

腎虚血再灌流モデルにおける Zn 投与による抗酸化作用

小川 利久

腎虚血再灌流モデルにおけるZn投与による抗酸化作用

小川利久

目 次

1. 研究の背景、目的	-1-
2. 材料および方法	
腎虚血再灌流モデル	-2-
組織過酸化脂質測定の意義	-3-
組織過酸化脂質の測定方法	-3-
血中過酸化脂質の測定	-4-
組織Metallothioneinの測定方法	-4-
その他の方法	-5-
統計法	-5-
3. 結果	-6-
4. 考察	
腎虚血再灌流モデルに関して	-9-
腎虚血再灌流と脂質過酸化について	-10-
Znの体内動態と生理作用	-11-
ZnによるMTの発現誘導とMTの抗酸化作用	-12-
腎虚血再灌流と腎機能について	-13-
Zn投与による虚血再灌流後の腎機能改善効果	-15-
5. 結語	-16-
6. 参考文献	-17-
7. 図表	

研究の背景, 目的

臓器虚血による組織障害は, 血流遮断とそれに引き続く血流再開に伴い発生し, 一旦不可逆的障害を受けると, これに伴い発生する多臓器不全の経過を経て死に至る重要な病態である。代表的疾患として心筋梗塞や脳梗塞があるが, 外科領域においては手術時の臓器の一時的な血流遮断や, 出血, 感染, 臓器移植などに伴ってみられる病態である。その中でも虚血性急性腎不全は日常臨床, 特に外科領域においてしばしば遭遇する疾患で, 大量出血による血圧低下, 心停止後の蘇生状態, 大動脈瘤等の腎血流を遮断する手術, 腎移植, などにおいて発生する。そしてこの病態の主因の一つとして, 腎組織の虚血と再酸素化により発生する活性酸素が注目されている¹⁾。そして, 活性酸素の除去は, これが関与する疾患の治療として有用であると考えられている。現在, 虚血性急性腎不全をはじめとし, 各種臓器の虚血性病変に対してsuperoxide dismutase (SOD)などのfree radical scavengerの投与が検討されている²⁻⁵⁾が, いまだ臨床応用は確立されていない。その理由は血中半減期の短さ, 臓器集積性の問題が解決されていないことによる。

近年, 内因性の重金属抱合蛋白であるMetallothionein (MT)が注目されている。MTは1957年, Valleにより発見された分子量約6000のcysteinに富む蛋白⁶⁾で, Zn, Cd, Cu, Bi等の金属イオンの生体負荷により諸臓器に発現が誘導される。その主な作用は有害重金属の抱合解毒と必須金属の恒常性維持であるが, 近年superoxide anionなどのradical に対するscavengerとしての機能が明らかとなり注目されている^{7,8)}。しかし, 臓器の虚血再灌流(ischemia/reperfusion=I/R)障害において, MTのこのような抗酸化機能を*in vivo*において検証した研究はこれまでにない。

そこで著者は, Zn, Bi等の生体に毒性を持たない金属により安全に組織MTの発現を誘導し, 臓器のI/Rによる障害をMTの活性酸素消去作用を利用することにより軽減しようと考えた。本研究では, ラット腎におけるI/Rモデルを作製し, ラットにMT誘導物質であるZnSO₄を前投与して, 活性酸素による脂質酸化の生成物である腎組織中の過酸化脂質の動向および腎機能の改善状況を検討した。

材料および方法

腎虚血再灌流モデル:

Wistar系雄性ラット(体重250-280g, 東京実験動物)を使用した。飼料は日本クレア社標準飼料(CE-2)(亜鉛(Zn)濃度: 5.1 mg/100g)を自由摂取させた。

ラットにpentobarbital (50mg/kg)を腹腔内投与し、麻酔完了後、右大腿動静脈にポリエチレンチューブ(夏目製作所製, 内径0.5 mm, 外径1.0 mm)を挿入した。動脈ラインは血圧測定のため圧トランスジューサー(PAS-111, Star medical社)に接続し、同時に採血ラインとして使用した。また、静脈ラインからは、循環血漿量を保持し血圧変動を抑える目的で6.25% bovine serum albumin(Sigma Co.)を20 ml/kg/hの速度で実験終了時まで持続投与した。同時にclearance testのため3% inulin(和光純薬工業)を5 ml/kg/hの速度で持続投与した。さらに採尿のため膀胱に小切開を加え、膀胱内にポリエチレンチューブ(内径1.5 mm, 外径2.7 mm)を挿入し固定した。引き続きラットを開腹し、両腎門部を露出した。その後、両腎実質中央部表面にlaser doppler 血流計プローブ(ALF-2100, Advance社, 精度: 0.1 ml/min/100g組織)を装着し、経時的に腎組織血流量を測定した。輸液開始後60分より、30分間にわたり腎clearance testを行った。糸球体濾過量(glomerular filtration rate=GFR)のI/R前値は、inulin clearanceにより求めた。また、同時に血中Zn濃度を測定した。その後組織血流が安定したところで、両側腎動静脈に血管クリップをかけ、30分間血流を遮断した。血流遮断解放後60分の時点より、同様に腎clearance testを行い、I/R後値とした。また、再灌流90分後に血中Zn濃度およびthiobarbituric acid reactive substance(TBARS)を測定し、さらに両腎を摘出し、両腎組織中のTBARS、共役ジエン(conjugated dien=CD)およびMT濃度を定量した。

ラットは以下の3群にわけた。

1. **Zn群** : Zn投与群, I/R開始24時間前にZnSO₄ (Znに換算し20 mg/kg)を腹腔内投与し, 両側腎にI/Rを加える群(n=11).
2. **Saline群** : I/R24時間前に生理食塩水を腹腔内投与し, 両側腎にI/Rを加える群(n=8).
3. **Sham群** : 開腹24時間前に生理食塩水を腹腔内投与し, 開腹後腎門部を露出するが, I/Rを加えない群(n=5).

Zn群, Saline群は, 24時間前の前処置後, 上記の方法でI/Rを加え, 各項目を測定した。Sham群は, 開腹し腎門部を露出するが, 腎への虚血再灌流を施行せず同様の項目について測定をした。Sham群の2回目のclearance testは, 1回目終了時点より120分後に行った。血液は虚血前後の各クリアランステスト終了時に動脈ラインより採取した。(図1)

組織過酸化脂質測定の意義 : 活性酸素による脂質の自動酸化の結果生成する過酸化物質には, 一次生成物のhydroperoxideや, 二次反応生成物であるaldehyde, ketone, alcoholがある。これらは, それぞれに異性体が存在するので生成物の種類は膨大であり, これらをすべて定量することは不可能である。したがって, いくつかの項目を決めて測定し, 脂質の過酸化の指標とすることが一般的である。文献上よく使用されている方法は, malondialdehydeとalkadienalを示すとされるTBARSを測定するTBA法と, 高度不飽和脂肪酸の酸化により生じる共役ジエン(conjugated dien:CD)をもつhydroperoxideとalcoholの和を測定する共役ジエン法であり, 本研究ではこの2つの方法を採用し, 腎組織中の過酸化脂質を測定した。

