

コモンマーモセットの
進行性糸球体腎症に関する病理学的研究

令和 5 年
(2023)

帯広畜産大学大学院畜産学研究科

山田 直明

Pathological studies on progressive glomerulonephropathy
in common marmosets

2023

YAMADA Naoaki

Graduate School of
Animal and Veterinary Sciences and Agriculture
Obihiro University of
Agriculture and Veterinary Medicine

目次

序論	3
第1章 コモンマーモセットにおける進行性糸球体腎症の病理形態学的特徴とグレード分類	4
第1節 緒言	4
第2節 材料および方法	6
第1項 動物	6
第2項 尿検査, 尿沈渣検査, 血液学的検査, および血液生化学的検査	6
第3項 病理組織学的検査	6
第4項 透過型電子顕微鏡学的検査	7
第5項 統計学的解析	7
第3節 結果	8
第1項 尿検査, 尿沈渣検査, 血液学的検査, および血液生化学的検査	8
第2項 光学顕微鏡学的検査	8
第3項 電子顕微鏡学的検査	10
第4項 統計学的解析	11
第4節 考察	12
第5節 小括	15
図および表	16
第2章 若齢のコモンマーモセットにおける糸球体への免疫グロブリン沈着と進行性糸球体腎症の関係	28
第1節 緒言	28
第2節 材料および方法	29
第1項 動物	29
第2項 採材	29
第3項 光学顕微鏡学的検査	29
第4項 電子顕微鏡学的検査	29
第5項 免疫組織学的検査	30
第3節 結果	31

第1項 光学顕微鏡学的検査	31
第2項 電子顕微鏡学的検査	31
第3項 免疫組織学的検査	31
第4節 考察	33
第5節 小括	35
図および表	36
第3章 コモンマーマセットの進行性糸球体腎症におけるネフリン発現の形態計測学的解析	45
第1節 緒言	45
第2節 材料および方法	46
第1項 動物	46
第2項 進行性糸球体腎症グレード分類	46
第3項 免疫組織学的検査	46
第4項 形態計測学的解析	47
第3節 結果	48
第1項 進行性糸球体腎症グレード分類	48
第2項 ネフリンの免疫組織学的検査	48
第3項 形態計測学的解析	48
第4節 考察	50
第5節 小括	52
図および表	53
総括	58
謝辞	62
参考文献	63
要旨	69
Abstract	71

序論

コモンマーモセット (*Callithrix jacchus*) は霊長目直鼻亜目真猿型下目広鼻小目オマキザル科 (いわゆる新世界ザル) に属するブラジル北東部原産の小型のサルである。医薬品の基礎研究開発における実験動物としてのサル類には狭鼻小目オナガザル科 (いわゆる旧世界ザル) に属するカニクイザルやアカゲザルが広く用いられているが、近年、他の霊長目の動物と比較して繁殖能力が高いことに加えて、小型なため必要な薬物が少量で済むといった利点から、コモンマーモセットの有用性が注目されてきている [1]。コモンマーモセットは、創薬研究や神経疾患研究、再生医療研究などで広く用いられるようになってきているほか、性成熟までの期間が短いことを利用して、霊長目としては珍しく遺伝子改変動物の作製も行われている [2, 3]。

このように、コモンマーモセットは実験動物として以前よりも広く用いられるようになってきおり、病理組織学的検査における背景病変も徐々に知られるようになってきている [4]。しかし、げっ歯類、ビーグル犬、およびカニクイザルでは毒性病理用語・診断基準の国際統一化事業 (International Harmonization of Nomenclature and Diagnostic Criteria (INHAND) Project) によって共通で用いることができる背景データが揃ってきているが [5-7]、コモンマーモセットの背景病変として利用できる病理組織学的データは、いまだに少ないのが現状である。

コモンマーモセットの背景病変のなかでも、腎症は自然発生性に生じる病変としていくつか報告されているが、いまだに不明な点も多い [8-11]。そして、体系的な評価方法もないため、腎臓の毒性病変を評価する際の妨げとなっている。そこで、本研究は、コモンマーモセットの自然発生性腎症について、光学顕微鏡学的検査で病変の病理組織学的スコアを評価し、そのスコアから腎症をグレーディングすることで、本腎症の体系的な評価を可能にすること、各グレードの病態や特徴を明らかにすることでコモンマーモセットの背景病変を明らかにすることを目的として実施した。

第 1 章では、本腎症をグレーディングし、超微形態学的特徴も合わせて評価した。さらに、第 2 章では、程度の軽いまたは腎症のみられないコモンマーモセットにおいて、糸球体への免疫グロブリンの沈着程度と糸球体病変の進行具合について比較・検討した。加えて、第 3 章では、コモンマーモセットの進行性糸球体腎症の特徴病変の 1 つである足細胞の足突起の消失に着目し、本腎症のグレードとスリット膜構成タンパク質であるネフリンの発現の関係について検討した。

第1章 コモンマーモセットにおける進行性糸球体腎症の病理形態学的特徴とグレード分類

第1節 緒言

コモンマーモセット (*Callithrix jacchus*) では、しばしば自然発生性の進行性の糸球体腎症が認められる。

進行性の腎症は、実験動物として広く用いられているげっ歯類の慢性進行性腎症がよく知られている [12]。この腎症は加齢とともに進行し、好塩基性尿細管や硝子円柱が認められ、進行すると尿細管の萎縮や拡張、限局性の糸球体硬化や糸球体の萎縮、間質の線維化などが認められ、INHAND にも用語として収載されている [5]。このように、ラットの慢性進行性腎症は、その病理発生が完全には解明されていないものの、背景病変として良く知られており、種々の実験の腎臓に対する結果を解釈する際には重要な情報となっている。

コモンマーモセットの進行性糸球体腎症については、古くから知られているものの、いまだに報告が少ない。磯部らによれば、この腎症の形態学的特徴は、糸球体門部のメサンギウム細胞とメサンギウム基質の増加、間質への炎症性細胞浸潤、尿細管上皮細胞の再生と過形成、そして尿細管内のタンパク円柱である。メサンギウム領域の拡大と年齢の間および糸球体病変と尿細管間質病変の程度の間に相関性があり、メサンギウム領域の拡大は年齢とともに進行する [11]。この進行性糸球体腎症が進行すると、糸球体硬化や尿細管間質性腎炎がみられるようになる [11]。また、コモンマーモセットに認められる腎病変としては、メサンギウムへの IgM 沈着を特徴とする IgM 腎症が知られている [8-10]。さらに、この IgM 腎症には IgA の関与も報告されている [13]。これらの IgM/IgA 腎症と磯部らの報告した進行性糸球体腎症は、形態学的に主たる病変が糸球体メサンギウムの変化であるという点で共通している。

一方で、進行性糸球体腎症の初期病変や進行後の病理形態学的特徴の詳細については、いまだに良く知られていない。これらの病理形態学的特徴の詳細を明らかにすることは、実験動物であるコモンマーモセットの背景病変の理解とこれらの病因を解明する一助となると考えられる。そこで本章では、コモンマーモセット 21 例 (2~11 歳, 雄 9 例, 雌 12 例) の腎臓を対象に、光学顕微鏡学的検査でその病変の進行度に応じて 5 つのグレードに分類することを試みた。さらに、電子顕微鏡

学的検査により各グレードにおける超微形態学的な特徴，糸球体病変と年齢の関係性および糸球体病変の初期変化とその病態の進行過程について調べた．

第2節 材料および方法

第1項 動物

21 匹のコモンマーモセットの腎臓の病理形態学的変化を評価した。このうち、9 匹は日本クレア株式会社（東京都）から購入した動物、残りの 12 匹は株式会社三菱化学メディエンス鹿島研究所（茨城県、現 L S I M 安全科学研究所）で繁殖した動物を用いた。剖検時の動物の年齢は、2 歳から 11 歳であった。また、9 匹が雄、12 匹が雌であった。動物の飼育環境は、室温 $26\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 20\%$ で維持され、飼料は CMS-1M（日本クレア株式会社、東京都）、飲料水は水道水を自由に与えた。

研究の開始に先立って、本研究計画書は研究施設（株式会社三菱化学メディエンス、創薬支援事業本部、試験研究センター、鹿島研究所）の実験動物委員会にレビューを受け、「Guidelines for Animal Studies」に従って、当該研究施設の運営管理者による承認を受けた。

第2項 尿検査、尿沈渣検査、血液学的検査、および血液生化学的検査

動物はペントバルビタールナトリウム $30\sim 40\text{ mg/kg}$ 以上の腹腔内投与による深麻酔下で、疼痛反射がないことを確認後、腹大動脈からの放血により安楽殺された。血液検体は腹腔の大静脈から採取した。尿検体は剖検時に膀胱から直接採尿した。血液検体および尿検体は、採取後速やかに各検査に供した。

赤血球数および白血球数は XT-200iV（シスメックス株式会社、兵庫県）を用いて測定した。血中尿素窒素、クレアチニン、総タンパク質、血清アルブミン、血清総コレステロール、および電解質は TBA-200FR（東芝メディカルシステム株式会社、栃木県）を用いて測定した。尿検査は尿試験紙法を用いて尿タンパク質、潜血、および pH を測定した（Clinitech500、シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社、東京都）。尿沈渣検査は、尿沈殿物から結晶、赤血球、白血球、上皮細胞、および尿円柱の有無を検査した。尿試験紙法の各項目の測定範囲と尿細胞診の基準を表 1-1 に示す。

第3項 病理組織学的検査

剖検時に腎臓を摘出し 10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。定法に従ってパラフィンに包埋し、 $5\text{ }\mu\text{m}$ の厚さで薄切した後、hematoxylin and eosin 染色（HE 染色）、periodic acid-Schiff 染色（PAS 染色）、periodic acid-methenamine-silver 染色（PAM 染色）、Masson's trichrome 染色（MT 染色）を実施した。腎病変については、HE

染色での組織像に基づいて糸球体病変，尿細管の再生と硝子円柱，間質への細胞浸潤，および間質の線維化の 4 つの指標をスコア化した．各病変については腎臓全体に対して 80%以上に影響がみられる場合をびまん性（diffuse），80%未満の場合を巣状／多巣状（focal/multifocal）とした．また，糸球体内の病変において，糸球体内全体にみられるものを全節性（global），一部にみられるものを分節性（segmental）とした．糸球体病変のスコアについては，磯部らの報告に従った [11]．これらの基準を表 1-2 に示す．そのスコアの合計値を元に，合計スコアが 1 から 3 を腎症グレード 0，合計スコアが 4 および 5 を腎症グレード 1，合計スコアが 6 および 7 を腎症グレード 2，合計スコア 8 から 10 を腎症グレード 3，合計スコア 11 および 12 を腎症グレード 4 と 5 段階のグレードに分類した．

第4項 透過型電子顕微鏡学的検査

各腎症グレードに分類された動物から各 1 例ずつ，合計 4 例のホルマリン固定した腎臓（動物番号 2，5，7，21）を透過型電子顕微鏡（TEM）観察に供した．腎皮質を小さなブロックにトリミングし，30 分間蒸留水で洗浄し，1%四酸化オスミウムで後固定し，エポン樹脂に包埋した．超薄切した切片を銅グリッドに乗せ，酢酸ウラニルとクエン酸鉛で電子染色した．染色後の切片を TEM（H-7600，日立ハイテクフィールドディング株式会社，東京都）で観察した．

第5項 統計学的解析

各腎症グレードに分類された動物の赤血球数，白血球数，血中尿素窒素，クレアチニン，総タンパク質，血清アルブミン，血清総コレステロールおよび電解質の平均値と標準偏差を算出した（ $mean \pm SD$ ）．統計学的解析は，マイクロソフトエクセル 2003（Microsoft Corporation, Redmond, WA）を用いて実施した．各データは一元配置分散分析（one-way ANOVA）を実施し，有意水準は 5%とした．

第3節 結果

第1項 尿検査, 尿沈査検査, 血液学的検査, および血液生化学的検査

尿検査, 尿沈査検査, 血液学的検査, および血液生化学的検査の結果を表 1-1 に示す. 雄 4 例 (動物番号 1, 2, 5, 6) と雌 6 例 (動物番号 10, 11, 12, 14, 15, 19) は, 剖検時に膀胱から直接採尿できなかったため, 尿検査および尿沈査検査は実施できなかった. 尿タンパク質は検査した全例で 30 mg/dL 以上の陽性(++~+++)となった. また, 潜血もほとんどの例で陽性となった. 尿 pH は 5 から 8 の間であった. 血液学的検査および血液生化学的検査では, 動物番号 15 の白血球 ($14.98 \times 10^3 \mu\text{L}$) の値を除いて, 特筆すべき異常は認められなかった.

第2項 光学顕微鏡学的検査

表 1-2 に示した HE 染色での組織学的変化のスコアに基づいて, 腎症の程度を 0 から 4 の 5 段階のグレードに分類した. その結果を表 1-3 に示す.

グレード 1 に分類されたのは, 雄 3 例 (動物番号 1, 2, 3) および雌 4 例 (動物番号 10, 11, 12, 14) であった. グレード 1 に分類された動物の年齢は 2 歳から 5 歳であった. グレード 2 に分類されたのは, 雄 3 例 (動物番号 4, 5, 8) および雌 1 例 (動物番号 13) であった. グレード 2 に分類された動物の年齢は 2 歳から 9 歳であった. グレード 3 に分類されたのは雄 3 例 (動物番号 6, 7, 9) および雌 4 例 (動物番号 15, 17, 18, 19) であった. グレード 3 に分類された動物の年齢は 7 歳から 11 歳であった. グレード 4 に分類されたのは, 雌 3 例 (動物番号 16, 20, 21) であった. グレード 4 に分類された動物の年齢は, いずれも 11 歳であった. 腎症グレードは年齢の増加に伴って高くなる傾向がみられた. 明らかな性差は認められなかった.

HE 染色, PAS 染色, PAM 染色, および MT 染色の組織学的変化の詳細を以下に述べる.

(i) グレード 0

グレード 0 に分類される動物は認められなかった.

(ii) グレード 1

糸球体病変では, 雌 1 例で軽微なメサンギウム基質の増加が認められたものの, 概ね光学顕微鏡学的検査で異常は認められなかった (図 1-1A および 1B). 尿細管

内の硝子円柱や部分的な尿細管上皮の再生（巣状）、および巣状の間質へのリンパ球浸潤といった尿細管間質病変が散見されたが、いずれも軽微な変化であった（図 1-1C）。

(iii) グレード 2

巣状に糸球体の腫大が認められた。巣状または多巣状に、糸球体門部におけるメサンギウム基質の増加とメサンギウム細胞の増殖および糸球体外メサンギウム細胞（Lacis cell または Goormaghtigh cell とも言う）の増殖が認められた（図 1-2A）。しかし、PAM 染色、PAS 染色、および MT 染色で軸性のメサンギウム基質の増加や糸球体毛細血管ループでの変化は観察されなかった（代表として PAM 染色像を図 1-2B に示す）。尿細管間質病変は腎症グレード 1 よりも、その病変の程度が強くなっていた（図 1-2C）。

(iv) グレード 3

巣状またはびまん性に糸球体の異常が認められた。糸球体内のメサンギウム細胞の軽微な増殖と軸性の明らかなメサンギウム基質の増加が認められた（図 1-3A および 3B）。糸球体毛細血管ループは部分的に拡張していたが、その内腔は保たれていた。PAM 染色および MT 染色では、部分的に糸球体毛細血管ループ壁に凹凸や肥厚が認められた。MT 染色では、直径がおおよそ 10 μm の赤い沈着物が糸球体基底膜直下のメサンギウム領域（パラメサンギウム領域）に認められた（図 1-3C）。尿細管間質病変は、グレード 2 よりも頻度および程度いずれも増加していた。

(v) グレード 4

グレード 3 でみられた異常な糸球体が腎全体にびまん性に認められた。糸球体係蹄に接するパラメサンギウム領域ではメサンギウム基質が増加していた。しかし、糸球体係蹄末梢でのメサンギウム細胞の増殖は明らかではなかった（図 1-4A および 1-4B）。好酸性沈着物がパラメサンギウム領域に認められた（図 1-4A, 矢印）。多くの毛細血管ループは虚脱していた。ボウマン嚢は拡張傾向にあり、その基底膜は肥厚していた。いくつかの糸球体はボウマン嚢に癒着していた。PAM 染色では糸球体係蹄壁で基底膜の二重化が認められた。MT 染色では、同部位に赤色の沈着物を伴うもの（図 1-4B, 矢印）と伴わないもの（図 1-4B, 矢頭）が認められた。さらに、糸球体係蹄壁だけではなく、パラメサンギウム領域にも多くの赤色

沈着物が認められた（図 1-4B, 矢印）. 間質の線維化も明らかで, 間質病変は拡大していた（図 1-4C）. びまん性にみられた尿細管病変には, 部分的に単純尿細管過形成（simple tubular hyperplasia, 単層の尿細管過形成）または非定型尿細管過形成（atypical tubular hyperplasia, 重層化しているようにみえる尿細管過形成）も認められた [9].

第3項 電子顕微鏡学的検査

(i) グレード 1

腎症グレード 1 に分類された糸球体の代表例（動物番号 2）を図 1-5 に示す. メサングウム領域に有意な変化は認められなかった. 糸球体基底膜の内透明板, 緻密層, 外透明板の形態は正常であった. しかし, 部分的に軽微な肥厚（おおよそ 400 nm 厚）が認められた. 糸球体上皮細胞（足細胞）の足突起の消失が, 肥厚した基底膜の近傍に認められた.

(ii) グレード 2

腎症グレード 2 に分類された糸球体の代表例（動物番号 5）を図 1-6 に示す. 糸球体門部におけるメサングウム基質の増加とメサングウム細胞の増殖が認められた（図 1-6A）. 糸球体基底膜はグレード 1 よりも肥厚し, 内透明板と緻密層のほつれ, または分離により, 3 層構造は部分的に不明瞭となっていた（図 1-6B）. 足細胞の足突起の消失の範囲はグレード 1 よりも拡大していた.

