

糸球体障害における Fibronectin の意義に 関する検討

— 第2報 Circumferential Mesangial Interposition と Fibronectin —

川崎医科大学 腎臓内科
(指導：大沢源吾教授)

米 田 昌 道

(昭和61年2月28日受付)

Significance of Fibronectin in the Glomerular Damage

— (II) Fibronectin in the Development of Circumferential Mesangial Interposition —

Masamichi Yoneda

Division of Nephrology, Department of Medicine
Kawasaki Medical School

(Accepted on February 28, 1986)

家兎に **Mitomycin C (MMC)** と抗腎血清を併用注射して **circumferential mesangial interposition** を作成し、その成因について検討した。MMC 注射と抗腎血清注射併用にて、各々単独注射よりも高頻度に広汎な係蹄壁の2重化を認めた。電顕にてこの2重化は **circumferential mesangial interposition** であることを確認した。蛍光抗体法による **Fibronectin (FN)** 分布は係蹄壁に沿って帯状に増加していた。MMC 単独注射では糸球体は電顕的に内皮細胞下腔の拡大がみられ、FN は線状に係蹄壁に沿って増加していた。これらのことより、**circumferential mesangial interposition** の成因機序として、① 内皮下腔の拡大、② FN の係蹄壁に沿った増加、の関与が推測された。

The pathogenic mechanism of circumferential mesangial interposition (CMI) was examined in experimental glomerulonephritis induced by a combination of mitomycin C (MMC) and antinephrotic serum injections in rabbits. Experimental glomerulonephritis, induced by both MMC and antinephrotic serum injections showed a diffuse double contour as opposed to the patterns when only MMC or antinephrotic serum was injected. The relation of this finding to CMI was confirmed electronmicroscopically. An immunofluorescent study revealed fibronectin (FN) in band-like depositions along the capillary walls. Only MMC injection, glomeruli showed expanding of subendothelial space by electron microscopy and linear increased of FN by immunofluorescent study. From the above results, it

is suggested that the pathogenetic mechanism of CMI is related to expansion of the subendothelial space and increased FN deposition along the capillary walls.

Key Words ①Fibronectin ② Mesangium cell ③ Endothelial cell

緒 言

メサンギウム細胞は糸球体の重要な構成成分であり、その働きとして血中の macromolecules の貪食, stalk-juxtaglomerular transport, capillary regurgitation などへの関与が明らかにされている。¹⁾ また、メサンギウム細胞にはアンジオテンシンIIやADHのホルモン受容体があり、それらのホルモンの働きによりメサンギウム細胞が収縮し糸球体内の血行を調節していることも知られている。²⁾

各種腎障害においてメサンギウム細胞は、細胞増生や免疫複合体の沈着, mesangiolysis などの多彩な変化を示す。そのなかでも circumferential mesangial interposition (C.M.I.) は、いわゆる膜性増殖性腎炎(MPGN)の基本をなす特異なメサンギウムの増殖性反応であるが、^{3),4)} その病理形態成立機序については不明な点が多い。一方、正常糸球体の係蹄壁にはほとんどみられない fibronectin (FN) がMPGN症例では糸球体係蹄壁に増加していることが明らかにされており、⁵⁾⁻⁹⁾ こうしたメサンギウム反応にはFNが何らかの関わりをもつことを示唆するようと思われる。そこで実験的にC.M.I.を作成しその病理形態成立機序について、係蹄壁のFNの変動の面より検討した。

方 法

1) 動物

正常白色家兎(雑種,雄),体重2.5~3.0kgを使用した。

2) 抗腎抗体作成

正常白色家兎の腎を腎動脈より生理食塩水にて灌流を行い皮質部分を分離しブレンダーにてhomogenizeした。その後生理食塩水にて重量あたり20%の腎粥を作成した。週に2回5mlずつアヒルの腹腔内へ腎粥を計8回注入した。

最終注入の9週後にアヒルの頸動脈より脱血し、血清を分離後56°C,30分間温室に放置し補体を不活化し抗腎血清とした。

3) CMI作成

7羽の家兎(No.1~7)を使用した。No.1,2,3にはmitomycin C(MMC)0.5mg/kgを4日間連続で耳静脈より投与した後に、抗腎血清を2.5ml/kg静注し馬杉腎炎を惹起させた。対照としてNo.4,5には抗腎血清のみを投与し、No.6にはMMC0.5mg/kgのみを連続4日間投与し、No.7には生理食塩水4mlを4日間連続投与した。

