

# 実験的急性肺水腫における肺胞壁基底膜陰荷電部位の 電顕組織化学的検討

石 井 恵 子

信州大学医学部第1病理学教室

(指導: 重松 秀一教授)

## Ultrastructural Histochemical Study on Anionic Sites of Alveolar Wall Basement Membrane in Experimental Acute Pulmonary Edema

Keiko ISHII

*Department of Pathology, Shinshu University School of Medicine*

*(Director: Prof. Hidekazu SHIGEMATSU)*

The localization and characterization of anionic sites in rat alveolar wall basement membrane were investigated in physiological and pathologic states by an ultrastructural histochemical method.

High iron diamine (HID) staining after enzyme-digestion studies demonstrated the presence of heparan sulfate proteoglycan (HS-PG) only along the lamina rara externa (LRE) of the basement membrane under alveolar type I cells (ABM: I), as had been revealed in glomerular basement membrane. The HID-reactivity of the LRE was heightened by the high iron diamine-thiocarbonyl-silver proteinate (HID-TCH-SP) method. Moreover, though slightly weaker, the other positive region was also revealed by the same method.

The alteration in the distribution of HS-PG of the alveolar wall was examined in acute pulmonary edema induced by intravenous injection of Paraquat (PQ) and Pneumotoxin (PT) in rats. In PQ-induced edema, the injury was more severe in the epithelium, but in the endothelium in PT-induced edema. In these permeability edemas, no change was observed in the distribution of HS-PG throughout the experiments.

It is concluded that the loss of HS-PG is not the primary cause, but rather the disturbance of cellular and interstitial elements is important in the development of permeability pulmonary edema.

*Shinshu Med. J.*, 36: 35-54, 1988

(Received for publication July 28, 1987)

---

**Key words:** alveolar wall basement membrane, heparan sulfate proteoglycan (HS-PG), permeability pulmonary edema, high iron diamine-thiocarbonyl-silver proteinate (HID-TCH-SP) method

肺胞壁基底膜, ヘパラン硫酸プロテオグリカン, 透過亢進型肺水腫, 高鉄ジアミン-チオカルボヒドロ  
ジド-蛋白銀 染色

---

## I 緒 言

肺胞壁は解剖学的に、肺胞上皮細胞—基底膜—毛細血管内皮細胞より構成されるガス交換に関わる thin side と、基底膜間に間質が加わる物質代謝に関与する thick side<sup>1)</sup> のいずれかにより構成されている。つまり、thin side の基底膜は上皮と内皮の間に1層介在しているのに対し、thick side においては間質に隔てられ、上皮下および内皮下に2層存在している。

基底膜は一般に、細胞構築の維持に関与するばかりでなく、異なった2つの環境における物質通過の関門としての機能を持っており、従来考えられてきた size barrier function と並び、陰荷電部位 (anionic sites: AS) に基づく charge barrier function という概念が、ことに糸球体基底膜 (glomerular basement membrane: GBM) における研究<sup>2)3)</sup> から注目されてきているが、肺胞壁においても同様の機構が存在しているのであろうか。また、肺における物質通過の異常は、肺水腫という病的状態を引き起こすが、この際肺胞壁の thin side および thick side における基底膜の機能に、何らかの変化が生じているのであろうか。それらの点に注目し、今回著者は、肺胞壁基底膜の AS を、正常ラットを用いて電顕組織化学的に検索し、その局在と特性を明らかにするとともに、実験的に高濃度蛋白の血管外漏出をきたす<sup>4)</sup> 透過亢進型急性肺水腫を作製し、その変化について検討したので報告する。

## II 材料と方法

## A 正常ラット肺胞壁の AS

実験には体重 200g 前後の雄 Wistar rat (静岡県実験動物農業協同組合、浜松) を用いた。ネブプター麻酔下で、腹大動脈より 0.1M 磷酸緩衝 (pH7.4) 4% パラフォルムアルデヒド (PFA) にて灌流固定を行い、気管を結紮し肺に空気が入ったままの状態を取り出し、さらに 0.1M 磷酸緩衝 (pH7.4) 1% PFA—1% グルタルアルデヒド (GA) にて気管支内注入固定をした後細切し、シリンジ内で手動的に減圧<sup>5)</sup> して、1時間同固定液中で浸漬固定した。その後、凍結の際に生じる小氷塊による組織破壊を防ぐ目的で、1% dimethyl sulfoxide (DMSO) を含んだ 10% グリセリン水溶液<sup>6)</sup> に1時間浸漬させ、取り出した肺組織を OCT コンパウンド (Lab-Tek, Miles, Illinois) に包埋し、ドライアイス—アセトン中で凍結し、Cryostat II (Ames, Miles, Illinois) にて 20 $\mu$ m の

切片を作製した。8% シュクロース水溶液で洗浄後、次の4種類の酵素で、37°C にて12時間処理した<sup>7)8)</sup>。

1. Heparitinase from *Flavobacterium heparinum* (生化学工業, 東京) 0.1 unit/ml in 0.1 M acetate buffer (pH 7.0)
2. Chondroitinase ABC from *Proteus vulgaris* (生化学工業, 東京) 5 units/ml in 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 8.0)
3. Neuraminidase from *Arthrobacter ureafaciens* (半井化学, 京都) 1 unit/ml in 0.01 M phosphate buffer (pH 6.8)
4. Hyaluronidase from Bovine Testis (半井化学, 京都) 0.1% in 0.1 M phosphate buffer (pH 5.5)

対照として、各酵素溶液に用いた緩衝液での処理を行った。各酵素溶液および緩衝液で処理した切片を10時間洗浄した後、硫酸化ムコ物質に高い特異性を示すといわれている high iron diamine (HID) 染色<sup>9)</sup> およびその変法である high iron diamine-thiocarbohydrazide-silver proteinate (HID-TCH-SP) 染色<sup>10)</sup> にて、23°C 18時間<sup>11)</sup> 染色を行い、洗浄後 2% 四酸化オスミウム水溶液で 4°C 1時間後固定をして、QuetoI-812 (日新EM, 東京) に包埋した。LKB-4800 型超ミクロトームで、ダイヤモンドナイフ (DI-ATOME Ltd., Swiss) を使用し、干渉色シルバー・ゴールドの厚さに切られた超薄切片を、HID法は銅グリッド (Veco, Holland) にのせ無染色で、一方、HID-TCH-SP法は金グリッド (Veco, Holland) にのせ 2% TCH を含む 10% 酢酸水溶液で 40分、引き続き 1% S P 水溶液で 30分間の二重染色を施行後、カーボンを蒸着し、日立 HS-9 型透過型電子顕微鏡 (75 kV) で観察した。なお、HID染色の対照として diamine を含まない溶液での染色を行った。さらに、塩基性物質である分子量 1200 の 0.5% 低分子ポリエチレンイミン (PEI)<sup>12)</sup> 8.5% シュクロース加溶液中 (pH 7.4) に、灌流固定せずに取り出した生の肺組織を、1 mm<sup>3</sup> 以下の大きさに細切し 30分間浸透させ、0.2M カコシル酸緩衝液 (pH 7.4) にて洗浄し、引き続き 0.1% GA—2% 燐タングステン酸 (PTA) 溶液 (pH 7.4) にて、1時間固定および PEI のタングステイオンと結合して不溶性の粒子を形成することによる視覚化を行い、同カコシル酸緩衝液にて洗浄、2% 四酸化オスミウム水溶液にて 2時間後固定をして、型のごとく電顕包埋を行い、超薄切片作製後、1% 酢酸ウ

ラニール水溶液と4%クエン酸鉛<sup>13)</sup>による二重染色を施したものについての観察も行った。

## B 透過亢進型急性肺水腫の作製

### 1. パラコート (Paraquat dichloride: PQ) 投与群

体重 200g 前後の雄 Wistar rat に生理的食塩水に溶解した PQ (4.8mg/ml, 武田薬品工業, 大阪) 20~40mg/kg を尾静脈より1回投与し, 投与直後~1週間の経過で1~3匹ずつ経時的に屠殺し, 肺組織を前述の方法と同様に固定および HID, HID-TCH-SP, PEI による各染色を行い電顕組織化学的に観察するとともに, 従来の1%酢酸ウラニールと4%クエン酸鉛で二重染色した透過型電顕像および3 $\mu$ m のパラフィン切片にヘマトキシリン・エオジン (H. E) 染色を施した光顕的観察も行った。

### 2. Pneumotoxin (PT) 投与群

#### a. PTの作製

体重 300g 前後の雄 Wistar rat 30匹を用いて, エーテル麻酔下で腹大動脈より 37°C に温めた生理的食塩水 (生食) を灌流し, 取り出した肺を太い気管支および血管を取り除き細切し, 湿重量を量り 25mg/ml の割合に生食を加え, ミキサー (Ultra-turrax, JANKE and KUNKEL, West Germany) および超音波破砕機 (ヒートシステム社 W375A, New York) により細片化したものを抗原液とし, 倍容積の Freund's complete adjuvant (Iatron Lab., Tokyo) とともに2週間おき4回, 体重 2.5kg 前後の雄家兎6羽 (安曇農協, 豊科) の後足蹠と背部の皮下に免疫した。最終免疫後2週間経過した時点で採血し, 血清を分離しPTとし, 補体の非働化後, ラットの赤血球で吸着したものを用いた。

#### b. PTの投与

体重 200g 前後の雄 Wistar rat にPT 1.5~5ml/kg を尾静脈より1回投与し, 投与直後~2週間の経過で経時的に屠殺。肺組織を前述と同様に固定, 染色を行い, 電顕組織化学的, 電顕的および光顕的観察を行うとともに, 肺および腎臓について灌流固定後凍結切片を作製し, fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識ヤギ抗ウサギ IgG および抗ラット IgG (医学生物学研究所, 名古屋) による直接蛍光抗体法<sup>14)</sup>での観察も, 落射型蛍光顕微鏡 (Nikon Optiphot XF-EFD, 日本光学, 東京) を用いB励起法 (波長 495nm, IF410~485: 励起フィルター, 515W: 吸収フィルター) にて行った。なお, 対照として等量の生食のみを投与し

たラットを用いた。

## III 結 果

### A 正常ラット肺胞壁の AS

HID染色により正常ラット肺胞壁基底膜は, I型肺胞上皮基底膜 (ABM: I) の肺胞腔側 (lamina rara externa: LRE) に, 電子密度は低いものの, 対照 (Fig. 1 a) と比べると明らかな線状の陽性部を認めた (Fig. 1 b)。変法である HID-TCH-SP 染色は, 同部をより電子密度の高い反応産物として示す (Fig. 1 c) とともに, HID染色では明らかでなかった ABM: I のLRE以外の部分, 血管内皮下基底膜 (CBM) (Fig. 1 d) およびII型肺胞上皮基底膜 (ABM: II) (Fig. 1 e) においても, 基底膜全体に点在するまばらな反応産物を染め出した。それらの分布は thin side, thick side を問わず同等であった。以上の陽性部は, 各種酵素消化法のうちヘパリチナーゼでのみ消化され (Fig. 1 f), その他の酵素には抵抗性であることから, ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HS-PG) であることが示された。なお, 基底膜以外の部位では, sulfomucin に富む<sup>15)</sup> II型肺胞上皮の surface coat (Fig. 1 e) および間質の膠原線維上に反応産物を認め, 後者はコンドロイチナーゼABCに感受性を示し, コンドロイチン4/6硫酸, あるいはデルマトン硫酸を含むことが示唆された。なお, 強拡大写真 (Fig. 1 c, d) で認められる血管内皮細胞表面のまばらな銀粒子の沈着は, オスミウム後固定による非特異的なものである。一方, PEI染色でも同様に, ABM: I のLREには1列に配列する直径約 10nm 前後の粒子状の反応産物が (Fig. 1 g), それ以外の基底膜上にはまばらに配列する反応産物が認められた。基底膜以外には, 間質の膠原線維上に, 規則正しく配列する反応産物を認めた (Fig. 1 h)。以上より肺胞壁基底膜は HS-PG で構成される AS により最外層にあたる ABM: I のLRE に強い charge barrier が存在することが示された (Fig. 2)。

