

[原著論文]

## 糖尿病ラット腎臓の低灌流 - 再灌流障害 に対するノルエピネフリンとグリベンクラミドの効果

古堅 裕章<sup>1</sup>、樋口マキエ<sup>1</sup>

### 【要旨】

先行研究にて、非糖尿病心臓に比べ糖尿病心臓は低灌流-再灌流障害を受けやすく、この障害はノルエピネフリンで増悪し、そこに血糖降下薬グリベンクラミドが存在するとさらに悪化することが明らかになっている。腎臓においてもこれらの障害や増悪が心臓と同様に起こりうる可能性があると考えられる。本研究では、ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラット摘出灌流腎臓の低灌流-再灌流障害に対するノルエピネフリンおよびグリベンクラミドの効果を腎灌流圧、腎灌流量、尿量の変化から比較検討した。1) 糖尿病腎臓は非糖尿病腎臓と比べ、通常灌流時の尿量が多いが次第に減少し、低灌流時の減少度は大きく、再灌流時の回復度は悪かった。また、再灌流時の灌流圧の上昇は糖尿病腎臓で大きかった。2) ノルエピネフリン  $10^{-7}$  M による腎灌流圧の上昇は、糖尿病腎臓の方が大きかったが、尿量の回復度には影響なかった。3) グリベンクラミド  $10^{-6}$  M により、低灌流-再灌流障害は影響されなかった。4) ノルエピネフリン存在下のグリベンクラミドにより、糖尿病腎臓の低灌流-再灌流障害は影響されなかったが、非糖尿病腎臓の再灌流時の灌流圧上昇は増強された。これらのことから、心臓と同様に糖尿病腎臓の方が低灌流-再灌流障害を受けやすいが、ノルエピネフリン  $10^{-7}$  M およびグリベンクラミド  $10^{-6}$  M の濃度は、低灌流-再灌流障害による尿量の減少には影響を与えないことが明らかになった。ノルエピネフリンやグリベンクラミドの血管平滑筋収縮による、灌流圧の上昇は低灌流-再灌流障害の尿量の変化に影響がないようであり、糖尿病腎臓では  $K_{ATP}$  チャンネル開口による低灌流障害の保護の役割は低い可能性が示唆された。

**キーワード:** 糖尿病、摘出腎臓灌流、低灌流 - 再灌流障害、ノルエピネフリン、グリベンクラミド

### 【緒言】

糖尿病は様々な全身症状を引き起こす代謝異常疾患であり、高血糖に起因するミクロアングリオパシー（毛細血管や細動脈における内腔の狭窄や細小血管瘤と呼ばれる動脈瘤など）やマクロアングリオパシー（脳動脈、大動脈、冠動脈、及び下肢の動脈における動脈硬化）が引き起こされる。その中でも、糖尿病性腎症は神経障害、網膜症とともに糖尿病特有の血管三大合併症の一つとされている。糖尿病性腎症の成因として高血糖が重要であることは、その発症・進展を厳格な血糖コントロールが遅延、あるいは阻止するという報告より明らかである<sup>1-3)</sup>。非糖尿病性腎症の発症・進展には虚血<sup>4)5)</sup>や交感神経活性亢進<sup>6)7)</sup>の関与などが報告されているため、糖尿病性腎症で

は、血糖コントロールと同時に虚血や交感神経活性亢進を起こさないようにすることが予防上、重要であると思われる。

糖尿病ラットの摘出灌流心臓を用いた研究では、非糖尿病心臓に比べ糖尿病心臓の方が、左心室の拡張期ステフネスの増加や局所心筋エネルギー代謝異常などの低流量灌流障害を受けやすく、糖尿病の重症度に依存して悪化している<sup>8)9)</sup>。低灌流下にノルエピネフリンが増加すると、障害は亢進している<sup>8-11)</sup>。また、血糖降下薬であるグリベンクラミド(グリブライド)は、心筋や血管平滑筋の $K_{ATP}$ チャンネル(ATP依存性カリウムチャンネル)を阻害することにより、このノルエピネフリン付加低灌流障害をさらに憎悪させることが示されている<sup>12)</sup>。

腎臓においても、虚血 - 再灌流により活性酸素の

<sup>1</sup> 九州看護福祉大学看護福祉学部 看護学科

増加と活性酸素消去系の活性低下<sup>5)</sup>、一酸化窒素の産生障害<sup>13)</sup>、およびエネルギー代謝異常<sup>4)</sup>など腎機能障害が誘発されることが報告されている。交感神経は腎臓の血管、糸球体、傍糸球体細胞、尿細管に分布しており、腎血管平滑筋細胞および尿細管には $\alpha_1$ と $\alpha_2$ アドレナリン受容体が、糸球体・傍糸球体細胞には $\beta_1$ 受容体が存在する。受容体のかなりの部分はシナプス外に存在し、循環血液中のノルエピネフリンやエピネフリンも作用する<sup>14)</sup>。ノルエピネフリンの投与により腎尿細管の繊維化<sup>15)</sup>や腎虚血<sup>6)</sup>が生じることなどより、腎交感神経活性亢進が腎機能障害に深く関与していると考えられる。また、血管平滑筋に存在する $K_{ATP}$ チャネルの開口により血管は拡張することより<sup>12)</sup>、腎臓においても $K_{ATP}$ チャネルは低灌流 - 再灌流障害時に開口し保護的に働いている可能性がある。

以上のことから、糖尿病腎臓においても糖尿病心臓と同様に、交感神経活性亢進下の虚血は障害を増悪させ、グリベンクラミドの存在でさらに悪化する可能性が考えられる。

そこで本研究では、ラット摘出灌流腎臓標本を用い、腎灌流圧・腎灌流量・尿量を指標として、糖尿病腎臓は非糖尿病腎臓に比べ、低灌流 - 再灌流障害を受けやすいかどうかを検討する。次に、これらの障害に対する交感神経系興奮の影響をみるために低濃度のノルエピネフリンを持続注入し、その効果を比較検討する。更に、低灌流 - 再灌流障害およびノルエピネフリン付加低灌流 - 再灌流障害に対する血糖降下薬である $K_{ATP}$ チャネル阻害薬グリベンクラミドの効果を比較検討する。

## 【方法】

### 1. 実験動物

実験には、8週齢の雄性Sprague Dawleyラット（日本エスエルシー株式会社）を用い、糖尿病誘発6週間の糖尿病ラット（ $n=35$ ）と同週齢の非糖尿病ラット（ $n=23$ ）を用いた。糖尿病ラットは、先に報告した方法に準じ<sup>8)</sup>、ネンブタール（大日本製薬）麻酔下にストレプトゾトシン（STZ, Sigma）50mg/kg iv投与により誘発した。ラットはSTZ投与前夜のみ絶食させた。対照群の非糖尿病ラットには、STZの

溶媒である生理食塩水を同様に投与した。血糖値は、グルテストエース（GT-1640, 三和化学研究所）を用い尾部血液より測定し、STZ投与3日目の血糖値が300mg/dl以上のものを糖尿病ラットとした。ラットは、実験日まで、飼育装置（日本クレア、ATCL-1NH）を用い、固形飼料と水を自由に摂取させ、自然の昼夜サイクルにて、1～2匹/ゲージ内で飼育された。動物実験は、文部科学省および日本薬理学会における動物実験等の基本指針に基づいて倫理的に行った。

