

A Study of Mesangial Clearance Kinetics in Glomerulosclerosis Model –The Impairment of Mesangial Clearing Function of Macromolecules in Daunomycin Treated Rats and its Improvement by ACEI–

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8174

糸球体硬化症モデルにおけるメサンギウム浄化機構に関する研究

—ダウノマイシン投与ラットのメサンギウム異物処理機構の障害と
アンギオテンシン変換酵素阻害剤によるその改善効果について—

金沢大学医学部内科学第二講座 (主任: 竹田亮祐教授)

此 下 忠 志

(平成2年1月24日受付)

糸球体硬化病変の進展に及ぼすメサンギウム浄化機構の役割とその調節機構を明らかにするために、著者はダウノマイシン投与ラットのメサンギウム浄化機構を検討し、さらにアンギオテンシン変換酵素阻害剤 (angiotensin converting enzyme inhibitor, ACEI) のメサンギウム浄化機構に及ぼす効果を検討した。第1の実験では、第1群のラットは無処置とし、第2、第3群のラットにはダウノマイシンを経静脈的に投与した。第1、2群にはその3週間後に、第3群には3カ月後に熱凝集ヒト免疫グロブリン G (heat aggregated human immunoglobulin G, AH-IgG) を経静脈的に投与し、糸球体内の AH-IgG の集積程度、生化学的検査成績、組織学的所見を評価した。第1群に比較して第2群では大量の蛋白尿、間質病変を認めた。第3群ではそれらに加えて、高窒素血症、糸球体硬化病変を認めた。血清の AH-IgG 濃度は静注後の同一時間では各群間で有意差を認めなかった。投与16時間後の糸球体内の AH-IgG の集積は第1群では消失する傾向にあったのに対して、第2、3群では集積が持続していた。第2の実験ではダウノマイシン投与3週間後のラットを用い、A群にはエナラプリルを、B群には生理的食塩水を腹腔内に投与した。その1時間後に AH-IgG を経静脈的に投与し、糸球体内の AH-IgG の集積程度、血圧、生化学的検査成績、組織学的所見を評価した。生化学的検査成績、組織学的所見には2群間で有意差を認めなかった。A群ではエナラプリルの投与後、有意に血圧が低下した。血清の AH-IgG 濃度は2群間で有意差を認めなかった。投与12時間後の糸球体内の AH-IgG の集積はA群では消失傾向にあったのに対してB群では集積が持続していた。これらの成績からダウノマイシン投与ラットでは、糸球体硬化病変の出現以前の早期にメサンギウム浄化機構が障害されていることが明らかとなり、メサンギウム浄化機構の悪化が糸球体硬化病変の形成に促進的に作用している可能性が示唆された。さらにダウノマイシン投与ラットでは ACEI がメサンギウム浄化機構を改善し得る可能性が示唆された。

Key words glomerular mesangium, daunomycin, glomerulosclerosis, heat aggregated human immunoglobulin G, angiotensin converting enzyme inhibitor

腎糸球体メサンギウムには、数々の生理学的な働きがあるとされている^{1)~4)}。その中でメサンギウム浄化機構は、炎症惹起物質と考えられる免疫複合体⁵⁾⁶⁾など

の比較的分子量の大きい異物の、糸球体内の集積を持続させないという点で、重要な役割を担っていると考えられる。

Abbreviations: ACEI, angiotensin converting enzyme inhibitor; AH-IgG, heat aggregated human immunoglobulin G; AT-II, angiotensin II; BUN, blood urea nitrogen; IF, immunofluorescence; S-D rat, Sprague-Dawley rat

メサンギウムに集積した変性蛋白質などの分子量の大きな物質は、主にメサンギウム流路と呼ばれる糸球体内通路を経て血管極より間質へ放出される形で処理されるが、この過程がメサンギウム浄化機構である¹⁰⁾。しかし、このメサンギウム浄化機構に関して、腎機能の低下や組織学的な糸球体硬化病変の程度との関係ははまだ明らかではない。そこで先ず著者は、糸球体硬化症のモデルと成り得るとされるダウノマイシン投与ラット⁷⁾を用い、この点を検討した。

一方近年、メサンギウム細胞はアンギオテンシン-II (angiotensin-II, AT-II) などの血管作働性物質による収縮機構が、細胞内情報伝達機構のレベルで解明されつつある⁹⁾⁻¹⁰⁾。しかし、その収縮と弛緩の生理学的意義は明らかでない面が多い。そこで次に著者は、糸球体硬化病変の未だ出現していない段階のダウノマイシン投与ラットを用いて、アンギオテンシン変換酵素阻害剤 (angiotensin converting enzyme inhibitor, ACEI) のメサンギウム浄化機構に及ぼす影響について検討した。

材料および方法

I. 材 料

実験動物には、体重 100g の雄性 Sprague-Dawley 系ラット (Sprague-Dawley rat, S-D rat) を用いた。実験 1 では各群 10 匹ずつ第 1 群、第 2 群、第 3 群の 3 つの群を設定した。実験 2 では各群 6 匹ずつ A 群、B 群の 2 つの群を設定した。

II. 方 法

1. 投与薬物等の調製

1) ダウノマイシンの調製

ダウノマイシン (Sigma Chemical Company, St. Louis, U. S. A.) は生理食塩水で 4mg/ml に調製した。

2) エナラプリルの調製

ACEI としてエナラプリル (萬有製薬, 東京) を生理食塩水で 10mg/ml に調製した。

3) 熱凝集ヒト免疫グロブリン G の作製

メサンギウムの浄化機構を評価する比較的分子量の

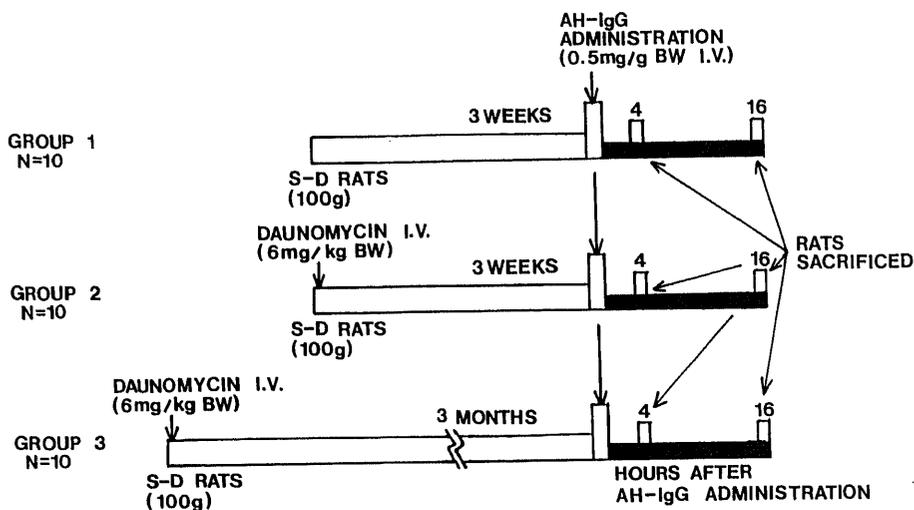


Fig. 1. Schematic representation of the first experimental design. Male Sprague-Dawley rats initially weighed 100g were used. Rats in group 1 received no treatment, and rats in group 2 and 3 received daunomycin (6mg/kg BW) intravenously. After 3 weeks in groups 1 and 2, and after 3 months in group 3, rats were placed in metabolic cages for 48 hours, then blood and urinary samples were taken. Thereafter, AH-IgG (0.5mg/g BW) was injected intravenously. Rats were sacrificed under light ether anesthesia by exsanguination at 4 or 16 hours after administration of AH-IgG. At the time of sacrifice, kidneys were taken for histologic and immunofluorescence study. Blood obtained at the time of sacrifice was used for determination of serum AH-IgG concentration.

