透析患者に多発する後天性腎嚢胞の発生メカニズム —実験的研究—

小野 慶治 王 幸 則*

小野外科クリニック 福岡赤十字病院腎センター*

(平成1年6月9日受付, 同2年2月20日受理)

key words : 後天性腎嚢胞, 尿酸, 尿細管拡張, ビタミンC

〈要旨〉

長期透析患者に多発する後天性腎嚢胞の発生メカニズムは解明されていないが, 臨床上の観察から尿酸カルシウム (OxCa) の尿細管内沈着によって尿細管内圧を上昇させ嚢胞が形成されるのではないかと疑い, 5/6 腎摘および正常ラットで実験的に検討した。

まず, 尿酸 (Ox) の前駆物質であるビタミン C (VC) を大量に与えた 5/6 腎摘ラットでは投与開始 11 か月後にしか OxCa の尿細管内沈着は認められず, すでにこの時点では 5/6 腎摘による急激な腎実質の減少に起因する renotropic growth factor の放出によって, VC 投与の有無にかかわらず尿細管の拡張が認められ OxCa の沈着と後天性腎嚢胞形成との関連性は証明出来なかった。

そこで, 5/6 腎摘ラットに直接尿酸ナトリウム (OxNa) を与えると, 非投与の 5/6 腎摘ラットよりも早期にしかも強い尿細管の拡張がみられた。

さらに正常ラットに OxNa を投与すると 7 日目には OxCa が尿細管内に沈着し, 腎機能低下はないのに尿細管の拡張が起こり, これらの変化は経時的に強くなっていった。

以上の結果から, 末期腎不全患者に好発する後天性腎嚢胞の発生メカニズムの一つとして OxCa の尿細管内沈着が関与していることが実験的に証明されたと考えられる。

Pathogenesis of acquired renal cyst formation in hemodialysis patients —Experimental study—

Keiji Ono, M. D., Yukinori Oh, M. D.*

Ono Geka Clinic ; Fukuoka Red Cross Hospital*

The present study was undertaken to determine whether the oxalate deposits seen in renal tubules are a causative factor in the development of acquired renal cysts in chronic renal failure. Thirty 5/6 nephrectomized rats had free access to water containing 8 mg/ml of vitamin C (oxalate precursor) and 20 5/6 nephrectomized rats were given tap water without vitamin C. Oxalate deposits were found on microscopy in the renal tubules of the vitamin C-treated rats in the 11th and 12th postnephrectomy months ; however, acquired renal cysts were noted far in advance of the appearance of oxalate crystals. It has been suggested that the tubular dilatation seen in 5/6 nephrectomized rats is caused by an abrupt decrease in the functioning renal mass, leading to the production of a so-called "renotropic growth factor." However, oxalate deposits and renal tubular dilatation in oxalate-treated 5/6 nephrectomized rats preceded the renal tubular dilatation of untreated partially nephrectomized rats. In addition, these histological changes in the kidney were also seen in healthy rats which were given oxalate orally and subcutaneously.

The present study suggested that the pathogenesis of acquired renal cysts is multifactorial. Renotropic factor may play an important role in nephron hyperplasia, but oxalate deposits in the renal tubules seem to be an

important factor in the formation of these cysts.

小野 慶治 小野外科クリニック

〒 812 福岡市博多区博多駅東 2-17-5 (092-472-5851)

緒言

近年、透析技術の進歩や腎移植の成績向上によって末期腎不全患者は長期に生存し、しかも生産性の高い人生を楽しめるようになった。これは末期腎不全症の病態生理やそれに対する処置が多方面から研究された成果であるが、しかし、これら患者自身の病腎に対する関心は極めて薄いといえる。

これらの病腎ではほとんど排泄機能が消失しているとはいえ、種々な形態学的な変化を起こす。例えば、透析患者の後天性腎囊胞は Dunnill ら¹⁾によって 1977 年に報告されて以来、約 50% の症例で認められて、出血や疼痛を伴い珍しい合併症ではなく腎の悪性腫瘍の発生と深い関係があるのではないかと疑われている。しかし、その発生メカニズムについてはいくつかの仮説が発表されているが、まだはっきりと解明されてはいない²⁾。OxCa の沈着や β_2 -MG 由来の結状物によって尿細管が狭窄ないしは閉塞して尿細管が囊胞状に拡張するという考え方が臨床所見から示唆されている³⁻⁶⁾。最近、我々は透析患者で血中 Ox 値と腎のサイズとの間に強い正の相関性があることを見出して⁷⁾、後天性腎囊胞発生メカニズムに関心を持った。そこで、OxCa の尿細管内沈着によって後天性腎囊胞が発生するのではないかと疑い、5/6 腎摘および正常ラットを使い実験的に検討した。

