

氏 名 (本籍)	わ 若	こう 生	ゆたか 豊
学 位 の 種 類	農	学	博 士
学 位 記 番 号	農 博 第	3 2 1	号
学位授与年月日	昭和 59 年 3 月 27 日		
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当		
研 究 科 専 攻	東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 食糧化学専攻		
学 位 論 文 題 目	糖代謝の発達に及ぼす胎児期栄養環境に関する研究 とくに糖尿病母体よりの出生児(仔)・ IDMを中心に		
論 文 審 査 委 員	(主 査)		
	教授 木 村 修 一	教授 金 田 尚 志	
		教授 津 田 恒 之	

論文内容要旨

序 論

発達初期の栄養環境がその後の発育や生理機能などへ、どのような影響を及ぼすかを明らかにすることは栄養学における課題のひとつである。胎児(仔)は栄養供給を母体血に依存しており、したがって母体の内部環境に変化が生じた場合、胎児(仔)の栄養環境は影響を受けることとなる。本研究は、糖尿病母体から生れる新生児(仔) (Infants of Diabetic Mothers, IDM) を取り上げ、高血糖環境が発達初期の糖代謝へ及ぼす影響について検討を行ない、栄養環境が胎仔およびその後の成育における生理機能の発達へいかに影響を及ぼすか、そしてそのメカニズムを知る手がかりを得ようとしたものである。

第 I 章 実験的糖尿病ラットの作成および糖尿病母体よりの出生仔の

基本的な特徴

実験的糖尿動物およびその胎仔の作成の検討を行なったところ、ストレプトゾトシンによりあらかじめ母体を軽度の糖尿にすることにより比較的緩やかな条件づけで胎仔の栄養環境を変えることが可能であることが確かめられた。すなわち母体血および胎仔血中の代謝産物を測定した結果、糖尿病母体とその胎仔で高血糖が観察された(表1)。

IDM ではリッターサイズの減少が認められ、また脾臓重量の増加および血中インシュリンレベルの上昇が観察され、脾機能の亢進していることが明らかとなったが(表2)、体重には正常胎仔と比べ変化はなかった。

第 II 章 糖尿病母体よりの出生仔 (IDM) における糖代謝の発達および

特徴について

糖新生は出生後出現し、新生仔の血糖維持の機能にかかわることとなる。この間新生仔は生理的な低血糖に陥るが、IDMは重症の低血糖症へ陥る頻度の高いことが臨床的に知られており、従来その原因にはIDMの高インシュリンが指摘されている。一方この時期の糖新生能は低血糖の程度を左右するもう一つの要因となっていると考えられ、本実験においては糖新生機能の発現へ胎仔期高血糖環境がどのように影響するかについて検討した。その結果IDMでは低血糖に陥る時刻および低血糖よりの回復する時刻が正常胎仔と比べ遅延していることが観察され(図1)、さらに糖新生の律速酵素のひとつであるPhosphoenolpyruvate Carboxykinase (PEPCK) 活性の上昇の開始が遅れていることが明らかとなった。活性上昇の遅延の原因について、グルコース、インシュリンおよびグルカゴンなどの投与実験を行ない検討した結果、IDMでは出生時の高血糖が

グルカゴン分泌の開始を遅れさせ、PEPCKの誘導を遅れさせていることが推測された。すなわち糖尿病母体の発育環境はその新生仔の糖新生機能開始のタイミングへ影響していることが明らかとなった。

次にIDMの糖利用能の特徴について、正常胎仔および幼若動物とを比較することにより検討を行なった。帝王切開により摘出した妊娠21日目の正常胎仔とIDMについて耐糖能を比較したところ、胎仔では幼若動物と比べ一般に弱いことが分かったが、IDMでは正常胎仔と比べて耐糖能の亢進していることが認められた(図2)。さらに *in vitro* で横隔膜組織のグルコースからCO₂への変換能およびグリコーゲンへの取り込みを検討したところいずれもIDMで顕著に増大していることが観察され、末梢組織において糖利用能の亢進していることが示唆された(図3,4)。しかしこれらに対するインシュリン応答性には正常胎仔とIDMの間に違いは認められなかった。これらの結果より新生仔の環境の変動に対する代謝的応答は幼若動物のそれとは質的あるいは量的に異なっていることが示唆された。

