法政大学学術機関リポジトリ
HOSEI UNIVERSITY REPOSITORY

PDF issue: 2025-08-31

ラット腎臓 糸球体におけるSOD活性染色の試み

Okabe, Masashi / 岡部, 雅史

(出版者 / Publisher)
法政大学多摩研究報告編集委員会
(雑誌名 / Journal or Publication Title)
法政大学多摩研究報告 / 法政大学多摩研究報告
(巻 / Volume)
30
(開始ページ / Start Page)
11
(終了ページ / End Page)
18
(発行年 / Year)
2015-05-30
(URL)
https://doi.org/10.15002/00012127

ラット腎臓　糸球体における SOD 活性染色の試み

岡部雅史 1)

Histochemical Activity of SOD in Kidney of Rat

Masashi OKABE

はじめに

ヒトの腎臓はソラマメ形状の臓器であり、背骨の両横、横隔膜の下に一対ある。1つあたり、握りこぶしほどの大きさ（成人の場合　約 150g）である。腎臓の生理学的役割は、(1) 尿生成を通じて、体液（細胞外液）各種成分のホメオスタシス（恒常性）を保つ、(2) タンパク質代謝物（尿素など）の排出、(3) 各種ホルモンの内分泌（活性化ビタミン D；骨組織におけるカルシウム代謝の調整、レニン；血圧上昇作用、エリスロポエチン；骨髄における赤血球の生産促進など）である。腎臓への血液の流経は、腹部大動脈から左右の腎臓に太い腎動脈が配置され、動脈血が供給される。腎臓からは腎静脈が直近の腹部大静脈へ配置され、腎臓にて老廃物が除去された血液が体流血液へと戻される。ヒトにおいては、腎臓の重量は体重の約 0.45% を占めるに過ぎないが、両腎臓合わせると体内全血流量の約 25% が還流し、毎分心拍血液吐出量（約 5 リットル）のうち、1 ～ 1.3 リットルにも達する血液を受け入れている（1 日あたり 1500 ～ 2000 リットル）。腎臓に入った動脈血は細動脈を経て、糸球体（腎小体）へと流入し、血圧によって 1 日あたり 150 ～ 200 リットルもの原尿が血液から濾し出される（腎臓へ流入した血液の 10% が原尿として濾し出されている）。糸球体は両腎臓合計すると約 200 万個存在し、1 つの糸球体は 1 日あたり 0.1 ミリリットルの原尿を血液から濾しとっている。原尿には体内に必要なアミノ酸類、無機塩類や糖質など種々の成分が含まれているため、ボーマン嚢下流域（主としてヘンレのレープ部位）にて 99% 以上が再吸収される。最終的に余分な無機塩類や代謝廃棄物などが溶け込んだ液体成分が 1 日あたり 1.5 ～ 2 リットルの尿として排泄される。

一方、腎臓は血流量あたりの酸素消費量の大きい臓器として認識されており、虚血（血流障害）などによる機能ダメージ（腎機能の低下）の出現しやすい器官として知られている。腎臓のろ過機能低下やさらには腎不全などの発病原因の多くが虚血による活性酸素の発生による酸化ダメージによるものと推測されている。特に、糸球体部位における酸化ダメージの蓄積は深刻な腎機能の低下をもたらす。糸球体は酸化ダメージによってボーマン嚢の変性・破裂や、糸球体内部の細動脈の硬化による血流の閉塞などによって容易に構成細胞のアポトーシスを引き起こすことが知られている。ヒトの場合通常両腎臓で約 200 万個の糸球体があるがアポトーシスによって変性・脱落した糸球体は再生されず、数を減ずるばかりとなる。腎臓は余剰能力の高い臓器であり、200 万個の糸球体のうち半分程度（100 万個）の糸球体を失っても通常の生活ができる程度の予備能力を持っている（片方の腎臓を失っても生活は可能である。したがって、健常人であれば片方の腎臓を移植用臓器として提供しても問題はないとされている）。しかし、全体の 75% 程度の糸球体を失ったあたりから、血液中へ

