

## NIDDM モデルラット腎糸球体病変における共焦点レーザー顕微鏡の有用性

徐 義之, 佐々木 環, 玉井 仁, 八田 秀一, 堅村 信介,  
大澤 源吾

現在腎組織の観察は、多くは二次元的な切片を作成し行われている。我々は、インスリン非依存型糖尿病モデルとして知られている OLETF ラットを80週間飼育後、シービング法にて糸球体を単離し糖尿病性糸球体病変の観察を共焦点レーザー顕微鏡 confocal laser scanning microscopy (CLSM) を用いて行った。二次元的な観察でびまん性病変と考えられるメサンギウム基質の増加した病変は、CLSM による観察では糸球体は血管極より分葉化し一塊となっている様子が、鮮明に観察された。(平成8年10月1日採用)

### An Evaluation of Confocal Imaging for Diabetic Abnormal Glomerular Structure

Yoshiyuki JYO, Tamaki SASAKI, Hitoshi TAMAI,  
Kazuhide HATTA, Shinsuke NOMURA and Gengo OSAWA

We have investigated the isolated glomerular structural abnormalities in normal rats and diabetic rats (OLETF rats) by confocal laser scanning microscopy (CLSM). The structural abnormalities were examined by three-dimensional observation with a rhodamine phalloidin and CLSM and immunohistochemistry for fibronectin. Fibronectin was stained at mesangial areas in the normal rat glomeruli. Staining for fibronectin increased at diffuse glomerulosclerotic lesions and adhesive lesions for Bowman's capsules in the diabetic glomeruli. We could clearly observe the diabetic glomerular structural changes by three-dimensional observation with CLSM. The glomeruli with diffuse glomerulonephritic lesion created lobulation 'en bloc' with expansive mesangial areas, inclusive of fibronectin. (Accepted on October 1, 1996)

*Kawasaki Igakkaishi* 22(3): 177-182, 1996

**Key Words** ① Confocal laser scanning microscopy  
② Diabetic glomerular lesion ③ OLETF rats

## はじめに

アクチン線維を含むストレスファイバーは基底側の細胞膜に多く存在し、細胞骨格を形成している<sup>1)</sup>が、腎糸球体においてもアクチン線維は細胞構築を維持するうえで重要な蛋白の一つと考えられている<sup>2)</sup>。現在腎組織の観察は、多くは数 $\mu\text{m}$ 以下の切片で二次元的に行われており、三次元的な観察の報告は稀である。

今回我々は自然糖尿病(NIDDM)発症モデルであるOLETFラット<sup>3)</sup>を用いて糖尿病性腎症が顕著な時期に糸球体を単離し、ローダミン-ファロイジンでアクチン線維の染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡 confocal laser scanning microscopy (CLSM) を用いて糸球体細胞骨格を三次元的に観察を行った。この結果、二次元的な観察ではびまん性病変と考えられるメサンギウムの変化が立体的には血管極より末梢にむかって分葉化し、基質の増加したメサンギウムを中心に一塊となっている状態が鮮明に観察された。

## 材 料

### 実験モデルの作成

1) 自然糖尿病(NIDDM)発症モデルであるOLETFラットをメサンギウム基質の増加、基底膜の肥厚といった糖尿病性腎症による糸球体病変が顕著とされる<sup>3)</sup>80週齢まで飼育を行い、これを糖尿病性腎症群とした(大塚製薬徳島研究所より供与)。

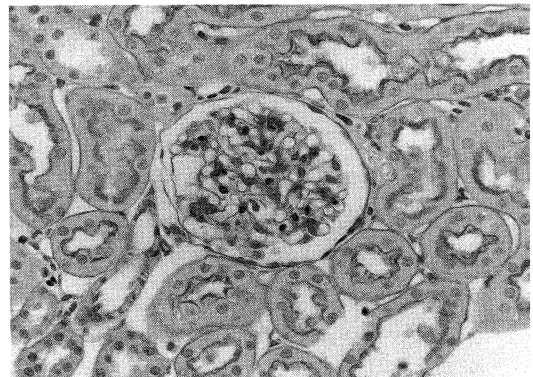
2) コントロールには正常の雄性Wistarラット180g(日本クレア,大阪)を用いた。

