

学 位 論 文 題 名

ループス腎炎における糸球体基底膜の Charge barrier および
Immune deposit の荷電についての電顕的観察

学位論文内容の要旨

I 研 究 目 的

糸球体基底膜（GBM）には、size barrier の他、heparan sulphate proteoglycan（HS-PG）よりなる charge barrier が備わっていると考えられている。

蛋白尿は腎糸球体障害を示す最も重要な所見の一つであるが、ループス腎炎における蛋白尿の成因を検討する目的で、periodate-lysine-paraphormaldehyde（PLP）液により固定された組織を用い、cuproinic blue（CB）を陽性のプローブとし、critical electrolyte concentration method により GBM の陰性荷電部位を染色し、半定量的に GBM の陰性荷電部位を解析した。さらに、ループス腎炎において認められる immune deposit（ID）の荷電においても検討した。

II 対象および方法

アメリカリウマチ協会の SLE 分類基準を 4 項目以上満足し、WOH のループス腎炎分類基準に従って診断されたループス腎炎の 17 症例を対象とした。class II が 5 症例（男 1 症例，女 4 症例，13 歳-15 歳），class IV が 6 症例（女 6 症例，9 歳-20 歳），class V が 6 症例（男子 1 症例，女 5 症例，14 歳-25 歳）であった。class II の全症例で尿蛋白は陰性であった。class IV および V の症例では全例 1 g/日以上尿蛋白が認められた。正常対照として、5 症例の腎盂腫瘍患者（男 4 症例，女 1 症例，52-60 歳）より摘出された腎皮質の健常部を用いた。

1. 陰性荷電部位の染色法

生検腎組織あるいは摘出腎組織の一部を、PLP 液にて 4 時間固定後 10~20% ショ糖加 PBS で洗浄した後 isopentane 中で、液体窒素にて急速凍結した。1mm×1mm×1mm に細切した組織を、0.025M sodium acetate - 2.5% glutaraldehyde - 0.2 M magnesium chloride 溶液（basic solution）にて洗浄固定した後、同液 5 ml 中に 10mg の CB を加え 1 時間染色した。その後 25mg の

sodium tungstate を溶解した basic solution 5 ml 中で 2 時間, さらに 10mg の CB と 25mg の sodium sulphate を溶解した basic solution の 5 ml 中で 2 時間反応させた。以降はエタノール系列で脱水し Epok 812 樹脂包埋を行なった。このブロックより超薄切片を作製し, 鉛の単染色を行ない電顕で観察した。

2. GBM の陰性荷電部位の半定量的解析

GBM の末梢部位を無作為に 15,000 倍で撮影し, 57,000 倍に引き伸ばした写真上で curvimeter にて糸球体一個あたり GBM を 10cm ずつ計 15 視野測定し, それぞれの視野における lamina rara externa (LRE) および lamina rara interna (LRI) の陰性荷電部位数を測定した。

各々の組織で糸球体を 3 個測定し, 結果は GBM 1,000nm あたりの数を平均値 ± 標準偏差で表した。各群間の有意差検定には, wilcoxon-U 検定を用いた。また, 相関係数の検定には t-検定を用いた。

Ⅲ 結 果

正常の GBM においてはその 1,000nm あたり LRE に 22.9 ± 1.9 から 23.7 ± 1.4 個の, LRI に 14.0 ± 1.6 から 15.1 ± 1.5 個の陰性荷電部位が認められ, これらの陰性荷電部位は線維状に染色され, 高倍率では横縞様の側鎖を有していることが観察された。

尿蛋白が認められなかったループス腎炎 class II の症例では, GBM の陰性荷電部位数は, LRE で 21.3 ± 2.0 から 22.3 ± 1.8 個, LRI で 13.5 ± 2.0 から 14.2 ± 2.0 個であり正常の GBM における測定結果と比較して有意差は認められなかった。一方, 1 g/日以上の高度の蛋白尿を有する class IV および V のループス腎炎においては, コントロールに比較して有意に陰性荷電部位の減少が認められた (class IV : LRE $14.8 \pm 2.7 \sim 19.3$ 個, LRI $5.8 \pm 1.9 \sim 11.3 \pm 2.4$ 個, class V : LRE $13.0 \pm 2.4 \sim 17.9 \pm 2.8$ 個, LRI $2.0 \pm 1.9 \sim 13.0 \pm 2.5$ 個, いずれも正常と比較して $p < 0.05$ で有意)。陰性荷電部位は, 内皮下の ID が認められる部位においては LRI で, また上皮下の ID が認められる部位において LRE が消失していた。LRE の陰性荷電部位数の減少と尿蛋白量は負の相関を示した (相関係数 = -0.86 , $p < 0.001$)。

ループス腎炎に認められた GBM やメサンギウム基質の ID は CB で染色されなかった。

Ⅳ 考 案

GBM の陰性荷電部位は側鎖を有する線維状に染色されたことから, 今回の染色法は HS-PG をより in vivo に近い状態で観察するのに有用であると考えられた。

