

# Effects of Aldose Reductase Inhibitor upon Myoinositol Uptake by Rat Sciatic Nerve and Human Erythrocytes

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8143">http://hdl.handle.net/2297/8143</a>

## ラット坐骨神経およびヒト赤血球におけるミオイノシトール 取り込みに与えるアルドースリダクターゼ阻害剤の影響

金沢大学医学部内科学第二講座 (主任: 竹田亮祐教授)

嘉 門 信 雄

(平成1年9月5日受付)

末梢神経および赤血球における高血糖下でのミオイノシトール取り込み抑制の機序とアルドースリダクターゼ阻害剤のミオイノシトール代謝およびソルビトール代謝に対する影響を検討した。ラット坐骨神経へのミオイノシトール取り込みには、ナトリウム依存性・飽和性とナトリウム非依存性・不飽和性の2つが区別された。前者はエネルギー依存性、担体介在性能動輸送であり、坐骨神経へのミオイノシトール取り込みの主たるものであった。坐骨神経におけるナトリウム依存性ミオイノシトール取り込みは、培地グルコースによって競合抑制された。100  $\mu$  M のアルドースリダクターゼ阻害剤 ONO-2235 添加によって、このナトリウム依存性ミオイノシトール取り込み抑制は改善され、同時に坐骨神経内ソルビトール蓄積は阻害された。10  $\mu$  M の ONO-2235 添加によっても、ナトリウム依存性ミオイノシトール取り込み抑制は部分的に改善されたが、坐骨神経内ソルビトール蓄積は有意には阻害されなかった。これらは、ONO-2235 が坐骨神経におけるソルビトール蓄積およびミオイノシトール取り込みの両者を改善すること、ONO-2235 はソルビトール蓄積抑制を介さない機序でミオイノシトール取り込みに作用することを示唆している。一方、ヒト赤血球へのミオイノシトール取り込みは、ナトリウム非依存性・エネルギー非依存性受動輸送であった。赤血球におけるナトリウム非依存性ミオイノシトール取り込みは、培地グルコースによって抑制された。しかし、その抑制様式は、坐骨神経における競合抑制とは異なるものであった。アルドースリダクターゼ阻害剤 ONO-2235 ないし ICI-128,436 添加によって、このナトリウム非依存性ミオイノシトール取り込み抑制は改善されなかった。しかし赤血球内ソルビトール蓄積はアルドースリダクターゼ阻害剤濃度依存性に阻害された。次に、糖尿病患者を対象にした糖負荷試験ないし食事負荷試験において ONO-2235 および ICI-128,436 の赤血球内ミオイノシトール濃度および赤血球内ソルビトール濃度と与える影響を検討した。両アルドースリダクターゼ阻害剤とも赤血球内ソルビトール蓄積を阻害したが、赤血球内ミオイノシトール濃度には影響しなかった。これらは、ミオイノシトール取り込み様式が坐骨神経と赤血球とでは異なること、アルドースリダクターゼ阻害剤は試験管内、生体内のいずれにおいても赤血球内ソルビトール蓄積を阻害することを示している。以上より、アルドースリダクターゼ阻害剤は末梢神経のソルビトール代謝のみならずミオイノシトール代謝にも効果があること、赤血球内ミオイノシトールは末梢神経内ミオイノシトールの指標とはならないこと、および赤血球内ソルビトール蓄積系はアルドースリダクターゼ阻害剤の阻害活性評価法として有用であることが示された。

---

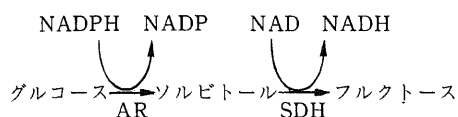
**Key words** diabetes mellitus, diabetic neuropathy, sorbitol, myo-inositol, aldose reductase inhibitor

---

Abbreviations: AR, aldose reductase; ATP, adenosine triphosphate; AUC, area under curve; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; G, glucose; IV, ionization voltage;  $K_i$ , transport inhibitor constant; KRB, Krebs-Ringer bicarbonate;  $K_t$ , the substrate concentration at which the initial velocity is one-half of  $V_{max}$ ; MG, multiplier gain; MI,

糖尿病性神経障害は、糖尿病慢性合併症の中で最も頻繁にみられる合併症であるが<sup>1)</sup>、その成因は今日なお不明である。しかしながら、糖尿病性神経障害が血糖コントロール不良群により多くみられることから<sup>2)</sup>、その発症・進展には高血糖状態が第一義的な役割を果たしていることは明らかである。

近年、糖尿病性神経障害の成因として神経内のソルビトール蓄積が提唱されている。ソルビトールは、グルコース代謝経路のうち、



で示される、いわゆるソルビトール経路の中間代謝産物である(ただし、NADPHは、nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form, NADPは、nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADは、nicotinamide adenine dinucleotide, NADHは、nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form)。ソルビトールは、アルドースリダクターゼ、すなわちアルドース還元酵素(aldehyde reductase, AR; EC 1.1.1.21)によりグルコースから還元されて生じ、ソルビトール脱水素酵素(sorbitol dehydrogenase, SDH; EC 1.1.1.14)によりフルクトースへ徐々に代謝される。高血糖下でAR活性が上昇するため、糖尿病状態ではこの経路を有する組織においてソルビトールが多量に生成される。末梢神経にもこのソルビトール経路が存在し<sup>3)-5)</sup>、糖尿病動物の坐骨神経<sup>6)-8)</sup>のみならず糖尿病患者の末梢神経<sup>9)-11)</sup>においてもソルビトールの過剰蓄積が報告されている。このような観点から、AR活性を阻害してソルビトール生成を減少される目的でアルドースリダクターゼ阻害剤が種々開発され<sup>12)</sup>、今日糖尿病動物<sup>13)-21)</sup>のほかヒト<sup>22)-31)</sup>においても神経障害に対する治療効果が検討されている。

しかしながら、糖尿病動物の末梢神経における代謝異常としては、ソルビトール蓄積以外にミオイノシトール減少も観察されている<sup>32)</sup>。最近、Greeneら<sup>33)</sup>は、糖尿病動物において運動神経伝導速度(motor nerve conduction velocity, MNCV)の遅延が神経内ミオイノシトール欠乏と対応すること、またミオイノ

シトール添加食投与により両者がともに改善することを観察し、糖尿病性神経障害の成因としてむしろミオイノシトール減少の方が重要であると報告した。

一方、最近糖尿病ラットを用いた生体内の実験において、アルドースリダクターゼ阻害剤にはソルビトール蓄積抑制作用のみならずミオイノシトール欠乏改善作用もあることが示唆されて<sup>34)</sup>、ソルビトール・ミオイノシトール両代謝の相互関連性の可能性も提唱されるに至った<sup>35)(36)</sup>。

そこで本研究では、アルドースリダクターゼ阻害剤の神経内ソルビトール蓄積および神経へのミオイノシトール取り込みに与える影響を単離ラット坐骨神経を用いた試験管内の実験系で検討した。

ところで、糖尿病動物を用いた実験において、神経内ソルビトール濃度は赤血球内ソルビトール濃度と相関することが示されている<sup>16)(37)(38)</sup>。したがって赤血球内ソルビトールは、神経内ソルビトールの指標として有用であるとも考えられ、その測定は神経内ソルビトール代謝解明の上からも興味のあるところである。これに対して、ミオイノシトールは、赤血球内にも存在することが知られてはいるが<sup>39)</sup>、その代謝の詳細などはほとんど不明である。

そこで本研究では、ヒト赤血球におけるソルビトール代謝およびミオイノシトール代謝を試験管内および生体内で検討し、あわせてアルドースリダクターゼ阻害剤の両代謝への影響についても検討を加えた。

### 対象および方法

#### 1. ラット坐骨神経におけるミオイノシトール取り込みおよびソルビトール濃度の検討

高濃度グルコース下における単離ラット坐骨神経へのミオイノシトール取り込みとソルビトール濃度の変化をアルドースリダクターゼ阻害剤添加との関連で試験管内で検討した。

##### 1. 対象

正常ウィスター系ラット(雄、500~700g)を使用した。

##### 2. 坐骨神経

ペントバルビタール(60mg/kg体重、腹腔内注射)麻酔下に各ラットから両側坐骨神経を単離し、Gillonら<sup>40)</sup>の方法にしたがってendoneurial preparationを

myo-inositol; MNCV, motor nerve conduction velocity; MS, multi-ion selection; NAD, nicotinamide adenine dinucleotide; NADH, nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form; NADP, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form; Na-K-ATPase, sodium-potassium-adenosine

作製した。すなわち、まず神経を7 mg/dl コラーゲンナーゼ (type I, Sigma 社, St. Louis, MO, USA), 90 mg/dl グルコース, 4% ウシ血清アルブミン (fraction V, essentially fatty acid free, Sigma 社) を含む Krebs-Ringer bicarbonate (KRB) 緩衝液 (pH 7.4) 5 ml 中で37°C, 14分間インキュベートした。インキュベーション終了後、神経を200カリクレイン抑制単位/ml アプロトニン (Sigma 社) を含む KRB 緩衝液で中和洗浄した。次に、顕微鏡下にピンセットを用いて、神経周囲の結合織などを除去して endoneurial preparation とし、電子てんびん AE 240 (Mettler 社, Zürich, Switzerland) で秤量し、以下の実験に供した。なお、神経の両断端は、熱凝固器を用いて凝固した。

3. 坐骨神経におけるミオイノシトール取り込みおよびソルビトール濃度に与える培地グルコースおよびアルドースリダクターゼ阻害剤の影響

まず、神経を90 mg/dl グルコースを含む KRB 緩衝液に浮置し、O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>(19:1) 気相下にそれぞれ37°C, 60分間プレインキュベートした。次に、神経へのミオイノシトール取り込みをNa (ナトリウム) 依存性と Na 非依存性に分けて検討するため、各ラット右脚から単離した神経を KRB 緩衝液に、左脚から単離した神経を、KRB 中の Na をコリンに置換した溶液 (以下、コリン溶液) に浮置し、O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>(19:1) 気相下にそれぞれ37°C, 60分間インキュベートした。これらの溶液のミオイノシトール濃度は5~1000 μM, グルコース濃度は90~450 mg/dl とし、一部にはさらにアルドースリダクターゼ阻害剤を1~100 μM となるように添加した。各溶液には、2-[<sup>3</sup>H]-ミオイノシトール {specific activity 370~740 GBq (10~20 Ci)/mmol, New England Nuclear 社, Boston, MA, USA} を37 KBq (1 μCi)/ml, および神経への非特異的取り込み (細胞間隙への取り込み) を除外するため1-[<sup>14</sup>C]-マンニトール {specific activity 1665~2035 MBq (45~55 mCi)/mmol, New England Nuclear 社} を9.25 KBq (0.25 μCi)/ml 加えた<sup>4)</sup>。アルドースリダクターゼ阻害剤としては、ONO-2235 {5-[1E, 2E)-2-methyl-3-phenylpropenylidene]-4-oxo-2-thioxo-3-thiazolidine-acetic acid} (小野薬品, 大阪) を使用した<sup>1)</sup>。インキュベーション終了後、神経を KRB 緩衝液ないしコリン溶液ですすいでから10 ml 用ホモジナイザー容器に移

し、さらに除タンパクのため冷8%過塩素酸溶液5 ml を加えた。この中に鉤付きガラス棒を挿入して3分間ホモジナイズし、全体を試験管に移して3000回転/分、10分間遠心し、上清を放射能とソルビトール濃度の測定に供した。

1) 坐骨神経内ミオイノシトール取り込み率の測定

上記の上清1.0 ml に液体シンチレーター ACS II (Amersham Japan 社, 東京) 10 ml を加え、液体シンチレーションカウンター LSC-700 (Aloka 社, 東京) で、<sup>3</sup>H および <sup>14</sup>C の放射能を同時計測した。一方、培地溶液についても除タンパク後、同様に液体シンチレーターを加え、<sup>3</sup>H および <sup>14</sup>C の放射能を計測した。神経細胞内への特異的ミオイノシトール取り込み量は、坐骨神経の2-[<sup>3</sup>H]-ミオイノシトール量全体から細胞間隙の、すなわち1-[<sup>14</sup>C]-マンニトール・スペースの2-[<sup>3</sup>H]-ミオイノシトール量 (非特異的取り込み) を差し引くことで算出し、単位重量(g)あたりの値で表した。

2) 坐骨神経内ソルビトール濃度の測定

上記の上清を2 N炭酸カリウムで中和し、そのソルビトール濃度を酵素法<sup>4)</sup>で測定した。中和上清0.48 ml を0.25 Mグリシン緩衝液 (pH 7.5) 0.40 ml に加え、12 mM NAD (grade III, イースト由来, Sigma 社) 0.1 ml, 22単位/ml ソルビトールデヒドロゲナーゼ溶液 (ヒツジ肝由来, Sigma 社) 20 μl とともに37°C, 40分間インキュベートした。この混合液のインキュベーション前後の蛍光強度を蛍光吸光度計650-40 (日立製作所, 日立) を用いて励起波長350 nm (スリット15 nm), 発光波長440 nm (スリット6 nm) の条件で測定して、新たに生じた NADH 量を求めた。同様にしてソルビトール標準サンプル希釈系について検量線を作成し、各サンプル中のソルビトール絶対濃度を算出し、単位重量(g)あたりの量で表した。

4. 坐骨神経へのミオイノシトール取り込みに与える神経内ソルビトールの影響

ラットを3群に分け、単離した神経を90, 450または900 mg/dl グルコースを含む KRB 緩衝液にそれぞれ浮置し、O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>(19:1) 気相下に37°C, 60分間プレインキュベートした。これによりソルビトール含量の比較的少ない神経の群から比較的多い神経の群までの3群 (A, B および C群) を作製した。次に、前記のように各群とも右脚から単離した神経を50 μM 2-[<sup>3</sup>H]-ミオ

triphosphatase; OGTT, oral glucose tolerance test; SDH, sorbitol dehydrogenase; SNCV, sensory nerve conduction velocity; TIC, total ion current; Vmax, maximum initial velocity

