

## 自然発症糖尿病モデル WBN/Kob ラットにおける糸球体上皮細胞の超微形態的研究

佐藤 哲也

自然発症糖尿病モデル動物における腎障害について糸球体上皮細胞を中心に超微形態的に観察し、糖尿病性腎障害の初期病変の関与について検討した。

雄性自然発症糖尿病モデル動物 (WBN/Kob ラット) は生後 9 カ月齢から血糖値が上昇し、10 カ月齢からは対照群に比して有意に尿蛋白排泄量が増加した。病理組織的には、光顕では14カ月齢まで形態変化を認めず、16カ月齢で限局性の糸球体係蹄硬化像が出現した。電顕的には、9 カ月齢から糸球体上皮細胞の核および Golgi 装置の発達等の微細構造の変化が出現し、以後は、足突起や細胞質の変性像が出現した。糸球体基底膜の肥厚やメサンギウム基質の増加は上皮細胞の形態変化に遅れて出現し、蛋白尿も次第に増加した。このことは WBN/Kob ラットにおける糖尿病性腎障害の初期形態変化は糸球体上皮細胞の形態変化であり、上皮細胞の障害過程でポウマン囊上皮細胞と係蹄壁の癒着が起こり、硬化病変が出現、進行する可能性を示唆していると思われる。

(平成 4 年10月30日採用)

### Ultrastructural Study of Glomerular Epithelial Cells in a Strain of Spontaneously Diabetic WBN/Kob Rats

Tetsuya Sato

The purpose of present study was to clarify a morphological change in glomerular epithelial cells (podocytes) in the early stage of diabetes and the development of diabetic glomerular sclerosis.

To examine the participation of podocytes in diabetes, we made ultrastructural observation of the morphological changes in glomeruli in a strain of spontaneously diabetic WBN/Kob rat till they reached 21-months of age by using electron microscopic methods.

Most rats developed hyperglycemia at 9-months of age, and proteinuria from 10-months of age.

Electron microscopically, various, morphological changes, such as a hypertrophic nucleus, an irregularly-shaped nucleus, an increase in number of Golgi apparatus, and dilatation of endoplasmic reticulum were observed in the podocytes. These findings were followed by thickening of the glomerular basement membranes (GBM).

It is suggested that these findings could be characteristic changes in the podocytes at the early stage (a phase of mild proteinuria until 12-months of age) of diabetic nephropathy in the WBN/Kob rats. In the advanced stage (16-months of age), the podocytes became generally atrophic.

Finally Bowman's epithelium covered the denuded GBM and produced an extracellular basement membrane-like substance outside the capillaries, which obliterated the lumens. These are non-specific findings of the glomerular sclerosing process.

Based on the results of the present study, it appears that the podocytes in the early phase of diabetes play an important role in the development of glomerular sclerosis in WBN/Kob rats. (Accepted on October 30, 1992) *Kawasaki Igakkaishi* 18(4):289-304, 1992

**Key Words** ① Glomerular epithelial cell ② Diabetic glomerular sclerosis  
③ WBN/Kob rat

## 結 言

糸球体上皮細胞には糸球体基底膜合成の主要な細胞とされており、係蹄壁構造の維持に関与していると考えられている。<sup>1), 2)</sup> 一方、糖尿病では、糸球体基底膜の肥厚とメサンギウム基質の増加による糸球体硬化が特徴的におこり、臨床的には多量の蛋白尿と進行する腎機能低下を示す<sup>3)</sup> が、その発現機構には不明な点も多く、病態の解明が急がれている。著者らはヒト糖尿病の糸球体硬化が完成する過程で糸球体上皮細胞の微細構造変化が起こり、変性、萎縮、脱落を示す過程を観察し、<sup>4)</sup> 糸球体上皮細胞の変化が腎症の発症、進行に密接に関与する可能性を示唆した。さらに、糸球体上皮細胞は、少なくともラットにおいては出生後には分裂、再生を示さないことが証明されており、<sup>5), 6)</sup> ヒトの糸球体上皮細胞である可能性が強い。従って、これまで糸球体基底膜やメサンギウム基質に観察の主眼がおかれた糖尿病腎障害を糸球体上皮細胞の形態変化との関連において再検討することは不可逆の糖尿病性糸球体硬化症の発現と進展機構を解明するためにも極めて重要と思われる。しかしながらヒト糖尿病における経時的検討は困難であり、実験動物による早期からの観察によって補充せざるをえない。これに対して、実験的糖尿病動物は高血糖などにより長期飼育維持

が困難であったため経時的な観察は殆どなされていらない。そこで今回、著者は長期飼育が可能とされる自然発症糖尿病 WBN/Kob ラットの糸球体を、上皮細胞の形態を中心に経時的に観察し、検討した。

## 実験材料と方法

### 1. 糖尿病動物および観察

Wister 系雄性 WBN/Kob ラット<sup>7)</sup> 50匹および糖尿病を発症しない雌性 WBN/Kob ラットを対照群として15匹、それぞれ5週齢、体重150~160gのものを購入した。ラットは4~6匹ずつ飼育籠に分け、一般の固形飼料(MF-オリエンタル酵母工業)と水道水を自由に摂取させて、室温にて飼育した。2カ月齢から21カ月齢の動物を経時的に2, 6, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 及び21カ月齢時にそれぞれ3~5体ずつ屠殺を行い、観察した。

屠殺前の24時間より代謝ケージを使用して絶食、飲水のみにして蓄尿を行い、尿蛋白濃度を Kingsbury Clark 法で測定、1日尿蛋白量を計算した。

屠殺時に大動脈より速やかに採血を行い、空腹時血糖値を Glucose Oxidase 法で、血清クレアチニンを Folin-Wu 法で測定した。

体重は屠殺直前に測定した。

なお全経過中、全てのラットはインスリンを

使用せずに飼育した。16カ月齢以降は死亡する個体が増え、最終観察時までには雄12匹、雌8匹が死亡した。なお自然死亡例は形態観察から除外した。

## 2. 形態学的観察

### 1) 光化学顕微鏡および透過電顕

屠殺に際しては、エチルエーテルのガス吸入によって麻酔した後、ネンプタールによる腹腔内麻酔を施行した。腹部正中切開後、出来るだけ迅速に腹部大動脈を露出し、24G カテラン針を挿入、大動脈中樞側を結紮した。生理食塩水 300 ml を灌流し、左腎静脈を切断して血液を流出させたところでまず右腎を光顕用に摘出。さらに2.5%グルタルアルデヒド (0.1M リン酸緩衝液, pH 7.2に溶解) で5分間灌流固定させた後、左腎を摘出した。摘出標本はすみやかに2~3 mm 角に細切し、更に24時間前固定して電顕試料とした。その後は型のごとく、リン酸緩衝液にて洗浄後、1%四酸化オスミウムリン酸緩衝液にて2時間固定後、エタノール系列で脱水処理をしたのち、プロピレンオキサイドを経て、エポキシ樹脂 Epon 812 に包埋し、電顕用試料とした。ガラスナイフ及びダイヤモンドナイフ(ディアトム社)を使用して90~150 nm に超薄切し、超薄切片を作成した。超薄切片を銅製メッシュにとり、酢酸ウランで15分間、クエン酸鉛で1分間、二重染色を施した。なお観察に際しては透過型電子顕微鏡 (Hitachi, HU-12A) を使用し、腎糸球体は1匹の動物について5~6個を観察した。

光顕用試料としては、型の如く、10%中性ホルマリンで1週間固定した後、水洗、脱水し、パラフィン包埋した。染色はヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、過沃素酸・Schiff (PAS) 染色、コロイド鉄染色等を施行し、キシロール・バルサムで封入後、鏡検、観察した。

電顕では一般観察に加えて、糸球体基底膜の厚さを Osawa の方法<sup>8)</sup> に準じて計測した。即ち糸球体末梢係蹄部を約 1~2  $\mu\text{m}$  の間隔で区分し、その部分で上皮細胞足突起が基底膜に垂直に接し、基底膜の三層構造の明らかな部位のみに限定して上皮細胞膜と内皮細胞膜の間の最短距離を直線で結び測定した。また、電顕上の上皮細胞の初期の形態変化の特徴を各月齢における病変の出現頻度 [病変のある上皮細胞/観察した全ての上皮細胞] (%) を算出することで表した。

