

高地飼育ラットに見られた 糸球体硬化病変の病理組織学的研究

江原孝史¹⁾ 浅野功治²⁾ 酒井秋男²⁾
重松秀一¹⁾

1) 信州大学医学部第1病理学教室

2) 信州大学医学部環境生理学教室

Histopathological Study on Glomerular Sclerotic Lesions of Rats Exposed to High Altitude

Takashi EHARA¹⁾, Kouji ASANO²⁾, Akio SAKAI²⁾,
and Hidekazu SHIGEMATSU¹⁾

1) *Department of Pathology, Shinshu University School of Medicine*

2) *Department of Environmental Physiology, Shinshu University School of Medicine*

We investigated the glomeruli of male Wistar rats which were fed at high altitude (2400m above sea level) for 5 months. These rats were sacrificed immediately after (H0), or 6 hours after (H6), or 24 hours after (H24) transfer to lower altitude (600m above sea level). Control rats were fed at the lower altitude for the same period. Focal segmental lesions of glomeruli such as adhesion and segmental sclerosis were observed to have formed preferentially in a deep cortex of experimental animals. The detachment of Bowman's epithelium from its capsule, which was unique to this experiment, was associated with these lesions. Electron microscopically, mesangial abnormalities as mesangial interposition were present in the glomeruli with or without adhesion. These focal segmental lesions of glomeruli were compared with those of human glomerular disease. We consider this model useful in the analysis of the developmental mechanism of focal segmental lesions. *Shinshu Med J* 41: 317-324, 1993

(Received for publication March 22, 1993)

Key words: glomerulus, focal segmental lesions, high altitude, rat

糸球体, 巣状分節性病変, 高地, ラット

I 緒 言

糸球体において、細胞外基質の異常に増加する硬化性病変は、種々の病態ないし腎炎において観察され、糸球体の機能にも深い影響を及ぼす。特に巣状糸球体硬化症 (focal segmental hyalinosis and/or sclerosis 以下 FSHS と略) は治療抵抗性のネフローゼを呈することが多く原因も不明の疾患で¹⁾その硬化の機序ないし原因の解明が必要である。

我々は、高所における低圧低酸素の環境が生体に及ぼす影響を見るため、八ヶ岳の信州大学医学部高所医学研究室において飼育されたラット腎を組織学的に調べたところ、FSHS 類似の巣状局所性の硬化性変化が糸球体に生じていることを見出した。そこで、この硬化性変化について、組織学および超微形態的に検討を加えた結果を報告するとともに FSHS との関連についても考察した。

II 材料と方法

生後4週齢の雄ウイスターラット（日本SLC，浜松）を，八ヶ岳黒百合平（海拔2,400m）の信州大学医学部高所医学研究室に運び7月から11月までの5カ月間通常の食事と飲水で飼育した。なお飼育環境は外気温と同じであった。高地飼育後，松本市の信州大学医学部（海拔610m）に約2時間かけて移し，移送した直後（H0），6時間後（H6），24時間後（H24）の間隔で，一度に4ないし5匹ずつエーテル麻酔下にて採血と体重測定を行い，屠殺後腎臓を摘出した。生後4週齢のコントロールのラットは高地飼育群と同期間信州大学医学部動物実験室（松本市）にて飼育した。摘出した腎は，光顕用にホルマリン固定，パラフィン包埋し，電顕用には腎組織を細切しグルタルアルデヒド固定後，オスミウムにて後固定しケトール（日新EM，東京）に樹脂包埋した。パラフィン包埋したブロックを2ないし3ミクロンの厚さに薄切し，ヘマトキシリンエオジン染色（HE），過ヨウ素酸シッフ染色（PAS），マッソントリクローム染色（MT），過ヨウ素酸メセナミン銀染色（PAM）の4種類の染色を行い，腎の組織学的変化について観察した。糸球体の大きさをマイクロメーターにより測定した。測定は，癒着硬化が見られず，かつほぼ円形に近い形で薄切されている糸球体を腎皮質全体から選び，最大直径をその糸球体の大きさとした。統計学的な検討はt検定によった。

免疫グロブリンの局在の有無を調べるため，2～3ミクロンに薄切したパラフィン切片を，脱パラ後0.25%トリプシンで2時間消化し，ヤギ抗ラットIgG，IgMと反応させ酵素抗体間接法による免疫染色を施行した。