方法

この研究は 3 つの実験から構成されている。

実験 I：体重約 220 g の Wistar 系ラット 50 匹で 5/6 腎摘を行い腎不全状態を作った。つまり、ペントバルビタール腹腔内麻酔下に左腎の上・下両極 1/3 を電気焼灼し、さらに 1 週間後に右側腎門部で動静脈を結紮して腎実質を 1/6 に減少させた。これらの腎不全ラットを蛋白量 26% の飼料で最長 12 か月間飼育し、30 匹には Ox の前駆物質である VC⁸⁾ 8 mg/ml を含む水を自由に与え、残り 20 匹には VC を与えずコントロール群とした。血清クレアチニン (Cr), Ht, 体重を毎月測定しクレアチニンクリアランス (CCr) を 1, 3, 6, 8, 11 か月目に調べた。また、血漿および尿中 Ox と血漿 VC 値を 3, 8 か月目に測定した。ラットは定期的に、あるいは生存が危ぶまれるほど弱った場合に全麻下に腹部大動脈から脱血し犠牲死させた。

実験 II：5/6 腎摘ラット 10 匹を 2 群に分け A 群には 5/6 腎摘 7 日目から蓂酸ナトリウム (OxNa) 2 mg/ml を含むサッカリンで甘くした水を自由に飲ませ、さらに OxNa 5 mg を毎日皮下に注射した。一方、B 群では OxNa を与えずに対照とした。5/6 腎摘 12 日後から両群のラットを毎週 1 匹ずつ Cr と CCr 測定後に犠牲死させた。

図 1 Body weight of 5/6 nephrectomised rats treated and untreated with vitamin C.

実験 III：正常ラット 6 匹に OxNa 2 mg/ml を含み人工甘味された水を与え、さらに OxNa 10 mg を毎日皮下に注射した。OxNa 投与開始 7 日目から毎週 1 匹ずつ腹腔内麻酔下に殺した。ラットは犠牲死時に腎を摘出し HE, PAS 染色標本で組織学的検査を行い、腎囊胞形成の程度を 0~Ⅲに分類した¹⁷⁾。この実験ではラットの心、肝、脾、甲状腺の組織標本も検鏡した。

血液は採取後 15 分以内に血漿を分離し -20°C に凍結した。Ox は脱蛋白後 Dionex HPIC-AS4A 分離カラムを使い capillary gas chromatography 法⁹⁾によって測定 (凍結血漿を空輸し、米国 Galbraith Lab. Inc. にて) した。VC は Pherylhydrazine 法¹⁰⁾によって測定した。

結果

実験 I：手術死したラットはなく全て 1 か月以上生存した。VC 投与・非投与 5/6 腎摘ラットの経時的な体重, Cr, CCr の変化は図 1, 2, 3 にまとめられている。5/6 腎摘後 1 か月間は体重の増加はなく、その後 5 か月までは正常ラットと同じ早さで増加したが、頭打ちに達し 7 か月目から減少した。Cr は 5/6 腎摘により平均 0.4 mg/dl から約 1.2 mg/dl まで上昇し、約 6 か月間は 1.2~1.5 mg を保っていたがそれ以後急激に値が高くなっていった。CCr は 5/6 腎摘により正常値の約 50% (350 μ l/min/100 g) まで低下し、それ以後経時的に悪くなっていった。一方、血中 Ox, VC 値および尿中の Ox

図 2 Plasma creatinine of 5/6 nephrectomised rats treated and untreated with vitamin C. Parentheses indicate the number of rats.

表 1 Laboratory findings in the two groups of 5/6 nephrectomised rats treated and untreated with vitamin C (mean±SEM)

	Rats N	Postnephrectomised month		
		0	3	8
Plasma oxalate, mcg/ml				
Healthy control	6	0.4±0.2		
Treated rats	6		4.67±0.7*	5.82±0.9*
Untreated rats	6		2.60±0.4	3.01±0.4
Plasma vitamin C, mg/dl				
Healthy control	6	0.2±0.03		
Treated rats	6		2.84±0.33*	6.76±0.25*
Untreated rats	6		0.41±0.08	1.21±0.41
Urinary oxalate, mcg/24 h/100 g bw				
Healthy control	6	245.5±10.7		
Treated rats	6		170.2±14.8	65.7±8.7*
Untreated rats	6		151.4±17.2	24.6±3.2

* p<0.01

値は表 1 にまとめられている。

左残腎は上・下面極の焼灼部が脱落変形し、6 か月以上経過したラットでは肉眼的に腎嚢胞の形成を認めるものもある (図 4)。

組織学的には VC 投与の有無にかかわらず糸球体や間質の硬化、細胞浸潤が経時的に進行していったが、5/6 腎

図 3 Creatinine clearance of 5/6 nephrectomised rats treated and untreated with vitamin C. Parentheses indicate the number of rats.

