ラットの実験的糖尿病の発症におよぼす Acarbose 摂取の影響

合 田 敏 尚*, 杉 山 み ち 子*, 細 谷 憲 政*
森 内 幸 子**

* 東京大学医学部保健学科保健栄養学教室

** 日本女子大学家政学部食物学科

Effects of the Feeding of Acarbose on the Development of Diabetes Induced by Streptozotocin in Rats

Toshinao GODA,* Michiko SUGIYAMA,* Norimasa HOSOYA,*
Sachiko MORIUCHI**

* *Department of Nutrition, School of Health Sciences, Faculty of Medicine, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo*

** *Department of Food and Nutrition, School of Home-Economics, Japan Women's University, Bunkyo-ku, Tokyo*

J. Jap. Soc. Nutr. Food Sci. 35, 339~344, (1982) Effects of the feeding of α -glucosidase inhibitor, Acarbose, on the development of diabetes were observed in rats. Rats were raised on standard laboratory chow diet (standard diet) or standard diet containing 75 mg/100 g of Acarbose (Acarbose diet) for a week followed by a peritoneal injection of streptozotocin (70 mg/kg). Immediately after the injection, the diet was changed from standard diet to Acarbose diet, or Acarbose diet to standard diet.

Incidence of diabetes was depressed by the pre-feeding of Acarbose diet before the injection of streptozotocin. Diabetic condition was moderated by the post-feeding of Acarbose diet after the injection. Intestinal disaccharidase activities were decreased in the rats fed Acarbose diet at the time of sacrifice.

Therefore, it was suggested that Acarbose feeding protects the incidence of diabetes induced by streptozotocin and Acarbose feeding causes the decrease of intestinal disaccharidase activities resulting in moderation of diabetic condition.

(Received April 2, 1982)

小腸粘膜微絨毛膜には、種々の膜消化酵素が局在しており、食物の最終段階の消化と吸収の初発段階に関与している¹⁾。近年、小腸粘膜における膜消化酵素の中でも、 α -グルコシダーゼを特異的に阻害する酵素阻害剤Acarboseが開発され、糖尿病、肥満などの治療剤として利用されている^{2,3)}。著者らは先に、Acarboseがラットの⁴⁾小腸粘膜二糖類水解酵素を *in vitro* で著しく阻害することを観察し、その阻害様式は拮抗型のものであることを報告した⁴⁾。また、Acarboseを食餌中に混和してラットを飼育すると、小腸粘膜二糖類水解酵素の活性が減少し、さらにストレプトゾトシンによる実験的糖尿病の発症率が低下して、糖尿病発症後の病態も緩和して

いることを報告した⁵⁾。しかしながら、Acarboseの摂取による糖尿病発症率の低下ならびに病態の緩和の影響が、ストレプトゾトシンを投与する以前のAcarbose摂取の影響か、あるいはストレプトゾトシンを投与した以後のAcarbose摂取の影響かは明らかでなかった。そこで、ラットにストレプトゾトシンを投与した後、ただちに飼料を切り換える群を設けることにより、実験的糖尿病の発症過程におよぼすAcarboseの影響を、ストレプトゾトシン投与以前の影響と投与以後の影響に区別して観察してみた。

