

正常および実験的糖尿病ラットの 組織内ソルビトール含量

—高速液体クロマトグラフィーを用いた新しい測定法—

東京医科大学第3内科学教室 (指導: 伊藤久雄主任教授)

三 輪 隆

【要旨】 糖尿病合併症の進展に深い関係を有するポリオール代謝のマーカーとして、組織内ソルビトール含量の測定は重要と考えられるが、従来の測定では、その原理上、組織によっては結果の信頼性が非常に低くなることが多い。今回我々は、酵素法に高速液体クロマトグラフィーを組合せた新しい測定法を開発し、ラット組織内ソルビトール含量をより正確に測定する事を試みた。同一検体では、神経組織で従来法と本測定法の結果は良く一致したが、他組織では我々の方法の方が標準偏差が小さく、より有用であった。ストレプトゾトシン (以下STZと略) 糖尿病ラットでは、腎・坐骨神経・腹部大動脈壁・赤血球中のソルビトール含量は有意に増加し、アルドース還元酵素阻害剤投与がそれらを有意に抑制した。STZ糖尿病ラットでは、赤血球中ソルビトール含量は腎および坐骨神経中含量と有意に相関し、これらの組織内含量のマーカーとなりうる可能性が示唆された。

はじめに

糖尿病合併症とポリオール代謝経路の関連については、Heyningenの糖尿病性白内障における報告¹⁾を契機として多くの研究^{2,3)}が行われてきた。ポリオール代謝経路は解糖系で処理しきれない過剰グルコースに対するバイパス機構として働き、aldose reductase (AR) および sorbitol dehydrogenase (SDH) のわずか2つの酵素より成る。ポリオール代謝経路においてはSDHは常時活性が変化せず、ARが律速酵素となる。ARは通常濃度のグルコースに対する親和性は低く、ソルビトールの生成はわずかである。しかし、ARはグルコース濃度の増加に伴い基質親和性も増大するという positive cooperative effect を有する⁴⁾ため、高血糖の持続があると多量のソルビトールが組織内に蓄積することとなる。この細胞内ソルビトール蓄積の意義としては、①細胞内浸透圧を上昇させることが細胞の膨化を招き、機能低下を惹起する。②細胞内c-AMPの低下をもたらす、細胞膜のNa⁺-K⁺ATPase活性を低下

させる。③細胞内ミオイノシトールの低下を招き、細胞内情報伝達系の障害を惹起する。④NADPH (還元型ニコチンアミドアデニンヌクレオチドリン酸) 消費を招き、抗オキシダント能が低下する⁵⁾。などが提唱されてきた。つまり、組織内ソルビトールの定量、或いは組織内ポリオール代謝経路関連酵素活性の測定は、血糖コントロールおよび糖尿病合併症進展のマーカーともなりうる可能性がある⁷⁻⁹⁾という点で重要であり、過去に多くの研究が行われてきた。組織内ソルビトール含量の測定には、Clementsの報告¹⁰⁾以来、主として酵素法とその変法である蛍光法—すなわち、ソルビトールを基質、SDHを酵素、さらにNAD⁺ (酸化型ニコチンアミドアデニンヌクレオチド) を補酵素とした反応の生成還元物質であるNADH (還元型ニコチンアミドアデニンヌクレオチド) を、その蛍光強度で測定する方法が用いられてきた¹¹⁻¹³⁾。この方法は検体の前処理、測定系の組立など比較的簡便であり、また測定に要する時間も短く済むため、大量検体処理が可能であるという利点がある。しかしこの方法で実際に

(1995年1月6日受付, 1995年1月19日受理)

キーワード: ポリオール代謝経路, ソルビトール, 糖尿病性合併症, 高速液体クロマトグラフィー.

(別刷請求先: 〒160 東京都新宿区西新宿 6-7-1 東京医科大学内科学教室第三講座 三輪 隆)

測定しているのは、紫外線にて励起された NADH の反応波長に近い波長を有する物質すべてであり、NADH 以外の夾雑物質が検体中に存在する場合には、何らかの手段にて NADH のみを分離しない限り、夾雑物質も 1 つのピークとして一緒に測定することとなる。それでも、眼水晶体・神経束など夾雑物質が少ない組織では従来法にても評価は可能であったが、肝臓・心筋・腎臓・大動脈壁などでは、バックグラウンドとして強い蛍光を呈する夾雑物質を無視し得ず、これらの組織中に AR が存在することは報告されていた²⁾にもかかわらず、組織内ソルビトール含量の正確な評価は困難であった。一方、ガスクロマトグラフィー (GC) を用いた方法では、直接的にソルビトールを定量でき、組織中の夾雑物質の影響を考慮する必要のない反面、シリル化などの特殊な前処理が必要であること、測定に約 1 昼夜の時間がかかることより、大量の検体処理には不向きであった。今回われわれは NADH の分離に逆相高速液体クロマトグラフィー (以下 HPLC と略) を用いることにより、夾雑物質の影響を可及的に排除し得る、新たなソルビトール含量測定法を開発した。また、それによりストレプトゾトシン (STZ) 誘発糖尿病ラットの肝・心筋・腎・坐骨神経・腹部大動脈壁・赤血球中のソルビトール含量を測定し血糖と組織内ソルビトール含量の関係を検討し、併せてアルドース還元酵素インヒビター (以下 ARI と略) の 1 つである Sorbinil の経口投与が、組織内ソルビトール含量に及ぼす影響を検討した。

対象と方法

1) 実験動物

実験には雄性ウイスター系ラットを用い、ソルビトール含量を測定する対象組織として、肝臓・心筋・腎臓・坐骨神経束・腹部大動脈壁・赤血球を使用した。

a. 正常ラット各組織中のソルビトール含量の定量

生後よりの経過週齢が各組織中ソルビトール含量に与える影響を検討した。① 9 週齢、② 6 ケ月齢、③ 12 ケ月齢。

b. STZ 糖尿病ラットの作製

糖尿病ラットは、5 週齢ウイスター系雄性ラットに 24 時間絶食後、STZ 60 mg/kg を尾静脈より注入し作製した。注入 72 時間後に自由摂食下で、血糖値

