

# ネフロンにおけるタンパクの輸送 —分割採取微小穿刺法による解析—

進行阻止に関する免疫・遺伝・病態生化学的研究  
実験的腎疾患の発症機序, 予防, 治療に関する研究

遠藤 仁\*, 藤乗嗣泰\*, 河 憲珠\*

**要約:** 正常ラット腎でのタンパクの限外濾過及び輸送の定量評価を行う目的で分割採取微小穿刺法を開発した。この方法により尿細管外に存在する大量のタンパクの穿刺時に生ずる混入を理論的にも実践面でも克服された。本研究により初めてラット糸球体での限外濾過されるアルブミン量が血中の0.062%, 低分子タンパクが98.9%と同定された。再吸収は主に近位尿細管起始部で行われ, 糖尿病モデルではアルブミンの再吸収の著明な低下が観察された。

**見出し語:** 微小穿刺法, タンパク濾過, 近位尿細管再吸収, 糖尿病性腎症

## はじめに

腎臓は血清蛋白質の代謝に重要な役割を果している。糸球体で濾過された蛋白質は尿細管で再吸収され, リソソームで分解を受け低分子物質として血液中に輸送されると考えられている。しかし, 蛋白質の糸球体での濾過量および尿細管での再吸収量についての確証ある報告はない。従来の微小穿刺法によるアルブミン(A1b)の濾過濃度は3~780 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と大きなバラツキがみられる。その原因は尿細管穿刺時に尿細管外に大量に存在するA1bの混入が避けられず, 正確なA1b濃度の測定が不可能なためである。そこで穿刺時の蛋白質混入の影響を除くために分割採取微小穿刺法を新しく開発した。まず, 正常ラットにおいて生理的状态での蛋白質の濾過と再吸収を評価した。次に, 糖尿病性腎症の初期の指標とされる微量A1b尿の機序をこの方法を用いて追求した。従来, 微量A1bは糸球体障害による蛋白質濾過量の増加によると考えられ, 尿細管の関与は $\beta 2$ ミクログロブリン排泄量が増加していないことのみから否定されてきた。しかし, 実際に糖尿病における蛋白質の濾過と再吸収を同時に測定した報告はないため本研究でその解明を試みた。

## 方法

実験は体重200~240gの雄Sprague-Dawleyラットを用いた。糖尿病モデルは同ラットにstreptozotocin(STZ)50mg/kg体重を一回静注して作製し, 2~3週後に実験を行なった。同週齢のラットを正常対照とした。ラットをInactin100mg/kg体重で麻酔し, 気管および膀胱にカテーテルを挿入し, 頸静脈より5% inulin 1mlを投与後1% inulinを1.4ml/hで持続投与した。一部の糖尿病ラットでは0.5% inulinを6.2ml/hで持続投与した(high infusion)。左側腹部切開で左腎を露出しkidney cupで固定し, 表面の近位および遠位尿細管に外径10~15 $\mu\text{m}$ の穿刺ピペットを実体顕微鏡下で刺入した。5~10分後に採取ピペットを穿刺ピペット内に挿入し尿細管液を採取し第一分画とした。穿刺ピペットはそのまま留置し, 採取ピペットにより第四分画まで単一ネフロンから分割採取した。尿細管液中のinulinはdimedoneによる蛍光法で, Albおよび低分子蛋白(LMWP)は連続濃度勾配micro-polyacrylamide gel 電気泳動法により測定した。

