サイクロスポリン投与ラットにおける腎毒性

—生化学的, 形態学的検討—

	阿	曾	佳	郎
	田	島		惇
	鈴	木	和	雄
浜松医科大学泌尿器科学教室	大	田	原	佳久
(主任: 阿曾佳郎教授)	太	田	信	隆
	畑		昌	宏
	塚	田		隆

NEPHROTOXICITY IN RATS RECEIVING CYCLOSPORINE

—Biochemical and Morphological Study—

Yoshio Aso, Atsushi Tajima, Kazuo Suzuki, Yoshihisa Ohtawara,

Nobutaka Ohta, Masahiro Hata and Takashi Tsukada

Department of Urology, Hamamatsu University School of Medicine

(Chairman: Prof. Yoshio Aso)

Cyclosporine (Cs) nephrotoxicity is harmful to recipients of renal transplantation and its pathogenesis remains unclear. To elucidate Cs nephrotoxicity, we carried out biochemical and morphological experiments in rats.

Adult male Wistar rats weighing 200 g were used. Rats were divided into 3 experimental groups; the Cs group (Cs 100 mg/kg/day was orally given for 9 consecutive days), the GM group (gentamicin 20 mg/kg/day was subcutaneously injected for 9 consecutive days) and the control group. All the rats were sacrificed and examined on the 10th day of the experiment. Blood urea nitrogen (BUN) and concentrations of N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG), alanine aminopeptidase (AAP) and lipoperoxide (LPO) in renal tissue were estimated in each group. Kidneys were also examined with light and electron microscopes.

The Cs group showed significant increases of BUN, NAG and LPO and more vacuoles in the proximal tubular cells, compared with the control group. On the other hand, the GM group revealed an increase of AAP activity in renal tissue and marked destruction of brush borders and many myelin-like structures in the cytoplasm of proximal tubular cells.

In proximal tubular cells, NAG and AAP are localized in lysosomes and brush borders, respectively. LPO is reported to be a possible marker of membrane destruction. Therefore, our results suggest that Cs directly damages proximal tubular cells via blood vessels in contrast to the GM injury mediated mainly through tubular lumens. The estimation of blood and urinary NAG and LPO may be useful for early detection of Cs nephrotoxicity.

要旨: サイクロスポリン (Cs) 腎毒性の解明のため, 10週齢の Wistar 系ラットを用い以下の実験を行った。ラットを Cs 群 (サイクロスポリン 100mg/kg/日, 9日間連日経口投与), GM 群 (ゲンタマイシン 20mg/kg/日, 9日間連日皮下注), および対照群の 3 群にわけた。各群とも実験開始後10日目に屠殺し, BUN, 腎組織中 N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) 値, alanine aminopeptidase (AAP) 値, 過酸化脂質 (LPO) 値の測定と, 光顕的, 電顕的に腎の組織学的検討を行った。その結果, Cs 群では BUN

が対照群と比べ明らかに上昇した。同様に Cs 群では、組織中 NAG 値、LPO 値の有意な上昇が認められた。Cs 群の組織像では、近位尿細管細胞の空胞変性が観察された。一方 GM 群では AAP が明らかに増加し、組織では刷子縁の脱落とミエリン様構造の出現がみられた。Cs 群において、近位尿細管細胞ライソゾーム由来である組織中 NAG 値および、細胞膜崩壊の指標と考えられる組織中 LPO 値の上昇がみられた。この事実から Cs が血行を介して近位尿細管上皮細胞を直接障害することが推測された。一方、GM 群においては刷子縁由来の酵素である組織中 AAP 値が増加することから、本剤が近位尿細管管腔、刷子縁を介して尿細管細胞の障害をひきおこす可能性が考えられた。このことは Cs 腎毒性診断において、血中、尿中の NAG 値、LPO 値の測定が有用である可能性を示唆するものであろう。

緒 言

最近、臨床応用が開始されたサイクロスポリン(Cs)は画期的免疫抑制剤である。Cs の登場により腎、肝、心などの臓器移植の臨床成績は飛躍的に向上した。しかし、Cs の予想外に強い腎毒性が明らかにされつつあり、その機序の解明と対策が臨床に急務となっている。

報告者らは従来より薬剤による腎毒性の解明について研究を行ってきた^{1)~4)}。今回この Cs の腎毒性の成立機序について基礎的研究を行ったので発表する。

材料と方法

200g 前後の10週齢の Wistar 系雄ラット SPF (specific-pathogens free) を用いた。

以下の3実験群をつくった。すなわち、サイクロスポリン投与群 (Cs 群)、ゲンタマイシン投与群 (GM 群)、対照群の3群である。Cs 群、GM 群はそれぞれ10匹のラット、対照群は6匹のラットとした。なお、GM 群をつくった理由は、GM 腎毒性について従来より多くの検討がなされているため、これと比較検討することにより Cs 腎毒性解明の手掛かりを得ることができらうと考えたからである。

