

氏名(本(国)籍)	土屋紀子(京都府)		
推薦教員	帯広畜産大学 教授 松井高峯		
学位の種類	博士(獣医)		
学位記番号	獣医博乙第92号		
学位授与年月日	平成21年9月11日		
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当		
学位論文題	Pathological Studies on Glomerulonephropathy Induced by Bolus Injection with Dibasic Sodium Phosphate Solution in Rats (リン酸水溶液の静脈内投与によるラットにおける糸 球体腎症の病理学的研究)		
審査委員	主査	帯広畜産大学 教授	松井高峯
	副査	帯広畜産大学 教授	北村延夫
	副査	岩手大学 教授	岡田幸助
	副査	東京農工大学 教授	三森国敏
	副査	岐阜大学 教授	柳井徳磨

論文の内容の要旨

リン酸塩は電解質補給薬や製剤原料として広く使用されるほか、注射用製剤の緩衝作用を目的とした媒体としても用いられている。これまでに、リン酸塩の大量経口投与によりラットやイヌで尿細管上皮にカルシウム塩が沈着し、腎石灰症が発生することは知られているが、リン酸水溶液の静脈内投与による腎毒性に関する報告はみあたらない。本研究は、ラットにおける第二リン酸水素ナトリウム (Na_2HPO_4) 水溶液(以下、リン酸水溶液)の静脈内投与による腎毒性の特徴を把握する目的で行った。

各実験に共通して、6週齢のJcl:SD雄ラットにpH6.0~6.5に調整したリン酸水溶液8 mL/kgを尾静脈から投与した。対照群には生理食塩液を投与した。尿検査、血液学および血液化学的検査、腎臓の病理組織学および電顕的検査を実施した。

リン酸水溶液濃度と糸球体病変の特徴を精査する目的で、1, 25, 250 および 360 mM リン酸水溶液(1, 28, 284 および 408 mg/kg Na_2HPO_4)投与群を設定し、1日1回、2週間反復静脈内投与したところ、250 mM以上のリン酸水溶液投与群で尿タンパク陽性例が増加した。投与期間を通して全例の一般状態に変化はなく、剖検時の腎臓重量、肉眼検査および血液化学的検査においても異常は認められなかった。組織学的に、250 および 360 mM リン酸水溶液投与群の腎臓において、糸球体上皮およびボウマン嚢上皮の変性および石灰沈着、ボウマン嚢上皮細胞の肥大が認められた。電顕的には、ボウマン腔、一部の糸球体基底膜およびメサンジウム領域において低電子密度の球状物が融合した層板状構造物が認められ、同部位ではX線定性分析によりリンとカルシウムが検出された。その他、糸球体上皮細胞の足突起の融合や微絨毛形成も認められ

た。1 および 25 mM リン酸水溶液投与群には変化は認められなかった。このことから、高濃度リン酸水溶液の反復静脈内投与により糸球体に主座する石灰沈着が発現し、この病変がタンパク尿の原因であることが示唆された。

高濃度リン酸水溶液による糸球体障害の発生機序を解明するために、360 mM リン酸水溶液をラットに1日1回静脈内投与し、単回投与後、3日間、7日間もしくは8日間反復投与後に剖検して経時的变化を検索した。投与3日目以降尿タンパク陽性例が増加し解剖時まで持続した。単回投与後に、電顕的にボウマン嚢腔や糸球体上皮細胞に空胞が認められた。3日間投与により、糸球体上皮およびボウマン嚢上皮に限局性の石灰沈着が見られ、7もしくは8日間投与例では糸球体全域への石灰沈着が認められた。3日間および8日間投与後には、電顕的にボウマン腔、糸球体の上皮や基底膜に層板状構造物が出現した。免疫組織化学的に、8日間投与例の糸球体上皮およびボウマン嚢上皮細胞質において、ポドプラニン（糸球体上皮マーカー）の発現減少およびデスミン（糸球体上皮傷害時のマーカー）の発現増強が認められた。7日間投与例において、組織学的に尿細管および間質に変化は認められなかったが、real time-PCRを用いた腎障害マーカー遺伝子の発現解析では、*Kim1*、*Spp1*および*A2m*の発現上昇が認められた。これらの結果からリン酸水溶液による糸球体障害発生の初期病変として糸球体上皮細胞の変性が重要であり、糸球体の機能障害によるタンパク尿および糸球体上皮の再生が引き続いて発生することが確認された。また、リン酸水溶液反復投与に伴う早期の尿細管障害が示唆された。

