
原 著

糖尿病ラットにおけるバナデートの腎への効果

医療法人愛仁会亀田第一病院内科 (指導: 新潟大学第一内科 柴田 昭教授)

中 澤 朝 生

Effect of Vanadate on Renal Function in
Streptozotocin-Induced
Diabetic Rats

Asao NAKAZAWA

*Department of Internal Medicine,
Kamedadaiichi Hospital*

(Director: Prof. Akira SHIBATA)

Vanadate of a trace element has been shown to have insulin-like effects. The effect of vanadate on some parameters of renal function was studied on streptozotocin-induced diabetic rats with heminephrectomy. Rats were divided into four groups as follows: vanadate (v)-untreated normal rats, v-treated normal rats, v-untreated diabetic rats and v-treated diabetic rats. Oral administration of vanadate was started three weeks after the induction of diabetes and continued for a period of 10 weeks. The v-treated diabetic rats were characterized by significant ($p < 0.001$) decreases of blood glucose and of both albumin and IgG excretion rates after 8 weeks of study. There was no significant difference in the blood glucose and both albumin and IgG excretion rates between v-untreated normal rats and v-treated normal rats. The kidney wet weights of the v-untreated diabetic rats were significantly ($p < 0.01$) greater than those in the v-treated diabetic rats. However there was no significant difference in the body weight and creatinine clearance between the v-treated diabetic rats and the v-untreated diabetic rats. The present findings suggest that glycemic control by oral administration of vanadate, which does not cause insulin release, also improves diabetic renal function.

Key words: streptozotocin diabetes, vanadate, albumin excretion rate, IgG excretion rate, renal hypertrophy

ストレプトゾトシン糖尿病, バナデート, アルブミン排泄率, IgG 排泄率, 腎肥大

Reprint request to: Asao NAKAZAWA,
Department of Internal Medicine,
Kamedadaiichi Hospital, Kameda-machi,
950-01, JAPAN.

別刷請求先: 〒950-01
新潟県中蒲原郡亀田町西町2-5-22
医療法人愛仁会亀田第一病院内科
中澤朝生

緒 言

バナジウムは動物および植物にとって必須微量元素の1つとして知られており¹⁾、また人体内にも微量蓄積されていることが報告されている²⁾。近年バナジウムの酸化物であるバナデートをストレプトゾトシン (STZ) 糖尿病ラットに投与して高血糖が改善されることが報告された³⁾⁴⁾⁵⁾。そこで今回バナデートを STZ 糖尿病ラットと非糖尿病ラットに投与して腎機能におよぼす効果を検討した。

実験対象と方法

4週齢(体重75~85g)のWistar系雄ラットを実験に使用した。腎症のモデルとする目的で5週齢においてペントバルビタール(Abbott Laboratories) 50mg/kg B.W. 麻酔下ですべてのラットに左腎摘出術を施行した⁶⁾。7週齢で2群に分け1群に対してSTZ(SIGMA Co. Ltd.) 40mg/kg B.W. を尾静脈より静注し、投与後5日目に血糖、尿糖を測定し、随時血糖 300mg/dl以上、尿糖3+以上を示したラットを糖尿病ラットとして用いた。ラットは日照時間に合わせた一定条件下でラット用飼料(Oriental Yeast Co. Ltd.)を自由に与えて飼育した。9週齢で糖尿病群と非糖尿病群それぞれにおいて体重、血糖、アルブミン排泄率(以下AERと略す)、IgG排泄率(以下IgGERと略す)をマッチさせてラットを1)非糖尿病群(以下C群と略す:n=6)、2)バナデート投与非糖尿病群(以下CV群と略す:n=6)、3)糖尿病群(以下D群と略す:n=12)、4)バナデート投与糖尿病群(以下DV群と略す:n=16)の4群に分け、個体ゲージにて飼育した。10週齢よりバナデート投与群にはメタバナジウム酸ナトリウム(Wako pure chemical Industries, Ltd.)として0.3mg/mlの濃度のものを自由飲水させた。またバナデートはその毒性を弱める為に50mmol/LのNaClを添加した水