## 結 果

### 1. 糖尿病の発症と蛋白尿の出現

雄性 WBN/Kob ラットの空腹時血糖は最も早い動物で生後6カ月、多くは生後9カ月以降の動物で有意に上昇を呈し、加齢とともに更に上昇傾向を認めた (Fig. 1)。

それに伴って生後9カ月頃より尿蛋白が増量したが、16カ月齢以降は100 mg/日を越す高度の蛋白尿個体が出現した (Fig. 2)。対照の雌性個体では生後18カ月まで糖尿病の発症を認めず、尿蛋白も13 mg/日以下であった。

血清クレアチニンは21カ月齢まで不変で最高値は1.1 mg/dl であったが対照群と有意差はなかった (Fig. 3)。

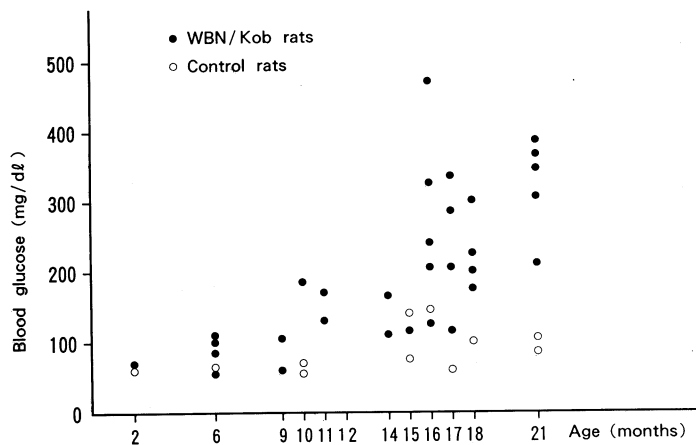


Fig. 1. Serial blood glucose levels of WBN/Kob and control rats

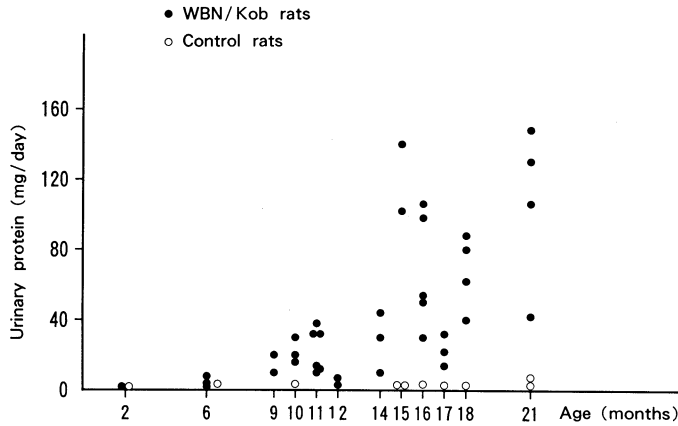


Fig. 2. Serial urine protein levels of WBN/Kob and control rats

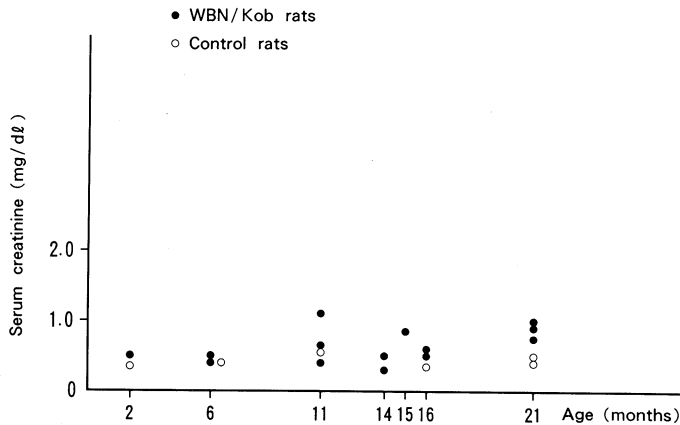


Fig. 3. Serial serum creatinine levels of WBN/Kob and control rats

## 2. 形態学的観察

### 1) 光学顕微鏡所見

雌の対照群では、18カ月齢においても糸球体にはほとんど形態変化を認めなかった。

雄では12カ月齢までは大きな形態変化は出現しなかったが、14カ月齢以降はメサンギウム基質が増加した。これは、尿蛋白量が40 mg/日を越える時期に一致する。16カ月齢では85%の動物で尿蛋白量が40 mg/日を越え、100 mg/日に達する個体も出現したが、上皮細胞にはPAS陽性の顆粒が出現し、一部の末梢係蹄腔内がPAS陽性の硝子様物質で閉塞された所見、係蹄壁とボーマン嚢との癒着、限局性の硬化病変の出現をみた (Fig. 4 a~d)。硬化糸球体の周囲には

線維増加もみられた。この変化はWBN/Kobラット腎障害の終末糸球体像と考えられた。従って、蛋白尿が出現する直前の9カ月齢から、軽度の蛋白尿が出現しはじめ光顕上はほとんどが形態変化を認めない12カ月齢までが腎症発症早期の形態観察に適すると考えられた。

### 2) 電子顕微鏡所見

雄性WBN/Kobラットにおいて早期に認められる変化は糸球体上皮細胞の変化と糸球体基底膜の肥厚である。

糸球体基底膜の計測では、10カ月齢( $280.93 \pm 24.89$  nm)は同齢対照群( $204.33 \pm 21.46$  nm)より有意に肥厚しており、14カ月齢( $423.66 \pm 27.45$  nm)、18カ月齢( $486.33 \pm 13.44$  nm)は、18カ月齢対照群( $220.67 \pm 13.39$  nm)に比して有意に肥厚していた (Fig. 5)。

対照群の糸球体上皮細胞は、16カ月齢においても核膜

がやや波状になる以外には、細胞内微細構造物には何ら変化は認めなかった (Fig. 6 a)。雄性個体の6カ月齢の糸球体上皮細胞も殆ど変化を認めない (Fig. 6 b)。9カ月齢からは、まず最初の変化として上皮細胞の核構造が注目をひき、核が一般に大きく(核/細胞質比の増大)、淡染する正染色質 (euchromatin) が豊富になり、核質が明るくなっていた。核小体も発達しており、特に線維層が発達していた (Fig. 7 a)。この時期は糸球体基底膜肥厚も有意にはみられず内皮細胞やメサンギウム細胞の形態変化も認めない。血糖値の上昇傾向を認め、蛋白尿もやや増量する時期の像である。蛋白尿増量が有意に確認される10カ月齢では上皮細胞の核は変形して切れ



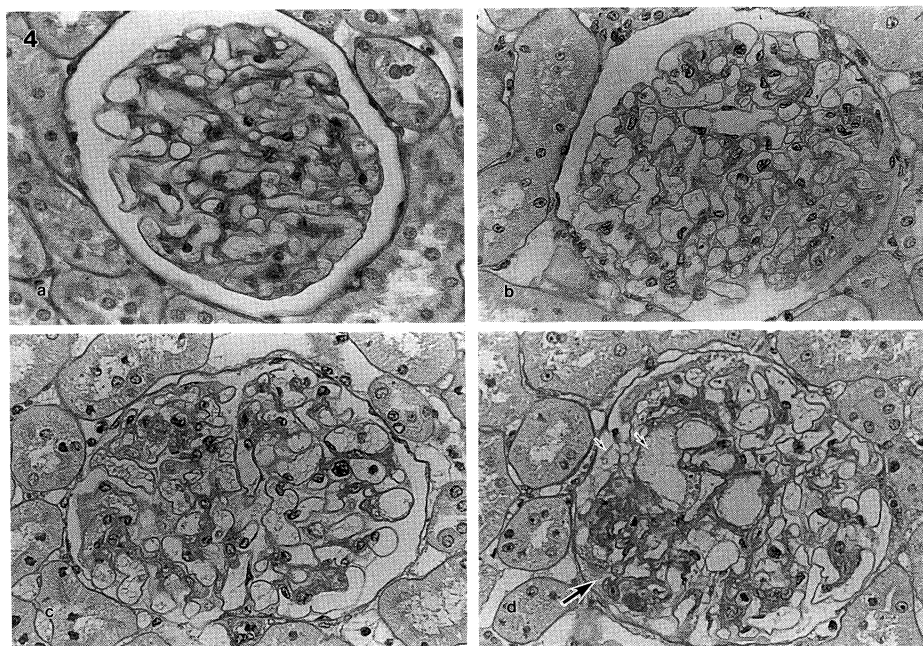


Fig. 4. a. A glomerulus in a WBN/Kob rat showing normal glomerular appearance at 9-months of age. PAS stain.  $\times 400$ .  
 b. A glomerulus in a WBN/Kob rat demonstrating mild mesangial thickening at 11-months of age. PAS stain.  $\times 400$ .  
 c. A glomerulus in a WBN/Kob rat demonstrating moderate mesangial thickening at 14-months of age. PAN stain.  $\times 400$ .  
 d. A glomerulus in a WBN/Kob rat demonstrating focal glomerular sclerosis at 16-months of age. small arrows : vacuoles in podocytes large arrows : focal segmental sclerosis PAS stain.  $\times 400$ .

