

# コンドロイチン硫酸投与による 短肢症マウス腎組織の低硫酸化の改善に関する研究

## A Study on the Improvement of Under Sulfation in Renal Tissues of Brachymorphic Mice through the Administration of Chondroitin Sulfates.

平林 義章

HIRABAYASHI Yoshifumi

**要旨：**短肢症マウスは、bm 遺伝子のポイントミューテーションにより硫酸基転移酵素に機能障害が起こり短肢症を自然発症する。本マウスは、四肢・脊柱・尾の短縮、脊柱の彎曲などの異常を示すことが報告されている。また、組織学的に短肢症マウスの腎臓では、糸球体や尿細管の基底膜、メサンギウム基質やボーマン嚢基底膜周囲、尿細管基底膜周囲ならびに間質の結合組織に低硫酸化が見られる。本研究では、正常のコンドロイチン硫酸 (CHS) A,C 混合液を投与した時、腎組織に分布する低硫酸化したグリコサミノグリカン複合体に改善が見られるかどうかを組織化学的に検索した。生後 4 週齢から12週齢の間 CHS-A,C を投与した群と無投与群を用いて、アルデヒド固定、パラフィン包埋した腎臓の光学顕微鏡用切片を作製した。切片に増感高鉄ジアミン染色による硫酸基検出法と、CHS-A,C を検出するためにウシ睾丸ヒアルロニダーゼ消化法を施した。無投与群では、糸球体基底膜、メサンギウム基質、ボーマン嚢や尿細管の基底膜ならびに間質に硫酸基の陽性反応が見られた。CHS 投与群を観察したところ、糸球体のメサンギウム基質、ボーマン嚢基底膜周囲と尿細管基底膜周囲ならびに間質の結合組織の低硫酸化が改善されていることが確認された。また、低硫酸化の改善は CHS 投与量に依存していることが分かった。加えて、投与した CHS の硫酸基の増加を検出するのに短肢症マウスが適していることが明らかになった。

**Abstract:** Brachymorphic mice have spontaneously brachymelia induced by the bm gene, which causes a point mutation in a sulfotransferase. Abnormalities such as shortening of the limbs, spine, and tail, and curvature of the spine have been reported in these mice. In this study, I examined histochemically whether administration of normal chondroitin sulfates (CHS-A,C) would improve the levels of undersulfated glycosaminoglycans in the renal tissues of brachymorphic mice. For light microscopic observation, aldehyde-fixed and paraffin-embedded sections of renal tissues were prepared from mice treated with CHS-A,C mixtures between 4 and 12 weeks of age and from a control group. The sections were stained with sensitized high iron diamine staining (S-HID) to detect sulfate groups in GAGs and digested with bovine testicular hyaluronidase for the detection of CHS-A,C. In the control group, sulfate groups were found to be present in the glomerular basement membrane, mesangial matrix, basement membrane and interstitial connective tissues of Bowman's capsule and urinary tubules. Observation of the treated group confirmed that undersulfation of the mesangial matrix of the glomerulus and the interstitial connective tissue of the Bowman's capsule and urinary tubules was improved, and that the improvement in undersulfation was dependent on the CHS-A,C administration dose. In addition, it became clear that brachymorphic mice are suitable for detecting the increase in sulfate groups of the administered CHS-A,C.

**キーワード：**短肢症マウス, 腎臓, グリコサミノグリカン投与, 光顕組織化学

**Key Words:** Brachymorphic mice, kidney, glycosaminoglycan administration, light microscopic histochemistry

## 序論

1960年代に短肢症を発症する C57BL 系マウスが発見された。その後の研究で、この短肢症が常染色体潜性(劣性)遺伝子の bm 遺伝子によることが確認された。bm 遺伝子は常染色体19の上であり、1 酵素で2つの機能を持つ硫酸基転移酵素 [ATP-sulfurylase/APS (Adenosine phosphosulfate) kinase] の APS kinase 部分にある236番目の塩基がポイントミューテーションによりグアニンからアデニンに変わった結果、79番目のアミノ酸がグリシンからアルギニンに変更される。bm 遺伝子ホモ接合体では、この硫酸基転移酵素 (ATP-sulfurylase/APS kinase) の異常により硫酸基供与体である PAPS (phosphoadenosine 5'-phosphosulfate) の合成が阻害されるため、硫酸化複合糖質 [グリコサミノグリカン (GAGs) や硫酸化糖タンパク質] の低硫酸化を生じることが確認された<sup>1-12)</sup>。著者らは異種交配によりこの bm 遺伝子を C57BL 系マウスから BALB/c 系マウスに導入し、BALB/c 系短肢症マウスの系を確立した。このマウスの短肢症は、PAPS の低形成が原因となり、成長軟骨の軟骨型プロテオグリカンに含まれる GAGs が低硫酸化するために発症することが知られている。短肢症マウスの形態学的特徴は、ドーム状の体躯の骨格や太くて短い尾、短縮した四肢などである<sup>2-12)</sup>。また、軟骨以外の他の臓器器官においても低硫酸化が見られることが近年報告されている<sup>13)</sup>。

