

氏 名(本籍) 小 高 裕 之

学位の種類 博士 (農 学)

学位記番号 農 第 4 1 5 号

学位授与年月日 平 成 3 年 2 月 14 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

学位論文題目 インスリン非依存型糖尿病の発症を左右
する環境因子に関する研究
— 肥満, 蔗糖摂取および食餌制限の影響 —

論文審査委員(主 査) 教 授 木 村 修 一
教 授 安 元 健
教 授 藤 本 健四郎

論文内容要旨

糖尿病の大部分は遺伝的素因を基盤として、それに環境因子が加わって発症すると考えられている。環境因子の中でも、肥満をもたらす過食あるいは膵に過剰の刺激を与える蔗糖摂取などは糖尿病発症を促進する重要な因子とされている。しかし、ヒトにおいては環境因子が複雑に絡みあっているために、個々の因子の役割について正確に判断することは困難な場合が多い。代謝面から眺めると、糖尿病では膵からのインスリン分泌障害と標的組織でのインスリン作用不足が認められるが、いずれが糖尿病の成因として一義的な役割を果たしているのかは未だに不明である。この最大の理由として、膵は生検が困難な組織の一つであることに加えて、死後の自己消化が急速に進むため、実態を正確に判断しうる標本が得難いことが挙げられる。これらの問題に対して有用な知見を提供するのが実験動物であることは言うまでもない。本研究ではヒト糖尿病の8-9割を占めるインスリン非依存型糖尿病(Non-insulin-dependent diabetes mellitus, NIDDM)の発症と進展における膵機能の意義を明らかにするため、Wistarラットの中から耐糖能の低い個体を選択交配して作成された非肥満NIDDMモデルの自然発症糖尿病(GK)ラットを用いて、肥満、蔗糖摂取および食餌制限など諸種の環境下における膵機能の変化を検討した。

第1章 肥満の催糖尿病作用

第1節 自然発症糖尿病(GK)ラットの糖尿病に及ぼす哺育仔数の影響

哺育仔数を通常の8匹から4匹に減らして飼育したGKおよび対照のWistarラットいずれの体重および脂肪組織重量も増加したが、16匹に増やして飼育した場合は減少した(図1のAおよびB)。脂肪組織重量を部位別に比較すると、GKラットの4匹群では内臓脂肪、Wistarラットの4匹群では副睾丸周囲脂肪の増加が著しかった。GKラットの血漿グルコース値は8匹群と16匹群との間に差はなく、いずれもWistarラットに

比べて軽度の高値にとどまったが、4匹群の場合は9週齢以後上昇し、13週齢では300mg/dlを超えた(図1のC)。血漿インスリン値もGKラットの4匹群において最も高値を示した(図1のD)。GKラットの膵インスリン含量はWistarラットよりも少なく、その程度は4匹群において著しかったが、Wistarラットの4匹群では他に比べて多かった。GKラットでは膵インスリン含量と血漿グルコース値との間に有意な負の相関が認められた(図2)。以上の結果から、哺育期の過栄養は脂肪蓄積、殊に糖代謝異常と直接関係するといわれる内臓脂肪の蓄積を介してインスリン抵抗性を増大させてインスリン要求量の増加を引き起こし、これが膵機能を上回ったために高血糖が発症したと考えられる。

第2節 Monosodium glutamate投与によって視床下部性肥満を発症した自然発症糖尿病(GK)ラットにおける糖尿病の増悪

生後1から5日目まで2 mg/kgのMonosodium glutamate(MSG)を投与したGKおよびWistarラットいずれにおいても、成熟後過食を伴わずに脂肪組織重量が増加した(図3)。同時に血漿インスリン値の上昇が認められた(図4)。血漿グルコース値はMSG肥満によってGKラットでは上昇したが、Wistarラットでは上昇しなかった(図4)。膵インスリン含量はMSG肥満のGKラットでは著しく低下したが、Wistarラットの場合は軽度に増加した(図4)。GKラットでは末梢組織のインスリン感受性低下が認められ、MSG肥満によって増強された(図5)。以上の結果から、MSG肥満は末梢組織のインスリン耐性を増大させることによってインスリン要求量の増加を引き起こすが、GKラットの膵はインスリン産生能に限界があり、血糖調節に必要なインスリン量を満たすことができないために高血糖が発症したと考えられる。

