

# 博 士 論 文

---

( 2018 年 12 月 14 日 提出)

論文題目 非観血的に腎・泌尿器系の器質的变化を  
検出する手法の開発

---

申請者所属 保健医療学部医療技術学科

---

申請者氏名 川中 洋平

---



広島国際大学大学院

# 目次

<b>第1章 序章</b> .....	<b>4</b>
1.1 臨床検査の現状と限界 .....	4
1.2 動物実験による病態の解析 .....	5
1.3 腎・泌尿器機能系に着目した理由 .....	5
1.4 本研究の目的と論文の構成 .....	8
第1章の参考文献 .....	9
<b>第2章 前立腺肥大症と排尿障害</b> .....	<b>10</b>
2.1 前立腺肥大症の疫学的背景 .....	10
2.2 前立腺肥大症の病態 .....	12
2.3 前立腺肥大症に伴う排尿障害の自覚症状の評価 .....	12
2.4 排尿障害を客観的に評価する検査方法 .....	14
2.4.1 尿流測定(Uroflowmetry: UFM) .....	14
2.4.2 残尿測定 .....	15
2.4.3 内圧尿流測定 (Pressure-flow study: PFS) .....	15
2.4.4 尿流測定の限界 .....	16
第2章の参考文献 .....	17
<b>第3章 排尿障害を惹起する前立腺の上皮細胞過形成</b> .....	<b>18</b>
3.1 背景と目的 .....	18
3.2 方法 .....	18
3.2.1 動物実験 .....	18
3.2.2 排尿過程の測定及び尿流測定パラメーターの算出 .....	18
3.2.3 組織学的解析 .....	20
3.2.4 統計学的解析 .....	21
3.3 結果 .....	21

3.3.1	排尿障害をきたしているマウスの検出.....	21
3.3.2	尿流測定パラメーターの比較 .....	25
3.3.3	前立腺組織像の検討 .....	25
3.3.4	尿流測定パラメーターと病理組織学的特徴との関係.....	30
3.4	考察.....	31
	第3章の参考文献.....	33
<b>第4章</b>	<b>腎機能障害への取り組み .....</b>	<b>34</b>
4.1	はじめに .....	34
4.2	腎障害の疫学的背景 .....	34
4.3	腎機能障害と臨床検査 .....	34
4.4	動物モデルによる腎機能障害に関する研究 .....	35
4.4.1	研究の現状.....	35
4.4.2	アデニン投与による腎機能障害マウス.....	36
4.5	おわりに .....	39
	第4章の参考文献.....	40
<b>第5章</b>	<b>新規ヒトCKDモデルの作製と尿細管上皮細胞形態による腎機能検査法の開発..</b>	<b>43</b>
5.1	背景.....	43
5.2	目的.....	44
5.3	方法.....	44
5.3.1	実験動物と給餌方法 .....	44
5.3.2	循環機能の測定.....	44
5.3.3	尿検体の生化学的解析 .....	45
5.3.4	血清検体の生化学的解析.....	45
5.3.5	病理組織学的解析.....	45
5.3.6	病理細胞学的解析.....	45
5.3.7	統計学的解析 .....	45
5.4	結果.....	46

5.4.1 収縮期血圧と心拍数の推移 .....	46
5.4.2 尿検体の生化学検査値.....	47
5.4.3 血清検体の生化学検査値.....	49
5.4.4 腎臓の病理組織所見 .....	49
5.4.5 尿沈渣中に剥離した尿細管上皮細胞の形態的特徴.....	51
5.5 考察.....	53
第5章の参考文献 .....	56
第6章 結語 .....	58
謝辞 .....	59

## 第1章 序章

### 1.1 臨床検査の現状と限界

現在の医療において、臨床検査が診療に関与する割合は70%に近いとされ<sup>1)</sup>、疾患の診断は臨床検査なしでは成り立たないと言っても過言ではない。実際、内科の外来初診患者の正診率を調べた報告では、問診だけでは58.2%、理学的所見（視診、触診、聴診などによる他覚所見）が加わっても69.2%であるのに対し、検査結果（血算や検尿、一部の臨床化学検査）が診察前に提供されると正診率が90%となるとされている<sup>2)</sup>。さらに、臨床検査は疾患の診断だけでなく、病態や病勢の把握、治療効果の判定、薬剤の副作用、疾患の予防などにも必須となっている。

臨床検査は、患者自身を用いて心電図検査などを行う生理機能検査と、体の一部を取り出して検査する検体検査に大別される。このうち検体検査では、患者の血液や尿を分析し、その測定値によって疾患の原因となる生体の機能変化を検出している。例えば腎・泌尿器疾患の多くは無症状で経過するため発症の時期を特定することが困難であるが、尿所見や血液生化学検査の異常を手掛かりに、病歴を聴取し、理学所見の推移を観察することによって診断されている<sup>3)</sup>。

しかし、検査を行っても、生体内での機能変化を捉えられない、あるいは捉えにくい事象も存在する。その代表的な事象として、臓器の組織学的変化の検出が挙げられる。癌のような重篤な疾患が予想される場合は、標的臓器の組織を採取して病理検査を行うが、患者の身体的負担が大きいため日常的に行われる検査ではなく、また、すべての臓器でサンプリングが可能ではない。さらに、病理組織検査は採取された時点での組織変化を検出するのみで、その後の経時変化を検討することが出来ない。組織採取された部分でのみの評価に留まるため臓器全体の評価をすることが出来ない。その結果、疾患の進行程度（病期）を、組織学的変化を指標として評価することは少なく、血液や尿を用いた検査で代用しているのが現状である。一例として、我が国では糖尿病性腎症病期分類が多く臨床現場において用いられているが、病期ごとに病理組織変化が示されているものの、病期分類は臨床所見（尿中タンパク値）に基づいており、組織像は基準となっていない。2007年に糖尿病性腎症の病理組織分類についての基準がRenal Pathology Societyより提唱され、①糸球体基底膜肥厚、②メサンギウム拡大、③結節性病変(Kimmelstiel-Wilson lesion)、④球状硬化の4つのクラス分け（表1.1）が示されたが、糖尿病性腎症のうち特に2型糖尿病では種々の要因による修飾を受け病変は多彩となっていること、尿細管や間質、様々のレベルの腎内血管系に病変が展開していること、1型糖尿病と2型糖尿病を区別していない、分類基準が糸球体病変のみである、尿細管・間質病変、血管病変が含まれていないなどの点から、必ずしも十分な分類ではないとの批判がある<sup>4)</sup>。このように、組織診断はあくまで病期分類の1所見とされるのみで、組織変化から病期分類されることはない。その理由は、ヒトの病態を把握するために任意の時点でヒトの臓器を摘出して組織検査をすることが不可能であるためである。

表 1.1 糖尿病性腎症の病理分類（糸球体病変）（文献 4）より引用）

Class I	GBM 肥厚
Class II	メサングウム拡大
	a：軽度
	b：高度
Class III	結節性硬化（Kimmelstiel-Wilson 病変）
Class IV	球状硬化

## 1.2 動物実験による病態の解析

上記に示した問題を解決するため、動物実験によって得られた、病態と臓器の組織的変化との関連性から疾患の進行状態を推測することも行われているが、その動物実験においての主眼は、病態と生体組織変化の 1 対 1 の関連性を明らかにするもので、疾患の進行に伴う生体組織の変化を経時的に見ていくという、いわば疾患の診断に情報を供するという視点に欠けている。つまり、これまでの報告では、疾患モデル動物を用いて、ある時点での組織変化と機能の関係を評価するに留り、臨床検査値との経時的な関係についての検討が行われていないため、どの時点で臨床上問題となる器質的変化が起きているのか不明なままである。

そこで、症状や非侵襲的な臨床検査データから組織像の変化を類推することが可能となれば、組織検体の採取に伴う患者の身体的負担がなくなるとともに、臨床検査値がどの程度変化すれば組織の非可逆的な器質的変化が起こっているか類推することができ、疾患の早期発見や予防に繋がるのが期待できる。そのため、本研究ではヒトの生体のうち、腎・泌尿器機能系に焦点をあて、機能障害の原因となる器官の組織学的変化を簡便に検出する方法の開発を目指した。

## 1.3 腎・泌尿器機能系に着目した理由

高齢男性によくみられる泌尿器系疾患に前立腺肥大症がある。前立腺肥大症とは「前立腺の良性過形成による下部尿路機能障害を呈する疾患」と定義されており<sup>5)</sup>、前立腺の大きさだけで定義されるものではなく、排尿症状を伴っているものをいう。前立腺肥大に伴い尿道を物理的に圧迫して排尿機能が低下するが、前立腺部の尿道は尿道粘膜で被覆されているため、前立腺組織が尿中に出現することはない。しかし、残尿が生じる程度の肥大をきたすと、尿沈渣中に大食細胞を認めることがある。これは、古くなった分泌物や腺管を構成していた古い細胞がマクロファージの自浄作用により貪食された結果、尿道に排出された大食細胞が尿中にみられることがあるとされる<sup>6)</sup>が、前立腺肥大症に特異的な現象ではない。そのため、前立腺の腫大は、直腸指診と腹部超音波検査でスクリーニングされ、加えて排尿障害の自覚障害や尿流測定などの検査を行い、総合的に診断されるため、臨床検査だけから前立腺の肥大の有無を検出することが出来ない。このように、既存の臨床検査では前立腺肥大症の診断には不十分であるため、本研究では、既存の尿検査から排尿障

害の原因となる前立腺の組織学的変化を検出する手法を開発することとした。

また、高齢化にともない腎能低下は避けられないことはよく知られている。解剖学的変化として、腎重量は40歳以降徐々に低下し、80歳になると30%以上の重量低下を示し、腎臓の全面積及び平均の皮質面積ともに加齢により有意に減少するとされている<sup>7)</sup>。腎機能はヒトの臓器機能の中でも肺機能に次いで加齢による機能低下が大きく(図1.1)、糸球体濾過量(Glomerular Filtration Ration; GFR)も加齢とともに性差によらず進行性に低下する(図1.2)<sup>8)</sup>。加齢でGFRの低下をきたす要因は、腎血管の動脈硬化による腎血流の低下や、硬化糸球体増加による機能ネフロン数の減少などが考えられる<sup>8)</sup>。したがって、このような機能低下を引き起こす器質的な変化を簡便な検査で検出することが望まれるところである。腎機能は一度低下すると回復することはないため、異常の兆候を早期に検出することが求められ、この器質的な変化をより早期に検出することにより、疾患を未然に防ぐための日常的な指標として疾患の予防に活用することが期待できる。現在、腎・泌尿器系疾患の一般的な検査は、尿の性状、残留物の検査、排尿速度の測定など、尿を用いた検査であるが、その検査で異常値が検出されたとしても、生体組織の変化を検出するまでには至らない。その主な原因は、尿の生成から排出にいたるまで多くの過程が含まれているため、その結果、どの部位に器質的な変異とそれに続く、機能変化が起こっているか不明になる。例えば、尿沈渣検査でみられるフィブリン円柱や空胞変性円柱などの特徴的な形態をとり、関連する疾患は明らかとなっても、その正確な生成過程が分かっている成分も少なくない<sup>9)</sup>。糸球体型赤血球の生成についても、尿細管での浸透圧、電解質(カリウム、リン酸)濃度変化が重要であることはある程度分かっているが、未だに確定しているわけではなく、またその理由については明確でない<sup>9)</sup>。尿沈渣成分の中には臨床的意義の確定していない成分もある<sup>9)</sup>など、尿沈渣から組織の器質的な変化を検出することは困難である。

尿は、腎臓の糸球体で血液をろ過して生成された排泄物であり、その中に含まれる成分は血液成分に由来するため、生体内の異常を知るうえで尿検査は重要な意義がある。尿は、毎日体外へ約1.5 L排泄されているため、非侵襲的に十分な量を採取することができ、臨床検査の材料としては最も適している。そのため、尿検査は臨床検査の中で最も広く行われており、基礎的な検査として重要である。また、尿の異常は腎・泌尿器系疾患だけでなく、全身の各種疾患との関連もあり、尿中成分の量的・質的变化や病的な成分の早期発見は臨床的価値が高い。しかし、既存の尿検査は臓器・組織の機能変化を検出することは出来るが、臓器の器質的な変化を検出することが出来ない。このように、腎・泌尿器系疾患に対する既存の尿検査では、組織の器質的な変化を検出することが不十分であるため、本研究では、尿中に出現する細胞の形態変化に着目し、腎障害との間に関係があるかどうか検討することとした。

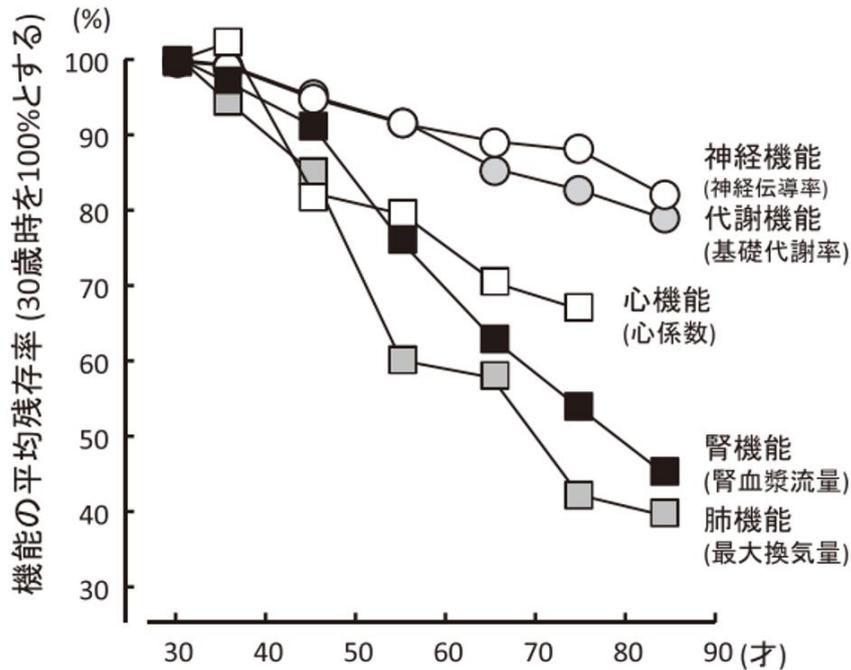


図 1.1 加齢に伴う生理機能の低下

神経機能、代謝機能は加齢による機能低下が小さいが、腎機能、肺機能は加齢による機能低下が大きい（文献<sup>8)</sup>より引用）

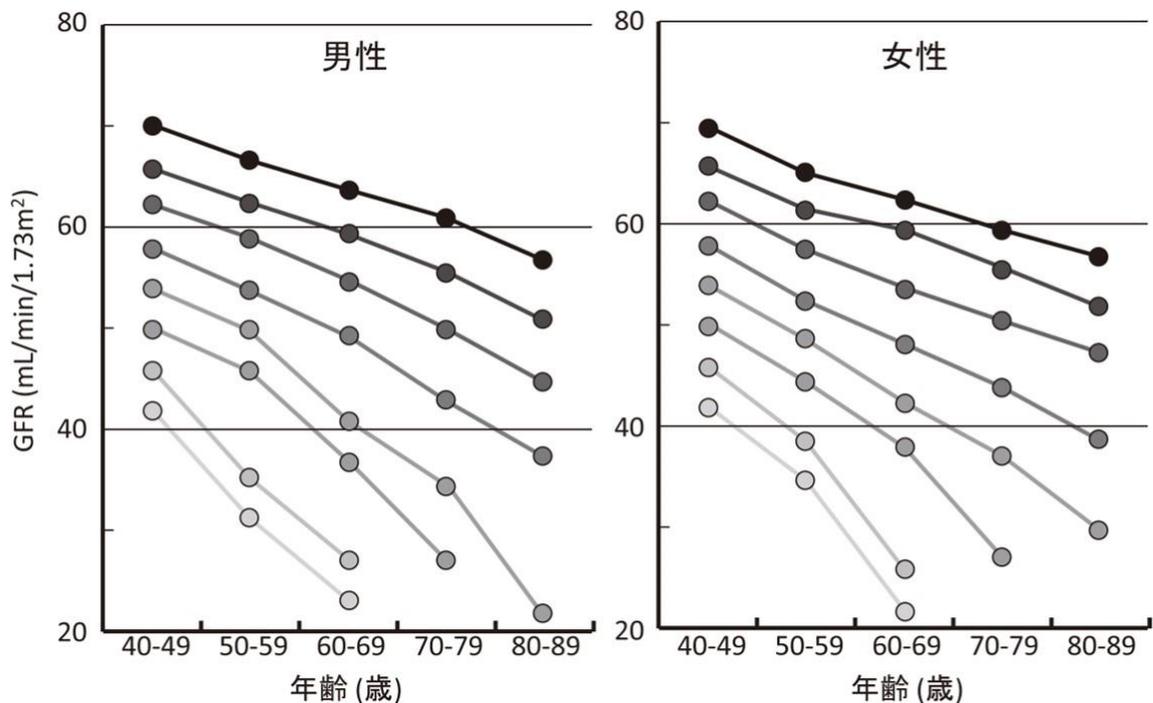


図 1.2 加齢による糸球体濾過量の低下

男女ともに加齢とともに糸球体濾過量は低下すが、その低下速度は、もともとの濾過量が低いほど早い（文献<sup>8)</sup>より引用）。

#### 1.4 本研究の目的と論文の構成

本研究の目的は、尿を用いた簡便な検査によって、機能変化を引き起こす組織変化を検出することである。非侵襲的に腎・泌尿器系の器質的変化を検出することが可能となれば、生検や手術を行って臓器・組織を摘出することなく組織学的変化を評価することができ、経時的な病態の経過観察も可能となる。

第2章では、排尿障害を伴う前立腺肥大症について、疫学や組織学的な発生・進展、自覚症状および他覚症状の評価方法についてまとめ、さらに既存の検査の問題点について指摘した。第3章では、実験動物を用いて、排尿障害を引き起こす前立腺の病理組織変化について検討し、尿流測定パラメーターとの関連を検討した。第4章では、腎障害の病態解析に用いられる各種動物モデルの中から、アデニン誘発モデルに着目し、腎障害が惹起されるメカニズムや生化学的・病理組織学的特徴について概説するとともに、慢性腎不全の症状進行に伴う腎機能の変化と尿中に剥離する尿細管上皮細胞との関係性について、これまでの報告をまとめた。第5章では、アデニン誘発慢性腎不全マウスが新しいヒトCKDモデルとして活用できるかどうかを実験によって検討し、腎機能変化と尿中に剥離する尿細管上皮細胞のN/C比（細胞質に占める核の面積比）との関係についても言及した。最終章である第6章では、本論文を総括するとともに、本研究の今後について述べて結語とした。

## 第1章の参考文献

- 1 前川 真人; 【臨床検査の展望】 生化学・免疫検査. 臨床検査 57: 12-16, 2013.
- 2 熊谷 俊一; 【臨床検査医学の展望】 立証検査医学. 生物試料分析 33: 133-140, 2010.
- 3 新田 孝作; 【腎疾患の診療に役立つ新しい検査】 腎泌尿器疾患における臨床検査の重要性. 腎と透析 65: 485-487, 2008.
- 4 北村 博司; 【糖尿病性腎症-病態の解明と最新治療戦略】 病理からみた糖尿病性腎症の病態解明. 医学のあゆみ 238: 840-845, 2011.
- 5 日本泌尿器科学会前立腺肥大症診療ガイドラインリッチヒルメディカル2011.
- 6 関田 信之; 【疾患・病態を理解する-尿沈渣レファレンスブック】 泌尿器疾患-疾患と尿沈渣成分 その他 前立腺肥大症. 臨床検査 62: 528-529, 2018.
- 7 土井 俊夫; 高齢者腎疾患. 日本老年医学会雑誌 36: 695-698, 1999.
- 8 佐藤 稔; 【老化と血栓症】 腎の老化のバイオマーカー. 日本血栓止血学会誌 26: 276-283, 2015.
- 9 菊池 春人; 臨床検査と標準化 各検査領域における標準化の現状と課題 尿形態検査の標準化. 臨床病理 66: 58-61, 2018.

