

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

日本尿路結石症学会誌 (2003.11) 2巻1号:56～61.

Shock waveによる尿路上皮細胞傷害とcrystal-cell interactionに与える影響の検討

山口 聡, 加藤祐司, 中園周作, 奥山光彦, 徳光正行, 高下
紀子, 八竹 直

◆Session 3-3

Shock wave による尿路上皮細胞傷害と
crystal-cell interaction に与える影響の検討

旭川医科大学 泌尿器科

山口 聡 加藤 祐司 中園 周作 奥山 光彦
徳光 正行 高下 紀子 八竹 直

Dr. Yamaguchi

背景(1)

・体外衝撃波碎石術(ESWL*)施行後の尿路結石の再発率が高いことが知られている。

1 本邦の再発率	1年	3年	5年
自然経過+開腹手術	3- 6 %	11-20 %	22-28 %
ESWL後	5-10 %	21-50 %	35-76 %

2 欧米の再発率 (Strohmaier WL, 2000)

自然経過	0.03-0.14 stone/patient/year
ESWL後	0.10-0.47 stone/patient/year

(* Dornier Medical Systems, Inc., Marietta, GA, USA)

▲【スライド1】

現在の尿路結石治療は、ESWL や各種 endourology の手技が中心に行われていますが、一方では ESWL 施行後の尿路結石の再発率が高いことが知られています。

本邦における結石の再発率は、1970年代の報告では、3年で15%前後、5年で25%前後であったのに対し、ESWLの長期成績が出てきた1990年台以降では、いずれも高く報告されています。欧米においても同様な傾向で、自然経過に比し、ESWL後には再発率の増加を認めています。

その理由として

- 1 微小碎石片(stone fragment)の残存
- 2 腎の解剖学的(形態)異常
- 3 結石の大きさ、位置、数や種類
- 4 腎障害(ネフロン、血管、細胞傷害)?

▲【スライド2】

この原因は、これまでは、ESWL後の碎石片残存を主なものとして、尿路形態異常や結石の大きさ、位置などを中心に論じられていました。

今回は、視点を変え、腎障害、特に腎上皮細胞傷害と

の関連を注目しました。

背景(2)

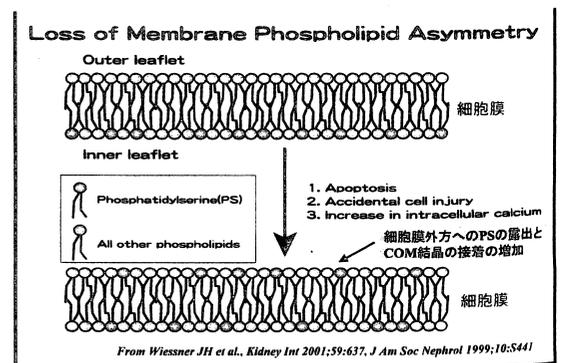
- 1 尿路結石形成の初期過程において、結晶細胞間相互作用 (crystal cell interaction) は重要である。
- 2 尿路上皮細胞の傷害時に、シュウ酸カルシウムなどの結晶の接着が増加することが知られている。
- 3 その要因の一つに細胞膜を構成するリン脂質の変化が考えられる。特に、細胞傷害時の細胞膜表面への phosphatidylserine (PS) の露出が重要であり、これは早期 apoptosis にも関与している。

▲【スライド3】

近年、尿路結石形成の初期過程において、結晶細胞間相互作用 (crystal cell interaction) が重要な因子と考えられております。

尿路上皮細胞の傷害時に、シュウ酸カルシウム結晶などが接着しやすくなり、その要因として、細胞膜を構成するリン脂質の変化が注目されています。

特に、細胞膜表面への phosphatidylserine (以下 PS とします) の露出は重要であり、これは早期アポトーシスにも関与しています。



▲【スライド4】

ここに schema を示しますが、正常細胞の細胞膜では、リン脂質構成はほぼ一定であり、PSは通常、内方に

み存在しています。

しかしこれに、何らかの細胞傷害が加わると、細胞膜リン脂質構成が変化し、PSが外方に出現してきます。これが、主に電氣的にシュウ酸カルシウム結晶を細胞に付着させ、結石形成初期に重要と考えられています。

背景(3)