イノシトール/90mg/dl グルコース/KRB 緩衝液に、左脚から単離した神経を同コリン溶液にそれぞれ浮置し、 $O_2/CO_2(19:1)$  気相下に $37^\circ C$ 、60分間インキュベートした。インキュベーション終了後、前記のように処理して神経内へのミオイノシトール取り込み量を求めた。

## II. ヒト赤血球におけるミオイノシトール取り込みおよびソルビトール濃度の試験管内での検討

高濃度グルコース下におけるヒト赤血球へのミオイノシトール取り込みとソルビトール濃度の変化をアルドースリダクターゼ阻害剤添加との関連で試験管内で検討した。

### 1. 対象

健康者から採取した血液の赤血球を対象とした。

### 2. 赤血球

早朝空腹時に、肘静脈よりヘパリン採血して3000回転/分、10分間、 $4^\circ C$ で遠心し、血漿と白血球層を取り除いた。赤血球は、冷 KRB 緩衝液で2回遠心洗浄してから以下の実験に供した。

3. 赤血球におけるミオイノシトール取り込みおよび赤血球ソルビトール濃度に与える培地グルコースおよびアルドースリダクターゼ阻害剤の影響

まず、赤血球を90mg/dl グルコースを含む KRB 緩衝液に浮置し、 $O_2/CO_2(19:1)$  気相下に $37^\circ C$ 、60分間プレインキュベートした。次に、赤血球へのミオイノシトール取り込みを Na 依存性と Na 非依存性に分けて検討するため、赤血球を KRB 緩衝液、またはコリン溶液に浮置し、 $O_2/CO_2(19:1)$  気相下にそれぞれ $37^\circ C$ 、60分間インキュベートした。これらの溶液のミオイノシトール濃度は、 $5 \mu M \sim 750mM$ 、グルコース濃度は $90 \sim 450mg/dl$  とし、一部にはさらにアルドースリダクターゼ阻害剤を $100 \mu M$  となるように添加した。各溶液には、 $2 \cdot [^3H]$ -ミオイノシトール {specific activity,  $370 \sim 740 GBq (10 \sim 20 Ci)/mmol$ , New England Nuclear 社} を $37KBq (1 \mu Ci)/ml$  加えた。アルドースリダクターゼ阻害剤としては、ONO-2235 および ICI-128,436 [3-(4-bromo-2-fluorobenzyl)-4-oxo-3H-phthalazin-1-ylacetic acid]<sup>19)</sup>(アイ・シー・アイファーマ製薬、大阪)を使用した。インキュベーション終了後、赤血球を KRB 緩衝液ないしコリン溶液で2回遠心洗浄し、赤血球のうち0.5ml を試験管に移して除タンパクのため冷10%過塩素酸溶液1.5ml を加えて振盪し、さらに超音波粉碎器 UR 200P (Tomy-Seiko 社、東京)を用いて60秒間ソニケートした。同液を3000回転/分、10分間遠心し、上清をアイソトープ活性とソルビトール濃度の測定に供した。ま

た、赤血球のうち $20 \mu l$  をヘモグロビン発色液5.0ml (Hemoglobin B-test, 和光純薬工業、大阪)に入れて、 $540nm$  でヘモグロビン濃度を比色定量した。

### 1) 赤血球内ミオイノシトール取り込み率の測定

上記の上清0.5ml に液体シンチレーター ACS II 10 ml を加え、液体シンチレーションカウンターで、 $^3H$ の放射能を計測した。一方、培地溶液についても5%硫酸亜鉛および0.3N 水酸化バリウムで除タンパク後、同様に液体シンチレーターを加え、 $^3H$ の放射能を計測した。これらの値より、赤血球へのミオイノシトール取り込み量を算出し、単位ヘモグロビン(gHb)あたりの値で表した。

### 2) 赤血球内ソルビトール濃度の測定

上記の上清を2N炭酸カリウム溶液で中和し、そのソルビトール濃度を酵素法<sup>20)</sup>で測定した。中和上清0.48ml を0.25M グリシン緩衝液(pH 7.5) 0.40ml に加え、12mM NAD (grade III, イースト由来, Sigma 社) 0.1ml, 22単位/ml ソルビトールデヒドロゲナーゼ溶液(ヒツジ肝由来, Sigma 社)  $20 \mu l$  とともに $37^\circ C$ 、40分間インキュベートした。この混合液のインキュベーション前後の蛍光強度を神経内ソルビトールの測定方法と同様の条件で測定し、標準サンプルの検量線より各サンプル中のソルビトール絶対濃度を算出し、単位ヘモグロビン(gHb)あたりの値で表した。

4. 赤血球へのミオイノシトール取り込みに与える赤血球内解糖抑制の影響

赤血球へのミオイノシトール取り込みにおけるエネルギー依存性の有無を検討するため、赤血球内の解糖を抑制した上で赤血球へのミオイノシトール取り込みを測定した。すなわち、まず赤血球を90mg/dl グルコース溶液、グルコースを含有しない溶液、または2mg/ml フッ化ソーダ(sodium fluoride, NaF)を含む90mg/dl グルコース溶液にそれぞれ浮置し、 $O_2/CO_2(19:1)$  気相下に $37^\circ C$ 、180分間プレインキュベートした。次に、 $50 \mu M 2 \cdot [^3H]$ -ミオイノシトール/90mg/dl グルコース/KRB 緩衝液ないしコリン溶液にそれぞれ浮置し、 $O_2/CO_2(19:1)$  気相下に $37^\circ C$ 、60分間インキュベートした。インキュベーション終了後、前記のように処理して赤血球へのミオイノシトール取り込み量を求めた。

5. 赤血球内ソルビトールに対するアルドースリダクターゼ阻害剤の阻害活性

アルドースリダクターゼ阻害剤の赤血球ソルビトール蓄積に対する阻害活性を検討するため、赤血球を450mg/dl グルコース/KRB 緩衝液、またはそれにアルドースリダクターゼ阻害剤を添加した溶液に浮置

し、 $O_2/CO_2(19:1)$  気相下に  $37^\circ C$ 、60分間インキュベートした。インキュベーション終了後、前記のように処理して、赤血球内ソルビトール濃度を測定した。また、インキュベーション前の赤血球についてもソルビトール濃度を測定した。

### III. ヒト赤血球におけるソルビトール濃度およびミオイノシトール濃度の生体内での検討

腎障害のない糖尿病患者を対象に、経口ブドウ糖負荷試験または食事負荷試験を施行し、高血糖下における赤血球内ミオイノシトール濃度および赤血球内ソルビトール濃度の変動をアルドースリダクターゼ阻害剤(ONO-2235, ICI-128,436)投与との関連で検討した。

#### 1. 対象

##### 1) ONO-2235 の赤血球内ソルビトールに対する影響

タイプ2 (インスリン非依存型) 糖尿病患者11例(男性9例, 女性2例)を対象とした。平均年齢は  $55.5 \pm 2.6$  歳, 罹病年数は  $6.9 \pm 1.8$  年であった。

##### 2) ONO-2235 の赤血球内ミオイノシトールに対する影響

タイプ2 (インスリン非依存型) 糖尿病患者4例(男性1例, 女性3例) およびタイプ1 (インスリン依存型) 糖尿病患者1例(女性)の5例を対象とした。平均年齢は  $56.2 \pm 3.1$  歳, 罹病年数は  $8.4 \pm 3.2$  年であった。

##### 3) ICI-128,436 の赤血球内ソルビトールおよび赤血球内ミオイノシトールに対する影響

タイプ2 (インスリン非依存型) 糖尿病患者6例(男性のみ)を対象とした。平均年齢は  $59.3 \pm 4.8$  歳, 罹病年数は  $12.5 \pm 3.7$  年であった。

#### 2. プロトコール

##### 1) ONO-2235 の赤血球内ソルビトールに対する影響

各例に対して  $75g$  oral glucose tolerance test (OGTT) を、1回目は ONO-2235 非投与で、2回目はその2~4週間後に糖負荷30分前に ONO-2235 (200mg) を経口投与して施行した。糖負荷直前, 負荷後30分, 60分, 90分, 120分および180分に ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA) 採血し、それぞれをただちに3000回転/分, 10分間,  $4^\circ C$  で遠心し、血漿を分離し、赤血球はさらに冷生理的食塩水で3回遠心洗浄した。血漿はグルコースの、赤血球はグルコースおよびソルビトールの測定に供した。なお、2回目の血漿については ONO-2235 濃度を測定した。

##### 2) ONO-2235 の赤血球内ミオイノシトールに対する影響

各例に対して食事負荷試験を、1回目は ONO-

2235 非投与で2回目はその2週後に食前30分に ONO-2235 (200mg) を経口投与して施行した。食前, および食後120分に EDTA 採血し、それぞれ前記と同様に処理した。血漿はグルコースおよびミオイノシトールの、赤血球はミオイノシトールの測定に供した。なお、2回目の血漿については ONO-2235 濃度を測定した。

##### 3) ICI-128,436 の赤血球内ソルビトールおよび赤血球内ミオイノシトールに対する影響

各例に対して食事負荷試験を、1回目は ICI-128,436 非投与で、2回目はその2週後に食前30分に ICI-128,436 (150,300または600mg) を経口投与して施行した。食前, 食後60分, 150分および210分に EDTA 採血し、それぞれ前記と同様に処理した。血漿はグルコースおよびミオイノシトールの、赤血球はグルコース, ソルビトール, およびミオイノシトールの測定に供した。なお、2回目の血漿については ICI-128,436 濃度を測定した。

#### 3. 糖類の測定

##### 1) 血糖値

血漿サンプルの血糖値をグルコースオキシダーゼ法で測定した。

##### 2) 血漿ミオイノシトール濃度

血漿  $0.25ml$  に  $5\%$  硫酸亜鉛  $1.0ml$  を加えて振盪した後、さらに  $0.3N$  水酸化バリウム  $1.0ml$  を加えて再振盪して遠心した。遠心後の上清  $0.25ml$  をガラスチューブに入れて  $\alpha$ -メチル-D-マンノピラノシッド  $35\mu g$  を内標準物質として加え、チッ素ガス気流下に  $80^\circ C$  で蒸発乾固した。さらにデシケーター内で12時間乾燥させた後、ピリジン  $40\mu l$ , ヘキサメチルジシラザン  $32\mu l$ , トリメチルクロロシラン  $16\mu l$  を添加してサンプルをトリメチルシリル化した。その約  $3\mu l$  をガスクロ質量分析計 M-80 (日立製作所) に注入し、total ion current (TIC) および multi-ion selection (MS) による検出を行なった。カラムには  $2\%$  OV-1 (担体, Uniport HP; 担体粒度, 60/80)  $1m$  を使用し、カラム温度は  $180^\circ C$  一定とした。インターフェース温度および注入部温度はいずれも  $250^\circ C$  とした。MG 値は  $1.5kV$ , IV 値は  $20eV$  とした。キャリアーガスにはヘリウムガス ( $40ml/分$ ) を使用した。トリメチルシリル化ミオイノシトールのマススペクトラムは図1に示すとおりで、 $m/e$  217 で最大活性が得られた。血漿のトリメチルシリル化合物のガスクロマトグラム (TIC) を図2に示す。保持時間4分20秒付近にミオイノシトールが検出され、その  $m/e$  217 のマスキングマトグラムを付属のコンピューター・システム M-003 (日立製作

所)を用いて面積定量した。保持時間40秒付近に内標準物質 $\alpha$ -メチルーD-マンノピラノシッドが検出され、その m/e 204 のマスプロトグラムを面積定量し、両者の比よりミオイノシトール量の補正を行った。同様にミオイノシトール標準サンプル希釈系について検量線を作成し、各血漿サンプル中のミオイノシトール絶対濃度を算出した。

3) 赤血球内グルコース濃度

赤血球0.5mlを冷10%過塩素酸溶液1.5mlで除タンパク後、上清を2N炭酸カリウム溶液で中和し、そのグルコース濃度を Bergmeyer らの方法<sup>4)</sup>に準じて測定した。すなわち、グルコースについては、中和上清200 $\mu$ lを0.3M トリエタノラミン緩衝液(pH 7.5; 3 mM 硫酸マグネシウム) 2.5 ml, 150 mM adenosine triphosphate (ATP)/12mM NADP 溶液200 $\mu$ lと混合してキュベットに入れてから1 mg/ml グルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ(オリエンタルイースト社, 吹田)液20 $\mu$ l, 1 mg/ml ヘキシキナーゼ(オリエン

タルイースト社)液20 $\mu$ lを添加し、366nmで添加前後の吸光度を測定して生成したNADPH量を求めた。同様にグルコース標準サンプル希釈系について検量線を作成し、各サンプル中のグルコース絶対濃度を算出した。吸光度計は、UV-190(島津製作所, 京都)を使用した。

4) 赤血球内ソルビトール濃度

上記の中和上清0.48mlについて前記のように酵素法<sup>4)</sup>を用いて測定した。

5) 赤血球内ミオイノシトール濃度

赤血球100 $\mu$ lに10%トリクロロ酢酸900 $\mu$ lを加えて振盪し、さらに超音波粉砕器 UR 200P (Tomy-Seiko 社)を用いて60秒間ソニケートした。同液を3000回転/分、10分間遠心し、上清0.5mlを分離ロートに入れて $\alpha$ -メチルーD-マンノピラノシッド35 $\mu$ gを内標準物質として加えた。さらに、トリクロロ酢酸を除去するためジエチルエーテル10mlを加えて振盪洗浄を4回繰り返し、同液をガラスチューブに移

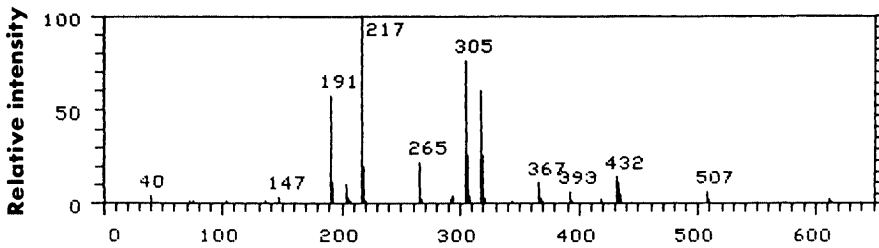


Fig. 1. Mass spectrum for trimethylsilyl-derivatives of myo-inositol. It shows a base peak at m/e 217.