1）法政大学経済学部

の老廃物の停滞が認められ、腎不全の様相を呈し始める。健常者の場合、60 歳で約 150 万個、80 歳で約 100 万個、90 歳で約 75 万個の糸球体が腎臓に残存しているとされている。しかし、糖尿病などのために高血糖状態になると糸球体への酸化ストレスが顕著に高まることが報告され、糖尿病性腎症の主要な原因として注目されている。糖尿病性腎症は急激な糸球体の変性・脱落（数年以内に 90% 以上の糸球体を失うこともある）が起きることが特徴であり、本邦をはじめとして先進諸国において末期腎不全の病因の第 1 位を占める疾病である [(1)]。現在までのところ、糖尿病性腎症に対し、幾つかの治療法が試行されているが、いまだに末期腎不全への転機をたどる患者が多く発生しているのが現状である。糖尿病に関与する酸化ストレスばかりではなく、パラコート（農薬：除草剤）の誤飲による引き起こされる重篤な腎不全も、パラコートの代謝中に産生される活性酸素の酸化ストレスによるものとされている。その他、虚血およびその後の再灌流によって生じる腎不全も活性酸素の関与が推測されている。腎臓は、酸素消費量の大きい器官として認識されており、その酸素消費量は 0.02 ～ 0.03ml O_2 /g・min に達することが報告されている。このように酸素消費の激しい器官は酸素の過剰代謝による障害である再灌流障害の発生もよく知られた事象である。これらのダメージの発生は、ミトコンドリア内部での酸素代謝に伴う活性酸素の発生に起因するとされている。 以上のように、腎臓が酸素消費量が大きい器官であることは明らかにされている一方、細胞内部における活性酸素の発生レベルは未だ明らかでなく、またそれに対する生体防御の程度も不明である。

そこで本稿では、活性酸素に焦点をあて、特に腎臓における活性酸素の消去（不均化反応）を司る酵素である Super Oxide Dismutase（SOD）の活性分布を明らかにすることを目的とした。

実験方法

1 実験動物および試薬

実験動物として 6 週齢のウィスターラット（SPF、♂、体重 200 ～ 220g）を用いた。

組織タンパク転写用のマトリックスシート剤としてニトロセルロース（NC）膜を用いた。

緩衝液としてトリスバッファー化生理食塩水（TBS：40mM Tris - 33mM HCl - 152mM NaCl, pH 7.4）を使用した。

SOD 活性染色試薬として、活性酸素発生剤のリボフラビン（ビタミン B2）、発色剤は NBT を用いた。

2 機材

組織切片の作成にクライオスタット、活性酸素発生のために紫外線ランプ（360nm）を用いた。

画像観察用にオリンパス顕微鏡 BX50、銀塩フィルムカメラにオリンパス OM2n を用いた。

3 実験動物の処理

実験動物は国際実験動物取り扱い規約に則り、無用な苦痛を与えぬように、二酸化炭素を吸引させ、深麻酔状態にせしめた後、実験に供した。胸部（横隔膜より上部）正中線に沿って切開し、心臓の左心室より冷 TBS（0℃）を灌流させ、同時に右心房を切開し放血を行った。500ml の冷 TBS の大動脈灌流によって全身から血液の除去がなされた後、眼球を実験サンプルとして摘出した。実験動物の解剖には、ネンブタール（ペントバルビタール）、またはエーテルなどの麻酔薬が通常用いられるが、本研究においては、ドライアイスから発生した二酸化炭素を麻酔ガスとして用いた。

4 実験手順

サンプルは組織接着用グルーを用いて、切削台へ −18℃にて接着された後、クライオスタットに装着され、凍結新鮮切片が作成された（厚さ 20 ㎛：矢状切片および正中断面切片）。

作成された凍結新鮮切片はそのまま In Situ Blotting 法 [(2)] に供され、組織中の高分子がマトリックスシート（サイズ 10×20mm）上へ転写された（図 1）。

