

慢性腎不全における
二次性副甲状腺機能亢進症
発症機序に関する研究

深川 雅史

慢性腎不全における
二次性副甲状腺機能亢進症
発症機序に関する研究

深川 雅史

目次：

I. 研究の背景	1
----------	---

II. 研究方法	4
----------	---

III. 実験結果	10
-----------	----

IV. 考察	24
--------	----

V. まとめ	30
--------	----

謝辞	32
----	----

参考文献	33
------	----

I. 研究の背景

人工透析が安全に行なわれ、慢性腎不全患者の長期生存が当然となった今日、長期透析療法に伴う合併症をコントロールすることが患者の「生活の質」を左右する重要な問題となっている。この中でも骨病変は最も重要な合併症であり、二次性副甲状腺機能亢進症がその中心像をなしている(1, 2)。その発症機序に関しては、現在までにいくつかの仮説が提唱されている。

副甲状腺ホルモン (PTH) 分泌を制御している最も重要な因子は、細胞外カルシウムイオンと活性型ビタミン D ($1, 25(\text{OH})_2\text{D}$) である。したがって、慢性腎不全における二次性副甲状腺機能亢進症の発症機序については、腎不全の進行に伴って生ずるリンの蓄積による低カルシウム血症(3)、さらに $1, 25(\text{OH})_2\text{D}$ 産生の低下(4)が PTH 分泌の刺激になると考えられきてきた。すなわち、腎機能がわずかに低下すると低カルシウム血症や $1, 25(\text{OH})_2\text{D}$ 産生の低下が生じ、これらの原因によって PTH 分泌が刺激される。PTH が分泌された結果として、低カルシウム血症は一旦改善し、 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}$ の産生も一旦正常になるが、PTH の分泌は亢進したままになる。このような病態を、腎機能が次第に低下していく過程で繰り返し、PTH 分泌は次第に亢進してくるというものである。これらの仮説を基にして、アルミゲルや炭酸カルシウムなどのリン吸着剤によってリンの蓄積を防いだり、 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ や $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ などの活性型ビタミン D 製剤を投与して、 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}$ の生理的濃度を維持する治療がひろく行なわれている(2)。しかし、このような治療にもかかわらず、著明な副甲状腺の hyperplasia を伴う二次性副甲状腺機能亢進症を呈する慢性腎不全の患者は、依然多数存在する。

したがって、いままでに提唱された仮説では、病態が完全に解明されたとは言いがたいのが現状である。まず、これまで二次性副甲

甲状腺機能亢進症は血中のPTH濃度，すなわちPTH分泌の面からのみ検討されており，PTH産生の増加，副甲状腺細胞の増殖の観点からは検討されていない。さらに，二次性副甲状腺機能亢進症が発症し始めると考えられる非常に初期の腎不全における検討が不十分であった。

PTH遺伝子がクローニング(5)されてから，PTHの合成レベルにおける調節の研究が進んでおり，PTH分泌と同様に合成に対しても，細胞外カルシウムイオン(6,7)と $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (8,9)がその重要な調節因子であることが判明した。すなわち，これらの因子はPTH遺伝子の5'上流域の塩基配列を介して，その転写を抑制する。これから類推すると，進行した慢性腎不全では，血清カルシウムイオンおよび $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 濃度の低下が見られるので，これらの因子による転写抑制が不十分となり，副甲状腺でのPTH合成はmRNAレベルで亢進していると予想される。しかし，これが正しいのか，血清カルシウムイオンや $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 濃度の低下が見られないような初期の腎不全でも成り立つのかについては，検討されていない。

一方，活性型ビタミンD製剤を常用量投与されて $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ の生理的濃度を達成しているにもかかわらず二次性副甲状腺機能亢進症がコントロールされない慢性透析患者に対して， $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を経静脈(10)もしくは経口(11)で大量投与することによりPTH分泌を抑制しようとする $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ パルス療法が最近行なわれるようになり効果をあげている。この臨床的証拠に加えて，透析患者の副甲状腺には $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の結合が減少しているという報告(12)もあり，慢性腎不全では生理的濃度の $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ に対する副甲状腺の抵抗性があるのではないかと考えられるようになっていく。しかしながら，この抵抗性が初期の腎不全でも存在するのか，その本態と発症機序は何かと言う問題に関しては，まだ検討されていない。

次に、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ パルス療法では、しばしば高カルシウム血症を生ずることがあり(11)、治療の障害となっている。最近 $22\text{-oxa-}1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (13)などの新しいビタミンD誘導体が、高カルシウム血症を生ずることなくPTHの合成分泌を抑制しうることが正常動物で示されている(14)。これらの薬剤は、慢性腎不全における二次性副甲状腺機能亢進症をコントロールするために有望と考えられるが、腎不全動物での検討はなされていない。

そこで本研究では、以上に挙げた問題点を前提にして、慢性腎不全における二次性副甲状腺機能亢進症の発症機序を、特にその初期の段階で、さらに解明するために、腎不全ラットモデルを用いて、PTH合成の異常とそれに対するビタミンD誘導体の効果を検討した。

II. 研究方法

慢性腎不全モデルラットの作成ならびに薬剤投与方法

慢性腎不全のモデルラットは、7/8 部分腎摘によって作成した。すなわち、標準飼料（カルシウム 0.6%，リン 0.6%；日本クレア）によって飼育されている11週齢の雄 Sprague-Dowleyラット（体重約350g）に対して、エーテル麻酔下に左背部よりアプローチして腎被膜を剥離し、左腎動脈を腎静脈および尿管から分離して、その4分枝のうち3本を結紮した。1週後に、同様の方法で右腎動脈の起始部を結紮し、その後少なくとも4週間後に慢性腎不全の初期モデルとして使用した。また、腎動脈の結紮以外は同様の偽手術を行なったラットをpair-feedして対照群とした。

次に、これらの動物に対して薬剤を投与する実験では、指定された用量のビタミンD誘導体を溶解した400 μ lのプロピレングリコールもしくはvehicleのみを、副甲状腺摘出の24および48時間前に腹腔内投与した。投与した1,25(OH) $_2$ D $_3$ は、Roussel UCRAF (Paris, France)から購入し、22-oxa-1,25(OH) $_2$ D $_3$ は中外製薬より供与された。

組織の摘出とRNAの抽出

エーテル麻酔下にラットの腹部大動脈から脱血した後、前頸部より甲状腺・副甲状腺もしくは指定された実験では副甲状腺のみを摘出し、総RNAを抽出した。すなわち、摘出した組織をただちに4Mのグアニジンチオシアネート中でホモジネートし、5.7M塩化セシウム上で、20℃、100,000gで18時間超遠心した。次に遠心されたRNAを蒸留水で溶解し、0.3M酢酸ナトリウム存在下に、-80℃でエタノール沈殿して回収した(15)。また、一部の実験では同時に

DNAを塩化セシウム層より上層からフェノール抽出した(16)。
RNAとDNAの量は、260nmの吸光度を測定して計算した(17)。
ラット一匹あたりの甲状腺-副甲状腺から得られるRNAの量は、約
30 μ gであった。

