

運動と食事療法併用による糖尿病性腎症進展抑制効果

—ヒト肥満・糖尿病モデル OLETF ラットを用いた研究—

鈴木政登¹⁾、穂積典子¹⁾、木村真規²⁾、町田勝彦¹⁾

1) 東京慈恵会医科大学臨床検査医学

2) 共立薬科大学薬物治療学教室

1. 緒言

運動療法は、食事および薬物療法と共に2型糖尿病治療の一つである。糖尿病合併症が発現する以前の、いわゆる糖尿病初期の運動は糖代謝能を改善させるのみならず他の生活習慣病予防にも効果を發揮する。さらに、運動は加齢とともに骨や骨格筋の萎縮および心肺機能の低下を防ぎ、QOLの向上にも貢献する。これら運動特有の効果は食事療法には期待できない。一方、健常人でも運動時には強度依存的に腎血流量の低下、糸球体濾過圧の亢進など腎への負担を惹起し、運動後に一過性のアルブミン尿を呈する場合もある。糖尿病患者では、運動時の腎機能低下が加速されることが予測される。

われわれの先行研究において、OLETFラットに自由走運動および食事制限療法を試みた結果、体重減少および耐糖能の改善には差はみられなかつたが、運動療法群の尿中アルブミン排泄量は安静対照群よりも僅少ではあったが、食事制限群に比較し有意な高値であった。運動時の一過性腎機能低下（腎への過剰負担）の累積が腎症の進展を招いている可能性が推測された。

そこで、本研究では運動量を減らし食餌制限と併用することにより、腎負担の軽減と十分な体重減少により、糖代謝能の改善と腎症の進展抑制効果の発現を試みた。

2. 研究方法

2.1 被検動物

被験動物として、雄性 OLETF (Otsuka—Long-Evance-Tokushima-Fatty) ラット 32 匹を用いた。10 週齢より予備飼育を開始し、21 週齢時に経口糖負荷試験 (OGTT) を行なった。その後、被検ラットを無作為に 4 群に分け、それぞれ自由走運動群 (EX 群)、食餌制限群 (DT 群)、運動と食事療法併用群 (EX+DT 群) および安静対照群 (CONT 群) とした。

2.2 研究方法

2.2.1 被検動物飼育方法および実験手順

EX および EX+DT 群は回転ドラム (円周 1.1m) の敷設されたケージで個別飼育し、EX+DT 群は一日

おきにドラムと飼育ケージとの間に仕切りを入れ、運動時間を EX 群の半分に制限した。1 週間毎に、これら 2 群のドラム回転数を記録し、走行距離（運動量）を算出した。CONT および DT 群は回転ドラムを伴わない通常のケージで、運動療法群と同じ飼育室（気温 22±2°C, 湿度 60±5%）で飼育した。EX および CONT 群にはラット粉末飼料（CE-2；日本クレア）と水道水を自由に摂取させた。DT および EX+DT 群は同週齢 OLETF ラットの 1 日当たり平均摂食量のそれぞれ 70% および 85% に相当する量を、毎日計測して与えた。また、正常対照群として同週齢の LETO (Long-Evance-Tokushima-Otsuka) ラット 8 匹を CONT 群と同じ条件で飼育 (LT-CONT 群) し、残り 7 匹の LETO ラットは EX 群と同じ条件で飼育した (LT-EX 群)。尚、運動、運動と食事療法および安静対照実験それぞれの実験期間を 10 週間とした。

予備飼育期間および実験飼育期間中の 10, 15, 20, 23, 26, および 29 週齢時に採尿、体重および血圧測定を行なった。採尿には個別代謝ケージを用い、24 時間蓄尿した。この尿検体を直ちに -20°C で凍結保存し、全ての採尿終了後に抗原抗体法によりアルブミン濃度 (ICN pharmaceuticals, Inc.) を測定した。尚、EX, EX+DT および LT-EX 群には回転ドラム付き代謝ケージを用い、採尿期間中も運動可能とした。採尿終了後、tail-cuff 法により尾動脈血圧 (BP-98A；ソフトロン) を測定した。40°C のポケット型保温装置内で安静を維持させ、脈波の安定確認後連続 5 回測定し、その平均値をその日の血圧値とした。10 週間の各療法期間終了後の 31 週齢時に再び OGTT を行なった。さらに、32 週齢時の前夜から約 16 時間絶食後に、ネンブタール麻酔下で露出した外頸静脈に留置したカニューレを介して採血し、中性脂肪 (TG), 総コレステロール (TC) (以上、酵素法), HDL コレステロール (HDL-C; 選択阻害法、コレステロール HDL, 第一化学薬品) 等の測定に用いた。脱血による心停止後、腹部を正中線に沿って切開し、左右腎を摘出し重量秤量後、腎の組織形態学的測定に適した処理をした。また、右半身の腹部皮下脂肪、後腹膜脂肪、副睾丸周囲脂肪および腸間膜脂肪を摘出し、重量を秤量した。

