水腎症における腎エネルギー代謝：

ラット水腎症における基礎的研究

筑波大学附属病院泌尿器科（主任：小磯謙吉教授）

近 藤 福 次*

ENERGY METABOLISM IN HYDRONEPHROTIC KIDNEYS

Fundamental Study in Rat Hydronephrotic Kidneys

Fukuji Kondo

Department of Urology, Tsukuba University Hospital

(Director: Prof. K. Koiso)

This study was undertaken to determine the effects of unilateral ureteral obstruction on the renal tissue levels of adenine nucleotides in order to elucidate the mechanisms underlying the hydronephrosis and how such changes may be recovered after relief of obstruction.

Ureteral obstruction with hydronephrosis was produced by ligation of a unilateral ureter in Wistar rats. Before and at 6 months after the operation, measurement of adenine nucleotides (ATP, ADP and AMP) was performed according to the method of Nagata and Rasmussen. Calculation of energy charge was made by Atkinson's formula. The levels of inorganic phosphate (Pi) and its specific activity (S.A.) were calculated from ^{32}P -orthophosphate incorporation. The same procedures were adopted after complete relief of ureteral obstruction lasting for 1, 2, 3, 4, 5 and 6 months. Sham-operated controls were also observed.

The results revealed that the level of ATP sharply decreased to about 60% of normal one month after ureteral ligation with a further decline continuing up to 6 months. ADP and AMP showed a mild decrease. Cell Pi and its S.A. increased during these periods. Recovery of the nucleotides after relief of ligation was prominent in the group with 1 and 2 months' ligation. A longer period of ligation, however, prevented the nucleotides from reaching the former levels. The levels of energy charge during the periods of ureteral obstruction and its relief did not show any significant change.

These results suggest that, there is positive relationship between the progress of hydronephrosis and decrease of ATP, and after ureteral obstruction in excess 3 months, complete recovery of ATP-generating system could not take place. This probably reflected irreversible changes in the energy-requiring system of kidney.

要旨：水腎症という表現型の裏に存在するメカニズムと閉塞解除後そのひずみがどのように回復するかを解明するために、片側尿管閉塞による腎アデニン系ヌクレオタイドの変動を測定して検討した。ウイスター系ラットの一侧尿管を結紮することによって水腎症を作成した。結紮前と結紮後6カ月まで、Nagata, Rasmussenらの方法よりアデニン系ヌクレオタイド(ATP, ADP, AMP)を測定すると同時に、Atkinsonの式よりエナジー・チャージを計算した。またその動的变化を観察するため、アデニン系ヌクレオタイドおよび無機リン(Pi)への放射性アイソトープ ^{32}P の取り込みを求めた。これらの磷酸エステル動態は閉塞1～6カ月後に閉塞を解除して同様に測定した。

その結果、ATPレベルは結紮後1カ月で正常の約60%まで急速に減少し、その後次第に減少していった。ADP, AMPは徐々に減少を示した。Piおよびその比放射活性は増加を示した。結紮解除後のヌク

* 県西総合病院泌尿器科

レオタイトの回復は結紮1, 2カ月群で早くから認められた。しかしそれ以上の結紮期間ではヌクレオタイトは元の値には戻れなかった。エネルギー・チャージは尿管閉塞後と解除後で有意の変化は認められなかった。

以上から、水腎症の進行とATPの減少度はよく相関すると思われた。そして尿管閉塞が3カ月以上ではATP産生系の完全回復は望めず、腎に不可逆性変化の起こる可能性が示唆された。

