

ラット虚血腎モデルにおける CsA-induced Nephropathy : 腎および全身循環動態と腎ミクロゾームチトクローム P-450 の変動ならびに Ca 拮抗剤の影響

大阪市立大学医学部泌尿器科学教室 (主任 : 前川正信教授)

岸本 武利, 辻野 孝, 仲谷 達也, 金 卓
大山 哲, 吉村 力勇, 坂本 亘, 前川たかし
川嶋 秀紀, 楠瀬 恵*, 前川 正信

EFFECTS OF VERAPAMIL ON CYCLOSPORINE A (CsA)-INDUCED NEPHROPATHY IN ISCHEMIC KIDNEY MODEL IN RATS : CHANGES IN SYSTEMIC HEMODYNAMICS AND HEPATIC AND RENAL MICROSOMAL CYTOCHROME P-450

Taketoshi Kishimoto, Takashi Tsujino, Tatsuya Nakatani,
Taku Kim, Akira Ohyama, Rikio Yoshimura,
Wataru Sakamoto, Takashi Maekawa, Hidenori Kawashima,
Emi Kusunose* and Masanobu Maekawa

From the Department of Urology, Osaka City University Medical School,

**3rd Department of Biochemistry, Osaka City University*

We have examined the effect of verapamil on CsA-induced nephropathy by measurement of systemic hemodynamics including each organ blood flow using the microsphere method in ischemic kidney model of heminephrectomized Wistar rats. Hepatic and renal microsomal cytochrome P-450 contents and their enzyme activities were measured to study the correlation between CsA-induced nephropathy and induction of hepatic and renal microsomal cytochrome P-450. All rats were heminephrectomized (1-nephrectomy) and were classified into the following 6 groups: 1) control group, 2) CsA at a dose of 40 mg/kg per day orally for 7 days (CsA group), 3) Oral administration of verapamil for 7 days in the CsA group (CsA+V group), 4) 20 min clamping of the remaining right kidney pedicle (Ischemic, Is group), 5) CsA was administered in the Is group (Is+CsA group), 6) Addition of verapamil to CsA in the Is+CsA group (Is+CsA+V group). Verapamil was given in the drinking water and the average dose calculated from the amount of drinking was 4.7 ± 1.0 mg/kg per day and 5.2 ± 0.7 mg/kg per day for the CsA+V group and the Is+CsA+V group, respectively. CsA caused significant increases in BUN and serum creatinine (sCr) with a significant decreases in renal inulin clearance (C_{In}) in all groups. When compared with the Is group, CsA caused significant decreases in cardiac output and all organ blood flow especially in renal blood flow with significant increases in BUN and sCr in the Is+CsA group. C_{In} in the Is+CsA group also significantly decreased as compared with that in the Is group. In the Is+CsA+V group, renal blood flow and C_{In} were significantly higher than those in the Is+CsA group. Plasma level of CsA at 12 hours after the last administration, measured by radioimmunoassay, for the CsA, CsA+V, Is+CsA and Is+CsA+V groups was $2,040 \pm 398$, $2,400 \pm 384$, $2,360 \pm 408$ and $2,475 \pm 1,020$ ng/ml, respectively, with no significant difference among the four. A significant induction of renal microsomal P-450 including increases in ω -1 and ω hydroxylase activities of laurate and prostaglandin A_1 was noted in the Is+CsA group. The degree of induction of renal microsomal cytochrome P-450 correlated with the degree of nephropathy. Although verapamil did not have a preventive effect on CsA-induced nephropathy in non-ischemic kidney model, verapamil was found

* 現 : 大阪市立大学医学部第三生化学教室

CsA-induced nephropathy in the microsomal cytochrome P-450 with a significant amelioration of the to suppress the induction of renal ischemic kidney model. Therefore, verapamil prevents CsA-induced nephropathy only in the ischemic kidney model. It is suggested that the preventive effect of verapamil is not due to its direct effect on the mechanism of the development of CsA-induced nephropathy. It is likely that verapamil ameliorates kidney tissue injury induced by ischemia through suppression of Ca^{++} influx into the cell, resulting in less penetration of CsA into the cell. (Acta Urol. Jpn. 37: 1159-1164, 1991)