### 2. 摘出灌流腎臓標本

ヘパリンナトリウム（持田）1000 U/kgの腹腔内投与15分後、エーテル麻酔下に開腹し、下大静脈より採血しグルテストエースを用い血糖値を測定した。遮血した後開胸し、心臓を摘出した（心臓は別の実験に使用した）。次に、約2℃に冷却した灌流液Krebs-Henseleit液（KH液：NaCl 120 mM, KCl 4.8 mM,  $MgSO_4$  1.2 mM,  $CaCl_2$  2.5 mM,  $KH_2PO_4$  1.2 mM, グルコース 11 mM,  $NaHCO_3$  25 mM）で胸腔・腹腔内を洗い、冷却下に泌尿生殖器を残し、胃から直腸までの腹腔内臓器を摘出した。次に、尿管、腎動脈、腎静脈の順に各々カニューレを挿入し、冷却したKH液を腎動脈からゆっくり注入し、血液を洗い流した。その後、腎臓を摘出した。カニューレを挿入した腎臓の摘出はまず左腎から行い、次に右腎も同様に摘出した。これらの左右の腎臓は、定流量灌流装置に装着されるまで、冷却したKH液内に保存され、装着後、95% $O_2$ ・5% $CO_2$ ガスを飽和させた37℃のKH液（pH 7.4）で灌流された。

### 3. 定流量灌流実験

#### 1) 通常灌流までの手順

左右の糖尿病腎臓（ $n=52$ ）と非糖尿病腎臓（ $n=42$ ）は灌流ポンプ（Minipuls 3, Gilson）を用い、灌流量約0.7ml/minで灌流を始め、腎灌流圧が大体一定になる15分後に1.4ml/minに増加させた。その後15分毎に灌流量を非糖尿病腎臓では約0.7ml/min、糖尿病腎臓では約1.4ml/minずつ段階的に増加させ、灌流圧を測定した。最終的に灌流圧が約70mmHgになるまで約1.5～2時間を要した。この状態を通常灌流とし、15分間通常灌流したときの値を対照値とした。

## 2) 通常灌流下のノルエピネフリンの効果判定実験手順

糖尿病腎臓 (n=4) と非糖尿病腎臓 (n=6) を用い、通常灌流下の腎灌流圧に対するノルエピネフリン  $10^{-7}$  M、 $3 \times 10^{-7}$  M、 $10^{-6}$  M、 $3 \times 10^{-6}$  M 含有KH液の効果を濃度の低い順に観察した。次に、輸液ポンプ (SP-70 NIPRO) を用い持続注入した  $\alpha$ -アドレナリン受容体拮抗薬フェントラミン  $10^{-6}$  M 存在下に、同濃度のノルエピネフリンの効果を同様に観察した。

## 3) 低流量灌流 - 再灌流実験プロトコール

低灌流 - 再灌流実験プロトコールをFig. 1に示す。摘出灌流腎臓を、灌流圧70mmHgで通常灌流45分後、腎灌流量を通常灌流の約1/3に減少させ、低灌流状態にした。低灌流60分後、通常灌流時の流量に戻し、60分間再灌流を行った。

上述の低灌流 - 再灌流実験において、Fig. 1に示すように、非糖尿病腎臓と糖尿病腎臓を各々4群に分けた。

非糖尿病Control (nonDM, n=8) 群と糖尿病Control (DM, n=11) 群：通常灌流30分後より、輸液ポンプ (SP-70 NIPRO) を用い、低灌流時に0.002%になるようにグリベンクラミドの溶媒Dimethyl Sulfoxide (DMSO) 0.04%液を持続注入した。ノルエピネフリン付加非糖尿病 (nonDM-NE, n=10) 群とノルエピネフリン付加糖尿病 (DM-NE, n=8) 群：通常灌流15分後より、ノルエピネフリン  $10^{-7}$  M 含有灌流液に変更し、反応を見た後、通常灌流30分後より、Control群と同様にDMSOを持続注入した。グリベンクラミド (glibenclamide:glyburide:Glyb) 付加非糖尿病 (nonDM-Glyb, n=8) 群とグリベンクラミド付加糖尿病 (DM-Glyb, n=17) 群：通常灌流30分後より、低灌流時の濃度が  $10^{-6}$  M になるようにグリベンクラミド  $2 \times 10^{-5}$  M 液を持続注入した。ノルエピネフリン存在下、グリベンクラミド付加非糖尿病 (nonDM-NE+Glyb, n=10) 群とノルエピネフリン存在

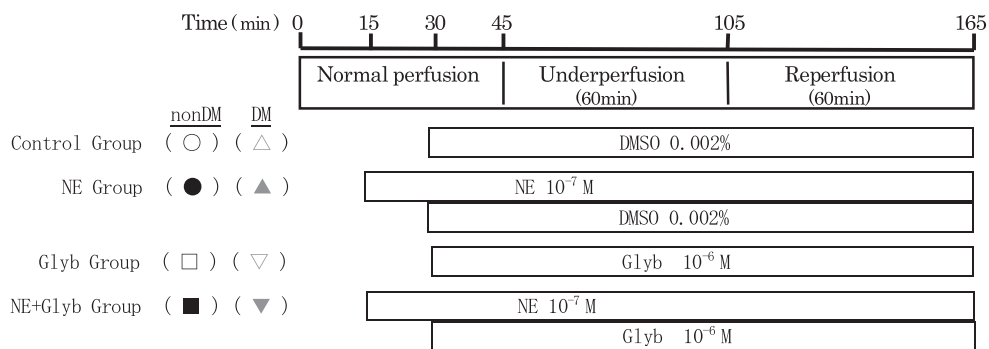


Fig. 1. Normal perfusion - underperfusion - reperfusion protocol

All isolated rat kidneys were perfused with Krebs-Henseleit solution (pH 7.4, 37 °C) containing NaCl 120 mM, KCl 4.8 mM,  $\text{MgSO}_4$  1.2 mM,  $\text{CaCl}_2$  2.5 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2 mM, glucose 11 mM,  $\text{NaHCO}_3$  25 mM gassed with 95%  $\text{O}_2$  - 5%  $\text{CO}_2$ . Using a microtube pump, renal perfusion flow (RPF) was kept constant at a rate adjusted to provide a renal perfusion pressure (RPP) of 70 mmHg (Normal perfusion). After 45-min normal perfusion, RPF was decreased to one-third (Underperfusion). After 60-min underperfusion, the kidneys were reperfused at a constant flow of the normal perfusion level for 60-min (Reperfusion). After 15-min normal perfusion, the perfusate was changed to that containing  $10^{-7}$  M norepinephrine (NE), the kidneys were perfused throughout the experiments. Glibenclamide (Glyb) and the solvent, Dimethyl Sulfoxide (DMSO) were infused using a syringe pump throughout the experiments after 30-min normal perfusion.

