

2型糖尿病モデルマウス KK-A^y におけるエトキシピコリン酸亜鉛(II) 錯体の血糖上昇抑制作用

森下美香¹⁾、西出 緑¹⁾、松本衣代¹⁾、安達祐介²⁾、吉川 豊²⁾、桜井 弘²⁾、梶原苗美¹⁾

¹⁾ 神戸女子大学 栄養生理学研究室

²⁾ 京都薬科大学 代謝分析学教室

Normalizing Effect of Zinc(II) Complex with 6-Ethoxy Picolinic Acid on Blood Glucose Levels in KK-A^y Mice

Mika Morishita¹⁾, Midori Nishide¹⁾, Kinuyo Matsumoto¹⁾, Yusuke Adachi²⁾,
Yutaka Yoshikawa²⁾, Hiromu Sakurai²⁾ and Naemi M. Kajiwara¹⁾

¹⁾ Laboratory of Nutrition Physiology, Graduate School of Life Science, Kobe Women's University

²⁾ Department of Analytical and Bioinorganic Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University

Abstract

We examined normalizing effect for blood glucose levels of zinc(II) complex with 6-ethoxy picolinic acid (Zn(6-EtOpa)₂) on KK-A^y mice which used in this study as the model animals of type 2 diabetes, and compared with its ligand, 6-ethoxy picolinic acid (6-EtOpa). These mice were divided into three groups after the onset of diabetes at 8 weeks of age, which were an untreated group, a 6-EtOpa treated group, and a Zn(6-EtOpa)₂ treated group. They were given daily intraperitoneal (i.p.) injections of each material for a period of 2 weeks from 8th to 10th week of ages. The dose of Zn(6-EtOpa)₂ was 3 mg Zn/kg of body weight. Each animal was examined for its body weight, food intake, blood glucose level, glucose tolerance, HbA_{1c} level, hematological status, organ weight, and zinc and copper concentrations in the organs. After 2 weeks of administration, the blood glucose level of KK-A^y mice treated with Zn(6-EtOpa)₂ showed a significant decrease compared to both of the 6-EtOpa and control groups. Furthermore, the mice treated with Zn(6-EtOpa)₂ showed decreasing effect on HbA_{1c} levels and increasing effect on glucose tolerance. Zinc (II) concentration in the femur was significantly increased in the Zn(6-EtOpa)₂ treated group compared to the both of 6-EtOpa and control groups. Copper concentration was decreased significantly in both of femur and femoris muscle.

Keywords : diabetes, Zn(II) complex, KK-A^y, blood glucose level

はじめに

糖尿病は膵臓に点在する内分泌器官、β細胞から分泌

連絡先：森下美香

〒654-8585 兵庫県神戸市須磨区東須磨青山 2-1

神戸女子大学 栄養生理学研究室

TEL : 078-737-2427

FAX : 078-737-2427

E-mail : mika05161981@yahoo.co.jp

されるインスリンの相対的または絶対的不足によって引き起こされ、主として糖質の代謝障害によって高血糖と尿糖を生じる疾患である¹⁾。2002年の世界保健機構(WHO)の報告によると、2000年の糖尿病患者数は全世界で約1億7千7百万人、2025年までにはその2倍の数になるといわれている²⁾。このような糖尿病患者の世界規模での増加は、糖尿病の中でもその大半を占める2型糖尿病の増加によるものである。その背景として現代人の生活習慣即ち、食生活の変化や運動不足による肥満、ストレスなどがあげられる³⁾。

この2型糖尿病の治療目標は血糖を良好にコントロールすることによって糖尿病性腎症・網膜症・神経障害など

論文受付日：平成18年7月31日

論文受理日：平成18年8月17日

の合併症を予防することである。血糖値の改善を図るためには、食事・運動療法が治療の基本となるが、医療サイドや患者自身においても多大な努力を要し、実践するのはそれほど容易ではない。経口血糖降下薬による薬物療法も副作用が問題となる場合がある⁴⁾。このような状況下、食品の3次機能に着目したサプリメントによる糖尿病の予防や血糖コントロールに有効な機能性食品(特定保健用食品)などの開発が注目されてきている。