## 第 2 章 前立腺肥大症と排尿障害

### 2.1 前立腺肥大症の疫学的背景

本章では、排尿障害の原因となる前立腺の組織学的変化を検出するにあたり、前立腺肥大症に関する一般的事項をまとめた。前立腺肥大症(Benign Prostatic Hyperplasia: BPH)の定義は、前立腺腫大(Benign Prostatic Enlargement: BPE)、閉塞(Benign Prostatic Obstruction: BPO)、下部尿路症状(Lower Urinary Tract Symptoms: LUTS)の 3 要素の存在、すなわち前立腺の良性過形成により前立腺が腫大し、そのために下部尿路閉塞が起こり、さらにさまざまな排尿・蓄尿症状を伴うものとされている<sup>1)</sup>。BPH の基本的な病態は前立腺腫大に伴う尿道抵抗増大による尿路通過障害であり、様々な排尿症状がみられる。しかし、実際には BPH では下部尿路閉塞のみでなく、膀胱の機能障害が起こり、より多彩な症状を呈する(図 2.1)。膀胱機能障害には、排尿筋過活動(Detrusor Overactivity: DO)と排尿筋低活動(Detrusor Underactivity: DU)があり<sup>1)</sup>、いずれも BPH に合併することが少なくない。そのため、前立腺肥大が必ずしも排尿障害を引き起こすわけではなく、逆に前立腺肥大がなくても排尿障害を呈する場合もある。このように、BPH と排尿障害は単純な関係ではないため、その診断は簡単でない。そこで、既存の臨床検査、特に尿検査を用いて簡便に排尿障害を伴う前立腺肥大を検出する方法を開発することに意義があると考えた。

次に、前立腺肥大症の有病率の推移について述べる。本邦における community-based study の結果をもとに、国際前立腺症状スコア(International Prostate Symptom score: IPSS)の重症度・前立腺体積・最大尿流量の 3 者に基づく前立腺肥大症の有病率を計算した結果、IPSS>7 点、前立腺体積>20 mL、最大尿流量<10 mL/秒の全てを満たす人の割合は、40 歳代 2%、50 歳代 2%、60 歳代 6%、70 歳代 12%と、加齢に伴って増大している(表 2.1)<sup>2)</sup>。この結果から、前立腺肥大症の明らかな危険因子は加齢と考えられる。また、思春期のテストステロンを産生する機能的に正常な精巣の存在も重要な危険因子である。それ以外にも、遺伝的要因や食事・嗜好品との関係が指摘されている。さらに、最近では肥満、高血圧、高血糖及び脂質異常症と前立腺肥大症の関係が注目されている<sup>3)</sup>。そのため、今後高齢社会が進行すればますます BPH 患者数が増加することが予想され、簡便に組織学的な前立腺肥大を検出する方法の開発が求められる。

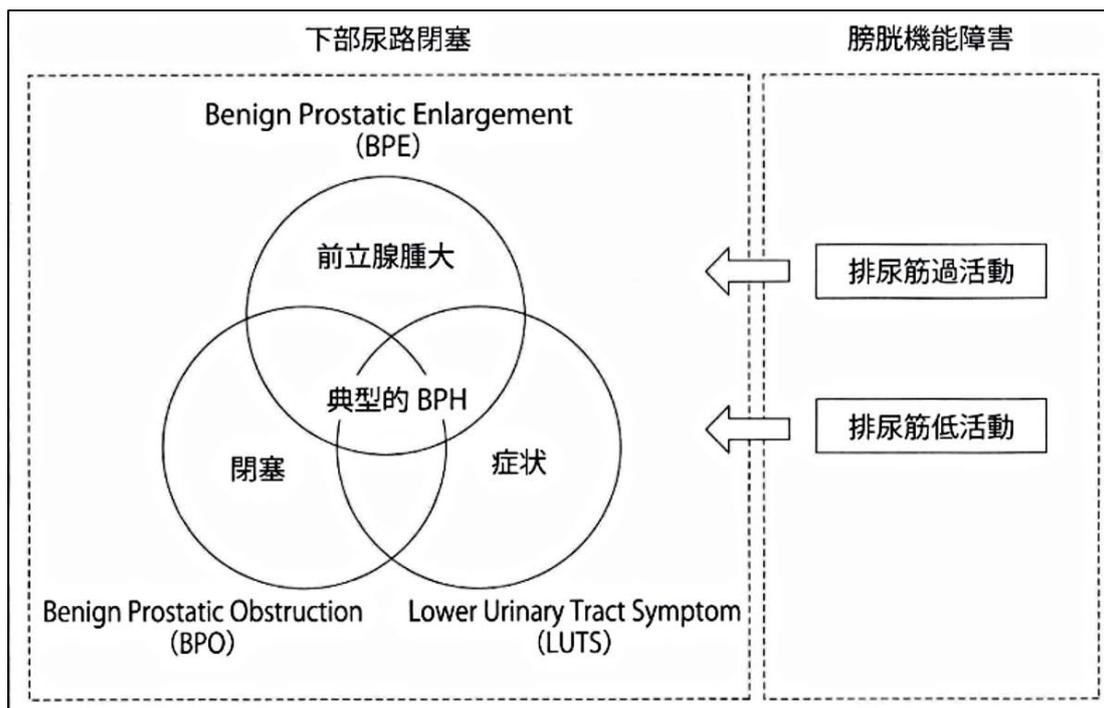


図 2.1 前立腺肥大症における下部尿路機能障害の病態（文献<sup>1)</sup>より引用）

前立腺肥大症では、前立腺腫大・閉塞により様々な症状を呈するが、下部尿路閉塞あるいは加齢や他の疾患による膀胱機能障害（排尿筋過活動、排尿筋低活動）が病態を修飾する。

表 2.1 本邦における前立腺肥大症の有病率（文献<sup>2)</sup>より引用）

年齢(歳)	(1) %IPSS>7	(2) %PV>20	(3) %Q <sub>max</sub> <10	(4) (1)+(2)+(3)
40~49	47	20	4	2
50~59	44	35	6	2
60~69	52	39	19	6
70~79	63	37	42	12

## 2.2 前立腺肥大症の病態

それでは、前立腺肥大はどのようにして発生し、進展していくのであろうか。剖検での検討<sup>4)</sup>によると、前立腺重量は20歳頃まで増大し、性的成熟後40～50歳頃までは20g前後とほぼ一定しているが、その後は加齢に従って増加する。組織学的な前立腺肥大症は30歳代より認められ、その頻度は加齢に従って増加し、80歳代では約90%に達する。この傾向は人種や地域を問わず普遍的に認められる<sup>5)</sup>ことから、前立腺肥大症は生理的な加齢現象であると考えられている。一般住民を対象に各国で施行されたいずれの横断的研究においても、経直腸的超音波断層法により推定した前立腺体積は、集団全体としては加齢に従って増大するとされ、本邦においても、欧米での結果と比較すると各年代とも前立腺体積は小さいものの加齢による増大を認める<sup>6)</sup>。加齢による前立腺体積の増大は縦断的研究においても確認されており、米国オルムステッド群での5年間にわたる研究によれば、前立腺体積は年間1.6%の増大を示している。本邦の15年にわたる研究では、40～79歳の一般住民の前立腺体積は17.4 mLから23.9 mLに有意に増加していた（年間前立腺増大率2.6%）<sup>2)</sup>。

一方、一部のヒトでは加齢に従って前立腺が縮小する。オランダの一般住民を対象にした検討<sup>7)</sup>によると、観察開始時と比較して10 mL以上、あるいは26%以上の前立腺体積の減少を有意な変化と定義した場合、それぞれ1.4%、1.1%の症例が4.2年後に前立腺体積の減少を示した。さらに、剖検での検討によると、過形成のない正常前立腺は加齢に伴って萎縮するのに対し、過形成を有する前立腺は加齢とともに増大していた。このことから、前立腺には萎縮と増大の2通りの過程があり、いずれを辿るかは40歳代半ばが分岐点とされている<sup>8)</sup>。また、経直腸的超音波断層法を用いた検討では、前立腺体積は全体としてみれば経時的に増大するが、個々の症例では萎縮から増大までの様々な自然史をとり、将来的に前立腺が増大するか否かは50歳前後で決定される可能性がある<sup>9)</sup>と報告されている。

## 2.3 前立腺肥大症に伴う排尿障害の自覚症状の評価

BPHによって引き起こされる排尿障害の自覚症状には、残尿感、頻尿、尿線途絶などがあり、これらの症状を客観的に評価するため、国際前立腺症状スコア(International Prostate Symptom score: IPSS)が用いられる。このIPSSは、自覚症状に関するスコアとQuality of Life(以下、QOL)についてのスコアから構成されており、前者の前立腺症状スコアは、残尿感、頻尿、尿線途絶、尿意コントロール、尿の勢い、排尿開始時のいきみ(遷延性排尿)、夜間頻尿の7項目の質問につき6段階の答えが用意されている(表2.2)<sup>6)</sup>。IPSSに関しては、7つの質問項目が典型的な前立腺肥大症の症状をカバーしていて重複がないこと、QOLに関する質問と相関が高いこと、正常例と肥大症例で差が出ること、治療により低スコア化することなどにより、信頼性が高いとされている<sup>10)</sup>。しかし、IPSSは後述する尿流率検査で得られる最大尿流率などの他覚的な検査とは相関が必ずしも高いわけではない<sup>11)</sup>。その理由として、自覚症状は個人の主観によって大きく結果が変わってくるためと考えられる。

表 2.2 国際前立腺症状スコア(IPSS)と QOL スコア質問票 (文献<sup>6)</sup>より引用)

どれくらいの割合で次のような症状がありましたか	全くない	5回に1回の割合より少ない	2回に1回の割合より少ない	2回に1回の割合くらい	2回に1回の割合より多い	ほとんどいつも
この1か月の間に、尿をしたあとにまだ尿が残っている感じがありましたか	0	1	2	3	4	5
この1か月の間に、尿をしてから2時間以内にもう一度しなくてはならないことがありましたか	0	1	2	3	4	5
この1か月の間に、尿をしている間に尿が何度もとぎれることがありましたか	0	1	2	3	4	5
この1か月の間に、尿を我慢するのが難しいことがありましたか	0	1	2	3	4	5
この1か月の間に、尿の勢いが弱いことがありましたか	0	1	2	3	4	5
この1か月の間に、尿をし始めるためにお腹に力を入れることがありましたか	0	1	2	3	4	5
	0回	1回	2回	3回	4回	5回以上
この1か月の間に、夜寝てから朝起きるまでに、ふつう何回尿をするために起きましたか	0	1	2	3	4	5

IPSS \_\_\_\_\_点

	とても満足	満足	ほぼ満足	なんともいえない	やや不満	いやだ	とてもいやだ
現在の尿の状態がこのまま変わらずに続くとしたら、どう思いますか	0	1	2	3	4	5	6

QOLスコア \_\_\_\_\_点

IPSS 重症度：軽症 (0~7点)、中等症 (8~19点)、重症 (20~35点)

QOL 重症度：軽症 (0, 1点)、中等症 (2, 3, 4点)、重症 (5, 6点)

## 2.4 排尿障害を客観的に評価する検査方法

次に、排尿障害を他覚的に評価する検査方法について述べる。尿流動態検査(urodynamic study: UDS)は、蓄尿から排尿までの下部尿路機能を総合的に評価する検査の総称であり、排尿障害の代表的な他覚検査である。正常な下部尿路機能は、膀胱の蓄尿機能と尿道の排出機能が上手く協同運動していることによって成り立っている。そのため、UDS の目的はこの両者を含む下部尿路機能を評価することである。正常な蓄尿機能には、①適切な尿意を感じることが出来る、②尿が溜まるにつれて膀胱（排尿筋）が弛む、③尿道（括約筋）が閉まって尿を漏らさない、④十分な量の尿を溜めることができる、ことなどが必要であり、正常な排出機能には、⑤膀胱（排尿筋）が収縮する、⑥尿道（括約筋）が弛む、⑦膀胱出口から先に狭いところがない（例えば前立腺肥大症など）、⑧残尿がない、ことなどが必要である<sup>12)</sup>。これら①から⑧がどうなっているか調べるために、各種の UDS が実施される。このうち、以下に代表的な測定項目についてまとめた。

### 2.4.1 尿流測定(Uroflowmetry: UFM)

尿流測定は、尿勢低下や尿線途絶といった排尿症状を訴える患者に対して行う検査であるが、排尿障害をきたす BPH などでは二次的変化として、頻尿や尿意切迫感などの蓄尿症状を訴えることもあるため、どのような下部尿路症状(LUTS)を訴える患者でも排尿障害の有無を確認するためにスクリーニングとして行われることが多い。排尿パターンと排尿量、最大尿流率(Q<sub>max</sub>)・平均尿流率(Q<sub>ave</sub>)や排尿時間が客観的数値として測定できる。排尿パターンには様々なタイプがあるが、正常では釣鐘型(図 2.1a)を呈し、典型的な腹圧排尿パターン(図 2.1b)では排尿筋低下が疑われ、閉塞パターン(図 2.1c)では下部尿路閉塞が疑われる<sup>13)</sup>。

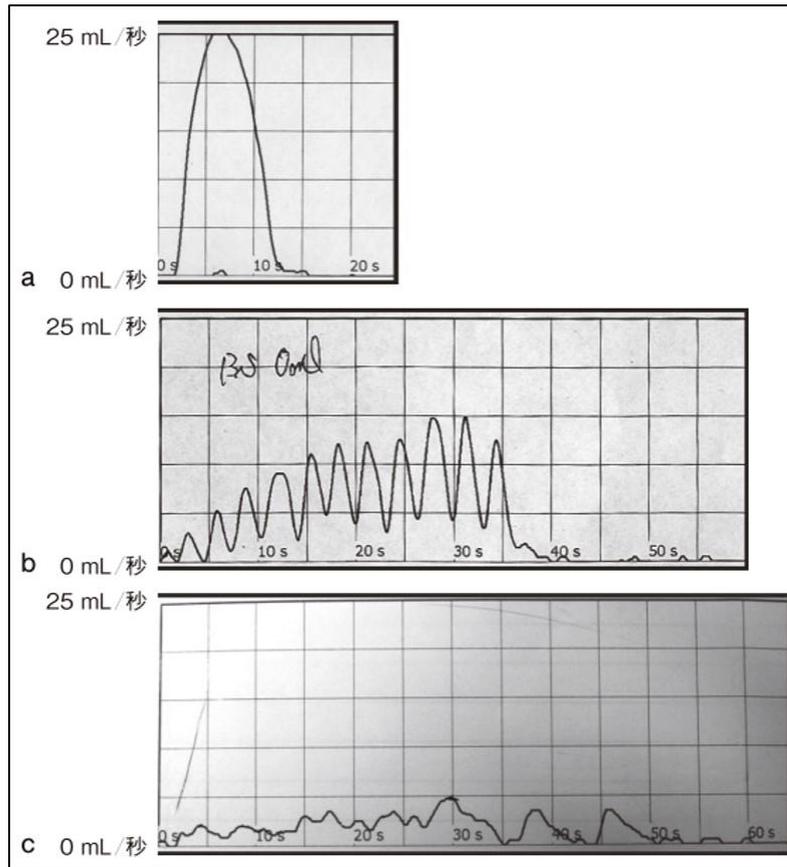


図 2.1 尿流パターン (文献<sup>13)</sup>より引用)

- a: 正常パターン。排尿量(Voided volume: VV): 179 mL、最大尿流率(Maximum flow rate: Qmax): 25.6 mL/秒
- b: 腹圧排尿パターン。VV: 244 mL、Qmax: 149 mL/秒
- c: 閉塞パターン。VV: 104mL、Qmax: 4.9 mL/秒

#### 2.4.2 残尿測定

尿の排出障害をもつ患者では、排尿後に膀胱内に尿が残ることがあり、これを残尿と呼ぶ。残尿量は排出障害の程度と相関があり、治療方針の決定を持つため、超音波断層装置による測定が一般的に行われている<sup>12)</sup>。残尿量の推定は、膀胱の縦・横・奥行きを測定して計算する。

#### 2.4.3 内圧尿流測定 (Pressure-flow study: PFS)

内圧尿流測定は尿道、直腸にカテーテルを挿入して行い、さらに尿道にカテーテルを留置したままで排尿するという侵襲的な検査で、排尿時の尿流量と排尿筋圧の解析により、下部尿路閉塞と膀胱排尿筋収縮能を評価するが、膀胱内圧測定と合わせて行うことにより、蓄尿機能と排尿機能を他覚的に評価できる検査で、BPH における下部尿路機能障害の病態を正確に診断することができる。PFS においては、排尿筋圧と尿流量の関係から下部尿

路閉塞と排尿筋収縮機能を評価するが、最も重要なパラメーターは最大尿流時排尿筋圧(PdetQmax)であり、尿流測定 of 最大尿流率(Qmax)との関係を解析する<sup>1)</sup>。

#### 2.4.4 尿流測定 of 限界

前述 of 尿流測定(UFM)や残尿測定は、BPH の 3 病態 (前立腺腫大、閉塞、下部尿路症状) of 中の下部尿路閉塞 of 有無や程度を正確に評価することは出来ない。すなわち、尿流測定は尿道抵抗と排尿時 of 膀胱内圧 (膀胱収縮力) により決定されるため、尿流率 of 低下は下部尿路閉塞か膀胱収縮障害によるが、両者を鑑別することが困難である<sup>1)</sup>。それでは、排尿障害を訴える患者全例に内圧尿流測定(PFS)を行うべきであろうか。前述のように、PFS は直腸と尿道にカテーテルを挿入する侵襲的検査であるため、患者に負担がかかるとともに、実施には専用 of 機器・専門的知識と技術を必要とするため、ルーチン検査として行うのは現実的ではない。さらに、尿流動態検査は、排尿障害 of 病態把握になくはならない検査であるが、機能障害を引き起こす臓器 of 器質的変化を検出することは出来ない。このような現状を踏まえ、排尿障害と前立腺組織 of 変異との関連を明かにして、さらにその組織 of 変異を検出する検査法 of 開発を目指した。

## 第2章の参考文献

- 1 後藤 百万; 【前立腺肥大症:あれかこれか】 前立腺肥大症の診断 Pressure-Flow Study かそれ以外か? 泌尿器外科 31: 251-257, 2018.
- 2 日本泌尿器科学会男性下部尿路症状・前立腺肥大症診療ガイドライン東京リッチヒルメディカル2017.
- 3 佐藤 俊介, 賀本 敏行; 【高齢化社会で増加する排尿障害】 排尿障害を来す疾患 前立腺肥大症. 臨牀と研究 94: 167-171, 2017.
- 4 Berry SJ, Coffey DS, Walsh PC, Ewing LL; The development of human benign prostatic hyperplasia with age. The Journal of Urology 132: 474-479, 1984.
- 5 Isaacs J. T., Coffey D. S.; Etiology and disease process of benign prostatic hyperplasia. Prostate Suppl 2: 33-50, 1989.
- 6 日本泌尿器科学会前立腺肥大症診療ガイドラインリッチヒルメディカル2011.
- 7 Bosch J. L., Bohnen A. M., Groeneveld F. P., Bernsen R.; Validity of three calliper-based transrectal ultrasound methods and digital rectal examination in the estimation of prostate volume and its changes with age: the Krimpen study. Prostate 62: 353-363, 2005.
- 8 Swyer G. I.; Post-natal growth changes in the human prostate. J Anat 78: 130-145, 1944.
- 9 Masumori N., Tsukamoto T., Kumamoto Y., et al.; Age-related differences in internal prostatic architecture on transrectal ultrasonography: results of a community based survey in Japan. J Urol 157: 1718-1722, 1997.
- 10 木村明、栗本重陽、西古靖、保坂義雄、北村唯一、河邊香月、中村昌平、浜田知久馬; 終日ウロフローメトリによる IPSS の信頼性の検討. 日本泌尿器科学会雑誌 86: 1728-1734, 1995.
- 11 本間 之夫; 前立腺肥大症の重症度分類の試み. 日本泌尿器科学会雑誌 84: 272-279, 1993.
- 12 西沢 理よくわかって役に立つ排尿障害のすべて大阪永井書店2007.
- 13 和田 直樹, 柿崎 秀宏; 【泌尿器科検査パーフェクトガイド】知っておきたい泌尿器科検査の手順のコツ 尿流動態検査 尿流動態検査. 臨床泌尿器科 71: 77-84, 2017.

## 第3章 排尿障害を惹起する前立腺の上皮細胞過形成

### 3.1 背景と目的

排尿障害は直接生命を脅かすことはないものの、日常生活において多岐にわたり影響を与え、生活の質 (Quality of life; QOL) を著しく低下させる。日本排尿機能学会が実施した排尿に関する疫学的調査において、何らかの排尿症状で生活に影響がある者は 14.7% に上る<sup>1)</sup>。排尿障害の症状としては、蓄尿相症状 (頻尿、尿意切迫、尿失禁など) と排尿相症状 (排尿の途絶、排尿開始時のいきみ、尿勢の減弱など) があり、高齢男性では、これらの症状を伴う疾患として最も頻度が高いのは、前立腺肥大症 (Benign Prostatic Hyperplasia; BPH) である<sup>2)</sup>。その一方で、排尿障害の自覚症状と前立腺サイズとの間に相関性はなく<sup>3)</sup>、前立腺の肥大が必ずしも排尿障害を引き起こすわけではないと言われている<sup>4)</sup>。この事実は、前立腺の肥大を惹起する要因が多く、前立腺の器質の変化が一様でないこと、また前立腺と尿路の位置的關係によって排尿に与える影響が異なること、など複雑な要素が関係していることに起因すると考えられる。そこで、本研究では、排尿障害を惹起する前立腺の組織学的な特徴を検出し、これまで不明の点が多かった、排尿障害と前立腺肥大との関連性を明らかにする一助とすることを目的として実験を行った。

### 3.2 方法

#### 3.2.1 実験動物

実験動物には、成熟齢の C57BL/6J 雄性マウス 8 匹 (44 週齢から 52 週齢、平均 50.0±3.7 週齢) 及び老齢の C57BL/6J 雄性マウス 28 匹 (115 週齢から 175 週齢、平均 137.3±21.2 週齢) を用い、マウス用固形飼料 (NMF、オリエンタル酵母工業(株)製) 並びに飲料水を自由に与えて、室温 24±2 °C で飼育した。本実験計画は、「愛媛県立医療技術大学動物実験指針」に従い、実施した。

#### 3.2.2 排尿過程の測定及び尿流測定パラメーターの算出

胃ゾンデを用いて純水 1.0 mL をマウスの胃内へ注入後、自作の測定装置を用い、無麻酔・無拘束下で排尿量を累積的に測定した。15×10 cm の透明なアクリル板で覆った囲い (図 3.1 矢印) の中にマウスを入れ、尿が金網を介して電子天秤皿の上に置いた採尿用アクリル板に落下するようにした。電子天秤 (A&D GX-200、株式会社エー・アンド・デイ、東京) とパソコンを接続し、電子天秤皿に落下した尿重量を 0.5 秒ごとに 3 時間測定し、尿比重を 1 として尿量に換算して記録した。測定時には実験装置全体を遮蔽し暗条件とし、1 日 1 回の測定を 3 回実施した。

排尿過程の典型例を図 3.2 に示した。尿流測定パラメーターとして一般的に用いられている項目<sup>5)</sup>のうち、1 回排尿量 (図 3.2 矢印 A)、排尿持続時間 (図 3.2 矢印 B) を測定した。これらの測定値から平均排尿速度 (A/B) を算出した。1 回の排尿終了時点は、3.0 秒以上排尿がない時点までとした。マウスは測定時間 3 時間の間に 2~5 回程度排尿し、それぞれの排尿過程から尿流測定パラメーターを算出した。

