

# 膵 Islet における Streptozotocin, Alloxan による H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生と DNA 損傷

浅 輪 孝 幸

信州大学医学部老年医学教室

(指導 : 山田 隆司教授)

## Streptozotocin and Alloxan Induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Generation and DNA Fragmentation in Pancreatic Islets

Takayuki ASAWA

Department of Geriatrics, Endocrinology and Metabolism,

Shinshu University School of Medicine

(Director : Prof. Takashi YAMADA)

Since large dose of glucose is toxic for pancreatic islet cells, and since excess dose of glucose increases hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) generation in the cells, possible mechanism of toxic effect of streptozotocin (STZ) and alloxan (AX) on the islet cells through the generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was studied *in vitro* and *in vivo* using rats. STZ and AX *in vitro* increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in the islet cells in a dose-dependent manner. Increase in the islet cell H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation was also found when STZ or AX was administered *in vivo* beforehand and the islet cells were examined *in vitro*. DNA isolated from the untreated islet cells showed a single peak in the sucrose density gradient, but this peak diminished progressively with time when STZ or AX was added *in vitro* indicating STZ- and AX-induced DNA fragmentation. A similar abnormal pattern of the DNA sedimentation was also found when STZ or AX was administered *in vivo* and then the islet cells were analyzed *in vitro*. In addition, incubation of the islet cells with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resulted in islet cell DNA fragmentation. Because STZ and AX failed to stimulate the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation by pancreatic exocrine cells, the drugs specifically stimulate the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in the islet cells. It is suggested that increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> thus produces toxic effects on the islet cells through the DNA fragmentation. *Shinshu Med. J.*, 38 : 627-636, 1990

(Received for publication August 6, 1990)

---

**Key words :** streptozotocin, alloxan, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation, DNA fragmentation, pancreatic islets

ストレプトゾトシン, アロキサソ, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>産生, DNA 損傷, 膵 islet

---

### I 緒 言

Streptozotocin (STZ) および alloxan (AX) は膵 B-cell に選択的に作用し障害を与える点から<sup>1)2)</sup>, 実験糖尿病を作るために広く使用されている<sup>3)-5)</sup>。人間に見られるインスリン依存性糖尿病 (IDDM) は、ウイルス感染などを糸口として insulinitis を生ずること

で発症進行するものと考えられているが、STZ や AX 投与時にも、ほぼ似た insulinitis を生ずることが知られている<sup>6)-8)</sup>。したがって STZ や AX を用い、IDDM 発症の一端を知ろうとする試みがあり、Okamoto らは自分自身の実験や他の実験から<sup>9)-12)</sup>, STZ や AX により膵 B-cell の DNA が損傷され、この DNA 損傷を通じて実験動物に糖尿病が生ずるので

はないかと提唱した。今回我々は、膵 islet が hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) を産生することを見だし、高濃度ブドウ糖が膵 islet の  $H_2O_2$  産生を増加させることに注目し、STZ や AX の膵 islet の  $H_2O_2$  産生に対する影響を調べた。その結果 STZ や AX は膵 islet の  $H_2O_2$  産生を増加させ、この増加した  $H_2O_2$  が次に DNA を損傷するに至る経路を明らかにし、実験糖尿病の発症機序について新しい視点を提出することができたと考えられるので、ここにその概略を報告する。

## II 実験材料と方法

実験には雄ウイスター系ラット (150~300 g) 120 匹を使用した。

### A 膵 islet の単離

実験前一夜絶食としたラットにまず sodium pentobarbital で腹腔内麻酔 (5mg/100g BW) を行い開腹した。総胆管合流部より上部から逆行性にカニューレーションし、0.5mg/ml のコラゲナーゼ (Serva, Feinbiochemica, New York) を加えた単離用の Hanks-HEPES 緩衝液 (Hanks solution, 0.95mM  $CaCl_2$ , 25mM  $NaHCO_3$ , 20mM HEPES, 5mM D-glucose を含み 95%  $O_2$  と 5%  $CO_2$  で通気, pH 7.4) 15ml を注入した。膨満した膵を切離し、37°C で16分間インキュベートして膵を digest した。Digest 後、水冷した Hanks-HEPES 緩衝液を用いて 5 回洗浄した。Digest した膵を Ficoll gradient (25.0%, 23.0%, 20.5%, and 11.0% (W/V): 4°C, 700×g 15min) にかけて、20.5% と 11.0% Ficoll の相の間に遊離した islet を実体顕微鏡下で採取した<sup>13)-16)</sup>。

### B 膵 islet の $H_2O_2$ 産生測定

$H_2O_2$  産生は Bénard と Brault の方法により持続的に測定した<sup>17)18)</sup>。この方法は外部より加えた peroxidase の存在下で medium 中の  $H_2O_2$  によって homovanillic acid が fluorescent metabolite に変化することを利用したものである<sup>19)</sup>。先に洗浄した islet を 0.5% bovine serum albumin を含む Krebs-Ringer bicarbonate-20mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) に suspend する。ついでこの islet suspension (100 islets/0.5ml) をキュベット (37°C) に移し  $H_2O_2$  測定に供した。このためキュベットには horseradish peroxidase (type II, 0.1mg/ml, final) と homovanillic acid (0.44 mM, final) が添加されている。この条件下での islet による  $H_2O_2$  産生は、excitation 315 nm, emission 425 nm 波長にて Hitachi F-4000 fluorometer (Hita-

chi, Tokyo) で測定した。Islet suspension は持続的にかくはんされ、安定状態となった後 STZ あるいは AX をマイクロシリンジを用いてキュベットに添加した。標準曲線は islet の代わりに既知量の  $H_2O_2$  を入れ測定した。STZ あるいは AX による  $H_2O_2$  産生は nmol/islet/min で示した。