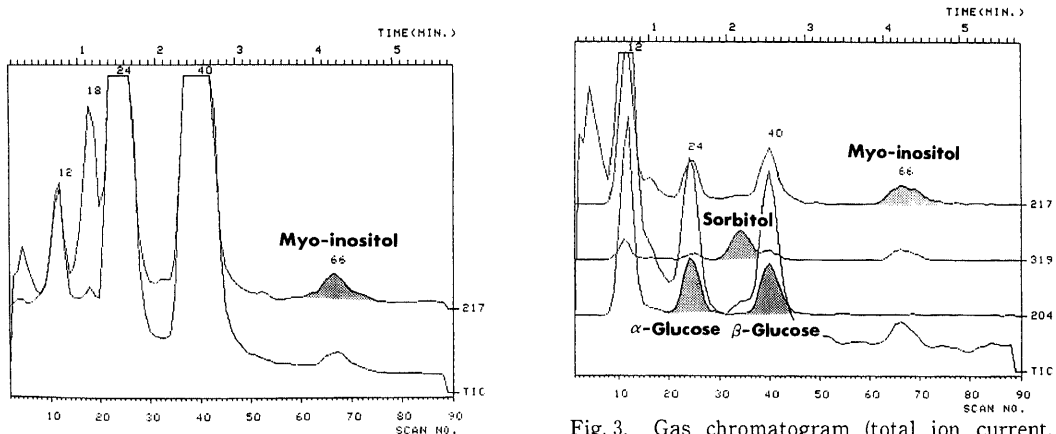


Fig. 2. Gas chromatogram (total ion current, TIC) and mass chromatogram of trimethylsilyl-derivatives of plasma. Shaded area represents mass chromatogram of m/e 217 for trimethylsilyl-derivatives of myo-inositol.

Fig. 3. Gas chromatogram (total ion current, TIC) and mass chromatogram of trimethylsilyl-derivatives of erythrocytes. Shaded areas represent mass chromatograms of m/e 217, 319 and 204 for trimethylsilyl-derivatives of myo-inositol, sorbitol and glucose, respectively.

し、チッ素ガス気流下で80°Cで蒸発乾固した。さらにデシケーター内で12時間乾燥させた後、前記のようにトリメチルシリル化した。その約3  $\mu$ l をガスクロ質量分析計 M-80 (日立製作所) に注入し、血漿ミオイノシトールと同様に TIC および MS による検出を行い (図3)、ミオイノシトール絶対濃度を算出した。

なお、各赤血球サンプルへのヘモグロビン濃度を前記の方法で求め、赤血球グルコース、ソルビトール、およびミオイノシトールは、いずれも単位ヘモグロビン (gHb) あたりの値で表した。

4. 血漿中のアルドースリダクターゼ阻害剤濃度の測定

1) ONO-2235 濃度

血漿をエタノール抽出した後、ラットレンズ AR に対する阻害活性を測定して血漿 ONO-2235 濃度を算出した。

2) ICI-128,436 濃度

血漿を除タンパクした後、高速液体クロマトグラフィを用いて分析して血漿 ICI-128,436 を測定した。

IV. 統計処理

データは、いずれも平均値  $\pm$  SEM で表した。有意差検定には、Student's t-test, one-way ANOVA, two-way ANOVA, Mann-whitney u-test を適宜用い、p値5%以下を有意とした。また、回帰直線は、最小二乗法を用いて求めた。

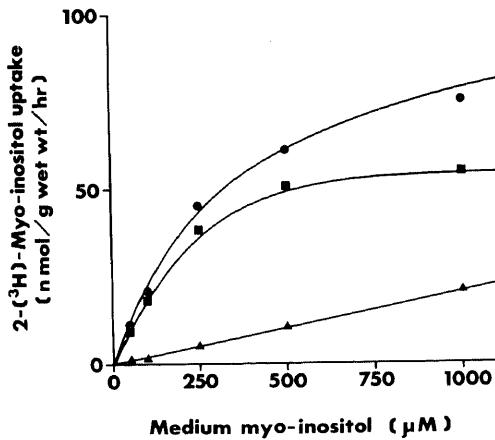


Fig. 4. Intracellular 2- $^{3}\text{H}$ -myo-inositol uptake by isolated rat sciatic nerve as a function of medium myo-inositol concentration. Solid circle (●) represents total myo-inositol uptake, solid triangle (▲) Na-independent myo-inositol uptake and solid square (■) Na-dependent myo-inositol uptake. Medium glucose concentration was 90 mg/dl. Each point represents the mean of at least 4 determinations.

成 績

I. ラット坐骨神経における検討

1. ミオイノシトール取り込み率

1) 取り込み様式

ラット坐骨神経へのミオイノシトール取り込み率と

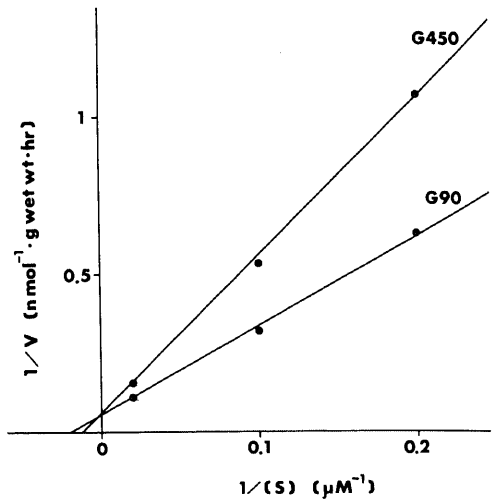


Fig. 5. Lineweaver-Burk plot of  $1/V$  against  $1/[S]$  for Na-dependent myo-inositol uptake by isolated rat sciatic nerve. The reciprocal of Na-dependent myo-inositol uptake ( $1/V$ ) measured in the presence of 90 mg/dl glucose (G90) and 450 mg/dl glucose (G450) was plotted as a function of the reciprocal of medium myo-inositol concentration ( $1/[S]$ ).

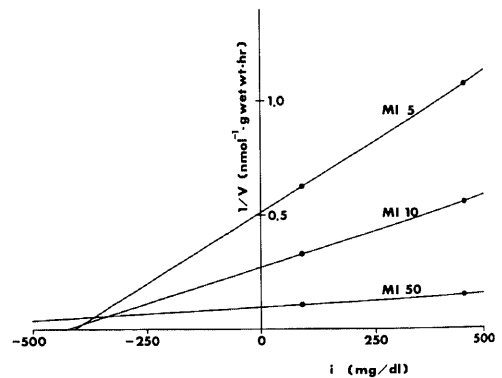


Fig. 6. Dixon plot of  $1/V$  against  $i$  for Na-dependent myo-inositol uptake by isolated rat sciatic nerve. The reciprocal of Na-dependent myo-inositol uptake ( $1/V$ ) measured at medium myo-inositol concentration of 5, 10 and 50  $\mu$ M myo-inositol was plotted as a function of medium glucose concentration ( $i$ ).



培地ミオイノシトール濃度との関係を図4に示す。Total とは KRB 緩衝液で, Na 非依存性とはコリン溶液でそれぞれインキュベートした場合である。両者の差が Na 依存性である。Na 依存性ミオイノシトール取り込みは, 培地ミオイノシトール低濃度領域では直線的に増加し, 約500 $\mu$ M でプラトーに達する飽和曲線を描いた。これに対して, Na 非依存性ミオイノシトール取り込みは, 少なくともテストした1000 $\mu$ M までは培地ミオイノシトール濃度にしたがって直線的に増加した。すなわち, 神経へのミオイノシトール取り込み様式には, Na 依存性で飽和性のものと Na 非依存性で非飽和性のものの2種類が区別された。量的には, 培地ミオイノシトール濃度50 $\mu$ M の場合は Na 依存性が91%, Na 非依存性が9%, 培地ミオイノシトール濃度500 $\mu$ M の場合は Na 依存性が81%, Na 非依存性が19%であり, いずれも Na 依存性が大半を占めた。

2) 培地グルコースの影響

Na 依存性取り込み率と培地ミオイノシトール濃度

Table 1. Estimates of kinetic parameters of Na-dependent myo-inositol uptake into sciatic nerve

Medium glucose (mg/dl)	Vmax (nmol/g/hr)	Kt ( $\mu$ M)
Lineweaver-Burk analysis		
90	22.6	65.5
450	21.4	110.7
Eadie-Hofstee analysis		
90	19.9	55.8
450	20.5	105.4

の関係を Lineweaver-Burk 方式でプロットした結果を図5に示す。培地グルコース濃度が90mg/dl の場合の直線より450mg/dl の場合の直線の方が傾きが急峻で, 両直線は縦軸上の1点で交差した。一方, Na 依存性取り込み率と培地グルコース濃度との関係を Dixon 方式でプロットした結果を図6に示す。培地ミオイノシトール濃度5, 10および50 $\mu$ M の3直線は, 横軸上ではなく縦軸の左側すなわち第2象限において交差した。以上のことから, ラット坐骨神経における Na 依存性ミオイノシトール取り込みは, グルコースによって抑制を受け, その抑制方式は競合性 (拮抗性) であることが示された。

Kinetic analysis の結果を表1に示す。培地グルコース濃度90mg/dl の場合, Michaelis の定数 Kt (Km) は, Lineweaver-Burk 方式からは 65.5 $\mu$ M, Eadie-Hofstee 方式からは55.8 $\mu$ M であった。培地グルコース濃度90mg/dl の場合, 最大速度 Vmax は, Lineweaver-Burk 方式からは 22.6nmol/g/hr, Eadie-Hofstee 方式からは19.9nmol/g/hr であった。また, 抑制定数 Ki (glucose) は, Dixon 方式から366 mg/dl であった(図6)。

培地ミオイノシトール濃度を50 $\mu$ M とした場合のミオイノシトール取り込み率を表2に示す(このミオイノシトール濃度においては, 図4に示したように Na 依存性および非依存性取り込み率は培地ミオイノシトール濃度に対して直線性が保たれた)。Na 依存性ミオイノシトール取り込み率は, グルコース濃度450 mg/dl でインキュベートした場合 (G450) は, グルコース濃度90mg/dl でインキュベートした場合 (G90) より有意に低値であり, 約32%の低下を呈した (unpaired t-test, p<0.01)。これに対して, Na 非依存性ミオイノシトール取り込み率は, 培地グルコース濃

Table 2. Effect of AR inhibitor on 2-[<sup>3</sup>H]-myo-inositol uptake into sciatic nerve

Group	n	2-[ <sup>3</sup> H]-myo-inositol uptake rate (nmol/g wet wt/hr)	
		Na-dependent	Na-independent
G90	10	10.53 $\pm$ 0.68	0.81 $\pm$ 0.08
G450	14	7.21 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>	0.83 $\pm$ 0.07
G450/ONO-2235 1 $\times$ 10 <sup>-6</sup> M	8	6.73 $\pm$ 0.37 <sup>b</sup>	0.72 $\pm$ 0.11
G450/ONO-2235 1 $\times$ 10 <sup>-5</sup> M	9	8.98 $\pm$ 0.40 <sup>c</sup>	0.73 $\pm$ 0.05
G450/ONO-2235 1 $\times$ 10 <sup>-4</sup> M	12	10.20 $\pm$ 0.54 <sup>d</sup>	0.81 $\pm$ 0.08

Medium myo-inositol concentration was 50  $\mu$ M.

a, p<0.01 vs G90; b, p<0.001 vs G90; c, p<0.01 vs G450;

d, p<0.001 vs G450.

度の変動によって変化せず, G90, G450間に有意差はなかった。

### 3) アルドースリダクターゼ阻害剤添加の影響

表2に示すように, G450の培地にアルドースリダクターゼ阻害剤 ONO-2235 を添加すると, グルコースによって抑制された Na 依存性ミオイノシトール取り込み低下は, ONO-2235 濃度依存性に改善され,  $100 \mu\text{M}$  ( $1 \times 10^{-4} \text{M}$ ) では G90 とほぼ同程度となった。これに対して, Na 非依存性ミオイノシトール取り込みは, ONO-2235 添加によって有意の変化は示さなかった。

### 4) 神経内ソルビトール濃度の影響

坐骨神経をグルコース濃度の異なる3種類の培地であらかじめプレインキュベートして作製したソルビトール濃度高低3群の同一条件下でのミオイノシトール

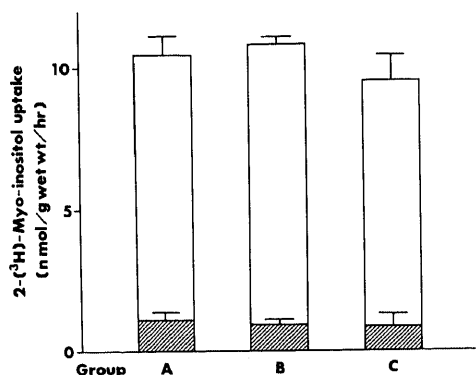


Fig. 7. Effect of increase in nerve sorbitol concentration on Na-dependent (unfilled area) and Na-independent (hatched area) myo-inositol uptake into nerve. Nerve preparations were incubated for 60 min with  $50 \mu\text{M}$  myo-inositol/90 mg/dl glucose after preincubation for 60 min in 90 (A), 450 (B) or 900 mg/dl glucose (C).

