

신장의 AA형 아밀로이드 형성기전에 관한 초미형태학적 연구

계명대학교 의과대학 병리학교실

박 관 규·김 영 호

경북대학교 의과대학 병리학교실

손 태 중

서 론

아밀로이드증은 불용성의 섬유성 단백질이 체내의 여러 장기에 침착하여 기능 장애를 초래하는 만성 침윤성 질환으로서 1863년에 Virchow¹⁾에 의해 처음 명명된 이래 임상적, 형태학적, 생화학적 및 면역학적 측면에서 국내외적으로 아주 다양하게 보고되어 있다^{2~14)}. 아밀로이드는 섬유단백의 성분에 따라 크게 AA (Amyloid A) 형과 AL (Amyloid L)형으로 분류되며, 최근 AF (amyloid F) 및 AH (Amyloid H)형까지 분류되고 있다³⁾. AA형 아밀로이드는 만성염증, 특히 류마토이드 질환에 이차적으로 잘 동반되며¹⁵⁾ 전신성 아밀로이드증의 가장 혼한 형으로 알려져 있고¹⁶⁾ 실험적으로 카제인, 대장균의 내독소, 사포닌 그리고 칸디다 알비칸스 등에 의해서 유발될 수 있다^{17~19)}. AL형은 다발성 골수종에 병발하며 원발성 혹은 특발성이 있다^{1,5)}. AF 아밀로이드는 유전형의 전신성 아밀로이드증에 침착되는 것으로 알려져 있으며, AH 아밀로이드는 최근 장기간 혈액 투석을 받고 있는 환자에서 발생한다고 보고되고 있다³⁾. 아밀로이드는 형태학적으로 통상 염색상 무정형의 호산성 초자질구조로 보이며, congo red 염색 후 편광현미경으로 관찰하면 apple-green 색의 복굴절로 나타난다. 면역형광 양상에 관한 문헌보고는 비교적 적은 편이며 그 결과도 상당히 다양하게 나타나고 있고²⁰⁾, 전자현미경상으로는 직경 7.5~10 nm의 nonbranching fibril이 무질서하게 배열되어 있다^{2,7)}.

신장의 아밀로이드증은 거의 전신성 아밀로이드증의 한 형태로서 AA형이 많으며 이 때의 아밀로이드 침착은 주로 혈관 및 사구체에 일어나고 사구체내에서는 주로

예산지움과 모세혈관 벽에 침착되는 것으로 알려져 있다^{2,8,16)}. 그러나 사구체내의 세포들 중 어떤 유형의 세포가 아밀로이드 생성과 관련이 있는지에 관한 연구는 매우 미미한 형편이다^{1,10)}. 아밀로이드의 형성기전은 아직 완전히 밝혀져 있지 않지만 아밀로이드의 전구물질이 말초혈액을 따라 순환하다가 신체의 각 장기에서 단백분해 효소의 작용에 의해 아밀로이드 원섬유를 형성하거나^{21,22)} 그렇지 않으면 신장에서는 자체에서 직접 만들어져서 침착될 것이라고도 한다^{23~25)}. 이러한 아밀로이드 유형의 증명은 원인 규명과 함께 치료의 접근방법 및 예후판정에 상당한 도움을 준다. 따라서 유형을 규명하기 위하여 지금까지 광학현미경적 수준에서 각기 다른 아밀로이드 원섬유에 대한 특이 항체를 사용하여 동결 절편 혹은 파라핀 절편상에서 많이 시도되어 왔으며^{16,26)}, 최근에는 전자현미경적 수준에서 단클론성 및 다클론성 항체를 사용하여 protein A-gold 기법을 사용한 면역전자현미경적 차원에서 관찰하려는 시도도 이루어지고 있다^{27~30)}.

저자는 상기한 문헌적 지견들을 기반으로 하여 흰쥐에 카제인과 내독소를 피하주사하여 아밀로이드 형성을 초래한 뒤 신 사구체 내에서 아밀로이드가 침착되는 양상을 광학 및 전자현미경으로 관찰하여 그 형태학적 소견과 기전을 규명해 보고자 이 실험을 계획하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

체중 약 20~30 g되는 ICR 생쥐 84 마리를 대조군 및 실험군의 재료로 사용하였다.

대조군 (I) :

- a: 아무 처치도 하지 않은 군(7 마리)
b: 피하조직에 생리식염수 0.5 ml를 반복 주사한 군(7 마리)
- 실험군(II) : 카제인과 내독소 혼합용액 0.5 ml를 피하조직에 반복 주사한 군(70 마리)
- a: 1 주간 반복 주사한 군(10 마리)
b: 2 주간 반복 주사한 군(10 마리)
c: 3 주간 반복 주사한 군(10 마리)
d: 4 주간 반복 주사한 군(10 마리)
e: 5 주간 반복 주사한 군(10 마리)
f: 6 주간 반복 주사한 군(10 마리)
g: 7 주간 반복 주사한 군(10 마리)

2. 실험방법

실험군에서는 카제인-내독소 혼합용액 0.5 ml씩을 생쥐의 배부 피하조직에 1주 내지 7주간 매일 주사하였으며 투여 후 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주 및 7주에 에테르 마취하에 복부를 절개한 다음 신장 조직을 적출하였다. 카제인 용액의 제조는 10g의 카제인(Casein, Aldrich Chemical Co., USA)에 90 ml의 중류수와 10 ml의 0.5 N NaOH를 혼합하였고 카제인-내독소 혼합용액은 이미 만들어진 카제인 용액에 내독소(E. coli 026:B6, Bacto-lipopolysaccharide, Difco, USA)를 혼합하여 내독소의 최종농도를 15 µg/ml로 만들었다.

(1) 광학현미경적 관찰 : 적출된 신장조직을 10% 중성 포르말린에 고정하고 탈수한 후 침투 과정을 거쳐 파라핀 포매를 실시한 후 2~4 µm의 박절편을 만들어 hematoxylin & eosin 염색과 Congo red 염색을 하여 광학 및 편광현미경으로 관찰하였다.

