日腎会誌 2000；**42**(1)：1-10.

原　著

加速型抗GBM抗体腎炎半月体中の細胞外基質生成における接着分子 α_3 integrin の役割

秋元寛正

The possible role of adhesion molecule, α_3 integrin, in the synthesis of intracrescentic extracellular matrix in accelerated anti-GBM nephritis

Hiromasa AKIMOTO

Department of Internal Medicine, Teikyo University School of Medicine, Tokyo, Japan

Studies were performed on the behavior of crescent-composing cells of crescent glomerulonephritis induced by the injection of anti-GBM antibody to WKY rats. α_3 integrin, podocalyxin and ED_1 were stained immunohistochemically as markers of parietal, visceral epithelial cells, and macrophages, respectively. Cellular fibronectin (cFn) and type Ⅰ collagen were also stained in the same manner. Fluoresceine- and Rhodamine-conjugated IgGs were used as second antibodies for double staining to show the geographic relation of the two target molecules. Morphological examinations were performed at day 7, 14 and 28 after disease induction. Periodic acid-methenamine-silver (PAM) and Azan staining showed time-dependent increase in extension and cellularity. PAM-positive intracrescentic fibers were likewise increased, which was related to an increased frequency of ruptured capsules. Intracrescentic cFn increasing in parallel with PAM-positive fibers and type Ⅰ collagen, was remarkably stained at day 28. Intracrescentic ED_1-positive cells showed also a significant increase at day 28. Podocalyxin was not stained in the crescent, while ED_1 and α_3 integrin were remarkably stained. Double staining showed apposition of cFn and α_3 integrin, indicating close contact of these molecules, but such apposition was not observed between ED_1 and cFn. These findings indicate that ED_1 and α_3 integrin-(possibly visceral cell derived) positive cells occupy significant cellular components of the crescent and that the latter plays a part in synthesis of the intracrescentic extracellular matrix.

Jpn J Nephrol 2000；42：1-10.

Key words：immunohistochemistry, crescentic glomerulonephritis, extracellular matrix, adhesion molecule, anti-GBM nephritis.

緒　言

糸球体腎炎の形態学的所見としての半月体の記載は100余年前のLanghansの報告[1]に溯る。以来長い間，半月体構成細胞は増殖したボーマン嚢上皮細胞のみであると考えられてきた。この事実は主として従来の光顕的，電顕的観察結果に基づいたものである。しかし，Kondoら[2]は綿密な電顕的観察結果から半月体内にマクロファージ(Mϕ)が少なからず含まれる可能性を示した。その後，Atkinsら[3]をはじめ多くの研究者達による免疫組織学的検討により，細胞性半月体の主たる構成細胞がMϕである可能性が支持されている。半月体細胞はアポトーシスにより治癒する可能性も示唆されているが[4]，多くの場合，活性化Mϕが主役となり種々のサイトカイン遊離，接着分子の発現を介して病変は進展する[5]。すなわち，半月体は経過とともに細胞成分は減少し，細胞外基質(ECM)に置き換えられていくが，このECM産生についてもtransforming growth factor-β(TGF-β)を介したMϕの役割が指摘され

帝京大学医学部内科学講座

(平成11年11月12日受理)

ている[6]。また，このほかにも進行期では，間質よりボーマン嚢内へ浸潤した線維芽細胞も線維化に関与する[7,8]。一方，上皮細胞もまた ECM を産生することが知られている[9~11]が，半月体の形成過程における意義は明らかでない。

今回，筆者は加速型抗糸球体基底膜(GBM)抗体腎炎の半月体形成に関して定量的な形態学的観察を行うとともに，半月体の構成細胞および半月体の ECM 産生における接着分子 α_3 integrin の役割について免疫学的マーカーを用いて検討した。

実験材料と方法

1．実験動物

体重約 200 g の雄性 WKY ラット(n＝15) (Charles River Japan, 神奈川)，ヒツジを使用した。

2．腎炎の作成

1）抗ラット GBM 抗体 IgG の作成

Meezan らの方法[12]に従い精製した。すなわち，Sieving 法により得た糸球体を超音波処理により GBM を分離し，その 200 mg を生理食塩水中に浮遊させ，Freund 完全 Adjuvant(Latoron，東京)とともに，ヒツジ皮内に 2 週間毎に計 4 回免疫し，抗ラット GBM 血清を得た。得られた抗血清より硫安沈殿法にてグロブリン分画を得，1/15M phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4)で透析したのちに，DEAE-Sepharose CL-6B(Pharmacia, Uppsala, Sweden)を用いて IgG 分画を分離精製した。

2）加速型抗 GBM 抗体腎炎の作成

体重約 200 g の雄性 WKY ラット(n＝15)に正常ヒツジ IgG(Sigma, St. Louis, USA)の生理食塩水溶液(2.5 mg/m*l*)を作成し，これと等量の Freund 完全 Adjuvant を加え懸濁液を作成し，その 0.5 m*l* をラット足蹠に前免疫した。4 日後にヒツジ抗ラット-GBM IgG 分画 7 mg/100 g BW を尾静脈より静注した。また，対照群として同様に正常ヒツジ IgG で前免疫し，生理食塩水を静注した WKY ラット(n＝15)を用いた。各群とも自由摂食・摂水下にて，代謝ケージ中で飼育し，抗血清静注後 1，3，7，10，14，28 日目に 24 時間尿を採取した。抗血清静注 7，14，28 日後に各々 pentobarbital 0.1 mg/100 g BW の腹腔麻酔下で，腹部大動脈より採血した。その後，4°C の PBS を同部より逆行性に灌流し，腎皮質片を得た(各群 n＝5)。

3．尿中・血中生化学的検査

1 日尿中総蛋白排泄量は Biuret 法にて測定し 4 週間観察し，尿中アルブミンは single radial immunodiffusion (SRID)法にて測定した。また，屠殺時の血清クレアチニンをアルカリピクリン法にて測定した。

4．組織学的検討

1）光学顕微鏡による検討

採取した腎組織は，4％パラホルムアルデヒド(pH 7.2)で固定後，型のごとく，アルコール脱水，パラフィン包埋し，パラフィン切片(3 μm)を作製した。脱水，脱パラフィン操作後，ヘマトキシリン-エオジン染色，periodic acid-Schiff(PAS)染色および periodic acid-methenamine-silver(PAM)染色，Azan 染色を行った。