実験方法

1. 実験動物

体重約 170 g の Wistar 系雄ラットを 2 群に分け、

* 〒113 東京都文京区本郷 7-3-1

** 〒112 東京都文京区目白台 2-8-1

標準粉末飼料 (MF, オリエンタル酵母 Co.; 標準食) あるいは標準粉末飼料に Acarbose を 75 mg/100 g の割合で混合した飼料 (Acarbose 食) を用いて 1 週間飼育した後, ストレプトゾトシン (70 mg/kg) を腹腔内に投与した。ストレプトゾトシンはクエン酸緩衝液 (pH 4.5) に溶解して用いた。それぞれの飼料群の一部のラットには, 対照群としてクエン酸緩衝液だけを投与した。ストレプトゾトシンを投与した後ただちに, 標準食を摂取していたラットの半数の飼料を Acarbose 食に切りかえ (S→A 群), Acarbose 食を摂取していたラットの半数の飼料を標準食に切り換えた (A→S 群)。残りのラットには, 標準食あるいは Acarbose 食を与え続けた (標準食群, Acarbose 食群)。ラットは代謝ケージで 1 匹ずつ飼育し, 毎日, 体重, 摂食量, 尿量を測定して糖尿病の発症過程を観察した。飼料ならびに水は自由に与えた。ストレプトゾトシン投与 12 日後, 断頭, 屠殺し, 断頭時の血糖が 250 mg/100 ml 以上で, 尿糖の陽性のものを糖尿病群として実験に供した。血糖ならびに尿糖はグルコースオキシダーゼを用いる Dahlqvist の方法⁶⁾に従って測定した。

2. 酵素液の調製

小腸の起始部より 10 cm を十二指腸とし, 残りを 2 等分して前部を空腸, 後部を回腸とした。空腸と回腸のそれぞれから粘膜を剥離採取した。小腸粘膜の湿性重量を測定した後, 10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) を用いてホモジネートを作製し, 二糖類水解酵素活性の測定に用いた。

3. 小腸粘膜二糖類水解酵素活性ならびにたん白質量の測定

小腸粘膜二糖類水解酵素活性の測定は, グルコースオキシダーゼを用いる Dahlqvist の方法⁶⁾を用いておこなった。酵素反応は, 50 mM マレイン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) 中において, 基質濃度が蔗糖, マルトースは 28 mM, イソマルトースは 2.8 mM となるようにした。酵素活性はたん白質 1 mg が 1 時間に水解する基質量 μ mole (比活性) ならびに各部位における総たん白質が 1 時間に水解する基質量 mmole (全活性) を用いて表わした。たん白質量の測定は, ウシ血清アルブミンを標準とし, Lowry ら⁷⁾の方法に従っておこなった。

4. 試 薬

Acarbose はバイエル薬品⁸⁾より供与いただいた。ストレプトゾトシンは Sigma 社製品を用い, グルコースオキシダーゼは藤沢薬品⁹⁾より, 蔗糖は国産化学より購入した。マルトース, イソマルトースは林原生物化学研究所より供与いただいた。

実験結果

1. ストレプトゾトシンによる糖尿病の発症ならびに病態に対する Acarbose 摂取の影響

ストレプトゾトシンによる糖尿病の発症率は, 標準食群 70%, S→A 群 70%, A→S 群 46%, Acarbose 群 33% であった。A→S 群においては, 糖尿病を発症しなかったラットの 50% にも, 投与数日後に一過性の尿糖が観察された。他の群では一過性の尿糖は観察されなかった。

体重についてストレプトゾトシン投与時と断頭時を比較してみると, 対照群においては Acarbose 食を摂取していたラットは摂食量が多いにもかかわらず標準食を摂取していたラットよりも体重の増加が小さい傾向にあった。糖尿病を発症したラットについてみると, いずれの群も摂食量は対照群に比べて増大したが, 体重の増加はいずれも抑制されていた。体重増加の抑制は標準食群では著しいが, Acarbose 食群では軽く, A→S 群ならびに S→A 群ではその中程度の体重増加を示した (Table 1)。

糖尿病の病態の指標として, 血糖ならびに 1 日あたりの尿中へのグルコース排泄量をそれぞれの飼料群で比較してみた。断頭時の血糖値ならびに断頭前の 24 時間尿の尿糖値は, 断頭時に Acarbose を摂取している群 (Acarbose 食群, S→A 群) では, 標準食を摂取している群 (標準食群, A→S 群) に比べて低い傾向にあった。また, 尿量は, S→A 群では標準食群に比べて有意に減少しており, A→S 群では Acarbose 食群に比べて有意に増大していた。その結果, 1 日あたりの尿中へのグルコース排泄量は, 標準食群では 11.0 g, A→S 群では 13.5 g と高い値を示すのに対し, Acarbose 食群ならびに S→A 群では, それぞれ 2.7 g, 2.3 g と低い値を示した (Table 1)。