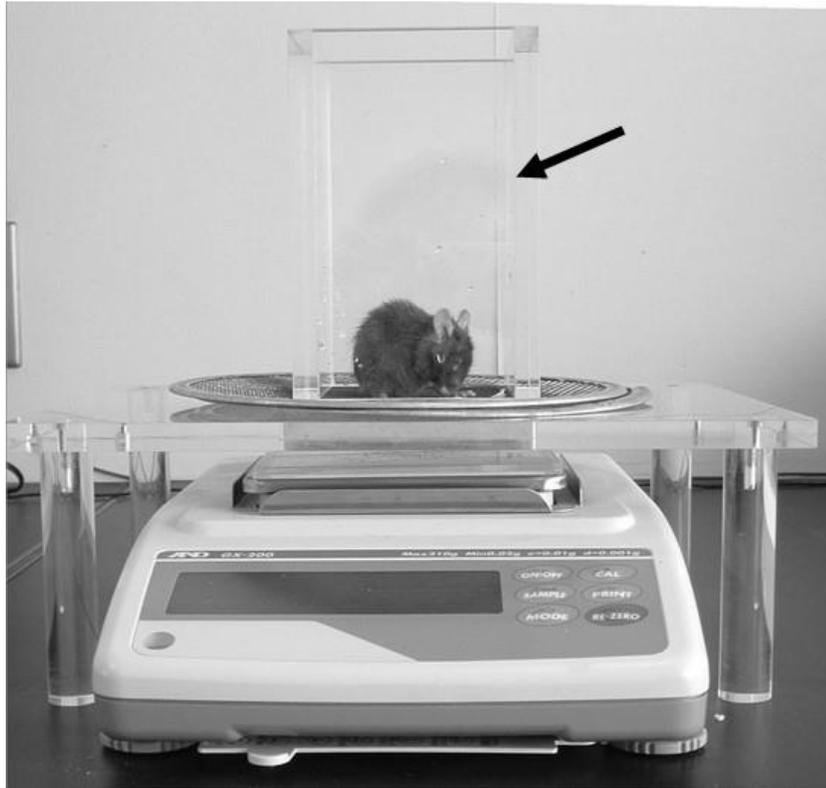


図 3.1 排尿量測定装置

電子天秤皿の上に金網を渡し、その上にアクリル板で作った囲い（矢印）を置いてから中にマウスを入れた。

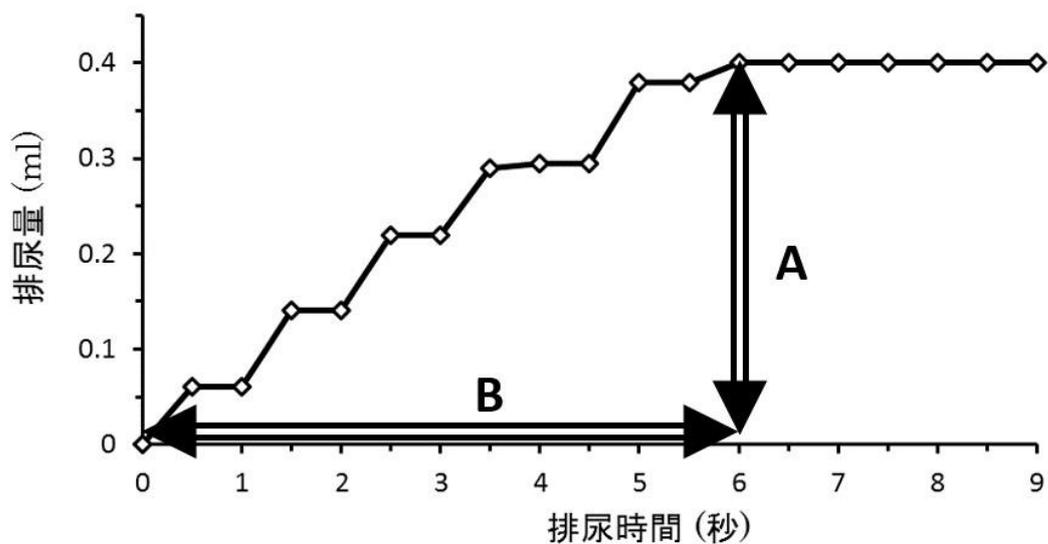


図 3.2 排尿過程の典型例

尿流測定パラメーターを算出するための排尿過程の典型例を示した。得られた排尿過程から、1回排尿量（矢印 A）、排尿持続時間（矢印 B）、平均排尿速度（A/B）を算出した。

### 3.2.3 組織学的解析

排尿過程の測定終了後、マウスの前立腺を摘出して左側葉・右側葉・腹葉・背葉の4つに分離し、10%ホルマリンで一昼夜固定した。摘出臓器をパラフィン包埋後、厚さ4  $\mu\text{m}$ の組織切片を作製してヘマトキシリン・エオジン染色を施し、組織像を顕鏡観察した。

前立腺肥大マウスにみられる組織学的特徴は、(a) 腺管の拡張、(b) 上皮細胞の増大及び増加による腺腔面積の減少、(c) 腺管数の増加である<sup>6,7)</sup>。これらの組織学的特徴を定量的に評価するため、前立腺を構成する各腺管について腺管面積、腺腔面積、上皮面積、上皮細胞数を測定し、腺管拡張の評価は上皮面積/腺管面積比、上皮細胞増殖については上皮細胞数/上皮面積比(=上皮細胞密度)を算出した。図3.3に前立腺腺管の定量化方法を示した。前立腺組織に存在する腺管のうち斜線で囲まれた部分(図3.3B 矢頭)が上皮面積、斑点で囲まれた部分(図3.3B 矢印)が腺腔面積、そして上皮面積と腺腔面積の和が腺管面積である。面積の測定には、精密面積線長測定器(X-PLAN360d II+, 牛方商会、東京)を用いた。次に、光学顕微鏡下で計測した上皮面積内に存在する細胞核の数を数え、細胞数とした。最後に、細胞数を上皮面積で除して上皮細胞密度とした。前立腺組織内の全ての腺管に対して解析を行った。但し、組織断面によって腺管数が変動するため、解析した腺管数を最大10とした。

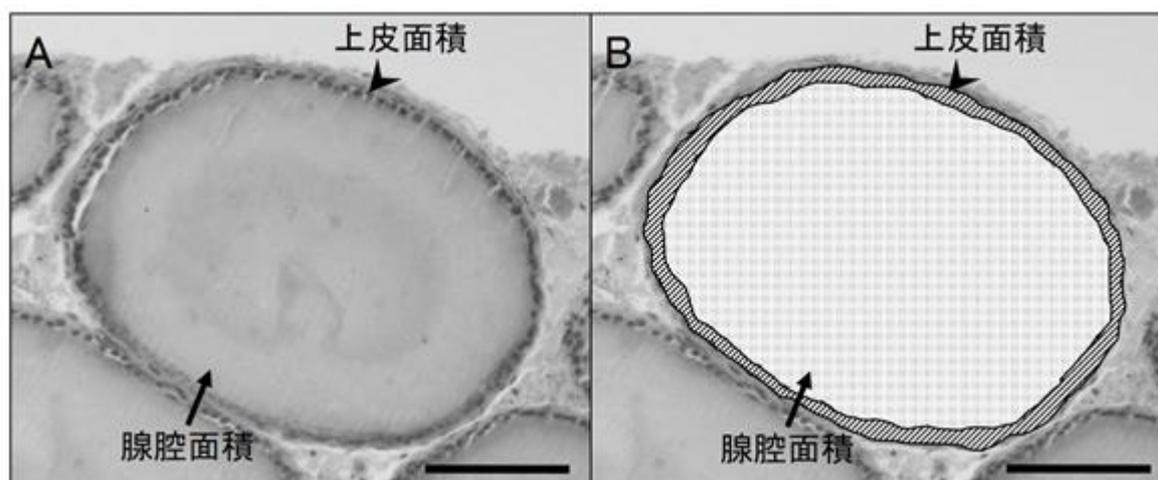


図 3.3 各腺腔の上皮細胞密度の算出方法

前立腺を構成する腺腔の1つを示した。斜線で囲まれた部分(矢頭)が上皮面積、斑点で囲まれた部分が腺腔面積である。上皮面積内に存在する細胞数をその上皮面積で除して、上皮細胞密度を算出した。スケールバーは100  $\mu\text{m}$ で示す。

### 3.2.4 統計学的解析

各マウスの測定値は平均値 ± 標準偏差で表示した。統計解析のためのソフトウェアとして EZR (Saitama Medical Center、Jichi Medical University、Saitama、Japan) を使用し、有意差検定は対応の無い t 検定を用い、 $p < 0.05$  を統計学的に有意差ありとした。

## 3.3 結果

### 3.3.1 排尿障害をきたしているマウスの検出

成熟齢マウス 8 匹 (成熟齢群) と老齢マウス 28 匹の排尿過程を比較したところ、老齢マウス 28 匹中 22 匹は成熟齢群と同様の 1 回排尿量と排尿持続時間を示した。この 22 匹の老齢マウスを老齢正常群 (平均  $134.3 \pm 19.7$  週齢) とした。一方、成熟齢群と比較して 1 回排尿量が少なく、そして採尿用アクリル板上に多数 (5~10 か所程度) の点状痕跡 (少量の尿の乾燥跡) が観察された老齢マウス 6 匹 (平均  $148.3 \pm 24.8$  週齢) を排尿障害群とした。成熟齢群、老齢正常群、排尿障害群の排尿過程の典型例を図 3.4 から図 3.6 に示した。排尿障害群の排尿過程は、成熟齢群及び老齢正常群と比較して 1 回排尿量と排尿持続時間が低下していた。

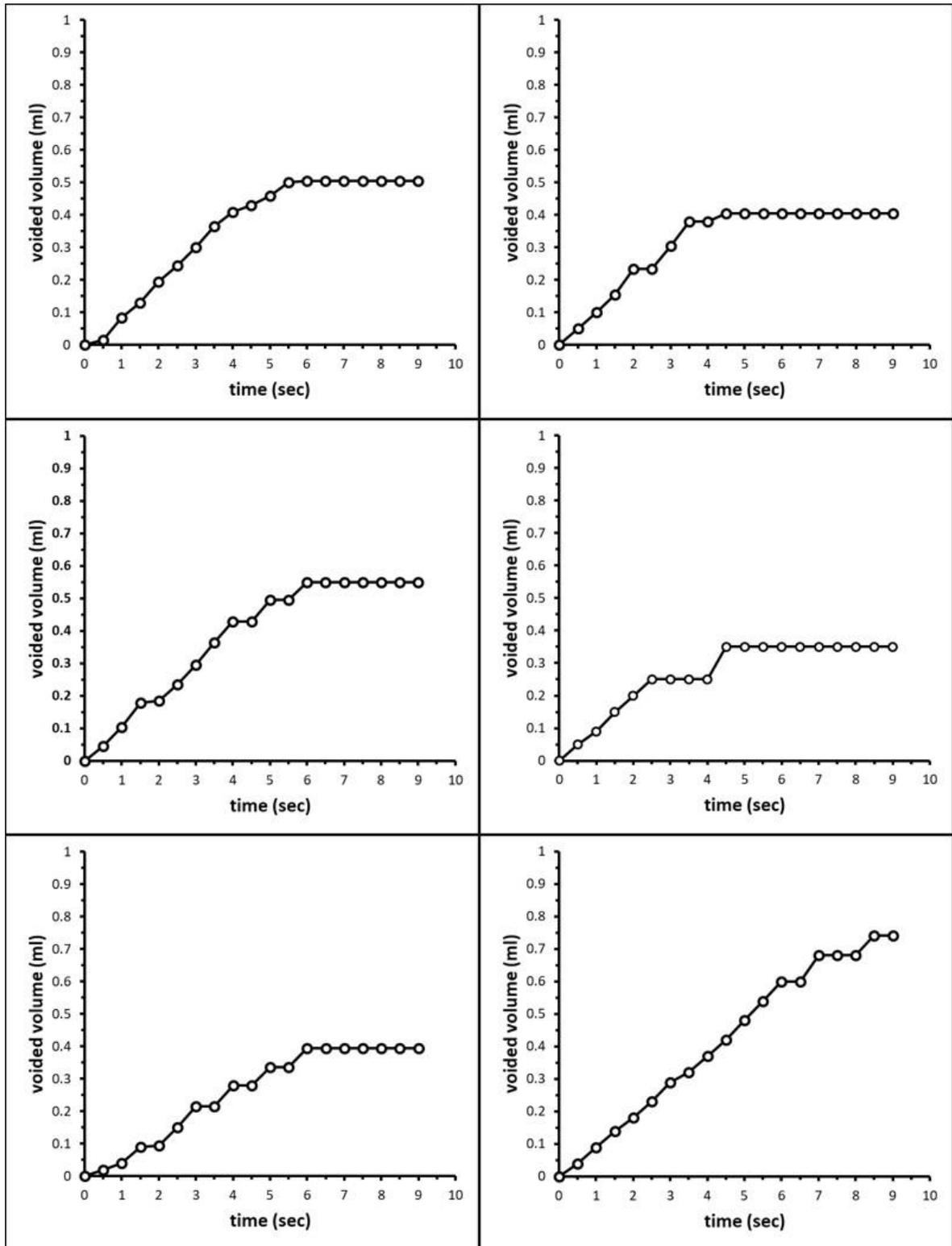


図 3.4 成熟年齢群の排尿過程の典型例

排尿持続時間は長く、1回排尿量も多い。排尿障害のない排尿過程である。

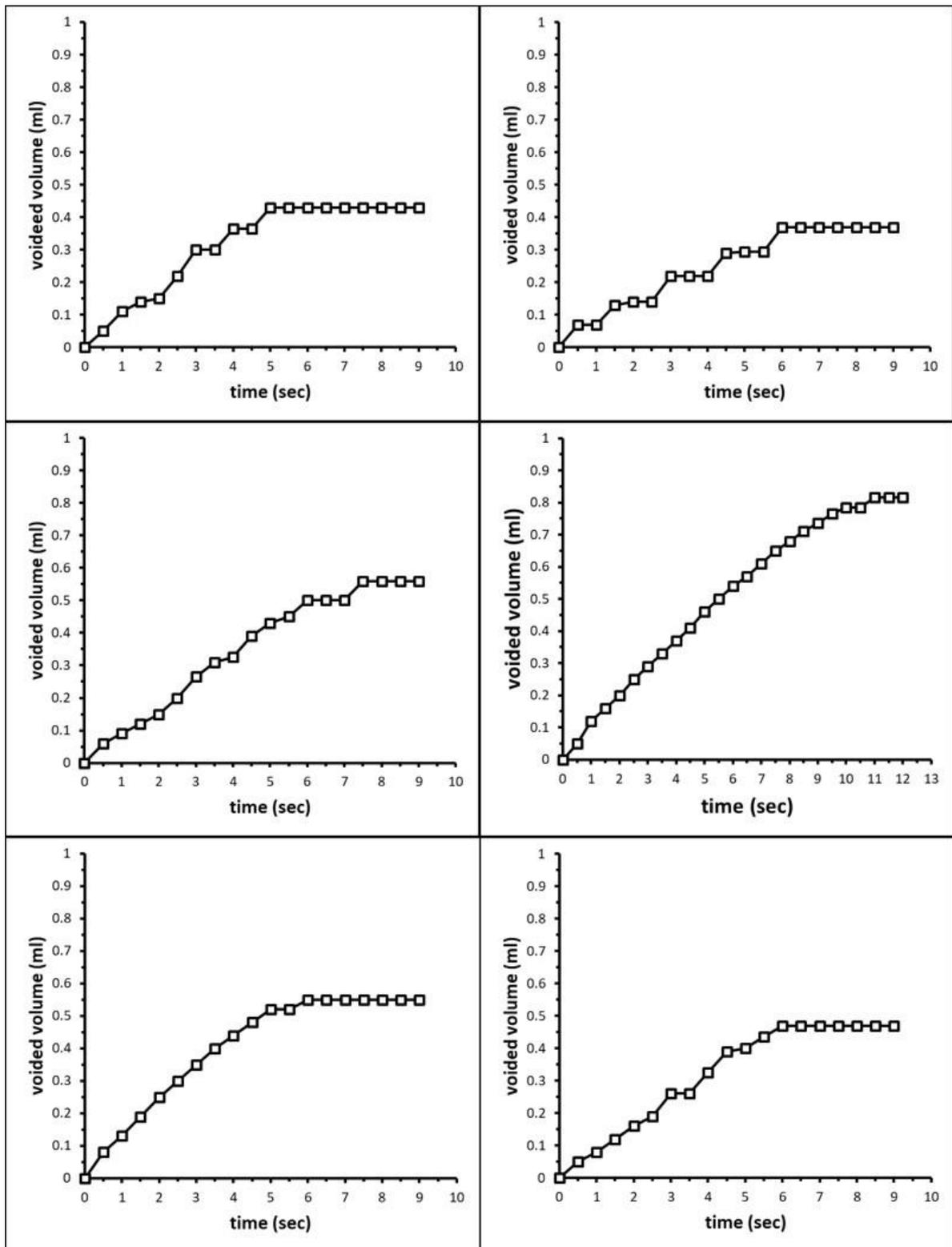


図 3.5 老齡正常群の排尿過程例

成熟齡群と類似した、排尿障害のない排尿過程を呈した。排尿持続時間は長く、1回排尿量も多い。

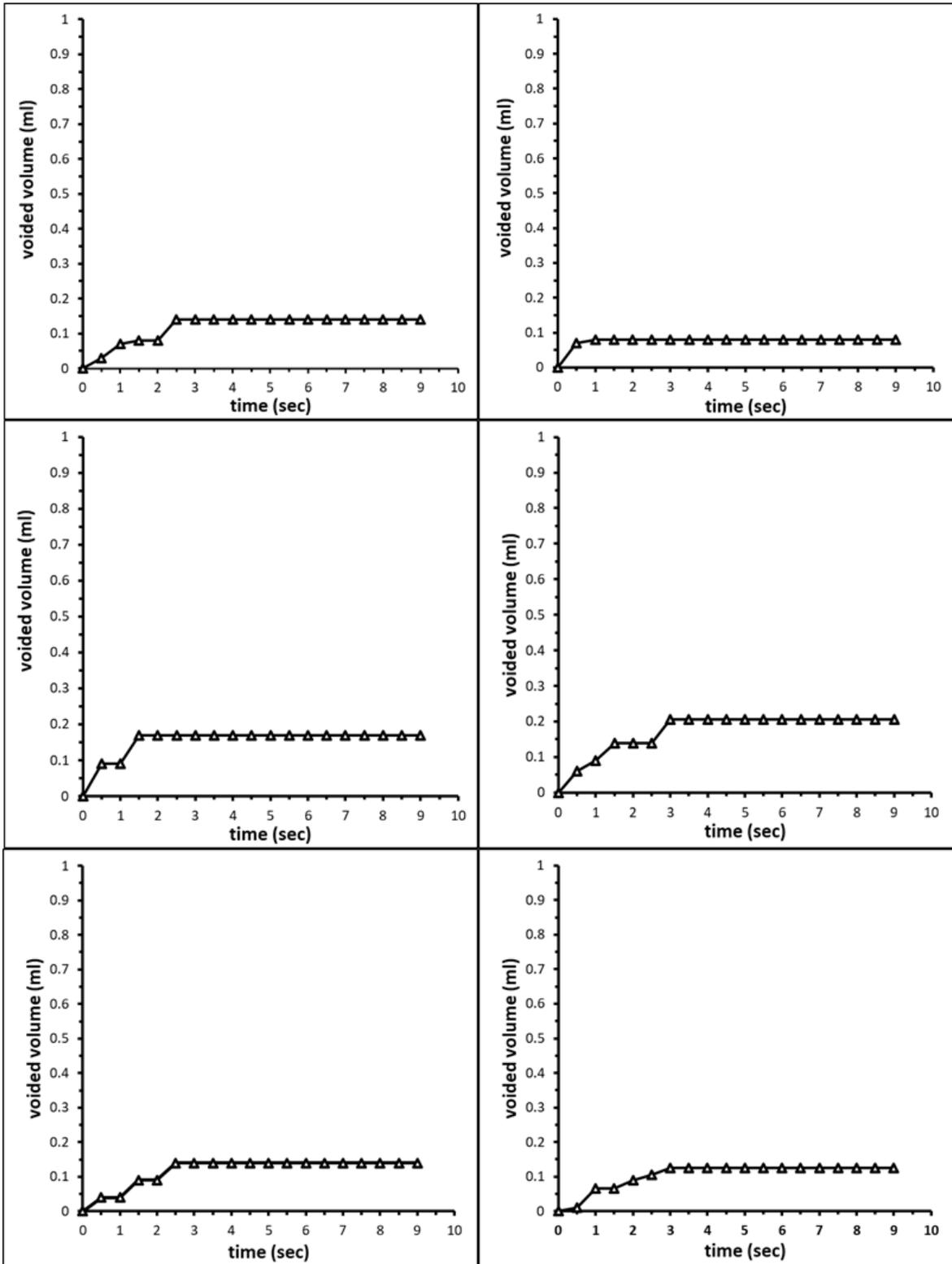


図 3.6 排尿障害群の排尿過程例

成熟年齢群や老齢正常群と比べて排尿持続時間は短く、1回排尿量も少ない。排尿障害のある排尿過程である。

### 3.3.2 尿流測定パラメーターの比較

成熟齢群と老齢マウスの正常群及び排尿障害群の尿流測定パラメーターの結果を表 3.1 に示した。成熟齢群及び老齢正常群それぞれの 1 回排尿量は  $0.381 \pm 0.077$  ml 及び  $0.289 \pm 0.121$  ml、排尿持続時間は  $4.3 \pm 0.7$  sec 及び  $4.1 \pm 1.5$  sec となり、ともに両群間で有意差を認めなかった。一方、平均排尿速度は成熟齢群で  $0.087 \pm 0.009$  ml/sec となり、老齢正常群  $0.077 \pm 0.009$  ml/sec と比較して有意に増加した ( $p < 0.05$ )。次に、老齢正常群と排尿障害群を比較したところ、排尿障害群の 1 回排尿量は  $0.105 \pm 0.029$  ml、排尿持続時間は  $1.6 \pm 0.5$  sec となり、ともに有意に低値を示した ( $p < 0.05$ )。一方、排尿障害群の平均排尿速度 ( $0.081 \pm 0.015$  ml/sec) は老齢正常群との間で有意差を認めなかった。

