

鶏卵由来オボトランスフェリンによる 慢性腎不全の病態進行抑制効果

鳥取大学農学部・教授 竹内 崇

■ 緒 言

オボトランスフェリン(OTf)は卵白中に存在する分子量約8万の鉄結合性蛋白である。血清中のトランスフェリン、乳汁中のラクトフェリン(Lf)とともに、トランスフェリンファミリーに属する¹⁾。OTfの作用には、鉄運搬のほか、リンパ球細胞障害性²⁾、tumor necrosis factor (TNF)抑制³⁾などが報告されているものの、機能の詳細は明らかにされていない。一方、Lfは多機能蛋白として知られ⁴⁾、抗菌作用、抗癌作用、抗ウイルス作用、抗炎症作用、血圧低下作用、脂質改善作用、鎮痛作用、抗ストレス作用などが明らかとなっている。

慢性腎不全は、腎実質の傷害が数ヶ月から数年にわたって進行し、最終的に末期腎不全、尿毒症へと移行する不可逆性の疾患である。したがって、慢性腎不全の治療は、その進行を緩徐化するための維持療法が主体となる。しかしながら、腎糸球体あるいは尿細管に特異的に作用する治療法は確立されていないのが現状である。最近、我々は抗癌剤であるシスプラチンによる腎障害をLfが軽減することを報告した⁵⁾。一方、OTfは慢性腎不全の病態ではセルロプラスミンの減少によって銅による酸化障害が発現したケースで、OTfが銅の酸化を軽減することが明らかにされている⁶⁾。OTfとLfは蛋白構造に相同性を有するため¹⁾、慢性腎不全に対して共通した保護効果を有する可能性が考えられる。そこで本研究では、自然発症に近い慢性腎不全モデルである5/6腎摘ラットを作成し、OTfとLfの効果を比較検証することを目的とした。

■ 方 法

1)実験動物

実験には5週齢のWistar系雄性ラット(動物繁殖研究所、茨城)を導入し、1週間の予備飼育の後に実験に供した。動物は室温22±1°Cの部屋で飼育し、固形飼料(CE-2、日本クレア、東京)および飲水は自由とした。尚、動物の取り扱いならびに実験手技については、鳥取大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

2)5/6腎臓摘出手術

5/6腎臓摘出(5/6NX)手術は高山ら⁷⁾の方法に準じて行った。すなわち、イソフルレン吸入麻酔下にて、左腹壁を約1.5cm切開し、腎臓周囲の結合組織を剥離した後に腎動脈を動脈クリップで止め、血流を一時遮断した。次いで、メス刃で左腎の両極各1/3を切除し、切断面はガーゼによる圧迫止血ののち、生体用接着剤(アロンアルファA、第一三共、東京)にて完全に止血した。緩やかに動脈クリップをはずし、出血のないことを確認した後に閉腹し、セファゾリン注20mg/kg(明治製菓、東京)を筋肉内注射した。

1週間後、イソフルレン吸入麻酔下にて右腹壁を約1.5cm切開し、右腎臓に分布する腎動静脈を絹糸で結紮した後に全摘出した。切開部位を縫合した後、セファゾリン注を筋肉内注射し、2回目の手術後12週間にわたって個別のケージで飼育した。

3)薬物投与

投与薬物は、ウシ血清アルブミン(BSA, Sigma Japan, Tokyo)、ウシラクトフェリン(bLf, 和光純薬、大阪)、OTf(Sigma Japan, Tokyo)とし、1回目の手術前日から各薬物ともに300mg/kgを経口投与し、2回目の手術後12週目まで連日1日1回投与を継続した。尚、BSA群は陽性対照群であり、5/6NXと同様に開腹手術を行うが腎臓摘出を行わない個体をSham群とした。例数は各群ともに5例とした。

