

食餌性コレステロール長期負荷によるラット腎臓への影響

小川 隆 吉田順一 国場幸史

Influence of a long-term load of dietary cholesterol on the rat kidney

Takashi OGAWA, Junichi YOSHIDA, and Yukifumi KOKUBA

Pharmaceutical Research Laboratories, Ajinomoto Co., Inc, Kanagawa, Japan

The involvement of hyperlipidemia in aggravation of nephrosis has remained controversial. In this study, to examine the influence of cholesterol on the kidney, normal SD rats were loaded with a normal diet (4.4 % fat, 0.09 % cholesterol) plus 0.25 % cholesterol for 10 months, and the urinary excretion of protein, blood cholesterol level and histological renal changes were compared with those in the control group given the normal diet alone. The urinary protein excretion was increased after 4 months of cholesterol loading and was about 6 times the control value at the end of the study (10 months). At 10 months, the blood levels of total, HDL- and LDL+VLDL-cholesterols were also increased, and the arteriosclerosis index (HDL/LDL+VLDL ratio) was about 1.3 times the control value. Histologically, segmental lesions of glomeruli containing sclerosis/PAS positive material were stronger than in the control animals. Thus, this study revealed increased blood cholesterol and urinary protein excretion and aggravated histological changes of the kidney in rats given a long-term cholesterol load, suggesting that cholesterol may be a risk factor affecting the kidney.

Jpn J Nephrol 2003 ; 45 : 361-366.

Key words : hyperlipidemia, kidney, nephrosis

緒 言

高脂血症は、動脈硬化性疾患の主要なリスクファクターの一つとなるほかに、慢性糸球体腎炎に付随して二次的に上昇する高脂血症では腎炎の進展・増悪に関与していることが報告され¹⁻³⁾、腎臓に対する増悪因子として知られている。しかし、高脂血症による腎臓障害に関する動物での検討は、主として腎臓に障害のある病態モデルあるいは片腎が摘出されているモデルに、基礎飼料に1~5%程度の高用量のコレステロールを添加した飼料を単独あるいは胆汁酸とともに負荷し、腎臓に対する影響を検討している⁴⁻⁶⁾。これは非生理的なコレステロール負荷の状態であり、ヒトが日常摂取している状況と大きく離れており、腎臓に対する影響を予測するためには必ずしも適切な条件とは言

えない。また、病態モデルを使用しているため、正常な腎臓に対する影響は明らかにされていない。

そこで今回、コレステロール負荷量として、標準飼料に0.25%の低用量コレステロールを添加した飼料を、無処置のラットに対し食餌性に長期間負荷したときの腎臓への影響について検討した。

実験材料および方法

1. 使用動物

実験には、9週齢の雄性SD系ラット(日本クレア)を用いた。ラットは、温度 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 5\%$ 、照明時間12時間(8~20時)の環境下で、飼料および水道水を自由に摂取させ飼育した。

動物実験は動物保護および管理に関する社内規定に基づいて行った。

2. 飼料

標準飼料(CE-2日本クレア, 粗脂肪 4.4%, コレステロール 0.09%)および標準飼料に 0.25%のコレステロールを添加してペレット状に整形したものをを用いた(日本クレア)。

3. 実験方法

実験群は, 標準飼料を与える標準飼料(Normal diet)群と 0.25%のコレステロールを添加した飼料を与えるコレステロール(Cholesterol diet)群の 2 群とし, 各々 6 例を用いた。実験期間は 10 カ月とし, その間 1 カ月に 1 度代謝ケージにて 4 時間(10~14 時)の蓄尿を行い, 尿中蛋白排泄量の測定(Bio Rads 社, クマシーブルー法)を実施した。10 カ月後, ネンプタール(大日本製薬)麻酔下で頸静脈にカニューレを挿入し血圧の測定を行った。血液は腹大動脈よりヘパリン処理注射筒により採血し, 遠心分離(3,000 rpm/15 min)し血漿を得た。この血漿を用いて, 総コレステロールは測定キット, オートセラ CHO(第一化学薬品)を用い日立 7050 オートアナライザーにより測定し, HDL-コレステロール(HDL-C)は, 分画剤(第一化学薬品, HDL-C[第一])で HDL-C 画分を分画後, 前記の方法により測定した。LDL+VLDL-コレステロール(LDL+VLDL-C)は, 総コレステロールより HDL-C を差し引き求めた。動脈硬化指数(AI)は LDL+VLDL-C を HDL-C で除して求めた。

