

アミノヌクレオシド腎症における腎糸球体および 血小板膜陰性荷電の変化

奈良県立奈良病院小児科

上 辻 秀 和, 山 下 隆 司

奈良県立医科大学小児科学教室

中 島 充, 岡 島 馨, 松 永 健 司

奈良県立医科大学法医学教室

河 原 信 吾

STUDY OF GLOMERULAR AND PLATELET ANINOIC SITES IN AMINONUCLEOSIDE NEPHROSIS

HIDEKAZU KAMITSUJI and TAKASHI YAMASHITA

Department of Pediatrics, Nara Prefectural Nara Hospital

MITSURU NAKAJIMA, KAORU OKAJIMA and TAKESHI MATSUNAGA

Department of Pediatrics, Nara Medical University

SHINGO KAWAHARA

Department of Legal Medicine, Nara Medical University

Received January 29, 1993

Summary: In aminonucleoside nephrosis (AN), which can be regarded as an experimental model of minimal change nephrotic syndrome (MCNS), ultrastructural alteration of glomerular anionic sites were studied using polyethyleneimine (PEI) as a cationic probe, and correlated with the change of platelet membrane negative charge. In control rats, PEI was seen in epithelial cell surface and in both lamina rara externa and lamina rara interna. On the other hand, AN rats, showed a loss of polyanion on the epithelial surface associated with foot process fusion and a reduction of anionic sites within glomerular basement membrane. The degree of anionic sites correlated with proteinuria. The negative charge of platelet membrane also decreased in AN rats and correlated with a loss of glomerular anionic sites. However, there was no remarkable change in platelet morphological findings on electron microscopy. These findings may provide useful information on platelet function in pediatric MCNS.

Index Terms

aminonucleoside nephrosis, glomerular anionic site, platelet

結 言

小児期ネフローゼ症候群の高頻度に見られる微小変化型ネフローゼ症候群(MCNS)の蛋白尿出現は糸球体基底膜(GBM)charge barrierの破綻によるとされている。

糸球体において上皮細胞足突起の癒合とともにGBM anionic sitesの減少が主因をなすも、かかる変化はTリンパ球由来の血管透過性因子(VPF)により引き起こされることが明らかとなってきた。したがってMCNSでは陰性荷電減少は腎局所のみならず赤血球膜や血小板

膜にも出現³⁾し、とりわけ血小板においては増悪期の血小板凝集亢進の誘因となることが報告⁴⁾されている。

我々は今回、MCNSの実験モデルとされるratのアミノヌクレオシド(AN)腎症における膜陰性荷電の変化をGBMとともに血小板についても検討したので報告する。

対 象

1. 実験モデル

生後1カ月齢のSprague-Dawley rat(雄, 体重180-220 g)を用いた。AN腎症は puromycin aminonucleoside を1.5 mg/100 g皮下注7日間連日投与⁵⁾し15日目に採尿、採血および腎組織を採取した。なお対照として生食0.2 mlを皮下注した。

2. GBM 陰性荷電の観察

GBMの陰性荷電は cationic probe として polyethyleneimine(PEI)を用い、Schurer らの方法⁶⁾に準じ浸透法にて検索した。

腎組織片を0.5% PEI(Polyscience社USA)溶液に30分間浸透、次いで0.1 M cacodylate bufferで30分間洗浄、2% O_3O_4 にて固定した。脱水、包埋を行い超薄切片を作製、uranyl acetate および lead citrate にて染色、

透過型電顕にて観察した。

3. 血小板膜陰性荷電の検索

1) Alcian-Blue 結合能

血小板膜陰性荷電は cationic probe として Alcian-Blue8GX(AB)(Wako-Junyaku kk. Japan)を用い、Levin らの方法⁷⁾によった。屠殺前、頸動脈より採血しクエン酸:血液1:9と混合し800 rpm 15分間遠沈、得られた血小板多血漿(PRP)に0.1 M EDTA加PBS(PH 6.0)を1/10溶加え遠沈、得られた血小板を0.1 M EDTA加PBS(PH 7.4)にて3回洗浄後、 $1 \times 10^6/\mu l$ の血小板浮遊液を作成した。AB溶液(100 $\mu g/ml$)と等量混合し37°C 30分間 incubate 後遠沈、上清のAB量をOD₅₉₅にて測定、 1×10^6 個の血小板に付着したAB量を測定した。

