Pathological Study on Nephrocalcinosis in Fischer 344/Du Crj Rats.

Hijiri Iwata, Yasuhiko Hirouchi, Hiroyuki Inoue and Makoto Enomoto

*Biosafety Research Center, Foods, Drugs and Pesticides (An-Pyō Center)
582-2, Arahama, Shioshinden, Fukude-cho, Iwata-gun
Shizuoka-ken, Japan, 437-12*

(Received 13 November 1985/Accepted 31 January 1986)

Histopathological examinations on nephrocalcinosis of the Fischer 344 (F344) rats were carried out. As the results of comparison on its appearance among F344, Wistar and SD strains of rats, F344 female rats showed the most severe nephrocalcinosis. Nephrocalcinosis developed between 4 weeks and 8 weeks and was likely to keep its appearance through 108 weeks of the survival period of the rats. Histologically, mineral deposit was always observed at cortico-medullary junction. It seemed to locate at the outer portion of the basement membrane of the tubular epithelium, adjacent to the capillary wall in the connective tissue. Four weeks after ovariectomy at 4 weeks of age, the rats showed a decrease in degree of nephrocalcinosis. In contrary, the rats treated with estorone following ovariectomy revealed an increase in degree of nephrocalcinosis. It was suggested that the oestrogen-type sex hormone appeared to give a role in nephrocalcinosis

Fischer 344/Du Crj ラットにおける 腎石灰沈着症の病理学的検討

岩田 聖・廣内康彦・井上博之・榎本 真

財食品農医薬品安全性評価センター

ラットの腎石灰沈着症については、Geary と Cousins [8, 9] のように腎石灰沈着症と雌性ホルモンとの相関、すなわち性差について注目した報告や、Woodard [19-21] らのように腎石灰沈着症と給与飼料との相関について注目した報告等数多くの報告がある。しかし、その殆んどは、SD系ラットあるいは、Wistar系ラットについての報告であり、Fischer ラットについての詳細な報告はまだない。そこで Fischer 344ラットを中心として、系統差、性差、経時的変動、沈着石灰の性状や所在についてそれぞれ検討した。また石灰沈着

の原因の1つとして雌性ホルモンの影響を考え、卵巣割去と雌性ホルモン投与を行って検討を加えた。

材料と方法

当センターで行われた毒性試験の対照群ラットの腎について検索した。動物は4週齢で搬入し、1週間検疫の後、毒性試験に供した。動物はSPF環境下で個別飼育し、オリエンタル酵母製NIH公開飼料を水道水とともに自由摂取させた。

まず、系統差および性差を比較検討するためにいずれも3～4カ月齢のFischer 344/Du Crj (F344) ラット雄150例、雌150例、Slc: Wistar (Wistar) ラット雄115例、雌115例、CRJ: CD (SD) ラット雄35例、雌35例について調査した。また、F344ラット雌について経時的変動を調べる目的で、1カ月(4週)齢から25カ月(108週)齢の動物385例について検索した。

組織標本は、10%PBSホルマリン固定、パラフィン包埋により作成し、H-E染色のほかカルシウム証明法として、Kossa法、Russell法、Alizarin-red法を試み、Periodic-acid-schiff法、Periodic-acid-methenamine silver法を行った。

卵巣除去は、1カ月(4週)齢と4カ月(18週)齢のF344ラット雌それぞれ15例について行った。動物はネブタール麻酔下に背部正中より切開し、卵管・卵巣を左右とも摘出した。摘出1カ月後に屠殺し、腎臓について組織学的検査を行った。

さらに雌性ホルモン投与の影響を観察するために、F344ラット4週齢の雌20例を4群に分けて検討した。対照群は未処置で2カ月(9週)齢まで飼育した。A群は4週齢で卵巣除去を施し、そのまま2カ月(9週)齢まで飼育した。B群は4週齢で卵巣除去を施した後、5 μ g/head/day エストロン(半井化学製)をコーン油を溶媒として皮下注射し、2カ月(9週)齢まで飼育した。C群は、4週齢で卵巣除去を施した後、6mg/head/day プロジェステロン(半井化学製)をコーン油を溶媒とし皮下注射し、2カ月(9週)齢まで飼育した。