(iii) グレード 3

腎症グレード 3 に分類された糸球体の代表例（動物番号 7）を図 1-7 に示す. メサングウム基質がメサングウム領域で増加していた. MT 染色で赤色の沈着物として観察されたものと思われる高電子密度の沈着物が, パラメサングウム領域とメサングウム領域に認められた（図 1-7A, 矢印）. 糸球体基底膜の凹凸が, 特に上皮側で広く観察され, 緻密層が部分的に層状あるいは網状化（fray, ほつれたようになり電子密度が低下した状態）していた（図 1-7B）. 緻密層は電子密度が低下し, 緻密層と透明板の境界は不明瞭となっていた. 足細胞の足突起の消失が, この不整な糸球体基底膜の近傍に認められ, その範囲は腎症グレード 2 よりも拡大していた.

(iv) グレード 4

腎症グレード 4 に分類された糸球体の代表例（動物番号 21）を図 1-8 に示す。局所的または散在的に、低電子密度および空胞が末梢の糸球体基底膜に認められた（図 1-8A）。メサンギウム基質を伴うメサンギウム細胞の侵入がパラメサンギウム領域に隣接した内皮下で観察された（mesangial interposition, 図 1-8B, 矢印）。いくつかの細胞内小器官（ミトコンドリアや粗面小胞体）がメサンギウム細胞内で多く認められた。足細胞の足突起の消失とボウマン嚢腔方向への微絨毛形成が明らかに認められた。糸球体基底膜の不整は顕著で上皮側に突出し、部分的に内皮方向へも突出していた。多くの高電子密度の沈着物が突出した糸球体基底膜内に認められた（いわゆる hump と呼ばれる高電子密度沈着物に類似した構造物, 図 1-8C, 矢印）。高電子密度の沈着物が沈着している部位の電子密度は部分的に減少し、同部位には顆粒状の構造物や細胞内小器官を伴う細胞質が認められた（図 1-8C, 矢頭）。これらの基底膜病変の位置は、光学顕微鏡で観察された基底膜の二重化や赤色の沈着物の局在と一致していた。

第4項 統計学的解析

統計学的に有意な差を示す測定項目はなかった（表 1-4）。

第4節 考察

本研究では、コモンマーモセットの進行性糸球体腎症の詳細な病理形態学的特徴像を明らかにした。初期段階である腎症グレード 1 または 2 では、足細胞の足突起の消失と部分的な糸球体基底膜の肥厚が認められた。続いて、糸球体門部におけるメサンギウム基質およびメサンギウム細胞の増加が認められ、その後、糸球体末梢方向に向かって軸性に拡大していくことが分かった。腎症グレード 3 以降ではパラメサンギウム領域における沈着物が MT 染色および透過型電子顕微鏡による観察で明らかとなった。さらに腎症グレード 4 に進行すると、糸球体基底膜の上皮側は蛇行し、緻密層の電子密度の低下や配列不整が認められ、高電子密度の沈着物を伴う像も多く観察された。

電子顕微鏡学的検査で腎症グレード 1 の個体に認められた足細胞の足突起の消失や糸球体基底膜の肥厚は、光学顕微鏡学的検査で異常が認められる前に認められた変化であることから、本腎症で最初に起きる病変と考えられる。ヒトでは、同じような変化が微小糸球体変化 (minimal glomerular abnormalities) として知られている。この微小糸球体変化という用語は、World Health Organization (WHO) によって提唱された形態学的な分類であり、臨床診断の分類ではない。この微小糸球体変化は、様々な病態の初期病変を含んでいるが、その中に微小変化群 (minimal change disease) も含まれている [14]。この微小変化群の形態学的特徴は、光学顕微鏡的に糸球体は正常または軽微な変化のみが認められるが、透過型電子顕微鏡による検査では足細胞の足突起の消失が認められることであり、本研究で認められた腎症との共通点もある。しかしながら、種々の糸球体腎炎でも足細胞の足突起の消失は観察されるため、足突起の消失は特定の糸球体腎炎に特徴的な変化とは言えない。つまり、この足突起の消失はコモンマーモセットにおける糸球体腎症の初期病変と言えるが、この所見だけでは微小変化群のような特定の疾患名と紐づけることは難しい。IgM 沈着は以前からコモンマーモセットの腎症として報告されていた [8, 9]。そして、ヒトでも、微小変化群は糸球体への IgM と関連があることが知られている [15]。したがって、本研究で認められた糸球体腎症の初期段階における足細胞の足突起の消失も免疫介在性であったかどうかを詳細に検討する必要があると考えられる。なぜなら、足細胞自身の障害によっても足突起の消失の原因がみられることが報告されているためである [16, 17]。

MT 染色で認められた赤色沈着物と高電子密度沈着物は、コモンマーモセットにおける進行性糸球体腎症の腎症グレード 3 以上の病態進行が免疫介在性であるこ

とを示唆している．ヒト IgA 腎症の病理組織学的特徴は，MT 染色で赤色を示すメサンギウム沈着物であり [18]，コモンマーモセット腎症に IgA 免疫複合体と抗グリアジン IgA が関与しているとの報告がある [13]．さらに，消耗性症候群 (wasting syndrome) はコモンマーモセットでしばしば発生する疾患であるが，この症候群は，尿細管間質性腎炎を含む全身性消耗性疾患として知られている [19]．この症候群には，糸球体の IgA-グリアジン抗体と IgA を含む免疫複合体が関与しているとの報告もある [20]．これらの報告は，免疫グロブリンがコモンマーモセットの腎病変と深く相関していることを示している．本研究で，腎症の進行した動物に観察された糸球体上皮下の瘤状の高電子密度構造物 (hump) の形成と高電子密度沈着物は，ヒトの膜性腎症の病変と形態が類似していた．ヒトの膜性腎症の特徴的所見は，病変初期の糸球体基底膜の上皮下での高電子密度沈着物であるが，通常はメサンギウムの反応性に乏しく，増殖や硬化像を伴うときは二次性膜性腎症や膜性増殖性糸球体腎炎を疑う [21]．この点で，コモンマーモセットにおける進行性糸球体腎症のメサンギウムの反応は，ヒトの一次性膜性腎症とは異なっていた．我々の病理組織学的検査の結果は，免疫グロブリンがコモンマーモセットの進行性糸球体腎症の進行に関与していることを示唆したが，ヒトの膜性腎症とは異なるメカニズムで生じていると考えられる．

コモンマーモセット以外でも，ヒト以外の霊長類で自発発生性の進行性腎症の報告がある．たとえば，メサンギウム増殖性糸球体腎炎がブタオザルで自然発生的にみられることが知られている [22, 23]．メサンギウムの増殖性病変や，ステージが進行すると糸球体基底膜の肥厚など糸球体係蹄壁の病変が進行する点ではコモンマーモセットの進行性糸球体腎症と類似しており，加齢に伴って悪化する点も共通している．この腎症には，IgM や IgA の沈着が伴うことが知られているが，その意義については解明されていない．

メサンギウム細胞の増殖よりもメサンギウム基質の増殖が顕著なことは，コモンマーモセットにおける進行性糸球体腎症の特徴の 1 つと考えられる．同じようなメサンギウム増殖パターンは，コモンマーモセットにおける腎症として，過去にも報告されている [8, 10]．メサンギウム細胞の増殖，メサンギウム基質の増生，糸球体基底膜の二重化を伴う糸球体係蹄壁の肥厚，電顕的な内皮細胞と糸球体基底膜間のメサンギウム細胞や基質の陥入などは，膜性増殖性糸球体腎炎の特徴であり，動物に認められる膜性増殖性糸球体腎炎の多くはヒトの膜性増殖性糸球体腎炎 I 型に相当するとされている [24]．また，ヒトの膜性増殖性糸球体腎炎 I 型

では、糸球体上皮下の **hump** が観察されることがあり、この点においてもコモンマーモセットの進行性糸球体腎症の特徴と一致している。また、微小糸球体変化は、膜性腎症や膜性増殖性糸球体腎症などの免疫複合体型腎炎の初期にも観察されることが知られている [25]。

本章の研究では、腎臓の凍結切片を準備しなかったため、免疫組織化学的染色を実施できなかった。免疫組織化学的検査は、病態の進行と免疫グロブリン沈着との関係を明らかにするために必要と考えられる。

第5節 小括

本章では、コモンマーモセットの進行性糸球体腎症を光学顕微鏡的に認められる所見を用いて 0 から 4 までの 5 段階のグレード分類を試み、形態学的な特徴を明らかにした。その結果、腎症グレード 1 では、光学顕微鏡で顕著な糸球体病変がないにもかかわらず、電子顕微鏡的に足細胞の足突起の消失が認められ、その近傍には基底膜の軽微な肥厚が認められた。腎症グレード 2 とグレードが進行すると、全例で光学顕微鏡的に糸球体門部から糸球体の末梢側に向かって軸性にメサンギウム増殖が明らかとなり、電子顕微鏡的にも腎症グレード 1 よりも糸球体基底膜病変は進行していた。腎症グレード 3 では、光学顕微鏡的に糸球体メサンギウムの病変は門部から糸球体末梢側に向かって軸性のメサンギウム増殖が明らかとなり、糸球体基底膜とパラメサンギウム領域の血管内皮直下に MT 染色で赤色に染色される沈着物がみられた。透過型電子顕微鏡では、同領域に高電子密度の沈着物がみられた。腎症グレード 4 では、光学顕微鏡的にも糸球体基底膜の走行や配列不整が顕著となり、同部位には高電子密度の沈着物あるいは細胞質成分が透過型電子顕微鏡で観察された。以上の結果より、本分類方法を使用することで、コモンマーモセットの進行性糸球体腎症について形態学的な病変の進行に合わせたグレーディングを可能とした。

メサンギウム基質の増加や病態の進行に伴ってみられた高電子密度の沈着物から、コモンマーモセットの進行性糸球体腎症は、形態学的にヒトの膜性増殖性糸球体腎炎に類似する病態と考えられた。その病変形成の原因が免疫介在性であったのか、それとも足細胞の障害によるものなのかを明らかにすることが、本腎症の機序解明につながるものと考えられた。

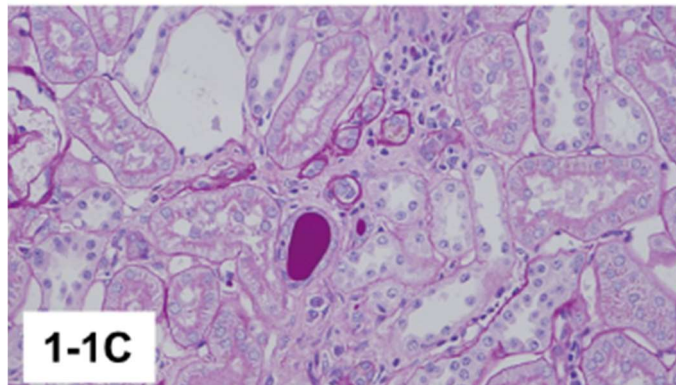
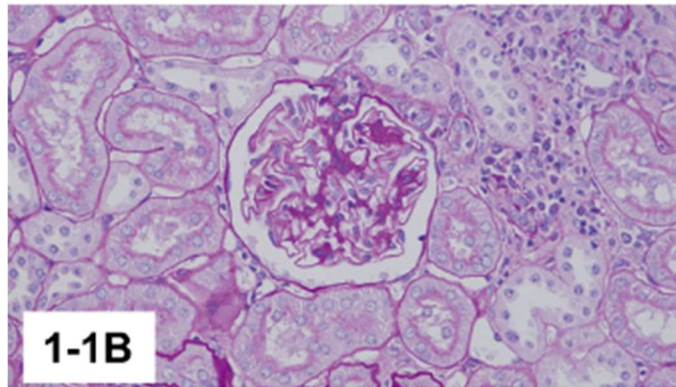
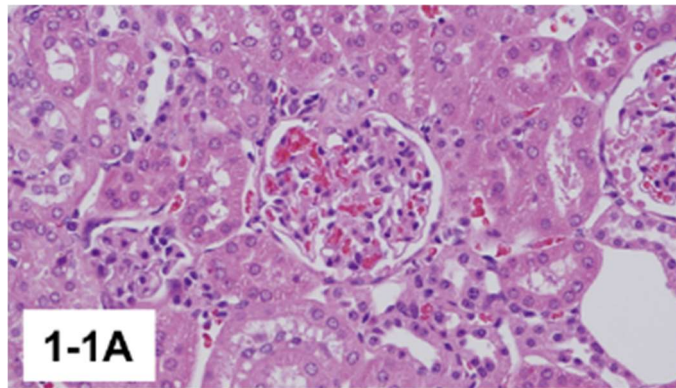


図 1-1A～1C 腎症グレード 1 の腎臓の代表例. 動物番号 2.

【図 1-1A】糸球体に特筆すべき異常は認められない (HE 染色).

【図 1-1B】メサンギウムの増殖は認められない (PAS 染色).

【図 1-1C】尿細管内の硝子円柱や部分的な（巣状の）尿細管上皮の再生，限局性の間質へのリンパ球浸潤といった尿細管間質病変が散見される (PAS 染色).

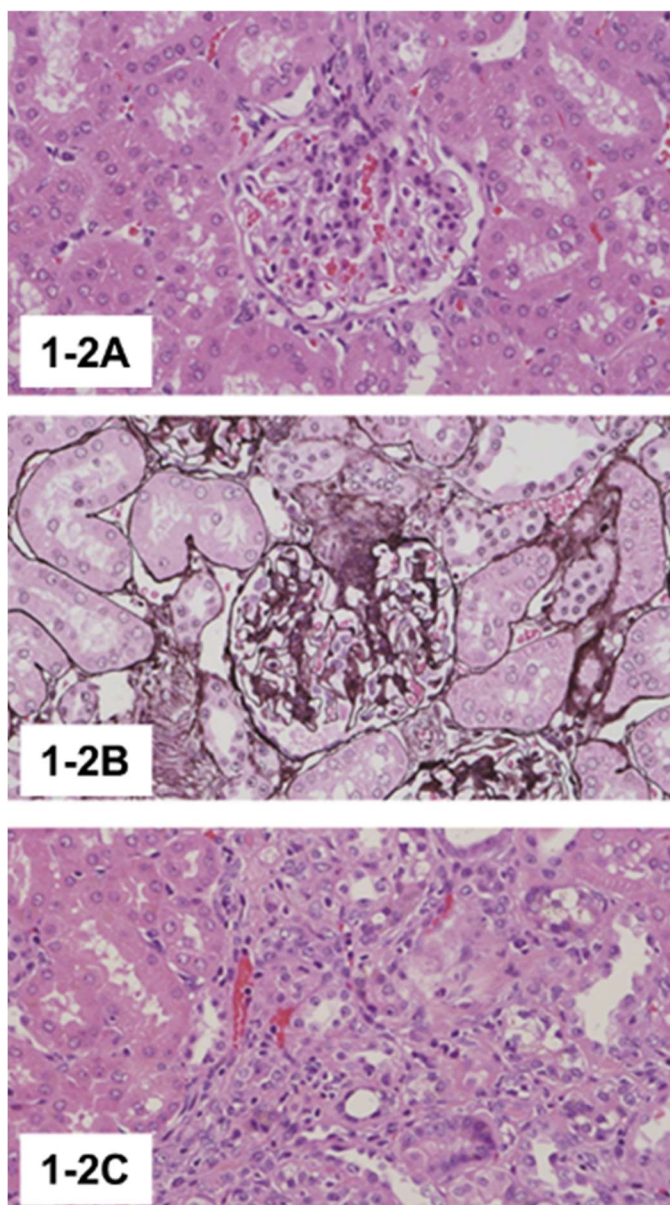


図 1-2A～2C 腎症グレード 2 の腎臓の代表例. 動物番号 5.

【図 1-2A】糸球体門部におけるメサンギウム細胞の増殖および糸球体外メサンギウム細胞の増殖が認められる (HE 染色).

【図 1-2B】メサンギウム細胞の増殖および糸球体外メサンギウム細胞の増殖は PAM 染色でも明らかに認められるが, 末梢メサンギウムの増殖や糸球体毛細血管ループの変化は明らかではない (PAM 染色).

【図 1-2C】部分的な (巣状の) 尿細管の再生と間質への炎症性細胞浸潤が認められる (HE 染色).

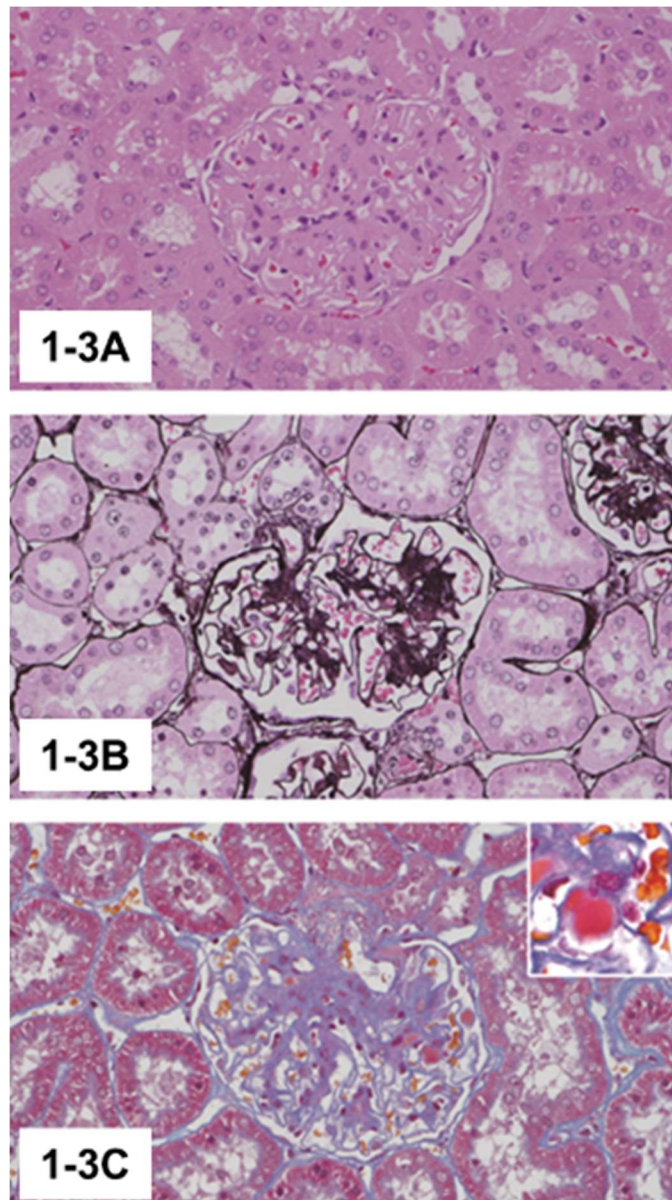


図 1-3A～3C 腎症グレード 3 の腎臓の代表例. 動物番号 7.