### B 透過亢進型急性肺水腫

#### 1. PQ投与群

a. 肉眼的観察: PQ投与後, 高濃度投与群では3時間頃より, 低濃度投与群では2日目頃より動作緩慢を認め, しだいに内眼角部の血性分泌物の付着, 頻呼吸, 口腔・鼻腔より泡沫状分泌物の流出等をきたした。屠殺解剖所見では, いずれも極期には全身諸臓器のうっ血が見られ, 肺は重量感を増し, 巣状肺出血が散見

された。

b. 光顕的所見：(25mg/kg 投与群の経時的変化) 投与後30時間で、末梢毛細血管領域を含む小静脈のうっ血に加えて、直径約 100  $\mu\text{m}$  以上の血管の周囲間質の水腫性拡張が見られ、肺胞は部分的に虚脱し、一方で気腔拡張の不規則性を示し、II型上皮細胞の腫大および肺胞腔への脱落が観察された。また、胸膜直下に肺胞内水腫を認めた (Fig. 3a)。48時間後には、上記の変化が一層著明となり、肺胞壁は間質細胞の顕在化、組織球様細胞の浸潤、多形核白血球 (PMN) の遊走、うっ血等により厚みを増した (Fig. 3b)。以後肺胞内水腫は全体にわたり観察されるようになり、壁の肥厚も一層強まり (Fig. 3c)、巣状肺出血も散見された。長期生存例の1週間後の所見として、肺胞腔滲出物の器質化や線維化が認められた (Fig. 3d)。

c. 電顕的所見：電顕的には、経時的には光顕像を裏付けるミトコンドリアおよび層板小体の膨化、微絨毛の減少等の変性傾向を示すII型上皮細胞の増加と脱落、線維芽細胞、脂肪滴を含む中隔細胞の増殖と線維増生・再生II型上皮細胞による壁の肥厚が認められたが、水腫性の変化としては、まずI型上皮細胞の胞体の空胞化・水腫性の膨化 (Fig. 4a) が認められ、変化の強い場所では、肺胞腔へ腫大した細胞質がバルーン状に突出する所見も観察された。この変化は、早いものでは投与後4時間の時点で認められ、thin sideにおいて優位であった。その後、経過とともにI型上皮細胞は変性・剥離をきたし、2日後には、肺胞腔に露

出あるいは傷害された上皮細胞の破砕物やフィブリンを付着した基底膜が観察されるようになった (Fig. 4b)。一方内皮細胞は、胞体の電子密度および小飲空胞の増加を早期に認め、しだいに胞体の凹凸不整の腫大を thick side に、また時に、内皮下浮腫による部分的な剥離を thin side にそれぞれ優位に認めるようになった (Fig. 4c)。しかしそれ以上の変化はその後とも認められず、上皮細胞傷害が著明な時期でも内皮細胞は保たれていた。さらに thick side では、上皮細胞の膨化が出現する時期と相前後して、間質浮腫が認められ (Fig. 4c)、しだいに膠原線維の産生にあずかる中隔細胞の数が増し、線維増生へと進展していった (Fig. 4d)。基底膜は上皮細胞傷害が高度な部でも保たれていた。また経過中、上皮および内皮細胞の接着装置には、哆開等の変化は認めなかった。

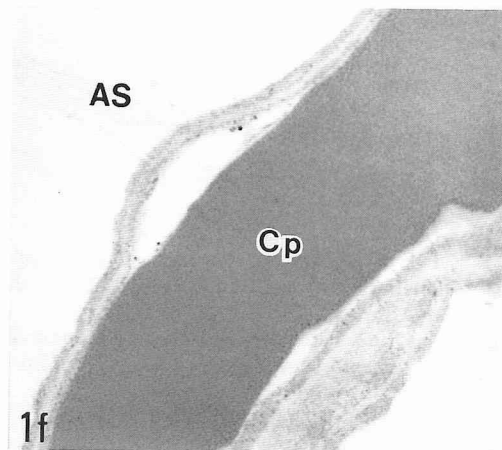
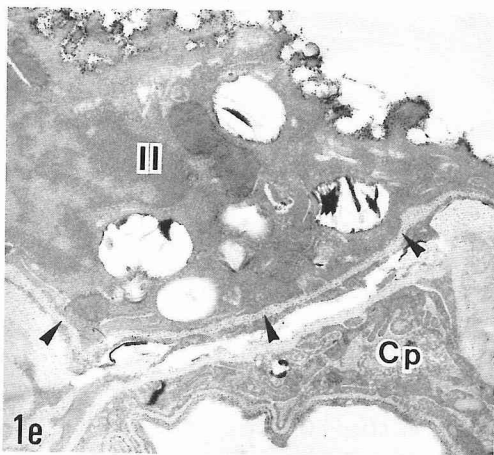
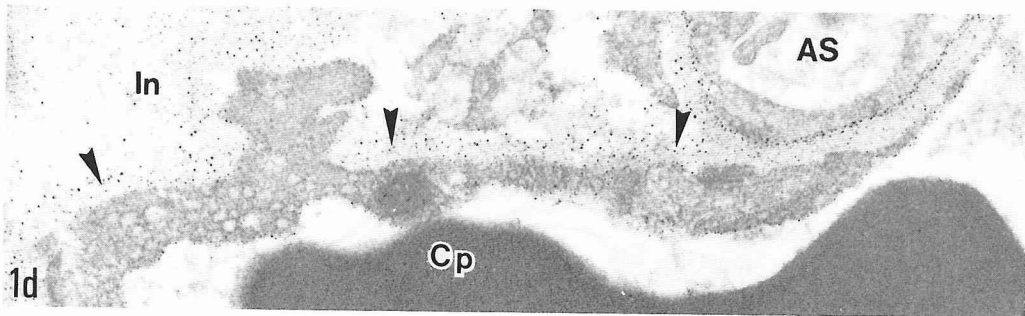
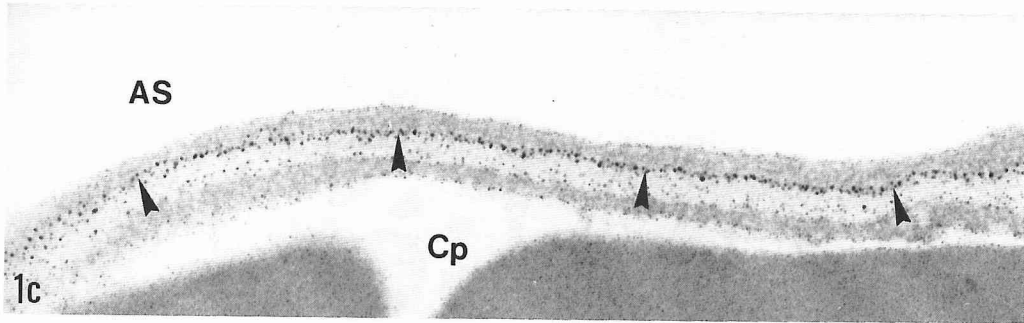
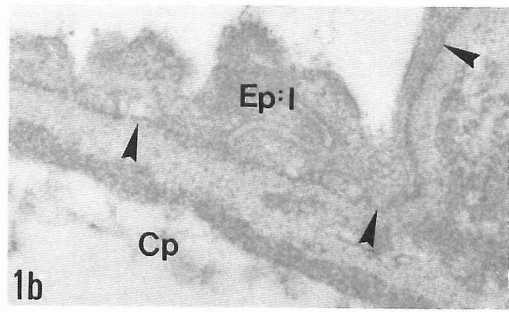
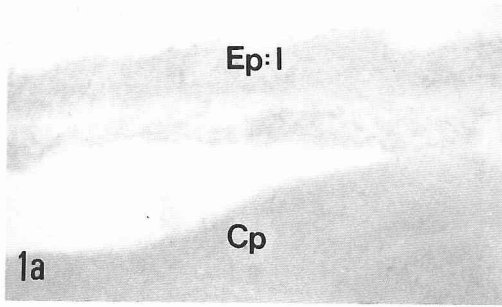
d. 電顕組織化学的所見：HID-TCH-SP法の基底膜における染色性は、健常に保たれている部分と同様、上皮細胞の空胞化や膨化が認められる部でも (Fig. 5a)、高度の上皮細胞傷害のため肺胞腔に露出した部においても (Fig. 5b) 低下を認めなかった。それは遊走細胞や滲出細胞の有無に関係なく (Fig. 5c)、thin side, thick side いずれにおいても同様であった (Fig. 5d)。さらに PEI法にて、その反応産物の分布に変化を認めることはできなかった (Fig. 5e,f)。また、II型肺胞上皮の surface coat および間質の膠原線維の染色性にも変化はなかった。

Fig. 1 Ultrastructural histochemical findings on the anionic sites (AS) of alveolar wall in normal rat.

- a. Control sample (without incubation in the mixed diamines).  $\times 24,000$
- b. HID stain: Though weak, the lamina rara externa (LRE) of the basement membrane under alveolar type I cells (ABM: I) shows reactivity ( $\blacktriangle$ ), in contrast to the control sample (a).  $\times 24,000$
- c. HID-TCH-SP stain: HID-reactivity of the LRE ( $\blacktriangle$ ) is emphasized by this method. Sparse reactivity of the lamina densa (LD) and lamina rara interna (LRI) is also revealed.  $\times 40,000$
- d. HID-TCH-SP stain: The capillary basement membrane (CBM) in the thick side also shows sparse reactivity ( $\blacktriangle$ ).  $\times 20,000$
- e. HID-TCH-SP stain: The basement membrane under alveolar type II cells (ABM: II) also shows sparse reactivity ( $\blacktriangle$ ), while the alveolar surface of type II pneumocyte is strongly stained.  $\times 12,000$
- f. HID-TCH-SP stain after heparitinase digestion: Loss of reactivity of all basement membranes including the LRE of the ABM: I is shown.  $\times 18,000$
- g. PEI stain: The PEI-stained granules, approximately 10 nm in diameter, are found regularly distributed along the LRE of the ABM: I ( $\blacktriangle$ ).  $\times 18,000$
- h. PEI stain: The CBM shows sparse reactivity ( $\blacktriangle$ ) and interstitial collagen fibers (Co) show regular reactivity.  $\times 18,000$

AS: alveolar space. Cp: capillary. In: interstitium.

