活性酸素による生体障害に関する研究 (第 1 報) アロキサン糖尿病発症
に対する種々ハイドロキシル・ラジカル消去剤の防御作用

桜井光一,* 三浦俊明, 小木曾健人

北海道薬科大学

Studies on Biological Damage by Active Oxygen. I. Protective Effect of Various
Hydroxyl Radical Scavengers against Alloxan-Induced Diabetes

KOICHI SAKURAI,* TOSHIAKI MIURA and TAKETO OGISO

Hokkaido Institute of Pharmaceutical Sciences,
7-1 Katsuraoka-cho, Otaru, 047-02, Japan

(Received May 19, 1986)

Protective effects of several hydroxyl radical ($\text{HO}\cdot$) scavengers and superoxide dismutase on alloxan-induced diabetes were studied *in vivo*. Thiourea, methylthiourea, dimethylthiourea and ethanol, $\text{HO}\cdot$ scavengers (type 1), which easily cross cellular membranes, protected initial- and permanent-hyperglycemia. In contrast, mannitol and sorbitol (type 2), which can not cross cellular membranes, protected initial-hyperglycemia, but did not protect permanent-hyperglycemia. Furthermore, superoxide dismutase which is not expected to be incorporated into pancreatic β -cell, strongly protected initial-hyperglycemia but partially protected permanent-hyperglycemia.

These results suggest that $\text{HO}\cdot$ primarily damages the β -cell membranes by acting at or near a site involved in insulin release, and subsequently damages the intracellular components. From these results, the possible protective mechanism of these scavengers was discussed.

Keywords—alloxan-induced diabetes; hydroxyl radical scavenger; thiourea; mannitol; superoxide dismutase; insulin

アロキサンは膵臓 β 細胞に障害を与え糖尿病を誘発する。一方、種々のハイドロキシル・ラジカル ($\text{HO}\cdot$) の消去剤をあらかじめ動物に投与しておくこととアロキサン誘導の糖尿病が阻止されることから、アロキサンは生体内でジアール酸に還元され、再び酸化される過程で $\text{HO}\cdot$ が発生し、それによって膵臓 β 細胞が障害されて、糖尿病が誘発されると考えられている。¹⁻⁴⁾ このことは *in vitro* においても還元剤としてアスコルビン酸を用いた系によって示されている。⁵⁾

アロキサン糖尿病においては最初に膵臓 β 細胞の膜が障害され、引き続いて細胞内の障害が誘発されることが組織学的観察から推察されている。⁶⁾ このことから最初に細胞外で発生した $\text{HO}\cdot$ によって β 細胞の膜が障害され、その後細胞内に取り込まれたアロキサンにより発生した $\text{HO}\cdot$ が細胞内障害を誘発すると考えられる。一方、 $\text{HO}\cdot$ 消去剤は生体膜に対する基本的な性質から 2 種類に分類することができる。1 つは細胞膜を容易に通過して細胞内にとり込まれるもの (type 1), もう 1 つは細胞膜を通過できず、細胞外にとどまるもの (type 2) である。Type 1 には脂肪鎖アルコール類、ジメチルスルホキシド、尿素誘導体, type 2 にはマニトール, ソルビトールなどが含まれる。⁷⁾ これまでに *in vivo* においてアロキサン糖尿病の防御について検証された $\text{HO}\cdot$ 消去剤はほとんどが容易に細胞内にとり込まれる type 1 のものであり,¹⁻⁴⁾ 膜を通過できない type 2 の消去剤の防御作用については検討されていない。

本研究において、著者らは type 1 の $\text{HO}\cdot$ 消去剤としてチオ尿素誘導体とエタノール, type 2 としてマニトールとソルビトールを用いてこれらの消去剤のアロキサン誘導の糖尿病に対する防御作用の相違について *in vivo* で検討し、若干の知見を得たので報告する。

実験の部

試薬 アロキサン, チオ尿素 (TU), マニトール, ソルビトール, Glucose B Test Wako はいずれも和光純薬工業社より, メチルチオ尿素 (MTU), ジメチルチオ尿素 (DMTU) はアルドリッチ社より得た. キサンチン・オキシダーゼ (バターミルク由来) はベーリンガー・マンハイム社より購入した. チオバルビツール酸はメルク・ジャパン社より購入し, 3回再結晶して実験に用いた. インスリン・リアビーズはダイナボット社より得た. その他の試薬は市販特級品を用いた.