PTH mRNAの測定

PTH mRNAレベルは、ノザンプロット法(18)ならびにブライ
マー伸展法(19)によって測定した。そのために、ラットPTH
mRNA(5)の第50塩基から第79塩基に相補的な30塩基のオリゴ
ヌクレオチド(5'-CCTGTATTAAGCTGGAGTAAGCCAGACAGC-3')お
よびラット β -actin mRNA(20)の第121塩基から第150塩基
に相補的な30塩基のオリゴヌクレオチド(5'-CGCCCCGCGA-
AGCCGGCCTTGCACATGGCGG-3')を、自動DNA合成装置(Model
8700; Biosearch, San Rafael, California, USA)にて作成した。
これらのオリゴヌクレオチドは、 γ - 32 P ATP(Amersham Japan)
およびT4ポリヌクレオチドキナーゼと37℃、1時間反応させ、5'末
端をラベルして用いた(21)。また、ノザンプロット法で β -
actin mRNAを検出するためには、ヒト β -actin cDNAの
Hinf fragment (0.44kb)を、ニックトランスレーションキット
(Amersham Japan, Tokyo)を用いて、 α - 32 P dCTP(Amersham
Japan)でラベルして使用した(22)。

ノザンプロット法では、まず10 μ gの総RNAを2.2Mホルムアル
デヒドを含む1%アガロースゲルで電気泳動した。次に、このゲルを、
Bio-dyne転写膜(Pall Ultrafine Filtration Corp., Glen Cove, New York,
USA)にトランスファーし、80℃、2時間で固定した。ブレイハイブリ
ダイゼーションは、50%ホルムアミド、5xSSC (1xSSC: 0.15M塩化ナト
リウム, 0.015Mクエン酸ナトリウム; pH7.0), 10xデンハルト液
(1x: 0.02%牛血清アルブミン(BSA), 0.02%ポリビニルピロリドン,

0.02%フィコール), 0.1% ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)で, 42℃, 4時間行なった. ハイブリダイゼーションは, この組成のほかに100 ngのラベルされたPTHプローブ (5×10^8 cpm/ μ g) もしくは300 ngのラベルされたヒト β -actin cDNA (3×10^8 cpm/ μ g)と, 断片化されたサケ精子DNA (10 ng/ml)を含む1 mlのパッファーで, 42℃, 12時間行なった. 次に, フィルターを1xSSC, 0.1% SDSにて室温で3回洗浄し, さらに0.1 xSSC, 0.1% SDSにて42℃で30分洗浄した. その後, オートラジオグラフィーを, 増感紙を用いて, Kodak X-Omat Filmで-80℃で2日間行なった.

プライマー伸展法では, まず, ラベルされたPTHおよび β -actinプローベ (それぞれ 5×10^8 cpm/ μ g) を20 μ lの10 mM PIPES (ピペラジン-N,N'-ビス-エタンスルホン酸, pH 6.4, 0.4M塩化ナトリウム) に溶解したRNAに加え, 62℃, 2時間ハイブリダイズした. 次に, 20 μ lの50 mM トリス塩酸緩衝液(pH 8.3), 8mM塩化マグネシウム, 50mM 塩化カリウム, 100 mMジチオスレイトール, 10 mM dNTP 溶液中で, 10単位の逆転写酵素を用いて, 42℃, 1時間反応させた. これによって伸展したプライマー, すなわちPTH mRNAに対応する79塩基のヌクレオチドと β -actin mRNAに対応する150塩基のヌクレオチドを, 熱によって解離した後, 7M尿素を含む8%ポリアクリラミドゲルで泳動し, オートラジオグラフィーで検出した.

一方, 副甲状腺のみから抽出したRNAへの甲状腺組織の混入を除外するために, サイログロブリンmRNAをドットプロット(23)によって検出した. すなわち, 副甲状腺から抽出したRNA 10 μ gおよび副甲状腺から抽出したRNAの1, 2.5, 5 μ gを, ミニフォルドI (Schleicher and Schuell, Inc., Dassel, Germany)を用いてニトロセルロースフィルターにトランスファーし, 80℃, 2時間で固定した. その後, 5'末端をラベルした合成ラットサイログロブリンプローベ (5'-TCAACAAAGTCGAGACCCACAAGACCAAGG-3'; エクソンIの91から

120塩基に相当)(24)とハイブリダイズした。(条件はPTH mRNAのノザンプロット法と同様)

以上のオートラジオグラフィーは、デンシトメーター (Digital Densitometer DMU-33C; 東洋光学産業) にてスキャンし、定量化が必要な際には、PTH mRNAのバンドと β -actin mRNAのバンドの比を計算した。

1,25(OH)₂D受容体のウエスタンプロット法による測定

腎不全ラットおよび対照群ラットの副甲状腺組織をエタノール麻酔下で摘出し、ただちに液体窒素で凍結した。その後の操作はすべて氷上で行なった。まず、摘出した副甲状腺組織を、KETD-0.3液 (0.01Mトリス塩酸緩衝液, pH7.4, 1mM エチレンジアミン四酢酸三ナトリウム, 5mMジエチオスレイトール, 0.3M塩化カリウム) 中でホモジネートし、165,000gで40分超遠心し、細胞質分画を抽出した。Bradford法にて蛋白量を定量し(25), 50 μ gを11% SDS-ポリアクリラミドゲルで電気泳動した後、ニトロセルロース膜にトランスファーした(26)。

次に、フィルターを、3%BSAを含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (3時間, 25 $^{\circ}$ C), 1%BSAと2-6 μ gのモノクローナル抗体 (9A7 γ) を含むPBS (16時間, 4 $^{\circ}$ C), 3% BSAを含むPBS (10分, 25 $^{\circ}$ C), さらにヨードラベルした抗9A7 γ 抗体 (10⁵ cpm/ml) (2時間, 25 $^{\circ}$ C) の順にインキュベートした(27,28)。なお、それぞれの抗体とインキュベートした後は、ただちに0.05% トゥイーン20を含むTBS緩衝液 (0.05M トリス塩酸, pH7.5, 0.2M塩化ナトリウム) で2時間洗浄した。ニトロセルロース膜を乾燥した後、-80 $^{\circ}$ Cで24から96時間オートラジオグラフィーを行なった。

血清パラメーターの測定

ラットの血液は、眼窩もしくは腹部大動脈から採血した。血清の尿素窒素、クレアチニン、カルシウム、無機リン、アルブミン濃度はオートアナライザー (Hitachi Model 736) にて測定した。

PTHの測定は、ヒトPTH(44-68)に対する抗体 (Immuno Nuclear Cooperation, Stillwater, Minnesota, USA) (29) を用い、キットの指示にしたがって、ラットPTH中間部分分子を標準曲線に用いて測定した。

次に、ビタミンD代謝物はHPLCを用いて抽出、測定した。すなわち、最初に、1mlの血清から2mlの酢酸エチルを用いて3回抽出し、無水硫酸ナトリウムにて脱水後、気化させてn-ヘキサン-イソプロパノール (96:4) に再溶解して、Sep-Pakシリカカートリッジ (Japan Waters Associates, Tokyo) にかけて (30)。10mlのn-ヘキサン-イソプロパノール (96:4) にて25(OH)Dを抽出した後、二水酸化されたビタミンD代謝物をn-ヘキサン-イソプロパノール (80:20) で抽出した。再び脱水後、n-ヘキサン-イソプロパノール (92.5:7.5) に溶解し、Radical-Pak mPorasil HPLCカラム (0.8x10 cm; Japan Waters Associates) にかけて、同じ溶媒で2ml/minの速度で抽出した。次に、1,25(OH)₂Dを含む分画を集め、ラジオレセプターアッセイキット (ヤマサ醤油) を用いて1,25(OH)₂Dを測定した (31)。24,25(OH)₂Dを含む分画は、気化してジクロロメタン-イソプロパノール (98:2) に溶解し、Radical-Pak mPorasil HPLCカラムで再び分画した。これによって抽出した24,25(OH)₂Dを含む分画は、ビタミンD欠乏ラットの血清を用いた競合的蛋白結合アッセイを行なった (32)。