【図 1-3A】糸球体は腫大し，メサンギウム基質の軸性の増加が認められる（HE 染色）.

【図 1-3B】図 1-3A 同様に糸球体末梢側でのメサンギウム基質の増加が認められるが，毛細血管ループには特筆すべき所見は認められない（PAM 染色）.

【図 1-3C】メサンギウム基質の増加とパラメサンギウム領域に赤色沈着物が認められる（MT 染色）.

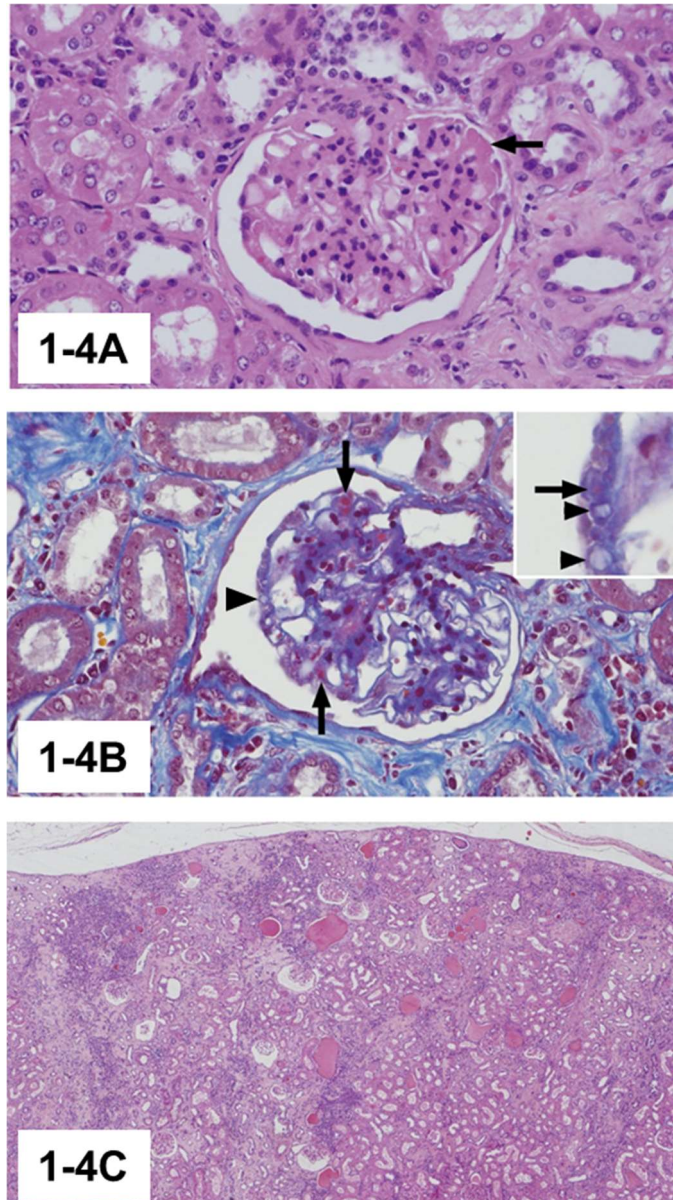


図 1-4A～4C 腎症グレード4の腎臓の代表例. 動物番号 21.

【図 1-4A】メサンギウム基質の増加とメサンギウムへの好酸性沈着物（矢印），ボウマン嚢基底膜の肥厚が認められる（HE 染色）.

【図 1-4B】いくつかの毛細血管係蹄壁がループ状に二重化し（矢頭），毛細血管係蹄壁だけでなくパラメサンギウム領域にも赤色沈着物が観察される（矢印）（MT 染色）.

【図 1-4C】間質の線維化と炎症性細胞浸潤，尿細管腔内の硝子円柱が認められ，腎症グレード3よりも尿細管間質病変が進行している（HE 染色）.

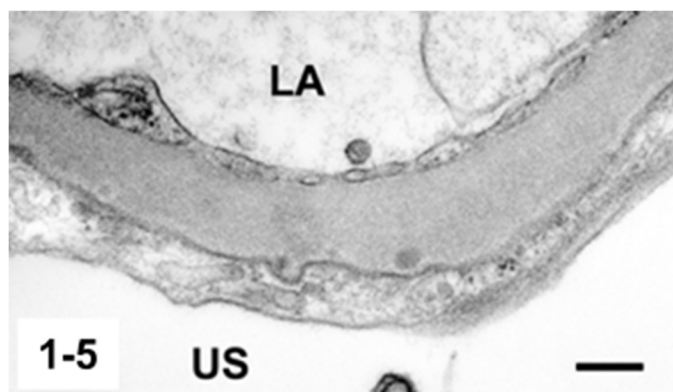


図 1-5 腎症グレード 1 の腎臓の代表例の透過型電子顕微鏡像. 動物番号 2.

糸球体係蹄壁の基底膜には軽微な肥厚と足細胞の足突起の消失が認められる.

LA : 血管腔, US : 尿腔, Bar: 250 nm.

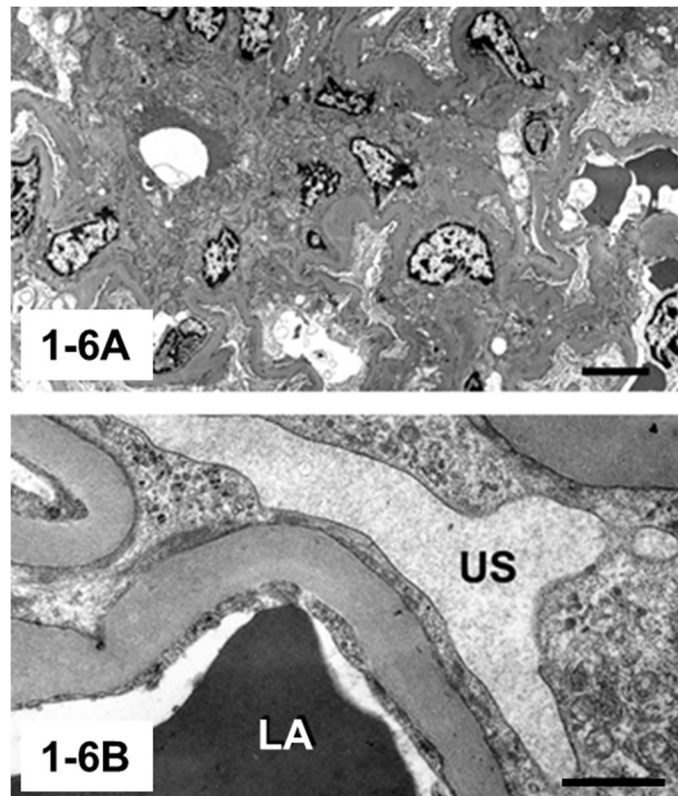


図 1-6 腎症グレード 2 の腎臓の代表例の透過型電子顕微鏡像．動物番号 5．

【図 6A】メサンギウム基質の増加とメサンギウム細胞の増殖が糸球体門部に認められる．Bar：5.0 μm ．

【図 6B】糸球体糸壁の基底膜は腎症グレード 1 よりも肥厚し，3 層構造の乱れが認められる．また，足細胞の足時の消失も認められる．LA：血管腔，US：尿腔，Bar: 1.0 μm ．

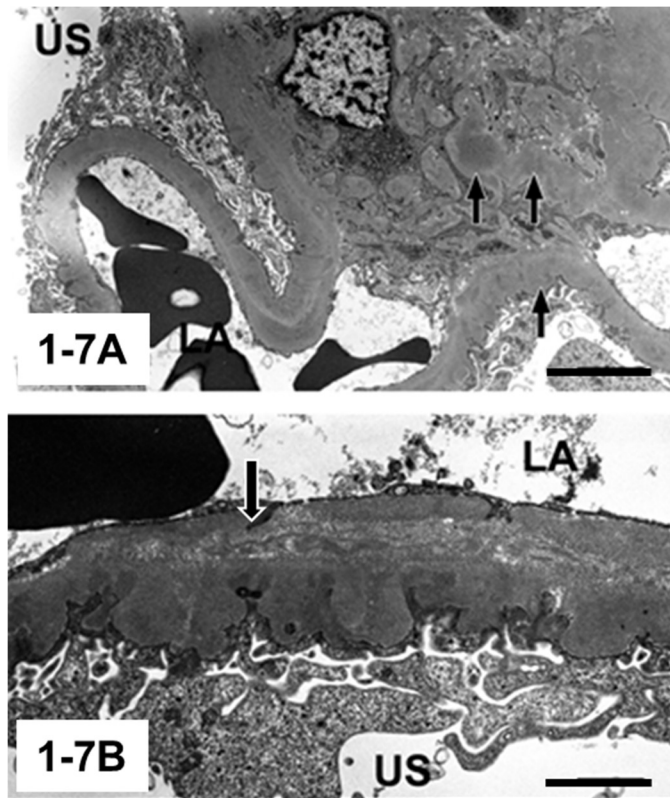


図 1-7 腎症グレード 3 の腎臓の代表例の透過型電子顕微鏡像．動物番号 7．

【図 1-7A】高電子密度の沈着物がパラメサンギウム領域とメサンギウム領域に認められる（矢印）．Bar：5.0 μm ．

【図 1-7B】糸球体基底膜の凹凸が，特に上皮側で認められる．また，緻密層の部分的な網状化が認められる（矢印）．LA：血管腔，US：尿腔，Bar: 2.0 μm ．

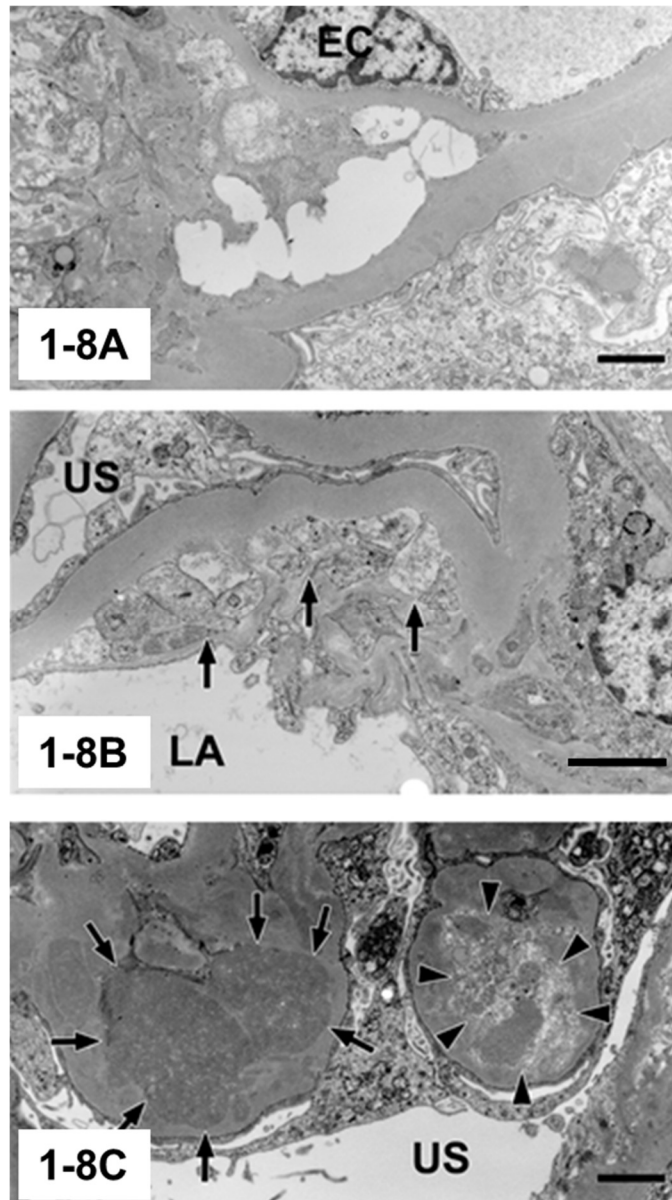


図 1-8 腎症グレード 4 の腎臓の代表例の透過型電子顕微鏡像. 動物番号 21.

【図 1-8A】メサンギウム領域に低電子密度および空隙の領域が認められる. EC: 血管内皮細胞, Bar: 2.0 μm .

【図 1-8B】パラメサンギウム領域近傍にメサンギウム細胞の嵌入 (mesangial interposition, 矢印) が認められる. LA: 血管腔, US: 尿腔, Bar: 2.0 μm .

【図 1-8C】高電子密度沈着物が突出した糸球体基底膜内に認められる (矢印). また, 高電子密度の部分と低電子密度の部分が不規則に混在する沈着物が認められる (矢頭). US: 尿腔, Bar: 2.0 μm .

表 1-1 検索した動物の情報と各種検査結果の概要

動物 番号 性別 年齢			腎症 グレード	尿検査 (尿試験紙法)			尿沈渣検査					血液学的検査		血液生化学的検査							Na	K	Cl
				尿タン パク質 ^a	潜血 ^b	pH	結晶 ^c	赤血球 ^d	白血球 ^d	上皮細胞 ^e	尿円柱 ^f	赤血球 数	白血球 数	血中尿 素窒素	クレアチ ニン	総タン パク質	血清ア ルブミン	血清総 コレステ ロール					
																			単位	x10 ⁶ /μL			
1	雄	3	1	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	9.71	5.75	20.9	0.2	6.2	4.2	174	161	5.0	113		
2	雄	3	1	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	3.01	7.04	19.8	0.3	6.9	5.4	172	158	3.8	109		
3	雄	4	1	++	++	5	-	++	-	-	-	5.24	7.29	14.4	0.3	6.7	4.8	188	161	4.8	112		
4	雄	4	2	++	+/-	5	-	-	-	-	-	3.86	7.18	19.4	0.3	6.6	5.1	195	161	4.6	113		
5	雄	4	2	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	8.25	6.35	38.5	0.3	4.6	3.1	206	158	5.1	113		
6	雄	7	3	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	3.52	6.06	17.6	0.2	6.4	4.8	202	160	5.1	113		
7	雄	9	3	++	+	7	-	-	-	+	-	2.52	6.89	16.9	0.2	7.6	4.2	292	158	3.7	109		
8	雄	9	2	++	+	8.5	+	+	-	-	-	3.56	6.60	22.8	0.2	7.7	4.6	213	157	4.2	108		
9	雄	10	3	++	-	5.5	-	-	-	-	-	8.57	5.15	13.0	0.2	7.2	5.7	141	163	4.4	116		
10	雌	2	1	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	5.95	7.04	23.8	0.2	5.1	3.5	219	156	4.4	111		
11	雌	2	1	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	4.99	7.91	13.4	0.2	8.9	7.0	202	163	4.9	112		
12	雌	3	1	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	10.36	4.83	19.1	0.2	7.3	5.5	135	166	5.7	120		
13	雌	4	2	+++	+++	6	-	++	-	-	+	9.93	7.14	13.3	0.2	7.4	5.5	153	161	4.0	111		
14	雌	5	1	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	5.62	6.25	35.3	0.2	4.1	2.7	153	157	4.2	113		
15	雌	9	3	NE	NE	NE	-	+++	-	-	-	6.33	14.98	22.3	0.2	7.5	5.7	119	157	4.4	110		
16	雌	11	4	++	+++	8	-	+++	-	-	-	6.52	3.00	21.3	0.3	7.3	5.3	180	158	4.6	110		
17	雌	11	3	++	++	6	-	+	-	-	+	5.40	7.86	19.5	0.2	8.2	5.3	174	161	5.4	113		
18	雌	11	3	++	++	5.5	-	+++	-	-	-	6.92	3.75	22.8	0.2	7.3	5.2	189	165	5.3	112		
19	雌	11	3	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	4.22	7.40	19.1	0.2	7.1	5.0	89	156	4.4	110		
20	雌	11	4	+++	+	7.5	-	+	-	-	-	6.88	6.45	13.2	0.2	6.7	4.0	254	160	4.4	112		
21	雌	11	4	+++	+/-	7	-	+	+	+	+	4.78	6.11	21.4	0.3	6.5	3.7	220	157	3.7	116		

NE: 検査なし

^a 尿検査, 尿タンパク質: (++) 30-100 mg/dL; (+++) 100-300 mg/dL

^b 尿検査, 潜血: 1+はヘモグロビン0.06 mg/dL相当し, 赤血球に換算すると約20個/μL

^c 尿沈渣検査, 結晶: (-) 0/10視野; (+) 1~10/10視野

^d 尿沈渣検査, 赤血球および白血球: (-) 0~1/10視野; (+) 2~5/10視野; (++) 6~10/10視野; (+++) >11/10視野

^e 尿沈渣検査, 上皮細胞: (-) 0~2/10視野; (+) 3~10/10視野

^f 尿沈渣検査, 尿円柱: (-) 0/10視野; (+) 1~2/10視野

表 1-2 各所見のスコアの診断基準

スコア	糸球体病変	尿細管の再生, 硝子円柱	間質への細胞浸潤	間質の線維化
0	-	変化なし	変化なし	変化なし
1	変化なし	4か所以内および巣状/多巣状 ^b にみられる	腎門部または血管周囲に散在性にみられる	巣状 ^b にみられる
2	糸球体門部のメサンギウム基質の増加が目立つ, または分節性 ^a のメサンギウム細胞の増殖やメサンギウム基質の増加がみられる(巣状/多巣状 ^b)	5か所を超える, またはびまん性 ^b にみられる	4か所以内および巣状/多巣状 ^b にみられる	びまん性 ^b にみられる(スコア1よりも程度が悪化している)
3	糸球体門部のメサンギウム基質の増加が目立つ, または全節性 ^a のメサンギウム細胞の増殖やメサンギウム基質の増加がみられる(びまん性 ^b)	-	5か所を超える, またはびまん性 ^b にみられる	-