(2) 면역조직화학적 관찰 : 카세인 반복 투여로 형성된 유전분 원섬유가 AA 원섬유임을 증명하기 위해 AA에 대한 단클론성 항체(Dako-Amyloid A mcl, USA)를 사용하여 면역조직화학적 검색을 실시하였다³¹⁾. 포르말린 용액으로 고정되고 파라핀 포매된 신장조직을 4 µm 두께로 잘라 슬라이드에 부착하여 탈파라핀과 함수 과정을 거친 후 0.3% H₂O₂와 혼합한 메탄올(Merck, W. Germany)에 슬라이드를 30분 담구어 내인성 과산화효소에 대한 반응을 차단시키고 0.01 M 인산 완충액(phosphate buffered saline)에서 10분간 세척하였다. 정상 마혈청(normal horse serum, Vector ABC kit)으로 20분간 실온에서 방치시킨 후 마혈청을 제거하고

1차 항체로 amyloid A component, 1:50을 사용하여 37°C에서 30분간 부란하였다. Biotinylated anti-mouse IgG (Vector ABC kit, USA), 1:200을 사용하여 상온에서 30분간 부란시킨 후 ABC (Avidin-biotin complex, Vector ABC kit, USA)로 30분간 실온에서 방치후 DAB (3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride)로 발색하고 Mayer hematoxylin으로 대비 염색을 한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

(3) 투과전자현미경적 관찰 : 투과전자현미경용으로 제공된 신장 조직 절편을 1 mm³의 크기로 세절하여 2.5% glutaraldehyde 용액(0.1 M phosphate buffer, pH 7.4)으로 1~4°C에서 2시간 전고정을 하고 0.1 M 인산 완충 용액으로 세척한 후 1% OsO₄ 용액에 2시간 후고정을 실시하고 같은 인산 완충 용액으로 세척하여 계열 에탄올로 털수하였다. Propylene oxide로 치환한 후 Luft 방법³²⁾에 의한 epon 혼합물로 포매하여 37°C에 12시간, 45°C에 12시간, 60°C에 48시간 동안 방치하여 열중합을 시켰다. 포매된 조직을 1 µm 두께로 박절하여 toluidine blue 염색을 하여 관찰 부위를 결정한 다음 초박절은 Sorvall MT 5000형 초박절기에 Dupont 다이아몬드 칼을 부착하여 회백색(40~60 nm)의 간섭색을 나타내는 초박절편을 얻어서 grid에 부착하여 Watson³³⁾ 및 Reynolds 방법³⁴⁾에 의한 uranyl acetate와 lead citrate로 이중전자염색을 실시하여 Hitachi H-600 투과전자현미경으로 관찰하였다.

(4) 면역전자현미경적 관찰 : 투과전자현미경적 관찰을 위하여 만들어진 epon 혼합물에 포매된 조직을 초박절한 후 니켈 grid에 부착하였다. 전자현미경을 위한 면역 염색을 하기 위해서는 회석하지 않은 단클론성 anti-AA 항체의 상청액을 사용하였으며 면역반응은 protein A-colloidal gold 기법으로²⁹⁾ 20 nm의 colloidal gold 입자(Sigma, USA)를 부착시켰다. 염색과정은 니켈 grid를 10% H₂O₂에 5분간 침엽한 후 중류수에 3번 수세하고 다시 PBS에 5분간 세척하였다. 비특이적 반응을 방지하기 위해 6000 rpm에 15분간 침강시키고 상층액을 PBS에 1:10으로 회석시킨 난 알부민이나 protalbinic acid (Sigma, USA)에 담근 다음 회석하지 않은 항체(mcl anti-AA)에 30분간 노출시켰다. 그 후 PBS에 1분씩 5번 수세하고 10% saccharose에 1:5로 회석시킨 colloidal gold 입자로 20분간 부착시키고, 다시 PBS에 5분씩 3회 세척시킨 후 렌즈 종이로 수분을

전조시켰다. 대비 염색을 위해 uranyl acetate에 20분 염색을 실시한 후 Hitachi H-600 투과전자현미경으로 관찰하였다.

성 적

1. 광학현미경적 소견

카제인-내독소를 주사하였지만 아밀로이드가 형성되지 않은 사구체에서는 메산지움이나 기저막 등에 큰 변화는 없었으며 모세혈관의 울혈이 관찰되었다(Fig. 1). 아밀로이드가 형성된 사구체의 hematoxylin & eosin 염색 후의 광학현미경상에서는 초자양의 아밀로이드가 메산지움을 중심으로 결절 모양으로 침착되었고(Fig. 2), 이러한 사구체를 Congo red 염색한 후에 편광현미경으로 관찰하면 apple-green색의 복굴절로 관찰되었다(Fig. 3). 카제인 및 내독소를 투여하여 도살한 생쥐 전예를 Congo red 염색을 시행하여 관찰한 결과 2주 1마리, 4주 4마리, 5주 6마리, 6주 6마리, 7주 7마리로 모두 24예에서 아밀로이드가 침착되었으며 이들을 대상으로 면역조직화학적 검사를 시행한 결과 전 예에서 메산지움을 중심으로 anti-AA에 양성으로 관찰되었다(Fig. 4).

2. 전자현미경적 소견

대부분의 예에서 아밀로이드는 주로 메산지움에 침착되었으며 모세혈관의 기저막은 대체로 균일하지만 일부 내피세포의 세포막은 융합되어 정상적인 내피세포의 창(fenestra)이 소실되었고 그 부위의 기저막의 두께는 약간 두꺼워 보이지만 아밀로이드의 침착은 관찰되지 않았다. 메산지움의 기질에 존재하는 기저막은 아밀로이드에 의하여 완전히 소실되어 있었으며 메산지움 자체는 세포질의 양이 감소된 메산지움세포와 아밀로이드로 구성되어 있었다(Fig. 5). 모세혈관 내에는 많은 적혈구와 함께 단핵세포가 관찰되었으며(Fig. 6), 메산지움에 침착된 아밀로이드의 양이 많아질수록 메산지움은 넓어지고, 이 아밀로이드 원섬유가 주위의 기저막을 침윤하여 내피하 공간이 넓어졌으며(Fig. 7, 8), 때로는 파괴된 내피세포의 틈을 통해 모세혈관 내로 아밀로이드가 분출되는 양상도 관찰되었다(Fig. 9). 이러한 부위의 내피세포의 세포질은 부종성 변화를 보였고 끌지체, 소포와 리소솜도 증가되어 있었다(Fig. 10). 아밀로이드가 침착