### C 膵 islet の DNA 測定—density gradient analysis

膵 islet の DNA 測定は density gradient analysis を用い、すでに報告された方法に従って行った<sup>11)</sup>。すなわち100個の islet を Krebs-Ringer bicarbonate medium (5 mM sodium fumarate, 5 mM sodium glutamate, 5 mM sodium pyruvate, 2mg/ml of bovine serum albumin, 2.8 mM D-glucose を含み, 95%  $O_2$  と 5%  $CO_2$  で通気, pH 7.4) 200 $\mu$ l で 37°C にて 30 分間ブレインキュベートした<sup>14)20)</sup>。ブレインキュベート後各種濃度の STZ, AX あるいは  $H_2O_2$  を medium に添加し 37°C で 5~20 分間 islet をインキュベートした。なお, STZ, AX は比較的破壊されやすいため、実験に使用する直前に pH 4.0 のアセテート液に溶解させた。インキュベート後、生食にて洗浄した islet を 50 $\mu$ l の水冷した生食に suspend し、すぐに 100 $\mu$ l の lysis solution (1.0N NaOH, 0.01M EDTA, 1% (v/v) Triton X-100) を加え溶解させた。その後 4.4ml の 5~20% (w/v) linear sucrose gradient (0.3N NaOH, 0.7M NaCl, 0.01M EDTA を含む) を 5ml のポリスチレンチューブに入れ、その上に処理した islet を加えた。これを 50,000 回転、20°C にて 200 分間 Beckman L8-M60 Ultracentrifuge, SW55TI rotor で遠心した。遠心後 sucrose gradient の bottom より 12 滴ずつ No1—No16 まで fraction を集めた。それぞれの fraction の DNA は 300 $\mu$ g の bovine serum albumin を含む 1 ml の水冷した 20% trichloroacetic acid を加え 2,500 回転で 10 分間遠心し沈澱させた。沈澱は水冷した 5% trichloroacetic acid を用い 3 回洗浄した後 fluorometric method にて DNA 含量をアッセイした<sup>21)22)</sup>。すなわちサンプル 100 $\mu$ l に 1N  $NH_4OH$  と 0.2% TritonX-100 を含む 200 $\mu$ l 溶液を加え 100°C で 60 分間熱する。その後 charcoal treated diamino benzoic acid dihydrochloride 300  $\mu$ l を加え 60°C で 30 分間インキュベートし、これに 1N HCl 1.6ml を加えて 2,500 回転で 10 分間遠心した。上清を fluorometer (excitation 408 nm, emission 508 nm 波長) で測定した。

Table 1 Effect of glucose on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation

glucose (mM)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> generation (nmol/islet/min)
50	0.418±0.092
30	0.306±0.092
20	0.154±0.058
10	0.020±0.012
5	0.007±0.004
2.5	0.007±0.005
0	0.006±0.003

Addition of graded doses of glucose to pancreatic islet suspension resulted in dose dependent increase in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation. The effect of glucose on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation was evident at a concentration of 10 mM (p<0.05).

Each value is the mean±SE of 3-6 determinations.

a: significantly different (p<0.05)

D 材料, その他

STZ, AX, horseradish peroxidase, homovanillic acid, は Sigma (St. Louis, MO, USA) より購入した。他の薬品も最高純度の物質を使用した。実験は数回繰り返り返し, 典型的データを示した。データは Student's t test により統計的に分析し, p<0.05 を統計的に有意とした。

III 結 果

A ブドウ糖刺激による膵 islet の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生

*In vitro* において無処理膵 islet は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を産生した。ブドウ糖は膵 B-cell の生理的調節因子であるが, 高濃度になると膵 islet の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生を増加させた。10mM のブドウ糖刺激で有意の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生増加が認められた (Table 1)。

B STZ, AX による膵 islet の *in vitro* と *in vivo* における H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生

1 STZ 刺激における H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生—*in vitro*

雄ウイスター系ラットより膵 islet を上述した方法

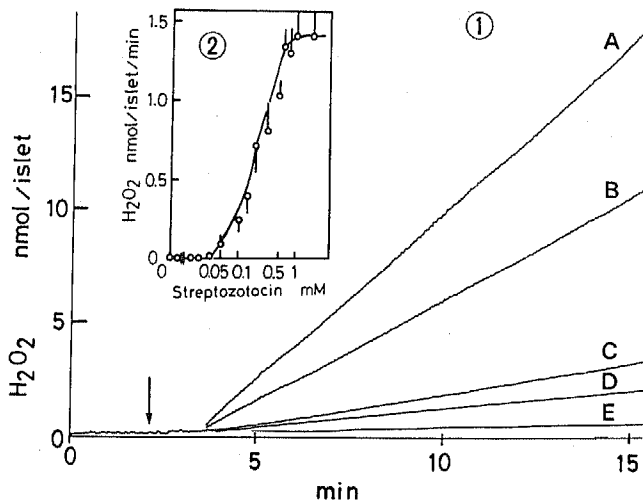


Fig. 1 Effect of streptozotocin on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation. ①: Time course of streptozotocin-stimulated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation was recorded continuously as described in the methods. Addition of 1mM (A), 0.5mM (B), 0.1mM (C), and 0.05mM (D) streptozotocin (arrow) to pancreatic islet suspension resulted in dose dependent increase in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation with 1.5 min initial lag. When streptozotocin was not added (E), the basal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> level increased. ②: Effects of graded doses of streptozotocin on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation. The effect of streptozotocin on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation was evident at a concentration of 0.1mM (p<0.05) and maximal at 1 mM. Each point and vertical line is the mean±SE of 5-7 determinations.