第Ⅱ章 蔗糖の催糖尿病作用

第1節 自然発症糖尿病(GK)ラットにおける高蔗糖食の糖尿病増悪作用

5週齢GKおよびWistarラットに市販の天然飼料(CE-2)あるいは蔗糖を炭水化物源とする半合成飼料(高蔗糖食)を21週間摂取させた。高蔗糖食によって体重、脂肪組織重量および血漿インスリン値は両ラットともに増加したが、血漿グルコース値はGKラットにおいてのみ上昇した(表1)。高蔗糖食によってGKラットの膵インスリン含量は一層減少し、神経障害の指標として測定した神経伝導速度もGKラットでは有意に遅延した(表1)。蔗糖のフルクトース骨格は肝におけるインスリン耐性を増大させ、グルコース骨格はインスリン分泌を刺激し、インスリン要求量を増大させるので、膵機能障害を持つGKラットでは高蔗糖食摂取によって糖尿病性変化が増強したと考えられる。

第2節 自然発症糖尿病(GK)ラットにおける蔗糖の過剰摂取による糖尿病の増悪

ラットは甘味に対する嗜好性が高いので、餌と水の他、蔗糖溶液を摂取できる条件下で飼育するとエネルギーの過剰摂取を起こす。この方法を用いて9週齢のGKおよびWistarラットを31週間飼育した。Wistarラットでは蔗糖溶液摂取によって血漿グルコース値の軽度上昇とともに、血漿インスリン値が上昇し、これらの持続は膵インスリン含量の増加傾向をもたらした(図6および7)。同時に脂肪組織重量も著しく増加した(図8)。また、膵の組織学的検索によりラ島数の増加と肥大が認められた。GKラットにおいても蔗糖溶液摂取の初期段階では血漿グルコース値の上昇と膵インスリン含量の減少が起きた以外はWistarラットと類似の変化が認められた。しかし、蔗糖溶液の摂取が長期に及んだ場合には、膵インスリン含量は著しく減少し、血漿インスリン値の低下とともに脂肪組織重量も著しく低下し、グルコース刺激性インスリン分泌反応も消

失した(図6-9)。膵ラ島は萎縮し、その数も減少しており、B細胞の脱顆粒が目立っていた。GKラットにおける神経伝導速度の低下も蔗糖溶液摂取によって顕著となり、この変化は神経のソルビトール含量の増加およびミオイノシトール含量の低下を伴っていた(図10)。蔗糖溶液摂取のGKラットでは、腎障害の指標として測定した尿中アルブミン排泄量は著しく増加しており、白内障の発症率も著しく増加した(図11および12)。以上の結果から、蔗糖を主としたエネルギー摂取量の増加とその持続によって、インスリン要求量が著しく増大するため、膵機能障害を持つGKラットでは能力を超える刺激が加わり、結果としてインスリン欠乏状態に陥ったと考えられる。また、高血糖の持続はGKラットにおける一連の糖尿病性合併症の発症を加速させることが分かった。

第Ⅲ章 食餌制限の抗糖尿病作用

第1節 自然発症糖尿病(GK)ラットおよびストレプトゾトシン(STZ)糖尿病ラットにおける小腸二糖類水解酵素阻害剤AO-128の糖尿病改善作用

GKラットおよびSTZ注射により膵B細胞を部分破壊して作成したNIDDMモデルラット(STZラット)に、二糖類水解酵素阻害剤AO-128を市販飼料に添加(0.005%)して与えると、いずれのラットにおいても脂肪組織重量は低下し、血漿グルコースおよび糖化ヘモグロビン値は低下した(表2)。AO-128投与のGKラットの膵インスリン含量は軽度に増加したが、STZラットでは有意な変化は認められなかった(表2)。グルコース刺激性インスリン分泌反応の障害はAO-128投与によって、STZラットにおいては正常化したが、GKラットにおいては回復しなかった(表3)。耐糖能障害の改善もGKラットよりもSTZラットの方が著明であった(表3)。以上の結果から、二糖類水解酵素阻害剤を投与し、糖の吸収を抑制することによりGKおよびSTZ

ラットの糖尿病が改善されることが分かった。しかし、その効果はラット間で異なることが分かった。

第2節 自然発症糖尿病(GK)ラットにおけるエネルギー摂取制限の糖尿病改善作用

50%エネルギー摂取制限して飼育したGKラットでは、体重増加は阻止され、脂肪組織重量は著しく低下し、飽食血糖値も低下し(表4)、グルコース刺激性インスリン分泌反応が出現した(表5)。しかし、GKラットの絶食血糖値は相変わらず高く、耐糖能障害の改善も僅かであった(表4および5)。以上の結果から、エネルギー摂取制限はGKラットにおけるインスリン分泌反応を改善することが分かった。しかし、末梢組織における糖代謝異常は根強く存続することが分かった。

