

学位論文題名

## 2型糖尿病モデルラットの糸球体病変進展に於ける 腎血行動態異常の意義

### 学位論文内容の要旨

#### 1. 緒言

2型糖尿病における腎症の発症と進展における腎血行動態異常の意義はいまだ明確ではない。その意義を実験的に明らかにする目的で、ヒト類似の病態を示す2型糖尿病モデル動物である Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat (OLETF)を用いて、腎血流の自動調節能ならびに糸球体内圧を観察し、糸球体の病理学的変化との関連を検討した。更に、腎皮質の表層と深層に存在する糸球体は機能や形態が異なる為、腎血行動態異常並びに糸球体病変の出現が異なる可能性があり、それらの部位的特性についても評価した。

#### 2. 材料と方法

雄性 OLETF (n=5) 及び同系対照の雄性 Long-Evans Tokushima Otsuka rat (LETO: n=5) を対象とし、10, 20, 30, 40週齢にて体重、血圧測定、24時間蓄尿、採血を施行し、40週齢にて病理組織学的検討を行った。また、OLETF (n=15)、LETO (n=15)を同様な条件で飼育し、30週齢にて腎血行動態・糸球体内圧測定を施行した。

30週齢の OLETF (n=10)、LETO (n=10)に、thiobutabarbiturate を腹腔内投与し麻酔した。右大腿動脈より腹部大動脈内に挿入したカテーテルより平均動脈圧(MAP)を測定し、腹部大動脈の腎動脈分岐直上の手動クランプにて、腎灌流圧(RPP)を任意のレベルに調節した。次に腎動脈に装着した電磁流量計で総腎血流量(RBF)を、laser-doppler flow meter のプローブを腎皮質表層と深層にそれぞれ刺入し皮質表層 (SBF)、深層血流信号 (DBF) とした。前測定を2回行った後 (baseline: B, time control: C)、RPP を 80~90mmHg (mild clamp: E1) 及び 70~80mmHg (moderate clamp: E2) とし、各パラメータを測定した。クランプを解放後、腎血行動態の安定を待って一酸化窒素合成酵素 (NOS) 阻害薬である *N*<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methylester (L-NAME) を 10<sup>-4</sup>mol/h/kg 体重で持続静注後、各血行動態パラメータを測定値し投与前値と比較した。

30週齢ラット (OLETF n=5, LETO n=5) を対象に、Auckland らの方法より部分的皮質除去により糸球体を露出し、マイクロバンクチャー法による直接穿刺にて内圧を測定した。腎表面から瘡底を約2分割し、表層糸球体、傍髄質糸球体とし、内圧を比較した。

40週齢ラットの腎臓の組織標本を用いて、腎皮質の表層 1/3 を皮質表層糸球体、深層 1/3 を深層糸球体とし、それぞれの硬化指数(SI)と糸球体容積(V<sub>g</sub>)を半定量的に評価した。それぞれの糸球体は各 50~100 個につき計測し、個体ごとの平均値を観察値とした。

結果は平均値±SE で表記し、各ラット間の比較、表層、深層間の糸球体内圧の比較は

分散分析 (ANOVA) にて検定した. 表層、深層間の病理組織の計測値の比較は対応のある t 検定によった. いずれも有意限界を  $P < 0.05$  とした.

### 3. 結果

10週齢から血糖値, 尿蛋白は OLETF で有意に上昇し, 以後有意差をもち更に上昇した. 20週齢以降 OLETF は LETO に比べて多尿, 糸球体過剰濾過を示した.

腹部大動脈クランプによる RPP の調節は各設定値 (E1, E2) で OLETF, LETO 両群間に差は無かった. OLETF の RBF は定常状態から, E1 ( $84.0 \pm 4.3\%$ ), E2 ( $71.3 \pm 4.8\%$ ) と有意に低下し, LETO と比べても明らかに低下した. SBF は RPP の低下において, E2 で初めて両群とも有意に低下したが, 群間に有意差はなかった. DBF は OLETF で E1 ( $92.2 \pm 1.8\%$ ), E2 ( $83.9 \pm 1.7\%$ ) といずれも定常状態から有意に低下した. E2 における OLETF の DBF は LETO より有意に低かった.

L-NAME 投与前値を 100% とした各相対値では, RBF は OLETF ( $30.87 \pm 5.44\%$ ) で LETO ( $49.32 \pm 1.78\%$ ) に比べ有意に低下し, DBF も OLETF ( $38.80 \pm 5.07\%$ ) で LETO ( $73.82 \pm 12.73\%$ ) に比べ有意に低下した.

糸球体内圧は, OLETF では表層 ( $57.5 \pm 3.8$  mmHg), 深層 ( $78.5 \pm 2.7$  mmHg) と, LETO より表層 ( $48.2 \pm 2.1$  mmHg), 深層 ( $58.5 \pm 1.6$  mmHg) とともに高く, いずれのラットでも表層に比べて深層糸球体内圧が有意に高かった.

40週齢での  $V_g$  は表層, 深層とも OLETF で大きく, 深層糸球体で OLETF ( $2.17 \pm 0.36 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ ), LETO ( $1.27 \pm 0.06 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ ) と有意差を認めた. SI は表層糸球体で OLETF ( $1.31 \pm 0.12$ ), LETO ( $0.68 \pm 0.92$ ), 深層糸球体で OLETF ( $1.84 \pm 0.12$ ), LETO ( $0.99 \pm 0.09$ ) といずれも OLETF で有意に高く, また両群とも深層では表層の SI に比較し有意に高かった.