大きい異物として、熱凝集ヒト免疫グロブリン G (heat aggregated human immunoglobulin G, AH-IgG) を用いた。AH-IgG は Michael ら¹²⁾の方法に準じて作製した。即ち human gamma globulins fraction II (Miles Laboratory Inc., Kankakee, U. S. A.) をリン酸緩衝食塩水で 2% に調製後、63°C の水槽内で 15 分間熱した後、104,000g、90 分間超遠心し、得られた沈渣をリン酸緩衝食塩水で 50mg/ml に調製した。

2. 実験計画

1) 実験 1

図 1 のように、自由飲水、自由飼料摂取下で、第 1 群は、ダウノマイシンは投与せず 3 週間飼育し、第 2 群および第 3 群は、ダウノマイシンを kg 体重あたり 6 mg 尾静脈より投与後、各々 3 週間、3 カ月間飼育した。飼育期間最終の 48 時間、代謝ケージを用い、採尿、採血した。その後体重を測定し、AH-IgG を g 体重あたり 0.5mg 尾静脈より投与し、各群につき 5 匹ずつ、各々 4 時間後および 16 時間後に腹部大動脈より採血後、屠殺し腎臓を摘出した。

2) 実験 2

図 2 のように、自由飲水、自由飼料摂取下で、ダウノマイシンを kg 体重あたり 6mg 尾静脈より投与し、3 週間飼育した。飼育期間最終の 48 時間、代謝ケージを用い、採尿、採血した。その後体重を測定し、A 群にはエナラプリルを、Richer ら¹²⁾に準じ、kg 体重あたり 25mg を、B 群には同量の生理食塩水を腹腔内投与した。この投与前、投与 1 時間後、4 時間後、12 時間後の計 4 回、ラット自動血圧計 RICK PS-100 (理研開発社、東京) を用い血圧を測定した。この腹腔内投与 1 時間後に、AH-IgG を g 体重あたり 0.4mg 尾静脈より投与し、その 12 時間後に腹部大動脈より採血後、屠殺し腎臓を摘出した。

3. 測定方法

1) 生化学的検査成績

尿中蛋白濃度はスルホサリチル酸法で、尿中クレアチニン値、血清総蛋白濃度、血中尿素窒素値 (blood urea nitrogen, BUN)、血清クレアチニン値はオートアナライザーを用いて測定し、クレアチニンクリアランス値を算出した。

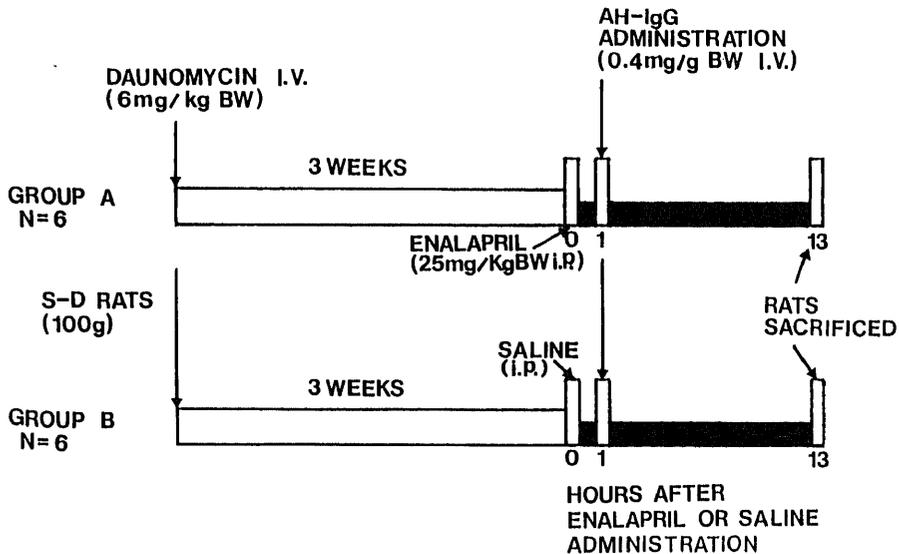


Fig.2. Schematic representation of the second experimental design. Male Sprague-Dawley rats initially weighed 100g were used. After 3 weeks of daunomycin injection (6mg/kg BW), rats were placed in metabolic cages for 48 hours, then blood and urinary samples were taken. Then, rats in group A received enalapril (25mg/kg BW) and those in group B received saline intraperitoneally. One hour thereafter, AH-IgG (0.5mg/g BW) was injected intravenously. Rats were sacrificed under light ether anesthesia by exsanguination at 12 hours after administration of AH-IgG. At the time of sacrifice, kidneys were taken for histologic and immunofluorescence study. Blood obtained at the time of sacrifice was used for determination of serum AH-IgG concentration.

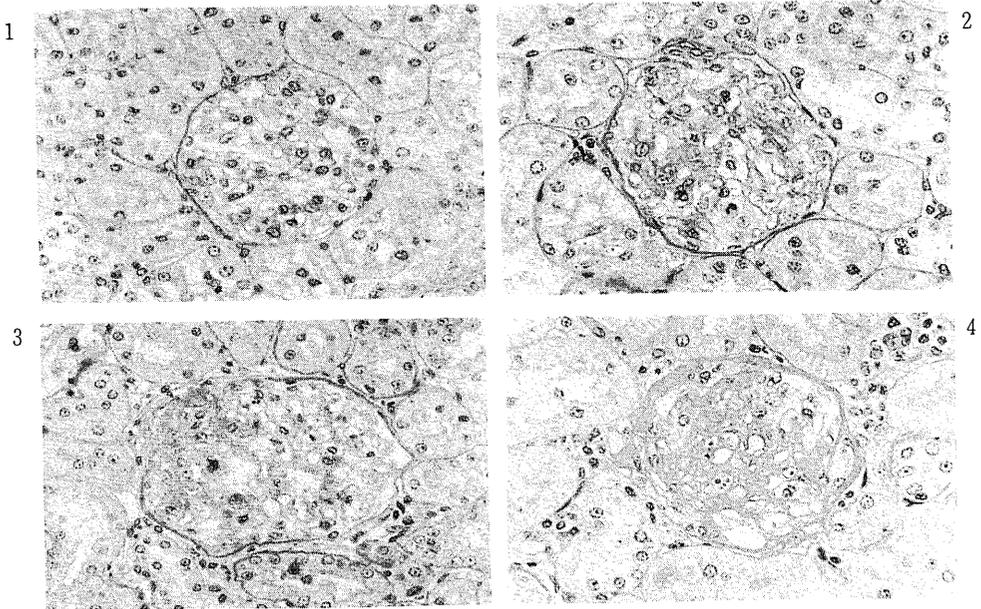


Fig. 3. Semiquantitative assessment of glomerular changes (glomerulosclerosis index). Glomerular changes were scored using scale: 1, showing normal (upper left); 2, showing diffuse mesangial expansion (upper right); 3, showing mesangial expansion plus glomerulosclerosis affecting less than 50% of the tuft (lower left); 4, showing glomerulosclerosis affecting more than 50% of the tuft (lower right). More than fifty glomeruli were examined and the average glomerulosclerosis index was calculated. Periodic acid Schiff stain. $\times 400$.