図 4 Gross appearance of the rat remnant kidney removed 11 months after 5/6 nephrectomy. Note the large cyst on the surface of the kidney.

摘 11 か月後に犠牲死させた VC 投与ラットでは尿細管に OxCa の沈着を認めた (図 5 a, b)。しかし、尿細管の拡張や嚢胞形成は OxCa の沈着が起こるより早期に両群ラットに同じように認められた。

実験 II: A 群の OxNa 投与ラットでは 5/6 腎摘 12 日目 (OxNa 投与開始 5 日目) には尿細管に OxCa が沈着

図 5 Light microscopic appearance of rat kidneys removed 11 months after 5/6 nephrectomy. There are marked cystic dilatation of the tubules, glomerular sclerosis and interstitial cell infiltration. (a) : Oxalate crystals are developed in renal tubules in vitamin C-treated rat. HE×200 in semipolarized light. (b) : Oxalate deposits are not seen in the kidney of rat without vitamin C supplementation. HE×200

図 6 Histological appearance of remnant kidneys removed 25 days after 5/6 nephrectomy in oxalate-treated (a) and untreated (b) rats. (a) : Severe degree of tubular dilation and oxalate deposits are seen. HE×200 in semipolarized light. (b) : Tubular dilation is mild and oxalate is not seen. HE×200

し、軽度ながら尿細管の拡張が起きていた。5/6 腎摘後 25 日目までは OxNa 投与の有無にかかわらず両群ラットの腎機能は同じであるのに、尿細管拡張は OxNa 投与ラットで早期から起こり、しかも広範囲に認められた(表 2, 図 6 a, b)。

実験Ⅲ：正常なラットに OxNa を与えると約 2 週間は腎機能低下はみられなかったが、早くも 7 日目には OxCa が尿細管内壁に沈着し、わずかながら尿細管の拡張が起きていた。これらの組織学的な変化は経時的に強くなり、それに伴い腎機能は 3 週目から低下しはじめた(表 3, 図 7)。また、35 日間 OxNa を与えたラットで

は心、肝、脾、甲状腺にごく微小な CaOx の沈着を認めたが、それに伴う二次的な組織変化はみられなかった(図 8)。

考案

“多くの腎疾患は進行すると最終的に腎の線維化・萎縮に陥る”と我々は病理学で教えられたし、また、排泄機能がほとんど停止した末期腎不全患者の萎縮腎を検索するほど興味がないものはないと 10 年前までは全く関心が払われなかった。しかし、1977 年に Dunnill ら¹⁾が剖検で得られた長期透析患者の病腎に後天性嚢胞を認めて以来、これは各種の非嚢胞性腎疾患が進行し到達した最終的な姿であると考えられるようになった²⁾。この後天性腎嚢胞に伴う腎の腫大、疼痛、出血あるいは悪性化

表 2 Renal function and cyst formation of oxalate-treated and untreated 5/6 nephrectomised rats

Days after	Rat N	Plasma creatinine (mg/dl)		Creatinine clearance (mcg/min/100 g)		Cyst formation*	
		Groups					
		A	B	A	B	A	B
-1	1	0.38	0.37	630	633	—	—
12	1	0.60	0.59	404	410	±	—
19	1	0.61	0.59	384	387	+	—
25	1	0.70	0.70	343	353	++	±
31	1	1.11	0.81	202	321	++	+
38	1	1.31	0.83	190	330	++	+

A=Oxalate treated rats, B=Untreated rats

* Based on Pirani's method¹⁷⁾

表 3 Renal function and renal cyst formation of normal rats treated with sodium oxalate

Rat No	N	Treatment period (days)	Plasma creatinine (mg/dl)	Creatinine clearance (mcg/min/100 g)	Cyst formation*
0	1	0	0.30	620	—
1	1	7	0.31	625	±
2	1	13	0.30	620	+
3	1	21	0.42	521	+
4	1	28	0.56	460	++
5	1	35	0.58	410	++

* Based on Pirani's method¹⁷⁾

図 7 Kidney of normal rat treated with sodium oxalate for 35 days. Note tubular dilatation and oxalate crystal deposits in renal tubules. HE×200 in semipolarized light.