Key words: Cyclosporine-induced nephropathy, Verapamil

緒 言

CsA の出現により、臓器移植の成績は飛躍的な向上を収めてきた。しかし薬剤であるが故に種々の副作用があり、中でもその腎毒性、高血圧は腎移植において特にその長期成績に影響を与える。CsA の腎毒性、高血圧の発症の機序については不明な点が多い。しかし CsA の腎毒性を軽減するため、CsA 少量処方による多剤併用療法や薬理学的予防の研究も盛んに行われている。薬理学的予防については Ca^{++} 拮抗剤等が予防的効果があるとされている¹⁻⁴⁾。一方腎は全身循環動態の調整に大きな役割を果たしており、移植腎の機能の変化が高血圧を含め全身循環動態に与える影響は大きい。さらに Ca 拮抗剤は末梢血管拡張作用ならびに降圧作用を有するので、CsA の腎毒性、高血圧、すなわち Ca による全身循環動態変動に対する Ca 拮抗剤の影響についても検討する必要がある。また近年 CsA と Ca 拮抗剤の肝での代謝に同じ肝ミクロゾーム P-450 が関与しているという報告がある⁵⁻⁷⁾。そこで著者等は今回ラットを用い、腎移植に近いモデルである片側腎摘ラットの腎動脈を一時閉塞して虚血腎モデルを作製し、CsA ならびに Ca 拮抗剤併用時の全身循環動態の変化を検討すると共に、肝ならびに腎ミクロゾーム P-450 の変動を検討した。

実 験 方 法

実験には10～15週齢の Wistar 系ラットを用いた。CsA-induced nephropathy は olive oil に溶解した CsA 40 mg/kg/day を胃ゾンデにより経口的に7日間投与して作製した。カルシウム拮抗剤として verapamil を使用し、0.1 mg/ml の濃度の水道水を飲料水として自由に飲水させ CsA 群と同様7日間投与した。実験はすべてのラットにまず左腎摘を行い、以下の6群に分けて行った。

第1群：オリーブ油 2 ml/kg/day P.O.

[control 群あるいはC群]

第2群：CsA 40 mg/kg/day P.O. 7日間 [CsA 群]

第3群：CsA 40 mg/kg/day P.O. + verapamil

[CsA+V 群]

第4群：左腎摘後右腎莖部20分間クランピング群
オリーブ油 2 ml/kg/day P.O. [Is 群]

第5群：第4群に CsA 40 mg/kg/day 7日間

[Is+CsA 群]

第6群：第5群に verapamil 併用群

[Is+CsA+V 群]

血圧、各臓器血流量は、事前にラットを pentobarbital sodium (40 mg/kg/ip) にて麻酔し、カテーテルを右頸動脈より左心室に、左大腿動脈より大動脈内にそれぞれ留置した後、麻酔覚醒させ、すなわち各薬剤最終経口投与後12時間目に行った。血圧は左大腿動脈カテーテルより圧トランスデューサーを用い、各臓器血流測定は microsphere 法⁸⁾ (15 μ carbonized microsphere labeled with ^{14}Ce , New England Nuclear Co., USA) で行った。イヌリンクリアランス (C_{In}) は 3H -inulin を用い、全身循環動態測定と同様、薬剤最終投与後12時間目に行った。膀胱内留置カテーテルより20分間採尿し、中間点で尾静脈より採血した。