統計および解析

結果は、すべて平均±標準誤差で表わし、対応のあるもしくは

III. 実験結果

部分腎摘後の血清パラメーターおよび副甲状腺の変化

7/8部分腎摘4週間後には、表1に示すように、血清尿素窒素は 13.4 ± 2.7 から 43.6 ± 6.3 mg/dlに上昇し、血清クレアチニンも 0.44 ± 0.02 から 0.91 ± 0.04 mg/dlに上昇しており、慢性腎不全の初期にあると考えられた。この時点において、血清のカルシウム、無機リン、アルブミン濃度は、腎不全群と対照群に有意差がなかった。したがって、直接イオン化カルシウムは測定していないが、恐らく両群で差がないと考えられる。それにもかかわらず、腎不全群でPTH濃度がやや増加していた。さらに、図1に示すように、腎不全ラットの副甲状腺は、肉眼的にも著明に腫大しており、組織学的には過形成が認められた。

表1. 7/8部分腎摘4週後の血清パラメーター

	腎不全群	対照群
Number of animals	9	9
Urea nitrogen, mg/dl	43.7 ± 6.3 *	13.4 ± 2.7
Creatinine, mg/dl	0.9 ± 0.04 *	0.4 ± 0.02
Albumin, g/dl	2.5 ± 0.06	2.6 ± 0.03
Calcium, mg/dl	10.4 ± 0.09	10.2 ± 0.12
Inorganic phosphate, mg/dl	6.5 ± 0.32	6.6 ± 0.14
PTH, pmol/l	198 ± 11.7 *	157 ± 6.67
Body weight, g	484 ± 8.1 *	516 ± 10.0

*: 対照群と比較して $p < 0.05$

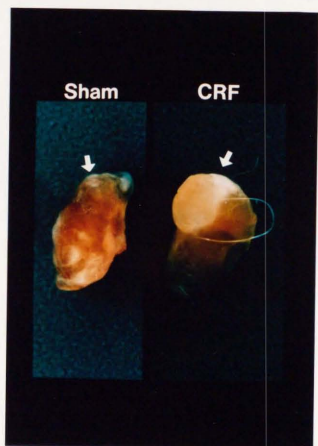


図 1. 対照（左）と腎不全ラット（右）の

摘出甲状腺-副甲状腺組織

腎不全ラットでは著明に腫大した副甲状腺（矢印）が認められる。

腎不全ラットにおけるPTH mRNAレベル

ラット1匹ごとの甲状腺-副甲状腺から抽出したRNA 10 μ g中のPTH mRNAレベルは、図2に示すように腎不全ラットで増加しており、PTH mRNA/ β -actin mRNA比は、対照群を100%とすると、 $326.5 \pm 42.0\%$ ($n=5$)であった。

このPTH mRNAの増加が、副甲状腺での増加を反映しているかを確認するために、5匹分の副甲状腺のみから抽出したRNAを検討したところ、RNA 5 μ g中のPTH mRNAレベルは、図3(a)左に示すように著明に増加しており、PTH mRNA/ β -actin mRNA比は、対照群の10倍以上 (10.8 ± 0.15 倍: $n=4$)であった。腎不全群の副甲状腺では細胞数が増加しているため、細胞数の指標として同時に抽出したDNA当たりのPTH mRNAレベルを検討したところ、図3(a)右に示すようにやはり10倍以上 (10.1 ± 0.46 倍: $n=3$)に増加していた。したがって、慢性腎不全ラットの腫大副甲状腺におけるPTH mRNAレベルは、副甲状腺あたり増加しているだけでなく、細胞当たりも増加していると考えられる。

なお、念のため、副甲状腺検体への甲状腺組織の混入を除外するために、サイログロブリンmRNAの発現を検討した。図3(b)に示すように、副甲状腺から抽出したRNA 10 μ g中のサイログロブリンmRNAの発現は、腎不全群 (lane 5)、対照群 (lane 6)ともに甲状腺から抽出したRNA 1 μ g中のサイログロブリンmRNAと同等かそれ以下であった。したがって、副甲状腺から抽出したRNA中の、甲状腺組織の混入は全体の1/10以下と考えられ、図3(a)で示したPTH mRNAの増加は有意であると考えられる。

血清中のビタミンD代謝物濃度

以上より、初期の腎不全ラットでは、副甲状腺は腫大し、PTHの分泌合成が亢進していることがわかる。それでは、これらの異常の

刺激となりうる変化は何であろうか。まず、表 1 に示したように、血清のカルシウムの低下は見られない。そこで、PTH 分泌合成の調節に重要なもう一つの因子であるビタミン D 代謝物の濃度を検討した。図 4 に示すように、 $25(\text{OH})\text{D}$ 、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 、 $24,25(\text{OH})_2\text{D}$ のいずれも腎不全群と対照群で差がなかった。したがって、初期の腎不全ラットでは、カルシウムの低下が見られず、生理的濃度の $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ が存在するにもかかわらず、PTH の合成、分泌および細胞増殖が亢進していることになる。

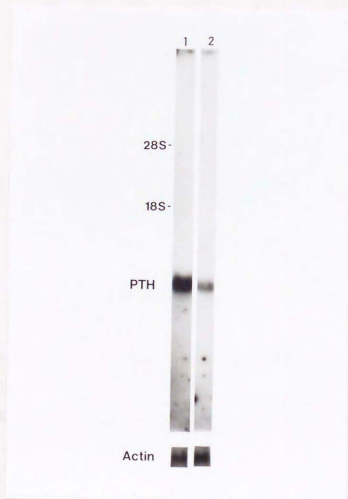


図 2. 7/8腎摘 4 週後の PTH mRNA レベル

腎不全ラット (lane 1) および対照ラット (lane 2) の甲状腺-副甲状腺から抽出した RNA 10 μ g 中の PTH mRNA レベルをノザンブロット法で検討した。腎不全ラットでは、対照群に比べ著明に増加している。

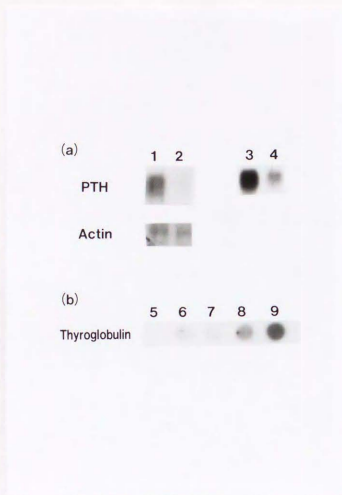


図 3. 副甲状腺組織中の PTH mRNA レベル

いずれの実験でも、ラット 5 匹の副甲状腺組織を合わせて、RNA を抽出した。

(a) 左: RNA 5 μ g 当たりの PTH mRNA および β -actin mRNA レベル (lane 1: 腎不全群, lane 2: 対照群)。

腎不全群で、PTH mRNA レベルは著明に増加している。

(a) 右: 同時に抽出した DNA 10 μ g 当たりの RNA 中の PTH mRNA レベル (lane 3: 腎不全群, lane 4: 対照群)。

腎不全群で、PTH mRNA レベルは著明に増加している。

(b) サイログロブリン mRNA の発現でみた甲状腺組織の混入度。副甲状腺より抽出した RNA 10 μ g (lane 1: 腎不全群, lane 2: 対照群) および甲状腺より抽出した RNA (lane 3: 1 μ g, lane 4: 2.5 μ g, lane 5: 5 μ g)。甲状腺組織の混入は、1/10 以下であり、(a) で示した PTH mRNA の増加は有意であると考えられる。