これらの結果から、尿流測定パラメーターのうち排尿障害の程度を評価する指標として 1 回排尿量と排尿持続時間が適切であることが示唆された。

表 3.1 成熟齢群と老齢マウスの尿流パラメーターの比較

	成熟齢群 (n=8)		正常群 (n=22)		排尿障害群 (n=6)	
	平均値 ±標準偏差	範囲	平均値 ±標準偏差	範囲	平均値 ±標準偏差	範囲
週齢	$50.0 \pm 3.7$	44-52	$134.3 \pm 19.7$	115-175	$148.3 \pm 24.8$	116-175
1回排尿量 (ml)	$0.381 \pm 0.077$	0.280-0.506	$0.289 \pm 0.121$	0.146-0.583	$0.105 \pm 0.029$	0.066-0.140
排尿持続時間 (秒)	$4.3 \pm 0.7$	3.3-5.2	$4.1 \pm 1.5$	2.0-6.6	$1.6 \pm 0.5$	0.8-2.3
平均排尿速度 (ml/秒)	$0.087 \pm 0.009$	0.071-0.099	$0.077 \pm 0.009$	0.051-0.091	$0.081 \pm 0.015$	0.065-0.100

得られた値は平均値 ± 標準偏差および範囲 (最小値-最大値) で示した。

\* 老齢正常群 vs. 成熟齢群 :  $p < 0.05$

\*\* 老齢正常群 vs. 排尿障害群 :  $p < 0.05$

### 3.3.3 前立腺組織像の検討

マウスの前立腺は、左側葉・右側葉・背葉・腹葉の 4 部位に分けられる (図 3.7)。このうち左右側葉前立腺は根元が尿道に付随しているだけで、大部分は精嚢と一体化している。そのため肥大による排尿への影響は軽微と判断し、腹葉と背葉の 2 部位について検討した。

背葉前立腺の組織像を老齢正常群と排尿障害群で比較した結果、排尿障害群は老齢正常群 (図 3.8) と比較して上皮細胞の過形成による密度の増加や重層化が見られた (図 3.9 矢印)。上皮細胞密度を用いた比較でも、老齢正常群の  $219.0 \pm 81.4$  個/mm<sup>2</sup> に対して排尿障害群は  $339.4 \pm 97.2$  個/mm<sup>2</sup> と有意に高値を呈した ( $p < 0.05$ )。一方、上皮面積/腺管面積比は、老齢正常群 ( $0.503 \pm 0.134$ ) と比較して排尿障害群 ( $0.412 \pm 0.101$ ) で有意差を認めず、背葉前立腺重量についても老齢正常群 ( $0.020 \pm 0.009$  g) と排尿障害群 ( $0.016 \pm 0.002$  g) で有意差を認めなかった (表 3.2)。

次に、老齢正常群と排尿障害群の腹葉前立腺の組織像を比較したところ、両群間に相違を認めなかった (図 3.10)。上皮面積/腺管面積比、上皮細胞密度、腹葉前立腺重量の比較

においても、老齡正常群と排尿障害群でそれぞれ $0.296 \pm 0.082$ と $0.347 \pm 0.142$ 、 $247.2 \pm 72.5$  個/mm<sup>2</sup>と $311.3 \pm 97.2$  個/mm<sup>2</sup>、 $0.014 \pm 0.005$  gと $0.015 \pm 0.006$  gとなり両者間に有意差はなかった(表 3.2)。そのため本研究では、背葉前立腺から得られる病理組織学的特徴のうち、以下に示す、上皮細胞密度を用いて1回排尿量と排尿持続時間という2つの尿流測定パラメーターとの関係を検討した。

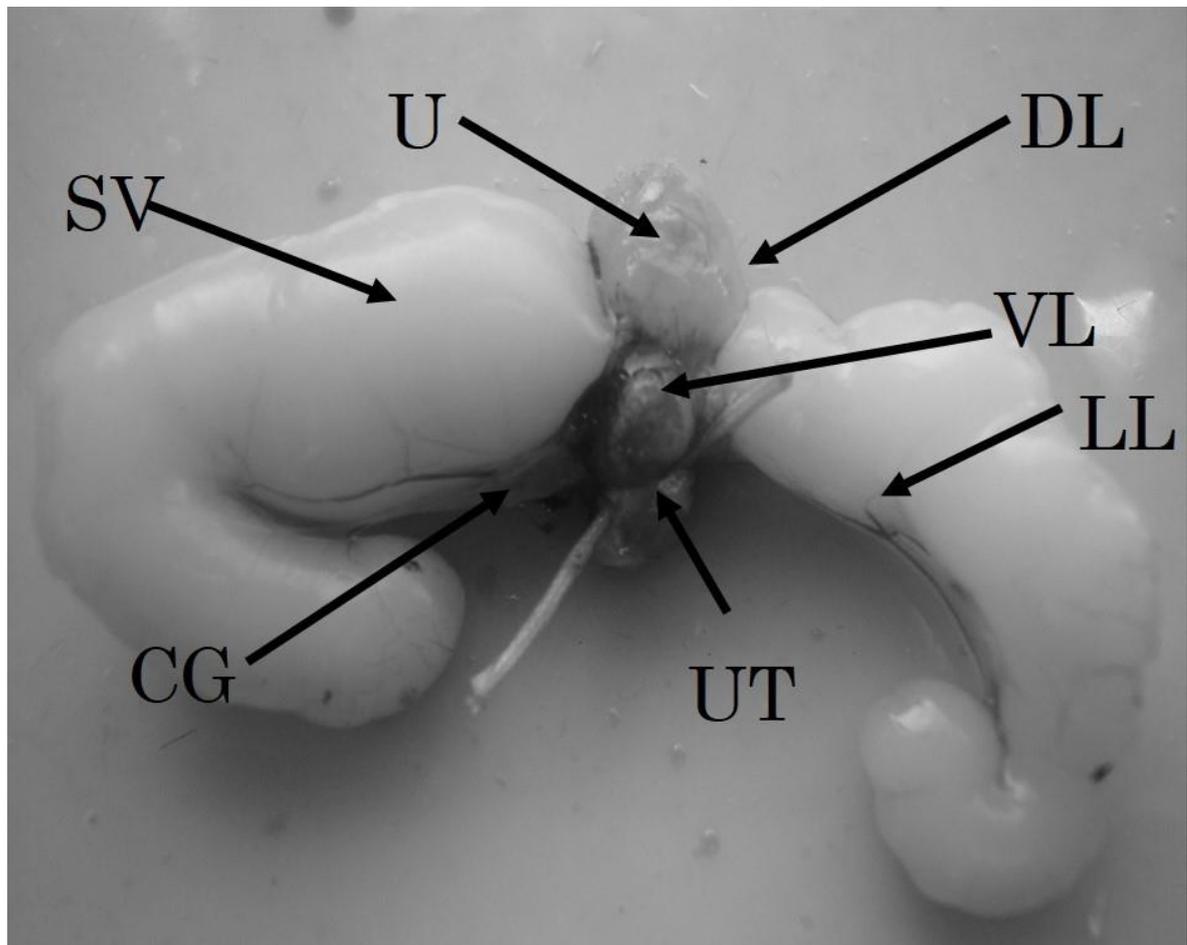


図 3.7 雄マウスの骨盤内臓器の肉眼的外観

雄マウスの骨盤内臓器の摘出写真を示した。CG: coagulating gland (凝固線)、DL: dorsal lobe (背葉)、LL: lateral lobe (側葉)、SV: seminal vesicle (精囊)、U: urinary bladder (膀胱)、UT: urethra (尿道)、VL: ventral lobe (腹葉)。

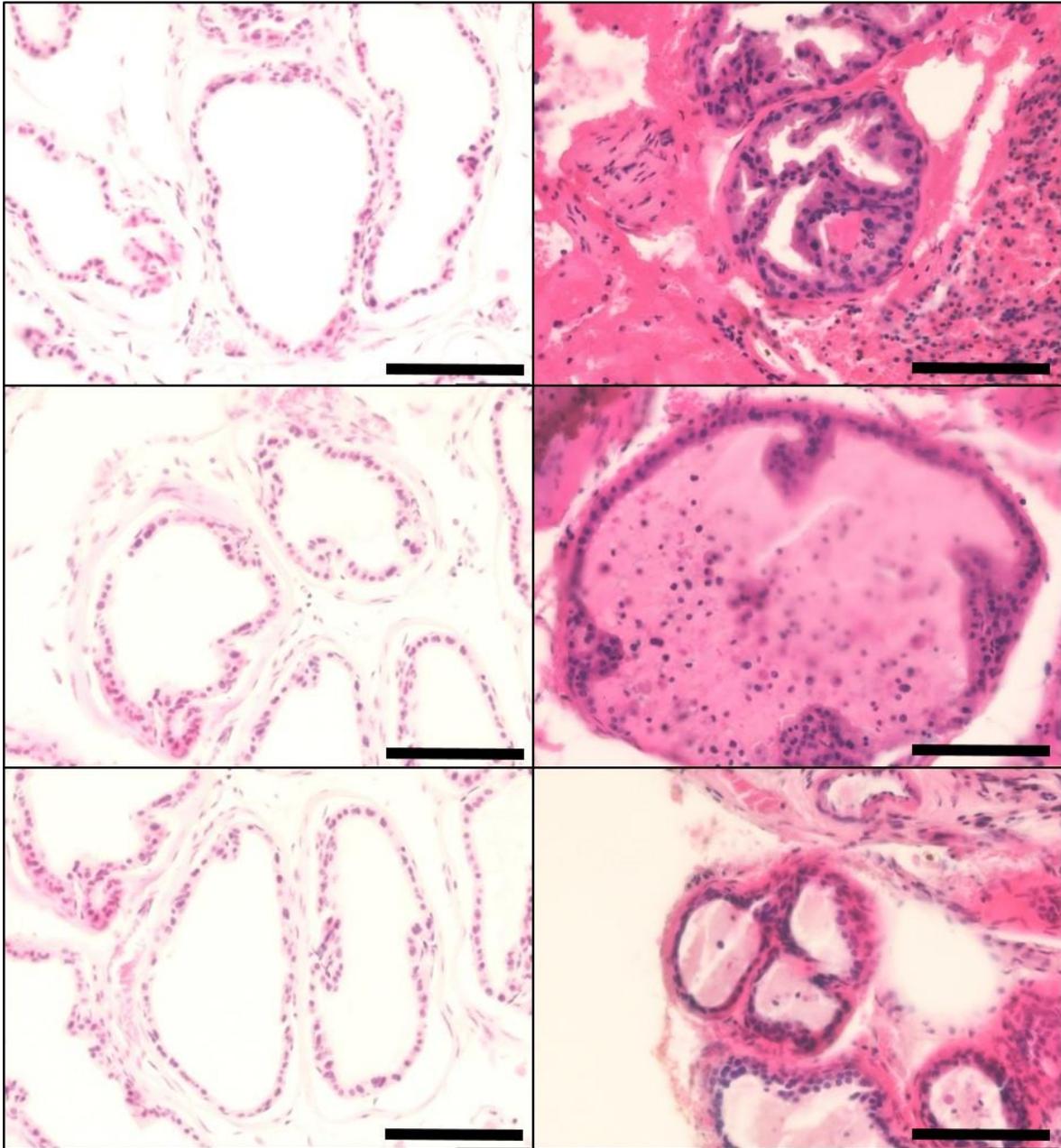


図 3.8 老齡正常群の背葉前立腺組織像の典型例

老齡正常群の背葉では上皮細胞が単層に並んでおり、上皮細胞密度も低い。  
スケールバーは 100  $\mu\text{m}$  で示す。

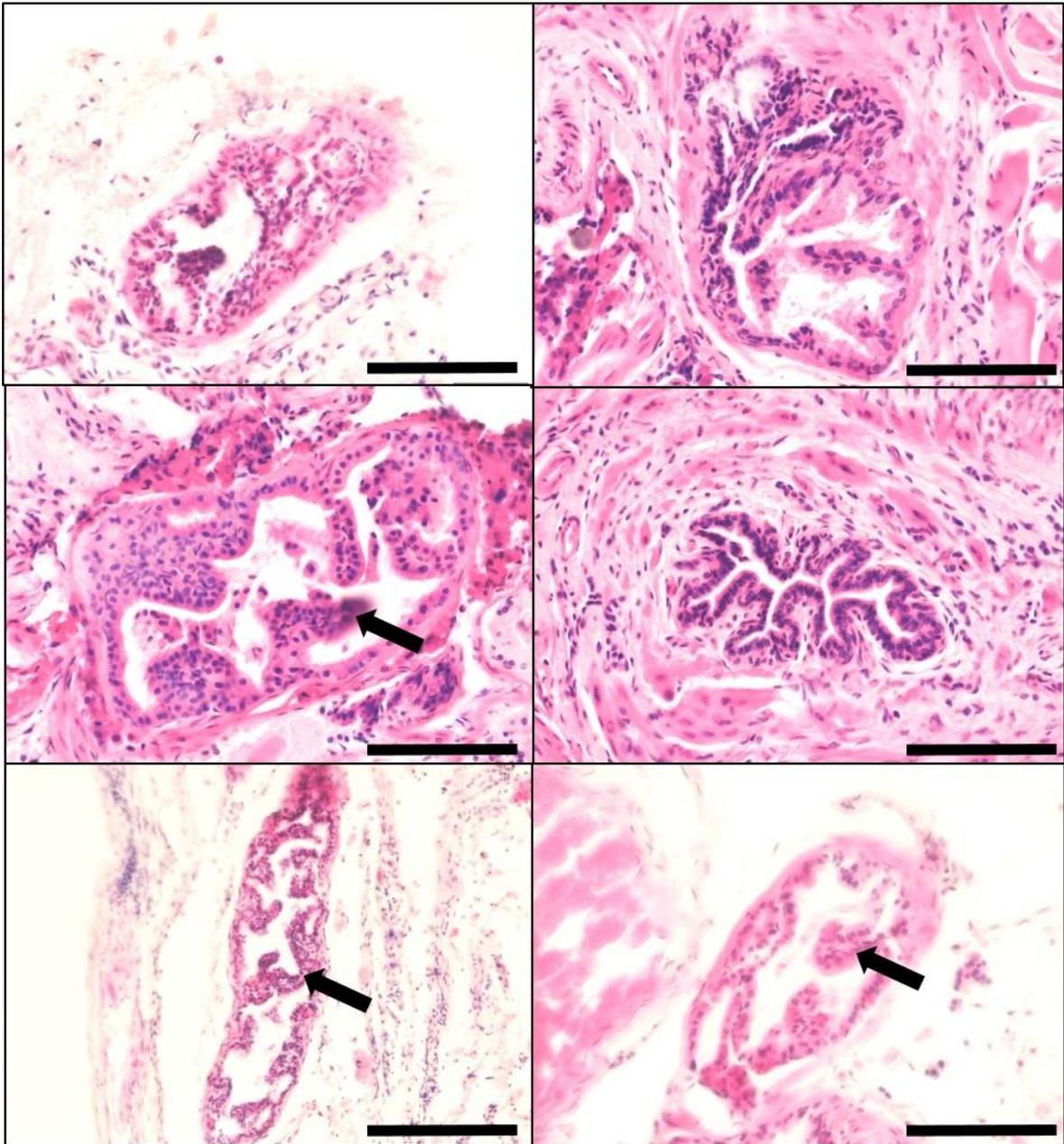


図 3.9 排尿障害群の背葉前立腺組織像の典型例

排尿障害群の背葉では上皮細胞の乳頭状増殖（矢印）や重層化、過形成による上皮細胞密度の増加がみられた。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$  で示す。

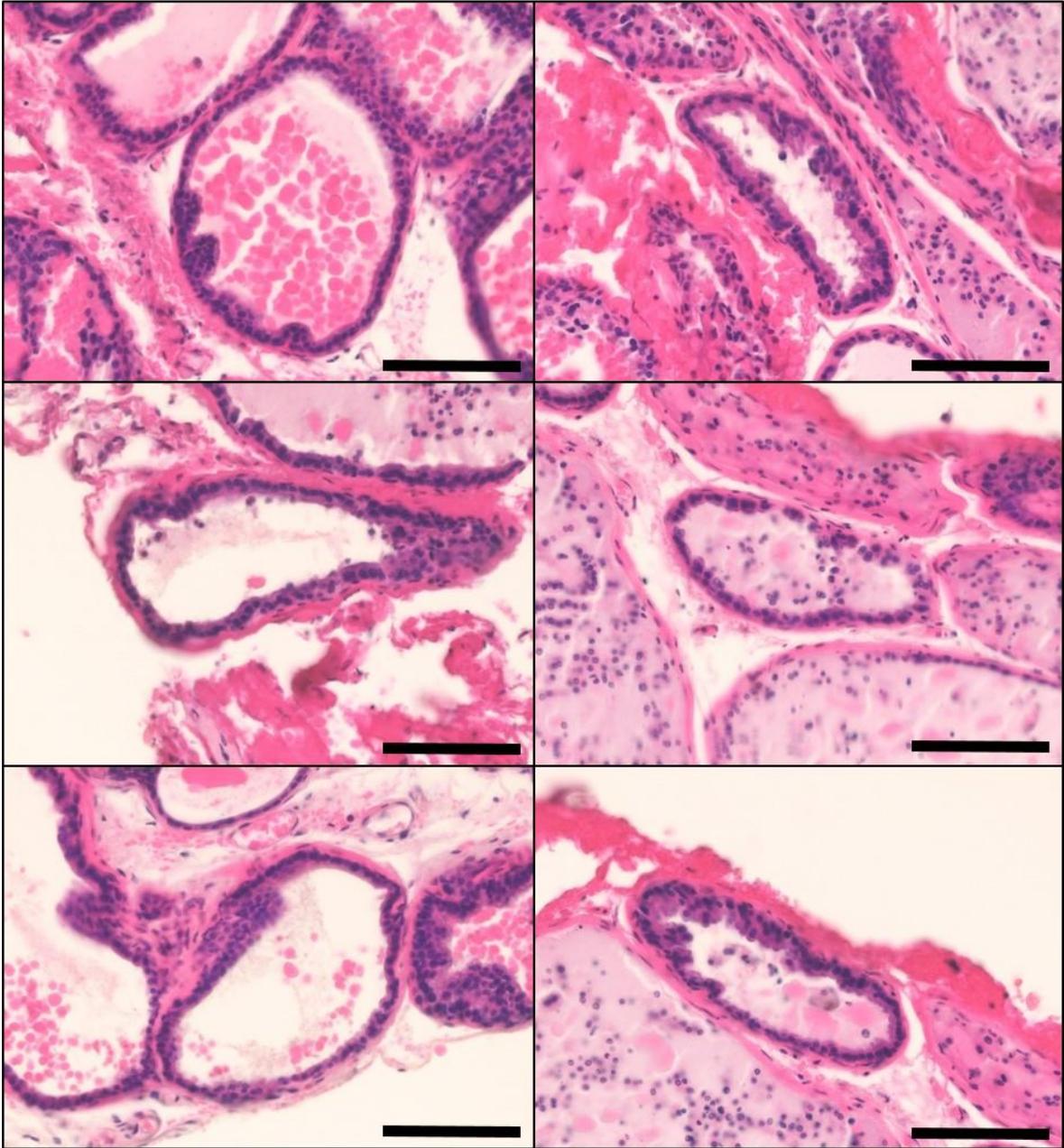


図 3.10 老齡正常群（左）と排尿障害群（右）の腹葉前立腺の比較

腹葉前立腺の比較において、老齡正常群と排尿障害群はともに上皮細胞が単層に並び、両群間で相違を認めなかった。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$  で示す。

表 3.2 腹葉前立腺と背葉前立腺における病理組織学的特徴の比較

	背葉前立腺		腹葉前立腺	
	老齡正常群 (n=22)	排尿障害群 (n=6)	老齡正常群 (n=22)	排尿障害群 (n=6)
上皮面積 / 腺管面積比	0.503±0.134	0.412±0.101	0.296±0.082	0.347±0.142
上皮細胞密度 (個/mm <sup>2</sup> )	219.0±81.4	339.4±97.2 *	247.2±72.5	311.3±97.2
前立腺重量 (g)	0.020±0.009	0.016±0.002	0.014±0.005	0.015±0.006

得られた値は平均値 ± 標準偏差で示した。

\* 老齡正常群 vs. 排尿障害群 : p<0.05

### 3.3.4 尿流測定パラメーターと病理組織学的特徴との関係

老齡マウス 28 匹 (老齡正常群と排尿障害群) の上皮細胞密度と、1 回排尿量及び排尿持続時間という 2 つの尿流測定パラメーターとの関係について Pearson の相関係数を用いて検討したところ、それぞれ  $r=-0.554$ 、 $r=-0.479$  (ともに  $p<0.05$ ) と有意な負の相関を認めた (図 3.11)。これらの結果から、背葉前立腺組織の上皮細胞密度の増加が、1 回排尿量と排尿持続時間を低下させることが示唆された。