で溶解した³⁾。バナデート投与群では、3日毎に新鮮なバナデート含有水と交換した。尿は代謝ゲージを用い24時間蓄尿した検体を持ちいた。血液は頸静脈より採血した。検体は-20°Cで保存し測定に用いた。実験計画をFig. 1に示す。血糖はglucose oxidase法で測定した。クレアチニンはアルカリピクリン酸法により測定した。ラット尿中アルブミンとラット尿中IgGの測定はBolton-Hunter法⁷⁾を用い¹²⁵Iで標識し、2抗体法⁸⁾によるラジオイムノアッセイで測定した。アルブミンは標識抗原およびstandardとしてCappel社のrat albumin (cat. No. 6013-0340)を用い、第一抗体にはCappel社のrabbit anti-rat albumin (Cat. No. 0113-0342)を用い、第二抗体としてAmersham社のdonkey anti-rabbit (cat. No. RPN 510)を使用した。IgGは標識抗原およびstandardとしてCappel社のrat-IgG (cat. No. 6013-0080)を用い、第一抗体にはZymed社のrabbit anti-rat IgG (cat. No. 61-9500)を用い、第二抗体としてAmersham社のdonkey anti-rabbit (cat. No. RPN 510)を使用した。検体はPackard社のAuto-Gamma scintillation spectrometerを用い測定した。アルブミンおよびIgGのIntra-assayのCV値はそれぞれ4.9%と6.0%であった。20週齢でペントバルビタール麻酔下にて屠殺し残存した右腎湿重量を測定した。

成績はmean±SDで示し、統計学的検討にはStudentのt-testを用い、危険率p<0.05を有意とした。

結 果

1. 一日平均飲水量

実験期間中の各群の一日平均飲水量は、C群61.2±8.6ml/day、CV群27.6±1.6ml/day、D群209.5±41.8ml/day、DV群42.6±14.7ml/dayでD群が他の3群に比べて有意(p<0.001)に多かった。CV群およびDV群の一日のバナデート平均摂取量はそれぞれ8.28±0.48mg、12.78±4.41mgであった。

2. 体重、血糖、AER、IgGER、クレアチニンクリアランスの変動

Table 1に各群の代謝・腎機能のパラメータを示した。9週齢で非糖尿病群および糖尿病群それぞれの体重、血糖、AER、IgGERに有意差は認めなかった。バナデート投与開始8週後の17週齢でD群と比べてDV群で有意(p<0.001)な高血糖の改善を認めた。体重については、D群とDV群で有意差を認めず、C群とCV群で有意(p<0.001)な体重増加の抑制を認めた。AER

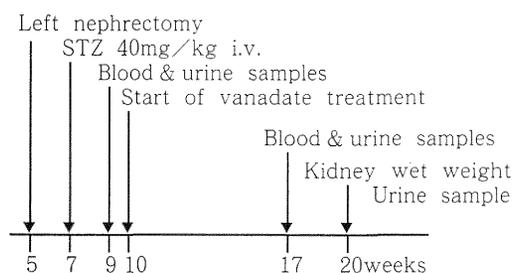


Fig. 1 Experimental design.

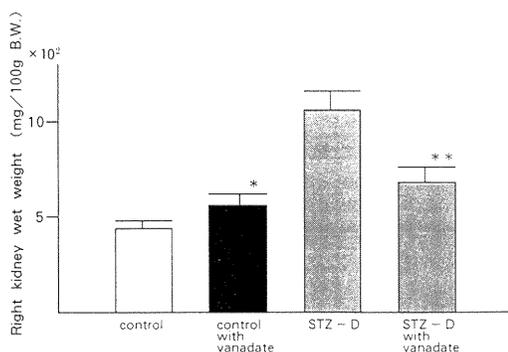


Fig. 2 Comparison of the right kidney wet weight in diabetic rats and non-diabetic rats with vanadate treatment and without vanadate treatment at 20 weeks of age.

