トリプトファン代謝異常による実験的糖尿病

Studies of Experimental Diabetes Caused by Xanthurenic Acid, an Abnormal Metabolite of Tryptophan

古 武 彌 人*
(Yahito Kotake)

Since 1950 we have conducted a series of experiments on the diabetic symptoms in albino rats caused by the administration of xanthurenic acid (XA), an abnormal metabolite of tryptophan. Our studies have given conclusive evidence that XA is related to the development of human diabetes, a disease generally attributes to an inadequate food intake. Evidence also suggests that there is a close relationship between animal and human diabetes.

Experiments have shown that XA is a substance produced in the body as a result of intake of excess of the sodium salts of fatty acid (representing fat) and tryptophan (representing animal protein).

Taking into consideration the chronic nature of human diabetes, we then studied the development of chronic diabetic symptoms in rat caused by accumulative effect of XA produced in the body when vitamin B₆ deficient diet or excessive fat and tryptophan diet was administered for a long period. Then the pancreatic tissue of these rats was examined histologically. A decrease of stainability, a decrease in granules, much vacuole formation, and collapse of the protoplasm were noticeable in the β -cells of the islets of Langerhans.

We then examined fairly large amount of XA in the urine of many diabetic patients by the partition paper chromatographic method. These is an undeniable etiological relationship between free XA and human diabetes since a fairly large amount of XA in a free form present in the urine was invariably present in the urines of diabetic patients.

Murakami, one of our co-worker, recently showed that XA formed a binding complex with insulin. We have observed XA bound with insulin in human serum. XA-insulin complex showed a new fluorescence spectrum. The hormonal activity of XA-insulin complex was markedly decreased.

From these results we may suggest that experimental diabetes in the presence of XA may be induced by the following mechanism:

今日ヒトの糖尿病発症の etiology は明確でなく、その原因は一つではなく複数のものであることは、まず間違いないだろう。以前より唱えられてきた原因の一つとして遺伝性ということが考えられる。遺伝性の存在はまず間違いないことながら、栄養学的に考え、食物の摂取状態ということが糖尿病発症と大きな関係を持っていることも間違いないだろう。その証拠の一つとして、戦争中

* 名古屋大学医学部

極度に食事状態の悪化した時には、糖尿病の発症は極端に減少し、戦後状態の良くなった今日、以前にも増して糖尿病発症の増大したことがあげられる。このようなことを考える時、食物中のある栄養素が異常代謝をおこし、平常余り生成されない物質が比較的多量に生成されそれが原因になって糖尿病が発症することも一応考えられる。遺伝性にしても、ある酵素の defect が存在しているため、このような物質が体内に生成されやすい性質

が遺伝しているのかも分らない。このようなことから栄養学的に見て、栄養素摂取のアンバランスということが永続した場合、それが原因となって糖尿病発症を惹起する可能性は十分考えられる。著者らは15年以前より、動物を用いて多くの実験を行ない、ビタミン B₆ 欠乏食とか、過剰の脂肪を続けて摂取した場合、体内にトリプトファンの代謝異常をおこし、そのため平常少量しか生成されないキサントウレン酸(XA)が多量に生成される。このXAが糖尿病発症物質であるため、このような食事状態が長く続けば遂に糖尿病発症という事態になることを証明した。この研究は、ヒトの糖尿病の etiology を解明する一つの approach を得たものと信じている。と同時に栄養学的に、栄養素の摂取に際して、脂肪の過剰摂取ということには、問題が存するのではないかと考えられる。

我々は、今から15年も以前に、特に稲田鋭郎とともにトリプトファンの代謝産物XAが動物の糖尿病発症物質であることをつきとめ、確実なる代謝産物を用いて始めて糖尿病動物を作ることに成功した。元来このXAなる物質は健常時には、極めて少量しか体内に生成されない物質であるが、ビタミンB₆欠乏時、また過剰の脂肪摂取時に多量に生成される。また近時著者たちの協同研究者村上枝彦は、このXAがインシュリンと結合することを証明し、それに続いてこのXA-インシュリン-complex が、インシュリンとしてのホルモン活性の著しい低下を確認して、ヒト糖尿病発症の etiology 研究に一つの可能性を示すことができた。以下これら著者らの研究の概略について述べ、ビタミン B₆ 欠乏、また脂肪過剰摂取ということとXA糖尿の関係について考えてみることにする。