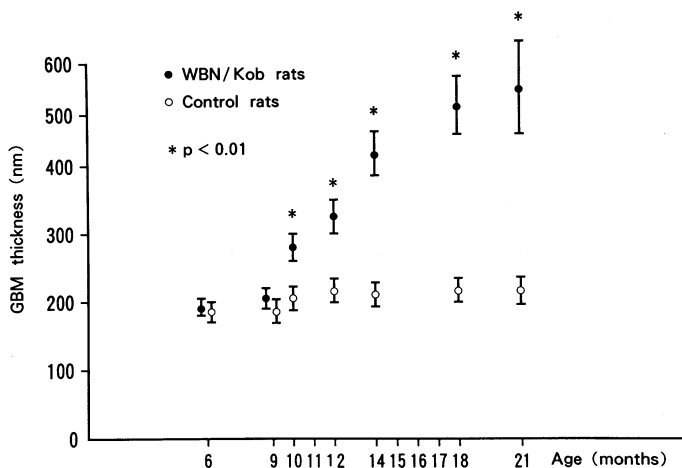


Fig. 5. Thickness of GBM in WBN/Kob and control rats

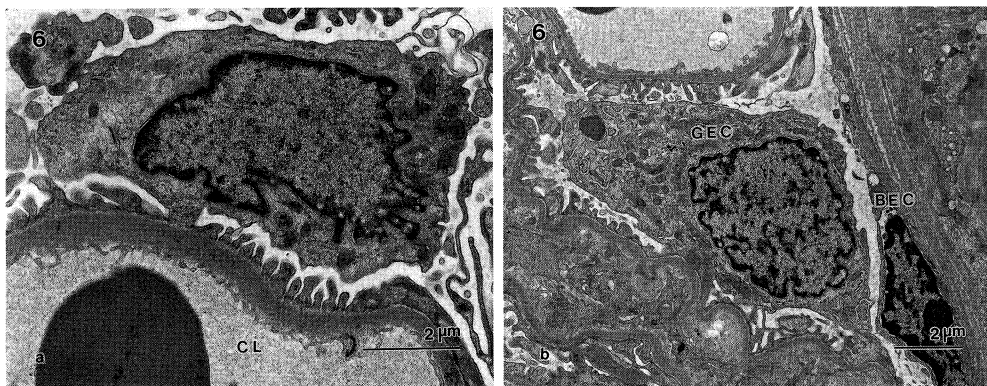


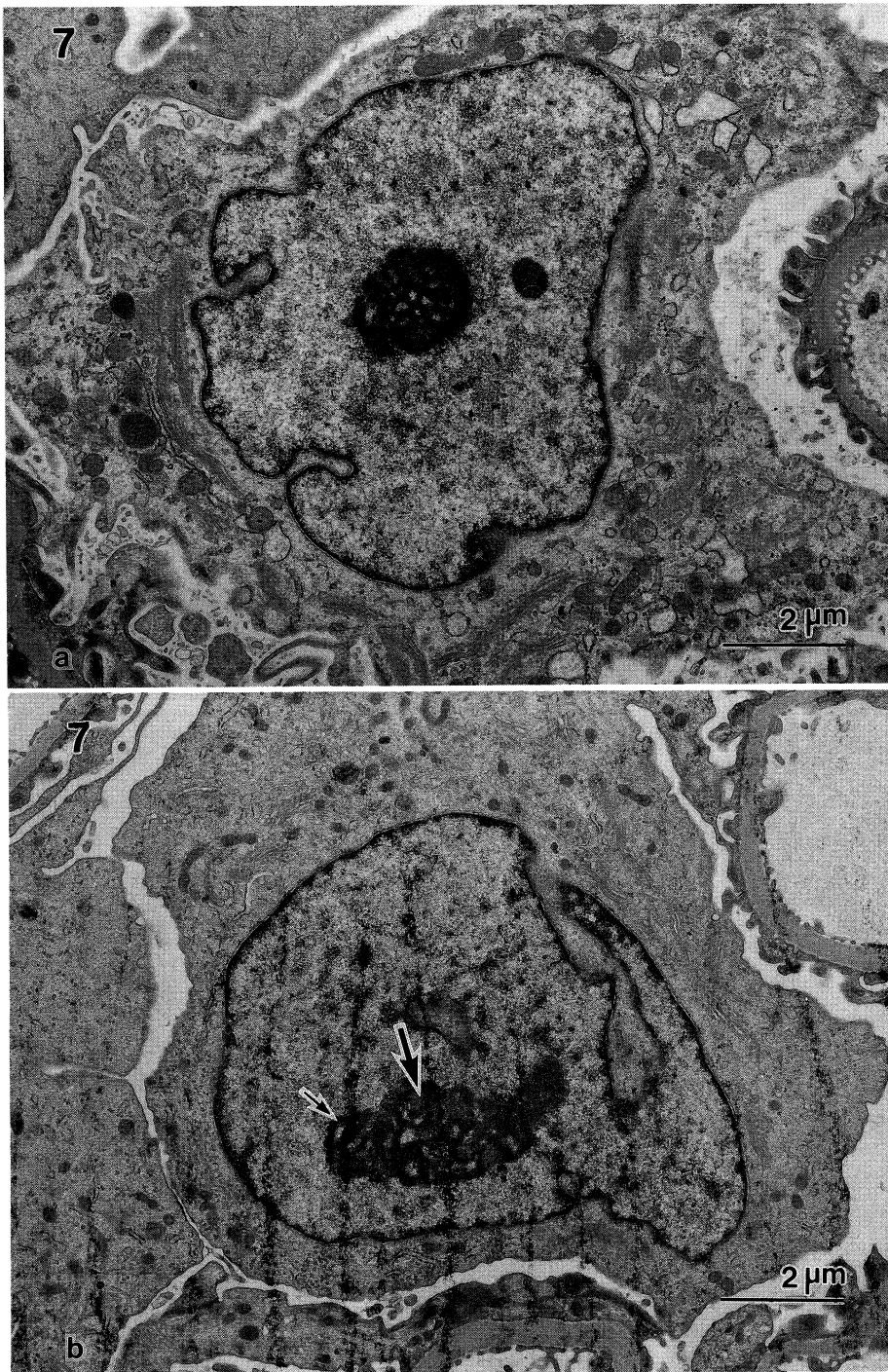
Fig. 6. a. A podocyte in a control rat showing normal appearance at 16-months of age. GEC: Glomerular epithelial cell. Bar=2  $\mu$ m  
b. A podocyte in a WBN/Kob rat showing normal appearance at 6-months of age. Bar=2  $\mu$ m

こみ、波状あるいは脳回状に見える。核小体では線維層に加えて、顆粒層も発達し、核内代謝の亢進を思わせた (Fig. 7 b)。また、この時期だけ一時的に Golgi 装置が発達、増加していたことが非常に特徴的である (Fig. 8 a, b)。12カ月齢以降も上皮細胞では大きな核がみられたが、Golgi 装置はむしろ減少傾向をしめし、この時期もメサンギウム細胞の形態変化は認めなかった (Fig. 9 a)、14カ月齢からは粗面小胞体(以下 rER) の増加もみられた (Fig. 9 b)。足突起構造は一部で足突起の幅が広がっている部分があったが、おおむね保たれていた。また、二次突起から足突起にかけて直径約 7 nm の微細フィラメントが増加していた (Fig. 10)。著者は免疫電顕法によりこの微細フィラメントがアクチンであることを確認している。<sup>9)</sup> 蛋白尿が増加する14カ月齢以後では rER が減少し、小胞体腔の拡張が著明になった (Fig. 11 a, b)。高度の蛋白尿を呈する個体では、Golgi 装置、小胞体、グリコーゲン顆粒、および遊離リボゾームが減少するために細胞質が薄くみえる。逆にミトコンドリア、lysosome (protein reabsorption droplets) や phagosome、細胞骨格である微小管、中間系フィラメントおよび微細フィラメントが目立ち、空胞形成や部分的な剥離もみられる (Fig. 12 a~c)。16カ月齢以後は特に高度の