\*東京大学医学部薬理学教室

Hitoshi Endou, Akihiro Tojo, Hunjoo Ha

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Tokyo

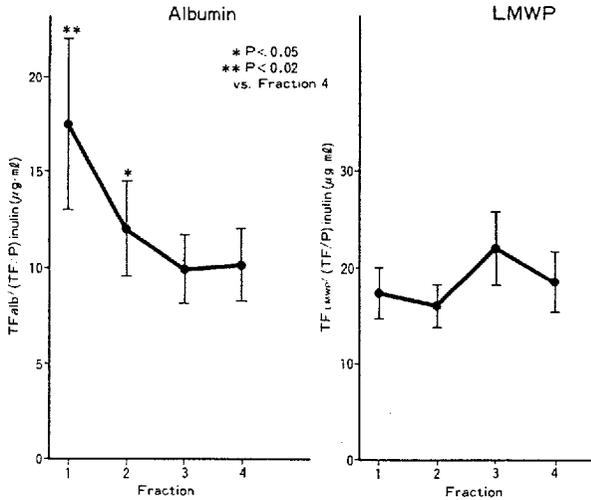


図1. 分割採取微小穿刺法による各分画試料中の蛋白濃度。  
各分画尿は約10分間隔で連続的に経時採取した。

## 結果および考察

### (1) 生理的状態での蛋白質動態

正常対照群で第一から四分画での尿管液のAlbおよびLMWP濃度の変化を図1に示す。尿管液のAlb濃度は第一分画ではネフロン穿刺時に尿管周囲に大量に存在するAlbの混入が避けられず有意に高値になることが明らかに分かる。しかし、第三および四分画ではこの影響が除かれ一定値に保持された。他方、LMWPは血中濃度が非常に低いため、穿刺時の混入の影響はみられなかった。分割採取微小穿刺法による第四分画の蛋白質(特にAlb)濃度は、混入の影響を受けない本来の尿管液中の濃度と断定し以下の評価を行なった。この方法によるAlb濃度をネフロン穿刺部位[(TF/P)inulin]に沿って表すと図2のようになる。(TF/P)inulin 1~2の測定値から回帰直線を求め、糸球体濾過液を意味する(TF/P)inulin = 1での蛋白質濃度を外挿により求めた(表1)。計算により得られたAlb濃度は22.9  $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。本実験に用いた正常対照ラッ

トの血中Alb濃度は36.7  $\text{mg}/\text{ml}$ であったので、0.062%が糸球体で濾過されたことになる。他方、LMWPは糸球体濾過量が72.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、血中の98.8%が濾過されることが示された。濾過されたAlbは(TF/P)inulin 1~2の近位尿管起始部(early PCT)で37%が再吸収され、(TF/P)inulin 2~4の近位尿管後半部(late PCT)で34%、さらに遠位尿管までの間、主に近位尿管(PST)で23%が再吸収された。LMWPはearly PCT 54%、late PCT 28%、PST 6%であり、主にearly PCTでの再吸収が強く認められた。以上より、分割採取微小穿刺法は蛋白質の糸球体濾過量と尿管での再吸収量の同時評価を可能にし、本実験で初めて両パラメータが定量化された。

### (2) 糖尿病における蛋白質動態

次に、糖尿病ラットに本法を適用し、糖尿病性腎症初期の指標とされる微量アルブミン尿の機序について調べた。糖尿病ラットでは

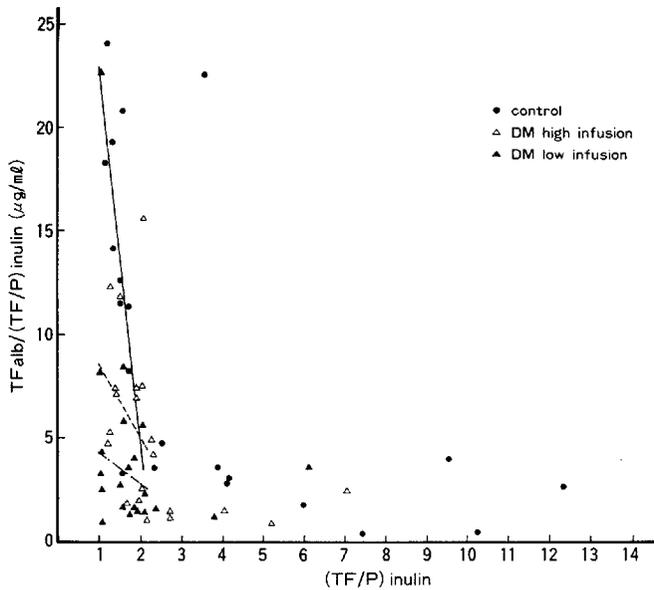


図2. ネフロンに沿った尿細管液中アルブミン濃度（水分再吸収量補正值）の変化

表1. アルブミン及び低分子蛋白質の糸球体濾過量

		Albumin	LMWP
control	$\mu\text{g/ml}$	22.9	72.1
	% of plasma	0.062	98.88
	ng/min	0.614	1.932
DM high infusion	$\mu\text{g/ml}$	8.5	13.5
	% of plasma	0.023	62.56
	ng/ml	0.263	0.417
DM low infusion	$\mu\text{g/ml}$	4.3	9.2
	% of plasma	0.012	42.63
	ng/ml	0.114	0.245

1週目より尿中Alb排泄量が増加し2週目では $2.04 \pm 0.42\text{mg}/\text{日}$ （正常対照 $0.80 \pm 0.14$ ， $P < 0.05$ ）と有意な上昇みられた。尿中LMWP排泄量は $18.50 \pm 5.26\text{mg}/\text{日}$ （同上