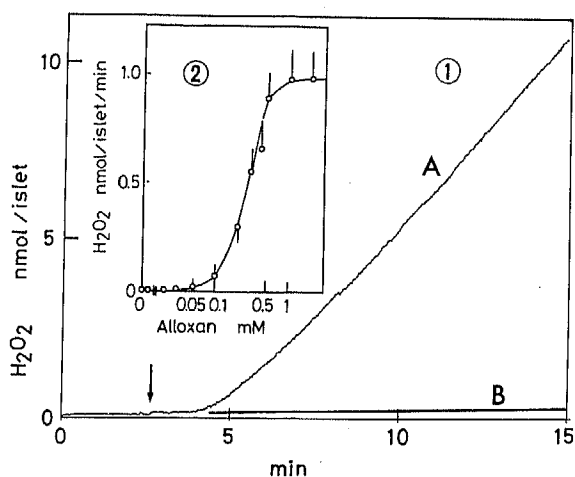


Fig. 2 Effect of alloxan on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation. ①: Time course of alloxan-stimulated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation was recorded continuously as described in the methods. Addition of 1 mM alloxan (arrow) to pancreatic islet suspension resulted in an increase in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation with 1.5 min initial lag (A). When alloxan was not added (B), the basal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> level increased. ②: Effects of graded doses of alloxan on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation. The effect of alloxan on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation was evident at a concentration of 0.1 mM ( $p < 0.05$ ) and maximal at 1 mM. Each point and vertical line is the mean  $\pm$  SE of 5-7 determinations.

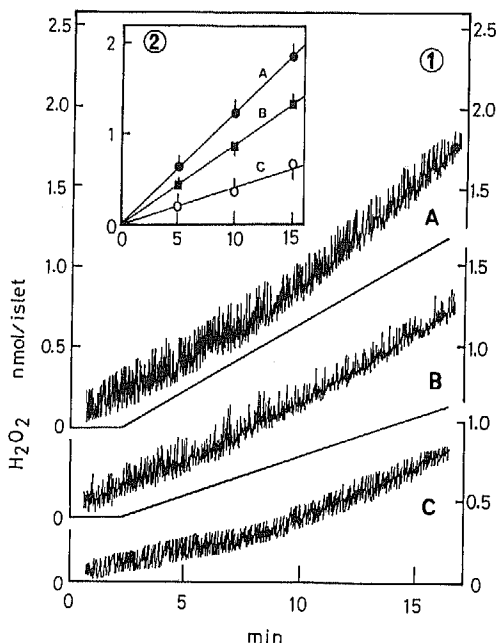


Fig. 3 Effect of administration of streptozotocin or alloxan *in vivo* on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation. ①, ②: Streptozotocin(65mg/kg) or alloxan (65mg/kg) was injected intravenously into rats. Twenty min after streptozotocin or alloxan injection, the islets were isolated from the pancreas, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation was measured. Injection of streptozotocin (A) or alloxan (B) increased the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation; the rate of streptozotocin- or alloxan-stimulated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation was higher than the control one(C). One typical experiment was shown in ①. ②: Each point and vertical line is the mean  $\pm$  SE of 5-7 determinations; (A) or (B) is significantly different from (C) at 10 min ( $p < 0.05$ ).

により取り出し、*in vitro*においてSTZ刺激におけるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>産生を測定した (Fig.1①)。無処理 islet によるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>産生量は時間とともに増加した (Fig.1E)。この条件下で 1 mM (Fig.1A), 0.5mM (Fig.1B), 0.1mM (Fig.1C), 0.05mM (Fig.1D) のSTZを加えると約 1.5 分の lag time の後、濃度依存性にH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>産生が増加した。ここには示していないが 1 mM STZ 刺激により H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>産生は 40 分間直線的に増加し

た。これらの直線はH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の総産生を示し、これより計算した 1 mM STZ 刺激 (Fig.1A) によるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>産生率は1.45nmol/islet/minであった。種々の濃度のSTZ刺激によるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>産生をみたものがFig.1②である。0.1mMで有意のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>産生が認められ 1 mM で最大反応が認められた。

2 AX 刺激における H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>産生—*in vitro*

1 mM AX を islet suspension に加えると、約1.5

分の lag time の後に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>産生が増加した (Fig.2① A)。この AX 刺激による H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>産生増加は40分間直線的に認められた。直線より計算した H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>産生率は 0.92nmol/islet/min であった。種々の濃度の AX による H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>産生をみたものが Fig.2 ②である。0.1mM で有意の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>産生が認められ、1 mM で最大反応が認められた。Fig.1 に示した STZ と Fig.2 に示した AX を比較すると、STZ のほうが膵 islet において強力な H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>産生刺激物質であった。