が 250 mg/dl 以上のものを STZ 糖尿病ラットとして実験に供した。糖尿病発症確認後、観察期間中連日中間型インスリン 4 単位の皮下注を行った、①インスリン 6 ケ月群、②インスリン 12 ケ月群に分け、それぞれの組織中ソルビトール含量を測定した。

c. ラット組織中ソルビトール含量に対する ARI (Sorbinil) 投与の影響

ラット組織中ソルビトール含量に対する ARI の影響を検討するために、糖尿病発症確認より 6 ケ月 (Sorbinil+インスリン 6 ケ月群) または 12 ケ月間 (Sorbinil+インスリン 12 ケ月群)、剖検前日まで連日 Sorbinil の経口投与、および中間型インスリン 4 単位の皮下注を行った。Sorbinil は原末 2.5 mg を 0.3%メチルセルロース 1 ml に懸濁させ、投与直前に測定した体重換算により、10 mg/kg を 1 回投与量とした。投与は、ラット用胃ゾンデを用い、連日 1 回午後 4~5 時に行った。

なお、Sorbinil 原末は Pfizer 社 (アメリカ) より提供を受けたものを用い、インスリンは、Monotard MC (Novo 社製:デンマーク) を使用した。

2) 剖検とサンプリング

a. 剖検:ラットは剖検前 24 時間より絶食 (飲水可) とした。ペントバルビタール麻酔下にて心臓採血を行い、可及的に臓器内脱血を目指すとともに、脱血死を確認後、直ちに肝・心・腎を摘出、坐骨神経・腹部大動脈を切離した。

b. サンプリング:各臓器検体 (肝実質・左室心筋・腎皮質・坐骨神経束・腹部大動脈壁) 湿重量 0.05~0.25 mg を 6%過塩素酸 2 ml とともにホモゲナイズし、3000 回転・10 分間遠沈後、上清 1.4 ml を分注、それに 3MK-K₂CO₃+0.5 M トリエタノールアミン 0.34 ml を加え、pH 7.8~9.0 に調節、再度 3000 回転・10 分間遠沈後の上清をサンプルとした。赤血球は、剖検時、全血 1 ml を採血、生食 2 ml を加え 3000 回転・10 分間にて遠沈洗浄後の赤血球層を分離し、それに他臓器と同様の 6%過塩素酸による除蛋白処理を行った。なお、測定までサンプルは凍結保存とした。

3) ソルビトールアッセイ系

a. 原理:酵素反応にて生成した NADH を逆相高速液体クロマトグラフを用いて分離後、蛍光分光光度計にてピーク高を測定した。毎測定時に標準濃度のソルビトール溶液を HPLC に注入し、得られたピーク高からソルビトールピーク高の検量線を作

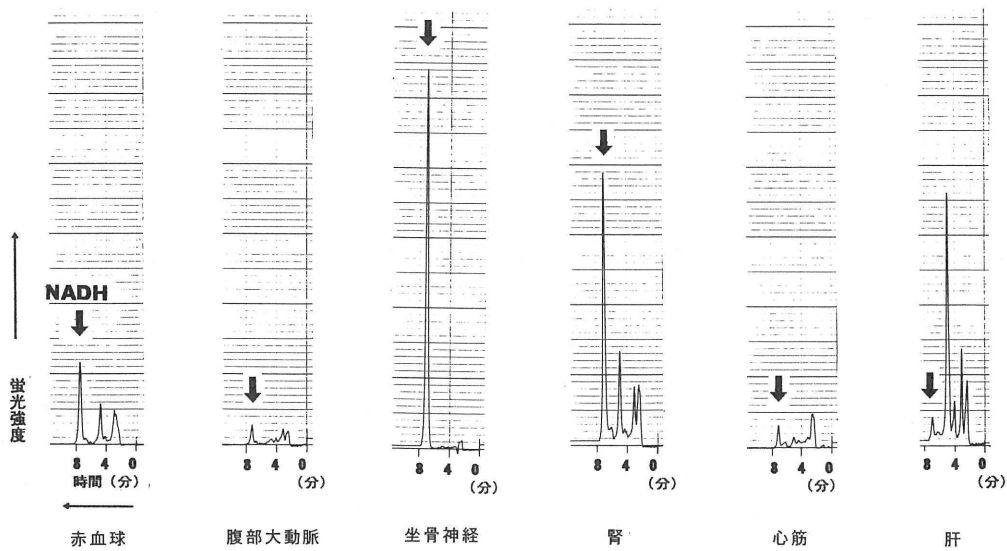


Fig. 1 各組織よりの検体のクロマトグラム

成し、これを用いて各組織中ソルビトール含量 (単位は nmol/wet・g; 赤血球では nmol/g・Hb) を求めた。

b. 使用機器：高速液体クロマトグラフ ポンプ：日立社製 655A-12 型, 分析用カラム：資生堂社製 CAPCELL PAK C18, ϕ 4.6×250 mm, 検出器：日立社製 蛍光分光光度計 650-10S 型, 試料注入器：レオダイン 7125 型, レコーダー：日立社製 056 型。

c. 試薬及び測定条件：試薬には、ソルビトール (SIGMA 社製 No. S1876：アメリカ), SDH (SIGMA 社製 No. S1128), NAD (SIGMA 社製 No. N7004) を用いた。SDH は蒸留水にて溶解、濃度 10 mg/ml に調整し、NAD はグリシンバッファーにて溶解、0.8 mg/ml (pH 9.4) に調整した。凍結保存されていたサンプルを室温解凍し、その 0.5 ml に、SDH 溶液 10 μ l, NAD 溶液 1 ml を加えて測定検体を作製した。測定はすべて恒温機器測定室内 (22~25°C) で行い、ソルビトール-SDH-NAD 反応時間は 30 分間とした。それ以後は、酵素反応を止めるために検体スピッツを測定まで 4°C 恒温槽内にて静置した。HPLC のポンプはフローコンスタント (1 ml/min) とした。検出器の励起波長は 365 nm (slit: 12.5 nm), 発光波長は 451 nm (slit: 10 nm) とした。HPLC の溶離液には、7.5 vol% メタノール-0.02 M リン酸水素二アンモニウム (pH 7.8) を用

