

PKD1 遺伝子変異が認められ長期間観察した 多発性嚢胞腎猫の嚢胞液の変化

佐藤れえ子[†] 小林沙織 佐々木一益 宇都若菜 御領政信

佐々木 淳 神志那弘明 大石明広 安田 準

岩手大学農学部 (〒020-8550 盛岡市上田3-18-8)

(2009年11月13日受付・2010年6月7日受理)

要 約

近医にて水腎症が疑われた4歳齢、雑種、去勢雄猫で、単純X線検査では両側腎臓の腫大が、また超音波検査で腎実質の複数の嚢胞性無エコー領域が認められた。PCR-RFLP法を用いたPKD1遺伝子診断では、PKD1遺伝子の点変異(3284C→A)が検出されたことから、遺伝子変異による猫の多発性嚢胞腎と診断した。初診時血液検査では高窒素血症、高リン血症を認め、短期間の腹膜透析の後、輸液と腎臓病用療法食の給与により維持し、約1年間経過を観察した。両側の腎臓から採取した嚢胞液分析では、Cl⁻とNa⁺濃度が高値を示した。この所見は、経過観察期間を通じて変わらなかった。いっぽう、嚢胞液中のN-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG)濃度とNAGアイソザイムのB分画の値は経過とともに増加する傾向が認められた。

—キーワード：猫の多発性嚢胞腎 (Feline PKD), NAGアイソザイムB, PKD1遺伝子, 腎嚢胞液。

----- 日獣会誌 63, 791~796 (2010)

猫の多発性嚢胞腎 (Feline PKD) は、ベルシャ猫や、その他の長毛種の猫に多いとされ、その病因としては先天的なPKD1遺伝子の変異が知られており [1, 2], Lyonsら [1] が猫でPKD1遺伝子のエクソン29の3284番目のC>A塩基置換を報告したのが最初である。医学領域においては、PKD1, PKD2, PKD3 (未同定) など複数の遺伝子の変異が報告されており関連する遺伝子の違いにより病態が異なることも知られている [3, 4]。いっぽう、獣医学領域においては、現在のところ前述したPKD1遺伝子変異による病態は報告されているが、医学領域においてみられるようなPKD2, あるいはそれ以外の遺伝子に関連した本症の存在についてはまだ明らかにはなっていない。PKD1以外の遺伝子に起因する本症の可能性を示唆する報告 [5] もあるものの、品種の遺伝的背景や臨床病理学的情報はいまだ十分ではない。現在のところ、本症の遺伝子診断は臨床の現場において簡易的には行われておらず、また、その存在も広く知られてはいないようである。

いっぽう、多発性嚢胞腎において嚢胞が経時的に拡大していくことのメカニズムについては必ずしも解明され

ていないが、嚢胞を形成する尿細管細胞は絶えず増殖しており、同時に嚢胞内に水とCl⁻が分泌され続けることが知られている。猫の嚢胞腎では嚢胞形成の長期間の詳細な観察記録はほとんどなく、また嚢胞液の性状について経時的に観察したものも見当たらない。人の多発性嚢胞腎患者では、嚢胞の存在が尿路死腔となり感染を起こしやすく、それが原因で病態の悪化と死亡を招く場合が多い [6]。そのため尿路感染と腎実質の傷害をモニターしながら維持することが長期生存につながるとされており、モニター項目の一つとして尿中酵素であるN-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG) の測定が行われている。今回、われわれは、短毛種雑種の猫で画像検査と遺伝子検査からPKD1遺伝子の変異によるFeline PKDと診断し、その後約1年間にわたって経過を観察するとともに、嚢胞液中の無機質濃度とNAG濃度についての分析を経時的に実施したので、その概要を報告する。

材料および方法

症例：症例は、4歳齢、短毛種の雑種猫、去勢雄であ

[†] 連絡責任者：佐藤れえ子 (岩手大学農学部獣医学課程小動物内科学研究室)