肺胞壁基底膜の charge barrier



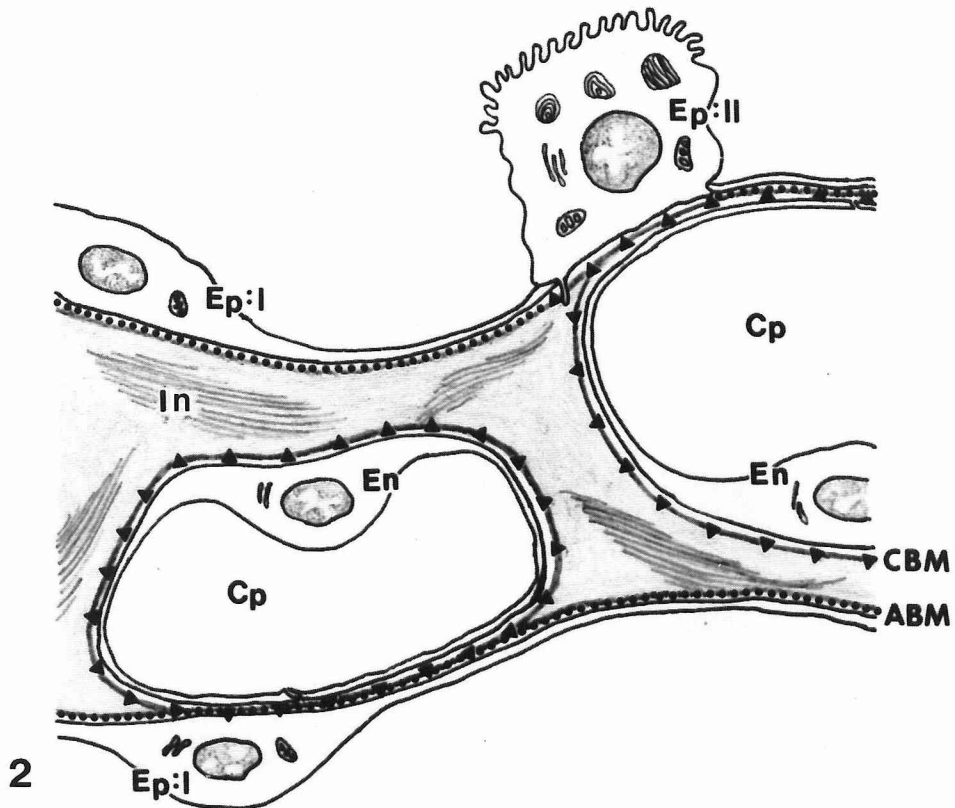
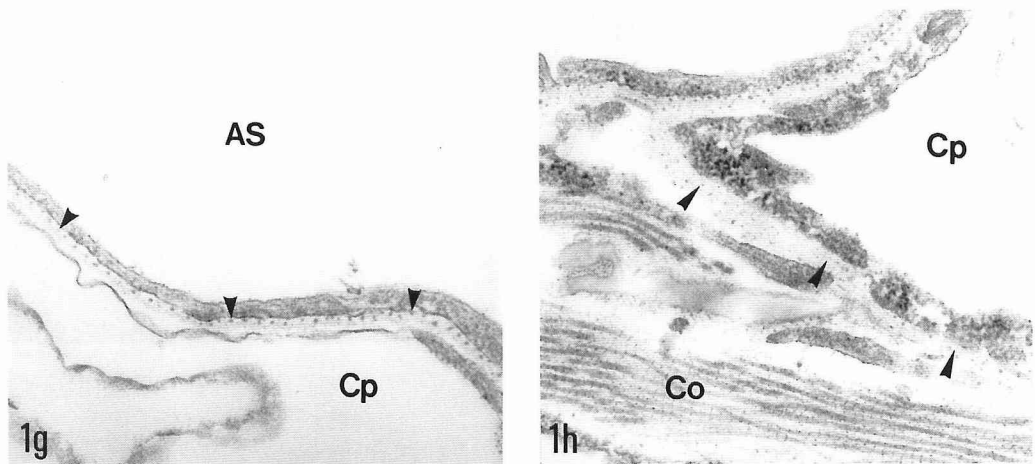
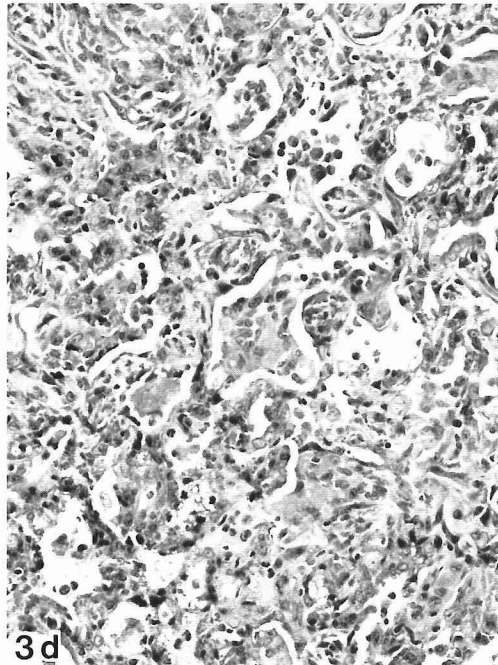
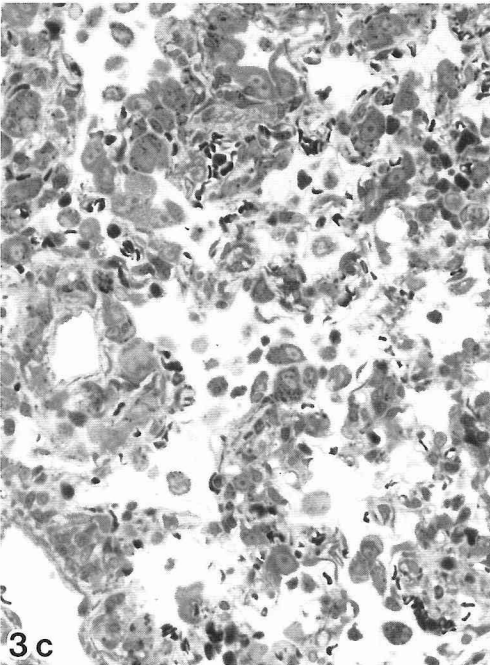
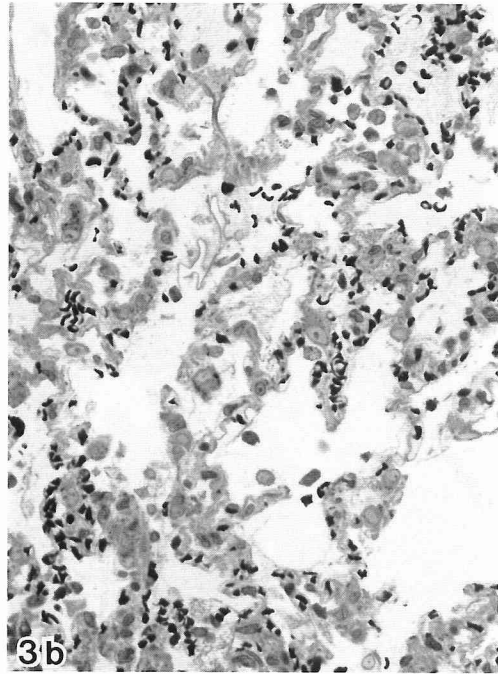
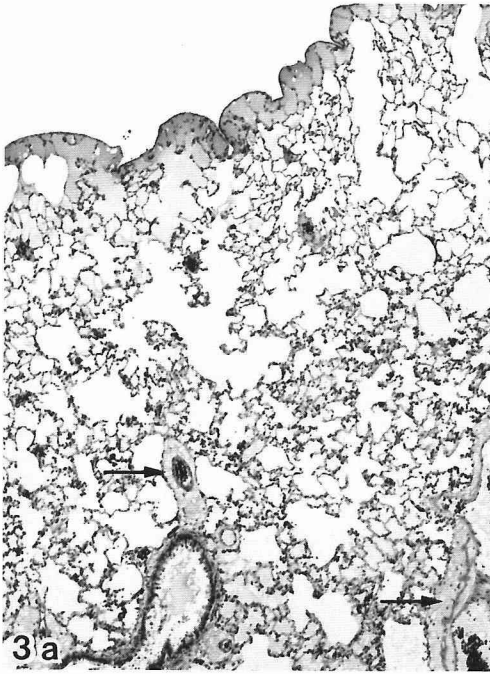


Fig. 2 Schematic diagram of the alveolar wall basement membrane charge barrier.  
 ● : Distribution of high and regular charge density anionic sites due to HS-PG in the LRE of the ABM: I.  
 ▲ : Weak and sparse charge density anionic sites in the CBM, ABM: I and ABM: II.  
 Ep: I : alveolar type I epithelium.      Ep: II : alveolar type II epithelium.

Fig. 3 Light micrographs of the lung from the rat after PQ (25mg/kg) injection.  
 a. Thirty hours after injection: Expansion of perivascular connective tissue sheaths (—→) due to interstitial edema and subpleural intra-alveolar edema are seen. H. E stain. ×40



- b. Two days after injection: The alveolar walls are mildly thickened by proliferating cell component and the alveolar lumen contains detached pneumocytes, macrophages and red blood cells, locally accompanying exudated fibrin. Toluidin blue (TB) stain.  $\times 260$
- c. Five days after injection: Thickening of the alveolar walls and proliferation of cell component in the alveolar lumen are more intense. TB stain.  $\times 260$
- d. One week after injection: Air space is decreased by fibrosis of the alveolar walls and organization of intra-alveolar exudates. H. E stain.  $\times 170$

