

漢方養生サプリメントによる5/6腎摘ラットにおける腎機能パラメーターの改善。腎保護的介入の観点から

Masatoshi Harada¹, Hala Sweed², Roberto Catanzaro³, Archana Kumari⁴, Alojz Bombas⁵, Emilio Minelli⁶, Ascanio Polimeni⁵, Umberto Solimene⁶, Francesco Marotta^{6,7}

¹MCH 病院 (日本、埼玉) ; ²アインシャムス大学医学部老年医学講座 (エジプト、カイロ) ; ³カターニア大学内科学講座消化器病学科 (イタリア) ; ⁴ケベック大学州立学術研究学院 (INRS) 水・土・環境研究所 (カナダ、ケベック) ; ⁵パヴェル・ヨゼフ・シヤファーリク大学実験医学研究所 (スロバキア、コシツェ) ; ⁶ミラノ大学パイオテクノロジー・伝統医学WHOセンター (イタリア、ミラノ) ; ⁷老化介入リジェネラ・リサーチ・グループ (イタリア、ミラノ) ;

要約.本研究は、5/6腎摘ラットにおける腎機能および形態構造に対する新規漢方養生サプリメント、田七杜仲精 (DTS、協通事業、日本)の有効性を確かめることを目的とした。雄性スプラーク・ダウリー (SD) 系ラット (体重240-280g) は偽手術対照群(A群)と腎臓摘出 (腎摘) 群(B群およびC群)とに分けた。5/6腎臓摘出術は右腎を摘出し、左腎動脈3本のうち2本を結紮することによって行った。術後、ラットは個別ケージで6週間飼育した。A群およびB群のラットには通常の蛋白餌のみを給餌し、C群のラットについては通常の蛋白餌にDTS(ラット1匹につき1日当たり10mg)を加えて給餌した。DTS追加投与は術後1日目から開始した。6週間後すべてのラットに腎機能検査を実施し、その後、形態学的検査のために左腎を単離した。体重、血圧、心拍数は各群間で有意の差はなかった。DTSを追加投与した腎摘出群 (C群) は偽手術対照群 (A群) およびDTS非投与腎摘対照群 (B群) と比較して、血漿クレアチニン濃度、糸球体濾過量、有効腎血漿流量、尿流速が有意に上昇した($p < 0.05$)。これに対し、DTS追加投与腎摘出群の血漿尿素濃度および形態構造に有意の変化はなかった。以上のデータから、通常の蛋白餌に加えDTSを追加投与することによって5/6腎摘ラットの腎機能は改善し、形態学的に影響を及ぼさないことが示され、軽度ながら形態温存力があるとも考えられる(www.actabiomedica.it)。

キー・ワード:腎摘ラット、DTS追加投与、腎機能、腎形態学的

慢性腎不全の病態生理学モデルとしてもっとも広く研究されているのは5/6腎摘モデル、あるいは、残存腎モデルである。実験によって腎臓の5/6を摘出すると全身高血圧症、蛋白尿、腎機能低下を惹起し、糸球体硬化を進行させることが知られている(1)。残存腎の機能不全への進行を抑えるために様々な実験的取り組みがなされる中でもっとも一般的に取り入れられている方法が食餌制限である。食餌制限としては、蛋白制限(2-4)、リン制限(5)、カロリー調整(6)があり、いずれの場合も、腎摘モデルである程度の血行動態的、形態学的変化が起きている。中程度の蛋白制限の場合には、通常の蛋白餌に比べ、ラットは長期生存し、糸球体硬化も軽度にとどまっている(2, 7)。しかしながら、低蛋白食には、カロリーを十分に摂取できない避けがたい難点がある。Afshinniaら(6)は、蛋白質とカロリーを制限した餌で、5/6腎摘ラットの血漿尿素窒素濃度が効果的に低下することを示した。5/6腎摘動物に高蛋白餌を与えると、低蛋白餌を与えた場合に比べて腎糸球体や尿細管に形態学的に高度の損傷が起きている。Gaoら(3)は、蛋白質そのものではなく、カロリーが非糸球体性病変スコアの程度と有意の関係にあると報告している。

慢性腎不全症状に相当する5/6腎摘モデルに関しては、食餌調整、特に中程度の蛋白制限、アミノ酸投与、十分なカロリー摂取の有効性が報告されている(5)。このため、こうした目的のために数多くの食品が開発されてきた。著者らは最近、幼若、高齢両実験動物において、一般的健康維持のために臨床的に安全に使用されている新規漢方養生サプリメント、田七杜仲精 (DTS) には、GSH/GSSGレドックス状態を良好に調整する(8, 9)一方、

