

実験ネフローゼの薬物による予防と治療

小児慢性腎炎の治療法の開発に関する研究 小児慢性腎炎の薬物療法の開発に関する研究

遠藤 仁*、高橋 剛、角野 勝彦、細山田 真

モデル動物として雄性ラットを、実験ネフローゼの作成には puromycin aminonucleoside (PAN) を用いた。プリン代謝の4酵素と活性酸素消去酵素の単離ネフロン内分布を測定すると、ネフローゼにおいてはプリンの代謝が亢進していた。Adenosine deaminase 活性は糸球体に最大の活性を有し、この酵素の抑制薬 deoxy coformycin は PAN ネフローゼの発症を完全に抑制した。その上、発症後の治療効果も従来の尿蛋白低下作用を示す薬物よりも強力であった。

実験ネフローゼ、プリン代謝、アデノシンデアミナーゼ抑制薬

研究方法

(1) 動物及び処置

雄性SDラット(150-180g)を用い、ネフローゼの発症には Puromycin amino-nucleoside (PAN) を100mg/kg 1回皮下注射を行い、対照には生理食塩水を投与した。予防及び治療の目的とした薬物は腹腔内注射した。各ラットは尿採取のため metabolic cage で飼育した。

(2) ネフロンの単離

断頭したラットの左腎を in situ で、氷冷した0.1% Collagenase, 0.1%牛血清アルブミンを含むHanks緩衝液で灌流した。腎を摘出してスライスを作製し、同緩衝液で、37度、30分反応させた。洗浄したスライスを用いて、実体顕微鏡下に以下のセグメントを単離した¹⁾。すなわち、糸球体(G1m)、近位尿細管起始部(S1)、同中間部(S2)、同終末部(S3)、皮質部太ヘンレの上行脚(TAL)、接合および遠位尿細管(DT)、皮質部集合管(CCT)である。さらに糸球体に関しては皮質表層部(SF)と傍髄質部(JM)に分けた。

(3) ネフロンセグメントの電気泳動

各ネフロンセグメントを1% triton X-100

で可溶化し、10 μ l capillary tube 内に作製した4~40%連続濃度勾配ポリアクリルアミドゲルの一端にのせ、100Vで30分間電気泳動した²⁾。

(4) 酵素活性の測定

capillary tube より取り出したゲルを phenazine methosulfate, nitroblue tetrazolium, hypoxanthine を含むリン酸緩衝液内で37度、60分間反応させ、ゲル内の xanthine oxidase (XOD) の分子に一致した band の densitogram の面積からネフロンセグメントのXOD活性を算出した³⁾。

ゲルを暗室内で5分間 tetramethyl-ethyl-diamine, nitroblue tetrazolium, riboflavin を含むリン酸緩衝液内で反応させた後、4000 lux の照明下に室温で60分間さらに反応を行った。ゲルは全体が濃青色に染まったが、SODを含む部分だけは染色されずに透明に残った。このゲルをXODと同様に densitogram を作製して、SODの酵素活性を定量した⁴⁾。

Adenosine deaminase (ADA) と 5'-nucleotidase (5'-NT) 活性は、adenosine 及び AMP をそれぞれ基質として、産生された NH₄ を NAD に変換させた後、酵素的サイク

* 東京大学医学部薬理学教室

Distribution of purine-catabolizing enzymes

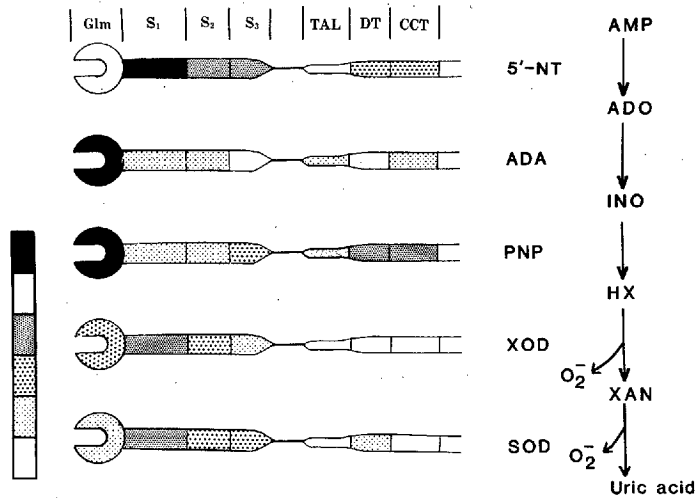


図1. プリン代謝関連酵素のラットネフロン内局在。最上段のネフロンの模式図の上に示したネフロン部位の略称は本文の研究方法を参照。その他の略語：5'-NT；5-nucleotidase, ADA；adenosine deaminase, PNP；purine nucleoside phosphorylase, XOD；xanthine oxidase, SOD；superoxide dismutase, AMP；adenosine-5'-monophosphate, ADO；adenosine, HX；hypoxanthine, XAN；xanthine, 本図は既発表⁴⁾及び未発表(投稿準備中)の結果を合成したものである。

