シクロスポリン投与マウスにおける傍糸球体装置の変化

浜松医科大学泌尿器科学教室 (主任: 河邊香月教授)

石川 晃 坂口 往子 中野 優 牛山 知己
太田 信隆 大田原佳久 田島 惇 河邊 香月

東京大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 阿曾佳郎教授)

阿 曾 佳 郎

CYCLOSPORINE INDUCED NEPHROTOXICITY AND JUXTAGLOMERULAR APPARATUS IN MICE

Akira Ishikawa, Michiko Sakaguchi, Masaru Nakano, Tomomi Ushiyama, Nobutaka Ohta, Yoshihisa Ohtawara, Atsushi Tajima and Kazuki Kawabe

Department of Urology, Hamamatsu University School of Medicine

(Chairman: Prof. Kazuki Kawabe)

Yoshio Aso

Department of Urology, Faculty of Medicine, The University of Tokyo

(Chairman: Prof. Yoshio Aso)

To elucidate the relationship between Cyclosporine (Cs) induced nephrotoxicity and juxtaglomerular (JG) apparatus, we carried out biochemical and morphological experiments using mice.

Adult male ICR strain mice weighing about 40 g were used. The mice were divided into 2 groups: the Cs group (Cs 50 mg/kg/day was orally given for 14 consecutive days) and the control group (olive oil for 14 days). Urine was stored for 24 hours on the day 0, 7 and 14 and urine volume and concentrations of urinary creatinine (u-Cr) and urinary potassium (u-K) were measured in each group. All the mice were sacrificed and examined on the 15th day. Concentrations of serum creatinine (s-Cr), serum potassium (s-K), plasma renin activity (PRA), plasma aldosterone (Ald) were noted in each group. The kidneys were also examined histologically with light and electron microscopes.

The Cs group showed significant increases of s-K, PRA and Ald and a significant decrease of creatinine clearance compared with the control group. Histologically, the Cs group demonstrated focal vacuolar changes in the proximal tubular cells and an increase in the number of granules in the JG cells.

Each granule of the Cs group was larger than that of the control group.

Cs certainly stimulates the renin-angiotensin-aldosterone system and causes consequently a secondary aldosteronism.

Key words: cyclosporine, juxtaglomerular apparatus, secondary aldosteronism

要旨: シクロスポリン (以下 Cs と略す) 腎毒性による傍糸球体装置 (以下 JGA と略す) の変化, レニン-アンギオテンシン-アルドステロン系 (以下 RAA 系と略す) の変化について実験的検討を行った。

動物は, ICR 系の成熟雄マウスを使用した。実験群は, Cs 50mg/kg/日, 14日間経口投与群 (以下 Cs 群と略す) と, オリーブ油14日間経口投与群 (以下対照群と略す) の2群とした。

Cs 投与前, 7日目, 14日目にマウスの体重を記録するとともに24時間蓄尿し尿量, 尿中クレアチニン, カリウムを測定した。15日目に屠殺採血し, 血中クレアチニン, カリウム, レニン活性, アルドステロン値を測定した。組織学的には, ヘマトキシリン-エオジン染色, Bowie 染色標本を光学顕微鏡で観察するとともに電子顕微鏡による観察を行った。

両群とも投与中の体重に有意な変化はなかった。Cs 群で血清カリウム, レニン活性, アルドステロン

値の有意な上昇, クレアチニンクリアランスの有意な低下を認めた。組織学的検索では, Cs 群で近位尿管の focal な空胞変性と傍糸球体細胞内顆粒の増大を認めた。

Cs 群で傍糸球体細胞内顆粒は増大し, RAA 系は活性化されていた。Cs により続発性アルドステロン症が惹起されると考えられた。

キーワード: シクロスボリン, 傍糸球体装置, 続発性アルドステロン症

緒 言

1985年に Bantle ら¹⁾は, シクロスボリン(以下 Cs と略す)を使用した腎移植患者に, 単なる腎機能の低下だけでは説明できない血清カリウム(S-K)の上昇がみられたと報告している。その原因について彼らは, レニン分泌障害に由来するアルドステロン分泌の低下, 尿管のアルドステロン感受性の低下, これらによる尿中カリウム排泄の低下が原因と述べている。