腎臓は、脊柱の左右で肋骨になかば隠れる位置にある器官である。腎臓の実質は、被膜に近い側を占める皮質と、腎洞に突出する髄質(腎錐体)とに区別される。皮質と髄質の組織には、血液を濾過し原尿を産生する腎小体と、原尿から水や電解質などを再吸収し最終的な尿を産生する細長い尿細管がおさまっている。さらに、腎小体は糸球体とボーマン嚢からできている。糸球体は毛細血管と特殊な結合組織(メサンギウム)からできおり、両者を合わせた表面を糸球体基底膜と足細胞とが覆っている<sup>14-16)</sup>。著者は、BALB/c 系短肢症マウスの腎臓で、腎臓の種々の組織構造、例えば腎糸球体や尿細管の基底膜、メサンギウム基質、尿細管基底膜周囲や間質の結合組織が低硫酸化していること<sup>13)</sup>、加齢にもなって基底膜の肥厚や変形、基底膜中に分布する陰性荷電障壁の分布異常や腎糸球体のメサンギウム基質の増殖が見られたことなどを報告した<sup>17)</sup>。文献によれば、腎糸球体のメサンギウム基質、尿細管の間質などにコンドロイチン硫酸 (CHS) が存在し、メサンギウム細胞や尿細管上皮のリモデリングや間質の線維化に寄与していることが

報告されている<sup>18-22)</sup>。また、IgA 腎症や糸球体性腎炎においてメサンギウムが増殖するが、メサンギウム基質に含まれる CHS は減少することが報告されている。同様に、糖尿病性腎症や膜性腎症では糸球体基底膜やメサンギウム領域の CHS が減少する。慢性腎不全では尿細管間質の増殖が見られるが、この部位の線維芽細胞等が CHS を含む間質成分を産生し間質のリモデリングや硬化に寄与していることなどが報告されており<sup>22-25)</sup>、腎臓において CHS が重要な働きを担っていることが示唆されている。

本研究では、マウスに投与する CHS として、腎糸球体のメサンギウム基質や尿細管の間質に多く含まれることが報告されている CHS-A と CHS-C を用いることとした。腎臓の諸組織が低硫酸化を示す BALB/c 系短肢症マウスを用いて、正常に硫酸化している CHS-A,C を経口投与した。この時、経口投与した CHS-A,C が腎臓組織に取り込まれるかどうか、また、投与量依存性に腎臓組織の各部位に分布している GAGs の低硫酸化が改善されるかどうかを検索することを目的とした。また、低硫酸化した実験動物を用いることによって、組織に取り込まれた CHS の増加分を組織化学的に容易に検出できる可能性についても検討した。

## 研究対象および方法

### 1. 研究対象

研究対象として、生後4週齢の BALB/c 系雌性マウスの bm 遺伝子ホモ接合体(短肢症マウス: BALB/c-bm/bm)を用いた。今回雌性マウスを用いたのは、先の腎臓の異常を報告<sup>14)</sup>した時と同じ動物種を用いるためである。コンドロイチン硫酸 (chondroitin sulfate: CHS) 投与群は、2 mg/kg, 10 mg/kg, 50 mg/kg の3群とし、BALB/c-bm/bm を各5匹ずつ用いた。また、対照として GAG 無投与群に BALB/c-bm/bm を5匹用いた。

### 2. コンドロイチン硫酸 (CHS) 投与方法

CHS 混合液の調製法: BALB/c-bm/bm に経口投与する CHS 混合液は、CHS-A ナトリウム塩 (Whale Cartilage: Lot No.S84502: 生化学工業) と CHS-C ナトリウム塩 (Shark Cartilage: Lot No.S87Y01: 生化学工業) をそれぞれ 2 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL の濃度で蒸留水に溶解し、それぞれ同濃度の CHS-A 溶液と CHS-C 溶液を 1:1 の割合で混合した。CHS-A および C 溶液は作り置きせず、それぞれ用時調製した。

CHS 投与群法：生後 4 週齢から12週齢の BALB/c-bm/bm に、それぞれの濃度の CHS 混合液をマウス体重10 g あたり10  $\mu$ L ずつ、マイクロピペットを用いて口腔内に投与した。

### 3. 組織調製法

- ① 固定：CHS 投与群ならびに CHS 無投与群の BALB/c-bm/bm を最終投与から 2 ないし 3 日後（13週齢の始め）に、イソフルラン吸入麻酔下に開胸し、左心室よりリング液で脱血した後、7.5% ショ糖含有 4% パラフォルムアルデヒド 0.05 M リン酸塩緩衝液（pH7.4）にて灌流固定した。腎臓を摘出し、同固定液を用いて 4℃にて 1 週間浸漬固定した。
- ② 洗浄：0.05 M リン酸塩緩衝液（pH7.4）にて洗浄した。
- ③ 脱水：エタノール上昇系列（50%，70%，80%，90%，100%エタノール）を用いて、4℃にて各 6～12時間ずつ浸漬した。
- ④ 透徹：キシレン I，II，III に室温にて各30分ずつ浸漬した。
- ⑤ 包埋：パラフィン（融点58～60℃）I，II，III に、60℃にて30～60分間浸漬した後、組織塊を定法に従って包埋した。
- ⑥ 薄切：ユング式の滑走式マイクロトームを用いて、厚さ4  $\mu$ m の切片を作製し、シラン（3-methacryloxypropyltrimethoxysilane, 信越化学工業）処理したスライドガラスに貼付し、37℃のオーブンで一晩乾燥した。

