

バイオイメージング技術を用いた腎内微小循環、血管透過性変化の解析

Analysis of Renal Microcirculation and Permeability-Change with Bio-Imaging Techniques

柏原 直樹, 桑原 篤憲, 長洲 一, 小林 伸哉, 春名 克祐, 佐藤 稔

Naoki Kashihara, Atsunori Kuwabara, Hajime Nagasu, Shinya Kobayashi, Yoshisuke Haruna and Minoru Satoh

川崎医科大学腎臓・高血圧内科学

要 旨 高血圧, 糖尿病, メタボリックシンドローム, 肥満等の生活習慣病患者において, アルブミン尿の出現が, 腎不全のみならず, 脳卒中, 虚血性心疾患などの心血管病と深く関連している. 生活習慣病における腎障害(慢性腎臓病:CKD)の発症・進展の共通基盤は, 糸球体血行動態変化(過剰濾過, 糸球体高血圧), と血管内皮機能異常である. 2-フォトンレーザー顕微鏡を用いた最新のイメージング技術を駆使することで, 生体動物において腎内微小循環動態と糸球体係蹄壁の透過性変化をリアルタイムで可視化することに成功した. さらに一酸化窒素(NO)と酸化ストレスを組織上で可視化しえた. これらの技術は, 腎臓のみならず, 他の臓器障害の基盤病態を解明する上でも大きく貢献しうるものとして期待される.

キーワード: 2-フォトンレーザー顕微鏡, アルブミン尿, グライコカリックス, 一酸化窒素

1. はじめに

腎臓病の最も忌避すべき臨床的な帰結は血液透析を要する末期腎不全への移行であると長く考えられてきた. ところが, 近年になりアルブミン尿や軽度の腎機能障害を有する患者が, 末期腎不全への移行以前の早い段階から脳卒中, 虚血性心疾患などの心血管病(Cardiovascular disease: CVD)を高率に発症し, 生命予後を悪化させていることが判明した¹⁾.

この変化の背景には腎障害の成因そのものの大きな変化が存在している. 末期腎不全の主要原因疾患は, 糖尿病性腎症, 慢性糸球体腎炎, 腎硬化症の3つである. 糖尿病性腎症と腎硬化症が増加の一途をたどっていることは事実であるが, 腎不全の原因疾患がこの3つであることは, 過去25年以上にわたって不変である. しかしながら, 軽度のアルブミン尿や腎機能障害を呈しながら, より早い段階で高率にCVDを発症するより大きな一群が存在し, 急速に増加していることが判明したのである. 慢性腎臓病(Chronic Kidney Disease: CKD)という疾患概念を新たに設定した理由がここにある. CKDの成因は, 耐糖能障害・糖尿病, 高血圧, メタボリックシンドローム, 肥満, 脂質代謝異常, 喫煙など, 生活習慣の異常と加齢であることが明らかになった. CKDは生活習慣病と加齢に起因する血管障害であると把握することも可能である.

アルブミン尿は生活習慣病を基盤としたCKDにおいて共通した初期所見であり, 現在の「微量アルブミン尿」の正常

下限値以下の超微量域から, CVD出現のリスク因子である. アルブミン尿の出現機構を理解することが, CVD合併症を防止する上で必須である²⁾.

アルブミン尿の出現部位が腎糸球体であり, 糸球体係蹄壁(毛細血管壁)における透過性変化がその原因であることは論を待たない. 係蹄壁にはアルブミン以上の分子サイズを有する分子の尿中への漏出を防止するバリアー(濾過障壁)が存在する. アルブミン尿の出現はこの濾過障壁の破綻に他ならない.

従来の組織学的研究手法を用いても係蹄壁の形態変化を解析することは可能であった. しかしながら, 機能単位としての濾過障壁の変化を生体においてダイナミックに解析することは不可能であった. 従って, アルブミン出現に直接責任を有する係蹄壁の微細構造変化を究明するには, 隔靴搔痒の感を免れ得なかった.

私どもは2光子励起方式レーザー走査型顕微鏡(two-photon laser scanning fluorescence microscope: 2-フォトンレーザー顕微鏡)を利用して生体腎において微小血流, 濾過状態をリアルタイムで可視化解析するバイオイメージング技術の開発に成功した. さらに本法と従来の研究手法を組み合わせることでアルブミン尿出現に腎糸球体内皮障害が関与することを解明し得た.