4) 組織学的検討

抗腎血清投与後9~10日後に屠殺した。腎を細切後光顕・電顕・蛍光抗体観察に供した。光顕はアルコールブアンにて固定後パラフィンにて包埋した。マイクロトームにて2~3μの薄片作成後hematoxylin-eosin(H&E)染色ならびにperiodic acid schiff(PAS)染色を施行し検鏡した。電顕は2.5%glutaraldehydeと2%osmium tetroxideにて固定後エタノール系列にて脱水を行いEpon 812にて包埋した。超薄切片は酢酸ウラニウムとクエン酸鉛にて二重染色を行いHU12Aにて観察した。

蛍光抗体法はn-ヘキサンにて凍結固定後クリオスタットにて3~4μ切片を作成した。FNは間接法にて,IgG・C₃・fibrinogen・ウサギの抗アヒルIgGは直接法にて観察した。

5) 尿蛋白

代謝ケージを用いて24時間尿を採尿し、Kingsbury-Clark法にて定量を行った。

結 果

1) 蛋白尿

生理食塩水投与家兎ならびにMMC投与家兎では経過中終始尿蛋白は10mg/dl以下であった。抗腎血清投与群およびMMCと抗腎血

清併用投与群では100 mg/dl から400 mg/dl の蛋白尿の増加を認めた。

2) 光顕的組織学的検討

a) 生理食塩水投与家兎には特記すべき腎組織変化はみられなかった。

b) 抗腎血清単独注射群

糸球体にはメサンギウム、好中球を含む係蹄内細胞の細胞をはじめ増殖が強く、メサンギウム基質の増加、PAS 陽性均一物質の沈着、係蹄壁の一部 necrosis をきたしていた(Fig. 1)。また、一部には細胞性半月体の形成もみられた。糸球体 100個中の分葉核球の滲出は57個であった。間質・血管周囲には単核球や分葉核球の広汎な滲出を認めた。

c) MMC 単独投与家兎

光顕上糸球体・間質・小血管に有意の変化はみられなかった。

d) MMC と抗腎血清投与併用群

No. 1, 2 には segmental なメサンギウム細胞の増加がみられ、広汎なメサンギウム基質の増加も認められた。係蹄壁は広汎に肥厚している所見が H & E 染色でみられ、PAS 染色標本

の強拡大でみると透明部分を中央にもった2重輪郭であり、いわゆる係蹄壁2重化像を広汎に認めた(Fig. 2)。No. 3 ではメサンギウム細胞や基質の増加は認めしたが、係蹄壁の広汎な2重化像は認めなかった。糸球体 100個中の分葉核球の滲出は25個であり抗腎血清単独注射群と比較すると一般に減少していた。間質・血管周囲への炎症細胞の滲出も抗腎血清単独注射群に比べ軽度であった。

3) 電子顕微鏡的検討

a) 抗腎血清単独投与群

メサンギウム細胞増加ならびに上皮細胞足突起の癒合消失がみられた。毛細血管内には顆粒をもった細胞が出現しており、糸球体の一部では毛細血管係蹄壁が消失し、細胞成分で占められていた。

b) MMC 単独投与家兎

糸球体内皮細胞下腔の拡大がみられ、その領域には小顆粒状の物質が浮遊していた。上皮細胞足突起の癒合消失はなく、メサンギウム細胞の増生や基質の増加はみられなかった(Fig. 3)。

