障害腎の autoradiography による研究

第1報 代償性肥大腎について

	大	江	宏
京都府立医科大学泌尿器科学教室	三	品	輝
(主任: 渡辺洪教授)	齊	藤	雅
	田	中	重
			喜

AUTORADIOGRAPHIC STUDIES ON THE INJURED KIDNEY

I. COMPENSATORY RENAL HYPERTROPHY

Hiroshi Ohe, Teruo Mishina, Masahito Saitoh and Shigeki Tanaka

Department of Urology, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto

(Director: Prof. H. Watanabe)

A pattern of proliferation in compensatory renal hypertrophy in rats was studied using ^3H -thymidine autoradiography.

The results obtained were as follows:

- 1) The cell proliferation in compensatory renal hypertrophy was most marked in the outer cortex especially in proximal convoluted tubule cells.
- 2) The number of labelled cells began to increase 24 hours after contralateral nephrectomy, reached a maximum value between 48 and 72 hours and returned to the control value after 2 weeks.
- 3) The ratio of the labelling in interstitial cells to tubule cells was constant throughout the period.

緒 言

腎の細胞の増殖性反応は、尿管閉塞、阻血、放射線照射、外傷などの傷害によってもひきおこされるが、一方、代償性肥大腎にもみられることが知られている。したがって各種の傷害により損傷された障害腎の研究をおこなうにあたっては、その修復過程に大きな影響をおよぼす代償性腎肥大についての問題を無視することはできない。

われわれは、 ^3H -thymidine autoradiography をもちいて障害腎の修復過程における反応を追求する一連の実験をおこなっているが、障害腎について知るためにはまず代償性肥大腎における増殖性反応の基本的なパターンを明らかにする必要にせまられた。そこでこの点につきラットを用いておこなった実験の結果を報告する。

方 法

1. 実験群および手術操作

Wistar 系雄性ラットを用いて実験をおこなった。ラ

ット腎の細胞分裂について問題となる年齢的因子については成熟ラット (150~220g) を使用することにより、また日差変動については手術時間を午前9~10時に定めることにより、一定の条件下に置くように努めた。ラットの飼育は市販の固形飼料を用い、摂食飲水は自由とした。

17匹を腎摘除群 (11匹)、擬似手術群 (4匹)、無処置群 (2匹) の3群に分類し、このうち後の2群を対照とした。

手術はすべてエーテル麻酔下に施行し、腎摘除群に対しては右腎の摘除をおこなった。腎摘除は腰部斜切開により、副腎、血管および神経などに損傷を与えないよう注意しつつ、腎を創外に脱転後、腎基を絹糸で結紮し腎を切離した。創は慎重に1次的に縫合閉鎖した。右腎の周囲組織、血液、尿などを十分除去したのち、その重量のグラフ数を0.01gまで測定した。この手術後、24、48、72時間を経過した時点で、それぞれ3匹づつ、また2週

間を経過した時点で残りの1匹を屠殺し、ただちに左腎を採取してその重量を測定したのち、後述する組織標本および autoradiography を行つた。

擬似手術群に対しては、右腎を用手剝離により脱転した後、再び創内にもどして閉創するにとどめ、腎摘除群と同じ時間を経過した時点でそれぞれ1匹ずつ屠殺して両側腎を採取した。ただちに左右腎重量を測定したのち左腎を標本作製に供した。

無処置群に対しては何の操作も加えず、ただちに屠殺して両側腎重量を測定したのち、同じく左腎を標本作製に供した (Table 1)。

Table 1 Number of experimental animals

		0	24	48	72 hr.	2 w.	T.
Nephrectomy			3	3	3	2	11
Sham operation			1	1	1	1	4
Non-operation		2					2

