

糸球体基底膜 anionic sites の電顕的観察

富山医科薬科大学小児科学教室

樋口 晃

緒 言

腎糸球体基底膜の蛋白透過性を規定する因子として、従来の糸球体基底膜（以下 GBM と略す）の size selective barrier に加え、同部に存在するポリアニオンによる charge selective barrier⁹⁾が注目されている。この陰荷電を構成する主たる物質として、上皮細胞表面のシアル酸⁶⁾と GBM の内・外透明層に存在する heparan sulfate⁷⁾が知られており、形態学的に colloidal iron²⁾, ruthenium red⁴⁾あるいは polyethyleneimine⁸⁾（以下 PEI と略す）等の cationic probe を用いて電顕的検索がなされている。実験的に陽荷電物質を投与して GBM の陰荷電を中和してやると蛋白尿が惹起される¹⁾。またヒトの minimal change nephrotic syndrome の実験モデルである puromycin aminonucleoside nephrosis³⁾あるいは nephrotoxic serum sickness⁵⁾では足突起の癒合とポリアニオンの減少が観察されている。しかしヒトの腎疾患における anionic sites の検討の報告はいまだ少ない。本論文は小児期の各種腎疾患における GBM の anionic sites の変化について電顕的に検討した結果について報告するものである。

対象および方法

症例は、富山医科薬科大学附属病院小児科並びに関連病院に於て施行した腎生検より、急性糸球体腎炎、特発性膜性腎炎、膜性増殖性糸球体腎炎 I 型、紫斑病性腎炎、IgA 腎炎、微小変化型ネフローゼ症候群、アルポート症候群について検討を加えた。得られた腎生検組織を 1 mm 程度に細切し、Schurer¹¹⁾らの方法に従い、0.5% glutaraldehyde 溶液（0.2 M cacodylate buffer, pH 7.4 使用, sucrose で 400 mOsm に調製）で 30 分間前固定を行い、0.5% PFI 溶液（分子量 1,800, HCl, sucrose で pH 7.4, 400 mOsm に調製）中にて 30 分間 PEI を浸透させ

た。その後同 buffer で 30 分洗浄し、0.1% glutaraldehyde-2% phosphotungstic acid 溶液中にて 1 時間反応させ、再び洗浄して、オスミウム酸にて後固定し電顕包埋を行った。電顕観察には、HITACHI H-300, JEM-200CX を使用した。

結 果

対照腎 (Fig. 1)

微少血尿を示した症例 (isolated hematuria) を対照腎とした。上皮細胞表面、GBM の lamina rara externa (LRE), lamina rara interna (LRI) に PEI 粒子を認め、特に LRE, LRI においては規則正しい配列を示した。同時に lamina densa にも僅かながら PRI 粒子の不規則な分布がみられた。上皮細胞表面は PFI 粒子に広範に被われ、slit membrane には PEI 粒子の集簇が認められ、一方メサンジウム領域では不規則にかつ GBM より淡く PEI 粒子が分布しているのが観察された。

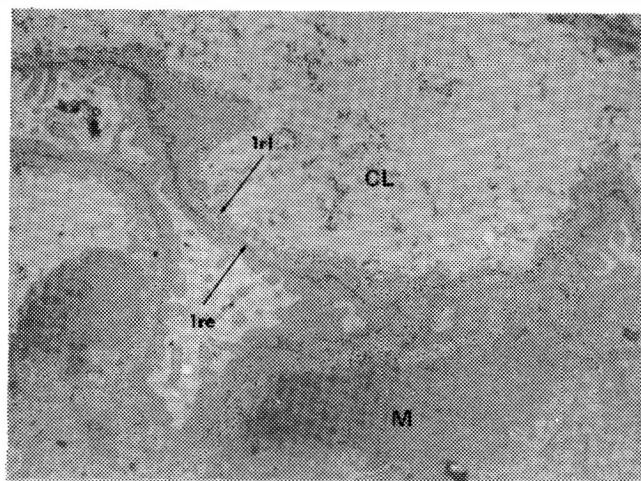


Fig. 2 Isolated hematuria. PEI particles indicating charged sites on both laminae rarae and in the mesangium. lre : lamina rara externa, lri : lamina rara interna, M : mesangial cell, CL : capillary lumen. (× 10,000)

急性糸球体腎炎

蛋白尿 4～5 g/日排泄時点での腎生検で、LRE, LRI の anionic charge は規則正しく配列していたが、GBM 内 electron dense deposit (EDD) の存在する部位では、LRI の PEI 粒子はやや粗大化し、粗であった。また EDD を囲む形で両側に PEI 粒子が並んでいるのがみられた。メサンジウム領域においては PEI 粒子の減少は認められなかった。

特発性膜性腎炎 (stage II) (Fig. 2)

蛋白尿 1 g/日の症例。全体的に LRE, LRI の PEI 粒子は小さく数の減少も認められた。特に上皮下 EDD の存在する部位では LRE の anionic charge は消失していた。EDD 内には殆ど PEI 粒子は認められず、また spike を形成している部分ではそれに一致して PEI 粒子の配列がみられた。上皮の足突起が癒合した部位でも PEI 粒子の消失がみられた。

