

生体内凍結による
腎うっ血近位尿細管形態像の解析

日本大学大学院医学研究科博士課程
内科系内分泌代謝内科学専攻

逸見 聖一朗

修了年 2015 年

指導教員 相馬 正義

生体内凍結による
腎うっ血近位尿細管形態像の解析

日本大学大学院医学研究科博士課程
内科系内分泌代謝内科学専攻

逸見 聖一朗

修了年 2015 年

指導教員 相馬 正義

目次

ア) 概要	1
イ) 緒言	2
1. 背景	2
(1) 形態観察における固定の役割	2
(2) 急速凍結法の原理	2
(3) 急速凍結法の手技	3
(4) 凍結置換法の原理と手技	3
(5) 生体内凍結技法の原理	4
(6) 生体内凍結技法の臨床応用	5
2. 研究の目的	5
ウ) 対象と方法	6
1. 実験動物	6
2. 腎うっ血	5
3. イソペンタン・プロパン混合寒剤の調整	6
4. 生体内凍結技法	6
5. 凍結置換法	7
6. 化学固定(従来法)	7
7. ヘマトキシリン・エオジン染色および免疫染色	8
8. 電子顕微鏡試料の作製および観察	8
9. 近位尿細管の計測	8
エ) 結果	10
1. 近位尿細管細胞高の計測	10
2. 近位尿細管径の計測	10
3. 光学顕微鏡像	11
4. 電子顕微鏡像	12
オ) 考察	13
カ) まとめ	17
謝辞	18
表	19

図	20
図説	32
引用文献	35
研究業績目録	38

ア) 概要

本研究の目的は、腎うっ血状態に伴う近位尿細管の変化について生体内凍結技法を用いて検討し、臨床応用に向けた基礎的データを得ることである。

12頭のオスのWisterラットを4つのグループ（各グループ3頭）に分けた。グループ1はコントロール群。グループ2は2分うっ血群。グループ3は5分うっ血群。グループ4は5分うっ血をかけた後に10分解除した群とした。麻酔下で下大静脈の腎静脈分岐部の中枢側で結紮して両腎のうっ血モデルを作製した。左の腎臓は生体内凍結技法で検体を採取し、右の腎臓は切除後に従来法を用いて光学顕微鏡と電子顕微鏡で観察し両者を比較した。生体内凍結を行った左の腎臓は、グループ1で近位尿細管が立方状の細胞から構成され、内腔は保たれていた。グループ2、グループ3では酸素欠乏の影響を受け近位尿細管細胞は腫大し、内腔は脱落した壊死細胞成分で充満しており、管径の著しい拡大がみられた。グループ4では腫大した近位尿細管細胞は元の立方状細胞に戻り、うっ血を解除したことによる回復の過程と考えられた。管径はうっ血グループと同様に拡大していたが、うっ血グループでみられた内腔の脱落した壊死細胞成分は消失して、内腔は拡張していた。近位尿細管の内腔の変化は、内腔を流れる尿量と関連していると考えられ、グループ1では正常時と同様に尿が流れており内腔は保たれていたが、うっ血群では内腔は脱落した壊死細胞成分が充満しており尿量は著しく減少した状態と考えられた。一方、うっ血解除に伴い近位尿細管内腔には多量の尿が流れ出したため、内腔と管径ともに拡張した状態を保ったまま脱落壊死細胞成分の排泄が起こったと考察された。従来法では生体内凍結法でみられた近位尿細管の動的な変化はみられず、いずれのグループも腫大した細胞からなり、尿細管内腔も不明瞭であった。

本研究は従来の手法では明らかにされなかった、ラットうっ血腎の近位尿細管の生体内での動的な形態像を明らかにした。

イ) 緒言

1. 背景

(1) 形態観察における固定の役割

組織や臓器の形態観察のための試料作製過程において固定は重要なステップである。固定は細胞をできるだけ新鮮な状態に保存するための処置で、生きている状態の構造と物性をできるだけそのまま維持することを目的として行われ、化学固定法と物理固定法に分けられる[1]。

化学固定はグルタルアルデヒド、ホルムアルデヒドなどの還元剤やオスミウム酸などの酸化剤を用いて化学反応により組織、細胞の構造と物性を保存する方法であるが、単なる酸化還元反応ではなく固定剤による蛋白などの架橋効果が重要な役割を果たしている。グルタルアルデヒド、ホルムアルデヒドなどの還元剤は主としてタンパク質を固定する。ホルムアルデヒドは浸透が早く、大きな組織片も比較的速やかに固定することができるが、固定力が弱く電子顕微鏡レベルの微細構造の保持には不十分である。グルタルアルデヒドやオスミウム酸は固定力に優れるが、浸透性が低いいため、大きな組織では周辺部のみ固定され、内部は保存されないなど、観察手法に合わせて固定剤を選択することが重要である。また、化学固定では蛋白などの架橋効果自体が超微形態像の変化や抗原性の消失の原因となり、物理固定に比べて固定に時間がかかるため、その間に構造の変化や可溶性蛋白の移動、消失など種々のアーティファクトが生じることなどの問題点もある [1-5]。

物理固定法は組織を瞬時に急速凍結することにより、組織中のすべての構成成分を氷中に閉じ込めるという物理現象を用いている[1]。

(2) 急速凍結法の原理

急速凍結法は瞬時に組織や細胞を凍らせることで構造を保存する事ができる。組織を凍結すると組織・細胞内に氷晶形成（いわゆる cubic ice）が起こり、これが原因で細胞の微細構造は破壊される。従って、急速凍結を行う場合は、如何に氷晶形成を防ぐかが重要なポイントとなる。

組織を 10^5 K/sec ほどの速さで急速凍結すると凍結面から $10\text{--}15\mu\text{m}$ ほどの範囲で無氷晶凍結（硝子状凍結）の領域が作られる（図 1）。この領域は超微構造の破壊もほとんど起こらないため電子顕微鏡観察に適した領域となる。さらに深い領域になると、深さに比例して徐々に氷晶が大きくなり、結果として凍結表面から $300\text{--}400\mu\text{m}$ までは光

学顕微鏡観察に使用できる領域が得られるが、それより深部は光学顕微鏡観察にも適さなくなる[6.7]

(3) 急速凍結法の手技

電子顕微鏡試料を得るために当電子顕微鏡室で行っている急速凍結法は、冷却金属への圧着凍結（金属圧着法）[8.9.10]と寒剤（試料を急速凍結するために用いられる冷却剤）に試料を浸漬する急速凍結（ジャブ漬け法）の2種類である（図2）。金属圧着装置は圧着面を鏡面仕上げした純銅ブロックを液体窒素（ -196°C ）で冷却し、圧着面に試料を瞬時に接着させ急速凍結を行う。一方、ジャブ漬け法は、試料を寒剤に漬けるだけで手技は簡単であるが寒剤の選択が重要となり、融点が低く融点と沸点の差が大きい寒剤がよい[6]。表1に主な寒剤の種類と融点および沸点を示したが、液体窒素のように融点は低くても、融点との差の少ない寒剤では試料を浸すと同時に窒素の気化が起こり、試料が窒素の気体で覆われる。気体の熱伝導率は低いため冷却速度は非常に遅くなり、結果として良好な凍結組織が得られない。著者はイソペンタン・プロパン混合寒剤を用いている[11]が、これは融点が -193°C でほぼ液体窒素と同様であるが、沸点は（正確には測定されていないが）室温に近い。安価で扱いやすくジャブ漬け法には適した寒剤である。

電子顕微鏡試料作製のためのその他の方法として、圧力を上げて凍結する加圧凍結や、化学的無氷晶凍結させるためにグリセロールや dimethyl sulfoxide (DMSO) などの有機溶剤を混ぜる方法もある。加圧凍結には専用の高価な装置や技術が必要である。また、後者はグリセロールや DMSO 自体が新鮮な細胞にとって毒性の強いものであり化学固定なしには使用できない。したがって、急速凍結本来の目的からは外れる[6]。

(4) 凍結置換法の原理と手技

凍結置換法は凍結試料を凍結時の超微形態や抗原性を保持した状態で化学固定に戻す方法で、その後は試料をパラフィンや樹脂に包埋し光学顕微鏡や電子顕微鏡試料を作製することができる[3.12.13]。溶媒にはアセトンを用い、あらかじめ光学顕微鏡試料の場合には2%パラホルムアルデヒドを、また電子顕微鏡試料にはオスミウム酸を1~2%濃度として溶解させて固定液として使用する。アセトンは -80°C でも液体であり、凍結組織中の氷と容易に置換する。氷との置換は脱水にも相当し、脱水と固定が同時に行われると考えられる方法である。これらの反応は氷が再結晶化しない -80°C 近傍で行う

ことで、構造蛋白質の消失や移動を抑えられ、凍結時すなわち新鮮状態の形態を観察するのに適した方法である。この置換過程は凍結標本を -80°C の溶媒に漬け、そのまま1～2日間低温に保つことで行われる。その後は徐々に温度を上昇させ室温に戻す。温度の上昇と共に固定剤と組織蛋白質はより一層反応し強く固定される。室温に達したならば過固定を避けるためにもただちに純粋なアセトンで3回洗浄する。これ以後の過程は一般の化学固定組織の脱水後の包埋過程と同じでパラフィンや樹脂に包埋し、包埋後は従来通りの方法で切片を作製し、光学顕微鏡や電子顕微鏡で観察することができる。この凍結置換法は細胞形態を新鮮に近い状態の切片像として捉えるだけでなく、免疫組織化学のための固定法としても最適である。しかし、固定範囲は臓器・組織の表面から1～2mmに限られるため、大きな組織の固定には適さない(図3) [3. 12. 13]。

(5) 生体内凍結技法の原理

光学顕微鏡および電子顕微鏡観察には化学固定が通常は用いられるが、化学固定は固定が完了するまでに時間がかかり、その間に組織や細胞に変化を与えてしまう。組織や臓器を切除後に速やかに急速凍結することによって、化学固定した検体よりもより生体内に近い状態で組織や細胞の観察をすることができる。しかし、急速凍結法でも生体の組織は切除することにより血流から遮断されてしまい、虚血や低酸素にさらされる。その為、真の生きた細胞や組織の形態を変化させてしまうという問題が解決できなかった [3]。

生体内凍結法 (in vivo cryotechnique : IVCT) は、これらの問題を解決するために1996年に大野らによってはじめて発表された [3]。IVCTでは、正常な血流が通っている生きた動物の組織や臓器の一部をイソペンタン・プロパン混合寒剤で急速凍結し、その後凍結組織を切除する。生体内凍結された組織や臓器は凍結置換法で化学固定に戻した後パラフィンや樹脂に包埋し、切片を作製し光学顕微鏡や電子顕微鏡で観察する方法である。大野らは、組織をイソペンタン・プロパン混合寒剤で凍結すると同時に、冷却メス刃で切れ込みを入れることで、組織深部の細胞まで電子顕微鏡に適した凍結が得られるように工夫している(図4)。組織を生体内で凍結し、それを取り出して実験に使用する試みは以前から行われているが、電子顕微鏡試料の作製を念頭において寒剤にイソペンタン・プロパンを用い臓器に切れ込みを入れるアイデアや、凍結置換法を用いて電子顕微鏡標本や光学顕微鏡標本を作製する試みはこのIVCTの新規性である [3]。

(6) 生体内凍結技法の臨床応用

藤井らは[14]生きたマウスから生体内凍結試料を繰り返し採取する生体内凍結生検法に成功している。現在、大野らにより生体内凍結の臨床応用に向けたクライオ生検装置の開発が行われている。これは、胃ファイバースコープ用の生検鉗子を液体窒素で冷却し、金属圧着法の原理で検体を生体内で凍結し、採取するための装置である。生検鉗子を通す内筒と鉗子を液体窒素下で冷却して保持するための外筒から構成される。液体窒素を貯蔵タンクから加圧灌流し、内筒を -190°C に冷却する。さらに使用する液体窒素を閉鎖系に収めるために気化窒素回収タンクを装備し、生検部位以外の凍結を避ける仕組みを持っている。クライオ生検装置は、現在市販されている腹腔鏡（オリンパスメディアカルシステムズ、東京）に装着が可能である [15]。さらに開発が進み、臨床応用されれば、生体内凍結技法で行われた基礎的データの蓄積が、より一層重要な意味を持つと考えられる。

2. 研究の目的

IVCT を用いた研究では、従来法に比べより詳細で機能的な組織や超微形態像が得られ、特に生きている動物の臓器や組織に起こっている時間依存的な瞬時の形態像の変化、機能的な蛋白質の発現などの可視化に威力を発揮すると考えられる [16-20]。また IVCT では従来法の化学固定の際に生じる、細胞内や間質の可溶性物質のアーティファクトによる移動や消失を防ぐことができる [21-23]。さらに、免疫染色を増強する効果 [23, 24] があり従来法と比較して多くの利点を有することが示されている。IVCT によって作製された検体は、光学顕微鏡や電子顕微鏡、免疫組織染色法、in-situ-hybridization など病理診断に必要な標本作製ができる [7]。従って、腎生検を含め IVCT を用いた臨床応用を念頭において、腎臓においてはうっ血や尿管結紮に伴う尿路閉鎖、利尿剤の使用といった種々の病態に伴う糸球体や尿細管などの変化について IVCT を用い実験動物で詳細に観察し基礎データを積み重ねる必要があると考えている。

腎組織における IVCT による解析はまだ少数であるが、腎臓では高血圧や心停止、蛋白質の過剰負荷による近位尿細管や糸球体の変化、近位尿細管におけるナトリウム・リン代謝への副甲状腺ホルモンの影響などが報告されている [5, 25-27]。IVCT を用いた腎うっ血の研究では共同研究者の逸見が 5 分の腎うっ血で従来法との違いがあることを報告している [7] が、うっ血やうっ血解除に伴う経時的な変化は検討されていない。この研究では、5 分のうっ血で尿細管細胞の変化が起こるまでの過程、さらにうっ血を

