



Title	造影剤起因性腎障害-糖尿病ラットにおける超微形態学のおよび生化学的検討-
Author(s)	檜崎, 克雄
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1997, 57(9), p. 586-595
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/17520
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

造影剤起因性腎障害

—糖尿病ラットにおける超微形態学および生化学的検討—

榑崎 克雄

帝京大学医学部放射線科学教室(主任:古井 滋教授)

Contrast-associated Nephrotoxicity: Ultrastructural and biochemical study in diabetic rats

Katsuo Narasaki

The present study was conducted to determine whether or not the pathologic state of diabetic mellitus serves as a risk factor for the induction of nephropathy by iodinated contrast medium (CM). CM was injected into experimentally induced diabetic rats showing early diabetic nephropathy, and these animals were compared with normal rats administered CM.

Various types of CM were injected into diabetic rats, and nephropathy was studied morphologically and biochemically. Electron microscopic ultrastructural study revealed vacuolar formation in the cytoplasm of the proximal tubular epithelial cells (PT cells) in both groups. However, some of these changes occurred less frequently in the diabetic group. In the diabetic group, activation of glomerular mesangial cells other than PT cells was observed with amidotrizoate, and retentive deposits in the mesangial areas were found with iopamidol.

Biochemical study revealed abnormal values suggesting impaired PT cells in both the diabetic and normal groups. These findings corresponded to the results of electron microscopic ultrastructural observation.

The above results suggested the possible occurrence of CM-associated nephrotoxicity in the pathologic stage of diabetic mellitus, even in mild nephropathy.

Research Code No. : 502

Key words : Contrast media, Nephrotoxicity, Rat, Diabetes mellitus, Kidney

Received Dec. 16, 1996; revision accepted Jun. 19, 1997

Departments of Radiology, TeikyUniversity School of Medicine

はじめに

近年ヨード性造影剤(以下, 造影剤)を使用した各種造影検査は増加傾向にあり, 病院内で発生する急性腎不全の約10%は, 造影剤に起因するとの報告がある¹⁾. 造影剤起因性腎障害の危険因子として糖尿病, 多発性骨髄腫, 腎不全の既往, 慢性腎不全, 脱水, 高齢などがよく知られ¹⁾⁻³⁾, これらの危険因子を持つ患者に高浸透圧性造影剤を投与すると, 急性腎不全が起きやすいといわれている^{4),5)}. 造影剤起因性の急性腎不全例の90%以上は何らかの腎機能障害が存在していた例であり, そのなかの約半数は糖尿病によるものであったという⁶⁾.

造影剤起因性の腎障害は, 従来より主に近位尿細管上皮細胞(以下, PT cells)の障害により説明され, 原形質内の空胞形成に原因が求められてきた⁷⁾. PT cellsの変化に関する報告は多く, 種々の高浸透圧性溶液を投与したときに見られる急性腎不全と類似して⁸⁾, 造影剤投与によりPT cellsの原形質内の空胞形成が観察されたことより^{7),9),10)}, 初期の研究では造影剤の高浸透圧性が原因と推測された. その後, これらの空胞は, 造影剤に対するpinocytic vacuoleであることが証明され¹¹⁾, 現在では造影剤のPT cellsに対する直接的な化学毒性と考えられてきている¹²⁾.

糖尿病腎に対する造影剤起因性腎障害の機序を解明するため, 薬剤誘発の糖尿病動物において研究された論文は二, 三見られる^{13),14)}. しかし, これらの論文は主にPT cellsについてのみ観察しており, 糖尿病性腎症の本体である糸球体に関して言及した報告は殆どない¹⁵⁾.

本実験は早期の糖尿病腎の状態のラットをモデルとして, 造影剤起因性腎障害をPT cellsの原形質内の空胞形成に絞り込んだ観察とせず, 主としてPT cellsの空胞形成とPT cellsの機能を示す生化学的検索項目から, 糖尿病において重要である糸球体を含めて検索し, 全体的にデータを解析した. さらに, 投与された造影剤については, その物理生化学的性質の差による糖尿病の病態下での腎機能障害への関わりの違いを, 正常ラット群を対照として, 比較検討した.

Table 1 Animal groups divided in this experiment

Untreated rats	Rats treated with agents	
	with control agents (Cont)	with control media (CM)
H	H + NaCl H + Mann	H + Ami H + Iox H + Iop H + Iov
DM	DM + NaCl DM + Mann	DM + Ami DM + Iox DM + Iop DM + Iov

H: healthy, DM: diabetes mellitus, NaCl: physiological saline, Mann: mannitol, Ami: amidotrizoate, Iox: ioxaglate, Iop: iopamidol, Iov: ioversol. The group names listed in Table 1 were cited in the text.

方 法

1. 実験的糖尿病ラット(以下, DMラット)の作成

24時間絶食の150~250gの成熟雄性Wistarラットにエーテル麻酔下で, streptozotocin 55mg/kgを尾静脈より1回注射により, DMラットを作製した. 造影剤の投与実験は, streptozotocin投与後約4週間で血糖が300mg/dl以上であるが, 形態学的に糖尿病性腎症が発現されていない時期のラットを用いた. なお, DMラットの一部はstreptozotocin投与後さらに4週間以上経過を観察し, 4カ月および6カ月の時点で形態学的に糖尿病性腎症に至ったことを確認してある.

2. 動物のグルーピング

Table 1のごとく動物をグルーピングした. 薬剤未投与で正常ラットをH群, 糖尿病ラットをDM群とした. 各薬剤はそれぞれ, 生理食塩水: NaCl, D-mannitol: Mann, amidotrizoate: Ami, ioxaglate: Iox, iopamidol: Iop, ioversol: Iovと略記し, 動物と薬剤の組み合わせにより, Table 1のごとく14グループに分け, 各群は5匹とした. 以下の文章ではTable 1の名称を使用する.

また, 各ラットは薬剤投与後から組織採取時まで絶食とした.

3. 造影剤

造影剤はイオン性造影剤として, amidotrizoate (Urografin 60%, Schering Japan), ioxaglate (Hexabrix 320, Eiken-Tanabe, Japan)を, 非イオン性造影剤として, iopamidol (Iopamiron 300, Schering Japan), ioversol (Optiray 320, Yamanouchi Japan)を, 各々4gI/kg投与した. 造影剤は, イオンの有無, 滲透圧の差, ダイマーかモノマーかによって分類し, Table 2に示した. 対照薬剤は, 量負荷とし生理的食塩水を15ml/kg, 滲透圧負荷としてD-mannitol (Mannitol 20%®, 日研, 1317mOsm/kgH₂O) 8ml/kgをそれぞれ投与した.

以上の各薬剤は, DMラットおよび正常ラット群にエーテル麻酔下で, 尾静脈より緩徐に投与し, 検索のための組織および血液は, 各薬剤投与24時間後に採取した.

4. 形態学的検索

Nembutal (Pentobarbital sodium)による腹腔内麻酔下で, 採血時に腎臓を採取し, 速やかに, 皮質を細切し, 2%glutaraldehydeおよび4%paraformaldehydeにて固定, 通常の方法で包埋, 超薄切し, ウラン・鉛の二重染色を実施し, 透過電顕(JEOL-100C, NEC, Tokyo, Japan)にて観察した.