電顕用に樹脂包埋した切片は，1～2ミクロンの厚さに薄切し，トルイジンブルー染色により糸球体を確認した後トリミングを行いLKBウルトラミクロトームで超薄切し，日立のHS-9電子顕微鏡で観察した。コントロール群のラットも高地飼育群と同様の方法で標本作製し比較観察を行った。

採血した血液より毛細管法でヘマトクリットを測定した。

なお，今回の実験では尿蛋白の測定は行わなかった。

III 結 果

体重はコントロール群で平均323gであり，高地飼

表1 ラットの体重とヘマトクリットの比較

ラ ッ ト	体 重 (g)	ヘマトクリット (%)
L (n = 8)	323±5	47.0±0.6
H 0 (n = 5)	300±7*	53.2±0.8*
H 6 (n = 5)	291±3*	49.7±0.8*
H24 (n = 5)	292±5*	50.2±0.9*

各値は Mean±SE

* コントロール（L）と比較したとき有意差あり
($p < 0.05$)

育群のH0，H6，H24では，それぞれ300g，291g，292gで，コントロールと比較して有意の差を認めた（表1）。

ヘマトクリットは，コントロール群で47%であり，高地飼育群では，H0，53%，H6，50%，H24，50%でいずれもコントロールとの間に有意差が見られた（表1）。

光顕的には，高地飼育群のラットでは皮質深部の糸球体はコントロール群と比べてやや腫大しており，PAM染色で見ると糸球体の分葉構造が不明瞭になる傾向が見られた。そして一部の糸球体には，メサンギウム基質の増加とボーマン嚢への癒着を主体とする硬化性変化が認められた（図1）。この硬化性変化は糸球体の全体におよぶものはほとんどなく最大限糸球体の半分程度までで，いわゆる巣状局所性の病変であった。癒着硬化巣の見られない糸球体には，メサンギウムや基底膜には特に変化が認められないものがほとんどであったが，なかには，血管極に近い係蹄に局所性の基底膜の肥厚を認めるものもあった（図2）。巣状局所性の硬化性変化に着目してみると，このような変化を見る糸球体は，算定したところH0，H6，H24各群5匹ずつの1腎切片でそれぞれ25，12，26個で総計63個であった。この硬化巣の特徴的な変化として，ボーマン嚢上皮細胞が基底膜から剝離して，間隙を生じそこに浸出物を認める糸球体（図3）や，糸球体係蹄の構築は虚脱に陥らず比較的保たれ，マッソントリクローム染色で淡染する基質がボーマン嚢と糸球体との間の尿腔を埋めるように形成された糸球体（図4）も見られた。硬化部の糸球体上皮細胞にはライソゾームの増加や空胞形成が見られた。硝子化の像がH24のラットに数個みられた以外，高地飼育群間で硬化像に特に大きな差は認められなかった。次に硬化性変化のみられる糸球体の腎内での局在の特徴を調べるために腎被膜から糸球体ボーマン嚢までの距離を測定したと