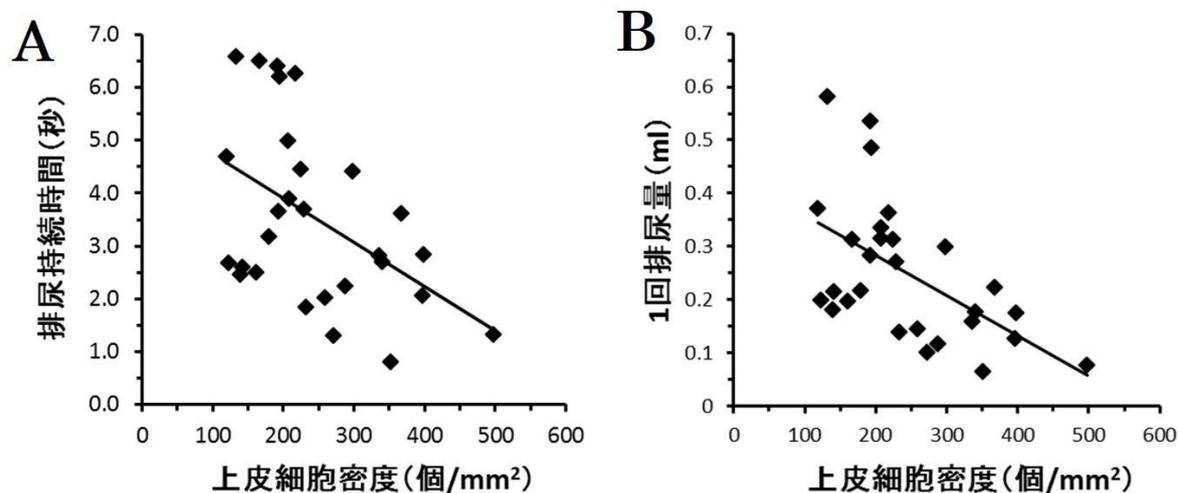


図 3.11 上皮細胞密度に対する排尿持続時間 (A) と 1 回排尿量 (B) の関係

上皮細胞の増加に伴い、排尿持続時間と 1 回排尿量が減少した。A: 回帰直線は  $y=-0.00076x+0.43$ 、相関係数は  $r=-0.554$  であった。B: 回帰直線は  $y=-0.00850x+5.61$ 、相関係数は  $r=-0.479$  であった。

### 3.4 考察

排尿障害の程度の評価のため行われる尿流測定(uroflowmetry)では、1回排尿量、排尿持続時間、最大排尿速度、平均排尿速度の項目が測定されている<sup>8)</sup>が、これらの尿流測定パラメーターは、排尿障害に関する自覚症状の指標である国際前立腺症状スコア(International Prostate Symptom Score; I-PSS)との相関性は認められていない<sup>8-10)</sup>。そのため、尿流測定は主として尿路閉塞の重症度の評価に用いられることに留まっており、尿流測定を前立腺サイズの評価のために行われることには至っていない。

BPHの組織学的特徴には、(1)腺管の囊腫状拡大、(2)異常に増殖した腺管、(3)腺管を構成する上皮細胞の増殖、(4)分泌物や剥離上皮細胞の存在、(5)腺葉内及び間質結合織の増殖、(6)結節性増生の存在等、がある<sup>11)</sup>。このように前立腺の肥大の成因が多岐にわたることが、前立腺の肥大が必ずしも排尿の障害に結びつかないと一因と考えられ、そして、尿流測定が前立腺サイズの評価に用いられないと考えられる。マウスを用いた本実験では前立腺の各葉のうち背葉においてのみ、老齢正常群と比較して排尿障害群で上皮細胞密度の有意差のある増加が確認されたが、前立腺重量の比較において両群間に有意差を認めなかった(表3.2)。この結果は、排尿障害を引き起こす原因として前立腺のサイズが必ずしも関与しないということを示している。これは、ヒトにおける前立腺のサイズと尿流測定の結果が相関しない<sup>8,9,12)</sup>ことと一致する。

本研究では、1回排尿量の減少及び排尿持続時間の低下を示したマウスの前立腺の組織像を検討し、背葉前立腺組織の上皮細胞密度の増加を認めた。この上皮細胞密度の上昇は、アンドロスタンジオールとエストラジオール投与で惹起した前立腺肥大イヌモデルの組織学的特徴として報告されている<sup>13)</sup>が、ここでは排尿障害の有無については述べられていない。では、なぜ背葉前立腺腺腔の上皮細胞増加が、排尿障害を惹起するのであろうか。1つの可能性として、尿道に接する前立腺組織の弾性が低下し、排尿時の尿道圧迫が起こることが考えられる。

今回の実験では、純水1.0 mlを強制的にマウス胃内に注入する飲水負荷を課し(強制飲水)、その後の排尿経過を測定した。ここで、このような飲水負荷を取り除いた時、老齢正常群と排尿障害群で、尿流測定パラメーターに差異がみられるか検討するため、自由な飲水下(自由飲水)で飼育している飼育ケージから、排尿測定装置にマウスを移動させ、尿流測定パラメーターを求めた。その結果、1回排尿量、排尿持続時間、平均排尿速度のいずれにおいても、両群で差異は認められなかった(表3.3)。本研究で示した排尿障害(表3.1)が強制飲水時のみ認められたことの原因として、強制飲水では短時間に多量の水が膀胱内に貯留するため、自由飲水時にくらべ、膀胱内径の増加により膀胱内圧の低下が起こったためと考えられる。さらに、この結果は、ヒトの排尿障害の程度の評価のため行われる尿流測定においても、大量の飲水後に測定することで鋭敏に排尿障害を検出できる可能性を示唆している。

表 3.3 自由飲水後の老齡正常群と排尿障害群の尿流測定パラメーターの比較

	老齡正常群 (n=22)	排尿障害群 (n=6)
1回排尿量 (ml)	0.233±0.115	0.196±0.129
排尿持続時間 (秒)	3.3±1.4	2.6±1.1
平均排尿速度 (ml/秒)	0.078±0.017	0.082±0.015

得られた値は平均値 ± 標準偏差で示した。1回排尿量、排尿持続時間、平均排尿速度のいずれにおいても、両群で差異は認められなかった。

### 第3章の参考文献

- 1 本間 之夫, 柿崎 秀宏, 後藤 百万, et al.; 排尿に関する疫学的研究. 日本排尿機能学会誌 14: 266-277, 2003.
- 2 舩森直哉, 塚本泰司; 【排尿障害・性機能障害のシェアード・ケア】 Lower Urinary Track Symptom:LUTS (具体的な)前立腺肥大症のシェアード・ケア. 排尿障害プラクティス 10: 101-107, 2002.
- 3 Rosier P. F., de la Rosette J. J.; Is there a correlation between prostate size and bladder-outlet obstruction? World J Urol 13: 9-13, 1995.
- 4 舩森直哉, 熊本悦明, 塚本泰司, 他; 加齢による高齢男子の排尿状態の変化 前立腺集団検診結果より. 日本泌尿器科学会雑誌 85: 1342-1347, 1994.
- 5 本間之夫, 西沢理, 山口脩; 下部尿路機能に関する用語基準 国際禁制学会標準化部会報告. 日本排尿機能学会誌 14: 278-289, 2003.
- 6 Kindblom J., Dillner K., Sahlin L., et al.; Prostate hyperplasia in a transgenic mouse with prostate-specific expression of prolactin. Endocrinology 144: 2269-2278, 2003.
- 7 Nicholson T. M., Ricke E. A., Marker P. C., et al.; Testosterone and 17beta-estradiol induce glandular prostatic growth, bladder outlet obstruction, and voiding dysfunction in male mice. Endocrinology 153: 5556-5565, 2012.
- 8 Gotoh M., Yoshikawa Y., Kondo A., et al.; Diagnostic values and limitations of conitional urodynamic studies (uroflowmetry.residual urine measurement. cystometry) in benign prostatic hypertrophy. Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi 87: 1321-1330, 1996.
- 9 柳沢良三; 前立腺肥大症の手術療法に対する自覚症状及び他覚所見による評価. 臨床泌尿器科 53: 317-320, 1999.
- 10 Gomes C. M., Nunes R. V., Araujo R. M., et al.; Urodynamic evaluation of patients with lower urinary tract symptoms and small prostate volume. Urol Int 81: 129-134, 2008.
- 11 近藤淳; 前立腺肥大症の臨床疫学的研究. 岡山医学会雑誌 78: 387-428, 1966.
- 12 Jensen K. M., Bruskevitz R. C., Iversen P., Madsen P. O.; Significance of prostatic weight in prostatism. Urol Int 38: 173-178, 1983.
- 13 Walsh P. C., Wilson J. D.; The induction of prostatic hypertrophy in the dog with androstanediol. J Clin Invest 57: 1093-1097, 1976.

## 第4章 腎機能障害への取り組み

### 4.1 はじめに

腎不全は、糸球体濾過値の低下により、高窒素血症、水・電解質代謝異常、酸・塩基平衡異常など、生体の内部環境の恒常性維持が出来なくなった状態であり、腎機能低下の速度によって急性と慢性に大別される<sup>1)</sup>。このうち慢性腎不全とは、各種腎疾患によって長期にわたり腎機能が低下している病態の総称であり、進行機序には **Brenner** らが提唱した糸球体高血圧による糸球体障害<sup>2)</sup>をはじめ、蛋白尿<sup>3)</sup>や慢性低酸素状態による尿細管間質障害<sup>4)</sup>などが示されている。慢性腎不全は非可逆的であり、最終的には末期腎不全(end-stage renal failure: ESRD)となり、透析療法や腎移植を行わない限り死に至りうるため、この腎機能低下を早期に発見し、治療に繋げることが重要である。

### 4.2 腎障害の疫学的背景

我が国の慢性透析患者数は増加の一途をたどり 2015 年末には 324,986 人に達し、このうち透析人口に占める腎不全原疾患構成比では糖尿病性腎症が最も多く(38.4%)、次に多い慢性糸球体腎炎(29.8%)、さらに第3位の腎硬化症(9.5%)と合わせて全体の75%以上を占めている<sup>5)</sup>。慢性腎疾患はこれら原疾患の如何に関わらず、慢性的にしかも不可逆的に進行し末期腎不全の状態となり<sup>6)</sup>、尿毒症症状が出現すれば透析療法が開始される。しかし、この透析療法は患者にとって肉体的・精神的に大きな負担となっており、生活の質(quality of life: QOL)を著しく低下させる。そのため慢性腎不全の病態と進行因子を解明することにより、腎不全の進行を遅らせたり阻止したりすることが可能となれば、患者にとって朗報となる。このような現状を踏まえ、今日までに多方面で慢性腎不全の病態の解明や治療に関する研究が進められている。

### 4.3 腎機能障害と臨床検査

腎障害の検査については、尿沈渣中の尿細管上皮細胞数が急性腎障害のバイオマーカーとなる可能性が報告される<sup>7)</sup>など、改めて古典的な尿検査に注目が集まっている。尿細管上皮細胞の出現は、ネフローゼ症候群のような腎実質障害の指標になるため、臨床現場では重要な観察対象となっている。しかし、これまでの報告は、出現する細胞や円柱の種類と数に着目しており、個々の形態変化についてはほとんど考慮されていない。そのため、尿量や観察する視野によっても結果が大きく左右される可能性があるうえ、形態変化の意味するところは不明な点が多い。さらに、臨床で日常的に行われている尿沈渣検査や尿細胞診検査においても、細胞の良悪の鑑別に主眼が置かれており、尿細管上皮細胞の形態変化から腎機能を評価するような試みもなされていない。そこで、尿中に剥離する尿細管上皮細胞の形態変化と腎機能変化との関連を解明することができれば、従来行われている痛みを伴う採血による腎機能評価(血漿クレアチニンや血中尿素窒素など)ではなく、非侵襲性の採尿によって患者の腎障害の病態を評価することが可能となると考えられる。

ヒトの尿中に剥離してくる細胞は、尿道内腔を構成する重層扁平上皮細胞、膀胱・尿管内腔を構成する尿路上皮細胞、そして腎尿細管を構成する単層立方上皮細胞と多岐にわた

る。このうち尿細管由来の単層立方上皮細胞は腎疾患に際して剥離し、尿中に出現するとされている<sup>8)</sup>。つまり一般的に尿中に剥離してくる細胞は扁平上皮細胞と尿路上皮細胞がほとんどであり、急性尿細管壊死や腎炎などの腎尿細管障害がある場合に尿細管上皮細胞が出現する。Kimura ら<sup>9)</sup>は慢性糸球体腎炎モデルマウスを用いて尿中剥離細胞の種類と腎機能の関係性を検討した結果、尿中アルブミン値の増加に伴い尿中剥離細胞数の増加が見られたことを報告している。

また、以前から腎機能の変化と尿中に出現する円柱との報告がある。ヒトの腎疾患では、急性・慢性ともに糸球体腎炎で赤血球円柱を認める。白血球円柱は腎盂腎炎、間質性腎炎、腎移植後の拒絶反応時にも見られる。ネフローゼ症候群では脂肪円柱を認めるのが特徴であるが、脂肪円柱の他に硝子円柱、顆粒円柱、上皮円柱を同時に伴うことが多い。悪性の重症ネフローゼ症候群では空胞変性円柱が出現する。この空胞変性円柱を認めるようになると血中クレアチニンも増加し急激に腎不全状態となる。さらに腎障害が重篤になり、腎不全状態に至ると蠟様円柱が出現するとされている<sup>8)</sup>。尿中に出現する円柱と腎機能の関係を検討した報告<sup>10, 11)</sup>もあるが、病理組織像との対比は行われておらず、慢性腎不全の病態を正確に評価するには至っていない。このように古くから検討されている円柱であるが、円柱内の上皮の形態については未だ十分な検討がなされておらず、今後の検討が必要であると考えられる。

さらに、ネフロン構成細胞の損失が腎機能の低下につながると考えられており、podocyte（糸球体係蹄を覆う臓側の糸球体上皮細胞）と糸球体所見との間の病的な関係がヒトや動物モデルにおいて検討されている<sup>12-14)</sup>。Hara ら<sup>15-17)</sup>は尿沈渣の蛍光抗体法を開発し、糸球体疾患のある患者の尿中に podocyte やその破片が存在することを報告している。このように尿中に剥離する細胞成分と腎機能の関係性に注目が集まっており、尿中細胞形態の検査の必要性が高まっている。

#### 4.4 動物モデルによる腎機能障害に関する研究

##### 4.4.1 研究の現状

腎機能障害の基礎研究では、糸球体腎炎モデル<sup>18)</sup>、尿細管間質性腎炎モデル<sup>19)</sup>、糖尿病性腎症モデル<sup>20)</sup>などが用いられ、原疾患に対する治療法の研究が盛んに行われている<sup>21)</sup>。これらの研究の中で、腎機能の低下に伴う病理組織学的な変化についての検討が行われている<sup>22)</sup>ものの、腎機能の経時変化と尿中に剥離する腎臓由来の細胞、すなわち尿細管上皮細胞の形態変化を直接的に比較・検討した研究はこれまでに行われていない。

また、慢性腎不全モデルの作製法として、片腎摘出モデル<sup>23)</sup>、高度腎摘出モデル<sup>24)</sup>、腎動脈分枝結紮モデル<sup>25)</sup>等が広く用いられている。しかしこれら外科的処置を行うモデルでは、その作製手技によって処置後の病態発症の個体差が大きく、実験結果のばらつきの原因となってしまう恐れがあるうえ、慢性腎不全の発症率も100%ではないという欠点がある<sup>26)</sup>。その他、糖尿病性腎症モデル<sup>27)</sup>や糸球体硬化の自然発症モデル<sup>28)</sup>といった高尿酸性間質性腎炎モデルなどがある。この中で、ほぼ確実に慢性腎不全を惹起し、発症の個体差も少ない、アデニンを投与することで慢性腎不全を惹起出来るマウスモデル<sup>29)</sup>に注目し

た。このアデニンはプリン塩基の1つであり、動植物組織中に広く分布しており、過剰摂取によって痛風や尿酸結石を引き起こすことが知られている。本章では、この間質性腎炎モデルであるアデニン誘発型慢性腎不全モデルの作製方法やその特徴について概説するとともに、慢性腎不全の症状進行に伴う腎機能の変化と尿中に剥離する尿細管上皮細胞との関係性について、これまでの報告をまとめた。

#### 4.4.2 アデニン投与による腎機能障害マウス

実験動物にアデニンを投与するにあたり、その投与量をどの程度にするのかが問題となる。横澤ら<sup>30)</sup>は、ラットの餌にアデニンを0.25 wt%、0.50 wt%、0.75 wt%、1.00 wt%の各割合で混入し、6日間摂取させた場合の差異を検討している。その結果、血清クレアチニンは0.25 wt%アデニン投与群から、血清尿素窒素は0.5 wt%アデニン投与群から有意に上昇し、逆に尿中への尿酸及びクレアチニンの排泄量が0.75 wt%アデニン投与群において低下したことを報告している。

マウスを用いた研究では、Tanakaら<sup>31)</sup>が0.05 wt%、0.2 wt%、0.5 wt%のアデニンを含有した餌を6週間摂食させ、その影響を比較・検討している。その結果、0.5 wt%アデニン投与群は1週間以内に全て死亡している。逆に0.05 wt%アデニン投与群では、摂食開始後6週間の時点においても血中尿素窒素の上昇が見られず、腎機能に変化がないとしている。そして0.2 wt%アデニン投与群では、摂食開始後6週間の時点まで血中尿素窒素が段階的に上昇し、病理組織所見における腎障害も認めたとしている(表4.1)。これらの結果は、慢性腎不全を惹起するためのアデニン投与量に閾値が存在することを示唆している。また、Tamuraら<sup>32)</sup>は0.25 wt%アデニン含有餌を28日間摂食させ、慢性腎不全を惹起させている。この研究においても、アデニン含有餌投与開始後7日目以降に血清クレアチニンが対照群と比較して有意に上昇しており、腎機能が低下したと考えられる(図4.1)。これらの報告から、マウスにアデニンを摂食させることでラットと同様に慢性腎不全が発症し腎機能が低下することが示されたが、その投与量を厳密にコントロールする必要があることが示された。

アデニンによる腎機能障害のメカニズムは、Philipsら<sup>33)</sup>、Shieldsら<sup>34)</sup>によって報告されている。それによると、アデニンは生体内で代謝されて不溶性の2,8-ジヒドロキシアデニンの結晶となり、腎尿細管を閉塞することで腎障害を引き起こすとしている。また、Lindbladら<sup>35)</sup>はこの2,8-ジヒドロキシアデニンの結晶が腎尿細管の閉塞や尿細管上皮細胞に対する機械的な損傷を引き起こし、腎臓における再吸収や分泌の機能を変化させ、尿細管細胞の代謝障害、糸球体濾過率や腎血流量の変化が起こるとしている。さらに横澤ら<sup>36)</sup>は、2,8-ジヒドロキシアデニンはキサンチンオキシダーゼによってアデニン及び8-ヒドロキシアデニンから生成され、この2,8-ジヒドロキシアデニンを含む不溶性物質の腎組織への沈着が尿中への尿酸排泄阻害を引き起こし、その結果として血清尿酸の蓄積を誘起させる一連のメカニズムを示している(図4.2)。

ラットにアデニンを長期投与することにより、血清中の尿素窒素やクレアチニンが上昇することが報告されている<sup>29,37)</sup>が、これら以外にも、総コレステロール、リン酸、ナトリ

ウムが対照群と比較して増加し、逆に血中アルブミンやカルシウムは減少して電解質代謝異常、低栄養状態を呈することも報告されている<sup>38)</sup>(表 4.2)。このような所見はヒトの高尿酸血症とも類似しており、アデニン誘発型モデルが高尿酸血症モデルとして利用できると考えている。しかし、尿中排泄量に関しては、アデニン投与群では対照群と比べて尿酸及びクレアチニンが有意に低下することが報告されている<sup>39)</sup>(図 4.3)。

また、大浦ら<sup>40)</sup>はアデニン投与モデルの生理学的所見に着目している。アデニン投与日数の経過とともに糸球体濾過量(GFP)、腎血漿流量(RPF)、腎血流量(RBF)が著しく低下し、腎機能が顕著に低下すると報告している。さらに赤血球数、ヘモグロビン値、ヘマトクリット値も次第に低下し、腎性貧血を呈する。一方、白血球数は逆に増加し、特に多形核白血球数の増加が顕著となる。他方、リンパ球数は低下し、血小板機能の低下も認められ、体温、心拍数も次第に低下するとしている。このような症状はヒトの慢性腎不全における代謝異常と極めて類似しており、本モデルが慢性腎不全のモデルとして適していることを示している。

表 4.1 アデニン添加餌摂食によって惹起された BUN 値の変化 (文献<sup>30)</sup>より引用)

	BUN(mg/dL)			
	0週目	2週間目	4週間目	6週間目
0.05%アデニン投与群	20.2±1.8	30.1±8.3	30.2±1.2	28.8±2.1
0.2%アデニン投与群	18.5±0.7	74.1±8.3	135.9±4.1	222.6±13.1
0.5%アデニン投与群	24.4±0.9	N/A	N/A	N/A

N/A; 全て死亡したため、データなし

各群 6-8 匹のラットの測定値を、平均値±標準偏差で表している。

0.5 wt%アデニン投与群のマウスは実験開始 1 週間以内に全て死亡した。

表 4.2 0.75wt%アデニン添加餌摂食後 50 日目の血中成分の変化 (文献<sup>37)</sup>より改変引用)

	対照	0.75%アデニン
アルブミン(g/dL)	3.63±0.07	2.97±0.08*
総コレステロール(mg/dL)	80.9±4.2	128.7±6.8*
トリグリセリド(mg/dL)	98.7±12.7	92.0±12.6
カルシウム(mg/dL)	10.23±0.31	7.68±0.39*
リン(mg/dL)	8.25±0.20	11.64±0.43*