肝臓や腎臓を薬剤誘発性のDNA損傷から保護する作用があることを示した(10)。本研究は、5/6腎摘ラットの腎機能および形態に対するDTS追加投与による保護効果を調べることを目的とする。

材料と方法

漢方養生サプリメントの準備

田七杜仲精 (DTS) (成分：田七人參、杜仲、50/25(%重量/重量)、協通事業、日本、東京)は国際標準化機構 ISO 9001/ 140001の規格に則り、品質管理手続きの下で非遺伝子組み換え作物から加工されたもので、漢方養生研究所 (日本、東京) の御厚意により寄贈を受けた。本剤は、飲みやすい中程度の粘り気のある小さな顆粒状で、簡単に食品に混ぜることができる。

研究方法

実験は、雄性スプラーク・ダウリー系ラット (体重240-280g) を対象に実施し、ラットは、蛋白質24%を含む標準餌で不断給餌し、水道水を自由に飲めるようにした。実験はすべて、米国国立衛生研究所 (NIH) および米国生理学会の実験動物の管理と使用に関する基準に則って行った。ラットは3グループに分けた。A群(n=15)は偽手術対照群、B群(n=15)は腎臓摘出対照群とし、C群(n=15)は5/6腎臓摘出術を施し、DTS (協通事業、日本、東京) を1匹につき1日当たり10mgの用量で追加投与した。DTSは通常の餌に混ぜた。手術前、ラットは24時間蓄尿のために代謝ケージに入れた。24時間蓄尿サンプルを用いて尿中蛋白/クレアチニン比を測定した。グルコース、尿素窒素、血球容積(PCV：ヘマトクリット値)測定のために、ラットの尾の先端をカットして、血液サンプルを採取した。採血後、A群には偽手術を、B群およびC群には5/6腎摘手術を行った。手術後、ラットはそれぞれ個別ケージに入れ、6週間にわたり蛋白質22%を含む標準餌で不断給餌し、水道水を自由に飲めるようにした。(C群の)腎摘ラットに対しては、手術後1日目から1日1回のDTS投与を開始し、6週間継続した。腎機能検査の1日前にラットを代謝ケージに移し、24時間とどめた。6週間終了時に、すべてのラットに腎機能検査を実施した。最後に、形態学的検査のために各ラットの左腎を回収した。

5/6 腎臓摘出手術の手術手順

初回の24時間蓄尿後、ペントバルビタールナトリウム(60mg/kg体重)を腹注して各ラットに麻酔を施した。ラットの尾先部をカットして50 μ lの血液を採取し、血中尿素窒素濃度測定のためにヘパリンチューブに滴下し、他の生化学的検査のために-20 $^{\circ}$ Cで保存した。A群は、開腹して腎臓を露出させ、その後、腎臓を前後に動かすことで偽手術を行った。B群およびC群には、腹部正中部を小切開し右腎を摘出、その後、左腎動脈3本のうち2本を結紮して、5/6腎臓摘出術を施行した。

腎クリアランス試験の操作手順

6週間後、塩酸ケタミン混合液(70mg/kg)を腹注して、ラットに麻酔を施した。気管を切開し、分泌物吸引のためにPE240カテーテルを気管に挿入し、気道を確保した。右大腿動静脈はPE50カテーテルでカニューレした。右大腿動脈はポリグラフ・レコーダ付きの圧力変換器に接続して動脈血圧をモニターし、右大腿静脈にはポリエチレンカテーテルを挿入してイヌリンおよびPAH (パラアミノ馬尿酸) 溶液を注入した。血液サンプルは左大腿動脈で採取した。腹部正中切開し、左右両方の尿細管の位置を注意深く確かめ、PE10カテーテルを挿入して採

尿した。B群およびC群は、残存する左尿細管にのみカニューレして採尿した。尿は、あらかじめ秤量したエッペンドルフ（チューブ）に回収した。

腎クリアランス試験

腎クリアランス試験は、血漿中のイヌリン濃度およびPAH濃度を安定させるためにPAH0.1g、イヌリン1.0g、マンニトール6gを0.9%食塩水で溶かした混合液をkg体重当たり毎時0.01mlの速度で45分間持続注入した。平衡期間後、20分間蓄尿を3回連続で行い、各蓄尿の中間時点で動脈血をサンプル採取した。尿量は、予め秤量したエッペンドルフの重量変化によって測定した。血液サンプルでPCV(ヘマトクリット値)を測定した。血漿および尿は更なるPAH濃度およびイヌリン濃度分析のために-20°Cで保存した。