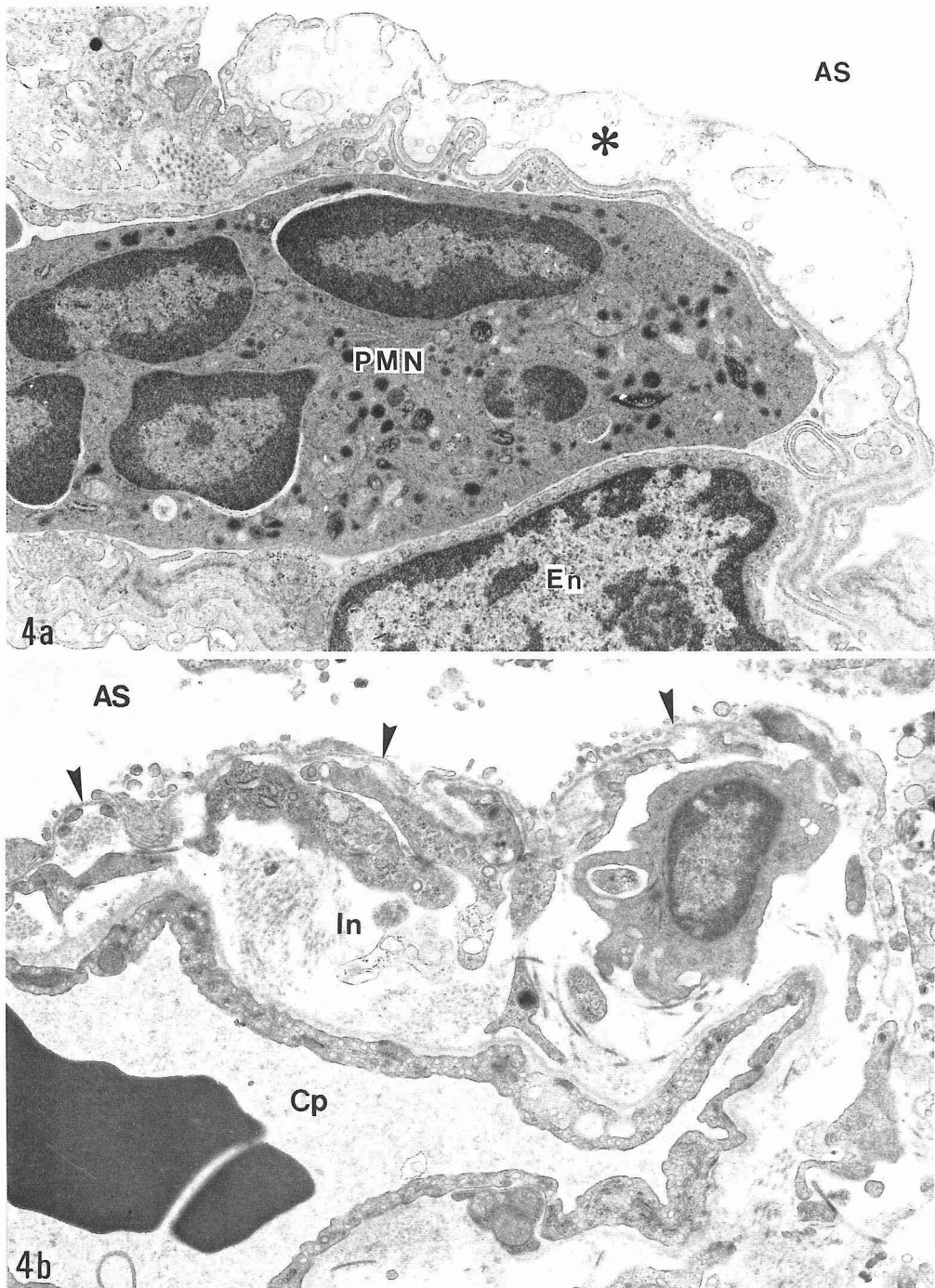
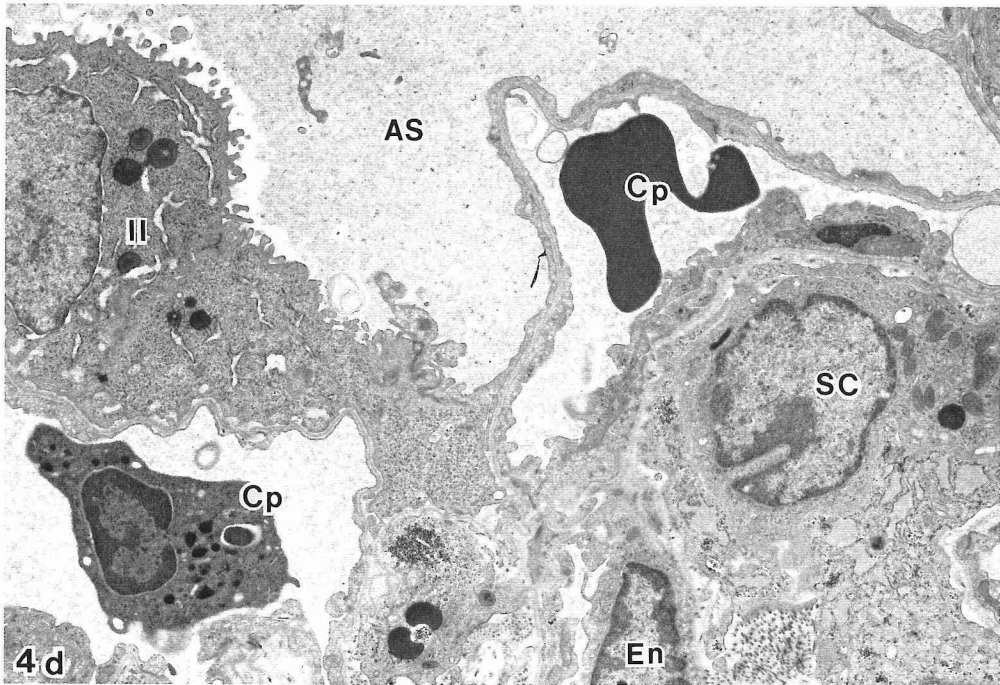
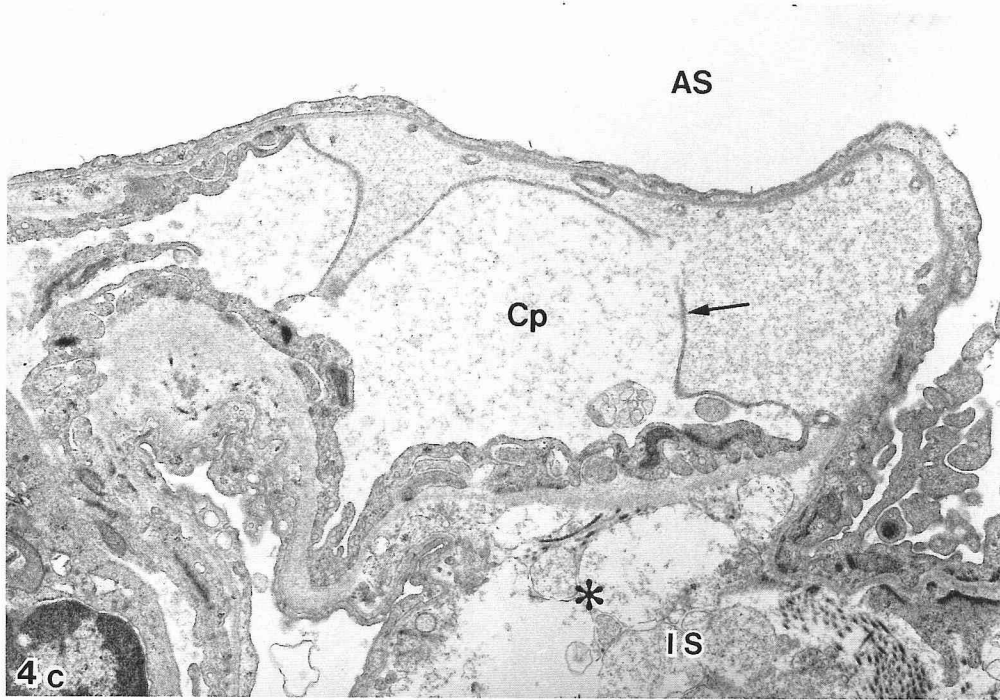


Fig. 4 Electron micrographs of the lung from the rat after PQ injection.

- a. Four hours after 40mg/kg injection: The swollen cytoplasm (\*) of type I pneumocyte is seen in the thin side.  $\times 6,000$
- b. Two days after 25mg/kg injection: The epithelial basement membrane is denuded (▲) by disintegration of the alveolar epithelium and interstitial edema is seen in the thick side. The capillary endothelium is preserved, though pinocytotic vesicles are increased.  $\times 6,000$





- c. Four hours after 40mg/kg injection: Abnormal thickening of the endothelium is seen in the thick side and focal detachment due to subendothelial edema (←) is seen in the thin side. Interstitial edema is also observed in the thick side (\*).  $\times 6,000$
- d. Five days after 20mg/kg injection: The alveolar septum is thickened by proliferating septal cells (SC) with collagen fibers. On the left of the figure, a regenerated type II pneumocyte (II) is present and repairs the denuded basement membrane.  $\times 3,600$  En: endothelium.

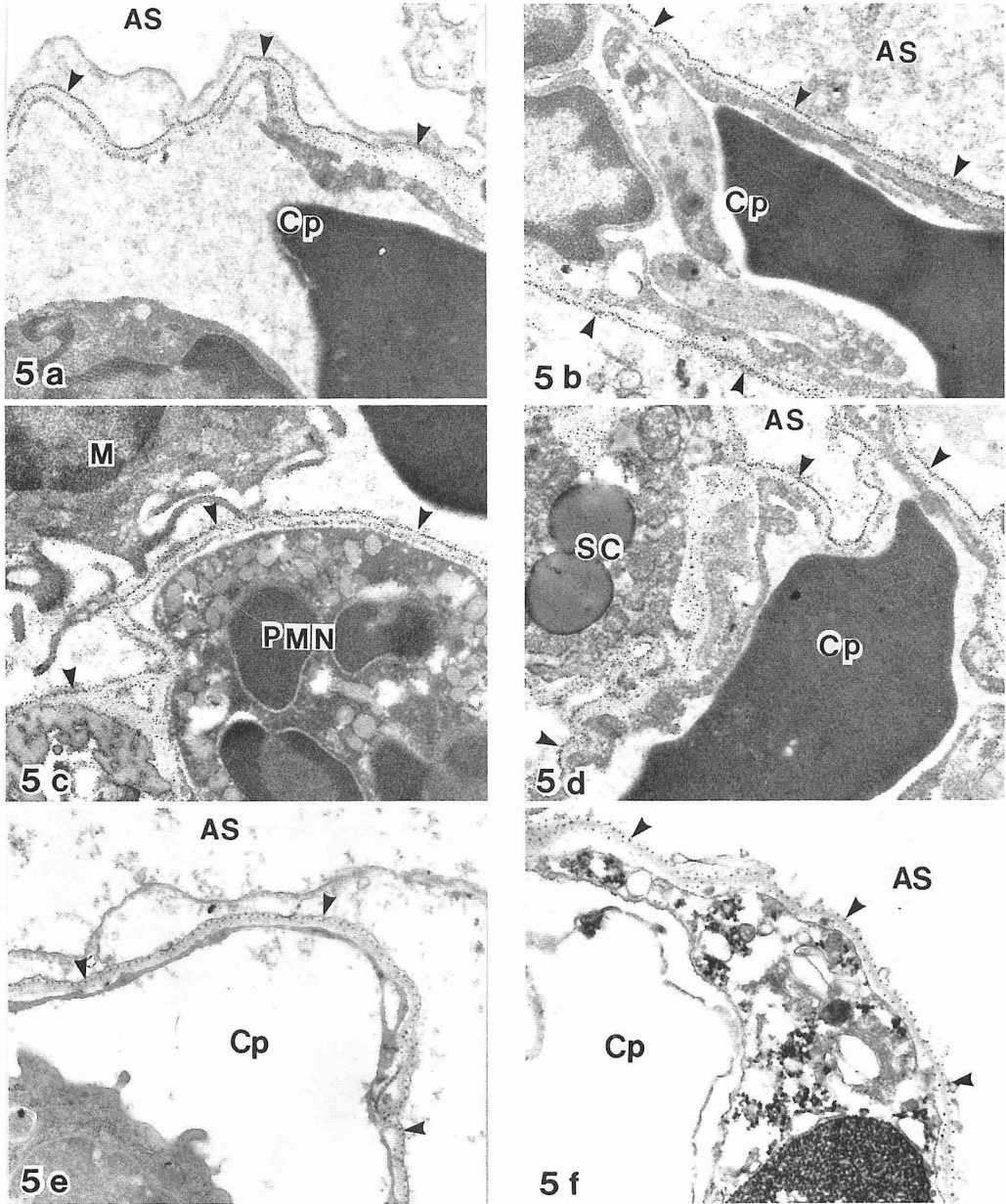


Fig. 5 Ultrastructural histochemical findings of the alveolar wall basement membrane from the rat after PQ injection.