5-6 匹のラットの測定値を、平均値±標準偏差で表している。

\*対照群との有意差あり; p<0.001



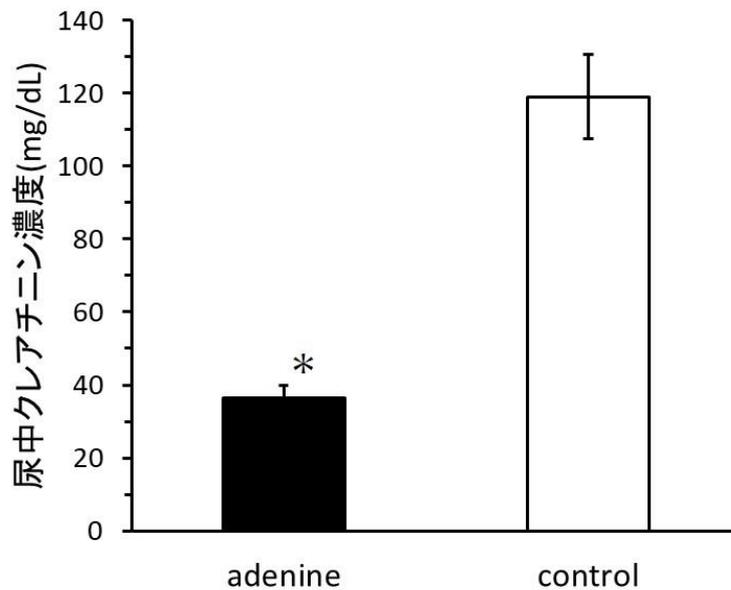


図 4.3 アデニン投与後 30 日目の尿中クレアチニン値の比較 (参考文献<sup>38)</sup> より改変引用) 対照群との有意差あり, \* $p < 0.01$

#### 4.5 おわりに

本章では、アデニンを摂食させることで誘発出来る慢性腎不全モデルについて紹介した。本モデルではラット又はマウスを実験動物で使うことが想定されているが、本研究では、尿中に剥離する尿細管上皮細胞の形態学的な特徴を定量的に評価することを目的としているため、多数の細胞データを収集する必要があることから、マウスを用いることとした。このアデニン誘発型慢性腎不全モデルを用いて腎機能の変化と尿細管上皮細胞の形態変化の関係性を明らかにすることが出来れば、非侵襲性の採尿によって患者の腎障害の病状評価が可能になると考えた。

本章で述べたように、実験動物にアデニンを摂食させることにより、慢性腎障害を惹起することが明らかとなった。しかし、慢性腎臓不全は腎機能がすでにある程度低下した状態であるため、臨床的にはもっと早期に腎機能低下を検出する必要がある。そこで次章では、本モデルが近年問題となっている慢性腎臓病(Chronic kidney disease; CKD)のモデルとしても活用できるか検討することとした。アデニン誘発慢性腎不全モデルが CKD モデルとしても活用できることが明らかとなれば、本モデルを用いて尿検査から腎臓の器質的変化を慢性腎不全に至る前に検出することが可能となる。

#### 第4章の参考文献

- 1 菱田 明; 【腎不全対策の現状と将来】 腎不全の病態と重症度. 日本内科学会雑誌 87: 1241-1246, 1998.
- 2 Brenner B. M.; Nephron adaptation to renal injury or ablation. *Am J Physiol* 249: F324-337, 1985.
- 3 Zandi-Nejad K., Eddy A. A., Glassock R. J., Brenner B. M.; Why is proteinuria an ominous biomarker of progressive kidney disease? *Kidney Int Suppl*: S76-89, 2004.
- 4 Nangaku M.; Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: a final common pathway to end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol* 17: 17-25, 2006.
- 5 政金 生人, 谷口 正智, 中井 滋, et al.; わが国の慢性透析療法の現況(2015年12月31日現在). *日本透析医学会雑誌* 50: 1-62, 2017.
- 6 Brenner B. M., Meyer T. W., Hostetter T. H.; Dietary protein intake and the progressive nature of kidney disease: the role of hemodynamically mediated glomerular injury in the pathogenesis of progressive glomerular sclerosis in aging, renal ablation, and intrinsic renal disease. *N Engl J Med* 307: 652-659, 1982.
- 7 Perazella M. A., Coca S. G.; Traditional urinary biomarkers in the assessment of hospital-acquired AKI. *Clin J Am Soc Nephrol* 7: 167-174, 2012.
- 8 今井 宣子; 【尿を科学する】 尿検査各論 尿沈渣. *総合臨床* 58: 1230-1233, 2009.
- 9 Kimura J., Ichii O., Otsuka S., et al.; Quantitative and qualitative urinary cellular patterns correlate with progression of murine glomerulonephritis. *PLoS One* 6: e16472, 2011.
- 10 下仮屋 雄二, 見山 裕紀, 若林 温, 高橋 勝美; 慢性腎臓病(CKD)における尿沈渣の有用性について. *医学検査* 57: 1387-1391, 2008.
- 11 小林 沙織, 星 雅人, 牛丸 星子, et al.; 早期 CKD における尿沈渣成分と生化学成分の関連性. *医学検査* 59: 694-698, 2010.
- 12 松田 昭彦; 糸球体疾患における尿中 podocyte の臨床的意義. *埼玉医科大学雑誌* 28: T33-T41, 2001.
- 13 White K. E., Bilous R. W., Marshall S. M., et al.; Podocyte number in normotensive type 1 diabetic patients with albuminuria. *Diabetes* 51: 3083-3089, 2002.
- 14 Kim Y. H., Goyal M., Kurnit D., et al.; Podocyte depletion and glomerulosclerosis have a direct relationship in the PAN-treated rat. *Kidney Int* 60: 957-968, 2001.
- 15 Hara M., Yanagihara T., Takada T., et al.; Urinary excretion of podocytes reflects disease activity in children with glomerulonephritis. *Am J Nephrol* 18: 35-41, 1998.
- 16 Nakamura T., Ushiyama C., Suzuki S., et al.; Urinary excretion of podocytes in patients with diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 15: 1379-1383, 2000.
- 17 Hara M., Yanagihara T., Kihara I., et al.; Apical cell membranes are shed into urine from injured podocytes: a novel phenomenon of podocyte injury. *J Am Soc*

- Nephrol 16: 408-416, 2005.
- 18 Yamada M., Katsuma S., Adachi T., et al.; Inhibition of protein kinase CK2 prevents the progression of glomerulonephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 7736-7741, 2005.
- 19 Gabbai F. B., Hammond T. C., Thomson S. C., Khang S., Kelly C. J.; Effect of acute iNOS inhibition on glomerular function in tubulointerstitial nephritis. *Kidney Int* 61: 851-854, 2002.
- 20 Evan A. P., Mong S. A., Gattone V. H., et al.; The effect of streptozotocin and streptozotocin-induced diabetes on the kidney. *Ren Physiol* 7: 78-89, 1984.
- 21 高山 淳二, 高岡 昌徳, 松村 靖夫; ラットおよびマウスにおける腎機能低下モデルの簡便な作製方法 急性および慢性腎不全モデル. *日本薬理学雑誌* 131: 37-42, 2008.
- 22 Risdon R. A., Sloper J. C., De Wardener H. E.; Relationship between renal function and histological changes found in renal-biopsy specimens from patients with persistent glomerular nephritis. *Lancet* 2: 363-366, 1968.
- 23 Grond J., van Goor H., Erkelens D. W., Elema J. D.; Glomerular sclerosis in Wistar rats: analysis of its variable occurrence after unilateral nephrectomy. *Br J Exp Pathol* 67: 473-479, 1986.
- 24 Takahashi S., Okada K., Nagura Y., et al.; Three-quarters nephrectomy in rats as a model of early renal failure. *Nihon Jinzo Gakkai Shi* 33: 27-31, 1991.
- 25 Nath K. A., Kren S. M., Hostetter T. H.; Dietary protein restriction in established renal injury in the rat. Selective role of glomerular capillary pressure in progressive glomerular dysfunction. *J Clin Invest* 78: 1199-1205, 1986.
- 26 小出 桂三, 伊勢 道仁; 慢性腎不全モデル. *人工臓器* 20: 1327-1335, 1991.
- 27 Zatz R., Meyer T. W., Rennke H. G., Brenner B. M.; Predominance of hemodynamic rather than metabolic factors in the pathogenesis of diabetic glomerulopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 5963-5967, 1985.
- 28 MacKay K., Striker L. J., Stauffer J. W., Agodoa L. Y., Striker G. E.; Relationship of glomerular hypertrophy and sclerosis: studies in SV40 transgenic mice. *Kidney Int* 37: 741-748, 1990.
- 29 大浦 彦吉, 横沢 隆子, 鄭 平東; アデニン誘発慢性腎不全モデルラットの作製. *医学のあゆみ* 130: 729-730, 1984.
- 30 横沢 隆子, 大浦 彦吉, 中川 眸, 岡田 敏夫; アデニン長期投与による血清尿酸レベルの上昇と腎機能障害. *日本農芸化学会誌* 56: 655-663, 1982.
- 31 Tanaka T., Doi K., Maeda-Mamiya R., et al.; Urinary L-type fatty acid-binding protein can reflect renal tubulointerstitial injury. *Am J Pathol* 174: 1203-1211, 2009.
- 32 Tamura M., Aizawa R., Hori M., Ozaki H.; Progressive renal dysfunction and macrophage infiltration in interstitial fibrosis in an adenine-induced tubulointerstitial nephritis mouse model. *Histochem Cell Biol* 131: 483-490, 2009.

- 33 Philips F. S., Thiersch J. B., Bendich A.; Adenine intoxication in relation to in vivo formation and deposition of 2,8-dioxyadenine in renal tubules. *J Pharmacol Exp Ther* 104: 20-30, 1952.
- 34 Shields C. E., Lopas H., Birndorf N. I.; Investigation of nephrotoxic effects of adenine and its metabolic product, 2,8-dioxyadenine, on primates (*Macaca irus*). *J Clin Pharmacol J New Drugs* 10: 316-322, 1970.
- 35 Lindblad G., Jonsson G., Falk J.; Adenine toxicity: a three week intravenous study in dogs. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 32: 246-256, 1973.
- 36 横沢 隆子, 大浦 彦吉, 中川 眸; アデニン長期投与による血清尿酸レベルの上昇と腎機能障害. *日本農芸化学会誌* 56: 655-663, 1982.
- 37 横沢隆子, 大浦彦吉, 中川眸, 他; アデニン投与がラットの体内代謝系に与える影響について. *日本農芸化学会誌* 55: 811-816, 1981.
- 38 Yokozawa T., Zheng P. D., Oura H., Koizumi F.; Animal model of adenine-induced chronic renal failure in rats. *Nephron* 44: 230-234, 1986.
- 39 横沢隆子, 大浦彦吉, 中川眸, 他; 食餌性プリンの中および尿中尿酸レベルに与える影響について. *栄養と食糧* 34: 35-41, 1981.
- 40 大浦 彦吉, 横沢 隆子; 漢方薬 その医薬学的研究の最先端 肝と腎 腎不全(尿毒症). *代謝* 29: 328-339, 1992.

## 第5章 新規ヒトCKDモデルの作製と尿細管上皮細胞形態による腎機能検査法の開発

### 5.1 背景

末期腎不全(ESRD)は不可逆的な病態であり、その時点から治療を行ったとしても、原疾患の治癒や進行の抑制は困難である。そこで、腎機能異常を早期に発見し、病態や病状の進行抑制を目指した治療を行うことを目的として、2002年に慢性腎臓病(Chronic Kidney Disease: CKD)という概念が米国腎臓財団から提唱された。急性もしくは慢性の病的機序によって腎臓の実質が障害されると、ネフロン数が少しずつ減少していき、残存ネフロンにおける過剰濾過(hyperfiltration)という適応反応が起こる。この過剰濾過は長期的には糸球体を傷害し、尿蛋白の増加と進行性の腎機能低下を招く<sup>1)</sup>。このように、腎臓の形態的・機能的障害を腎機能(糸球体濾過量; glomerular filtration rate: GFR)と、障害の程度(蛋白尿や解剖学的・病理学的異常)に着目し、一つの共通の症候群としてとらえ直したのがCKDの疾患概念である。

本邦における慢性腎臓病(CKD)の患者数は成人人口の約13%に当たる1,330万人ともいわれ<sup>2)</sup>、今や国民病ともいえる状態である。CKDとは、慢性に経過する全ての腎臓病を指し、明らかな腎障害の所見もしくは糸球体濾過量の低下のいずれか、または両方が3ヵ月以上持続するものと定義されている<sup>2)</sup>。そして近年、いわゆるメタボリックシンドロームとその構成因子である高血圧、高血糖、脂質異常が、それぞれCKDの発症・進展に関係し、互いに悪循環を生じることが明らかとなっている(図5.1)。更には、このCKDの進行が、末期腎不全のみならず、脳卒中や心筋梗塞など重篤な心血管病変にも関与しており、CKDの早期発見、進行予防は、透析患者数の抑制にとどまらず、これらの心血管病変の発症予防の観点からも急務となっている。

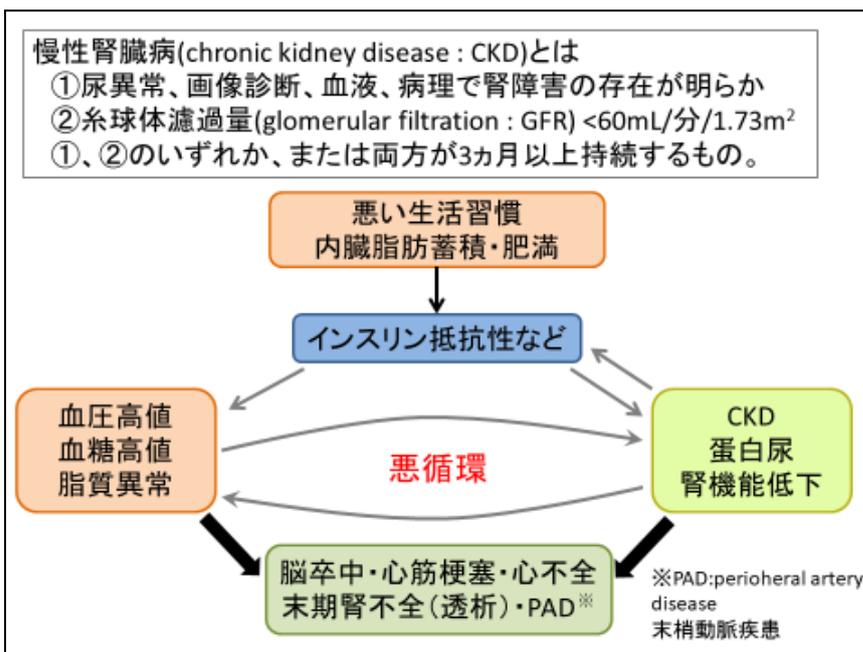


図 5.1 生活習慣と心腎連関の概念 (文献<sup>2)</sup>より改変引用)

## 5.2 目的

CKD の病態解析には、腎障害が緩徐に進行するモデル動物が求められている。第 4 章で示したように、核酸塩基のひとつであるアデニンは、マウスに摂食させると腎障害が徐々に進行し、慢性腎不全を誘発する。第 1 章で述べたように、本研究の目的は、尿を用いた簡便な検査によって、機能変化を引き起こす組織変化を検出することである。そのためには、腎障害を惹起する病態モデルを利用して検討する必要がある。そこで本章では、アデニン誘発慢性腎不全の進行過程を経時的に解析し、新たなヒト CKD モデルになりえるか検討し、さらに、腎臓の器質的変化を尿沈査検査によって検出することを目的とした。

## 5.3 方法

### 5.3.1 実験動物と給餌方法

実験動物は、日本チャールス・リバー株式会社(神奈川、日本)から購入した C57BL/6J 系統の 10 週齢の雄マウス 31 匹を用い、無作為に 0.25 wt%アデニン添加飼料を摂食させるアデニン群 (14 匹)、アデニン無添加飼料を摂食させる対照群 (17 匹) の 2 群に分けた。各群それぞれ飼料摂食開始後 0、4、8、12、16 週時点で代謝ケージを用いた 24 時間蓄尿を行った後、実験動物に三種混合麻酔薬 (メドミジン、ミダゾラム、ブトルファノール) を腹腔投与することで麻酔をかけ、開腹して後大静脈から採血し、遠心分離により血清を得た。採血終了後、ジエチルエーテルを過剰吸引させて安楽死させ、剖検により左右腎臓を摘出し重量を測定した。さらに、胸大動脈も同時に摘出した。得られた尿及び血清の検体は、測定まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保管した。

実験飼料は、固形飼料 (オリエンタル酵母工業、日本) を用い、さらにアデニンを添加した。アデニンは水に難溶性であり、固形飼料に均一な量を混合するのが困難である。そこで本研究では、あらかじめ水酸化ナトリウムを加えてアルカリ性にした水溶液にアデニンを完全溶解した。その後、加えた水酸化ナトリウムと同量の塩酸を滴下して中和し、水溶液中のアデニンが析出する前に素早く固形飼料に吸収させ、0.20 wt%アデニン添加飼料 (固形飼料 100 g 中、アデニン 0.20 g 含有) を作製した。

飼育室は恒温恒湿 ( $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $45\pm 5\%$ )、12 時間ごとの明暗サイクル (午前 7 時から午後 7 時まで点灯、それ以後は消灯) に調節を行って昼夜の日内サイクルをつくった。全ての動物は、水道水及び飼料を自由に摂取した。

全ての動物実験は、広島国際大学の動物実験に関する規定に則り、広島国際大学動物実験委員会の承認の下で行った (承認番号 AE12-021)。

### 5.3.2 循環機能の測定

実験 0、4、8、12 週目に実験動物の尾部を用いて収縮期血圧(BPs)及び心拍数(HR)の測定を行った。測定は、非侵襲性の尾部一カフ・マイクロセンサー装置 (MK-2000A; 室町機械、東京、日本) を使用した。

### 5.3.3 尿検体の生化学的解析

採取した 24 時間蓄尿を用いて、尿量、尿比重、クレアチニン濃度、蛋白濃度を測定した。クレアチニン濃度は、Jaffé 反応を用いた化学的検査法で測定した。蛋白濃度は、ピロガロールレッド法に基づいたマイクロ TP-テストワコー（和光純薬工業、日本）を用いて測定した。

### 5.3.4 血清検体の生化学的解析

血清を用いて、尿素窒素濃度及びクレアチニン濃度を測定した。尿素窒素濃度は、ウレアーゼ-LED-NADH 系を用いたシカリキッド-N UN（関東化学株式会社、日本）を使用し測定した。クレアチニン濃度は、Jaffé 反応を用いた化学的検査法で測定した。

### 5.3.5 病理組織学的解析

摘出した腎臓は、右腎は縦切り、左腎は横切りし 10%ホルマリン液で一昼夜固定した。胸大動脈は収縮を防ぐためにホルマンボード（松浪硝子工業株式会社、日本）に貼付し、10%ホルマリン液で一昼夜固定した。各検体はパラフィン包埋後に 4  $\mu\text{m}$  に薄切し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を施した。さらに、16 週目の腎臓標本には、間質の線維化の有無を評価するためマッソン・トリクローム(MT)染色を施した。胸大動脈は組織石灰化の有無を可視化するためにコッサ反応を用いて染色した。

### 5.3.6 病理細胞学的解析

回収した実験 12 週目の尿検体をサイトテック セントリフュージ（サクラファインテックジャパン株式会社、日本）を用いて、2,000 rpm で 5 分間遠心することにより尿沈渣成分から細胞診標本を作製した。95%エタノールで固定後、パパニコロウ染色を施した。細胞像を鏡検観察後、形態変化を数値化するために画像イメージングソフト cellSens（オリンパス株式会社、日本）を用いて細胞面積及び核面積を測定し、その値から核面積/細胞質面積比（N/C 比）を算出した。

### 5.3.7 統計学的解析

全ての測定値は平均値±標準偏差（Mean ± SD）で示した。群間比較の検定は unpaired t-test を用いた。有意差は  $p < 0.05$  を統計学的に有意と判定した。

## 5.4 結果

### 5.4.1 収縮期血圧と心拍数の推移

動脈圧の経時変化を図 5.1 に示した。実験開始 8 週目におけるアデニン群の収縮期血圧 ( $140.4 \pm 16.3$  mmHg) は、対照群 ( $94.8 \pm 17.9$  mmHg) と比較して有意に上昇した。12 週目に至っても、アデニン群の収縮期血圧 ( $126.2 \pm 10.7$  mmHg) は対照群 ( $109.2 \pm 11.0$  mmHg) よりも有意に高値を維持した。心拍数の経時変化は、図 5.2 に示した。心拍数は、12 週目に至るまでアデニン群 ( $677.1 \pm 54.0$  beats/min) と対照群 ( $650.9 \pm 106.9$  beats/min) の間で有意差を認めなかった。