된 부위의 메산지움세포는 핵의 위치과 리소솜의 증가 및 수초모양 진류체가 관찰되었고(Fig. 11), 아밀로이드가 풍부한 곳의 메산지움세포는 세포막의 일부분이 불분명해지거나 파괴된 부위도 관찰되었다. 그러한 곳에서는 전자밀도가 증가되어 이곳이 아밀로이드가 생성되는 곳처럼 보이기도 하였으며(Fig. 12) 메산지움세포의 세포질내에 함입된 아밀로이드가, 분명한 막에 의해 둘러싸여 세포질 내에 존재하고 있는 것도 관찰되었다(Fig. 13). 메산지움세포의 세포막이 파괴된 곳에서는 많은 소포들이 주위에 흩어져 관찰되었다(Fig. 14). 상피세포의 족상돌기는 융합되었으며 세포질내에 일부 공포화된 사립체도 관찰되었고 리소솜의 수도 증가되어 있었다(Fig. 15). 일부의 상피세포에서는 상피하 아밀로이드 원섬유가 원추모양으로 세포질 내로 함입된 곳도 보이며(Fig. 16), 상피세포의 세포질내에 다량의 아밀로이드가 완전히 막에 의해 둘러싸여 있는 것도 관찰되었다(Fig. 17). 상피하 아밀로이드가 침착된 부위에는 상피세포의 족상돌기가 융합되거나 탈락된 곳이 많았으며(Fig. 18) 세포막 근처에는 많은 소포들이 관찰되었다(Fig. 19). 기저막에서의 아밀로이드 원섬유는 아주 국소적으로 메산지움 근처에 관찰되었고 아밀로이드 원섬유들이 기저막에 수직으로 침착되어 상피세포 혹은 내피세포의 세포막이 불분명하게 관찰되는 경우가 많았다(Fig. 20). 내피세포는 정상적인 구조인 창이 파괴되어 망상모양을 이루는 곳이 많았으며 그 부위의 내피하 공간은 넓어져 있고(Fig. 21), 세포질내에는 일부 사립체의 경한 공포화와 함께 리소솜의 숫자도 증가되어 있었다(Fig. 22).

3. 면역전자현미경적 소견

면역전자현미경 관찰을 위한 면역염색은 Congo red 염색으로 아밀로이드 침착이 확인된 예를 대상으로 하였으며 대조군과 같이 시행하였다. 대조군에서의 AA 항체에 대한 면역반응은 일어나지 않았고 아밀로이드 침착이 관찰된 부위에서는 직경 20 nm정도 크기의 원형구조인 gold 입자들이 전하게 염색되었으며(Fig. 23), 아밀로이드가 형성되는 인접세포인 상피, 내피 및 메산지움세포의 세포질내에는 gold 입자가 관찰되지 않았다(Fig. 24).

고찰

아밀로이드의 전자현미경적 구조는 이미 잘 알려져 있듯이 직경 약 100 Å의 무질서하게 배열된 nonbranching fibril로 되어 있으며 신 사구체에서의 아밀로이드의 침착은 주로 메산지움과 기저막을 따라 일어난다고 보고되고 있으나^{35~43)} 기저막에도 침착된다는 보고가 있다^{44,45)}. Cohen 등⁴⁶⁾은 아밀로이드 원섬유의 tuft와 사구체의 메산지움세포, 내피세포 및 상피세포간의 상세한 구조적 관계에 관하여 기술하였고 Shimamura와 Sorenson³⁷⁾은 사구체를 연속 절편하여 내피하 아밀로이드 침착을 관찰하고 그것이 메산지움의 더 큰 침착과 연결되어 있는 것을 관찰하였다. 그러나 Trump와 Benditt³⁹⁾는 아밀로이드의 침착이 상피하에서도 독립적으로 일어날 수 있다고 시사하였고(the concept of isolated amyloid deposit), Suzuki²⁴⁾와 Cohen 등⁴⁶⁾도 이를 뒷받침하였다. 저자의 실험에서는 아밀로이드가 주로 메산지움에 축적되고 이것이 주위 기저막으로 침윤되어 인접한 내피하 혹은 상피하에 축적되는 경우는 있었으나 상피하에 독립적으로 침착되거나 특히 메산지움과의 연결없이 기저막에만 침착되는 경우는 관찰되지 않았는데 이것은 아밀로이드가 상피하에는 독립적으로 침착이 되지 않거나 그렇지 않으면 본 실험에서 형성된 아밀로이드 유형의 특성상 AA형의 아밀로이드는 주로 메산지움에만 침착되는 것인지는 알 수 없으며 추후 연구해 보아야 할 과제로 사료된다.

Gise 등²²⁾은 신사구체의 초기 전자현미경적 변화에 대해 기술하였고 그들의 연구결과와 문헌고찰 등을 통하여 신 아밀로이드의 형성과 침착에 관한 네가지 가설을 제시하는데 첫째로는 아밀로이드가 메산지움에 주로 침착이 일어나고 이차적으로 기저막과 인접하는 내피하 혹은 상피하로 침투해 들어 간다는 것이고, 둘째로는 메산지움과 기저막 양쪽 모두에 침착이 일어나며 양자 사이에 전혀 연결이 없이 별개로 침착이 일어날 수 있다는 것이며, 셋째는 혈류를 따라 이동해 온 아밀로이드 전구물질로 부터 효소 등의 도움이 없이 바로 아밀로이드가 형성된다는 것이고, 넷째로는 혈류를 따라 이동해 온 아밀로이드 전구물질이 세포 바깥에 침착되고 아밀로이드 원섬유는 사구체의 세포외 지역에서 사구체세포에서 분비되는 가수분해 효소 등의 작용에 의해 형성된다고 하

였다. 저자의 실험을 통해 관찰해 본 결과, Gise 등²²⁾이 아밀로이드의 유형과 침착되는 위치에 관한 연관성에 대해서는 언급이 없었지만, 이들의 가설에 동의하면서 단지 실험적으로 형성된 AA형인 경우에는 그 기전이 4번 째 가설일 것으로 사료되고 여기에는 메산지움세포, 내피세포, 상피세포 모두가 관여될 것으로 생각된다. 또한 이 때의 아밀로이드는 메산지움에 주로 침착이 일어나고 이차적으로 주위의 기저막으로 침윤되는 것으로 보여진다. 그 근거는 아밀로이드 침착근처의 모든 세포에서 세포막 근처에 소포 모양의 구조가 증가되어 있었고 부분적으로 세포막이 불분명해 지거나 파괴된 것이 관찰되어서 여기에서 세포 내용물을 주위의 세포간질로 배출하는 게 아닌가 보여지며 또한 이미 카제인이나 내독소에 의해 손상받은 세포는 가수 분해 효소 등이 더욱 분비될 것이라는 의견이 제시된 바도 있다³⁸⁾.