解除した際に起こる回復の過程を経時的に IVCT を用いて解析し、臨床応用に向けた基礎データを得ることを目的とした。

ウ) 対象と方法

1. 実験動物

5-6 週齢のオスの Wister-Rats を用いて実験を行った。ラットは Oriental East Corporation (Tokyo, Japan) より購入し、1 週間、標準的なエサと水を与えて飼育した。動物の実験および飼育は日本大学医学部動物実験指針に準拠し、実験動物委員会の承認を得た上で施行した。(承認番号 AP12M001)

2. 腎うっ血

ラットにペントバルビタール (40 mg/kg 体重) を腹腔内投与して、麻酔をかけた。ペントバルビタールは鎮痛作用が弱く、呼吸抑制、循環抑制が強い。過度の呼吸抑制、循環抑制がなく、深麻酔により実験動物の疼痛が取り除かれていることを確認し、実験を開始した。まず、ラットを開腹し下大静脈を腎静脈分岐部の中枢側で結紮し、両側の腎うっ血を起こした。ラットはグループ 1 をコントロール群とし、グループ 2 および 3 をそれぞれ 2 分および 5 分のうっ血群、グループ 4 は 5 分うっ血をさせその後 10 分うっ血を解除した群の 4 群に分けた。それぞれのグループは 3 頭ずつのラットからなり合計 12 頭のラットを使用した。

3. イソペンタン・プロパン混合寒剤の調整

イソペンタン・プロパン混合寒剤は大野らの報告した方法によって作製した [3. 12]。図 5 のように 20ml のイソペンタンを 100ml 入りビーカーに用意し、液体窒素中で冷却した。マグネットスターラーでイソペンタンを攪拌しながらプロパンガスを注入するとプロパンガスは冷却され液化し、イソペンタンと混ざって 5 分ほどで 60ml のイソペンタン・プロパン混合寒剤ができる。寒剤は大気中の水分を含むと凍ってしまうため作製後速やかに使用した。

4. 生体内凍結技法

生体内凍結技法は、大野ら [3. 12] が報告した手順を一部修正して行った。まずイソペンタン・プロパン混合寒剤の容器を 500ml のペットボトルとクッキングペーパーを使

用して作製した（図 6）。次に生体内凍結を行う左腎の下にシート状に折りたたんだアルミホイルを敷くことによって凍結した時に腎臓と下部の腹膜組織が固着するのを防ぎ、腎臓を摘出しやすく工夫した。凍結は、容器の中にイソペンタン・プロパン混合寒剤と刃の部分であらかじめ冷却した彫刻刀を入れ容器の先端を開腹したラットの左腎の数ミリ上に固定し、その直後に容器の内側から彫刻刀の刃でクッキングペーパーを一気に突き破りながら腎臓に切れ込みを入れ、同時に混合寒剤を流し込み生体内凍結を行った。腎臓を凍結している間、容器の口で腎臓周囲組織を密着して寒剤が周囲へ流れ出さないよう注意しながらラットの心臓が拍動し生きていることを確認した。腎臓の摘出は右腎臓から行い、通常の化学固定標本作製した。左腎臓は腎動脈静脈や尿管を含んだ周囲組織とともに凍っているため、ペットボトルの口の外側から彫刻刀の刃で削り、腎臓を剥離・摘出し液体窒素中に保存した。尚、左腎臓を摘出すると同時にイソペンタン・プロパン混合寒剤が周囲に流れ出しプロパンが揮発するため、生体内凍結の一連の作業はドラフトチャンバー内で行った。

5. 凍結置換法

生体内凍結した左腎臓は -80°C の2%パラホルムアルデヒド・アセトン溶液中に24時間浸漬し、 -20°C で2時間、さらに -4°C で2時間反応した後、室温に2時間維持した。その後、組織を100%アセトンで洗浄し、キシレンで置換し、パラフィン包埋を行った。電子顕微鏡観察を行う試料は2%パラホルムアルデヒド・アセトン溶液の代わりに、2%四酸化オスミウム・アセトン溶液で凍結置換し Quetol-812 (Nisshin EM, Tokyo, Japan) で包埋した [3. 12. 25]。

6. 化学固定（従来法）

摘出した右の腎臓は3分割し、従来通り室温で4%パラホルムアルデヒド溶液中に24時間浸漬固定した[27]。その後、試料をリン酸緩衝液 (Phosphate buffered saline: PBS) で洗浄し、エタノールで段階的に脱水を行いキシレンに置換し、パラフィン包埋を行った。電子顕微鏡用の試料は、2%グルタルアルデヒド・0.1%カコジル酸緩衝液で3時間前固定した、0.1%四酸化オスミウム・0.1M カコジル酸緩衝液で後固定した。その後エタノールで段階的に脱水を行い Quetol-812 で包埋した。

7. ヘマトキシリン-エオジン染色および免疫染色

パラフィン包埋した試料をマイクロトームで3 μ mに薄切した。型のごとく脱パラフィンし、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。アルブミン、IgGの免疫染色は切片を3%過酸化水素水に10分浸けて、内因性ペルオキシターゼを除去しPBSで洗浄した。切片を抗ラットアルブミンヒツジ抗体 (1:1500) (Bethyl Laboratories Inc, Montgomery, TX, USA) と抗ラットIgG1ヤギ抗体(1:1000) (Bethyl Laboratories Inc, Montgomery, TX, USA) を用い室温で30分間反応させた。二次抗体は、それぞれVectastain ABC (sheep IgG) kit (Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA, USA) とSimple Stain MAX-PO (goat) (Nichirei, Tokyo, Japan) を用い室温で30分反応させた。CD10の免疫染色は、0.01M酢酸緩衝液で前処置を行い、抗原賦活のため10分間オートクレープをかけた。PBSで洗浄し、マウス抗CD10抗体 (1:100) (Leica Biosystems, Newcastle, UK) で室温にて30分間反応させた。さらに切片をSimple Stain MAX-PO (Multi) (Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan) を使用して室温で30分間反応させた。発色は3-3' ジアミノベンジジン (DAB) を用い、ヘマトキシリンで対比染色して免疫染色標本を作製した。陰性対照は、それぞれ一次抗体に正常ヒツジ、ヤギ、マウス抗体を用いて染色を行った。

8. 電子顕微鏡試料の作製および観察

従来の固定法と凍結置換法で準備した試料からダイヤモンドナイフを取り付けたウルトラマイクロトーム (ULTRACUT UCT, Leica, Wien, Austria) を使用して超薄切片を作製し、銅製のグリッドに載せて、ウラニル酢酸とクエン酸鉛で対比染色した。試料は80kVの電圧を用い透過型電子顕微鏡 (TEM-1200EX II, JEOL, Tokyo, Japan) で観察した。

9. 近位尿細管細胞高と尿細管径の計測

HE染色した組織を用いて、各々のラットの腎皮質部を無作為に5領域選択し、400倍に拡大し顕微鏡写真を撮影した。各写真から無作為に近位尿細管細胞を選択し細胞高(基底膜から刷子縁の基部までの距離)を20カ所(各ラットから合計100カ所)画像解析ソフト (cellSens, OLYMPUS, Tokyo, Japan) を用いて計測した。したがって各グループで計300個の近位尿細管細胞の高さを計測した。近位尿細管の管径の測定は各々のラットの腎皮質部を無作為に10領域選択し、400倍に拡大し顕微鏡写真を撮影した。各写真から無作為に近位尿細管を選択しその管径を20カ所(各ラットから合計200カ所)同様の画像解析ソフトを用いて計測した。したがって、各グループで計600個の近

位尿細管径を計測した。統計学的な解析には t 検定を用いて、p 値が 0.05 以下を統計学的な有意差とした。また、各グループでの差が有意であるかどうか分散分析を行い検討した。

エ) 結果

図 3 に示したように、生体内凍結試料の光学顕微鏡観察では、腎皮質表面の 2 mm ほどの領域が凍結置換法で良好な固定がなされる [12, 14, 25, 27]。従って、本研究で計測に用いた近位尿細管は主に皮質に分布している S1、S2 領域のものである。細胞の高さと尿細管径に関する結果を表 2 と図 7a-d にそれぞれ示した。

1. 近位尿細管細胞高の計測

細胞高の平均値の比較では (図 7a)、グループ 2 は、従来法と IVCT では細胞の高さに差はなかった。しかしグループ 1、グループ 3、グループ 4 では、従来法は IVCT に比べて有意に細胞高が高かった ($p < 0.001$)。従来法で各グループを比較すると、グループ 1 とグループ 2 では細胞高に有意差はみられなかったが、グループ 3 ではグループ 2 と比較し軽度に増加していた ($p < 0.05$)。グループ 4 は、他の 3 グループに比較し細胞高が著明に減少していた ($p < 0.001$)。逆に IVCT では、グループ 2 が最も細胞高が高くグループ 2、グループ 3、グループ 4、グループ 1 の順番で次第に細胞高の減少がみられた ($p < 0.001$)。

また、多グループ間での比較に有意差があるかどうか検定する為、分散分析を行った。通常群では細胞高 ($F(2, 61) = 52.41, p < 0.05$)、生体内凍結群では細胞高 ($F(2, 61) = 255.77, p < 0.05$) であった。上記より各グループでのうっ血および解除による細胞高への変化は有意であった。なお、各ラットの細胞高のブラフを図 7b に示すが、概ね平均値で比較したグラフ (図 7a) と相関している傾向がみられた。

2. 近位尿細管径の計測

尿細管径の平均値を図 7c に示した。従来法で各グループを比較すると、グループ 1、グループ 2、グループ 3 とともに尿細管径に差はみられなかった。しかし、グループ 4 では尿細管径の明らかな減少がみられた ($p < 0.001$)。IVCT では、グループ 1、グループ 2、グループ 3 の順番で管径が増加していた (グループ 2、グループ 3、 $p < 0.001$)。グループ 3 とグループ 4 の間では管径に有意差は認められなかった。従来法と IVCT を比較するとグループ 1、グループ 2、グループ 3 共に IVCT で尿細管径が減少しておりグループ 1、グループ 2 で有意差を認めた ($p < 0.001$)。しかし、グループ 4 では逆に、IVCT は従来法よりも尿細管径が増大していた ($p < 0.001$)。また、多グループ間での比較に有意差があるかどうか検定する為、分散分析を行った。通常群では尿細管径 ($F(2, 61) = 22.28$ 、

p<0.05)、生体内凍結群では尿細管径(F(2.61)=44.65、p<0.05)であった。上記より各グループでのうっ血および解除による尿細管径の変化は有意であった。なお、各ラットの尿細管径のグラフを図7dに示すが、概ね平均値で比較したグラフと相関している傾向がみられた。

3. 光学顕微鏡像

図8にグループ1の組織像を示した。IVCTでは近位尿細管の大部分で内腔が開いており、立方状の細胞から構成されていた。間質の幅は軽度に広がっており、毛細血管中に少数の赤血球が観察された(図8a)。従来法ではIVCTと比較して尿細管細胞が腫大し、尿細管腔も不明瞭であった。間質も著しく狭く毛細血管は虚脱しており、所々で尿細管が互いに接していた(図8b)。HE染色では、固定剤のPHの違いの影響を受けて、通常法に比べて、IVCTではエオジンの染色性が薄かった。免疫染色では、いずれのグループでも染色性はIVCTの方が、従来法に比べて増強していた。IVCTでは、アルブミンとIgG1の免疫染色が間質と毛細血管内で陽性を示した(図8c, d)。また、CD10の免疫染色では尿細管微絨毛で陽性を認めた(図8e)。

グループ2、グループ3の組織像を図9に示した。IVCTで近位尿細管細胞の腫大と尿細管内腔の狭窄がみられた。また、核の配列は不揃いで内腔側への核の偏位がしばしばみられた。間質は著しく拡張し、毛細血管内には多くの赤血球を認め、また尿細管細胞の基底線条が明瞭に観察された(図9a)。従来法ではグループ1とほぼ同様の所見を示しており、尿細管細胞は腫大し内腔は狭窄した状態であった。また、間質は狭く毛細血管は虚脱し基底線条も不明瞭であった(図9b)。さらにうっ血のグループでは尿細管細胞質に多数の空胞が認められた(図9a挿入図)。これらは電子顕微鏡像との対比からファゴゾームと考えられ、グループ2に比べグループ3で増加傾向を示していた。うっ血グループの免疫染色では明瞭化した基底線条と毛細血管を含む間質でアルブミンとIgG1の陽性所見がみられた。また、ファゴゾームもアルブミンとIgG1が陽性であった(図9c, d)。さらに、一部の近位尿細管細胞の細胞質もアルブミンの免疫染色で陽性像をみとめた。うっ血をかけたグループのCD10の免疫染色では、近位尿細管の微絨毛領域が部分的に破壊され陰性化していた。また、尿細管の中心部にみられた細胞核は微絨毛との位置関係から尿細管内腔に脱落壊死した細胞の核であった(図9e)。

グループ4の尿細管の組織像を図10に示した。近位尿細管の形態像からは、うっ血時の像を伴った尿細管(図10a左側)と正常尿細管に似た回復期の像を伴った尿細管(図

10a 右側) が混在してみられた。前者は腫大した細胞からなり尿細管内腔の狭窄や内腔に脱落した細胞核や細胞成分がみられた。後者はグループ 1 でみられたように、細胞腫大から回復した立方状細胞からなる近位尿細管像を示しており、内腔は拡張していて脱落した細胞核や細胞質成分は消失していた。従来法では近位尿細管細胞はグループ 1~3 のものと同様で腫大しており尿細管内腔は不明瞭で、間質は狭く毛細血管は目立たなかった (図 10b)。グループ 4 の免疫染色ではアルブミンと IgG1 は間質と空胞に陽性を示したが、基底線条は不明瞭化に伴いアルブミンと IgG1 は陰性化していた (図 10c、d)。

4. 電子顕微鏡像

IVCT による電子顕微鏡観察では、彫刻刀で切れ込みを入れた面から 5-10 μm の範囲に氷晶のできない良好な観察範囲を得ることができる [3. 7. 28]。今回の実験でも、割面の表層部は良好な電子顕微鏡像が得られたが深部では、氷晶によるアーティファクトがみられた (図 11a)。