obtained kidney

2. 腎重量増加率
全群において、採取した左腎および右腎重量の差と、右腎重量との比、すなわち $NL-NR/NR$ を算定し、この値を腎重量の増加率とした。

3. 血清尿素窒素およびクレアチニン値
全群において、屠殺時、頸静脈より採血し、血清尿素窒素およびクレアチニン値を測定した。

4. 組織標本および autoradiography 標識指数
全群において、屠殺1時間前に、あらかじめ 3H -thymidine 0.5 μ Ci/g 体重を腹腔内に投与しておいた。屠殺後採取した腎は10%ホルマリン溶液で固定したのち、腎乳頭を中心とする longitudinal block としてパラフィンに包埋し、その4.5 μ パラフィン切片の一部を H・E 染色して組織標本とし、他の一部を autoradiography の作製に供した。

autoradiography は dipping 法により、サクラ NR-M₂ 核乳剤を使用し、冷暗所で1カ月間露光を行つた。露光後 FD-111 処方現象液で現像し、さらに H・E 単染色を施した⁷⁾。

これまでの mitotic activity の研究においても示されているように、観察の対象を糸球体を除く腎細胞とし²²⁾
^{29) 30)}、顕微鏡下に腎細胞1000個あたりの標識細胞の数を

Table 2 Zonal distribution of nephrons in the rat kidney (McFarlane)

CORTEX	OUTER ZONE	Zone 1 Labyrinthine 1st tubules 2nd convoluted tubules Broad limbs of Henle Collecting tubules
	INNER ZONE	Zone 2 Descending straight limbs of 1st tubule Broad limbs of Henle Collecting tubules
MEDULLA	OUTER ZONE	Zone 3 Broad limbs of Henle Narrow limbs of Henle Collecting tubules
	INNER ZONE	Zone 4 Collecting tubules Narrow limbs of Henle

算出し、その割合を百分率で表して標識指数(%)とした。

ラット腎のネフロン分布に関して、McFarlane¹⁹⁾, Rodin and Crowson²⁸⁾は腎の皮質を2層(zone 1, 2), 髄質を2層(zone 3, 4)の計4層に分ける腎分画法を提唱した。彼らの腎分画分類によれば、各分画中の腎構成細胞はほぼ規定されるので、各分画別の標識指数はある程度どのような種類の細胞がより多く標識されているかを示すことになる(Table 2), この分布についてはわれわれも顕微鏡的に確認したが、十分首肯しうる腎分画法であると考えられたので、これにならつて各分画ごとの標識指数を算定することにした。

また代償性肥大腎のしめす尿細管上皮細胞および間質の増殖性反応の割合を知るため、この4層全体を通じて、全標識細胞のうち尿細管上皮細胞の占める割合を調べ、これも百分率で表わした。

成 績

1. 腎重量増加率

腎摘除群における腎重量増加率は、腎摘後より漸次増加し、2週後には0.23増となつた。これに対し擬似手術群および無処置群の腎重量増加率は、常に一定の低い値にとどまつた(Fig. 1)。

2. 血清尿素窒素およびクレアチニン値

血清尿素窒素およびクレアチニンの値は、全群とも経時的にほとんど一定して、正常範囲内にあつた(Fig. 2)。

Fig. 1 Ratio of kidney weight $\frac{(NL-NR)}{NR}$

3. 組織標本

組織学的には腎摘除2週後屠殺群において、擬似手術群および無処置群のそれに比べ糸球体径、尿細管および腎内血管径の増大が認められた(Fig. 3)。

4. autoradiography 標識指数

autoradiography の成績は Table 3 に示した。

無処置群の標識率は zone 1—4 を通じてほぼ同じ水準の低い値にとどまつた。

擬似手術群では手術後24時間の zone 1 においてわずかな標識指数の増加がみられたが、全体としては無処置群に比べ有意の変化はなく、手術侵襲そのものの標識指

Fig. 2 Blood urea nitrogen and serum creatinine

Fig. 3 Histological appearance of left kidney 2 weeks after right nephrectomy.

Fig. 4 Autoradiogram of the outer cortex (zone 1) of left kidney 48 hours after right nephrectomy.

Fig. 5 Autoradiogram of the inner cortex (zone 2) of left kidney 48 hours after right nephrectomy.

Fig. 6 Autoradiogram of the outer medulla (zone 3) of left kidney 48 hours after right nephrectomy.