第IV章 まとめ

本研究では、生体のインスリン要求量を変化させる諸種の環境条件を用い、GKラットにゆさぶりをかけることによって、本ラットの糖尿病が膵の先天性障害に起因していることを浮き彫りにすると同時に、本ラットの膵機能障害と糖代謝異常は食餌のコントロールに対して抵抗性を持つことを明らかにした。ヒトNIDDMの発症においても病因、病態に不均一性がみられるが、膵機能障害が重要な役割を果たしていると考えられる。NIDDMでは膵インスリン分泌の予備能に限界があり、これが引き金となって末梢組織における糖代謝異常が起こる。環境因子はこの過程を修飾することによって糖尿病の発症に係わっている。生体内のインスリン需要と供給のバランスが崩れた時に、高血糖が発症するものと考えられ、インスリン要求量を減らすことによって供給とのバランスを保つことが糖尿病の根本的な予防と治療につながると考えられる。

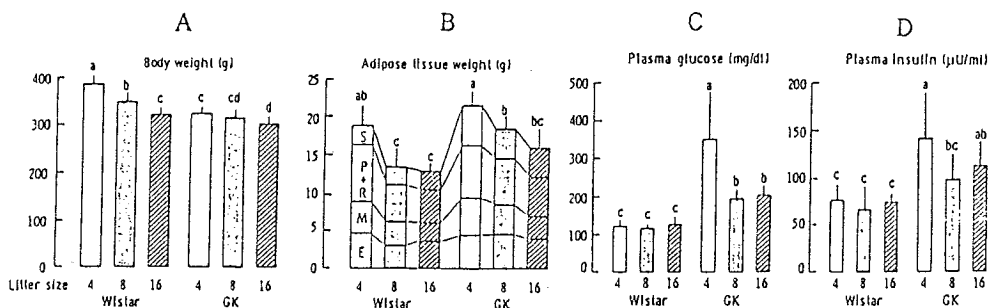


図1 哺育仔数を4、8あるいは16匹で3週齢まで飼育したWistarおよびGKラットの13週齢での体重(A)、脂肪組織重量(B)、血漿グルコース(C)および血漿インスリン値(D)。異なる記号の付いた平均値は多重検定による有意差(P<0.05)を示す。平均値±標準偏差(n=6-8)。S:皮下、P:後腹膜、R:腎周囲、M:内臓、E:副睾丸周囲。

