

ラット胎仔由来後腎・尿管・膀胱の臓器再生における画像診断の  
有用性と尿路再建適期に関する検討

西 晃太郎

Availability of diagnostic imaging and timing urinary tract  
reconstruction in the organ regeneration of fetal metanephros in rats

Kotaro NISHI

## 目次

I . 序論 .....	1
II . 第一章：造影 CT 検査と超音波検査を用いた MNB の経時的評価法の検討	
1. 緒言 .....	6
2. 材料及び方法 .....	8
2-1. 供試動物 .....	8
2-2. MNB 分離 .....	8
2-3. MNB 移植・SWPU 実施法 .....	8
2-4. 造影 CT 検査を用いた MNB の評価 .....	9
2-5. 超音波検査を用いた MNB の評価 .....	10
2-6. 病理組織学的検査 .....	11
2-7. 統計処理 .....	11
3. 実験結果 .....	13
3-1. 造影 CT 検査と超音波検査による MNB の検出 .....	13
3-2. 造影 CT 検査と超音波検査による MNB の体積における 相関関係 .....	14
3-3. MNB1 と MNB2 における病理組織学的評価：尿細管の拡張、 間質の線維化 .....	14
4. 考察 .....	15
付図表および説明	
III . 第二章：MNB の成長に対する性差の影響の検討	

1. 緒言 .....	33
2. 材料及び方法 .....	34
2-1. 供試動物 .....	34
2-2. MNB 分離 .....	34
2-3. MNB 移植法 .....	34
2-4. 超音波検査を用いた MNB の評価 .....	35
2-5. MNB 膀胱からの採尿 .....	35
2-6. レシピエントラットの情報と血液検査 .....	35
2-7. 病理組織学的検査 .....	36
2-8. 統計処理 .....	36
3. 実験結果 .....	38
3-1. ラットの身体情報と血液検査結果 .....	38
3-2. 超音波検査により算出した MNB の体積 .....	38
3-3. 28 日間発育した MNB の貯尿量 .....	39
3-4. 病理組織学的検査所見 .....	39
4. 考察 .....	40

付図表および説明

#### IV. 第三章：MNB の経時的評価による SWPU 適期の検討

1. 緒言 .....	53
2. 材料及び方法 .....	55
2-1. 供試動物 .....	55
2-2. MNB 分離 .....	55
2-3. SWPU 適期に対する仮説の設定 .....	55



2-4.	実験方法 .....	55
2-5.	超音波検査を用いた MNB、MNB 膀胱体積測定法 .....	56
2-6.	病理組織学的検査 .....	56
2-7.	統計処理 .....	57
3.	実験結果 .....	57
3-1.	MNB 移植から MNB 採取までの日数 .....	58
3-2.	MNB の採取日数と尿細管拡張面積における相関 .....	58
3-3.	採取した MNB における尿細管拡張と線維化の Day21 以前と以降での比較 .....	58
4.	考察 .....	59

付図表および説明

## V. 第四章：SWPU 適期に尿路再建を実施した場合の MNB の発育

1.	緒言 .....	67
2.	材料及び方法 .....	69
2-1.	供試動物 .....	69
2-2.	MNB 分離 .....	69
2-3.	実験方法 .....	69
2-4.	超音波検査を用いた MNB、MNB 膀胱体積測定法 .....	70
2-5.	病理組織学的検査 .....	70
2-5-1.	TGF- $\beta$ 1 染色	
2-5-2.	Vimentin 染色	
2-5-3.	Collagen- $\alpha$ 1 Type1 染色	
2-5-4.	TUNEL 染色	

2-6. 糸球体濾過量測定 .....	73
2-7. 統計処理 .....	73
3. 実験結果 .....	74
3-1. 両群における採取した際の MNB の外観 .....	74
3-2. 56 日間発育した MNB の糸球体濾過量 .....	74
3-3. 尿細管拡張と線維化における評価 .....	74
3-4. TUNEL 染色による後腎におけるアポトーシス割合 .....	75
3-5. TGF- $\beta$ 1 とアポトーシスの相関性 .....	75
4. 考察 .....	76
付図表および説明	
<b>VI. 総括 .....</b>	<b>90</b>
<b>VII. 謝辞 .....</b>	<b>93</b>
<b>VIII. 引用文献 .....</b>	<b>95</b>

## I. 序論

慢性腎臓病(Chronic Kidney Disease: CKD)は高齢の犬や猫に一般的にみられる腎疾患である[9]。高齢猫では1.0~3.0%、高齢の犬では0.5~1.0%の割合で発症するとされ、慢性疾患を持つ猫の中で2番目、犬では3番目に多い死因となっている[22]。CKDの定義は、片側あるいは両側の腎臓の構造的および/または機能的障害が、約3ヶ月以上継続している状態とされている。CKDは不可逆的かつ進行性の病態であり、最終的に腎臓は線維化を引き起こして縮小し、腎機能は廃絶する。

猫のCKDは、特に、高齢猫において多く見受けられ、15歳以上で80%以上の有病率であり、増加傾向にある[66,88]。近年、Sugisawaらは、急性腎障害(Acute Kidney Disease: AKI)に陥った際に、マクロファージから分泌されるApoptosis inhibitor of macrophage(AIM)というタンパク質が、尿細管を閉塞した死細胞に蓄積し、これにより上皮細胞が起こることを明らかにした[97]。しかしながら、通常AIMは血液中でIgMと結合して存在し、特異的なイベント(AKIを含む)が起こることでIgMから解離して、尿中に移行することで作用するが、猫では他の動物種と比較してAIM-IgM結合親和性がかなり高いため、この機序が作用しないことがわかった[97]。これは、猫におけるCKDがAKIから移行しやすい要因であると考えられ、CKDの有病率が高いことを示唆する一つの要因となりうることから、その他の動物種より重要な疾患と捉える必要がある。CKDの発症に関わる要因として、まず年齢が挙げられ、そのほかにも疑われる要因としては性別、体重、歯周病、食事、飲水、高血圧、高血糖、感染など多岐にわたる[10,42,80,85, 88,96,108]。一方、尿路結石症とCKDの

関連性が指摘されており[27]、近年、特に上部尿路におけるシュウ酸カルシウム結石症の発生が増加していることとの関係性を考える必要がある[50]。猫の尿管内腔は 0.4 mm 程度と非常に細いため、尿管結石や細胞成分による閉塞が治療されずに残存し続けることで慢性経過を辿る可能性が高い[11,62]。シュウ酸カルシウム結石は、内科的治療では溶解できず、外科的手術の適用となるため腎臓への侵襲は不可避となる。加えて、猫の閉塞性尿路疾患における AKI の臨床徴候は非特異的であり[31,36,61]、片側に尿管閉塞が存在するにも関わらず、もう片方の腎臓が正常に機能している場合には、明らかな臨床症状が発現しないためにしばしば発見が遅くなる。このことも、猫において CKD の発生率が高まる原因の一つであると考えられる。猫が CKD に罹患した場合、動物病院へ来院する機会が多くなるため、飼い主の医療費負担が問題となっている。アニコム損保が行った 2017~2018 年の 1 年間における調査では、猫の保険請求理由の第一位が CKD であり、1 頭あたりの年間平均診療費は 30 万円弱であるとしている[5]。これらのことから、飼い主は時間的負担、経済的負担を強いられる可能性が高く、加えて、猫は動物病院へ通うことのストレスを受けることとなる[45]。

現在、獣医療において慢性腎臓病の治療は、血中の尿素窒素の軽減や血流量の維持を目的とした輸液療法、組織的な病態進行の抑制を目的としたアンギオテンシン変換酵素阻害薬 (Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor: ACE-I) やアンジオテンシ II 受容体拮抗薬 (Angiotensin II Receptor Blocker: ARB) による薬物療法、タンパク質やリンを制限した食餌療法、腹膜/血液透析による尿毒症物質の除去と電解質平衡の維持を目的とした腎代替療法などが挙げられる

[2,12,16,29,86]。しかし、これらの治療法は根治的な治療法ではなく、不可逆的に進行する慢性腎臓病の寛解は腎移植以外に存在しない。腎移植は、人のみならず犬や猫において、有効な根治的治療法である[6]。生体間腎移植はタクロリムスやミコフェノール酸モフェチルのような精良な免疫抑制剤が創製されたことにより、終末期のCKDに対する一般的な治療法となった反面、人ではドナー不足が大きな問題となっている。さらに、腎臓提供後に片腎になったドナーにおける腎臓病のリスクが危惧されており、動物医療では腎移植を実施している施設はごくわずかである。これらの状況を打破するために、新規の腎臓代替療法が必要とされている。たとえば、多能性幹細胞を使用して腎臓を再生する試みがなされ、人の幹細胞を使用して、*In Vitro* においてネフロンおよび尿管芽前駆細胞が再生可能であることを示した報告がある[101,102]。この中では、培養液内で良好に成熟した組織オルガノイドには、分化中のネフロン、間質、および血管系が含まれていることを確認し、さらに、人の幹細胞の使用により、人胎児の腎臓に類似したオルガノイドの生成が可能となった。しかしながら、得られた腎臓組織は正常の腎臓と比較しても著しく小さく、尿細管や糸球体血管新生が未熟なこと、尿中排泄経路の必要性など、いくつかの問題が影響して、尿生成が困難であった[103]。

これらの問題を克服するため、胎仔の臓器を分離して使用する再生方法が模索されている。腎臓となる固有の能力を備えた臓器原基の移植再生は、細胞からの工学的なアプローチに加えて大きな利点を持っていることが指摘されている[53]。1つ目として臓器原基は器官形成がすでに開始しており、成熟した複雑な構造を細胞から作り上げる必要性を軽減している。2つ目として移植片がレシピエン

ト血管から血管新生を誘導するため、異種源であったとしても、部分的に免疫寛容を起こしうる。さらにこの方法を応用したものとして、胎仔由来の後腎・尿管・膀胱(Metanephros with bladder: MNB)を一塊として分離し、レシピエント体内で腎臓を作成する方法が注目されている[116]。胎仔から分離した MNB をレシピエント体内に移植することにより、生体内でレシピエントからの血管新生が起こり、MNB 後腎領域(以下 MNB 後腎)からの尿生成、MNB の膀胱領域(以下 MNB 膀胱)への尿貯留が認められる。体内に移植した後腎はエリスロポエチン産生、レニン産生による血圧の維持のような機能が確認されており[68,114,118]、現在、多く存在する腎臓再生研究の中においても、完全な機能を持つ腎臓が発育する臓器再生研究の一つである。

しかしながら、移植臓器が成長するだけでは、生成された尿を排泄するための経路は発生しない。したがって、後腎のみを移植し再生した場合は、水腎症に陥り、結果として無機能腎となる可能性があった[39,113,116]。これは、発達した MNB 膀胱とレシピエント尿管を吻合する段階的蠕動尿管(Stepwise Peristaltic Ureter: SWPU)システム(以下 SWPU と表記)と呼ばれる新たな尿路再建法を開発したことで解決した[116]。この新しい尿路再建法により、MNB から生成された尿を継続的にレシピエントの尿管を介してレシピエントの膀胱に排泄することが可能となった。しかしながら、これまで適切な時期とされたタイミングでの SWPU 実施にもかかわらず、水腎化や線維化が認められることが多かった。このことは MNB の成長に差が存在する可能性があり、成長段階における SWPU の最適な尿路再建時期を見極めることが重要と考えられる。[39,116]。また、水腎症

などの腎後性腎障害および閉塞解除の遅延は、腎実質に器質的な傷害を与える[20,21,104]。さらに、人の胎児期における尿路閉塞は、後腎の発達異常を引き起こすことが示されている[52]。したがって、胎仔由来の移植片でも、閉塞の早期緩和により、その後の腎機能が大幅に改善されることが予想される。

豚、犬、または人のように実際の臨床を意識した大型実験動物や臨床現場における MNB 再生の場合、体格や性別、年齢のような個体差が移植片に及ぼす影響は重要であることが推定され、結果を決定する重要な要因となりうる。したがって、SWPU を実施するための適切な時期は、臨床現場で MNB の発育を頻繁に観察するために使用できる低侵襲な診断法を使用して決定する必要がある。日常の診療では、造影コンピュータ断層撮影(CT)、特に超音波検査を含む画像診断法が、低侵襲で体内の組織や臓器の状態を簡便に評価するために使用されている。

したがって、本研究では、腎臓再生の基礎研究として、ラットを用いた画像解析による MNB の経時的かつ低侵襲な形態学的評価法の確立と、画像診断結果と組織学的検討から SWPU の適切な実施時期の条件を確立することを目的とした。

## II. 第一章：造影 CT 検査と超音波検査を用いた MNB の経時的評価法の検討

### 1. 緒言

これまで、腎臓再生医療研究として、さまざまな試みがなされてきた。後腎移植・再生法はその代表的な例の一つである。しかしながら、移植された後腎や MNB の発育過程を詳細に追跡した報告はなく、開腹下で確認されることが主であった。したがって、血管新生や、尿生成のタイミング、MNB 後腎や膀胱の位置のような形態的情報に乏しく、尿路再建時期についても不明確であった。

体内の臓器や組織を観察する一般的な方法として、X 線検査、コンピュータ断層撮影 (Computed Tomography: CT)、核磁気共鳴画像 (magnetic resonance imaging: MRI)、超音波検査のような画像診断法があげられる。X 線検査は、簡便であるが、2 次元的な画像に限られ、立体的な臓器把握や詳細な組織像が捉えにくい。CT 検査は、放射線を用いて、体内を連続的に観察し、かつ立体的に構築することが可能な撮影法である。特に、造影剤を使用して行う造影 CT 検査は、血管を詳細に描出するだけでなく、造影剤が腎臓から排泄されることを利用して、排泄性尿路造影 (IVP) が行われる。以前、Iwai らは、MNB を SWPU によって尿路再建したのち、IVP による CT 検査を行ったところ、MNB 膀胱からレシピエント尿管への開通性を明らかにした (図 1) [116]。さらに、吻合部の尿路上皮は、ウロプラキン III の免疫組織染色により連続性が認められ、開通性を画像診断と組織学的評価から明らかにした。造影 CT 検査と同様に、体内の組織や臓器構造を把握する方法として MRI が挙げられる。MRI は放射性被曝がなく、画像のコントラストが CT 検査より比較的高いことが利



点として挙げられる。しかしながら、動物において MRI は鎮静または麻酔の使用や CT 撮影と比較して長時間の撮影時間であることから、頻回の検査に適していない。超音波検査は、造影 CT 検査ほど広範囲かつ立体的な臓器の画像描出は難しいものの、その低侵襲かつ簡便な検査手技は、患者への負担軽減と経時的な評価には最適である。さらに、超音波検査を用いると、膀胱や胆嚢のように内容物が液体状の場合、均一な低エコー状の袋状として描出される。これは、MNB の拡張した膀胱や水腎化した MNB の後腎が容易に観察できる可能性を示し、MNB の経時的評価には極めて有用性が高いと考えられる。

したがって、本章の目的は、MNB の大きさや状態を把握するため、超音波検査と造影 CT 検査を用いて MNB を画像診断学的に評価し、形態学的な変化を経時的に観察することとした。

## 2. 材料及び方法

### 2-1. 供試動物

これまでの研究において、移植に適していることが明らかな胎齢 15 日目のラット胎仔の後腎、尿管、膀胱を使用した[1,44]。MNB 分離のため、妊娠ラットとして、妊娠 15 日目、雌の Lewis ラット 7 匹(日本チャールズリヴァー株式会社、神奈川県、日本)を用いた。レシピエントラット(臓器受給動物)として 11 週齢、体重 293~333g(309.3 ±11.9g)の Lewis ラット雄 12 匹(日本チャールズリヴァー株式会社、神奈川県、日本)を用いた。飼育管理は、北里大学獣医学部動物実験指針および実験動物の飼育管理マニュアルに従って行った。(承認番号 No:17-127)

### 2-2. MNB 分離

胎齢 15 日目の妊娠ラットをイソフルラン(イソフル®、ゾエティス・ジャパン株式会社、東京、日本)で麻酔導入、維持した。腹部正中切開にて子宮を無菌的に摘出し、ハンクス平衡塩液(Hank's Balanced Salt Solution: HBSS, gibco®、Life Technologies Corporation、カリフォルニア州、アメリカ)内で胎仔を摘出した。手術用顕微鏡(ライカ M320F12®、ライカマイクロシステムズ株式会社)下で、ラット胎仔より後腎、尿管、膀胱を一塊(MNB)として採取した。MNB を含む HBSS は移植直前まで氷上にて保存した。

### 2-3. MNB 移植・SWPU 実施法

移植プロトコルを図 2 に示した。レシピエントラットをイソフルランで麻酔導入、維持した。これまでの研究から、大動脈近傍に後

腎や MNB を移植すると発育が良好であることが明らかとなっているため[26,118]、腹部正中を切開後、腸管を体外に牽引し、後腹膜および腹部大動脈を露出した。手術用顕微鏡下でマイクロ鑷子により後腹膜に小切開を加え、腹部大動脈近傍の後腹膜下腔に 1 個目の MNB(MNB1)を移植した(Day0)。移植後、切開した後腹膜を 6-0 非吸収性縫合糸(PROLINE®、ジョンソン・エンド・ジョンソン株式会社、東京、日本)で 1 糸縫合した。腸管を腹腔内に戻した後、3-0 非吸収性縫合糸(PROLINE®、ジョンソン・エンド・ジョンソン株式会社、東京、日本)で腹壁と皮膚をそれぞれ連続縫合により閉創した。MNB1 移植後 28 日目(Day28)に、MNB1 と同様の方法で採取した 2 個目の MNB(MNB2)を上記と同様に移植し、MNB2 は MNB1 よりも頭側に移植することで区別した。同時に、無作為にレシピエントを選択し、MNB1 に SWPU を実施する群(SWPU 群；n=8)と SWPU を実施しない群(non-SWPU 群；n=4)に分類して、さらに 28 日間、Day56 まで経過観察した。

SWPU 法の概略を図 3 に示した。まず、レシピエントラットの左腎動静脈および尿管を腎門付近で分離・結紮し、左腎摘出を行った。摘出後、切離した左側尿管と同径の切開を MNB 膀胱に加え、11-0 ナイロン(11-0 黒ナイロンモノフィラメント、ケイセイ医科工業株式会社、東京都、日本)で 4 糸の単純結紮縫合を行った。SWPU 実施後、3-0 非吸収糸で腹壁と皮膚をそれぞれ連続縫合して閉創した。

#### 2-4. 造影 CT 検査を用いた MNB の評価

撮影には、16 列マルチスライス CT(Aquilion16、東芝メディカルシステムズ株式会社、栃木、日本)を用いた。Dynamic CT モードにて

管電圧 80kV、管電流 150mA、撮像回転速度 0.5 秒/1 回転、スライス厚は 0.5mm に設定した。被曝線量は 392.7mGy に統一した。MNB1 の移植後 45 日目 (Day45) と 52 日目 (Day52) にラットをイソフルランで麻酔導入、維持し、撮影体位は仰臥位に統一した。造影 CT 検査には、ヨード造影剤であるイオヘキソール(オムニパーク®300 注 20mL 尿路・血管用、第一三共株式会社、東京都、日本)を 0.3mL/head で尾静脈よりボラス投与し、30 分後に撮影を実施した。撮影画像を CT 撮影装置にて再構成、画像構築した後、DICOM ビューアソフトである OsiriX を使用した。体積の算出方法は、断面図から MNB の関心領域を設定し、体積算出を行った。

#### 2-5. 超音波検査を用いた MNB の評価

超音波診断には、超音波診断装置 (LOGIQ S8 with XDclear®、GE ヘルスケア・ジャパン株式会社、東京都、日本) と、プローブとして 3-11MHz のリニアアレイ型プローブ (11L-D、GE ヘルスケア・ジャパン株式会社、東京都、日本) を用いた。表示モードは B モードにし、ゲインを 90、デプスを 2.3~2.5 に設定した。また、カラー Doppler モードを使用することで腹部大動脈と後大静脈をリファレンスとして、近傍に移植された MNB の探索を行った (図 4)。検査を行う際は、ラットをイソフルランで麻酔導入、維持し、腹部の毛刈りを行い、体位は仰臥位に統一した。

MNB1 の移植後 7 日目 (Day7) から 56 日目 (Day56) まで 7 日毎に超音波検査を行い、MNB の長さ (L)、横幅 (W)、高さ (H) を測定した。また、移植後 45 日目 (Day45) と 52 日目 (Day52) には、造影 CT 検査も同時に実施した。

MNB を回転楕円体と仮定し、回転楕円体の体積の公式である  $\pi /6(\approx 0.52) \times L \times W \times H$  に値を代入し、MNB の体積を算出した(図 4)。

## 2-6. 病理組織学的検査

Day56 に MNB を採取して、固定液(アルテフィックス、株式会社ファルマ、東京、日本)で固定を行い、病理組織学的検査を行った。固定した MNB 組織を、パラフィン包埋し、2 $\mu$ m に薄切処理後、Hematoxylin-Eosin(HE)染色および、Masson-trichrome(MT)染色を行った。染色したスライドは、顕微鏡用デジタルカメラ(cellSens、オリンパス株式会社、東京、日本)を用いて盲検的に選択した 1 スライドにつき無作為に 20 視野を撮影した。画像は画像解析ソフト ImageJ®(National Institutes of Health、メリーランド、アメリカ)を用いて HE 染色では尿細管の拡張、MT 染色は後腎の線維化を盲検的に評価した。評価は、画像解析ソフト ImageJ で領域の面積を算出して行った。

## 2-7. 統計処理

結果は平均値±標準偏差値で表した。すべての統計分析は、生物統計学で頻繁に使用される統計関数が追加された R コマンダーの修正バージョンである EZR(埼玉医療センター、自治医科大学、埼玉、日本)[56]を使用して実施した。造影 CT 検査と超音波検査により算出した MNB 体積の相関性は Spearman's 順位相関係数を使用した。超音波検査により算出した MNB 体積の経時的な差の比較に Paired t-test を使用した。Mann-Whitney U test は尿細管拡張、間質線維化における群間の比較に使用した。すべての検定は、危険率  $p < 0.05$  を

もって統計的に有意差ありと判定した。

### 3. 実験結果

本章は、造影 CT 検査と超音波検査を使用し、2つの移植した MNB の形態学的評価を実施した。最初に移植した MNB は MNB1(n=12)とし、2番目に移植した MNB は MNB2(n=12)とした。また、Day28 に MNB1 で SWPU を実施した群を SWPU 群(n=8)、実施しなかった群を non-SWPU 群(n=4)とした。

#### 3-1. 造影 CT 検査と超音波検査による MNB の検出

造影 CT と超音波検査により、Day21 までにすべての MNB を同定し、評価することが可能であった(図 5,6)。しかし、造影 CT 検査では、MNB 体積の輪郭は判断でき、体積の算出は可能であったが、MNB や MNB 膀胱の造影強調を多くの個体で認められず、水腎症の MNB や MNB 膀胱を詳細に評価することが困難であった(図 5)。レシピエントの尿管や膀胱は造影強調を示しており、Day28 時点の既存の腎臓からの排泄が認められた。一方で、超音波検査は腹部大動脈、後大静脈をリファレンスとして、MNB を明確かつ早期に検出することが可能であった。さらに、超音波検査は、MNB1(Day0 に最初に移植した MNB)と MNB2(Day28 に 2 番目に移植した MNB)の両方を 100% 識別できた(表 1)。超音波検査による MNB の描出像は、背側にある筋膜と腹側にある後腹膜で作られる後腹膜下腔に挟まれ、円柱体の構造を示しており、その内部には実質または液体を含む袋状の構造を示した(図 6)。

造影 CT 検査と超音波検査により算出した MNB の体積を表 2 に示した。超音波検査により、正常と考えられた MNB の画像は液胞が 1 つのみであり、一方、水腎症の MNB はいくつかの液胞が集簇

した像を呈した(図 6,7)。さらに、MNB の周囲に走行する血管をカラードップラー法にて観察したところ、一部の血管では明瞭に観察でき、MNB 内部へ走行する様子が確認できた(図 8)。

### 3-2. 造影 CT 検査と超音波検査による MNB の体積における相関関係

造影 CT 検査と超音波検査を使用して測定した各 MNB 体積の相関は、強い正の相関を示しており、日数の経過とともにさらに強くなった(Day45 : MNB1、 $R = 0.78$ ; MNB2、 $R = 0.79$  および Day52 : MNB1、 $R = 0.90$ ; MNB2 =  $0.94$ )(図 9)。

