

ストレプトゾトシン糖尿病ラット水晶体の糖代謝に 対するバナデイトの影響

遠 藤 実

鳥取大学医学部眼科学教室, 同 生化学教室

要 約

5週齢 Sprague-Dawley 系雄性ラットにストレプトゾトシン 50 mg/kg を腹腔内投与して糖尿病を誘発し, 5価バナジウム (バナデイト) 投与の影響を水晶体について糖代謝の面から調べた。糖尿病ラットにバナジウムを 0.2 g/l NaVO_3 -5 g/l NaCl 溶液として2週間自由に飲用させた。1. 糖尿病ラットに対するバナデイトの血糖降下作用を確認した。2. バナデイト投与により水晶体中グルコース量, ソルビトール量は有意に低下した。特にソルビトール量は著明に減少した。しかしフルクトース量は有意な減少を示さなかった。3. 糖尿病ラットにバナデイトを投与しても水晶体アルドース還元酵素活性は低下せず, ソルビトール脱水素酵素 (SDH) 活性は有意に上昇した。以上の結果より, 糖尿病ラットへのバナデイト投与による著明な水晶体中ソルビトール量の減少は, SDH 活性上昇に伴うフルクトースへの変換の促進によると考えられた。(日眼会誌 97: 333-339, 1993)

キーワード: バナデイト, ソルビトール, アルドース還元酵素, 糖尿病ラット水晶体, ソルビトール脱水素酵素

Effects of Vanadate on Glucose Metabolism of the Streptozotocin-diabetic Rat Lens

Minoru Endo

Department of Ophthalmology and Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Tottori University

Abstract

The effects of oral administration of vanadate, an oxidized form of vanadium, on glucose metabolism of the lens were studied in 5-week-old male Sprague-Dawley rats rendered diabetic with streptozotocin (50 mg/kg, intraperitoneal injection). The rats were given 0.2g/l NaVO_3 -5 g/l NaCl solution in drinking water ad libitum for 2 weeks and biochemical parameters in their lenses were determined. Blood glucose levels significantly decreased in the vanadate-administered diabetic rats (DM-V group), compared with the diabetic rats given no vanadate (DM group). In the DM-V group, significant decreases were observed in lens contents of glucose and sorbitol without significant decrease in fructose content, compared with the DM group. In the former group, aldose reductase activity was not decreased, but sorbitol dehydrogenase (SDH) activity was significantly increased, compared with the latter group. These results suggest that oral administration of vanadate may decrease sorbitol content in the diabetic rat lens by an acceleration of the sorbitol pathway to fructose accompanied by increase in SDH activity. (J Jpn Ophthalmol Soc 97: 333-339, 1993)

Key words: Vanadate, Sorbitol, Aldose reductase, Diabetic rat lens, Sorbitol dehydrogenase

別刷請求先: 683 米子市西町 86 鳥取大学医学部眼科学教室 遠藤 実

(平成4年6月29日受付, 平成4年8月31日改訂受理)

Reprint requests to: Minoru Endo, M.D. Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Tottori University, 86 Nishi-machi, Yonago 683, Japan

(Received June 29, 1992 and accepted in revised form August 31, 1992)

I 緒 言

Tolman ら¹⁾が5価バナジウム(バナデイト)にインシュリン様作用があることを1979年に報告して以来、バナデイトの糖代謝に及ぼす影響についてさまざまな研究が行われ、バナデイトにはグルコースの取り込みの促進²⁾³⁾、グリコーゲン生成の促進⁴⁾⁵⁾、解糖促進⁶⁾などの作用があることが明らかにされた。糖尿病との関係については、1985年にHeyliger ら⁷⁾がストレプトゾトシン(STZ)糖尿病ラットに5価バナジウムを経口投与すると、血清中インシュリンレベルは低下したままで血糖値が正常化することを報告し、その後バナデイトの糖尿病ラットに対する血糖降下作用についても研究されるようになった^{8)~10)}。しかし、糖尿病ラット水晶体の糖代謝に対するバナデイトの作用についての報告はみられない。

