

# 糸球体硬化とマクロファージ —ラット実験腎炎での検討—

山本 正敏

信州大学医学部第1病理学教室

(指導: 重松 秀一教授)

## Glomerular Sclerosis and Macrophages —Analysis of Experimental Nephritis in the Rat—

Masatoshi YAMAMOTO

Department of Pathology, Shinshu University School of Medicine

(Director: Prof. Hidekazu SHIGEMATSU)

This study was designed to investigate the role of macrophages (M $\phi$ s) accumulating in injured glomeruli. Anti-thymocyte serum (ATS) nephritis was induced in rats by an intravenous injection of ATS on Day 0. After three days methylcellulose (MC) was given intraperitoneally to induce the intraglomerular accumulation of M $\phi$ s. Urinary protein excretion and glomerular histology were examined in this group (ATS+MC) and compared with ATS or MC alone treated groups until Day 35.

The MC group showed an increasing accumulation of M $\phi$ s in the mesangial areas by Day 6 without proteinuria. In the ATS group, the peak of proteinuria was noted on Day 2 and ballooning of the glomerular capillary loop and mesangial proliferation with extracellular matrix (ECM) production occurred through Days 4 to 8, but thereafter the amount of ECM gradually reduced until Day 35. Additional treatment with MC (ATS+MC group) produced biphasic proteinuria with peaks at Days 2 and 7. Glomerular histopathology in the ATS+MC group revealed the most pronounced mesangial accumulation of M $\phi$ s, with a high incidence of rupture of glomerular basement membranes, extracapillary exudation, and synechia leading to sclerotic changes.

These results suggest that glomerular M $\phi$ s play important and significant roles in injuries consisting of initial matrix-lysis and subsequent glomerular sclerosis. *Shinshu Med J* 45: 177-191, 1997

(Received for publication January 24, 1997)

---

**Key words:** glomerulosclerosis, macrophage, methylcellulose, rat, anti-thymocyte serum (ATS)

糸球体硬化, マクロファージ, メチルセルロース, ラット, 抗胸腺細胞抗血清 (ATS)

---

### I 緒 言

種々の糸球体腎炎において血行由来の単球/マクロ

別刷請求先: 山本 正敏

〒399-45 伊那市西箕輪8047

株式会社 イナ リサーチ

ファージが糸球体内に出現し, 糸球体腎炎の発症, 進展に大きく関与していることが論議されてきた<sup>1)~3)</sup>。その中でも糸球体硬化におけるマクロファージの役割が注目されているが, 糸球体障害を増悪させ硬化へと進展させるメカニズムにはまだ不明な点が多い。

腎炎急性期の障害糸球体では, 起炎物質や炎症産物

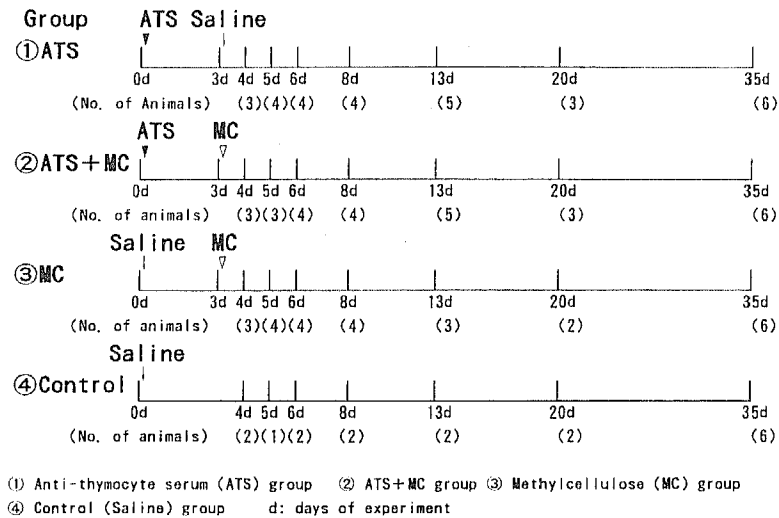


Fig. 1 Experimental design

の処理にマクロファージがスカベンジャーとして糸球体浄化に働き、修復に寄与すると同時に自己の放出するプロテアーゼやコラゲナーゼにより糸球体基底膜などの障害をもたらすことが指摘されている<sup>19)</sup>。進行性腎障害モデルである馬杉腎炎におけるマクロファージの動態観察<sup>6)7)</sup>、移入<sup>8)9)</sup>あるいは抑制<sup>10)</sup>に関する研究や、腎切除動物<sup>11)12)</sup>における観察から、障害糸球体に侵入したマクロファージは糸球体腎炎の進展に大きく関わっていることが明らかにされてきた。

抗ラット胸腺細胞抗血清 (ATS), または抗ラット Thy-1 モノクローナル抗体をラットに1回静脈内投与すると、ヒトのメサングウム増殖性腎炎に類似した糸球体変化が生じることが明らかとなり<sup>13)~15)</sup>、最近では糸球体メサングウムの増殖及び細胞外基質増加のメカニズム解明のために広く研究されている。ATSあるいは抗 Thy-1 抗体による腎炎 (以下、抗 Thy-1 腎炎と略) では、腎炎惹起後2日以内にメサングウム細胞の融解を生じた後、顕著なメサングウム細胞及び基質の増加をもたらすが、1~3カ月後にはほぼ正常な糸球体に再構築されることが観察されている<sup>16)</sup>。しかし、このように修復可能な腎炎モデルであるがゆえに、ヒトの進行性腎炎の増悪機構の解明という点からのアプローチは不足している。

著者はラットにメチルセルロース (MC) を投与すると糸球体に顕著な泡沫細胞の集積が生じることに注目して<sup>17)~19)</sup>、抗 Thy-1 腎炎発症後に MC を付加投与し、糸球体内に集積したマクロファージが腎炎の進行、

増悪にどのように関わるかを経時的に観察した。また、腎糸球体にマクロファージが持続的に停滞することと硬化性病変の発生との関連についても形態学的な検討を加えた。

## II 材料と方法

### A 実験動物

実験には5週齢の雄 SPF Crj : Wistar ラット (日本チャールスリバー株式会社) を購入し、10日間馴化飼育した後、体重216~264 gの動物を使用した。実験期間中、温度21~25°C、湿度40~70%に設定した飼育室において動物を個別に飼育して、市販固型飼料 (CRF-1, オリエンタル酵母工業株式会社) 及び水道水を自由に摂取させた。

### B 抗ラット胸腺細胞抗血清 (ATS) の作製

石崎<sup>20)</sup>の方法を参考に体重2~2.5kgの日本白色種ウサギ (北山ラベス株式会社) を用いて免疫し、ATSを作製した。すなわち、4週齢の Wistar ラットの胸腺細胞浮遊液  $1 \times 10^6$ /ml を等量の Freund's complete adjuvant (Iatron, 東京) と混合し、その1 ml をウサギの背部皮下に投与し、その2及び4週後に  $1 \times 10^6$ /ml の胸腺細胞を耳介静脈から静注した。最終免疫1週間後にチオペンタールナトリウム麻酔下で開腹し、腹部大動脈から全採血を行った。血清を分離後、56°Cで30分間非働化し、ラット赤血球と反応させた後の血清を ATS として使用した。

### C 実験群の構成

実験群の構成及び使用匹数を Fig. 1 に示した。

腎炎誘発のために0.6mlのATSをラット尾静脈から1回投与し、この日を実験0日とした。これらのラットは投与後2日の尿蛋白排泄量に偏りがないようにI及びII群に分配した。

I群：ATS投与後の腎炎の経過を観察した(ATS群)。

II群：ATS投与後3日に0.5% Methylcellulose (400cP, 和光純薬工業, 以下MCと略)溶液を1回腹腔内投与(5ml/kg)してMC付加の影響を調べた(ATS+MC群)。

