Insulin and Lipoperoxide

Kazuo KATSUMATA and Kouzo YAMADA

Third Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Nagoya University,
Nagoya, Japan (Director : Professor K. Yamada)

Ikuo NISHIGAKI, Naoki YAMANAKA and Takayuki OZAWA

Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Nagoya University
(Director : Professor K. Yagi)

The relationship between insulin and lipoperoxide was studied. The following results were obtained.

1. The levels of T.B.A. on the liver of insulin deficient alloxan diabetic rats were observed with or without V.E. and were compared with the levels of TBA on the liver of control rats. Alloxan diabetic rats had higher TBA levels on the liver than that of control rats. On the contrary insulin treatment decreased TBA on the liver of alloxan diabetic rats to normal.

2. The addition of 100 mU pork insulin per ml of reaction system in vitro markedly decreased TBA level on the liver of normal rats, but did not influence TBA level on the liver of alloxan diabetic rats.

3. The above-mentioned results show that insulin has some biological or pharmacological effect on the TBA and that the increased level of liver lipid observed in the alloxan diabetic rats together with the decreased level of antioxidant must have a causal relation with the increased TBA level on the liver of alloxan diabetic rats.

(See pp. 778~782)

インスリンと過酸化脂質に関する研究

名大山田内科

勝 又 一 夫, 山 田 弘 三

名大第一生化

西 垣 郁 雄, 山 中 直 樹

小 沢 高 将

(昭和44年3月17日受付)

アロキサン糖尿病白鼠肝の TBA 値は対照白鼠肝より明らかに高かった。インスリン治療のアロキサン糖尿病白鼠肝では、TBA 値の上昇はなかった。In vitro のインスリン添加で、対照白鼠肝 TBA 値は低下したが、アロキサン糖尿病白鼠肝では低下が明らかでなかった。

In vitro の VE, albumin の添加で、対照群肝の TBA の低下は明白に認められたが、アロキサン糖尿病肝では TBA 値の低下は対照群ほどではなかった。以上の成績に基づき、インスリンと過酸化脂質に関して 2, 3 の考察を行なった。

序 言

人動脈壁の atheroma 病変部位より抽出した脂質に大量の過酸化脂質 (lipoperoxide) の存在が証明せられ、最近、動脈硬化の発生要因と動脈壁の lipoperoxide の増加との関係が一部の学者の間で注目されている¹⁾。ところで人糖尿病では血管障害が多発し、糖尿病の死因の第一位は合併する血管病変である。換言すればインスリン欠乏、あるいは利用障害時の病態は血管障害の発生に好適な場を提供している。しかしながら、それらの理由は明白ではない。

インスリン欠乏状態では、周知の如く脂質代謝の異常が存在する。脂質の増加が存在した場合に、何らかの要因によつて自動酸化が起り、lipoperoxide 値が増加する可能性がある。lipoperoxide の増量と血管障害の発生との密接な関連については、すでに述べた¹⁾。インスリン欠乏時に lipoperoxide の増加が存在すれば血管障害の発生を促進するのみならず、肝酵素活性にも影響を及ぼし、糖尿病の病態を修飾するであろう。そこで我々は、アロキサンでインスリン欠乏性糖尿病白鼠を作り、その lipoperoxide 値を検討した。従来、lipoperoxide の測定方法は、血糖の上昇に伴い、その影響で高値を示すなどの、かなりの問題を含んでいた。我々は脂質を抽出してから測定する西垣、八木等の方法²⁾に従い、血糖に影響されることなく、lipoperoxide 値を測定し、興味ある成績を得た。

実 験 方 法

雄性 Wistar 系白鼠20匹を oriental 固形食と野菜で飼育し、5例の対照群と15例のアロキサン糖尿病群に分けた。15例のアロキサン糖尿病群にはアロキサンを200mg/kg体重当たり腹注し、7日後に空腹時血糖200mg/dl 以上を示す白鼠10例をアロキサン糖尿病群とした。その中の5例は以後レンテインスリンを1単位ずつ7日間筋注するアロキサン治療群とし、5例はインスリンを注射しない未治療群とした。アロキサン注射後14日目に食餌を抜いて4時間後に断頭屠殺し、肝をとりだし、lipoperoxide 値を測定した。測定方法は Table 1 に示す。Lipoperoxide 値は肝湿重量1g当たりの TBA 値として表わした。また肝の一部については、総脂質を重クロム酸カリ法³⁾で測定した。Table 1 に示す如く、in vitro に tocopherol

Table 1. Method of TBA determination

*0.67% Thiobarbituric acid aqueous solution was mixed with the same amount of acetic acid.

acetate, albumin, pork insulin などに加え、肝 TBA 値に及ぼす影響についても検討し、興味ある成績を得た。

結 果

1) アロキサン糖尿病ならびに対照白鼠肝の総脂質と lipoperoxide 値

5例のアロキサン糖尿病白鼠肝の TBA 値は 5.68 ± 1.92 で対照白鼠 5例の TBA 値 3.07 ± 0.38 よりも明白に高かった (Table 2)。この高値は肝総脂質の増加とかなりよく符合した。

