

〔特別掲載〕

(東女医大誌第29巻第12号)
(頁1125—1130昭和34年12月)正常及び糖尿病ラットについての
亜鉛代謝に関する研究

第 3 報

正常及びアロキサンラットにおけるインシュリン-Zn⁶⁵
の攝取量の測定

東京女子医大中山内科学教室 (主任 中山光重教授)

松 本 善 也
マツ モト ヨシ ナリ

(受付 昭和 34 年 11 月 2 日)

I 緒 言

正常及びアロキサン糖尿病ラットにおける亜鉛含有量の測定成績を第1報¹⁾で、放射性亜鉛Zn⁶⁵の摂取量の測定成績を第2報²⁾で報告し、夫々について考按してきたが、第3報では、結晶インシュリン中のZnを、放射性亜鉛Zn⁶⁵におきかえ、このZn⁶⁵インシュリンを、正常及びアロキサンラットに注射して、Zn⁶⁵の動向を研究したので第3報とし、併せて全報を通じての考察を行った。

II Zn⁶⁵結合インシュリンの製法^{3) 4)}

結晶インシュリンは1mg中に亜鉛を6.7%含む、この亜鉛を、Zn⁶⁵に変えるために、まず亜鉛の除去の為、結晶インシュリン100mgを、塩酸性水(pH 2.0~2.5)40ccに溶解し、この溶液に30ccの10%トリクロール醋酸(CCl₃COOH)を加えて、インシュリンを沈澱させる。しばらく放置し、インシュリンが完全に沈澱した後、遠心分離し、遊離の亜鉛を含む上澄をすてる。猶、亜鉛の除去を充分にするために、更に5%トリクロール醋酸に、インシュリンの沈澱を懸濁させ、遠心分離し、上澄液を除去する。この沈澱を100ccの蒸溜水に溶解し、1規定の苛性ソーダを滴下し、等電点(pH 3.3~3.4)として、インシュリンを再

び沈澱させる、沈澱を完全にするため、しばらく冷蔵庫中に放置し、遠心分離し沈澱を集める。沈澱は再び塩酸性水に溶解し、等電点沈澱を繰返す、かくして殆んど亜鉛を含まないインシュリンを50ccの稀醋酸水(氷醋酸5.25ccを300ccの水にとかす)に溶解し濾過する。澄明な濾液に、Zn⁶⁵溶液(Zn⁶⁵1mcを、アンモニア醋酸緩衝液(氷醋酸5.25ccを300ccの水に溶解しアンモニア水を加えてpH 5.9としたもの)に0.1mc/ccの割合に稀釈したもの)9.9ccをよく攪拌しつつ静かに添加する、かくZn⁶⁵を加えた後、稀アンモニア水(濃アンモニア6.05ccを300ccの水に稀釈)を約50cc攪拌しつつ加え、pH 6.7~7.0にする、この時の液は澄明である、次いで氷醋酸をよく攪拌しながら注意深く徐々に滴下し、pH 5.9~6.0とする。このpHにおいて、インシュリンは20~30分の間に結晶となつて析出する。遠心分離し、過剰のZn⁶⁵を除去するため、2~3回少量の蒸溜水で洗滌する。かくして得たZn⁶⁵結合インシュリン結晶を、デシケータ中で減圧乾燥する。本製法に由つて作られた結晶Zn⁶⁵インシュリンの血糖降下作用は、第1表第1図の通りで、収量約80~90%、生物活性22~24u/mg、比放射能はGeiger Mueller計数器で5208cpm/uであつた。

Yoshinari MATSUMOTO (Nakayama Clinic, Department of Internal Medicine, Tokyo Women's Medical College): Studies on the zinc metabolism in normal and alloxan diabetic rats. III Distribution of insulin-Zn⁶⁵ in normal and alloxan diabetic rats.

