

自然発症糖尿病ラット (WBN/Kob) における心筋障害と カテコラミン代謝に関する研究

奈良県立医科大学第1内科学教室

加藤 茂

RELATIONSHIP BETWEEN MYOCARDIAL INVOLVEMENT AND CATECHOLAMINE METABOLISM IN SPONTANEOUSLY DIABETIC (WBN/KOB) RAT

SHIGERU KATO

The First Department of Internal Medicine, Nara Medical University

Received March 27, 1992

Summary: To clarify the relationship between cardiac involvement in diabetes and catecholamine metabolism, hearts of the male WBN/Kob rat, a new strain of spontaneously diabetic rat, were examined morphologically, and catecholamine concentration in cardiac tissue was measured.

The heart in WBN/Kob rats showed focal myocytic necrosis and replacement fibrosis of the myocardium, and hypertrophy and dilatation in the left ventricle at the advanced stage. There were no significant morphological differences in the arteries and arterioles between WBN/Kob and control rats. In WBN/Kob rats, low catecholamine concentrations in cardiac tissue and high sensitivity of heart rate to catecholamine were present before the manifestation of diabetes, compared with control rats.

To evaluate the effects of β blockade or angiotensin converting enzyme inhibitor on cardiovascular lesion, β blockade (metoprolol; 0.4 mg/100 g BW/day) or ACE inhibitor (captopril; 0.2 mg/100 g BW/day) was administered to WBN/Kob rats for 18 months. In WBN/Kob rats treated with metoprolol and captopril, the systolic blood pressure was lower than that of controls (non-medicated WBN/Kob rats), and the heart weight as well as cross-sectional area of the ventricular wall were smaller than those of controls. In WBN/Kob rats treated with metoprolol, the degree of dilatation and fibrosis area of the left ventricle was diminished compared with that of other groups of rats.

β blockade prevented the cardiovascular involvement in WBN/Kob rat from progression. The present study suggests that high sensitivity of cardiomyocyte to catecholamine may lead to cardiovascular involvements in diabetes mellitus.

Index Terms

cardiac involvement, catecholamine, diabetes mellitus, WBN/Kob rat

I. はじめに

糖尿病患者では心血管系の障害が高率に認められる。

その大半は粥状硬化に基づく虚血性心疾患であるが、糖尿病患者の中には冠血管病変がないのに心不全を呈する症例のあることが1972年にRuberら¹⁾によって最初に報

告された。このような病態に対して糖尿病性心筋症(diabetic cardiomyopathy)という概念²⁾³⁾が提唱されているが、その発症機序は不明である。

Reganら⁴⁾は、冠動脈造影で、冠動脈狭窄の認められない12例の糖尿病患者について、左室拡張終期圧の上昇と左室stiffnessの増大が認められたという。またAhmedら⁵⁾は、冠動脈狭窄を伴っていない糖尿病患者について、心機関によりPEPの延長とETの短縮を認め、左室機能が低下していると報告した。著者の教室の藪田ら⁶⁾は、心エコー図を用い、心症状のない糖尿病患者について、左室収縮期時相に異常がなくても左室拡張早期の拡張特性が障害されており、等容拡張期の延長が認められると述べている。これらの報告はいずれも明らかな心症状のない糖尿病患者でも左室機能の障害が潜在する可能性があることを示している。つまり糖尿病患者は冠動脈狭窄がなくても、左室拡張特性の障害から収縮障害を引き起こし、さらに心筋症様病態を呈するに至ると推測される。糖尿病死亡者の剖検による心臓の組織学的検討では、冠血管病変を合併していなくても、心筋に細小動脈の硬化性変化、間質の線維症、間質へのPAS陽性物質沈着などが認められるという⁷⁾。

糖尿病における組織学的変化・機能障害の成因としては、まず糖尿病に好発する微小血管障害が考えられるが、糖尿病における代謝異常も心筋症様病態発現要因として重要である⁸⁾。解糖系酵素の活性低下は、心筋細胞におけるグリコーゲンの蓄積⁹⁾や心筋細胞内エネルギー産生の低下¹⁰⁾を招き、低インスリン状態が持続すると蛋白の異化亢進・合成低下などの蛋白代謝異常を生じ、その結果心筋収縮蛋白の減少をきたすことが実験的に報告されている¹¹⁾。また高血糖状態になると血中のカテコラミンが増加し、 β 受容体を介してインスリンの分泌を促進する¹²⁾。この高血糖状態におけるカテコラミン異常が糖尿病性心筋障害の成因の一つであるとする意見がある¹³⁾。KKマウスによる実験的検討では糖尿病発症早期から血中カテコラミンの過剰分泌が認められ、心筋組織内カテコラミン濃度は減少するという¹⁴⁾。さらに糖尿病患者における血中カテコラミンの増加は心毒性をもつアドレノクロームやフリーラジカルを発生させ、心筋障害を惹起するという意見もある¹⁵⁾。

本研究では糖尿病性心筋障害の発生・進展におけるカテコラミン代謝異常の関与を解明するため、ヒト糖尿病に類似の病態を示す自然発症糖尿病ラット(WBN/Kobラット)をモデルとして、糖尿病性心筋障害の形態学的変化を経時的に観察した。併せて心筋組織内カテコラミン濃度を測定し、外因性カテコラミンに対する心筋交感神

経活性の応答を心拍数の変化として検討し、さらに糖尿病性心筋障害の進展に対する β 遮断薬の効果についても検討を行った。

II. 方 法

1. 自然発症糖尿病ラット(WBN/Kob)における心筋病変と心筋組織内カテコラミン濃度に関する検討

(1) 対象

WBN/Kobラットは静岡実験動物農業協同組合から分与を受け、飼育にはオリエンタル酵母工業㈱のラット用固形飼料を用いた。実験には生後3カ月、7カ月、12カ月、18カ月齢の雄WBN/Kobラットをそれぞれ10匹ずつ使用し、対照群として月齢・性を一致させたWistar系ラットそれぞれ10匹ずつを用いた。

(2) WBN/Kobラット一般病態の検討

WBN/Kobラットおよび対照Wistar系ラットを同じ環境下で飼育し、生後3カ月、7カ月、12カ月、18カ月に体重・血圧測定、糖負荷試験を行った。血圧はテイルカフ法によって測定した。糖負荷試験は18時間絶食後にグルコース2.0g/kgを腹腔内投与し、投与前、投与後30分、60分、120分に尾静脈から採血し、グルコースオキシダーゼ法によって血糖を測定した。その後ペンタバルビタール麻酔下で開腹して、腹部大動脈より採血を行い、ついで心摘出を行った。