I. 結 言

尿路が機能的、器質的に閉塞を起こした場合、それより上部の尿路の拡張が起こり、最終的には腎機能障害を生ずる。この腎機能障害は一般に閉塞性腎障害と呼ばれている。その病態生理は主として腎機能、腎杯、腎盂の形態学上の変化として捉えられ三期に分類できる。すなわち閉塞初期で閉塞部位の外傷性変化(広義)である。次いで尿細管、集合管の拡大が認められ、最終的には腎実質の破壊が起こる。これらの変化は腎における能動、受動輸送に影響を与え、排泄、電解質代謝異常へとつながっていく^{1)~5)}。これらの著しい変化は腎を構成する腎細胞の代謝異常にその原因を求めることが出来、その中心を占める腎エネルギー代謝にも多大な影響があると推定される。しかし現在まで尿路閉塞性腎障害のエネルギー代謝について検討した論文は極めて少ない⁶⁾。

本研究は尿路閉塞性腎障害の根底に横たわる腎エネルギー代謝にスポットをあて、その中心を占める磷酸化合物の動態について基礎的、臨床的に検討したので報告する。

II. 研究方法

1. 実験動物

体重200g前後の成熟Wister系ラットを用いた。飼料や水分は自由に投与した。エーテル麻酔下、腹部正中切開にて右尿管を確認し、膀胱尿管移行部で5-0絹糸にて二重に結紮した。結紮部位の開放は膀胱部分切除にて行い、顕微鏡下に再開通を行った。

2. アデニン系ヌクレオタイトの測定

右尿管結紮後1, 2, 3, 4, 5, 6カ月後にラットを屠殺して右腎摘除を行った。各時点におけるラット数は各群とも10匹であった。摘除腎は直ちにアセトン・ドライアイスにて凍結し、測定まで保存した。組織をホモゲナイズした後、10%過塩素酸を添加し酸性分画を得た。この分画中のアデノシン三リン酸(adenosine tri-phosphate, ATP), アデノシン二リン酸(adenosine di-phosphate, ADP), アデノシン一リン酸(adenosine mono-phosphate, AMP)の測定はNagata, Rasmussenら⁷⁾の方法に従って行った。

3. 無機リン(Pi)の測定

アデニン系ヌクレオタイトの測定と同時に無機リン(Pi)の測定をMartin-Doity法⁸⁾により測定した。

4. エネルギー・チャージ(energy charge)の測定

エネルギー・チャージの測定はAtkinsonの式⁹⁾により次の如く行った。

$$\text{energy charge} = \frac{[(\text{ATP}) + 0.5 (\text{ADP})]}{[(\text{ATP}) + (\text{ADP}) + (\text{AMP})]}$$

5. アデニン系ヌクレオタイト、無機リンへの³²P転入率の測定

³²P(³²P-Orthophosphate, 30mC/kg, Daiichi Chemical, 東京)をラット屠殺60分前に腹腔内に投与し、アデニン系ヌクレオタイト、無機リン各分画への転入率を測定した。放射活性の測定はGeiger-Müllerカウンタにて行い、そのspecific activity (S.A.)はcount per min (cpm)/μmol nucleotides又はcpm/μg無機リンで示した。

以上、上記の実験は尿管の剝離だけにとどめた対照群(sham-operated)と尿管結紮12時間後の対側腎についても比較検討した。

6. 尿管結紮解除後のアデニン系ヌクレオタイト、無機リンおよびenergy chargeの測定

尿管結紮1~6カ月後の各々につき、結紮解除後1~6カ月目に屠殺して同様に測定を行った。各群の各時点におけるラット数は10匹であった。

III. 研究成績

一侧尿管結紮による腎アデニン系ヌクレオタイトの変化を表1に示す。

閉塞腎ではATPレベルが1カ月の閉塞で対照の57.4%にまで低下しているのが認められた。この1カ月間における低下は比較的急激であるが、それ以降5カ月間は徐々に低下していくのが観察された。これに反しADP, AMPの反応は1カ月でも各々85.4%, 83.3%と急激ではなく、次第次第に減少していく傾向が伺われた。総アデニン・ヌクレオタイトはこれら三種類のヌクレオタイトの総和であるがATPの減少を反映して1カ月で対照の65.9%にまで減少し、以後なかなか減少曲線をたどっている。