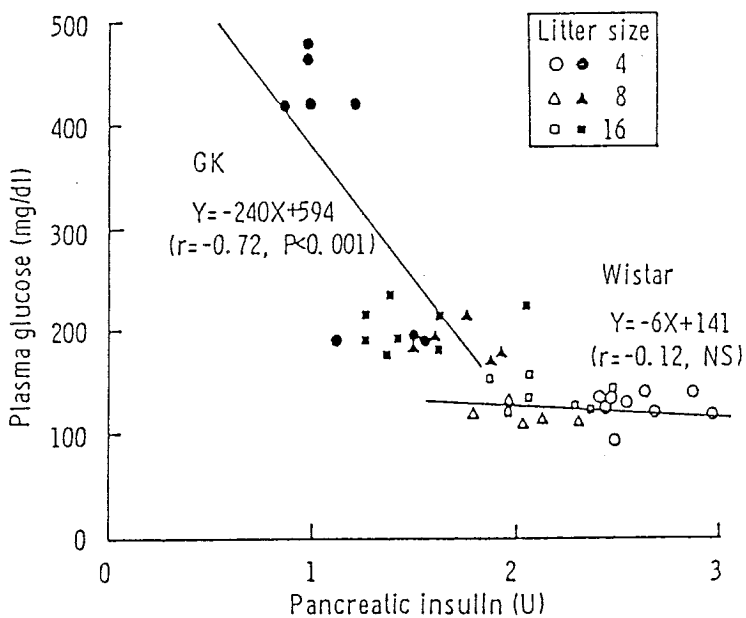


図2 哺育仔数を4、8あるいは16匹で3週齢まで飼育したWistarおよびGKラットの13週齢での飽食下の血漿グルコースと膵インスリン含量との相関。

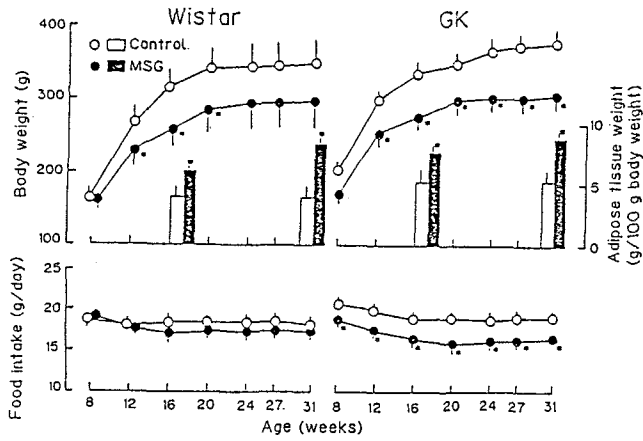


図3 WistarおよびGKラットの体重、摂食量および脂肪組織重量に及ぼすMSGの影響。*の付いた平均値はそれぞれの対照に対するt検定による有意差 ($P < 0.05$) を示す。平均値±標準偏差 ($n = 6 - 8$)。

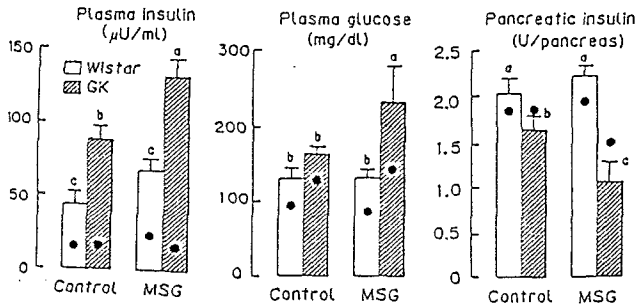


図4 WistarおよびGKラットの血漿グルコースおよびインスリン値および膵インスリン含量に及ぼすMSGの影響。カラムは飽食、黒丸は絶食下の値。異なる記号の付いた平均値は多重検定による有意差 ($P < 0.05$) を示す。平均値±標準偏差。 $n = 5$ あるいは 6 。

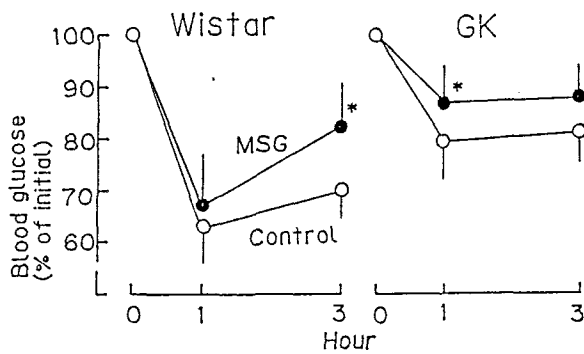


図5 MSGを投与したWistarおよびGKラットにおける31週齢でのインスリン負荷試験 (0.4 U/kg)。インスリン投与前の血糖値 (mg/dl) は、Wistarの対照群は 62 ± 6 、MSG群は 58 ± 5 、GKの対照群は 81 ± 5 、MSG群は 90 ± 11 。*の付いた平均値はそれぞれの対照群に対するt検定による有意差 ($P < 0.05$) を示す。平均値±標準偏差 ($n = 5$ あるいは 6)。

表1 高蔗糖食を21週間与えたWistarおよびGKラットで得られた試験成績

	Wistar		GK	
	対照	高蔗糖食	対照	高蔗糖食
体重 (g)	396±32 ^{b,c}	441±21 ^a	367±24 ^c	410±19 ^b
副腎丸周囲脂肪組織重量 (g/100 g体重)	1.35±0.18 ^b	1.86±0.06 ^a	1.11±0.16 ^c	1.44±0.19 ^b
血漿グルコース (mg/dl)	124±3 ^c	130±9 ^c	204±15 ^b	221±13 ^a
血漿インスリン (μU/ml)	42±9 ^b	60±20 ^a	56±16 ^{a,b}	72±14 ^a
膵インスリン (U/g)	2.07±0.20 ^a	1.88±0.48 ^a	1.42±0.23 ^b	1.05±0.25 ^c
尾神経伝導速度 (m/秒)	45.3±3.0 ^a	43.6±2.2 ^a	42.2±2.2 ^{a,b}	39.7±3.8 ^b

