

アミノヌクレオシドネフローゼにおける糸球体 adenosine deaminase の関与

遠藤 仁, 高橋 剛, 細山田 真

東京大学医学部薬理学教室

1. 序 言

ヒトの微小変化型ネフローゼ症候群の動物モデルとして、ラットにPuromycin aminonucleoside (PAN) を投与して作成するネフローゼが30年以上前から腎臓学で繁用されているが、その発症機序は未だ解明されていない。この疾患モデル動物における腎の変化を検索し、その病態の阻止する方法ないし発症後の治療を可能にする方策を追求することは、本研究班の任務である腎炎の治療法の開発に寄与するものと考えた。

昨年度において私共はPANネフローゼの発症において、活性酸素の発生を伴う代謝であるプリン代謝の中でのXanthine oxidase

(XOD)の活性が糸球体で特異的に、有意に上昇することを明らかにした。¹⁾ 同時に測定した活性酸素の処理酵素であるSuperoxide dismutase (SOD)は変化を示さなかったことより、このPANネフローゼの発症に活性酸素の関与が考えられることが示唆された。その上、PANネフローゼはラットやサル、ヒトにネフローゼを発症せしめるものの、モルモットやマウスには発症しないことも既に知られている事実である。

従って本年度はPANネフローゼにおけるプリン代謝(図1)の中のadenosine deaminase (ADA)の活性変動を中心に実験を行った。

2. 対象・方法

動物の処置：雄性SD系ラット(150～180g)を用い、これを2群に分けた。一群にはPANを80mg/Kg 1回皮下注射し、ネフ

ロゼを発症させた。他群は対照として生理食塩水を投与した。各群ラットは尿採取のためmetabolic cageで飼育した。

ネフロン単離：Collagenase処理による既報の方法²⁾により行った。

ADA活性の測定：正常対照並びにPAN処置各ラット腎より単離したネフロンセグメントを1% Triton X-100で可溶化し、adenosineを基質として37℃30分間反応させた。ADAにより遊出されるアンモニアの産生量により酵素活性を測定した。アンモニアの微量定量法は既に本研究者らにより開発された方法³⁾によった。その概要は、アンモニアを含む試料に α -ketoglutarate, NADH, glutamic dehydrogenaseを加えてアンモニアと等モルのNADを産生させ、その微量のNADをNAD/NADH系の酵素的サイクリング法により増巾されたmalateの量をNADHの蛍光量として定量した。この方法により糸球体1個に含まれるADA活性を測定することが可能となった。

尿タンパク量の測定：尿中タンパク量は尿を10% trichloroacetic acidで沈澱させ、Lowry法により定量した。

組織タンパク含量の測定：単離ネフロンの各セグメントに含まれるタンパクはマイクロキュベットを用いたLowry法のマイクロ化によった。⁴⁾

データの検定：全ての結果は平均±標準誤差で現した。又、二群間の有意差はunpairedのStudentのt検定を用いた。

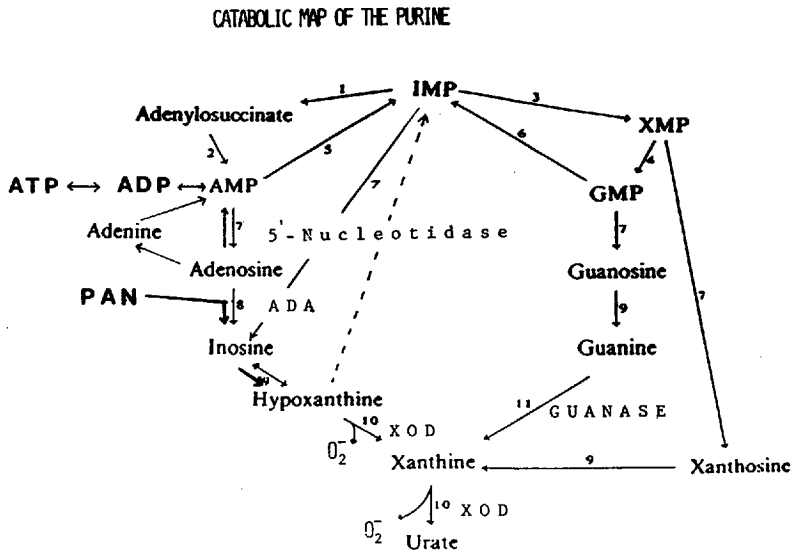


図1. プリンの分解経路並びに関連代謝図. PANはadensine と共にADA (adenosine deaminase)により分解を受け, inosine類似物質を介してhypoxanthine へと代謝される。

