

ストレプトゾトシン糖尿病ラット水晶体におけるアルドース還元酵素活性に及ぼすインシュリンの影響

西上 哲弘

鳥取大学医学部眼科学教室

鳥取大学医学部生化学教室

要約

5週齢の Sprague-Dawley 系ラットにストレプトゾトシン (STZ) 65mg/kg を1回尾静脈より投与して糖尿病を誘発し、インシュリン (INS) 投与の影響を水晶体について糖代謝の面から調べた。(1) INS 非投与糖尿病群では、正常対照群に比べてアルドース還元酵素 (AR) 活性の上昇とソルビトール量、グルコース量、フルクトース量の増加が認められた。(2) 糖尿病群に、中間型 INS 10単位を7日間連続投与すると、INS 非投与の糖尿病群と比べて AR 活性の低下傾向とソルビトール量、フルクトース量の減少が認められたが、グルコース量の低下は認められなかった。(3) 糖尿病群に速効型 INS 10単位を1回投与しても、その3時間後に AR 活性の低下はみられなかった。以上の結果より STZ 糖尿病ラットに INS を連続投与すれば、水晶体中のグルコース量は低下しないのに、AR 活性は低下する傾向を示し、またソルビトール量は著明に減少することを明らかにした。(日眼会誌 94:128-134, 1990)

キーワード: インシュリン, アルドース還元酵素活性, 水晶体, ストレプトゾトシン糖尿病, ラット

Effect of Insulin on Aldose Reductase Activity in the Lens of Rats with Streptozotocin-induced Diabetes

Tetsuhiro Nishigami

Department of Ophthalmology, Tottori University School of Medicine

Department of Biochemistry, Tottori University School of Medicine

Abstract

Sprague-Dawley rats (5 weeks old) were injected intravenously with 65mg of streptozotocin (STZ)/kg body weight. The diabetic rats were injected subcutaneously with insulin chronically or acutely and biochemical parameters in the lens were determined. Increases in aldose reductase (AR) activity and contents of sobitol, glucose and fructose were found in the STZ-diabetic rats, compared with normal control rats. When the STZ-diabetic rats were injected with 10 units of monotard insulin on each of 7 successive days, AR activity tended to decrease, and contents of sorbitol and fructose significantly decreased, but the glucose content did not significantly decrease, compared with STZ-diabetic rats given no insulin. There was no decrease in AR activity in the STZ-diabetic rats 3 hours after an injection of 10 units of actrapid insulin. These results demonstrated that the chronic administration of monotard insulin may decrease AR activity and sorbitol content in the lens of STZ-diabetic rats without lowering glucose levels. (*Acta Soc Ophthalmol Jpn* 94:128-134, 1990)

別刷請求先: 683 米子市西町86 鳥取大学医学部眼科学教室 西上 哲弘

(平成元年8月17日受付, 平成元年9月11日改訂受理)

Reprint requests to: Tetsuhiro Nishigami, M.D. Dept. of Ophthalmol., Tottori Univ. School of Med.
86 Nishi-machi, Yonago 683, Japan

(Received August 17, 1989 and accepted in revised form September 11, 1989)

Key words: Insulin, Aldose reductase (AR) activity, Lens, Streptozotocin (STZ)-induced diabetes, Rat

I 緒 言

1959年 van Heyningen によって、ラット糖白内障の水晶体においてはじめてソルビトールが発見された¹⁾²⁾。その後、Kinoshita が、実験的ラット糖白内障はアルドース還元酵素 (AR) が起因酵素となってポリオールの蓄積により細胞内浸透圧が上昇し水を吸収して水晶体線維が膨化することにより発症するという Polyol-Osmotic 説^{3)~6)}を確立し、広く認められるに至っている。この説を裏付ける事実の一つとしてストレプトゾトシン (STZ) およびアロキサン糖尿病ラットにおける水晶体の AR 活性の上昇が報告⁷⁾⁸⁾されているが、その機序は明らかではない。また、ガラクトース白内障やヒト糖尿病性白内障では AR 活性の上昇は観察されておらず⁷⁾⁹⁾、水晶体 AR 活性の上昇が高血糖状態によるものであるか否かについては疑問が残されている。本研究では、STZ 糖尿病ラットにインシュリンを投与し、血糖、水晶体の AR 活性および AR による反応生成物とその代謝関連物質質の変動について観察したので報告する。