아밀로이드의 유형과 사구체 내의 침착되는 위치에 대한 문헌보고도 있는데 실험적으로 유도된 아밀로이드는 주로 AA형이며 이형의 아밀로이드 원섬유는 주로 메산지움에 결절형으로 침착되고⁴⁰⁾, AL형은 주로 기저막에 침착되며 따라서 신증후군이 AL형에 더 많은 이유가 여기에 있다고 한다²³⁾. 또한 기저막에의 아밀로이드 침착은 기저막의 재생장애에 의해 초래되고 아밀로이드 전구물질의 침윤에 의해 상피하 혹은 내피하 지역이 이완될 수 있으며 기저막은 아밀로이드의 일차적인 침착이 일어날 수 있는 곳이거나⁴¹⁾ 그렇지 않으면 메산지움에의 과다한 아밀로이드 침착에 의한 이차적 침윤이라고 알려져 있고^{35,36)}, 본 실험에서도 후자의 의견을 뒷받침하는 소견들이 관찰되었다. 또한 아밀로이드가 비정상적인 위치에 침착된 것도 보고된 바가 있는데 Sorenson과 Shimamura³⁷⁾은 아밀로이드가 모세혈관 내에, 그리고 Hinglais 등⁴⁴⁾은 요강(urinary space)에 침착된 것을 보고한 바가 있으며 저자도 사람의 신 생검조직에서 요강에 침착된 아밀로이드를 관찰한 바가 있고³⁸⁾ 본 실험에서도 상피세포의 세포질에 의해 둘러싸여진 아밀로이드와 혈관 내로 분출되는 아밀로이드가 관찰되는 점 등으로 미루어 충분히 그 가능성은 있을 것으로 생각된다. 신 상피세포가 아밀로이드 형성과 관련이 있다는 또 다른 증거는 세뇨관 상피세포 기원인 신세포암의 25~30%에서 아밀로이드가 발생된다는 보고에서도 알 수 있다⁴⁸⁾.

신 아밀로이드증 때의 사구체 세포에 관한 전자현미경

적 연구는 혼하지 않지만 메산지움세포, 내피 및 외피세포 모두에서 유리리보좀, 내형질세망, 골지체가 풍부하다고 보고되고 있고⁴⁶⁾ 특히 메산지움세포는 세포질 내에 많은 봉입체를 포함하고 있어서 이것이 메산지움세포의 탐식 작용과 관련이 있다고 한다^{24,46)}. Suzuki 등²⁴⁾은 메산지움세포의 퇴행성 변화로 세포질내 공포 및 소포의 형성은 아밀로이드 형성과 관련된 이차적인 혹은 비특이적 변화라고 하면서 이러한 메산지움세포들의 변화는 그들이 아밀로이드 전구물질이나 원섬유 그 자체를 형성하는 과정에서 나타나는 변화라고 주장하였고 이러한 변화들은 정상 혹은 병적 상태하의 교원질과 탄력소(elastin)의 섬유형성(fibrogenesis) 과정에서도 볼 수 있다고 하였다. 본 실험을 통해 아밀로이드 형성이 많은 곳에 인접한 메산지움세포의 변화도 위에서 언급된 제소견들이 외에도 리소솜의 증가와 수초모양 잔류체 등이 관찰되고 세포막의 일부가 소실되면서 그 주위에 많은 소포들이 훌어져 있고 아밀로이드가 메산지움세포의 세포질내로 함입되는 것이 관찰되었는데, 내피세포와 상피세포에서도 이와 비슷한 소견들이 관찰되었다.

아직까지 신 아밀로이드의 형성과정에 관하여서는 완전히 밝혀지고 있지 않으나 많은 인자들이 현재까지 고려되어 왔다. 그 중 가장 큰 흥미와 관심을 가지는 형성기전은 첫째로 아밀로이드의 전구물질이 혈장내에 존재하다가 혈관투과성의 장애로 인해 혈관벽을 뚫고 혈관의 지역에 침착된다는 설과^{49,50)} 둘째로 아밀로이드가 신장 자체에서 직접 만들어지고 축적된다는 그것이다^{23,24)}. 이와 연관지어 사구체 내에서의 아밀로이드의 침착 위치도 다양하게 해석될 수 있는데, 즉 아밀로이드가 축적된 위치의 인접 세포에서 직접 만들어지거나 혹은 메산지움의 기질과 기저막에 축적된 것은 그것이 혈장 기원이라는 것을 암시한다든지 하는 것이다^{51~54)}. 이러한 관점에서 보면 아밀로이드가 침착되는 위치와 인접 세포와의 관계는 이 세포가 아밀로이드 원섬유의 형성과 관계가 있거나 탐식작용과 관계가 있는데 Shimamura 등⁴⁶⁾은 이 인접 세포들이 탐식작용보다는 아밀로이드의 직접 형성과 관계가 있다고 하면서 그 근거로서는 첫째 인접 세포들이 풍부한 세포 소기관을 가지는 활동적인 세포질의 특징을 가지고 있고 둘째 탐식세포로 보기에는 리소솜의 숫자가 너무 적으며 셋째 세포질내의 아밀로이드 원섬유를 둘러싸는 세포막이 세포질내 이입과정 때와는 달리 불분명하게 보이고 넷째 침착되는 아밀로이드 원섬유들

이 비교적 규칙적으로 배열되어 있다는 것을 제시하였다. 이러한 세포막과 아밀로이드 원섬유의 tuft와의 구조적 관계에 관하여 다른 연구자들도 이것이 아밀로이드 직접 생성의 증거라는 것에 동의하였으며^{38~39)} 이 개념은 또한 간 및 비장에서의 광학 및 전자현미경적 연구에 의한 아밀로이드 직접 형성을 규명하는 데에도 적용되었다⁵⁵⁾. 저자도 이들의 의견에 부분적으로 동의하나 단지 아밀로이드가 사구체내의 특정세포에서 직접 만들어진다고는 보여지지 않고 혈중의 아밀로이드 전구물질이 과거된 내피세포를 통해 침착되고 사구체 세포내의 가수분해 효소 등에 의해 세포외에서 형성된다고 보여지며 본 실험에서 면역전자현미경을 통한 관찰에서도 세포내에서는 아밀로이드 원섬유가 전혀 관찰되지 않았다는 것이 이를 뒷받침한다.

면역전자현미경을 이용하여 아밀로이드를 관찰하고 그 발생기전을 규명해 보고자 한 노력은 드문 실정이다^{29,30)}. 그 이유 중의 하나로서는 면역염색의 결과에 대한 특이성 여부 혹은 염색 과정중의 비특이적 반응에 의한 인공산물과 그로 인한 해석상의 어려움 등에 연유된다고 생각한다. 이 염색과정의 주요점은 AA 아밀로이드와 AA 항체와의 반응, 그리고 AA 항체와 gold를 결합시키기 위해 그 전 단계인 colloidal gold와 staphylococcal protein A와의 부착인데 Roth 등^{56,57)}에 의해 이미 그 방법이 제시된 바가 있다. 본 실험 결과에서 gold 입자의 침착이 관찰되는데 이것이 인공산물이 아닌 특이적 반응으로 확인할 수 있는 근거는 아밀로이드가 침착되지 않은 곳에서는 gold 입자가 존재하지 않았으며 아밀로이드가 침착된 곳만 선택적으로 염색이 되었다는 점이다. 이 면역전자현미경으로 관찰해 본 실험의 결과 이 아밀로이드가 AA type (mc 1)이라는 것과 아밀로이드가 침착된 인접의 세포내에서는 gold 입자가 전혀 관찰되지 않아 사구체의 세포내에서는 아밀로이드의 직접 형성이 일어나지 않았다는 사실이다. 비록 그것이 아밀로이드 AA형이라는 한정된 유형에 국한된 결과이지만 다른 유형의 아밀로이드증에서도 앞으로 많은 연구가 이루어질 것을 기대해 본다.