2) Cationized ferritin による血小板膜電顕像

一部 rat の血小板については Cationized ferritin⁷⁾により電顕像にて血小板膜陰性荷電を観察した。PRP 0.5 mlを1% glutaraldehyde in 0.1 M PB(pH 7.4)30 mlに加え1時間4°Cにて固定、800 rpm 10分間遠沈、沈渣を0.01 M PBS(pH 7.4)にて洗浄、浮遊させた。次いで Cationized ferritin(Sigma社USA)を終濃度0.52 mg/

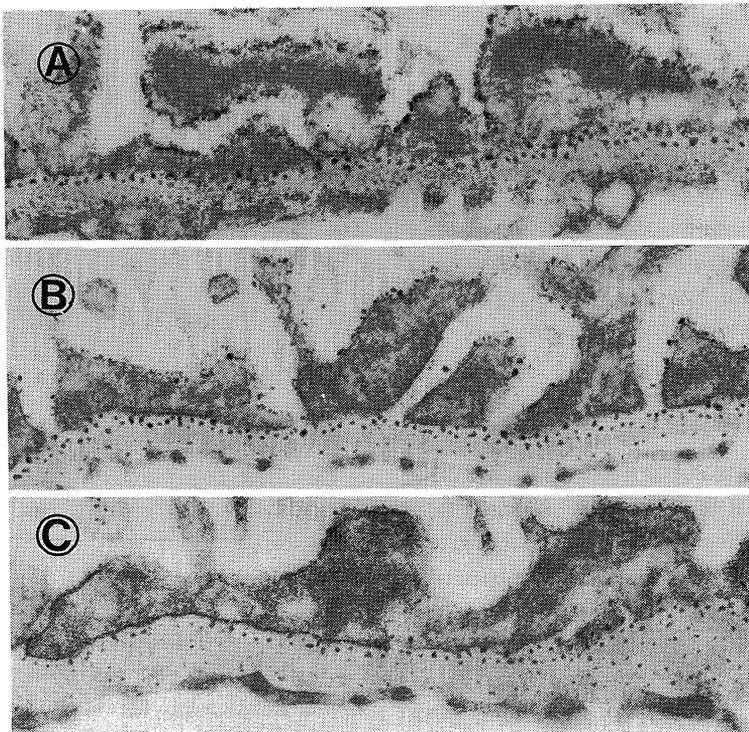


Fig. 1. Polyethyleneimine (PEI) stained electron microscopic findings of GBM of the rat in Type I (A), Type II (B) and Type III (C).

ml になる様に加え 37°C 30 分間 incubate した. 0.1 M PBS にて洗浄後, 2 % O₃O₄ 固定, LR white にて包埋し超薄切片を作成, 染色後透過型電顕にて観察した.

4. 尿中蛋白量

代謝ケージにて採取した 24 時間尿の尿中蛋白量は pyrogallol red method⁹⁾にて測定した.

5. 統計学的処理

統計学的処理は student's t 法により行った.

結 果

1. GBM の anionic sites の変化

GBM の anionic sites の変化を PEI の沈着像より観察し, その程度を 3 段階に分類した. I は PEI が上皮細胞表面, GBM の lamina rara externa, lamina rara interna に正常に分布するもの, II は上皮細胞表面の PEI の減少が見られるもの. III は上皮細胞層の PEI は消失し足突起の癒合を呈し, かつ GBM の PEI の減少も明らかかなものとした (Fig. 1).

Control rat 11 匹はいずれも正常の I であったのに対して AN rat では 22 匹中 7 匹 (31 %) が III, 9 匹 (41 %) が II と明らかかな GBM anionic sites の減少が認められた (Fig. 2).

2. GBM anionic sites と尿中蛋白量

尿中蛋白量を GBM anionic sites の分布と対比した結果, PEI 分布が I の 6 匹に比して III の 7 匹では尿中蛋白量の優位な増加が認められた. しかし I と II, II と III の尿中蛋白量に優位差は認められなかった (Fig. 3).

3. 血小板膜陰性荷電の変化

Control rat, AN rat の一部について cationized ferritin を probe として血小板膜陰性荷電を電顕像で観察した結果, Control rat 3 匹では ferritin が血小板膜表面に多数観察され陰荷電の存在を示していた. 一方, AN rat 群では 5 匹中 3 匹に血小板膜表面の ferritin の消失が観察された. しかし形態学的に変化は認められなかった (Fig. 4).