第1表 結晶亜鉛インシュリン及び Zn^{65} -インシュリン結晶の血糖降下作用 (使用動物はウサギ)

結晶亜鉛インシュリンの血糖降下作用							
動物 番号	重量 (kg)	注射量 (u/kg)	血 糖 (mg/dl)				
			0	1.5	3.0	5.0	(Hour) 7.0
1	2.85	0.6	108	56	60	78	103
2	2.64	γ	104	49	58	80	97
3	2.70	γ	110	51	57	74	104
4	2.45	γ	101	47	49	69	99
5	2.30	γ	106	44	50	72	108
6	2.05	γ	105	50	59	89	98
血糖降下率(%)			100	46.8	52.5	72.8	96.0
Zn ⁶⁵ -インシュリン結晶の血糖降下作用							
動物 番号	重量 (kg)	注射量 (u/kg)	血 糖 (mg/dl)				
			0	1.5	3.0	5.0	(Hour) 7.0
1	2.70	0.6	103	48	51	69	99
2	2.50	γ	106	53	54	70	93
3	2.45	γ	111	50	58	84	104
4	2.45	γ	98	46	49	68	89
5	2.30	γ	101	44	50	72	84
6	2.20	γ	104	52	56	87	96
			(100)	(47.0)	(51.0)	(72.2)	(90.6)
7	2.75	0.6	102	54	60	75	89
8	2.55	γ	95	49	56	79	96
9	2.50	γ	104	58	64	88	98
10	2.40	γ	110	46	48	75	102
11	2.30	γ	103	48	53	80	101
12	2.25	γ	102	51	62	87	99
血糖降下率(%)			(100)	(49.6)	(55.6)	(78.5)	(94.9)

(注) 注射量は日本薬同法, 第2改正国民医薬品集及び国家検定規準の持続性製剤の持続時間を検する項に準じて 0.6 u/kg 使用したものである。

III 実験方法

使用動物は, Wistar King A 系の雄ラットで, アロキサン糖尿病ラットは, 前報と同様の方法で糖尿病を発病せしめた, Zn^{65} 結合インシュリン結晶は, pH 5.2の稀塩酸で溶解して実験に供した。 Zn^{65} インシュリン46単位を, 健康及びアロキサン糖尿病ラット各5匹に, 皮下注射し, 前報同様の操作の後, 各臓器の放射能を, Geiger Mueller 及び Scintillation Counter で測定した。

IV 実験結果

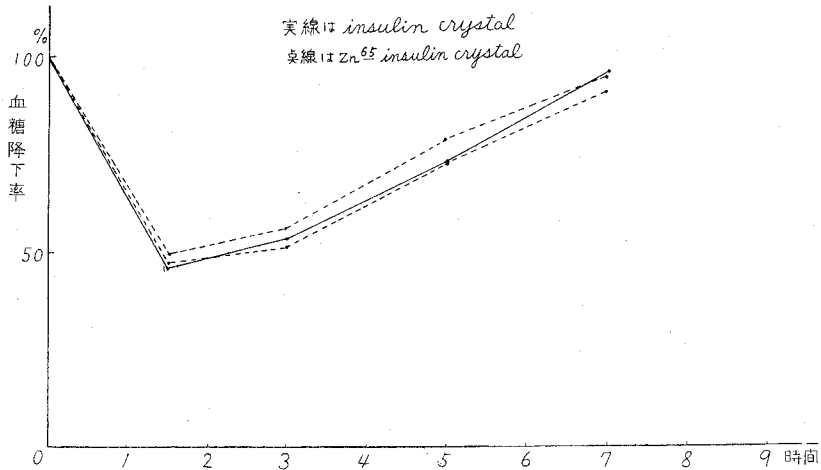
Zn^{65} インシュリン皮下注射後, 1時間における各臓器の放射能を測定し, 投与した Zn^{65} インシ

ュリンの全カウント数を 100 として, 各臓器の 1g あたりの Zn^{65} の摂取率を求めると, 第2表及び第3表の如くで, この値は, 測定計数器の如何を問わず, ほぼ一定であつた。正常ラットのグラムあたりの摂取率は, 脳下垂体, 副腎, 腎, 甲状腺, 肝, 脾, 腸, 脾, 前立腺, 肺, 耳下腺, 顎下舌下腺, 血液, 胸腺, 心, 精囊, 副睾丸, 睾丸, 筋肉, 脳の順に少くなり, アロキサンラットの場合は, Zn^{65} のグラムあたりの摂取率は, 脳下垂体, 甲状腺, 腎, 副腎, 肝, 脾, 腸, 脾, 前立腺耳下腺, 肺, 顎下舌下腺, 心, 胸腺, 血液, 副睾丸, 精囊, 睾丸, 筋肉, 脳の順となる。又健康及びアロキサンラットについて, Zn^{65} の摂取率を比較してみると, 第2図に示すように, アロキサンラットの方が, 正常ラットよりも, 脳下垂体, 副腎, 腎, 甲状腺, 肝, 脾, 腸, 脾などに於て, 目立つて多い。