4)尿および血液採取

全実験期間を通じて、動物の体重を4日間隔で計測した。血液サンプルは、1回目の手術前(pre)、2回目の手術当日、2回目の手術後2、4、6、8、10、12週目にそれぞれ尾静脈から採取し、ヘパリン血漿を分離した後に-80°Cで保存した。血漿の生化学分析として、血中尿素窒素(BUN)、クレアチニン(Cre)および無機リン(iP)を生化学測定装置(ドライケム3000、富士フィルム、東京)にて測定した。また、血液採取の前日からの24時間尿を代謝ケージ(夏目製作所、東京)にて採取し、尿量を計測した。

5) 病理組織学的解析

5/6NX 手術後 12 週目において、尿および血液の採取後、動物にペントバルビタールナトリウム(ソムノペンチル、共立製薬、東京)を過量投与して安楽死させ、摘出した左腎をリン酸緩衝ホルマリンにて固定し、常法にしたがって HE 染色標本およびマッソン・トリクローム(MT)染色標本を作成した。腎組織の病理学的変化については、腎皮質を低倍(x100)で 5 視野観察して合計の糸球体数を計測するとともに、糸球体の形態学的特徴を 3 つのパターン(正常、メサンギウム細胞の増生を伴う肥大、虚脱・萎縮)に分類し、各比率を算出した。MT 染色標本については、線維化の程度を比較した。

6) 統計処理

すべてのデータは Mean±SE で表示し、群間の比較は One-way ANOVA(Prism 4, GraphPad, USA) 解析の後、有意差が認められた場合は、Tukey's Multiple Comparison Test を実施した。

■ 結果

実験期間中における各群の体重変化は、BSA 群および bLf 群において、Sham 群よりもやや増体が減少傾向にあったが、OTf 群は Sham 群にほぼ近い増体を示した。しかし、いずれの群においても有意差は認められなかった(図 1)。

5/6NX 処置により、術後 2 週目からの尿量は顕著に増加し、特に BSA 群においては Sham 群の約 2.5 倍にまで増加した(図 2)。一方、bLf 群における尿量の増加は実験期間を通じて有意($P<0.001$)に抑制されていた。また、OTf 群の尿量は、BSA 群とほぼ同程度に多尿を示した。

BSA 群における術後 2 週目からの BUN および Cre は顕著に増加し、BUN 約 50mg/dl、Cre 約 0.5mg/dl の高値に達した(図 3、4)。一方、bLf 群における BUN および Cre の上昇は実験期間を通じて有意($P<0.01$)に抑制されていた。また、OTf 群では、BSA 群とほぼ同程度の値で推移した。5/6NX 処置を行った 3 群における Cre は術後経過とともに上昇し続けた。血漿 iP 濃度は、群間の差がほとんど認められず、実験期間中を通じてほぼ同レベルの数値で推移した(図 5)。

5/6NX 処置を行った腎臓の病理組織学的解析では、糸球体総数の減少、メサンギウム細胞の増生を伴う肥大、糸球体の虚脱または萎縮が顕著に認められた。また、尿細管内にはタンパク円柱の貯留をみとめ、間質には細胞浸潤が観察された(図 6)。各群における糸球体総数および糸球体の病的変化について定量的に解析したところ、BSA 群は Sham 群に比べて糸球体総数は顕著に減少し、正常な糸球体も減少した。さらに、萎縮または虚脱した糸球体数は明らかに増加していた。これに対して、bLf 群では糸球体総数は減少しているものの、正常糸球体数は BSA 群に比べて有意に改善していた。一方、OTf 群は、いずれの所見においても有意な改善は認められなかった(図 7)。

マッソン・トリクローム染色標本による解析では、BSA 群において皮質および髄質の広範な領域に顕著な線維化を認めた。これに対して、bLf 群では線維化の程度が軽減されており、OTf 群においても、やや軽減される傾向にあった(図 8)。

