原　著

新生 Chinese Hamster における Monosodium Glutamate 誘発糖尿病に対する合成 Trypsin Inhibitor の予防効果および治療効果の検討

酒井　芳紀　　渡辺　清　　建部　高明
石井　兼央

要約：Monosodium glutamate (MSG) 誘発糖尿病 Chinese hamster (CH) に対する合成 trypsin inhibitor (TI) の経口投与による糖尿病発症抑制の機序を，膵に対する栄養効果，膵内分泌，肝の糖代謝酵素活性ならびに血漿脂質レベルより検討した．また TI 投与開始時期の違いによる糖尿病の発症頻度，重症度に及ぼす効果を検討した．合成 TI として〔N.N-dimethyl-carbamyolmethyl 4-(4-guanidinobenzoyloxy)-phenyl-acetate〕methansulfonate (FOY 305) を使用した．

(1) FOY 305 を授乳期より，生後4週目より，および生後11週目より投与を開始し検討したが，この3つの異なる時点のいずれの時期からの投与でも糖尿病状態を改善した．すなわち FOY 305 の経口投与には糖尿病発症の予防効果と治療効果のあることが明らかになった．

(2) FOY 305 経口投与により，血漿インスリンならびに膵内インスリン含量はある程度保持され，hexokinase, pyruvatekinase 活性および glucose-6-phosphatase, phosphoenolpyruvate carboxykinase 活性は正常に維持された．また膵内グルカゴン含量の上昇が抑制され，血漿グルカゴン値，胃グルカゴン含量は正常対照群より低値であった．一方，高脂血症の改善には無効であった．

(3) FOY 305 経口投与により糖尿病，非糖尿病状態にかかわらず CH 膵は肥大した．この膵肥大出現には CCK-PZ の遊離効果を介する機序が推測されるが，この中にB細胞の変性阻止や再生促進が含まれている可能性が考えられる．

Key words: ① 新生 Chinese hamster, ② Monosodium glutamate 誘発糖尿病, ② trypsin inhibitor ④ 膵に対する栄養効果, ⑤ 糖尿病発症抑制

〔糖尿病　27(10)：1083～1093，1984〕

はじめに

新生 Chinese hamster（以下 CH と略す）に大量の monosodium glutamate（以下 MSG と略す）を投与することにより，非肥満型の糖尿病を誘発することが可能である[1]．一方，天然あるいは合成の trypsin inhibitor（以下 TI と略す）を経口投与すると，数種類の実験動物において膵重量の増加することが知られているが[2)3)]，肥大膵の内分泌機能を検討した報告は少ない[4)-7)]．

われわれは今までに，このモデル動物に早期から TI を経口投与することにより，糖尿病の発症が著しく抑制されること，また発症した糖尿病も軽症であることを明らかにしてきた[8)]．今回は，観察期間を延長し，糖尿病発症頻度の経時的な追跡を続けるとともに，TI 投与による糖尿病発症抑制の機序を，膵に対する栄養効果，血漿・膵インスリン値，血漿・膵グルカゴン値，肝の糖代謝酵素活性ならびに肝グリコーゲ

旭川医科大学第二内科（〒078-11 旭川市西神楽4線5号 3-11）
連絡先：旭川医科大学第二内科　渡辺　清

受付日：昭和59年2月3日

ン量，さらに血漿脂質レベルより TI の効果を検討した．また，TI 投与開始時期の違いによる糖尿病の発症頻度，重症度に及ぼす効果を検討した．

対象および方法

旭川医科大学生物学教室から提供された新生 CH を実験対象とした．MSG-CH は新生 CH に生後1日目より3日間 MSG 4 mg/g・体重を皮下注して作成した．正常対照群には生後3日間 MSG の代わりに同量の生食水を皮下注した．TI としては，合成 TI である，〔N. N-dimethyl-carbamoylmethyl 4-(4-guanidinobenzoyloxy)-phenylacetate〕 methansulfonate（以下 FOY 305 と略す）[9] を使用した．次に TI の投与開始時期を次の3群に分けて検討した．すなわち，実験 I: MSG 投与直後（まだ糖尿病動物の出現がみられない頃）より，実験 II: 生後4週目（糖尿病動物が散発してくる頃）より，実験 III: 生後11週目（ほとんどの動物が糖尿病になる頃）より投与開始する3群に分けて検討を加えた．これらの動物は AM 5:00～PM 7:00 まで照明された，温度 23±1°C，湿度50～60%の安定した条件下で維持された．

実験 I：64匹の新生 CH を実験対象とし，次の3群に分けた．A群（n＝18）：生後3日間 MSG を投与し，離乳後に 0.1% FOY 305 含有 MF 固形飼料（オリエンタル酵母，東京）を与え，また3週間の授乳中には母獣（n＝4）に同じ飼料を与えた．B群（n＝27）：A群と同様に MSG を注射し，離乳後に MF 固形飼料で飼育し，授乳中には母獣（n＝6）を同じ飼料で飼育した．C群（n＝19）：正常対照群で MSG の代わりに生食水を皮下注し，授乳中の母獣（n＝4）および離乳後の新生 CH を MF 固形飼料で飼育した．

A. 血糖および体重の経時的変化の観察

生後 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 17, 20, 22, 26 週目に体重および飽食時血糖（以下血糖と略す）を測定した．22週目には 2g/kg・体重のグルコースによる経口ブドウ糖負荷試験（GTT）を施行した．血液は眼窩穿刺により採取した．