5. 生化学的検索

1)尿の検索

採取した24時間尿は滲透圧(氷点降下法), アルブミン(U-Alb, BCG法), Na(Flame photometry), K(Flame photometry), Cl(Chloride meter), N-acetyl-β-D-glucosaminidase(以下, NAG)(MCP比色法), クレアチニン(U-Cr, アルカリピクリン酸法)の各項目について計測した.

2)血液の検索

各群のラットはNembutalによる腹腔内麻酔下で, 腹部大動脈へのカテーテル挿入により採血し, 血清を分離し凍結保存

Table 2 Basic propaties of the injected contrast media

Contrast medium	Type	Iodine contents (mg/ml)	Osmolality (m Osm/ KgH ₂ O)	Osmolality ratio	MW	Viscosity at 37° Ccp	LD50 (rat IV)
amidotrizoate 60%	ionic monomer, hyperosmolar	292	1776	6	613.92	3.83~4.17	9.3gI/Kg
ioxaglate 320	ionic dimer, low osmolar	320	584	2	1268.89	7.5	> 7.2gI/Kg (♂♀) 7.2gI/Kg (♀)
iopamidol 300	nonionic monomer, low osmolar	300	796	3	777.09	4.4	13.4gI/Kg (♂) 12.2gI/Kg (♀)
ioversol 320	nonionic monomer, low osmolar	320	719	2	807.12	5.8	14.0gI/Kg (♂) 14.4gI/Kg (♀)

IV: intravenous injection MW: Molecular weight

Table 3 Results of findings of electron microscopic changes of kidney

injected materials	grouping	proximal tubules				glomerulus		
		simple vacuole	complicated vacuole	tendency of detachment of epithelial cells	enlargement of capillaries	mesangial cell	mesangial area	epithelial cell
						activation	retentive deposits in sub-BM area	vacuole
control	DM healthy	-	-	-	+	-	-	-
0.9%NaCl	DM healthy	-	-	-	+	-	-	-
mannitol	DM healthy	-	-	-	+	-	-	-
amidotrizoate	DM healthy	±	±	±	+	+	-	-
ioxaglate	DM healthy	+	+	+	+	-	-	+
iopamidol	DM healthy	±	+	-	+	-	+	-
ioversol	DM healthy	+	+	-	+	-	-	±

- : not seen, ± : minimal, + : moderate, ++ : marked

後、インスリン(RIA)、血糖(Glu-DH法)、Na、K、Cl、尿素窒素(以下、BUN)、総蛋白(TP、Biuret法)、アルブミン、血清クレアチニン(S-Cr)、浸透圧の各項目について計測した。

3) A. B. の各測定値より24時間法によるクレアチニークリアランス(以下Ccr)、FENa(%), FECl(%), NAG/尿中クレアチニン(NAG/Cr)を計算した。計算式を以下に示す。

Ccr = 尿中クレアチニン × 一分間尿量(ml) × 100/血清クレアチニン × 測定時間(min) × 体重(g),

FENa(%)(Cl) = 尿中Na(Cl) × 血清クレアチニン × 100/血清Na(Cl) × 尿中クレアチニン。

4) 統計的検索

得られた各観測値について、DMラットと正常ラットの生化学データはstudent's t-testを、また、正常とDMラットへ

の、各薬剤投与群の生化学データはANOVA testを実施し、 $p < 0.05$ 以下を有意とした。

結 果

1. 電顕形態学的検索結果

電顕形態学的検索結果をTable 3とTable 4にまとめた。

1) H 群

正常ラットの腎の形態は主に尿細管および糸球体について観察し、本実験に用いたラットについて正常形態が保たれていることを確認した。

2) H + Cont, H + CM群

a. PT cellsの変化(Fig.1-A~E)

Table 4 Summary of electron microscopic findings

injected materials	Proximal tubules		Glomerulus		
	simple vacuole	complicated vacuole	Mesangial cell	Mesangial area	Epithelial cell
			activation	retentive deposits in sub-BM area	vacuole
amidotrizoate	DM ↓	DM ↓	DM		
ioxaglate	DM ↓	DM ↓			DM ↑
iopamidol	→	DM		DM	
ioversol	DM ↓	→			DM

DM: responses only seen in DM rats group, DM ↑ : marked responses seen in DM rats group, → : no differentiated responses between DM and healthy rats group, DM ↓ : marked responses seen in healthy rats group.

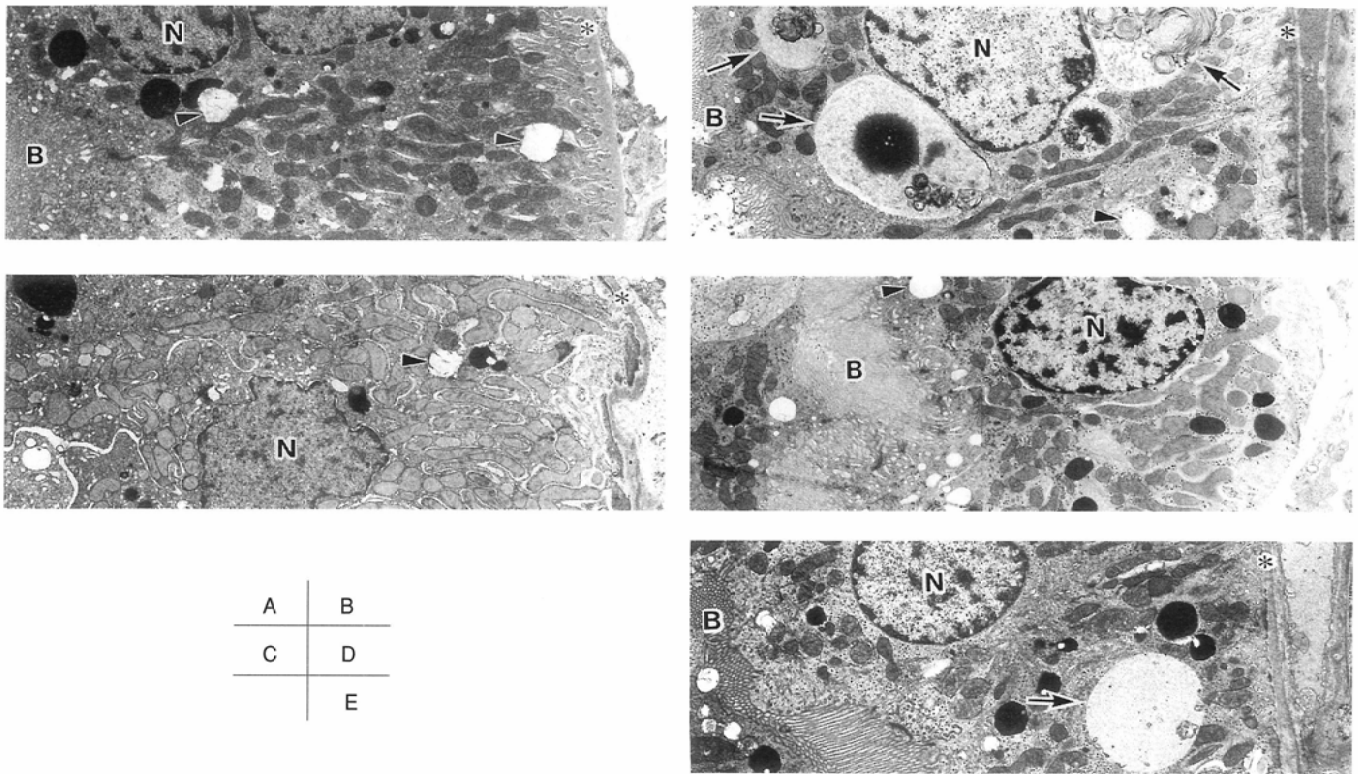


Fig.1 Electron micrograms of healthy rat proximal tubules injected physiological saline and contrast media.

