

# 温阻血およびサイクロスポリン A によるラット障害腎に対する 心房性ナトリウム利尿ペプチド投与による影響

奈良県立医科大学泌尿器科学教室

坂 宗 久

## EFFECT OF RECOMBINANT ATRIAL NATRIURETIC PEPTIDE (R-ANP) ON WARM ISCHEMIC AND CYCLOSPORINE A-INDUCED KIDNEY DAMAGE IN RATS

TOSHIHISA SAKA

Department of Urology Nara Medical University

Received November 30, 1995.

**Abstract:** The nephrotoxicity of Cyclosporine A (CYA) is a serious problem, and constitutes the major obstacle limiting the use of CYA as an immunosuppressive agent for renal transplantation. On the other hand, the newly described atrial natriuretic peptide (ANP) hormonal system in both humans and animals appears to play an important role in sodium and water excretion.

In study 1, the effect of recombinant-ANP (r-ANP) on warm ischemic (WI) damaged kidney was examined in six experimental groups.

In study 2, the effects of r-ANP on kidneys damaged by WI followed by CYA administration, which is a similar condition in renal transplantation, were examined in four experimental groups.

Consequently, the efficiency of r-ANP on renal function which was damaged by CYA and WI was shown to be verifiable.

### Index Terms

rat, warm ischemia, cyclosporine A, recombinant-atrial natriuretic peptide

### 結 言

腎移植後に伴う腎障害は比較的良好にみられ、腎移植前における持続した低血圧状態、長時間に渡る温阻血時間、また腎移植後の動脈吻合部位の狭窄および Acute tubular necrosis (ATN) などが腎障害因子としてあげられるが、特に腎移植初期においては急性拒絶反応および強力な免疫抑制剤サイクロスポリン A (以下 CYA と略す) の腎毒性の影響が複雑に関わりあい、さらに急性拒絶反応と CYA による腎障害が同時に合併する症例も認められる場合もあり、薬剤の腎毒性と拒絶反応の鑑別が困難である場合がしばしばみられる。これらの腎移植に伴

う腎障害発生の最も影響の大きい因子は温阻血時間および CYA の腎障害であり、腎移植時には温阻血時間の短縮、免疫抑制剤を多剤併用することにより CYA 投与量を出来る限り減量する試みがなされており、現在では 3 剤あるいは 4 剤の併用が一般的で、CYA による腎障害が軽減されている。

一方、心房性 Na 利尿ペプチド (Atrial natriuretic peptides: 以下 ANP と略す) は最近その一時構造が解明され<sup>1)~3)</sup>、強力な Na 利尿作用はもとより種々の内分泌作用が報告されており<sup>4)~7)</sup>、腎に対しては腎機能改善作用等が認められ、障害腎に対しその有用性が期待されている。

今回、著者は腎移植時の温阻血による移植後早期の腎障害に対する、ANP 投与による腎障害改善作用を検討するために、ラットを用いて腎を温阻血することにより腎障害モデルを作成し、温阻血の腎機能に対する影響を検討した。さらに、recombinant ANP(r-ANP)を温阻血直前単回投与し、腎障害に対する腎機能改善効果を血液生化学的、腎組織生化学的並びに病理組織的に検討した。また、温阻血後 CYA 投与による移植後長期の腎障害に対する ANP の影響を検討するために、ラット腎を温阻血処置した後、CYA を 14 日間投与することにより腎障害モデルを作成し、温阻血および CYA が腎機能に対する影響をそれぞれ検討した。さらに、r-ANP を CYA と同時に投与して腎障害に対する効果を、血液生化学的並びに病理組織学的にも検討し、腎障害モデルにおける腎障害に対する r-ANP の腎機能改善剤としての有用性を検討した。

実験材料および方法

I. 実験動物：12 週齢で体重 200-300 g の Fischer 系雄性ラット(オリエンタル・バイオ・サービス, 京都)を用い、動物舎に搬入後実験開始までに約 1 週間 air-condition room にて 22°C で飼育した後使用した。

飼料は CHF-1(オリエンタル・バイオ・サービス, 京都)で、飲料水は水道水を自由に摂取させた。

CYA はサンデミュン® (サンド薬品株式会社, 東京),

ANP は recombinant ANP(Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. USA)をそれぞれ使用した。

II. 温阻血の方法：温阻血の方法は、ペントバルビタール(5 mg/100 g)腹腔内注入による全身麻酔下で、腹部正中切開により経腹的に左腎動脈を遊離し、ミニクリップにて 45 分間動脈を遮断し温阻血とし、左腎温阻血解放後直ちに右腎を摘出した。Sham-operation としては同様に経腹的に左腎動脈を遊離し、左腎動脈血流は遮断せずに右腎を摘出した。

III. 実験方法：以下のごとく 2 つの実験を行い、実験 I では 6 実験群、実験 2 では 4 実験群で比較検討した。

実験 1：腎の温阻血による腎機能障害に対する r-ANP の検討(Fig. 1)

Group 1：ラット 8 匹を用い、全身麻酔下に経腹的に左腎に対し Sham-operation を、右腎に対し摘除術を施行、3 日後に同様に全身麻酔下に左腎機能を測定した。

Group 2：ラット 8 匹を用い、Group 1 と同様に全麻下に左腎動脈を剥離し、ミニクリップにて温阻血 45 分間クランプし、クランプ解放後右腎を摘除、3 日後に左腎機能を測定した。

Group 3：ラット 8 匹を用い、Group 2 と同様に温阻血を施行するが温阻血直前に r-ANP(20 μg/kg)を投与した。

Group 4：ラット 8 匹を用い、Group 1 と同様の処置を施行し、7 日後に左腎機能を測定した。

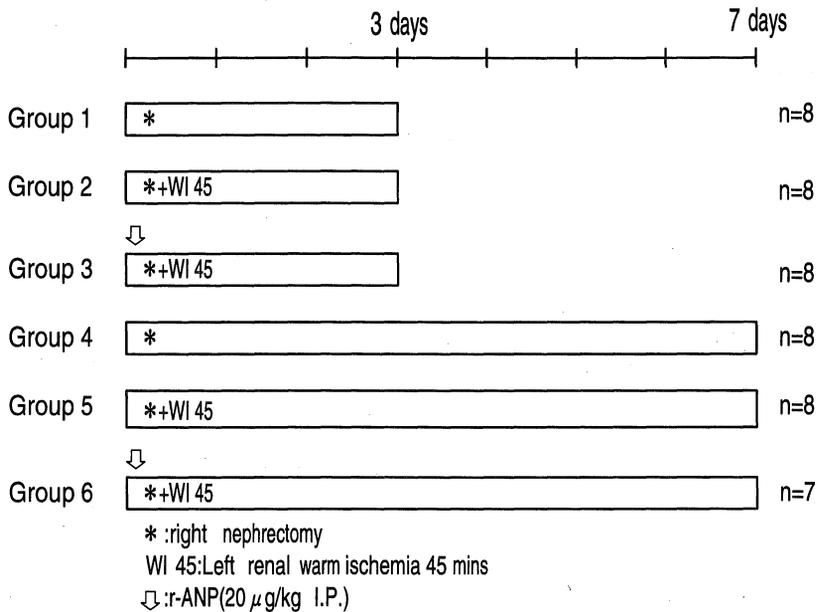


Fig. 1. Experimental design of experiment 1.

Group 5: ラット 8 匹を用い, Group 2 と同様の処置を  
施行し, 7 日後に左腎機能を測定した.

Group 6: ラット 8 匹を用い, Group 3 と同様の処置を  
施行し, 7 日後に左腎機能を測定した.

