

ベンチジン誘導体によるラット腎障害の 形態的研究

川崎医科大学大学院 形態系超微形態病理学 III

(指導: 大澤源吾教授)

松 谷 拓 郎

(昭和62年 2 月25日受理)

Morphological Study of Benzidine Derivative Induced Rat Nephropathy

Takuro Matsutani

Division of Nephrology, Department of Medicine
Kawasaki Medical School

(Accepted on February 25, 1987)

糸球体基底膜の選択透過性異常の原因として、基底膜合成に関与していると考えられる糸球体上皮細胞の態度が注目される。一方、ラットに N, N'-Diacetylbenzidine (N, N'-DAB) を投与すると、蛋白尿と上皮細胞の特異な病理変化が出現することが知られている。著者は、この上皮細胞の病理変化と蛋白尿の関係を明らかにするために N, N'-DAB をラットの腹腔内に1回または2回投与し、観察した。投与後40日に蛋白尿が出現し始め、100日には多くの個体で蛋白尿が陽性化し、200日にわたって 300 mg/日以上尿蛋白が持続増強した。形態的には糸球体上皮細胞に空胞状変化が出現し、蛋白尿の程度に伴って係蹄硬化性変化、硝子化巣が出現し、増悪した。推計学的には、上皮細胞の空胞状変化は、蛋白尿の出現に先行していた。このことは糸球体上皮細胞の空胞性病変のなかには、薬剤による原発性の細胞障害によって発現したものがある可能性を示す。

The glomerular epithelial cells are assumed to synthesize basement membrane. Therefore, pathological changes in glomerular epithelial cells are noteworthy as a cause of abnormal permselectivity of the glomerular basement membrane.

Administration of N, N'-Diacetylbenzidine (N, N'-DAB) to rats causes proteinuria and characteristic pathological epithelial cell changes. The author investigated N, N'-DAB injected rats and attempted to clarify the relationship between proteinuria and pathological epithelial cell changes.

The first evidence of proteinuria among the rats appeared 40 days after the beginning of the experiment and most of the rats had proteinuria at the end of 100 days. Then proteinuria increased to over 300 mg/day and continued to the 200th experimental day.

Morphological observations just of all revealed glomerular epithelial cell vacuolization. Focal hyalinosis and capillary sclerotic lesions also appeared and spread

gradually with the progress of proteinuria.

Statistically, the glomerular epithelial vacuolizations appeared before the beginning of proteinuria. This indicates that some vacuolization of the epithelial cells is the result of drug induced degenerative changes in the cytoplasm rather than absorptive vacuoles.

Key Words ① Glomerular epithelial cell ② Epithelial vacuole
③ Proteinuria

緒 言

蛋白尿の原因のひとつとして、糸球体基底膜の barrier の破綻が考えられる。^{1)~5)}

Walker は銀粒子を tracer として、ラットの腎糸球体基底膜が上皮側で新生され、内皮側に向かって代謝される過程を推定した。^{6),7)} このことは、糸球体基底膜の選択透過性の維持に、糸球体上皮細胞の関与する可能性を示唆する。^{8),9)}

加えて、puromycin aminonucleoside (以下 PAN) を用いた動物実験においては、蛋白尿出現期に一致して上皮細胞足突起が癒合消失する現象が知られている。^{10),11)} また、上皮細胞質内に空胞状構造の出現することも報告されている。^{10)~13)} 顕微鏡的に上皮細胞に空胞状変化の出現する例としてはほかに Adriamycin, および Daunomycin 投与による実験腎障害が挙げられる。^{14)~17)} 糸球体上皮細胞における類似の空胞状変化は、N, N'-Diacetylbenzidine (以下 N, N'-DAB) による腎障害においても報告されている。^{18)~24)} しかしこれまで、このような上皮細胞の変化が、蛋白尿の出現とどのような関係を持つのかその意義の詳細については明らかにされていない。

著者は N, N'-DAB によるラット腎障害の、蛋白尿出現期における糸球体の形態を、上皮細胞を中心に観察した。

対 象 と 方 法

1) 腎症動物の作成および観察

N, N'-DAB^{25)~30)} (東京化成工業) を 100mg/dl の蒸留水懸濁液とし、6 週齢の雌ウィスターラ

ットの腹腔内に注射投与した。57 匹に 200 mg を投与し、第 1 群とした。別に 23 匹のラットには、4 週の間隔をおいてさらに 200 mg を追加投与して第 2 群とした。さらにはほかの 29 匹のラットには、倍量の 400 mg を 1 回に投与して第 3 群とした。対照群として 38 匹のラットを未処置、あるいは生食投与して観察した。

ラットは 4~6 匹ずつ飼育籠に分け、一般の飼料 (MF-オリエンタル酵母) と飲料水を自由に摂取させて飼育した。

実験開始前、および実験開始後 20 日から 180 日まで 10 日間隔で各群から 4~10 匹のラットにつき、代謝ゲージを使用して 24 時間蓄尿し、Kingsbury Clark 法 (以下 K-C 法) で蛋白濃度を測定、1 日尿蛋白量を計算した。

ラットは屠殺直前に 24 時間蓄尿し、エチルエーテルのガス吸入によって麻酔したのち、胸腔を露出して左心室より血液を採取した。

血液採取の後、すみやかに左腎をとり出し、まず皮質小片をグルタルアルデヒド、および四酸化オスミウムによる二重固定、Epon 812 包埋して電顕用試料とした。また、左腎中央部を 0.5 cm の厚さに横断し、アルコールブアンに固定後パラフィン包埋した。残りの組織は -30°C の冷凍庫中にて凍結標本とした。

血清については、Folin-Wu 法、および BCG 法にて、それぞれクレアチニン値とアルブミン値を測定した。

2) 組織標本の判定

パラフィン包埋された組織を 2 μ m の厚さの光顕用切片とし、これに HE、および PAS 染色を行って、一匹のラットについて 50 個の糸球体を観察した。上皮細胞の形態変化、係蹄構造

の破壊の有無について注目し、50個の糸球体に出現する頻度を求めた。なお、観察した上皮細胞の病理変化の出現期については、対照群との比較のために、Wilcoxon の検定法を行った。

Epon 包埋された電顕用試料は、糸球体部分をガラスナイフにて超薄切し、銅製メッシュにとり、酢酸ウラン、クエン酸鉛の二重染色を行った。電子顕微鏡は日立 HU-12A を用いて観察した。

凍結標本はクリオスタットで 4μ の凍結切片とし、これをガラスプレパラートにとり、抗ラット IgM、フィブリノーゲン、 C_3 蛍光抗体による直接法、抗ラット IgG 抗体と抗 IgG 蛍光抗体による間接法を用いて検索した。

結 果

<蛋白尿の出現と進行>

対照群では、10週齢から35週齢の24時間尿蛋白排泄量は変動がなく、平均値は 1.3mg/日 、標準偏差は 1.1 であった。対照群の観察から

2.5mg/日 以上の尿蛋白量を示す個体を、有意の蛋白尿個体とした。

N, N'-DAB 投与個体では、Figure 1 に示すように、N, N'-DAB 投与50日から100日後にわたって上記の正常値を超えて異常蛋白尿が出現し始めた。図に示すように蛋白尿の出現時期は個体によって差異がある。

各群間における蛋白尿の程度については、第3群が最も強く、第2群がこれに次いでいたが (Fig. 2, Table 1)、第3群では蛋白尿出現前の早期死亡が38%と高頻度である。これに蛋白尿出現後の死亡を合わせると第3群では全体の死亡率は52%と半数を超えた。これに対し、第1群と第2群における死亡はそれぞれ16%と18%であった。

<血清クレアチニン値およびアルブミン値>

対照群では実験開始100日までとそれ以後で血清クレアチニン値の平均はそれぞれ $1.3 \pm 0.4\text{mg/dl}$ から $1.2 \pm 0.2\text{mg/dl}$ と変動はなかった。これに対し、N, N'-DAB 投与群では実験開始100日までの値は対照群と有意差はないが、