尿量における相関では、特に、Day28 に MNB1 膀胱から採取した尿量が、超音波検査にて回転楕円体の公式を使用して測定した MNB 膀胱体積と強い正の相関を示した( $R = 0.79$ )(図 10)。

### 3-3. MNB1 と MNB2 における病理組織学的評価：尿細管の拡張、間質の線維化

MNB1 における尿細管の拡張は、SWPU の実施に関係なく、拡張を呈しており、しかしながら、SWPU 群で non-SWPU 群と比較して軽度であった( $p < 0.05$ )。MNB2 は両群ともに、28 日間の発育で尿細管の拡張が認められた。

間質の線維化では、MNB1 の SWPU 実施に関係なく、MNB1 と MNB2 の間で有意差は認められなかった。



#### 4. 考察

本章では、MNB の移植再生における評価法として簡便かつ経時的な画像診断を行うために、造影 CT 検査と超音波検査を選択し、実際に MNB の観察を行い、形態学的特徴や発育についての解析を行った。

観察結果から、造影 CT 検査、超音波検査ともに MNB の観察は可能であった。造影 CT 検査は、小さい腫瘤状構造物を詳細に検出でき、算出した大きさは実際の寸法に近似していたため、本研究の造影 CT 検査による MNB 体積測定値が正確な体積の指標であると考えた。造影 CT 検査では、MNB 体積を評価することが可能であったものの、MNB 後腎または膀胱の造影強調を示さなかった。本来、非イオン性ヨウ素を基材とした造影剤であるイオヘキソールの単回静脈内投与は、ラットの血液から急速にクリアランスされ、組織内に移行する[76]。さらに、急速に腎臓に移動し、高濃度で分布することが知られている[76]。このため、Yokote らは以前、後腎移植の際に CT 検査により位置の特定や、MNB に造影 CT 検査を実施し、SWPU 後の尿路の開存性を確認した[116,117]。しかしながら、以前の報告にある MNB の開存性は、両方の腎臓を切除し、レシピエント尿管を結紮して血管造影を行うことで、排泄経路を MNB 後腎に集中させ、MNB とレシピエントの尿管を可視化した[116]。一方で、本研究では、レシピエントの片側腎臓が存在しており、レシピエント尿管や膀胱に造影剤の貯留が認められたことから、MNB に流入する前に造影剤が排泄したことが推察された。CKD の患者においては、糸球体濾過量の低下が認められるため、実際の臨床的な状況下を考慮した場合、MNB の造影増強が起こる可能性はあると考えられる。しか

しながら、動物や人における造影剤の投与は虚血性損傷や尿細管の空胞変性のような組織的变化をもたらし、造影剤腎症を誘発する可能性がある[49]。本研究の採取した後腎における病理組織学的検査では、尿細管拡張が著しいことや造影 CT 検査から時間経過が長いため、組織学的な評価による造影剤による影響は断定できなかった。後腎は尿生成を引き起こすまで時間があり、その期間における複数回の麻酔処置や放射線による被曝が MNB の形態や機能に与える影響の詳細は不明であるが、MNB の発育に何らかの影響を及ぼすリスクがあることが推察される。これらのことから、動物における MNB の経時的な評価に造影 CT 検査は推奨されないと考えられた。

超音波検査は造影 CT 検査と同様に、本研究におけるすべての個体で MNB を検出し、その形態的構造を評価可能であった。MNB を後腹膜下腔に移植したため、腸管などの腹腔臓器と区別され、後腹膜下腔の拡張により移植後早期の MNB を認識できた。後腎または MNB 移植により尿生成が発現することは以前に確認されていたため[26,39,113,116]、MNB 膀胱は超音波画像において低エコー源性で視覚化され、検索が容易になると予想した。実際に、超音波検査は 1~2cm 未満のラット MNB 膀胱に貯留した尿を観察可能であった。また、超音波画像による、水腎化を引き起こした MNB 後腎の実質は不明瞭であり、隔壁のような構造を伴う液胞として視覚化された。先天性水腎症の胎児および乳児では、重度の水腎症が発生した際に、超音波検査により腎臓の中隔および嚢胞が明らかになる場合がある[25,38,54,89]。これと同様に、MNB 後腎においても水腎化を判断可能であった。さらに、超音波検査を使用した回転楕円体の体積測定は、腎臓、甲状腺、および前立腺のような組織に使用した報告があ

る [8,51,65,77,87]。本研究において超音波検査と回転楕円体の公式を使用して算出した MNB 体積は、CT を使用して決定された体積と強く相関し、MNB 体積は非常に小さいにもかかわらず、MNB の安定した体積推定に有用であることが証明された。したがって、造影剤による侵襲と放射線被曝を伴う造影 CT 検査と比較して、超音波検査は MNB 評価のための簡便かつ低侵襲な方法として推奨できると考えられた。

本研究では、実際の臨床応用において複数個の MNB を移植する可能性を考慮し、2つの MNB を段階的に移植した。MNB1 において、SWPU の実施の有無に関係なく、MNB1 と MNB2 の間で線維化の程度に違いは観察されなかった。これは、Day56 までに、多くの後腎がすでに水腎症に陥っており、SWPU を実施したにもかかわらず、適切な SWPU の実施時期を逸した可能性があることを示唆していると考えられた。実際、以前の報告では、移植後 21 日目までに水腎症が発症する可能性について言及している [116]。今回、同様の発育期間における MNB1 と MNB2 の体積を比較した際に、個々の MNB における成長差のためか明らかな差は認められなかった。さらに、カラードップラー法を使用して MNB1 および MNB2 周囲には複数の血流を確認したが、明らかな血流分布の違いは確認できなかった。しかしながら、超音波検査により描出した MNB2 の検出率は、MNB1 と比較して Day7 でより高かった。このことは、2 個目に移植した後腎が 1 個目に移植した後腎よりも発育が早い可能性を示している。この現象を引き起こす要因は明確には不明であるが、いくつかの可能性が考えられた。移植された後腎は、レシピエント由来の血管を再生し、血管とキメラ化することが確認されている [113]。血管新生

には、血管内皮増殖因子(VEGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、および線維芽細胞増殖因子(FGF)が関与する[32]。これらの血管新生因子は、組織の虚血および血管新生において重要な役割を果たす。ある報告は、後腎が VEGF から毛細血管発達の空間的方向を受け取り、MNB 周辺の血管系に関与している可能性があることを示唆しており[105]、MNB2 は、後腹膜腔の MNB1 のすぐ頭側に移植したため、MNB1 の血管新生の影響を受けやすい可能性があった。すなわち、超音波検査により確認不可能な微細レベルでの血管新生が、MNB2 の成長に関与した可能性がある。一方で、VEGF は腎臓における間質の線維化にも関与することを考慮する必要がある。VEGF は移植片の成長を促進し、水腎症による線維症をさらに悪化させる可能性がある[18,58]。進行性腎障害の片側尿管閉塞(UUO)モデルでは、血管新生反応が早期に観察され、内皮細胞が増殖した。しかし、4 日後に内皮細胞が失われ、血管新生した毛細血管は消失し、組織は再び虚血状態へ陥ることがわかっている[63]。これは MNB2 の線維化が、MNB1 と大きな差がない理由の一つの可能性もある。さらに、各 MNB における Day7 では、MNB1 よりも MNB2 の検出率が高く、MNB2 の尿細管拡張が MNB1 と明らかな差がないことは、MNB1 の血管新生が MNB2 の成長の一端を担っている可能性がある。Day7 の MNB2 の検出率が高い他の理由として、MNB2 移植中にレシピエントの片方の腎臓を摘出した影響が考えられる。羊胎仔における研究では、片側尿管の閉塞により片側腎機能が突然失われた場合、残りの腎臓が代償的な役割を果たし、胎仔期において残りの腎臓が肥大することが示されている[82]。さらに、ラットの妊娠中に母親の腎臓を摘出した場合、胎仔の後腎における糸球体の体積が増加し、摘

出されていない偽手術の胎仔の腎臓より、糸球体の発達が大いことが報告されている [79]。これらの結果から、移植後 4 週間の成長期間は、MNB2 の後腎が発育するには長すぎると考えられ、複数の移植片が移植された場合、MNB の成長の程度は一定ではなく、成長は MNB 間で大きく異なる可能性があることを示した。したがって、SWPU の詳細な適期を観察する必要があると考えられた。

本章より、MNB の経時的な画像診断法として超音波検査が有用であり、水腎化した MNB 後腎や尿貯留した MNB 膀胱を明瞭に観察することが可能であった。これにより、MNB の SWPU 実施時期を膀胱や後腎の構造的変化によって評価することができると考えられた。

## 付図表および説明

	MNB の 検 出 率 (%)			
	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
<b>MNB1</b> <b>(n=12)</b>	16.7	83.3	100	100
<b>MNB2</b> <b>(n=12)</b>	75.0	91.7	100	100

表 1. MNB 移植後の超音波検査における MNB 検出率

それぞれの MNB 移植後の経過日数と検出率を表に示した。MNB1 では Day7 で検出率が低いものの、Day14 からは大部分の MNB が検出可能であった。MNB2 は Day7 から検出率が高く、Day14 には 90%以上の検出率であった。

Day: MNB1 移植後の経過日数；MNB: 胎仔由来後腎・尿管・膀胱；

MNB1: 1 つ目に移植した MNB；MNB2: 2 つ目に移植した MNB

		各週における MNB 体積 (cm <sup>3</sup> )									
		Day 7	Day 14	Day 21	Day 28	Day 35	Day 42	Day 45	Day 49	Day 52	Day 56
CT	MNB 1 (n=12)	—	—	—	—	—	—	0.310 ± 0.141*	—	0.352 ± 0.195*	—
	MNB 2 (n=12)	—	—	—	—	—	—	0.096± 0.053	—	0.203± 0.107	—
Ult	MNB1 (n=12)	ND	0.073± 0.041	0.139 ± 0.090*	0.277 ± 0.131	0.271 ± 0.082*	0.396 ± 0.136	0.390 ± 0.148	0.361 ± 0.146	0.452 ± 0.164	0.381 ± 0.252
	MNB2 (n=12)	—	—	—	—	0.019 ± 0.010	0.098 ± 0.090	0.096 ± 0.039*	0.145 ± 0.082*	0.203 ± 0.120	0.214 ± 0.164

表 2. 造影 CT 検査と超音波検査により算出した MNB 体積



MNB の体積は Day45, 52 に CT を使用して測定し、同日に超音波検査を実施した。さらに、超音波検査は Day7 から Day56（移植後 8 週目）まで 7 日毎に実施した。

\* $p < 0.01$  vs. 同日に得た超音波検査による測定値, \*  $p < 0.01$  vs. 同じ MNB 群における 7 日前の測定値

CT: コンピューター断層撮影; Day: MNB1 移植後の経過日数; MNB: 胎仔由来後腎・尿管・膀胱; MNB1: 1 つ目に移植した MNB; MNB2: 2 つ目に移植した MNB; Ult: 超音波検査

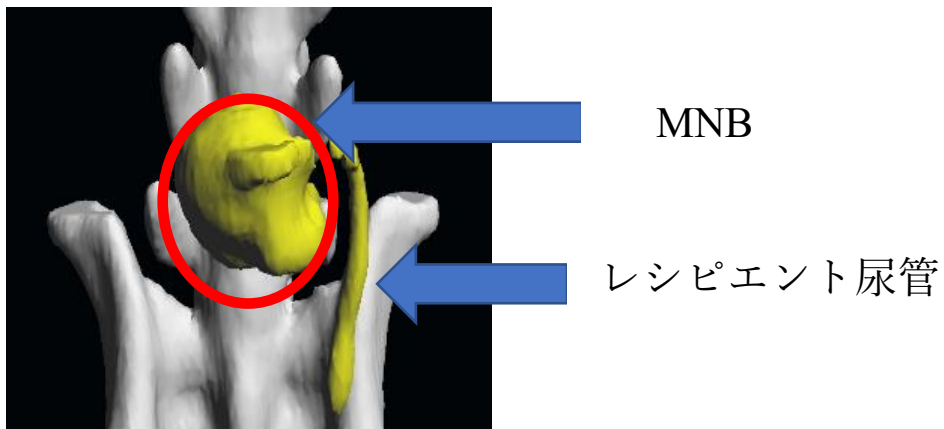


図 1. 造影 CT 検査による MNB 尿路造影の立体構築像

造影 CT 検査により確認した、MNB からレシピエント尿管への尿の開通性を示した。

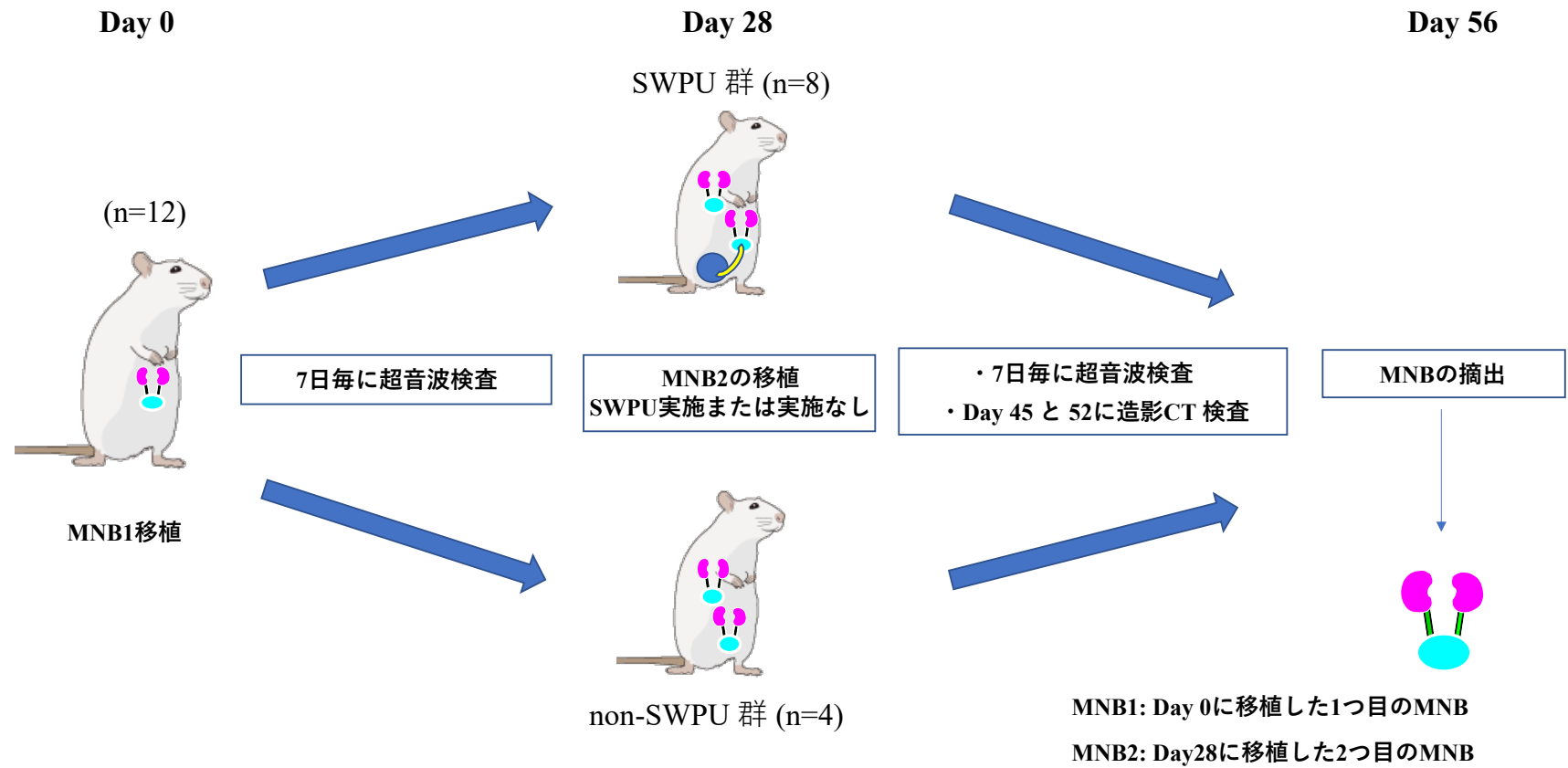


図 2. 実験プロトコル

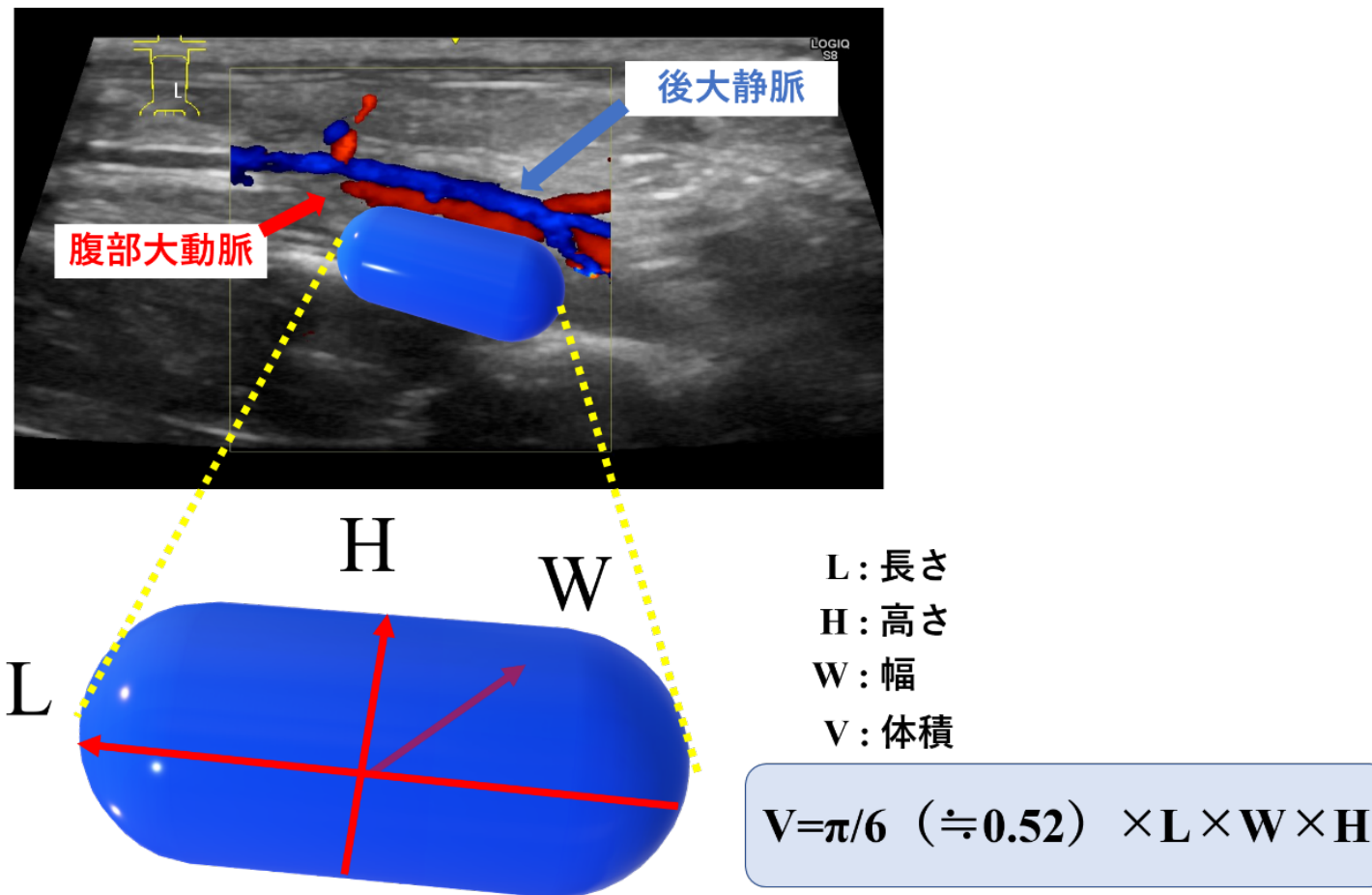


図3. 超音波検査によるMNBの観察方法

腹部超音波検査下で大動脈と後大静脈を確認し、近傍に存在するMNBを観察した。さらに、MNBの立体像を考慮し、3方向の最長計を測定することで、回転楕円体体積の公式からMNBの体積を算出した。

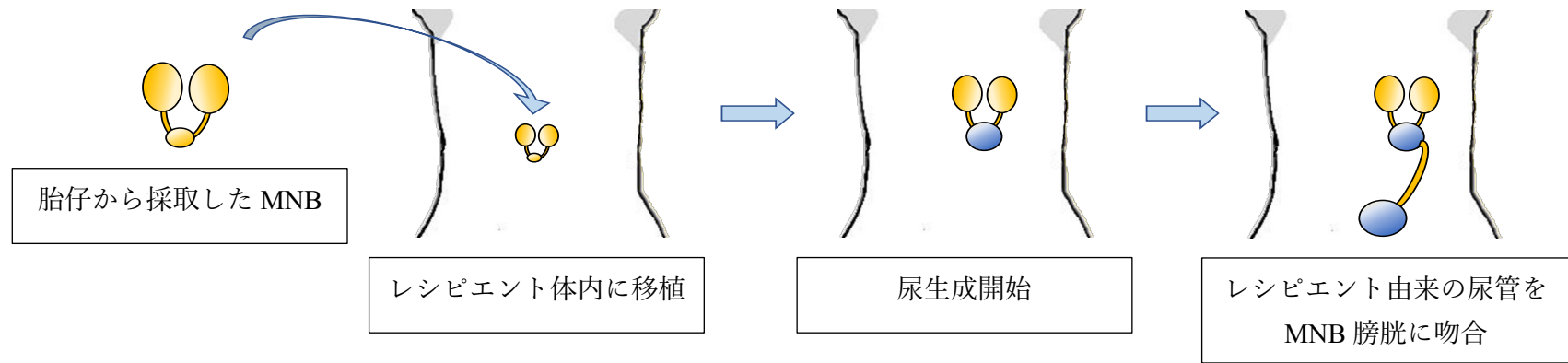


図 4. 胎仔由来後腎・尿管・膀胱(MNB)の移植と段階的蠕動尿管(SWPU)システムの概略

胎仔から採取した MNB はレシピエントの体内で発育し、尿排泄経路を必要とする。MNB の膀胱領域から尿排泄の経路を作成するため、レシピエント由来の腎臓を摘出して付属する尿管を MNB の膀胱領域に吻合する。これにより、MNB 後腎から生成された尿は通常の経路を介して体外に排泄される。

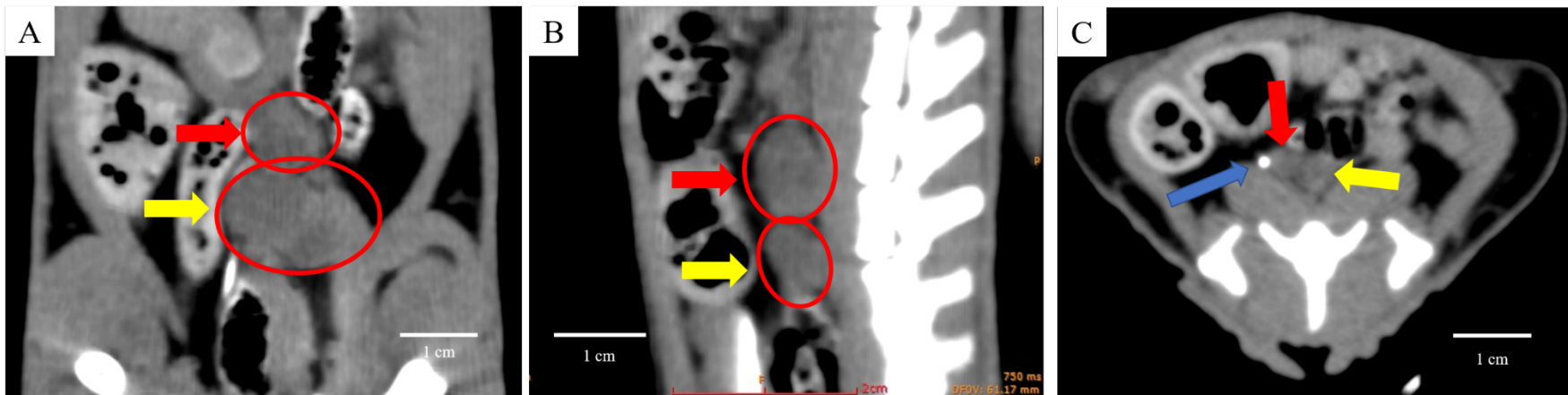


図5. 造影CT画像によるMNBの描出画像

造影CT検査により描出したMNBを背断面像、矢状断面像、横断面像の3方向からの画像で示した。MNBは後腹膜下腔の大動脈近傍で描出できたものの、造影強調が認められなかった。MNB1と2は後腹膜下腔で上下に位置して発育しており、明確に判断可能であった。