成 績

F344, Wistar およびSDの3～4カ月齢のラットでの腎石灰沈着症の発生率をFig. 1に示した。F344ラットでは雌100% (150/150)、雄20% (30/150)。Wistarラットでは雌77.4% (89/115)、雄3.5% (4/115)。SDラットでは、雌54.3% (19/35)、雄22.9% (8/35)であった。また、石灰沈着の程度は、F344ラット雌で特に著明に認められ、F344ラット雄や他の2系統のラットでは、微細な石灰が数カ所散在して認められる程度であった(Fig. 4 to 8)。

F344ラット雌の腎石灰沈着症については、1カ月(4週)齢で21.4% (3/14)、2カ月(9週)齢ないし19カ月(82週)齢では100% (230/230)、また、25カ月(108週)齢では95.7% (135/141)に認められた

Fig. 1. Occurrence of renal calcification in rat strains.

Fig. 2. Renal calcification in Fischer 344 female rats.

(Fig. 2)。

これらのF344ラットにおける腎石灰沈着症の出現率および強さは、2カ月齢ないし25カ月齢については常に同程度であった。また、病変の出現部位も同じで、主に皮髄境界部に認められた。石灰は尿細管上皮基底膜外で間質結合組織中の血管に接した部分に層状構造を呈して観察された(Figs. 9 and 10)。

石灰沈着の発生初期と考えられる時期、すなわち1カ月(4週)齢で卵巣除去を施したラット15例では1カ月飼育後(2カ月齢)腎石灰沈着症は全く認められないか、あるいは極く微細な石灰沈着巣を認めるにすぎなかった。一方、石灰沈着がすでに発生し、その程度も十分強いと考えられる時期4カ月齢(17週齢)で卵巣除去を施したラット15例では、1カ月間の飼育後でも腎石灰沈着は依然著明に認められた。

Fig. 3. Replacement with female sex hormone following ovariectomy.

Fig. 3に1カ月（4週）齢で卵巣割去を施したラットの雌性ホルモン（エストロン $5\mu\text{g}/\text{head}/\text{day}$ あるいはプロジェステロン $6\text{mg}/\text{head}/\text{day}$ ）投与の影響を検討した結果を示した。A群すなわち4週齢で卵巣割去を施し、そのまま2カ月（8週）齢まで飼育した5例では全例石灰沈着は認められなかった。B群すなわち4週齢で卵巣割去を施した後 $5\mu\text{g}/\text{head}/\text{day}$ エストロンを皮下注射し2カ月（9週）齢まで飼育した5例では全例に軽度から中程度の石灰沈着を認めた。C群すなわち4週齢で卵巣割去を施した後 $6\text{mg}/\text{head}/\text{day}$ プロジェステロンを皮下注射し2カ月（9週）齢まで飼育した5例では石灰沈着は認められなかった。

考 察

今回の調査の結果、同一環境、同一飼料で飼育したF344、WistarおよびSDの3系統のラットの中で、腎石灰沈着症はその発生率や程度においてF344ラットの雌に特に著明であった。また、いずれの系統においても発生率は雄に比べ雌で有意に高かった。

なお、血清Ca値・P値については、当センターの血液生化学検査値あるいは文献[15, 18]的にも、この3系統間に有意な差はなかった。

F344ラット雌では腎石灰沈着症の発生の時期が4ないし8週齢の間、すなわち離乳後から性成熟の時期であることから、F344雌ラットに観察される腎皮髄境界部の石灰沈着には雌性ホルモンが何らかの関与をしてい

る事が示唆された。Geary と Cousins [8, 9] は Wistar 系ラットに認められた顕著な腎皮髄境界部の石灰沈着症について報告している中で、卵巣割去術と石灰沈着との関連についても言及し、雌性ホルモン特にエストロジェンが腎のカルシウムあるいはリンの沈着の一要因となる事を示唆している。F344 ラット雌を用いた今回の実験では、腎石灰沈着の発生初期すなわち性成熟の起こる以前の時期において卵巣割去術を施す事により、腎石灰沈着症は全く認められないかあるいは極く軽微な程度になった。その後エストロジェン前駆物質であるエストロンを投与すると全例に病変の増強が認められたが、プロゲステロンを投与した群では腎石灰沈着症の増強は全く認められなかった。このことから、F344 ラットにおける腎石灰沈着症も Geary と Cousins [8, 9] の Wistar 系ラットでの報告と同様に雌性ホルモン特にエストロジェンの影響下にあることが明らかとなった。