〒020-8550 盛岡市上田3-18-8 ☎・FAX 019-621-6227 E-mail: reekos@iwate-u.ac.jp

猫多発性嚢胞腎の嚢胞液

表1 初診時の血液検査・尿検査所見ならびに嚢胞液の生化学所見

一般血液検査		血液生化学検査		尿検査		嚢胞液検査	
WBC (/ μ l)	13,100	BUN (mg/dl)	107.7	試験紙法		性状	淡赤褐色
RBC (10 ⁴ / μ l)	642	Cre (mg/dl)	6.4	蛋白	+	蛋白	3+
Hb (g/dl)	9.8	Tp (g/dl)	7.65	pH	5	pH	5
Ht (%)	30.2	T-Chol	221.1	ブドウ糖	-	ブドウ糖	+
PLT (10 ⁴ / μ l)	15	T-Bil	0.01	ケトン体	-	ケトン体	-
白血球分類		ALT (U/l)	54	潜血	+	潜血	3+
Bas. (/ μ l)	0	ALP (U/l)	31.6				
Eos. (/ μ l)	262	γ -GTP	測定限界以下	沈渣		沈渣	
St. (/ μ l)	262	LDH (U/l)	112	赤血球	+	赤血球	3+
S. (/ μ l)	7,336	Ca (mg/dl)	10.1	白血球	+		
Lym. (/ μ l)	5,240	iP (mg/dl)	8.6	細菌	+	比重	1.007
Mon. (/ μ l)	0	Na (mEq/l)	156	円柱	細胞性円柱	BUN (mg/dl)	126.4
		Cl (mEq/l)	131		ろう様円柱	Cre (mg/dl)	8.3
		K (mEq/l)	3	比重	1.009		

尿蛋白 + : 30mg/dl 3+ : 300mg/dl (オーシヨンスティック, ARKRAY Japan)
 潜血 + : 0.06mg/dl 3+ : 1mg/dl (オーシヨンスティック, ARKRAY Japan)
 沈渣赤血球 + : HPFにて軽度に観察 3+ : HPFにて高度に観察

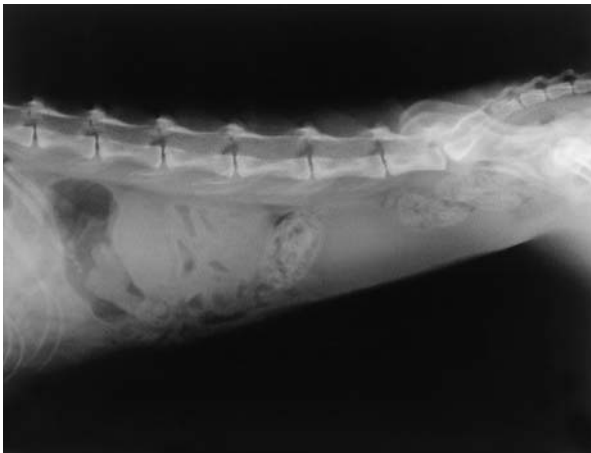


図1 初診時の腹部X線写真 (RL像)。腫大した腎臓の陰影が観察され、腸管は圧迫され腹側へ変位している。

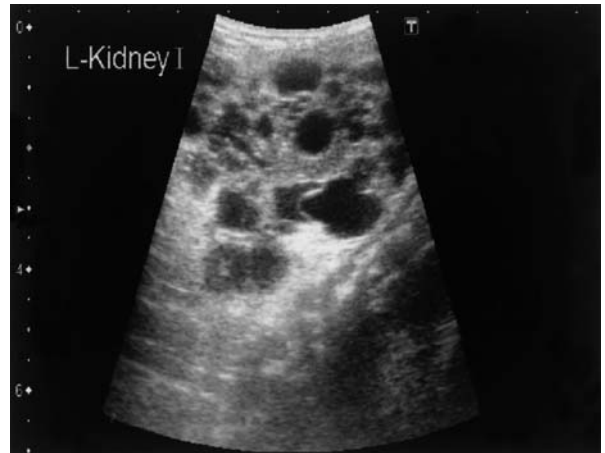


図2 初診時の腎臓の超音波検査所見 (左腎)。腎臓実質内に大きささまざまな大きさの嚢胞形成が観察される。右腎にも同様の所見が認められる。

った。近医にて水腎症が疑われ、本院には元気・食欲の消失、多飲・多尿、消瘦を主訴に来院した。これまでに腎泌尿器疾患の既往歴はなかった。初診時の高窒素血症に対する輸液・腹膜透析などの治療の後、自宅にて皮下輸液と腎臓病用療法食の投与にて維持し、その間定期的に各種検査を行いながら、嚢胞の状態について継続的観察を実施した。