$22.08 \pm 3.05$ ，NS）と有意差はないが低下傾向が見られた。分割採取微小穿刺法によるネフロンに沿ったAlb濃度の動態を図3に示す。糸球体濾過液中のAlb濃度は表1に示す

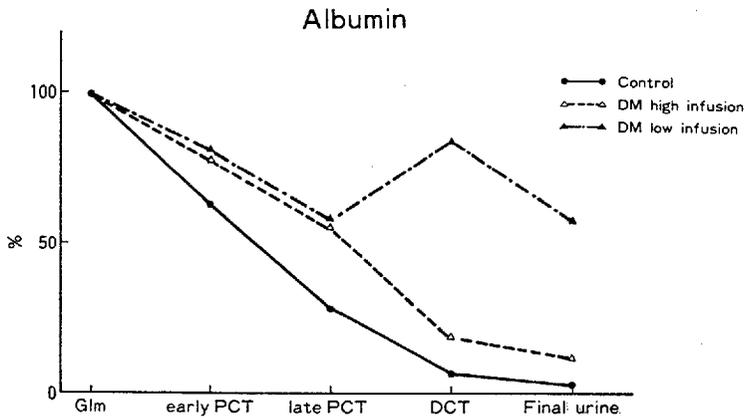


図3. ネフロンに沿ったアルブミンの相対的排泄量の変動

ように  $8.5 \mu\text{g}/\text{ml}$  (high infusion) と正常対照に比べ低値であった。単位時間当りの Alb 排泄量と比較しても糖尿病群で低値であった。これは高血糖により Alb や糸球体の基底膜に glycation が起こり陰性荷電が増加し反跳作用により濾過されにくくなるためと考えられる。LMWP の糸球体濾過量も  $13.5 \mu\text{g}/\text{ml}$  と糖尿病群で低下しているが、これは血中 LMWP が糖尿病で低下していることで説明できる。尿細管での再吸収量は図3に示すように糖尿病群で著明に低下していた。濾過された Alb は early PCT で 22%, late PCT で 22%, PST で 37% と再吸収の低下が認められた。同様に LMWP もそれぞれ 19%, 45%, 0% であり、Alb, LMWP とともに early PCT での再吸収の低下が顕著であった。糖尿病群のうち low infusion では単一ネフロン糸球体濾過量 (SNGFR) が低下しており、Alb および LMWP の糸球体濾過量は high infusion より低値であったが、再吸収は high infusion と同じ傾向であった。以上より糖尿病初期では糸球体で濾過される蛋白質量は増加しておらず、尿細管での蛋白質の再吸収低下が明白となった。

次に尿細管の蛋白質再吸収低下の原因とし

て、本研究では STZ 糖尿病の発症に関与している過酸化脂質 (LPO) について検討した。糖尿病群では 2 週目より尿中 LPO 排泄量が著明に増加しており ( $9.3 \pm 1.8$  vs. 正常対照  $0.25 \pm 0.04 \mu\text{mol}/\text{日}$ ,  $P < 0.0001$ ), これは血中 LPO にみられる 2 倍の増加だけでは説明できず腎臓組織での LPO 産生増加が考えられた。全腎ホモジネートの単位重量当りの LPO 産生には両群間に有意差はみられなかったが、微小単離法による early PCT での LPO 産生は有意に上昇していた ( $1.68 \pm 0.08$  vs. 同上  $1.10 \pm 0.11 \text{ pmol}/\mu\text{g}$  protein,  $P < 0.05$ )。従って early PCT での LPO 産生増加が糖尿病での尿細管機能障害を引き起こす原因の一つと考えられる。

## 結 論

分割採取法によりネフロンでの蛋白質動態が生理的状态で定量評価できた。糖尿病性腎症初期の微量アルブミン尿は尿細管での蛋白質再吸収の低下に起因する。この尿細管機能障害の原因の一つは近位尿細管起始部での過酸化脂質の増加による。



## 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



要約:正常ラット腎でのタンパクの限外濾過及び輸送の定量評価を行う目的で分割採取微小穿刺法を開発した。この方法により尿細管外に存在する大量のタンパクの穿刺時に生ずる混入を理論的にも実践面でも克服された。本研究により初めてラット系球体での限外濾過されるアルブミン量が血中の0.062%,低分子タンパクが98.9%と同定された。再吸収は主に近位尿細管起始部で行われ,糖尿病モデルではアルブミンの再吸収の著明な低下が観察された。