II 方 法

1. 実験材料

5週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラットを用いた。食餌は日本クレア社製 CE-2を与えた。細隙灯顕微鏡にて水晶体に混濁がないことを確認したうえで、一晚絶食後10mM クエン酸緩衝液 (pH 4.5) に2g/dl の濃度に溶解した STZ (Sigma) 65mg/kg を尾静脈より1回投与し糖尿病を惹起した。投与7日後に血糖値を測定し、400mg/dl 以上のものを糖尿病群とした。また、糖尿病群のうちの一部を無作為に選び、STZ 投与7日後より中間型インシュリンであるブタ精製インシュリン亜鉛水性懸濁注射液 (Insulin Novo Monotard® MC, Novo Ind. A/S) 10単位を7日間毎日18時から19時の間に1回皮下注射し、これを中間型インシュリン投与糖尿病群とした。同様に STZ 投与7日後に速効型インシュリンであるブタ精製インシュリン注射液 (Insulin Novo Actrapid® MC, Novo Ind. A/S) を10単位1回限り投与し、これを速効型インシュリン投与糖尿病群とした。さらに、STZ を投与しない正常ラットを

対照群として設定した。各群7匹以上使用し、STZ 投与7日後および14日後にエーテル麻酔下に眼球摘出し、実体顕微鏡下に後部強膜を切開して水晶体を摘出し、ろ紙上で硝子体や血液などの付着物を除去し、湿重量を測定した後、 -20°C 以下で保存し、以下の測定を行った。

2. 測定方法

1) 水晶体の AR 活性

水晶体1個に対し0.1M リン酸緩衝液 (pH 6.2) 2.0 ml を加えてホモジナイズし、27,000g で1時間遠心分離後の上清を試料として、Hayman と Kinoshita¹⁰⁾の方法に準じて測定した。

2) 水晶体中 D-ソルビトール、D-グルコース、D-フルクトース量

水晶体1個に対し0.3N ZnSO_4 1.0ml を加えてホモジナイズした後、0.3N $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 1.0ml を加えて混和し、3,000rpm で10分間遠心分離して除タンパク後、F-キット (ペーリンガー・マンハイム社) を用いて測定した。

3) 血糖値

尾静脈より採取した血液を3,000rpm で10分間遠心分離して得た血漿を用い、グルコースオキシダーゼ法 (グルコース B-テストワコー, 和光純薬) により測定した。なお、血糖値は特に断らない限り摂食時のものである。

以上の測定には、島津製作所製紫外可視分光光度計 UV-160 を用いた。

測定値はすべて平均値±標準誤差で表し、平均値の間の有意差の検定には Student の t 検定を用い、危険率が5%以下を有意とした。

III 結 果

1. STZ 投与前 (空腹時) の血糖

血糖値は、対照群 $101 \pm 4\text{mg/dl}$ ($n=11$), 糖尿病群 $98 \pm 5\text{mg/dl}$ ($n=10$), 中間型インシュリン投与糖尿病群 $105 \pm 4\text{mg/dl}$ ($n=10$), 速効型インシュリン投与糖尿病群 $102 \pm 5\text{mg/dl}$ ($n=7$) で、各群の間に差異は認められなかった。

2. STZ 投与7日後の血糖値、水晶体の AR 活性とソルビトール量

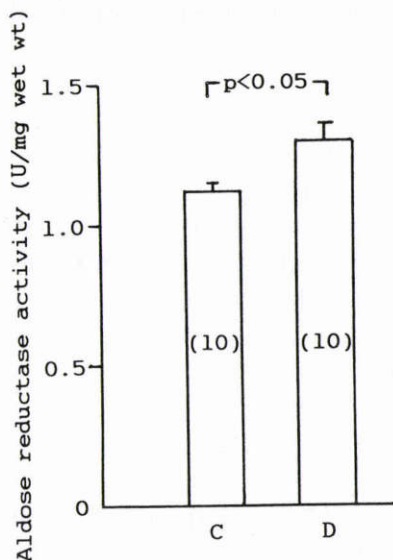


図1 ストレプトゾトシン投与7日後の水晶体アルドース還元酵素活性
 平均値±標準誤差, 括弧内の数字は測定水晶体数を示す。C: 対照群, D: 糖尿病群, 以下同様。