^a 分節性, 糸球体の一部の係蹄に病変がみられる; 全節性, 糸球体の全係蹄に病変がみられる

^b 巣状/多巣状, 病変が腎臓の80%未満の領域に分布している; びまん性, 病変が腎臓の全域あるいはほぼ全域(80%以上)に分布している

表 1-3 病理組織学的スコアと腎症グレード

動物 番号	性別	年齢	病理組織学的スコア ^a					スコア 合計	腎症 グレード ^b
			糸球体 病変	尿細管の 再生	硝子円柱	間質への 細胞浸潤	間質の 線維化		
1	雄	3	1	1	1	1	0	4	1
2	雄	3	1	1	1	1	0	4	1
3	雄	4	1	1	1	1	0	4	1
4	雄	4	2	2	0	2	0	6	2
5	雄	4	2	2	1	1	0	6	2
6	雄	7	3	2	2	2	1	10	3
7	雄	9	2	2	2	3	0	9	3
8	雄	9	2	1	1	2	1	7	2
9	雄	10	2	2	2	3	1	10	3
10	雌	2	1	2	1	1	0	5	1
11	雌	2	2	1	1	1	0	5	1
12	雌	3	1	1	1	1	0	4	1
13	雌	4	2	1	2	2	0	7	2
14	雌	5	1	1	0	1	1	4	1
15	雌	9	2	2	2	3	0	9	3
16	雌	11	3	2	2	3	2	12	4
17	雌	11	3	2	2	3	0	10	3
18	雌	11	3	2	2	2	0	9	3
19	雌	11	3	2	2	2	0	9	3
20	雌	11	3	2	2	3	2	12	4
21	雌	11	3	2	2	3	2	12	4

^a 病理組織学的スコアの診断基準は表1-2を参照

^b 合計スコア 1-3, 腎症グレード 0; 合計スコア 4-5, 腎症グレード 1; 合計スコア 6-7, 腎症グレード 2;
合計スコア 8-10, 腎症グレード 3; 合計スコア 11-12, 腎症グレード 4

表 1-4 各腎症グレードの血液学的検査と血液生化学的検査結果(平均±標準偏差)

腎症グレード	血液学的検査		血液生化学的検査							Na	K	Cl
	赤血球数	白血球数	血中尿素窒素	クレアチニン	総タンパク質	血清アルブミン	血清総コレステロール					
	x10 ⁶ /μL	x10 ³ /μL	mg/dL	mg/dL	g/dL	g/dL	mg/dL	mmol/L	mmol/L			
1	6.41 ± 2.65	6.59 ± 1.05	21.0 ± 7.29	0.23 ± 0.05	6.46 ± 1.55	4.73 ± 1.42	178 ± 28.5	160 ± 3.55	4.69 ± 0.62	113 ± 3.44		
2	6.40 ± 3.18	6.82 ± 0.41	23.5 ± 10.7	0.25 ± 0.06	6.58 ± 1.40	4.58 ± 1.05	192 ± 26.9	159 ± 2.06	4.48 ± 0.49	111 ± 2.36		
3	5.66 ± 2.12	7.67 ± 3.90	18.9 ± 3.63	0.20 ± 0.00	7.48 ± 0.40	5.18 ± 0.56	167 ± 71.0	160 ± 3.58	4.60 ± 0.64	112 ± 2.58		
4	6.06 ± 1.12	5.19 ± 1.90	18.6 ± 4.71	0.27 ± 0.06	6.83 ± 0.42	4.33 ± 0.85	218 ± 37.0	158 ± 1.53	4.23 ± 0.47	113 ± 3.06		
ANOVA	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS		

ANOVA: 一元配置分散分析; NS: 有意差無し

第2章 若齢のコモンマーモセットにおける糸球体への免疫グロブリン沈着と進行性糸球体腎症の関係

第1節 緒言

糸球体腎炎の発症と進展には免疫学的機序が関与していることはよく知られている．一般的に，糸球体腎炎の免疫学的発症機序として，いくつかの機序が知られている．糸球体基底膜や足細胞に対する自己抗体が産生され，その抗体の沈着により発症するもの，腎臓以外で形成された免疫複合体が糸球体のメサングウムや糸球体係蹄壁に沈着し発症するもの，糸球体に非特異的に沈着した抗原に対して生体が抗体を産生し発症するもの，血中で安定性を失った遊離軽鎖や CH1（免疫グロブリンの重鎖定常領域の一つ）欠損重鎖などが免疫複合体を形成せずに沈着し発症するもの，抗好中球細胞質抗体などが関与するなど，免疫グロブリンの沈着を伴わない腎炎などがある [26, 27]．

第 1 章では，2 歳から 11 歳のコモンマーモセットの進行性糸球体腎症について光学顕微鏡学的検査から腎症のグレーディングを実施し，そのグレード別の病理学的な特徴について電子顕微鏡的所見も含めて明らかにした．若齢のコモンマーモセットにおける進行性糸球体腎症の初期段階では，光学顕微鏡で認識可能な糸球体病変が検出されなかったにもかかわらず，足細胞の足突起の消失と糸球体基底膜の部分的な肥厚が電子顕微鏡的に観察された．この時点では，高電子密度物質はまだ糸球体基底膜に沈着していなかった．いくつかの報告では，コモンマーモセットは生後 24 日でも糸球体が IgM または IgA 陽性の沈着物が認められ，コモンマーモセットにおける腎症の原因が IgM および IgA 沈着であることが示唆されている [10, 13]．よって，進行性糸球体腎症の初期段階あるいは発症前の糸球体の免疫グロブリンの沈着を明らかにすることは，本腎症の病態をさらに特徴づけることができると考えられる．

第 2 章の研究の目的は，若齢のコモンマーモセットの糸球体を免疫組織化学的および超微細構造的に検索し，第 1 章で実施したコモンマーモセットの進行性糸球体腎症の低グレード時，すなわち初期病変と免疫組織学的な病態の進行の関係について明らかにすることである．

第2節 材料および方法

第1項 動物

実験動物中央研究所（Central Institution for Experimental Animals; CIEA, 神奈川県川崎市）で飼育され、後肢損傷（動物番号1）、体重減少（動物番号2および4）、腰椎の湾曲（動物番号3）、下顎関節脱臼（動物番号5）といった理由により、ケタミン（20～50 mg/kg）およびキシラジン（2～4 mg/kg）を筋肉内投与し、2～4 %イソフルランの吸入麻酔下で腹大動脈からの放血により安楽殺された、6か月齢から3歳までの5匹のコモンマーモセット（雄2例、雌3例）の腎臓病変を評価した（表2-1）。動物の飼育環境は、室温 $26 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 20\%$ で維持され、飼料はCMS-1M（日本クレア株式会社、東京都）、飲料水は水道水を供与していた。

実験の開始に先立って、本研究は CIEA で承認され、動物実験の適正な実施に向けたガイドライン（日本学術会議，2006 年）に基づく CIEA の動物実験規則に厳密に従って実施された。

第2項 採材

剖検時、右側の腎臓を生理食塩液で灌流し脱血した後、4%パラホルムアルデヒドで灌流固定した。皮質の一部を、透過型電子顕微鏡学的検査用の試料として 2.5%グルタルアルデヒドで固定し、残りは光学顕微鏡学的検査用の試料として 10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。左側の腎臓は、免疫組織学的検査用の試料として、生理食塩液で灌流し脱血した後、Tissue-Tek O.C.T. Compound（サクラファインテックジャパン、東京都）で包埋し、液体窒素で凍結ブロック標本を作製した。

第3項 光学顕微鏡学的検査

光学顕微鏡用の試料は、定法に従いパラフィン包埋し、 $5\text{ }\mu\text{m}$ の厚さに薄切して HE 染色、PAS 染色、PAM 染色および MT 染色を実施した。進行性糸球体腎症のグレード分類は、第 1 章で実施したスコアリングと腎症グレード分類に従った（表 1-2, 表 1-3）。

第4項 電子顕微鏡学的検査

電子顕微鏡学的検査用に 2.5%グルタルアルデヒドで固定した試料は、定法に従い 1%四酸化オスミウムで後固定を 2 時間実施し、脱水後にエポン樹脂に包埋した。

超薄切切片を酢酸ウランとクエン酸鉛で電子染色し，透過型電子顕微鏡（H-7600；日立ハイテクノロジーズ株式会社，東京都）で観察した．

第5項 免疫組織学的検査

免疫組織学的検査用に作製した凍結ブロックを 5 μm の厚さでクライオスタット（CM3050S，ライカマイクロシステムズ株式会社，東京都）を用いて薄切した．一次抗体として polyclonal rabbit antihuman IgM（1:300，DakoCytomation，Glostrup），polyclonal rabbit antihuman IgA（1:200，DakoCytomation，Glostrup），polyclonal rabbit antihuman IgG（1:500，DakoCytomation，Glostrup）を使用した．二次抗体には polyclonal swine anti-rabbit immunoglobulins/FITC（1:40，DakoCytomation，Glostrup）を使用した．定法に従い免疫染色を実施した後，蛍光顕微鏡（BX-51N-34-FL-1-D，Olympus，東京都）で撮像した．沈着物については，細顆粒状のパターン（fine granular pattern）をグレード 1，粗顆粒状パターン（coarse granular pattern）や線状のパターン（linear pattern）をグレード 2 とした．

第3節 結果

第1項 光学顕微鏡学的検査

光学顕微鏡学的検査結果を表 2-1 および表 2-2 に示す.

動物番号 1 は糸球体病変のスコアが 1, その他のスコアは 0 となり, 合計の病理組織学的スコアは 1 で腎症グレード 0 であった. 動物番号 2 は, 糸球体病変のスコアが 1, 間質への細胞浸潤のスコアが 1, 合計の病理組織学的スコアは 2 で腎症グレードは 0 であった. 動物番号 3 は糸球体病変のスコアが 2, 尿細管の再生のスコアが 1, 間質への細胞浸潤のスコアが 2, 合計の病理組織学的スコアは 5 で腎症グレードは 1 であった. 糸球体には, 門部メサンギウム基質の増加が認められた (図 2-1). 尿細管の再生および間質への細胞浸潤の代表的な組織像を, それぞれ図 2-2, 図 2-3 に示す. 動物番号 4 は, 糸球体病変のスコアが 2, 硝子円柱のスコアが 1, 間質の線維化のスコアが 1, 間質への細胞浸潤スコアが 1, 合計の病理組織学的スコアが 5 で腎症グレードは 1 であった. 間質の線維化の代表的な組織像を図 2-4 に示す. 動物番号 5 は, 糸球体病変のスコアが 2, 硝子円柱のスコアが 1, 尿細管の再生のスコアが 1, 間質への細胞浸潤のスコアが 3, 合計の病理組織学的スコアが 7 で腎症グレードは 2 であった. 硝子円柱の代表的な組織像を図 2-5 に示す. 糸球体係蹄壁の変化は, PAS 染色, PAM 染色および MT 染色いずれにおいても認められなかった.

第2項 電子顕微鏡学的検査

電子顕微鏡学的検査結果を表 2-1 に示す.

微絨毛の形成を伴う足細胞の足突起の消失が, 光学顕微鏡的に病変の認められなかった動物番号 1 および 2 を含む, いずれの動物にも認められた (図 2-6). 動物番号 2 から 5 では, 糸球体基底膜の肥厚と網状化が散在的に認められた. 網状化は血管内皮側の内透明板で認められ, 時折, 網状化のみられた領域に細胞質成分が認められた. 組織学的スコア増加に伴う糸球体基底膜の肥厚や網状化の進行は認められなかった. また, いずれの動物にも糸球体基底膜内の高電子密度沈着物は認められなかった.

第3項 免疫組織学的検査

免疫組織学的検査結果を表 2-1 に示す.

いずれの動物にも、IgM の陽性反応が主にメサングウム領域、特に門部で認められた。IgM の沈着は、動物番号 2 で細顆粒状、動物番号 1 (図 2-7A), 3 (図 2-7B), 4 および 5 (図 2-7C) で粗顆粒状のパターンで認められ、部分的に糸球体係蹄壁にも陽性反応が認められた。IgA の沈着は、動物番号 1 (図 2-7D) を除いて、主にメサングウム領域に認められた。動物番号 2 および 3 (図 2-7E) で細顆粒状パターン、動物番号 4 および 5 (図 2-7F) で粗顆粒状、部分的に糸球体係蹄壁に線状のパターンで認められた。IgG の沈着は、動物番号 1 (図 2-7G), 2, 3 (図 2-7H) は陰性で、動物番号 4 は粗顆粒状、動物番号 5 (図 2-7I) は細顆粒状のパターンでメサングウム領域や糸球体係蹄壁に認められた。

第4節 考察

本章の研究では、コモンマーモセットの進行性糸球体腎症の初期病変と免疫グロブリン沈着との関係を明らかにするために、第1章で実施した病理組織学的スコアおよび腎症グレードを病態進行の指標として、電子顕微鏡学的検査と免疫組織化学的検査によって糸球体を詳細に検索した。その結果、電子顕微鏡的に糸球体基底膜病変はなく足細胞の足突起の消失のみを示す段階で、IgMのみがメサンギウムに沈着していることが分かった。また、糸球体基底膜の網状化や肥厚が認められる段階で、IgAおよびIgM沈着も認められた。さらに、IgGの沈着は光学顕微鏡的に糸球体からのタンパク質漏出の指標である硝子円柱がみられた動物で認められた。

コモンマーモセットの腎症では、光学顕微鏡的にメサンギウム基質の増加がみられる状態では糸球体基底膜の網状化および足細胞の足突起が消失していることが分かっている [10]。また、本研究の第1章において光学顕微鏡で糸球体病変が検出されなかった動物でも、すでに足細胞の足突起が消失していることを示した。この結果は、以前の報告よりも早い段階で、コモンマーモセットが進行性糸球体腎症の進行が始まっていることを示している。足突起消失とメサンギウム IgM 沈着の因果関係はヒトおよびコモンマーモセットいずれでも、その詳細は分かっていない。今回の研究で示した初期の IgM 沈着部位はメサンギウム基質への沈着であり足細胞への沈着ではなかったため、微小変化群を伴う IgA 腎症でみられるグリコシル化された IgA1 がメサンギウム細胞からのサイトカイン放出を促すのと同じように [28]、サイトカインを介して足細胞の障害が起きている可能性がある。また、IgM 応答を誘発する食品によって、ヒトおよびコモンマーモセットの両方で IgM 沈着を引き起こすと言われている [13, 29]。本研究に供した若齢のコモンマーモセットでみられた足細胞の足突起の消失と IgM の沈着との関連は明らかではないが、IgM の沈着がコモンマーモセットの進行性糸球体腎症の初期あるいは最も早い段階で沈着する免疫グロブリンであることが示された。

本章の研究では、IgA および IgG の沈着も認められた。そして、IgA および IgG 沈着は、腎病変の進行の増加とともに増加することが分かった。糸球体基底膜の網状化と肥厚は、病理組織学的スコア 2 以上の動物で認められた。また、糸球体基底膜へ IgG が沈着していた 2 匹の動物では、光学顕微鏡的に硝子円柱が認められた。これらの結果は、IgA と IgG の沈着がコモンマーモセットの進行性糸球体腎症の進行に重要な役割を果たしていることを示唆している。ヒトの IgA 腎症では、正常

のヒトの口腔内細菌叢に常在する *Haemophilus parainfluenzae* の膜抗原に対する免疫応答によって、免疫グロブリンのアイソタイプスイッチングが起きることが知られており [30]、コモンマーモセットの進行性糸球体腎症でも、IgM から IgA や IgG へのアイソタイプスイッチングが何らかの免疫応答を引き起こす抗原に対して起きた可能性がある。過去に、コモンマーモセットの腎症における IgA の血清中濃度の報告はあるが、IgA の糸球体への沈着が、腎症の病態進行にどの程度影響しているかは明らかになっていない [13]。

本章の研究では、メサンギウム基質への IgM 沈着と足細胞の足突起の消失は、コモンマーモセットが生まれてからかなり早い段階で始まることが明らかとなった。そして、免疫グロブリンの沈着については、IgM の沈着が最初に起き、IgA および IgG の沈着は腎症の発症前または初期段階から腎症の進行に伴って発生し、進行することが示された。

第5節 小括

本章では、若齢のコモンマーモセット 5 例の腎臓を光学顕微鏡学的、電子顕微鏡学的、免疫組織学的に調べた。その結果、光学顕微鏡的な病変が認められないにもかかわらず、電子顕微鏡的には足細胞の足突起の消失が認められ、さらに IgM の沈着がメサンギウム領域に認められた。第 1 章で定義した病理組織学的スコアが増加するに伴ってメサンギウム領域への IgA の沈着が認められ、さらにメサンギウム領域や糸球体係蹄壁への IgG の沈着も認められた。0.5 歳の動物においても、すでに光学顕微鏡的にメサンギウム基質の増加や IgM, IgA の沈着が認められ、動物によっては、生まれて間もなくから進行性糸球体腎症が進行していく可能性が示された。また、進行性糸球体腎症と免疫グロブリンには関連があることが示唆され、病変初期では IgM のみが沈着するが、進行に伴って IgA や IgG の沈着し、これが病態の進行に関与している可能性が示された。

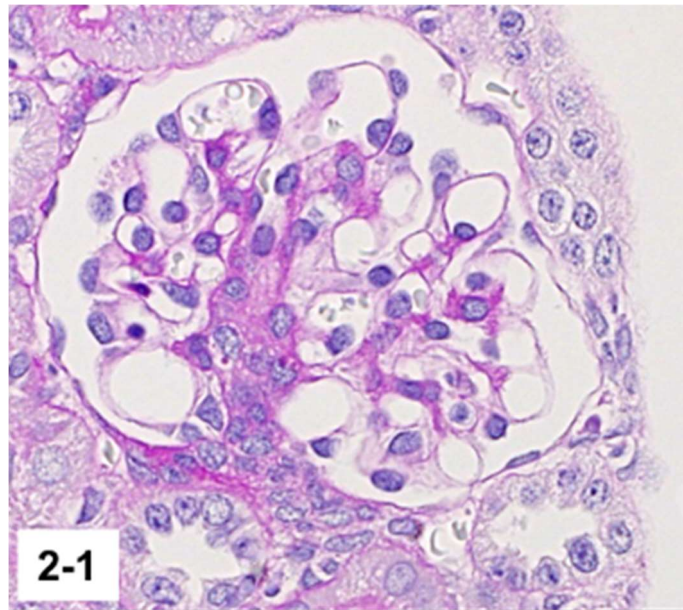


図 2-1 組織学的スコア 5, 腎症グレード 1 の腎臓にみられた糸球体の変化. 動物番号 3.
糸球体門部のメサンギウム基質とメサンギウム細胞の軽微な増殖が認められる (PAS 染色).

