Фуросемид 長期投与ラットの尿中 カルシウム排泄量・腎・副甲状腺

北海道大学医学部泌尿器科学教室（主任：小柳知彦教授）

浅野 嘉文 野々村克也 小柳 知彦

EFFECTS OF LONG TERM ADMINISTRATION OF FUROSEMIDE ON CALCIUM BALANCE, KIDNEY AND PARATHYROID GLAND

Yoshifumi Asano, Katsuya Nonomura and Tomohiko Koyanagi

Department of Urology, Hokkaido University School of Medicine

(Director: Prof. T. Koyanagi)

Furosemide, a potent natriuretic agent, is well known to increase urinary calcium excretion. We study the effects of long term administration of furosemide on the calcium balance, renal function and histopathological changes of the kidneys and the parathyroid glands in the rat.

Furosemide (20 mg/kg) was administered 3—4 times per week for 62 weeks intraperitoneally in 10 male rats. The same volume of normal saline was administered intraperitoneally in 9 male rats as control. All were given with standard diet (CE-2) and deionized water. While urinary calcium and creatinine were measured every 1—4 weeks, serum calcium and creatinine were measured in the first week and at the end of examination.

24 hours urinary excretion of calcium was elevated to two to three folds (a significant increase over the control: $p<0.01$) after the furosemide loading, though serum calcium and creatinine levels remained as in control. Despite a marked hypercalciuria in the furosemide loaded rats, there was no evidence of stone formation in the kidney or in the urinary tract. On histopathological examination renal parenchyma showed some pyelonephritic changes but without evidence of crystal formation, while no significant change was noted in the parathyroid glands.

Based on these data we concluded that in our model, 1) there was a significant calcium loss in the absence of any change in the serum calcium, but 2) this hypercalciuria alone was not lithogenic, and 3) parathyroid glands showed no discernible secondary morphological changes.

Some discussion was made on the possible mechanism of (a) failure in stone formation, (b) lack of hyperplasia in the parathyroid glands, and (c) calcium homeostasis in the furosemide loaded rats.

Key words: furosemide, hypercalciuria

要旨：利尿剤である furosemide には尿中カルシウム排泄量を増やす作用もある。我々は、長期 furosemide 投与がカルシウムバランスや腎機能与える影響、さらに腎・副甲状腺の病理組織学的変化について検討した。

実験動物には、4 週齢の WKA rat, 雄を用いた。10匹に furosemide 20mg/kg を隔日、62週腹腔内投与、9 匹を対照群とした。両群とも飼料は CE-2 を、飲水は脱イオン水を自由摂取させた。1～4 週毎に24時間尿中カルシウム及びクレアチニン排泄量を測定、投与 1 週目と実験終了時（62週目）に採血し、血清カルシウム及びクレアチニンを測定した。実験終了後屠殺し、腎・副甲状腺の病理組織学的検索を行なった。

24時間カルシウム排泄量は、対照群に比べ 2～3 倍に有意に増加したが、($p<0.01$)、血清カルシウム・クレアチニン値には差が見られなかった。Furosemide による高カルシウム尿症は確かに存在したが、肉眼的に腎一尿路に結石形成は見られなかった。病理組織学的にも結晶形成は認められなかったが、腎盂

腎炎様変化が瀰漫性に見られた。しかし、副甲状腺には過形成等の変化は見出せなかった。Furosemideにより高カルシウム尿症を誘発することは可能であったが、これが病態的に renal hypercalciuria の実験モデルとするには今回の実験結果からでは困難であった。さらに、結石形成が見られなかったことから、高カルシウム尿症という単独の要因では尿路結石の発症に至らないことが示唆された。