実験 2: 腎の温阻血後に CYA 投与による腎障害に対  
する r-ANP の検討 (Fig. 2)

Group 1: ラット 8 匹を用い, 全身麻酔下に経腹的に左

腎に対し Sham-operation を, 右腎に対し摘除術を施  
行, 14 日後に同様に全身麻酔下に左腎機能を測定した.

Group 2: ラット 8 匹を用い, Group 1 と同様に全麻下  
に左腎動脈を剥離し, ミニクリップにて温阻血 45 分間ク  
ランプし, クランプ解放後右腎を摘除, 14 日後に左腎機  
能を測定した.

Group 3: ラット 8 匹を用い, Group 2 と同様な処置を

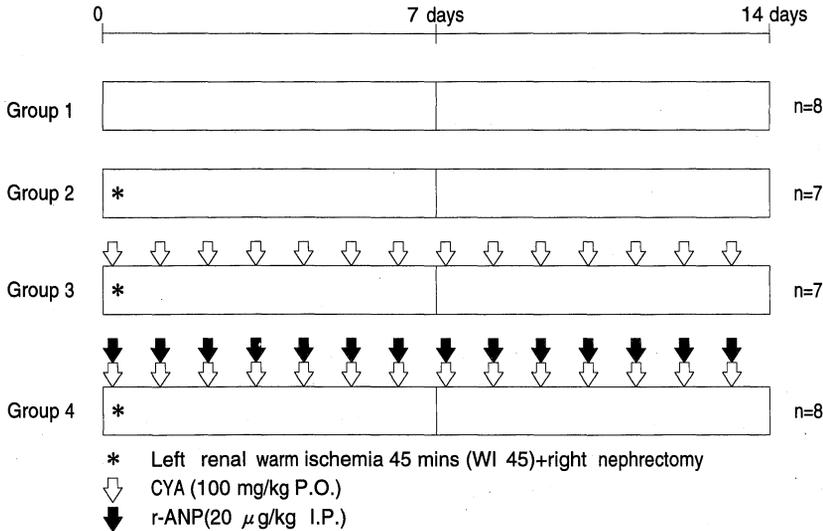


Fig. 2. Experimental design of experiment 2.

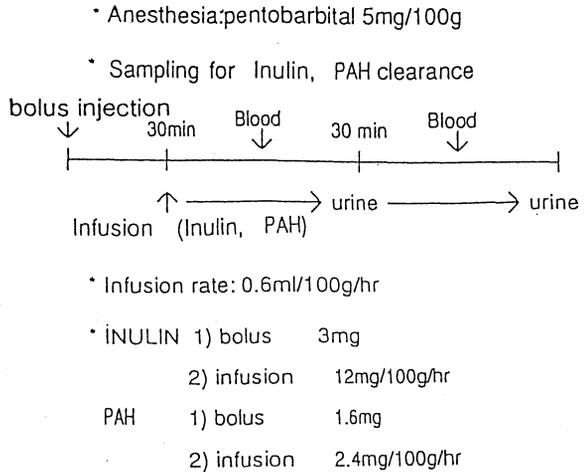
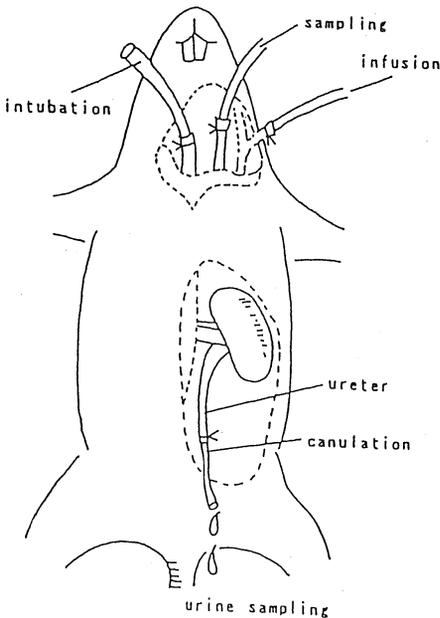


Fig. 3. Methods of Inulin and PAH clearance.

施行後1日目よりCYA(100 mg/kg)を胃管チューブにて14日間連日経口投与し、14日後に左腎機能を測定した。

Group 4: ラット8匹を用い、Group 2と同様な処置を施行後1日目よりCYA(100 mg/kg)連日経口投与に加えr-ANP(20  $\mu$ g/kg)を連日腹腔内投与し、14日後に左腎機能を測定した。

IV. 血液生化学的検査および腎機能検査の検査方法: 血液生化学検査として血清グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ(GOT), グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ(GPT), 乳酸脱水素酵素(LDH), ナトリウム(Na), カリウム(K)を測定した。GOT, GPTはHarmann法, LDHはWroblewski法にてそれぞれ測定した。

腎機能評価法としては糸球体機能を反映するイヌリンクリアランス( $C_{IN}$ ), および腎血漿流量を反映する馬尿酸クリアランス( $C_{PAH}$ )を測定した。

$C_{IN}$ ,  $C_{PAH}$ の測定方法はポリエチレンチューブを外頸動・静脈, 左尿管に留置し, 外頸静脈より測定30分前にイヌリン(Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. USA.)3 mg, PAH(第一製薬株式会社)1.6 mgを初回投与し, その後生理食塩水に溶解したイヌリン, PAHをそれぞれ12 mg/100 g/min, 2.4 mg/100 g/minで持続投与し, 血液および尿はそれぞれ外頸静脈および尿管に留置したポリエチレンチューブより採取した(Fig. 3)。

#### (Preparation)

Tissue	about 100 mg
10% TCA	2 ml
↓ (Homogenize in ice 30 sec)	
0.1 N HCL	2 ml
↓ (Homogenize in ice 30 sec)	
Centrifuge	(3,500 RPM for 10 minutes)
↓	
Supernatant	0.4 ml
+ Ethyl Ether	0.4 ml
↓ ↑ (3 times)	
contrifuge	(12,000 RPM for 10 minutes)
↓	
HPLC	
(Buffer) A→B	(30 min)
A:	Acetonitrile/0.1 M phosphate buffer
	(pH 3.0)=20/80
B:	Acetonitrile/0.5 M phosphate buffer
	(pH 3.0)=20/80

Fig. 4. Methods of ATP, ADP, AMP analysis of renal tissue.

$C_{IN}$ 測定: イヌリン測定はアンスロン法により測定した。すなわち, 血清は0.3 Nの過塩素酸(PCA)にて除蛋白遠沈後上清を用い, 尿は100~1000倍の希釈尿を用い, それぞれの検体及び標準サンプル50  $\mu$ lに濃硫酸を混和したアンスロン試液(和光純薬工業株式会社, 大阪)2000  $\mu$ lを加え56°Cにて10分間反応させた後, 直ちに氷水で冷却し, 反応を止め, 比色計(Hitachi spectrometer 150-200)を用い, 測定波長636 nmで測定し, 標準曲線より算定した。

$C_{PAH}$ 測定: 血清およびPAH標準液200  $\mu$ lに水1400  $\mu$ lおよびトリクロル酢酸(TCA)400  $\mu$ lを混和し室温で10分間放置後15分間遠沈した上清を用い, 尿は100~1000倍の希釈尿を用いた。上清と希釈尿に2 N濃硫酸と亜硝酸ナトリウムを加え3分間反応させ, 尿素を加え激しく混和させた後30分間放置し, 津田試薬[1-( $\beta$ -ジエチルアミノエチル) $\alpha$ -ナフチルアミン・蓊酸塩・和光純薬工業株式会社, 大阪]36  $\mu$ lを加えさらに30分間放置する。その後, 比色計(測定波長570 nm)で測定し, 標準曲線より算定した。