動物 体重約 20 g の ddY 雄マウスを 24 時間絶食したのち, アロキサンを窒素置換した生理食塩水に溶解し, マウス尾静脈より投与した. 対照群には生理食塩水を投与し, 両群とも投与後ただちに飼料 (オリエンタル酵母社 MF) にて飼育したアロキサン投与後の各一定時間に尾静脈より採血し, 1200 rpm, 10 分間遠心して血漿を分離した.

血糖値及びインスリンの定量 血中グルコースは酵素法により測定し,⁸⁾ インスリンは二抗体法で測定した.⁹⁾

HO・の消去活性の測定 HO・は Gutteridge らの方法¹⁰⁾に従い, EDTA-Fe³⁺ 存在下キサンチン・オキシダーゼ系で発生させ, 消去剤によるデオキシリボースの分解阻止率を求めた. キサンチン・オキシダーゼ系は 3.0 ml の 10 mM リン酸緩衝液 pH 7.4 中に 0.15 M NaCl, 50 μ M EDTA-Fe³⁺, 1 mM ヒポキサンチン, 0.025 unit のキサンチン・オキシダーゼを含み, この反応系に 1 mM デオキシリボースを加え, 37°C で 5 分間インキュベートした. 系中に 0.3 ml のトリクロル酢酸を加えて反応を停止させたのち 0.75 ml の 1% チオバルビツール酸を加え, 15 分間, 100°C で加熱した. その後, 反応液を流水中で冷却し, 532 nm の吸光度を分光光度計 (Hitachi Model 200-20) で測定した.

結 果

TU 及びマニトールによるアロキサン誘導高血糖の抑制

Type 1 の消去剤として TU, type 2 の消去剤としてマニトールを用いてアロキサン誘導の高血糖に対する影響について検討した. Fig. 1 に示すようにマウスにアロキサンを投与すると 1 時間後には血糖値は著しく増加し, 約 500 mg/100 ml となった (初期高血糖). その後わずかに血糖値は減少したが, 6 時間以後血糖値は再び増加して 24 時間後には約 580 mg/100 ml となった. 以後血糖値はほとんど変化せず, 動物は持続的高血糖を示した.

アロキサン投与 30 分前に TU を投与しておくと 1 時間後の初期高血糖の発現を有意に抑制したばかりでなくその後 24 時間に至るまでに血糖値は低下し続け持続的高血糖の発現も強く抑制した. 一方, マニトールを投与しておくとアロキサン投与 1 時間後に認められる血糖値の上昇 (初期高血糖) は有意に抑制された. しかしながら, その後血糖値は徐々に上昇し, アロキサン投与 24 時間後には約 490 mg/100 ml となりマニトールは持続的

Fig. 1. Effect of Mannitol and Thiourea on Alloxan-Induced Hyperglycemia

Mice were injected alloxan (50 mg/kg b.w.; ○) or physiological saline (●). Mannitol (2.0 g/kg b.w.; ■) and thiourea (1.0 g/kg b.w.; ▲) were injected i.p. to the mice 30 min prior to alloxan injection. Each point is the mean $\pm$ S.E. of 6—34 mice. a) $p < 0.05$, compared to alloxan-injected mice.