キーワード：フロセマイド、高カルシウム尿症

緒 言

特発性高カルシウム尿症は、原発性副甲状腺機能亢進症や尿管管性アシドーシスなど明らかな原因がなく高カルシウム尿症が見られ、さらに血中カルシウム値が正常のものを言う。Pak¹⁾はこれを、腸管でのカルシウム吸収が亢進していることによる腸管型 (absorptive hypercalciuria) と、腎でのカルシウム再吸収が低下していることによる腎漏出型 (renal hypercalciuria) に大きく分類している。ループ利尿剤である furosemide (Lasix[®]) は主にヘンレ係蹄上行脚に作用し、ナトリウム・クロールの再吸収を阻害する²⁾³⁾。さらにヘンレ係蹄において、カルシウム・マグネシウムの再吸収も抑制する作用を持っている²⁾³⁾。この尿中カルシウム排泄増加作用により、ヒト高カルシウム血症において血中カルシウムを下げるのに有用とされている。しかし一般に、血中カルシウム値が正常な場合に furosemide を投与しても、尿中カルシウム排泄量は増加するが血中カルシウム値の変化は起きないと言われている^{4)~7)}。以上のことから、この furosemide-induced hypercalciuria は、特発性高カルシウム尿症のうち renal hypercalciuria に類似した状態であるとされている⁴⁾⁵⁾⁸⁾⁹⁾。高カルシウム尿症は尿路結石症の危険因子の1つであるが、成人例で furosemide の長期投与で尿路結石の形成をみたと言う報告は見当たらない。Coe⁴⁾、Fujita⁶⁾⁸⁾は投与期間が短いが健常人で furosemide-induced hypercalciuria の報告をしている。

これらのことから今回我々は、ラットを用いて furosemide を長期に投与することが尿中カルシウム排泄量・血中カルシウム値にどのような変化を与えるか、さらに腎及び副甲状腺に機能的・形態的变化を及ぼし得るかを検討した。

材料及び方法

実験動物には Wister 系雄性ラットを使用し、furosemide 20mg/kg を隔日腹腔内投与 (L 群: n=10)、対照群として生理食塩水 2ml/kg を隔日腹腔内投与した (C 群: n=9)。生後 4 週目より投与を開始し、毎週体重を測定し投与量を測定した。投与開始 1, 2,

4, 10, 14, 18, 22, 27, 30, 34, 43, 48, 53, 56, 62 週目に、代謝ケージを使って個々の 24 時間尿を採取した。又、投与開始 1 週目及び実験終了時に採血を行なった。飼料は CE-2 (日本クレア) を、飲水は脱イオン水を自由摂取させた。

投与開始 62 週目に屠殺、個々の両側腎及び副甲状腺を摘出、肉眼的観察の後ホルマリン固定しヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) を行ない組織学的に検索した。さらに、腎に関しては von Kossa 染色も行ない、カルシウム結晶形成の有無も検討した。

個々の 24 時間尿はあらかじめ 6N 塩酸 (1ml) を入れたフラスコに蓄尿し、カルシウム及びクレアチニンを測定、血液は血清に分離しカルシウム及びクレアチニンを測定した。カルシウムはヤトロン社カルシウム測定用試験液を使用し吸光度計にて、クレアチニンは AMES 社セラライザーにて測定した。なお、統計学的検討は student t 検定によって行なった。

結 果

1. 体重: L 群において投与開始 4 週目から C 群に比べて有意に軽くなり ($p<0.01$)、以後 L 群の体重は C 群の 90~93% とほぼ一定であった (図 1)。

2. 24 時間尿量: L 群において投与 1 週目より 13.8 ± 0.9 (mean $\pm$ SD) ml/day と C 群の 8.17 ± 1.6

図 1 体重の変化: L 群の体重 ($\bullet$ mean $\pm$ SD) は C 群 ($\circ$ mean $\pm$ SD) に比べ 4 週以後有意に軽くなった ($*p<0.01$)。

図2 24時間尿量：L群の尿量(●mean±SD)は1週目よりC群(○mean±SD)に比べ有意差増加した(* $p<0.01$).