近年、亜鉛にはSTZラットやob/obマウスなどの糖尿病モデル動物を用いた実験で、血糖降下作用があることが報告されている^{5)~8)}。しかしこれらの研究結果は、糖尿病治療に用いるには大量投与が必要であり、問題点を多く含んでいる。そこで小嶋・吉川らは、亜鉛(II)イオンと比較して、低容量で生体内でのbioavailabilityを高めた亜鉛(II)錯体を開発し、血糖値の上昇抑制効果をはじめとする糖尿病病態改善効果について多くの報告を行っている^{9)~11)}。その配位子としては生体物質のアミノ酸やピコリン酸、食品添加物であるマルトールおよびそれらの誘導体を用いている。その他、ビタミンCやビタミン様物質であるカルニチン、食品のパパイヤなどを配位子とした亜鉛(II)錯体においても、糖尿病の病態を改善する効果が報告されている¹²⁾¹³⁾。そこで我々の研究グループでは、このように血糖値上昇抑制効果が報告されている亜鉛(II)錯体の中でもピコリン酸に着目した。ピコリン酸は必須アミノ酸のトリプトファンから合成される物質で、亜鉛の腸管粘膜通過を促進させる強力なキレート剤として働いている¹⁴⁾。腭液中や腸管粘膜に存在するが、牛乳や人乳にも含まれており、人乳中の低分子量亜鉛分画について、その亜鉛結合物質(Zinc-Binding-Ligand; ZBL)がピコリン酸であるという報告がある¹⁵⁾。本実験ではこのピコリン酸のピリジン環の6位にエトキシ基を導入させ、より脂溶性を高め、腸管で吸収されやすい形にしたエトキシピコリン酸亜鉛(II)錯体(Zn(6-EtOpa)₂)の血糖上昇抑制作用について2型糖尿病モデルマウスKK-A^yを用いて検討した。

方 法

(1) 実験動物

日本クレア株式会社より4週齢の雄性、2型糖尿病モデルマウスKK-A^yを購入し、飼育・繁殖用市販固形飼料(CE-2:日本クレア株式会社)を水とともに自由摂取させ飼育した。週1回の尾静脈血糖測定により、平均血糖値が400 mg/dl以上となった8週齢から、動物を対照群(control群)、Zn(6-EtOpa)₂群及びリガンドのエトキシピコリン酸投与群(ligand群)の3群に分け、1日1回14日間連続腹腔内投与をおこなった。実験動物はプラスチック製のケージ内で飼育し、餌及び水は自由摂取させ、室温約22 ± 2 °C、湿度約40~60%、点灯時間午前7時~午後7時の動物飼育室で飼育した。

(2) 実験方法

本実験では、体重、摂食量、摂水量の測定を行い、血糖値は午前10時に測定した(午前血糖値)。午前血糖値は尾静脈採血により簡易血糖測定器(三和化学株式会社、名古屋)を用いて測定した。14日間の試料投与後、糖負荷試験(OGTT)を実施した。即ち動物を13時間絶食させ、グルコース水溶液(1 g/kg 体重)を経口投与し、経時的に、0、30、60、90、120及び180分後の血糖値を測定した。

(3) 血液生化学性状検索

試料投与後の動物はネプタール麻酔下、腹部大動脈より採血し、4 °C、5000 rpm、10分間の遠心分離後、血清を採取して、動物用血液生化学自動分析装置(富士ドライケム3500V:富士フィルム株式会社)により血液生化学検査(AST、ALT、TG、T-Cho、BUN)を行った。HbA_{1c}値は、試料投与開始前と14日間の試料投与後にラテックス凝集阻止反応法によるDCA2000システム(バイエルメディカル株式会社、東京)により測定した。

(4) 剖検及び臓器中の亜鉛・銅濃度の測定

動物は、主要臓器(肝臓、脾臓、腎臓、副腎、膵臓、生殖器、大腿骨、大腿筋)並びに腹腔内脂肪を採取し秤量を行った。肝臓、脾臓、腎臓、膵臓、大腿骨、大腿筋については、湿式灰化後、原子吸光分光光度計(偏光ゼーマンZ-8200:日立製作所株式会社)にて亜鉛及び銅濃度の測定を行った。

結果及び考察

2型糖尿病モデルマウスにおけるZn(6-EtOpa)₂錯体の血糖値上昇抑制効果を調べるために、8週齢のKK-A^yマウスに14日間3 mg Zn/kg 体重のZn(6-EtOpa)₂錯体溶液を腹腔内投与したところ、これらの動物の摂食量・摂水量はcontrol群、ligand群と比較して減少傾向が見られたが、有意な差は認められなかった。平均体重については、亜鉛非投与群(control群、ligand群)と比較して、有意な差は認められなかった。(data not shown)