画像診断：初診時とその後の約1年間に経時的に腹部X線検査を実施し、腎臓の大きさと形状を観察した。また、同時に腹部超音波検査にて、腎嚢胞の形状と数についても観察を実施した。初診時には、腹部CT検査も実施して、腎臓とそれ以外の臓器についても嚢胞の有無を確認した。

血液検査：一般血液検査 (pocH-100iV Diff, シスメックス株, 兵庫) と血液生化学検査 (血液自動分析装

置: TBA-40FR, 東芝メディカルシステムズ株, 東京) ならびに血清無機質濃度 (Dri-Chem 800V, 富士フィルムメディカル株, 東京) の測定を経時的に実施した。

尿検査ならびに嚢胞液の検査：尿については試験紙法と尿沈渣の鏡検, 尿蛋白クレアチニン比の測定を実施した。比重については屈折計で測定した。腎嚢胞液の採取は、超音波ガイド下で23G針により経皮的に実施し、嚢胞液中のNAG活性値 (PNP法) [7] と無機質濃度, 沈渣の鏡検を実施した。また、嚢胞液のNAGアイソザイム分析を、ミニカラム法 [7] で実施した。なお、尿中NAG排泄に関しては、活性値を尿中クレアチニン濃度で除して得られたNAG指数 [7] として表した。なお、クレアチニン濃度については、前述の血液自動分析装置にて測定した。

遺伝子検査 (PCR-RFLP法)：症例の全血よりDNA

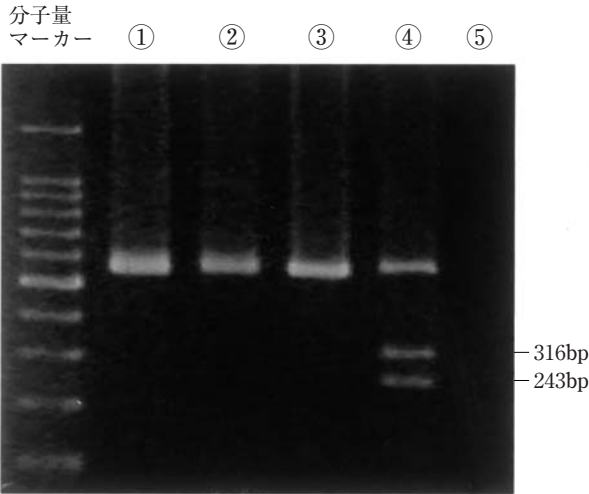


図3 PKD 遺伝子診断. PCR-RFLP法により血中PKD1 遺伝子を増幅し, PCR産物を制限酵素 (Mly I) で処理後アガロースゲル電気泳動を実施. ①正常ネコPCR産物. ②正常ネコPCR産物をMly I処理したもの. ③本症例PCR産物. ④本症例PCR産物をMly I処理. ⑤ネガティブコントロール. 症例の遺伝子産物では, 316bpと243bpのバンドを検出した.

を抽出し, PKD1 遺伝子をPCRにて増幅した. 得られたPCR産物の1部を制限酵素 Mly I (Fermentas社, U.S.A.) 処理し, アガロースゲル電気泳動を行った. なお, PCRで使用したプライマーは, forward: TTCTTCCTGGTCAACGACTG, reverse: CAGGTAGACGGGATAGACGAである.