B. Plasma sample および臓器重量の測定

29週目に無麻酔，飽食状態で頸静脈よりヘパリン採血し，直ちに 4°C にて遠心分離し血漿分画をとり血糖を測定した．残りの血漿は trasylol®添加後 −75°C 以下に凍結保存し，インスリン，グルカゴンおよび各種脂質の測定に用いた．血糖はグルコース酸化法，血漿遊離脂肪酸（FFA），中性脂肪（TG），総コレステロール（TC），HDL-コレステロール（HDL-C），リン脂質（PL），はそれぞれ市販のキット（和光純薬工業）を用いて測定した．血漿過酸化脂質（LPO）は八木法[10]で測定した．また肝，膵，腎，脳，胃についてはそれぞれ重量を測定し，肝は次に述べる酵素活性測定に使用し，膵，脳，胃に関してはインスリンあるいはグルカゴンを酸エタノール法で抽出し[11]，膵インスリンおよびグルカゴン，脳グルカゴン，胃グルカゴンを測定した．インスリンは plain-charcoal を用いた一抗体法[12]，グルカゴンは 30-K を抗体とした dextran-charcoal 法[13]で測定した．

C. Liver sample

CH を無麻酔で採血後，できるだけ速く開腹し肝を摘出，重量を測定後，一部をフリージングトングスを用いて瞬間凍結をした．凍結までに要する時間は肝摘出後，少なくとも10秒以内に終えるようにした．以後，凍結組織片は −75°C 以下にて保存した．残りの肝は，重量に対して3倍量の冷却 buffer を用いて teflon homogenizer にて homogenate した．buffer の成分は 20 mM Tris, 0.15 M KC1, 2 mM EDTA および 0.5 mM dithiothreitol を含み HCl にて pH 8.0 に調整したものを用いた．homogenate は 104000 g, 60 分遠心を行い上清を分離した．hexokinase(HK) および phosphoenolpyruvate carboxykinase(PEPCK) の酵素活性の測定には新鮮な上清[14]をそのまま用いた．その他のものは分注し，−75°C 以下にて凍結保存し測定時に融解して用いた．

D. Liver enzyme assay

glucose-6-phosphatase (G-6-Pase) は凍結肝を homogenate し，これを用いて incubation[15]し，無機リンの測定[16]にて酵素活性を測定した．PEPCK は $^{14}CO_2$ の固定により，HK は NADPH の生成量を 340 nm での吸収増加より測定した[18]．fructose-1, 6-diphosphatase (F-1, 6-DPase) は 0.1 M glycine buffer (pH 9.4) を用いて NADPH 生成における 340 nm 吸収増加により測定した[19]．pyruvatekinase (PK) は NADP による 340 nm 吸収減少により酵素活性を測定した[20]．肝グリコーゲン含量は，凍結組織片を用いて Anthron 法[21]にて測定した．liver supernatant protein 含量は Folin-Ciocalteu 試薬[22]を用いて BSA Cohn Fraction V を standard にして測定した．

実験 II：45匹の CH を実験対象として，次の3群に分けて検討した．A群（n＝21）：生後 MSG を皮下注し，生後4週目より 0.1% FOY305 含有 MF 固形飼料で飼育した．授乳期には，その母獣に MF 固形飼料を与え，離乳後より4週目までは MF 固形飼

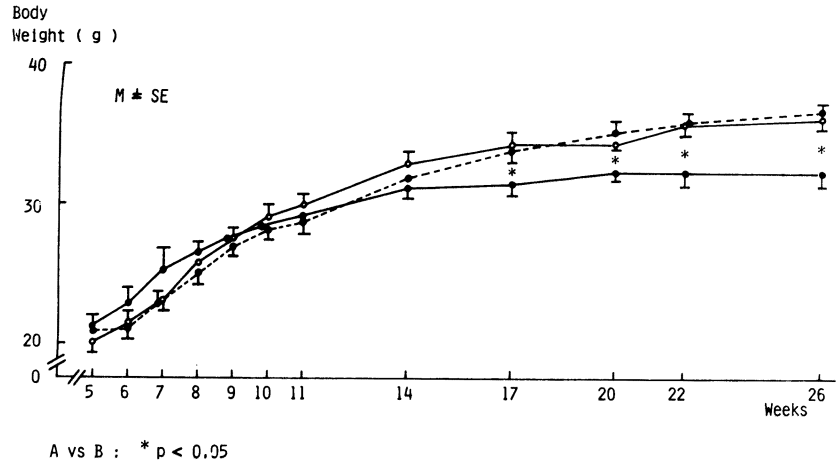

Fig. 1 Comparison of body weight and plasma glucose level among three groups of newborn Chinese hamsters.
○——○ : Monosodium glutamate injected, FOY-305 started at the period of lactation (Group A)
●——● : Monosodium glutamate injected (Group B)
●- - - -● : Saline injected (Group C)

料を投与した．B群（n＝19）：A群と同様に MSG を皮下注し，授乳中は母獣に MF 固形飼料を投与し離乳後も同じ飼料で飼育した．C群（n＝5）：正常対照群で MSG の代わりに生食水を皮下注し，以後 MF 固形飼料で飼育した．生後6週目より43週目まで体重，血糖を測定し糖尿病の重症度について比較検討した．