形態学的検査

各群のラットに、腎臓の組織学的変化を調べる検査を行った。腎クリアランス試験に続き、それぞれの腎臓を通常の食塩水により灌流した後、18%グルタルアルデヒドを加えた0.02 Mカコジル酸緩衝液(pH=7.2)で20分間、さらにその後、3%グルタルアルデヒドを加えた0.1 Mカコジル酸緩衝液(pH=7.2)で20分間、灌流固定した。腎臓はすべて回収し、腹膜の脂肪を取り除いた。腎皮質部を小片(1 x 1ミリ)に薄く切り、3%カコジル酸緩衝液で後固定した。組織ブロックも、電子顕微鏡検査のために処置した。残りの部分については10%緩衝ホルマリン液で固定し、組織学的評価のために処置した。パラフィン切片はヘマトキシリン・エオジン(HE)で染色し、過ヨウ素酸シッフ試薬(PAS)で処理した。組織の出所を知らない第三者の手でラット1匹あたり少なくとも100の糸球体について評価を行った。

血液サンプルと尿サンプルの分析

腎クリアランス試験の血漿および尿を用い、自動分析装置NOVA16(NOVAバイオメディカル社、米国マサチューセッツ州ウォルサム)を使用してイヌリン、PAH、電解質、クレアチニン、モル浸透圧濃度を測定した

機能パラメーター

脈圧 (PP)	SP-DP
糸球体濾過量 (GFR)	$\frac{U_{in} V}{P_{in}}$
有効腎血漿流量 (ERPF)	$\frac{U_{pah} V}{P_{pah}}$
有効腎血流量 (ERBF)	$\frac{ERPF}{(1-PCV) \times 100}$
濾過率 (FF)	$\frac{GFR}{ERPF \times 100}$
腎血管抵抗 (RVR)	$\frac{MAP}{ERPF}$
尿中電解質排泄率	UeFr

SP = 収縮期 (血) 圧 ; DP = 拡張期 (血) 圧 ; Uin = 尿中イヌリン濃度 ; Pin = 血漿イヌリン濃度 ; UPAH = 尿中PAH濃度 ; PPAH = 血漿PAH濃度 ; Ue = 尿中電解質濃度 ; Pe = 血漿電解質濃度 ; Fr = 尿流速.

統計分析

データは平均値±標準偏差 (SD) として表示した。同一グループ内のデータ比較には、対応のあるステューデントのt検定を用いた。3グループ間の差の測定には、一元配置分散分析(ANOVA)を用いた。一対比較にはダンカンの多重配置検定を用いた。ノンパラメトリックパラメーター分析にはクラスカル・ウォリス検定を使用する一方、2腎摘群間の一対比較にはダネット法を用いた。p値が0.05以下の場合、結果は統計的に有意の差があるとみなした。

結果

体重は、DTS投与前も後もグループ間で有意の差はなかった(表1)。6週間の投与後、DTS投与5/6腎摘ラット群の血漿尿素濃度が有意に(p<0.05)上昇したが、グループ間で数値に有意の差はなかった(表1)。C群の血漿クレアチニン濃度はB群と比較して有意に上昇したが、PCVはB群、C群ともに有意に低下した(p<0.05) (表1)。尿蛋白クレアチニン比は、DTS投与の前も後もグループ間で差はなかった。

腎血行動態

尿流速は、グループ間で有意の差はなかった(表2)。B群の糸球体濾過量および有効腎血漿流量は、拮抗する数値を示したA群、C群と比較して有意に低下した。濾過率は3グループ間で有意の差はなかった。B群の腎血管抵抗はA群に比べて2倍高く、C群のそれはA群とほぼ同じ数値へ低下した対C群

血漿中および尿中の電解質

血漿ナトリウム濃度、血漿カリウム濃度、血漿塩素濃度は、3グループ間で有意の差がなかった(表3)。尿中ナトリウム排泄率および尿中塩素排泄率は3グループ間で有意の差はなかったが、尿中カリウム排泄率は、A群に比べてC群は有意に高かった。両腎摘群(B群およびC群)のカリウム分画排泄率は偽手術対照群 (A群) のおよそ2倍に達したが、B群とA群とのあいだにのみ有意の差が認められた。これに対し、ナトリウム分画排泄率、塩素分画排泄率、尿/血漿浸透圧比は、3グループ間で有意の差はなかった。