成 績

初診時の検査所見: 体格は大型であったが体重3.7kgと削瘦しておりBCS2, 高度の脱水を呈し, 触診により腹腔内に大きな両腎を触知したが, 両側腎臓の圧痛は認めなかった. 一般血液検査では, 軽度の貧血が認められたが, その他の項目に著変は認められなかった (表1). 血清生化学検査では, BUN (107.7mg/dl), Cre (6.4mg/dl), iP (8.6mg/dl) の増加が認められたが, その他異常は認められなかった. 尿検査では, pH5, 潜血・蛋白陽性, 尿沈渣において赤血球, 白血球, ろう様円柱, 細胞円柱, 球菌, 脂肪滴を少数認めた. 尿比重は1.009と低値を示した (表1).

X線検査所見では, 腹部RL像において腎臓の腫大とそれに伴う消化管の腹側への変位 (図1), 腹部VD像において両腎の腫大, 特に右腎の腫大が認められた. 腹部超音波検査では, 左右両側の腎臓の腫大, 腎実質内に複数の無エコー領域を認め, 皮髄の境界は不明瞭であった (図2). 超音波ガイド下で嚢胞液を吸引し採材したところ, 色調は透明で, 各嚢胞で若干色調が異なり, やや暗赤色を示すものもみられた. 嚢胞液の生化学検査ではBUNとCreは血清よりやや高い値を示した. 嚢胞液は,

pH5, タンパク・潜血が陽性であった. また, 沈渣においては多数の赤血球を認め, 比重が1.007であった (表1).

PKD 遺伝子診断のために初診時に採取した血液からPCR法を用いPKD1 遺伝子を増幅し, そのPCR産物を制限酵素 Mly I で処理してアガロースゲル電気泳動を実施し, PKD1 の点変異の有無を調べたところ, 243bpと316bpの位置にバンドを検出し, PKD1 遺伝子変異の存在が明らかとなった (図3).

臨床経過: 本症例は, 超音波検査, 遺伝子検査の結果から, PKD1 遺伝子の変異によるFeline PKDと診断された. 高窒素血症の軽減を期待して, 腹膜透析, 療法食, 補液による支持療法を行ったところ, 全身状態の改善と高窒素血症の緩和が観察された. その後のCT検査では, 左腎は5.3×3.7cm, 右腎は7.1×4.7cmと腫大し, 内部に直径1.0~1.7cmの複数の嚢胞を認めた. 肝臓をはじめその他の臓器には, 嚢胞形成を認めなかった. その後は, 自宅での皮下輸液による支持療法にて維持され, 体重も第119病日以降は5kg以上に回復した. 本症例は長期間に及び全身状態を比較的良好に保つことができたが, 左右両側の腎臓は徐々に腫大化し腎実質は萎縮して高窒素血症が進行した. すなわちBUNとCreは腹膜透析と輸液によって第11病日には, それぞれ51.5mg/dl, 3.7mg/dlまで低下したが, その後自宅での治療の間はそれぞれ110~130mg/dlと4.0~8.0mg/dlの間で推移した. しかし, 徐々に高窒素血症は進行し, 死亡する18日前の第370病日にはBUN 212.5mg/dl, Cre 5.7mg/dlを示し, 体重も3kgまで減少し, 悪液質の状態となっていた.

尿中酵素NAG指数は, 第119病日に10.8U/gを示したが第140病日に一時的に5.9U/gに低下し, その後第169病日から269病日まで終始8.0U/gの高値で経過した. 尿蛋白クレアチニン比 (UPC) は, 第269病日まで0.2から0.4の間で推移したが, 第370病日には1.32へと増加した. 血圧は第8病日には収縮期血圧ならびに拡張期血圧はそれぞれ, 129mmHg, 73mmHgと正常範囲にあったが, その後次第に上昇する傾向を示し, 第248病日にはそれぞれ159mmHg, 96mmHgと軽度の高血圧を認めた. 血中電解質濃度は, Na濃度が脱水の進行とともに高値 (162mEq/l) を示すようになった他は正常範囲で推移した. 本症例は, 第388病日に慢性腎不全による全身衰弱のため死亡した.