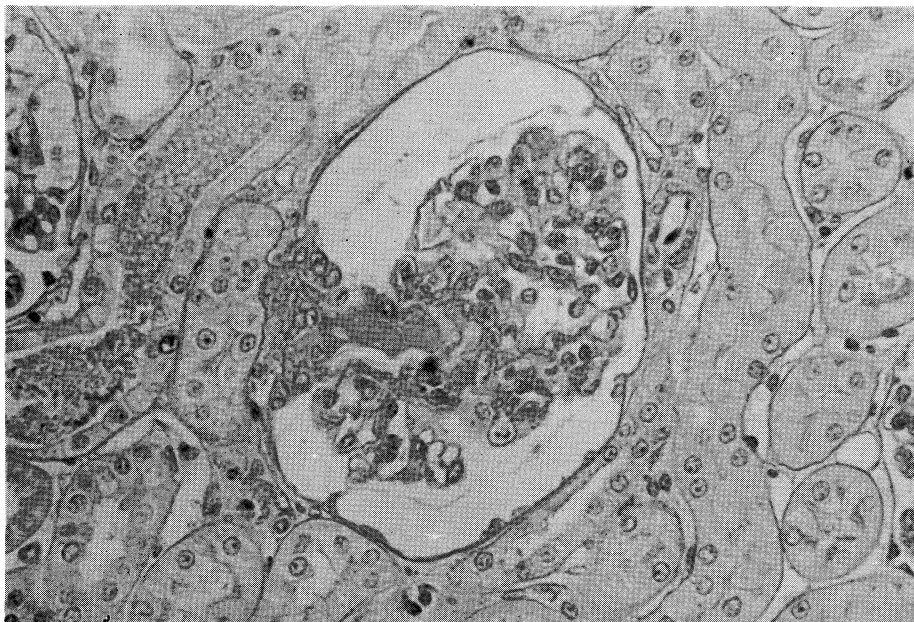


Fig. 1. Light microscopy. From the animal with antinephrotic serum injection. Intracapillary cells including PMN are increased, and the capillary lumens are narrowed or almost occluded. $\times 200$, PAS.

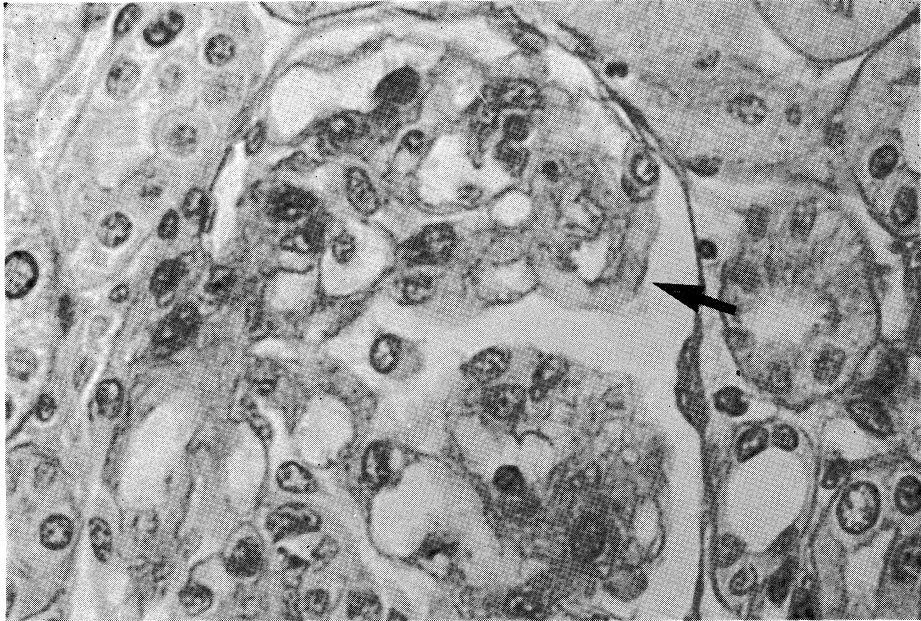


Fig. 2. Light microscopy: Glomerulus, with MMC and antinephrotic serum injection. Double track lesion of the capillary loops is extensively observed (arrow). $\times 400$, PAS.



Fig. 3. Electron microscopy. The subendothelial space is expanded with accumulation of fine granular deposits and amorphous lucent materials. $\times 18000$.