マトリックスシートとして、SOD 活性の検出にはニトロセルロース（NC）膜が用いられた。

4 − 1 SOD 活性の検出（図 2）

SOD 活性は活性酸素の除去活性として示される。

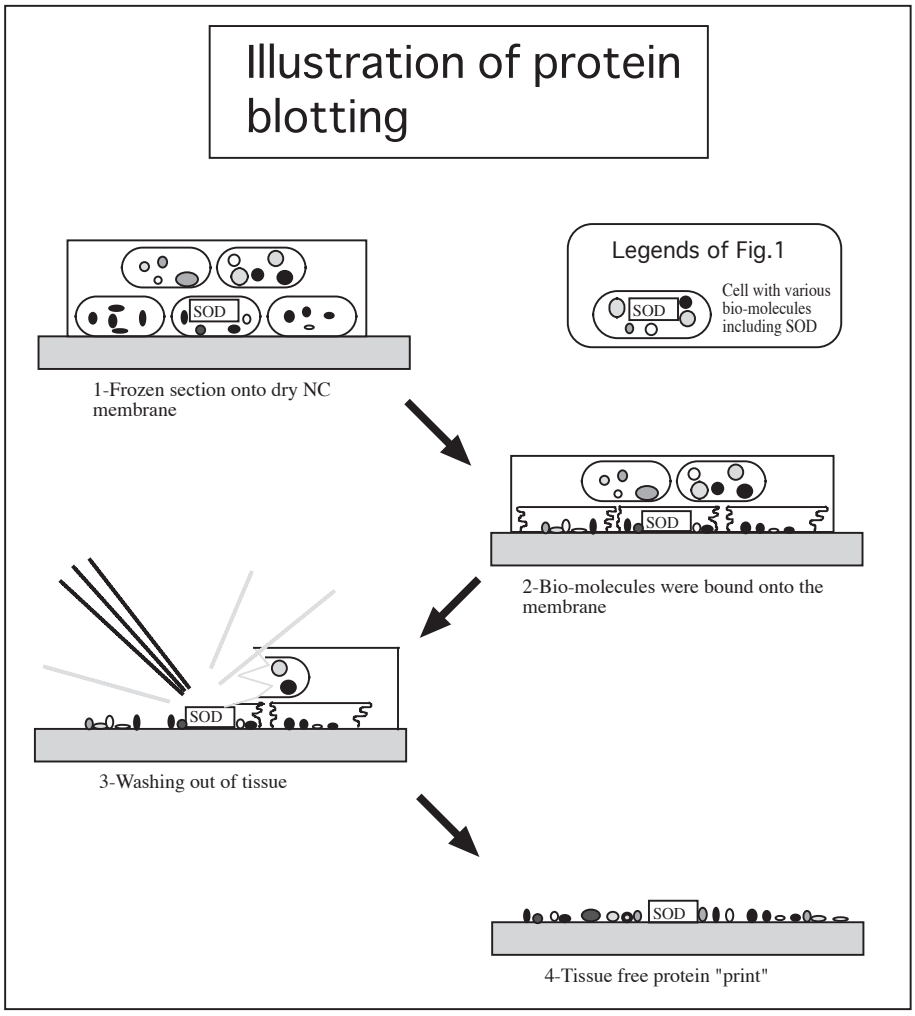


図 1

そのため、組織化学的に SOD 活性の染色を行うためには、活性酸素の発生剤と活性酸素によって発色する色素の組み合わせによって組織像を発現させる必要がある。本研究では既報 [3] の活性酸素発生剤として紫外線励起リボフラビン、発色色素として NBT を用いる方法を発色基質液の組成割合と反応条件を以下のようにわずかに改変して採用した [4]。

眼球組織中の高分子が転写されたニトロセルロース（NC）膜は、転写面を上部にして、発色基質液（15 μ M リボフラビン、2.5mM NBT　in TBS）に浸され、360nm の紫外線を照射された（シート面において 20000 ルクス、15 分、20℃）。組織像が現像された後、発色基質液は蒸留水にて洗浄され、除去された。

活性染色が現像されたニトロセルロース膜は、顕微鏡にて観察され、カメラによって銀塩フィルムに記録された。

結果

SOD 活性の分布（図 3、4、5）

SOD 活性は活性酸素を除去する酵素活性であるため、活性酸素による NBT の沈殿発色を阻止する活性として現れる。つまり、SOD 活性が発現しているところは染色されず、明度の高い部分（白色に近い部分）として示される（図 2）。

腎臓全景図において、SOD 活性は、Cortex（腎皮質）、Medulla（腎髄質）、Pelvis renalis（腎盂）の全体にわたって分布が認められた。活性の程度は、腎盂・腎髄質に強い活性が認められ、腎皮質は全体としては SOD 活性は弱かった（図 3、図 4）。全景図皮質内部には、肉眼でも確認できるほどに極めて強い活性酸素除去活性（SOD 活性）が糸球体に認められた（図 3、図 4 の皮質部　白点状の部分）。