Cs 群は、各ラットに Cs をオリーブオイルで溶解し、100mg/kg/日を9日間連日、胃管により経口投与した。一方 GM 群では、各ラットに GM 20mg/kg/日を9日間連日皮下注射した。各群とも実験開始後10日目に屠殺し、血清 BUN、腎組織中 N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) 値、腎組織中 alanine aminopeptidase (AAP) 値、腎組織中過酸化脂質 (LPO) 値の測定と光顕的、電顕的に腎の組織学的検討を行った。

血清 BUN の測定方法は、オートアナライザー(島津自動分析器 CL 12 型、ウレアーゼ UV 法)によった。

腎組織中 NAG 値、AAP 値は以下の方法によった。採取した腎組織を直ちに0.1モル、リン酸緩衝液 (pH 7.6) で10倍希釈し、冷却しつつホモジネートした。その後3,000rpm で7分間冷却遠心を行い、上清を

NAG、AAP 測定用試料とした。NAG 測定は、シオノギ MCP-NAG 測定キットを用い可視部比色法で測定⁵⁾し、一方、AAP は L-alanine-4-nitroanilide を基質として初速度法で測定した⁶⁾。

腎組織中 LPO 値の測定は Yagi らによる TBA 法によった⁷⁾。

なお組織中 NAG 値、AAP 値、LPO 値の測定値は腎の湿重量1g 当りで算出した。

組織学的検討では、HE 染色による光顕像および電顕像を検討した。

統計処理は、Student t 検定によった。

結 果

1) 血清 BUN の変化 (図1)

各群の血清 BUN の変化は図1に示す。Cs 群の血清 BUN 値は 23.4 ± 5.9 (平均値 $\pm$ 標準偏差値) mg/dl であった。一方、GM 群の血清 BUN 値は、 11.5 ± 2.0 mg/dl であった。対照群では、血清 BUN 値は 14.9 ± 1.5 mg/dl であった。従って Cs 群は対照群と比較して、血清 BUN 値は有意(危険率1%以下)に上昇したといえる。

2) 腎組織中 NAG 値 (図2)

腎組織中 NAG 値の結果を図2に示す。Cs 群の腎組織中 NAG 値は $(11.6 \pm 1.9) \times 10^3$ 単位/g wet weight。GM 群の腎組織中 NAG 値は $(9.4 \pm 2.0) \times 10^3$ 単位/g wet weight であった。一方、対照群の腎組織中 NAG

図1 BUN の変化

図2 組織中 NAG 値

図3 組織中 AAP 値

図4 組織中 LPO 値

値は $(8.6 \pm 1.4) \times 10^3$ 単位/g wet weight であった。Cs 群は対照群と比較して、腎組織中 NAG 値は有意(危険率 1 %以下)に上昇していた。

3) 腎組織中 AAP 値 (図3)

腎組織中 AAP 値の結果を図3に示す。Cs 群の腎組織中の AAP 値は 355 ± 39 単位/g wet weight であった。一方、対照群の腎組織中 AAP 値は 316 ± 87 単位/g wet weight であった。GM 群の腎組織中 AAP 値は対照群と比較して有意 (危険率 1 %以下) に上昇していたが、Cs 群では有意の差は認められなかった。

4) 腎組織中 LPO 値 (図4)

各群の腎組織中 LPO 値の変化を図4に示す。Cs 群の腎組織中 LPO 値は 256 ± 26 nmol/g wet weight, GM 群の腎組織中 LPO 値は 174 ± 33 nmol/g wet weight であった。一方、対照群の腎組織中 LPO 値は

図5 対照群の光顕像。近位尿細管上皮細胞は正常構造を示している。HE 染色, 140倍。

図6 Cs 群の光顕像。近位尿細管上皮細胞では空腔変性 (矢印) が著明で、核は濃縮している。刷子縁は比較的よく保れている。HE 染色, 140倍。

180 ± 23 nmol/g wet weight であった。Cs 群の腎組織中 LPO 値は対照群と比較して有意 (危険率 1 %以下) に上昇した。

5) 組織像の検討

対照群 (図5), Cs 群 (図6), GM 群 (図7) の HE 染色による光顕像は以下のとおりであった。

Cs 群は、対照群、GM 群と比較し近位尿細管上皮細胞の空腔変性が著明で、核の濃縮がみられた。一方 GM 群では、対照群、Cs 群と比較して近位尿細管上皮細胞の刷子縁の脱落が明らかにみられた。しかし、GM 群では近位尿細管上皮細胞の空腔変性は軽度のみられたにすぎない。