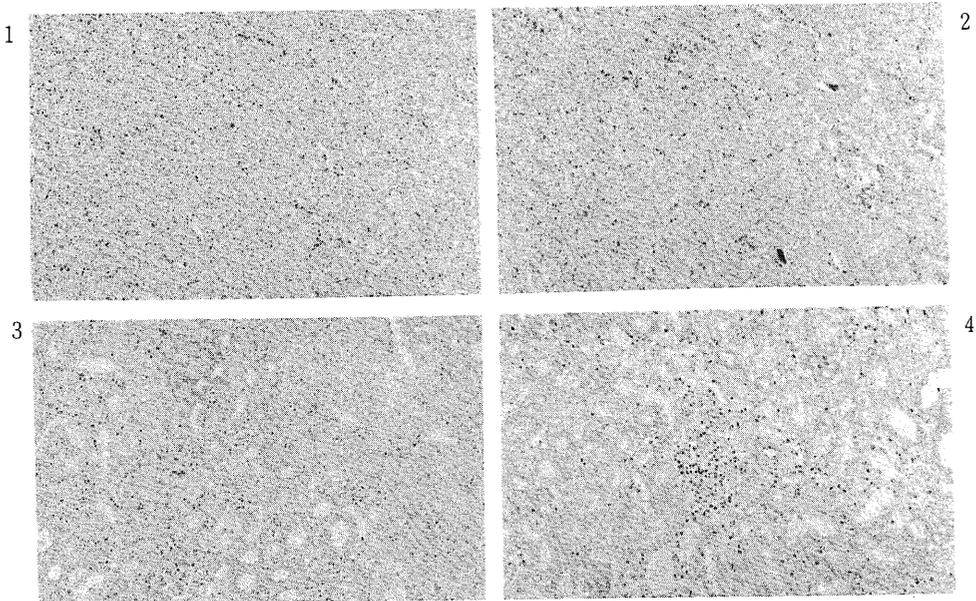


Fig. 4. Semiquantitative assessment of tubulo-interstitial changes. Tubulo-interstitial changes were scored as follow: 1, showing normal tubuli and normal interstitium (upper left); 2, showing tubular casts formation (upper right); 3, showing tubular dilatations (lower left); 4, showing marking interstitial changes (lower right). Periodic acid Schiff stain. $\times 100$.

2) 血清 AH-IgG 濃度の測定

血清 AH-IgG 濃度は、屠殺時の採血標本を用い、ヤギ抗ヒト IgG 抗体 (Cappel Laboratory Inc., West Chester, U. S. A.) とペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG 抗体 (Cappel Laboratory Inc.) を用いた酵素免疫測定法のサンドウィッチ法で測定した。

4. 組織学的評価

屠殺時に摘出した腎組織を Susa 固定液で固定後、パラフィン包埋し、4 μ に薄切し、hematoxylin-eosin, periodic acid Schiff 染色を行い、光学顕微鏡下で観察した。糸球体の硬化度は Jackson ら¹³⁾の方法に準じた。即ち、図3のように、左上のほぼ正常な糸球体から右下のようにほぼ全体に硬化した糸球体までを4段階に、各々、1点から4点までを配し、各標本の50個以上の糸球体の点数を平均し、糸球体硬化指数とし

て算出した。間質病変は Bertani らのアドリアマイシンラットの腎間質病変に関する報告¹⁴⁾に準じた。即ち、図4のように、変化のないものを1、円柱形成と軽度の尿細管拡張のあるものを2、著明な尿細管拡張を認めるものを3、さらに間質の細胞浸潤を認めるものを4とした。

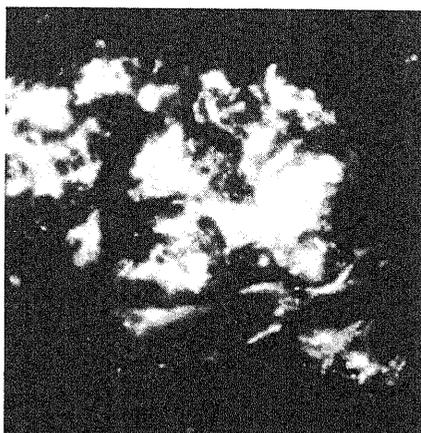
5. 糸球体内 AH-IgG 集積程度の評価

糸球体内の AH-IgG の集積程度は、fluorescein isothiocyanate 標識家兎抗ヒト IgG 抗体 (Behringwerke, A. G., Marburg, West Germany) を用い、蛍光抗体直接法により評価した。即ち、図5のように、左上の強陽性を示すものから、右下の陰性のものまでを順に、2+, 1+, \pm , -とした。

III. 統計学的分析法

群間の比較には、対応ある t 検定法, Student の

2+



1+

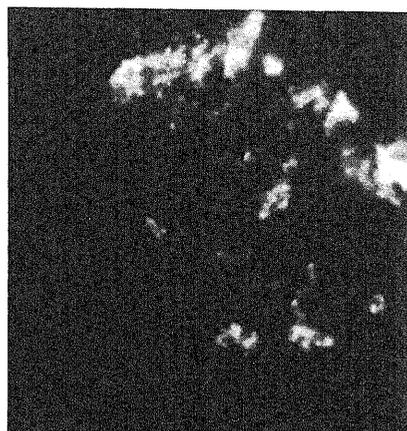
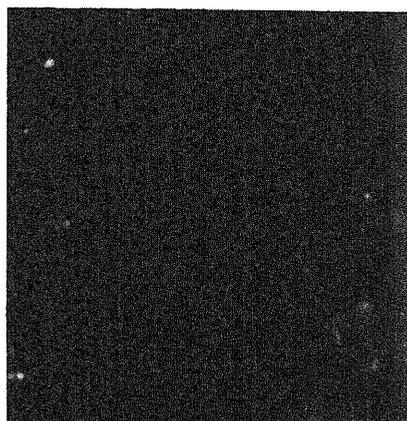
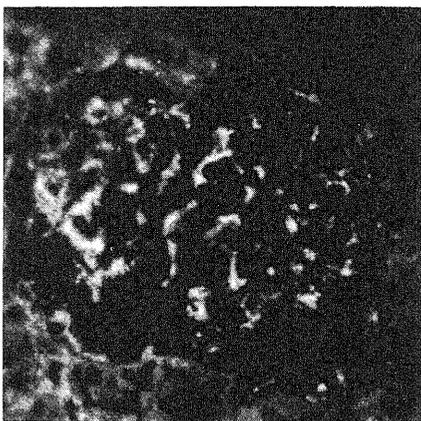
 \pm 

Fig. 5. Semiquantitative assessment of glomerular AH-IgG accumulation. Intensity of immunofluorescence was scored as follows: 2+, showing strongly positive (upper left); 1+, showing positive (upper right); \pm , showing faintly positive (lower left); -, showing negative (lower right). $\times 400$.

t 検定法, Cochran-Cox test, Wilcoxon の順位和検定を用いた.