(A): physiological saline, (B): amidotrizoate, (C): ioxaglate, (D): iopamidol, (E): ioversol.

BB: brush border, N: nucleus, *: basement membrane, arrow: complicated vacuole, arrowhead: simple vacuole.

Simple vacuoles were observed in all groups other than the H + Iop group (D). Many simple vacuoles were observed particularly in the H + Iox group (C). Irregular impression of the basement membrane was observed in both the H + Ami (B) and H + Iox (C) groups. The incidence of irregular or dissected epithelium was higher in the H + Iox group (C) which showed many vacuoles overall.

H + Cont群では、H群と比較し形態学的変化は観察されなかった。

PT cells内には通常観察される機能的な空胞のほかに、造影剤を投与することにより、特徴的な空胞形成が観察された。これについては形態学的に、通常見られる非特異的な空胞でelectron dense granulesの含有が少ないものをsimple vacuoleとし、一方electron dense granulesやミエリン状のものを多量に含み、大きさはsimple vacuoleよりやや小型のものを、complicated vacuoleとして区別して観察した。これら空胞の分布は腎のPT cells全体としては均一ではなく、PTcellsの配列の不規則化、基底膜陥入の不規則化や胞体の剥離が見られる部分が多かった。Simple vacuoleは、H+CM全群で観察されたが、H + Iox 群 (Fig.1-C) およびH + Iov群 (Fig.1-E) で多かった。

Complicated vacuoleは、H + Iop 投与群 (Fig.1-D) 以外では全体で見られ、H + Iox 群 (Fig.1-C) で特に多かった。基底膜陥入の不規則化はH + Ami (Fig.1-B) およびH + Iox群 (Fig.1-C) で観察され、全体的に空胞の多かったH + Iox群では上皮の不規則化や剥離の頻度がより高かった。

b. 糸球体の変化

H + MannおよびH + CM群で、毛細血管の拡張が見られた。H + CM群でメサングウム細胞を含む糸球体の構成細胞に正常と比較し核の陥入の増加と胞体の腫大が観察された。さらに、上皮内の空胞がH + Iox群で軽度で観察された。

3) DM群

DM群は典型的な糖尿病腎には至っていないが、糸球体構成細胞(上皮、内皮、メサングウム細胞)は全体的に胞体の萎縮と核縁の不規則な凹部形成があり、ことにメサングウム細胞では胞体の萎縮により胞体突起は棘枝状となり、メサングウム領域は減少し、それに伴う毛細血管の拡大が観察されたが、基底膜に肥厚は無く正常であった (Fig.3-A)。

PT cellsに軽度の萎縮があり、核縁には軽度の不規則化があり、基底膜陥入は軽度に萎縮し、刷子縁にも不規則化が見られた。胞体の並び方は不規則となり、剥離部も見られた。機能的な空胞は増加し、小硝子滴も増加していた (Fig.2-A)。遠位尿細管には著明な水腫および脱落が観察された。

4) DM + Cont, DM + CM群の腎の変化

a. PT cellsの変化 (Fig.2-A ~ E)

DM + NaCl およびDM + Mann 群ではDM群と同様の所見を示した。

Simple vacuoleはDM + CM群の全群で観察されたが、DM + Ami (Fig.2-B) およびDM + Iop群 (Fig.2-D) では軽度であった。complicated vacuoleは、DM + CM群の全群で観察されたが、DM + Ami群 (Fig.2-B) では軽度であった。基底膜陥入の不規則化はDM + Ami (Fig.2-B) およびDM + Iox群 (Fig.2-C) で観察され、全体的に空胞の多いDM + Iox群では上皮の不規則化や剥離の頻度がより高かった。DM + CM 群ではH + CM群に比しPT cells内の空胞は概して発現頻度が低下し

