

## ラットアミノヌクレオシド腎症の病理学的研究

——糸球体病変の経時的推移とフィブロネクチンの糸球体内局在について——

奈良県立医科大学第1内科学教室

花 谷 正 和

### **PATHOLOGIC STUDIES ON AMINONUCLEOSIDE NEPHROSIS IN RATS: SEQUENTIAL CHANGES IN GLOMERULAR LESIONS AND INTRAGLOMERULAR LOCALIZATION OF FIBRONECTIN**

MASAKAZU HANATANI

*First Department of Internal Medicine, Nara Medical University*

Received January 31, 1989

*Summary:* The aim of this study is to describe the morphologic characteristics of the early changes of focal sclerotic lesions in aminonucleoside (AN) nephrosis. AN nephrosis was induced by repeated injection of puromycin aminonucleoside in WKA rats.

Sequential changes in glomerular lesions were observed by light and electron microscopy. In the early stages, a number of glomeruli were found to adhere to Bowman's capsule without focal sclerotic lesion and/or hyalinosis. Electron microscopy showed degeneration of the podocyte, such as by foot process fusion, microvilli formation, vacuolation or lysosome in its cytoplasm. Moreover, detachment of the podocyte and some denuding of the glomerular basement membrane were noted. These features seem to be initiating events for capsular adhesion, leading to deposition of hyaline or proteinaceous material and desquamation of endothelial cells in the capillary lumen.

Immuno-electron microscopy was used to study the localization of fibronectin in the controls and in the glomeruli with AN nephrosis. In the controls, fibronectin was mainly restricted to the mesangial matrix, especially in the area surrounding the mesangial cell process and at the interface between endothelial and mesangial cells. In the glomeruli with focal sclerotic lesion, fibronectin increased proportionately with expansion of the mesangial matrix. Deposition of fibronectin was also found subendothelially along the glomerular basement membrane and in the region of capsular adhesion. The results suggest a possible role of fibronectin in the pathogenesis of focal sclerotic lesion.

#### **Index Terms**

aminonucleoside nephrosis, capsular adhesion, focal sclerotic lesion, fibronectin, immuno-electron microscopy

#### **緒 言**

Puromycin aminonucleoside (AN) を実験動物に短期

投与すると多量の蛋白尿が出現し、糸球体の足突起細胞の足突起融合、微絨毛形成など微小変化型ネフローゼ症候群 (MCNS) に類似した病変が惹起される<sup>1)</sup> (急性 AN

腎症). 一方, AN を反復投与すると高度のネフローゼ状態が持続し, 糸球体に巣状硬化性病変 (focal sclerotic lesion; FSL) が発生する<sup>2)</sup> (慢性 AN 腎症). そこで現在では, 前者はヒト MCNS, 後者はヒトの巣状糸球体硬化症 (focal glomerular sclerosis; FGS) の実験モデルとして用いられている.

Rich<sup>3)</sup> は1957年に, MCNS の剖検腎を検討し, 皮髄境界部の糸球体にはじまる FSL を特徴とする FGS を MCNS とは異なる範疇の疾患群と考えて報告している. 以後, 本症については大半の症例が難治性ネフローゼ症候群を呈して末期腎不全へ移行する<sup>4)~6)</sup>, 移植腎に再発する<sup>4)7)</sup>などの臨床的特徴が明らかになっている. しかし, 本症の病理発生については依然として不明の点が多い.

フィブロネクチン (fibronectin; FN) は分子量約45万の糖蛋白であり, 細胞と細胞, 細胞と細胞外基質の接合に介在する細胞接着性蛋白の1つであり, また血栓形成, 貪食作用や創傷治癒過程の促進などの多彩な生物活性を發揮する. すでに1978年, Scheinman<sup>8)</sup>が腎疾患における FN の糸球体内局在を報告している. FN が糸球体疾患の発症・進展機序とどのような関連を有するかという点は興味深い, この点に関する知見はいまだ少ない.

著者は, まず AN 腎症を FGS の実験モデルとして用い, 微小糸球体変化から FSL への発生過程を病理形態学的に検討した. さらに同モデルにおける FN の糸球体内局在を免疫電顕法により観察し, FSL の発症・進展機序における FN の役割の一端を明らかにした.

## 実験方法

### 1. 実験的 AN 腎症の作製法

#### (1) 実験動物

実験動物は8週齢の WKA 純系雄ラット (体重150~180 g) (愛知県がんセンター島田浩一郎博士より供与された) を使用した. ラットは代謝ケージ内で飼育し, オリエンタル MF 固型飼料 (オリエンタル酵母工業社製) と飲料水を自由に摂取させた.

#### (2) AN 腎症の作製法

まず puromycin aminonucleoside (6-dimethyl-aminopurine-3-amino-D-ribose, Sigma 社製) を 5 mg/dl の濃度となるように生理食塩水に溶解し, 1.5 mg/100 g・体重を1日1回, 5日間連続して背部に皮下注射した (1クール).

1) AN<sub>1</sub> 群 (12匹): AN 1 クール投与ののち21日目に屠殺した.

2) AN<sub>2</sub> 群 (16匹): AN 1 クール投与ののち20日間隔において AN 1 クールを追加し, 38日目に屠殺した.

3) 対照群: 生理食塩水のみを背部に皮下注射した7匹と8匹のラットをそれぞれ AN<sub>1</sub> および AN<sub>2</sub> 群の対照群として同期間飼育した (Fig. 1).

### 2. 血漿 FN の精製

FN の精製は Hayashi & Yamada<sup>9)</sup> の方法によった. WKA 純系ラットをエーテル麻醉下で開腹し, 腹部大動脈にベニューラ針を挿入してあらかじめクエン酸ナトリウムを満たした注射筒に採血した. ついで, 2,000 g, 10分間遠心して得られた血漿 50 ml に 0.2 M EDTA 1.25

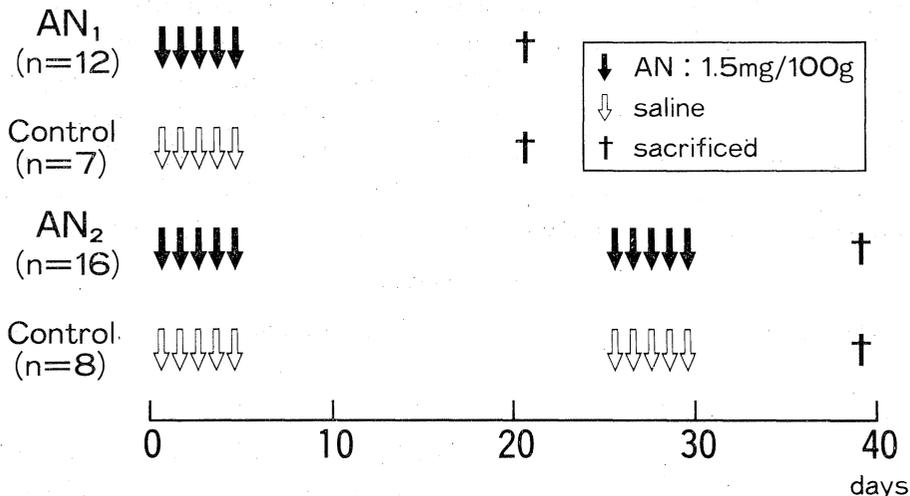


Fig. 1. Experimental design.

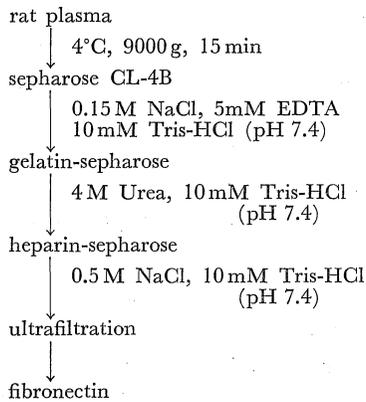


Fig. 2. Purification of fibronectin.

ml, 0.2 M フッ化フェニルメタンスルホニル (Sigma 社製) 0.25 ml および 95% エタノール 0.04 ml を加えて混合し, 4°C, 9,000g, 15分間遠心分離した. その上清を Sepharose CL-4B (Pharmacia 社製) カラム (1.5×25 cm) に添加し, 0.15 M 塩化ナトリウム (NaCl), 5 mM EDTA 含有 10 mM トリス塩酸緩衝液 (Tris-HCl) (pH 7.4) で溶出し, 溶出体積比 0.35 の分画を集めた. さらに Gelatin-Sepharose 4B (Pharmacia 社製) カラム (0.8×15 cm) を 0.15 M NaCl, 5 mM EDTA 含有 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) で平衡化した. このカラムにゲル濾過で溶出した粗 FN 分画を結合させてから, 0.5 M NaCl 含有 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), ついで 0.15 M NaCl, 5 mM EDTA 含有 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) で洗浄し, 4 M 尿素含有 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) で溶出した. つぎに, 0.15 M NaCl, 5 mM EDTA 含有 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) で平衡化した Heparin-Sepharose CL-6B (Pharmacia 社製) カラム (0.8×15 cm) に溶出画分を添加し, 0.15 M NaCl, 5 mM EDTA 含有 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) で洗浄したのちに 0.5 M NaCl 含有 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) で溶出した. 溶出分画の 280 nm での吸光度を測定し, 精製 FN 分画を得た (Fig. 2).

なお, FN の精製度は SDS-polyacrylamide gel 電気泳動法 (Laemmli の方法<sup>10</sup>) によって検定した.

### 3. 抗 FN 抗体の作製法

#### (1) 抗血清の作製法

FN 抗血清は Molnar ら<sup>11</sup>)の方法によって作製した. 精製した 1 ml の FN (0.5 mg/ml) と complete Freund's adjuvant (Difco Lab. 社製) の等量懸濁液を家兎の後肢筋肉内に注射した. 追加免疫注射は 14, 21, 28 および 35 日目の計 4 回実施し, 42 日目に採血した. 抗血清は免疫拡散法 (Ouchterlony 法) により特異性と力価を検定し

た.

#### (2) IgG の精製および Fab' の調製法

家兎抗血清を 56°C, 30分間非働化したのち, 0.01 M PBS (pH 7.2) で 2 倍に稀釈した. ついで抗血清に等量の 100% 飽和硫酸アンモニウム (硫安) を攪拌しながら徐々に加え, ひき続き室温で 30分間攪拌した. 試料を遠心分離して得た沈澱物を 50% 飽和硫安に再懸濁し, 再度遠心分離して沈澱物を得た. この沈澱物を少量の 0.01 M リン酸緩衝液 (PBS) (pH 8.0) に溶解し, 同緩衝液で 1 昼夜透析した. ついでその透析液を DEAE-Sephacel (Pharmacia 社製) カラム (0.8×15 cm) に添加し, 0.01 M PBS (pH 8.0) で非吸着分画を溶出した. 溶出した分画の 280 nm での吸光度を測定し, IgG 分画を集めて限外濾過法で濃縮し, -20°C に凍結保存した.

家兎抗血清から得られた 2.0 ml の精製 IgG (10 mg/ml) に 1 ml の 0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) を加えたのち, 新たに調製したペプシン (Sigma 社製) 溶液 (3 mg/0.05 M 酢酸緩衝液 1 ml) 0.1 ml を加えて 37°C, 16時間反応させた. つぎに反応液を 0.1 M PBS (pH 7.5) 中で 4°C, 6時間透析後, 2-メルカプトエタノールを終濃度が 0.1 M になるように添加し, 4°C, 30分間攪拌した. さらにヨードアセトアミド (Sigma 社製) を終濃度 0.12 M になるように加えて 4°C, 1時間攪拌し, 0.01 M PBS (pH 7.5) 中で 4°C, 1晩透析したのち, 室温, 10,000g, 30分間遠心分離した. 最後にその上清を Sephadex G-100 (Pharmacia 社製) カラム (1.5×90 cm) に添加し, 0.01 M PBS (pH 7.2) で溶出させて Fab' 分画を得た.