■ 考察

5/6 腎臓摘出は自然発生による慢性腎不全と類似した病態変化を示すことから、慢性腎不全モデルとして広く応用されている⁷⁾。摘出手術後、残存する 1/6 の腎臓組織は代償性に肥大するが、血流の過剰な増加による負荷が常在するため、やがて糸球体の崩壊が進行し、尿細管障害の重篤化とともに間質の線維化が進行する⁸⁾。多尿、BUN および Cre の上昇、病理組織学的所見から考えると、本研究における BSA 群は、すでに報告されている 5/6 腎臓摘出モデルラットの病態を再現していると判断された。

一方、bLf は多尿、BUN および Cre の上昇のいずれも有意に抑制し、糸球体の病的変化を軽減し、腎線維化も軽減されていたことから、慢性腎不全の病態進行を遅らせる効果が示唆された。これに対して、bLf と同程度の高い OTf においても同様の効果を期待したが、OTf には慢性腎不全の病態進行を抑制する効果は認められなかった。bLf と OTf による効果の違いが何に起因するのかわからないが、同程度の高い蛋白質であっても、特異的受容体への親和性の違いや、サイトカイン等の調節因子との相互作用など、様々な点で作用が異なる結果かもしれない。

■ 要約

卵白由来の鉄結合性蛋白であるオボトランスフェリン(OTf)の経口投与による慢性腎不全の病態進行軽減効果を検証する目的で、5/6 腎臓摘出(5/6NX)モデルラットを作成し、類似のタンパク構造を有するラクトフェリン(Lf)と比較解析した。5/6NX 処置を行い、ウシ血清アルブミン(BSA)を経口投

与した陽性対照群では、術後2週目から12週目まで顕著な尿量の増加、BUNおよびクレアチニン(Cre)の上昇を認めた。一方、ウシ由来Lf(bLf)の経口投与は、多尿、BUNおよびCreの上昇を有意に抑制したが、OTfにはそのような効果が認められなかった。術後12週目の腎組織のHE染色標本では、5/6NX処置により糸球体数の減少、糸球体の肥大あるいは萎縮の出現割合が増大し、OTfはこれら組織学的変化に対して有意な影響を及ぼさなかった。一方、bLfは糸球体の減少を有意に抑制し、間質の線維化も軽減する傾向にあった。以上の結果から、bLfは慢性腎不全の進行を有意に抑制することが明らかとなったが、OTfには明らかな効果は認められなかった。

■ 文献

- 1) Aisen P and Listowsky I. 1980. Iron transport and storage proteins. *Ann. Rev. Biochem.*, 49: 357-393.
- 2) 小田嶋真里, 大谷 元. 2000. ウズラオボトランスフェリンの細胞障害特性. *Anim. Sci. J.*, 71: J338-J346.
- 3) Majumder K, Chakrabarti, S, Davidge ST and Wu J. 2013. Structure and activity study of egg protein ovotransferrin derived peptides (IRW and IQW) on endothelial inflammatory response and oxidative stress. *J. Agric. Food Chem.*, 61: 2120-2129.
- 4) Brock JH. 2004. Lactoferrin: An overview of research and future prospects. *Milk Sci.*, 53: 219-224.
- 5) Kimoto Y, Nishinohara M, Sugiyama A, Haruna A and Takeuchi T. 2013, Protective effect of lactoferrin on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *J. Vet. Med. Sci.*, 75: 159-164.
- 6) Roxborough HE, Millar CA, McEneny J and Young IS. 1995. Carbamylation inhibits the ferroxidase activity of caeruloplasmin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 214: 1073-1078.
- 7) 高山淳二, 高岡昌徳, 松村靖夫, 2008. ラットおよびマウスにおける腎機能低下モデルの簡便な作製方法. 一急性および慢性腎不全モデル—. *日本薬理学雑誌*, 131: 37-42.
- 8) Shimamura T and Morrison AB. 1975. A progressive glomerulosclerosis occurring in partial five-sixths nephrectomized rats. *Am. J. Pathol.*, 79: 95-106.