지금까지 아밀로이드가 직접 만들어지는 장소 중의 하나로 알려진 간세포에서의 기전은⁵⁵⁾ 급성 혹은 만성 염증이나 만성 조직괴사 등에 의해 대식세포의 수가 증가되어 여기에서 interleukin- I 을 분비하고 이것이 간세포로 하여금 아밀로이드의 전구물질인 SAA (serum

amyloid A)의 합성을 촉진한다고 하는데⁵⁸⁾ 사구체 내의 세포에서는 interleukin-I 과의 관계는 알려진 바가 없고 또한 본 실험에서도 모세혈관내에 단핵세포가 관찰되었지만 이것과 신장내 아밀로이드와의 연관성을 추측하기가 어려워 여기에 관한 것은 앞으로 연구되어야 할 과제로 생각된다. 그렇지만 SAA의 생성이 많다고 하여 반드시 아밀로이드증이 되는 것은 아니다. 그것은 모든 만성염증 때에 아밀로이드증이 되지 않는 것과 같은 이치이다. SAA는 정상적으로 monocyte-associated serine esterase에 의해 분해된다고 알려져 있고 이 SAA를 분해할 수 없을 때 아밀로이드가 형성된다고 하는데 이것은 유전과도 관련이 있을 것이라는 보고도 있다⁵⁹⁾. 본 실험에서도 카제인과 내독소를 투여한 같은 조건하의 모든 예에서 아밀로이드가 발생되지 않았던 점도 이와 관련이 있지 않을까 생각되고 동시에 한국인에 있어서도 아밀로이드증에 관한 문헌보고가 극히 적은 것이 혹시 유전과 어떤 관련이 있는지 의심해 보면서 앞으로 이 방면에 대한 연구도 뒤따라야 할 것으로 생각된다. 본 실험에서 관찰된 아밀로이드가 침착되는 인접 세포의 세포막이 불분명해지는 것은 세포막의 파괴로 인한 것인지 그래서 이곳을 통해 세포내 효소가 밖으로 배출되는지, 그렇지 않으면 조직절편 과정의 인공산물인자의 여부는 분명치 않으나 저자는 전자일것으로 생각된다. 또한 아밀로이드 원섬유가 인접 세포의 세포질내에 막에 의해 완전히 둘러 싸여진 것을 볼 수 있는데 이것은 수직 또는 경사 절단에 의한 것으로 보여진다. 그리고 이미 아밀로이드가 형성되는 장기의 하나로 알려진²⁸⁾ 비장의 망상내 피세포에서 보였던 세포질내 아밀로이드 원섬유의 존재도 본 실험에서 관찰되지 않았는데 이것도 사구체의 세포내에서는 아밀로이드가 직접 만들어 지지 않은 소견으로 사료되는 바이다. 아밀로이드가 사구체에서의 흡수 과정에 대해서는 보고된 바가 극히 드물지만⁵⁹⁾ 메산지움 세포의 탐식능력에 대해서는 이미 잘 알려져 있고 이미 다른 장기에서는 아밀로이드의 탐식과정에 대한 보고가 있으므로^{60,61)} 탐식작용이 한 방법이 아닐까 하고 생각되지만 추후 더 연구되어야 할 과제로 생각된다.

요 약

저자는 신 아밀로이드증의 광학 및 전자현미경과 면역 전자현미경적 관찰을 통하여 그 형태학적 소견을 관찰하

고 기전을 규명해보기 위하여 ICR 생쥐를 대상으로 카제인 및 내독소를 과하조직에 반복주사한 뒤 다음과 같은 결과를 얻었다.

광학현미경적으로는 아밀로이드의 침착이 일어나지 않은 사구체에서는 모세혈관에 울혈의 소견이 관찰되었고 아밀로이드가 형성된 사구체에서는 hematoxylin and eosin 염색상 아밀로이드가 주로 메산지움을 중심으로 결절모양으로 침착되었으며 PAP 방법에 의한 면역화학적 염색에서는 모두가 AA형의 아밀로이드임이 확인되었다. 전자현미경적 소견은 아밀로이드가 메산지움에 주로 침착되고 이것이 주위 기저막으로 침윤되어 인접한 내피하 혹은 상피하 지역에까지 확장되어 있었으나 메산지움과의 연결없이 기저막에만 침착된 경우는 관찰되지 않았다. 사구체 세포들의 구조변화는 아밀로이드가 침착된 곳에 인접한 메산지움세포에서는 풍부한 리보솜과 내형질세망 및 끌지체와 리소ーム의 증가, 수초모양 진류체의 출현이 관찰되었고, 세포막은 일부가 소실되면서 주위에 많은 소포들이 흩어져 있고 아밀로이드 원섬유의 일부가 메산지움세포의 세포질내로 합입되는 것도 관찰되었다. 이러한 소견들은 내피 및 상피세포에서도 모두 비슷하였다. 면역전자현미경적 관찰을 통해서 본 결과는 아밀로이드가 침착된 부위에서는 전하게 염색된 gold 입자가 관찰되었으며 아밀로이드가 침착되지 않은 부위와 아밀로이드가 침착된 인접부위의 세포내에서는 gold 입자가 전혀 관찰되지 않아서 세포내에서는 아밀로이드 물질이 생성되지 않는다는 것이 확인되었다.

이상의 연구 결과로 보아 AA형 아밀로이드의 형성기전은 신장외의 다른곳에서 형성되어 혈류를 따라 이동해온 아밀로이드 전구 물질이 신사구체의 손상된 내피세포를 통해 세포의 지역에 침착되며 아밀로이드 원섬유는 사구체 세포 즉 메산지움세포, 내피세포 및 외피세포 모두에서 분비될 것으로 생각되는 효소의 작용에 의해 형성된다고 생각되어지고 이 아밀로이드는 주로 메산지움에 침착되어 주위의 기저막으로 침윤되는 것으로 생각된다.

= Abstract =

Electron Microscopic Study on the Pathogenesis of AA type Renal Amyloidosis

Kwan Kyu Park, M.D. and Young Ho Kim, M.T.

Department of Pathology, Keimyung University School of Medicine, Taegu, Korea

Tae Joong Sohn, M.D.