本実験は、川崎医科大学動物実験委員会の承認を受け(No. 93-125, 1993年),川崎医科大学の動物実験指針に基づき実施された。

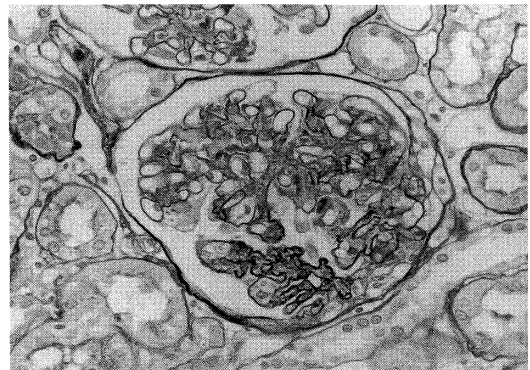
## 方 法

それぞれのラットはエーテルにより吸入麻酔

を行いペントバルビタールを腹腔内投与の後、4%パラホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝液(pH 7.4)で灌流固定の後、両側腎臓を取り出した。腎組織の一部はパラフィン切片を作成しperiodic-acid Schiff (PAS) 染色およびfibronectinに対する抗体(Rabbit Anti-Human Fibronectin, DAKO, Japan)を一次抗体に用いた免疫染色を行った。残りの腎組織は皮質部を中心に適当な大きさに切り刻み、シービング法<sup>4)</sup>にて糸球体を単離し、シランコーティングスライドガラスに塗付した。0.1% Triton X-100を含むリン酸緩衝液で10分間浸透させ、0.165 mg/dl ローダミン-ファロイジン(Wako, Life Science, Japan)を含むリン酸緩衝液で10分間染色後50%グリセリンを含むリン酸緩衝液で封入し、それぞれの群で最も代表的と考えられる糸球体を選択しCLSM (LSM・10 UV, Carl



A



B

Fig. 1. PAS staining for normal rat glomeruli (A) and OLETF rat glomeruli (B). ( $\times 400$ )

Zeiss, Germany) にて観察を行った。

免疫組織化学は、脱パラフィンを行い一次抗体は Tris 緩衝液 (0.15 M, pH 7.4) で100倍に希釈し、Hsu らの報告<sup>5)</sup>に従いピオチン化アビジン法で 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride で発色させた。陰性コントロールは、一次抗体の代わりに PBS を反応させた。

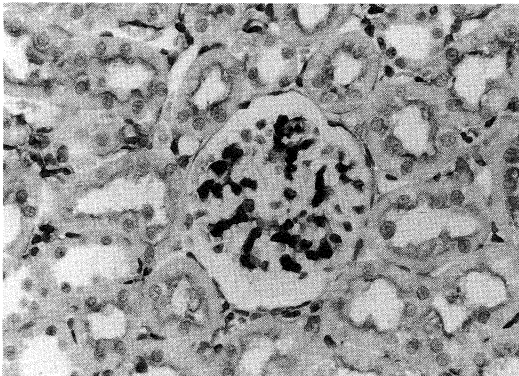
## 結 果

### 1. PAS 染色標本の観察

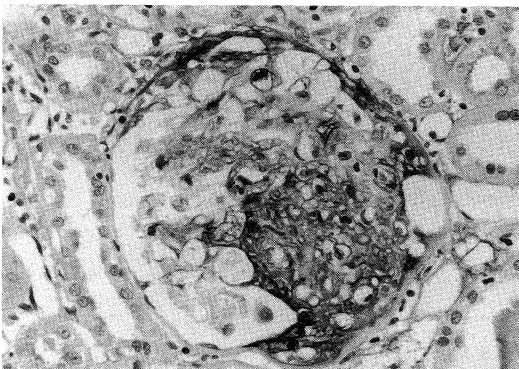
正常ラットの糸球体 (Fig. 1A) に比較し、糖尿病モデルラットの糸球体は肥大し、メサンギウム基質の増加および一部に Bowman 嚢との癒着も認められた (Fig. 1B)。

### 2. fibronectin による免疫組織化学

正常ラットの糸球体ではメサンギウム領域に



A



B

Fig. 2. Immunostaining at normal rat glomeruli (A) and OLETF rat glomeruli (B) for fibronectin. ( $\times 400$ )

弱く染色性を認めた (Fig. 2A) が、糖尿病ラットの糸球体ではメサンギウムの拡大領域および Bowman 嚢との癒着病変に染色性を認めた (Fig. 2B)。

### 3. 共焦点モードでの観察

正常コントロールラットの単離糸球体の直径は約  $60 \mu\text{m}$  で、ほぼ赤道面と考えられる位置にピントを合わせ平面画像を作成した (Fig. 3A)。糸球体表面より  $1.0 \mu\text{m}$  毎30の光学的連続切片を作成し、立体画像により遠近感をもたせるためステレオ合成画像とした (Fig. 4A)。