リング法で増巾後、蛍光量で測定した⁵⁾。

Purine nucleoside phosphorylase (PNP) は ¹⁴C-inosine を基質として産生された hypoxanthine を高速液体クロマトにより分離し、放射活性から PNP 活性を算出した。

(5) 尿タンパク及び組織タンパク含量の測定

尿中タンパク量は TCA-Lowry 法によりネフロンセグメントのタンパク量は Lowry の方法を改良して定量した⁶⁾。

結 果

(1) ラット単離ネフロン内プリン代謝酵素及び SOD の活性分布

プリン代謝に与る 4 酵素と SOD 活性の正常ラット単一ネフロン内分布を図 1 に示す。

5'-NT は S₁ に、ADA 及び PNP は Gln に、そして XOD と SOD は S₁ にそれぞれ最大活性を有し、図には示していないけれども PAN ネフローゼの発生初期には Gln の ADA が有意に活性上昇を示した⁷⁾。PAN は adenosine 類似構造を有しているため、この薬物の投与により ADA が活性化されて、その代謝が亢進することが予測される。

各酵素の基質濃度に対する K_m 値は、5'-NT で 370 μM、ADA で 88、XOD で 21 と低下して親和性が増大する。即ち、PAN がこの代謝系に入ることにより、尿酸まで代謝されるものと考えられる。

(2) ADA 抑制薬による実験ネフローゼの予防
PAN 投与 6 時間前に ADA 抑制薬の

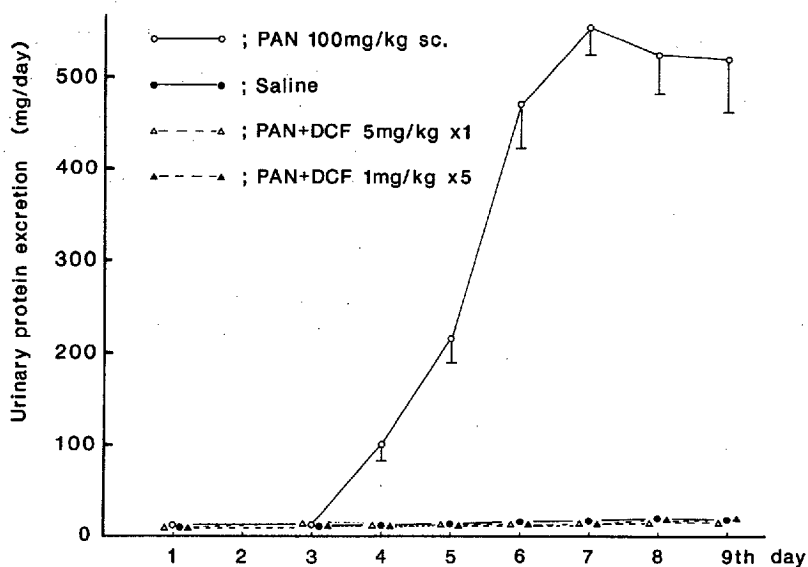


図2. ADA 抑制薬、deoxycoformycin(DCF)のPANネフローゼの発症予防効果。PANはday 0で投与し、DCFはPAN投与6時間前に腹腔内に投与した。DCF 1mg/kgの群には初回投与後終日的に5回連日投与した。