基底線条の電子顕微鏡像を図 11 に示した。IVCT によるうっ血グループとグループ 1 の比較では、前者では基底線条の著しい拡張がみられたが (図 11a b)、後者では基底線条は接着していた (図 11c)。また、従来法でのうっ血グループは、IVCT のものと比較すると基底線条が著しく狭小化していた (図 11d)。これらの所見は IVCT の光学顕微鏡像で観察される基底線条の変化に一致していた (図 8a, 図 9a b)。

従来法によるうっ血グループの近位尿細管細胞尖端部の電子顕微鏡像を図 12 に示した。近位尿細管細胞の微絨毛には所々で破壊像がみられ、管腔内には脱落・壊死した細胞の核や小器官を含んだ細胞成分が詰まってみられた (図 12a b)。これらの所見はうっ血グループの CD10 の免疫染色の結果と一致した (図 9e)。

従来法によるファゴゾーム・ライソゾームの電子顕微鏡像を図 13 に示した。うっ血グループではグループ 1 (図 13a) と比較し多数のファゴゾームと一次および二次ライソゾームの増加がみられた (図 13b c d)。ファゴゾームは多量の膜状構造物を含んでおり (図 13b c)、この所見は光学顕微鏡によるうっ血グループの尿細管細胞質にみられた空胞 (図 9a、挿入図) に一致し、免疫染色では IgG1、アルブミン陽性を示していた (図 9c d)。また、絨毛領域には境界の不明瞭な球状の構造物であるポストライソゾームを多数認めた (図 13e)。

オ) 考察

マウスやラットのように小さい動物で腎臓の IVCT を行う場合、腎臓にイソペンタン・プロパン混合寒剤を上から注ぐ方法で行われていた。しかし、この方法ではしばしば反対側の腎臓まで凍結されてしまうため対側腎を別の目的で使用することは手技的に困難であった。今回、著者は大野らによる IVCT のプロトコール[3]を改良し、片方の腎臓を着実に凍結するために図 6 のような手製の容器を作製した。この容器を用いることにより、左腎臓が着実に生体内凍結され、反対側の腎臓を別の目的に使用することが可能であった。結果として、同じラットから IVCT と従来法の試料を同時に採取することができ両者の比較試験を行うことができた。一方、IVCT を用いた電子顕微鏡観察では凍結の良好な電子顕微鏡像を得るのに苦慮した。これは、今回作製した容器によって寒剤の温度の上昇を招き、その為に電子顕微鏡で観察できる領域を減少させてしまったことが要因と思われた。それゆえ IVCT の工程では一層の手技的な工夫が必要と考えている。

本研究では、近位尿細管細胞の高さは細胞腫大の指標として用いた。グループ 2 では IVCT と従来法で比較すると細胞の高さに差はなかった。しかし、他の 3 グループでは従来法で近位尿細管の細胞の高さが著明に増加していることが示された。従来法では固定に時間がかかり、その間に細胞は虚血と低酸素にさらされ膜の透過性の亢進がおこり血漿成分が細胞内に流入し、細胞の腫大を引き起こすことが知られている[7, 25]。従って、IVCT よりも従来法のほうがより顕著な細胞腫大を示したという結果は化学固定に伴う虚血や低酸素に起因したアーティファクトと考えられた。一方で、IVCT における近位尿細管細胞高の変化は近位尿細管の生体内で起こっている構造的な変化をより正確に表していると考えられた。これらの中でグループ 2 の近位尿細管の細胞高は他の 3 つのグループに比べて著明に増加しており、グループ 2 から 4 の順番で段階的に減少を示した。グループ 3 ではグループ 2 と比べてより長い時間うっ血にさらされているため、生存している近位尿細管細胞が減少していると考えられる。このことが残存している細胞にとっては虚血や低酸素の程度の改善に繋がり、これがグループ 2 と比較してグループ 3 の細胞の腫脹が改善した理由と考えられた。グループ 4 ではグループ 3 と比べて細胞の腫大はさらに改善したが、これは再灌流によって酸素が供給された結果と考えられた。

本研究では、近位尿細管の管径を解析するうえで、①間質圧、②近位尿細管細胞の体積、③近位尿細管内の細胞崩壊物の量、④近位尿細管中を流れる尿の量の 4 つの因子が

重要と考えられた。グループ 1, 2, 3 では従来法の方が IVCT より近位尿細管の径が大きかったが、これは従来法による化学固定では、固定が完了するまでに低酸素によって細胞の体積の膨張が起きたこと、検体の採取のときに起こる間質圧の減少（切除された腎臓は正常な血流から遮断されてしまう為、間質圧は 0 になる。）の 2 つの因子によると考えられた。一方で IVCT では、グループ 1 から 3 の順に近位尿細管の径は増加していた。IVCT によるうっ血をかけたグループでは、間質のスペースが拡大し、間質の毛細血管や基底線条は開いていた。これらの所見はうっ血をかけたグループはグループ 1 に比べて間質の圧が増加していることを示す。それにも関わらず、グループ 2 での尿細管径が拡大していたのは、近位尿細管の細胞腫大や内腔の細胞崩壊物の増加による管腔内圧の増強効果が間質圧を上回った結果と考えられた。グループ 3 ではグループ 2 より更に管径の拡大がみられたが、これは前者では近位尿細管の腫大した細胞の総体積と細胞質崩壊物の総量がグループ 2 より一層増加した結果と考えられた。

グループ 4 では回復像を呈した近位尿細管とうっ血像を残した近位尿細管が混在して観察され、再循環による近位尿細管の回復にはネフロンごとに程度の差が著しいことが示された。一般的に近位尿細管が回復するとき、その径はグループ 1 でみられるサイズに回復することが予想されるが、回復期の近位尿細管ではグループ 3 で観察されたように内腔が著しく拡張した状態を保ち続けていた。結果、グループ 1 とグループ 4 では細胞像が似ているのにも関わらず尿細管径は著しい違いがあることが判明した。過去のマウスの IVCT のレポートでは、急性高血圧を導入したことによって尿量が増加した結果、近位尿細管の管腔径が拡大したことが報告されている [23]。今回の結果では、グループ 1 では近位尿細管の内腔が軽度を開いており、グループ 2 および 3 では管径は拡張しているものの、内腔は尿細管細胞の腫大による狭窄と脱落細胞成分による閉塞を生じていた。さらにグループ 4 になると管径の著しい拡大を保った状態で内腔も拡張しており脱落細胞成分は消失した。この結果は、正常状態で通常に近位尿細管を流れていた尿量が 2 分から 5 分のうっ血状態では著しく減少しており、うっ血状態を解除すると今度は大量の尿が近位尿細管を流れ始め、尿細管径が拡張し内腔も著しく拡張した状態で細胞崩壊物が洗い流された事を示している。一方で、従来法ではグループ 4 で近位尿細管の管径は著明に縮小していた。従来法では、近位尿細管の中にあった尿は腎臓を切除し組織を切り出した時点で外に流れ出てしまう。その結果、近位尿細管が縮んだ状態で固定されるために尿細管径の縮小が起こったと考えられる。従来法のグループ 4 の尿細管像もアーティファクトであった。

今回の実験では、電子顕微鏡像においても興味ある所見が得られた。第一にうっ血グループにおける IVCT と従来法の比較で、前者は基底線条の著明な拡大（近位尿細管の細胞間距離の拡大）がみられたが、後者では基底線条が狭小化していたことである。このことは生体内でうっ血が起こると間質圧が上昇し基底線条も拡張するが、従来法では間質圧が減少し、その結果基底線条も狭小化してしまうことを示している。IVCT による形態観察の重要性を裏付ける所見である。第二にうっ血が起こると近位尿細管細胞に多数のファゴゾームが出現し、これらが多量の膜状構造物を含み IgG やアルブミン陽性像を示したことである。一般的に細胞障害が起こると膜構造からなる小器官が破壊されるため、膜成分などを貪食するためにファゴゾーム（オートファゴゾーム）が増加する[29]。またこのようなファゴゾームは空胞内に多量の膜状構造物を含んでいることが特徴である。近位尿細管細胞では原尿からの蛋白吸収が亢進した場合にファゴゾーム様の空胞（頂部空胞）が出現することがあり IgG やアルブミンが陽性を示す。これらは尿蛋白の取り込み空胞であり、細胞膜の破壊とは無関係に出現する[29]。そのため空胞内には多量の膜状構造物はみられない。したがって、今回観察されたファゴゾームはオートファゴゾームと考えている。IgG やアルブミンの陽性像は、うっ血による細胞障害の結果、小器官のみならず細胞側壁や底部の膜にも障害がおこり、それらをファゴゾームが貪食する際に細胞間に存在していた IgG やアルブミンも一緒に取り込まれたことによると考えられた。ファゴゾームはその後、一次ライソゾームと融合して二次ライソゾームを形成し、さらに膜構造物が消化しきれないとポストライソゾームになり細胞頂部の微絨毛の間から排泄される[29、30]。今回の実験でポストライソゾームは微絨毛領域に多数みとめられており、この所見もファゴゾームがオートファゴゾームであることを示している。

IVCT を用いた本研究では、近位尿細管はうっ血や尿量の変化などに対し柔軟にその形態像を変化させることを示した。細胞崩壊物などの異物が尿細管内に留まるとキャストを形成し、キャストは骨髄腫腎のように腎障害の原因となる[31、32]。従って、近位尿細管の異物の排泄の際に尿細管腔の拡張が起こることは、異物の排泄を容易にし、腎障害を予防するための重要なメカニズムの一つであると考えられた。また、下大静脈結紮による腎うっ血モデルラットの形態解析で得られた基礎的データは、起立性蛋白尿、ナットクラッカー症候群、うっ血性心不全や腎静脈血栓症のモデルなど腎静脈灌流の障害によって起こる病態の解明に有用となる可能性がある。今回の研究では、各グループ n=3 で尿細管細胞高、管径の変化を検討した。個体間のばらつきに関して、今後さらに

多くの個体で検討する必要があると考える。

最後に、IVCT では従来法より詳細で機能的な組織像を得ることができるため、今後臨床応用が重要な課題と考えている。その為に種々の病態と腎臓の形態像の関連について IVCT による調査の積み重ねが必要である。今回、IVCT の臨床応用のための基礎研究としてラットうっ血腎の形態変化を IVCT で詳細に観察を行い、従来法では捉えられない生きた近位尿細管像を解析し報告した。

カ) まとめ

本研究では、ラットうっ血腎の近位尿細管の変化について IVCT を用いて観察した。図 14 のシェーマで示したように IVCT では正常からうっ血状態、うっ血解除に伴う尿細管の変化を詳細に観察でき病態の変化に対応し近位尿細管は柔軟に形態像を変化させていることが判明した。さらに一連の経過中に起こる近位尿細管内を流れる尿量の変化についても推察することが可能であった。一方、このような尿細管の動的な変化は通常法では観察することができなかった。生体内凍結技法の臨床応用に向かい、本研究は基礎データとして有用である。

謝辞

本研究に関して、研究ならびに学位論文のご指導、ご校閲を賜りました日本大学医学部病態病理学系人体病理学分野逸見明博教授、また研究全般を支えていただきました日本大学医学部腎臓高血圧内分泌内科相馬正義教授に深謝いたします。加えて、免疫染色について、貴重なアドバイスをいただいた獨協医科大学越谷病院病理診断科上田善彦教授に深謝いたします。そして、本研究において多くの実験手技をご指導下さり、ご協力いただいた日本大学医学部総合医学研究所電子顕微鏡室地家豊治さん、日本大学医学部病態病理学系病理学分野廣谷ゆかりさん、中西陽子先生、クレハ分析センター松本なつきさんほかご協力いただきました皆様にこころより感謝いたします。

表 1：寒剤の種類および融点と沸点

寒剤	融点(°C)	沸点(°C)	温度差(°C)
プロパン	-188	-42	146
イソペンタン	-160	28	188
アセトン	-94	57	151
エタノール	-117	79	196
窒素	-210	-196	14
ヘリウム	-271	-269	2

表 2：従来法と IVCT による近位尿細管細胞高と管径の計測

		Conventional		IVCT	
Group		mean		mean	
PT cell height (μm)	Group1	11.18 \pm 1.64	12.10 \pm 2.05	8.86 \pm 1.14	8.11 \pm 1.44
		12.24 \pm 2.32		7.86 \pm 1.01	
		12.96 \pm 1.75		7.63 \pm 1.75	
	Group2	12.64 \pm 1.56	12.30 \pm 1.83	12.55 \pm 2.05	12.40 \pm 1.93
		13.07 \pm 1.65		11.69 \pm 1.80	
		11.19 \pm 1.74		12.96 \pm 1.73	
	Group3	12.27 \pm 1.65	12.71 \pm 1.98	9.34 \pm 1.63	11.56 \pm 2.70
		12.32 \pm 1.84		11.38 \pm 1.90	
		13.56 \pm 2.15		13.96 \pm 2.21	
	Group4	11.20 \pm 1.89	10.84 \pm 1.85	9.49 \pm 1.72	9.83 \pm 1.97
		10.15 \pm 1.55		8.53 \pm 1.09	
		11.17 \pm 1.93		11.46 \pm 1.76	
PT diameter (μm)	Group1	40.67 \pm 4.02	38.20 \pm 4.30	33.17 \pm 1.14	33.91 \pm 4.90
		37.99 \pm 3.80		32.82 \pm 5.44	
		35.86 \pm 3.69		35.75 \pm 4.45	
	Group2	38.11 \pm 3.30	38.09 \pm 3.87	35.15 \pm 5.62	36.03 \pm 5.60
		39.37 \pm 3.89		35.82 \pm 5.34	
		36.80 \pm 3.97		37.12 \pm 5.70	
	Group3	36.94 \pm 4.99	37.99 \pm 4.48	34.95 \pm 4.52	37.44 \pm 5.72
		38.00 \pm 4.14		41.67 \pm 4.64	
		38.99 \pm 4.03		35.68 \pm 5.41	
	Group4	36.05 \pm 4.30	35.48 \pm 3.87	39.04 \pm 5.78	37.82 \pm 5.46
		35.10 \pm 3.55		35.67 \pm 4.81	
		35.29 \pm 3.68		38.75 \pm 5.12	