2）腎病変の定量的観察

半月体の状態を検討する目的で，PAM 染色標本を用いてボーマン嚢の全面積，半月体面積，半月体内細胞数をポイントカウンティング法[13]にて測定し，次いで観察糸球体における半月体形成糸球体が占める割合(半月体出現率)，ボーマン嚢内の全面積に占める半月体の割合，半月体単位面積当たりの細胞数を計算した。次いで，ボーマン嚢破綻の有無についても検討した。観察に当たっては，ほぼ赤道面で切れた糸球体を無差別に 1 検体当たり 30 個以上選択し，400 倍にて写真撮影した。

3）免疫組織化学的検索

腎皮質採取後，瞬時に 5mm 角に細切し，O. C. T. Compound(Sakura, USA)に包埋，液体窒素中で急速凍結した。4 μm の凍結切片を作製し，以下の要領で間接法による染色を行った。観察は蛍光顕微鏡 BX60(オリンパス，東京)，撮影装置 PM30(オリンパス)を用いて行った。また，異なる標識抗原相互の位置関係を明らかにするため FITC，Rhodamine による二重染色を行った。撮影に際してフィルターはそれぞれ WIB(520 nm)(オリンパス)，WIG(572 nm)(オリンパス)を使用した。観察に当たっては，ほぼ赤道面で切れた糸球体を無差別に 1 検体当たり 10 個以上選択し，400 倍にて写真撮影した。

A．type Ⅰ collagen の間接法による単染色

アセトン固定後，一次抗体に家ウサギ抗ラット type Ⅰ collagen(Chemicon, USA)を PBS で最終倍率 40 倍に希釈し一次抗体として用い，室温で 45 分間反応させた。二次抗体として FITC-ヤギ抗家ウサギ IgG(マウス，ヒツジ正常血清で吸収済)を用い，それぞれ室温で 45 分間反応させた。得られた染色標本から，type Ⅰ collagen 染色強度および染色範囲の経時的増減につき定性的に観察した。

B．α_3 integrin，monocyte/Mϕ の間接法による二重染色

家ウサギ抗ヒト α_3 integrin(Chemicon)とマウスモノク

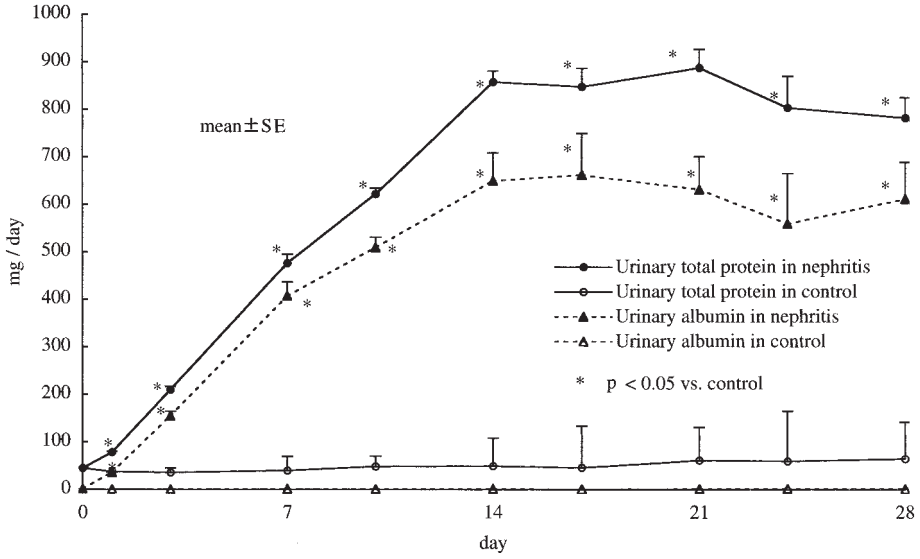

Fig. 1.　Urinary total protein and albumin/24 hrs
All data are shown as mean±SE, * p<0.05 vs control

ローナル抗ラット Monocyte/Mϕ (ED_1) (Chemicon) を PBS でそれぞれ最終倍率 50 倍，100 倍に希釈し一次抗体として用い，室温で 45 分間反応させた。二次抗体として FITC-ヤギ抗家ウサギ IgG (Cappel Products, USA) (マウス，ヒツジ正常血清で吸収済) と Rhodamine-ヤギ抗マウス IgG (Chemicon) (家ウサギ，ヒツジ正常血清で吸収済) を用い，それぞれ室温で 45 分間反応させた。得られた染色標本から，糸球体内外の ED_1 陽性細胞の増減につき，それぞれ定量的に観察するとともに，α_3 integrin との位置的関係も観察した。

C．α_3 integrin，podocyte の間接法による二重染色

一次抗体に家ウサギ抗ヒト α_3 integrin とマウスモノクローナル抗 podocalyxin (4D5)[14] (新潟県立吉田病院小児科，原　正則博士より供与) を PBS でそれぞれ最終倍率 50 倍，100 倍に希釈し一次抗体として用い，室温で 45 分間反応させた。二次抗体として FITC-ヤギ抗家ウサギ IgG (マウス，ヒツジ正常血清吸収済) と Rhodamine-ヤギ抗マウス IgG_{2a} (Chemicon) (家ウサギ，ヒツジ正常血清で吸収済) を用い，それぞれ室温で 45 分間反応させた。得られた染色標本から，各々の染色強度および染色範囲の経時的増減につき定性的に観察するとともに両者の位置的関係を観察した。

D．α_3 integrin，cFn の間接法による二重染色

一次抗体に家ウサギ抗ヒト α_3 integrin とマウスモノクローナル抗ヒト cellular fibronectin (EDA-cFn) (Chemicon) を PBS でそれぞれ最終倍率 50 倍，400 倍に希釈し一次抗体として用い，室温で 45 分間反応させた。二次抗体として FITC-ヤギ抗家ウサギ IgG (マウス，ヒツジ正常血清で吸収済) と Rhodamine-ヒツジ抗マウス IgG (家ウサギ，ヒツジ正常血清で吸収済) を用い，それぞれ室温で 45 分間反応させた。得られた染色標本から，前述の方法と同様に観察した