Table 1. Characteristics diabetic state in rats

	n	Body weight (g)		Blood sugar (mg/dl)		Kidney weight (g)
		Just before saline or STZ	6 weeks after saline or STZ	Just before saline or STZ	6 weeks after saline or STZ	6 weeks after saline or STZ
Non-diabetic rats	23	250 $\pm$ 3	438 $\pm$ 4 <sup>++</sup>	67 $\pm$ 2	129 $\pm$ 4 <sup>++</sup>	1.61 $\pm$ 0.03
Diabetic rats	35	249 $\pm$ 2	252 $\pm$ 6 <sup>**</sup>	65 $\pm$ 1	475 $\pm$ 10 <sup>**++</sup>	1.89 $\pm$ 0.04 <sup>**</sup>

Diabetic rats were induced by a single intravenous injection of 50 mg/kg streptozotocin (STZ) in 8 week-old male Sprague-Dawley rats. Non-diabetic rats were injected saline instead of STZ. Blood sugar was measured with the Glutestace set (GT-1640, Sanwakagaku Kennkyusho). Kidney weights are average of right and left.

Means  $\pm$  S.E. <sup>\*\*</sup>P<0.01 vs. Non-diabetic rats, <sup>++</sup>P<0.01 vs. Just before saline or STZ

下, グリベンクラミド付加糖尿病 (DM-NE+Glyb, n=12) 群: 通常灌流15分後より、ノルエピネフリン $10^{-7}$  M 含有灌流液に変更し、通常灌流30分後より、低灌流時の濃度が $10^{-6}$  M になるようにグリベンクラミド $2 \times 10^{-5}$  M 液を持続注入した。

#### 4. 腎臓の重量測定

前述の腎臓灌流実験終了後、腎皮膜を取り除き、腎動脈・腎静脈・尿管を腎門部から切り離した後、重量を測定した。

#### 5. 統計処理

データは全て平均値±標準誤差で示した。統計解析には、Student's t-testとANOVA+Scheffe法 (post-hoc test) を用いた。

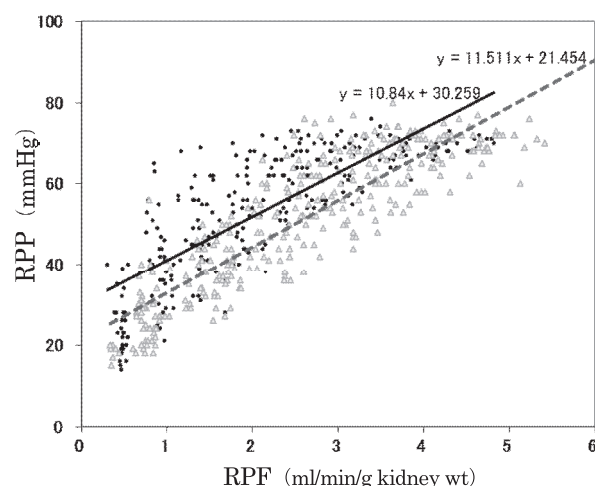
### 【結果】

#### 1. 実験動物の特性

Table 1は、STZ誘発6週間の糖尿病ラットの特性を示す。非糖尿病ラットに比べ糖尿病ラットでは、体重は増加せず、血糖値の顕著な増加が見られ、腎臓の重量は有意に増加していた。

#### 2. 腎灌流量と腎灌流圧の関係

Fig. 2は、腎灌流圧が約70mmHgになるまで腎灌流量を段階的に増加させた過程の腎灌流量と腎灌流圧の関係を示す。散布図の回帰直線からみると、同じ灌流量では、非糖尿病群より糖尿病群の方が灌流圧は低かった。



**Fig. 2. Relationships between changes in renal perfusion flow (RPF) and renal perfusion pressure (RPP) in the isolated diabetic and non-diabetic rat kidneys.**

RPF was gradually increased in steps using a microtube pump to provide RPP of about 70 mmHg (normal perfusion) within 90~120 min. The RPF and RPP were plotted in the isolated non-diabetic rat kidney (●, n=42, regression solid line) and diabetic rat kidney (△, n=52, regression dashed line).

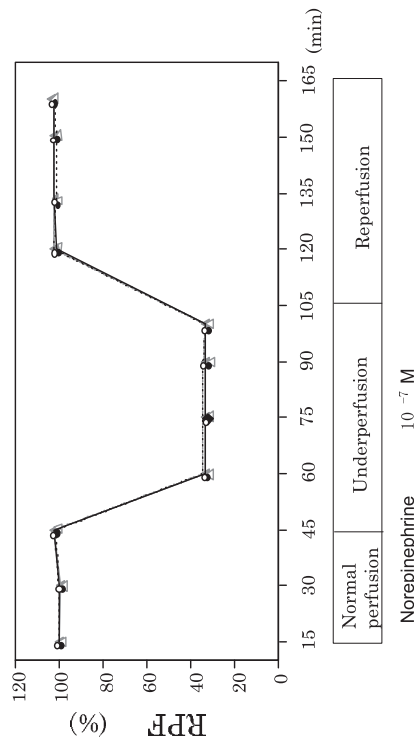
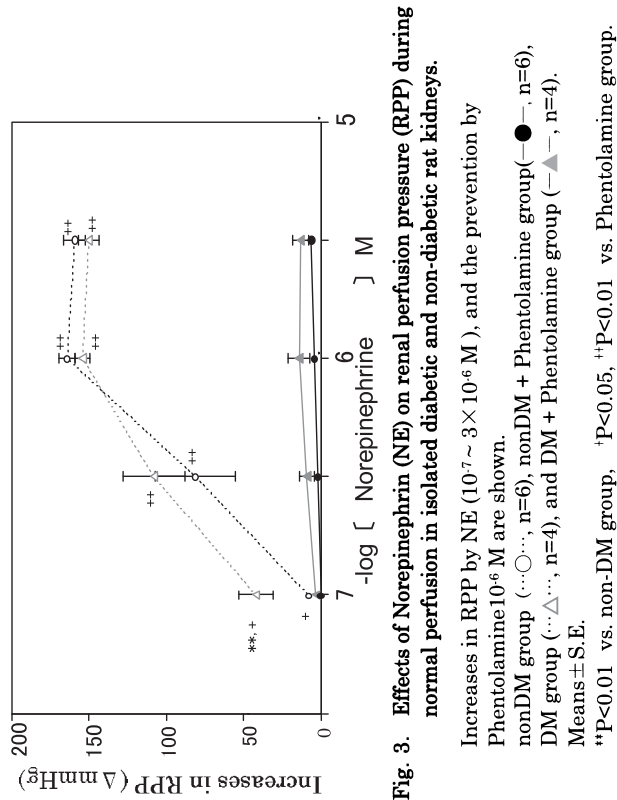
#### 3. 摘出灌流腎臓の通常灌流時の状態