I. 生体内 XA 生成について

XA 生体内生成に関して述べる前に、XA そのものについて少しく述べることにする。XAがトリプトファン代謝産物としてシロネズミ尿中より Musajo²⁾ によって発見されたのは1935年のことである。尿より得られた黄色の酸という意味で Xanthurenic acid と命名された。合成にも成功して、4,8-dihydroxyquinoline-2-carboxylic acid であることが判明した。

1942年より1943年にかけて Lepkowsky³⁾ らによって V. B₆ 欠乏時に多量の XA が、体内にトリプトファンよ

り生成されることが判明した。この発見は、トリプトファン代謝に関しては偉大なる発見であった。その理由として V. B₆ あるいは、V. B₆ 欠乏においても XA の多少の増加排せつは認められるが、V. B₆ 欠乏時の増加排せつは健常時の20倍にも達し、これらの場合に比して比較にならぬくらい大きいことがあげられる。そこで体内にてXAの著明な生成増加があれば、必ず、直接、間接 V. B₆ 欠乏と関係があると考えてよい。現在 V. B₆ 欠乏の証明にしばしばこのXA増加排せつが用いられることから考えても理解できる。これらの事実はトリプトファン代謝が正常に進むためには V. B₆ の十分なる存在ということが必ず必要であることが了解できる。このXAの生成ということはトリプトファン代謝において栄養学上なんら貢献するところなく、この増加生成はむしろ有害で、このXA生成の少ないほどトリプトファンは有意義に体内で利用されていると考えてよい。その意味から言っても、XA生成は、健常時には生体内に極めて少量しか生成されず、V. B₆ というような栄養学上の一つの欠陥が存する場合に、体内に多産されると解される。これらの事実を証明される上において後程に述べるごとくトリプトファン代謝において重要な役割をつとめているキヌレニネース、キヌレニトランスアミネースなどの酵素がピリドキサルリン酸を補酵素とする酵素であることが Braunstein⁴⁾ によって証明されている。

XAは上述のごとく、健常時においても生成されるがその量はきわめて少なく、トリプトファンはキヌレニンを経て主として完全分解されたり、また栄養学上大切な生理的意味を有すると考えられるNADの生成、またアンスラニル酸の生成ということが大きな意味をもっていると考えられる。従って上述のごとくXAの増加生成ということは、トリプトファンの栄養学的の大きな欠陥ということができる。そこで我々が実験研究しているXAの増加生成の意義、ついでこのXAによる実験的糖尿病について以下述べることにする。

A. V. B₆ 欠乏と XA 多量生成の意義

このことは Fig. 1 においてキヌレニン→アンスラニル酸、3-OHキヌレニン→3-OHアンスラニル酸なる代謝経路において、これら反応に関係ある酵素キヌレニネースが、ピリドキサルリン酸を補酵素としている関係上 V. B₆ 欠乏時に本酵素活性が衰え、これらの変化が円滑に行なわれなくなり、その結果XAが主として生成されることより一応説明された。しかし、キヌレニン→キヌレン酸、3-OHキヌレニン→XAなる両反応を触媒する酵素キヌレニトランスアミネースもまた、ピリドキサルリン酸を補酵素としている事実より、以上の説明では満足な解決が与えられなくなった。

今回我々⁵⁾は、この意義の説明を両酵素の細胞内分布により説明することができた。このことに関して説明する。

Table 1. Distribution of Kynurenine-Transaminase and Kynureninase

	Kynureninase		Kynurenine-transaminase
	Liver	Kidney	Kidney
Mitochondria (700—9,000× g)	3.4	3.6	42.7
Microsome (9,000—105,000 × g)	5.1	4.4	3.0
Supernatant	91.5	92.0	54.3

Table 1. に示すように、キヌレニントランスアミナーゼ活性の40%は、細胞内においてミトコンドリアに存在するのに反して、キヌレニナーゼの全活性は、上清部のみに存している。