#### (3) Horseradish-peroxidase 標識 Fab' 作製法<sup>12</sup>)

Horseradish-peroxidase (HRP) (RZ 3.0) (東洋紡織社製) 4 mg を 1 ml の蒸留水に溶解し, 0.2 ml の 0.1 M 過ヨウ素酸ナトリウムを加えて室温で 20分間攪拌しながら反応させた. つぎに反応液を 1 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.5) 中で 4°C, 1晩透析した. その後, 0.2 M 炭酸緩衝液 (pH 9.5) 20 ml を加えて HRP 液をアルカリ化してから, あらかじめ 1 ml の 0.01 M 炭酸緩衝液 (pH 9.5) に溶解した 5 mg の Fab' を添加して室温で 2時間攪拌した. 新たに調製した 0.1 ml の水素化ホウ素ナトリウム (4 mg/ml) を加え, さらに 4°C, 2時間攪拌し, HRP 標識 Fab' を得た. つぎに 0.01 M PBS (pH 7.2) 中で 4°C, 1晩透析後, Sephacryl S-200 (Pharmacia 社製) カラム (2.6×70 cm) に添加し, 0.01 M PBS (pH 7.2) で溶出し精製した. 280 nm と 403 nm での吸光度を測定して至適分画を集め, -80°C で凍結保存した.

### 4. 解析方法

#### (1) 尿蛋白量測定

24時間尿を採取して尿量を測定し、Kingsbury-Clark法により蛋白濃度を測定して1日尿蛋白量を算出した。

(2) 病理形態学的検査

AN<sub>1</sub>群、AN<sub>2</sub>群および対照群のラットをエーテル麻醉下に脱血して屠殺した。屠殺後、速やかに両側の腎臓を摘出して光顕、電顕および免疫電顕の検索用の試料とした。

1) 光顕的観察：腎皮質全体が観察できるように短軸に沿って横切り、10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定した。パラフィン包埋後に3μmに薄切り、Hematoxylin-eosin (HE), Periodic acid Schiff (PAS), Periodic acid-methenamine silver (PAM) の各染色を実施して光顕的観察を行った。

2) 糸球体病変の評価：各実験群の糸球体病変の重症度は糸球体係蹄とBowman嚢との癒着(Bowman嚢癒着; capsular adhesion)の有無とFSLの程度に応じてつぎに示すGrade 0からIIIの4段階に分類して評価した。

Grade 0; Bowman嚢癒着やFSLがまったく認められず、微小糸球体病変に相当するもの(Plate 1-A)。

Grade I; Bowman嚢癒着を認めるが、FSLが出現していないもの(Plate 1-B)。

Grade II; FSLを認めるが、その病変が糸球体面積の1/8未満にとどまっているもの(Plate 1-C)。

Grade III; FSLが糸球体面積の1/8以上におよぶもの(Plate 1-D)。

の(Plate 1-D)。

糸球体病変の判定はラット1匹当たり100個の糸球体(総数2,800個)を観察し、糸球体のGrade別頻度を百分率で表わした。なお、一部の実験動物については腎組織の連続切片を作製し、Bowman嚢癒着やFSLの拡がりについても検討を加えた。

3) 電顕的観察：摘出腎の一部を約1mm<sup>3</sup>大に細切り、2.5%グルタルアルデヒド(Taab社製)による前固定、1%四酸化オスミウム(Taab社製)による後固定ののち、エタノール系列で脱水してQuetol 812樹脂(日新EM社製)に包埋した。ウルトラマイクローム(Reichert-Jung社製)で超薄切片を作成し、酢酸ウラニウムとクエン酸鉛を用いて二重染色し、透過型電子顕微鏡JEM-1200EX(日本電子製)で観察した。

4) 免疫電顕法：摘出腎を約1mm<sup>3</sup>に細切り、McLean & Nakane<sup>13)</sup>の方法によるperiodate-lysine-paraformaldehyde (PLP)固定液中で4°C、12時間軽く振盪しながら固定したのち、10%蔗糖加0.01 M PBS (pH 7.2)に置換して1晩放置した。その後、順次15%蔗糖加0.01 M PBS (pH 7.2)、20%蔗糖加0.01 M PBS (pH 7.2)で4°C、4時間ずつ洗浄し、最後に5%グリセリン、20%蔗糖加0.01 M PBS (pH 7.2)で4°C、1時間洗浄したのち、組織を凍結組織包埋剤のOCT compound (Miles社製)に包埋し、ドライアイス・アセトンで急速凍結した。この凍結組織からクリオスタット(Miles社製)で厚さ

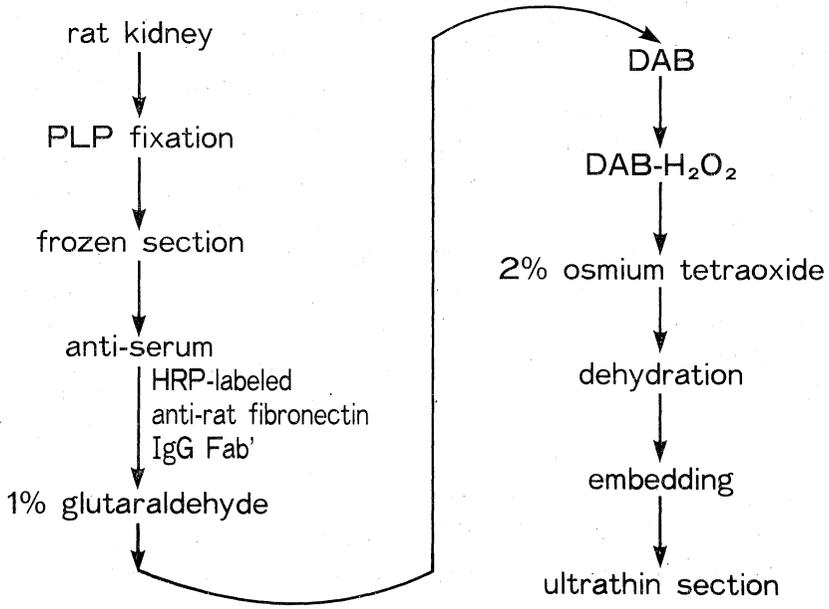


Fig. 3. Procedure for immuno-electron microscopy.

6 $\mu$ m の薄切片を作製し、卵白アルブミン処理スライドガラスに貼付した。この切片を室温で30分間風乾したのち、10%蔗糖加 0.01 M PBS (pH 7.2) で5分間ずつ3回洗浄して切片を10%非感作家兔血清と反応させ、非特異的染色を減弱させた。さらに10%蔗糖加 0.01 M PBS (pH 7.2) で洗浄したのち、4°C の湿潤箱中で HRP 標識抗ラット FN 家兔 IgG-Fab' と12時間反応させた。10%蔗糖加 0.01 M PBS (pH 7.2) で洗浄後、1%グルタルアルデヒド固定を20分間行った。さらに 0.01 M PBS (pH 7.2) で洗浄して0.02% 3-3'-diaminobenzidine 4HCl (DAB) (同仁化学研究所製) 液に30分間浸漬したのち、1%ジメチルスルホキシド添加0.02% DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 基質溶液で3分間発色させた。ついで 0.01 M PBS (pH 7.2) で洗浄し、2%四酸化オスミウムで45分間の後固定を実施し、再び 0.01 M PBS (pH 7.2) で洗浄後、エタノール系列で脱水してゼラチンカプセル内の Quetol 812 に包埋した。ウルトラミクロトームで超薄切片を作製し、無染色標本を透過型電子顕微鏡 JEM-1200 EX で観察した (Fig. 3)。

なお、精製 FN を HRP 標識抗ラット FN 家兔 IgG Fab' と反応させた抗体を対照として使用した。

(3) 推計学的処理

推計学的処理は  $\chi^2$  検定あるいは条件つき Wilcoxon 検定により、危険率 5% 以下を有意性ありとした。文中の数字は平均土標準偏差を示す。

成 績

1. 蛋白尿の推移

尿蛋白は AN<sub>1</sub>, AN<sub>2</sub>, 対照群のいずれにおいても AN 投与前には検出されなかった。AN<sub>1</sub> 群では1日尿蛋白排泄量は AN 投与8日目から増加しはじめ、12日目には 211 $\pm$ 88 mg に達したが、16日目からしだいに減少して屠殺時 (21日目) には 24 $\pm$ 5 mg になった。AN<sub>2</sub> 群も AN<sub>1</sub> 群と同様に AN 投与8日目から1日尿蛋白排泄量が増加しはじめ、12日目には 278 $\pm$ 164 mg 達し、以後はしだいに減少する傾向を示した。しかし AN 2 クール投与後から再び尿蛋白量が増加し、38日目の屠殺時には1日尿蛋白排泄量は 476 $\pm$ 176 mg に達した (Fig. 4)。

2. 腎組織所見

(1) 光顕所見

1) 糸球体病変: AN 腎症では糸球体足突起細胞の腫大を示すものが多く、ときに硝子滴 (hyaline droplet) を含むものもみられる。壁側上皮細胞も立方状となりしばしば Bowman 囊癒着の近傍に集積する。AN 腎症ではさらに管外性病変として偽尿管構造 (pseudotubule) や小半月体形成が観察され、ときに Bowman 腔に蛋白様物質 (proteinaceous material) の浸出もみられる。AN 腎症では FSL の出現をみない糸球体にも Bowman 囊癒着が認められるが、FSL 部では Bowman 囊癒着はほぼ例外なく観察される病変である (Plate 1-B, 1-C, 1-

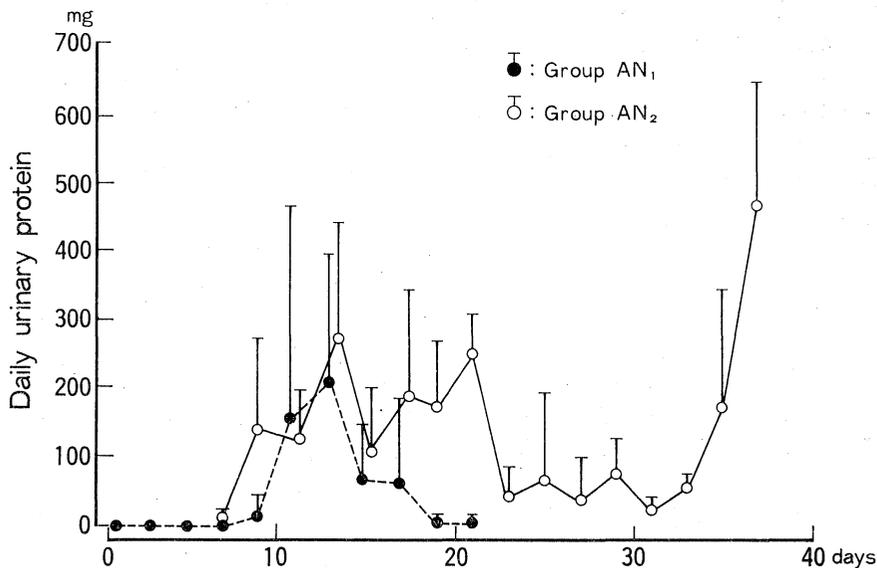


Fig. 4. Serial changes of daily urinary protein after administration of aminonucleoside in group AN<sub>1</sub> (●) and AN<sub>2</sub> (○).

D). さらに1つの糸球体に Bowman 囊癒着が2ないし3カ所みられる場合もあり, この Bowman 囊癒着部には Bowman 囊の肥厚も観察される. Bowman 囊癒着や FSL は糸球体血管極部 (hilar region) に限らず, 末梢係蹄部 (peripheral region) にも出現しており, その糸球体内分布には部位特異性が認められなかった. さらに FSL が進展すると, 係蹄腔に PAS 陽性の硝子様物質 (hyaline deposit) が蓄積してくる. この際にはメサンギウム増生を伴い, 係蹄腔が狭小化して係蹄は完全に閉塞する. また FSL を認める糸球体は皮髄境界部と皮質表層部のいずれにもほぼ一様に出現していた. つまり AN 腎症では, 障害糸球体が皮髄境界部に優位に出現するとはいえない.