a. HID-TCH-SP stain: Swelling and vacuolation of the type I pneumocyte are seen, but staining pattern with the HID-TCH-SP method is not affected (▲).  $\times 12,000$  b. HID-TCH-SP stain: The epithelial basement membrane is denuded by detachment of the epithelium, but staining pattern with the HID-TCH-SP method is not affected (▲).  $\times 12,000$  c. HID-TCH-SP stain: Polymorphonuclear leukocyte (PMN) from the capillary lumen and macrophage (M) from the alveolar space approach the epithelial basement membrane respectively, but they do not affect the HS-PG distribution (▲).  $\times 12,000$  d. HID-TCH-SP stain: Detachment of the epithelium is seen irrespective of side, but staining pattern with the HID-TCH-SP method is not affected (▲).  $\times 12,000$  e. PEI stain: Severe swelling of the type I pneumocyte is seen, but there is no change in the distribution of PEI-stained granules on the LRE (▲).  $\times 8,400$  f. PEI stain: The epithelial detachment does not affect the distribution of PEI-stained granules (▲).  $\times 12,000$

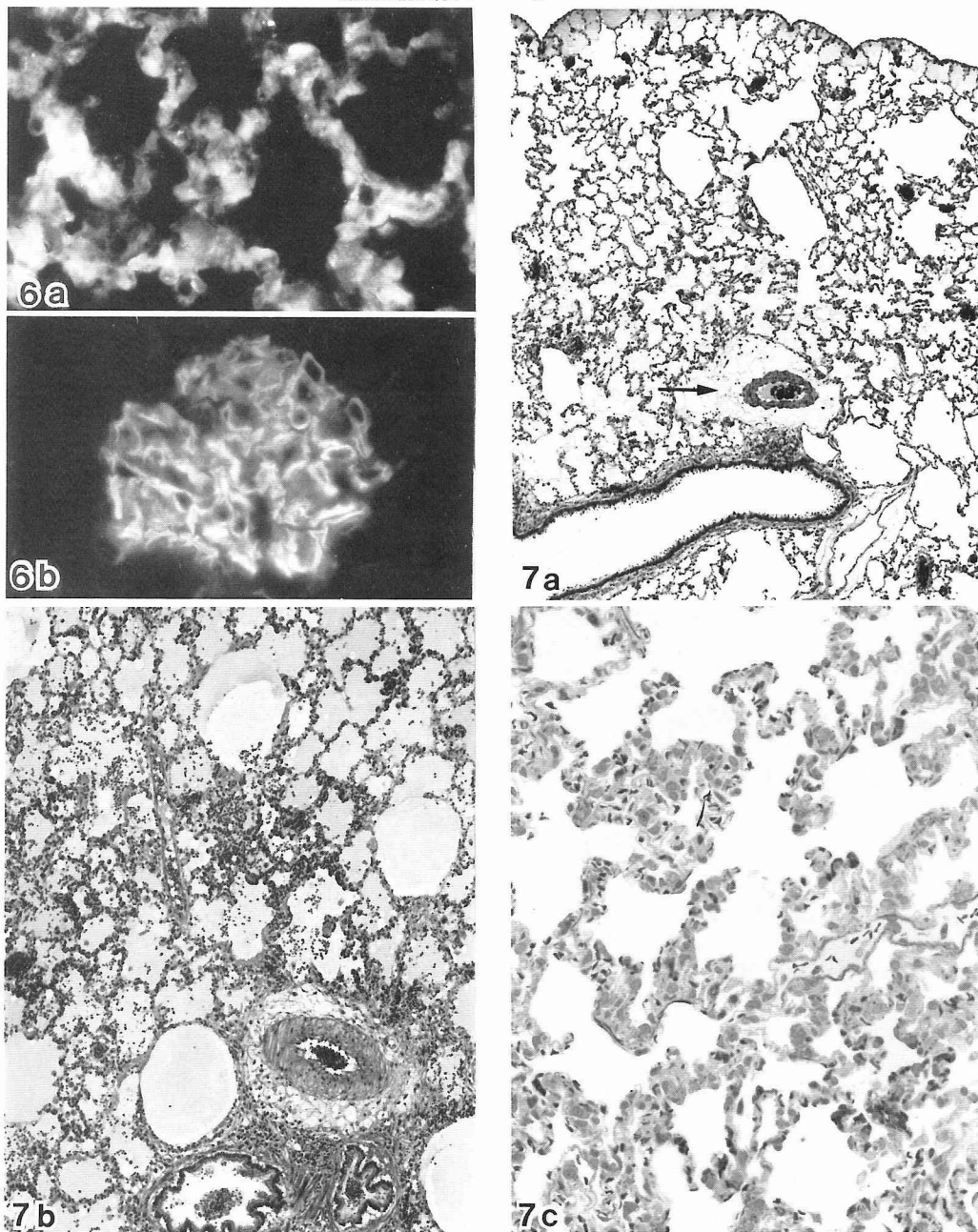
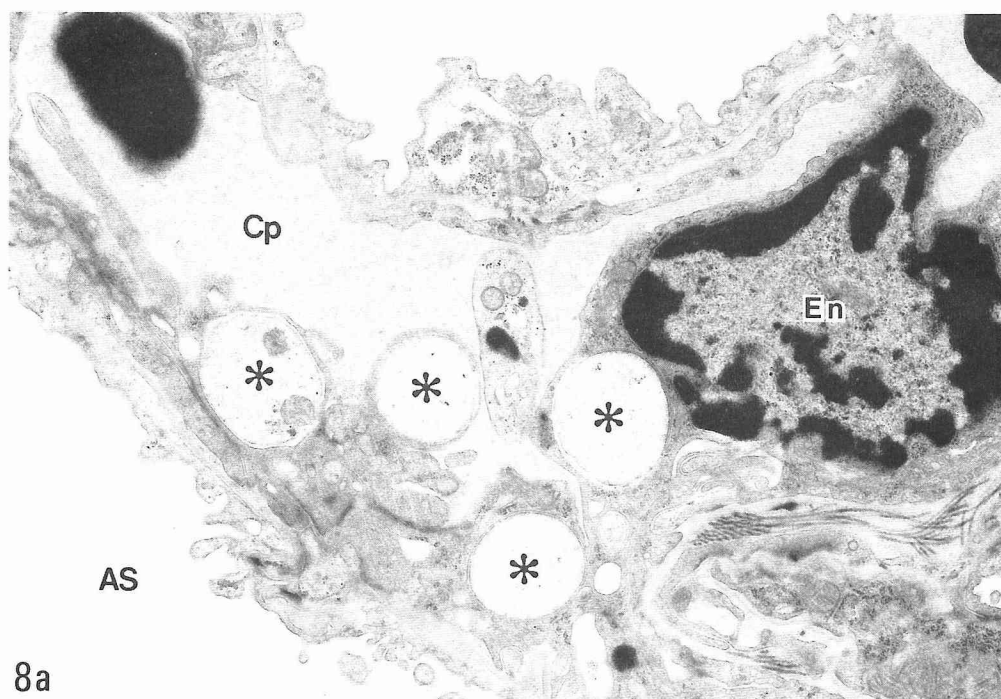
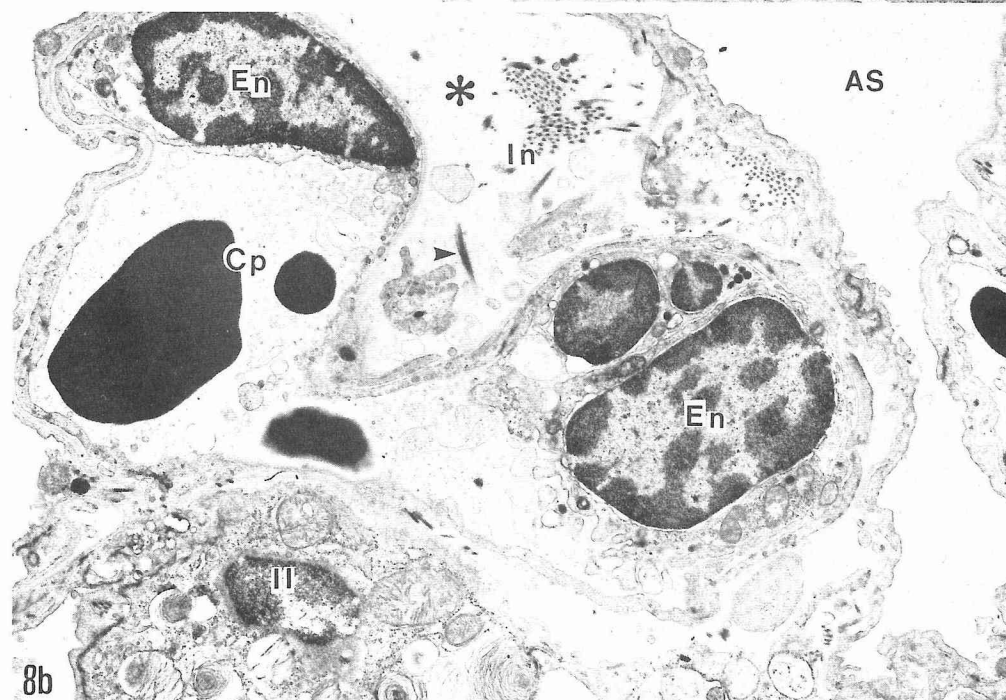


Fig. 6 Immunofluorescent light micrographs of the lung and kidney from the rat sacrificed soon after PT injection. (Blue Excitation.)  
 a. Alveolus: Rabbit IgG is demonstrated along the alveolar walls.  $\times 520$  b. Glomerulus: Rabbit IgG is demonstrated along the glomerular capillary loops.  $\times 520$

Fig. 7 Light micrographs of the lung from the rat after PT (2ml/kg) injection.  
 a. Thirty minutes after injection: Expansion of perivascular connective tissue sheaths (—) due to interstitial edema and subpleural intra-alveolar edema are seen. H. E stain.  $\times 40$   
 b. Thirty minutes after injection: Intra-alveolar edema; intra-alveolar hemorrhage is noticed in addition to congestion. H. E stain.  $\times 60$  c. One week after injection: Alveoli show a tendency to collapse and a mild septal expansion due to proliferation of the interstitial cell is seen. TB stain.  $\times 20$