2.2.2 経口糖負荷試験 (OGTT)

約 16 時間絶食後の午前中に、ジエチルエーテルで麻酔し、眼底静脈叢にキャピラリーを刺入し約 1ml

採血した。ラットの覚醒後、ゾンデを用いて体重 1kgあたり 2g相当の 20%グルコース溶液を胃内に投与した。グルコース投与後 30, 60 および 120 分後に再び採血し、血清グルコース濃度 (sGL) を測定 (酵素法) した。

2.2.3 腎の組織形態学的所見

左右の腎に肉眼的病変が無いことを確認後、右腎を組織形態学的検査に用いた。腎摘出後、重量秤量後直ちに正中面で 2 分割し、10%ホルマリン溶液で浸漬固定後、パラフィン包埋した。これらの切り出し切片を PAM 染色し、光学顕微鏡下で標本毎に可及的大きい糸球体断面像を選び、画像解析システム (SP-500 ; オリンパス AVIO) を用いてデジタル画像化し、糸球体断面積 (GA) およびメサンギウム領域面積 (MA) を算出した。さらに、糸球体を球体と仮定し、GA を次式¹⁾に代入して糸球体容積 (GV) を求めた。一標本あたり 50 個の糸球体を選択・計測し、各個体の平均糸球体容積 (GV)、平均メサンギウム領域面積 (MA) および平均メサンギウム領域比 (Mratio) を算出した。

$$GV = \beta / K \times GA^{3/2} \quad \beta = 1.38 \quad K = 1.10$$

2.2.4 統計処理法

各群間の差の検定には二元配置分散分析を適用し、有意差が認められた場合に Dunnet の多重比較を行なった。得られた Q 値に基づき、5%水準を有意限界とした。

3. 研究結果

運動および食餌制限が体重変化におよぼす影響を Fig1 に示した。CONT 群の体重は実験期間中上昇を続けたが、EX, DT および EX+DT の体重は各療法開始後低下を続け、療法終了まで低値が持続した。EX, DT および EX+DT 群の体重は CONT 群に比較し有意な低値であったが、これら 3 群間には有意差は認められなかった。10 週齢および 29 週齢時の収縮期血圧を Table 1 に示した。本研究対象 6 群間には 10 週齢の収縮期血圧には全く差異はなかったが、29 週齢時には OLETF ラット 4 群いずれも有意な上昇を示し、EX 群が CONT および DT 群に比較しても有意な高値であった。Fig2 には、各部位の脂肪重量を体重あたりで

示した。いずれも運動、食餌制限群および併用群はCONT群に比較し、低値傾向を示した。一方、EX, DT および EX+DT 群の体重あたり下肢骨格筋重量はCONT群に比較し有意な高値を示した(Fig3)。しかし、EX, DT および EX+DT 群3群間には有意差はなかった。EX+DT 群の運動可能時間はEX群の2分の1であつたが、EX および EX+DT 群の総走行距離はそれぞれ 233.41 ± 58.52 および 73.43 ± 10.49 km であり、EX+DT 群の運動量はEX群の約3分の1であった。一方、LT-EX の平均総走行距離は 234.32 ± 34.79 km であり、OLETF-EX と LETO-EX 群間に有意差は認められなかつた。

各療法前後のOGTT時の血清グルコース濃度(sGL)変化をFig4に示した。21週齢時における経口投与後のsGLはOLETFラットいずれの群においてもLETO両群に比べ明らかな高値を示した。療法終了後には、EX, DT および EX+DT 群の経口投与後のsGL曲線は、療法前に比較し顕著な低値で推移した。これらOLETFラット3群とLT-CONT群との間にsGLの推移に有意差は認められなかつた。

各療法終了後の血清中性脂肪(TG)、総コレステロール(TC) およびHDLコレステロール(HDL-C)濃度をTable 2に示した。血清TCは運動、食餌制限および両者の併用により顕著に低下した。血清TG濃度についても概ね同様傾向であったが、TC程明確ではなく、EX群のみ顕著な低下を示した。血清HDL-C濃度はDT群が他群に比較し有意な低値を示した。

