

AMCoR

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

日本尿路結石症学会誌 (2004.11) 3巻2号:79～83.

ブタにおける蓚酸カルシウム結石形成モデルの確立とその応用

山口 聡, 奥山光彦, 加藤祐司, 北 雅史, 金子茂男, 八竹直, 石原知佳

◆Session 4-1

ブタにおける蔘酸カルシウム結石形成モデルの 確立とその応用

旭川医科大学医学部泌尿器科

山口 聡、奥山 光彦、加藤 祐司、北 雅史
金子 茂男、八竹 直、石原 知佳



Dr. Yamaguchi

ブタにおける蔘酸カルシウム結石
形成モデルの確立とその応用

旭川医科大学泌尿器科

山口 聡、奥山光彦、加藤祐司
北 雅史、金子茂男、八竹 直、石原知佳

研究の背景

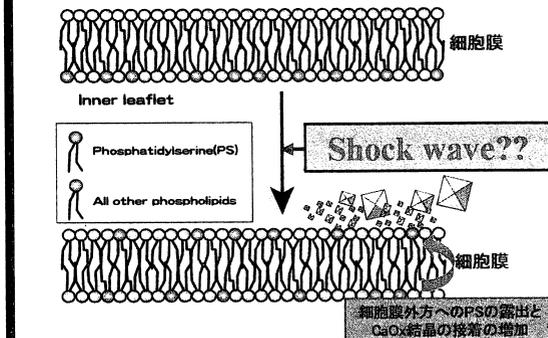
第13回日本尿路結石症学会(2003年)での報告

- 1 腎(ブタ)への衝撃波の曝露によって、腎集合管細胞の細胞膜リン脂質の構造変化などの細胞微小傷害が惹起された。
- 2 衝撃波による細胞膜への微小傷害は、crystal cell interactionの変化をもたらし、新たな結石形成の場となるかもしれない。
- 3 これに、高蔘酸尿などの危険因子が加わると、更に結石形成が促進されることも予想される。

▲【スライド1、2】

私たちは、昨年の本学会において、ブタ腎への衝撃波の曝露によって、腎集合管細胞に微小傷害が惹起され、それがcrystal cell interactionの変化をもたらし、新たな結石形成の場となる可能性があること、またそれに、高蔘酸尿などの危険因子が加わると、更に結石形成が促進される可能性を示唆いたしました。

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3】

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、phosphatidylserine は通常、内方にのみ存在しています。これまでの検討では、衝撃波により細胞膜の微小傷害が惹起されると、phosphatidylserine が外方に出現してくることが確認されました。すなわち、これが電氣的にシュウ酸カルシウム結晶を細胞に付着させ、ESWL後の結石再発に影響をもたらすのではないかと考えました。

研究の目的

これらを証明するために

- 1 衝撃波実験に適用可能な動物(ブタ)に対して、安定した高蔘酸尿モデル、または蔘酸カルシウム結石形成モデルを確立させる。
→Hydroxyproline負荷
- 2 そのモデルに対して衝撃波曝露実験を行い、結石形成が促進されるか否かを検討する。

▲【スライド4】

しかし、昨年のdiscussionでもありましたように、それを証明するためには、結石誘発実験による裏付けが必要でありましたが、これまで衝撃波実験に適用可能な

動物における尿酸カルシウム結石実験モデルは存在していませんでした。

そこで今回の研究では、1 ブタに対する、安定した高尿酸尿モデル、または尿酸カルシウム結石形成モデルを確立させること、2 そのモデルに対して衝撃波曝露実験を行い、結石形成が促進されるか否かを検討しました。