III群：実験0日に生理食塩液を投与し、実験3日に0.5% MC溶液を1回腹腔内投与して、MC単独投与の影響を調べた(MC群)。

IV群：腎炎惹起日に生理食塩液を1回尾静脈内に投与し、その後の処置は行わなかった(対照群)。

動物は各群とも実験の4, 5, 6, 8, 13, 20及び35日に屠殺して腎組織を採取した。

### D 尿蛋白排泄量の測定

代謝ケージ(東洋理工)を用いて、実験の0~8日までは毎日、その後は10, 12, 14, 20, 27及び34日前日からの24時間蓄積尿を採取し、尿量を測定した。尿中蛋白濃度はピロガールレッド法(Micro TP-test Wako, 和光純薬工業)により測定し、24時間排泄量を算出した。なお、データは35日に屠殺した各群6匹の動物について集計した。

### E 血液生化学検査

腎組織採取前に動物をエーテルで麻酔し、ヘパリン加注射筒を用いて腹部大動脈から採血し、得られた血漿について、尿素窒素(Urease-indophenol法)、クレアチニン(Jaffé法)、総コレステロール(酵素法)及び総蛋白(Biuret法)を自動分析装置(日立7150自動分析装置)により測定した。

### F 病理学的検査

腎組織を採取するため、腹部大動脈の左右腎動脈分岐部より心臓側を結紮して血流を止めた。直ちに総腸骨動脈分岐部から挿入したカニューレからヘパリン加生理食塩液を注入すると同時に、後大静脈を切開して腎臓内の血液を軽く洗い流した。さらに、0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.4)に溶解した4%パラホルムアルデヒドを130cm H<sub>2</sub>O圧で約3分間還流し、組織を固定した。

### 1 光学顕微鏡的検査

還流固定した腎臓の一部を10%中性緩衝ホルマリン液で一晩浸漬固定した。常法に従いパラフィン切片とし、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色、過ヨウ素酸シッフ(PAS)染色及び過ヨウ素酸メテナミン銀(PAM)染色を施して鏡検した。なお、実験の35日に採取した腎臓のPAM染色標本を用いて、各個体50個の糸球体について糸球体硬化の頻度を調べるとともに、Saitoら<sup>21)</sup>の方法により糸球体硬化指数(S. I.)を求めて、各群の差を比較した。

糸球体内のマクロファージを同定するため、マウス抗ラット単球/マクロファージモノクローナル抗体(ED-1, Chemicon, USA)を用いて、免疫酵素抗体法により染色を実施した。すなわち、腎組織パラフィン切片を脱パラフィン後、0.1%トリプシン(DAKO JAPAN, 東京)で37°C, 1時間の処理を行い、0.3%過酸化水素加メタノールで内因性ペルオキシダーゼの阻止をした後、1%ウシ血清アルブミン加リン酸緩衝生理食塩水で400倍に希釈したED-1抗体と24時間反応させた。2次抗体にはビオチン標識ウサギ抗マウス免疫グロブリンを用い、室温で60分インキュベートした後、SAB peroxidase 染色キット(ニチレイ, Japan)を用い、3, 3'-ジアミノベンチジン・4HCl(DAB)により発色させた。

### 2 電子顕微鏡学的検査

還流固定した腎皮質の一部を0.1Mリン酸緩衝液に溶解した2.5%グルタルアルデヒド水溶液に浸漬固定した。1%四酸化オスミウム水溶液で後固定し、脱水後Epok812(日新EM, 東京)に包埋した。光学顕微鏡観察用に作製した厚切り切片をトルイジンブルーで染色した後、ウルトラミクロトーム(MT2-B, Sorvall)で超薄切切片を作製し、ウラン・鉛二重染色を行い、透過型電子顕微鏡(日立H-300, 東京)により観察した。

### G 統計学的処理

実験結果の集計値はMean±S.D.で表示し、Studentのt検定を用いて対照群と他群との差あるいはATS群とATS+MC群との差の検定を行った。なお、検定は4例以上のデータが得られた群について行い、危険率0.05以下の場合に有意差ありとした。

## III 結 果

### A 尿蛋白

Fig. 2に24時間尿蛋白排泄量の推移を示した。

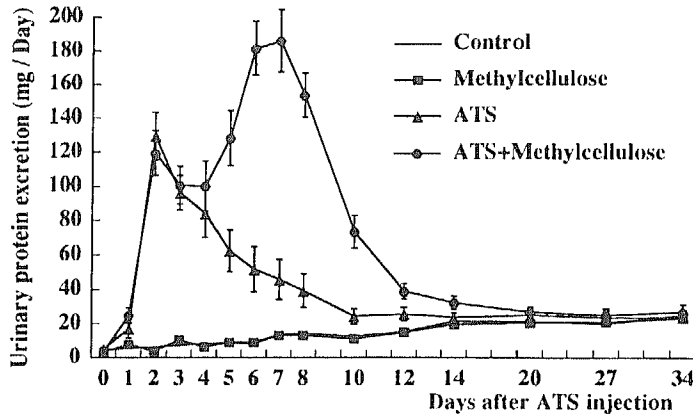


Fig. 2 Changes in urinary protein excretion. In the ATS(antithymocyte serum)+MC(methylcellulose) group, the amount of urinary protein was significantly elevated in comparison with the ATS group, from Days 5 to 12. MC solution was administered peritoneally 3 days after ATS injection. Each point represents the mean  $\pm$  S. E. for 6 rats.

ATS群では2日に尿蛋白排泄のピーク(129 $\pm$ 35 mg/day)がみられた後徐々に減少し、14日には対照群との差を認めなくなった。ATS+MC群では、2日にATS群と同等の尿蛋白(120 $\pm$ 32mg/day)を示した後、MC付加投与2日後の5日から再び排泄量の増加がみられ、7日に最高値(186 $\pm$ 46mg/day)を示した。尿蛋白はその後すみやかに減少し、20日にはほぼ正常レベルに復した。対照群及びMC群ではいずれも正常範囲内の値(30mg/day以下)で推移した。

**B 血液生化学的検査**

結果は試験期間の初期(6及び8日)、中期(13日)及び後期(35日)の3時点に分けてTable 1に示した。

MC群では初期に2例で尿素窒素の軽度な増加(24.4及び25.1mg/dl)が認められたが、その他には特記すべき変動はみられなかった。ATS群では初期に1例で尿素窒素の軽度な増加(24.5mg/dl)と総コレステロールの増加(144mg/dl)が認められ、総コレステロールは他の例でもわずかに増加傾向を示した。ATS+MC群では、初期に3例で尿素窒素の軽度な増加(26.2~35.9mg/dl)及び総コレステロールの増加(105~123mg/dl)が認められ、対照群との差は有意であった。このように、ATS+MC群でみられた変化はATS群と比べてやや強かったが、中期から後期には回復傾向あるいは回復を示した。

Fig. 3 Light micrographs of glomeruli in MC-treated rats at Days 5(a), 13(b) and 35(c) of the experiment. PAM  $\times$ 350

- a : Mild hypercellularity by infiltration of mononuclear or foamy vacuolated cells is seen 2 days after the administration of MC.
- b : Many foamy cells are observed in the mesangial areas 10 days after the administration of MC.
- c : A few foamy cells are still present in some mesangial areas 32 days after the administration of MC.

Fig. 4 Light micrographs of glomeruli in ATS-treated rat at Days 5(a), 8(b) and 35(c) of the experiment. PAM  $\times$ 350

- a : Ballooning of capillary loop and segmental mesangial proliferation with scanty extracellular matrix are seen.
- b : More intense mesangial proliferation with loosened matrix is noted.
- c : Mild increase of the mesangial matrix only.