病理学的検査: 剖検所見では両側の腎臓は大きく腫大し, 表面は凹凸不整であった. 剖面では漿液を容れた大小嚢胞が多発性に認められた (図4) が, 嚢胞の感染は認められなかった. 腎実質は, 嚢胞形成により重度に菲薄化していた. 病理組織学的には, 腎臓では好酸性漿液性物質を容れる大小の嚢胞が多発性に認められ, 立法形



図4 剖検時の腎臓。表面は凹凸不整であり、断面では漿液を容れた大きささまざまな嚢胞が多発性に認められる。腎実質は、嚢胞形成により重度に菲薄化している。

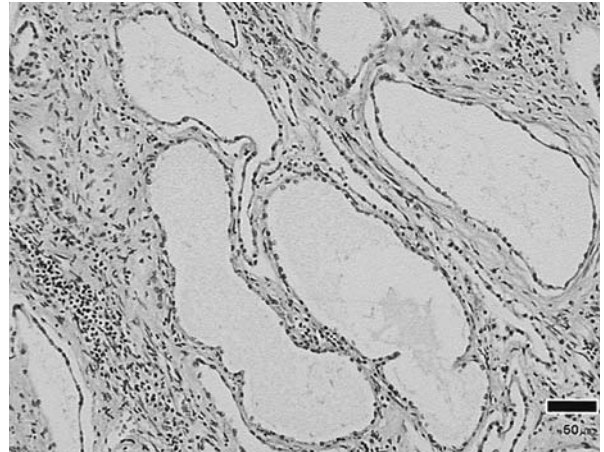


図5 病理組織学的には、腎臓では好酸性漿液性物質を容れる大小の嚢胞が多発性に認められた。間質ではリンパ球・形質細胞の巣状あるいはび慢性浸潤像が認められた (Bar = 50 μm)。

表2 嚢胞液の電解質濃度ならびにNAG活性値とアイソザイムの変動

検査項目	第119病日	第160病日		第169病日		第269病日	
		左腎	右腎	左腎	右腎	左腎	右腎
Na (mEq/l)	300mEq/l 以上	300mEq/l 以上	300mEq/l 以上	300mEq/l 以上	300mEq/l 以上	300mEq/l 以上	300mEq/l 以上
K (mEq/l)	8.3	7.9	8.6	8.3	7.3	4.9	6.1
Cl (mEq/l)	272	267	271	271	277	272	238
NAG活性値 (U/l)	2.66	5.31	10.16	1.88	2.65	6.41	①9.06 ②10.47
アイソザイムA (%)	ND	ND	85.4	①72.4 ②95.2	82.7	①69.5 ②76.3	
アイソザイムB (%)	ND	ND	14.6	①27.6 ②4.8	17.3	①30.5 ②23.7	

経過観察期間を通して尿中 Na 濃度は 152mEq/l ~ 181mEq/l, 尿中 Cl 濃度は 127mEq/l ~ 141mEq/l で推移した。
 表中の①②は、それぞれ別個の嚢胞であることを示す。
 NDは測定していない。

ないし扁平な上皮細胞により内張りされていた。尿細管基底膜ならびにポーマン嚢は一部肥厚し、しばしば石灰沈着をともなっていた。間質ではリンパ球・形質細胞の巣状あるいはび慢性浸潤像や線維化が認められ、慢性非化膿性間質性腎炎の組織像を呈していた (図5)。肝臓やその他の臓器には嚢胞形成は認められなかった。

嚢胞液の性状分析: 嚢胞液は各嚢胞で色調が異なり、初診時には透明なものが多かったが、時間の経過とともに出血のため次第に暗赤色から赤黄色を示す嚢胞液が多くなった。嚢胞液の電解質濃度は、Na⁺濃度が測定上限値 (300mEq/l) 以上を示し、Cl⁻濃度も常時高値を示した (238 ~ 277mEq/l) (表2)。嚢胞液中のNAG活性値は各嚢胞で異なる傾向を示し、第269病日には高値を示すものがみられた。NAG アイソザイム分画比は、第169病日、第269病日ともに、B分画の占める割合が高い傾向を示した (表2)。