図 1：急速凍結法の原理

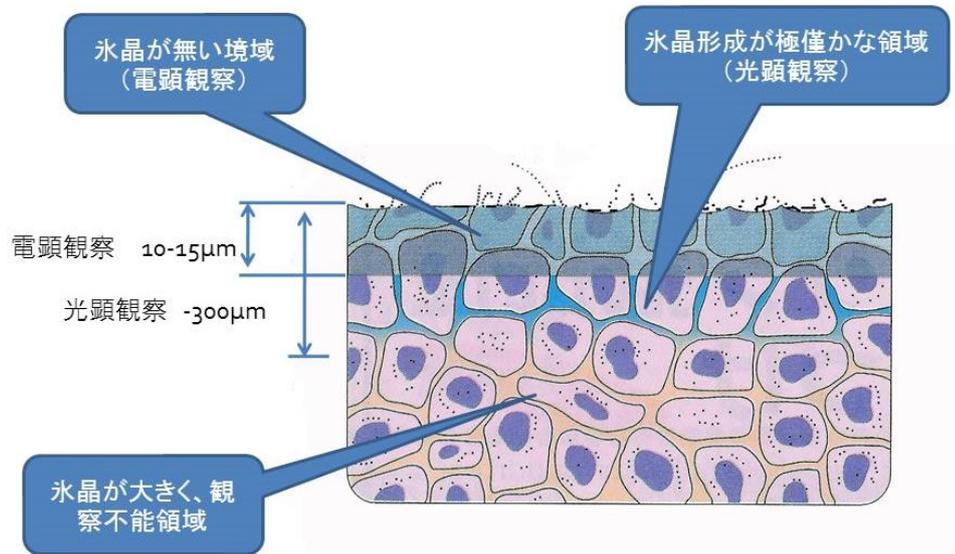


図 2：金属圧着法とジャブ漬け法のシェーマ

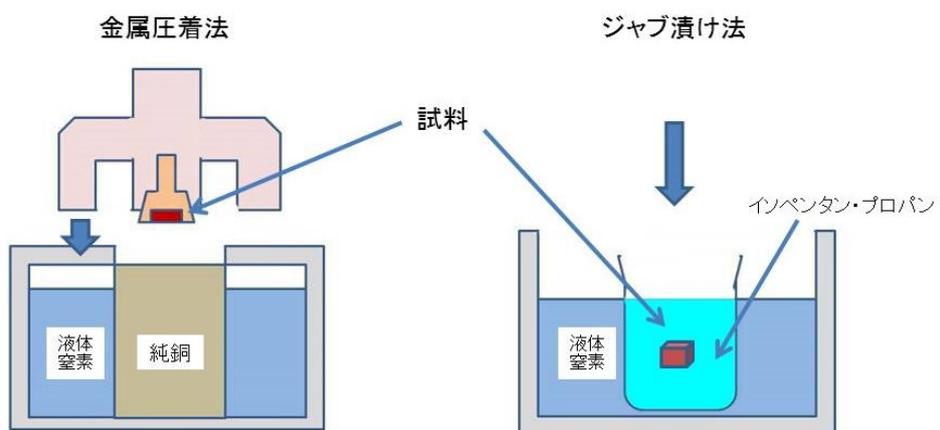


図 3 : 凍結置換法による固定領域 (腎臓、HE 染色)

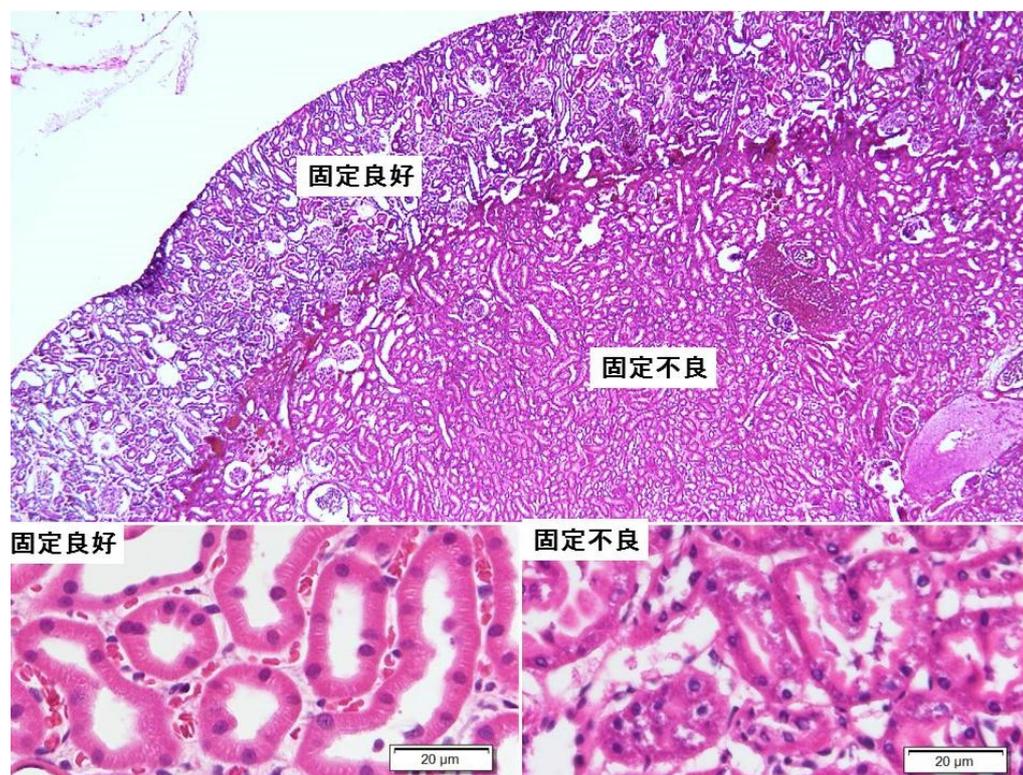


図 4 : 生体内凍結技法のシェーマ

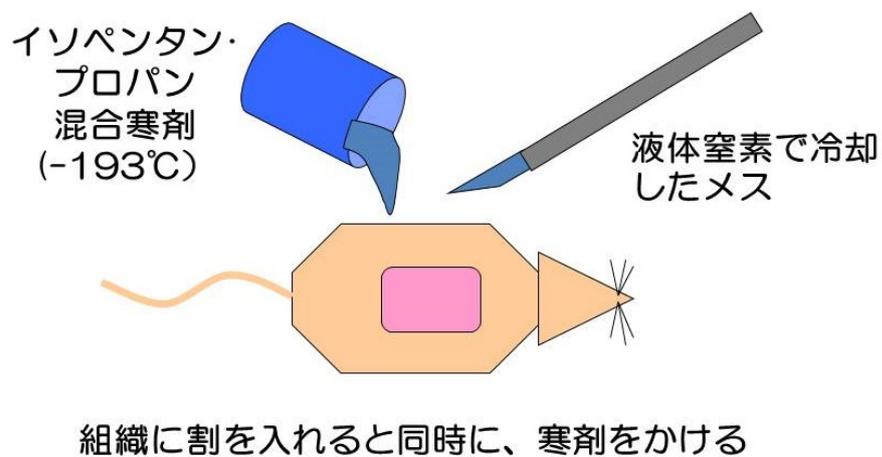


図 5 : イソペンタン・プロパン混合寒剤の作製

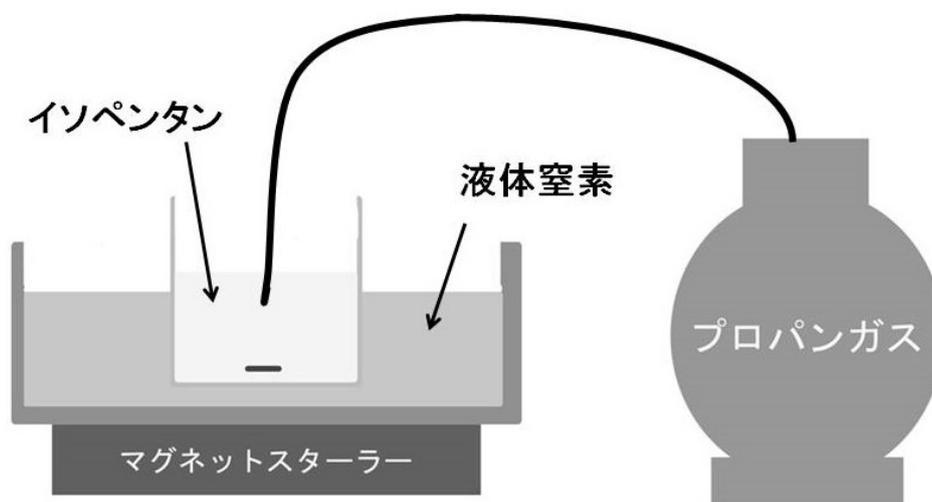


図 6 : ペットボトル容器を用いた生体内凍結技法の概要

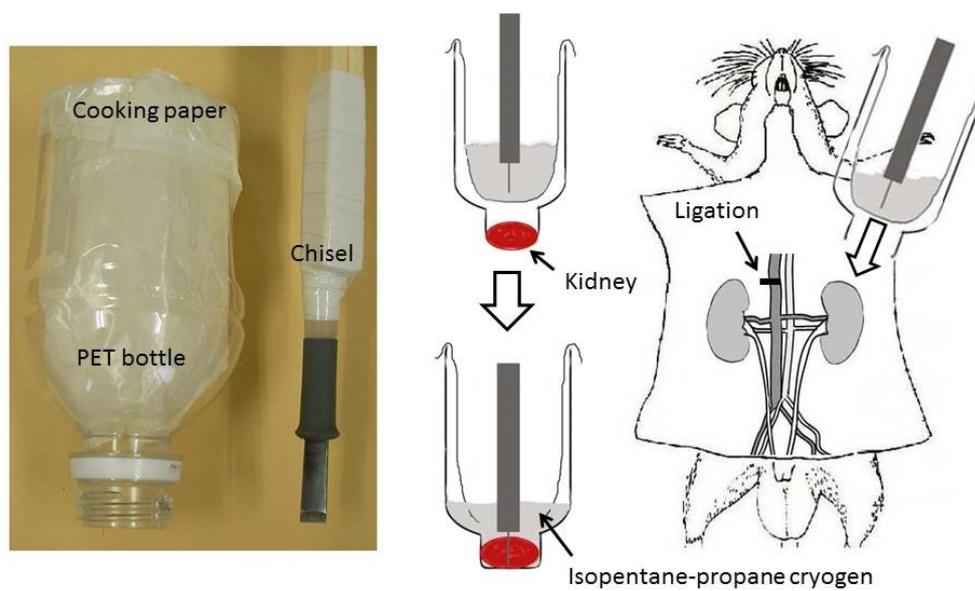
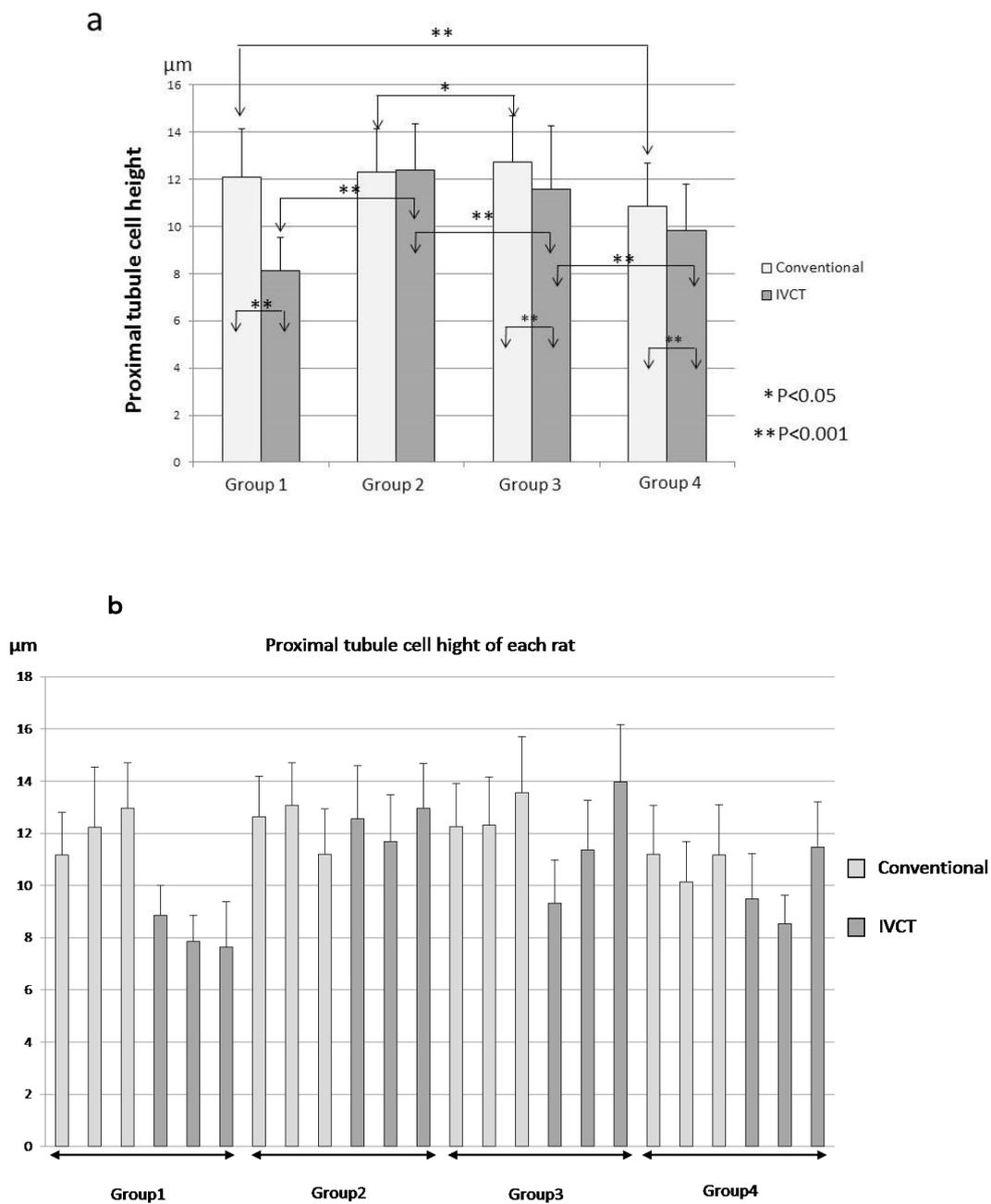
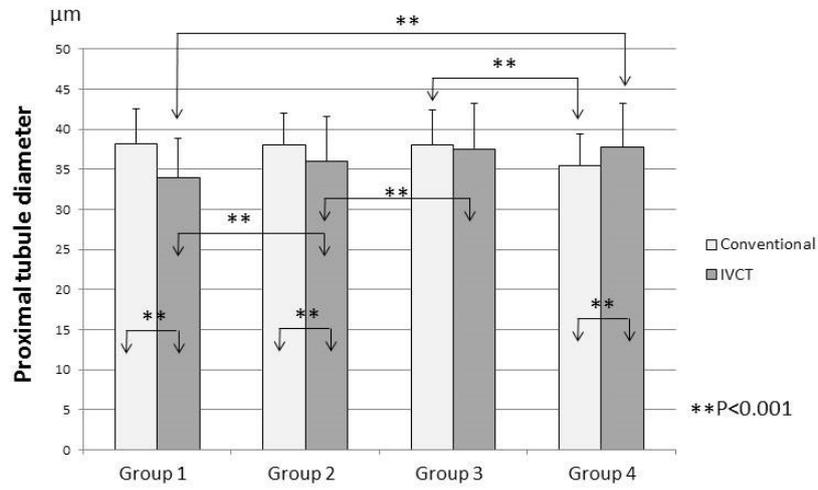