### 3 STZ, AX 刺激における H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>産生—*in vivo*

STZ, AX の *in vivo* 処理による *in vitro* の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>産生について検討した。雄ウイスター系ラットに sodium pentobarbital で腹腔内麻酔 (5mg/100g BW) し、頸静脈より STZ (65mg/kg BW) あるいは AX (65mg/kg BW) を注入した。これらの量はラットに100%糖尿病を生じさせるに充分な量である<sup>4)</sup>。一方コントロール群には pH4.0 のアセテート液を注入した。注入20分後に islet を取り出し、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を測定した。STZ あるいは AX 処理後に取り出した膵 islet の数はコントロール群に比較して明らかに減少していた。コントロール群より取り出した islet において H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>産生が認められたが、STZ あるいは AX 処理膵 islet はコントロール群以上の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を産生した (Fig.3 ①)。5~7 回の実験より、比較検討したものが Fig.3 ②であり STZ 処理群はコントロール群の約 2.7 倍、また AX 処理群はコントロール群の約 2 倍程度の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を産生しているものと思われた。

### C STZ, AX による膵 islet の *in vitro* と *in vivo* における DNA 損傷

#### 1 STZ による膵 islet の DNA 損傷—*in vitro*

雄ウイスター系ラットより取り出した膵 islet を Krebs-Ringer bicarbonate medium で STZ あるいは AX を加え 5~20 分間インキュベートし、alkaline sucrose density gradient にて DNA の velocity sedimentation を分析した。STZ あるいは AX を加えずに 20 分間インキュベートした islet の DNA は sucrose gradient の bottom 近くに 1 つのピークを形成し、これは損傷を受けていない DNA である (Fig.4 A, Fig. 5 A)。しかし 1 mM の STZ とともに islet を 5 分間インキュベートすると正常 DNA ピークは減少し、逆に損傷を受けた DNA が gradient の中ほどに幅広いピークを作った (Fig.4 B)。さらに 1 mM の STZ で 20 分間インキュベートすると正常 DNA ピークは完全に消失し、損傷した DNA が gradient の中ほどに

幅広いピークを形成した (Fig.4 C)。種々の濃度の STZ を用い 20 分間 islet をインキュベートし、DNA 損傷を調べたものが Fig.4 D である。STZ 用量依存性に膵 islet の DNA が損傷を受けることが判明した。

#### 2 AX による膵 islet の DNA 損傷—*in vitro*

1 mM の AX で 5 分間 islet をインキュベートし DNA を分析すると STZ と同様に正常 DNA ピークが減少した (Fig.5 B)。さらに 1 mM AX で 20 分間インキュベートすると正常 DNA ピークは完全に消失し、損傷した DNA が gradient の中ほどに幅広いピークを形成した (Fig.5 C)。種々の濃度の AX を用い 20 分間 islet をインキュベートし、DNA 損傷を調べたものが Fig.5 D で、やはり用量依存性に DNA 損傷が生じた。

#### 3 STZ, AX による膵 islet の DNA 損傷—*in vivo*

STZ と AX の *in vivo* 処理による膵 islet の DNA 損傷について検討した。雄ウイスター系ラットに sodium pentobarbital で腹腔内麻酔 (5 mg/100g BW) し、頸静脈より STZ (65mg/kg BW) あるいは AX (65mg/kg BW) を注入した。これらの量はラットに100%糖尿病を生じさせるに充分な量である<sup>4)</sup>。注入20分後に膵 islet を取り出し、alkaline sucrose density gradient により DNA を分析した。STZ あるいは AX 処理後に取り出した膵 islet の数はコントロール群に比較して明らかに減少していた。コントロール群は gradient の bottom 近くに 1 つのピークを示した (Fig.6 A) が、STZ (Fig.6 B), AX (Fig.6 C) 注入後 20 分間で膵 islet の DNA が完全に損傷した。

#### D H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>による膵 islet の DNA 損傷

雄ウイスター系ラットより取り出した膵 islet を H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で 20 分間インキュベートし、alkaline sucrose density gradient で DNA を分析した。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を加えずに 20 分間 islet をインキュベートし、DNA を分析すると損傷していない DNA が 1 つのピークを形成した (Fig.7 A)。しかし 500 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を加え 20 分間 islet をインキュベートすると DNA は完全に損傷された (Fig.7 B)。種々の濃度の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>による膵 islet の DNA 損傷をみたものが Fig.7 C である。30 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>添加で DNA 損傷が認められ、500 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で最大反応を示した。

## IV 考 察

糖尿病を引き起こす量の STZ や AX を実験動物に投与すると、膵 B-cell は不可逆的ダメージを受ける。投与後 6~12 時間は B-cell 崩壊により大量のインス