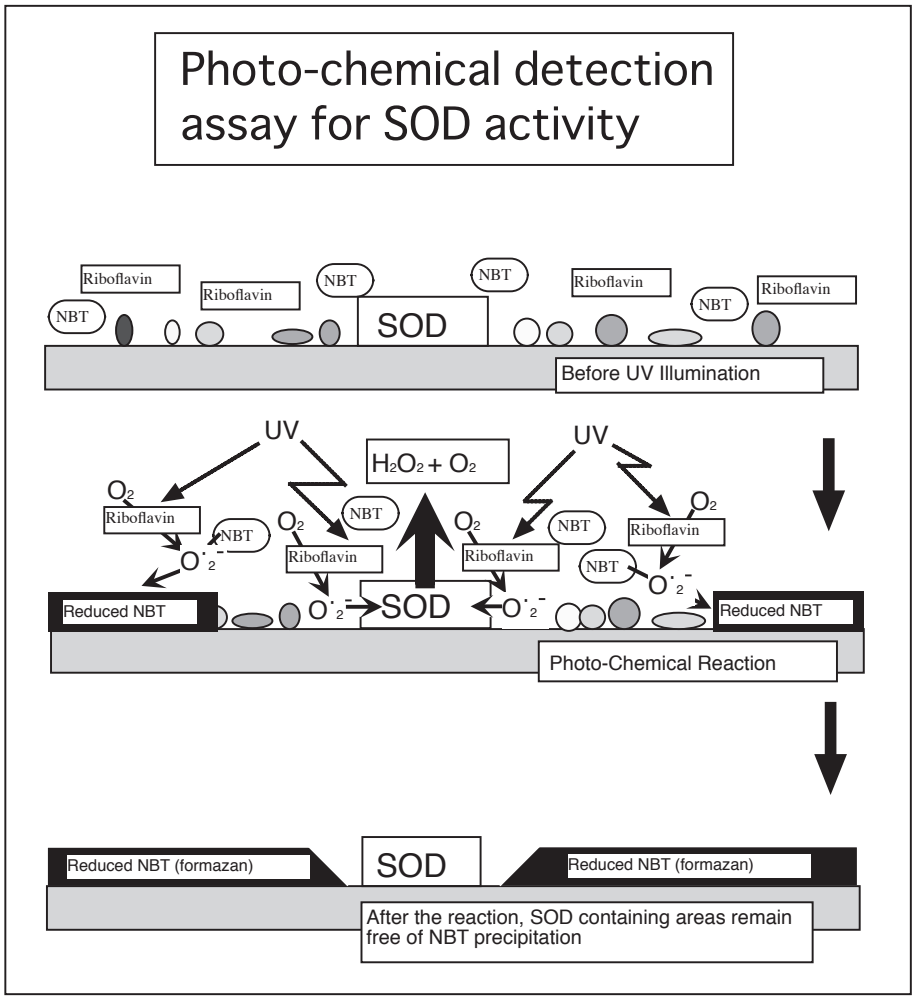


図 2

腎皮質拡大図（図 5）において、糸球体のボーマン嚢内部全体に活性が強く示されていたが、内部の微細構造（糸球体細胞、タコ足細胞）などによる活性の差異は区別できなかった。一方､糸球体付属細胞(極枕、メサンギウム細胞）には活性は示されなかった。

さらに SOD 活性がほとんど検出されなかった部位は近位尿細管～ヘンレのループに当たる部位（腎皮質内層、髄質との境界部分）であった。この部位には糸球体がほとんど観察されないことから、皮質における SOD 活性の検出はそのほとんどが糸球体に起因していることが考えられた。

腎臓髄質（遠位尿細管～集合管）および腎盂部分は比較的強い活性が認められた。特に腎盂部位には強い活性が認められたが、顕微鏡的には細胞構造が認められず、粘液、もしくは腎内部の残存尿による SOD 様活性を誤検出してしまったアーティファクトな結果の可能性も除去しきれない。

図 3、図 4 における黒いスジ状のものは、サンプルを観察中についてしまったガラスの亀裂であり、SOD 活性の表示とは関連性はない。

考察

腎臓は、酸素消費量が極めて激しい器官であり、酸素呼吸の結果、活性酸素の発生量が大きい事が推測され、それが腎機能の低下をもたらす要因であろうと推測できる。一方で酸素供給量を維持するために、腎皮質内に細密血管網を配置していることが明らかとなっており、多くの研究者によって研究がなされている。