Table 2は、各群ごとの通常灌流時の腎灌流量、腎灌流圧、および尿量を示す。1分間あたりの腎灌流量は、糖尿病群で有意に多かったが、腎臓1gあたりの腎灌流量では非糖尿病群と糖尿病群で同様であった。DM群とDM-NE群の灌流圧は、対応する非糖尿病群より有意な高値を示した。しかし、全ての例数の平均でみると、非糖尿病群(n=36:  $72 \pm 1$  mmHg) と糖尿病群(n=48:  $71 \pm 0$  mmHg) で、有意差はみられなかった。尿量は、10分間あたりの尿量と腎臓1gあたりの尿量のどちらも糖尿病群で有意に多かった。

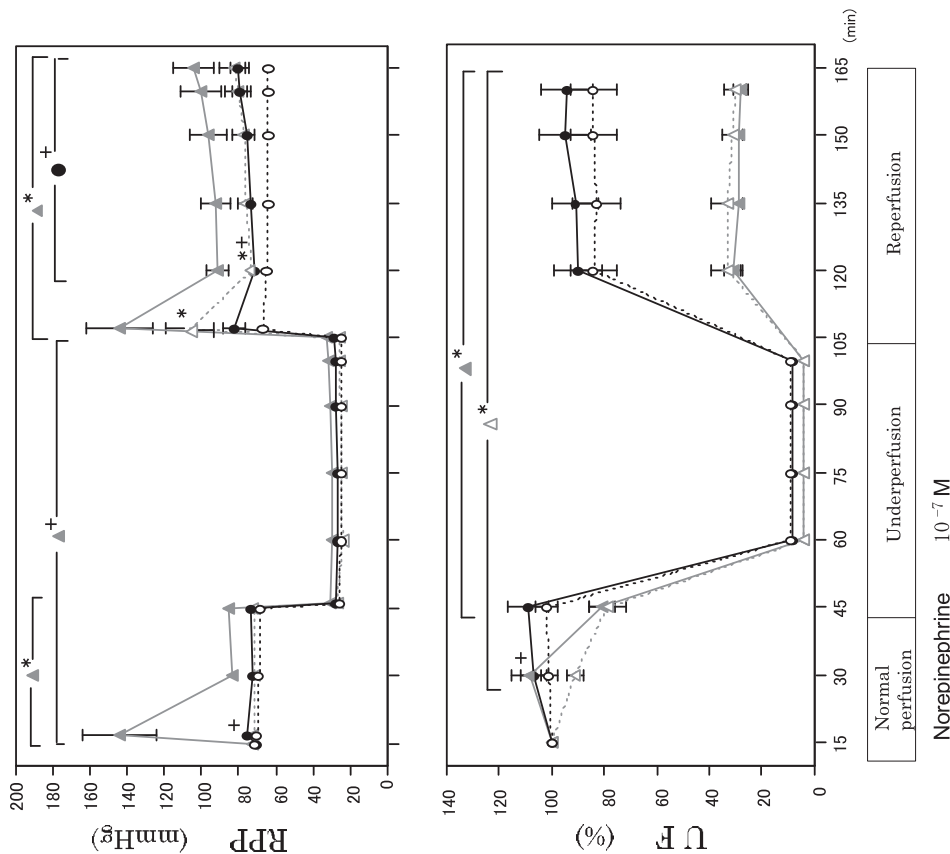
**Table 2. State of normal perfusion in isolated perfused diabetic and non-diabetic rat kidneys**

Group	n	Renal perfusion flow (RPF)		Renal perfusion pressure (RPP)	Urine flow (UF)	
		(ml/min)	(ml/min/gKW)		(ml/10min)	(ml/10min/gKW)
nonDM	8	$6.24 \pm 0.37$	$3.94 \pm 0.25$	$71 \pm 0$	$0.50 \pm 0.08$	$0.31 \pm 0.06$
nonDM-NE	10	$5.32 \pm 0.37$	$3.35 \pm 0.26$	$70 \pm 1$	$0.50 \pm 0.05$	$0.30 \pm 0.03$
nonDM-Glyb	8	$6.09 \pm 0.33$	$3.88 \pm 0.20$	$72 \pm 1$	$0.47 \pm 0.10$	$0.30 \pm 0.07$
nonDM-NE+Glyb	10	$5.74 \pm 0.39$	$3.52 \pm 0.28$	$71 \pm 0$	$0.57 \pm 0.09$	$0.36 \pm 0.06$
DM	11	$7.39 \pm 0.41^{**}$	$4.19 \pm 0.23$	$72 \pm 0^{*}$	$1.38 \pm 0.23^{**}$	$0.78 \pm 0.18^{*}$
DM-NE	8	$7.28 \pm 0.48^{**}$	$4.02 \pm 0.25$	$72 \pm 1^{*}$	$1.87 \pm 0.30^{**}$	$1.04 \pm 0.17^{**}$
DM-Glyb	17	$7.98 \pm 0.32^{**}$	$4.05 \pm 0.21$	$72 \pm 1$	$1.79 \pm 0.22^{**}$	$0.91 \pm 0.12^{**}$
DM-NE+Glyb	12	$8.01 \pm 0.33^{**}$	$4.01 \pm 0.20$	$72 \pm 1$	$2.10 \pm 0.25^{**}$	$1.05 \pm 0.18^{**}$

Values are means  $\pm$  S.E.  $^{*}P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$  vs. corresponding non-diabetic group. KW : kidney weight.



**Fig. 4. Effects of Norepinephrine (NE) on renal perfusion flow (RPF) during Normal, under- and reperfusion in isolated diabetic and non-diabetic rat kidneys.**



**Fig. 5. Effects of Norepinephrine (NE) on renal perfusion pressure (RPP, upper), and urine flow (UF, lower) during normal, under- and reperfusion in isolated diabetic and non-diabetic rat kidneys.**

