

## 糸球体硬化過程から見た系蹄上皮細胞の動態

### —ボウマン嚢上皮細胞の関与—

佐々木 環

Bromodeoxyuridine (BrdU)はS期細胞周期に細胞に取り込まれることから、 $[^3\text{H}]$ -thymidineと同様に細胞動態解析に有用とされている。今回、糸球体系蹄上皮細胞を中心にBrdUを使用し免疫組織学的に、さらに電子顕微鏡も用いて、正常成熟過程と糸球体硬化過程での細胞動態を観察した。

新生仔と成熟Wistar系ラットの腹腔内にBrdUを投与し2時間後に腎臓を取り出し免疫組織学的に検討した。また同時に透過、走査両電子顕微鏡にて超微形態学的に観察した。新生仔ラットではすべての糸球体成熟像が観察できた。未熟な糸球体ほど皮質表層に存在した。将来系蹄上皮細胞やボウマン嚢上皮細胞に分化するS字管の上皮細胞に標識を認め、以後系蹄が形成されるにつれて系蹄上皮細胞の標識は観察できなくなった。一方、他の糸球体系蹄細胞では、内皮細胞やメサングウム細胞に標識を確認できるようになった。電子顕微鏡にて、形態学的に血管形成期に徐々に分化、発達する系蹄上皮細胞が観察された。成熟ラット(110g)での、系蹄細胞の標識率は約0.54%で、ほとんどが内皮細胞であった。ボウマン嚢上皮細胞の標識率は0.71%で、系蹄細胞全体より高かった。

系蹄上皮細胞を直接障害するN, N'-diacetylbenzidine (DAB)により腎障害を惹起し、コントロール群ラットと比較した。両群とも系蹄細胞の標識率の経過は同様で、生後60日前後で一定となり0.2%となった。DABにより系蹄上皮細胞に種々の形態的障害が認められても、分裂再生像や標識を認めなかった。一方ボウマン嚢上皮細胞の標識率の経過は蛋白尿が著明な160~200日にかけてDAB群で若干高く、糸球体硬化部付近に標識ボウマン嚢上皮細胞を認めた。

以上より、両上皮細胞の生物学的特異性、特に分裂能力の差が、糸球体硬化過程で重要な役割を演じていると思われる。

(平成3年10月19日採用)

## Kinetic Study of Podocytes in Glomerular Sclerosis

Tamaki Sasaki

Bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation into DNA in the S phase of the cell cycle is now regarded as a useful alternative to tritiated thymidine in cell kinetic studies. In this study, we examined the kinetics of podocytes by using immunohistochemical and electron microscopic methods in both developing and sclerosing glomeruli.

Newborn and mature male Wistar strain rats received a single intraperitoneal injection of BrdU. For immunohistochemical analysis, paraffin section were pre-

pared two hours after flash labeling. At the same time, electron microscopic observations were performed. Nephrons at all stages of development were represented within each newborn rat. Primitive nephrons were found in the outer part of the kidney with progressively more mature nephrons located deeper in the renal cortex. At the S-shaped stage, the presumptive podocytes or Bowman's epithelial cells showed immunoreactivity. However, at the early capillary stage, the podocytes no longer showed immunoreactivity, and electron microscopy revealed the development of foot processes in podocytes. The endothelial cells and the mesangial cells were easily detected in the glomerular tufts. The labeling index of the glomerular tuft cells of mature rats was approximately 0.54%. The majority of labeled cells noted in the glomerular tufts were endothelial cells. Mesangial cells had a low labeling index. The podocytes revealed no evidence of proliferation. The labeling index of Bowman's epithelial cells, however, was approximately 0.71% higher than that of tuft cells.

Wistar strain rats with N, N'-diacetylbenzidine (DAB)-induced nephropathy, which causes podocyte damage, were prepared, and the dynamics of the glomerular cells were observed in comparison with rats in a control group. The labeling index (L. I.) of the tuft cells in both groups stabilized at approximately 0.2% on about postnatal day 60. Various forms of morphologic damage to the podocytes were observed during the experimental protocol, but no regenerative state was seen. The L. I. of Bowman's epithelial cells increased slightly in the DAB group at the 160-days interval, 200 days after DAB injection. BrdU-positive Bowman's epithelial cells were observed close to the adhesive or sclerotic tufts.

Based on the results of the present study, it appears that these cell dynamics play an important role in the development of glomerular sclerosis. (Accepted on October 19, 1991) *Kawasaki Igakkaishi* 17(4): 361-376, 1991

**Key Words** ① BrdU ② Labeling Index ③ Podocyte  
④ Bowman's epithelial cell ⑤ Glomerular sclerosis

## 緒 言

腎糸球体は、主としてメサンギウム細胞、内皮細胞、係蹄上皮細胞およびボウマン囊上皮細胞で構成されている。これらは、通常は血流の調節、物質の濾過等に関与し、さらに免疫調節細胞としても作用している。また、糸球体腎炎をはじめとする種々の病態で、この各々の細胞が反応性に増殖し、各病型を形成していくことが知られている。これら糸球体障害の進行で問題となる慢性化は、形態的には糸球体硬化像を

認め、さらに進行し、ついには硝子化糸球体に至る不可逆的な過程と考えられているが、その成立機構の詳細は不明である。糸球体硬化の定義は Border<sup>1)</sup> によればメサンギウム基質の増加、基底膜の不整、糸球体濾過面積の減少、消失をあげている。さらに彼らは細胞外基質から糸球体硬化に検討を加え、メサンギウム増殖性腎炎では TGF- $\beta$  (Transforming growth factor- $\beta$ ) が増加し、さらに TGF- $\beta$  は細胞外基質を形成することから、抗 TGF- $\beta$  を Anti-thy 1 腎炎に投与し、糸球体硬化を抑制し得たと報告している。<sup>2)</sup>

一方、糸球上皮細胞から糸球体硬化の要因を指摘した報告は少なく、Osawa<sup>3)</sup>が糖尿病性腎症において不可逆的な糸球体硬化は糸球上皮細胞の障害が大きく関与していると報告し、また最近実験的に糸球体肥大による糸球上皮細胞の糸球体基底膜からの剝離等の形態変化が糸球体硬化の端緒として重要であることが指摘されており、<sup>4)</sup>さらに馬杉腎炎ラットの観察により、糸球上皮細胞の壊死とそれに続く糸球基底膜とボウマン囊との癒着が<sup>5)</sup>初期糸球体硬化過程で重要な変化であると報告されている。したがって糸球上皮細胞の生物学的特異性を検討し、個々の刺激に対する態度、特に障害時の動態は糸球体硬化過程を解析する上で重要と思われる。

従来細胞動態の一指標として標識率(labeling index)が用いられ、その有用性が認められている。以前よりこの目的で [<sup>3</sup>H]-thymidineを用いた in vivoあるいは in vitroの標識が行われているが、アイソトープを使用するため、限られた施設でしか実施できず、しかも結果を得るまでに長時間を要する欠点があった。最近、thymidineのanalogueである5-bromodeoxyuridine(BrdU)の抗体がGratzner<sup>6)</sup>により開発され、免疫組織学的に短時間に標識率が求められるようになった。

今回著者は、BrdUを使用し、まず糸球体細胞の成熟過程、さらに正常成熟ラットでの分裂能力を検討し、次いで糸球体硬化過程での糸球体の細胞動態を、特に糸球上皮細胞を中心に形態学的に解析した。

## 対象・方法

### 1. 対象

#### 実験1. 正常ラットの観察

出産予定1週間前の雌Wistar系ラット(日本クレア社、大阪)を1匹購入し使用した。1週間後計12匹の新生仔ラットを出産した。各々生後1日、3日、7日、14日のラット各2匹ずつ使用した。さらに体重110gの成熟雄Wistar系ラット(日本クレア社、大阪)5匹を1週間自

