

水欠乏性脱水の腎機能への影響に関する 実験的研究

神戸市立中央市民病院泌尿器科（部長：松尾光雄）

石 川 英 二

EXPERIMENTAL STUDY OF EFFECT OF WATER DEPRIVATION-INDUCED DEHYDRATION ON RENAL FUNCTION IN RATS

Eiji ISHIKAWA

From the Department of Urology, Kobe General Hospital

(Chief: Dr. M. Matsuo)

To clarify the renal function induced by water deprivation-induced dehydration, intrarenal blood flow and changes in adenine nucleotide level in the renal tissue were investigated. Male SD rats were completely deprived of water for 2, 4 and 5 days. The intrarenal blood flow was determined by the hydrogen-gas clearance method and adenine nucleotide level in the renal tissue by high pressure liquid chromatography (HPLC) on the 2nd, 4th, and 5th day after water deprivation.

The renal function and energy charge ($EC = \{ATP + 1/2ADP\} / \{ATP + ADP + AMP\}$) were normal in all rats. In the dehydrated rats, the urine and blood were concentrated, and the medullary blood flow decreased. The mean arterial blood pressure was in the lower limit of renal perfusion pressure under autoregulation. In conclusion, the lower limit of renal perfusion pressure under autoregulation and urine and blood concentration due to water deprivation-induced dehydration may easily cause acute renal failure.

Key words: Dehydration, Acute renal failure, Intrarenal blood flow, Adenine nucleotide

緒 言

近年、人口構成の高齢化に伴い、急性腎不全 (acute renal failure, 以下 ARF と略す) 患者における高齢者の占める割合が増加している¹⁾ Kumar ら²⁾によると70歳以上の高齢者(122人)において、ARFの原因として脱水・電解質不均衡に起因するものが症例の約50%を占めている。このように高齢者においては脱水はARFの原因としてきわめて重要であるといえる。したがって、水欠乏性脱水は体液区画や腎機能にどのように影響しているか古くより研究され、Elkinton (1942)³⁾ および Painter (1948)⁴⁾ は犬で体液区画への影響を検討し、Heller (1949)⁵⁾ はラットの実験系で腎の尿濃縮能を検討した。そして、1960年までに腎髄質の対向流理論が受け入れられるようになり、尿濃縮時の腎循環や腎組織変化に関して研

究されてきている⁶⁻⁹⁾。しかし、それらは腎内組織血流量や、腎組織回復力をみるための energy charge については詳細に検討されていない。

そこで、今回SD系雄ラットを用いて、完全絶飲水として水欠乏性脱水時の腎循環動態をみるために水素ガスクリアランス法によって腎内組織血流量を検討し、また、腎臓の組織回復力をみるために腎組織の energy charge の変動を検討し、若干の知見を得たので報告する。

実験材料および方法

7週齢のSD系雄ラットを1週間自由飲水・自由摂食で予備飼育をし、体重が300g前後となったところで、絶飲水による水欠乏性脱水を開始した。この間、オリエンタル酵母NMF乾燥飼料を自由摂食させた。なお、飼育室の環境は温度23±2°C、湿度55±

5%、換気18回/時間に設定した。

完全脱水2日間(A群)、4日間(B群)、5日間(C群)の3群に分け、各群のラット数は6匹とした。そして、対照群は8匹とし、同じ環境で飼育した8週齢ラットを自由飲水・自由摂食させた。

各群のラットをペントバルビタール麻酔(30~40 mg/kg 腹腔内注入)で仰臥位に固定後、左大腿動脈にヘパリン化したポリエチレンカテーテル(Venula V5)を挿入し、Hewlett Packer社血圧測定用トランスデューサー(1280C)を接続し、平均動脈圧を測定した。ついで、開腹後水素ガスクリアランス法による腎組織血流量を測定した。また同様の麻酔後、開腹し腎臓周囲の脂肪組織を剝離し、腎をin situの状態では液体窒素に冷却した圧挫鉗子をあて瞬時に腎を圧挫摘出し、アデニンスクレオチド測定用凍結腎のsamplingを行なった。このとき、動脈採血も行なった。

1) 腎組織血流量測定法 (Table 1, Fig. 1)

麻酔開腹後、腎臓の神経と血管を損傷せぬように剝離し自発呼吸下に水素ガスを300 ml/min吸入させ

た。まえもって腎皮髄境界を計測した結果、C群でも腎被膜から約1.7 mmの深さであったため (Table 1)、腎皮質として腎被膜に垂直より斜めに白金電極を1

Table 1. The kidney size of the control and dehydrated rats. The values are shown as mean $\pm$ S.D., and are not significantly different.