2) 糸球体病変の評価: 各 Grade の FSL 出現頻度をみると, AN<sub>1</sub> 群では Grade 0 が66.5%, I が24.5%, II が8.9%, III が0.1%であった. 一方, AN<sub>2</sub> 群では Grade 0 が54.9%, I が6.2%, II が27.3%, III が11.6%であった. すなわち, AN<sub>1</sub> 群では糸球体病変は微小糸球体病変にとどまるものが大半であり, Bowman 囊癒着のみを示すものが散見されるにとどまる. つまり, AN<sub>1</sub> 群の糸球体病変は FSL の出現が少なく, 全体として軽度であることを示している. 一方, AN<sub>2</sub> 群では Bowman 囊癒着のみの Grade I に比して FSL を示す Grade II やIIIの糸球体病変を示す糸球体の出現頻度が増加しており, AN<sub>2</sub> 群の糸球体病変は AN<sub>1</sub> 群に比して有意に進展していたことになる (Fig. 5).

なお, AN<sub>1</sub> 群の一部について, Grade I を呈する糸球体の連続切片を観察したが, FSL は該当する糸球体には認められなかった.

3) 間質・血管病変: 高度の FSL を示す場合には, 間質には萎縮した尿管管や内腔に硝子円柱を含んで内腔の拡大した尿管管が散見され, さらに単核球の浸潤を伴って間質は線維化を示すようになる (Plate 2). ただし,

細動脈硬化性病変は観察されなかった.

(2) 電顕所見

1) 上皮細胞障害: 糸球体の足突起細胞においても広範な足突起の融合が観察され (Plate 3, 4), また足突起細胞の細胞質内には多数のライソゾームや空胞形成 (vacuolation) が観察される (Plate 3, 4). さらに足突起細胞の一部は基底膜から剝離 (detachment) し, 基底膜は直接 Bowman 腔へ露出 (denudation) する (Plate 3, 5). 足突起細胞の基底膜に近接した細胞質内には微小線維 (microfilament) が集束しており (Plate 3), また bleb の形成や微絨毛形成 (microvilli) の形態異常も観察される. Bowman 腔は腫大した上皮細胞のため狭小化する.

以上の所見は, AN 腎症における上皮細胞の著しい変性・障害像を示すものである.

2) Bowman 囊癒着: 末梢係蹄では, 基底膜と Bowman 囊との癒着像が観察される (Plate 6). この糸球体係蹄と Bowman 囊との癒着病変 (capsular adhesion) 部では Bowman 囊が層状化し, 限局性に肥厚して係蹄に向かって突出する (Plate 6). この癒着病変部では基底膜と Bowman 囊はしばしば基底膜様物質 (basement membrane-like material) で被覆され, 係蹄が固定される (Plate 6). Bowman 囊癒着部では膠原線維や基底膜の露出, Bowman 腔内には細線維状物質 (fibrillar material) が観察される (Plate 7). 癒着部の近傍には, 壁側上皮細胞が集積しており, 管外性増殖病変を伴っている. さらに FSL 部の基底膜は肥厚し, 波打ち像 (wrinkling) を示すようになる (Plate 8).

3) 管内性病変: 係蹄腔では, しばしば内皮下腔が拡大し (Plate 9), 内皮細胞の剝離や核濃縮 (pycnosis) が認められる (Plate 10). 内皮下腔には硝子様物質が瘤状に蓄積し, 進行すると半月状に蓄積して係蹄腔を完全に閉塞する (Plate 10). さらに進行すると基底膜自体が硝子様物質で置換され, その構造は消失する (Plate 10). また係蹄腔には泡沫細胞も観察される (Plate 7). FSL にはメサンギウム基質の増生や, 一部にはメサンギウム間入 (mesangial interposition) が観察される. FSL の終末像は係蹄の虚脱と硝子様物質の蓄積による係蹄腔の閉塞であり, 細胞崩壊物 (cell debris) も散在している (Plate 11) が, 細胞成分には乏しい.

これら形態学的観察から, AN 腎症においてはまず上皮細胞が障害され, ついで基底膜の露出, 係蹄と Bowman 囊との癒着, 係蹄腔への硝子様物質の沈着, メサンギウム基質の増加という一連の過程を経て典型的な FSL が成立すると推測される. ことに光顕的観察から

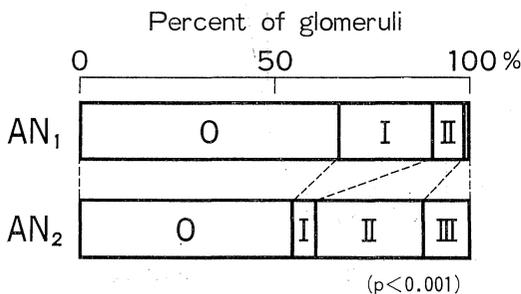


Fig. 5. Incidence of glomerular lesions (grade 0~III) by light microscopy.

FSLの初発病変としてはBowman 囊癒着が重要と思われる。

### (3) FNの糸球体内局在

糸球体内FN局在を酵素抗体直接法による免疫電顕法で検討した。FNの局在は黒色の高電子密度反応産物(reaction product; RP)として観察された。

1) 対照群: 対照群ではRPは主にメサンギウム基質に局在しており、ことにメサンギウム細胞突起の陥凹部およびメサンギウム基質と内皮細胞の接合部にRPが密に観察された(Plate 12)。しかし、メサンギウム細胞、足突起細胞、壁側上皮細胞、内皮細胞内のいずれにもRPは局在しなかった。また糸球体基底膜では緻密層(lamina densa)や基底膜と足突起の接合部、内皮下腔にはRPは観察されなかった。一方、Bowman 囊と壁側上皮細胞の接合部に密なRPの局在が観察された(Plate 13)。

2) AN腎症: FSL部ではメサンギウム域が拡大しており、同部には多量のRPが認められた(Plate 14)。ことに糸球体基底膜とBowman 囊の癒着部には多量のRPが存在し(Plate 15)、その一部は細線維状に観察された(Plate 16)。さらにAN腎症では、糸球体基底膜内皮下にもRPが存在していた(Plate 17)。しかしRPは、対照群ラットと同様に、メサンギウム細胞、内皮細胞、足突起細胞、壁側上皮細胞内には観察されなかった。

なお、標識抗体を精製FNで吸収すると、メサンギウム域のPRは認められなかった(Plate 18)。

## 考 察

### 1. FGS

FGSの病理学的特徴はFSL部にしばしばBowman 囊癒着、メサンギウム硬化、硝子様物質および泡沫細胞が観察されることにある。また間質には尿細管萎縮、間質の線維化および細動脈病変が存在する。しかし、このような病理学的特徴像はヒトの生検材料からは必ずしも得られないので、その診断のみならず早期病変・進展過程の把握が困難であった。Siegelら<sup>14)</sup>は経過観察中にMCNSからFGSへ移行した症例、Artinanoら<sup>15)</sup>はMCNSに間質性腎炎を伴い、のちにFGSを発症したフェノプロフェン腎症を報告している。一方、ネフローゼ発症時からFGSと診断される症例が存在するという事実もあり、FGSは独立した疾患単位か、MCNSの亜型かについての一定した見解がまだ得られていない。さらにFSLは逆流腎症、肥満、片腎摘出、ヘロイン中毒、妊娠中毒症<sup>16)</sup>などの糸球体疾患や、IgA腎炎、膜性増殖性糸球体腎炎などの糸球体腎炎にも出現することが知られてい

る。FSLはこれら種々の糸球体病変にもついた病理形態的な反応様式の1つと理解されるが、その病理発生の詳細については明らかでない。

以上のような理由から、このFGSの成因や進展過程の解明については、適切な実験モデルによる詳細な検討が重要になる。

### 2. AN腎症

前述のように、急性AN腎症はMCNSに類似した糸球体病変を呈する<sup>1)</sup>ことから、ネフローゼ症候群の病態・病因の解明に繁用されてきた。しかし、急性AN腎症の糸球体病変は可逆性であり、蛋白尿も経過とともに消失する。のちに、ANを反復投与すると、高度のネフローゼ状態が持続するのみならず、FSLの出現することが判明した<sup>2)</sup>。しかもVelosaら<sup>17)</sup>はFSLに一致してIgM, C3およびフィブリン体が糸球体内に沈着することを証明しており、これがヒトFGSの実験モデルとなり得ることを示した。さらに、硫酸プロタミンの併用<sup>18)</sup>、片腎摘出、高蛋白食、高脂肪食の投与<sup>19)</sup>などの操作をこの実験モデルに加えることによって、FSLの出現が促進されることも報告されている。また最近、Diamond & Karnovsky<sup>20)</sup>はAN 13 mg/100 g・体重の1回投与でもFSLを惹起し得ることを報告している。

著者はFSLの早期病変およびその成立過程を観察する目的で、比較的少量のANを反復投与して実験モデルを作製した。つまり、AN 1.5 mg/100 g・体重を5日間皮下注射(1クール)したAN<sub>1</sub>群と、20日間の間隔においてAN投与を2クール反復したAN<sub>2</sub>群を作製した。この2群を比較したところ、両群の蛋白尿出現時期は同じであったが、AN<sub>2</sub>群では2クール施行後から蛋白尿が著明に増加した。光顕的観察については、AN<sub>1</sub>群はBowman 囊癒着だけを認めるGrade Iの糸球体の出現頻度が高く、FSLを示す出現頻度は全体の9.0%にとどまっており、全体として比較的軽度の糸球体病変を示した。一方、AN<sub>2</sub>群はGrade IIおよびIIIを示す糸球体の出現頻度が38.9%であり、AN<sub>1</sub>群に比して有意にFSLが増加していた。また、AN<sub>1</sub>群の一部について、Grade Iを呈する糸球体の連続切片を観察したが、FSLに該当する糸球体を認めなかった。

以上をまとめると、AN<sub>1</sub>群ではFSLの出現率が低く、その主病変がFSLでなくBowman 囊癒着であることから、このBowman 囊癒着がFSLの初発病変として重要であると考えられる。

### 3. 上皮細胞障害

足突起細胞は糸球体基底膜を被覆する位置にあり、基底膜の蛋白透過性に関して基底膜とともに重要な役割を

はたしているものと思われる。実際、多量の蛋白尿を呈するネフローゼ症候群に共通した上皮細胞の形態的变化が観察されている。

著者の AN 腎症における検討では、足突起細胞の形態変化として足突起融合、細胞質内に出現する多数のライソゾームや空胞形成、さらには微小線維の集束像が認められた。また足突起細胞の基底膜からの剝離や基底膜の Bowman 腔への露呈は FSL ないし是非硬化部のいずれにおいても観察された。Masugi 腎炎にも同様の病変が観察され、Bowman 嚢癒着が同モデルの初発病変と考えられている<sup>21)</sup>。この糸球体基底膜の露呈は Grishman & Churg<sup>22)</sup> によると、MCNS には認められない像であり、FGS に特異的とはいえないものの、特徴的所見であるという。さらに Cohen ら<sup>23)</sup>は、多量の蛋白尿を呈するヒト糸球体疾患についての電顕的検討から、足突起細胞の変性・壊死が基底膜を露呈させるのであり、FGS をはじめとする種々の糸球体疾患に認められる像であるとしている。また Yoshikawa ら<sup>24)</sup>は、MCNS と FGS の病理組織像を比較して、足突起細胞の空胞化が MCNS に比して FGS でより顕著であったという。これら上皮細胞障害の機序は明らかでないが、FGS のような治療に抵抗して多量の蛋白尿が持続する糸球体疾患では、蛋白尿それ自身が上皮細胞を障害するのかもしれない。

Ryan & Karnovsky<sup>25)</sup> は、Bowman 腔へ直接露呈した基底膜では蛋白の透過性が著しく亢進していると報告している。したがって、基底膜の露呈が係蹄腔から Bowman 腔への血漿成分の浸出を促し、管外性増殖病変や Bowman 嚢癒着を誘発するものと推測されよう。移植腎に FGS の再発をみたため、移植後 2 カ月目に腎を摘出した症例についての報告<sup>27)</sup>によると、係蹄上皮細胞の変性と剝離および泡沫細胞の出現が再発 FGS の早期病変として重要であり、係蹄腔内の硝子様沈着物は晩期に出現する病変と考えられるという。