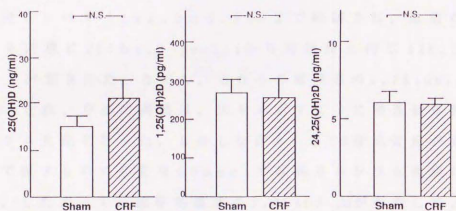


図4. 対照ラットと腎不全ラットにおける
血清中のビタミンD代謝物濃度

25(OH)D (ng/ml), 1,25(OH)₂D (pg/ml), 24,25(OH)₂D (ng/ml)のいずれも腎不全ラット (n=9) と対照ラット (n=12) の間に、有意差は見られない。

薬理量の $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ のPTH mRNAに対する効果

次に、薬理的濃度の $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の効果を検討した。図5(a)に示すように、甲状腺-副甲状腺摘出の24および48時間前に、薬理量の $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を腹腔内投与したところ、PTH mRNAレベルは、用量依存性に抑制を受けた。図5(b)に示すように、体重100g当たり40 pmolの $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を投与すると、PTH mRNAレベルは対照群と同じレベル($112.2 \pm 6.9\%$)まで抑制され、血清のPTHレベルも同様に 200 ± 8.3 pmol/lから対照群と同じ 138.7 ± 6.7 pmolまで抑制された。ただし、これらの薬理量の $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ によるPTH合成、分泌の抑制は、図6に示すように用量依存性の高カルシウム血症を伴った。しかしながら、PTH合成分泌が正常レベルまで復するのに必要な40 pmolでは高カルシウム血症は軽度であり、したがって、薬理的濃度の $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が存在して、初めてPTH分泌合成が正常化したと解釈できる。つまり、初期の腎不全では、生理的濃度の $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ に対する副甲状腺細胞の抵抗性があるために、PTHの合成分泌の亢進ならびに副甲状腺細胞の増殖が起こるのではないかと考えられる。

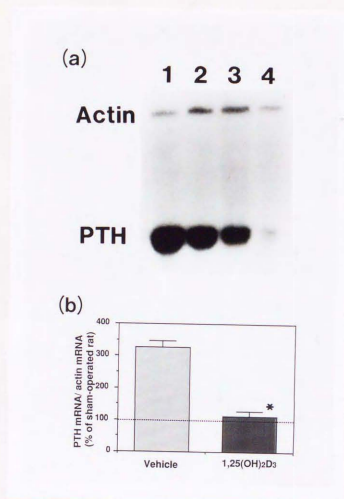


図5. 腎不全ラットのPTH mRNAレベルに対する

1,25(OH)₂D₃の効果

(a) 慢性腎不全ラットに対し、甲状腺-副甲状腺摘出24,48時間前に1,25(OH)₂D₃を腹腔内投与しPTH mRNAおよび β -actin mRNAを検出した。投与量は体重100g当たり、lane 1: vehicleのみ、lane 2: 20 pmol, lane 3: 40 pmol, lane 4: 80 pmol

(b) 体重100g当たり40 pmol投与した際のPTH mRNA/ β -actin mRNA比。対照群のPTH mRNA/ β -actin mRNA比を100%として表わした。40 pmol投与で、正常化している。

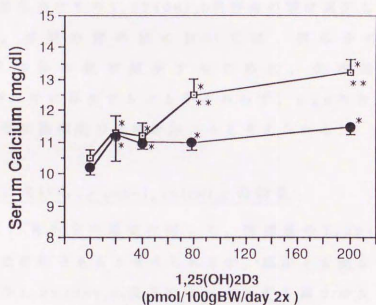


図6. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 投与後の血清カルシウム濃度

血清カルシウム濃度は、甲状腺-副甲状腺摘出の採血を用いた。血清カルシウム濃度は、腎不全群 (□)、対照群 (●) のいずれも $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 投与により上昇している。同じ用量でも、腎不全群の上昇が、対照群の上昇より大きいことに注意。

*は、vehicle投与ラットに対する有意差、**は同じ投与量の対照群に対する有意差を表わす。

1,25(OH)₂D受容体数の変化

次に、生理的濃度の1,25(OH)₂Dに対する抵抗性の本態を明らかにするために、副甲状腺における1,25(OH)₂D受容体の数を、ウエストンブロット法にて検討した。図7に示すように、腎不全ラットの副甲状腺では、蛋白当たりの1,25(OH)₂D受容体の数は減少していた。したがって、初期の腎不全においては、何らかの原因で1,25(OH)₂D受容体の数が減少するために、生理的濃度の1,25(OH)₂Dが血中に存在するにもかかわらず、PTHの合成、分泌が亢進し、副甲状腺細胞の増殖が起こると考えられる。

腎不全ラットにおける22-oxa-1,25(OH)₂D₃の効果

したがって、腎不全の患者に対して、薬理量の1,25(OH)₂D₃を投与することは有効であると考えられるが、臨床上也図6でも示したような大量の1,25(OH)₂D₃投与によって生ずる高カルシウム血症が問題となる。そこで、最近正常ラットにおいて、高カルシウム血症を生ずることなく、PTHの合成分泌を抑制することが示されている22-oxa-1,25(OH)₂D₃の効果を、腎不全ラットで検討した。

図8(a)に示すように、22-oxa-1,25(OH)₂D₃は1,25(OH)₂D₃よりも弱いですが、PTH mRNAレベルを有効に抑制した。図8(b)に示すように、体重100g当たり200 pmolの22-oxa-1,25(OH)₂D₃の投与で、PTH mRNA/ β -actin mRNA比は対照群と同等(85.4 \pm 0.7%)に復し、血清PTH濃度も対照群と同等(141.2 \pm 13.0 pmol/l)まで低下した。しかし、この用量では、1,25(OH)₂D₃とは対照的に全く高カルシウム血症を生じなかった(図9)。

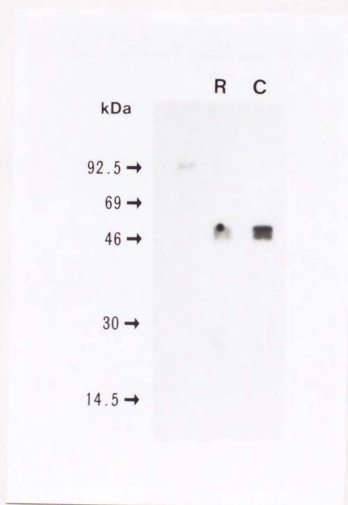


図 7. 副甲状腺における $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 受容体

副甲状腺から抽出した蛋白 $50\mu\text{g}$ 中の $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 受容体をウエスタンブロット法にて検出した。腎不全群 (R) では、対照群 (C) に比べ減少している。

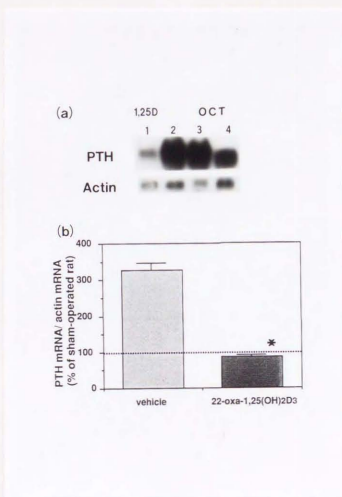


図 8. 22-oxa-1,25(OH)₂D₃によるPTH mRNAの抑制

(a) 甲状腺-副甲状腺より抽出したRNA 10μgあたりのPTH mRNAレベルをノザンプロット法にて検討した。

投与量は体重100g当たり, lane 1: 1,25(OH)₂D₃を200 pmol, lane 2: vehicleのみ, lane 3: 22-oxa-1,25(OH)₂D₃を40 pmol, lane 4: 200 pmol

