胆管結紮による肝不全モデル動物における 腎血行動態異常についての解析

学位論文内容の要旨

【背景と目的】「肝腎症候群」(Hepatorenal syndrome, 以下 HRS) は肝機能が著しく障害された状態において合併する急性あるいは亜急性の腎機能障害と定義され、正常肝機能を持つ慢性腎不全患者に HRS 患者の腎臓を移植した場合に腎機能が回復したことなどが報告されていることなどから機能的腎障害と考えられている。

HRS の発症機序に血行動態異常が深く関わることを示されており、肝機能低下に伴い血管作動物質の産生や消費が生じ、内臓血管抵抗の低下と心拍出量増加に伴う循環動態の変化が惹起され、腎臓では腎血管抵抗の増大により腎血流量の低下が生じるとされているが、詳細な機序については未だ明らかになっていない。

腎臓には血行動態の自動調節機構が存在し、主要な調節機構として、血管そのものが本質的に備えている筋原反応と、単一ネフロンにおける糸球体濾過量を最適化するための尿細管糸球体フィードバック機構 (Tubuloglomerular feedback, 以下 TGF) の 2 種類が知られている。糖尿病・高血圧などの全身性疾患ではこれらの機構の破綻と病態への関与が明らかにされている。

そこで本研究においては、「HRS は血行動態異常に基づく機能障害である」という観点から HRS における腎血行動態異常を明らかにすることを目的とした。実験に供する動物モデルとして、胆管結紮によるラットおよびマウス肝機能障害モデルを作成し、腎臓の血行動態ならびにそれに関わる因子につき検討した。

【対象と方法】

<1. 胆管結紮モデルの作製> 8 週齢の SD ラットおよび、TGF の主要なメディエーターであるアデノシンと一酸化窒素 (NO) の関与を検討するため、8-12 週齢の A1 adenosine receptor ノックアウトマウス (A1AR), brain Nitric Oxide Synthases ノックアウトマウス (bNOS), endothelial Nitric Oxide Synthases ノックアウトマウス (eNOS) に対し胆管結紮 (Bile Duct Ligation, 以下 BDL) を行い、対照として開腹のみ行った偽手術 (Sham) 群を作成した。ラットは手術施行 2 週間後、マウスは 10 日後に肝機能・腎機能を評価した。

<2. 動脈手動クランプによる自動調節能の測定> 胆管結紮術を施行 2 週間後のラットを使用し腎血行動態測定実験を行った。右大腿動脈より腹部大動脈内にカテーテルを挿入し腎灌流圧 (RPP) を測定した。腹部大動脈の腎動脈分岐直上に手動クランプを掛け、大動脈を絞扼し、腎灌流圧を約 10mmHg 前値より軽度低下させ (mild clamp: E1) 続いて約 20mmHg 低下させて (moderate clamp: E2) 腎動脈に設置した超音波流量により総腎血流量 (RBF) を測定した。更にグラスファイバー製の超音波プローブ 2 本をそれぞれ腎表面から約 1mm, 約 3mm の深さに挿入し皮質表層 (SBF), 深層血流信号 (DBF) を測定した。

<3. Micropuncture 法を用いた尿細管糸球体フィードバック反応の検討> マイクロプレッシャーシステムに接続した硝子ピペット (先端径: 2 μ m) を近位尿細管に穿刺し、これを尿細管圧測定用の圧ピペットとした。同部位より下流の尿細管を固形ワックスで閉塞し尿

流を遮断, さらに下流へ人工尿細管液で満たしたガラスピペット穿刺し, ヘンレループ内に灌流させる人工尿細管液量を 0.40nl/min まで任意に変化させた. このときに圧ピペットで測定される尿細管内圧を Stop flow pressure (P_{sf}) とした.

<4. アンギオテンシン受容体阻害薬投与実験> 胆管結紮術を施行 1 週間後のラットを使用し, RPP, RBF, SBF, DBF の基礎値を測定後, アンギオテンシン受容体阻害薬である RNH6270 (Olmesartan Medoxomil 活性体) を 0.1mg/kg・体重 を静注した. 投与後の RPP, RBF, SBF, DBF を経時的に観察した.

<5. アンギオテンシン受容体 (AT1) の評価> 胆管結紮手術 2 週後のラットより片腎を摘出し, 全腎組織を用いて AT1 受容体の発現程度をウエスタンブロット法で確認した.