てはいまだ不明である。機能するネフロン数の減少に伴う renotropic growth factor の放出、細胞毒性物質の蓄積、尿細管の狭窄・閉塞、尿細管の阻血、尿細管基底膜の変性などによって後天性腎嚢胞が発生するという仮説が発表されてはいる^{1-7,12)}。しかしながら、この発生メカニズムの解明を実験的に試みた研究は少ない。長期透析患者の剖検で得られた組織標本の検索から尿細管内の OxCa の沈着がしばしば嚢胞と近接して認められることから、この両者の関連性を示唆する報告がなされている³⁻⁵⁾。最近我々は 10 年以上透析された症例で血中 Ox 値と腎サイズとの間に強い相関性があることを報告⁷⁾し、高 Ox 血症から二次性に起こる尿酸管の OxCa 沈着が後天性腎嚢胞発生の一因になっているのではないかと疑い、この点について腎不全および正常ラットで今回の研究を行った。

まず、ラットを透析患者と同じレベルの腎不全状態にして何らかの replacement therapy によって生かして観察するのが望ましい方法であるが、技術的に不可能であるので 5/6 腎摘にとどめて透析患者の腎機能よりはずっと良好な状態で飼育観察せざるを得なかった。したがっ

などの臨床症状や合併症については興味を持たれ明らかになってきたが^{2,12)}、しかし、その発生メカニズムについ

図8 Histological appearance of heart (a), liver (b), spleen (c) and thyroid (d) of normal rat removed 35 days after injection of sodium oxalate. Minimum oxalate deposits are noted. HE×200, semipolarized light.

てOxの前駆物質であるVCを大量に与えOxCaの沈着が早期に起こることを期待したが⁸⁾, 1/6 残腎によって排泄機能が長期に保たれているために5/6 腎摘11か月以後にしかOxCaが沈着しなかった。この時点ではVC投与の有無にかかわらず5/6 腎摘という急激な腎実質の減少に起因すると考えられる renotropic growth factor の放出¹³⁻¹⁵⁾ですでに多数の腎嚢胞が形成されており, OxCa 沈着と腎嚢胞形成との関連性はこの実験モデルでは解明されなかった。片側腎摘によって残腎が代償性に肥大するという現象は古くから知られており¹⁶⁾, 残腎から放出される物質によって支配されている¹⁵⁾。これはヒトの培養腎細胞に片側腎摘後の血清を加えると ³H-thymidine の取り込みが増えてDNAの合成が増加するという in vitro の実験ではっきり証明されている¹⁵⁾。

実験IIおよびIIIでは大量のOxNaを経口的・経皮的に直接5/6 腎摘および正常ラットに与えて早期に腎にOxCaを沈着させて嚢胞発生との関連を調べた。興味あ

ることにはOxNa投与の有無にかかわらずA・B両群ラットの腎機能は5/6 腎摘後4週間目までは差異がないのにOxCaが沈着したOxNa投与ラットの腎に嚢胞が早期にしかも強く形成された。これは負荷されたOxNaが唯一の排泄器官である腎でOxCaとして尿細管内に沈着し、その結果内腔が狭くなり内圧が高くなって嚢胞が形成されるというメカニズムを示唆している。さらに正常ラットでもOxNa負荷によって尿細管内にOxCaが沈着し、腎機能低下がない初期の段階で嚢胞が発生したので、少なくとも負荷されたOxNaがOxCaに変わり尿細管に沈着して嚢胞形成の原因の一つになっていることを示している。

加齢による腎嚢胞も知られているが、体重測定用に12か月間飼育した正常ラットでは腎嚢胞は認められなかったし、OxNaが与えられた正常ラットで7日目には早くも尿細管が拡張したことから、今回観察された腎嚢胞は加齢によるものではなく、OxNa負荷によって血中Ox値が上昇し尿細管にOxCaが沈着したためと考えられる。

血中Oxの測定は操作が複雑で各種の測定法が試みられ報告されており、その正常値も2~150 $\mu\text{mol/l}$ と大きなばらつきがある。今回採用した capillary gas chromatography 法は正常値が最も信頼性の高い in vivo のアイソトープ法とほとんど同じ程度であり、その信頼性と再現性は広く認められている¹⁸⁾。