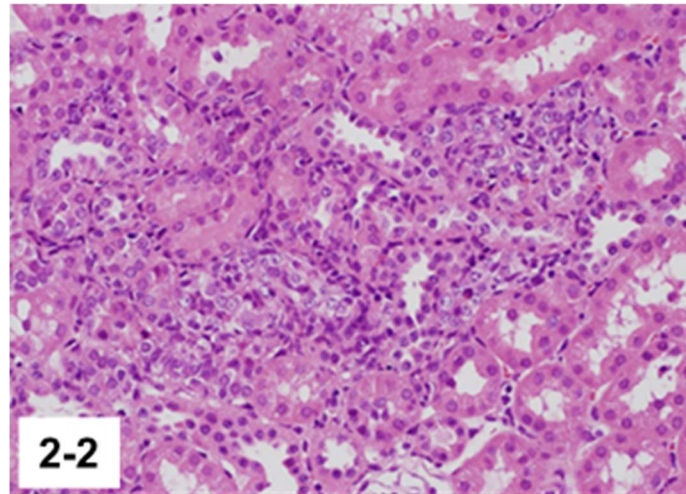


図 2-2 組織学的スコア 5, 腎症グレード 1 の腎臓に認められた再生尿細管. 動物番号 3.
やや核が腫大し細胞質が好塩基性に染色される再生性の尿細管が認められる
(HE 染色).

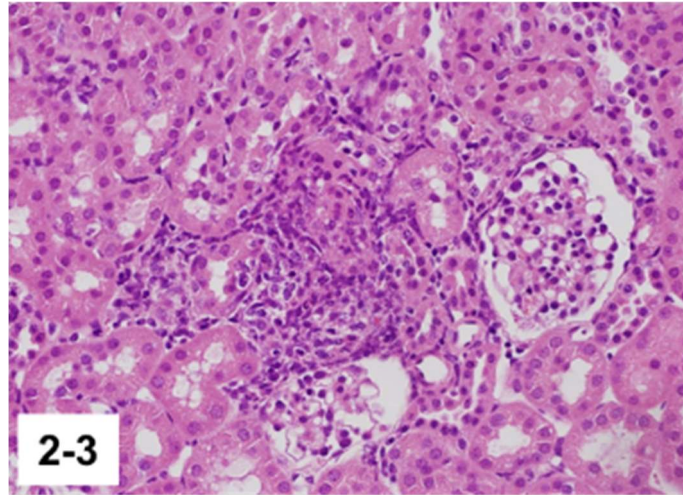


図 2-3 組織学的スコア 5, 腎症グレード 1 にみられた間質の炎症性細胞浸潤. 動物番号 3.

間質に単核球中心の炎症性細胞浸潤が認められる (HE 染色).

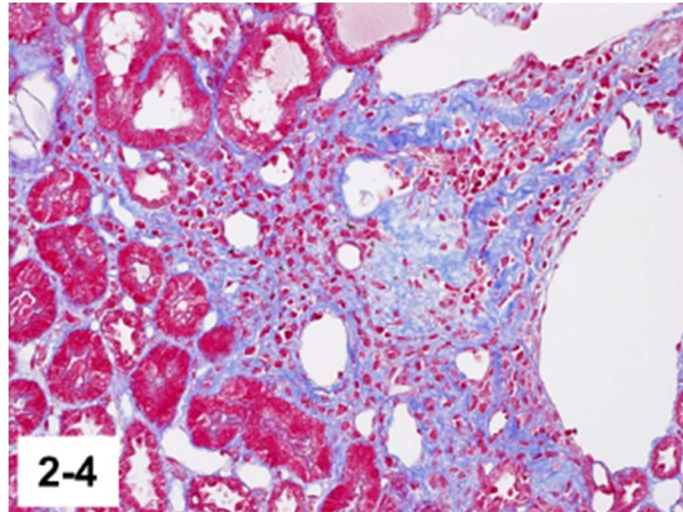


図 2-4 組織学的スコア 5, 腎症グレード 1 の腎臓に認められた間質の線維化. 動物番号 4.

アニリンブルーで青色に染色される間質の線維化が認められる (MT 染色).

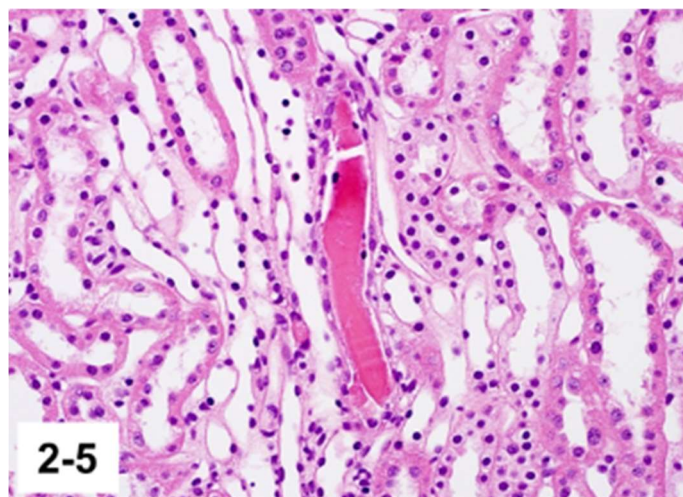


図 2-5 組織学的スコア 5, 腎症グレード 1 の腎臓に認められた硝子円柱. 動物番号 4.
好酸性無構造物が尿細管内に認められる (HE 染色).

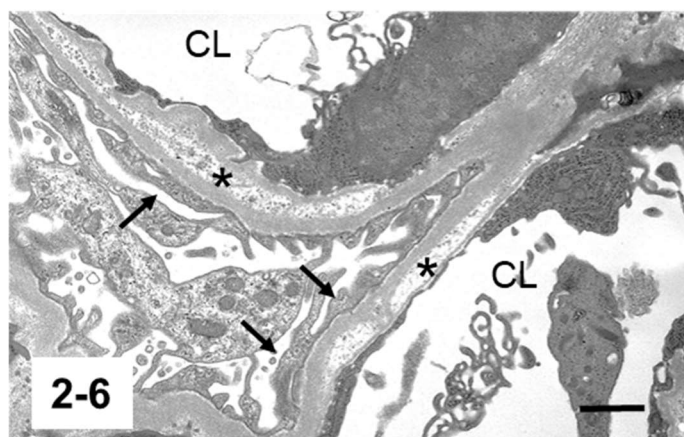


図 2-6 組織学的スコア 2, 腎症グレード 1 の腎臓に認められた糸球体基底膜と足細胞の電子顕微鏡的变化. 動物番号 2.

微絨毛の形成を伴う足細胞の足突起の消失が認められる (矢印). また, 糸球体基底膜の肥厚と網状化が認められる (アスタリスク). CL: 血管腔. Bar : 1.0 μm .

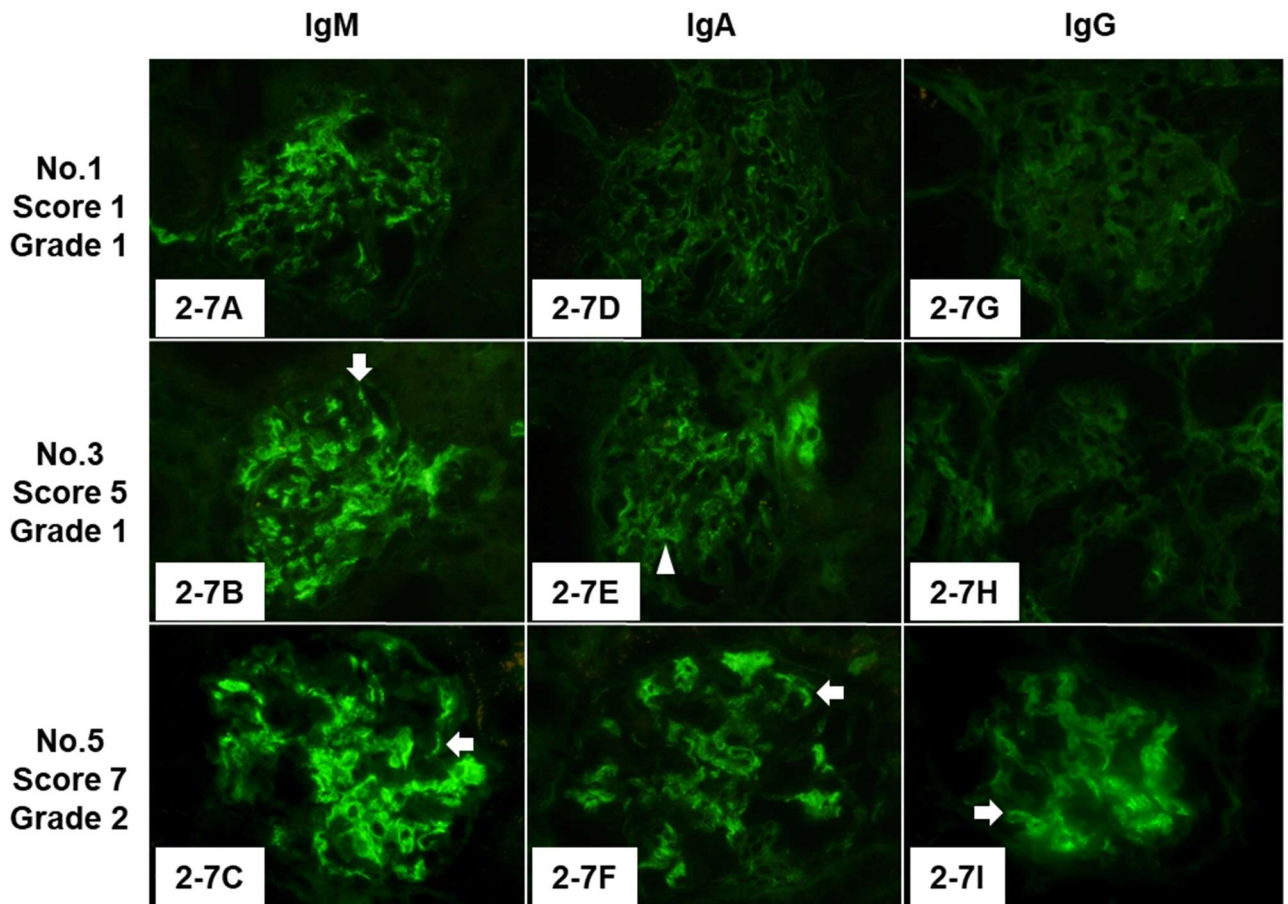


図 2-7A～I 組織学的スコアによる糸球体への免疫グロブリンの沈着の比較. 2-7A, D, G:動物番号 1(組織学的スコア 1, 腎症グレード 1). 2-7B, E, H:動物番号 3(組織学的スコア 5, 腎症グレード 1). 2-7C, F, I:動物番号 5(組織学的スコア 7, 腎症グレード 2).

【図 2-7A～7C】 IgM 免疫染色. IgM の沈着が主にメサンギウム領域, 特に門部で粗顆粒状のパターンで認められる. 動物番号 3 や 5 では, 糸球体係蹄壁にも部分的に陽性反応が認められる (矢印).

【図 2-7D～7F】 IgA 免疫染色. IgA の沈着は, 動物番号 1 には認められない (バックグラウンドとして糸球体の形状が認識できる程度の露出で撮影しているため, 図 2-7D 程度の弱い反応は陰性とし, これよりも強い蛍光発色がみられる部分を陽性としている. 図 2-7G, 図 2-7H も同じ). 動物番号 3 では主にメサンギウム領域において細顆粒状パターンで認められ (矢頭), 動物番号 5 では粗顆粒状, 部分的に糸球体係蹄壁で線状のパターンが認められる (矢印).

【図 2-7G～7I】 IgG 免疫染色. IgG の沈着は, 動物番号 1 および 3 は陰性だが, 動物番号 5 は細顆粒状のパターンが糸球体係蹄壁に認められる (矢印).

表 2-1 光学顕微鏡学的, 電子顕微鏡学的, 免疫組織学的検査結果

症例	年齢	性別	光学顕微鏡学的検査	電子顕微鏡学的検査			免疫組織学的検査		
			腎症グレード(病理組織学的スコア) ^a	足細胞の足突起の消失	糸球体基底膜の肥厚	糸球体基底膜の網状化	IgM ^b	IgA ^b	IgG ^b
症例1	1.2	雄	0 (1)	p	—	—	++	—	—
症例2	2.7	雄	0 (2)	p	p	p	+	+	—
症例3	0.5	雌	1 (5)	p	p	p	++	+	—
症例4	3.6	雌	1 (5)	p	p	p	++	++	++
症例5	2.5	雌	2 (7)	p	p	p	++	++	+

p, 所見あり

^a 第1章 第2節 第3項 病理組織学的検査の方法に従い分類. 病理組織学的スコアの詳細は表2-2を参照

^b +, 細顆粒状パターン; ++, 粗顆粒状パターン および/または 線状パターン

表 2-2 病理組織学的スコアと腎症グレード分類

症例	年齢	性別	瀕死原因	光学顕微鏡学的検査による病理組織学的スコア					腎症グレード (病理組織学的スコア合計)
				糸球体 病変 ^a	硝子円柱 ^b	間質の線 維化 ^c	尿細管の 再生 ^b	間質への 細胞浸潤 ^d	
症例1	1.2	雄	後肢損傷	1	0	0	0	0	0 (1)
症例2	2.7	雄	体重減少	1	0	0	0	1	0 (2)
症例3	0.5	雌	腰椎湾曲	2	0	0	1	2	1 (5)
症例4	3.6	雌	体重減少	2	1	1	0	1	1 (5)
症例5	2.5	雌	下顎関節脱臼	2	1	0	1	3	2 (7)

^a1, 変化なし; 2, 糸球体門部のメサンギウム基質の増加が目立つ, または分節性aのメサンギウム細胞の増殖やメサンギウム基質の増加がみられる(巣状/多巣状)

^b0, 変化なし; 1, 4か所以内および巣状/多巣状にみられる

^c0, 変化なし; 1, 巣状にみられる

^d0, 変化なし; 1, 腎門部または血管周囲に散在性にみられる; 2, 4か所以内および巣状/多巣状にみられる

第3章 コモンマーモセットの進行性糸球体腎症におけるネフリン発現の形態計測学的解析

第1節 緒言

足細胞のスリット膜で発現する重要な分子の 1 つであるネフリンは、1241 個のアミノ酸からなる糖タンパク質であり、スリット膜の障害を監視するために使用されるよく知られたバイオマーカーである。スリット膜関連分子についてコモンマーモセットの腎症では研究されていない。しかし、ヒトとラットでは、ネフリンの発現状況に着眼した報告がなされており、その多くはネフローゼ症候群や種々の疾患に伴うタンパク尿との関連、およびスリット膜を構成する分子に関連した研究である [31-35]。

第 1 章で示したように、コモンマーモセットにおける進行性糸球体腎症の初期段階の糸球体の変化は、足細胞の足突起の消失と糸球体基底膜の部分的な肥厚によって特徴付けられる。この変化は、糸球体からのタンパク質の漏出を引き起こすと推定され、電子顕微鏡では観察できるが、光学顕微鏡では認知できない。糸球体からのタンパク質の漏出を示唆する硝子円柱は、コモンマーモセットにおいて進行性糸球体腎症の進行とともに光学顕微鏡で観察できるようになる。タンパク尿は、足細胞の隣接する足突起を結び付けるスリット膜の障害によって誘発される可能性がある。スリット膜構造は、隣接する足の突起の間に存在する細胞間接合複合体からなり、その形成に関連するいくつかの分子が同定されている。ヒトの小児でみられる特発性微小変化型ネフローゼ症候群では、これらの分子の発現低下や変化によって膜の機能不全が惹起され、タンパク尿が進行すると考えられている [36]。

腎症グレードが進行するにしたがって尿タンパクを示唆する硝子円柱が多く観察されること、および第 2 章で示したように、IgA や IgG の免疫グロブリンの糸球体係蹄壁への沈着が腎症の進行に従って進行することから、足突起のスリット膜構造の異常は、腎症進行に伴い悪化していくことが推察される。しかし、本腎症の病態初期において、足細胞のスリット膜構造に異常があるのかどうかは不明である。よって、本章ではコモンマーモセットの進行性糸球体腎症の症例に対してネフリンの免疫組織化学的染色および形態計測学的解析を実施し腎症グレードとの比較を行った。

第2節 材料および方法

第1項 動物

雄 11 例，雌 8 例，合計 19 例のコモンマーモセットを評価した．動物は，CIEA で飼育されていたが，原因不明の衰弱，腰椎の湾曲，下顎関節脱臼などの理由で人道的エンドポイントに達したため，ケタミン（20～50 mg/kg）およびキシラジン（2～4 mg/kg）を筋肉内投与し，2～4%イソフルランの吸入麻酔下で，腹大動脈からの放血により安楽殺された動物を実験に供した．年齢は剖検時，2 から 10 歳であった．なお，動物の飼育環境は，室温 $26\pm3^{\circ}\text{C}$ ，湿度 $55\pm20\%$ で維持され，飼料は CMS-1M（日本クレア株式会社，東京都），飲料水は水道水を供与していた．

研究の開始に先立って，本研究は CIEA で承認され，動物実験の適正な実施に向けたガイドライン（日本学術会議，2006 年）に基づく CIEA の動物実験規則に厳密に従って実施された．

第2項 進行性糸球体腎症グレード分類

剖検時，右側の腎臓を生理食塩液で灌流し脱血した後，4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し，その後 10%中性緩衝ホルマリン液で固定した．定法に従いパラフィンに包埋した後，5 μm の厚さで薄切し，HE 染色を実施した．進行性糸球体腎症の組織学的スコアおよび腎症グレード分類は，第 1 章の方法に従った（表 1-2，表 1-3）．