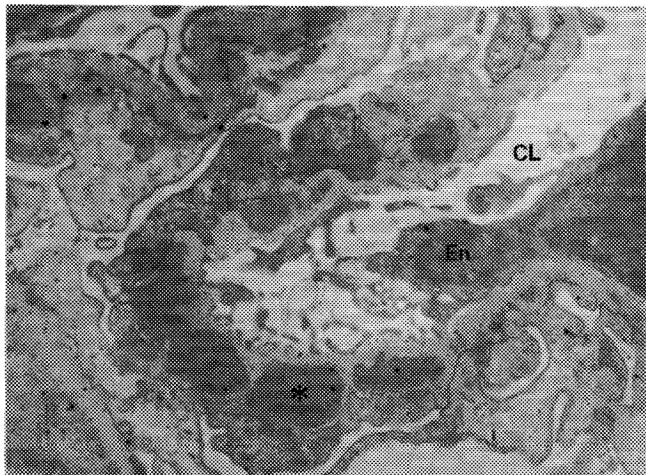


Fig. 2 Stage II membranous glomerulonephritis. Subepithelial deposits with tracer PEI particles. Outer surface of the deposits has no particulate staining. En: endothelial cell, *: electron dense deposit. ($\times 21,000$)

膜性増殖性糸球体腎炎 I 型

蛋白尿は 1 g/日の症例。EDD の存在していない部位での GBM においては、LRE, LRI 並びに上皮細胞表面の PEI 粒子は減少を示さなかったが、上皮下 EDD が存在する部位では LRE の PEI 粒子は消失し、同時に LRI においても数の減少が認められた。この症例においても EDD 内には PEI 粒子はみられなかった。

微小変化型ネフローゼ症候群 (MCNS) (Fig. 3)

大量の蛋白尿を排泄している時点で腎生検を施行した症例である。LRE, LRI の PEI 粒子は対照に比べて全体的に fine となっているのが観察され、anionic charge の減少が推測された。上皮細胞表面においては PEI 粒子は広範に被い、メサンジウム領域でも正常の分布を示した。



Fig. 3 Minimal change nephrotic syndrome. Basement membrane showing lesser density of PEI staining in the laminae rarae with foot process effacement. ($\times 10,000$)

紫斑病性腎炎 (Fig. 4)

nephrotic pattern を示した症例であるが、EDD のない GBM においては anionic sites に著変は認められなかった。メサンジウムの EDD 内には PEI 粒子の凝集はみられなかった。

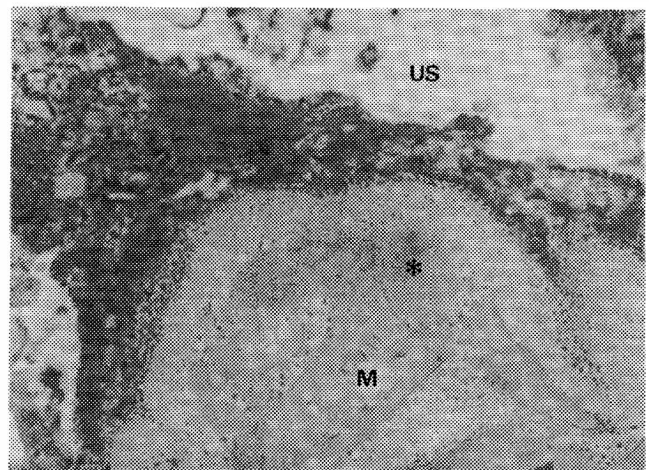


Fig. 4 Purpura nephritis. Electron dense deposits in the mesangial area have no PEI particles. ($\times 35,000$)

IgA 腎炎においてもほぼ同様の所見が得られた。

Alport 症候群 (Fig. 5)

蛋白尿は0.3～1/日。形態学的に正常と思われる GBM では、LRE、LRI の PEI 粒子は規則正しく配列し数の減少はみられなかったが、splitting を示す GBM では PEI 粒子の不規則な配列が観察された。上皮細胞表面においては対照と差のない分布を示した。

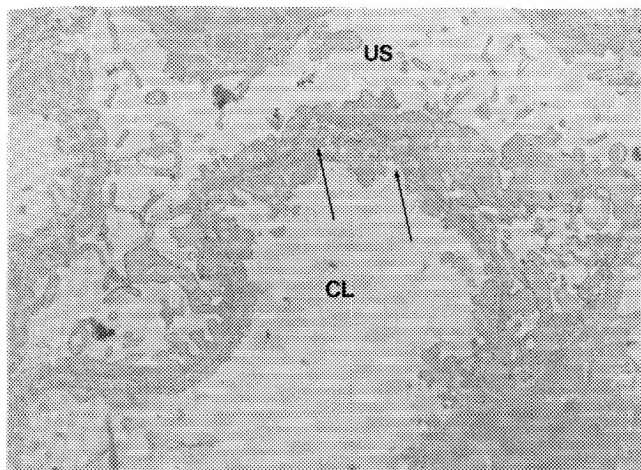


Fig. 5 Alport's syndrome. PEI particles are irregularly present on the splitted basement membrane (↑). (× 10,000)

