites の消失が蛋白尿を発現させるものと思われた。ただこのような上皮下 deposits の多い膜性腎症 2 例では anionic sites の半定量的解析が行えないため、その研究対象から除外した。その他の糸球体腎炎例のみでもほとんどの症例で anionic sites 数はコントロール (19.07 ± 2.42) に比較して減弱していた。その減弱の程度を臨床 data と比較検討すると、年齢、性、血尿の程度とは明らかな関連性は認められなかった。腎生検時の蛋白尿量により 3 群に分けて比較した anionic sites 数を図 4 に示す。中等度蛋白尿群 (Group 2) 、高度蛋白尿群 (Group 3) の anionic sites は軽度蛋白尿群 (Group 1) に比べ有意に減弱していた。また Group 1 では anionic sites の粒子直径、配列ともコントロール腎に類似していたが、Group 2、Group 3 では粒子直径の縮小化、配列の不規

則性の増大が認められた。Group 3はGroup 2に比べさらに anionic sites数が減少していたが有意差は認められなかった。図5にはこの3群におけるP/C比を示す。Group 1はコントロール腎と同様P/C比は1.0前後を示す。これに対し、Group 2、Group 3では低下する傾向があり、特にGroup 3では有意に低下していた。つまりGroup 3では糸球体毛細血管壁に比べパラメサンギウム領域のLREのanionic sitesがより減少していることを示している。

IgA腎症、紫斑病性腎炎症例で、糸球体組織病変の相違から、anionic sitesの減弱程度を比較検討すると、メサンギウム硬化度³⁾、半月体形成病変はanionic sitesの減弱程度と有意な関連性が見られなかった。それに対し、ボーマン嚢への癒着病変のある症例のanionic sites数はそれがない症例より有意に減弱していた。

〈考察〉糸球体腎炎での蛋白尿発現において、糸球体係蹄がどのように障害を受け、尿腔へ蛋白を漏出するに至るかについて今だその詳細は明らかでない。今回われわれは、実験的ネフローゼラットと各種小児糸球体腎炎31例につき、腎糸球体基底膜のanionic sitesを電顕的に観察し半定量的検討を行った。ネフローゼラットではanionic sitesの減弱が蛋白尿発現に先行して起こっていた。種々の糸球体腎炎例でもanionic sitesの減弱程度は腎生検時蛋白尿量と強く関連しており、蛋白尿量が多い程より強いanionic sitesの減弱が認められた。これに対し、血尿など他の臨床症状、所見とは明らかな関連性が認められず、IgA腎症、紫斑病性腎炎におけるメサンギウム硬化病変の強さといった組織病変とも明らかな相関性は得られなかった。以上より種々の糸球体腎炎において、anionic sitesは障害を受け、それによる基底膜陰荷電性の減弱等糸球体係蹄蛋白漏出阻止機構の破綻により蛋白尿が出現し、またそれは種々の糸球体腎炎において共通してみられる事象であることが示唆された。

anionic sitesの糸球体基底膜内の局在に関し

て、われわれはLRE領域がHS-PGを主成分としたcharge-selective barrierの主体であると考えた。なぜならHID-TCH-SP顆粒はLRE領域に特に密に染色されており、HID法は硫酸化ムコ多糖類を選択的に染色する方法だからである^{4~6)}。このことは、LRE領域のanionic sites数の減弱程度が蛋白尿量と関連していたことから、より確かなものと思われた。