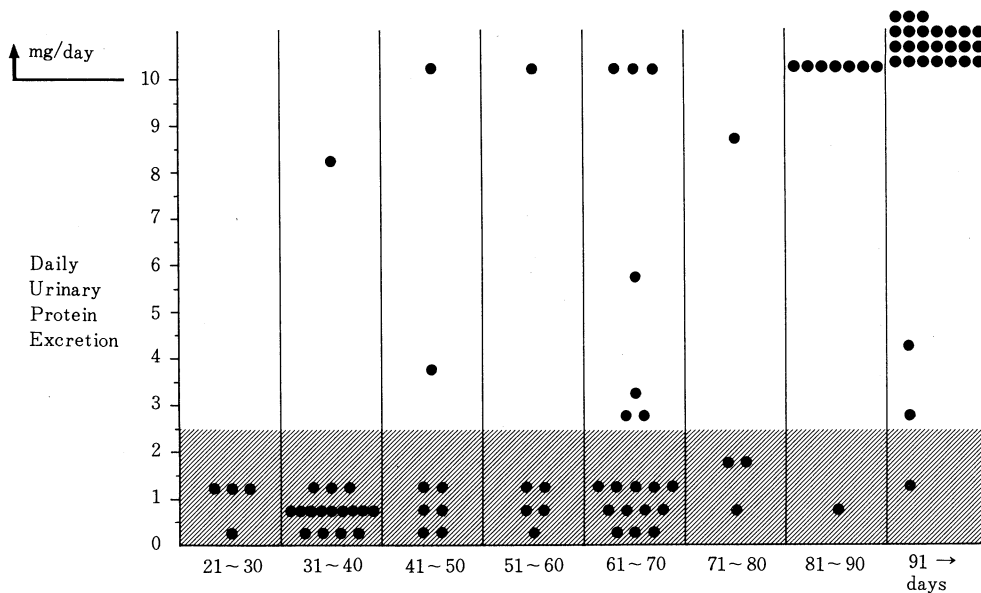


Fig. 1. Distribution of urinary protein in every ten days after the beginning of experiment. The part of normal range is shaded.

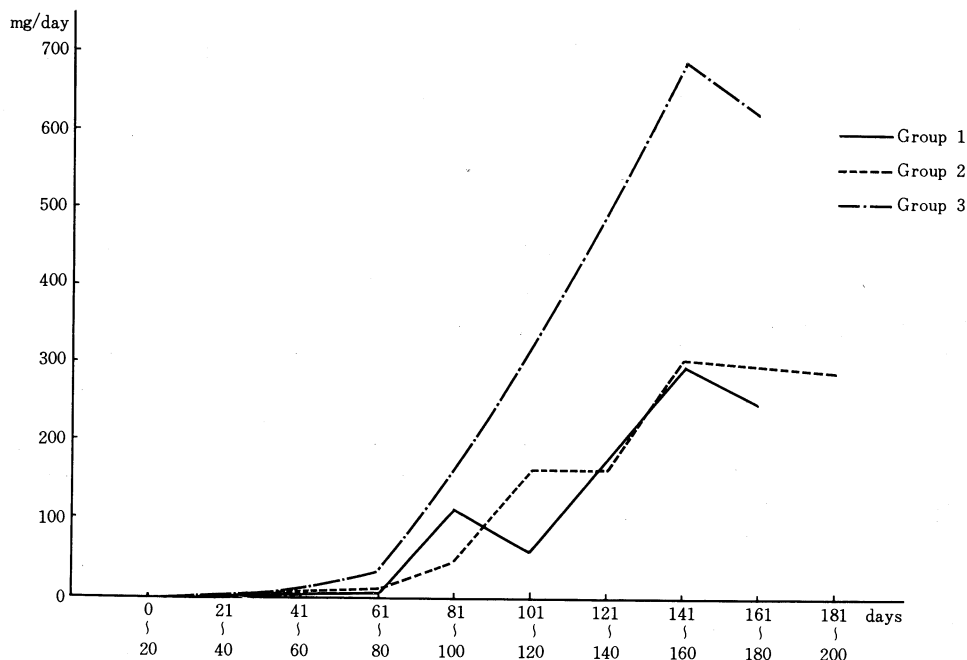


Fig. 2. Progress of daily urinary protein excretion.

Table 1. Progress of daily urinary protein excretion.

Group \ day	21~40	41~60	61~80	81~100	101~120	121~140	141~160	161~180	181~200
Group 1	1.0±1.5	8.0±18	7.7±20	110±110	59±64	180±170	300±220	250±150	N. D.
Group 2	1.0±0.9	14±38	8.6±39	44±40	170±130	170±140	300±120	N. D.	290±110
Group 3	1.5±0.9	2.7±5.1	32±39	170±140	310±310	N. D.	700±90	630±200	N. D.
Control	1.2±0.7	1.5±1.8	1.4±0.6	1.6±0.8	1.2±0.5	1.4±1.1	1.0±0.5	0.3±0.3	0.9±0.4

100日以後の平均値は第1群 1.6 ± 0.5 mg/dl, 第2群 2.4 ± 0.7 mg/dl, 第3群 3.1 mg/dl と上昇を示し, これらの値は対照群と比し, Student の t 検定を用いて5%の危険率で有意差があった (Fig. 3a).

血清アルブミン値については, 実験開始後100日までとそれ以後では, 対照群で 4.5 ± 1.2 g/dl から 4.9 ± 0.5 g/dl に対し, 第1群 4.4 ± 1.2 g/dl から 4.3 ± 0.5 g/dl, 第2群 4.1 ± 0.6 g/dl から 3.7 ± 0.8 g/dl, 第3群 3.9 ± 0.6 g/dl から 3.7 g/dl と低下傾向を示し, 100日以後の値はやはり対照群とは5%の危険率で有意差があった (Fig. 3b).

〈形態的観察〉

1) 光顕所見

対照群においては, 糸球体係蹄は開大し, メサンギウム領域の増殖はみられない. 実験開始後200日経過した対照群の個体では, 一部の糸球体で, 係蹄末梢部に限局性のPAS陽性均質部を認めることもあったが, これらの変化は極めてまれで, 全観察糸球体の1%以下であった. 1年以上経過した対照群のラットでは, 上皮細胞の空胞状変化が10%に達することもあった. このように, 対照群の個体でも加齢に伴って徐々に軽度ながら糸球体に変化を生じることが確かめられた.

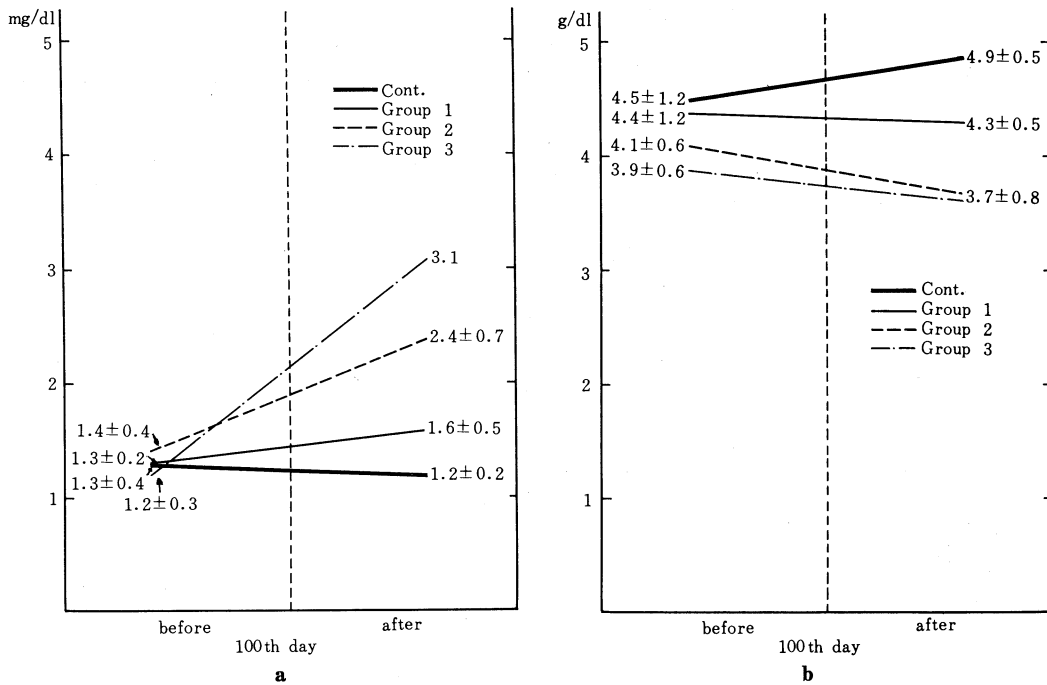


Fig. 3. a) Change of serum creatinine. b) Change of serum albumin.

