

S u l f o n y l u r e a 剤の慢性投与による インスリン分泌能の低下について

弘前大学医学部第三内科、八戸市民病院病理*

梅田 芳彦 小川 吉司 田澤 康明
長谷川範幸 方山 揚誠* 中村 光男

日本胆膵生理機能研究会・胆膵の生理機能第17巻1号 別冊・2001

Sulfonylurea剤の慢性投与による インスリン分泌能の低下について

弘前大学医学部第三内科、八戸市民病院病理*

梅田 芳彦 小川 吉司 田澤 康明

長谷川範幸 方山 揭誠* 中村 光男

Loss of insulin secretion caused by chronic administration of sulfonylurea

**Yoshihiko Umeda, Yoshiji Ogawa, Yasuaki Tazawa,
Noriyuki Hasegawa, Yousei Katayama*, Teruo Nakamura**

Third Dept. of Internal Medicine, Hirosaki Univ. School of Medicine,

*Dept. of Pathology, Hachinohe City Hospital

Key words : diabetes mellitus, sulfonylurea, islet, insulin

目的

2型糖尿病の発症に至る経過として、脾における β cell massの低下が着目されている。2型糖尿病においては、インスリン抵抗性が高血糖発症の一次的要因とする見解が一般的であるが、2型として発症しても長期間の経過の後、脾 β 細胞からのインスリン分泌能が低下し、インスリン治療を必要とする症例が多々見られる。その原因として、脾 β 細胞の疲弊あるいは β cell massの低下が生じ、インスリン分泌不全が起こっていることが考えられている。脾 β 細胞が減少した糖尿病状態において経口血糖降下剤の慢性的な使用は β 細胞の疲弊を招き、薬が効かなくなる（いわゆる二次無効）可能性が示唆されている¹⁾。このような状態において、Sulfonylurea剤（以下、SU剤）お

よびインスリン治療を行い、残存 β 細胞に及ぼす影響を評価することは、適切な治療法を選択する上で重要な意義を持つ。本実験では、70%脾切除ラットを用いて β 細胞が減少した状態のモデル動物をつくり、治療法の違いによって糖輸送蛋白GLUT 2の発現量、及び β 細胞のインスリン分泌能にどのような変化が起こるかを検討した。

方 法

糖尿病ラットの作成

4週齢の雄のSprague-Dawleyラット（以下、SDラット）を用いて、Richardsら²⁾の定義に基づき脾全体の70%に相当する脾体尾部を切除した。切除後2週間をあけてグルコース2g/kgの経口糖負荷試験を行い、負荷後0分、30分、60分、120分に血糖を測定し、0分、60分に血中インスリン濃度を測定した。経口糖負荷試験により耐糖能障害の程度の等しい3群に分け、それぞれグリベンクラミドを10mg/kg、18時に毎日1回経口投与した群（以下Px. +D群、n=13）、インスリンペレット（LINPLANT, LINSHIN社）の上腹部皮

（連絡先）

〒036-8216 弘前市在府町5

弘前大学医学部第三内科 梅田 芳彦

Tel (0172) 39-5062

下への植込群（以下、Px. +I群、n=13）、非治療群（以下、Px. 群、n=13）とし4週間治療を行った。また、コントロールとして、normalの雄のSDラット群（C群、n=13）をおき計4群とした。この間、術後3日目、7日目、14日目、21日目、28日目に午後18時の随時体重および随時血糖値を測定した。治療終了後、酵素抗体法（DCA2000 HbA1c測定キット、バイエル・三共）により糖化ヘモグロビン（HbA1c）を測定し各群の血糖コントロール状態を比較した。

脾ランゲルハンス氏島（ラ島）の分離

Gotohら³⁾によるコラゲナーゼ脾管内注入法に若干の変更を加えラ島を分離した。ネンブタール50mg/kgで麻酔し開腹、21G翼状針を総胆管に肝門部から末梢に向けて刺入した。十二指腸乳頭部をクランプし、1mg/mlのコラゲナーゼ（collagenase S-1、新田ゼラチン）溶液6mlを脾管内に逆行性に注入、膨化した脾を摘出した。摘出脾を37℃の恒温槽に18分間静置し、2%newborn bovine serum（NBS）加Hanks Balanced Salt Solution（HBSS）を加えて2回遠心し酵素反応を停止させた。さらにHistopaque-1077（Sigma）を用いた比重分離法にてラ島を純化し実験に使用した。