蛋白尿を呈する動物で上皮細胞の萎縮が顕著であり、糸球体基底膜から剥離し、露出した係蹄を基底膜様物質の出現とともにポウマン囊壁から立方状の上皮細胞が被っており、係蹄腔は閉塞、硬化していた。この上皮細胞は核や細胞質の形態の特徴よりポウマン囊上皮細胞であると考えられた (Fig. 13 a)。メサンギウム基質の増加も顕著になったが (Fig. 13 b)、ヒト糖尿病性糸球体硬化症に特徴的な結節性病変は全経過中、観察し得なかった。糸球体上皮細胞における微細構造の変化の出現率を9カ月齢から21カ月齢まで経時的に求めた成績を Table 1 に示す。

## 考 察

糖尿病における特徴的な糸球体病変は糸球体基底膜肥厚とメサンギウム基質の増加による糸球体硬化とされ、結節性病変とびまん性病変に大別されている。特に結節性病変は糖尿病に極めて特徴的であり1936年、Kimmelstiel と Wilson によって初めて記載された<sup>10)</sup> が、実際はこの病変は臨床的に蛋白尿が出現する頃には完成しているものと考えてよい。<sup>11)</sup> 電顕ではメサンギウム基質の増加と糸球体基底膜の肥厚とが基本的な病変とされているが、糖尿病性腎症の発症



**Fig. 7.** A podocyte in a WBN/Kob rat with a rather pleomorphic and distinct nucleus  
a. 9-months of age. Bar=2 μm  
b. 10-months of age. Bar=2 μm  
small arrows : fibrillar zone    large arrows : granular zone

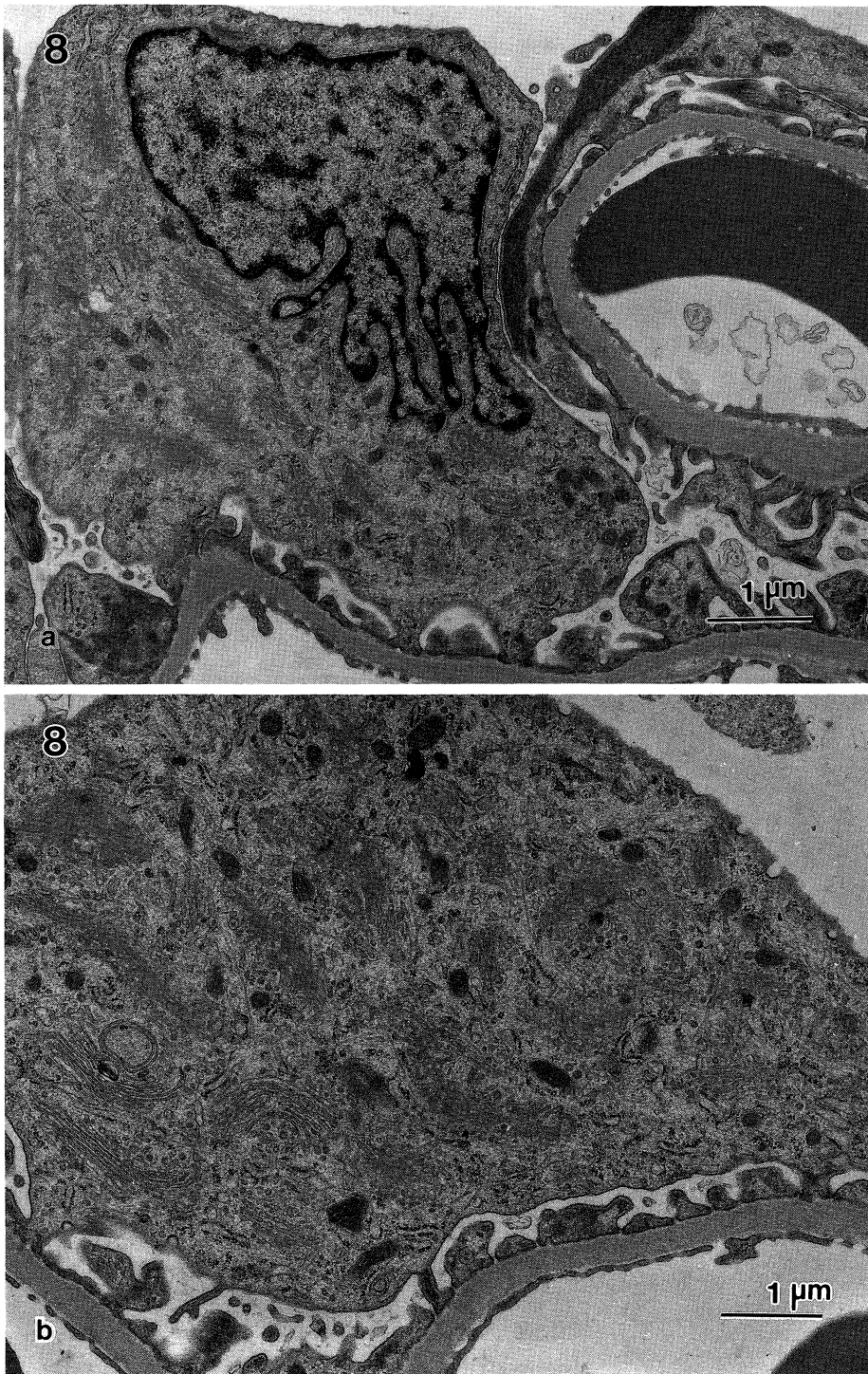
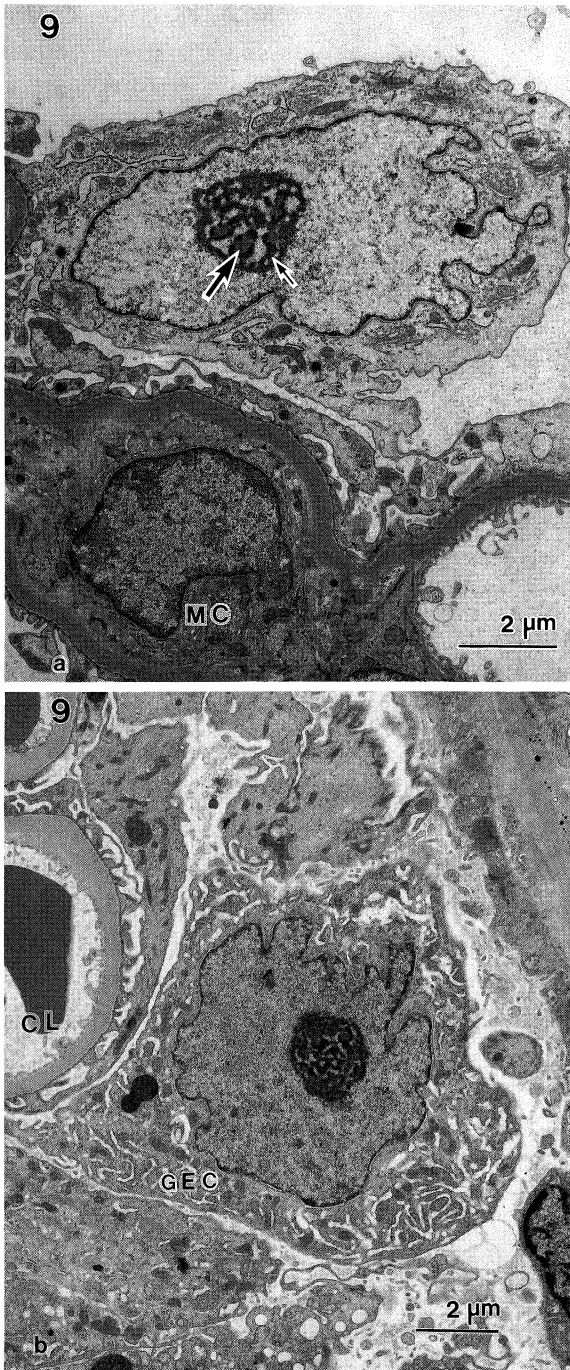