今回の結果から、糸球体に極めて強い SOD 活性が認められ、若齢ラットにおいては糸球体は活性酸素

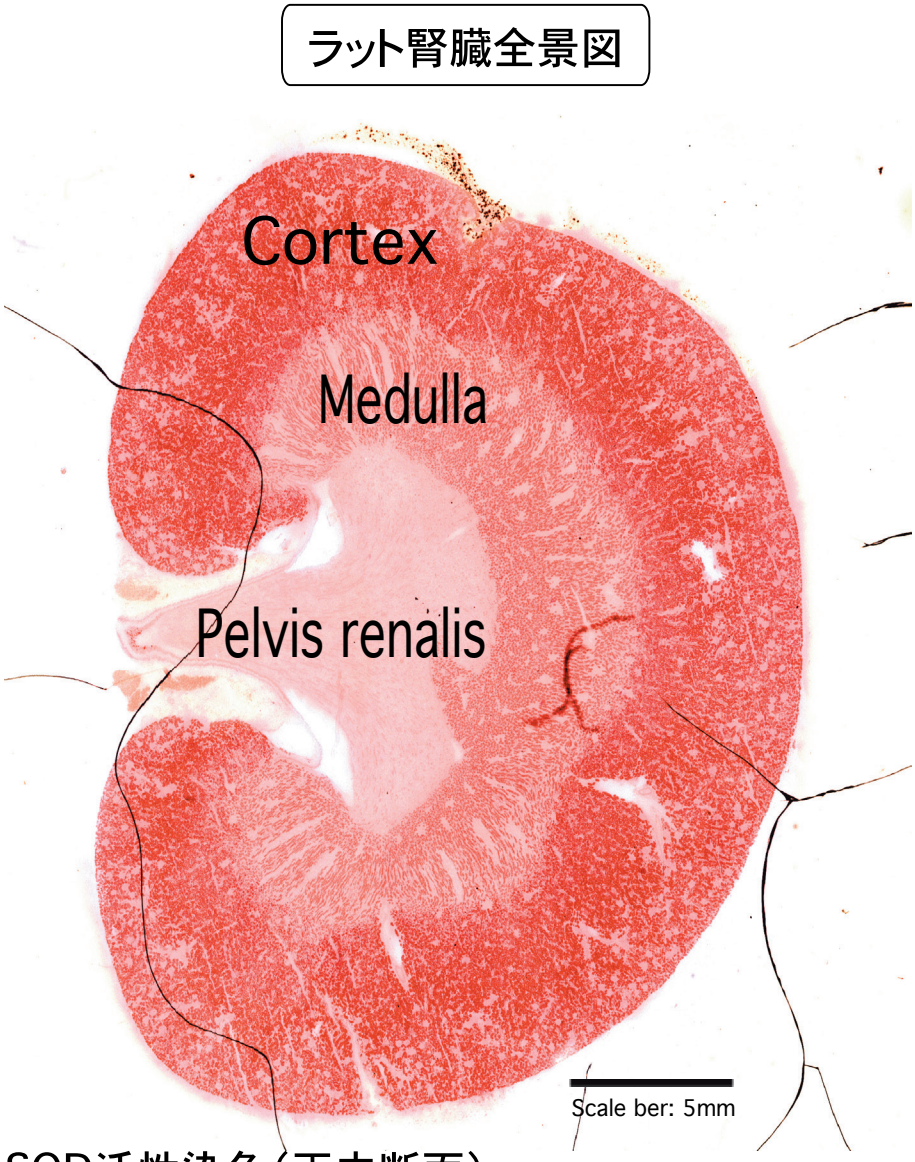


図３

に対してある程度の抵抗性を持っていることが実験的に示唆された。一方において糸球体は種々の因子（糖尿病・虚血・有毒物質代謝等）によって発生する活性酸素によってダメージを受け、容易に腎不全状態になることが人においてもよく知られている。糸球体に SOD 活性が蓋然的に備わっていることは、腎小体においては、生理的条件下においても、活性酸素にさらされやすい部位であり、それに対する生体防御の一環として理解できるかもしれない。腎臓は自己の組織からレニンおよびエリスロポエチンという生理活性物質を内分泌し、全身の血管の緊張を強力に支配することによって血圧を調整している。腎臓自身の内部血流量についてはメサンギウム細胞が一酸化窒素合成酵素（NOS）を発現し、糸球体の弛緩と緊張をコントロールし、流入細動脈、流出細静脈の血流調整をおこなっている可能性が考えられる[5]。腎臓内部における NOS 活性（NADPH デアホレース活性）[6] の組織染色結果が待たれるところである。