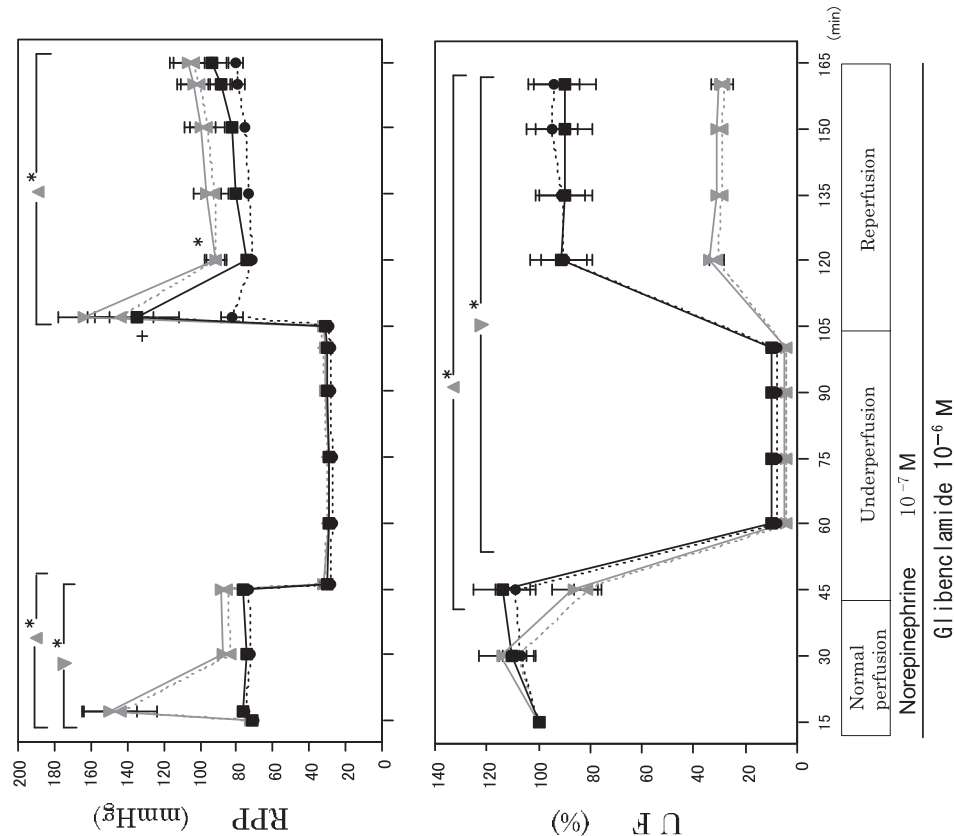


Fig. 7. Effects of Glibenclamide (Glyb) on renal perfusion pressure (RPP, upper), and urine flow (UF, lower) during under- and reperfusion with NE injuries in isolated diabetic and non-diabetic rat kidneys. UF (lower) at 15-min normal perfusion in Table 2 is shown as 100%. nonDM + NE group (—●—, n=10), nonDM + NE + Glyb group (---■---, n=10), DM + NE group (···▲···, n=8), and DM + NE + Glyb group (—▼—, n=12). Means ± S.E. \*P<0.05 vs. nonDM - NE ± Glyb, \*P<0.05 +Glyb vs. -Glyb. All other explanations as in legend to Fig. 1.

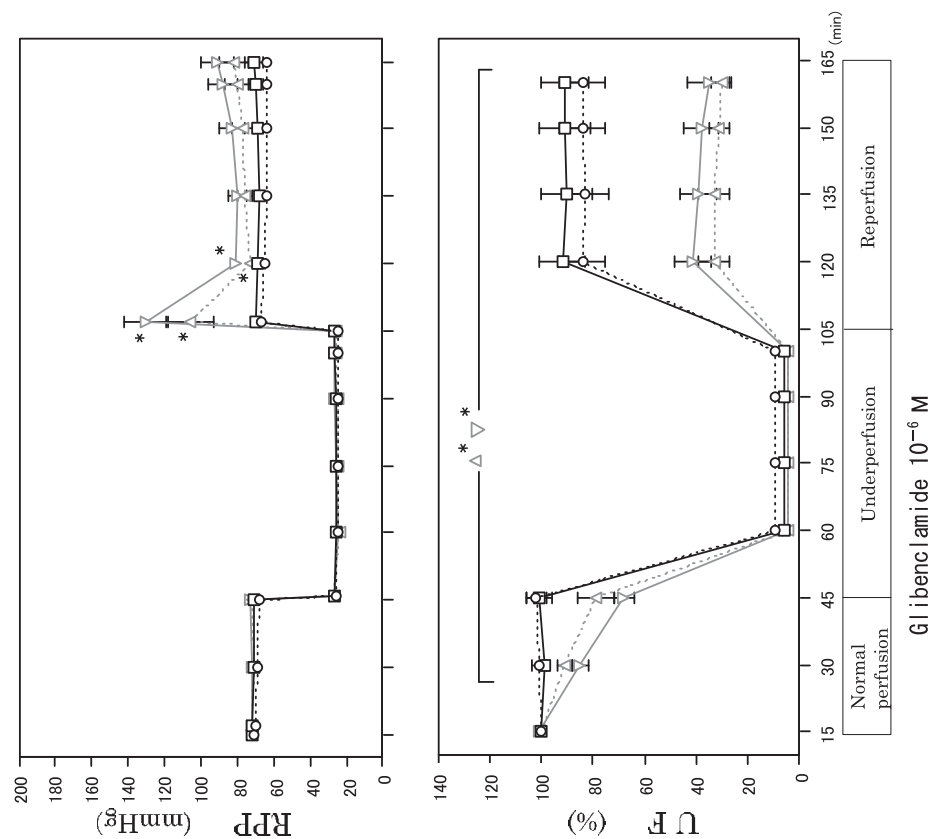


Fig. 6. Effects of Glibenclamide (Glyb) on renal perfusion pressure (RPP, upper), and urine flow (UF, lower) during normal-, under- and reperfusion in isolated diabetic and non-diabetic rat kidneys. UF (lower) at 15-min normal perfusion in Table 2 is shown as 100%. nonDM group (···○···, n=8), nonDM + Glyb group (---□---, n=8), DM group (—△—, n=11), and DM + Glyb group (—▽—, n=17). Means ± S.E. \*P<0.05 vs. nonDM ± Glyb. All other explanations as in legend to Fig. 1.

#### 4. 摘出灌流腎臓における通常灌流下の灌流圧に対するノルエピネフリンの効果

Fig. 3は、通常灌流時の糖尿病群と非糖尿病群の灌流圧に対するノルエピネフリンの効果を示す。非糖尿病群、糖尿病群共にノルエピネフリンの濃度に依存した灌流圧の上昇が見られた。ノルエピネフリン $10^{-7}$  Mでのみ、非糖尿病群に比べ糖尿病群の方が有意に強い反応を示した。両群におけるノルエピネフリンによるこれらの増加は、 $\alpha$ -アドレナリン受容体拮抗薬のフェントラミン $10^{-6}$  Mで抑制された。

#### 5. 低灌流 - 再灌流障害に対するノルエピネフリンの作用

Fig. 4は、糖尿病ラット腎臓の低灌流 - 再灌流時の腎灌流量に対するノルエピネフリンの効果を示す。通常灌流時の腎灌流量を100%として示すと、低灌流時の腎灌流量は、通常灌流時の約1/3であり、再灌流時は通常灌流時とほぼ同等の腎灌流量であり、Fig. 1で示した8群全てにおいて、同様の結果であった。

Fig. 5上図は、糖尿病ラット腎臓の低灌流-再灌流時の腎灌流圧に対するノルエピネフリンの効果を示す。

nonDM群では、通常灌流時の灌流圧は約70mmHgであり、低灌流により灌流圧はすぐに約25mmHgへ減少しそのまま60分間持続した。再灌流直後の一過性の灌流圧の上昇は起こさず、約67mmHgにて、60分間持続した。nonDM-NE群では、ノルエピネフリン投与直後および再灌流15分以降において、non-DM群より有意な高値を示した。

DM群では、通常灌流時の灌流圧は約70mmHgであり、低灌流により、灌流圧はすぐに約25mmHgへ減少しそのまま60分間持続した。再灌流直後の一過性の灌流圧の上昇は $106 \pm 13$ mmHgであり、再灌流15分では $73 \pm 2$ mmHgまで減少し、その後ゆるやかに上昇していった。DM群は、再灌流直後と再灌流15分において、nonDM群より有意な高値を示した。DM-NE群では、ノルエピネフリン投与直後から低灌流時および再灌流15分において、DM群より有意な高値を示した。また、ノルエピネフリン投与直後からの通常灌流時と再灌流時の灌流圧は、nonDM-NE群より有意な高値を示した。