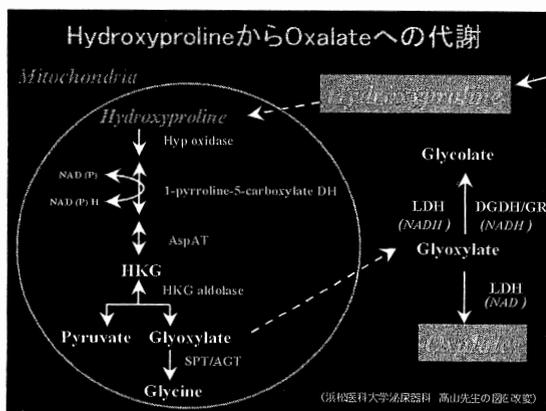
Hydroxyproline (Hyp)

- 1 Hypは、Collagenを構成するアミノ酸の13-21%、動物性蛋白質の3-6%と推定されている。
- 2 Hypは、肉食動物ではMitochondria内でGlycineに代謝される。Glyoxylateの一部が尿酸に変わる。
Ichiyama A. et al.: Mol Urol, 2000
- 3 ブタへの10-20% Hyp含有食(20日間投与)により高尿酸尿が誘発され、腎乳頭部に鍾乳石様の尿酸カルシウム結晶の沈着を認めた。
Mandel NS, et al.: J Urol, 2004

▲【スライド5】

今回、実験には、ヒトのモデルを意識し、より生理的な尿酸の前駆物質を求めた結果、Hydroxyprolineを利用することといたしました。

Hydroxyprolineは、肉食動物ではMitochondria内でGlycineに代謝されますが、Glyoxylateの一部が尿酸に変わると考えられています。Hydroxyprolineは、Collagenを構成するアミノ酸の13-21%であり、Collagenは動物性蛋白質の約30%を占めることから、理論的には動物性蛋白質の3-6%と推定されます。毒性はなく、ヒトにおいても食事中に十分含まれるものであり、外因性の高尿酸尿のモデルとなり得るのではないかと考えました。実際、Mandelらは今年、ブタへのHydroxyproline投与により高尿酸尿が誘発され、腎乳頭部に鍾乳石様の尿酸カルシウム結晶の沈着を認めたと報告しています。



▲【スライド6】

その代謝図を示しますが、HydroxyprolineはMitochondria内でGlyoxylateからGlycineに代謝される一

方で、余剰のGlyoxylateの一部が尿酸に変わると考えられています。本実験は、このpathwayを利用したものです。

主な食品中のHydroxyproline含有量の測定

牛ロース	0.073 %
牛カルビ	0.048 %
カレイ(魚)	0.044 %
トリ(もも肉)	0.041 %
イクラ	0.019 %
かに	0.017 %
中トロ(マグロ)	0.012 %
玉子焼き	0.003 %

Dimethylamino benzaldehyde method (Anal Biochem, 19, 1967)

▲【スライド7】

果たして、本当にそれほどの高濃度のHydroxyprolineが食事に含まれているのか、検証するために、私たちが普段口にすることが多い、動物性蛋白食品をいくつかピックアップし、Hydroxyprolineの含有量を調べてみました。結果は、最も多かった牛ロースにしても、0.07%と予想よりかなり低い結果でした。ただ全体的には、やはり筋肉や線維成分の多い食品での含有量が多いようです。

実験1: HydroxyprolineによるCaOx結石形成実験

- 1 SPFブタ(オス:18-20kg)飼育
- 2 24時間蓄尿(全期間):尿化学検査
- 3 採血、採尿、腎組織の検討(Day 42)

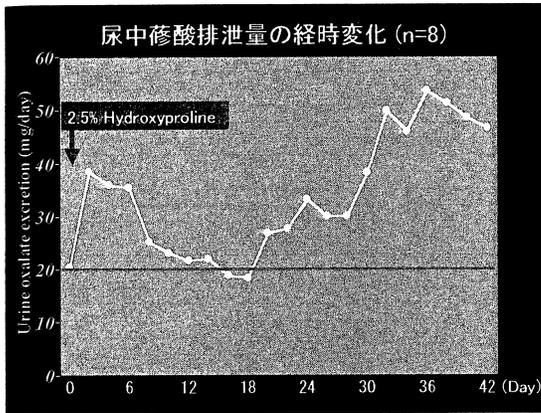
(専用代謝ケージ)

