

氏名(本(国)籍)	下 井 昭 仁 (大阪府)
推 薦 教 員	岩手大学 教授 古 濱 和 久
学 位 の 種 類	博士(獣医)
学 位 記 番 号	獣医博乙第119号
学位授与年月日	平成25年3月13日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学 位 論 文 題 目	ラットにおける糸球体係蹄壁の超微形態変化と荷電の 関連性および蛋白漏出についての研究
審 査 委 員	主査 岩 手 大 学 教 授 古 濱 和 久 副査 帯広畜産大学 教 授 石 井 利 明 副査 岩 手 大 学 教 授 橋 爪 一 善 副査 東京農工大学 教 授 下 田 実 副査 岐 阜 大 学 教 授 柳 井 徳 磨

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

腎糸球体障害でみられる蛋白尿は、診断上極めて重要な指標であり、糸球体での透過性亢進により血液から尿中へ蛋白質が漏出することによって生じると考えられている。そのメカニズムに関しては、糸球体障害における糸球体係蹄壁の陰性荷電と微細構造の変化が考えられている。しかし、基底膜の陰性荷電は減少しないとする反論もなされている。一方では、上皮細胞の陰性荷電の変化が重要とする報告があり、蛋白漏出機序の解明には至っていないのが現状である。

糸球体障害には微少変化型ネフローゼ症候群、糖尿病性腎症あるいは膜性腎症のような形態的变化が異なる様々なタイプがあるが、それらの病態に共通してみられるのは蛋白尿であり、超微形態変化としては、糸球体の構成細胞である上皮細胞足突起の平坦化である。本研究では、糸球体係蹄壁の超微形態変化と荷電および蛋白漏出の関連性を明らかにする目的で、ラットを用いて puromycin aminonucleoside (PAN) による微少変化型ネフローゼ、streptozotocin (STZ) による糖尿病性腎症および active Heymann 型膜性腎症 (AHN) を作成し、以下3章にわたり解析を行った。

第1章では、PAN ネフローゼラットを用いて検索した。透過型電子顕微鏡(電顕)所見として、上皮細胞の足突起の平坦化、高電子密度小体、空胞がみられ、蛋白尿排泄の強さに併行してこれらの形態学的変化が増強した。なお、基底膜からの足突起の剥離および基底膜の陰性荷電の減少はみられなかったが、上皮細胞表面の陰性荷電は明らかに減少していた。糸球体におけるアルブミンおよび IgG の分布は、毛細血管腔内および基底膜では変化はなかったが、上皮細胞の空胞や高電子密度小体に観察され、receptor mediated transcytosis と思われる像が確認された。

第2章では、STZ 糖尿病性腎症ラットを用いた。電顕所見では上皮細胞の足突起の平坦化のみが認められ、基底膜からの足突起の剥離はなかった。また、基底膜および上皮細胞の陰性荷電ならびに糸球体におけるアルブミンの分布には変化はみられなかった。

第3章では、膜性腎症のモデルである能動型 Heymann 腎炎 (AHN) ラットについて検討した。電顕所見では上皮下に高電子密度の沈着物がみられ、基底膜の突出像 (hump) も散見された。また、上皮下沈着物の有無に拘わらず足突起の平坦化がみられ、上皮細胞には高電子密度小体および空胞もみられた。足突起の剥離および基底膜の陰性荷電の減少はなかったが、上皮細胞表面では陰性荷電は減少していた。糸球体におけるアルブミンの分布は PAN によるネフローゼラットと同様であり、receptor mediated transcytosis と思われる像も確認された。

検討した3種の腎糸球体モデルラットで共通して認められたことは以下の三つであった。①明らかな蛋白尿を呈する動物においても基底膜の陰性荷電の減少はないこと。これは、従来、基底膜の陰性荷電が濾過障壁として重要な役割を担っているという学説を否定するものであり、蛋白漏出に基底膜の陰性荷電は関与しないと結論づけられた。②足突起の平坦化がみられること。蛋白漏出時には上皮細胞の足突起が変化することが明らかとなった。PAN ネフローゼラットにおいては、蛋白尿を呈さない動物にも足突起の平坦化がみられたが、これは蛋白尿発症に進展する上皮細胞の初期変化と推察された。③明らかな蛋白尿を呈する動物においても足突起の剥離はないこと。上皮細胞足突起の剥離については一定した見解が得られていないが、本研究からは剥離は上皮細胞の初期変化であり、上皮細胞の剥離、脱落はより進行した病変であろうと考えられた。