KIDNEY SIZE

The diagram illustrates the vertical structure of a kidney. It is divided into two main horizontal sections: the upper 'CORTEX' and the lower 'MEDULLA'. A vertical double-headed arrow on the right side spans the entire height of both sections, labeled 'TOTAL HEIGHT'. Another vertical double-headed arrow is positioned between the two horizontal lines separating the cortex and medulla, indicating the relative thickness of each layer.

		Control (n = 8)	A (n = 6)	B (n = 6)	C (n = 6)
Cortex	(mm)	1.9±0.16	1.7±0.21	1.7±0.21	1.7±0.25
Medulla	(mm)	3.6±0.42	3.9±0.74	3.5±0.50	3.4±0.21
Total Height	(mm)	7.5±0.41	7.5±0.33	6.9±0.57	6.9±0.21

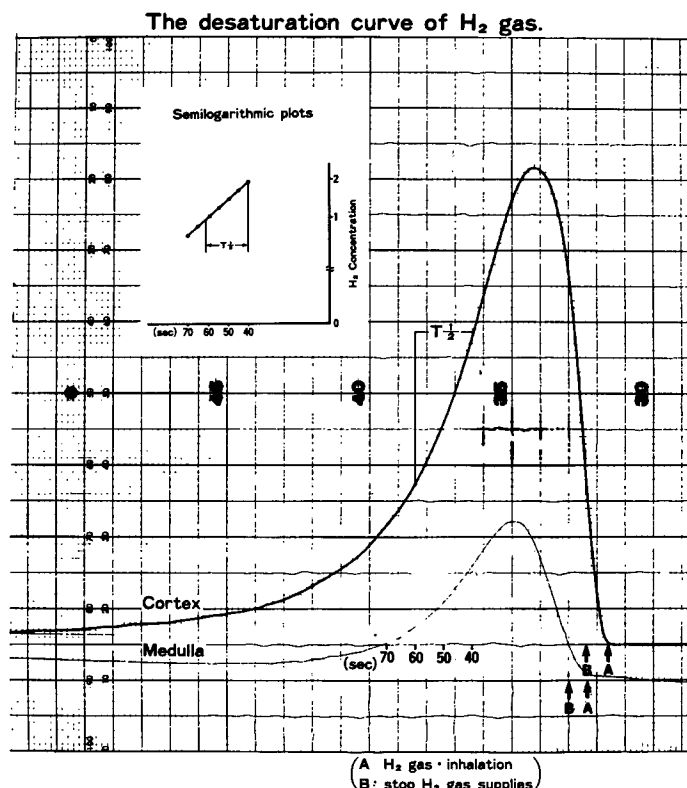


Fig. 1. The typical hydrogen clearance curve of the dehydrated rat kidney. The H_2 gas supplies start at point A and stop at point B. The small figure (the semilogarithmic curve; the horizontal axis is the time from point A and the vertical axis is the H_2 gas concentration) demonstrates the H_2 clearance curve between 40 and 70 seconds.

mm の深さ、腎髄質として腎被膜に垂直に 3 mm の深さの 2 カ所同時に刺入して腎組織の水素ガスクリアランス曲線を計測した¹⁰⁻¹²⁾ このクリアランス曲線は水素ガス吸入から急速に上昇し (数秒間)、吸入停止後急速に減少する。この吸入停止後 40 秒間は血流計測から除外した¹³⁾ (Fig. 1)。なお、水素クリアランス式組織血流量計は MT 技研製 (PHK-300) を用い、水素イオン検出用の関電極は、直径 0.3 mm の白金線をエポキシ樹脂でコーティングしたもので、この先端を 0.5 mm 露出し、白金墨を付着させたものを使用した。そして、不関電極は塩化銀電極を用いた。