また同時に大量蛋白尿発現にはcharge-selective barrierの障害だけでなく、さらに別の糸球体係蹄の異常が存在するものと思われた。それは中等度蛋白尿群と高度蛋白尿群のanionic sites数に有意差が無かった点、またネフローゼ症候群を呈していた症例でもanionic sites数の減少がそれ程強くない例があったことなどから示唆された。anionic sitesの主体であるHS-PGはcharge selective barrierの主要構成成分であるだけでなく、size-selective barrierの主体であるといわれる糸球体基底膜の三次元的構造の構築にも重要な役割を果たしていることが示されてきている^{1),7)}。また以前よりHS-PGは細胞と細胞外基質との結合に関与していることが指摘されている⁸⁾。このような点から考えるとanionic sitesの減弱は単にcharge-selective barrierの障害を意味するのではなく、HS-PGの障害がさらに糸球体基底膜構造の破壊、基底膜と上皮細胞間の結合性の低下を招き、糸球体係蹄の蛋白漏出阻止機構を障害するひきがねとなっているのかもしれない。また大量蛋白尿群ではパラメサンギウム領域のanionic sitesが末梢係蹄壁より強く減弱していたという所見がみられた。これは大量蛋白尿発現時、蛋白はメサンギウム領域の基底膜を通過して尿腔へ漏出していることを示しているものと思われる。最近メサンギウム細胞は血管内腔に流れてきた物質を処理する浄化機能や、各種活性物質の産生を行うという機能も示されてきており注目されている。そのようなメサンギウム細胞機能と蛋白尿発現との関連性を考えるうえでも興味深い所見と言えよう。

糸球体組織病変と anionic sites 数の減弱との関連性については、症例数も少なく明確な結論は得られなかった。ただポーマン嚢への癒着病変のある症例の方が無い症例より有意に強い anionic sites の減弱を示した。このことは、ポーマン嚢への癒着病変というような糸球体の不可逆的病変に anionic sites の減弱が関与している可能性も考えられた。一般に IgA 腎症などでは蛋白尿量の多い症例程予後不良であるとされており、持続的な anionic sites の障害がその後の腎病変の進行、ひいては腎機能低下に結びつく可能性もあるのかもしれない。

今後さらに症例数を重ねて各種糸球体腎炎における anionic sites の障害について検討するとともに、この anionic sites を障害する因子、あるいは anionic sites 減弱と組織病変進行との関連性につき検討したいと考えている。

<文献>

1. Martinez-Hernandez, A. and Amenta, P. S.: The basement membrane in pathology. *Lab. Invest.* 48:656-677, 1983.
2. Kanwar, Y. S., Linker, A. and Farquhar M. G.: Increased permeability of the glomerular basement membrane to ferritin after removal of glycosaminoglycans (heparan sulfate) by enzyme digestion. *J. Cell. Biol.* 86:686-693, 1980.
3. Shigematsu, H., Kobayashi, Y. et al.: Prognostic significance of mesangial sclerosis in IgA nephropathy. *Jpn. J. Nephrol.* 27:303-309, 1985.
4. Spicer, S. S.: Diamine methods for differentiating mucosubstances histochemically. *J. Histochem. Cytochem.* 13:211-234, 1965.
5. Uchida, M. and Shigematsu, H.: Ultra-structural demonstration of sulfated mucosaccharide in the glomerular basement membrane of rats. *Jpn. J. Nephrol.* 28:239-243, 1986.
6. Washizawa, K., Ishi, K. et al.: Morphometric changes in glomerular anionic sites during aminonucleoside nephrosis. *Acta Pathol. Jpn.* 39:558-565, 1989.
7. Groggel, G. C., Stevenson, J. et al.: Changes in heparan sulfate correlate with increased glomerular permeability. *Kidney Int.* 33:517-523, 1988.
8. Structure and function of heparan sulphate proteoglycans. *Biochem. J.* 236:313-325, 1986.



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



小児各種糸球体腎炎 31 例につき電顕的 HID-TCH-SP 法を用いて糸球体基底膜外透明層の anionic sites の半定量的検討を行った。多くの腎炎例の anionic sites はコントロールに比較して減少していた。腎生検時蛋白尿量により 3 群に分けて比較すると、中等度、高度蛋白尿群でより強い減弱があり、その減弱の程度は末梢係蹄壁よりパラメサンギウム領域でより強かった。これら糸球体腎炎では anionic sites が障害されており、これにより蛋白尿が発現することが示唆された。