この報告をきっかけに我々は, Cs を用いた腎移植自験例78例(生体腎39例, 死体腎39例)の移植後入院中のデータを解析してみた。

その結果, 移植腎針生検で Cs 腎毒性と診断された28回のうち, 25回(89%)は S-K の上昇を伴っていた²⁾。参考までに, 急性拒絶反応は44回で, その内 S-K が上昇していたのは23回(52%)であった。S-K の上昇に関して, 両者の間には有意な差が認められた(危険率1%以下)。レニン-アンギオテンシン-アルドステロン(RAA)系についてはデータ数が少なく, 一定の傾向はつかめなかった。

以上の臨床上的知見をもとに, Cs による腎毒性時の S-K 上昇の機序を解明するため, 今回 Cs 投与時の S-K・RAA 系・傍糸球体装置(JGA)の変化についてマウスを用いて実験的検討を行った。

材料と方法

実験には体重約40gのICR系成熟雄マウスを使用した。実験群はCs投与群(Cs群)と対照群の2群とし, 動物数は各群20匹とした。

ラットではなくマウスを用いたのは次の理由による。高価なCsがラットに比べて少ない量で済み, しかもJGAの観察がラットに比べてマウスでは容易であるからである。しかし, 1匹のマウスから得られる血清が約1mlと少なく, 量が不十分だったため, 結局同じ条件で2回の実験を施行した。2回目は15日目の採血のみ行い, レニン活性(PRA), アルドステロン(Ald)を測定した。

Cs群の各マウスには, Csの5mg/mlオリーブ油溶液を用意し, 1日体重1kg当り50mg, 14日間連日胃管を用いて経口投与した。対照群の各マウスには, 溶媒

として用いたオリーブ油だけを14日間連日, 胃管を用いて経口投与した。

各群とも実験開始前, 開始後7日目, 14日目の計3回24時間蓄尿を行い, 尿量(UV), 尿中クレアチニン(U-Cr), 尿中カリウム(U-K)をそれぞれ測定した。

Cs投与終了後の15日目に, マウスの左大腿動静脈を切断し採血を行った。血清クレアチニン(S-Cr), S-K, PRA, Aldを測定した。特にPRA, Ald測定用の検体はヘパリン採血とし, 3,000回転で15分間遠心分離後の上清を-70℃で凍結保存した。

U-Cr・S-Crはアルカリ性ビクリン酸法で, U-K・S-Kはイオン電極法で, PRAはRIA固相法で, AldはRIA2抗体法で, それぞれ測定した。

UV・U-Cr・S-Crのデータが得られたマウスでクレアチニンクリアランス(Ccr)を算出し, 両群間で比較した。この内更にU-K・S-Kも得られたマウスは, Fractional Excretion of Kalium (FEK)を算出し, 両群間で比較した。

組織学的には, ヘマトキシリン-エオジン(HE)染色標本(10%ホルマリン液固定), Bowie染色³⁾標本(Helly液⁴⁾固定)を光学顕微鏡で観察するとともに, 電子顕微鏡による観察を行った。

結果の有意差検定には, student T検定を用いた。

結 果

1) 実験期間中のマウスの体重変化(図1)

各群の実験期間中の体重変化を図1に示す。Cs群の投与終了時の体重は 38.5 ± 2.6 (平均値 $\pm$ 標準偏差値)gであった。対照群の投与終了時の体重は 38.0 ± 3.2 gであった。両群間に有意な差はなかった。

なお, 1回目の実験でCs群2匹・対照群4匹, 2回目の実験でCs群2匹・対照群1匹のマウスが, それぞれ途中で死亡した。経口投与時の誤嚥による肺炎・消化管穿孔による腹膜炎が死亡の誘因であった。

2) S-Cr(図2)

S-Crの測定結果を図2に示す。Cs群のS-Crは 0.30 ± 0.18 mg/dl, 対照群のS-Crは 0.20 ± 0.18 mg/dlであった。両群間に有意な差はなかった。

3) S-K(図2)

図1 投与期間中のマウスの体重の変化 (mean±S.D.)