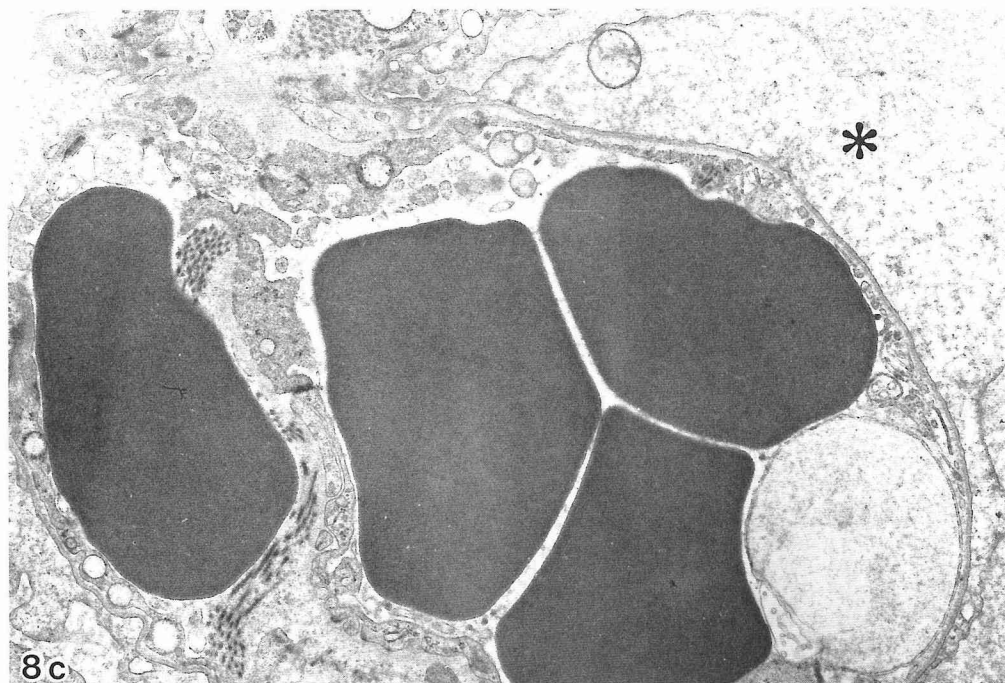
8a



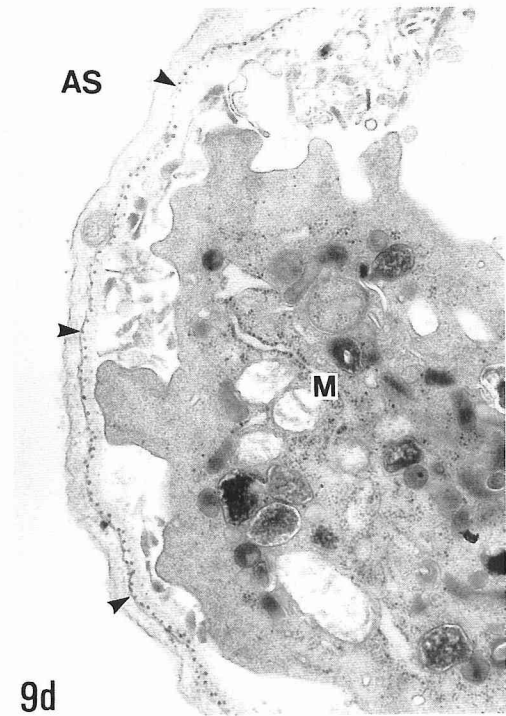
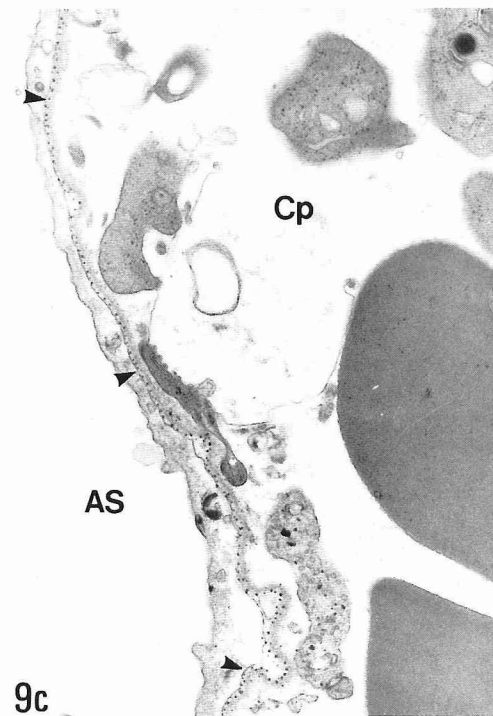
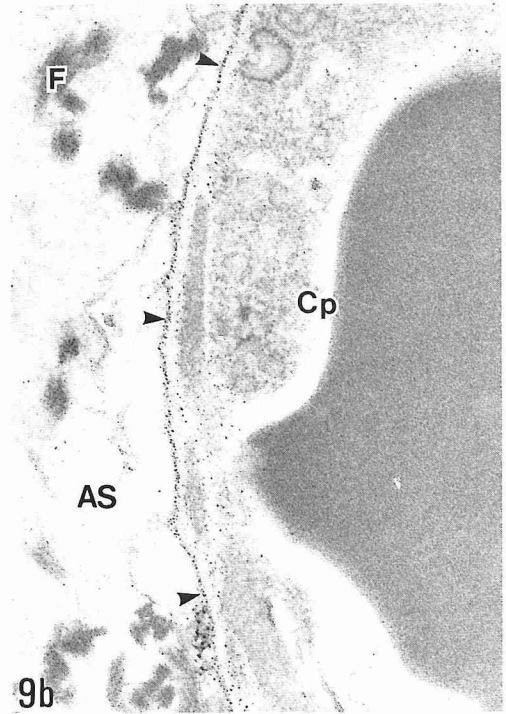
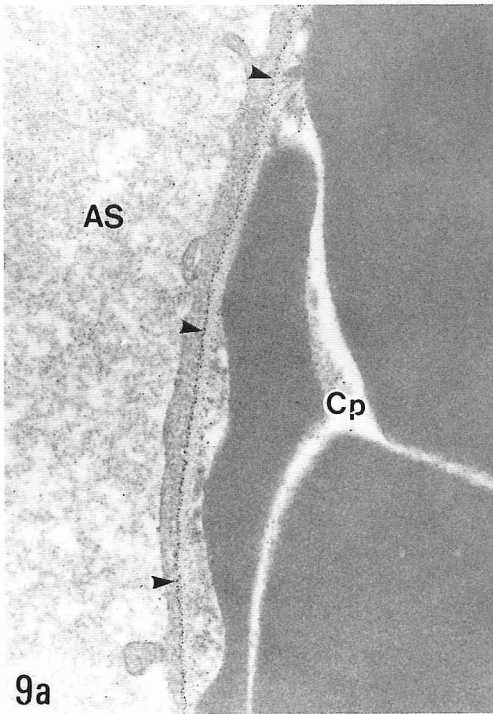
8b

Fig. 8 Electron micrographs of the lung from the rat after PT injection.

- a. One hour after 2ml/kg injection: Vacuolation (\*) and abnormal thickening of the endothelium is seen.  $\times 6,000$
- b. One hour after 3ml/kg injection: Degenerative endothelium and type II pneumocyte which show alteration in the structure of mitochondria are seen, and severe interstitial edema (\*) with exudation of fibrin (▲) is also observed.  $\times 36,000$



- c. Ten minutes after 5ml/kg injection: Disintegration of the endothelium and swelling of the type I pneumocyte (\*) are seen, but the basement membrane between them is preserved.  $\times 6,000$
- d. Thirty minutes after 3ml/kg injection: Numerous platelets (Pl) are present in the capillary lumen and adhere to the injured endothelium. The cytoplasm of the epithelium is less electron-dense than normal.  $\times 6,000$



## 2. P T 投与群

a. 肉眼的観察：高濃度投与群では、数分～数十分のうちに、喘鳴を伴った呼吸困難とともに、口腔・鼻腔よりの泡沫状流出物の流涎が認められ、死に至るものも観察されたが、個体差が著しく、同濃度投与でも、投与後動作緩慢および軽い喘鳴を認めるもしだいに回復するものも観察され、P Q 投与群が進行性（非可逆性）の変化を呈すのと対照的であった。

b. 蛍光抗体法：P T 投与直後にはウサギ IgG が肺胞壁および糸球体係蹄壁に沿って連続性に強く蛍光陽性となった (Fig. 6a, b)。ラット IgG はいずれにおいても陰性であったが、2 週間後にはウサギ IgG の蛍光は減弱し、かわってラット IgG が肺胞壁および糸球体係蹄壁に線状に陽性所見を呈した。対照群はいずれの時点においても、ウサギ IgG・ラット IgG とともに陰性であった。

c. 光顕的所見：(2 ml/kg 投与群の経時的变化) 約半数が早期に死に至る致死量と考えられる 2 ml/kg 投与にて、喘鳴の聞こえる投与後 30 分の時点では、血管周囲間質の水腫性拡大および胸膜直下の肺胞内水腫が認められた (Fig. 7a)。一方、この時点までに死に至ったものでは、肺胞内水腫は胸膜下に限局せず広い範囲にわたり観察され、肺胞腔内への漏出性出血も散見された (Fig. 7b)。投与後急性期を脱した 2 時間後の時点では、血管周囲間質の水腫性拡大は依然として認められたが、肺胞内水腫は少範囲に限局しており、かわって II 型上皮細胞の脱落および肺胞虚脱傾向、間質細胞顕在化、うっ血による中隔拡大が主な所見となった。6 時間後には、血管周囲間質の拡大および肺胞内水腫は認められず、II 型上皮細胞の脱落、不規則な肺胞虚脱および中隔拡大が認められ、その後もほぼ同様の所見を呈しており (Fig. 7c)、P Q 投与群で観察された線維化へと進展する進行性の変化は認められなかった。

d. 電顕的所見：P T 致死量投与早期の肺胞壁の変化としては、まず内皮細胞の胞体の空胞化 (Fig. 8a) および凹凸不整の腫大が、P Q 投与群で観察されたのと同じ傾向、すなわち thick side に主として認められ、時に内皮下浮腫による部分的な剝離が、やはり P Q 投与群と同様 thin side において観察された。上皮細胞は、I 型の胞体の凹凸と軽度の淡明化が、II 型にはミトコンドリアおよび層板小体の膨化等の変性傾向が認められた。また thick side の間質浮腫は、フィブリンの析出を伴い、P Q 投与群に比べ強い印象を受けた (Fig. 8b)。一方、症状の回復が得られず悪化したものは、内皮細胞の傷害が高度で、水腫性の膨化・崩壊・脱落が認められ、I 型上皮細胞の胞体の水腫性の膨化も、thin side, thick side を問わず認められた (Fig. 8c)。また、内皮細胞の傷害が強い場所では、血小板の血管壁への付着 (Fig. 8d)、PMN の遊走等の所見がめだつた。さらに、肺胞腔へのフィブリンの析出も認められた。経時的に観察できたものについては、thick side における間質浮腫はしだいに軽減し、上皮および内皮の変化も軽微となり、P Q 投与群で著しい肺胞壁肥厚が認められたのと同じ時期には、中隔細胞出現による肺胞中隔の軽度の肥厚を残すにとどまった。基底膜の明らかな傷害は認められなかった。また、上皮および内皮細胞の接着装置にも著変を認めなかった。

e. 電顕組織化学的所見：P T 投与群も P Q 投与群と同様に、HID-TCH-SP 法 (Fig. 9a, b) および PEI 法 (Fig. 9c, d) にても、内皮・上皮細胞の傷害および遊走細胞の出現の有無にかかわらず、いずれの部位でも、染色性すなわち反応産物の分布に著変を認めなかった。

## IV 考 察

基底膜は周知のように、物質通過の関門としての機

Fig. 9 Ultrastructural histochemical findings of the alveolar wall basement membrane from the rat after PT injection.