Control	Food: 750g + 2.5% Hyp	Food: 1000g + 2.5% Hyp
4 days	Water: 1500ml	Water: 2000ml
Day 1	Day 21	Day 42

(Hyp: Hydroxyproline)

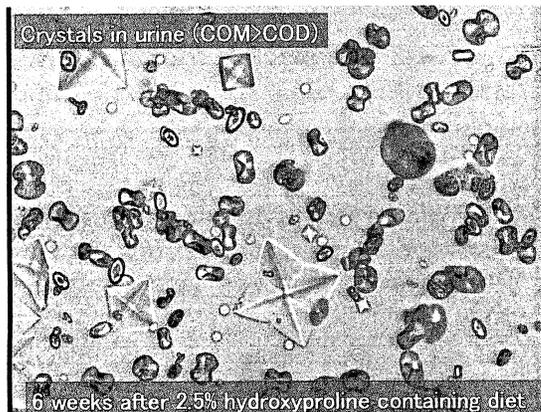
▲【スライド8】

さて、Hydroxyprolineによる結石形成実験の方法(実験1)にまいります。このような専用代謝ケージ内で、SPFブタを計6週間、飼育しました。コントロール期間を経た後に、ブタ通常食に2.5%hydroxyprolineを含有させた特殊食を、途中、成長にあわせて増量しつつ、1日750g-1000gを投与しました。その間、このように、全期間にわたり24時間蓄尿をおこない、6週後に、血液、尿、腎組織の検討を行いました。



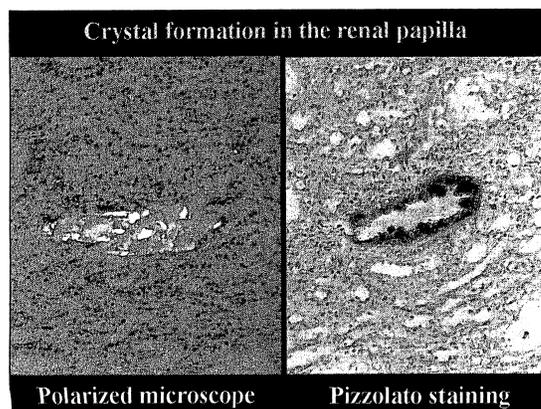
▲【スライド9】

結果を示します。まず尿中蓐酸排泄量の経時変化を示しますが、蓐酸は Hydroxyproline 投与直後に急上昇し、約2～3週後に一時、正常値付近まで下降、その後、再び上昇に転じ、6週後には約2.5倍の値となりました。



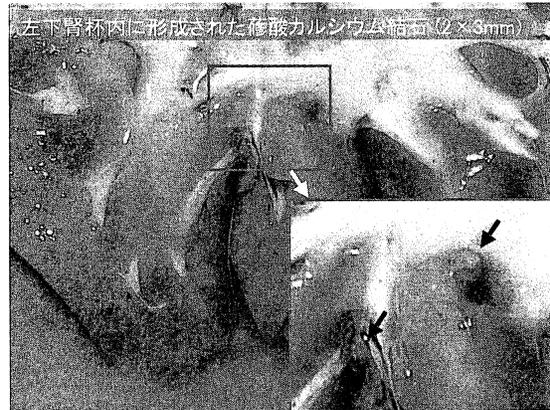
▲【スライド10】

尿中の結晶形成を示します。蓐酸カルシウム結晶は、蓐酸排泄量とほぼ一致して増減しましたが、ほぼ全期間を通じて、全てのブタに観察されました。スライドは、6週後の膀胱穿刺尿ですが、大小様々な結晶が観察され、その数はCOMが優位、CODは数は少ないものの所々大きな結晶が出現していました。



