

阻血性腎障害に対するウレタン誘導体および ATP の 効果に関する実験的研究

奈良県立医科大学泌尿器科学教室 (主任: 石川昌義教授)

井 本 卓

EFFECT OF URETHANE DERIVATIVES AND ATP ON ISCHEMIC RENAL DAMAGE

Takashi Imoro

From the Department of Urology, Nara Medical University

(Director: Prof. M. Ishikawa, M.D.)

Present author studied the effect of urethane derivatives (UD) and ATP on the renal ischemic damage resulting from temporary occlusion of renal vessel during palliative operation of the kidney.

Unilateral nephrectomized male dogs were used. Renal blood flow was interrupted for 100 minutes. Fifteen minutes before interruption, butylmorpholine urethane was administered at rate of 50 mg/kg b.w. and postoperatively ATP was administered intravenously at rate of 100 mg/day.

Biological, histochemical, and histological examinations were made.

Two groups, one nontreated and another administered ATP, demonstrated severe ischemic renal damage and mostly died. The other two groups, one given UD and another UD with ATP, were alive at 14th days postoperatively. The group, which was given UD, demonstrated not only severe ischemic renal damage at the 4th postoperative day, but mild elevation of BUN as well as biological and histological mild renal damage at the 14th postoperative day. On the other hand, the group, which was given UD with ATP, indicated mild ischemic renal damage at 4th day and returned to normal at the 14th postoperative day.

This results indicate that UD with ATP administration was more effective than administration of only UD.

緒 言

泌尿器科領域における手術の進歩に伴い、保存的腎手術が施行される機会が増加している。これらの手術の際、問題となるのは腎血流遮断に随伴する ischemic hypoxia による術後の腎障害であり、その程度が手術の成果に対する重要な因子となることは明らかである。したがって阻血性腎障害を防止するための方法として低体温下麻酔¹⁾、腎局所冷却法²⁻⁴⁾、腎神経遮断法⁵⁾、マニトール投与方法⁶⁾、ヘパリン投与方法⁷⁾などの種々の報告がみられるが、いずれの方法においても

多少の差はあれ種々の副作用を認め、かつ、手技が繁雑である欠点のみられるものもある。そのために、より簡単な阻血性腎障害防止策が検討されるのは当然であろう。

ウレタン誘導体 urethane derivatives (以下 UD と略す) には周知のごとく麻酔作用、放射能様作用のほか超低下の酸素欠乏状態での特異的延命効果の存在が知られており、酸素欠乏耐性作用のあることが明らかになっている^{8,30)}。この事実に着目し、当教室の石川、杉村⁹⁾は UD を腎血流遮断前に投与し、腎阻

血可能限界時間延長に有効であることを外科的単腎家兎を用いて明らかにし、さらに奥村¹⁰⁾は組織化学的にその効果を実証するとともに臨床に応用し好結果を得ている。

著者は Vogt ら¹¹⁾が Wistar 系雄性ラットを用い10分から2時間までの腎阻血をおこない、その経時的に腎組織中の adenosine triphosphate (ATP) および lactic acid を測定した実験において、阻血の進行とともに前者の減少と後者の増加がおこるが、一方、阻血性腎障害が可逆性であるときは両者の回復は速いが、不可逆性変化をおこしたときには両者の回復は遅れ、ATP は正常腎の50%までにも及ばなかったとの興味ある報告に着目し、イヌを用いて阻血性腎障害を加え、この障害に対する UD および ATP の効果を生化学的、ならびに組織学的ないし組織化学的に比較検索した。その結果、認むべき成績が得られたので以下その大要を報告する。

実験材料および実験方法

実験に使用した UD は carboxymorpholine 誘導体のうち、まったく毒性のない N-carb(n)butoxy morpholine すなわち  N-COOC₄H₉ で通常 butylmorpholine urethane (以下 BMU と略す) と呼ばれるものを用いた。

ATP としては sodium adenosine triphosphate を主剤とする Adephos-L を使用した。

室温 25°C 以下ですべての実験をおこなった。

使用動物：13~15 kg の雄性の雑種犬を24頭用い、阻血3週間前にあらかじめ右側腎摘除をおこなった外科的単腎犬としたものを用いた。各阻血群は6頭使用し、非阻血動物には3頭を用いた。

阻血方法：Nembutal 静脈内注射による全身麻酔のもとに左側傍脊椎切開で腎に達し腎基血管以外の腎への血管を切断し、腎を周囲組織よりじゅうぶんに剥離して左腎基部を露出後、heparin 1cc を静脈内注射し、腎基部動静脈を血管鉗子にて一挙に挟み腎の血流を遮断した。阻血中は腎をもとの位置に還納し、創面を一時的に簡単に閉鎖した。阻血時間は100分で、鉗子を除去して阻血終了後腎血流の回復を肉眼的に確認し、次いで腎を正常の位置にもどし抗生物質を散布し手術創を2層に縫合した。

実験動物群は以下の4群の実験群に分けた。

第1群：無処置群。前記の阻血方法にて100分の腎阻血をおこなったもの。

第2群：UD 投与群。辻井ら¹²⁾の報告に従い腎阻血

前15分に腹膜に小切開を加え UD を腹腔内に 50 mg/kg b.w. 投与した。

第3群：UD および ATP 投与群。第2群と同様に UD を投与し、阻血終了直後より連続7日間 ATP (100 mg) の静脈内注射をおこなったもの。

第4群：ATP 投与群。阻血終了直後より連続7日間 ATP (100mg) のみの静脈内注射をおこなったもの。阻血終了後の検査ならびにその方法

1. 阻血終了後2週間後の生存数
2. 血中尿素窒素：採血後直ちに 3,000 rpm で遠沈し、その血清を autoanalyser を用いて、術前、術後7日間および14日目に測定した。
3. 血中および尿中の酵素活性：採血後直ちに 3,000 rpm で遠沈した血清と splint catheter を用いて導尿した尿について術前、術後7日間および14日目に下記の酵素について測定した。

a) Acid phosphatase：酸シカフォス (中外製薬) を用いて測定した。

b) Alkaline phosphatase：新シカフォス (中外製薬) を用いて測定した。

c) Lactic dehydrogenase：エルテスト (中外製薬) を用いて測定した。

d) β -glucuronidase：Talalay et al. 法¹³⁾により測定した。

4. 腎酵素活性の定量：阻血解除後4日目および14日目に阻血腎を摘出し、直ちに腎皮質部を 0.14 M KCl にて10倍に希釈し、homogenate し、3,000 rpm 15分間冷凍遠沈をおこない、上清について Acid P, AlP, LDH, β -G の酵素活性を前述の方法と同様に測定し、ビューレットにより蛋白含有量を測定した。

5. 組織学的検索：阻血後4日目および14日目に各群とも阻血腎を摘出し10%ホルマリン固定後に切片作成し、hematoxylin-eosin 染色をおこなった。

6. 組織化学的検索：各群ともに100分の阻血解除後4日目および14日目に阻血腎を摘出し、迅速に -20°C の cryostat 内にて 10 μ の新鮮未固定凍結切片を作成し下記の酵素染色をおこなった。ただし第1群については14日目の生存犬がなかったので10~12日生存の症例を用いた。観察は3酵素について下記の方法に従っておこなった。

a) Alkaline phosphatase (AlP) Azo 色素結合法 (Manheimer and Seligman)¹⁴⁾ にて染色した。

b) Succinic dehydrogenase (SD) Nachlas 氏法¹⁵⁾を用いた。

c) Lactic dehydrogenase (LDH) Hess, Scarpelli et Pearse 氏法¹⁶⁾を用いた。

実験成績

1. 生存数

阻血解除後2週間後の生存犬数は第1群においては術後4~12日目に全例死亡したのに対して、第2群および第3群は全例が生存した。第4群においては3頭中1頭のみが生存し、他は術後9日目および12日目に死亡した。

2. 血中尿素窒素の変動

各群の成績は Table 1 にしめし、その平均値を図示すると Fig. 1 のごとくである。すなわち第1群および第4群は同様の経過をとり、BUN は急激な上昇を続け1週間後には 220 mg/dl と高値をしめすのに対し、第2群は2日目までは第1群および第4群と同様の上昇を続けるが3日目以後はあまり上昇せず4日目には 98 mg/dl と最高値をしめしたのち、徐々に低下するが、2週間後においても 52 mg/dl と中等度の上昇をしめすだけである。第3群は阻血後の BUN の上昇は軽度であり、3日目に 53 mg/dl と最高値をしめしたのち、徐々に下降し2週間後には 17 mg/dl となり正常値にまで回復している。

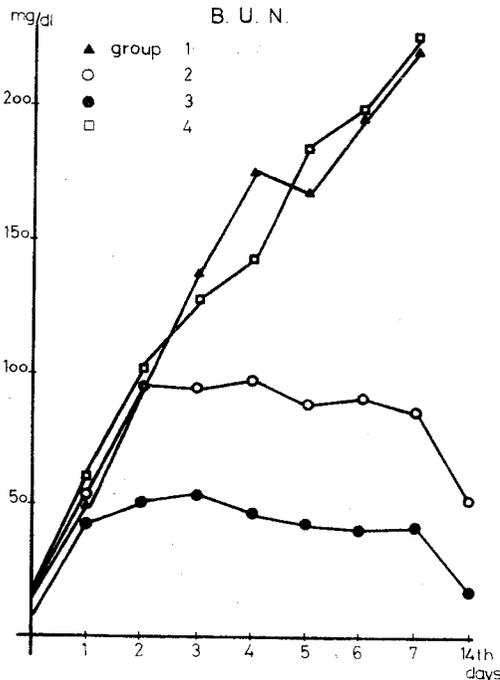


Fig. 1. A comparison of mean blood urea nitrogen value in each group.

3. 血中および尿中の酵素活性

各群の成績は Table 2~6 にしめすごとくである。血中 Acid P の平均値を図示すると Fig. 2 にしめす

ごとく各群ともに術後より上昇を始め、第1群および第4群は上昇を続けたまま死亡するが、第1群より第4群のほうが急激に上昇する。第2群の変化は軽度であり術後第1日目と第7日目に 3.6 KA と最高値をしめす。第3群は術後5日目に 7.5 KA と最高値をしめすが、以後急激に下降し14日目には第2群と同様に正常値になっている。

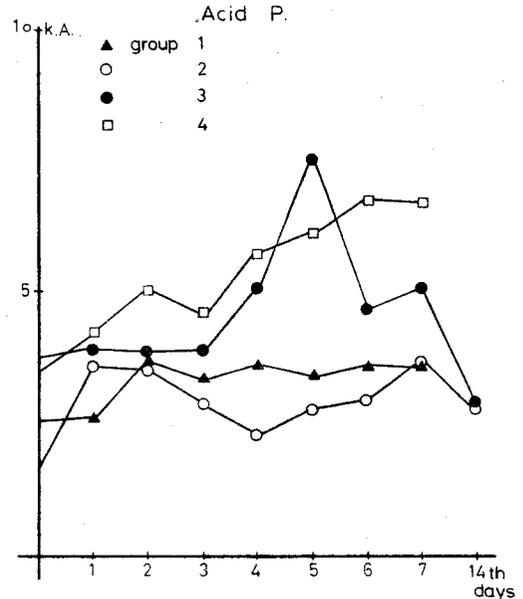


Fig. 2. A comparison of mean Acid P activity in each group.