c) MMC と抗腎血清併用投与
糸球体基底膜は不規則な蛇行をしており、上皮細胞の足突起の癒合消失が一部にみられた。

基底膜と内皮細胞との間には、細胞質の侵入がみられた(**Fig. 4**)。強拡大でみるとこの細胞質の辺縁には電子密度の高い線維状成分がみら

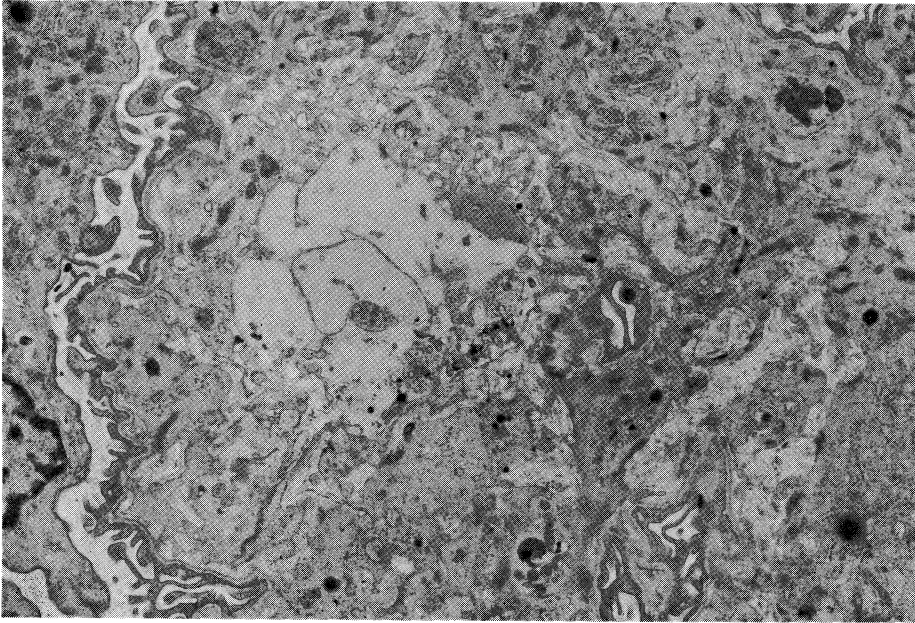


Fig. 4. Electron microscopy. Circumferential mesangial interposition. $\times 4800$.

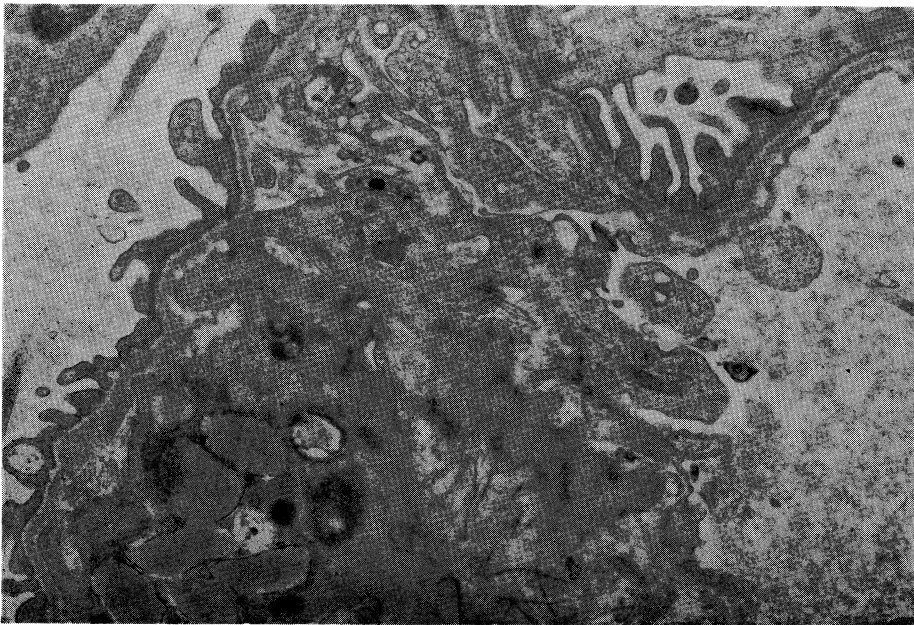


Fig. 5. Electron microscopy. Circumferential mesangial interposition. The fibrillar materials are seen in the peripheral space of the cytoplasm. $\times 10000$.