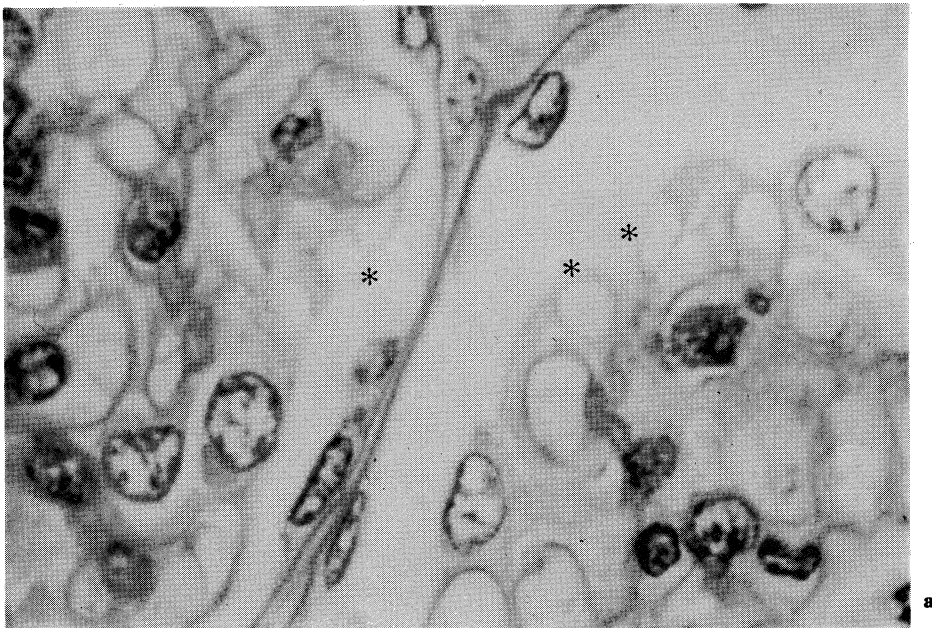


Fig. 4. a) Glomerular epithelial cell vacuoles of non proteinuric, N,N'-DAB injected rat in group 3 (PAS $\times 1000$).

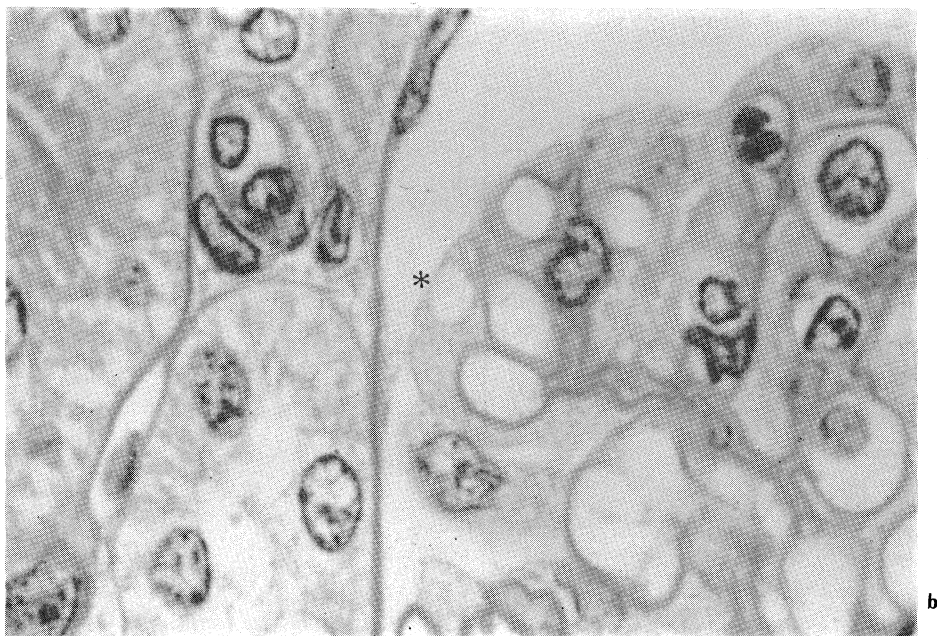


Fig. 4. b) Glomerular epithelial cell vacuoles of non proteinuric, N, N'-DAB injected rat in group 3 (PAS $\times 1000$).

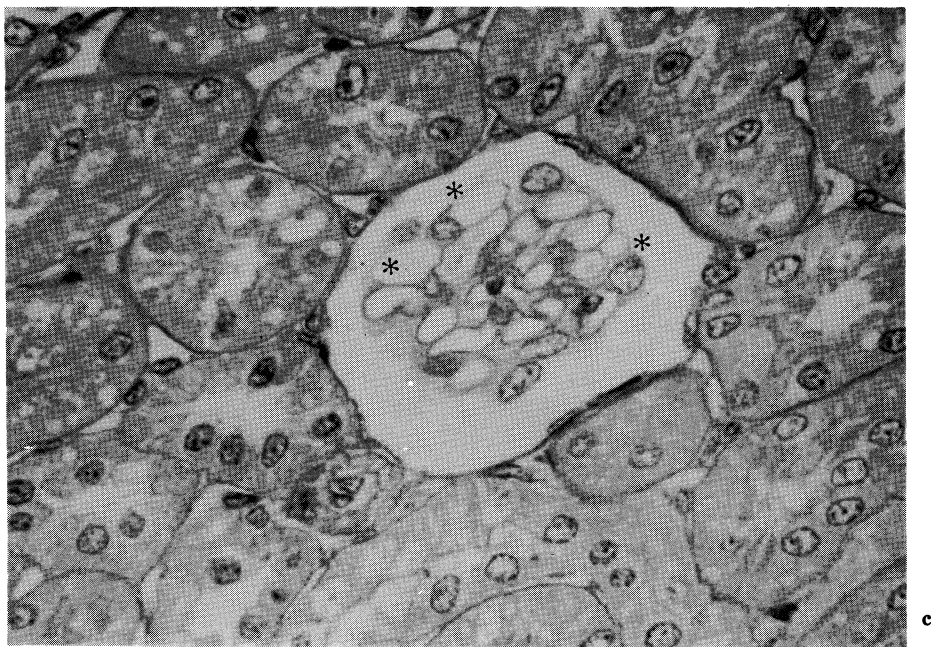


Fig. 4. c) Glomerular epithelial cell vacuoles of non proteinuric N, N'-DAB injected rat in group 1 (PAS $\times 400$).