Fig. 8. a, b. A podocyte of a WBN/Kob rat containing pleomorphic nucleus and well-developed Golgi apparatus. 10-months of age. Bar=1  $\mu$ m





**Fig. 9.** a. A podocyte in a WBN/Kob rat with a rather pleomorphic and distinct nucleus. 12-months of age. small arrows : fibrillar zone large arrows : granular zone MC : Mesangial cell Bar = 2  $\mu$ m  
b. A podocyte in a WBN/Kob rat containing modest amount of rough endoplasmic reticulum. 14-months of age. Bar = 2  $\mu$ m

期の推定が困難であることもあり初期病変の観察は少ない。ØsterbyとGunderson<sup>12)</sup>は発症1年から6年の初期例の電顕にてヒト糖尿病では糸球体面積および毛細血管腔が対照の2倍位大きいことと、細胞の肥大によるメサンギウム領域の拡大があることを報告している。また、Østerby<sup>13)</sup>は発症後間もないインスリン依存性糖尿病患者でみられない基底膜の肥厚やメサンギウムの肥厚が1年半から2年で出現し、5年で明瞭となることを報告している。一方、Mauerら<sup>14)</sup>は糸球体基底膜の厚さは糖尿病罹病期間、アルブミン尿、腎機能、高血圧の有無とは関係ないことを示している。このように病変の進行過程についてはいまだ一定の見解がないのが現状である。糸球体上皮細胞の初期の微細構造については、Østerby<sup>13)</sup>が糖尿病発症の3年半～5年で上皮細胞の細胞質が水腫様の変化をすることに加え、basement membrane materialと異種封入体とを粗面小胞体(rER)の中に認め、上皮細胞が基底膜のturn overを司る可能性を説明している。また同時期にrERの中にRNA顆粒が存在することも報告している。著者ら<sup>4)</sup>もヒトの糖尿病発症早期例の糸球体上皮細胞で核の発達、rERの著明な拡張および小空胞形成の増加をみとめている。しかしながら、糖尿病における糸球体上皮細胞のこうした微細構造変化の意義は殆ど不明である。糖尿病性腎症そのものの経過が長いことも併せて前臨床期の腎症に対するヒトでの検索に制限があることを示すもので、

こうした問題の解決にはモデル動物による解析が有効な情報を与えてくれる可能性がある。

従来、糖尿病性腎症のモ

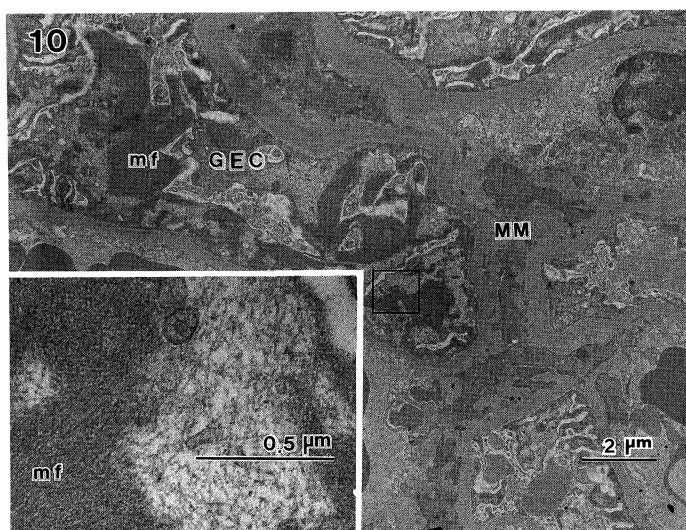


Fig. 10. A podocyte of WBN/Kob rat containing numerous microfilaments. 11-months of age. mf: microfilaments. Bar=2  $\mu$ m (higher magnification, Bar=0.5  $\mu$ m)

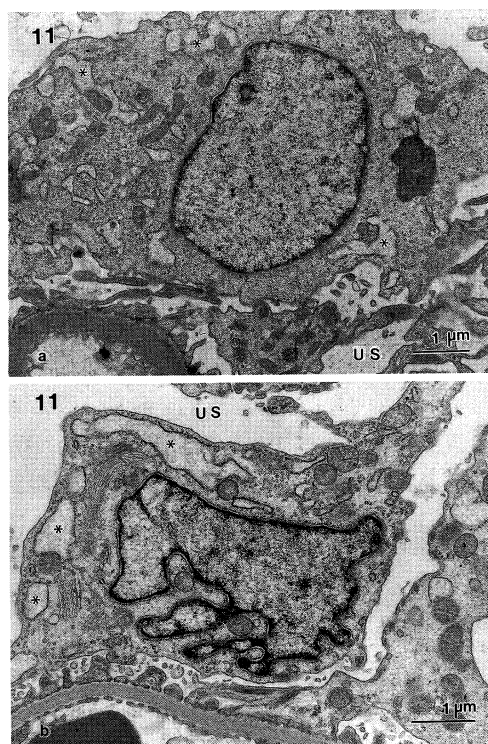
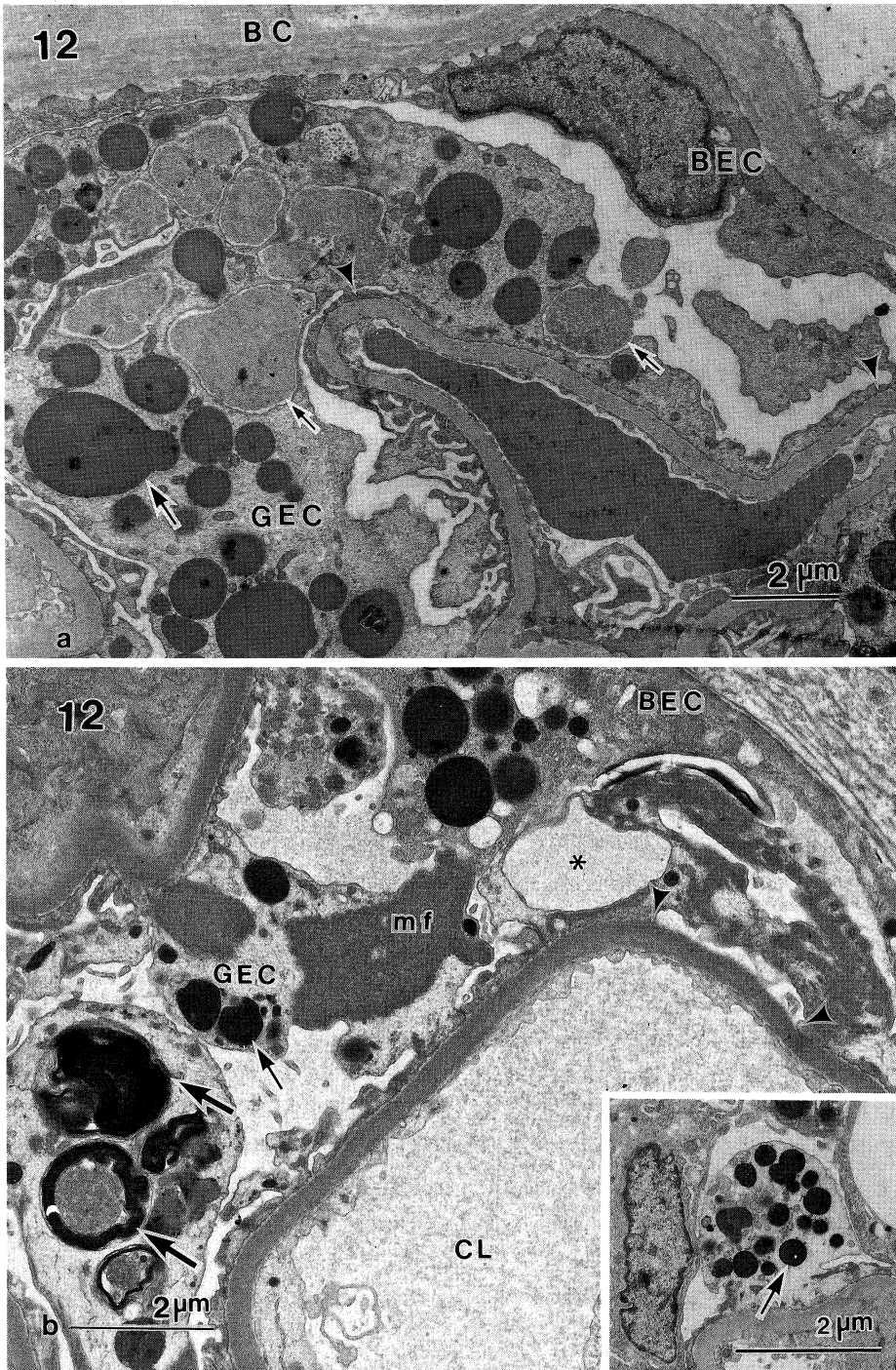