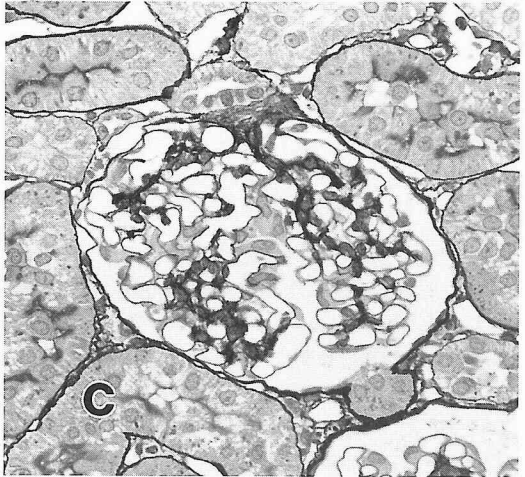
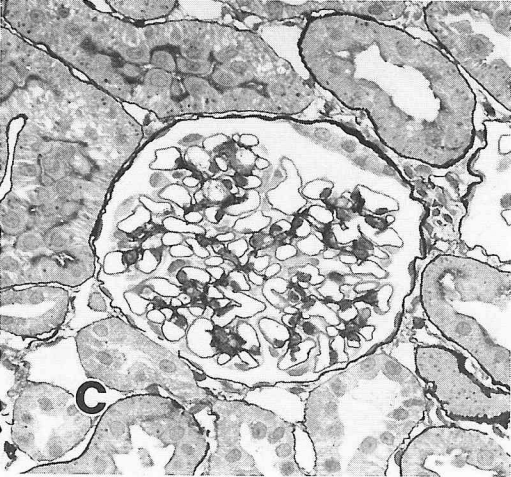
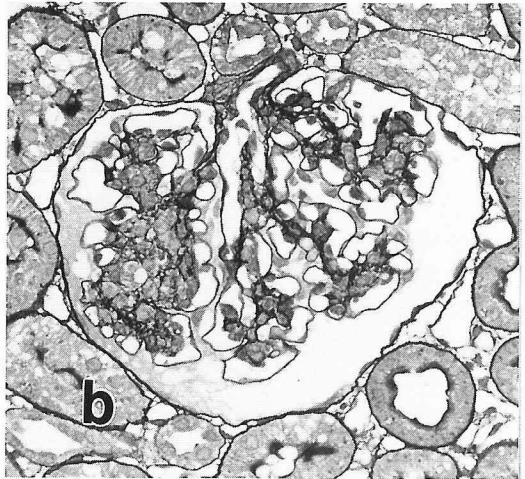
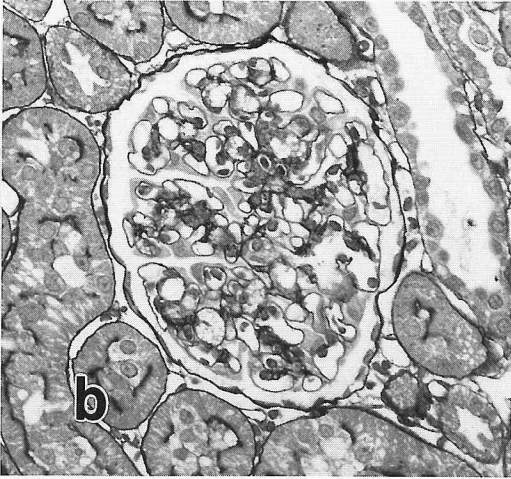
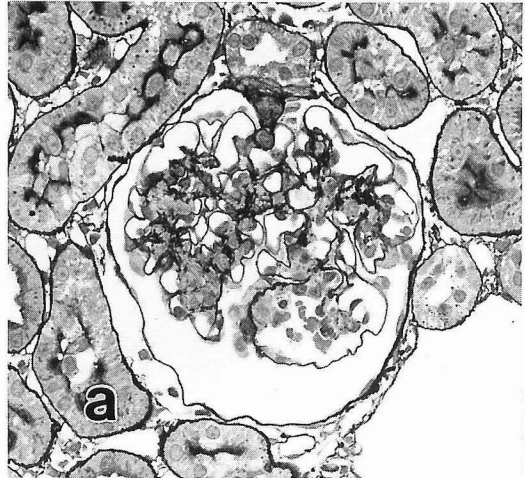
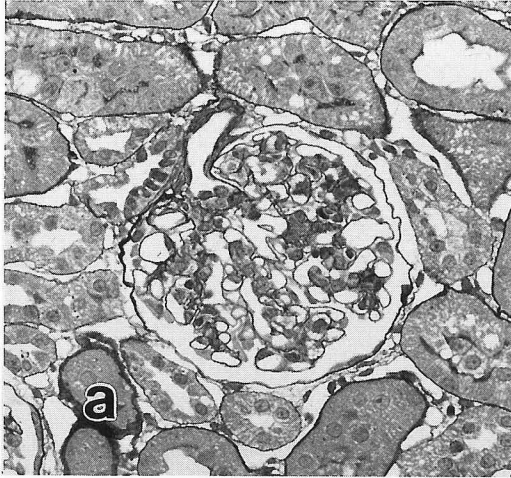


Fig. 3

Fig. 4

Table 1 Effect of methylcellulose(MC) treatment on plasma biochemical values in rats after induction of anti-thymocyte serum(ATs)nephritis

Days after induction	Group	No. of animals	Urea nitrogen (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)	Total cholesterol (mg/dl)	Total protein (g/dl)
6, 8	Control	4	18.2±1.6	0.45±0.08	62±3	4.92±0.63
	MC	8	19.8±4.2	0.42±0.04	70±11	5.03±0.34
	ATS	8	18.2±3.4	0.40±0.05	82±28 <sup>a)</sup>	4.89±0.29
	ATS+MC	8	22.4±7.4 <sup>a)</sup>	0.42±0.07	99±16 <sup>a)</sup>	4.67±0.40
13	Control	3	19.2±2.0	0.48±0.07	60±6	5.14±0.39
	MC	4	17.4±2.6	0.41±0.05	75±14	5.08±0.43
	ATS	5	18.2±2.5	0.45±0.08	63±6	5.21±0.59
	ATS+MC	5	20.7±1.2 <sup>b)</sup>	0.45±0.04	75±4 <sup>b)</sup>	5.22±0.35
35	Control	6	20.4±2.2	0.51±0.07	80±10	5.65±0.17
	MC	6	18.7±1.7	0.51±0.05	59±6 <sup>a)</sup>	5.41±0.31
	ATS	6	20.4±1.7	0.50±0.09	68±15	5.59±0.21
	ATS+MC	6	22.1±2.8	0.50±0.03	80±12	5.52±0.34

Each value is expressed as mean ± S.D.

<sup>a)</sup> Significant difference from the control ( $p < 0.05$ ).

<sup>b)</sup> Significant difference between ATS and ATS+MC groups ( $p < 0.05$ ).

### C 腎臓の肉眼及び光学顕微鏡検査

ATS+MC群では、6日において2例で肉眼的に軽度の腫大と褪色がみられた。また、8日において1例で腎臓の軽度な腫大が認められた。その他の群の動物では異常は認められなかった。

光学顕微鏡検査において、MC群では4日から糸球体は単核細胞の浸潤により富核を示し、5及び6日にはメサンギウム領域にMCを貪食したと思われる腫大した泡沫細胞の集積 (Fig. 3a) が次第に増加したが、糸球体係蹄構造はよく保持されていた。メサンギウム領域に出現した泡沫細胞はその後日数の経過とともに大きさを増した (Fig. 3b) が、35日ではその数は顕著に減少していた (Fig. 3c)。ATS群では4から8日の間に一部の糸球体係蹄にメサンギウム融解を伴ったBallooning (Fig. 4a) を認め、13日までにメサンギウム細胞の増殖及び細胞外基質の増加 (Fig. 4a, b) がみられた後、20及び35日では一部の糸球体係蹄に癒着病変や細胞外基質の軽度な増加所見 (Fig. 4c) を残してほぼ正常構造を示すまでに修復した。一方、ATS+MC群では、4日に糸球体への単核細胞や多形核白血球の遊走が嚢胞状に拡張した毛細血管腔にみられるとともに、メサンギウム領域には泡沫細胞が出現した。5及び6日では、MC群と比べて明らかに多くの泡沫細胞の集積によりメサンギウム領域は拡大し