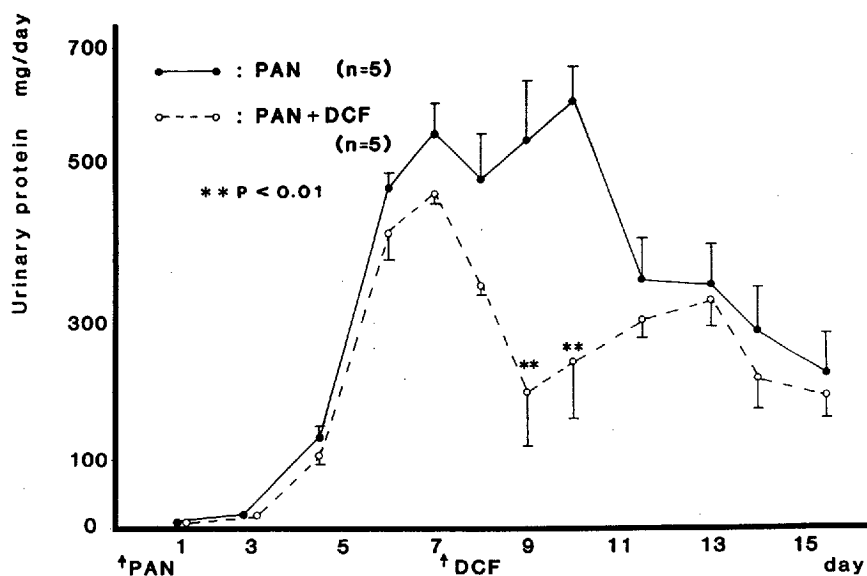


図3. ADA 抑制薬、deoxycoformycinのPANネフローゼの治療効果。PAN投与後7日目にDCFを5mg/kg一回、腹腔内に投与した。

deoxycoformycin (DCF) を5mg/kg、1回腹腔投与すると、図2に示すように、ネフローゼの発症は完全に阻止された。DCFは現時点での報告では最も強力なADA抑制薬であり、ADAとの結合が長時間継続する高い特異性を有していることから、PANのネフローゼ発症にADAが深くかかわっていることを示す結果と考えられる。

(3) ADA抑制薬による実験ネフローゼの治療
PAN単回投与後、3～4日以降に尿中タンパクは著明に増加する。この高蛋白尿の程度が最大値に達したPAN投与後7日目にDCFを5mg/kg一回腹腔内に投与した結果を図3に示す。PANによる強い尿中蛋白排泄はDCFにより2日間にわたり有意に減少した。其の後徐々に再上昇して、PAN単独群とほぼ同様の経過をたどった。図中には示していないが、DCFを1mg/kg/dayを5日間連続に投与すると、この尿中蛋白排泄抑制が更に長期間持続した。即ち、DCFがADAを抑制することがPANネフローゼの治療にもつながり、この治療実験においてもPANネフローゼとADAの強い関連性が示唆された。

考 察

実験ネフローゼのモデルとしてPANが簡単に確実な方法として腎臓病学の領域に導入されてから30年以上も経過している。しかしその発症機序は未だ解明されずにおり、一つのこのPANモデルの予防、治療の方策も当然のことながら確立されていない。従って、このPANモデルよりも複雑で、多彩な発症機序を有していると推定されるヒトの腎炎の治療方法が定まっていないのも現時点では当然の帰結と言わねばならない。

過去3年間の本研究班において展開した我々の成果は、初年度は活性酸素の産生、消去に関与するXOD、SODのラットネフロン内分布と、PANによる影響であった。昨年度はプリン代謝酵素を更に広げて、5'-NT

とADAを加え、ADAがネフロン内では糸球体に最も高く、PAN処置により活性の増大があることを初めて見出した。その上、糸球体の蛋白透過性の調節に与る基底膜周辺の陰性荷電の発現がpodocalyxinを主体としていること、PANによりこの膜糖蛋白であるpodocalyxinが尿中蛋白量と逆相関を示し、減弱することを報告した⁸⁾

最終年度は、プリン代謝系の中でもPANの代謝と深くかかわり合っており、ネフローゼの発症に関与するものと想定されたADAを抑制する薬物の検討を行い、DCFによってPANネフローゼを完全に予防でき(図2)、しかも治療効果のあること(図3)を新たな知見として示すことができた。

以前に我々が報告したPANネフローゼの蛋白尿をdipyridamoleが抑制すること⁹⁾又最近の報告にみられるallopurinolやSODがPANネフローゼの尿中蛋白を部分的に抑制するという報告¹⁰⁾等は恐らく図1に示されたプリン代謝系の異常をPAN投与により生じさせられたとの考え方から説明できるものである。

ヒトの腎炎の発症とPANモデルとの関連性の解明と新しい腎炎治療薬の確立が今後の課題である。

文 献

- 1) Endou, H. Japan. J. Pharmacol., 33:423(1982)
- 2) Endou, H. et al.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 356:1381(1975)
- 3) Endou, H. et al.: Jap. J. Exp. Med., 48:297(1978)
- 4) Endou, H. et al.: Molecular Nephrology., 347(1987)
- 5) Nonoguchi, H. et al.: Pfluegers Arch., 403:229(1985)
- 6) Shimada, H. et al.: Japan. J. Pharmacol., 32:131(1982)
- 7) Endou, H. et al.: In: Nephrotoxicity of Antibiotics and Immunosuppressants. p207(1986)
- 8) Hosoyamada, M. et al.: Xth Int. Cong. Nephrol., 502(1987)
- 9) Kimura, K. et al.: J. Toxicol. Sci., 4:1(1987)
- 10) Diamond, J. R. et al.: Kidney Int., 29:478(1986)



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



モデル動物として雄性ラットを、実験ネフローゼの作成には puromycin aminonucleoside (PAN) を用いた。プリン代謝の4酵素と活性酸素消去酵素の単離ネフロン内分布を測定すると、ネフローゼにおいてはプリンの代謝が亢進していた。Adenosine deaminase 活性は糸球体に最大の活性を有し、この酵素の抑制薬 deoxy coformycin は PAN ネフローゼの発症を完全に抑制した。その上、発症後の治療効果も従来の尿蛋白低下作用を示す薬物よりも強力であった。