

## 実験的ネフローゼマウスにおける糸球体の電子顕微鏡組織化学的研究

山田 昌彦

腎糸球体係蹄上皮細胞 (podocyte) は、係蹄毛細血管基底膜の保持の役割を担っている。そこで著者は実験的に N, N'-DAB を腹腔内に注射してマウスにネフローゼを起こさせ、正常動物とともに podocyte 外被の状態を超組織化学的に研究した。N, N'-DAB は体重 10 g 当たり 12.5 mg を腹腔内に注射した。投与後 15 週目から尿蛋白が出現しはじめ、24 週目には多くの動物に尿蛋白が見られるようになった。組織の光顕所見では、投与後 24 週目には糸球体に部分的な硬化像が見られた。またコントロール動物の組織にコロイド鉄染色を施し電顕で観察すると、podocyte 外被にコロイド鉄微粒子の沈着を認めたが、ニウラミニダーゼ消化後ではこれが消失した。実験動物ではコロイド鉄微粒子の沈着は部分的に減少していた。そしてニウラミニダーゼ消化後ではコロイド鉄の沈着は減少するが一部にニウラミニダーゼ消化抵抗してコロイド鉄に反応する部分が見られた。一方、コンドロイチナーゼ ABC やヒアルロニダーゼによる消化では、消化前後にコロイド鉄の沈着に差を認めなかった。このことはネフローゼ状態のマウスにおいては、podocyte のムコ多糖にとむ外被に変化が生じ、違う種類のムコ多糖に変わっていることを示唆していると思われた。

(平成 3 年 10 月 30 日採用)

### Ultrahistochemical Studies of the Glomerulus in Experimental Nephropathic Mice

Masahiko Yamada

The visceral layer of the glomerular epithelial cell (podocyte) plays a role in the regulation of the function of the glomerular basal lamina. In the present study, the author carried out an ultrahistochemical observations of the cell coat of the podocytes of normal mice and nephropathic mice in which induced by nephropathy was administration of N, N'-diacetylbenzidine (N, N'-DAB). N, N'-DAB intra-peritoneally in a single injection (12.5 mg per 10 g body weight). The first evidence of proteinuria among the mice appeared 15 weeks after the injection and most of the mice had proteinuria at 24 weeks. Observations of the kidneys of experimental animals at 24 weeks light microscopically showed segmental glomerular sclerosis. In the control animals, electron microscopic observations with the use of colloidal iron, showed electron opaque granules deposited on the free surface of the podocytes. After digestion with neuraminidase, the regular pattern of colloidal iron binding was no longer found. In the experimental animals, the number of electron opaque granules deposited on the surface of the podocytes partially decreased. By the treatment with neuraminidase, colloidal iron positive substances were almost com-

pletely removed from the podocytes, although scanty amounts could still be seen on the cell surface. On the other hand, neither hyaluronidases nor chondroitinase ABC were observed in the distribution of colloidal iron binding on the cell coat. This observation suggests change of the cell coat of the podocytes in nephropathic mice from a carbohydraterich surface coat with polyanion properties into a coat of different carbohydrate moieties. (Accepted on October 30, 1991) *Kawasaki Igakkaishi* 17 (4): 335-343, 1991

**Key Words** ① Glomerular epithelial cells ② N,N'-DAB  
③ Sialic acid

## はじめに

ネフローゼ症候群では、その蛋白尿発生の主病変として腎糸球体毛細血管系蹄壁の基底膜の蛋白透過性亢進が考えられる。すなわち糸球体基底膜における barrier の障害が血漿蛋白漏出の原因のひとつと思われる。この barrier には size barrier と charge barrier が存在し、糸球体基底膜の生化学的、物理化学的な変化がこれらの barrier の機能を変化させ、蛋白尿出現の要因となっていることが推測されている。<sup>1)~2)</sup> 特に charge barrier を形成する陰性荷電分布の変化は、各種トレーサーを用いた実験や組織化学反応などでその減少も含め様々な報告がみられる。<sup>3)~9)</sup>

一方、糸球体系蹄上皮細胞 (podocyte) は、その役割のひとつとして系蹄基底膜の修復ならびに陰性荷電の保持の一部も担っていると考えられている。<sup>10)</sup> 実験障害腎において系蹄壁陰荷電物質の変動における podocyte の関与を検討する目的で、著者はベンチジン誘導体である N,N'-diacetylbenzidine (以下 N,N'-DAB) による腎障害<sup>11)~14)</sup>を疾患モデルとして、ネフローゼ状態におけるマウスの腎糸球体の変化を podocyte を中心に観察した。