れ、この細胞質は平滑筋に類似した構造を示しており、この細胞はメサンギウム細胞であると考えた。いわゆる CMI の像であると考えた (Fig. 5)。内皮細胞は風船状に膨化していた。

4) 蛍光抗体法

生食単独投与家兎ではメサンギウム領域に FN を中等度に認めたが、糸球体壁では微弱な線状蛍光を認めるか、あるいは組織によってはほ

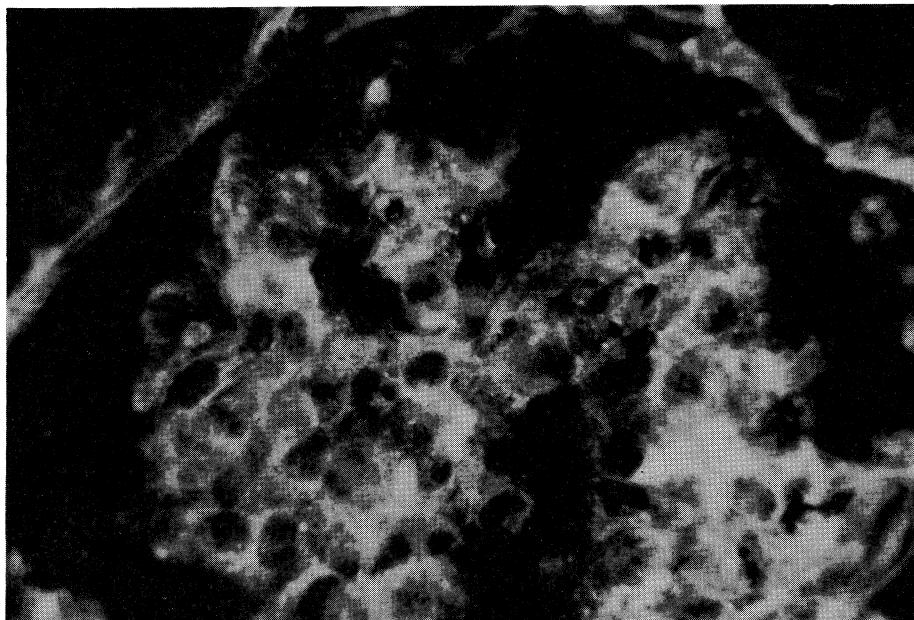


Fig. 6. Immunofluorescent study of FN. FN is seen in the mesangium area and weakly linear along the capillary walls (saline injection). $\times 400$.

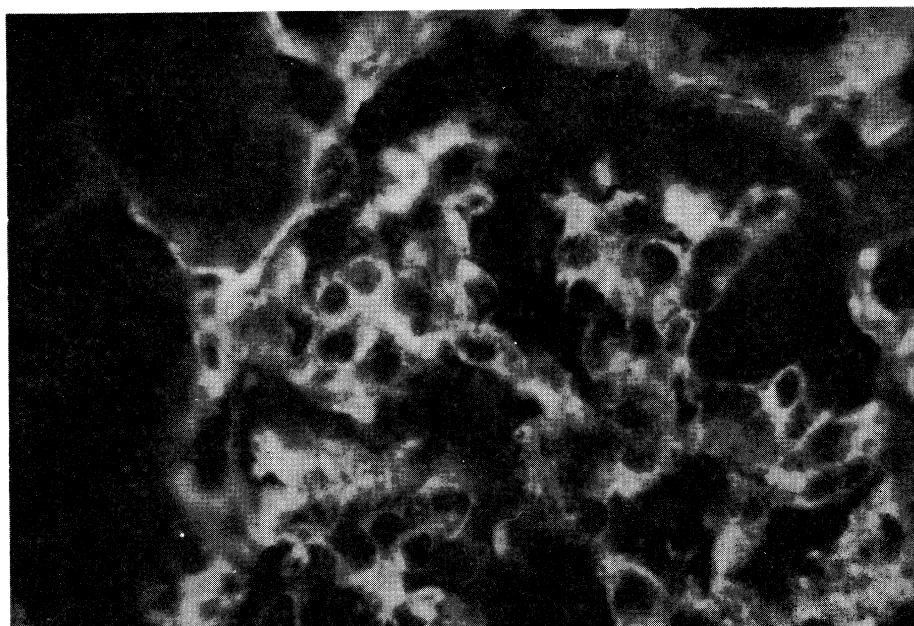


Fig. 7. Immunofluorescent study of FN. FN is seen in the mesangium area and strong linear along the capillary walls (MMC injection). $\times 400$.