NOS によって産生された NO は極めて分子量が小さく（分子量 30）、酸素分子の吸収と同様に、特にレセプターなどの機能タンパクが細胞表面になくとも、分子の拡散によって近隣の血管平滑筋細胞の細胞膜を通過し細胞に取り込まれ、血管の拡張作用が現れる。NO は、一方において極めて反応性に富む分子種

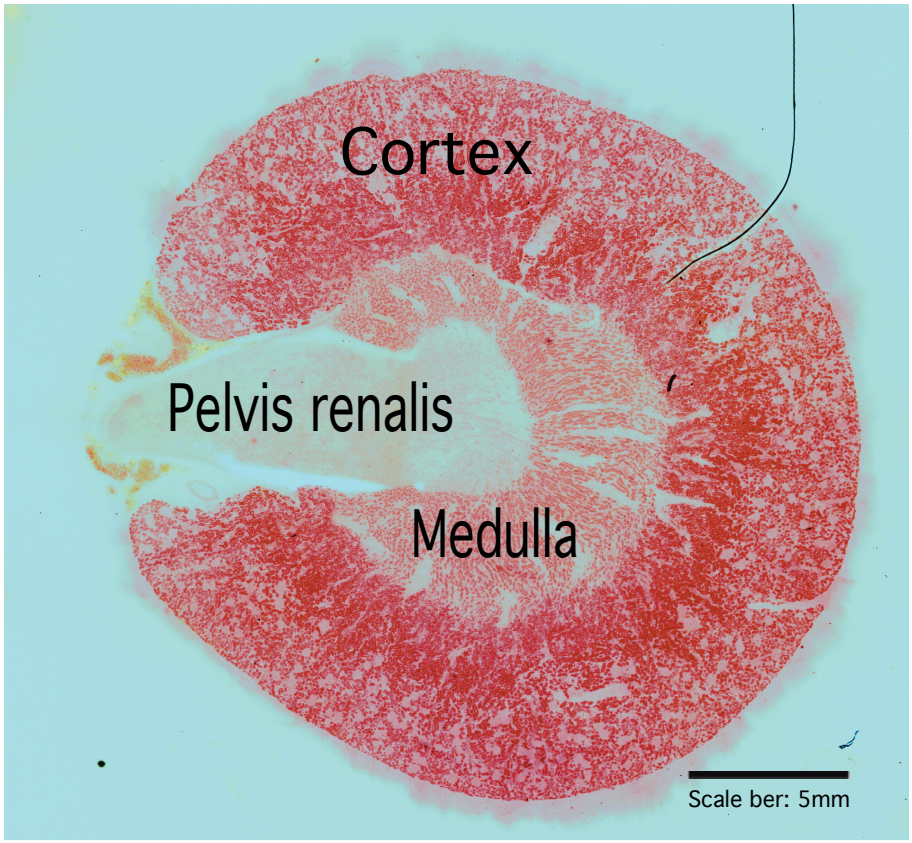


図 4

であり、組織内で生じた活性酸素分子とも容易に反応し、パーオキシナイトライト（ONOO ラジカル）を形成し、細胞内のタンパク質や核酸を酸化し、酸化ストレスの発生を促すことになる[7]。

つまり、NO が、本来の有益な作用（血管拡張作用）を示すか、有害な作用（生体高分子の酸化作用）を示すか？　作用の分かれ道は NO 産生現場の活性酸素ラジカルの発生程度に影響されうる（図 6）。