## 対象と方法

### 1. 蛋白尿出現モデルマウスの作製

生後 5 週齢、体重  $80 \pm 10$  g の ICR 系雄マウ

ス (日本クレア) 20 匹を用いて、Bremner らの方法<sup>13)</sup>に準じて腎症〜ネフローゼモデルを作製した。具体的には、N,N'-DAB を 100 mg/ml の蒸留水懸濁液として体重 10 g 当たり 12.5 mg を腹腔内に 1 回注射投与した。20 匹中 15 匹に N,N'-DAB を投与し、5 匹に生理的食塩水を 1 ml 投与しコントロールとした。動物は 4~6 匹ずつ飼育籠に分け一般飼料 (MF-オリエンタル酵母) と飲料水を自由に摂取させ、室温下に飼育した。実験開始後 4 週ごとに 24 週まで代謝ケージを使用して 24 時間絶食として蓄尿し尿蛋白を 3 g/dl トリクロール酢酸を用いた比濁法にて測定した。実験動物は N,N'-DAB 注射後 4, 8, 16, 20, 24 週に 24 時間蓄尿後、エチルエーテルによる吸入麻酔下に屠殺した。心停止前に左心室から採血後、すみやかに左腎を摘出し組織標本とした。

### 2. 光線顕微鏡標本

摘出した左腎の皮髓境界の一部を電子顕微鏡標本用に組織塊として切り出したのち、残りを 10%ホルマリンで 24 時間固定した。固定した組織塊はエタノール列で脱水しパラフィン包埋し、約 5  $\mu$ m 厚に薄切した。切片は脱パラフィン後、ヘマテイン・エオシン染色、過ヨウ素酸・Schiff 反応 (PAS 反応) を施し、キシロール・バルサムで封入後、鏡検、観察した。

### 3. 電子顕微鏡標本

切り出した小片を 2% グルタルアルデヒド (pH 7.4) 0.1 M リン酸溶液中に 1 時間固定し、一部はそのまま洗浄後四酸化オスミウムで後固定後、エタノール列で脱水しエポキシ樹脂 (Epon

812)に包埋した。また、他の一部はグルタルアル固定後、(1) 2.5%酢酸 (pH 2.5) に入れたのち水酸化鉄液(以下コロイド鉄液) (pH 1.9)に室温下で4時間浸漬し、<sup>15),16)</sup>その後、リン酸緩衝液で洗浄後四酸化オスミウムで後固定し、脱水、エポキシ樹脂包埋した。(2) また、ムコ多糖分解酵素による処理を行うため、切り出した小片の一部をそれぞれ (a) ニウラミニダーゼ (*clostridium perfringens*) (Sigma 社) で pH 6.0, 40°C, 4時間消化、<sup>16),17)</sup> (b) コンドロイチナーゼ ABC (*Proteus vulgaris*) (Sigma 社) で pH 8.0, 37°C, 2時間消化、<sup>16),18)</sup> (c) ヒアルロニダーゼ (*Streptomyces*) (Sigma 社) で pH 6.0, 40°C, 4時間消化、<sup>16),18)</sup>あるいは (d) ヒアルロニダーゼ (*bovine testis*) (Sigma 社) で pH 5.8, 37°C, 4時間消化<sup>16),18)</sup>した。酵素処理後の各組織塊を蒸留水で洗浄し、コロイド鉄液で同様の条件で染色して、四酸化オスミウムで後固定後エポキシ樹脂包埋した。またそれぞれの酵素反応においてはコントロールとして同 pH のリン酸緩衝液に同時間浸漬した組織を用いた。エポキシ樹脂包埋された電子顕微鏡標本は糸球体部分を実体鏡下でトリミングの後、ガラス刃及びダイヤモンド刃(ディアトーム社)にて90~150 nmに超薄切し、銅製メッシュに載せ、日立 H-500型透過型電子顕微鏡で観察した。また1%酢酸ウラニールとクエン酸鉛による電子染はルチーンの観察標本のみに行った。

## 結 果

### A. 蛋白尿の出現と推移

コントロール群(生食投与群)では、実験開始後から24週に至るまで24時間蓄尿における蛋白排泄量に変動はなく平均値は1.0 mg/日であった(20 mg/dl)。

N,N'-DAB 投与群では、15週目から尿蛋白が出現する個体が現われ、24週には15匹中10匹の個体で尿蛋白は5.0 mg/日になった。**Figure 1**にはN, N'-DAB 投与群と非投与群の4個ごとの平均1日尿蛋白量を示した。