▲【スライド11】

腎の組織学的検討では、75%の腎に、腎乳頭部、集合管内に結晶形成が認められ、本結晶は Von Kossa 染色陰性、Pizzolato 染色陽性により、蓐酸カルシウム結晶と考えられました。



▲【スライド12】

1例2腎には、このように、下腎杯内に肉眼的に確認される2～3mmの小結石が形成され、赤外分析により、pure COMと確認されました。

実験1のまとめ

2.5% Hydroxyproline (6 weeks)

高蓐酸尿	8/8 (100%)
結晶尿 (COD, COM)	8/8 (100%)
腎内結晶沈着 (LM)	14/16 (75.0%)
腎結石形成 (COM)	2/16 (12.5%)

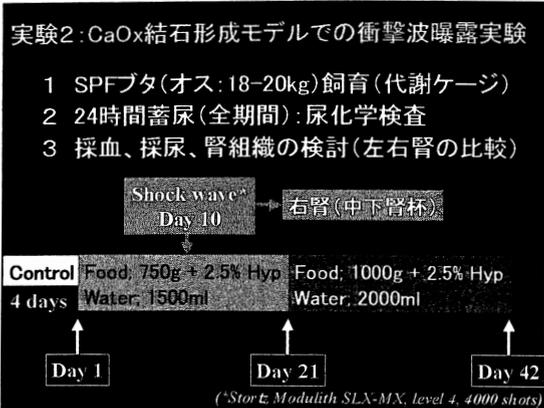
・実験期間中、尿中カルシウムが若干上昇した以外は、他の尿化学値の変化は認めなかった。

・ブタの発育状況は順調で、肝・腎機能障害などの合併症は認めなかった。

▲【スライド13】

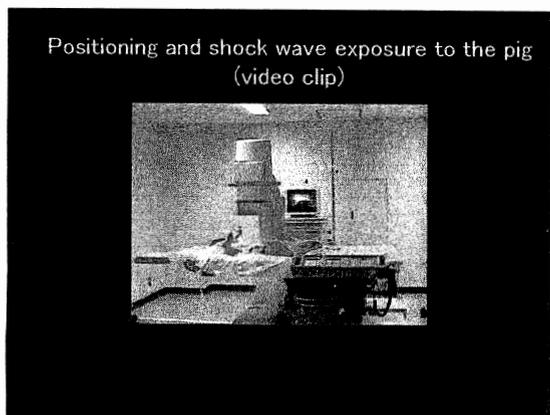
以上、本実験のまとめを示しますが、2.5% Hydroxyproline、6週の投与により、高蓐酸尿、蓐酸カルシウム結晶尿が、100%誘発されました。75%では、腎内に蓐酸カルシウム結晶沈着が認められ、12.5%には、肉眼的な腎結石が形成されました。他のデータとして、実験期間中は、尿中カルシウムが若干上昇した以外は、他の尿化学値の変化は認めず、ブタの健康状態はきわめて良好で、肝・腎機能障害などの合併症は一切認めませんでした。

この結果をもとに、次の実験を行いました。



▲【スライド14】

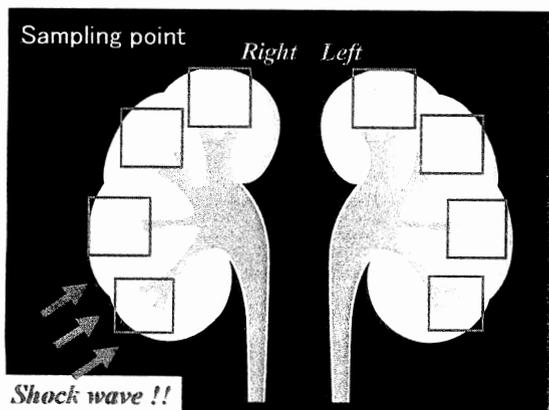
実験2として、2.5%Hydroxyproline 投与下に、一側腎への衝撃波曝露実験を行い、衝撃波により、結石形成が促進されないかどうかを検討いたしました。実験条件は、実験1と同様ですが、Hydroxyproline 投与後10日目に全身麻酔下、右腎中下腎杯に衝撃波を曝露しました。