第Ⅱ章 胎仔期高血糖環境による代謝変動の機序について

その1. 糖の取り込み過程について

筋組織の糖の取り込み過程は、組織の糖利用制御の主要な機構であると同時に、生体全体の血糖の恒常性維持などへ貢献していることが知られており、エネルギー代謝の中で重要な位置を占めている。そこでIDMの糖利用能の亢進について、糖の取り込みの側面より検討した。横隔膜組織における糖の膜透過速度を2-デオキシグルコースの取り込みで比較を行なったが、組織中の遊離のデオキシグルコース量には差は認められず、膜透過速度は変化していない可能性が示された(図5)。しかしIDMで横隔膜組織のヘキソキナーゼ(HK)活性の上昇が観察され膜透過以後のリン酸化の段階が糖利用亢進の要因のひとつとなっていることが示された(表3)。血糖のホメオスタシスなどへ直接的に関与している臓器は比較的限られており、上述の筋組織以外では肝臓、脂肪組織であるが、ラット胎仔では脂肪組織は著しく未発達であり、そこで次に肝臓の糖処理能力について検討した。肝臓での糖の取り込みはリン酸化過程が律速段階と考えられており、ヘキソキナーゼ活性について検討したところ、IDMで活性が上昇しており(表3)、それはHKアイソザイムⅡ型の活性上昇によることが明らかとなった(図6,表4)。Ⅱ型は比較的K_mが大きいことより、胎仔肝臓では適応的な活性変動を介して糖利用制御に関与しておりグルコキナーゼ類似の役割を果たしている可能性がある。

その2. IDMにおける糖利用亢進の内分泌学的側面からの検討

ーインシュリン応答性についてー

筋組織などの末梢組織では糖の膜透過過程はインシュリンの作用点となっており、インシュリン濃度およびそれに対する応答性が制禦的役割を果たしていると考えられる。既にIDMではインシュリンレベルの上昇が認められ、糖利用能の亢進へ関与していることが示唆されており、さらにインシュリン応答性も関与していることが考えられる。そこでIDMの糖の膜透過に対するインシュリン感受性を正常胎仔および幼若動物のそれらと比較することにより検討した。その結果胎仔は幼若動物と比べ栄養環境の変動に対する感受性の対応は低いことが示された(表5)。すなわち幼若動物では食餌中のグルコースの比率を変えること、たとえば高糖質食で飼育することでインシュリン感受性の高まっていることが観察されたが、胎仔では臍帯血のグルコース濃度の異なっている、IDMにおいてもインシュリン感受性は正常胎仔と比べ違いは観察されなかった。また糖の膜透過とはインシュリン作用機構の異なると考えられるグリコーゲン合成能についても同様に違いは認められず、糖利用に対するインシュリン感受性あるいは応答性の変化をIDMで観察することはできなかった(表6)。これは胎仔のインシュリン受容機構の未熟さが原因となっていることが考えられ、次にインシュリン応答性を規定する基本的要素のひとつであるインシュリン受容体の数および性質が胎仔においてはどのような状態であるのかを、モノサイトおよび赤血球の受容体について検討した。その結果胎仔のモノサイトへのインシュリン結合量は幼若動物よりむしろ胎仔で多いことが確認された(図7)。また发育環境の違いによる影響は、高血糖環境で成育したIDMでインシュリン結合量の上昇していることが観察され、母体環境の変動により胎仔のインシュリン受容体は変化することが明らかとなった。さらに親和性を赤血球のインシュリン受容体について検討したところ、IDMと正常胎仔は同様のAverage affinity profileを描き親和性には違いのないことが明らかとなった(図8)。しかしこれらのモノサイトや赤血球でのインシュリン結合量の変化は末梢組織の応答の変化へ直接結びつくものではなく、作用発現機構も未熟である可能性が示唆された。

第IV章 総合的考察

子宮内の栄養環境が周産期の胎仔あるいは新生仔の糖代謝およびその調節機構へどのように関与しているのかを実験的糠尿ラットより生まれた仔(IDM)を取り上げ検討し、従来の知見をもとに以下のように考察した。

糖尿病母体より生れた仔においては出生後、低血糖症に陥ることが知られているが、この原因のひとつは出生時の高血糖が糖新生の機能の開始を遅れさせることによるものであり、糖新生の機能開始のタイミングが发育環境により影響されることが示された。またIDMでは耐糖能の亢