これら先人の成績と著者の電顕による成績を併せて考えると、FSL の早期病変として上皮細胞の著明な空胞化や剝離、基底膜の露呈が重要であると考えられる。

#### 4. FSL

##### (1) FSL の糸球体内分布

Ito ら<sup>26)</sup>は FSL の糸球体内分布に注目して FSL の出現部位を血管極型 (hilar type) と末梢係蹄型 (peripheral type) に分類し、小児 FGS の予後を比較している。血管極型では、平均 6 年の観察期間中に腎機能障害を呈した症例の頻度が高く、末梢係蹄型では副腎皮質ステロイド療法の奏効例が多いという。Howie & Brewer<sup>27)</sup> は、尿管極の近傍における Bowman 嚢癒着を glomerular

tip lesion (GTL) と記載した。この GTL は副腎皮質ステロイド療法によく反応することから、FGS と異なる疾患単位とすることを提唱している<sup>27)</sup>。しかし、これは Ito ら<sup>26)</sup>の報告した FGS の係蹄型に相当すると思われる。また Brown ら<sup>28)</sup>は、悪性 FGS にしばしば血管極型 FSL を認めており、その血管極病変が糸球体虚血を助長するであろうと推測している。

著者の AN 腎症における観察では、Bowman 嚢癒着や FSL は血管極や末梢係蹄部のいずれにも認められ、しかも同一糸球体の複数の箇所にも FSL を示すものも存在していた。著者の成績を重視すると、ヒトの FGS を血管極型と末梢係蹄型の 2 型に分類することがはたして妥当なのか、この両型間に移行がないか、末梢係蹄型から全節性硬化 (global sclerosis) へ進展する可能性がないかなどの問題が残されているように思われる。

##### (2) FSL の皮質内分布

Rich<sup>3)</sup> の報告にみられるように、ヒト FGS における皮髄境界部糸球体の易障害性は、同部と皮質外層糸球体との解剖学的・生理学的差異にもとづくと考えられている。五月女ら<sup>29)</sup>は、片腎実験モデルで FSL の腎皮質内分布を検討しているが、ヒト FGS と同様に FSL が皮髄境界部糸球体に優位に出現したという。一方、FSL が自然発症する Wistar 雄ラットを検討した報告<sup>30)</sup>によると、FSL は皮質の各部位に認められており、FSL の出現に部位特異性がみられなかったという。また Olson ら<sup>31)</sup>の腎摘除モデルでも FSL の出現部位は皮髄境界部に優位とはいえないと報告している。一方、Kasiske<sup>32)</sup>は、ヒト剖検腎における硬化糸球体出現部位の検討から、硬化糸球体がむしろ皮質外層に有意に出現していたという。

著者の観察においても Bowman 嚢癒着や FSL の出現を伴う糸球体は皮質外層と皮質境界部のいずれにも出現していた。

以上、従来成績と著者の成績を併せて考えると、各実験モデルや各種糸球体疾患によって FSL の皮質内分布が異なっており、本病変における発生機序の多様性が示唆される。

##### (3) FSL の成因

Brenner ら<sup>33)</sup>は腎摘除モデルの残存糸球体に FSL が出現することを明らかにし、その発症機序として過剰濾過説 (hyperfiltration theory) を提唱した。すなわち腎実質の減少に比例してネフロン数が減少するので、腎機能は低下すると考えるのが一般的である。しかし、生体は腎機能の維持をはかろうと努めるので、残存ネフロンは単一ネフロン糸球体濾過量を増加させるが、その代償

として生体に不利な糸球体内高血圧が惹起される。その結果、足突起細胞・内皮細胞が障害されて流血中の蛋白がメサンギウム域に取り込まれ、メサンギウム細胞を障害して FSL へ進展する機序を想定している。前述したように種々の糸球体疾患で FSL が出現することを考慮すると、この仮説は一旦障害を受けた糸球体が糸球体病変の原因にかかわらず腎機能障害への進展する機序を考えるうえで興味深い。しかし、AN 腎症では糸球体濾過量はむしろ減少しているとされており<sup>34)</sup>、AN 腎症における FSL の成因は過剰濾過説のみでは説明し得ないように思われる。

一方、FSL の成因をメサンギウム機能異常に求めている報告者<sup>35)36)</sup>もある。さらに FSL の成因には糸球体凝固線溶系異常<sup>37)</sup>、高蛋白食、高脂肪食などの諸説があり、なお不明といわざるを得ないが、非免疫学的機序を含む多くの糸球体障害因子が複雑に関与しているものと解される。

#### (4) 間質・血管病変

Hyman ら<sup>5)</sup>はヒト FGS における糸球体病変や腎機能障害の増悪因子として間質・血管病変が重要であるとしている。しかし、Habib<sup>4)</sup>は血管病変が稀であるとしており、血管病変の頻度については必ずしも一致しているわけではない。宮本<sup>38)</sup>は、細動脈硬化病変が MCNS よりも FGS に高頻度に出現すること、また加齢や糸球体病変の進展とともに細動脈硬化も増強することから、FGS の進展に対する血管病変の重要性を強調している。

著者の観察によると、糸球体病変が軽度の AN<sub>1</sub> 群では間質病変もきわめて稀であったが、高度の FSL が出現する AN<sub>2</sub> 群の一部では単核球浸潤、尿管管の萎縮や内腔の拡大などの間質病変が観察された。しかし、AN<sub>2</sub> 群においても血管病変の出現は明らかでなかった。したがって著者は、AN 腎症における FSL の成立には血管系の関与が少ないと考える。

### 5. FN

#### (1) FN の生理機能

FN は血漿、細胞表面、基底膜、細胞外基質に広く分布する接着蛋白の1つである。FN は血漿 FN と細胞性 FN に大別されるが、血漿 FN は細胞性 FN と免疫学的に共通抗原性を示すとされている。細胞性 FN は細胞と細胞、細胞と細胞外基質との接着に関与しており、血漿 FN は活性化 XIII 因子の作用でフィブリンと架橋結合して血栓を安定化する作用がある。さらに、血漿 FN は網内系の処理機能を補助するオプソニン作用も示す。

#### (2) 正常腎における FN の局在

FN は主としてメサンギウム基質に存在し<sup>8)39)~46)</sup>、特

にメサンギウム域と内皮細胞の接合部に豊富とされている<sup>43)~45)</sup>。今回の観察でも、メサンギウム基質と内皮細胞の接合部およびメサンギウム細胞突起の陥凹部に RP が密に観察された。また FN は糸球体基底膜の外透明層 (lamina rara externa) に沿って存在し、足突起細胞と基底膜の接合部や内皮細胞と基底膜の接合部にも認められる<sup>43)44)</sup>。また Bowman 嚢<sup>40)41)43)45)</sup>や間質<sup>8)39)45)</sup>にも分布するとの報告もみられる。

以上の報告はポリクローナル抗体による検討であるが、糸球体 FN に対するモノクローナル抗体を使用した検討<sup>47)</sup>でも FN 沈着はメサンギウム域に高度、糸球体係蹄や Bowman 嚢に軽度で認められている。しかし、基底膜に FN の局在が認められないとする報告<sup>8)</sup>もある。つまり、糸球体メサンギウム域の局在については異論がない。しかし、FN の他の部位での局在については、見解が必ずしも一致していない。この不一致は、実験動物、使用抗体、固定法、観察法 (光顕あるいは電顕) の相違などによるものと思われる。

#### (3) 糸球体疾患における FN の局在

IgA 腎炎<sup>39)~41)</sup>、メサンギウム増殖性糸球体腎炎<sup>41)42)</sup>、紫斑病性腎炎<sup>39)40)</sup>、妊娠中毒症<sup>46)</sup>、糖尿病性腎症<sup>39)~41)</sup>では、メサンギウム域への沈着、さらに膜性腎症<sup>40)41)48)</sup>や膜性増殖性糸球体腎炎<sup>40)41)48)</sup>では末梢係蹄にも FN の沈着が観察されている。また半月体形成性糸球体腎炎では半月体、Bowman 嚢にも FN が沈着することが知られている<sup>39)40)</sup>。

しかし今回、著者が研究の目的としている FSL 部の FN 局在を糸球体疾患について検索した報告は見当たらない。その理由は、前述したように FGS 症例が少ないことと、FSL が必ずしも腎生検材料に含まれないからである。そこで著者は、FSL の実験モデルである AN 腎症について FN の局在を免疫電顕法により検討した。

#### (4) AN 腎症における FN の局在

AN 腎症の FSL 部では、拡大したメサンギウム域に一致して FN の密な沈着と、末梢基底膜の内皮側に沿った FN の沈着が観察された。さらに係蹄と Bowman 嚢の癒着病変にも多量の FN が沈着していた。

さて、AN 腎症の FSL 部における FN の沈着の機序については、現在のところ不明といわざるを得ない。しかし、FN の硬化部沈着の機序には、1) 糸球体内血液凝固への関与、2) 糸球体基底膜の透過性亢進による沈着、3) 障害基底膜や糸球体硬化部に存在するコラーゲンとの結合、4) メサンギウム基質への取り込みの亢進などの要因が単独ないしは複合して関与する機序が想定されるが、いずれも推論の域をでない。著者は今後の検

討課題と考えている。

最後に、FN の局所産生について考察する。Oberley ら<sup>39)</sup>は、単離糸球体の培養実験からメサンギウム細胞や係蹄上皮細胞が FN を産生すると報告している。しかし著者は、細胞質内に浸透し得る Fab' フラグメント抗体を使用して FN 局在を検討したが、FN は糸球体細胞内に観察されなかった。したがって、FSL に局在する FN については、メサンギウム細胞で産生された FN が局在したとするよりは、前述した機序による可能性が示唆される。

## 結 語

WKA 純系ラットに慢性 puromycin aminonucleoside (AN) 腎症を作製して糸球体病変の経時的推移ならびにフィブロネクチン (FN) の糸球体内局在を観察し、以下の成績を得た。

### 1. AN 腎症における糸球体病変の経時的推移

(1) 光顕的観察では巣状硬化性病変 (FSL) の出現をみない初期から糸球体係蹄と Bowman 嚢との癒着 (Bowman 嚢癒着) が高頻度に出現していた。この Bowman 嚢癒着は FSL の初発病変と考えられる。(2) 電顕的検索では、足突起融合、空胞形成、微絨毛形成などの微小変化型ネフローゼ症候群にみられる病変に加えて、足突起細胞の剝離、基底膜の露呈などの高度の上皮細胞と基底膜の障害像が観察された。これら病変が Bowman 嚢癒着に進展するものと推測される。(3) FSL は皮髄境界部と皮質外層のいずれにも分布しており、ヒト巣状糸球体硬化症 (FGS) にみられる皮髄境界部糸球体の易障害性は認められなかった。AN 腎症の病理形態学的変化はヒトの FGS ときわめて類似しているが、その発症機序には差異があるものと推測される。(4) 管内性病変として、内皮細胞の剝離や内皮下腔の拡大が認められた。さらに内皮下腔には FGS に特徴的な硝子様物質の沈着が生じ、その沈着が進展すると、係蹄腔は閉塞されて虚脱した。この硝子様物質の沈着は FSL の晩期病変と考えられる。

### 2. FN の糸球体内局在

(1) 正常ラット糸球体においては、FN は主としてメサンギウム域に局在していた。したがってフィブロネクチンはメサンギウム基質構成成分の1つとみなされる。(2) AN腎症における FN の沈着は FSL のメサンギウム域に高度であり、基底膜内皮側および Bowman 嚢癒着部にも認められた。糸球体細胞内には局在しなかった。

本論文の要旨は第26回日本腎臓学会総会 (1983年、京

都) および第29回日本腎臓学会総会 (1986年、東京) において発表した。

稿を終わるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました石川兵衛教授に深甚なる謝意を表すとともに、ご校閲、ご助言を賜りました解剖学第2講座山本浩司教授ならびに病理学第2講座日浅義雄教授に深謝します。さらに直接ご指導いただきました土肥和紘講師に感謝します。また終始ご協力いただきました第1内科腎研究班の諸兄に感謝します。