クリアランス曲線で横軸を時間、縦軸を水素ガス濃度とした片対数を目盛にプロットして得られた直線の傾きから、Fick の原理を応用した Kety の理論式¹⁴⁾ により半減時間 $T^{1/2}$ (min) を求めた。つまり、 $F = 69.3 / T^{1/2}$ (ml/min/100 g) により算出した。

2) 腎組織の adenine nucleotide の測定法 (Fig. 2)

前述のごとく、腎組織を in situ の状態で採取するため、液体窒素 (-196°C) に浸しておいたステンレス製の圧挫鉗子 (平板部分 3×3 cm) を用いて瞬時に腎を圧座・摘出し、ただちに液体窒素に浸漬した。凍結試料のうち、おもに腎皮質と思われる部の 100~200 mg を $0 \sim 4^{\circ}\text{C}$ ですばやく精秤し、氷冷したテフロン製ホモジナイザーに入れ、氷冷した 10% トリクロル酢酸を 2 ml を加えてホモジナイズした。このホモジナイズした試料を 1,000 G で 15 分間遠心分離した後、適当量の上清液に 0.01 M 磷酸緩衝液 (pH 3.35) で

希釈し、さらに $0.45 \mu\text{m}$ フィルターを用いてろ過した後、高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法^{15,16)} で測定した。

i) ATP 分析の HPLC 条件: カラムは、Polygosil 5N (CH_3)₂ で、移動相は 0.35 M phosphate-buffer (pH 3.35)、流速は 1.0 ml/min、検出波長は 260 nm であった。

ii) ADP, AMP 分析の HPLC 条件: カラムは Lichrosorb RP18、移動相はメタノール 0.1 M phosphate buffer (pH 4.96)、流速は 1.0 ml/min、検出波長は 260 nm であった。このクロマトグラムの結果から、ピークを測定し、かねて作成した回帰直線の式を用いてアデニンスクレオチドの算出を行なった。Energy charge (以下 EC と略す) の計算は、次の公式によった¹⁷⁾。

$$EC = \frac{(\text{ATP} + 1/2 \text{ADP})}{(\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP})}$$

3) 血液検査および尿検査

血液は動脈採血とし、尿は代謝ケージ (岡崎産業 MK10D) にて 24 時間採尿とし、BUN は urease-indophenol 法、Na (血清、尿) は蛍光々度法、Cr (血清、尿) は Jaffe 法、Osm (血液、尿) は Advanced Digimatic (R) Osmometer Model 3D II 型浸透圧計を用いて測定した。

FE_{Na} (fractional excretion of Na)

$$\text{FE}_{\text{Na}} = \frac{u\text{Na}/s\text{Na}}{u\text{Cr}/s\text{Cr}} \times 100$$

尿細管の再吸収能を示すマーカーとして使用した¹⁸⁾。

すべての結果は、mean $\pm$ S. D. で示し、有意差検定は Student t 検定を使用した。

結 果

1) 体重変動と食餌摂取量 (Table 2)

体重および食餌摂取量は脱水の進行に並行して減少

Table 2. The changes in the body weight of each group and the food eaten on the last day of experimental term.

	Control (n=8)	A (n=6)	B (n=6)	C (n=6)
Body weight (g)	336 $\pm$ 17.4	256 $\pm$ 7.9**	236 $\pm$ 7.2**	230 $\pm$ 7.6**
Changes of B. Wt. (%)	+8.7 $\pm$ 1.88	-14.0 $\pm$ 0.61	-21.9 $\pm$ 1.36	-23.7 $\pm$ 1.49
Foods (g/day)	29.4 $\pm$ 2.45	15.9 $\pm$ 1.31**	3.0 $\pm$ 1.37**	3.4 $\pm$ 1.37**

All values are shown as mean $\pm$ S. D., compared with the control group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