進が認められ糖利用能の亢進していることが考えられた。この機序について肝臓および末梢組織（筋組織）について検討したところ、肝臓ではヘキソキナーゼの活性およびアイソザイムパターンに変化が認められた。すなわち比較的 K_m の大であるHK II型活性が上昇しており、血糖のホメオスタシスなど個体レベルでの糖利用制御へ関与していることが考えられた。また筋組織など末梢組織の糖の膜透過過程は、糖の取り込みの律速段階であり、かつインシュリンの作用点でもあることより、もうひとつの血糖のホメオスタシスの主要な機構であるが、これらは胎仔期より幼若期の間完成されるものであり、したがって発達過程にある胎仔ではIDMの横隔膜組織においてグルコースの酸化能やグリコーゲン合成能などの糖利用能の亢進が観察されるものの、糖の膜透過速度およびそのインシュリン感受性には、はっきりした変化は認められず、この時期（妊娠21~22日）の膜透過過程は糖利用能の拡大の主要な制御過程にはなっていないことが示唆された。しかしIDMの横隔膜組織ではヘキソキナーゼ活性の上昇していることが観察され、これが糖利用能の亢進へ寄与していることが考えられた。また胎仔では糖利用に対するインシュリン応答性が低いにもかかわらずインシュリン受容体の多い可能性が示され、ホルモンの作用発現過程が未熟であることが考えられた。

胎仔・新生仔の栄養環境の変動に対する代謝的応答を観察したが、これらのエネルギー代謝の恒常性維持能力は極めて弱く、子宮内環境の恒常性がこの未熟さを補っており、したがって子宮内環境の恒常性が破綻するような場合、胎仔の分化・発達は重大な影響を受けるものと考えられる。

Table 1. Circulating energy substrates and insulin concentration in the normal, diabetic pregnant rats and their fetuses.

Substrates	Pregnant rats		Fetuses	
	Normal	Diabetic	Normal	IDM
Glucose, mM	8.75 ± 0.69 (9)	21.84 ± 4.16** (8)	5.73 ± 0.57 (5)	18.87 ± 2.00** (6)
Lactate, mM	2.18 ± 0.29 (5)	2.80 ± 0.11** (5)	10.76 ± 0.74 (5)	14.07 ± 1.69* (5)
Pyruvate, μM	129 ± 17 (5)	154 ± 38 (5)	240 ± 9 (5)	261 ± 23 (5)
Free fatty acid, μM	312 ± 89 (7)	571 ± 128** (5)	334 ± 75 (5)	484 ± 73** (5)

Values are means ± SD, of the number of observation in parentheses. *P<0.01, **P<0.005 compared to normal pregnant rats. †P<0.01, ††P<0.005 compared to normal fetuses.

Table 2. Body and pancreas weights, litter size, and insulin level in normal fetuses and IDM.

Observation	Normal	IDM
Litter size (pups/litter)	14.2 ± 2.0 (6)	11.4 ± 1.5* (7)
Average fetal wt ¹ (g/pup)	5.20 ± 0.31 (43)	5.22 ± 0.44 (49)
Pancreas wt (mg/g body wt)	4.73 ± 0.32 (6)	5.93 ± 0.34* (6)
Insulin (μU/ml)	81.3 ± 8.5 (6)	125.0 ± 18.3* (6)

Values are means ± SD, of the number of observation in parentheses. Significantly different from normal group, *P<0.005. ¹21 th day of gestation.

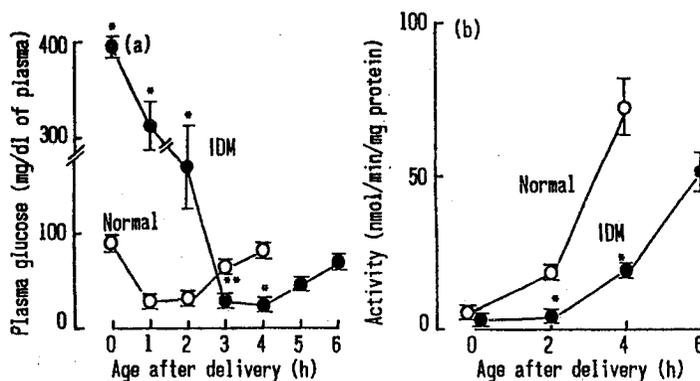


Fig. 1. Plasma glucose (a) and PEPC activity (b) as a function of age in caesarian delivered fetuses from normal (○) and diabetic (●) pregnant rats. Each point represents the mean ± SD for five determinations. Significantly different from normal group, * (P<0.005), ** (P<0.01).