第3項 免疫組織学的検査

ヒト由来ネフリンの細胞外ドメインに対する抗体（1:1000，Nephrin g-8，Santa Cruz Biotechnology Inc.，Santa Cruz，CA）を一次抗体として，ネフリンに対する免疫組織学的染色を実施した．5 μm の厚さに薄切したパラフィン切片を脱パラフィンした後，3%過酸化水素を 5 分間室温で反応させ，内因性ペルオキシターゼを不活性化した．オートクレーブにより 121°C 20 分，抗原賦活化液（Target retrieval solution pH 6.0，Dako，Glostrup）によって抗原を賦活化した．クーリング後，前述の抗ネフリン抗体を 4°C で一晩反応させた．二次抗体の反応は，抗マウスおよび抗ウサギ IgG ペルオキシターゼ標識ポリマー試薬（Histofine Simple Stain Rat MAX-PO(MULTI)，ニチレイバイオサイエンス，東京都）を室温で 30 分間反応させる polymer-based method で実施した [37]．その後，3,3'-diaminobenzidine（DAB）を発色基質として用いて，ネフリンに対する免疫組織化学的反応を可視化させた．対

比染色にはヘマトキシリンを用いた．なお，一次抗体を反応させない切片を陰性対照として染色した．

第4項 形態計測学的解析

形態計測学的解析は，糸球体門部が切片上で確認できる糸球体に対して実施した．その結果，それぞれのスライドで 16～28 個の糸球体が解析対象となった（表 3-1）．これらの糸球体は Whole slide scanner（Aperio AT2, Leica Microsystems Inc., USA）でスライド全体を取り込んだ後，各糸球体をビューワーソフト（Aperio ImageScope, Leica Microsystems Inc.）で同じ解像度，同じ画像サイズで取り込んだ．糸球体面積は画像解析ソフト（Image Pro V10, Mediacybenetics Inc., USA）で糸球体の周囲を関心領域として囲み測定した [38]．糸球体領域は，バックグラウンドの白色と区別できる部位として定義した．ネフリン陽性領域のカラー閾値は，それぞれの切片の染色具合により，鏡検しながら設定した．その結果，赤の閾値は 37～67，緑は 31～77，青は 32～88 の範囲となった．ネフリン陽性領域の割合はネフリン陽性領域から糸球体面積を割って求めた．統計学的解析は，ヨンキーの傾向性検定によって，腎症グレードとネフリン発現の間に傾向があるかどうかを検定した（片側検定，有意水準 5%）．

第3節 結果

第1項 進行性糸球体腎症グレード分類

各動物の組織学的スコアと進行性糸球体腎症のグレード分類結果を表 3-1 に示す．腎症グレード 0 に分類されたのは雄 3 例，雌 1 例，腎症グレード 1 は雄 3 例，雌 5 例，腎症グレード 2 は雄 2 例，雌 2 例，腎症グレード 3 は雄 3 例であった．第 1 章の結果と同様，腎症グレードは年齢に伴って増加する傾向が認められたが，性差は明らかではなかった．

第2項 ネフリンの免疫組織学的検査

各腎症グレードにおけるネフリン染色結果の代表例を図 3-1，各動物の病理組織学的スコア，腎症グレード，ネフリン陽性領域の割合を表 3-1 に示す．各動物の結果は，腎症グレードの順に並べて示した．糸球体係蹄壁に沿ったネフリンの発現は，腎症グレード 0 から 2 では連続的な線状パターンを示し，メサンギウム領域と接触している毛細血管壁が染色されていないのに対し，足細胞と接触している毛細血管壁は染色された（図 3-1A～3C）．腎症グレード 3 の例では，非連続性の線状パターンあるいは粗顆粒状パターンを示した（図 3-1D）．陰性対照にネフリンの陽性反応は認められなかった．

第3項 形態計測学的解析

ネフリン陽性領域の割合と腎症グレードの比較を表 3-1 に示す．腎症グレード 0 のネフリン陽性領域の割合の平均±標準偏差は $5.66 \pm 1.18\%$ ，最大値は 6.84%，最小値は 4.27%，中央値は 5.76%であった．腎症グレード 1 では，ネフリン陽性領域の割合は $3.99 \pm 1.61\%$ ，最大値は 5.69%，最小値は 1.19%，中央値は 4.35%であった．腎症グレード 2 では，ネフリン陽性領域の割合は $3.82 \pm 2.25\%$ ，最大値は 6.71%，最小値は 1.58%，中央値は 3.49%であった．腎症グレード 3 では，ネフリン陽性領域の割合は $2.52 \pm 1.02\%$ ，最大値は 3.67%，最小値は 2.17%，中央値は 2.17%であった．

ネフリン発現の個体差は腎症グレード 0 の場合は小さかったが，腎症グレード 1 以上の場合は大きく，陽性領域の割合が低い動物が散見された．腎症グレードが高くなるに従いネフリンの発現が低下する傾向がみられた（図 3-2）．ヨンキーの傾向検定の結果，腎症グレードが増加するにしたがってネフリン陽性領域の割合が有意に減少する傾向が認められた（ $p = 0.0166$ ）．腎症グレードと硝子円柱の病理組

組織学的スコアを図 3-3 に示す．硝子円柱スコアが 0 では，ネフリン陽性領域の割合の平均±標準偏差は $5.40 \pm 1.32\%$ ，スコア 1 の場合は $4.10 \pm 1.70\%$ ，スコア 2 の場合では $3.37 \pm 1.98\%$ であった．ヨンキーの傾向検定の結果，ネフリン陽性領域の割合と硝子円柱スコアの間に有意な差は認められなかったが，減少傾向は認められた ($p = 0.0654$)．

第4節 考察

本章の研究で使用された抗ネフリン抗体は、N 末端側の細胞外ドメインを認識する。この細胞外ドメインは NEPH1 分子と相互作用し、足細胞の足突起のスリット状の隔壁にジッパーのような構造を形成する [39]。正常な糸球体におけるネフリンの局在は、糸球体の毛細血管ループに沿っており、染色パターンはラットもヒトも連続した細顆粒状あるいは線状パターンを示す [34, 35, 40-42]。本研究の腎症グレード 0 から 2 でみられたネフリンの染色像は、メサングウム領域と接触している毛細血管壁が染色されていないのに対し、足細胞と接触している毛細血管壁は染色されていた。これはネフリンが発現している部位と一致し、過去の報告の染色パターンとも矛盾しない。よって、本研究のネフリン染色は適切であったと考えられる。

ヒトの腎炎症候群やラットのピューロマイシン誘発腎症など糸球体基底膜異常がみられる条件下では、糸球体のネフリン染色パターンは不連続、粗顆粒状となり、免疫組織化学的染色の染色強度は正常な糸球体よりも弱くなることが知られている [34, 40, 41]。本研究では、腎症グレード 0 から 2 のネフリン発現パターンは、連続的な線状のパターンで染色され、正常のパターンを示した。しかし、腎症グレード 3 の染色パターンは、前述の糸球体基底膜に異常がみられる病態と同様の染色パターンを示した。微小変化群として報告された CrI : CD (SD) ラットにおいて、足細胞の足突起は電子顕微鏡下で消失していたにも関わらず、ネフリンの発現は正常の染色パターンと同等であったと報告されている [42]。ラットの一般的な腎疾患として知られている慢性進行性腎症では、初期の慢性進行性腎症によるアルブミン尿は、近位尿細管からのアルブミンの再吸収阻害によるものであり、糸球体透過性の変化は僅かであることが確認されている [43]。ヒトでは、微小変化群や膜性腎症、ループス腎炎、糖尿病性腎症など種々の疾患でネフリン発現の減少に関する報告がある [33, 38, 40]。一方、微小変化型ネフローゼにおいてネフリン発現に変化がないとする報告もある [44]。微小変化型ネフローゼにおけるネフリンの発現変化の有無については、現在も議論が続いている。本章の研究において、コモンマーモセットの進行性糸球体腎症ではネフリンの抗体反応の増減を光学顕微鏡的に目視のみで確認することは困難であったが、画像解析により、その変化を検出することができた。本結果は、コモンマーモセットの進行性糸球体腎症の進行に、糸球体のスリット膜の異常およびネフリンの減少が関与している可能性があることを示唆している。ネフリン陽性染色パターンが線状パターンから顆粒状パター

ンへ変換する現象は、ネフローゼ疾患のラット動物モデルでいくつか報告されている [34, 40, 45]. また、形態学的なスリット膜の異常とタンパク尿との関連は良く知られている [46]. したがって、コモンマーモセットの進行性糸球体腎症における、原尿中へのタンパク漏出を示唆する硝子円柱は、スリット膜機能障害によって引き起こされた可能性があるとして推測される. 実際、本研究でみられた硝子円柱は、尿細管間質の変化がない症例にも観察されたため、尿細管病変からの変化というよりも、スリット膜機能障害による糸球体タンパク質透過性の進行により発生した可能性が高いと推察される. 本研究では、硝子円柱の病変スコアとネフリン発現減少との間に統計的に有意な差は観察されなかった ($p=0.0654$). しかし、ネフリンの発現は、糸球体からのタンパク質漏出の指標である硝子円柱スコアに応じて減少する傾向がみられた.

第 1 章の研究では、コモンマーモセットの進行性糸球体腎症の初期段階で足細胞の足突起の消失が観察され、腎病変のグレードが進行するに伴って影響を受ける足突起領域が拡大した. 表 3-2 に本章での研究におけるネフリンの減少率と、第 1 章および第 2 章でみられた各腎病変グレードの電子顕微鏡所見との関係を示す. 足細胞の足突起の消失は、足突起のアクチン細胞骨格の崩壊によるものと考えられている [47]. ネフリンは、スリット膜が構築されるときに脱リン酸化され、CD2AP およびポドシンを介してアクチンに結合する [48]. スリット膜が損傷すると、ネフリン分子がクラスター化され、ネフリンのリン酸化、アクチンの重合化、および足突起の消失が誘導される [48]. ネフリンのリン酸化は、マウスの硫酸プロタミンモデルでの足突起消失の誘導後にも急速に発生する [49]. ネフリンは、有足細胞の成熟や分化、プロセス形成およびシグナル伝達に関連する糸球体接着タンパク質である. 本研究では、免疫組織化学検索によってネフリン発現の減少と腎病変のグレードの進行との間に相関関係があることを示した. この結果は、足細胞の足突起の消失の拡大と関連があることを示唆している. しかし、スリット膜タンパク質複合体の異常が足細胞の足突起に損傷を与えるのか、それとも足細胞の損傷がスリット膜の変化とネフリンの減少を引き起こすのか、どちらが先に引き起こされるかは明らかではない. ネフリンは足細胞の分化にも関与しているため、本病態の病理発生は、足細胞の再生と分化に関するデータを蓄積することによってさらに明らかになると考えられる.

第5節 小括

本章の研究では，コモンマーモセットの進行性糸球体腎症におけるネフリン発現の変化について明らかにした．形態学的には，ネフリンの発現は腎症グレード0～2で連続的な線状パターンを示したが，腎症グレード3の例では，非連続性の線状パターンあるいは粗顆粒状パターンを示し，光学顕微鏡学的な検査でもパターンの違いが明らかであった．さらに，形態計測学的解析により，コモンマーモセットの進行性糸球体腎症の足細胞におけるネフリン発現量は，腎症グレードが増加するに伴い低下することが明らかになった．また，硝子円柱の病理組織学的スコアが増加するに伴い，ネフリン発現量が低下する傾向も認められた．ネフリンは足細胞の足突起のスリット膜構造を構成する重要な分子であり，スリット膜構造の変化は足細胞の足突起の消失やタンパク尿との関連が示唆され，コモンマーモセットの進行性腎症においても，病変の進行は，スリット膜構造の変化，ネフリン発現の減少と硝子円柱の増加が密接に関連していると考えられた．

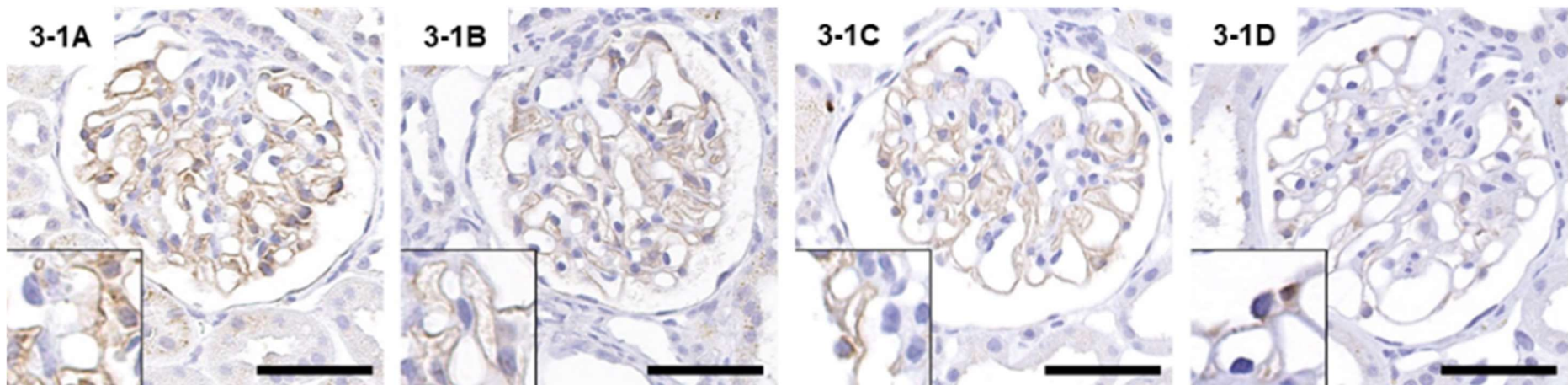


図 3-1A～1D 各腎症グレードにおける抗ネフリン免疫組織学的染色の代表例

【図 3-1A】腎症グレード 0. 糸球体係蹄壁に沿ったネフリンの発現は，連続的な線状パターンを示す（抗ネフリン染色）. Bar : 50 μ m.

【図 3-1B】腎症グレード 1. 糸球体係蹄壁に沿ったネフリンの発現は，腎症グレード 0 と同様に連続的な線状パターンを示す. 抗ネフリン染色. Bar : 50 μ m.

【図 3-1C】腎症グレード 2. 糸球体係蹄壁に沿ったネフリンの発現は，腎症グレード 0 や 1 と同様に連続的な線状パターンを示し，発現パターンに明らかな差は認められない. 抗ネフリン染色. Bar : 50 μ m.

【図 3-1D】腎症グレード 3 では，非連続性の線状パターンあるいは粗顆粒状パターンを示す. 抗ネフリン染色. Bar : 50 μ m.

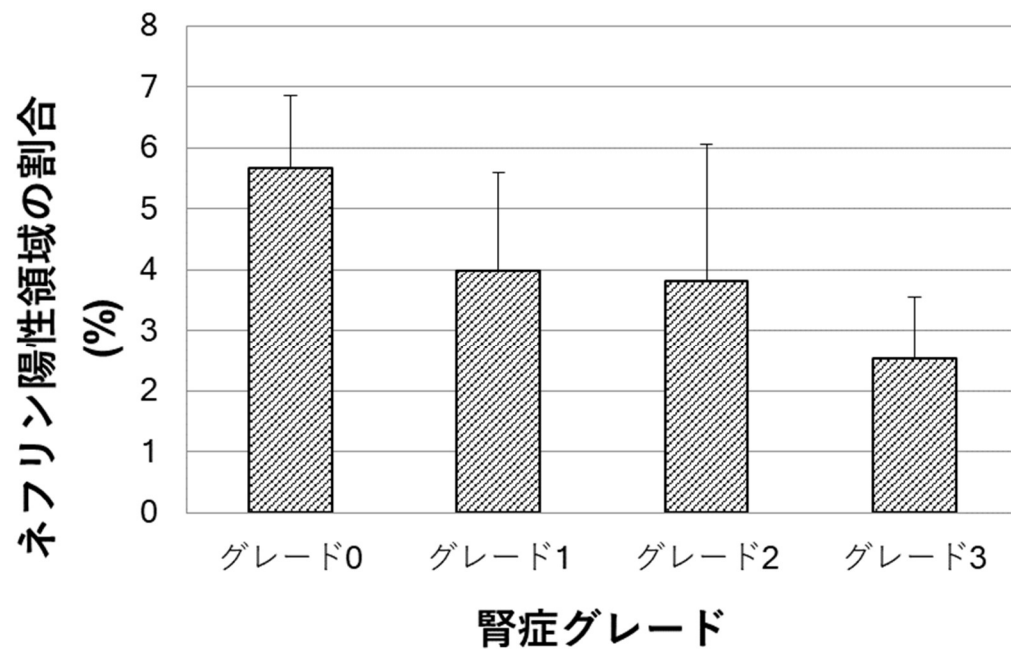


図 3-2 ネフリン陽性領域の割合と腎症グレードの比較 (平均値および標準偏差)

ネフリンの発現は、腎症のグレードが上昇するに従い有意に低下する傾向を示した (ヨンキーの傾向検定, $p=0.0166$) .