【結果】

<1>SDラットにおいては, 総ビリルビン (T-bil), アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST), アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) 値はBDL群でSham群よりも有意に上昇していた. また血清クレアチニン (Cr), 尿素窒素 (UN) 値はBDL群でSham群よりも有意に上昇しており, 24時間クレアチニンクリアランス (Ccr) がBDL群でSham群よりも有意に低下していた. Wild typeマウス (以下WT) に対して同様の検討を行った結果はほぼラットと同様であった. A1AR, bNOS, eNOSのノックアウトマウスでは, eNOS群で血清Cr値がWT群に比較し有意な上昇を認めしたが, A1AR群, bNOS群では有意差を認めなかった.

<2>測定装置を設置後15分間静置し定常状態となった値をbaselineとして測定後, 更にtime control (C) を計測した. RBFは, E1, E2におけるtime controlからの変化率がSham群ではE1で-3.9%, E2で-7.3%であったが, BDL群ではE1で-13.8%, E2で-20.7%とSham群に比較し有意に大きな変化を示した. SBFの変化率は, BDL群においてE1で-3.1%, E2で-5.5%の低下を認め, Sham群に比較しても有意な低下を認めしたが, DBFの変化率はE1, E2とも両群間に有意差を認めず, かつtime controlに対しても有意差を認めなかった.

<3>定常状態 (0 nl/min) において, P_{sf} はSham群の 40.6 ± 5.87 mmHgに対し, BDL群で 29.2 ± 6.36 mmHgと有意に低下していた. 20 nl/min, 40 nl/minではSham群の P_{sf} が徐々に低下しTGF反応を明確に示すのに対し, BDL群では P_{sf} の低下を認めなかった. 変化率 (ΔP_{sf}) でみると40 nl/minの時にSham群が $-25.8 \pm 7.28\%$ と0 nl/minの時に比べて大きく低下しているのに比べBDL群では $-13.72 \pm 13.54\%$ と低下の割合が小さく, 両者間には有意差を認めた.

<4> Δ RBF, Δ SBF, Δ DBFは, 各経過時間時点において両群間に有意差を認めなかった.

<5>両群の腎におけるAT1受容体蛋白の発現程度は, 有意差を認めなかった.

【結論】胆管結紮モデルラットでは, 糸球体尿細管フィードバックの著しい障害を認めた. 腎血管の自動調節能も胆管結紮モデルラットでは障害を受け, 特に皮質血管において著明な障害を認め, 深部血管と差異を認めた. すなわち, 肝障害時の腎機能低下には, 腎血行動態異常, 特に血行動態調節能力の破綻が大きく寄与していると考えられる. eNOS ノックアウトマウスでは野生型に比較し胆管結紮により有意な腎機能の低下を認めており, NO 産生系の異常が深く関与していると考えられるが, レニン・アンギオテンシン系の異常については有意な結果が得られず, その関与については更なる検討を要する.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫
副 査 教 授 筒 井 裕 之
副 査 教 授 浅 香 正 博

学位論文題名

胆管結紮による肝不全モデル動物における 腎血行動態異常についての解析

「肝腎症候群」(Hepatorenal syndrome, 以下 HRS) は肝機能が著しく障害された状態において合併する急性あるいは亜急性の腎機能障害と定義され、機能的腎障害と考えられている。肝障害に続き血管作動物質の産生が生じ、腎血流量の低下が生じるとされているが、詳細な機序については未だ明らかになっていない。

腎臓の主要な血行動態調節機構として、血管そのものが本質的に備えている筋原反応と、単一ネフロンにおける糸球体濾過量を最適化するための尿細管糸球体フィードバック機構 (Tubuloglomerular feedback, 以下 TGF) の 2 種類があり、HRS においてこれら調節機構の異常を明らかにすることを実験の目的とした。実験に供する動物モデルとして、胆管結紮 (bile duct ligation, 以下 BDL) によるラットおよびマウスの肝機能障害モデルを作成した。

SD ラットおよび、TGF の主要なメディエーターの一つである一酸化窒素の関与を検討するため、brain Nitric Oxide Synthases ノックアウトマウス、endothelial Nitric Oxide Synthases ノックアウトマウス (eNOS) に対し胆管結紮を行い、対照として偽手術 (Sham) 群を作成した。ラットは手術施行 2 週間後、マウスは 10 日後に肝機能・腎機能を評価し、BDL 群で Sham 群よりも有意な肝酵素、血清クレアチニン (Cr) 値の上昇を認めた。マウスにおいては、eNOS 群で血清 Cr 値が Wild type 群に比較し有意な上昇を認めた。