自然糖尿病発症ラットの直径は約  $120 \mu\text{m}$  で、ほぼ赤道面と考えられる位置にピントを合わせ平面画像を作成した (Fig. 3B)。糸球体表面より  $1.0 \mu\text{m}$  毎37枚の光学的連続切片を作成し、立体画像により遠近感をもたせるためステレオ合成画像とし (Fig. 4B)、さらにカラー表示による三次元画像を作成した (Fig. 4C)。

糖尿病ラットでは正常ラットに比較し、赤道面での平面画像の観察においてもメサンギウム基質の増加に伴い、糸球体の細胞骨格は変化し分葉傾向を示したが、立体画像作成により、基質の増加したメサンギウムは一塊となり、血管極より末梢に向かって分葉化している状態が鮮明に観察された。

## 考 察

CLSM は、資料内の焦点面からの情報を画像化できる顕微鏡である。その特徴は、①顕微鏡の分解能が良い、②焦点面の構造が鮮明である、③光学的切片として観察できる、④画像処理ができる、⑤立体観察ができる、といった点にある<sup>6)</sup>。

CLSM は、適当な厚み (数  $\mu\text{m}$  ~  $100 \mu\text{m}$ ) のある切片を立体的に観察することに適しており、この点からも糸球体の観察に有用であると考えられる。現在のところ CLSM の腎糸球体への応用は、ラット Bowman 嚢上皮におけるアクチン線維の観察が報告され<sup>7)</sup>、これによるとアクチン線維は各々の Bowman 嚢上皮細胞内にほぼ平