一方糖白内障の成因については、水晶体ソルビトール経路におけるアルドース還元酵素活性の亢進によるソルビトールの蓄積が主要な因子であるというpolyol-osmotic説をKinoshita¹¹⁾が提唱して以来、それが広く認められてきた。

そこで、本研究では糖尿病ラット水晶体の糖代謝に対するバナデイトの影響を調べるため、STZ糖尿病ラットにメタバナジン酸ナトリウム(NaVO_3)を飲料水に混合して投与し、空腹時血糖、水晶体のソルビトール経路における関連酵素活性およびその代謝物の変動について追究した。

II 実験方法

1. 動物実験

実験動物には5週齢Sprague-Dawley系雄ラット(体重115~144g:130±6g, n=60)を用い、実験期間中市販飼料(Clea A-1, 日本クレア)と下記の飲料水とを自由に摂取させ、室温約23°C, 12時間サイクルの明暗(照時時間6:00~18:00)の環境で飼育した。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、ラットを無作為に正常群(n=27)と糖尿病群(n=33)とに分け、さらに正常群は正常対照群(n=17)と正常バナデイト投与群(n=10)とに分けた。糖尿病群には一昼夜絶食後、2g/dl STZ (Sigma)-10mM クエン酸緩衝液(pH 4.5)溶液を1回腹腔内投与(50mg/kg 体重)し、両正常群には同量の10mM クエン酸緩衝液を同じ条件下に投与した。STZ投与1週間後(6週齢)に空腹時血糖値を測定し、300mg/dl以上のものを

を糖尿病ラットとし、これを2群〔糖尿病対照群(DM群:n=16)と糖尿病バナデイト投与群(DM-V群;n=17)〕に分けた。正常ラットのバナデイト投与群とDM-V群にはBlondel ら¹⁰⁾の方法に従い、0.2g/l NaVO_3 -80mM NaCl溶液を2週間飲料水として与え、正常対照群とDM群には80mM NaCl溶液を与えた。正常ラットのバナデイト投与群におけるバナデイト投与量は NaVO_3 として 4.88 ± 0.39 mg/日(バナジウム換算量で 2.04 ± 0.16 mg/日)、2週間で合計 68.26 ± 5.44 mg(28.6 ± 2.3 mg)であった。DM-V群でのバナデイト投与量は NaVO_3 として 8.71 ± 3.67 mg/日(3.64 ± 1.54 mg/日)、2週間で合計 122 ± 51 mg(51.0 ± 21.5 mg)であった。

各群とも実験開始3週間後に、ベントバルビタールナトリウム(ネプタール®)(50mg/kg 体重、腹腔内注射)麻酔下に眼球を摘出した後、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、毛様体、血液など付着物を除去し、湿重量を測定した後、-80°Cで保存した。

なお、眼球摘出前の細隙灯顕微鏡検査において、各群とも白内障生成例はなかった。

2. 測定方法

1) 血糖値

6時間絶食後尾部末端切断により血液を採取し、3,000rpmにて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。

2) 水晶体中グルコース、ソルビトールおよびフルクトース量

水晶体1個につき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分間遠心分離して得られる上清についてF-キット(ペーリンガー・マンハイム)を用いて測定した。

3) 水晶体アルドース還元酵素(AR)活性

水晶体1個につき0.1M リン酸緩衝液(pH 6.2)1.0mlを加えてホモジナイズし、27,000×gで1時間遠心分離した後の上清を試料として、Hayman ら¹²⁾の方法に準じて測定した。

4) 水晶体ソルビトール脱水素酵素(SDH)活性

水晶体1個につき0.1M トリス緩衝液(pH 7.5)1.0mlを加えてホモジナイズし、27,000×gで1時間遠心分離した後の上清を試料として、臨床用測定キット50-UV (Sigma)を用いて測定した。

なお、AR および SDH 活性算定に必要な水晶体中タンパク量は、3) および 4) の上清を用いて Lowry-Folin 法¹³⁾にて測定した。

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±標準偏差で表わし、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 5% 以下を有意とした。