とんど認め得なかった (**Fig. 6**). MMC 単独投与家兎ではメサンギウム領域の FN は生食単独投与対照家兎と同様に認められたが、ほかに係

蹄壁に強く線状に沈着していた (**Fig. 7**). 抗腎血清投与群ではメサンギウムへの増加への FN の沈着は増加していたが、係蹄壁への増加はみ

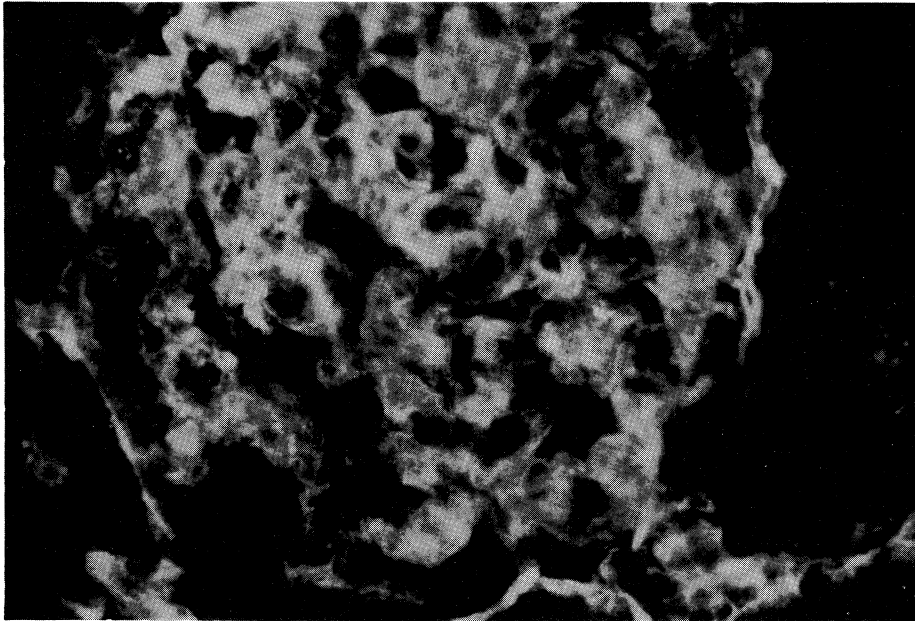


Fig. 8. Immunofluorescent study of FN. FN is seen in the mesangium and band like along the capillary walls (both MMC and antinephrotic serum injection).
×400.

られなかった。MMC と抗腎血清併用投与群では、メサンギウム領域への沈着の増加は軽度であったが、係蹄壁へは帯状に著明な増加を示した (Fig. 8)。

fibrinogen, IgG, C₃ が係蹄壁に沿って小顆粒状に沈着しているものも認めた (Table 1)。

抗腎血清を投与した家兎はすべてウサギ抗アヒル IgG の係蹄壁への線状の沈着を認めた。

Table 1. Immunofluorescent study

No.		FN (capillary)	Fib	IgG	C ₃
1	MMC+Masugi	+++	++	++	+
2	MMC+Masugi	+++	++	++	±
3	MMC+Masugi	+	±	+	±
4	Masugi	+	+	+	±
5	Masugi	+	+	+	±
6	MMC	++	+	±	+
7	Saline	±	+	±	±

考 察

種々な糸球体病変でメサンギウム細胞の増生を認めるが、その増生様式は大きく2型に分け

られ、そのうちの1つは軸部に中心性に増殖を示すもので、いろいろな慢性膜炎で認められる。他の1つはメサンギウム細胞が細胞周囲の基底膜物質を伴って係蹄壁末梢内皮下に係蹄壁全周囲性に伸展をきたす型で、このようなメサンギウム反応形式は circumferential mesangial interposition (CMI) とよばれ、MPGN (type I) では診断確立のための特徴的な変化とされている。同様の糸球体病変は他の腎障害、たとえばループス腎炎、HBV 腎症、悪性腫瘍における腎障害、sickle cell disease などでも出現するので、⁴⁾ 多彩な病因が関与していると思われるがその病変成立過程には不明な点が多い。

馬杉腎炎単独でも Kondo らの報告¹⁰⁾ では部分的に CMI の出現をみとめており、また MMC 単独でも臨床例^{11), 12)} あるいは実験的に¹³⁾ CMI を認められるがいずれも部分的にすぎない。今回の MMC と抗腎血清併用注射で明らかに広汎な CMI を対照群に比べて高頻度に認めた。このことより馬杉腎炎によるメサンギウム細胞の増生をきたす前に MMC 投与