(b) 22-oxa-1,25(OH)₂D₃ 200 pmol投与後のPTH mRNA/ β -actin mRNA比は正常レベルまで抑制される。

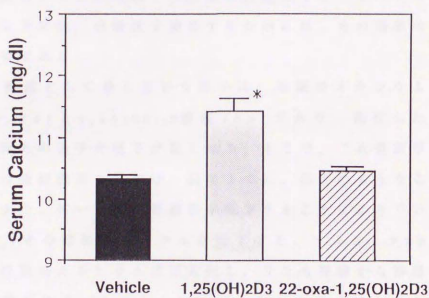


図9. 22-oxa-1,25(OH)₂D₃投与後の血清カルシウム濃度
 体重100g当たり200 pmol投与しても、1,25(OH)₂D₃とは対照的に、
 22-oxa-1,25(OH)₂D₃では高カルシウム血症は見られない。

IV. 考察

二次性副甲状腺機能亢進症は、言うまでもなく、慢性腎不全患者の骨病変の中心をなす病態である(1, 2)。活性型ビタミンD製剤が使用可能になってから久しいが、いまなお維持透析患者のほとんどがその経過中に二次性副甲状腺機能亢進症を呈するのが現状であり、有効な予防法、治療法を開発するためには、その病態の完全な解明が必要である。

PTH分泌刺激として最も重要な因子は、血清のカルシウムイオン濃度(33, 34)と $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 濃度(35)であり、進行した腎不全ではこの両方の因子の低下が見られる。そこで、二次性副甲状腺機能亢進症の発症機序としては、現在までに、以下のようなことが考えられてきた。第一には、腎機能が低下することによりリンの蓄積が起こり、その結果カルシウムが低下する。すると、PTHが分泌され、その結果カルシウムは正常化し、リンも腎臓から排泄が促進されて正常化する。しかし、PTHは上昇したままになるというものである(3)。これは、古典的なtrade-off理論と呼ばれるもので、進行した腎不全の場合に当てはまる病態である。しかし、初期の腎不全では血清リン濃度はむしろ正常から低めの場合が多く、この理論はあてはまらない。第二の理論は、早期の腎不全にもあてはまるもので、腎機能がわずかに低下すると、リンの蓄積が生じ(これは必ずしも血清リン濃度が上昇するという事ではない。)、その結果 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 産生が低下する。すると、PTHの骨における作用が充分発現しなくなりカルシウム濃度が低下するため、PTHの分泌は亢進する(4)。PTHによって、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 合成は促進されその血中濃度は正常化するが、PTHは上昇したままになるというものである。確かに、初期から中期の腎不全患者に対して、腎機能の低下に応じて食事のリンを制限することにより、

1,25(OH)₂D濃度が正常化し、二次性副甲状腺機能亢進症の発症も抑制されるという事実は、この理論を支持する(36)。

しかし、いままでの仮説には、いくつかの問題がある。第一は、どこに視点を置くかによって、何が原因で何が結果かわからなくなる点である。第二には、二次性副甲状腺機能亢進症が発症すると思われる非常に初期での検討が不十分であるということである。第三には、これまで二次性副甲状腺機能亢進症は血中のPTH濃度、すなわちPTH分泌の面からのみ検討されている点である。他の内分泌臓器でもそうであるが、長期にわたる分泌亢進は、産生の増加、さらには産生細胞の増殖を伴うはずである。しかし、このような観点からの検討は最近になってやっとなされ始めたにすぎない。

PTHはペプチドホルモンであり、その合成はPTH遺伝子から特異的なmRNAに「転写」されることから始まる。次に、リボソーム上でPTH mRNAはpre-pro-PTHに「翻訳」される。Pre-pro-PTHは、そのシグナルペプチドによって認識されて、小胞体の内腔を経てゴルジ装置に入り、pro-PTHからPTHにプロセスされる。最終的に分泌顆粒の中に貯蔵されたPTHは、適切な刺激(例えば低カルシウム血症)によって細胞外に分泌されるか、一定の時間がたつと分解されるという運命をたどる(37)。持続的な分泌刺激は、当然ながら合成の亢進につながるはずである。PTH遺伝子のクローニングがされてから、この合成調節機構についての研究が進み、合成も特に転写段階で細かく調節されていることが明らかになってきている。

PTH合成調節に重要な因子は、分泌と同様にカルシウムイオンと1,25(OH)₂Dの濃度である。まず、細胞外のカルシウムイオン濃度によって培養副甲状腺細胞のPTH mRNAレベルが調節される(6)ことはすでに証明されていたが、Yamamotoら(7)は正常ラットで、EGTAを含む溶液を持続注入してカルシウム濃度をわずかに下げると48時間後にPTH mRNAが増加し、逆に塩化カルシウムを持続注

入してカルシウム濃度をわずかに上げるとPTH mRNAが抑制されることを示した。(もっと急激なカルシウム濃度の変化では、さらに短時間にPTH mRNAレベルの変化が証明されている。)したがって、進行した慢性腎不全に見られる程度の低カルシウム血症でも、PTH合成はmRNAレベルで亢進していることが推察される。細胞外カルシウムイオン濃度によるPTHmRNAレベルの調節機序に関しては、最近のOkazakiらのヒトPTH遺伝子の5'上領域の塩基配列を使ったCATアッセイによると、この調節は転写段階で行なわれており、転写開始点より約3.5kbp上流に存在する6bpのパリンドローム(この配列は、AP-1やCREBなどの遺伝子制御蛋白を認識する配列に類似している)が、高カルシウム濃度によるPTH遺伝子の転写抑制に関与していることが示されている(38)。

次に、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ は、PTH遺伝子の転写を抑制するもう一つの重要な因子である。すなわち、*in vitro*では培養副甲状腺細胞のPTH mRNAレベルを $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を加えることで抑制できる(8)。*In vivo*では、ビタミンD欠乏状態ではPTH mRNAレベルが上昇しており(39)、逆に $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 投与によって抑制されることが示されている(9)。 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ はステロイドホルモンの一種であり、細胞の核内にある受容体のホルモン結合部位に結合して受容体の三次構造を変え、受容体のDNA結合部位が特定の遺伝子の転写を調節することによってその作用を現す(40)。ヒトPTH遺伝子では、転写開始部位より-212から-353bp上流域が $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ による転写抑制に関係していることが知られており、この部位に結合する核蛋白も証明されている(41)。

以上を総合すると、生理的状态ではPTH遺伝子の転写は生理的濃度の細胞外カルシウムと $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ によってある一定のレベルに抑制されていると考えられる。進行した慢性腎不全では血清カルシウムイオンおよび $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 濃度の低下が見られるので、以上に述べた正常におけるPTH合成調節機構から考えると、副甲状腺

でのPTH合成はmRNAレベルで亢進していると予想される。しかし、これが正しいのか、初期の腎不全でも成り立つのかについては最近までほとんどデータがなかった。

本研究の7/8部分腎摘ラットを用いた実験では、腎摘後4週目に、血清クレアチニン濃度は正常の2倍に上昇しているが、血清カルシウムも $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 濃度も低下していない状態で、副甲状腺の肉眼的な腫大が認められ、PTH mRNAレベルは著明に上昇していた。PTH mRNAレベルは細胞当りに換算しても増加しており、慢性腎不全の副甲状腺は非常にhyperplasticであると同時にhypertrophicであると考えられる。さらに、このPTH mRNAレベルの上昇は、薬理量の $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 投与によって正常まで抑制可能であった。