電顕像でみると、Cs 群 (図8) では光顕像同様空腔変性が著しかったが、刷子縁の構築はよく保たれていた。一方 GM 群の電顕像 (図9) では、刷子縁の脱落は著明であり、また近位尿細管上皮細胞内にミエリン

図7 GM群の光顕像。近位尿細管上皮細胞の刷子縁は脱落している。HE染色, 140倍。

図8 Cs群の電顕像。近位尿細管上皮細胞の刷子縁(*印)はよく保たれて細胞質内には多数の空腔(V)がみられる。Ly: ライソゾーム。

図9 GM群の電顕像。近位尿細管上皮細胞の刷子縁(*印)は脱落し、尿細管腔内に沢山のdebris(D)が存在する。細胞質内には電子密度の高いミエリン様構造物(M)がみられる。Nu: 核, BL: 基底膜。

様構造の出現を認めた。

なお、各群とも糸球体、血管では著変は認められなかった。

考 察

1969年から1970年の間に、サンド社(スイス、バーゼル)でノルウェーの土壌サンプルから、真菌 *Tolypocladium inflatum* Gramsが発見された。この真菌の抽出精製物(サイクロスポリン)は、従来の免疫抑制剤とは全く異なる免疫抑制効果を有していることが判明した⁸⁾。Calneらは、Csを初めて臨床に応用しその結果を1978年に報告した⁹⁾。1980年には、StarzlらがステロイドとCsの併用により画期的な腎移植成績の向上を報告した¹⁰⁾。現在臓器移植において、きわめて良好な臨床成績が得られたことにより、Csは主要な免疫抑制剤となりつつある。しかし、臨床上当に腎移植の臨床において、高頻度に出現するCsの腎毒性がきわめて重大な問題の一つになっている。すなわち、拒絶反応と本剤の腎毒性との鑑別、あるいは腎移植後の急性尿細管壊死の期間におけるCs腎毒性の診断が問題となっている。

Csの腎毒性の機序については、いくつかの発表がみられるが^{11)~13)}、その本態はなお不明である。現在のところ、Cs腎毒性の機序として尿細管上皮細胞に対する直接的な作用あるいは、プロスタサイクリンを介する腎血流の変化¹⁴⁾などが考えられている。

臨床Cs腎毒性診断の手掛かりとして、Cs血中濃度測定¹⁵⁾、あるいは尿中FDPの測定¹⁶⁾¹⁷⁾などがあげられている。移植腎機能が低下した時、Cs血中濃度が高値を示しているならばCs腎毒性、低値を示しているならば拒絶反応の可能性が高いと考えられている。また、尿中FDPが高値を示すならば拒絶反応を考慮し、尿中FDPが出現せず移植腎機能が低下しているならばCs腎毒性の出現が考えられている。さらに移植腎生検所見も、Cs腎毒性診断の手掛かりの一つとされている¹⁸⁾。しかし、Cs腎毒性の生検所見としてあげられている近位尿細管の空腔変性、石灰化、巨大ミトコンドリア、ライソゾームの増加などはCs腎毒性の特異的な変化ではない¹¹⁾¹⁸⁾。

そこで、Cs腎毒性の発現機序の解明と、その診断のための特異的な指標を求めて、NAG, AAP, LPOについて検討した。NAGは近位尿細管上皮細胞のライソゾーム由来の酵素である⁵⁾¹⁹⁾。一方AAPは、近位尿細管上皮細胞刷子縁由来の酵素である²⁰⁾、各種の腎疾患における尿中NAG, AAPの検討がなされて、その診

断的有用性が明らかにされつつある²¹⁾。

また LPO については、細胞あるいは細胞内小器管の膜の崩壊の指標として注目され、報告者らは腎の viability の指標、腎毒性物質による近位尿細管上皮細胞の変性の指標として検討を行ってきた¹³⁾⁴⁾。

今回の実験では、Cs 群では対照群と比較して腎組織中 NAG 値、LPO 値は有意に上昇し、一方 GM 群では対照群と比べ腎組織中 AAP 値が明らかに上昇することが示された。また、組織学的検討では、Cs 群において近位尿細管上皮細胞の空胞変性があるにもかかわらず、刷子縁は正常に保たれていた。逆に GM 群では近位尿細管上皮細胞刷子縁の脱落が著明であるにもかかわらず、細胞内の空胞変性は認められていなかった。Cs 群の組織像は報告者らが従来研究してきた水銀投与ラットの腎組織にきわめて類似していた¹⁴⁾。以上のことを要約すると表 1 のごとくなる。