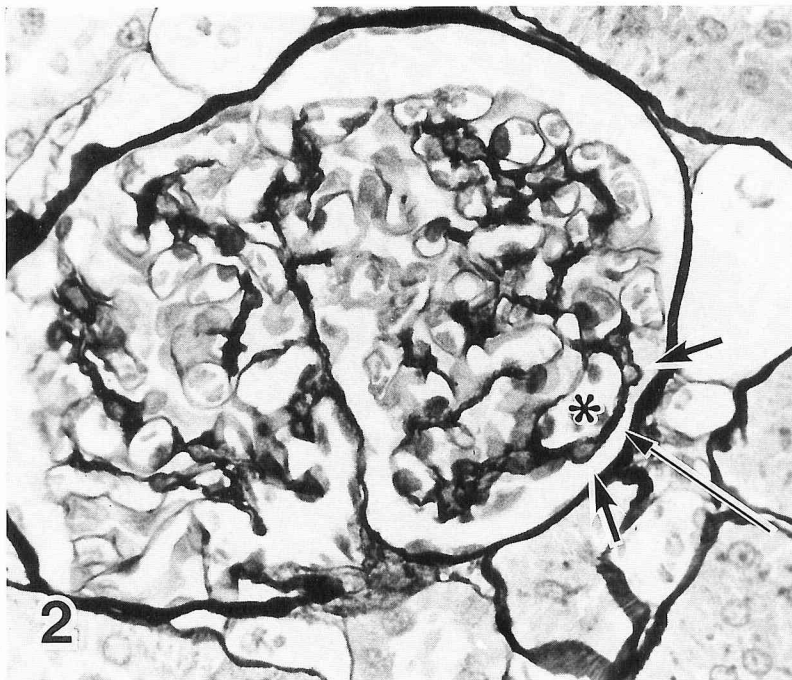
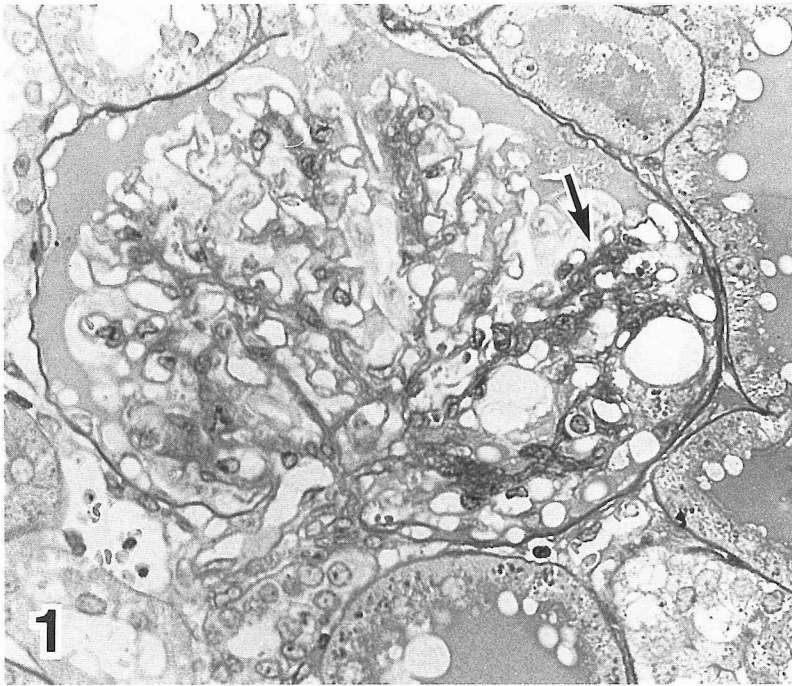
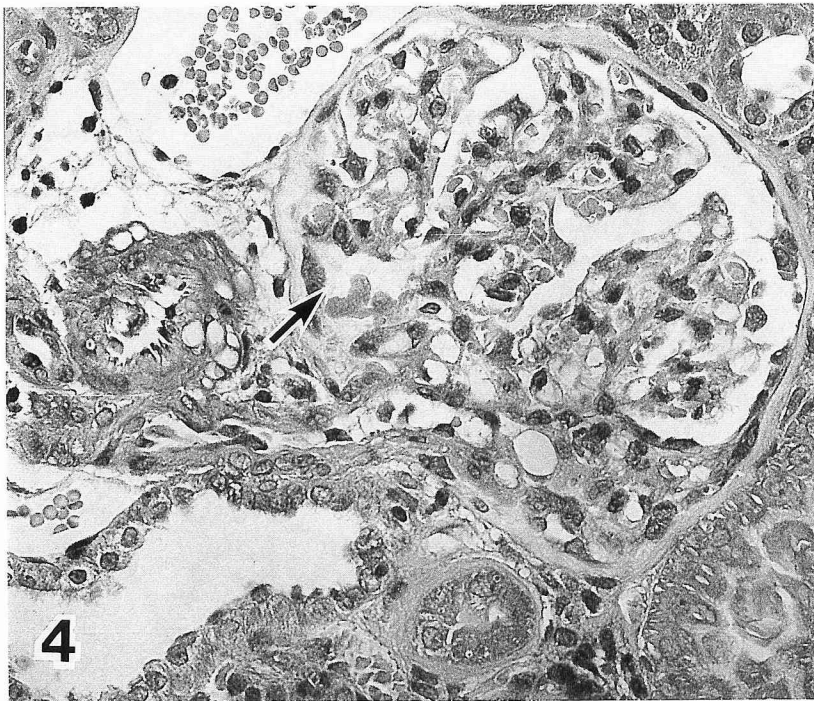
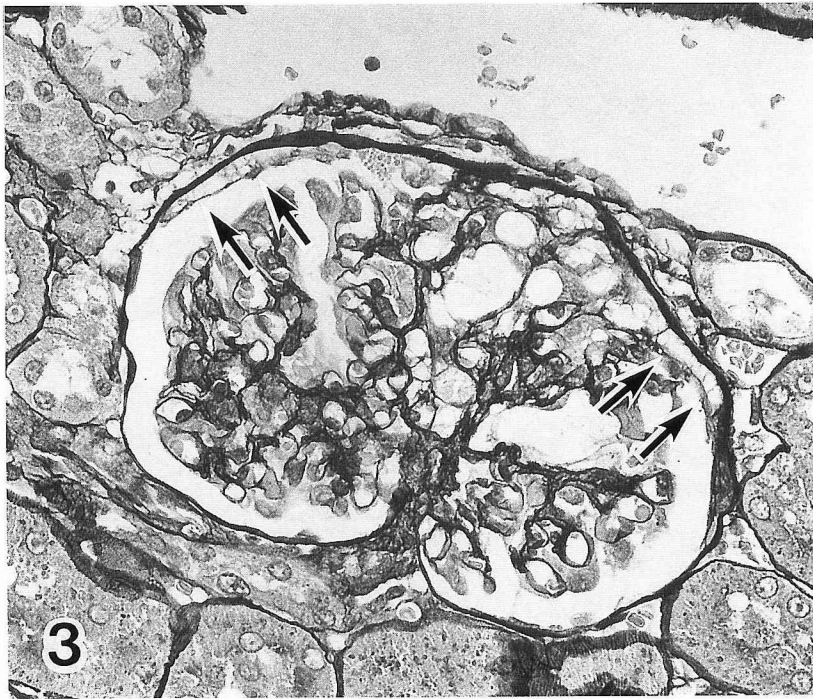