表1 一侧尿管結紮後の腎アデニン・ヌクレオチド値の変化
(平均値±SE, 各群 n=10)

閉塞期間	アデニン・ヌクレオチド (μ mole/g, wet weight)			
	ATP	ADP	AMP	Total
対照 (sham-operated)	1.48±0.10	0.48±0.09	0.18±0.06	2.14±0.12
対側腎(12時間閉塞後)	1.58±0.15	0.47±0.12	0.20±0.08	2.25±0.13
水腎 1ヵ月	0.85±0.08*	0.41±0.09	0.15±0.03	1.41±0.16
2ヵ月	0.73±0.12	0.37±0.11	0.14±0.04	1.24±0.13
3ヵ月	0.65±0.14	0.31±0.08	0.15±0.09	1.11±0.14
4ヵ月	0.61±0.12	0.34±0.12	0.11±0.05	1.05±0.09
5ヵ月	0.45±0.11	0.30±0.08	0.10±0.04	0.85±0.09
6ヵ月	0.44±0.08	0.28±0.09	0.08±0.05	0.80±0.06

*統計上有意 p<0.01

表2 一侧尿管結紮後の腎無機燐値とその比放射活性(平均値±SE)

閉塞期間	無機燐値 (μ g/mg, wet weight)	比放射活性 (cpm/ μ g Pi)×10 ³
対照 (sham-operated)	3.18±0.19	1.15±0.04
対側腎(12時間閉塞後)	3.29±0.18	1.30±0.08
水腎 1ヵ月	3.30±0.11	1.18±0.09
2ヵ月	3.41±0.09	1.19±0.11
3ヵ月	3.99±0.13	1.40±0.10
4ヵ月	4.15±0.10	1.48±0.13
5ヵ月	4.19±0.08	1.45±0.11
6ヵ月	4.28±0.19	1.41±0.09

表3 一侧尿管閉塞による腎 energy charge の変動

閉塞期間	energy charge
対照 (sham-operated)	0.80±0.09
対側腎(12時間閉塞後)	0.81±0.11
水腎 1ヵ月	0.75±0.08
2ヵ月	0.74±0.10
3ヵ月	0.72±0.12
4ヵ月	0.74±0.10
5ヵ月	0.70±0.12
6ヵ月	0.73±0.10

一侧尿管結紮による腎無機燐の量的変化とその比放射活性を表2に示す。

腎の無機燐の値は一侧尿管閉塞後の水腎において2ヵ月目まではほぼ一定値を保っていたが、3ヵ月目より上昇傾向を示した。また無機燐の比放射活性も2ヵ月まではほぼ変動なく、3ヵ月に上昇し、その後はほぼ一定値を示していた。

アデニン系ヌクレオチドの量より測定できる energy charge についての成績を表3に示す。

対照の energy charge は0.80±0.09を示し、対側腎では0.81±0.11を示した。一侧尿管結紮による水腎の energy charge は0.70~0.75に分布し、一定の傾向を示さなかった。また対照群との間でも統計学的に有意差を認めなかった。

一侧尿管閉塞解除後のアデニン系ヌクレオチド、無機燐の値を図1、2、3に示す。

図1に示すごとく、腎ATPの回復は閉塞期間が1~2ヵ月で著しいが、3、6ヵ月ではその回復が遅れているのが観察された。推計学的には対照、閉塞1、

図1 尿管結紮解除後のATP値(右上の数字は各閉塞期間を示す)