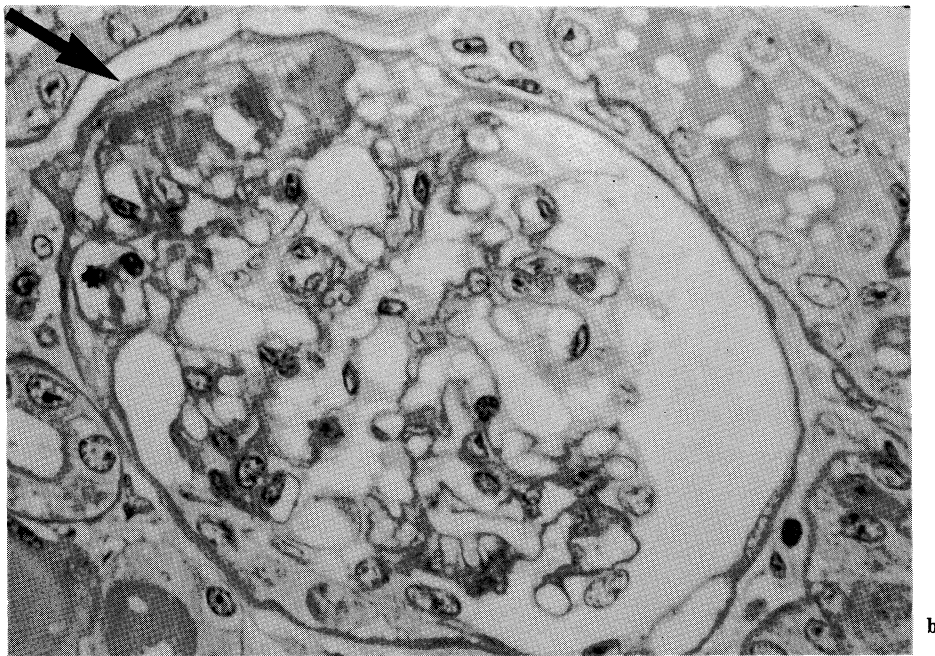
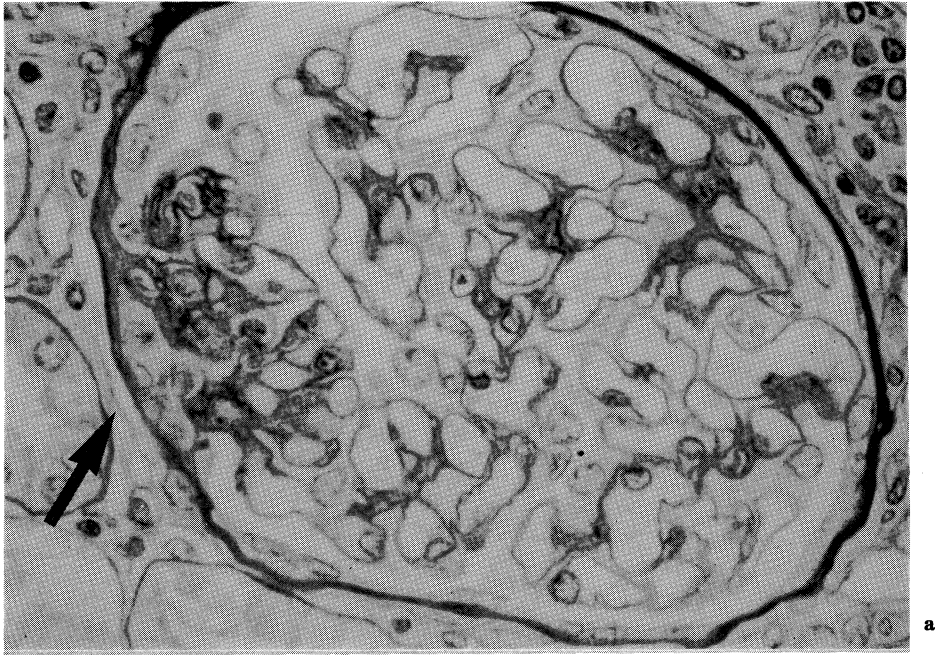


Fig. 5. **a)** A glomerulus of the rat in group 1 which excreted urinary protein over 100 mg/day and sacrificed 140 th experimental day. Focal capillary sclerotic change is seen (PAS $\times 400$). **b)** A glomerulus of the rat in group 1 which excreted urinary protein 300 mg/day and sacrificed 170 th experimental day. Focal hyalinosis is seen (PAS $\times 400$).

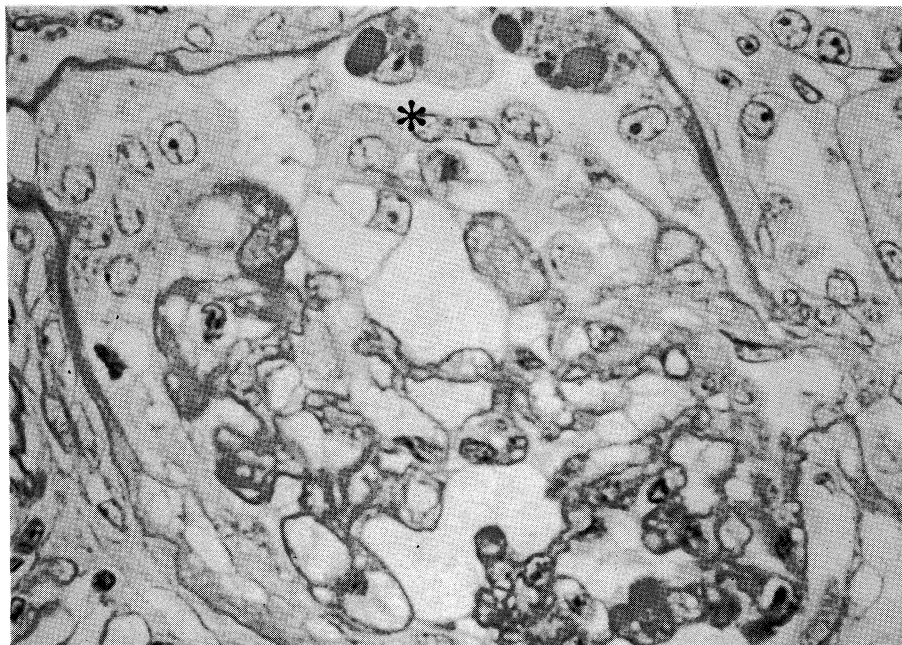


Fig. 6. A glomerulus of the rat in group 3 which excreted urinary protein over 500 mg/day and sacrificed 200th experimental day. Massive capillary sclerotic change and vacuolated epithelial cell clusters (*) are seen (PAS $\times 400$).

N, N'-DAB を投与されたラットにおいて最も早期に認められる変化は上皮細胞の空胞状変化で、実験開始後40日で認めた (**Fig. 4a, b, c**).

実験開始後40日から尿蛋白を認める個体が出現し、100日までの間に多くの個体で蛋白尿を認めるようになるが、蛋白尿陽性ラットにおいては、この時期に、上皮細胞の空胞状変化はすでに半数以上の糸球体に認める。係蹄内腔のわずかな狭小化、あるいは係蹄壁の蛇行を認めるが、硝子化は認めない。

実験開始後150日には、尿蛋白は100 mg/日を超えるようになり、上皮細胞の空胞状変化は90%以上の糸球体に出現し、空胞自体も大きさを増す。糸球体係蹄の40%は蛇行、収縮し、いわゆる硬化性変化を形成する。末梢係蹄腔内がPAS陽性の硝子様物質で閉塞された所見、あるいは係蹄壁の硝子様物質による肥厚所見などのいわゆる硝子化巣も見られるようになる。

しかしこれらの変化はこの時期ではまだ糸球体内の一部に限局している (**Fig. 5a, b**).

実験開始後200日にかけて、尿蛋白は300 mg/日以上となり、係蹄の硬化性変化は、観察糸球体の80%を超える。PAS陽性の硝子化は半数以上の糸球体に出現する。係蹄のボーマン嚢との癒着が90%みられ、この癒着部を中心として線維性の沈着もみられる。また一部の糸球体では、硬化した係蹄をとりかこむ上皮細胞の増殖所見も認めた。メサングウム細胞には、有意の増殖を認めなかった。変化の高度なものでは、開大した糸球体係蹄が減少し、硬化、および硝子様物質沈着を示す係蹄が同一糸球体に広汎にひろがり、進展したN, N'-DAB腎障害の特徴的な糸球体像となる (**Fig. 6**).