最後に実験動物を供与いただいた愛知県がんセンター島田浩一郎博士に感謝します。

## 文 献

- 1) Frenk, S., Antonowicz, Z., Craig, J.M. and Metcalf, J.: Experimental nephrotic syndrome induced in rats by aminonucleoside: Renal lesions and body electrolyte composition. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **89**: 424, 1955.
- 2) Glasser, R.J., Velosa, J.A. and Michael, A.F.: Experimental model of focal sclerosis: I. Relationship to protein excretion in aminonucleoside nephrosis. *Lab. Invest.* **36**: 519, 1977.
- 3) Rich, A.R.: A hitherto undescribed vulnerability of the juxtamedullary glomeruli in lipid nephrosis. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* **100**: 173, 1957.
- 4) Habib, R.: Focal glomerular sclerosis. *Kidney Int.* **4**: 355, 1973.
- 5) Hyman, L.R. and Burkholder, P.M.: Focal sclerosing glomerulonephropathy with segmental hyalinosis: A clinicopathologic analysis. *Lab. Invest.* **28**: 533, 1973.
- 6) Goldszer, R.C., Sweet, J. and Cotran, R.S.: Focal segmental glomerulosclerosis. *Ann. Rev. Med.* **35**: 429, 1984.
- 7) Verani, R.R. and Hawkins, E.P.: Recurrent focal segmental glomerulosclerosis: A pathological study of the early lesion. *Am. J. Nephrol.* **6**: 263, 1986.
- 8) Scheinman, J.I., Fish, A.J., Matas, A.J. and Michael, A.F.: The immunohistopathology of glomerular antigens. II. The glomerular basement membrane, actomyosin, and fibroblast surface antigens in normal, diseased, and transplanted human kidneys. *Am. J. Pathol.* **90**: 71, 1978.
- 9) Hayashi, M. and Yamada, K.M.: Divalent

- cation modulation of fibronectin binding to heparin and to DNA. *J. Biol. Chem.* 257: 5263, 1982.
- 10) **Laemmli, U.K.:** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* 227: 680, 1970.
  - 11) **Molnar, J., Gelder, F.B., Lai, M.Z., Siefing, Jr., G.E., Credo, R.B. and Lorand, L.:** Purification of opsonically active human and rat cold-insoluble globulin (plasma fibronectin). *Biochemistry* 18: 3909, 1979.
  - 12) **Willson, M.B. and Nakane, P.K.:** Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. *in Immunofluorescence and Related Staining Techniques* (Knapp, W., Holubar, K. and Wick, G., eds.). Elsevier/North Holland Biomedical Press, p 215, 1978.
  - 13) **McLean, I.W. and Nakane, P.K.:** Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative: A new fixative for immuno-electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 22: 1077, 1974.
  - 14) **Siegel, N.J., Kashgarian, M., Spargo, B.H. and Hayslett, J.P.:** Minimal change and focal sclerotic lesions in lipoid nephrosis. *Nephron* 13: 125, 1974.
  - 15) **Artinano, M., Etheridge, W.B., Stroehlein, K.B. and Barcenas, C.G.:** Progression of minimal-change glomerulopathy to focal glomerulosclerosis in a patient with fenoprofen nephropathy. *Am. J. Nephrol.* 6: 353, 1986.
  - 16) **Nochy, D., Hinglais, N., Jacquot, C., Gaudry, C., Remy, P. and Bariety, J.:** De novo focal glomerular sclerosis in preeclampsia. *Clin. Nephrol.* 25: 116, 1986.
  - 17) **Velosa, J.A., Glasser, R.J., Nevins, T.E. and Michael, A.F.:** Experimental model of focal sclerosis: II. Correlation with immunopathologic changes, macromolecular kinetics, and polyanion loss. *Lab. Invest.* 36: 527, 1977.
  - 18) **Saito, T., Sumithran, E., Glasgow, E.F. and Atkins, R.C.:** The enhancement of aminonucleoside nephrosis by the co-administration of protamine. *Kidney Int.* 32: 691, 1987.
  - 19) **Diamond, J.R. and Karnovsky, M.J.:** Exacerbation of chronic aminonucleoside nephrosis by dietary cholesterol supplementation. *Kidney Int.* 32: 671, 1987.
  - 20) **Diamond, J.R. and Karnovsky, M.J.:** Focal and segmental glomerulosclerosis following a single intravenous dose of puromycin aminonucleoside. *Am. J. Pathol.* 122: 481, 1986.
  - 21) **Kondo, Y. and Akikusa, B.:** Chronic Masugi nephritis in the rat: An electron microscopic study on evolution and consequences of glomerular capsular adhesions. *Acta Pathol. Jpn.* 32: 231, 1982.
  - 22) **Grishman, E. and Churg, J.:** Focal glomerular sclerosis in nephrotic patients: An electron microscopic study of glomerular podocytes. *Kidney Int.* 7: 111, 1975.
  - 23) **Cohen, A.H., Mampaso, F. and Zamboni, L.:** Glomerular podocyte degeneration in human renal disease: An ultrastructural study. *Lab. Invest.* 37: 30, 1977.
  - 24) **Yoshikawa, N., Ito, H., Akamatsu, R., Hazikano, H., Okada, S. and Matsuo, T.:** Glomerular podocyte vacuolation in focal segmental glomerulosclerosis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 110: 394, 1986.
  - 25) **Ryan, G.B. and Karnovsky, M.J.:** An ultrastructural study of the mechanism of proteinuria in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int.* 8: 219, 1975.
  - 26) **Ito, H., Yoshikawa, N., Aozai, F., Hazikano, H., Sakaguchi, H., Akamatsu, R., Matsuo, T. and Matsuyama, S.:** Twenty-seven children with focal segmental glomerulosclerosis: Correlation between the segmental location of the glomerular lesions and prognosis. *Clin. Nephrol.* 22: 9, 1984.
  - 27) **Howie, A.J. and Brewer, D.B.:** The glomerular tip lesion: A previously undescribed type of segmental glomerular abnormality. *J. Pathol.* 142: 205, 1984.
  - 28) **Brown, C.B., Cameron, J.S., Turner, D.R., Chantler, C., Ogg, C.S., Williams, D.G. and Bewick, M.:** Focal segmental glomerulosclerosis with rapid decline in renal function ("malignant FSGS"). *Clin. Nephrol.* 10: 51, 1978.
  - 29) 五月女茂, 石飛文雄, 和久茂仁, 溝口康司, 上田善彦: 巣状糸球体硬化症ラットの病理学的所見—糸球体障害と腎皮質内分布様相. *日腎誌.* 25: 363, 1983.

- 30) **Elema, J.D.** and **Arends, A.**: Focal and segmental glomerular hyalinosis and sclerosis in the rat. *Lab. Invest.* **33**: 554, 1975.
- 31) **Olson, J.L.**, **Gaskin de Urdaneta, A.** and **Heptinstall, R.H.**: Glomerular hyalinosis and its relation to hyperfiltration. *Lab. Invest.* **52**: 387, 1985.
- 32) **Kasiske, B.L.**: Relationship between vascular disease and age-associated changes in the human kidney. *Kidney Int.* **31**: 1153, 1987.
- 33) **Brenner, B.M.**: Hemodynamically mediated glomerular injury and the progressive nature of kidney disease. *Kidney Int.* **23**: 647, 1983.
- 34) **Oken, D.E.**, **Cotes, S.C.** and **Mende, C.W.**: Micropuncture study of tubular transport of albumin in rats with aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int.* **1**: 3, 1972.
- 35) **Couser, W.G.** and **Stilmant, M.M.**: Mesangial lesions and focal glomerular sclerosis in the aging rat. *Lab. Invest.* **33**: 491, 1975.
- 36) **Grond, J.**, **Schilthuis, M.S.**, **Koudstaal, J.** and **Elema, J.D.**: Mesangial function and glomerular sclerosis in rats after unilateral nephrectomy. *Kidney Int.* **22**: 338, 1982.
- 37) 金内雅夫: 巣状糸球体硬化症の成因に関する実験的研究—ラット aminonucleoside 腎症における凝固線溶系の動態を中心として. *奈医誌.* **32**: 747, 1981.
- 38) 宮本祐一: 巣状糸球体硬化症における細動脈硬化病変の意義. *日腎誌.* **24**: 139, 1982.
- 39) **Pettersson, E.E.** and **Colvin, R.B.**: Cold-insoluble globulin (fibronectin, LETS protein) in normal and diseased human glomeruli: Papain-sensitive attachment to normal glomeruli and deposition in crescents. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **11**: 425, 1978.
- 40) **Oberley, T.D.**, **Mosher, D.F.** and **Mills, M.D.**: Localization of fibronectin within the renal glomerulus and its production by cultured glomerular cells. *Am. J. Pathol.* **96**: 651, 1979.
- 41) **Weiss, M.A.**, **Ooi, B.S.**, **Ooi, Y.M.**, **Engvall, E.** and **Ruoslahti, E.**: Immunofluorescent localization of fibronectin in the human kidney. *Lab. Invest.* **41**: 340, 1979.
- 42) **Dixon, A.J.**, **Burns, J.**, **Dunnill, M.S.** and **McGee, J.O'D.**: Distribution of fibronectin in normal and diseased human kidneys. *J. Clin. Pathol.* **33**: 1021, 1980.
- 43) **Madri, J.A.**, **Roll, F.J.**, **Furthmayr, H.** and **Foidart, J.M.**: Ultrastructural localization of fibronectin and laminin in the basement membranes of the murine kidney. *J. Cell Biol.* **86**: 682, 1980.
- 44) **Dixon, A.J.** and **Burns, J.**: Ultrastructural localisation of fibronectin in mouse kidney. *J. Pathol.* **138**: 25, 1982.
- 45) **Courtoy, P.J.**, **Timpl, R.** and **Farquhar, M.G.**: Comparative distribution of laminin, type IV collagen, and fibronectin in the rat glomerulus. *J. Histochem. Cytochem.* **30**: 874, 1982.
- 46) **Foidart, J.M.**, **Nochy, D.**, **Nusgens, B.**, **Foidart, J.B.**, **Mahieu, P.R.**, **Lapiere, C.M.**, **Lambotte, R.** and **Bariety, J.**: Accumulation of several basement membrane proteins in glomeruli of patients with preeclampsia and other hypertensive syndromes of pregnancy: Possible role of renal prostaglandins and fibronectin. *Lab. Invest.* **49**: 250, 1983.
- 47) **Hancock, W.W.**, **Kraft, N.**, **Clarke, F.** and **Atkins, R.C.**: Production of monoclonal antibodies to fibronectin, type IV collagen and other antigens of the human glomerulus. *Pathology* **16**: 197, 1984.
- 48) **Ikeya, M.**, **Nagase, M.** and **Honda, N.**: Intraglomerular distribution of fibronectin in primary glomerular diseases. *Clin. Nephrol.* **24**: 53, 1985.