図1 H0ラット糸球体PAS染色

局所性のメサンギウム基質の増加(矢印), 上皮細胞の空胞化, 癒着が見られる。×330

図2 H0ラット糸球体PAM染色

アステリスクの部分の係蹄に基底膜の肥厚(長い矢印)がみられる。基底膜内に核が埋まって見える細胞(短い矢印)は, メサンギウム細胞と考えられる。×440



- 図3 H0ラット糸球体PAM染色
尿管極の部分に癒着およびボウマン囊上皮の基底膜からの剥離（矢印）が見られる。×300
- 図4 H24ラット糸球体マッソン染色
マッソン染色に淡染する基質の形成が認められる（矢印）。×500

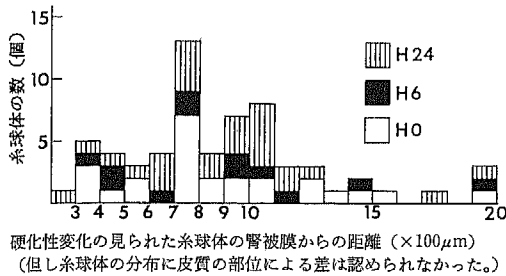


図5 局所性の硬化性変化を呈した高地飼育群ラット糸球体 (63個) の腎被膜からの距離

ころ、腎被膜から700から800ミクロンの間に硬化性変化を生じた糸球体が多いことがわかった (図5)。泡沫細胞は糸球体のみならず間質においても観察されなかった。コントロール群の糸球体には高地飼育群に見られたような硬化性変化や基底膜の肥厚は観察されなかった。高地飼育群のラットの腎間質には軽度の線維化と尿細管に少数の尿円柱をも認めたが、コントロール群には線維化も尿円柱も見られなかった。

高地飼育群ラットの糸球体に腫大傾向が見られたので、糸球体の大きさ (直径) を各ラットにつき100個測定したところ、コントロール群のラットの糸球体直径は平均114ミクロンであり、H0、H6、H24がそれぞれ120、116、119ミクロンと、高地飼育群ラットの糸球体が腫大していることがわかった。統計学的には、H0とH24においてコントロール群との間に有意差を認めた ($p < 0.05$)。