Department of Pathology, Kyungpook National University School of Medicine, Taegu, Korea

Renal amyloidosis was induced in a group of ICR mice by daily subcutaneous injections of casein-endotoxin solution to clarify the pathogenetic mechanism of renal glomerular amyloidosis. The mice were sacrificed at 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 weeks after the last injection of casein-endotoxin. The kidneys were processed for light and electron microscopy. Amyloid deposits were investigated on light microscopy, immunohistochemistry by the PAP method, electron microscopy and ultrathin section using the protein-A gold method.

Light microscopically, the distribution of amyloid in the glomerulus was not diffuse but focal and nodular leaving some portions of the capillary walls intact even in the heaviest lesion. Electron microscopically, amyloid fibrils were demonstrated predominantly in the mesangial matrix and could be seen penetrating the basement membrane of the mesangial region into the subepithelial and subendothelial space of adjacent glomerular capillaries. The basement membrane is not primarily involved in amyloidosis, but is secondarily infiltrated by heavy amyloid deposition. These amyloid fibrils were arranged in random array as thin, rigid and nonbranching fibrils. With increasing amounts of amyloid, the mesangium became widened and the mesangial cell cytoplasm diminished in amount. The glomerular cells - whether they are mesangial, endothelial or epithelial cells - contain an abundance of free ribosomes, polysomal aggregates, endoplasmic reticulum and Golgi apparatuses. The intimate structural relationships of the tufts of amyloid fibrils to mesangial cells, as well as to the endothelial and epithelial cells were observed. Membrane surrounded amyloid fibrils were found within the cytoplasm of the mesangial and epithelial cells.

These are most likely the result of cross sections or oblique sections of the invagination of the amyloid to the cytoplasm of the cells. The cytoplasmic membrane or the membrane surrounding the intracellular amyloid fibrils appears incisive at the particular site of apparent amyloid formation. Many vesicles and vacuoles are also found near the cytoplasmic membrane of the cells. Using the postembedding protein-A gold technique, monoclonal antibodies directed against amyloid-A protein (AA) were examined by immunoelectron microscopy to identify the fibrils. Many gold particles labelled fibrillar structure were seen in the extracellular space.

It is concluded by our morphologic findings that amyloid fibrils in the glomerulus are formed from amyloid precursors brought via the blood stream and may be formed in the extracellular space under the lysosomal enzyme released from epithelial, mesangial and perhaps endothelial cells.

REFERENCES

- 1) Nolting SF, Cambell WG, Jr: *Subepithelial argyrophilic spicular structures in renal amyloidosis-an aid in diagnosis*. *Hum Pathol* **12**:724-734, 1981
- 2) Shiiki H, Shimokama T, Yoshikawa Y, Toyoshima H, Kitamoto T, Watanabe T: *Renal amyloidosis: Correlations between morphology, chemical types of amyloid protein and clinical features*. *Virchows Arch [A]* **412**:197-204, 1988
- 3) Cohen AS, Connors LH: *The pathogenesis and biochemistry of amyloidosis*. *J Pathol* **151**:1-10, 1987
- 4) Nakagawa S: *Ultrastructural investigation of amyloidosis: Pathogenesis of systemic amyloidosis*. *Appl Pathol* **2**:328-340, 1984
- 5) Shiiki H, Shimokama T, Yoshikawa Y, Onoyama K, Morimatsu M, Watanabe T: *Perimembranous-type renal amyloidosis: A peculiar form of AL amyloidosis*. *Nephron* **53**:27-32, 1989
- 6) Noel LH, Droz D, Ganeval D: *Immunohistochemical characterization of renal amyloidosis*. *Am J Clin Pathol* **87**:756-761, 1987
- 7) Gise HV, Mikelet E, Gruber M, Christ H, Bohle A: *Investigations on the cause of the nephrotic syndrome in renal amyloidosis: A discussion of electron microscopic findings*. *Virchows Arch [A]* **379**:131-141, 1978
- 8) 박관규, 권건영, 장은숙, 박성배, 김현철: 신아밀로이드증 1예: 전자현미경 및 면역화학적 소견. 대한신장

- 학회지 **10(4)**:625-631, 1991
- 9) 고행일, 김명진, 강영석, 김철수, 이현순 : 원발성 유전분증: 1예 보고. 대한신장학회지 **1(1)**:61-64, 1982
- 10) 오하영, 궁성수, 박정식, 김성권, 최성재, 이정상, 이문호, 김용일 : 신유전분증. 대한내과학회지 **26(5)**: 530-539, 1983
- 11) 노임환, 안정경, 윤호주, 최호순, 박찬현, 강종명, 박한철, 박문향, 정화순 : 신증후군을 동반한 유전분증. 대한신장학회지 **6(1)**:167-175, 1987
- 12) 이인규, 박성배, 정병천, 김현철 : 원발성 유전분증 1예. 계명의대 논문집 **3(1)**:125-130, 1984
- 13) Bonsib SM, Plattner SB; *A cellular scanning electron microscopy of spicular renal amyloidosis. Ultrastruct Pathol* **10**:497-504, 1986
- 14) Gise HV, Helmchen U, Mikeler E, Brüning L, Walther CH, Christ H, Mackensen S, Bohle A: *Correlations between the morphological and clinical findings in a patient recovering from secondary generalised amyloidosis with renal involvement: Light and electron microscopic investigations on serial biopsies. Virchows Arch [A]* **379**:119-129, 1978
- 15) Cohen AS: *amyloidosis. Bull Rheum Dis* **40**:1-12, 1991
- 16) Watanabe S, Jaffe E, Pollock S, Sipe J, Glenner G: *amyloid AA protein: Cellular distribution and appearance. Am J Clin Pathol* **67**:540-544, 1977
- 17) Sano K: *Experimental amyloidosis induced by saponin. Acta pathol Jpn* **38**:1241-1253, 1988
- 18) Baumal R, Sklar S, Wilson B, Laskov R: *Casein-induced murine amyloidosis: amyloidogenesis in vitro by monolayer spleen explants of casein-injected mice. Lab Invest* **39**:632-639, 1978
- 19) Uchino F, Takahashi M, Yokota T, Ishihara T: *Experimental amyloidosis: Role of the hepatocytes and Kupffer cells in amyloid formation. Appl Pathol* **3**:78-87, 1985
- 20) Gallo GR, Feiner HD, Kate LA, Feldman GM, Correa EB, Chuba JV, Buxbaum JN: *Nodular glomerulopathy associated with non-amyloidotic kappa light chain deposits and excess immunoglobulin light chain synthesis. Am J Pathol* **99**:621-644, 1980
- 21) Takahashi M, Yokota T, Yamashita Y, Ishihara T, Uchino F: *Ultrastructural evidence for the synthesis of serum amyloid A protein by murine hepatocytes. Lab Invest* **52**:220-223, 1985
- 22) Gise HV, Christ H, Bohle A: *Early glomerular lesions in amyloidosis: Electronmicroscopic findings. Virchows Arch [A]* **390**:259-272, 1981
- 23) Cohen AS, Gross E, Shirahama T: *The light and electronmicroscopic autoradiographic demonstration of local amyloid formation in spleen explants. Am J Pathol* **47**:1079-1111, 1965
- 24) Suzuki Y, Churg J, Grishman E, Mautner W, Dachs S: *The mesangium of the renal glomerulus: Electron microscopic studies of pathologic alterations. Am J Pathol* **43**:555-578, 1963
- 25) Shirahama T, Cohen AS: *Intralyosomal formation of amyloid fibrils. Am J Pathol* **81**:101-116, 1975
- 26) Linke RP, Geisel O, Mann K: *Equine cutaneous amyloidosis derived from an immunoglobulin λ-light chain: Immunohistochemical, immunochemical and chemical results. Biol Chem Hoppe-Seyler* **372**:835-843, 1991
- 27) Donini U, Casanova S, Zucchielli P, Linke RP: *Immunoelectron microscopic classification of amyloid in renal biopsies. J Histochem Cytochem* **37**:1101-1106, 1989
- 28) Takahashi M, Yokota T, Kawano H, Gondo T, Ishihara T, Uchino F: *Ultrastructural evidence for intracellular formation of amyloid fibrils in macrophages. Virchows Arch [A]* **415**:411-419, 1989
- 29) Linke RP, Nathrath WBJ, Wilson PD: *Immunoelectron microscopic identification and classification of amyloid in tissue sections by the postembedding protein-A gold method. Ultrastruct Pathol* **4**:1-7, 1983
- 30) Linke RP, Huhn D, Casanova S, Donini U: *Methods in laboratory investigation: Immunoelectron microscopic identification of human AA-type amyloid: Exploration of various monoclonal AA-antibodies, methods of fixation, embedding and of other parameters for the protein-A gold method. Lab Invest* **61**:691-697, 1989
- 31) Taylor CR: *Immunoperoxidase techniques: Practical and theoretical aspects. Arch Pathol Lab Med* **102**: 113-121, 1978
- 32) Luft JH: *Improvement in epoxy resin embedding method. J Biophys Biochem Cytol* **9**:409-417, 1961
- 33) Watson ML: *Staining of tissue sections for electron-microscopy with heavy metals. J Biophys Biochem Cytol* **6**:475-479, 1958
- 34) Reynolds ES: *The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J Cell Biol* **17**:208-212, 1963