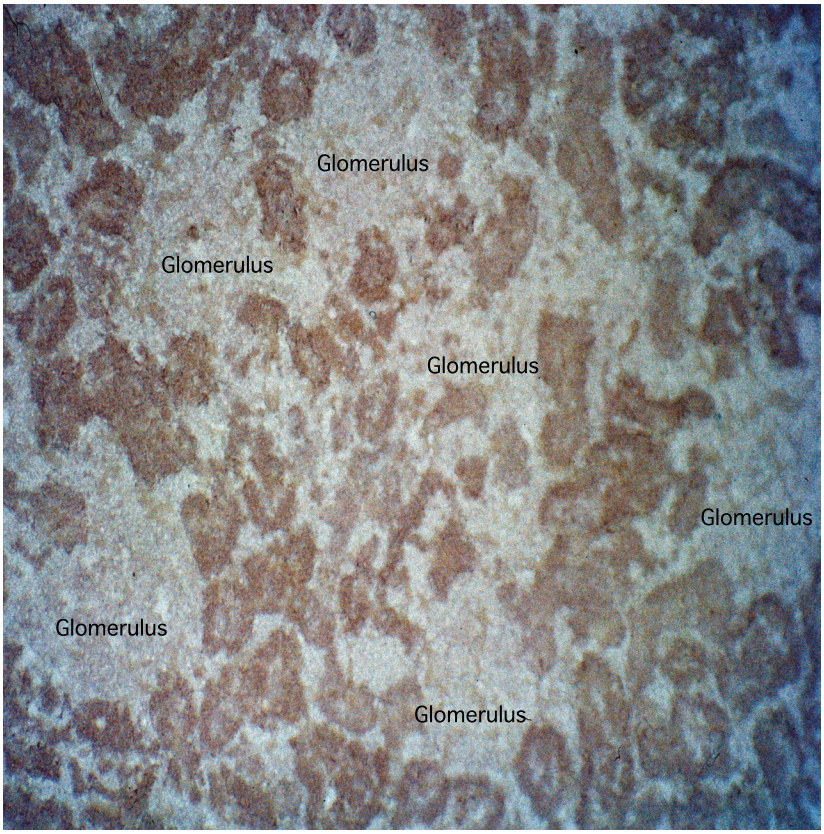
今回の研究の結果は、直接、組織中の活性酸素の濃度や、NO の濃度を測定したものではない。しかし、腎臓組織内の SOD 活性の分布を示し得た点では、画期的な結果であり、若齢ラット腎臓内の組織酸化環境に以下のような大きな知見を与えることができた。

糸球体内部の酸化環境は、SOD 活性が強く、活性酸素ラジカルの発生レベルが低く保たれている可能性が示された。この可能性から、メサンギウム細胞などにおいても一酸化窒素が存在する場合においても、NO ラジカル種の産生は限定的になり得ると考えられた。

ただし、今回の結果は 6 週齢の若いラットの腎組織によるものであり、加齢状態のラット（通常ではラットの寿命は 24 ～ 36 ヶ月ほどである）たとえば、24 ヶ月齢あたりのサンプルにて同様の調査を行い、ヒトの加齢状態における腎臓の老化を SOD 活性、NOS 活性の変化で再現できるかどうかを至急行うことが将来の課題として残されている。

本研究は 2013 年 9 月～ 2014 年 8 月の在外研究中に行った研究の一部をまとめたものである。

腎皮質拡大図



SOD活性染色（正中断面）

図５

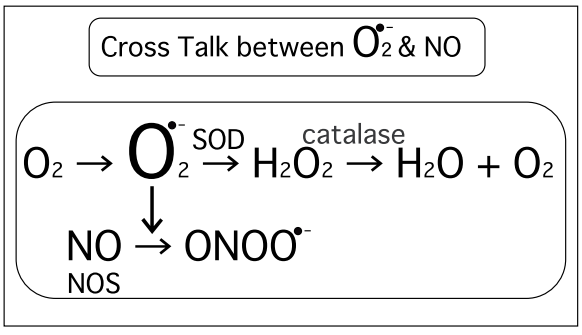


図６

引用文献

（1）藤田（2011）：糖尿病性腎症に対する抗酸化防御機構の解明 . Akita J Med. 38:97

（2）Okabe M, Nyakas C, Buwalda B, Luiten PG（1993）: In Situ Blotting: A novel method for direct transfer of native proteins from sectioned tissue to blotting membrane: Procedure and some applications. J Histochem Cytochem. 41:927

（3）Beauchamp C, Fridvich I.（1971）: Superoxide Dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Anal. Biochem.44:276

（4）Okabe M, Saito S, Saito T, Ito K, Kimura S, Niioka T, Kurasaki M（1998）: Histochemical Localization of Superoxide Dismutase Activity in Rat Brain. Free Rad. Biol & Med. 24:1470

（5）Bian K, Doursout MF, Murad F（2008）: Vascular system: role of nitric oxide in cardiovascular diseases. J Clin Hypertens.（Greenwich）10:304

（6）Vincent SR, Kimura H（1992）Histochemical Mapping of Nitric Oxide Synthase in the Rat Brain. Neuroscience 46:755

（7）Olanow CW（1993）:A radical hypothesis for neurodegeneration. Trends Neurosci. 16:439