III 結 果

1. 血糖値

STZ 投与前の血糖値は正常対照群 111 ± 12 mg/dl ($n=17$)、DM 群 112 ± 11 mg/dl ($n=16$)、DM-V 群 116 ± 12 mg/dl ($n=17$) で各群間に差異は認められなかった。また正常ラットのバナデイト投与群の血糖値は 108 ± 13 mg/dl ($n=10$) で、正常対照群との間に有意差はなかった。STZ 投与後の血糖値は DM 群 378 ± 38 mg/dl、DM-V 群 359 ± 51 mg/dl で、両群とも正常対照群 124 ± 9 mg/dl に比して 3 倍以上に上昇し ($p < 0.001$)、両群間に有意差は認められなかった。

図 1 に示すように、 NaVO_3 を 2 週間投与した後 (8 週齢) の DM-V 群では、血糖値は 163 ± 46 mg/dl となり、バナデイトを投与しない DM 群の 461 ± 38 mg/dl に比して 3 分の 1 近くまで低下したが、正常対照群 (125 ± 8 mg/dl) と比べると、なお有意 ($p < 0.005$) に高値を示した。

正常ラットのバナデイト投与群のバナデイト 2 週間投与後の血糖値は 121 ± 10 mg/dl で、正常対照群との間に有意差はなかった。

2. 水晶体湿重量

DM 群 [29.6 ± 1.6 mg ($n=34$)] では、正常対照群 [33.1 ± 1.0 mg ($n=32$)] に比してやや低値を示し、DM-V 群では 32.5 ± 1.3 mg ($n=34$) で正常対照群に近い値を示した。また正常ラットのバナデイト投与群は 33.5 ± 1.1 mg ($n=10$) であった。

3. 水晶体中グルコース量 (図 2)

DM 群 [4.39 ± 0.83 $\mu\text{mol/g w.w.}$ (w.w.: 湿重量)] では、正常対照群 (0.19 ± 0.03 $\mu\text{mol/g w.w.}$) に比して約 23 倍にも上昇した。DM-V 群 (2.57 ± 0.75 $\mu\text{mol/g w.w.}$) では DM 群に比して約 40% の低下を示したが、正常対照群に対してはなお著明な高値を示した。

正常ラットのバナデイト投与群では 0.49 ± 0.03 $\mu\text{mol/g w.w.}$ で、正常対照群に比し有意に上昇していた。

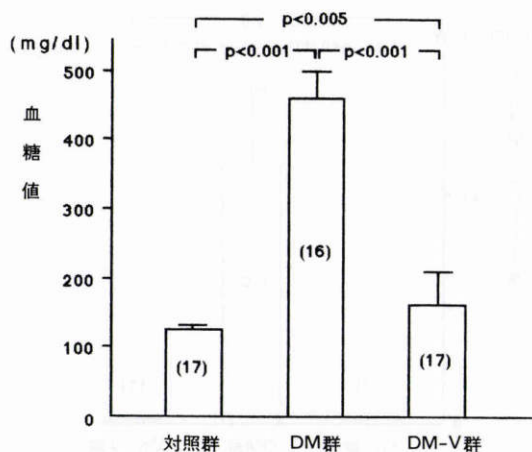


図1 バナデイト 2 週間投与後 (8 週齢) の血糖値。括弧内の数字はラット数を示す。対照群: 正常対照群, DM 群: 糖尿病対照群, DM-V 群: 糖尿病バナデイト投与群。

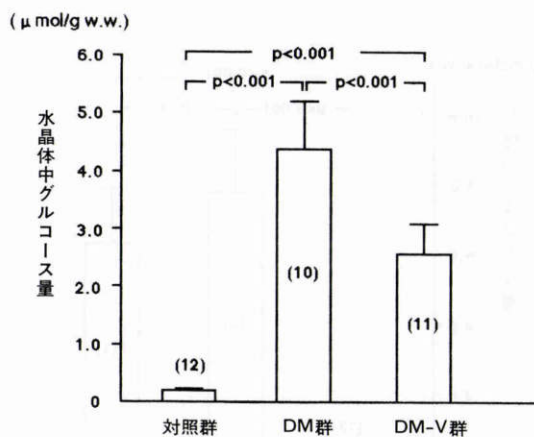


図2 8 週齢における水晶体中グルコース量の比較。括弧内の数値は水晶体の数を示す。対照群: 正常対照群, DM 群: 糖尿病対照群, DM-V 群: 糖尿病バナデイト投与群。w.w.: 湿重量。