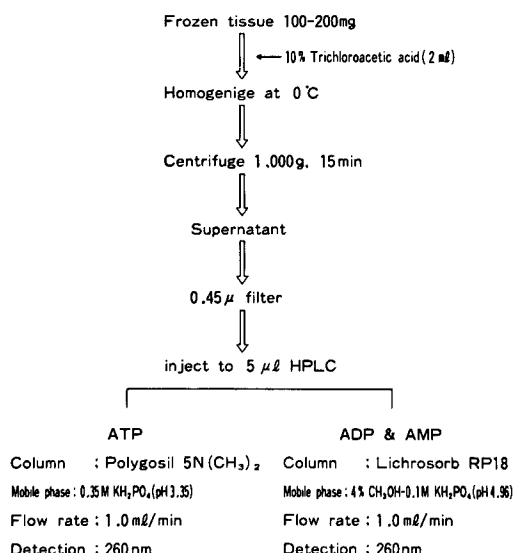


Fig. 2. Procedure for HPLC assay of adenine nucleotides.

Table 3. The changes in the laboratory data.

	Control (n=8)	A (n=6)	B (n=6)	C (n=6)
plasma Osm (mOsm/kg)	297±4.1	305±4.2*	318±5.2**	323±6.1**
Ht (%)	48±1.9	50±1.5	53±1.9**	54±2.6**
serum Na (mEq/l)	137±4.8	144±5.0*	151±3.2**	156±2.7**
urine Volume (μl/min)	16.9±3.67	3.0±0.56**	2.1±0.29**	2.0±0.22**
u/p Osm	2.4±0.58	12.9±5.0**	10.5±1.34**	12.3±2.38**
serum BUN (mg/dl)	16.1±4.19	21.8±4.88	26.3±4.13**	30.8±3.71**
serum Cr (mg/dl)	0.5±0.15	0.6±0.10	0.6±0.15	0.7±0.14
FENa (%)	0.249±0.0950	0.121±0.0249	0.118±0.0198*	0.118±0.0229

All values are shown as mean±S.D., compared with the control group (* p<0.05, ** p<0.01).

した。

2) 血液および尿検査 (Table 3)

B群, C群の Ht, plasma Osm, serum Na は対照群に比べて有意に高かった (B群・C群: 各 p<0.01). 尿量は脱水の進行とともに有意に減少した (各 p<0.01). serum BUN はB群, C群で対照群に比べて有意に高値となったが (各 p<0.01), serum Cr は正常であった. 脱水群の FENa は, 対照群に比べ正常範囲内で, 脱水群の u/p Osm は有意に上昇し (各 p<0.01), 腎の尿濃縮能は保たれていた。

3) 腎組織血流量および動脈圧 (Table 4)

大動脈圧は平均血圧として計測し, B群・C群で対照群に比べて有意に低下した (p<0.01). 各群の腎皮質と腎髄質の血流量は有意差を認めた (各 p<0.01). 脱水群の腎皮質の血流量はA群と対照群ではほぼ同じであったが, B群・C群で若干増加した。しかし, 腎

髄質の血流量はB群・C群で対照群に比べて有意に低下した (p<0.05)。

4) 腎組織の adenine nucleotide と EC (Fig. 3)

腎組織の ATP はA群でいったん低下し, B群・C群で有意ではないが上昇した。しかし, 各脱水群の ADP, AMP および EC は正常範囲であった。

考 察

水欠乏性脱水時 Table 4 に示すように腎皮質血流量は若干増加し, 腎髄質血流量は有意に減少した。腎循環は血液喪失に対してきわめて敏感で, 出血性低血圧時の腎皮質血流は腎髄質血流に比べ減少すると報告されている^{19,20}。しかし, 生理的な血圧変動における腎皮質血流は腎髄質血流に比べて一定の動向を維持するとされ^{7,23}。しかも, 平均動脈圧が80~180 mmHg の範囲では GFR (glomerular filtration rate) および RBF (renal blood flow) の変化は軽微であり, この動脈圧は腎灌流圧の自己調節領域であるとされている^{23,24}。そして, この自己調節領域の腎灌流圧において, 腎皮質血流および腎髄質血流は変動しないと報告されている²³。本実験の水欠乏性脱水時において平均動脈圧が Table 4 のように 80 mmHg と腎灌流圧の自己調節領域の下限であったため, 腎皮質血流量の変動は軽微で, 腎機能も正常であったと考えられた。

しかし, 腎髄質血流は Table 4 のように減少した。利尿尿時の腎髄質血流は増加し, 尿濃縮時には減少するとされている¹⁸。本実験のような水欠乏性脱水時の尿は濃縮状態のため, 髄質浸透圧勾配の増強が必要であり, これには腎髄質血流が大きな factor として関

Table 4. The changes in mean arterial blood pressure (MABP), the renal cortical blood flow (RCBF) and the renal medullary blood flow (RMBF) of each group.