組織過酸化脂質の測定方法 :

組織TBARSの測定 : Kosugira⁹⁾の方法により測定した。すなわち, 脱血した腎組織を1.15% KClにてteflon homogenizerにてhomogenizeし, この0.1mlに8.1%SDS水溶液0.2ml, 酢酸緩衝液(pH3.5)および1.5 ml, 0.8%BHT酢酸溶液50 μ l, 0.8%TBA水溶液1.5 ml, H₂O 0.7 mlを加え, 5℃で60分間置き, さらに100℃で60分間加熱した。

冷却後、H₂O 1 ml と *n*-butanol, pyridine の 15 : 1 の混合液 5 ml を加え、3000 rpm で 10 分間遠心後、上清液の 532 nm における吸光度 A を分光光度計（島津製作所, UV-1200）にて測定した。湿重量 1 g から生成する赤色色素量（ μ mol）は、赤色色素の分子吸光係数が 156,000 であることより以下の式により算出した。

$$\text{TBARS}(\mu\text{ mol/g wet wt.}) = (A - A_0) / 156,000 \times 5.8 / 103 \times 102 / 3 \times 106$$

(A₀ は試料を含まない対照吸光度)

組織 CD の測定：0.5 ml の homogenate 試料に、2.5 ml の ether/ethanol 混液 (1:3, v/v) を加え振とうした後、1000 g にて 5 分間遠心し、上清の 234 nm における吸光度を測定して定量値とした。

血中過酸化脂質の測定：Yagi 法¹⁰⁾に準じ蛍光法にて測定した。すなわち、血液 50 μ l に 1.0 ml の生理食塩水を加え、4000 rpm で 10 分間遠心し、0.5 ml の上清を採取した。この上清に 1/12 N H₂SO₄ を 4.0 ml 加え、さらに 10% リンタングステン酸を 0.5 ml 加え、4000 rpm で 10 分間遠心した。この沈殿物に 1/12 N H₂PO₄、2.0 ml と 10% リンタングステン酸、0.3 ml を加え再び 4000 rpm で 10 分間遠心した。この沈殿物に 4.0 ml の精製水と 1.0 ml の TBA 溶液を加え、95 °C で 60 分間加熱した。冷却後、5.0 ml の *n*-butanol を加え 4000 rpm で 15 分遠心し、*n*-butanol の層を抽出し、励起波長 515 nm、蛍光波長 515 nm にて蛍光光度計にて測定した。検量線は各濃度の tetraethoxypropane を同様に反応させ作成した。

組織 Metallothionein の測定方法：Onosaka¹¹⁾, David ら¹²⁾の方法による Cadmium-

Hemoglobin Affinity Assay により測定した。すなわち、腎組織を 4 倍量の 0.25 M sucrose 液とともに homogenize し、18000 g で 20 分間の遠心後、上清に 10 ppm CdCl₂ を加えた。これにラット赤血球 hemoglobin 0.2 ml を加え、100 °C で 1 分間加熱した。1000 g で 5 分間遠心後、hemoglobin-添加-遠心操作を 3 回繰り返し、上清の Cd 濃度を原子吸光度計（日立, Z-8200）にて測定した。MT 濃度は、Cd の 6 g 原子が同量の MT (MW=6050) モルに結合することより換算して求めた。

その他の測定法：

血中，尿中inulinは，anthrone法¹³⁾にて分光学的に測定した。

血中，尿中Naは自動分析機(EKTACHEM250,Kodak社)にて測定した。

血中Zn濃度測定：原子吸光度計(Z-8200,日立製作所)にて，Zn標準液による検量線により測定した。

GFR,Fractional Excretion of Sodium(FENa), Δ FENaの算出法：

以下の計算式により算出した。

$GFR(ml/min) = U_{inu} \times UF / P_{inu}$ ， U_{inu} =尿中inulin濃度(mg/dl) P_{inu} =血中inulin濃度(mg/dl) UF =尿量(ml/min)

$FENa(\%) = (U_{Na} / P_{Na} \div U_{inu} / P_{inu}) \times 100$ U_{Na} =尿中Na濃度(mEq/l) P_{Na} =血中Na濃度(mEq/l)

$\Delta FENa = I/R$ 後のFENa-I/R前のFENa(%)

組織標本作製法：

摘出腎組織の一部は10%ホルマリン液に固定し，パラフィンブロックに包埋した後厚さ3 μm の切片を作製し，プレパラートに固定した後hematoxylin-eosin染色を行い光学顕微鏡的観察に供した。

統計法：データは平均値±標準誤差で表した。

3群以上の比較は,analysis of variance(ANOVA)およびpost hocの多重比較検定にて行った。また同群間のI/R前後の値の比較はStudent paired-*t*-testにて行い，いずれも $p < 0.05$ にて有意差ありとした。腎血流量,腎組織MT,過酸化脂質の値は検定の結果左右差を認めなかったため左右腎の平均値として表した。

結果

腎組織血流量の変化：Lasar doppler flowmeter プローブを腎実質中央部表面に固定し、組織血流量を、腎動静脈クランプ前、クランプ後10分、20分、30分及び再灌流後5分、10分、20分の時点で計測した。腎動静脈クランプにより血流量は、Saline群（右腎）：クランプ前=41.2±0.9→クランプ後10分=4.65±0.2,（左腎）：41.3±1.2→4.3±0.3；Zn群（右腎）：40.8±1.1→4.5±0.2,（左腎）：38±2.5→4.4±0.2 (ml/min/100g tissue)に低下した(それぞれ $p<0.001$)。Zn群とSaline群および同群内の左右腎において血流量の有意差は認めなかった。また、クランプ解除により血流量は前値に回復した。左右腎血流の平均値の経時の変化を図2に示した。Laser doppler組織血流計にて測定した組織血流量は、腎動静脈クランプ時に4-5 ml/min/100gとして計測されたが、この値は血流量計の性質上生じた値（いわばブランク値）であると思われ、実際のクランプ中の血流量は0であると考えられる。

血中Zn濃度：(図3)Saline群の平均値106.4 μ g/dlに対し、Zn群の平均値は178.5 μ g/dlであり、両群間に有意差を認めた($P<0.01$)。また、各群のI/R前後の血中Zn濃度の変化については、Sham群は開腹の経過中に、Saline群はI/R後血清中のZn濃度がI/R前に比べ有意に低下した($p<0.05$)。これに対しZn群はI/R後に有意な血中Zn濃度の低下を示さなかった。

尿量の変化：(図4)輸液開始60分後より約5 ml/hrと、安定した利尿を認めた。左右腎動静脈クランプ中は無尿となり、クランプ解除後30分より利尿が生じ、60分過ぎには9 ml/hr前後の尿量となった。各時間の尿量においてZn群とSaline群との間に差は認めなかった。また、この間、血圧の変動は認めなかった。

組織MT濃度：組織MT濃度は、表1に示すようにZn群はSaline群に比べ平均値で2倍以上に増加した($p<0.05$)。また、Sham群に比べSaline群は平均値で増加したが有意差は認めなかった。いずれの群も左右差は認めなかった。