14日間のZn(6-EtOpa)₂錯体の投与期間中の午前血糖値(Fig. 1)及び投与終了後に行った経口糖負荷試験(data

Table 1 HbA_{1c} values of control mice, KK-A^y mice treated with ligand, and KK-A^y mice treated with Zn(6-EtOpa)₂

	HbA _{1c} (%)	
	0 day	14 day
control	5.8 ± 0.6	6.9 ± 0.9**
ligand	5.6 ± 0.8	6.8 ± 0.5*
Zn(6-EtOpa) ₂	7.5 ± 0.2	4.7 ± 0.8*

Values are the mean ± SDs for the 3-6 mice.

*, **: statistical significance at p<0.05 and p<0.01 against 0 day, respectively.

not shown)から、control群、ligand群と比較して、血糖値降下作用ならびに耐糖能改善効果を有することがわかった。又、投与前と比較して試料投与後のHbA_{1c}値(Table 1)は、control群、ligand群で上昇したにもかかわらず、Zn(6-EtOpa)₂群では14日間の投与後、有意な低値を示した。従って、Zn(6-EtOpa)₂錯体は糖尿病モデルマウスの血糖値コントロール改善作用を有することが明らかとなった。

一般に亜鉛(II)錯体の抗糖尿病作用は、インスリン抵抗性やレプチン抵抗性の改善効果によることが報告されている^{10,11)}。本実験のZn(6-EtOpa)₂投与による血糖値上昇抑制効果は、これらと同様の効果と推測されるが、インスリン抵抗性及びレプチン抵抗性の測定は行っていないためその理由は明確ではない。

Zn(6-EtOpa)₂錯体の体内吸収を検討するために、14日間の試料投与後の動物の臓器中(肝臓、腎臓、膵臓、脾臓、大腿骨、大腿筋)の亜鉛及び亜鉛と拮抗関係にある銅の濃度を調べた。Zn(6-EtOpa)₂群では、大腿骨で亜鉛濃度の上昇がみられ、大腿骨・大腿筋で銅の濃度の有意な

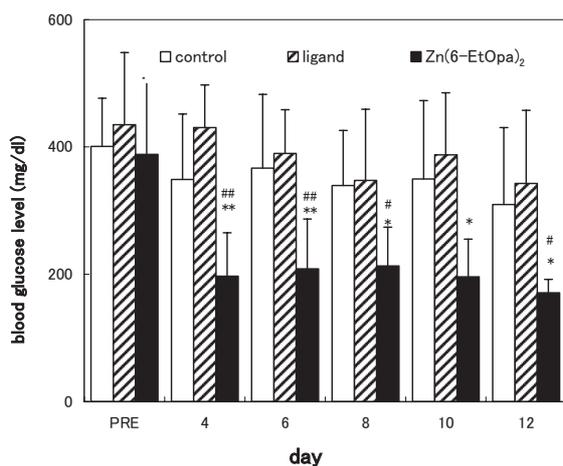


Fig. 1 Effect of Zn(6-EtOpa)₂ on the glucose level of KK-A^y mice.

Values are the mean \pm SDs for the 6-13 mice.

*, **: statistical significance at $p < 0.05$ and $p < 0.01$ against control group, respectively

#, ##: statistical significance at $p < 0.05$ and $p < 0.01$ against ligand group, respectively

低下が観察された(Table 2)。亜鉛の大量投与により拮抗関係にある銅の吸収が抑制され、大腿骨及び大腿筋の銅濃度が減少したことが理由の1つとして考えられる。このことは、亜鉛錯体を生体に投与する場合の投与量において慎重な検討が必要である事を示唆するものと考えられる。他の臓器に関しては有意な結果はみられなかった(data not shown)。

以上の結果より、Zn(6-EtOpa)₂錯体は糖尿病モデルマウスの糖尿病病態の改善に有効であり、現代人の食生活

の中で不足が懸念されている亜鉛を補えると共に、糖尿病の予防や病態の改善に役立つ有用な化合物として今後利用できるのではないかと考えている。

Table 2 Effect of Zn(6-EtOpa)₂ on the zinc and copper concentration in the femur and femoral muscle of KK-A^y mice.

		control	ligand	Zn(6-EtOpa) ₂
Zn (nmol/g)	Femur	1561.7 \pm 222.7	1515.6 \pm 156.1	2198.7 \pm 170.8 **, ##
	Femoral muscle	161.1 \pm 45.0	177.1 \pm 45.0	161.6 \pm 14.2
Cu (nmol/g)	Femur	32.0 \pm 15.2	40.5 \pm 11.0	17.7 \pm 4.2 *, #
	Femoral muscle	24.5 \pm 7.3	31.2 \pm 7.9	17.3 \pm 3.0 ##

Values are the mean \pm SDs for the 6-12 mice.