### B. 血清クレアチニン値及び他臓器病変

マウス屠殺直前の採血による血清クレアチニン値は、いずれの動物においても0.8 mg/dl 以下であった。また、N, N'-DAB 投与動物において解剖時15匹中1匹に肝細胞肉腫が、また1匹に腹膜炎のためと思われる腹腔内の癒着所見がみられたため、これらの動物は実験対象から除外した。

### C. 形態的観察

#### 1. 光線顕微鏡所見

コントロール群においては糸球体糸球体は開大しメサンギウム領域の増殖はみられない。また実験開始後24週目の動物においても、加齢によると思われる糸球体の部分的変化も認めなかった。N, N'-DAB 投与群の動物では投与後16週

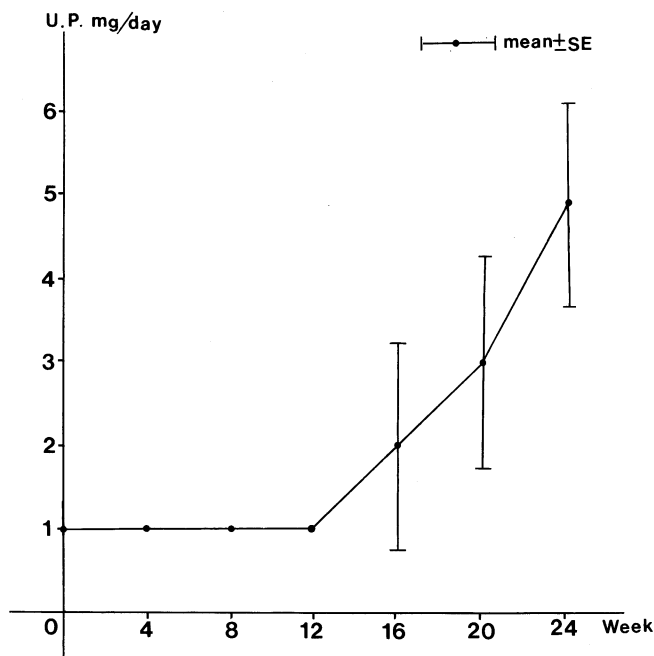
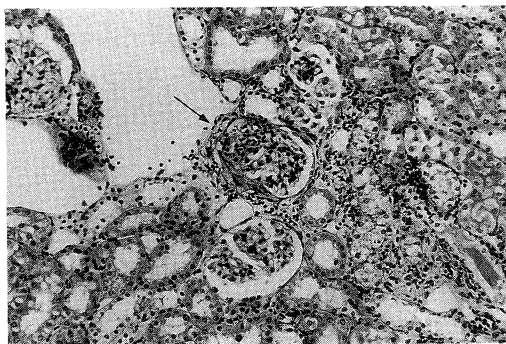
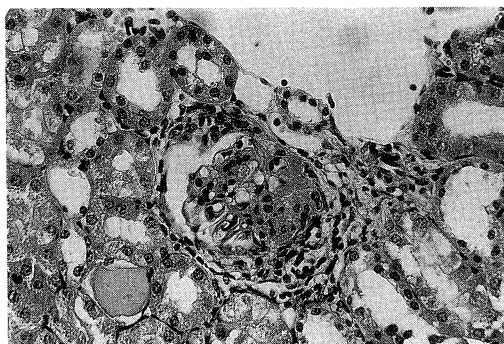


Fig. 1. Mean urinary protein during observation periods

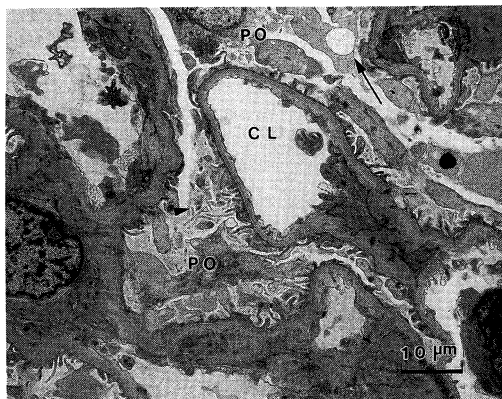


**Fig. 2.** Light microscopic findings of N, N'-DAB injected mouse at the 20th week of experiment kidney. Focal capillary sclerotic change is seen (arrow) (PAS staining,  $\times 200$ ).