肝・腎ミクロゾームモノオキダーゼ測定については、まず頸椎脱臼によりラットを屠殺後、脱血の上、腎および肝を取り出し1.15% KCl 液で灌流した後、氷冷し、ホモゲナイズ後、超遠沈法にてミクロゾーム分画を採取した。蛋白質濃度は Lowry 法⁹⁾、P-450 の定量は Omura & Sato 法¹⁰⁾ で測定した。P-450 分画の各酵素活性は、Kusunose ら^{11,12)} の方法によりラウリン酸 $\omega_3(\omega-1)$ 水酸化活性ならびに $PGA_{1\omega}$ ($\omega-1$) 水酸化活性を測定した。尿分析は代謝ケージで採尿し、血液化学用には心腔穿刺により採血して自動分析にて測定した。血中シクロスポリン濃度は radio-immunoassay にて測定した。得られたデータは各項目について平均 (mean) $\pm$ 標準偏差 (SD) と表し、分散分析を行い危険率5%以下を有意差とした。

結 果

1. 各群の CsA 血漿濃度

最終投与後12時間目の各群の CsA 血漿濃度は,

CsA 群: $2,040 \pm 398$ ng/ml

CsA+V 群: $2,400 \pm 384$ ng/ml

Is+CsA 群: $2,360 \pm 408$ ng/ml

Is+CsA+V 群: $2,475 \pm 1,020$ ng/ml

で, 各群間に有意差を認めなかった.

2. ペラパミル投与

ペラパミルを tap water に 0.1 mg/ml の濃度で溶解し自由飲水させ, 飲水量から摂取量を算定した. 各群の1日摂取量は,

CsA+V 群: 4.69 ± 1.00 mg/kg

Is+CsA+V 群: 5.15 ± 0.69 mg/kg

であった.

3. 血清クレアチニン (sCr), 血中尿素窒素 (BUN), イヌリンクリアランス (C_{In}) の変化

Fig. 1 に各群の CsA 最終投与後12時間目の sCr, BUN および C_{In} を示す. Is 群は C 群に比し sCr および BUN は有意の高値を示し, C_{In} も有意の低値を示した. CsA 群および Is+CsA 群はそれぞれ C 群および Is 群に比し sCr および BUN は有意の高値を, C_{In} は有意の低値を示し, CsA 群と Is+CsA 群間でも後者において sCr, BUN が有意に高値を示し, C_{In} も低値を示した. CsA+V 群は CsA 群に対し sCr, BUN および C_{In} の有意の変化を認めなかった. しかし Is+CsA+V 群は Is+CsA 群に比し C_{In} の有意の高値, sCr, BUN の有意の低値を示した.

4. 全身循環動態の変化

薬剤最終投与後12時間目の測定においては, 平均血圧は C 群, CsA 群, Is 群, Is+CsA 群間に有意差を認めなかった. しかし verapamil 投与群の CsA+

V 群, Is+CsA+V 群の平均血圧は, 僅かであるが他群に比し有意の低値を示した.

Fig. 2 に各臓器血流量の変化を示す. 心拍出量 (CO) については,

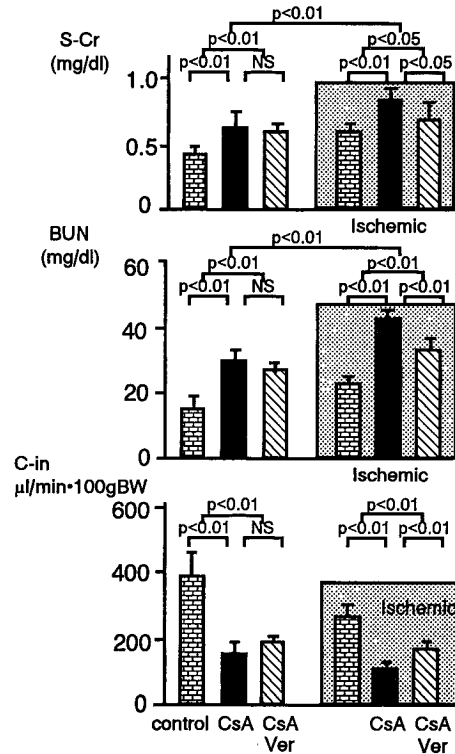


Fig. 1. Control 群, CsA 群, CsA+V 群, Is 群, Is+CsA 群, Is+CsA+V 群における各薬剤最終投与後12時間目の血清クレアチニン (sCr), BUN, 腎イヌリンクリアランス (C_{In})