グルコース応答能の評価

単離されたラ島の高グルコース、及びL-アルギニンに対するインスリン分泌能を検討する目的でラ島持続灌流を行った。分離した直径150μmのラ島20個をハンドピックし、灌流速度0.8ml/minで持続灌流を行った。灌流液は2%NBS及び20mM HEPES添加後pHを7.4に調製したHBSSを37℃に保ち使用した。グルコース濃度300mg/dlで15分間、50mg/dlに戻して10分間、更に10mM L-アルギニン加50mg/dlグルコースで15分間灌流し、再び50mg/dlに戻して10分間灌流した。グルコース50mg/dlでの灌流時は2分間隔で、グルコース濃度300mg/dl及びL-アルギニン加グルコース50mg/dlでの灌流時は1分間隔で灌流液を採取し

た。検体は速やかに冷凍保存し、インスリン濃度をradio-immunoassay法（RIA）キット（栄研）にて測定した。また、インスリン分泌の第1相目を刺激開始後2分目から5分目までの3分間と定義し、第2相目を刺激開始後7分目から15分目までの8分間と定義して、灌流液のインスリン濃度と流量の積からインスリン分泌のarea under the curve（以下、AUC）を計算した。

GLUT 2の発現

Western blot法

Ogawaら⁴⁾の方法に準じ、脾ラ島のGLUT 2蛋白発現量をWestern blot法にて検討した。直径150μmの分離ラ島20個をもちいて、ラ島のホモジネートを作成した。蛋白は10%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動し、セミドライ式電気泳動転写装置にてニトロセルロース膜上にトランスファーした。GLUT 2の同定はECL protein detection system（Amersham社）にて行った。

GLUT 2蛋白の比較定量

Western blot法によって同定されたGLUT 2蛋白をデンシトメーターソフトウェア（NIH）にて解析した。C群の1検体をスタンダードとして、各検体の相対的な蛋白量の比率を百分率で求め比較定量した。

免疫蛍光染色

ラ島を分離する前の脾臓から病理切片を作成し、間接免疫蛍光染色法を用い、インスリンとGLUT 2の二重染色を行った。染色した組織標本はレーザー顕微鏡LSM410（Carl Zeiss社）にて観察した。

インスリンの含量の測定

GLUT 2の測定に用いたラ島のホモジネートを用い、インスリン濃度をradio-immunoassay法（RIA）キット（栄研）にて測定。直径150μmのラ島1個当たりのインスリン含量を算出した。

統計解析

統計解析にはANOVA及びt-検定を用いた。

結 果

1) OGTTの結果 (Fig. 1)

術後14日目に行ったOGTTの検討ではPx. +D, Px. +I, Px. 群の3群では血糖値に有意差はみられなかった。糖負荷後30分後値でPx. 群ではC群に比べて $213 \pm 8 \text{ mg/dl}$ vs. $170 \pm 7 \text{ mg/dl}$ と有意な血糖上昇をみとめた。インスリンについては0分値、60分値のいずれも脾切除群で低下していた。

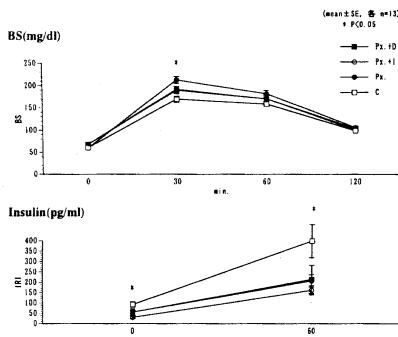


Fig.1 OGTTの経時的变化

正常コントロールラット、70%脾切除ラットに対して（術後）14日目にOGTTを施行した。上部に血糖値の変化、下部にインスリン値の変化を示す。

2) 隨時血糖値及び体重の変化 (Fig. 2)

随時血糖は脾切除術後の21、28日目でPx. +I群 ($94 \pm 7 \text{ mg/dl}$, $96 \pm 6 \text{ mg/dl}$) で有意に低下していた。術後35、42日目ではPx. +D群 ($120 \pm 4 \text{ mg/dl}$, $117 \pm 3 \text{ mg/dl}$) で有意に上昇していた。