上述の結果から Cs 腎毒性成立の機序は、GM 腎毒性と異なり、腎流血中から近位尿細管上皮細胞を直接障害することによりひきおこされる可能性が示唆された。電顕的な所見からこの事実の裏づけを得るため、尿細管周囲の血管の内皮細胞、尿細胞基底膜および細胞質突起をとくに注意して観察した。しかし今回の実験ではこれらの構造物にはっきりとした変化は認められなかった。

一般に腎毒性物質の近位尿細管上皮細胞に対する障害作用として 2 つの機序が考えられる。1 つは、GM 腎毒性などにみられるごとく、主として尿細管管腔を介すると考えられる障害作用²⁾であり、他の 1 つは、Hg、Cs 腎毒性などにみられるような、主として腎流血中から吸収されて直接近位尿細管上皮細胞を障害する機序である⁴⁾¹⁵⁾。従って前者の腎毒性の早期診断の指標としては、血中、尿中の AAP 値測定が有用である可能性²¹⁾がある。一方、後者の腎毒性の早期診断の手がかりとしては、血中、尿中の NAG 値および LPO 値の測定

が役立つ可能性が示唆される。事実、Cs 腎毒性の指標として尿中 NAG 値の測定が注目されている²²⁾²³⁾。

毒性実験では、毒性物質の投与量および投与期間が問題となる。その実験結果を一概に普遍化することはできないが、本実験結果は Cs 腎毒性の成立の機序について解明の手がかりを与えるものであろう。今後さらに腎組織のみならず、血中、尿中の NAG 値、AAP 値、LPO 値の測定を行いその結果を腎移植に応用していく予定である。

結 語

サイクロスポリン (Cs) をラットに投与し、腎組織中 NAG 値、AAP 値、LPO 値を測定した。その結果、腎組織中 NAG 値、LPO 値は、対照群と比較し明らかに上昇していた。また組織学的には Cs 投与ラットの近位尿細管上皮細胞の著明な空胞変性が観察された。以上の結果より Cs 腎毒性機序について若干の考察を行い、Cs 腎毒性診断の指標として血中、尿中の NAG および LPO の測定が有用である可能性について言及した。

本論文の一部は、報告者の一人、畑 昌宏が第20回日本移植学会(東京、1984)で発表した。また他の一部は報告者の一人、大田原佳久が第8回日本過酸化脂質学会(群馬、1984)で発表した。サイクロスポリンの提供をうけたサンド社(スイス、バーゼル)に深謝する。NAG、AAP の測定法について御教示賜った塩野義製薬研究所、中村益久先生に感謝の意を表する。なお本研究は文部省科学研究費(課題番号 58480328)によったことを付記する。

文 献

1) Aso, Y., Ohtawara, Y., Suzuki, K., Tajima, A. and Fujita, K.: The effect of gentamicin and mercuric chloride on cyclic AMP and lipoperoxide in rat kidneys. Jpn. J. Nephrol., 24, 583—590, 1982.

2) Fujita, K., Ohtawara, Y., Suzuki, K., Tajima, A. and Aso, Y.: A comparative electron microscopic study of antibiotic nephrotoxicity. Jpn. J. Nephrol., 25, 5—19, 1983.

3) 田島 惇, 石井数子, 大見嘉郎, 大田原佳久, 鈴木和雄, 藤田公生, 阿曾佳郎: 保存腎の cyclic AMP, 過酸化脂質に対する coenzyme Q₁₀ および Inosine の影響. 移植, 16, 131—137, 1981.

4) 田島 惇, 大田原佳久, 鈴木和雄, 藤田公生, 阿曾佳郎: 腎毒性における過酸化脂質の動態. 過酸化脂質研究, 2, 161—164, 1978.

5) 野戸 章, 森 幸雄, 北風 猛, 中村益久: NAG 活性測定法概説. 臨床病理3(臨時増刊号), 65—72, 1983.