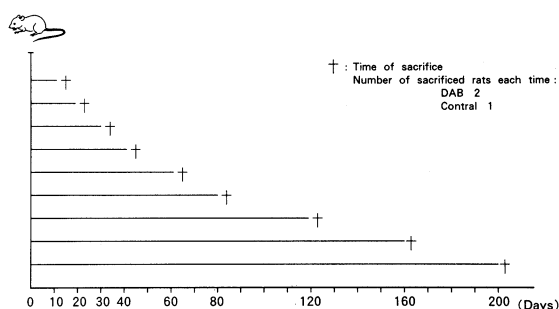


Fig. 1. Experimental protocol

由飼育後使用した。

各々処分2時間前にBrdU(Sigma社、St. Louis, USA)100 mg/kgを腹腔内に投与し、両腎を取り出した。一部を電子顕微鏡の検体とし、残りを免疫組織化学用として使用した。

#### 実験2. N, N'-diacetylbenzidineによる腎障害ラットの観察

体重110gの雄Wistar系ラット60匹(日本クレア社、大阪)を30匹ずつ2回に分けて購入し、30匹のうち20匹に糸球上皮細胞を直接障害するとされるN, N'-diacetylbenzidine(DAB)(東京化成工業社、東京)を腹腔内に200 mg投与し腎障害を作製し、また残り10匹は同量の生理食塩水を投与しコントロール群とした。プロトコール(Fig. 1)に従い、DAB群2匹コントロール群1匹ずつ処分しながら200日まで経過観察を行った。この実験を同様に2回繰り返し施行した。処分前日に代謝ゲージに移し24時間蓄尿を行い尿中蛋白をKingsbury-Clark法で測定した。実験1と同様に処分2時間前にBrdU 100 mg/kgを腹腔内に投与し、両腎を摘出し免疫組織学的検索、また電子顕微鏡の検索に利用した。

両実験のラットは、飼育籠に分けMF-オリエンタル酵母(オリエンタル社)と飲料水を自由に与え飼育した。

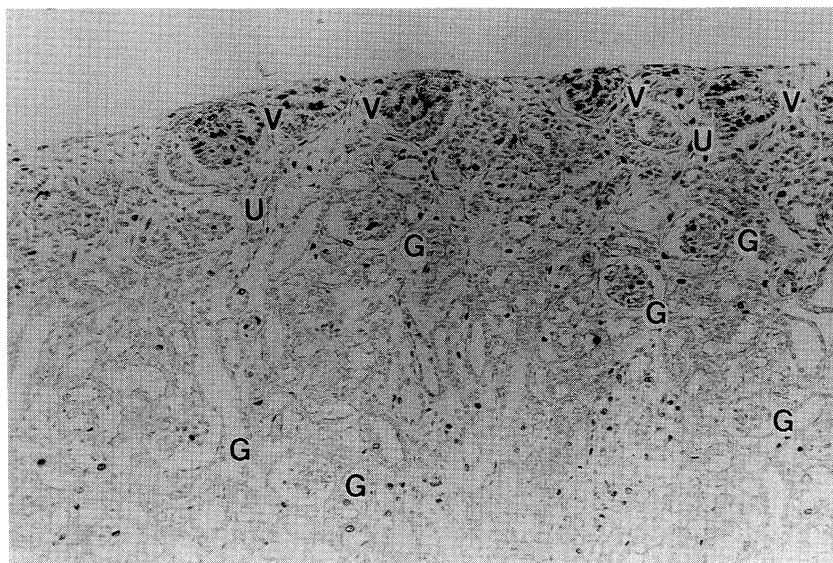
### 2. 方法

#### a. 免疫組織学的検討

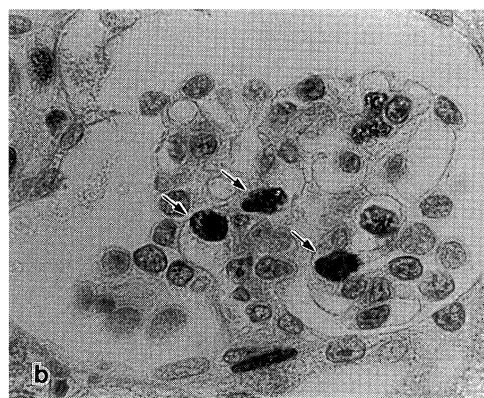
従来の報告<sup>7),8)</sup>に従い摘出した腎臓を70%冷エタノールで一晩固定し脱水後、パラフィン包埋

を行った. 約 $1\mu\text{m}$ に薄切後脱パラフィンを行い, 3N-HClで30分間処理し,  $0.1\text{M Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ で中和した. 内因性 peroxidase 活性を阻止するため,  $5\% \text{H}_2\text{O}_2$  加メタノールで30分処理後, 非特異反応を阻止するため正常ウマ血清に30分間反応させた. 一次抗体は Tris 液 ( $0.15\text{M}$ ,  $\text{pH}$  7.4) で100倍希釈した抗 BrdU 抗体 (Becton

Dickinson 社, Mt. View, CA) を用い, 室温で2時間反応させた. 次いで二次抗体である200倍希釈 biotin 化抗マウス抗体 (Vector 社) を30分室温で反応させ, さらに調製済みの avidin-biotin-peroxidase complex (Vector 社) で30分間反応させ, 最後に  $5\% \text{H}_2\text{O}_2$  を加えた  $0.02\%$  3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride に



**Fig. 2.** Low magnification of immature kidneys. 3 days after birth. V : metanephrogenic vesicle, U : ureteral bud, G : glomerulus (BrdU-ABC, PAS  $\times 100$ )



**Fig. 3. a.** S-shaped stage. BrdU positive nuclei are seen in the cell of S-shaped tubule (arrows). 3 days after birth. (BrdU-ABC, PAS  $\times 1000$ )  
**b.** Early capillary stage. BrdU positive nuclei are seen in the immature glomerulus (arrows). 7 days after birth. (BrdU-ABC, PAS  $\times 1000$ )



て発色させた。さらにPAS染色を行い、hematoxylinにて核染を行った。陰性コントロールは、一次抗体の代わりにPBSを反応させ、陽性コントロールは同ラットの小腸を用いた。

実験1では、糸球体成熟過程の観察は標識されている細胞の判別を中心に行い、正常成熟ラットでは、標識率 (labeling index : L. I.) を両腎各100個の糸球体の係蹄細胞とボウマン囊上

皮細胞を数え、それに対する各々の標識細胞の割合で表し求めた。係蹄細胞の認識は400倍から1000倍で、光学顕微鏡にて行った。

実験2では各観察日の標識率を両腎50個の糸球体の係蹄細胞とボウマン囊上皮細胞を数え、それに対する標識細胞の割合で表した。

#### b. 電子顕微鏡学的検索

取り出した腎臓組織の一部を、2.5%グルター

Table 1. Labeling indices of glomerular cells

Wistar-strain-rats	1	2	3	4	5	mean±SD
number of examined tuft cells	10698	11419	10447	10850	12111	11105±666.0
number of labeled tuft cells	57	50	72	57	54	58±8.3
Endothelial cells	37	41	50	41	40	41.8±4.9
Mesangial cells	16	9	21	14	13	14.6±4.4
Unclassified cells	4	0	1	2	1	1.6±1.5
Podocyte	0	0	0	0	0	0
Labeling index (%)	0.50	0.44	0.69	0.53	0.53	0.54±0.09
number of examined Bowman's epithelial cells	985	920	892	964	923	936.8±37.2
number of labeled Bowman's epithelial cells	6	9	5	7	6	6.6±1.5
Labeling index (%)	0.61	0.98	0.56	0.73	0.65	0.71±0.17