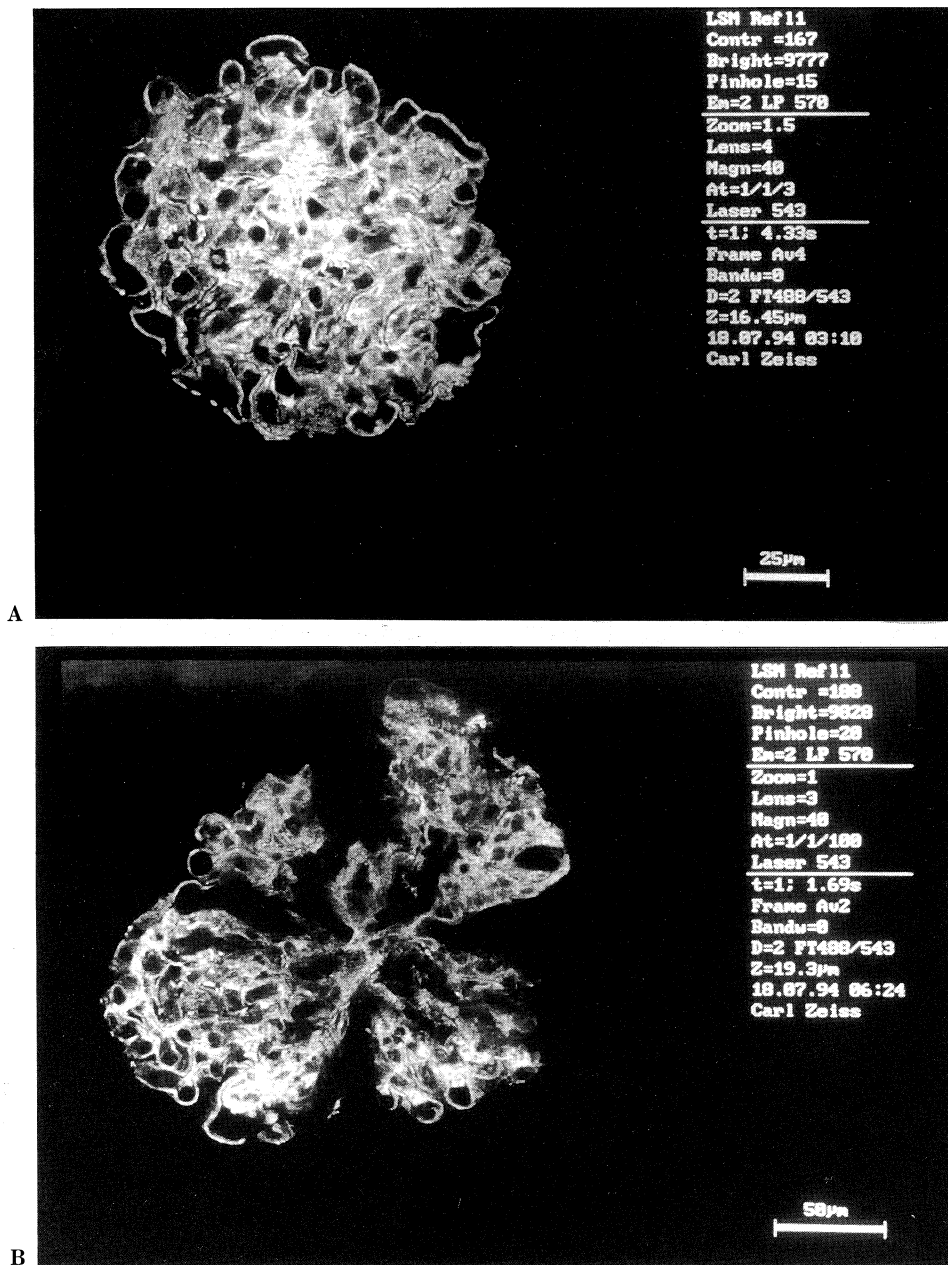


Fig. 3. Immunostaining for actin with rhodamine-phalloidin on transectional observation by confocal laser scanning microscopy.

A: normal rat glomeruli

B: OLETF rat glomeruli

行、あるいは扇形に走行していることが確認されている。

我々は今回 CLSM を用いて正常ラットおよび NIDDM モデルである OLETF ラットの腎糸球

体を単離し、立体画像として観察を行った。OLETF ラットは、糖尿病の発症ならびに経過が緩徐で腎糸球体病変についてもメサンギウム基質の増加から、ヒトの結節性病変に類似の病変