2. 濾過障壁としての糸球体係蹄壁の構造

糸球体係蹄壁は, 内皮細胞層, 基底膜, 上皮細胞層の3要素から構成されている(図1). 他の毛細血管と比較すると以下の構造上の特徴を有している. ①内皮細胞には多数の小孔(fenestrae)が存在する. この小孔径は500-1000Åと他

〒701-0192 倉敷市松島577

E-mail: kashinao@med.kawasaki-m.ac.jp

2011年8月9日受付

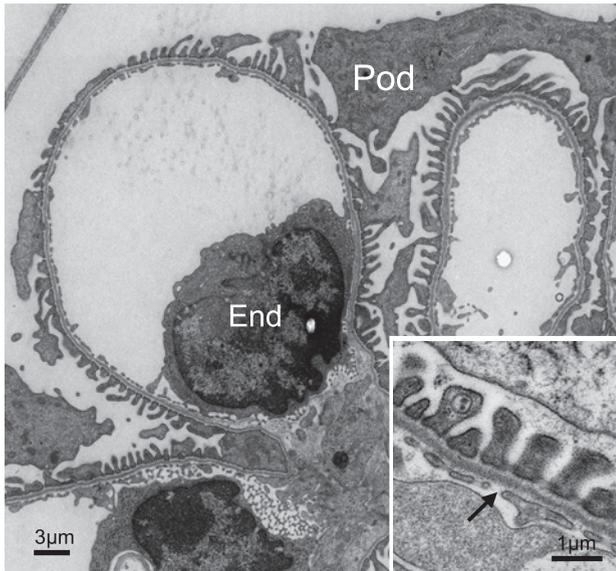


図1 糸球体糸蹄壁の構造

糸球体糸蹄壁は内皮細胞 (End)、基底膜、上皮細胞 (Pod) から構成されており、いずれもが barrier 機能に寄与していると考えられる。内皮細胞には fenestrae (矢印) が存在する。

臓器の有窓性内皮細胞 (内分泌臓器や腸管など) と比較して大きい。②厚い基底膜を有する。③毛細血管外層に外膜構造を有していない。代わりに高度に分化した上皮細胞 (足細胞) が外側から血管壁を被覆している。④通常の毛細血管に存在する pericyte に該当する細胞はメサンジウム細胞であるが、血管外層に位置せず糸球体の軸構造を形成している³⁾。

糸球体では水分子や小分子物質が大量に濾過され、一方でアルブミンなどの macromolecule は血液内に保持される。ultrafiltration membrane としての糸球体糸蹄壁には、高い選択性と高効率の濾過機能が必要とされ、上記の様な特徴的な形態をとるに至ったと考えられる。

糸球体糸蹄壁は水や小分子物質をほぼ完全に通過させるが、アルブミン (分子量約 69000) はほとんど濾過されない。糸球体での濾過障壁 (filtration barrier) はどこに存在するのであろうか。内皮細胞の fenestrae はアルブミン分子よりもはるかに大きく、当初よりバリアーは基底膜ないしは上皮細胞層に存在するものと考えられていた。

糸球体基底膜 (glomerular basement membrane: GBM) は type IV collagen による三次元的網目構造を主構造とし laminin, entactin, nidogen, heparan sulfate-proteoglycan (HS-PG) 等の分子により構成されている。1960年代から電子顕微鏡で観察可能な物質を tracer として用いて filtration barrier の存在部位が検討されている。ferritin や dextran を用いると、lamina rara interna と lamina densa の境界部にこれらの tracer の集積を認めることから、GBM に主たる barrier (main barrier) が存在すると考えられてきた。

近年、上皮細胞の slit diaphragm に nephrin をはじめとする蛋白の透過性を制御する重要な分子群が次々に発見されて

いる。詳細は本誌他項にゆずるが、上皮細胞と slit diaphragm が filtration barrier として重要な役割を果たしていることは間違いない。

糸球体における main filtration barrier の所在部位が長年論じられてきた。これまでは GBM が main barrier であるとする考えが主流であった。ところが、近年、上皮細胞及び slit diaphragm の蛋白透過性制御における役割が判明し、上皮細胞層こそが main barrier ではないかという認識もある。

糸球体濾過率を 140 l/day、血漿アルブミン濃度を 40 g/l とすると、一日 5600 g のアルブミンが糸球体に負荷される。後述するアルブミンのふるい係数 $\theta = 4 \sim 6 \times 10^{-4}$ であるから、濾過されるアルブミンは $5600 \text{ g} \times 4 \times 10^{-4} = 2.24 \text{ g}$ に過ぎない。上皮細胞層が main barrier と仮定するとこれだけ大量のアルブミンが内皮細胞層、GBM 内を通過していることになる。糸球体糸蹄壁を構成する 3 つの層、内皮細胞層、GBM、上皮細胞層が協調的に機能して filtration barrier を構成していると考えerべきではないだろうか⁴⁾。

3. 2 つの濾過障壁：size barrier と charge barrier

糸球体糸蹄壁には前述したように、透過する物質の大きさに基づく size selectivity あるいは size barrier が存在する。分子量とも相関するがより正確には溶液中における物質の有効径 (Einstein-Stokes radius: ESR) と相関する。ある物質がどの程度、糸球体で透過されるかを表す指標として、ふるい係数 θ (sieving coefficient: CE) が用いられる。ある物質のふるい係数 θ はボウマン嚢中濃度 / 血漿中濃度で示される。完全に濾過される物質は $\theta = 1$ であり、まったく濾過されない物質では $\theta = 0$ となる。また尿細管で吸収も分泌もされない物質のふるい係数 θ はその物質の fractional clearance と一致する。