(3) 心筋の肉眼的・組織学的検討

摘出心の重量を測定した後に、心室長径の約1/3の心尖部側で横断し、心尖部側をさらに長軸方向に等分した。心尖部側を用いて心筋内カテコラミン濃度を測定した。心基部側の2/3をホルマリン固定した後に、心室長径の1/2の部位の横断面薄切標本をヘマトキシリン・エオジン、アザン・マロリ、PAS染色法で染色し、形態学的観察を行った。この部位での心室壁厚、左室腔周径を計測し、さらに冠動脈および心筋内微小血管の狭窄率、心筋細胞横径、心筋線維症面積比をcolor image processor SPICCA-II(AVIONICS社製)で測定した。

血管狭窄度：左室の前壁、中隔、側壁、後壁および右心室壁の5カ所で、18カ月齢における冠動脈および心筋内微小血管の狭窄度を検討した。血管外径の大きさによって30 μ m未満群、30 μ m以上50 μ m未満群、50 μ m以上100 μ m未満群、100 μ m以上群の4段階に区分した。各群とも40個の血管を無作為抽出し、その内径と外径を計測して、両者の比を狭窄度の指標とした。

心筋細胞横径：PAS染色標本を用いて、左室の前壁、中隔、側壁、後壁および右室壁の5カ所で無作為に2視野を選び、それぞれ200個ずつの細胞について核を通る

短軸に沿って心筋細胞横径を計測した。

線維症面積比：アザン・マロリ染色標本を用い、SPIC-CA-IIに心室横断面全体を記録した。心筋細胞と血管を示す赤色の部分と線維症を示す青色の部分について二値化画像処理を行い、青色に染色された部分の面積と全横断面面積を計測し、両面積の比すなわち線維症面積比を求めた。

(4) 心筋組織内カテコラミン濃度の測定

3カ月、7カ月、12カ月、18カ月齢で屠殺後15分以内に -70°C で凍結保存しておいた心筋組織を細切し、0.3 N HClO_4 2.5 mlを加えてホモジナイズした。さらに0.3 N HClO_4 5 mlを追加し、12,000 ppm、 4°C で20分間遠心分離を行い、上清を採取した。この操作を数回繰り返して、上清中の蛋白を除去した試料にDHBA 0.4 nmol、1 mol/Lの Na_2SO_4 25 mlおよびアルミナ 60 mgを加え、pHを8.4から8.6の間に保ちながら混和した。アルミナを採取し、それを3回以上洗浄した後、1 mol/Lの酢酸を1 ml加え、カテコラミンを遊離させた。この試料について、高速液体クロマトグラフィシステム・カテコラミン分析用カラム(日本ミリポア社製)を用いて心筋組織内カテコラミンの定量を行った¹⁰⁾。

(5) 外因性カテコラミンに対する交感神経活性応答の検討

外因性カテコラミンに対する心筋の応答を検討するため、3カ月、7カ月、12カ月、18カ月齢のWBN/KobラットとWistar系ラットそれぞれ5匹ずつ、計40匹について β 刺激薬イソプロテレンールを投与して心拍数の変化を調べた。実験はラットを仰臥位で固定し、ペントバルビタール0.1 ml/100 gBWを腹腔内に投与し、体動がなくなり、心拍数が安定した時点で心電図四肢誘導を描記した。イソプロテレンール $2\mu\text{g}/100\text{gBW}$ を腹腔内投与し、投与後30秒、1分、2分、3分、5分、7分、10分、15分に心電図を描記して心拍数を測定した。イソプロテレンール投与中の最大心拍数と投与前の心拍数との差を心拍数増加量とし、これを外因性カテコラミンに対する交感神経活性応答の指標とした。

2. WBN/Kobラットの心筋病変に対する β 遮断薬の影響に関する検討

(1) 対象

1カ月齢のWBN/Kobラット雄30匹を対象とし、Wistarラット10匹を対照とした。

(2) 検討方法

β 遮断薬投与群：生後1カ月齢のWBN/Kobラット10匹に β 1選択性 β 遮断薬メトプロロールを飲料水に混和し、自由飲水にて投与し、18カ月齢まで飼育した(Met

群)。メトプロロールの投与量は予備実験において、降圧効果が認められた最小量が $0.40\pm 0.08\text{mg}/100\text{g BW}/\text{日}$ であったことに基づき、 $0.4\text{mg}/100\text{g BW}/\text{日}$ とした。2カ月ごとに体重・血圧・飲水量を測定し、対照としたWistarラットの血圧値を基準としてメトプロロールの投与量を調節した。18カ月齢で血圧を測定した後に、屠殺して心摘出を行った。摘出心は重量を測定してからホルマリン固定し、心室1/2横断面でのHE染色薄切標本を作成した。その標本についてSPICCA-IIを用い、1)心室1/2横断面における心室壁面積、2)心室1/2横断面における左室腔面積および3)心室1/2横断面における線維症面積比の計測を行った。

対照群：1)WBN/KobラットにMet群と同程度の降圧が得られるようにACE阻害薬(カプトプリル； $0.20\pm 0.05\text{mg}/100\text{gBW}/\text{日}$)を同様の方法で投与した群(Cap群、10匹)、2)WBN/Kobラット無投薬群(N群、10匹)および3)非糖尿病Wistarラットの無投薬群(W群、10匹)について、それぞれMet群と同様の測定を行った(Fig. 1)。

3. 統計処理

各群測定値は平均値 \pm 標準偏差(SD)で示し、平均値の群間差の有意性については対応のないStudent's *t*検定を用いた。

III. 成 績

1. WBN/Kobラットにおける心筋病変と心筋内カテコラミン濃度の関係

(1) WBN/Kobラットの一般病態

体重：12カ月齢まで月齢とともに増加し、各月齢において対照群より重かった($p<0.01$)。しかし18カ月齢の体重は12カ月齢に比して減少し($p<0.05$)、対照群との間には有意差がなかった。

糖負荷試験：3カ月、7カ月齢は対照群と差がなかったが、12カ月および18カ月齢では空腹時血糖が $300\text{mg}/\text{dl}$ 以上の高値を示し、糖負荷後30分には平均 $394\text{mg}/\text{dl}$ に上昇した。

血圧：すべての月齢において対照群より高値($p<0.01$)を示した(Fig. 2, left)。

心重量：すべての群で対照群に比して増加(7カ月齢； $p<0.05$ 、3カ月、12カ月、18カ月齢； $p<0.01$)していた(Fig. 2, middle)。体重あたりの心重量は、7カ月齢では対照群と差がなかったが、その後の月齢で対照群に比して高値($p<0.05$)を示した(Fig. 2, right)。

