

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 8 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591568

研究課題名(和文)低真空走査型電子顕微鏡を用いた巣状糸球体硬化症の早期診断

研究課題名(英文)A diagnostic method of focal segmental glomerulosclerosis by low vacuum scanning electron microscopy

研究代表者

岡田 晋一 (OKADA, Shinichi)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：50343281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：ネフローゼ症候群(NS)症例の腎生検組織パラフィン切片を低真空走査型電子顕微鏡(LVSEM)で観察評価し以下の成果を得た。ステロイド抵抗性NSでは感受性NSより糸球体上皮細胞体の球形化変化が多く認められた。両者は異なる病因により発症している可能性がある。LVSEM観察で得られた糸球体上皮細胞体の球形化の所見は上皮細胞足突起スリット膜蛋白(ポドシン、ネフリン)の変化に関連していると考えられた。巣状分節性糸球体硬化症のコロンビア分類亜型診断においてLVSEM観察が有用である。NS症例腎生検組織のLVSEM観察により巣状分節性糸球体硬化症の早期診断が可能と考えられる。

研究成果の概要(英文)：We observed renal biopsy paraffin sections of nephrotic syndrome (NS) patients by low vacuum scanning electron microscopy (LVSEM). The round-shaped podocyte cell bodies were noted especially in steroid-resistant NS specimens compared with steroid-sensitive NS. The morphological changes of podocytes cell bodies may be related to the decreased expressions of nephrin or podocin in glomeruli. An application of a LVSEM to renal biopsy paraffin sections of NS patients was useful to classify focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) specimens into the variants of the Columbia pathological classification. we considered that the evaluation method by LVSEM is probably useful the early histological diagnosis of FSGS.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：低真空走査型電子顕微鏡 ネフローゼ症候群

1. 研究開始当初の背景

ネフローゼ症候群 (NS) の原因としての微小糸球体変化と巣状分節性糸球体硬化症とは腎組織切片での鑑別は容易ではないことがある。「硬化糸球体が腎生検で採取されていないだけの微小糸球体変化」を真の「微小糸球体変化」と鑑別することは困難である。これまで私たちは低真空走査型電子顕微鏡を用いることにより見いだされる上皮細胞の形態変化が巣状分節性糸球体硬化症を示唆することを示した。

2. 研究の目的

特に専用の検体を採取することなく簡易に迅速に観察が可能である低真空走査型電子顕微鏡観察と上皮細胞、メサンギウム細胞特異抗体による免疫染色を併用することにより巣状分節性糸球体硬化症の早期診断指針を作成することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

以下の研究は鳥取大学倫理委員会の承認を得て行った (承認番号: 1093、2107)。

(1) NS 患者腎生検組織の低真空走査型電子顕微鏡 (LVSEM) での検討

鳥取大学医学部附属病院小児科で加療している NS 患者 (ステロイド感受性: 3 例、ステロイド抵抗性: 4 例) の腎生検組織を LVSEM で観察した。具体的には以下の方法による。腎生検組織パラフィン切片を脱パラフィンの後、白金ブルー染色もしくは PAM 染色を行い、LVSEM (日立卓上顕微鏡 TM-1000、3000) で観察した。

(2) NS 患者腎生検組織免疫組織染色での検討

上記腎生検組織切片を用いて、細胞骨格に対する抗体 (α -アクチニン 4、シナプトポジン)、上皮細胞足突起スリット膜蛋白に対する抗体 (ポドシン、ネフリン、CD2AP) で酵素抗体法免疫組織染色を行った。具体的には、腎生検組織パラフィン切片を脱パラフィンの後、上記抗体を一次抗体として酵素抗体法免疫組織染色を行った。糸球体における各抗体の染色像を顕微鏡カメラで撮影後、染色強度を ImageJ ソフトウェアで定量化し、ステロイド感受性 NS とステロイド抵抗性 NS とで比較検討した。

(3) NS 患者腎生検組織 LVSEM 像のコロンビア分類、頼岡の腎糸球体上皮細胞障害度分類への適応

NS 患者腎生検組織 LVSEM 像を、巣状分節性糸球体硬化症のコロンビア分類に当てはめ検討した。また、頼岡の糸球体疾患における腎糸球体上皮細胞障害度分類 (頼岡徳在、広島大学医学雑誌 28:711, 1980) についても同様に検討した。