Alcian blue 8GX (AB) 結合能による血小板膜陰性荷電は Control rat 13 匹では 220~550 ng/1 × 10⁶ platelets (平均 353.1 ng/1 × 10⁶ platelets) であるのに対して AN rat 16 匹では 60~310 ng/1 × 10⁶ platelets (平均 178.4/1 × 10⁶ platelets) で AN rat 群に優位な AB 結合能の低下が認められた (Fig. 5).

4. GBM anionic sites と血小板膜陰性荷電

GBM anionic sites を PEI 浸透法, 血小板膜陰性荷電を AB 結合能にて測定し両者の関係を検討した. GBM anionic sites の減少が III であった AN rat 群の血小板

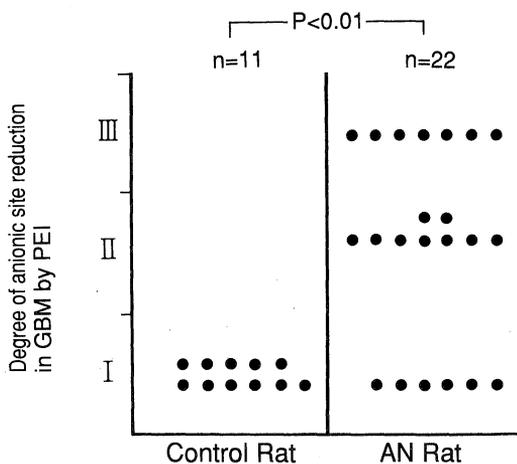


Fig. 2. Degree of anionic site reduction in GBM by polyethyleneimine (PEI) in control rat and aminonucleoside (AN) rat.

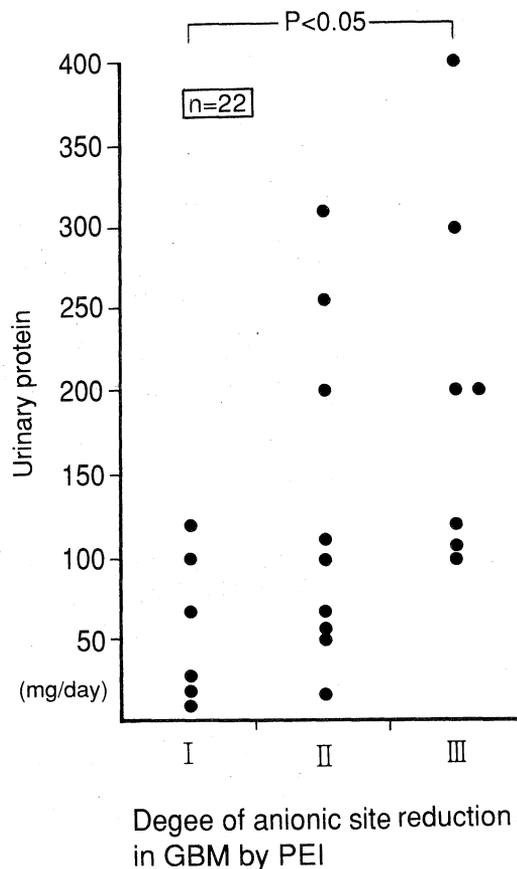


Fig. 3. Relationship between urinary protein and degree of anionic site reduction in GBM by polyethyleneimine (PEI) in aminonucleoside rat.