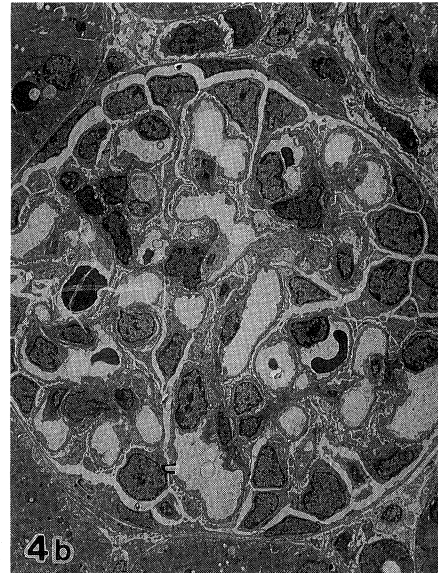
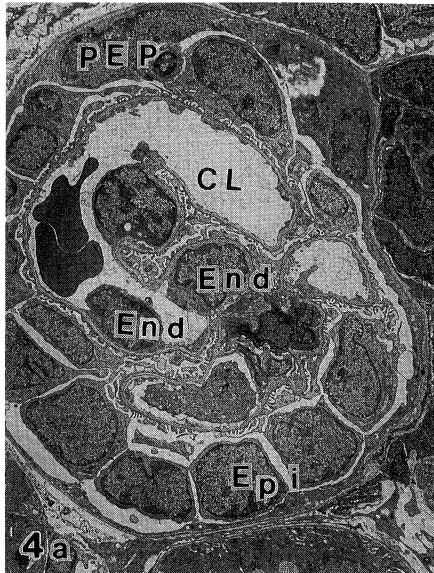


Fig. 4. a. Transmission electron micrography showing early capillary stage glomerulus. 3 days after birth. CL: capillary lumen, End: endothelium, Epi: podocyte, PEP: Bowman's epithelial cell (×2100)

b. Transmission electron micrography showing mature glomerulus. 14 days after birth. (×1100)

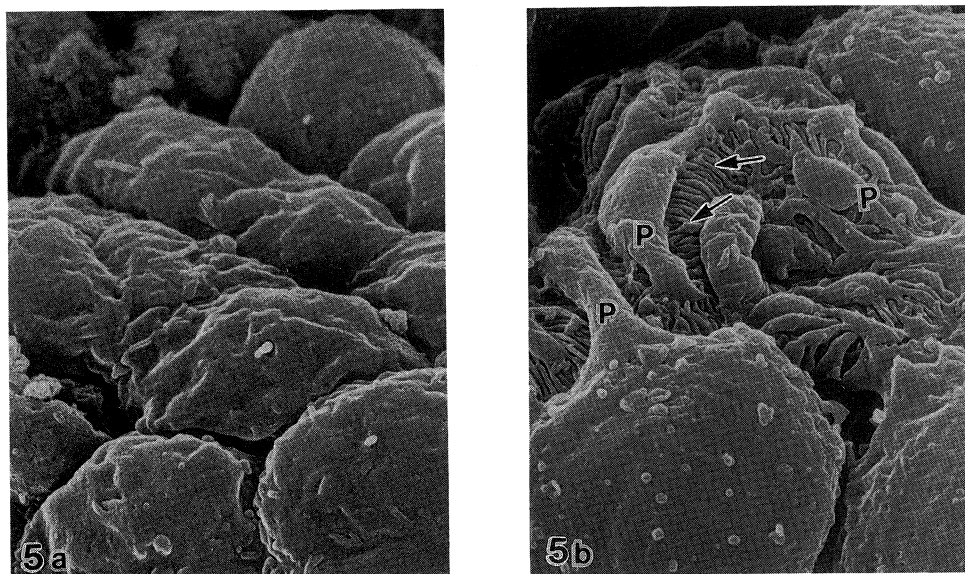


Fig. 5. a. Scanning electron micrography showing podocyte at early capillary stage. 3 days after birth ( $\times 6000$ )

b. Scanning electron microscopy showing podocyte at mature stage. 7 days after birth. F: primary process, arrows: pedicels ( $\times 6500$ )

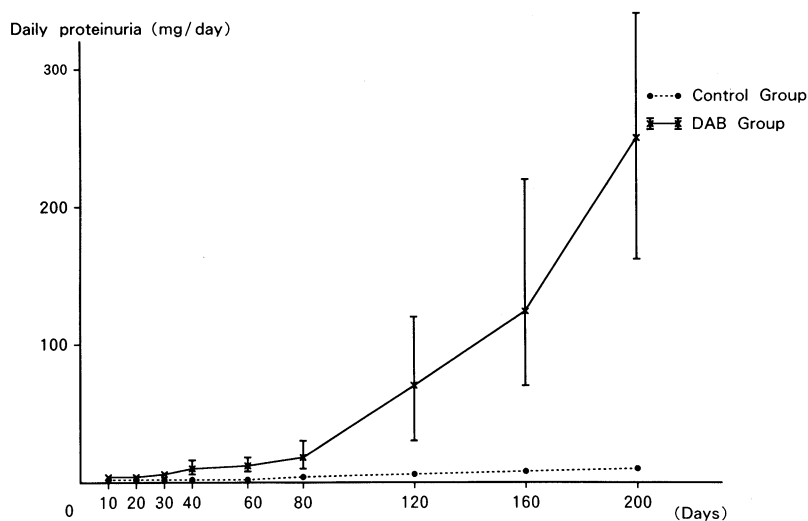


Fig. 6. Urinary protein excretion in rats. Time course of the 24-hour urinary protein excretion (daily protein excretion) in control rats and DAB rats. Values are the mean of 2-4 animals and (extremes).

ルアルデヒド (0.1M リン酸緩衝液) に固定し、さらに 2% 四酸化オスミウム液 (0.1M リン酸緩衝液) にて後固定を行いエタノール系列にて脱水を行い、Epon-812 にて包埋し、超薄切片作製後、酢酸ウラン-ルークエン酸鉛の二重染色を施行

し透過電子顕微鏡 (HU-12A, 日立) にて加速電圧 75 kV で観察した。また試料の一部は臨界点乾燥後、白金-パラジウムを蒸着し走査電子顕微鏡 (S-570, 日立) にて加速電圧 20 kV で観察した。

## 結 果

### 1. 実験1 正常ラットの観察

新生仔ラットの腎臓は、S字管期 (S-shaped stage)、血管形成期 (vascular stage)、成熟期 (mature stage) と以前より分類されている。<sup>9),10)</sup>

各時期の糸球体が観察でき、生後約7日までは腎被膜直下に糸球体形成層を認めた。すなわち、尿管芽 (ureteral bud) の最先端、すなわち原始集合管先端部と後腎小胞 (metanephrogenic vesicle) の膨らんだS字管を認めた。この表層の形成層に多数の標識細胞を認め (Fig. 2)、S字管の標識細胞を観察すると、将来糸球体係蹄