(2) WBN/Kobラットの心筋病変

1) 組織形態学的所見

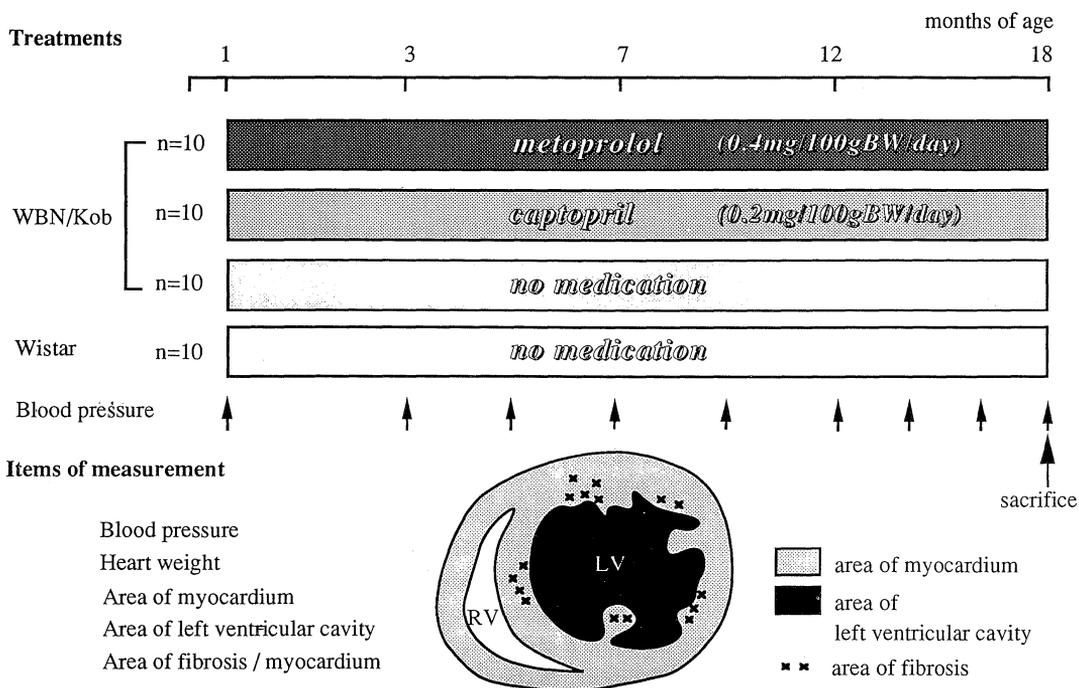


Fig. 1. Experimental protocol..

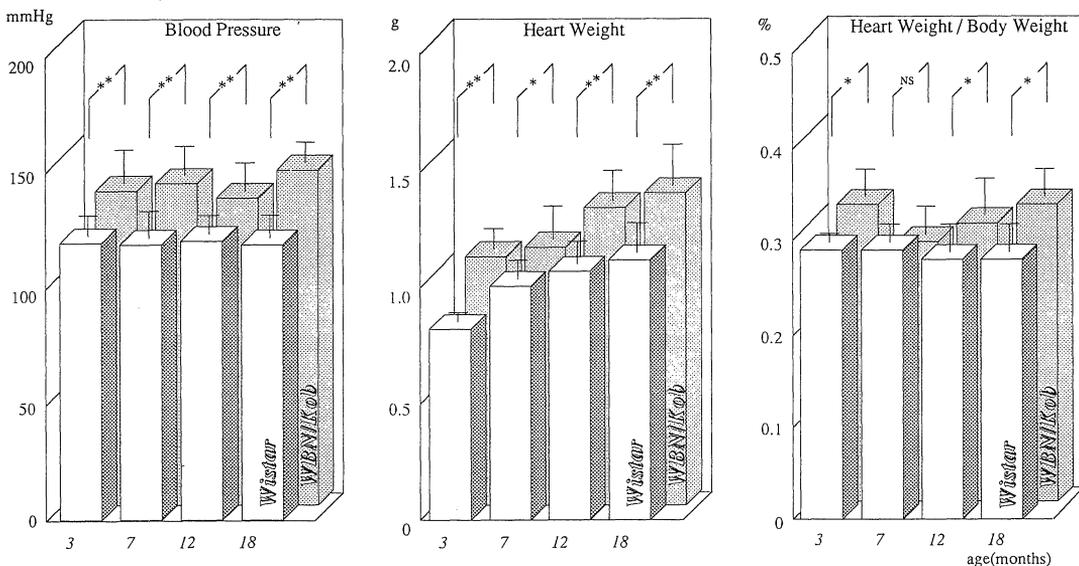


Fig. 2. Left panel showing systolic blood pressure of WBN/Kob rats (dotted bar) and Wistar rats (open bar) at 3, 7, 12, 18, months of age, middle panel showing heart weight and right panel showing heart/body weight. Values are mean \pm SD, *p < 0.05, **p < 0.01 WBN/Kob vs Wistar, Student's *t* test for unpaired data.

WBN/Kobラットでは3カ月齢ですでに心室壁に微小な心筋細胞壊死が出現し、7カ月齢には巣状の心筋細胞壊死と小円形細胞浸潤が認められた。さらに12カ月齢には斑状の心筋細胞壊死とそれに続く置換性線維症および心筋細胞肥大が、18カ月齢には心室壁中層から心内膜下にかけて広範囲に置換性線維症が認められた(Fig. 3)。

2) 冠動脈および心筋内微小血管の狭窄度

冠動脈および心筋内微小血管の狭窄度は、18カ月齢においてWBN/Kobラットと対照群との間に有意差がなかった(Table 1)。

3) 心筋細胞横径

Table 1. Stenosis index of intramyocardial arteriole and small artery, coronary artery

Diameter of vessels	>100	50-100	30-50	<30 μm
WBN/Kob	55.0±12.1	66.4±16.0	66.7±15.9	72.5±13.1
Control	58.4±14.2	63.4±11.4	62.2±10.1	64.6±11.0
	NS	NS	NS	NS

WBN/Kobラットの心筋細胞横径は、3カ月齢では13.9±0.8 μm、7カ月齢で14.2±1.0 μm、12カ月齢で15.3±0.7 μm、18カ月齢で15.2±0.9 μmであり、心筋細胞の肥大は12カ月齢まで加齢とともに進行し、各月齢とも対照群に比して肥大(p<0.01)を示した(Fig. 4)。

4) 心筋線維症面積比

WBN/Kobラットの3カ月、7カ月、12カ月齢においては対照群と同様に測定可能な線維症は認められなかった。18カ月齢はWBN/Kobラット3.9±2.7%、対照群1.6±1.9%であり、WBN/Kobラット群の心筋線維症面積が対照群に比して有意差はないが、大きい傾向がみられた。

(3) 心筋組織内カテコラミン濃度

心筋組織内エピネフリン濃度：3カ月齢ではWBN/Kobラット10.6±4.2 pg/mg、対照群22.7±12.1 pg/mg、7カ月齢ではそれぞれ7.5±2.4 pg/mg、14.4±9.9 pg/mg、12カ月齢ではそれぞれ5.9±3.9 pg/mg、12.4±4.1 pg/mg、18カ月齢ではそれぞれ2.4±2.2 pg/mg、