いた。

なお、統計学的検定には多群間比較 (Scheffe) を用い、 $p < 0.01$ を有意とした。

結 果

1) 測定の実際

Fig. 1 には HPLC により分離されたクロマトグラムの 1 例を示す。検体は糖尿病ラットのものであり、チャートスピードは 0.25 cm/min である。本実験の条件では、注入後 7 分に組織内ソルビトールに由来する NADH のピーク (↓) が確認された。

2) 正常ラット各組織中のソルビトール含量

a. 日内・日差変動係数：同一検体を用いての再現性試験では、日内変動の変動係数は 12.9%、日差変動の変動係数は 14.8% であった。いずれも既出の方法と同等¹³⁾ の満足すべきものであった。

b. 添加実験：未測定検体とソルビトール標準溶液 (6.2 nmol/ml, 12.4 nmol/ml) を用いた添加回収実験では、96~107% の回収率が得られた。

c. 加齢の影響：9 週齢の組織内ソルビトール含量は、肝 26±15 nmol/wet・g, 心 24±6.3 nmol/wet・g, 腎 36±14 nmol/wet・g, 坐骨神経 84±24 nmol/wet・g, 腹部大動脈壁 69±22 nmol/wet・g, 赤血球 37±3.1 nmol/wet・g であり、6 ケ月・12 ケ月と加齢した時点での成績は肝・腹部大動脈壁ではほぼ不変であった。心・腎・坐骨神経・赤血球では加齢とと

もに増加傾向を認めるものの有意な変化ではなかった (Table 1)。

d. ソルビトール含量の組織差：同一個体においても、ソルビトール含量の組織差が認められた。すなわち、肝・心筋・腎・大動脈壁・赤血球に比べ、坐骨神経では常に約2~3倍のソルビトール含量を認めた。

3) 糖尿病ラットのプロフィール (Table 2)

剖検時体重は正常コントロール群 (6ヶ月：460±137 g, 12ヶ月：498±128 g; m±s.d.) に比べ、イン

スリン6ヶ月群：320±42 g, インスリン12ヶ月群：317±39 g, Sorbinil+インスリン6ヶ月群：328±92 g, Sorbinil+インスリン12ヶ月群：325±59 g, と糖尿病ラットで有意に低下を認めたが、6ヶ月群, 12ヶ月群ともインスリン群と Sorbinil+インスリン投与群との間には有意な差はなかった。

剖検時血糖は正常コントロール群 (6ヶ月：118±50 mg/dl, 12ヶ月：75±25 mg/dl; m±s.d.) に比べ、インスリン6ヶ月群：379±165 mg/dl, インスリン12ヶ月群：246±68 mg/dl, Sorbinil+インスリン6ヶ月群：325±112 mg/dl, Sorbinil+インスリン12ヶ月群：167±42 mg/dl, と糖尿病ラットで有意に上昇を認めた。糖尿病群の間では有意な差は認められなかった。

4) STZ糖尿病ラット各組織中のソルビトール含量 (Table 3)

腎では正常対照 33±13 nmol/wet・g に対し、インスリン6ヶ月群で 118±93 nmol/wet・g と有意に増加、インスリン12ヶ月群では 196±70 nmol/wet・g と6ヶ月群に比してもさらに有意な増加が認められ

Table 1 組織内ソルビトール含量に対する加齢の影響

	9週齢 n=13	6ヶ月齢 n=12	12ヶ月齢 n=22
肝	26±15	23±9.2	32±13
心筋	24±6.3	22±13	36±18
腎	36±14	33±13	52±16
坐骨神経	84±24	128±54	122±54
腹部大動脈	69±22	39±16	59±24
赤血球	37±3.1	57±23	48±15
			m±s.d.

Table 2 糖尿病ラットのプロフィール

	6ヶ月		6ヶ月糖尿病群		12ヶ月		12ヶ月糖尿病群	
	正常コントロール群	インスリン群	インスリン群	Sorbinil+インスリン群	正常コントロール群	インスリン群	インスリン群	Sorbinil+インスリン群
	n=12	n=26	n=26	n=34	n=22	n=9	n=9	n=7
剖検時体重 (g)	460±137	320±42*	328±92*	328±92*	498±127	317±39*	317±39*	325±59*
剖検時血糖 (mg/dl)	118±50	379±165*	325±112*	325±112*	75±25	246±68*	246±68*	167±42*
								m±s.d.
								* : p<0.01

Table 3 正常および糖尿病ラットにおける各組織内ソルビトール含量

	6ヶ月		6ヶ月糖尿病群		12ヶ月		12ヶ月糖尿病群	
	正常コントロール群	インスリン群	インスリン群	Sorbinil+インスリン群	正常コントロール群	インスリン群	インスリン群	Sorbinil+インスリン群
	n=12	n=26	n=26	n=34	n=22	n=9	n=9	n=7
肝 (nmol/wet・g)	23±9.2	35±12	35±12	24±15	32±13	45±16	45±16	37±17
心筋 (nmol/wet・g)	22±13	36±16	36±16	33±18	36±18	47±20	47±20	34±11
腎 (nmol/wet・g)	33±13	118±93*	118±93*	54±31	52±16	196±70**	196±70**	63±16
坐骨神経 (nmol/wet・g)	128±54	884±685*	884±685*	242±222	122±54	1028±335*	1028±335*	128±40
腹部大動脈 (nmol/wet・g)	39±16	48±25	48±25	56±28	59±24	115±47*	115±47*	80±20*
赤血球 (nmol/g-Hb)	57±23	67±43	67±43	64±34	48±15	121±25	121±25	51±13
								m±s.d.
								*, ** : p<0.01