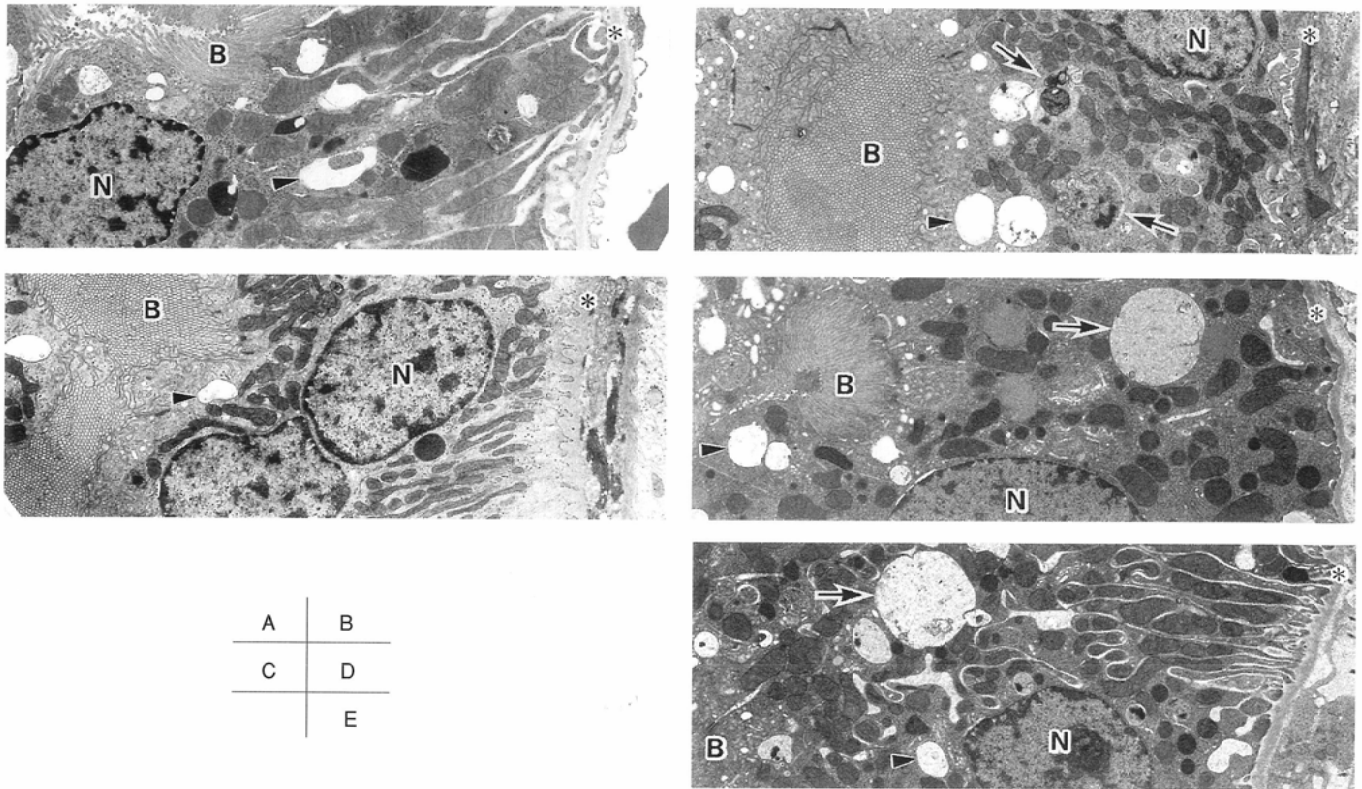


Fig.2 Electron micrograms of diabetic rat proximal tubules which injected physiological saline and contrast media.

(A): physiological saline, (B): amidotrizoate, (C): ioxaglate, (D): iopamidol, (E): ioversol.

BB: brush border, N: nucleus, *: basement membrane, arrow: complicated vacuole, arrowhead: simple vacuole.

Diabetes induced changes observed in the DM + NaCl group were atrophy of PT cells, irregular arrangements of the cytoplasm and dissected regions. The numbers of functional vacuoles and hyaline droplets increased. Simple vacuoles were observed in all of contrast medium injected groups(B~D), but the intensity was moderate in the DM + Ami(B) and DM + Iop(D) groups. Similarly, complicated vacuoles were observed in all the DM + CM groups, but the intensity was moderate in the DM + Ami(B) group. Irregular impression of the basement membrane was observed in the DM + Ami(B) and DM + Iox(C) groups: the incidence of irregular of dissected epithelia was higher in the DM + Iox group showing a high frequency of vacuoles overall.

ていたが、上皮の不規則化、剥離所見は同様かそれ以上に観察された。

b. 糸球体の変化(Fig.3, 4)

DM + ContおよびDM + Mann群で全体的な毛細血管の拡張が観察されたが、この変化は糖尿病を基盤として既にDM群に存在しており特異的な変化ではなかった。メサンギウム細胞については、DM + Ami群(Fig.3-C)では、核の陥入が増加し、胞体は粗面小胞体の増加を伴ったactivationがあり、メサンギウム基質の増加を伴っていた。DM + Iop群(Fig.4-A)ではメサンギウム領域で一部に、基底膜直下にamorphous electron denseなretentive depositsが観察された。DM + Ami群以外のDM + CM群では糖尿病性変化に加えて軽度の核の陥入の増加と胞体の樹枝状のactivation(dendritic activation)が観察された(Fig.3-B, Fig.4-A, B)。上皮内の空胞がDM + IoxおよびDM + Iov群(Fig.4-C)で観察された。

2. 生化学的検索結果

1) DMラットでの基礎的变化

H群とDM群の生化学的検査値の比較において(Table 5), DM群では、H群に比し、尿量は著明に増加し、BUN, NAG/Cr, FENa(%)の有意な上昇、尿中クレアチニンの有意な減少が見られた。

2) 薬剤投与による変化

a. H + Cont, H + CM群の生化学データ

H + AmiおよびH + Iox群では、H + Mann, H + Iop, H + Iov群と比較してFENa(%)が有意($p < 0.01$)に上昇していた。H + Mann群ではH + Iox群と比較して尿浸透圧が有意($p < 0.05$)に低下していた。血清クレアチニン, BUN, Ccr, NAG, NAG/Crは、H + ContおよびH + CM群全体で、有意な変化は見られなかった。

b. DM + Cont, DM + CM群の生化学データ

NAGがDM + Iox群において、DM + Ami, DM + Iop($p < 0.05$), DM + Iov($p < 0.01$)群との各群間比較で有意に上昇していた。血清クレアチニン, BUNの低下とCcrの改善が、DM + Mann群において他のDM + CM群との各群間比較で有意に見られた。DM + Mann群では、DM + Ami群と比較して尿浸透圧が有意に($p < 0.05$)低下していた。

3) 造影剤投与によるDMラットと正常ラットとの比較

DM + ContおよびDM + CM群の結果をH + ContおよびH + CM群と比較すると、H + AmiおよびH + Iox群でFENa(%)が上昇していた。一方、DM + Iox群でNAGが上昇し、DM + Mann群において血清クレアチニン, BUNの低下とCcrの改善が示された。DM + Mann群では正常ラット群間ではH