採血後, 腸間膜血管床を取り出し, ペリスタポンプに接続して Krebs Henseleit 液で灌流し, 血管の末梢抵抗を灌流の流速と灌流圧の関係から求めた。さらにノルエピネフリンによる昇圧反応も同時に観察した⁷⁾。最後に腎臓および胸部大動脈を摘出し, 10%中性緩衝ホルマリン液で固定後, 腎臓については短軸の正中矢状面を切り出した。腎臓は, HE および PAS 染色標本を作製し病理組織学的検討を行った。糸球体変化は, PAS 標本を用いて Short BG らの基準に準じて検索した⁸⁾。全例について 1 個体当たり腎臓左右各々 1 切片の PAS 染色標本中における観察可能な全糸球体(341~458 個/両側標本)を観察し, ボウマン囊基底膜を含む糸球体基底膜の硬化, あるいはメサンギウム領域の PAS 陽性物質の貯留を有する糸球体の出現率(病変を有する糸球体数/総観察糸球体数×100)を算出した。

4. 統計学的処理

2 群間の比較は, 統計解析ソフト, StatLight(Yukms 社)を用いて行った。すなわち, F 検定にて分散分析の検

定後, 等分散の場合は Student t-test, 不等分散の場合は Aspin-Welch の検定を行った。相関性は Pearson 検定を用いた⁹⁾。いずれも危険率 5%以下を有意差ありとした。

結 果

1. 体 重

負荷終了時の体重は, 標準飼料群で 565±38 g, コレステロール群で 608±47 g と, コレステロール負荷により体重増加が認められた。

2. 血中コレステロール

血中コレステロールおよび AI の変化を Fig. 1 に示した。コレステロール群で標準飼料群と比較し, 総コレステロールで約 2 倍, HDL-C で約 1.7 倍, LDL+VLDL-C で約 2.2 倍の高値を示した。また, HDL-C と LDL+VLDL-C より求めた AI では, コレステロール群が上昇傾向を示した。

3. 腸間膜血管床灌流および血圧

末梢血管抵抗およびノルエピネフリンによる昇圧反応の変化を Fig. 2 に示した。血管の器質的な変化の指標となる機械的な末梢抵抗および血管の機能的な変化の指標となるノルエピネフリンによる昇圧反応は, コレステロール群と標準飼料群の間に差は認められなかった。血圧においても差異は認められなかった。

4. 尿中蛋白排泄

尿中蛋白排泄の変化を Fig. 3 に示した。標準飼料群は, 実験開始前の値と比較し 9 カ月から最終の 10 カ月でわずかに増加がみられたのみであった。これに対してコレステロール群では標準飼料群と比較し 4 カ月で増加傾向を示し, 5 カ月目では約 4 倍の値となった。最終の 10 カ月では約 6 倍の値となり標準飼料群との間に有意差が認められた。

5. 病理組織学的検討

病理組織学的検査結果を Table に示した。腎糸球体は, HE 染色標本ではボウマン囊基底膜を含む糸球体基底膜の肥厚, メサンギウム細胞の絮状物の沈着, あるいはその両所見が観察された。これらの程度は, 標準飼料群では軽微が 5 例であったのに対し, コレステロール群では軽度 1 例, 中等度 4 例, および高度が 1 例であった。そのほかは, コレステロール群に脂肪と類推される空胞およびメサンギウム細胞の泡沫化が散見された程度で, 強い細胞浸潤像は観察されなかった。さらに PAS 染色標本では, これらに加えメサンギウム細胞の PAS 陽性物質の貯留, ボウ