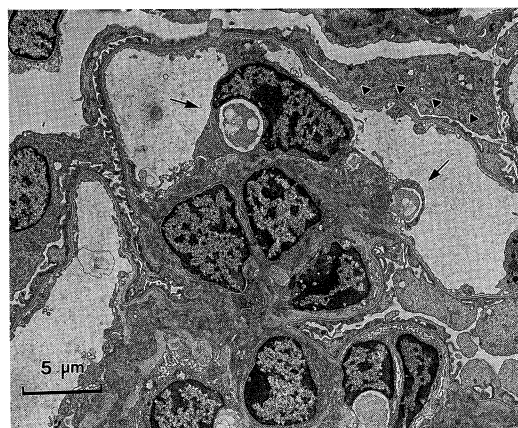


**Fig. 3.** Light microscopic findings of N, N'-DAB injected mouse at 24th of experiment kidney. Focal hyalinosis in experimental mouse of 24th week glomerulus. Focal hyalinosis is seen (H. E. staining,  $\times 400$ ).

においても、光線顕微鏡所見においてN,N'-DABによるラット腎障害にみられるようなpodocyteの空胞状変化や係蹄内腔の狭小化、メサンギウム細胞や基質の増多などの所見はみられなかった。しかし投与後20週に至ると**Figure 2**に示すように皮髄境界部では糸球体10~15個に1個程度の割合で部分的なメサンギウム基質の増多や毛細血管の虚脱、メサンギウム細胞の増加、間質の細胞浸潤などが観察された。さらに投与後24週では**Figure 3**に示すように分節状に糸球体の硬化や癒着病変を示すものもみられ、いわゆる focal segmental hyalinosis and/or sclerosis (FSHS, FGS) に類似した所見が観察された。



**Fig. 4.** Electron micrograph of mouse renal tissue of N,N'-DAB injection after 16 weeks. A vacuole like change (arrow) and villi formation (arrow head) of the podocyte.



**Fig. 5.** Electron micrograph of mouse renal tissue of N,N'-DAB injection after 24 weeks. The fusion of the foot process (arrow heads) and phagocytosis like change of the endothelial cells (arrows).

## 2. 電子顕微鏡所見

N, N'-DAB 投与マウスで実験開始後16週目の尿蛋白1.0 mg/日の動物の透過型電子顕微鏡による観察では(**Fig. 4**)、糸球体毛細血管係蹄内腔は開大しているが、podocyteにおいては一部でも足突起の融合や villi formation、空胞様変化もみられ、係蹄基底膜には一部蛇行も観察された。さらに24週目の糸球体のうち硬化性病変の少ない部分(**Fig. 5**)では前記の所見に加えてさらに基底膜の肥厚、蛇行が進み、血管内

皮側では内皮細胞の胞形質には貪食像を思わせる変化も一部にみられた。

次いで N, N'-DAB 投与前の生後 5 週齢のマウス糸球体にコロイド鉄染色を施したものと及びニウラミニダーゼで消化後の透過電顕写真を Figure 6 に示す。ニウラミニダーゼ消化前では podocyte の外被及び足突起の尿腔側、足突起間の diaphragm にコロイド鉄の微粒子が沈着している。コロイド鉄微粒子は直径約 20 nm で、

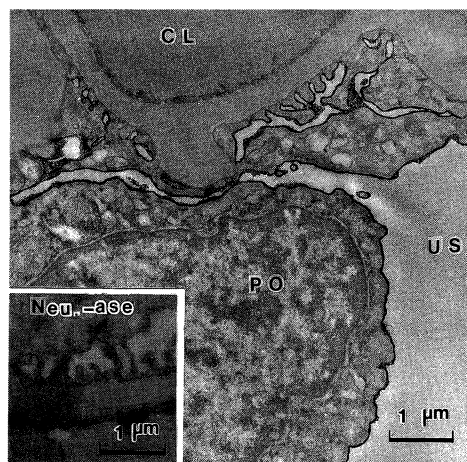


Fig. 6. Electron micrograph of control mouse renal tissue stained with colloidal iron and colloidal iron stain after digested by neuraminidase

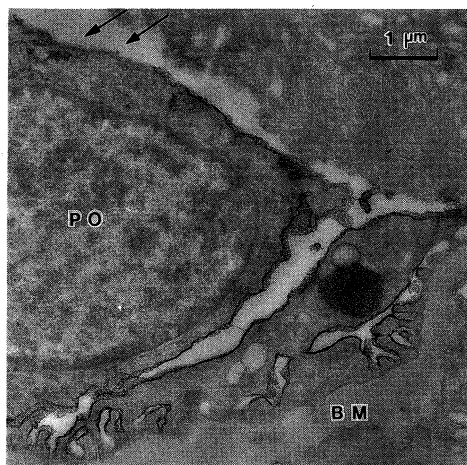


Fig. 7. Electron micrograph of mouse renal tissue of N, N'-DAB injection after 24 weeks. The regular pattern colloidal iron binding was no longer found (arrows).