### 4. 染色法

組織中に含まれる GAGs の硫酸基を検出するため増感高鉄ジアミン（Sensitized high iron diamine: S-HID）染色を用いた。<sup>26)</sup>

#### 1) 試薬調製法

- ①高鉄ジアミン液  
p- ジアミン（N, N'-dimethyl-p-phenylenediamine (HCL), Sigma）50 mg と m- ジアミン（N, N'-dimethyl-p-phenylenediamine(2HCL), Sigma）300 mg を蒸留水 125 mL に溶解した後、染色直前に40%塩化第 2 鉄溶液 3.5 mL を加えた。
- ②0.5 mM トリクロロ（エチレン）白金酸カリウム溶液（pH8.0）  
0.1 M ホウ酸0.1 M 塩化カリウム溶液50 mL と0.1 N 水

酸化ナトリウム溶液4 mL を混和し、蒸留水を加えて 100 mL にした。これにトリクロロ（エチレン）白金酸カリウム（potassium trichloro(ethylene)platinate(II) hydrate, Aldrich）18.4 mg を溶解した。

#### ③0.2%水素化ホウ素ナトリウム溶液

リン酸水素2-ナトリウム（12水塩）3.02 g を蒸留水 120 mL に溶解し、水素化ホウ素ナトリウム0.24 g を溶解した。

#### ④物理現像液

A 液：20%アラビアゴム水溶液45 mL と10%硝酸銀水溶液1 mL を混合した。

B 液：ヒドロキノン100 mg とクエン酸300 mg を蒸留水 15 mL に溶解した。

A 液と B 液をあらかじめ18～20℃に温度設定した後、使用直前に両液を混合し用いた。

#### 2) 増感高鉄ジアミン（S-HID）染色法

- ① パラフィン切片を、キシレンに 3 回それぞれ 7～10分間浸漬して脱パラフィンした。
- ② 切片を水和するために、100%，90%，80%，70% エタノールに順番に浸漬した。
- ③ 流水水洗を10分間程度行った後、蒸留水水洗を 3 回行った。
- ④ 用時調整した高鉄ジアミン液に37℃で60分染色した。
- ⑤ 流水水洗を10分間程度行った後、蒸留水水洗を 3 回行った。
- ⑥ 0.5 mM トリクロロ（エチレン）白金酸カリウム溶液に室温で60分間浸漬した。
- ⑦ 流水水洗を10分間程度行った後、蒸留水水洗を 3 回行った。
- ⑧ 0.2%水素化ホウ素ナトリウム溶液に室温で10秒間浸漬した。
- ⑨ 流水水洗を10分間程度行った後、蒸留水水洗を 3 回行った。
- ⑩ 物理現像液に20℃で遮光して 3 分間浸漬した。
- ⑪ 蒸留水を 3 回換えて軽く洗浄した。
- ⑫ 5 倍希釈したスーパーフジフィクス（写真用定着液、富士フィルム）に約 2 分間浸漬した。
- ⑬ 流水水洗を 10～20分間行った。
- ⑭ 100%エタノールに 3 回浸漬して脱水を行った。
- ⑮ キシレンに 3 回浸漬して透徹した。
- ⑯ HSR 液（シスメック）を用いてカバーガラスで封入した。

## 5. 辜丸ヒアルロニダーゼ (T-Hylase) 消化法<sup>27-30)</sup>

組織中に分布する CHS-A,C を同定するために、CHS-A,C を選択的に消化する辜丸ヒアルロニダーゼ消化法を用いた。

### 1) 試薬調製法 (T-Hylase 酵素液)

ウシ辜丸ヒアルロニダーゼ (type VIII) (Sigma) を 1 mg/mL の濃度で 0.1 M リン酸緩衝液 (pH5.5) に溶解する。

### 2) 消化方法

① 切片を脱パラフィン・水和する。

② 切片に T-Hylase 酵素液を 100  $\mu$ l 載せ、湿潤箱にて、37°C で 18 ~ 22 時間消化する。

③ 流水水洗後、酸性基検出法を行う。

## 6. 実験記録方法

S-HID 染色および T-Hylase 消化した腎臓の各切片を、顕微鏡用デジタルカメラ (DP25: オリンパス) を装着した生物顕微鏡 (BH-2: オリンパス) にて、200 倍の拡大 (対物レンズ 20 倍, 中間レンズ 10 倍) で撮影し、デジタル顕微鏡写真として保存した。