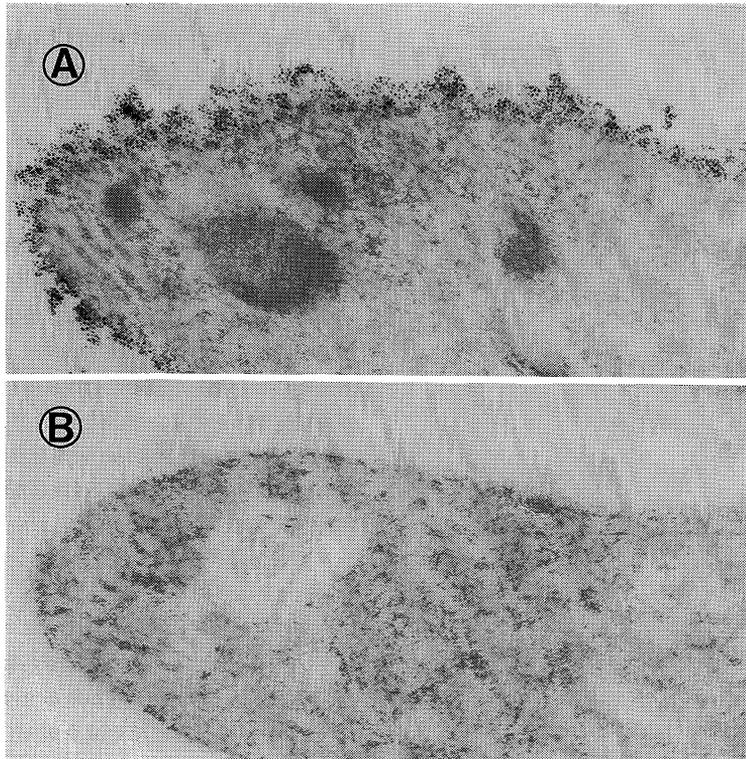


Fig. 4. Cationized ferritin stained electron microscopic findings of platelet in control rat (A) and aminonucleoside (AN) rat (B).

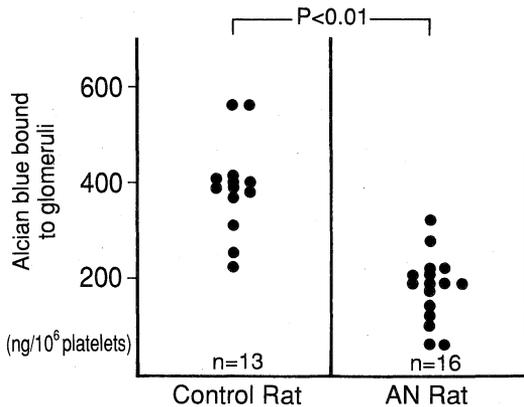


Fig. 5. Alcian blue bound to glomeruli in control rat and aminonucleoside (AN) rat.

AB 結合能は $60 \sim 200 \text{ ng}/1 \times 10^6 \text{ platelets}$ であるのに対して I では $100 \sim 420 \text{ ng}/1 \times 10^6 \text{ platelets}$ で GBM anionic sites 減少群に血小板膜陰性荷電の低下が認められた (Fig. 6).

考 察

MCNS の実験モデルとされる AN rat 腎症は rat に puromycin の aminonucleoside (AN) 投与により作成される。我々は今回、朝倉らの方法に準じて AN $1.5 \text{ mg}/100 \text{ g}$ 7 日間の連日投与を行い尿蛋白出現のピークが見られる 15 日目に屠殺、糸球体上皮細胞、GBM の陰性荷電を PEI 浸透法にて電顕的に観察し尿蛋白量と比較した。その結果、上皮細胞足突起の癒合や上皮細胞層、GBM の陰性荷電減少の強いものに尿蛋白量の排泄増加が認められた。このことは AN rat での尿蛋白出現が MCNS 同様、上皮細胞の障害や GBM anionic sites の減少による charge barrier の破綻に起因することを示唆していた。

糸球体には sialoglycoprotein や Heparan sulfate を含む proteoglycan 等の酸性ムコ多糖体が多く存在し charge barrier を形成する。⁹⁻¹¹⁾ Sialoglycoprotein は主として上皮細胞表面や足突起表面等の細胞表面外層に存在し上皮細胞の charge barrier のみならず GBM との付着等形態保持にも関与するとされている。他方

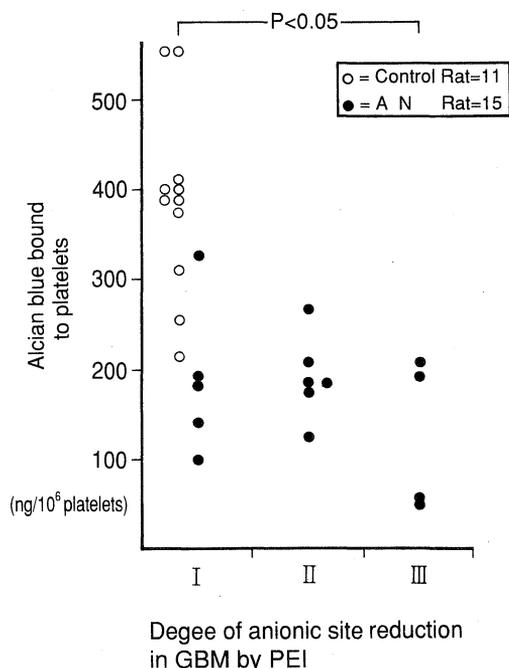


Fig. 6. Relationship between alcian blue to platelet and degree of anionic site reduction in GBM by polyethylenimine (PEI).

