

エンドトキシン誘発播種性血管内凝固に対する糖尿病の影響

今村 友美*, 宮本 幸代*, 高橋 志乃**, 堀江 登*

* (武庫川女子大学生生活環境学部食物栄養学科)

** (武庫川女子大学大学院生活環境学研究科食物栄養学専攻)

Influence of diabetes for disseminated intravascular coagulation induced with endotoxin

Tomomi Imamura*, Sachiyo Miyamoto*, Shino Takahashi**, Noboru Horie*

* *Department of Food Science and Nutrition,
School of Human Environmental Sciences,*

** *Food Science and Nutrition Major,
Graduate School of Human Environmental Sciences,
Mukogawa Women's University, Nishinomiya, 663-8558, Japan*

This paper is a study concerning diabetes that have a tendency for blood coagulation whether it was a risk of sudden death. We made a diabetes model mouse by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ), and we caused disseminated intravascular coagulation (DIC) by doing an intra-tailvenous injection of endotoxin (ET) to the mouse.

After injection of STZ, a weight loss, decrease of intra-abdominal fat, polyphagy, polyposia are induced and they are the main symptoms of diabetes.

Furthermore, with an ET injection to the mouse, it showed increase of weight such as the lung and the liver and extension of PT time with the blood clot formation, and that it was it in a blood coagulation tendency was confirmed by these symptoms. Then, the mouse showed a decrease of plasminogen activator activity in the lung.

Therefore, fibrinolysis system was enhanced in the mouse, and it was suggested that a symptom of DIC turned worse under a state of diabetes.

緒言

現在、厚生労働省の糖尿病実態調査によると、日本で糖尿病が「強く疑われる人」は約740万人と発表されている。更に糖尿病予備軍にあたる「可能性が否定できない人」を含めると、その人数は成人の6.3人に1人となり、約1620万人にも上ると発表されている¹⁾。年々増加の一途をたどり、まさに国民病であると言える。糖尿病は、日本における死因の第10番目にあたるが、直接の死因にならなくとも、死因順位の上位を占める血管障害による、心疾

患・脳血管疾患に合併しやすいという点で国民の健康に及ぼす影響は大きい。

糖尿病は、グルコースの細胞への取り込みを促進することにより血糖を抑制する唯一のホルモンであるインスリンの絶対的または相対的不足によって起こる代謝性疾患で、主として糖質の代謝異常によって高血糖と尿糖を生じるが、糖質のほか脂肪、タンパク質、電解質の代謝異常も引き起こす。また、血栓化傾向にあることも報告²⁾されている。

血糖値は、食後の経過時間などにより変動するが、血糖は絶えず供給される一方で絶えず失われ、

血糖値はホルモンにより巧みに調節されている。血糖は腸管からの吸収、肝臓グリコーゲンの分解により供給されている一方、肝臓や筋肉のグリコーゲン、脂肪細胞などの合成素材として、また組織ではエネルギー源として利用されている。血糖値が上昇しすぎると、膵臓から分泌されるインスリンの作用で、血糖は肝臓、筋肉、脂肪組織の細胞中へ取り込まれ、グリコーゲンまたは脂肪に合成され貯蔵される。逆に、血糖値が下がると、グルカゴンやアドレナリンの作用により、肝臓グリコーゲンは分解してグルコースとなり、血中に放出されるため血糖値は維持されている。更に、血糖を維持するため糖新生により、糖以外の物質、乳酸、グリセロール、アミノ酸からもグルコースを合成して供給している³⁾。

播種性血管内凝固(DIC)とは全身の血液循環で血管内の血液凝固と線維素溶解系の亢進が同時に起こり、重篤な状態に陥ることをいい、悪性腫瘍、感染症、手術侵襲、熱傷、外傷、急性膵炎、胎盤剥離などで生じる。DICを発症すると血液凝固の活性化、血小板の凝集、フィブリン析出、赤血球の破壊を引き起こし、出血傾向になったり、虚血性臓器障害を引き起こし、突然死の原因であると考えられている⁴⁾。