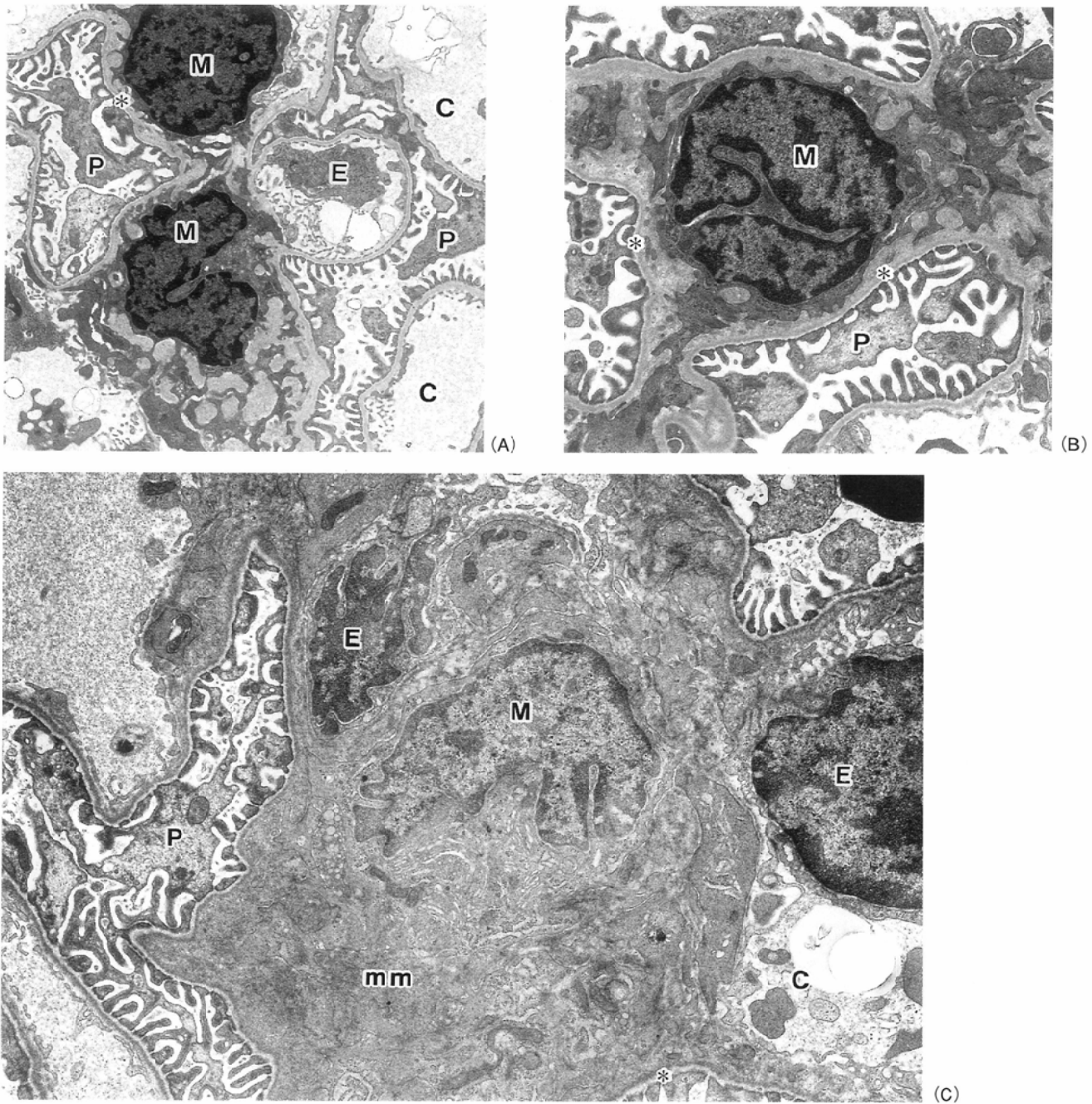


Fig.3 Electron micrograms of diabetic rat glomerulus, untreated (A), injected ioxaglate (B) and amidotrizoate (C). N: nucleus, E: epithelial cell, P: podocyte, M: mesangial cell, C: capillary, *: basement membrane, mm: mesangial material. Although the typical diabetic kidney did not develop in the DM group, their glomeruli constituting cells showed atrophy of the cytoplasm and formation of irregular nuclear marginal impression. Particularly in the mesangial cells, it was observed that the cytoplasmic process became spiny due to atrophy of the cytoplasm, thereby leading to narrowing of the mesangial area, which resulted in dilatation of the capillaries (A). In the DM + Iox group, swelling of the podocytes, increased nuclear impressions of the mesangial cells, and dendritic activation causing arborescent extension of the cytoplasm were observed in addition to the diabetic changes (B). In the DM + Ami group, increased nuclear impressions, cytoplasmic activation with rER growth and increased mesangial matrices were present (C).

+ Ami群, DMラット群間ではDM + Iox群でそれぞれ尿滲透圧が低下していた。

3. 造影剤の性質との関連性

造影剤のなかで、より分子量の高いioxaglate (H + Iox, DM + Iox 群) およびioversol投与群 (H + Iov, DM + Iov群) にPT cellsのcomplicated vacuoleやsimple vacuoleが多く観察された。DM + CM 群において糸球体のメサンギウム細胞のactivationがイオン性モノマーであるamidotrizoate 投与群

(DM + Ami群)で、また、メサンギウム領域のretentive depositsが低分子量の非イオン性モノマーであるiopamidol投与群 (DM + Iop群) で観察された。

4. 結果のまとめ

DMラット腎ではすでに形態学および生化学的变化が存在しており、造影剤投与により修飾された結果が観察された。H + CM群におけるPT cellsの観察では、PT cellsの原形質内の空胞形成が多数観察され、特に低浸透圧性造影剤に

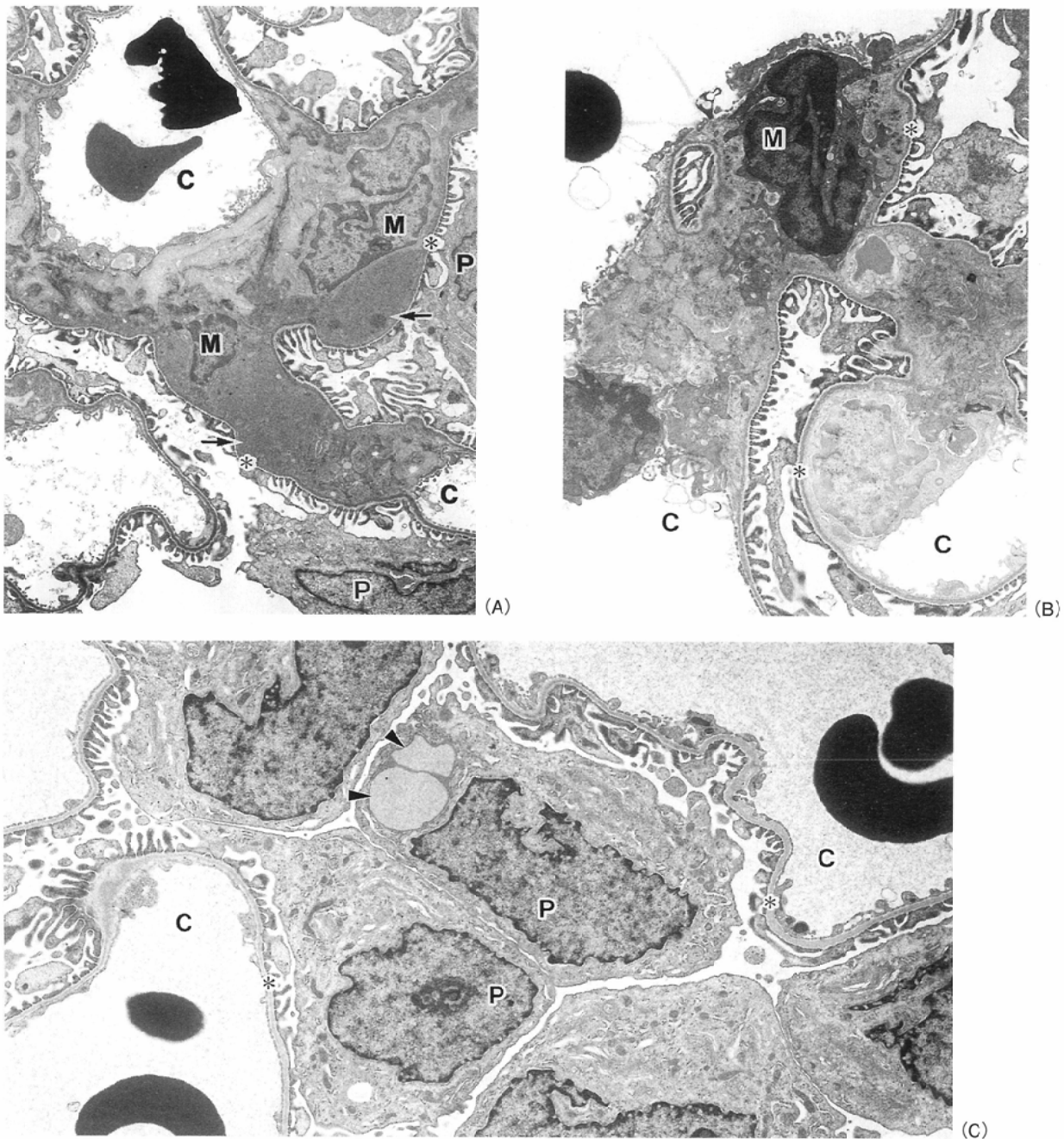


Fig.4 Electron micrograms of diabetic rat glomerulus, injected iopamidol (A), ioversol (B and C).