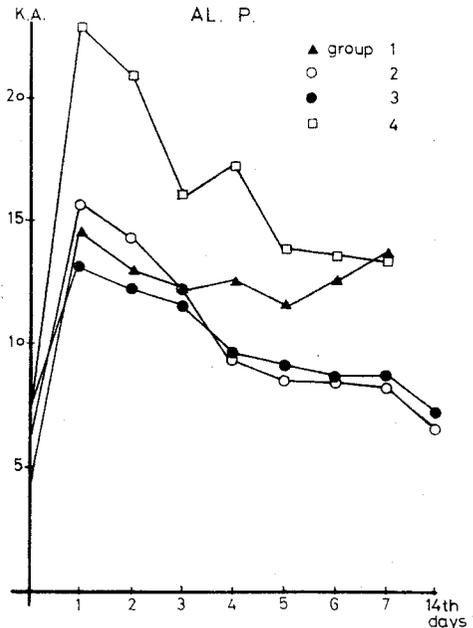


Fig. 3. A comparison of mean ALP activity in each group.

Table 1. BUN (mg/dl)

Experimental group	Before operation	Postoperation time (days)							
		1	2	3	4	5	6	7	14
1	13±4	49±11	95±9	137±10	175±33	167±15	195±38	220±60	
2	14±6	54±10	95±22	94±18	97±27	88±27	91±33	86±35	52±37
3	8±2	43±10	51±4	53±1	47±8	43±9	42±11	42±8	17±5
4	11±0.7	60±7	101±12	127±8	143±8	174±18	199±48	227±64	110

Table 2. Acid P (KAU) activity in dog sera.

Experimental group	Before operation	Postoperation time (days)							
		1	2	3	4	5	6	7	14
1	2.5±0.2	2.6±0.6	3.7±1.0	3.3±1.5	3.6±0.7	3.6±0.6	3.6±0.2	3.6±0.3	
2	1.6±1.0	3.6±0.6	3.5±0.9	2.9±1.5	2.3±1.0	2.8±1.3	3.0±1.8	3.7±1.5	2.8±0.2
3	3.7±1.3	3.9±0.6	3.8±0.5	3.8±0.3	5.1±1.9	7.5±2.3	4.7±1.2	5.1±0.6	2.9±0.2
4	3.5±0.3	4.2±0.1	5.0±0.5	4.6±0.5	5.7±0.2	6.1±1.5	6.7±2.4	6.6±3.5	3.4

Table 3. Al P (KAU) activity in dog sera.

Experimental group	Before operation	Postoperation time (days)							
		1	2	3	4	5	6	7	14
1	6.3±2.0	14.5±4.3	12.9±3.6	12.2±1.3	12.4±1.8	11.4±2.8	12.6±3.4	14.1±4.7	
2	4.0±2.0	15.8±5.0	14.3±5.6	12.3±4.4	9.4±2.4	8.6±1.7	8.5±1.7	8.3±0.9	6.7±0.9
3	7.4±2.4	13.3±1.8	12.3±1.0	11.6±0.8	9.6±0.6	9.3±1.3	8.7±1.5	8.8±0.8	7.4±1.3
4	7.2±1.2	22.8±7.3	20.8±6.4	16.0±5.6	17.2±7.3	14.8±4.8	14.5±4.6	14.4±2.9	7.6

Table 4. LDH (WU) activity in dog sera.

Experimental group	Before operation	Postoperation time (days)							
		1	2	3	4	5	6	7	14
1	42±20	182±33	77±47	76±13	103±54	66±0	62±14	46±34	
2	104±40	136±15	80±39	116±70	106±66	110±69	106±42	64±2	72±19
3	88±10	98±10	61±5	72±10	90±10	73±8	82±17	65±5	106±56
4	92±18	152±30	98±12	77±9	103±28	82±15	92±13	86±17	76

Table 5. β -G (μ g/hr/dl) activity in dog sera.

Experimental group	Before operation	Postoperation time (days)							
		1	2	3	4	5	6	7	14
1	4458±1693	4222±1575	4527±1799	4930±1399	5555±2033	5333±2500	5624±2542	5937±1896	
2	5347±1746	5583±1840	4583±1499	5597±2049	7374±2978	8916±2036	9485±1871	10333±1927	6736±1261
3	3194±646	3213±564	3513±326	4818±900	5708±446	6317±252	7111±991	7930±406	4624±1054
4	5430±1337	4875±1679	5680±934	8388±708	10611±2958	11805±2667	12430±3426	12374±2456	4583

Table 6. Urine enzyme

	Acid P (KAU)				A β P (KAU)				LDH (WU/ml)				β -G (μ g/hr/dl)			
	G.1	G.2	G.3	G.4	G.1	G.2	G.3	G.4	G.1	G.2	G.3	G.4	G.1	G.2	G.3	G.4
Preop.	2.0	3.0	3.4	2.4	2.6	6.0	3.2	10.7	34	18	44	42	328	213	234	238
Post Op. 1 days	1.7	2.0	3.0	1.2	2.4	13.0	4.9	11.6	298	238	203	274	429	327	518	545
2	2.0	2.0	2.8	1.3	1.3	9.1	2.7	6.4	148	156	101	108	481	285	266	247
3	1.4	1.7	2.0	1.7	1.3	3.5	3.3	3.1	212	87	66	72	214	202	236	145
4	1.8	2.5	2.4	2.6	2.5		2.8	1.9	120	182	79	164	629	379	208	202
5	1.5	1.7	2.6	1.6	1.3	3.6	6.7	1.6	104	85	78	61	289	181	255	145
6	1.3	1.8	3.7	2.0	3.8	1.9	2.9	1.9	200	92	124	184		162	227	235
7	1.6	1.9	3.5	2.1	1.4	2.2	8.5	2.8	102	91	164	190	191	226	419	373
14		4.8	1.8	2.2		8.6	1.6	3.6		118	40			555	187	516

G.: Group

血中 A β P の活性の平均値は Fig. 3 にしめすごとくで、第1群は術後第1日目に 14.5 KA と最高値をしめし以後軽度下降し6日目より上昇傾向をしめし死亡している。第2群および第3群はおのおの阻血後第1日目に 15.8 KA, 13.3 KA と最高値をしめしたのち徐々に下降し2週間後には、ほぼ術前値に回復している。第4群は第1日目に 22.8 KA と各群のうち最高値をしめし以後下降するが1週間後においても 14.4 KA と術前値の2倍の高値をしめしている。

血中 LDH 活性の平均値の変動は Fig. 4 にしめすごとく阻血後第1日目に最高値をしめし、第1群が最も高く 182 u をしめし、第4群が 152 u でこれに次ぐ高値をしめすが、第2群では 136 u、第3群ではさらに低値で 98 u である。2日目からは各群ともに著

明に低下し、各群ともに同程度の活性で経過して著明な差異は認められない。

血中 β -G 活性の平均値の変動は Fig. 5 にしめすごとく各群ともに3日目より上昇するが、第1群においては上昇傾向は軽度であり、7日目に 593 μ g/dl/hr をしめすのに対して、第2, 3, 4群では3日目より急激に上昇を始め7日目には第4群が 12,374 μ g/dl/hr と最も高く、次いで第2群が 6,736 μ g/dl/hr をしめし第3群は 4,624 μ g/dl/hr をしめしている。第2, 3群は以後下降するが2週間後においても、なお術前値より高値をしめしている。

尿中 LDH 活性は Fig. 6 にしめすごとく各群とも

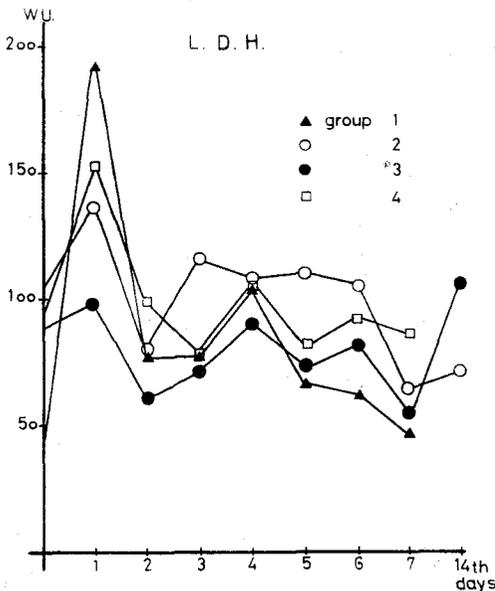


Fig. 4. A comparison of mean serum LDH activity in each group.

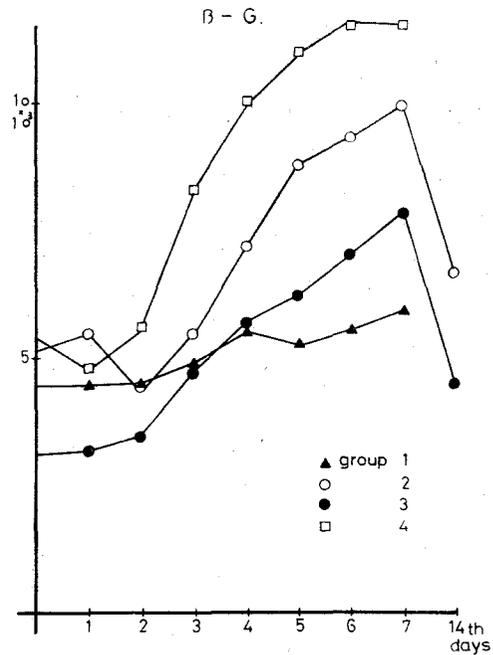


Fig. 5. A comparison of mean serum β -G activity in each group.

に術後第1日目に最高値をしめすが、中でも第1群が最も高く298 WU/mlをしめすが、第4群は274 WU/mlでこれに次ぎ、第2群が238 WU/mlであり、第3群が203 WU/mlで、第2群および第3群で比較的low値である。しかしいずれの場合も術前値と比較すると非常にhigh値である。2日目より各群ともに下降あるいは上昇をくり返して経過するが7日目でもなお非阻血群値に比較すると著明なhigh値をしめしている。

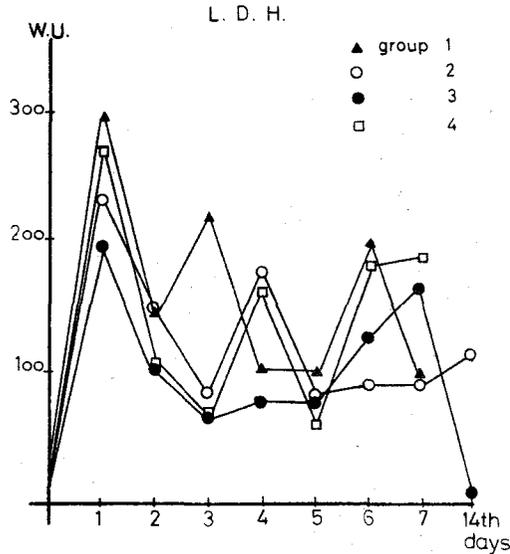


Fig. 6. A comparison of mean urinary LDH activity in each group.