図2 投与終了時の血液検査結果 (mean±S.D.)

S-Kの測定結果を図2に示す。Cs群のS-Kは 7.3 ± 1.7 mEq/l, 対照群のS-Kは 5.4 ± 0.5 mEq/lであった。Cs群は対照群と比較してS-Kが有意(危険率1%以下)に上昇していた。

4) PRA (図2)

PRAの測定結果を図2に示す。Cs群のPRAは 32.6 ± 10.3 ng/ml/hr, 対照群のPRAは 24.2 ± 7.9 ng/ml/hrであった。Cs群は対照群と比較してPRAが有意(危険率5%以下)に上昇していた。

5) Ald (図2)

Aldの測定結果を図2に示す。Cs群のAldは $16.7 \pm$

14.9 pg/ml, 対照群のAldは 5.8 ± 4.2 pg/mlであった。Cs群は対照群と比較してAld値が有意(危険率5%以下)に上昇していた。

6) Ccr (図3)

Ccrの比較を図3に示す。Cs群はCcrは 273.3 ± 164.3 ml/日, 対照群のCcrは 488.0 ± 280.9 ml/日であった。Cs群はCcrは対照群と比較して有意(危険率5%以下)に低値を示した。

7) FEK (図3)

FEKの比較を図3に示す。Cs群のFEKは 0.00669 ± 0.00485 , 対照群のFEKは $0.00442 \pm$

図3 両群の Ccr・FEK の比較 (mean±S.D.)

0.00266であった。両群間に有意差はなかった。

8) 組織所見 (図4, 5)

両群の Bowie 染色標本の光学顕微鏡像を図4に示す。観察したCs群のマウス18匹全てに、対照群には認められない。①近位尿細管上皮細胞の focal な空胞変性と、②傍糸球体細胞(JGC)内顆粒の増大が認められた。

さらに、電子顕微鏡下に JGC 内顆粒一つ一つの肥大も観察された (図5)。

考 察

実験の結果、S-Kは予想された通りCs群で有意に上昇していた。RAA系は、Bantleらは抑制されると報告している¹⁾が、我々の実験では逆に活性化されていた。現在、Cs投与時のRAA系の変化については、活性化されるというのが多数を占める見解である^{4)~6)}。しかし、RAAが活性化される具体的な機序は不明である。

RAA系の活性化は、糸球体の輸入細動脈壁に存在するJGCからのレニン分泌の増加に始まる⁷⁾。レニンの分泌は、主としてJGCの圧感受機構により調節され、輸入細動脈内圧が低下すると分泌が増加する⁷⁾。

輸入細動脈内圧が低下する主な原因として、①循環血液量の減少、②腎血流量の減少があげられる⁷⁾。循環血液量が減少する原因には、大量の出血・発汗・水・Naの摂取不足、頻回の嘔吐・下痢等がある。ラットにCs 50mg/kg/日を経口投与し、激しい下痢が起きたという報告⁸⁾、著明な体重減少を認めたという報告⁹⁾もあるが、今回の我々の実験では下痢は認めず、また実験期間中のマウスの体重に有意な変化はなかった。

図4 マウス腎の Bowie 染色標本。Cs群で近位尿細管の空胞変性が focal に認められる。また、Cs群では傍糸球体細胞内顆粒 (矢印) が鮮明に観察できる。

図5 マウス腎の電子顕微鏡像。Cs群の傍糸球体細胞内顆粒は肥大している。

以上より、Cs群でRAA系が活性化された原因として、循環血液量の減少よりはむしろ、腎血流量の低下の可能性が示唆される。しかし、今回の実験では組織学的に腎血管系の異常は認められず、腎血流量の低下を裏付ける証拠は得られていない。Cs投与時の腎血流量の変化についての検討が今後の課題である。

組織学的検索の結果Cs群で、①近位尿細管のfocalな空胞変性の他に、②JGC内顆粒の増大が観察された。我々が調べ得た限り、増大したJGC内顆粒を示している報告は見当たらない。