4. 水晶体中ソルビトール量 (図 3)

DM 群 (22.87 ± 6.86 $\mu\text{mol/g w.w.}$) では、正常対照群 (0.28 ± 0.06 $\mu\text{mol/g w.w.}$) に比して 80 倍以上の著明な上昇を認めた。DM-V 群 (0.37 ± 0.14 $\mu\text{mol/g w.w.}$) では DM 群の 2% 以下の低値を示し、正常対照群と比べると減少傾向を認めたが有意差はなかった。

5. 水晶体中フルクトース量 (図 4)

DM 群 (7.79 ± 1.82 $\mu\text{mol/g w.w.}$) では、正常対照群 (0.21 ± 0.08 $\mu\text{mol/g w.w.}$) に比して 37 倍に上昇していた。DM-V 群 (6.30 ± 1.61 $\mu\text{mol/g w.w.}$) でも正

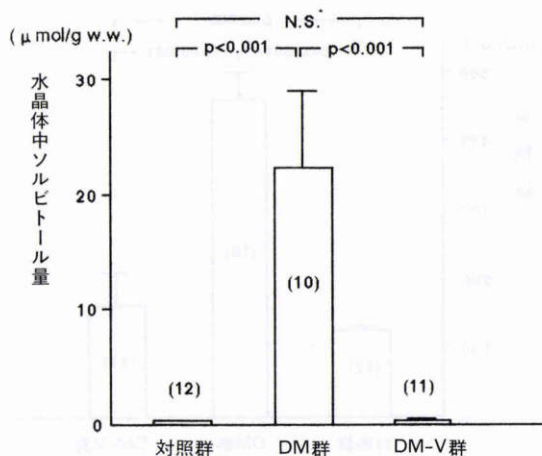


図3 8週齢における水晶体中ソルビトール量の比較。

括弧内の数値は水晶体の数を示す。対照群：正常対照群，DM群：糖尿病対照群，DM-V群：糖尿病パナデイト投与群，w.w.：湿重量。

*有意差なし ($p>0.05$)。

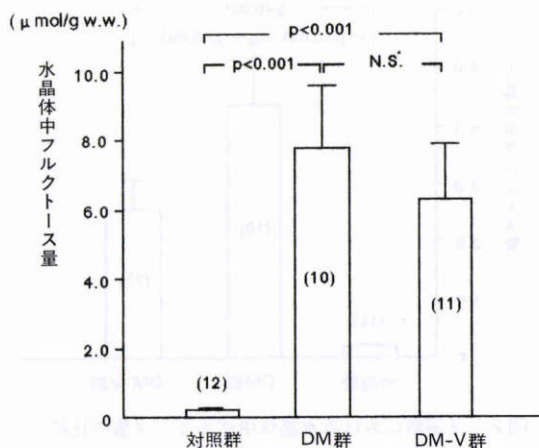


図4 8週齢における水晶体中フルクトース量の比較。

括弧内の数値は水晶体の数を示す。対照群：正常対照群，DM群：糖尿病対照群，DM-V群：糖尿病パナデイト投与群，w.w.：湿重量。

*有意差なし ($p>0.05$)。

常対照群に対し30倍の高値を示し，DM群に比べると減少傾向を認めたが有意差はなかった。

6. 水晶体アルドース還元酵素活性 (図5)

DM群 (1.27 ± 0.13 U/min/mg protein) では，正常対照群 (1.12 ± 0.14 U/min/mg protein) に比してAR活性は有意 ($p<0.05$) に上昇した，DM-V群 (1.27 ± 0.14 U/min/mg protein) はDM群とほぼ同