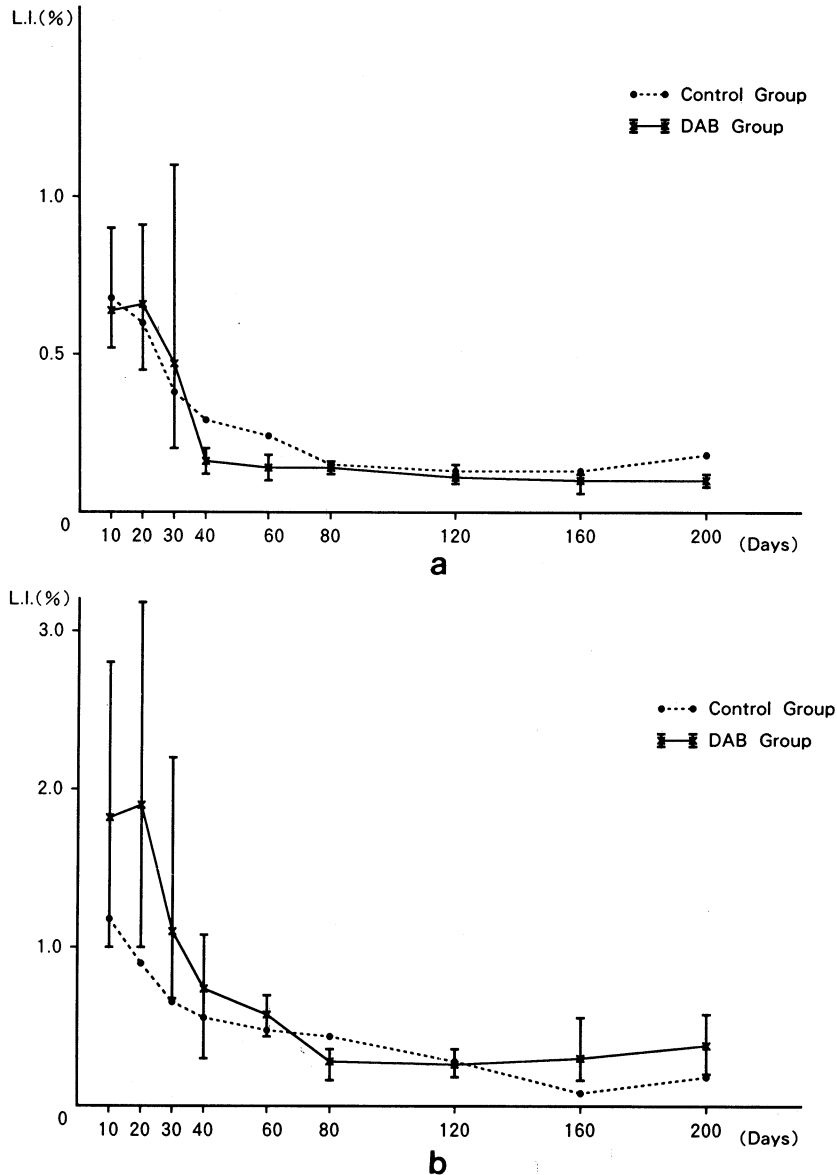


Fig. 7. a. Labeling indices of tuft cells after flash labeling during the experiment  
b. Labeling indices of Bowman's epithelial cells after flash labeling during the experiment

上皮細胞に分化する下脚内葉細胞と、 Bowman 囊上皮細胞に分化する下脚外葉細胞に標識を認めた (Fig. 3 a). さらに深層の成熟した糸球体では、標識係蹄細胞を観察できる糸球体数は減少し、主に内皮細胞やメサンギウム細胞に分化

するとされている血管極の間葉系細胞、さらに分化したメサンギウム細胞に標識を認めた (Fig. 3 b). 生後より随時糸球体形成層が減少し、逆に血管形成期、成熟した糸球体が増加し、糸球体係蹄の標識細胞もそれに伴い減少し、比較的

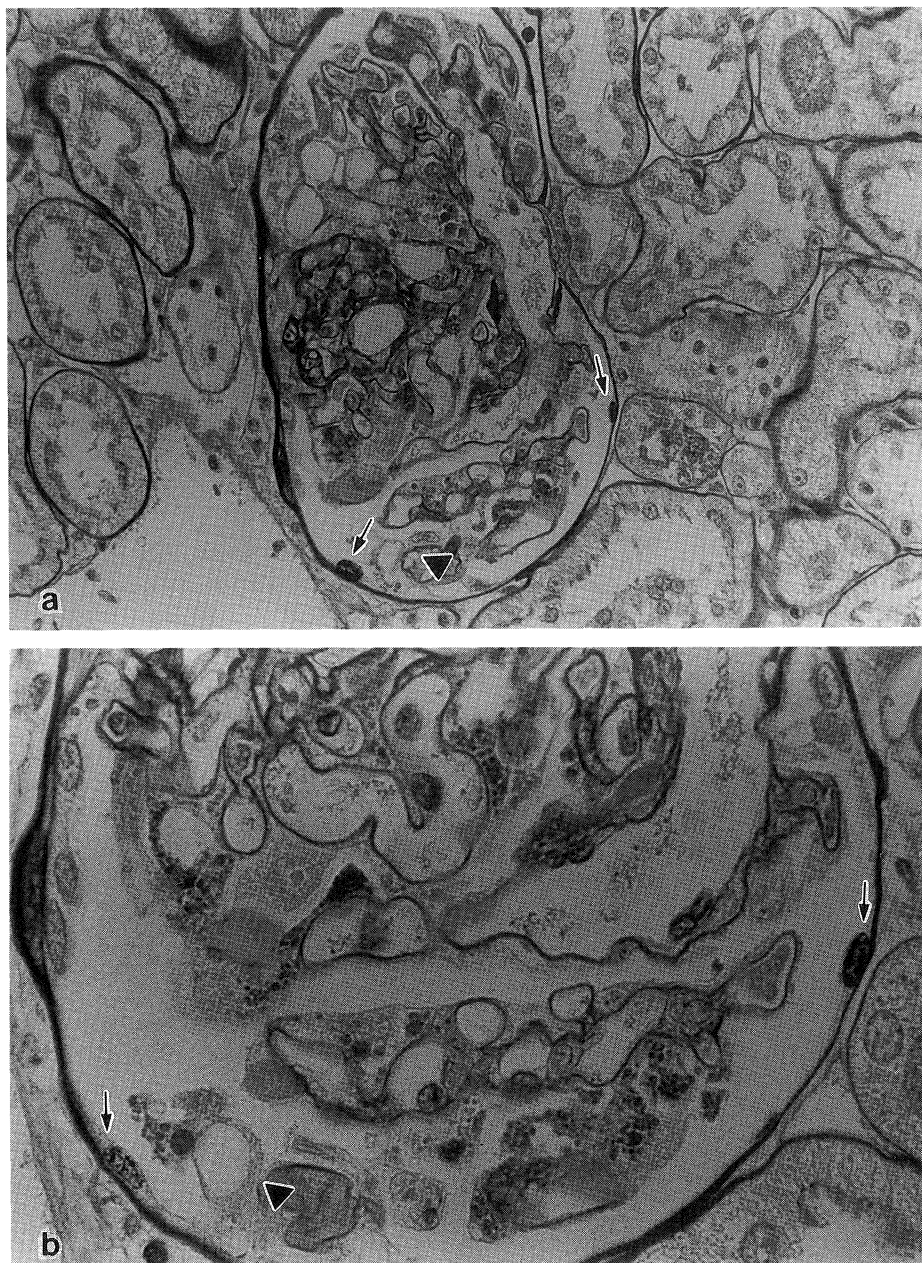


Fig. 8. a, b. BrdU-positive nuclei of Bowman's epithelial cells are detected close to the adhesive tufts (arrows). 200 days. ▲: adhesive tuft (BrdU-ABC, PAS, a $\times$ 400, b $\times$ 1000)

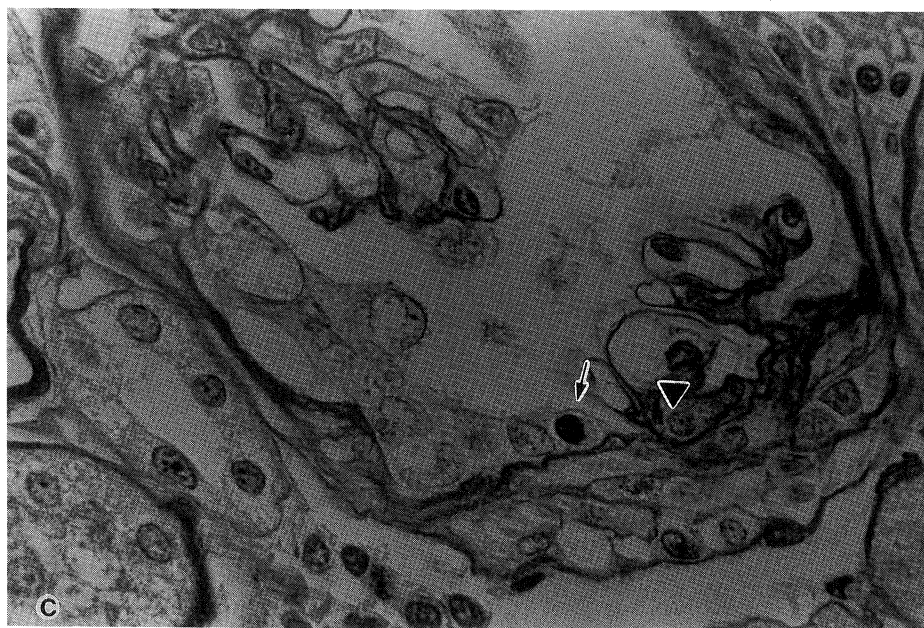


Fig. 8. c. BrdU-positive nucleus of cell lining Bowman's capsule is detected at the adhesive tuft (arrow). 200 days. ▲ : adhesive tuft (BrdU-ABC, PAS  $\times 1000$ )