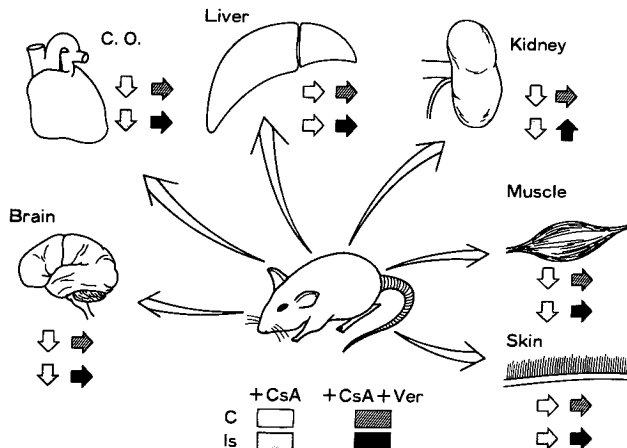


Fig. 2. 各群における各臓器血流量の変動. 矢印は control 群に対しての変動方向を示す

C群: 38.3 ± 8.3 ml/min $\cdot$ 100 g $\cdot$ BW
 CsA 群: 29.2 ± 5.8 ml/min $\cdot$ 100 g $\cdot$ BW
 CsA+V 群: 31.6 ± 6.6 ml/min $\cdot$ 100 g $\cdot$ BW
 Is 群: 41.5 ± 8.3 ml/min $\cdot$ 100 g $\cdot$ BW
 Is+CsA 群: 25.0 ± 3.7 ml/min $\cdot$ 100 g $\cdot$ BW
 Is+CsA+V 群: 25.2 ± 1.7 ml/min $\cdot$ 100 g $\cdot$ BW
 であり, CsA 投与群は非投与群に比し有意の低値を示した。V投与群は CsA 群あるいは Is+CsA 群と有意差を認めなかった。各臓器血流量で特異的な変化を示したのは腎血流量であった。各群の RBF は、
 C群: 6.2 ± 1.1 ml/min $\cdot$ g $\cdot$ tissue
 CsA 群: 4.0 ± 0.6 ml/min $\cdot$ g $\cdot$ tissue
 CsA+V 群: 4.3 ± 0.8 ml/min $\cdot$ g $\cdot$ tissue
 Is 群: 5.5 ± 1.1 ml/min $\cdot$ g $\cdot$ tissue
 Is+CsA 群: 3.4 ± 0.3 ml/min $\cdot$ g $\cdot$ tissue
 Is+CsA+V 群 4.8 ± 1.0 ml/min $\cdot$ g $\cdot$ tissue
 であり, CsA 投与群は非投与群に比し有意の低値を示した。CsA+V 投与群は Is+CsA+V 群のみ Is+CsA 群に比し有意の高値を示した。

肝血流量は肝にトラップされる microsphere で計

算される肝動脈血流量と、胃・腸・脾血流の総和である門脈血流量がある。CsA 投与により門脈血流量は減少傾向を示すが、肝動脈血流量は有意に増加したため、総肝血流量として各群間に有意の差を認めなかった。脳、筋肉の血流量は CsA 投与により CO の減少とともに減少し、verapamil 投与によっても変化しなかった。皮膚の血流は各群間に有意差を認めなかった。

5. 肝・腎ミクロゾームモノオキシダーゼの変化

これらの測定は C, Is, Is+CsA, Is+CsA+V 群の4群で行った。Fig. 3 は肝ミクロゾームチトクローム P-450 比含量、ラウリン酸および PGA₁ の ω 水酸化酵素活性を示す。P-450 比含量はあまり大きな変化を示さなかったが、C群に比し Is 群および Is+CsA+V 群において僅かであるが有意の減少を示した。しかし Is+CsA 群では減少を認めなかった。ラウリン酸 ω 水酸化酵素活性には有意の変動を認めなかった。PGA ω 水酸化酵素活性は Is, Is+CsA, Is+CsA+V 群はC群に比し有意の低値を示した。Fig. 4 は腎ミクロゾームチトクローム P-450 の比含