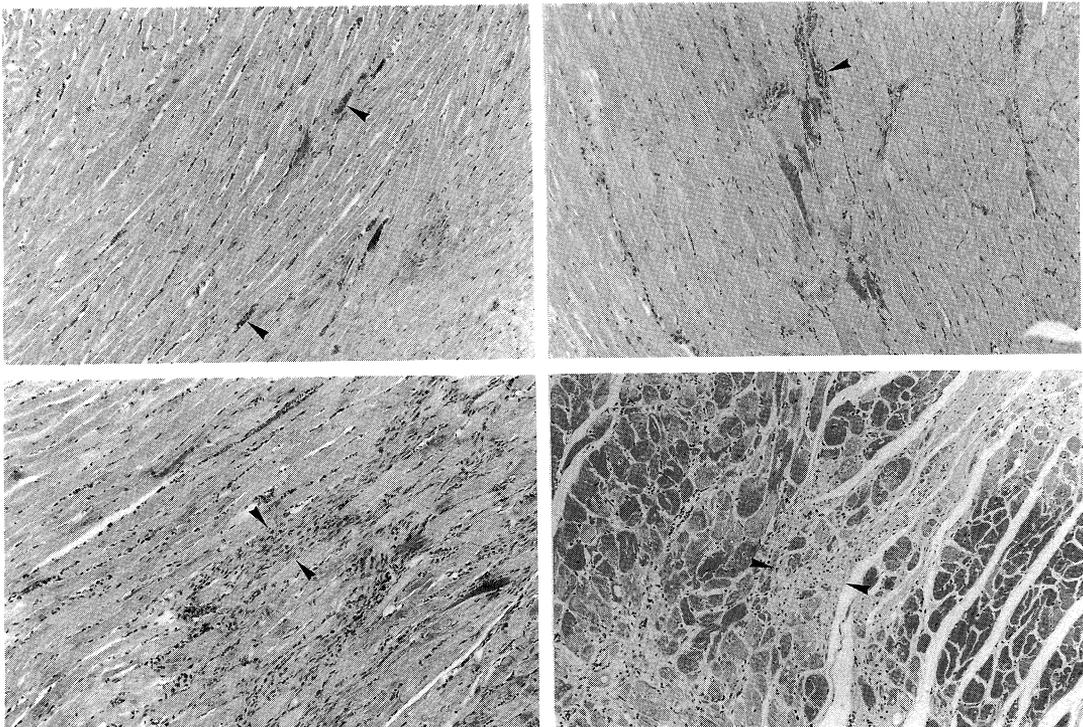


Fig. 3. Light micrographs of cardiomyocyte in WBN/Kob rat. Panel A (at 3 months of age, HE staining×200) showing necrosis of myocyte (allow head). Panel B (at 7 months of age, ×200) infiltration of inflammatry cells and necrosis of myocyte (allow head). Panel C (at 12 months of age,×400) myocardial fibrosis (allow head). Panel D (at 18 months of age, ×200) massive fibrosis (allow head) from sudendocardial to middle layer of myometrium.

A	B
C	D

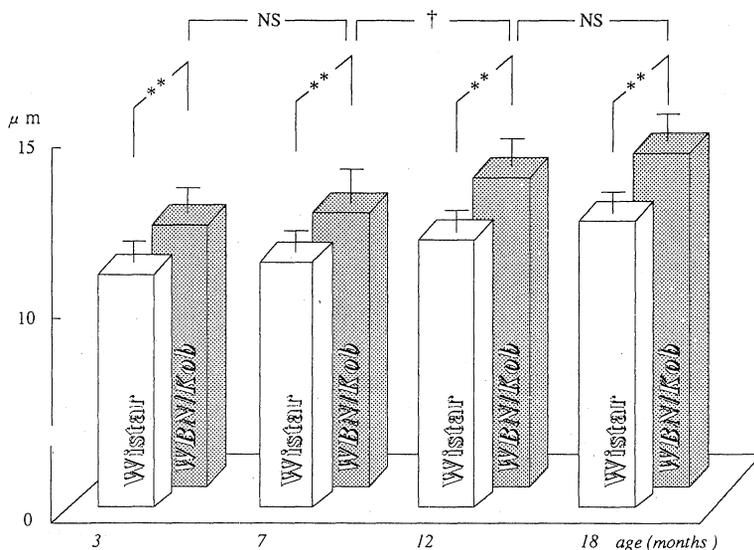


Fig. 4. Diameter of cardiac myocyte in WBN/Kob (dotted bar) and Wistar (open bar) rat. Values are mean \pm SD, ** $p < 0.01$ WBN/Kob vs Wistar, Student's t test for unpaired data. † $p < 0.05$, WBN/Kob.

6.3 \pm 2.5 pg/mgであった(Fig. 5, upper).

心筋内ノルエピネフリン濃度：3カ月齢ではWBN/Kobラット189.2 \pm 135.8 pg/mg, 対照群267.0 \pm 207.8 pg/mg, 7カ月齢ではそれぞれ68.8 \pm 45.3 pg/mg, 253.2 \pm 142.7 pg/mg, 12カ月齢ではそれぞれ70.2 \pm 32.8 pg/mg, 237.3 \pm 128.2 pg/mg, 18カ月齢では73.5 \pm 54.3 pg/mg, 180.1 \pm 64.1 pg/mgであった(Fig. 5, lower).

すなわち, 心筋組織内カテコラミン濃度は対照群に比してWBN/Kobラットで3カ月齢においてすでに有意に低下しており, さらに加齢に伴って減少が進行した。

(4) 外因性カテコラミンと心拍数

インプロテレンール投与による心拍数の最大増加量と月齢との関係をFig. 6に示した。3カ月齢ではWBN/Kobラット107.3 \pm 28.6 beats/min, 対照群37.5 \pm 33.2 beats/min, 7カ月齢ではWBN/Kobラット96.7 \pm 76.6 beats/min, 対照群81.9 \pm 40.5 beats/minであり, WBN/Kobラットは3カ月齢で対照群に比して有意の増加($p < 0.01$)を示したが, 7カ月齢では有意差はなかった。さらに18カ月齢になるとWBN/Kobラットにおける最大増加量は21.9 \pm 18.8 beats/minに低下し, 対照群の82.0 \pm 48.4 beats/minに比して有意に低値($p < 0.05$)を示した。対照群における心拍数の最大増加量は各月齢間で有意差がなかった。

2. WBN/Kobラットの心筋病変に対する β 遮断薬の

効果

(1) 血糖値・血圧

血糖値：WBN/Kobラットにメトプロロールあるいはカプトプリルを投与中の血糖値の推移を4カ月ごとに17カ月間観察した。Met群, Cap群ともN群の血糖値と比較して差がなかった。

血圧：18カ月齢においてMet群, Cap群はそれぞれ107.2 \pm 15.3 mmHg, 113.5 \pm 13.8 mmHgであり, 両群とも無投薬のN群139.4 \pm 8.0 mmHgに比して低値($p < 0.05$)であった。非糖尿病対照ラットであるW群の血圧は120.1 \pm 16.4 mmHgであり, Met群, Cap群と差がなかった(Fig. 7, left)。