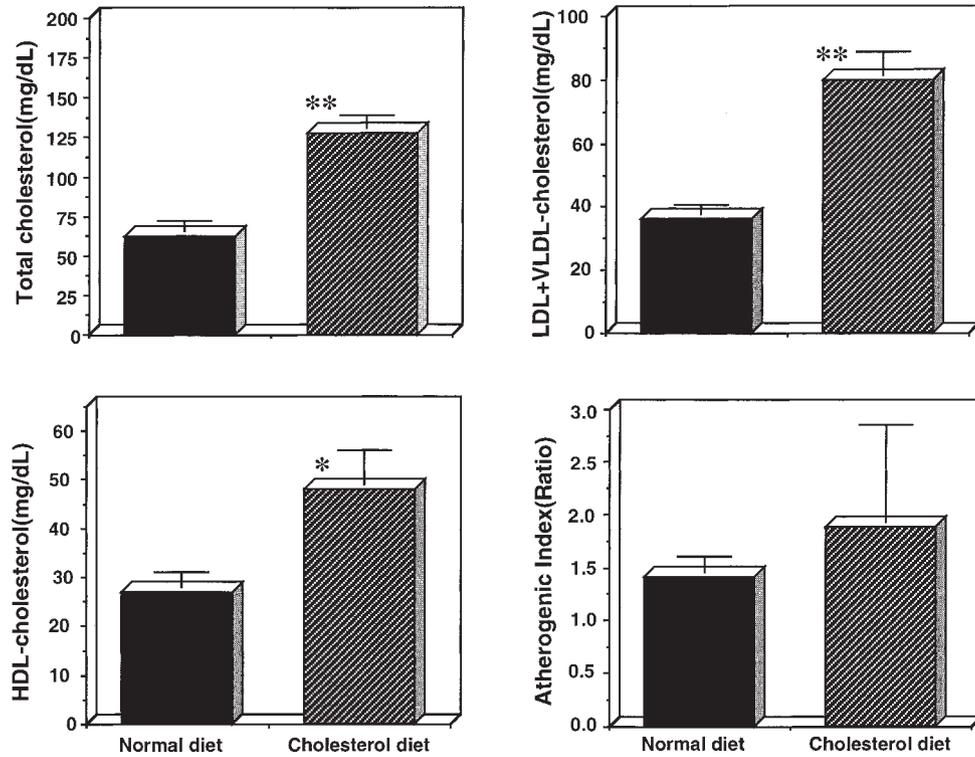


Fig. 1. The effect of dietary cholesterol supplementation after 10 months on blood total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL+VLDL cholesterol and atherogenic index in rats.

Each column shows the mean \pm SD of 6 rats. Significantly different from the Normal diet group. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