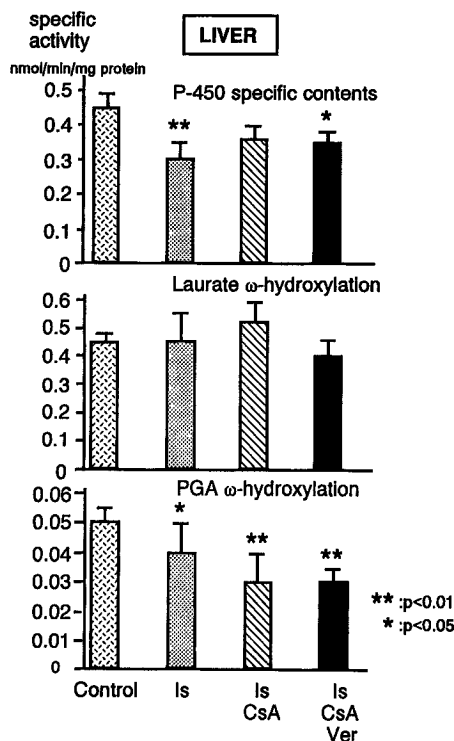


Fig. 3. Control 群, Is 群, Is+CsA 群, Is+CsA+V 群における肝ミクロゾームチトクローム P-450 比含量ならびにラウリン酸および PGA₁ ω 水酸化酵素活性

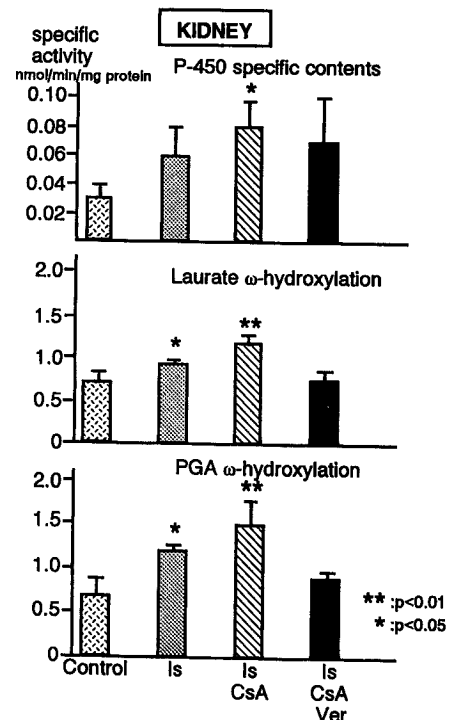


Fig. 4. Control 群, Is 群, Is+CsA₁ 群, Is+CsA+V 群における腎ミクロゾームチトクローム P-450 比含量ならびにラウリン酸および PGA ω 水酸化酵素活性

量ならびにラウリン酸および $\text{PGA}_{1\omega}$ 水酸化酵素活性の変化を示す。P-450 比含量はC群以外の群で高値を示したが、Is+CsA 群のみが有意差を示した。ラウリン酸および $\text{PGA}_{1\omega}$ 水酸化酵素活性はともに同様の変化を示し、Is および Is+CsA 群が有意の高値を示した。

考 察

CsA-induced nephropathy はあらゆる臓器移植において CsA を主免疫抑制剤として使用する際の大きな問題であり、その防止を如何にするかは特に腎移植において大きな課題となっている。CsA-induced nephropathy の病態および発生機序に関する研究は数多くなされているが、いまだ不明な点が多いので、その効果的予防も確立されていない。ただ CsA-induced nephropathy の進展は用量依存性であるので、実際の臨床においては CsA 少量処方のできる他剤併用療法が推奨されている。また詳細な発生機序が解れば薬理学的予防も可能になる。今回われわれは免疫学的細胞障害の欠けた腎移植に近いモデルである虚血腎モデルを用いて CsA-induced nephropathy を作製し、全身循環動態の測定を行い、さらに CsA の代謝と深くかかわっているチトクローム P-450 について肝・腎のそれらを測定し、全身循環動態と各臓器血流量の変動から CsA-induced nephropathy の発生機序について検討するとともに、Ca 拮抗剤である verapamil の併用が予防効果をもたらすか否かを検討した。