- HID-TCH-SP stain: Though the epithelium is preserved, the endothelium is damaged, but staining pattern with the HID-TCH-SP method is not affected (▲). ×14,400
- HID-TCH-SP stain: Swelling of the epithelium and exudation of fibrin (F) to the alveolar space in addition to the endothelial injury are seen, but staining pattern with the HID-TCH-SP method is not affected (▲). ×24,000
- PEI stain: Detachment of the endothelium is seen, but there is no change in the distribution of PEI-stained granules on the LRE (▲). ×12,000
- PEI stain: The endothelial detachment and macrophage infiltration do not affect the distribution of PEI-stained granules (▲). ×14,000

能を持っているが、基底膜がすべて同一の微細構造と構成成分を持つか否かは明らかでない。組織の機能によって構造に差異があることは考えうることで、この異質性は逆に、個々の組織の機能を理解する上で重要と思われる。現在のところ基底膜の濾過作用は、腎糸球体基底膜 (GBM) において最も詳しく研究されている。すなわち、その微細構造から推定される器械的濾過を規定する size barrier function<sup>16)17)</sup> とともに、構成成分のひとつであるグリコサミノグリカン (GAG) の陰性荷電に基づく電氣的濾過を規定する charge barrier function<sup>2)3)</sup> があげられる。後者については、GAGのうちでも、その糖鎖中に硫酸基とカルボキシル基を持つヘパラン硫酸プロテオグリカン (HS-PG) が重要であると考えられるようになり、GBMの外透明層 (LRE) に、その存在が証明されている<sup>18)</sup>。

肺胞壁はその構造を考えた場合、ことに thin side の基底膜は、上皮細胞と内皮細胞の間に1層介在しており、機能的にも外界との物質輸送の接点という点で GBM と類似している。さらに臨床的にもグッドパスチャー症候群で認められる、肺胞および糸球体に対する抗基底膜抗体が存在する点で、両者は免疫学的に抗原の交叉性が認められている。これらは、両者の基底膜の共通性を示唆する興味ある事実である。

さて、肺胞壁基底膜における AS に関しては、cationic probes であるルテニウムレッド (RR)<sup>19)</sup>、コロイド鉄 (CI)<sup>15)</sup> さらに H I D<sup>15)</sup>、HID-TCH-SP<sup>6)</sup> および P E I<sup>20)</sup> を用いて、その局在が超微形態的に検索されており、また、GAG 水解酵素による酵素消化法にて、GAG 同定の試みがなされている<sup>15)19)</sup>。これらの染色法のうち、RR は試料内への浸透がきわめて悪く、また、CI は高度に硫酸化されたムコ物質は染まりにくく、むしろシアロムチンに強い親和性を有する<sup>21)22)</sup> という性質から、GAG の同定には必ずしも適切でない。そこで今回は、硫酸化ムコ物質に高い特異性が得られ、HS-PG の検出には最適と思われる従来の H I D 法に加え、その変法である HID-TCH-SP 法を施行し、その染色性を比較するとともに、低分子陽荷電染料で組織浸透性に優れ、簡便に行える P E I 法による検索を行った。

その結果、正常ラットの肺胞壁基底膜の AS は、H I D 法では従来の報告<sup>15)</sup> と同様、肺胞壁をひろく覆っている I 型肺胞上皮下基底膜 (ABM: I) の肺胞腔側 (LRE) に線状に染まる陽性部を認めた。また、

ヘパリチナーゼでのみ完全に消化され、その他の酵素には抵抗性であることから、HS-PG であることが示された。さらに、この H I D 陽性部は、H I D による反応産物に銀粒子を結合させ陽性部を強調してみることのできる HID-TCH-SP 法にて、より明瞭となった。また同染色は、L R E 以外の ABM: I, II 型肺胞上皮下基底膜 (ABM: II) および血管内皮下基底膜 (CBM) においても、弱いながらもばらばらに染まる反応産物を認めた。この肺胞上皮下基底膜の所見は、ABM: I と ABM: II の相違を HID-TCH-SP 法で検索した Sannes<sup>5)</sup> の報告と一致していた。P E I 法では、GAG の同定はできなかったものの、その反応産物の局在は HID-TCH-SP 法の結果と一致していた。

これら正常肺胞壁における AS の検索により得られた結果において、それぞれの組織化学的方法の特異性について、いくつかの問題が生じたので、この点に関してまず考察する。H I D 法により示された HS-PG の局在は、従来の報告と一致していたが、本法は硫酸基の検出においての特異性は高いものの感度はやや低い。つまり染色性が弱く陽性部の判読に困難があり、硫酸化ムコ物質が豊富に存在しないと、その検出が困難となり、偽陰性としてしまう可能性があると思われる。その点、アルデヒド類と反応するヒドラジン基 ( $-NHNH_2$ ) とオスミウム酸あるいは蛋白銀 (SP) を還元するチオカルバミノ基 ( $-SCNH_2$ ) を含むチオカルボヒドラジド ( $H_2NNHCSNHNH_2$ : TCH) で架橋し、H I D 反応産物を強調する HID-TCH-SP 法は、硫酸化ムコ物質の検出により高感度となり、H I D 法で陽性を呈さなかった部位も染まるようになる。今回の H I D 法と HID-TCH-SP 法による陽性部の差異は、この原因によると考えられる。次に、ポリアニオンと静電的に結合する P E I 法であるが、その結果は、やはり同様の染色機構を持つ RR を用いた従来の報告<sup>19)</sup> と一致していた。P E I および RR は、硫酸基に限らず陰性に荷電している部位にひろく結合し、特異性は低いものの、特に低分子で浸透性に優れた P E I は、染色法も簡便で AS の検出には感度がよい。しかし P E I は、GA による前固定により反応性が失われやすいという性質<sup>23)</sup> があり、染色条件について検討の余地のある方法であろう。今回 H I D 法で陽性として認識できず、HID-TCH-SP 法で陽性となった部位は、ヘパリチナーゼ感受性を示し、少量のあるいはばらばらに HS-PG を含むものと考えられる。P E I 法による結果も同じことを示唆するが、さらに、硫酸基を含ま



ない、GBMの内透明層(LRI)で示されている<sup>18)</sup>ヒアルロン酸といったGAGを含む可能性も考えられる。

以上肺胞壁においては、ABM:IのLREにHS-PGによる強いchargeが存在し、その他の基底膜には、少量のHS-PGによる弱いchargeが存在することがわかった。それはthin side, thick sideを問わず同等で、sideによる分布の差はなかった。しかし、同じ肺胞上皮でもABM:IIにおいては、そのLREに強いchargeは存在せず、VacaroとBrody<sup>19)</sup>によると、II型肺胞上皮は、基底面で基底膜を貫く突起を出して直接間質に接するという所見を、電顕的にとらえており、明らかにI型肺胞上皮と異なり、より間質と密接な相互関係を持っているものと考えられる。それはたとえば、間質におきた異常をいち早く察知し、反応性の増殖へとつながるのかもしれない。いずれにせよII型上皮細胞の機能を解明する上で興味ある事実である。さらに、thin sideにおける1層の基底膜のLRE以外の部分は、thick sideの血管内皮下基底膜(CBM)と同じく強いchargeは存在しないことが示されたが、thin sideの基底膜は、上皮基底膜と内皮下基底膜が緻密層で融合して1層になったもので、すなわちその血管腔側は、CBMと同一であると考えれば、両者は一元的に理解することができる。Staub<sup>24)</sup>、Guytonら<sup>25)</sup>による水分移動を中心とした肺胞構造および生理的機能の概念によると、thick sideの結合間質が、水分移動の重要な交通路になっていると考えられているが、CBMに強いchargeが存在しないことは、血管腔から間質への物質通過を容易にするのに好都合で、正常の状態では、間質からリンパ管へと向かう経路により、異常な水分の貯留を防ぐ。一方、肺胞壁基底膜の最外層にあたるLREにおける強いchargeは、間質にいったん移動した物質が容易に肺胞腔へと移動しないように働いているものと理解でき、前述の概念を裏付ける形態的な1つの根拠となるものである。

ABM:IのLREにおけるHS-PGの局在は、GBMにおけるその局在と一致し、このことから、GBMで考えられているいわゆるcharge barrier functionとしての機構を備えている可能性を考えますが、実際に蛋白の漏出をきたす肺水腫状態におけるHS-PGによるchargeの変化に関する報告はない。肺水腫は肺血管外に異常な体液の貯留をきたした病的状態と定義されており、水出納のバランスがくずれ、肺胞間質組織あるいは肺胞腔内に水分の貯留がおこる。前者を

間質水腫、後者を肺胞内水腫と呼び、その発生にはいくつかの因子が複合して、肺毛細血管から血管外に水分が漏出し、血管外水分量の増加をきたすことになる。その因子としては、①肺毛細血管内圧の上昇。②血漿膠質滲透圧の低下。③肺胞毛細血管壁の透過性の亢進。④肺リンパ管流通の障害。⑤組織圧の低下。などが考えられており<sup>26)</sup>、これらの因子のうち何が主体的な役割を演じているかにより3つに大別される。すなわち①②が主因となるhydrostatic edema、③が主因となるpermeability edemaおよび④によるlymphatic edemaで、このうちhydrostatic edemaとpermeability edemaが最も一般的なものである<sup>27)</sup>。この透過性亢進に基づく肺水腫の大きな特徴は、漏出液の蛋白濃度がhydrostatic edemaのそれに比べて有意に高く、通常その患者の血清蛋白濃度の0.7以上とされている<sup>4)</sup>。その点に注目し、今回は従来より肺胞上皮細胞に傷害を与え、肺線維症へと進展する非可逆性の変化をおこすとされている肺毒性の強いパラコート(PQ)および実験的グッドパスチャー症候群類似モデルの作製に使われるpneumotoxin(PT)<sup>28)</sup>を用いて、いずれも尾静脈から1回投与にて透過亢進型肺水腫を惹起し、経時的観察を行った。PQには、生体組織に有害なスーパーオキシドおよび活性酸素の産生亢進作用のあることが、主として*in vitro*の実験などにより指摘されており<sup>29)</sup>、このスーパーオキシドの過量産生の結果、特に酸素依存性の強い肺組織に細胞障害が惹起されることが示唆されている。今回のPQ投与群で観察された肺胞傷害の経時的変化、すなわち早期にI型上皮細胞の水腫性の膨化を認め、しだいに剥離して基底膜の露出がおき、肺胞内滲出物の器質化および線維化による中隔の肥厚をきたすという経過は、従来のラットを用いた実験の報告<sup>30)31)</sup>と一致している。PQによる肺胞傷害は、用いる動物および投与方法により多少の違いがある<sup>32)33)</sup>と言われているが、ラットは線維化へ移行する変化をきたしやすく、ヒトの肺線維症の実験モデルとして有用と考えられている<sup>31)</sup>。一方PTは、馬腎炎におけるNephrotoxin(NT)と同様免疫学的機序により、heterologous IgGにより引きおこされるheterologous phaseと、heterologous phase IgGに対して産生されたautologous IgGにより引きおこされるautologous phaseの2相性の経過を示す病態を惹起すると考えられる。このことは、今回の肺胞壁および腎糸球体で観察されたウサギおよびラットの

