

酵素処理によるラット腎糸球体基底膜の微細構造の観察

岡山大学第三内科

一安 朗・高岡 道夫・高橋 香代
太田 善介

(昭和61年11月26日受稿)

Key words : glomerular basement membrane
enzymatic digestion
ultrastructure
type IV collagen

はじめに

糸球体における main filtration barrier である糸球体基底膜 (GBM) の微細構造は、古くから、pappenheimer¹⁾により、pore theory が提唱されていたにもかかわらず、GBM の小孔の存在は長い間確認されていなかった。

1977年、太田は、negative 染色により、GBM の電顕的観察を行ない、GBM が細線維により形成された立体的網目構造であることをはじめて明らかにした^{2,3)}。

しかし通常の超薄切片法を用いて糸球体全体を透過型電顕により観察する方法では、GBM は外透明層、緻密層、内透明層のいわゆる三層構造が観察されるのみであり、GBM の基本的な微細構造を観察することは不可能であった。そこで今回、我々は分離したラットGBMを用いて、更に α -amylase と elastase⁴⁾により酵素処理を行うことによりGBMの微細構造を透過型電顕で観察したので報告する。

方法と結果

Wistar 系雄性ラット腎より、Spiro の方法⁵⁾に準じて sieving method で糸球体を採取した。糸球体の採取に際しては、位相差顕微鏡を用いて細胞成分や尿細管が除去されているのを確認

した。採取した糸球体に超音波処理を5分間おこない、洗浄遠沈し、GBMを分離した。この分離GBM 0.1ml に0.5% α -amylase 液 (0.5g α -amylase/0.5 mol PBS 100 ml) 5 ml, および elastase 加0.5% α -amylase 液 (elastase 10 μ l + 0.5g α -amylase/0.5 mol PBS 100 ml) 5 ml を各々添加し、37°C 5時間反応させた。反応後、Epon 812 にて包埋し、型のごとく透過型電顕にて観察をおこなった。

0.5% α -amylase 液にて処理した分離 GBM は、図1のごとくGBMの辺縁部は膨化し、粗な線維が、あたかもほつれた毛糸のように観察された。この細線維はちぢれ、巾は一定でなく、数本の細線維がもつれたように観察された。

elastase 加0.5% α -amylase 液にて処理した分離GBMは、図2のごとくGBMの辺縁部より網目がほどけるように細線維が遊離しつつある所見が観察された。個々の細線維の巾は約3 nm であり、所々結節状に観察された。

考案とまとめ

GBMの微細構造については、negative 染色を用いた楨野の報告によれば、巾約3nm⁶⁾の細線維からなる立体的網目構造であり、これによって直径約3~4 nmの小孔が形成され、これがアルブミン濾過に対する barrier の役目を

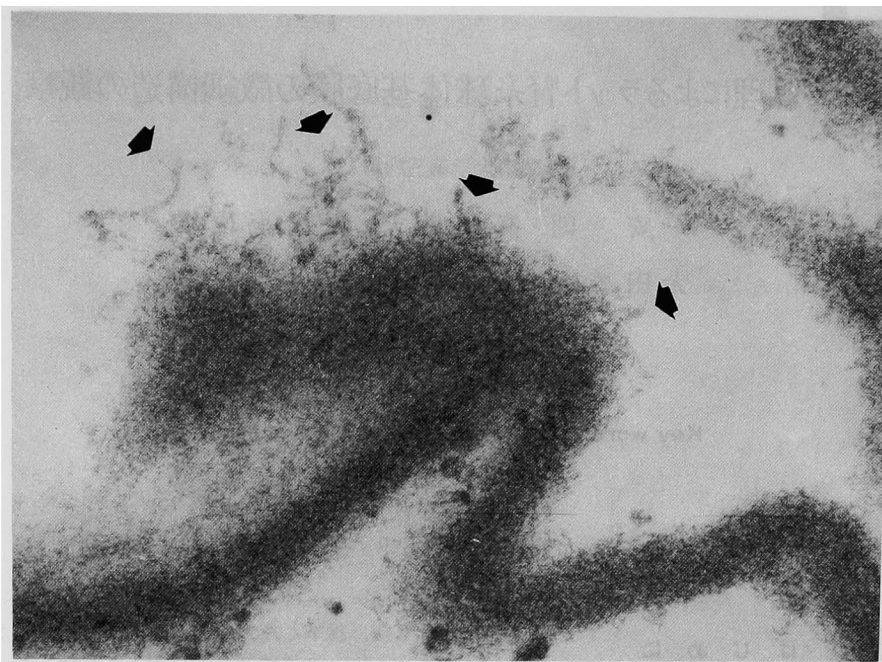


Fig. 1 0.5% α -amylase 液による処理後の分離 GBM
数本の細線維がもつれたように見える (矢印) ($\times 80,000$)