5週齢雄ラットに市販飼料あるいは高蔗糖食を21週間与え、飽食下で屠殺、解剖した。初体重はWistarラットが100±5 g、GKラットが107±16 g。異なる記号の付いた平均値は多重検定による有意差 (P<0.05) を示す。平均値±標準偏差 (n=7-8)。

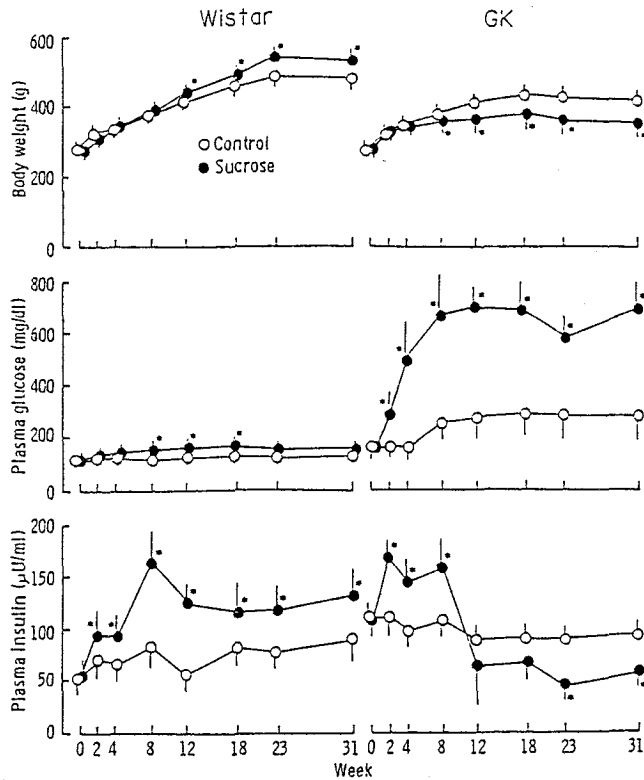


図6 蔗糖溶液を与えたWistarおよびGKラットの体重、血漿グルコースとインスリンの変化。9週齢雄ラットに餌と水、あるいは餌、水と30%蔗糖溶液を31週間与えた。*の付いた平均値はそれぞれの対照に対するt検定による有意差 (P<0.05) を示す。平均値±標準偏差 (n=5-16)。

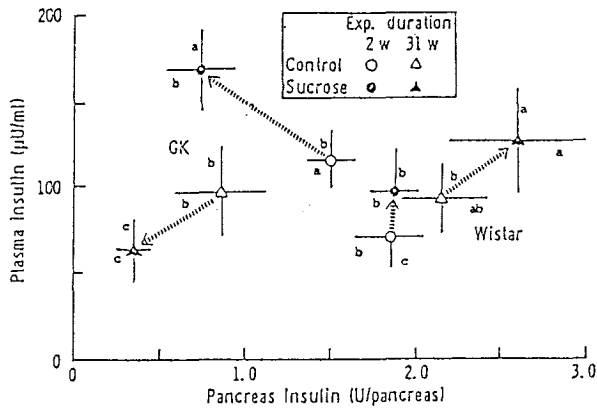


図7 蔗糖溶液を与えたWistarおよびGKラットの膵インスリンと血漿インスリンとの関係。9週齢雄ラットを2あるいは31週間飼育し、飽食下でインスリンを測定した。横棒に付した記号が異なる場合は膵の、縦棒の場合は血漿のインスリンの有意差 ($P < 0.05$) を示す。平均値±標準偏差 ($n=5$ あるいは6)。

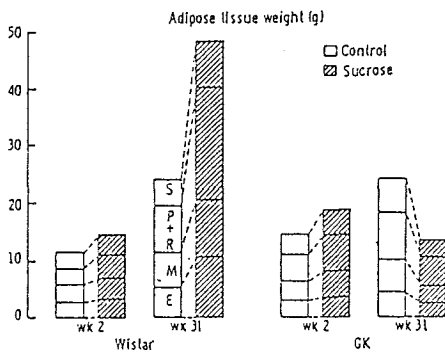


図8 蔗糖溶液を与えたWistarおよびGKラットの脂肪組織重量の変化。9週齢雄ラットを2あるいは31週間飼育した。値は5-6匹の平均を示す。S:皮下、P:腎周囲、R:後腹膜、M:内蔵、E:副睾丸周囲。