Fig. 5下図は、糖尿病ラット腎臓の低灌流 - 再灌流時の尿量に対するノルエピネフリンの効果を示す。

nonDM群では、通常灌流時の尿量に変化は見られず（通常灌流15分値： $0.31 \pm 0.06$ ml/10min/g）、低灌流により尿量は通常灌流時の約9%に減少した（低灌流55分値： $0.04 \pm 0.01$ ml/10min/g）。再灌流により、尿量は通常灌流15分値と有意差のない状態まで回復した（再灌流55分値： $0.26 \pm 0.05$ ml/10min/g）。nonDM-NE群では、ノルエピネフリン投与直後より尿量は通常灌流時の約108%まで上昇し、再灌流時の尿量は通常灌流15分値まで回復した。

DM群では、通常灌流時の尿量は時間経過と共に減少していった（通常灌流15分値： $0.78 \pm 0.13$ ml/10min/g, 45分値： $0.60 \pm 0.11$ ml/10min/g）。低灌流により、尿量は通常灌流時の約4%に減少し（低灌流55分値： $0.03 \pm 0.01$ ml/10min/g）、再灌流により、通常灌流時の約33%までしか回復しなかった（再灌流55分値： $0.22 \pm 0.05$ ml/10min/g）。DM-NE群では、ノルエピネフリン投与直後のみ尿量の有意な増加がみられ、その後はDM群とほぼ同様の結果であった。

#### 6. 低灌流 - 再灌流障害に対するグリベンクラミドの作用

Fig. 6は、糖尿病ラット腎臓の低灌流 - 再灌流時の灌流圧（上図）と尿量（下図）に対するグリベンクラミドの効果を示す。nonDM, DM群共に、グリベンクラミドにより灌流圧と尿量の変化は見られなかった。また、グリベンクラミドの有無に関わらず、再灌流直後と15分後の灌流圧は、DM群が有意な高値を示し、通常灌流30分以降の尿量は、有意な低値を示した。

#### 7. ノルエピネフリン付加低灌流 - 再灌流障害に対するグリベンクラミドの作用

Fig. 7は、糖尿病ラット腎臓のノルエピネフリン付加低灌流 - 再灌流障害時の灌流圧（上図）と尿量（下図）に対するグリベンクラミドの効果を示す。DM-NE群の灌流圧は、グリベンクラミドにより変化が見られなかったが、nonDM-NE群では、再灌流直後の灌流圧はグリベンクラミドにより有意な高値を示した。しかし、尿量は、nonDM-NE群、DM-NE群共にグリベンクラミドによる変化は見られなかった。ま

た、グリベンクラミドの有無に関わらず、通常灌流45分以降の尿量は、有意な低値を示した。

## 【考察】

### 1. 実験糖尿病ラットの特性について

ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットでは、膵臓のランゲルハンス島β細胞が破壊され<sup>16)</sup>、インスリン分泌は減少し、細胞内への糖の取り込みと利用が抑制され、代償的に蛋白質や脂質の分解が増加する。今回の実験に用いたストレプトゾトシン誘発6週間の糖尿病ラットは、3日目より顕著な高血糖を示し、体軀の痩身がみられ、心臓、肝臓、脾臓および脂肪重量は減少していた。一方、腎臓では重量の有意な増加がみられた。糖尿病性腎症における最初の生理学的な変化は糸球体の過剰濾過で形態学的な変化は腎・糸球体肥大である<sup>17)</sup>ことから、この重量の増加は腎・糸球体肥大によるものと推察される。

### 2. 摘出腎臓灌流実験研究における糖尿病腎臓と非糖尿病腎臓の違いについて

今回の糖尿病と非糖尿病両群における摘出腎臓標本の灌流量と灌流圧は正の直線関係にあった。同じ灌流圧では、非糖尿病群より糖尿病群の方が多い灌流量を示したが、通常灌流時の腎臓1gあたりに換算した腎灌流量は、両群で大きな差はなかった。しかしながら、糖尿病群の尿量は顕著に増加していた。すなわち、摘出腎臓灌流実験において通常灌流時の腎臓1gあたりに換算した糖尿病群の腎灌流量は非糖尿病群の約1.12倍であったが、腎臓1gあたりの尿量は非糖尿病群の約2.88倍もあり顕著に増加していた。この尿量の増加は灌流量の増加だけでは説明ができず、糖尿病による腎障害が推察される。

腎症早期には糸球体過剰濾過がみられ、1型糖尿病では糸球体濾過面積と糸球体濾過量および糸球体体積との間には有意な正の相関が示され、メサンギウム領域の拡大に対し糸球体濾過量を維持するために糸球体濾過面積の代償性の増加が起きるといわれている<sup>18) 19)</sup>。また、糖尿病では糸球体病変を介して尿中に蛋白とともに濾過されてくる各種成長因子、遊離脂肪酸、ポリオール経路などの代謝産物および酸化ストレスにより尿細管・間質の繊維化を引き起

こすと報告されている<sup>20)</sup>。

以上のことから考えると、ストレプトゾトシン誘発6週間の糖尿病ラット腎臓では、糸球体濾過量の増加と尿細管での再吸収の減少の両方によって、尿量の増加が起きていることが推察される。本研究に用いた糖尿病腎臓の機能は、摘出腎臓灌流実験の尿量および腎重量の増加という結果からではあるが、糖尿病性腎症病期分類<sup>21)</sup>による腎症Ⅱ期(早期腎症)に相当するのではないかと推察される。

### 3. 糖尿病によるノルエピネフリン反応性の変化

本研究では、通常灌流時の灌流圧に対するノルエピネフリンの作用は、両腎臓とも濃度依存的な上昇であった。これらの効果はノルエピネフリンの濃度依存的な腎血管収縮反応の報告<sup>17)</sup>や、フェントラミンにより拮抗されることよりα受容体を介した血管収縮反応であることが明らかになった。腎血管平滑筋細胞にはα<sub>1</sub>とα<sub>2</sub>アドレナリン受容体が存在するという報告<sup>14)</sup>もこれらの結果を支持している。

しかしながら、ノルエピネフリン10<sup>-7</sup>Mの効果は、糖尿病群の方が非糖尿病群より有意に反応が大きかった。この結果は、正常マウスに比し糖尿病マウスの大動脈平滑筋におけるノルエピネフリンの一過性の収縮反応は有意に大きいというAbeらの報告と一致している<sup>22)</sup>。腎臓の輸入・輸出細動脈にも平滑筋細胞が存在しており交感神経の支配を受けている。糖尿病腎臓では交感神経活性低下により腎血管は拡張状態であり、血管平滑筋のα受容体数、細胞内情報伝達系、平滑筋収縮系のいずれかに関連して血管収縮が起こりやすい状態であり、ノルエピネフリンによる一過性の血管収縮作用が増強したためと考えられる。今回の結果は、糖尿病腎動脈平滑筋細胞のノルエピネフリンに対する感受性の増加を示唆している。