4. 腎酵素活性の定量

各群の酵素活性の定量結果は Table 7 にしめすごとくである。Acid P は Fig. 7 にしめすごとく第1群は4日目で正常腎の75%で軽度の活性低下を認め、第2, 4群はおのおの91%, 86.9%とほぼ正常腎値であるが、第3群においては正常値の126%と上昇し、さらに2週間後には186%となお上昇する。第2群においても第3群と同様に上昇をしめすが、正常腎の

105%とごく軽度である。第1群は2週間後の生存犬がなく、第4群では1頭のみ生存しただけであるので、2週間後の活性を第2, 3群と比較するのは問題であるが、第1群および第4群はおのおの63%, 84%と正常腎より活性値の低下がみられる。第1群においては4日目よりさらに低下し回復傾向をしめさない。

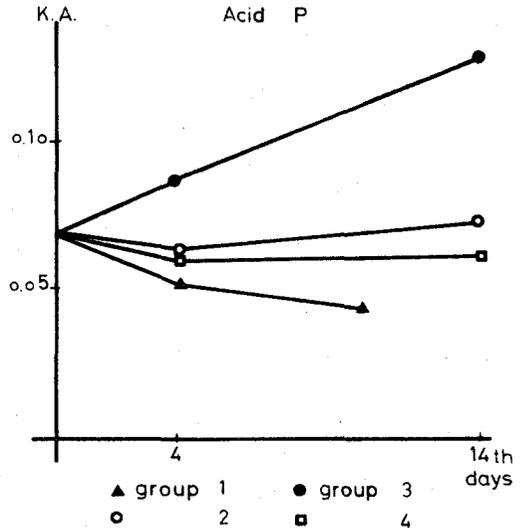


Fig. 7. A comparison of mean renal cortical Acid P activity in each group.

ALP 活性の変動は Fig. 8 にしめすごとく第1群は4日目に正常腎の35.6%に低下し、12日目に死亡したイヌの腎組織の活性は14.1%と著明に低下している。第2群は4日目には39.3%と第1群とはほぼ同程度の低下をしめすが以後急速に回復して14日目には正常腎の66.3%にまで回復している。第3群では4日目で正常腎の85.8%とごく軽度に低下するのみで、14日目には105.3%と正常腎の活性にまで回復している。第4群においては4日目で54.8%と第2群よりその低下は軽度であるが、以後回復せず、唯一の生存犬の2週間目

Table 7. Enzyme activities in dog kidney.

Experimental group	Post-operative day	Acid P (KAU/mgpr.)	Al P (KAU/mgpr.)	LDH (WU/mgpr.)	β -G (μ g/hr/mgpr.)
Control		0.069 \pm 0.004	0.297 \pm 0.059	3103 \pm 401	21.1 \pm 7.6
1	4	0.052 \pm 0.009	0.106 \pm 0.040	1805 \pm 767	19.4 \pm 9.5
	10	0.044	0.042	864	16.2
2	4	0.063 \pm 0.011	0.117 \pm 0.078	1963 \pm 751	17.1 \pm 3.1
	14	0.073 \pm 0.006	0.197 \pm 0.044	2550 \pm 177	27.4 \pm 4.1
3	4	0.087 \pm 0.009	0.255 \pm 0.082	3025 \pm 176	25.9 \pm 4.1
	14	0.129 \pm 0.054	0.313 \pm 0.113	3264 \pm 1396	40.1 \pm 18.2
4	4	0.060 \pm 0.023	0.163 \pm 0.072	2498 \pm 251	22.4 \pm 4.6
	14	0.061	0.091	1896	27.5

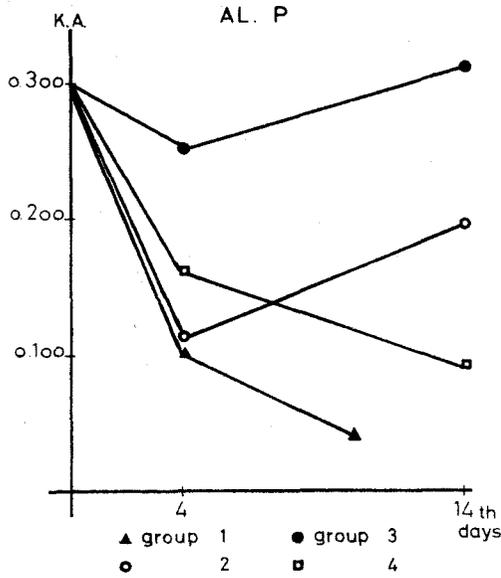


Fig. 8. A comparison of mean renal cortical ALP activity in each group.

の活性は30.6%と著明な低下をしめしている。

LDH 活性の変動は Fig. 9 にしめす。第1群および第4群は4日目におおの58.1%, 80.5%と低下し以後さらに低下を続け第1群の10日目では27.8%と著明に低下している。また第4群のうち唯一の2週間生存犬にしてもさらに低下し正常値の61.9%をしめしている。一方、第2群は4日目では第4群より低値であり正常腎の63.2%をしめすが、その後回復をしめし、2週間後には正常腎の83.4%にまで回復している。第

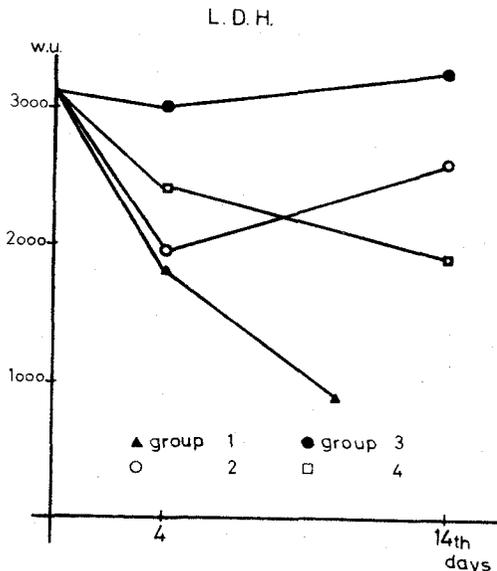


Fig. 9. A comparison of mean renal cortical LDH activity in each group.

3群の変化は軽度であり4日目においても正常腎の85.8%の活性があり2週間後には105%とまったく正常腎値まで回復している。

β -G 活性の変動は Fig. 10 にしめす。第1群および第2群においては術後4日目にそれぞれ正常腎の92.1%, 81.1%と低下するが第2群はその後上昇し2週間後には正常腎値を上回り129.8%と上昇している。一方、第1群は4日目以後も低下し10日目で76.9%である。第3群および第4群は4日目でも正常腎値より高く、前者では129%, 後者では104%をしめし、その後も上昇を続け2週間後には第3群では190%, 第4群でも130%まで上昇している。

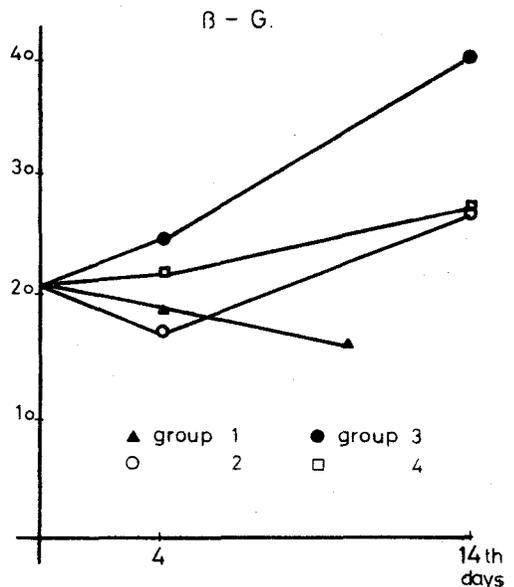


Fig. 10. A comparison of mean renal cortical β -G activity in each group.

5. 組織学的所見

第1群は14日生存犬はなく12日目死亡の症例について観察した。第1群の4日目の主たる変化は尿管上皮細胞の著明な変性および嚢腫状の腫大がみられるほか核の消失もみられ、さらに尿管内には eosin 好性の硝子様物質をみとめ著明な腎障害像がみられる。しかし糸球体にはほとんど変化はない (Fig. 11)。12日目の標本においては尿管内にみられた硝子様物質は消失しているが、尿管上皮細胞の浮腫を伴う変性は強く、糸球体を除くすべての腎組織の高度な変性壊死像がみられる (Fig. 12)。

第2群の4日目の標本では尿管上皮細胞の混濁腫脹、空胞変性、間質における細胞浸潤がみとめられるが糸球体には変化はない。第1群と比し軽度である

(Fig. 13). 14日目の標本では4日目にみられた尿細管上皮細胞の変性像はほとんど消失しており、明らかな回復像をしめしている (Fig. 14). 第3群の4日目の標本では尿細管上皮細胞の変性は他の各群に比し最も軽微であり軽度の細胞の腫大がみられるのみで、他の群にみられるごとき混濁腫脹を伴う著明な腎障害像はまったく認められず、また糸球体にも変化はなかった (Fig. 15). 14日目の標本では尿細管上皮細胞の変性像は全くみとめられない (Fig. 16).

第4群の4日目の標本では間質における円形細胞の浸潤とともに尿細管上皮細胞の腫脹拡大があり、尿細管内に eosin 好性の蛋白様物質が充満し著明な腎障害像をしめしている (Fig. 17). 14日目の標本においても尿細管上皮細胞の混濁腫脹はなお強くみられ、第1群とほぼ同様の組織像をしめしている (Fig. 18).

以上の組織学的所見を要約すると、阻血腎組織における HE 染色の主たる変化は尿細管上皮細胞に出現し、第1群および第4群においては、その組織所見は類似し、尿細管上皮細胞の混濁腫脹を主とする変性像が強く、かつ12~14日経過後においても、その変性像は残存し、強い壊死像がみられる。これに対し第2群の4日目の標本では、かなり強い変性が主として尿細管にみられるが、2週間後にはその変性像はほとんど消失し明らかな回復像がみられる。また第3群では4日目の変性像は4群中もっとも軽度であり、かつ2週間後の組織像はほとんど正常腎に近い所見を呈していた。

6. 組織化学的所見

a) Alkaline phosphatase (A_lP)

正常腎は近位尿細管の brush border に一致して強い活性を認め、その他の部位には活性はほとんど認めず、遠位尿細管にわずかに活性を認める。

第1群の4日目では Fig. 19 にしめすごとく近位尿細管の一部に拡張した部分がみられ全例著明な活性の低下がみとめられる。さらに10日目死亡の症例においては活性の回復はまったく認められず、むしろ壊死傾向がみられる (Fig. 20).

第2群の4日目では近位尿細管はかなり拡張がみられ、その部では活性の低下が認められるも、なお活性は比較的強く残存しているところもある (Fig. 21). 14日後においては近位尿細管の brush border の部に一致して著明な活性の回復像がみられる (Fig. 22).

第3群の4日目では一部近位尿細管の拡張した部位以外では、その活性はかなりよく保存されており (Fig. 23), 14日目ではまったく正常腎と同様の酵素活性をしめしている (Fig. 24).

第4群の4日目では活性は著明に低下し尿細管の拡張変性像がみられ (Fig. 25), 14日目でも尿細管の酵素活性の回復像はほとんどみられず、むしろ変性壊死像がみられる (Fig. 26).

以上第1群より第4群までに共通して認められることは拡張せる尿細管においては本酵素活性は著しく低下をしめしていた。

b) Succinic dehydrogenase (SD)

正常腎の本酵素活性は遠位尿細管に最も強く活性が認められ、近位尿細管、ヘンレ上行脚がこれについて強い活性がみとめられる。

第1群の4日目では皮質全体に著明な活性低下がみられるも、なお活性の残存するところも認められる (Fig. 27). 10日目においても遠位尿細管およびヘンレの上行脚に活性が認められるが、近位尿細管においては活性はほとんど認められず変性壊死像がみられ回復像はほとんど認められない (Fig. 28).