## Legends to Figures:

図中のスケールバーはすべて 20  $\mu$ m を示す。図 A, C, E, G は短肢症マウスの腎臓の切片に、増感高鉄ジアミン (S-HID) 染色を施したもの、図 B, D, F, H は S-HID 染色の前にウシ辜丸ヒアルロニダーゼ (T-Hylase) 消化を施した光学顕微鏡写真である。

A: S-HID 染色 (CHS 無投与群): 腎小体 (RC) 中の腎糸球体の基底膜, ポーマン囊の基底膜と尿細管 (RT) の基底膜が褐色の中等度ないし強陽性反応を示した。腎糸球体のメサンギウム基質 (矢印), ポーマン囊基底膜周囲, 尿細管基底膜周囲および尿細管の間にある間質 (尿細管間質) (アスタリスク) に存在する結合組織は, S-HID 反応性がほとんどないか, または弱陽性反応を示した。

B: T-Hylase/S-HID 染色 (CHS 無投与群): 腎小体中のメサンギウム基質, ならびに尿細管基底膜周囲の結合組織の S-HID 染色性がわずかに減弱したが, 腎糸球体基底膜, ポーマン囊基底膜ならびに尿細管基底膜の S-HID 染色性は極くわずかに減弱したかまたは, ほとんど変化しなかった。

C: S-HID 染色 (2 mg/kg CHS 投与群): 腎糸球体のメサンギウム基質 (矢印) とポーマン囊基底膜周囲, 尿細管基底膜周囲および尿細管間質の結合組織 (アスタリスク) の S-HID 染色性が, びまん性にやや増強し, 褐色ないし黒色の中等度または強陽性反応を示した。

D: T-Hylase/S-HID 染色 (2 mg/kg CHS 投与群): 腎糸球体のメサンギウム基質, ならびにポーマン囊基底膜周囲, 尿細管基底膜周囲ならびに尿細管間質の結合組織の S-HID 染色性が弱ないし中等度に減弱したが, 腎糸球体基底膜, ポーマン囊基底膜ならびに尿細管基底膜の S-HID 染色性は褐色の強陽性反応を示し変化しなかった。

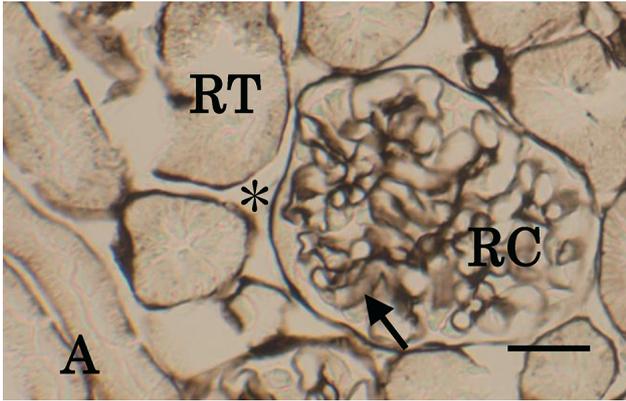
E: S-HID 染色 (10 mg/kg CHS 投与群): 腎糸球体メサンギウム基質 (矢印) とポーマン囊基底膜周囲, 尿細管基底膜周囲ならびに尿細管間質の結合組織 (アスタリスク) の S-HID 染色性が, 全体的に中等度に増強し黒褐色ないし黒色の中等度ないし強陽性反応を示した。

F: T-Hylase/S-HID 染色 (10 mg/kg CHS 投与群): 腎糸球体のメサンギウム基質とポーマン囊基底膜周囲, 尿細管基底膜周囲ならびに尿細管間質の結合組織の S-HID 染色性が顕著に減弱したが, 腎糸球体基底膜, ポーマン囊基底膜ならびに尿細管基底膜の S-HID 染色性は褐色ないし黒色の中等度ないし強陽性を示し, 変化しなかった。

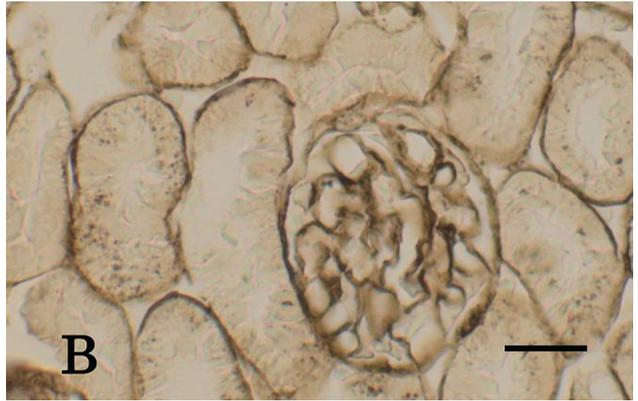
G: S-HID 染色 (50 mg/kg CHS 投与群): 腎糸球体メサンギウム基質 (矢印) とポーマン囊基底膜周囲, 尿細管基底膜周囲ならびに尿細管間質の結合組織 (アスタリスク) の S-HID 染色性が無投与群と比較して全体的に顕著に増強し黒褐色ないし黒色の強陽性反応を示した。