黄矢印: MNB1; 赤矢印: MNB2; 赤丸: MNB; 青矢印: 造影したレシピエント尿管

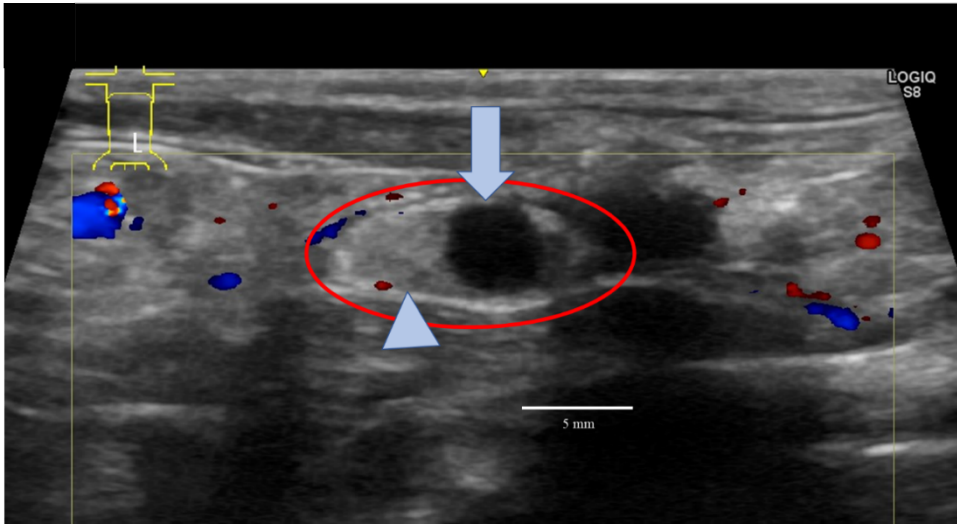


図 6. 超音波検査により正常な発育と判断した MNB の画像

正常な発育と推定した MNB は、画像のように単一の液胞を持ち、その液胞の内部は明瞭な低エコー像を示した。

矢印: MNB 膀胱；矢頭: MNB 後腎

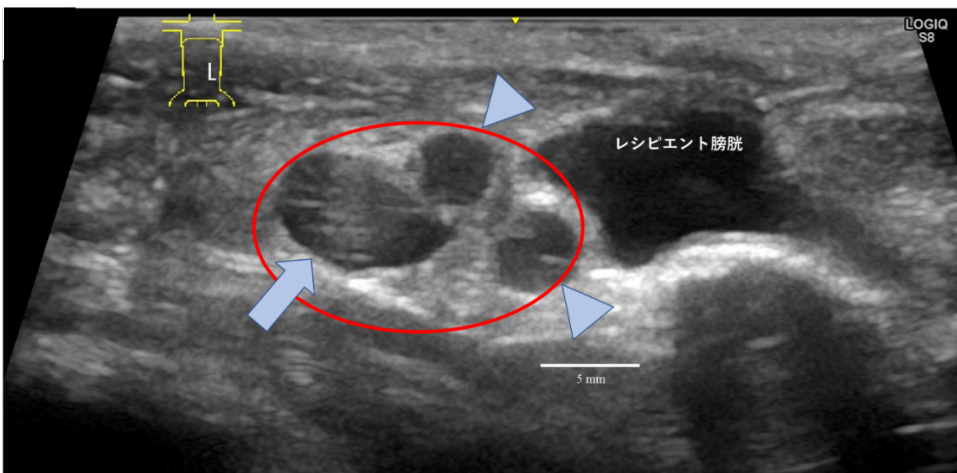


図 7. 超音波検査により水腎化が疑われた MNB の画像

画像にある水腎化が疑われた MNB は3つの液胞をもち、レシピエントの膀胱と同程度の大きさまで拡張した。

矢印: MNB 膀胱；矢頭: MNB 後腎

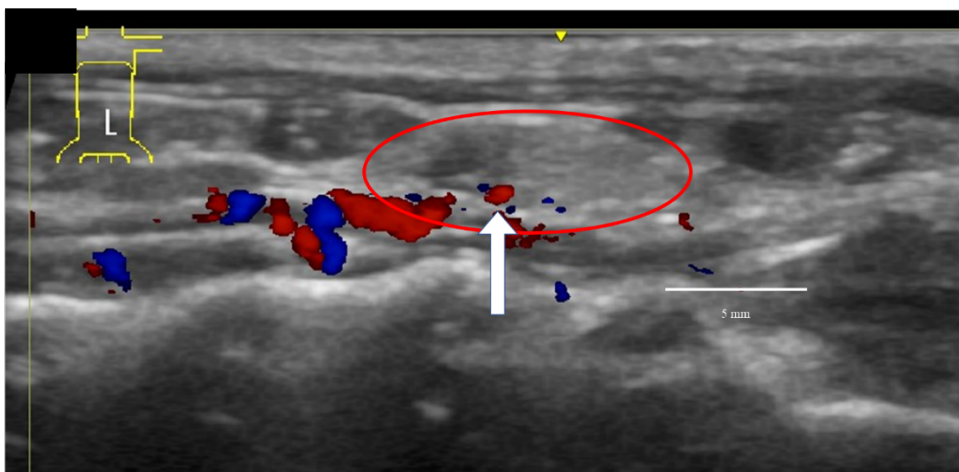


図 8. MNB 周囲の血流画像

MNB 周囲の血流は超音波検査のカラードプラ法により確認した。MNB の周囲に細かい血管が走行している画像を示した。

矢印: MNB 周囲の血流



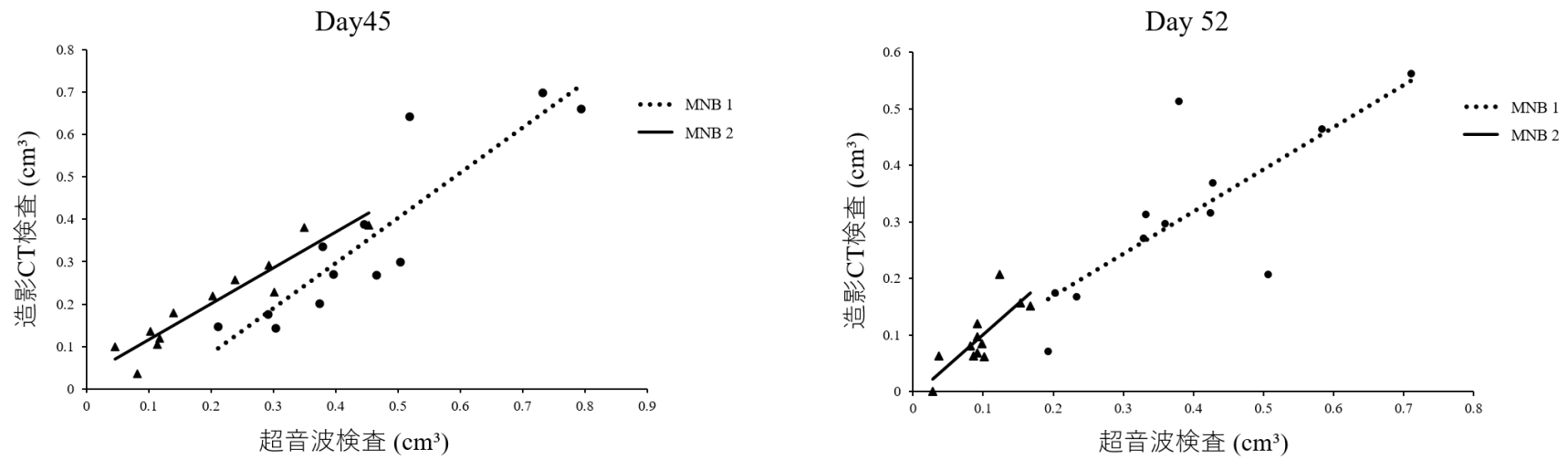


図 9. 造影 CT 検査と超音波検査における相関関係

各週の超音波検査と造影 CT 検査を使用して算出した MNB 体積の相関。点線は MNB1 を示し、実線は MNB2 を示した。左の図：Day45 の MNB 体積(MNB1:  $R = 0.78$  ; MNB2:  $R = 0.79$ )。右の図：Day52 の MNB 体積(MNB1:  $R = 0.90$  ; MNB2:  $R = 0.94$ )。

## Day28におけるMNB1膀胱の超音波検査による体積と 実際に採尿された尿量の相関

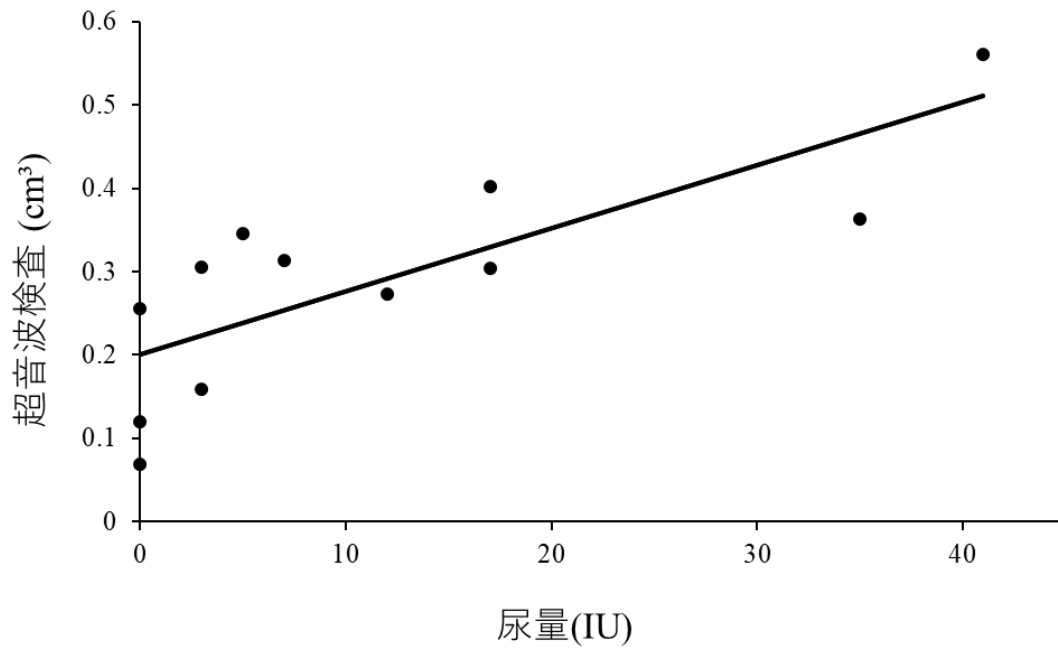


図 10. 超音波検査による MNB 膀胱体積と実際の採尿量の相関  
Day28 に測定した MNB 膀胱体積と実際に MNB 膀胱から採取した尿  
量は正の相関を示した。(R=0.79).

### III. 第二章：MNBの成長に対する性差の影響の検討

#### 1. 緒言

CKDは、腎臓を有する動物種全てに起こり得る疾患であり、その進行は年齢、性別に関係なく不可逆的である。さらに、CKDの発症には多数の因子が関与するため、その発症リスクは個体ごとに異なる。人においては、性別や年齢がCKDの予後因子の一つとして示されている[37,59]。猫や実験モデル動物においても、性別や加齢に伴う変化はCKDが進行するリスクファクターとなりうることが知られている[15,85,111]。特に、性別はさまざまな疾患に影響を与える重要な要因であり、性ステロイドホルモンや性別特有の組織や細胞は生体にあらゆる影響を及ぼす[3,17,23,46]。組織の治癒、再生、移植に対して、性差が与える影響を検討した報告は多く存在する[55,83]。しかしながら、後腎やMNB移植に関しては、主にオスがレシピエントとして使用され、後腎移植に対する性別の影響を一部言及している報告は存在するものの[7]、詳細に検討した報告はない。性別による成長への影響を解析することは、MNBを臨床的に応用する上で非常に重要であると考えられる。

したがって、第二章では、第一章の結果をもとに超音波検査を用いて、移植したMNBの成長に対する性差の影響を検討することを目的とした。

## 2. 材料及び方法

### 2-1. 供試動物

妊娠ラットとして、妊娠 15 日目、雌の Lewis ラット 7 匹(日本チャールズリヴァー)を用いた。レシピエントラットとして 11 週齢、体重 179~333g( $245.7 \pm 59.5$  g)の Lewis ラット雄 12 匹、雌 14 匹(日本チャールズリヴァー)を用いた。飼育管理は、北里大学獣医学部動物実験指針および実験動物の飼育管理マニュアルに従って行った。(承認番号 No:17-127)

### 2-2. MNB 分離

胎齢 15 日目の妊娠ラットをイソフルラン(ゾエティス・ジャパン)により麻酔導入、維持した。腹部正中切開にて子宮を無菌的に摘出し、ハンクス平衡塩液(Life Technologies Corporation)を分注したシャーレ内に子宮を移して胎仔を摘出した。手術用顕微鏡(ライカマイクロシステムズ)下で、ラット胎仔より後腎、尿管、膀胱を一塊(MNB)として採取した。HBSS 内で保存した MNB のシャーレは移植直前まで氷上にて保存した。

### 2-3. MNB 移植法

実験プロトコルを図 11 に示した。レシピエントラットをイソフルランで麻酔導入、維持した。腹部正中を切開後、腸管を体外に牽引し、後腹膜および腹部大動脈を露出した。手術用顕微鏡下で後腹膜に小切開を加え、腹部大動脈近傍の後腹膜下腔に 1 個目の MNB(MNB1)を移植した(Day0)。移植後、6-0 非吸収性縫合糸(ジョンソン・エンド・ジョンソン)で後腹膜を 1 糸縫合した。腸管を腹腔内

に戻した後、3-0 非吸収性縫合糸(ジョンソン・エンド・ジョンソン)で腹壁と皮膚をそれぞれ連続縫合により閉創した。MNB1 移植後 28 日目(Day28)に 2 個目の MNB(MNB2)を上記と同様に移植し、MNB2 は MNB1 よりも頭側に移植することで区別した。その後、7 日毎に超音波検査による評価を行い、MNB2 移植後 28 日目(Day56)に両方の MNB を採取して病理組織学的検査に供した。

#### 2-4. 超音波検査を用いた MNB の体積測定

撮影には、超音波診断装置(GE ヘルスケア・ジャパン)と、プローブとして 3-11MHz のリニアアレイ型プローブ(GE ヘルスケア・ジャパン)を用いた。表示モードは B モードにし、ゲインを 90、デプスを 2.3~2.5 に設定した。検査を行う際は、ラットをイソフルランで麻酔導入、維持し、腹部の毛刈りを行い、体位は仰臥位に統一した。Day7 から 56 まで 7 日ごとに超音波検査を行い、MNB の長さ(L)、横幅(W)、高さ(H)を測定した。MNB を回転楕円体と仮定し、第一章と同様に回転楕円体の体積の公式から MNB の体積を算出した。

#### 2-5. MNB 膀胱からの採尿

Day28 と Day56 の開腹時にそれぞれ MNB1 と MNB2 の膀胱領域を確認し、尿貯留を認めた場合に採尿して尿量を記録した。採尿はインスリン専用シリンジ(マイJECTA SS-10M2913A、テルモ株式会社、東京、日本)を使用して MNB の膀胱穿刺により行った。

#### 2-6. レシピエントラットの情報と血液検査

レシピエントラットは、Day0 から Day56 まで、7 日間毎の全ての

時点において体重測定を行った。イソフルラン麻酔の際は麻酔時間を記録し、Day56までの総麻酔時間を算出した。

Day0 から Day56 まで、7日間毎にイソフルランの吸入麻酔下で尾静脈より血液を採取し、マイクロチューブ(ヘパリン処理済み)と採血管(EDTA-2Na)に分注した。全自動血球計算器(全自動血球計数器 MEK-6450 Celltac  $\alpha$ 、日本光電工業株式会社、東京、日本)でヘマトクリット値(Hct)を測定した。ヘパリン処理血液は 3000rpm で 5 分間遠心分離した後、血漿を分離し、生化学的検査に供するまでは -80°C で凍結保存した。生化学自動分析装置(SIMENS Dimension RXL Max、シーメンス・ジャパン株式会社、東京都、日本)にて、血中尿素窒素(BUN)濃度および血中クレアチニン(Cr)濃度を測定した。

#### 2-7. 病理組織学的検査

固定液(ファルマ)で固定した MNB 組織をパラフィン包埋し、2 $\mu$ m に薄切処理後、Hematoxylin-Eosin(HE)染色および、Masson-trichrome(MT)染色を行った。HE染色では尿細管の拡張、MT染色は後腎における間質の線維化を評価した。

#### 2-8. 統計処理

結果は、平均値 $\pm$ 標準偏差として表した。Student's t-test は雌雄の血液検査の結果、MNB の体積の比較に使用した。Kruskal-Wallis test は各週同士における MNB 体積の差の比較に使用した。28 日間発育した MNB の尿量は、Mann-Whitney U test により評価した。体重/麻酔時間と MNB 体積との関係性は Spearman's 順位相関係数を使用した。すべての検定は、危険率  $p < 0.05$  をもって統計的に有意差ありと

判定した。

### 3. 実験結果

#### 3-1. ラットの身体情報と血液検査結果

ラットの身体情報と血液検査の結果を表 3 に示した。Day0、28、56 に、雄ラットの平均体重は雌ラットと比較して有意に重かった。すべての個体の平均体重と Day28 の MNB1 の体積との間には正の相関が認められたが、オスとメスそれぞれの体重との相関はみられなかった。雌雄で総麻酔時間に差はなく、MNB の体積とは相関していなかった( $r = -0.11$ )。さらに、総麻酔時間と体重の間に相関関係は認められなかった( $r = 0.03$ )。Day28 と Day56 における尿の採取率は、MNB1 と MNB2 において、オスで 75% (9/12) と 69.7% (8/12)、メスで MNB1 と MNB2 とともに 14.3% (2/14)であった。オスの Day0 と Day28 の BUN と Cr の値はメスよりも高かったが、それらは正常範囲内であった。Hct 値についても同様に基準値範囲内であった。

#### 3-2. 超音波検査により算出した MNB の体積

MNB1 を移植した時点から、7 日毎に評価した MNB の体積を表 4 に示した。MNB の体積は、体積が測定可能であったすべての週において、オスでメスよりも有意に大きかった。経過観察期間内において、オスとメスともに MNB1 と MNB2 の体積は増加したが、メスの体積増加はオスよりも小さく、28 日目以降では、メスの MNB1 にあきらかな成長がみられなかった。雌雄全個体における MNB1 の体積と体重は、正の相関関係を示した( $r = 0.69$ ) (図 12A)。しかしながら、オスまたはメスの体重それぞれと MNB1 の体積における相関関係は認められなかった(オス: $r = 0.23$ , メス: $r = -0.15$ ) (図 12A および B)。



### 3-3. 28日間発育したMNBの貯尿量

Day28のMNB1の肉眼的所見では、オスのMNBはメスのMNBと比較して明らかに大きく、尿貯留が認められたMNBの数は多かった(図13Aおよび13B)。さらに、Day28とDay56に、MNB1またはMNB2からの採尿が可能であったラットの割合は、オスがメスと比較して高かった。貯尿量は、オスがメスと比較して有意に多かった( $p<0.01$ )(図13C)。

### 3-4. 病理組織学的検査所見

HE・MT染色による病理組織学的検査では、オスのMNBにおいて、正常な尿生成によるものと考えられる尿細管拡張、ボーマン嚢の拡張が認められ、糸球体細胞の萎縮がみられた。さらに、間質の線維化が広範囲に観察された(図14A)。メスのMNBは後腎領域が非常に小さく、単核球のびまん性間質性浸潤、尿細管萎縮、および後腎全域での間質の線維化が観察された(図14B)。

#### 4. 考察

本章の目的は、オスとメスのレシピエントラットに移植した MNB を経時的に解析し、MNB の成長に対する性別の影響を超音波検査により経時的に評価することであった。

本章における MNB 移植では、尿の排泄経路を作成していないことから、尿細管の重度拡張に起因する水腎化が組織学的変化の結果として認められたが、これは、特にオスにおいて顕著であり、尿生成能が正常に働いたことを示していると考えられた。以前の研究では、移植の 4 週間後にはすでに一部の MNB で水腎化や線維化を引き起こしているものの、SWPU 実施により排泄経路の作成を可能とした。本研究においても、オスの成長した MNB に適切な時期で SWPU システムを実施した場合、水腎化を抑制し、発育が可能であったと考えられる [116]。一方で、メスの MNB1 と MNB2 の尿量は少なく、尿生成は少数の個体でしか確認できなかった。この原因の一つとして、体重と臓器重量の関連性が影響していると考えられた。今回、経過観察中に、雌雄ともに体重は増加し、それぞれ MNB の体積と正の相関があった。Tadokoro らは、60～100 日齢のオスの体重増加が、メスの体重増加より顕著であると報告していることから [100]、本章では、体重増加が著しい時期に、MNB の移植とその成長を観察することで性差をより明確にできると考えた。実際、今回の結果から、体重増加と MNB の成長に関連性があることを示唆することができた。さらに、オスの腎臓重量はメスと比較して重いことが報告されており、これには男性ホルモンであるアンドロゲンが関与するといわれている [100]。アンドロゲンが去勢ラットの腎臓重量を有意に増加させたことや、不妊処置を施して片方の腎臓を切除し

たメスラットにアンドロゲンを投与することで、代償性の糸球体および尿細管の成長が亢進したとの報告がある [93,119]。したがって、メスと比較して、オスの MNB で尿生成能と体積増加が良好であった要因の一つとして、アンドロゲンが影響した可能性があると考えられた。

本章においても第一章と同様に、2つの MNB を段階的に移植する方法を採用した。マウスやラットのような一部の動物では、生後数週間で糸球体の数が急速に増加する。さらに、片側腎摘出術は、性別に関係なく対側腎サイズを増加させる [13,74]。したがって、本研究では、これまでの SWPU システムを想定して、Day28 にレシピエントの片側腎を摘出した。第一章の結果より、オスラットにおける腎摘出後に移植した MNB2 の成長は、最初に移植した MNB1 より早い可能性を示した。このことは、MNB2 の成長がメスにおいても同様に亢進し、尿の生成につながる可能性があるという推測に至ったが、結果は異なった。全てのメスの後腎組織は、尿の生成が少なく、尿細管の拡張が軽度であるにもかかわらず、間質の線維化と尿細管の萎縮がみられた。単核細胞が後腎の広範囲に浸潤していたため、異物反応や拒絶反応の病理組織学的検査所見と類似し、シンジェニックな移植にもかかわらず拒絶様の組織反応が生じた可能性があることが推察された。ルイスラットは、移植研究において、レシピエントまたはドナーとして一般的に使用されている [30,94,120]。ルイスラット間の MHC ハプロタイプである RT1 は同じ L タイプであり、移植の際の基本的な拒絶反応性は軽度であると考えられる [94]。このことから、レシピエントにおける免疫増強、またはハプロタイプ以外での拒絶反応が関与している可能性が考えられた。また、ラッ

トを含むオスの動物は、移植研究だけでなく、多様な動物研究分野で利用される。これはメスの動物の性周期が、実験結果へ与える影響の可能性を考慮するためである。エストロゲンは、メスラットの正常な発情周期に関連する最も重要な因子の一つである。エストロゲンが腎保護効果を持ち、代償性の腎臓の成長に寄与することを示唆する多くの報告がある[57,98,109]。また、代償性に腎臓が成長する初期段階では、オスラットは成長ホルモン(GH)に依存するが、インスリン様成長因子 1(IGF-1)には非依存的であるといわれており、対照的に、メスラットの代償性腎成長は IGF-1 に依存し、GH に非依存的であると報告されている[74]。したがって、雌雄の MNB の成長の差に、性ホルモンだけでなく、インスリン様成長因子のような要因が組織の成熟に関与している可能性が考えられた。エストロゲンは腎臓に対して正の作用が多く報告されているが、これらの研究では成熟した動物が使用されており、臓器形成の過程にある組織とは異なる可能性がある。また、エストロゲンは血管内皮増殖因子(VEGF)の発現を増加させて虚血の緩和に働くが、一方で、VEGF は線維症を促進する[18,58]。加えて、エストロゲンの存在は、女性が男性より免疫反応が強固である要因の一つであると考えられている。全身性または臓器特異的な自己免疫疾患は、ヒトの女性で 2~10 倍高いことが知られている[69,78]。このことから、メスの MNB 後腎で認められた拒絶様の所見に、エストロゲンの関与が疑われた。