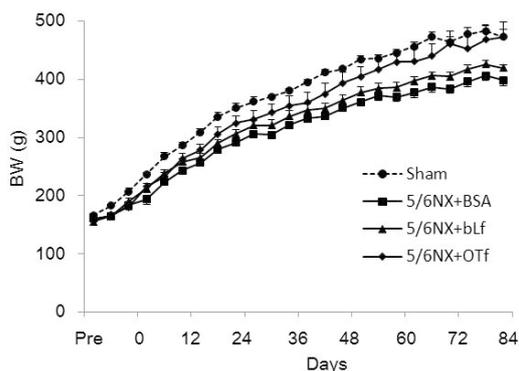


図1 各群における体重変化

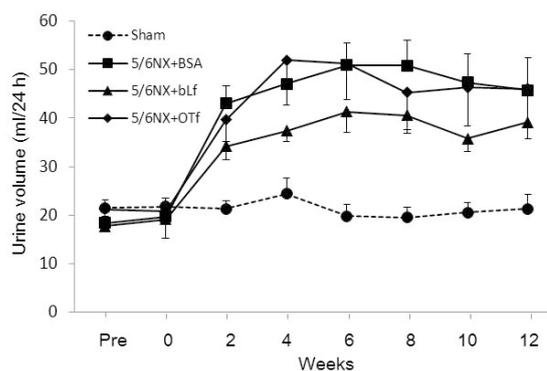


図2 各群における尿量の変化

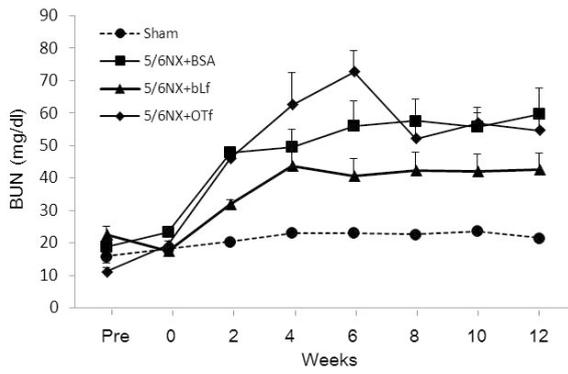


図3 各群における血漿 BUN の変化

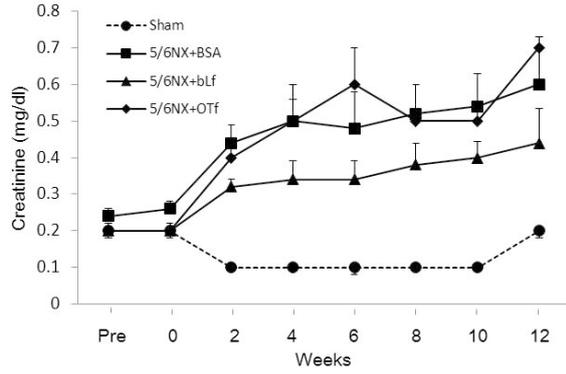