随時体重は術後3、7日目でC群 ($112 \pm 1 \text{ g}$, $156 \pm 2 \text{ g}$) で有意に高く、術後14、21、28、35日目ではPx. +D群で $190 \pm 3 \text{ g}$, $226 \pm 4 \text{ g}$, $268 \pm 4 \text{ g}$, $304 \pm 5 \text{ g}$ と有意に低下していた。

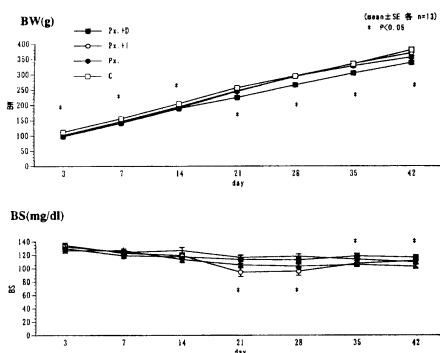


Fig.2 隨時血糖値及び体重の経時的変化
治療前後の隨時血糖及び体重の経時的変化を示す。

3) ヘモグロビンA1c (HbA1c) (Fig. 3)

HbA1c値は各群で差がなかった。

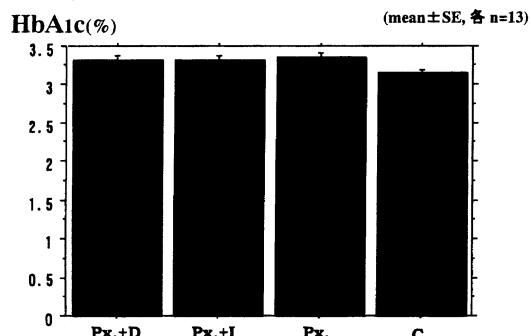


Fig.3 HbA1c値
治療終了時のHbA1c値を示す。

4) ラ島インスリン含量 (Fig. 4)

ラ島一個あたりのインスリン含量は各群で差がなかった。

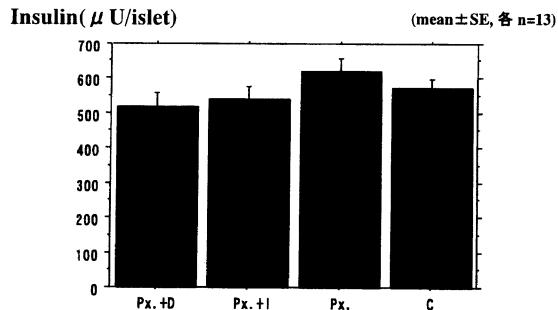


Fig.4 ラ島インスリン含量
治療終了時のラ島1個（直径 $150 \mu \text{m}$ ）あたりのインスリン含量を示す。

5) ラ島灌流 (Fig. 5)

グルコース 300 mg/dl 刺激によるインスリン分泌の第一相目 (AUC) は各群間で差がなかった。 300 mg/dl 刺激によるインスリン分泌の第二相目 (AUC) ではPx. +D群で、C群に比べ $211 \pm 27 \mu \text{U}$ vs. $425 \pm 75 \mu \text{U}$ とインスリン分泌の有意な低下がみられた。

10mM L-アルギニン刺激によるインスリン分泌の第一相目 (AUC) はPx. +D群が、Px. +I群、Px. 群に比べ $35 \pm 7 \mu\text{U}$ vs. $65 \pm 7 \mu\text{U}$ 、 $69 \pm 9 \mu\text{U}$ とインスリン分泌の有意な低下がみられ、インスリン分泌の第二相目 (AUC) ではPx. +D群で、C群に比べ $70 \pm 11 \mu\text{U}$ vs. $244 \pm 29 \mu\text{U}$ とインスリン分泌の有意な低下がみられた。