Fig. 11. a, b. A podocyte containing dilated cistern of rough endoplasmic reticulum and several mitochondria. 14-months of age. asterisks: dilatation of cisterns. US: urinary space. Bar=1  $\mu$ m

デル動物としては; alloxan,<sup>15)</sup> streptozotocin (STZ)<sup>16)</sup> のラ氏島 $\beta$ 細胞毒素の投与によるもの, また, Chinese hamster,<sup>17)</sup> diabetic mice,<sup>18)</sup> spiny mice,<sup>19)</sup> KK mice,<sup>20)</sup> NSY mice<sup>21)</sup> 等の自然発症糖尿病動物が報告されているが, 最近はSTZが使用される機会が多い. STZ動物モデルではSTZ静注後1週間より尿中アルブミン排泄率が増加し, その後メサンギウム増加と糸球体基底膜の厚さが増加するが, 糖尿病性腎症モデルとしては, 蛋白尿の発現が急激すぎる点や長期生

存しにくい等の問題がある. 一方WBN/Kobラットは1976年, 小堀<sup>22)</sup> がWister系ラットにN-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidineを投与して得た実験的胃癌発生ラットを日本に導入して発見されたものである. すなわち, この雄は生後1年前後より糖尿病を発症し, 自然発症糖尿病モデルとされている. 組織的には膵組織の線維化, 脂肪置換が起こり, インスリンの絶対的欠乏を起こすためヒトの膵性糖尿病に類似した病態を呈するものと考えられている.<sup>5)</sup> 今回, 本ラットを使用した理由は長期観察にあたり, ①糖尿病の発症が緩徐, ②本邦に多いインスリン非依存型糖尿病のモデル動物である, ③インスリン治療なしで長期生存するといった特徴を持つためであった. 本ラットの腎病変に関するこれまで報ぜられた検討では森ら<sup>23)</sup> や, Ishizakiら<sup>24)</sup> が12カ月齢で糸球体基底膜の肥厚, 17カ月齢でメサンギウムの増加や浸出性病変が, 21カ月齢では糸球体係蹄の硬化像が出現したと報告している.

今回の観察において, 血糖値が上昇する時期から蛋白尿が増加する時期までに認められたWBN/Kobラットの糸球体上皮細胞の経時的な微細構造の変化を要約すると, 1) 血糖値上昇



**Fig. 12.** The degenerative podocytes  
**a.** large arrows : lysosome    small arrows : phagosome  
 between arrowheads : fusion of the foot process  
 14-months of age. Bar=2  $\mu$ m  
**b.** large arrows : lysosome  
 between arrowheads : focal detachment of podocytes  
 asterisk : vasuole    16-months of age. Bar=1  $\mu$ m

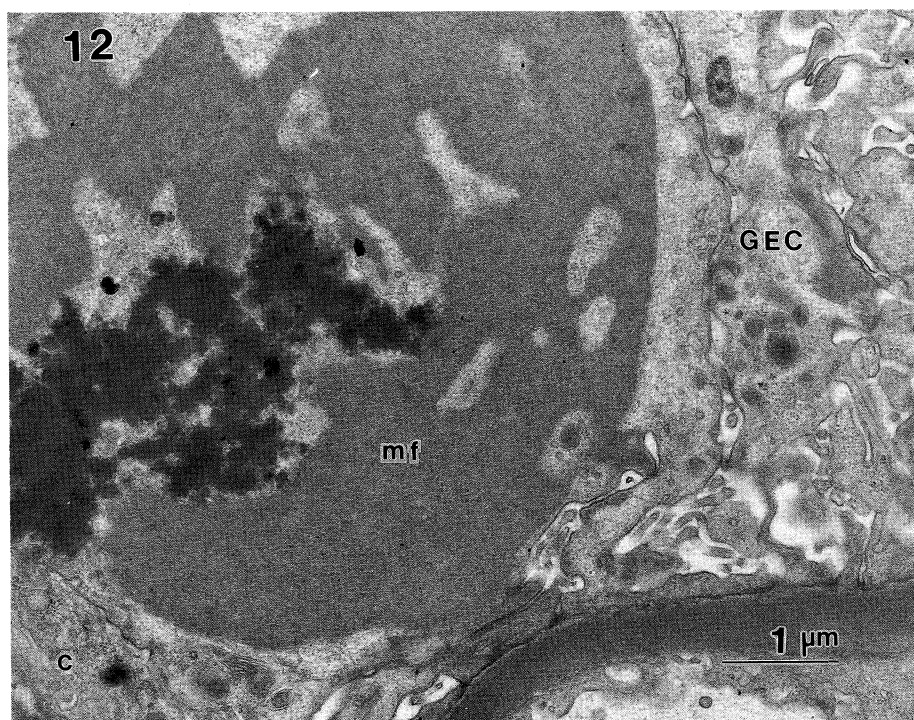


Fig. 12. The degenerative podocytes  
c. mf : numerous microfilaments 16-months of age. Bar = 1  $\mu$ m

傾向を示す時期の核および核小体の膨大（9カ月齢），2）明らかな血糖値上昇時に一致したGolgi装置の発達，増加（10カ月齢），3）rERの増加（12カ月齢），小胞体腔の著明な拡大（12カ月齢以後）および4）ミトコンドリアの増加（14カ月齢以後）として特徴づけられる．こうした形態的特徴の意義を，細胞生化学的に考察すると，まず早期に目立つ核の膨大，核クロマチン量減少，核小体の発達は糸球体上皮細胞核内でDNAやRNAの合成が何らかの原因で亢進していることを示唆する．また，核小体における顆粒層の発達はリボゾームRNA（r-RNA）の合成亢進<sup>25)</sup>を示し，蛋白尿出現時に一致して上皮細胞にr-RNA合成の亢進がおこっていることを示唆する．一方，Golgi装置の機能としては，①rERで合成された前駆物質から分泌物を形成し，②rERから輸送された分泌物に糖の大部分を結合し，さらに③細胞表面に存在する糖衣（glycocalyx）を形成すること，などが明らかにされつつある．<sup>26)</sup>有意の血糖上昇時期に一致して

一時的に出現するGolgi装置の発達が高血糖病態に続発した変化なのか，糖蛋白質合成亢進という一次的变化であるのか判断し得ないが，この時期から有意にみられる基底膜肥厚を考慮すると，糖尿病病態初期の何らかの糖鎖形成亢進の関連した変化を示唆するものと思われる．そのあとにおこってくるrERの増加は引き続き上皮細胞での代謝過程の蛋白合成の亢進を示唆し，<sup>27)</sup>尿蛋白量が著明に増量する時期にも一致した核小体の変化やrERの減少や著明な拡張は蛋白合成の低下を示唆し，上皮細胞活動の衰退をうかがわせる変化と解される．病変の進行した時期の上皮細胞に観察されるlysosome，およびphagosomeの増加はむしろ末期的な上皮細胞変化であり，増加した係蹄壁通過蛋白より修飾された変化である可能性が強く，上皮細胞の非特異的な変性像と考える．ミトコンドリアの増加，細胞骨格蛋白の増加は正常の機能を失い，変性から萎縮，脱落に至る過程の前駆状態を示唆するものと考えられる．