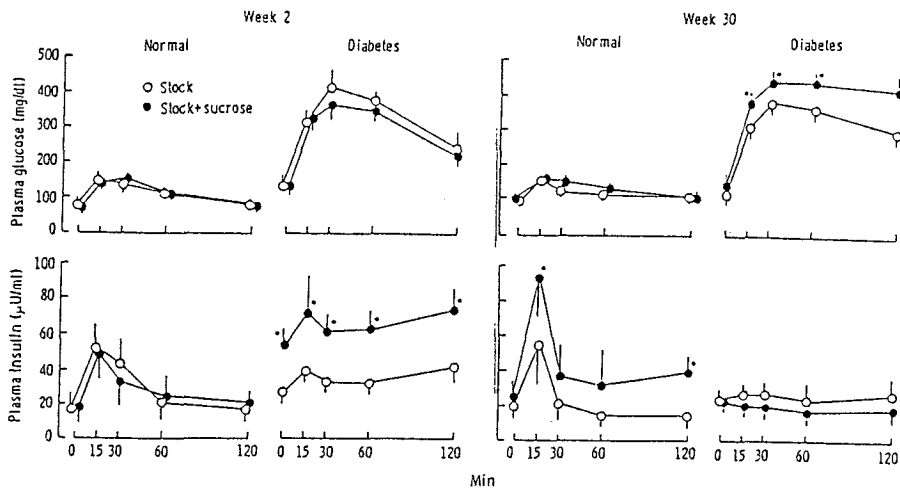


図9 蔗糖溶液を与えたWistarおよびGKラットにおける経口糖負荷試験。9週齢雄ラットを2あるいは30週間飼育後、20時間絶食(蔗糖溶液も除く)してから1 g/kgのグルコースを経口投与した。*は対照に対するt検定による有意差 ($P < 0.05$) を示す。平均値±標準偏差 ($n=5$ あるいは6)。

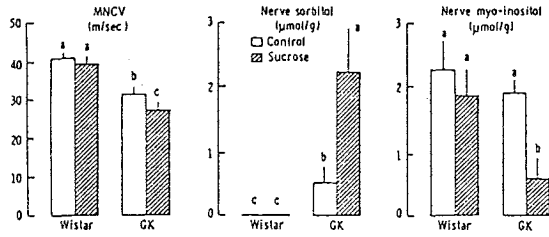


図10 蔗糖溶液を与えたWistarおよびGKラットの尾神経伝導速度と坐骨神経糖アルコール含量。9週齢雄ラットを31週間飼育した。異なる記号の付いた平均値は多重検定による有意差 ($P < 0.05$) を示す。平均値±標準偏差 ($n = 5$ あるいは6)。

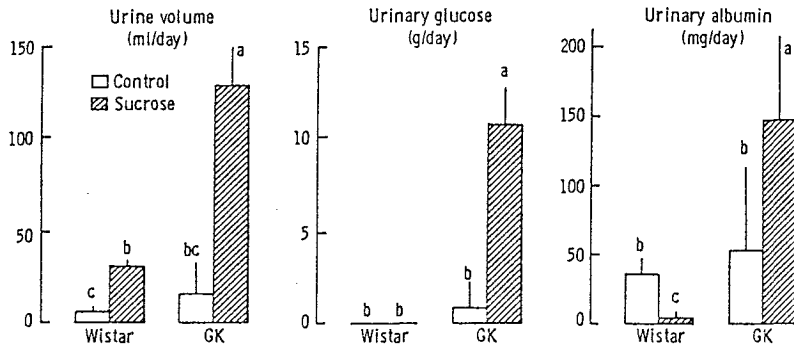


図11 蔗糖溶液を与えたWistarおよびGKラットの尿量、および尿中グルコースおよびアルブミン排泄量。9週齢雄ラットを27週間飼育した後、代謝ケージで3日間飼育した。異なる記号の付いた平均値は多重検定による有意差 ($P < 0.05$) を示す。平均値±標準偏差 ($n = 5$ あるいは6)。