表 1 結果の要約

	Cs 群	GM 群
組織 NAG	↑	→
組織 AAP	→	↑
組織 LPO	↑	→
組 織 像	近位尿細管の 空胞変性	刷子縁の脱落 ミエリン様構造の出現

↑: 対照群と比較して増加
→: 対照群と比較して不変

- 6) Jung, K. and Scholz, D.: An optimized assay of alanine aminopeptidase activity in urine. *Clin. Chem.*, **26**, 1251—1254, 1980.
- 7) Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K.: Assay for lipid peroxidase in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, **95**, 351—358, 1979.
- 8) Borel, J.F.: The history of cyclosporin A and its significance. in *Cyclosporin A*, p. 5—17, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, 1982.
- 9) Calne, R.Y., White, D.J.G., Thiru, S., Evans, D. B., McMaster, P., Dunn, D.C., Craddock, G.N., Pentlow, B.D. and Rolles, K.: Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver. *Lancet*, **2**, 1323—1327, 1978.
- 10) Starzl, T.E., Weil, R., Iwatsuki, S., Klintmalm, G., Schröter, G.P.J., Koep, L.J., Iwaki, Y., Terasaki, P.I. and Porter, K.A.: The use of cyclosporin A and prednisone in cadaver kidney transplantation. *Surg. Gynecol. Obstet.*, **151**, 17—26, 1980.
- 11) Ryffel, B.: Experimental toxicological studies with cyclosporin A. in *Cyclosporin A*, p. 45—75, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, 1982.
- 12) Flechner, S.M., Van Buren, C., Kerman, R.H. and Kahan, B.D.: The nephrotoxicity of cyclosporine in renal transplant recipients. *Transplant. Proc.*, **15**(Suppl. 1 and 2), 2689—2694, 1983.
- 13) Divineni, R., McKenzie, N., Duplan, J., Keown, P., Stiller, C. and Wallace, A.C.: Renal effects of cyclosporine: Clinical and experimental observations. *Transplant. Proc.*, **15**(Suppl. 1 and 2), 2695—2698, 1983.
- 14) Neeild, G.H., Rocchi, G., Inberti, L., Fumagalli, F., Brown, Z., Remuzzi, G. and Williams, D.G.: Effect of cyclosporine on prostacyclin synthesis by vascular tissue in rabbits. *Transplant. Proc.*, **15**(suppl. 1 and 2), 2398—2402, 1983.
- 15) Klintmalm, G., Ringdén, O. and Groth, C.G.: Clinical and laboratory signs in nephrotoxicity and rejection in cyclosporine-treated renal allograft recipients. *Transplant. Proc.*, **15**(Suppl. 1 and 2), 2815—2820, 1983.
- 16) Uchida, K., Takagi, H., Morimoto, T., Kano, T., Yamada, N., Tominaga, Y., Kawai, M., Akaza, T., Morozumi, K. and Yasue, M.: Measuring urinary fibrin-fibrinogen degeneration products with the differentiation between rejection and nephrotoxicity during cyclosporin A treatment. *Transplant. Proc.*, **17**, 1277—1281, 1985.
- 17) 石橋道男, 市川靖二, 高羽 津, 園田孝夫, 佐川史郎: 血清クレアチニン, 尿中蛋白, 層中 FDP を指標にしたサイクロスポリン投与における拒否反応と腎毒性の臨床像. 第18回腎移植臨床検査検討発表会 (1985, 1, 宮城県秋保町).
- 18) 山口 裕, 高橋公太, 水口 潤, 八木沢隆, 寺岡 慧, 東間 紘, 伊藤克己, 吉田美喜子, 阿岸鉄三, 太田和夫: 腎移植患者 Cyclosporin A 投与例における腎毒性に関する形態学的研究. 移植, **19**, 287—294, 1984.
- 19) Pierce, R.J., Spik, G. and Montreuil, J.: Cytosolic location of an endo-N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity in rat liver and kidney. *Biochem. J.*, **180**, 673—676, 1979.
- 20) Davey, P.G., Geddes, A.M. and Cowley, D.M.: Study of alanine aminopeptidase excretion as a test of gentamicin nephrotoxicity. *J. Antimicrob. Chemother.*, **11**, 455—465, 1983.
- 21) Gibey, R., Dupond, J., Alber, D., Leconte, R. and Henry, J.: Predictive value of urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG), alanine aminopeptidase (AAP) and beta-2-microglobulin (β_2 M) in evaluating nephrotoxicity of gentamicin. *Clinica. Chimica. Acta*, **116**, 25—34, 1981.
- 22) Whiting, P.H., Thomson, A.W., Blair, J.T. and Simpson, J.G.: Experimental cyclosporin A nephrotoxicity. *Br. J. Exp. Path.*, **63**, 92—94, 1982.
- 23) Whiting, P.H., Simpson, J.G., Davidson, R.J.L. and Thomson, A.W.: Pathological changes in rats receiving cyclosporin A at immunotherapeutic dosage for 6 weeks. *Br. J. Exp. Path.*, **64**, 437—444, 1983.

(1985年4月6日受付, 特別掲載)