免疫グロブリンの沈着は高地飼育群、コントロール群ともに認められなかった。

電顕的には、癒着硬化部にはメサンギウム基質の増加、足突起の癒着や同部の糸球体上皮細胞にライソゾームの増加、空胞形成などが観察された。さらに光顕のマッソン染色で見られた尿腔を埋める基質は、電顕で見ると層状構造を呈していた (図6)。またトルイジンブルーによる厚切標本で癒着や硬化の見られなかった糸球体においても、メサンギウム基質の増加、メサンギウム間入、足突起の扁平化 (図7)、メサンギウム基質へのコラーゲンの出現 (図8) などの異常が見つかった。コントロール群ではこのようなメサンギウムの変化は見られなかった。

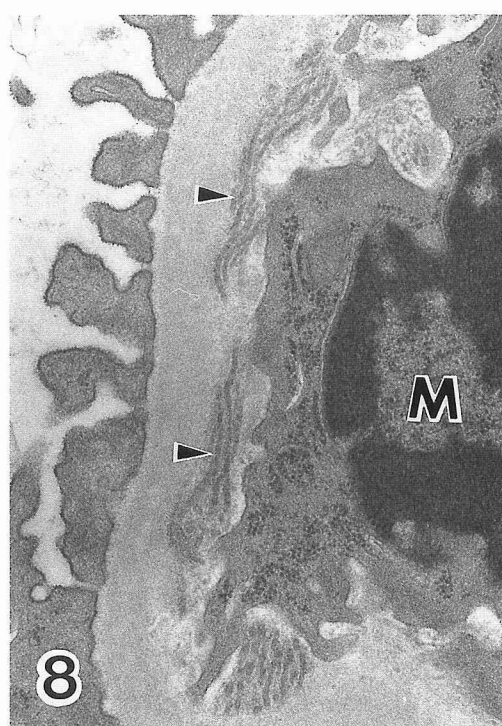
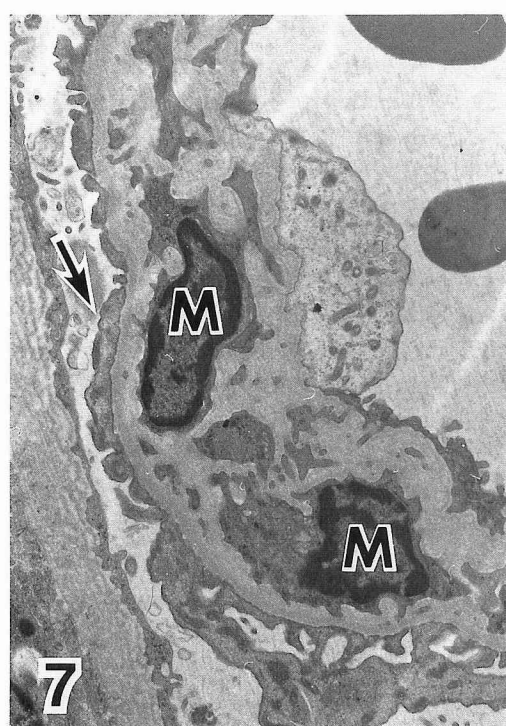
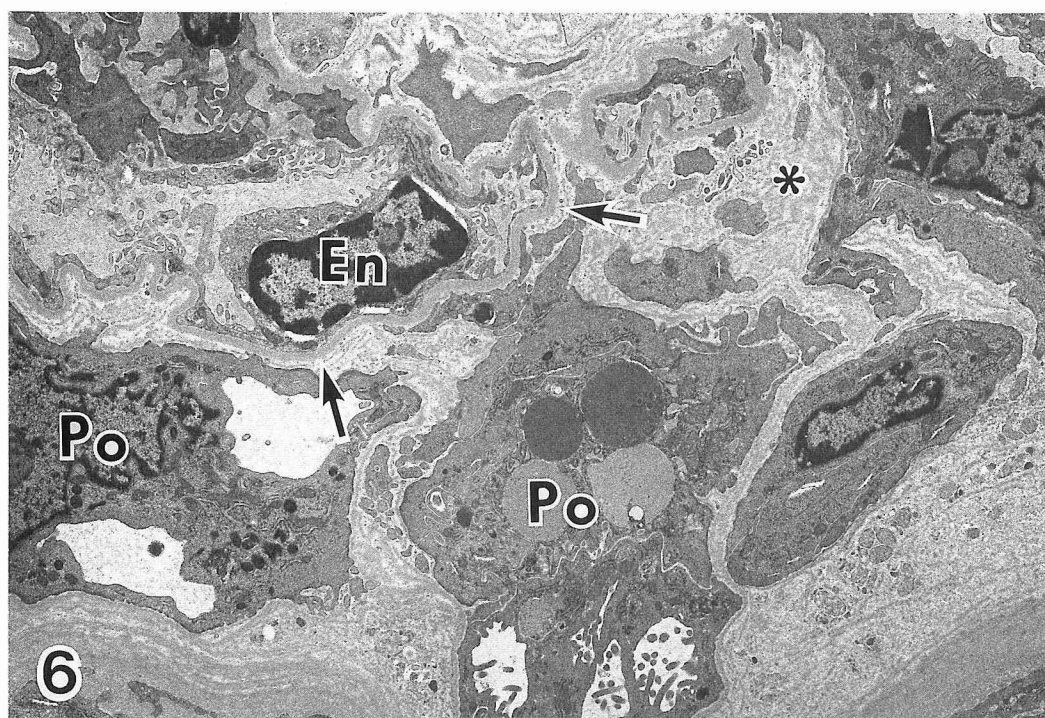
IV 考 察