V. 腎組織 viability の生化学的検索方法: クリアランス測定後, 腎組織 viability の検索のため直ちに左腎を摘除し, 液体窒素にて凍結し, -80°C超低温保冷庫にて凍結保存した。

各Groupの腎の viability の評価は腎皮質組織ATP, ADP, AMPを高速液体クロマトグラフィーで測定し,

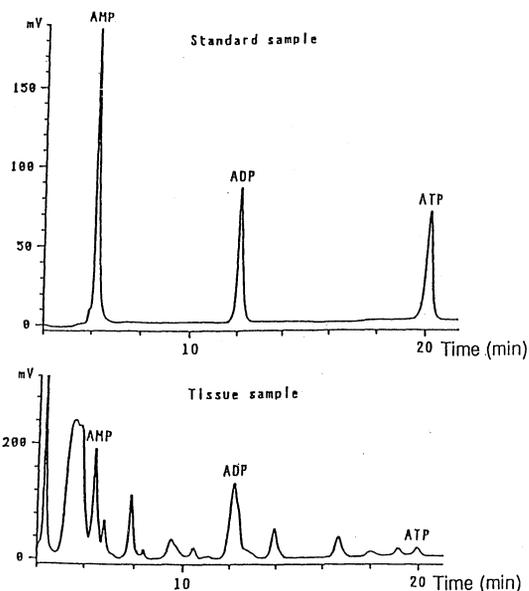


Fig. 5. Chromatogram of ATP, ADP, AMP.

また adenylate energy charge [EC = {ATP + (1/2) ADP} / (ATP + ADP + AMP)] を算定し検討した。

ATP, ADP, AMP 測定: 凍結保存した腎を, 液体窒素にて冷却したカッターで腎皮質部約 100 mg を切離し, 即座に 10% TCA 2 ml にて水中で hemogenize し除蛋白した後, 0.1 N HCl で再度 hemogenize 後 10 分間遠沈 (3500 回転) した。得られた上清 400  $\mu$ l に水飽和エチルエーテル 400  $\mu$ l 混和後, 微量高速遠沈器にて 12000 回転で 2 分間遠沈し, この操作を 3 回繰り返して得られた検

体 100  $\mu$ l を HPLC に注入し測定した。使用したカラムはイオン交換カラム (TSK gel DEAE-2 SW, 東洋ソーダ社, 東京) でカラム温度 35°C で測定した。溶離液は A 液: acetonitrile/0.1 M phosphate buffer (pH 3.0) = 20:80, B 液: acetonitrile/0.5 M phosphate buffer (pH 3.0) = 20:80 を (A 液  $\rightarrow$  B 液: 30 分) に調整し, flow rate 1.0 ml/min で使用した。測定機器は紫外可視検出器 (UV-8000, 東洋ソーダ社, 東京) を使用し, 測定波長は 260 nm にて検出測定した (Fig. 4)。標準 ATP,

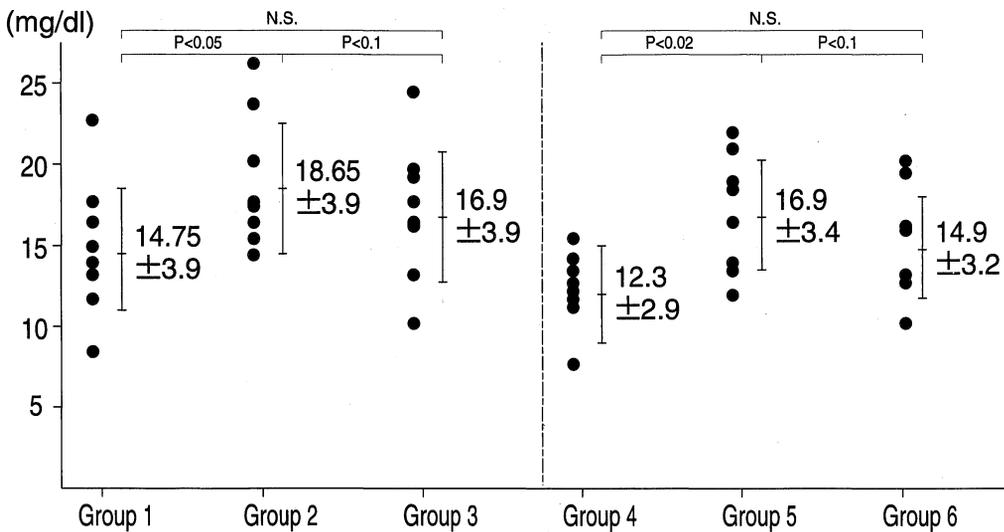


Fig. 6. Effect of r-ANP on BUN among 6 groups of experiment 1.

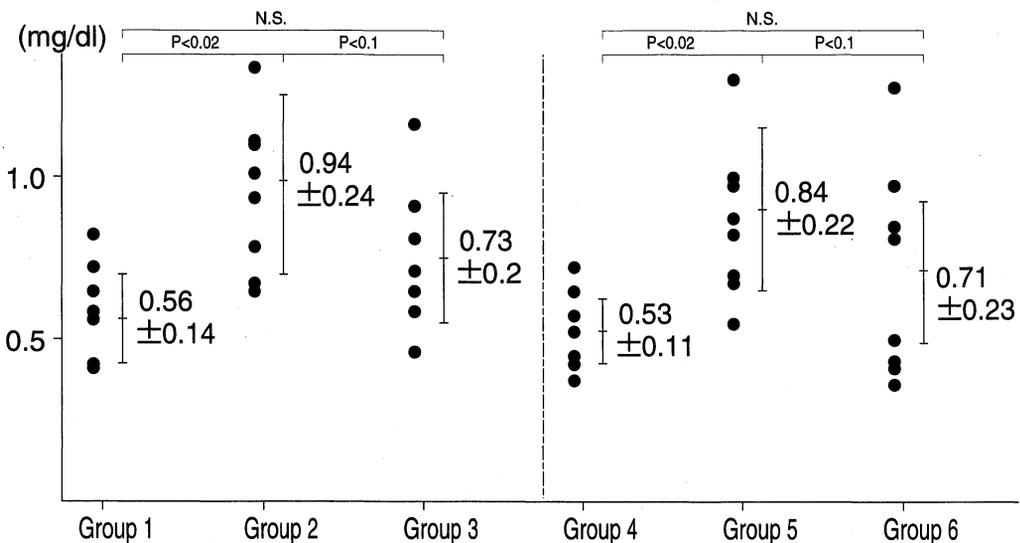


Fig. 7. Effect of r-ANP on Cr among 6 groups of experiment 1.

ADP, AMP のピークは retention time をまず測定し, 生体サンプルにおいても ATP, ADP, AMP のピークが標準資料の retention time と同一部位に確認されたために computer analyzer (CP-8000, 東洋ソーダ社, 東京) を使用し, ピークの解析を行った (Fig. 5). また測定された ATP, ADP, AMP より EC を算定した.

病理組織は H. E. 染色で, 尿細管, 間質および腎細血管の変化を比較した.

統計学的な有意差検定は Student-t 検定を使用した.