以上の経過を係蹄の硬化性病変、硝子化病変、および係蹄上皮内空胞出現に分けて、各病変の出現率を経時的に求めてみると、空胞状変化が係蹄硬化性変化や硝子化病変に先行してお

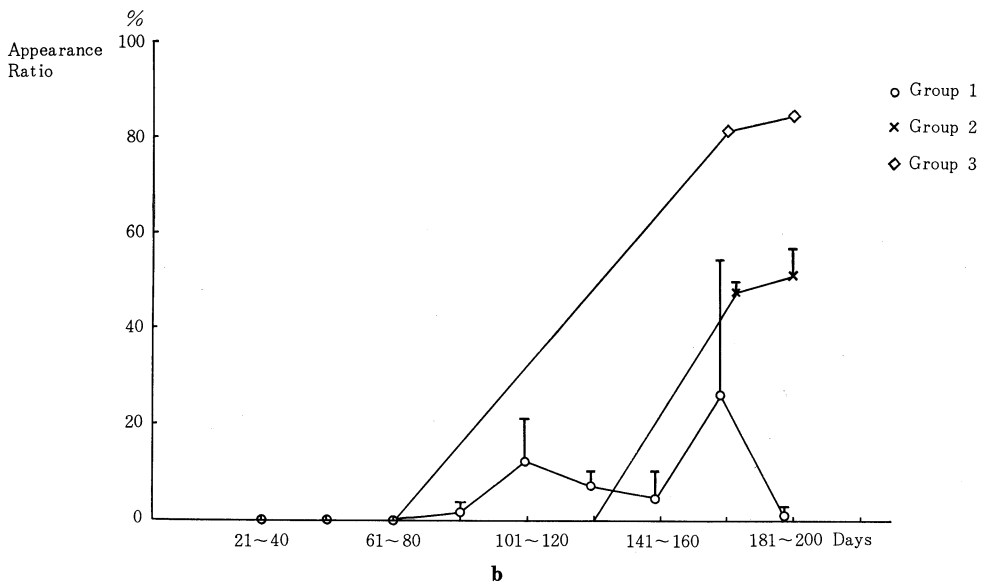
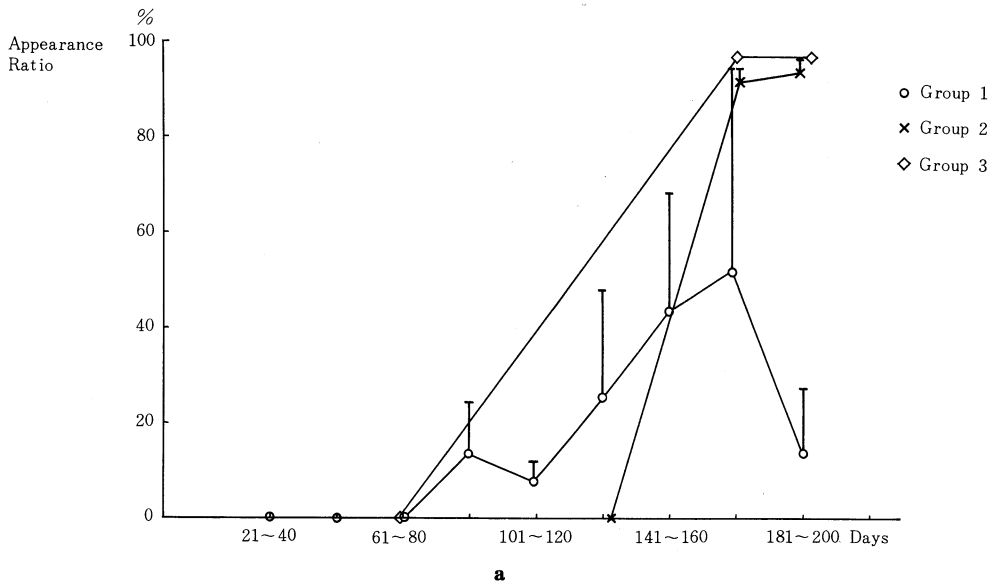


Fig. 7. Progress of appearance ratio of lesions.

a) capillary sclerotic changes.

b) hyalinosis.

ることが示唆される (Fig. 7a, b, c).

N, N'-DAB 投与後も尿蛋白陰性の個体が、ことに80日以前には多いが、これらの個体では、大部分が後に尿蛋白が陽性化し、単に変化の出現が早期尿蛋白陽性化ラットに比し遅延し

ていると思われるものであった。

2) 上皮細胞の変化と蛋白尿の出現時期

対照群における実験期間中の上皮細胞の空胞状変化は全体では1%以下であり、個体によって多くみられるものでも出現率は6%以下で

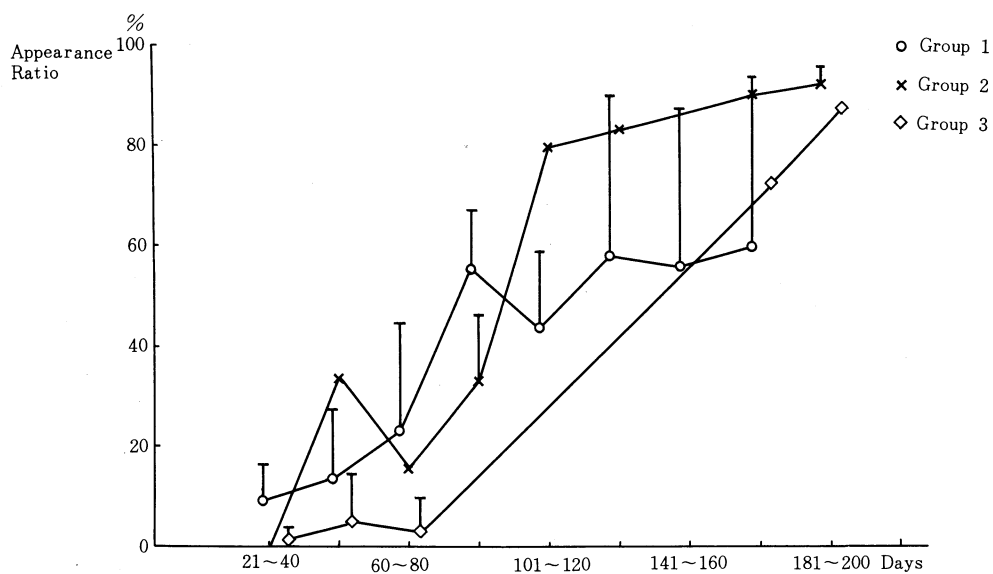


Fig. 7. Progress of appearance ratio of lesions.
c) vacuoles of epithelial cells.



Fig. 8. The vacuole of epithelial cell of an N,N'-DAB injected non proteinuric rat in group 1 which is sacrificed 40th experimental day. The rat is same with Fig. 4c.

あった。これをふまえて、N, N'-DAB 投与個体で、10%以上空胞状変化の出現した個体は病理学所見が有意に存在すると判断した。

第1群における40日から60日における10日ごとの蛋白尿と上皮細胞病変を見ると、蛋白尿が陰性でも10%以上の糸球体に上皮細胞病変の見られる個体がある。また、蛋白尿が陽性で上皮細胞にほとんど変化のない個体もあり、両者が必ずしも一定の傾向を示していないように見えるが、これを Wilcoxon の検定法を用いて対照群と比較すると、上皮細胞病変の出現が蛋白尿の出現に先行していることが推定された。

3) 電子顕微鏡所見

N, N'-DAB 投与ラットで、実験開始後40日の、蛋白尿陰性でありながら上皮細胞病変の出現した個体について、電顕で観察すると、上皮細胞質内に空胞状変化を認める (Fig. 8)。空胞は細胞膜よりも厚い被膜を有しており、細胞膜の単なる彎入とは異なる。このような所見は

各糸球体にみられるが、対照群個体の糸球体には認められることはない。また、この時期には上皮細胞質内に電子密度の高い濃縮顆粒はまだみられない。

空胞状変化以外に、ミトコンドリアを含んだ自己貪食像^{31), 32)}と思われる所見を蛋白尿出現直前の個体の上皮細胞質内に認めた。この時期の足突起は対照群に比し腫脹して見えるが、広範な癒合はみられない (Fig. 9)。