ル取り込み率を one-way ANOVA で比較したが, 3群間に差は認められなかった ( $F=1.018$ , NS; 図7)。

### 2. ソルビトール濃度

前記のミオイノシトール取り込みと同時に測定した各インキュベーション後のソルビトール濃度を表3に示す。G450はG90より有意に高値であった (unpaired t-test,  $p < 0.001$ )。G450に ONO-2235 を添加した群では, ソルビトール値は ONO-2235 の濃度に依存して低下し,  $1 \times 10^{-4} \text{M}$  添加群は G450 との間に有意差を認めた (unpaired t-test,  $p < 0.01$ )。また,  $\text{IC}_{50}$ , すなわち G450 におけるソルビトール増加を 50% に抑制するのに必要な ONO-2235 の濃度は,  $6.3 \times 10^{-5} \text{M}$  であった。

### II. ヒト赤血球試験管内における検討

#### 1. ミオイノシトール取り込み率

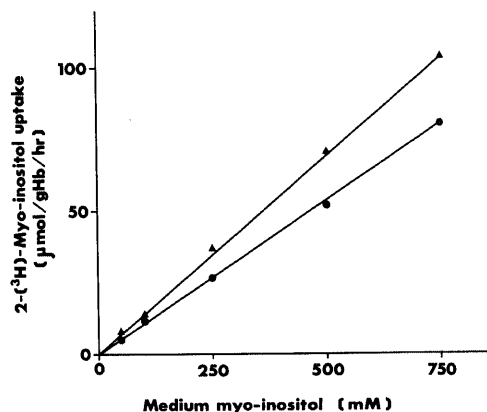


Fig. 8. Intracellular 2- $[^3\text{H}]$ -myo-inositol uptake by erythrocytes as a function of medium myo-inositol concentration. Solid circle (●) represents total myo-inositol uptake and solid triangle (▲) Na-independent myo-inositol uptake. Medium glucose concentration was 90 mg/dl. Each point represents the mean of at least 4 determinations.

Table 3. Effect of AR inhibitor on sorbitol accumulation in sciatic nerve

Group	n	Nerve sorbitol	
		Concentration ( $\mu\text{mol/g wet wt}$ )	% Change in accumulation
Basal	4	$0.076 \pm 0.006$	—
G90	10	$0.077 \pm 0.006$	—
G450	14	$0.127 \pm 0.004^a$	0
G450/ONO-2235 $1 \times 10^{-6} \text{M}$	8	$0.129 \pm 0.011^a$	+4
G450/ONO-2235 $1 \times 10^{-5} \text{M}$	9	$0.112 \pm 0.013^b$	-29
G450/ONO-2235 $1 \times 10^{-4} \text{M}$	12	$0.094 \pm 0.008^c$	-65

a,  $p < 0.001$  vs G90; b,  $p < 0.05$  vs G90; c,  $p < 0.01$  vs G450.

1) 取り込み様式

赤血球へのミオイノシトール取り込み率と培地ミオイノシトール濃度との関係を図8に示す。ミオイノシトール取り込み率は、KRB緩衝液でインキュベートした場合がコリン溶液でインキュベートした場合より常に低値であった。すなわち、赤血球におけるミオイノシトール取り込みはNa非依存性であって、Naの存在はその取り込みをむしろ抑制した。Na非依存性ミオイノシトール取り込みは、培地ミオイノシトール濃度にしたがって直線的に増加し、ミオイノシトールの溶解度(14g/dl, 25°C)に近い極端な高濃度である750mMにおいてもプラトーを呈さなかった。

2) 培地グルコースの影響

Na非依存性取り込みと培地ミオイノシトール濃度の関係をLineweaver-Burk方式でプロットした結果を図9に示す。培地グルコース濃度の0から450mg/dlへの増加にしたがって直線の傾きが急峻化し、培地グルコースによってNa非依存性ミオイノシトール取り込みの低下することが示された。しかし、直線は、軸上の一点で交差せず、原点に集束した。

3) アルドースリダクターゼ阻害剤添加の影響

G90, G450および後者にONO-2235またはICI-128,436を $1 \times 10^{-4} M$ 添加した群におけるNa非

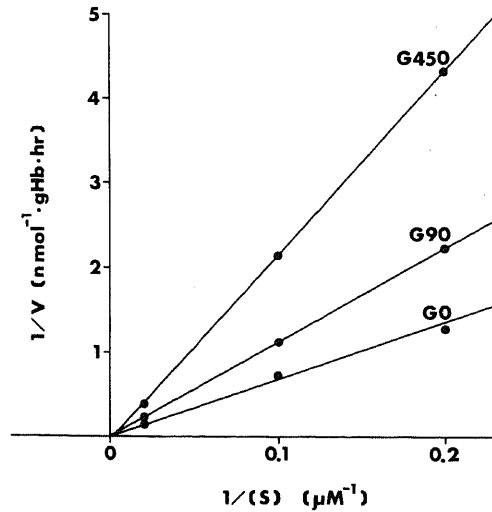


Fig. 9. Lineweaver-Burk plot of 1/V against 1/[S] for Na-independent myo-inositol uptake by erythrocytes. The reciprocal of Na-independent myo-inositol uptake (1/V) measured in the absence (G0) or presence of 90 mg/dl glucose (G90) and 450 mg/dl (G450) was plotted as a function of medium myo-inositol concentration (1/[S]).

Table 4. Effect of AR inhibitor on Na-independent 2-[<sup>3</sup>H]-myo-inositol uptake into erythrocytes

Group	n	2-[ <sup>3</sup> H]-myo-inositol uptake rate (nmol/gHb/hr)
G90	5	4.94 ± 0.17
G450	5	3.03 ± 0.29 <sup>a</sup>
G450/ONO-2235 $1 \times 10^{-4} M$	5	3.24 ± 0.26 <sup>a</sup>
G450/ICI-128,436 $1 \times 10^{-4} M$	5	3.03 ± 0.23 <sup>a</sup>

Medium myo-inositol concentration was 50 μM.  
a, p < 0.01 vs G90.

Table 5. Effect of inhibition of erythrocyte glycolytic pathway on Na-independent 2-[<sup>3</sup>H]-myo-inositol uptake into erythrocytes

Preincubation condition	n	2-[ <sup>3</sup> H]-myo-inositol uptake rate (nmol/gHb/hr)
G90	3	5.99 ± 0.25
G0	3	5.40 ± 0.12
G90/NaF	3	5.52 ± 1.24

Erythrocytes were incubated for 60 min with 50 μM 2-[<sup>3</sup>H]-myo-inositol/90 mg/dl glucose after preincubated for 180 min in 90 mg/dl glucose (G90), glucose free (G0) or 90 mg/dl glucose medium containing 2 mg/ml NaF (G90/NaF).

依存性ミオイノシトール取り込み率を表4に示す。one-way ANOVAによる比較では、G450は、G90より有意に低値であった ( $F=8.192, p<0.01$ )。G450にONO-2235 または ICI-128,436 を添加した群は、G90より有意に低値であって (それぞれ、 $F=6.503, p<0.01$ ;  $F=8.192, p<0.01$ )、G450と差がなかった (それぞれ、 $F=0.0974, NS$ ;  $F=0, NS$ )。

4) 赤血球内解糖抑制の影響

赤血球を90mg/dl グルコース溶液、グルコースを含まない溶液、または2mg/ml NaFを含む90mg/dl グルコース溶液で180分間プレインキュベートした上でのそれぞれの赤血球へのNa非依存性ミオイノシトール取り込み率を表5に示す。3群間に差は認められなかった (Mann-Whitney u-test)。

2. ソルビトール濃度

前記のミオイノシトール取り込みと同時に測定した各インキュベーション後のソルビトール濃度を表6に示す。one-way ANOVAによる比較では、G450は、G90より有意に高値であった ( $F=10.36, p<0.001$ )。G450にONO-2235 または ICI-128,436 を添加した群は、G450より有意に低値であった (それぞれ  $F=$

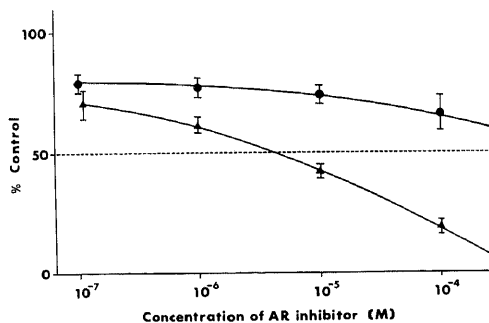


Fig. 10. Effect of ONO-2235 (●) and ICI-128,436 (▲) on sorbitol accumulation in erythrocytes incubated with 450 mg/dl glucose.

3.645,  $p<0.05$ ;  $F=10.61, p<0.001$ ).

両アルドースリダクターゼ阻害剤の濃度と赤血球ソルビトール蓄積率との関係を図10に示す。ソルビトール

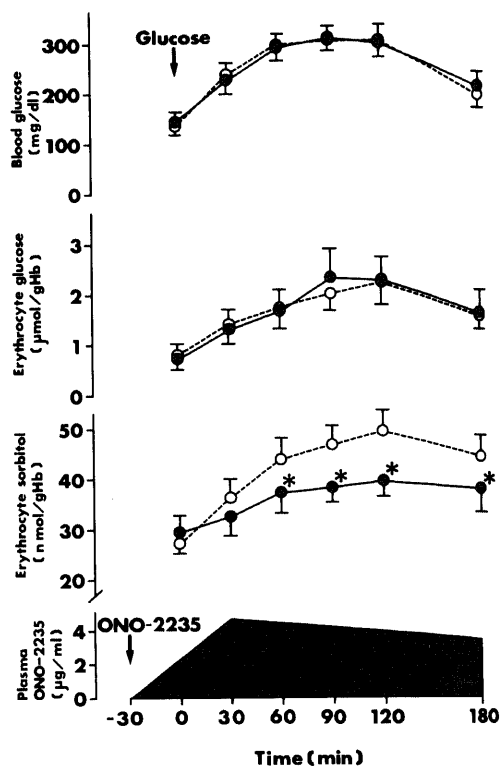


Fig. 11. Comparison of blood glucose, erythrocyte glucose and erythrocyte sorbitol concentrations in the first OGTT performed without administration of ONO-2235 (○-○) and in the second OGTT performed with administration of ONO-2235 (●-●). Values are means±SEM (n=11). \*,  $p<0.05$  significant differences from the first OGTT. Shaded area represents mean plasma concentration of ONO-2235 in the second OGTT.

Table 6. Effect of AR inhibitor on sorbitol accumulation in erythrocytes

Group	n	Erythrocyte sorbitol	
		Concentration (nmol/gHb)	% Change in accumulation
Basal	5	22.3±4.2	—
G90	5	37.2±1.6	—
G450	5	68.8±5.3 <sup>a</sup>	0
G450/ONO-2235 $1 \times 10^{-4}$ M	5	50.1±3.3 <sup>b</sup>	-40
G450/ICI-128,436 $1 \times 10^{-4}$ M	5	36.8±3.1 <sup>c</sup>	-69

a,  $p<0.001$  vs G90; b,  $p<0.05$  vs G450; c,  $p<0.001$  vs G450.

ル蓄積率は、各アルドースリダクターゼ阻害剤の濃度に依りて低下した。ONO-2235 の IC<sub>50</sub> は、 $> 1 \times 10^{-4} M$ 、ICI-128,436 の IC<sub>50</sub> は、 $6.4 \times 10^{-6} M$  であった。

Ⅲ. ヒト赤血球生体内における検討

1. ONO-2235 の赤血球内ソルビトールに対する影響 (図11)

1 回目 (ONO-2235 非投与で施行) の75g OGTT における血糖値、赤血球内グルコースおよび赤血球内ソルビトール値と、2 回目 (ONO-2235 投与で施行) の75g OGTT におけるこれらの値の差を two-way ANOVA (repeated measures) を用いて検定し、Scheffe 型で多重比較した。

1) 血糖値

糖負荷前の血糖値は、1 回目が $140 \pm 16$ 、2 回目が $144 \pm 18 \text{ mg/dl}$  で両者間に差はなかった。糖負荷後、1 回目、2 回目とも経時的に増加し、120分にそれぞれ $308 \pm 27$ 、 $317 \pm 27 \text{ mg/dl}$  の頂値に達した。その後両者とも低下した。また、いずれの時間においても1 回目と2 回目間に差は認められなかった ( $F=0.0917$ , NS)。

2) 赤血球内グルコース濃度

糖負荷前の赤血球内グルコース濃度は、1 回目が $0.78 \pm 0.20$ 、2 回目が $0.71 \pm 0.18 \mu \text{ mol/gHb}$  で両者間に差はなかった。糖負荷後経時的に増加し、1 回目では120分に、2 回目では90分にそれぞれ $2.20 \pm 0.43$ 、 $2.33 \pm 0.51 \mu \text{ mol/gHb}$  の頂値に達した。その後両者とも低下した。また、いずれの時間においても1 回目と2 回目間に差は認められなかった ( $F=0.0289$ , NS)。

3) 赤血球内ソルビトール濃度

糖負荷前の赤血球内ソルビトール濃度は、1 回目が $27.6 \pm 2.3$ 、2 回目が $29.6 \pm 3.2 \text{ nmol/gHb}$  で両者間に差はなかった。糖負荷後、1 回目、2 回目とも経時