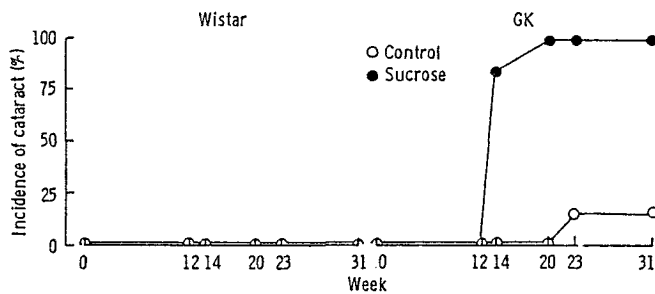


図12 蔗糖溶液を与えたWistarおよびGKラットの白内障の発症率。9週齢雄ラットを31週間飼育した。 $n = 5$ あるいは6。

表2 小腸二糖類水解酵素阻害剤AO-128を4週間与えたGK、STZおよび対照のVistarラットで得られた試験成績

試験群 使用動物数	Vistar		GK		STZ	
	対照	AO-128	対照	AO-128	対照	AO-128
	5	6	6	7	9	9
初体重 (g)	221±9	219±12	207±22	206±19	182±12	183±10
終体重 (g)	293±23	256±22	297±21	256±17*	236±14	219±6*
体重増加量 (g/4週間)	69±15	38±10*	90±9	50±5**	54±9	36±10*
摂食量 (g/4週間)	484±33	427±34*	535±43	460±38*	456±22	415±34*
食餌効率 (%)	12.4±4.4	8.7±1.8	16.8±2.3	10.9±1.6**	11.8±1.8	8.6±2.4*
薬物摂取量 (mg/kg/日)	0	3.1±0.1**	0	3.3±0.2**	0	3.6±0.3**
副腎丸周囲脂肪組織 (mg/100g 体重)	947±87	570±56**	859±99	462±53**	1227±156	698±72**
膵臓 (mg)	1095±135	910±207	691±55	630±66	932±116	878±113
膵インスリン (U/膵)	2.37±0.82	1.74±0.85	1.95±0.36	2.39±0.31*	1.79±0.79	1.50±0.43
血漿グルコース (mg/dl)	131±8	120±6	190±21	150±10*	156±11	143±12
糖化ヘモグロビン (%)	3.23±0.30	2.85±0.16*	3.05±0.13	2.81±0.06*	3.19±0.20	2.91±0.15*
血漿インスリン (μU/ml)	103±45	43±22	88±26	32±12**	122±37	65±17*

9週齢雄ラットに市販粉末食 (CE-2) あるいはAO-128が0.005%混入されたCE-2を4週間与え、絶食下で屠殺した。平均値±標準偏差。t-検定によるそれぞれの対照に対する有意差 (*P<0.05, **P<0.001)。

表3 小腸二糖類水解酵素阻害剤AO-128を3週間投与したGK、STZおよび対照のVistarラットにおける経口糖負荷試験

試験群		血漿グルコース (mg/dl)				グルコース 面積 (mg/dl・時間)	血漿インスリン (μU/ml)					頂値までの インスリン上昇量 (μU/ml)	
		分	分	分	分		分	分	分	分			
		0	15	30	60	120	0	15	30	60	120		
Vistar	対照	90±9	183±16	172±21	140±14	103±8	98±27	4±2	45±26	28±7	17±7	7±8	53±7
	AO-128	93±3	191±17	140±19*	104±8	96±11	51±13*	3±1	36±16	16±12	3±1*	3±2	32±16
GK	対照	116±14	271±27	316±33	302±28	190±23	291±40	11±2	22±5	22±12	13±9	16±5	14±10
	AO-128	101±7	269±17	279±16*	269±15*	139±17**	253±25	13±5	23±6	12±5	12±4	15±6	11±9
STZ	対照	88±6	245±16	324±27	309±39	225±46	363±54	4±2	13±9	9±5	7±5	13±11	9±9
	AO-128	101±6	244±28	243±24**	184±37**	120±30**	162±61**	5±1	47±17*	14±8	9±7	6±6	42±17

9週齢雄ラットに市販粉末食 (CE-2) あるいはAO-128が0.005%混入されたCE-2を3週間与えた後、20時間絶食しグルコース (1g/kg体重) を経口投与した。平均値±標準偏差。t-検定によるそれぞれの対照に対する有意差 (*P<0.05, **P<0.001)。

表4 50%エネルギー摂取制限して4週間飼育したGKおよび対照のVistarラットで得られた試験成績

試験群	Vistar		GK	
	対照	制限	対照	制限
使用動物数	6	6	6	6
初体重 (g)	257±14	259±14	253±7	255±10
終体重 (g)	315±13	210±6**	331±16	200±9**
体重増加量 (g/4週間)	58±6	-49±12**	78±10	-55±4**
摂食量 (g/4週間)	587±24	282±10**	620±19	293±5**
副腎丸周囲脂肪組織 (mg/100g 体重)	1223±132	826±55**	960±10	288±62**
腎 (mg)	1200±121	1015±75	851±100	883±55
腎インスリン (U/腎)	2.16±0.18	1.88±0.22**	1.98±0.18	1.36±0.17*
血糖グルコース (mg/dl)	111±3	118±6*	155±10	133±7*
血糖インスリン (μU/ml)	77±33	72±15	154±22	79±30**