蛋白尿が顕在化した個体では、糸球体上皮細胞の空胞は巨大化し、多数みられる。この頃には足突起の癒合は明らかとなり、細胞質内に濃縮顆粒がみられるようになる。この頃の空胞状変化の中には、比較的小型で、内容が濃縮されたものがあり、濃縮顆粒への移行が考えられるが、また空胞の成因が単一ではないことも推定される。

蛋白尿が100 mg/日以上個体では、上皮細胞の変化はさらに強くなり、上皮細胞の絨毛様

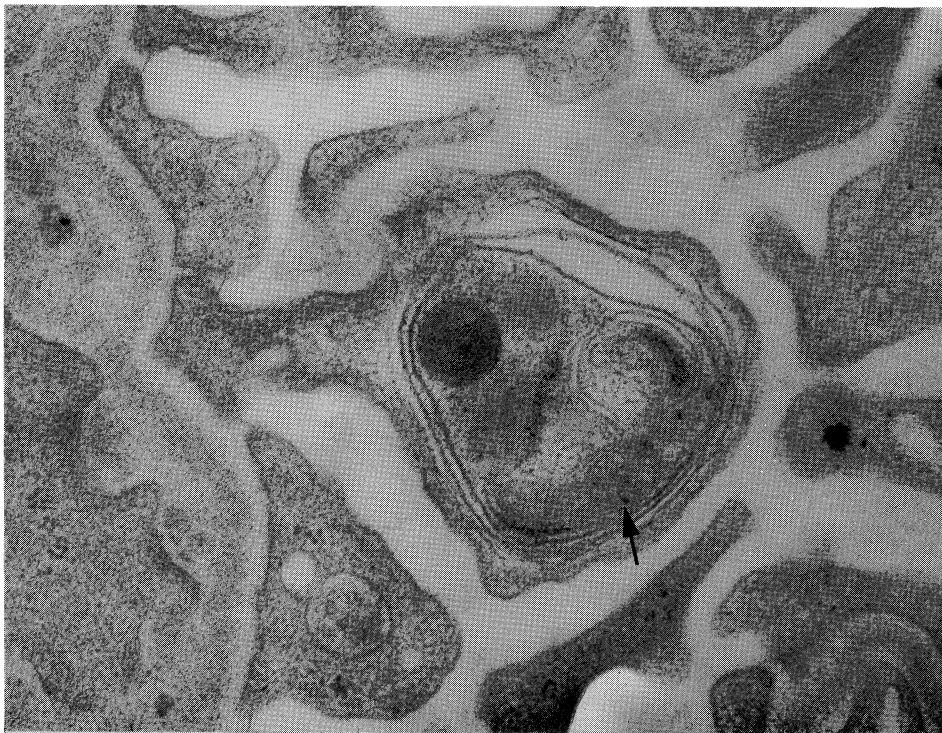


Fig. 9. The wrapped structure of epithelial cell of same rat with Fig. 4.
A mitochondria is seen inside.

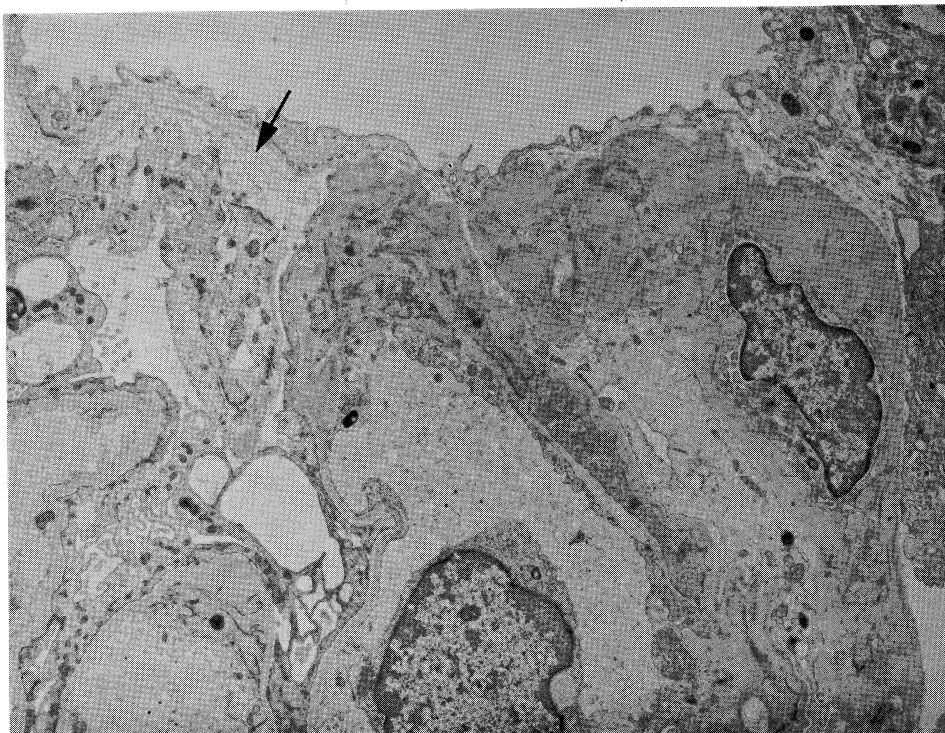


Fig. 10. Wrinkling of basement membrane and detachment of epithelial cells. Fibrous materials are seen in detached subepithelium. The rat of this figure excreted urinary protein over 300 mg/day and sacrificed 200th experimental day.

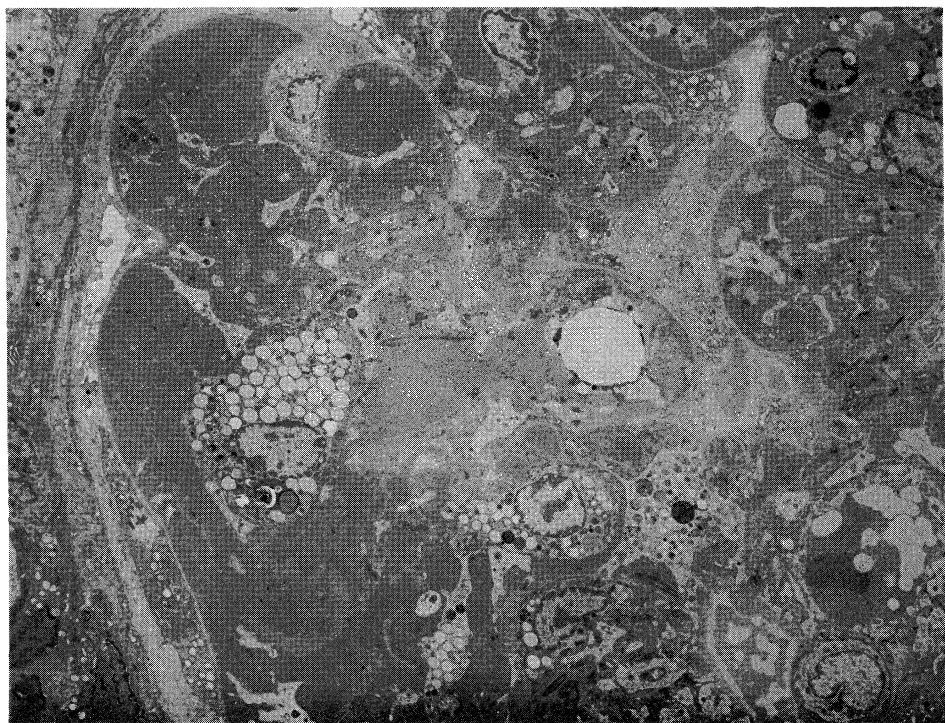
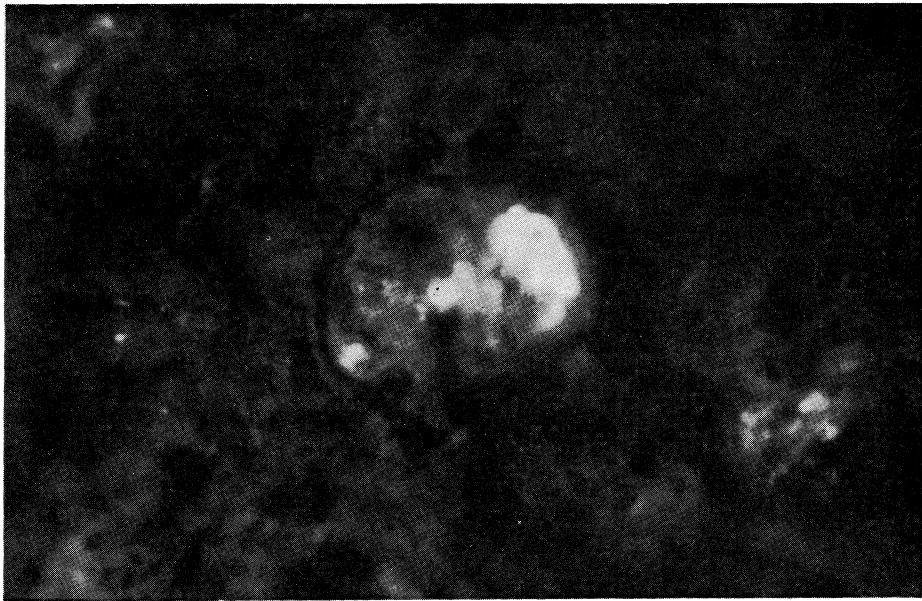