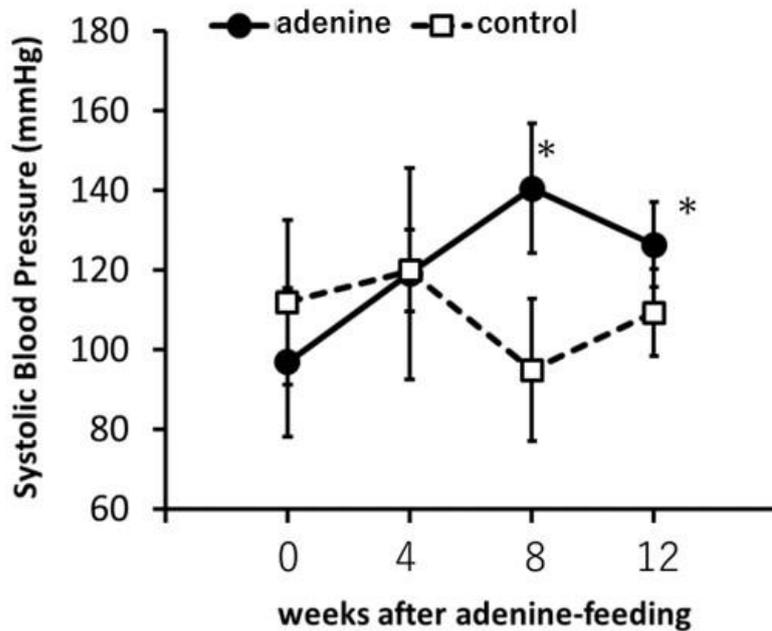


図 5.1 アデニン群と対照群の収縮期血圧の経時変化

各点は平均値±標準偏差で示した。アデニン群は対照群と比較して 8 週目に収縮期血圧が有意に上昇した。

●: アデニン群 (n=3), □: 対照群 (n=3)。

対照群との有意差あり; \*p<0.05

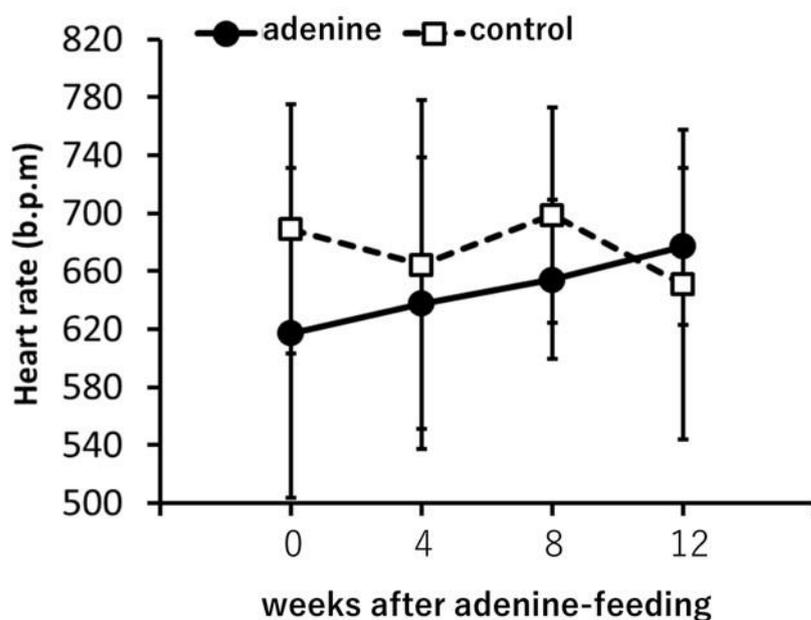


図 5.2 アデニン群と対照群の心拍数の経時変化

各点は平均値±標準偏差で示した。実験期間を通して、アデニン群と対照群で心拍数に有意な差を認めなかった。

●: アデニン群 (n=3), □: 対照群 (n=3)。

#### 5.4.2 尿検体の生化学検査値

尿検体の生化学検査結果を図 5.3 に示した。アデニン群の 24 時間尿量は、実験開始 4 週目に対照群(1.45±0.26 mL/day)と比較して有意に増加し(5.80±2.33 mL/day)、16 週目(9.18±2.90 mL/day)に至るまで高値を維持していた (図 5.3A)。尿比重は、4 週目に対照群(1.059±0.007)と比較してアデニン群(1.014±0.001)は有意に低下し、16 週目(1.015±0.002)に至るまで低値を維持していた (図 5.3B)。クレアチニン濃度は、4 週目に対照群(35.5±1.0 mg/dL)と比較してアデニン群(14.3±5.7 mg/dL)は有意に低下し、16 週目(12.3±3.2 mg/dL)に至るまで低値を維持していた (図 5.3C)。さらに、尿中蛋白濃度も、4 週目に対照群(660.0±108.5 mg/dL)と比較してアデニン群は有意に低下し(54.8±29.1 mg/dL)、16 週目(41.1±50.2 mg/dL)まで低値を維持していた (図 5.3D)。

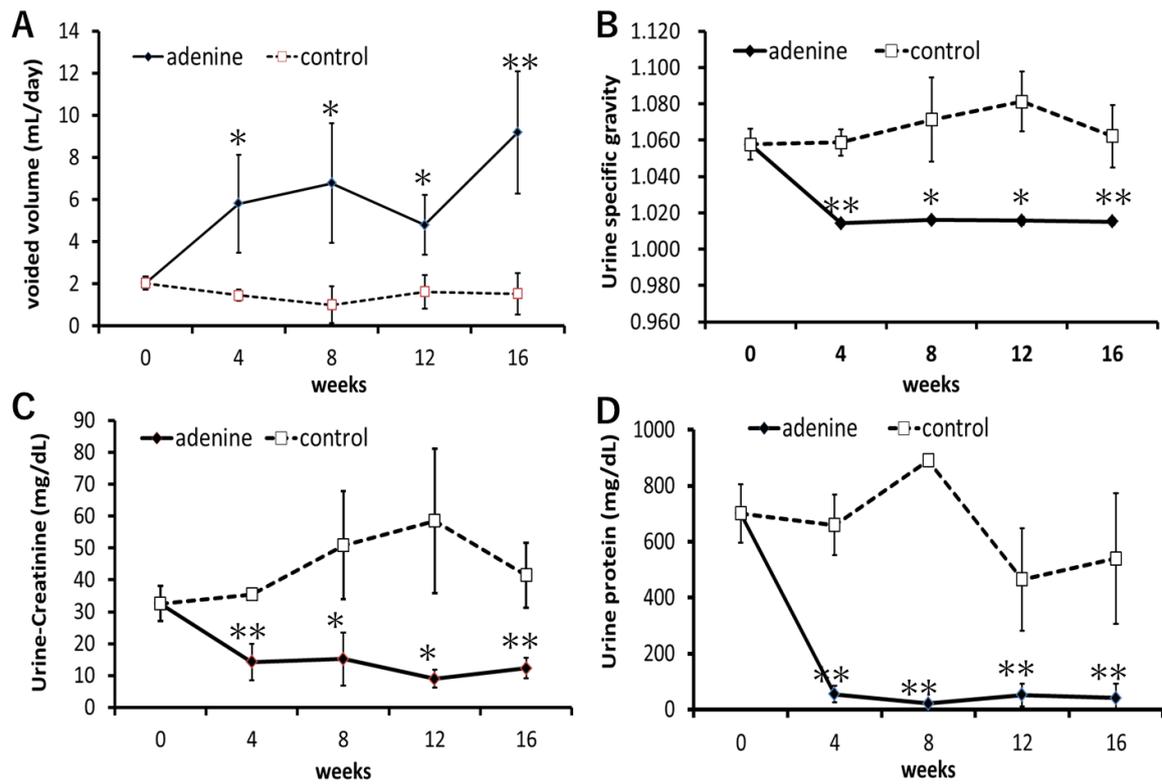


図 5.3 アデニン群と対照群の尿検査結果の比較

アデニン群は対照群と比較して尿量が有意に増加したが、尿比重、クレアチニン濃度、蛋白濃度は逆に有意に低下した。

●: アデニン群 (n=3), □: 対照群 (n=3)。

対照群との有意差あり; \*p<0.05、\*\*p<0.01

### 5.4.3 血清検体の生化学検査値

血清検体の生化学検査結果を図 5.4 に示した。実験開始 4 週目において、アデニン群の尿素窒素濃度は対照群(26.0±5.8 mg/dL)と比較して有意に増加し(81.5±20.0 mg/dL)、16 週目においても、アデニン群で 147.5±57.0 mg/dL となり、対照群(32.4±4.6 mg/dL)と比較して有意に高値を示した (図 5.4A)。次に、クレアチニン濃度は、12 週目においてアデニン群で 1.53±0.27 mg/dL となり、対照群の 0.30±0.14 mg/dL と比較して有意に高値を示したが、その他の期間についてはアデニン群が対照群よりも高値を示したものの有意差を認めなかった (図 5.4B)。

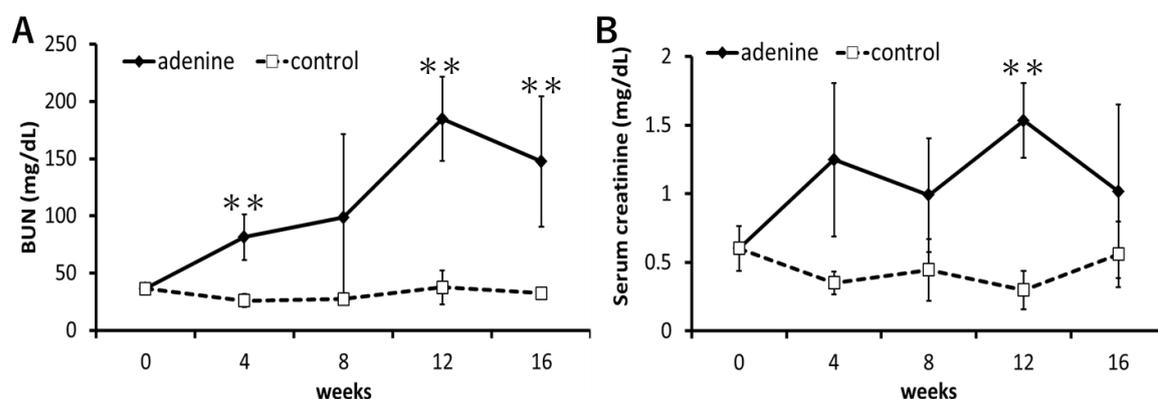


図 5.4 アデニン群と対照群の血清生化学検査結果の比較

アデニン群は対照群と比較して、尿素窒素濃度とクレアチニン濃度が増加傾向にあった。

●: アデニン群 (n=3), □: 対照群 (n=3)。

対照群との有意差あり; \*\*p<0.01

### 5.4.4 腎臓の病理組織所見

病理組織学的解析の結果、アデニン群において 4 週目に萎縮尿細管の出現を主徴とする尿細管再生像 (図 5.5 矢印 A) と、間質にリンパ球を主体とする炎症細胞浸潤像が確認された (3 例中 3 例)。8 週目には、さらに広範囲で尿細管再生像と炎症細胞浸潤像 (図 5.5 矢印 B) を認めた。12 週目以降では、上記の所見に加え拡張した尿細管と間質に著しい線維化 (図 5.5 矢印 C、D) も確認された。しかし、16 週目に至るまで糸球体に著変は観察されなかった。一方、対照群では、全期間を通して病理組織学的な変化は観察されなかった (図 5.5)。

図 5.6 に 16 週目のアデニン群と対照群のマッソン・トリクローム染色結果を示した。アデニン群では、対照群と比較して間質に青色に染まる膠原線維を多数認めた (図 5.6 矢印)。

また、胸大動脈の HE 染色における病理組織学検査結果では、アデニン群及び対照群において差異を認めなかった (図 5.7)。さらに胸大動脈のコッサ反応による染色では、アデニン群及び対照群で石灰化を示唆する所見を認めなかった (図では示していない)。

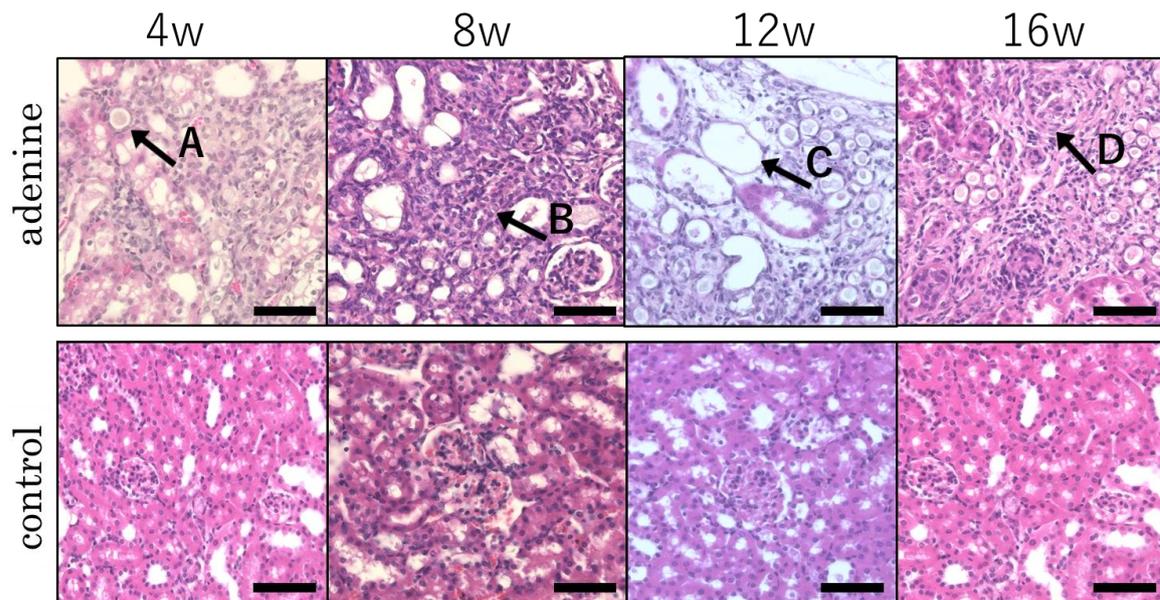


図 5.5 アデニン群と対照群の腎臓の HE 染色結果

アデニン群と対照群の腎臓の病理組織像の経時変化を示した。アデニン群では 4 週目に萎縮尿細管の出現を主徴とする尿細管再生像 (矢印 A) と、間質にリンパ球を主体とする炎症細胞浸潤像が確認された。8 週目には、さらに広範囲で尿細管再生像と炎症細胞浸潤像 (矢印 B) を認めた。12 週目以降では、上記の所見に加え拡張した尿細管と間質に著しい線維化 (矢印 C、D) も確認された。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  で示す。

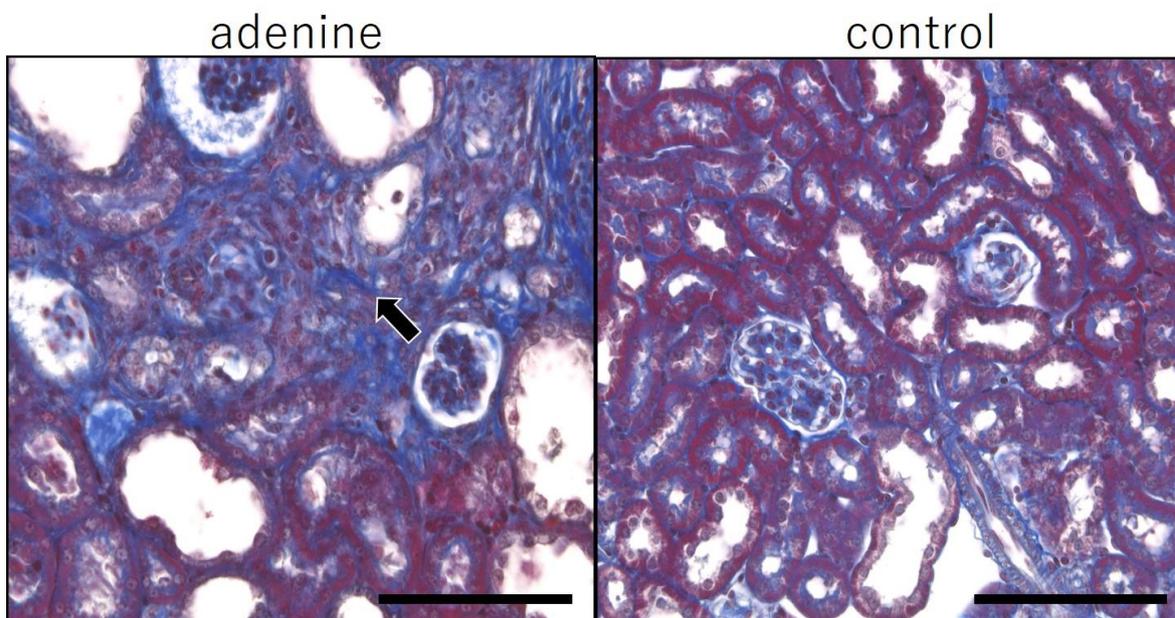


図 5.6 実験開始 16 週目の腎臓の MT 染色結果

アデニン群では、間質に青色に染まる膠原線維を多数認めた (矢印)。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$  で示す。

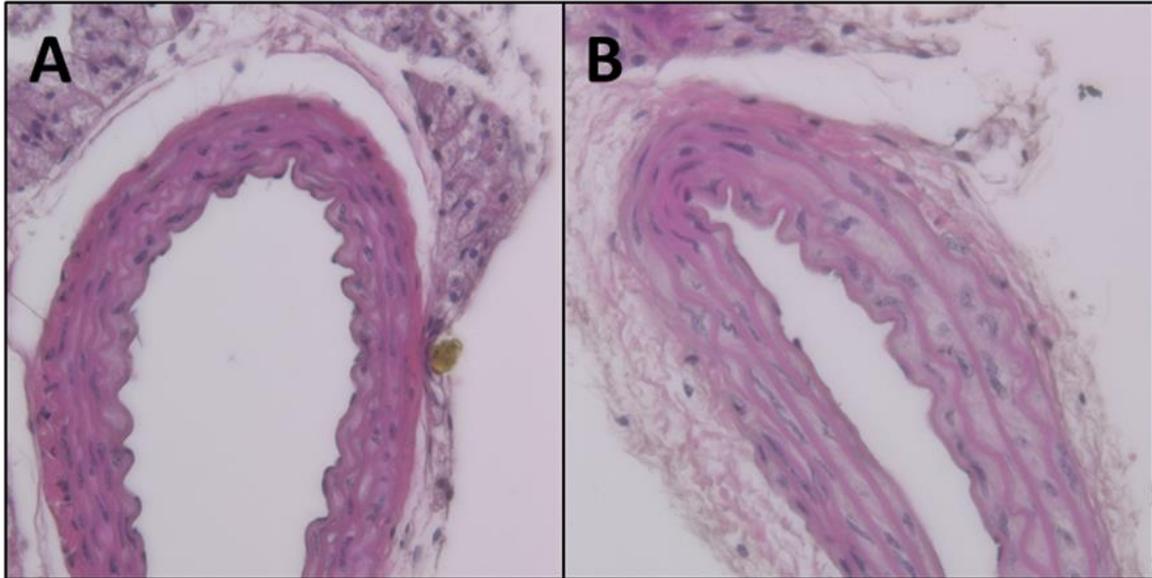


図 5.7 アデニン群(A)と対照群(B)の胸大動脈の HE 染色結果 (倍率、 $\times 400$ ).

胸大動脈の HE 染色像を比較したところ、アデニン群と対照群で差異を認めなかった。

#### 5.4.5 尿沈渣中に剥離した尿細管上皮細胞の形態的特徴

アデニン群と対照群の尿中に剥離した尿細管上皮細胞の典型像を図 5.8 に示した。アデニン群でみられた尿細管上皮細胞は、対照群と比較して核面積/細胞質面積比 (N/C 比) が増大傾向にあった。この N/C 比増大の程度を客観的に評価するため、両群の標本中に出現していた尿細管上皮細胞を無作為に各 22 個ずつ選び、細胞質面積及び核面積を測定した後、N/C 比を算出して両群間で比較した。その結果、アデニン群の N/C 比 ( $0.40 \pm 0.07$ ) は対照群の N/C 比 ( $0.31 \pm 0.08$ ) と比較して有意に高値を示した (図 5.9)。

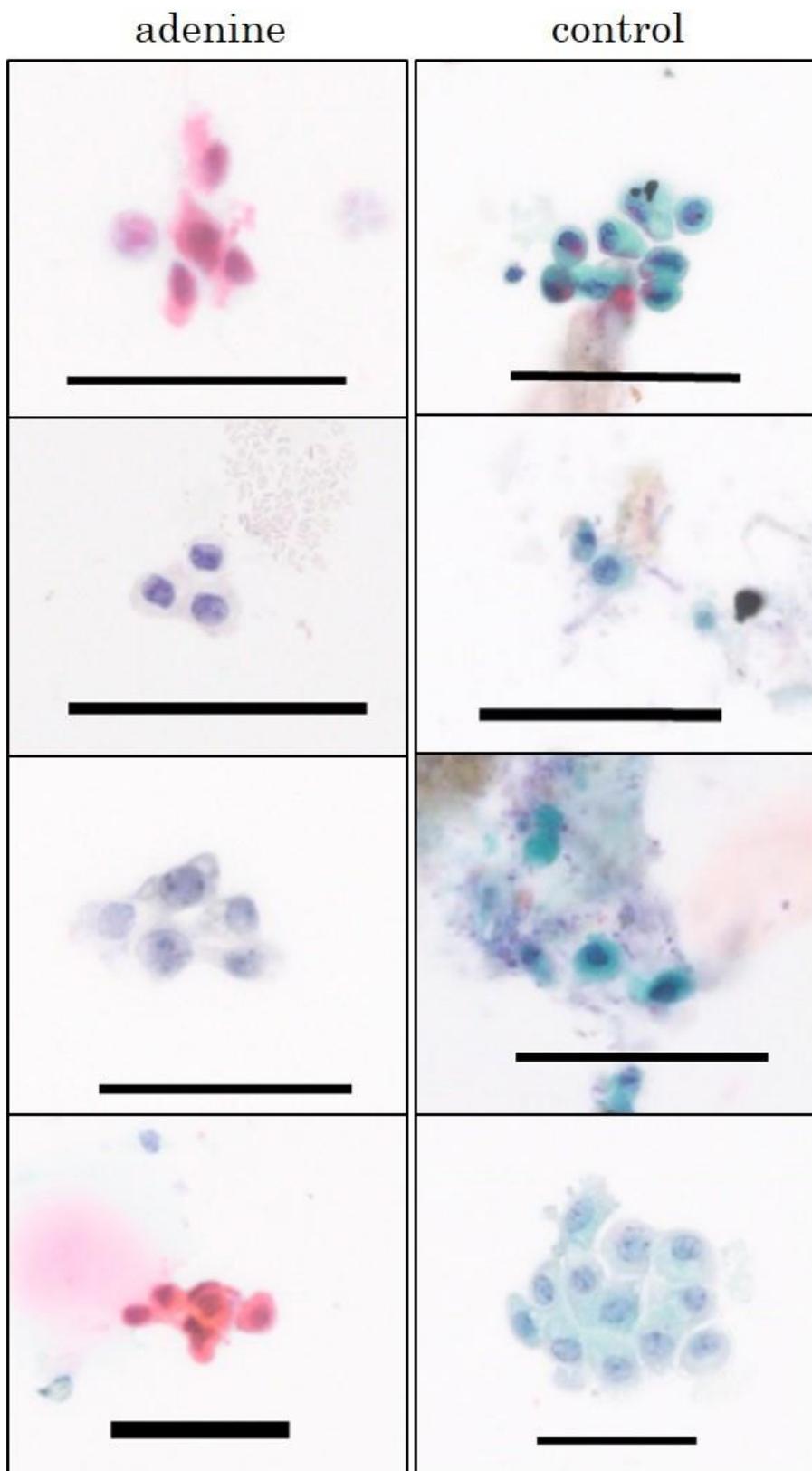


図 5.8 アデニン群と対照群の尿中に剥離した尿細管上皮細胞

アデニン群の尿細管上皮細胞は、対照群と比較して N/C 比の増大傾向がみられた。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  で示す。