腎血行動態測定実験にはラットのモデルを用いた。腹部大動脈に手動クランプを掛け、大動脈を絞扼し、腎灌流圧 (RPP) を約 10mmHg 前値より低下させ (mild clamp: E1) 続いて約 20mmHg 低下させて (moderate clamp: E2) 腎動脈に設置した超音波流量と、腎表面に設置した超音波プローブにより総腎血流量 (RBF)、皮質表層 (SBF)、深層血流信号 (DBF) を測定した。また、主要な血管作動物質であるレニン-アンギオテンシン系の関与の検討のため、RPP, RBF, SBF, DBF については、アンギオテンシン受容体阻害薬である Olmesartan Medoxomil 活性体投与後の変化を経時的に観察した。さらに、ラットより片腎を摘出し、全腎組織を用いて AT1 受容体の発現程度をウエスタンブロット法で確認した。RBF は、E1, E2 における control からの変化率が BDL 群で Sham 群に比較し有意に大きな変化を示した。SBF の変化率は BDL 群において Sham 群に比較しても有意な低下を認めたが、DBF の変化率は両群間に有意差を認めなかった。アンギオテンシン受容体拮抗薬の投与後は、RBF, SBF, DBF について、その初期値からの変化率は各

経過時間時点において両群間に有意差を認めなかった。両群の腎における AT1 受容体蛋白の発現程度にも差を認めなかった。

次に、TGF 反応についての検討を行った。硝子ピペットを近位尿細管に穿刺し、ヘンレーループ内に灌流させる人工尿細管液量を 0-40nl/min まで任意に変化させたときの近位尿細管内圧 (stop flow pressure, 以下 P_{sf}) を測定した。定常状態において、 P_{sf} は Sham 群に対し、BDL 群で有意に低下していた。20 nl/min, 40 nl/min では Sham 群の P_{sf} が徐々に低下し TGF 反応を明確に示すのに対し、BDL 群では P_{sf} の低下を認めなかった。

以上より、胆管結紮モデルラットでは、腎血管の自動調節能においては特に皮質血管で著明に障害され、深部血管と差異があり、また糸球体尿細管フィードバック反応の著しい障害を認め、肝障害時の腎機能低下には、血行動態調節能力の破綻が大きく寄与していると考えられた。これには NO 産生系の異常が関与している可能性があるが、レニン・アンギオテンシン系の異常については有意な結果が得られなかった。以上が論文の要旨である。

学位申請者眞岡知央の学位論文公開発表は、平成 22 年 2 月 1 日午後 2 時 8 分より医学部臨床大講堂において行われた。申請者はスライドを用いながら約 20 分に渡って学位論文内容の発表を行った。

その後、副査筒井裕之教授より、本実験で使用されたモデルについてアンギオテンシン受容体の発現の部位による違い、アンギオテンシン受容体拮抗薬の投与で腎機能が回復するかどうか、臨床的に考えられる治療法について質問があった。

この質問に対して申請者は、腎の部位によるアンギオテンシン受容体発現の違い、アンギオテンシン受容体拮抗薬の投与による腎機能回復効果については本研究では未検証であるが、肝腎症候群の血行動態異常は複数の血管収縮因子、血管拡張因子の作用が複雑に関与していると推測されることから、単一の薬剤投与での治療は困難ではないかと回答した。

次いで、副査浅香正博教授より、本実験で使用されたモデルについてビリルビンの腎機能に与える影響について、エンドトキシンの関与について、およびこのモデルが肝硬変に至っているのかどうか、について質問があった。

また、主査小池隆夫教授より、本実験で使用されたモデルが、肝腎症候群のモデルとして妥当であるかどうか、腎組織に非可逆的変化が起きるのかどうかについて質問があった。

これらの質問に対して申請者は、本モデルにおいては、組織学的異常が認められなかったことからビリルビンやエンドトキシンの影響はあっても限定的であると考えられ、また、本モデルは完全な肝硬変には至っていないが、肝腎症候群の初期の段階を再現するものとしては一定の妥当性があるものと考えられると回答した。質疑応答の時間は約 15 分であった。

この論文は、肝機能障害時の腎血行動態変化についての詳細を明らかにした点で評価され、今後のさらに詳細な病態解明の一助となることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。