これまでのラット腎石灰沈着症に関する報告の多くは Wistar 系およびSD系ラットについて飼料組成の違いによる発生率の相違について議論されたもので、一般に栄養性腎石灰症 (Nutritional Nephrocalcinosis) と表現されたものである [3-7, 10, 12-14, 16-22]。すなわち、飼料中の塩化カルシウムやマグネシウム塩が腎石灰沈着症の発生を防ぐ、あるいは飼料中のリン酸塩やフッ化物が腎石灰沈着症を誘発する等の報告で、飼料中の特定の成分と腎石灰沈着症との因果関係についての定説はまだない。しかし、これらの栄養性腎石灰症の病理組織像、沈着物の組成、雌雄差などは、前述した Geary と Cousins の報告 [8, 9] と共通する点が多い。今回我々が観察したF344雌ラットに見られる腎石灰沈着症についても飼料による影響が十分考えられるが、用いた飼料の成分中カルシウム塩やマグネシウム塩の不足あるいはリン酸塩やフッ化物の過剰等は考えられなかった。

一方、F344ラットを用いたある種の薬物の毒性試験において、腎石灰沈着症が高用量群で軽減する事実を我々は経験しているが(成績は示さない)、その際に無機物質の吸収・代謝が腎変化を介するものか、あるいは雌性ホルモンの影響によるものかは未だ不明である。

要 約

Fischer 344 ラットに観察される腎石灰沈着症について病理組織学的な検索を行い、またその出現に及ぼす

ホルモンの影響について検討した。

SD系およびWistar系ラットとの比較の結果、腎石灰沈着症は、その発生率・程度においてFischer 344 ラットの雌に特に高かった。Fischer 344 ラット雌では腎石灰沈着症の発生は4ないし8週齢の間に始まり、9ないし108週齢では常に同程度の沈着を示した。組織学的に病変は常に皮髄境界部に認められ尿細管上皮基底膜外の間質結合組織中の血管に接した部分に存在すると考えられた。また、4週齢ラットの卵巣を割去すると、腎石灰沈着の程度が軽減したが、その後エストロンの投与によって腎石灰沈着は再び増強した。この結果は、石灰沈着機序における雌性ホルモン、特にエストロジェンの関与を示唆している。

稿を終るにあたり、本研究の遂行に際して、御協力をいただいた(株)日本チャールスリバーの飛沢英雄氏、当センターの職員諸氏に深謝致します。

なお、本論文の要旨は昭和59年10月、第31回日本実験動物学会総会において発表した。

文 献

- [1] Belanger, L. F., Guertin-Coutu, L., and Parton, D. E. (1975). Protective action of sex hormones against mast cell depletion and other deleterious effect of magnesium deprivation. *Rev. Can. Biol.*, **34**(4), 195-203.
- [2] Benirschke, K., Garner, F. M., and Jones, T. C. (1978). Renal calcification. *In Pathology of Laboratory Animals*, pp. 154-155, Harold, W. C., Kenneth, M. A., and Robinson, F. R. (edit.), Springer-Verlag New York Inc.
- [3] Bunce, G. E. Saacke, R. G., and Mullins, J. (1980). The morphology and pathogenesis of magnesium deficiency-induced nephrocalcinosis. *Exp. Mol. Pathol.*, **33**(2), 203-210.
- [4] De Groat, A. P., Slump, P. (1969). Effect of several alkali treatment of protein on amino acid composition and nutritive value. *J. Nutr.*, **98**, 45-56.
- [5] Du Bruyn, D. B. (1972). Nephrocalcinosis in the white rat. *S. Afr. Med. J.*, **46**, 1588-1593.
- [6] Eklund, A., Agren, G., Nordgren, H., and Stenram, U. (1973). Nephrocalcinosis in adolescent Sprague-Dawley rats fed casein and different salt mixtures. *Nutr. Metab.*, **15**(6), 348-356.
- [7] Forbes, R. M. (1971) Attempts to alter kidney calcification in the magnesium-deficient rat. *J. Nutrition*, **101**, 35-44.
- [8] Geary, C. P., and Cousins, F. B. (1966). A sex-determining renal calcification in rats. *Nature*, **211**, 980-981.
- [9] Geary, C. P., and Cousins, F. B. (1969). An oestrogen-linked nephrocalcinosis in rats. *Br. J. Pathol.*, **50**, 507-515.