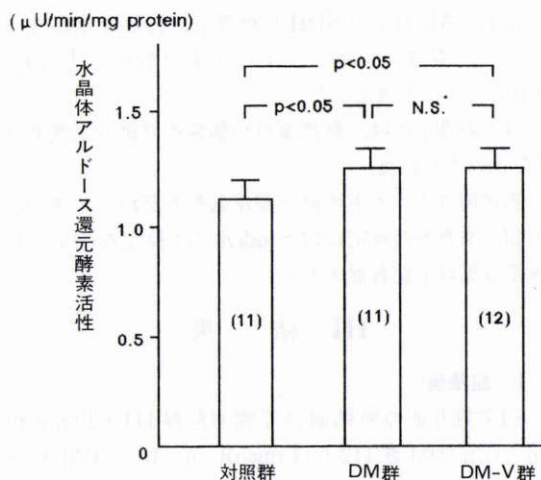


図5 8週齢における水晶体アルドース還元酵素活性の比較。

括弧内の数値は水晶体の数を示す。対照群：正常対照群，DM群：糖尿病対照群，DM-V群：糖尿病パナデイト投与群。

*有意差なし ($p>0.05$)。

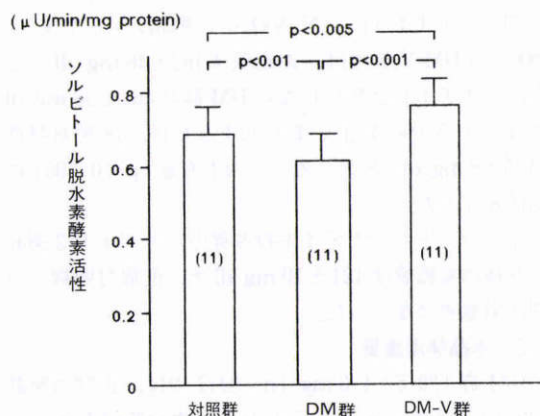


図6 8週齢における水晶体ソルビトール脱水素酵素活性の比較。

括弧内の数値は水晶体の数を示す。対照群：正常対照群，DM群：糖尿病対照群，DM-V群：糖尿病パナデイト投与群。

値を示し，正常対照群に比してAR活性は有意 ($p<0.05$) に高かった。

7. 水晶体ソルビトール脱水素酵素活性 (図6)

DM群 (0.61 ± 0.06 U/min/mg protein) では，正常対照群 (0.69 ± 0.05 U/min/mg protein) に比してSDH活性は10%以上低下し，DM-V群 (0.76 ± 0.05 U/min/mg protein) では，逆に正常対照群に比べて約

10%上昇していた。

IV 考 按

1979年にTolmanら¹⁾が、バナジウムの5価イオン(バナデイト)にラット脂肪細胞におけるグルコース輸送および酸化の促進、また肝や横隔膜に対するグリコーゲン合成促進などのインシュリン様作用があることを報告した。それ以来、バナデイトの糖代謝に対する作用については、脂肪細胞、横隔膜、その他の組織でのグルコース取り込みの促進^{2,3)}、グリコーゲン生成の促進^{4,5)}、解糖促進⁶⁾などのインシュリン様作用があることが確認されている。糖尿病との関係では、1985年にHeyligerら⁷⁾がSTZ糖尿病ラットにバナデイトを経口投与し、血清中インシュリンレベルの上昇なしに血糖値が正常化したことを報告し、その後バナデイトの糖尿病ラットに対する血糖降下作用についても研究が進められてきた^{8)~10)}。そこで、この研究では水晶体の糖代謝、とくに糖白内障の成因に決定的に係わるソルビトール経路についてその関連酵素ならびに代謝産物に対するバナデイト投与による影響を調べた。

まず、この実験においても正常ラットにおいては影響は認められない¹⁰⁾が、糖尿病ラットにバナデイトを投与すると血糖値は有意に低下することを認め、バナデイトの血糖降下作用が追試確認された。

水晶体中グルコース量は、DM群では正常対照群に比し著明に増加したが、DM-V群ではDM群に比し有意に低下した。しかし、正常対照群に比してはなお有意に多く、血糖値の低下と比べるとその低下の度合は少なかった(血糖値低下65%、水晶体中グルコース量低下41%)。in vitroにおいてインシュリンが水晶体へのグルコースの取り込みを促進したとの報告¹¹⁾もあるので、インシュリン様作用を持つバナデイトが水晶体においてもグルコースの取り込みを促進した可能性も考えられる。