図3 24時間尿中カルシウム排泄量：L群の24時間尿中カルシウム排泄量(●mean±SD)はC群(○mean±SD)に比べ、1週目及び14週以降有意に増加した(* $p<0.01$).

ml/day に比べ1.7倍と24時間尿量の有意な増加が認められた($p<0.01$)。以後L群24時間尿量は20ml/day前後となりC群の1.5~4.1倍(平均2.2倍)の尿量であった(図2)。

3. 24時間尿中カルシウム排泄量：L群の24時間尿中カルシウム排泄量は投与開始1週目 1.93 ± 0.25 (mean±SD) mg/day とC群の 1.14 ± 0.27 mg/day に比べて有意に増加した($p<0.01$)。2週目は両群間に有意差は見られなかった。4週目でL群で1.7倍と再度増加したが($p<0.01$)、10週目では有意差は見られなかった。しかし、14週目以後ではL群において約2倍の排泄量となり、34週以後は3倍以上となった($p<$

図4 24時間尿中クレアチニン排泄量：L群の24時間尿中クレアチニン排泄量(●mean±SD)はC群(○mean±SD)に比べ減少傾向が見られた(* $p<0.01$, ** $p<0.05$).

図5 尿中カルシウム//クレアチニン比：L群の尿中カルシウム/クレアチニン比(●mean±SD)はC群(○mean±SD)に比べ4週以降有意に高くなった(* $p<0.01$).

0.01) (図3)。

4. 24時間尿中クレアチニン排泄量：L群の24時間尿中クレアチニン排泄量は投与開始2週目よりC群の75~95%と減少傾向が見られたが、有意差があったのは投与開始4・22・30・44・53・56週目のみであった($p<0.01$, $p<0.05$) (図4)。

5. 尿中カルシウム/クレアチニン比：投与開始1週目及び2週目では両群間に有意差は見られなかったが、4週目以後L群において尿中カルシウム/クレアチニン比はC群に比べ平均3.3倍と有意に高くなった($p<0.01$) (図5)。

6. 血清カルシウム値：投与1週目の値は、L群で

8.53±1.36 (mean±SD) mg/dl, C 群で9.30±1.20 mg/dl と有意差はなく、また投与終了時も L 群11.2±0.8mg/C 群11.0±0.6mg/dl と有意差は見られなかった。

7. 血清クレアチニン値：投与 1 週目では L 群 0.13±0.55 (mean±SD) mg/dl, C 群0.14±0.05mg/dl, 投与終了時は L 群0.56±0.23mg/dl, C 群0.43±0.12mg/dl といずれも両群間に有意差は見られなかった。

8. 腎重量：摘出した腎臓 1 個の重さは、L 群で 2.25±0.2(mean±SD)g, C 群で2.10±0.2g と、L 群が約 7 %有意に重かった (p<0.01)。

9. 肉眼的結石形成：両群とも肉眼的に腎尿管

図 6 L 群の腎 HE 染色標本：尿管から集合管に散在性にエオジン好性硝子様物質が甲状腺濾胞のように満たされている。

図 7 L 群の腎 HE 染色標本：糸球体、尿管・集合管上皮には変化は見られない。

図 8 C 群の腎 HE 染色標本：L 群と同様に尿管から集合管にエオジン好性硝子様物質が甲状腺濾胞のように満たされているがその程度は軽度である。

図 9 上皮小体の HE 染色標本(左 C 群, 右 L 群)：両群とも細胞構築の変化など見られない。

一膀胱に結石形成は見られなかった。

10. 腎の組織学的所見：図6はL群の腎HE染色標本であるが、尿細管～集合管腔にエオジン好性の硝子様物質が甲状腺濾胞のように満たされている。しかし、糸球体、尿細管・集合管上皮には変化は見られなかった(図7)。同様の所見はC群(図8)でも軽度見られた。しかしHE染色及びvon Kossa染色でも両群とも明らかなカルシウム沈着や結石形成は見られなかった。