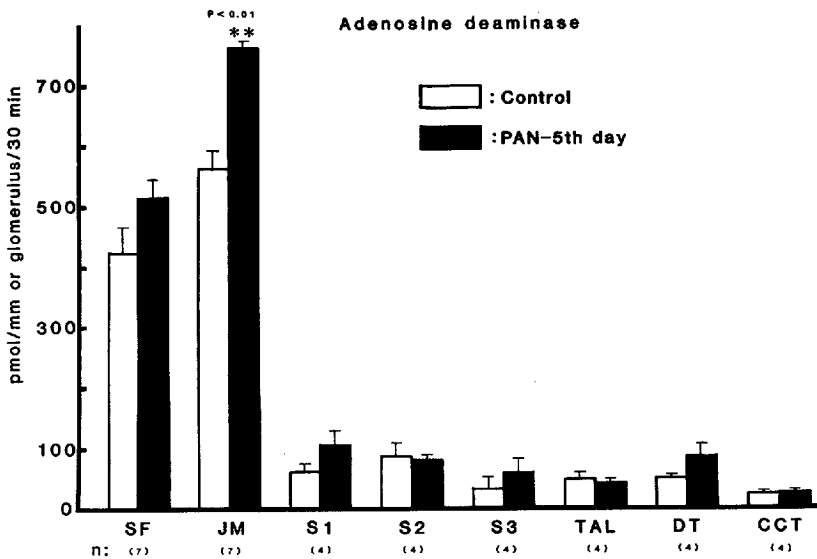


図2. ラットネフロン内adenosine deaminase 活性の分布とPuromycin aminonucleoside (PAN)による活性変化。横軸のネフロン名の略語は本文を参照されたい。

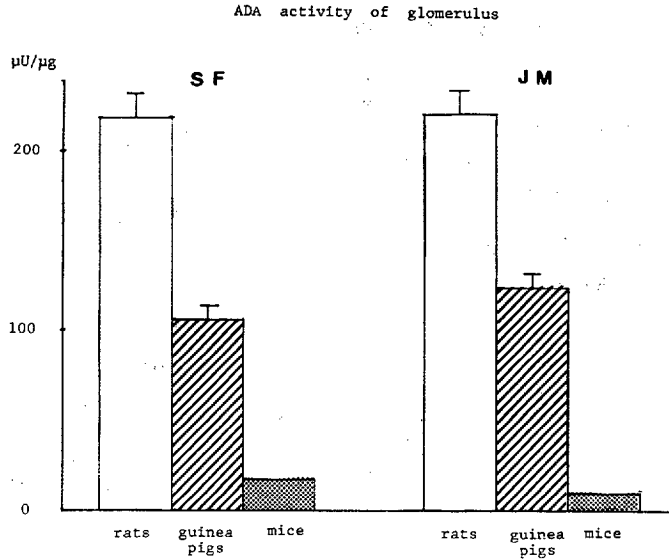


図3. 糸球体内adenosine deaminase 活性の三種動物間の比較。各動物の糸球体含有組織タンパク量が異なるので、酵素活性は単位組織タンパク当りに換算して示した。

3. 成績

(1) 正常対照ラットネフロン内ADA活性の分布

図2の白抜きカラムで示すように、糸球体1個ないし尿細管1mm当りのADA活性は糸球体で最も高く、尿細管の各セグメントでは低値であった。糸球体を皮質表層(Superficial; SF)と傍髄質(juxtamedullary; JM)に分けて採取すると、後者の方が若干、活性値が高かった。これはJMの方がSFよりも組織タンパクが高いことに由来するものであった。

(2) PAN 投与によるADA活性の影響

PAN 投与5日目のラット腎からネフロンを単離して各セグメントに含まれるADA活性を測定した。この5日目は全ての処置動物が著明に高い尿中タンパクの排泄を示した。ADA活性は糸球体で上昇したが、特にJMでは有意の上昇であり、SFを含めてその他のセグメントでは有意の差が認められなかった。

(3) 糸球体内ADA活性の種差

既に述べたようにPANネフローゼは通常の実験動物ではラットに特異的に発症するので、三種の哺乳動物の糸球体内ADA活性を比較した。図3に見られるように、単位タンパク当りの酵素活性はラットで最大で、モルモット、マウスは有意の低値を示した。三種動物共にこのシリーズの実験ではSFとJMでの差異は認められなかった。