V 考按及び総括

生体内におけるインシュリンの消長及び各臓器への分布を調べる事は, 極めて意義の深いものと信じられる。然しながら, 生体中に存在するインシュリンは微量であるので, その正確な且容易な定量手段は今日迄に未だ与えられていない。放射性同位元素にて標識されたインシュリンを投与し, その放射能を指標として追跡する事は, 上述の研究の一助となり得るものであろう。

既に述べた如く, インシュリン分子中に, 亜鉛の存在が報告されているが, この両者の結合は化学量論的であり, かなりの酸性域以外では充分強固なものであると言われる⁵⁾。又亜鉛と結合した結晶インシュリンは, その作用時間が長く, 所謂持続性インシュリンとして広く臨床的に用いられているが, この事は, 亜鉛とインシュリンの結合が生体内においても, かなり強固である事を示すものと思われる。従つて本報にて行つた Zn^{65} インシュリン投与時における Zn^{65} の分布は, インシュリン自体の動向に対しても何等かの指示を与え得るものであろう。内外の文献において, 本報の如く Zn^{65} インシュリン結晶を用いた報告を見出す事は得なかつたが, 放射性ヨード I^{131} を用いて標識した I^{131} インシュリンについては吉岡⁶⁾の実験がある。氏は正常及びアロキサン糖尿病ラットに I^{131} インシュリンを静脈内注射によつて与えた後, 各臓器中の I^{131} 量を, 全投与量



第1図 血糖降下曲線

第2表 健康ラットの Insulin-Zn⁶⁵ 摂取率
 (各臓器のグラム当りの摂取率, 単位%)

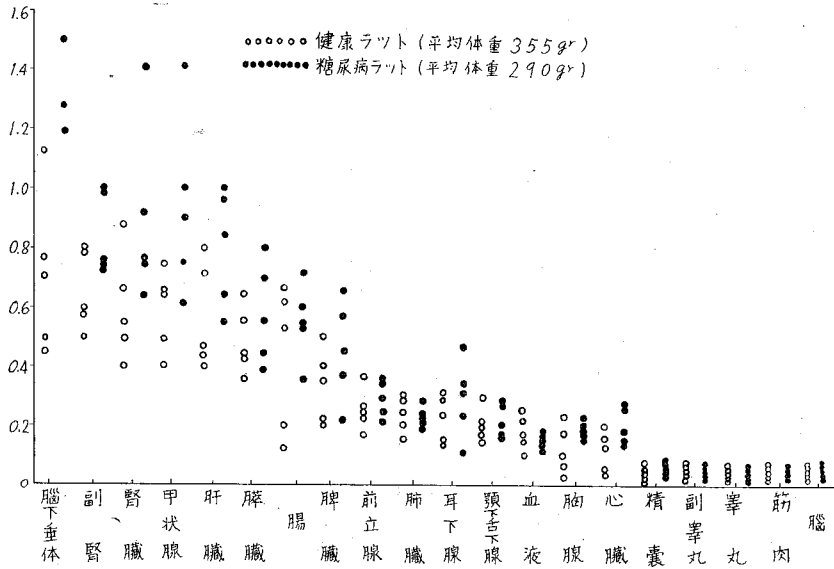
	第1例	第2例	第3例	第4例	第5例	平均値
脳下垂体	0.49	0.76	1.12	0.70	0.45	0.88
副腎	0.79	0.80	0.60	0.50	0.58	0.65
腎臓	0.67	0.88	0.55	0.40	0.49	0.60
甲状腺	0.64	0.65	0.74	0.40	0.49	0.58
肝臓	0.70	0.47	0.80	0.40	0.44	0.56
脾臓	0.64	0.42	0.55	0.36	0.42	0.48
腸	0.61	0.52	0.67	0.20	0.12	0.42
脾臓	0.34	0.40	0.50	0.21	0.20	0.33
前立腺	0.26	0.23	0.17	0.36	0.25	0.25
肺臓	0.15	0.29	0.20	0.30	0.24	0.24
耳下腺	0.31	0.15	0.23	0.28	0.13	0.22
顎下舌下腺	0.29	0.20	0.15	0.20	0.18	0.20
血液	0.17	0.21	0.25	0.13	0.10	0.17
胸腺	0.07	0.22	0.18	0.10	0.02	0.12
心臓	0.12	0.15	0.20	0.06	0.04	0.11
精嚢	0.03	0.04	0.06	0.04	0.01	0.03
副睪丸	0.03	0.02	0.04	0.02	0.01	0.02
睪丸	0.02	0.01	0.03	0.02	0.01	0.02
筋肉	0.02	0.03	0.02	0.01	0.01	0.02
脳	0.01	0.03	0.01	0.01	0.02	0.01

