



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	第 1010 号
氏名	廣瀬 泰彦
授与年月日	平成 26 年 3 月 25 日
学位論文の題名	<p>Oxygen nano-bubble water reduces calcium oxalate deposits and tubular cell injury in ethylene glycol-treated rat kidney (酸素ナノバブル水はエチレングリコール投与ラットの腎においてシュウ酸カルシウムの沈着と腎尿細管細胞障害を減少させる)</p> <p>Urolithiasis: Volume 41, Issue 4 (2013), Page 279-294</p>
論文審査担当者	<p>主査： 高橋 智 副査： 大手 信之, 郡 健二郎</p>

## 論文内容の要旨

【背景と目的】 尿路結石の初期形成には、腎尿細管細胞傷害に伴う炎症が関わっている。近年、酸素を直径 200nm 以下のガス核として安定化させた機能水、酸素ナノバブル(Oxygen nano-bubbles: ONB)水が、抗炎症作用によって動脈硬化を抑制することや、魚類を活性化させる作用があることが報告された。尿路結石は、動脈硬化と形成機序, 石灰化の成分, 疫学などが類似していることから、本研究では、ONB 水は尿路結石形成の抑制効果があるものと推測し、その効果と作用機序を調べた。

【方法】 1%塩分濃度の地下水中で、酸素マイクロバブル(直径 $\leq 50 \mu\text{m}$ )を衝撃波により破壊し、急速に収縮させて ONB を作成した。さらに逆浸透膜を用いて脱塩化し、0%塩分濃度の 100%ONB 水とした。蒸留水:100%ONB 水を 1:1 に混合し、50%ONB 水とした。結石ラットは、10% Ethylene glycol (EG) (1.2 ml 連日)と Vitamin D<sub>3</sub>(0.5  $\mu\text{g}$  隔日)を、胃管を用いて投与し、作成した。4 週齢 SD ラット 60 匹を、Control 群、100%ONB 群、EG 群、EG+50%ONB 群、EG+100%ONB 群の 5 群にわけ、Control 群、EG 群には蒸留水を、100%ONB 群、EG+100%ONB 群には 100%ONB 水を、EG+50%ONB 群には 50%ONB 水を自由飲水させた。7 週齢から EG 群、EG+50%ONB 群、EG+100%ONB 群には、EG と Vitamin D<sub>3</sub> を投与した。EG 投与 7、14 日後に各群 6 匹ずつ、24 時間蓄尿、採血を行い、腎を摘出した。腎結石形成量は Pizzolato 染色を行い、腎断面積あたりの結石占有面積比で定量化した。尿生化学より ion-activity products of calcium oxalate(CaOx) [AP (CaOx) index]を計算した。腎尿細管細胞障害の指標として尿中 *N*-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG)排泄を測定した。腎における結石関連蛋白 (osteopontin(OPN), monocyte chemotactic protein-1(MCP-1))と酸化ストレスマーカー (superoxide dismutase-1 (SOD-1))は定量 PCR、免疫染色、Western blotting を行なった。酸化ストレスマーカー(4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE)、8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG))について、免疫染色を行った。結晶接着因子(hyaluronic acid(HA))の合成は免疫染色を行い、腎断面積あたりの染色面積比で定量化し、検討した。

【結果】 Control 群、ONB 群では、腎結石形成を認めなかった。結石形成面積比は、EG 群では  $1.9 \pm 1.1\%$ であったが、EG+100%ONB 群では  $0.8 \pm 0.4\%$ と有意に減少した ( $p < 0.05$ )。EG 群では、Control 群に比べて、AP (CaOx) index、尿中 NAG 排泄、腎における OPN, MCP-1, HA の発現は上昇し、SOD-1 の発現は低下した。EG+100%ONB 群では、EG 群に比べて、AP (CaOx) index は変化しなかったが、尿中 NAG 排泄、OPN, MCP-1, HA の発現は低下し、SOD-1 の発現は上昇した。EG 群では、Control 群に比べて、4-HNE、8-OHdG の発現が増加し、EG+100%ONB 群では、EG 群に比べて、4-HNE、8-OHdG の発現が抑制された。