エンドトキシン(ET)はグラム陰性菌の細胞壁成分であり、リポ多糖(大腸菌リポポリサッカライド)である。エンドトキシンは直接血管内皮細胞のインターロイキン(IL)やTNFの産生を亢進させたり、複合体を介して、単球-マクロファージを活性化し、白血球遊走因子や種々のサイトカイン(IL-1, TNF, IFN- γ , TGF- β)を放出させることが知られている。これらが血管内皮細胞や単球において、血液凝固促進物質といわれる組織因子(TF)の産生を誘導し、外因系の凝固反応を活性化すると考えられている⁵⁾。

我々はこれまでに、細胞におけるグルコースの取り込みを促進することにより血糖値を低下させる唯一のホルモンであるインスリンを分泌する膵臓のランゲルハンス島を破壊し、糖尿病を引き起こすstreptozotocinを用いて、実験的に糖尿病モデルマウスを作製し⁶⁾、このモデルマウスにおいて外因系血液凝固機序において変化が現れることを見出している。

本研究では、糖尿病モデルマウスにおいて感染や合併症が加わったときへの反応をみるため、このモデルにエンドトキシンを投与し、止血障害が全身に

広がる血管内血栓症であるDICを誘発させた。そして、糖尿病患者に対する感染や合併症の影響を検討することを目的として行った。

実験材料及び方法

1. 実験動物および飼育

本実験には、20匹の雄性10週齢Jcl-ICRマウス(日本クレア)を使用した。飼育には、環境制御飼育装置(日本クレア)を使用し、温度は22~24℃、湿度は45~55%に調節し、飼育棚内は清潔な環境を保った。明暗サイクルは12時間(明期8~20時)とした。ケージは125mm×200mm×110(h)mmを使用し、床敷きとして木材のカンナ屑(日本クレア)を約2cmの厚さに敷き、1ケージ1匹とし、給餌は固形試料MF(オリエンタル酵母工業株式会社)を使用し、給水は給水瓶により水道水を自由摂取させた。

マウス20匹のうち10匹にはstreptozotocin(STZ:和光純薬工業株式会社)を体重1g当たり0.06mgの量を12日間腹腔内に投与した。STZ投与開始16日後に、エーテル麻酔により安楽死後、採血及び臓器の摘出を行った。解剖前24時間は絶食とした。更に、解剖の1時間前にSTZ非投与群(対照群)およびSTZ投与群それぞれ10匹のうち5匹ずつにエンドトキシン(ET:Lipopolysaccharide W E. coli 0127: B8, 三光純薬株式会社)を投与した。摘出した臓器は、個々に重量を測定した後、使用直前まで冷凍保存した。

2. 生化学的検査

血中中性脂肪(TG)の測定にはトリグリセライドE-テストワコー(GPO・DAOS法⁷⁾、和光純薬工業株式会社)を使用した。血中尿素窒素(BUN)の測定⁸⁾には尿素窒素-テストワコー(和光純薬工業株式会社)を使用した。それぞれキットに付属の使用説明書に従って測定を行った。

3. プロトロンビン時間(PT)の測定⁹⁾

サンプルカップに血漿50 μ l及び0.9%生理食塩水50 μ lを入れ、37℃で3分間加温し、組織トロンプラスチン・カルシウム混液(DADE社)200 μ lを加えて凝固するまでの時間を血液凝固測定装置(Coagulometer KC-1A, Amelung)で測定した。

4. 肺における線維素溶解系の検査(平板法によるフィブリン分解活性の測定¹⁰⁾)

フィブリン平板は次のように作製した。フィブリンノーゲン(牛血漿, ナカライテスク)を0.6%になる

ように 0.18M ホウ酸緩衝液(pH7.75)に溶解し、恒温槽 37℃の中で一晚放置させ、残存した不溶物を濾過したものをフィブリノーゲン液として使用した。標準平板は Astrup と Müllerz の方法¹¹⁾に準拠して、0.6%フィブリノーゲン液 4.0ml と 0.2%塩化カルシウム液(ナカライテスク)を含む 10U/ml トロンビン液(持田製薬)2.1ml とを内径 9cm のシャーレ中に混和して作製した。プラスミノーゲンを含まないフィブリン平板は、0.6%フィブリノーゲンをリジン・セファローズ CL4B カラムに通すことによりプラスミノーゲンを除去したフィブリノーゲン液を用いて、標準平板と同様に作製した。