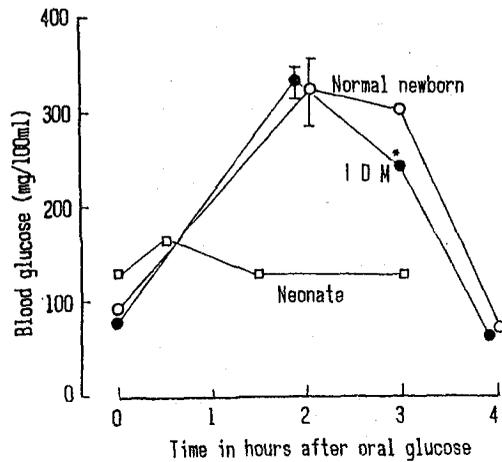


Fig. 2. Glucose tolerance tests in normal newborns (○), IDH (●) and 22-day old (□) rats. Blood glucose response to oral load of glucose (5mg/g body wet.). Each point represents the mean of five to three determinations.

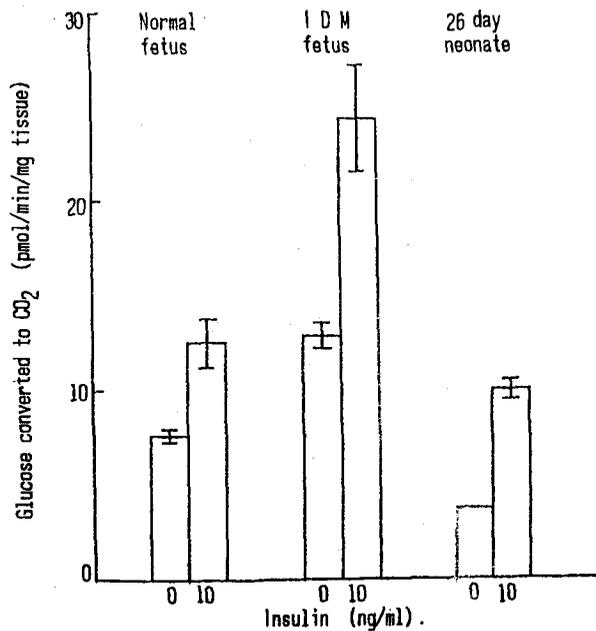


Fig. 3. The conversion (1-¹⁴C)glucose to ¹⁴CO₂ in rat diaphragms from fetuses of normal and diabetic pregnant rats, and 26-day neonate. Values represent mean ± SD for four to five determinations.

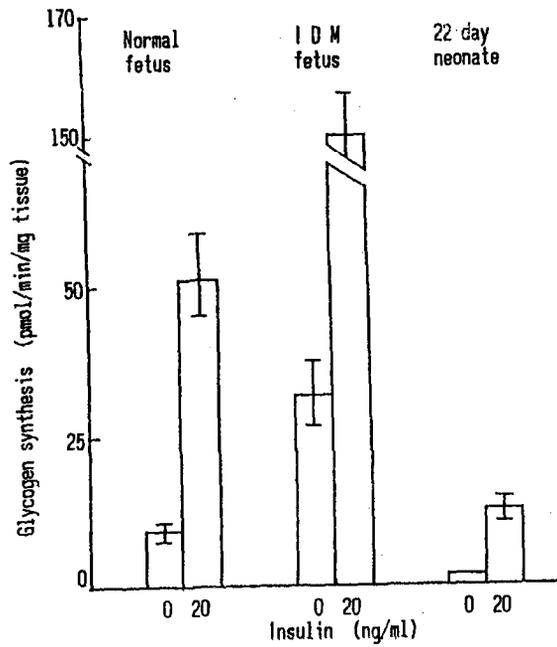


Fig. 4. The incorporation of (1-¹⁴C)glucose into glycogen in rat diaphragms from fetuses of normal and diabetic pregnant rats, and 22 day neonate. Values represent mean \pm SD for four to five determinations.

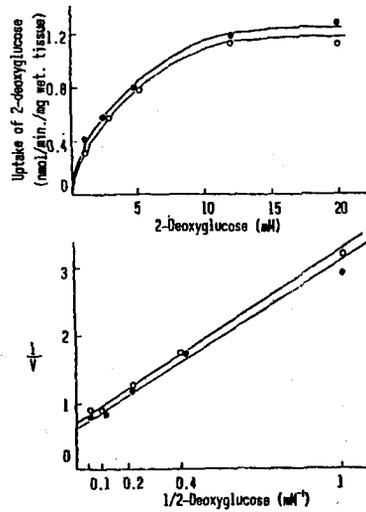


Fig. 5. Deoxyglucose uptake by diaphragms from normal fetuses (normal) and fetuses of diabetic pregnant rats (IDM). Each point represents the average of the three determinations. ○ normal, ● IDM

Table 3 Hepatic and diaphragm hexokinase activity
21-day fetuses of normal and diabetic pregnant rats

	Liver		Diaphragm	
	(nmol/min/mg prot.)			
Normal fetus	28.62 ± 1.63 (10)	16.84 ± 1.75 (5)		
I D M	37.52 ± 3.81* (10)	24.16 ± 4.43* (5)		

Values are means ± SD of the number of observations in parentheses. Significantly different from normal group, *(P<0.01), **(P<0.005).