た。坐骨神経でもインスリン 6 ヶ月群, 12 ヶ月群で, 884 ± 685 nmol/wet・g, 1028 ± 335 nmol/wet・g と, 両群とも正常対照に比し有意な増加が認められた。腹部大動脈壁及び赤血球では, 正常対照群とインスリン 6 ヶ月群の間に有意差は認められず, インスリン 12 ヶ月群のソルビトール含量が, 腹部大動脈壁 115 ± 47 nmol/wet・g, 赤血球 121 ± 25 nmol/g・Hb と有意な増加を示した。一方, 肝・心筋ではインスリン 6 ヶ月群, 12 ヶ月群とも正常対照群に比し, 有意な差は認めなかった。

5) 組織中ソルビトール含量に対する ARI 投与の影響 (Table 3)

腎・坐骨神経内ソルビトール含量は Sorbinil 投与により, 6 ヶ月群の腎 54 ± 31 nmol/wet・g, 坐骨神経 242 ± 222 nmol/wet・g, 12 ヶ月群の腎 63 ± 16 nmol/wet・g, 坐骨神経 128 ± 40 nmol/wet・g と, インスリン単独投与群に比し有意に減少し, 正常対照群とも有意な差は認めなくなった。赤血球では, インスリン 12 ヶ月群でのソルビトール含量の有意な増加が, Sorbinil 投与により 51 ± 13 nmol/gHb と有意に減少し, 正常対照とほぼ同値となった。一方, 腹部大動脈壁ではインスリン 12 ヶ月群でのソルビトール含量 115 ± 47 nmol/wet・g が, Sorbinil 投与により 80 ± 20 nmol/wet・g と減少したが, 有意な変化ではなかった。肝・心筋では, 6 ヶ月・12 ヶ月間の Sorbinil 投与により, ソルビトール含量はインスリン単独投与群より低下傾向を認めるものの, 有意ではなかった。

6) 赤血球と他組織内ソルビトール含量の相関 (Fig. 2, Fig. 3)

a. 正常ラット：組織内ソルビトール含量と赤血球中のソルビトール含量との間に, 心筋： $r=0.548$ ($p<0.01$), 坐骨神経： $r=0.588$ ($p<0.01$) と, 有意な相関が認められた。一方, 肝・腎・腹部大動脈では, 相関は認められなかった。

b. STZ 糖尿病ラット：組織内ソルビトール含量と赤血球中ソルビトール含量との間に, 腎： $r=0.497$ ($p<0.01$), 坐骨神経： $r=0.487$ ($p<0.01$) と, 有意な相関が認められたが, 肝・心筋・腹部大動脈では, 相関は認められなかった。

考 察

正常コントロールから得た同一検体を用いて, 従来法¹⁰⁾と本方法での測定結果を比較した結果

(Table 4) では, 夾雑物質の影響の少ない坐骨神経でのみ有意な相関が認められたが, 他の組織では 2 方法での結果の間には大きな乖離があり, かつ, 同一検体でありながら従来法で有意に標準偏差が大であった。また, 肝・大動脈壁では従来法で測定不能の検体も存在した。組織内ソルビトール含量には AR の活性差に基づく臓器差があると考えられ, 特に正常コントロール動物の肝・心筋・大動脈壁ではポリオール代謝経路で処理されるグルコースは少量のためソルビトール含量も少量と考えられる。それゆえに, 測定上, NADH 以外の発光物質の影響をより受けやすくなった結果, 従来法では測定値が不安定になったものと考えられた。実際に HPLC のクロマトグラムでも, 坐骨神経組織において, NADH 以外の夾雑物質が極めて少ないことを認める一方で, 肝・心筋・腎・腹部大動脈壁・赤血球では夾雑物質の存在が, 無視し得ないほど多量であった。したがって, これらを分離しないまま測定する従来法においては, 対象となる組織によっては組織内ソルビトール含量が正確に測定されていないと考えられる。一方, 同一検体を用いて, GC 法による測定は行っていないが, 正常及び STZ 糖尿病ラットでの神経・赤血球ソルビトール含量について, 我々の方法での結果は, GC 法を用いての結果¹⁴⁾¹⁵⁾, と近似した値が得られた。以上より, 今回我々が開発した HPLC を用いる方法は, 酵素反応のみを用いる従来法に比べ, 少量の組織内ソルビトール含量の測定でも鋭敏であり, さらに, GC 法と比べても, より簡便な検体処理で, 同等の精度を有する測定結果が得られる方法と考えられる。

本測定法を用いての正常ラットでの検討では, 同一個体でのソルビトール含量の組織差が認められた。ポリオール代謝経路には, 前段階酵素である AR 活性と後段階酵素である SDH 活性の 2 つの要素があるが, ソルビトール含量に及ぼす SDH 活性の変化の寄与は低いとされており¹⁶⁾, 正常ラットにて認められたソルビトール含量の組織差は, ほぼ組織の AR 活性の差を表わしているものと考えられた。また今回の結果からは, 組織内ソルビトール含量への加齢の影響は少ないと思われた。ヒト非糖尿病患者で, 加齢により赤血球内ソルビトール含量が有意に増加するとの報告があり¹⁷⁾, その理由として, 加齢による耐糖能の低下に伴い組織内に酵素反応の基質としてのグルコースが蓄積することが示唆されているが,