## 結 果

### 実験 I

血液生化学検査: 血清 BUN では, 温阻血処置をした Group 2 が Group 1 に比較して ( $P < 0.05$ ), また Group 5 が Group 4 に比較して上昇を認めた ( $P < 0.02$ ). 一方, r-ANP 投与群の Group 3 および Group 6 では Group 2 および Group 5 に比較して改善傾向が認められた ( $P < 0.1$ ) (Fig. 6). 血清 Cr についても血清 BUN と同様に

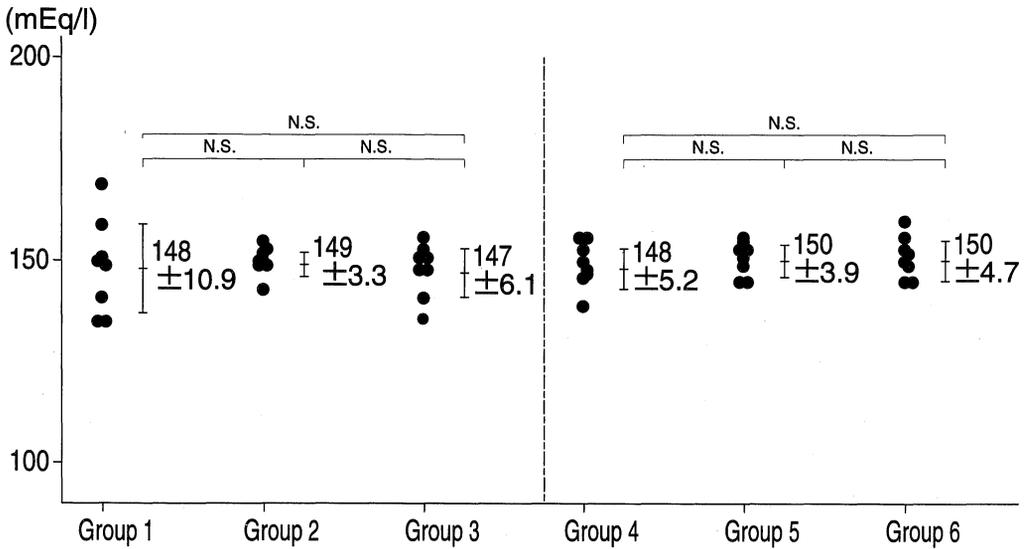


Fig. 8. Effect of r-ANP on Na among 6 groups of experiment 1.

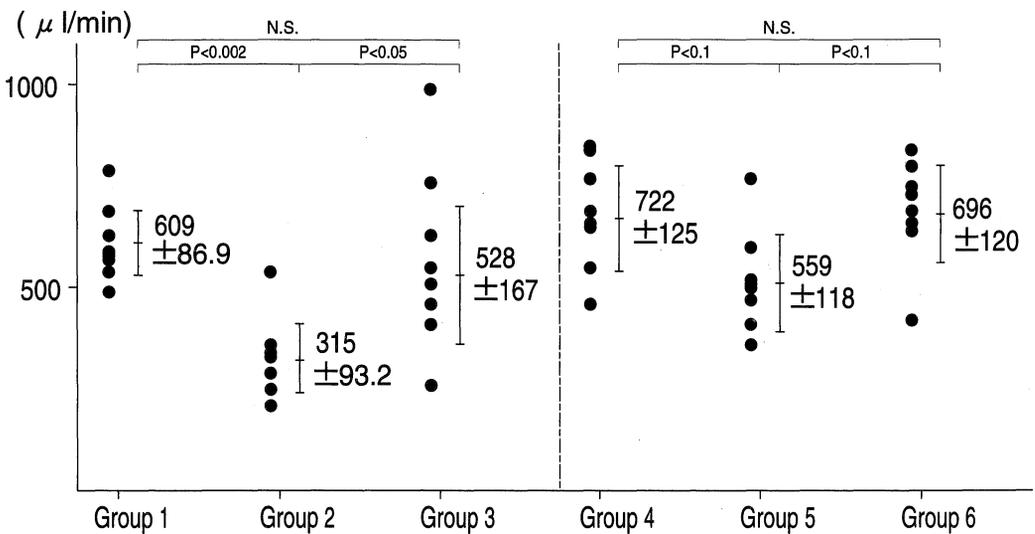


Fig. 9. Effect of r-ANP on lulin clearance ( $C_{IN}$ ) among 6 groups of experiment 1.

温阻血処置をした Group 2 が Group 1 に比較して、また Group 5 が Group 4 に比較して上昇を認めた ( $P < 0.02$ )。また、r-ANP を投与した Group 3 は Group 2 に比較して、Group 6 は Group 5 に比較して改善傾向が認められた ( $P < 0.1$ ) (Fig. 7)。血清 Na は各群において変化は認められなかった (Fig. 8)。

なお、Group 6 のラット 8 匹中 1 匹は実験開始後 1 日目で出血死した。

$C_{IN}$ ,  $C_{PAH}$  : 糸球体機能を反映する  $C_{IN}$  では温阻血処置

を行った Group 2 は Group 1 に比較して著明な低下 ( $P < 0.002$ ) を、Group 5 は Group 4 に比較して低下傾向を認めた ( $P < 0.1$ )。一方、r-ANP を投与した Group 3 は Group 2 に比較して改善を認め ( $P < 0.05$ )、また Group 6 は Group 5 に比較して改善傾向を認めた ( $P < 0.1$ ) (Fig. 9)。腎血漿流量を反映する  $C_{PAH}$  においては  $C_{IN}$  と同様に Group 2 は Group 1 に比較して ( $P < 0.002$ )、また Group 5 は Group 4 に比較して著明な低下を認めた ( $P < 0.02$ )。さらに、Group 2 に比べ、Group

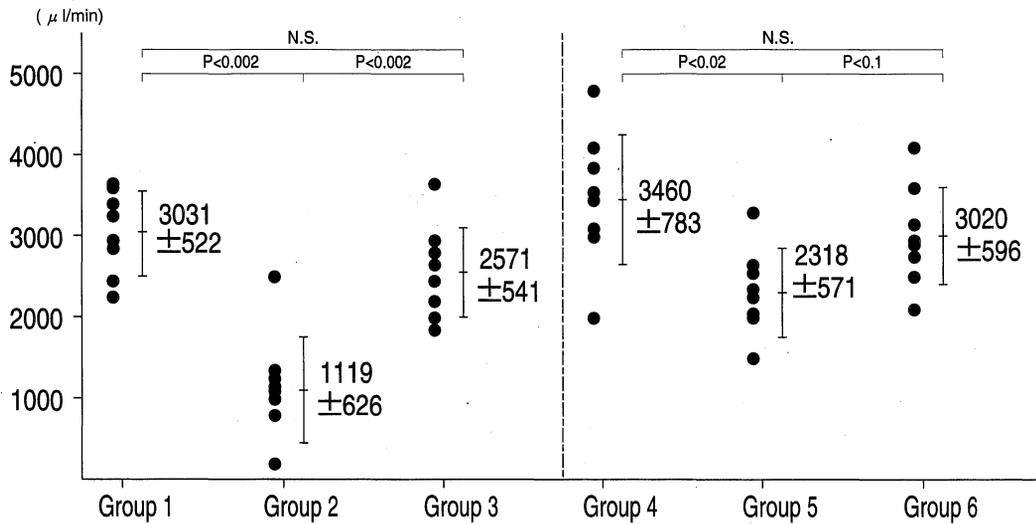


Fig. 10. Effect of r-ANP on PAH clearance ( $C_{PAH}$ ) among 6 groups of experiment 1.