高血糖を有意に抑制しなかった。なお生理食塩水の単独投与により、血糖値は約倍に増加したがこれは絶食状態から飼料を摂取することによる血糖値の上昇と考えられる。また TU, マニトールの単独投与では血糖値の変動は全く認められなかった。

以上の結果より, TU は初期高血糖のみならず持続的高血糖をも強く抑制するのに対し, マニトールは初期高血糖のみを抑制し, 持続的高血糖はほとんど抑制せず, HO・消去剤の間に明らかな作用の相違があることが分かった。

TU 及びマニトールによるアロキサン誘導血中インスリン低下に対する防御

血糖値の変動が膵臓 β 細胞の障害を反映したものであることを確認するために血中インスリン濃度の変動について検討した。Table I に示すようにアロキサン投与 1 時間後において血中インスリン濃度は著しく低下し約 $14 \mu\text{U/ml}$ の値を示した。アロキサン投与 6 時間後に血中インスリン濃度は一過性の上昇を示したが, 24 時間後には再び低下して約 $15 \mu\text{U/ml}$ の値を示した。

これに対し, TU はアロキサン投与 1 及び 24 時間後の血中インスリン濃度の低下を有意に抑制した。一方, マニトールはアロキサン投与 1 時間後の血中インスリン濃度の低下を有意に抑制したが, アロキサン投与 24 時間後の血中インスリン濃度の低下を有意には抑制しなかった。データには示さないが, マニトール, 及び TU の単独投与は血中インスリン濃度に影響を与えることはなかった。

これらの結果より, アロキサンによる初期又は持続的な血糖値の上昇がアロキサンの膵臓 β 細胞の障害によるインスリン分泌低下に起因すること, また TU はアロキサン投与後初期及び持続的に起こるインスリン分泌の低下をともに抑制するが, マニトールは初期に起こるインスリン分泌の低下のみを抑制することが分かった。

TABLE I. Effect of Mannitol and Thiourea on Plasma Insulin Values in Alloxan Injected Mice

Group	Time after alloxan injection (h)			
	0	1	6	24
	Plasma insulin ($\mu\text{U/ml}$)			
Saline	20.0 ± 0.7 (3)	32.5 ± 1.6^a (3)	33.0 ± 0.9 (3)	40.0 ± 1.3^a (3)
Alloxan	—	13.5 ± 4.5 (5)	30.5 ± 1.3 (3)	15.4 ± 3.1 (9)
Thiourea + alloxan	16.0 ± 1.4 (3)	25.3 ± 0.7^a (3)	27.1 ± 1.6^a (3)	33.3 ± 3.6^a (3)
Mannitol + alloxan	17.6 ± 0.8 (3)	21.7 ± 0.7^a (3)	24.1 ± 0.9^a (3)	18.0 ± 1.8 (3)

Experimental conditions were same as described in Fig. 1. Values represent the mean $\pm$ S.E. Number in parentheses represents number of animals. $a) p < 0.05$ compared to alloxan injected mice.

その他の HO・消去剤によるアロキサン誘導の高血糖発症の防御

TU やマニトールを含む他の HO・消去剤のアロキサン誘導高血糖に対する影響について検討した。Table II に示すように type 1 に属する消去剤, TU, MTU, DMTU, エタノールはいずれも投与量に依存してアロキサンによる初期高血糖及び持続的高血糖の発症を防御した。一方, type 2 に属する消去剤マニトール, ソルビトールは投与量に依存して初期高血糖の発症を防御したが, 持続的高血糖の発症を防御しなかった。また, この実験に用いた消去剤を動物に単独投与しても血糖値の変動は認められなかった。これらの結果は前述した結果と一致して type 1, type 2 に分類される HO・消去剤の間でアロキサン誘導の高血糖発症に対する防御作用に明らかな相違があることを示すものであった。以上のことより, type 1 の HO・消去剤は HO・による β 細胞障害をほとんど完全に防御するのに対して, type 2 の消去剤は初期に誘発されるインスリン分泌の低下のみを防御するものと推定した。

HO・消去剤の HO・消去活性

Type 1 及び type 2 の HO・消去剤の *in vivo* でのアロキサン誘導高血糖の防御効果と HO・消去活性の関係について検討した。Table III に示すように type 1 の消去剤 TU, MTU, DMTU は, 10 mM 濃度において, HO・によるデオキシリボースの分解を約 80% 阻害し, エタノールは約 40% 阻害した。一方, type 2 の消去剤マニトール, ソルビトール (10 mM) は HO・によるデオキシリボースの分解を約 70% 阻止した。これらの結果