H: T-Hylase/S-HID 染色 (50 mg/kg CHS 投与群): 腎小体中のメサンギウム基質とポーマン囊基底膜周囲, 尿細管基底膜周囲ならびに尿細管間質の結合組織の S-HID 染色性は顕著に減弱したが, 腎糸球体基底膜, ポーマン囊基底膜ならびに尿細管基底膜の S-HID 染色性は消化されずに褐色から黒色の中等度ないし強陽性反応を示し, 変化しなかった。

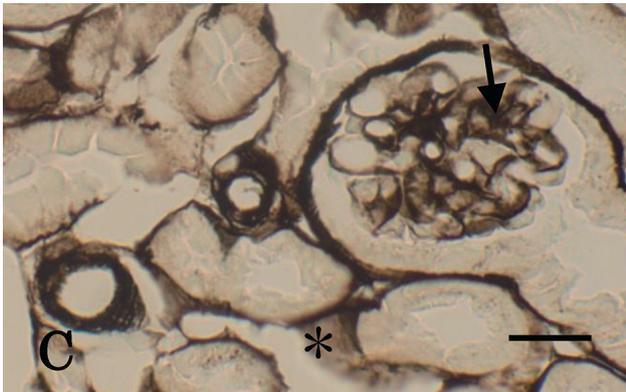
Figure1



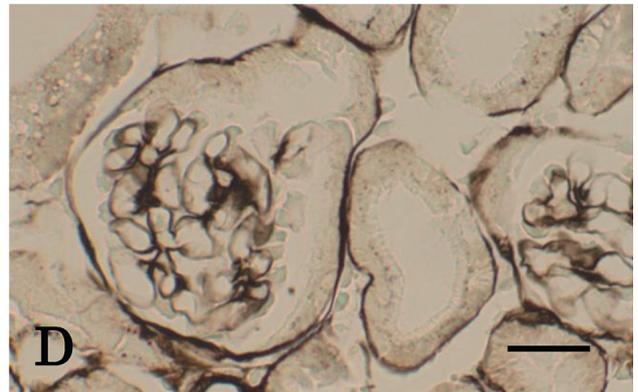
A : S-HID (無投与群)



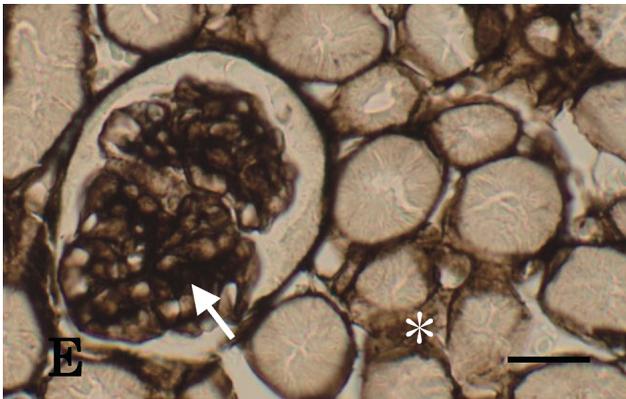
B : T-Hylase/S-HID (無投与群)



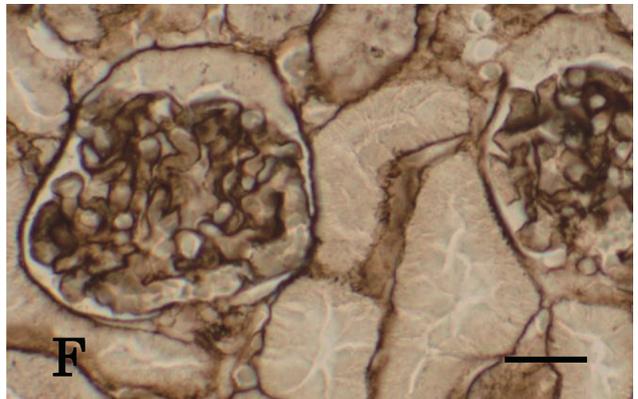
C : S-HID (2 mg/kg 投与群)



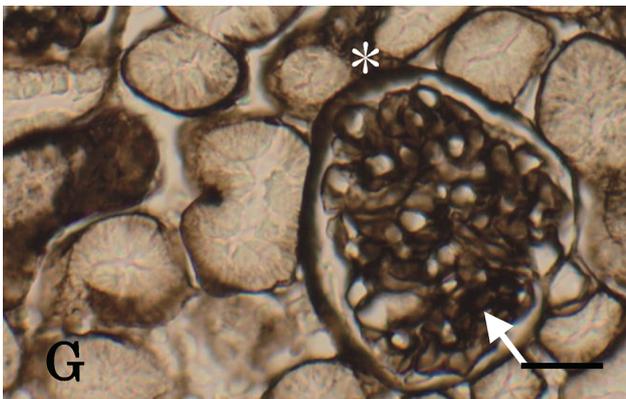
D : T-Hylase/S-HID (2 mg/kg 投与群)