第2群の4日目では活性はかなり残存しているが、尿細管の拡張する部分では著明にその活性の低下がみられる。この傾向は近位尿細管に強い (Fig. 29). しかし14日目には著明な活性の回復像がみられ、ほとんど正常に近い活性をしめしている (Fig. 30).

第3群の4日目では活性はなお強く保存されているが、尿細管の拡張がみられるところにおいてのみ活性の低下がみられる (Fig. 31). 14日目では、その活性はほとんど正常腎と同様な像を呈するまでに回復しており変性像もみられない (Fig. 32).

第4群の4日目では著明な活性の低下が近位尿細管にみとめられ、その部位の拡張壊死がみられ、これは遠位尿細管、ヘンレ上行脚よりも著明である (Fig. 33). 14日目では一部において活性の回復がみられるも近位尿細管の拡張壊死像がみられる (Fig. 34).

c) Lactic dehydrogenase (LDH)

正常腎の本酵素活性は近位尿細管において最も強くその活性が認められ、ヘンレ上行脚、遠位尿細管がこれに次ぐ活性をしめす。

第1群の4日目では尿細管の拡張変性壊死が認められ著明な活性の低下が認められる (Fig. 35). 10日目では一部においてやや活性の回復がみとめられたが尿細管の拡張変性像がなお強く認められる (Fig. 36).

第2群の4日目では第1群と同様に近く近位尿細管の拡張変性壊死像が認められるが、なお比較的強い酵素活性が認められる (Fig. 37). 14日目では尿細管の拡張、壊死などの変性像もなくほとんど正常腎にまで活性の回復がみられる (Fig. 38).