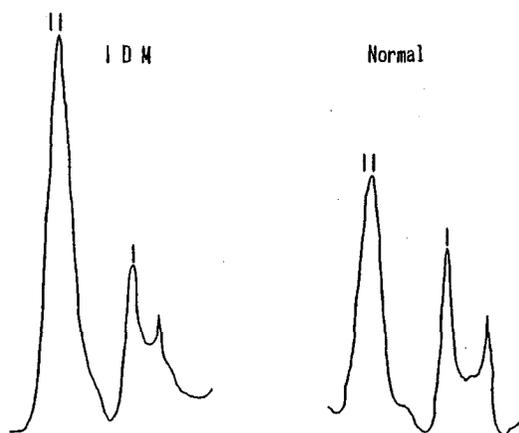


Fig. 6. Densitometric tracings of hexokinase isozyme bands on cellulose acetate membranes of normal and IDM fetal liver.

Table 4. Distribution of hexokinase isozyme (%)

Isozyme	Liver		Diaphragm	
	I	II	I	II
Normal fetus	36.0 ± 5.2	64.0 ± 5.1	24.9 ± 3.0	75.1 ± 2.9
I D M	23.4 ± 6.9*	76.6 ± 6.9*	22.9 ± 3.5	77.1 ± 3.5

Values are means ± SD of four determinations. Significantly different from normal group, *(P<0.025).

Table 5. Effect of age and nutrition on the response of deoxyglucose uptake to insulin.

Age	Treatment	Insulin	Uptake pmol/min/mg	% increase
22 day Fetus	Normal	-	1103.9 ± 209.8	192
		+	2110.9 ± 423.9	
	I D M	-	1180.7 ± 78.1	177
		+	2094.5 ± 136.2	
22 day Neonate		-	332.4 ± 35.2	326
		+	1084.0 ± 227.6	
26 day Neonate	Carbohydrate diet	-	378.0 ± 37.0*	346
		+	1306.3 ± 59.6*	
	Fat diet	-	288.4 ± 20.1	289
		+	834.4 ± 67.7	

Each value represents mean ± SD for four to five determinations. * P<0.01 compared to fat diet group.

Table 6. Effect of age and nutrition on the response of glycogen synthesis to insulin.

Age	Treatment	Insulin	Incorporation pmol/min/mg	% increase
22 day Fetus	Normal	-	9.39 ± 2.99	542
		+	50.90 ± 16.67	
	I D M	-	32.15 ± 10.19*	465
		+	149.46 ± 13.82*	
22 day Neonate		-	1.491 ± 0.541	856
		+	12.770 ± 3.994	
26 day Neonate	Carbohydrate diet	-	1.721 ± 0.195	814
		+	14.007 ± 3.403	
	Fat diet	-	1.177 ± 0.316	825
		+	9.710 ± 1.429	

Each value represents mean ± SD for four to five determinations. * P<0.005 compared to normal group.

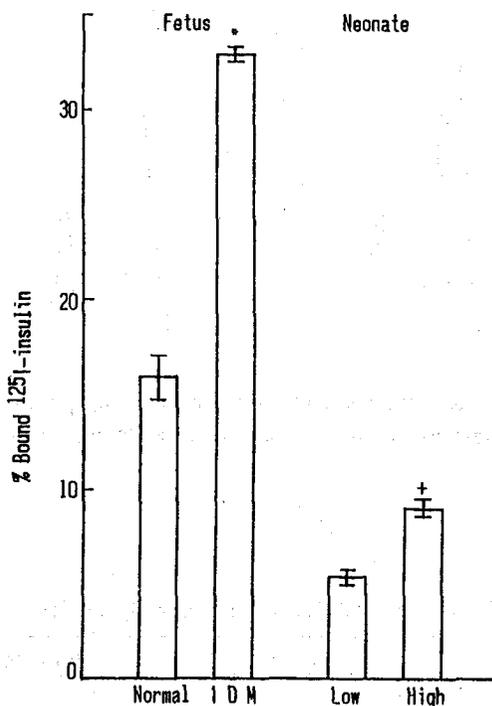


Fig. 7. ¹²⁵I-insulin (3-5 ng insulin/ml) binding to mononuclear cells from normal, IDM fetal rats and high glucose or low glucose fed neonatal rats. All data were normalized to 10⁷ cells. Each values represent the mean of four determinations. *P<0.005 compared to normal fetus, †P<0.005 compared to low glucose fed group.