この微粒子がびまん性にほぼ均一に沈着しており、その厚さは 150~200 nm であった。また組織をニウラミニダーゼで消化した後では、コロイド鉄微粒子の沈着はほとんど認められなかった。

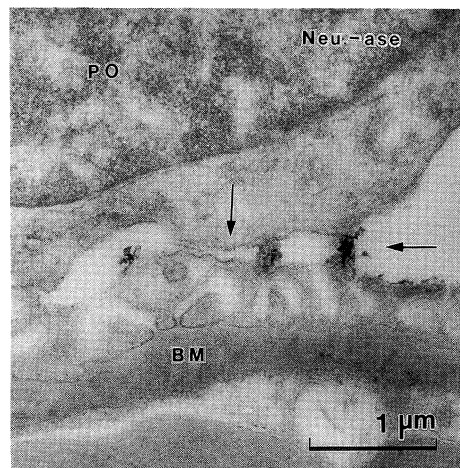


Fig. 8. Electron micrograph of mouse renal tissue of N, N'-DAB injection after 24 weeks with colloidal iron stain following digestion by neuraminidase. The scanty amount of colloidal iron deposits could still be seen on the podocyte surface.

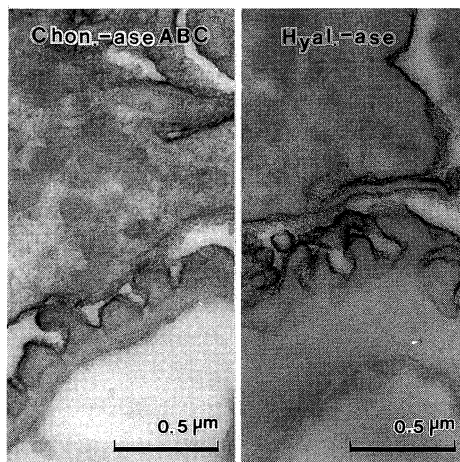


Fig. 9. Electron micrograph of mouse renal tissue of N, N'-DAB injection after 24 weeks with colloidal iron stain following digestion by chondroitinase ABC (left) and hyaluronidase (right). Distribution and density of the colloidal iron particles are invariably seen as the particles before digestion.

さらに蛋白尿のみられる N, N'-DAB 投与後 24 週目の動物の組織に同様にコロイド鉄染色を施してみると, podocyte の細胞外被にコロイド鉄微粒子の沈着の減じている場所が一つの糸球体につき 25% 程度に観察された (Fig. 7). 鉄微粒子の沈着態度をみると足突起の細胞外被には比較的よく沈着しているが, podocyte の自由表面に至るほど沈着程度が低くなる傾向がみられた.

次いでやはり N, N'-DAB 投与後 24 週目の高蛋白尿状態のマウスの腎組織を, それぞれニウラミニダーゼ, コンドロイチナーゼ ABC, あるいは放線菌ないしは睾丸由来のヒアルロニダーゼで消化後, コロイド鉄反応を施し, その沈着態度を観察した. その結果, コンドロイチナーゼ ABC, ならびに放線菌ないしは睾丸由来のヒアルロニダーゼによる消化では, 未消化のものと比べて, 鉄微粒子の沈着には足突起と podocyte のいずれの外被においても著差は認めなかった (Fig. 8). しかしニウラミニダーゼで消化後コロイド鉄反応を施すと, この消化反応に抵抗して足突起と podocyte 外被にコロイド鉄微粒子の沈着が認められた (Fig. 9). 鉄微粒子の沈着は足突起においては diaphragm などその指合の陥入部にはあまり認められず, 尿腔に面した部分に比較的多く観察された.

## 考 察

N, N'-DAB による動物 (ラット, ほか) に対する腎障害についての報告は 1952 年の Harman ら以来数編みられる.<sup>11)~14)</sup> これらは N, N'-DAB を経口投与またはアルコール溶液としての腹腔内投与などの方法を用い, ヒトの急速進行性腎炎類似の病変や, ウサギの副腎皮質ホルモン投与による腎症様病変, または puromycin amino-nucleoside (PAN) 腎症類似の腎病変など多彩な変化を観察している. すでに, 松谷<sup>14)</sup> は著者と同様に N, N'-DAB を蒸留水懸濁液としてラットの腹腔内に注射投与し, 蛋白尿の出現に先行して podocyte の変化を認め, N, N'-DAB に