実験 III：18匹の MSG-CH を実験対象として次の2群に分けた．A群（n＝9）：MSG 注射後11週目までは MF 固形飼料で飼育し，11週目以降 0.1% FOY 305 含有 MF 固形飼料で飼育した．B群（n＝9）：MSG 注射後 MF 固形飼料で飼育した．TI 投与開始後1週目から23週目まで体重，血糖を測定した．また投与開始前，投与開始後7週目および25週目に GTT

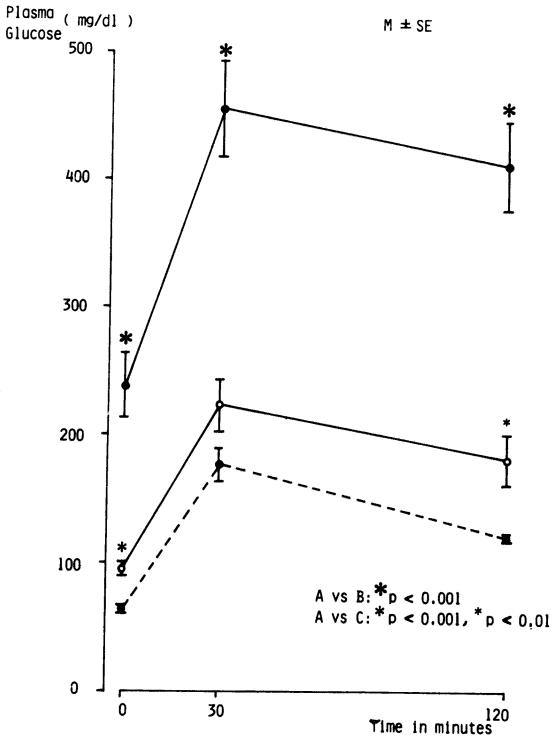

Fig. 2 Plasma glucose levels after oral glucose load at 22-th week after birth in three groups of newborn Chinese hamsters.
○——○ : Monosodium glutamate injected, FOY-305 started at the period of lactation (Group A)
●——● : Monosodium glutamate injected (Group B)
●----● : Saline injected (Group C)

を施行し各々で比較検討した．

結　果

実験 I

(1) 血糖および体重の経時的推移 (Fig. 1)

C群の血糖値は観察期間中 98～118 mg/dl とほぼ一定であった．B群の血糖値は6週目より急速に上昇し11週目で 379±39.3 mg/dl に達し，20週以降ほぼプラトーとなり，その値は平均 451～458 mg/dl であった．一方，A群の血糖値は8週以降緩徐に上昇しながら推移したが，B群に比べると6週以降26週目までの各時点で有意の低値を示し11週目で 134±10.7 mg/dl，20週以降も平均 249～279 mg/dl であった．

次に体重の推移は，A・C両群では全く同様な経過をたどり観察期間中有意差はみられなかった．一方，B群の体重は14週目まではA・C両群と同様の経過をとったが，17週目以降体重増加はほとんどみられなくなり，17, 20, 22, 26 週目の各時点ではA群，C群に比べ有意に減少していた．

(2) GTT (Fig. 2)

22週目に施行した GTT の成績を Fig. 2 に示した．B群は前値 235±25 mg/dl, 30分値 460±35 mg/dl 120分値 400±35 mg/dl と著明な高血糖を示したが，A群では前値 95±5 mg/dl，30分値 210±21 mg/dl, 120分値 190±22 mg/dl と各点ともB群に比べ有意に低値であった．

(3) 29週目の屠殺時の成績

A．血糖，体重および臓器重量 (Table 1)

26週目以降，特にB群での死亡が目立つようになったため29週目に屠殺し各種パラメーターの検討を加え

Table 1 Body weight, fasted plasma glucose, non-fasted plasma glucose, liver weight, pancreas weight and kidney weight

	Body Weight (g)	Fasted Plasma Glucose (mg/dl)	Non-fasted Plasma Glucose (mg/dl)
Group A	35.1±0.6	111± 6.8	240±24.4
Group B	28.5±1.7	303±31.3	346±16.2
Group C	37.5±0.6	61± 2.0	151±13.1
	** ** *	** ** **	** ** **
	Liver Weight (g)	**Pancreas Weight (mg)**	**Kidney Weight (mg)**
Group A	1.77±0.09	207±12.3	326±22.4
Group B	1.29±0.12	148±10.7	389±29.3
Group C	1.49±0.06	164±10.1	303± 8.5
	** **	** *	*

Group A (n=12) : Monosodium glutamate injected and FOY-305 started at the period of lactation
Group B (n=13) : Monosodium glutamate injected
Group C (n=12) : Saline injected
The value represents Mean±S.E. * $p<0.05$, ** $p<0.01$

Table 2 Plasma insulin level, pancreatic insulin content, plasma glucagon level, pancreatic glucagon content, stomach glucagon content and brain glucagon content

	Plasma Insulin (μU/ml)	Pancreatic Insulin (mU/g)	Plasma Glucagon (pg/ml)
Group A	94±16.4	3.57±0.71	66± 6.6
Group B	27± 6.7	1.75±0.32	115±16.6
Group C	73±10.2	8.76±0.96	114±12.7
	** **	* *** **	* **
	Pancreatic Glucagon (μg/g)	**Stomach Glucagon (ng/g)**	**Brain Glucagon (ng/brain)**
Group A	10.3±1.95	61±10.7	4.2±0.83
Group B	17.5±1.33	238±19.3	4.1±0.94
Group C	11.9±6.36	127±27.4	1.5±0.31
	* *	** ** **	** **