用いた3種類の腎障害モデルでは上皮細胞の足突起の平坦化がみられているにもかかわらず、足細胞の陰性荷電の減少は PAN ネフローゼラットおよび AHN ラットでのみ観察され、STZ 糖尿病性腎症ラットでは変化はないことから、異なった機序で足突起の平坦化が生じることが推察された。

蛋白漏出における基底膜のサイズバリアーについては、AHN ラットで基底膜に形態的变化がみられたにもかかわらず、アルブミンの分布に差がなかったことから、その関与はないものと推測された。また、PAN ネフローゼラットおよび STZ 糖尿病性腎症ラットにおいても基底膜に形態的变化がみられなかったことから、同様にサイズバリアーは関与しないものと考えられた。

以上のことから、微少変化群ネフローゼ症候群、糖尿病性腎症および膜性腎症のいずれのモデルにおいても、共通して足突起の平坦化がみられたが、基底膜の陰性荷電の減少はみられなかった。したがって、蛋白尿排泄には上皮細胞の足突起の形態学的変化が密接に関与していると考えられた。

## 審 査 結 果 の 要 旨

各種腎障害でみられる蛋白尿は、診断上重要な指標であり、その漏出メカニズムとしては、糸球体糸球壁の陰性荷電と微細構造の変化が考えられている。しかし、基底膜の陰性荷電は変化しないとする反論もあり、未だ不明な点が多い。本研究では、糸球体糸球壁の超微形態変化と荷電および蛋白漏出の関連性を明らかにする目的で、ラットを用いて puromycin aminonucleoside (PAN) による微少変化型ネフローゼ、streptozotocin (STZ) による糖尿病性腎症および active Heymann 型膜性腎症 (AHN) を作成し、以下3章にわたり解析を行った。

第1章では PAN によるネフローゼラットを用いた。透過型電子顕微鏡 (電顕) 所見では、上皮細胞の足突起の平坦化、高電子密度小体と空胞化がみられ、蛋白尿排泄の強さに併行して、これら形態学的変化が増強した。なお、基底膜からの足突起の剥離および基底膜の陰性荷電の減少はみられなかったが、上皮細胞表面の陰性荷電は明らかに減少していた。糸球体の毛細血管腔内および基底膜におけるアルブミンと IgG の分布には、変化がみられなかったが、上皮細胞の空胞化や高電子

密度小体に観察され、receptor-mediated transcytosis と思われる像が確認された。

第2章ではSTZによる糖尿病性腎症ラットを用いた。電顕所見では、足突起の平坦化のみ観察された。足突起の剥離、陰性荷電の分布、糸球体の毛細血管腔内と基底膜におけるアルブミンの分布には変化はみられなかった。

第3章ではAHNラットを用いた。電顕所見では上皮細胞下に高電子密度小体の沈着物と基底膜の突出像(hump)が散見された。また、上皮細胞下の沈着物の有無に拘わらず足突起の平坦化がみられた。基底膜では足突起の剥離および陰性荷電の減少はみられなかったが、上皮細胞表面では陰性荷電は減少していた。糸球体の毛細血管腔内と基底膜におけるアルブミンの分布には、変化がみられず、PANラットと同様、receptor-mediated transcytosis 類似の像が観察された。

検討した3種の腎糸球体障害モデルにおいて、共通して足突起の平坦化がみられたが、基底膜の陰性荷電の減少はみられなかった。したがって、蛋白尿排泄には上皮細胞の足突起の形態学的変化が密接に関与していると推察された。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