4. 研究成果

(1) NS 患者腎生検組織の LVSEM での検討

①ステロイド感受性 NS 腎組織切片

白金ブルー染色を施した腎生検組織では、糸球体上皮細胞が明瞭に染色され、一方、糸球体基底膜は染色されず暗色に認められた (図 1)。糸球体上皮細胞の一次、二次突起は、その形状はほぼ正常であったが、配列の乱れが一部に認められた (図 2)。

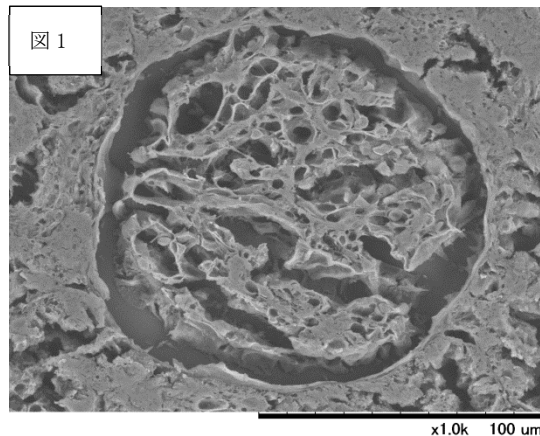


図 1: ステロイド感受性 NS 腎組織白金ブルー染色の LVSEM 像

微小糸球体変化。糸球体上皮細胞体の変化は認められない。

図 2

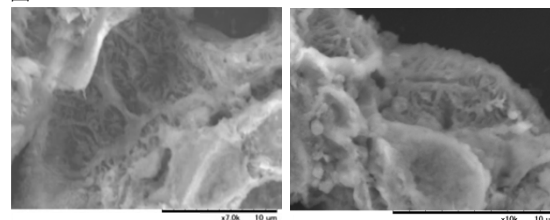


図 2: ステロイド感受性 NS 腎組織白金ブルー染色の LVSEM 像、拡大像

糸球体上皮細胞足突起の配列はほぼ正常であるが一部に配列の乱れがある。

PAM 染色を行った腎生検組織では、糸球体基底膜、メサンギウム基質が明るく染色された一方で、糸球体上皮細胞、メサンギウム細胞は染色されず暗色であった。糸球体基底膜の蛇行や厚さの不均一性がみられた (図 3)。

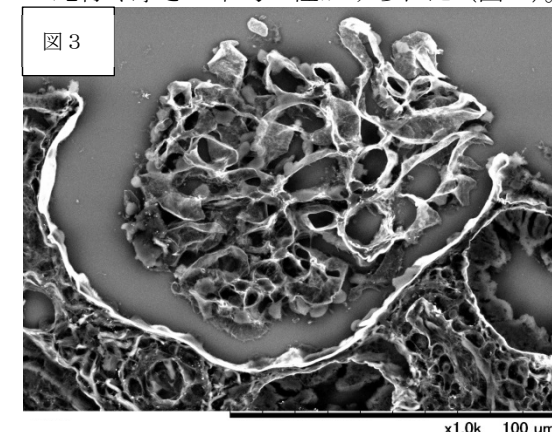


図 3

x1.0k 100 um

図3(前頁):ステロイド感受性NS腎組織PAM染色のLVSEM像

糸球体基底膜が明るく描出されている。糸球体基底膜の厚さの不均一がある。

②ステロイド抵抗性NS腎組織切片

白金ブルー染色を施した腎生検組織では、球形化した糸球体上皮細胞が多く認められた(図4)。また上皮細胞足突起の変形、配列の乱れ、伸長化が認められた(図5)