5．統計処理

測定値は平均±SE で表示した。また，3 群間差は Kruskal-Wallis の検定を用い，2 群間差は Mann-Whitney の U 検定を用いた。2 群間差は危険率 0.05 以下を有意差ありとし，3 群間差は p を補正し危険率 0.0167 以下を有意差ありとした。

結　果

1）尿中蛋白排泄量 (Fig. 1)

尿蛋白は抗血清静注後 1 日目より増加し，かつ 1 日目より対照群に比し有意に増加した ($p<0.05$)。以後漸増し，14 日目には 857±39 mg/日となり，28 日目まで持続した。また，尿中アルブミンは抗血清静注後 1 日目より増加し，1 日目以降対照群に比し有意に増加した ($p<0.05$)。以後漸増し，14 日目まで 650±88 mg/日となり，28 日目まで持続した。なお，生理的食塩水を静注した対照群では，尿蛋白，尿中アルブミンの経時的な変化はみられなかった。

2）血液生化学的所見 (Table)

血清クレアチニン濃度は実験群の各時期 (7，14，28 日

Table. Clinical and morphological findings

		Day 7		Day 14		Day 28	
		Experimental	Control	Experimental	Control	Experimental	Control
Serum creatinine (mg/dl)		1.27±0.07*	0.46±0.02	1.14±0.17*	0.50±0.00	1.32±0.09[a]	0.55±0.03
Glomerular area (μm^2)		1,515±39*	1,010±29	1,628±106*,[a]	957±42	1,897±47*,[a]	1,085±20
Frequency of glomeruli with crescent (%)		48.1±6.5		49.4±15.7		89.9±2.7[a]	
Crescent area (μm^2)		199±37		141±50		452±38[a,b]	
Crescent/Glomerulus (%)		12.5±2.5		8.29±3.00		24.7±2.0[a,b]	
Cellularity of crescent		4.42±0.93		4.50±1.86		10.8±1.8[a]	
Cellularity of crescent/Crescent area (μm^{-2})		0.03±0.00		0.03±0.00		0.03±0.00	
Frequency of glomeruli with ruptured Bowman's capsule (%)		0.69±0.69		7.78±2.22		27.8±3.0[a,b]	
Number of ED_1 positive cells	Endocapillary (E)	24.1±10.1		49.4±11.2		22.2±4.7[c]	
	Intracrescent (I)	19.8±1.6		30.3±0.9		57.4±15.8[d,f]	
	E/I ratio	1.17±0.40		2.37±0.88		0.46±0.06[e]	

All data are shown as mean±SE. *$p<0.05$ vs control, [a]：$p<0.0167$ vs day 7, [b]：$p<0.0167$ vs day 14, [c]：$p=0.0768$ vs day 14, [d]：$p=0.0495$ vs day 7, [e]：$p=0.0339$ vs day 14, [f]：$p=0.0495$ vs I

目)にて 1.27±0.07 mg/dl，1.14±0.17 mg/dl，1.32±0.09 mg/dl にあり，対照群の 0.46±0.02 mg/dl，0.50±0.00 mg/dl，0.55±0.03 mg/dl に比し有意に上昇していた($p<0.05$)。

3）組織学的所見

A．光学顕微鏡による形態学的所見

糸球体面積は各時期において，対照群に比し有意に大きく($p<0.05$)，実験群間の検討でも 14 日目，28 日目では 7 日目と比べ有意に増加していた($p<0.0167$) (Table)。

また，腎炎発症後 7 日目には半月体が観察され，半月体陽性糸球体の出現率は，7，14 日目では各々48.1±6.5 %，49.4±15.7 %で有意差はみられなかったが，28 日目では 89.9±2.7 %となり，7，14 日目と比べ有意に増加した($p<0.0167$) (Table)。

また，半月体細胞数，半月体面積ともに 7，14 日目と比べ有意に増加した($p<0.0167$)。しかし，半月体単位面積当たりの細胞数(＝半月体細胞数/半月体面積)としては経時的に有意な増減はみられなかった(Table)。

PAM 染色による観察では，7 日目において半月体内に PAM 陽性物質はほとんど認められなかったが，14，28 日目では PAM 陽性物質は増加した(Fig. 2)。

Azan 染色では，7 日目より糸球体硬化部位および半月体に Azan 陽性物質が認められ，14，28 日目となるに従い，染色強度および染色範囲の増加がみられた(Fig. 3)。

観察糸球体におけるボーマン嚢破綻の出現率は，7 日目では 0.69±0.69 %，14 日目で 7.78±2.22 %，28 日目で 27.8±3.0 %であり，28 日目ではボーマン嚢破綻は，7，14 日目に比し有意に増加した($p<0.0167$)。また，対照群ではどの時期にもボーマン嚢破綻はみられなかった(Table)。

B．免疫組織学的検討

① type Ⅰ collagen の沈着

対照群においては，糸球体内に type Ⅰ collagen 陽性部位は全く認められなかった。

実験群においては 7 日目より，メサンギウム領域に type Ⅰ collagen 陽性部位が出現した。14 日目には係蹄外にわずかに出現し，28 日目には半月体中にも著明になった。しかし，メサンギウム領域の type Ⅰ collagen 陽性部位では蛍光強度はむしろ減弱した。糸球体全体では，type Ⅰ collagen 陽性部位は定性的観察では経時的に増加を示した(Fig. 4)。

② α_3 integrin と ED_1 陽性細胞の二重染色

対照群においては，観察期間中糸球体係蹄壁に沿って α_3 integrin が線状パターンを示し，ED_1 陽性細胞は認められなかった(Fig. 5D)。

実験群 7 日目において ED_1 陽性細胞は半月体内に出現し，α_3 integrin も半月体内に出現したが，観察期間中両者が隣接する像は認められなかった(Fig. 5A，B，C)。28 日目においては 7，14 日目に比し半月体内 ED_1 陽性細胞は増加傾向をみたが有意な差はみられなかった($p=0.0495$ vs day 7)。また係蹄内 ED_1 陽性細胞の変化も有意差を示さなかった($p=0.0768$ vs day 14) (Table)。