第3表 アロキサンラットの Insulin-Zn⁶⁵ 摂取率
 (各臓器のグラム当りの摂取率; 単位%)

	第1例	第2例	第3例	第4例	第5例	平均値
脳下垂体	1.28	1.19	1.85	1.87	1.50	1.54
甲状腺	1.60	1.41	1.00	0.70	0.61	1.06
腎臓	0.63	0.74	0.74	1.40	0.91	0.88
副腎	1.00	0.76	0.74	0.75	1.00	0.85
肝臓	0.64	0.54	0.96	1.00	0.84	0.79
脾臓	0.44	0.54	0.39	0.70	0.80	0.57
腸	0.60	0.71	0.53	0.35	0.54	0.55
脾臓	0.66	0.21	0.44	0.57	0.38	0.45
前立腺	0.25	0.29	0.34	0.21	0.36	0.29
耳下腺	0.34	0.47	0.24	0.31	0.11	0.29
肺臓	0.24	0.28	0.23	0.23	0.23	0.24
顎下舌下腺	0.28	0.17	0.20	0.27	0.17	0.22
心臓	0.26	0.14	0.14	0.27	0.18	0.20
胸腺	0.22	0.20	0.19	0.18	0.19	0.19
血液	0.16	0.15	0.14	0.18	0.13	0.15
副睪丸	0.04	0.04	0.06	0.06	0.02	0.04
精嚢	0.04	0.05	0.03	0.03	0.05	0.04
睪丸	0.02	0.02	0.02	0.04	0.02	0.02
筋肉	0.02	0.01	0.02	0.02	0.01	0.02
脳	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02

の百分率として示した。(第4表及び第5表)これに由ると、正常及びアロキサンラット共に、腎、肝、消化管に最も多く I¹³¹ は存在し、肺、脾、はこれに次ぐ、正常ラットとアロキサンラットを比較した場合、腎を除いては、殆んどどの臓器において、アロキサンラットの方がより大量の Zn⁶⁵ を摂取する事を示している。甲状腺、副腎に於ては、有意の計数を得る事が出来なかつたと述べておられるが、インシュリンの如く、生物学的活性

の甚だ大なる物質の投与は自ら投与量の制限が厳しくなり、従つて極めて比放射能の高い標識物質を用いなければ、小なる臓器中の微量の物質を検出する事は難かしい。本実験においても、インシュリンに結合させる Zn⁶⁵ は比放射能の高いものを使用した。著者の Zn⁶⁵ インシュリンを用いた実験においても、臓器全量についての Zn⁶⁵ 摂取量は、肝、腎、腸において最も多く、肺、脾、脾、心がこれに次ぐ、副腎、甲状腺は、グラムあた



第 2 図 Rat 臓器インシュリン-Zn⁶⁵ 摂取率

第4表 Normal control Uptake %

Rat No.	64	32	94
blood			
liver	2.04	4.46	4.63
kidney	0.75	9.94	32.0
spleen	0.22	0.25	0.51
lung	1.05	0.61	0.85
pancreas	0.38	0.25	0.58
stomach	5.68		2.02
small intestine	7.15	4.30	4.46
large intestine	1.31		1.09
heart	0.21		0.27
diaphragm			0.08
muscle			
uterus		0.14	0.15
ovary			0.12
adrenal			
thyroid	4.06	0.12	0.31
brain		0.13	
fat			
summation	22.85	20.20	64.99