古くから各種サイズの dextran を probe として糸球体の size barrier の大きさが検討されている。dextran では 48–60 Å になると、全く濾過されなくなる ($\theta = 0$)。ficoll を用いてもほぼ同様で ESR 45–52 Å 以下で濾過されなくなる。一方、球状蛋白 (globular protein) を用いると、糸球体に存在する小孔の有効半径は小さく、37 あるいは 38 Å と推測される。この様に用いる probe の種類によって異なる数値となる理由は何であろうか。

糸球体での物質の透過は、分子のサイズ (有効径や分子量) のみならず、形態や可塑性 (flexibility)、変形能 (deformability) によっても異なることが判明している。多糖類である dextran や ficoll は球状蛋白と異なり flexibility が異なることが示されている³⁾。アルブミンは分子量約 69000、有効径は約 36 Å である。アルブミンでは $\theta = 4 \sim 6 \times 10^{-4}$ と小さく、ほとんど濾過されない。従って、基底膜に物質を透過させる小孔の存在を想定すると、その小孔半径は球状蛋白については約 36 Å 以下、多糖類については 45 Å 以下と考えられる。

糸球体糸蹄壁では物質のサイズのみならず、荷電の状態によっても透過性が変化することが報告されている。これを

charge selectivity あるいは charge barrier と呼ぶ。charge barrier の存在は荷電状態の異なる dextran の透過性を比較した研究によって示された。すなわち同サイズの dextran であっても、fractional clearance は陽性荷電 dextran > 中性荷電 dextran > 陰性荷電 dextran であることが示された。GBM 及び上皮・内皮細胞膜は陰性に荷電していることが示されている。一方アルブミンを代表とする血漿蛋白の多くが陰性に荷電している。陰性荷電物質は糸球体毛細血管壁に存在する陰性荷電との間に働く斥力によって濾過されにくいと考えられた。

多糖類 dextran を用いたこの実験には、その後、いくつかの反論が提出された。dextran に陰性荷電を与えるために硫酸基を付与している (sulfated dextran) が、硫酸化 dextran は糸球体細胞に結合し処理されることが示された。さらに血漿蛋白とも結合することも報告されている。また硫酸化以外の方法で陰性荷電化された dextran と中性 dextran との間に透過性の相違がないことも報告されている。ficoll についても同様の報告があり、少なくとも大分子量の多糖類の透過性については、分子量と三次元構造の影響が荷電の影響よりも大きいと考えられる。

しかしながら、蛋白を tracer に用いた研究により charge barrier の存在が再確認された。陰性荷電 horseradish peroxidase (HRP) (等電点 isoelectric point : $pI < 4.0$) は中性荷電 HRP ($pI 7.3-7.5$) と比較して透過性が約 11% に減少し、逆に陽性荷電 HRP ($pI 8.4-9.2$) は中性荷電 HRP に比較して透過性が約 7 倍増大することが示された。native (陰性荷電) アルブミンと陽性荷電アルブミンの間にも透過性が約 3 倍異なることも報告された。同様に荷電状態によって透過性が異なることは、IgG や LDH などの蛋白においても証明されている。

糸球体には細胞外基質成分としてプロテオグリカン (proteoglycan: PG) が存在する。PG は core protein と glycosaminoglycan (GAG) 鎖から構成されている。メサンジウム基質には chondroitin sulfate-PG が存在し、GBM には heparan sulfate-PG (HS-PG) が存在することが Kanwar らにより発見された。GAG 鎖には陰性に荷電した硫酸基が多数存在するために PG 分子は強く陰性に荷電している。GBM の陰性荷電は HS-PG の存在によって付与されていることが示されている。

大量の血漿を常時効率良く濾過するためには、GBM に存在する微細な pore の目詰まりを防ぐ必要がある。Kanwar は限外濾過膜を用いた hollow fiber の製造過程で高い濾過機能を維持するために膜構造に陰性荷電を付与していることに着目した⁵⁾。この事実から着想を得て GBM に同様の陰性荷電分子が存在するのではないかと考え、GAG の発見に至ったという。陰性に荷電した GAG は GBM に親水性を付与し、GBM 内に水分子を保持させる。GBM を hydrated gel matrix とみたてたわけである。これによって GBM の微細 pore 内に血漿蛋白が目詰まり (clogging) することを防ぎ、濾過率

の低下を阻止していると推測した。HS-PG の発見者である Kanwar は、陰性荷電を担う HS-PG を anti-clogging 因子として位置づけたわけである。その後 GBM の陰性荷電を減少させると pore size の減少 (collapse) が随伴することも示されている。

4. 糸球体係蹄壁におけるプロテオグリカン

糸球体における HS-PG の含量は少なく、HS-PG 分子の同定には長時間を要した。最初に分離同定されたのが perlecan である。perlecan は当初 EHS 腫瘍細胞から発見され、糸球体にも存在することが示された。ヒト cDNA 配列から core protein の分子量は 467 kD と推定された。糸球体で発見された最初の HS-PG としてその機能、とりわけ charge selectivity や蛋白尿における役割が注目された。しかしながら、perlecan の GAG 鎖を欠損する遺伝子改変動物においても蛋白尿は認められず、perlecan は蛋白透過性の制御には重要な役割を果たしていないことが示された⁴⁾。