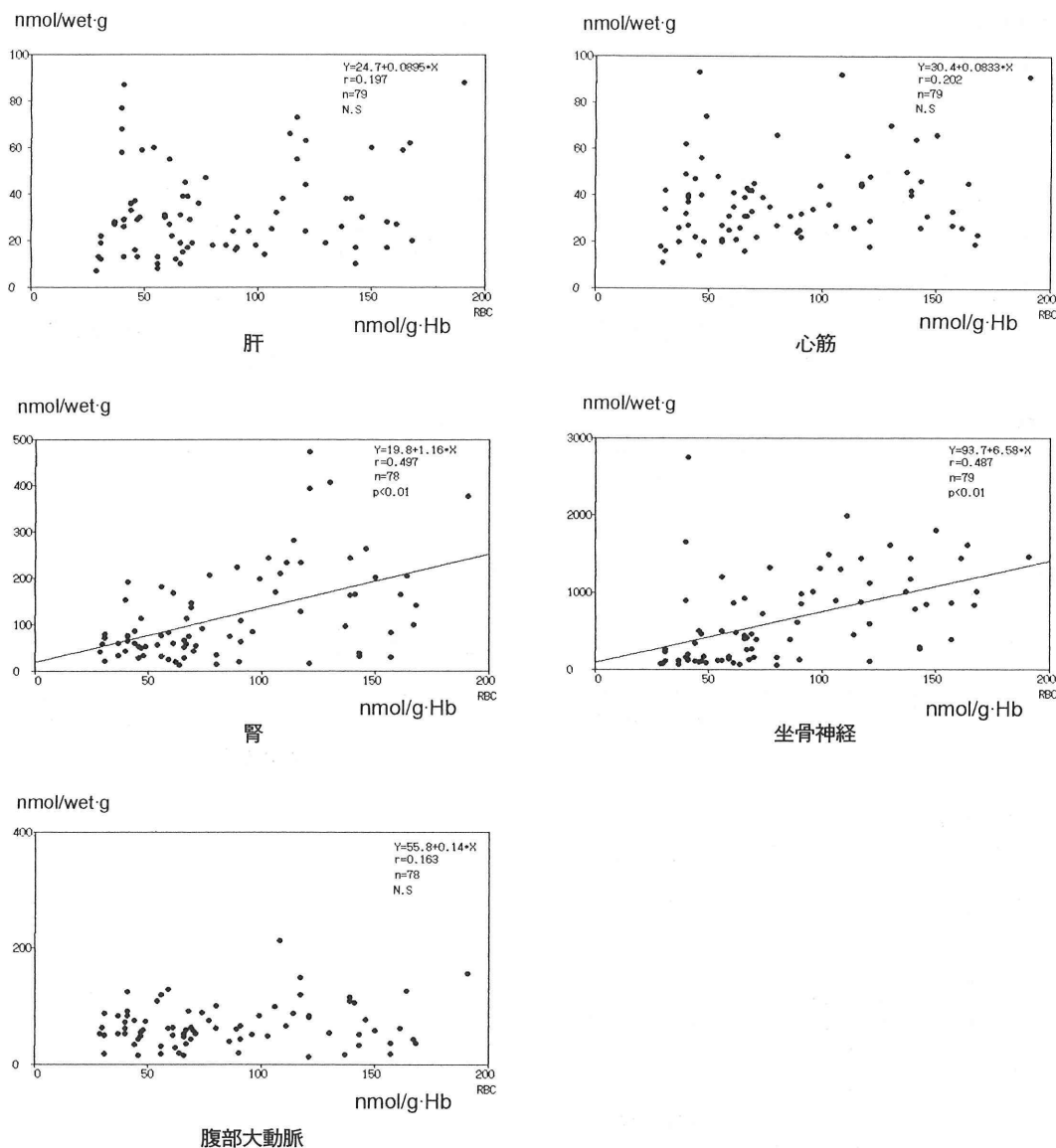


Fig. 2 正常ラットにおける赤血球内ソルビトール含量と他組織内含量との相関

本検討では赤血球にても有意な差は認められなかった。

STZ 糖尿病ラットにおける、発症経過時間による組織内ソルビトール含量の変化の検討では、組織によって明らかな相違が認められた。すなわち、肝および心筋では正常コントロールに対し、糖尿病発症後12ヶ月を経過した後もソルビトール含量は有意な変化を示さず、Sorbinil内服によりソルビトール含量は減少傾向を示すものの有意な変化ではな

かった。Heathら¹⁸⁾は発症後15日経過のSTZ糖尿病ラットの肝ソルビトール含量を337 nmol/gと報告し、正常コントロール群の354 nmol/gと差がないとしているが、Gaynesら¹⁹⁾発症後30日のSTZ糖尿病ラットの肝ソルビトール含量は25~30 μmol/gであり、正常コントロールの15~20 μmol/gに比べ37%の増加を認めたと報告している。しかし、両者の測定結果とも今回の我々の結果の10~1000倍という値を示し、大きな隔たりを認めている。このこ