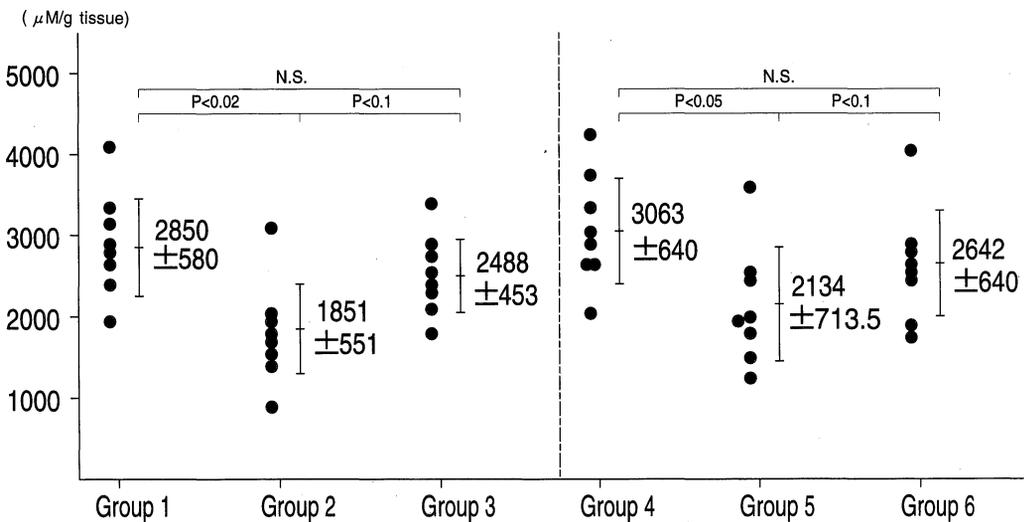


Fig. 11. Effect of r-ANP on ATP levels of damaged kidney tissue among 6 groups of experiment 1.

3は著明な改善(P<0.002)を、また Group 5 に比較して Group 6 は改善傾向が認められた(P<0.1)(Fig. 10).

腎皮質 ATP 値：腎皮質 ATP 値に関して Group 2 は Group 1 に比較して低下を認め(P<0.02), Group 3 は Group 2 に対して改善傾向が認められた(P<0.1). Group 5 では Group 4 に比べ低下が認められ(P<0.05), Group 6 は Group 5 に比較して改善傾向がみられ, r-ANP 投与により ATP 値の低下を抑制する傾向が

認められた(P<0.1)(Fig. 11).

実験 2

血液生化学検査・血清 GOT, GTP, LDH, BUN, Cr, Na, K 濃度を測定したが, Group 3 は対照群の Group 1 と r-ANP 同時投与群の Group 4 に比較して血清 GOT, GPT, LDH 濃度が上昇していた(P<0.05)(Table 1).

C<sub>IN</sub>, C<sub>PAH</sub> : 糸球体機能を反映する C<sub>IN</sub> は, Group 3 に

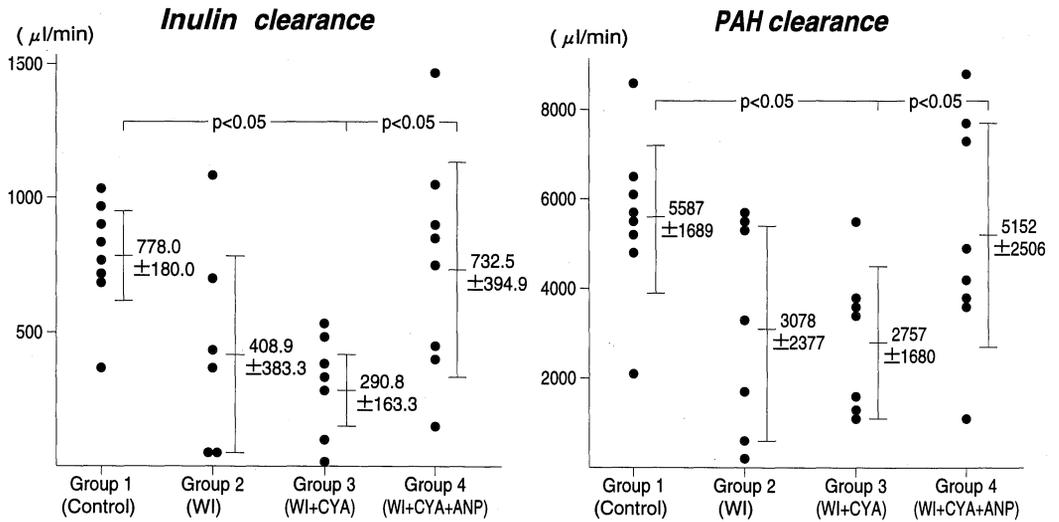


Fig. 12. Comparison of renal function (Inulin, PAH clearance) among 4 groups of experiment 2.

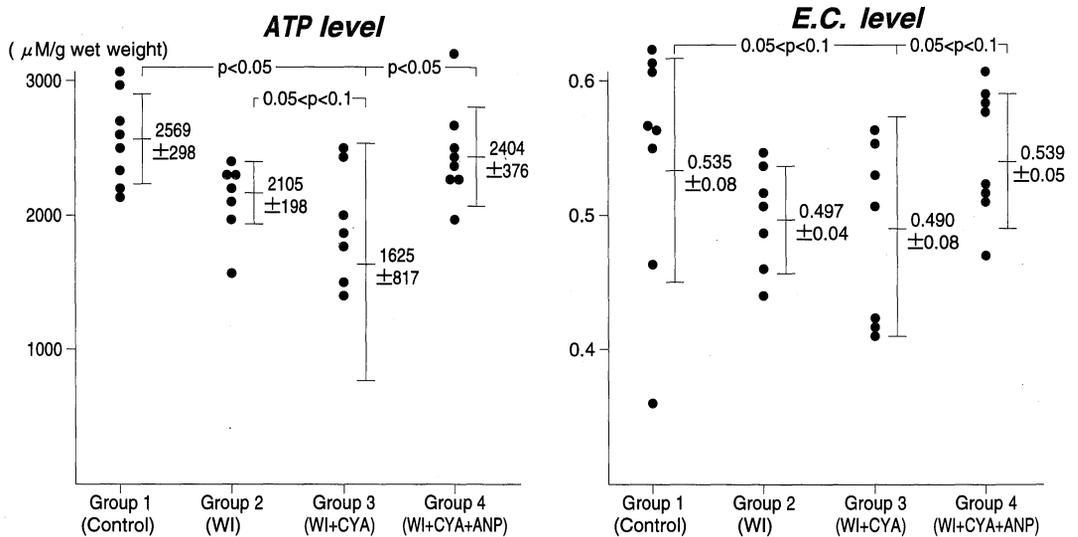


Fig. 13. Comparison of kidney viability (ATP, E. C. level) among 4 groups of experiment 2.

おいては Group 1 に比較して低下が認められたが( $P < 0.05$ ), Group 4 に比較して改善が認められた( $P < 0.05$ ). Group 1 と Group 4 の 2 群間においては有意な差は認められなかった. 腎血漿流量を反映する  $C_{PAH}$  においても Group 3 は Group 1 に比較して低下が認められたが( $P < 0.05$ ), Group 4 は Group 3 に比較し改善が認められた( $P < 0.05$ )(Fig. 12).

腎皮質 ATP 値及び adenylate energy charge(EC) :

腎皮質 ATP に関して Group 3 は Group 1 に比較して低下し( $P < 0.05$ ), また r-ANP 同時投与の Group 4 は低下の抑制が認められ( $P < 0.05$ ), また腎皮質 EC についても Group 4 は Group 3 に比較して低下の抑制傾向が認められた(Fig. 13).