11. 副甲状腺の組織学的所見：ラットの副甲状腺は、甲状軟骨直下の気管の前面にある左右甲状腺の上に左右1個ずつ位置している。肉眼的大きさに両群間に差はみられず、又、HE染色でも(図9：左C群、右L群)細胞構築の変化などは見られなかった。

考 察

Furosemide 20mg/kg 隔日腹腔内に投与したラット群の尿中カルシウム排泄量は、対照群に比べて2～3倍に増加した。一方、血中カルシウム値は両群間で有意差がみられなかった。このことは、尿中カルシウム排泄量の増加に対応して何らかの血中カルシウム値を維持する機構が働いていることを推測するものである。Warshow ら¹⁰⁾はラットに furosemide を25日間投与し、尿量は40～60%上昇、尿中カルシウム排泄量は2～3倍となったが、血中カルシウム値は不変であったことの説明として、腸管からのカルシウム吸収が亢進することにより代償されているためであるとした。さらに、Bushinsky ら¹¹⁾は同様のラットを使用した実験系で、通常の飼料では血中カルシウム値は正常に保たれていたが、低カルシウム食にした群では血中カルシウム値の低下をみたことから、Warshow らと同様にカルシウムーバランスを保っている主役は腸管からのカルシウム吸収亢進であると言っている。また、Nielsen ら²⁾も、furosemide による尿中カルシウム排泄量増加によりきたしたカルシウムの負のバランスは、副甲状腺ホルモン(PTH)を介して是正されていると言っている。つまり、尿中カルシウム排泄量の増加→血中カルシウム値の低下→PTH分泌増加→腸管でのカルシウム吸収亢進によりカルシウムーバランスが保たれていると考えられる。しなわち furosemide-induced hypercalciuria では二次性副甲状腺機能亢進の状態にあると言えよう。

腎機能の面では、血清クレアチニン値のみであるが、対照群と有意差がなかったことから、furosemide を長期に大量投与(20mg/kg)しても総腎機能そのものに

影響はないものと思われた。Brokaw¹²⁾はカリウム欠乏ラットにおいて腎肥大を見ると言っていることから、furosemide 投与群において腎重量が有意に増加していたのは、furosemide によるカリウム欠乏が腎重量増加の原因であったと思われた。腎の組織学的検索にて、尿細管～集合管にエオジン好性の硝子様物質が充満されているのが見られた。これは対照群にも見られたが、より furosemide 投与群に著明であった。この変化は細菌感染に基づく腎盂腎炎に特徴的な所見とされており、カリウム欠乏ラットは腎感染に抵抗が弱いとも言われており¹³⁾¹⁴⁾、furosemide によるカリウム欠乏が腎の感染を起こしやすくし、このような組織学的所見が得られた可能性がある。

一方、結石形成という面に関してみると、肉眼的に、さらに病理組織的にも furosemide 投与のみでは尿路結石の形成は見られなかった。尿路結石の大きな危険因子の一つである高カルシウム尿症が存在していたにもかかわらず、今回の実験系で結石形成が見られなかったことから、高カルシウム尿症単独では結石が形成されない可能性があることが示唆された。

副甲状腺に関しても、特発性高カルシウム尿症のうち renal hypercalciuria では二次性副甲状腺機能亢進により副甲状腺に過形成が見られると言う報告⁹⁾¹⁵⁾があるが、今回我々の実験系では病理組織学的には副甲状腺に変化は見られなかった。ただ、ラットの副甲状腺自体が非常に小さい臓器であることから大きさや重量の測定が困難であったことや、組織学的にも単なるHE染色では過形成は証明するのは困難で、特殊組織化学染色やより詳細な副甲状腺機能の検索が必要であったと考えられる。

以上より、furosemide 長期投与は高カルシウム尿症の実験モデルと成り得ると思われるが、いわゆる renal hypercalciuria の実験モデルとするには今回の実験結果からでは困難であった。