N: nucleus, P: podocyte, M: mesangial cell, C: capillary, *: basement membrane, arrow: retentive deposits, arrowhead: vacuole.

In addition to the diabetic changes, the DM + lop and DM + lov groups showed an increase in nuclear impressions of the mesangial cells in some part of the dilated intercapillary mesangial area, and dendritic activation causing tree like extension of the cytoplasmic processes (A and B). In the DM + lop group, amorphous electron dense retentive deposits were observed immediately underneath the basement membrane around the cytoplasm, which was a finding specific to this group (A). Vacuoles were observed in the epithelial cells of the DM + lov group (C).

において多く観察されるという傾向があり、DM+CM群ではむしろ減少していた。PT cellsの基底膜陥入の不規則化は両ラット群でイオン性造影剤投与群で多く観察された。

PT cellsの障害を示す生化学的データでは、H+CM群でFENa(%)がイオン性造影剤において有意に高く、DM+CM群では、DM+Iox群においてNAGが、DM+Ami, DM+Iop群($p < 0.05$), DM+Iov群($p < 0.01$)と比較し有意に上昇しており、PT cellsの障害はイオン性造影剤において強く見られ、これは電顕形態学的には基底膜陥入の不規則化の観察

結果に一致した。糸球体の観察では上皮細胞に、DM+Iox群でdepositsが観察され、メサンギウム領域の変化はDMラット群のみに観察されたが、糸球体に関する生化学的に機能を反映するCcrには有意な所見は得られなかった。

考 察

Streptozotocinにより膵臓のB細胞は選択的に破壊されインスリン依存性の糖尿病が実験的に作成されるが¹⁶⁾⁻¹⁸⁾、文献

Table 5 Comparison of the DM and healthy rats group on baseline data

	Diabetic rat group (n = 5)	Healthy rat group (n = 10)	P value
body weight (g)	301 ± 26	392 ± 34	< 0.001
glucose (mg/dl)	431 ± 153	197 ± 15	< 0.001
insulin (μU/ml)	6 ± 2	12 ± 4	< 0.001
urine volume (ml/day)	25 ± 7	14 ± 6	< 0.001
TP (g/dl)	5.5 ± 0.4	5.7 ± 0.2	NS
Alb (g/dl)	4.5 ± 0.3	4.4 ± 0.2	NS
U-Alb (g/dl)	under 0.4	under 0.4	NS
creatinin (mg/dl)	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	NS
BUN (mg/dl)	26 ± 12	16 ± 3	< 0.01
Ccr (ml/min)	135 ± 35	125 ± 32	NS
FENA (%)	0.9 ± 0.3	0.4 ± 0.2	< 0.01
FECl (%)	1.4 ± 0.8	0.8 ± 0.1	NS
NAG (U)	11 ± 7	12 ± 8	NS
NAG/Cr (U/g)	0.55 ± 0.43	0.16 ± 0.11	< 0.01
U-Creatinin (mg/dl)	32 ± 36	78 ± 28	< 0.001
Na (mEq/l)	140 ± 4	143 ± 7	NS
K (mEq/l)	4.6 ± 0.5	4.8 ± 0.3	NS
Cl (mEq/l)	100 ± 3	104 ± 5	< 0.05
U-Osmolarity (m Osm/KgH ₂ O)	1436 ± 430	1098 ± 310	NS

Comparisons were performed by Student's t-test. NS: not significant.

的にはstreptozotocin投与により、6~9カ月でPT cellsに原形質内の空胞形成やmyeloid bodyの形成、基底膜の肥厚、糸球体のメサングウム細胞へのelectron dense materialsの貯留等の糖尿病性的変化が出現すると報告されている¹⁹⁾。

造影剤起因性腎障害を検討するにあたり、投与される造影剤の量は重要と考えられる。著者は本実験の投与量の決定にあたり、1)尿細管上皮細胞では、生理食塩水を投与した場合は異なる空胞が出現し始める造影剤濃度は2gI/kg~5gI/kgで、明らかな空胞が出現する濃度は7.5gI/kg~10gI/kgであるとの報告があり^{12),20)}、また、2)著者が行った予備実験では4gI/kgと8gI/kgでは、空胞は出現したが、組織学的および生化学的結果で大差がなかったことを考慮した。従来よりこの空胞が急性腎不全の主要因であると考えられていることから、造影剤による急性腎不全の機序を解明するため、臨床的投与量としては比較的高用量ではあるが空胞が出現する量として4gI/kgを選択した。

本実験において、H + Cont, H + CM群におけるPT cellsの観察では、従来の報告^{7),9),10)}と同様に原形質内の空胞形成が多数観察された。これらの空胞は低浸透圧造影剤において多いという傾向がある一方、浸透圧負荷であるH+Mann群においては観察されなかった。これらの空胞を simple vacuole と complicated vacuole と称し分けて観察すると、complicated vacuole の多いPT cellsでは急性腎不全における特徴的所見である尿細管上皮の剥離傾向や基底膜嵌入の不規則化を伴うことが多く、この傾向はイオン性造影剤において見られ

た。生化学データではH + CM群においてFENA(%)がイオン性造影剤において有意に高く、DM + CM群では、NAGがDM + Iox群において、他の造影剤投与群と比較し有意に上昇しており、PT cellsの障害はイオン性造影剤において強いと考えられ、形態学的観察結果と一致した。したがって、simple vacuoleは、造影剤の浸透圧等の物理化学的特性に強く依存し、complicated vacuole は特異的細胞反応を強く反映している可能性が高いと考えられた。近年、この complicated vacuoleの出現に着目している論文もあるが¹²⁾、造影剤の種類は1種類であり、かつ生化学的検索はなく、その機序についても言及していない。著者のように生化学データに裏付けされた、その機序を解明した論文は初めてである。

さらに、PT cellsの空胞形成の出現頻度を比較すると、Table 4

のごとく simple vacuole および complicated vacuole の形成はともにH + CM群よりもDM + CM群において低下するという傾向が見いだされた。このような結果は報告されているが¹⁴⁾、その機序は不明であるとしている。著者はこの現象を、糖尿病による血流量の増加と造影剤の浸透圧利尿による多尿で解釈した。すなわち糖尿病による多尿が原尿中に排泄される造影剤の濃度を低下させること、および糖尿病によるhyperfiltrationによりPT cells中の尿の流速、量の上昇によりPT cellsと造影剤との接触時間が短縮することにより説明される。今回作製したDMラットでは造影剤を投与する以前より既に、PT cellsの異常を示す生化学データや基底膜陥入の不規則化、剥離所見などが存在していた。したがって、単にPT cellsの空胞の出現頻度の低下が糖尿病という病態下における造影剤起因性腎障害のリスクの低下を示すのではなく、PT cellsに病因が求められる急性腎不全の可能性も十分考えられる。