* $p < 0.01$ vs control

** $p < 0.01$ vs STZ-D

では17週齢でC群とCV群の間に有意差を認めず、D群と比べてDV群において有意 ($p < 0.001$) な増加の抑制を認めた。IgGERにおいてもAERと同様にC群とCV群の間に有意差を認めず、D群と比べてDV群において有意 ($p < 0.001$) な増加の抑制を認めた。クレアチニンクリアランスでは、各群の間に有意差を認めなかった。

3. 腎湿重量

20週齢における右腎湿重量を Fig. 2 に示した。D群に比べてDV群において有意 ($p < 0.01$) な増加の抑制を認めた。C群とCV群の間にも有意差 ($p < 0.01$) を認めた。

4. 20週齢におけるAERと腎湿重量

20週齢におけるAERと右腎湿重量の検討 (Fig. 3) では相関係数 $r = 0.70$ と正の相関 ($p < 0.01$) を認め、腎湿重量が大きいラットではAERも大きい傾向を認めた。

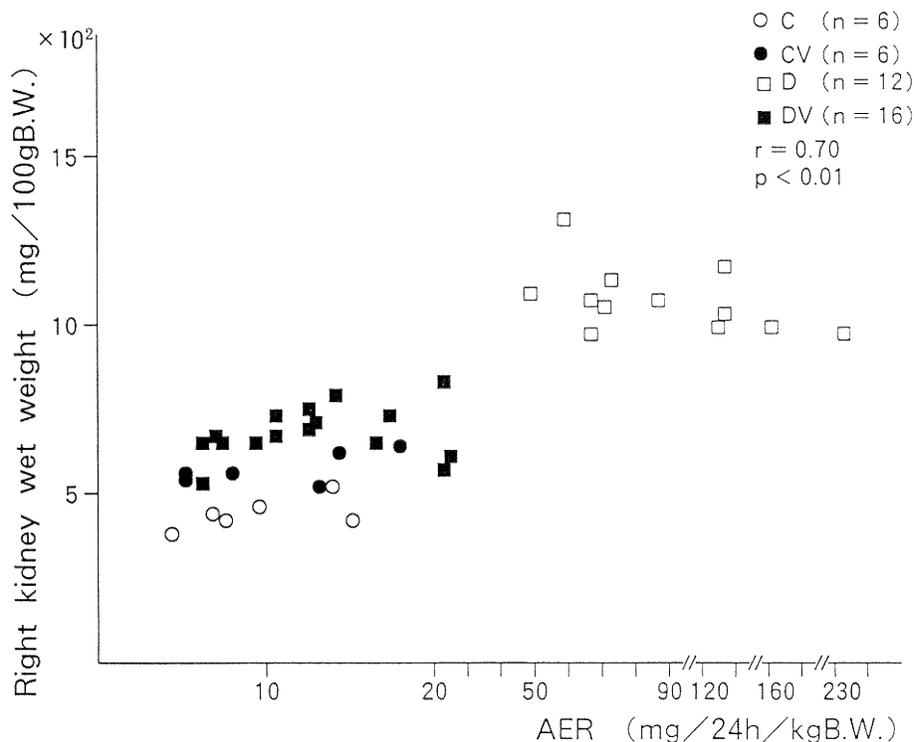


Fig. 3 Correlation between AER and right kidney wet weight at 20 weeks of age.

Table 1 Metabolic and functional parameters in diabetic rats and non-diabetic rats with vanadate treatment and without vanadate treatment.

RATS	N	Age	Body weight (g)	Blood glucose (mg/dl)	Albumin excretion rate (mg/24h/kgBW)	IgG excretion rate (mg/24h/kgBW)	Creatinine clearance (ml/min/kgBW)
control (C)	6	9W 17W	308.3±14.7 511.7±48.9	120.5±8.1 103.0±10.3	2.7±2.4 8.3±5.6	0.2±0.1 0.2±0.1	2.2±0.3
control with vanadate (CV)	6	9W 17W	294.2±20.1 ^c 407.5±24.8 ^a	122.8±9.0 ^e 92.5±8.2 ^e	1.7±0.9 ^e 6.9±4.6 ^e	0.2±0.1 ^c 0.2±0.1 ^c	2.3±0.2 ^c
STZ-D (D)	12	9W 17W	259.6±15.4 329.2±47.5	590.0±98.4 560.3±118.5	5.6±4.2 128.0±81.5	0.2±0.1 1.6±1.0	2.2±0.6
STZ-D with vanadate (DV)	16	9W 17W	263.4±31.7 ^d 323.1±79.1 ^d	532.1±128.9 ^d 178.0±51.6 ^b	4.8±3.4 ^d 7.7±6.1 ^b	0.2±0.1 ^d 0.2±0.1 ^b	2.6±0.3 ^d