て糸球体は腫大し、毛細血管腔は周辺部へ押しやられていた (Fig. 5a)。さらに、係蹄基底膜の断裂によりフィブリン及び泡沫細胞のボウマン腔への流出が認められた (Fig. 5a)。8日では糸球体の大部分はさらに腫大し、好酸性の液性成分と大型の泡沫細胞で占められ、管外にはボウマン嚢との癒着や泡沫細胞を混じた半月体が形成されていた (Fig. 5b)。13日以降、泡沫細胞は次第に結節状に集簇したが、35日にはその周辺部に細胞外基質の増加がみられるようになり、癒着部付近の係蹄は虚脱して硬化の様相を呈するようになった (Fig. 5c)。また、泡沫細胞が消失した一部の糸球体では顕著な細胞外基質の増加とともに網状化 (Fig. 5d) が認められた。

Fig. 6に癒着病変の頻度を、Table 2に硬化性病変の頻度及び硬化指数を示した。13及び35日の癒着病変の頻度はATS群と比べて、ATS+MC群で明らかに増加しており、また、35日では軽度な硬化性病変の頻度及び硬化指数はATS単独投与と比べて有意に高かった。Fig. 7に示すように、MC及びATS+MC群でみられた単核細胞及び泡沫細胞はED-1抗体で強陽性に染色された。ED-1陽性細胞数は、MC群及びATS+MC群とも4から6日まで次第に増加したが、その変化はATS+MC群で著しかった。ATS群では初期に少数の陽性細胞が散見されたが、13日以降では

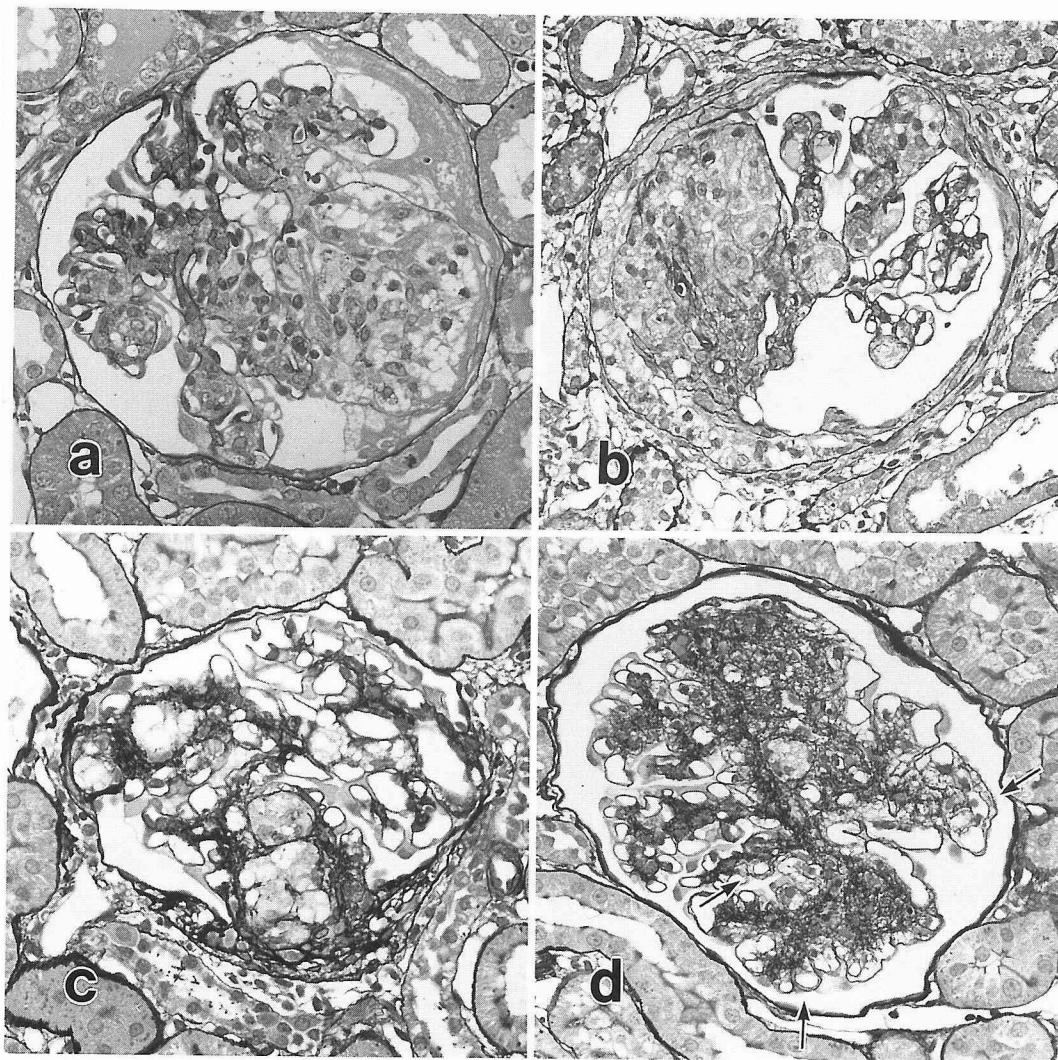


Fig. 5 Light micrographs of glomeruli in ATS+MC-treated rats at Days 5 (a), 8(b) and 35(c, d) of the experiment. PAM  $\times 350$ (a, b),  $\times 330$ (c, d)

- a : Accumulation of large numbers of mononuclear or foamy cells is seen in the large ballooning lesion and expanded mesangial areas. Exudated fibrinous substance is also noted in the Bowman's space.
- b : Intraglomerular accumulation of large mononuclear cells is observed. Crescent formation with extracapillary exudation of foamy cells and adhesion of the glomerular tuft to the Bowman's capsule are also seen.
- c : Increased extracellular matrix around foamy cells and adhesions to the Bowman's capsule are noted.
- d : Marked increase of mesangial matrix with reticular appearance is prominent. Double contour(↑) is found in some capillary loops.

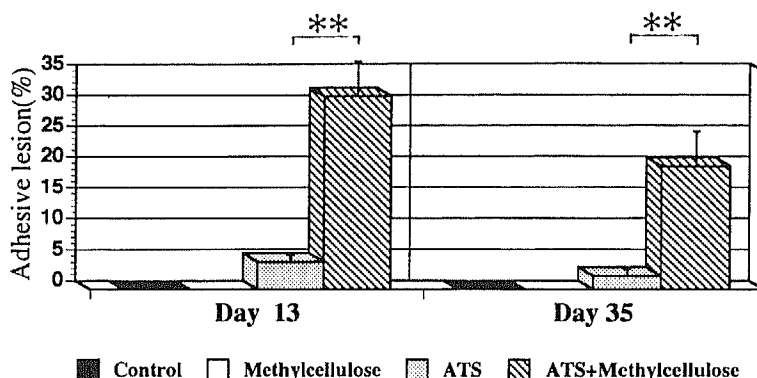


Fig. 6 Incidence of glomerular adhesive lesions at Days 13 and 35 after injection of anti-thymocyte serum(ATS)

\*\* Significant difference between ATS and ATS+MC groups ( $p < 0.01$ )

Each plot represents the mean  $\pm$  S. E.

Table 2 Glomerulosclerotic incidence(%) and sclerosis index on Day 35 after injection of Anti-thymocyte serum(ATS)

Group	No. of animals	Grade of glomerulosclerosis				Sclerosis index(SI)
		0	1+	2+	3+	
Control	6	0	0	0	0	0
MC	6	0	0	0	0	0
ATS	6	91.0 $\pm$ 13.5	8.5 $\pm$ 12.3	0.5 $\pm$ 1.2	0	0.10 $\pm$ 0.15
ATS+MC	6	38.0 $\pm$ 17.6 <sup>a)</sup>	56.7 $\pm$ 10.9 <sup>a)</sup>	5.0 $\pm$ 8.9	0.3 $\pm$ 0.5	0.69 $\pm$ 0.27 <sup>a)</sup>

Each value represents the mean  $\pm$  S. D.

MC : Methylcellulose

Grade 0 : No change.

Grade 1+ : Sclerotic area less than 1/4 of glomerulus.

Grade 2+ : Sclerotic area between 1/4 to 1/2 of glomerulus.

Grade 3+ : Sclerotic area more than 1/2 of glomerulus.

Formula of sclerosis index(SI) :

$$SI = \frac{1 \times N_1 + 2 \times N_2 + 3 \times N_3}{N_0 + N_1 + N_2 + N_3}$$

N is the number of glomeruli in each grade of sclerosis.