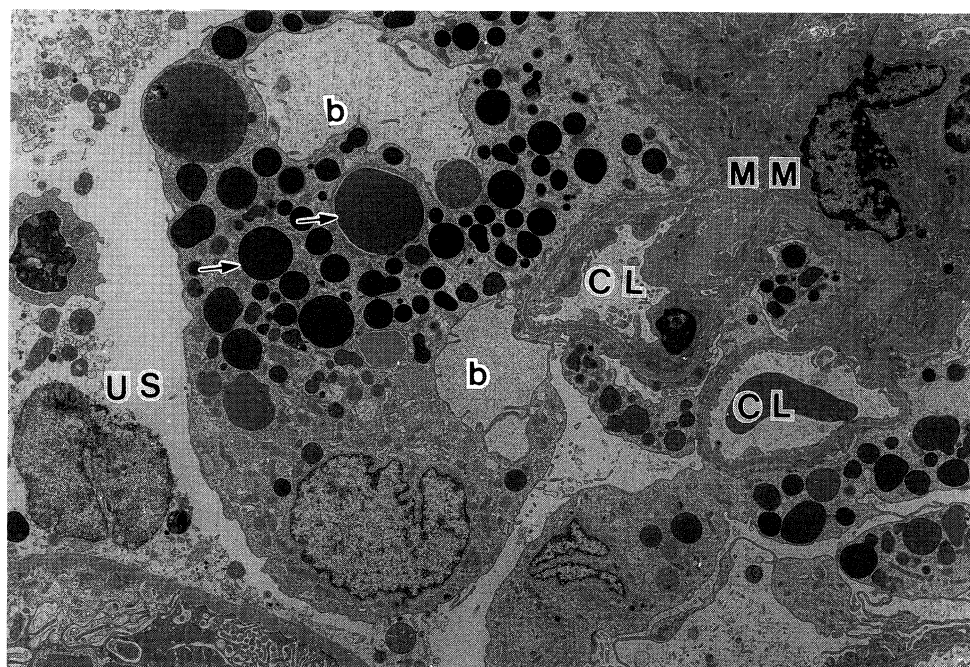
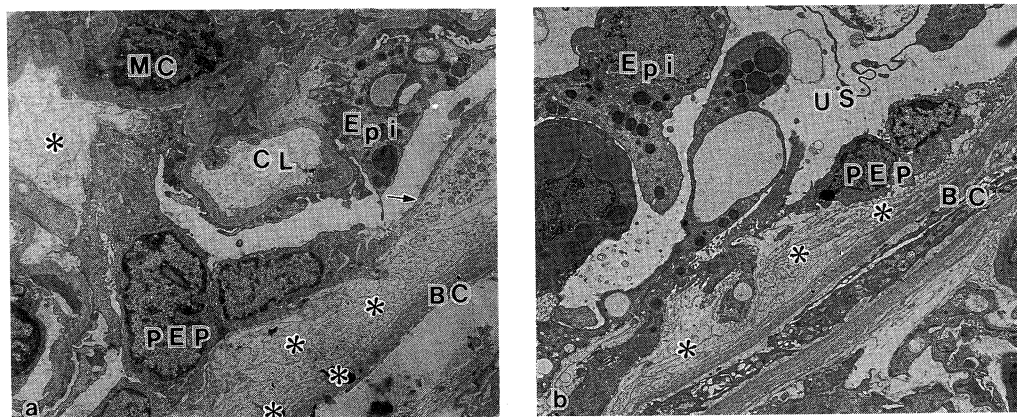
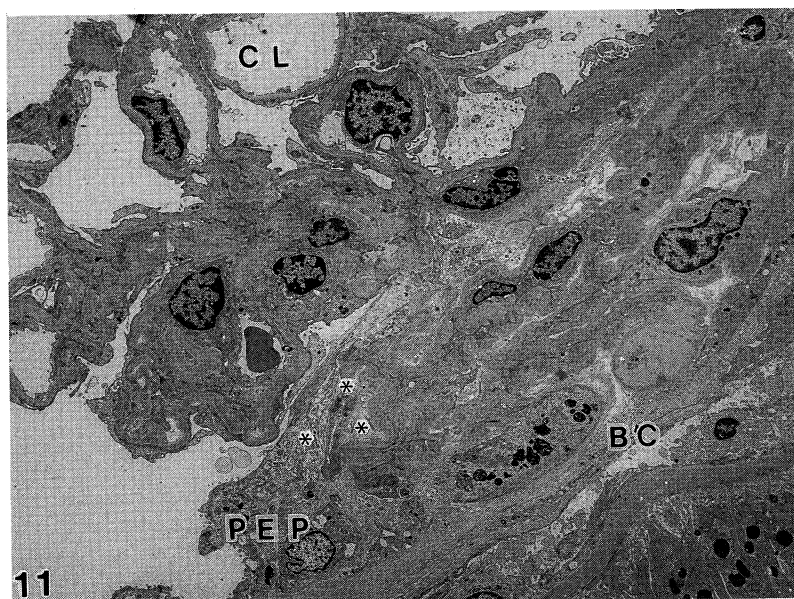


Fig. 9. The degenerative podocytes contain numerous protein reabsorption droplets (arrows). 160 days. MM : mesangial matrix, CL : capillary lumen, b : bleb, US urinary space ( $\times 3100$ )





**Fig. 10.** a. The denuded glomerular basement membrane is covered by Bowman's epithelial cells. Note thickening Bowman's capsule. 120 days. PEP: Bowman's epithelial cell, CL: Capillary lumen, BC: Bowman's capsule, arrows: lamellation of Bowman's capsule, asterisks: BM-like materials ( $\times 2900$ )  
 b. BM-like materials may be projected by Bowman's epithelial cells at the adhesive tuft. 160 days. PEP: Bowman's epithelial cells, Epi: podocyte, BC: Bowman's capsule, US: urinary space, asterisks: BM-like materials ( $\times 2600$ )



**Fig. 11.** Bowman's epithelial cells oppress the intact tuft which forms the segmental glomerular sclerosis. 200 days. CL: capillary lumen, PEP: Bowman's epithelial cells, BC: Bowman's capsule, asterisks: BM-like materials ( $\times 1800$ )

尿細管上皮細胞に認めやすくなった。

成熟したラットでの係蹄細胞の標識率は (Table 1), 平均0.54%で, 細胞別では内皮細胞 72.4%, メサングウム細胞が24.9%で, その他

の分類不能の血管極近くの細胞も標識が認められた。しかし係蹄上皮細胞の標識は, 全く観察されなかった。一方ボウマン嚢上皮細胞の標識率は糸球体係蹄細胞より高く平均0.71%で, 尿

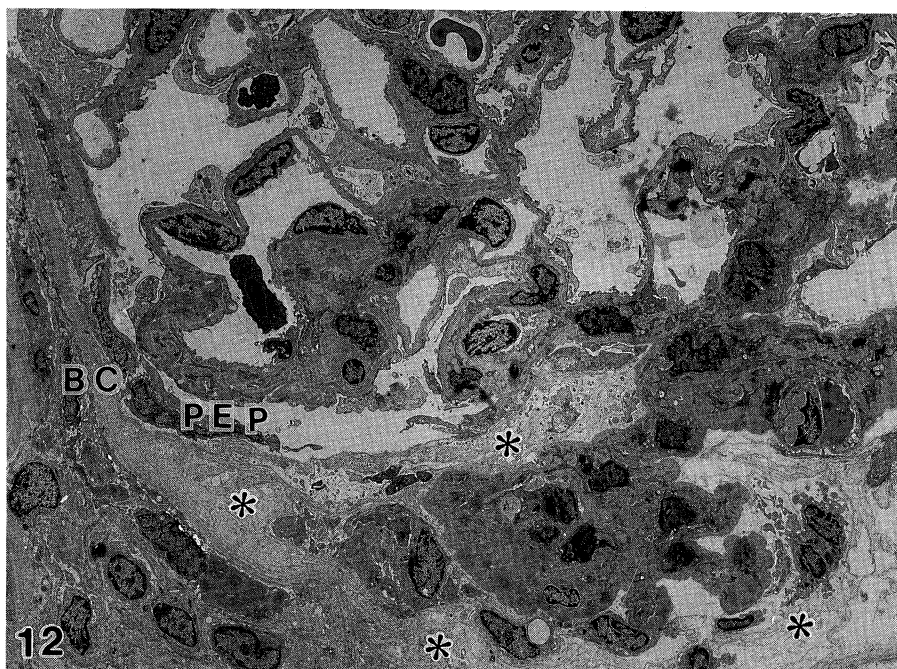


Fig. 12. BM-like materials cover the sclerotic tufts. Bowman's epithelial cells migrate to the surface of BM-like materials. 200 days. PEP: Bowman's epithelial cell, BC: Bowman's capsule, asterisks: BM-like materials ( $\times 1100$ )