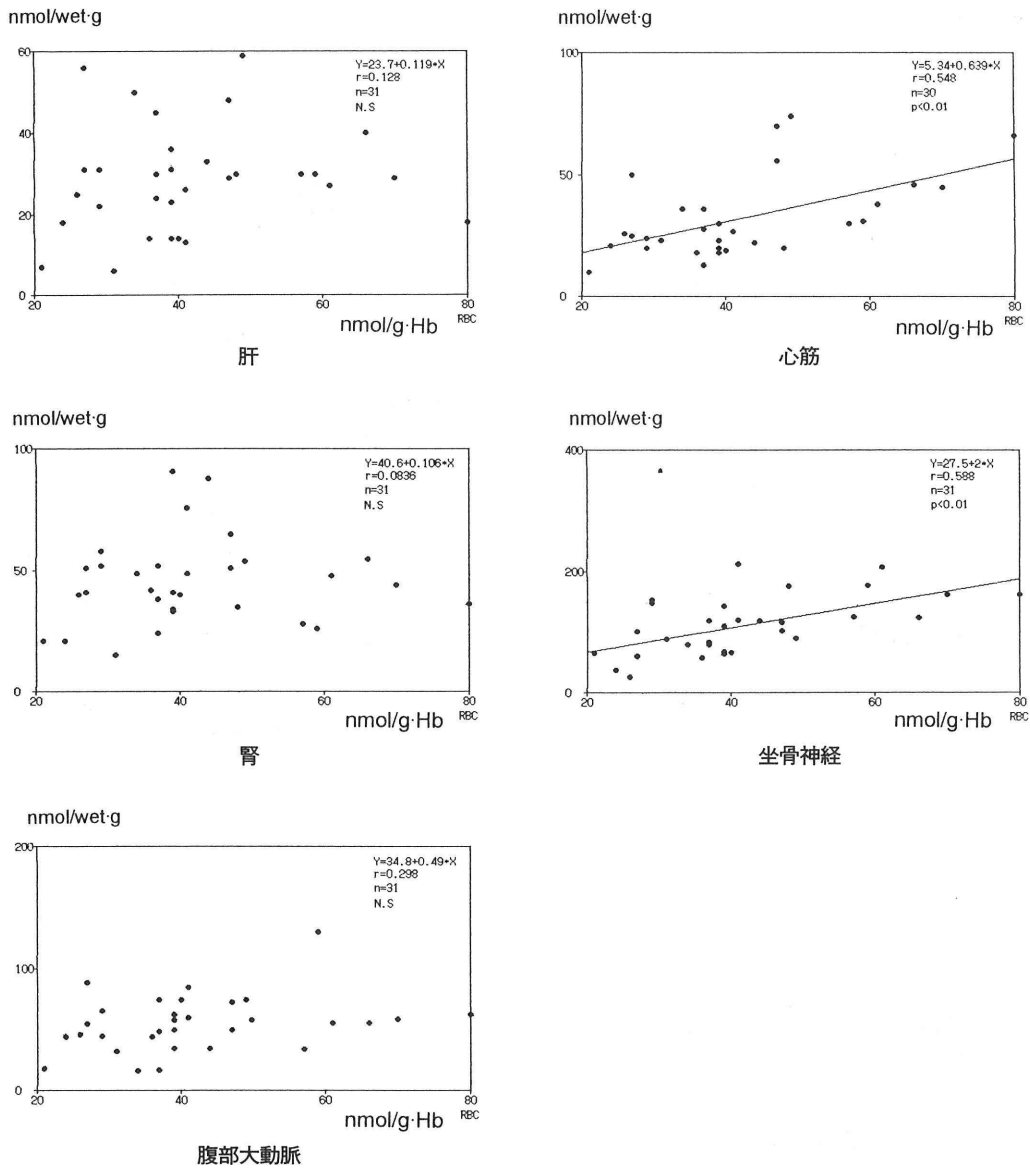


Fig. 3 糖尿病ラットにおける赤血球内ソルビトール含量と他組織内含量との相関

とは、肝のようにバックグラウンドとしての夾雑物質を多く含む (Fig. 1) 臓器では、従来の酵素法のみで組織内ソルビトール含量を測定し検討を行うことは適当でないことを示すものと考えられる。事実、Gaynesらの同一報告における、肝 AR 活性・肝 SDH 活性の測定結果では、正常コントロールと STZ 糖尿病ラット群間で差が認められておらず、むしろラット肝においては血糖上昇がソルビトール含

量の上昇には結びつかないという、我々の実験結果が支持されるものと考えられた。

糖尿病における心筋組織内ソルビトール含量測定 の報告は少なく、山内ら²⁰⁾の報告では、糖尿病発症 21 週後のラット心筋では正常コントロールに比し、ソルビトール含量は約 2.1~2.2 倍の増加を認めている。しかし、彼らの報告は測定に酵素法のみを用いており、組織中の夾雑物質の存在についての記述

Table 4 測定法の違いに伴う同一検体中ソルビトール含量の変化

肝	NO.	1	2	3	4	5	6	mean±s.d.
	HPLC	19	19	16	23	28	14	20±4.6
	従来法	9.7	17	不能	4.7	31	不能	16±9.9
両法の相関		N.S						
心筋	NO.	1	2	3	4	5	6	mean±s.d.
	HPLC	15	16	16	22	32	21	20±5.8
	従来法	4.4	8.0	2.6	19	5.8	22	10±7.4
両法の相関		N.S						
腎	NO.	1	2	3	4	5	6	mean±s.d.
	HPLC	47	46	40	53	57	43	48±5.8
	従来法	12	41	6.0	21	30	13	21±12
両法の相関		N.S						
坐骨神経	NO.	1	2	3	4	5	6	mean±s.d.
	HPLC	83	71	114	250	97	114	122±6.0
	従来法	73	62	105	278	92	80	115±7.4
両法の相関		r=0.99 (p<0.01)						
腹部大動脈	NO.	1	2	3	4	5	6	mean±s.d.
	HPLC	60	36	45	48	37	51	46±8.2
	従来法	40	26	17	19	不能	不能	26±9.0
両法の相関		N.S						

はない。今回の我々の結果では、糖尿病の経過に伴い、バックグラウンドとしての夾雑物質の増加も認めており、その影響を排除し測定した結果からは、肝と同様に生体の血糖上昇が心筋のソルビトール含量には影響を与えないと考えられた。