よる podocyte への障害が係蹄壁の蛋白透過性亢進に関与していることを推測している. 著者はラットに自然発生的に起こるウイルス感染による影響を避ける意味で, より影響の少ないとされるマウスを用いて実験を行った. 一方, 糸球体係蹄壁の荷電物質の動きについては PAN 腎症について多数の報告がみられ,<sup>19)~22)</sup> このうち糸球体基底膜の荷電に注目したものでは Brenner<sup>20)</sup> が電気的に陰性のデキストランを使用してそのクリアランスの亢進から陰性荷電の減少を報告している. さらに Grond ら<sup>23)</sup> はコロイド鉄染色を用いて, PAN 腎症においては糸球体基底膜のメサングウム側ではその染色性が保たれるが, 上皮側では染色性の低下がみられることを報告している. また従来まで腎糸球体基底膜の陰性荷電を担っているものはシアル酸であるとの考え方が支配的であった. その理由は podocyte 外被に多く含まれるシアル酸が強力な陰荷電物質であり, 他の多糖類やムコ蛋白, 糖蛋白に比べて強い荷電をもつため, podocyte の外被のシアル酸についての報告もこの考えに準じていた.<sup>24)</sup> しかし, Kanwar ら<sup>25)</sup> は種々の酵素処理を行ったのちルテニウム赤による染色を行い, 係蹄基底膜の陰荷電物質はヘパラン硫酸が主であることを明らかにした. そしてその後もこの結果を支持し, ヘパラン硫酸の増減についてルテニウム赤やポリエチセレイミン (PEI) を使用した実験の報告が多く出されているが, 明確な結論は出ていない.<sup>26)~29)</sup> これはルテニウム赤も PEI もプローベとしてその特異性について問題があるとされるからで, これに対して Beritolatus ら<sup>30)</sup> はヘキサメチレンジプロマイド (HDM) をプローベとして使用したが, これは他のカルボキシル基をもつ多糖類とも反応する可能性がありむしろヘパラン硫酸よりそれらの方が陰荷電物質として重要であるとしている.

一方, ムコ蛋白には多くのものが知られているが, これらムコ蛋白の種類と細胞表面における量は正常の場合, 細胞の種類によってほぼ決まっており,<sup>31)</sup> 複合糖質に含まれるシアル酸は腎臓では podocyte にのみ証明され, ポーマン囊上

皮細胞や尿細管上皮細胞、あるいは係蹄内皮細胞やメサングウム細胞には認められない点で注目される。podocyte 以外には、肺胞上皮細胞や胃底腺細胞などの外被に多く含まれている。また正常以外では肝臓などの癌細胞の表面にも存在し、<sup>31)</sup> これは癌の診断に臨床的に応用されている。さらに Iwatsuki<sup>32)</sup> は肺胞上皮細胞で、胎生期や病的状態後の細胞の再生期では細胞表面のムコ蛋白やシアル酸の性質が変化することを報告している。ムコ蛋白は細胞内のゴルジ装置において合成され、糖成分に蛋白が添加され、細胞内膜系を介して細胞外被の成分となり、細胞表面に糖鎖を出す。<sup>33)</sup> しかしこれらムコ蛋白の役割は定かではなく、podocyte 外被のシアル酸の役目も現在では足突起の構造保持に役立っている<sup>34)</sup>といわれているにすぎない。今回の著者の実験で、尿蛋白の出現している動物の podocyte 外被のコロイド鉄に対する染色性の部分的な低下はこの場所のシアル酸の減少を示しており、これが係蹄壁を通過する蛋白成分による二次的変化である可能性のほかに、podocyte において糖蛋白の合成ないし分泌過程が障害されている可能性も示唆する所見と思われる。北野<sup>35)</sup> や Boulton-Jones ら<sup>36)</sup> はヒト微小変化型ネフローゼ症候群では赤血球膜の陰性荷電の減少を報告しており、podocyte でおこっているのと同様の变化が赤血球膜にもおこっている可能性が示唆され、興味深く思われる。

上皮細胞におけるこのような細胞外被の変化はそれを作っている細胞内小器官の多糖類などの合成状況の変化を反映している可能性がある。また著者の実験では蛋白尿の出現している動物の podocyte 外被にはニウラミニダーゼ消化に抵抗し、コンドロイチナーゼ ABC や放線菌と睾丸由来のヒアルロニダーゼにも酵素消化されないムコ多糖の存在が示唆された。これと同様な反応態度を示すムコ多糖がヘパリチナーゼ消化に反応するヘパラン硫酸を含むケタラン硫酸であることを Kanwar ら<sup>18)</sup> は証明している。したがって、著者の実験において蛋白尿のみられる動物の podocyte 外被に新しく出現してくるニウラ