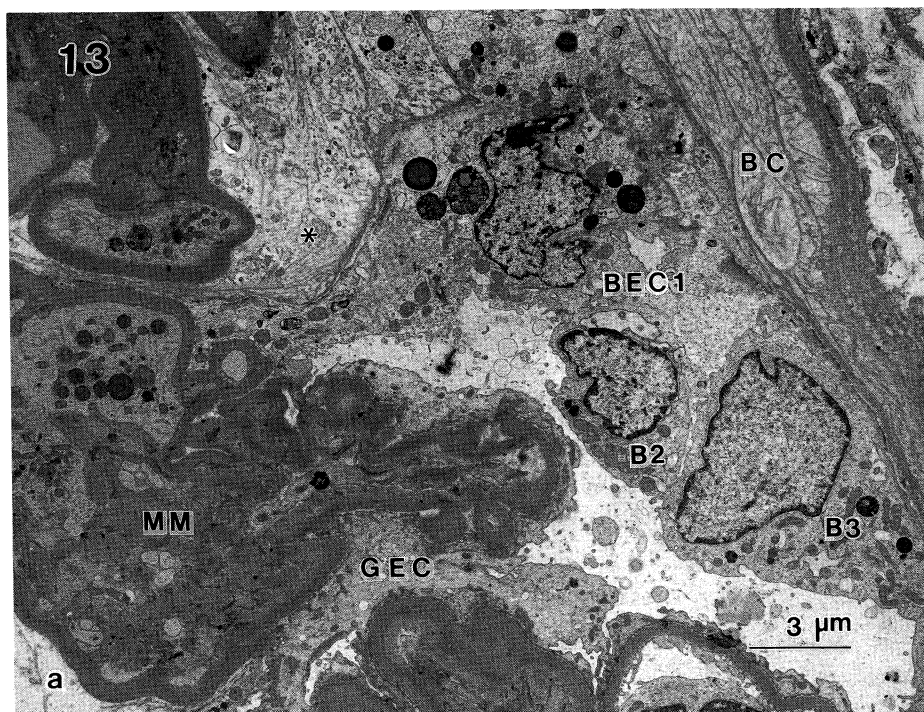


Fig. 13. a. The denuded glomerular basement membrane is covered by Bowman's epithelial cells. 16-months of age.

BEC-1, B-2, B-3 : Bowman's epithelial cells

asterisk : BM-like materials BC : Bowman's capsule. Bar=3 μm

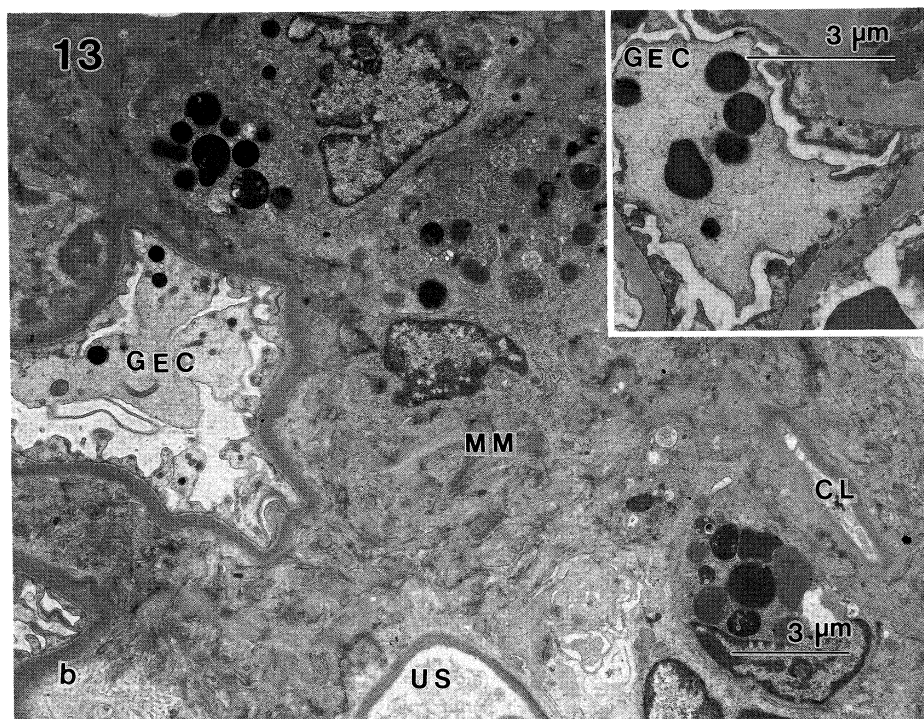


Fig. 13. b. Atrophic podocytes and marked mesangial expansion. Bar=3 μm

Table 1. Morphological parameters of podocytes (WBN/Kob rats)

| Age (M)                   | 9        | 12       | 13       | 14       | 15       | 16       | 18       | 21       |
|---------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| No. of examined podocytes | 40       | 36       | 45       | 27       | 38       | 19       | 15       | 40       |
| Nucleus                   |          |          |          |          |          |          |          |          |
| Hypertrophic              | 30 (75%) | 12 (34%) | 14 (31%) | 8 (29%)  | 4 (8%)   | 1 (5%)   | 1 (5%)   | 2 (10%)  |
| Irregular shaped          | 8 (20%)  | 24 (69%) | 31 (78%) | 19 (63%) | 34 (71%) | 18 (82%) | 14 (93%) | 19 (90%) |
| Golgi apparatus           |          |          |          |          |          |          |          |          |
| Increased                 | 11 (28%) | 7 (19%)  | 8 (20%)  | 5 (18%)  | 4 (10%)  | 2 (9%)   | 1 (8%)   | 0 (0%)   |
| Decreased                 | 3 (7%)   | 7 (19%)  | 4 (10%)  | 10 (37%) | 13 (34%) | 9 (40%)  | 6 (40%)  | 18 (45%) |
| Endoplasmic reticulum     |          |          |          |          |          |          |          |          |
| Dilatation                | 8 (20%)  | 8 (22%)  | 31 (68%) | 25 (93%) | 35 (92%) | 10 (72%) | 12 (80%) | 36 (90%) |

糸蹄壁構造維持における糸球体上皮細胞は、①コラーゲンを中心とした基底膜物質の産生、維持<sup>1), 2)</sup> ②足突起構造が基底膜の size barrier の一部を担う、および③陰性荷電物質のシアル酸<sup>26)</sup> を Golgi 装置で産生したり、basement membrane heparan sulfate proteoglycan (BMH-SPG) を rER において産生<sup>28)</sup> し、charge barrier の一部を担うことでその役割を演じている。実験的には、puromycin aminonucleoside や N, N'-diacetylbenzidine による腎障害において<sup>29)~31)</sup> 急速な上皮細胞表面シアル酸の減少、足突起の退縮、および slit membrane の減少とともに尿蛋白が発現する過程は、こうした上皮細胞障害による糸蹄壁構造機能に破綻をきたし、蛋白透過性が亢進することによると説明され、上皮細胞の剥離により蛋白の透過性が亢進して蛋白尿が増量する<sup>32)</sup> ともいわれている。今回の観察において蛋白尿増量や基底膜肥厚は、前述の如き上皮細胞の微細構造変化にともなって出現しており、上皮細胞の糸蹄維持機能障害による糸蹄壁構造維持の破綻との関連で説明しようように思われる。さらに出生後には分裂、再生能を持たないとされる糸球体上皮細胞における前述の変化や結果、細胞は萎縮し、細胞質糖鎖の変化や、細胞骨格の変化による剥離をきたし、糸蹄壁構造維持の破綻による高度の蛋白尿や不可逆的な糸蹄硬化につながる<sup>33), 34)</sup> ものと考えられる。

ヒト糖尿病で観察した上皮細胞にみられる早

期の細胞腫大、核の発達、および rER の拡大や、高度の蛋白尿を呈する個体での糸球体糸蹄上皮細胞の萎縮、剥離過程もこうした糸蹄壁糖鎖維持機構との関連で説明すべきものであるように思われる。

最近、糖尿病性腎症の発現に重要視されてきているポリオール代謝異常<sup>35), 36)</sup> が、糸球体上皮細胞の早期からのいかなる形態変化と関連性を持つものであるか、は今後の検討にまたねばならない。

以上、WBN/Kob ラットにおいて早期から糸球体上皮細胞にみられた微細構造の変化は、上皮細胞におこる核酸代謝や糖蛋白合成機能の変化を示唆する所見であり、基底膜肥厚や蛋白尿の出現に先行してみられ、さらには不可逆的な糸球体硬化に結びつく可能性が考えられた。