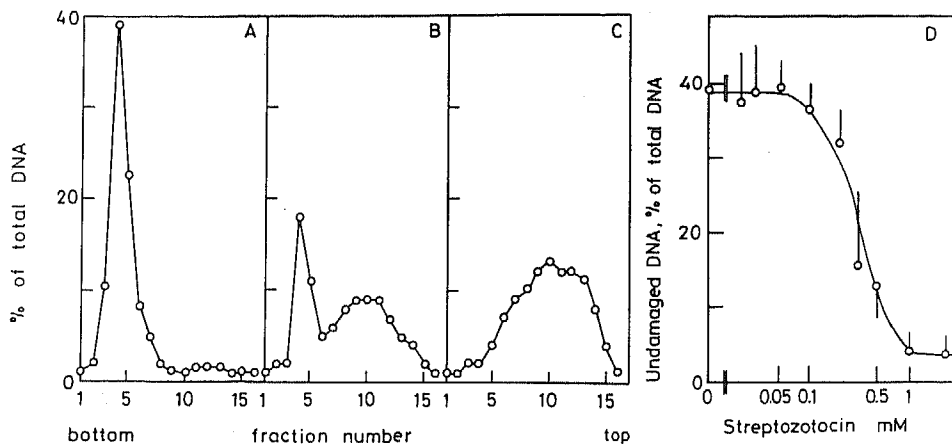


Fig. 4 Effect of streptozotocin on DNA fragmentation. DNA of islets incubated without streptozotocin for 20 min was recovered as a single peak near the bottom of the gradient, the position at which undamaged DNA sediments (A). However, after 5 min incubation with 1 mM streptozotocin, a considerable amount of DNA sedimented as a broad peak in the middle of the gradient with a concomitant decrease in undamaged DNA (B). After incubation with 1 mM streptozotocin for 20 min, the DNA was almost completely fragmented (C); islet DNA sedimented slower as a broad peak, indicating that streptozotocin produced islet DNA breaks. (D): Effects of 20 min exposure to graded doses of streptozotocin on undamaged DNA contents. Graded doses of streptozotocin decreased the amounts of undamaged DNA contents in fraction 4; the effect was evident at a concentration of 0.1 mM ( $p < 0.05$ ) and maximal at 1 mM. Each point and vertical line is the mean  $\pm$  SE of 5-7 determinations.

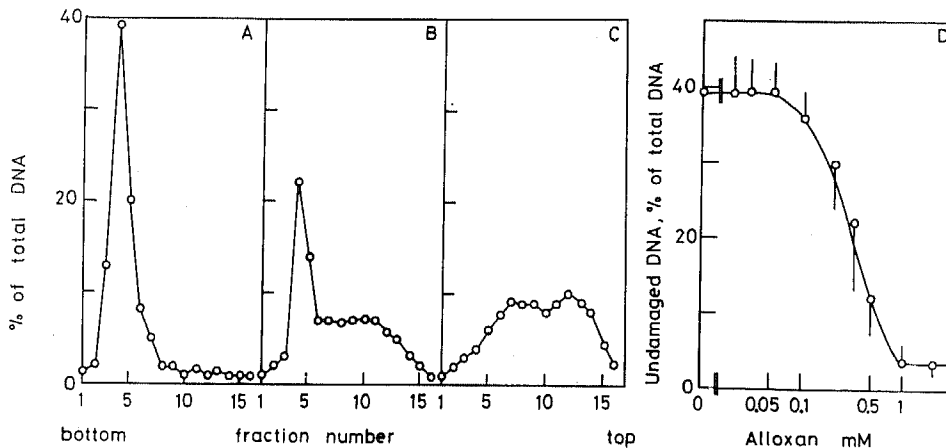


Fig. 5 Effect of alloxan on DNA fragmentation. DNA of islets incubated without alloxan for 20 min was recovered as a single peak near the bottom of the gradient, the position at which undamaged DNA sediments (A). However, after 5 min incubation with 1 mM alloxan, a considerable amount of DNA sedimented as a broad peak in the middle of the gradient with a concomitant decrease in undamaged DNA (B). After incubation with 1 mM alloxan for 20 min, the DNA was almost completely fragmented (C); islet DNA sedimented slower as a broad peak, indicating that alloxan produced islet DNA breaks. (D): Effects of 20 min exposure to graded doses of alloxan on undamaged DNA contents. Graded doses of alloxan decreased the amounts of undamaged DNA contents in fraction 4; the effect was evident at a concentration of 0.1 mM ( $p < 0.05$ ) and maximal at 1 mM. Each point and vertical line is the mean  $\pm$  SE of 5-7 determinations.

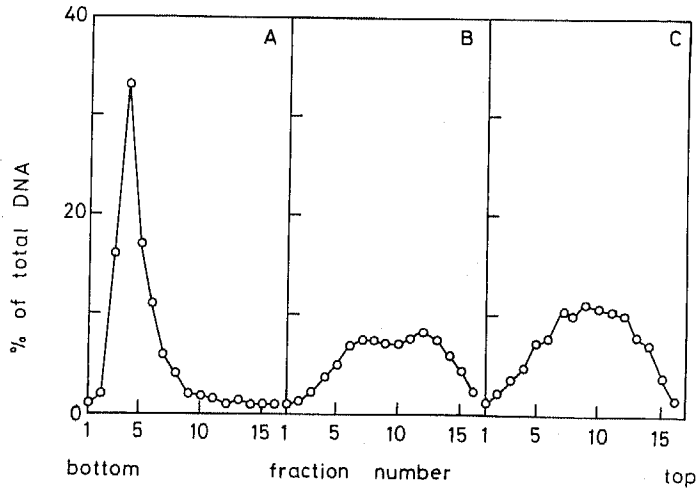


Fig. 6 Effect of administration of streptozotocin or alloxan *in vivo* on DNA fragmentation. Twenty min after streptozotocin (65mg/kg) or alloxan (65mg/kg) injection, the islets were isolated from the pancreas, and the velocity sedimentation of islet DNA in the alkaline sucrose density gradient was examined. DNA of islets of the rats, not injected with streptozotocin or alloxan, was recovered as a single peak near the bottom of the gradient, the position at which undamaged DNA sediments (A). However, injection of streptozotocin (B) or alloxan (C) induced DNA fragmentation; islet DNA sedimented slower as a broad peak, indicating that both drugs induced islet DNA breaks.