動脈壁の組織内ソルビトール含量に関する記述としては、ウサギ胸部大動脈を用いた Clements らの報告¹⁰⁾があるのみである。糖尿病性合併症としてのマクロアングリオパシーを考える時に、動脈壁の脂質代謝異常・組織構成蛋白の glycation などの問題の他に、ポリオール代謝の関与も検討する必要があるとする考えもあり²¹⁾、その指標としてのソルビトール含量測定の意義は少なくないと思われる。我々の結果で、糖尿病ラット 6 ヶ月経過群では正常群と差が無く、12 ヶ月経過群でのみ、有意な増加を認めたことは、さらに長期の観察期間の検討が必要であろう。

坐骨神経ソルビトール含量に関しては、酵素法を用いて測定する上での変動要因である、組織中夾雑

物質の少ないことが我々の方法でも確認された (Fig. 1)。糖尿病発症後の時間的経過に伴う神経組織でのソルビトール含量の変化については、すでに多くの報告²⁾⁴⁾¹²⁾¹⁴⁾¹⁸⁾があり、また、ARI の投与により神経機能の改善を認めたとの報告も多い。しかし、いずれの糖尿病観察期間も短期間であり、6 ヶ月、12 ヶ月という長期間にわたって観察を行った報告は少ない。今回の結果では、発症 6 ヶ月・12 ヶ月の時点では正常コントロールに比し、それぞれ約 7 倍・9 倍の増加を認め、糖尿病経過期間とともにソルビトール含量が増加を認める結果であった。さらに、両グループとも、観察期間中の高血糖の持続にもかかわらず Sorbinil 投与が、著明に増加した組織内ソルビトール含量を正常コントロールと同等のレベルまで有意に減少させたことは、神経組織へのソルビトールの蓄積を抑制する上で血糖以上に AR の障害が大きな意味を有することが示唆された。

腎ソルビトール含量についても坐骨神経と同様の变化を認めた。すなわち、糖尿病発症 6 ヶ月・12 ヶ

月の時点では正常コントロールに比し、それぞれ約 4 倍、5 倍の増加を認め、そのいずれも、Sorbitinil の投与により有意な減少を認めた。糖尿病性腎症に対する ARI の治療薬としての可能性については、動物実験にて有用とする報告²²⁾と、無効とする報告²³⁾があり、未だ結論は得られてはいないが、今後、腎機能と組織内ソルビトール含量との関係を検討する場合には、AR の局在性という問題も考慮し、より細かく機能単位別に定量を行うことも必要であろう。

糖尿病における赤血球ソルビトール含量測定には 2 つの意義があると考えられる。1 つは他組織と同様に、赤血球自体の機能に対する細胞内ソルビトール蓄積の影響を調べることであり、もう 1 つの意義は、生体における各組織内ソルビトール含量のマーカーとしての可能性を検討することである。組織内ソルビトール蓄積とそれによる細胞機能障害との関連が指摘されるに伴い、赤血球ソルビトール含量が各組織内ソルビトール含量を反映するとすれば、採血のみにて得られるデータにより、生検等を行うことなく糖尿病性合併症の評価あるいは予測が可能²⁴⁾と期待される。我々の測定では、正常コントロール群で赤血球ソルビトール含量は心筋および坐骨神経ソルビトール含量と有意な相関を認め、糖尿病群では、腎および坐骨神経ソルビトール含量と有意な相関を認める結果であった。しかし、非糖尿病状態ではグルコース代謝におけるポリオール代謝経路の関与は全体の 3% 程度と報告されており¹⁴⁾、組織内ソルビトール含量が機能に影響を及ぼすことは考えにくい、組織内に蓄積したソルビトール含量が問題となるのは生体の血糖値が上昇した時であることをふまえると、赤血球ソルビトール含量が組織内ソルビトール含量のマーカーとなり得るのは、糖尿病での腎および神経組織であろうと推測された。

本論文の要旨の一部は、第 29 回、第 30 回、第 31 回日本糖尿病学会学術総会、第 13 回国際糖尿病会議(シドニー)にて発表した。

結 論

1. 酵素法に HPLC を組合わせた新しい測定法を開発し、ラット組織内ソルビトール含量を測定した。

2. 新しい方法と、従来の方法とで同一検体を測定すると、神経組織で両者は良く一致したが、肝・心筋・腎・腹部大動脈壁では結果に乖離を認めた。

新しい方法の方が標準偏差が小さく、より有用であった。

3. STZ 糖尿病ラットでは、腎・坐骨神経・腹部大動脈壁・赤血球中のソルビトール含量は有意の増加を認め、ARI 投与がそれらを有意に抑制した。

4. STZ 糖尿病ラットでは、赤血球中ソルビトール含量は腎および坐骨神経中ソルビトール含量と有意な相関を認めた。

〈謝辞〉

本稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました恩師伊藤久雄教授、また御指導と御鞭撻を頂きました金澤真雄講師に深甚なる謝意を捧げます。さらに本研究にあたり、終始直接の御指導・御助言を賜りました東京医科大学化学教室佐藤久雄名誉教授、山下順三教授、北原恵一講師、さらには化学教室教室員の皆様には心より御礼申し上げます。