その後、糸球体に存在する HS-PG として agrin, type XVIII collagen が同定された。ヒト cDNA 配列から agrin, type XVIII collagen の core protein の分子量は各々、212 kD, 180 kD であることが示されている。core protein に対する抗体を用いた免疫組織学的検討では、perlecan, type XVIII collagen は主としてメサンジウム領域に存在し、agrin が主として GBM に存在することが示された。存在部位、分子量からみると、³⁵S sulfate で GAG 鎖が最も高率にラベルされる、すなわち最も多くの硫酸基を有する糸球体 HS-PG は agrin である可能性がある。

これらのプロテオグリカン類は、GBM のみならず上皮・内皮細胞の細胞膜、内皮細胞層の fenestrae 内にも存在することが判明し、後述する glycocalyx を構成する重要分子群として再認識されるに至った。

5. 2-フォトンレーザー顕微鏡を用いた解析

2-フォトンレーザー顕微鏡では、通常の蛍光顕微鏡と比して励起波長が短く光毒性が低いため、生体臓器の深部まで低侵襲性に長時間観察可能である。時間・空間分解能が高く、蛍光標識した小分子の生体内挙動が 3 次元的に動画で記録可能である⁶⁾。

従来からの形態学的解析は摘出標本を用いてなされてきた。臓器摘出、固定、組織標本作製の各過程で様々な修飾が生じ、生体内での真の姿から解離する可能性を回避することができなかった。生体内での事象を「その現場で」「ありのまま」観察、解析できることが最良であることは自明である。2-フォトンレーザー顕微鏡を用いることで、生体内でリアルタイムで生じている生命現象を低侵襲で捉えることができるようになり、この分野の研究は画期的に進歩したといえる。

本法を利用して、生体腎において微小血流、濾過状態をリアルタイムで可視化解析するイメージング技術の開発に成功した⁷⁾。2-フォトンレーザー顕微鏡で観察するには、蛍光標

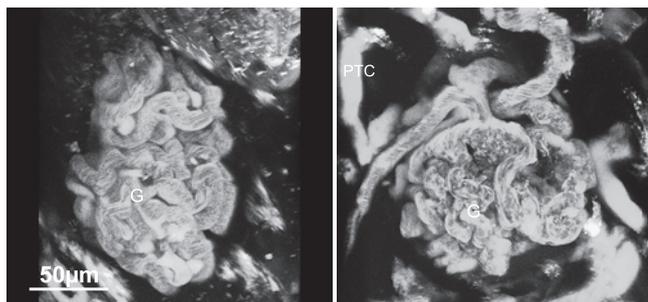


図2 ラット糸球体3次元構築

SD ラットに FITC 標識分子量 500 kD dextran を経静脈的に投与し血流を可視化し、2-フォトンレーザー顕微鏡で観察した。観察深度を連続的に変化させ、得られた画像を重積し、ラット生体糸球体(G)の3次元立体構造を再構築することが可能である。PTC：傍尿細管毛細血管

識プローブを使用することになる。fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識分子量 500 kD dextran で血流を可視化した。本法では観察深度を連続的に変化させ、得られた画像を重積し、生体糸球体の3次元立体構造を再構築することが可能である。その様にして得られた正常ラットの糸球体立体構築像を示す(図2)。また、ほぼ完全に濾過されるサイズの3 kD dextran (rhodamine 標識) で糸球体濾過、尿細管再吸収動態を観察しえた。血管腔からボウマン嚢腔内への経時的な蛍光強度の変化を測定することにより、観察下にある単一糸球体の濾過率 (single nephron glomerular filtration ratio: snGFR) を測定可能である (図3)。

6. 2-フォトンレーザー顕微鏡の病態解析への応用

本邦において血液透析や腎移植を必要とする末期腎不全患者の数は増加の一途をたどっている。その原因は糖尿病と糖尿病性腎症の増加にある。糖尿病性腎症は1998年以降、本邦の腎不全の最大原因疾患となっている。糖尿病性腎症の発症機序、とりわけ早期の指標であるアルブミン尿の発症機序を解明すべく、2-フォトンレーザー顕微鏡技術の利用を試みた。

糸球体濾過率 GFR は糸球体内圧によって規定される。輸入細動脈には、糸球体内圧を一定に維持するための機構(自動調節能)が付与されている。これによって、糸球体内圧は

ほぼ 50 mmHg に維持されている。Brenner らは micro-puncture 法を用いて腎障害モデルにおいて糸球体内圧の上昇(糸球体高血圧: glomerular hypertension)を見いだした。糸球体高血圧は同時に糸球体過剰濾過 (glomerular hyperfiltration) 状態でもある。糸球体過剰濾過を反映して糸球体サイズ自体も増大する (glomerular hypertrophy)。本来、糸球体高血圧 (= 糸球体過剰濾過) は GFR を維持しようとする適応機転である。しかしながら、糸球体高血圧が一定期間持続すると、次第に糸球体構築変化をもたらし、ついには糸球体硬化に至る⁸⁾。