<sup>a)</sup> Significant difference between ATS and ATS+MC groups ( $p < 0.05$ ).

Fig. 7 Immunohistochemical staining for ED-1 at Days 6(a, c, e) and 35(b, d, f) in 3 experimental groups(a, b, MC group; c, d, ATS group; e, f, ATS+MC group). Accumulation of ED-1 positive macrophages is more prominent in the ATS+MC group than in other groups at Day 6. At Day 35, mononuclear cells are stained positively with an aggregated pattern.



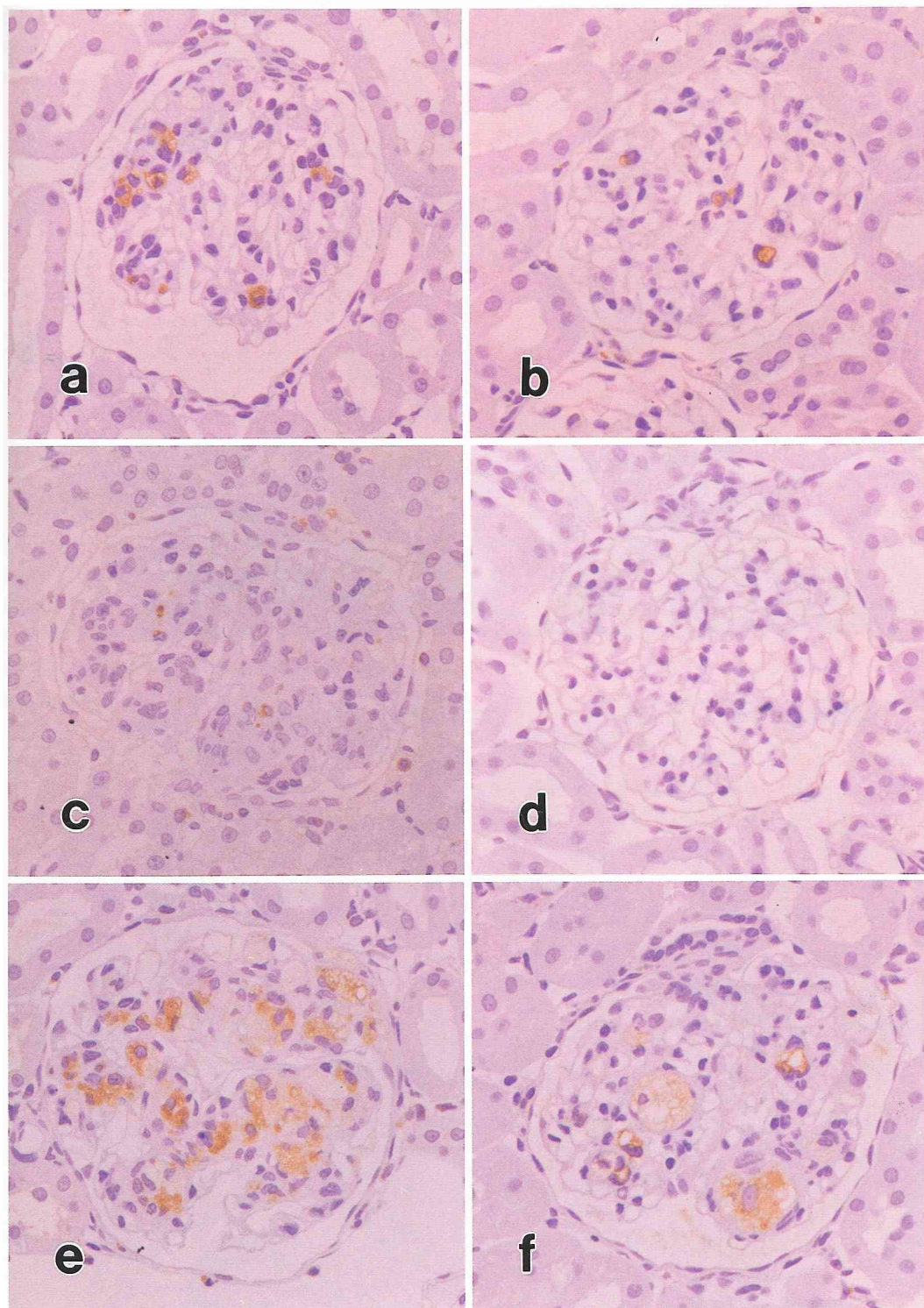


Fig. 7

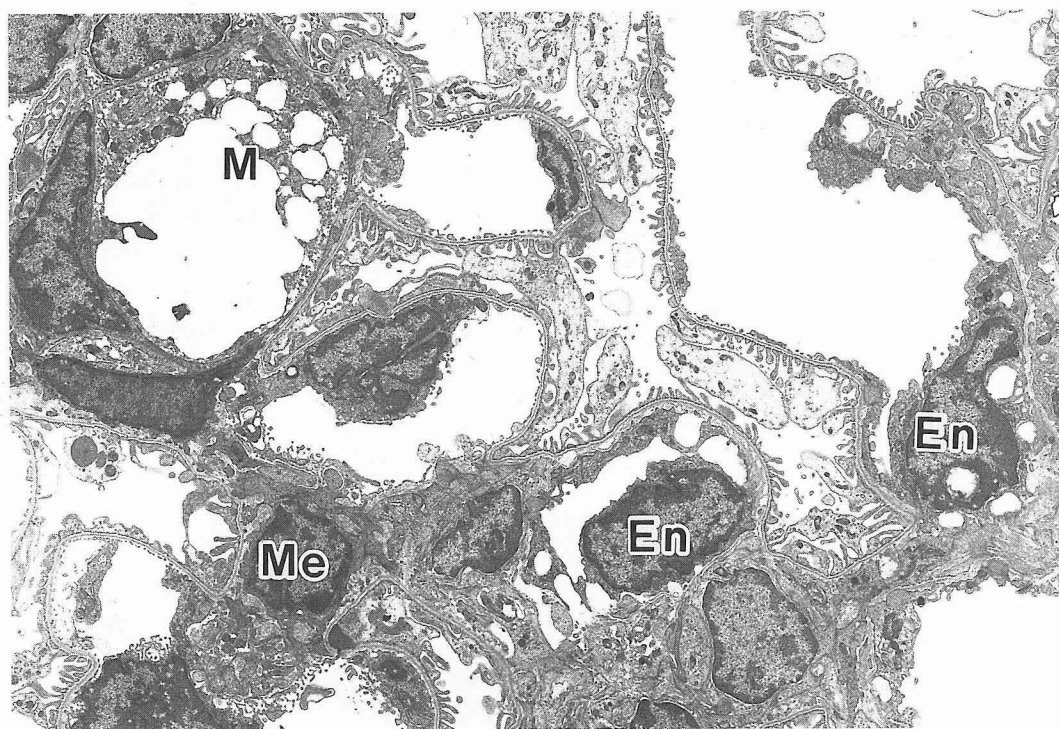


Fig. 8

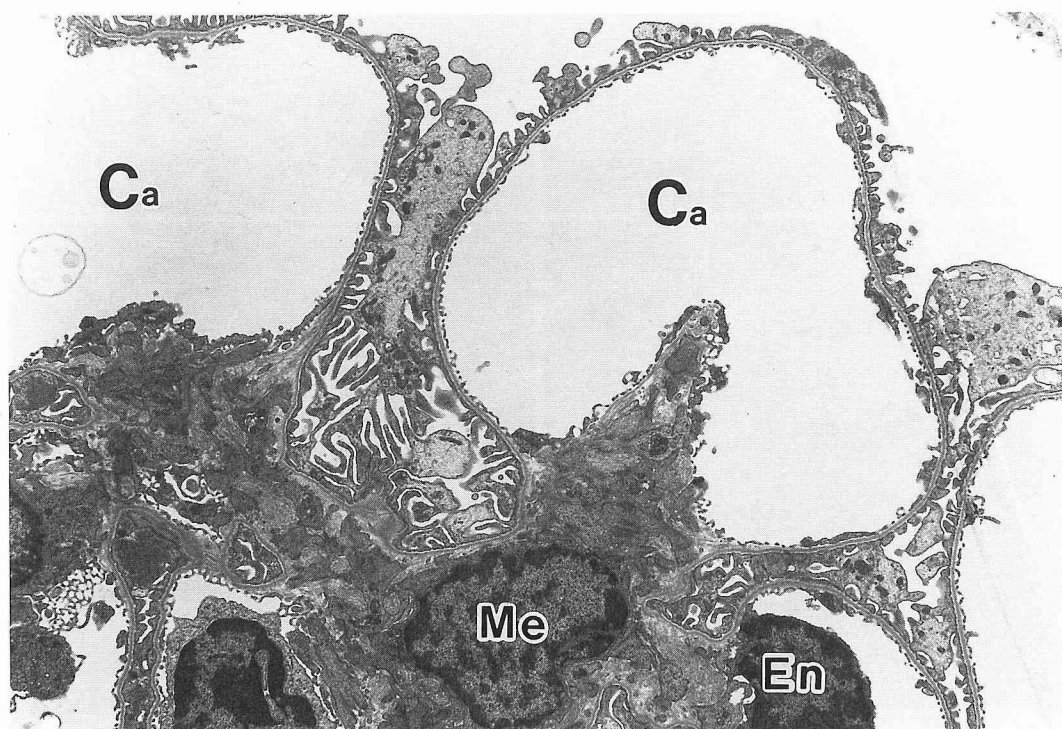


Fig. 9

対照群と同様にごくまれに弱陽性に染色される単核細胞が認められる程度であった。

#### D 電子顕微鏡検査

MC 群では MC 投与翌日より毛細血管腔からメサンギウム領域への多数の空胞を有するマクロファージの侵入がみられた。20 あるいは 35 日ではメサンギウム領域に少数のマクロファージが停滞してみられ、一部の例で糸球体内皮細胞内の空胞と細胞質の肥厚及び小孔の消失がみられた (Fig. 8)。

ATS 群では 13 日までにメサンギウム細胞の増殖及びメサンギウム基質の増加が顕著にみられた後、35 日ではメサンギウム基質の軽度な増加を残しほぼ正常構造に修復していた (Fig. 9)。

ATS+MC 群では 4 及び 5 日において、毛細血管腔には MC と思われる細粒状物質やマクロファージの出現とともに多形核白血球及び血小板の出現が目立った。Ballooning の生じた部位には、基底膜の直下に遊離した内皮細胞に囲まれた血管腔が存在しその構造が保持されていた。拡大したメサンギウム領域には細顆粒状物を取り込んだマクロファージや空胞状となったマクロファージにより満たされていた (Fig. 10)。さらに、一部の係蹄には上皮細胞足突起の癒合や新生基底膜の形成が認められた。6、8 及び 13 日では空胞状マクロファージが次第に集簇し、一部周辺部に基質の増加がみられ、健全な血管係蹄が末梢部にみられた。35 日では集簇マクロファージの減少及びサイズの縮小により正常構造への修復像がみられたが、残存マクロファージの近傍や不規則な細胞質の突起を伸ばしたメサンギウム細胞間に基質の増加や顕著なコラーゲン線維の出現が認められた (Fig. 11)。

#### IV 考 察

胸腺細胞に存在する Thy-1 抗原がラットの糸球体メサンギウム細胞にも存在することが、石崎<sup>20)</sup>によって明らかにされ、抗ラット Thy-1 抗体を含む抗血清