Fig. 7 Autoradiogram of the inner medulla (zone 4) of left kidney 48 hours after right nephrectomy.

Fig. 8 Autoradiogram of labelled interstitial cell in the inner cortex of left kidney 48 hours after right nephrectomy.

Table 3 ³H-thymidine label index

group	interval	zonal distribution of nephron				labelled tubular cells
		zone 1	zone 2	zone 3	zone 4	
Nephrectomy	24	1.49 (0.59)	0.80 (0.08)	0.23 (0.23)	0.23 (0.11)	90.4 (2.14)%
	48	2.21 (0.05)	1.27 (0.10)	0.45 (0.05)	0.23 (0.04)	95.1 (2.29)
	72hr	1.41 (0.57)	1.26 (0.41)	0.63 (0.14)	0.21 (0.18)	93.5 (3.83)
	2w	0.15	0.18	0.08	0.07	90.3
Sham operation	24	0.26	0.11	0.09	0.04	92.2
	48	0.14	0.10	0.11	0.10	90.4
	72hr.	0.14	0.15	0.12	0.09	92.3
	2w.	0.10	0.10	0.08	0.13	92.7
Non-operation	0hr.	0.09	0.08	0.10	0.09	95.1

Values are means (S. E.)

数への影響は無視してよいと考えられた。
これに対して腎摘除群では、かなり明瞭な標識指数の変動が認められた。まずこれを腎分画別にみると、腎摘除後の残腎の標識指数は皮質表層 zone 1 (Fig. 4) において著明に増加し、皮質深層 zone 2 (Fig. 5) がこれに次いだ。髄質部では皮質部に比して標識が少なく (Fig. 6, 7), zone 4 にはほとんど見るべき変化はなかつた。各分画中における細胞構成を考慮すれば、標識細胞は近位尿管上皮細胞に多く、遠位尿管がこれに次ぎ、Henle のループの細い部分や集合管には少ないと思われた。

間質への標識は (Fig. 8) endothel や fibroblast などへのものと²⁾と考えられたが、endothel か fibroblast かの顕微鏡レベルでの明瞭な鑑別は困難であつた。

つぎに経時的観察においては (Fig. 9), 腎摘除後の皮質における残腎の標識指数は、腎摘除24時間後にすでにかなりの増加があり、増殖性反応の開始されていることを示した。反応のピークは zone 1 では48時間後に、zone 2 では48~72時間後にあり、このときの標識率は対照値の10倍強にものぼつた。以後、減少し2週後には激減して対照値に落着いた。一方髄質では、zone 3 に72時間後にピークを有する標識増加が認められたのみであつた。

全標識細胞のうち尿管上皮の占める割合は、各時期を通じて全体のほぼ90%以上となり、残り10%弱は間質への標識であつた。この割合は各時期を通じて常に一定していた。

考 按

Fig. 9 Label index from ³H autoradiographs of the left kidney at intervals after removal of the right kidney.

1869年 Simon は、はじめて人に腎摘除術を施行したが、これに端を発して、残腎の代償性肥大についての研究が広く行われるようになった²¹⁾。それらの研究は大きく分けて、機能学的手法による研究と、形態学的手法による研究とに分類することができる。このうち前者については、その後の種々な腎機能検査法の開発にともなつて、今日ではすでに詳細な成績が得られている^{18) 25)}。一

方、形態学的手法による研究でまず明らかになった腎摘除後の残腎におけるもつとも基本的な変化は腎重量の増加と、これにともなう特徴的な組織学的所見の変化であった。この点については、1927年 Jackson and Schiels¹²⁾が、ラットにおける残腎重量の増加について述べたのをはじめとして、今日まで多数の報告がある。要約すると、ラットにおいては腎摘除後の残腎重量は、腎摘後、1～2週まで急増し、以後は緩徐に増加し、約40日前後で完成、結果的に25～30%増加する^{3) 11) 15) 26) 29)}。これにともなう組織学的には糸球体径、尿細管径および腎内血管径の増大がみられる^{15) 29)}。