TABLE II. Effect of Various Hydroxyl Radical Scavengers on Alloxan-Induced Hyperglycemia

Scavengers	Dose (g/kg b.w.)	Time after alloxan injection (h)	
		1	24
Plasma glucose values (mg/100 ml)			
Saline	—	526.9±13.4 (34)	579.9± 25.1 (10)
Thiourea	0.5	362.9±60.8 ^{a)} (3)	345.3± 77.0 ^{a)} (3)
	1.0	345.2±37.4 ^{a)} (7)	172.6± 27.0 ^{a)} (6)
Methylthiourea	0.5	267.9±65.8 ^{a)} (3)	170.8± 28.1 ^{a)} (3)
	1.0	131.5±22.6 ^{a)} (3)	265.8±110.3 ^{a)} (3)
Dimethylthiourea	0.5	175.9±17.6 ^{a)} (3)	299.6± 58.6 ^{a)} (3)
	1.0	139.9±11.2 ^{a)} (4)	163.8± 11.7 ^{a)} (5)
Ethanol	2.0	446.2±16.5 ^{a)} (6)	511.6± 39.0 (3)
	4.0	311.5±34.3 ^{a)} (8)	396.3± 28.4 ^{a)} (3)
Mannitol	0.5	510.1±25.5 (8)	484.6± 49.2 (3)
	1.0	388.8±26.1 ^{a)} (17)	501.4± 73.9 (3)
	2.0	353.0±28.8 ^{a)} (14)	488.5± 37.1 (6)
Sorbitol	1.0	413.2±52.4 ^{a)} (8)	517.2± 37.3 (3)
	2.0	415.0±31.6 ^{a)} (9)	511.8± 37.7 (6)

Mice were injected i.p. with hydroxyl radical scavengers or saline 30 min prior to alloxan. Other conditions were same as described in Fig. 1. Values represent the mean±S.E. Number in parentheses represents number of animals. ^{a)} $p<0.05$ compared to saline.

TABLE III. Inhibition of Deoxyribose Degradation by Various Hydroxyl Radical Scavengers

Scavengers	Concentration (mM)	O.D. 532 nm	% inhibition of degradation
Control	—	0.465	—
Thiourea	10.0	0.073	84.3
Methylthiourea	10.0	0.077	83.5
Dimethylthiourea	10.0	0.107	77.0
Ethanol	10.0	0.275	41.0
Mannitol	10.0	0.162	65.2
Sorbitol	10.0	0.156	66.5

Various scavengers were added to the xanthine oxidase system containing 1 mM deoxyribose. Other conditions were described in Experimental.

より実験に用いた type 1 及び type 2 の HO· 消去剤はいずれも高い HO· 消去活性を有していることが明らかとなった。

このことより、本実験に用いた HO· 消去剤の間に認められるアロキサン誘導の高血糖に対する防御効果の違いは HO· 消去剤の HO· 消去活性の違いによるものではなく細胞膜に対する性質の違いによるものであると推定した。

Superoxide Dismutase によるアロキサン誘導高血糖発現の防御

Superoxide dismutase (SOD) は O₂⁻ を消去し、Haber-Weiss 反応を介した機構での HO· の発生を阻止することができる。一方、SOD は高分子であるため動物に投与しても細胞膜を通過せず、type 2 の HO· 消去剤と同様に初期高血糖の発現を防御し得るが持続的高血糖の発現は防御されないものと予想される。

Table IV に示すようにアロキサン投与の直前に SOD を投与すると投与量に依存して初期高血糖は強く抑制された。しかしながら持続的高血糖は SOD の低投与量 (250 mg/kg) では抑制されず、高投与量 (500 mg/kg) のときのみわずかに抑制された。熱変性によって失活した SOD を投与してもアロキサン誘導のいずれの高血糖の発現にも全く影響しなかった。また SOD を正常動物に投与しても血糖値には有意な変動は認められなかった。

