

尿路結石症およびカルシウム代謝異常症患者の 尿中カルシウム排泄と腎機能の検討

東京大学医学部腎臓・内分泌内科 教授 藤田敏郎
講師 竹内靖博

要 旨

カルシウム代謝異常症において、カルシウム排泄を制御することにより、血中カルシウム濃度および腎機能にもたらされる影響について検討した。その背景には、尿路結石症や副甲状腺機能障害においてカルシウム摂取及び排泄をどのように制御することがカルシウムバランスや腎機能の維持に有効であるのか不明な点が多く残されていることが挙げられる。本研究では特に、尿中カルシウム排泄が亢進している、カルシウム感知受容体遺伝子異常症（常染色体優性低カルシウム血症）の症例を対象とし、検索を行った。その結果、腎機能は尿中カルシウム排泄量よりもむしろ血中カルシウム濃度の上昇により悪化する傾向が認められ、従来尿中カルシウム排泄の抑制に好んで用いられているサイアザイド利尿薬よりもむしろ塩分制限の方が、腎機能の改善には有効である可能性が示唆された。

キーワード：カルシウム、腎機能、カルシウム感知受容体、サイアザイド、常染色体優性低カルシウム血症

1. 背 景

主に高カルシウム尿症を呈する尿路結石症患者に対して、古典的には低カルシウム食が推奨されてきた。しかし、低カルシウム食が尿路結石の再発防止につながるという証拠は得られていない。しかも、カルシウム摂取を減らしても尿中カルシウム排泄は減少せず、負のカルシウムバランスをもたらすのみで、骨量の低下をも招きかねないとする報告も認められる。最近のN Engl J Medには、イタリア・パルマにおける5年間の臨床研究で、低カルシウム食よりも、カルシウムは減らさずに蛋白制限と塩分制限を行った症例の方が、有意に尿路結石の再発率が低かったという成績が報告されている⁽¹⁾。欧米の研究では、低カルシウム食は400 mg/日、通常カルシウム食は1000 - 1200mg/日であり、我が国のカルシウム摂取の実体とは乖離がある。すなわち、我が国においては、尿路結石症患者であっても、むしろカルシウム摂取量を増量することが奨められる可能性がある。十分量のカルシウム摂取が、骨粗鬆症の予防と改善に有益であることは多くの臨床研究から支持されているところであり、特に骨粗鬆症のリスクが高い閉経後女性や高齢男性にとっては、カルシウム摂取量の増加が尿路結石や腎機

能の悪化をもたらす可能性があるか否かは重要な問題である。これまで、このような観点からの臨床研究はほとんどなされておらず、専門医といえども患者に対してカルシウム摂取に関して適切なアドバイスができない状況である。

一方、骨粗鬆症の治療と予防に対する社会的な関心の高まりとその重要性から、特に高齢者を中心に、カルシウム摂取を増やす必要性が広く世間一般に認識されつつある。代表的なカルシウム代謝異常症であり、高カルシウム血症を主な臨床的特徴とする原発性副甲状腺機能亢進症患者では、骨量が対照者に比べて低値であり、骨粗鬆症への対策という観点に立つと、カルシウム摂取の是非は、これらの患者にとって重要な問題である。尿路結石症はおよそ人口の10%と頻度の高い疾患であり、また、原発性副甲状腺機能亢進症患者も人口の0.1%程度存在することから、この問題の解決は社会的にも大きな影響をもつものと考えられる。

このような問題には、疫学的研究および前向き縦断的研究が不可欠であるが、短期間に単独の施設でこのような研究を実施することは不可能である。しかしながら、病因・病態が解明されている特殊な疾患をひとつのモデルとして詳しく解析することにより、一般の尿路結石症患者に対する治療法を選択する上での理論的根拠が得られる可能性が期待できる。

カルシウム感知受容体遺伝子に活性化型変異が生じると、常染色体優性低カルシウム血症として知られる病態を呈する^(2, 3)。本疾患は、一般には常染色体優性遺伝で、様々な程度の低カルシウム血症により気付かれる。また、軽症例では低カルシウム血症による症状に乏しいこともあり、家族内に発端者となる患者が見つかりその家系調査の結果診断される場合もある。主な病態は副甲状腺機能低下症と同様であるが、尿中カルシウム排泄が過剰であり、しばしば尿路結石症、腎石灰化症、腎不全をきたすことが特徴である。したがって、本疾患では血中カルシウム濃度の改善のみならず、尿中カルシウム排泄を抑制して腎への障害を軽減することが臨床的に重要である。したがって、本疾患は、様々な治療法が尿中カルシウム排泄および腎機能に与える影響を検討する上で、格好のモデルとなるものと考えられる。