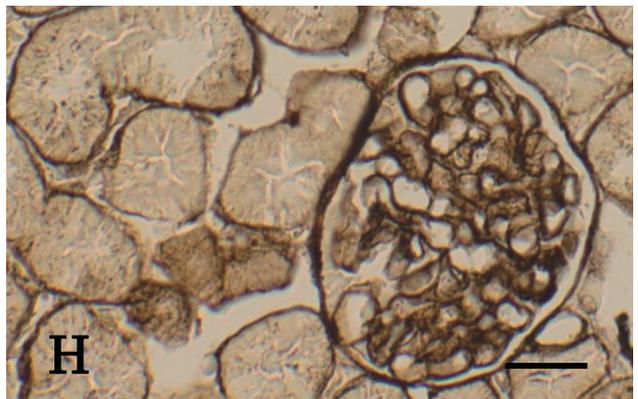
E : S-HID (10 mg/kg 投与群)



F : T-Hylase/S-HID (10 mg/kg 投与群)



G : S-HID (50 mg/kg 投与群)



H : T-Hylase/S-HID (50 mg/kg 投与群)

## 結果

Figure1の図 A, C, E, G は短肢症マウスの腎臓の切片に増感高鉄ジアミン (S-HID) 染色を施したもの, 図 B, D, F, H は S-HID 染色の前にウシ辜丸ヒアルロニダーゼ (T-Hylase) 消化を施した後に S-HID 染色を行ったものの光学顕微鏡写真である。

CHS 無投与群の腎臓の皮質では, 腎小体 (renal corpuscle : RC) および尿細管 (近位尿細管, 遠位尿細管, 集合管など) (renal tubule : RT) などの組織構造物を観察することができた。腎小体は腎糸球体とボーマン囊からなり, さらに腎糸球体は毛細血管, メサンギウム, 上皮細胞 (タコ足細胞) などから構成されている。S-HID 染色を施すと, これらの組織構造のうち, 腎糸球体, ボーマン囊および尿細管の基底膜が中等度ないし強陽性反応を示した。一方, 腎糸球体内にあるメサンギウム基質, ボーマン囊基底膜周囲, 尿細管基底膜周囲および尿細管間質の結合組織は, S-HID 反応性がほとんどないか, または弱陽性反応を示した。

2 mg/kg CHS 投与群では, 腎糸球体のメサンギウム基質, ボーマン囊基底膜周囲, 尿細管周囲および尿細管間質の結合組織の S-HID 染色性に, ごく僅かな増強が見られた (Figs. A,C)。10 mg/kg および 50 mg/kg CHS 投与群では, 投与量依存性に腎糸球体のメサンギウム基質, ボーマン囊基底膜周囲, 尿細管周囲および尿細管間質の結合組織の S-HID 染色性が増強した (Figs. E,G)。また, 腎糸球体基底膜, ボーマン囊基底膜および尿細管基底膜の S-HID 染色性はほとんど変化を示さなかった (Figs. A,C,E,G)。

ウシ辜丸ヒアルロニダーゼ (T-Hylase) 消化を施すと, 腎糸球体のメサンギウム基質, ボーマン囊基底膜周囲, 尿細管基底膜周囲および尿細管間質の結合組織の S-HID 染色性が顕著に減弱したが, 腎糸球体基底膜, ボーマン囊基底膜ならびに尿細管基底膜の S-HID 染色性はほとんど変化しなかった (Figs B,D,F,H)。

## 考察

グリコサミノグリカン (GAGs) は, アミノ糖とウロン酸の 2 糖の繰り返し構造からなる。これらは多数の硫酸基とカルボキシル基を持つために, 強く陰性に帯電している。多くの GAGs は, コアタンパク質と結合してプロテオグリカンの形で存在している<sup>31)</sup>。GAGs には, コンドロイチン硫酸 (CHS), デルマトン硫酸, ヘパリン, ヘパラン硫酸, ケラタン硫酸, ヒアルロン酸などの種類がある。

今回実験対象とした腎臓では, 腎糸球体基底膜, ボーマン囊基底膜ならびに尿細管基底膜等にはヘパラン硫酸を含むパーレカンなどの基底膜型プロテオグリカンが, 腎糸球体メサンギウム基質にはロイシンに富む繰り返し配列を持つ小型のプロテオグリカンファミリーのビブリカンと, ヘパラン硫酸およびコンドロイチン硫酸を結合した膜貫通型プロテオグリカンであるシンデカンなどが含まれている。また, 尿細管の間質には結合組織に広く分布している小型のプロテオグリカンであるデコリンやパーシカンが含まれていることがすでに報告されている<sup>18-25,31-33)</sup>。