正常の腎糸球体基底膜においては、HS-PG は不規則かつ密にネットワークを形成しており、文字どおり barrier として機能していることが示唆された。

ループス腎炎においては、尿蛋白を呈していた class IV および V の症例において ID の認められる部位で陰性荷電部位の消失が観察された。これらの症例においては GBM の陰性荷電部位数の有意の減少が認められたことから、charge barrier の破綻が尿蛋白の成因と密接に関連していることが示唆された。この charge barrier の障害は高度と考えられ、GBM の正常構造自体も障害されていることが示唆され、size barrier も同時に破綻を来していることもループス腎炎の蛋白尿の成因と考える際念頭に置く必要がある。

ID 自体は CB で染色されず、ID の net charge は陽性である可能性が考えられ、陽性荷電の免疫複合体あるいは抗体がループス腎炎の成因に関与していることが推測された。

V 要 約

1. PLP 液固定組織においても cuproinic blue を用いる、critical electrolyte concentration method により、腎の陰性荷電部位は良好に染色された。
2. ループス腎炎においては、尿蛋白の認められた class IV および V の症例では、LRE および LRI の陰性荷電部位数の減少が認められ GBM の charge barrier の破綻が尿蛋白の成因として関与していることが考えられた。これらの症例の GBM では ID の局在と陰性荷電部位の消失が関連していた。
3. ID 自体の net charge は陽性である可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 本 脩 三
副 査 教 授 吉 木 敬
副 査 教 授 小 林 邦 彦

正常の糸球体基底膜 (GBM) には、size barrier の他、heparan sulfate proteoglycan (HS-PG) よりなる charge barrier が備わっていると考えられている。

尿蛋白は腎糸球体障害を示す最も重要な所見の一つであるが、ループス腎炎における尿蛋白の

成因が charge barrier の障害の有無にどの程度 depend するかを知るために GBM の陰性荷電部位を半定量的に解析して検討したのが構丸氏の研究の主幹である。アメリカリウマチ協会の SLE 分類基準を 4 項目以上を満たし、WHO のループス腎炎分類基準に従って診断されたループス腎炎の 17 症例を対象とした。class II が 5 症例（男 1 症例，女 4 症例，13 歳 - 15 歳），class IV が 6 症例（女 6 症例，9 歳 - 20 歳），class V が 6 症例（男 1 症例，女 5 症例，14 歳 - 25 歳）である。class II の全症例では尿蛋白は陰性であった。class IV および V の症例では全例 1 g / 日以上の尿蛋白が認められた。正常対照には，5 症例の腎盂腫瘍患者より摘出された腎皮質の健全部が用いられた。陰性荷電部位の染色は cuproinic blue を cation probe とする critical concentration method により行われ，periodate - lysin - paraformaldehyde (PLP) 液固定組織を用いて染色している。

問題は GBM の陰性荷電部位の半定量的解析であるが，GBM の末梢部位を無作為に 57,000 倍に引き伸ばした写真で curvimeter にて糸球体一個あたり GBM を 10cm ずつ計 15 視野測定し，それぞれの視野における lamina rara externa (LRE) および lamina rara interna (LRI) の陰性荷電部位数を測定して判断した。

正常の GBM では，1,000nm あたり LRE に 22.9 ± 1.9 から 23.7 ± 1.4 個の LRI に 14.0 ± 1.6 から 15.1 ± 1.5 個の陰性荷電部位が認められた。これらの陰性荷電部位は繊維状に染色され，高倍率では横縞様の側鎖を有していることが観察され，今回の染色法は HS-PG をより in vivo に近い状態で観察するのに有用であると考えられた。また，正常の GBM においては，HS-PG は不規則かつ密にネットワークを形成しており，文字通り barrier として機能していることが明らかに窺われた。

蛋白尿が認められなかったループス腎炎 class II の症例では，GBM の陰性荷電部位数は，LRE で 21.3 ± 2.0 から 22.3 ± 1.8 個，LRI 13.5 ± 2.0 から 14.2 ± 2.0 個であり，正常の GBM における測定結果と比較して有意差は認められなかった。一方，1g / 日以上の高度の蛋白尿を有する class IV および V ループス腎炎においては，コントロールと比較して有意に陰性荷電部位の減少が認められた（class V : LRE $14.8 \pm 2.7 \sim 19.3 \pm 1.8$ 個，LRI $5.8 \pm 1.9 \sim 11.3 \pm 2.4$ 個，class V : LRE $13.0 \pm 2.4 \sim 17.9 \pm 2.8$ 個，LRI $12.0 \pm 1.9 \sim 13.0 \pm 2.5$ 個，いずれも正常と比較して $p < 0.05$ で有意）。陰性荷電部位は，内皮下の免疫沈着物 (ID) が認められる部位においては LRI で，また上皮下の ID が認められる部位において LRE で消失していた。以上のことよりループス腎炎においては，charge barrier の破綻が蛋白尿の成因と密接に関連していることが明らかにされた。

ループス腎炎に認められた GBM やメサングウム基質の ID は CB で染色されず、この net charge は陽性である可能性が考えられた。つまり陽性荷電の染色複合体あるいは抗体が、charge barrier の破綻を介してループス腎炎の成因に関与していることが推測された。以上ループス腎炎に於ける蛋白尿の成因の少なくとも一部を独特の半定量的手法を用いて charge site の量的変動から実証した点はユニークであり、学位論文として妥当な価値を持つものと判断した。副査の吉木、小林（邦）両教授並びに阿部（和）教授からそれぞれの専門領域に関連して幾つかの質問があり、討議が行われたが、いずれに関しても適正な答えが得られたものと判断された。