尿中アルブミン濃度と尿量より、24時間当たりの尿中アルブミン排泄量(UAE)を算出し、Fig.5に示した。CONT群では全実験期間中、顕著なUAEの排泄増加が観察された。EX群のUAE排泄量はCONT群より僅少ではあったが、DT および EX+DT 群に比較し有意な増加であった。DT, EX+DT, LT-CONT および LT-EX 群ではUAEの増加は認められなかつた。

Fig6に、腎の組織・形態学的所見を示した。OLETFラット4群間に腎の絶体重量の差は認められなかつた。しかし、体重当たり腎重量は、LT-EX群を含めいずれの運動群も非運動群に比較し有意に高値を示した。OLETFラット4群間ではGV, MA および Mratio に有意差は認められなかつたが、LT-CONT群はCONT群に比較し、有意に低いGVを呈した。さらに、LT-EX群はLT-CONT群に比較し、有意に高いMA

およびMratio を示した。

4. 考察

本研究において、運動と食餌制限を組み合わせることにより、腎症の進展を伴わずに糖・脂質代謝能の改善を認め、体脂肪量の減少および筋量の増加が示された。先行研究²⁾によれば、高血糖は OLETF ラットを含めた他の糖尿病モデル動物におけるアルブミン尿発現の直接的・間接的要因であるとされている。高血糖に起因した Advanced glycation end products (AGEs) の沈着がメサンギウム細胞の増殖や糸球体基底膜の肥厚をもたらすと考えられている。しかし本研究では、高血糖の改善程度は略同じであるにも拘わらず、EX 群の UAE は DT 群より有意に高値を示し、EX+DT 群のそれは DT 群と同様の低値であった。CONT および EX 群共にアルブミン尿の増加を呈したが、その要因は多少異なるようである。EX 群の UAE 増加の主要因は高血糖ではなく、運動により惹起された血圧上昇、延いては糸球体内圧上昇に起因した UAE の増加であろうと思われる。EX 群において観察された UAE 先進機序と、健常者の激運動後にみられる一過性蛋白尿出現機序と同じか否かは明らかではない。しかし、健常人では激運動後のみに観察されるが、糖尿病患者では中等度強度でもアルブミン排泄増加を呈することから、異なった機序によると思われる。本研究において、腎糸球体の形態的変化についても観察したが、LETO 群を除き、運動群と非運動群との間に有意な所見の差は提示されなかった。本研究では、運動療法により UAE の増加が認められたが、腎組織形態に変化をもたらす程には到っておらず、腎の不可逆的変化は伴っていないことが明らかにされた。一方、採尿期間中も運動群のラットは走行可能な状態にあったが、UAE 先進は EX 群にのみ観察され EX+DT 群では UAE 先進は認められなかった。EX 群の運動は連日行なわれ、走行距離も EX+DT 群の約 3 倍であった。このことが過剰な腎負担をもたらしたものと思われる。一方、EX+DT 群は隔日の運動が可能であったが、約 1/3 以下の走行距離に止まった。任意の運動であるにも拘わらず何が走行距離の僅少化に関ったのであろうか。ところで、ストレプトゾトシン投与により糖尿病を発症させたラットでは顕著な UAE の増加が見られるが、ACE 阻害剤の投与により高血糖の改善なしに UAE

増加が抑制された、という報告³⁾がある。これらの結果から、UAE 増加要因としてアンギオテンシン II (AII) を介した糸球体高血圧、PKC 活性および TGF- β 活性亢進の関与が考えられ、ACE 阻害剤投与により AII が生成されないため高血糖の改善なしに腎症の進展が抑制された、と考えることができる。一方、運動による UAE の増加は運動強度に依存する⁴⁾、と言われる。本研究では、運動強度のコントロールは行なわなかったが、いずれの運動群も任意走行可能とした。EX+DT 群は運動実施日を 1 日毎に制限し、総走行距離が EX 群の半分以下になった結果、腎症の進展は見られなかった。したがって、運動療法における運動量がラットの腎症進展に関与している可能性がある。運動による腎糸球体内圧の上昇が持続すればする程、UAE の亢進も持続するのかもしれない。さらに、運動による腎の局所的低酸素状態も考慮されなければならないかも知れない。先行研究⁵⁾によれば、高血糖により NADH から NAD⁺への酸化が阻害され、健常者では問題にならない程の組織酸素分圧の低下であっても軽度とは言え腎症を伴った糖尿病モデルラットの場合には腎の組織障害を進行させる可能性が高くなると考えられる。本研究で用いた OLETF ラットは自由走運動開始時点において、すでに顕著な高血糖を呈していた。このような高血糖状態において運動に起因した腎血流量の減少が惹起されれば、相対的な低酸素状態を引き起こし、組織障害を進展させる可能性は高まると考えられる。