病理組織的検査所見: 病理組織学的には, Group 1(Fig. 14)に比較して Group 2 は温阻血の影響が著しく尿細管の萎縮, 間質の繊維化及び単球の浸潤が単状に認められ

Table 1. Comparison of biochemical examination of serum among 4 groups of experiment 2

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
GOT (IU/l)	45.5±13.1 <sup>a</sup>	83.2±42.1	108.5±30.5	59.3±35.1 <sup>b</sup>
GPT (IU/l)	20.2±5.17 <sup>a</sup>	57.8±29.3	60.3±23.9	21.0±10.7 <sup>b</sup>
LDH (IU/l)	349±115 <sup>a</sup>	548±352	1049±354	393±440 <sup>b</sup>
BUN (mg/dl)	12.4±3.84	15.0±6.5	22.9±10.8	18.8±9.34
Cr (mg/dl)	0.53±0.19	0.52±0.18	0.81±0.55	0.52±0.29
Na (mEq/l)	142±4.7	142±2.0	146±3.4	142±4.7
K (mEq/l)	3.28±0.8	3.00±1.0	3.42±1.0	3.08±4.3

Group 1: Control    Group 2: W1    Group 3: W1+CYA    Group 4: W1+CYA+ANP

a:  $P < 0.05$  Group 1 vs Group 3    b:  $P < 0.05$  Group 4 vs Group 3

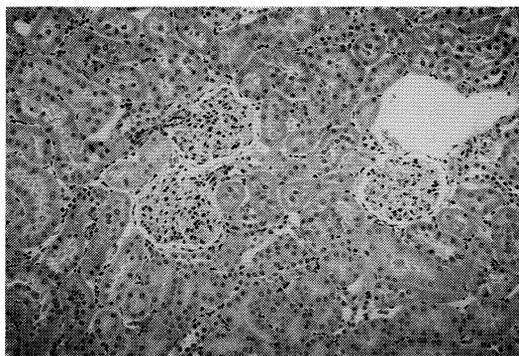


Fig. 14. Histopathological finding in group 1 in experiment 2.

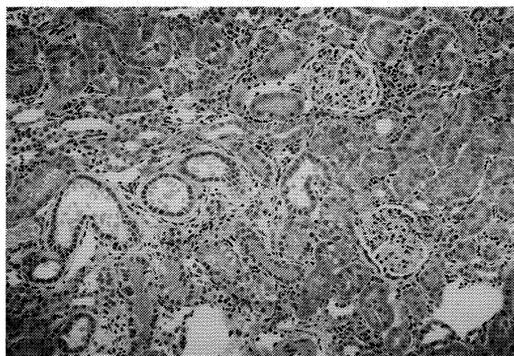


Fig. 16. Histopathological finding of group 3 in experiment 2.



Fig. 15. Histopathological finding of group 2 in experiment 2.

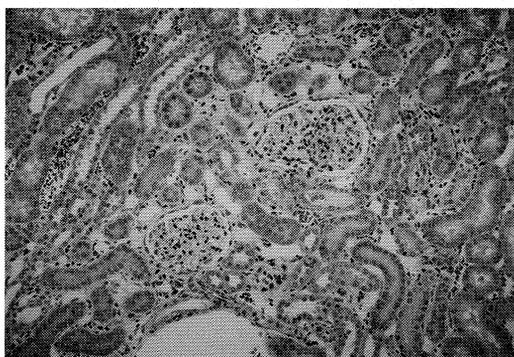


Fig. 17. Histopathological finding of group 4 in experiment 2.

た(Fig. 15). さらに Group 3 は CYA 投与により尿管及び間質の変化が拡大し、特に皮髄境界に著しかった(Fig. 16). 一方、Group 4 は r-ANP 投与により間質の変化及び尿管変化が CYA 投与群と比較して改善を示していた(Fig. 17).

なお、実験 2 においては Group 2 と Group 3 においてそれぞれ 1 匹づつのラットが、術後第 1 日目に出血死した。

## 考 察

腎移植に関する組織適合検査の発達、免疫抑制剤の発見及び開発、さらに医療技術の発達に伴い移植腎の生着率は近年飛躍的な改善がみられている<sup>8)~10)</sup>一方、拒絶反応を含めた移植腎機能障害により Graft loss の症例が少なからず認められているのが現状である。

移植腎が移植後機能障害を発生する要因は種々明らかにされているが、一般的に移植腎に対する回避できない増悪因子として、移植時の温阻血及び免疫抑制剤を含めた腎毒性薬剤があり、それぞれ移植後早期ならびに長期における移植腎障害の原因となっている。

生体腎移植あるいは死体腎移植の際の腎血流の遮断、いわゆる温阻血は、腎移植直後および長期の移植腎機能の予後に関し最も重要な増悪因子であり、温阻血により腎細胞内 mitochondria 障害が惹起され、移植腎の viability に重要な影響を与える。一方、温阻血時間が腎組織の viability に与える影響に関しては、実験的温阻血における報告では温阻血 60 分を irreversible time の限界とする報告<sup>11)~14)</sup>が多い。以前我々が報告した如く、イヌを使用した実験では、腎灌流中の酵素をマーカーとした評価において、腎機能良好群の温阻血時間は  $40.7 \pm 13.2$  分で、一方腎機能不良群の温阻血時間は  $52.5 \pm 7.5$  分であり、時間の延長とともに腎機能が増悪することが確認され、また戻し自家腎移植においても、長期間の温阻血により自家移植腎機能が増悪傾向を示すことが示唆されている<sup>15)</sup>。これらのことにより、今回の著者の実験では、reversible time として 45 分の温阻血時間を設定した。また臨床的にも温阻血時間は移植腎機能に重要な影響を与え、特に、早期の移植腎機能発現に関する Acute tubular necrosis(ATN)の程度と深い関連性が認められるとされている<sup>13)</sup>。したがって、腎移植時の温阻血は、移植後早期の腎機能に関して最も重要な予後因子となっている。

一方、近年開発された免疫抑制 CYA の登場により、それまでのイムランおよびステロイドを中心とした従来の免疫抑制療法に比較し、腎移植をはじめとして他の臓器移植に関しても、その生着率は飛躍的に改善され、現在

では免疫作用の点から最も優れた免疫抑制剤とされ、一般的に使用されている<sup>16)</sup>。しかし、CYA は免疫抑制剤としての有用性をもつ反面、長期使用により腎毒性が認められ、移植腎にとって腎障害の発現という paradoxical な作用を持ち、最近では移植腎機能の増悪因子の 1 つとして問題となっている。CYA の腎障害は CYA を投与されている全症例において出現する可能性があり、臨床的には移植後高頻度に高血圧がみられ、また過剰な CYA 投与により血清 Cr あるいは血清 BUN の上昇を伴う進行性の腎機能低下が認められ、最終的には Graft loss となる。したがって、最近では CYA の血中濃度を測定しつつ、その投与方法ならびに投与量を随時変更しているのが現状である。CYA の腎障害は機能的腎障害に起因し、すなわち、腎細動脈の収縮であり、腎血流量(RPF)の減少および糸球体濾過量(GFR)の減少が認められ、腎細血管の変化は比較的選択的に糸球体前動脈(輸入動脈)に収縮が認められている。血管収縮に関しては、CYA の直接的な血管障害、レニン・アンギオテンシン系を介した作用、およびプロスタグランジン系を介した作用などが報告されており<sup>16)</sup>、最近では血管内皮細胞刺激因子であるエンドセリンによる影響も確認されている<sup>17)</sup>。これらの副作用の影響を軽減させるために、免疫抑制療法としてステロイド、イムラン、およびミゾリピンなどを併用する投与方法が用いられるようになり、多剤併用により CYA 投与量を軽減する試みがなされている<sup>18)</sup>。したがって、移植腎機能障害に関連した因子としては、急性拒絶反応あるいは慢性拒絶反応による影響は重要であるが、初期の腎機能発現に関しては温阻血による ATN の発現を最小限にすることが最も重要であり、さらに CYA による腎障害を軽減することもグラフト機能温存の点から重要である。