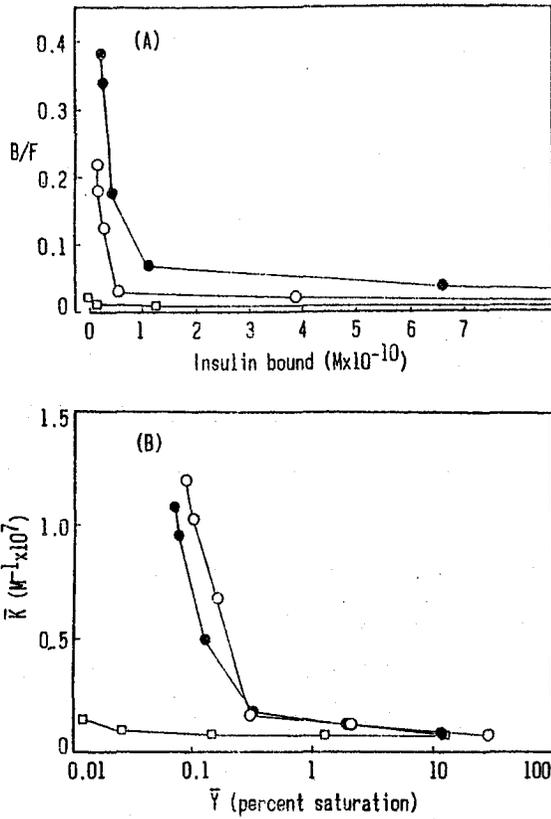


Fig. 8 Scatchard analysis (A) of insulin to normal (○), IDM (●) fetal and adult (□) rat erythrocyte. Average affinity profiles (B) for normal (○), IDM (●) and adult (□) rat erythrocyte.

審 査 結 果 の 要 旨

発達初期の栄養環境がその後の発育や生理機能などに、どのような影響を及ぼすかを明らかにすることは、栄養学における課題の一つといえよう。

胎児はその栄養のすべてを母体血に依存しており、母体の内部環境の変化に大きく左右されることは容易に推測できる、事実糖尿病の母親から生れた子供（Infant of Diabetic Mothers : IDM）にはしばしば低血糖症その他の障害が観察される。しかし胎児期における栄養学的研究は、種々の困難を伴うために、その数も少なく明らかでない点も多い。

本研究は実験動物を用いて、この問題にとりくみ、高血糖という母体環境が胎児および新生児期の生理機能の発達にいかなる影響を与えるのか、そしてまたどのようなメカニズムがそこにあるかを明らかにしようとして企てられたものである。

その内容を概略すれば、まずストレプトゾトシン投与による実験的糖尿病ラットを作成し、この糖尿病母体よりえた IDM が高血糖を示し、すい臓機能を昇進しているなどの特徴をもつことをたしかめた。

次にこの IDM における糖代謝の発達およびその特徴を検討した。その結果 IDM が低血糖に陥る原因の一つは出生時の高血糖条件による糖新生開始の遅延によることを示した。また IDM では耐糖能の昇進がみられるが、肝臓などにおける観察でヘキソキナーゼ活性の上昇が糖利用能を昇進させていることがその主要な機序であることを明らかにした。

このばあいアイソザイムパターンでみるとヘキソキナーゼ I I 型の上昇が著しいことを見出した。この時期では末梢組織への糖の膜透過の過程に大きな差がないことも分った。

さらに IDM では横隔膜組織などの観察で、グルコースの酸化能やグリコーゲン合成能などの昇進がみられるものの、膜透過過程やインシュリン感受性にははっきりした変化がないことを示した。しかしインシュリン受容体は多い可能性があることを見出し、インシュリンの作用発現過程が未熟であることを示唆した。

以上のように、本研究は IDM に関する基本的ないくつかの知見を示し、胎児、新生児の栄養の分野における研究の進展に寄与するところ大である。よって著者に農学博士の学位を授与する資格があると認定した。