MNB は前述したように、一部で免疫寛容を起こすことが期待されている。しかしながら、その免疫寛容は完全ではないため、拒絶の問題は最も解決すべき点の一つである。この課題について、従来の報告では異種動物の腎性ニッチを足場として使用し、間葉系幹細胞

から腎臓を生成することを試みている [68,112,115]。胎仔の後腎における発生段階で、後腎実質の領域から宿主ネフロン前駆細胞(NPC)を排除することにより、外部 NPC からのネフロンを正常に生成することが可能となる [40,110]。このシステムがラットとマウスの間、種間キメラネフロンを生成できることが以前に確認されている [40]。さらに、完全な宿主由来の組織を作成することを目的として、人工多能性幹細胞 (iPSC) および間葉系幹細胞 (MSC) の使用が検討されている。実際に、血液透析患者から得られた人工多能性幹細胞から分化させた NPC は、健康なヒトの細胞から生成した NPC と比較した場合、細胞の質が低下することなく使用できることがわかっている [102]。さらに、この NPC をマウスの腎臓に移植することにより、血管新生を伴う糸球体への分化が確認されている [102]。したがって、メスでの後腎に対する成長に影響を与える要因と、ネイティブ細胞を除去した後腎をレシピエント由来の iPSC や MSC で置換した際のメスでの成長は今後検討する必要性があると考えられた。

本章では、MNB の移植再生において、レシピエントの性別によって MNB の発育に差が生じることを明らかにした。一方、SWPU を行う場合には、後腎の形態学的変化と、吻合するための MNB 膀胱の体積が、一定基準を満たしていなければならないだけでなく、MNB の成長から一定基準を決めていく必要性がある。したがって、次章では、MNB の成長過程において、SWPU を実施する適期の基準を決定しなければならないため、オスに統一した条件下で基準を決める検討をすることとした。

## 付図表および説明

		オス (n=12)	メス (n=14)	P value
体重(g)	Day 0	309.3 ± 11.9	193.6 ± 8.7	< .01
	Day 28	347.9 ± 14.3	207.0 ± 8.3	< .01
	Day 56	369.0 ± 14.1	207.7 ± 8.9	< .01
総麻酔時間 (min)		254.8 ± 18.6	250.1 ± 20.1	.56
採尿可能なラット数 (%) (個体数)	MNB 1	75% (9/12)	14.3% (2/14)	
	MNB 2	66.7% (8/12)	14.3% (2/14)	
BUN (mg/dL)	Day 0	13.1 ± 1.6	11.0 ± 1.3	< .01
	Day 28	16.3 ± 1.9	14.3 ± 2.7	< .05
	Day 56	18.8 ± 1.9	17.9 ± 5.4	.57
Cr (mg/dL)	Day 0	0.13 ± 0.03	0.16 ± 0.02	< .01
	Day 28	0.10 ± 0.02	0.14 ± 0.03	< .01
	Day 56	0.27 ± 0.02	0.30 ± 0.11	.33
Hct (%)	Day 0	46.8 ± 3.9	46.6 ± 1.3	.87
	Day 28	46.9 ± 1.3	43.9 ± 1.1	< .01
	Day 56	46.1 ± 2.7	43.9 ± 3.7	.10

表 3. ラット情報と血液生化学検査結果

BUN: 血中尿素窒素 ; Cr: 血中クレアチニン ; Hct: ヘマトクリット値 ; MNB: 胎仔由来後腎・尿管・膀胱 ; MNB1: 1つ目に移植した MNB ; MNB2: 2つ目に移植した MNB

			MNB 体積 (cm <sup>3</sup> )							
			Day 7	Day14	Day21	Day28	Day35	Day42	Day49	Day56
オス (n=12)	MNB 1	ND	0.073±	0.139±	0.277±	0.270±	0.396±	0.361±	0.381±	
			0.04 <sup>†</sup>	0.09*	0.13 <sup>†, ‡</sup>	0.08 <sup>†, §</sup>	0.14 <sup>†</sup>	0.15 <sup>†</sup>	0.25 <sup>†</sup>	
	MNB 2	-	-	-	-	0.016±	0.098±	0.145±	0.214±	
						0.01 <sup>†</sup>	0.09*	0.08 <sup>†,   </sup>	0.16 <sup>†</sup>	
メス (n=14)	MNB 1	ND	0.039±	0.073±	0.107±	0.116±	0.114±	0.122±	0.105±	
			0.03	0.03	0.03 <sup>‡</sup>	0.05	0.05	0.04 <sup>§</sup>	0.05	
	MNB 2	-	-	-	-	0.004±	0.026±	0.051±	0.039±	
						0.01	0.02	0.05 <sup>  </sup>	0.04	

表 4. 超音波検査による 7 日毎の MNB 体積

\* : vs. メス, p&lt;0.05, †: vs. メス, p&lt;0.01

‡: vs. Day14, p&lt;0.01, §: vs. Day21 p&lt;0.05, ||: vs. Day35, p&lt;0.05

CT: コンピューター断層撮影 ; Day: MNB1 移植後の経過日数 ; MNB: 胎仔由来後腎・尿管・膀胱 ;

MNB1: 1 つ目に移植した MNB ; MNB2: 2 つ目に移植した MNB ; ND: 測定不可 ; Ult: 超音波検査



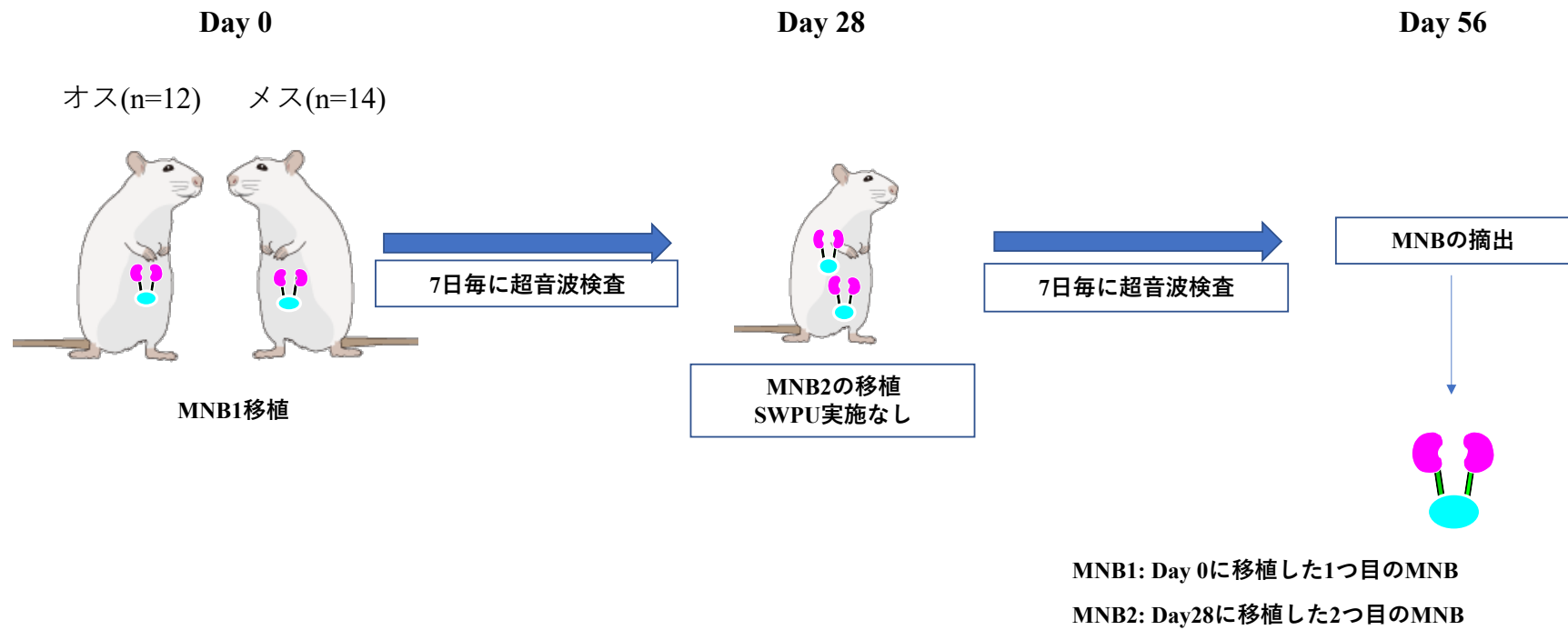


図 11. 実験プロトコル

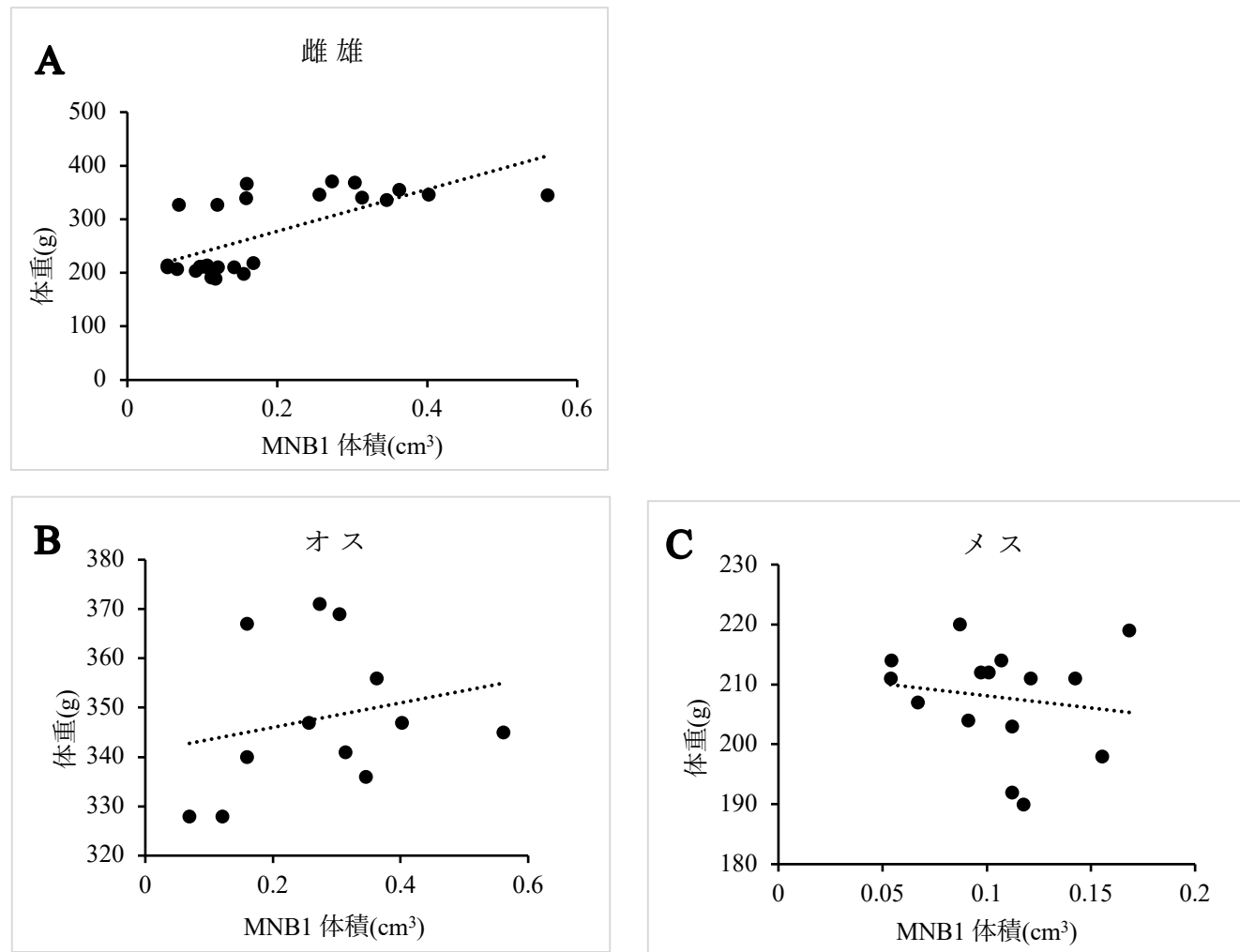


図 12. Day28 におけるラットの体重と MNB 体積の相関

Day28におけるレシピエントラットの体重とMNB1の体積を示した。A: 雌雄全ての個体における体重とMNB1の間に正の相関関係が認められた ( $r = 0.69$ ). B: オス; C: メス, オスとメスそれぞれの体重とMNB1,2の間に相関は認められなかった(オス:  $r = 0.23$ , メス:  $r = -0.15$ )。

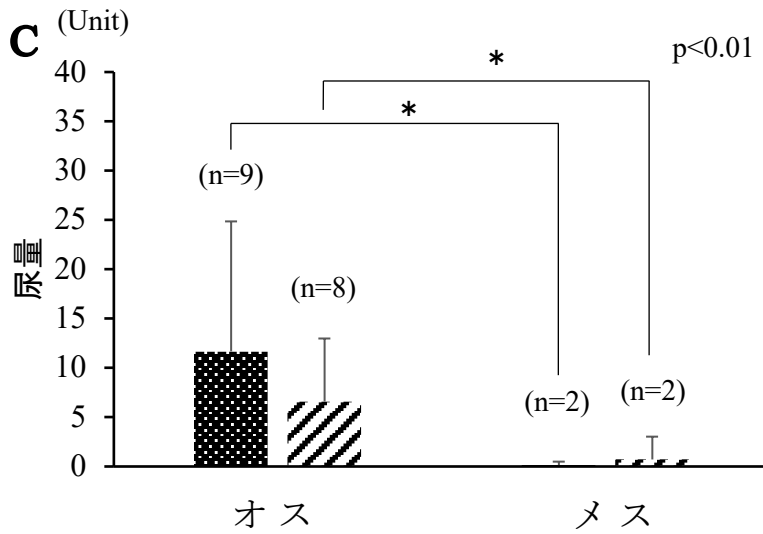
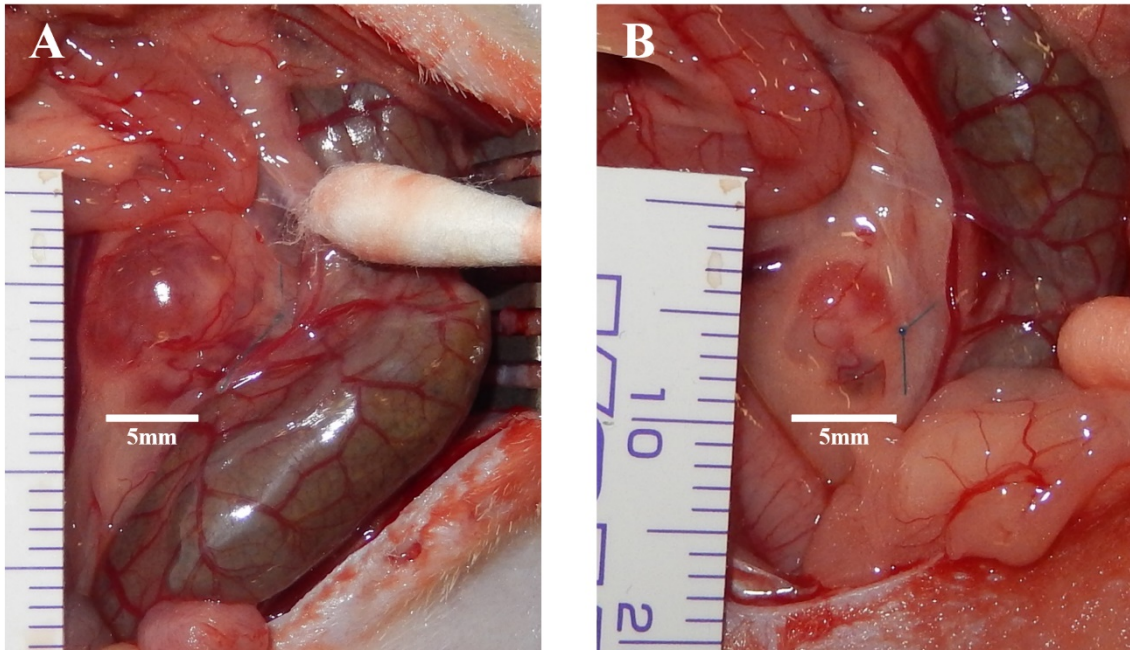


図 13. Day28 の MNB1 の代表的な画像と MNB1,2 における尿量  
 図 A,B にオスとメスの MNB1 の代表的な画像を示した。A: オスの MNB は大きく、尿貯留が肉眼的に確認できた。新生血管と考えられる微小な血管も容易に観察可能であった。B: メスの MNB は明らかに小さく、尿貯留は確認できなかった。C: グラフはそれぞれ 28 日間発育した MNB1,2 から得られた雌雄それぞれの尿量を示し

た。尿量は MNB1,2 ともにオスがメスと比較して有意に多く採尿可能であった。

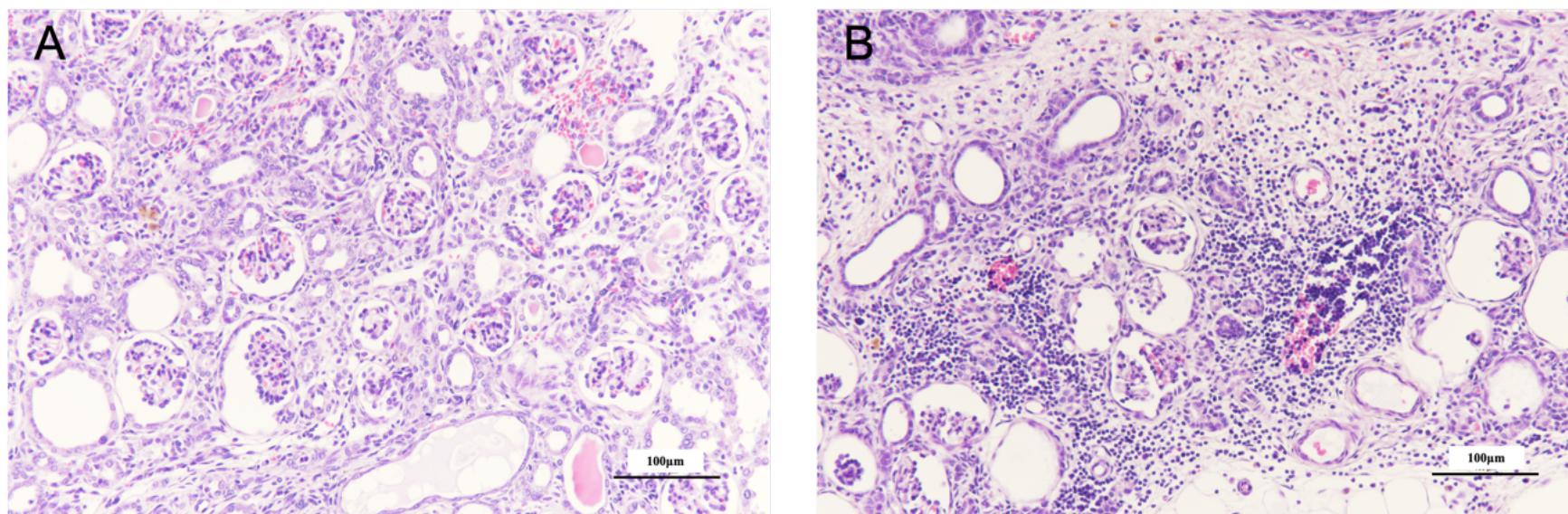


図 14. オスとメスの MNB における病理組織画像

A: オスの MNB 後腎における HE 染色組織像を示す。後腎全域に渡り尿細管の拡張が認められた。ボーマン嚢腔の拡張、散在して間質の出血が認められた。B: メスの MNB では間質の線維化、単核球の細胞浸潤、尿細管萎縮が認められた。血管内には著しい単核球の遊走が認められた。

#### IV. 第三章：MNBの経時的評価によるSWPU適期の検討

##### 1. 緒言

MNBの成長に性差や個体差がある可能性についてわかったが、従来はレシピエントに移植した後腎あるいはMNBの採取や尿路再建は約3~6週目に行われてきた。しかし、これらはすでに水腎化している後腎が多く存在した[39,67,68,106,113,116]。第一、二章ではMNBの形態学的特徴における画像診断の有用性と評価のために1週間ごとの観察を行った。これは、ラットにおけるストレスや麻酔時間によるMNBへの影響を考慮したためであった。しかしながら、ラットは妊娠から約21日で出産に至り、胎仔期の後期に後腎は尿生成や糸球体形成のような機能を獲得しており、出生後1~2週間で腎臓は完全な成熟を遂げる[21]。これは、後腎の1~2週間での急速な成長を意味しており、実際、第一章において、移植後3週目にMNBの膀胱領域が拡張しているMNBが存在した。このことから、7日毎の検査ではMNBのSWPU適期を確定できず、より短い間隔での綿密な観察が必要である可能性が高い。

第一章の結果から、MNB膀胱における尿貯留や水腎化を示すMNB後腎が超音波検査により確認可能であることを示した。加えて、MNBにSWPUを実施した際のMNB膀胱の最低体積は $0.016\text{cm}^3$ であり、これは顕微鏡下でSWPUを実施可能な最小の体積と考えられた。尿路閉塞時には早期の改善がその後の腎機能に多大な影響を与えることから[20,21]、この最小の体積のうちにSWPUを実施することは、後腎の組織学的な障害の軽減につながることを予想される。

したがって、個々のMNBの成長に差がある可能性を考慮して、MNBにおけるSWPUの適期がそれぞれに存在すると考えた。また、

SWPU 適期を行うための最適な期間は非常に短い可能性を想定し、超音波検査によって MNB の変化をさらに細かく追う必要性があった。これにより、MNB 後腎の尿細管拡張を最小限にくいとめ、かつ、SWPU が可能な MNB 膀胱のサイズであるという両方の条件を満たす必要性があるという仮説を立てた。本章では、第一章、二章の結果をもとに、超音波検査を用いた SWPU 適期のための MNB の構造的な基準における仮説を設定し、立証することを目的とした。



## 2. 材料及び方法

### 2-1. 供試動物

MNB 分離のため、妊娠 15 日目のメス Lewis ラット 3 匹(日本チャールズリヴァー)を用いた。レシピエントラットとしてオス、9 週齢、体重 233~256g( $242 \pm 7.45$ g)の Lewis ラット 18 匹(日本チャールズリヴァー)を用いた。飼育管理は、北里大学獣医学部動物実験指針および実験動物の飼育管理マニュアルに従って行った。(承認番号 No:18-127)

### 2-2. MNB 分離

胎齢 15 日目の妊娠ラットをイソフルランで麻酔導入、維持した。腹部正中切開にて子宮を無菌的に摘出し、HBSS 内で胎仔を摘出した。手術用顕微鏡(ライカマイクロシステムズ)下で、ラット胎仔より MNB を採取し、氷上の HBSS 内で移植直前まで保存した。

### 2-3. SWPU 適期に対する仮説の設定

第一章の結果より、超音波検査時に以下の 2 つの条件を満たした時に適期であると仮定した。

- ① MNB 内の液胞が一つである
- ② SWPU 実施可能である MNB 膀胱の最小体積( $0.016 \text{ cm}^3$ )に至った時点

### 2-4. 実験方法

実験プロトコルを図 15 で示した。レシピエントラットをイソフルランで麻酔導入、維持した。腹部正中を切開後、腸管を避け、後腹

膜および腹部大動脈を露出した。手術用顕微鏡下で後腹膜に小切開を加え、腹部大動脈近傍の後腹膜下腔に MNB を移植した(観察 0 日目)。移植後、6-0 非吸収性縫合糸(ジョンソンエンドジョンソン)で後腹膜を 1 糸縫合した。3-0 非吸収性縫合糸(ベアーメディック)で腹壁と皮膚をそれぞれ連続縫合により閉創した。

MNB 移植後 17 日目(Day17)より 1 日おきに、移植後 35 日目まで超音波検査による評価を行った。条件により SWPU 実施適期と判断した場合、麻酔下で MNB を採取した。採取時に MNB 膀胱から採尿を行い、その後すみやかに固定液(ファルマ)で固定後、病理組織学的検査に供した。