- 4 シュウ酸曝露により細胞膜外方のPSが増加し、腎尿管細胞にシュウ酸カルシウム結晶が、接着しやすくなることが明らかとなっている(*in vitro*)。
- 5 シュウ酸カルシウム結石形成モデル(ラット)でも、腎集合管細胞での細胞膜表面へのPSの露出が定量的に確認され、それに伴うapoptosis pathwayも亢進していた(2002年、第12回日本尿路結石症学会)。
- 6 これらの所見は、腎上皮細胞の微小傷害が、尿路結石形成の初期段階に重要な役割を果たしていることを支持するものである。

▲【スライド5】

シュウ酸曝露により細胞膜外方のPSが増加し、尿管細胞にシュウ酸カルシウム結晶が接着しやすくなることが知られ、また昨年の本学会で報告しましたように、ラット結石形成モデルにおいても、腎集合管細胞での細胞膜表面へのPSの露出が定量的に確認されています。

これらの所見により、腎上皮細胞の微小傷害～細胞膜の変化が、尿路結石形成の初期段階に重要な役割を果たしているのではないかと考えられます。

目的

- 1 衝撃波によって、腎上皮細胞にこのような細胞傷害が生じていないか？
- 2 すなわち、衝撃波曝露後の腎上皮細胞傷害が、細胞膜構造の変化をもたらし、結石再発に関与している可能性はないか？
- 3 動物実験により、衝撃波が腎上皮細胞に与える影響を、細胞膜表面へのphosphatidylserine (PS)の露出とそれに関係するapoptosis pathwayに注目して検討した。

▲【スライド6】

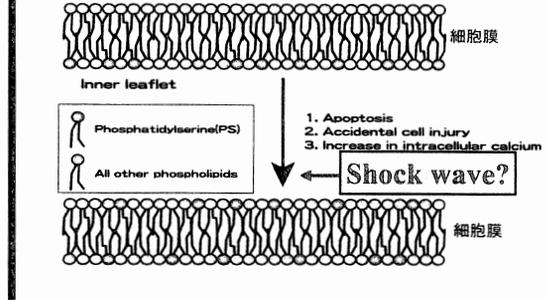
これらの結果を踏まえ、衝撃波による腎細胞障害の観点から、尿路結石の再発との関連性について考察してみたいと思います。

すなわち、衝撃波によって、腎上皮細胞にこのような細胞傷害が生じていないか？

衝撃波曝露後の腎上皮細胞傷害が、細胞膜構造の変化をもたらし、結石再発に関与していないか？

これらを、動物実験により、細胞膜表面へのPSの露出とそれに関係するアポトーシス pathwayに注目して検討しました。

衝撃波による腎上皮細胞への傷害が結石再発に関係していないか？



▲【スライド7】

先ほどの schema をもう一度示しますが、PSが外方に出現するという、細胞膜構造の変化が、これまで知られている因子のほかに、衝撃波も関与していないか、そしてこれが結石再発に関係していないか、を検討することが今回の目的です。

衝撃波治療による腎障害の検討

- 1 1980年-90年代前半にかけて、動物実験(dog, pig, rat, rabbitなど)で、急性障害、慢性障害などの副作用が多数検討された。
- 2 腎障害については、糸球体、尿管や血管への障害の報告が多い。
- 3 腎盂の尿路上皮細胞への影響については、dogにおいて、尿中へのglycosaminoglycan (GAG)の増加が報告されている。

▲【スライド8】

衝撃波治療による腎障害については、ESWLが臨床応用された前後に、急性障害、慢性障害などの副作用が多く検討されています。

その腎障害については、糸球体、尿管や血管への障害が主なもので、実際の尿路結石の形成の場となる、腎盂側の細胞群への影響については、犬の実験において、尿中へのGAGの増加が報告されているのみでした。

方法

I 動物実験

- 1 SPF pig* (n=7)を全身麻酔
- 2 排泄性尿路造影で腎盂、腎杯の位置を確認
- 3 右腎の中～下腎杯方向から、shock wave** (spark gap, 14 kV, 2000 shots)を曝露
- 4 採血、採尿後、両側腎摘出→sample採取、分析