われわれの実験においても、腎摘除後の血清尿素窒素およびクレアチニン値は変動せず、経時的腎重量は増加し、腎の組織学的所見には、特徴的な変化がみられるなど、機能的にも形態的にも従来の報告に一致した代償性肥大の進行が示されていた。

さて代償性肥大腎にみられる腎重量の増加および組織学的変化は、古くから成熟ネフロン数の増加によるものではなく、大きさの増大によるものとされている¹⁾。ただこの各ネフロンの大きさの増大が、細胞レベルでの増殖をとまなう hyperplasia によるものか、増殖をとまなわない hypertrophy によるものか、という点は、ながらく論争的となってきた。しかし、1935年 Bollman⁴⁾らが、代償性肥大腎に細胞分裂を証明したのを端緒として、Rollason (1949)²⁹⁾、Sulkin (1949)³⁰⁾などによる mitotic activity についての詳細な報告が現われ、hypertrophy に加えて hyperplasia も、ネフロンの大きさの増大の要因として認められるようになった。そして代償性肥大の形態学的変化には、尿細管上皮細胞の増殖と肥大の両者が関与し、これに血管系の変化をもともなうことが明らかにされ^{15) 16)}、現在ではこれらも含めて、代償性肥大にみられる形態的变化は、広い意味での hypertrophy と呼称されている。

このような観点から、代償性肥大における広い意味での hypertrophy を、腎細胞の synthetic activity の大きさのみで定義するには無理があるが、少なくとも hyperplasia すなわち new cell formation は、hypertrophy のうちでも非常に大きな意義を有していることは確かである³⁾。この考え方にもとづき、mitotic activity の観察^{22) 29) 30)}や核酸合成の生化学的測定^{11) 23) 24)}により、細胞の増殖性反応についての検討がなされるようになり、詳細な mitotic activity や cellular enlargement の検索がおこなわれた結果、腎の代償性肥大が完成する過程お

よび時期については、形態学的にもかなり明確な成績が得られつつある^{11) 22) 23) 24) 29) 30)}。

さらに近年開発された autoradiography は、代償性肥大腎の増殖性反応を追求するうえに、非常に有力な手法とみなされるにいたった。

1951年 Fitzgerald ら⁶⁾は、トリチウム (³H) をトレーサーとする micro-autoradiography を最初に行つたが、1955年に Hughes ら¹⁰⁾が ³H-thymidine を合成してから、その優れた分解能と DNA の前駆体であるという特性を生かして、各方面の研究に広く応用されるようになった。

³H-thymidine autoradiography の代償性肥大腎研究への応用は、欧米では1960年 Franck⁵⁾、1961年 Kessner ら¹⁴⁾が代償性肥大腎に ³H-thymidine の標識を認め、その増殖性反応を指摘したのにはじまるが、本邦でのまとまつた報告は未だみられない。

周知のごとく ³H-thymidine autoradiography は、DNA 合成期の細胞の増殖性反応を表示する。DNA 合成期に要する時間は、それに続く実際の細胞分裂に要する時間より長いので、この方法は、従来の mitotic activity そのものを検出する方法よりも、細胞分裂に入ろうとしている細胞を、広い時期にわたつてより鋭敏に証明することができる。さらに増殖細胞の割合と分配の解析も可能であるなど、代償性肥大の研究にとつてはいろいろと有利なことが多い³⁾。

このような利点を活用して、われわれは代償性肥大腎にみられる増殖性反応を、反応部位 (局在性)、時間的变化、尿細管上皮と間質の示す反応の割合の三点にしばつて追求した。

まず増殖性反応の局在性については、これまでの mitotic activity や核酸測定の研究から反応は皮質とくに近位尿細管に著明であり髓質には少ないとするのが、ほぼ一致した見解である^{22) 23) 24) 29)}。一方 autoradiography によるこれまでの検索では、標識細胞は皮髄ともに見られるが、とくに皮質に特徴的であるとするところまで一致している^{3) 13) 20) 26) 27)}。なかでも Lowenstein¹⁷⁾は、皮質での増殖細胞の内訳を近位尿細管61%、遠位尿細管17%、集合管および Henle のループ10%、その他12%と分析している。