(2) 心重量

18カ月齢においてMet群では1.05 \pm 0.06 g, Cap群では1.18 \pm 0.20 gであり, 両群ともN群の1.35 \pm 0.18 gに比して有意の低値を示し, W群の1.12 \pm 0.13 gとは差がなかった(Fig. 7, middle)。

(3) 心室壁面積

18カ月齢においてMet群では64.0 \pm 4.8 mm², Cap群では64.6 \pm 3.7 mm²であり, 両群ともにN群の69.9 \pm 6.2 mm²に比して有意の低値を示し, W群の61.4 \pm 8.7 mm²とは差がなかった(Fig. 7, right)。

(4) 左室腔面積

Met群では15.3 \pm 2.2 mm²であり, Cap群の20.2 \pm 2.9 mm², N群の22.3 \pm 2.7 mm²に比して有意の低値を

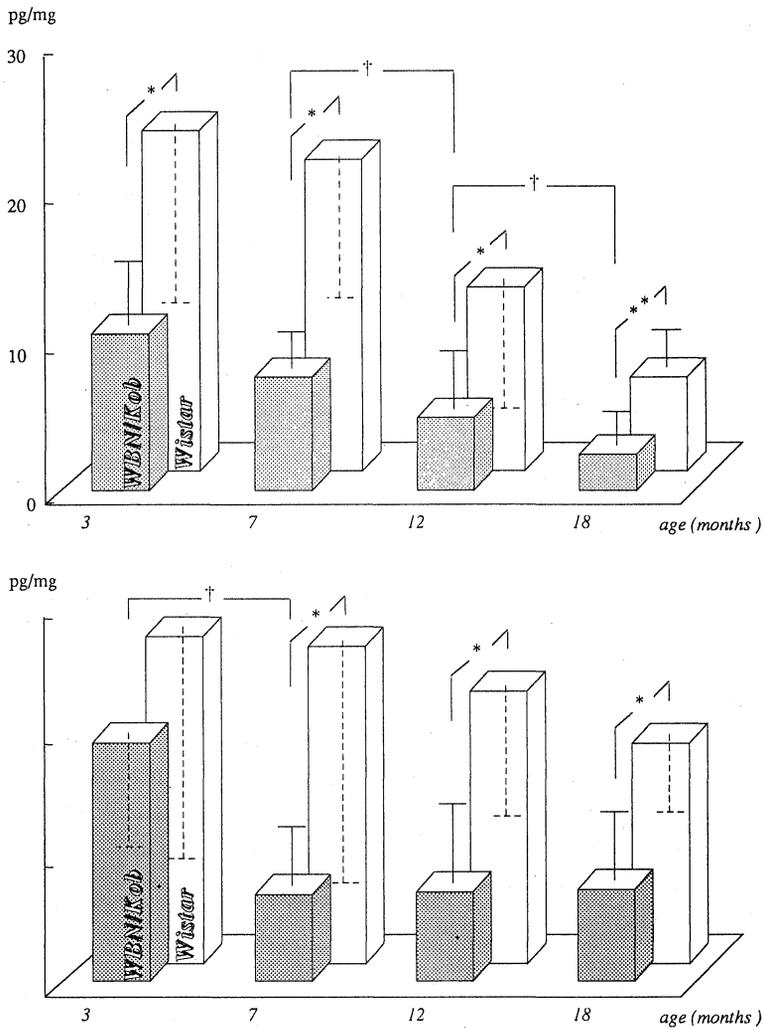


Fig. 5. Epinephrine (upper panel) and norepinephrine (lower panel) concentration in cardiac tissue of WBN/Kob and Wistar rats. Values are mean \pm SD, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, WBN/Kob vs Wistar, student's *t* test for unpaired data. † $p < 0.05$, WBN/Kob.

示した。W群 $9.3 \pm 2.2 \text{ mm}^2$ はMet群に比して有意に低値であった(Fig. 8, left).

(5) 線維症面積比

線維症面積が心室全横断面積に占める割合は、18カ月齢ではMet群 $1.20 \pm 0.70 \%$ で、Cap群 $1.66 \pm 1.08 \%$ 、N群 $1.53 \pm 0.80 \%$ 、およびW群 $0.75 \pm 0.45 \%$ であり、線維症面積比はMet群でのみ改善傾向を示した(Fig. 8, right).

IV. 考 察

1, WBN/Kobラットの心筋病変について

WBN/Kobラット：1980年に小堀¹⁷⁾によって本邦に導入されたWistar系由来の近交系で、雄に多尿・尿糖・高血糖が認められる自然発症糖尿病モデル動物である¹⁸⁾¹⁹⁾²⁰⁾。本研究において、WBN/Kobラットの耐糖能は3カ月齢、7カ月齢では異常を示さなかったが、12カ月齢および18カ月齢は低下し、七戸ら²¹⁾の成績と同様の結果であった。また本ラットは他の糖尿病動物と異なり、インスリン投与による血糖のコントロールを行わなくても2年間以上の長期生存が可能である。したがって著者は、ヒト糖尿病に合併する心筋病変の発症機序に関する研究に適しているとの考えから、本研究にWBN/Kobラ

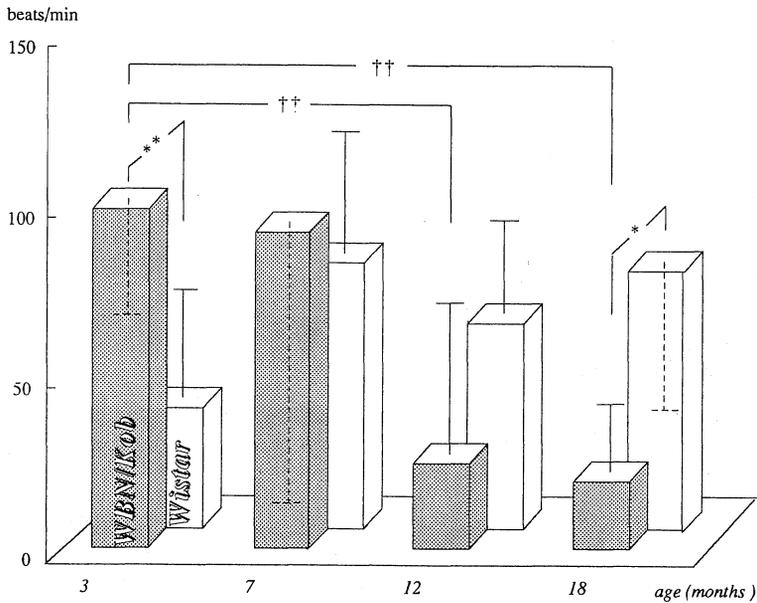


Fig. 6. Maximum variation of heart rate with isoproterenol in WBN/Kob and Wistar rat. Values are mean \pm SD, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, WBN/Kob vs Wistar, Student's t test for unpaired data. †† $p < 0.01$, WBN/Kob.