今回用いた増感高鉄ジアミン (S-HID) 染色は, 組織中の硫酸基を検出する染色法で, S-HID 陽性部位には, 硫酸基を多く含む生体高分子である GAGs や硫酸化糖タンパク質などが存在するものと考えられる<sup>25,33,34)</sup>。今回の実験結果では S-HID 染色により, 腎臓の糸球体にある毛細血管基底膜, メサンギウム基質およびボーマン囊基底膜, 尿細管基底膜, ならびに腎小体や尿細管周囲の間質の結合組織が, 種々の強さの褐色から黒色の陽性反応を示した。S-HID 染色の染色特性から, 腎組織のこれらの染色性の強い部位には硫酸基が存在することが明らかとなった<sup>26,34,35)</sup>。S-HID 染色と併用して消化法に用いたウシ辜丸ヒアルロニダーゼ (T-Hylase) は, ヒアルロン酸, コンドロイチン, CHS-A, C などを酵素基質としていることが知られている<sup>27-30)</sup>。この CHS-A および C は硫酸基を持っているが, ヒアルロン酸やコンドロイチンは硫酸基を持っていないので S-HID 染色により染色されることはない。S-HID 染色の硫酸基に対する染色特異性と, T-Hylase 消化による基質特異性から判断すると, T-Hylase 消化により S-HID 染色性が減弱した組織部位には, CHS-A および C が存在することを特定することができる。これらの点を考慮すると, 本実験結果において, T-Hylase 消化により S-HID 反応性が減弱した, 短肢症マウスの腎糸球体のメサンギウム基質, ボーマン囊基底膜周囲ならびに尿細管の基底膜周囲ならびに間質の結合組織には, CHS-A および C が含まれていることが明らかとなった。また, T-Hylase 消化により影響を受けなかった, 基底膜には CHS-A,C があまり含まれていなかったと考えられる。

遺伝子異常により GAGs が低硫酸化している短肢症マウスは, 正常マウスよりも CHS-A,C の硫酸基の量が少ないと考えられる。今回短肢症マウスに正常に硫酸化している CHS-A,C を経口投与した結果, 以下の 3 つの所見を得た。1) 腎糸球体のメサンギウム基質やボーマ

ン囊基底膜周囲ならびに尿細管の基底膜周囲や間質の結合組織の S-HID 染色性が増加した。この所見は、経口投与した正常に硫酸化した CHS-A,C が腎臓の組織内で再構築され低硫酸化が改善されたものと解された。また、2) S-HID の染色性の変化ならびに T-Hylase 消化による S-HID の染色性の低下の度合いに鑑みて、腎臓の組織部位における低硫酸化の改善は、CHS-A,C の投与量に依存しているものと解された。3) 今回、低硫酸化した動物を用いることによって、CHS-A,C の腎組織への取り込みを組織化学的に容易に検出することが確認できた。

本研究において、経口投与した CHS-A,C が腎組織に存在する CHS の組成に影響を与えることを観察できたことは興味深く、序論で述べた腎疾患等に対して、今後の CHS 製剤の経口投与への可能性を導くものと考えられる。また、将来的には、CHS 投与による腎機能の変化についての検索や、短肢症マウスに CHS を投与し続けた時、加齢による腎糸球体のメサンギウム基質の増殖を抑えることができるかどうか検討することが課題となると考える。

## 利益相反

本研究に関して、開示すべき利益相反事項はない。

## 参考文献

- 1) Kurima K, Warman ML, Krishnan S, Komowicz M, Krueger-JR RC, Deyrup AD, Schwartz NB, A member of a family of sulfate-activating enzymes causes murine brachymorphism, *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 8681-8685 (1998)
- 2) Lane P, Dickie M, Three recessive mutations producing disproportionate dwarfing in mice, *J Hered*, **59**, 300-308 (1968)
- 3) Orkin RW, Pratt RM, Martin GR, Undersulfated chondroitin sulfate in the cartilage matrix of brachymorphic mice, *Develop Biol*, **50**, 82-94 (1976)
- 4) Schwartz NB, Ostrowsky V, Brown KS, Pratt RM, Defective PAPS synthesis in epiphyseal cartilage from brachymorphic mice, *Biochem Biophys Res Commun*, **82**, 173-178 (1978)
- 5) Sugahara K, Schwartz NB, Defect in 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate formation in brachymorphic mice, *Proc Natn Acd Sci USA*, **76**, 6615-6618 (1979)
- 6) Sugahara K, Schwartz NB, Defect in 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthesis in brachymorphic mice. I. Characterization of the defect, *Arch Biochem Biophys*, **214**, 589-601 (1982)
- 7) Sugahara K, Schwartz NB, 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthesis in brachymorphic mice. II. Tissue distribution of the defect, *Archs Biochem Biophys*, **214**, 602-609 (1982)
- 8) Orkin RW, Williams BR, Cranley RE, Poppke DC, Brown KS, Defects in the cartilaginous growth plates of brachymorphic mice, *J Cell Biol*, **73**, 287-299 (1977)
- 9) Greene RM, Brown KS, Pratt RM, Autoradiographic analysis of altered glycosaminoglycan synthesis in the epiphyseal cartilage of neonatal brachymorphic mice, *Anat Rec*, **191**, 19-30 (1978)
- 10) Yamada K, Shimizu S, Brown KS, Kimata K, The histochemistry of complex carbohydrates in certain organs of homozygous brachymorphic (bm/bm) mice, *Histochem J*, **16**, 587-599 (1984)
- 11) Wikstrom B, Gay R, Gay S, Hjerpe A, Mengarelli S, Reinholt FP, Engfeldt B, Morphological studies of the epiphyseal growth zone in the brachymorphic (bm/bm) mouse, *Virchows Arch (Cell Pathol)*, **47**, 167-176 (1984)
- 12) Wezeman FH, Bollnow MR, Immunohistochemical localization of fibroblast growth factor-2 in normal and brachymorphic mouse tibial growth plate and articular cartilage, *Histochem J*, **29**, 505-514 (1997)
- 13) Hirabayashi Y, Fujimori O, Availability of brachymorphic mice as undersulfated animals, *J Nagoya Bunri Univ*, **15**, 45-53 (2015)
- 14) Rohdin JAG, Kidney, In: *Histology, text and atlas*, New York/Oxford university Press, 648-666 (1974)
- 15) 坂井建雄, 河原克雅, 腎臓の概要, カラー図解 人体の正常構造と機能 V 腎・泌尿器系, 第1版, 日本医事新報社, 10-15 (2005)
- 16) 坂井建雄, 河原克雅, 腎小体, カラー図解 人体の正常構造と機能 V 腎・泌尿器系, 第1版, 日本医事新報社, 16-29 (2005)
- 17) Hirabayashi Y, Abnormality of glomerular basement membrane in aging brachymorphic mice, *J Nagoya Bunri Univ*, **17**, 63-72 (2017).
- 18) Abrahamson DR, Leardkamolkarn V, Development