- 35) Cohen AS, Frensdorff A, Lamprecht S, Calkins E: *A study of the fine structure of the amyloid associated with familial mediterranean fever.* Am J Pathol 41: 567-578, 1962
- 36) Movat HZ: *The fine structure of the glomerulus in amyloidosis.* Arch Pathol (Chicago) 69:323-332, 1960
- 37) Shimamura T, Sorenson GD: *Experimental amyloidosis. V. Relationship between experimental glomerular amyloid and the mesangial region.* Am J Pathol 46:645-656, 1965
- 38) Sorenson GD, Shimamura T: *Experimental amyloidosis. III. light and electron microscopic observations of renal glomeruli.* Lab Invest 13:1409-1417, 1964
- 39) Trump BF, Benditt EP: *Electron microscopic studies of human renal disease: Observation of normal visceral glomerular epithelium and its modification in disease.* Lab Invest 11:753-781, 1962
- 40) Ansell ID, Joekes AM: *Spicular arrangement of amyloid in renal biopsy.* J Clin Pathol 25:1056-1062, 1972
- 41) Dikman SH, Churg J, Kahn T: *Morphologic and clinical correlates in renal amyloidosis.* Hum Pathol 12:160-169, 1981
- 42) Moorthy AV, Burkholder PM: *Unusual appearance of amyloid in renal biopsy specimen.* Arch Pathol Lab Med 101:664-665, 1977
- 43) Watanabe T, Saniter T: *Morphological and clinical features of renal amyloidosis.* Virchows Arch [A] 366:125-135, 1975
- 44) Hinglais N, Zweibaum A, Richet G: *Les lésions précoce de Vamylose expérimentale du hamster.* Nephron 1:16-30, 1964
- 45) Shirahama T, Cohen AS: *An analysis of the close relationship of lysosomes to early deposits of amyloid.* Am J Pathol 73:97-114, 1973
- 46) Shirahama T, Cohen AS: *Fine structure of the glomerulus in human and experimental renal amyloidosis.* Am J Pathol 51:869-911, 1967
- 47) Bergstrand A, Bucht H: *Electron microscopy and renal function in amyloidosis of the kidneys.* J Pathol Bacteriol 81:495-503, 1961
- 48) Vanatta PR, Silva FG, Taylor WE, Costa JC: *Renal cell carcinoma and systemic amyloidosis: Demonstration of AA protein and review of the literature.* Hum Pathol 14:195-201, 1983
- 49) Schultz RT: *Role of altered vascular permeability in amyloid formation.* Am J Pathol 86:321-342, 1977
- 50) Miura K, Takahashi Y, Shirasawa H: *Immunohistochemical detection of serum amyloid A protein in the liver and the kidney after casein injection.* Lab Invest 53:453-463, 1985
- 51) Feldman JD, Hammer D, Dixon FJ: *Experimental glomerulonephritis. III. Pathogenesis of glomerular ultrastructural lesions in nephrotoxic serum nephritis.* Lab Invest 12:748-763, 1963
- 52) Movat HZ, Steiner JW, Huhn D: *The fine structure of the glomerulus in acute glomerulonephritis.* Lab Invest 11:117-135, 1962
- 53) Pardo V, Shapiro AP: *Ultrastructural glomerular lesions produced by synthetic polysaccharides.* Lab Invest 15:617-628, 1966
- 54) Strunk SW, Hammond WS, Benditt EP: *The resolution of acute glomerulonephritis: An electron microscopic study of four sequential biopsies.* Lab Invest 13:401-429, 1964
- 55) Shirahama T, Cohen AS: *Immunocytochemical study of hepatocyte synthesis of amyloid AA: Demonstration of usual site of synthesis and intracellular pathway but unusual retention on the surface membrane.* Am J Pathol 118:108-115, 1985
- 56) Roth J, Bendayan M, Carlemalm E, Villiger W, Garavito M: *Enhancement of structural preservation and immunocytochemical staining in low temperature embedded pancreatic tissue.* J Histochem Cytochem 29:663-671, 1981
- 57) Roth J, Bendayan M, Orci L: *Ultrastructural localization of intracellular antigens by the use of protein A-gold complex.* J Histochem Cytochem 26:1074-1081, 1978
- 58) Cotran RS, Kumar V, Robbins SL: *Robbins pathologic basis of disease.* 4th ed. Philadelphia, WB Saunders Co 1989 pp210-220.
- 59) Shirahama T, Cohen AS: *Redistribution of amyloid deposits.* Am J Pathol 99:539-550, 1980
- 60) Heefner WA, Sorenson GD: *Experimental amyloidosis. I. Light and electron microscopic observations of spleen and lymph nodes.* Lab Invest 11: 585-593, 1962
- 61) Sorenson GD, Heefner WA, Kirkpatrick JB: *Experimental amyloidosis. II. Light and electron microscopic observations of liver.* Am J Pathol 44:629-644, 1964