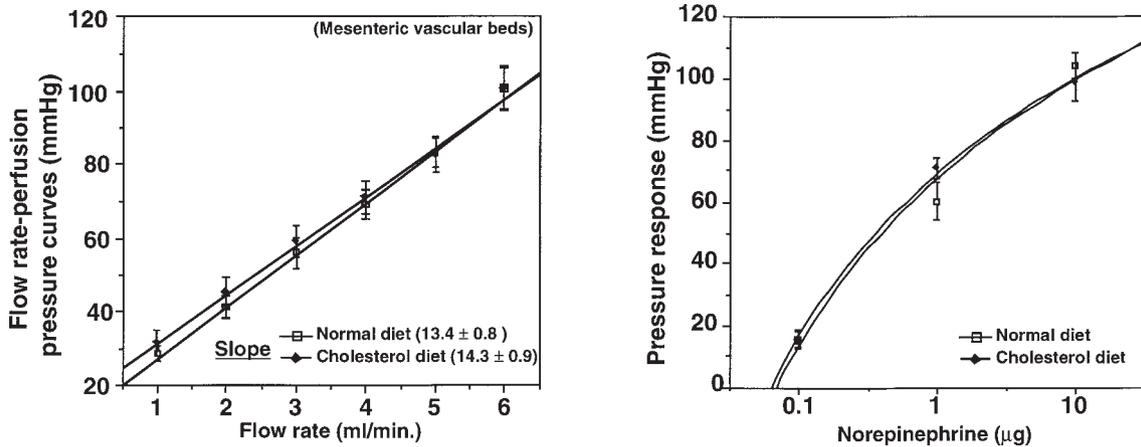


Fig. 2. The effect of dietary cholesterol supplementation after 10 months on flow rate-perfusion pressure curves, and the pressure response in rat mesenteric vascular beds.

Each point with a bar shows the mean \pm SD of 6 rats.

マン囊と糸球体またはボウマン囊と尿細管の癒着が観察され、巣状分節状糸球体硬化(focal and segmental glomerulosclerosis : FSGS)に近い組織像であった(Fig. 4)。各個体の病変を有する糸球体の出現率は、標準飼料群と比較してコレステロール群で約9倍の高値を示し(Fig. 5)、この

出現率と血中総コレステロールの間には、正の相関関係が認められた(Fig. 6)。

腎尿細管では、変性、尿円柱、硝子様小滴が認められ、標準飼料群はいずれも軽微が各々5、6、2例に出現したが、コレステロール群では全例で変性が軽度～高度に、尿円柱

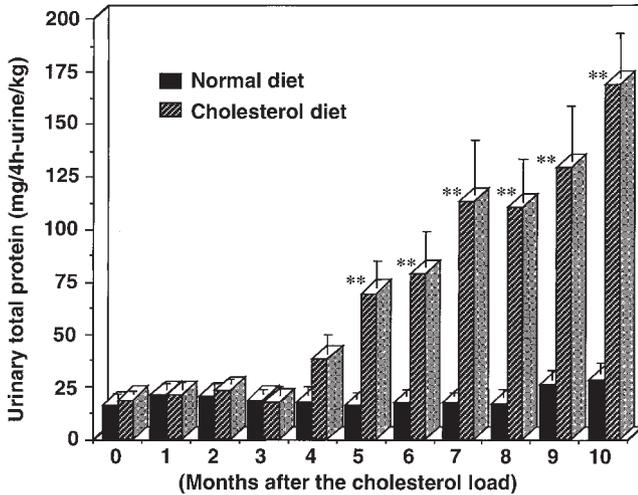


Fig. 3. The effect of dietary cholesterol supplementation during the experimental period on urinary total protein excretion in rats. Each column shows the mean±SD of 6 rats. Significantly different from the Normal diet group. (**p<0.01)

が軽度～中等度に，尿細管上皮内硝子様小滴貯留が軽微～軽度に認められた。また，尿細管間質においては小円形細胞浸潤が標準飼料群で軽微が3例に，コレステロール群で軽度が5例に，中等度が1例に，加えて線維化がコレステロール群で軽微が2例に認められた。

考 察

ラットを用いた高脂血症に関する実験では，低用量のコレステロール負荷で高脂血症が発症し難いため，多くの研究者は，高用量コレステロールを負荷して短期的に高脂血症モデルを作製している。そのため，血中コレステロール濃度は負荷前のレベルの5倍前後まで増加し，高度の高脂