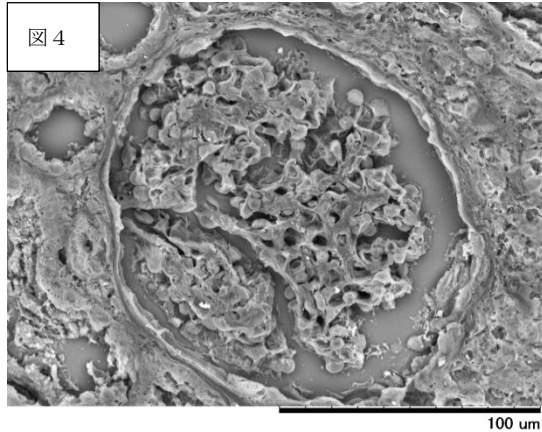


図4:ステロイド抵抗性NS腎組織白金ブルー染色のLVSEM像

糸球体上皮細胞体の球形化が多くみられる。

図5

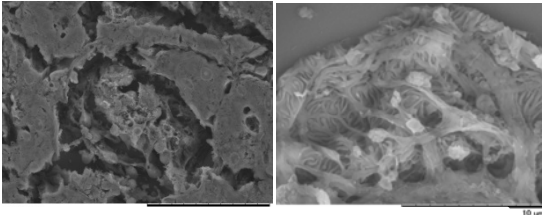


図5:ステロイド抵抗性NS腎組織白金ブルー染色のLVSEM像、拡大像

糸球体上皮細胞体の球形化がみられる。一次足突起の伸長化、二次足突起の変形がみられる。

PAM染色を行った腎生検組織では、糸球体基底膜の厚さの大小が認められた。また暗くみえる糸球体上皮細胞体の球形化もみられた(図6、7)。

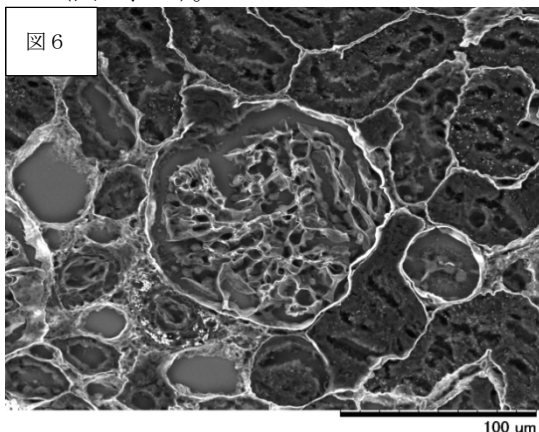


図6(前段):ステロイド抵抗性NS腎組織PAM染色のLVSEM像

糸球体基底膜の厚さに大小を認める。

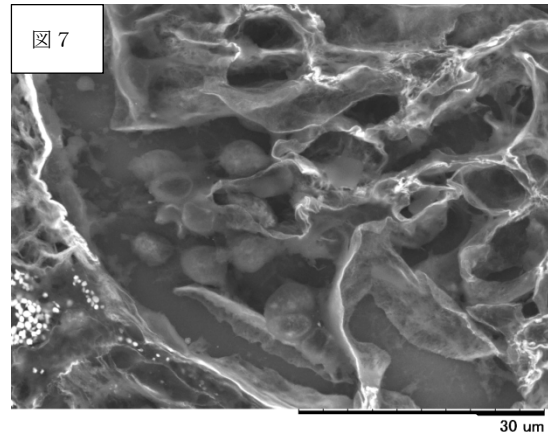


図7:ステロイド抵抗性NS腎組織PAM染色のLVSEM像、拡大像

糸球体基底膜の厚さに大小を認める。糸球体上皮細胞体の球形化を認める。

上記のステロイド感受性と抵抗性NSの比較では、糸球体上皮細胞体の球形化はステロイド抵抗性NSにおいて多く認められた。この球形化の所見は糸球体硬化がない糸球体にみられており、硬化のない一見正常である糸球体(微小変化糸球体)であっても、ステロイド抵抗性NSとステロイド感受性NSとでは差があることが示された。このことはステロイド抵抗性NSと感受性NSは、異なる要因により発症する疾患であることが示唆された。

PAM染色での検討からは、糸球体基底膜の蛇行や厚さの不均一性が、ステロイド感受性ネフローゼNSと抵抗性NSと同様に認められた。このことからLVSEMでみられた糸球体基底膜の異常所見はステロイドの感受性の有無によらないネフローゼ症候群一般的な変化である可能性が示唆された。

(2) NS患者腎生検組織免疫組織染色での検討

その結果を図8(次頁)に示す。ステロイド感受性NSと抵抗性NSとの比較で、糸球体における α -アクチニン4、シナプトポジンの染色では有意差は認めなかった。一方、上皮細胞足突起スリット膜蛋白に対する抗体(ポドシン、ネフリン、CD2AP)のうち、CD2APの発現は両群間で差は認められなかったものの、ポドシンとネフリンの染色ではステロイド抵抗性NS群が有意に低値であった。