2. 小腸粘膜二糖類水解酵素活性に対する Acarbose 摂取の影響

標準食群, A→S 群, S→A 群, ならびに Acarbose 食群の糖尿病ラットについて, 空腸ならびに回腸の二糖類水解酵素活性を測定し, 群ごとに比較してみた。小腸粘膜の湿性重量は, 正常ラットに Acarbose を摂取させると若干増大するが, 糖尿病を発症した場合にも, とくに標準食を摂取していた群においては小腸粘膜の増大が観察された。しかしながら, 他の群においては小腸粘膜湿性重量の著しい増大は観察されなかった (Fig. 1)。このように, 糖尿病の発症によって, あるいは飼料によって小腸粘膜の湿性重量は異なるので, 小腸粘膜の二糖類水解酵素の活性は, 単位たん白質あたり (比活性) ならびに小腸粘膜部位あたり (全活性) の 2 通りの方法で表

Table 1. The effect of Acarbose feeding on diabetic rats induced by streptozotocin.

	Control		Diabetic			
	Standard (7)	Acarbose (8)	Standard (4)	A→S†) (4)	S→A††) (7)	Acarbose (3)
Body weight (g) (0-day)	215±6.3	223±4.7 ^a	200±4.2 ^a	209±11.6	208±7.7	212±13.3
(12-day)	315±6.9 ^a	295±4.2 ^a	221±12.3 ^b	248±13.6	234±10.7 ^c	280±11.1 ^{b,c}
Blood glucose (mg/100 ml)	116±2.5	114±1.2	380±16.3 ^a	441±32.1 ^b	337±22.5	294±26.8 ^{a,b}
Food intake (g/day)	24.5*	29.3*	32.3±2.9	40.5±2.3 ^d	30.3±1.8 ^{a,d}	41.3±4.8 ^a
Urine volume (ml/day)	—**	—**	125±28 ^d	167±18 ^{a,e}	38.7±6.2 ^{d,e}	64.3±20.1 ^a
Urine glucose (g/100 ml)	ND	ND	9.10±0.59	8.24±0.49	5.95±1.33	4.04±1.65
Glucose excretion (g/day)	ND	ND	10.96±1.92 ^{a,d}	13.46±0.69 ^{e,f}	2.29±0.53 ^{d,e}	2.70±1.76 ^{a,f}

Results are expressed as means±S.E. (): number of animals. ND: not detected.

†) Diet was changed from Acarbose diet to Standard diet on the day of the injection of streptozotocin.

††) Diet was changed from Standard diet to Acarbose diet on the day of the injection of streptozotocin. a-a, b-b, c-c: significantly different from each other at $p<0.05$. d-d, e-e, f-f: significantly different from each other at $p<0.01$.

* Mean value only, since control rats were housed in group, ** not determined.

Fig. 1. The effect of Acarbose feeding on intestinal mucosal weight in control and streptozotocin-induced diabetic rats.

The values are expressed as means±S.E.

Open bar and oblique lines bar: control rats raised on standard diet ($N=7$) or Acarbose diet ($N=8$), respectively. Dotted bar and thin and thick oblique lines bar: diabetic rats raised on standard diet ($N=4$) or Acarbose diet ($N=3$), respectively. Lateral stripes bar and white dotted bar: diabetic rats whose diet was changed from Acarbose diet to standard diet ($N=4$) or from standard diet to Acarbose diet ($N=7$) on the day of the injection of streptozotocin, respectively. Statistic analysis was carried out between diabetic groups.

a-a: significantly different from each other at $p<0.05$.