Fig. 11. Massive capillary sclerotic lesion of the rat in group 3 which excreted urinary protein over 500 mg/day and sacrificed 200th experimental day.

Fig. 12. IF (IgM) $\times 200$.

突起形成，基底膜よりの剥離像がみられる．剥離した上皮細胞の基底膜側には線維状構造がみられることがある．基底膜内皮下の開大所見が見られ，基底膜は蛇行重積する (Fig. 10).

さらに尿蛋白量が300 mg/日以上 の個体では，パラメサングウム領域に多量の基底膜様構造が重積し，広範な無構造均質巣を認めるものがある (Fig. 11).

4) 蛍光抗体所見

硬化性病変がみられる個体の糸球体では，IgM がメサングウムに局限して沈着している所見を認めた．軽度のC₃沈着も認めた．IgGについては一定の陽性所見はなく，対照群との差異はなかった (Fig. 12).

考 察

N, N'-DAB によるラット糸球体病変は，1952年 Harman らによってはじめて報告されており，¹⁸⁾ その後数編みられる．^{19)~23)} 1971年の Harman の報告では経口的にラットに N, N'-DAB を投与して観察し，半月体形成に注目して，ヒトの急速進行性糸球体腎炎に類似したものとして位置づけている．²¹⁾ Dunn らの観察で

はこの糸球体の変化を cortisone を投与されたウサギの腎病変と類似したものとしている．¹⁹⁾ Bremner ら，²⁰⁾ および Carrol ら²²⁾ は，N, N'-DAB をアルコールに懸濁させてラットに投与し，PAN による腎障害に近いものとして観察結果を報告している．このように，N, N'-DAB によるラット糸球体病変は，上皮細胞，およびボーマン腔内の変化に注目して研究されてきた歴史的経緯がある．しかし，これまで，どの研究者も上皮細胞の病理学的変化と蛋白尿の出現時期との前後関係について明らかにしていない．一方，PAN による実験腎障害において，1960年 Harkin ら，1964年 Tange らが蛋白尿出現前に上皮細胞に空胞がみられると記載している．^{12), 13)}

今回著者の行った実験では，実験開始後40～60日における蛋白尿と上皮細胞の病理変化を見ると，蛋白尿が陰性で，上皮細胞に変化の出現した個体が認められる (Table 2). 蛋白尿が陽性で上皮細胞病変が陰性の個体も認めるが，Wilcoxon の検定法を用いて対照群と比較してみると，上皮細胞の病理変化は実験開始後40日ですでに対照群との間に有意差を認めた．これ

Table 2. Urinary protein excretion and epithelial vacuole in each rats which is sacrificed the period from 40 days to 60 days after the beginning of experiment.

P: Hazard rate for assertion of significant difference from control group by Wilcoxon's test.

rats & date	urinary protein (mg/day)	epithelial vacuole (%)
40 days		
A	0	0
B	0.6	12
C	0	16
D	0.9	22
E	8.4	4
		$p < 0.01$
50 days		
F	0.8	2
G	0	2
H	1.8	10
I	34.1	40
J	63.7	18
		$p < 0.01$
60 days		
K	0	0
L	3.3	32
M	35.1	66
N	93.9	48
O	2.6	2
		$p < 0.05$
control group	1.3 ± 1.1 (n=60)	0.9 ± 1.7 (n=20)

に対して、尿蛋白は実験開始後60日まではまったく対照群との間に有意な増量を認めなかった。すなわち蛋白尿の出現よりも、上皮細胞の空胞形成性変化の出現が病理組織学的、推計学的に先行していることが確かめられた。

Caulfield らはラットの PAN 腎障害において、デキストランを tracer とした観察から、上皮細胞における空胞の成因として異常濾過物質の処理過程を主張している。^{10), 11)}

著者の実験で確かめた糸球体上皮細胞内の空胞形成の過程を蛋白尿との関連で説明しようとする場合、次のようないくつかの仮説を挙げることができよう。

① 糸球体係蹄の各部分によって基底膜選択透過性の障害発現の時期が異なっており、一部

糸球体基底膜に障害があっても全体としては尿蛋白陰性の時期がある。

② 基底膜に障害があっても軽度であれば、糸球体上皮細胞、あるいは尿細管上皮細胞による代償作用によって尿中蛋白を陰性に保っている可能性がある。

③ 上皮細胞における形態変化は異常濾過物質に対する代償作用以外のものである可能性。

これらの仮定のうち、①については K-C 法で尿蛋白が検出できない時期でも上皮細胞に変化を認めるものでは、電顕で上皮細胞足突起が腫大した傾向があり、全ては否定し得ない。この場合、基底膜の透過性異常がどのように発現するのかわ不明で、内皮細胞や基底膜の直接障害に端を求めねばならない。しかし、著者の観察では、内皮や基底膜の変化を電顕的にはとらえることができなかった。②については、対照群でわずかな尿中蛋白を検出するときにも空胞状変化がみられないことの説明が十分にできない。対照群では尿細管で異常濾過物質が処理され、N, N'-DAB 投与群では上皮細胞で処理されるとするのは少し無理があるように思う。

③については一般に空胞の成因として、細胞内での貪食された物質の処理過程の途上で出現するもの、さらに産生された物質の貯留されたものの3種類に大別される。これらのうち、貪食空胞はライソゾームと癒合し、次第に濃縮されるもので、蛋白尿出現後に多くみられる濃縮顆粒、およびこれらに移行する過程と思われる不定の内容を有する空胞がこれにあたるとされる。これに対し、蛋白尿陽性化直前の初期の空胞は、内容がみとめられず、周囲の細胞質が菲薄となっており、濃縮障害があるようにみえる。著者の観察した上皮病変は、細胞障害性の空胞状変化であることが示唆される。

以上、N, N'-DAB 負荷後ラットの尿蛋白出現前後の形態学的観察の結果、本薬剤が腎糸球体上皮細胞の障害を介して、尿蛋白の出現につながり、以後の糸球体病変形成に密接に関与する可能性が示唆される。

結 論

1. ラットに N, N'-DAB を1ないし2回投与することによって投与後40日に蛋白尿が出現し始め, 100日には多くの個体で蛋白尿が陽性化し, 200日にわたって300 mg/日以上蛋白尿が持続, 増強する。