ミニダーゼやコンドロイチナーゼ ABC、あるいは放線菌と睾丸由来のヒアルロニダーゼに抵抗性をもつムコ多糖は、ヘパリチナーゼに消化される種類のいわばヘパラン硫酸プロテオグリカンのごときムコ多糖である可能性が残される。すなわち、ベンチジン誘導体による podocyte 障害がムコ多糖の生成ないし分泌過程の変化をもたらし、一方では係蹄基底膜への正常ムコ多糖供給を減じて蛋白尿発現をもたらすと同時に、他方では podocyte 外被のムコ多糖体の変化を惹起した可能性が考えられる。

## 結 論

1. マウスに N, N'-DAB を投与すると15週目から尿蛋白の増加する個体が現われる。
2. 蛋白尿の出現した動物の腎組織の観察では光顕的には巣状糸球体硬化症類似の病変が見られ、電顕的には部分的に係蹄基底膜の肥厚や蛇行、podocyte の足突起の融合や空胞様変化、内皮細胞の変性がみられた。
3. 電顕的に組織のコロイド鉄染色と酵素消化反応を観察すると podocyte 外被の鉄微粒子の沈着はネフローゼで一部減少し、さらにニウラミニダーゼ消化に抵抗するシアル酸以外のムコ多糖物質の出現がうかがえた。このような podocyte 外被の変化は上皮細胞も担っている係蹄基底膜の代謝やさらに係蹄基底膜の陰性荷電の変化にも何らかの影響を与えている可能性が示唆された。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲をいただいた大澤源吾教授に深謝いたします。また研究にご協力いただいた腎臓内科学教室、解剖学2教室、電子顕微鏡センター、動物飼育センターの皆様方の御厚情に感謝いたします。

本論文の要旨は、第24回日本臨床電子顕微鏡学会および第34回日本腎臓学会において発表した。

本研究費の一部は厚生省「進行性腎障害」調査研究班 ト研究2—702によった。記して感謝の意を表す。  
 (班長 黒川清教授)調査費及び川崎医科大学プロジェクト (大澤源吾)

## 文 献

- 1) Brenner, B. M., Hostetter, T. H. and Hemes, H. D. : Glomerular permselectivity : Barrier function based on discrimination of molecular size and charge. *Am. J. Physiol.* 234 : F455—460, 1978
- 2) Cotran, R. S. and Rennke, H. G. : Anionic sites and the mechanisms of proteinuria. *N. Engl. J. Med.* 309 : 1050—1051, 1983
- 3) Caulfield, J. P. and Farquhar, M. G. : Loss of anionic sites from the glomerular basement membrane in aminonucleoside nephrosis. *Lab. Invest.* 39 : 505—512, 1978
- 4) Hirsch, H. Z., Ainsworth, S. K., Spicer, S. S., Kurtz, E. H. and Brissie, R. M. : Ultrastructural assessment by colloidal iron of the distribution and localization of anionic sites in human glomerulonephritides. *Am. J. Pathol.* 102 : 99—107, 1981
- 5) Olson, J. L., Rennke, H. G. and Venkatachalam, M. A. : Alterations in the charge and size selectivity barrier of the glomerular filter in aminonucleoside nephrosis in rats. *Lab. Invest.* 44 : 271—279, 1981
- 6) Vehaskari, V. M., Root, E. R., Germuth, F. G. and Robson, A. M. : Glomerular charge and urinary protein excretion : Effects of systemic and intrarenal polycation infusion in the rat. *Kidney Int.* 22 : 127—135, 1982
- 7) Kanwar, Y. S. and Jakubowski, M. L. : Unaltered anionic sites of glomerular basement membrane in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int.* 25 : 613—618, 1984
- 8) Pilia, P. A., Swain, R. P., Williams, A. V., Loadholt, C. B. and Ainsworth, S. K. : Glomerular anionic site distribution in nonproteinuric rats. *Am. J. Pathol.* 121 : 474—485, 1985
- 9) Mahan, J. D., Sisson-Ross, S. and Vernier, R. L. : Glomerular basement membrane anionic charge site changes in aminonucleoside nephrosis. *Am. J. Pathol.* 125 : 393—401, 1986
- 10) Brenner, B. M. and Rector, F. C. : *The Kidney*. 4th ed. Philadelphia, W. B. Saunders Co. 1991, pp.10—15
- 11) 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—530, 1952
- 12) 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'-teterametyl-benzidine. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 91 : 105—107, 1956
- 13) 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
- 14) 松谷拓郎 : ベンチジン誘導体によるラット腎障害の形態的研究. *川崎医学会誌* 13 : 279—294, 1987
- 15) Nolte, A. and Ohkuma, M. : Elektronenmikroskopisch-histochemische Untersuchungen zur Darstellung saurer Mucopolysaccharide und sialinsäurehaltiger Glycoproteine in Nierenrinde und innerem Nierenmark der Ratte. *Histochemie* 17 : 170—180, 1969
- 16) 山田和順 : ムコ糖の組織細胞化学的研究法. *蛋・核・酵* 17 : 775—790, 1972
- 17) Groniowski, J., Biszyskova, W. and Walski, M. : Electron microscope studies on the surface coat of the nephron. *J. Cell Biol.* 40 : 585—601, 1969
- 18) Kanwar, Y. S., Linker, A. and Farquhar, M. G. : Increased permeability of the glomerular basement membrane to after removal of glycosaminoglycans (heparan sulfate) by enzyme digestion.