成 績

I. 実験 1

体重は第 3 群, 第 1 群, 第 2 群の順で大きく, 各群間で有意差を認めた. 生化学的検査成績では, 血清総蛋白値は第 3 群でのみ有意に低下していたが, 尿蛋白量は第 3 群, 第 2 群, 第 1 群の順に多く, 各群間に有意差を認めた. BUN 値は第 1 群, 2 群と比較して第

3 群で有意に上昇していた. 血清クレアチニン値は各群間で有意な差を認めなかったが, クレアチニンクリアランス値は第 1, 2 群と比較して第 3 群で有意に低下していた (表 1).

組織学的な検討では, 糸球体硬化指数は第 3 群でのみ有意に上昇していた (図 6). 間質病変の強度は各群間で有意差を認め, 第 3 群, 第 2 群, 第 1 群の順であった (図 7).

AH-IgG の血清濃度は, 各群とも, 静注 4 時間後の値よりも 16 時間後の値が有意に低下していたが, 各群

Table 1. Body weight and chemical findings in groups 1, 2 and 3

	Group 1 (N=10)	Group 2 (N=10)	Group 3 (N=10)
Body weight (g)	303±22	229±28	339±43
Serum total protein (g/dl)	6.51±0.80	6.14±0.53	4.86±1.61
Urinary protein (mg/day)	38.7±19.5	174.5±93.4	320.9±149.4
Blood urea nitrogen (mg/dl)	20.8±3.51	19.9±5.86	28.7±7.93
Serum creatinine (mg/dl)	0.38±0.09	0.39±0.08	0.43±0.11
Creatinine clearance (ml/day/100g BW)	556±192	553±131	315±186

Each value represents means±S.D. Differences in all variables are evaluated with Student's t test or Cochran-Cox test. *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001

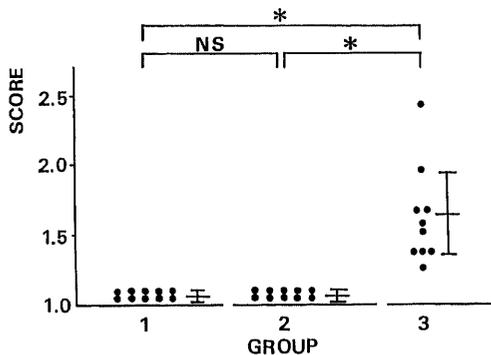


Fig. 6. Glomerulosclerosis index in groups 1, 2 and 3. Vertical bars represent means±S.D. *p<0.001 by Cochran-Cox test.

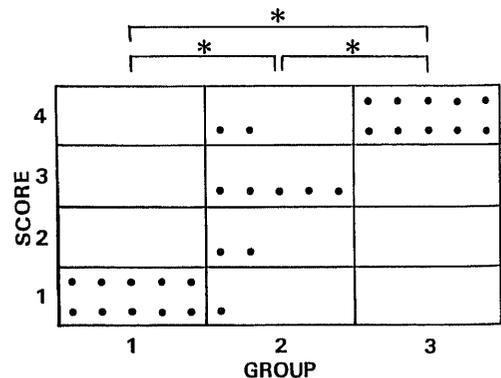


Fig. 7. Tubulo-interstitial changes in groups 1, 2 and 3. *p<0.001 by Wilcoxon rank sum test.

間の同一時間での AH-IgG の濃度には有意差は認められなかった (図 8).

図 9 に、蛍光抗体直接法による糸球体内の AH-IgG の集積程度の評価を示した. AH-IgG の静注 4 時間

後の蛍光強度には、各群間に有意差を認めなかった. 16時間後の蛍光強度は、第 1 群に比較して、第 2 群、第 3 群で有意に強かった. 第 3 群では 4 時間後、16時間後とも、第 2 群より強い集積を認める傾向にあった

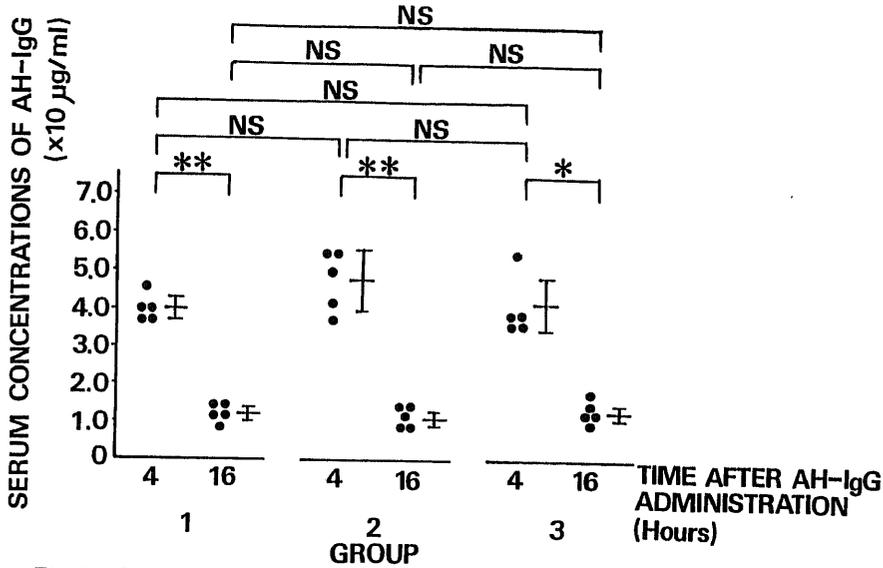


Fig. 8. Serum concentrations of AH-IgG at 4 and 16 hours after administration of AH-IgG in groups 1, 2 and 3. Vertical bars represent means±S.D. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ by Student's t or Cochran-Cox test.

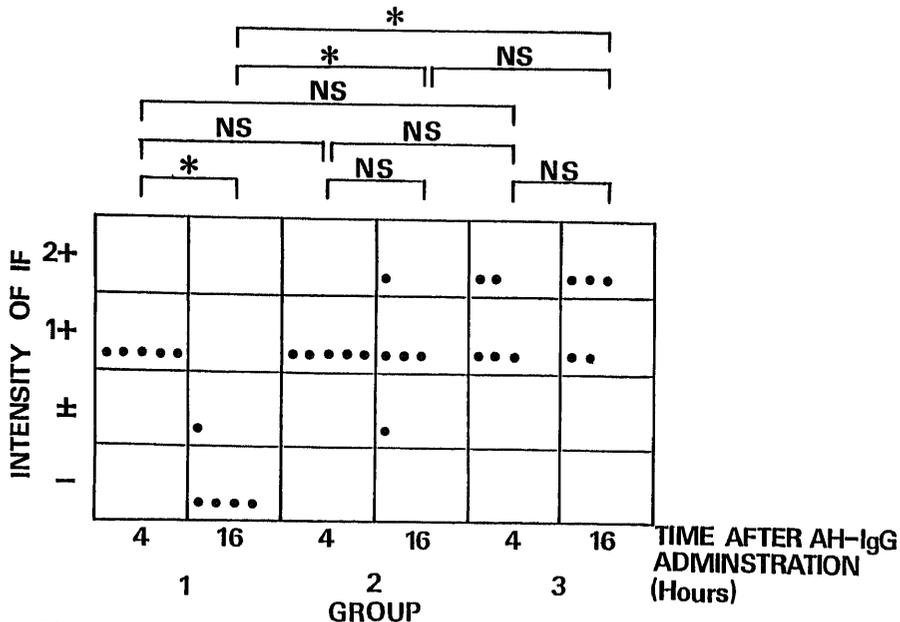


Fig. 9. Immunofluorescence microscopic studies on glomeruli staining for AH-IgG at 4 or 16 hours after administration of AH-IgG in groups 1, 2 and 3. * $p < 0.01$ by Wilcoxon rank sum test.