Group A (n=12) : Monosodium glutamate injected and FOY-305 started at the period of lactation
Group B (n=13) : Monosodium glutamate injected
Group C (n=12) : Saline injected
The value represents Mean±S.E. * $p<0.05$, ** $p<0.005$, *** $p<0.001$

た．屠殺3日前に眼窩穿刺により採血した空腹時血糖および屠殺時の血糖はB群に比べA群で有意に低値を示した（各々 $p<0.01$）．また，血糖 300 mg/dl 以上の高血糖動物はB群では5週目より出現し，11週目で63%，屠殺時には82.4%に達した．ケトン尿（ケトスティックス 2+以上）は30%に認められ26週目から29週目までの死亡率は37%であった．一方，A群では14週目にはじめて血糖 300 mg/dl 以上の動物が出現し以後緩徐に増加してきたが，29週目でも全体の31.3%にとどまった．ケトン尿を示した動物は認められず26週目から29週目までの死亡率は11%であった．

体重はB群で26週目の 32.4±1.2 g より 28.5±1.7 g と減少し，るいそう傾向が出現してきた．A群は 35.1±0.6 g とB群に比し有意に増加していたが（$p<0.01$），C群の 37.5±0.6 g と比べると有意に減少しており（$p<0.05$），この時点ではじめてC群とA群との間に有意差がみられた．

組織重量に関しては，肝重量，膵重量ともにA群でB群，C群に比べて明らかに増加していた（$p<0.05$）．また肝重量・体重比，膵重量・体重比で表してもA群はC群より有意に増加していた（$p<0.01$）．腎重量に関しては腎重量そのもの，および腎重量・体重比ともにB群で最も高値を示し（$p<0.05$），A群とC群間では有意差は認められなかった．

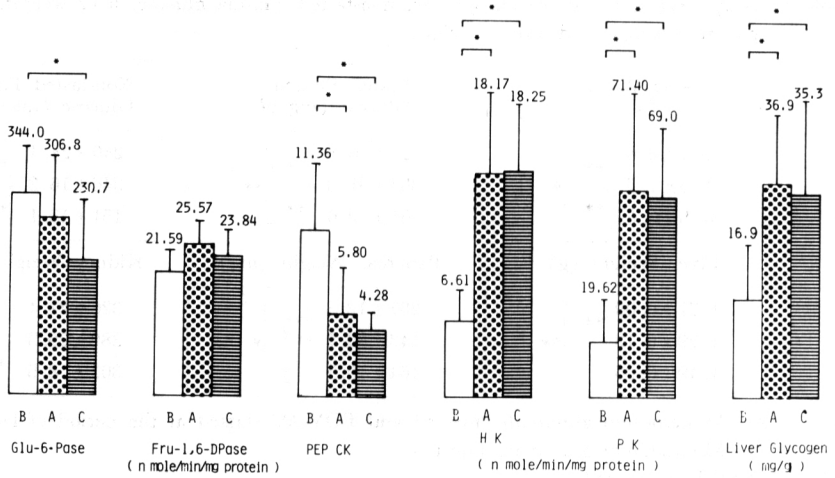

Fig. 3 Activities of liver gluconeogenic enzymes, glycolytic enzymes, and liver glycogen levels at 29-th week after birth in three groups of newborn Chinese hamsters.
Group A: Monosodium glutamate injected, FOY-305 started at the period of lactation
Group B: Monosodium glutamate injected
Group C: Saline injected
The value represents Mean±S.D. * $p<0.01$

B．インスリンおよびグルカゴン値（Table 2）

血漿インスリン値はC群（n＝12）の73±10μU/*ml*に比べB群（n＝13）では 27±7 μU/m*l* と有意に低値を示した（$p<0.01$）．一方，A群(n＝12)は 94±16μU/m*l* とC群よりも高い傾向を示した．膵インスリン含量はC群の 8.76±0.71 mU/g に比べるとA群の3.57±0.71 mU/g，B群の 1.75±0.32 mU/g ともに明らかな減少がみられたが（各々$p<0.01$），A，B両群間の比較ではA群で有意に高値であった（$p<0.05$）．

血漿グルカゴン値はC群の114±13pg/m*l* とB群の115±17 pg/m*l* の間には差はみられなかったが，A群では 66±7 pg/m*l* とC，B両群と比べ明らかに低値であった（各々$p<0.01$）．膵グルカゴン含量もC群の 11.9±6.4 μg/g に比べB群では 17.5±1.3 μg/g と有意に増加したが（$p<0.05$），A群では 10.3±2.0μg/g とC群との間には有意差はなかった．

さらに膵外グルカゴンとして，胃グルカゴンおよび脳内グルカゴン含量を検討した．胃重量，脳重量は，A，B，C 3群間で差はなかった．胃グルカゴン含量はC群の 127±27 ng/g に対してB群では 238±19ng/g と約2倍に増加していた（$p<0.01$）．それに対して，A群では 61±11 ng/g と逆にC群の半分に減少していた（$p<0.01$）．脳グルカゴンについては，全脳当たりの含量で表すと，C群の 1.5±0.3 ng に対してB群は 4.1±0.9 ng，A群は 4.2±0.8 ng と両群とも有意に増加したが（各々$p<0.01$），A，B両群間では有意差はみられなかった．