形態構造

両腎摘群で糸球体拡張が観察された(図.1)。血管壁の肥厚や細胞増多を示すものがある一方、糸球体の萎縮も認められた。B群は尿細管が拡張し、近位尿細管上皮細胞にヒアリン滴を認めた。近位尿細管上皮は一部が水腫変性を来し核が濃縮する一方、他は剥がれ落ちていた(図.2)。C群は、DTS追加投与によって尿細管拡張は軽度で近位尿細管上皮は核が濃縮し、一部の上皮が剥がれ落ちていた。管間浮腫も軽度に認められた。結局、これをB群と比較すると、軽度の形態温存を示している。

電顕下、B群とC群は似かよった変化を示した。足細胞や内皮細胞の軽度の腫大、足突起の融合、(内皮細

胞) 浸潤、血管腔内の細胞質残屑、糸球体腔の球状滴などである(図.3)。

考察

食餌療法とは関係なく、腎摘ラットは偽手術対照群ラットと比較して、実験終了時にPCVが有意に低下した。これは腎質量が減少し、その後、エリスロポエチン産生が減少したためとみられる。3群すべてにおいて手術後に血糖値(血漿グルコース濃度)が上昇した。こうした変化は、ストレスによる高血糖症が原因かもしれない(11)。本研究においては、5/6腎摘出術を受けただけのラットは腎機能が低下した。糸球体濾過量および腎血漿流量は半減する一方、濾過率は変化せず、RVRは上昇した。こうした結果は、手術後4~6週間後に、5/6腎摘ラットのGFR値およびERPF値が低下したBoubyらの研究結果と一致する。この段階では、残存腎の代償機能が働いて血漿量が増加するため、過剰濾過が起きる。DTS投与群(C群)はB群と比較してGFR値やRPF値が有意に高かった。RPF上昇幅はGFR上昇幅よりはるかに大きいため、濾過率は低下した。腎血管抵抗の値は対照群と同程度まで低下し、残存腎に顕著な血管拡張が起きていることを示している。実際、腎輸出細動脈の拡張は濾過率を低下させる初期の現象であることが示されている(13)。濾過率は低下してもC群のGFRが上昇したことは、DTS投与ラットにおいて尿流速が高まるとともにより効率の良い過剰濾過が起きていることを示している。他方、著者らは、少なくとも本実験研究の設定においては、そうした過剰濾過が全身血圧の上昇によるものではないことを示した。

B群と比較してC群の腎血管抵抗が低下したのは、DTSの一部養分が原因かもしれない。特に、著者らは最近、DTSの主成分にあるとされる抗酸化作用や抗炎症作用(8, 9)を通じて糸球体のMCP-1(単球走化性蛋白質-1)発現が有意に低下し(14)、結果的に、杜仲に関して最近示されている一酸化窒素による血管拡張を引き起こした(15)との所見を得たが、この仮説は実験によって確認する必要がある。Vosら(16)は、腎臓同種移植ラットに、飲料水に高用量のL-アルギニン(水100ml中L-アルギニン1g)を加えて与えたところ、添加しない水を与えられたラットに比べ腎血管抵抗が低下したと報告している。C群の尿中カリウム排泄率はB群に比べてやや上昇し、尿流速の軽度上昇と一致した。C群の尿流速が軽度上昇したのは、DTS投与後にGFRが上昇したためとみられる。5/6腎摘出術後6週目に、両腎摘群とも、残存腎の糸球体に幾つかの変化がみられた。光顕下で糸球体毛細血管の拡張が観察された。電顕下で観察された足突起の融合は、足細胞の損傷を示している。しかしながら、糸球体基底膜剥離は認められず、同時に、尿蛋白クレアチニン比にも変化はなかった。短期的な組織学的観察では糸球体基底膜に異常は認められなかったが、長期的には糸球体硬化が進行する可能性は否定できない。実際、これまでの研究では、残存腎を有するラットで巣状糸球体硬化が起きるのは、術後30日目で糸球体のわずか8%、120日目では24%だった(17)。幼若ラットに一側腎摘出術を施行すると、成熟ラットに比べて残存腎の肥大がより顕著で、巣状糸球体硬化が起きる割合が高くなる(18)。NagataとKriz(19)は、幼若スプラーク・ダウリー系ラットの一側腎摘出術後12週目および24週目の糸球体肥大プロセスについて研究し、糸球体肥大がメサンギウムの局所的膨張、毛細血管の拡張、足細胞の構造的変化に関与していることを示した。本研究においては、足細胞の構造的変化は認められたが、糸球体肥大は観察されなかった。