が、有意差はなかった。

II. 実験 2

体重、生化学的検査成績では 2 群間に有意差を認めなかった。組織学的な検討では、実験 1 における第 2 群と同様な所見で、間質病変は認められるものの、明らかな糸球体硬化性病変は認められない段階であり、

糸球体硬化指数、間質病変の強度ともに 2 群間で有意差を認めなかった (表 2)。

図10にエナラプリルないしは生理食塩水投与後の血圧の変化を示した。A 群では前値に比較して投与 1 時間後、4 時間後、12 時間後とも有意に低下していたのに対し、B 群では有意な変化は認められなかった。

Table 2. Body weight, chemical findings and histological findings in groups A and B

	Group A (N=6)	Group B (N=6)
Body weight (g)	311±21	301±16
Serum total protein (g/dl)	6.85±0.35	6.71±0.24
Urinary protein (mg/day)	76.6±37.5	107.1±77.0
Blood urea nitrogen (mg/dl)	15.0±1.35	16.9±2.17
Serum creatinine (mg/dl)	0.25±0.01	0.26±0.03
Creatinine clearance (ml/day/100g BW)	459±120	484±36
Glomerulosclerosis index	1.03±0.02	1.05±0.04
Tubulo-interstitial change		
score	number	number
1	1	0
2	0	1
3	4	2
4	1	3

Each value represents mean±S.D. except for tubulo-interstitial change. Differences in all variables except for creatinine clearance and tubulo-interstitial change are evaluated with Student's t test, in creatinine clearance from Cochran-Cox test and in tubulo-interstitial change from Wilcoxon rank sum test.

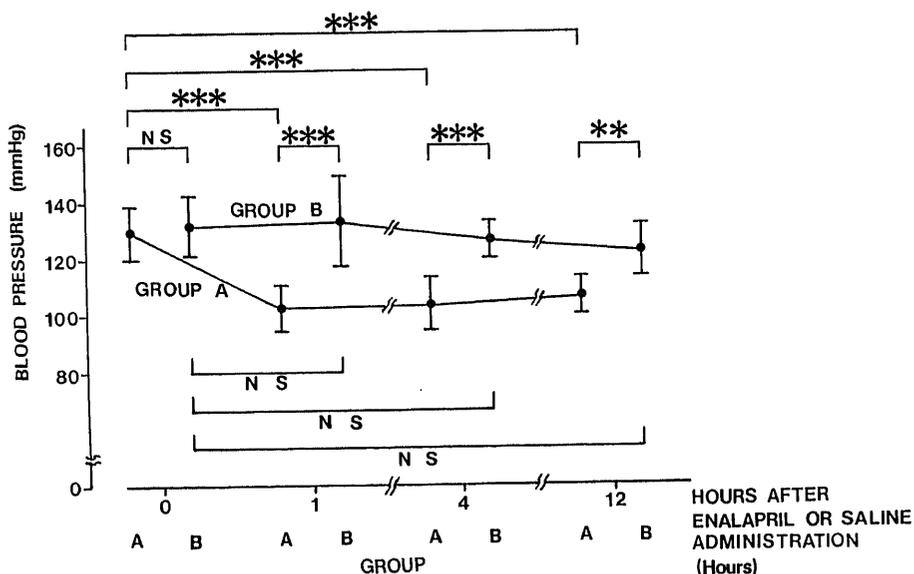


Fig.10. Changes in blood pressure in groups A and B. Vertical bars represent means±S.D. **p<0.01, ***p<0.001 by paired t or Student's t test.

AH-IgG の血清濃度は、2 群間に有意差を認めなかった (図11)。

図12に蛍光抗体直接法による糸球体内の AH-IgG の集積程度の評価を示した。AH-IgG の静注12時間後の蛍光強度は B 群に比較して、A 群で有意に低かった。

考 察

腎糸球体メサンギウムには現在、糸球体の支持、糸

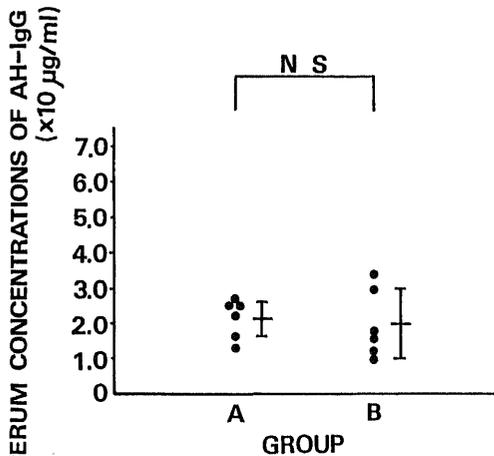


Fig.11. Serum concentrations of AH-IgG at 12 hours after administration of AH-IgG in group A and B. Vertical bars represent means \pm S.D. Difference is inferred from Student's t test.

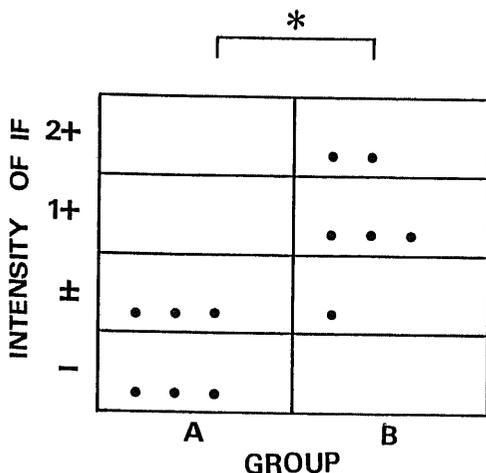


Fig.12. Immunofluorescence microscopic studies on glomeruli staining for AH-IgG at 12 hours after administration of AH-IgG in group A and B. * $p < 0.01$ by Wilcoxon rank sum test.