proteoglycan は GBM の lamina rara interna や lamina rara externa に存在, GBM の陰荷電分布に関与する. AN rat では AN が上皮細胞層を障害しその結果として上皮細胞表面の Sialoglycoprotein の減少をきたし上皮細胞表面の陰荷電減少とともに足突起癒合や GBM からの剝離を起こす.¹²⁾さらには Heparan sulfate の産生を抑制し GBM の陰荷電減少にも関与する¹³⁾とされている. 今回の結果でも糸球体 PEI の減少~消失等の変化は GBM に先立ち上皮細胞層に早く, かつ強度に認められた. このことは AN による上皮細胞の障害の結果として GBM anionic sites の減少が生じる可能性を示唆していた.

これら AN rat について血小板膜陰性荷電を AB 結合能や cationized ferritin を probe とした電顕像にて検討した結果, 上皮細胞や GBM 陰性荷電減少の強いものに血小板膜陰性荷電の減少が見られた. しかし血小板の形態に著変は認められなかった.

血小板膜は Glycoprotein I, II, III より構成されるが主体は Glycoprotein I でありわけ Glycoprotein Ib は血小板機能の粘着に重要な役割を与す¹⁴⁾とされている. Glycoprotein Ib は MW 17 万の糖蛋白で Glycocalycin が主成分で全血小板中の 64% のシアール酸を含む^{15),16)}

とされている. 血小板シアール酸の測定は出来なかったが AN rat での血小板膜陰性荷電の減少は糸球体の陰荷電と平行することより AN によるシアール酸の減少が有力と考えられた.

MCNS において血小板凝集亢進が存在することは諸家により報告されているも, その成因として 1) 低アルブミン血症に起因した血小板内アラキドン酸代謝異常¹⁷⁾, 2) 血小板膜陰性荷電の減少¹⁸⁾が推測されている. 教室の平らは⁹⁾MCNS 患児の血小板膜 AB 結合能を測定し増悪期に見られる結合能の低下は尿中蛋白量の改善とともに速やかに正常化することを報告した. これは MCNS 増悪期での全身的な膜陰性荷電減少を示し血中での膜陰性荷電減少因子の存在を示唆する. MCNS において近年 T-リンパ球培養上清の rat 腎動脈注入により rat 糸球体陰性荷電減少と同時に尿蛋白の排泄が見られることが報告され MCNS では T-リンパ球由来のリンフォカインが血管透過性因子 (VPF) であるとの見解^{1,2,19)}が有力視されている.

今回の AN rat における AN がこの T-リンパ球由来のリンフォカインと同様の機序で糸球体や血小板の膜陰性荷電減少を起したかどうか定かたではない. しかし AN rat での血小板膜陰性荷電減少が MCNS での血小板機能を検索する上で有効な指標になり得ると思われた.

結 語

Rat アミノヌクレオシド腎症 (AN) の膜陰性荷電の変化を糸球体上皮細胞, GBM とともに血小板膜について検討した.

1. AN rat での糸球体陰性荷電減少は上皮細胞表面から GBM の内~外透明層へと拡大し, その程度は尿中蛋白量と平行していた.
2. Alcian-blue 結合能にて測定した血小板膜陰性荷電は AN rat において明らかに減少し糸球体陰性荷電減少と平行していた. しかし血小板形態に異常はなかった.
3. AN 腎症での AN による血小板膜陰性荷電減少は腎局所のみならず全身的なものであり MCNS での血小板機能を検索する上で有効な指標になり得ると思われた.