一方、ANP を含むナトリウム利尿ペプチドシステムは、心房性(ANP)、脳性(BNP)および C タイプ(CNP)の 3 種のリドカイン、2 種類の生物作用を伝達する受容体(NPR-A, NPR-B)と 1 種類のクリアランス受容体(NPR-C)から構成される複雑かつ巧妙な生体内調節系であり、ANP および BNP は心臓ナトリウム利尿ペプチド系の、CNP は脳ナトリウム利尿ペプチド系、さらに血管壁ナトリウム利尿ペプチド系の重要なリドカインとしてその病態生理的意義が注目されている<sup>19)~24)</sup>。ANP, BNP, CNP の作用は、ナトリウム排泄作用、利尿作用、血管拡張作用およびアルドステロン分泌抑制作用が代表的なものであるが、ナトリウム排泄作用、利尿作用、血管拡張作用は ANP, BNP の方が CNP より強い。また、受容体に関して、NPR-A 受容体は ANP およ

びBNPの、NPR-B受容体はCNPの特異的な受容体と考えられ、NPR-A受容体は広く血管壁や腎に分布しており、NPR-B受容体は中枢神経系や血管平滑筋細胞に多く存在する<sup>23)~27)</sup>。したがって、これらのナトリウム利尿ペプチドの投与にて腎細血管が拡張して血流が改善されることや、ナトリウム利尿作用などにより、腎に対して腎機能改善作用が認められ、障害腎に対しその有用性が期待されている。

今回の検討で実験1は腎移植時の温阻血による腎機能障害軽減の目的で、温阻血直前のr-ANPを単回投与して、温阻血による腎機能障害の庇護効果を検討したが、 $C_{IN}$ および $C_{PAH}$ が、r-ANPの非投与の温阻血群に比較し改善を示した。また、腎のviabilityを反映する腎組織内ATPについても、障害の抑制効果を示した。さらに、実験2では14日間ではあるが、温阻血にCYAを投与した場合の腎障害に対するr-ANPの影響を検討した。その結果、CYA投与群においては、種々の報告<sup>16),28),29)</sup>と同様に明らかに腎毒性が認められており、以前に我々<sup>30),31)</sup>が報告したように、これらの腎障害はr-ANP投与にて改善傾向を示し、組織内ATP、ECについても温阻血による活性低下に対して改善を示した。改善効果として、 $C_{IN}$ および $C_{PAH}$ のそれぞれについても改善を示したことにより、ANPは温阻血による糸球体機能および腎血流の障害に対して改善効果が得られたことになる。さらに、腎組織ATPおよびECについても改善効果を示したことより、細胞レベルにおいてもANP投与による腎組織のviabilityの改善効果を示し、その有用性を示唆する結果が得られた。

病理組織学的には、温阻血により間質の障害が強くなり、また明らかに間質障害を中心として尿細管の障害も認められ、温阻血がacute tubular necrosis(ATN)の主な原因であることを示唆する結果が得られた。しかし、CYA投与によりその代表的障害である腎細血管の障害<sup>17)</sup>は明らかには認められなかった。したがって、これらの温阻血による腎の病理組織学的変化は、45分間の温阻血時間の影響および14日間の短期CYA投与期間の影響によるものと考えられるが、このことは血液学的データによっても温阻血自体の影響が著しく、CYA投与による障害の程度が軽度であることを反映していると考えられた。さらに、これらの病理組織学的変化はANPの投与により改善したことで温阻血による腎障害に対してANPの効果が大きな役割を課していると考えられた。

以上より、ANPは温阻血による早期の腎障害およびCYA投与による腎障害に対し腎機能改善作用を示す結果が得られ、臨床的な腎移植に対する治療薬としての有

用性が示唆された。

## 結 語

腎移植時の温阻血による腎移植早期の腎障害に対するANP投与による腎障害改善作用を検討するために、ラットを用いて腎阻血による腎障害モデルを作成して以下の実験を行った。

1) 実験1として温阻血ラット障害腎に対する心房性ナトリウム利尿ペプチドの影響を検討した。すなわち温阻血直前にr-ANP(20  $\mu$ g/kg)を単回投与し、3日目・7日目において障害腎に対する影響を検討した。

腎の温阻血処置により血清BUNおよびCr、また $C_{IN}$ および $C_{PAH}$ は、増悪傾向を示したが、r-ANP投与群では3日目において改善を示し、7日目においても改善傾向を示した。腎のviabilityについて腎皮質ATP値をHPLCにて測定したが、r-ANP投与群は非投与群に比較し、ATP値の低下を抑制する傾向を示した。

2) 実験2として温阻血+CYA投与ラット障害腎に対する心房性ナトリウム利尿ペプチドの影響を検討した。すなわち対照群、温阻血後右腎摘出した群、温阻血後CYA(100 mg/kg)を14日間連続投与した群及び温阻血後CYAと同時にr-ANP(20  $\mu$ g/kg/日)を連日投与した群で検討した。

温阻血後CYA連日投与群は、温阻血群に比較しBUNおよびCrは上昇を示し( $P < 0.05$ )、r-ANP連日投与群は低下を示した( $P < 0.05$ )。 $C_{IN}$ および $C_{PAH}$ では、温阻血後CYA連日投与した群では低下を示したがr-ANP連日投与群は改善を示した( $P < 0.05$ )。腎皮質ATP値については、温阻血後CYA投与により低下を示し、r-ANP投与群において低下の抑制が認められた( $P < 0.05$ )。腎皮質ECについてはr-ANP投与群において低下の抑制傾向が認められた。病理組織学的には、温阻血の影響は著しく、またCYA投与により尿細管及び間質の変化が増大し特に皮髄境界に著しかった。一方、r-ANP投与により尿細管の変化および間質の変化はCYA投与群に比較して改善を示した。

3) 以上より、心房性Na利尿ペプチドは、温阻血後CYAによる腎障害に対して、腎庇護作用および障害腎改善作用が確認された。したがって臨床的に腎移植における腎障害抑制剤としての有用性が示された。

(本論文の要旨は第28回日本移植学会総会、第13回国際腎臓学会において報告した。稿を終えるにあたり、終始御懇篤なご指導ならびに御校閲を賜りました恩師岡島英

五郎教授に心より感謝いたします。さらに御助言御指導をいただきました第1内科学教室土肥和紘教授、第1外科学教室中野博重教授に感謝いたします。また本研究の遂行にあたり御協力いただきました奈良県立医科大学泌尿科学教室諸兄に厚く感謝申し上げます。)