的に増加し、120分にそれぞれ $48.9 \pm 4.1$ 、 $39.6 \pm 3.0 \text{ nmol/gHb}$  の頂値に達した。1 回目と2 回目間に60分、90分、120分および180分において有意差が認められた ( $F=5.782$ ,  $p<0.05$ )。

4) 血中 ONO-2235 濃度

2 回目における ONO-2235 濃度は、30分で頂値に達した後漸減した。180分においても頂値の66%の濃度が認められた。各例における180分間の平均血中 ONO-2235 濃度と下記の式で算出した赤血球内ソルビトール抑制率間には有意相関は認められなかった ( $r=0.394$ , NS)。

$$\text{ソルビトール抑制率} = \frac{\text{AUC}(1\text{回目}) - \text{AUC}(2\text{回目})}{\text{AUC}(1\text{回目})} \times 100(\%)$$

{ただし、AUC (area under curve) は、各 OGTT におけるソルビトール曲線下面積}

2. ONO-2235 の赤血球内ミオイノシトールに対する影響 (表7)

1 回目 (ONO-2235 非投与で施行) の食事負荷試験における血糖値、血漿ミオイノシトール、赤血球内ミオイノシトール値と、2 回目 (ONO-2235 投与で施行) の食事負荷試験におけるこれらの値の変化および差を paired t-test で検定した。

1) 血糖値

食事負荷前の血糖値は、1 回目と2 回目間に差はなかった。食事負荷後、1 回目、2 回目とも有意に増加した。また、1 回目と2 回目間に差は認められなかった。

2) 血漿ミオイノシトール濃度

食事負荷前の血漿ミオイノシトール濃度は、1 回目と2 回目間に差はなかったが、正常者に比し高値傾向であった。食事負荷後、1 回目、2 回目ともやや増加したが有意の変化ではなかった。また、1 回目と2 回目間に差は認められなかった。

3) 赤血球内ミオイノシトール濃度

Table 7. Plasma myo-inositol, erythrocyte myo-inositol and plasma glucose concentration in normal and diabetic subjects

Group	n	Plasma myo-inositol ( $\mu M$ )		Erythrocyte myo-inositol (nmol/gHb)		Plasma glucose (mg/dl)	
		0 min	120 min	0 min	120 min	0 min	120 min
Normal	10	$27.2 \pm 2.1$	—	$126 \pm 11$	—	$90 \pm 3$	—
Diabetic untreated	5	$36.8 \pm 7.7$	$45.9 \pm 10.9$	$188 \pm 25^a$	$194 \pm 33$	$130 \pm 16^a$	$195 \pm 20^c$
ONO-2235-treated	5	$35.5 \pm 3.8$	$49.8 \pm 2.0$	$178 \pm 22^a$	$184 \pm 24$	$123 \pm 8^b$	$183 \pm 20^c$

ONO-2235 was given 30 min before meal loading. Plasma concentrations of ONO-2235 in diabetic subjects at 0 min and 120 min were  $0.92 \pm 0.81$  and  $5.83 \pm 1.41 \mu \text{ g/ml}$ , respectively.

a,  $p<0.05$  vs Normal group; b,  $p<0.001$  vs Normal group; c,  $p<0.01$  vs time 0 min.

食事負荷前の赤血球内ミオイノシトール濃度は、1回目と2回目間で差はなかったが、正常者の平均値より有意に高値であった (いずれも  $p < 0.05$ , unpaired

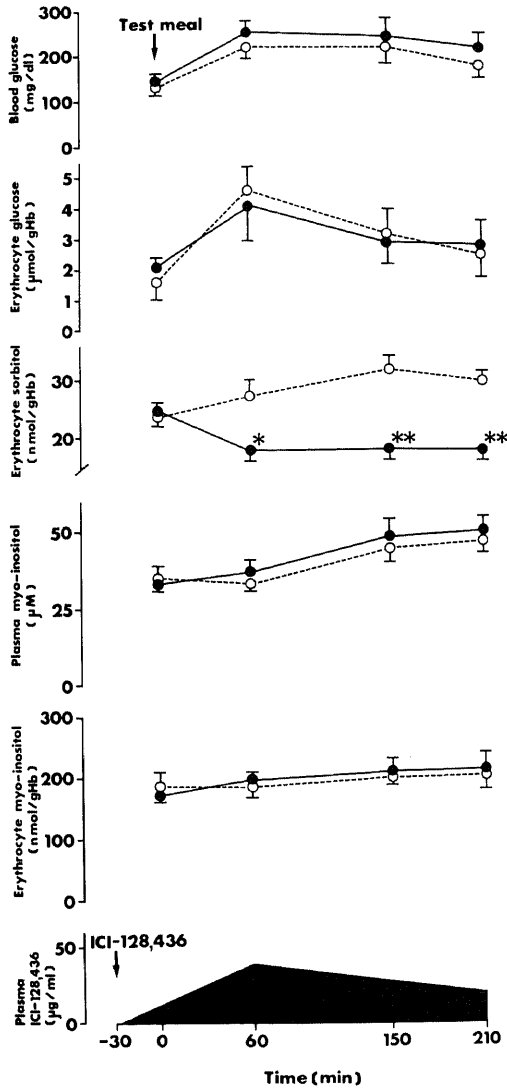


Fig. 12. Comparison of blood glucose, erythrocyte glucose, erythrocyte sorbitol, plasma myo-inositol and erythrocyte myo-inositol concentrations in the first meal load test performed without administration of ICI-128,436 (○-○) and in the second meal load test with administration of ICI-128,436 (●-●). Values are means  $\pm$  SEM (n=6). \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$  significant differences from the first meal load test. Shaded area represents mean plasma concentration of ICI-128,436 in the second meal load test.

t-test). 食事負荷後、1回目、2回目とも有意の変化を示さなかった。また、1回目と2回目間に差は認められなかった。

3. ICI-128,436 の赤血球内ソルビトールおよび赤血球内ミオイノシトールに対する影響 (図12)

1回目 (ICI-128,436 非投与で施行) の食事負荷試験における血糖値、赤血球内グルコース、赤血球内ソルビトール、血漿ミオイノシトール、赤血球内ミオイノシトール値と、2回目 (ICI-128,436 投与で施行) の食事負荷試験におけるこれらの値の差を two-way ANOVA (repeated measures) を用いて検定し、Scheffe 型で多重比較した。

1) 血糖値

食事負荷前の血糖値は、1回目が  $134 \pm 10$ 、2回目が  $142 \pm 17$  mg/dl で両者間に差はなかった。食事負荷後、1回目、2回目とも経時的に増加した後、漸減した。また、いずれの時間においても1回目と2回目間に差は認められなかった ( $F = 0.8367$ , NS).

2) 赤血球内グルコース濃度

食事負荷前の赤血球内グルコース濃度は、1回目が  $1.73 \pm 0.66$ 、2回目が  $2.04 \pm 0.38 \mu\text{mol/gHb}$  で両者

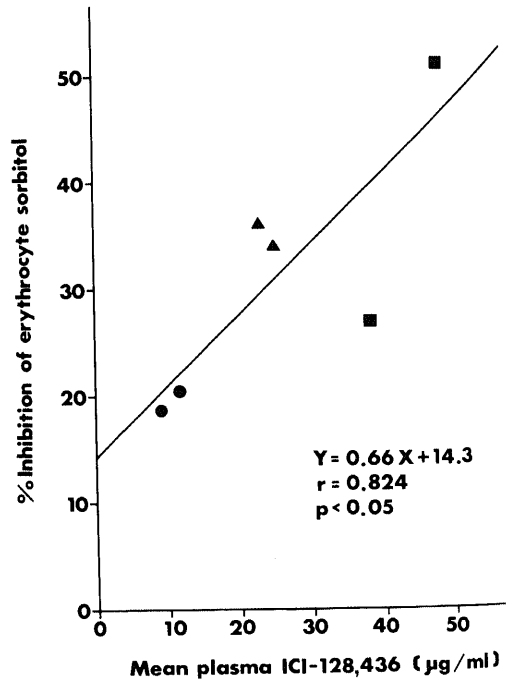


Fig. 13. Relationship between %inhibition of erythrocyte sorbitol and mean plasma concentration of ICI-128,436. Subjects were given 150 (●), 300 (▲) or 600 mg of ICI-128,436 (■) 30 min before meal loading.

間に差はなかった。食事負荷後、1回目、2回目とも経時的に増加した後、減少した。また、いずれの時間においても1回目と2回目間に差は認められなかった ( $F=0.1542$ , NS)。

### 3) 赤血球内ソルビトール濃度

食事負荷前の赤血球内ソルビトール濃度は、1回目が $23.7 \pm 1.2$ 、2回目が $24.2 \pm 1.4$  nmol/gHb で両者間に差はなかった。食事負荷後、1回目では経時的に増加したのに対し、2回目では減少し低値を維持した。また、60分、150分および210分のいずれにおいても1回目と2回目間に有意差が認められた ( $F=29.15$ ,  $p < 0.01$ )。

### 4) 血漿ミオイノシトール濃度

食事負荷前の血漿ミオイノシトール濃度は、1回目が $35.2 \pm 3.0$ 、2回目が $34.7 \pm 1.3$   $\mu$ M で両者間に差はなかったが、いずれも正常者の平均値 $27.2 \pm 2.1$   $\mu$ M (表7) より有意に高値であった (いずれも  $p < 0.05$ , unpaired t-test)。食事負荷後、1回目、2回目とも経時的に増加した。また、いずれの時間においても1回目と2回目間に差は認められなかった ( $F=0.7002$ , NS)。

### 5) 赤血球内ミオイノシトール濃度

食事負荷前の赤血球内ミオイノシトール濃度は、1回目が $192 \pm 16$ 、2回目が $184 \pm 16$  nmol/gHb で両者間に差はなかったが、いずれも正常者の平均値 $126 \pm 11$  nmol/gHb (表7) より有意に高値であった (いずれも  $p < 0.01$ , unpaired t-test)。食事負荷後、1回目、2回目とも経時的にわずかに増加したが有意の変化ではなかった。また、いずれの時間においても1回目と2回目間に差は認められなかった ( $F=0.0014$ , NS)。

### 6) 血漿 ICI-128,436 濃度

2回目における ICI-128,436 濃度は、60分で頂値に達した後漸減した。210分においても頂値の48%の濃度が認められた。各例における210分間の平均血中 ICI-128,436 濃度と前記の式で算出した赤血球内ソルビトール抑制率間には有意相関が認められた ( $r=0.824$ ,  $p < 0.05$ , 図13)。また、赤血球内ソルビトール抑制率は、ほぼ投薬量に比例して増大した。

## 考 察

### I. ラット坐骨神経試験管内におけるミオイノシトール取り込みおよびソルビトール代謝

ミオイノシトールは、イノシトールの9つの異性体の一つで、きわめて安定した環状アルコールであり、広義にはソルビトールと同様、糖アルコールに分類される。ミオイノシトールは、植物・動物の細胞に遍在

し、神経内にも存在することが知られている<sup>30</sup>。生体各細胞におけるミオイノシトール維持方法としては、細胞外から細胞内へミオイノシトールを取り込む方法と、脳、肝、腎<sup>40</sup>や精巣<sup>40</sup>のように細胞自身がグルコース-6-リン酸から酵素反応でミオイノシトールを合成する方法の二つが知られている。坐骨神経にもこのようなミオイノシトール合成系の存在が示唆されているがその活性は小さく<sup>40</sup>、坐骨神経内のミオイノシトールは、もっぱら取り込みによって維持されていると考えられている。

本研究の結果から、まず、末梢神経におけるミオイノシトール取り込み様式には、Na 依存性のものと Na 非依存性のものの2種類が区別されることが示された。培地ミオイノシトール濃度が比較的低い場合はほとんどが前者で占められたことから、生理的条件下におけるミオイノシトール取り込みは、主として Na 依存性であることが明らかとなった。Na 依存性ミオイノシトール取り込みが飽和性であったことから、Na 依存性ミオイノシトール輸送は担体介在性輸送であると考えられた。また、予備実験で、グルコースを含有しない培地で坐骨神経をあらかじめブレインキューベートした上でミオイノシトール取り込みを検討したが、その結果、Na 依存性ミオイノシトール取り込み率が低下したことから、Na 依存性ミオイノシトール取り込みはエネルギー依存性の輸送、すなわち能動輸送であると考えられた。一方、グルコースは、Na 依存性ミオイノシトール取り込みに対して抑制的に作用することが示された。その抑制方式は、Lineweaver-Burk プロットおよび Dixon プロットの結果より競合抑制であることが明らかとなった。これは、グルコースがミオイノシトールと構造的類似性<sup>41</sup>を有するために、両者がミオイノシトール輸送担体に共通に親和性をもつことによると解釈される。この際、Kt 値が培地グルコース濃度90mg/dl で65.5 $\mu$ M とかなり小さかったことから、この担体はミオイノシトールに高い親和性を有しており、さらに Ki (glucose) 値が366 mg/dl であったことを考え併せると、この担体のミオイノシトールに対する親和性はグルコースに対するその約300倍以上とみなされる。以上は、Greene ら<sup>42</sup>が家兎の単離坐骨神経を用いて行なった実験結果とほぼ同様の成績であった。糖尿病動物の末梢神経<sup>32)45)49</sup>においても糖尿病患者の末梢神経<sup>10</sup>においてもミオイノシトール欠乏が観察されている。その機序としては上記のような糖尿病における高血糖状態が末梢神経へのミオイノシトール取り込みを阻害することが主成分であると考えられる。