C．肝の糖代謝酵素活性ならびに肝グリコーゲン含量（Fig. 3）

肝の糖代謝酵素活性は，解糖系酵素の HK, PK と，糖新生系酵素の Glu-6-Pase, Fru-1, 6-DPase, PEPCK についてそれぞれ検討を加えた．HK 活性はC群（n＝12）の 18.25±5.35 nmole/min/mgprotein に対して，B群（n＝13）では 6.61±2.66 と著明な低下がみられたが，A群（n＝12）では 18.17±8.05とC群とほとんど変わりなかった．PK 活性は，C群の 69.0±24.5 nmole/min/mg protein に対して，B群では 19.62±14.57 とやはり明らかな低下がみられたがA群では 71.40±34.76 とこれもC群との間に全く差はみられなかった．

次に糖新生酵素である Glu-6-Pase 活性は，C群の 230.7±102.1 nmole/min/mgprotein，A群の 306.8±123.2，B群の 344.0±76.5 と段階的にその活性は増大し，C，B両群間で有意差がみられたが（$p<0.05$），A，C両群間では明らかな差はなかった．Fru-1, 6-DPase 活性は 3 群間で有意差はみられなかった．PEPCK 活性はC群の 4.28±1.08nmole/min/mgprotein と比

Table 3 Plasma levels of free fatty acid, triglyceride, total cholesterol, HDL-cholesterol, phospholipid and lipoperoxide

	Free Fatty Acid (mEq/*l*)	Triglyceride (mg/d*l*)	Total Cholesterol (mg/d*l*)
Group A	1.17±0.06	690±28.8	206±11.1
Group B	1.22±0.06 *	735±41.6 *	184±16.4
Group C	0.71±0.02 *	358±16.3 *	161± 2.5
	HDL-Cholesterol (mg/d*l*)	**Phospholipid (mg/d*l*)**	**Lipoperoxide# (nmole/m*l*)**
Group A	66± 4.2	417±16.5	6.9±1.00 **
Group B	62± 3.8	425±20.8 **	22.4±1.84 **
Group C	57± 6.0	275± 7.3 **	5.0±0.33 **

Group A(n=12) : Monosodium glutamate injected and FOY-305 started at the period of lactation
Group B(n=13) : Monosodium glutamate injected
Group C(n=12) : Saline injected
The value represents Mean±S.E. * $p<0.05$, ** $p<0.01$
: Group A(n=4), Group B(n=3), Group C(n=3)

べてB群では 11.36±4.40と著明に増加していた．一方，A群では 5.80±2.95 と，これはC群とは有意差がなく，B群と比べると明らかに低値であった（$p<0.05$）．さらに肝グリコーゲン含量は，C群の 35.3±4.6 mg/g に対して，B群では 16.9±9.4 mg/g と明らかに低下していたが，A群では 36.9±12.2 mg/g とC群との間に有意差はなかった．

D．血漿脂質レベル (Table 3)

FFA はC群（n=12）の 0.71±0.02 mEq/1 に対して，B群（n=13）で 1.22±0.31，A群（n=12）で 1.17±0.06 と共に有意に高値であり，かつ A，B 両群間には差はなかった．TG も同様にC群の 358±16 mg/d*l* に比べてB群で 735±42 mg/d*l*，A群で 690±29 mg/d*l* と共に明らかな高値を示した．PL も FFA，TG と全く同様の傾向であり A，B 両群間に有意差はみられなかった．また TC，HDL-C に関しては A，B，C 3 群間で明らかな差はみられなかった．一方，LPO はC群（n=3）の 4.99±0.33 nmole/m*l* に対して，B群（n=3）では 22.4±1.84 と著明に増加したがA群（n=4）では 6.90±1.00 と，C群とは差がなく，かつB群に比べ有意に低値であった．

実験 II

血糖値は，C群（n=5）で6週目より43週目までの観察期間中，平均 90～116 mg/d*l* の間を推移しほぼ一定であった．B群（n=19）では6週目の血糖値がすでに 271±11.9 mg/d*l* と高値を示し，10週目で 407±61.8 mg/d*l* に達した．その後17週目以降ほぼプラトーとなり平均 527～551 mg/d*l* の間を推移した．43週目までの死亡率は 47.4% であった．一方，A群（n=21）は6週目の血糖が 185±25.5 mg/d*l* とC群の 96±1.7 mg/d*l* に比して明らかに高値（$p<0.01$）であるがB群と比べると低値であった．その後も血糖値は緩徐に上昇を続けるが，43週目までの各時点でB群に比べ有意な低値（$p<0.05$）を示した．すなわち10週目で 246±32.0 mg/d*l*，20週目以降ほぼプラトーとなり，その平均血糖値は 378～408 mg/d*l* の間を推移した．A群の観察期間中の死亡率は 4.8% であった．

次に体重の経時的推移では，6週目から14週目までは3群とも同様に増加し有意差はなかった．しかし15週目以降，B群の体重増加は極めてゆるやかとなり43週目で 30.5±0.96 g と，A群の 36.8±0.96 g，C群の37.1±1.75 g に比べ有意に低値であった（それぞれ $p<0.01$）．

実験 III

TI 投与前の血糖は A群（n=9）で 458±51 mg/d*l*，B群（n=9）で 421±50 mg/d*l* と両群間に有意差はなかった．A群は投与開始後1週目より低下傾向を示し，4週目の血糖は 418±13 mg/d*l* と B群の 466±15 mg/d*l* に比べて有意に低値を（$p<0.05$）示し，さらに23週目には A群の血糖は 407±42 mg/d*l* に低下，B群の 551±12 mg/d*l* との差は著明にひろがった（$p<0.01$）．一方，体重は観察期間中，両群間に有意差はみられなかった．