あるいは Thy-1 モノクローナル抗体を投与することにより、メサンギウム細胞を標的とする糸球体腎炎が惹起されることが報告された<sup>13)-15)</sup>。本研究ではこの腎炎の発症初期に MC を付加投与すると、糸球体内に集積したマクロファージが腎炎の進展に有意な影響を与えることを明らかにした。著者は予備検討において MC を ATS 腎炎発症後の早い時期 (ATS 投与後 1 日) あるいは反復的 (ATS 投与後 1~3 日) に投与すると、より強い糸球体の障害性変化を生じることを観察している (未発表)。今回の実験では MC 投与のタイミングを糸球体に過度の障害を生じない時期として、蛋白尿が軽減し始めた ATS 投与後 3 日に設定した。

抗 Thy-1 腎炎の発症にはメサンギウム細胞表面の Thy-1 抗原に抗体が結合して補体が活性化され、細胞障害が引き起こされるが、第 II 相反応は生じないためその変化は一過性で、多くの係蹄はもとの正常構造に修復することが知られている<sup>16)</sup>。今回の実験でも ATS を単独投与した場合、4 日後の観察からメサンギウム融解に起因する糸球体係蹄の Ballooning、細胞増殖及び細胞外基質の増加がみられたが、修復の転帰をとる可逆性の変化であった。蛋白尿のピークはメサンギウム融解の生じていると考えられる ATS 投与後 2 日にあり、血液生化学検査では 6 から 8 日後に軽度の総コレステロールの上昇がみられる程度で機能的にも強い障害性は認められなかった。一方、ATS 投与後 3 日に MC を付加投与することによって、メサンギウム領域には急激なマクロファージの集積が起これ、これに呼応して投与後 7 日頃に蛋白尿の再上昇が認められた。マクロファージが糸球体内に集積することにより蛋白透過性の亢進が生じることは、馬杉腎炎モデルにマクロファージを移入した研究<sup>8)9)</sup>でも観察されている。MC 付加モデルではメサンギウム融解により糸球体メサンギウム領域への透過性は高度に亢進状態にあったと考えられ、大量の MC の流入と同時にその処

Fig. 8 Electron micrograph of the glomerulus from a MC-treated rat at Day 20.

A large vacuolated macrophage is seen in the mesangial area. Cytoplasm of endothelial cells is seen thickened with scanty pores.

Uranyl acetate and lead citrate stain  $\times 3,900$

M: Macrophage, Me: Mesangial cell, En: Endothelial cell.

Fig. 9 Electron micrograph of the glomerulus from an ATS-treated rat at Day 35.

Almost intact structure is seen except for a slightly increased mesangial matrix.

Uranyl acetate and lead citrate stain  $\times 4,900$

Me: Mesangial cell, En: Endothelial cell, Ca: Capillary lumen.