2ヵ月、閉塞3、4、5、6ヵ月の3群に分けることができ、それぞれp<0.01で有意の差を示した。

図2は同様にADP、AMPの回復について検討した

表 4 一側尿管閉塞解除後の腎 energy charge の変動

尿管閉塞解除後の期間(月)	対 照	尿管閉塞期間(月) 別腎 energy charge					
		1	2	3	4	5	6
0	0.80±0.09	0.75±0.08	0.74±0.10	0.72±0.12	0.74±0.10	0.70±0.12	0.73±0.10
1	0.78±0.08	0.74±0.06	0.75±0.11	0.74±0.15	0.73±0.14	0.75±0.14	0.76±0.14
2	0.83±0.10	0.79±0.15	0.77±0.14	0.75±0.12	0.71±0.11	0.74±0.11	0.73±0.14
3	0.78±0.15	0.74±0.12	0.81±0.15	0.77±0.11	0.75±0.15	0.77±0.14	0.73±0.13
4	0.77±0.11	0.78±0.11	0.77±0.14	0.76±0.15	0.73±0.13	0.77±0.16	0.77±0.15
5	0.82±0.09	0.78±0.14	0.72±0.15	0.79±0.14	0.77±0.15	0.79±0.14	0.75±0.18
6	0.79±0.11	0.79±0.09	0.78±0.11	0.77±0.11	0.76±0.09	0.77±0.15	0.77±0.16

図 2 尿管結紮解除後の ADP, AMP 値

ものである。ADP の回復は閉塞 1 カ月ではほぼ正常(対照)と同じ程度であるが、その他閉塞 2～6 カ月では回復が遅れていた。また AMP についてみると、その回復は各々区々で一定の傾向は認められなかった。しかし閉塞 2～6 カ月ではその回復は遅れていた。

尿管閉塞解除後の無機燐の動きをみると(図 3)、対照および閉塞 1、2 カ月では殆ど変動が認められなかったが、閉塞 3～6 カ月ではむしろ減少の傾向が認められた。しかし各々の群内においての減少、増加は有意ではなかった。

一側尿管閉塞解除後の腎 energy charge の変動を表 4 に示す。

各閉塞期間群において、結紮解除後の energy charge に著しい変動はなく、各々の群内の増加、減少

図 3 尿管結紮解除後の無機燐値

に有意差はなかった。

IV. 考 按

尿路閉塞性疾患の臨床的な問題点は尿路閉塞に伴う腎機能障害とそれに伴う種々の合併症である。尿流が短期間の間に完全に杜絶すれば無尿となり、尿毒症を惹起する。一方、部分的な閉塞は種々の臨床症状(尿量の変動、尿路感染、尿路結石、難治性の腎機能障害)が出現する。

これらの閉塞性腎疾患は腎機能低下をもたらす。まず腎血流の低下、腎有効血漿量の減少、尿細管機能、特に尿濃縮能の低下がみられる。糸球体濾過率もやがて低下する¹⁾。このような腎機能の障害が終局的には尿毒症へと発展する基盤を構成する。

一方、このような閉塞性腎疾患において閉塞を解除した後、腎機能がどのように回復していくかについての研究もなされている¹⁾⁵⁾¹⁰⁾。それは糸球体、腎血流、そして尿細管の順で回復するとする研究が多いが、閉塞の期間と機能回復との間には尚一定の説を構成する段階にまでは来ていない。

本研究は水腎症という表現型の裏に存在する腎の代謝障害、特にアデニン系ヌクレオチドを中心とした燐酸エステル、燐酸化合物に焦点をあてて、その動態

をパラメーターとして検討した。

ラットにおける尿管閉塞時の変動についてまず検討すると、尿管閉塞後腎アデニン系ヌクレオタイドの変化はATP, ADP, AMP共に減少を示した。特に高エネルギー磷酸化合物の中心であるATPの変化について検討すると、尿管結紮後1カ月でATPレベルは対照の約60%にまで比較的急激に減少し、以後次第に減少していた。水腎症の進行に伴ってアデニン系ヌクレオタイドの総和も、ATPとほぼ同様の変動を示した。しかしenergy chargeについてみるとATPほどの減少は示さず、その増減に有意差はなかった。したがって水腎症の進行と比較的パラレルに動くものとしてATPがあげられると考えられる。そこでさらにATPについて検討を加えた。