考 察

本症例は、画像検査・遺伝子検査の結果から、PKD1 遺伝子の変異による Feline PKD であると考えられた。PKD1 遺伝子の変異に基づくペルシャ猫の Feline PKD は以前から報告されているが、本症例は、遺伝子診断に基づく日本在来の短毛雑種猫の初めての報告である。

猫の多発性嚢胞腎における嚢胞液の詳細な検討はこれまで見当たらないが、本症例の嚢胞液では、Cl⁻濃度と Na⁺濃度は常時ともに高値を示していた。PKD において嚢胞内に水と電解質が分泌されるメカニズムについては、人の常染色体優性多発性嚢胞腎 (autosomal dominant polycystic kidney disease : ADPKD) の原因遺伝子である PKD1 と PKD2 がコードするタンパク質 polycystin1 (PC1) と polysystin2 (PC2) が関連しているとされている [8]。PC1 が尿流を感知するセンサーとして働き、PC2 はカルシウムチャンネルとして働くと考えられている。これらのタンパク質異常により嚢胞形成

が進行すると考えられているものの、実際にはその機序は不明な点が多い。

ADPKDにおいてはPCタンパクの異常により、細胞内Ca²⁺濃度が低下していることが原因となり、細胞内のcyclic-AMPは絶えず細胞増殖刺激を促すと考えられている。また、cyclic-AMPの活性化は、Cl⁻の分泌において中心的な役割を担うクロライドチャネル (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator : CFTR) の刺激につながり、嚢胞内へのCl⁻分泌を高めると考えられている。このようにして人のADPKDでは嚢胞液のCl⁻濃度は高値を示す訳であるが、猫のPKDでも同じような病態があるかどうかはまだ明らかにされていない。少なくとも本症例では嚢胞液のCl⁻濃度は経過観察中常時高値を示しており、猫においても人と同様なメカニズムが存在する可能性があると考えられた。また、CFTRはクロライドチャネルとして働くだけでなくナトリウムチャネルの活性も調整しており、Na⁺濃度の高値も同時に引き起こすと考えられている [8]。今後、猫の多発性嚢胞腎の嚢胞上皮にCFTRの異常発現があるかどうか検索してゆくことが必要と思われた。

いっぽう、人のPKDにおけるモニター項目の一つである尿中酵素NAGの測定は、猫では腎疾患の際に増加することと、活動性の病変がある時にNAGアイソザイムのB分画が増加することが知られている [7]。Satoらの報告 [7] では、健康猫の尿中NAG指数 (PNP法) は1.6 ± 1.5U/gであり、ミニカラム法で分析した尿中NAGアイソザイムはA分画 : B分画が約8 : 2であった。本症例の嚢胞液中のNAG濃度は経過とともに増加する傾向にあり、アイソザイムではB分画が高値を示す嚢胞がみられた。また、各嚢胞でNAG濃度は異なっていた。したがって、それぞれの嚢胞はおおの分離独立した状態であって交通はなく、末期になるにつれて重度の尿細管傷害を示すものが増えている可能性が示唆された。また、尿中のNAG指数も末期には高値を示すようになった。尿中NAG指数の高値は、嚢胞形成による腎実質の圧迫が尿細管傷害を引き起こすことによって起こるのではないかと考えられるが、その一方で嚢胞上皮細胞の変性による嚢胞液の高値を一部反映している可能性もあるのではないかと考えられた。したがって、尿中NAG指数やアイソザイム測定は、嚢胞感染以外でも嚢胞上皮細胞の病変の程度をモニターする項目の一つとし

て活用できるのではないかと考えられた。

PKDは遺伝性の疾患であることから、本症の根絶には保因猫を繁殖に供しないことが重要であると考えられる。そのためにもPKDの遺伝子診断を応用する意義は高いと思われる。また、本症は発症するまで比較的長い時間を要するので、未発症の個体に対する診断にも遺伝子診断は有効であり、今後多くの臨床家が利用することが望まれる。