第3群の4日目では活性は近位尿細管において著明

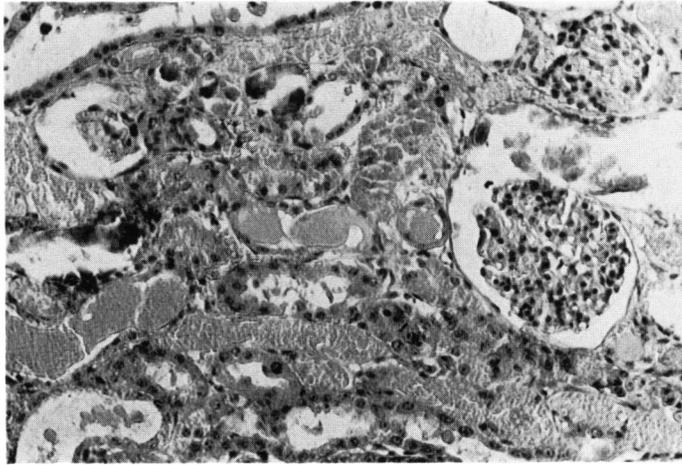


Fig. 11

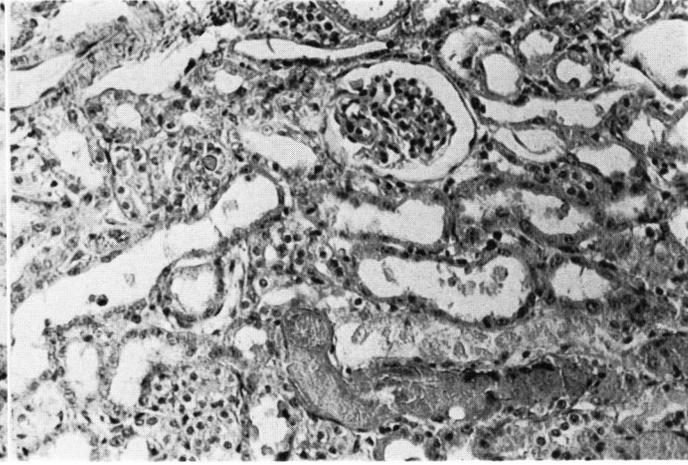


Fig. 12

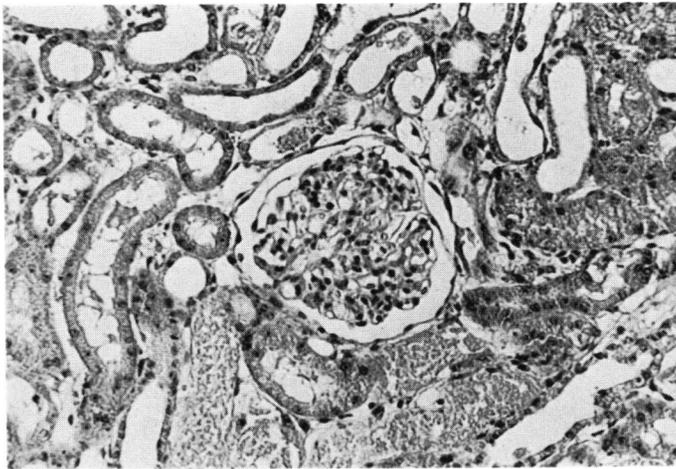


Fig. 13

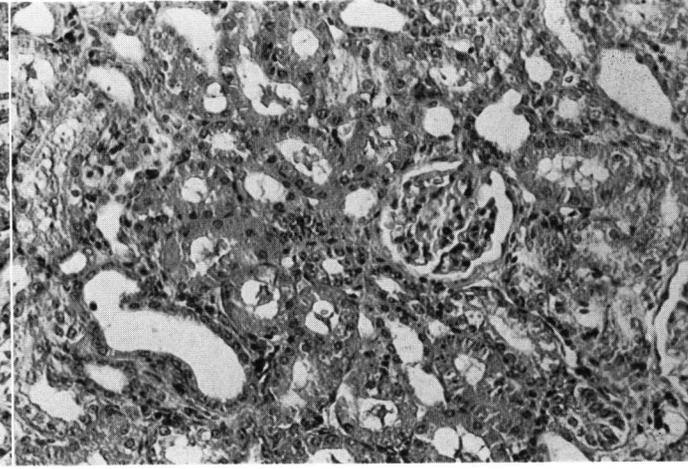


Fig. 14

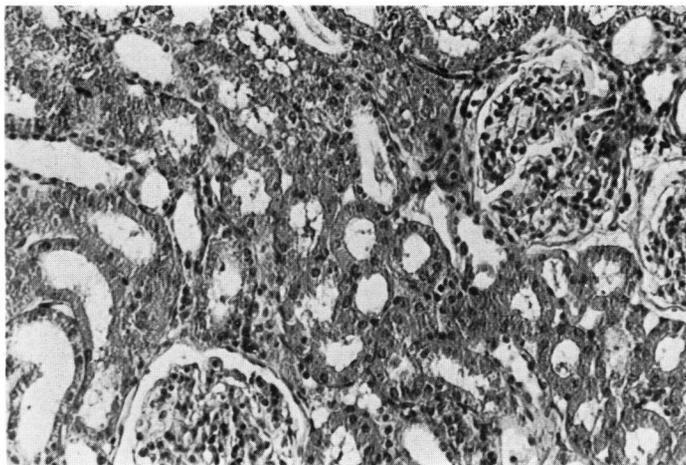


Fig. 15

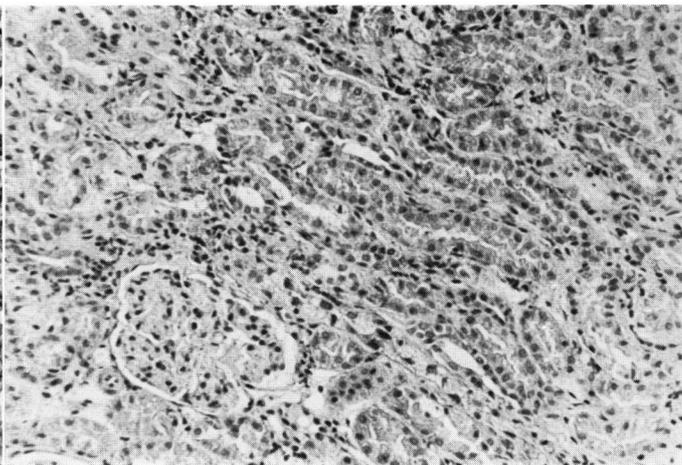


Fig. 16

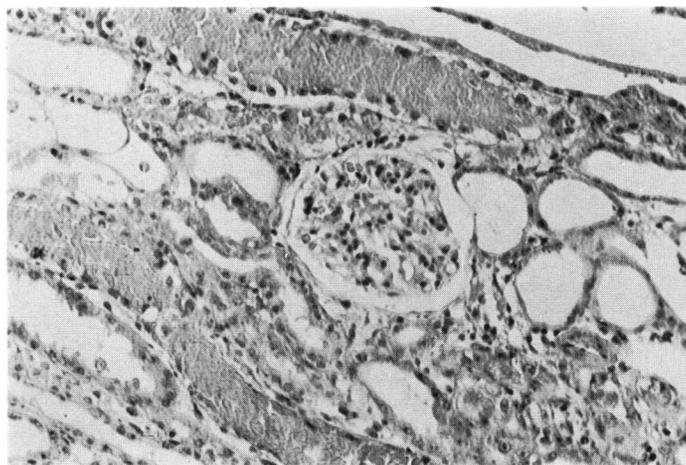


Fig. 17

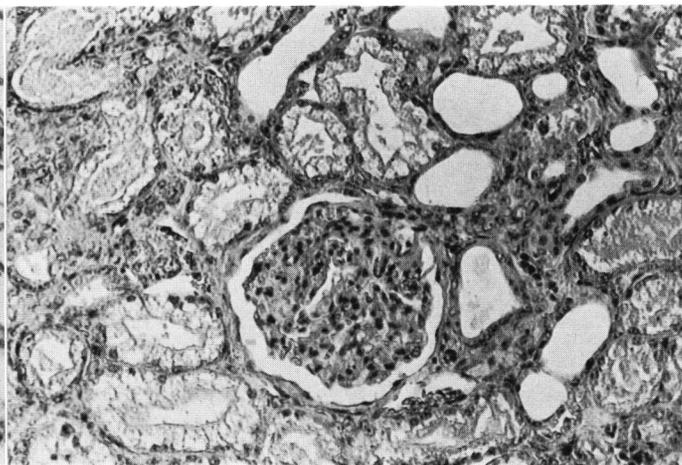


Fig. 18

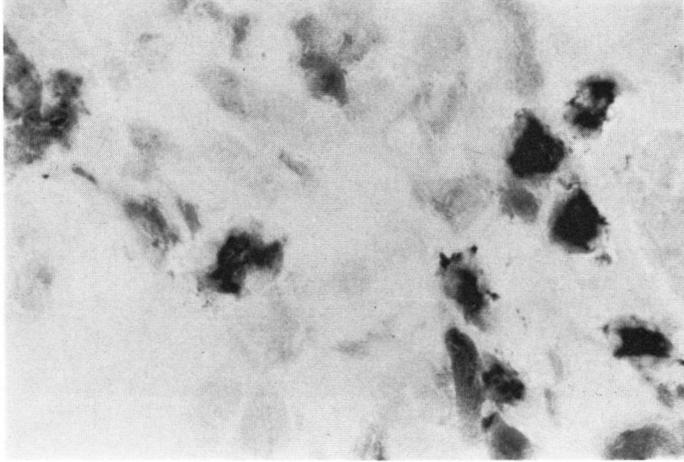


Fig. 19

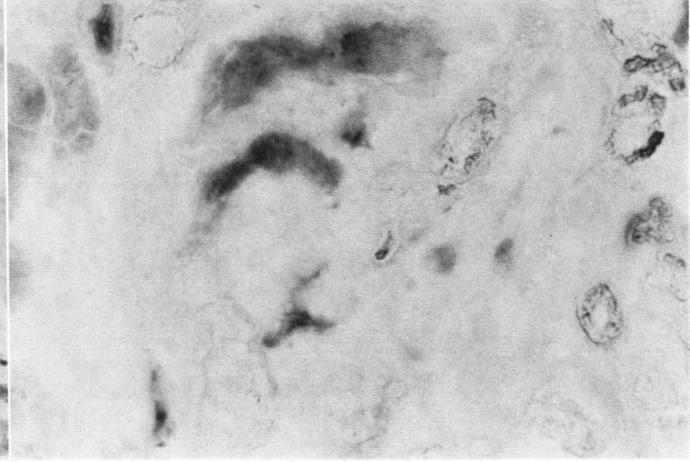


Fig. 20

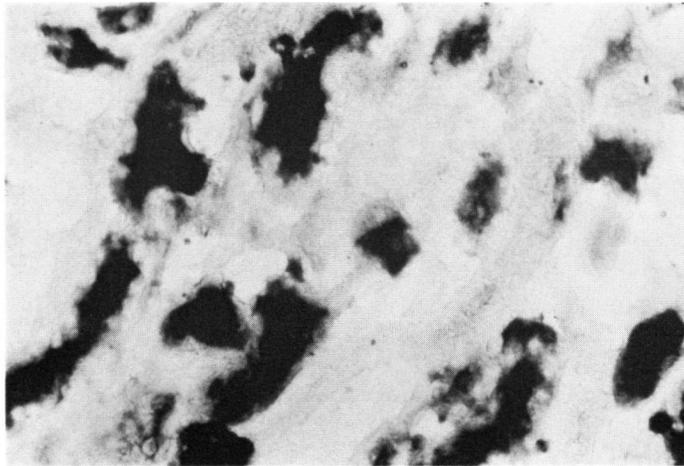


Fig. 21

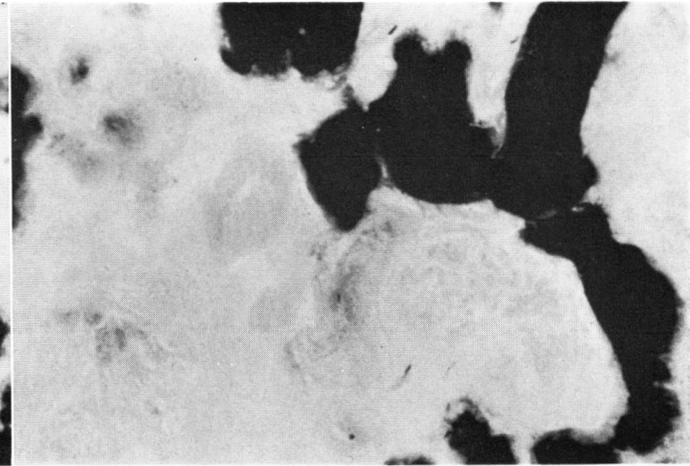


Fig. 22

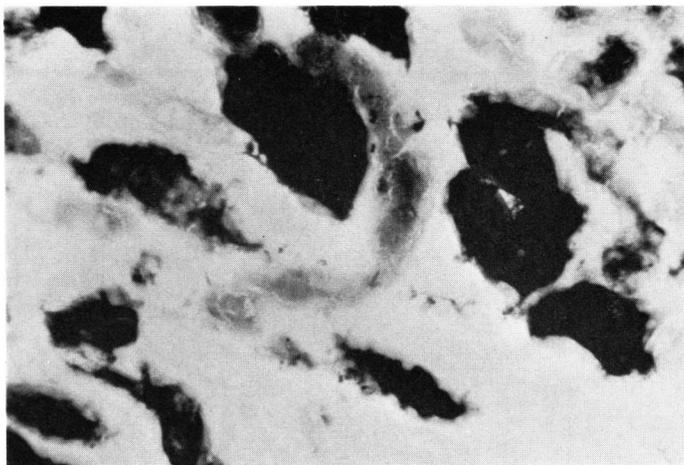


Fig. 23

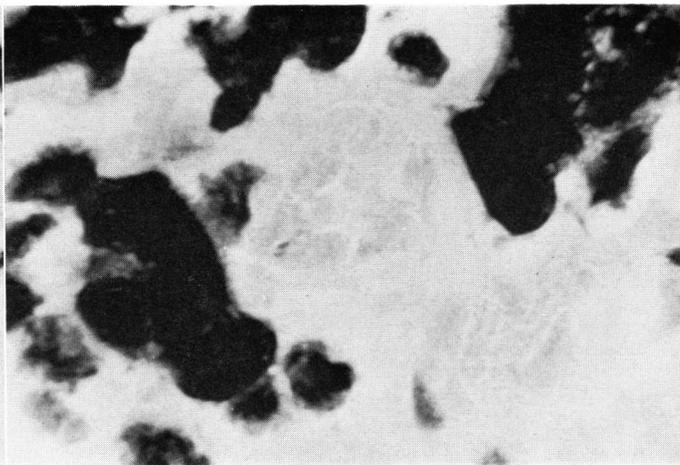


Fig. 24

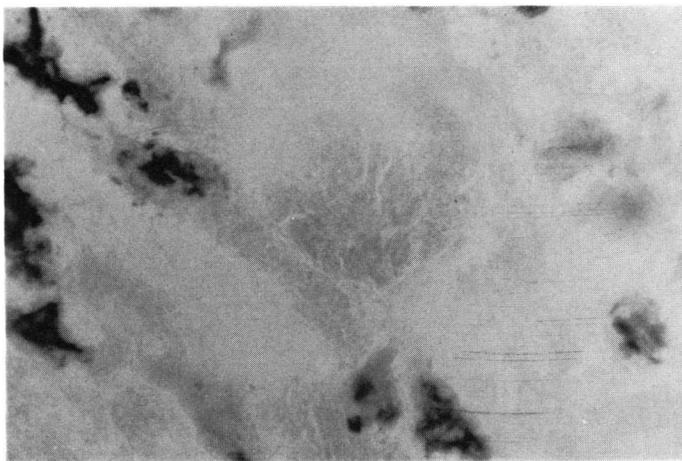


Fig. 25

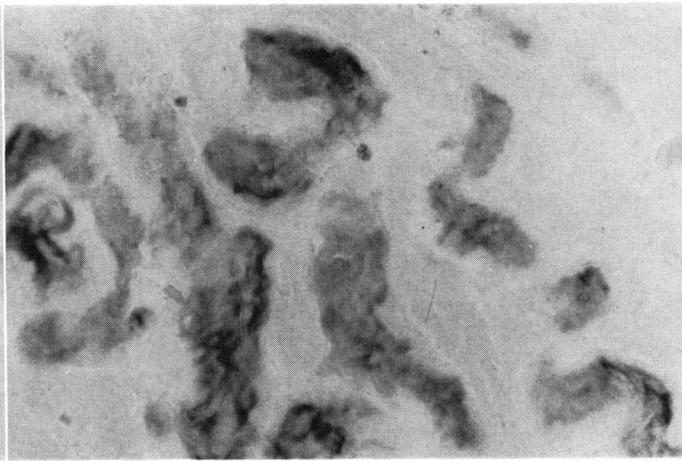


Fig. 26

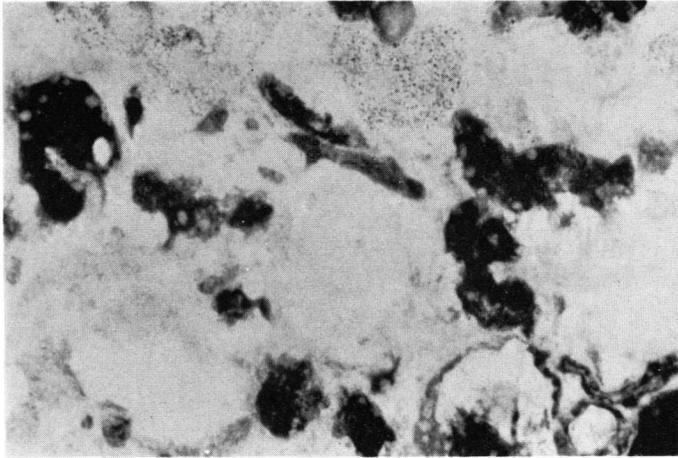


Fig. 27

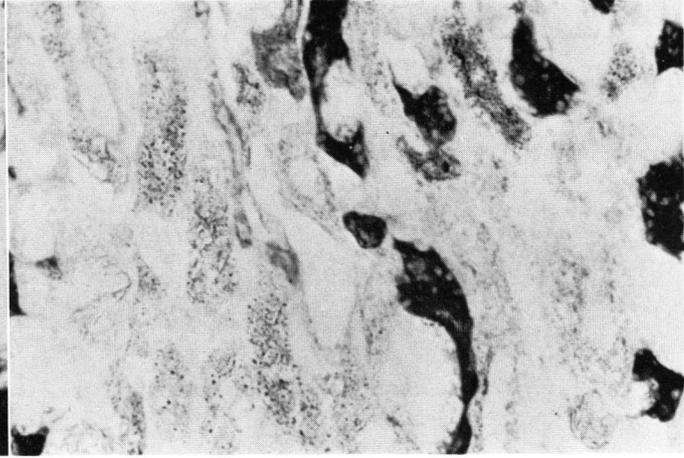


Fig. 28

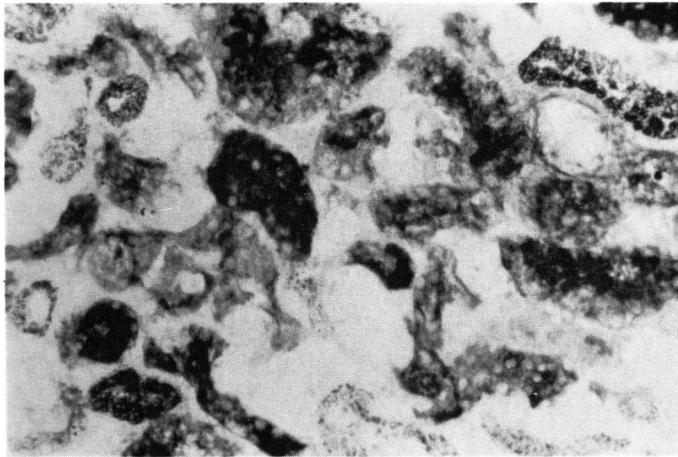


Fig. 29

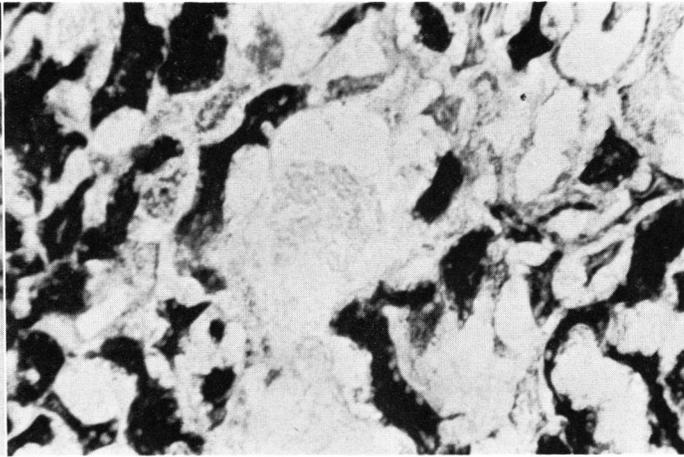


Fig. 30

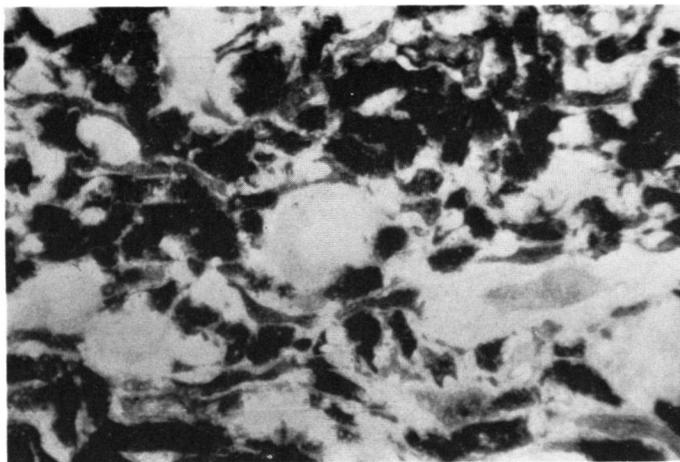


Fig. 31

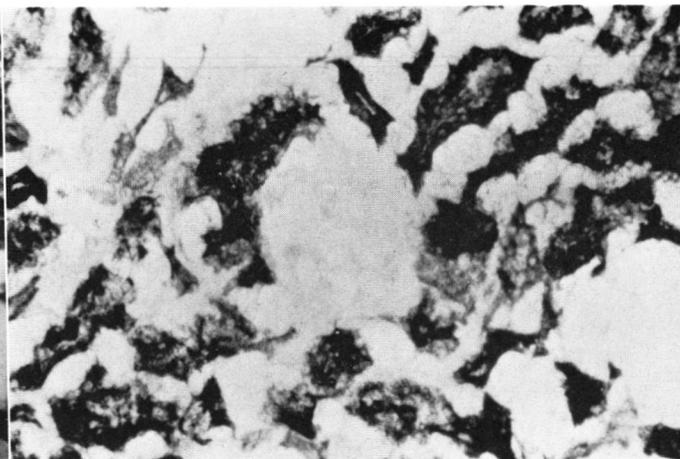


Fig. 32

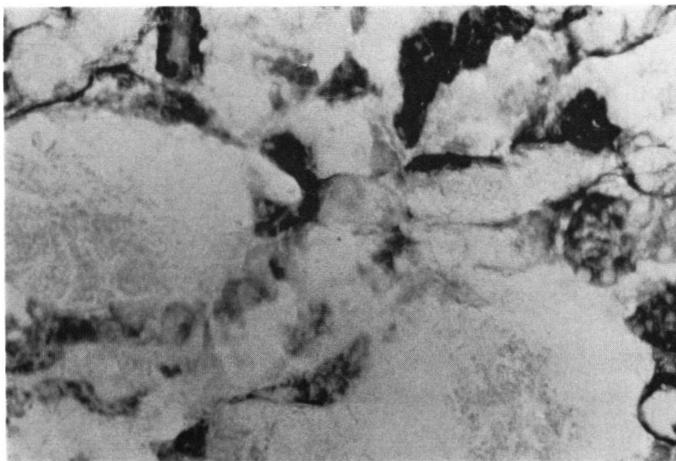


Fig. 33

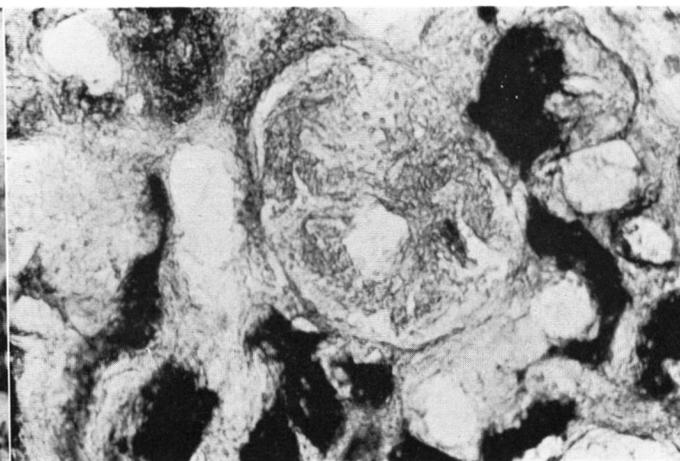


Fig. 34

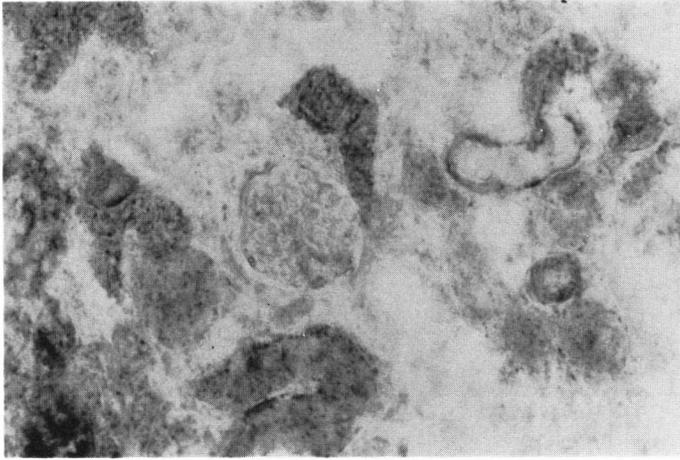


Fig. 35

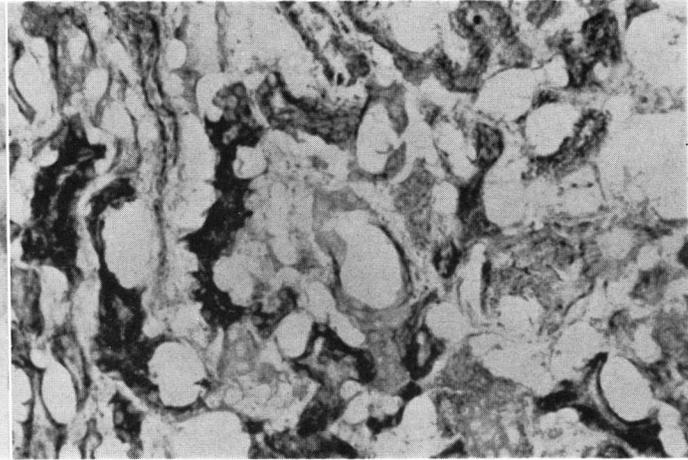


Fig. 36

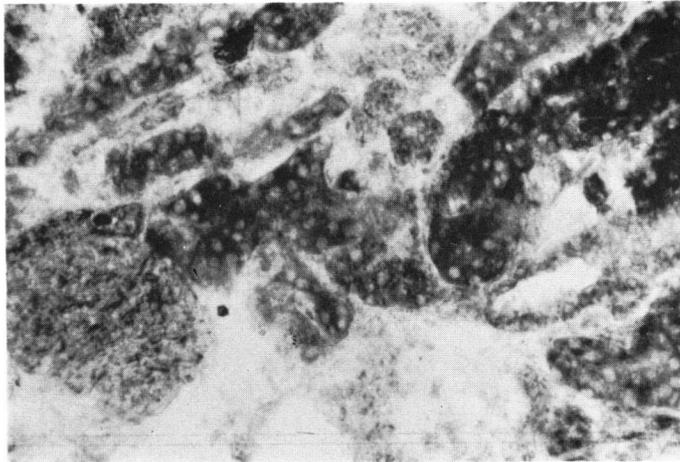


Fig. 37

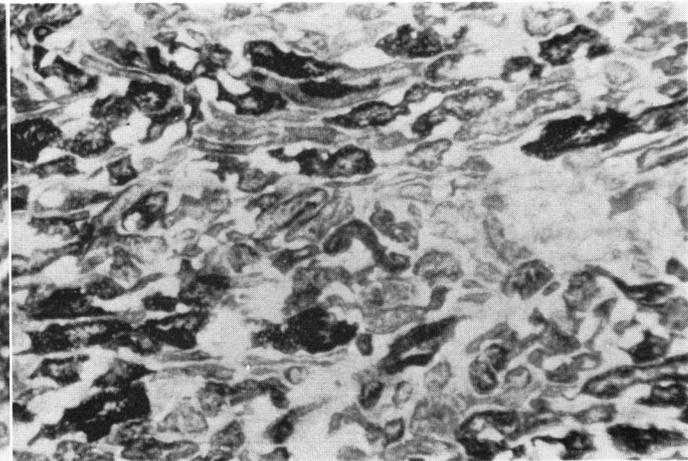


Fig. 38

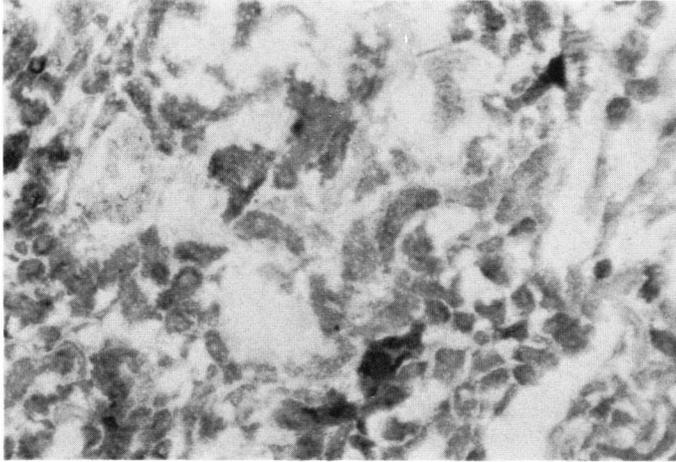


Fig. 39

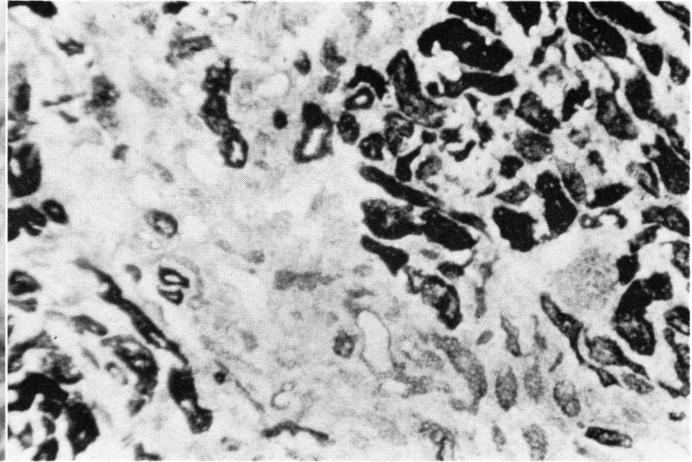


Fig. 40

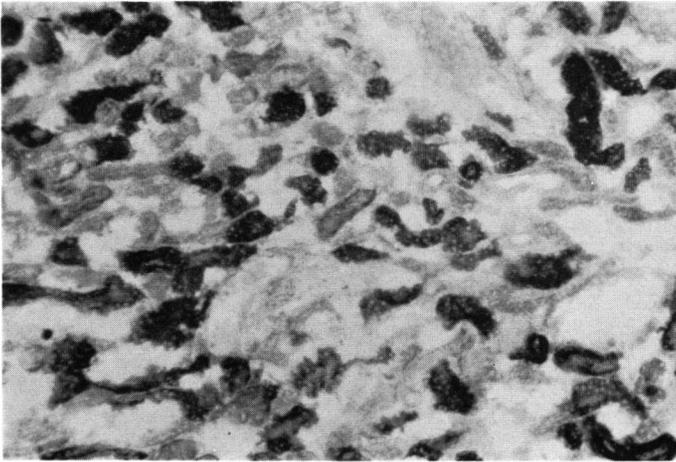


Fig. 41

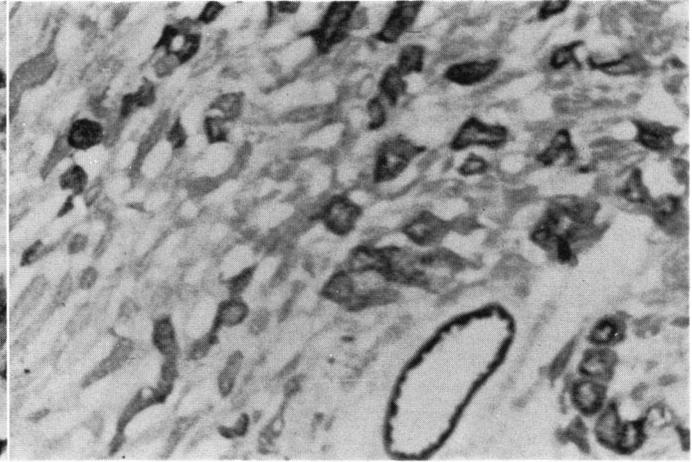


Fig. 42

に低下しているが (Fig. 39), 14日目の標本では, その活性は明らかな回復像を認めほとんど正常腎の酵素活性をしめしている (Fig. 40).

第4群の4日目では本酵素活性は著明な低下をしめすもおかなり強い活性を残存している (Fig. 41). しかしながら14日目の標本では, その活性は4日目よりむしろ低下をしめすものさえ認められ活性の回復は

まったく認められなかった (Fig. 42).

以上, 成犬 100 分阻血後の腎における ALP, SD, LDH 各酵素活性の変動を一括すると Table 8 にしめすとおりである.

小 括

第1群は2週間後の生存犬はみとめず, また第4群は3頭中1頭のみ生存したのに対し, 第2群および第3群は全例生存している.

阻血後の第1群および第4群の BUN は急激な上昇をしめし7日後には 220 mg/dl にまで達しているのに対して, 第2群および第3群は3日目に最高値をしめし以後徐々に下降するが第2群は2週間後においても中等度の上昇をみとめるが, 第3群はまったく正常値にまで回復している.