フィブリン分解酵素の抽出と酵素活性の測定は次のように行った。プラスチック製の遠心分離用遠心管(HITACHI Co.)に肺を入れ、適量の生理食塩水を加えてホモジナイズした後、4℃、10,000rpm で 10 分間遠心分離し、生理食塩水に可溶性成分を除去した。沈殿重量の 10 倍量の 2M 過塩素酸ナトリウム溶液(ナカライテスク)を加えてホモジナイズし、水中で 2 時間放置し抽出した。更に 4℃、10,000rpm で 20 分間遠心分離して得られた上清を、標準平板及びプラスミノーゲンを含まない平板上に 30 μ l ずつ滴下した。これらを 37℃、18 時間孵卵器中でインキュベートした後の溶解窓(長径×短径 mm²)を測定した。酵素活性はウロキナーゼ標準線を同時に作製し、ウロキナーゼ活性(IU/ml)に換算した。標準平板で測定した酵素活性からプラスミノーゲンを含まない平板で測定した酵素活性の値を差し引いた値をプラスミノーゲンアクチベーター(PA)活性とした。

5. 解析方法

データの解析は分散分析(Post-hoc テスト; Bonferroni/Dunn)を用いて行なった。

実験結果および考察

データには示していないが、STZ の投与濃度依存的(0.02~0.08mg/gWt)に血糖値が上昇することを確認した。血糖値の上昇は、糖の細胞への取り込みを促進することにより血糖値の上昇を抑制する唯一のホルモンであるインスリンの分泌不足または作用不足により生じる。本実験では血糖値の上昇が確認できた 0.06mg/gWt の STZ 濃度を継続的に投与し糖尿病モデルマウスを作製した。対照群に対して STZ 投与群では STZ の継続的投与により顕著な体

重減少を示した(Fig. 1)。

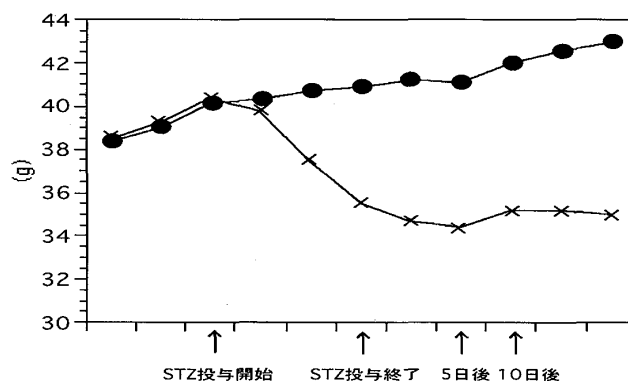


Fig. 1. Changes of the body weight of the mouse by STZ injection. ●; control, ×; STZ

一方、餌摂取量及び飲水量は STZ 投与群で顕著に増加した(Fig. 2-1, 2-2)。体重当りの脂肪重量は、副睪丸周囲の脂肪を内臓脂肪として摘出し、重量を測定した。STZ 投与群で対照群に対して著しく減少していた(Fig. 3-1)。TG についても STZ 投与群で低値を示した(Fig. 3-2)。糖尿病によるインスリン分泌低下が生じたことにより、血中の糖をエネルギーとして細胞内に取り込むことが困難となり、糖新生が行われたのではないかと考えた。STZ 投与群のマウスにおいて脂肪の貯蔵ができない上、エネルギーとして動員されたため、脂肪重量は減少し、体重減少につながったと推察した。

糖尿病の急性期における高血糖状態では、腎尿細管でのグルコースの再吸収の限界値を超えるので糖尿が生じる。尿中に糖が排泄されることにより、浸透圧利尿が生じ、多尿になる。また、尿中に多量の糖、すなわち多量のカロリーを含む栄養分が流出するため、絶えず空腹感が起こり多食をきたす。また、多尿は体液(細胞外液)量の減少を、高血糖は高浸透圧をもたらす、細胞内脱水が起こり、細胞内外の脱水によって、口渇、多飲という症状が現れる。また、インスリン作用の欠乏は脂肪だけでなく、筋肉とその他の組織でのタンパク質の分解を亢進させるため、体重減少(やせ)を引き起こす¹²⁾。