高濃度リン酸水溶液の長期間反復投与による影響と高度な糸球体石灰沈着の回復性を検討するために、360 mM リン酸水溶液を1日1回、4週間反復静脈内投与もしくは2週間反復投与後2週間休薬後に剖検した。リン酸水溶液投与群では、投与3日目以降の持続性尿タンパク増加、貧血および高脂血症が認められた。4週間投与により、糸球体全域への石灰沈着、糸球体毛細血管の拡張、糸球体上皮およびボウマン嚢壁細胞の変性が認められた。メサンジウム融解などの著しい糸球体障害に加え、近位尿細管上皮のびまん性変性および再生、尿細管基底膜への石灰沈着、間質への炎症性細胞浸潤および線維化も認められた。また、リン酸水溶液により高度に障害された糸球体は、休薬後も機能的および形態学的に回復せず、皮質尿細管上皮細胞や間質に病変が拡大することが示された。尿細管上皮細胞の変性・再生及び間質の病変はタンパク尿性尿細管障害の結果と推察され、ヒトのネフローゼ症候群に類似した臨床症状および組織像を示した。

本研究により、リン酸水溶液の静脈内投与により濃度に依存して糸球体石灰沈着を特徴とする腎障害が発生することを示し、高濃度リン酸水溶液の4週間投与により短期間で有用な腎疾患病態モデルを誘発できることが示唆された。

審 査 結 果 の 要 旨

リン酸塩は医療用薬剤等の原料あるいは緩衝性媒体として広く使用されている。リン酸塩をラットやイヌに大量経口投与すると尿細管への石灰沈着（腎石灰症）が生じることが知られているが、リン酸水溶液を静脈内投与した場合の腎毒性に関する報告は見当たらない。本研究では、ラットの尾静脈から第二リン酸水素ナトリウム (Na_2HPO_4) 水溶液（以下、リン酸水溶液）を投与し、経時的尿検査とともに腎臓を病理組織学的および微微形態学的に検索した。

第1章では、リン酸水溶液濃度と糸球体病変の特徴を精査する目的で1, 25, 250 および 360 mM のリン酸水溶液投与群を設定し、2週間反復静脈内投与後に検索した。250 mM 以上の投与群で尿タンパク陽性例が増加した。組織学的および電顕的に250および360 mM 群において糸球体上皮およびボウマン嚢上皮の石灰沈着と変性が認められ、高濃度リン酸水溶液の反復静脈内投与が糸球体障害とタンパク尿を引き起こすことを明らかにした。

第2章では、高濃度リン酸水溶液による糸球体障害の発生機序を解明する目的で360 mM リン酸水溶液を単回および複数回反復投与後に剖検し、経時的变化を検索した。単回投与例では電顕的にボウマン嚢腔および糸球体上皮細胞に空胞が認められた。組織学的に、石灰沈着が3日間投与後にはボウマン嚢上皮および糸球体上皮に限局性に見られ、7もしくは8日間投与後には糸球体全域に認められた。7日間投与例では尿細管および間質に光顕的な変化は認められなかったが、腎障害のマーカー遺伝子 (*Kim1*, *Spp1* および *A2m*) の発現が上昇した。