第5表 Alloxan diabetes Uptake %

Rat No.	53	87	30	29
blood				
liver	16.30	5.51	4.34	7.92
kidney	18.60	14.10	7.50	5.30
spleen	0.25	0.66	0.09	0.70
lung	1.50	1.29	0.78	1.15
pancreas	0.85	0.36	0.62	0.43
stomach		1.79(0.95)		
small intestine	3.94	3.75(1.24)	4.83	4.15
large intestine		1.09		
heart	0.29	0.28	0.07	0.38
diaphragm	0.74	0.19	0.10	
muscle				
uterus	0.09	0.43	0.55	0.95
ovary				
adrenal				
thyroid		0.17	0.09	
brain		0.16	0.08	
fat				
summation	41.91	29.78	19.05	20.98

りの放射能はかなり大きい為、臓器が小さい為、臓器全量での値は決して大きなものではない。正常とアロキサン糖尿病の各ラットを比較すれば、殆んど全ての臓器において、放射能の摂取量が、アロキサンラットの方が大であった。

Himwich⁷⁾は脳の代謝にはインシュリンを必要としないと述べ、小坂ら⁸⁾は、I¹³¹インシュリンを用いて脳の I¹³¹ 摂取の小さい事を示した。

本実験でも、正常及びアロキサンラット共に脳の Zn⁶⁵ 摂取は小さかった。Elgee and Williams^{9) 10) 11)}は、ラットに I¹³¹インシュリンを静注して、インシュリン代謝を調べた結果、脳下垂体及び甲状腺剔除後のラットではインシュリンの分解低下を招くが、副腎剔除後のラットでは、インシュリン代謝に著変を認めなかつたと述べ、これは脳下垂体剔除による二次的の甲状腺機能低下が原

因であるかもしれないし、或いは、脳下垂体別出によつて生じた腎血流量の減少が要因であるかもしれないと考察している。著者の実験において、これら、甲状腺、脳下垂体、副腎の如き内分泌臓器に Zn^{65} が、濃度高く分布した事は、やはりインシュリン代謝と、これら諸臓器の密接な関連を示すものではなからうか。

全三報を通じての実験について、正常及びアロキサン糖尿病ラットに対し、内分泌臓器を含む主要臓器中の亜鉛量、 $Zn^{65}Cl_2$ 及び Zn^{65} インシュリン投与後における Zn^{65} の摂取につき報告を行つてきた。これらを総括し考察すると、正常ラットの臓器亜鉛全量は、グラムあたりの量に於て、脳下垂体、副腎、甲状腺、腎、脾等に多く、臓器全量に於ては、臓器全量の大きい肝、腸、腎に亜鉛量が大きくなる。 $Zn^{65}Cl_2$ 投与後の Zn^{65} 分布も亦、グラムあたり摂取率では、副腎、脳下垂体、腎、甲状腺、が高値を示したが、脾、肝、腸、前立腺の値もかなり高く、従つて臓器全量での摂取量は、肝、腸、腎で特に大きい、臓器亜鉛全量と Zn^{65} 摂取率は必ずしも平行せず、脾、肝腎では亜鉛全量の割には、 Zn^{65} 摂取の大きい事が認められる。脾、肺、腸、顎下舌下腺も又、亜鉛全量の割に Zn^{65} 摂取が大きい、脳、筋肉、睪丸は小さい。 Zn^{65} インシュリン投与後における Zn^{65} 分布は、やはりグラムあたりでは、脳下垂体、副腎、甲状腺、腎、脾、肝、腸において大きく、臓器全量では、肝、腸、腎に高値が得られた。然し Zn^{65} の投与形態を変ずることによつて、その摂取量は同一でなく、 $Zn^{65}Cl_2$ と Zn^{65} インシュリンを比較した場合、耳下腺、筋肉、精囊を除いては、すべて Zn^{65} インシュリンの場合の摂取率が小さかつた、然も、夫々の場合の血中濃度は略等しい。アロキサンラットにおいても類似の結果を得たが、これを正常ラットと比較した場合、しばしば著しい変化のあるのを認めた、臓器亜鉛全量は、殆んどすべての場合、アロキサンラットに増加を認めた、寺内¹²⁾は、中等症以上の糖尿病患者は正常人に比し、血液中の亜鉛量の増加を報告しているが、本報では、アロキサンラットにおいて調べ得たすべての臓器において同様の亜鉛量増加を観察した。 $Zn^{65}Cl_2$ 投与後の Zn^{65} 分布では、逆にアロキサンラットは、正常ラットに比しすべて低い摂取率を示している。