今回我々は、高所における低圧低酸素の環境の影響を見るために、ハケ岳の標高2,400mの高地で飼育さ

れたラットの腎を組織学的に調べて、おもに皮質深部の糸球体に局所性の硬化性病変を見出した。その病変の特徴は軽度のメサンギウム基質の増加を伴った局所性の硬化とボウマン囊への癒着およびボウマン囊上皮の剝離である。電顕的には、高地飼育ラットにおいてはメサンギウム間入を始めとするメサンギウムの異常が観察された。それに対して、コントロールとしてハケ岳より低地の松本市で飼育されたラットにこのような異常が見られず、また組織学的変化に高地飼育群間で差が認められなかったことから、高地飼育されたラットの糸球体変化が、高地環境因子により引き起こされたことは明らかであろう。

高地実験群において巣状局所性の硬化性糸球体病変が観察されたが、これは今回の実験で注目すべき変化と考えられる。ラット糸球体に硬化性変化をおこす因子として、アミノヌクレオシド²⁾、片腎摘出³⁾、加齢⁴⁾などが知られている。今回の研究で、高地環境も巣状局所性の硬化性変化をラット糸球体に生ぜしめる可能性があることが明らかになった。この病変のおこるメカニズムは今のところ推測の域を出ないが、高地での飼育による低圧、および低酸素への暴露により、赤血球増加、ヘマトクリットの上昇、循環血液量の増加が生じることが知られている^{5)~7)}。循環血液量の増加により糸球体ろ過量 (GFR) も増加し、片腎摘出などの実験で提唱されている糸球体過剰ろ過⁸⁾を生じているのかもしれない。血圧の影響も GFR に影響を及ぼすと思われるが、血圧の測定は行わなかった。正常では皮質深部のほうが GFR は大きいといわれている⁹⁾が、具体的なデータが不明で、硬化の目立った皮質深部と GFR との関係はわからない。寒冷や低酸素刺激のみでも GFR は上昇することが知られているが¹⁰⁾、今回の実験条件では低圧低酸素に加えて寒冷因子が GFR を上昇させている可能性も考慮しなければならない。今回の高地飼育ラットに見られた糸球体の硬化性変化にこれらの因子のどれが最も深く関わっているか現在実験により検討中である。しかし、ボウマン囊上皮の剝離やメサンギウム間入など従来報告のない変化が観察されたことは、GFR 増加による過剰ろ過以外の因子も関与している可能性が考えられる。

高地環境と同様に低酸素状態にあるチアノーゼ性心疾患のヒトに、糸球体の腫大がおきることが過去に報告されている¹⁰⁾¹¹⁾。今回の実験条件はチアノーゼを生じるほどの低酸素ではなかったが、高地飼育群のラット糸球体はコントロール群に比し腫大傾向を認めた。