Tocopherol acetate を in vitro で、肝をとりだしてから直ちにに加え、全く同様にして測定したが、その結果 TBA 値は同様にアロキサン糖尿病白鼠肝が対照よりも高値を示した。しかし、対照群、アロキサン糖尿病群ともに tocopherol acetate 添加時の TBA 値は tocopherol acetate の添加しない場合に比して、かなり低くなっていた (Table 2)。総脂質は、しかしながら tocopherol acetate の有無によつて、著しい

Table 2. Changes of TBA levels and total fat in liver of untreated alloxan diabetic and control rats

rat No.	Untreated alloxan diabetic				Control			
	TBA/g liver		total fat mg/g		TBA/g liver		total fat mg/g	
	VE(-)	VE(+)	VE(-)	VE(+)	VE(-)	VE(+)	VE(-)	VE(+)
1	6.28	3.09	94.5	99.4	3.08	0.76	54.6	53.4
2	3.18	1.41	78.9	81.5	2.56	0.77	57.3	57.1
3	4.12	2.09	97.3	104.3	2.74	0.89	51.9	51.3
4	8.72	4.18	112.4	113.6	3.56	0.88	47.5	49.1
5	6.12	4.52	109.5	101.7	3.41	0.79	69.1	68.4
Mean ±S.D.	5.68 ±1.92	3.06 ±1.22	98.5 ±13.7	100.1 ±10.5	3.07 ±0.38	0.82 ±0.06	56.1 ±10.4	55.9 ±8.8

VE(+) or VE(-) means that tocopherol acetate is added in vitro to the experimental system or not.

変化は見られなかった。なおアロキサン糖尿病群白鼠肝での TBA 値は肝 1g 当たりでもまた肝総重量としてみても、すべて対照に比して高値を示したが、肝脂質当たりの TBA 値として計算すると、アロキサン糖尿病白鼠肝で TBA 値の増加は認められなかった。

2) In vivo. In vitro のインスリン効果

アロキサン注射 7 日後に高血糖を示し、糖尿病の発症をみたアロキサン糖尿病白鼠に毎日 7 日間 Lente insulin 1 単位の注射をし、治療してきた 5 例の肝 TBA 値は Table 3 に示す如くで、Table 2 に示す対照群に比べて増加は見られなかった。一方、

Table 3. Changes of TBA level and total fat in liver of insulin-treated alloxan diabetic rats

rat's No.	insulin treated alloxan diabetic rats	
	TBA/g liver	total fat mg/g
1	3.53	59.1
2	3.01	61.4
3	2.94	57.9
4	3.31	59.3
5	2.77	55.1
mean ± S.D.	3.11 ± 0.29	58.6 ± 2.0

Table 4. The effect of insulin addition in vitro to the untreated alloxan diabetic and control rats liver homogenate

rat No.	untreated alloxan diabetic				control rats			
	TBA/g liver		total fat mg/g		TBA/g liver		total fat mg/g	
insulin	100mU	200mU	100mU	200mU	100mU	200mU	100mU	200mU
1	6.32	6.31	93.7	97.1	3.49	3.50	57.3	57.1
2	3.16	3.17	76.5	80.9	2.44	2.41	59.2	59.1
3	4.11	4.13	99.5	113.4	2.23	2.14	50.4	51.7
4	8.89	8.95			2.26	2.17		
5	6.16	6.11			2.21	2.22		
mean ±S.D.	5.73 ±1.99	5.73 ±2.01	89.9 ±6.45	97.1 ±13.2	2.53 ±0.49	2.49 ±0.51	55.6 ±3.8	56.0 ±3.1

Table 5. The effect of albumin addition in vitro to the untreated alloxan diabetic and control rats liver homogenate

rats No.	untreated alloxan diabetic		control	
	TBA/g liver	total fat mg/g	TBA/g liver	total fat mg/g
1	5.41	95.3	1.49	53.9
2	2.77	77.6	1.21	57.4
3	3.74	99.4	1.30	51.8
4	6.79		1.73	
5	5.54		1.56	
mean ±S.D.	4.85±0.58	90.8±9.5	1.46±0.19	54.2±2.2

5mg bovine albumin was added to the experimental system (1mg/ml)

in vitro で対照ならびにアロキサン未治療糖尿病白鼠肝 homogenate に, 100mU, 200mU の pork insulin を加え, 次いで TBA 値を測定した (Table 4). 肝総脂質はインスリンの添加で著変はなかったが, TBA 値は対照群で著明に減少した. しかしながら, アロキサン糖尿病群の肝では減少が全くみられなかった.