この結果はどのような病態を示すのだろうか。1番目の可能性は、一種のtrade-off理論で、何らかの原因でPTHが上昇することによって、腎不全によって低下していた血清カルシウムイオンと $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ が正常に復したとする従来からの考え方である。これを逆に、副甲状腺の側に生理的濃度の $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ に対する抵抗性があると考えることも可能である。Korkor(12)によって報告された透析患者の副甲状腺の $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 結合能の減少は、affinityは変わらないことから $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 受容体数の減少を意味しており、この理論を支持するものである。同様の $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 結合能の減少は、腎不全動物モデルの副甲状腺細胞でも報告されている(42,43)。本研究の初期腎不全モデルラットでは、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 受容体の数が、蛋白質の量としても減少していることが証明された。したがって、何らかの原因で、慢性腎不全の極めて初期から $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 受容体数の減少が起これ、その結果生理的濃度の $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ に対する抵抗性が生じて、二次性副甲状腺機能亢進症が発症するものと考えられる。

それでは、この $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 受容体数減少の原因は何だろうか。

1,25(OH)₂D₃は正常動物の小腸(44)や副甲状腺(45)の1,25(OH)₂D₃受容体をup-regulateして、さらにその効果を現すことがmRNAレベルで報告されているが、腎不全ラットで検討した論文では1,25(OH)₂D₃受容体mRNAレベルに変化がなく(46)、腎不全ではむしろ1,25(OH)₂D₃受容体のup-regulationが起こりにくいことが、1,25(OH)₂D₃受容体数の減少につながっている可能性がある。

一方、著明な副甲状腺過形成も、慢性腎不全に伴う二次性副甲状腺機能亢進症の特徴である。最近の研究によると、副甲状腺細胞の増殖抑制にも1,25(OH)₂D₃が関与していることが判明した。すなわち、1,25(OH)₂D₃がin vivoで副甲状腺細胞の³H-thymidineの取り込みを抑制し(47)、in vitroで副甲状腺細胞のc-mycの発現を抑制する(48)ことが報告されている。本研究の初期腎不全モデルでは、低カルシウム血症も1,25(OH)₂D₃の低下もないうちから、副甲状腺細胞の著明な増殖が見られた。さらに、preliminaryなデータであるが、慢性腎不全ラットでは対照ラットに比べて、副甲状腺でのc-mycの発現が増加しており、これも薬理的濃度の1,25(OH)₂D₃によって正常まで抑制可能であった。このことから考えると、慢性腎不全における副甲状腺細胞増殖に対しても、生理的濃度の1,25(OH)₂D₃に対する抵抗性が関与しているものと考えられる。

さて、このように見てくると、最近長期透析患者に対してさかんに行なわれている1,25(OH)₂D₃パルス療法の理論的根拠が整理されてくる(10,11)。パルス療法を開始すると、しばらくして血清PTH濃度は減少を始める。これは、副甲状腺に従来の活性型ビタミンD療法で得られる生理的濃度の1,25(OH)₂D₃に対する抵抗性があり、超生理量の1,25(OH)₂D₃によって始めて抑制可能であると考えられ、機序的にはPTH分泌に対するカルシウムのセットポイント(PTH分泌を50%に抑制するカルシウム濃度)が上昇していた(49)のを正常に復したと説明されている(50)。これに加えて、本研究の動

物モデルのように、長期的にはPTHの合成も抑制しているものと考えられる。さらに、私のグループが慢性透析患者で示したように、副甲状腺細胞の増殖を押さえ、腫大副甲状腺の退縮へとつながるものと思われる(51)。

パルス療法のような $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 大量投与は、本研究の動物モデルでも示したように、慢性透析患者においてしばしば高カルシウム血症を生ずる(11)。特に最近アルミニウム骨症(52)を予防するために、リン吸着剤として炭酸カルシウム(53)が使われるようになっており、さらに重要な臨床上問題となっている。したがって、高カルシウム血症をきたさずに二次性副甲状腺機能亢進症を抑制する薬剤の開発が重要である。最近、細胞分化能の強力なビタミンD誘導体として開発された $22\text{-oxa-}1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (13)が、血清カルシウム濃度を上昇させずにPTHの合成、分泌を抑制するという報告がなされた(14)。そこで、腎不全モデルラットでこの誘導体の効果を検討したところ、まったく高カルシウム血症を生じずに、PTHの分泌合成を正常化することが可能であった。したがって、 $22\text{-oxa-}1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は、慢性腎不全患者で高カルシウム血症の危険を伴わずに二次性副甲状腺機能亢進症をコントロール出来る薬剤として有望である。 $22\text{-oxa-}1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が、どのような機序でPTH分泌合成を抑制するのかに関しては、まだ充分にはわかっていないが、血中で多くが遊離状態で存在し(54)、副甲状腺に多く蓄積する(55)ためである可能性が報告されている。しかし、これだけでは $22\text{-oxa-}1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の著明な臓器特異性は説明不能であり、レチノイド受容体で証明されているような受容体のサブタイプが、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 受容体でも存在する可能性は検討されるべきであろう。

V. まとめ

以上のように、初期の慢性腎不全における二次性副甲状腺機能亢進症をPTH分泌の面だけでなく、PTH合成、副甲状腺細胞増殖の面から検討してみると、従来考えられてきた病態とは別に、副甲状腺自身の生理的濃度の $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ に対する抵抗性が、二次性副甲状腺機能亢進症の発症に関与している可能性が示唆される。すなわち、図10に示すように慢性腎不全では、その初期から副甲状腺細胞の $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 受容体数が減少するため、生理的濃度の $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ が血中の存在していたとしても副甲状腺に対する抑制効果が不十分となり、その結果としてPTH分泌のセットポイントは上昇し、PTH合成は亢進し、副甲状腺細胞は増殖するという考え方である。したがって、薬理的濃度の $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を投与するパルス療法は、理論的にも有効と考えられる。さらに、新しいビタミンD誘導体である $22\text{-oxa-}1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は、パルス療法の欠点である高カルシウム血症生じないでPTHの合成分泌を抑制する薬剤として期待される。

今後は、なぜ腎不全で $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 受容体数が減少するのか、それを防止するためには腎不全のどの段階で何をしなくてはならないかが解決すべき第一の問題と考えられる。また、新しいビタミンD誘導体の開発、さらに $22\text{-oxa-}1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の作用機序についても解明が望まれる。

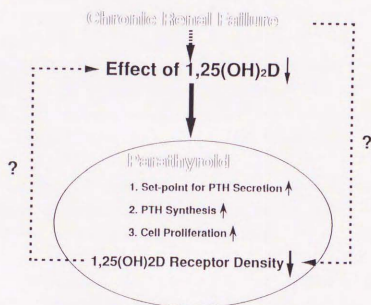


図 10 : 初期腎不全における
 二次性副甲状腺機能亢進症発症機序モデル

謝 辞

この研究をまとめるにあたり、参考論文の共著者である要仲也、五十嵐徹也、尾形悦郎、黒川清の各氏に深謝します。さらに、技術的に多大な助力を頂いた易虹氏、大和英之氏、また技術的な助言と指導を頂いた清野佳紀氏のグループに感謝いたします。