われわれは増殖性反応の局在性を知るために、McFarlane¹⁹⁾の腎分画法を導入することにより、これらの知見を一層詳しく検討しようとした。その結果は、やはり皮質とくに近位尿細管を中心とした表層での反応が著

明であるという、従来の知見を支持する成績であつた。そして髄質での反応も髄質表層にはある程度認められたが、深層すなわち乳頭にはほとんど認められなかつた。

次に増殖性反応の時間的変化に関しては、mitotic activity や核酸測定これまでの研究からは腎摘後はば48時間に反応のピークがあり、2週後には対照値に復するとする報告が多い⁸⁾²⁹⁾³¹⁾。しかし一部には7日後にも2峰性のピークを有するとする者もいる²²⁾³⁰⁾。Goss⁸⁾はピークでの反応は対照の6倍に達するとした。

autoradiography の面からは、Miyada ら²⁰⁾が、偏腎摘除後6日目まではその標識は増加し、以後16日目までに減少すると述べている。Johnson ら¹³⁾はさらに早期の反応の開始について観察し、腎摘後9時間までは対照との有意差はないものの、18時間後には著しい標識の増加を認め、48時間後に反応のピークを確認している。Reiter²⁶⁾²⁷⁾は偏腎摘除後48時間のピークには皮質で対照値の5~6倍、髄質で12~13倍の標識の増加を観察している。Bury³⁾らも48~72時間後にピークがあり、2週後に対照値に落ち着くとしており、normal cell turnover は2週でなされると述べている。

われわれはここでも腎分画ごとの経時的観察を試みた。その結果、zone 1における反応のピークは腎摘後48時間、zone 2では48~72時間、zone 3では72時間と遅くなる傾向がある程度認められ、興味深く思われた。反応の大きさは皮質で対照値の約10倍強に達した。髄質深層(zone 4)ではほとんど変化はなかつた。

以上われわれの得た成績をも含めて、autoradiography による代償性肥腎の増殖性反応についての成績は、反応の部位(局在性)および時間的変化という点に関して、mitotic activity や核酸測定によつてなされた成績とはほぼ平行すると考えてよからう。

最後にわれわれは、代償性肥腎の尿細管上皮と間質との増殖性反応の割合を知るために、尿細管標識細胞と間質標識細胞の割合を求めた。

これまで代償性肥大の形態学的研究では、尿細管の反応を中心として考えられてきた。わずかに Benitz ら²⁾が、間質反応の増加について触れている程度である。Johnson ら¹³⁾は、間質における反応は腎盂腎炎などのわずかな炎症性反応によつても影響を受けやすく、一定の傾向を示さないとしている。

これに反してわれわれの成績では、尿細管上皮での標識細胞は約90%、間質でのそれは約10%と経時的にはば一定した割合で認められ、間質での増殖性反応は比較的安定していることがわかつた。これは代償性肥腎の示

す一つの特徴であろうと思われる。

以上われわれは、autoradiography による代償性肥腎の基本的パターンを知ることができたので、今後はこれを活用してさらに複雑な障害腎の病態機構を解明してゆきたい。

結 語

われわれは障害腎の³H-thymidine autoradiography による研究をおこなうにあつて、その修復過程に大きな影響をおよぼす代償性肥腎における増殖性反応の基本的パターンを知るために、ラットを用いて実験をおこない、次のような結果を得た。

- 1) 代償性肥腎にみられる増殖性反応は、経時的には偏腎摘除後24時間ですでに始つており、48~72時間後にピークに達し、2週後には対照値に落ち着く。
- 2) その反応の部位については、皮質表層、ついで皮質深層に著明で、髄質には少なく、乳頭部にはほとんど認められない。
- 3) 尿細管上皮細胞での反応は、近位尿細管を中心とし、集合管や Henle のループの細い部分には少ない。
- 4) 間質での反応は経時的にも一定しており、常に10%弱を占める。