^ap<0.001 vs control ^bp<0.001 vs STZ-D^cnot significant (n.s.) vs control ^dn.s. vs STZ-D

考 察

今回の実験では STZ 糖尿病ラットにおいてバナデートの投与が AER および IgGER の増加の抑制に効果のあることが示された。またバナデートの投与が腎症に伴う腎肥大の抑制にも効果があることが示された。

糖尿病性腎症における AER や IgGER の増加については、主に腎糸球体基底膜の透過性の亢進が原因と言われている。腎糸球体基底膜の透過性の亢進をもたらすものとして transglomerular hydrostatic pressure の増加、腎基底膜の size barrier や charge barrier の異常⁹⁾¹⁰⁾ が考えられている。今回の実験における AER や IgGER の検討では、C 群と CV 群の間で特に有意差を認めなかったことよりバナデートの腎への直接作用というよりはバナデートのもつインスリン様作用による血糖降下作用が上述した3つの機序のいずれかの改善をもたらした DV 群における AER および IgGER の増加の抑制をもたらしたと考えられる。

腎肥大は人および実験動物で認められる糖尿病腎病変の一つと考えられている。D 群に対して DV 群で有意な腎肥大の抑制を認めたことは、バナデートのインスリン様作用による高血糖の改善が AER や IgGER の増加の抑制をもたらしたと同様に腎肥大の抑制にも関与したと考えられる。バナデートの腎への直接作用により肥大の抑制をもたらした可能性は非糖尿病群での検討で CV 群に腎重量の低下をもたらさなかったことより考えにくいと思われる。また C 群と CV 群で有意差を認めた原因としては、腎湿重量の実測値の比較では有意差を認めなかったことより体重による差が影響したことが考

えられる。最近腎肥大の発症機序として STZ 糖尿病ラットの検討で Insulin-like Growth Factor 1 (以下 IGF-1 と略す) の増加が報告¹¹⁾¹²⁾ されているが、今回の実験では IGF-1 についての検討はしていないのでバナデートが IGF-1 の増加を抑制したかは不明である。

早期腎症において hyperfiltration と腎肥大との間に関連があることよりバナデート投与8週目にクレアチニンクリアランスを測定したが各群の間に有意差は認めなかった。今回の検討で有意差を認めなかった原因は不明である。測定時期に問題があるか、あるいは糖尿病ラットにおいてクレアチニンクリアランスによって glomerular hyperfiltration を評価することに問題がある可能性などが考えられる。

20週齢において腎湿重量が大きくなる程、AER の増加傾向が認められたことは腎肥大に伴って hyperfiltration が出現し、糸球体障害が促進されることの仮説¹³⁾ を支持するものと考えられる。

体重への効果については正常ラットおよび糖尿病ラットに投与した場合、両者で摂取量の減少により体重の増加が不良になるとの報告¹⁴⁾ がある。今回の実験においてバナデート投与群で体重の増加が不良であった原因として、摂取量の検討はしていないので推測となるが、摂取量の減少が関与している可能性はあると思われる。

本実験においてバナデートの高血糖への効果は報告³⁾ ⁴⁾⁵⁾¹⁵⁾¹⁶⁾ されていると同様に高血糖の改善を認めた。

今回の実験結果より微量元素の一つであるバナデートによるインスリンを介さない血糖降下作用が AER および IgGER の増加の抑制に効果を認めたことは、糖尿病性腎症の予防においていかに血糖のコントロールが