図4 各群における血漿 Cre の変化

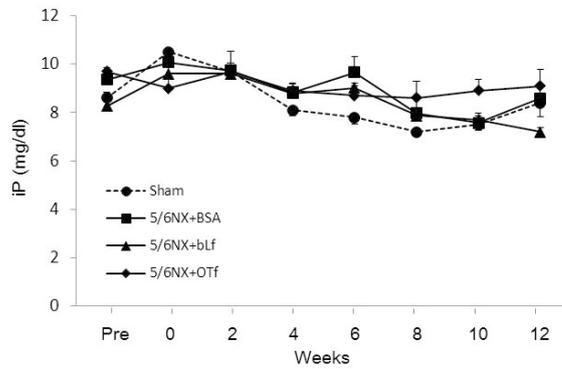


図5 各群における血漿無機リンの変化

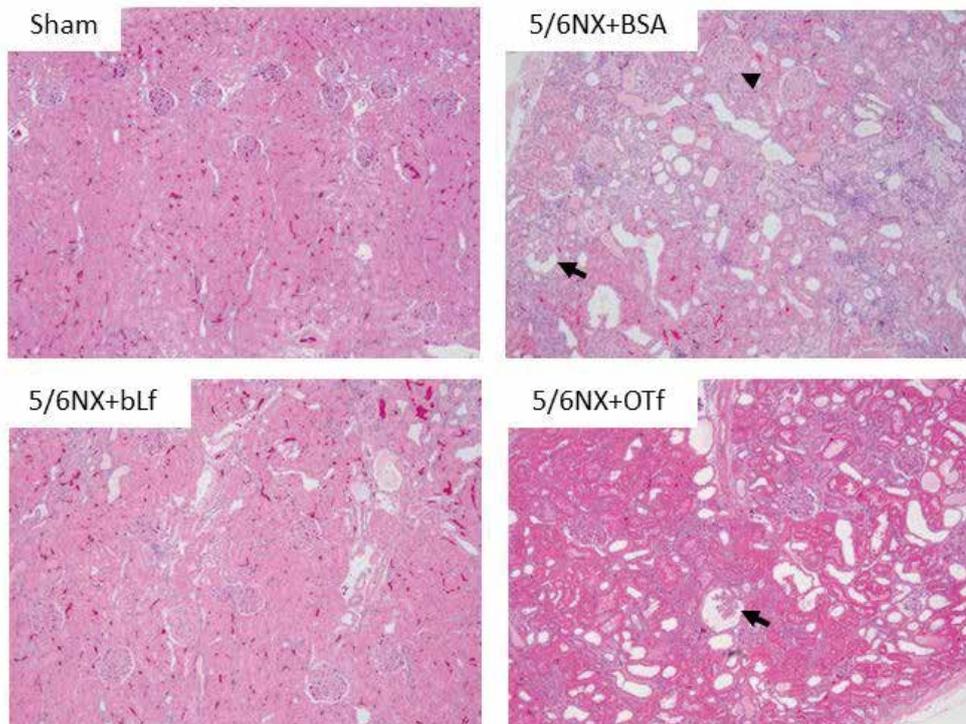


図6 腎糸球体の組織学的変化(HE 染色)
 矢頭はメサンギウム細胞の増生を伴う糸球体の肥大を、矢印は萎縮した糸球体を示す。(100倍)