TI 投与前の GTT はA群の前値 233±42 mg/dl, 30分値 469±53 mg/dl, 120分値 421±50 mg/dl に対してB群ではそれぞれ 222±43 mg/dl, 397±38 mg/dl, 335±45 mg/dl と両群間でともに有意差はなかったが3点ともA群で高い傾向を示した. TI 投与後7週目の GTT は, A群で前値 322±32 mg/dl, 30分値 482±32 mg/dl, 120分値 388±15 mg/dl を示したのに対して, B群ではそれぞれ 366±36 mg/dl, 527±26 mg/dl, 451±16 mg/dl であり120分値においてA群で有意な低値 ($P<0.05$) を示した. さらに投与後25週目の GTT は, A群で前値 359±16 mg/dl, 30分値 454±26 mg/dl, 120分値 353±25 mg/dl であるのに対してB群ではそれぞれ 459±21 mg/dl, 524±13 mg/dl, 463±13 mg/dl と3点ともB群に比してA群で有意な低値を示した ($P<0.05$).

考 案

MSG は Olney[23] の報告以来, 乳仔マウスの脳視床下部弓状核を中心に神経細胞の壊死を惹起しその結果マウスを肥満に導くということで, 肥満モデル動物の作成に用いられてきたアミノ酸である. 一方, Komeda ら[1] は新生 CH に MSG を皮下投与することにより, CH にもマウスの脳の病理所見と同様の変化が起こることをみいだし, しかも成長過程で非肥満型の糖尿病動物が出現してくることを明らかにした. われわれの追試[8] でも非肥満型の糖尿病動物が作成できることを確認した. すなわち, 生後4週目頃より高血糖動物が散発しはじめ, 生後11週目にはほとんどの動物が高血糖を示すようになった. 29週目に屠殺した時点での生化学的成績でも著明な高血糖, 一部ケトン尿陽性, 血中・膵インスリン値の低下, 膵・胃グルカゴン値の上昇が認められ, また肝の糖新生系酵素の活性増大ならびに解糖系酵素の活性低下, さらに血漿脂質レベルの上昇と未治療ヒト糖尿病の成績と非常に酷似しており MSG それ自体の糖尿病発症機構についての詳細はまだ不明の点が多いが, 臨床的にはインスリン欠乏型の糖尿病に進行してゆくモデル動物とみなすことができるであろう.

今回の検討で, CH における MSG 誘発糖尿病の発症は早期から FOY 305 を経口投与すると著しく抑制され, しかも発症した糖尿病も非投与群に比べて軽度であることが明らかにされた. また4週目および11週目からの高血糖動物への投与でも, その後の血糖上昇が抑制され非投与群と比べて有意な低値を示した. これらの事実は, この種の糖尿病モデル動物においては, 合成 TI の経口投与は糖尿病発症に予防的効果を有すると同時に, ある程度の治療効果を持つことが明らかになった.

このような実験糖尿病に対する TI の効果に関しては, Ihse, Lundquist ら[7)24)] は, alloxan 糖尿病ラットに TI を経口投与した場合, 糖尿病状態が改善されたことを報告し, その機序のひとつとして膵内インスリン含有量の増加することを推測している. 今回の実験結果の機序についての詳細は明らかではないが, TI 投与群では非投与群と比較すると, 血漿インスリン値および膵インスリン含量が有意に高値を示し, また HK, PK, Glu-6-Pase, PEPCK 活性および肝グリコーゲン含量がそれぞれ正常範囲内に維持されていることが判明した. このことは FOY 305 の膵に対する効果が MSG 効果に拮抗して膵内インスリン含量およびインスリン分泌を保持するように作用し, その結果肝の糖代謝酵素活性を正常に維持したと考えられる.

一方, 天然あるいは合成 TI の経口投与が膵に対して栄養効果を有することが知られている. すなわち p-aminobenzamidine や trasylol などをラットに経口投与すると膵の肥大をみたという報告[2)-4)] であるが, CH の膵に対する TI の効果については報告がない. 今回の検討では FOY 305 を経口投与すると CH 膵は確実に肥大する. すなわち29週目での膵重量は, 非投与群の平均 148 mg に対して投与群では平均 207mg と約40%の増加が認められた. また別の実験系で非糖尿病成人 CH に8週間 FOY 305 を経口投与した場合の膵重量も非投与群 ($n=9$) の平均 156 mg に対して投与群 ($n=9$) で平均 263 mg と約68% の増加を示している. このように糖尿病, 非糖尿病状態にかかわらず FOY 305 の経口投与により CH 膵の重量が増加することが明らかになった. この作用機序として, 他の TI の場合と同様に上部小腸粘膜内の CCK-PZ の遊離効果を介する機構[25)-29)] が推測されている. すなわち, 腸管腔内の protease の存在は CCK-PZ 産生細胞からの CCK-PZ の放出に対して feed back inhibition の役目をはたしており protease と TI との結合はこののうな inhibition を除去するものと推測される.