*, **: statistical significance at $p < 0.05$ and $p < 0.01$ against control group, respectively

#, ##: statistical significance at $p < 0.05$ and $p < 0.01$ against ligand group, respectively

謝 辞

本研究は文部科学省科学研究費補助金特別推進研究(桜井弘)により行われた。

本研究を遂行するにあたり、実験に協力いただきました神戸女子大学 大崎めぐみ修士、鳥澤奈津子修士、及び梶原研究室の皆様には厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) 後藤昌義, 瀧下修一 : 新しい臨床栄養学 改訂第3版. 南江堂, 東京, 2001. 63頁.
- 2) Fact Sheet No.236 WHO Revised September, 2002.
- 3) King, H. and Rewers, M. : WHO AD HOC Diabetes Reporting Group. Diabetes Care. 16 : 157-177, 1993.
- 4) 森 保道、関原久彦 : 経口血糖降下薬の副作用とその対策. 日本臨床 60 巻 増刊号 9. 2002. 325-324.
- 5) Shisheva, A., Gefel, D., and Shechter, Y. : Insulin-like effects of zinc ion in vitro and in vivo. Diabetes 41 : 982-988, 1992.
- 6) Chen, M. D., Liou, S. J., Lin, P. Y., Yang, V. C., Alexander, P. S., and Lin, W. H. : Effects of zinc supplementation on the plasma glucose level and insulin activity in genetically obese(ob/ob)mice. Biol Trace Elem Res 61 : 303-311, 1998.
- 7) Moon, K. S., Mark, J. R., Sukjin, H., Diane, M. H.,

- Inkyung, H., Ian, Y., Michael, S. G., Marvin, E. A., and Vay, L. W. : Synergistic antidiabetic activities of zinc, cyclo(His-Pro), and arachidonic acid. *Metabolism* 50 : 53-59, 2001.
- 8) Coulston, L. and Dandona, P. : Insulin-like Effect of Zinc on Adipocytes. *Diabetes* 29 : 665-667, 1980.
- 9) 吉川 豊, 植田英里好, 三宅弘之, 桜井 弘, 小嶋良種 : 血糖降下作用を有する亜鉛(II)錯体の開発研究. *Biomed. Res. Trace Elements*. 11 : 349-350, 2000.
- 10) Yoshikawa, Y., Ueda, E., Kawabe, K., Miyake, H., Takino, T., Sakurai, H. and Kojima, Y. : Development of New Insulinomimetic zinc(II) picolinate complexes with a Zn(N₂O₂) Coordination Mode : Structure Characterization, in vitro, and in vivo Studies. *J. Biol. Inorg. Chem.* 7 : 68-73, 2002.
- 11) 吉川 豊, 小嶋良種 : 亜鉛錯体の抗糖尿病作用(1)-基礎研究から実用化に向けて-. *FFI JOURNAL*, 209 : 94-102, 2004.
- 12) 梶原苗美, 橋本弘子, 松本衣代, 谷口 洋 : 亜鉛錯体の抗糖尿病作用(2)-健康食品素材としての栄養生理学的機能の研究-. *FFI JOURNAL*, 209 : 103-111, 2004.
- 13) Matsumoto, K., Hashimoto, H., Taniguchi, H., Yoshikawa, Y., Kojima, Y. and Kajiwara, N. : Preventiv Effects of Zn(II)complex with Papaya Powder on Type 2 Diabetes Mellitus. *日本病態栄養学会誌* 7 : 197-201, 2004.
- 14) 岡田 正 : 亜鉛と臨床, 高木洋治編、朝倉書店, 11-12. 1984
- 15) Evans, G. W. and Johnson, P. E. : Characterization and Quantitation of a Zinc-Binding Ligand in Human Milk. *Pediatr. Res.* 14 : 876-880, 1980.