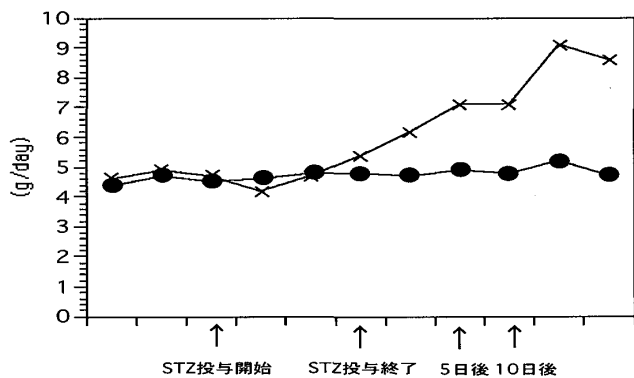


Fig. 2-1. Changes of food consumption of the control mouse and the STZ mouse. ●; control, ×; STZ

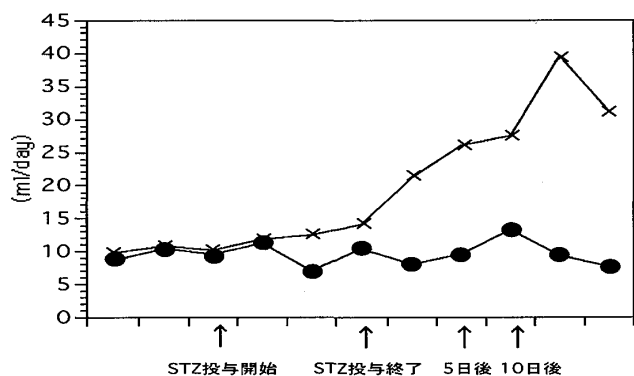


Fig. 2-2. Changes of amount of drinking of the control mouse and the STZ mouse. ●; control, ×; STZ

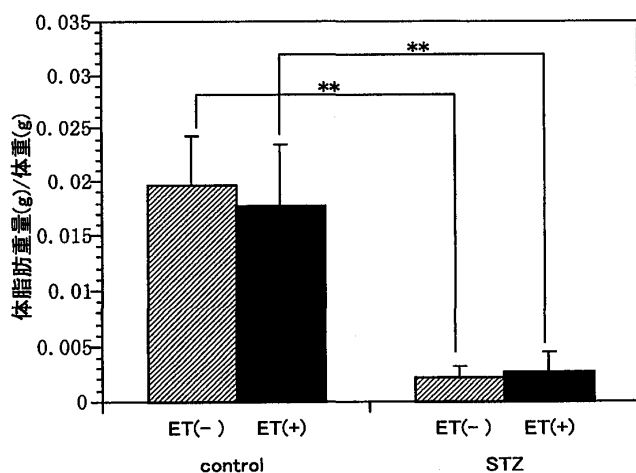


Fig. 3-1. The ratios of the intra-abdominal fat to body weight. Several bars are means \pm SD. **: $p < 0.01$, $n = 5$

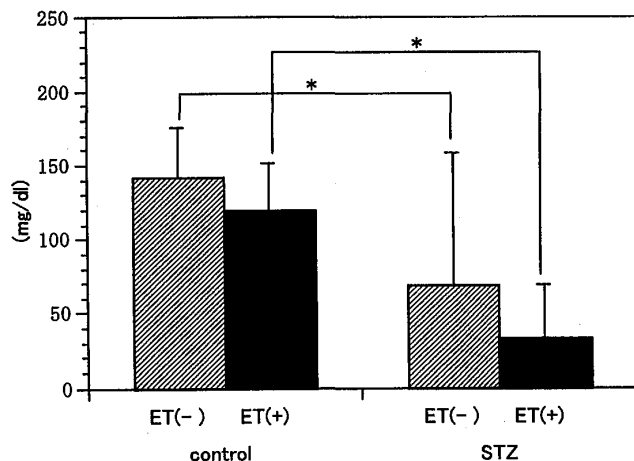


Fig. 3-2. Blood triglyceride levels of the control mouse and STZ mouse. Several bars means \pm SD. *: $p < 0.05$, $n = 5$