#### 2-5. 超音波検査を用いた MNB、MNB 膀胱体積測定法

ラットをイソフルランで麻酔導入、維持し、測定体位は仰臥位に統一した。検査には超音波診断装置(GE ヘルスケア・ジャパン)を用いた。11MHz リニアプローブを用い、ダイナミックレンジ 75、フレームレート 26、ゲイン 90、深度 2.5 に設定し、超音波診断用ゼリー(UF FINEGEL®低粘度)を用いて検査を行った。矢状面で MNB と MNB 膀胱の最大前後径(L)、最大上下径(H)、横断面において最大横径(W)を測定し、これまでの章と同様に回転楕円体の式を用いて MNB 体積、MNB 膀胱体積を算出した。

#### 2-6. 病理組織学的検査法

固定液で固定した MNB 組織を、パラフィン包埋し、2 $\mu$ m に薄切処理後、Hematoxylin-Eosin(HE)染色および、Masson-trichrome(MT)染色を行った。染色したスライドは、顕微鏡用デジタルカメラ(cellSens、

オリンパス株式会社、東京、日本)を用いて盲検的に選択した1スライドにつき無作為に20視野を撮影した。画像は画像解析ソフトImageJ®(National Institutes of Health、メリーランド、アメリカ)を用いてHE染色では尿細管の拡張、MT染色は後腎の線維化を盲検的に評価した。評価は、画像解析ソフトImageJで領域の面積を算出して行った。

## 2-7. 統計処理

結果は平均値±標準偏差値で表した。Mann-Whitney U testは尿細管拡張、間質繊維化における群間の比較に使用した。MNB膀胱体積とMNB膀胱の貯尿量関連性、MNB膀胱確認後から尿路再建適期と判断した日までの日数やMNB膀胱体積と尿細管の拡張、間質の線維化における関連性の検討にはSpearman's順位相関係数により評価した。すべての検定は、 $p < 0.05$ をもって統計的に有意とした。

### 3. 実験結果

#### 3-1. MNB 移植から MNB 採取までの日数

Day17 に、すべての MNB が超音波検査にて確認可能であった。膀胱が形成されていないものや水腎症のある MNB は、発育不良と判断した(3/18)。発育不良を含まない MNB を採取するまでの平均日数は、 $20.7 \pm 3.6$  日(範囲、17~29 日)であった(図 16A)。摘出した MNB のうち 72.2% (13/15)については、Day21 以内に SWPU 適期と判断した。超音波検査にて SWPU の適期と判断した MNB の割合は、Day17、Day19、Day21、Day28 以上のそれぞれにおいて、20%(3/15)、26.7%(4/15)、40%(6/15)、13.3%(2/15)であった。

#### 3-2. MNB の採取日数と尿細管拡張面積における相関

SWPU 適期と考えられる日数で採取した MNB の経過日数と、MNB 後腎の尿細管拡張面積における相関関係を図 16B に示した。Day21 以降に採取した MNB は尿貯留を認めない MNB や体積に変化がない MNB が存在した。また、経過日数を追うごとに尿細管拡張面積が拡張する傾向にあり、MNB を採取した日数と尿細管拡張面積は正の相関を示した( $r=0.87$ )。このことから、Day21 が正常と発育している MNB の基準になると仮定した。

#### 3-3. 採取した MNB における尿細管拡張と線維化の Day21 以前と以降での比較

前述した正常に発育していると仮定する日数を Day21 と設定し、Day21 までに採取した MNB と以降に採取した MNB を比較したところ、以前に採取した MNB が以降に採取した MNB と比べて尿細管拡

張が有意に軽度であった( $p < 0.01$ )(図 17A)。Day21 以前と Day21 以降に採取した MNB における線維化の比較では、線維化した面積に差はなかった(図 17B)。

#### 4. 考察

本章では、SWPU 適期の基準における仮説を立て、MNB を 1 個のみ移植し、超音波検査下で MNB の成長速度や MNB 膀胱の形態を経時的に観察することで設定した仮説の立証を行なった。

本章では、第一章での段階的に 2 個 MNB を移植した場合に、成長速度に個体差があるという結果と同様に、MNB を 1 個のみ移植した場合においても成長速度には個体差があることが明らかとなった。特に発達が早期であった MNB(38.9%)は、Day21 以前に膀胱の拡張を示した。Day21 までに半数以上の MNB が今回定めた SWPU の基準に達しており、これらは水腎化した所見が認められなかった。また、Day21 以降に採取した多くの MNB が、Day21 以前に採取したものと比較して尿細管の拡張が著明だった。したがって、従来の報告における 4 週目付近での尿路再建よりも、実際の適期は早期であることが明らかとなった。さらに、Day21 以降、超音波検査所見において、MNB 自体の形状や MNB 膀胱の大きさに変化がない MNB が存在した(16.8%)。発育不良となった原因として MNB の採取時に微小な傷害が加わった可能性、MNB を採取したドナーの問題、拒絶や血管新生が上手く行われなかった可能性が挙げられるが、本章の研究では原因は明確にできなかった。しかし、これらの MNB は Day35 まで発育の経過を観察したにも関わらず、大きな変化が認められなかったことから、Day21 はラットの MNB 移植において、MNB の発育の良悪を判断する基準となりうる時期と考えられた。これらのことから、1 日おきの超音波検査を行い、仮説に合致した MNB の組織学的評価を行うことで、後腎の腎後性腎障害が長期間継続し、後腎へ傷害が加わることを未然に防ぐ指標となることがわかった。

本章では、1日おきに超音波検査による観察を行ったが、一部のラットでは1日で急速な膀胱の拡張が認められた。ラットでは、出生時に形成されるネフロン数は成熟時の10%程度であり、生後1週間以内に腎臓形成が完了するといわれている[21]。本研究で使用したMNBは、胚発生日15日目に採取したものであり、ラットの出生は通常平均して妊娠21~23日目付近であることを考慮した場合、移植後2週間程度で腎臓の形態形成が完了することとなる。移植後2~3週間でMNBの急速な尿の貯留がみられたことは、正常な発育と時期を同じくして進んだ可能性があった。すなわち、良好に成長したMNBは、正常な胎仔ラットの生体内臓器の成長に近い速度で発育する可能性があることが示された。そのため、移植したMNBがラット内で急速に成長すると考えられる2週目から、移植した膀胱の拡張をできる限り短い間隔で観察し、評価することが重要であると考えられた。しかしながら、胎齢期間の異なる異種動物での発育については、本章の結果に従うとは断定できないことから、今後は異種動物ごとの評価を行う必要があると考えられる。

病理組織学的検査結果において、SWPUの適期と考えられた時点で採取したMNBでは、第一章のMNB後腎で認められたような過剰な尿細管の拡張や線維化の進行は確認されなかった。閉塞は通常、尿管や腎盂圧の上昇を引き起こし、続いて尿細管腔の拡張を誘発する。この圧力の上昇は尿細管上皮細胞を刺激し、上皮間葉転換により線維化が進行する原因となる[72]。ラット片側尿管閉塞(UUO)モデルを用いた研究では、尿路閉塞直後に腎臓組織内にTGF- $\beta$ 1の発現が検出され、閉塞2日後にビメンチンと筋線維芽細胞の発現が認められた[95]。同様に、ラット新生仔UUOモデルを用いた器官形成期

の実験では、5日間の尿路閉塞の後、閉塞を解除したところ、腎臓の成長は30~50%にまで遅延し、血圧の上昇、尿細管萎縮の悪化、さらに、GFR、尿量、ナトリウム・カリウム排泄量の低下などが生じており[21]、腎臓形成時期に発生する傷害が、その後の腎臓機能に大きな影響を与えることがわかっている[20,21]。本研究において、移植したMNBの後腎は、観察期間中に新生仔期に移行し、新生仔期のUUOモデルの状況に類似するため、その成長においても閉塞が大きく関与する可能性があると考えられた。したがって、本研究では、仮説のSWPU適期でのMNB採取における病理組織学的結果から、適期にSWPUを行って腎後性腎障害を早期に回避することにより、尿細管の拡張、それに続く間質の線維化を軽減する可能性があることがわかった。

本章の結果より、設定したSWPU適期の仮説に合致するMNBは、MNB膀胱が拡張し始め、かつ、MNB後腎は水腎化していない、極短期間であり、この時点でSWPUを行うことにより、尿路閉塞が始まったと考えられる直後に閉塞を解除することができるため、閉塞性の腎後性腎障害を最小限にすることができると考えられた。したがって、仮説を設定したSWPU適期の基準が、有用であることが明らかとなった。次章では、この確立した基準でSWPUを実施することにより、後腎の発育と機能にどのような影響を与えるかを検討することとした。



## 付図表および説明

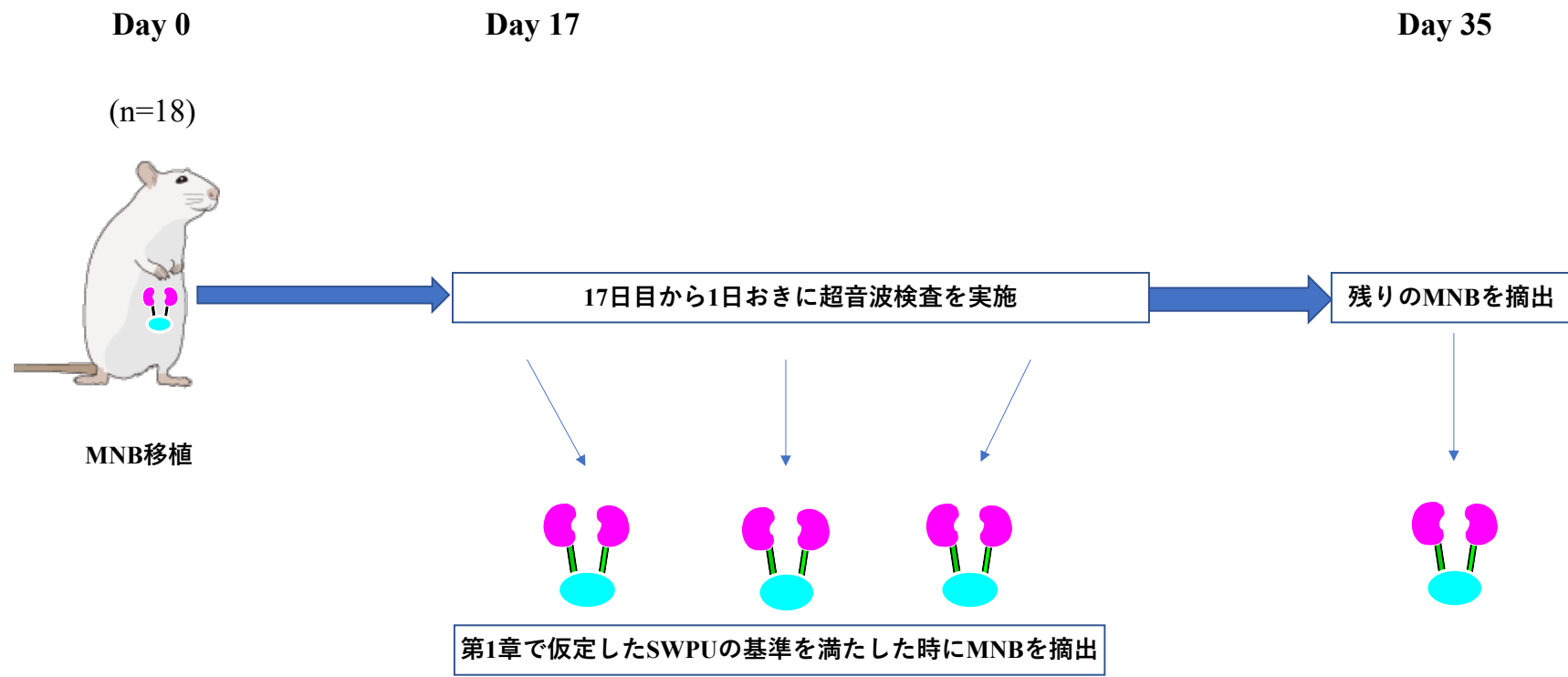


図 15. 実験プロトコル

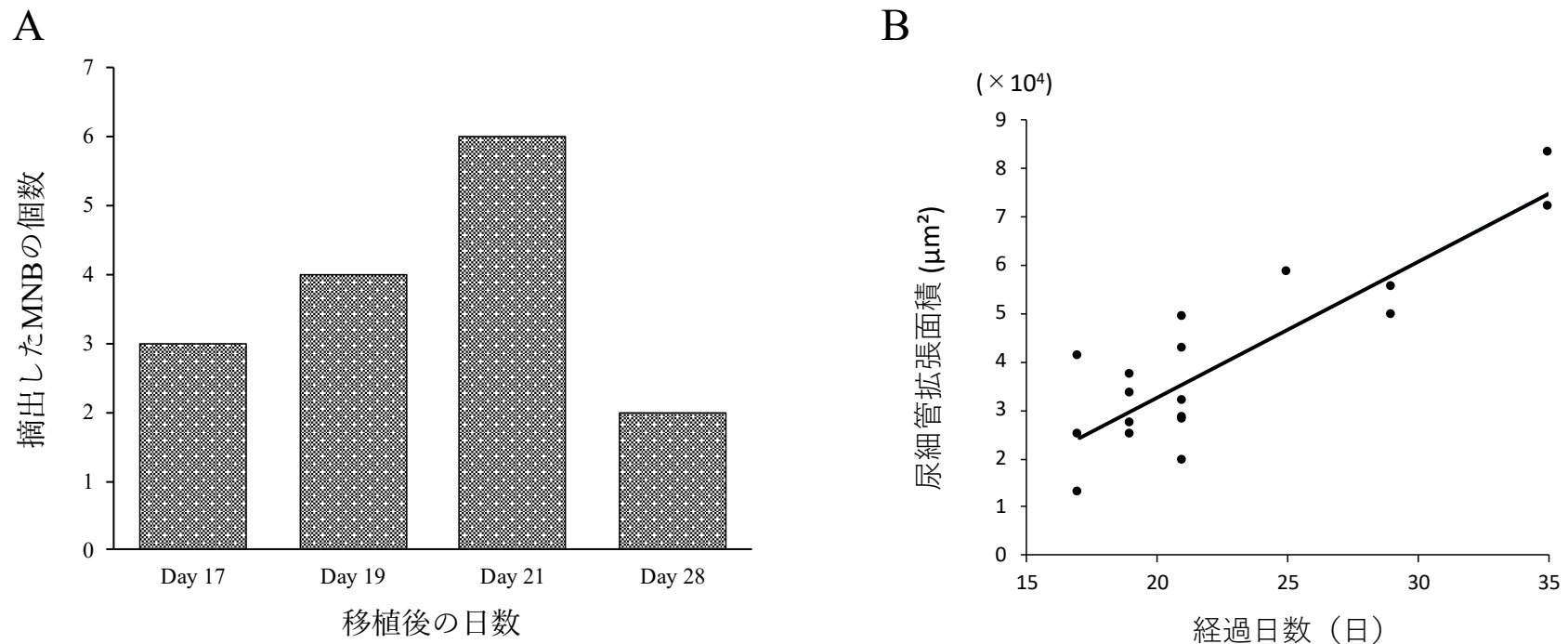


図 16. 適期で採取した MNB の個数と日数

A: 移植後の最適な SWPU までの日数と SWPU 適期における仮説で採取された MNB の数を示した。大部分の MNB は 21 日以前に採取した。Day35 で採取した MNB は 3/15 個であり、これらは発育不良と考えられたため、グラフには示していない。B: 尿細管拡張面積と経過日数の相関を示した。MNB を採取した日数と尿細管拡張面積は強い正の相関を示した ( $r=0.87$ )。

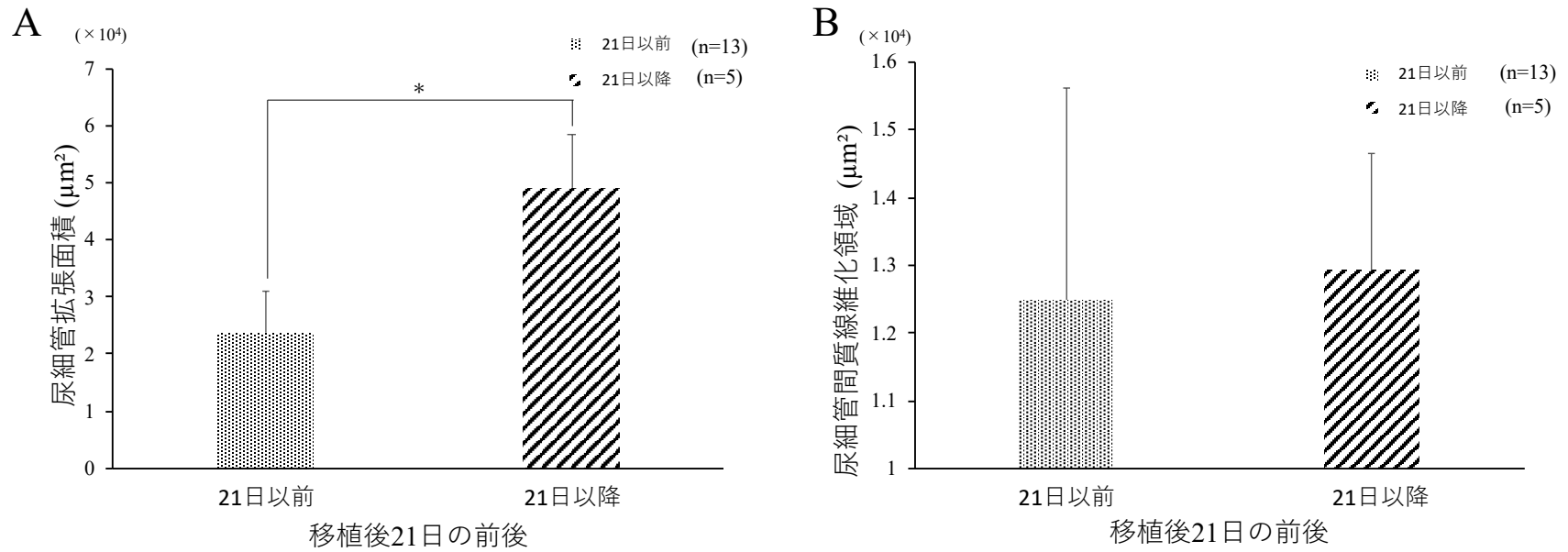


図 17. Day21 以前と Day21 以降に採取した MNB の尿細管拡張と繊維化

A : Day21 以前と以降に採取した MNB の尿細管拡張の比較をグラフで示した。Day21 以前 (Day21 を含む) に採取した MNB の後腎における尿細管拡張領域は、移植後 21 日以降に採取した MNB と比較して有意に軽減した ( $p < 0.01$ )。B : Day21 以前 (Day21 を含む) と以降に採取した MNB における間質の線維化の比較を示した。2 つのグループに差は認められなかった。

## V. 第四章：SWPU 適期に尿路再建を実施した場合の MNB の発育

### 1. 緒言

動物の胎仔期に器官形成へ起こる事象は、出生後の臓器の機能に影響を与える重要な要因である。中間中胚葉から分化する腎臓に関しては、前腎、中腎は後の発生過程で大部分が消失し、後腎のみが腎臓として機能することになる。後腎の発生には後腎間葉と尿管芽の相互作用が必須であり、ネフロン創生には尿細管や糸球体を作成するために Six2, Osrl, Sall1 のような様々な発生因子が必要とされる [101]。これは移植した未成熟な後腎においても重要であると考えられ、レシピエントに移植した状況下での物理的または化学的因子の変化は、その後の発生のみならず発育や機能に影響を及ぼすことが予想される。

CKD の進行に伴い、間質の線維性マトリックスは増加し、腎臓の機能低下が著しくなる。線維化は、毒性、虚血、遺伝的、高血糖、高血圧のような多様な要因に関連して発生し [33,35]、腎機能廃絶に至るカスケードを亢進させる。尿路閉塞はこのような要因と同様に線維化と腎機能の低下を誘発する。尿路閉塞は尿細管拡張を引き起こし、その数時間後にはマクロファージの遊走が起こり、炎症を惹起することで線維化につながる [104]。さらに、尿路閉塞といった腎後性腎障害における腎成長障害は、細胞増殖の低下、尿細管上皮細胞アポトーシスの増加、進行性間質性線維症などの複数の組織学的変化の結果であることが示されている [19,20,24]。また、胎仔期の尿路閉塞が後の腎臓発育に関連することが、人や動物モデルにおいて報告されており、胎仔期における尿路閉塞の傷害性が提起されている [20,21,52,82]。

したがって、本章では第三章で確立した SWPU 適期の基準を使用して、実際に SWPU を行うことにより、腎後性の損傷を軽減し、線維化を抑制できるかなど、適期での SWPU が MNB の発育と機能に及ぼす影響を評価することを目的とした。

## 2. 材料及び方法

### 2-1. 供試動物

妊娠 15 日齢の雌の Lewis ラット 3 匹(日本チャールズリヴァー)と 10 週齢の雄の Lewis ラット 9 匹(297.5±9.8g)を用いた。飼育管理は北里大学獣医学部実験動物指針および実験動物の飼育管理マニュアルに従って行った。(承認番号 No:19-085)

### 2-2. MNB の分離

妊娠 15 日目の妊娠ラットをイソフルランで麻酔導入後、2%で維持した。子宮を無菌的に摘出後、冷却した HBSS 内で胎仔を摘出した。手術用顕微鏡下で、胎仔から MNB を採取し、保存液内で移植直前まで氷上で保存した。

### 2-3. 実験方法

実験プロトコルを図 18 に示した。レシピエントラットをイソフルランで麻酔導入、維持した。腹部正中切開後、腸管を体外に牽引し、後腹膜および腹部大動脈を露出した。手術用顕微鏡下で後腹膜に小切開を加え、腹部大動脈近傍の後腹膜下腔に MNB を移植した(Day0)。移植後、6-0 非吸収性縫合糸(PROLINE®)で後腹膜を 1 糸縫合した。腸管を戻し、3-0 非吸収性縫合糸(ベアーメディック)を用いて腹壁と皮膚をそれぞれ連続縫合で閉創した。

第三章で決定した超音波検査を用いた基準により SWPU を実施した群(SP 群: n=6)、これまでの報告と同様に移植後 4 週目に SWPU を行った群(28UR 群: n=3)に設定した。SWPU 法は第一章の方法と同様に行なった。すなわち、イソフルランで麻酔導入、維持し、腹部正

中切開後 MNB 移植部位を露出した。レシピエントラットの左腎動脈および尿管を腎門付近で分離・結紮し、左腎摘出を行った。摘出後、残った左側尿管と同径の切開を MNB 膀胱に加え、11-0 ナイロン(11-0 黒ナイロンモノフィラメント、ケイセイ医科工業株式会社、東京都、日本)で単純結紮縫合を行った。SWPU 実施後、3-0 非吸収糸で腹壁と皮膚をそれぞれ連続縫合で閉創した。Day56 まで経過観察とし、全ての MNB を採取した。

#### 2-4. 超音波検査を用いた MNB、MNB 膀胱体積測定法

MNB 移植後 2 週目から 1 日おきに Day28 までと Day56 に超音波検査を行い、MNB を経時的に観察した。ラットをイソフルランで麻酔導入、維持し、仰臥位で検査を行った。機材は超音波診断装置 (LOGIQ S8 with XDclear®) を使用した。11MHz リニアプローブ、ダイナミックレンジ 75、ゲイン 90、深度 2.5 に設定して検査を行った。矢状面で MNB と MNB 膀胱最大後径(L)、最大上下径(H)、横断面において最大横径(W)を測定し回転楕円体の式を用いて MNB 体積、MNB 膀胱体積を求めた。

#### 2-5. 病理組織学的検査

採取した MNB 組織を、4%-パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液 (ナカライテスク株式会社、京都府、日本)で固定した後、パラフィン包埋し、2 $\mu$ m に薄切処理後、Hematoxylin-Eosin(HE)染色および、Masson-trichrome(MT)染色、TGF- $\beta$ 1、Vimentin、Collagen- $\alpha$ 1 Type1 の免疫染色、Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridien triphosphate-biotin nick and labeling (TUNEL)染色を行