本研究では、食餌制限により UAE 亢進を伴わずに糖代謝能を改善させるのに十分な体重の減少がみられた。さらに、運動と食事療法の併用 (EX+DT 群) により、UAE の亢進を伴わずに十分な体重減少と糖代謝能の改善がはかられたことから、腎症を進展させない程度の運動量と糖・脂質代謝の改善に十分な食餌制限を処方することが重要と考えられた。高血糖など代謝異常の改善には、運動療法よりも食餌制限の方が即効的で、比較的容易に実施し得るが、運動には心肺機能の向上および骨や骨格筋に対する廃用性萎縮防止効果などが期待される。本研究においても、隔日の運動療法によって下肢骨格筋の一部に肥大が認められた。したがって、運動療法には糖・脂質代謝の改善のみならず QOL の向上や廃用性萎縮防止効果があり、糖尿病性腎症のような合併症を有する場合には病態を悪化させない程度の運動と食事

制限による代謝改善効果を併用させる処方が望ましいと思われる。

5. まとめ

ヒト2型糖尿病モデル OLETF ラットを用いて、10週間の食事療法(DT)、運動療法(Ex)および運動と食事療法の併用(DT+Ex)による糖・脂質代謝および糖尿病性腎症進展への影響を比較した。その結果、いずれの療法でも体重減少および糖・脂質代謝改善効果は同程度に得られた。しかし、運動療法単独では腎症の進展は十分には抑制できず、食事療法単独では骨格筋重量の増加は認められなかった。一方、隔日の運動と摂食量を85%に制限した、いわゆる運動と食事療法併用群では腎症の進展を伴わずに体重減少および糖・脂質代謝が改善された。

以上の結果から、糖尿病性腎症のような合併症を有する場合には、病態を悪化させない程度の運動と食事制限による糖・脂質代謝改善効果を併用させた処方が望ましいと思われる。

引用文献

- 1) 吉澤 祥子, 宇都宮一典, 太田 英樹, 蔵田 英明, 野村 幸史, 池田 義雄.
ストレプトゾシン(STZ)糖尿病ラットにおける運動の腎病変進展抑制効果について. 糖尿病の運動療法' 93(別冊プラクティス). 医歯薬出版、東京、1993、69-74.
- 2) Brownlee, M. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging.
Annual Review of Medicine, 46, 223-234, 1995.
- 3) Fujihara, CK, Padilha, RM and Zatz R. Glomerular abnormalities in long-term experimental diabetes ;Role of hemodynamic and nonhemodynamic factors and effects of antihypertensive therapy. Diabetes, 41, 286-293, 1992.
- 4) Poortmans, JR and Labillois, D. The influence of work intensity on postexercise proteinuria.
J. Appl. Physiol. 57, 260-263, 1988
- 5) Tilton, RG, Baier, JE, Harlow, JE, Smith, SR, Ostrow, E and Williamson, JR. Diabetes-induced glomerular dysfunction: Links to a more reduced cytosolic ratio of NADH/NAD⁺. Kidney International 41, 778-788, 1992.