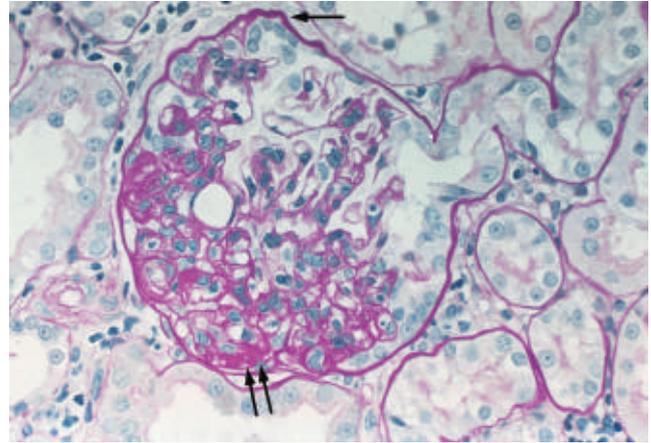


Fig. 4. Light micrograph of kidney Segmental lesion of glomeruli containing sclerosis(←)/PAS positive material(↑↑) were seen in rats fed a cholesterol diet. Grade : moderate, PAS staining.

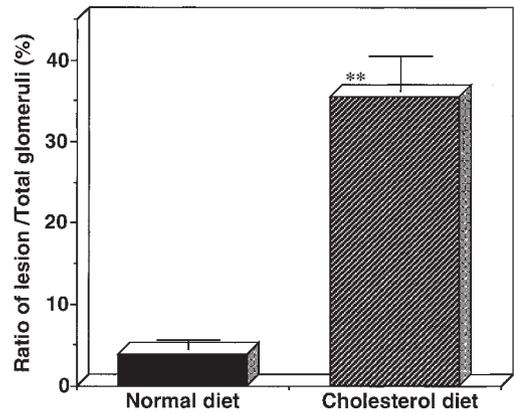


Fig. 5. The effect of dietary cholesterol supplementation after 10 months on glomerular changes, segmental lesion containing PAS-positive material/sclerosis in rats. Each column shows the mean±SD of 6 rats. Significantly different from the Normal diet group. (**p<0.01)

Table. Histopathological findings of the kidney in rats

Findings	Normal diet					1 % Cholesterol diet				
	-	±	+	2+	3+	-	±	+	2+	3+
Glomerulus										
Segmental lesion contained hyalinosis amorphous and/or sclerosis	1	5	0	0	0	0	0	1	4	1
Renal tubules										
Degeneration	1	5	0	0	0	0	0	1	4	1
Hyaline casts	0	6	0	0	0	0	0	4	2	0
Hyaline droplets in tubular epithelium	4	2	0	0	0	0	1	5	0	0
Interstitial										
Small round cell infiltration	3	3	0	0	0	0	0	5	1	0
Fibrosis	6	0	0	0	0	4	2	0	0	0

- : within normal limits, ± : very slight, + : slight, 2+ : moderate, 3+ : severe

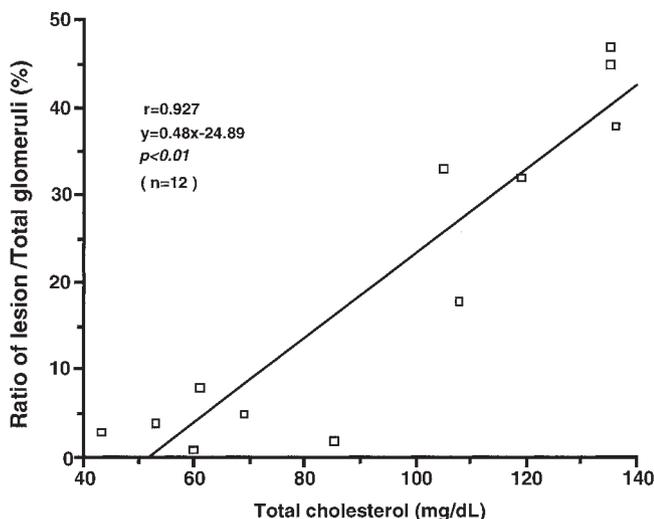


Fig. 6. Relationship between the glomerular changes and blood total cholesterol in rats fed a cholesterol diet and normal diet.