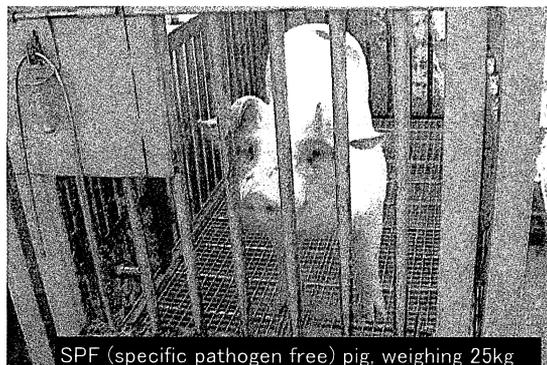
(*specific pathogen free, BW: 24-26 kg)
(**ESWL装置: Dornier, MFL5000)

▲【スライド9】

今回の動物実験には、SPFブタ7頭を用いました。

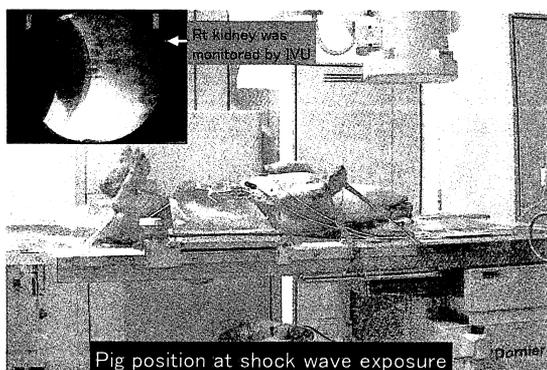
実験の概要ですが、ブタを全身麻酔し、排泄性尿路造影で腎盂、腎杯の位置を確認し、右腎の中・下腎杯方向から、衝撃波、spark gap, 14 kV, 2000 shotsを当てました。

採血、採尿後に、両側腎を摘出し、フローサイトメリー等の検討を行いました。



▲【スライド10】

これが実際に用いたブタですが、SPF動物ですので、細菌学的には非常にcleanな状態となっております。



▲【スライド11】

気管内挿管後、通常の治療と全く同様に治療ユニットに固定し、IVPにて右腎をモニターしながら中・下腎杯方向から衝撃波を当てました。

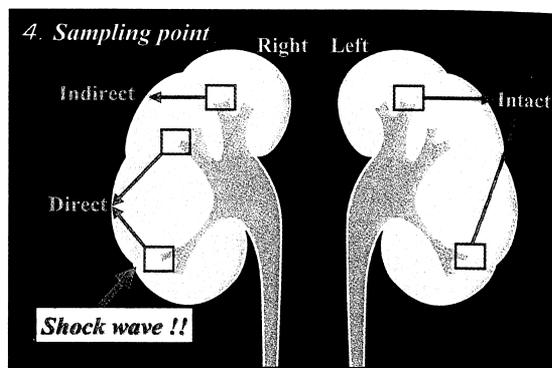
なおESWL装置は、Dornier, MFL5000を使用しました。

II 検討項目

- 1 血液検査: BUN, Cre, CPK, GOT, GPT, LDH
- 2 尿検査(膀胱穿刺尿): 一般検尿, NAG
- 3 腎組織: 腎乳頭部切離~腎集合管細胞の分離
 - 1) Flowcytometry解析
 - 2) Caspase activity (3, 8, 9)
 - 3) 病理組織像(HE染色)

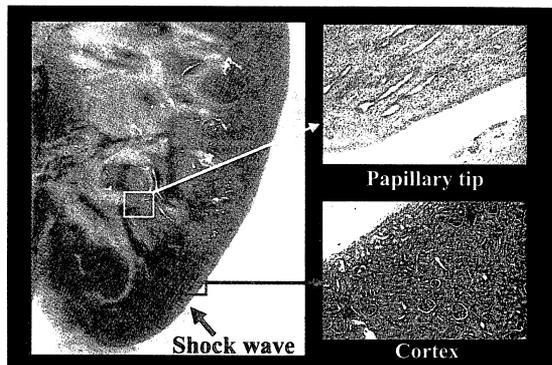
▲【スライド12】

検討項目としては、これらの血液・尿検査を行い、腎組織は、腎乳頭部を切離、腎集合管細胞を分離し、フローサイトメリー解析、カスパーゼ活性を測定しました。



▲【スライド13】

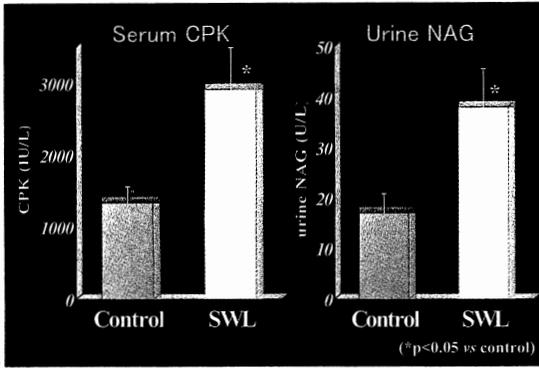
腎組織は、衝撃波の直接 damage 部位として右中・下腎杯を、間接 damage 部位として右上腎杯を、Intact 部位として左上・下腎杯を、それぞれサンプリングしました。