わした。

空腸ならびに回腸におけるスクラーゼ、イソマルターゼ、マルターゼの比活性を Fig. 2 に示した。空腸についてみると、糖尿病群における二糖類水解酵素活性は、

A→S 群、標準食群、S→A 群、Acarbose 食群の順に高かった。A→S 群においてはいずれの酵素活性も Acarbose 食群と比べて有意に増大していた。また、S→A 群においては標準食群と比べてマルターゼの活性が有意に

Fig. 2. The effect of Acarbose feeding on specific activities of intestinal disaccharidases in control and streptozotocin-induced diabetic rats.

The values are expressed as means $\pm$ S.E.

Specific activity was expressed as μ mole substrate hydrolyzed/mg protein/hr.

A: sucrase, B: isomaltase, C: maltase.

The symbols of the experimental groups are the same as in Fig. 1. Statistic analysis was carried out between diabetic groups.

a-a, b-b, c-c: significantly different from each other at $p < 0.05$. d-d, e-e, f-f: significantly different from each other at $p < 0.01$.

低下していた。回腸においても空腸の場合と同様の傾向が認められた。標準食群ならびに A $\rightarrow$ S 群では二糖類水解酵素の活性が同様に高いのに対し、Acarbose 食群ならびに S $\rightarrow$ A 群では二糖類水解酵素の活性は同様に低いものであった (Fig. 2)。

全活性についても、比活性の場合と同様の傾向が認められた。いずれの二糖類水解酵素活性とも、標準食群、A $\rightarrow$ S 群、S $\rightarrow$ A 群、Acarbose 群の順に活性が高かった。空腸においては、いずれの二糖類水解酵素活性とも S $\rightarrow$ A 群は標準食群と比べて有意に活性が低く、A $\rightarrow$ S 群は Acarbose 群と比べて有意に活性の高いことが観察された (Fig. 3)。

考 察

ストレプトゾトシンを投与することにより膵臓ランゲルハンス島の B 細胞は特異的に障害を受け、個体は糖尿病を発症してくる⁹⁾。しかしながら、マウスにストレプトゾトシンを投与する時刻により発症率が異なり⁹⁾、また、肥満などの栄養状態によっても発症率が異なることが報

告されている¹⁰⁾。著者らは先に、食餌の差異が実験的糖尿病の発症過程にどのような影響を与えるかをラットを用いて検討し、糖質としてデンプンを蔗糖に置きかえるとストレプトゾトシンによる糖尿病の発症率が上昇するが、飼料に Acarbose を混和すると糖尿病の発症率は低下することを報告した⁹⁾。しかしながら、先の実験においては、ストレプトゾトシン投与前後に同じ飼料を与えていたので、どの時点の食餌が糖尿病の発症に影響をおよぼしているかは明らかではない。そこで、Acarbose を含む飼料をストレプトゾトシン投与以前だけあるいは投与以後だけ摂取する群を作成して、糖尿病の発症に影響をおよぼしているのが投与以前の食餌によるものかどうかを検討してみた。

ストレプトゾトシンによる糖尿病の発症率は、標準食群では 70% であるのに対し、Acarbose 食群では 33% であって、先の報告⁹⁾と同様に発症の抑制が観察された。S $\rightarrow$ A 群ではストレプトゾトシン投与後 Acarbose 食に切りかえたにもかかわらず、糖尿病の発症率は 70% と高く、標準食群と変わらなかった。また、A $\rightarrow$ S 群では

Fig. 3. The effect of Acarbose feeding on total activities of intestinal disaccharidases in control and streptozotocin-induced diabetic rats.

The values are expressed as means $\pm$ S.E.

Total activity was expressed as mmole substrate hydrolyzed/jejunum or ileum/hr.

A: sucrase, B: isomaltase, C: maltase.

The symbols of the experimental groups are the same as in Fig. 1. Statistic analysis was carried out between diabetic groups.

a-a, b-b, c-c: significantly different from each other at $p < 0.05$. d-d, e-e, f-f: significantly different from each other at $p < 0.01$.