った。染色したスライドは、顕微鏡用デジタルカメラ (cellSens、オリンパス株式会社、東京、日本) を用いて、TUNEL 染色は 1 スライドにつき 10 視野、その他は 1 スライドにつき 20 視野を撮影した。画像は画像解析ソフト ImageJ® (National Institutes of Health、メリーランド、アメリカ) を用いて HE 染色では尿細管の拡張、MT 染色は後腎の線維化、免疫染色では各分子の発現領域、TUNEL 染色では断片化 DNA を標的とし、DAPI 染色による細胞数に対する陽性細胞数の割合によりアポトーシスを評価した。評価は、HE 染色、MT 染色、免疫染色では画像解析ソフト ImageJ で目的とする領域の面積を算出し、TUNEL 染色ではアポトーシス細胞の割合を算定して行った。

#### 2-5-1. TGF- $\beta$ 1 染色

薄切した組織を脱パラフィン、親水化処理後、3%過酸化水素メタノールで 15 分間内因性ペルオキシダーゼ活性不活化処理を行った。その後、10 $\mu$ g/ml の Proteinase K で 30 分間抗原不活化処理を行い、1%ヤギ正常血清 (ヒストファインブロッキング試薬 10%ヤギ正常血清、株式会社ニチレイバイオサイエンス、東京都、日本) を用いてブロッキング処理を行なった。TGF- $\beta$ 1 抗体 (3C11 sc-130348、SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY、テキサス、アメリカ) を一晩反応させ、二次抗体 (Dako Envision+System-HRP Labelled Polymer Anti-mouse、Agilent、カリフォルニア、アメリカ) を 30 分間反応させた。DAB (株式会社ニチレイバイオサイエンス) で発色後、ヘマトキシリンで対比染色し、脱水、透徹、封入を行った。

#### 2-5-2. Vimentin 染色

薄切した組織を脱パラフィン、親水化処理後、3%過酸化水素メタノールで15分間内因性ペルオキシダーゼ活性不活化処理を行った。その後、10 $\mu$ g/mlのProteinase Kで30分間抗原不活化処理を行い、1%ヤギ正常血清を用いてブロッキング処理を行なった。一次抗体(株式会社ニチレイバイオサイエンス)を一晩反応させ、二次抗体(Dako)を30分間反応させた。DABで発色後、ヘマトキシリンで対比染色し、脱水、透徹、封入を行った。

#### 2-5-3. Collagen- $\alpha$ 1 Type1 染色

薄切した組織を脱パラフィン、親水化処理後、3%過酸化水素メタノールで15分間内因性ペルオキシダーゼ活性不活化処理を行った。その後、10 $\mu$ g/mlのProteinase Kで30分間抗原不活化処理を行い、1%ヤギ正常血清を用いてブロッキング処理を行なった。COL1A1抗体(3G3 sc-293182、SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY、テキサス、アメリカ)を一晩反応させ、二次抗体(Dako)を30分間反応させた。DABで発色後、ヘマトキシリンで対比染色し、脱水、透徹、封入を行った。

#### 2-5-4. TUNEL 染色

薄切した組織を脱パラフィン、再水和処理後、10 $\mu$ g/mlのProteinase Kで15分間抗原不活化処理し、3%過酸化水素水溶液で内因性ペルオキシダーゼ活性不活化処理を5分間行った。また、50 $\mu$ lの反応液(TdT Enzyme 5 $\mu$ l + Labeling Safe Buffer 45 $\mu$ l, タカラバイオ株式会社、滋賀県、日本)を37 $^{\circ}$ Cで90分間反応させた後、PBSで反応を停止した。その後、Anti-FITC HRP Conjugate(タカラバイオ株式会社)70 $\mu$ lを

37°C、30 分間反応させて観察を行った。

#### 2-6. 糸球体濾過量測定

糸球体濾過量(GFR)は、市販のキット(Diacolor®イヌリン、東洋紡、大阪、日本)を使用して、キットの指示に従って測定した。方法は、まず Day56 の MNB 採取前に麻酔下で両側腎摘出術を実施した。その後、ラットの尾静脈より、100mg/kg のイヌリン製剤(イヌリード注、株式会社富士薬品、埼玉、日本)を尾静脈内に投与した。イヌリン投与 1 時間後および 2 時間後にラットの尾静脈から採血し、血漿を用いて GFR 測定値を取得した。正常な腎臓における GFR 値は、健康な成体ラットにより同様の手技で得たデータを用いた(表 5)。

#### 2-7. 統計処理

結果は平均値±標準偏差で表した。両群における GFR 値、尿細管の拡張と間質の線維化、TGF-β1、Vimentin、Collagen-α 1 Type1 の発現量、アポトーシス細胞の割合の比較は Mann-Whitney U test により評価した。TGF-β1 発現量とアポトーシス細胞の割合の関連性の検討には Spearman's 順位相関係数を用いた。すべての検定は、 $p < 0.05$  をもって統計的に有意とした。

### 3. 実験結果

#### 3-1. 両群における採取した際の MNB の外観

採取した MNB の代表的な画像を例として示した(図 19)。実体顕微鏡での観察において、SP 群では、MNB 後腎の表面は平滑であり、色は腎実質様で血流を視覚的に確認でき、MNB 後腎に液体の貯留は観察されなかった。一方、28UR 群は、観察した MNB 後腎の形状は不規則であり、MNB 膀胱には顕著な液体貯留は認められなかった。

#### 3-2. 56 日間発育した MNB の糸球体濾過量

図 20 に GFR 測定結果を示した。GFR は、SP 群および 28UR 群すべての動物で測定可能であった。SP 群と 28UR 群の間に有意な差は認められなかったが、SP 群は GFR が高い傾向にあった。SP 群では、GFR が 0% の個体は存在しなかった。

#### 3-3. 尿細管拡張と線維化における評価

図 21A に尿細管拡張および間質の線維化を評価するための HE および MT 染色の顕微鏡写真を示した。28UR 群は SP 群と比較して拡張傾向にあったが、2 つの群間で有意差は認められなかった(図 21B)。

間質の線維化の比較を図 5B に示した。線維化面積は、SP 群の方が 28UR 群よりも有意に軽度であった( $p < 0.01$ )。

線維化マーカーの免疫組織化学染色画像を図 22A に示した。TGF- $\beta$ 1 は 28UR 群における尿細管上皮細胞、尿細管間質で強い発現が認められた。同様に、Vimentin と Collagen- $\alpha$ 1 Type1 は尿細管間質で強い発現を示した。線維化マーカーの発現面積は、28UR 群と比較して SP 群のすべてのマーカーで有意に抑制した( $p < 0.01$ )(図 22B)。

#### 3-4. TUNEL 染色による後腎におけるアポトーシス割合

TUNEL 染色の画像を図 23A に示した。アポトーシス細胞の割合は、尿細管上皮細胞、糸球体で 28UR 群と比較して SP 群の MNB で有意に低かった ( $p<0.05$ )(図 23B)。

#### 3-5. TGF- $\beta$ 1 とアポトーシスの相関性

TGF- $\beta$ 1 の発現と糸球体と尿細管上皮細胞の両方のアポトーシス細胞の割合との間に強い正の相関が認められた ( $p<0.01$ )(図 24)。

#### 4. 考察

本章は、決定した基準で SWPU を実施することにより、その後の後腎の発育を評価することを目的とした。

本章の結果から、適期で SWPU を実施することにより、その後の発育において線維化が軽減することが明らかとなった。新生仔マウスにおける慢性 UUO 後の尿細管細胞アポトーシスは尿細管拡張に直接関連していることが知られている [21]。また、尿細管上皮細胞のアポトーシスが機械的伸展によって刺激され、アポトーシスの重症度が伸展の大きさに直接依存するとされている [21]。一方で、尿路閉塞に長期的に罹患した場合、尿細管と糸球体ボーマン囊が持続的に拡張し、尿細管細胞から TGF- $\beta$ 1 のような炎症性サイトカインが産生されることが明らかとなっている [70]。TGF- $\beta$ 1 は本来、発育中の胚の造血組織、内皮組織、骨組織などの組織で発現し、心臓形成の重要な成長因子として機能する [4,41]。また、13 日齢のラット胎仔の後腎において TGF- $\beta$ 1 の発現が確認されており、腎形成を調節することが示されている [91]。しかし、TGF- $\beta$ 1 は線維化に深く関与しており、腎臓の尿細管細胞に上皮間葉転換を引き起こし、ビメンチン、コラーゲン、および  $\alpha$ -平滑筋アクチンの発現を誘導する [70]。TGF- $\beta$ 1 は近位尿細管上皮細胞および間質線維芽細胞のプロテアーゼ阻害剤-1(PAI-1)を標的とし、転写因子 p53 はこのメカニズムを介して複製する。これらは細胞の老化状態を引き起こし、細胞増殖阻害とアポトーシスを誘発する [34,47,70,92]。したがって、胎仔の MNB 移植再生において、尿路閉塞は TGF- $\beta$ 1 を介して線維化へと誘導する一つの機序であり、適切な時期での SWPU は、尿細管拡張に伴う TGF- $\beta$ 1 の抑制、さらにそれに付随する線維化や尿細管細胞のアポト

ーシスを抑制することが明らかとなった。

本研究の GFR 測定では、SP 群の GFR が成熟ラットの腎機能と比較して 5% 程度であった。これまでの研究において、移植した後腎の GFR 測定は、通常の腎機能の 0.3~11% とされている [26,67,90]。本研究における推定値の根拠は、後腎を移植し、尿路再建後に約 90~130 日後の GFR 測定したこれまでの報告に基づいている [26,67,90]。本研究の GFR 値がこれまでの報告より低い要因の一つとして、発育期間の短さが考えられる。以前の報告では、3~4 ヶ月と比較的長期間であった [26,67,90]。本研究では、これまで実施した章を元に観察期間を 56 日間に設定した。これは、前述の観察期間に対して半分程度の期間設定である。したがって、適期に SWPU を実施して MNB の発育をさらに長期的に観察することで、後腎の機能をより高めることができる可能性があると考えられた。これまでの研究では、後腎の SWPU は一定に設定した時期に実施しており、実際に移植・再建・発育の過程が成功した後腎は少なかったことが予想された。また、以前の報告にあるような [67]、ラットでの後腎付着尿管とレシピエント尿管の端端吻合を実施することは大変困難であり、狭窄による尿路閉塞は後腎のさらなる発育を妨げる原因となりうる。尿管と尿管の端端吻合による尿路再建は、尿管膀胱吻合術と比較しても尿管狭窄の発生が高く、合併症に陥りやすい [60,99]。今回の方法のように、拡張した MNB 膀胱とレシピエント尿管における SWPU が、MNB にとって適切な時期に正確に実施できたことは、長期的な尿路閉塞に伴う細胞の変性や壊死を抑制し、後腎発育と機能維持へ貢献することが期待できると考えられた。

本章では、発育途中の後腎に対する適期での SWPU の実施により、

尿細管拡張を早期に解除することができ、TGF- $\beta$ 1 の発現や尿細管細胞のアポトーシスを軽減した可能性がある。このことは、後腎の間質内におけるコラーゲンやビメンチンへの組織置換による線維化抑制し、機能維持に貢献したと考えられる。したがって、移植後約 60 日における MNB の GFR 値の結果に明らかな差は認められなかったものの、さらに長期観察をすることによって、GFR 値のさらなる向上と、臓器の成長が継続する可能性を示唆した。



## 付図表および説明

ラット番号	GFR (ml/min/m <sup>2</sup> )
1	58.7
2	58.0
3	64.4
4	65.2
平均	61.6
標準偏差	3.2

表 5. 成熟した健康なラットにおける GFR 値の参考値

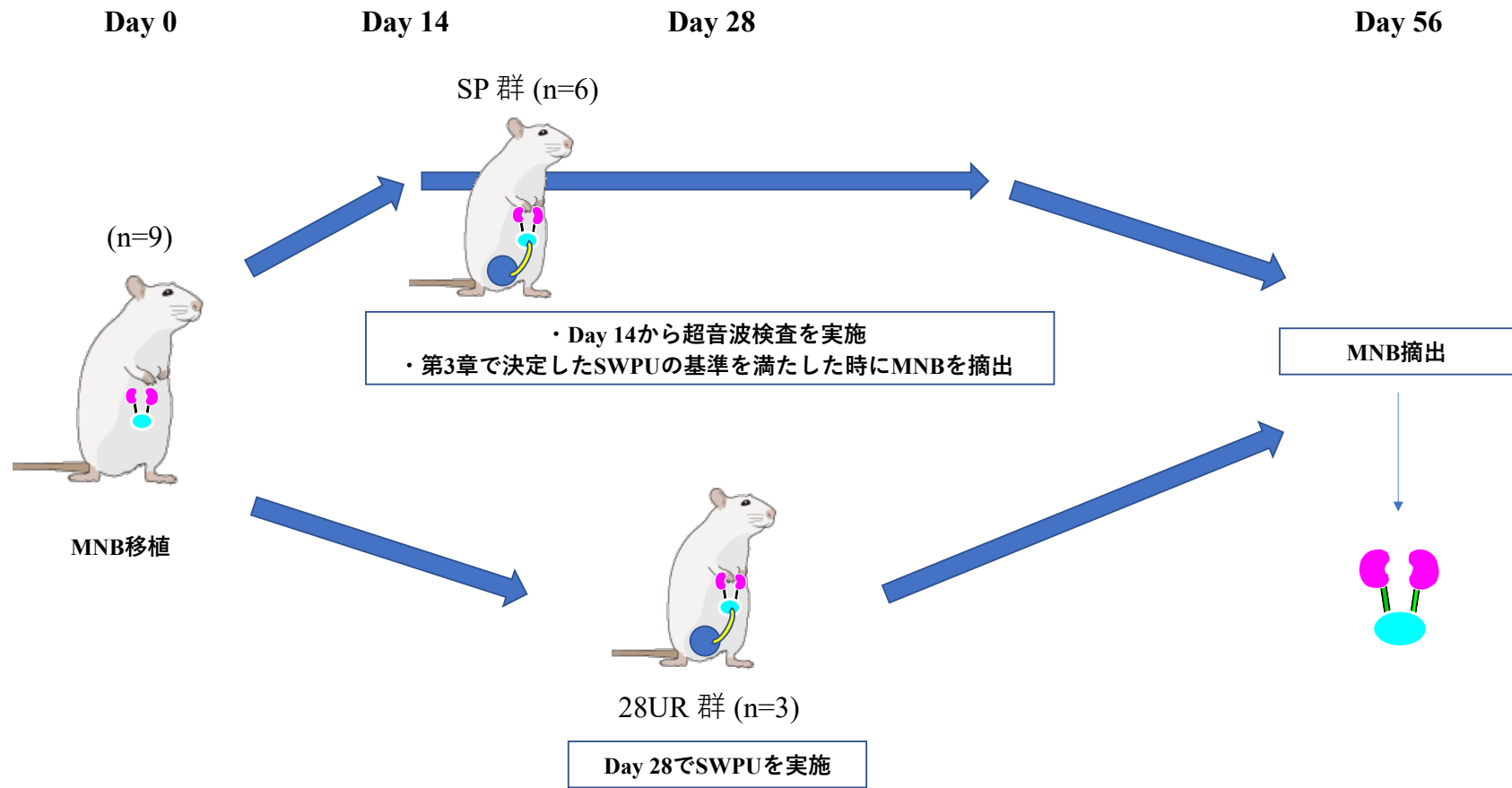


図 18. 実験プロトコル

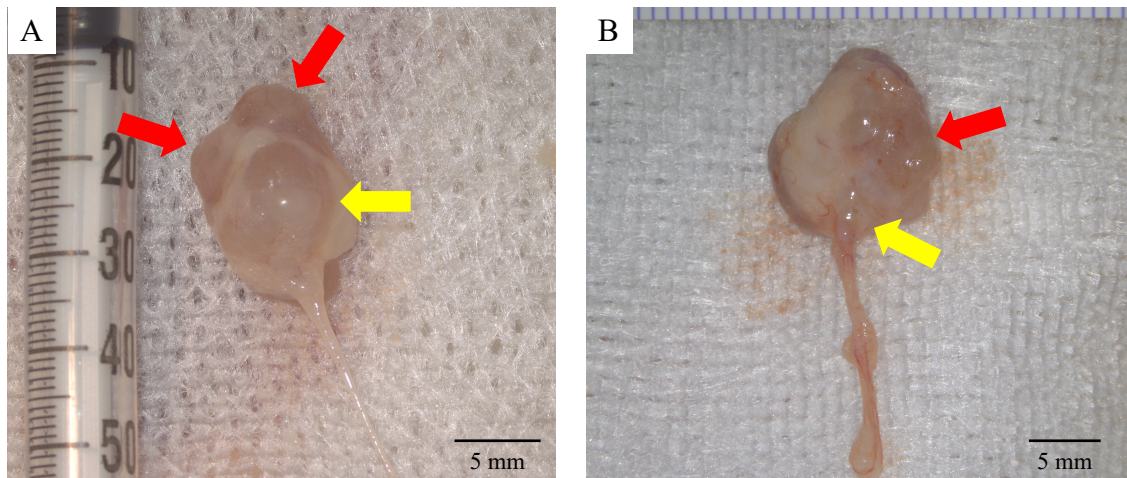


図 19. 採取した MNB の代表的な画像

実体顕微鏡での観察における MNB の代表的な画像を示した。A は SP 群の MNB における代表的な画像を示した。SP 群では、MNB 後腎の表面は平滑であり、色は腎実質様で血流を視覚的に確認でき、MNB 後腎に液体の貯留は観察されなかった。一方、28UR 群は、観察した MNB 後腎の形状は不規則であり、MNB 膀胱には顕著な液体貯留は認められなかった。

赤矢印：MNB 後腎、黄矢印：MNB 膀胱

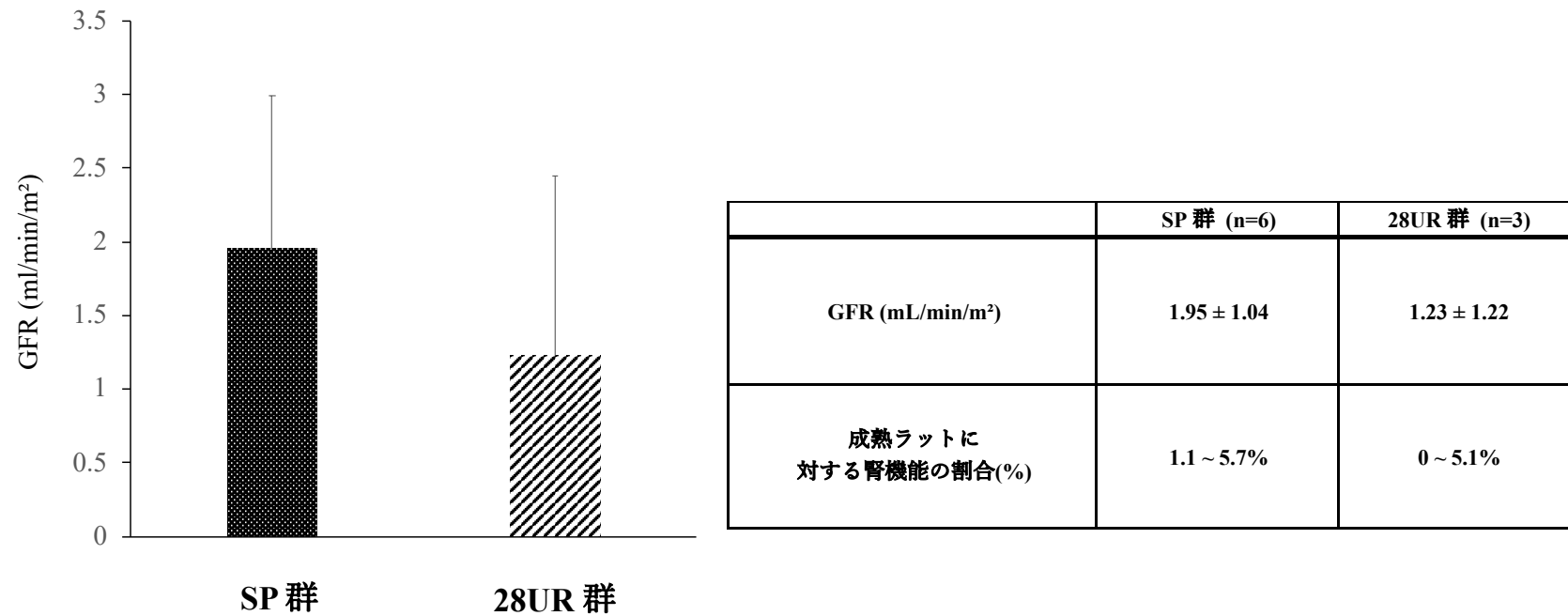


図 20. 両群における GFR 値

GFR 値において SP 群と 28UR 群の間に有意な差は認められなかったものの、SP 群で高い傾向にあった。

28UR: Day28 に SWPU を実施した群；GFR: 糸球体濾過率；SP: 第三章で立証した SWPU 適期の基準を用いた群

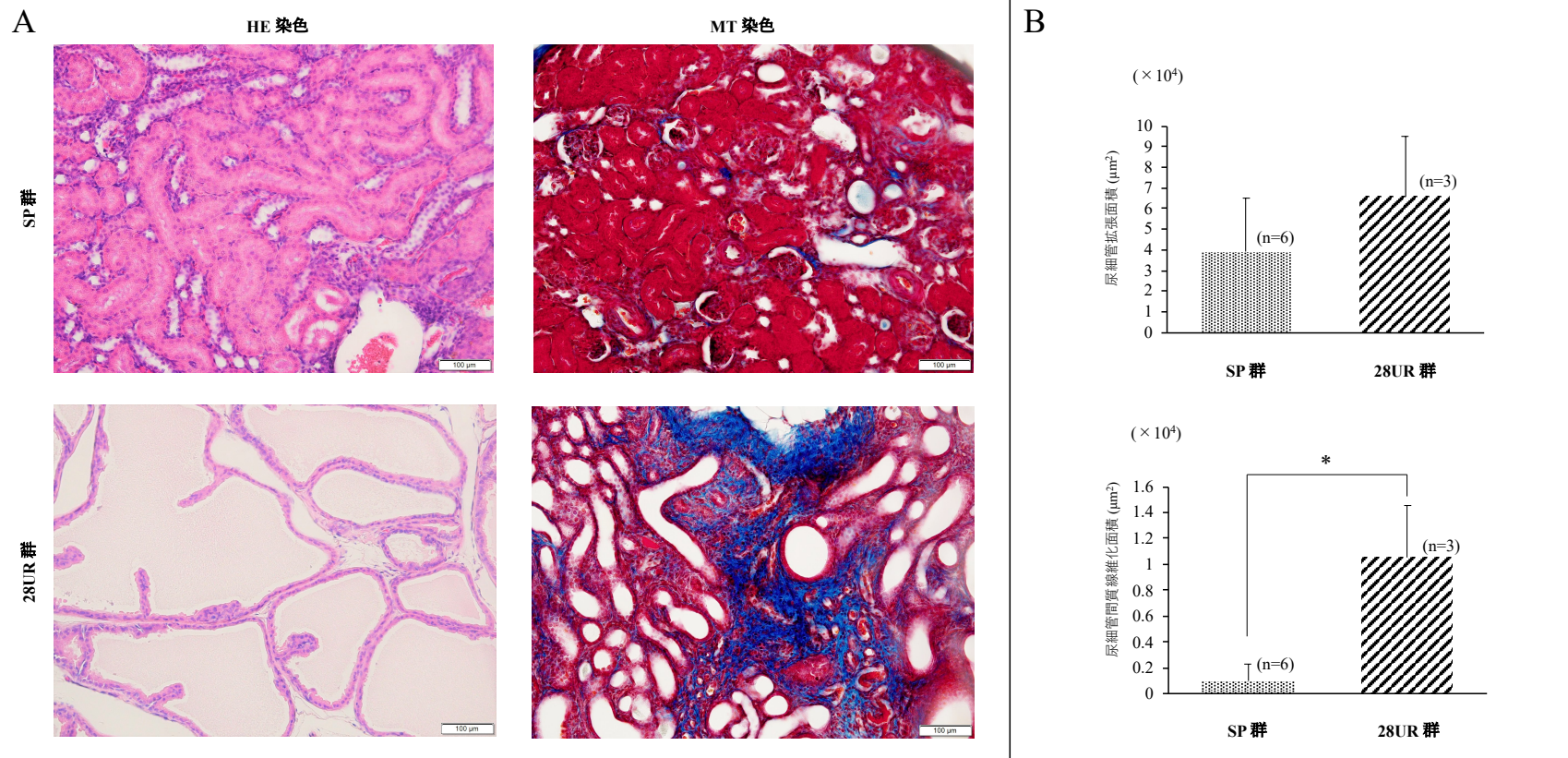


図 21. 尿細管の拡張と間質線維化

A に HE および MT 染色による MNB の病理組織画像を示した。Day56 で採取した MNB は SP 群において一部の尿細管の拡張は認められるものの、間質の線維化や単核球の浸潤は軽度であった。28UR 群は一部の尿細管の拡張は認められるものの、間質の線維化や単核球の浸潤は軽度であった。28UR 群は