組織TBARS濃度：表1に示すように、Zn群はSaline群と比較し有意に腎組織TBARS濃度は低下した($p<0.01$)。Saline群はSham群と比較し増加する傾向を示したが、有意差はなかった。

組織CD濃度：(表1) Saline群と比較し、Zn群で有意に低下した($p<0.01$)。また、Sham群と比較しSaline群では、I/R後に有意に上昇した($p<0.01$)。

血清中TBARS濃度：表1にその結果を示す。Sham群と比較すると、Saline群で有意にTBARSが増加したが($p<0.05$)、組織中にみられたSaline群とZn群とのTBARS濃度の差は、血清中では認めなかった。

血中Zn濃度とGFRとの相関：(図5) I/R後、GFRと血中Zn濃度との間に正の相関を認めた($p<0.05$)。

GFRの変化：GFRは表2に示すように、Sham群においては開腹操作によって変化はなかったが、Zn群とSaline群は、ともにI/R後に著明に低下した($P<0.01$)。I/R後のGFRはZn群においてSaline群と比較し有意に改善を認めた($p<0.05$)。

FENaの変化：表2に示す様に、Salin,Zn群ともFENaはI/R前に比べI/R後は6-10倍に増加した。I/R後のFENaについては、Zn群は、Saline群と比較し増加を有意に抑制した($P<0.05$)。I/R前値は3群間で差は認めなかった。

Δ FENa：表2： Δ FENaにおいてもZn群においては、Saline群と比較し有意にその増加が抑制された($P<0.05$)。またSham群と比較しSaline、Zn群は有意な増加を認めた($P<0.01$)。

組織所見：虚血性腎障害の組織所見はJablonskiら¹⁴⁾のgrade分類に従った。すなわち grade 1:個々の単一細胞のmitosisやnecrosisを認める。 grade 2:近位曲尿細管細胞すべてのnecrosisを認めるが、これを取り囲む尿細管は正常である。 grade 3:皮質内側縁に延びる壊死帯を伴う近位曲尿細管の遠位1/3に限局した壊死を認める。 grade 4:近位曲尿細管の3つの部分すべてに壊死を認める。

本研究より得られた組織所見は、Zn投与群、生食投与群の2群とも上記分類においては grade 3に該当し、両群の組織学的な所見の差は認めなかった。また、微小血管内に部分的に血栓形成を認めた。

考察

<腎虚血再灌流モデルに関して>

急性虚血性腎不全モデルとして、腎の血行を遮断する方法が一般的に用いられているが、虚血時間、血行を遮断する部位は様々である。Ferwanaら¹⁵⁾によれば、左腎に対して45分間の温虚血を加えた実験で腎動静脈、尿管を腎門部で一括クランプすると、動脈のみのクランプに比べ著しくGFRが低下する。腎虚血モデルとしては尿管を巻き込まない血流遮断がより生理的であろう。虚血時間を60分や75分に設定した研究もあるが、いずれも生存率を比較した長期的実験であり^{16,17)}、急性実験では、腎機能を比較するには腎の障害が強すぎる。Chintalaら¹⁸⁾の行った片腎40分虚血における腎機能の比較においても、GFRは0.2 ml/min以下になる。著者の行った予備実験においても、虚血時間45分を越えると再灌流後利尿が得られない個体が生じ、尿のサンプルが得られずクリアランステストが行えない事、虚血10分では再灌流後の腎機能Sham群と差がない事が判明した。以上の背景により本研究における虚血時間を30分と設定した。

筆者は、予備実験で右腎を摘出し、左腎の代償機能が安定するといわれる14日後に左腎に対しI/Rを負荷する実験系を採用したが、開腹し右腎を摘出するという手術侵襲がすでにMTの発現を誘導する因子となるという事実¹⁹⁾があり、これによりZn投与によるMTの誘導が修飾された可能性が生じたこと、腎摘後の片腎にさらにI/Rを負荷すると重篤な腎障害をきたし、腎機能の面からの比較検討が困難になったことより、本研究においては両側同時腎虚血モデルを採用した。

I/R後の尿量の推移についての詳細な文献は見あたらないが、再灌流初期においては非乏尿性急性腎不全となり、利尿は得られるとの報告が多い^{20,21)}。本研究においても再灌流後30分より、I/R前を上回る著明な利尿をみとめた。

＜腎虚血再灌流と脂質過酸化について＞

臓器虚血とそれに引き続く血流再開後の細胞障害機序に関しては、現在のところMcCordの説²¹⁾が有力である。すなわち、細胞がhypoxiaやischemiaにさらされると細胞内mitochondriaにおけるATPの分解が進行し、AMP,adenosine,inosineを経てhypoxanthineとなる。Hypoxiaにより、細胞内に蓄積したCa⁺⁺イオンの存在下にxanthine dehydrogenaseはxanthine oxidaseとなり、この酵素の働きにより流入したO₂の一部は電子の供与を受け、O₂⁻となって細胞障害性に働く。さらに、O₂⁻は水素イオンと反応しH₂O₂を生成し、またH₂O₂はFeイオンの存在下でO₂⁻と反応しhydroxyl radical(OH・)を発生させる。これらの活性酸素種はいずれも細胞障害に寄与する。実際、虚血時よりも再灌流時において細胞障害は強く、この細胞障害は細胞内Ca⁺⁺イオンの増加と連動している^{22,23)}。

そして、I/Rにおいて生じた活性酸素は、不飽和脂肪酸における水素原子引き抜きによる脂質peroxyradical(LOO・)の生成を開始反応として自動酸化反応を引き起こし、脂質hydroperoxide(LOOH)を生成蓄積する²⁴⁾。

現在このような組織の活性酸素の発生状態を把握するために、一般的には最終生成物である過酸化脂質を定量する方法がとられている。それは、組織で発生する活性酸素を直接検出することは、反応性に富みかつ反応時間がきわめて短いため、非常に困難であるからである。実際、一定時間の虚血とそれに引き続く再灌流の後には組織過酸化脂質は増加するという報告が多い。たとえば、腹腔動脈に対するI/Rにより胃粘膜の過酸化脂質は増加する²⁵⁾。また、肝²⁶⁾、肺²⁷⁾、脳²⁸⁾、心臓²⁹⁾に対するI/RにおいてもMDAが上昇する。腎においては、Pallerら³⁰⁾の、左腎動脈を60分クランプし、15分再灌流させた実験では、組織過酸化脂質は有意に増加した。そして、SODの投与によりこの増加は抑制された。本研究においては、Sham群と比較しSaline群ではI/Rを加えることにより有意なTBARSの上昇は認めなかった。しかし、Zn群では、Saline群に比べてTBARSの抑制を認めた(表1)。以上の結果がZnそのものの作用か、Znにより誘導されたMTによる作用によるかは断定できないが、少なくともZn投与により抗酸化作用を示したことは確認できた。

〈Znの体内動態と生理作用〉

今回のモデルではZnSO₄を経腹的に投与した。この結果、24時間後の血中Zn濃度は、Saline投与に比べて有意に上昇した(図3)。ラットの経口投与による血中濃度のピークは投与後1時間であり、8時間後には内因性濃度に復する³¹⁾ことがわかっている。本研究においては、腹腔内投与においてかなり長時間にわたり血中Zn濃度が維持された。

