

氏名	ふかだみか 深田美香
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲第541号
学位授与年月日	平成18年 3月10日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Systemic administration of lipopolysaccharide upregulates angiotensin II expression in rat renal tubules: Immunohistochemical and ELISA studies (LPS 全身投与はラット腎尿細管のアンギオテンシン II 発現を増強させる: 免疫組織化学および ELISA による検討)
学位論文審査委員	(主査) 宮川 征男 (副査) 大浜 栄作 渡辺 達生

### 学位論文の内容の要旨

アンギオテンシンII(AII)は、内毒素血症時の腎障害に関与する。一方AIIは、尿細管や間質の障害、及び線維化を引き起こす原因物質の一つである。したがって、尿細管あるいは尿細管間質に存在するAIIが、内毒素血症下で起こる腎障害に深く関与していると考えられる。しかし、内毒素血症動物の腎臓(特に尿細管)でAIIが発現することを示す直接的(組織学的)証拠は報告されていない。これまで抗AII抗体を用いた多くの免疫組織化学的研究がなされてきたが、正常ラット腎臓で検出されるAIIは動脈壁あるいは傍糸球体細胞に局在すると報告されている。

本研究では、免疫組織化学とELISA法により、内毒素血症状態のラット腎臓にAIIが発現するか否かを検討した。さらに、内毒素(lipopolysaccharide,LPS)による様々な反応に関与していることが示されているプロスタグランジン(PG)のAII発現における役割についてPG合成阻害薬を用いて検討した。もし、PG合成阻害薬がLPSによるAII発現を抑制するならば、内毒素血症時の腎障害の治療薬としての有用性が示唆されるからである。

#### 方法

ウィスターラット(オス、体重:250-300g)を使用した。LPSはサルモネラ属内毒素(cat. no. L 6386; Sigma, St. Louis, MO, USA)を使用した。日内変動の影響を最小にするために、LPSは11:00~12:00に投与した。ラットを以下の3群に分けた。

実験1:LPS(1,000  $\mu$ g/kg)あるいは生理食塩水を腹腔内(i.p.)に投与し、1時間後あるいは3時間後に腎臓を摘出。実験2:LPS(0.1, 10あるいは1,000  $\mu$ g/kg)あるいは生理食塩水(1ml/kg)を腹腔内投

与し、3 時間後に腎臓を摘出。実験 3: インドメタシン(20mg/kg)をLPS(1,000  $\mu$ g/kg i.p.)投与の 15 分前に皮下に投与し、LPS 投与 3 時間後に腎臓を摘出。

免疫組織化学は凍結保存した腎臓から作製した 10  $\mu$ m の切片を用いて行った。一次抗体はウサギ抗 AII 抗体を、二次抗体はビオチン化ヤギ抗ウサギ IgG を用いた。3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride を用いて発色させたのち、ヘマトキシリンの対比染色を行った。

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)は、凍結腎臓を粉末にした後、ELISA kit を使用して、ホモジネート上清中の AII 濃度を測定した。蛋白濃度は Bio-Rad protein assay kit で測定し、組織 AII 濃度は蛋白 1mg 当りの濃度で表した。

## 結果

生理食塩水投与ラット腎臓ではほとんど免疫反応は認められなかった。LPS(1,000  $\mu$ g/kg, i.p.)投与ラットの腎尿細管では、投与後 1 時間では AII 免疫反応は僅かであったが、投与後 3 時間では顕著な増強が認められた。ELISA による腎の AII 濃度は、LPS 投与後 1 時間では生理食塩水投与群との間に差は認められなかったが、投与後 3 時間では著しく増加した。

LPS(0.1, 10 あるいは 1,000  $\mu$ g/kg)の投与 3 時間後の尿細管 AII 免疫反応は LPS 投与量に依存して増強した。ELISA では、LPS 10  $\mu$ g/kg あるいは 1,000  $\mu$ g/kg 投与群の腎 AII 濃度は生理食塩水投与群に比し有意に増加し、LPS 投与量に依存性であった。

LPS(1,000  $\mu$ g/kg)腹腔内投与 15 分前にインドメタシン(20mg/kg)を皮下投与しても、AII 免疫反応に変動は観察されなかった。ELISA でも同様の結果が得られた。また、インドメタシン単独投与でも AII 発現に影響は認められなかった。

## 考察

内毒素血症時の腎損傷には、AII が重要な役割を演じていると考えられる。今回の実験で明らかにされた LPS による腎尿細管細胞の AII 発現増強は、腎機能不全の原因に関与している可能性が高い。一方、今回の結果は、PG が LPS による AII 発現増強に関与していないことを示している。この事実は、PG 合成阻害薬を投与しても、内毒素血症時の AII による腎損傷は改善されないことを示唆している。

## 結論

ラットに LPS を全身投与すると、PG に依存しないメカニズムによって、用量および時間依存性に尿細管の AII 発現が増強される。

## 審査結果の要旨

本研究は、免疫組織化学と ELISA 法により、内毒素血症状態のラット腎臓に AII が発現するか否か、さらに、LPS による AII 発現に及ぼす PG 合成阻害薬インドメタシンの効果を検討したものである。その結果、LPS を全身投与すると、PG に依存しないメカニズムによって、尿細管で AII 発現が用量および

時間依存性に増強することが明らかになった。本論文の内容は、内毒素血症時のラット尿細管で、腎障害を起こす原因物質の一つである AII が発現すること、さらには PG 合成阻害薬を投与しても、内毒素血症時の AII による腎損傷は改善されないことを示唆しており、明らかに学術水準を高めたものと認める。