Key For Abbreviations

- A: Amyloid
Bm: Basement membrane
CL: Capillary lumen
En: Endothelial cell
Ep: Epithelial cell
Ms: Mesangial cell
N: Nucleus

- Fig. 1.** One week after casein and endotoxin injection. Glomerular capillaries are congested and amyloid is not deposited (H & E, $\times 200$).
- Fig. 2.** Six weeks after casein and endotoxin injection. Amyloid deposits form a nodule in the mesangium extending to the capillary wall (H & E, $\times 200$).
- Fig. 3.** Six weeks after casein and endotoxin injection. Orange-green birefringence of amyloid under polarizing microscope (Congo red, $\times 200$).
- Fig. 4.** Seven weeks after casein and endotoxin injection. Immunohistochemistry using monoclonal anti-AA serum shows brown nodular amyloid deposits in the mesangium (PAP, $\times 200$).
- Fig. 5.** Six weeks after casein and endotoxin injection. Amyloid deposition is found predominantly in the mesangium. The cytoplasm of the mesangial cell is reduced in volume (TEM, $\times 10, 200$).
- Fig. 6.** Seven weeks after casein and endotoxin injection. A monocyte is seen in the capillary lumen of the glomerulus (TEM, $\times 13, 600$).
- Fig. 7.** Two weeks after casein and endotoxin injection. Amyloid in the mesangium extended to the basement membrane of capillary wall (TEM, $\times 17, 000$).
- Fig. 8.** Six weeks after casein and endotoxin injection. Early formation of amyloid fibrils in the subendothelial space and endothelial cell in loose contact with underlying layer (TEM, $\times 28, 900$).
- Fig. 9.** Six weeks after casein and endotoxin injection. Bundles of amyloid fibrils which have extended through the epithelial cytoplasm into the capillary lumen (arrow). Fenestrae between endothelial cells appear unusually wide (TEM, $\times 17, 000$).
- Fig. 10.** Seven weeks after casein and endotoxin injection. The endothelial cell shows abundant Golgi apparatus, endoplasmic reticulum, vesicles and some lysosomes (TEM, $\times 20, 400$).
- Fig. 11.** One week after casein and endotoxin injection. The mesangial cell lying in amyloid deposit shows pyknotic nucleus. The cytoplasm shows many lysosomes (arrow head) and myelin figure-like residual body (arrow) (TEM, $\times 17, 000$).
- Fig. 12.** Six weeks after casein and endotoxin injection. Amyloid fibrils are arranged almost perpendicularly to the surface of mesangial cell. Plasma membrane appears to be indistinct and dense due to aggregation of finely granular or filamentous amyloid materials (TEM, $\times 25, 500$).
- Fig. 13.** Two weeks after casein and endotoxin injection. Mesangial cells have finger-like cytoplasmic projections. The plasma membrane appears to be indistinct and invaginated as a pocket filled with amyloid fibrils (arrow). Some membrane-surrounded amyloid fibrils are intracellular (TEM, $\times 34, 000$).
- Fig. 14.** Seven weeks after casein and endotoxin injection. Small vesicles are attached to plasma membrane of the mesangial cells and are present in the extracellular space due to destruction of the membrane. Some vacuoles are also present in the cytoplasm (TEM, $\times 34, 000$).
- Fig. 15.** Seven weeks after casein and endotoxin injection. The cytoplasm of the podocyte is swollen and shows lysosomes, swollen mitochondria and numerous filaments. These filaments are seen in normal podocytes as well. Although they appear somewhat similar to amyloid fibrils in dimension and density, they are slightly thinner and softer than amyloid fibrils. The basement membrane is nearly intact (TEM, $\times 20, 400$).
- Fig. 16.** Six weeks after casein and endotoxin injection. Cone shaped bundle of amyloid fibrils in the basement membrane are invaginated to the cytoplasm of the podocyte (arrow) (TEM, $\times 42, 500$).
- Fig. 17.** Four weeks after casein and endotoxin injection. Membrane-surrounded amyloid fibrils are seen within the cytoplasm of the epithelial cell (*). Granular and fine filamentous materials are also present in the capillary lumen (TEM, $\times 25, 500$).

Fig. 18. Six weeks after casein and endotoxin injection. In border of endothelial cell and of mesangial cell, intimate structural relationship between cell membrane and amyloid fibrils is seen. Some foot processes are denuded and subepithelial space is enlarged (TEM, $\times 34,000$).

Fig. 19. Seven weeks after casein and endotoxin injection. Amyloid is present on both sides of basement membrane. The foot processes of epithelial cell are fused and show several vesicles close to the cytoplasmic membrane (TEM, $\times 25,500$).

Fig. 20. Six weeks after casein and endotoxin injection. Amyloid fibrils are arranged perpendicularly to the basement membrane and the cytoplasmic membrane of the podocyte is focally indistinct. Opened vesicle is integrated into the cell membrane (arrow) (TEM, $\times 42,500$).

Fig. 21. Seven weeks after casein and endotoxin injection. Endothelial cells show reticulated pattern and their fenestrae are widened (TEM, $\times 13,600$).

Fig. 22. Seven weeks after casein and endotoxin injection. The endothelial cell shows increased number of lysosomes, ovoid or elongated mitochondria, free ribosomes and rough endoplasmic reticulum (TEM, $\times 20,400$).

Fig. 23. Immunoelectron microscopic finding of AA-type amyloid fibrils. Staining with monoclonal anti-AA (mc1) reveals many gold particles of approximately 20 nm over the amyloid fibrils. Epon embedding; contrast with uranyl acetate (IEM, $\times 34,000$).

Fig. 24. Immunoelectron microscopy using anti-mouse AA. Gold particles are not seen within the mesangial cytoplasm. Many vesicles or vacuoles are present near the cytoplasmic membrane (IEM, $\times 42,500$).

-박관규 외 2인 : 사 진 부 도-

—박관규 외 2인 : 사 진 부 도—

— 박관규 외 2인 : 사 진 부 도 —

—박관규 외 2인 : 사 진 부 도—

-박관규 외 2인 : 사 진 부 도-

-박관규 외 2인 : 사 진 부 도-

—박관규 외 2인 : 사 진 부 도—

—박관규 외 2인 : 사 진 부 도—