TABLE IV. Effect of SOD on Alloxan-Induced Hyperglycemia

Group	Dose (mg/kg b.w.)	Time after alloxan injection (h)	
		1	24
Plasma glucose values (mg/100 ml)			
Saline	—	526.7±13.4 (34)	579.9±25.1 (10)
SOD	250	380.5±31.6 ^{b)} (4)	519.0±41.4 (4)
SOD	500	312.0±50.4 ^{b)} (3)	450.1±42.7 ^{a)} (3)
Inactivated SOD	500	568.5±20.7 (4)	586.1±40.2 (4)

Mice were injected i.v. with SOD or saline 5 s prior to alloxan injection. Other conditions were same as described in Fig. 1. Number in parentheses represents number of animals. a) $p < 0.05$; b) $p < 0.01$, compared to saline injected mice.

以上の結果より, SOD の作用は type 2 の HO・消去剤に類似しているものと考えた. なぜなら type 1 の HO・消去剤は初期高血糖に比べて持続的高血糖をほぼ同じ程度か又はより強く抑制するのにに対して type 2 の HO・消去剤は初期高血糖のみを強く抑制するからである.

考 察

多くの研究者の報告と同様に,¹¹⁻¹³⁾ 動物にアロキサンを投与すると初期及び持続的高血糖が観察され, これに伴い血中インスリン濃度は低下した (Fig. 1, Table I). またアロキサン投与 1 時間以内に著しい血糖値の上昇が観察されたこととアロキサンが投与後数分以内に血中より消失し,¹⁴⁾ すみやかに細胞に取り込まれる¹⁵⁾ 報告とを考えあわせると, アロキサンが投与後直ちに β 細胞に障害をあたえる可能性を示唆している.

今回の実験において, type 1 の HO・消去剤, TU, MTU, DMTU, エタノールはいずれも初期及び持続的高血糖の発現を防御し, type 2 の HO・消去剤マニトール及びソルビトールは初期高血糖の発現のみを防御した (Table II). また実験に用いた HO・消去剤はいずれも強い HO・消去活性を示した (Table III). このことは, type 1 と type 2 の HO・消去剤によるアロキサン誘導高血糖の発症に対する防御作用の相違は HO・消去剤の HO・消去活性によるものではなく HO・消去剤の細胞膜に対する性質の相違によるものと考えた. すなわち type 1 の HO・消去剤は細胞膜を通過して細胞の内と外に分布するのにに対して, type 2 の HO・消去剤は細胞膜を通過できないため, 細胞外のみに分布することによるものであると考えられる. Uchigata ら¹⁶⁾ は *in vivo* でアロキサンを投与すると膵臓 β 細胞の DNA 鎖が切断されることを示し, これがアロキサンを介して発生した HO・に起因することを示唆した. 一方, Idahl ら¹⁷⁾ はアロキサンが膵臓 β 細胞への Rb^+ の取り込みを阻止することからアロキサンにより細胞膜が障害されたものと考えた. また *in vitro* においては, グルコースによる膵臓 β 細胞からのインスリンの分泌がアロキサンにより阻害され, HO・消去剤ジメチル尿素がアロキサンによるインスリン分泌の阻害を防御することも示されている.¹⁸⁾ これらの報告と今回の実験結果を考え合わせると, アロキサン投与によってまず β 細胞の膜が障害されてインスリン分泌が阻害され, 引き続いて細胞内にとり込まれたアロキサンによって DNA のような細胞内成分が障害され, インスリン合成は阻害され, 更に細胞の障害が進行するものと考えられる.

結論として, type 1 消去剤は膜を通過して細胞内にとり込まれるので膵臓 β 細胞の内と外でアロキサンを介して発生した HO・を消去して細胞の酸化障害を阻止し, 糖尿病の発生を防ぐと考えた. これに対して, type 2 消去剤は細胞膜を通過できず細胞外にとどまるため細胞外において発生した HO・を消去し得るが細胞内にとり込まれたアロキサンによって惹起される障害は防御し得ないと考えた.