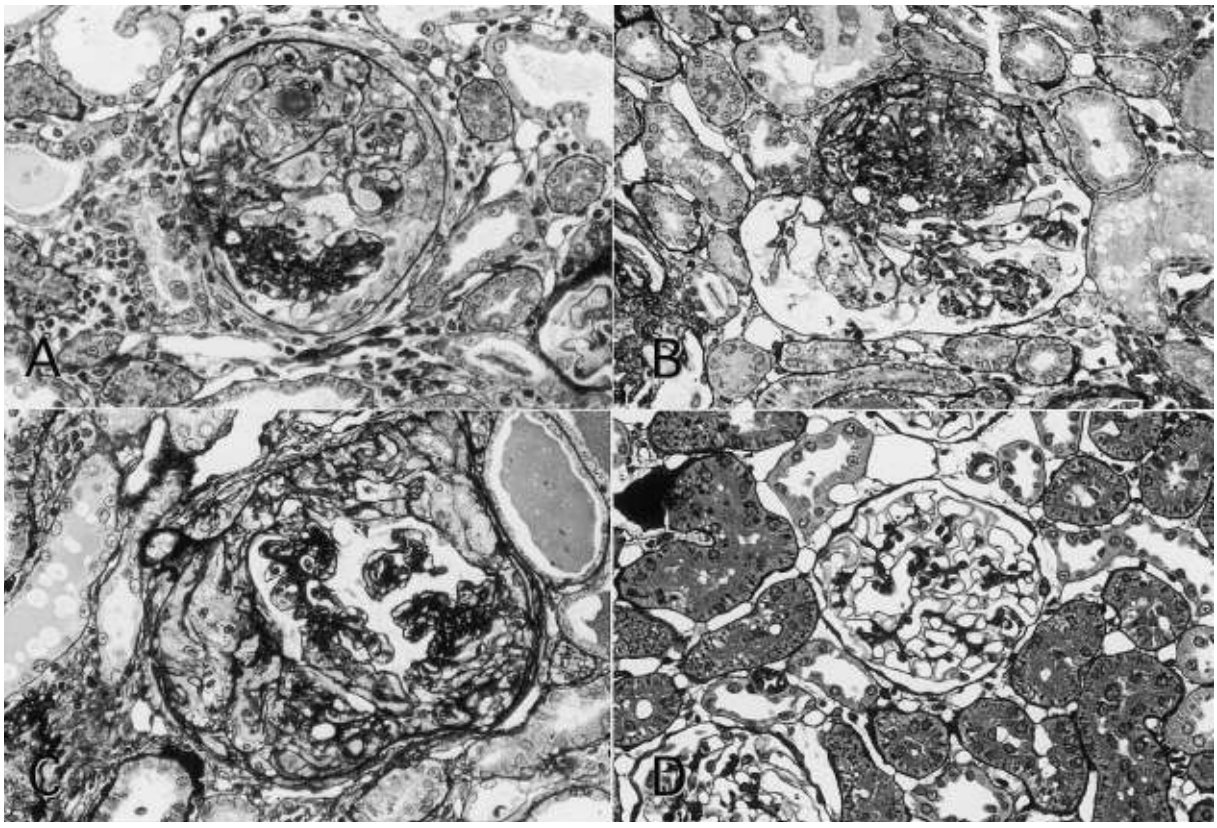

Fig. 2. PAM staining in glomeruli of nephritic rats (×400)
A : Day 7, B : Day 14, C : Day 28, D : Control
Note over time increase of crescent formation.

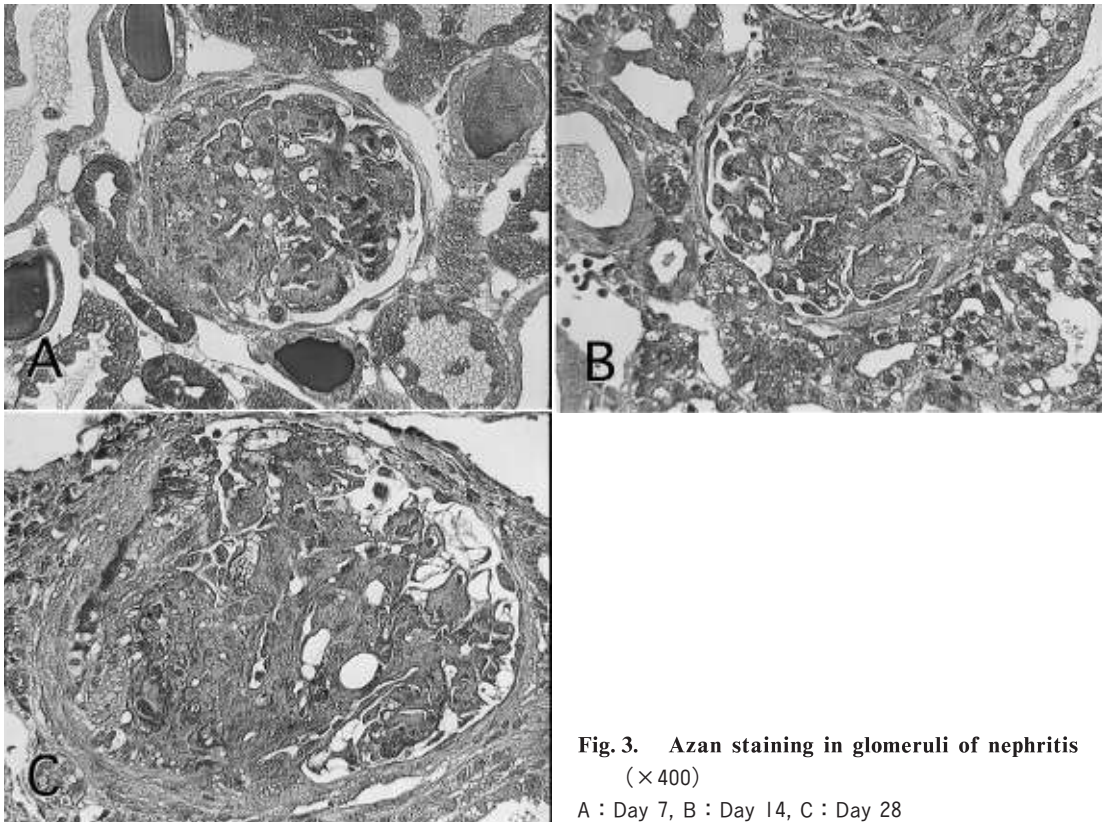

Fig. 3. Azan staining in glomeruli of nephritis (×400)
A : Day 7, B : Day 14, C : Day 28