然もこの場合、血中濃度は殆んど同一であつた。更に Zn^{65} インシュリン投与の場合の Zn^{65} 分布は、アロキサンラットの方がより高い摂取率を、殆んどすべての臓器で示している。この為、アロキサンラットにおいては、 $Zn^{65}Cl_2$ と Zn^{65} インシュリンを夫々投与した場合の、 Zn^{65} の摂取率の比は、正常ラットの場合とは逆に、多くの臓器において、 Zn^{65} インシュリン投与の場合の方がより大きな Zn^{65} 摂取を示した。

以上の如く、アロキサン糖尿病ラットは、亜鉛代謝の各面において、正常ラットと異つた様相を呈しているが、これは亜鉛代謝も又糖代謝に密接な関連を有していることを示すものであろう。又 $Zn^{65}Cl_2$ と Zn^{65} インシュリンの夫々を投与した後での Zn^{65} の摂取が異なつてゐるのは、 Zn^{65} インシュリン投与後、生体中での Zn^{65} の行動は、遊離亜鉛と全く同一ではない事を示すもので、従つてインシュリン自体の行動に対する指標となり得ることを示すものと考えられる。この両 Zn^{65} の行動の相違は、正常ラットとアロキサンラットでは、相反する結果となつて現れた、寺内¹²⁾の血液及び尿中亜鉛についての研究に依れば、糖尿病患者に対するインシュリン治療は、亜鉛量を正常に近づけるといふ、アロキサンラットに Zn^{65} インシュリン投与時の Zn^{65} 摂取率は、正常ラットに $Zn^{65}Cl_2$ 投与時の Zn^{65} の摂取率に類似の値を呈しているが、先にも述べたように、インシュリンと亜鉛とは、かなり強固に結合していると考えられ、又 Zn^{65} インシュリン投与時の Zn^{65} の動きは、インシュリンの行動を示すところが大きであると思われるので、この摂取率の類似に特に意義を求めるのは困難であらう、正常及びアロキサンラット共に $Zn^{65}Cl_2$ 投与時と、 Zn^{65} インシュリン投与時の Zn^{65} 分布の相違は、各臓器について区々であり決して一様ではなかつた。

IV 結 語

亜鉛含有量、 $Zn^{65}Cl_2$ 、 Zn^{65} インシュリンの摂取率を3報にわたり、ラットについて調べた結果、アロキサンラットは、正常ラットに比し、各臓器のグラムあたりの亜鉛含有量、 Zn^{65} インシュリンの摂取率は多く、 $Zn^{65}Cl_2$ の摂取率は少かつた。そして何れの実験においても、臓器のグラムあたりの高値は、脳下垂体、腎、副腎、甲状腺、肝、脾等が示し、脳、筋肉等は常に低値を示し

た。そしてこの結果について考察を行った。

終りに臨み常に御指導，御援助を賜った，中山光重教授，山田喜久馬助教授，生化学教室，松村養寛教授，松村剛講師に対し，謹んで謝意を表します，併せて，Zn⁶⁵ 結合インシュリン精製に御協力，御援助を賜った清水製薬社長始め，福屋氏，甲賀氏に対し深謝致します。

文 献

- 1) 松本善也；東女医大誌 29 777 (昭 34)
- 2) 松本善也；東女医大誌 29 781 (昭 34)
- 3) Romans, R.G., Scott, D. A. and Fisher, A. M. : Ind. Eng. Chem. 37 908 (1940)
- 4) Dodds and Dickens : Biochem, J. 19 27 (1925)
- 5) Gurd, F.R. N. and Wilcox, P.E. : Adv. in Protein Chem., 11 311 (1956)
- 6) 吉岡亮平；日内分泌会誌 35 344 (1939)
- 7) Hinwich, H. E. : Brain Metabolism and cerebral disorders. Williams and Wilkins Co. Baltimore (1951) P.88
- 8) 小坂樹徳・外；綜臨 6 104 (1957)
- 9) Elgee, N.J. and Williams, R.H. : Diabetes. 4 87 (1955)
- 10) Elgee, N.J. and Williams, R.H. : Am. J. Physiol. 180 9 (1955)
- 11) Elgee, N.J. and Williams, R.H. : Am. J. Physiol., 180 13 (1955)
- 12) 寺内ちせ；東女医大誌 29 17 (昭 34)