## Explanation of plates

- Plate 1. Group AN<sub>1</sub> and AN<sub>2</sub>. Light microscopic findings of glomeruli. PAS ×400  
1-A. minor glomerular abnormality: Grade 0  
1-B. capsular adhesion: Grade I  
1-C. focal sclerotic lesion (less than 1/8 of glomerular area): Grade II  
1-D. focal sclerotic lesion (1/8 of glomerular area or more): Grade III
- Plate 2. Group AN<sub>2</sub>. Interstitial changes. Tubular atrophy and interstitial fibrosis are present. Mononuclear cell infiltrate is also noted. PAS ×200
- Plate 3. Group AN<sub>2</sub>. Podocyte showing numerous vacuoles and band-like structure of condensed microfilament in its cytoplasm (arrow head). Portion of basement membrane is denuded (arrow). ×5,000
- Plate 4. Group AN<sub>2</sub>. Podocyte showing swelling of cytoplasm and large number of lysosomes. Urinary space is packed with swollen podocytes. ×2,600
- Plate 5. Group AN<sub>2</sub>. Podocyte completely detached from basement membrane, which is wrinkled and covered with basement membrane-like material. ×8,300
- Plate 6. Group AN<sub>2</sub>. Adhesion of basement membrane to Bowman's capsule (capsular adhesion). Basement membrane is covered with newly formed basement membrane-like material. Pycnotic changes of parietal epithelium are visible. ×3,300
- Plate 7. Group AN<sub>2</sub>. Electron micrograph showing capsular adhesion. Portion of basement membrane is extensively denuded. Note foam cell in capillary lumen and fibrillar material in urinary space (arrow head). ×2,600
- Plate 8. Group AN<sub>2</sub>. Electron micrograph showing thickening and wrinkling of basement membrane. ×6,600
- Plate 9. Group AN<sub>2</sub>. Widening of subendothelial space, containing microfibrils (arrow). Note swelling of podocyte. ×10,000
- Plate 10. Group AN<sub>2</sub>. Hyalinosis in focal sclerotic lesion, with capillary lumen totally obliterated. Note pycnotic changes of endothelial cell. ×3,300
- Plate 11. Group AN<sub>2</sub>. Electron micrograph of hyalinosis in the focal sclerotic lesion, containing scattered cell debris (arrow). ×5,000
- Plate 12. Normal control. Fibronectin is localized in mesangial matrix, especially in area immediately surrounding mesangial cell process and between endothelial and mesangial cells (arrow). ×6,600
- Plate 13. Normal control. Focal staining of fibronectin is found at interface between parietal epithelium and Bowman's capsule. ×6,600
- Plate 14. Group AN<sub>2</sub>. Mesangial fibronectin is increased proportionately with expansion of mesangial matrix. ×3,300
- Plate 15. Group AN<sub>2</sub>. Fibronectin is densely localized in the region of capsular adhesion. ×3,300
- Plate 16. Group AN<sub>2</sub>. Fibronectin exists partly in fibrillar fashion in the region of capsular adhesion. ×2,600
- Plate 17. Group AN<sub>2</sub>. Deposition of fibronectin is also observed subendothelially along basement membrane. ×2,600
- Plate 18. Normal control. Electron micrograph of section stained with control antibody, being preincubated with purified fibronectin. No staining of mesangium is seen. ×5,000

Explanation of abbreviations

PD, podocyte    EN, endothelium    MC, mesangial cell    PEP, parietal epithelium  
MM, mesangial matrix    BM, basement membrane    BC, Bowman's capsule  
CL, capillary lumen    US, urinary space    V, vacuole    LY, lysosome    E, erythrocyte

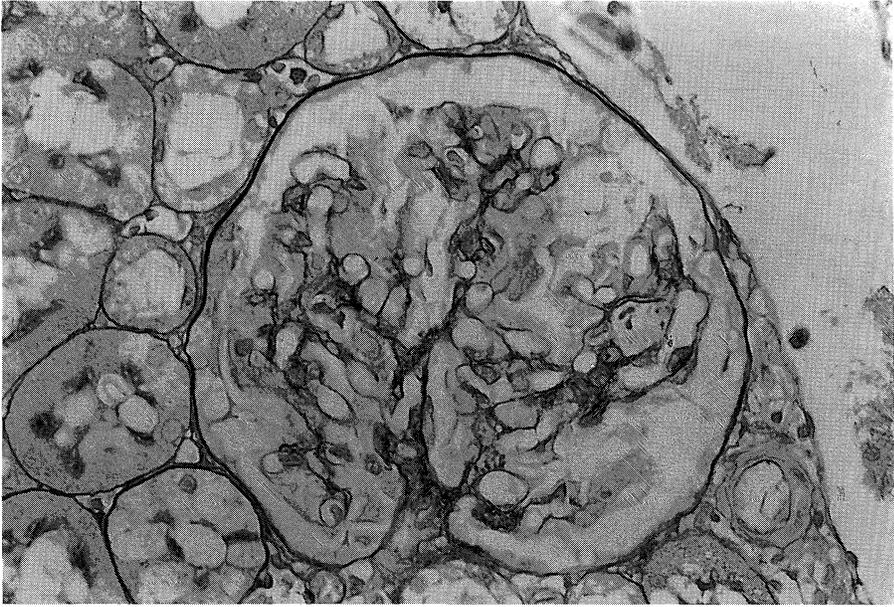


Plate 1-A.



Plate 1-B.

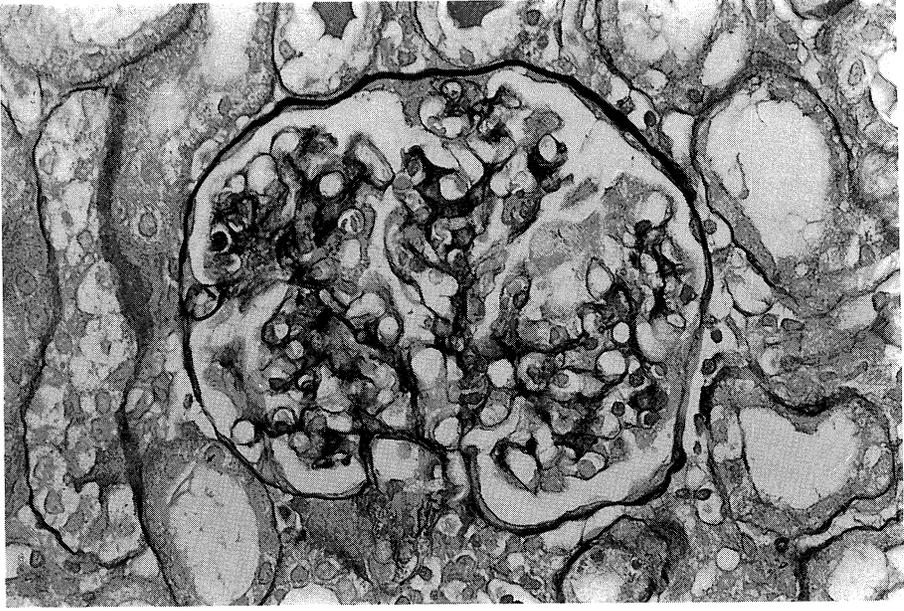


Plate 1-C.

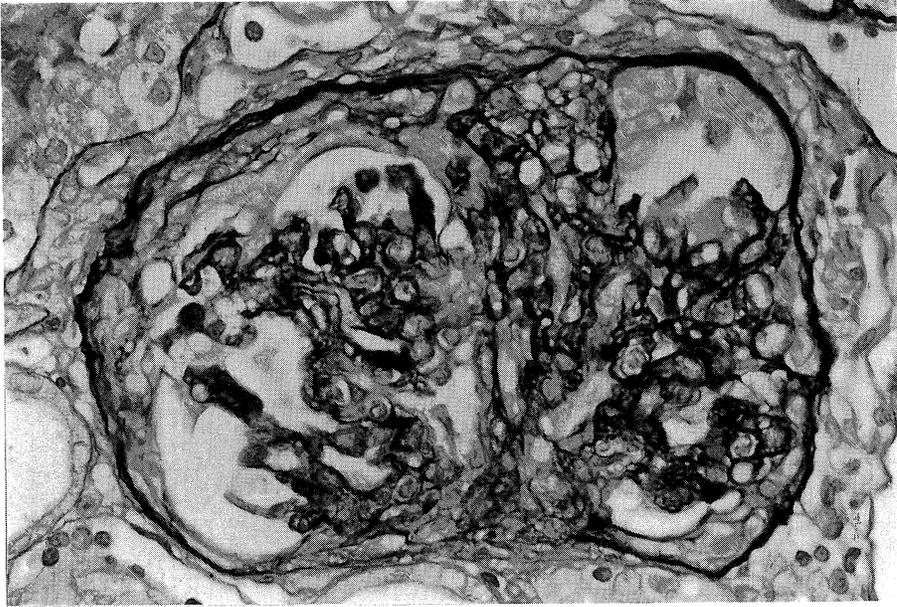


Plate 1-D.

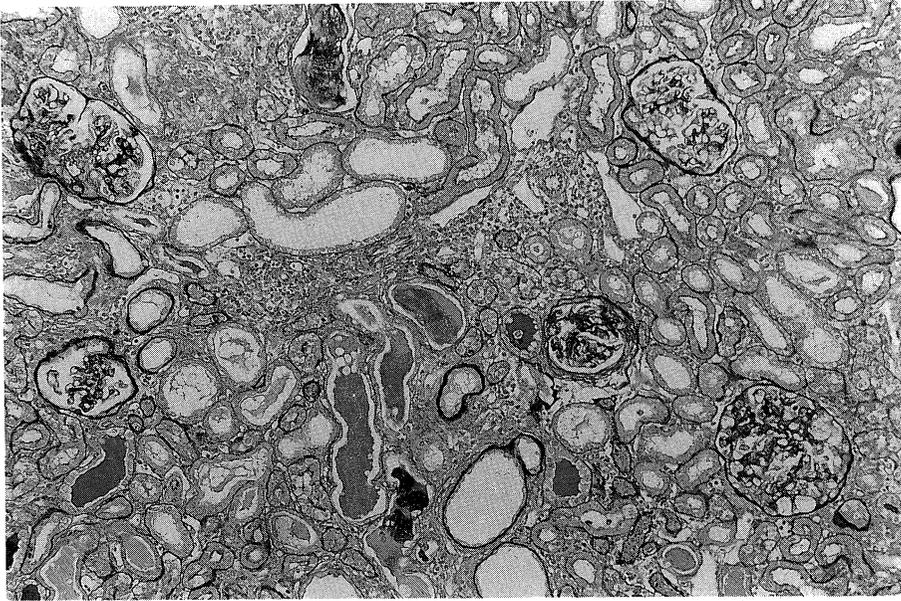


Plate 2.

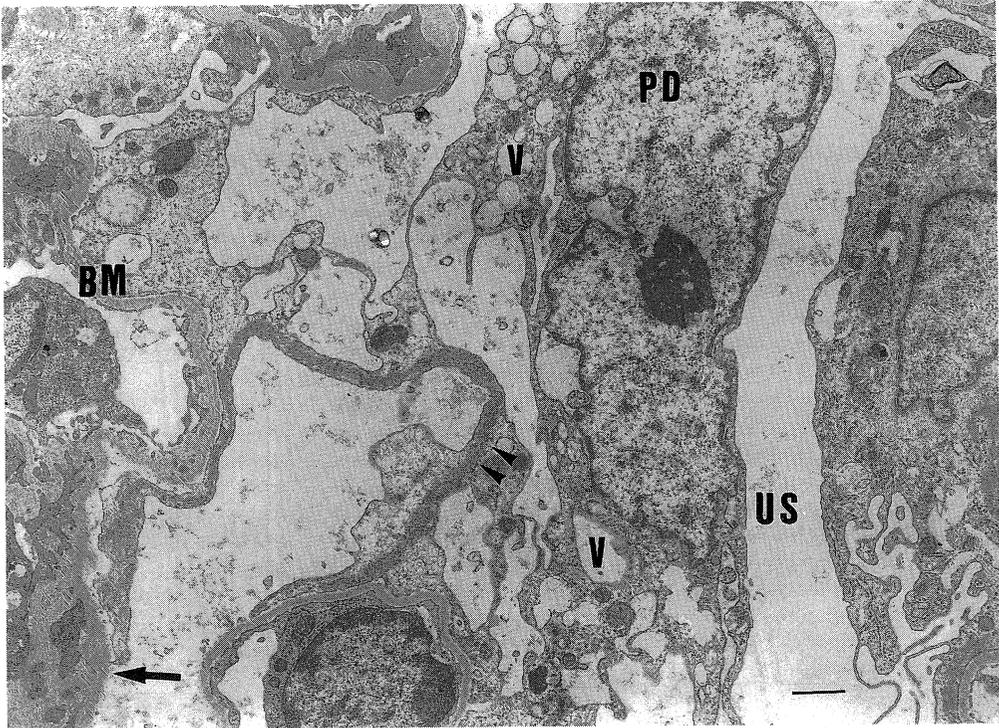


Plate 3.