つぎに V. B₆ 欠乏時の細胞内両分画の両酵素活性の変動を検査した。(体重40 g 前後のシロネズミに V. B₆ 欠乏食を30日間投与)

全ホモジネートを用いて検査すると Fig. 2 の如く、キヌレニナーゼ活性は、対照動物の25%まで低下したがキヌレニナーゼトランスアミナーゼ活性は、50%にまで低下したに過ぎない。これらの結果は Mason ら⁶⁾ のそれとよく一致している。つぎに細胞内各分画について両酵素活性の変動については、上清部のみに存するキヌレニナーゼの全活性とキヌレニントランスアミナーゼ全活性の60%を占める上清部の活性は、V. B₆ 欠乏により殆んどその活性が消失するのに反して、全活性の40%を占めるミトコンドリア中のキヌレニントランスアミナーゼ活性は、ごくわずかに活性の低下をみるに過ぎない。(Fig. 2 は比活性を%で示している)

この実験によって、V. B₆ 欠乏シロネズミにおいて肝または腎中の上清部のみに存在しているキヌレニナーゼ活性は、ほとんど消失するのに反して、ミトコンドリアに存する全活性の40%を占めるキヌレニントランスアミナーゼ活性は残存し、体内の3-OH キヌレニンの大部分は、XAに移行することが判明した。以上両酵素の細胞内分布により、V. B₆ 欠乏時に XA の多量生成される理由を明確にすることができた。

B. 脂酸ソーダ投与または高脂肪食摂取による XA

Fig. 2.

Activities of Kynurenine-transaminase and Kynureninase in Vitamin B₆ deficient rats.

の増加生成

我々はトリプトファン (0.1 g) とともに脂酸ソーダ例えば酪酸ソーダ (0.4 g) をともにシロネズミに投与して、その尿中より多量の XA を見出した。ここに新しくトリプトファンと脂肪の過剰摂取ということがトリプトファン代謝の異常を来すことを知った。Table 2. はトリプトファンと各脂酸ソーダを体重 120 g のシロネズミに投与した時の XA 排泄の様子を示している。

Table 2.

The amount of XA excreted in 24 hours after administration of tryptophan and various fatty acids. Urine XA was determined by Glazer's method. To albino rats, weighing 120gm, 0.1gm of tryptophan and 0.4gm of the sodium salts of various fatty acids were simultaneously administered.

Substance administered	Amount excreted
Tryptophan alone	1.61mg
Tryptophan plus sodium acetate	5.37
Tryptophan plus sodium propionate	8.79
Tryptophan plus sodium butyrate	9.89
Tryptophan plus sodium valerianate	9.64
Tryptophan plus sodium palmitate	9.61
Tryptophan plus sodium stearate	8.57
Tryptophan plus sodium oleate	10.49

つぎにこれら実験の意味づけに関する検討を行なった。この場合 Lepkowsky らの考え方を導入して V. B₆ 欠乏と XA 多産ということが、脂酸ソーダ (脂肪) の過剰投与ということと何らかの関係があるのではないかとの考えをもった。そこで酪酸ソーダ投与群、脂肪過剰投与群 (35% バター食長期投与) の各群を作り、それらシロネズミ肝中のビリドキサルリン酸の定量を行なった。定量法は市原⁹⁾の方法によった。またビリドキシン 5 mg/100 g body wt. を各群のシロネズミに注射後、同じく肝ビリドキサルリン酸量を定量した。その結果⁷⁾をつぎに示す。

Fig. 3 に示す如く、肝中ビリドキサルリン酸量は、確実に V. B₆ 欠乏群、酪酸ソーダ投与群、高脂肪長期投与群では、対照に比して減少を示している。かつビリドキシン 5 mg/100 g body wt. 投与した場合、V. B₆ 欠乏群のビリドキサルリン酸の増加量は、対照の健常時となら異ならないが、酪酸ソーダ投与群、高脂肪長期投与群の各々では、明らかにビリドキサルリン酸の増加量