結 語

ラットに furosemide 20mg/kg を隔日・62週間腹腔内投与し、furosemide-induced hypercalciuria につき検討した。尿中カルシウム排泄量は対照群に比し3～4倍に増えたが、血中カルシウム値に変化はなかった。これは二次性副甲状腺機能亢進症により主に腸管ではカルシウム吸収亢進によりカルシウムーバランスが保たれていたためと思われた。Furosemide は高カルシウム尿症を誘発するのに利用できると思われたが、renal hypercalciuria の実験モデルとするには今

回の実験結果からでは困難であった。さらに、結石形成が見られなかったことから、高カルシウム尿症という単独の要因では尿路結石の発症に至らないことが示唆された。

文 献

- 1) Pak, C.Y.C.: Physiological basis for absorptive and renal hypercalciuria. *Am. J. Physiol.*, 237, F415—F423, 1979.
- 2) Nielsen, S.P., Andersen, O. and Steven, K.E.: Magnesium and calcium metabolism during prolonged furosemide (Lasix®) administration to normal rats. *Acta Pharmacol. et Toxicol.*, 27, 469—479, 1969.
- 3) Weiner, I.M. and Mudge, H.M.: Diuretics and other agents employed in the mobilization of edema fluid. in *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Gilman, A.G., Goodman, L.S., Rall, T.W. and Murad, F., 7th ed., p. 887—907, Macmillan Publisher Company, New York, 1985.
- 4) Coe, F.L., Cantabury, J.M., Firpo, J.J. and Reiss, E.: Evidence of secondary hyperparathyroidism in idiopathic hypercalciuria. *J. Clin. Invest.*, 52, 134—142, 1973.
- 5) Toft, H. and Roin, J.: Effect of furosemide administration on calcium excretion. *Brit. Med. J.*, 1, 437—438, 1971.
- 6) Fujita, T., Delea, C.S. and Bartter, F.C.: The effects of oral furosemide on the response of urinary excretion of cyclic adenosine monophosphate and phosphate to parathyroid extract in normal subjects. *Nephron*, 41, 333—336, 1985.
- 7) McElligott, M.: Effect of furosemide on serum calcium. *Ir. J. Med. Sci.*, 140, 410—412, 1971.
- 8) Fujita, T., Chan, J.C.M. and Bartter, F.C.: Effects of oral furosemide and salt loading on parathyroid function in normal subjects. *Nephron*, 38, 109—114, 1984.
- 9) Johansson, H., Thoren, L., Werner, I. and Grimelius, L.: Normocalcemic hyperparathyroidism, kidney stones, and idiopathic hypercalciuria. *Surgery*, 77, 691—696, 1975.
- 10) Warshaw, B.L., Aanad, S.K., Kerian, A. and Lieberman, E.: The effect of chronic furosemide administration on urinary calcium excretion and calcium balance in growing rats. *Pediat. Res.*, 14, 1118—1121, 1980.
- 11) Bushinsky, D.A., Favus, M.J. and Langman, C. B.: Mechanism of chronic hypercalciuria with furosemide; increased calcium absorption. *Am. J. Physiol.*, 251, F17—F24, 1986.
- 12) Brpkaw, A.: Renal hypertrophy and polydipsia in potassium-deficient rats. *Am. J. Physiol.*, 172, 333—346, 1953.
- 13) Fourman, P., McCance, R.A. and Parker, R.A.: Chronic renal disease in rats following a temporary deficiency of potassium. *Brit. J. Exp. Path.*, 37, 40—43, 1956.
- 14) Woods, J.W., Welt, L.G., Hollander, W. and Newton, M.: Susceptibility of rats to experimental pyelonephritis following recovery from potassium depletion. *J. Clin. invest.*, 39, 28—33, 1960.
- 15) 中西正一郎：高カルシウム尿症の臨床的研究；カルシウム系結石患者における上皮小体機能亢進症。日泌尿会誌, 75, 1029—1037, 1984.

(1989年7月25日受理)