▲【スライド15】

衝撃波実験のビデオクリップを供覧いたします(1分6秒)。

全身麻酔下、このようにヒトと同様に体位をとり、IVPにより尿路を確認した後、右腎の中下腎杯に衝撃波(level 4, 4000shots)を曝露しました。なおESWL装置は、Storz SLX-MXを使用しました。



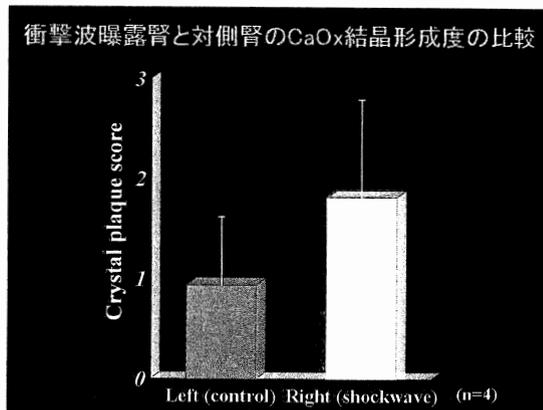
▲【スライド16】

その後、再び同様な条件でブタを飼育し、通算6週後に両側腎を摘出しました。腎の検討部位を示しますが、赤のareaで示す中下腎杯を中心に、衝撃波曝露腎と非曝露腎の比較検討を行いました。



▲【スライド17】

腎の病理学的所見を示しますが、衝撃波を曝露した腎においても、実験1と同様に腎集合管内に、尿酸カルシウム結晶形成が認められました。肉眼的な結石形成は、確認されませんでした。



▲【スライド18】

集合管内の尿酸カルシウム結晶形成度合をスコア化し、衝撃波曝露腎と対側腎の比較を行いました。結果は、まだ例数が少なく、有意差を得るまでには至っていませんが、衝撃波曝露腎では、非曝露腎に比し、腎内の尿酸カルシウム結晶形成が増加する傾向を認めました。

実験2のまとめ

- 1 高尿酸尿かつCaOx結晶尿が出現している状態で、右腎に治療レベルの衝撃波を曝露した。
- 2 実験後のブタの全身状態は良好であり、衝撃波曝露後(32日後)の腎障害は認められなかった。
- 3 衝撃波曝露腎には、肉眼的な結石形成は確認されなかったものの、非曝露腎に比し、腎集合管内のCaOx結晶沈着が増加する傾向を認めた。

▲【スライド19】

実験2のまとめを示します。

高尿酸尿かつ尿酸カルシウム結晶尿が出現している状態で、右腎に治療レベルの衝撃波を曝露したところ、腎集合管内の尿酸カルシウム結晶沈着が増加する傾向を認めました。

衝撃波曝露後のブタの全身状態には問題なく、衝撃波による副作用は認められませんでした。

結論

- 1 Hyp投与により、ブタにおいて安定した高尿酸尿やCaOx結晶尿を誘発することができた。
- 2 本実験系において、腎に衝撃波を作用させると、結石形成が促進される可能性が示された。
- 3 本実験系は、ヒトにおけるCaOx結石の発生機序や再発予防を検討する上で、有用な実験モデルとなりうる。
- 4 今後は、確実にCaOx結石を形成させる条件設定が必要である。

▲【スライド20】

結論と今後の展望ですが、Hydroxyproline投与により、ブタにおいて安定した高尿酸尿や尿酸カルシウム結晶尿を誘発することができました。本実験系において、腎に衝撃波を作用させると、結石形成が促進される可能性が示されました。本実験系は、ヒトにおける尿酸カルシウム結石の発生機序や再発予防を検討する上で、有用な実験モデルとなりうると考えられますが、今後は、より確実に尿酸カルシウム結石を形成させる条件設定が必要であると思われます。