	Control (n=8)	A (n=6)	B (n=6)	C (n=6)
MABP (mmHg)	99±6.8	86±10.8	85±6.9**	80±8.2**
RCBF (ml/min·100g)	314±38.6	295±10.1	324±32.0	339±51.3
RMBF (ml/min·100g)	121±33.0	119±44.4	63±27.5**	69±18.3**

All values are shown as mean±S.D., compared with the control group (*p<0.05, **p<0.01).

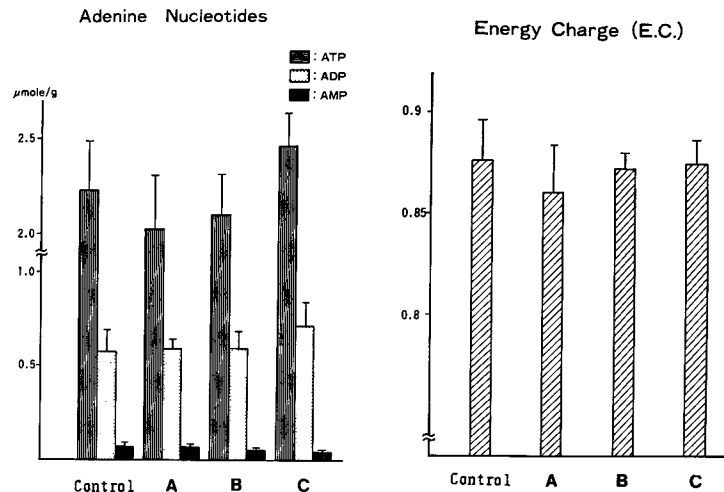


Fig. 3. The changes in the adenine nucleotide level and the energy charges of the kidney in each group. The values are shown as mean $\pm$ S.D.. The values are not significantly different.

与している。つまり、腎髄質血流によって washout される髄質溶質が減少すれば、髄質浸透圧勾配が増強し尿が濃縮される⁶⁾。そのため、本実験の腎灌流圧が自己調節領域であるにもかかわらず腎髄質血流が減少したことは生理的反応であったと考えられた。

本実験の水欠乏性脱水時の腎灌流圧は自己調節領域の下限まで低下し、血液は Table 3 のように濃縮状態であった。そのため、血液の viscosity は上昇していると考えられ、この状態は peripheral resistance を増加し、組織の酸素摂取量を低下させ hypoxia を助長すると報告されている⁹⁾。もちろん、一元的にはいえないが、このような理由で水欠乏性脱水が hypoxia であれば組織の ATP 産生に変化をきたしていると考えられる。このときの腎組織の ATP を測定すると、Fig. 3 のように正常であった。しかし、adenine nucleotide の反応系は相互変遷が迅速なため、この絶対量だけから細胞内の動的なエネルギー代謝の状態を把握することは不十分である。そのため、Atkinson¹⁷⁾ の提唱したエネルギーの産生と消費のバランスと調節律速を表わす energy charge を検討すると、Fig. 3 のように EC も正常範囲であった。

Ischemia 時の腎組織の ATP レベルは低下するとされ²⁵⁻²⁷⁾、著明な腎組織の ATP の低下はエネルギー依存性の尿細管の能動輸送を障害し細胞膜構築の破綻をきたすとされている²⁸⁾。hypoxia 時や出血性低血圧時の腎組織の回復能は EC に相関し、EC レベルの低下は腎組織の非可逆性変化を招来するとも報告されている^{30,31)}。しかし、腎組織の ATP および EC レベルは腎機能と必ずしも相関しないという報告もあ

る^{28,31)}。また、本実験のような sampling 方法による adenine nucleotides 測定から全腎組織の機能および回復能を推測することは困難であろうが⁶⁾、今回の実験でいえることは、水欠乏性脱水時の腎組織の ATP および EC は正常範囲であり、少なくとも hypoxia や出血性低血圧などの異常はないと考えられた。