文 献

- 1) Lagrue, G., Xheneumont, S., Branellec, A. and Well, B.: Lymphokines and nephrotic syndrome. *Lancet* I: 271-272, 1975.
- 2) Tomizawa, S., Nagasawa, N., Maruyama, K., Shimabukuro, N., Arai, H. and Kuroume, T.: Release of the vascular permeability factor in

- minimal change nephrotic syndrome in related to CD4⁺ lymphocytes. *Nephron* **56** : 341-342, 1990.
- 3) **Levin, M., Smith, C., Walters, M. D. S., Gascoine, P. and Barratt, T. M.** : Steroid-responsive nephrotic syndrome. A generalized disorder of membrane negative charge. *Lancet* **II** : 239-242, 1985.
 - 4) 平 康二, 岡島千賀子, 山下隆司, 河原信吾, 松永健司, 中島 充, 上辻秀和 : ネフローゼ症候群における血小板リストセチン凝集能. *日腎誌*. **32** : 659-666. 1990.
 - 5) 朝倉伸司, 照喜多重治, 加藤謙吉, 瀧 滋彦, 浅野泰 : アミノヌクレオシドラットにおける組織及び尿中 NAG 活性と尿中低分子蛋白について(第 1 報). *日腎誌*. **29** : 1443~1452, 1987.
 - 6) **Shurer, J. W., Kalicharan, D., Hoedemaeker, P. H. J. and Molenaar, I.** : The use of polyethylenimine for demonstration of anionic sites in basement membranes and collagen fibrils. *Cytochemistry* **26** : 688-689, 1978.
 - 7) **Kanwar, Y. S. and Farquhar, M. G.** : Anionic sites in the glomerular basement membrane, in vivo and in vitro localization to the laminae rarae by cationic probe. *J. Cell Biol.* **81** : 137-153, 1983.
 - 8) **Fujita, Y., Mori, I. and Kitano, S.** : Color reaction between pyrogallol red-molybdenum (VI) complex and protein. *Bunseki Kagaku* **32** : 379-386, 1983.
 - 9) **Michael, A. F., Blau, E. and Vernier, R. L.** : Glomerular polyanion. Alteration in aminonucleoside nephrosis. *Lab. Invest.* **23** : 649-657, 1970.
 - 10) **Kanwar, Y. S., Linker, A. and Farquhar, M. G.** : Increased permeability of the glomerular basement membrane to ferritin after the removal of glycosaminoglycans (heparan sulfate) by enzyme digestion *J. Cell Biol.* **86** : 688-693, 1980.
 - 11) **Mynderse, L. A., Hassell, J. R., Kleinman, H. K., Martin, G. R. and Hernaudez, A. M.** : Loss of heparan sulfate proteoglycan from glomerular basement membrane of nephrotic rats. *Lab. Invest.* **48** : 292-302, 1983.
 - 12) **Velsa, J. A., Glasser, R. J., Nevins, T. E. and Michael, A. F.** : Experimental model of focal sclerosis II. Correlation with immunopathologic change, macromolecular kinetics and polyanion loss. *Lab. Invest.* **36** : 527-534, 1977.
 - 13) **Fishman, J. A. and Karnovsky, M. J.** : Effects of the aminonucleoside of puromycin on glomerular epithelial cells in vitro. *Am. J. Pathol.* **118** : 398-407, 1985.
 - 14) 渡辺清明 : 血小板膜, Glycoprotein I. *日本血栓止血学会誌*. **15** : 317-332, 1984.
 - 15) **Lawler, J. W., Margossian, S. and Slayter, H. S.** : Physical parameters of platelet glycolocalicin. *Fed. Proc.* **39** : 1895, 1980.
 - 16) **Solum, N. O., Hagen, I., Myklebust, C. F. and Stabaek, T.** : Platelet glycolocalicin, its membrane association and solubilization in aqueous media. *Biochem. Biophys. Acta* **597** : 235-246, 1980.
 - 17) **Bang, N. U., Tyrgsted, C. W., Schroeder, J. E., Heidenreich, R. O. and Barbara, M.** : Enhanced platelet function in glomerular renal disease. *J. Lab. Clin. Med.* **81** : 651-660, 1973.
 - 18) **Bennett, A. and Cameron, J. S.** : Platelet hyperaggregability in the nephrotic syndrome which is not dependent on arachidonic acid metabolism or on plasma albumin concentration. *Clin. Nephrol.* **27** : 182-188, 1987.
 - 19) **Maruyama, K., Tomizawa, S., Shimabukuro, N., Fukuda, T., Johsita, T. and Kuroume, T.** : Effect of supernatants derived from T lymphocyte culture in minimal change nephrotic syndrome on rat kidney capillaries. *Nephron* **51** : 73-76, 1989.