## 文 献

- 1) **de Bold, A. J., Borenstein, H. B., Veress, A. T. and Sonnenberg, H.** : A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sciences* **28** : 89-94, 1981.
- 2) **丸茂文昭, 羽田俊彦** : 透析と ANP family. 透析学会誌. **24** : 1319-1324, 1992.
- 3) **中尾一和** : ナトリウム利尿ペプチドファミリー. 日内分泌会誌. **68** : 134-142, 1992.
- 4) **植村信久, 細見 弘** : 心房性ナトリウム利尿ペプチド. *Medio* **10** : 56-61, 1995.
- 5) **Garcia, R., Thibault, G., Gutkowska, J., Cantin, M. and Genest, J.** : Changes of regional blood flow induced by atrial natriuretic factor (ANF) in conscious rats. *Life Sciences* **36** : 1687-1692, 1985.
- 6) **Yandel, T. G., Richards, A. M., Nocholls, M. G., Cuneo, R., Espiner, E. A. and Liversey, J. H.** : Metabolic clearance rate and plasma half-life of alpha-human atrial natriuretic peptide in man. *Life Sciences* **38** : 1827-1833, 1986.
- 7) **Laragh, J. H. and Atlas, S. A.** : Atrial natriuretic hormone : A regulator of blood pressure and volume homeostasis. *Kidney Int.* **34** : s64-71, 1988.
- 8) **Frisk, B., Persson, H., Wedel, N., Andersson, C., Wijnveen, A. C., Blohme, I., Karlberg, I., Hedman, L. and Brynner, H.** : Study of 172 patients at 10 to 21 years after renal transplantation. *Transplant Proc.* **19** : 3769-3764, 1987.
- 9) **Rao, K. V. and Andernen, R. C.** : Long-term results and complications in renal transplant recipients. *Transplantation* **45** : 45-52, 1988.
- 10) **安村忠樹, 秋岡清一, 岡本雅彦, 安井 仁, 満尾学, 赤見敏和, 大阪芳夫, 中井一郎, 吉村了勇, 鈴木茂敏, 大森吉弘, 岡 隆宏** : 腎移植後長期生着例の成績と問題点. *移植* **29** : 314-323, 1994.
- 11) **Venkatachalam, M. A., Kreisberg, J. I., Steim, J. H. and Lifschitz, M. D.** : Editorial. -Salvage of ischemic cells by impermeant solute and adenosinetriphosphate. *Lab. Invest.* **49** : 1-3, 1983.
- 12) **Reimer, K. A., Ganote, C. E. and Jennings, R. B.** : Alterations in renal cortex following ischemic injury. III-Ultrastructure of proximal tubules after ischemia or autolysis. *Lab. Invest.* **26** : 347-363, 1972.
- 13) **Aydin, G., Okiye, S. E. and Zincke, H.** : Successful 24-hour preservation of the ischemic canine kidney with Euro-Collins Solution. *J. Urol.* **128** : 1401-1403, 1982.
- 14) **Siegel, N. J., Glazier, W. B., Chaudry, I. H., Gaudio, K. M., Lytton, B., Baue, A. E. and Kashgarian, M.** : Enhanced recovery from acute renal failure by the postischemic infusion of adenine nucleotides and magnesium chloride in rats. *Kidney Int.* **17** : 338-349, 1980.
- 15) **吉田克法, 吉川元祥, 金子佳照, 窪田一男, 駒田佐多男, 丸山良夫, 脇岡 隆, 小原壮一, 松尾好祥, 平尾佳彦, 本宮善恢, 岡島英五郎, 鈴木盛一, 雨宮浩** : イヌ灌流後存腎の viability と灌流液中逸脱酵素の変動. *日泌尿会誌.* **78** : 431-436, 1987.
- 16) **Myers, B. D., Sibley, R., Newton, L., Tomlanovich, S. J., Boshkos, C., Stinson, E., Luetscher, J. A., Whitney, D. J., Krasny, D., Coplon, N. S. and Perlroth, M. G.** : The long-term course of cyclosporine-associated chronic nephropathy. *Kidney Int.* **33** : 590-600, 1988.
- 17) **Perio, N., Dadan, J. and Remizzi, G.** : Endothelin mediates the renal vasoconstriction induced in the rat. *J. Am. Soc. Nephrol.* **1** : 76-83, 1990.
- 18) **安村忠樹, 荒川幸平, 吉村了勇, 中井一郎, 浜島高挑, 李 哲柱, 大阪芳夫, 満尾学, 赤見敏和, 岡本雅彦, 安井 仁, 大森吉弘, 岡 隆宏** : シクロスポリン, アザチオプリン, プレドニゾロン 3 剤併用療法と移植腎の長期予後. *移植* **26** : 363-368, 1991.
- 19) **Kangawa, K., Tawaragi, Y., Olikawa, S., Mizuno, A., Sakuragawa, Y., Nakazato, H., Fukuda, A., Minamino, N. and Matsuo, H.** : Identification of rat gamma atrial natriuretic polypeptide and characterization of the c-DNA encoding its precursor. *Nature* **312** : 152-155, 1984.
- 20) **Sudoh, T., Minamino, N., Kangawa, K. and Matsuo, H.** : A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* **332** : 78-81, 1988.

- 21) Mukoyama, M., Nakao, K., Hosoda, K., Suga, S., Saito, Y., Ogawa, Y., Shirami, G., Jougasaki, M., Obata, K., Yasue, H., Kambayashi, Y., Inouye, K. and Imura, H. : Brain natriuretic peptide (BNP) as anovel cardiac hormone in humans—Evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide. *J. Clin. Invest.* **87** : 1402-1412, 1991.
- 22) Nakao, K., Ogawa, Y., Suga, S. and Imura, H. : Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system. I : Natriuretic peptides. *J. Hypertension* **10** : 907-912, 1992.
- 23) Nakao, K., Ogasawa, Y., Suga, S. and Imura, H. : Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system. II : Natriuretic peptide receptors. *J. Hypertension* **10** : 1111-1114, 1992.
- 24) 斎藤能彦, 栢田 出, 中尾一和 : ナトリウム利尿ペプチドファミリーの病態生理的意義. *Mebio* **12** : 28-36, 1995.
- 25) Espiner, E. A. : Physiology of natriuretic peptide. *J. Int. Med.* **235** : 527-541, 1994.
- 26) Saito, Y., Nakao, K., Nishimura, K., Sugawara, A., Okumura, K., Obata, K., Sonoda, R., Ban, T., Yasie, H. and Imura, H. : Clinical application of atrial natriuretic polypeptide to patients with congestive heart failure: Beneficial effect on left ventricular function. *Circulation* **76** : 115-124, 1987.
- 27) Yoshimura, M., Yasue, H., Morita, E., Sakaino, N., Jougasaki, M., Kurose, M., Mukoyama, M., Saito, Y., Nakao, K. and Imura, H. : Hemodynamic, renal and hormonal responses to brain natriuretic peptide infusion in patients with congestive heart failure. *Circulation* **84** : 1581-1588, 1991.
- 28) Aupetit, B., Ghazi, A., Blanchouin, N., Toury, R., Shechter, E. and Legrand, J. C. : Impact on energy metabolism of quantitative and functional cyclosporine-induced damage of kidney mitochondria. *Biochem. Biophys. Acta* **936** : 325-331, 1988.
- 29) Coffman, T. M., Carr, D. R., Yargar, W. E. and Klotman, P. E. : Evidence that renal prostaglandin and thromboxane production is stimulated in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation* **43** : 282-285, 1987.
- 30) 吉田克法, 影林頼明, 坂 宗久, 金子佳照, 大園誠一郎, 本宮善恢, 平尾佳彦, 岡島英五郎 : 温阻血障害腎(ラット)に対する recombinant atrial natriurec polypeptide(r-ANP)の影響-第1報. 腎移植・血管外科 **4** : 9-15, 1992.
- 31) 吉田克法, 影林頼明, 坂 宗久, 米田龍生, 谷 満, 太田匡彦, 岡島英二郎, 大園誠一郎, 平尾佳彦, 岡島英五郎 : 温阻血および Cyclosporine A による障害腎に対する recombinant-ANP の影響. *日腎誌*. **36** : 123-129, 1994.