自動調節能の破綻と糸球体高血圧のメカニズムは糖尿病モデルを用いて詳細に解析されている。高血糖下では近位尿細管におけるブドウ糖再吸収が亢進するが、ブドウ糖-Na 共輸送体を介するため、Na 再吸収も亢進する。結果として下流に位置する緻密斑の NaCl 濃度が低下し tubulo-glomerular feedback (TGF) 機構を介して輸入細動脈血管抵抗が減弱する。また輸入細動脈における prostaglandin 産生の亢進、膜電位依存性 Ca チャネルの機能異常が示されており、myogenic reaction の障害につながる⁴⁾。糖尿病は低レニン状態であるが、腎組織の組織 RAS 系はむしろ亢進していると考えられている。アンジオテニン II (Ang II) により輸出細動脈血管抵抗がより強く増強するために、糸球体内圧の上昇をもたらす。

インスリンは近位尿細管における Na 再吸収亢進を介して TGF を増強する。またインスリン抵抗性は輸出細動脈の拡張能を障害することも示されている。腎交感神経系の活性化は腎・糸球体血流量を減少させるが、一定レベルの交感神経活性化は輸出細動脈血管抵抗を増強し、糸球体内圧を上昇させることが報告されている。

糖尿病モデルとしてラットストレプトゾトシン誘導糖尿病 (STZ-DM) モデルを作成し2-フォトンレーザー顕微鏡を利用して腎内微小循環、糸球体壁における透過性変化の解析を試みた。

10 週目になると STZ-DM 群では糸球体肥大を認めたが、同時に糸球体間のサイズの heterogeneity が大きくなり、糖尿病における糸球体肥大は一様でないことが明らかとなった。個々の糸球体の構造にも顕著な変化が認められた。毛細

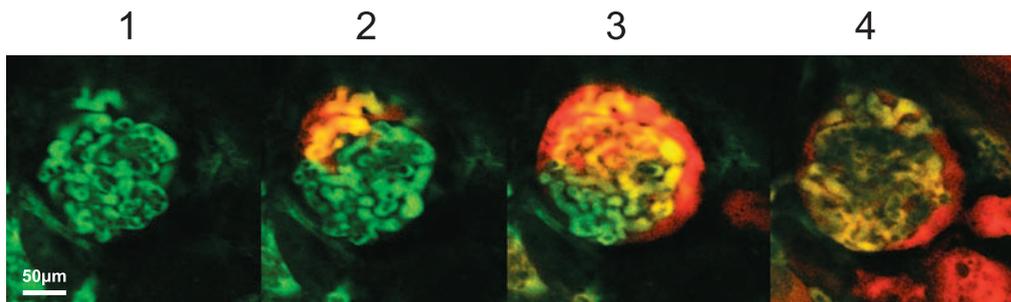


図3 ラット腎における糸球体濾過の可視化

FITC 標識分子量 500 kD dextran 糸球体血流を可視化し、その後、3 kD dextran (rhodamine 標識) で糸球体濾過を可視化観察した。血管腔からボウマン嚢腔内へ経時的に rhodamine 標識 3 kD dextran が漏出される様子を観察することができる。

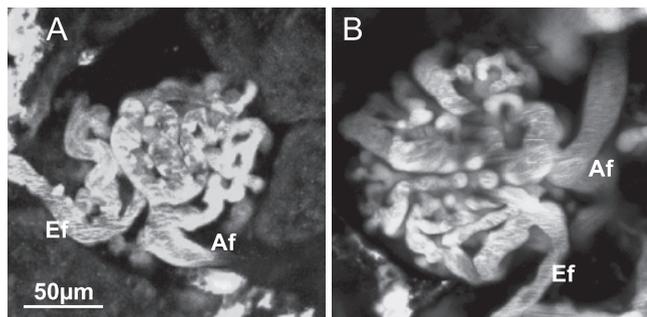


図4 ラット糖尿病モデルにおける糸球体形態変化
SD ラットに STZ を投与し糖尿病モデルを作成した。FITC 標識分子量 500 kD dextran 糸球体血流を可視化し、2-フォトンレーザー顕微鏡で観察した。対照群 (A) と比較して、5 週目の早期から糖尿病群 (B) で糸球体肥大を認める。輸入細動脈 (Af) と輸出細動脈 (Ef) の長径変化を評価することもできる。

血管内腔径の均一性が失われ、部分的な拡張部位を各所に認めるようになった。また輸入細動脈径の増大と輸出細動脈径の縮小傾向も観察することができた (図4)。これらは通常の固定した組織標本からは得られなかった知見である。

次いで、糸球体糸球体壁における大分子量物質の透過性変化を本法を用いて解析した。まず分子量 40 kD の texas red 標識 dextran と分子量 500 kD の FITC 標識 dextran を灌流し各々の透過性変化を解析した。正常ラット腎では赤色の texas red 標識 dextran の糸球体毛細血管外への漏出は確認できないが、一方、STZ-DM ではボウマン嚢腔内への著しい漏出が認められた。糖尿病では早期から毛細血管透過性が亢進し、分子量 40 kD の macromolecule の過剰濾過が出現していることが、2-フォトンレーザー顕微鏡による観察により明確に示された (図5)。