第3章では、高濃度リン酸水溶液投与により誘発される腎障害の回復性と長期投与による影響を検討するため、360 mM リン酸水溶液を4週間反復投与群と2週間反復投与後2週間休薬群について検討した。その結果、ヒトのネフローゼ症候群の臨床症状に類似した持続的な尿タンパクの増加、貧血、高脂血症および間質・尿細管病変を伴う糸球体障害が認められた。高濃度のリン酸水溶液投与により高度に障害された糸球体は、休薬後も機能的、形態学的に回復せず、皮質尿細管上皮細胞や間質に病変が拡大することが示された。

以上の成績は、リン酸水溶液の濃度に依存してラットで糸球体への石灰沈着が発生することを示し、高濃度リン酸水溶液の静脈内投与によりヒトのネフローゼ症候群類似の病態モデルをラットで短期間に作成できる可能性を示唆したものである。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Glomerular calcification induced by bolus injection with dibasic sodium phosphate solution in Sprague-Dawley rats
著 者 名 : Tsuchiya, N., Matsushima, S., Takasu, N., Kyokawa, Y., and Torii, M.
学術雑誌名 : Toxicologic Pathology
巻・号・頁・発行年 : 32(4) : 408-412, 2004
- 2) 題 目 : Early events involving glomerular calcification induced by dibasic sodium phosphate solution in rats
著 者 名 : Tsuchiya, N., Torii, M., Narama, I. and Matsui, T.
学術雑誌名 : Journal of Toxicologic Pathology
巻・号・頁・発行年 : 21(4) : 229-237, 2008
- 3) 題 目 : Nephrotic syndrome induced by dibasic sodium phosphate injections for twenty-eight days in rats
著 者 名 : Tsuchiya, N., Torii, M., Narama, I. and Matsui, T.
学術雑誌名 : Toxicologic Pathology
巻・号・頁・発行年 : 37(3) : 270-279, 2009

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Renal dysplasia in a Shih Tzu Dog in Japan
著 者 名 : Ohara, K., Kobayashi, Y., Tsuchiya, N., Furuoka, H. and Matsui, T.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
卷・号・頁・発行年 : 63(10): 1127-1130, 2001

- 2) 題 目 : Spontaneous collagenofibrotic glomerulonephropathy in a young Cynomolgus Monkey
著 者 名 : Fujisawa-Imura, K., Takasu, N., Tsuchiya, N., Matsushima, S., Inagaki, H. and Torii, M.
学術雑誌名 : Journal of Toxicologic Pathology
卷・号・頁・発行年 : 17(4): 279-282, 2004

- 3) 題 目 : Ultrastructural and morphometrical evaluation of the parathyroid gland in iron-lactate-overloaded rats
著 者 名 : Matsushima, S., Tsuchiya, N., Fujisawa-Imura, K., Hoshimoto, M., Takasu, N., Torii, M., Ozaki, K., Narama, I. and Kotani, T.
学術雑誌名 : Toxicologic Pathology
卷・号・頁・発行年 : 33(5): 533-539, 2005

- 4) 題 目 : Comparative analysis of gene expression between renal cortex and papilla in nedaplatin-induced nephrotoxicity in rats
著 者 名 : Uehara, T., Miyoshi, T., Tsuchiya, N., Masuno, K., Okada, M., Inoue, S., Torii, M., Yamate, J. and Maruyama, T.
学術雑誌名 : Human and Experimental Toxicology
卷・号・頁・発行年 : 26(10): 767-780, 2007

- 5) 題 目 : Amelioration of nedaplatin-induced nephrotoxicity by continuous infusion in rats
著 者 名 : Uehara, T., Tsuchiya, N., Torii, M., Yamate, J. and Maruyama, T.
学術雑誌名 : Journal of Toxicologic Pathology
卷・号・頁・発行年 : 20(3): 141-147, 2007

- 6) 題 目 : Time course of the change and amelioration of nedaplatin-induced nephrotoxicity in rats
著 者 名 : Uehara, T., Tsuchiya, N., Masuda, A., Torii, M., Nakamura, M., Yamate, J. and Maruyama, T.
学術雑誌名 : Journal of Applied Toxicology
卷・号・頁・発行年 : 28(3): 388-398, 2008