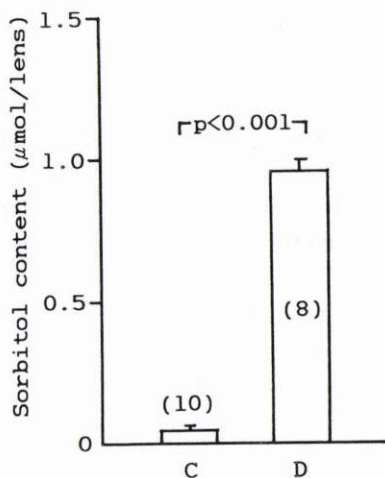


図2 ストレプトゾトシン投与7日後の水晶体中ソルビトール量
 図1に同じ。

血糖値は, 糖尿病群(615±29mg/dl, n=10)では対照群(140±8mg/dl, n=10)に対し有意に上昇し(p<0.001), 明らかな糖尿病状態を呈していた。

水晶体湿重量当たりのAR活性(図1)は, 糖尿病群(1.31±0.06U/mg)では対照群(1.13±0.03U/mg)に対して有意な上昇(p<0.05)が認められた。水晶体

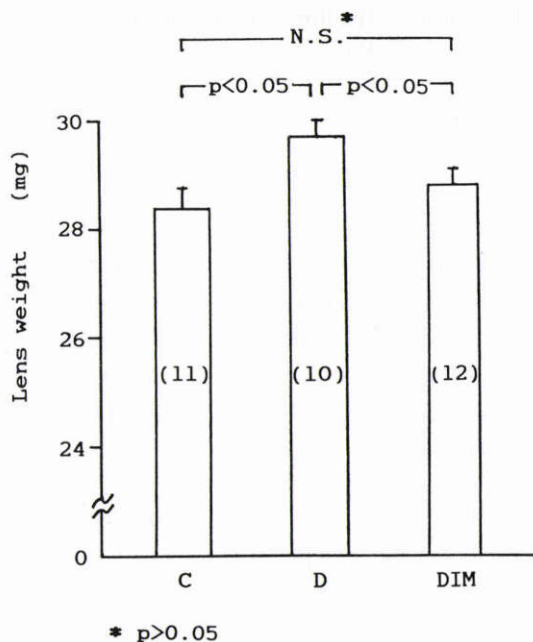


図3 中間型インシュリン7日間投与後の水晶体湿重量
 DIM: 中間型インシュリン投与糖尿病群, その他は図1に同じ。
 * p>0.05

1個当たりのソルビトール量(図2)は, 糖尿病群(0.96±0.04μmol)では対照群(0.05±0.01μmol)に対し約20倍の著明な増加(p<0.001)を示した。

3. 中間型インシュリン7日間投与の影響

上述の結果よりSTZ投与7日後には水晶体のAR活性が上昇し, またソルビトールの増加があることが確認されたので, 次に中間型インシュリンを7日間投与してその影響を調べた。

血糖値は, 糖尿病群(633±22mg/dl, n=10)では相変わらず高く, 対照群(151±5mg/dl, n=11)に対して有意に高血糖を維持していた(p<0.001)。中間型インシュリン投与糖尿病群(402±39mg/dl, n=12)では糖尿病群より有意に低下しているものの対照群に対しては有意な高血糖を示した(p<0.01)。なお, 中間型インシュリン1回投与後の血糖値は, 投与約3時間後に100mg/dl以下で最低値となり, 約14時間後にはほぼもとの値に戻った。

水晶体湿重量(図3)は, 糖尿病群(29.7±0.3mg)では, 対照群(28.4±0.4mg)に対し有意な増加を示し(p<0.05), 中間型インシュリン投与糖尿病群(28.8±0.3mg)では糖尿病群に対し有意に減少し(p<0.05),