- [10] Goulding A., and Malthus, R. S. (1969). Effect of dietary magnesium on the development of nephrocalcinosis in rats. *J. Nutrition*, **97**, 353-358.
- [11] Greaves, P., and Faddini, J. M. (1984). Renal mineralization. *In* Rat Histopathology pp. 145-146, Elsevier Science Publishers B. V.
- [12] Harrison, J. E., Hitchman, A. J., Hasany, S. A., Hitchman, A., and Tam, C. S. (1985). The effect of fluoride on nephrocalcinosis in rats. *Clin. Biochem.*, **18**(2), 109-113.
- [13] Hitchman, A. I., Hasany, S. A., Hitchman, A., Harrison, J. E., and Tam, C. (1979). Phosphate-induced renal calcification in the rat. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **57**, 92-97.
- [14] Kaunitz, H., and Johnson, R. E. (1976). Dietary protein, fat, and minerals in nephrocalcinosis in female rats. *Metabolism*, **25**(1), 69-77.
- [15] 日本チャールスリバー株式会社.F344/Du Crj (Fischer) ラット長期飼育試験集. pp. 18-19.
- [16] Rosenmann, E., Yanko, L., and Cohen, A. M. (1984). Female sex hormone and nephropathy in Cohen Diabetic rat. *Horm. Metabol. Res.*, **16**, 11-16.
- [17] Shah, B. G., Belonje, B., and Nera, E. A. (1980). Reduction of nephrocalcinosis in female rats by additional magnesium and by fluoride. *Nutr. Rep. Int.*, **22**(6), 957-964.
- [18] 静岡県実験動物農業協同組合 (1984). 実験動物データ集. pp.6.
- [19] Smith, B. S., and Nisbet, D. I. (1972). Biochemical and pathological studies on magnesium deficiency in the rat. *J. Com. Pathol.*, **82**(1), 37-46.
- [20] Stonard, M. D., Samuels, D. M., and Lock, E. A. (1984). The pathogenesis and effect on renal function of nephrocalcinosis induced by different diets in female rats. *Food. Chem. Toxicol.*, **22**(2), 139-146.
- [21] Woodard, J. C. (1969). On the pathogenesis of alpha protein induced nephromegalia. *Lab. Invest.*, **20**, 9-16.
- [22] Woodard, J. C. (1971). A morphologic and biological study of semipurified nephrocalcinosis in female rats fed semipurified diets. *Am. J. Pathol.*, **65**(1), 253-268.
- [23] Woodard, J. C. (1971). Relationship between the ingredients of semipurified diets and nutritional nephrocalcinosis in rats. *Am. J. Pathol.*, **65**(1), 269-278.
- [24] Zalups, R. K., Haase, P., and Philbrick, D. J. (1983). Phosphate and the development of nephrocalcinosis in rats fed diets containing alpha protein. *Am. J. Pathol.*, **113**(1), 95-106.

Explanation of Figures

- Fig. 4. Cut surface of the F344 female rat kidney with white deposits at corticomedullary junction.
- Fig. 5. Marked calcified deposit (arrow) of the F344 female rat kidney. 4 months old. HE. $\times 40$.
- Fig. 6. A calcified deposit (arrow) of the F344 male rat kidney. 4 months old. HE. $\times 40$.
- Fig. 7. A calcified deposit (arrow) of the Wistar female rat kidney. 4 months old. HE. $\times 40$.
- Fig. 8. A calcified deposit (arrow) of the SD female rat kidney. 4 months old. HE. $\times 40$.
- Fig. 9. The deposit of F344 female rats kidney seems to locate at the outer portion of the basement membrane of the tubular epithelium. PAS stain. $\times 400$.
- Fig. 10. The deposit showing a lamellated structure. HE. $\times 400$.
- Fig. 11. Four weeks after ovariectomy at four weeks of age, the rats showed a decrease in degree of nephrocalcinosis. HE. $\times 40$.
- Fig. 12. The rats treated following ovariectomy revealed an increase in nephrocalcinosis. Calcified deposits (arrow) are shown. HE. $\times 40$.