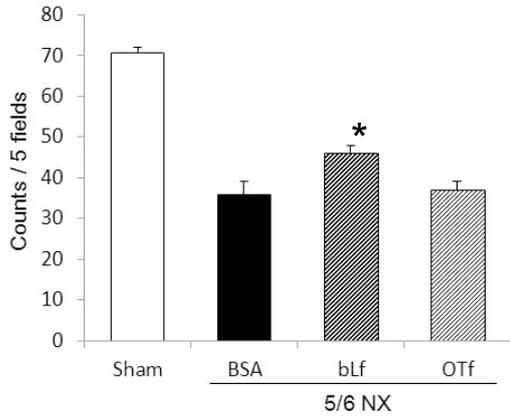


図 7-1 腎糸球体数の変化(n=5)
*P<0.05 vs. NX+BSA

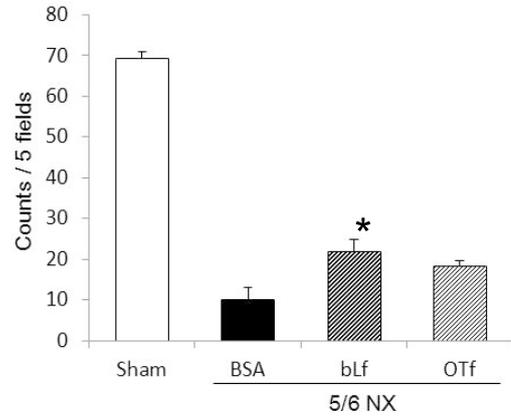


図 7-2 正常な糸球体数(n=5)
*P<0.05 vs. NX+BSA

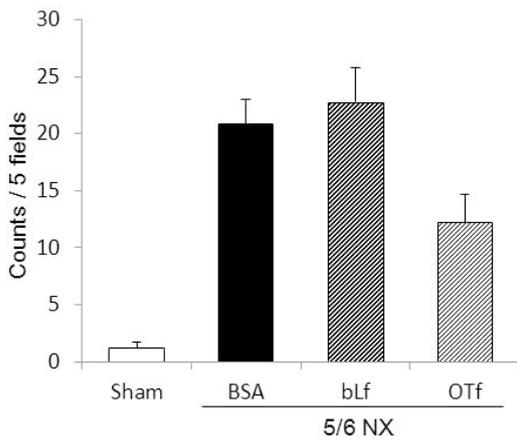


図 7-3 メサンギウム細胞の増生を伴う
肥大した糸球体数(n=5)

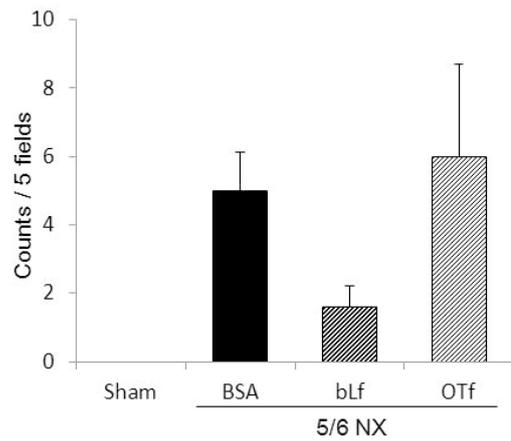


図 7-4 萎縮した糸球体数(n=5)

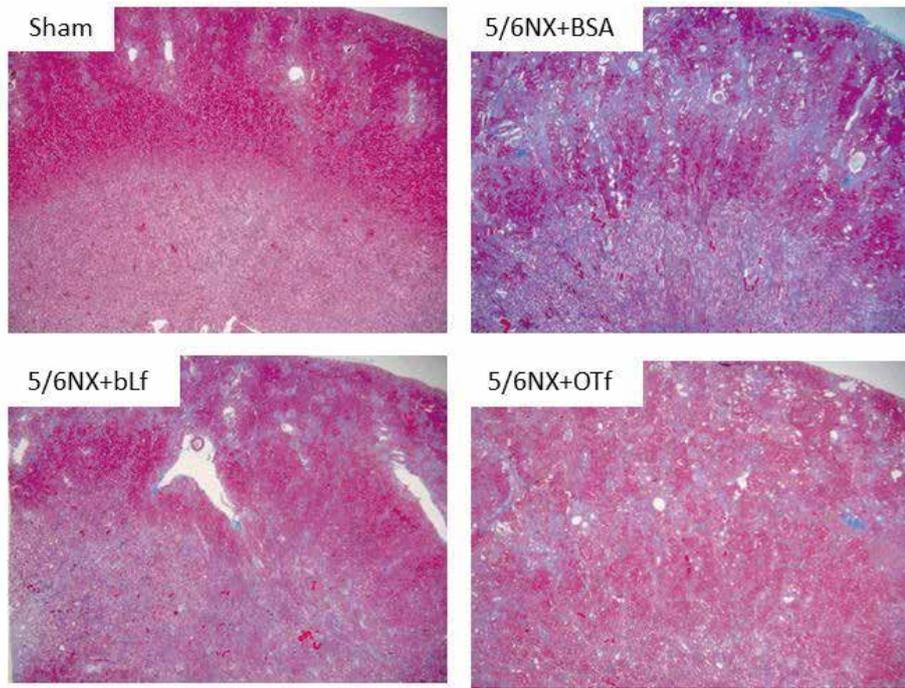


図8 マッソン・トリクローム染色による腎線維化の比較