ヒトではZnを経口投与すると、血中のZn濃度は投与後120-180分でピークに達し、以後漸減しつつ6-8時間後には投与前の濃度に戻る³²⁾。また、ラットにおけるZnの動態は、日リズムを示さず、内因性濃度はヒトよりやや高い³³⁾。

Znの投与量とMTの発現量に関しては、小山ら³³⁾の検討結果によれば、Znとして16 mg/kgをマウスに皮下投与すると腎のMTは投与4時間後はまだ投与前と変化なかったが、24時間後には投与前の4倍強に増加していた。同様に筆者らの予備実験において、Znとして10 mg/kg、20 mg/kg投与の検討をおこなったが、20 mg/kg投与、24時間後の腎組織におけるMT発現量が最大であったことより、Znの投与量を20 mg/kgと設定し、腎I/RはZn投与24時間後に行うこととした。

一方、Znの毒性は他の重金属にくらべて低い³⁴⁾と言われている。ラットにおけるZnSO₄・7H₂Oの中毒量は50 mg/kgとされているので、本実験における投与量がラットに及ぼす影響は少ないと思われた。事実、Zn投与群の実験前の摂食状態、実験中の血圧、尿量は生食投与群と比べ差はなかった。

Znは多岐にわたる薬理作用を有し、生体内に広く分布する重要な微量元素の一つで、MTと同様、それ自身にも抗酸化作用がある³⁵⁾ことが知られている。Tammyら³⁶⁾は、低Zn食ラットと通常食ラットの肺、肝のmicrosomeにおける活性酸素の発生を電子スピン共鳴法により検討したが、低亜鉛食ラットでは、明らかに活性酸素の発生が増加していた。さらにBeswickら³⁷⁾は、Znがヒト多核白血球からのsuperoxide産生を抑制すると報告している。また、Girotti³⁸⁾らは、Znがxanthine系およびFeによる膜の脂質過酸化を抑制すると報告した。近年、ZnとL-carnosineのキレート化合物が抗潰瘍剤として開発されたが、

Yoshikawaら³⁹⁾は、この化合物の抗酸化作用を、電子スピン共鳴法によるヒト多核白血球の活性酸素産生能およびラット脳homogenate、肝microsomeにおけるTBA反応から検討し、強力な抗酸化能を有すると報告した。そして、この抗酸化作用はおもにZnによる作用であろうと述べている。以上のようなZnの抗酸化作用機序としてはSH基に対する感受性を低下させたり、CuやFeなどの酸化能を有する金属と競合し、電子伝達能を減弱させるなどが考察されている⁴⁰⁾がなお不明な点が多い。

血清Zn濃度と手術侵襲との関係については、多くの知見が得られている⁴¹⁻⁴⁴⁾。いずれの報告においても、手術侵襲やendotoxin投与により血中Zn濃度は減少する。手術侵襲により血清、肝などのMT濃度が上昇し、このMTがfree Znと結合することで血中Znの減少を来すとされ⁴³⁾、血中Zn濃度の減少とともに血中MT濃度の減少を認めれば、真のZn欠乏状態であるといえる。本研究では、I/Rもしくは腎門部露出という侵襲を加えると、Zn非投与群で有意に血中Zn濃度が減少した。しかし、Znをあらかじめ投与しておく、I/R負荷によっても血中Zn濃度は変化しなかった(図3)。Zn群でI/R後に血中Zn濃度が低下しない理由は、Satohら⁴⁵⁾によればZn腹腔内投与24時間後に腎組織MT濃度は約8倍に上昇するので、Zn投与によってI/R前にすでに組織Zn-MTが増加し、血中ZnがMTに補足されないためであろうと筆者は考える。

<ZnによるMTの発現誘導とMTの抗酸化作用>

MTは1957年、Valleによりウマの腎臓から発見された蛋白で、1分子に6原子のZn,Cu,Cdなどの金属イオンを含む。Cysteinのthiol基はすべて金属イオンに配位し熱に安定である。MTは生物種に広く分布し、その主な生物学的作用はCd,Hgなどの有害金属イオンの抱合解毒作用、Zn,Cuなどの必須金属の生体負荷であるが、金属以外にも有機溶媒、cytokine, stress等様々な因子により発現が誘導される。実験的には、組織MTの発現を誘導させるためZnやBiを投与することが多い⁴⁵⁻⁴⁸⁾。本研究では、Zn 20mg/kg投与により腎組織MTはSaline投与群と比較し2倍以上に増加した(表1)。また、Zn投与は組織中のSODやGSHなどの他の抗酸化物質濃度に影響を与えない⁴⁹⁾ため、Zn投与により誘導されたMTはI/Rに

よる組織障害の軽減に大きく関与したことを示唆する。

Free radical scavengerとしてのMTの機能は、*in vivo*, *in vitro* 両面から検討されている。Shiraishiら⁷⁾およびThornallyら⁸⁾は、1982年および1985年にそれぞれMTが O_2^- を消去することを発見した。以来free radical scavengerとしてのMTに関する多くの知見が得られた。たとえば、Zn, Cd, MnによるMT誘導マウスでは、放射線照射による致死率(LD₅₀)を改善する⁴⁷⁾。遊離肝細胞において培養液中のZn濃度を増すと、活性酸素の生成が減少する⁴⁸⁾。また、Cd-MTによりhydroxyl radicalによるDNAの断片化が抑制される⁴⁹⁾。これらはいずれもZn, Bi, Cd等により誘導されたMTが、抗酸化的に作用していることを示している。

MTのradical scavenging作用の機序として様々な推論が挙げられている。すなわち、MTはthiol基に富むが、hydroxy radicalの最初のattackがこのthiol基であるとする説⁸⁾、oxidative stressに会うとMTがZnを放出し、このZnの抗酸化作用、膜安定化作用により抗酸化作用を示すとする説⁵¹⁾、このZnがFeの細胞内移行を抑制し、NADPH-cytochrome C reductaseを阻害し、GSH peroxidase活性を増加させることによるとする説⁵²⁾、MTがFeとchelateを形成することで、Fenton反応の進行を抑制するという説^{53, 54)}、MTはGSH peroxidaseと共同して抗酸化作用を示すとする説⁵⁵⁾、などであるが、これらすべてが複合的に抗酸化作用を発揮している可能性もある。

<腎虚血再灌流と腎機能について>

本研究では腎虚血後90分の観察時間を置き腎機能を評価した。I/R後の腎機能の推移に関しては様々な報告がなされている。Dagherら¹⁶⁾によるウサギ両側腎に対する60分虚血および再灌流後120分のGFRは前値の22%に低下したが、虚血時間が本研究より長いにもかかわらずGFRの低下率は同様の傾向を示した。Ferwanaら¹⁵⁾による、片腎に対する45分間の虚血とその後の240分間の再灌流実験では、GFRは虚血前の1%以下に低下した。Chintalaら¹⁸⁾は、ラット片腎に40分間虚血を加え、再灌流150分後の腎機能を評価した結果GFRはI/R前の1/4に低下した。本研究ではこれほどの強い腎機能障害は認めなかった