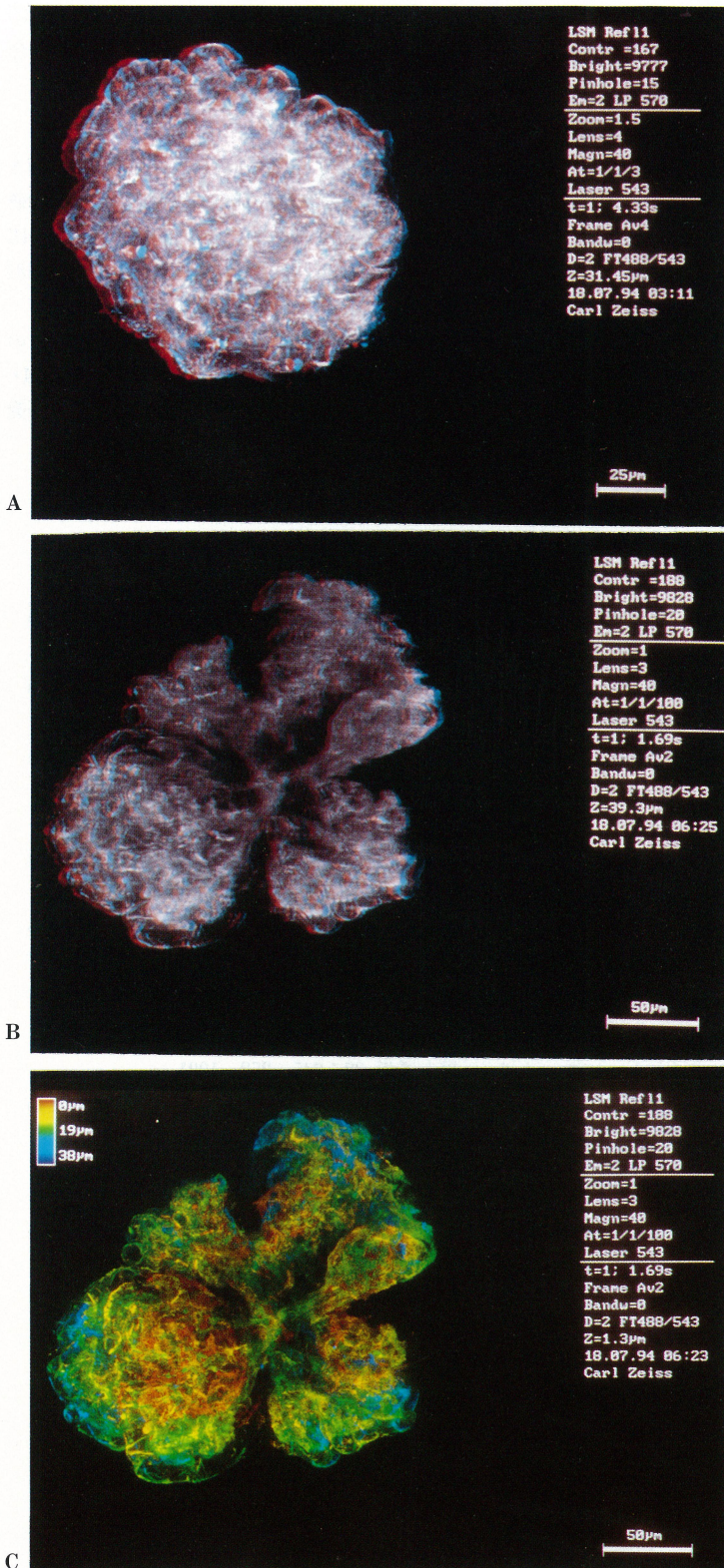


Fig. 4. Immunostaining for actin with rhodamine-phalloidin on three-dimensional observation by confocal laser scanning microscopy. A: normal rat glomeruli (stereo view) B: OLETF rat glomeruli (stereo view) C: OLETF rat glomeruli (color view)

を作り糸球体硬化へと進展する点で極めてヒトの糖尿病性腎症に近い実験モデルとして知られている<sup>3)</sup>。ヒト糖尿病性腎症におけるメサンギウムのびまん性病変では、IV型collagen・laminin・fibronectinといった細胞外基質増加が報告されており<sup>8)</sup>、OLETFラットにおいてもメサンギウムの拡大領域にfibronectinの染色性が増加していることから、ヒト糖尿病性腎症と同様にfibronectinなどの細胞外基質の増加からびまん性のメサンギウム病変が形成され、糸球体硬化が引き起こされることが容易に推察される。OLETFラットは、生後40週齢よりメサンギウム基質の増加がおこり、70週齢には結節性病変の形成が報告されている<sup>3)</sup>。今回用いた80週齢のOLETFラットは、びまん性病変と結節性病変が混在している時期であるが、赤道面での平面画像の観察においてメサンギウム基質の増加に伴う糸球体の細胞骨

格の変化は、まだ結節性病変が明らかでもなくとも光学的連続切片を作成し、ステレオ合成画像およびカラー表示による三次元画像作成により、メサンギウムは一塊となり血管極より末梢に向かって分葉化している状態が鮮明に観察された。

CLSMの最大の利点は、通常の蛍光顕微鏡では焦点外の不必要な蛍光によって不鮮明であった焦点面からの蛍光が明確に観察できる点にある。また得られた光学的連続切片を立体構築できる点も挙げられる。今回は行わなかったが、免疫組織化学による観察も蛍光標識により、目的としている蛋白の局在も1つの全載標本で任意

の断面で観察が行え、また三次元的な拡がりについても容易に観察が可能であり、CLSMは今後ますます応用されているものと思われる。

稿を終えるにあたり、OLETFラットを供与して頂きました大塚製薬徳島研究所 河野一弥先生ならびに本研究に多大なる御協力をいただきました川崎医科大学 ME学教室・徳田周子先生、Carl Zeiss社・石館文善、相沢博一両氏に厚く御礼申し上げます。

本研究は、文部省科学研究費(07671269, 0770911)の援助を受けており、また本研究に用いたCLSM(LSM・10UV)は、平成3年度私立学校施設設備費補助金(研究設備)により購入したものであり、深謝いたします。

## 文 献

- 1) Byers HR, White GE, Fujiwara K : Organization and function of stress fibers in cells in vitro and in situ. *In* Cell and Muscle Motility Vol. 5, New York, Plenum Press. 1984, pp83-137
- 2) Harper JT, Puchtler H, Meloan SN, Terry MS : Light-microscopic demonstration of myoid fibrils in renal epithelial, mesangial and interstitial cells. *J Microsc* 91 : 71-85, 1970
- 3) Kawano K, Hirashima T, Mori S, Saitoh Y, Kurosumi M, Natori T : Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain. *Diabetes* 41 : 1422-1428, 1992
- 4) Krakowar CA, Greenspon SA : Localization of nephrotoxic antigen with in the isolated renal glomerulus. *Amer Med Ass Pathol* 51 : 629-639, 1951
- 5) Hsu S-M, Rainey L, Fanger H : Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. *J Histochem Cytochem* 29 : 577-580, 1981
- 6) White JG, Amos WB, Fordham M : An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy. *J Cell Biol* 105 : 41-48, 1987
- 7) 村上 徹 : ラットポーマン囊におけるストレスファイバー. *腎と透析* 32 : 245-252, 1991
- 8) Nerlich A, Schleicher E : Immunohistochemical localization of extracellular matrix components in human diabetic glomerular lesions. *Am J Pathol* 139 : 889-899, 1991