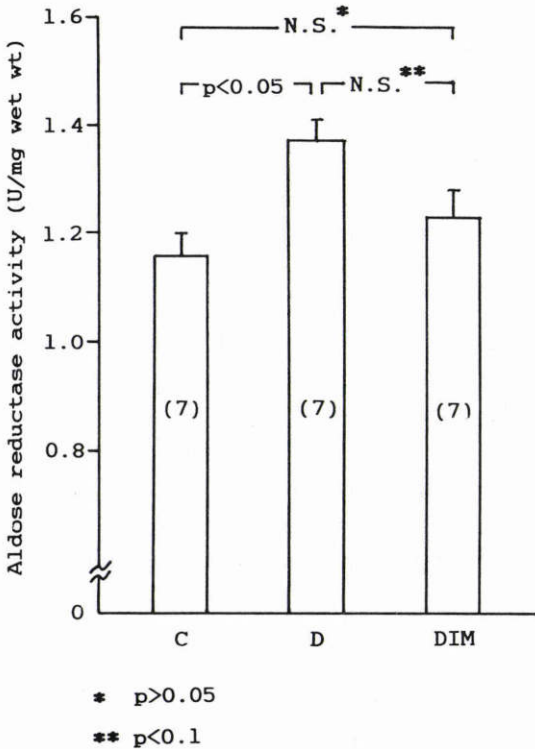


図4 中間型インシュリン7日間投与後の水晶体アルドース還元酵素活性
図3に同じ。

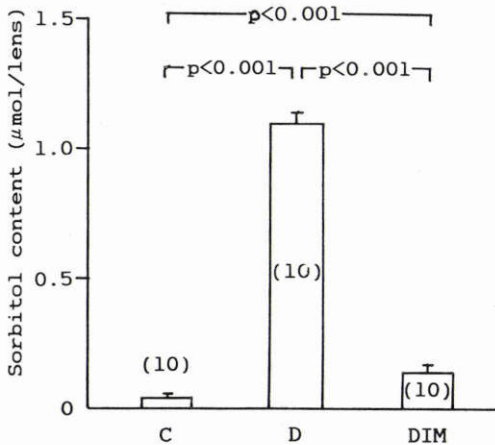


図5 中間型インシュリン7日間投与後の水晶体中ソルビトール量
図3に同じ。

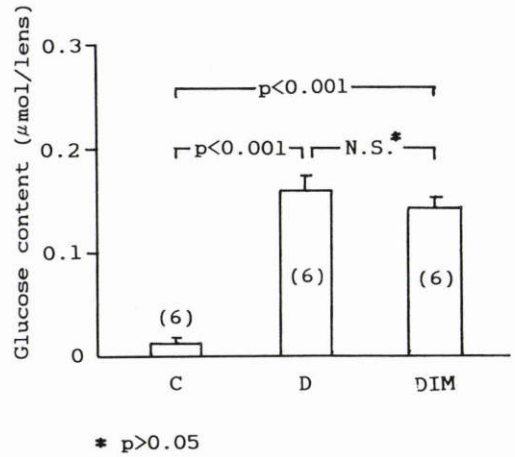


図6 中間型インシュリン7日間投与後の水晶体中グルコース量
図3に同じ。

与14日後でも糖尿病群(1.37±0.04U/mg)では対照群(1.16±0.04U/mg)に対し有意に上昇していた(p<0.05)。中間型インシュリン投与糖尿病群(1.23±0.05U/mg)は糖尿病群に比べて低下する傾向を示し(p<0.1)、対照群との間に有意差は認められなかった。

以上の結果よりSTZ糖尿病ラットにおけるAR活性の上昇が中間型インシュリン投与により抑制される傾向があることが分かったので、次にARが触媒する反応の生成物であるソルビトール、またその代謝関連物質であるグルコースおよびフルクトールの含有量を調べた。

水晶体1個当たりのソルビトール量(図5)は、糖尿病群(1.10±0.04μmol)では対照群(0.04±0.01μmol)に対し著明な高値(p<0.001)を示したが、STZ投与7日後(0.96±0.04μmol, n=8; 図2参照)とは有意差は認められなかった。中間型インシュリン投与糖尿病群(0.14±0.03μmol)では対照群より有意に増加(p<0.001)しているものの、糖尿病群に比べて有意に低く(p<0.001)、約1/8の量しかなかった。