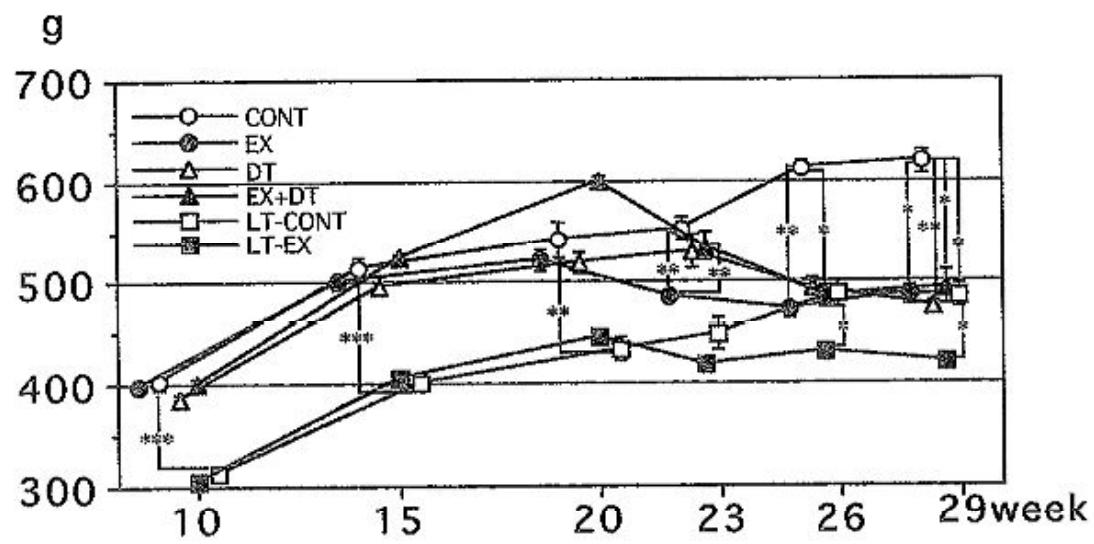


Fig.1 運動および運動と食事療法併用療法による体重の推移

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

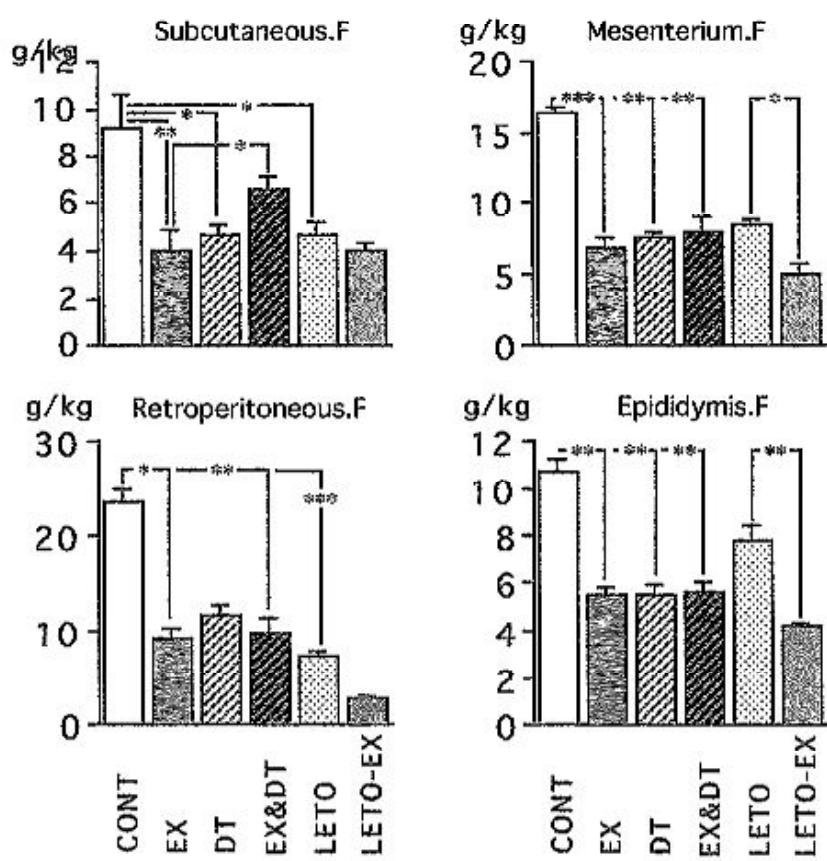


Fig.2 10週間の運動および運動と食事療法併用による体重当たり
皮下および内臓周囲脂肪重量への影響

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

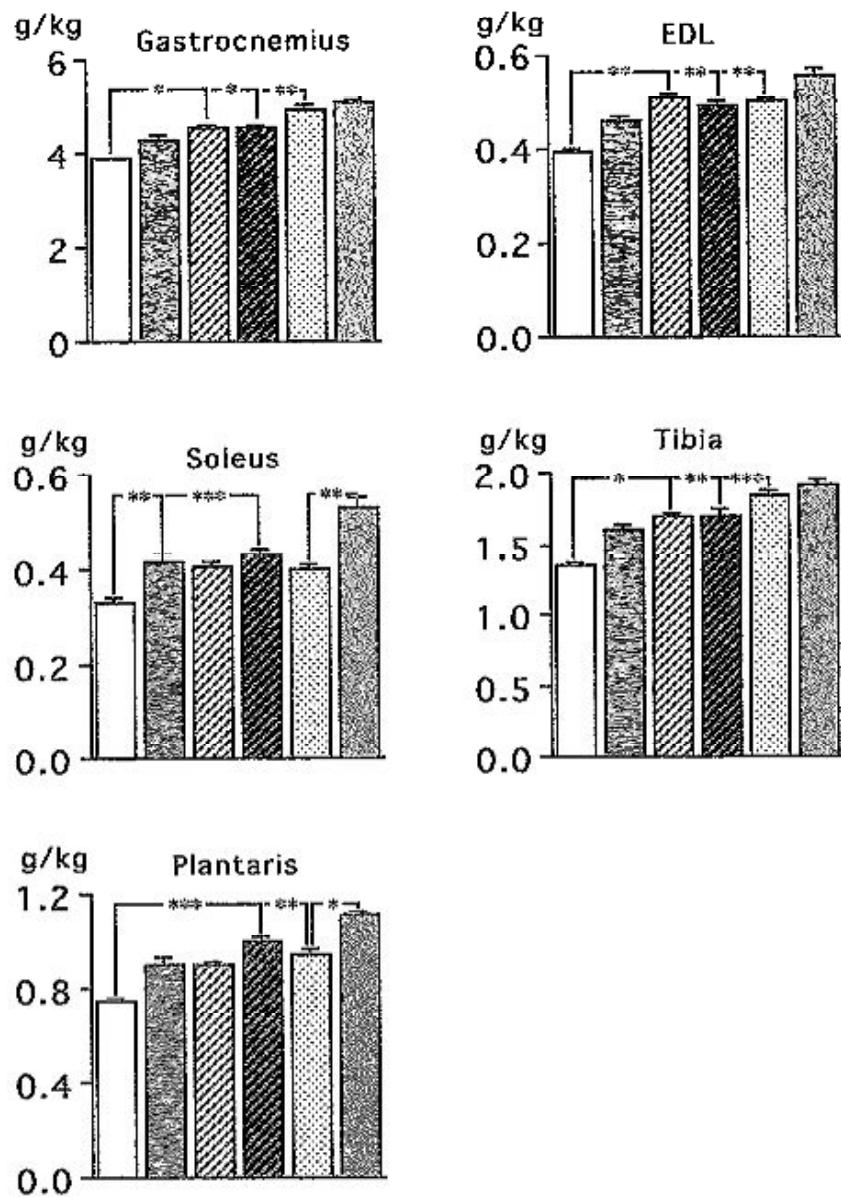