血症状態となる⁴⁻⁶⁾。

今回の実験では、標準飼料に0.25%と低用量のコレステロールを添加した飼料を、無処置の正常ラットに対し食餌性に長期間負荷した。その結果、血中コレステロール、HDL-C、LDL+VLDL-Cは標準飼料群の2倍前後の高値を示した。しかし、動脈硬化指数は上昇傾向を示したのみであり、さらに血圧上昇および大動脈への脂質沈着は認められず、腸間膜血管床の器質的および機能的な変化も示さなかった。

HDL-Cは、ヒトにおける高脂血症の所見と異なり上昇を示した。ラットの高脂血症でのHDLのほとんどがヒトでみられるHDL₃より大型のHDL₂であり、HDL-Cの血中濃度は糸球体から尿中への排泄量が少なくなるため、その産生亢進に伴って上昇する^{10,11)}。さらに、ラットおよびマウスではCETP(コレステロールエステル転送蛋白)活性がほとんど存在していないためHDL-Cは増加が認められることが報告されている¹²⁾。今回みられたHDLの増加はこれらの要因によるものと思われる。

ヒトでは血中コレステロール値の正常域は、150~220 mg/dlであり220 mg/dlを超えると高コレステロール血症と診断される¹³⁾。このため、正常域の約5倍と過度のコレステロールが負荷されたラット高脂血症モデルはヒト臨床現場でのコレステロール値と大きく離れた高値となり、ヒトの病態モデルとして適切なものではない。

この観点から、今回の低用量コレステロールの長期負荷により惹起させた高コレステロール血症は、総コレステロールレベルからみるとヒトで観察されている高脂血症に

比較的近いマイルドなものであると考えられる。

このマイルドな高コレステロール血症が長期間にわたり持続することにより、尿中蛋白排泄量の経時的な増加が認められ、腎に糸球体硬化が惹起された。組織学的検査では、FSGS様の糸球体像や尿細管の変性、尿円柱、尿細管上皮内硝子様小滴貯留、尿細管間質の小円形細胞浸潤が認められた。この糸球体変化と尿蛋白排泄の間に正の相関関係($r=0.937$)が認められており、尿蛋白排泄の原因は主に糸球体病変によるものと考えられた。さらに血漿コレステロール値の高い個体では糸球体変化の頻度が高く、これらに間に正の相関関係が認められた。糸球体硬化のメカニズムについて、Moorheadら¹⁾はメサンギウム細胞の障害とそれに続くメサンギウム細胞の増殖が糸球体硬化を惹起させると説明した。また、Diamondら⁴⁾は蛋白尿と糸球体硬化の病理学的発現機序を以下のように類推した。すなわち、血中のVLDLやLDLが糸球体毛細血管内皮を損傷し、糸球体基底膜に作用してその透過性を亢進させ、その結果として毛細血管間質にあるメサンギウム細胞内へ高分子物質が入り込む。これら貯留した高分子物質がメサンギウム細胞を損傷し、メサンギウム細胞の増殖や基質の過剰生産を起こして最終的に糸球体硬化を惹起させ、結果として蛋白尿が発現するとしている。

Diamondら⁴⁾は、ラットにpuromycin aminonucleoside (PA)で腎症を発生させた後、4%コレステロールと1%コール酸を含む飼料を与えた結果、蛋白尿が増加してPA投与の18週後に腎糸球体にFSGS像が示されたと報告している。また、Peric-Goliaら¹⁵⁾は3%添加食をラットに1年以上の長期間与えることにより、単独であっても血漿コレステロール150 mg/100 ml以上の個体で糸球体硬化が観察されたと報告している。

ラット以外の実験動物を用いた研究では、コレステロールの単独処置でも糸球体硬化が報告されている。すなわち、Frenchら¹⁶⁾は、1%コレステロール添加飼料を与えたモルモットでFSGSと同等の糸球体病変を発現させたと報告しており、Wellmannら¹⁷⁾は2カ月おきに1%コレステロール添加食をウサギに与えて、ヒトの糸球体硬化症(nodular glomerulosclerosis)に類似した糸球体病変を観察したと報告している。