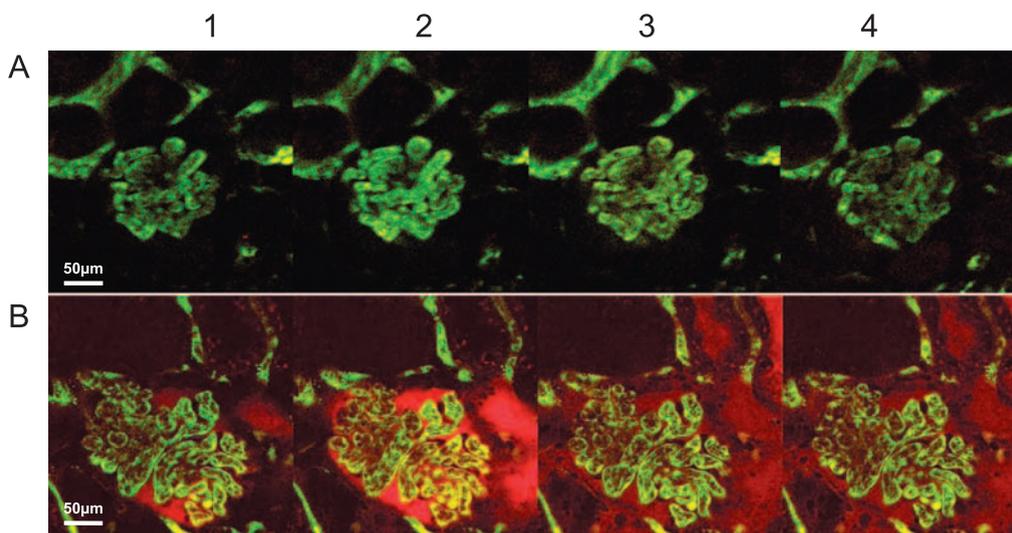


図5 ラット糖尿病モデルにおける糸球体糸球体壁の透過性変化
分子量 500 kD の FITC 標識 dextran で血流を可視化し、分子量 40 kD の texas red 標識 dextran を投与した。正常ラット腎 (A) では赤色の texas red 標識 dextran の糸球体毛細血管外への漏出は確認できないが、一方、STZ 糖尿病 (B) ではボウマン嚢腔内への著しい漏出が認められた。糖尿病では早期から毛細血管透過性が亢進し、分子量 40 kD の macromolecule の過剰濾過が出現していることが、2-フォトンレーザー顕微鏡による観察により示された。

7. 糸球体内皮細胞 (機能) 障害とアルブミン尿 : glyco-calyx の関与

糸球体内皮細胞は有窓性内皮細胞 (fenestrated endothelium) であり、アルブミン程度の macromolecule は容易に通過し、濾過障壁への寄与は少ないものと考えられていた。しかしながら、糸球体内皮細胞も濾過障壁として一定の役割を果たしていることが明らかになってきた^{9,10}。

真核細胞、原核細胞共に細胞表面には glyco-calyx と総称される layer が存在する。glyco-calyx は糖蛋白、糖脂質、プロテオグリカンなどから構成される。内細胞表層にも glyco-calyx が存在し、endothelial surface layer (ESL) とも呼称される。腎糸球体内皮細胞表面及び fenestra 内にも glyco-calyx 層が存在することが示されている。colloidal lanthanum を用いて電子顕微鏡で観察すると糸球体内皮表層は 60–200 nm の glyco-calyx 層で被覆されていることが示された。Glyco-calyx 層は lectin を用いても検出可能である。WGA lectin を用いて糸球体糸球体壁の glyco-calyx 層を可視化検出した。

肥満、耐糖能障害、高血圧を呈し、メタボリックシンドロームモデルとされる Zucker fatty rat を用い glyco-calyx 層の変化を解析した¹¹。18 週齢の同ラットでは対照群と比較して有意なアルブミン尿を認める。この時期において glyco-calyx 層の減少を認めた (図6)。さらに 2-フォトンレーザー顕微鏡を用いて in vivo で観察すると、Zucker fatty rat では肥大した糸球体から、40 kD dextran の著しい漏出が観察された。アンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (angiotensin receptor blocker: ARB) は臨床的にも強いアルブミン尿減少作用が示されている薬剤である。ARB を用いると大分子量の dextran の漏出を著明に抑制することが、生体において確認された (図7)。

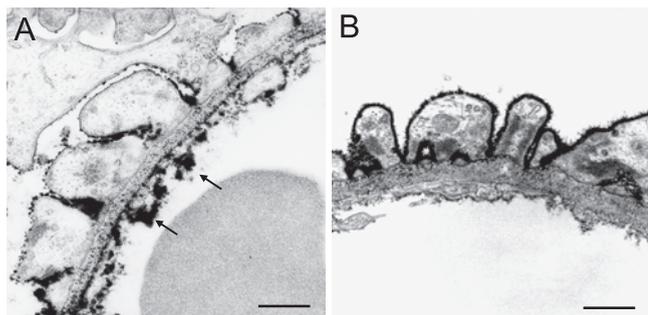


図6 ラット糸球体における Glycocalyx

ラット腎糸球体における glycocalyx の局在を colloidal lanthanum と電子顕微鏡を用いて検出した。対象群である Zucker lean rat (A) では糸球体上皮細胞表層, 基底膜さらに内皮細胞表層, fenestrae 内に glycocalyx を認める (矢印)。メタボリックシンドロームモデルである Zucker fatty rat (B) を用い glycocalyx 層の変化を解析した。18 週齢の同ラットでは対照群と比較して有意なアルブミン尿を認める。この時期において内皮側の glycocalyx 層の減少を認めた。Scale bar: 1 μm