### 4. 糖尿病腎臓と非糖尿病腎臓の低灌流 - 再灌流障害の違いについて

非糖尿病Control群では通常灌流45分間の灌流圧はほとんど変わらず、再灌流時の灌流圧は通常灌流時と同等の値まで戻り60分間維持した。尿量は通常灌流時の値まで回復しなかったが、有意な減少ではなかった。一方、糖尿病Control群では、低灌流 - 再灌流により灌流圧の一過性の上昇とそれに続くゆる

やかな上昇がみられ、尿量でも非糖尿病Control群にくらべ通常灌流30分から、低灌流、再灌流を通して有意な低値を示した。

非糖尿病腎臓でも、虚血 - 再灌流による活性酸素消去系の低下<sup>5)</sup>、活性酸素の増加<sup>5)</sup>、一酸化窒素の産生障害<sup>13)</sup>、およびエネルギー代謝異常<sup>4)</sup> などにより、腎機能障害が誘発されることが報告されている。今回の研究でもこれらの障害が起きている可能性は否定できないが、通常灌流時の1/3の流量の60分間低灌流 - 再灌流では、灌流圧と尿量に有意な変動を示していないことから、灌流圧と尿量の変動を糖尿病腎臓における障害の指標として用いた。

糖尿病腎臓では、灌流圧には変化はないが通常灌流時より尿量の減少が見られた。通常灌流時に尿量が安定するまで、通常灌流を行ったあと低灌流にした方が、低灌流 - 再灌流障害は明確になったと思われる。しかしながら、非糖尿病腎臓では見られなかった再灌流時の一過性の灌流圧上昇とそれに続くゆるやかな上昇がみられ、尿量の回復もみられないことから、糖尿病腎臓の方が非糖尿病腎臓に比べ低灌流 - 再灌流障害を起こしやすいといえるであろう。

今回用いた糖尿病摘出腎臓標本は既に酸化ストレスが亢進している可能性があり<sup>23)</sup>、また糸球体や尿細管に組織病変を起こしている可能性<sup>18-20)</sup>があり、非糖尿病に比べ低灌流 - 再灌流障害を受けやすい状態にあったと推察される。

## 5. 低灌流 - 再灌流障害に対するノルエピネフリンの作用について

ノルエピネフリン $10^{-7}$  M 付加非糖尿病群は、再灌流直後の一過性の灌流圧の上昇とそれに続くゆるやかな灌流圧の上昇がみられた。一方、ノルエピネフリン $10^{-7}$  M 付加糖尿病群では、ノルエピネフリン付加直後に糖尿病Control群に比べ、有意な一過性の灌流圧の上昇がみられ、再灌流時においても有意な差ではないが高い灌流圧を示した。尿量に関しては、両群ともに、ノルエピネフリン投与直後の尿量に上昇が見られるほかは、Control群とほとんど変わらなかった。今回の実験では、灌流圧の上昇は尿量に必ずしも反映されていない。しかし、過剰な血圧の亢進は糸球体を傷害することが明らかになっていること、交感神経の過剰または慢性的な亢進が腎臓に

障害や機能変化をもたらすという報告<sup>7)24)</sup>、そして心臓ではノルエピネフリン $10^{-6}$  M で障害が悪化することなどから、腎臓でもノルエピネフリンの濃度を上昇させると尿量に影響を与える可能性はあり、検討する必要がある。

## 6. 糖尿病腎臓の低灌流 - 再灌流障害に対するグリベンクラミドの作用について

今回の実験では、非糖尿病と糖尿病両腎臓において、グリベンクラミド $10^{-6}$  M のみでは灌流圧と尿量に変化がもたらされなかった。これは心臓でも同様であった<sup>12)</sup>。

糖尿病腎臓では、ノルエピネフリン $10^{-7}$  M 付加低灌流 - 再灌流障害に対するグリベンクラミドの影響はみられなかった。一方、非糖尿病腎臓の再灌流時の灌流圧上昇は増強された。しかし、尿量には変化が見られなかった。糖尿病ラットの摘出灌流心臓を用いた研究では、非糖尿病心臓に比べ糖尿病心臓の方が、低流量灌流障害を起こしやすく、低流量灌流下でノルエピネフリンが増加すると障害は増悪し、グリベンクラミドの存在でこの障害はさらに悪化することが明らかになっている<sup>8-12)</sup>。しかし、腎臓では糖尿病群に影響を及ぼさず、心臓とは異なる反応を示した。

腎尿細管における $\text{Na}^+$ 再吸収に要するエネルギーは、腎臓における種々の仕事で消費されるエネルギーの中で最も多い。しかし、糖尿病では尿細管の繊維化<sup>23)</sup>が起きている可能性があることや、ストレプトゾトシン誘発29週の糖尿病ラットではヘンレループ上行脚部の $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPaseが消失しているとの報告<sup>25)</sup>から考えると、糖尿病腎臓では尿細管の病変によりエネルギー消費が減少している可能性があり、 $\text{K}_{\text{ATP}}$ チャネル開口による低灌流障害の保護の意味は低いと思われる。また、摘出心臓の実験ではノルエピネフリン $10^{-6}$  M でグリベンクラミドの増悪作用がみられることより、この濃度での検討が必要である。

**【結語】** ストレプトゾトシン誘発6週間の実験糖尿病ラット摘出腎臓標本は非糖尿病に比し、腎重量と尿量は有意に増加し、糸球体および尿細管病変を起こしていることが推察された。尿量の減少を腎障害の指標とすると、心臓と同様に糖尿病状態下の

方が低灌流 - 再灌流障害を受けやすいが、心臓とは異なり低濃度のノルエピネフリン $10^{-7}$  M、グリベンクラミド $10^{-6}$  M および両薬物の存在は、低灌流 - 再灌流障害の程度に影響を与えないことが示唆された。すなわち、ノルエピネフリン存在下におけるグリベンクラミドによる灌流圧の上昇は、低灌流 - 再灌流障害の尿量の変化には影響しなかった。糖尿病腎臓では尿細管の病変によりエネルギー消費が減少している可能性があり、 $K_{ATP}$  チャンネル開口による低灌流障害の保護の意味は低い可能性が示唆された。今後の課題として、低灌流 - 再灌流障害に対するノルエピネフリン $10^{-6}$  M の効果を調べてみる必要がある。