水欠乏性脱水が進行すると、Table 4 に示すように ATP が若干増加した。これは endotoxin shock の初期および中期における肝臓の ATP 産生能の亢進によく似ている。そして、mitochondria はエネルギー需要増大時に代償性に機能亢進すると報告されている³⁰⁾。水欠乏性脱水時にも尿濃縮を増強するために腎皮質ではエネルギー需要が増大していると考えられる。この尿濃縮状態においてエネルギー依存性の能動的再吸収である Na 再吸収は増加している。この Na の大部分は腎皮質の近位および遠位尿細管で再吸収され、この腎皮質部は好氣的代謝が盛んであるとされている³²⁾。そのため、水欠乏性脱水時における腎組織の mitochondria では ATP 産生能が代償性に機能亢進して ATP が若干上昇したとも考えられ、さらに、腎皮質血流が若干増加したことも、このような代償性変化への対応とも考えられた。

水欠乏性脱水時、腎灌流圧は自己調節領域下限で正常領域であるが、出血などの侵襲により腎灌流圧は容易に低下し腎障害をきたしやすいと考えられた。さらに、従来からいわれているように脱水時の血液および尿濃縮も腎毒性物質などによる腎障害を起こしやすい要因のひとつとも考えられた。そのため臨床で、水欠乏性脱水に陥らないように努めるとともに、もしこの状

態にいたら早急に適切な治療が必要である。今後、水欠乏性脱水の薬物起因性腎障害への影響に関して検討していきたい。

結 語

SD 系雄ラットを 2, 4, 5 日間完全脱水にし、腎機能、水素ガスクリアランス法による腎組織血流量、および腎組織の adenine nucleotide を測定し、以下の結果を得た。

- 1) 水欠乏性脱水時の腎機能は正常に保たれていた。
- 2) 水素ガスクリアランス法による腎組織血流量の測定の結果、脱水の進行とともに腎髄質血流が有意に減少し ($p < 0.01$)、腎皮質血流量は若干増加した。このときの平均動脈圧は腎灌流圧の自己調節領域下限であった。
- 3) 腎組織の ATP 値は A 群で低下し、B・C 群で若干増加したが、腎組織の EC は正常に保たれていた。

本研究の要旨は第27回日本腎臓学会総会および第73回日本泌尿器科学会総会において発表した。

稿を終るにあたり、御指導、御校閲頂いた恩師の吉田修教授、終始直接に御指導頂いた沢西謙次講師をはじめ、京都大学泌尿器科の教室員の皆様、神戸市立中央市民病院泌尿器科松尾光雄部長ら医局員の皆様に心より感謝の意を捧げます。