血中酵素活性についても ALP, LDH 活性において第1群および第4群は第2群および第3群より明らかに高値をしめしている.

腎組織中の各種の酵素活性をみると ALP および LDH において各群の差異が著明にみられ, ALP および LDH ともに同様の傾向をしめし, 第1群, 第2群, 第4群は術後4日目にはほぼ同程度の低下をしめすか, 第1群および第4群はその後まったく回復傾向をみないのに対して, 第2群は2週間後には正常腎の約80%にまで回復している. 第3群は4日目においても活性値の低下はごく軽度であり2週間後にはまったく正常値にまで回復している.

組織学的には, おもな病変は近位尿管上皮細胞にみられ, 第1群および第4群は混濁腫脹を主とする変性像が強く, 10日~12日においてもその変性像は強く残存し壊死像もみられる. これらに対し, 第2群の4日目には変性像はかなり強くみられたが2週間後にはそれらの変化はほぼ消失している. また第3群においては全群中最も変性像は軽微であり2週間後には正常腎に近い所見を呈している.

ALP, SD, LDH の組織化学的所見は同様の傾向をしめし, 第1群および第4群では4日目には著明な活性低下がみられ, さらに10~14日経過後も低下している.

一方, 第2群および第3群は4日目においても活性の低下は軽度であり, また活性が強く残存しているところもみられ2週間後にはほぼ正常腎の活性にまで回復している.

以上のことより, 阻血性腎障害の防止には UD と ATP 併用が最も有効であり, 次いで UD 単独投与であり, ATP 単独投与では阻血性腎障害の防止は期待できない.

Table 8. Summary of histochemical finding on ischemic renal tissue.

	AL. P.				S. D.				L. D. H.			
	GI	PCT.	L. des.	L. h. os.	GI	PCT.	L. des.	L. h. os.	GI	PCT.	L. des.	L. h. os.
NORMAL	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4th days	1 G.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	4	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14th days	1 G.	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	4	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

GI: Glomerulus DCT: Distal Convoluted Tubule PCT: Proximal Convoluted Tubule
CT: Collecting Tubule Lh: Loop of Henle

考 察

阻血性腎障害の発生には腎鉗子による腎神経の刺激により腎阻血終了後も長時間続く腎血管の痙攣性収縮と腎内血行異常²⁾および阻血時間の延長に関連して発生する ischemic hypoxia による腎細胞障害が重要である^{17,18)}。この ischemic hypoxia による腎細胞障害の防止法として腎局所冷却法が現在おもに用いられている²⁻⁴⁾。すなわち Fegen ら³⁾によるとダイコクネズミを用い、3時間の腎阻血の実験において、腎皮質温度を 0~5°C, 10~15°C, 20~25°C および無処置群に分け、術後 BUN, serum creatinine を測定し阻血性腎障害に対する腎局所冷却の効果を検討した結果、無処置群の BUN, serum creatinine は術後急激に上昇し全例死亡したのに対し、10~15°C 冷却群および 0~5°C 冷却群はともに全例生存し、かつ BUN および serum creatinine は腎皮質温度の低下に比例して術後の上昇も少なく、0~5°C 冷却群では阻血後術前値と比較してほとんど変化なく経過し腎局所冷却法の効果をもとめている。しかしこの方法では操作が繁雑であり Mitchel²⁾によると冷却器と接触した周囲組織の変性および壊死、創傷の治癒遅延および発熱などの副作用があるために、手技が簡単でかつまったく副作用がない阻血性腎障害の防止方法が求められるのは当然である。