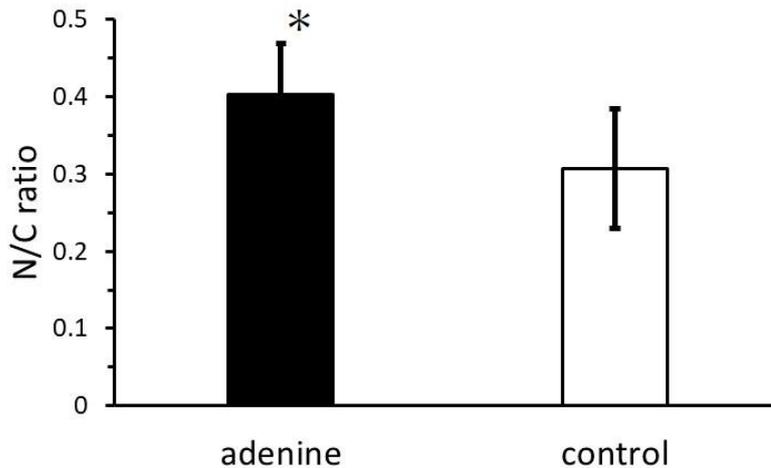


図 5.9 尿細管上皮細胞の N/C 比の比較

アデニン群は対照群と比較して N/C 比が有意に高値を示した。

対照群との有意差あり； \* $p < 0.05$

## 5.5 考察

実験動物を用いた腎障害モデルは、これまで自然発症モデル、遺伝子改変モデル、免疫誘発モデル、後天性モデルと多岐に渡り開発され<sup>3)</sup>、腎障害の合併症や治療法の開発等に利用されている。このうち、アデニン誘発腎障害モデルは、実験動物にアデニン添加飼料を摂食させることで間質性腎炎を簡便に惹起することができる有用なモデルの1つである。先行研究におけるアデニン誘発モデルの作製は、ラットを用いた報告が多く<sup>4-7)</sup>、マウスを用いたものは少ない<sup>8,9)</sup>。しかし、実験動物として一般的に用いられているマウスは、取り扱いが簡便で遺伝学的にも均一であることから、多数の個体データからある結論を得るのに適切な動物であり、治療薬の有用性の評価や病態解析等に活用することが期待できるため、本研究では実験動物にマウスを用いた。また、マウスを用いたアデニン誘発腎障害モデルにおいて、アデニン添加飼料の摂食期間は最長 8 週間にとどまっております<sup>10)</sup>、長期摂食における影響は明らかにされていない。アデニン投与方法についても、0.2 wt%<sup>11)</sup>または 0.25 wt%<sup>12)</sup>アデニン添加飼料の継続摂食や、段階的にアデニン添加濃度を変化させる方法<sup>10)</sup>が報告されており、標準的な方法が確立されていない。そこで本研究では、市販の固形飼料を用いて簡便にアデニンを添加する方法として、アルカリ性水溶液中にアデニンを溶解し、その後、加えた水酸化ナトリウム溶液と同量の塩酸を加えることで中和し、アデニンが析出する前に素早く吸収させる方法をとった。本方法により、任意の固形飼料に自由な濃度のアデニンを添加することが可能となり、腎障害モデルを簡便に作成することができるため、病態解析や薬効評価に積極的に活用することが期待できる。

本研究では、0.20 wt%添加飼料を最長 16 週間に渡りマウスに摂食させた。その結果、実験期間中、アデニン群の 24 時間尿量、血清尿素窒素濃度、血清クレアチニン濃度は、対照群と比較して増加傾向を示した。一方、アデニン群の尿比重、尿中クレアチニン濃度、

尿中蛋白濃度は対照群と比較して、実験期間中を通して低下傾向を示した。腎臓の病理組織学検査においても、アデニン群では、実験開始4週目の時点で、尿細管内腔に硝子円柱を含む尿細管再生像を認めた。8週目には、腎組織全体にマクロファージを中心とする炎症細胞浸潤像を認め、16週目に至る時点では、MT染色で確認されたように、間質の著明な線維化像が確認された。これらの結果は、これまで報告された間質性腎炎とそれに続く線維化像の所見と酷似しており<sup>11)</sup>、本モデルが間質性腎炎および線維化を誘発していることが示唆される。また、16週目以降も0.25 wt%アデニン添加飼料をマウスに摂食させた結果、全個体が死亡した。これらの個体は、末期腎不全の状態にあったと考えられるが、死因については未確認であるため、今後さらに検討する必要がある。

食餌中のアデニンは腸管で吸収され、肝臓、腎臓、心臓、脾臓と広範囲に取り込まれ、主に肝臓で代謝されるため、通常尿中にはほとんど排泄されない<sup>12)</sup>。体内のアデニンはサルベージ経路の adenine phosphoribosyl transferase (APRT) によって adenosine monophosphate (AMP) に変換され<sup>13, 14)</sup>、最終的に尿酸となり体外へ排泄される。本研究でみられたような高濃度のアデニン摂食では、APRT で処理しきれない過剰なアデニンが xanthine dehydrogenase (XDH) によって中間体である 8-hydroxyadenine を経て 2,8-dihydroxyadenine (DHA) へと酸化され<sup>15)</sup>、始め腎臓の遠位尿細管へ沈着し、次いで近位尿細管へ沈着する<sup>16)</sup>。さらに、尿細管に沈着した DHA 結晶の成長により、尿細管の機械的破壊が進行し、微絨毛が消失し、尿細管上皮の変性に繋がる<sup>13)</sup>。それに伴い、障害を受けた尿細管から interleukin-1 (IL-1)、tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) などのサイトカインが分泌され、単核球を間質へ遊走させる<sup>17)</sup>。間質へ浸潤したマクロファージは、TNF- $\alpha$  などのサイトカインや transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) のような成長因子、繊維芽細胞成長因子を分泌する<sup>18)</sup>。その結果、間質組織中にコラーゲンが産生、沈着することで線維形成反応が次々と誘発される<sup>9)</sup>。さらに腎障害が進行すると、遠位尿細管と集合管の拡張、間質の線維化と細胞浸潤が起こる<sup>13)</sup>。本研究においても、腎障害の進行に伴い、間質へマクロファージの浸潤及び線維化像が確認されたため、同様の変化が起こっていると考えられる。

次に、本研究において、アデニン摂食によって惹起される本腎不全モデルマウスが、対照マウスと比較して収縮期血圧を有意に上昇させることを明らかにした。先行研究におけるラットを用いたアデニン摂食腎不全モデルでは、腎障害の進行に伴い動脈血圧が上昇することが報告されている<sup>19, 20)</sup>。しかし我々が調べた限り、マウスを用いたアデニン摂食腎不全モデルにおいて動脈血圧の上昇は報告されていない。Mori-Kawabe らは、0.25 wt% アデニン含有餌を摂食させた腎不全モデルマウスに対して本研究と同様テール・カフ法によって収縮期血圧、拡張期血圧、平均血圧を測定しているが、実験開始3週目に至るまで対照群と比較して有意差を認めていない<sup>8)</sup>。本研究では、アデニン摂食腎不全モデルマウスを12週間にわたり検討した結果、8週目以降においてアデニン群の収縮期血圧が対照群と比較して有意に上昇することを示したことから、アデニン誘発腎不全モデルマウスが心血管疾患(CVD)を引き起こすことが明らかとなった。CVDは慢性腎臓病(CKD)の合併症として惹起されることが知られており、アデニン誘発腎不全モデルは新しいヒトCKDモデ

ルとして有用であると考えられる。

アデニン誘発 CKD モデルにおける初期血圧上昇のメカニズムとして、動脈硬化と血管内皮機能低下が示唆されている<sup>19)</sup>ものの、レニン-アンジオテンシン系については報告されていない。本実験では、胸大動脈の HE 染色における病理組織学的検討において、アデニン群と対照群の間に差異を認めなかった。さらに、コッサ反応の結果においても、アデニン群では胸大動脈の石灰化所見を確認することができなかった。そのため、本実験における収縮期血圧の上昇は、血管内皮細胞の機能低下によると考えられる。そのメカニズムは、腎機能低下に伴い血管内皮細胞からの一酸化窒素放出が大動脈で減少すると考えられている<sup>8)</sup>。一酸化窒素は血管平滑筋を弛緩させる作用があり、CKD に伴う内因性の一酸化炭素放出量の減少が平滑筋の弛緩を阻害した結果、動脈血圧上昇に繋がったと考えられる。しかし、腎障害に伴う血管内皮細胞からの一酸化窒素放出のメカニズムは、アデニンが血管内皮に直接作用しているのかそれとも別のルートが存在するか等、十分解明されておらず、本モデルを用いた更なる検討が必要である。従って、アデニン摂食 CKD モデルマウスを用いたこのメカニズムに関する知識の向上は、CKD を有する患者における心血管疾患の治療において重要な役割を果たす可能性がある。また、アデニン摂食 CKD モデルラットでは、動脈の石灰化所見が複数報告されている<sup>21-24)</sup>。しかし、今回のマウスを用いた検討においては石灰化所見を呈さなかった。先行研究において、尿毒症性ラットにおける動脈石灰化は低蛋白食によって増加するとの報告があり<sup>24)</sup>、本方法をアデニン摂食 CKD マウスモデルに用いて石灰化を惹起するかどうかの検討が今後必要であると考えられる。

最後に、尿中に剥離した尿細管上皮細胞の N/C 比をアデニン群と対照群で比較した結果、アデニン群は対照群と比較して有意に高値を示した。この事実は、尿細管上皮細胞の核面積の増大が腎臓の器質的変化を反映していると考えられる。形態検査では、N/C 比の増大は悪性又は良性の反応性変化の所見の 1 つとされており、機能との関係は考慮されていないが、本研究の結果から、核クロマチン増量等の他の悪性を示唆する所見を伴わない N/C 比増大は、腎機能の低下を示唆していると考えられる。これまでの尿沈渣検査では、慢性糸球体腎炎などによる尿細管間質病変の形成に伴って尿細管上皮細胞の尿中排泄数が増加するとされ、特に蛋白尿を伴って鏡検 400 倍で 1 視野に 1 個以上排泄していた場合は腎機能低下が示唆される<sup>25)</sup>など、腎機能と剥離細胞数に着目しているのみで、形態変化との関連は考慮されていない。また、尿細胞診検査における尿細管上皮細胞の扱いは、癌細胞との鑑別点に焦点が当てられているのみで、機能との関係について考慮されていない<sup>26)</sup>。さらに、細胞診検査における細胞形態の評価方法は、N/C 比の大小や細胞・核の形、核クロマチンの状態などを主観的に評価することがほとんどで、客観的評価が伴っていない<sup>27)</sup>。そこで本研究では、尿中に剥離した尿細管上皮細胞で個別に N/C 比を算出し、腎機能との関係性を客観的に評価したことに意義があると考えられる。今後は、腎機能の経時推移と尿細管上皮細胞の N/C 比の変化について検討を加えるとともに、N/C 比以外の細胞所見についても客観的評価方法を確立したい。

## 第5章の参考文献

- 1 樋口 誠; 慢性腎臓病(CKD). 信州医学雑誌 62: 227-237, 2014.
- 2 日本腎臓学会CKD 診療ガイド 2012東京医学社2012.
- 3 Yang H. C., Zuo Y., Fogo A. B.; Models of chronic kidney disease. *Drug Discov Today Dis Models* 7: 13-19, 2010.
- 4 横澤 隆子, 大浦 彦吉, 中川 眸, 岡田 敏夫; アデニン長期投与による血清尿酸レベルの上昇と腎機能障害. *日本農芸化学会誌* 56: 655-663, 1982.
- 5 Iijima K., Ito Y., Son B. K., Akishita M., Ouchi Y.; Pravastatin and olmesartan synergistically ameliorate renal failure-induced vascular calcification. *J Atheroscler Thromb* 21: 917-929, 2014.
- 6 Okada H. , Kaneko Yoshiteru , Yawata Takiko, et al.; Reversibility of adenine-induced renal failure in rats. *Clinical and Experimental Nephrology* 3: 82-88, 1999.
- 7 Yokozawa T., Zheng P. D., Oura H.; Biochemical features induced by adenine feeding in rats. Polyuria, electrolyte disorders, and 2,8-dihydroxyadenine deposits. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 30: 245-254, 1984.
- 8 Mori-Kawabe M., Yasuda Y., Ito M., Matsuo S.; Reduction of NO-mediated Relaxing Effects in the Thoracic Aorta in an Experimental Chronic Kidney Disease Mouse Model. *J Atheroscler Thromb* 22: 845-853, 2015.
- 9 Tamura M., Aizawa R., Hori M., Ozaki H.; Progressive renal dysfunction and macrophage infiltration in interstitial fibrosis in an adenine-induced tubulointerstitial nephritis mouse model. *Histochem Cell Biol* 131: 483-490, 2009.
- 10 Jia T., Olauson H., Lindberg K., et al.; A novel model of adenine-induced tubulointerstitial nephropathy in mice. *BMC Nephrol* 14: 116, 2013.
- 11 Tanaka T., Doi K., Maeda-Mamiya R., et al.; Urinary L-type fatty acid-binding protein can reflect renal tubulointerstitial injury. *Am J Pathol* 174: 1203-1211, 2009.
- 12 Aguiar C. F. , Naffah-de-Souza C. , Castoldi A., et al.; Administration of alpha-Galactosylceramide Improves Adenine-Induced Renal Injury. *Mol Med* 21: 553-562, 2015.
- 13 Koeda T., Wakaki K., Koizumi F., Yokozawa T., Oura H.; Early changes of proximal tubules in the kidney of adenine-ingesting rats, with special reference to biochemical and electron microscopic studies. *Nihon Jinzo Gakkai Shi* 30: 239-246, 1988.
- 14 Yokozawa T., Oura H., Koizumi F.; 2,8-Dihydroxyadenine urolithiasis induced by dietary adenine in rats. *Nihon Jinzo Gakkai Shi* 27: 371-378, 1985.
- 15 Wyngaarden J. B., Dunn J. T.; 8-Hydroxyadenine as the intermediate in the oxidation of adenine to 2, 8-dihydroxyadenine by xanthine oxidase. *Arch Biochem Biophys* 70: 150-156, 1957.

- 16 Stockelman M. G., Lorenz J. N., Smith F. N., et al.; Chronic renal failure in a mouse model of human adenine phosphoribosyltransferase deficiency. *Am J Physiol* 275: F154-163, 1998.
- 17 Strutz F., Neilson E. G.; New insights into mechanisms of fibrosis in immune renal injury. *Springer Semin Immunopathol* 24: 459-476, 2003.
- 18 Rodriguez-Iturbe B., Pons H., Herrera-Acosta J., Johnson R. J.; Role of immunocompetent cells in nonimmune renal diseases. *Kidney Int* 59: 1626-1640, 2001.
- 19 Nguy L., Nilsson H., Lundgren J., et al.; Vascular function in rats with adenine-induced chronic renal failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 302: R1426-1435, 2012.
- 20 Nguy L., Johansson M. E., Grimberg E., et al.; Rats with adenine-induced chronic renal failure develop low-renin, salt-sensitive hypertension and increased aortic stiffness. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 304: R744-752, 2013.
- 21 Tamagaki K., Yuan Q., Ohkawa H., et al.; Severe hyperparathyroidism with bone abnormalities and metastatic calcification in rats with adenine-induced uraemia. *Nephrol Dial Transplant* 21: 651-659, 2006.
- 22 Katsumata K., Kusano K., Hirata M., et al.; Sevelamer hydrochloride prevents ectopic calcification and renal osteodystrophy in chronic renal failure rats. *Kidney Int* 64: 441-450, 2003.
- 23 Neven E., Dauwe S., De Broe M. E., D'Haese P. C., Persy V.; Endochondral bone formation is involved in media calcification in rats and in men. *Kidney Int* 72: 574-581, 2007.
- 24 Price P. A., Roublick A. M., Williamson M. K.; Artery calcification in uremic rats is increased by a low protein diet and prevented by treatment with ibandronate. *Kidney Int* 70: 1577-1583, 2006.
- 25 横山 貴; CKD および CVD 抑制のために有用な指標としての尿沈渣成分. *医学検査* 60: 694-703, 2011.
- 26 佐伯 勇輔, 大崎 博之, 此上 武典, 藤田 泰吏, 北澤 荘平; 反応性尿路上皮細胞と尿路上皮癌細胞の鑑別における vimentin の有用性について. *医学検査* 66: 1-7, 2017.
- 27 大崎 博之, 羽場 礼次, 平川 栄一郎; 【細胞診の進歩】 尿細胞診における尿細管上皮細胞の判定法と鑑別. *病理と臨床* 27: 1191-1196, 2009.

## 第6章 結語

本研究では、尿を用いた簡便な検査によって、機能変化を引き起こす組織の器質的变化を検出する手法を開発することを目的とした。ヒトを対象とした実験では任意の時点で組織を検出し、その組織像を観察することが不可能であるため、実験動物（マウス）を用いて実施した。そこで、腎・泌尿器系の器質的变化を検出するために、病態モデルが必要となった。

前立腺肥大症のモデルマウスの作製法は、ホルモン投与や遺伝子組み換えなどの方法が報告されているが、長期的に飼育した加齢マウスを用いた報告はない。本研究では、ヒトと同じように生理的条件下で発生する組織変化を検出するため、この長期飼育マウスを実験に用いたことに特徴がある。さらに、既存の病理組織検査の報告では、N/C比（細胞質に占める核の面積比）が大きい、核クロマチンが増量している、細胞の配列に乱れがある、などといった主観に基づいた表現が多く、観察者によって結果が変わってしまう恐れがある。そこで本研究では、病理組織所見を客観的に評価するため、上皮面積/腺管面積比や上皮細胞密度を用いて数値化することにより、他のパラメーターとの関係性を評価できるようにしたことにも意義があると考えられた。

また、腎障害のモデルについても、これまで複数の動物種に様々な方法を用いて病態モデルが作製されているが、どの方法にも一長一短がある中で、本研究ではアデニン誘発腎障害モデルに着目し、実験を行った。その結果、アデニン誘発腎障害モデルがヒトCKDモデルとして活用できることが明らかとなったとともに、心血管疾患の病態モデルとしても活用できる可能性を示した。しかしながら、ヒトと同じように生理条件下で発生する腎障害を評価するというのであれば、上記の前立腺肥大モデルと同様に長期飼育による加齢マウスを用いた方が良いかもしれず、この点については今後の検討課題としたい。さらに、尿中に剥離した尿細管上皮細胞のN/C比を定量化することにより、臨床検査値との比較が可能となった。本研究の結果、尿細管上皮細胞のN/C比増加が腎機能低下を示唆することを明らかにしたことにより、尿検査から腎臓の器質的变化を検出する1つの手法を開発できたと考えられた。これまでの形態検査は、観察者の主観によって表現されることが多く、客観的評価に欠けているため、今後は各細胞所見を定量化することに取り組んでいきたい。

本研究により、部分的ではあるものの非観血的に腎・泌尿器系の器質的变化を検出する手法を開発することが出来た。腎機能と尿中に剥離する尿細管上皮細胞形態の変化の関係については、これからさらに実験を行っていく予定である。また、本研究はあくまで実験動物（マウス）による結果であるため、ヒトにおいても同様の結果となるのか興味のあるところである。そのためには、将来的に臨床機関と連携して研究を進めることが必要になってくる。本研究の成果が、臨床検査の新たな検査方法の1つとして確立し、病期の早期発見・早期治療に貢献できることを期待し、結びの言葉としたい。

## 謝辞

博士学位論文を作成するにあたって、これまで多くの方々のご指導とご助力を頂きました。

愛媛県立医療技術大学保健科学部教授（現：愛媛大学大学院医学系研究科・客員研究員）の昆和典先生には、学部生時代からご指導を頂き、現在に至ります。臨床検査技師として医療機関に勤務していた私を放送大学大学院に導いてくださったことにはじまり、研究テーマを与えて頂いた上、実験方法や論理的な考え方、実験動物の飼養方法や実験手技などの幅広い知識・技術に加え、プライベートに至るまで多くの助言を頂きました。ただ、私にそれを受け入れるだけの十分な能力もなく、また努力不足もあり、全くご期待に応えることが出来ませんでした。しかし、全く進歩のない私を見捨てることなく、本学位論文作成まで辛抱強くご指導頂いたことは、私にとって感謝しかありません。心よりお礼申し上げます。

この度、主査を引き受けて頂きました広島国際大学総合リハビリテーション学部教授の南山求先生には、厚く御礼申し上げます。広島国際大学に赴任させて頂く際、出来るだけ早く博士学位論文を提出するとのお話でしたが、私の努力不足で遅くなってしまいました。それでも今日まで待って頂いたうえ、本学位論文の相談に乗って頂き、ご助言も頂きました。本当にありがとうございました。

愛媛県立医療技術大学保健科学部講師の岡村法宜先生にも、学部生時代からお世話になり、本学位論文作成に当たっても多くのご助言を頂きました。謹んで感謝申し上げます。

広島国際大学薬学部准教授の兒玉安史先生には、研究についての助言や指導を頂くとともに、実験に使用する機器を貸与して頂き、厚く御礼申し上げます。

副査を引き受けて頂いた広島国際大学医療技術学科教授の藤原章先生及び清水希功先生には平素から大変お世話になっており、深謝いたします。

最後に、研究、実験に協力して下さった全ての方々にお礼を申し上げるとともに、私を支えてくれた家族にも感謝いたします。

皆様、本当にありがとうございました。