高濃度ミオイノシトール添加食を投与された糖尿病ラットでは、坐骨神経内ミオイノシトール減少とMNCV遅延がともに改善することが実証されているが<sup>33)30)51)</sup>、これは、神経ミオイノシトールがほとんど取り込みに依存することを示すのみならずミオイノシトールが神経機能維持に実際に関与していることを示唆するものである。糖尿病患者においても、糖尿病性末梢神経障害に対するミオイノシトール投与の効果はいくつかの施設ですでに検討されている<sup>52)~54)</sup>。

Clementsら<sup>54)</sup>は、糖尿病患者を2群に分けて、一方には高濃度ミオイノシトール食(1.3g/日)を、他方には低濃度ミオイノシトール食(0.4g/日)をそれぞれ16週間与え、MNCVおよび知覚神経伝導速度(sensory nerve conduction velocity, SNCV)の経過を観察した。その結果、低濃度ミオイノシトール食投与群ではMNCVが有意に減少してSNCVもわずかながら減少したのに対し、高濃度ミオイノシトール食投与群ではSNCVが有意に増加してMNCVも若干増加した。これらは、ヒト末梢神経機能も部分的ながらもミオイノシトールの影響下にあることを示唆するものである。

ミオイノシトール欠乏のMNCV遅延に対する作用機序は未解決であるが、sodium-potassium-adenosine triphosphatase (Na-K-ATPase) 活性低下を介していると今日考えられている。糖尿病動物の坐骨神経では、Na-K-ATPase活性の低下が証明されており<sup>55)</sup>、軸索におけるこの活性低下によってNaが停滞し、その結果膜電位が低下し、ついにMNCVが遅延すると考えられる<sup>56)</sup>。Na-K-ATPase活性はプロテインキナーゼC活性の作用下にあるが、プロテインキナーゼC活性は、ホスフォイノシチドの分解産物であるジアシルグリセロール、およびイノシトール三リン酸塩によって小胞体から動員されたカルシウムイオンの二者によって相乗的活性化を受けている。ミオイノシトールは、ホスファチジルイノシトール代謝回転の前駆物質であり、したがってミオイノシトール欠乏はこの経路の活性低下を介して間接的にNa-K-ATPase活性を低下させると想定される<sup>57)</sup>。Greeneら<sup>58)</sup>は、糖尿病ラット坐骨神経におけるミオイノシトール欠乏とNa-K-ATPase活性低下が1%ミオイノシトール添加食によって共に完全に改善することを報告したが、これは神経内ミオイノシトール欠乏とNa-K-ATPase活性低下の関連性を支持するものである。一方、ミオイノシトール欠乏の神経形態学的変化に対する作用機序についても、このようなNa-K-ATPase活性低下の点から究明されている。軸索のNa-K-ATPaseの分布は

ランヴィエ絞輪に集中しているため、糖尿病状態ではこの活性低下によるNa蓄積がランヴィエ絞輪に生じ、同部の腫脹をきたす。この腫脹は、引き続いていわゆる「軸索・グリア接合異常」に進展し、さらに傍絞輪性脱髄の前段階を形成するといわれている<sup>59)</sup>。このような神経の形態学的変化は実験動物<sup>60)</sup>のみならずヒト<sup>61)</sup>においても観察されている。Greeneら<sup>57)</sup>は、糖尿病ラット脛骨神経におけるランヴィエ絞輪部の腫脹がミオイノシトール添加食投与によって防止しうることを示したが、これは神経内ミオイノシトール欠乏と神経の形態学的変化との結び付きを示唆するものである。

以上から、本研究で示した高濃度グルコース下Na依存性ミオイノシトール取り込み減少という代謝面の異常は、Na-K-ATPase活性低下など一連の反応を介して末梢神経の機能面および形態面の障害・変化を惹起し、糖尿病性神経障害の進展をきたすと考えられる。

一方、今回の試験管内の実験で、ミオイノシトール取り込み率と同時に神経内ソルビトール濃度の変化についても検討した。高濃度グルコース下において坐骨神経ソルビトール濃度の有意増加が認められた。これは、糖尿病動物の坐骨神経内ソルビトールが異常高値である生体内の所見<sup>36)~8)</sup>と符合しており、ソルビトール経路が坐骨神経内にも実在することを支持するものである。しかしながら、糖尿病性神経障害発症・進展におけるソルビトール蓄積の意義はいまだに確立されていない。

ソルビトール蓄積説は、もともと糖尿病性白内障の成因を説明するために提唱された仮説である。レンズ細胞内に存在するAR活性が高血糖下で亢進して、細胞内に透過性の乏しいソルビトールが蓄積し、それが浸透圧を上昇させて水を細胞内へ引き入れ、浮腫をきたして組織を破壊し、ついに白内障を生ずるというもので、一名“osmotic theory (浸透圧説)”とも呼ばれている。末梢神経内にもソルビトール経路の存在が示唆されて以来<sup>3)</sup>、この仮説が糖尿病性神経障害の発生機序の説明に拡張導入されたのであった。しかしながら、神経内ソルビトール濃度はレンズ内ソルビトール濃度の20分の1前後と微量であること<sup>14)20)</sup>、神経内の水分含量は必ずしも増加していないこと<sup>61)</sup>、しかも水分は細胞内ではなくむしろ細胞間に貯留していること<sup>62)</sup>が指摘されており、さらに、前述したGreeneらの1%ミオイノシトール添加食投与実験ではMNCV遅延の改善が得られた際、神経内ミオイノシトール欠乏は改善したもののソルビトール蓄積は持続していた



ことが確認されている。これらのことから、ソルビトールの糖尿病性神経障害発症・進展への関与は、少なくとも直接的な関与については、今日疑問視されるようになった。

ソルビトール蓄積の意義が未解決のまま、ソルビトール蓄積説に基づいて種々のアルドースリダクターゼ阻害剤が開発されたが、糖尿病ラットへのその投与実験において MNCV 遅延改善と神経内ソルビトール蓄積阻害の対応が観察されたことから、糖尿病性神経障害発症へのソルビトール蓄積の重要性を支持する報告がなされた<sup>15)16)</sup>。

これに対して Gillon ら<sup>34)</sup>は、糖尿病ラットへのアルドースリダクターゼ阻害剤 CP-45,634 (Sorbinil, Pfizer, Ltd., Groton, Conn.) 投与実験において MNCV 遅延、ソルビトール過剰、およびミオイノシトール欠乏に対する効果を検討し、そのいずれもが投薬後改善したこと、さらに MNCV 遅延はむしろミオイノシトール欠乏と対応することを報告した。ミオイノシトール欠乏へのアルドースリダクターゼ阻害剤の効果については、ICI-128,436<sup>19)23)</sup> (Statil, ICI Pharmaceuticals, Macclesfield, Cheshire, UK), ADN-138<sup>24)</sup> (杏林製薬, 東京) などの CP-45,634 と異なる構造を有するアルドースリダクターゼ阻害剤を用いた生体内の実験系でも報告されている。

本研究では、アルドースリダクターゼ阻害剤のうちの一つである ONO-2235 (小野薬品) について、単離坐骨神経におけるソルビトール蓄積への効果とミオイノシトール取り込みへの影響を試験管内で同時に検討した。その結果、ONO-2235 添加によって、高濃度グルコース下でのソルビトール蓄積は有意に阻害され、同時に高濃度グルコース下での Na 依存性ミオイノシトール取り込み低下は完全に改善された。また、Na 非依存性ミオイノシトール取り込みは、不変であった。アルドースリダクターゼ阻害剤がソルビトール過剰およびミオイノシトール取り込み低下のいずれをも改善した事実のみに着目すれば、両者間に何らかの関係が介在することも想定される。

Finogold ら<sup>35)</sup>は、このような観点からソルビトール代謝・ミオイノシトール代謝の相互関連性を提唱した。この考え方に従えば、ミオイノシトール取り込みはソルビトール経路から抑制を受けており、アルドースリダクターゼ阻害剤はソルビトール経路阻害を介しておのずとミオイノシトール取り込みを是正すると解釈される。しかしながら、ミオイノシトール取り込みが前述したようにグルコースからも競合抑制を受け続ける中で、神経内ソルビトール蓄積阻害のみが単独で

ミオイノシトール取り込み減少を完全に改善するとは本来考えにくい。本研究において、ONO-2235 がソルビトール生成阻害には不十分な濃度 ( $1 \times 10^{-8}$  M) であってもミオイノシトール取り込み低下を有意に改善したことを考え併せると、文字どおりの「相互関連性」が実在するかは疑問である。

両者の「相互関連性」を明らかにするため、本研究では、坐骨神経内ソルビトール経路の賦活化によってミオイノシトール取り込み率が影響されるか否かについても検討した。すなわち、坐骨神経を3種類のグルコース濃度でそれぞれあらかじめプレインキュベートすることによってソルビトール濃度の異なる3群の坐骨神経を作製した上で、あらためて同一条件でこれらをインキュベートしてミオイノシトール取り込み率に差があるかを検討した。その結果、3群間でミオイノシトール取り込み率に有意差は示されず、ソルビトール経路活性亢進のミオイノシトール取り込みへの阻害作用を支持するデータは認められなかった。

以上を総合すれば、ソルビトール代謝・ミオイノシトール代謝相互関連性の想定は不合理な面を有しており、アルドースリダクターゼ阻害剤のミオイノシトール取り込みへの作用機序としては、むしろソルビトール経路阻害を介さない機序が推定された。その機序の詳細は、今後解明されるべき課題である。

いずれにせよ、本研究の結果より、糖尿病性神経障害の-成因とされるミオイノシトール欠乏に対し、ソルビトール生成抑制を本来の目的とするアルドースリダクターゼ阻害剤 ONO-2235 が有用である可能性が示された。

## II. ヒト赤血球試験管内および生体内におけるミオイノシトール取り込みおよびソルビトール代謝

赤血球におけるミオイノシトール維持方法ないし代謝については、まだ解明されていない。しかし、赤血球にも他の組織と同様にミオイノシトールが存在することは、本研究におけるヒト赤血球トリメチルシリル化物のマススペクトラム解析の結果より明らかである。本研究では、まずヒト赤血球においてもラット坐骨神経同様のミオイノシトール取り込みがみられるか否かについて試験管内で検討した。その結果、赤血球は培地からミオイノシトールを取り込むことが示された。しかし、ミオイノシトール取り込み様式は、ほとんどが Na 依存性であった坐骨神経の場合と異なり、赤血球では Na 非依存性であって、むしろ Na の存在はミオイノシトール取り込みに対して抑制的に作用すると想定された。赤血球へのミオイノシトール取り込み率は、培地ミオイノシトール濃度を飽和状態 (14g/

dl) 近くにまで高めてもお直線的に増加し続けた。このことは、赤血球への Na 非依存性ミオイノシトール取り込みが担体介在性輸送ではないことを示している。また、赤血球への Na 非依存性ミオイノシトール取り込みがグルコース欠乏状態ないし NaF 添加によって影響を受けなかったことから、この取り込みはエネルギーに依存しない、すなわち受動性のものであると考えられた。これらのことから、赤血球におけるミオイノシトール取り込み様式は、Na 非依存性・担体非介在性・エネルギー非依存性の受動輸送であって、したがって単純拡散または制限拡散のいずれかであると想定された。一方、グルコースは、この Na 非依存性ミオイノシトール取り込みに対して抑制的に作用することが示された。その機序は今後解明されるべき課題ではあるが、この Na 非依存性ミオイノシトール取り込みは担体非介在性の取り込みであるので、少なくとも坐骨神経で認められたようなグルコースとミオイノシトールの担体競争によるものでないことは明らかである。Lineweaver-Burk 方式によるプロットを試みても原点集束像を呈するのみで原点以外の軸上の一点で交差しないことは、このことを支持するものである。

以上のことから、赤血球へのミオイノシトール取り込み様式は、坐骨神経へのミオイノシトール取り込み様式と本質的に異なる輸送であり、また、グルコースによって抑制を受けるという点では両者は共通しているもののその機序は異なるものであることが明らかとなった。

一方、今回の試験管内の実験で、赤血球へのミオイノシトール取り込み率と同時に赤血球内ソルビトール濃度の変化についても検討した。赤血球にソルビトールが存在することは、Morrison ら<sup>64(65)</sup>によって酵素法を用いた測定で初めて示唆された。赤血球における AR の存在については当初疑われたが<sup>65(67)</sup>、近年その分離精製がなされ<sup>68-71)</sup>、その性質や L-ヘキサネートデヒドロゲナーゼ (EC1.1.1.2) との異同についての議論が依然続いてはいるものの、グルコースに対する高い Km 値を有し、高血糖下で活性が亢進してグルコースをソルビトールに還元する酵素が赤血球にも実在することについては今日意見の一致をみている。本研究では、グルコース濃度450mg/dl、60分間のインキュベート条件で赤血球内ソルビトールの変化を測定したが、赤血球内ソルビトール濃度はインキュベーション後3.1倍の増加を示した。これは、坐骨神経の場合の1.7倍に比しかなり大きいものであった。この差は、AR の Km 値、AR の分布度、細胞へのグルコースの取り

込みなどが両者間で異なるためとも考えられるが、いずれにせよこれらのことは、赤血球にも坐骨神経と同様のソルビトール経路が存在することを示唆している。

本研究では、アルドースリダクターゼ阻害剤の赤血球におけるミオイノシトール取り込みおよびソルビトール蓄積に対する効果の有無について検討した。まず、高濃度グルコース下での Na 非依存性ミオイノシトール取り込み低下は、ONO-2235 ないし ICI-128,436 添加によって改善されなかった。これは、前述したように赤血球へのミオイノシトール取り込み様式が坐骨神経へのミオイノシトール取り込み様式と本質的に異なるためと考えられる。このことから逆に、アルドースリダクターゼ阻害剤のミオイノシトール取り込みへの作用発現には、その輸送が担体介在性・エネルギー依存性であることが必要条件であることが推定される。一方、高濃度グルコース下での赤血球内ソルビトール蓄積は、ONO-2235 および ICI-128,436 添加によって有意に抑制された。このことは、赤血球にも坐骨神経におけるソルビトール経路と同様のソルビトール経路が存在することを支持するものである。