管極，血管極いずれの場所でも標識を確認できた。

透過電子顕微鏡での糸球体の発達過程の観察では，糸球体成熟につれて係蹄腔の数が徐々に増加し，内皮細胞，メサンギウム細胞が容易に識別できるようになった。係蹄上皮細胞の発達速度は緩徐で小微絨毛突起を形成し，基底膜に向かい足突起を形成し，形態も徐々に立方状から扁平な細胞に変わっていった (Fig. 4 a, b)。走査電子顕微鏡像で，さらに足突起の形成による係蹄上皮細胞の変化が明らかとなった (Fig. 5 a, b)。

## 2. 実験2 N, N'-diacetylbenzidine による腎障害ラットの観察

1日尿中蛋白量の経過は，実験約40日よりコントロール群より多いラットがDAB群に見られるようになり，それ以後経過とともにDAB群の蛋白量は増加した (Fig. 6)。またDAB群にも個体差が認められた。

糸球体係蹄細胞の標識率の経過は，コントロ

ール群とDAB群ともに，実験開始40日(生後60日)頃より一定となり0.2%前後となった (Fig. 7 a)。コントロール群のボウマン囊上皮細胞の標識率の経過は，係蹄細胞と同じような経過で年齢とともに低下した。しかしDAB群では，実験開始10～20日にかけて高く，その後徐々に低下しコントロール群と同じような経過であったが，160日，200日にかけて再び軽度ながら若干DAB群で高くなっていた (Fig. 7 b)。全経過中，光学顕微鏡の観察で障害を受けている係蹄上皮細胞や，隣接する正常に近い形態の係蹄上皮細胞に標識を確認できなかった。一方ボウマン囊上皮細胞は硬化周辺部や，癒着係蹄に接するようにボウマン囊に連続する異常形態の細胞に標識を認めた (Fig. 8 a, b, c)。

透過電子顕微鏡での経時的観察では，DAB投与30日頃より係蹄上皮細胞質内に小空泡を認め，一部足突起の癒合を認めた。蛋白尿の増加とともに変性像は進行し，細胞質内に多数のライソゾームやBlebの形成，あるいは微絨毛形成が認

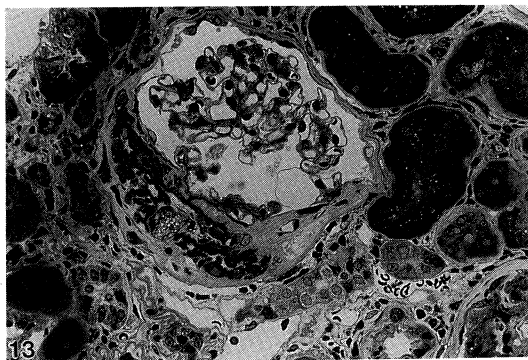


Fig. 13. A micrographic illustration of the changes in segmental glomerular sclerosis. 160 days. ( $\times 400$ )

められ、係蹄上皮細胞に腫大を認めた(Fig. 9)。また係蹄上皮細胞の基底膜からの剥離を認め、末梢係蹄ではボウマン囊上皮細胞が、露出した基底膜を被覆している像が認められ、この像が、光顕でみる係蹄とボウマン囊との癒着像の初期的形態像を示すものと思われる。また、かかる部位ではボウマン囊が限局性に肥厚し、さらにあたかもボウマン囊上皮細胞が基底膜様物質 (basement membrane-like material) を産生しているように (Fig. 10 a, b), 正常係蹄を圧迫閉塞する像が認められた (Fig. 11)。そして健全係蹄と区別するようにボウマン囊上皮細胞が新生基底膜を形成し分節状の硬化病変を完成させる像が観察された (Figs. 12, 13)。糸球体硬化過程の形態学的観察をまとめると Figure 14 のようになる。

## 考 察

係蹄上皮細胞は、尿細管系と血管系の接点である糸球体において、その尿細管系の接点として存在する。したがって発生過程においても係蹄血管形成時期に一致して同じ後腎小胞から発生してくるボウマン囊上皮細胞と、性質が大きく異なることが知られている。例えば、形態的にボウマン囊上皮細胞は徐々に扁平化するのに対し、係蹄上皮細胞は足突起の形成を始めることが知られ、今回の走査、透過電子顕微鏡の観

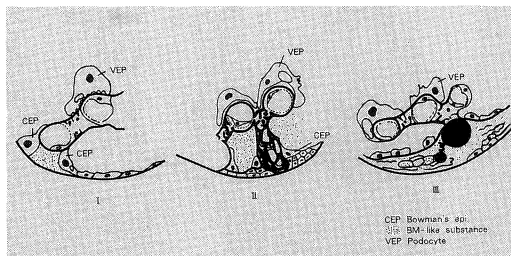


Fig. 14. The proposed pathogenetic schema for segmental sclerosis

察でも確認された。完成された係蹄上皮細胞は一次、二次突起を形成し、いわゆる“タコ足細胞”の形態となり、細胞接着装置等の観察からもボウマン囊上皮細胞との差が認められる。また種々の表面マーカー等の検討でも、係蹄形成時期に一致して大きく両上皮細胞のマーカーが異なり、特に係蹄上皮細胞では補体リセプターである CR-1 が認められてくる。<sup>11)</sup> 膜性腎症などの上皮下沉着物をきたす疾患や、糖尿病性腎症の硬化部で CR-1 リセプターの減少が報告されているが、<sup>12)</sup> その存在意義は現在まで不明である。今回、腎成熟過程の検討で糸球体は腎皮質の深部より成熟が進み、表層には糸球体形成層を生後約 7 日に至るまで認め、ここに多くの標識細胞を認めた。S 字管の上皮細胞、特に後腎小胞内葉、外葉の、将来両上皮細胞に分化していく細胞群に、この時期までは標識を確認できたが、係蹄形成とともに後腎小胞内葉から分化した係蹄上皮細胞は標識を急激に確認できなくなったことは、上記の形態の成熟過程の検討とあわせて考えると、係蹄上皮細胞が他の糸球体細胞に比較して非常に分化した細胞である可能性を示唆する。これを指示するようにヒトの係蹄上皮細胞の場合も、胎生期に最初に細胞質の活動を認めるとの報告<sup>13)</sup> や、増殖マーカーである Ki-67 を用いた報告<sup>14)</sup> でも、短期間のうちに標識を観察できなくなることが報告されている。正常成熟ラットの観察からも、係蹄上皮細胞には標識を認めず、糸球体