図 7：近位尿細管の細胞高(a)と管径(b)



c



d

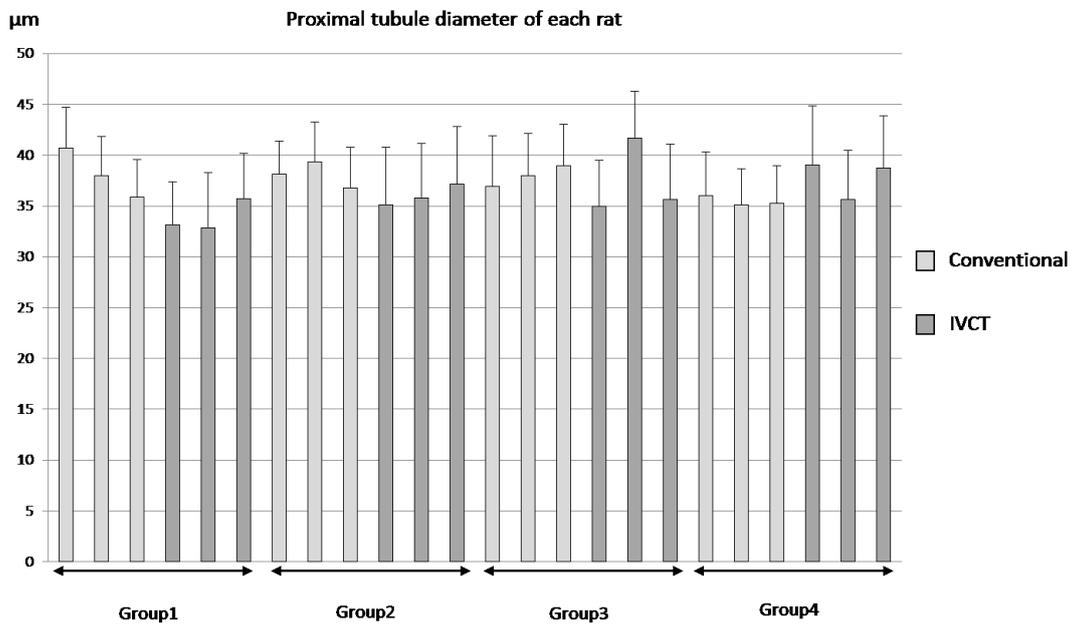


図 8：グループ 1 の組織像

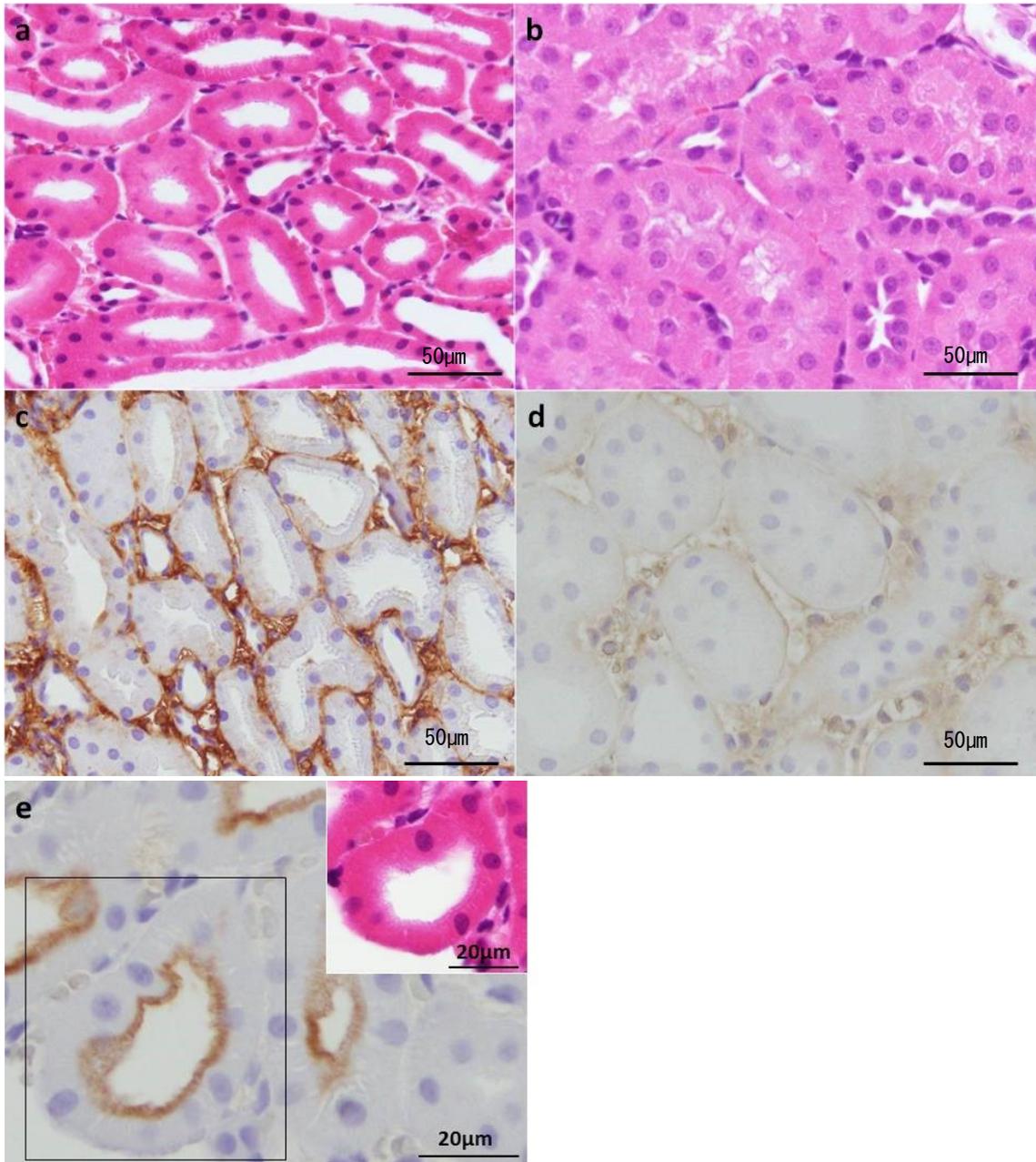


図9：グループ2 (a, c, d) とグループ3 (b, e) の組織像 (a, c, d; 連続切片)

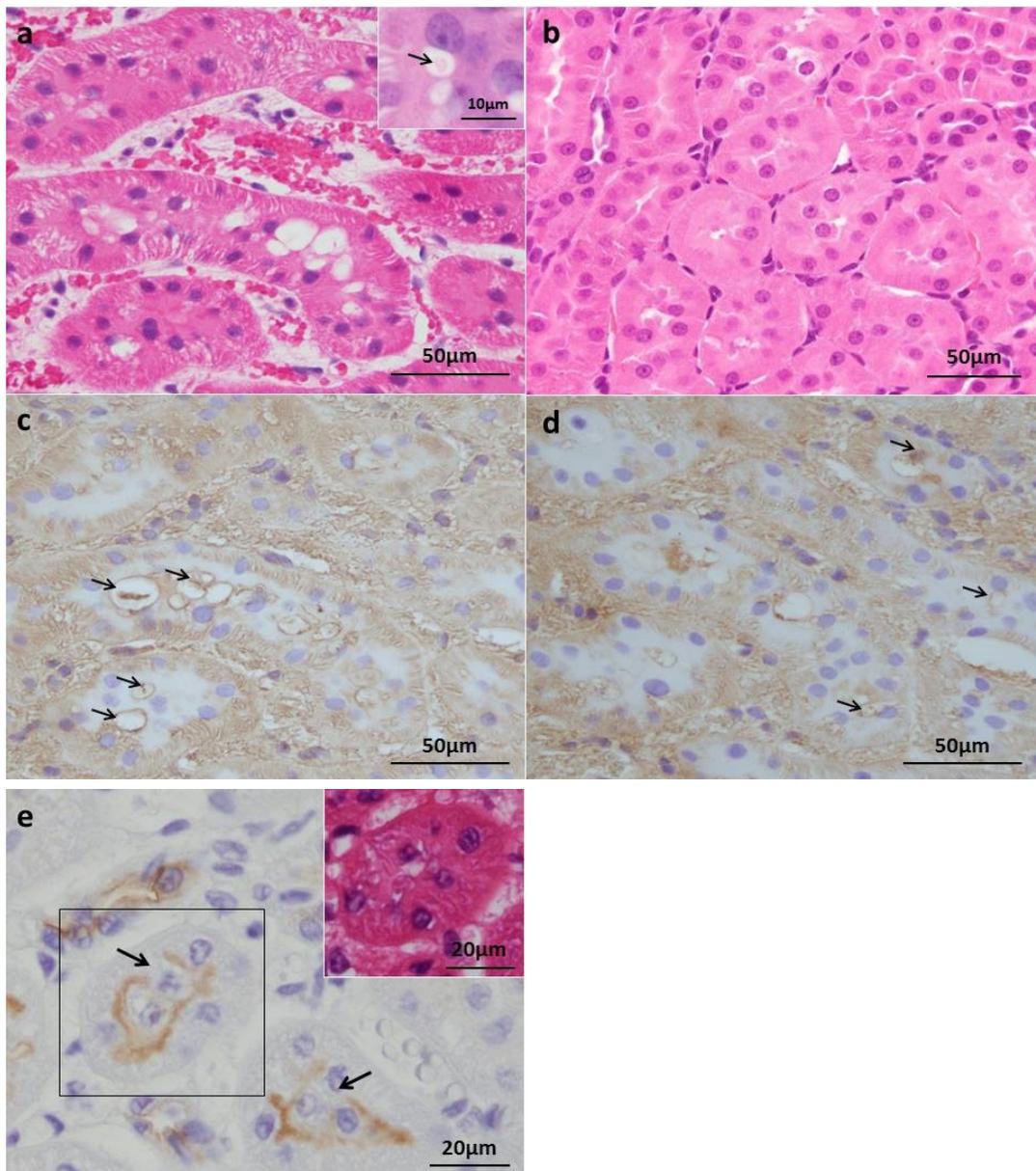


図 10：グループ 4 の組織像 (a, c, d；連続切片)

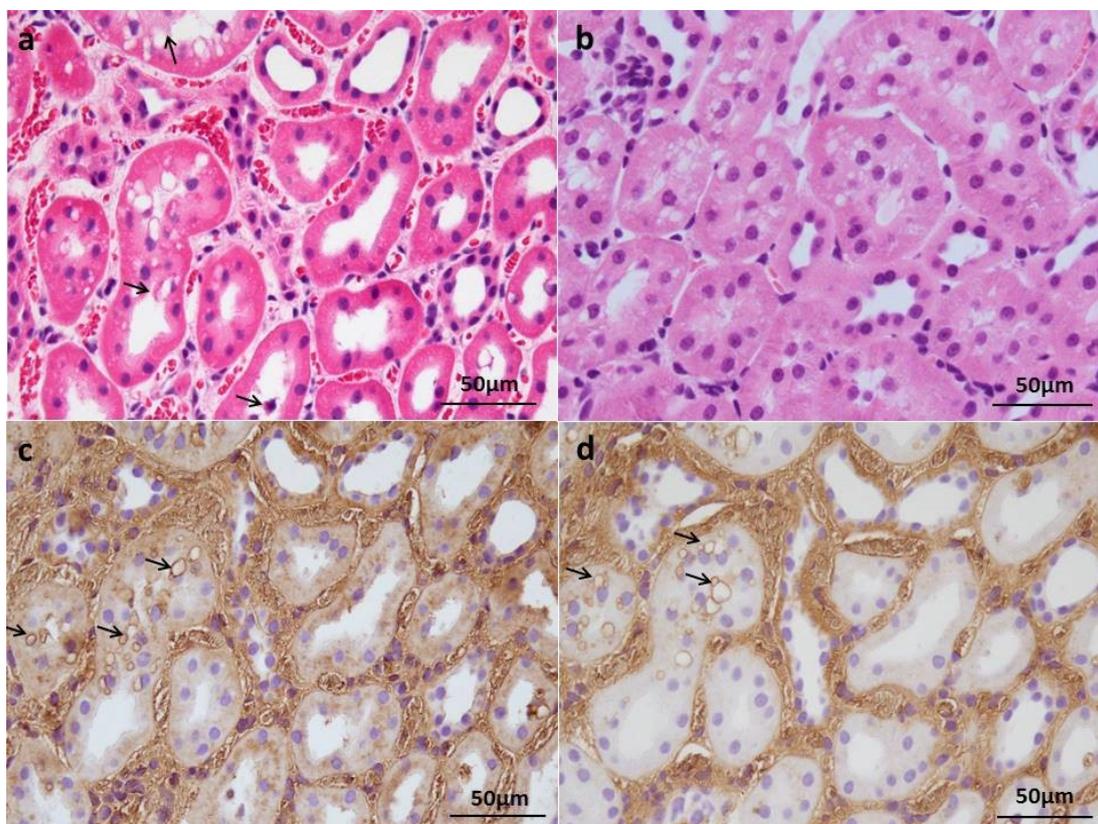


図 11：グループ 1 と 3 の電子顕微鏡像 (a, b IVCT グループ 3 ; c IVCT グループ 1 ; d 従来法 グループ 3)