球体濾過量の調節、異物の浄化等の生理学的な働きがあるとされている¹¹⁻¹⁴。メサンギウム領域は、毛細血管内の成分が糸球体基底膜を通らずに侵入し得るという、解剖学的構造を有しているの、炎症惹起物質と考えられる免疫複合体⁵⁰などの異物が、容易に直接負荷されることになる。

かつてメサンギウム細胞は、単なる糸球体の支持組織であるとみなされていた。電子顕微鏡の登場でその存在が確認された¹⁵頃に相前後して、メサンギウム細胞は単球、マクロファージ系の細胞であり、メサンギウム領域に負荷された異物をあまなく貪食処理すると考えられるようになった^{16,17}。しかし近年の詳細な検討ではメサンギウム細胞には大多数のメサンギウム固有平滑筋類似細胞²²⁻²⁷と極く少数の単球、マクロファージ系の Ia 抗原陽性細胞¹⁸の 2 種類が存在し、変性蛋白質や免疫複合体などの分子量の大きな物質は、極く一部のみが Ia 抗原陽性細胞に貪食されるが、メサンギウム固有平滑筋類似メサンギウム細胞に貪食されることはほとんどなく、大部分はメサンギウム流路と呼ばれる糸球体内通路を経て血管極より間質へ放出される形で処理される¹⁹と考えられている。よって、このメサンギウム浄化機構が糸球体疾患の発症、進展の抑制に果たすべき役割は、極めて重要であると考えられる。

これまでも種々のトレーサーを用いたこの機構の研究がなされている^{11,19-25,29,30}。それらの成績をまとめると、一般にトレーサーとして分子量の大きいもの¹¹、正に荷電したもの²⁰の方がメサンギウムに集積し易いことが知られている他、Batsford ら²⁴のグルタルアルデヒドで処理したフェリチンは、無処置のものより長期間メサンギウム領域にとどまるという報告や、Haakenstad ら²⁵の還元アルキル化された抗体は無処置のものよりメサンギウム局在性が増すという報告にみられるように、その物質の生物学的特性がメサンギウムへの集積に重要であるとされる。

各種のトレーサー物質の中で AH-IgG は、大きさの他、補体活性化能、炎症細胞遊走能など^{26,27}、免疫複合体に類似した性質を有している。またその作製も比較的容易であり、免疫複合体測定の標準物質にも使用されている²⁸。このためメサンギウム浄化機構を検討する実験では、免疫複合体のモデルとして広く用いられており^{11,19,30,40,41}、著者もトレーサーとして、AH-IgG を採用した。

この AH-IgG を用いた病的糸球体についての検討では、アミノヌクレオシド腎症¹¹において、メサンギウム浄化機構が障害されていることが知られている。

ダウノマイシンと類似の生物学的活性を有するとされるアドリアマイシンによる腎症ラットについては Okuda ら³⁰⁾が、メサンギウム浄化機構の障害を示す成績を報告している。しかし、これらの報告ではメサンギウム浄化機構と糸球体濾過値を含めた生化学的検査成績や、糸球体硬化病変の程度との関係は十分には検討されていない。

著者は、実験1でダウノマイシン投与ラットの生化学的、組織学的検討により、尿蛋白排泄量の増加、間質病変は認めるが、糸球体濾過値の低下、糸球体硬化病変を認めないモデル(第2群)、糸球体濾過値の低下、糸球体硬化病変まで認めるモデル(第3群)を作成し得た。AH-IgGを用いた検討で、第2群においても第3群と同様に、AH-IgGが静注16時間後まで糸球体内に沈着していたことから糸球体濾過値の低下や明らかな糸球体硬化のおこる以前の段階で、メサンギウム浄化機構は障害されていると考えられた。腎障害モデルは異なるが、Grond ら³¹⁾のアミノヌクレオシド腎症ラットにコロイドカーボンを投与し、メサンギウムへの集積の強い部位に一致して硬化性病変が生じてくるという成績と考え合わせると、メサンギウム浄化機構の障害自体が、糸球体硬化の過程に促進的に影響している可能性が示唆される。

さて近年、メサンギウム細胞はその胞体内にアクチン³²⁾、アクチン³³⁾を有することが明らかとなる一方、細胞表面にAT-IIのレセプターを有する³⁴⁾ことが明らかとなり、さらにAT-II³⁵⁻³⁷⁾、アルギニンバゾプレッシン^{38,39)}、ヒスタミン⁴⁰⁾、血小板活性化因子⁴¹⁾などの血管作働性物質により収縮することが明らかとなった。このためメサンギウム細胞は近年、血管平滑筋に類似した細胞であると考えられるようになった。さらに血管作働性物質によるその収縮機構が、細胞内情報伝達機構のレベルで解明されつつある⁴²⁻⁴⁶⁾。しかし、このメサンギウム細胞の収縮及び弛緩の生理学的意義はなお明らかでない面が残されており、特にメサンギウム浄化機構にどのように関与するかは十分に、検討されていない。

近年、Keane ら⁴⁰⁾はアミノヌクレオシド腎症ラットでは、AT-IIの拮抗阻害剤であるサララシンによって、静注されたAH-IgGの糸球体内集積が抑制されることを報告し、同じグループのRaij ら⁴¹⁾はAT-IIを持続投与したラットでは、静注されたAH-IgGの糸球体内集積が増強されることを報告している。これらの成績は、AT-IIがメサンギウム浄化機構に調節作用を有していることを示唆するものである。しかし、ACEIがメサンギウムの浄化機構に及ぼす影響につい

ては知られていない。

著者は、実験2で糸球体硬化病変の未だ出現していない段階のダウノマイシン投与ラットで、エナラプリルを投与したA群と、対照群のB群を設定し、AH-IgGを用いて検討した。この2群は生化学的、組織学的検討から均質な群と考えられたが、静注12時間後のAH-IgGの糸球体内沈着がB群に比較してA群で有意に少なかったことからエナラプリルがメサンギウム浄化機構を改善したと考えられた。ACEIの投与は、生体内で糸球体におけるメサンギウム細胞の過剰収縮を緩和し、メサンギウム流路を活性化すると想定される。即ち、ACEIがメサンギウム浄化機構を改善する機序の一つとして、メサンギウム細胞の弛緩によって生じるメサンギウム流路における、異物の交通状態の改善が考えられる。

著者は、メサンギウム浄化機構の障害が糸球体硬化病変を促進する可能性のあること、ACEIがそのメサンギウム浄化機構を改善し得ることを示した。近年、ACEIが、腎機能低下の進行、糸球体硬化病変の進展に抑制的な効果を及ぼすという報告⁴²⁻⁴⁶⁾がみられ、その機序として、ACEIにより糸球体過剰濾過状態^{47,48)}が改善されることが強調されているが、この他に今回、著者が明らかにした、メサンギウム浄化機構の改善も関与していると考えられる。

結 論

実験1ではラットにダウノマイシンの投与なく3週間を経過した群(第1群)、ダウノマイシンの投与後3週間を経過した群(第2群)、ダウノマイシンの投与後3カ月を経過した群(第3群)を設定し、生化学的検討、組織学的検討と合わせ、AH-IgGの静注後の糸球体内沈着程度を評価し、メサンギウム浄化機構障害を検討した。さらに実験2ではダウノマイシン投与後3週間を経過したラット群にエナラプリルを投与した群(A群)と投与しなかった群(B群)とを設定し、AH-IgGの静注後の糸球体内沈着程度を評価し、ACEIのメサンギウム浄化機構に及ぼす効果を検討し、以下の結論を得た。

1. 第2群では、糸球体濾過値の低下、明らかな糸球体硬化病変の出現を認めなかったが、糸球体濾過値の低下、糸球体硬化病変の出現を認めた第3群と同様に、第1群と比較して、糸球体内AH-IgGの集積の有意な持続を認めた。