▲【スライド14】

結果を示します。

まず、衝撃波曝露後の腎のマクロ像では、衝撃波が当たった部位の腎実質にはわずかな出血巣が認められました。それは一部、腎盂方向にも認めますが、ミクロ像では、腎皮質と比べ、腎乳頭部にはほとんど出血は認められず、健常側と比べても、腎集合管細胞にはほとんど変化を認めませんでした。



▲【スライド15】

主な検査結果を示します。

衝撃波を加えないブタ8頭をコントロール群として比較したところ、血清CPKと尿NAGの有意な上昇を認めました。

III Flowcytometry

方法

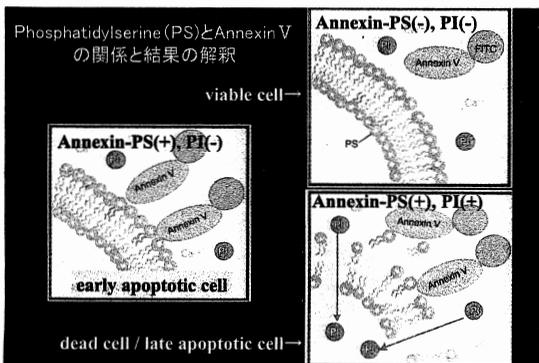
- 腎集合管細胞の分離・分散
 - 各部位の腎乳頭部を切離、PBS洗浄、細切
 - dispase(400U/ml) + collagenase S1(500U/ml) 37°C, 120min., incubation
 - 細胞数カウント、生死判別
- 細胞調整 (MEBCYTO® Apoptosis Kit, MBL Co. Ltd.)
 - 2 × 10⁶ cellとし、PBS洗浄後、binding buffer添加
 - Annexin V-FITC, propidium iodode(PI)の反応 15min., incubation (dark room, ambient)
- FCM解析 (EPICS Elite™, Beckman-Coulter Inc.)

▲【スライド16】

腎集合管細胞の細胞膜リン脂質の構成変化、特にPSの変化をflowcytometryにより検討しました。

実験手順を示しますが、細胞を酵素処理により分散、PSを特異的に認識するFITC標識Annexin Vを反応させ、propidium iododeと二重染色の後、flowcytometryによる解析を行いました。

分析装置としては、Beckman-Coulter社のEPICS エリートを用いました。



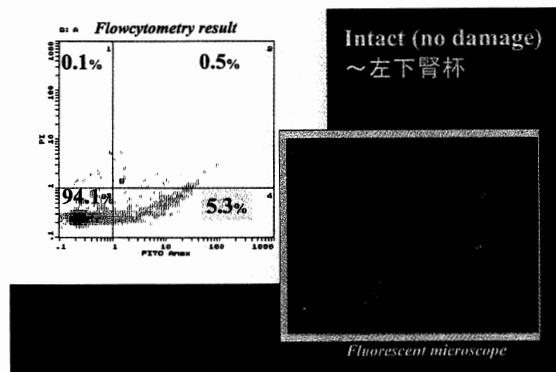
▲【スライド17】

結果の解釈について schemaを示しますが、細胞の傷

害がない場合(右上)、PSは細胞膜の内方に位置しているため、Annexinは結合しませんし、細胞膜構造が保たれているため propidium iododeも核内に到達せず、両者の染色は陰性となります。

これに対し早期アポトーシス細胞では(左)、リン脂質のうちPSのみが細胞膜外方に変位するため、Annexinが結合し、FITC標識されます。この細胞数をカウントすることにより、PS陽性細胞〜つまり早期アポトーシス細胞の相対数が判明します。