引用文献

- [1] Lyons LA, Biller DS, Erdman CA, Lipinski MJ, Young AE, Roe BA, Qin B, Grahn RA : Feline polycystic kidney disease mutation identified in PKD1, *J Am Soc Nephrol*, 15, 2548-2555 (2004)
- [2] Domanjko-Petric A, Cernec C, Cotman M : Polycystic kidney disease : a review and occurrence in Slovenia with comparison between ultrasound and genetic testing, *J Feline Medicine and Surgery*, 10, 115-119 (2008)
- [3] Rossetti S, Burton S, Strmecki L, Pond GR, San Millán JL, Zerres K, Barratt TM, Ozen S, Torres VE, Bergstralh EJ, Winearls CG, Harris PC : The position of the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene mutation correlates with the severity of renal disease, *J Am Soc Nephrol*, 13, 1230-1237 (2002)
- [4] Hateboer N, Veldhuisen B, Peters D, Breuning MH, San-Millán JL, Bogdanova N, Coto E, van Dijk MA, Afzal AR, Jeffery S, Saggar-Malik AK, Torra R, Dimitrakov D, Martinez I, de Castro SS, Krawczak M, Ravine D : Location of mutations within the PKD2 gene influences clinical outcome, *Kidney Int*, 57, 1444-1451 (2000)
- [5] Helps C, Tasker S, Harley R : Correlation of the feline PKD1 genetic mutation with cases of PKD diagnosed by pathological examination, *Exp Mol Pathol*, 83, 264-268 (2007)
- [6] 香村 衡一 : 多発性嚢胞腎の臨床 8. 感染, 多発性嚢胞腎のすべて, 東原英二監修, 188-189, インターメディカ, 東京 (2006)
- [7] Sato R, Soeta S, Syuto B, Yamagishi N, Sato J, Naito Y : Urinary excretion of N-acetyl-β-D-glucosaminidase and its isoenzymes in cats with urinary disease, *J Vet Med Sci*, 64, 367-371 (2002)
- [8] 望月俊雄, 花岡一成, 山口太美雄 : 多発性嚢胞腎の基礎, 多発性嚢胞腎のすべて, 東原英二監修, 73-76, インターメディカ, 東京 (2006)

Change of Renal Cystic Fluid in a Cat with Feline Polycystic Kidney Disease
Caused by PKDh1 Gene Mutation

Reeko SATO^{*†}, Saori KOBAYASHI, Kazumasu SASAKI, Wakana UTO, Masanobu GORYO,
Jun SASAKI, Hiroaki KAMISHINA, Akihiro OISHI and Jun YASUDA

** Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Iwate University, 3-18-8 Ueda,
Morioka-shi, 020-8550, Japan*

SUMMARY

A four-year-old castrated male mixed-breed cat suspected of hydronephrosis was referred to our Veterinary Teaching Hospital. Abdominal radiography revealed enlarged kidneys, and renal ultrasonography detected anechoic cysts of various sizes in both kidneys. Genetic testing using the PCR-hRFLP method identified a mutation (3284C → A) in the PKD1 gene. The cat was therefore diagnosed with autosomal dominantly inherited polycystic kidney disease. At initial presentation to our Veterinary Teaching Hospital, hematological examination showed azotemia and hyperphosphatemia. The cat received peritoneal dialysis for a short duration. Subsequently, it was treated by fluid therapy and prescription diet for renal disease, and monitored for about one year. An analysis of cystic fluid collected from several cysts of both kidneys showed persistently high concentrations of chloride anion and sodium cation. This finding was observed throughout the follow-up period. In addition, the concentration of N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG) and the value of NAG isozyme B tended to increase with the progression of renal failure.

— Key words : feline polycystic kidney disease (fPKD), N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG) isozyme B, PKD1 gene, renal cystic fluid.

† Correspondence to : Reeko SATO (Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Iwate University)
3-18-8 Ueda, Morioka-shi, 020-8550, Japan
TEL · FAX 019-621-6227 E-mail : reekos@iwate-u.ac.jp

— J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 63, 791 ~ 796 (2010)