5 mg の bovine albumin を加えてみると, 対照群及びアロキサン糖尿病白鼠肝の TBA は共に減少したが, アロキサン糖尿病白鼠肝 TBA 値の方が減少は少なかった (Table 5).

考 案

アロキサン糖尿病白鼠肝で, TBA 値は明白に対照白鼠の肝より高値を示した. しかしながら, 肝脂質 mg 当たりとして計算すると, TBA 値の差がないことから, アロキサン糖尿病では肝脂質の増量がまず存在し, 次いで過酸化機構の促進, 抗過酸化機構の減弱が加わつて, 肝 TBA 値は増加したものと思われる. 従来すでに VE を始め, 多くの抗過酸化物質が示されているが⁴⁾, 抗過酸化, ならびに過酸化物質形成促進の機構, アロキサン糖尿病白鼠におけるそれらの機構の詳細は明らかではない. ところで in vitro で VE を最初より加えると, アロキサン糖尿病群の肝 TBA 値は VE により低下はしたが, 対照群の方が低下が著明であつたため, 対照群に比べて著しく高値を示した. VE は優れた抗過酸化剤であり, 一般に過酸化反応を抑制するといわれているので, アロキサン糖尿病肝にみられる TBA 値の増加のすべてが, 肝脂質が実験操作の過程において peroxidation を来したためとは考えられず, 生体内で peroxidation の増加が確かに起つていることを示すものと考えられる. ところで, インスリン治療を行なつたアロキサン糖尿病白鼠で肝の TBA 値は明白に低下していた. この事実は, インスリンの治療により肝脂質の増加が見られないことと一致する. 対照白鼠肝にみられた in vitro でのインスリン添加効果は興味深い. 有効なインスリン添加量は大量を要し, 100mU/ml 以上であつた. かかる in vitro のインスリン効果は対照白鼠肝にのみ認められ, アロキサン糖尿病白鼠肝では殆んど無効であつた. インスリンの抗酸化作用はそのメカニズムは不明であるが, 注目に値する. In vitro の有効インスリン濃度, 対照群の白鼠肝にのみインスリンが有効である事実より, in vitro でのインスリン効果はインスリンそのものが直接生物学的な作用で抗過酸化作用を示すのか, あるいは薬物的に理解すべきであるのか, 不明である. アロキサン糖尿病群の肝で, in vitro のインスリンによる抗過酸化作用がなく, albumin の抗過酸化作用も少ないことは, アロキサン糖尿病時に抗過酸化機構の減弱と, 過酸化促進機構の増強を示すものかもしれない. 一般に脂質過酸化物は多くの酵素活性に対して, 障害作用を有することはよく知られている. 門脈血中の高いインスリン濃度より考えて, 生体内でインスリンは抗過酸化剤として働らし, 各種酵素を保護している可能性もある. 勿論, すでに多くの抗過酸化物質が知られており, インスリンの抗過酸化作用はインスリンのみに特異的なものではない. albumin 1mg/ml でも抗過酸化作用があるが, しかしインスリンよりも遙かに大量であることは興味深い.

以上, 要約するとインスリン欠乏時には脂質の増加があり, 同時にインスリン欠乏による代謝の乱れより, 抗過酸化機構の減少と過酸化促進機構の増加を来し, 肝 TBA 値の増加が来るとされる. このような TBA 値の増加は永続すれば, 当然血管障害の発生に好適な場を提供するのみならず, 肝酵素活性にも何らかの影響を与え得るかもしれない. なおアロキサン糖尿病白鼠のその他の臓器における TBA 値については, 血液, 心では対照と差はなく, 各臓器間の差が存在し⁶⁾, 複雑な因子の関与が推定される.

結 論

1) アロキサン糖尿病白鼠肝では過酸化脂質の増量が存在し, インスリンの治療では増量はみられない. この増加は VE の添加によつても存在しているので, 生体内で過酸化物が増加したものと思われる.

2) 100mU/ml 以上のインスリンの *in vitro* の添加により対照白鼠肝で過酸化脂質は減少するが, アロキサン糖尿病白鼠では変動はない.

かかるインスリン作用が生物学的作用か, インスリンの薬物的作用によるのか不明であるが, 興味深い現象である.

3) アロキサン糖尿病白鼠肝の過酸化脂質の増加は肝脂質の増加が基礎となり, 糖尿病時の代謝異常のために抗過酸化機構の減弱を来したことによると思われる.

以上の成績を糖尿病時の血管障害との関連で論じた.

文 献

- 1) 福住一雄, 岩田国雄: 油化学, 12: 93, (1963).
- 2) 西垣郁雄, 八木国夫, 小沢高将: ビタミン, 38: 359, (1968).
- 3) BRAGDON, J.H.: J. Biol. Chem., 190: 513, (1951)
- 4) MATTILL, H.A.: Oil and Soap 22: 1, (1945)
- 5) TAPPEL, A.L.: Arch. Biochem. Biophys. 54: 266, (1955)
- 6) 勝又一夫: Unpublished data