が、その理由として虚血時間が30分と短かったこと、両腎に対する虚血を行ったことが考えられる。片腎のみのI/Rは、より腎機能障害が高度になるようである。

急性虚血性腎不全では、尿細管は最終的に壊死に陥る^{56,57}。本研究ではGFRに加えて尿細管機能の評価となりうる¹⁸EFNaをもう一つの腎機能の指標とした。尿細管が障害を受けるとNa再吸収が減少しFE_{Na}が増加する。Chintalaら¹⁸の報告では、片腎で40分間の虚血後に150分間再灌流すると、FE_{Na}は10倍以上に上昇した。同様にDagherら¹⁶のウサギ両側60分腎虚血のモデルでは、FE_{Na}は20倍以上に上昇した。そして、SODの投与は近位尿管の細胞障害を軽減した⁵⁸。本研究においてもI/R後のFE_{Na}はきわめて高値であり、尿管の障害が強かったことを示している。組織所見においてもJablonskiの分類¹⁴において grade 3の尿管障害を認めた。

これより長時間の観察はいずれも血清creatinine(Cr),BUNを腎機能の指標として検討されている。Hughesら⁵⁹によれば、ラット片腎に対する40分の虚血後BUN,Crは24時間後にはピークに達しそれぞれ120,5.5に上昇した。Pallerら³⁰によれば、片腎に対する60分の虚血後24-36時間の時点で血清Cr値は最大値となり、7日後には前値に回復した。また、Lopes-Nebolinaら¹⁷による片腎に対する75分間の虚血再灌流実験において、血清Crのピークは再灌流48時間後であった。以上の結果より腎虚血再灌流後早期に腎機能は著しく低下し、機能低下のピークは24-48時間後であることが判明した。

ラット腎I/Rがその後の生存率に及ぼす影響は、本研究においては検討できなかった。本研究はいわば急性実験であり、再灌流後2時間以内の腎機能がいかに改善するかを主眼としたためである。この点に関して文献的には以下の知見が得られた。すなわちLopes-Nebolinaら¹⁷によれば、ラット腎の75分間の温阻血再灌流後48時間より生存率が低下しはじめ、7日目は30%に低下した。同時に測定した血清クレアチニンは、再灌流1時間後より上昇を始め、48時間後にピークに達している。また、Bakerら⁵⁸によれば45分のラット腎虚血モデルにおいて再灌流4日目の生存率は60%であった。

<Zn投与によるI/R後の腎機能改善効果>

今回の研究により、Zn投与によるI/R後の脂質過酸化反応の抑制効果は確認できたが、腎機能に対する作用についても検討を加えた(表2)。その結果、I/R後のGFRの低下はSaline群でI/R前の16%に低下したのに対しZn群では26%の低下に留まり、Zn投与により有意にI/R後の腎機能を改善した。また血中Zn濃度とGFRとの間に正の相関が認められた(図5)。

Znはfree radical scavenger作用を持つMTを発現誘導するが、Znそれ自身も膜安定化作用、細胞保護作用を有することが知られている。これらの作用により、I/Rによる障害の標的である腎内微小血管内皮細胞を保護し、白血球の遊走、付着、血小板の付着、凝集を抑制し、微小血流量を保持したのであろう。

尿細管障害に対するZn投与の効果は組織学的所見およびFENaを指標とし検討した。組織所見ではI/RによりJablinski分類によるgrade 3の尿細管障害を認めたが、Zn投与による明らかな差は認めなかった。機能的にはZn投与により有意にI/R後のFENaの上昇を抑制した。さらに、Zn投与により Δ FENaの有意な上昇抑制を認めた(表2)。この結果より、Zn投与はI/Rの尿細管障害に対し保護的作用に働いたことが考えられる。

以上より、Znの投与は急性虚血性腎不全に伴い生じるGFRの低下および急性尿細管障害を軽減し得た。従って腎移植、大動脈手術、腎障害をきたす可能性のある侵襲の大きな手術などの術前にZnを投与することで、術後の腎機能を保護しうる可能性があり、臨床応用面において意義のある結果と思われる。

結語

Zn投与による腎機能保護作用を、ラット両側腎に対する虚血再灌流障害モデルにおいて検討した。その結果、Zn投与により組織MT濃度は増加し、I/Rによる腎組織の過酸化脂質の増加を抑制した。腎機能の面では、Zn投与によりI/R後のGFRは有意に改善し、FENaの上昇を有意に抑制した。以上の事実、Zn投与により主にMTを介し、free radical scavenge作用を発揮し、I/Rによるoxidative stressを軽減していることを示唆する。本研究の臨床的応用として、あらかじめ組織のMTの発現を誘導すれば手術侵襲や移植後の臓器障害を軽減できる可能性が示された。

参考文献

- 1)McCord JM: Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312:159-163,1985.
- 2)Land W,Schneeberger H,Schleibner S: The beneficial effect of human recombinant superoxide dismutase on acute and chronic rejection events in recipients of cadaveric renal transplants. *Transplantation* 57:211-217,1994.
- 3)Marzi I,Buhren V,Schuttler A,Trentz O: Value of superoxide dismutase for prevention of multiple organ failure after multiple trauma. *J Trauma* 35:110-120,1993.
- 4)Muizelaar JP,Marmarou A,Young HF,Choi SC,Wolf A,Schneider RL,Kontos HA: Improving the outcome of severe head injury with the oxygen radical scavenger polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase:a Phase 2 trial. *J Neurosurg* 78:375-382,1993.
- 5)Flaherty JT,Pitt B,Gruber JW,Heuser RR,Rothbaum DA,BurwellLR,George BS, Kereiakes DJ,Deichman D,Gustafson N: Recombinant human superoxide dismutase(h-SOD)fails to improve recovery of ventricular function in patients undergoing coronary angioplasty for acute myocardial infarction. *Circulation* 89:1982-1991,1994.
- 6)Margoschees M,Vallee BL: A cadmium protein from equine kidney cortex. *J Am Chem Soc* 79:4813-4814,1957.
- 7)Shiraishi M,Utsumi K,Morimoto S,Joja I,Iida S,Takeda Y, Aono K: Inhibition of nitroblue tetrazolium reduction by metallothionein. *Physiol Chem Phys* 14:533-537,1982.
- 8)Thonalley PJ,Vasak M: Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress.Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochim Biophys Acta* 827:36-44,1985.