なお本研究の一部は昭和59, 60年度神戸市病院事業基金の補助を受けたことを記して感謝します。

文 献

- 1) 石川英二・西 俊昌・安田和弘・原 康行・浮草 実・沢西謙次・川村寿一・吉田 修：急性腎不全150症例の予後に関する臨床的研究。泌尿紀要 **29** : 169~183, 1983
- 2) Kumar R, Hill CM and McGeown MG: Acute renal failure in the elderly. *Lancet* **1**: 90~91, 1973
- 3) Elkinton TR and Taffel M: Prolonged water deprivation in the dog. *J Clin Invest* **21**: 787~794, 1942
- 4) Painter EE, Holmes JH and Gregersen MI: Exchange and distribution of fluid in dehydration in the dog. *Am J Physiol* **152**: 66~76, 1948
- 5) Heller H: Effect of dehydration on adult and newborn rats. *J Physiol* **108**: 303~314, 1949
- 6) Brenner BM and Rector FC: The kidney: Acute renal failure. W.B. Saunders Company, 1986
- 7) 西原三宏：腎内循環に関する実験的研究。日腎誌 **11** : 363~381, 1969
- 8) Aizawa C, Honda N and Yoshitoshi Y: Depletion of the renal medullary osmotic gradient following hemorrhagic hypotension in hydropenic rabbits. *Jap Heart J* **10**: 177~184, 1969
- 9) Ederstrom HE: Effects of acute dehydration on circulation and body fluids. *Circul Shock* **3**: 211~216, 1976
- 10) Aukland K, Bower BF and Berliner RW: Measurement of local blood flow with hydrogen gas. *Circ Res* **14**: 164~187, 1964
- 11) Neerly WA, Hardy JD and Godfrey WD: The use of the hydrogen electrode to measure tissue blood flow. *J Surg Res* **5**: 363~369, 1965
- 12) Myklebust JB, Cuisick JF and Macur RA: A combination isothermal hydrogen clearance system for the measurement of local tissue flow. *Ieee Trans Biomde Eng BME* **28**: 265~271, 1981
- 13) Pasztor E, Symon L, Dorsch NW and Branston NM: The hydrogen clearance method in assessment of blood in cortex, white matter and deep nuclei of baboons. *Stroke* **4**: 556~567, 1973
- 14) Ketty SS: Measurement of regional circulation by the local clearance of radioactive sodium. *Am Heart J* **38**: 321~328, 1949
- 15) 今井一洋：高速液体クロマトグラフィー検出系の高感度化。薬誌 **103**(12): 1225~1242, 1983
- 16) 清水一広・川添祥一・白石美津子・旭 哲也・高速液体クロマトグラフィーによる生体中のアデノシン-5'-トリホスフェートの定量。薬誌 **103**(12): 1323~1326, 1983
- 17) Atkinson DE: The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochem J*: 4030~4034, 1968
- 18) Espinel CH and Gregory AW: Differential diagnosis of acute renal failure. *Clin Nephrol* **13**: 73~77, 1980
- 19) Carriere S, Thorburn GD, O'Morchoe CCC and Barger CA: Intrarenal distribution of blood flow in dogs during hemorrhagic hypotension. *Circ Res* **19**: 167~179, 1966
- 20) Aukland K and Wolgast M: Effect of hemorrhagic and retransfusion on intrarenal distribution of blood flow in dogs. *J Clin Invest* **47**: 488~501, 1968
- 21) Stein JH, Boonjarern S, Mauk RC and Ferris TF: Mechanism of the redistribution of renal cortical blood flow during hemorrhagic hypotension in the dog. *J Clin Invest* **52**: 39~47, 1973
- 22) Passmore JC and Baker CH: Intrarenal blood

- flow distribution in irreversible hemorrhagic shock in dogs. *J Trauma* **13**: 1066~1074, 1973
- 23) Hope A, Clausen G and Rosivall L: Total and local renal blood flow and filtration in the rat during reduced renal arterial blood pressure. *Acta Physiol Scand* **13**: 455~463, 1981
- 24) Navar LG: Renal autoregulation: Perspectives from whole kidney and single nephron studies. *Am J Physiol* **234**: F357~F370, 1978
- 25) Bore PJ, Papatheofanis I and Sells RA: Adenosine triphosphate regeneration and function in the rat kidney following warm ischemia. *Transplantation* **27**: 235~237, 1979
- 26) Hems DA and Brosnan JT: Effects of ischemia on content of metabolites in rat liver and kidney in vivo. *Biochem J* **120**: 105~111, 1970
- 27) Kahng MW, Berezesky IK and Trump BF: Metabolic and ultrastructural response of rat kidney cortex to in vitro ischemia. *Exp Molec Pathol* **29**: 183~198, 1978
- 28) Farber JL: Membrane injury and calcium homeostasis in the pathogenesis of coagulative necrosis. *Lab Invest* **47**: 114~123, 1982
- 29) Chaudry IH: Cellular mechanisms in shock and ischemia and their correction. *Am J Physiol* **245**: R117~R134, 1983
- 30) 嵐原康行: 肝ミトコンドリア機能よりみた, 出血性ショック及びエンドトキシンショックにおける実験的研究. *Arch Jpn Chir* **51**(3): 460~480, 1982
- 31) Farber E: ATP and cell integrity. *Fed Proc* **32**: 1534~1539, 1973
- 32) Brezis M, Shanly P, Silva P, Spokes K, Lear S, Epstein FH and Rosen S: Disparate mechanisms for hypoxic cell injury in different nephron segments. *J Clin Invest* **76**: 1796~1806, 1985
- (1987年3月9日迅速掲載受付)