構成細胞のボウマン囊上皮細胞、内皮細胞、メサンギウム細胞の順に標識を認めた。しかし最近行われている糸球体培養では、初代培養で最も早く分裂するのは係蹄上皮細胞とされ、*in vivo*、*in vitro*の差も指摘されている。実際培養を行ってみると、培養2日頃より最初に増殖してくる細胞は、単層 (mono-layer) で敷石状の上皮細胞で、これが係蹄上皮細胞由来とされているが、<sup>15),16)</sup> 我々の検討では、透過、走査電子顕微鏡で観察すると細胞中心に cilla があり、細胞接合装置をみても *in vivo* でのボウマン囊上皮細胞に似ている。また *in vivo* の係蹄上皮細胞において細胞骨格蛋白である vimentin の存在が知られているが、培養細胞では証明できず、cytokeratin が証明されることより、培養環境での変化は否定できないが、この培養上皮細胞はボウマン囊上皮細胞、あるいはそれに近い細胞由来ではないかと考えられる (発表予定)。今回得られた結果は、種々の障害時の個々の細胞の再生能力を考える上で重要な因子と考えられる。例えば、急性糸球体腎炎や悪性高血圧での内皮細胞の障害はある程度可逆的であることが推定されているし、さらに実験的にメサンギウムの融解を惹起しても正常に修復されることも知られている。<sup>17)</sup> 今回、標識を認めず、分裂能力を認め得なかった係蹄上皮細胞が障害されたときの、糸球体構成細胞の動態は、糸球体障害の経過に大きく影響すると考えられる。

実験2において、経過すなわち年齢とともに糸球体係蹄細胞やボウマン囊上皮細胞の標識率は、DAB 群、コントロール群ともに同じように低下し、生後60日前後に一定となり約0.2%となった。これから係蹄細胞の細胞周期を計算すると約148日で肝細胞や腸上皮細胞に比較して非常に長いことがわかる。係蹄細胞全体での計算であり、実際は内皮細胞メサンギウム細胞はさらに長いことになる。それから考えるとボウマン囊上皮細胞は全経過とも、係蹄細胞より比較的分裂能力が高いことがわかる。Pabst ら<sup>18)</sup> は飼育環境や labeling の時間による影響を受けると報告し、さらに糸球体細胞にはリンパ球系と同

じように二つのグループの細胞周期が存在する可能性も同時に報告しているが、その意義については考察していない。

DABは、直接係蹄上皮細胞を障害し不可逆的糸球体硬化病変を形成することが報告されている。<sup>19),20)</sup> 著者らもこのモデルを利用してボウマン囊上皮細胞の糸球体硬化過程の動態を観察しているが、<sup>21)</sup> 糸球体組織に変性、障害が進行しても係蹄上皮細胞の標識は、やはり観察されなかった。障害部へは、隣接する係蹄上皮細胞が足突起を伸ばし被覆する像が見られ、一方末梢係蹄ではボウマン囊上皮細胞が腫大し空胞等を伴いながら、係蹄上皮細胞の剥離した基底膜を被覆する像や、そこにボウマン囊上皮細胞が集まる像が認められた。この考えを支持するように、標識細胞が硬化病変周辺や硬化部の近接したボウマン囊上皮細胞に認めたが、分裂能力の差や、同じ胎生期の起源の細胞であるボウマン囊上皮細胞が係蹄上皮細胞の脱落に代わって被覆するのは、大変興味深く思われる。なぜボウマン囊上皮細胞が剥離箇所を認識し被覆するに至るかその詳細な機序については現時点ではわからないが、その箇所のボウマン囊基底膜が肥厚し、ボウマン囊上皮細胞が増殖し集まる像は、何か液性因子の存在を示唆するように思われる。係蹄壊死による半月体形成腎炎にてボウマン囊基底膜の破裂がなければ、主たる増殖細胞はボウマン囊上皮細胞とされ、<sup>22)</sup> 著者の実験ラットにおいても係蹄上皮細胞が剥離し、その基底膜機能の破綻をきたし、半月体形成腎炎と同じように血清成分が漏出し、ボウマン囊上皮細胞増生を刺激した可能性も否定できない。これを支持するように、著者らの膜性腎症の検討でも、<sup>23)</sup> 尿蛋白の量が多いほどボウマン囊病変が高頻度に認められた。最近 IgA 腎症の生検組織で、癒着部のボウマン囊上皮細胞に B 細胞の分化促進因子でも、メサンギウム細胞増殖因子である IL-6 (Interleukin-6) が認められたとの報告もあり、<sup>24)</sup> ボウマン囊病変に対する種々のサイトカインの関与も考えられる。

以上は糸球体内の、特に係蹄上皮細胞の障害

とそれに続くボウマン囊上皮細胞の増生による癒着、さらに硬化過程を考察したが、係蹄上皮細胞の障害がなく、糸球体外、いわゆるボウマン囊外からの刺激による分裂能力の高いボウマン囊上皮細胞の増生等による癒着、硬化病変形成機序の存在も否定できない。最近硬化糸球体のボウマン囊周囲に間質コラーゲン(type 1, 3)が存在することが報告され、<sup>25),26)</sup> 注目されているが、今回、透過電子顕微鏡観察で、ボウマン囊上皮細胞があたかも基底膜様物質を硬化係蹄に向け産生し移動している像を観察したが、上皮細胞がコラーゲン type 1, 3 を産生する成績は報告されていない。したがってgene expression の変化が起こっていることも否定できないが、何らかの間質系細胞の関与も考慮すべきと思われる。実際、小児期 IgA 腎症の臨床病理学的検討で、糸球体係蹄に異常がないものの、半月体や癒着を認める例があり、そのボウマン囊上皮細胞の形態に注目してみると、立方状で整列し増殖している像が認められる。その糸球体ボウマン囊壁に間質の細胞浸潤を認め、何らかの間質系からのボウマン囊上皮細胞の増殖刺激の存在を感じさせる(未発表)。既に進藤は糸球体病変における間質系の細胞反応に注目し、免疫複合体型腎炎の初期に、糸球体病変生成よりも早期に間質の免疫細胞の変動が起こると報告している。<sup>27)</sup> また大澤らは、<sup>28)</sup> 糸球体腎炎において間質の広がり注目し経過との相関を報告している。同じように Bohle, Müller らのグループは、発病初期より腎機能(糸球体濾過量)は糸球体病変以上に間質病変、特に間質の線維化と相関し、<sup>29)</sup> さらにあらゆる病因の糸球体障害の末期像においても、同じように間質病変(細胞浸潤と線維化)と hyperperfusion による糸球体障害の形態像を伴うことより、<sup>30)</sup> 糸球体荒廃過程での間質病変、特に線維化の機序に注目し検討している。彼らは種々の糸球体腎炎において、近位尿細管上皮細胞での HLA class II の異常な発現を認め、その発現と間質のリンパ球、単球、線維芽細胞等の浸潤が相関することより、<sup>31),32)</sup> 尿細管細胞が局所での抗原提示などの免疫機構の

重要な役割を演じているとし、それに反応して間質での細胞性免疫等を介しての線維化機序を推測している。in vitro の実験でも種々報告し、<sup>33)</sup> 同じような結論を出している。最近、巣状糸球体硬化症の検討でも、糸球体とその周囲に、特に癒着部に同時期に CD(cluster of differentiation) 8 細胞の浸潤を認め、糸球体硬化部でのメサンギウム細胞の HLA 発現の低下を認め、一方間質においては CD4 細胞の浸潤と尿細管上皮細胞の異常な HLA の発現を認めたことより、糸球体と間質の細胞性免疫反応の違いを考察している。<sup>34)</sup> いずれにせよ間質の細胞が糸球体硬化過程に関与することを支持する所見として興味深い。最近ボウマン囊上皮細胞には、白血球接着因子の ICAM-1 (Intracellular adhesion molecule-1) が認められるとの報告があり、<sup>35)</sup> 間質の細胞とボウマン囊上皮細胞の関係も興味もたれる。

## 結 論

実験動物ラットの観察で、

- 1) 係蹄上皮細胞は、成熟過程早期に BrdU の標識が認められなくなり、成熟後も確認できなかった。
- 2) DAB 障害ラットでも係蹄上皮細胞の再生像を認めず、代わりに比較的標識率の高いボウマン囊上皮細胞が障害係蹄を被覆し癒着を形成し、糸球体硬化が形成される。

稿を終えるにあたり、御指導、御検閲を賜った川崎医科大学腎臓内科 大澤源吾教授に深謝いたします。さらに研究に御助力いただいた電子顕微鏡センターと、腎臓内科学教室の諸兄に深く感謝いたします。