2. 研究の目的

尿路結石症および高カルシウム尿症に対して考慮される治療法が、カルシウム感知受容体遺伝子活性化型変異による低カルシウム血症患者におけるカルシウムバランスとその腎機能におよぼす影響を検討することにより、それらの治療法の理論的裏付けを検証することを目的として本研究を遂行した。

尿中カルシウム排泄を制御する治療法としては、サイアザイド系利尿薬、塩分摂取制限を行い、摂取カルシウムはできるだけ一定にした。

3. 研究計画及び方法

・対象症例：24歳女性（症例1）、27歳女性（症例2）、19歳男性（症例3）

いずれも、生下時もしくは幼児期より低カルシウム血症によるテタニーや痙攣の症状があり、診断当初は特発性副甲状腺機能低下症として活性型ビタミンD₃により治療されていた。全例にエコー上腎石灰化症が認められ、軽度から中等度の腎機能障害を認めた。

患者およびその両親からinformed consentを得た上で、カルシウム感知受容体遺伝子を解析した（学内倫理委員会申請・承認済み）。全血よりDNAを抽出し、既報のごとくにカルシウム感知受容体遺伝子の各エクソン毎に設定したプライマーを用いて、PCR法により遺伝子の増幅を行い、dideoxy法にて直接塩基配列を決定した。

同定された変異カルシウム感知受容体遺伝子をin vitroで構築し、発現ベクターpcDNA3に組み込んだ。リポフェクトアミン（遺伝子導入試薬）を用いて、哺乳類の株化細胞であるCHO細胞にそれらの作成したベクターを導入し、細胞内で変異カルシウム感知受容体を発現させ、そのカルシウム感知受容体としての機能を解析した。まず、カルシウム感知受容体が蛋白として発現されていることを、western blot法により確認した⁽⁴⁾。次に、変異カルシウム感知受容体の機能を評価するために、細胞外液カルシウム濃度を0から16mMまで段階的に上昇させ、それぞれの条件下で細胞内に産生されるIP₃（inositol triphosphate）を測定した。細胞外カルシウム濃度の上昇に伴いカルシウム感知受容体の活性化が促進され、IP₃産生が上昇することが明らかにされている。IP₃産生は、^[3H]で標識されたmyoinositolのIP₃分画への取り込みにより評価した⁽⁵⁾。実際には、細胞を溶解したサンプルをDowexカラムにより20のフラクションに分画し、IP₃が溶出し回収されるフラクションにおける^[3H]の放射活性を測定した。いずれの実験においても、正常カルシウム感知受容体遺伝子導入細胞を対照として用いた。

・臨床検査プロトコール

食事中のカルシウム含有量は普通入院食と同様の600mg/日とする。症例1に対しては、入院後に基礎値の測定を行った後に、サイアザイド利尿薬（フルイトラン2mg）投与、塩分制限3gを連続して行った。この間、連日24時間蓄尿を行い、適宜採血を行った。症例2に対しては外来にてフルイトラン2mg処方を2ヵ月間行い、その前後も含めて評価した。