Fig.3 10週間の運動および運動と食事療法併用による体重当たり下肢骨格筋重量への影響

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

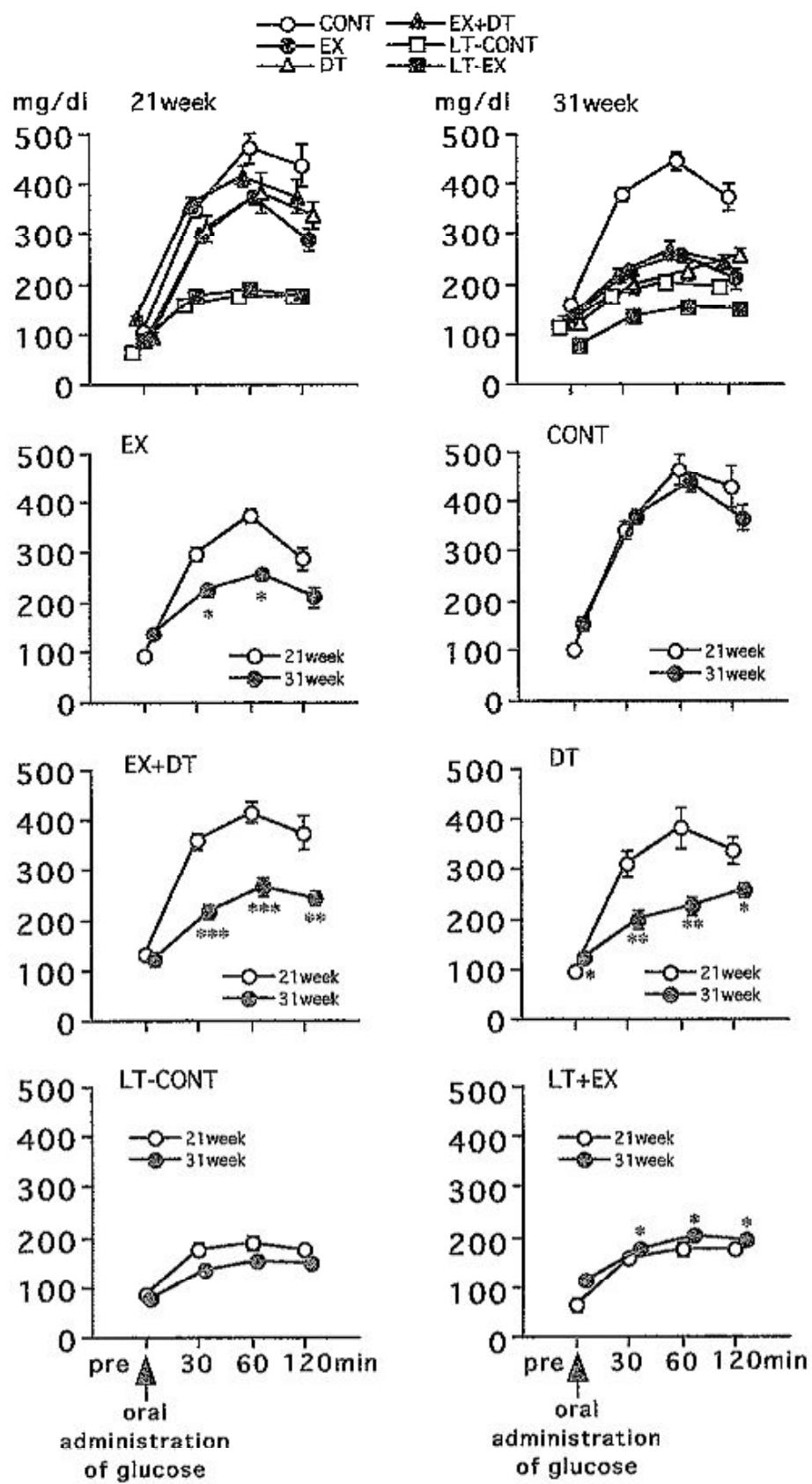


Fig.4 10週間の運動および運動と食事療法併用による糖負荷試験時
血糖値の推移に及ぼす影響

* <0.05 , ** <0.01 , *** $p<0.001$

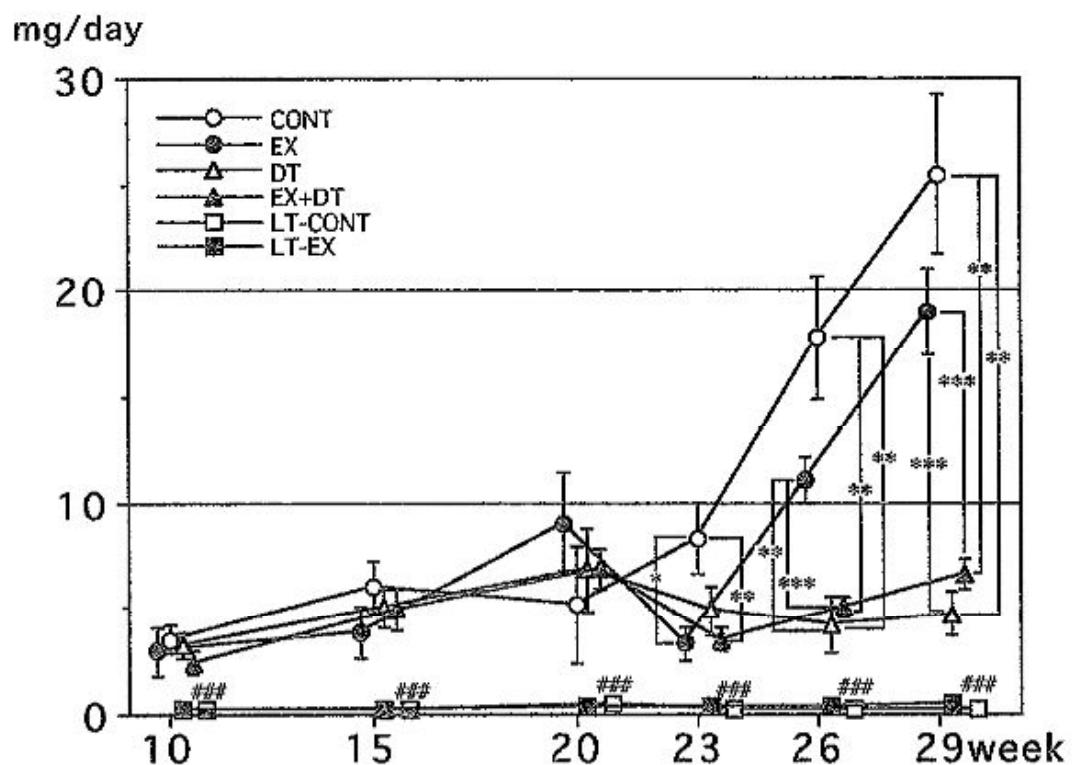


Fig.5 10週間の運動および運動と食事療法併用療法期間中の尿中アルブミン排泄量の推移