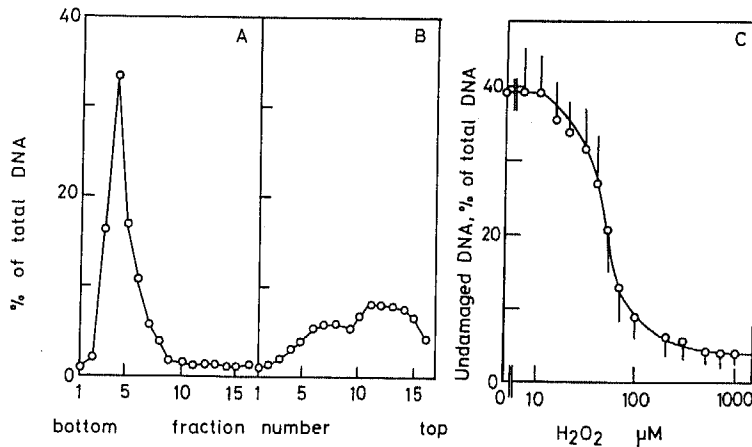


Fig. 7 Effect of  $H_2O_2$  on DNA fragmentation. Islets were incubated without (A) or with 500  $\mu M$   $H_2O_2$  (B) for 20 min, and velocity sedimentation of DNA was examined in the alkaline sucrose density gradient. DNA of islets incubated without  $H_2O_2$  for 20 min was recovered as a single peak near the bottom of the gradient, the position at which undamaged DNA sediments (A). However, after incubation with 500  $\mu M$   $H_2O_2$  for 20 min, the DNA was almost completely fragmented (B); islet DNA sedimented slower as a broad peak, indicating that  $H_2O_2$  produced islet DNA breaks. (C): Effects of graded doses of  $H_2O_2$  on undamaged DNA contents. DNA in fraction 4 was considered undamaged. Graded doses of  $H_2O_2$  decreased the amounts of undamaged DNA contents in fraction 4; the effect was evident at a concentration of 30  $\mu M$  ( $p < 0.05$ ) and maximal at 500  $\mu M$ . Each point and vertical line is the mean  $\pm$  SE of 5-7 determinations.

リンが血中に放出されるために低血糖を生じ、投与後24時間でインスリン不足による永続的な高血糖すなわち糖尿病を生じることは広く知られている<sup>9)</sup>。こうしたことを生じる真の理由は不明であったが、最近Okamotoら<sup>9)-11)</sup>はSTZやAXにより膵 islet B-cellのDNAが損傷される結果、糖尿病が発症するという仮説を提唱した。ここに報告した研究においても*in vivo*でラットに糖尿病を引き起こすに充分量のSTZ (65mg/kg BW)やAX (65mg/kg BW)を投与し、20分後に膵 isletを取り出して調べると、そのDNAに損傷がみられOkamotoらの報告<sup>23)</sup>を確認することができた。*In vivo*におけるDNA損傷はSTZやAXが他の組織に作用し2次的に膵 islet B-cellに作用した可能性もあるが、*in vitro*で膵 isletに直接STZ, AXを加えた場合も用量依存性にDNA損傷がみられた。したがってSTZやAXが直接膵 islet B-cellに作用しDNA損傷を引き起こすと結論してよいであろう。

STZやAXによるDNA損傷は膵外分泌腺細胞では全く認められない点から<sup>10)</sup>、これらによるDNA損傷は膵 islet B-cellに特異的に生じるものと考えられる。これらの研究では、B-cellの単離実験は実際上不可能なため whole isletを使用している。したがってSTZやAXがB-cellのみならずA-cellやD-cellのDNAも同時に損傷させている可能性もあるが、従来よりSTZやAXは膵 B-cellに特異的に作用すると報告されており<sup>12)</sup>、B-cellのDNAが損傷されていることは確実と思われる。さて投与されたSTZやAXがB-cellに集まり<sup>24)</sup>、B-cellではこれらに障害を受けやすいと思われるが、いったいどのような経路によりDNAが損傷されるのであろうか。AXによるDNA損傷にはhydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ )が関与しているという報告があり<sup>25)-30)</sup>、このhydroxyl radicalはsuperoxide ( $\text{O}_2^-$ )や $\text{H}_2\text{O}_2$ より産生される<sup>31)32)</sup>。我々は膵 isletにおいて $\text{H}_2\text{O}_2$ 産生があることを初めて発見し、この $\text{H}_2\text{O}_2$ 産生がSTZやAXにより特異的に刺激され、過剰に産生された $\text{H}_2\text{O}_2$ がDNA損傷を引き起こす可能性があることを見いだした。ここには示していないが $\text{H}_2\text{O}_2$ 産生は膵外分泌細胞においても認められた。しかし isletにおいてのみSTZやAX刺激により $\text{H}_2\text{O}_2$ 産生増加が認められた。したがって*in vitro*においても*in vivo*においてもSTZやAXは膵 isletに特異的に作用し $\text{H}_2\text{O}_2$ 産生を増加させるものと考えられる。さらに*in vitro*で $\text{H}_2\text{O}_2$ を膵 isletに加えるとDNA損傷の生じることが明らかにされた。しか