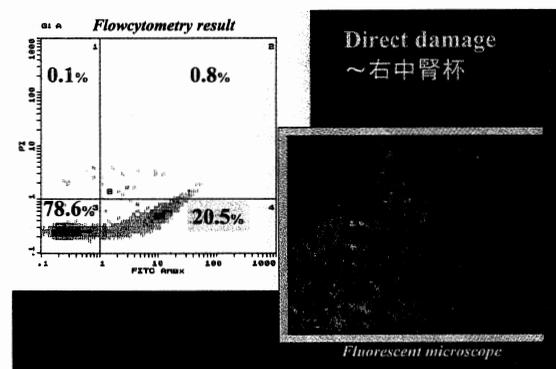
一方、完全に necrosis になった細胞では(右下)、細胞膜構造の崩壊により、Annexin、propidium iododeの両者が結合し、両者が染色されることとなります。



▲【スライド18】

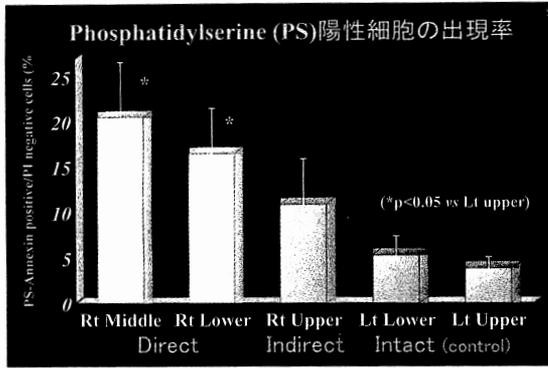
実際の flowcytometry の結果と対応する細胞の蛍光顕微鏡像を示します。

スライドは、衝撃波を当てなかった左下腎杯の細胞解析結果ですが、PS陽性細胞は、このarea(右下)でカウントされ、ここでは5.3%存在していました。



▲【スライド19】

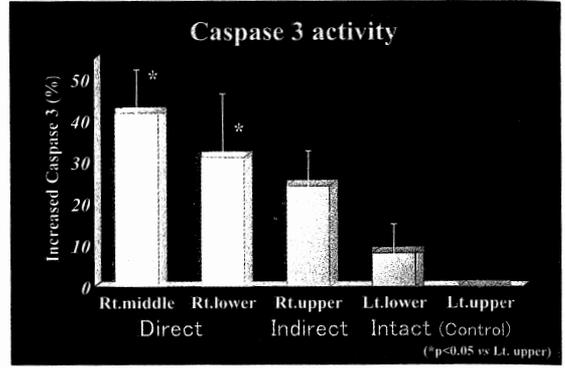
次に衝撃波を直接当てた右中腎杯の細胞解析結果を示しますが、PS陽性細胞は最も増加し、20.5%カウントされました。