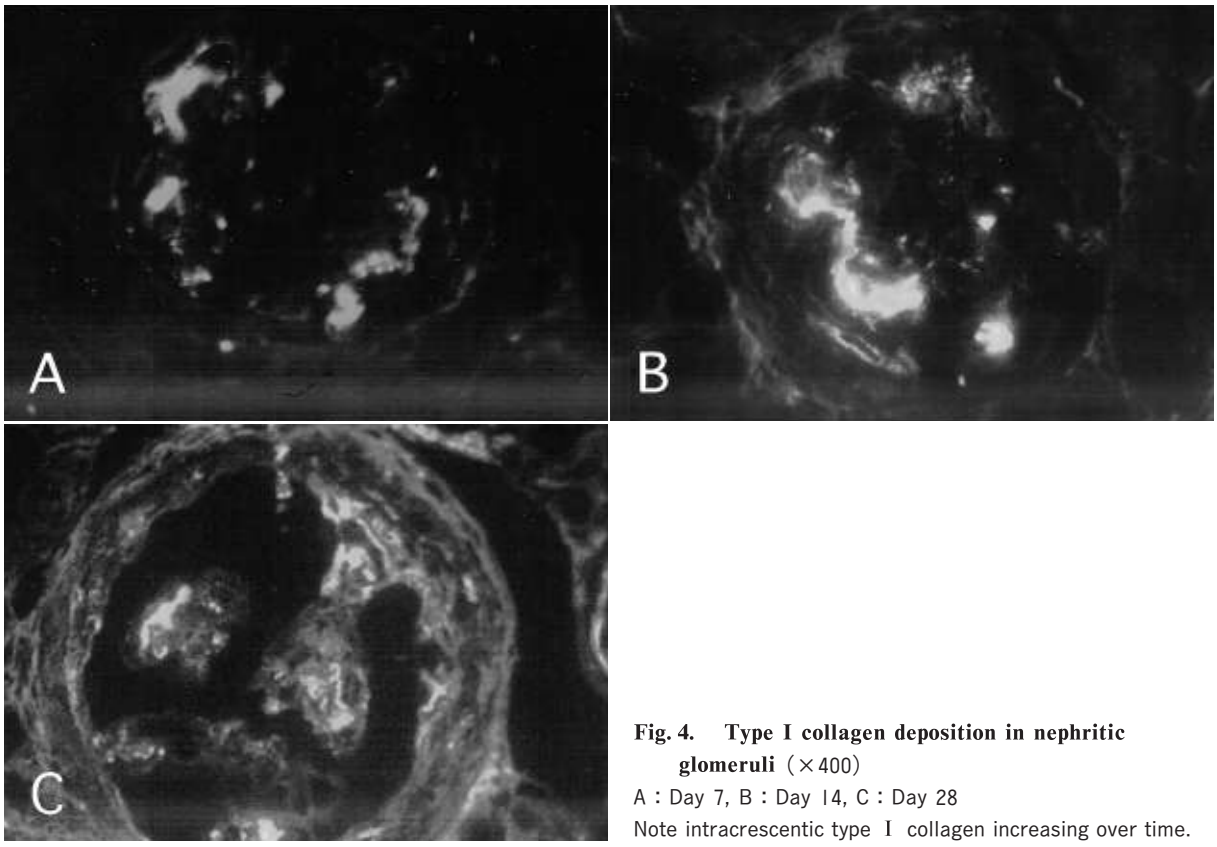

Fig. 4. Type I collagen deposition in nephritic glomeruli（×400）
A：Day 7, B：Day 14, C：Day 28
Note intracrescentic type Ⅰ collagen increasing over time.

③ α_3 integrin と podocalyxin 陽性細胞の二重染色

対照群においては，観察期間中糸球体係蹄に沿って α_3 integrin, podocalyxin とも線状パターンに陽性となり，ボーマン嚢周囲は α_3 integrin のみ線状パターンに発現した(Fig. 6D)。

実験群 7 日目においては，半月体内では α_3 integrin のみが線状パターンに陽性を示した。一方，糸球体係蹄壁においては，α_3 integrin，podocalyxin ともに線状パターンに陽性を示した(Fig. 6A)。また，14，28 日目においても同様の所見であった(Fig. 6B, C)。

④ α_3 integrin と cFn の二重染色

対照群においては，糸球体内に cFn 陽性部位はメサンギウム領域を中心に homogenous に陽性となり，一部糸球体係蹄，ボーマン嚢壁にも線状に陽性部位がみられた。

実験群においては 7 日目より，半月体に cFn 陽性部位が出現し，14，28 日目では陽性輝度およびその範囲の増加がみられた(Fig. 7A，B，C)。

Fig. 7D に 14 日目の α_3 integrin と cFn の二重蛍光染色(Fig. 7B)の高倍率写真を示す。半月体に homogenous な cFn 陽性部位を認め，それに接して α_3 integrin 陽性細胞を認め，両者の隣接した位置関係が示唆された(Fig. 7B, D)。

考　察

半月体は，その形態より次の 3 つに大別される。すなわち，1）ECM の沈着をほとんど伴わない 2 層以上の細胞からなる細胞性半月体，2）細胞増加とともに種々の程度に ECM の沈着を認める線維細胞性半月体，3）ECM の沈着が著明で細胞は極めて少ない線維性半月体，である[3]。半月体は腎炎の経過中，1)から 3）への進行がみられるが，一部はアポトーシスによって治癒するともいわれている[4]。また，形成された半月体は周囲の糸球体係蹄を巻き込んで糸球体は荒廃に至る。この意味において，半月体における ECM の沈着は重要である。

本実験では，糸球体は経過とともに増大し，半月体出現率および糸球体に占める半月体面積も増加した。これとともに半月体内細胞数も増加したが，半月体の単位面積当たりの細胞数には変化がなかった。これは半月体内の PAM，Azan 陽性線維あるいは type Ⅰ collagen，cFn な