しここで問題となることは*in vitro*でDNA損傷を引き起こすのに必要な $\text{H}_2\text{O}_2$ 量はSTZやAXにより膵 isletから産生される量より大量ということである。一般に*in vitro*で加えられた薬物はなかなか細胞内へ浸透しないため大量添加が必要となるが、残念ながら加えられた $\text{H}_2\text{O}_2$ がどの程度細胞内へ入ったのかは不明である。Adipocyteではmedium中の濃度 $100\mu\text{M}$ の $\text{H}_2\text{O}_2$ が細胞膜を通過するといわれているが<sup>33)</sup>、膵 isletでは $30\mu\text{M}$ の $\text{H}_2\text{O}_2$ 添加でDNA損傷が認められたため、これより通過性が良いと思われる。また細胞内で産生された $\text{H}_2\text{O}_2$ が低濃度で容易にDNAに損傷を与える可能性も考えられ、今後の詳細な検討が必要と思われる。 $\text{H}_2\text{O}_2$ がDNA損傷を引き起こす可能性はfibroblastでも報告されており<sup>34)35)</sup>、膵 isletのみならず多くの細胞でもおこっているのかもしれない。しかしSTZやAX投与においては膵 B-cellに特異的に $\text{H}_2\text{O}_2$ 産生が増加しDNA損傷が生じると考えられる。またpurified DNAに直接 $\text{H}_2\text{O}_2$ を加えてもDNA損傷は生じなかったと報告されており<sup>34)35)</sup>、 $\text{H}_2\text{O}_2$ の作用は生きている細胞でないと思われず発現しないと思われる。

膵 B-cellの最も強力な生理的調節因子はブドウ糖であるが、このブドウ糖はtoxicな高濃度になると膵 isletの $\text{H}_2\text{O}_2$ 産生を増加させた。このことは生体内で高血糖を長く持続すると膵 B-cellの機能が低下し、インスリン分泌不足により糖尿病となることの一部に $\text{H}_2\text{O}_2$ 過剰産生が関与している可能性を示唆し、興味深く思われる。以上我々はSTZ, AXによる実験糖尿病において膵 isletの過剰 $\text{H}_2\text{O}_2$ 産生によるDNA損傷の可能性について報告した。これらの事実はIDDMの病因を理解するのみならず、治療を考える上でも重要であると考えられる。

## V 結 語

- 1 膵 isletは $\text{H}_2\text{O}_2$ を産生する。
- 2 STZ, AXは膵 isletの $\text{H}_2\text{O}_2$ 産生を増加させる。
- 3 STZ, AXは膵 isletのDNA損傷を引き起こす。
- 4  $\text{H}_2\text{O}_2$ は膵 isletのDNA損傷を引き起こす。

以上の事実より、STZ, AXは膵 isletの $\text{H}_2\text{O}_2$ 産生を亢進させ、この過剰 $\text{H}_2\text{O}_2$ がDNA損傷を引き起こし、B-cell変性を促し糖尿病を発症させる可能性が示唆された。STZ, AXによる実験糖尿病発症において $\text{H}_2\text{O}_2$ 産生亢進は重要な役割を演じていると考えられた。

本論文の要旨は、第33回日本糖尿病学会総会(1990



年5月, 東京) において発表した。

稿を終えるにあたり, 終始御懇篤なる御指導, 御校閲を賜りました恩師山田隆司教授に深甚なる謝意を表します。同時に本研究に際し御教示御指導下さいまし

た高須信行助教授, 小宮一郎先生, 長沢慶尚先生, 相沢 徹講師, 法医学教室福島弘文助教授に深謝致します。

## 文 献

- 1) Dunn, J. S., Sheehan, H. L. and McLetchie, N. G. B.: Necrosis of islets of Langerhans. *Lancet*, 1: 484-487, 1943
- 2) Rakieten, N., Rakieten, M. L. and Nadkarni, M. V.: Studies on the diabetogenic action of streptozotocin. *Cancer Chemother Res*, 29: 91-98, 1963
- 3) Dulin, W. E. and Soret, M. G.: Chemically and hormonally induced diabetes. In: Volk, B. W. and Wellmann, K.F. (eds.), *The diabetic pancreas*, pp. 425-465, Plenum Press, New York, 1977
- 4) Rerup, C. C.: Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacol Rev*, 22: 485-518, 1970
- 5) Agarwal, M. K.: Streptozotocin: Mechanisms of action. *FEBS Lett*, 120: 1-3, 1980
- 6) Rossini, A. A., Williams, R. M., Apple, M. C. and Like, A. A.: Sex differences in the multiple-dose streptozotocin model of diabetes. *Endocrinology*, 103: 1518-1520, 1978
- 7) Leiter, E. H.: Multiple low-dose streptozotocin-induced hyperglycemia and insulinitis in C57BL mice: Influence of inbred background, sex, and thymus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79: 630-634, 1982
- 8) Mendola, J., Wright, J. R., Jr. and Lacy, P. E.: Oxygen free-radical scavengers and immune destruction of murine islets in allograft rejection and multiple low-dose streptozotocin-induced insulinitis. *Diabetes*, 38: 379-385, 1989
- 9) Okamoto, H.: Molecular basis of experimental diabetes: Degeneration, oncogenesis and regeneration of pancreatic B-cells of islets of Langerhans. *BioEssays*, 2: 15-21, 1985
- 10) Yamamoto, H., Uchigata, Y. and Okamoto, H.: Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature*, 294: 284-286, 1981
- 11) Uchigata, Y., Yamamoto, H., Kawamura, A. and Okamoto, H.: Protection by superoxide dismutase, catalase, and poly(ADP-ribose) synthetase inhibitors against alloxan- and streptozotocin-induced islet DNA strand breaks and against the inhibition of proinsulin synthesis. *J Biol Chem*, 257: 6084-6088, 1982
- 12) Renold, A. E.: Animal models. In: Alberti, K. G. M. M. and Krall, L. P. (eds.), *The diabetes annual*, vol. 4, pp. 592-608, Elsevier, Amsterdam, 1988
- 13) Lacy, P. E. and Kostianovsky, M.: Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes*, 16: 35-39, 1967
- 14) Okamoto, H., Noto, Y., Miyamoto, S., Mabuchi, H. and Takeda, R.: Inhibition by somatostatin of insulin release from isolated pancreatic islets. *FEBS Lett*, 25: 103-105, 1975
- 15) Shibata, A., Ludvigsen, C. W., Jr., Naber, S. P., McDaniel, M. L. and Lacy, P. E.: Standardization of a digestion-filtration method for isolation of pancreatic islets. *Diabetes*, 25: 667-672, 1976
- 16) Gotoh, M., Maki, T., Halban, P., Mutkoski, R., Satomi, S. and Monaco, A.: Reproducibly high yield of rat islets by stationary digestion after intraductal collagenase injection (abstract). *Diabetes*, 34 [Suppl]: 169, 1985
- 17) Bénard, B. et Brault, J.: Production de peroxyde dans la thyroïde. *L'Union Médicale du Canada*, 100: 701-705, 1971
- 18) Takasu, N., Yamada, T., Shimizu, Y., Nagasawa, Y. and Komiya, I.: Generation of hydrogen peroxide in cultured porcine thyroid cells: synergistic regulation by cytoplasmic free calcium and protein kinase