▲【スライド20】

7頭の分析結果のまとめを示しますが、PS陽性細胞は、衝撃波が直接当たった右中・下腎杯での出現率が高く、衝撃波を当てていない腎に比し、有意に増加していました。

また、衝撃波が間接的に関与したと考えられる右上腎杯も有意差は認めませんでした。PS陽性細胞の増加傾向がありました。

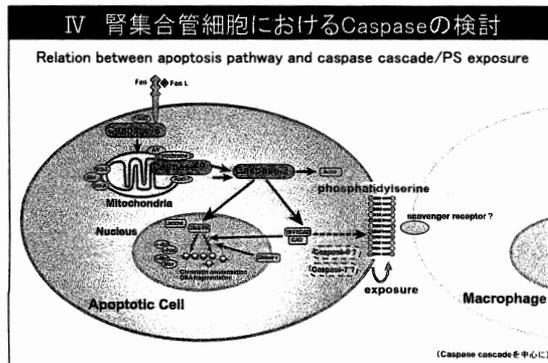


▲【スライド22】

カスパーゼ3活性の変化率を示しますが、衝撃波が直接当たった右中～下腎杯での増加率が高く、衝撃波を当てていない腎に比し、有意差を認めました。

衝撃波が間接的に関与したと考えられる右上腎杯も有意差は認めませんでした。約25%増加していました。

このことは、PSの検討結果とも一致し、カスパーゼカスケードにも何らかの影響があることが示唆されました。



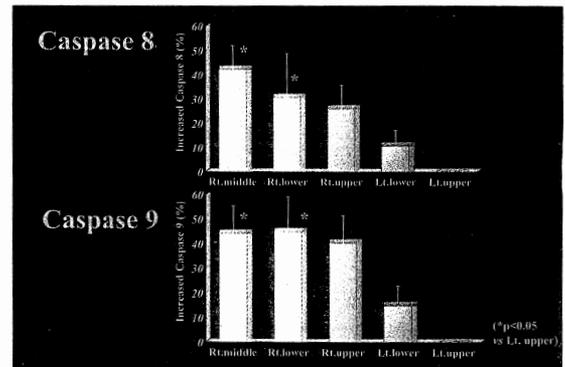
▲【スライド21】

次に細胞内カスパーゼ活性について検討しました。

細胞膜外方へのPS出現は、細胞のアポトーシス早期に見られますが、この変化には、細胞内アポトーシス情報伝達系が、重要な役割を担うと考えられています。

その中で私たちは、カスパーゼファミリーについてその活性を検討しました。スライドに、その関係を示しますが、PSの細胞外方への露出は最終的には、マクロファージに認識され貪食される方向に進めます。

PSの露出は、これらのカスパーゼの一部が制御していると考えられており、特に重要と考えられるカスパーゼ3,8,9について分析しました。



▲【スライド23】

カスパーゼ8,9活性も同様な変化を示しており、衝撃波が直接当たった右中・下腎杯での増加率が最も高く、衝撃波を当てていない腎杯と有意差を認めました。

まとめ

- 1 SWL実験モデルとして、ブタ腎に治療レベルの衝撃波を曝露したところ、腎集合管細胞の細胞膜リン脂質の構造変化(phosphatidylserineの露出)が確認された。
- 2 これらの反応を制御すると考えられる、apoptosis pathwayに重要な細胞内情報伝達系(caspase family)においても、その活性化が確認された。
- 3 これらの変化は、衝撃波を直接曝露した中～下腎杯のみならず、上腎杯においても観察された。

▲【スライド24】

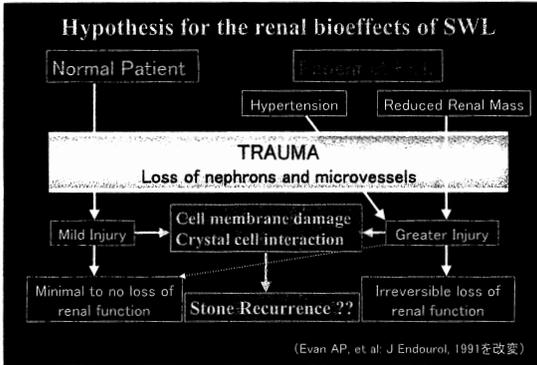
以上のまとめを示します。

- 1 ブタ腎に治療レベルの衝撃波を曝露したところ、腎

集合管細胞の細胞膜リン脂質の構造変化として、PSの露出が確認されました。

傷害が、薬剤等の手段で抑制することが可能か、などについて検討する余地が残されていると考えております。

- 2 これらの反応を制御すると考えられる、アポトーシス細胞内情報伝達系においても、その活性化が確認されました。
- 3 これらの変化は、衝撃波を直接曝露した中・下腎杯のみならず、上腎杯においても観察されました。



▲【スライド25】

この図は、衝撃波治療後の腎障害についてのEvanの図を改変したものです。

従来考えられていた、ネフロンや血管ダメージによる将来的な腎機能変化に加えて、その細胞傷害が、crystal-cell interactionに影響を与えて、結石再発の危険因子となる可能性を、本実験は示しているのではないかと考えられます。

結論と展望

- 1 SWLにより、腎盂側の細胞群も傷害され、特に細胞膜への微小傷害は、新たな結石形成の場となる危険性がある。
- 2 患者が有する危険因子(高尿酸尿など)が加わると、更に結石形成が促進されることが予想され、これらがSWL後の結石再発の増加に寄与する可能性がある。
- 3 将来的には、結石形成モデルの衝撃波曝露実験で結石再発を再現させることや、薬剤などで細胞傷害を抑制することが可能か、などについて検討する余地が残されている。

▲【スライド26】

最後に、結論と展望を示しますが、

- 1 衝撃波治療により、腎盂側の細胞群も傷害され、特に細胞膜への微小傷害は、新たな結石形成の場となる危険性があります。
- 2 患者が有する危険因子、例えば高尿酸尿など、が加わると、更に結石形成が促進されることが予想され、これらが衝撃波治療後の結石再発の増加に寄与する可能性があります。
- 3 将来的には、結石形成モデルでの衝撃波曝露実験で結石再発が再現されるか、一方、衝撃波による細胞