- J. Cell Biol. 86 : 688—693, 1980
- 19) Ryan, G. B. and Karnovsky, M. J. : An ultrastructural study of the mechanisms of proteinuria in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int.* 8 : 219—232, 1975
  - 20) Brenner, B. M. : Molecular basis of proteinuria of glomerular origin. *N. Engl. J. Med.* 298 : 826, 1978
  - 21) Kobayashi, S., Nabase, M., Honda, N., Adachi, K., Ichinose, N. and Hishida, A. : Analysis of anionic charge of the glomerular basement membrane in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int.* 35 : 1405—1408, 1989
  - 22) Wada, N., Ueda, Y., Ono, H. and Iidaka, K. : Decreased anionic sites in different portions of the basement membrane in aminonucleoside nephrosis. *Jpn. J. Nephrol.* 33 : 9—16, 1991
  - 23) Grond, G. and Elema, J. D. : Localization and distribution of anionic changes in the glomerular mesangium of normal and nephrotic rats. *Virchows Arch. [B]* 48 : 135—143, 1985
  - 24) Blau, E. B. and Haas, J. E. : Glomerular sialic acid and proteinuria in human renal disease. *Lab. Invest.* 28 : 477—481, 1973
  - 25) Kanwar, Y. S. and Farquhar, M. G. : Presence of heparan sulfate in the glomerular basement membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76 : 1303—1307, 1979
  - 26) Kanwar, Y. S., Linker, A. and Farquhar, M. G. : Increased permeability of the glomerular basement membrane to ferritin after removal of glycosaminoglycans (heparan sulfate) by enzyme digestion. *J. Cell. Biol.* 86 : 688—693, 1980
  - 27) Myndase, L. A., Hassell, J. R., Kieinmann, H. K., Martin, G. R. and Martinez-Hernandez, A. : Loss of heparan sulfate proteoglycan from glomerular basement membrane of nephrotic rates. *Lab. Invest.* 48 : 292—302, 1983
  - 28) Vernier, R. L., Klein, D. J., Sission, 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
  - 29) Groggel, G. C., Hovingh, P., Border, W. A. and Linker, A. : Changes in glomerular heparan sulfate in puromycin aminonucleoside nephrosis. *Am. J. Pathol.* 128 : 521—527, 1987
  - 30) Bertolatus, J. A. and Hunsicker, L. G. : Polycation binding to glomerular basement membrane. *Lab. Invest.* 56 : 170—179, 1987
  - 31) Spicer, S. S., Baron, D. A., Sato, A. and Schulte, B. A. : Variability of cell surface glycoconjugates. *J. Histochem. Cytochem.* 29 : 944—1002, 1981
  - 32) Iwatsuki, H. : Changes in Complex Carbohydrates on the Surface of Regenerating Alveolar Type I Cells during Morphological Differentiation in Mouse Lung. *Proc. XIth Int. Cong. on Electron Microscopy, Kyoto.* 1986, pp. 2745—2746
  - 33) 小川和郎, 中根一穂 : 細胞膜. 東京, 朝倉書店. 1989, pp. 4—8
  - 34) Kanwar, Y. S. and Farquhar, M. G. : Detachment of endothelium and epithelium from the glomerular basement membrane produced by kidney perfusion with neuraminidase. *Lab. Invest.* 42 : 375—384, 1980
  - 35) 北野裕一 : 腎疾患における赤血球陰性荷電の測定. *日腎誌* 32 : 643—649, 1990
  - 36) Boulton-Jones, J. R., McWilliams, G. and Chandrachud, L. : Variation in charge on red cells of patients with different glomerulopathies. *Lancet* 2 : 186—188, 1986