後腎の全域における著しい尿細管の拡張と間質の線維化が認められた。BはSP群と28UR群の間の尿細管拡張面積および間質の線維化面積の比較をグラフ化した。尿細管拡張に差が認められないものの、線維化は28UR群と比較してSP群が軽度であった。



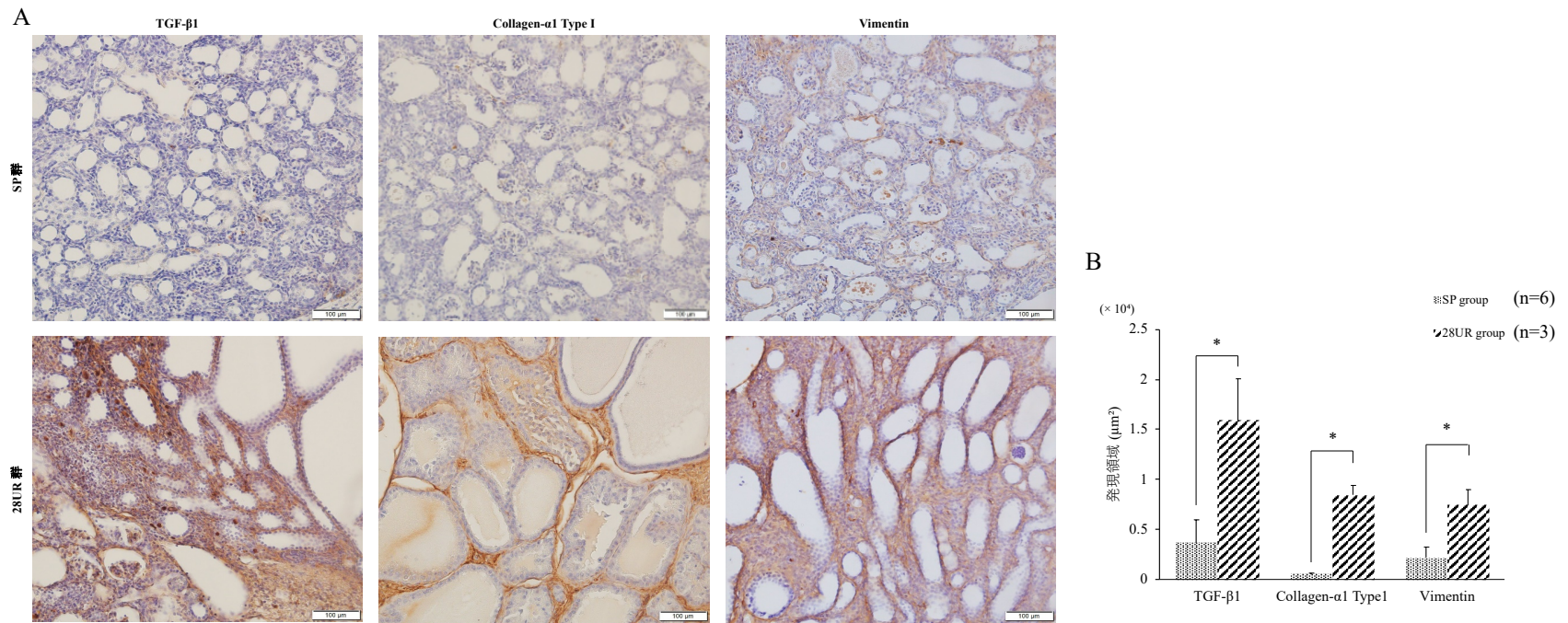


図 22. 線維化マーカー発現

A は TGF- $\beta$ 、Collagen- $\alpha$ 1 Type1、および Vimentin の免疫組織化学染色の画像を示した。B は両群における線維化マーカー発現面積をグラフに示した。SP 群と 28UR 群の TGF- $\beta$ 1、Collagen- $\alpha$ 1 Type1、Vimentin 発現面積の比較において 28UR 群よりも SP 群で有意に抑制がみられた ( $p < 0.01$ )。



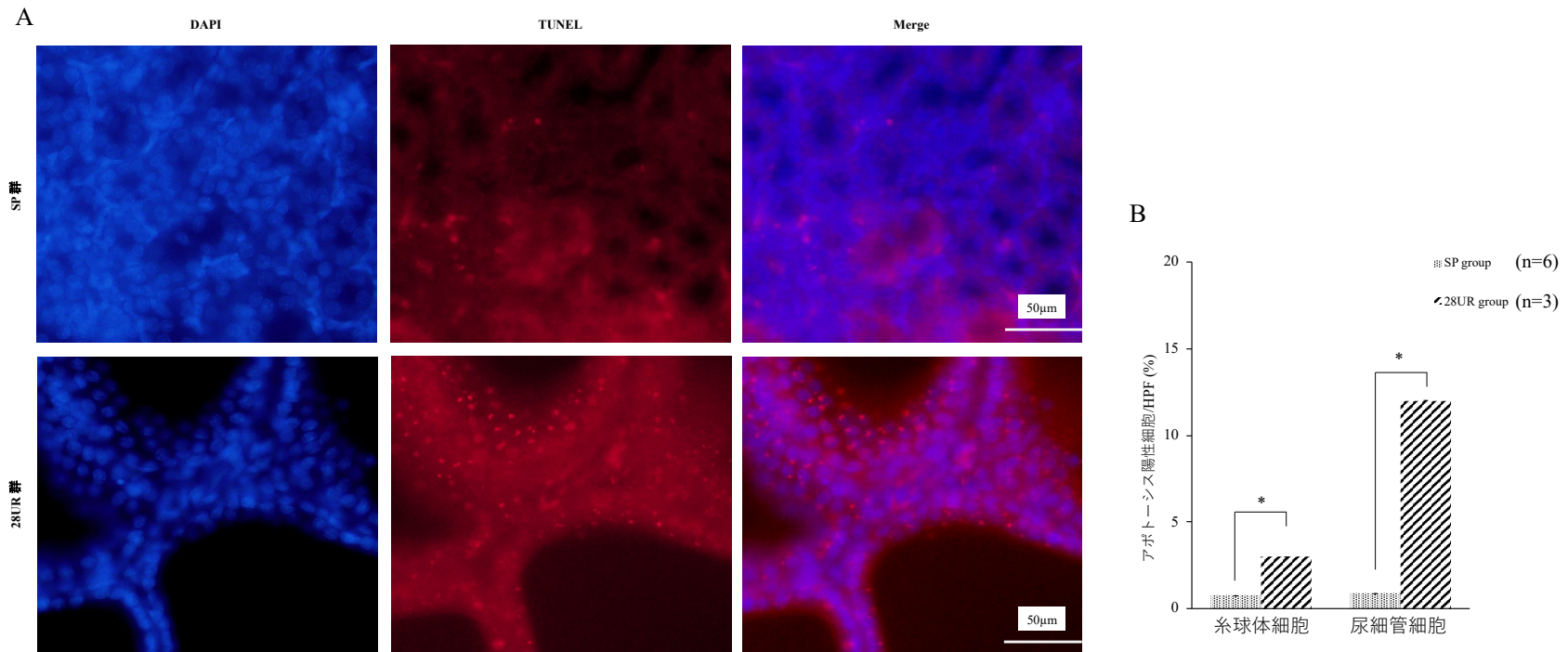


図 23. アポトーシス細胞発現割合

A に SP および 28UR 群の TUNEL 染色の画像を示した。B に両群間における尿細管細胞と糸球体細胞のアポトーシス割合を示した。糸球体細胞、尿細管細胞ともに SP 群が 28UR 群と比較して有意に軽度であった ( $p < 0.01$ )。

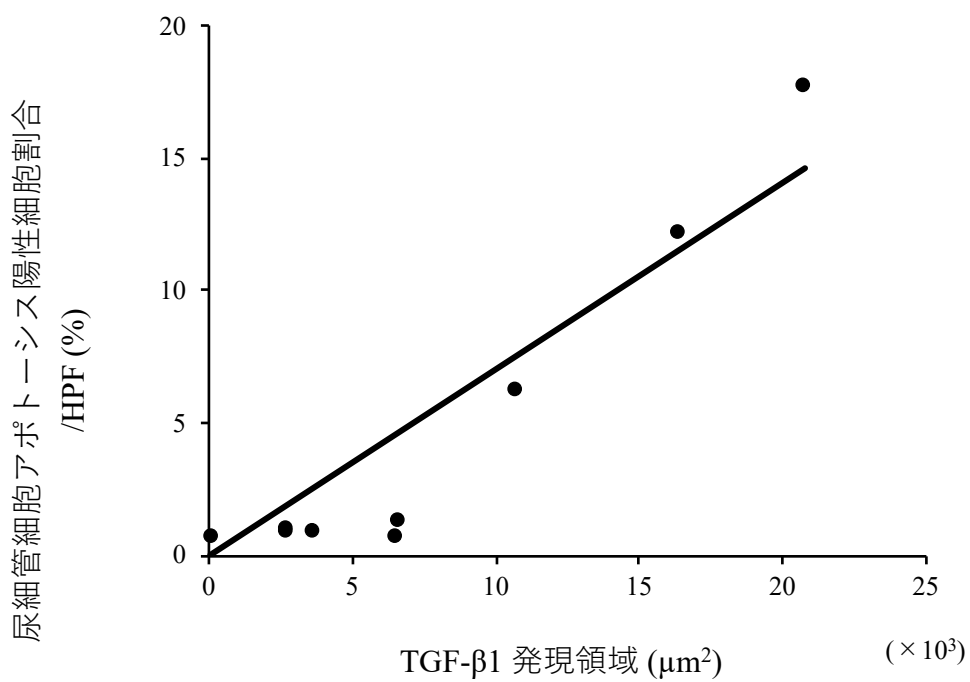
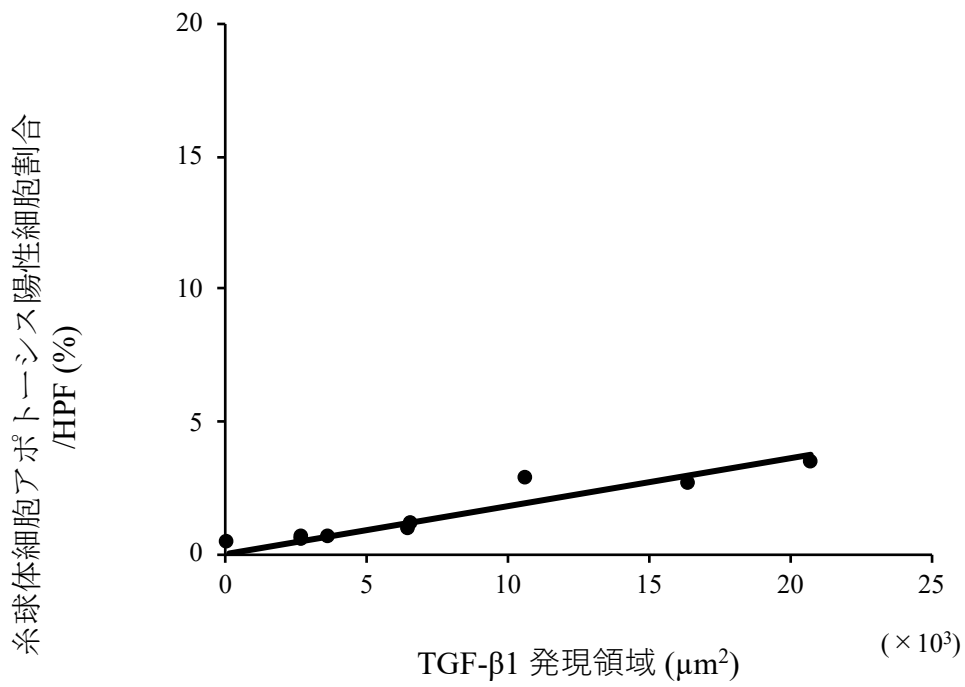


図 24. アポトーシス発現割合と TGF-β1 領域の相関性

アポトーシス発現割合と TGF-β1 における相関性を示した。上の図：糸球体細胞におけるアポトーシス陽性率と TGF-β1 発現領域との相

関。下の図：尿細管細胞におけるアポトーシス陽性率と TGF- $\beta$ 1 発現領域の相関。

## VI. 総括

本研究は、猫の慢性腎臓病の再生医療における基礎的研究として、ラットの胎仔由来後腎・尿管・膀胱(MNB)の移植再生と、その尿路再建法である段階的蠕動尿管システム(SWPU)に着目して研究を行った。これまで明らかとされていなかった、ラットにおける MNB の形態学的変化や発育を経時的に評価する方法の検討と、SWPU 適期の基準を確立して発育を評価することが本研究の目的であった。

第一章では、これまで報告がなかったラットにおける後腎や MNB の発育過程を経時的に観察する方法として、造影 CT 検査と超音波検査を使用して評価方法の有用性の検討を行った。結果として、造影 CT 検査、超音波検査ともに MNB の画像描出が可能であり、超音波検査は、造影 CT 検査と比較して、水腎化した MNB の後腎や膀胱を明瞭に観察でき、カラードプラ法では MNB 周囲に流入する血流が確認可能であった。超音波検査を用いて MNB の 3 方向の距離を測定して算出した MNB 体積は、造影 CT 検査によって算出した体積と非常に近似しており、直径 1cm 程度の MNB を正確に評価できた。これらのことから、本章では、ラットにおける MNB の経時的評価は、超音波検査が有用であることを明らかとした。

第二章では、第一章より、超音波検査によりオスのレシピエントラットにおける MNB は、経時的に評価可能であったことが明らかとなった。しかし、CKD は性別に関わらず罹患し、さらに、臓器の発育や一般的な臓器移植に対して、性差が影響を与えることが知られている。したがって、本章では、オスとメスのラットをレシピエントとして、MNB 組織の発育へ与える性差の影響を検討することを目的とした。結果として、発育した MNB の体積は、オスでメスより

大きかった。尿貯留を確認できた MNB の割合はオスが高く、メスの MNB は移植後 28 日目以降においても MNB 体積に明らかな増加はなく、尿の生成量は増加しなかった。また、オスの MNB 後腎は尿生成による尿細管の拡張、それに伴う線維化が認められたが、メスの MNB 後腎は単核球浸潤、線維化、尿細管の萎縮のような拒絶様の反応がみられた。したがって、メスの MNB におけるこれらの組織所見は、一般的に移植の際に起こりうる拒絶反応と類似していた。これらのことから、本章では、MNB の移植再生において、レシピエントの性別によって MNB の発育に差が生じることを明らかにした。一方、SWPU を行う場合には、後腎の形態学的変化と、吻合するための MNB 膀胱の体積が、一定基準を満たしていなければならない、雌雄の違いではなく、MNB の成長から一定基準を決めていく必要性がある。したがって、次章では、MNB の成長過程において、SWPU を実施する適期の基準を決定しなければならないため、オスに統一した条件下での基準を検討することとした。

第三章では、これまで、MNB 移植に際して、移植後 28 日目に SWPU を実施する方法がとられてきたが、すでに後腎が水腎化した MNB が存在したことから、個々でその尿路再建適期が異なることが推察された。したがって、本章では、第一、二章の結果を踏まえて、オスのレシピエントを用い、移植した MNB における SWPU の尿路再建適期の仮説を立て、立証することを目的とした。仮説は、① MNB 内の液胞が一つである、かつ、② MNB 膀胱体積が第一章で SWPU 可能であった最低 MNB 膀胱体積を超えた時点とし、超音波検査を用いてこれらを経時的に評価した。結果として、移植した MNB の発育は、個々で異なることが明らかとなった。約 70% の MNB が、移植後

21日以内に、尿貯留と判定されるMNB膀胱への低エコー原性を示す所見が得られた。さらに、超音波検査によりSWPU適期と判断したMNBの後腎は、組織学的に尿細管の拡張が軽度であった。これらのことから、本章では、個体ごとにMNBの発育が異なる事を明らかとし、設定した仮説がSWPU適期の基準として有用であることを立証した。

第四章では、成長過程の腎臓における尿路閉塞は、腎臓の発育に大きく影響することが知られていることから、第三章で決定したSWPU適期で尿路再建を行うことにより、発育へ及ぼす影響について検討することを目的とした。結果として、SWPU適期に尿路再建を行ったMNBでは、移植後28日目にSWPUを実施したMNBと比較して、後腎の線維化が有意に抑制された。また、線維化を促進する因子であるTGF- $\beta$ 1の発現領域、さらに尿細管と糸球体におけるアポトーシス細胞の陽性率は低かった。また、SWPU適期に尿路再建した群は、全ての個体で尿を生成し、糸球体濾過量を測定することが可能であった。これらのことから、本章では、SWPU適期での尿路再建実施は、発育過程において尿細管拡張を抑制し、TGF- $\beta$ 1の発現抑制による線維化と尿細管細胞のアポトーシスを抑制することを明らかとした。

本研究から、MNBの発育を観察するために超音波検査が有用であることがわかり、経時的な発育の評価をすることによって、個々のMNBにおけるSWPU適期の基準に合致する時期を見極めることが可能となった。この基準をもとに、最適な時期にSWPUを実施することによって、後腎組織のさらなる成熟とより高い機能の獲得に貢献する可能性を示した。

## VII. 謝辞

本論文は著者が北里大学大学院獣医学系研究科獣医学専攻博士課程に在籍中の研究成果をまとめたものである。博士学位論文を提出するにあたり、多くの方々に御懇篤なる御指導、御高閲及び御鞭撻を賜った。

北里大学獣医学部小動物第2外科学研究室 岡野昇三教授、岩井聡美准教授、前田賢一講師に深甚なる謝意を表するとともに、深く御礼申し上げる。特に岩井聡美准教授には、指導教官として本研究の実施の機会を与えていただくとともに、研究的・臨床的観点での考え方の御指導、多くの方々との関係性構築を築いて頂いた。深く感謝の意を表する。さらに、岩井聡美准教授の恩師である慶応義塾大学医学部ブリヂストン臓器再生医学寄附講座 小林英司教授には研究の構築方法、考え方、手術手技に至るまで大変な御指導及び御鞭撻を賜った。この場をお借りして深く感謝の意を表する。

慈恵会医科大学腎臓・高血圧内科 横尾隆教授、慶応義塾大学医学部循環器内科佐野元昭准教授には、本研究の御助言、御指導頂いた。ここに深謝の意を表する。

研究の実施に際して多大なる御助言を頂いた赤坂むつ子技能主任、北里大学獣医学部獣医放射線学研究室柿崎竹彦講師、小動物第1内科学研究室 伊藤直之教授、亀島聡助教、多忙な中、書類の受理や機材の借用をしてくださった北里大学附属動物病院 川崎直美臨床検査技師、動物病院研修医、看護師、事務員の方々へ心より感謝の意を表する。

研究を支えて頂いた Suwannachote Thanikran 博士、小動物第2外科学研究室専攻生各位、特に土師崇史氏、松本拓也氏、早川千里氏、

平島達也氏には研究に際し、多くのご助力を頂いた。感謝の意を表  
する。

博士課程に所属するにあたり、多大な苦勞を掛けたにもかかわらず、支持と激励してくれた家族に感謝の意を表する。

最後に、本研究に尊い命を捧げてくれたラットに深く感謝し、冥  
福をお祈りする。



## VIII. 引用文献

1. Abrahamson, D. R., St John, P. L., Pillion, D. J. and Tucker, D. C. 1991. Glomerular development in intraocular and intrarenal grafts of fetal kidneys. *Lab. Invest.* **64**: 629-639.
2. Acierno, M. J. 2011. Continuous renal replacement therapy in dogs and cats. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* **41**: 135-146.
3. Ahmed, S. B. and Ramesh, S. 2016. Sex hormones in women with kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* **31**: 1787-1795.
4. Akhurst, R. J., Lehnert, S. A., Faissner, A. and Duffie, E. 1990. TGF beta in murine morphogenetic processes: the early embryo and cardiogenesis. *Development* **108**: 645-656.
5. アニコム 家庭どうぶつ白書. 2019. 第2部: 犬、猫の診療内容と診療費, pp.16. [https://www.anicom-page.com/hakusho/book/pdf/book\\_201912\\_2.pdf](https://www.anicom-page.com/hakusho/book/pdf/book_201912_2.pdf) [accessed on Jan 4,2021]
6. Aronson, L. R. 2016. Update on the current status of kidney transplantation for chronic kidney disease in animals. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* **46**: 1193-1218.
7. Barakat, T. I. and Harrison, R. G. 1971. The capacity of fetal and neonatal renal tissues to regenerate and differentiate in a heterotopic allogeneic subcutaneous tissue site in the rat. *J. Anat.* **110**: 393-407.
8. Barberet, V., Baeumlin, Y., Taeymans, O., Duchateau, L., Peremans, K., van Hoek, I., Daminet, S. and Saunders, J. H. 2010. Pre- and

- posttreatment ultrasonography of the thyroid gland in hyperthyroid cats. *Vet. Radiol. Ultrasound* **51**: 324-330.
9. Bartges, J. W. 2012. Chronic kidney disease in dogs and cats. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* **42**: 669-692.
10. Bartlett, P. C., Buren, J. W. V., Bartlett, A. W. and Zhou, C. 2010. Case-control study of risk factors associated with feline and canine chronic kidney disease. *Vet. Med. Int.* **2010**: 957570.
11. Berent, A. C., Weisse, C. W., Bagley, D. H. and Lamb, K. 2018. Use of a subcutaneous ureteral bypass device for treatment of benign ureteral obstruction in cats: 174 ureters in 134 cats (2009-2015). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **253**: 1309-1327.
12. Bloom, C. A. and Labato, M. A. 2011. Intermittent hemodialysis for small animals. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* **41**: 115-133.
13. Bonvalet, J. P., Champion, M., Courtalon, A., Farman N, Vandewalle, A. and Wanstok, F. 1977. Number of glomeruli in normal and hypertrophied kidneys of mice and guinea-pigs. *J. Physiol.* **269**: 627-641.
14. Breshears, M. A. and Anthony, W. C. 2017. The urinary system. pp. 617-681. In: *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 6th ed. (Zachary, J. F. ed.), Elsevier. St. Louis, Missouri.
15. Brown, C. A., Elliott, J., Schmiedt, C. W. and Brown, S. A. 2016. Chronic kidney disease in aged cats: clinical features, morphology, and proposed pathogeneses. *Vet. Pathol.* **53**: 309-326.

16. Brown, S. A. 2016. Chronic kidney disease: An update. pp. 457-465. In: August's consultations in feline internal medicine vol 7. (Joseph, W. B. and Susan, E. L. eds.). Elsevier. St. Louis. Missouri.
17. Carrero, J. J. 2010. Gender differences in chronic kidney disease: underpinnings and therapeutic implications. *Kidney Blood Press. Res.* **33**: 383-392.
18. Chaudhary, N. I., Roth, G. J., Hilberg, F., Müller-Quernheim, J., Prasse, A., Zissel, G., Schnapp, A. and Park, J. E. 2007. Inhibition of PDGF, VEGF and FGF signalling attenuates fibrosis. *Eur. Respir. J.* **29**: 976-985.
19. Chevalier, R. L., Chung, K. H., Smith, C. D., Ficenc, M. and Gomez, R. A. 1996. Renal apoptosis and clusterin following ureteral obstruction: the role of maturation. *J. Urol.* **156**: 1474-1479.
20. Chevalier, R. L., Kim, A., Thornhill, B. A. and Wolstenholme, J. T. 1999. Recovery following relief of unilateral ureteral obstruction in the neonatal rat. *Kidney Int.* **55**: 793-807.
21. Chevalier, R. L., Thornhill, B. A., Chang, A. Y., Cachat, F. and Lackey, A. 2002. Recovery from release of ureteral obstruction in the rat: relationship to nephrogenesis. *Kidney Int.* **61**: 2033-2043.
22. Chew, D. J., DiBartola, S. P., and Schenck, P. 2010. Canine and feline nephrology and urology, 2nd ed. Elsevier, St. Louis. Missouri.