参考文献

1. Malluche H, Faugere MC: Renal bone disease 1990: An unmet challenge for the nephrologist. *Kidney Int.* 38: 193-211, 1990
2. Coburn JW, Llach F: Renal osteodystrophy, In *Clinical Disorders of Fluid and Electrolyte Metabolism.*, edited by Maxwell MH, Kleeman CR, Narins RG, Fourth edition, New York, McGrawHill Book Company, 1987, p985
3. Slatopolsky E, Caglar S, Pennell JP, Canterbury JM, Reiss E, and Bricker NS. On the pathogenesis of hyperparathyroidism in chronic experimental renal insufficiency in the dog. *J. Clin. Invest.* 50: 492-499, 1971
4. Massry SG, Coburn JW, Lee DNB, Jowsey J, and Kleeman CR. Skeletal resistance to parathyroid hormone in renal failure: Study in 105 human subjects. *Ann. Int. Med.* 78:357-364, 1973
5. Heinrich G, Kronenberg HM, Potts Jr. JT, Habener JF: Gene encoding parathyroid hormone. Nucleotide sequence of the rat gene and deduced amino acid sequence of rat prepro-parathyroid hormone. *J. Biol. Chem.* 259: 3320-3329, 1984
6. Russell J, Lettieri D, Sherwood LM: Direct regulation by calcium of cytoplasmic messenger ribonucleic acid coding pre-proparathyroid hormone in isolated bovine parathyroid cells. *J. Clin. Invest.* 72: 1851-1855, 1983
7. Yamamoto M, Igarashi T, Muramatsu M, Fukagawa M, Motokura T, Ogata E: Hypocalcemia increases and hypercalcemia decreases the steady state level of parathyroid hormone messenger ribonucleic acid in the rat. *J. Clin. Invest.* 83: 1053-1056, 1989

8. Silver J, Russell J, Sherwood LM: Regulation by vitamin D metabolites of messenger ribonucleic acid for preproparathyroid hormone in isolated bovine parathyroid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 4270-4273, 1985
9. Silver J, Naveh-Many T, Mayer H, Schmelzer HJ, Popovtzer MM: Regulation by vitamin D metabolites of parathyroid hormone gene transcription in vivo in the rat. *J. Clin. Invest.* 78: 1296-1301, 1986
10. Slatopolsky EA, Weerts C, Thielan J, Horst R, Harter H, Martin KJ: Marked suppression of secondary hyperparathyroidism by intravenous administration of 1,25-dihydroxycholecalciferol in uremic patients. *J. Clin. Invest.* 74: 2136-2143, 1984
11. Tsukamoto Y, Nomura M, Takahashi Y, Takagi Y, Yoshida A, Nagaoka T, Togashi K, Kikawada R, and Marumo F: The "Oral 1,25(OH)₂D₃ pulse therapy" in hemodialysis patients with severe secondary hyperparathyroidism. *Nephron.* 57: 23-28, 1991
12. Korkor AB: Reduced binding of [³H]1,25-dihydroxyvitamin D₃ in the parathyroid glands of patients with renal failure. *N. Engl. J. Med.* 316: 1573-1577, 1987
13. Abe J, Takita Y, Nakano T, Miyaura C, Suda T, Nishii Y: A synthetic analogue of vitamin D, 22-oxa-1,25-dihydroxyvitamin D₃, is a potent modulator of in vivo immunoregulating activity without inducing hypercalcemia in mice. *Endocrinol.* 124: 2645-2647, 1989
14. Brown A, Ritter C, Finch J, Morrissey J, Martin K, Murayama E, Nishii Y, Slatopolsky E: The noncalcemic analogue of vitamin D, 22-oxacalciferol, suppresses parathyroid hormone synthesis and secretion. *J. Clin. Invest.* 84: 728-732, 1989

15. Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ: Isolation of biologically active nucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18:5294-5299, 1979
16. Davis LG, Dibner MD, Battey JF: Basic Methods in Molecular Biology, New York, Elsevier Science Publishing Co., Inc., 1986, p133
17. Sambrook J, Fritsh EF, Maniatis T: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second edition, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, p E5
18. Lehrach M, Diamond D, Wozney JM, Boedtker H: RNA molecular weight determination by electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* 16: 4743-4751, 1977
19. Colman A: Expression of exogenous DNA in xenopus oocytes. in *Transcription and Translation: A practical Approach*, edited by Hames BD and Higgins SJ, Oxford, IRL Press Limited, 1984, p49
20. Nudel U, Zakut R, Shani M, Neuman S, Levy Z, Yaffe D: The nucleotide sequence of rat cytoplasmic β -actin gene. *Nucl. Acid Res.* 11: 1759-1771, 1983
21. Davis LG, Dibner MD, Battey JF: Basic Methods in Molecular Biology, New York, Elsevier Science Publishing Co., Inc., 1986, p72
22. Feinberg AP, Vogelstein B: A technique for radio-labelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132: 6-13, 1983
23. White BA, Bancroft FC: Cytoplasmic dot hybridization. Simple analysis of relative mRNA levels in multiple small

cell or tissue samples. J. Biol. Chem. 257: 8569-8572, 1982

24. Musti AM, Avvedimento EV, Polistina C, Ursini VM, Obici S, Nitsch L, Cocozza S, Di Lauro R: The complete structure of the rat thyroglobulin gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 323-327, 1986

25. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal Biochem 72: 248-254, 1976

26. Bummette WH: Western blotting: Electrophoretic transfer of proteins from SDS-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein. Anal. Biochem. 112: 195-203, 1981

27. Pike W, Haussler MR: Monoclonal antibodies as probes in the characterization of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors. Methods Enzymol. 123: 199-211, 1986

28. Pike JW, Sleator NM, Haussler MR: Chicken intestinal receptor for 1,25-dihydroxyvitamin D₃. J. Biol. Chem. 262: 1305-1311, 1987

29. Roos BA, Lindall AW, Aron DC, Orf JW, Yoon M, Huber MB, Pensky J, Ells J, Lambert PW: Detection and characterization of small midregion parathyroid hormone fragment(s) in normal and hyperparathyroid glands and sera by immunoextraction and region-specific radioimmunoassay. Endocrinol. 53: 709-721, 1981

30. Reinhardt TA, Horst RL, Orf JW, Hollis BW: A microassay for 1,25-dihydroxyvitamin D not requiring high performance liquid chromatography: application to clinical studies. J. Clin. Endocrinol. Metab. 58: 91-98, 1984

31. Seino Y, Yamaoka K, Ishida M, Yabuuchi H, Ichikawa M, Ishige H, Yoshino H, Avioli LV: Biochemical characterization of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ receptor in chick embryonal cytosol. *Calcif. Tissue Int.* 34: 265-269, 1982
32. Eisman JA, Hamstra AH, Kream BE, DeLuca HF: A sensitive, precise, and convenient method for determination of $1,25$ -dihydroxyvitamin D in human plasma. *Arch. Biochem. Biophys.* 176: 235-243, 1976
33. Sherwood LM, Mayer GP, Ramberg Jr CF, Kronfeld DS, Aurbach, and Potts Jr JT: Regulation of parathyroid hormone secretion: proportional control by calcium, lack of effect of phosphate. *Endocrinol.* 83: 1043-1051, 1968
34. Mayer GP, and Hurst JG: Sigmoidal relationship between parathyroid hormone secretion rate and plasma calcium concentration in calves. *Endocrinol.* 102: 1036-1042, 1978
35. Chertow BD, Baylink DJ, Wergedal JE, Su MH, and Norman AW: Decrease in serum immunoreactive parathyroid hormone in rats and parathyroid hormone secretion in vitro by $1,25$ -dihydroxycholecalciferol. *J. Clin. Invest.* 56: 668-678, 1975
36. Portale AP, Booth BE, Halloran BP, and Morris Jr. RC. Effect of dietary phosphorus on circulating concentrations on $1,25$ -dihydroxyvitamin D and immunoreactive parathyroid hormone in children with moderate renal insufficiency. *J. Clin. Invest.* 73: 1580-1589, 1984
37. Wiren KM, Freeman MW, Potts Jr JT, and Kronenberg HM: Preproparathyroid hormone. A model for analyzing the secretory pathway. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 493: 43-49, 1987
38. Okazaki T, Igarashi T, Ogata E: Calcium-responsive DNA element in the human parathyroid hormone gene. (abstract) *J.*