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$: #### $p < 0.001$

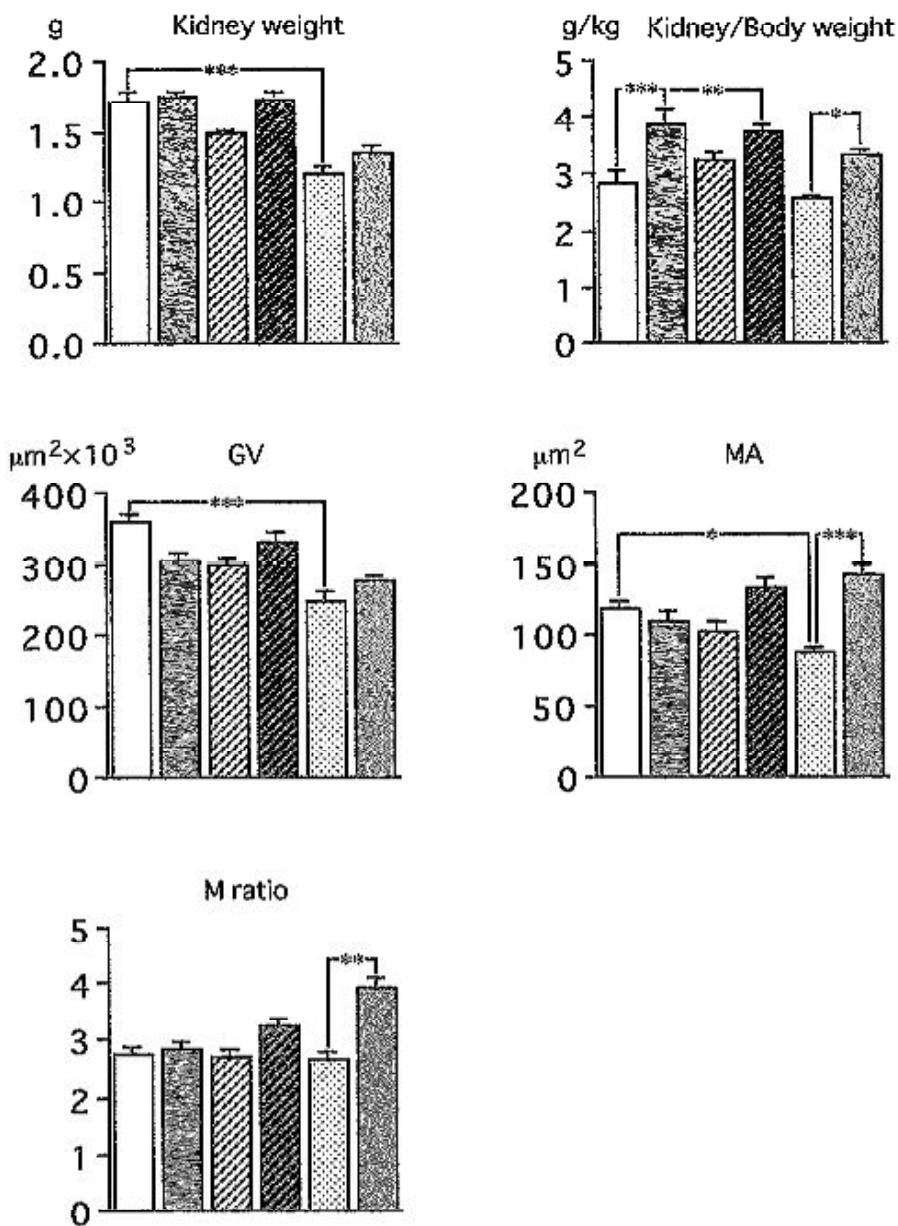


Fig.6 10週間の運動および運動と食事療法併用による腎の組織・形態学的所見に及ぼす影響

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

Table 1. 10週齢および29週齢時収縮期血圧

	10w mmHg	29w mmHg
CONT	135.6±3.7	142.1±10.0
EX	134.5±2.5	155.7±6.6
DT	132.8±4.3	147.6±6.2
EX&DT	130.3±3.7	146.1±5.9
LT-CONT	135.3±8.8	130.5±8.3
LT-EX	130.4±3.2	136.3±10.4

** p <0.01

Table 2 10週間の運動および運動と食事療法併用による血清脂質濃度に及ぼす影響

	TC mg/dl	TG mg/dl	HDL-C mg/dl
CONT	88.1±9.3	154.9±45.1	36.8±5.1
EX	57.0±6.6	39.4±21.3	31.0±4.6
DT	74.1±6.1	44.0±19.0	44.3±5.3
EX&DT	76.6±6.6	37.5±10.4	30.0±1.5
LT-CONT	74.6±8.6	26.6±6.9	34.1±3.5
LT-EX	64.4±4.5	17.0±2.8	23.3±1.5