C群の構造的変化としては、近位および遠位尿細管拡張や一部尿細管上皮の変性などがあり、これは尿中電解質濃度の上昇と一致する。一部糸球体に毛細血管の拡張が認められたが、萎縮した糸球体も一部に存在した。これは、本モデルの糸球体にさまざまな程度の変化が起きていることを示している。3群すべてのラットの糸球体腔に見つかったピンク色したPAS反応陰性の球状滴は、血漿から濾過されたイヌリンの可能性もある。3群すべてのラットの近位(尿細管)上皮に見つかったヒアリン滴は、ConferとPanciera(20 1995年)が以前報告していた、尿細管腔から再吸収された蛋白質の可能性もある。腎摘出ラットすべてを電子顕微鏡検査した結果、内皮細胞の拡大により毛細血管腔が狭くなっていた。内皮細胞質の断裂も観察された。こうした変化は、内皮細胞の限外濾過機能に変化が起きていることを示している。C群の足細胞に見つかった球状の電解質滴は再吸収滴とも考えられる。C群のメサンギウム細胞は正常と思われた。この結果は蛋白尿が検出されないことと一致する。結

局、こうしたデータは、DTSを投与することで腎摘ラットのGFRおよびERPFが上昇し、効率的な過剰濾過プロセスにつながることを示している。5/6腎摘ラットの残存腎の構造的変化に、DTS投与は何の影響もなかった。過剰濾過と関連して腎臓の構造的変化に及ぼすDTS投与の影響を評価するには、さらに中長期的な研究を行う必要があるだろう。一酸化窒素による血管拡張がメカニズム候補だとすれば、腎血管拡張に關与するDTS成分についても更に調査する必要がある。

参考文献

2011年12月2日受付

連絡先住所: Francesco Marotta, MD, PhD

Piazza Firenze, 12

20154 Milano, Italy

Eメール: fmarchimede@libero.it

表 1. DTS追加投与前および6週間後の体重、血漿尿素濃度、血漿クレアチニン濃度、ヘマトクリット値 (PCV)、血糖値、尿蛋白クレアチニン比、血液 pH

データは平均値 \pm SDとして表示; A群、偽手術対照群; B群、DTS非投与腎摘群; C群、DTS追加投与腎摘群; # 同一横列中、肩符号を付した数値は有意差あり ($p < 0.05$); *治療前の基準値と比較して有意の差 ($P < 0.001$); ** 報告数値は中央値
収縮期 (血) 圧、拡張期 (血) 圧、平均動脈圧、心拍数は、3群間で有意の差はなかった(データを示さず)

表 2. 実験対象3群の腎血行動態.

データは平均値 \pm SDとして表示; *, **同一横列中、肩符号を付した数値は有意差あり ($P < 0.05$); Fr = 尿流速; GFR = 糸球体濾過量; ERPF = 有効腎血漿流量; ERBF = 有効腎血流量; FF = 濾過率; RVR = 腎血管抵抗

表 3. 血漿電解質濃度、電解質の尿中排泄率と分画排泄率、尿/血漿浸透圧比

データは平均値 + SDとして表示; * $p < 0.05$ 、同一横列中、数値に有意差あり; UNaV = ナトリウム尿中排泄率; UKV = カリウム尿中排泄率; UCIV = 塩素尿中排泄率; FENa = ナトリウム分画排泄率; FEK = カリウム分画排泄率; FECl = 塩素分画排泄率; PNa = 血漿ナトリウム濃度; PK = 血漿カリウム濃度; PCI = 血漿塩素濃度; Uosm/Posm = 尿/血漿浸透圧比

図 1. B群: 糸球体毛細血管が拡張しているようだ (C)。ボウマン腔には液滴が幾つか認められた (矢印) (HE染色、40倍)

図 2. B群: 腎被膜に隣接する近位上皮層に水腫変性がみられた。近位尿細管腔 (星印) に円柱が認められた (HE染色、40倍)。C群: 尿細管の拡張が存在する。近位尿細管細胞は形状や大きさが不同で、核(矢印)の濃縮がみられる。管間に軽度の浮腫(星印)が認められた (HE染色、40倍)

図 3. 電子顕微鏡検査結果。内皮細胞浸潤 (I)、足細胞の軽度の腫大(P)、血管腔内の細胞質残屑 (D)、足細胞細胞質内に電子密度滴 (R) 、糸球体腔に球状滴(*)など、B 群(a - b) とC群 (c- d) に似通った異常が認められた。 ; M= メサンギウム細胞、 E = 内皮細胞 (9000倍)