本実験においては、CsA-induced nephropathy は虚血腎において増強された。しかし全身循環動態の変化は CsA および Is+CsA 群とも同様の変化を示した。すなわち CO の減少とそれに伴い肝動脈、皮膚、筋肉を除く腎血流量、門脈血流量をはじめ、各臓器ならびに組織の血流量は減少した。しかし血圧には変化が見られないことから総末梢血管抵抗は有意に上昇した。すなわち CsA の腎毒性ならびに高血圧の誘発が循環動態の面からも理解される。肝動脈および筋肉を除いて全血管床、特に腎血管の収縮が起こっている。従って本実験の CsA-induced nephropathy は腎血管収縮が腎障害の主因と考えられる。この全身循環の変動パターンは renin-angiotensin 系が賦活された時のパターンと似る¹³⁾。しかし Paller ら¹⁴⁾は angiotensin converting inhibitor である captopril® では CsA-induced nephropathy を遮断することができないと報告している。Ca 拮抗剤である verapamil により血圧は僅かであるが有意に下降するにもかかわらず

らず CO や各臓器血流量や CO の末梢への分布のパターンに大きな変化が見られなかった。TPR の上昇は CO 減少による反射的なものではなくて、TPR の上昇に伴い CO が減少したものと考えerの方が妥当である。この TPR の上昇は交感神経系やレニン・アンジオテンシン系の賦活が主因とは考え難く末梢、血管収縮は他の要因かあるいは CsA の直接別のパラグラフ作用によるものかも知れない。

われわれは以前にラットに CsA を投与すると腎ミクロゾームチトクローム P-450 が誘導され、その程度と腎障害の程度が相関することを見出した¹⁵⁾。しかし P-450 の誘導が腎障害の原因なのか結果であるのか不明であるが、CsA が直接腎細胞に作用していることによると思われる。本実験においても前報と同様に腎ミクロゾーム P-450 の誘導が見られ、特に虚血腎において P-450 誘導と腎障害の程度が相関した。さらに正常腎における CsA-induced nephropathy の進展は verapamil で抑制できなかったが、虚血腎では明らかにその進展が抑制された。従って虚血腎における verapamil の CsA-induced nephropathy の進展予防効果は CsA-induced nephropathy の進展機序に直接関与したものとは考え難く、間接的に作用した可能性が高い。虚血による腎障害が Ca 拮抗剤により遮断されることが知られており¹⁶⁾、本実験においても verapamil が虚血腎障害を抑制した結果、CsA の細胞内への流入が抑制され、P-450 の誘導も少なくなったものと仮定すれば理解しやすい。事実、Kone ら¹⁷⁾は病理形態学的に、Ja blonski ら¹⁸⁾は機能的に、虚血腎では CsA の腎障害が増強されたと報告している。このことは臨床的に重要な意味を持つ。すなわち腎移植、特に死体腎移植の場合、提供腎は虚血による変化と腎冷保存期間に生体腎とは比較できないほど傷害されると考えられ、初期免疫抑制にできるだけ CsA を用いない方が移植直後の ATN を長期化させないことや CsA 腎障の発症を防ぐ上で大いに意義がある。近年 UW solution を用いると冷保存時間の延長が可能である上、ATN の予防と初期利尿に大変有効であると報告されている¹⁹⁻²²⁾。この UW solution には Ca 拮抗剤、radicals scavenger が処方されており、血流再開時の腎細胞障害を抑制することで ATN の予防ができるとされている。その結果 CsA-induced nephropathy の進展も抑制されることが大いに考えられる。

文 献

- 1) Iaina A, Herzog D, Cohen D, et al.:

- Calcium entry blockade with verapamil in cyclosporine A plus ischemia in rats. *Clin Nephrol* 25 (suppl 1): 168-170, 1986
- 2) Dawidson I, Rooth P, Fry WR et al.: Prevention of acute cyclosporine A-induced renal blood flow inhibition and improved immunosuppression with verapamil. *Transplantation* 48: 575-579, 1989
 - 3) Dawidson I, Rooth P, Fisher D, et al.: Verapamil ameliorates acute cyclosporine A (CsA) nephrotoxicity and improves immunosuppression after cadaver renal transplantation. *Transplant Proc* 21: 1511-1513, 1989
 - 4) Kirk AJB, Omur I, Bateman DN, et al.: Cyclosporine-associated hypertension in cardiopulmonary transplantation. The beneficial effect of nifedipine on renal function. *Transplantation* 48: 428-430, 1989
 - 5) Henricsson S and Lindholm A: Inhibition of cyclosporine metabolism by other drugs in vitro. *Transplant Proc* 20 (suppl 2): 569-571, 1988
 - 6) Wagner K, Henkel M, Heinemeyer G, et al.: Interactions of calcium blockers and cyclosporine. *Transplant Proc* 20 (suppl 2): 561-568, 1988
 - 7) Robson RA, Fraenkel M, Barratt LJ, et al.: Cyclosporine-verapamil interaction. *Br J Clin Pharmacol* 25: 402-403, 1988
 - 8) Wagner HN, Rhodes BA, Sakaki Y, et al.: Studies of circulation with radioactive microspheres. *Invest Radiol* 4: 374-386, 1969
 - 9) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biochem* 193: 265-275, 1951
 - 10) Omura T and Sato R: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes: II solubilization, purification, and properties. *J Biochem* 239: 2779-2385, 1964
 - 11) Kusunose M, Kusunose E and Coon MJ: Enzymatic ω -oxidation of fatty acids: 1. products of octanoate, and laurate oxidation. *J Biochem* 239: 1374-1380, 1964
 - 12) Kusunose E, Kaku M, Ichihara K, et al.: Hydroxylation of prostaglandin A₁ by the microsomes of rabbit intestinal mucosa. *J Biochem* 95: 1733-1739, 1984
 - 13) 岸本武利: 急性腎不全モデルにおける全身循環動態. *日泌尿会誌* 74: 1906-1911, 1984
 - 14) Paller MS and Murrav BM: Renal dysfunction in animal models of cyclosporine toxicity. *Transpl Proc* 17: (suppl 1): 155-159, 1985
 - 15) Yoshimura R, Yoshimura N, Kusunose E, et al.: Role of kidney microsomal cytochrome P-450 in cyclosporine-induced nephropathy. *Transpl Proc* 21: 934-938, 1989
 - 16) Lee SM, Hillman BJ, Clark RL, et al.: The effects of diltiazem and captopril on glycerol-induced acute renal failure in the rat. *Invest Radiol* 20: 961-970, 1985
 - 17) Kone BC, Racusen LC, Whelton A, et al.: Acute renal failure produced by combining cyclosporine and brief renal ischemia in Munich Wistar rat. *Clin Nephrol* 25 (suppl 1): 171-174, 1986
 - 18) Jabronski P, Harrison C, Howden B, et al.: Cyclosporine and the ischemic rat kidney. *Transplantation* 41: 147-151, 1986
 - 19) Wahlberg JA, Southard JH and Belzer FO: Development of a cold storage solution for pancreas preservation. *Cryobiology* 23: 477, 1986
 - 20) Jamieson NV, Sundberg R, Lindell S, et al.: Preservation of the canine liver for 24~48 hours using simple storage with UW solution. *Transplantation* 46: 517-522, 1988
 - 21) Ploeg RJ, Goosens D, Vreugdenhil P, et al.: Successful 72-hour cold storage kidney preservation with UW solution. *Transplant Proc* 20: 935, 1988
 - 22) Biguzas M, Jablonski P, Howden BO, et al.: Evaluation of UW solution in rat kidney preservation. *Transplantation* 49: 1051-1055, 1990

(Received on March 1, 1991)
(Accepted on April 22, 1991)