ステロイド抵抗性NSにおいて、糸球体上皮細胞体の球形化の所見が多いということ、ポドシン、ネフリンという上皮細胞足突起スリット膜蛋白の発現が低下していることが示された。これらのことから、糸球体上皮細胞体の球形化の所見は、上皮細胞足突

起スリット膜蛋白の変化に影響されていると考えられた。

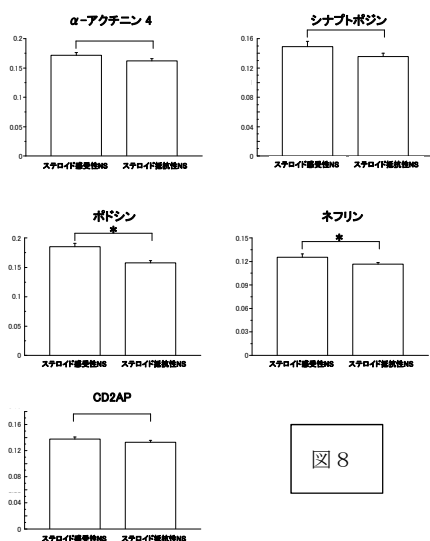


図 8：免疫組織染色結果

α-アクチニン 4、シナプトポジン、CD2AP の染色はステロイド感受性 NS とステロイド抵抗性 NS で有意差はなかった。ポドシン、ネフリンの染色はステロイド抵抗性 NS 症例が感受性より有意に低値であった。*：P<0.01

(3) NS 患者腎生検組織 LVSEM 像のコロンビア分類、頼岡の腎糸球体上皮細胞障害度分類への適応

巣状分節性糸球体硬化症のコロンビア分類の細胞型Ⅱ型を示す腎組織は、LVSEM 観察により糸球体上皮細胞体の球形化所見が多く認められた。一方、非特異型Ⅱ型では上皮細胞体の球形化の所見は少なく、上皮細胞足突起の消失、伸長化の所見が多く認められる傾向があった。

頼岡の腎糸球体上皮細胞障害度分類への LVSEM 所見のあてはめでは、ステロイド感受性 NS でみられた上皮細胞足突起の配列変化の所見は、上記分類の障害度 2 度に相当すると考えられた。一方、ステロイド抵抗性 NS の上皮細胞足突起の癒合変化は障害度 3 度に相当した。また上皮細胞の微絨毛化所見もステロイド抵抗性 NS に多く認められた。上皮細胞体の球形化の所見についての記載は頼岡の分類にはなかった。

(4) 結論

- ①ステロイド感受性ネフローゼ症候群と抵抗性ネフローゼ症候群とでは低真空走査型電子顕微鏡での所見に差があり、両者は異なる病因により発症している可能性がある。
- ②糸球体上皮細胞体の球形化の所見は上皮細胞足突起スリット膜蛋白の変化に関連していると考えられた。
- ③巣状分節性糸球体硬化症のコロンビア分類Ⅱ型診断において低真空走査型電子顕微鏡が有用であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Okada S, Inaga S 他 (他 7 名、1 番目) : A novel approach to the histological diagnosis of pediatric nephrotic syndrome by low vacuum scanning electron microscopy Biomed Res (査読あり) in press, 2014

[学会発表] (計 3 件)

1. 岡田晋一：ネフローゼ症候群の病態、診断と治療 第 30 回中国四国小児腎臓病学会、2013 年 11 月 17 日、徳島市
2. Shinichi Okada 他 (他 6 名、1 番目) : Morphological changes of podocytes in pediatric nephrotic syndrome. XXIII International Symposium on Morphological Sciences 2013/09/10, Niigata
3. 岡田晋一、稲賀すみれ他(他 6 名、1 番目)：低真空走査型電子顕微鏡を用いた小児期ネフローゼ症候群腎組織の検討 第 43 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会 2011 年 9 月 10 日、大阪府

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 晋一 (OKADA Shinichi)
鳥取大学・医学部・准教授
研究者番号：5 0 3 4 3 2 8 1

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

稲賀 すみれ (INAGA Sumire)
鳥取大学・医学部・助教
研究者番号：6 0 1 1 6 3 5 8