今回の実験で、Csにより続発性アルドステロン症が惹起されることが判明した。Aldは尿中へのカリウム排泄を促進し¹⁰⁾、その結果S-Kは低下する¹⁰⁾。ところが、実験ではCs群でAldが有意に上昇していたにもかかわらずS-Kは高値であった。この原因としては、2群間でFEKに有意な差がみられなかったことから、①Bantleら¹¹⁾が示唆したように、Csにより尿細管のAld感受性が低下し、その結果尿中カリウム排泄が低下した可能性はある。また②Csにより尿細管のカリウム排泄機能自体が障害され、その結果尿中カリウム排泄が低下したことも考えられる。

今回の実験でCsの投与量・投与法は、諸家の報告⁸⁾⁹⁾¹¹⁾¹²⁾を参考にして50mg/kg/日の14日間経口投与とした。しかし、実際の臨床での投与量は多くて16mg/

kg/日である。臨床で生ずる変化にできるだけ近づけるため、マウスへのCs投与量について検討を要すると考えられた。

結 語

ICR系マウスに、1日体重1kg当り50mgのCsを14日間連日、胃管を用いて経口投与した。

その結果RAAは活性化され、JGC内顆粒は増大していた。Csにより続発性アルドステロン症が惹起されたと考えられた。

本論文の要旨は、報告者の一人、石川 晃が第78回日本泌尿器科学会総会（札幌、1990）で発表した。

文 献

- 1) Bantle, J.P., Nath, K.A., Sutherland, D.E.R., Naharian, J.S. and Ferris, T.F.: Effects of cyclosporine on the renin-angiotensin-aldosterone system and potassium excretion in renal transplant recipients. Arch. Intern. Med., 145, 505-508, 1985.
- 2) 田島 惇, 石川 晃, 寺田央巳, 森永聡一郎, 上田大介, 麦谷荘一, 中野 優, 中原正男, 畑 昌宏, 牛山知己, 太田信隆, 大田原佳久, 鈴木和雄, 河邊香月, 阿曾佳郎: 拒絶反応の早期診断。腎移植・血管外科, 1, 14-24, 1989.
- 3) 西森一正: 傍糸球体細胞顆粒の染色法。臨床検査, 15, 445-449, 1971.
- 4) Perico, N., Zoja, C., Benigni, A., Bosco, E.,

- Rossini, M., Morelli, C., Cattaneo, G.M. and Remuzzi, G.: Renin-angiotensin system and glomerular prostaglandins in early nephrotoxicity of ciclosporin. *Contr. Nephrol.*, 51, 120—125, 1986.
- 5) Siegl, H., Ryffel, B., Petric, R., Shoemaker, P., Muller, A., Donatsch, P. and Mihatsch, M.: Cyclosporine, the renin-angiotensin-aldosterone system, and renal adverse reactions. *Transplant. Proceedings*, 15, 2719—2725, 1983.
 - 6) Duggin, G.G., Baxter, C., Hall, B.M., Horvath, J. S. and Tiller, D.J.: Influence of cyclosporine A(CSA) on intrarenal control of GFR. *Clinical Nephrology*, 25, S43—S45, 1986.
 - 7) 河野 剛: IV. 内分泌学的検査 H. その他血漿レニン活性(PRA). *日本臨床*, 43, 1108—1111, 1985.
 - 8) 朴 勺, 友吉唯夫, 野村康之, 岡部俊英: Ciclosporin の腎毒性に関する研究. 第 1 報. Ciclosporin 投与ラットにおける腎毒性について. *泌尿紀要*, 33, 1966—1974, 1987.
 - 9) 新村育夫, 両角國男, 吉田篤博, 及川 理, 藤波隆夫, 打田和治, 高木 弘: シクロスポリンの腎毒性に関する実験的検討. *移植*, 20, 530—539, 1985.
 - 10) 藤本 守: 電解質輸送機構/腎における電解質輸送 K 輸送. *腎と透析*, 21, 39—53, 1986.
 - 11) Paller, M.S. and Murray, B.M.: Renal dysfunction in animal models of cyclosporine toxicity. *Transpla. Proc.*, 17, 155—159, 1985.
 - 12) Dieperink, H.: Cyclosporine A nephrotoxicity. *Danish Medical Bulletin*, 36, 235—248, 1989.

(1991年 5 月14日受理)