2. A群では、B群に比較して、糸球体内AH-IgGの集積の有意な低下を認めた。

以上より、ダウノマイシン投与ラットでは、糸球体

硬化病変の出現以前にメサンギウム浄化機構が障害されていることが明らかとなり、このことからダウノマイシン投与ラットでは、メサンギウムの浄化機構の障害が、糸球体硬化病変の形成に促進的に作用する可能性が示唆された。また、ダウノマイシン投与ラットでは、ACEI がメサンギウム浄化機構を改善し得る可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました恩師竹田亮祐教授に深甚の謝意を表します。また、直接御指導、御援助を頂きました金沢大学保健管理センター、東福要平教授、金沢大学第2内科、紺井一郎助手ならびに第2内科腎臓研究班の諸先生に深謝いたします。

本論文の要旨は、第31回、第32回日本腎臓学会総会において発表した。

文 献

- 1) Michael, A. F., Keane, W. F., Raij, L., Vernier, R. L. & Mauer, S. M.: The glomerular mesangium. *Kidney Int.*, **17**, 141-154 (1980).
- 2) Michael, A. F.: The glomerular mesangium. *Contrib. Nephrol.*, **40**, 7-16 (1984).
- 3) Fujiwara, Y., Kikkawa, R., Kitamura, E., Takama, T. & Shigeta, Y.: Angiotensin II effects upon glomerular intracapillary volume in the rat. *Renal Physiol.*, **7**, 344-348 (1984).
- 4) Blantz, R. C., Konnen, K. S. & Tucker, B. J.: Angiotensin II effects upon the glomerular microcirculation and ultrafiltration coefficient of the rat. *Lab. Invest.*, **57**, 419-434 (1976).
- 5) Dixon, F. J., Feldman, J. D. & Vasquets, J. J.: Experimental glomerulonephritis. The pathogenesis of a laboratory model resembling the spectrum of human glomerulonephritis. *J. Exp. Med.*, **113**, 899-920 (1961).
- 6) Wilson, C. B. & Dixon, F. J.: Immunopathology and glomerulonephritis. *Annu. Rev. Med.*, **25**, 83-98 (1974).
- 7) Kubosawa, H., Akikusa, B. & Kondo, Y.: Daunomycin-induced nephropathy in rats. *Acta Pathol. Jpn.*, **35**, 109-123 (1985).
- 8) Pfeilschifter, J.: Cross-talk between transmembrane signalling systems: a prerequisite for the delicate regulation of glomerular haemodynamics by mesangial cells. *Eur. J. Clin. Invest.*, **19**, 347-361 (1989).
- 9) Kreisberg, J. I.: Cell biology and biochemistry of the glomerular mesangium. *Miner. Electrolyte Metab.*, **14**, 167-175 (1988).
- 10) Berrige, M. J. & Irvine, R. F.: Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*, **312**, 315-321 (1984).
- 11) Mauer, S. M., Fish, A. J., Blau, E. B. & Michael, A. F.: The glomerular mesangium I. Kinetic studies of macromolecular uptake in normal and nephrotic rats. *J. Clin. Invest.*, **51**, 1092-1101 (1972).
- 12) Richer, C., Daussau, M. P. & Giudicelli, J. F.: MK 421 and prevention of genetic hypertension development in young spontaneously hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **79**, 23-29 (1982).
- 13) Jackson, B. & Johnston, C. I.: The contribution of systemic hypertension to progression of chronic renal failure in the rat remnant kidney: effect of treatment with an angiotensin converting enzyme inhibitor or a calcium inhibitor. *J. Hypertens.*, **6**, 495-501 (1988).
- 14) Bertani, T., Cutillo, F., Zoja, C., Brogгинi, M. & Remuzzi, G.: Tubulo-interstitial lesions mediate renal damage in adriamycin glomerulopathy. *Kidney Int.*, **30**, 488-496 (1986).
- 15) Suzuki, Y., Churg, J., Grishman, E., Mautner, W. & Dachs, S.: The mesangium of the renal glomerulus: Electron microscopic studies of pathologic alterations. *Am. J. Pathol.*, **43**, 555-568 (1963).
- 16) Latta, H. & Maunsbach, N. B.: Relation of the centralobular region of the glomerulus to the juxtaglomerular apparatus. *J. Ultrastruct. Res.*, **6**, 562-578 (1962).
- 17) Farquhar, M. G. & Parade, G. E.: Functional evidence for the existence of a third cell type in the renal glomerulus. *J. Cell Biol.*, **13**, 55-87 (1962).
- 18) Schreiner, G. F., Kiely, J. M., Cotran, R. S. & Unanue, E. R.: Characterization of resident glomerular cells in the rat expressing Ia-determinants and manifesting genetically restricted interactions with lymphocytes. *J. Clin. Invest.*, **68**, 920-931 (1981).
- 19) Keane, W. F. & Raij, L.: Impaired mesangial clearance of macromolecules in rats with