にて、① FN の係蹄壁への増加、② 内皮下腔の拡大の2つの所見を認めており、この状態で増殖性変化が付加惹起すると CMI 形成が促進されやすいのではないかと推定される。

FN は細胞性 FN と血漿 FN の2種類が知られており、FN の機能として細胞と細胞の接着、細胞と基質との接着、細胞の移動や形態保持などの働きが明らかにされている。^{14)~16)} 正常腎糸球体における分布はメサンギウム領域に主に分布し、係蹄壁部には軽度かあるいはほとんど認めないとされている。¹⁷⁾ しかし、膜性腎症・MPGN・糖尿病性腎症^{18),19)} などにおいては FN が係蹄壁に増加し、これらの係蹄壁病変における FN の関与が推測されている。今回 MMC 単独投与にて FN の係蹄壁への増加を認め、CMI 形成時には帯状の係蹄壁への増加をみた。著者のラットを使った実験²⁰⁾ でも MMC 投与により FN が係蹄壁に増加して今回 MMC 投与により係蹄壁にみられた線状の FN の増加も MMC による糸球体係蹄内皮細胞障害に関連しておこったものと考えられる。MMC 投与に馬杉型の腎抗原を追加投与することによって FN 沈着を伴ってメサンギウム細胞質の伸展がみられたが、これは MMC 投与によって係蹄壁に増加した FN に沿って、抗腎抗体刺激、ことに抗基底膜抗体の刺激によってメサンギウム細胞が侵入してきたものと推測した。CMI が形成された係蹄壁での帯状増加は、内皮障害によって増加した FN に加えて伸展してきたメサンギウム細胞がさらに FN の増量に拍車をかけた可能性が強く示唆されるが、さらにこの FN 沈着に流血中の FN がいかほどに加わっているかは明確になし得ない。Ikeya ら⁸⁾ は MPGN 症例における係蹄壁 FN は IgG や C₃ よりも内皮側、すなわち内皮細胞の基底膜側直下に存在していることを観察しており、沈着した FN がメサンギウム伸展の足場になっていると考えており、この点で著者と同様の機序を推定している。

MMC 投与により内皮細胞が障害されることは著者もラットを使って明らかにしており、²⁰⁾ 今回の MMC 単独投与における内皮細胞下腔

の拡大も MMC のもつ細胞障害性により直接内皮細胞が障害されて内皮下腔が拡大したものと思われる。こうした内皮下腔の拡大と FN の沈着の増加した状態が、抗腎血清によって刺激されたメサンギウム細胞の末梢側伸展と密接に関連していることが推測される。つまり、内皮下腔の FN の係蹄壁への増加と同様にメサンギウム細胞の末梢への伸展増生への準備状態となっている可能性が示唆された。Zamurovic ら²¹⁾ も CMI 形成には内皮下腔の拡大の関与を推測しているが、彼は内皮下腔の拡大は免疫複合体の内皮下腔への沈着によるとしている。MMC 投与では内皮下腔への免疫複合体沈着は認められず、したがって必ずしも免疫複合体の沈着によらなくても他の機序で内皮細胞が障害されることによって基底膜から離開し、内皮下腔が拡大していることが CMI 形成に重要な因子になることが強く示唆される。

MMC と抗腎血清併用群で抗腎血清単独群に較べ糸球体への炎症細胞の滲出が軽減されたが、このこともメサンギウム反応に何らかの影響を及ぼし、CMI 形成に関与している可能性が考えられるが、^{22),23)} その詳細は今回の実験結果からは明らかになし得なかった。

結 論

1. MMC と抗腎血清を併せ注射し、糸球体係蹄壁の広汎な2重化を伴った腎炎が MMC 単独または抗腎血清単独注射に較べて高頻度に出現した。電顕にてこの2重化はメサンギウムの係蹄壁内皮下腔への伸展であることを確かめた。FN は係蹄壁に帯状に増加していた。
2. MMC 単独注射では電顕的に内皮細胞の基底膜からの離開と係蹄壁 FN の軽度線状増加を示した。
3. このことより CMI 形成には内皮細胞が基底膜から離開すること、および FN の係蹄壁への増加が関与していることが示唆された。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲いただいた川崎医科大学腎臓内科大沢源吾教授に深謝いたします。