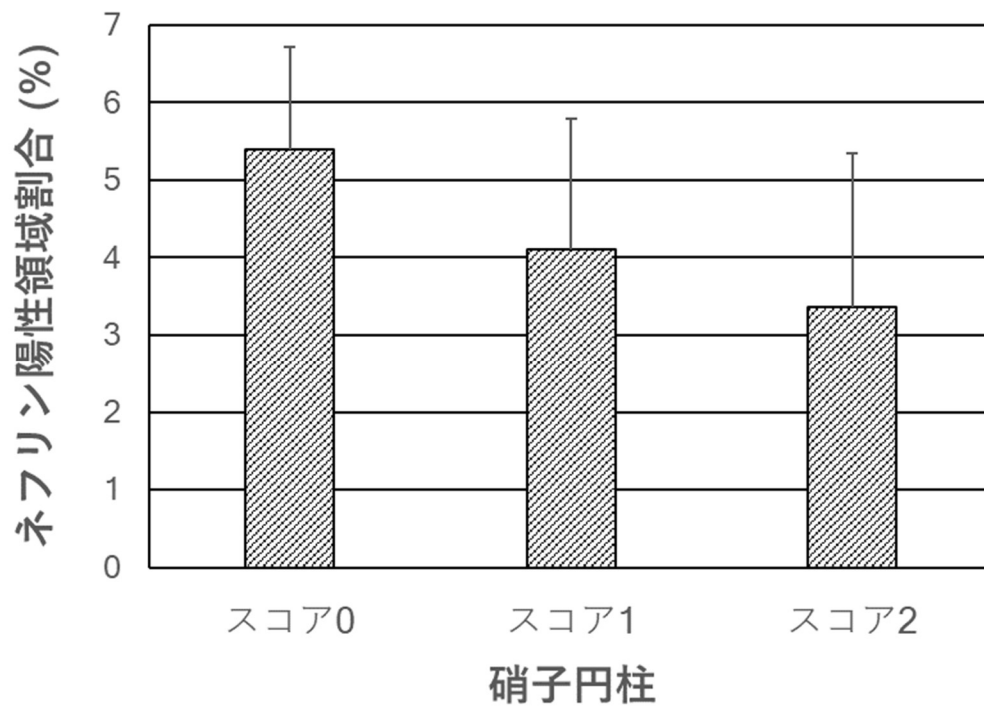


図 3-3 ネフリン陽性領域の割合と硝子円柱スコアの比較(平均値および標準偏差)

ネフリンの発現は、硝子円柱スコアが上昇するに従い低下する傾向を示したが、統計学的な有意差は認められなかった (ヨンキーの傾向検定, $p=0.0654$).

表 3-1 各個体の腎症グレードと組織学的スコア, ネフリン陽性領域の割合

動物番号	年齢	性別	糸球体病変	硝子円柱	間質の線維化	尿細管の再生	間質への細胞浸潤	合計スコア	腎症グレード	糸球体解析数	ネフリン陽性領域割合 (%)
3	2	M	1	0	0	0	0	1	0	19	6.84
2	4	M	1	1	0	0	1	3	0	17	6.44
4	2	F	1	0	0	0	0	1	0	20	5.08
1	6	M	1	0	0	0	0	1	0	18	4.27
7	4	M	2	1	0	0	2	5	1	18	5.69
11	2	F	2	1	0	0	1	4	1	16	5.46
12	2	F	2	1	0	0	1	4	1	26	5.08
10	2	F	2	1	0	0	1	4	1	24	4.92
6	3	F	2	1	1	0	1	5	1	19	3.78
9	2	F	2	1	0	1	0	4	1	24	3.56
5	8	M	2	1	0	0	1	4	1	19	2.26
8	4	M	2	1	0	0	2	5	1	24	1.19
16	2	M	2	2	1	0	2	7	2	20	6.71
14	4	F	3	2	0	0	1	6	2	19	4.36
15	2	F	3	1	0	0	2	6	2	22	2.61
13	7	M	2	2	1	1	1	7	2	20	1.58
18	10	M	3	2	1	2	1	9	3	28	3.67
17	7	M	2	2	2	1	1	8	3	27	2.17
19	6	M	2	2	1	2	2	9	3	24	1.72

合計スコア 1-3, 腎症グレード 0; 合計スコア 4-5, 腎症グレード 1; 合計スコア 6-7, 腎症グレード 2; 合計スコア 8-10, 腎症グレード 3.

解析は, 糸球体門部が切片上で確認できる糸球体に対して実施され, 各スライドで16~28個の糸球体が解析対象となった.

ネフリン陽性領域の割合はネフリン陽性領域から糸球体面積を割って求められた.

表 3-2 足細胞足突起の超微形態学的変化とネフリン発現の減少率の比較

腎症グレード	足細胞の足突起の超微形態学的特徴	ネフリン減少率 (グレード0に対する割合)
グレード0	基底膜の肥厚が散在的に認められ、足細胞の足突起の消失が認められる*、**	100%
グレード1		70.6%
グレード2	基底膜はグレード1よりも肥厚し、足突起の消失の範囲もグレード1より拡大する**	67.4%
グレード3	糸球体基底膜の凹凸が特に上皮側で広く観察されるようになり、足細胞の足突起の消失がこの不整な糸球体基底膜の近傍に認められ、その範囲は腎症グレード2よりも拡大する**	44.5%

* 第2章 第3節 第2項 より

** 第1章 第3節 第3項 より

総括

本論文では、実験動物として使用されることが多くなってきたコモンマーモセットの背景病変として知られている進行性糸球体腎症に注目し、体系的に本腎症を評価することを目的とした。

第一の課題として、通常の検査で行われる HE 染色切片の顕微鏡検査から、各病変の病理組織学的スコアを元に腎症のグレーディングを実施し、その結果と電子顕微鏡学的検査の結果を照らし合わせて、腎症グレードと超微形態学的変化の関係性について明らかにした。第二の課題として、糸球体病変には免疫グロブリン沈着が関与していることが多く、過去のコモンマーモセットの腎症でもその関与が示唆されていることから、腎症グレードと免疫グロブリンの沈着との関係性について明らかにした。第三の課題として、超微形態学的に病変初期から観察される足細胞の足突起の消失に注目し、足突起に形成されるスリット膜構造に重要な分子であるネフリンの発現パターンの変化と腎症グレードの関係について明らかにした。

腎症グレード 0 では、光学顕微鏡で認知可能な顕著な糸球体病変がないにもかかわらず、電子顕微鏡的に足細胞の足突起の消失が認められた。この時点で、糸球体糸球壁のネフリンは連続的な線状パターンを示し、異常は認められなかった。一方、免疫グロブリンは主に IgM の沈着がメサンギウム領域に認められ、IgA の沈着が認められる例もあった。IgA の沈着が認められた例では、超微形態学的に糸球体基底膜の肥厚や網状化がみられていた。このことから、本腎症の初期では、まずメサンギウム領域へ IgM の沈着と足細胞の足突起の消失が起き、次いで IgA が沈着し糸球体基底膜の病変が進行していくものと考えられた。

腎症グレード 1 では、光学顕微鏡学的検査で糸球体病変として門部メサンギウム基質の増加が多く例でとらえられた。この時、電子顕微鏡的に足細胞の足突起の消失が共通して認められ、糸球体基底膜の肥厚や網状化といった変化が腎症グレード 0 よりも進行していた。腎症グレード 0 と同様にネフリンの発現パターンに異常は捉えられなかったが、傾向として、ネフリンの発現量は腎症グレードが進行するにしたがって低下していた。免疫グロブリンの沈着は、メサンギウム領域への IgM および IgA の沈着が認められ、部分的に糸球体糸球壁への沈着も認められた。また、IgG がメサンギウム領域や糸球体糸球壁に沈着している例も認められた。このことから、ネフリンの発現パターンを形態学的にとらえることはできなかったが、光学顕微鏡的にメサンギウム基質の増加が認められる時点では、少なくとも

IgM および IgA が既に多く沈着し、糸球体基底膜病変は進行していることが明らかとなった。また、病変進行に伴って IgG も沈着することが明らかとなった。

腎症グレード 2 では、光学顕微鏡的に糸球体門部から係蹄に向かってメサンギウム基質の増加が明らかとなり、糸球体全体にわたってメサンギウム基質の増加が認められる例もいた。電子顕微鏡的には、腎症グレード 1 よりも糸球体基底膜病変は進行していた。この時点でも、形態学的に糸球体係蹄壁のネフリン発現の変化は捉えられなかったが、メサンギウム領域への IgM および IgA の沈着が強く認められ、糸球体係蹄壁への IgG の沈着も腎症グレード 1 と同様に認められた。腎症グレード 2 で光学顕微鏡的にメサンギウム基質の増加やメサンギウム細胞の増殖が顕著な例も認められ、この時点では糸球体以外の病変（尿細管の再生、硝子円柱、間質への炎症性細胞浸潤、線維化）も徐々に進行していた。

腎症グレード 3 では、光学顕微鏡的に糸球体の病変は門部から末梢側に向かってメサンギウム基質の増加やメサンギウム細胞の増殖が明らかとなる例が多くなり、糸球体基底膜とパラメサンギウム領域に MT 染色で赤色に染色される沈着物がみられた。電子顕微鏡的には、同領域に高電子密度の沈着物がみられ、糸球体基底膜では上皮側で凹凸が目立った。ネフリンの発現パターンは非連続性の線状パターンあるいは粗顆粒状パターンを示し、腎症グレード 0 から 2 までのパターンとは異なっていた。これは、電子顕微鏡的な糸球体基底膜の変化を反映しているものと考えられた。これらの変化はメサンギウム領域と糸球体基底膜の病変が進行していく膜性増殖性糸球体腎炎の病変パターンと類似しており、尿細管間質病変の程度も腎症グレード 2 より明らかに進行していた。

腎症グレード 4 では、光学顕微鏡的に、糸球体基底膜の走行や配列の不整が顕著であった。PAM 染色では糸球体係蹄壁で基底膜の二重化が認められ、MT 染色では、同部位に赤色の沈着物を伴う部位と伴わない部位が認められた。さらに、糸球体係蹄壁だけではなく、パラメサンギウム領域にも多くの赤色沈着物が認められ、腎症グレード 3 と比較して間質の線維化も明らかで、間質病変は拡大していた。電子顕微鏡的には、突出した糸球体基底膜内に高電子密度の沈着物が認められた。さらに、高電子密度の沈着物が沈着している部位の電子密度は部分的に減少し、同部位には顆粒状の構造物や細胞内小器官を伴う細胞質が認められた。

本腎症は進行性の疾患であり、糸球体内ではメサンギウム領域と糸球体基底膜に様々な変化が連続的に進行していく。そのような中で、腎症初期のグレード 0～1 ではヒトの微小糸球体変化と言われる病態に類似した変化を示すことが分かっ

た．免疫学的には既にメサンギウム領域への IgM の沈着が始まっており，その後 IgA，次いで IgG が沈着していくことから，免疫グロブリンの沈着がその病態進行に大きく関与している可能性が示された．腎症グレード 1～2 では光学顕微鏡的にもメサンギウム基質の増加やメサンギウム細胞の増殖という形で病変が明らかとなるが，糸球体係蹄壁の病変は光学顕微鏡では捉えられなかった．しかし，電子顕微鏡学的検査では糸球体基底膜の肥厚や網状化といった変化が進むとともに，糸球体係蹄壁への IgG の沈着も進むものと考えられた．腎症グレード 2～3 ではメサンギウム基質の増加やメサンギウム細胞の増殖性病変も進行し，パラメサンギウム領域への沈着物も MT 染色で確認できるようになるが，糸球体係蹄壁にはまだ明らかな病変は認められなかった．しかし，ネフリンの発現パターンが変化しはじめ，電子顕微鏡的にも凹凸がはっきりしてくるなど，糸球体基底膜の病変が進行しているものと考えられた．腎症グレード 3 までの検索で，ネフリンの発現量は減少傾向を示していることから，糸球体基底膜のスリット膜構造の変化が徐々に進行していることが示唆された．腎症グレード 3～4 になると，光学顕微鏡的には尿細管間質病変も進行し，糸球体では糸球体係蹄壁にも明らかな肥厚や二重化といった病変が認められるようになった．このことから，コモンマーマセットの進行性糸球体腎症には免疫グロブリンの沈着が関与し，微小糸球体変化から始まり，最終的にはメサンギウム基質やメサンギウム細胞の増殖といったメサンギウム領域の病変と糸球体係蹄壁の肥厚が特徴的なヒトの膜性増殖性糸球体腎炎 I 型に類似する形態を呈することが分かった．

本研究では，臨床病理学的な所見との関連についての詳細は調べられなかった．特に，尿中の尿細管傷害マーカーである Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1) が FDA に受け入れられ [50]，肝臓型脂肪酸結合タンパク (Liver-type fatty acid binding protein, L-FABP) や N-アセチル- β -D-グルコサミニダーゼ (N-acetyl- β -D-glucosaminidase, NAG) は日本国内でも保険診療で測定できるようになるなど，尿中バイオマーカーの測定はヒトの臨床において重要な存在になってきている [51]．動物実験でも，血漿シスタチン C，尿中 b2-ミクログロブリン，Kim-1 など各種の尿中バイオマーカーに注目が集まっており，これらの尿中バイオマーカーと組織学的なグレードの関係を明らかにすることで，今後は，進行性糸球体腎症の程度を飼育中に予測できるようになるかもしれない [52-54]．

本研究では，コモンマーマセットの進行性糸球体腎症の病理組織学的なグレーディングを可能にした．そして，病理組織学的な特徴については，超微形態学的変

化や免疫グロブリンの沈着程度，およびネフリンの発現状況について，各グレード毎にそれらの詳細を明らかにした．本研究の成果は，毒性試験を含む多くの研究でコモンマーモセットの腎病変を判断する一助となるものと考ええる．

謝辞

本稿を終えるにあたり，本研究の遂行に際して終始ご指導賜りました株式会社 L S I M安全科学研究所病理研究部 佐藤順子 博士，並びに帯広畜産大学グローバルアグロメディシン研究センター獣医学研究部門 古林与志安 教授に深く感謝いたします．

本稿作成に際し，有益な御助言と御校閲を頂いた帯広畜産大学基礎獣医学分野形態学系 佐々木基樹 教授，帯広畜産大学基礎獣医学分野機能学系 石井利明 教授，帯広畜産大学グローバルアグロメディシン研究センター獣医学研究部門 山田学 教授並びに 渡邊謙一 准教授に深甚なる謝意を表します．

本研究はマーモセットという限られた施設しか飼育していない実験動物の背景病変を探索するという性質上，複数の機関の方たちのご協力を賜りました．検体のご提供や腎病変についてのご助言を賜りました麻布大学獣医学部 代田欣二 名誉教授並びに同病理学研究室 上家潤一 教授，公益財団法人実験動物中央研究所 鈴木雅実 博士（前中外製薬株式会社）並びに 井上貴史 博士，公益財団法人東京都医学総合研究所 橋本菜名子 先生に深甚なる謝意を表します．株式会社 L S I M安全科学研究所病理研究部の皆様には，本研究を通して高品質な標本の作製並びにご助言・ご鞭撻いただきました事を感謝いたします．

参考文献

- [1] 佐々木えりか. 老化研究におけるコモンマーモセットの可能性. 基礎老化研究. 2017 41(2):9–15.
- [2] Sasaki E, Suemizu H, Shimada A, Hanazawa K, Oiwa R, Kamioka M, Tomioka I, Sotomaru Y, Hirakawa R, Eto T, Shiozawa S, Maeda T, Ito M, Ito R, Kito C, Yagihashi C, Kawai K, Miyoshi H, Tanioka Y, Tamaoki N, Habu S, Okano H, Nomura T. Generation of transgenic non-human primates with germline transmission. *Nature*. 2009 28;459(7246):523–527.
- [3] Sato K, Oiwa R, Kumita W, Henry R, Sakuma T, Ito R, Nozu R, Inoue T, Katano I, Sato K, Okahara N, Okahara J, Shimizu Y, Yamamoto M, Hanazawa K, Kawakami T, Kametani Y, Suzuki R, Takahashi T, Weinstein EJ, Yamamoto T, Sakakibara Y, Habu S, Hata J, Okano H, Sasaki E. Generation of a Nonhuman Primate Model of Severe Combined Immunodeficiency Using Highly Efficient Genome Editing. *Cell Stem Cell*. 2016 19(1):127–138.
- [4] Kaspareit J, Friderichs-Gromoll S, Buse E, Habermann G. Background pathology of the common marmoset (*Callithrix jacchus*) in toxicological studies. *Exp Toxicol Pathol*. 2006 57(5-6):405–410.
- [5] Frazier KS, Seely JC, Hard GC, Betton G, Burnett R, Nakatsuji S, Nishikawa A, Durchfeld-Meyer B, Bube A. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse urinary system. *Toxicol Pathol*. 2012 40(4 Suppl):14S–86S.
- [6] Woicke J, Al-Haddawi MM, Bienvenu JG, Caverly Rae JM, Chanut FJ, Colman K, Cullen JM, Davis W, Fukuda R, Huisinga M, Walker UJ, Kai K, Kovi RC, Macri NP, Marxfeld HA, Nikula KJ, Pardo ID, Rosol TJ, Sharma AK, Singh BP, Tamura K, Thibodeau MS, Vezzali E, Vidal JD, Meseck EK. International Harmonization of Nomenclature and Diagnostic Criteria (INHAND): Nonproliferative and Proliferative Lesions of the Dog. *Toxicol Pathol*. 2021 49(1):5–109.

- [7] Colman K, Andrews RN, Atkins H, Boulineau T, Bradley A, Braendli-Baiocco A, Capobianco R, Caudell D, Cline M, Doi T, Ernst R, van Esch E, Everitt J, Fant P, Gruebbl MM, Mecklenburg L, Miller AD, Nikula KJ, Satake S, Schwartz J, Sharma A, Shimo A, Sobry C, Taylor I, Vemireddi V, Vidal J, Wood C, Vahle JL. International Harmonization of Nomenclature and Diagnostic Criteria (INHAND): Non-proliferative and Proliferative Lesions of the Non-human Primate (*M. fascicularis*). *J Toxicol Pathol*. 2021 34(3 Suppl):1S–182S.
- [8] Brack M. IgM-mesangial nephropathy in callithricids. *Vet Pathol*. 1988 25(4):270–276.
- [9] Brack M. Callitrichid IgM-nephropathy--an old age-related disease? *Lab Anim*. 1995 29(1):54–58.
- [10] Brack M, Weber M. Ultrastructural and histochemical mesangial alterations in Callitrichid IgM nephropathy (primates: platyrrhina). *Nephron*. 1995 69(3):286–292.
- [11] Isobe K, Adachi K, Hayashi S, Ito T, Miyoshi A, Kato A, Suzuki M. Spontaneous glomerular and tubulointerstitial lesions in common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Vet Pathol*. 2012 49(5):839–845.
- [12] Hard GC, Seely JC. Histological investigation of diagnostically challenging tubule profiles in advanced chronic progressive nephropathy (CPN) in the Fischer 344 Rat. *Toxicol Pathol*. 2006 34(7):941–948.
- [13] Brack M, Schroeder C, Fooke M, Schlumberger W. IgM/IgA nephropathy in callitrichids: antigen studies. *Nephron*. 1999 82(3):221–231.
- [14] 岡林佑典, 清水章. 糸球体腎炎の病理像と疾患分類 ―増殖性炎症による病理像の多様性と疾患分類―. *日腎会誌*. 2016 58(5):622–631.
- [15] 丸山真弓, 豊田雅夫, 梅園朋也, 宮内雅晃, 山本直之, 木村守次, 本間正史, 仁科良, 遠藤正之, 堺秀人, 鈴木大輔. 成人発症の微小変化型ネフローゼ症候群における組織学的相違と臨床予後の検討. *日腎会誌*. 2006 48(1):14–21.
- [16] Chugh, SS, Clement LC, Mace C. New insights into humanminimal change disease: Lessons from animal models. *Am J Kidney Dis*. 2011 59:284–292.
- [17] Wei C, Reiser J. Minimal change disease as a modifiable podocyte paracrine disorder. *Nephrol Dial Transplant*. 2011 26:1776–1777.
- [18] 城謙輔. IgA 腎症. 腎疾患各論. 腎生検病理アトラス. 編集:日本腎臓学会, 腎病理診断標準化委員会, 日本腎病理協会. 東京医学社. 2010 pp.105–110.