以上示した、高濃度グルコース下における態様およびアルドースリダクターゼ阻害剤に対する反応の点から、赤血球内ミオイノシトールは坐骨神経内ミオイノシトールの指標とならないこと、および赤血球内ソルビトールは坐骨神経内ソルビトールの指標として有用であることが示唆された。

このような高濃度グルコース下試験管内における赤血球内ソルビトール蓄積系を用いたアルドースリダクターゼ阻害剤の薬効評価法は、Malone ら<sup>42)</sup>によって導入され、今日ひろく行われている<sup>17)(19)(20)</sup>。一方、アルドースリダクターゼ阻害剤のソルビトール代謝への長期投与と効果判定法として、糖尿病患者生体内における赤血球内ソルビトール蓄積系を用いる方法が試みられている<sup>37)(39)(72)-74)</sup>。本研究ではヒト生体内において、赤血球内ソルビトール濃度および赤血球内ミオイノシトール濃度の短時間変動とアルドースリダクターゼ阻害剤による影響について検討を加えた。すなわち、糖尿病患者を対象にグルコースないしミオイノシトールの負荷試験を施行して、赤血球内ソルビトール濃度および赤血球内ミオイノシトール濃度の変動をアルドースリダクターゼ阻害剤投与との関連で検討した。その結果、高血糖下での赤血球内ソルビトール蓄積は、ONO-2235 ないし ICI-128,436 投与によって抑制された。その抑制率は、試験管内のデータから類推した値より低値ではあったが、有意のものであった。

これに対して、これら糖尿病患者の赤血球内ミオイノ

シトール濃度は、負荷前からすでに正常者に比し有意に高値で、さらに食事負荷後に有意の変動を示さなかった。これは、赤血球におけるミオイノシトール取り込みがグルコースによって阻害されることを示した試験管内の成績と矛盾する結果であり、赤血球内ミオイノシトールがグルコースからの生成によって維持されている可能性を想定させるものである。しかし、赤血球において<sup>14</sup>C-グルコースのミオイノシトールへの移行を検討した予備実験の結果からは、その可能性は否定的であった。この予備実験はさらに検討の余地はあるが、今回見られた糖尿病患者の赤血球内ミオイノシトール高値には、血漿ミオイノシトール高値の関与が考えられる。Maloneら<sup>7)</sup>は、糖尿病患者における赤血球内ミオイノシトール濃度および血漿ミオイノシトール濃度を測定し、いずれも正常者の平均値に比し有意に高値であったと報告している。著者ら<sup>8)</sup>は、糖尿病患者36例および健康者9例を対象に空腹時採血して赤血球内ミオイノシトール濃度と血漿ミオイノシトール濃度の関連性を検討した。その結果、全例で両者間には単相関係数  $r=0.657(p<0.005)$  の有意相関関係が、さらに血糖値の影響を除去後も偏相関係数  $r=0.672(p<0.001)$  の有意相関関係が認められたことから、赤血球内ミオイノシトール濃度は主として血漿ミオイノシトール濃度によって規定されていることが推定された。したがって、今回糖尿病患者の赤血球内ミオイノシトール濃度が高値であり、また食事負荷後の高血糖下においても低下を示さなかったのは、グルコースによる抑制分を上回ってミオイノシトールが赤血球へ流入することによると考えられた。

一方、ONO-2235 ないし ICI-128,436 投与によって赤血球内ミオイノシトール濃度は有意の変化を示さなかった。これは、両薬剤によって赤血球へのミオイノシトール取り込みが影響されなかった試験管内の成績と符合するものであった。

以上示した、糖尿病患者生体内における検討からも、赤血球内ミオイノシトール代謝は坐骨神経内ミオイノシトール代謝と異なることが明らかとなった。また、赤血球内ソルビトール代謝は坐骨神経内ソルビトール代謝の指標として、さらにその蓄積系はアルドースリダクターゼ阻害剤の阻害活性評価法として有用であることが示された。しかし、赤血球内ソルビトールはきわめて短時間のうちに変動するのに対して、坐骨神経などの組織ソルビトールが同様に短時間変動するかは明らかではなく、赤血球内ソルビトール濃度が組織ソルビトール濃度をいずれの時相においても反映するかは、今後解明されるべき課題である。

## 結 論

単離ラット坐骨神経試験管内およびヒト赤血球試験管内、生体内におけるミオイノシトール代謝とソルビトール代謝をアルドースリダクターゼ阻害剤投与との関連で検討し、以下の結果を得た。

1. 坐骨神経におけるミオイノシトール取り込みには、Na 依存性と Na 非依存性の2つが区別され、生理的条件下のミオイノシトール取り込みは、主として Na 依存性であった。Na 依存性ミオイノシトール取り込みは、エネルギー依存性・担体介在性の能動輸送であった。

2. 坐骨神経における Na 依存性ミオイノシトール取り込みは、グルコースによって競合抑制された。この抑制は、アルドースリダクターゼ阻害剤 ONO-2235 添加によって改善された。

3. 坐骨神経におけるソルビトール濃度は、高濃度グルコース下で増加した。この増加は、アルドースリダクターゼ阻害剤 ONO-2235 添加によって改善された。

4. 赤血球におけるミオイノシトール取り込みは、Na 非依存性であり、エネルギー非依存性・担体非介在性の受動輸送であった。

5. 赤血球における Na 非依存性ミオイノシトール取り込みは、グルコースによって抑制された。しかし、その抑制様式は、坐骨神経における競合抑制とは異なるものであった。また、この抑制は、アルドースリダクターゼ阻害剤 ONO-2235 ないし ICI-128,436 添加によって改善されなかった。

6. 赤血球におけるソルビトール濃度は、高濃度グルコース下で増加した。この増加は、アルドースリダクターゼ阻害剤 ONO-2235 ないし ICI-128,436 添加によって改善された。

7. 糖尿病患者の赤血球内ミオイノシトール濃度は、食事負荷後の血糖値上昇、血漿ミオイノシトール濃度上昇によって変化せず、また、アルドースリダクターゼ阻害剤 ONO-2235 ないし ICI-128,436 投与によっても変動しなかった。

8. 糖尿病患者の赤血球内ソルビトール濃度は、糖負荷ないし食事負荷後の血糖値上昇によって増加した。この増加は、アルドースリダクターゼ阻害剤 ONO-2235 ないし ICI-128,436 投与によって改善された。

以上より、アルドースリダクターゼ阻害剤は、ソルビトール、ミオイノシトールのいずれの代謝面からも糖尿病性神経障害の治療に有用である可能性が示唆された。また、赤血球内ミオイノシトールは、末梢神経

内ミオインシトールの指標とならないのに対して、赤血球内ソルビトールは末梢神経内ソルビトールの指標として有用であることが示唆された。さらに、試験管内および生体内における赤血球内ソルビトール蓄積系は、アルドースリダクターゼ阻害剤の阻害活性評価法として有用であることが示された。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました竹田亮祐教授に深甚なる謝意を捧げます。また、御指導と御助言を頂いた馬淵宏助教授、および多大な御協力を頂いた第二内科第一研究室の各位に謝意を表します。

なお、本論文の各部分は、第27回日本糖尿病学会中部地方会(昭和58年、金沢)、第26回日本糖尿病学会総会(昭和58年大阪)、第29回日本糖尿病学会中部地方会(昭和59年、名古屋)、US-Japan Aldose Reductase Workshop(1984、Hawaii)、12th Congress of the International Diabetes Federation(1985、Madrid)、昭和60年度日本糖尿病学会東海・北陸合同地方会(昭和60年、名古屋)、第33回日本糖尿病学会中部地方会(昭和61年、豊明)、第29回日本糖尿病学会総会(昭和61年、宇部)、International Symposium on Polyol Pathway and its Role in Diabetic Complications(1987、Kashikojima)、第30回日本糖尿病学会総会(昭和62年、京都)、International Workshop on Aldose Reductase Inhibitors(1987、Hawaii)、第25回日本臨床代謝学会総会(昭和63年、東京)、第31回日本糖尿病学会総会(昭和63年、東京)、3rd International Symposium on Diabetes Mellitus(1988、Nagoya)、13th Congress of the International Diabetes Federation(1988、Sydney)、第39回日本糖尿病学会中部地方会(平成1年、福井)、第32回日本糖尿病学会総会(平成1年、金沢)において、それぞれ発表した。

## 文 献

- 1) Clements, R. S. & Bell, D. S. H. : Complications of diabetes: prevalence, detection, current treatment, and prognosis. *Am. J. Med.*, **79** (suppl. 5A), 2-7 (1985).
- 2) Pirart, J. : Diabetes mellitus and its degenerative complications: A prospective study of 4,400 patients observed between 1947 and 1973. *Diabetes Care*, **1**, 168-188 (1978).
- 3) Gabbay, K. H., Merola, L. O. & Field, R. A. : Sorbitol pathway: presence in nerve and cord with substrate accumulation in diabetes. *Science*, **151**, 209-210 (1966).
- 4) Ludvigson, M. A. & Sorenson, R. L. : Immunohistochemical localization of aldose reductase. I. Enzyme purification and antibody preparation—localization in peripheral nerve, artery, and testis. *Diabetes*, **29**, 438-449 (1980).
- 5) Chakrabarti, S., Sima, A. A. F., Nakajima, T., Yagihashi, S. & Greene, D. A. : Aldose reductase in the BB rat: isolation, immunological identification and localization in the retina and peripheral nerve. *Diabetologia*, **30**, 244-251 (1987).
- 6) Ward, J. D., Baker, R. W. R. & Davis, B. H. : Effect of blood sugar control on the accumulation of sorbitol and fructose in nervous tissues. *Diabetes*, **21**, 1173-1178 (1972).
- 7) Gabbay, K. H. : Hyperglycemia, polyol metabolism, and complications of diabetes mellitus. *Annu. Rev. Med.*, **26**, 521-536 (1975).
- 8) Clements, R. S. : Diabetic neuropathy—new concepts of its etiology. *Diabetes*, **28**, 604-611 (1979).
- 9) Dyck, P. J., Sherman, W. R., Hallcher, L. M., Service, F. J., O'Brien, P. C., Grina, L. A., Palumbo, P. J. & Swanson, C. J. : Human diabetic endoneurial sorbitol, fructose, and myo-inositol related to sural nerve morphometry. *Ann. Neurol.*, **8**, 590-596 (1980).
- 10) Mayhew, J. A., Gillon, K. R. W. & Hawthorne, J. N. : Free and lipid inositol, sorbitol and sugars in sciatic nerve obtained post-mortem from diabetic patients and control subjects. *Diabetologia*, **24**, 13-15 (1983).
- 11) Hale, P. J., Natrass, M., Silverman, S. H., Sennit, C., Perkins, C. M., Uden, A. & Sundkvist, G. : Peripheral nerve concentrations of glucose, fructose, sorbitol and myo-inositol in diabetic and non-diabetic patients. *Diabetologia*, **30**, 464-467 (1987).
- 12) Dvornik, D. : Aldose reductase inhibitors. In D. Porte (ed), *Aldose Reductase Inhibition. An Approach to the Prevention of Diabetic Complications*, 1st ed. p221-323, McGraw-Hill, New York, 1987.
- 13) Dvornik, D., Simard-Duquesne, N., Kram, M., Sestanaj, K., Gabbay, K. H., Kinoshita, J. H., Varma, S. D. & Merola, L. O. : Polyol accumulation in galactosemic and diabetic rats: control by an aldose reductase inhibitor. *Science*, **182**, 1146-1147 (1973).
- 14) Peterson, M. J., Sarges, R., Aldinger, C. E. & MacDonald, D. P. : CP-45,634: A novel aldose reductase inhibitor that inhibits polyol pathway activity in diabetic and galactosemic