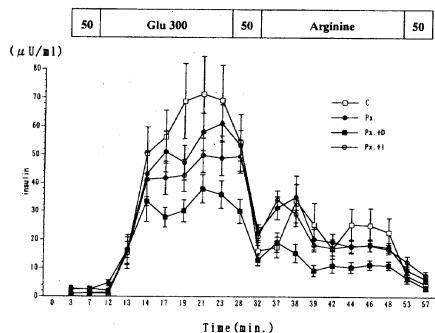
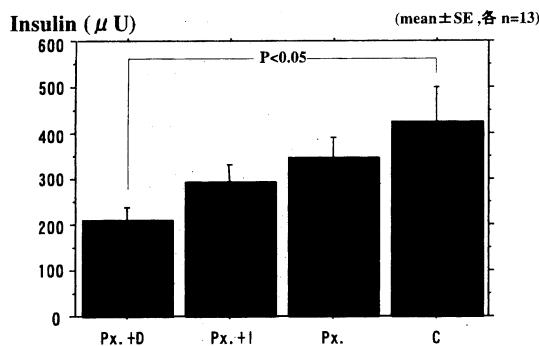
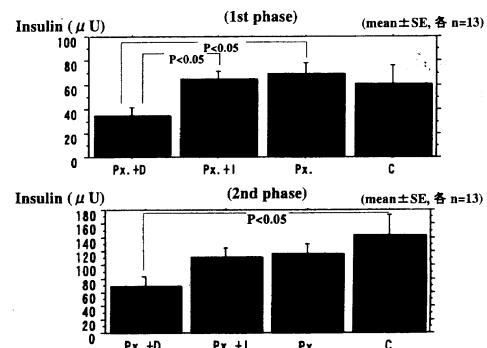


Fig.5 ラ島灌流におけるインスリン分泌
a) 各群におけるラ島灌流時のインスリン分泌量を示す。Px.+D群で著明なインスリン分泌低下がみとめられた。



b) グルコース300mg/dl刺激第二相目のインスリン分泌のAUCを示す。Px.+D群はコントロール群に比べ著明なインスリン分泌低下をみとめた。



c) 10mM L-Arginine 刺激第一、二相目のインスリン分泌のAUCを示す。第1相目ではPx.+D群でPx.+I、Px.群に比べて著明なインスリン分泌低下をみとめた。第2相目ではPx.+D群でコントロール群に比べ著明なインスリン分泌低下をみとめた。

6) GLUT2の発現 (Fig. 6)

GLUT2の発現は各群間で有意差がなかった。

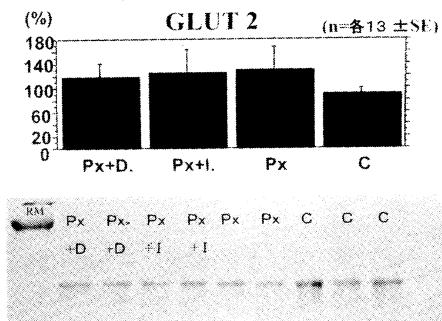


Fig.6 GLUT2の発現量 (Western Blot法)
治療終了時のGLUT2の発現量を示す。

7) ラ島組織 (免疫蛍光染色) (Fig. 7)