以上のことから総合的に判断して、STZ 投与マウスは、顕著な体重減少、多食、多飲、体脂肪及び血中中性脂肪の減少という糖尿病の主症状と一致した症状を示したことから、糖尿病を発症したと考えた。また、データには示していないが、腓腹筋における筋重量が STZ 投与群において低下していた。これは糖新生により筋肉がエネルギー源として動員されたためであると推察するが、エネルギー産生は、まず肝臓グリコーゲンを用いて行われ、次に体脂肪が利用され、筋肉が動員されるのは最終段階であるため、このモデルでは重度の糖尿病を発症していたと考えた。

本実験では、DIC を誘発するために、外因系血液凝固を亢進させる ET を投与した。STZ 投与糖尿病モデルマウスにおける ET の影響については、まず、ET 投与において対照群および STZ 投与群の両方で、体重あたりの肺重量が有意に増加した (Fig. 4-1)。更に、STZ 投与群は対照群と比較して高値を示した。肝臓においても ET 投与において体重あたりの肝臓重量が増加し、更に STZ 投与群では対照群と比較して高値を示した (Fig. 4-2)。これは、ET 投与により血液凝固が亢進し、毛細血管の発達している肺や肝臓において血栓が形成され、うっ血状態に陥ったものと考えた。STZ 投与群において肺、肝臓重量のどちらにおいても対照群と比較して高値を示していたことから、糖尿病発症状態下では、血栓化傾向になったと推察した。

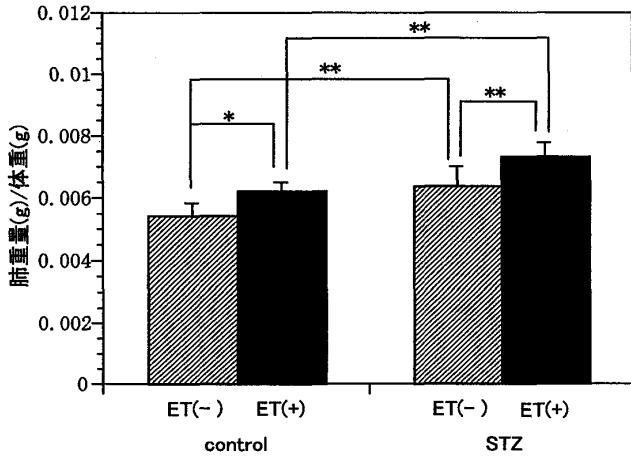


Fig. 4-1. The ratios of the lung to body weight of the control mouse and the STZ mouse, furthermore an ET injection or a non-injection into the mouse about each group. Several bars are means±SD. **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$, $n = 5$

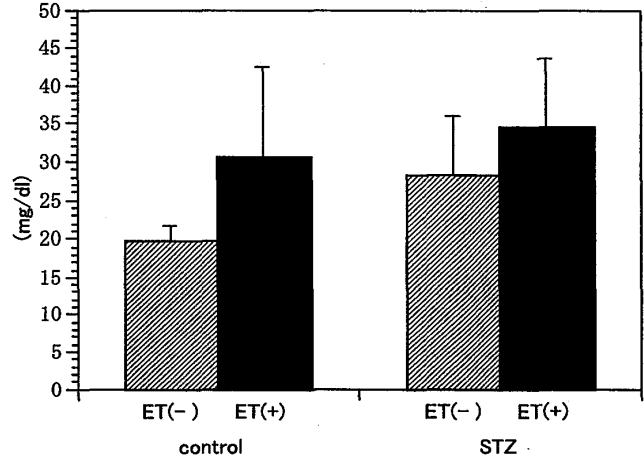


Fig. 5. Blood urea nitrogen of the control mouse and the STZ mouse, furthermore an ET injection or a non-injection into the mouse about each group. Several bars are means±SD. $n = 5$