39. Hendy GN, Stotland MA, Grunbaum D, Fraher LJ, Loveridge N and Golzman D: Characteristics of secondary hyperparathyroidism in vitamin D-deficient dogs. Am. J. Physiol. 256: E765-772, 1989

40. Carlson-Jurica MA, Schrader WT, and O'Malley BW: Steroid receptor family: Structure and functions. Endocrine Reviews 11: 201-220, 1990

41. Okazaki T, Igarashi T, Kronenberg HM: 5'-Flanking region of parathyroid hormone gene mediates negative regulation by $1,25(\text{OH})_2$ vitamin D_3 . J. Biol. Chem. 263: 2203-2208, 1988

42. Merke J, Hugel U, Zlotowski A, Szabo A, Bommer J, Mall G, Ritz E: Diminished parathyroid $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ receptors in experimental uremia. Kidney Int. 32: 350-353, 1987

43. Brown AJ, Dusso A, Lopez-Hilker S, Finch J, Grooms P, Slatopolsky E: $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ receptors are decreased in parathyroid glands from chronically uremic dogs. Kidney Int. 35: 19-23, 1989

44. Strom M, Sandgren ME, Brown TA, DeLuca HF: $1,25$ -dihydroxyvitamin D_3 up-regulates the $1,25$ -dihydroxyvitamin D_3 receptor gene. Proc Natl Acad Sci USA, 86: 9770-9773, 1989

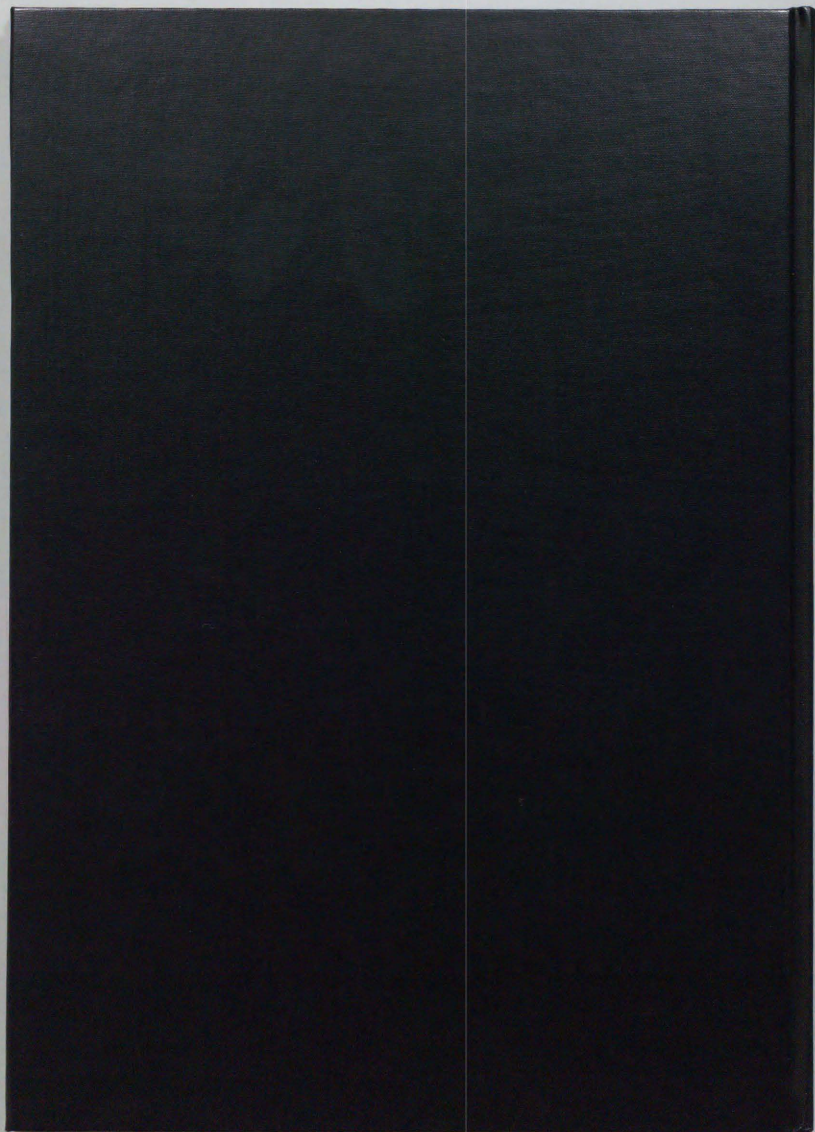
45. Naveh-Manly T, Marx R, Keshet E, Pike JW, Silver J: Regulation of $1,25$ -dihydroxyvitamin D_3 receptor gene expression by $1,25$ -dihydroxyvitamin D_3 in the parathyroid in vivo. J Clin Invest, 86: 1968-1975, 1990

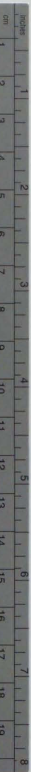
46. Shvil Y, Naveh-Manly T, Barach P, Silver J: Regulation of parathyroid cell gene expression in experimental uremia. J. Am. Soc. Nephrol. 1: 99-104, 1990

47. Szabo A, Merke J, Beier E, Mall G, Ritz E: 1,25(OH)₂ vitamin D₃ inhibits parathyroid cell proliferation in experimental uremia. *Kidney Int.* 35: 1049-1056, 1989
48. Kremer R, Boliver I, Goltzman D, et al: Influence of calcium and 1,25-dihydroxycholecalciferol on proliferation and proto-oncogene expression in primary cultures of bovine parathyroid cells. *Endocrinol.* 125: 935-941, 1989
49. Brown EM, Wilkinson RE, Eastman RC, Pallotta J, and Marynick SP: Abnormal regulation of parathyroid hormone release by calcium in secondary hyperparathyroidism due to chronic renal failure. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 54: 172-179, 1982
50. Delmez JA, Tindira C, Grooms P, Dusso A, Windus DW, Slatopolsky E: Parathyroid hormone suppression by intravenous 1,25-Dihydroxyvitamin D. A role for increased sensitivity to calcium. *J. Clin. Invest.* 83: 1349-1355, 1989
51. Fukagawa M, Okazaki R, Takano K, Kaname S, Ogata E, Kitaoka M, Harada S, Sekine N, Matsumoto T, Kurokawa K: Regression of parathyroid hyperplasia by calcitriol-pulse therapy in patients on long-term dialysis. *N. Engl. J. Med.* 323: 421-422, 1990
52. Nebeker HG, Coburn JW: Aluminum and renal osteodystrophy. *Ann. Rev. Med.* 37: 79-95, 1986
53. Slatopolsky E, Weerts C, Lopez-Hilker S, Norwood K, Zink M, Windus D, Delmez J: Calcium carbonate as a phosphate binder in patients with chronic renal failure undergoing dialysis. *N. Engl. J. Med.* 315: 157-161, 1986
54. Dusso AS, Negrea L, Gunawardhana S, Lopez-Hilker S, Finch J, Mori T, Nishii Y, Slatopolsky E, Martin AJ: On the mechanism for selective action of vitamin D analogs.

Endocrinol, 128: 1687-1692, 1991

55. Kobayashi T, Okano T, Tsugawa N, Masuda S, Takeuchi A, Nishii Y: Metabolism, circulating system and tissue distribution of 22-oxa-1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃, a non-calcemic analogue of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃, in rats. (personal communication)





Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