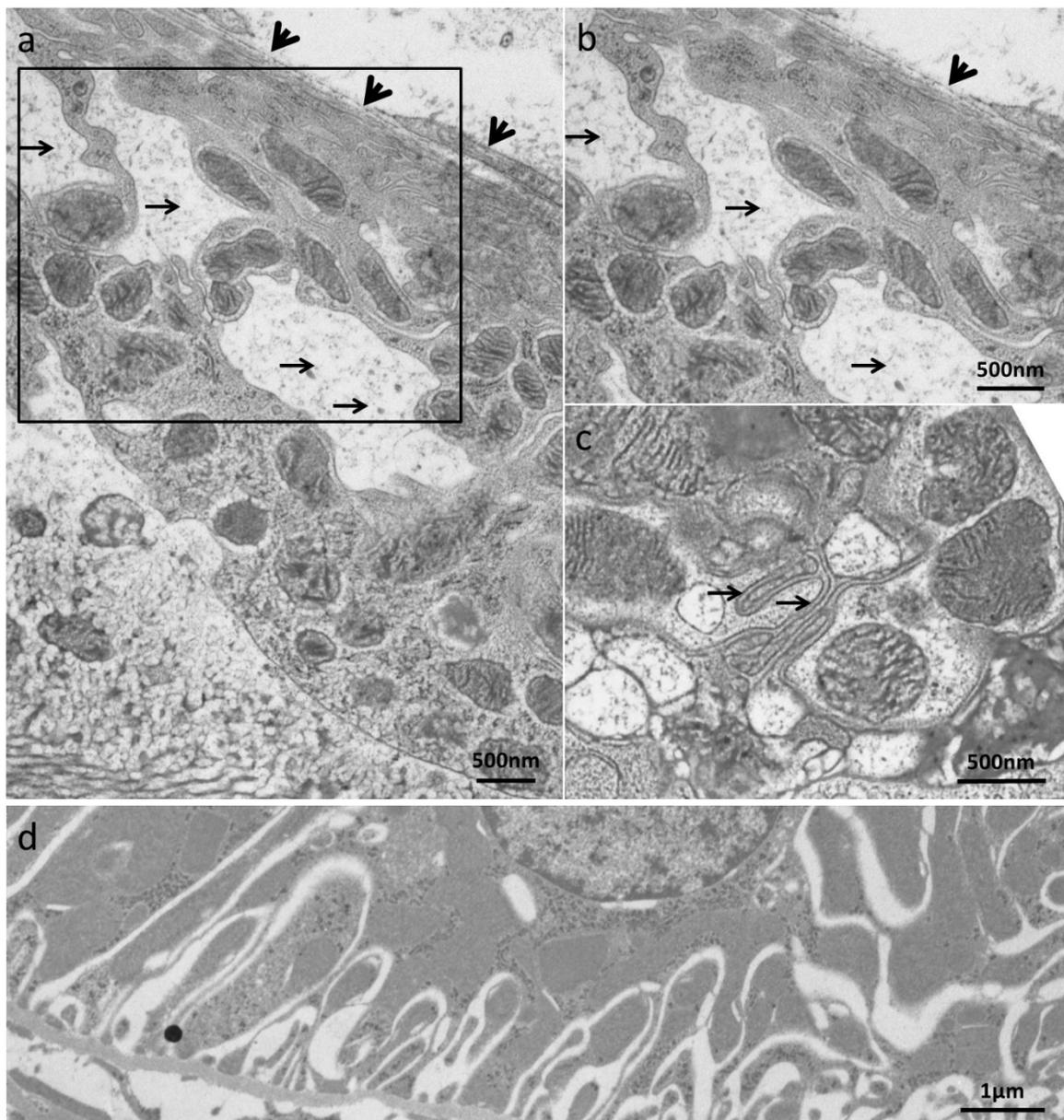


図 12：グループ 3 の電子顕微鏡像（従来法）

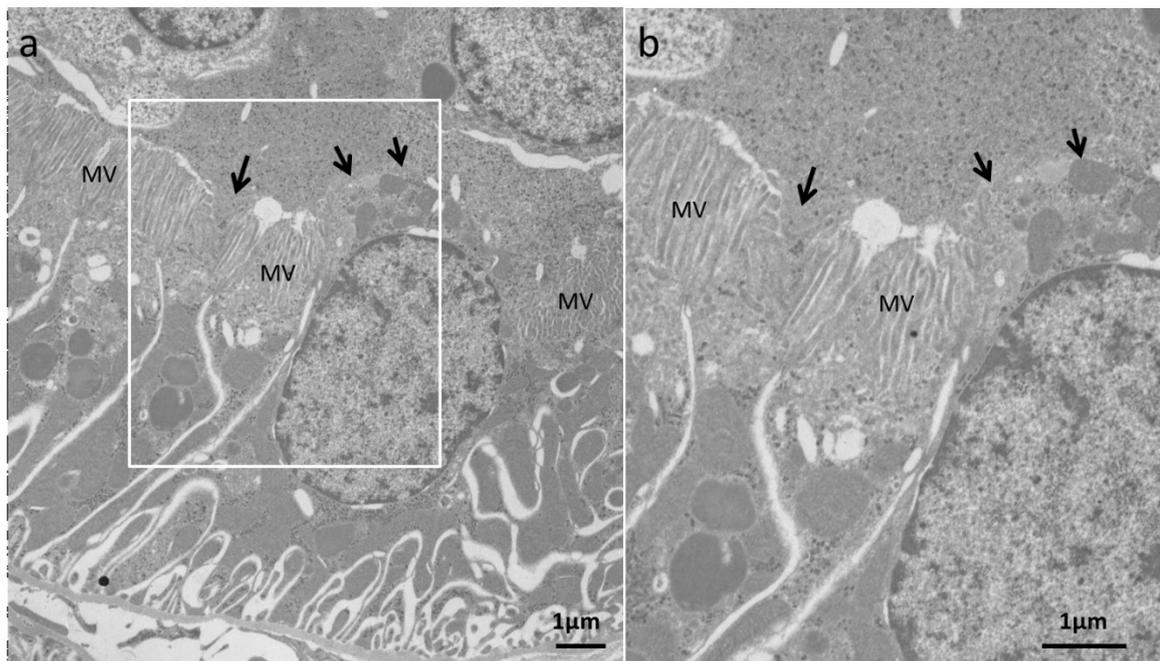


図 13: グループ 1 とグループ 3 の電子顕微鏡像 (従来法) (a グループ 1; b-e グループ 3)

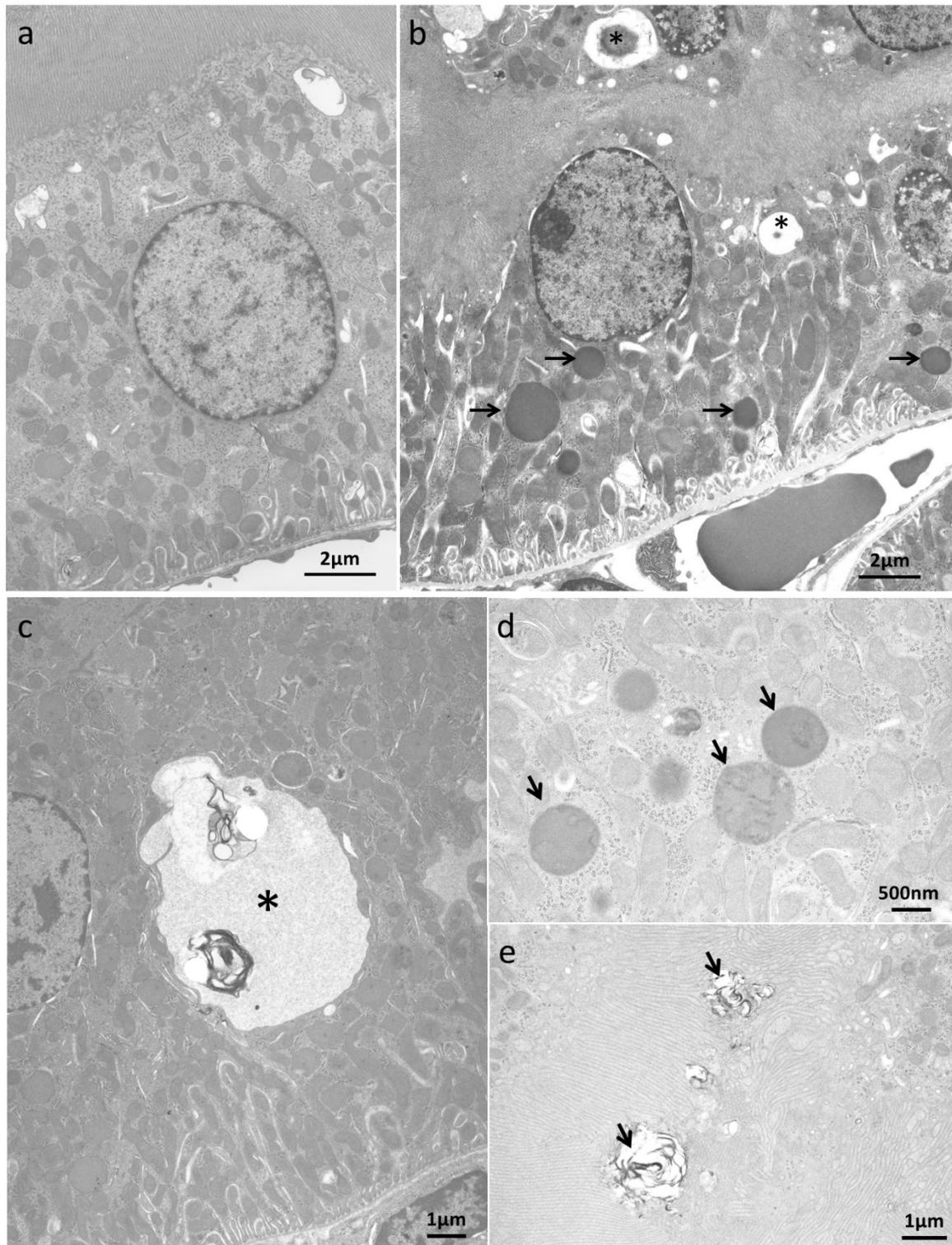
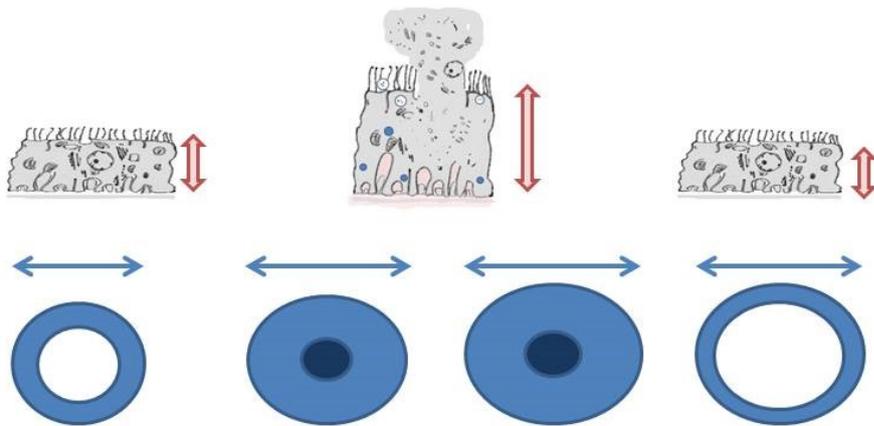
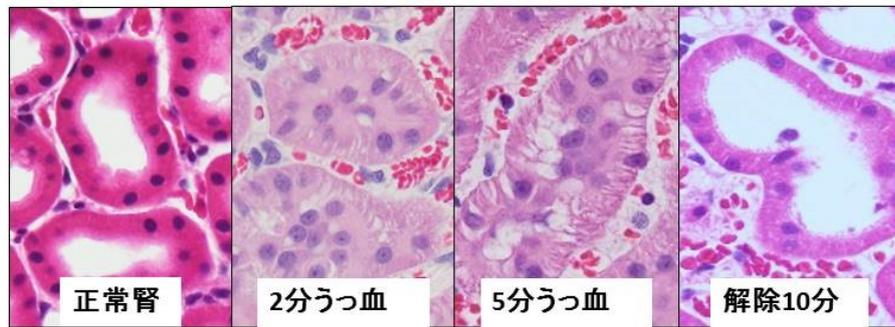


図 14 うっ血腎近位尿細管の経時的変化



細胞腫大	0	3+	2+	1+
基底線条の 拡大	0	3+	3+	1+
ファゴゾーム・ ライソゾーム	1+	3+	4+	2+
管径の太さ	1+	2+	3+	3+

表

表 1 寒剤の種類および融点と沸点

表 2 従来法と IVCT による近位尿細管細胞高と管径の計測

図説

図 1 急速凍結法の原理

図 2 金属圧着法とジャブ漬け法のシェーマ

図 3 凍結置換法による固定領域（腎臓、HE 染色）

図 4 生体内凍結技法のシェーマ（文献[7]から引用）

図 5 イソペンタン・プロパン混合寒剤の作製（文献[7]から引用）

図 6 ペットボトル容器を用いた生体内凍結技法の概要

図 7 近位尿細管の細胞高(a)と管径(b)