ストレプトゾトシン投与後標準食を摂取していたにもかかわらず発症率は40%と低かった。それゆえ、Acarbose 摂取による糖尿病発症率の低下は、ストレプトゾトシン投与以前のAcarbose 摂取が影響をおよぼしたものと考えられる。また、投与以後の食餌条件は糖尿病の発症には影響をおよぼさないことから、投与時点の膵臓B細胞のストレプトゾトシンに対する感受性の程度が糖尿病の発症を決定するものと推察される。Acarbose を摂取していたラットの膵臓のホモジネートにおける過酸化脂質量は標準食を摂取していたラットのものよりもやや低い傾向があることが観察されている¹¹⁾。Acarbose の摂取が膵臓B細胞の細胞膜の障害の受けやすさを変化させて、ストレプトゾトシンに対する感受性を変化させている可能性も推察される。

一方、糖尿病発症後の病態は、ストレプトゾトシン投与前にのみAcarbose を含む飼料を与えた群(A→S群)においては、投与前後も標準粉末飼料を与えた群と同様に、糖尿病の病態は重篤なものであった。それゆえ、糖尿病の発症とは異なり、糖尿病の病態は発症後の飼料によって著しく影響を受けているものと考えられる。

小腸粘膜の二糖類水解酵素活性は、空腸、回腸いずれの部位においても、断頭時にAcarbose を摂取していた群(S→A群、Acarbose 群)では低く、断頭時に標準粉末飼料を摂取していた群(A→S群、標準食群)では高いことが示された。このように、小腸粘膜の二糖類水解酵素活性は、糖尿病の病態の程度とよく一致していることから、Acarbose の摂取による糖尿病の病態の緩和化には、小腸粘膜の二糖類水解酵素活性の低下が強く関与しているものと推察される。

要 約

ストレプトゾトシンをラットに投与すると同時に飼料を標準粉末飼料からAcarbose 添加飼料(70 mg/kg)に切り換え、あるいはAcarbose 添加飼料から標準粉末飼料に切り換えて、実験的糖尿病の発症ならびに病態におよぼすAcarbose 摂取の影響を観察した。

1) ストレプトゾトシン投与以前のAcarbose の摂取は糖尿病の発症を抑制した。

2) ストレプトゾトシン投与以後のAcarbose の摂取は糖尿病の病態を緩和させた。

3) 小腸粘膜二糖類水解酵素の活性は、断頭時に Acarbose を摂取していた場合には低下していた。

それゆえ、Acarbose の摂取は、ストレプトゾトシン投与以前の場合には糖尿病の発症を抑制し、また、投与以後の場合には、小腸粘膜の二糖類水解酵素の活性を低下させて糖尿病の病態を緩和するものと考えられる。

文 献

- 1) Crane, R.K. : Handbook of physiology (Code, C.F. and Heidel, W., ed.), Section 6, Alimentary Canal, Vol. 5, American Physiological Society, Washington, 2535 (1968)
- 2) Schmidt, D.D., Frommer, W., Junge, B., Müller, L., Wingender, W., Truscheit, E. and Schäfer, D. : *Naturwissenschaften*, **64**, 535 (1977)
- 3) Puls, W., Keup, U., Kraus, H.P., Thomas, G. and Hoffmeister, F. : *Naturwissenschaften*, **64**, 536 (1977)
- 4) 合田敏尚, 山田和彦, 細谷憲政, 森内幸子 : 栄養と食糧, **34**, 139 (1981)
- 5) Goda, T., Yamada, K., Sugiyama, M. and Hosoya, N. : *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **28**, 41 (1982)
- 6) Dahlqvist, A. : *Anal. Biochem.*, **7**, 18 (1964)
- 7) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
- 8) Junod, A., Lambert, A.E., Stauffacher, W. and Renold, A.E. : *J. Clin. Invest.*, **48**, 2129 (1969)
- 9) Candela, S., Hernandez, R.E. and Gagliardino, J.J. : *Experientia*, **35**, 1256 (1979)
- 10) Inoue, S. and Bray, G.A. : *Horm. Metab. Res.*, **10**, 273 (1978)
- 11) 合田敏尚, 細谷憲政 : 未発表資料

(昭和 57 年 4 月 2 日受理)