当教室の杉村⁹⁾は外科的単腎家兎を用い、阻血前40~50分に腹腔内へ UD を投与する簡単な方法で腎阻血可能限界時間の延長を認めるとともに腎局所冷却法と比較し UD の効果は腎皮質温度を 23~30°C に冷却した成績に匹敵すると報告している。また奥村¹⁰⁾は UD の効果を家兎を用いて組織化学的に実証するとともに臨床に応用し好結果を得ている。

今回著者は UD 投与に加え術後7日間 ATP (100 mg) を静脈内注射し、その効果を高め阻血性腎障害の防止を試みた。

腎阻血後の BUN 値は単腎の場合、阻血性腎障害の程度をしめすと考えられ、Fegen ら³⁾、杉村⁹⁾らの多くの研究者により測定され、阻血性腎障害が可逆性変化のときには³⁻⁵⁾ 3~5日目に最高値をしめしたのち漸次低下するが、不可逆性変化を起こしたときにはそのまま上昇を続け死亡している。著者の測定においても第1群および第4群は阻血後急激な上昇を続け1週間後には 220 mg/dl と高値をしめし死亡したのに対し、第2群および第3群は3~4日目に最高値をしめしたのち回復がみられるが、第2群の最高値は 92 mg/dl であり、第3群の最高値は 53 mg/dl であり、2

週間後においても第2群は 52 mg/dl と中等度の上昇をしめしているのに対して、第3群は正常範囲に回復している。すなわち阻血性腎障害は第1群および第4群が最も強く、第2群および第3群は可逆性変化であるが腎障害の程度は第3群のほうがより軽微である。

ischemic hypoxia に続発する阻血性腎障害時の血中酵素活性については LDH, A₁P, GOP, muramidase 等の種々の酵素が検索されているが最近ではおもに LDH が測定され、村上¹⁹⁾は急性腎硬塞時に経目的に測定し発作後3~4日目に最高値に達し、そのご漸次低下し8~14日目に正常値に回復すると報告している。Silk ら²⁰⁾は実験的に acute ischemic renal damage を作成後4時間後より著明な LDH の上昇を認め、Kohn and Ross²¹⁾ はイヌを用いて阻血時間の増減により腎組織よりの LDH の流出量を測定し阻血時間とは無関係に 0~200 u, 400~700 u, 1,100~2,200 u の3群に分け阻血後の BUN 値を測定した結果、LDH 活性が 0~200 u 群の BUN 値は術後著変なく経過するが LDH 活性が 1,100~2,200 u 群では阻血後 BUN 値は著明な上昇を続け死亡している。このことより LDH 流出量と阻血性腎障害の程度との間には密接な相関関係があると報告している。著者の実験成績においても LDH は阻血解除後早期に上昇し、阻血性腎障害の最も強い第1群の LDH 活性が 182 u と最も高いのに対して阻血性腎障害が最も軽微である第3群 LDH は 98 u と最も低値をしめしている。また第2群と第3群を比較すると第2群のほうが高値をしめしている。

血中 A₁P 活性に関しては Dugyan²²⁾ は腎硬塞発作後に血中 A₁P が上昇をしめした症例を報じ、Highman ら²³⁾は実験的に腎硬塞を作成し術後血中 A₁P を測定した結果、24時間以内に最高値に達し1週間後には正常値に回復したと報告しているが、著者の実験においても血中 A₁P は各群ともに第1日目に最高値に達し、そのご第2群および第3群は急速に低下するが、第1群および第4群では1週間後もなお高値をしめしている。また術後第1日目において第3群より第2群のほうが高値をしめしている。

Acid P および β-G は腎細胞中の lysosome 中に多量に含まれているので阻血後の血中 Acid P および β-G はともに同様の経過をしめし、阻血後腎組織中の酵素活性が上昇を始める4日目より上昇し時間の経過とともにさらに上昇し1週間目に最高値をしめす。

以上のことより保存的腎手術施行後に BUN 値の測定とともに血中酵素活性とくに LDH, A₁P を測定することにより阻血性腎障害の程度の推定も可能である

うと考える。

尿中の Acid P, A β P, β -G の活性は Ballatyne ら²⁴⁾によると腎移植後経日的に測定した結果, renal tubular cell の necrosis および desquamation のときに明らかに上昇をしめすと報告しているが, 今回著者の成績では Acid P, A β P, β -G とともに著明な変化は認められなかった. Lingardh ら²⁵⁾はイヌを用いて30~60分の腎阻血後尿中の LDH, LAP, urokinase を測定し, 尿中 LDH 活性は阻血後直ちに上昇し正常値までの回復には約1カ月を要したと報告している. 著者の成績においても各群ともに第1日目に一様に最高値をしめし, 血中 LDH 活性と同じく第1群が最も高く, 第3群が最も低値をしめしている. 第2群および第3群の2週間後の活性値は Lingardh らの報告と同様になお高値をしめしている.

