

Title	ラット単離糸球体毛細血管内腔容積の測定とそれに及ぼすangiotensin II の効果
Author(s)	北村, 栄作
Citation	大阪大学, 1987, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35624
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【5】

氏名・(本籍)	北 村 栄 作
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 7788 号
学位授与の日付	昭和62年5月11日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	ラット単離糸球体毛細血管内腔容積の測定とそれに及ぼす angiotensin IIの効果
論文審査委員	(主査) 教授 鎌田 武信 (副査) 教授 熊原 雄一 教授 園田 孝夫

論文内容の要旨

[目 的]

Angiotensin II (A II) は腎糸球体毛細血管 (G C) を収縮, その濾過面積を減少させることにより糸球体濾過値 (G F R) の調節に重要な役割を果たすものと推定されている。しかし, このA IIによるG C収縮作用を定量的に評価した成績はいまだ無く, そのための指標の開発が望まれている。本研究ではまずラット単離糸球体の細胞外液spaceを³H-inulinを用いて測定, その糸球体毛細血管内腔容積 (G I C V) の指標としての妥当性を検証し, さらに糸球体inulin spaceに対するA IIの効果を観察することによりA IIのG C収縮作用の定量的解析を試みた。

[方 法]

1. 糸球体単離

体重約200 gの雄性Sprague-Dawleyラットを断頭屠殺後, 腎を摘出し外側皮質のミンチを作成した。これを径120 μmのstainless sieve, 径133 μm, 63 μmのnylon sieveの順に通し, 最後の63 μm sieve上に残った糸球体を集め, Dulbeccoリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) に懸濁した。低速遠心 (1000rpm, 1 min) による洗浄後, 以下の実験に供した。得られた単離糸球体には輸入, 輸出細動脈の付着なく, Bowman囊は除去され, 尿細管断片の混在は5%以下であった。

2. 単離糸球体³H-inulin space (G I S) の測定

糸球体懸濁液に³H-inulinを加えて37°C, 30min preincubation後, A IIを添加, 所定時間後, あらかじめoilを入れたmicrotubeに懸濁液を重層, 3200xg, 5 sec遠心することにより糸球体だけをpelletとしてoil下に沈降させた。そのpelletとoil上の上清50 μl中の放射能をliquid scintillation spectro-

metryにより測定し、次式を用いてG I S (pl/glomerulus)を計算した。

$$\frac{\text{糸球体}^3\text{H (dpm)}}{\text{上清}^3\text{H (dpm/pl)}} \times \frac{1}{1 \text{ pellet 中の糸球体数}}$$

3. 糸球体分布³H-inulinの分画に関する検討

細胞外液spaceの他にも³H-inulinの分布するcompartmentが単離糸球体に存在するか否かを検討するため、糸球体を³H-inulinと37°Cまたは4°Cでincubation(液量0.3ml)後、遠心して上清を除いた。糸球体をPBS 3mlに再懸濁、遠心、上清除去。この洗浄操作を4回施行し、洗浄後も糸球体に残存する非交換性³H-inulinの放射能を測定した。

4. 糸球体pelletの光学顕微鏡的観察

G I S測定時の遠心操作によりGCが遠心力を受けて虚脱する可能性がありうる。そこで方法2.で作成した糸球体pelletを10%formalin液で固定、alcohol脱水、PAS染色し、光学顕微鏡下に観察した。

5. 糸球体血管鑄型(GCC; glomerular capillary cast)の作製と重量測定

G I S測定以外の方法でG I C Vの推定を試みた。Fujitaらの方法によりmethacrylate resin (Mercox)を用い、体重200gのラットで腎の血管鑄型を作製。これから前記sieving法を応用してほぼ100%純度のGCCを得た。100~300個のGCCの重量を電子マイクロ天秤(感量1μg)で測定後、実体顕微鏡下にその個数を数え、密度(1.078g/cm³)と併せてGCC1個の体積、即ちG I C Vを計算した。