- C. J Endocrinol, 120 : 503-508, 1989
- 19) Guilbault, G. G., Brignac, P., Jr. and Zimmer, M.: Homovanillic acid as a fluorometric substrate for oxidative enzymes. Anal Chem, 40 : 190-195, 1968
  - 20) Noto, Y. and Okamoto, H.: Inhibition by kynurenine metabolites of proinsulin synthesis in isolated pancreatic islets. Acta Diabetol Lat, 15 : 273-282, 1978
  - 21) Kissane, J. M. and Robins, E.: The fluorometric measurement of deoxyribonucleic acid in animal tissues with special reference to the central nervous system. J Biol Chem, 233 : 184-188, 1958
  - 22) Fiszer-Szafarz, B., Szafarz, D. and Guevara de Murillo, A.: A general, fast, and sensitive micromethod for DNA determination. Anal Biochem, 110 : 165-170, 1981
  - 23) Yamamoto, H., Uchigata, Y. and Okamoto, H.: DNA strand breaks in pancreatic islets by *in vivo* administration of alloxan or streptozotocin. Biochem Biophys Res Commun, 103 : 1014-1020, 1981
  - 24) Malaisse, W. J.: Alloxan toxicity to the pancreatic B-cell. Biochem Pharmacol, 31 : 3527-3534, 1982
  - 25) Heikkila, R. E., Winston, B., Cohen, G. and Barden, H.: Alloxan-induced diabetes-Evidence for hydroxyl radical as a cytotoxic intermediate. Biochem Pharmacol, 25 : 1085-1092, 1976
  - 26) Cohen, G. and Heikkila, R. E.: The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical, and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, diauric acid, and related cytotoxic agents. J Biol Chem, 249 : 2447-2452, 1974
  - 27) Holmgren, A. and Lyckeberg, C.: Enzymatic reduction of alloxan by thioredoxin and NADPH-thioredoxin reductase. Proc Natl Acad Sci USA, 77 : 5149-5152, 1980
  - 28) Grankvist, K., Marklund, S., Sehlin, J. and Täljedal, I.B.: Superoxide dismutase, catalase and scavengers of hydroxyl radical protect against the toxic action of alloxan on pancreatic islet cells *in vitro*. Biochem J, 182 : 17-25, 1979
  - 29) Fischer, L. J. and Hamburger, S. A.: Inhibition of alloxan action in isolated pancreatic islets by superoxide dismutase, catalase, and a metal chelator. Diabetes, 29 : 213-216, 1980
  - 30) Nakatsuka, M., Sakurai, H. and Kawada, J.: Generation of alloxan free radicals in chemical and biological systems: Implication in the diabetogenic action of alloxan. Biochem Biophys Res Commun, 165 : 278-283, 1989
  - 31) Haber, F. and Weiss, J.: The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. Proceedings of the Royal Society of London, A147 : 332-351, 1934
  - 32) McCord, J. M. and Day, E. D., Jr.: Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron-EDTA complex. FEBS Lett, 86 : 139-142, 1978
  - 33) Mukherjee, S. P.: Mediation of the antilipolytic and lipogenic effects of insulin in adipocytes by intracellular accumulation of hydrogen peroxide. Biochem Pharmacol, 29 : 1239-1246, 1980
  - 34) Meneghini, R. and Hoffmann, M. E.: The damaging action of hydrogen peroxide on DNA of human fibroblasts is mediated by a non-dialyzable compound. Biochim Biophys Acta, 608 : 167-173, 1980
  - 35) Hoffmann, M. E., Mello-Filho, A. C. and Meneghini, R.: Correlation between cytotoxic effect of hydrogen peroxide and the yield of DNA strand breaks in cells of different species. Biochim Biophys Acta, 781 : 234-238, 1984

(2. 8. 6 受稿)