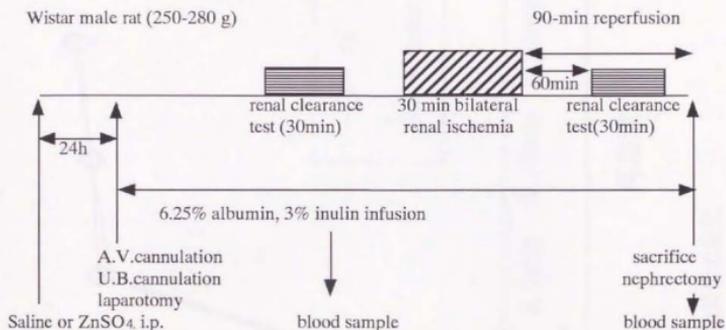
- 9)Kikugawa K,Kojima T,Yamaki S,Kosugi H: Interpretation of the thiobarbituric acid reactivity of rat liver and brain homogenates in the presence of ferric ion and ethylenediaminetetraacetic acid. *Anal Biochem* 202:249-255,1992.
- 10)Yagi K: A Simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med* 15:212-216,1976.
- 11)Onosaka S,Cherian M G: Comparison of metallothionein determination by polarographic and cadmium-saturatuion methods. *Toxicol Appl Permacol* 63:270-274,1982.
- 12)David LE, Cherian MG: Determination of metallothionein in tissues by cadmium-hemoglobin affinity assay. *Methods in Enzymol* 205:83- 88 ,1991.
- 13)Davidson WD, Sackner MA: Simplification of the anthrone method for the determination of inulin in clearance studies. *J Lab Clin Med* 62:351-356,1963.
- 14)Jablonski P,Howden BO,Rac DA,Birrell CS,Marshall VC,Tange J: An experimental model for assessment of renal recovery from warm ischemia. *Transplantation* 35:198-204,1983.
- 15)Ferwana OS, Pirie SC: Unilateral renal ischemia in the rat:effect of method of occlusion of the blood supply on function of ipsilaterel and contralateral kidneys. *Clin Sci* 73:11-17,1987.
- 16)Dagher F,Pollina RM,Rogers DM,Gennago M,Ascer E: The value and limitations of L-arginine infusion on glomerular and tubular function in the ischemic/reperfusion kidney. *J Vasc Surg* 21:453-459,1995.
- 17)Lopes-Neblina F,Paez AJ,Toledo AH, Toledo-Pereyra LH: Role of nitric oxide in ischemia/reperfusion of the rat kidney. *Circ Shock* 44:91-95,1995.
- 18)Chintala MS,Chiu PJS,Vemulapalli S,Watkins RW,Sybertz EJ: Inhibition of endothelial derived relaxing factor(EDRF)aggravates ischemic acute renal failure in aneathetized rats. *Arch Pharmacol* 348:305-310,1993.

- 19)Zalups RK,Fraser J,Koropatnic J: Enhanced transcription of metallothionein genes in rat kidney:effect of uninephrectomy and compensatory renal growth.
Am J Physiol 268:F643-650,1995.
- 20)Tanner GA, Sloan KL,Sophasan S: Effect of renal artery occlusion on kidney function in the rat. *Kidney Int* 4:377-389,1973.
- 21)Mason J,Torhorst J,Welsch J: Role of the medullary perfusion defect in the pathogenesis of ischemic renal failure. *Kidney Int* 26:283-293,1984.
- 22)Schieppati A.,Schrier R.W: Cellular calcium in the pathogenesis of ischemic acute renal failure. *Contrib Nephrol* 77:123-131,1990.
- 23)Nishida T,Inoue T,Kamiike W,Kawashima Y,Tagawa K: Involvement of Ca²⁺ release and activation of phospholipase A₂ in mitochondrial dysfunction during anoxia.
J Biochem 106:533-538,1989.
- 24)Frankel EN: Chemistry of free radical and singlet oxidation of lipids.
Prog Lipid Res 23:197-221,1984.
- 25)Yoshikawa T,Naito Y,Tanigawa T,Yoneta T,Yasuda M,Ueda S,Oyamada H,Kondo M: Effect of Zinc-Carnosine chelate compound(Z-103),a novel antioxidant,on acute gastric mucosal injury induced by ischemia-reperfusion in rats. *Free Rad Res Comms* 14:289-296,1991.
- 26)Marubayashi S,Dohi K,Ochi K,Kawasaki T: Role of free radicals in ischemic rat liver cell injury:prevention of damage by α -tocopherol administration. *Surgery* 99:184-191,1984.
- 27)Majewsca MD,Strosznajder J,Lazarewicz J: Effect of ischemic anoxia and barbiturate anesthesia on free radical oxidation of mitochondrial phospholipids.
Brain Res 158:423- 434,1978.
- 28)Yamamoto M,Shima T,Uozumi T,Sogabe T,Yamada K,Kawasaki T: A possible role of lipid peroxidation in cellular damage caused by cerebral ischemia and the protective effect of α -tocopherol administration. *Stroke* 14:977-982,1983.

- 29)Gardner TJ,Stewart JR,Casale AS,Downey JM,Chambers DE: Reduction of myocardial ischemic injury with oxygen derived free radical scavengers. *Surgery* 94:423-427,1983.
- 30)Paller MS,Hoidal JR,Ferris TF: Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat. *J Clin Invest* 74:1156-1164,1984.
- 31)Furuta S,Toyama S,Miwa M,Ikeda Y,Sano H,Matsuda K: Study on the metabolic fate of catena-(s)-[μ -[N α -(3-aminopropionyl)histidinato(2-)-N1,N2,O:N π]-Zinc. *Drug Res* 41:992-995,1991.
- 32)Sturniolo GC, Dinca R, Montino MC, Sanzari M, Maran D, Valerio G, Romagnoni F, Naccarato R: Zinc metabolism and immune function in healthy elderly people. *Clin Nutr* 13:280-285,1994.
- 33)小山祐子、中戸川邦子、永沼 章、井村伸正、小野坂敏晃、田中慶一：HgCl₂毒性に対する他金属の修飾効果とメタロチオネイン量との関係について。日衛誌 39：385,1984.
- 34)友国勝磨：亜鉛中毒。現代医療 21：905-908,1989.
- 35)Girotti AW, Thomas JP, Jordan JE: Inhibitory effect of zinc(II) on free radical lipid peroxidation in erythrocyte membranes. *Free Rad Biol Med* 1:395-401,1985.
- 36)Tammy MB, Kubow S, Bettger WJ: Effect of dietary zinc on endogenous free radical production in rat lung microsomes. *J Nutr* 116:1054-1060,1986.
- 37)Beswick PH, Brennen PC, Hurles SS: The effects of smoking and zinc on the oxidative reactions of human neutrophils. *J Clin Lab Immunol* 21:71-75,1986.
- 38)Girotti AW: Mechanism of lipid peroxidation. *J Free Rad Biol Med* 1:87-95,1985.
- 39)Yoshikawa T, Naito Y, Tanigawa T, Yoneta T, Kondo M: The antioxidant properties of novel zinc-carnosine chelate compound, N-(3-aminopropionyl)-L-histidinato zinc. *Biochim Biophys Acta* 1115:15-22,1991.
- 40)Bray TM, Bettger WJ: The physiological role of zinc as an antioxidant. *Free Rad Biol Med* 8:281-291,1990.