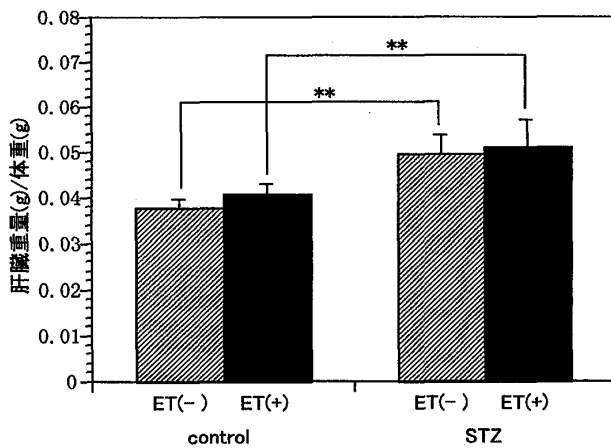


Fig. 4-2. The ratios of liver to body weight of the control mouse and the STZ mouse, furthermore an ET injection or a non-injection into the mouse about each group. Several bars are means±SD. **: $p < 0.01$, $n = 5$

腎機能の指標である BUN は、血栓が形成されると腎臓の毛細血管において血流の障害が生じ、その結果血中濃度が上昇する¹³⁾。血漿中の BUN 濃度は対照群および STZ 投与群の両方において ET 投与により増加する傾向がみられた (Fig. 5)。ET 投与により血液凝固傾向にあり、血栓が形成されていたと考えた。更に、ET 非投与において、対照群と比較して、STZ 投与群では BUN 値が高い傾向にあり、糖尿病の状態では、腎機能が低下していたと推察した。

血液凝固系の指標となるプロトロンビン時間 (PT) は、特に外因系の血液凝固因子の量を反映し、PT が長いほど凝固因子が減少していることを表す。対照群および STZ 投与群の両方において、ET 投与により延長する傾向がみられた (Fig. 6)。よって、ET 投与により、体内において血液凝固が充進し、凝固因子が動員されていたと考えた。更に、対照群と比較して STZ 投与群では ET 投与による PT 延長の割合が大きい傾向にあり、このことから、糖尿病状態下では血液凝固が充進し、血栓化傾向にある可能性が示唆されたので、次に線維素溶解系のパラメーターである PA の酵素活性を測定した。

データには示していないが、プラスミノーゲンを含まない平板を用いた測定において、肺におけるフィブリン分解酵素活性は ET 非投与では検出されず、ET 投与によりその活性が出現した。これは、エラスターゼやカテプシン G によりプラスミンの活性化を必要としない作用機序でフィブリンが分解されたためであると考えた。肺における PA 活性は、対照群および STZ 投与群の ET 非投与においても検出された (Fig. 7)。よって、プラスミノーゲンが PA の作用によりプラスミンとなり、フィブリン (線維素) を溶解したと推察した¹⁴⁾。ET 投与により、対照群および STZ 投与群において有意に減少した (Fig. 7 対照群; $p < 0.05$, STZ 投与群; $p < 0.01$)。これは、血管内皮細胞から PA が放出されたためであると考えられ、ET 投与により線溶系が充進していたことを示唆した。また、対照群と比較

して、STZ 投与群において、ET 投与による PA 活性の減少が大きかったことから、より線溶系が亢進していたと推察した。

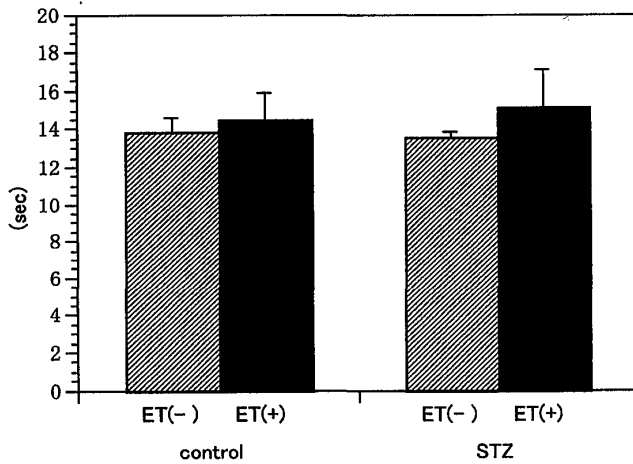


Fig. 6. Prothrombin time of the blood in control mouse and STZ mouse, furthermore ET injection or non-injection into mouse about each group. Several bars are means \pm SD. n=5