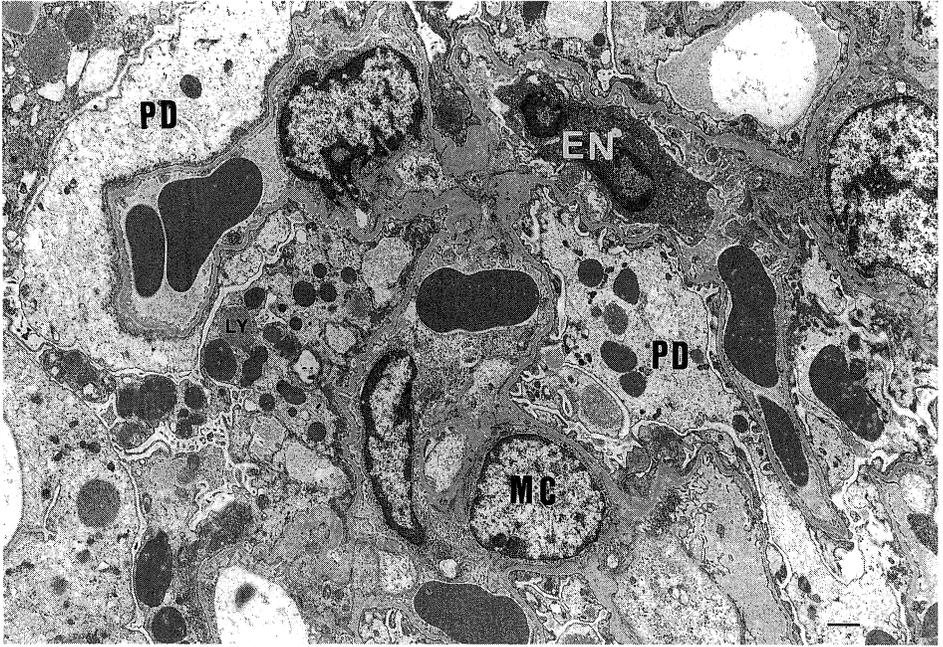


Plate 4.



Plate 5.

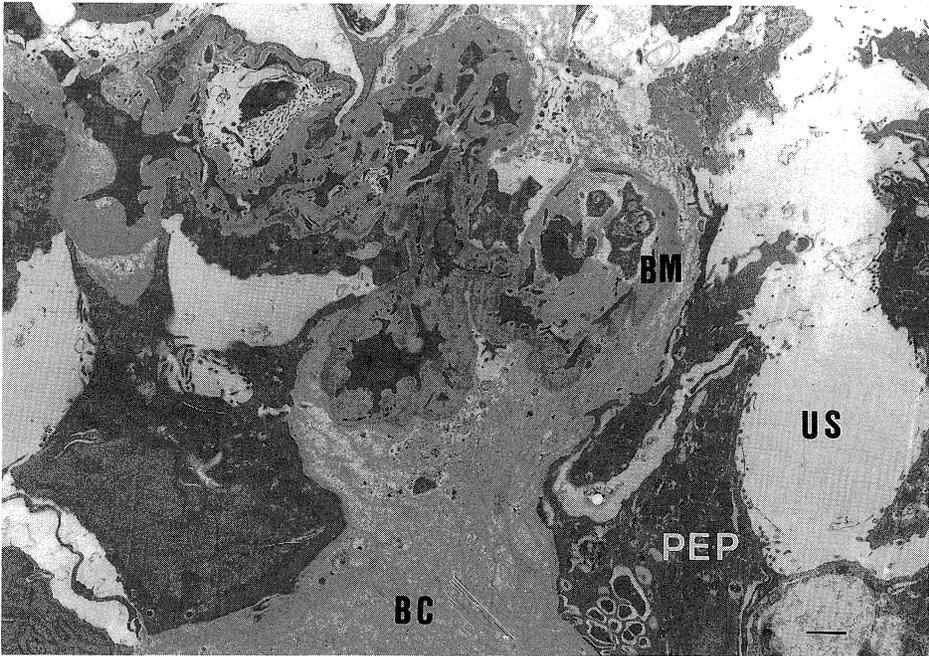


Plate 6.



Plate 7.

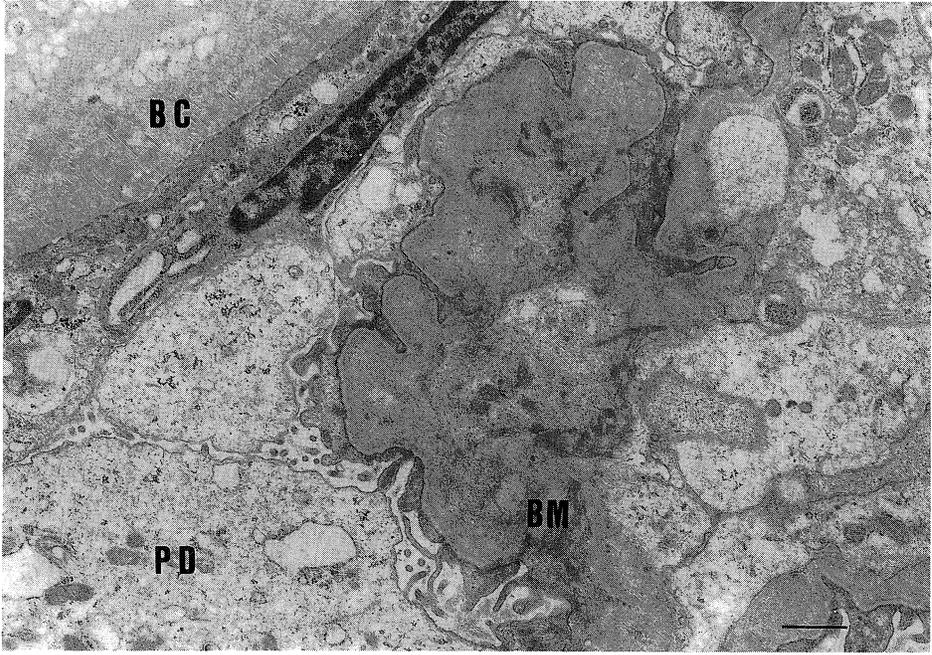


Plate 8.

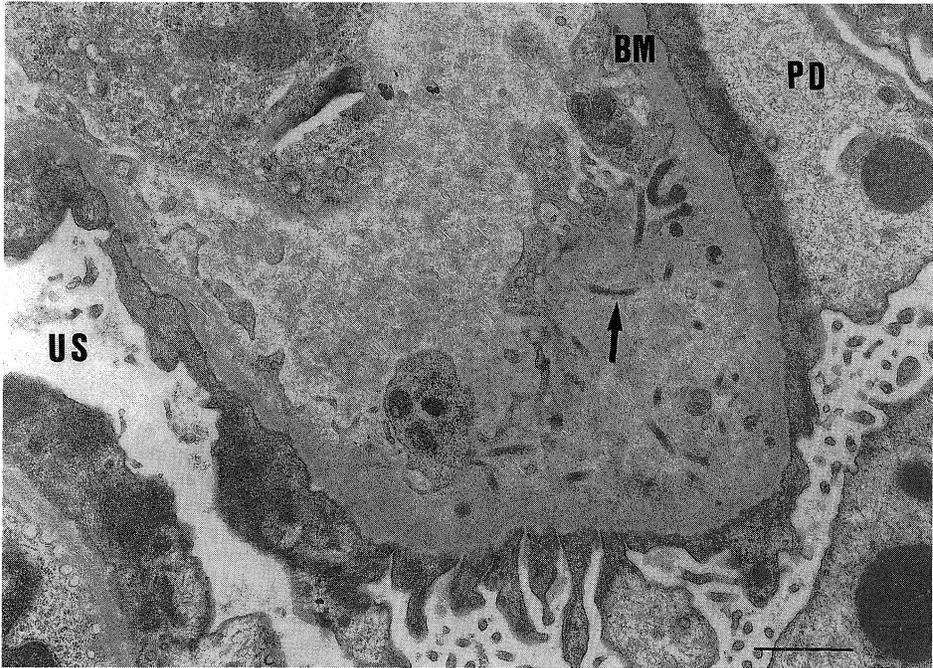


Plate 9.

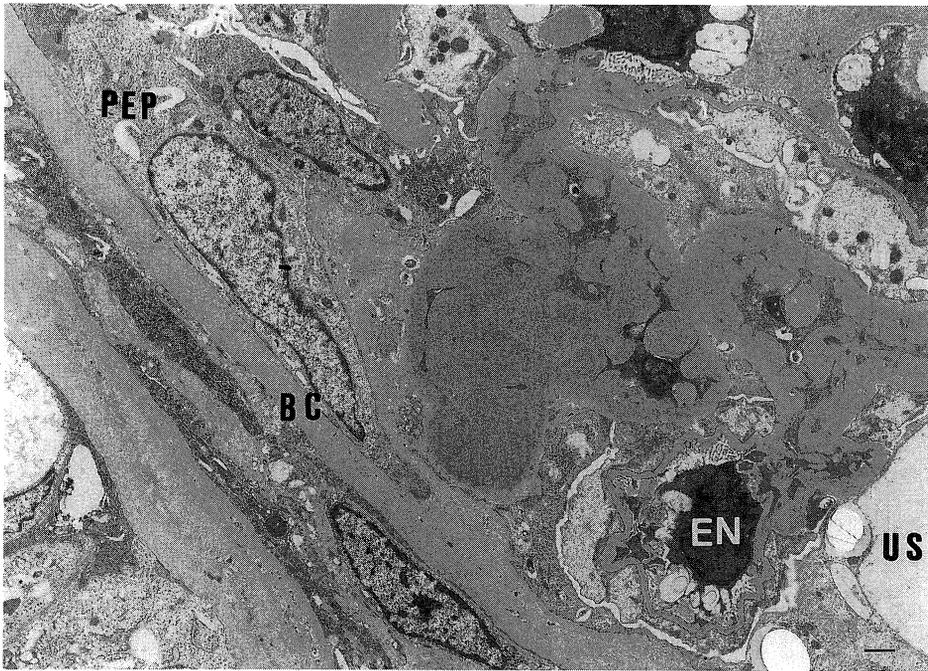


Plate 10.

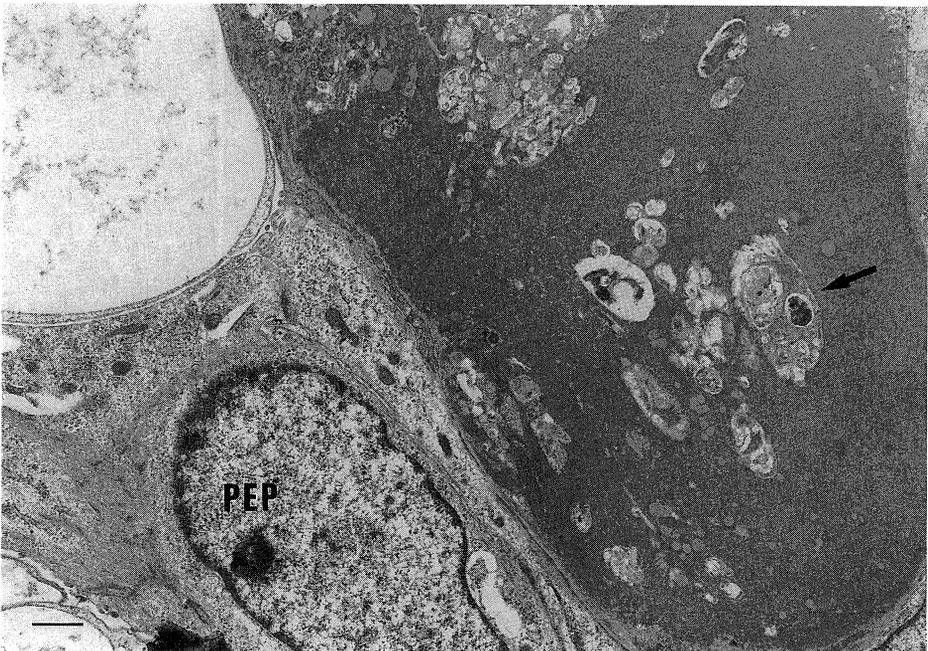


Plate 11.