References

- 1) Heyningen, R.: Formation of polyols by the lens of the rat with "sugar" cataract. *Nature*, **184**: 194~195, 1959
- 2) Gabbay K.H.: Hyperglycemia, polyol metabolism and complication of diabetes mellitus, *Ann Rev Med* **26**: 521~536, 1975
- 3) Clements, R.S.: The role of abnormal polyol metabolism in diabetic complications. In *Diabetes Mellitus and Obesity* (Brohoff. B.N., SJ Bleicher. S.J. eds), p117~128, Williams and Willkins, Baltimore, 1982
- 4) Ward, J.D.: Effect of blood sugar control on the accumulation of sorbitol and fructose in nervous tissues. *Diabetes* **21**: 1173~1178, 1972
- 5) Conard, S.M.: Comparative studies on aldose reductase from bovine, rat and human lens. *Biocim. Biophys. Acta.* **708**: 348~357, 1982
- 6) Greene, D.A., Lattimer, S.A.: Altered myo-inositol metabolism in diabetic nerve. In: *Diabetic Neuropathy* p289~298, WB Saunders Co, Philadelphia, 1987
- 7) Akgun, S., et al.: Red cell sorbitol and Diabetic control. *Horm. metabol. Res.* **17**: 355~357, 1985
- 8) Ward, J.D.: The polyol pathway and complications of diabetes. *The British Journal of Clinical Practice*, March p118~122, 1986
- 9) 細島弘行ら: 網膜症を伴うインスリン非依存性糖尿病患者における赤血球ソルビトール値について. *最新医学* **45**: 1433~1437, 1990
- 10) Clements, R.S. et al.: Polyol pathway in aorta:

- Regulation by hormones. *Science* **166**: 1007~1008, 1969
- 11) Perterson, M.J., et al.: A novel aldose reductase inhibitor that inhibits polyol pathway activity in diabetic and galactosemic rats. *Metabolism* **28**: 456~461, 1979
 - 12) Greene, D.A., et al.: Action of sorbinil in Diabetic peripheral nerve. *Diabetes* **33**: 712~716, 1984
 - 13) 森本妙子: 赤血球中ソルビトールの測定. *SRL 宝函* **12**: 36~41, 1988
 - 14) Malone, J.I., et al.: Red cell sorbitol. *Diabetes* **29**: 861~864, 1980
 - 15) Dyck, P.J., et al.: Nerve glucose, sorbitol, fructose, and myo-inositol at various times after feeding in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Mayo Clin Proc* **64**: 905~910, 1989
 - 16) 坂本信夫, 堀田 饒: 糖尿病における polyol, myo-inositol 代謝—その細胞障害— *糖尿病学* 1990: 7~24, 1992
 - 17) 船迫真人ら: 加齢と赤血球ソルビトール. *Jpn. J. Geriat* **24**: 476~477, 1987
 - 18) Heath, H., Hamlett, Y.C.: The sorbitol pathway: Effect of streptozotocin induced diabetes and the feeding of a sucrose rich diet on glucose, sorbitol, and fructose in the retina, blood and liver of rats. *Diabetologia* **12**: 43~46, 1976
 - 19) Gaynes, B.I., Watkins, J.B.: Comparison of glucose, sorbitol and fructose accumulation in lens and liver of diabetic and insulin-treated rat and mice. *Comp. Biochem. Physiol.* **92B**: 685~690, 1989
 - 20) 山内理充ら: 実験的糖尿病ラットの各組織内アルドースリダクターゼ活性およびソルビトール濃度について (会議録). *臨床病理* **40**: suppl 140, 1992
 - 21) 三浦 傳, 田村芳一: 虚血性心疾患の発症因子として糖尿病の演じる役割. *医学のあゆみ* **114**: 532~535, 1988
 - 22) Beyer-Mears, A., et al.: Diminished proteinuria in diabetes mellitus by Sorbinil, an aldose reductase inhibitor. *Pharmacology* **32**: 52~60, 1986
 - 23) 中村 毅: 実験的糖尿病ラット腎症に対する Aldose Reductase Inhibitor の効果. *東医大誌* **52**: 1~8, 1994
 - 24) Hasegawa G., Tsutsumi, Y., Aoki, S., et al.: Relationship between erythrocyte sorbitol content and diabetic microangiopathy in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: the study of a diet loading test. *Diabetes Reseach and Clinical Practice* **12**: 143~148, 1991

Tissue Sorbitol Content in Normal and Experimental Diabetic Rats

—A new method of measuring sorbitol using high-Performance liquid chromatography—

Takashi MIWA

Department of Internal Medicine, Tokyo Medical College
(Director: Prof. Hisao ITOH)

The involvement of the polyol pathway has been recently reported as one of the cause of diabetic complications. The tissue sorbitol content has been considered to reflect the activity of the polyol pathway. We report a new, efficient method to accurately measure the tissue sorbitol content, using high-performance liquid chromatography (HPLC) and the effect of aldose reductase inhibitor (Sorbinil, Pfizer) on the sorbitol content in the liver, myocardium, kidney, sciatic nerve, aortic wall and erythrocytes. Rats with Streptozotocine-induced diabetes were bred 6 or 12 months after the onset of diabetes. Some of the diabetic rats were also given Sorbinil (10 mg/kg/day). The test specimens were obtained at the end of the 6- or 12- month period. Sorbitol dehydrogenase and NAD were added to specimens from which protein had been removed, and the resulting NADH was measured by reversed-phase HPLC using a fluorescence spectrophotometer as a detector. The kidney and sciatic nerve sorbitol content was significantly elevated at 6 and 12 months after the onset of diabetes, while the administration of Sorbinil for 6 and 12 months significantly reduced the sorbitol content in those tissues. There was a significantly greater amount ($p < 0.01$) of kidney sorbitol content in the 6-month diabetic rats compared to the 6-month controls, 6-month Sorbinil-treated diabetic rats, 12-month controls and 12-month Sorbinil-

trated diabetic rats. There was a further significant difference ($p < 0.01$) between the 12-month diabetic rats and all other groups, including the 6-month diabetic rats. Aortic wall and erythrocyte sorbitol content was significantly elevated only 12 months after the onset of diabetes, and after administration of Sorbinil there was a significant reduction of sorbitol content only in erythrocytes. No significant elevation was observed in the liver or myocardium of diabetic rats. The erythrocyte sorbitol content showed significant correlation with that of the kidney and sciatic nerve in the diabetic rats.

〈Key words〉 Polyol pathway, Sorbitol, Diabetic complication, High-performance liquid chromatography (HPLC).