水晶体1個当たりのグルコース量(図6)は、糖尿病群(0.159±0.014μmol)では対照群(0.014±0.003μmol)に対し血糖値と同様に著明な増加(p<0.001)が見られ、また中間型インシュリン投与糖尿病群(0.143±0.009μmol)でも糖尿病群に対して有意な低下はみられなかった。

水晶体1個当たりのフルクトース量(図7)は、糖尿病群(0.253±0.013μmol)では対照群(0.017±0.003

対照群とは有意差が認められなかった。
水晶体湿重量当たりのAR活性(図4)は、STZ投

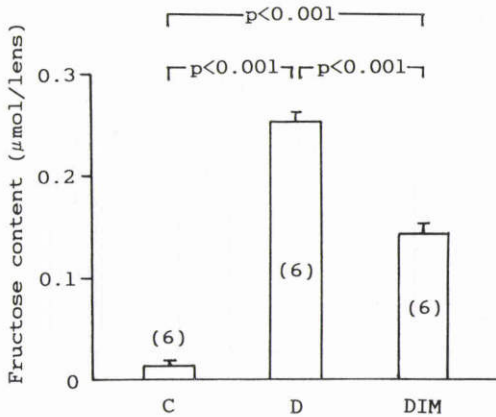


図7 中間型インシュリン7日間投与後の水晶体中フルクトース量
図3に同じ。

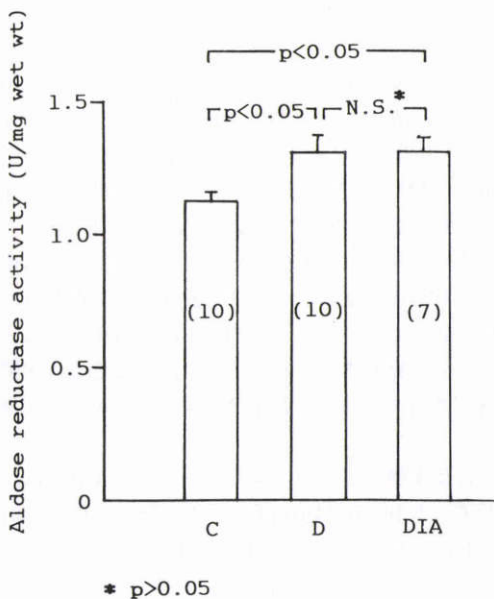


図8 速効型インシュリン投与3時間後の水晶体アルドース還元酵素活性
DIA:速効型インシュリン投与糖尿病群. その他は図1に同じ。

μmol) に対し著明な増加 ($p < 0.001$) がみられ, 中間型インシュリン投与糖尿病群 ($0.123 \pm 0.016 \mu\text{mol}$) では糖尿病群に対して有意に低下 ($p < 0.001$) していた。

4. 速効型インシュリン投与3時間後の血糖値およびAR活性

STZ投与7日後に速効型インシュリンを投与し, そ

の3時間後に血糖および水晶体AR活性を調べた。

血糖値は, 速効型インシュリン投与糖尿病群 ($59 \pm 9 \text{mg/dl}$, $n=7$) では対照群 ($140 \pm 8 \text{mg/dl}$, $n=10$) に比べ有意に低い値 ($p < 0.001$) を示した。

しかし, 水晶体湿重量当たりのAR活性 (図8) は速効型インシュリン投与糖尿病群 ($1.31 \pm 0.05 \text{U/mg}$) でも糖尿病群 ($1.31 \pm 0.06 \text{U/mg}$) に比べて低下は認められなかった。

IV 考 按

実験的ラット糖白内障は, ARが起因酵素となってポリオールが蓄積し, その細胞膜に対する透過性が低いため¹¹⁾細胞内浸透圧が上昇し, 水を吸収して水晶体線維が膨化することによって発症すると考えられている。これは, Polyol-Osmotic説³⁾⁻⁶⁾と呼ばれ, Kinoshitaにより確立され現在広く認められている。STZは, 膵臓のLangerhans島のβ細胞を選択的に破壊し, インシュリンの分泌を抑制することにより糖尿病を誘発する¹²⁾。従来, STZ糖尿病ラットにおいて水晶体のAR活性の上昇が報告⁷⁾されているが, 本研究ではこのインシュリンの分泌不足から発症するSTZ糖尿病にみられるAR活性の上昇が, インシュリンの補充によりどのように変化するかを調べた。