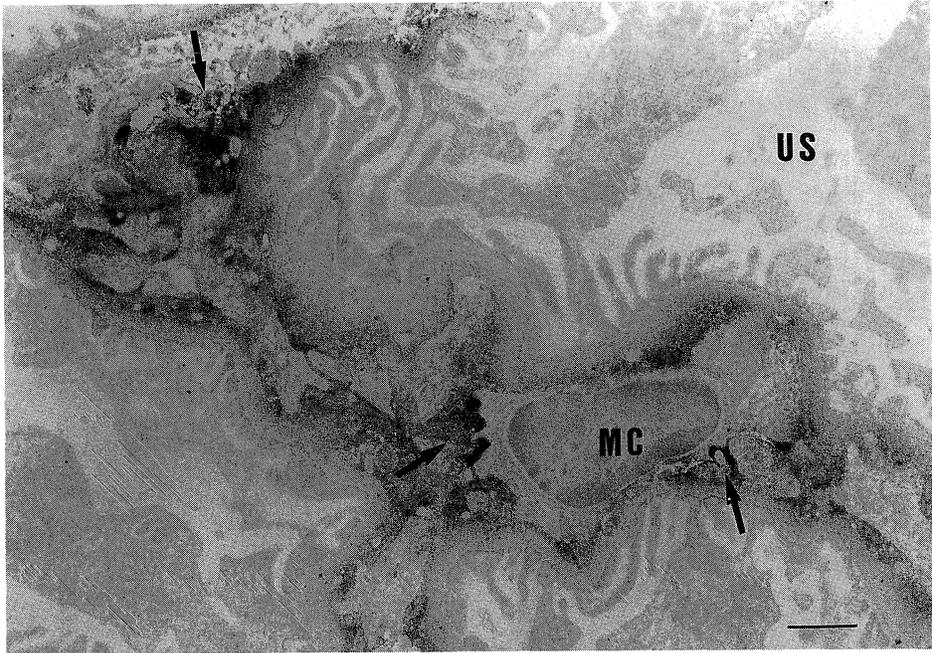


Plate 12.

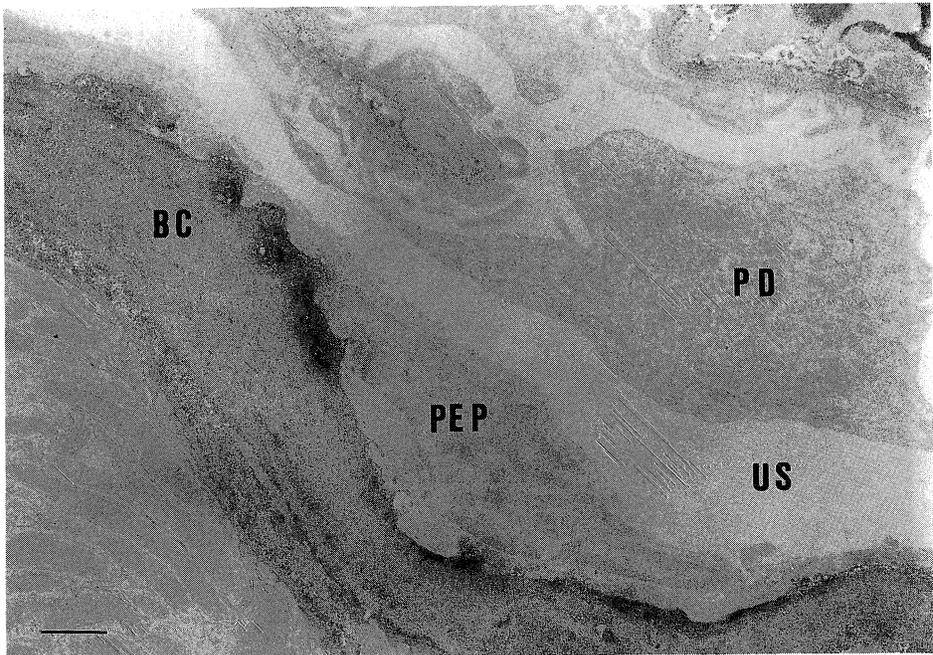


Plate 13.

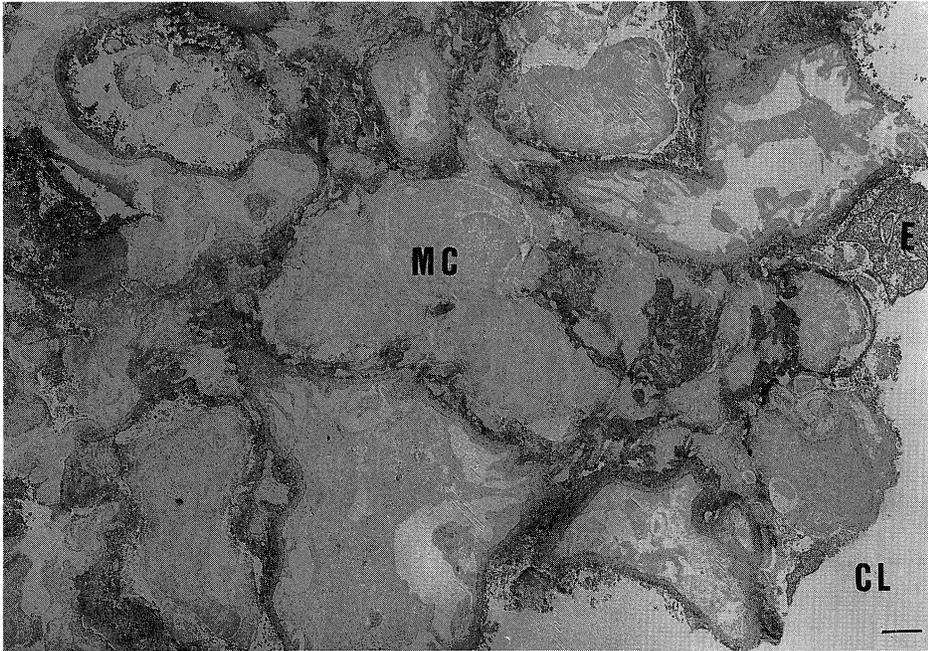


Plate 14.

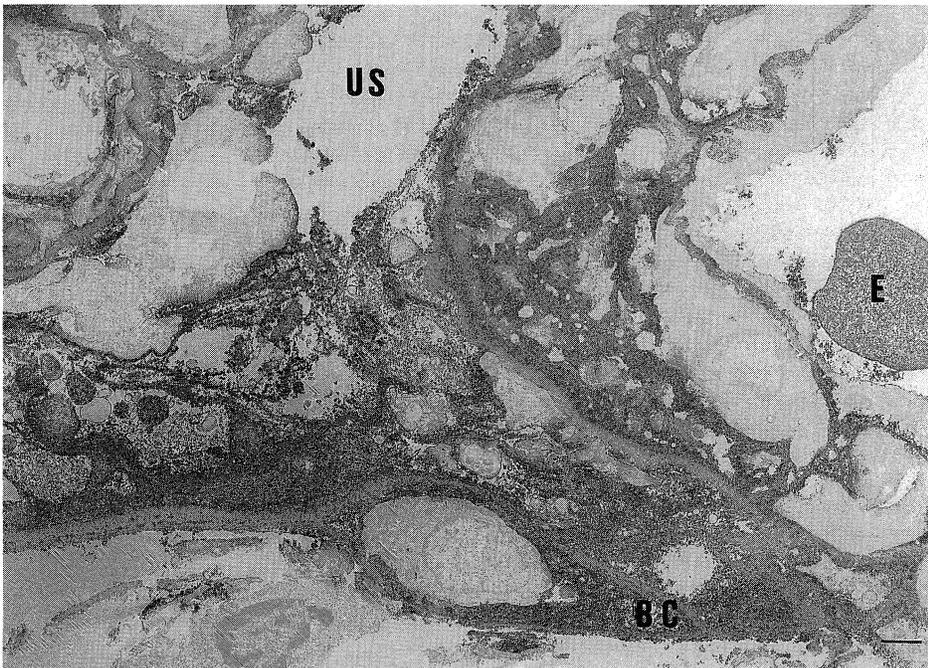


Plate 15.

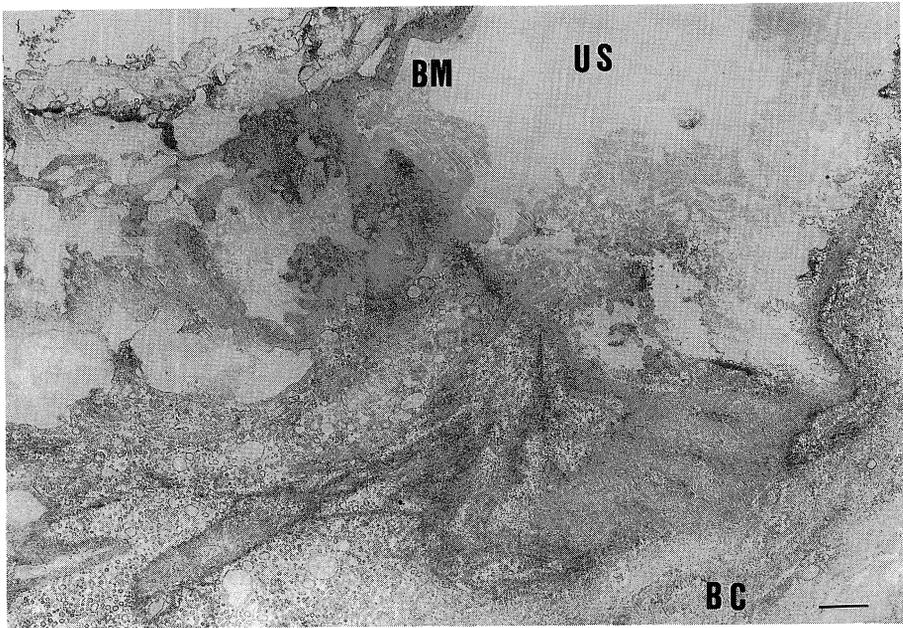


Plate 16.

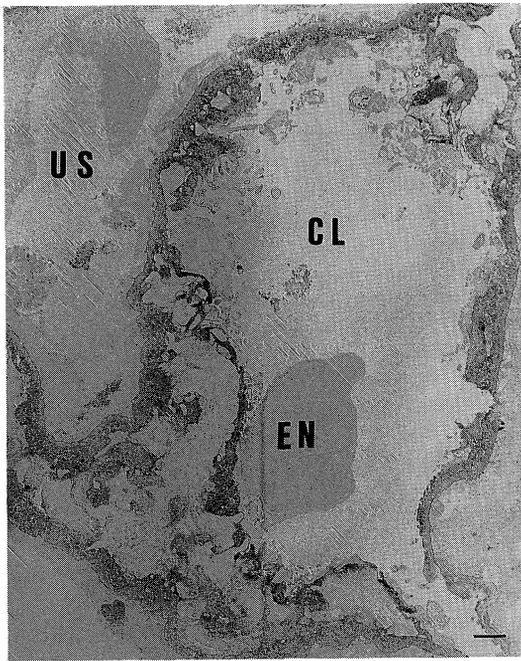


Plate 17.

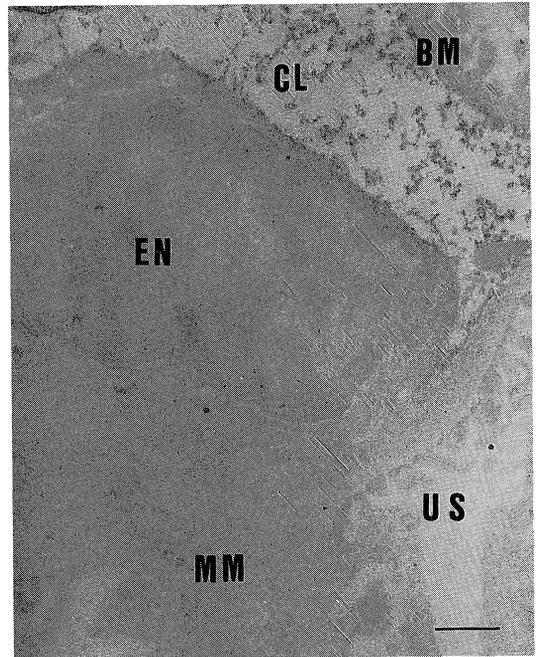


Plate 18.