Fig. 3.
Pyridoxal phosphate concentration under various conditions

の少ないことが認められた。そこでシロネズミの体内において、ビリドキシンが活性型のビリドキサルリン酸になる酵素反応において、多量の脂肪投与により阻害を受け、一種の V. B₆ 欠乏になり、その結果 XA の多産をきたすと推定した。以上の研究に対してその後中原、渡辺、森野、坂本⁹⁾は、さらに酵素化学レベルで追求し、次の結果を得た (Fig. 4)。すなわちシロネズミ体内において、ビリドキシン→ビリドキシンリン酸→ビリドキサルリン酸なる変化を認め、脂酸ソーダ、脂肪の過剰投与により、ビリドキシンリン酸→ビリドキサルリン酸に関係する酵素活性が阻害を受け、ビリドキシンがビリドキサルリン酸になり難くなると結論した。

以上の研究よりトリプトファンの正常な代謝を行なう上においては V. B₆ 欠乏にならないこと、また過剰の脂肪摂取を避けることがぜひ必要であると考えられる。トリプトファンより NAD, アンスラニル酸 (キヌレニン経由代謝) は生理的に大きな意味をもっている。これに反して XA の多産は、XA 自体生理的になら意味のない物質と言ってもよく、後述のように却って有害な産物と考えてよい。XA 自体がこのような物質であるのみならず、このものの多産は他の有効なトリプトファン代謝産物、例えば組織タンパク質合成、NAD, アンスラニル酸セロトニンなどの生成を妨げる結果になる。このような考え

Fig. 4.

Variation of liver pyridoxal phosphate content and pyridoxine phosphate oxidase activity with time after oral administration of sodium butyrate 0.3 gm/120 gm. Open symbols represent pyridoxal phosphate content, and closed symbols pyridoxine phosphate oxidase activity. (坂本らが行った結果)

から脂肪の過剰摂取を避けること、また十分な V.B₆ を摂ることはトリプトファン代謝を円滑にするためには、ぜひ必要なことと考えられる。

II. XA と実験糖尿病

以上述べた研究結果が土台となって、高脂肪・高トリプトファン食(美食中に多く含まれている), また V.B₆ 欠

乏食を長期にわたって摂取したシロネズミの体内に XA が増加し、その XA によると考えられる実験的慢性糖尿病発症を証明したのが、次の Fig. 5, Fig. 6 に示す実験である。以上のようなことはヒトにおいても多く起こりうる条件であるので、或いはヒトの糖尿病発症の原因になる可能性を有しているのではないかと私は信じている。なお、酪酸ソーダとトリプトファンを同時投与したシロネズミ尿中より分離した XA を用いて 1 回注射して行なった血糖曲線も併わせて Fig. 7 で示しておく。

血糖の測定は何れも King-Garner の方法によって行なった。

XA 糖尿に関して最近我々の協同研究者の 1 人村上¹⁰⁾は、XA は試験管内で容易にインシュリンと結合することを見出し、引きつづいて血清中においてもたやすく結合することを、我々は確めた。さらにこの XA-インシュリン結合物のホルモンとしての作用を検した¹¹⁾。

インシュリン溶液を pH 8.0 の Krebs-Ringer 液にて XA 溶液と合一し、37°C, 30 分間保温してから Sephadex G-50 カラムを通し、タンパク質部分を合一して流水透析を行ない、余分の遊離の XA を除き、内容物を凍結乾燥させる。得たものの蛍光スペクトルをとると

Fig. 5.

Body weight and blood sugar level after administering high fat and casein diet. Albino rats were fed for a long period on a diet containing much fat and casein.

Fig. 6.

Body weight and blood sugar level after feeding on a vitamin B_6 deficient diet. Albino rats were fed for a long period on a diet deficient in vitamin B_6 .

Fig. 7.

Blood sugar level after injection of xanthurenic acid. Male albino rats, weighing 150gm were employed. Xanthurenic acid 120mg/kg was injected intraperitoneally. +, +, + indicate the amount of glucose in the urine determined by Benedict's method.

Fig. 8.

Fluorescence spectrum of XA-insulin complex

Fig. 9.