組織学的にOxCaは多くは尿細管内壁に沈着し管腔を狭小化しているが、この点が嚢胞発生的重要原因になっているのではないだろうか？尿細管がOxCaによって完全に閉塞されると近位の尿細管内圧が上昇し、この圧が糸球体の濾過圧に達すれば糸球体の濾過は停止すると予想される。一方、尿細管の狭窄では尿細管内圧の上昇が持続するので尿細管が拡張し嚢胞形成へと進むのではないだろうか？

今回の研究は5/6 腎摘および正常ラットでの尿細管内OxCa沈着が後天性腎嚢胞形成の一因であることを明確に示している。腎実質が線維化し排泄機能が停止した末期腎不全患者に多発する後天性腎嚢胞がどのようなメカニズムで発生するのか、その疑問を解く手がかりを与えるものと考えられる。

結語

OxNaを5/6 腎摘および正常ラットに与えると尿細管内にOxCaの結晶が沈着し、非投与ラットよりも早期にしかも高度に尿細管の拡張や嚢胞形成がみられる。これはOxCaの尿細管内沈着が後天性腎嚢胞発生の一因であることを明確に示している。

文献

- 1) Dunnill MS, Millard PR, Oliver D : Acquired cystic disease of the kidneys : A hazard of long-term intermittent maintenance haemodialysis. *J Clin Pathol* 30 : 868-877, 1977
- 2) Grantham JJ, Levine E : Acquired cystic disease : Replacing one kidney disease with another. *Kidney Int* 28 : 99-105, 1985
- 3) Krempien B, Eberhard R : Acquired cystic transformation of the kidneys of haemodialysed patients. *Virchows Arch* 386 : 189-200, 1980
- 4) Mickisch O, Bommer J, Bachmann S, Waldherr R, Mann JFE, Ritz E : Multicystic transformation of kidneys in chronic renal failure. *Nephron* 38 : 93-99, 1984
- 5) Narasimhan N, Golper TA, Wolfson M, Rahatzad M, Bennet WM : Clinical characteristics and diagnosis consideration in acquired renal cystic disease. *Kidney Int* 30 : 748-752, 1986
- 6) Bommer J, Waldherr R, Ritz E : Kidney lesions in uraemic patients and beta-2-microglobulin derived amyloid. *Lancet* ii : 1437-1438, 1985
- 7) Ono K, Yasukochi A, Kikawa K : Pathogenesis of acquired renal cystic (ARC) in hemodialysis patients. The role of oxalate crystal deposition in renal tubules. *ASAIO* 33 : 245-249, 1987
- 8) Ono K : Secondary hyperoxalemia caused by vitamin C supplementation in regular hemodialysis patients. *Clin Nephrol* 26 : 239-243, 1986
- 9) Wolthers BG, Hayer M : The determination of oxalic acid in plasma and urine by means of capillary gas chromatography. *Clin Chim Acta* 120 : 87-102, 1982
- 10) Roe JH, Kuerther CA : The determination of ascorbic acid in the whole blood and urine through the 2, 4-dinitrophenyl-hydrazine derivative of dehydroascorbic acid. *J Biol Chem* 147 : 399-405, 1953
- 11) Ono K, Ono H, Ono T, Kikawa K, Oh Y : Effect of vitamin C supplementation of renal oxalate deposits in five-sixths nephrectomised rats. *Nephron* 51 : 536-539, 1989
- 12) Ishikawa I : Uremic acquired cystic disease of kidney. *Urology* 26 : 101-108, 1985
- 13) Dicker SE, Morris CA : Presence of renotropic factors in plasma of unilaterally nephrectomised rats. *J Physiol* 299 : 13-27, 1980
- 14) Preuss HG, Golden H : A renotropic system in rats. *J Clin Invest* 57 : 94-101, 1976
- 15) Yamada J, Kanetake H, Saito Y, Kondo A, Yamamoto N : Renotropic growth factor in cancer patient sera after removal of cancer-bearing kidney. *Kidney Int* 23 : 632-634, 1983
- 16) Saphir O : The state of the glomerulus in experimental hypertrophy of the kidney of rabbits. *Am J Pathol* 3 : 329-342, 1927
- 17) Pirani CL, Pollack VE, Schwartz FD : The reproducibility of semiquantitative analysis of renal histology. *Nephron* 1 : 230-236, 1964
- 18) Dorhout Mees EJ, Boer MP : Plasma oxalate in chronic renal failure and normal subjects. Methodological problems. *Nephron* 48 : 256-257, 1988