10週齢雄ラットに市販粉末食 (CE-2) を自由摂取あるいは50%摂取制限して4週間飼育した。血液は飽食下 (13:00) で採取した。平均値±標準偏差。t-検定によるそれぞれの対照に対する有意差 (*P<0.05, **P<0.001)。

表5 50%エネルギー摂取制限して3週間飼育したGKおよび対照のVistarラットにおける経口糖負荷試験

試験群		血糖グルコース (mg/dl)				グルコース 面積	血糖インスリン (μU/ml)					頂値までの インスリン上昇値 (μU/ml)	
		分					分						
		0	15	30	60	120	(mg/dl・時間)	0	15	30	60	120	
Vistar	対照	92±7	139±6	125±12	112±13	83±8	52±7	20±7	54±22	36±10	24±8	19±6	39±7
	制限	108±7*	176±15**	106±12	95±5	83±4	44±53	25±4	55±22	27±6	21±4	22±4	30±11
GK	対照	116±10	238±38	271±24	295±34	264±31	297±49	34±8	28±13	24±7	21±6	23±3	-2±14
	制限	150±13**	360±22**	307±25	257±41	170±33*	204±32*	25±4	51±12**	25±6	16±6	19±5	25±12*

10週齢雄ラットに市販粉末食 (CE-2) を自由摂取あるいは50%摂取制限して3週間飼育した後、20時間絶食しグルコース (1g/kg体重) を経口投与した。平均値±標準偏差。t-検定によるそれぞれの対照に対する有意差 (*P<0.05, **P<0.001)。

審査結果の要旨

ヒト糖尿病の8割ないし9割を占めるインスリン非依存型 (non-insulin-dependent diabetes mellitus, NIDDM) では膵のインスリン分泌障害が普遍的に認められるが、この障害が糖尿病の原因か、あるいは結果なのかは未だに不明である。この最大の理由は、膵は生検が困難な臓器の一つであることに加えて、死後の自己消化が早く、実態の正確な把握が難しいことにある。これらの問題に対して有用な知見を得るためには実験動物を用いた解析が必須であるといえる。本研究は、NIDDMの発症と進展における膵機能の意義を明らかにするために行われたものである。すなわち、wistar系ラットの中から耐糖能の低い個体を選択交配して作成された非肥満 NIDDM モデルの自然発症糖尿病 (GK) ラットを用いて、とくに肥満、ショ糖摂取ならびに食餌制限など種々の環境下における膵機能を検討し、その機構を解明した。第1章では、自然発症糖尿病 (NIDDM) ラット並びに、Wistar系ラットを用いては育仔数を減らすことにより、脂肪組織の増加を介し、インスリン要求量の増加が起こり、膵機能にストレスを与え、高血糖を発症する可能性を示唆する結果を示した。また GK ラットに、生後ただちに大量の monosodium glutamate (MSG) を投与して視床下部性肥満を発症させた場合も糖尿病を憎悪させることを示した。

第2章では、とくにしょ糖の催糖尿作用について検討した。すなわち、高しょ糖飼料を与えると、両系ラットとも脂肪組織が増加し血漿インスリン濃度が上昇した。とくに GK ラットでは血糖値の上昇、膵インスリン含量の減少、神経障害の指標となる神経伝導速度の遅延などが示され、糖尿病性変化が増強することを示した。しょ糖摂取をさらに増加させた場合には、GK ラットでは糖尿病性変化はいっそう増強され、膵のランゲルハンス氏島細胞にも萎縮が見られ、B細胞の顆粒が目立つとともに、腎障害をも引き起こしていることを示した。第3章では食餌制限の糖尿病に対する影響を検討した。GK ラットおよびストレプトゾトシン (STZ) 注射によって膵のB細胞を部分破壊して作成した糖尿病ラットを用い、まず糖の吸収を阻害する二糖類水解酵素阻害剤である AO-128 を投与したとき、糖尿病が改善されることを観察し、エネルギーを50パーセント制限する条件の制限食投与によっても、GK ラットにおける耐糖能障害をある程度改善することを確かめた。

以上のように、本研究は糖尿病の発症ならびにその改善に対する栄養条件の関与について、新しい知見を加えるものであり、著者に農学博士を授与するに値すると判断した。