測定項目

一般検査：血清アルブミン、カルシウム、リン、マグネシウム、クレアチニン、Na、K、Cl、尿中カルシウム、リン、マグネシウム、クレアチニン、Na、K、Cl

4. 結 果

1) カルシウム感知受容体遺伝子変異の同定

3症例ともカルシウム感知受容体遺伝子のエクソンにそれぞれ1ヵ所のミスセンス変異が同定された。いずれの症例においても両親の遺伝子には変異を認めず、全てde novoの変異と考えられた。24歳女性（症例1）における変異は活性化型変異として既に報告されているものと同じであった（Phe788Cys変異）⁽⁶⁾。症例2の遺伝子では131番目のコドンがGからCに変異しておりシステインがトリプトファンに置換されていた。症例3では843番目のコドンがAからCに変異しておりアラニンがグルタミン酸に置換されていた（図1A）。症例2と3の変異カルシウム感知受容体遺伝子を構築し、発現ベクターに組み込み、哺乳類の株化細胞であるCHO細胞に導入し、そのカルシウム感知受容体としての機能をIP3の産生量により既報のごとく解析した。その結果、いずれの変異カルシウム感知受容体を発現する細胞においても、正常カルシウム感知受容体発現細胞に比べて、同一細胞外液カルシウム濃度におけるIP3産生は高値を示し、その用量反応曲線からはED50が低下していることが明らかとなった（図1B）。すなわち、患者のカルシウム感知受容体は正常より低濃度の細胞外液カルシウムにより活性化されるため、副甲状腺ホルモンの分泌が抑制され低カルシウム血症となるものと考えられた。