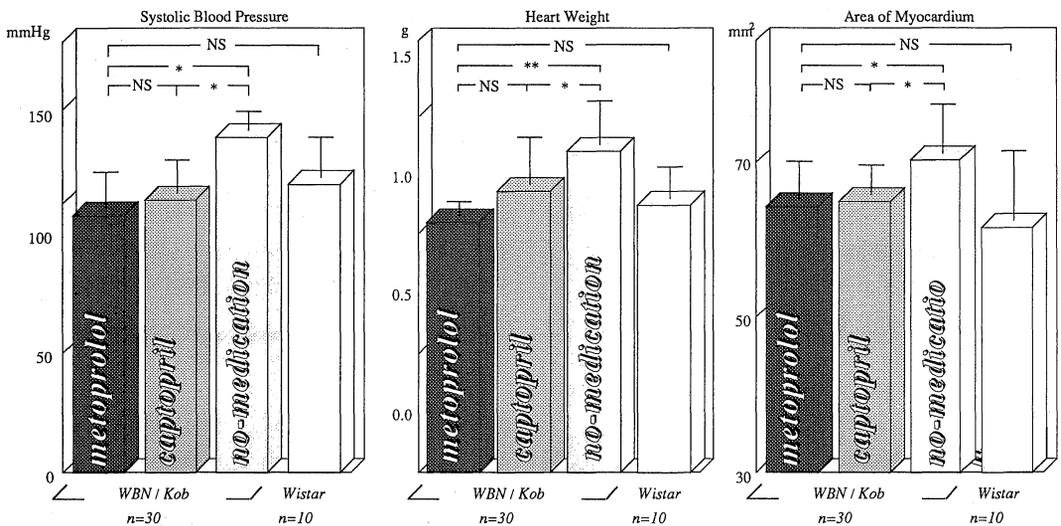


Fig. 7. Systolic blood pressure (left panel), heart weight (middle panel) and area of myocardium (right panel) in each groups of rats at 18 months of age. Values are mean \pm SD, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; Met group vs other groups and Cap group vs N group, Student's t test for unpaired.

ットを使用した。

糖尿病性心筋病変：WBN/Kobラットは12カ月齢で耐糖能の低下が認められるようになるが、その糖尿病発症をみる12カ月齢においては、発症以前の病変に加え、症より先行して、3カ月齢にはすでに心筋細胞壊死と炎

症細胞の浸潤が現れており、7カ月齢には巣状心筋細胞壊死と続発する心筋細胞肥大が観察された。糖尿病の発症をみる12カ月齢においては、発症以前の病変に加え、広範な心筋線維症および高度の心筋細胞肥大が認められ

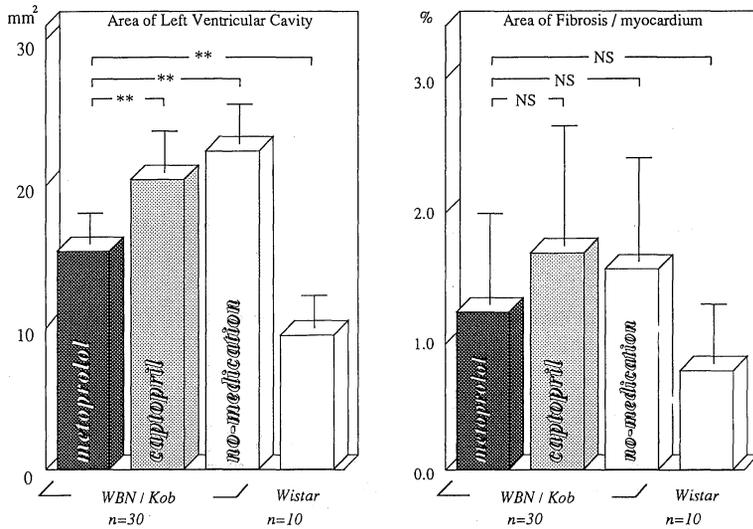


Fig. 8. Area of Left ventricular cavity (left panel) and area of fibrosis/myocardium (right panel), in each groups of rats at 18 months of age. Values are mean \pm SD, **p<0.01, Met group vs other groups, Student's t test for unpaired data.

た。18カ月齢においては心筋線維症がさらに進行し、左室腔の拡大を伴ってきた。つまり本研究の結果では、糖尿病発症に先行して心筋病変が出現し、糖尿病発症後にヒトの糖尿病性心筋障害¹⁾⁷⁾²²⁾²³⁾と同様に、血管および細胞周囲に広範な心筋線維症が認められた。

糖尿病性心筋障害の成因についてはいまだに解明されていないが、糖尿病による心筋内微小血管病変(microangiopathy)²⁴⁾や、糖尿病に伴う代謝異常¹⁰⁾¹¹⁾²⁵⁾が成因と考えられている。本研究における検討では心筋内微小血管および冠動脈の血管狭窄度は非糖尿病対照と差がなかった。したがって著者は糖尿病性のmicroangiopathyが心筋障害発症の原因である可能性は少ないと考える。

2. WBN/Kobラットにおけるカテコラミン代謝異常について

カテコラミン代謝異常における組織所見：褐色細胞腫患者では高血中カテコラミン濃度とともに炎症細胞浸潤を伴う心筋細胞の巣状変性・壊死および続発する心筋細胞肥大などの病変が認められる²⁶⁾。Wistarラットを対象とした実験においてもカテコラミン微量投与により同様の心筋障害所見が光顕的・電顕的に確かめられている²⁷⁾。

本研究では、糖尿病を発症していない3カ月、7カ月齢で、すでに巣状心筋細胞壊死や炎症細胞浸潤が左室内膜下から中層にかけて認められた。糖尿病の発症に先行して心筋内カテコラミン濃度の低下をきたしていたこ

とから、この心筋障害は、糖代謝異常よりはカテコラミン代謝異常との関連が大きいと推測される。また血中カテコラミン濃度については採血操作による影響が大きく、血中カテコラミン濃度と心筋障害との関連を検討するには問題があると考えられるので、今回測定項目から除外した。

外因性カテコラミンに対する交感神経活性の応答：本研究におけるWBN/Kobラットの心筋組織内カテコラミン濃度は、対照群に比して3カ月齢において有意の低値を示し、糖尿病発症後も加齢とともに減少する傾向を示した。ヒトの糖尿病患者の剖検例においても同様に心筋組織内カテコラミン濃度の低下が認められており¹⁵⁾、その成因として自律神経障害の関与が指摘されている。

そこで著者は、外因性カテコラミンに対する交感神経活性の応答を心拍数の最大増加量を指標として検討した。WBN/Kobラットの応答は3カ月齢では対照群に比して有意に大であったが、糖尿病発症後の12カ月、18カ月齢では外因性カテコラミンに対する心拍数の最大増加量が3カ月齢の20%に低下し、対照群よりも有意に小であった。

ヒトの糖尿病患者においても外因性カテコラミンに対する心拍数の最大増加量と糖尿病罹病期間の間に負の相関関係が認められており²⁸⁾、その成因として心筋細胞膜での β 受容体密度の減少、アデニレートシクラーゼの活性低下、Ca⁺⁺の細胞内流入の障害などが推測されてい