8. 活性酸素種と一酸化窒素 (NO) の可視化

既述した一連の結果から、アルブミン尿と糸球体内皮障害との関連が示唆された。内皮細胞は多彩な機能を有しているが、一酸化窒素 (Nitric Oxide: NO) 産生はその中核をなしている。NO は血管平滑筋細胞に作用して血管の tonus を調整している。糖尿病、メタボリックシンドロームモデルにおいて糸球体内皮細胞における NO 産生異常・NO bioavailability 低下が生じており、NO 産生酵素 (endothelial NO synthetase: eNOS) の機能異常 (uncoupling) が関与することが示された。CKD では糸球体内において主として NAD (P) H oxidase 活性化に由来する活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) 産生過剰状態があり、そのために eNOS の補

酵素である BH4 が酸化・減少するためである^{12~14)}。

この様に ROS, NO の腎疾患病態形成上の関与は以前より認識されていた。しかしながら、①両者とも半減期が短命な非ペプチド性小分子であり実体検出が困難である、② ROS, NO 共に両義的存在であり、生理機能伝達を介して内皮機能維持に必須でありながら、過量産生により細胞障害因子としても働く、③両者は相互に反応し、消去、増強 (ONOO-形成等) する関係にある、以上の理由から病態形成上の正確な意義づけが困難であった。

従って、ROS, NO の病態形成上の真の意義を知るためには、①両者の実体を同時に直接検出し、②組織変化の推移とともに両者の消長を検討し、③ ROS, NO 不均衡是正による病態改善を評価する、必要がある。

私共はこれを可能にする、ROS, NO 両者を同時に組織上で検出する方法 (in situ 可視化法) を開発しえた。細胞内で活性酸素と反応し緑色蛍光を発する Dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA)、及び一酸化窒素と反応し、赤色蛍光を発する Diaminorhodamine-4M (DAR-4M) を用いる。両者及び一定濃度 Ca イオン, L-Arginine を含む灌流液をラット心腔内より微量ポンプにより投与する。摘出腎スライスを共焦点レーザー顕微鏡で異なる波長下で観察すると ROS, NO を可視化し検出する事が可能である (図8)。

本法を用いて、糖尿病、高血圧などの各種疾患モデル動物の腎内血管系における ROS, NO の産生変化を可視化検討した。共通して腎内微小血管系 (糸球体を含む) において ROS の産生亢進と NO の低下、両者の不均衡を認めた。

9. 終わりに

2-フォトンレーザー顕微鏡を用いた最新のイメージング技術を駆使することで、世界に先駆けて生体動物において疾患

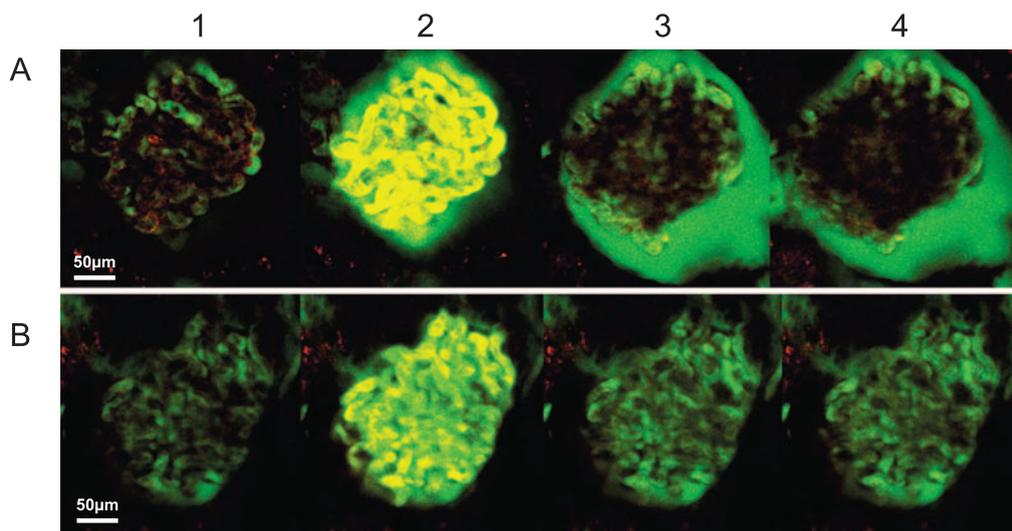


図7 薬物投与による過剰濾過改善作用

Zucker fatty rat では、40 kD の大分子量 FITC 標識 dextran が肥大した糸球体から濾過される (A)。ARB 投与によりこの大分子量物質の過剰濾過は著しく抑制される (B)。この技術を利用することで、生体腎で各種薬剤の過剰濾過改善作用を直接、リアルタイムで検証することができる。