さらに興味のある現象は, 膵内グルカゴン含量は正常対照群と変わりなく, かつ血漿グルカゴン値および胃グルカゴン含量が正常対照群と比較しても有意に低値を示したことである. この成績はインスリンがある程度以上保持されているという結果の2次的な現象とも考えられるが FOY 305 の経口投与が, 膵グルカゴンの分泌抑制や胃グルカゴンの合成抑制に関与してい

る可能性を示唆するものであり，この血漿グルカゴン値の抑制が，糖尿病状態の改善にひとつの役割を果している可能性も考えられる．この成績をさらに支持するものとして，われわれは streptozotocin (STZ) 誘発糖尿病ラットに8週間 FOY 305 を経口投与した実験[30]で，膵内インスリン含量ならびに血漿インスリン値が著明に低下した状態でも FOY 305 投与群では膵内グルカゴン含量および血漿グルカゴン値の上昇が抑制され正常ラットと有意差がないという結果を得ている．これらの事実からも FOY 305 の経口投与は，直接膵A細胞に影響を及ぼしている可能性が強いと思われる．いずれにしても，この肥大膵にはインスリンがかなりの量保持されており，合成 TI の経口投与が膵に対する栄養効果を介してB細胞の変性を抑えたりあるいは再生を促進している可能性が強い．

一方，血漿脂質に対しては FOY 305 経口投与群と非投与群で有意差は認められず高脂血症の改善には無効であった．この点に関しては，STZ 誘発糖尿病ラットに8週間 FOY 805 を経口投与した場合に高脂血症が著明に改善した実験成績[30]とは全く異なる結果となった．これら2つの実験結果の差の詳細は不明であるが，種差による違いも考えられるが，化学的膵摘といわれる STZ 誘発糖尿病と，視床下部にも病変を併せ持つ MSG 誘発糖尿病とでは，脂質代謝異常の機序も異なることが推測される．

本論文の要旨は第24回日本糖尿病学会総会および第56回日本内分泌学会総会において発表した．

新生チャイニーズハムスターを提供された旭川医科大学生物学教室美甘和哉教授，舟木賢二博士と FOY-305 含有飼料を提供された小野薬品工業株式会社に対して深謝の意を表します．

なお，本研究の一部は文部省科学研究費 No. 56570794 によった．

文　献

1) Komeda, K., Yokote, M., Oki, Y.: Diabetic syndrome in the Chinese hamster induced with monosodium glutamate. Experientia 36: 232-234 (1980)
2) Booth, A.N., Robbins, D.J., Ribelin, W.E., DeEds, F., Smith, A.K., Rackis, J.J.: Prolonged pancreatic hypertrophy and reversibility in rats fed raw soybean meal. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 116: 1067-1069 (1964)
3) Geratz, J.D., Hurt, J.P.: Regulation of pancreatic enzyme levels trypsin inhibitors. Amer. J. Physiol. 219: 705-711 (1970)
4) Arnesjö, B., Ihse, I., Lundquist, I., Qvisit, I.: Effect on exocrine and endocrine rat pancreatic function of bovine lung trypsin inhibitor administered perorally. Scand. J. Gastroent. 8: 545-554 (1973)
5) Ihse, I., Arnesjö, B., Lundquist, I.: Studies on the reversibility of oral trypsin inhibitor induced changes of rat pancreatic exocrine enzyme activity and insulin secretory capacity. Scand. J. Gastroent. 10: 321-326 (1975)
6) Ihse, I., Arnesjö, B., Lundquist, I.: Effect on exocrine and endocrine rat pancreas of long-term administration of CCK-PZ (cholecystokinin-pancreozymin) or synthetic octapeptide-CCK-PZ. Scand. J. Gastroent. 11: 529-535 (1976)
7) Ihse, I., Lundquist, I., Arnesjö, B.: Oral trypsin inhibitor-induced improvement of the exocrine and endocrine pancreatic functions in alloxan diabetic rats. Scand. J. Gastroent. 11: 363-368 (1976)
8) 酒井芳紀，渡辺　清，建部高明，石井兼央：新生 Chinese hamster における Monosodium glutamate 誘発高血糖症に対する合成 Trypsin inhibitor の効果．糖尿病 24(1): 77-79 (1981)
9) Taruma, Y., Hirado, M., Okumura, K., Minata, Y., Fujii, S.: Synthetic inhibitors of trypsin, plasmin, kallikrein, thrombin, C_1, and C_1 esterase. Biochem. Biophys. Acta 484: 417-422 (1977)
10) Yagi, K.: A simple fluometric assay for lipoperoxide in the plasma. Biochem. Med. 15: 212-216 (1976)
11) Kenny, A.J.: Extractable glucagon of the human pancreas. J. Clin. Endocr. 15: 1089-1104 (1955)
12) 浅野　喬，佐々木　悠，西田香苗，奥村　恂，結城美代子：Plain charcoal 法による血中インスリン測定法—Dextran coated charcoal と plain charcoal のインスリン吸着の比較について．糖尿病 18(5): 468-476 (1975)
13) Faloona, G.R., Unger, R.H.: Glucagon. In: B.M. Jaffe, H.R. Behrman (eds.): Methods of Hormone Radioimmunoassay. pp. 317-330. New York: Academic Press (1974)
14) Chang, A.Y., Nobe, R.E., Wyse, B.M.: Comparison of highly inbred diabetic and nondiabetic line in the Upjohn colony of Chinese hamsters. Diabetes 26: 1063-1071

(1977)

15) Nordlie, R.C., Arion, W.J.: In: W.A. Wood (eds.): Methods in Enzymology, pp. 619-625, New York, Academic Press (1966)

16) Fiske, C.H., Subbarow, Y.: The calorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem., 66: 375-400 (1925)