る²⁹⁾。

今回、WBN/Kobラットは糖尿病の顕性化以前にカテコラミンに対する交感神経活性の過剰応答を生じている。このことが心筋における巣状の心筋細胞壊死、心筋細胞の交感神経受容体のdown regulationを招く結果、心筋細胞膜におけるカテコラミン受容体数が減少しており、そのために受容体と結合したカテコラミンの心筋細胞内への取り込み量も減少し、心筋内カテコラミン濃度が低下したと推測される。

3. WBN/Kobラットの心筋病変に対する β 遮断薬の効果について

本研究ではWBN/Kobラットにおける心筋障害の進展にカテコラミン代謝異常の関与が大きいことが示唆された。そこで本ラット心筋障害の進展に対する β 遮断薬の影響を β_1 選択性があり、腺内分泌機能に対する影響の少ないメトプロロールを選択して検討した。WBN/Kobラットは3カ月齢から血圧の上昇が認められるので、 β 遮断薬投与による降圧という心筋障害の改善因子の影響を除外するため、 β 遮断薬投与群と同程度の降圧効果を示す最小有効量のACE阻害薬カプトプリルをWBN/Kobラットに投与して、対照群とした。

その結果、WBN/Kobラットでは心筋病変として心筋細胞の巣状壊死とそれに伴う炎症細胞浸潤、心筋細胞肥大、血管周囲・心筋細胞周囲型線維症、左室腔の拡大が認められ、 β 遮断薬群ではACE阻害群および無投薬群に比して心筋線維症面積の縮小と左室腔の拡大抑制効果が認められた。

β 遮断薬は、近年拡張型心筋症における臨床症状および予後の改善に有用であると報告されている³⁰⁾³¹⁾。その機序として①心筋細胞の合成や修復に必要なエネルギーの増加、②拡張特性の改善、③拡張期相の延長による心室充満効率の改善、④カテコラミンによる直接的な心筋障害や壊死発生からの保護、⑤ β 遮断薬を少量投与した場合カテコラミン受容体数の増加によってカテコラミンに対する反応性が改善される、などが挙げられている³²⁾。

本研究ではWBN/Kobラットにおける心筋障害の発症にカテコラミンに対する心筋の過剰反応が関与すると推測されるが、 β 遮断薬メトプロロール投与で心筋病変の進展が抑制されたことは、 β 遮断薬の拡張型心筋症に対する作用と同様に心筋細胞レベルでカテコラミン代謝異常を改善した可能性を示唆している。また β 遮断薬投与群では心筋障害の進展が抑制されたのに対し、降圧効果が β 遮断薬と同程度のACE阻害薬投与群では心筋障害進展の抑制が認められなかったことは、高血圧がWBN/Kobラットにおける心筋障害の主因でないことを示して

いる。近年ACE阻害薬を心不全患者の治療に用いることが多いが、これは血管壁に局在するレニン・アンジオテンシン系³³⁾を阻害して、心の後負荷の軽減を期待するものであった。しかし最近、ACE阻害薬の投与により心筋の微小血管血流が増加することが報告され³⁴⁾、ACE阻害薬の心筋保護作用³⁵⁾が検討されているが、本研究では左室拡大・心筋線維症の進展に対するACE阻害薬の効果は無投薬群と差がなかった。

以上のことから、本研究におけるWBN/Kobラット心筋細胞障害の進展には β 受容体を介するカテコラミン代謝異常が密接に関与していると考えられる。なお、本研究の β 遮断薬群・ACE阻害薬群・無投薬群の3群間で体重・血糖には差がなかった。心筋病変の進展抑制に血糖コントロールの関与は少ないと考えられる。

V. ま と め

自然発症糖尿病ラット(WBN/Kob)の心筋病変について、心筋内カテコラミン代謝異常との関連性および β 遮断薬が心筋病変の進展に与える影響を検討した。

1. WBN/Kobラットでは、糖尿病の発症に先行して、3カ月齢で心筋細胞壊死と炎症細胞の浸潤が、7カ月齢で巣状心筋細胞壊死と続発する心筋細胞肥大が認められた。12カ月齢には糖尿病が発症しており、心筋病変は広範な心筋線維症と高度の心筋細胞肥大を伴っていた。18カ月齢には心筋線維症が一層進行し、左室腔の拡大を示した。かかる糖尿病発症後の心筋病変はヒトの糖尿病患者者に類似していた。

2. WBN/Kobラットの心筋組織内カテコラミン濃度は3カ月齢ですすに対照群より低値を示し、月齢とともにさらに減少した。外因性カテコラミンに対する心筋の交感神経活性性応答を心拍数でみると、対照群に比して、3カ月齢では反応性が亢進しているが、月齢とともに低下して、12カ月、18カ月齢では対照群より低値を示した。

3. WBN/Kobラットに β 遮断薬を18カ月間投与したところ、ACE阻害薬群および無投薬群に比し、心筋線維症面積の縮小と左室腔拡大の抑制が認められた。

以上、WBN/Kobラットでは心筋病変が糖尿病の発症に先行しており、心筋障害の成因としてカテコラミンに対する心筋の過剰反応の関与が示唆された。

謝 辞

稿を終るにあたり、ご指導、ご校閲いただきました第1内科学講座石川兵衛教授に深甚の謝意を表しますとともに、ご校閲、ご助言をいただきました第1病理学講座

青笹克之教授ならびに第3内科学講座辻井 正教授に感謝いたします。さらに直接ご指導いただきました籠島忠講師に感謝致します。また終始ご協力いただきました第1内科学教室心臓グループの諸兄に感謝致します。

本論文の要旨は第53回日本循環器学会総会(平成元年,名古屋),第54回日本循環器学会総会(平成2年,福岡)および第55回日本循環器学会総会(平成3年,京都)において発表した。