2. 形態的には糸球体上皮細胞に空胞状変化が出現し, 蛋白尿の程度に伴って係蹄硬化性変化, 硝子化巣が出現し, 増悪する。

3. 推計学的に上皮細胞の空胞状変化の出現は, 尿蛋白の陽性化に先行していた。

4. 糸球体上皮細胞の空胞状病変のなかには, 薬剤による原発性の細胞障害によって発現したものがある可能性を考察した。

稿を終えるにあたって実験手技から校閲に至るまで御指導いただいた川崎医科大学腎臓内科教授 大澤源吾先生に感謝いたします。

川崎医科大学腎臓内科, 電子顕微鏡センターの各位からも様々な御指導, 御協力をいただきありがとうございます。

本研究費の一部は厚生省「進行性腎障害」調査研究班(班長 東條静夫教授)調査費によった。記して感謝の意を表す。(大澤源吾)

文 献

- 1) Sterzel, R. B., Perfetto, M., Biemesderfer, D. and Kashagarian, M.: Disposal of ferritin in the glomerular mesangium of rats. *Kidney Int.* 23: 480—488, 1983
- 2) Caulfield, J. P. and Farquhar, M. G.: The permeability of glomerular capillaries of aminonucleoside nephrotic rats to graded dextrans. *J. exp. Med.* 142: 61—83, 1975
- 3) Bhrer, M. P., Baylis, C., Robertson, C. R., Bremner, B. M., Troy, J. L. and Willis, W. T.: Mechanisms of the puromycin-induced defects in the transglomerular passage of water and macromolecules. *J. clin. Invest.* 60: 152—161, 1977
- 4) Ohson, J. L., Rennke, H. G. and Venkatachalam, M. A.: Alteration in the charge and size selectivity barrier of the glomerular filter in aminonucleoside nephrosis in rats. *Lab. Invest.* 44: 271—279, 1981
- 5) Kanwar, Y. S., Linker, A. and Farquhar, M. G.: Increased permeability of the glomerular basement membrane to ferritin and removal of glycosaminoglycans (Heparan Sulfate) by enzyme digestion. *J. Cell Biol.* 86: 688—693, 1980
- 6) Walker, F.: Experimental argyria: A model for basement membrane studies. *Br. J. exp. Pathol.* LII: 589—593, 1971
- 7) Walker, F.: The origin, turnover and removal of glomerular basement membranes. *Am. J. Pathol.* 110: 233—245, 1973
- 8) Vernier, R. L., Klein, D. J., Sisson, S. P., Mahan, J. D., Oegema, T. R. and Brown, D. M.: Heparan sulfate-rich anionic sites in the human glomerular basement membrane. *N. Engl. J. Med.* 309: 1001—1009, 1983
- 9) Scachter, H. and Roden, L.: The biosynthesis of animal glycoproteins: metabolic conjugation and metabolic hydrolysis. ed. by Fishman, W. H. New York and London, Academic Press. 1973, vol. 3, pp. 1—149
- 10) Venkatachalam, M. A., Karnovsky, M. J. and Cotran, R. S.: Glomerular permeability; ultrastructural studies in experimental nephrosis using horseradish peroxidase as a tracer. *J. exp. Med.* 130: 381—399, 1969
- 11) Caulfield, J. P., Reid, J. J. and Farquhar, M. G.: Alteration of glomerular epithelium in acute aminonucleoside nephrosis. *Lab. Invest.* 34: 43—59, 1976
- 12) Harkin, J. C. and Recat, L.: Pathogenesis of experimental nephrosis electron microscopic observations. *Am. J. Pathol.* 36: 303—329, 1960

- 13) Tange, J. D., Willis, A. G. and Willis, D. M.: The epithelial cells of the renal glomerulus in aminonucleoside nephrosis. *Am. J. Pathol.* 45: 963—975, 1964
- 14) Weening, J. J. and Renke, H. G.: Glomerular permeability and polyanion in adriamycin nephrosis in the rat. *Lab. Invest.* 24: 152—159, 1983
- 15) Giroux, L., Smeesters, C., Boury, F., Faure, M. P. and Jean, G.: Adriamycin and adriamycin-DNA nephrotoxicity in rats. *Lab. Invest.* 50: 190—196, 1984
- 16) Okuda, S., Oh, Y., Tsuruda, H., Onoyama, K., Tajimi, S. and Fujishima, M.: Adriamycin-induced nephropathy as a model of chronic progressive glomerular disease. *Kidney Int.* 29: 502—510, 1986
- 17) Kubosawa, H., Akikusa, B. and Kondo, Y.: Daunomycin-induced nephropathy in rats. *Acta Pathol. Jpn.* 35: 109—123, 1985
- 18) Harman, J. W., Miller, E. C. and Miller, J. A.: Chronic glomerulonephritis and nephrotic syndrome induced in rats by N, N'-diacetylbenzidine. *Am. J. Pathol.* 28: 529, 1952
- 19) Dunn, J. B., Morris, H. P. and Wagner, B. P.: Lipemia and glomerular lesion in rats fed diets containing N, N'-diacetyl- and 4, 4', 4'-tetramethylbenzidine. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 91: 105—107, 1956
- 20) Bremner, D. A. and Tange, J. D.: Renal and neoplastic lesion after injection of N, N'-diacetylbenzidine. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 81: 146—151, 1966
- 21) Harman, J. W.: Chronic glomerulonephritis and the nephrotic syndrome induced in rats with N, N'-diacetylbenzidine. *J. Pathol.* 104: 119—129, 1971
- 22) Carroll, N., Crock, G. W., Fuder, C. C., Green, C. R., Ham, K. N. and Tange, J. D.: Glomerular epithelial cell lesions induced by N, N'-diacetylbenzidine. *Lab. Invest.* 31: 239—245, 1974
- 23) Zimmerman, S. W.: Characterization of chronic N, N'-diacetylbenzidine induced nephropathy. *Am. J. Pathol.* 94: 285—301, 1979
- 24) Matsutani, T., Ohsawa, G., Hirano, H. and Shindo, T.: Rat N, N'-diacetylbenzidine nephropathy. *J. Clin. Electron Microscopy* 18: 5—6, 1983
- 25) Zavon, M. R., Hoegg, N. and Bingham, E.: Benzidine exposure as a cause of bladder tumors. *Arch. environ. Health* 27: 1—7, 1973
- 26) Morton, K. C., Beland, F. A., Evans, F. E., Fullerton, N. F. and Kadlubar, F. F.: Metabolic activation of N-hydroxy-N, N'-diacetylbenzidine by hepatic sulfotransferase. *Cancer Res.* 40: 751—759, 1980
- 27) Morton, K. C., King, C. M. and Beathe, K. P.: Metabolism of benzidine to N-hydroxy-N, N'-diacetylbenzidine and subsequent nucleic acid binding and mutagenicity. *Cancer Res.* 39: 3107—3113, 1979
- 28) Martin, C. N., Beland, F. A., Kennelly, J. C. and Kadlubar, F. F.: Binding of benzidine, N-acetylbenzidine, N, N'-diacetylbenzidine and direct blue 6 to rat liver DNA. *Exp. Health Perspect.* 49: 101—106, 1983
- 29) Kennelly, J. C., Beland, F. A., Kadlubar, F. F. and Martin, C. N.: Binding of N-acetyl and N, N'-diacetylbenzidine to hepatic DNA of rat and hamster *in vivo* and *in vitro*. *Carcinogenesis* 5: 407—412, 1984
- 30) Johnson, H. J., Cernosek, S. F., Gutierrez-Cernosek, R. L. and Brown, L. L.: Validation of a radioimmunoassay procedure for N, N'-diacetylbenzidine, a metabolite of the chemical carcinogen benzidine, in urine. *J. anal. Toxicol.* 5: 157—161, 1981
- 31) Berkenstein, A., Ahlberg, J. and Glauman, H.: Isolation and characterization of autophagic vacuoles from rat kidney cortex. *Virchows Arch. [Cell Pathol.]* 44: 275—286, 1983
- 32) Ogawa, K., Sakai, M. and Mayahara, H.: The intracellular regulation of the lysosomal wrapping mechanism observed during autophagy. *Acta Histochem.* 30(suppl.): 533—546, 1984