この結合物には新しい蛍光特性が現われ、二物質の結合を証明している。(Fig. 8)

この XA-インシュリン結合物についてホルモンとしての作用を検した¹⁵⁾。

A) 血糖降下作用、イヌ、ウサギについて実験を行ない両動物とも満足すべき結果を得た。ここではウサギを用いての実験の結果を Fig. 9 に示す。血糖は Hagedorn-Jensen 法によって測定を行なった。

図に示すように XA-インシュリン結合物質のホルモンとしての活性は、インシュリンそのものの結晶のその約50%の低い活性を示すに過ぎない。

B) つぎに Renold らの方法に従ってネズミの副腎丸脂肪組織を用いて、グルコースのとりこみをしらべた。その結果を Table 3 で示す。(この実験は、慈恵医科大

Table 3. Effect of XA on the uptake of glucose by epididymal fat pad of rat

Concentration in the medium		Glucose uptake mg
Basal Glucose 100mg/dl		0.25±0.07 (6)
XA	1.0/dl	0.29±0.11 (5)
	10.0/dl	0.23±0.06 (6)
	100.0/dl	0.31±0.07 (7)

glucose mg = glucose mg/100mg wet tissue weight/4hrs Numerical values in the parentheses indicate numbers of experiments. (阿部)

The effect of insulin and XA-insulin on the uptake of glucose by epidymal fat pad of rat

medium	Glucose uptake mg	
Basal (Glucose 100mg/dl)	0.25	0.07 (6)
	0.36	0.09 (12)
+ Insulin 100μu/ml	0.60	0.14 (6)
	0.59	0.12 (16)
+XA insulin 100μu/ml	0.38	0.12 (7)
	0.31	0.05 (10)

Glucose mg = Glucose mg/100mg wet tissue weight/4 hrs Numerical values in the parentheses indicate numbers of experiments. (阿部)

学阿部内科教室との協同研究として行なわれた。)

XA 自体はなんら影響を示さないが、XA-インシュリンは、インシュリン自体のグルコースとりこみ増加作用を殆んど示さない結果を得た。

以上の結果は、XA-インシュリン結合物は、ホルモンとしての活性を著しく低下させる結果を得た。このように、XA がインシュリンと結合することにより、その結合物のホルモンとしての活性低下ということを考えると XA による実験的糖尿病は、ヒトの糖尿病原因探索研究に一つの進展をもたらしたと考え、現在研究を続けている。我々は現在 XA による実験的糖尿病発症の etiology をつぎの如く考えている。

脂肪、トリプトファンの過食→XA 多産

XA とインシュリン結合→XA-インシュリン complex 生成

インシュリン活性低下→糖尿病 脾臓に荷重がか発症

かる→脾臓ランゲルハンス島組織徐々に障害される。

文 献

- 1) Kotake, Y. & Inada, T.: *J. Biochem.*, **40**, 287 (1953)
 - 2) Musajo, L.: *Atti Acad. Linsei*, **21**, 368 (1935)
 - 3) Lepkowsky, S., Roboz, E. & Haagen-Smit, A.: *J. Biol. Chem.*, **149**, 195 (1943)
 - 4) Braunstein, A. E.: *Biokhimiya*, **18**, 393 (1953)
 - 5) Kotake, Y., Ogasawara, N. & Hagino, Y.: *Proc. Jap. Acad.*, **38**, 223 (1962)
 - 6) Mason, M. & Berg, C. P.: *J. Biol. Chem.*, **195**, 515 (1952)
 - 7) 中井 燾: 和歌山医学, **8**, 33 (1957)
 - 8) Nakahara, I., Watanabe, Y., Morino, Y., & Sakamoto, Y.: *J. Biochem.*, **49**, 343 (1961)
 - 9) Kotake, Y., Inada, T., Matsumura, Y.: *J. Biochem.*, **41**, 255 (1954)
 - 10) Murakami, E.: *J. Biochem.*, **573**, 63 (1968)
 - 11) Kotake, Y., Sotokawa, Y., Murakami, E., Hisatake, A., Abe, M. & Ikeda, Y.: *J. Biochem.*, **578**, 63 (1969)
-