#### 基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Diminution of podocyte anionic sites in drug-induced proteinuric rats  
著 者 名 : Shimoi, A., Harada, T. and Watanabe, M.  
学術雑誌名 : Journal of Toxicologic Pathology  
巻・号・頁・発行年 : 13 (2) : 97-107, 2000
- 2) 題 目 : Unchanged distribution density of anionic sites on the glomerular wall in rats with streptozotocin-induced diabetic nephropathy  
著 者 名 : Shimoi, A., Hatakeyama, H., Koizumi, H., Satoh, H. and Watanabe, M.  
学術雑誌名 : Toxicologic Pathology  
巻・号・頁・発行年 : 40 (5) : 789-796, 2012
- 3) 題 目 : Unchanged distribution density of anionic sites on the glomerular wall in rats with active Heymann nephritis  
著 者 名 : Shimoi, A., Hatakeyama, H., Miyoshi, S. and Watanabe, M.  
学術雑誌名 : Journal of Toxicologic Pathology  
巻・号・頁・発行年 : in press, 2013

#### 既発表学術論文

- 1) 題 目 : Importance of early gamma interferon production in *Propionibacterium acnes*-induced resistance to *Toxoplasma gondii* infection in mice  
著 者 名 : Shirahata, T., Shimoi, A., Kanda, H., Goto, H. and Nakane, A.  
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science  
巻・号・頁・発行年 : 56 (2) : 293-297, 1994
- 2) 題 目 : Comparison of spontaneous minor lesions in wild-caught and laboratory-bred monkeys  
著 者 名 : Shimoi, A., Kakinuma, C., Kuwayama, C. and Watanabe, M.  
学術雑誌名 : Journal of Toxicologic Pathology  
巻・号・頁・発行年 : 11 (2) : 85-94, 1998
- 3) 題 目 : Human natural tumor necrosis factor  $\alpha$  induces multiple endocrine and hematologic disorders in rats  
著 者 名 : Kakinuma, C., Hamada, Y., Futamura, Y., Kuwayama, C., Shimoi, A. and Shibutani, Y.  
学術雑誌名 : Toxicologic Pathology  
巻・号・頁・発行年 : 27 (4) : 402-411, 1999

- 4) 題 目 : Interpretation of zonal lesions by different concepts of the hepatic lobule  
 著 者 名 : Watanabe, M. and Shimoi, A  
 学術雑誌名 : Journal of Toxicologic Pathology  
 卷・号・頁・発行年 : 14 (2) : 163-167, 2001
- 5) 題 目 : Vacuolar change in the thyroid follicular cells in BrlHan:WIST@Jcl(GALAS) rats  
 著 者 名 : Shimoi, A., Kuwayama, C., Miyauchi, M., Kakinuma, C., Kamiya, M., Harada, T., Ogihara, T., Kurokawa, M. and Mizuguchi, K.  
 学術雑誌名 : Journal of Toxicologic Pathology  
 卷・号・頁・発行年 : 14 (3) : 253-257, 2001
- 6) 題 目 : Identification of pulmonary surfactant that bears intestinal-type and tissue-nonspecific-type alkaline phosphatase in endotoxin-induced rat bronchoalveolar fluid  
 著 者 名 : Harada, T., Koyama, I., Shimoi, A., Alpers, D. H. and Komoda, T.  
 学術雑誌名 : Cell and Tissue Research  
 卷・号・頁・発行年 : 307 (1) : 69-77, 2002
- 7) 題 目 : Spontaneous vacuolar degeneration of the thyroid follicular epithelium in cynomolgus monkeys  
 著 者 名 : Hatakeyama, H., Takei, Y., Cruz, Y., Miyoshi, S., Watanabe, J., Koizumi, H., Shimoi, A. and Satoh, H.  
 学術雑誌名 : Journal of Toxicologic Pathology  
 卷・号・頁・発行年 : 24 (4) : 229-232, 2011
- 8) 題 目 : Osteosarcoma in Sprague-Dawley rats after long-term treatment with teriparatide [human parathyroid hormone (1-34)]  
 著 者 名 : Watanabe, A., Yoneyama, S., Nakajima, M., Sato, N., Takao-Kawabata, R., Isogai, Y., Sakurai-Tanikawa, A., Higuchi, K., Shimoi, A., Yamatoya, H., Yoshida, K. and Kohira, T.  
 学術雑誌名 : The Journal of Toxicologic Sciences  
 卷・号・頁・発行年 : 37 (3) : 617-629, 2012