### 4. 考察

OLETF では腎血行動態の自動調節能が障害され, 腎皮質深層血流が表層に比べて強く障害されていた. 更に, L-NAME の投与により RBF と DBF の低下が LETO に比較し有意に強いことより, OLETF の腎血行動態異常に NO の過剰作用が関与する可能性が示唆された. 糸球体内圧は OLETF で有意に上昇し, 糖尿病の発症以後認められる尿蛋白排泄の増加と糸球体濾過値の上昇をあわせると, この時期に糸球体内圧上昇とともに過剰濾過が出現しているものと考えられた. こうした糸球体血行動態異常も深層糸球体でその傾向が強い可能性がある. こうした一連の機能的異常は, 糸球体構成細胞の形質変換や直接的な障害をもたらし, 更に糖尿病状態がその病態を促進し, 糸球体硬化に進展することが知られている. 今回観察した糸球体肥大と硬化の部位が腎血行動態異常の分布と一致することからも, 糖尿病によってもたらされる腎自動調節能の障害と, それと関連した糸球体内圧上昇が本病態における糸球体障害の発症と進展に深く関与しているものと推察された.

### 5. 結語

2型糖尿病モデルラットである OLETF では糖尿病発症後, 腎血行動態の自動調節能は障害され, 糸球体内圧は上昇する. 腎血行動態異常は腎皮質表層よりも深層で強く出現し, 糸球体障害と密接な関係を有する.

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫  
副 査 教 授 吉 木 敬  
副 査 教 授 小 柳 知 彦

学 位 論 文 題 名

## 2 型糖尿病モデルラットの糸球体病変進展に於ける 腎血行動態異常の意義

本研究では、ヒト 2 型糖尿病類似モデル動物である Otsuka Long- Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラットとその同系対照である Long- Evans Tokushima Otsuka (LETO) ラットを用いて、糖尿病の腎糸球体障害における腎血行動態異常の病態生理学的意義につき検討した。

糖尿病で出現する腎血行動態異常の解析はこれまで 1 型糖尿病及びその実験モデル動物に限られ、2 型糖尿病における詳細な報告はなく、その病態的な意義はいまだ明らかではない。そうした理由の一つとしてこれまでヒト 2 型糖尿病に対応する良好な疾患動物モデルが存在しなかったことが上げられる。今回の実験対象とした OLETF ラットは、早期よりインスリン抵抗性を示し生後 20 週前後で糖尿病を自然発症し、40 週齢以降で糸球体硬化病変が出現しヒトの糖尿病性腎症に類似した結節性病変を認めるに至る。

一方、腎の糸球体では皮質表層と深層においてその構造と機能が異なっており、糸球体障害の出現や進展もそれに伴い相違する可能性が示唆されている。しかし、糖尿病の糸球体障害に関して糸球体の部位的な相違はこれまで解析されていない。以上の背景のもと、OLETF ラットにおける腎血行動態と糸球体障害の関係を検討した。

対象となった 30 週齢雄性 OLETF ラットは対照の同性同週齢 LETO ラットに比べ体重、血糖、収縮期血圧、尿蛋白排泄量は有意に高く、明らかな糸球体過剰濾過を示した。麻酔下で評価した総腎血流と皮質深部血流は、OLETF ラットで腎灌流圧の変化に対して大きく変動し、血行動態調節機能としての自動調節能の障害が示された。更に、非特異的一酸化窒素合成酵素阻害薬である  $N^G$ -nitro-L-arginine methylester (L-NAME) の持続静脈内投与 ( $10^{-6}$  mol/h/kg) に対する総腎血流と皮質深部血流の変化率が OLETF ラットでは有意に大きく、内因性一酸化窒素の産生亢進が腎深部での血行動態異常の一因と考えられた。また、同週齢の OLETF ラットと LETO ラットにおいて、部分的皮質除去にて糸球体を露出し、直接穿刺法で内圧を測定した。いずれの群においても皮質表層に比べて深層の糸球体内圧が有意に高く、それぞれの部位で OLETF ラットでは LETO ラットに比べて有意な上昇をみた。40 週齢において採取した腎病理切片で糸球体容積、糸球体硬化を定量、

半定量的に評価した。OLETFラットでは表層ならびに深層でLETOラットに比べ糸球体は大きく、硬化の程度も強かった。また、この傾向は深層糸球体で著しかった。したがって、OLETFラットでは糸球体内圧の安定化が障害され、その結果として糸球体障害が進展し、その傾向は深層糸球体で強いことが示唆された。

本研究で、2型糖尿病類似の病態における腎血行動態異常の存在と糸球体障害におけるその重要性が初めて明確に示された。また糖尿病における糸球体の機能ならびに形態を部位別に解析した報告はこれまで存在せず、その意義は大きいものと考えられた。

発表後、吉木教授からOLETFラットの全身性の動脈硬化・発症遺伝子の報告、深層糸球体の硬化機序の他の疾患での可能性及びL-NAMEの作用機序についての質問があった。次いで小柳教授からOLETFラットの食餌摂取量、OLETFラットでのレプチンの意義、OLETFラットの多尿出現時期、高血糖・尿糖出現時期、及び腎のNO産生についての質問がなされた。

最後に小池教授からは、糸球体硬化が臨床的に部位的差異をもって出現するかについての質問があった。これらの質問に対しても、申請者は概ね適切な回答をした。

この論文はヒト2型糖尿病類似モデルラットを用い腎血行動態異常と糸球体病変との関連を腎皮質糸球体の部位的解析という観点から検討したとして高く評価され、今後临床上においても糖尿病の血行動態異常が糸球体病変に関連する可能性を踏まえつつ、その治療法確立の一助となる可能性が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院過程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判断した。