ヒト各種細胞ではそのATPレベルが正常時の50%を割るとcritical pointになるともいわれており、今回の成績からATPのinitial dosisの半分、すなわち50%ATP値(対照値の半分、 $0.74\mu\text{mol/g}$)をみると、閉塞1カ月ではまだ十分であるが、3カ月を越すと明らかに50%を切っており、これを臨床的にみた場合、尿管閉塞解除後腎機能が元に戻る場合の限度(critical period)は未だ定説はないが、水腎症の進行とATPの減少度はよく相関するものと思われた。

閉塞腎ではATPはじめ、アデニン系ヌクレオタイドはすべて減少していたが、このことは急性虚血腎においてATPの減少に伴ってAMPが増加する¹¹⁾との報告と対照的であった。ATP, ADP, AMPが共に減少してくる理由として、Chapmanら¹²⁾やNitoら¹³⁾はATP分解という一次的变化に加えて、AMPを分解する5'-nucleotidaseやAMP deaminaseの活性増大によると指摘している。アデニン系ヌクレオタイドの脱リン作用が著しくなってきたことは、細胞内無機磷(Pi)やその放射活性の増大がこの事実を裏付けている。

Blondinら¹⁴⁾は、閉塞腎では腎組織中のレベルの減少と共に、糖新生(gluconeogenesis)¹⁵⁾も抑制されていたと報告しており、Nitoらもラットで同様の成績を発表している。このように水腎症における糖新生の減少も、解糖系の低下につながり、アデニン系ヌクレオタイドの減少をもたらし1つの要因と解釈されよう。

閉塞腎においては、細胞内呼吸能の低下も報告されており¹⁶⁾、尿管閉塞が腎血流量の減少や尿細管障害を引き起こし、水腎の進行につれて酸素消費量も減少し、最終的にはミトコンドリアはじめ細胞内のATP-

generating systemが障害され、腎アデニン系ヌクレオタイドの減少につながるものと考えられる。閉塞腎においては、また5'-nucleotidaseやAMP deaminaseのようなアデニル酸分解酵素系が活性化されるため、アデニン系ヌクレオタイドの減少とそれに伴う無機磷の増大に更に拍車がかかるものと考えられる。

尿管閉塞解除後の結果についてみると、腎アデニン系ヌクレオタイドの変化は、1カ月尿管結紮群でATPレベルは、対照群の約90%まで回復していたが、3～6カ月結紮群ではその回復は1、2カ月群と有意に遅れており、3カ月結紮群でもその6カ月後では約65%の回復がみられたにすぎない。ADP, AMPレベルについても1カ月尿管結紮群では、各々早期に回復しているが、2～6カ月結紮群では共にその回復が遅れていた。

細胞内に放出された無機磷(Pi)は、閉塞解除後アデニン系ヌクレオタイドの生合成に用いられる可能性があり、減少してくる可能性が考えられるが、今回の結果では1～2カ月結紮群では早期に正常に回復していたものの、3～6カ月結紮群では減少傾向が著しく遅れていた。

以上の成績より、尿管閉塞解除後の腎アデニン系ヌクレオタイドの変化は、一般に予想されるごとくその結紮期間に左右され、結紮期間が長ければ長い程、その回復は遅れることが認められた。

臨床的にみてcritical periodは2～3カ月ともいわれており、ラットにおいても腎のcritical periodは結紮後1～2カ月で、3カ月以上の経過ではATP-generating systemの完全回復は望めず、腎のエネルギー産生系に不可逆性変化の起こる可能性が示唆された。

energy chargeの変動について検討すると、閉塞期間中も閉塞解除後も、その変化に有意差は認められなかった。このことは尿管閉塞後を例にと考えると、Atkinsonの式からATPの減少に伴ってADP, AMPも共に低下することは、もっと合目的にみれば腎細胞内energy chargeの保持を目的にしたものと解釈されよう。