そこで、このことを確かめるために、正常ラットについて同じ実験条件下でバナデイト投与の効果を調べた。その結果、正常ラットのバナデイト投与群の水晶体中グルコース量は $0.49 \pm 0.03 \mu\text{mol/g w.w.}$ ($n=10$)で、正常対照群 [$0.19 \pm 0.03 \mu\text{mol/g w.w.}$ ($n=12$)] に比し有意 ($p<0.001$) に上昇しており、正常ラットの水晶体においてもバナデイト投与によりグルコースの取り込みが促進されることが明らかになった。

水晶体中ソルビトール量は、STZ糖尿病ラットでは増加することが報告されており¹⁵⁾、本実験でもDM群

のソルビトール量は有意に増加していた。これに対しDM-V群では水晶体中ソルビトール量はDM群に比し有意に少なく、正常対照群との間に有意差を認めなかった。また、水晶体AR活性はSTZ糖尿病ラットでは亢進することが報告されている¹⁶⁾が、本実験でもDM群のAR活性は亢進していた。一方、バナデイトを投与したDM-V群でもAR活性は正常対照群に比し有意に高く、DM群との有意差は認められなかった。従って、バナデイトはAR活性を低下させることなく、糖白内障の原因とされるソルビトール量を減少させたことになる。DM-V群においてもAR活性の亢進状態が維持されていた機序については十分明らかではない。しかし、Kinoshitaら¹⁷⁾が主張するように、AR活性の亢進は水晶体中のグルコース濃度の上昇により起こるとすれば、本実験においてもDM-V群の水晶体中グルコースの濃度は対照群に比して有意に増加していたので、このためAR活性が亢進した状態に保たれたものと考えられる。

そこで、水晶体中のソルビトール量が減少した原因を調べるためさらに、ソルビトールから生成される水晶体中フルクトース量を測定した。水晶体中フルクトース量は、DM-V群では正常対照群に比して有意に多く、DM群に比しては減少傾向を認めたが有意差はなかった。すなわちバナデイト投与によりソルビトールからフルクトースへの変換が促進された可能性が示唆される。そこでさらに水晶体中SDH活性を測定した。DM群では、Varmaら¹⁸⁾が報告しているように正常対照群に比して低下していた。DM-V群ではDM群に比し有意に上昇し、また正常対照群に比しても有意な上昇を認め、バナデイトの水晶体SDH活性亢進作用が明らかになった。今回は測定していないが、ソルビトールからフルクトースの変換には補酵素である酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD^+)濃度、還元型NAD(NADH)濃度が関連している。Jedziniakら¹⁸⁾によるとNADH濃度の上昇はフルクトースへの変換を抑制するとされ、またバナデイトは $\text{NADH} \rightarrow \text{NAD}^+$ の反応を促進することが知られている¹⁹⁾。従ってバナデイト投与により水晶体中のNADH濃度は低下すると考えられ、水晶体SDH活性の亢進と相まって、ソルビトールからフルクトースへの変換が促進し、著明な水晶体中ソルビトール量の著明な減少を来したものと考えられる。なおこの水晶体SDH活性亢進の機序については現時点においては不明である。

一方、インシュリンの水晶体ソルビトール経路に対する作用については、西上²⁰⁾がSTZ糖尿病ラットにインシュリンを投与した実験により、水晶体中ソルビトール量が減少することを示し、また水晶体へのグルコース取り込みの促進が示唆されたことを報告している。この所見は本実験の結果と一致し、パナデイトは水晶体に対してもインシュリン様作用を持つことが示唆される。しかし、同論文²⁰⁾では水晶体中フルクトース量の減少、インシュリンの水晶体AR活性の低下作用が示されている。このことは本実験の結果とは異なっており、パナデイトとインシュリンの作用機序の異同についての問題が提起される。

さらに水晶体全体の代謝から考えれば、今回の実験経過（8週齢）において、細隙灯顕微鏡下に各群とも白内障の生成をみていないが、ソルビトール経路が亢進することにより、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(NADPH)、NAD⁺などの補酵素が消費されることに伴い、これらの補酵素を必要とする他の代謝経路に対しどのような影響を及ぼすのか、またパナデイトはどの程度水晶体中に移行するのか、これらのパナデイトの作用は水晶体への直接作用であるか否か、などの点について現時点では不明であり、今後の研究が必要であろう。