- [19] Brack M, Rothe H. Chronic tubulointerstitial nephritis and wasting disease in marmosets (*Callithrix jacchus*). *Vet Pathol.* 1981 18:45–54.
- [20] Schroeder C, Osman AA, Roggenbuck D, Mothes T. IgA-gliadin antibodies, IgA-containing circulating immune complexes, and IgA glomerular deposits in wasting marmoset syndrome. *Nephrol Dial Transplant.* 1999 14:1875–1880.
- [21] 田口尚, 小山田美紀, 原田孝司. 膜性腎症の病理. *日腎会誌.* 2011 53(5):684–691.
- [22] Boyce JT, Giddens WE Jr., Seifert R. Spontaneous mesangioproliferative glomerulonephritis in pigtailed macaques (*Macaca nemestrina*). 1981 *Vet Pathol* 18:82–88.
- [23] Giddens WE Jr., Boyce JT, Blakley GA, Morton WR. Renal disease in the pigtailed macaque (*Macaca nemestrina*). *Vet Pathol* 1981 18:70–81.
- [24] 上家潤一, 糸球体疾患, 腎臓, 泌尿器. 動物病理学各論第3版. 編集: 日本獣医病理学専門家協会. 文永堂出版. 2021 pp.263–270.
- [25] 橋口明典. 微小変化型ネフローゼ症候群. 腎疾患各論. 腎生検病理アトラス. 編集: 日本腎臓学会, 腎病理診断標準化委員会, 日本腎病理協会. 東京医学社. 2010 pp.85–90.
- [26] 富野康日己. 糸球体腎炎と免疫. *日本内科学会雑誌.* 1998. 87(3):166–169.
- [27] 眞部俊, 長田道夫. 糸球体腎炎発症の免疫学的多様性. *日腎会誌.* 2016 58(5):614–621.
- [28] Coppo R, Fonsato V, Balegno S, Ricotti E, Loiacono E, Camilla R, Peruzzi L, Amore A, Bussolati B, Camussi G. Aberrantly glycosylated IgA1 induces mesangial cells to produce platelet-activating factor that mediates nephrin loss in cultured podocytes. *Kidney Int.* 2010 77(5):417–427.
- [29] Vanikar A. IgM nephropathy; can we still ignore it. *J Nephropathol.* 2013 2(2):98–103.
- [30] 鈴木亨, 藤枝重治. IgA 腎症患者扁桃組織リンパ球の *Haemophilus parainfluenzae* 菌体外膜抗原に対する免疫応答. *口咽科.* 2000 12(2):161–166.
- [31] Kestilä M, Lenkkeri U, Männikkö M, Lamerdin J, Mc-Cready P, Putaala H, Ruotsalainen V, Morita T, Nissinen M, Herva R, Kashtan CE, Peltonen L, Holmberg C, Olsen A, Tryggvason K. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell.* 1998 1:575–582.

- [32] Langham RG, Kelly DJ, Cox AJ, Thomson NM, Holthöfer H, Zaoui P, Pinel N, Cordonnier DJ, Gilbert RE. Proteinuria and the expression of the podocyte slit diaphragm protein, nephrin, in diabetic nephropathy: effects of angiotensin converting enzyme inhibition. *Diabetologia*. 2002 45:1572–1576.
- [33] van de Lest NA, Zandbergen M, Ijpelaar DHT, Wolterbeek R, Bruijn JA, Bajema IM, Scharpfenecker M. Nephrin loss can be used to predict remission and long-term renal outcome in patients with minimal change disease. *Kidney Int Rep*. 2017 3:168–177.
- [34] Kawachi H, Koike H, Kurihara H, Yaoita E, Orikasa M, Shia MA, Sakai T, Yamamoto T, Salant DJ, Shimizu F. Cloning of rat nephrin: expression in developing glomeruli and in proteinuric states. *Kidney Int*. 2000 57:1949–1961.
- [35] Luimula P, Ahola H, Wang SX, Solin ML, Aaltonen P, Tikkanen I, Kerjaschki D, Holthöfer H. Nephrin in experimental glomerular disease. *Kidney Int*. 2000 58:1461–1468.
- [36] Cara-Fuentes G, Clapp WL, Johnson RJ, Garin EH. Pathogenesis of proteinuria in idiopathic minimal change disease: molecular mechanisms. *Pediatr Nephrol*. 2016 31:2179–2189.
- [37] Janardhan KS, Jensen H, Clayton NP, Herbert RA. Immunohistochemistry in investigative and toxicologic pathology. *Toxicol Pathol*. 2018 46:488–510.
- [38] Koop K, Eikmans M, Baelde HJ, Kawachi H, De Heer E, Paul LC, Bruijn JA. Expression of podocyte-associated molecules in acquired human kidney diseases. *J Am Soc Nephrol*. 2003 14:2063–2071.
- [39] Gerke P, Huber TB, Sellin L, Benzing T, Walz G. Homodimerization and heterodimerization of the glomerular podocyte proteins nephrin and NEPH1. *J Am Soc Nephrol*. 2003 14:918–926.
- [40] Doublier S, Ruotsalainen V, Salvidio G, Lupia E, Biancone L, Conaldi PG, Reponen P, Tryggvason K, Camussi G. Nephrin redistribution on podocytes is a potential mechanism for proteinuria in patients with primary acquired nephrotic syndrome. *Am J Pathol*. 2001 158:1723–1731.

- [41] Kawakami H, Kamiie J, Yasuno K, Kobayashi R, Aihara N, and Shirota K. Dynamics of absolute amount of nephrin in a single podocyte in puromycin aminonucleoside nephrosis rats calculated by quantitative glomerular proteomics approach with selected reaction monitoring mode. *Nephrol Dial Transplant*. 2012 27:1324–1330.
- [42] Yasuno K, Honda K, Hakamata S, Kai K, Mori K. Minimal change disease of the kidney in a young Sprague Dawley rat. *J Toxicol Pathol*. 2018 31:55–59.
- [43] Obert LA, Frazier KS. Intrarenal renin-angiotensin system involvement in the pathogenesis of chronic progressive nephropathy-bridging the informational gap between disciplines. *Toxicol Pathol*. 2019 47:799–816.
- [44] Patrakka J, Ruotsalainen V, Ketola I, Holmberg C, Heikinheimo M, Tryggvason K, Jalanko H. Expression of nephrin in pediatric kidney diseases. *J Am Soc Nephrol*. 2001 12:289–296.
- [45] Saran AM, Yuan H, Takeuchi E, McLaughlin M, Salant DJ. Complement mediates nephrin redistribution and actin dissociation in experimental membranous nephropathy. *Kidney Int*. 2003 64:2072–2078.
- [46] Gagliardini E, Benigni A, Tomasoni S, Abbate M, Kalluri R, Remuzzi G. Targeted downregulation of extracellular nephrin in human IgA nephropathy. *Am J Nephrol*. 2003 23:277–286.
- [47] Garg P. A review of podocyte biology. *Am J Nephrol*. 2018 47(Suppl 1):3–13.
- [48] Ronco P. Proteinuria: is it all in the foot? *J Clin Invest*. 2007 117:2079–2082.
- [49] Verma R, Kovari I, Soofi A, Nihalani D, Patrie K, Holzman LB. Nephrin ectodomain engagement results in Src kinase activation, nephrin phosphorylation, Nck recruitment, and actin polymerization. *J Clin Invest*. 2006 116:1346–1359.
- [50] Griffin BR, Faubel S, Edelstein CL. Biomarkers of Drug-Induced Kidney Toxicity. *Ther Drug Monit*. 2019 41(2):213–226.
- [51] 堀江重郎. CQ2 抗がん薬による AKI の早期診断に、バイオマーカーによる評価は推奨されるか？. がん薬物療法時の腎障害診療ガイドライン 2016. 編集:日本腎臓学会, 日本癌治療学会, 日本臨床腫瘍学会, 日本腎臓病薬物療学会. ライフサイエンス出版. 2016 pp.8–14.

- [52] Pinches M, Betts C, Bickerton S, Burdett L, Thomas H, Derbyshire N, Jones HB, Moores M. Evaluation of novel renal biomarkers with a cisplatin model of kidney injury: gender and dosage differences. *Toxicol Pathol.* 2012 40(3):522–533.
- [53] Pinches MD, Betts CJ, Bickerton SJ, Beattie L, Burdett LD, Thomas HT, Derbyshire NA, Moores M. Evaluation of novel urinary renal biomarkers with a cisplatin model of kidney injury: effects of collection period. *Toxicol Pathol.* 2012 40(3):534–540.
- [54] Pinches MD, Betts CJ, Bickerton SJ, Beattie L, Burdett LD, Thomas HT, Derbyshire NA, Moores M, Price SA. Evaluation of novel urinary renal biomarkers: biological variation and reference change values. *Toxicol Pathol.* 2012 40(3):541–549.

要旨

コモンマーモセットの背景病変のなかでも、腎症は自然発生性に生じる病変としていくつか報告されているが、いまだに不明な点も多い。また、体系的な評価方法もないため、種々の実験において腎臓病変を評価する際の妨げとなる。そこで、本研究ではコモンマーモセットの進行性糸球体腎症について、光学顕微鏡学的検査で病理組織学的な病変スコアを評価し、そのスコアから腎症をグレーディングすることで、本腎症の体系的な評価を試みた。

第1章では、コモンマーモセットの進行性糸球体腎症を光学顕微鏡学的検査で糸球体病変、再生尿細管、硝子円柱、間質への炎症性細胞浸潤と線維化についてスコア化した。そしてこれらのスコアの合計値に基づき、腎症を5つのグレードに分類した。さらに、透過型電子顕微鏡学的検査により各腎症グレードにおける超微形態学的な特徴、糸球体病変と年齢の関係性および糸球体病変の初期変化とその病態の進行について調べた。その結果、腎症グレード1では、光学顕微鏡的に顕著な糸球体病変が認知できないにもかかわらず、電子顕微鏡学的検査では足細胞の足突起の消失が認められた。腎症グレード2では、光学顕微鏡的に糸球体門部から糸球体末梢側に向かって軸性のメサンギウム基質やメサンギウム細胞の増殖が明らかとなり、電子顕微鏡的にも腎症グレード1よりも糸球体足細胞の足突起の消失は進行していた。腎症グレード3では、糸球体メサンギウムの病変は門部から末梢側に向かってメサンギウム基質の増加やメサンギウム細胞の増殖が明らかとなり、糸球体基底膜とパラメサンギウム領域の血管内皮直下にマッソン・トリクローム染色で赤色に染色される沈着物がみられた。透過型電子顕微鏡観察では、同領域に高電子密度の沈着物が認められた。腎症グレード4では、糸球体基底膜の走行や配列の不整が顕著となり、同部位には高電子密度の沈着物および細胞質成分が透過型電子顕微鏡検索で観察された。以上の結果より、本分類方法を使用することで、コモンマーモセットの進行性糸球体腎症について病変の進行に合わせたグレーディングを可能とした。

第2章では、若齢のコモンマーモセット5例の腎臓について、光学顕微鏡学的、電子顕微鏡学的検査に合わせて免疫組織学的検査を実施し、若齢で本腎症がまだ初期と考えられる段階での免疫グロブリンの関与について形態学的に調べた。その結果、若齢の動物で、光学顕微鏡的な病変が認められないにもかかわらず、電子顕微鏡的には足細胞の足突起の消失が認められ、さらにIgMの沈着がメサンギウム領域に認められた。腎症グレードが進行するとメサンギウム領域へのIgAの沈

着が認められ、さらにメサンギウム領域や糸球体係蹄壁への IgG の沈着も認められた。以上の結果により、若齢動物においても、すでにメサンギウム基質の増加や IgM, IgA の沈着が認められることが分かった。また、進行性糸球体腎症の病態進行において、病変初期では IgM が沈着し、IgA や IgG の沈着が病変の進行に関与している可能性が示された。

コモンマーモセットの進行性糸球体腎症では、病変初期の足細胞の足突起の消失が特徴的であることから、第3章として足細胞の足突起のスリット膜を構成する重要な分子であるネフリンの発現状況について調べた。その結果、ネフリンの発現は腎症グレード0～2で連続的な線状パターンを示したが、腎症グレード3の例では、非連続性の線状パターンあるいは粗顆粒状パターンを示し、光学顕微鏡的な検査でもパターンの違いが明らかであった。さらに、形態学的解析により、コモンマーモセットの進行性糸球体腎症の足細胞におけるネフリン発現量は、腎症グレードが増加するに伴い低下することが明らかになった。また、硝子円柱の組織学的スコアが増加するに伴い、ネフリン発現量が低下する傾向も認められた。ネフリン発現パターンの変化はスリット膜構造の変化を反映していると考えられ、これらの結果は、病変の進行に伴ってスリット膜構造が変化し、この変化とネフリン発現の減少や硝子円柱の増加が密接に関連していることを示唆している。

本研究では、コモンマーモセットの進行性糸球体腎症の病理組織学的なグレーディングを可能にした。そして、超微形態学的特徴や免疫グロブリンの沈着、ネフリンの発現について、各腎症グレードの詳細を明らかにした。本研究の成果は、毒性試験を含む多くの研究で腎病変を判断する一助となるものと考ええる。

Abstract

Among the background lesions of common marmosets, some nephropathies have been reported as spontaneous lesions, but there are still many unclear points. In addition, the absence of a systematic evaluation method hinders evaluation of the renal lesions in various experiments. Therefore, in this study, I attempted to systematically evaluate spontaneous progressive glomerulonephropathy in common marmosets by evaluating the histopathological score by light microscopy and grading the nephropathy based on the score.

In Chapter 1, spontaneous progressive glomerulonephropathy in common marmosets was scored for glomerular lesions, regenerating tubules, hyaline casts, interstitial inflammatory cell infiltration, and fibrosis by light-microscopy. Based on the sum of these scores, nephropathy was classified into 5 grades. In addition, transmission electron microscopy (TEM) was used to examine the ultrastructural characteristics of each grade of nephropathy, the relationship between glomerular lesions and age, and the initial changes and progression of glomerular lesions. As a result, in nephropathy grade 1, effacement of podocyte foot processes was observed electron-microscopically, although there was no significant glomerular lesion light-microscopically. In grade 2 nephropathy, mesangial cell proliferation and mesangial matrix increasing from the glomerular hilum to the peripheral side of the tuft is revealed by light-microscopy, and glomerular basement membrane lesions are more advanced than in grade 1 nephropathy by electron-microscopy. In grade 3 nephropathy, glomerular mesangial lesions revealed mesangial cell proliferation and mesangial matrix increasing from the hilus to the peripheral side of the tuft. In Masson's trichrome-stained sections, red deposits were observed under the endothelium of the glomerular basement membrane and the paramesangial region. TEM examination revealed electron-dense deposits in the same regions. In nephropathy grade 4, irregular arrangement of the glomerular basement membrane was remarkable. At the same sites, electron-dense deposits or cytoplasmic components were observed by TEM. Based on these results, the use of this classification enabled grading according to the progression of lesions for progressive glomerulonephropathy in common marmosets.

In Chapter 2, immunohistochemical examination was performed to investigate about the involvement of immunoglobulin along with light-microscopy and electron-microscopy on the kidneys of 5 young common marmosets whose nephropathy is still considered to

be in the early stages. As a result, in young animals, although no lesions were observed on light-microscopy, electron-microscopy showed effacement of podocyte foot processes. In addition, IgM deposition was observed in the mesangial region by immunohistochemical examination. As the grade of nephropathy progressed, IgA deposition was observed in the mesangial region, and IgG deposition was also observed in the mesangial region and the glomerular loop. From these results, it was found that an increase in the mesangial matrix and the deposition of IgM and IgA were already observed in young animals. In addition, in the progression of progressive glomerulonephropathy, the deposition of IgM occurred in the early stage of the lesion, and the deposition of IgA and IgG may be involved in the progression of the lesion.

In the progressive glomerulonephritis of the common marmoset, the effacement of the foot process of the podocyte in the early stage of the lesion is characteristic, and the expression of nephrin which is an important molecule constituting the slit membrane of the foot process of the podocyte was examined in Chapter 3. As a result, nephrin expression showed a continuous linear pattern in nephropathy grades 0-2, but showed a discontinuous linear pattern or a coarse granular pattern in patients with nephropathy grade 3. In this way, the difference in staining pattern of nephrin was clearly demonstrated by light microscopic examination. Furthermore, morphometrical analysis revealed that the expression of nephrin in the podocytes of common marmosets with progressive glomerulonephropathy decreased as the nephropathy progressed. In addition, nephrin expression tended to decrease as the histological score of hyaline casts increased. Because changes in nephrin expression pattern reflect changes in the slit membrane structure, these results suggest that the slit-membrane structure changes with the progression of the lesion and that this change is closely related to a decrease in nephrin expression and an increase in hyaline casts.

This study enabled histological grading of progressive glomerulonephropathy in common marmosets. And details of each nephropathy grade were clarified in terms of ultrastructural morphology, immunoglobulin deposition, and nephrin expression. I believe that the results will help determination of renal lesions in many studies including toxicologic studies.