Bauer ら¹¹⁾はファロー四徴の患者を調べたところ、赤血球の増加の程度と糸球体の腫大との間に相関を認め、ヘマトクリットの上昇による血液粘度の増加により糸球体係蹄が拡張される結果糸球体に腫大がおきると考えている。本研究でも高地実験群では有意なヘマトクリットの上昇を認め、ヘマトクリットが最大であったH0において糸球体の大きさも最大で、続くH6ではH0よりもヘマトクリットは低下し糸球体の大きさもコントロールとの間に有意差がなくなり、ヘマトクリットと糸球体の大きさの間に関連が見られる。しかしH24ではヘマトクリットはH6と差がないにもかかわらず糸球体はコントロールより腫大しており、ヘマトクリットのみでは説明できない点もある。これについては、低酸素や右室圧の上昇に糸球体腫大の原因を求める意見¹²⁾もあり、さらに検討が必要と思われる。

ヒト、動物ともに高地環境においては右室肥大、肺動脈圧の上昇など循環器系の変化を伴うことがすでに多くの研究により明らかにされている^{13)~15)}。今回の実験で見られた糸球体の硬化性変化も、糸球体が血管の一種であることを考えると、上記の血管系の一連の変化と関連があると思われる。この関連性を明らかにするため、腎および肺の血管特に動脈の平滑筋細胞の変化について現在検討しているところである。またメサンギウムは糸球体外のリンパ管と、いわゆるメサンギウム流路を形成して異物処理を行う¹⁶⁾と考えられている。肺のリンパの流れについて人工気象室を使った実験では、低酸素低圧環境ないし低圧環境下では細羊の肺リンパ流量が増加するという¹⁷⁾。腎のリンパ流の変化に関しては調べられていないが、上記のメサンギウムとリンパの関係からすると、この実験で得られた糸球体の硬化性変化の成り立ちを考える上で興味あるデータと考えられる。

ウイスターラットにおいてはオスの方がメスより加

齢、高蛋白食により硬化性変化を生じやすいことが報告されている¹⁸⁾。実験に用いたラットはすべてオスであったため硬化巣の出現が一層目立ったことも考えられる。高地実験群ではH6において硬化性変化が少なかったが、この点に関しても腫大の問題を含めて検討する必要があると考えられる。

今回の実験では蛋白尿の測定を行わなかったが、尿細管内に尿円柱を認めたのである程度の腎機能障害はあるものと思われた。

今回見られたような巣状局所性の変化が見られるヒトの疾患として巣状糸球体硬化症 (FSHS) があげられる。これは、1957年 Rich¹⁹⁾により報告されて以来難治性原因不明の糸球体疾患として注目されてきた疾患で、その原因としては、免疫異常、糸球体過剰ろ過、凝固異常、糸球体上皮細胞障害などが考えられている²⁰⁾。ヒトのいわゆるFSHSと今回の高地ラットの病変を比較してみると、血管極を中心にした巣状局所性の変化はよく似ているが、ヒトにおいて多く観察される硬化巣へのIgMの沈着や糸球体足細胞の基底膜からの剝離は見られなかった。IgMに関しては、検索組織が凍結切片ではなくパラフィン切片であったためかもしれない。泡沫細胞の集積は見られなかった。また従来報告のなかったボウマン嚢上皮の基底膜からの剝離が高地飼育ラットには見られた。高地飼育ラットの腎病変がヒトのFSHSのモデルと成り得るかはさらに今後の検討を待たねばならないが、FSHSは多くの因子が関わる全身的な病態と考えられており²¹⁾高地飼育ラットの腎病変の解析は重要と思われる。

今回の実験結果から、高地での飼育によってラットに特徴的な巣状局所性の変化が生じることがわかった。その原因は今のところ明らかでないが、今後の研究により巣状糸球体硬化症を始めとする糸球体硬化の成り立ちを明らかにできる可能性が開けてくると思われる。

文 献

- 1) Chung J, Habib R, White RHR: Pathology of the nephrotic syndrome in children. A report for the