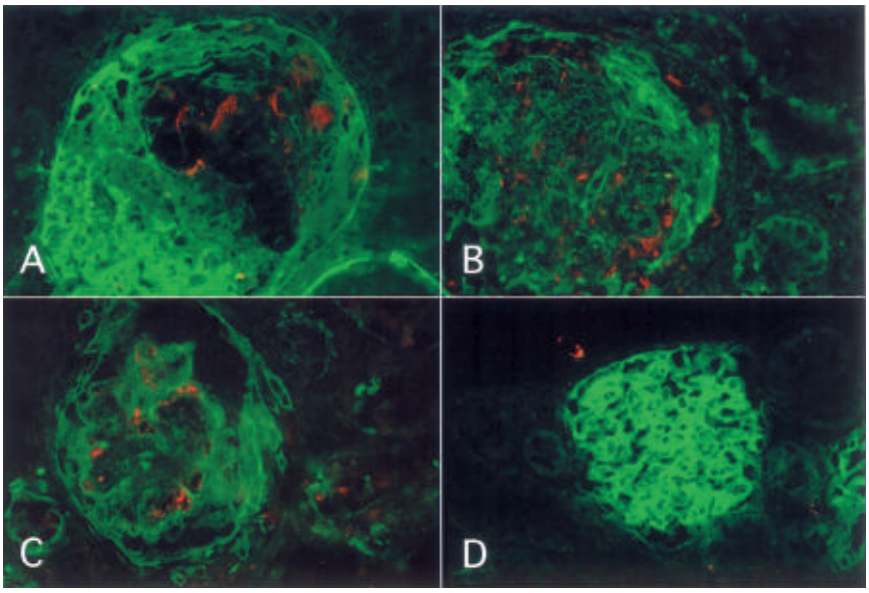

Fig. 5. Double staining of α_3 integrin and Mϕ

FITC-labeled (green) and Rhodamine-labeled (red) molecules represent α_3 integrin and Mϕ, respectively. (×400)
A : Day 7, B : Day 14, C : Day 28, D : Control

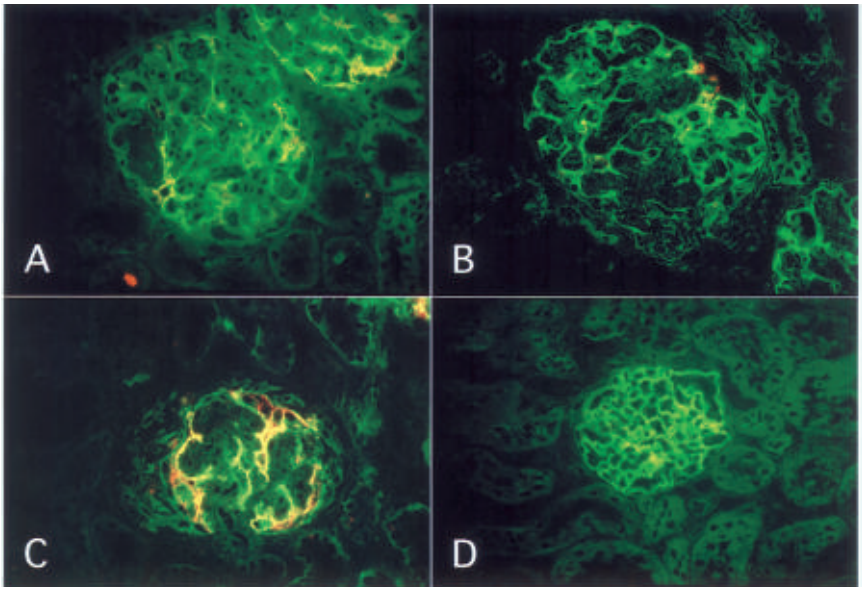

Fig. 6. Double staining of α_3 integrin and podocalyxin

FITC-labeled (green) and Rhodamine-labeled (red) molecules represent α_3 integrin and podocalyxin, respectively. (×400)
A : Day 7, B : Day 14, C : Day 28, D : Control
Note yellowish staining in capillary wall. Also note no staining of podocalyxin within the crescent.

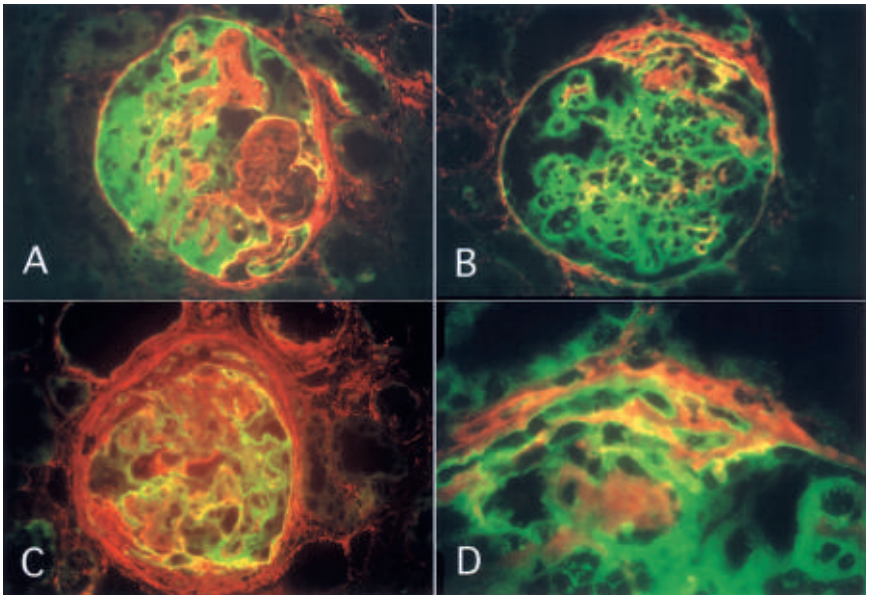

Fig. 7. Double staining of α_3 integrin and cFn

FITC-labeled (green) and Rhodamine-labeled (red) molecules represent α_3 integrin and cFn, respectively.
A : Day 7, B : Day 14, C : Day 28×400, D : Crescent of B magnified to×1,000
Note staining with yellowish color, indicating apposition of the two molecules.