- chronic mesangial ferritin-antiferritin immune complex deposition. *Lab. Invest.*, **43**, 500-508 (1980).
- 20) **Gauthier, V. J., Mannik, M. & Striker, G. E.**: Effect of cationized antibodies in preformed immune complexes on deposition and persistence in renal glomeruli. *J. Exp. Med.*, **156**, 766-777 (1982).
- 21) **Latta, H. & Fligel, S.**: Mesangial fenestrations, sieving, filtration, and flow. *Lab. Invest.*, **52**, 591-598 (1985).
- 22) **Goode, N. P., Davison, A. M., Gowland, G., Aparicio, S. R. & Shires, M.**: Uptake and disposal of BSA-coated latex particles by the rat mesangium: Reaction with subsequently administered heterogenous antiserum. *J. Pathol.*, **147**, 189-198 (1985).
- 23) **Seiler, M. W., Terrell, C. H., Finnegan, A., Sterzel, R. B. & Hoyer, J. R.**: Studies of glomerular mesangial uptake and processing of macromolecules I. Effect of polyvinyl alcohol-induced macrophages on uptake of iron dextran. *Lab. Invest.*, **54**, 616-623 (1986).
- 24) **Batsford, S. R., Weghaupt, R., Takamiya, H. & Vogt, A.**: Studies on mesangial handling of protein antigen: Influence of size, charge and biologic activity. *Nephron*, **41**, 146-151 (1985).
- 25) **Haakenstad, A. O., Striker, G. E. & Mannik, M.**: The glomerular deposition of soluble immune complexes prepared with reduced and alkylated antibodies in mice. *Lab. Invest.*, **35**, 293-301 (1976).
- 26) **Christian, C. L.**: Studies of aggregated γ -globulin. I. Sedimentation, electrophoretic and anticomplementary properties. *J. Immunol.*, **84**, 112-116 (1960).
- 27) **Christian, C. L.**: Studies of aggregated γ -globulin. II. Effect in vivo. *J. Immunol.*, **84**, 117-121 (1960).
- 28) **Lambert, P. H., Dixon, F. J., Zubler, R. H., Agnello, V., Canbiano, C., Casali, P., Clarke, J., Cowdery, J. S., McDuffie, F. C., Hay, F. C., MacLennan, I. C. M., Masson, P., Muller-Eberhard, H. J., Penttinen, K., Smith, M., Tappeiner, G., Theofilopoulos, A. N. & Verroust, P.**: A WHO collaborative study for the evaluation of eighteen methods for detecting immune complex in serum. *J. Clin. Lab. Immunol.*, **1**, 1-15 (1978).
- 29) **Hoyer, J. R., Elema, J. D. & Vernier, R. L.**: Unilateral renal disease in the rat. II. Glomerular mesangial uptake of colloidal carbon in unilateral aminonucleoside nephrosis and nephrototoxic serum nephritis. *Lab. Invest.*, **34**, 250-255 (1976).
- 30) **Okuda, S., Oh, Y., Tsuruda, H., Onoyama, K., Fujimi, S. & Fujishima, M.**: Adriamycin-induced nephropathy as a model of chronic progressive glomerular disease. *Kidney Int.*, **29**, 502-510 (1986).
- 31) **Grond, J., Koudstaal, J. & Elema, J. B.**: Mesangial function and glomerular sclerosis in rats with aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int.*, **27**, 405-410 (1985).
- 32) **Becker, C. G.**: Demonstration of actomyosin in mesangial cells of the renal glomerulus. *Am. J. Pathol.*, **66**, 97-110 (1972).
- 33) **Ito, K. & Ger, Y-G.**: Distribution of actin in mesangial cell of rat glomerulus. *Acta. Pathol. Jpn.*, **34**, 1267-1276 (1984).
- 34) **Foidart, J., Sraer, J., Delarue, F., Mahieu, P. & Ardaillou, R.**: Evidence for mesangial glomerular receptors for angiotensin II linked to mesangial cell contractility. *F. E. B. S. Lett.*, **121**, 333-339 (1980).
- 35) **Singhal, P. C., Scharschmidt, L. A., Gibbons, N. & Hays, R. M.**: Contraction and relaxation of cultured mesangial cells on a silicone rubber surface. *kidney Int.*, **30**, 862-873 (1986).
- 36) **Kreisberg, J. I.**: Contactile properties of the glomerular mesangium. *Fed. Proc.*, **42**, 3053-3057 (1983).
- 37) **Ausiello, D. A., kreisberg, J. I., Roy, C. & karnovsky, M. J.**: Contraction of cultured rat glomerular cells of apparent mesangial origin after stimulation with angiotensin II and arginine vasopressin. *J. Clin. invest.*, **65**, 754-760 (1980).
- 38) **Sedor, J. R. & Abboud, H. E.**: Histamine modulates contraction and cyclic nucleosides in cultured rat mesangium H_1 and H_2 receptors. *J. Clin. Invest.*, **75**, 1679-1689 (1985).
- 39) **Schlondorff, D., Satriano, J. A., Hagege, J., Perez, J. & Baud. L.**: Effect of platelet-activa-

- ting factor and serum treated zymosan on prostaglandin E₂ synthesis, arachidonic acid release, and contraction of cultured rat mesangial cells. *J. Clin. Invest.*, **73**, 1227-1231 (1984).
- 40) Keane, W. F. & Raij, L.: Relationship among altered glomerular barrier permselectivity, angiotensin II, and mesangial uptake of macromolecules. *Lab. Invest.*, **52**, 599-598 (1985).
- 41) Raij, L. & Keane, W. F.: Glomerular mesangium: its function and relationship to angiotensin II. *Am. J. Med.*, **79**, 24-30 (1985).
- 42) Keane, W. F., Anderson, S., Aurell, M., De Zeeuw, D., Narins, R. G. & Povar G.: Angiotensin converting enzyme inhibitors and progressive renal insufficiency. Current experience and future directions. *Ann. Intern. Med.*, **111**, 503-516 (1989).
- 43) Meyer, T. W., Anderson, S., Rennike, H. G. & Brenner, B. M.: Converting enzyme inhibitor therapy limits progressive glomerular injury in rats with renal insufficiency. *Am. J. Med.*, **79**, 31-36 (1985).
- 44) Abraham, P. A., Opsahl, J. A., Halstenson, C. E. & Keane, W. F.: Efficiency and renal effects of enalapril therapy for hypertensive patients with chronic renal insufficiency. *Arch. Intern. Med.*, **148**, 2358-2362 (1988).
- 45) Reams, G. P. & Bauer, J. H.: Enalapril in subjects with renal disease. *J. Hypertens.*, **4**, 417-419 (1986).
- 46) Brenner, B. M., Mayer, T. W. & Hostetter, T. H.: Dietary protein intake and the progressive nature of kidney disease: the role of hemodynamically mediated glomerular injury in the pathogenesis of progressive glomerular sclerosis in aging, renal, ablation, and intrinsic renal disease. *N. Engl. J. Med.*, **307**, 652-660 (1982).
- 47) Brenner, B. M.: Nephron adaptation to renal injury or ablation. *Am. J. Physiol.*, **249**, 324-337 (1985).

A Study of Mesangial Clearance Kinetics in Glomerulosclerosis Model —The Impairment of Mesangial Clearing Function of Macromolecules in Daunomycin Treated Rats and its Improvement by ACEI— Tadashi Konoshita, Department of Internal Medicine (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med. Soc.*, **99**, 159—172 (1990)

Key words glomerular mesangium, daunomycin, glomerulosclerosis, heat aggregated human immunoglobulin G, angiotensin converting enzyme inhibitor

Abstract

To clarify the role in the progression of glomerulosclerosis and the modulation system of the mesangial clearing function, the author studied the mesangial clearing kinetics of macromolecules and the effects of angiotensin converting enzyme inhibitor (ACEI), on the mesangial clearing function in daunomycin (DMN) treated rats. In the first experiment, rats in group 1 received no treatment, and those in groups 2 and 3 received DMN intravenously. After 3 weeks heat aggregated human immunoglobulin G (AH-IgG) was injected intravenously in groups 1 and 2, and after 3 months in group 3. The AH-IgG accumulation on glomeruli, the chemical and histological findings were investigated. As opposed to group 1, massive proteinuria and renal interstitial changes were observed in group 2. Moreover, azotemia and glomerulosclerosis were observed in group 3. No significant difference of serum AH-IgG levels was observed among the 3 groups at any period. Glomerular accumulation of AH-IgG disappeared at 16 hours after injection in group 1, but remained in groups 2 and 3. In the second experiment, 3 weeks after the

DMN injection, rats in group A received enalapril, and those in group B received saline intraperitoneally. One hour thereafter, AH-IgG was injected intravenously. The AH-IgG accumulation on glomeruli, the blood pressure, the chemical and histological findings were investigated. There were no significant differences in both the chemical and histological findings between the 2 groups. In group A, the blood pressure fell significantly. No significant difference of serum AH-IgG levels was observed between the 2 groups. The glomerular accumulation of AH-IgG disappeared after 12 hours in group A, but remained in group B. These results suggest that the mesangial clearing function of macromolecules is impaired at an early stage, before glomerular sclerosis appears, in DMN treated rats. Conversely, it is suggested that the mesangial dysfunction plays an important role in the progression of DMN induced glomerulosclerosis. Moreover, ACEI may play some role in improving the mesangial clearing function.