2) 尿中カルシウム排泄と腎機能

Figure 1

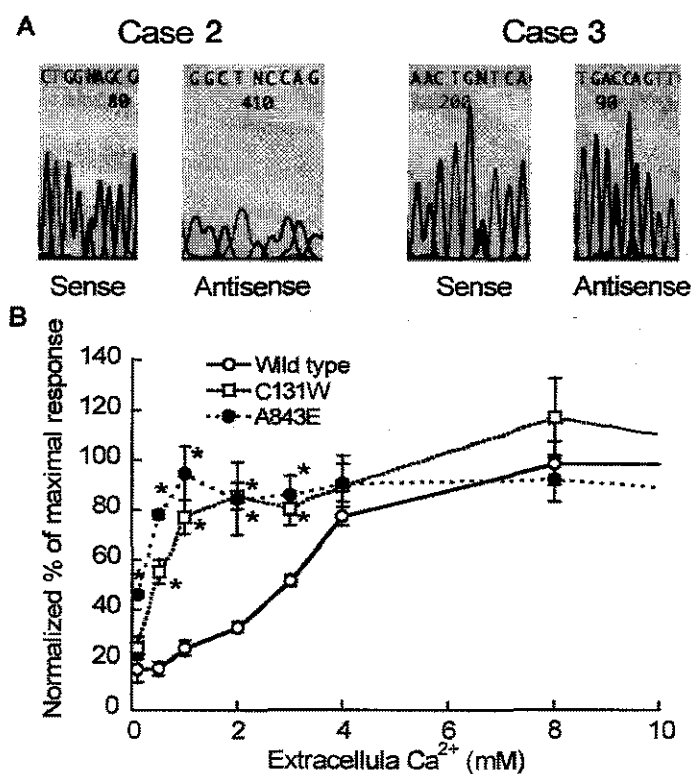


図1A カルシウム感知受容体のDNA配列の決定

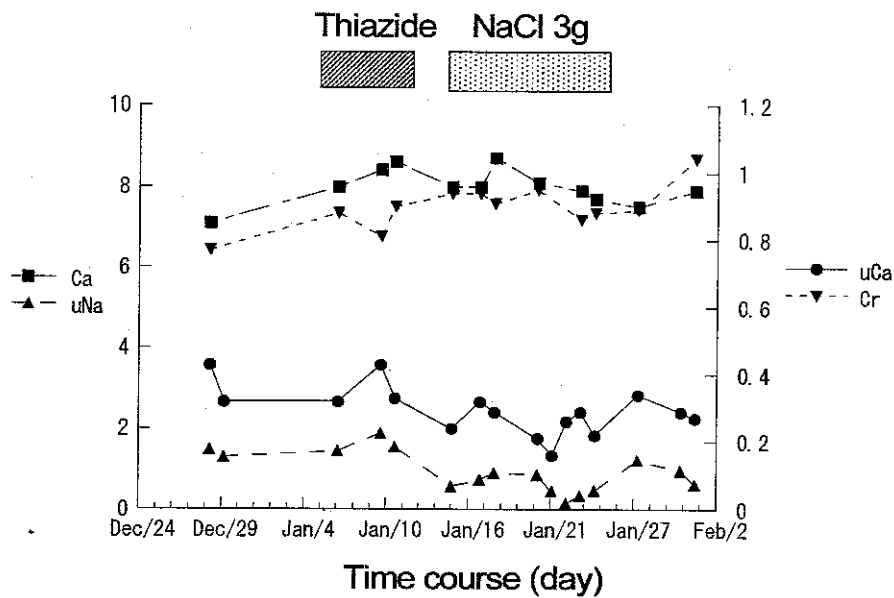
図1B 変異カルシウム感知受容体の機能解析

症例2 : C131W

症例3 : A843E

各治療中の尿中カルシウム排泄量と血中カルシウム濃度とクレアチニン濃度を示す (図2)。いずれの症例でもサイアザイドにより尿中カルシウム排泄量の明らかな減少は認められなかったが、血中カルシウム濃度の上昇傾向を認めた。また、クレアチニン濃度の低下は認められなかった。塩分制限により尿中カルシウム排泄量の低下傾向が認められたが、血中カルシウム濃度とクレアチニン濃度には明らかな変化は認められなかった。尿中カルシウム排泄と尿中ナトリウム排泄量との間には密接な関係が認められ、尿中ナトリウム排泄減少に伴い尿中カルシウム排泄は減少した。また、血中カルシウム濃度とクレアチニン濃度との間にも密接な関係が認められ、血中カルシウム濃度の上昇に伴いクレアチニン濃度は上昇した。

A 症例 1 Figure 2A



B 症例 2 Figure 2B

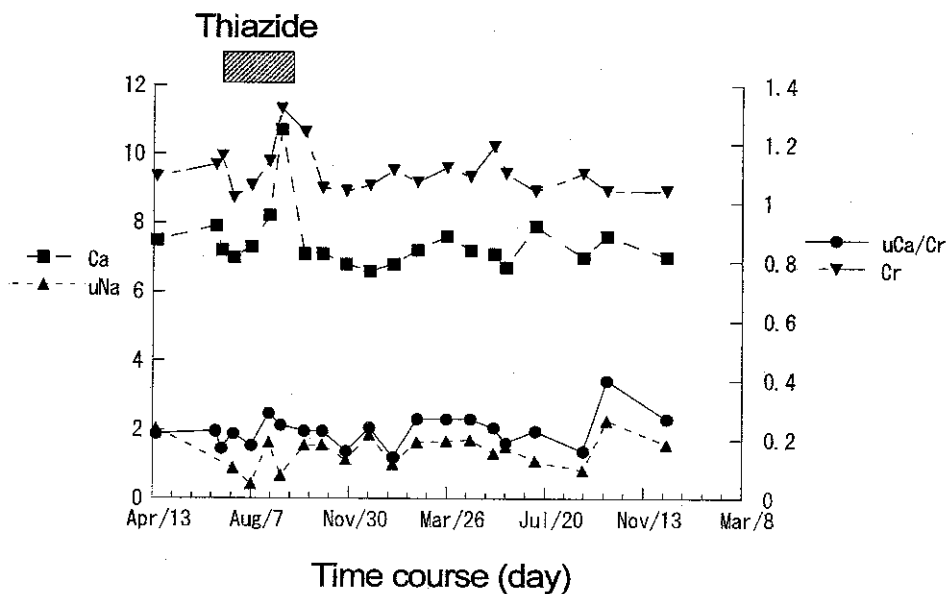


図2 症例1 (A) および症例2 (B) における尿中カルシウム、ナトリウム、血中カルシウム、クレアチニンの経時的変化

症例3はすでに血中クレアチニン濃度が3 mg/dL以上と腎機能障害を呈しており、尿中カルシウム排泄データは評価不可能であったが、やはり、血中カルシウム濃度とクレアチニン濃度との間に、症例1, 2と同様の関連が認められ、血中カルシウム濃度の上昇が腎機能を悪化させることが示唆された。

5. 考 察

古典的には、高カルシウム尿症を伴う尿路結石患者に対して低カルシウム食が薦められていたが、近年その有効性に疑問がもたれている。また、近年、我が国を含む先進諸国では、無症候性の原発性副甲状腺機能亢進症患者が増加しており、無治療で経過観察される場合が多くなっているが、この様な患者におけるカルシウム摂取の是非は不明である。さらに、副甲状腺機能低下症患者の治療には活性型ビタミンD₃製剤が用いられており、しばしば高カルシウム尿症をきたす危険性があるが、食事中のカルシウム増加による尿中カルシウム排泄量の変化には不明な点が多い。したがって、これらの患者に対して、食事によるカルシウム摂取量に関して、どのように指示すべきか明らかにされていない。近年、高齢者が急速に増加しており、骨の健康を維持するためには、カルシウムバランスを正に保つ努力が必要であることが強調されている。このような背景から、尿路結石症及び副甲状腺機能異常患者における、適切なカルシウム摂取量を決定するための指標が強く求められている。