また、同内科平野宏助教授をはじめ教員各位に感謝いたします。

本研究の一部は厚生省特定疾患「進行性腎障害」(班長大野教授)の研究費によった。

文 献

- 1) Michael, A. F., Keane, W. F., Raij, L., Verner, R. F. and Mauer, S. M.: The glomerular mesangium. *Kidney Int.* 17: 141—154, 1980
- 2) 松永 浩, 黒川 清: 糸球体における受容体と物質代謝. *日臨* 42: 21—28, 1984
- 3) Kimmelstiel, P., Osawa, G. and Beres, J.: Some glomerular changes by electron microscopy with predominant mesangial reaction. *In Proceedings Third International Congress of Nephrology Washington, 1966.* New York, Karger, 1967
- 4) Jones, D. B.: Membranoproliferative glomerulonephritis. *Arch. Pathol. Lab.* 101: 457—461, 1977
- 5) 照喜名重治, 青木延雄: Fibronectin. *日臨* 42: 223—234, 1984
- 6) Weiss, M. A., Ooi, B. S., Ooi, Y. M., Engwall, E. and Rouslahti, E.: Immunofluorescent localization of fibronectin in the human kidney. *Labo. Invest.* 41: 340—347, 1979
- 7) Suzuki, Y., Matsui, K., Oite, T., Shimizu, Y., Koda, Y. and Arakawa, M.: Localization of glomerular fibronectin in human and experimental glomerulonephritis. *Jpn. J. Nephrol.* 26: 263—273, 1984
- 8) Ikeya, Y., Nagase, M. and Honda, N.: Intraglomerular distribution of fibronectin in primary glomerular diseases. *Clin. Nephrol.* 24: 53—59, 1985
- 9) 米田昌道: 各種腎疾患におけるファイブロンネクチンの意義 (投稿中)
- 10) Kondo, Y., Shigematsu, H. and Okabayashi, A.: Cellular aspects of rabbits masugi nephritis. *Labo. Invest.* 34: 363—371, 1976
- 11) Hanna, W. T., Krauss, S., Regester, R. F. and Murphy, W. M.: Renal disease after mitomycin C therapy. *Cancer* 48: 2583—2588, 1981
- 12) Hamner, R. W., Verani, R. and Weinman, E. J.: Mitomycin-associated renal failure. *Arch. intern. Med.* 143: 803—807, 1983
- 13) Cattel, V.: Mitomycin-induced hemolytic uremic kidney. An experimental model in the rat. *Am. J. Pathol.* 131: 88—95, 1985
- 14) Yamada, K. M., 林 正男: フィブロンネクチン. *科学* 51: 762—768, 1982
- 15) 林 正男, 平野英保: フィブロンネクチンの構造と機能. *蛋, 核, 酵* 28: 169—181, 1983
- 16) 林 正男: フィブロンネクチンの物質的実体と取扱法. *最新医学* 39: 1988—1991, 1984
- 17) Scheinman, J. I., Fish, A. J., Matas, A. J. and Michael, A. J.: The immunohistopathology of glomerular antigens. *Am. J. Pathol.* 90: 71—84, 1978
- 18) Dixon, A. J., Burnd, J., Dunnill, S. and McGee, J. M.: Distribution of fibronectin in normal and diseased human kidneys. *J. clin. Pathol.* 33: 1021—1028, 1980
- 19) Linder, E., Mittinen, A. and Törnroth, T.: Fibronectin as a marker for the glomerular mesangium in immunohistology of kidney biopsies. *Labo. Invest.* 42: 70—75, 1980
- 20) 米田昌道: 糸球体障害における Fibronectin の意義に関する検討—第1報 Mitomycin C 腎障害と糸球体Fibronectin—*川崎医学会誌* 12: 100—109, 1986
- 21) Zamurovic, D. and Churg, J.: Idiopathic and secondary mesangiocapillary glomerulonephritis. *Nephron* 38: 145—153, 1984
- 22) Holdworth, S. R., Neale, I. J. and Wilson, C. B.: Abrogation of macrophage-dependent injury in experimental glomerulonephritis in the rabbit. *J. clin. Invest.* 68: 686—698, 1981
- 23) Shibata, N., Uchida, M., Itoh, N. and Shigematsu, H.: Macrophages in glomerular II, Kinetics of macrophages and the glomerular injury in accelerated masugi nephritis in X-irradiated rats. *Jpn. J. Nephrol.* 27: 1271—1279, 1985