なお、本研究の一部は厚生省特定疾患「進行性腎障害」調査研究班(班長：黒川清教授)および川崎医科大学プロジェクト研究費(2-702)によったことを付記し、感謝の意を表します。(大澤源吾)

## 文 献

- 1) Border, W. A., Okuda, S. and Nakamura, T. : Extracellular matrix and glomerular disease. *Semin. Nephrol.* 9 : 307—371, 1989
- 2) Border, W. A., Okuda, S., Languino, L. R., Sporn, M. B. and Ruoslahti, E. : Suppression of experimental glomerulonephritis by anti-serum against transforming growth factor  $\beta$ 1. *Nature* 346 : 371—374, 1990
- 3) Osawa, G. : Diabetic nephropathy. *Jpn. J. Nephrol.* 31 : 412—414, 1989
- 4) Yoshida, Y., Fogo, A. and Ichikawa, I. : Glomerular hemodynamic changes vs. hypertrophy in experimental glomerular sclerosis. *Kidney Int.* 35 : 654—660, 1989
- 5) Kondo, Y. and Akikusa, B. : Chronic Masugi nephritis in the rat. An electron microscopic study on evolution and consequences of glomerular capsular adhesion. *Acta. Pathol. Jpn.* 32 : 231—243, 1982
- 6) Grantzer, H. G. : Monoclonal antibody to 5-bromo-deoxyuridine : A new reagent for detection of DNA replication. *Science* 218 : 474—475, 1982
- 7) Dean, P. N., Dolbeare, F., Grantzer, H., Rice, G. C. and Gray, J. W. : Cell cycle analysis using a monoclonal antibody to BrdU. *Cell Tissue Kinet.* 17 : 427—436, 1986
- 8) Hayashi, Y., Koike, M., Matsutani M. and Hosino, T. : Effects of fixation time and enzymatic digestion on immunohistochemical demonstration of bromodeoxyuridine in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *J. Histochem. Cytochem.* 36 : 511—514, 1988
- 9) Abrashamson, D. R. : Origin of the glomerular basement membrane visualized after in vivo labeling of laminin in newborn rat kidney. *J. Cell Biol.* 100 : 1988—2000, 1985
- 10) Gernstein, J., Cheng, F. and Roszka, J. : Glomerular differentiation in metanephronic culture. *Lab. Invest.* 45 : 183—190, 1981
- 11) Weiss, L., Fischer, E., Haeffner-Cavaillon, N., Jouvin, M. H., Appay, M. D., Bariety, J. and Kazatchkine, M. : The human C3b receptor (CR1) . *Adv. Nephrol.* 18 : 249—270, 1989
- 12) Kazatchkine, M. D., Fearon, D. T. and Appay, M. D. : Immunohistochemical study of the human glomerular C3b receptor in normal kidney and in seventy-five cases of renal diseases : Loss of C3b receptor antigen in focal hyalinosis and in proliferative nephritis systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* 69 : 900—912, 1982
- 13) Suzuki, Y. : An electron microscopy of the renal differentiation. *Keio J. Med.* 8 : 129—144, 1959
- 14) Fleming, S. and Jones, D. B. : Immunocytochemical evidence for transferrin-dependent proliferation during renal tubulogenesis. *J. Anat.* 153 : 191—201, 1987
- 15) Striker, G. E., Lange, M. A., Mackay, K., Bernstein, K. and Striker, L. J. : Glomerular cells in vitro. *Adv. Nephrol.* 16 : 169—186, 1987
- 16) Kreisberg, J. I. and Karnovsky, M. J. : Glomerular cells in culture. *Kidney Int.* 23 : 439—447, 1983
- 17) Wen Min : Mesangial proliferative change and mesangiolysis. Habu-snake venom induced glomerular lesions of the kidney. *日医大誌* 56 : 39—50, 1989
- 18) Pabst, R. and Sterzel, R. B. : Cell renewal of glomerular cell types in normal rats. An autoradiographic analysis. *Kidney Int.* 34 : 626—631, 1983
- 19) Carrol, N., Crock, G. W., Funder, 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
- 20) Matsutani, T., Osawa, G., Hirano, H. and Shindo, T. : N, N'-diacetylbenzidine nephropathy. *J. Clin. Electron Microscopy* 18 : 5—6, 1985
- 21) Sasaki, T., Sato, T., Yamada, M., Kitano, Y., Matsutani, T., Shindo, T., Hirano, H. and Osawa, G. :

- Ultrastructural observation of the role of Bowman's epithelium in segmental glomerular sclerosis. *J. Clin. Electron Microscopy* 23 : 1084—1085, 1990
- 22) Guettier, C., Nochy, D., Jacquot, C. Mandet, C., Camilleri, J. P. and Bariety, J. : Immunohistochemical demonstration of parietal epithelial cells and macrophages in human proliferative extra-capillary lesions. *Virchows Archiv. [A]* 409 : 739—748, 1986
- 23) Sasaki, T. and Osawa, G. : Clinico-pathological study of Bowman's capsular changes in idiopathic membranous nephropathy. *Clin. Nephrol.* (submitted for publication)
- 24) Fukatsu, A., Matsuo, S., Tamai, H., Sakamoto, N., Matsuda, T. and Hirano, T. : Distribution of interleukin-6 in normal and diseased human kidney. *Lab. Invest.* 65 : 61—66, 1991
- 25) Yoshioka, K., Takemura, T., Tohda, M., Akano, N., Miyamoto, H., Ooshima, A. and Maki, S. : Glomerular location of type 3 collagen in human kidney diseases. *Kidney Int.* 35 : 1203—1211, 1989
- 26) Yoshioka, K., Tohda, M., Takemura, T., Akano, N., Ooshima, A. and Maki, S. : Distribution type 1 collagen in human kidney diseases in comparison with type 3 collagen. *J. Pathol.* 162 : 141—148, 1990
- 27) 進藤 亨 : 腎抗原刺激マウスの腎間質組織における免疫細胞反応の意義. *川崎医学会誌* 11 : 117—126, 1985
- 28) 大澤源吾, 阿部昌洋, 長井靖仁 : 糸球体腎炎の臨床病理. 糸球体腎炎における間質病変の検討. *臨免疫* 12 : 916—923, 1980
- 29) Bohle, A., Gise, H. V., Mackensen-Hasen, S. and Stark-Jakob, B. : The obliteration of the post-glomerular capillaries and its influence upon the function of both glomeruli and tubuli. *Klin. Wochenschr.* 59 : 1043—1051, 1981
- 30) Bohle, A., Kressel, G., Müller, C. A. and Müller, G. A. : The pathogenesis of chronic renal failure. *Pathol. Res. Pract.* 185 : 412—440, 1989
- 31) Müller, C. A., Markovic-Lipkovski, J., Risler, T., Bohle, A. and Müller, G. A. : Expression of HLA-DQ, DR, and-DP antigens in normal kidney and glomerulonephritis. *Kidney Int.* 35 : 116—124, 1989
- 32) Müller, G. A., Müller, C. A., Markovic-Lipkovski-Markovic, J., Kilper, R. B. and Risler, T. : Renal, major histocompatibility complex antigens and cellular components in rapidly progressive glomerulonephritis identified by monoclonal antibodies. *Nephron* 49 : 132—139, 1988
- 33) Müller, G. A., Risher, T., Bohle, A. and Rodemann, P. : Abnormal growth of renal fibroblasts derived from kidneys with interstitial fibrosis. *Kidney Int.* 35 : 178 (b), 1989
- 34) Markovic-Lipkovski, J., Müller, C. A., Risler, T., Bohle, A. and Müller, G. A. : Mononuclear leukocytes, expression of HLA Class II antigens and intercellular adhesion molecule 1 in segmental glomerulosclerosis. *Nephron* 59 : 286—293, 1991
- 35) Faull, R. J. and Russ, G. R. : Tubular expression of intercellular adhesion molecule 1 during renal allograft rejection. *Transplantation* 48 : 226—230, 1989