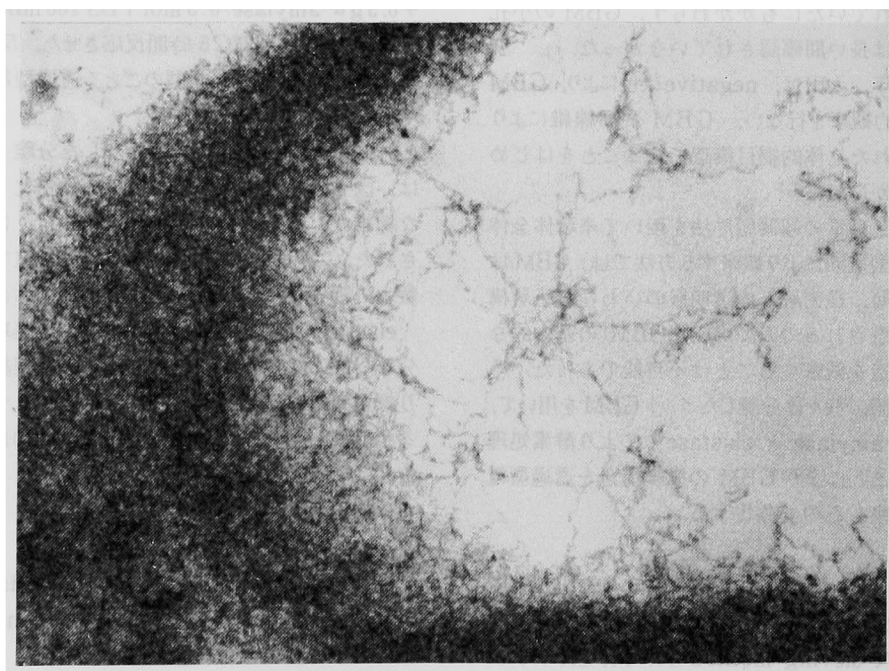


Fig. 2 elastase 加 0.5% α -amylase 液による処理後の分離 GBM
多数の細線維がみられる。巾約 3 nm. ($\times 120,000$)

果たすと報告している。

さらにGBMの基本的な成分の一つであるIV型コラーゲンの分子構造について、最近、巾2~3 nm、長さ400 nmの三重らせん構造で、ちぢれた細線維であると報告されている⁷⁾。今回、我々がGBMの微細構造を観察するために、分

離GBMをelastase加0.5% α -amylase液で酵素処理を行ない、透過型電顕で細線維構造を明らかにしたことは、上記の太田の報告に続いてGBMの立体的網目構造を裏付けるものと考えられ報告する。

参 考 文 献

1. Pappenheimer, J.R.: Passage of molecules through capillary walls. *Physiol. Rev.* 33, 387-423, 1953.
2. Ota, Z., Makino, H., Miyoshi, A., Hiramatsu, M., Takahashi, K. and Ofuji, T.: Electron microscopic demonstration of meshwork structure in human and bovine glomerular basement membrane. *Acta Med. Okayama* 31, 339-342, 1977.
3. Ota, Z., Makino, H., Takaya, Y. and Ofuji, T.: Molecular sieve in renal glomerular and tubular basement membranes as revealed by electron microscopy. *Renal Physiol.* 3, 317-323, 1980.
4. Goto, T., Sugi, Y. and Hirakow, R.: Ultrastructural constitution of collagen fibrils as revealed by the freeze-fracture technique. *J. Electron Microsc.* 32, 3, 213-215, 1983.
5. Sipro, R.G.: Studies on the renal glomerular basement membrane. *J. Biol. Chem.* 242, 1915-1922, 1967.
6. Makino, H.: Molecular sieve in rat glomerular basement membrane as revealed by negative staining. *Acta Med. Okayama* 36, 5, 371-382, 1982.
7. Timpl, R., Wiedermann, H., Van Delden, V., Furthmayr, H. and Kühn, K.: A network model for the organization of Type IV collagen molecules in basement membranes. *Eur. J. Biochem.* 120, 203-211, 1981.

**Ultrastructure of the rat glomerular basement membrane after
enzymatic digestion**

**Akira ICHIYASU, Michio TAKAOKA, Kayo TAKAHASHI
and Zenske OTA**

**The Third Department of Internal Medicine,
Okayama University Medical School, Okayama**

(Director: Prof. Z. Ota)

Although various hypotheses have been proposed about the ultrastructure of the glomerular basement membrane (GBM) of the kidney, it has not clearly revealed. At present, it is thought to be composed of a meshwork of fibrils as reported by Ota *et al.* We successfully observed the meshwork structure of the GBM under an electron microscope after enzymatic treatment with α -amylase and elastase. The fibrils were about 30 nm in width and were thought to be composed of type IV collagen.