IgG に対する抗体の経時的な蛍光所見の推移が示唆するところでもある。本研究で観察されたこの2つの肺水腫の特徴をまとめてみると、PQでは上皮細胞の傷害が強く、肺線維症へと進展する非可逆性の肺水腫が引き起こされたのに対し、PTは内皮細胞の傷害が強く、上皮細胞に傷害がおよぶと非可逆性となるが、内皮傷害のみの場合は間質浮腫にとどまり可逆性で、両者は同じ透過亢進型の肺水腫ではあるが、発生機序および経過は異っていた。この傷害部位のちがいによる経過あるいは予後の相違は、肺胞壁において毛細血管内皮細胞—肺胞上皮細胞が水分移動の1つの大きな障壁となり肺胞性肺水腫を防いでいること、および前にもふれたが、thick sideの間質が水分移動の重要な交通路になっていること<sup>25)</sup>、さらに、水分および蛋白質の通路の大きさが、リンパ管、内皮細胞、上皮細胞の順になっていること<sup>24)</sup>などの肺胞領域の電顕的研究に基づく水分移動を中心とした肺胞構造の概念より理解できる。さて、この2つの発生機序の異なる肺水腫状態において、血中ではその等電点の関係から陰荷電を帯びている蛋白質の、透過に対する1つの barrier と考えられる HS-PG による charge の変化について電顕組織化学的に検索を試みたわけであるが、いずれの時点においても対照と比して分布・染色性ともに差は明らかでなく、この結果から今回作製した2つの急性肺水腫においては、肺胞壁蛋白透過性亢進の機序として少なくとも HS-PG の消失による charge barrier の破綻が関与している可能性は否定される。この事実、GBMにおける非免疫学的機序によるいくつかの蛋白尿をきたす疾患の人体例や実験例の検索で、同様に HS-PG に変化を認めないという報告があること<sup>18)34)</sup>、また肺胞壁においても、 $\alpha$ -naphthylthiourea (ANTU) 投与により作製された内皮細胞傷害に基づく透過亢進型の急性肺水腫状態において、カチオン化およびアニオン化フェリチンを灌流して両者の肺胞壁の透過を経時的に観察した Brody ら<sup>35)</sup>の実験で、肺水腫極期にカチオン化フェリチンが ABM の LRE に集積していたという結果からも支持される。GBMにおいては、charge barrier の障害をおこす原因として、上皮細胞傷害による HS-PG の産生障害が考えられているが、HS-PG による charge barrier を基底膜透過性の調節機構と考えた場合、おそらく GAG の供給に関与しているであろう上皮および内皮細胞が傷害を受けても、基底膜の turnover が非常に長い<sup>36)</sup>という事から、少なくとも急性変化の場合は、

charge barrier はかなり長期にわたり保たれているものと考えられる。この点を明らかにする為には、慢性肺水腫における基底膜の charge barrier の検索を行う必要があるが、実験的に慢性肺水腫を作製することは困難で、人体例における観察が有用と思われる。今回の結果は逆に、基底膜の size barrier すなわち無数の小孔を有する立体的篩構造<sup>17)</sup>の破綻が、蛋白透過を許した可能性が考えられるが、その証拠を形態的にとらえることはできなかった。

基底膜の濾過機構は複雑で、物質透過の原因を単一のものに帰すことはできないと思われるが、size と charge といった2つの barrier を考えた場合、前者の方がより支配的で、charge barrier は size barrier の存在する狭い範囲内においてのみ有効に作用するのではないかと思われた。さらに、透過亢進型肺水腫の成因を肺胞壁全体から考えた場合は、上皮および内皮細胞障壁の破綻がより支配的であることが示唆された。

## V 結 語

正常肺胞壁基底膜の AS をラットを用いて電顕組織化学的に証明し、さらに実験的に透過亢進型急性肺水腫を作製し、その変化について観察して以下の結果を得た。

1 正常ラット肺胞壁基底膜においては、HS-PG による強い charge が ABM:I の LRE に、また ABM:II, CBM には弱い charge が存在した。その分布は、thin side および thick side を問わず同等であった。

2 HS-PG の検出には、HID法の変法である HID-TCH-SP 法が感度がよく有用であった。

3 同じ透過亢進型肺水腫でも、PQは上皮細胞傷害性で非可逆性であり、一方PTは上皮・内皮ともに傷害するが、内皮細胞傷害でとどまる場合は可逆性の急性肺水腫が惹起された。

4 今回作製したいずれの肺水腫状態にても、経過中 HS-PG の分布に著変は認められず、これらのモデルの蛋白透過の原因として charge barrier の傷害を考えることはできなかった。

本論文の要旨は、第76回日本病理学会総会(昭和62年4月、東京)および International Symposium on High-Altitude Medical Science (Nov. 1987, Matsumoto) において発表した。

稿を終るにあたり、懇篤なる御指導、御校閲を賜

りました恩師重松秀一教授に深く感謝の意を表します。同時に、本論文に貴重な御助言を頂きました信州大学医学部第2病理学教室、発地雅夫教授、同第1解剖学教室、永田哲士教授および組織化学的染色に関して御助言を頂きました同臨床検査医学講座、勝山努助教授に深謝いたします。さらに、御援助下さった第1病理

学教室の諸先生方、標本作製その他に御協力頂きました当教室、西沢朋子氏、青島典子氏、山口真貴子氏、信州大学医学部総合研究室、市川良治氏、亀谷清和氏、キッセイ薬品工業第2研究所、柴田信男氏に対し、心より厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Fishman, A. P. and Pietra, G. G. : Hemodynamic edema. In: Fishman, A. P. and Renkin, E. M. (ed.), Pulmonary edema, pp. 79-111, Am Physiol Soc, Maryland, 1979
- 2) Kanwar, Y. S. and Farquhar, M. G. : Isolation of glycosaminoglycans (heparan sulfate) from glomerular basement membrane. Proc Natl Acad Sci USA, 76 : 4493-4497, 1979
- 3) 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, 1973
- 4) Staub, N.C. : Pulmonary edema. Hypoxia and overperfusion. N Engl J Med, 320 : 1085-1086, 1980
- 5) 安田寛基 : 各種材料の取り扱い方と見方, 肺. 日本病理学会(編), 病理技術マニュアル5 病理学領域における電顕応用, 第1版, pp. 240-251, 医歯薬出版, 東京, 1985
- 6) Sannes, P. L. : Difference in basement membrane-associated microdomains of type I and type II pneumocytes in the rat and rabbit lung. J Histochem Cytochem, 32 : 827-833, 1984
- 7) 山田和順, 村田久栄 : ムコ多糖の光顕組織化学. 日本組織細胞化学会(編), 組織細胞化学1984, pp.19-32, 学際企画, 東京, 1984
- 8) Linker, A. and Hovingh, P. : Heparinase and heparitinase from Flavobacteria. Methods Enzymol, 28 : 902-911, 1972
- 9) Spicer, S. S., Hardin, J. H. and Sester, M. E. : Ultrastructural visualization of sulfated complex carbohydrates in blood and epithelial cells with the high iron diamine procedure. Histochem J, 10 : 435-452, 1978
- 10) Sannes, P. L., Spicer, S. S. and Katsuyama, T. : Ultrastructural localization of sulfated complex carbohydrates with a modified iron diamine procedure. J Histochem Cytochem, 27 : 1108-1111, 1979
- 11) 勝山 努 : 複合糖質の組織化学. 日本組織細胞化学会(編), 組織細胞化学1979, pp. 219-239, 学際企画, 東京, 1979
- 12) Schurer, J. W., Kalicharan, D., Hoedemaeker, P. H. J. and Molenaar, I. : The use of polyethyleneimine for demonstration of anionic sites in basement membranes and collagen fibrils. J Histochem Cytochem, 26 : 688-689, 1978
- 13) Reynolds, E. S. : The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J Cell Biol, 17 : 208-212, 1963
- 14) 川生 明 : 図説蛍光抗体法. 第1版, pp. 21-41, ソフトサイエンス社, 東京, 1983
- 15) Katsuyama, T. and Spicer, S. S. : A cation-retaining layer in the alveolar-capillary membrane. Lab Invest, 36 : 428-435, 1977
- 16) Pappenheimer, J. R. : Passage of molecules through capillary walls. Physiol Rev, 33 : 387-423, 1953
- 17) Ota, Z., Makino, H., Miyoshi, A., Hiramatsu, M., Takahashi, K. and Ofuji, T. : Molecular sieve in glomerular basement membrane as revealed by electron microscopy. J Electron Microsc, 28 : 20-28, 1979
- 18) 内田光枝 : 糸球体基底膜の Charge barrier —腎炎における heparan sulfate proteoglycan の局在に関する電顕組織化学的研究—. 信州医誌, 33 : 27-41, 1985
- 19) Vacaro, C. A. and Brody, J. S. : Structural features of alveolar wall basement membrane in the

- adult rat lung. *J Cell Biol*, 91 : 427-437, 1981
- 20) 鈴木康仁, 甲田 豊, 荒川正和, 追手 颯 : 糸球体基底膜 anionic sites の polyethyleneimine による電顕的観察. 木原 達, 清水不二雄, 荒川正和, 堺 薫(編), 腎糸球体基底膜・基礎と臨床の接点, pp. 97-107, 西村書店, 新潟, 1982
  - 21) Michael, A. F., Blau, E. and Vernier, R. L. : Glomerular polyanion. *Lab Invest*, 23 : 649-657, 1970
  - 22) Spicer, S. S., Horn, R. G. and Leppi, T. J. : Histochemistry of connective tissue mucopolysaccharides. In: Wanger, B. M. and Smith, D. E. (ed.), *The connective tissue*, pp. 251-303, Williams and Wilkins, Baltimore, 1967
  - 23) 川上浩一郎, 岡田 要 : 各種の糸球体腎炎における glomerular anionic sites の電顕的検討. *日腎誌*, 27 : 1385-1395, 1985
  - 24) Staub, N. C. : Pulmonary edema. *Physiol Rev*, 54 : 678-811, 1974
  - 25) Guyton, A. C., Parker, J. C., Taylor, A. E., Jakson, T. E. and Moffatt, D. S. : Forces governing water movement in the lung. In: Fishman, A. P. and Renkin, E. M. (ed.), *Pulmonary edema*, pp. 65-78, Am Physiol Soc, Maryland, 1979
  - 26) Robin, E. D., Cross, C. E. and Zelis, R. : Pulmonary edema (second of two parts). *N Engl J Med*, 288 : 292-304, 1973
  - 27) Hurley, J. V. : Current views on the mechanism of pulmonary oedema. *J Pathol*, 125 : 59-79, 1978
  - 28) Hagadorn, J. E., Vazques, J. J. and Kinney, T. R. : Immunopathologic studies of an experimental model resembling Goodpasture's syndrome. *Am J Pathol*, 57 : 17-30, 1969
  - 29) Hassan, H. M. and Fridorich, I. : Paraquat and *Escherichia coli*. Mechanism of production of extracellular superoxide radical. *J Biol Chem*, 254 : 10846-10852, 1979
  - 30) Sykes, B. I., Purchase, I. F. and Smith, L. L. : Pulmonary ultrastructure after oral and intravenous dosage of paraquat to rats. *J Pathol*, 122 : 233-241, 1977
  - 31) 横山 武, 山中 晃, 小池盛雄 : パラコート (Paraquat dichloride) によるラット肺線維症の実験的研究. 村尾 誠, 三上理一郎, 滝島 任, 山中 晃, 米田良蔵, 本田行彦(編), 厚生省特定疾患 肺線維症調査研究班 昭和51年度研究報告書肺線維症の成因・治療及び予防に関する研究, pp. 104-108, 山藤印刷株式会社, 北海道, 1976
  - 32) Clark, D. G., McElligatt, T. F. and Hurst, E. W. : The toxicity of paraquat. *Br J Ind Med*, 23 : 126-132, 1966
  - 33) Murray, R. E. and Gibson, J. E. : A comparative study of paraquat intoxication in rats, guinea pigs and monkeys. *Exp Mol Pathol*, 17 : 317-325, 1972
  - 34) Alorn, D. and Ryan, G. B. : Distribution of anionic groups in the glomerular capillary wall in the rat nephrotoxic nephritis and aminonucleoside nephrosis. *Pathology*, 13 : 37-50, 1981
  - 35) Brody, J. S., Vaccaro, C. A., Hill, N. S. and Rounds, S. : Binding of charged ferritin to alveolar wall components and charge selectivity of macromolecular transport in permeability pulmonary edema in rats. *Circ Res*, 55 : 155-167, 1984
  - 36) Walker, F. : Basement-membrane turnover in the rat. *J Pathol*, 107 : 119-121, 1972

(62. 7. 28 受稿)