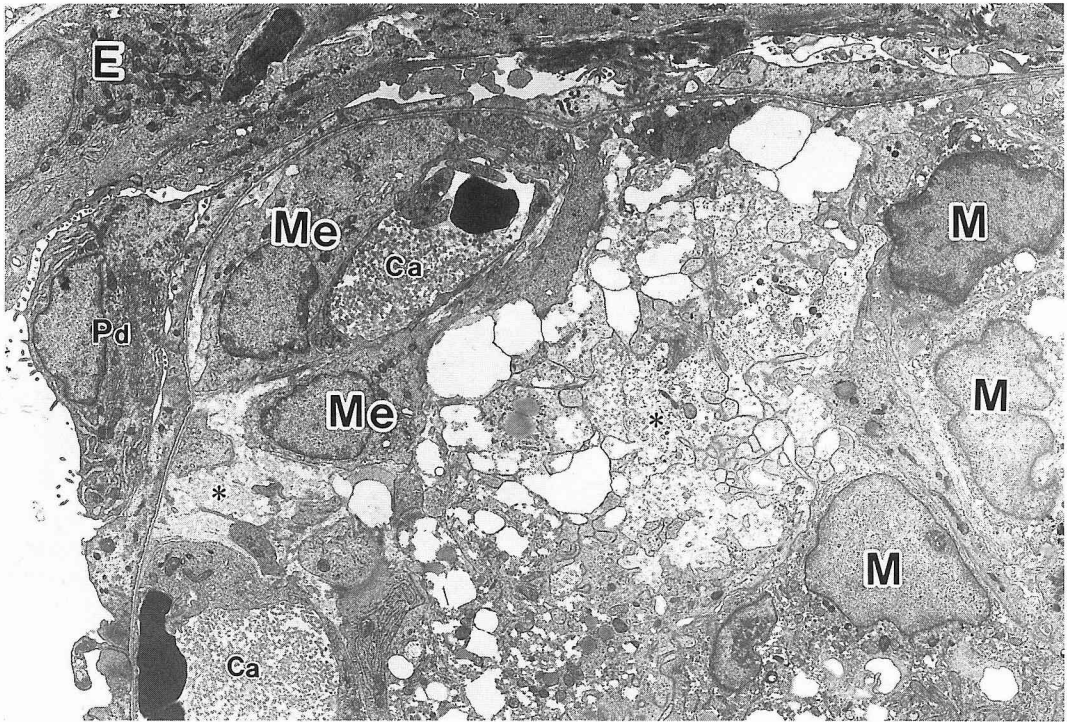


Fig. 10

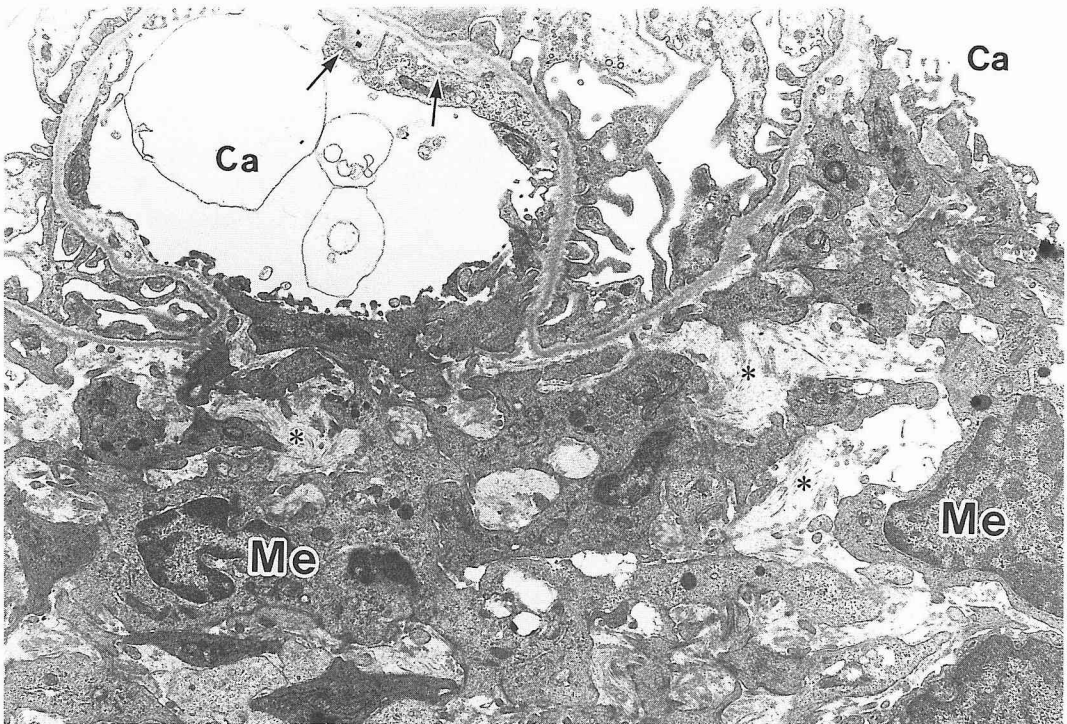


Fig. 11

理のために動員されたマクロファージが糸球体障害を増強し、更なる蛋白透過性の亢進をもたらしたと考えられる。すなわち、集積マクロファージから放出されるプロテアーゼやコラゲナーゼなど過剰な酵素の作用によって基質融解を促進するとともに基底膜の障害をももたらし、管外性の病変を生じさせたと考えられた。抗基底膜抗体によって誘発されるラット馬杉腎炎では、第I相後、第II相の反応が持続し続け、内皮、基底膜の障害とともに、マクロファージの持続的集積が続く間にメサンギウム硬化が進行してくることが知られている<sup>9)</sup>。また、その他の実験腎炎モデル<sup>22)23)</sup>においても腎炎悪化の要因には蛋白尿や高コレステロール血症などに加えて、糸球体へのマクロファージの侵入が重要であるとの報告がなされている。今回の実験では、尿蛋白や血中コレステロールの上昇は比較的早期に回復したが、先行するメサンギウム障害の後に集積したマクロファージの停滞がもたらされることによって障害糸球体へのマクロファージの作用が持続したものと思われる。近年の培養メサンギウム細胞を用いた研究や抗Thy-1腎炎モデルにおける成長因子の発現と細胞外基質産生との関連を調べた研究<sup>24)</sup>から、サイトカインの1つである形質転換成長因子(TGF- $\beta$ )が細胞外基質合成促進に有意に作用していることが示唆されている。また、抗TGF- $\beta$ 抗体投与によりメサンギウム基質の産生が抑制されたことが報告されている<sup>25)</sup>。このように、抗Thy-1腎炎モデルでの細胞外基質産生にはTGF- $\beta$ が有意に関与していると考えられる。ED-1陽性マクロファージは腎炎発症初期に増加していたが、Bagchusら<sup>26)</sup>の報告と同様にATS投与後13日には正常動物との差はみられなくなった。マクロファージはTGF- $\beta$ を産生する有力な細胞の1つであることから、抗Thy-1腎炎においてマクロファージが

比較的すみやかに消失することは、基質産生が一過性で可逆的な変化であることと関係しているのかもしれない。一方、MC付加投与により実験35日にみられた細胞外基質の増加所見は、マクロファージから放出されるサイトカインの作用を強く示唆させるものといえ、今後このモデルにおいて糸球体マクロファージの停滞と基質産生との関連をさらに検討する必要があると思われる。

MCを1回腹腔内投与した場合、その3日後まで糸球体メサンギウム領域にはマクロファージの増加がみられ、電顕的に一部の糸球体で糸球体内皮細胞小孔の消失を伴った細胞質の肥厚や基底膜の層状化が認められた。しかしながら、蛋白尿の発現は観察期間を通じて全く認められず、糸球体構造はよく保持されていた。実験35日では糸球体内に残存するマクロファージの数は著明に減少し、細胞外基質の増加も認められなかった。MC<sup>17)-19)</sup>やポリビニールアルコール<sup>27)28)</sup>などの反復投与では、投与日数の経過とともに蛋白尿が出現し、著明な糸球体内の泡沫細胞の集積による障害がみられているが、糸球体に明らかな硬化性病変を生じたとの報告はない。この理由は明らかではないが、今回のMC付加モデルでは腎炎発症初期に基底膜の障害や管外性の変化が顕著に生じており、このような障害因子が糸球体硬化の進展に複雑に関連しあっているのかもしれない。

これまで、抗Thy-1腎炎モデルにおいてBallooningを示すほどの高度のメサンギウム融解を受けた糸球体でも進行性の過程を経ずに修復可能であるということから、このモデルが必ずしもヒトのメサンギウム増殖性腎炎モデルとして対応するものではないことが指摘されている。近年、抗Thy-1抗体の反復投与<sup>29)30)</sup>や少量のハブ毒の追加投与<sup>31)</sup>により、不可逆性の腎障

Fig. 10 Electron micrograph of the glomerulus from an ATS+MC treated rat at Day 5. Influx of substances(\*) derived from methylcellulose and vacuolated macrophages in the expanded mesangial area are seen. A small capillary lumen surrounded by two mesangial cells is noted at the left upper part of the figure. Widely flattened foot process of podocyte is seen along the capillary loop.  
Uranyl acetate and lead citrate stain  $\times 3,900$   
M: Macrophage, Me: Mesangial cell, Ca: Capillary lumen, Pd: Podocyte, E: Parietal epithelial cell.

Fig. 11 Electron micrograph of the glomerulus from an ATS+MC group rat at Day 35. Prominent collagen fibers(\*) appear around mesangial cells. Newly formed glomerular basement membrane(arrow) is also seen beneath the endothelial sheath.  
Uranyl acetate and lead citrate stain  $\times 6,500$   
Me: Mesangial cell, Ca: Capillary lumen.