文 献

- 1) Rubler, S., Dlugash, J., Yoceoglu, Y. Z., Kumral, T., Branwood, A. W. and Grishman, A.: New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulo sclerosis. *Am. J. Cardiol.* **30** : 595, 1972.
- 2) 齊藤嘉一, 市原紀久雄, 坪庭幹弘, 垂井清一郎: 長期罹病糖尿病患者にみられるcardiomyopathy. *日本臨牀* **31** : 373, 1973.
- 3) Hamby, R. I., Zonerach, S. and Sherman, L.: Diabetic cardiomyopathy. *J. A. M. A.* **229** : 1749, 1974.
- 4) Regan, T. J., Lyons, M. M., Ahmed, S. S. and Levinson, G. E.: Evidence for cardiomyopathy in familial diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* **60** : 885, 1977.
- 5) Ahmed, S. S., Jaferi, G. A., Narang, R. M. and Regan, T. J.: Preclinical abnormality of left ventricular function in diabetes mellitus. *Am. Heart J.* **89** : 153, 1975.
- 6) 藪田又弘: 糖尿病患者の心筋特性. *奈医誌.* **36** : 594, 1985.
- 7) Factor, S. M., Minase, T., Cho, S., Dominitz, R. and Sonnenblick, E. H.: Clinical morphological features of human hypertensive-diabetic cardiomyopathy *Am. heart J.* **99** : 446, 1980.
- 8) Dhalla, N. S., Pierce, G. N., Innes, I. R. and Beamish, R. E.: Pathogenesis of cardiac dysfunction in diabetes mellitus. *Can. J. Cardiol.* **1** : 263, 1985.
- 9) Chen, V. and Ianuzzo, C. D.: Dosage effect of streptozotocin on rat tissue enzyme activities and glycogen concentration. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **60** : 1251, 1982.
- 10) Chen, V., Ianuzzo, C. D., Fong, B. C. and Spitzer, J. J.: The effect of acute and chronic diabetes on myocardial metabolism in rats. *Diabetes* **33** : 1078, 1984.
- 11) Williams, I. H., Chau, B. H. L., Sahms, R. H., Siehl, D. and Morgan, H. E.: Effect of diabetes on protein turnover in cardiac muscle. *Am. J. Physiol.* **239** : E 178, 1980.
- 12) Fedelt, R. B.: Central role for sodium in the pathogenesis of blood pressure changes independent of angiotensin, aldosterone and catecholamines in Type 1 diabetes mellitus. *Diabetologia* **30** : 610, 1987.
- 13) Heyliger, C. E., Pierce, G. N., Singal, P. K., Meamish, R. E. and Dhalla, N. S.: Cardiac alpha- and beta-adrenergic receptor alterations in diabetic cardiomyopathy. *Basic. Res. Cardiol.* **77** : 610, 1982.
- 14) Neubauer, B. and Christensen, J. N.: Norepinephrine, epinephrine contents of the cardiovascular system in longterm diabetics. *Diabetes* **20** : 6, 1976.
- 15) Christensen, N. J.: Plasma norepinephrine and epinephrine in untreated diabetics, during fasting and after insulin administration. *Diabetes* **23** : 1, 1974.
- 16) Pierpont, G. L., Reynolds, S., Demaster, E. G. and Cohn, J. N.: Quantitative analysis of post-mortem changes in myocardial norepinephrine using HPLC with electrochemical detection. *J. Lab. Clin. Med.* **104** : 678, 1984.
- 17) Kobori, O., Gedigk, P. and Totovic, V.: Adenomatous changes and adenocarcinoma of glandular stomach in Wistar rats induced by N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine. *Virchows Arch.* **373** : 37, 1977.
- 18) 森 豊, 横山淳一, 西村正彦, 芹沢 治, 池田義雄: 膵外分泌能障害を伴う新しい自然発症糖尿病モデル WBN/Kobラットに関する研究(第1報), 発症様式と病態解析. *糖尿病* **31** : 15, 1988.
- 19) 森 豊, 横山淳一, 西村正彦, 芹沢 治, 池田義雄: 膵外分泌能障害を伴う新しい自然発症糖尿病モデル WBN/Kobラットに関する研究(第2報), 膵病変について. *糖尿病* **31** : 21, 1988.
- 20) 森 豊, 横山淳一, 西村正彦, 蔵田英明, 三浦順子, 野村幸史, 宇都宮一典, 池田義雄: 膵外分泌能障害を伴う新しい自然発症糖尿病モデル WBN/Kob

- ラットに関する研究(第3報), 腎病変について. 糖尿病 31: 909, 1988.
- 21) 七戸和博, 清水真澄, 秋元敏雄, 仲間一雅, 石崎正通: WBN/Kobラットの糖尿病発症におけるコロニー差について. 糖尿病動物 2: 104, 1988.
 - 22) 西 征二, 田中 弘, 新屋敷辰郎, 金久卓也, 西村正彦, 岩塚 寿: 自然発症糖尿病マウス(KKマウス)の心筋病変について. 医学のあゆみ 97: 286, 1976.
 - 23) Regan, T. J., Lyon, M. M., Ahmed, S. S., Levinson, G. E., Oldewurtel, H. A., Ahmad, M. R. and Haider, B.: Cardiomyopathy and regional scar in diabetes mellitus. *Trans. Assoc. Am. Physicians* 88: 217, 1975.
 - 24) Factor, S. M., Okun, E. M. and Minase, T.: Capillary microaneurysms in the human diabetic heart. *N. Engl. J. Med.* 302: 384, 1980.
 - 25) Regan, T. J., Ettinger, P. O., Kahn, M. I., Jesrani, M. U., Lyon, M. M., Oldewurtel, H. A. and Weber, M.: Altered myocardial function and metabolism in chronic diabetes mellitus without ischemia in dogs. *Circ. Res.* 35: 222, 1974.
 - 26) van Vliet, P. D., Burchell, H. B. and Titus, J. L.: Focal myocarditis associated with pheochromocytoma. *N. Engl. J. Med.* 274: 1102, 1966.
 - 27) 厚生省特定疾患特発性心筋症調査研究班: 昭和55年度研究業績集. p 27, 1980.
 - 28) 西尾喜彦, 柏木厚典, 寺田雅彦, 畑中行雄, 吉川隆一, 原納 優, 繁田幸男: 糖尿病患者における心臓のエピネフリン反応性異常について. 糖尿病 30: 411, 1987.
 - 29) Nishio, Y., Kashiwagi, A., Kida, Y., Kodama, M., Abe, N., Saeki, Y. and Shigeta, Y.: Deficiency of cardiac β -adrenergic receptor in streptozotcin induced diabetic rats. *Diabetes* 37: 1181, 1989.
 - 30) Engelmeier, R. S., O'Connell, J. B., Walsh, R., Rad, N., Scanlon, P. J. and Gunnar, R. M.: Improvement in symptom and exercise tolerance by metoprolol in patients with cardiomyopathy: a double blind, randomized, placebo-controlled trial. *Circulation* 72: 536, 1985.
 - 31) Anderson, J. L., Lutz, J. R., Gilbert, E. M., Sorensen, S. G., Yanowitz, F. G., Menlove, R. L. and Bartholomew, M.: A randomized trial of low-dose beta-blockade therapy for idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am. J. Cardiol.* 55: 471, 1985.
 - 32) Waagstein, F., Caidahl, K., Wallentin, I., Bergh, C. and Hjalmarson, A.: Long-term beta-blockade in dilated cardio-myopathy. *Circulation* 80: 551, 1989.
 - 33) Saito, K. and Tanaka, K.: Angiotensin II binding sites in the conduction system of rat heart. *Am. J. Physiol.* 253: 618, 1987.
 - 34) Kato, M., Takeda, N., Takeda, A., Yang, J., Yin, H. Q. and Nagano, M.: The roles of renin-angiotensin-aldosterone and kallikrein-kinin system in J-2-N cardiomyopathic hamster. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 22: 513, 1990.