Conventional; 通常法 IVCT; 生体内凍結技法 (a n = 300 per group; b n = 600 per group)

図 8 グループ 1 の組織像

(a) IVCT による HE 像：近位尿細管は立方状細胞からなり内腔は保たれている。間質は軽度に拡張し部分的に毛細血管内に赤血球がみられる。

(b) 従来法の HE 像：近位尿細管の細胞は腫大し内腔が狭窄している。間質は狭い。

(c) IVCT の免疫染色（アルブミン）、(d) IVCT の免疫染色（IgG1）：間質にアルブミンと IgG1 が陽性である。

(e) IVCT の免疫染色（CD10、右上は連続切片による HE 像）：微絨毛を含む領域に陽性像をみとめる。

図9 グループ2 (a, c, d) とグループ3 (b, e) の組織像 (a, c, d ; 連続切片)

(a) IVCT の HE 像 : 近位尿細管は腫大した細胞からなり内腔は狭窄しており、核も不揃いに配列している。細胞質内に空胞がみられ、空胞内には無構造な物質が存在する (右上 HE 像 ; 矢印)。間質は拡大して多数の赤血球を含み拡張した毛細血管がみられる。また基底線条も明瞭である。

(b) 従来法の HE 像 : 近位尿細管の細胞は腫大し内腔は狭窄している。基底線条は不明瞭で間質も狭い。

(c) IVCT の免疫染色 (アルブミン)、(d) IVCT の免疫染色 (IgG1) : 基底線条の領域と空胞内 (矢印) および間質にアルブミンと IgG1 が陽性である。

(e) IVCT の免疫染色 (CD10、右上は連続切片による HE 像) : 微絨毛領域は一部で CD10 が陰性である。また、尿細管内腔に脱落細胞の核が観察される。

図10 グループ4 の組織像 (a, c, d ; 連続切片)

(a) IVCT の HE 像 : 写真の右半分は近位尿細管が広がっており、内腔は拡張している。細胞は立方状を示し基底線条も不明瞭である。写真の左半分では、近位尿細管は腫大した細胞からなり空胞もみられ部分的に内腔は狭窄している。内腔には脱落細胞核 (矢印) もみられる。

(b) 従来法の HE 像 : ほとんどの近位尿細管細胞は腫大し内腔は狭窄しており、間質も狭い。

(c) IVCT の免疫染色 (アルブミン)、(d) IVCT の免疫染色 (IgG1) : 間質と空胞 (矢印) にアルブミンと IgG1 が陽性である。

図11 グループ1と3の電子顕微鏡像 (a, b IVCT グループ3 ; c IVCT グループ1 ; d 従来法 グループ3)

a, 断面 (矢頭) 近傍では凍結状態はよく基底陥入の拡大 (矢印) がみられる。深部は氷晶によるアーティファクトが目立つ。(b ; aの強拡大)

c, 基底陥入は閉じている (矢印)。

d, a, bと比較して基底陥入は狭小化している。

図12 グループ3の電子顕微鏡像 (従来法)

a, 微絨毛 (MV) の一部で破壊がみられる (矢印)。内腔には脱落した壊死細胞成分が存在する (b ; aの強拡大)。

図13 グループ1とグループ3の電子顕微鏡像(従来法)(a グループ1; b-e グループ3)

- a, 近位尿細管細胞にはライソゾームやファゴゾームはみられない。
- b, 近位尿細管の細胞質には多数のライソゾーム(矢印)と一部にファゴゾーム(*)がみられる。
- c, ファゴゾーム(*)には膜状の構造物がみられる。
- d, 細胞質には多数のライソゾームがみられる。一部は基質が不均一で二次ライソゾーム(矢印)である。
- e, 0微絨毛領域にはポストライソゾーム(矢印)がみられる。

図14 うっ血腎近位尿細管の経時的変化

腎うっ血に伴い細胞の腫大、基底線条の拡大、ファゴソームの増加を認めた。うっ血解除と共にこれらの所見は改善した。管径はうっ血に伴い拡大し、うっ血解除後も拡大を維持していた。

引用文献

1. 白倉治郎：固定の意味, (白倉治郎 編) よくわかる電子顕微鏡技術—プロトコル・ノウハウ・原理, pp2-3, 共立出版, 東京, 2008
2. Hayat MA : Chemical fixation, (Hayat MA) Principles and techniques of electron microscopy, 3rd edn, pp1-78, Macmillan press, Houndmills, 1989
3. Ohno S, Terada N, Fujii Y, Ueda H, Takayama I : Dynamic structure of glomerular capillary loop as revealed by an in vivo cryotechnique, *Virchows Arch*, 427:519–527, 1996
4. Yu Y, Leng CG, Terada N, Ohno S : Scanning electron microscopic study of the renal glomerulus by an in vivo cryotechnique combined with freeze-substitution, *J Anat* 192:595–603, 1998
5. Ohno S, Kato Y, Xiang T, Terada N, Takayama I, Fujii Y, Baba T : Ultrastructural study of mouse renal glomeruli under various hemodynamic conditions by an “in vivo cryotechnique”, *Ital J Anat Embryol*, 106:431–438, 2001
6. 白倉治郎：急速凍結法, (白倉治郎 編) よくわかる電子顕微鏡技術—プロトコル・ノウハウ・原理, pp55-64, 共立出版, 東京, 2008
7. 逸見明博：急速凍結技法の病理診断への応用と生きた臓器・組織の観察, *日大医学雑誌*, 72:39-42, 2013
8. Hemmi A, Komiyama A, Ohno S, Fujii Y, Kawaoi A, Katoh R, Suzuki K : Different organization of intermediate filaments in columnar cells of rat large intestinal mucosa as revealed by confocal laser scanning microscopy and quick-freezing and deep-etching method, *Virchows Archiv*, 426:401-410, 1995
9. Hemmi A, Inaniwa Y, Ohno S, Fujii Y, Terada N, Mitsumata M, Nemoto N : Relationship between skeinoid fibers and stromal matrix in gastrointestinal stromal tumors: Morphometric analysis with quick-freezing and deep-etching method, *Pathology International*, 51:338-348, 2001
10. Hemmi A, Osaka S, Ohno N, Terada N, Fujii Y, Ohno S, Ohno S, Nemoto N : Chondrosarcoma with myxoid change: A study using quick-freezing and deep-etching method, *Ultrastructural Pathology*, 31:293-302, 2007
11. Hemmi S, Matsumoto N, Jike T, Yukari Obana Y, Nakanishi Y, Soma M, Hemmi A : Proximal tubule morphology in rats with renal congestion:a study involving the in vivo cryotechnique, *Med Mol Morphol*, DOI 10.1007/s00795-014-0084-x
12. Ohno N, Terada N, Saitoh S, Zhou H, Fujii Y, Ohno S : Recent development of in vivo cryotechnique to cryobiopsy for living animals, *Histol Histopathol*, 22:1281–1290, 2007

13. 白倉治郎：凍結置換法, (白倉治郎 編) よくわかる電子顕微鏡技術—プロトコル・ノウハウ・原理, pp65-74, 共立出版, 東京, 2008
14. Fujii Y, Ohno N, Li Z, Terada N, Baba T, Ohno S : Morphological and histochemical analyses of living mouse livers by new ‘cryobiopsy’ technique, *J Electron Microsc*, 55:113–122, 2006
15. 大野伸彦, 斎藤百合花, 寺田信夫, 藤井靖久, 斎藤成, 大野伸一:凍結技法の基礎から免疫組織化学と光イメージングへの応用, 組織細胞化学 2014 (組織細胞化学会 編) pp15-26, 中西印刷, 東京, 2014
16. Terada N, Kato Y, Fuji Y, Ueda H, Baba T, Ohno S : Scanning electron microscopic study of flowing erythrocytes in hepatic sinusoids as revealed by ‘in vivo cryotechnique’, *J Electron Microsc*, 47:67–72, 1998
17. Takayama I, Terada N, Baba T, Ueda H, Kato Y, Fujii Y, Ohno S : “In vivo cryotechnique” in combination with replica immunoelectron microscopy for caveolin in smooth muscle cells, *Histochem Cell Biol*, 112:443–445, 1999
18. Zea-Aragon Z, Terada N, Ohtsuki K, Ohnishi M, Ohno S : Immunohistochemical localization of phosphatidylcholine in rat mandibular condylar surface and lower joint cavity by cryotechniques, *Histol Histopathol*, 20:531–536, 2005
19. Terada N, Ohno N, Li Z, Fujii Y, Baba T, Ohno S : Detection of injected fluorescence-conjugated IgG in living mouse organs using “in vivo cryotechnique” with freeze-substitution, *Microsc Res Tech*, 66:173–178, 2005
20. Terada N, Saitoh Y, Saitoh S, Ohno N, Jin T, Ohno S : Visualization of microvascular blood flow in mouse kidney and spleen by quantum dot injection with “in vivo cryotechnique”, *Microvasc Res*, 80:491–498, 2010
21. Ohno N, Terada N, Ohno S (2006) Histochemical analyses of living mouse liver under different hemodynamic conditions by ‘in vivo cryotechnique’, *Histochem Cell Biol*, 126:389–398, 2010
22. Zea-Arago'n Z, Terada N, Ohno N, Fujii Y, Baba T, Ohno S : Effects of anoxia on serum immunoglobulin and albumin leakage through blood–brain barrier in mouse cerebellum as revealed by cryotechniques, *J Neurosci Methods*, 138:89–95, 2004
23. Saitoh S, Terada N, Ohno N, Ohno S : Distribution of immunoglobulin-producing cells in immunized mouse spleens revealed with “in vivo cryotechnique”, *J Immunol Methods*, 331:114–126, 2008
24. Ohno N, Terada N, Murata S, Katoh R, Ohno S : Application of cryotechniques with freeze-substitution for the immunohistochemical demonstration of

- intranuclear pCREB and chromosome territory, *J Histochem Cytochem*, 53:55–62, 2005
25. Li Z, Terada N, Ohno N, Ohno S : Immunohistochemical analyses on albumin and immunoglobulin in acute hypertensive mouse kidneys by “in vivo cryotechnique”, *Histol Histopathol*, 20:807–816, 2005
 26. Zhou D, Ohno N, Terada N, Li Z, Morita H, Inui K, Yoshimura A, Ohno S : Immunohistochemical analyses on serum proteins in nephrons of protein-overload mice by “in vivo cryotechnique”, *Histol Histopathol*, 22:137–145, 2007
 27. Matsumoto N, Hemmi A, Yamato H, Ohnishi R, Segawa H, Ohno S, Miyamoto K : Immunohistochemical analyses of parathyroid hormone-dependent downregulation of renal type II Na-Pi cotransporters by cryobiopsy, *J Med Invest*, 57:138–145, 2010
 28. Takayama I, Terada N, Baba T, Ueda H, Fujii Y, Kato Y, Ohno S : Dynamic ultrastructure of mouse pulmonary alveoli revealed by an in vivo cryotechnique in combination with freeze substitution, *J Anat*, 197:199–205, 2000
 29. 鈴木昭男 : 腎臓の構造. 現代病理学大系 15A 腎臓 I (飯島宗一 編), pp16-24 中山書店, 東京, 1989
 30. 橋本初次郎, 小川和朗 : 電子顕微鏡学辞典, (橋本初次郎, 小川和朗 編), pp941-942, 朝倉書店, 東京, 1986
 31. Sanders PW : Pathogenesis and treatment of myeloma kidney, *J Lab Clin Med*, 124:484–488, 1994
 32. Heher EC, Rennke HG, Laubach JP, Richardson PG : Kidney disease and multiple myeloma, *Clin J Am Soc Nephrol*, 8:2007–2017, 2013

研究業績

逸見 聖一朗

I	発表	①一般発表	30
		②特別発表	4
II	論文	①原著論文	8 (共 7)
		②症例報告	2 (共 2)
		③総説	なし
III	著書		5

I 発表

①一般発表

1. 逸見聖一朗, 梶原麻実子, 清水千枝, 矢吹美奈子, 伊藤謙, 福家吉伸, 藤田宜是, 相馬正義 : II型クリオグロブリンによりネフローゼ症候群を併発したループス腎炎の1例, 第41回日本腎臓学会東部学術大会, 東京, 2011年9月
2. 福家吉伸, 逸見聖一朗, 梶原麻実子, 清水千枝, 矢吹美奈子, 伊藤謙, 藤田宜是, 相馬正義 : 極低出生体重による二次性FSGSが軽度肥満により顕性化した一例, 第41回日本腎臓学会東部学術大会, 東京, 2011年9月
3. 藤田宜是, 逸見聖一朗, 北井真貴, 梶原麻実子, 矢吹美奈子, 福家吉伸, 相馬正義 : 糖尿病性腎症の発症進展におけるアディポカイン・炎症性シグナルの関与, 第109回日本内科学会総会, 京都, 2012年4月
4. 藤田宜是, 逸見聖一朗, 石原有子, 梶原麻実子, 矢吹美奈子, 福家吉伸, 里村厚司, 相馬正義 : 糖尿病性血管合併症におけるC3aを介したインスリン抵抗性や補体仲介型慢性炎症の関与, 第55回日本糖尿病学会年次学術集会, 神奈川, 2012年5月
5. 福家吉伸, 逸見聖一朗, 石原有子, 梶原麻実子, 矢吹美奈子, 藤田宜是, 相馬正義 : 高年発症微小変化型ネフローゼ症候群の臨床的特徴, 第55回日本腎臓学会学術総会, 神奈川, 2012年6月
6. 梶原麻実子, 福家吉伸, 佐々木裕和, 逸見聖一朗, 石原有子, 矢吹美奈子, 岡田一義, 藤田宜是, 相馬正義 : 運動後急性腎不全にReversible posterior leukoencephalopathy syndrome (RPLS)を合併した一例, 第57回日本透析医学会学術集会・総会, 北海道, 2012年6月
7. 高島 弘至, 井下篤司, 矢吹美奈子, 鈴木紘子, 逸見聖一朗, 小林伸一郎, 岡田一義, 相馬正義, 大西禎彦, 逸見一之 : IgG4高値を示した後腹膜線維症の2症例, 第57回日本透析医学会学術集会・総会, 北海道, 2012年6月
8. 吉田好徳, 阿部雅紀, 小林伸一郎, 梶原麻実子, 奈倉千苗美, 石原有子, 北井真貴, 佐々木裕和, 逸見聖一朗, 鈴木紘子, 谷口真知子, 馬場晴志郎, 岡田一義, 相馬正義 : 腹膜透析患者における血糖コントロール指標に関する検討, 第57回日本透析医学会学術集会・総会, 北海道, 2012年6月
9. 福家吉伸, 逸見聖一朗, 北井真貴, 石原有子, 奈倉千苗美, 梶原麻実子, 矢吹美奈子, 岡田一義, 藤田宜是, 相馬正義 : ANCA関連血管炎におけるplasmapheresis療法 中程度腎障害($\text{Cr} < 500 \mu\text{mol/l}$)での検討, 第57回日本透析医学会学術集会・総会, 北海道, 2012年6月
10. 逸見聖一朗, 福家吉伸, 石原有子, 梶原麻実子, 矢吹美奈子, 藤田宜是, 相馬正義 : 肺結核が関与したと考えられた膜性腎症の一例, 第42回日本腎臓学会東部学術大会, 新潟, 2012年10月