- 41) Okada A, Takagi Y, Nezu R, Lee S: Zinc in clinical surgery-a research review.
 Jp J Surg 20:635-644,1990
- 42) Shanbhogue LK, Paterson N: Effect of sepsis and surgery on trace minerals.
 J P E N 14:287-289,1990.
- 43) Sato M, Mehra RK, Bremner I: Measurement of plasma metallothionein-I in the assessment
 of the zinc status of zinc-deficient and stress rats. J Nutr 114:1683-1689,1984.
- 44) Chesters JK, Will M: Measurement of zinc flux through plasma in normal and endotoxin-
 stressed pig and the effects of Zn supplementation during stress. Br J Nutr 46:119-130,1981.
- 45) Satoh M, Kloth DM, Kadhim SA, Chin JL, Naganuma A, Imura N, Cherian MG: Modulation of
 both cisplatin nephrotoxicity and drug resistance in murine bladder tumor by controlling
 metallothionein synthesis. Cancer Res 53:1829-1832,1993.
- 46) Naganuma A, Satoh M, Imura N: Prevention of lethal and renal toxicity of *cis*-
 Diamminedichloroplatinum(II) by induction of metallothionein synthesis without
 compromising its antitumor activity in mice. Cancer Res 47:983-987,1987.
- 47) Matsubara J, Shida T, Ishioka K, Egawa S, Inada T, Machida K: Protective effect of zinc
 against lethality in irradiated mice. Environ Res 41:558-567,1986.
- 48) Coppen D.E. Richardson D.E. Cousins R.J. Zinc suppression of free radicals induced in cultures
 of rat hepatocytes by iron. Proc Soc Exp Biol Med 189:100-109,1988.
- 49) 永沼 章, 井村伸正: メタロチオネインの示す薬物毒性軽減作用とその医療への応用.
 蛋白質 核酸 酵素 32: 1031-1040,1987.
- 50) Adel J, Reuter N. Inhibition of hydroxyl-radical generated DNA degradation by
 metallothionein. Toxicol Lett 47:191-196,1989.
- 51) Thomas JP, Bachowski GL, Girotti AW: Inhibition of cell membrane lipid peroxidation by
 cadmium-and zinc-metallothionein. Biochem Biophys Acta 884:448-461,1986.

- 52)Coppen DE, Richardson DE, Cousins RJ: Zinc suppression of free radicals induced in cultures of rat hepatocytes by iron. *Proc Soc Exp Biol Med* 189:100-109,1988.
- 53)Adel J,Reuter N: Inhibition of hydroxyl-radical generated DNA degradation by metallothionein. *Toxicol Lett* 47:191-196,1989.
- 54)Mello-Filho AC,Chubatsu LS, Meneghini R: V79 Chinese hamster cells rendered to high cadmium concentration also become resistant to oxidative stress. *Biochem J* 256:475-479,1988.
- 55)Matsubara J: Alteration of radiosensitivity in metallothionein induced mice and a possible role of Zn-Cu-thionein in GSH-peroxidase system. *Experientia Suppl* 52:603-612,1987.
- 56)Beecherl EE,Petroll MW,Cavanaugh HD,Shires GT: Vital microscopy of proximal renal tubule morphology in response to one minute of ischemia. *Shock Suppl* 3:A57,1995.
- 57)Tanner GA,Sophasan S: Kidney pressure after temporary renal artery occlusion in the rat. *Am J Physiol* 230:1173-1181,1976.
- 58)Baker GL, Corry RJ, Autor AP: Oxygen free radical induced damage in kidneys subjected warm ischemia and reperfusion. *Ann Surg* 202:628-641,1985.
- 59)Hughes JD,Mattar SG,Chen C,Someren A,Noc B,Suwyn CR,Lumsden AB: Renal artery perfusion modifies ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res* 60:321-326,1996.



Zn group: ZnSO₄ 20mg/kg i.p.+I/R (n=11)

Saline group: saline i.p.+I/R (n=8)

Sham group: saline i.p.+sham operation without I/R (n=5)

図 1 実験プロトコール

A.V.:femoral artery and vein, U.B.:urinary bladder, i.p.:intraperitoneal injection

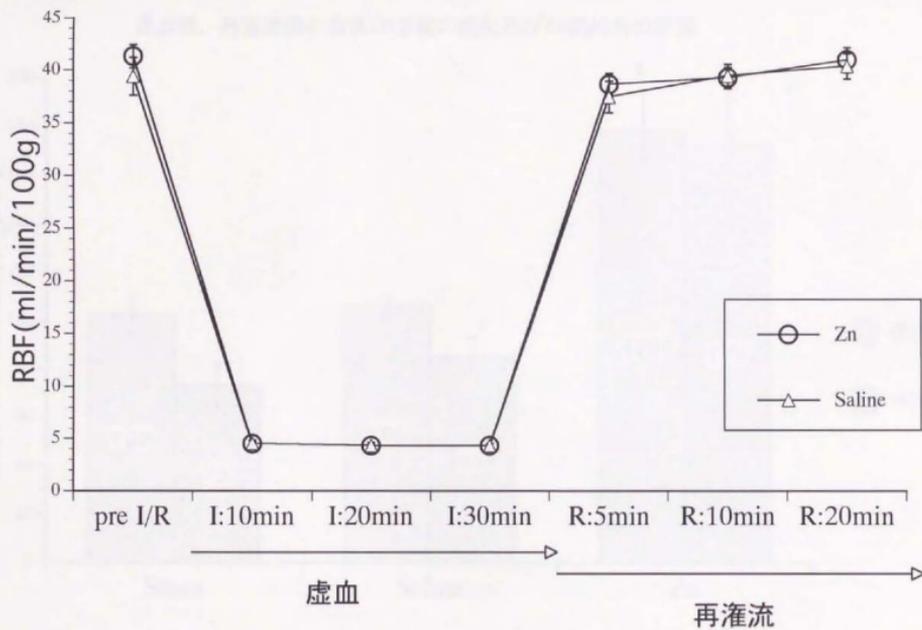
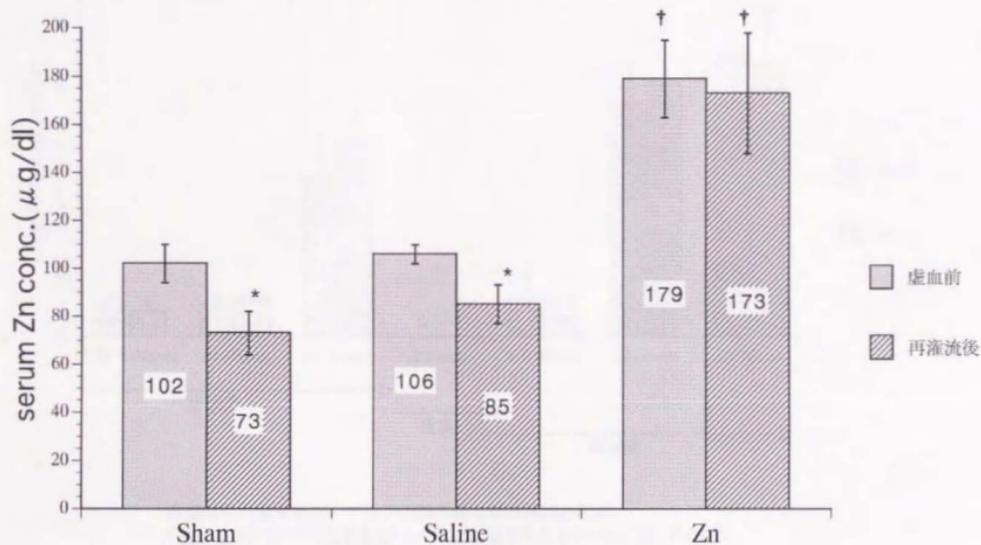