カルシウム摂取量の増加には、日常生活の指導に容易に応用できる牛乳およびその他の乳製品を用いることが大切である。一方、摂取カルシウムの腎からの排泄を抑制することもカルシウムバランスを正に維持するためには重要な手段である。カルシウム摂取を増加しても、カルシウム排泄量がそれに見合って増えてしまえば、カルシウムバランスが改善されないばかりか、かえって尿路結石症の発症や腎機能の低下をもたらす可能性があり、患者にとっては不利益となる。現在、カルシウム排泄を抑制する手段としては、塩分制限、サイアザイド系利尿薬が有効であることが知られている。今回の研究では、カルシウム感知受容体遺伝子の活性化型変異により、カルシウムの負荷に対するカルシウム排泄の増加が著しい特異な症例において、既知の手段によりカルシウム排泄の抑制を試みた場合の、尿中カルシウム排泄量と腎機能におよぼす影響について検討を行った。

検討した症例では、尿中カルシウム排泄量と血中クレアチニン濃度との間には明らかな相関が認められず、むしろ血中カルシウム濃度とクレアチニン濃度との間に相関が認められ、カルシウム排泄の多寡よりも血中カルシウム濃度の上昇が腎機能低下の原因となることが示唆された。また、腎機能の低下は可逆的であった。尿中カルシウム排泄量の低下には、3g塩分制限は有効であったが、サイアザイド利尿薬の効果は、検討した2症例では明瞭ではなかった。塩分3gの制限は患者の食生活の質を低下させ、長期の実施には困難が伴うことが予想されたが、尿中ナトリウム排泄量とカルシウム排泄量との間には密接な相関があることも認められたため、いくらかでも塩分の制限をすることで尿中カルシウム排泄量はそれに見合って減少するものと考えられた。一方、サイアザイド利尿薬では、尿量の増加に伴う日常生活上の制約が予想されるが、経験的には多くの症例では長期の服用が可能であ

り、尿中カルシウム排泄量を低下させる必要がある場合には試みるべき治療法であると考えられている。しかしながら、今回検討した2症例ではサイアザイドにより血中カルシウム濃度が上昇し、それに伴ってクレアチニン濃度も上昇していることから、その長期処方のは是非に関しては、慎重に経過を観察しつつ決定する必要があると考えられる。また、サイアザイドは一方でカリウムとマグネシウムの排泄を促進させる作用を有しており、これらのデータのモニターも必要である。必要に応じて、カリウムのみならずマグネシウムの補充を考慮する必要がある。

今回の検討では、摂取カルシウム量を変えてその影響を定量的に評価するところまで実施できなかったが、カルシウム製剤や牛乳などを用いて、経口摂取カルシウム量を増量することにより、カルシウム排泄がどの様に変化するか、また、その際に、サイアザイドや塩分制限を加えることによりどのような影響が認められるか、などについて今後検討していく必要がある。さらに、その後に、日常生活におけるカルシウム負荷がカルシウム代謝異常症患者の骨と腎機能に対してどのような影響を及ぼすのが長期的な視野に立った検討が必要となるであろう。

文 献

1. Borghi L. et al., Comparison of two diets for the prevention of recurrent stones in idiopathic hypercalciuria. *N Engl J Med*, 346:77-84, 2002.
2. Okazaki R. et al., A novel activating mutation in calcium-sensing receptor gene associated with a family of autosomal dominant hypocalcemia. *J Clin Endocrinol Metab*, 84:363-366, 1999.
3. Chikatsu N. et al., A family of autosomal dominant hypocalcemia with an activating mutation of calcium-sensing receptor gene. *Endocr J*, in press.
4. Chikatsu N. et al., Cloning and characterization of two promoters for the human calcium-sensing receptor (CaSR) and changes of CaSR expression in parathyroid adenoma. *J Biol Chem*, 275:7553-7557, 2000.
5. Watanabe S. et al., Association between activating mutations of calcium-sensing receptor and Bartter's syndrome. *Lancet*, 360:692-694, 2002.
6. Lienhardt A. et al., Activating mutations of the calcium-sensing receptor: management of hypocalcemia. *J Clin Endocrinol Metab*, 86:5313-5323, 2001.