[成 績]

1. G I S測定時の諸条件の検討

³H-inulinとのincubation time 5~150minではG I Sに有意の変動はなかった。遠心速度を1700xg, 3200xg, 6500xg, 9200xgと変えてもG I Sに有意差はなかった(遠心時間5sec)。遠心速度を3200xgに固定して時間をかえると、2, 5, 10secの間では有意差がなかったが、30, 60secでは前3者と比較して有意に小であった。pelletあたりのG I Sは350~2800個の広範囲内でpellet中の糸球体数に正比例し(相関係数0.998)、G I S測定の定量性が示唆された。方法2.の条件で測定したG I Sのcontrol値は645±65pl/glomerulus(mean±S. D., n=154)であった。

2. 洗浄後糸球体に残存する³H-inulin

10⁴倍以上の希釈効果のある洗浄により最終上清の放射能はほぼ0であった。しかし糸球体にはG I Sの10~14%に相当する放射能が残存し、incubationの温度、時間、A II (10⁻⁷M)の有無により残存量は影響されなかった。従って、G I Sの10%程度はG I C V以外の非交換性compartmentへの取り込みを表すと考えられる。

3. 糸球体pelletの光学顕微鏡所見

強拡大(400倍)で観察したところ、糸球体毛細血管は十分開存していた。

4. GCC重量測定によるG I C Vの推定

走査型電子顕微鏡で観察したGCCは全て完全なGC係蹄構造を有し、細動脈の付着やGC以外の血管鑄型断片の混入は全く認めなかった。200gラットの両側腎より得たGCC約1000個をほぼ均等に5

分割し、方法5.に従って計算したGCC体積即ちGICVは $450 \pm 34 \text{pl}/\text{glomerulus}$ (mean \pm S.D., n=5)で、GISのcontrol値に近い値であった。

5. AIIがGISに及ぼす効果

10^{-10} , 10^{-6} MのAII添加によりGISは急速に減少し、3~5 min後減少反応は最大 (10^{-10} Mで9%, 10^{-6} Mで19%減少)に達し、以後30minまで持続した。 10^{-9} M AIIのGIS減少効果は 10^{-6} M saralasinの同時添加により完全に阻止された。 10^{-12} ~ 10^{-5} Mの種々の濃度のAII添加5 min後のGIS減少反応は明らかに用量依存性であった。最大効果は 10^{-6} Mで出現し20%減少、 $E C_{50}$ は 10^{-10} Mであった。

[総括]

1. AIIのGC収縮作用の定量的解析を目的としてラット腎糸球体を単離し、その細胞外液space (GIS)を測定した。
2. GCC重量測定によるGICVの推定値がGISのcontrol値に近似したことから、GISはGICVの適切な指標と考えられた。
3. AIIは受容体を介して速やかにそして用量依存性にGISを減少させた。
4. 従って、AIIはGICVを減少即ちGCを収縮させ、糸球体濾過面積の減少をきたしてGFR調節に関与しうると考えられる。

論文の審査結果の要旨

本研究はangiotensin IIの腎糸球体毛細血管に対する直接作用を定量的に評価することを目的として、ラット腎から輸出、輸入細動脈、ボーマン嚢を有しない糸球体を単離し、十分な基礎的検討のもとに ^3H -inulin spaceによる糸球体毛細血管内腔容積の測定法を確立、さらにこのinulin spaceを指標としてangiotensin IIの糸球体毛細血管収縮作用を初めて定量的に解析してangiotensin IIが濾過面積の減少を介して糸球体濾過値の調節に関与する可能性を示唆したものである。

本研究で開発された方法はangiotensin II以外の種々の血管作動性物質にも応用可能と考えられ、angiotensin II作用に関する新知見と共に、腎病態生理学に貢献するところ大である。従って、本論文は学位論文として十分価値あるものと評価される。