### 【文献】

- 1) The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 1993 ; 329 : 977-986.
- 2) Ohkubo Y, Kishikawa H, Araki E, Miyata T, Isami S, Motoyoshi S, Kojima Y, Furuyoshi N, Shichiri M. Intensive insulin therapy prevents the progression of diabetic microvascular complication in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: a randomized prospective 6-year study. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 1995 ; 28 : 103-117.
- 3) 深尾充宏, 當瀬規嗣. 血管内皮と糖尿病. *J. Smooth Muscle Res.* 2004 ; 8 : J35-J47.
- 4) 宮村隆三. 腎保存に関する基礎的研究 特に腎エネルギー代謝を中心として. *日泌尿会誌.* 1972 ; 63 (3) : 200-214.
- 5) 岡嶋晋. ラット腎虚血再灌流障害機構に関する実験的研究. *北海道医学雑誌.* 1990 ; 65 (3) : 277-284.
- 6) Cronin RE, Erickson AM, Torrente AD, McDonald KM, and Schrier RW. Norepinephrine-induced acute renal failure: A reversible ischemic model of acute renal failure. *Kidney Int.* 1978 ; 14 : 187-190.
- 7) Johnson RJ, Gordon KL, Suga S, Duijvestijn AM, Griffin K, and Bidani A. Renal injury and salt-sensitive hypertension after exposure to catecholamines. *Hypertension.* 1999 ; 34 : 151-159.
- 8) Higuchi M, Ikema S, Matsuzaki T, Hirayama K, and Sakanashi M. Effects of norepinephrine on hypoperfusion-reperfusion injuries in hearts isolated from normal and diabetic rats. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1991 ; 23 : 137-148.
- 9) Higuchi M, Ikema S, and Sakanashi M. Correlation of contractile dysfunction and abnormal tissue energy metabolism during hypoperfusion with norepinephrine in isolated rat hearts: Differences between normal and diabetic hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1992 ; 24 : 1125-1141.
- 10) Higuchi M, Miyagi K, Nakasone J, and Sakanashi M. Role of high glycogen in underperfused diabetic rat hearts with added norepinephrine. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1995 ; 26 : 899-907.
- 11) Higuchi M, Miyagi K, and Sakanashi M. Under-perfusion Injury in diabetic rat hearts: Effects of norepinephrine and/or insulin on stiffness increase and abnormal energy metabolism. *NS Dhalla. The Ischemic Heart.* Boston. Kluwer Academic Publishers. 1998. p. 473-500.
- 12) Higuchi M, Miyagi K, Kayo S, and Sakanashi M. Acceleration of stiffness in underperfused diabetic rat hearts by glyburide, a  $K_{ATP}$  channel blocker, and its prevention by levcromakalim and insulin. *Cardiovasc. Res.* 1997 ; 35 : 303-314.
- 13) Hirabayashi G. The role of NO in renal ischemia-reperfusion injury in rats. *J. Tokyo Med. Univ.* 2000 ; 58 (2) : 175-182.
- 14) Dibona GF, and Kopp UC. Neural control of renal function. *Physiol. Rev.* 1997 ; 77 : 75-197.
- 15) Cowley AW, and Lohmeier TE. Changes in renal vascular sensitivity and arterial pressure associated with sodium intake during long-term intrarenal norepinephrine infusion in dogs. *Hypertension.* 1979 ; 1 : 549-558.
- 16) Rakićen N, Rakićen ML, and Nadkarni MV. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemother. Rep.* 1963 ; 29 : 91-98.
- 17) Seyer-Hansen K. Renal hypertrophy in experimental diabetes mellitus. *Kidney Int.* 1983. 23 : 643-646.

- 18) Fioretto P, Steffes MW, and Mauer M. Glomerular structure in nonproteinuric IDDM patients with various levels of albuminuria. *Diabetes*. 1994 ; 43 : 1358-1364.
- 19) Ellis EN, Steffes MW, Goetz FC, Sutherland DE, and Mauer SM. Glomerular filtration surface in type I diabetes mellitus. *Kidney Int.* 1986;29:889-894.
- 20) Yamagishi S, Inagaki Y, Okamoto T, Amano S, Koga K, and Takeuchi M. Advanced glycation end products inhibit de novo protein synthesis and induce TGF- $\beta$  overexpression in proximal tubular cells. *Kidney Int.* 2003;63:464-473.
- 21) 繁田幸男. 平成3年度糖尿病調査研究報告書. 東京 : 厚生省;1992. P.317-320.
- 22) Abe A, Kawasoe C, Kondo Y, and Sato K. Enhancement of norepinephrine-induced transient contraction in aortic smooth muscle of diabetic mice. *Acta. Med. Okayama.* 2003;57 (1) :45-48.
- 23) Schrijvers BF, De Vriese AS, and Flyvbjerg A. From hyperglycemia to diabetic kidney disease: The role of metabolic, hemodynamic, intracellular factors and growth factors/cytokines. *Endocr. Rev.* 2004;25(6): 971-1010.
- 24) Bhagwanjee S, Bosenberg AT, and Muckart DJ. Management of sympathetic overactivity in tetanus with epidural bupivacaine and sufentanil : Experience with 11 patients. *Crit. Care. Med.* 1999 ; 27 (9) : 1721-1725.
- 25) 井戸康夫. 糖尿病性腎症の発症機序に関する実験研究. 弘前医学. 1989 ; 41 : 202-215.

[Original Article]

## Effects of Norepinephrine and/or Glibenclamide on Underperfusion-Reperfusion Injuries in Kidneys Isolated from Normal and Diabetic Rats

Hiroaki Furugen<sup>1,\*</sup>, Makie Higuchi<sup>1</sup>

*<sup>1</sup>Department of Nursing, Kyushu University of Nursing and Social Welfare, 888 Tomio, Tamana-shi, Kumamoto  
865-0062, Japan*

[Abstract]

Previous studies have shown diabetic hearts to be more susceptible than non-diabetic hearts to coronary perfusion flow reduction. The studies show that norepinephrine (NE) exacerbated this effect, particularly in diabetic hearts, and did so more rapidly in the presence of Glibenclamide (Glyb). The purpose of this study was to consider whether injuries and exacerbation can be caused equally in the kidney. Changes in the renal perfusion pressure (RPP), renal perfusion flow (RPF), and urine flow (UF) were examined during normal perfusion, underperfusion, and reperfusion with NE and/or Glyb in isolated perfused non-diabetic and streptozotocin-induced diabetic rat kidneys. 1) The UF during normal perfusion was greater but began to decrease gradually, the rate of decrease in the UF during underperfusion was greater, the RPP during reperfusion was higher, and the UF recovery rate was lower in diabetic than in non-diabetic kidneys. 2) The RPP was increased by NE  $10^{-7}$  M, which was higher in the diabetic than non-diabetic kidneys; however, the UF recovery rate remained uninfluenced. 3) Underperfusion and reperfusion injuries were not influenced by Glyb  $10^{-6}$  M. 4) The influence of Glyb on underperfusion and reperfusion injuries with NE was not seen in the diabetic kidneys. On the other hand, RPP during reperfusion increased in the non-diabetic kidneys. These results show diabetic kidneys to be more susceptible than non-diabetic kidneys to underperfusion and reperfusion injuries, being consistent with the previous studies on diabetic hearts. However, it was revealed that NE  $10^{-7}$  M and Glyb  $10^{-6}$  M did not affect the UF decrease due to these injuries. It was suggested that the RPP raised by the renal vascular smooth muscle constricted by NE and Glyb does not seem to influence the change in the UF caused by underperfusion and reperfusion injuries. Protection against underperfusion injuries by the  $K_{ATP}$  channel opening in diabetic kidneys proved to be unlikely.

**Keywords:** *diabetes, isolated perfusion rat kidneys, underperfusion-reperfusion injuries, norepinephrine, Glibenclamide*

---

\* Corresponding author.