- of kidney tubular basement membranes, Symposium on the Cell Biology of the Tubulointerstitium 39, 382-393 (1991)
- 19) McCarthy KJ et al, Basement membrane proteoglycans in glomerular morphogenesis: chondroitin sulfate proteoglycan is temporally and spatially restricted during development, *J Histochem Cytochem* 41, 401-414 (1993)
  - 20) McCarthy KJ et al, Basement membrane-specific chondroitin sulfate proteoglycan is abnormally associated with the glomerular capillary basement membrane of diabetic rats, *J Histochem Cytochem* 42, 473-484 (1994)
  - 21) Wu R-R et al, cDNA cloning of the basement membrane chondroitin sulfate proteoglycan core protein, bamacan: a five domain structure including coiled-coil motifs, *J Cell Biol* 136, 433-444 (1997)
  - 22) Hara S, et al. Expression of connective tissue growth factor in human diabetic nephropathy, *Clin Exp Nephrol* 8, 23-30 (2004)
  - 23) Genovese F et al, The extracellular matrix in the kidney: a source of novel non-invasive biomarkers of kidney fibrosis? *Fibrogenesis Tissue Repair* 7:4 doi:10.1186/1755-1536-7-4 (2014)
  - 24) Taylor S et al, The metalloproteinase ADAMTS5 is expressed by interstitial inflammatory cells in IgA nephropathy and is proteolytically active on the kidney Matrix, *J Immunol* 205, 2243-2254 (2020)
  - 25) Rudnicki M et al, Increased renal versican expression is associated with progression of chronic kidney disease, *PLoS One*, 14,7(9),e44891.doi (2021)
  - 26) Hirabayashi Y, Light-microscopic detection of acidic glycoconjugates with sensitized diamine procedures. *Histochem J*, 24, 409-418 (1992)
  - 27) Leppi TJ, Stoward PJ, On the use of testicular hyaluronidase for identifying acid mucins in tissue sections. *J Histochem Cytochem* 13, 406-407 (1965)
  - 28) 平林義章, 磯貝文典, 山田和順, 結語組織酸性複合糖質の光顕組織化学における酵素消化法の活用法. 結合組織, 24, 193-197 (1992)
  - 29) 平林義章, 酸性複合糖質の選択的検出法, 日本組織細胞化学会 (編), 細胞組織化学1996, 学際企画, 91-95 (1996)
  - 30) 平林義章, プロテオグリカンの組織化学. 名古屋文理大学紀要, 13, 133-140 (2013)
  - 31) Lander AD, Proteoglycans, In *Guidbook to the Extracellular Matrix, Anchor, and Adhesion Proteins*, 2nd ed, Krei T & Vale R (eds), Oxford Univ Press, 351-356 (1999)
  - 32) Pyke C, Kristensen P, Ostergaard PB, Oturai OS Romer J, Proteoglycan expression in the normal rat kidney, *Nephron* 77, 461-470 (1997)
  - 33) Schaefer L, Gröne HJ, Raslik I, Robenek H, Ugorcakova J, Budny S, Schaefer RM, Kresse H, Small proteoglycans of normal adult human kidney: distinct expression patterns of decorin, biglycan, fibromodulin, and lumican, *Kidney Int* 58, 1557-1568 (2000)
  - 34) Spicer SS, Diamine methods for differentiating mucosubstances histochemically, *J Histochem Cytochem* 13, 211-234 (1965)
  - 35) Spicer SS, Horn RG, Leppi TJ, Histochemistry of connective tissue mucopolysaccharides. In the *Connective Tissue*, Wagner BM & Smith DE (eds), Williams & Wilkins, 251-303 (1967)