害を作製できたとの報告があるが、いずれもメサンジウムへの障害作用を増強させることによる効果と考えられる。一方、糸球体硬化の進展にマクロファージの関与が示唆される実験としては、腎部分摘出モデル<sup>29)</sup>や各種実験腎炎にコレステロール食を負荷したモデル<sup>23)24)32)</sup>での検討がある。今回の成績は、糸球体硬化におけるマクロファージの関与という面から新たなアプローチのできるモデルとしての有用性を示唆するものである。

以上のように本実験モデルにおける障害の進展は、初期の基質融解による障害とそれに引き続く基質産生亢進からなっており、マクロファージは糸球体硬化への移行に重要な役割を担っている可能性があるこ

とが示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました信州大学医学部第1病理学教室 重松秀一教授に深謝致します。また本論文に貴重な御助言を頂きました同教室の伊藤信夫助教ならびに株式会社イナリサーチ 西垣敏明博士に感謝致します。また、本研究の機会を与えて頂きました株式会社イナリサーチ 中川博司博士をはじめ、御協力を頂きました研究所の皆様により御礼申し上げます。

本論文の要旨は第39回日本腎臓学会総会（平成8年5月、倉敷）において発表した。

## 文 献

- 1) Atkins RC, Glasgow EF, Holdsworth SR, Matthews FE: The macrophage in human rapidly progressive glomerulonephritis. *Lancet* 1: 830-832, 1976
- 2) Monga G, Mazzucco G, Barbiano di Belgiojoso G, Busnach G: The presence and possible role of monocyte infiltration in human chronic proliferative glomerulonephritis. *Am J Pathol* 94: 271-284, 1979
- 3) Van Goor H, Ding G, Kees-Folts D, Grond J, Schreiner GF, Diamond JR: Biology of disease, Macrophages and renal disease. *Lab Invest* 71: 456-462, 1994
- 4) 重松秀一, 伊藤信夫: メサンジウムの浄化機能. *循環器科* 16: 16-25, 1984
- 5) Shigematu H: Renal damage and macrophages. *J Toxicol Pathol* 7: 1-8, 1994
- 6) Shibata N, Ito N, Shigematu H: Macrophages in accelerated Masugi nephritis in the rat. *Acta Pathol Jpn* 35: 9-22, 1985
- 7) Hattori T, Nagamatsu T, Ito M, Suzuki I: Contribution of ED-1- and CD-8-positive cells to the development of crescent-type anti-GBM nephritis in rats. *Jpn J Nephrol* 36: 1228-1239, 1994
- 8) Holdsworth SR, Neale TJ: Macrophage-induced glomerular injury, Cell transfer studies in passive autologous antiglomerular basement membrane antibody-initiated experimental glomerulonephritis. *Lab Invest* 51: 172-180, 1984
- 9) 江原孝史: ラット加型型馬杉腎炎における腹腔細胞移入の影響について. *信州医誌* 35: 107-117, 1987
- 10) Holdsworth SR, Neale TJ, Wilson CB: Abrogation of macrophage-dependent injury in experimental glomerulonephritis in the rabbit: use of an anti-macrophage serum. *J Clin Invest* 68: 686-692, 1982
- 11) Van Goor H, Fidler V, Weening JJ, Grond J: Determinants of focal segmental glomerulosclerosis in the rat after renal ablation, Evidence for involvement of macrophages and lipids. *Lab Invest* 64: 754-765, 1991
- 12) Van Goor H, Van der Horst MLC, Fidler V, Grond J: Glomerular macrophage modulation affects mesangial expansion in the rat after renal ablation. *Lab Invest* 66: 564-571, 1992
- 13) Ishizaki M, Masuda Y, Fukuda Y, Sugiyama Y, Yamanaka N, Masugi Y: Experimental mesangio-proliferated glomerulonephritis in rats induced by intravenous administration of anti-thymocyte serum. *Acta Pathol Jpn* 36: 1191-1203, 1986
- 14) Bagchus MW, Hoedemaeker PhJ, Rozing J, Bakker WW: Glomerulonephritis induced by monoclonal anti-Thy 1. 1 antibodies. A sequential histological and ultrastructural study in the rat. *Lab Invest* 55: 680-687, 1986

- 15) Yamamoto T, Yamamoto K, Kawasaki K, Yaoita E, Shimizu F, Kihara I: Immunoelectron microscopic demonstration of Thy-1 antigen on the surface of mesangial cells in the rat glomerulus. *Nephron* 43: 293-298, 1986
- 16) 笠原 寛: 糸球体係蹄の再構築—抗胸腺細胞抗体によるメサンギウム融解での観察. *日腎会誌* 11: 1117-1133, 1992
- 17) Hall CE, Hall O: Glomerulonephritis and hypertension produced by parenteral administration of methylcellulose. *Am J Pathol* 40: 167-183, 1962
- 18) Pardo V, Shapiro AP: Ultrastructural glomerular lesions produced by synthetic polysaccharides. *Lab Invest* 15: 617-628, 1966
- 19) Rowley DA, Fitch FW, Bye IJ: Anemia produced in the rat by methylcellulose, I. Repeated intraperitoneal injection of methylcellulose. *Arch Pathol* 74: 331-339, 1962
- 20) 石崎正道: ラット糸球体 Mesangium における Thy-1・1 抗原の存在について. *アレルギー* 29: 816-826, 1980
- 21) Saito T, Sumithran E, Glasgow EF, Atkins RC: The enhancement of aminonucleoside nephrosis by the co-administration of protamine. *Kidney Int* 32: 691-699, 1987
- 22) Baba N, Shimokama T, Watanabe T: Effects of hypercholesterolemia on initial and chronic phases of rat nephrotoxic serum nephritis: development of focal segmental glomerulosclerosis, analogous to atherosclerosis. *Virchows Arch B Cell Pathol* 64: 97-105, 1993
- 23) Diamond JK, Pesek I, McCarter MD, Karnovsky MJ: Altered functional characteristics of rat macrophages during nephrosis, Synergistic effects of hypercholesterolemia. *Am J Pathol* 135: 711-718, 1981
- 24) Okuda S, Languino LR, Ruoslahti E, Border WA: Elevated expression of transforming growth factor  $\beta$  and proteoglycan production in experimental glomerulonephritis, Possible role in expansion of the mesangial extracellular matrix. *J Clin Invest* 86: 453-462, 1990
- 25) Border WA, Okuda S, Languino LR, Sporn MB, Ruoslahti E: Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor  $\beta_1$ . *Nature* 346: 371-374, 1990
- 26) Bagchus WM, Jeunink MF, Elema JD: The mesangium in anti-Thy-1 nephritis, Influx of macrophages, mesangial cell hypercellularity, and macromolecular accumulation. *Am J Pathol* 137: 215-223, 1990
- 27) Seiler MW, Hoyer JR, Sterzel RB: Role of macrophages in the glomerular mesangial uptake of polyvinyl alcohol in rats. *Lab Invest* 49: 26-37, 1983
- 28) Sterzel RB, Eisenbach GM, Seiler MW, Hoyer JR: Uptake of polyvinyl alcohol by macrophages in the glomerular mesangium of rats. *Am J Pathol* 111: 247-257, 1983
- 29) Morita H, Maeda K, Obayashi M, Shinzato T, Nakayama A, Fuzita Y, Takai Y, Kobayakawa H, Inoue I, Sugiyama S, Asai J, Nakashima I, Isobe J: Induction of irreversible glomerulosclerosis in the rat by repeated injections of a monoclonal anti-Thy-1. 1 antibody. *Nephron* 60: 92-99, 1992
- 30) Iida H, Izumino K, Asaka M, Entani C, Takata M, Johnson RJ: Glomerulosclerosis in the rat, induced by repeated immune-mediated mesangial cell injury. *Jpn J Nephrol* 35: 905-912, 1993
- 31) 益田幸成, 清水 章, 北村博司, 石崎正通, 杉崎祐一, 山中宣昭: 増殖性腎炎における内皮細胞の役割 (抄録). *日病誌* 83: 294, 1994
- 32) Miyata J, Takebayashi S: Effect of hyperlipidemia on glomerular sclerosis in unilateral nephrectomized rats. *Acta Pathol Jpn* 37: 1433-1439, 1987

(9. 1. 24 受稿)