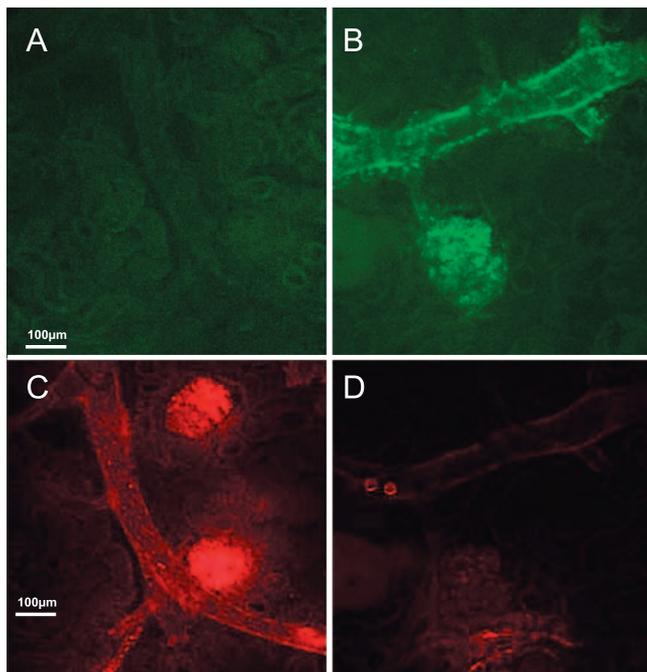


図8 腎組織における一酸化窒素 (NO) 及び活性酸素種 (ROS) の可視化

細胞内で活性酸素と反応し緑色蛍光を発するDichlorofluoresceindiacetate (DCFH-DA), 及び一酸化窒素と反応し, 赤色蛍光を発するDiaminorhodamine-4M (DAR-4M) を用い, 摘出腎スライスを共焦点レーザー顕微鏡で異なる波長下で観察するとROS, NOを可視化し検出する事が可能である. 対象群である正常血圧を呈するDahl salt resistant ratでは, 腎組織に有意な酸化ストレスを認めない(A). また腎内小血管の血管壁及び糸球体に十分な量のNOを検出する(C). 一方, 高血圧を発症したDahl salt sensitive rat1では, 腎内小血管, 糸球体において強い酸化ストレスを認める(B). これとは逆に本来NOを検出すべき, 血管壁, 糸球体においてNOの有意な存在を検出できなかった. AとC, BとDはそれぞれ同一組織である.

腎における微小循環変化, 透過性変化を可視化することに成功した. 生体における微小血行動態変化を動的に解析しうるこの技術は, 腎臓のみならず, 他の臓器障害の基盤病態を解明する上でも大きく貢献しうるものとして期待される.

謝 辞

本研究は川崎医科大学組織・電子顕微鏡センター, 医用実験センター, 医用生物センターにおいて, 技術員, 補助員の支援を受け実施した. 電子顕微鏡を用いた研究に関しては川崎医科大学・清蔭恵美講師並びにならび同解剖学教室との共同研究である.

文 献

- 1) 日本腎臓学会: エビデンスに基づくCKD診療ガイドライン 2009. 東京, 東京医学社 (2009)
- 2) 柏原直樹: 伊藤貞嘉, 柏原直樹 (編), 慢性腎臓病CKD 病態理解に基づいた予防と治療のあり方, メディカルレビュー社, 東京, 121-127 (2009)
- 3) 柏原直樹, 駒井則夫, 富田奈留也: 腎と透析, 59, 66-71 (2005)
- 4) Farquhar, M.G.: *J. Clin. Invest.*, 116, 2090-2093 (2006)
- 5) Kanwar, Y.S., Liu, Z.Z., Kashihara, N. *et al.*: *Semin Nephrol*, 11, 390-413 (1991)
- 6) 佐藤 稔, 小林伸哉, 柏原直樹: Annual Review 腎臓, 01, 50-54 (2009)
- 7) Satoh, M., Kobayashi, S., Kuwabara, A. *et al.*: *Microcirculation*, 17, 103-112 (2010)
- 8) 柏原直樹, 佐藤 稔, 駒井則夫ら: 日本臨床, 68, 390-395 (2010)
- 9) Nieuwdorp, M., Mooij, H.L., Kroon, J. *et al.*: *Diabetes*, 55, 1127-1132 (2006)
- 10) Jeansson, M. and Haraldsson, B.: *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 290, F111-116 (2006)
- 11) Kuwabara, A., Satoh, M., Tomita, N. *et al.*: *Diabetologia*, 53, 2056-2065 (2010)
- 12) Kashihara, N., Haruna, Y., Kondeti, V.K. *et al.*: *Curr Med. Chem.*, 17, 4256-4269 (2010)
- 13) Satoh, M., Fujimoto, S., Haruna, Y. *et al.*: *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 288, F1144-1152 (2005)
- 14) Nagasu, H., Satoh, M., Kuwabara, A. *et al.*: *Nephrol Dial Transplant* (2010)