考 案

蛋白尿の漏出は GBM のポリアニオンの減少並びに上皮細胞足突起との間に密接な関係があることが、puromycin aminonucleoside nephrosis の検討から広く受け入れられている。同様に今回の研究で MCNS において大量の蛋白尿が排泄している時点では、上皮細胞足突起の癒合がみられ、GBM の negative charge の変化が観察された。このことは、ヒトの糸球体基底膜においても、chemical mediator 等によりポリアニオンの減少をきたし、蛋白尿が惹起されるものと推測される。

一方、IC 型腎炎では、上皮 EDD の存在する部位ではそれを被う上皮細胞表面のポリアニオンの減少と、LRE の anionic sites の消失が観察された。また EDD 内には PEI 粒子は認められなかった。このように IC 型腎炎では、EDD の存在部位における部分的な negative charge の脱落が認められた。この所見は、まず抗体が上皮細胞表面の glycoprotein と in situ で結合し、次第に LRE に蓄積された結果、anionic sites が減少する可能性が推測されている[10]。上皮 EDD の存在は、spike を形成

し GBM の構造変化をもたらすと同時に、charge-barrier の破綻を生ぜしめ、蛋白尿を惹起することが示唆される。

Alport 症候群のように構造変化の著しい例では、size barrier の破綻が蛋白尿の主たる原因と考えられる。今回検討した症例においても negative charge は十分に保たれていた。しかし二次的に anionic charge の減少をきたす可能性は存在する。

今回使用した PEI による GBM の anionic sites の検討は半定量的であり、極く微細な変化と蛋白尿の漏出については不明と言わざるを得ない。

結 語

PEI を用いて小児期の腎疾患について糸球体の anionic sites の変化について電顕的に観察し検討を加えた。

- 1) 正常糸球体では、上皮細胞表面、GBM の LRE、LRI に PEI の結合がみられた。同時にメサンジウム領域にも PEI が結合した。
- 2) MCNS では anionic charge が対照に比べてより fine であった。
- 3) IC 型腎炎では上皮 EDD の部位で LRE の anionic sites の消失が認められた。
- 4) Alport 症候群では anionic charge の減少はなく、GBM の構造の変化が蛋白尿の主因と考えられた。

稿を終るに当たり電顕材料の包埋、写真の現像にご協力をいただいている研究協力科川原昌彦、吉井亮一、小児科学教室永田仁志、第二生理学教室五十嵐勝美の各氏に深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) Barnes J. L., Radnik R. A., Gilchrist E. P. and Venkatachalam M. A. : Site and charge selective permeability defects induced in a glomerular basement membrane by a cation. *Kidney Int.* 25 : 11-19, 1984.
- 2) Blau E. B. and Hass J. E. : Glomerular sialic acid and proteinuria in human renal diseases. *Lab. Invest.* 28 : 477-481, 1973.
- 3) Caulfield J. P., and Farquhar M. G. : Loss of

- anionic sites from the glomerular basement membrane in aminonucleoside nephrosis. *Lab. Invest.* 39 : 505-512, 1978.
- 4) Groniowski J., Bizyskova W. and Walski, M. : Electron microscope studies on the surface coat of the nephron. *J. Cell. Biol.* 40 : 585-601, 1969.
 - 5) Kreisberg J. I., Wayne D. B. and Karnovsky M. J. : Rapid and focal loss of negative charge associated with mononuclear cell infiltration early in nephrotoxic serum nephritis. *Kidney Int.* 16 : 290-300, 1979.
 - 6) Latta H., Johnston W. H. and Stanley T. M. : Sialoglycoproteins and filtration barriers in the glomerular capillary wall. *J. Ultrastruct. Res.* 51 : 354-376, 1975.
 - 7) Michael A. F., Blau E., Vernier R. L. : Glomerular polyanion alteration in aminonucleoside nephrosis. *Lab. Invest.* 23 : 649-657, 1970.
 - 8) Okada K., Kawakami K., Miyao M., and Oite T. : Ultrastructural alterations of glomerular anionic sites in idiopathic membranous glomerulonephritis. *Clin. Nephrol.* 26 : 7-17, 1986.
 - 9) Rennke H. G., Patel Y. and Venkatachalam, M. A. : Glomerular filtration of proteins : clearance of anionic, neutral and cationic horseradish peroxidase in the rat. *Kidney Int.* 13 : 278-288, 1978.
 - 10) Schneeberger E. E., Stavrakis G. and McCarthy K. : Alterations in glomerular anionic sites in autologous immune complex nephritis. *Lab. Invest.* 49 : 445-452, 1983.
 - 11) Schurer J. W., Kalicharan D., Hoedemaeker PhJ. and Molenaar I. : The use of polyethyleneimine for demonstration of anionic sites in basement membranes and collagen fibrils. *J. Histochem.* 26 : 688-689, 1978.