どの ECM が増加したためと思われる。したがって，実験 28 日目においてはいわゆる線維細胞性/線維性の段階にあったと思われる。

従来，半月体構成細胞はボーマン嚢上皮細胞であるといわれてきた。しかし，前述のごとく Kondo ら[2] は綿密な電顕的観察結果から半月体内に Mϕ が少なからず含まれる可能性を示し，その後，Atkins ら[3] をはじめとする多くの研究者達による免疫学的検討により，細胞性半月体の主たる構成細胞が Mϕ である可能性が支持されている。筆者の α_3 integrin と ED_1 陽性細胞の染色において，半月体内において両者がみられたことから，本実験モデルでは，α_3 integrin 陽性細胞と Mϕ の両方が構成細胞として存在すると考えられた。また，筆者の α_3 integrin と podocalyxin の染色では，α_3 integrin が半月体中に陽性を示したが，経過中 podocalyxin が陰性であった。このことから，半月体内の α_3 integrin 陽性細胞はボーマン嚢上皮由来の細胞の可能性が高い。しかし，半月体中の構成細胞について Mϕ の形質転換による上皮様細胞であるとするグループもあり[2]，また，podocyte は通常では増殖しないといわれているが，Mϕ 様細胞へ形質転換する可能性も示唆されている[13]。さらに，一部病的状態では足突起細胞は形質転換を起こし，この際 podocalyxin の発現は消失すると報告されており[16]，これらの可能性を考慮すると α_3 integrin 陽性細胞がボーマン嚢上皮由来であるとは断言できない。

半月体内の Mϕ の侵入経路については糸球体係蹄，ボーマン嚢断裂の両方が考えられている[17,18]。また，ボーマン嚢の尿腔内で増殖する可能性も考えられる[3]。しかし，本実験ではボーマン嚢破綻は 28 日目に有意にみられたが，半月体中の ED_1 陽性細胞の経時的な増加は有意ではなかった。

また，半月体形成の際，ボーマン嚢上皮は intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1)，vascular adhesion molecule-1(VCAM-1)などを発現し，Mϕ の VLA-4 や FLA-1 との interaction により炎症は進展すると考えられる。事実，抗 ICAM-1 抗体や抗 LFA-1 抗体の投与による半月体形成の抑制も報告されている[19,20]。筆者の α_3 integrin と ED_1 陽性細胞の二重染色では，両者に隣接関係はみられず，α_3 integrin 陽性細胞(おそらくはボーマン嚢上皮由来細胞)と Mϕ との間の interaction の可能性は得られなかった。おそらくは諸家が報告しているように，半月体細胞と Mϕ との interaction には ICAM-1，VCAM-1 が接着因子として働いていると思われる[19,20]。

活性化 Mϕ は，周知のごとく炎症の場において数多くのサイトカインその他の炎症メディエーターを遊離するが，これらは autocrine/paracrine 的に影響し合い，炎症のネットワークを形成し増殖する。その結果として炎症の場には究極的に ECM の沈着が起こる[3,5]。好中球も同様に炎症の効果細胞として重要な役割を果たすが，抗 GBM 抗体腎炎ではその浸潤はごく初期のみであるといわれている[19,20]。一方，今回は検討しなかったが，半月体形成には係蹄外ボーマン腔へのフィブリンの漏出が重要視されている。事実，抗凝固薬投与により半月体形成を抑制できたという報告もある[23,24]。ボーマン腔内への血漿成分の漏出には GBM の破綻を必要とするが，この際 Mϕ 自体も procoagulate 活性を有しており，その他血小板も炎症反応における効果細胞として作用するものと考えられる[25~27]。

Mϕ はもちろん TGF-β を介して fibronectin を代表とする ECM の産生にも寄与する[6]。筆者はこのことを Mϕ と ECM 両者の二重蛍光抗体法で試みようとしたが，標識色素，二次抗体の適切な組み合わせができず実施が不可能であった。fibronectin は肝で生成され血漿中に遊離されたものと，局所細胞由来のもの(cFn)がある。糸球体では cFn はメサンギウム領域に主として認められるが，上皮細胞もこの ECM の産生にかかわっているという報告もある[10,11]。また，fibronectin は代謝が速く[28]，血漿由来であれ細胞由来であれ，その断片は線維芽細胞の chemoattractant になりうるという[29]。本実験では経過とともにボーマン嚢破綻と type Ⅰ collagen が増加した。筆者の二重蛍光抗体法による検討において α_3 integrin と cFn が隣接してみられたことは，半月体内の α_3 integrin 陽性細胞(おそらくはボーマン嚢上皮由来細胞)も fibronectin の産生に寄与していることを示唆する。また，cFn は α_3 β_1 integrin のリガンドであるため，両者の接着によりサイトカインその他の炎症刺激を細胞内へ伝達し，更なる炎症反応の進行および半月体の基質化に寄与していることも考えられる[30]。

結　語

1）加速型抗 GBM 抗体腎炎において podocalyxin は，すべての半月体で経過中陰性であったことより，半月体内の α_3 integrin 陽性細胞はボーマン嚢上皮由来である可能性が示唆された。

2）半月体内において α_3 integrin 陽性細胞と ED_1 陽性細胞の両者がみられたことから，本実験モデルでは，ボー

マン嚢上皮由来細胞とMϕの両方が構成細胞として存在すると考えられた。

3）半月体内においてcFnは陽性で，半月体中の構成細胞はcFnを産生することが示唆され，またα_3 integrinとcFnの隣接が認められたことから，ボーマン嚢上皮由来細胞もこのcFn産生に関与していることが示唆された。

謝　辞

稿を終えるにあたり，ご指導，ご校閲を賜りました長瀬光昌教授，松井克之先生に深謝するとともに，本研究にご協力頂きました内科腎研究室諸兄姉に篤く感謝します。また，マウス抗podocalyxin抗体(4D5)は新潟県立吉田病院小児科原　正則博士による提供であり，御礼申し上げます。