まず, STZ糖尿病ラットにおいて水晶体AR活性が上昇することを追試, 確認した。そして, この活性上昇は, 中間型インシュリンを7日間毎日10単位ずつ連続投与することにより抑制される傾向があることがわかった。また同時に, インシュリン補充により高い血糖値は抑制されるものの水晶体中のグルコース量は低下しないことが明らかになった。しかし, そのさいソルビトール量とフルクトース量の減少がみられた。このようなインシュリンによるAR活性抑制作用が, 血糖値すなわち血中グルコース量の低下を介して間接的に起こるのか, あるいはインシュリンの直接の影響によるのか, またはインシュリンと拮抗するグルカゴンが関係しているのか, 現時点では不明である。これに関連して, 糖尿病ラットに速効型インシュリンを投与し, その高いAR活性に及ぼす影響を調べた。しかし, 速効型インシュリン1回投与の3時間後では水晶体AR活性の低下は見られなかった。このように, 糖尿病ラットの高AR活性はインシュリンの持続的作用によって抑制されるのに, 一過性作用では効果がないことが分かった。この意味付けは今後に残された問題であろう。

水晶体ではARは上皮細胞層において活性が高い¹³⁾

ので、その障害の有無により水晶体全体のAR活性は左右されるが、糖白内障発生過程においては、上皮細胞が非特異的に増殖する^{14)~16)}。このように、上皮細胞層が高いAR活性をもっているながら崩壊するどころか増殖するのは、上皮細胞が浸透圧の上昇に強い上にソルビトールデヒドロゲナーゼ活性も高いことなどによるものと推定されている¹⁶⁾。そこで、インシュリン投与によりAR活性が低下するという本実験の成績からすると、そのさい上皮細胞数は抑制されていると考えるのが妥当であろう。しかし、インシュリンはin vitroにおいてはウサギの水晶体の上皮細胞を増殖させると報告されている¹⁷⁾。

Coulterら¹⁸⁾¹⁹⁾は、次のような観察をしている。正常ウサギでは摂食により血中インシュリン濃度は2.5倍に上昇するのに血液房水関門のため房水中インシュリン濃度は1.7倍しか上昇しない。ところが、糖尿病ウサギでは血液房水関門の透過性亢進のため房水中インシュリン濃度が正常ウサギと同程度であった。これにインシュリンを投与すると正常ウサギ以上になり、そのさい投与したインシュリンは1時間以内に房水に達した。これらの事実からすると、糖尿病ラットで水晶体の高いAR活性を低下させるインシュリンの作用が、局所に対する直接的なものである可能性も考えられる。

本実験において、中間型インシュリン投与糖尿病群でAR活性の低下の程度に比べてソルビトール量の減少が著しく、またフルクトース量も比較的減少していた。これについては、フルクトース以降の代謝系(解糖系)がインシュリンの作用により亢進した結果であるとも考えられる。この実験ではソルビトールデヒドロゲナーゼ活性の測定は行わなかったが、STZ糖尿病ではこの酵素活性は低下するといわれている⁷⁾。同様にラットのガラクトース白内障では水晶体の酵素活性のほとんどは変わらないかあるいは減少する²⁰⁾。

現時点では、ヒト糖尿病白内障もARが起因酵素となって起こるという明確な根拠はない。しかし、現在様々なAR阻害剤が糖尿病白内障の治療に有効であるといわれており、水晶体にARが無意味に存在しているとは考えられず、高血糖下でやむなくグルコースをソルビトール経路に組み入れて代謝している可能性があり、それを長期にわたり阻害することは別の代謝異常を生む可能性もあり治療の本質としては問題が残る。今後の一層の研究が必要であろう。