【考察】 ONB 水は、腎尿細管細胞傷害を軽減し、結石形成を抑制することを発見した。ONB 水の作用機序は、酸化ストレスの関与が示唆された。ONB 水は、定期的な飲水による尿路結石の新規予防法になると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

【目的】酸素ナノバブル(Oxygen nano-bubbles: ONB)水は、酸素を直径 200nm 以下のガス核として安定化させた機能水で、魚類の成長を促進させる効果や動脈硬化を抑制することなどが報告されている。尿路結石と動脈硬化の発生機序は類似点が多いことから、ONB 水による尿路結石形成の抑制効果が期待できるものと考え、その効果と作用機序について検討した。

【方法】腎結石はラットに 10% Ethylene glycol (EG) と Vitamin D<sub>3</sub> を投与して惹起し、50%ONB 水は蒸留水:100%ONB 水を 1:1 に混合して作成した。4 週齢 SD ラット 60 匹を対照群、100%ONB 水群、EG 群、EG+50%ONB 水群、EG+100%ONB 水群の 5 群に分け、EG 投与 7、14 日後に 24 時間蓄尿、採血を行い、腎を摘出した。腎結石形成量は Pizzolato 染色により腎断面積あたりの結石占有率を定量化し、尿生化学より ion-activity products of calcium oxalate (CaOx) [AP (CaOx) index] を算出した。また、腎尿細管細胞障害の指標として尿中 *N*-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) 値を測定した。腎における結石関連蛋白 (osteopontin (OPN), MCP-1)、酸化ストレスマーカー (SOD1) は定量 PCR、免疫染色、Western blotting、酸化ストレスマーカー (4-HNE、8-OHdG)、結晶接着因子 (ヒアルロン酸 (HA)) は免疫染色にて定量化した。

【結果】EG を投与した群では腎結石がみられたのに対し、対照群、ONB 水群では腎結石形成は観察されなかった。EG 群における結石占有率が  $1.9 \pm 1.1\%$  であったのに対し、EG+100%ONB 水群では  $0.8 \pm 0.4\%$  と有意に減少した ( $P < 0.05$ )。対照群に比較して、EG 群では AP (CaOx) index、尿中 NAG 値、腎における OPN, MCP-1, HA 発現、4-HNE、8-OHdG 量が増加する一方で、SOD-1 発現は低下していた。また、EG 群に比較して、EG+100%ONB 水群では AP (CaOx) index に変動はみられなかったが、尿中 NAG 値、腎における OPN, MCP-1, HA 発現、4-HNE、8-OHdG 量は抑制され、SOD-1 発現は上昇した。

【考察・結論】ONB 水は、酸化ストレスを減弱することで腎尿細管細胞障害を軽減し、結石形成を抑制することが明らかとなった。ONB 水摂取は、尿路結石の新規予防・治療法になるものと考えられた。

【審査内容】主査の高橋から、ONB は体内に吸収されても維持されているのか、OPN のレセプターである CD44, インテグリンの発現は変動したのか、ONB によって腎尿細管障害が軽減されていることが組織学的に証明できるのか、など 11 項目、第一副査の大手教授からは、今回用いた動物モデルの結石形成メカニズムは何か、結石形成における動脈硬化との類似点を述べているが、異なる点はどのようなものか、ONB が腎に到達していることを証明できているのか、など 9 項目、さらに第二副査の郡教授からは食生活による尿路結石の再発予防、前立腺癌治療における最新の知見についての質問があった。これらの質問に対して申請者から適切な回答が得られ、学位論文の内容を十分に理解していると判断した。本研究は、ONB 水を日常的に摂取することで尿路結石発症の新たな予防・治療法になりうる事を明らかにした。よって、これらの新しい知見を報告している本論文の筆頭著者は博士 (医学) の学位を授与するに相応しいと判定した。

論文審査担当者 主査 高橋 智 副査 大手 信之 郡 健二郎