本論文の要旨は，第42回日本腎臓学会総会にて報告した。

文　献

1. Langhans T. Ueber die veranderungen der glomeruli bei der nephritis nebst einigen Bemerkungen uber die Entstehung der Fibrincylinder. Arch Pathol Physiol Klin Med 1879；76：85–118.
2. Kondo Y, Shigematsu H, Kobayashi Y. Cellular aspects of rabbit Masugi nephritis：Ⅱ. Progressive glomerular injuries with crescent formation. Lab Invest 1972；27：620–31.
3. Atkins RC, Nikolic–Paterson DJ, Song Q, Lan HY. Modulators of crescentic glomerulonephritis. J Am Soc Nephrol 1996；7：2271–8.
4. Shimizu A, Masuda Y, Kitamura H, Ishizaki M, Sugisaki Y, Yamanaka N. Apoptosis in progressive crescentic glomerulonephritis. Lab Invest 1996；74：941–51.
5. Holzman LB, Wiggins RC. Glomerular crescent formation. Semin Nephrol 1991；11：346–53.
6. MacKay K, Stiker LJ, Stauffer JW, Doi T, Agodoa LY, Striker GE. Transforming growth factor–β. Murine glomerular receptors and responses of isolated glomerular cells. J Clin Invest 1989；83：1160–7.
7. Morel–Maroger Striker LX, Killen PD, Chi E, Striker GE. The composition of glomerulosclerosis. Ⅰ. Studies in focal sclerosis, crescentic glomerulonephritis, and membranoproliferative glomerulonephritis. Lab Invest 1984；51：181–92.
8. Yoshioka K, Tohda M, Takemura T, Akino N, Matsubara K, Ooshima K, Maki S. Distribution of type Ⅰ collagen in human kidney diseases in comparison with type Ⅲ collagen. J Pathol 1990；162：141–8.
9. Yoshioka K, Takemura T, Akano N, Miyamoto H, Iseki T, Maki S. Cellular and non–cellular compositions of crescents in human glomerulonephritis. Kidney Int 1987；32：284–91.
10. Assad L, Schwartz MM, Vitanen Ⅰ, Gould VE. Immunolocalization of tenascin and cellular fibronectins in diverse glomerulopathies. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 1993；63：307–16.
11. Nakamura T, Miller D, Ruoslahti E, Border WA. Production of extracellular matrix by glomerular epithelial cells is regulated by transforming growth factor–β1. Kidney Int 1992；41：1213–21.
12. Meezan E, Hjelle JT, Brendel K, Carlson EC. A simple, varsatile, nondisruptive method for the isolation of morphologically and chemically pure basement membranes from several tissues. Life Sciences 1976；17：1721–32.
13. Tapp DC, Wortham WG, Addison JF, Hammonds DN, Barnes JL, Venkatachalam MA. Food restriction retards body growth and prevents end–stage renal pathology in remnant kidneys of rats regardless of protein intake. Lab Invest 1989；60：184–95.
14. 原　正則，柳原俊雄，高田恒郎，山本　格，川崎克俊，木原　達．尿中剝離糸球体上皮細胞は糸球体硬化を予知するマーカーとなりうるか―糸球体硬化機序に関する仮説の提唱―．日児腎誌 1996；9：71–7.
15. Orikasa M, Iwanaga T, Takahashi–Iwanaga H, Kojima K, Shimizu F. Macrophagic cell outgrowth from normal rat glomerular culture：Possible metaplastic change from podocytes. Lab Invest 1996；75：719–33.
16. Barisoni L, Kritz W, Mundel P, Agati V. The Dysregulated Podocyte Phenotype：A novel concept in the pathogenesis of collapsing idopathic focal segmental glomerulosclerosis and HIV–associated nephropathy. J Am Soc Nephol 1999；10：51–61.
17. Bonsib SM. Glomerular basement membrane discontinuities. Am J Pathol 1985；119：357–60.
18. Stejskal J, Pirani CL, Okada M, Mandelanakis N, Pollak VE. Discontinuities(gaps) of the glomerular capillary wall and basement membrane in renal disease. Lab Invest 1973；28：149–69.
19. Kawasaki K, Yaoita E, Yamamoto T, Tamatani T, Miyasaka M, Kihara Ⅰ. Antibodies against intercellular adhesion molecule–1 and lymphocyte function–associated antigen–1 prevent glomerular injury in rat experiment crescentic glomerulonephritis. J Immunol 1993；150：1074–83.
20. Nishikawa K, Gou Y, Miyasaka M, Tamatani T, Collins AB, Sy MS, McClusky RT, Andres G. Antibodies to intercellular adhesion molecule 1/lymphocyte function–associated antigen 1 prevent crescent formation in rat autoimmune glomerulonephritis. J Exp Med 1993；177：667–77.
21. Lavelle KJ, Durland BD, Yum MN. The effect of antimacrophage anti–serum on immune complex glomerulonephritis. J Lab Clin Med 1981；98：195–205.
22. Holdsworth SR, Neale TJ, Wilson CB. Abrogation of macrophage–dependent injury in experimental glomerulonephritis in the rabbit. J Clin Invest 1981；68：686–98.
23. Naish P, Penn GB, Evans DJ, Peters DK. The effect of

defibrination on nephrotoxic serum nephritis in rabbits. Cli Sci 1972；42：643–6.

24. Zoja C, Corna D, Macconi D, Zilio P, Bertani T, Remuzzi G. Tissue plasminogen activator therapy of rabbit nephrotoxic nephritis. Lab Invest 1990；62：34–40.
25. Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, Miller DM. Transforming growth factor-β in human platelets. J Biol Chem 1983；258：7155–60.
26. Johnson R, Iida H, Yoshimura A, Floege J, Bowen-Pope DF. Platelet-derived growth factor：a potentially important cytokine in glomerular disease. Kidney Int 1992；41：590–4.
27. Alpers CE, Seifert RA, Hudkins KL, Johnson RJ, Bowen-Pope DF. PDGF-receptor localizes to mesangial, parietal epithelial, and interstitial cells in human and primate kidneys. Kidney Int 1993；43：286–94.
28. Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Balian G, Kang AH. Induction of fibroblast chemotaxis by fibronectin. Localization of chemotactic region to a 140,000-molecular weight non-gelatin-binding fragment. J Exp Med 1981；153：494–9.
29. Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-β1 induces α-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. J Cell Biol 1993；122：103–11.
30. Cosio FG. Cell-Matrix Adhesion Receptors：Relevance to Glomerular Pathology. Am J Kid Dis 1992；20：294–305.