以上を要するに、本研究ではSTZ糖尿病ラットに

おける水晶体のAR活性上昇、およびこれに関連するソルビトール量の増加は中間型インシュリンの7日間連続投与では抑制されるのに、速効型インシュリンの1回投与ではその効果がないことを明らかにした。しかし、その作用機序については現時点では不明である。

本稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました本学生化学教室小倉道雄教授、ならびに眼科学教室藤永 豊名誉教授、玉井嗣彦教授に深謝いたします。また、生化学教室綾木義和助教授、同教室員各位に心より感謝申し上げます。

本論文の要旨は、第93回日本眼科学会総会にて発表した。

文 献

- 1) **van Heyningen R**: Formation of polyols by the lens of the rat with 'sugar' cataract. *Nature* 184: 194—195, 1959.
- 2) **van Heyningen R**: Metabolism of xylose by the lens. 2. Rat lens in vivo and in vitro. *Biochem J* 73: 197—207, 1959.
- 3) **Kinoshita JH, Merola LO, Satoh K, et al**: Osmotic changes caused by the accumulation of dulcitol in the lenses of rats fed with galactose. *Nature* 194: 1085—1087, 1962.
- 4) **Kinoshita JH**: Mechanisms initiating cataract formation. Proctor lecture. *Invest Ophthalmol* 13: 713—724, 1974.
- 5) **Kinoshita JH**: Cataracts in galactosemia. The Jonas S. Friedenwald memorial lecture. *Invest Ophthalmol* 4: 786—799, 1965.
- 6) **Kinoshita JH**: 白内障発生に関する生化学的考察. *日眼会誌* 80: 1362—1371, 1976.
- 7) **Varma SD, Kinoshita JH**: Sorbitol pathway in diabetic and galactosemic rat lens. *Biochim Biophys Acta* 338: 632—640, 1974.
- 8) **Collins JG, Corder CN**: Aldose reductase and sorbitol dehydrogenase distribution in substructures of normal and diabetic rat lens. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 16: 242—243, 1977.
- 9) **Jedziniak JA, Chylack LT Jr, Cheng H-M, et al**: The sorbitol pathway in the human lens: Aldose reductase and polyol dehydrogenase. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 20: 314—326, 1981.
- 10) **Hayman S, Kinoshita JH**: Isolation and properties of lens aldose reductase. *J Biol Chem* 240: 877—882, 1965.
- 11) **Wick AN, Drury DR**: Action of insulin on the permeability of cells to sorbitol. *Am J Physiol* 166: 421—423, 1951.
- 12) **Junod A, Lambert AE, Orci L, et al**: Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc Soc Exp Biol Med* 126: 201—205, 1967.

- 13) **Hayman S, Lou MF, Merola LO, et al:** Aldose reductase activity in the lens and other tissues. *Biochim Biophys Acta* 128: 474—482, 1966.
 - 14) **Grimes P, von Sallmann L:** Lens epithelium proliferation in sugar cataracts. *Invest Ophthalmol* 7: 535—543, 1968.
 - 15) 神谷美保子, 馬嶋慶直, 中沢 清, 他: 糖性白内障水晶体の上皮細胞増殖現象に対する生化学的解析. *日眼会誌* 91: 459—464, 1987.
 - 16) 赤木好男, 中路 裕, 糸井素一: 実験的ラット糖尿病白内障における Aldose Reductase の局在性について—免疫組織化学的研究—. *眼紀* 36: 1207—1211, 1985.
 - 17) **Reddan JR, Unakar NJ, Harding CV, et al:** Induction of mitosis in the cultured rabbit lens initiated by the addition of insulin to medium KEI-4. *Exp Eye Res* 20: 45—61, 1975.
 - 18) **Coulter JB, Knebel RL:** Entry of insulin into aqueous humor of rabbits after feeding. *Ophthalmol Res* 9: 269—275, 1977.
 - 19) **Coulter JB, Engelke JA, Eaton DK:** Insulin concentration in aqueous humor of rabbits: Effects of alloxan-diabetes and insulin treatment. *Exp Eye Res* 37: 153—157, 1983.
 - 20) **Sippel TO:** Enzymes of carbohydrate metabolism in developing galactose cataracts of rats. *Invest Ophthalmol* 6: 59—63, 1967.
-