阻血腎に対する組織化学的研究は Wachstein and Meisel²⁶⁾によるとラットを用いた3~4時間の阻血腎では SD は近位曲尿細管において部分的に活性の低下がみられるが24~48時間阻血腎でもなお活性の存在をみとめている. Acid P, A β P において4時間阻血の近位曲尿細管の一部で活性低下がみられるが24~48時間阻血したものにおいてもかなりの活性が残存していると報告しているが, 阻血解除後の経過については言及していない. 奥村²⁶⁾は家兎を用いて腎血流遮断(80 min)後経日的に Acid P, A β P, SD の活性について検索し, UD 投与群における組織化学的所見では阻血後3日目にその酵素活性は最も著明に低下しており, 5日目より各酵素活性の回復がみられ10日~14日目にほぼ正常にもどる. 一方, UD 非投与群においては7日目ごろより回復を始めるが, UD 投与群に比しその程度が低く, かつ完全な回復状態をしめしたものはなく, なかにはまったく回復の認められないものがあったと報告している.

著者の成績においても同様の傾向をしめし, A β P, SD, LDH の活性は第1群および第4群においては4日目には著明な低下がみられるが, 第2群および第3群では比較的活性の残存している部位もみられた. 10日~14日目では第1群および第4群のこれらの酵素活性はともに回復の像はみられないのに対して, 第2群および第3群ではほぼ正常の酵素活性をしめすまでに回復している. すなわち第1群および第4群と第2群および第3群との間には明らかな差異をみとめるが, 第2群と第3群との差異は組織化学的には判然としな

い. Meffan ら²⁷⁾はイヌを用い30~45分の腎阻血をおこない, 2日後に阻血腎を摘出し腎組織中の β -G, Acid

P, A β P 活性を測定し β -G は術前値とほぼ同程度か軽度の上昇をしめし, 他の酵素は術前値より軽度低下したと述べている. 村橋²⁸⁾はイヌの自家移植の実験で平均30分の阻血時間後 LAP, A β P, Acid P, SD, LDH について組織化学的検索および A β P, LAP の腎組織中の活性の定量をおこない A β P は4日目には正常値の0~20%低下をしめし, 7~10日目には術前対照腎と同値をしめしたと報告しているが, 著者のおこなった腎阻血可能限界時間近くの100分の腎阻血では A β P, LDH 活性は4日目では各群ともに低下しているが, 第1, 2, 4群では A β P で正常腎の35~54%, LDH で58~80%に低下し, 2週間後においても第1群および第4群は A β P で正常腎値の14~30%, LDH では27~61%とさらに低下している. 第2群では A β P, LDH とともに4日目では第4群より低値をしめしているが, 2週間後には急速に回復し A β P で正常腎値の66%, LDH で83%まで回復している. 第3群においては4日目でも A β P, LDH は正常腎値の85%とごく軽度の低下であり, 2週間後には A β P および LDH とともにまったく正常腎値まで回復している. すなわち組織化学的検索では差異のなかった第2群と第3群の間にも腎組織中の A β P, LDH 活性の測定により, 第2群より第3群のほうが阻血性腎障害が軽度であることが明らかである.

西本²⁹⁾はクロム酸カリ障害家兎において pH の変動による腎組織中の phosphatase 活性を測定し皮質では pH 8 を境として酸性側では正常腎より障害腎のほうが活性が高く, 逆にアルカリ側では障害腎の活性は低下すると報告しているが, 著者の成績では阻血性腎障害の強い第1群および第4群では正常腎値より低下し, 最も阻血性腎障害の軽度な第3群において明らかな上昇がみられる. また β -G についても同様の傾向がみられる.

以上のことより, 阻血性腎障害の防止に対して UD 単独投与よりも UD および ATP の併用が最も有効であることが明らかになった.

UD の作用機序は, 鎌倉^{34,35)}によると酸素不足の一次作用は細胞膜のカチオン, とくに Na の能動輸送の障害であり, U はこれを防御するものであるという. また, U はカルバミン酸の alkylester であるが, H と置換される alkyl 基の炭素数が増すにつれて酸素不足防御作用が増大し炭素数が9 (nonyl urethane) 付近において極大をしめし, その相対抗アノキシア作用は EU の90倍であると報告³⁰⁾している. 今回使用した UD は毒性のない morpholine 置換体を使用し, その酸素不足耐性作用は EU の約5倍とされている.

一方、赤血球冷蔵によるK減およびNa増（一般細胞の酸素不足と同じ）をUが防御し、また、同血球解置による前記カチオン変化の回復をも促進するが、この場合ブドウ糖の存在が必要であることを証明している^{36,37}。赤血球は酸素を消費せず、したがって生活エネルギー（ATP）の生産は解糖によるから、著者の実験成績は鎌倉らのそれに一致している。

腎阻血時腎組織中のATPは急激に低下しVogt and Farber¹¹によるとラットでは10~20分の短時間の腎阻血では腎血流再開後腎組織中のATPはすみやかに回復するが、2時間の腎阻血をおこなうと腎血流再開後の腎組織中のATPの回復は遅れ、かつ正常腎の50%までしか回復しないと報告していることより、阻血腎のATPの低下の防止あるいは回復を促進さすことにより腎阻血可能時間の延長ができると考えられ、宮村³¹は腎保存の実験で灌流液中にinosineを添加することにより腎組織中のATPの上昇を認めている。Murphy³²は灌流液中にATPを加え灌流し腎静脈および尿管よりの尿のATPを測定し、その差より腎組織によりATPが消費された可能性を述べていることより、今回の実験において投与されたATPが腎細胞中へはいり、エネルギー源として作用し阻血性腎障害の軽減に役だったと考えられる。

大島ら³³は糸球体腎炎にATPを使用し腎血管の拡張により腎血流の増大をきたしBUNが低下したと報告していることより、今回投与されたATPがvasodilatorとして作用し阻血性腎障害を軽減させる助けとなったとも推定される。

結 語

1) イヌを用いた腎血流遮断（100分）の実験でBUN、血中および尿中の酵素活性の変動をしらべ、腎の組織学的、組織化学的および生化学的観察をおこなった結果、UDおよびATP併用投与群が阻血性腎障害の軽減に最も効果的であり、次いでUD単独投与群であった。ATP単独投与群では、その効果はまったく認められなかった。

2) 腎阻血後の血中酵素活性はAcid P, A₁P, LDH, β-Gは各群ともに上昇する。A₁P, LDHにおいては阻血後第1日目に最高値をしめし、阻血性腎障害との間には相関関係が認められるので、保存的腎手術施行後に阻血性腎障害の程度を推定するためにBUNとともに血中A₁P, LDHを測定することは有益である。

3) 阻血性腎障害の組織化学的検索において、第1群および第4群は4日目にA₁P, LDH, SDともに低下し、10~14日経過後もまったく回復像がみられない

のに対して、第2群および第3群は14日目には正常像にまで回復しているが、第2群と第3群との間には差異は認められない。

4) 腎組織中のA₁PおよびLDHの測定をおこなうと、14日目では第2群のA₁P, LDHは第3群に比して、その回復は悪い。すなわちUDおよびATP併用投与群の阻血性腎障害が最も軽微である。

擧筆するに当りご懇切なるご指導、ご校閲を賜った恩師石川教授に深甚の謝意を捧げ、本研究にご援助を賜った第一生理学教室鎌倉教授、腫瘍病理学教室伊東教授、当泌尿器科学教室奥村非常勤講師に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Moyer, J. H., Heider, C., Morris, G. C. and Handley, C.: *Ann. Surg.*, **146**: 152, 1957.
- 2) Mitchell, R. M.: *Brit. J. Surg.*, **46**: 593, 1959.
- 3) Fegen, J. P., Albert, D. J. and Persky, L.: *Brit. J. Urol.*, **42**: 273, 1970.
- 4) Hanley, H. G.: *Brit. J. Urol.*, **42**: 540, 1970.
- 5) 前川正信: 日泌尿会誌, **50**: 787, 1959.
- 6) 後藤宏一郎: 皮と泌, **26**: 985, 1964.
- 7) Fegen, J. P., Albert, D. J. and Persky, L.: *Invest. Urol.*, **9**: 16, 1971.
- 8) Kamakura, K., Kaijo, W. and Morikawa, A.: *Jap. J. Physiol.*, **5**: 16, 1955.
- 9) 杉村克治: 泌尿紀要, **6**: 1146, 1960.
- 10) 奥村秀弘: 泌尿紀要, **13**: 645, 1967.
- 11) Vogt, M. T., Farber, E.: *Am. J. Path.*, **53**: 1, 1968.
- 12) 辻井 主・川嶋昭司・鶴山浩之祐: 奈医誌, **8**: 171, 1955.
- 13) Talalay, P. et al.: *J. Biol. Chem.*, **166**: 757, 1964.
- 14) Manheimer, L. H. and Seligman, A. M.: *J. Nat. Canc. Inst.*, **9**: 181, 1948.
- 15) Nachlas, M. M., Tsou, K. C., de Souza, E., Cheng, C. S. and Seligman, A. M.: *J. Histochem. Cytochem.*, **5**: 420, 1957.
- 16) Hess, R., Scarpelli, D. G. and Pearse, A. G. E.: *J. Biophys. & Biochem. Cytol.*, **4**: 753, 1958.
- 17) Kolesky, S.: *A. M. A. Arch. Path.*, **59**: 592, 1954.
- 18) Sheehan, H. L. and Davis, J. C.: *J. Path. Bact.*, **78**: 351, 1959.
- 19) 村上元考・森本真平・黒田満彦・山崎幹雄・能登 稔・岩崎紀男・東福要平・井沢宏夫・酒井 晃:

- 心臓, **2**: 39, 1970.
- 20) Silk, M., Sigman, E. and Silk, M.: *Invest. Urol.*, **9**: 154, 1971.
- 21) Kohn, M. and Ross, H.: *Transplantation*, **11**: 461, 1971.
- 22) Duggan, M. L.: *J. Urol.*, **90**: 669, 1963.
- 23) Highman, B., Thompson, E.C., Roshe, J. and Altland, P.D.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **95**: 109, 1957.
- 24) Ballantyne, B., Wood, W.G. and Meffan, P. M.: *Brit. med. J.*, **2**: 667, 1968.
- 25) Lingardh, G., Andersson, L., Voigt, A. and Olin, T.: *Scand. J. Urol. Nephrol.*, **2**: 165, 1968.
- 26) Wachstein, M. and Meisel, E.: *J. Hist. Cyto.*, **5**: 205, 1957.
- 27) Meffan, P., Ballantyne, B., Wood, W.G., Andorson, C.K. and Parsous, F.M.: *Brit. J. Surg.*, **56**: 205, 1969.
- 28) 村橋 勲: *日泌尿会誌*, **63**: 1, 1972.
- 29) 西本裕美子: *日腎誌*, **12**: 383, 1970.
- 30) 鎌倉勝夫: *奈医誌*, **11**: 25, 1960.
- 31) 宮村隆三: *日泌尿会誌*, **63**: 200, 1972.
- 32) Murphy, G. T., Schoonees, R. and Groenewaerd, J. H., Retif, C. P., Van Zyl, J. J. W. and De Klerk, J. N.: *Invest. Urol.*, **6**: 466, 1969.
- 33) 大島研三・波多野道信・壁谷沢一正・高橋満喜雄・山本 宏・菅野寛也・及川 豊・前山芳雄・赤嶺徹・原田 稔: *ATP の基礎と臨床*, 69, 1963.
- 34) 鎌倉勝夫: *医学のあゆみ*, **57**: 667, 1966.
- 35) 鎌倉勝夫: *医学のあゆみ*, **57**: 783, 1966.
- 36) 鎌倉勝夫: *Sympo. on Chem. Physiol. & Pathol.*, **IV**: 180, 1964.
- 37) 鎌倉勝夫: *日本生理誌*, **33**: 477, 1971.

(1973年10月17日特別掲載受付)