一方, SOD 投与によるアロキサン誘導高血糖に対する防御効果は, type 2 の HO・消去剤の効果と類似した (Table IV). このことは SOD は細胞膜を通過しないため, 細胞外に発生する O_2^- のみを消去することによって二次的に産生する HO・の発生を阻止する結果であると考えられる. 一方, アロキサンが膜を通過したのち起こす細胞内での障害はもはや細胞外の SOD では防御できないものと考えた. しかしながら, 高投与量 (500 mg/kg) の SOD によってわずかに持続的高血糖が防御された理由について次のように考えた.

O_2^- は HO・と比較すると寿命が長く,¹⁹⁾ 生体膜を容易に通過する²⁰⁾ ので, 細胞外の SOD は細胞内の O_2^- の

濃度を低下させることが考えられる。事実、細胞内の O_2^- による障害に対する細胞外 SOD の防御効果が *in vitro* 赤血球膜 vesicle を用いた系で示されている。²⁰⁾ しかしながら、Grankvist ら²¹⁾ はアロキサン糖尿病の発症がポリエチレングリコールと結合させた SOD (200 mg/kg) の投与で有意に防御されることを報告しているので、SOD のアロキサン糖尿病に対する防御効果の詳細については更に検討する必要がある。

引用文献

- 1) R. E. Heikkila, H. Barden, G. Cohen, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **190**, 501 (1974).
- 2) R. E. Heikkila, B. Winstor, G. Cohen, H. Barden, *Biochem. Pharmacol.*, **25**, 1085 (1976).
- 3) R. E. Heikkila, *Eur. J. Pharmacol.*, **44**, 191 (1977).
- 4) R. E. Heikkila, F. S. Cabbat, *Eur. J. Pharmacol.*, **52**, 57 (1978).
- 5) G. Cohen, R. E. Heikkila, *J. Biol. Chem.*, **249**, 2447 (1974).
- 6) S. J. Cooperstein, D. Watkins (eds.), "The Islets of Langerhans," Academic Press, 1981, p. 392.
- 7) S. Marklund, J. Grankvist, I. B. Taljedal, "Oxy Radicals and Their Scavenger Systems Volume II, Cellular and Medical Aspects," ed. by R. A. Greenwald, G. Cohen, Elsevier Biochemical, New York, 1982, p. 96.
- 8) W. Werner, H. G. Rey, H. Wielinger, *Fresenius. Z. Anal. Chem.*, **252**, 224 (1970).
- 9) M. Awai, M. Narasaki, Y. Yamanoi, S. Seno, *Am. J. Pathol.*, **95**, 663 (1979).
- 10) J. M. C. Gutteridge, *FEBS Lett.*, **128**, 343 (1981).
- 11) F. D. W. Luhens, *Physiol. Rev.*, **28**, 304 (1948).
- 12) I. Lundquist, C. Rerup, *Eur. J. Pharmacol.*, **2**, 35 (1967).
- 13) H. Nakakimura, K. Mizuno, *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 2207 (1980).
- 14) N. Siliprandi, *Experientia*, **4**, 228 (1948).
- 15) D. C. Weaver, M. L. McDaniel, P. E. Lacy, *Endocrinology*, **102**, 1847 (1978).
- 16) Y. Uchigata, H. Yamamoto, A. Kawamura, H. Okamoto, *J. Biol. Chem.*, **257**, 6084 (1982).
- 17) L. A. Idahl, A. Lernmark, J. Sehlin, I. B. Taljedal, *Biochem. J.*, **162**, 9 (1977).
- 18) L. J. Fischer, S. A. Hamburger, *Life Sci.*, **26**, 1405 (1980).
- 19) 浅田浩二, 生化学, **48**, 226 (1976).
- 20) R. E. Lynch, I. Fridovich, *J. Biol. Chem.*, **253**, 1838 (1978).
- 21) K. Grankvist, S. Marklund, I. B. Taljedal, *Nature (London)*, **294**, 158 (1981).