## 結 論

1. WBN/Kob ラットを最長21カ月齢まで長期観察した。多くの雄では9カ月齢から血糖値が上昇、10カ月齢より尿蛋白排泄量が増加した。
2. 光頭では14カ月齢でメサンギウムの増加、16カ月齢で限局性の糸球体硬化が出現した。
3. 電頭では9カ月から糸球体上皮細胞の核の発達が、10カ月から Golgi 装置の発達し増加がみられ、蛋白尿の増量、基底膜の有意な肥厚に先行していた。
4. WBN/Kob ラットにおいては、糸球体上皮

細胞の病変を介して糸球体障害が発現，進行する可能性が示唆された。

稿を終えるにあたり，大澤源吾教授の直接のご指導とご校閲に深く感謝するとともに，川崎医科大学電子顕微鏡センターの各位からも様々なご指導，ご協力をいただきましたことに感謝いたします。

なお，本論文の要旨は第34回日本腎臓学会総会で報告した。

本研究の一部は厚生省特定疾患「進行性腎障害」調査研究班調査費及び川崎医科大学プロジェクト研究費(4-606)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) Walker, F. : The origin, turnover and removal of glomerular basement membranes. *Am. J. Pathol.* 110 : 233—245, 1972
- 2) Romn, W., Schultze, B. and Hempel, K. : Synthesis of the glomerular basement membrane in the rat kidney. *Virchows Arch. [B]* 20 : 125—137, 1976
- 3) Østerby, R., Jorgen, H., Gunderson, G., Nyberg, G. and Aurell, M. : Advanced diabetic glomerulopathy. Quantative structural characterization of non-occluded glomeruli. *Diabetes* 36 : 612—619, 1987
- 4) Sato, T., Osawa, G., Hirano, H., Sasaki, T., Yamada, M. and Kitano, Y. : Glomerular podocyte degeneration in diabetic glomerulosclerosis. *J. Clin. Electron. Microscopy* 22 : 942—943, 1989
- 5) 佐々木環：係蹄上皮細胞の動態からみた糸球体硬化過程—ポウマン囊上皮細胞の関与—。川崎医会誌 17 : 361—376, 1991
- 6) Fries, J. W. U., Sanstrom, D. J., Meyer, T. W. and Rennke, H. G. : Glomerular hypertrophy and epithelial injury moderate progressive glomerulosclerosis in the rat. *Lab. Invest.* 60 : 205—218, 1989
- 7) Tsuchitani, M., Saegusa, T., Narama, I., Nishikawa, T. and Gonda, Y. : A new diabetic strain of rat (WBN/Kob). *Lab. Anim.* 19 : 200—207, 1985
- 8) Osawa, G., Kimmelstiel, P. and Seiling, V. : Thickness of glomerular basement membranes. *Am. J. Clin. Path.* 45 : 7—20, 1966
- 9) Sato, T., Sasaki, T., Yamada, M. and Osawa, G. : Morphological study of diabetic glomerulosclerosis in WBN/Kob rats—Early ultrastructural character of podocytes—。 *J. Clin. Electron Microscopy* 25 (掲載予定)
- 10) Kimmelstiel, P. and Wilson, C. : Intercapillary lesions in glomeruli of Kidney. *Am. J. Pathol.* 12 : 83—98, 1936
- 11) Osawa, G. : Basement membrane lesions and proteinuria in diabetes mellitus. *Asian Medical Journal* 23 : 346—359, 1980
- 12) Østerby, R. and Gundersen, H. J. G. : Glomerular size and structure in diabetes mellitus. I. Early abnormalities. *Diabetologia* 11 : 225—229, 1975
- 13) Østerby, R. : Early phase in the development of diabetic glomerulopathy. *Acta. Med. Scand. [Suppl]* 1 : 1—82, 1975
- 14) Mauer, S. M., Steffes, M. W. and Ellis, E. N. : Structural-functional relationships in diabetic nephropathy. *J. Clin. Invest.* 74 : 1143—1155, 1984
- 15) Orskov, H., Olsen, T. S., Nielsen, K., Rafaelsen, O. J. and Lundbaek, K. : Kidney lesions in rats with severe long-term alloxan diabetes. I. Influence of age, alloxan damage, and insulin administration. *Diabetologia* 1 : 172—179, 1965
- 16) Fox, C. J., Darby, S. C., Ireland, J. T. and Sonksen, P. H. : Blood glucose control and glomerular

- capillary basement membrane thickening in experimental diabetes. *Br. Med. J.* 2 : 605—607, 1977
- 17) Soret, M. G., Dulin, W. E., Mathews, J. and Gerritsen, G. C. : Morphologic abnormalities observed in retina, pancreas and kidney of diabetic chinese hamsters. *Diabetologia* 10 : 567—579, 1974
  - 18) Like, A. A., Lavine, R. L., Poffenbarger, P. L. and Chick, W. L. D. : Studies, in the diabetic mutant mouse IV. Evolution of glomerular lesions and associated proteinuria. *Am. J. Pathol.* 66 : 193—224, 1972
  - 19) Orchi, L., Stauffacher, W., Amherdt, M., Pictet, R., Renold, A. E. and Rouiller, C. H. : The kidney of spiny mice (*Acomys cahirinus*) : Electron microscopy of glomerular changes associated with ageing and tubular glycogen accumulation during hyperglycemia. *Diabetologia* 6 : 343—355, 1970
  - 20) Camerini-Davalos, R. A., Oppermann, W., Mittl, R. and Ehrenreich, T. : Studies of vascular and other lesions in KK mice. *Diabetologia* 6 : 324—329, 1970
  - 21) 柴田昌雄 : 動物モデルからみた糖尿病性腎症の発症・進展. *糖尿病* 23 : 1008—1011, 1980
  - 22) 小堀鷗一郎, 草間 悟 : N-methyl-N'-nitrosoguanidine 経口投与による実験胃癌発症過程の分析. *医のあゆみ* 100 : 549—557, 1977
  - 23) 森 豊, 横山淳一, 西村昌彦, 蔵田英明, 三浦順子, 野村幸史, 宇都宮一典, 池田義雄 : 自然発症糖尿病モデル WBN/Kob ラットに関する研究 (第三報) —腎病変について—. *糖尿病* 31 : 909—915, 1988
  - 24) Ishizaki, M., Masuda, Y., Fukuda, Y., Yamanaka, N., Masugi, Y., Shichinohe, K. and Nakama, K. : Renal lesions in a strain of spontaneously diabetic WBN/Kob rats. *Acta. Diabetol. Lat.* 24 : 27—35, 1987
  - 25) Phillips, S. G. and Phillips, D. M. : Nucleoli of diploid cell strains —Their normal ultrastructure and the effect of Toyocamycin and Actinomycin D. *J. Cell Biol.* 49 : 785—802, 1971
  - 26) Beams, H. W. and Kessel, R. G. : The golgi apparatus : Structure and function. *Int. Rev. Cytol.* 23 : 209—276, 1968
  - 27) Matsuura, S. and Tashiro, Y. : Immunoelectronmicroscopic studies of endoplasmic reticulum-golgi relationships in the intracellular transport process of lipoprotein particles in rat hepatocytes. *J. Cell Biol.* 39 : 273—290, 1979
  - 28) Stow, J. L., Soroka, C. J., MacKay, K., Striker, L., Striker, G. and Farquhar, M. G. : Basement membrane heparane sulfate proteoglycan is the main proteoglycan synthesized by glomerular epithelial cells in culture. *Am. J. Pathol.* 135 : 6347—646, 1989
  - 29) Harkin, J. C. and Recat, L. : Pathogenesis of experimental nephrosis electron microscopic observations. *Am. J. Pathol.* 36 : 303—329, 1960
  - 30) 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
  - 31) 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
  - 32) Kanwar, Y. S. and Rosenzweig, L. J. : Altered permeability as a result of focal detachment of the visceral epithelium. *Kidney Int.* 21 : 565—574, 1982
  - 33) Velosa, J. A., Glasser, R. J., Nevins, T. E. and Michael, A. F. : Experimental model of focal sclerosis. *Lab. Invest.* 36 : 527—534, 1977
  - 34) Cohen, A. H., Manpaso, F. and Zamboni, L. : Glomerular podocyte degeneration in human renal disease. *Lab. Invest.* 37 : 30—42, 1974
  - 35) Winegrad, A. I. : Does a common mechanism induce the diverse Complications of diabetes ? *Diabetes* 36 : 396—406, 1987
  - 36) Cohen, M. P. : Aldose reductase, glomerular metabolism, and diabetic nephropathy. *Metabolism* 35 : 55—59, 1986