図 2 ラット腎虚血再灌流における腎組織血流量の変化

図 3

虚血前、再灌流後の血清Zn濃度の変化及びZn前投与の影響

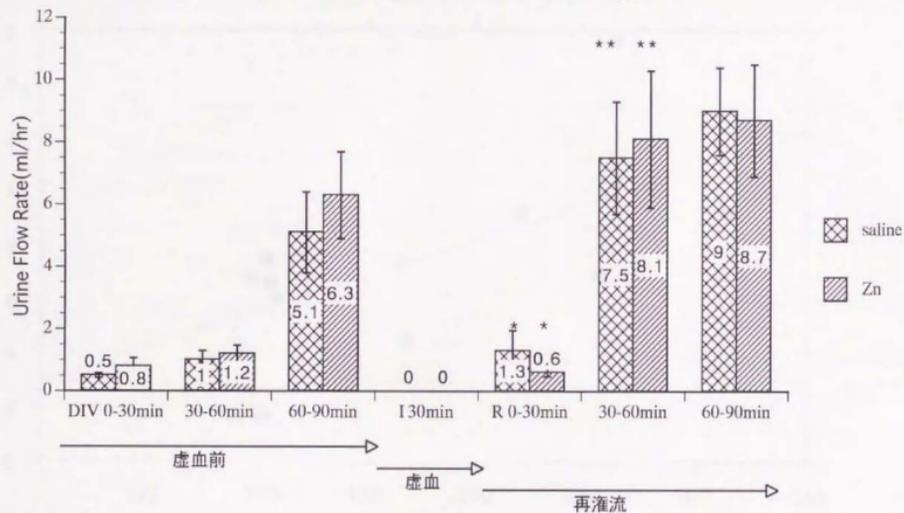


* 虚血前に対して $p < 0.05$ (Student paired t-test)

† Saline群に対して $p < 0.01$ (ANOVA及びpost hoc検定)

図 4

腎虚血再灌流における尿量の経時的变化



各値は平均値を示す。グラフの誤差線は標準誤差を示す。

* 虚血前60-90min に対し $p < 0.05$, ** 再灌流 R 0-30min に対し $P < 0.01$,
(ANOVA 及び post hoc 検定による)

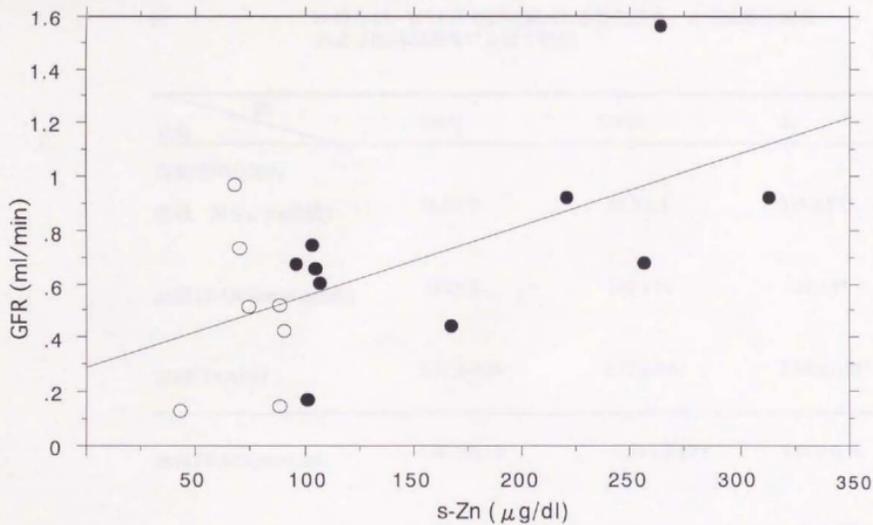


図 5 糸球体濾過量(GFR)と血清Zn濃度との相関

● Zn前投与群, ○ 生食投与群

$GFR = 0.291 + 0.003 \times s\text{-Zn conc.}$ $R = 0.6$ $F = 8.2$ $p < 0.05$ (単純回帰分析による)

表 1

Zn投与が、腎I/R後の腎組織MT,過酸化脂質、血清過酸化脂質
および血清Zn濃度に及ぼす効果

濃度 \ 群	Sham	Saline	Zn
再灌流90分後の			
組織 MT(μ g/g組織)	36.5 \pm 3	45.5 \pm 4	116 \pm 17*
組織TBARS(nmol/g組織)	116 \pm 3	144 \pm 11	114 \pm 4*
組織CD(ABS)	1.71 \pm 0.04	2.75 \pm 0.03	2.10 \pm 0.05*
血清TBARS(nmol/ml)	5.00 \pm 0.10	5.36 \pm 0.10 †	5.51 \pm 0.10
血清Zn(μ g/dl)	73 \pm 9	85 \pm 8	173 \pm 25*

MT: Metallothionein TBARS: Thiobarbituric acid reactive substances CD: Conjugated dien

Zn: Zinc

各値は平均 \pm 標準誤差で示した。

*Saline群に対して $p < 0.05$, † Sham群に対して $p < 0.05$, (ANOVA 及び post hoc 検定)

表 2

Zn前投与がI/R前後の腎機能に及ぼす効果

	Sham		Saline		Zn	
	pre I/R	after I/R	pre I/R	after I/R	pre I/R	after I/R
MAP (mmHg)	112±5	111±3	109±4	107±3	109±3	111±4
V (ml/hour)	5.0±0.3	5.7±0.4	5.1±1.3	9.0±1.4 †	6.3±1.4	8.7±1.8
GFR (ml/min)	2.00±0.30	2.00±0.20	2.70±0.37	0.43±0.14 † §	2.60±0.25	0.68±0.05 §
FENa (%)	2.1±0.3	4.3±0.7	2.9±0.4	29.1±3.3 † §	3.6±0.9	20.5±1.8* §
ΔFENa (%)	2.2±0.9		25.7±3.6 †		17.0±1.8*	

各値は平均±標準誤差にて示した。

*Saline群に対し $p<0.05$ 、†Sham群に対し $p<0.05$ 、(ANOVA及びpost hoc検定による)

§ pre I/Rに対し $p<0.05$ 、(Student paired t-testによる)

MAP:mean atrial pressure V:urine flow rate GFR:glomerular filtration rate FENa: fractional excretion of sodium I/R:ischemia reperfusion



inches 1 2 3 4 5 6 7 8
centimeters 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM Kodak

Blue	Cyan	Green	Yellow	Red	Magenta	White	3/Color	Black
[Patch 1]	[Patch 2]	[Patch 3]	[Patch 4]	[Patch 5]	[Patch 6]	[Patch 7]	[Patch 8]	[Patch 9]

Kodak Gray Scale

C **Y** **M**

© Kodak, 2007 TM Kodak

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