PT cellsと同様に糸球体より尿路側である糸球体上皮細胞では、DM + Iox群において、またDM + Iov群では軽度でdepositsが観察された。これは基底膜を通過する際に、filtration slit membraneへのイオンチャージ等の何らかの受動的影響を与えた結果ではないかと考えられた。糸球体上皮細胞はPT cellsと同様に上皮系の細胞であるから、ioxaglate投与により上皮系細胞が障害を受けたと考えられる。

糸球体の観察では、H + CM群において軽度の変化が見られたが、特異的なものではなかった。形態学的に特異な所

Table 6 Results of laboratory findings concerning renal function after injection of control agents and CM in the healthy rat group

	0.9% NaCl	mannitol	amidotrizoate	ioxaglate	iopamidol	ioversol
TP (g/dl)	5.6 ± 0.7	5.8 ± 0.2	5.4 ± 0.8	5.7 ± 0.2	5.8 ± 0.3	5.7 ± 0.2
Alb (g/dl)	4.2 ± 0.4	4.3 ± 0.2	4.1 ± 0.7	4.3 ± 0.2	4.3 ± 0.3	4.5 ± 0.7
Cr (mg/dl)	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.04 ^a	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.04	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1
BUN (mg/dl)	14 ± 4	14 ± 2	16 ± 5	15 ± 2	16 ± 3	16 ± 2
Ccr (ml/min)	126 ± 33	145 ± 36 ^b	123 ± 35	137 ± 11	137 ± 35	108 ± 17
FENA (%)	0.3 ± 0.1 ^c	0.2 ± 0.1	0.5 ± 0.1 ^d	0.4 ± 0.1 ^e	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1
FECI (%)	0.7 ± 0.2 ^f	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.2 ^g	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1
NAG (U)	22 ± 6	21 ± 8	22 ± 8	24 ± 10	24 ± 10	21 ± 13
NAG/Cr (U/g)	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.01
U-Cr (mg/dl)	77 ± 17	55 ± 11	100 ± 60	90 ± 44	99 ± 72	98 ± 51
urine volume (ml/day)	15 ± 4	23 ± 9 ^h	15 ± 9	17 ± 10	18 ± 11	13 ± 7
U-Osmolarity	1021 ± 222	844 ± 184 ⁱ	1648 ± 760	1323 ± 411	1168 ± 837	1360 ± 619

Multiple Comparisons were performed by one factor analysis of variance.

a; p < 0.05 compared with ioxaglate. p < 0.01 compared with 0.9% NaCl, iopamidol and ioversol.

b; p < 0.05 compared with ioversol. c; p < 0.01 compared with mannitol and ioversol. p < 0.05 compared with amidotrizoate and iopamidol.

d; p < 0.01 compared with mannitol, iopamidol and ioversol. e; p < 0.01 compared with mannitol, iopamidol and ioversol.

f; p < 0.01 compared with mannitol, ioxaglate, iopamidol and ioversol. p < 0.05 compared with amidotrizoate.

g; p < 0.05 compared with ioxaglate and ioversol. p < 0.01 compared with amidotrizoate and iopamidol.

h; p < 0.05 compared with ioversol. i; p < 0.05 compared with amidotrizoate.

Table 7 Results of laboratory findings concerning renal function after injection of control agents and CM in the diabetic rat group

	0.9% NaCl	mannitol	amidotrizoate	ioxaglate	iopamidol	ioversol
TP (g/dl)	5.0 ± 0.5	5.1 ± 0.4	5.2 ± 0.1	5.0 ± 0.2	5.0 ± 0.3	5.0 ± 0.2
Alb (g/dl)	4.4 ± 0.7	3.9 ± 0.2	4.0 ± 0.2	3.8 ± 0.1	3.8 ± 0.2	3.8 ± 0.2
Cr (mg/dl)	0.7 ± 0.1	0.5 ± 0.1 ^a	0.6 ± 0.1 ^b	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1
BUN (mg/dl)	53 ± 13	30 ± 16 ^c	43 ± 14	59 ± 21	39 ± 13	46 ± 18
Ccr (ml/min)	62 ± 28 ^d	152 ± 40 ^e	85 ± 34	88 ± 26	119 ± 20	99 ± 2
FENA (%)	0.6 ± 0.3	0.3 ± 0.1 ^f	0.4 ± 0.3	0.6 ± 0.3	0.7 ± 0.4	0.8 ± 0.2
FECI (%)	1.3 ± 0.7 ^g	0.4 ± 0.1 ^h	1.4 ± 0.9 ⁱ	0.7 ± 0.2	0.6 ± 0.3	1.1 ± 0.3
NAG (U)	20 ± 6	23 ± 4	22 ± 6	32 ± 6 ^j	21 ± 9	20 ± 6
NAG/Cr (U/g)	0.6 ± 0.2	0.6 ± 0.2	0.8 ± 0.6	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.2	0.6 ± 0.2
U-Cr (mg/dl)	30 ± 11	34 ± 7	36 ± 17	51 ± 13 ^k	45 ± 6	34 ± 8
urine volume (ml/day)	21 ± 9	34 ± 5	19 ± 5	17 ± 3 ^l	26 ± 10	27 ± 7
U-Osmolarity	1468 ± 393	1081 ± 288 ^m	1422 ± 344	1549 ± 389	1443 ± 589	1317 ± 270

Multiple Comparisons were performed by one factor analysis of variance.

a; p < 0.01 compared with 0.9% NaCl, ioxaglate, iopamidol and ioversol. b; p < 0.05 compared with ioxaglate.

c; p < 0.05 compared with ioxaglate p < 0.05 compared with 0.9% NaCl.

d; p < 0.05 compared with ioxaglate and ioversol. e; p < 0.05 compared with 0.9% NaCl, amidotrizoate, ioxaglate and ioversol.

f; p < 0.05 compared with iopamidol and ioversol. g; p < 0.05 compared with iopamidol.

h; p < 0.01 compared with amidotrizoate and ioversol. i; p < 0.01 compared with iopamidol. p < 0.05 compared with ioxaglate.

j; p < 0.05 compared with mannitol, amidotrizoate and iopamidol. k; p < 0.05 compared with 0.9% NaCl, mannitol and iopamidol.

l; p < 0.05 compared with iopamidol. m; p < 0.05 compared with ioxaglate.