Osatoら¹⁸⁾は、ラットに直接コレステロール食を負荷させなくてもadriamycinを処置することにより二次的に中性脂肪とコレステロール値が上昇して糸球体硬化(FGS)が惹起されることから、血清コレステロール値と糸球体硬化指標に正の相関があったと報告した。

このように、コレステロール値と糸球体硬化症の関連性は、ラット、モルモット、ウサギと多動物種で報告されており、軽度な負荷であっても長期間にわたりコレステロール食を摂取させて観察された今回の腎病変は、コレステロール食に起因したものと推察された。

以上より、ラットを用い食餌性に軽度の高コレステロール血症を長期間維持させた場合、単独処置であっても腎障害が惹起されたことから、コレステロールは正常な腎臓に対しても障害を与えるリスクファクターとなる可能性が示唆された。

文 献

1. Moorhead JF, Chan MK, El-nahas M, Varghese Z. Lipid nephrotoxicity in chronic progressive glomerular and tubulointerstitial disease. *Lancet* 1982 ; 11 : 1309-11.
2. William FK, Bertram LK, Michael PO. Lipids and progressive glomerulosclerosis. *Am J Nephrol* 1988 ; 261-71.
3. 伊藤貞嘉. 腎不全の進行因子. *Bio Clinica* 1998 ; 13 : 37-40.
4. Jonathan RD, Morris JK. Exacerbation of chronic aminonucleoside nephrosis by dietary cholesterol supplementation. *Kidney Int* 1987 ; 32 : 671-7.
5. Bertram LK, Michael PO, Paul GS, Youngki K, William FK, Fred P, Frank D, Gregory H. Renal injury of diet-induced hypercholesterolemia in rats. *Kidney Int* 1990 ; 37 : 880-91.
6. Hugh CR, Lianne W, John W. Cholesterol feeding following unilateral nephrectomy in the rat leads to glomerular hypertrophy. *Nephron* 1991 ; 57 : 453-9.
7. Tsutomu I, Takako M, Koichiro K. Structural and functional alterations of mesenteric vascular beds in spontaneously hypertensive rats. *Jpn Herat J* 1989 ; 31 : 393-403.
8. Short BG, Goldstein RS. Pathology of the aging rat. vol 1, USA : ILSI Press, 1992 : 211-25.
9. 宮原英夫, 丹後俊郎. 医学統計ハンドブック. 東京 : 朝倉書店, 1995 : 156-7.
10. 平野 勉. 実験的ネフローゼにおける高脂血症の発症機序. *腎と透析* 1991 ; 30 : 43-8.
11. Marsh JB. Lipoprotein metabolism in experimental nephrosis. *J Lipid Res* 1984 ; 25 : 1619.
12. 木下 誠, 寺本民生. CETP 蛋白の測定と臨床的意義. *The Lipid* 1998 ; 9 : 158-63.
13. 日本動脈硬化学会高脂血症診断ガイドライン検討委員会. シンポジウム I 高脂血症診断ガイドライン. *動脈硬化* 1996 ; 23 : 259-65.
14. Jonathan RD, Morris JK. Focal and segmental glomerulosclerosis : Analogies to atherosclerosis. *Kidney Int* 1988 ; 33 : 917-24.
15. Peric-Golia L, Peric-Golia M. Aortic and renal lesions in hypercholesterolemic adult, male, virgin Sprague-Dawley rats. *Atherosclero* 1983 ; 46 : 57-65.
16. French SW, Yamanka W, Ostwald R. Dietary induced glomerulosclerosis in the guinea pig. *Arch Pathol* 1967 ; 83 ; 204-10.
17. Wellmann KF, Volk BW. Renal changes in experimental hypercholesterolemia in normal and in subdiabetic rabbits. *Lab Invest* 1971 ; 24(2) : 144-55.
18. Osato S, Onoyama K, Okuda S, Sanai T, Hori K, Fijishima M. Effect of swimming exercise on the progress of renal dysfunction in rat with focal glomerulosclerosis. *Nephron* 1990 ; 55 : 306-11.