ラ島組織では β 細胞内にインスリン、 β 細胞膜にGLUT2の陽性染色像をみとめ、 β 細胞の空胞変性などの異常はなく各群間で差がなかった。

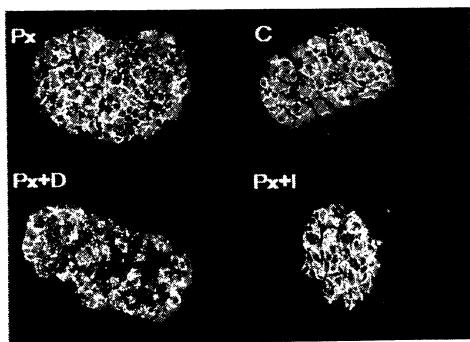


Fig.7 組織学的変化
各群のラ島組織像（蛍光免疫染色）を示す。

考 察

治療開始前のOGTTではC群を除く3群間で血糖値に有意差はなかった。インスリン反応ではPx.を行った群でC群に比べ0分値、60分値が低下しており、70%脾切除によるβ細胞容量の低下が示唆された。随時血糖はPx. + I群で治療開始後1、2週目で有意な低下が見られたが、この理由としてはPx. + I群ではインスリンペレット植込みの効果のピークが1～2週目にあつたためと考えられる。また、Px. + D群で治療開始後3、4週目で血糖値の有意な高値をみとめたが、この現象はPx. + D群で徐々に耐糖能が悪化している可能性を示唆するものである。随時体重については、治療開始前では脾切除を行った群で低かったが、これは手術侵襲による影響と考えられた。また、治療開始後、Px. + D群で体重の増加が低下していた点については、SU剤を経口ゾンデにより強制的に服用させたことによるストレス負荷が原因と考えられた。以上のように、随時血糖の推移に若干の差がみられたものの、治療終了時のヘモグロビンA1c値には有意差がなかったことから、経過中の血糖コントロール状態は各群でほぼ等しいものと考えられた。

今回の実験結果はβ cell massが低下した状態での慢性的なSU剤の投与により、生体内の残存脾ラ島細胞において、インスリン分泌能が障害され

ていることを示唆している。灌流実験ではPx. + D群で高グルコースに対する、インスリン分泌の第二相目と、L-アルギニン刺激に対する第一相目、二相目でインスリン分泌の有意な低下をみとめた。これまで、同様の結果がグリベンクラミドとトルブタマイドを用いたいくつかの実験で報告されており^{5, 6)}、二次無効の原因の一つの可能性として、SU剤の持続的な刺激がβ細胞膜の慢性的な脱分極をもたらし、結果的にそれ以上のSU剤刺激に対してβ細胞の反応性が低下することが推測されている。今回著者は、インスリン分泌メカニズムのファースト・ステップであるGLUT 2の変化について検討してみた。これまでin vivoにおける高血糖状態においては、インスリン分泌低下とGLUT 2低下が同時に起こることが報告されており⁷⁾、GLUT 2の低下とβ細胞の疲弊との関連を予測したが、今回GLUT 2については有意差がみられなかつた。従って、今回認められたインスリン分泌障害の原因としては、インスリン分泌過程における、GLUT 2による糖輸送よりも下流での障害を考えねばならない。また、近年SU剤のレセプターが、ATP感受性カリウムチャネルと複合体を形成し、ATP感受性カリウムチャネルのregulatorとして働いていることが示されており⁸⁾、このチャネルの機能異常や発現がβ細胞の疲弊とどのように関わっているのかも興味深く、今後の検討が必要と考える。

結 語

脾β細胞量が減少している状態において、SU剤の慢性投与がインスリン分泌機能の低下を引き起こすことが示唆された。原因として、慢性的なインスリン分泌刺激による脾β細胞の疲弊が考えられた。従って、このような病態下においては、β細胞のインスリン分泌能低下を予防するためにSU剤治療よりも、インスリン治療の方が適切であると考えられた。インスリン分泌能低下の原因として糖輸送膜蛋白GLUT 2の減少を考えたが、発現量は各群間で差がなかつた。

参考文献

- 1) Groop LC. et al. : Secondary failure to treatment with oral antidiabetic agents in non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes Care*, 9 : 129-133, 1986.
- 2) Richards C. et al. : Segmental division for experimental procedures. *Lab.Invest.*, 13 : 1303-1321, 1964.
- 3) Gotoh M. et al. : Reproducible high yield of rat islets by stationary in vitro digestion following pancreatic ductal or portal venous collagenase injection. *Transplantation*, 43 : 725-730, 1987.
- 4) Ogawa Y. et al. : Loss of glucose-induced Insulin secretion and GLUT2 expression in transplanted β -cells. *Diabetes*, 44: 75-79, 1995.
- 5) Zawalich WS. : Phosphoinositide hydrolysis and insulin secretion in response to glucose are impaired in isolated exposure to the sulfonylurea tolbutamide. *Endocrinology*, 125 : 281-286, 1989.
- 6) Gullo D. et al. : Chronic exposure to glibenclamide impairs insulin secretion in isolated rat pancreatic islets. *J Endocrinol Invest*, 14 : 287-291, 1991.
- 7) Thorens B. et al. : Reduced expression of the liver / beta-cell glucose transporter isoform in glucose-insensitive pancreatic betacells of diabetic rats. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87 : 6492-6496, 1990.
- 8) Nobuya I. et al. : Reconstitution of / KATP : an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science*, 270 : 1166-1170, 1995.