23. Chiaroni-Clarke, R. C., Munro, J. E. and Ellis, J. A. 2016. Sex bias in paediatric autoimmune disease - Not just about sex hormones? *J. Autoimmun.* **69**: 12-23.
24. Chung, K. H. and Chevalier, R. L. 1996. Arrested development of the neonatal kidney following chronic ureteral obstruction. *J. Urol.* **155**: 1139-1144.
25. Dias, T., Sairam, S. and Kumarasiri, S. 2014. Ultrasound diagnosis of fetal renal abnormalities. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **28**: 403-415.
26. Clancy, M. J., Marshall, D., Dilworth, M., Bottomley, M., Ashton, N. and Brenchley, P. 2009. Immunosuppression is essential for successful allogeneic transplantation of the metanephros. *Transplantation* **88**: 151-159.
27. Cl eroux, A., Alexander, K., Beauchamp, G. and Dunn, M. 2017. Evaluation for association between urolithiasis and chronic kidney disease in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **250**: 770-774.
28. Coggins, C. H., Lewis, J. B., Caggiula, A. W., Castaldo, L. S., Klahr, S. and Wang, S. R. 1998. Differences between women and men with chronic renal disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* **13**: 1430-1437.
29. Cowgill, L. D. and Langston, C. E. 1996. Role of hemodialysis in the management of dogs and cats with renal failure. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* **26**: 1347-1378.

30. Deng, J., Xia, Y., Zhou, Q., Wang, X., Xiong, C., Shao, X., Shao, M. and Zou, H. 2019. Protective effect of rosiglitazone on chronic renal allograft dysfunction in rats. *Transpl. Immunol.* **54**: 20-28.
31. DiBartola, S. P., Rutgers, H. C., Zack, P. M. and Tarr, M. J. 1987. Clinicopathologic findings associated with chronic renal disease in cats: 74 cases (1973-1984). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **190**: 1196-1202.
32. Distler, J. H., Hirth, A., Kurowska-Stolarska, M., Gay, R. E, Gay, S. and Distler, O. 2003. Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **47**: 149-161.
33. Djudjaj, S. and Boor, P. 2019. Cellular and molecular mechanisms of kidney fibrosis. *Mol. Aspects Med.* **65**: 16-36.
34. Dockrell, M. E., Phanish, M. K. and Hendry, B. M. 2009. Tgf-beta auto-induction and connective tissue growth factor expression in human renal tubule epithelial cells requires N-ras. *Nephron Exp. Nephrol.* **112**: e71-79.
35. Duffield, J. S. 2014. Cellular and molecular mechanisms in kidney fibrosis. *J. Clin. Invest.* **124**: 2299-2306.
36. Elliott, J. and Barber, P. J. 1998. Feline chronic renal failure: clinical findings in 80 cases diagnosed between 1992 and 1995. *J. Small Anim. Pract.* **39**: 78-85.
37. Eriksen, B. O. and Ingebretsen, O. C. 2006. The progression of chronic kidney disease: a 10-year population-based study of the effects of gender and age. *Kidney Int.* **69**: 375-382.

38. Fernbach, S. K., Maizels, M. and Conway, J. J. 1993. Ultrasound grading of hydronephrosis: introduction to the system used by the society for fetal urology. *Pediatr. Radiol.* **23**: 478-480.
39. Fujimoto, E., Yamanaka, S., Kurihara, S., Tajiri, S., Izuhara, L., Katsuoka, Y., Yokote, S., Matsumoto, K., Kobayashi, E., Okano, H. J., Chikaraishi, T. and Yokoo, T. 2016. Embryonic kidney function in chronic renal failure model in rodents. *Clin. Exp. Nephrol.* **21**: 579-588.
40. Fujimoto, T., Yamanaka, S., Tajiri, S., Takamura, T., Saito, Y., Matsumoto, K., Takase, K., Fukunaga, S., Okano, H. J. and Yokoo, T. 2019. In vivo regeneration of interspecies chimeric kidneys using a nephron progenitor cell replacement system. *Sci. Rep.* **9**: 6965.
41. Gatherer, D, Ten Dijke, P., Baird, D. T., and Akhurst, R. J. 1990. Expression of TGF-beta isoforms during first trimester human embryogenesis. *Development* **110**: 445-460.
42. Greene, J. P., Lefebvre, S. L., Wang, M., Yang, M., Lund, E. M. and Polzin, D. J. 2014. Risk factors associated with the development of chronic kidney disease in cats evaluated at primary care veterinary hospitals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **244**: 320-327.
43. Guo, S. and Dipietro, L. A. 2010. Factors affecting wound healing. *J. Dent. Res.* **89**: 219-229.
44. Hammerman, M. R. 1999. Distinguished scientists lecture series. New developments in kidney development. *Nephron* **81**: 131-135.

45. Hampton, A., Ford, A., Cox 3<sup>rd</sup>, R. E., Liu, C. C. and Koh, R. 2020. Effects of music on behavior and physiological stress response of domestic cats in a veterinary clinic. *J. Feline Med. Surg.* **22**: 122-128.
46. Hester, J., Ventetuolo, C. and Lahm, T. 2019. Sex, gender, and sex hormones in pulmonary hypertension and right ventricular failure. *Compr. Physiol.* **10**: 125-170.
47. Higgins, S. P., Tang, Y., Higgins, C. E., Mian, B., Zhang, W., Czekay, R. P., Samarakoon, R., Conti, D. J. and Higgins, P. J. 2018. TGF- $\beta$ 1/p53 signaling in renal fibrogenesis. *Cell. Signal.* **43**: 1-10.
48. Hill, N. R., Fatoba, S. T., Oke, J. L., Hirst, J. A., O'Callaghan, C. A., Lasserson, D. S. and Hobbs, F. D. 2016. Global prevalence of chronic kidney disease – A systematic review and meta-analysis. *PloS One* **11**: e0158765.
49. Hossain, M. A., Costanzo, E., Cosentino, J., Patel, C., Qaisar, H., Singh, V, Khan, T., Cheng, J. S., Asif, A. and Vachharajani, T. J. 2018. Contrast-induced nephropathy: Pathophysiology, risk factors, and prevention. *Saudi. J. Kidney Dis. Transpl.* **29**: 1-9.
50. Houston, D. M. and Moore, A. E. P. 2009. Canine and feline urolithiasis: examination of over 50 000 urolith submissions to the Canadian veterinary urolith centre from 1998 to 2008. *Can. Vet. J.* **50**: 1263-1268.
51. Hyun, C. K., Dal, M. Y., Sang, H. L. and Yong, D. C. 2008. Usefulness of renal volume measurements obtained by a 3-

- dimensional sonographic transducer with matrix electronic arrays. *J. Ultrasound Med.* **27**: 1673-1681.
52. Ichikawa, I., Kuwayama, F. Pope, J. C. 4th., Stephens, F. D. and Miyazaki, Y. 2002. Paradigm shift from classic anatomic theories to contemporary cell biological views of CAKUT. *Kidney Int.* **61**: 889-898.
53. Imberti, B., Corna, D., Rizzo, P., Xinaris, C., Abbate, M., Longaretti, L., Cassis, P., Benedetti, V., Benigni, A., Zoja, C., Remuzzi, G. and Morigi, M. 2015. Renal primordia activate kidney regenerative events in a rat model of progressive renal disease. *PLoS One* **10**: e0120235.
54. Isaksen, C. V., Eik-Nes, S. H., Blaas, H. G. and Torp, S. H. 2000. Fetuses and infants with congenital urinary system anomalies: correlation between prenatal ultrasound and postmortem findings. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* **15**: 177-185.
55. Jones, K. J. 1993. Recovery from facial paralysis following crush injury of the facial nerve in hamsters: differential effects of gender and androgen exposure. *Exp. Neurol.* **121**: 133-138.
56. Kanda, Y. 2013. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant.* **48**: 452-458.
57. Kang, D. H., Yu, E. S., Yoon, K. I. and Johnson, R. 2004. The impact of gender on progression of renal disease: potential role of estrogen-mediated vascular endothelial growth factor regulation and vascular protection. *Am. J. Pathol.* **164**: 679-688.



58. Kariya, T., Nishimura, H., Mizuno, M., Suzuki, Y., Matsukawa, Y., Sakata, F., Maruyama, S., Takei, Y. and Ito, Y. 2018. TGF- $\beta$ 1-VEGF-A pathway induces neoangiogenesis with peritoneal fibrosis in patients undergoing peritoneal dialysis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **314**: F167-180.
59. Kattah, A. G. and Garovic, V. D. 2020. Understanding sex differences in progression and prognosis of chronic kidney disease. *Ann. Transl. Med.* **8**: 897.
60. Kouwenhoven, E. A., Bruin, R. W., Heemann, U. W., Marquet, R. L. and Ijzermans, J. N. 2001. Ureteroneocystostomy contributes to late functional and morphological changes in rat kidney transplants. *J. Urol.* **165**: 1700-1704.
61. Kuzi, S., Mazaki-Tovi, M., Aroch, I., and Segev, G., Chen, H., Dunaevich, A. and Apfelbaum, N. 2020. Acute on chronic kidney disease in cats: etiology, clinical and clinicopathologic findings, prognostic markers, and outcome. *J. Vet. Intern. Med.* **34**: 1496-1506.
62. Kyles, A. E., Hardie, E. M., Wooden, B. G., Adin, C. A., Stone, E. A., Gregory, C. R., Kyle G Mathews, Cowgill, L. D., Vaden, S., Nyland, T. G. and Ling, G. V. 2005. Management and outcome of cats with ureteral calculi: 153 cases (1984-2002). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **226**: 937-944.
63. Lin, S. L., Chang, F. C., Schrimpf, C., Chen, Y. T., Wu, C. F., Wu, V. C., Chiang, W. C., Kuhnert, F., Kuo, C. J., Chen, Y. M., Wu, K. D., Tsai, T. J. and Duffield, J. S. 2011. Targeting endothelium-

- pericyte cross talk by inhibiting VEGF receptor signaling attenuates kidney microvascular rarefaction and fibrosis. *Am. J. Pathol.* **178**: 911-923.
64. Lulich, J. P., Berent, A. C., Adams, L. G., Westropp, J. L., Bartges, J. W. and Osborne, C. A. 2016. ACVIM Small animal consensus recommendations on the treatment and prevention of uroliths in dogs and cats. *J. Vet. Intern. Med.* **30**: 1564-1574.
65. Mancini, M., Mainenti, P. P., Speranza, A., Liuzzi, R., Soscia, E., Sabbatini, M., Ferrara, L. A., Federico, S. and Salvatore, M. 2006. Accuracy of sonographic volume measurements of kidney transplant. *J. Clin. Ultrasound* **34**: 184-189.
66. Marino, C. L., Lascelles, B. D. X., Vaden, S. L., Gruen, M. E. and Marks, S. L. 2014. Prevalence and classification of chronic kidney disease in cats randomly selected from four age groups and in cats recruited for degenerative joint disease studies. *J. Feline Med. Surg.* **16**: 465-472.
67. Marshall, D., Clancy, M., Bottomley, M., Symonds, K., Brenchley, P. E. and Bravery, C. A. 2005. Transplantation of metanephroi to sites within the abdominal cavity. *Transplant. Proc.* **37**: 194-197.
68. Matsumoto, K., Yokoo, T., Matsunari, H., Iwai, S., Yokote, S., Teratani, T., Gheisari, Y., Tsuji, O., Okano, H., Utsunomiya, Y., Hosoya, T., Okano, H. J., Nagashima, H. and Kobayashi, E. 2012. Xenotransplanted embryonic kidney provides a niche for endogenous mesenchymal stem cell differentiation into erythropoietin-producing tissue. *Stem Cells* **30**: 1228-1235.

69. McCarthy, M. 2000. The "gender gap" in autoimmune disease. *Lancet* **356**: 1088.
70. Meng, X. M., Nikolic-Paterson, D. J. and Lan, H. Y. 2016. TGF- $\beta$ : the master regulator of fibrosis. *Nat. Rev. Nephrol.* **12**: 325-338.
71. Mills, K. T., Xu, Y., Zhang, W., Bundy, J. D., Chen, C. S., Kelly, T. N., Chen, J. and He, J. 2015. A systematic analysis of worldwide population-based data on the global burden of chronic kidney disease in 2010. *Kidney Int.* **88**: 950-957.
72. Moeller, B. J., Cao, Y., Vujaskovic, Z., Li, C. Y., Haroon, Z. A. and Dewhirst, M. W. 2004. The relationship between hypoxia and angiogenesis. *Semin. Radiat. Oncol.* **14**: 215-221.
73. Mugford, J. W., Sipilä, P., McMahon, J. A. and McMahon, A. P. 2008. *Osrl* expression demarcates a multi-potent population of intermediate mesoderm that undergoes progressive restriction to an *Osrl*-dependent nephron progenitor compartment within the mammalian kidney. *Dev. Biol.* **324**: 88-98.
74. Mulroney, S. E. and Pesce, C. 2000. Early hyperplastic renal growth after uninephrectomy in adult female rats. *Endocrinology* **141**: 932-937.
75. Mulroney, S. E., Woda, C., Johnson, M. and Pesce, C. 1999. Gender differences in renal growth and function after uninephrectomy in adult rats. *Kidney Int.* **56**: 944-953.
76. Nagai, E., Ishigaki, N. and Hakusui, H. 1986. Pharmacokinetic studies of Iohexol after a single intravenous injection in rats. *Prog. Med.* **6**: 2378-2389.

77. Noto, H., Kizu, N., Sugaya, K., Nishizawa, O., Harada, T. and Tsuchida, T. 1987. Prostate measurement by transabdominal ultrasonography. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi* **78**: 1071-1076.
78. Oertelt-Prigione, S. 2012. The influence of sex and gender on the immune response. *Autoimmun. Rev.* **11**: A479-485.
79. Okada, T., Yamagishi, T. and Morikawa, Y. 1998. Effects of maternal uninephrectomy on the development of fetal rat kidney: numerical and volumetric changes of the glomerulus and formation of the anionic site in the glomerular basement membrane. *J. Morphol.* **238**: 337-342.
80. Pérez-López, L., Boronat, M., Melián, C., Saavedra, P., Brito-Casillas, Y. and Ana M Wägner, A. M. 2019. Assessment of the association between diabetes mellitus and chronic kidney disease in adult cats. *J. Vet. Intern. Med.* **33**: 1921-1925.
81. Pérez-López, L., Boronat, M., Melián, C., Brito-Casillas, Y. and Wägner, A. M. 2020. Kidney function and glucose metabolism in overweight and obese cats. *Vet. Q.* **40**: 132-139.
82. Peters, C. A., Gaertner, R. C., Carr, M. C. and Mandell, J. 1993. Fetal compensatory renal growth due to unilateral ureteral obstruction. *J. Urol.* **150**: 597-600.
83. Pham, T. L., Kakazu, A., He, J. and Bazan, H. E. P. 2019. Mouse strains and sexual divergence in corneal innervation and nerve regeneration. *FASEB J.* **33**: 4598-4609.
84. Picavet, P., Detilleux, J., Verschuren, S., Sparkes, A., Lulich, J., Osborne, C., Istasse, L. and Diez, M. 2007. Analysis of 4495

- canine and feline uroliths in the Benelux. A retrospective study: 1994-2004. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. **91**: 247-251.
85. Piyarungsri, K. and Pusoonthornthum, R. 2017. Risk and protective factors for cats with naturally occurring chronic kidney disease. *J. Feline Med. Surg.* **19**: 358-363.
86. Polzin, D. J. 2013. Evidence-based step-wise approach to managing chronic kidney disease in dogs and cats. *J. Vet. Emerg. Crit. Care (San Antonio)*. **23**: 205-215.
87. Reid, T., Stacy, A. L., Stephen, R. W. and Gregory, B. D. 2012. Estimation of feline renal volume using computed tomography and ultrasound. *Vet. Radiol. Ultrasound* **54**: 127-132.
88. Reynolds, B. S. and Lefebvre, H. P. 2013. Feline CKD: Pathophysiology and risk factors--what do we know? *J. Feline Med. Surg.* **15**: 3-14.
89. Robyr, R., Benachi, A., Daikha-Dahmane, F., Martinovich, J., Dumez, Y. and Ville, Y. 2005. Correlation between ultrasound and anatomical findings in fetuses with lower urinary tract obstruction in the first half of pregnancy. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* **25**: 478-482.
90. Rogers, S. A., Lowell, J. A., Hammerman, N. A. and Hammerman, M. R. 1998. Transplantation of developing metanephros into adult rats. *Kidney Int.* **54**: 27-37.
91. Rogers, S. A., Ryan, G., Purchio, A. F. and Hammerman, M. R. 1993. Metanephric transforming growth factor-beta 1 regulates nephrogenesis in vitro. *Am. J. Physiol.* **264**: F996-1002.

92. Schuster, N. and Krieglstein, K. 2002. Mechanisms of TGF-beta-mediated apoptosis. *Cell Tissue Res.* **307**: 1-14.
93. Shortliffe, L. M., Ye, Y., Behr, B. and Wang, B. 2014. Testosterone changes bladder and kidney structure in juvenile male rats. *J. Urol.* **191**: 1913-1919.
94. Shrestha, B. and Haylor, J. 2014. Experimental rat models of chronic allograft nephropathy: a review. *Int. J. Nephrol. Renov. Dis.* **7**: 315-322.
95. Souma, T., Yamazaki, S., Moriguchi, T., Suzuki, N., Hirano, I., Pan, X., Minegishi, N., Abe, M., Kiyomoto, H., Ito, S. and Yamamoto, M. 2013. Plasticity of renal erythropoietin-producing cells governs fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **24**: 1599-1616.
96. Sparkes, A. H., Caney, S., Chalhoub, S., Elliott, J., Finch, N., Gajanayake, I., Langston, C., Lefebvre, H. P., White, J. and Quimby, J. 2016. ISFM consensus guidelines on the diagnosis and management of feline chronic kidney disease. *J. Feline Med. Surg.* **18**: 219-239.
97. Sugisawa, R., Hiramoto, E., Matsuoka, S., Iwai, S., Takai, R., Yamazaki, T., Mori, N., Okada, Y., Takeda, N., Yamamura, K., Arai, T., Arai, S. and Miyazaki, T. 2016. Impact of feline AIM on the susceptibility of cats to renal disease. *Sci. Rep.* **6**: 35251.
98. Sun, J., Langer, W. J., Devish, K. and Lane, P. H. 2006. Compensatory kidney growth in estrogen receptor-alpha null mice. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **290**: F319-323.

99. Suttle, T., Fumo, D., Baghmanli, Z., Saltzman, B. and Ortiz, J. 2016. Comparison of urologic complications between ureteroneocystostomy and ureteroureterostomy in renal transplant: a meta-analysis. *Exp. Clin. Transplant.* **14**: 276-281.
100. Tadokoro, S., Kurihara, Y., Kurihara, N., Ogawa, H. and Miyashita, K. 1962. Body weight and organ weight in rats. *Kita Kanto Igaku* **12**: 250-265.
101. Taguchi, A., Kaku, Y., Ohmori, T., Sharmin, S., Ogawa, M., Sasaki, H. and Nishinakamura, R. 2014. Redefining the in vivo origin of metanephric nephron progenitors enables generation of complex kidney structures from pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **14**: 53-67.
102. Tajiri, S., Yamanaka, S., Fujimoto, T., Matsumoto, K., Taguchi, A., Nishinakamura, R., Okano, H. J. and Yokoo, T. 2018. Regenerative potential of induced pluripotent stem cells derived from patients undergoing haemodialysis in kidney regeneration. *Sci. Rep.* **8**: 14919.
103. Takasato, M., Er, P. X., Chiu, H. S., Maier, B., Baillie, G.J., Ferguson, C., Parton, R. G., Wolvetang, E. J., Roost, M. S., Chuva de Sousa Lopes, S. M. and Little, M. H. 2015. Kidney organoids from human iPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis. *Nature* **526**: 564-568.
104. Truong, L. D., Gaber, L. and Eknoyan, G. 2011. Obstructive uropathy. *Contrib. Nephrol.* **169**: 311-326.

105. Tufró, A. 2000. VEGF spatially directs angiogenesis during metanephric development in vitro. *Dev. Biol.* **227**: 558-566.
106. Vera-Donoso, C. D., García-Dominguez, X., Jiménez-Trigos, E., García-Valero, L., Vicente, J.S. and Marco-Jiménez, F. 2015. Laparoscopic transplantation of metanephroi: a first step to kidney xenotransplantation. *Actas Urol. Esp.* **39**: 527-534.
107. Westropp, J. L., Ruby, A. L., Bailiff, N. L., Kyles, A. E. and Ling, G. V. 2006. Dried solidified blood calculi in the urinary tract of cats. *J. Vet. Intern. Med.* **20**: 828-834.
108. Woo, P. C., Lau, S. K., Wong, B. H., Fan, R. Y., Wong, A. Y., Zhang, A. J., Wu, Y., Choi, G. K., Li, K. S., Hui, J., Wang, M., Zheng, B. J., Chan, K. H. and Yuen, K. Y. 2012. Feline morbillivirus, a previously undescribed paramyxovirus associated with tubulointerstitial nephritis in domestic cats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**: 5435-5440.
109. Wu, C. C., Chang, C. Y., Chang, S. T. and Chen, S. H. 2016. 17 $\beta$ -estradiol accelerated renal tubule regeneration in male rats after ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury. *Shock* **46**: 158-163.
110. Yamanaka, S., Tajiri, S., Fujimoto, T., Matsumoto, K., Fukunaga, S., Kim, B. S., Okano, H. J. and Yokoo, T. 2017. Generation of interspecies limited chimeric nephrons using a conditional nephron progenitor cell replacement system. *Nat. Commun.* **8**: 1719.
111. Yang, H. C., Zuo, Y. and Fogo, A. B. 2010. Models of chronic kidney disease. *Drug Discov. Today Dis. Models* **7**: 13-19.



112. Yokoo, T., Fukui, A., Ohashi, T., Miyazaki, Y., Utsunomiya, Y., Kawamura, T., Hosoya, T., Okabe, M. and Kobayashi, E. 2006. Xenobiotic kidney organogenesis from human mesenchymal stem cells using a growing rodent embryo. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**: 1026-1034.
113. Yokoo, T., Fukui, A., Matsumoto, K. and Kawamura, T. 2008. Kidney regeneration by xeno-embryonic nephrogenesis. *Med. Mol. Morphol.* **41**: 5-13.
114. Yokoo, T., Fukui, A., Matsumoto, K., Ohashi, T., Sado, Y., Suzuki, H., Kawamura, T., Okabe, M., Hosoya, T. and Kobayashi, E. 2008. Generation of a transplantable erythropoietin-producer derived from human mesenchymal stem cells. *Transplantation* **85**: 1654-1658.
115. Yokoo, T., Ohashi, T., Shen, J. S., Sakurai, K., Miyazaki, Y., Utsunomiya, Y., Takahashi, M., Terada, Y., Eto, Y., Kawamura, T., Osumi, N. and Hosoya, T. 2005. Human mesenchymal stem cells in rodent whole-embryo culture are reprogrammed to contribute to kidney tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 3296-3300.
116. Yokote, S., Matsunari, H., Iwai, S., Yamanaka, S., Uchikura, A., Fujimoto, E., Matsumoto, K., Nagashima, H., Kobayashi, E. and Yokoo, T. 2015. Urine excretion strategy for stem cell-generated embryonic kidneys. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**: 12980-12985.
117. Yokote, S., Yokoo, T., Matsumoto, K., Ohkido, I., Utsunomiya, Y., Kawamura, T. and Hosoya, T. 2012. Metanephros transplantation

- inhibits the progression of vascular calcification in rats with adenine-induced renal failure. *Nephron Exp. Nephrol.* **120**: e32-40.
118. Yokote, S., Yokoo, T., Matsumoto, K., Utsunomiya, Y., Kawamura, T. and Hosoya, T. 2012. The effect of metanephros transplantation on blood pressure in anephric rats with induced acute hypotension. *Nephrol. Dial. Transplant.* **27**: 3449-3455.
119. Zeier, M., Schönherr, R., Amann, K. and Ritz, E. 1998. Effects of testosterone on glomerular growth after uninephrectomy. *Nephrol. Dial. Transplant.* **13**: 2234-2240.
120. Zhang, Y., Yang, Y., Li, X., Chen, D., Tang, G. and Men, T. 2019. Thalidomide ameliorate graft chronic rejection in an allogenic kidney transplant model. *Int. Immunopharmacol.* **71**: 32-39.