図6 H0ラット糸球体電顕像

尿腔に層状の基質形成が見られる (アステリスク)。矢印：糸球体基底膜，En：内皮細胞，Po：糸球体足細胞 ×5,200

図7 H0ラット糸球体電顕像

メサンギウム間入を認める。足突起は一部扁平化している (矢印)。M：メサンギウム細胞 ×7,300

図8 H0ラット糸球体電顕像

メサンギウム基質にコラーゲンフィブリルの形成が見られる (矢頭)。×26,000

- international study of kidney disease in children. *Lancet* 1: 1299—1302, 1970
- 2) Glasser RJ, Velosa JA, Michael AF: Experimental model of focal sclerosis: I. Relationship to protein excretion in aminonucleoside nephrosis. *Lab Invest* 36: 519—526, 1977
 - 3) Couser WG, Stilmant MM: Mesangial lesions and focal glomerular sclerosis in the aging rat. *Lab Invest* 33: 491—501, 1975
 - 4) Grond J, Beukers JYB, Schilthuis MS, Weening JJ, Elema JD: Analysis of renal structural and functional features in two rat strains with a different susceptibility to glomerular sclerosis. *Lab Invest* 54: 77—83, 1986
 - 5) Monge CC, Cazola AT, Whittenbury GM, Sakata Y, Rizo—Patron C: A description of the circulatory dynamics in the heart and lung of people at sea level and at high altitude, by means of the dye dilution technique. *Acta Physiol Lat Am* 5: 190—220, 1955
 - 6) Bullard RW, Brownmand C, Meyer FR: Blood characteristics and volume in two rodents native to high altitude. *J Appl Physiol* 21: 994—998, 1966
 - 7) 浜畑 学, 酒井秋男, 柳平担徳, 米川正利, 本山十三生, 上田五雨: 野生ヒメネズミの心臓の大きさ並びに血液性状の海拔高度および季節に伴う変化. *成長* 22: 1—5, 1982
 - 8) Glassock RJ: Pathogenesis of the nephrotic syndrome in humans. In: Cameron JS, Glassock RJ (eds), *The nephrotic syndrome*, pp163—192, Marcel Dekker, New York, 1988
 - 9) Ganong WF: 松田幸次郎, 市岡正道, 東 健彦, 菅野富夫, 佐藤昭夫 (訳), *医科生理学展望*, 第7版, pp538—539, 丸善, 東京, 1977
 - 10) Ingelfinger JR, Kissane JM, Robson AM: Glomerulomegaly in a patient with cyanotic heart disease. *Am J Dis Child* 120: 69—71, 1970
 - 11) Bauer WC, Rosenberg BF: A quantitative study of glomerular enlargement in children with tetralogy of Fallot. *Am J Pathol* 37: 695—712 1960
 - 12) Spear GS: The glomerulus in cyanotic congenital heart disease and primary pulmonary hypertension. *Nephron* 1: 238—248, 1964
 - 13) Hultgren HN, Miller H: Right ventricular hypertrophy at high altitude. *Ann NY Acad Sci* 127: 627—631, 1965
 - 14) 小林俊夫, 八木ひかる, 小山関哉, 芝本利重, 吉村一彦, 福島雅夫, 久保恵嗣, 草間昌三, 酒井秋男, 上田五雨: 高血圧自然発症ラットの長期高地環境曝露による心肥大様式の検討. *信州大学環境科学論集* 8: 20—24, 1986
 - 15) 酒井秋男: 高所環境下にみられる右心室肥大の解明; ヘマトクリットと右心室肥大の関係. *日本生理誌* 39: 431—441, 1977
 - 16) 重松秀一: メサンジウムの病理. *信州医誌* 28: 165—174, 1980
 - 17) Kubo K, Kobayashi T, Fukushima M, Yoshimura K, Shibamoto T, Hirai K, Sakai A, Ueda G: Effects of simulated high altitude and alveolar hypoxia on pulmonary hemodynamics and lung fluid balance in unanesthetized sheep. *Jpn J Appl Physiol* 18: 41—47, 1988
 - 18) Elema JD, Arends A: Focal and segmental glomerular hyalinosis and sclerosis in the rat. *Lab Invest* 33: 554—561, 1975
 - 19) Rich AR: A hitherto undescribed vulnerability of juxtamedullary glomeruli in lipoid nephrosis. *Bull Johns Hopkins Hosp* 100: 173—186, 1957

(5. 3. 22 受稿)