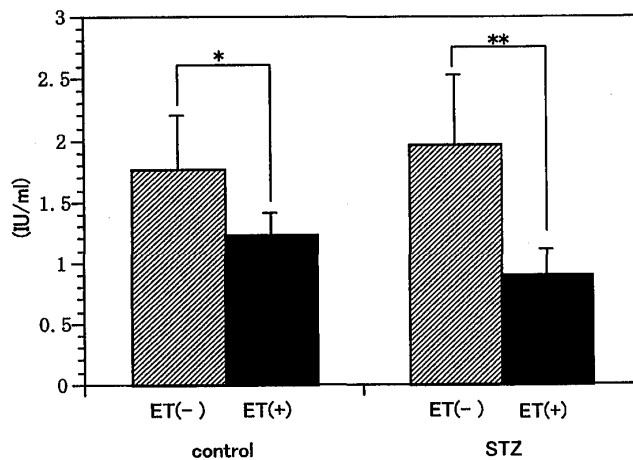


Fig. 7. Enzyme activity of lung the PA in control mouse and STZ mouse, furthermore ET injection or non-injection into mouse about each group. Several bars are average and SD. **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$

まとめ

本研究では、STZ で作製した糖尿病モデルマウスに ET を静注することによって DIC を誘発し、この病態における糖尿病の影響を検討した。

STZ の継続的投与(0.06mg/g BodyWt)により糖

尿病を発症したモデルマウスにおいて、毛細血管における血栓形成による肺や肝臓うっ血に伴う臓器重量の増加、および BUN 値の上昇など、血液凝固傾向にあることが示唆された。更に、STZ 投与群では ET 投与により DIC を誘発した状態において、対照群と比較して、より PT の延長、PA 活性の低下の亢進が観察された。

糖尿病の病態においては、血液凝固・血栓化傾向にあり、突然死の原因となりうる DIC 発症のリスクが高まることが示唆された。

文献

- 1) 平成 14 年度糖尿病調査の概要(厚生省)
- 2) Sobel, B.E., Schneider, D.J., *Cardiol. Clin.*, **22**(4), 511-26. (2004)
- 3) 糸川嘉則, 柴田克巳: 栄養学総論(改訂第 2 版), pp.115-116(南光堂)(2001)
- 4) 中川雅夫, 新しい DIC の病態・診断・治療, 医薬ジャーナル社, pp.10-47(2001)
- 5) Thorn, J., *Inflamm. Res.*, **50**, 254-261(2001)
- 6) Rakieten, N., Rakieten, M.L., Nadkarni, M.V., *Cancer Chemother. Rep.*, **29**, 91-98 (1963)
- 7) Spayd, R.W., Bruschi, B., *Clin. Chem.*, **24**, 1343-1350(1978)
- 8) Coulombe, J.J., Favreau, L. *Clin. Chem.*, **9**, 102-108(1963)
- 9) Quick, A.J., Stanly, B. M. and Baneroft F. W., *Am. J. Med. Sci.*, **190**, 501-511.(1935)
- 10) Okamoto, U., Yamamoto, J., Nagamatsu, Y., Horie, N., *Thromb. Haemostas.*, **42**, 726-733. (1979)
- 11) Astrup, T., Müllertz, S., *Arch. Biochem. Biophys.*, **40**: 346-351(1952)
- 12) Alberti, K.G.M.M., Zimmet, P., DeFronzo, R.A., Keen, H., International Textbook of Diabetes Mellitus., Wiley. vol.2(1997)
- 13) Dorinsky, P.M., Gadek, J.E., *Chest*, **96**, 885-892(1989)
- 14) 岡本歌子, 佐々木邦子, 長尾直樹, 内木位節子, 永松陽子, 日本生理誌, vol.44, 633-641(1982)