V. 結 語

閉塞性腎疾患(水腎症)に対して、アデニン系ヌクレオタイドの変動を測定することによって、そのエネルギー代謝を検討した。ウイスター系ラットを用いた研究成績より以下の結論を得た。

1. 水腎症の進行と、ATPの減少度とはよく相関す

ることが考えられた。

2. 尿管閉塞の critical period は閉塞後 1～2 カ月で、3 カ月以上の経過では ATP 産生系の完全回復は望めず、腎に不可逆性変化の起こる可能性が示唆された。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲をいただいた恩師小磯謙吉教授に心より感謝いたします。また御援助、御協力頂いた加納勝利助教授はじめ各位に厚く御礼申し上げます。

なお本論文の要旨は第28回日本腎臓学会総会において発表した。また本研究の一部は文部省科学研究費（課題番号 58480326）で行った。

References

- 1) Gillenwater, J.Y.: The pathophysiology of urinary obstruction. in *Urology*, Campbell, M. F., 5th ed., p. 542—578, Saunders Co., Philadelphia, 1986.
- 2) Wilson, D.R.: Pathophysiology of obstructive nephropathy. *Kidney Int.*, 18, 281—292, 1980.
- 3) Klahr, S.: Pathophysiology of obstructive nephropathy. *Kidney Int.*, 23, 414—426, 1983.
- 4) Augusta, V.E., Panko, W.B. and Gillenwater, J. Y.: Changed in the in vivo metabolism of hydronephrotic canine kidneys. *Invest. Urol.*, 11, 379—385, 1974.
- 5) Better, O.S., Arieff, A.I., Massry, S.G., Kleeman, C.R. and Maxwell, M.H.: Studies on renal function after relief of complete unilateral obstruction of three months duration in man. *Amer. J. Med.*, 54, 234—240, 1973.
- 6) Cohen, J.J. and Barac-Nieto, M.: Renal metabolism of substrates in relation to renal function. In *Renal physiology*, Orloff, J., Berliner, R.W. and Geiger, S.R., p. 909—1001, American Physiology Society, Washington, D.C., 1973.
- 7) Nagata, N. and Rasumussen, H.: Parathyroid hormone and renal cell metabolism. *Biochemistry*, 7, 3728—3733, 1968.
- 8) Martin, D.C. and Doity, A.F.: Determination of inorganic phosphates in various tissues. *Ann. Chem.*, 21, 965—971, 1949.
- 9) Atkinson, D.E.: The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry*, 7, 4030—4034, 1968.
- 10) Provoost, A.P. and Mollenaar, J.C.: Renal function during after a temporary complete unilateral ureter obstruction in r rats. *Invest. Urol.*, 18, 242—246, 1981.
- 11) Hems, D.A. and Brosman, J.T.: Effects of ischemia on content of metabolites in rat liver and kidney in vivo. *Biochem. J.*, 120, 105—111, 1970.
- 12) Chapman, A.G. and Atkinson, D.: Stabilization of adenylate energy charge by the adenylate deaminase reaction. *J. Biol. Chem.*, 248, 8309—8312, 1973.
- 13) Nito, H., Descœudres, C., Kurokawa, K. and Massry, S.G.: Effects of unilateral obstruction on renal cell metabolism and function. *J. Lab. Clin. med.*, 91, 60—71, 1978.
- 14) Blondin, J., Purkerson, M.L., Rolf, D., Schoolwerth, A.C. and Klahr, S.: Renal function and metabolism after relief of unilateral ureteral obstruction. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 150, 71—76, 1975.
- 15) Krebs, H.A.: Renal gluconeogenesis. *Adv. Enzyme Regul.*, 1, 385—400, 1963.
- 16) Stecker, J.F. Jr., Vaughan, E.D. Jr. and Gillenwater, J.Y.: Alternation in renal metabolism occurring in ureteral obstruction in vivo. *Surg. Gynecol. Obstet.*, 133, 846—848, 1971.

(1987年11月16日受理, 特別掲載)