4. 考察

昨年度明らかにしたラットネフロン内XOD及びSODの活性分布とPAN投与による変動の結果は、このPANによるネフローゼモデルにおいて活性酸素の関与を強く示唆するものであった。この結果を受けて本年度は図1のadenosineからPAN共に代謝を受けるADAの活性測定を行った。まず第一に、ADAが糸球体に高く分布していることはこの研究で

始めて明らかにされたばかりではなく、従来のネフロン内酵素の分布で、糸球体に特異的に高い活性を示す酵素としては特記すべき新しい知見である。即ちADAは糸球体特異マーカー酵素としても将来的に有用であることを示すものである。

第二には、PANによってJMのADAが有意に上昇したことは、PANネフローゼによる糸球体組織変化がSFよりもJMに特異的であるという形態学的観察と良く一致する点が重要である。昨年度のXODの変化もJMに特異的であったので、PANによる腎内変化がJMに初期に生ずることは形態、代謝の両面から確認されたと云っても良い。

第三に、PANネフローゼが何故にラットに強く生ずるかの説明として、ADA活性がラット糸球体で高値であるという結果(図3)により可能となった。即ち、図1の代謝図が示すように、ラットに投与されたPANはADAで分解を受けinosine類似物質を経由してhydroxanthineに代謝され、XODによって活性酸素を生じせしめるという考え方が成り立つ。しかしadenosineの大量投与がPANと同じネフローゼを生じさせないことより、その機序は単純ではない。多分PANの代謝物質が図1の点線で示される経路、即ちhypoxanthineからIMPへの回路を抑制するものと考えられ、この点は今後の課題である。

考察の第四点はADAの抑制薬によるタンパク尿の低下作用である。PANラットをADA拮抗薬のdipyridamoleで治療すると尿中タンパクは有意に低下した。⁵⁾この事実はADAの高い活性(糸球体での)がPANの分解を促進してネフローゼを発症させるが、このADA活性を抑制することにより糸球体の性状をラット型(高い活性)からモルモットないしまウス型(低い活性)に一時的に変換させて、ネフローゼ発症を軽減させるという推定が成り立つ。

最後に、糸球体基底膜近傍の陰性荷電によ

る高分子物質の透過性を調節していると思われるシアール酸を含んだPodocalyxin⁶⁾を定量すると、PANによるネフローゼの発症と平行してその糸球体内含量が低下すること、並びにその低下がJMに特徴的に顕著に認められること、などの知見を本研究者らが最近認めた。即ち、PANによる代謝の変化から糸球体におけるタンパク透過の亢進に至る一連の流れがJM糸球体を中心に生じていることを示し得たと思われる。

5. 結 論

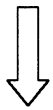
Puromycin aminonucleosideネフローゼの発症に活性酸素が関与する。ラットにこのネフローゼが発症することは、糸球体でのadenosine deaminase活性の高値がその原因の一つと考えられる。

6. 参考文献

- 1) Endou H., Koseki C., Yamada H., Obara T.: Evaluation of nephrotoxicity using isolated nephron segments, in *Nephrotoxicity of Antibiotics and Immunosuppressants*, edited by Tanabe T., Hook J.B. and Endou, H., Elsevier p.207-216, 1986.
- 2) Endou H.: Cytochrome P-450 monooxygenase system in the rabbit kidney: its intranephron localization and its induction. *Japan.J.Pharmacol.* 33:423-433, 1983.
- 3) Nonoguchi H., Uchida S., Shiigai T., Endou H.: Effect of chronic metabolic acidosis on ammonia production from L-glutamine in microdissected rat nephron segments. *Pflügers Arch.* 403: 229-235, 1985.
- 4) Shimada H., Endou H., Sakai F.: Distribution of gamma-glutamyl transpeptidase and glutaminase isoenzymes in the rabbit single nephron. *Japan.J.Pharmacol.* 32:121-129, 1982.
- 5) Kimura K., Endou H., Sakai F.: Suppressive effect of dipyridamole on the proteinuria of aminonucleoside nephrosis in rat. *J.Toxicol. Sci.* 4:1-10, 1978.
- 6) Kerjaschki D., Sharkey D.I., Farquhar M.G.: Identification and characterization of podocalyxin - the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell. *J. Cell Biol.* 98: 1591-1596, 1984.



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用
論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



5, 結論

Puromycin aminonucleoside ネフローゼの発症に活性酸素が関与する。ラットにこのネフローゼが発症することは、糸球体での adenosine deaminase 活性の高値がその原因の一つと考えられる。