重要かを示唆するものである。

要約: 微量元素であるバナデートには、インスリン様効果のあることが報告されている。バナデートの腎への効果を片腎摘出を施行したストレプトゾトシン糖尿病ラットを用いて検討した。非糖尿病群、バナデート投与非糖尿病群、糖尿病群、バナデート投与糖尿病群の4群に分けた。糖尿病作成3週後よりバナデートの投与を開始し10週間継続した。バナデート投与8週目にアルブミンおよびIgG 排泄率を測定し、10週目に腎重量を測定した。アルブミンおよびIgG 排泄率は、バナデート非投与糖尿病群と比べてバナデート投与糖尿病群で有意($p<0.001$)な増加の抑制を示したが、非糖尿病群とバナデート投与非糖尿病群の間には有意差を認めなかった。腎重量についてはバナデート非投与糖尿病群と比べてバナデート投与糖尿病群で有意($p<0.01$)な肥大の抑制を認めた。バナデートによるインスリン様効果が血糖の改善を介して糖尿病性腎症の改善に有効であることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり御指導、御校閲を賜りました新潟大学医学部第一内科柴田 昭教授ならびに御教示、御指導いただいた伊藤正毅助教授および御協力いただいた五十嵐一雅先生、谷 長行先生、山崎雅俊先生他第一内科学教室内分泌班の諸先生方に深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Meisch, H.U. and Bielig, H.J.: Chemistry and biochemistry of vanadium, *Basic Res. Cardiol.*, **75**: 413~417, 1980.
- 2) Byrne, A.R. and Kosta, L.: Vanadium in foods and in human body fluids and tissues, *The Science of the Total Environment* 10 Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, pp17~30, 1978.
- 3) Heyliger, C.E., Tahiliani, A.G. and Mcneill, J.H.: Effect of vanadate on elevated blood glucose and depressed cardiac performance of diabetic rats, *Science*, **227**: 1474~1477, 1985.
- 4) Meyerovitch, J., Farfel, Z., Sack, J. and Shechter, Y.: Oral administration of vanadate normalizes blood glucose levels in streptozototin-treated rats, *J. Biol. Chem.*, **262**: 6658~6662, 1987.

- 5) Brichard, S.M., Okitolonda, W. and Henquin, J.: Long term improvement of glucose homeostasis by vanadate treatment in diabetic rats, *Endocrinology*, **123**: 2048~2053, 1988.
- 6) Steffes, M.W., Brown, D.M. and Mauer, S.M.: Diabetic glomerulopathy following unilateral nephrectomy in the rat, *Diabetes*, **27**: 35~41, 1978.
- 7) Bolton, A.E. and Hunter, W.M.: A new method for labelling protein hormones with radioiodine for use in the radioimmunoassay, *J. Endocrinol.*, **55**: xxx~xxxii, 1972.
- 8) Skom, J.H. and Talmage, D.W.: Nonprecipitating insulin antibodies, *J. Clin. Invest.*, **37**: 783~786, 1958.
- 9) Myers, B.D., Winetz, J.A., Chui, F. and Michaels, A.S.: Mechanisms of proteinuria in diabetic nephropathy: A study of glomerular barrier function, *Kidney Int.*, **21**: 633~641, 1982.
- 10) Friedman, S., Jones, H.W., Golbetz, H.V., Lee, J.A., Little, H.L. and Myers, B.D.: Mechanisms of proteinuria in diabetic nephropathy II A study of the size-selective glomerular filtration barrier, *Diabetes*, **32(Suppl.2)**: 40~46, 1983.
- 11) Flybjerg, A., Frystyk, J. and Marshall, S.M.: Additive increase in kidney insulin-like growth factor I and initial renal enlargement in uninephrectomized-diabetic rats, *Horm. Metabol. Res.*, **22**: 516~520, 1990.
- 12) Flybjerg, A., Bornfeldt, K.E., Marshall, S.M., Arnqvist, H.J. and Ørskov, H.: Kidney IGF-I mRNA in initial renal hypertrophy in experimental diabetes in rats, *Diabetologia*, **33**: 334~338, 1990.
- 13) Viberti, G.C. and Wiseman, M.J.: The Kidney size in diabetes: Significance of the early abnormalities, *Clin. in Endocrinol. Metab.*, **15**: 753~782, 1986.
- 14) Pugazhenti, S. and Khandelwal, R.L.: Insulin-like effects of vanadate on hepatic glycogen metabolism in nondiabetic and streptozocin-induced diabetic rats, *Diabetes*, **39**: 821~827, 1990.
- 15) Bendayan, M. and Gingras, D.: Effect of vanadate administration on blood glucose and insulin levels as well as on the exocrine pancreatic

function in streptozotocin-diabetic rats, *Diabetologia*, **32**: 561~567, 1989.

diabetic ob/ob mice given oral vanadate, *Diabetes*, **39**: 1326~1332, 1990.

- 16) **Brichard, S.M., Bailey, C.J. and Henquin, J.C.:**
Marked improvement of glucose homeostasis in

(平成4年9月17日受付)