11. 村田悠輔, 福家吉伸, 逸見聖一朗, 石原有子, 梶原麻実子, 矢吹美奈子, 藤田宜是, 相馬正義 : 肺結核の治療に一致して著明な改善を認めたIgA腎症の一例, 第42回日本腎臓学会東部学術大会, 新潟, 2012年10月
12. 鈴木紘子, 阿部雅紀, 丸山範晃, 及川治, 高島弘至, 馬場晴志郎, 伊藤緑, 藤井由希, 谷口真知子, 逸見聖一朗, 岡田一義, 相馬正義 : 急性血液浄化法を要した患者の予後規定因子の検討, 第 23 回日本急性血液浄化学会学術集会, 埼玉, 2012 年 10 月
13. 逸見 聖一朗, 福家吉伸, 石原有子, 梶原麻実子, 矢吹美奈子, 藤田宜是, 相馬正義 : 肺結核が関与したと考えられた膜性腎症の一例, 第 513 回日本大学医学会例会, 東京, 2012 年 10 月
14. 藤田宜是, 逸見聖一朗, 小林有子, 梶原麻実子, 矢吹美奈子, 福家吉伸, 相馬正義 : 2 型糖尿病における腎症の進展と ASP を介した補体仲介型慢性炎症の関連, 第 110 回日本内科学会総会, 東京, 2013 年 4 月
15. 福家吉伸, 逸見聖一朗, 小林有子, 梶原麻実子, 矢吹美奈子, 藤田宜是, 相馬正義 : MPO-ANCA 関連血管炎における腎限局型と全身型での腎障害の比較, 第 56 回日本腎臓学会学術総会, 東京, 2013 年 5 月
16. 小林有子, 逸見聖一朗, 梶原麻実子, 矢吹美奈子, 福家吉伸, 藤田宜是, 相馬正義 : ループス腎炎における血清 IL-22 の臨床的意義, 第 56 回日本腎臓学会学術総会, 東京, 2013 年 5 月
17. 藤田宜是, 渡辺英綱, 村田悠輔, 逸見聖一朗, 小林有子, 梶原麻実子, 矢吹美奈子, 福家吉伸, 里村厚司, 相馬正義 : 2 型糖尿病患者における DPP4 阻害薬の尿アルブミン排泄量に及ぼす影響, 第 56 回日本腎臓学会学術総会, 東京, 2013 年 5 月
18. 逸見聖一朗, 福家吉伸, 村田悠輔, 小林有子, 梶原麻実子, 矢吹美奈子, 岡田一義, 藤田宜是, 相馬正義 : 紫斑病性腎炎による急速進行性糸球体腎炎に血漿交換療法・多剤併用療法が有効であった一例, 第 58 回日本透析医学会 学術集会・総会, 福岡, 2013 年 6 月
19. 梶原麻実子, 福家吉伸, 矢吹美奈子, 小林有子, 逸見聖一朗, 村田悠輔, 根岸恵理子, 岡田一義, 藤田宜是, 相馬正義 : 顕微鏡的多発血管炎に伴う高度の消化管出血および急速進行性糸球体腎炎に対し血漿交換療法が著効した一例, 第 58 回日本透析医学会 学術集会・総会, 福岡, 2013 年 6 月
20. 福家吉伸, 逸見聖一朗, 小林有子, 梶原麻実子, 矢吹美奈子, 岡田一義, 藤田宜是, 相馬正義 : ANCA 関連血管炎における肺腎症候群に対する血漿交換療法の有用性, 第 58 回日本透析医学会 学術集会・総会, 福岡, 2013 年 6 月
21. 鈴木紘子, 阿部雅紀, 丸山範晃, 及川治, 高島弘至, 馬場晴志郎, 伊藤緑, 藤井由季, 谷口真知子, 逸見聖一朗, 岡田一義, 相馬正義 : 急性血液浄化法

- を必要とされた患者の予後規定因子の検討, 第 58 回日本透析医学会 学術集会・総会, 福岡, 2013 年 6 月
22. 逸見聖一朗、地家豊治、松本なつき、尾花ゆかり、逸見明博 : 生体内凍結技法を用いたラットうっ血腎集合管の観察, 第 29 回医学生物学電子顕微鏡技術学会, 神奈川, 2013 年 6 月
 23. 逸見 聖一朗, 地家豊治, 松本なつき, 尾花ゆかり, 中西陽子, 逸見明博 : 生体内凍結技法を用いたラットうっ血腎近位尿細管の観察, 第 54 回日本組織細胞化学会総会・学術集会, 東京, 2013 年 9 月
 24. 逸見聖一朗, 福家吉伸, 村田悠輔, 小林有子, 梶原麻実子, 矢吹美奈子, 藤田宜是, 相馬正義 : 慢性 GVHD の経過中に発症した膜性腎症の一例, 第 43 回日本腎臓学会東部学術大会, 東京, 2013 年 10 月
 25. 村田悠輔, 福家吉伸, 逸見聖一朗, 小林有子, 梶原麻実子, 矢吹美奈子, 藤田宜是, 相馬正義 : IgA 腎症に薬剤性尿細管間質性腎炎を合併し半月体形成性 RPGN を呈した一例, 第 43 回日本腎臓学会東部学術大会, 東京, 2013 年 10 月
 26. 藤田宜是, 渡邊英綱, 逸見聖一朗, 梶原麻実子, 矢吹美奈子, 福家吉伸, 里村厚司, 相馬正義 : 糖尿病性腎症患者における DPP4 阻害薬の腎内皮細胞障害修復効果, 第 111 回日本内科学会総会, 東京, 2014 年 4 月
 27. 福家吉伸, 逸見聖一朗, 梶原麻実子, 藤田宜是, 相馬正義 : ループス腎炎における IL-22 と腎病態に関する検討, 第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 東京, 2014 年 4 月
 28. 藤田宜是, 福家吉伸, 矢吹美奈子, 梶原麻実子, 逸見聖一朗, 村田悠輔, 里村厚司, 相馬正義 : 2 型糖尿病におけるインスリン抵抗性と補体活性および糸球体障害との関連, 第 57 回日本腎臓学会学術総会, 神奈川, 2014 年 7 月
 29. 丸山範晃, 岡田一義, 藤井由季, 小林伸一郎, 逸見聖一朗, 東龍英, 堀越周, 及川治, 阿部雅紀, 相馬正義 : 腹水濾過濃縮再静注法における腹水中の IL-6 の動向と生体反応の観察, 第 59 回日本透析医学会学術集会・総会, 兵庫, 2014 年 7 月
 30. 福家吉伸, 東龍英, 村田悠輔, 逸見聖一朗, 奈倉千苗美, 梶原麻実子, 矢吹美奈子, 岡田一義, 藤田宜是, 相馬正義 : 抗糸球体基底膜抗体腎炎に HIT と Thrombotic microangiopathy (TMA) を合併し、長期に血小板減少が持続した一例, 第 59 回日本透析医学会学術集会・総会, 兵庫, 2014 年 7 月

②特別発表

1. 藤田宜是, 逸見聖一朗, 矢吹美奈子, 梶原麻実子, 福家吉伸, 里村厚司, 相馬正義 : 腎症 糖尿病性腎症の発症進展における炎症性ストレスと補体系の活性化, 第 24 回日本糖尿病合併学会, 大宮, 2011 年 10 月
2. 藤田宜是, 福家吉伸, 矢吹美奈子, 梶原麻実子, 石原有子, 逸見聖一朗, 里村厚司, 相馬正義 : 糖尿病性血管合併症の成立における補体系の関与, 第27回日本糖尿病合併症学会, 福岡, 2012年11月
3. 藤田宜是, 渡邊英綱, 村田悠輔, 逸見聖一朗, 小林有子, 梶原麻実子, 矢吹美奈子, 福家吉伸, 里村厚司, 相馬正義 : 糖尿病性腎症患者において DPP4 阻害薬投与が腎血管障害に及ぼす影響について, 第 28 回日本糖尿病合併症学会, 北海道, 2013 年 9 月
4. 福家吉伸, 逸見聖一朗, 梶原麻実子, 藤田宜是, 相馬正義 : 血管炎 ANCA 関連血管炎における肺腎症候群に対する血漿交換療法 2 年間の臨床成績, 第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 東京, 2014 年 4 月

II 論文

①原著論文

1. 岡田一義, 阿部雅紀, 水盛邦彦, 小林伸一郎, 佐々木裕和, 鈴木絃子, 谷口真知子, 逸見聖一朗, 北井真貴, 鈴木緑, 奈倉千苗美, 池田和也, 梶原麻実子, 清水千枝, 矢吹美奈子, 松本史郎, 伊藤謙, 井下篤司, 丸山高史, 福家吉伸, 藤田宣是, 相馬正義 : 頭蓋内圧亢進症急性期に高張グリセロール併用頻回低効率短時間血液透析(frequent, low-efficient and short hemodialysis:FLESHD)が有用であった維持血液透析症例, 日本透析医学会雑誌 44: 581-587, 2011
2. Fujita T, Hemmi S, Kajiwara M, Yabuki M, Fuke Y, Satomura A, Soma M. : Complement-mediated chronic inflammation is associated with diabetic microvascular complication. Diabetes/Metabolism Research and Reviews. 29:220-226, 2013
3. Shimizu C, Fujita T, Fuke Y, Yabuki M, Kajiwara M, Hemmi S, Satomura A, Soma M. : Effects of cyclosporine on bone mineral density in patients with glucocorticoid-dependent nephrotic syndrome in remission. International Urology and Nephrology. 45:803-808, 2013
4. 鈴木絃子, 阿部雅紀, 丸山範晃, 及川治, 高島弘至, 馬場晴志郎, 伊藤緑, 藤井由季, 谷口真知子, 逸見聖一朗, 岡田一義, 相馬正義 : 急性血液浄化法を要した患者の予後予測因子の検討, 日本急性血液浄化学会雑誌 4:81-86, 2013
5. 吉田好徳, 阿部雅紀, 小林伸一郎, 梶原麻美子, 奈倉千苗美, 石原有子, 北井真貴, 佐々木裕和, 逸見聖一朗, 鈴木絃子, 谷口真知子, 馬場晴志郎, 岡田一義, 相馬正義 : 糖尿病腹膜透析患者における血糖コントロール指標, 腎と透析 75, 227-228, 2013
6. 大川恵里奈, 馬場晴志郎, 高島弘至, 谷口真知子, 鈴木絃子, 逸見聖一朗, 吉田好徳, 丸山範晃, 阿部雅紀, 岡田一義, 相馬正義 : 腹膜透析休息日継続因子についての検討, 腎と透析 75, 99-100, 2013
7. Fujita T, Hemmi S, Kajiwara M, Yabuki M, Fuke Y, Satomura A, Soma M. : Diminished complement-activating capacity through the classical pathway in sera from type 2 diabetes mellitus. Immunological Investigations. 43:170-181, 2014
8. Hemmi S, Matsumoto N, Jike T, Obana Y, Nakanishi Y, Soma M, Hemmi A. : Proximal tubule morphology in rats with renal congestion: a study involving the in vivo cryotechnique. Medical Molecular Morphology. DOI 10.1007/s00795-014-0084-x, 2014

②症例報告

1. Fuke Y, Hemmi S, Kajiwara M, Yabuki M, Fujita T, Soma M. : Oligomeganephronia in an adult without end stage renal failure. Clinical and Experimental Nephrology. 16:325-328, 2012
2. Suzuki H, Fujita T, Fuke Y, Yabuki M, Kajiwara M, Ishihara Y, Hemmi S, Soma M. : A case of ANCA-associated vasculitis with glomerular eosinophilic infiltration: a possible pathogenic implication. Modern Rheumatology. 23:564-571, 2013

Ⅲ 著書

1. 逸見聖一朗：血液透析の導入基準，（岡田一義，阿部雅紀，及川治 編）血液浄化療法ポケットハンドブック，pp7-10，東京医学社，東京，2014
2. 逸見聖一朗：腹膜透析の導入基準，（岡田一義，阿部雅紀，及川治 編）血液浄化療法ポケットハンドブック，pp15-17，東京医学社，東京，2014
3. 逸見聖一朗：ミルキング法，（岡田一義，阿部雅紀，及川治 編）血液浄化療法ポケットハンドブック，pp102-103，東京医学社，東京，2014
4. 逸見聖一朗：ヘプシジン，（岡田一義，阿部雅紀，及川治 編）血液浄化療法ポケットハンドブック，pp279，東京医学社，東京，2014
5. 逸見聖一朗：血漿交換療法，（岡田一義，阿部雅紀，及川治 編）血液浄化療法ポケットハンドブック，pp491-496，東京医学社，東京，2014