以上を要するに、著者はパナデイトには、正常ラット水晶体に対するグルコース取り込み促進作用、糖尿病ラット水晶体に対するソルビトール量の低下作用、およびSDH活性亢進作用があることを明らかにした。

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玉井嗣彦教授に深謝いたします。また終始御助言、御協力いただきまし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96回日本眼科学会総会にて発表した。

文 献

- 1) Tolman LE, Barris E, Burns M, Pansini A, Partridge R: Effects of vanadium on glucose metabolism in vitro. *Life Sciences* 25: 1159—1164, 1979.
- 2) Dubyak GRD, Kleinzeller A: The insulin-mimetic effects of vanadate in isolated rat adipocytes. *J Biol Chem* 255: 5306—5312, 1980.
- 3) Duckworth WC, Solomon SS, Liepnieks J, Hamel FG, Hand S, Peavy DE: Insulin-like effects of vanadate in isolated rat adipocytes. *Endocrinology* 122: 2285—2289, 1988.
- 4) Tamura S, Brown TA, Dubler RE, Lerner J: Insulin-like effect of vanadate on adipocyte glycogen synthase and on phosphorylation of 95,000 dalton subunit of insulin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 113: 80—86, 1983.
- 5) Strout HV, Vicario PP, Saperstein R, Slater EE: The insulin-mimetic effect of vanadate is not correlated with insulin receptor tyrosine kinase activity nor phosphorylation in mouse diaphragm in vivo. *Endocrinology* 124: 1918—1924, 1989.
- 6) Ninfali P, Accorsi A, Fazi A, Palma F, Fornaini G: Vanadate affects glucose metabolism of human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* 226: 441—447, 1983.
- 7) Heyliger CE, Tahiliani AG, McNeill JH: Effect of vanadate on elevated blood glucose and depressed cardiac performance of diabetic rats. *Science* 227: 1474—1477, 1985.
- 8) Meyerovitch J, Farfel Z, Sack J, Shechter Y: Oral administration of vanadate normalizes blood glucose levels in streptozotocin-treated rats. *J Biol Chem* 262: 6658—6662, 1987.
- 9) Brichard SM, Okitolonda W, Henquin JC: Long term improvement of glucose homeostasis by vanadate treatment in diabetic rats. *Endocrinology* 123: 2048—2053, 1988.
- 10) Blondel O, Bailbe D, Portha B: In vivo insulin resistance in streptozotocin-diabetic rats—evidence for reversal following oral vanadate treatment. *Diabetologia* 32: 185—190, 1989.
- 11) Kinoshita JH: Mechanisms initiating cataract formation. Proctor lecture. *Invest Ophthalmol* 13: 713—724, 1974.
- 12) Heyman S, Kinoshita JH: Isolation and properties of lens aldose reductase. *J Biol Chem* 240: 877—882, 1965.
- 13) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr LA, Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265—275, 1951.
- 14) Farkas TG, Mahajan YL: In vitro insulin effect on glucose utilization of isolated rat lenses. *Ophthalmic Res* 1: 72—78, 1970.
- 15) van Heyningen R: Formation of polyols by the lens of the rat with 'sugar' cataract. *Nature* 184: 194—195, 1959.
- 16) Varma SD, Kinoshita JH: Sorbitol pathway in diabetic and galactosemic rat lens. *Biochem Biophys Acta* 338: 632—640, 1974.
- 17) Kinoshita JH, Futterman S, Satoh K, Merola LO: Factors affecting the formation of sugar

- alcohols in ocular lens. *Biochem Biophys Acta* 74: 340—350, 1963.
- 18) **Jedziniak JA, Yates EM**: Lens polyol dehydrogenase. *Exp Eye Res* 16: 95—104, 1973.
- 19) **Ramasarma T, MacKellar WC, Crane FL**: Vanadate-stimulated NADH oxidation in plasma membrane. *Biochem Biophys Acta* 646: 88—98, 1981.
- 20) **西上哲弘**: 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, *日眼会誌* 94: 128—134, 1990.
-