稿を終るにあたり、御指導、御教示いただいた故小田完五教授、芦原司滋賢医科大学助教授(病理)、ならびに御校閣下さった渡辺泱教授に深謝する。

文 献

- 1) Arataki, M.: Amer. J. Anat., **36**, 437, 1926.
- 2) Benitz, L. and Shaka, J.A.: Amer. J. Path., **44**, 961, 1964.
- 3) Bury, H.P.R., Crane, W.A.J. and Dutter, L.P.: Brit. J. Urol., **37**, 201, 1965.
- 4) Bollman, J.L. and Mann, F.C.: Arch. Path., **19**, 28, 1935.
- 5) Franck, G.: Compt. Rend., **251**, 1306, 1960.
- 6) Fitzgerald, P.J., Edinoff, M.L., Knoll, J.E. and Simmel, E.B.: Science., **114**, 494, 1951.
- 7) 藤田哲也: 新細胞学(妹尾佐知丸、高木康敬編), p. 605, 朝倉書店, 東京, 1965.
- 8) Goss, R.J. and Rankin, M.: J. Exp. Zool., **145**, 209, 1960.
- 9) Hamburger, J.: Nephrology, Vol. 1, p. 93, Saunders Co., Philadelphia, 1968.
- 10) Hughes, W.L., Bond, V.P., Brecher, G., Cronkite, E.P., Painter, R.B., Quastler, H. and Schermann, F.G.: Proc. Nat. Acad. Sci., **44**, 476, 1958.
- 11) Hullibert, I.W.: Cancer Res., **25**, 1882, 1965.

- 12) Jackson, C.M. and Schiels, M.: *Anat. Rec.*, **36**, 221, 1927.
- 13) Johnson, H.A. and Vera Roman, J.M.: *Amer. J. Path.*, **49**, 1, 1966.
- 14) Kessner, D.M. and Thomas, E.D.: *Nature*, **190**, 4771, 1961.
- 15) 小金丸恒夫: 泌尿紀要, **18**, 871, 1972.
- 16) Krohn, A.G., Peng, B.B.K., Antell, H.I., Stein, S. and Waterhouse, K.: *J. Urol.*, **103**, 564, 1970.
- 17) Lowenstein, L.W. and Stern, A.: *Science*, **142**, 1479, 1963.
- 18) Maluf, N.S.R., Ford, R.V. and Spurp, C.S.: *J. Urol.*, **78**, 117, 1957.
- 19) McFarlane, D.: *J. Path. Bact.*, **52**, 17, 1941.
- 20) Miyada, D.S. and Kurnick, N.B.: *Fed. Proc.*, **20**, 404, 1961.
- 21) Nowinski, W.W.: *Compensatory Renal Hypertrophy* (edited by Nowinski, W.W. and Goss, R.J.), p. 1, Academic Press, New York and London, 1961.
- 22) Ogawa, K. and Sinclair, J.G.: *Texas Rep. Biol. Med.*, **16**, 215, 1958.
- 23) Ogawa, K.: *Texas Rep. Biol. Med.*, **19**, 825, 1961.
- 24) 大北純三: 泌尿紀要, **19**, 129, 1973.
- 25) Peters, G.: *Amer. J. Physiol.*, **205**, 1042, 1963.
- 26) Reiter, R.J.: *Lab. Invest.*, **14**, 1636, 1965.
- 27) Reiter, R.J.: *Compensatory Renal Hypertrophy* (edited by Nowinsky, W.W. and Goss, R.J.), p. 183, Academic Press, New York and London, 1969.
- 28) Rodin, A.E. and Crowson, C.N.: *Amer. J. Path.*, **41**, 297, 1962.
- 29) Rollason, H.D.: *Anat. Rec.*, **104**, 263, 1949.
- 30) Sulkin, N.M.: *Anat. Rec.*, **105**, 95, 1949.
- 31) Williams, G.E.G.: *Brit. J. Exp. Path.*, **42**, 386, 1961.

(1976年9月4日受付, 特別掲載)