見は、DM + CM群で糸球体のメサンギウム細胞のactivationがDM + Ami群で観察されたことと、メサンギウム領域のretentive depositがDM + Iop群で観察されたことであった。DM + Ami群におけるメサンギウム細胞のactivationは、造影剤の持つ物理化学的な性質とメサンギウム細胞の貪食能、血行動態、糸球体毛細血管の状態、メサンギウム基質との親和性といったメサンギウム領域側の因子が錯綜しているものと思われた。DM群ではメサンギウム細胞は萎縮状態で、正常に比しベースとしてすでに機能低下が考えられたが、この反応も糖尿病状態の特異性と造影剤が本来持つて

いる性状が組み合わさったものであり、細胞膜への何らかの刺激に属する変化と思われる。メサンギウム領域のretentive depositがDM + Iop群で観察されたが、これは造影剤側の特性とDMラットにおけるメサンギウム細胞の萎縮、浸透圧利尿および腎血流量の増大による拡張した毛細血管と接するメサンギウム領域の面積の延長、およびhyperfiltrationといった糸球体側の特性に依存する。これらの要因によるmesangial channelの過負荷により、メサンギウム領域にdepositが生じたと考えられる。mesangial channelに関しては、トレーサーを用いた実験²¹⁾によりある種の物質はメサンギウ

ム領域を通過し、そのルートとして内皮下腔およびメサンギウム細胞と毛細血管腔の間の内皮細胞層の二つmesangial channelがあると考えられている。実験的腎炎にて高分子蛋白が循環血液中に長い間少量存在すると、次第にmesangial channelが過負荷となり糸球体障害を引き起こすと一般に考えられており²²⁾、今回の観察結果を裏付けるデータと考えられる。一方、生化学的な観察では糸球体の機能を反映するCcrには有意な所見は得られなかったが、このことはラットという小動物において、代謝ケージで24時間尿量を測定することの難しさ、小動物故の筋肉量の少なさに由来する血清クレアチニン値の変動の少なさ、尿中へ餌に含まれる蛋白や便の混入を避けるために絶食にしたことなど技術的に解決しなければならぬ問題もあり、今後の課題であった。

以上をまとめると、投与された造影剤は腎臓を通過するが、基底膜通過前の障害部位が内皮細胞およびメサンギウム領域であり、基底膜通過後の障害部位が上皮細胞およびPT cellsであり、後者二つは上皮系細胞として一括して認識される。造影剤の投与による腎障害を一面的に捉えるのではなく、このように基底膜通過前および基底膜通過後における障害を別個に捉えると、本実験で観察されたような投

与された造影剤の物理化学的特性の差による多彩な反応が理解しやすくなるのではないかと考えられた。

結 語

DMラットを用いた実験により、糖尿病病態下での造影剤起因性腎障害は、臨床的に捉えにくい軽度の腎障害の時期においても腎障害が生じることが証明された。その機序は、従来より提唱されてきたPT cellsの空胞化のみによるのではなく、PT cellsの上皮の剥離所見や糸球体病変が関与するものと考えられた。

本論文の要旨は第84回日本病理学会総会及び第55回日本医学放射線学会学術発表会で発表した。

謝辞

この研究全般にわたり直接指導いただいた帝京大学医学部放射線科学教室の古井 滋教授に深謝致します。

さらにご指導・ご校閲を賜りました帝京大学医学部第二病理学教室の安田寛基教授、同医学部放射線科学教室大島統男助教授、同医学部放射線科学教室東 静香講師、同医学部第二病理学教室植田壽々子講師に深謝致します。

文 献

- 1) Hou SH, Bunshinsky DA, Wish JB, et al: Hospital-acquired renal insufficiency: A prospective study. *Amer J Med* 74: 243-248, 1983
- 2) VanZEE BE, Hoy WE, Talley TE, et al: Renal injury associated with intravenous pyelography in nondiabetic and diabetic patients. *Ann Intern Med.* 89: 51-54, 1978
- 3) Finger MA and Ramsay A: Contrast nephropathy. *AFP* 35: 171-175, 1987
- 4) Pillay VGK, Robbins PC, Schwartz FD, et al: Acute renal failure following intravenous urography in patients with long-standing diabetic mellitus and azotemia. *Radiology* 95: 633-636, 1970
- 5) Borra S, Hawkins D, Duguid W, et al: Acute renal failure and nephrotic syndrome after angiocardigraphy with meglumine diatrizoate. *N Engl J Med* 284: 592-593, 1971
- 6) Harkonen S, Kjellstrand CM: Contrast nephropathy. *Amer J Nephrol* 1: 69-77, 1981
- 7) Moreau J-F, Droz D, Noel L-H, et al: Tubular nephrotoxicity of water-soluble iodinated contrast media. *Invest Radiol* 15: S54-S60, 1980
- 8) Discala VA, Mautner W, Cohen JA, et al: Tubular alterations produced by osmotic diuresis with mannitol. *Ann Intern Med* 63: 767-775, 1965
- 9) Pillay VGK, Robbins PC, Schwartz FD, et al: Acute renal failure following intravenous urography in patients with long-standing diabetic mellitus and azotemia. *Radiology* 95: 633-636, 1970
- 10) Moreau J-F, Droz D, Sabto J, et al: Osmotic nephrosis induced by water-soluble triiodinate contrast media in man. A retrospective study of 47 cases. *Radiology* 115: 329-336, 1975
- 11) Nordby A, Tvedt KE, Halgunset J, et al: Intracellular penetration and accumulation of radiographic contrast media in the rat kidney. *Scanning Microscopy* 4: 651-666, 1990
- 12) Battenfeld R, Khater AER, Drommer W, et al: Ioxaglate-induced light and electron microscopic alterations in the renal proximal tubular epithelium of rats. *Invest Radiol* 26: 35-39, 1991
- 13) Vaamonde CA, Bier RT, Papendick R, et al: Acute and chronic renal effects of radiocontrast in diabetic rats. Role of anesthesia and risk factors. *Invest Radiol* 24: 206-218, 1989
- 14) Tervahartiala P, Kivisaari L, Kivisaari R: Contrast media-induced renal morphologic lesions in diabetic rats. *Acta Radiol* 34: 220-225, 1993
- 15) Higashi S, Yasukochi H, Ishioka K, et al: Effects of urography performed twice at a close interval with contrast media on renal function and morphology in rabbits. *Nippon Acta Radiol* 54: 725-736, 1993
- 16) Evans JS, Gerritsen GC, Mann KM, et al: Antitumor and hyperglycemic activity of streptozotocin (NSC-37917) and its cofactor, U-15.774. *Cancer Chemother Rep* 48: 1-6, 1965
- 17) Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, et al: Diabetogenic action of streptozotocin: Relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest* 48: 2129-2139, 1964
- 18) Junod A, Lambert AE, Orci L, et al: Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *PSEBM.* 126: 201-205, 1967
- 19) Weil R, Nozawa M, Koss M, et al: The kidney in streptozotocin diabetic rats. Morphologic, ultrastructural, and function studies. *Arch Pathol Lab Med* 100: 37-47, 1976
- 20) Tervahartiala P, Kivisaari L, Kivisaari R, et al: Contrast media-induced renal tubular vacuolization: A light and electron microscopic study on rat kidney. *Invest Radiol*, 26: 882-886, 1991
- 21) Farquhar MG, Palade GE: Functional evidence for the existence of a third cell type in the renal glomerulus. *J Cell Biol* 13: 58-87, 1962
- 22) Hoyer JR, Elema JD, Vernier RL: Unilateral renal disease in rat. Glomerular mesangial uptake of colloidal carbon in unilateral aminonucleoside nephrosis and nephrotoxic serum nephritis. *Lab Invest* 34: 250-255, 1976