17) Ballard, F.J., Hanson, R.W.: Phosphoenolpyruvate carboxykinase and pyruvate carboxylase in developing rat liver. Biochem. J. 104: 866-871 (1967)

18) Joshi, M.D., Jagannathan, V.: In: W.A. Wood, (eds.): Methods in Enzymology, pp. 371-375, New York, : Academic Press (1966)

19) Traniello, S., Melloni, E., Pontremoli, S., Sia, C.L., Horecker B.L.: Rabbit liver fructose-1, 6-diphosphatase. Properties of thenative enzyme and thier modification by subtilisin. Arch. Biochem. Biophys. 149: 222-231 (1972)

20) Bücher, T., Pfleiderer, G.: In: S.P. Colowick, N.O. Kaplan (eds.): Methods in Enzymology. pp. 435-440, New York: Academic press (1955)

21) Seiffer, S., Dayton, S., Novic, B., Muntwyler, E.: The estimation glycogen with the Anthron Reagent. Arch. Biochem. Biophys. 25: 191-200 (1950)

22) Layne, E.: In S.P. Colowick, N.O. Kaplan (eds.): Methods in Enzymology pp. 447-450, New York: Academic Press (1957)

23) Olney, J.W.: Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. Science 164: 719 (1969)

24) Lundquist, I., Ihse, I., Arnesjö, B.: Carbohydrate metabolism in normal and diabetic rats folloing long-term trypsin inhibitor administration. Scand. J. Gastroent. 11: 369-375 (1976)

25) Ihse, I., Lundquist, I.: Glucose-induced insulin secretion and pattern of exocrine pancreatic enzymes in the rat following oral and parenteral trypsin inhibitor administration. Scand. J. Gastroent. 9: 719-724 (1974)

26) Melmed, R.N., Bouchier A.D.: Further phisiological role for naturally occuring trypsin inhibitors: the evidence for trophic stimulant of the pancreatic acinar cell. Gut 10: 973-979 (1969)

27) Ihse, I.: Abolishment of oral trypsin inhibitor stimulation of the rat exocrine pancreas after duodenojejunal resection. Scand. J. Gastroent. 11: 11-15 (1976)

28) Khayambashi, H., Lyman, R.L.: Secretion of rat pancreas perfused with plasma from rats fed soybean trypsin inhibitor. Amer. J. Phisiol. 217: 646-651 (1969)

29) Mainz, D.L., Black, O., Webster, P.D.: Hormonal control of pancreatic growth, J. Clin. Invest. 52: 2300-2304 (1973)

30) 衛藤雅昭，渡辺 清，加賀谷寿孝，酒井芳紀，吉田征子，大山公三，二木 源，斎藤達也，建部高明，石井兼央：正常および Streptozotocin 糖尿病ラットの膵内分泌および糖，脂質代謝における合成 Protease Inhibitor (FOY 305) の影響．日内分泌誌 60(5): 684-695 (1984)

Abstract

The Therapeutic Effect of Synthetic Trypsin Inhibitor on Monosodium-glutamate-induced Diabetes Mellitus in Newborn Chinese Hamsters

Yoshiki Sakai, Kiyoshi Watanabe, Takaaki Takebe and Kaneo Ishii

Second Department of Medicine, Asahikawa Medical College, Asahikawa, Japan

The mechanism of the therapeutic action of synthetic trypsin inhibitor (STI) on monosodium-glutamate (MSG)-induced diabetes mellitus in newborn Chinese hamsters was investigated from the aspects of the trophic effect on the pancreas, pancreatic endocrine function, activity of hepatic enzymes in the carbohydrate metabolism and plasma lipid levels. Futhermore, it was studied whether the difference of the starting period of the ST1 treatment would affect the incidence and severity of diabetes mellitus or not. [N. N-dimethylcarbamoylmethyl 4-(4-guanidinobenzoyloxy)-phenylacetate] methansulfonate (FOY-305) was used as STI and was administered by the oral route. The results are as follows. 1. MSG-induced diabetic hamsters not treated with STI developed to insulin-deficient diabetes mellitus. 2. Diabetes mellitus was ameliorated with all three different initial periods of STI treatment, i.e., during the lactation period and at the 4th and 11th weeks after birth, respectively. Namely, it was clarified that STI had preventive and therapeutic effects on MSG-induced diabetes mellitus in Chinese hamsters. 3. The following data were obtaned from the results using sacrificed hamsters at the 29th week after birth in the group in which the ST1 treatment was begun during the lactation period. (a) A good amount of plasma and pancreatic insulin was preserved, and activities of hexokinase, pyruvate kinase, glucose-6-phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase were kept within normal range by STI treatment. (b) Elevation of pancreatic glucagon content was suppressed, and the plasma glucagon level and stomach glucagon content were significantly lowered as compared with the normal control group. These results were thought as secondary phenomena produced by insulin, but it was also indicated that STI acted directly on A cells of the pancreas and stomach thus suppressing secretion and biosynthesis of glucagon. (c) Plasma levels of free fatty acid, triglyceride, total cholesterol, HDL-cholesterol, and phospholipid were not improved by STI. But blood lipoperoxide was significantly improved by STI. (d) The pancreata of Chinese hamsters, whether diabetic or non-diabetic were hypertrophied by STI. It was surmised that the effect of released CCK-PZ from the duodenum by STI led to this phenomenon, but in this mechanism, the possibility that it suppresses degeneration and promotes regeneration of B-cell might be also included.

J. Japan Diab. Soc. 27(10): 1083～1093, 1984