- rats. *Metabolism*, **28**, 456-461 (1979).
- 15) **Yue, D. K., Hanwell, M. A., Satchell, P. M. & Turtle, J. R.**: The effect of aldose reductase inhibition on motor nerve conduction velocity in diabetic rats. *Diabetes*, **31**, 789-794 (1982).
- 16) **Kikkawa, R., Hatanaka, I., Yasuda, H., Kobayashi, N., Shigeta, Y., Terashima, H., Morimura, T. & Tsuboshima, M.**: Effect of a new aldose reductase inhibitor, (E)-3-carboxymethyl-5-[(2E)-methyl-3-phenylpropenylidene] rhodanine (ONO-2235) on peripheral nerve disorders in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia*, **24**, 290-292 (1983).
- 17) **Terashima, H., Hama, K., Yamamoto, R., Tsuboshima, M., Kikkawa, R., Hatanaka, I. & Shigeta, Y.**: Effects of a new aldose reductase inhibitor on various tissues *in vitro*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **229**, 226-230 (1984).
- 18) **Hotta, N., Kakuta, H., Fukasawa, H., Kimura, M., Koh, N., Iida, M., Terashima, H., Morimura, T. & Sakamoto, N.**: Effects of a fructose-rich diet and the aldose reductase inhibitor, ONO-2235, on the development of diabetic neuropathy in streptozotocin-treated rats. *Diabetologia*, **28**, 176-180 (1985).
- 19) **Stribling, D., Mirrlees, D. J., Harrison, H. E. & Earl, D. C. N.**: Properties of ICI-128,436, a novel aldose reductase inhibitor, and its effects on diabetic complications in the rat. *Metabolism*, **34**, 336-344 (1985).
- 20) **Simard-Duquesne, N., Greselin, E., Dubuc, J. & Dvornik, D.**: The effects of a new aldose reductase inhibitor (tolrestat) in galactosemic and diabetic rats. *Metabolism*, **34**, 885-892 (1985).
- 21) **Hirata, Y., Fujimori, S. & Okada, K.**: Effect of a new aldose reductase inhibitor, ADN-138, on delayed motor nerve conduction velocity in streptozotocin-diabetic rats. *Metabolism*, **37**, 159-163 (1988).
- 22) **Gabbay, K. H., Spack, N., Loo, S., Hirsch, H. J. & Ackil, A. A.**: Aldose reductase inhibition: studies with alrestatin. *Metabolism*, **28**, 471-476 (1979).
- 23) **Culebras, A., Alio, J., Herrera, J. L. & Lopez-Fraile, M. I. P.**: Effects of an aldose reductase inhibitor on diabetic peripheral neuropathy. *Arch. Neurol.*, **38**, 133-134 (1981).
- 24) **Handelsman, D. J. & Turtle, J. R.**: Clinical trial of an aldose reductase inhibitor in diabetic neuropathy. *Diabetes*, **30**, 459-464 (1981).
- 25) **Fagius, J. & Jameson, S.**: Effects of aldose reductase inhibitor treatment in diabetic polyneuropathy—a clinical and neurophysiological study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **44**, 991-1001 (1981).
- 26) **Young, R. J., Ewing, D. J. & Clarke, B. F.**: A controlled trial of sorbinil, an aldose reductase inhibitor, in chronic painful diabetic neuropathy. *Diabetes*, **32**, 938-942 (1983).
- 27) **Jaspan, J., Maselli, R., Herold, K. & Bartkus, C.**: Treatment of severely painful diabetic neuropathy with an aldose reductase inhibitor: relief of pain and improved somatic and autonomic nerve function. *Lancet*, **1**, 758-762 (1983).
- 28) **Judzewitsch, R. G., Jaspan, J. B., Polonsky, K. S., Weinberg, C. R., Halter, J. B., Halar, E., Pfeifer, M. A., Vukadinovic, C., Bernstein, L., Schneider, M., Liang, K. Y., Gabbay, K. H., Rubenstein, A. H. & Porte, D.**: Aldose reductase inhibition improves nerve conduction velocity in diabetic patients. *N. Engl. J. Med.*, **308**, 119-125 (1983).
- 29) **Lewin, I. G., O'Brien, I. A. D., Morgan, M. H. & Corral, R. J. M.**: Clinical and neurophysiological studies with the aldose reductase inhibitor, sorbinil, in symptomatic diabetic neuropathy. *Diabetologia*, **26**, 445-448 (1984).
- 30) **Fagius, J., Brattberg, A., Jameson, S. & Berne, C.**: Limited benefit of treatment of diabetic polyneuropathy with an aldose reductase inhibitor: a 24-week controlled trial. *Diabetologia*, **28**, 323-329 (1985).
- 31) 後藤由夫, 及川登, 赤沼宏夫, 菊池方利, 平田幸正, 高橋良当, 阿部正和, 持尾聰一郎, 浅野次義, 松岡健平, 久保明, 坂本信夫, 堀田鏡, 角田博信, 竹田亮祐, 馬淵宏, 繁田幸雄, 吉川隆一, 畑中行雄, 垂井清一郎, 野中共平, 鬼頭昭三, 岸田健伸: 糖尿病性神経障害に対する新しいアルドース還元酵素阻害剤(ONO-2235)の臨床的研究—全国10施設による臨床成績—. *糖尿病*, **28**, 89-99 (1985).
- 32) **Stewart, M. A., Sherman, W. R., Kurien,**

- M. M., Moonsammy, G. I. & Wisgerhof, M.: Polyol accumulations in nervous tissue of rats with experimental diabetes and galactosaemia. *J. Neurochem.*, **14**, 1057-1066 (1967).
- 33) Greene, D. A., De Jesus, P. V. & Winegrad, A. I.: Effects of insulin and dietary myoinositol on impaired peripheral motor nerve conduction velocity in acute streptozotocin diabetes. *J. Clin. Invest.*, **55**, 1326-1336 (1975).
- 34) Gillon, K. R. W. & Hawthorne, J. N.: Sorbitol, inositol and nerve conduction in diabetes. *Life Sci.*, **32**, 1943-1947 (1983).
- 35) Finegold, D., Lattimer, S. A., Nolle, S., Bernstein, M. & Greene, D. A.: Polyol pathway activity and myo-inositol metabolism. A suggested relationship in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetes*, **32**, 988-992 (1983).
- 36) Gillon, K. R. W., Hawthorne, J. N. & Tomlinson, D. R.: Myo-inositol and sorbitol metabolism in relation to peripheral nerve function in experimental diabetes in the rat: the effect of aldose reductase inhibition. *Diabetologia*, **25**, 365-371 (1983).
- 37) Malone, J. I., Leavengood, H., Peterson, M. J., O'Brien, M. M., Page, M. G. & Aldinger, C. E.: Red blood cell sorbitol as an indicator of polyol pathway activity. Inhibition by sorbinil in insulin-dependent diabetic subjects. *Diabetes*, **33**, 45-49 (1984).
- 38) Yue, D. K., Hanwell, M. A., Satchell, P. M., Handelsman, D. J. & Turtle, J. R.: The effects of aldose reductase inhibition on nerve sorbitol and myoinositol concentrations in diabetic and galactosemic rats. *Metabolism*, **33**, 1119-1122 (1984).
- 39) Popp-Snijders, C., Lomecky-Janousek, M. Z., Schouten, J. A. & van der Veen, E. A.: myo-Inositol and sorbitol in erythrocytes from diabetic patients before and after sorbinil treatment. *Diabetologia*, **27**, 514-516 (1984).
- 40) Gillon, K. R. W. & Hawthorne, J. N.: Transport of myo-inositol into endoneurial preparations of sciatic nerve from normal and streptozotocin-diabetic rats. *Biochem. J.*, **210**, 775-781 (1983).
- 41) Greene, D. A. & Lattimer, S. A.: Sodium- and energy-dependent uptake of myo-inositol by rabbit peripheral nerve. *J. Clin. Invest.*, **70**, 1009-1018 (1982).
- 42) Malone, J. I., Knox, G., Benford, S. & Tedesco, T. A.: Red cell sorbitol. An indicator of diabetic control. *Diabetes*, **29**, 861-864 (1980).
- 43) Bergmeyer, H. U., Bernt, E., Schmidt, F. & Stork, H.: D-Glucose. In H. U. Bergmeyer (ed), *Methods of Enzymatic Analysis*, 1st ed. p1196-1201, Academic Press, New York, 1974.
- 44) Hauser, G. & Finelli, V. N.: The biosynthesis of free and phosphatide myo-inositol from glucose by mammalian tissue slices. *J. Biol. Chem.*, **238**, 3224-3228 (1963).
- 45) Eisenberg, F.: D-myoinositol 1-phosphate as product of cyclization of glucose 6-phosphate and substrate for a specific phosphatase in rat testis. *J. Biol. Chem.*, **242**, 1375-1382 (1967).
- 46) Whiting, P. H., Palmano, K. P. & Hawthorne, J. N.: Enzymes of myo-inositol and inositol lipid metabolism in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Biochem. J.*, **179**, 549-553 (1979).
- 47) Greene, D. A., Lattimer, S. A., Ulbrecht, J. & Carroll, P.: Glucose-induced alterations in nerve metabolism: current perspective on the pathogenesis of diabetic neuropathy and future directions for research and therapy. *Diabetes Care*, **8**, 290-299 (1985).
- 48) Palmano, K. P., Whiting, P. H. & Hawthorne, J. N.: Free and lipid myo-inositol in tissues from rats with acute and less severe streptozotocin-induced diabetes. *Biochem. J.*, **167**, 229-235 (1977).
- 49) Clements, R. S. & Stockard, C. R.: Abnormal sciatic nerve myo-inositol metabolism in the streptozotocin-diabetic rat. *Diabetes*, **29**, 227-235 (1980).
- 50) Greene, D. A., Lewis, R. A., Lattimer, S. A. & Brown, M. J.: Selective effects of myo-inositol administration on sciatic and tibial motor nerve conduction parameters in the streptozotocin-diabetic rat. *Diabetes*, **31**, 573-578 (1982).
- 51) Mayer, J. H. & Tomlinson, D. R.: Prevention of defects of axonal transport and nerve conduction velocity by oral administration of

- myo*-inositol or an aldose reductase inhibitor in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia*, **25**, 433-438 (1983).
- 52) **Gregersen, G., Borsting, H., Theil, P., & Servo, C.**: *Myo*-inositol and function of peripheral nerves in human diabetics. A controlled clinical trial. *Acta. Neurol. Scand.*, **58**, 241-248 (1978).
- 53) **Salway, J. G., Whitehead, L., Finnegan, J. A., Karunanayaka, A., Barnett, D. & Payne, R. B.**: Effect of *myo*-inositol on peripheral-nerve function in diabetes. *Lancet*, **2**, 1282-1284 (1978).
- 54) **Clements, R. S., Vourganti, B., Kuba, T., Oh, S. J. & Darnell, B.**: Dietary *myo*-inositol intake and peripheral nerve function in diabetic neuropathy. *Metabolism*, **28** (suppl. 1), 477-483 (1979).
- 55) **Das, P. K., Bray, G. M., Aguayo, A. J. & Rasminsky, M.**: Diminished ouabain-sensitive, sodium-potassium ATPase activity in sciatic nerves of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Exp. Neurol.*, **53**, 285-288 (1976).
- 56) **Brismar, T. & Sima, A. A. F.**: Changes in nodal function in nerve fibres of the spontaneously diabetic BB-Wistar rat: potential clamp analysis. *Acta. Physiol. Scand.*, **113**, 499-506 (1981).
- 57) **Greene, D. A., Lattimer, S. A. & Sima, A. A. F.**: Sorbitol, phosphoinositides, and sodium-potassium-ATPase in the pathogenesis of diabetic complications. *N. Engl. J. Med.*, **316**, 599-606 (1987).
- 58) **Greene, D. A. & Lattimer, S. A.**: Impaired rat sciatic nerve sodium-potassium adenosine triphosphatase in acute streptozotocin diabetes and its correction by dietary *myo*-inositol supplementation. *J. Clin. Invest.*, **72**, 1058-1063 (1983).
- 59) **Sima, A. A. F., Lattimer, S. A., Yagihashi, S. & Greene, D. A.**: Axo-gliai dysjunction: a novel structural lesion that accounts for poorly reversible slowing of nerve conduction in the spontaneously diabetic bio-breeding rat. *J. Clin. Invest.*, **77**, 474-484 (1986).
- 60) **Sima, A. A. F., Nathaniel, V., Bril, V., McEwen, T. A. J. & Greene, D. A.**: Histopathological heterogeneity of neuropathy in insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes, and demonstration of axo-gliai dysjunction in human diabetic neuropathy. *J. Clin. Invest.*, **81**, 349-364 (1988).
- 61) **Greene, D. A.**: Metabolic abnormalities in diabetic peripheral nerve: relation to impaired function. *Metabolism*, **32** (Suppl. 1), 118-123 (1983).
- 62) **Jakobsen, J.**: Peripheral nerves in early experimental diabetes. *Diabetologia*, **14**, 113-119 (1978).
- 63) **Willars, G. B., Calcutt, N. A. & Tomlinson, D. R.**: Reduced anterograde and retrograde accumulation of axonally transported phosphofructokinase in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin and the aldose reductase inhibitor 'Statil'. *Diabetologia*, **30**, 239-243 (1987).
- 64) **Morrison, A. D., Clements, R. S., Travis, S. B., Oski, F. & Winegrad, A. I.**: Glucose utilization by the polyol pathway in human erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **40**, 199-205 (1970).
- 65) **Travis, S. F., Morrison, A. D., Clements, R. S., Winegrad, A. I. & Oski, F. A.**: Metabolic alterations in the human erythrocyte produced by increases in glucose concentration. *J. Clin. Invest.*, **50**, 2104-2112 (1971).
- 66) **Beutler, E. & Guinto, E.**: The reduction of glyceraldehyde by human erythrocytes. 1-Hexonate dehydrogenase activity. *J. Clin. Invest.*, **53**, 1258-1264 (1974).
- 67) **Gabbay, K. H. & Cathcart, E. S.**: Purification and immunologic identification of aldose reductases. *Diabetes*, **23**, 460-468 (1974).
- 68) **Crabbe, M. J. C. & Halder, A. B.**: Affinity chromatography of bovine lens aldose reductase, and a comparison of some kinetic properties of the enzyme from lens and human erythrocyte. *Biochem. Soc. Trans.*, **8**, 194-195 (1980).
- 69) **Halder, A. B., Wolff, S., Ting, H. H. & Crabbe, M. J. C.**: An aldose reductase from the human erythrocyte. *Biochem. Soc. Trans.*, **8**, 644-645 (1980).
- 70) **Srivastava, S. K., Ansari, N. H., Hair, G. A. & Das, B.**: Aldose and aldehyde reductases in human tissues. *Biochim. Biophys. Acta.*, **800**, 220-227 (1984).
- 71) **Srivastava, S. K., Hair, G. A. & Das, B.**:

Activated and unactivated forms of human erythrocyte aldose reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 7222-7226 (1985).

72) Hotta, N., Kakuta, H., Kimura, M., Fukasawa, H., Koh, N., Terashima, H., Iida, M. & Sakamoto, N.: Experimental and clinical trial of aldose reductase inhibitor in diabetic neuropathy. *Diabetes*, 32 (suppl. 1), 98A (1983).

73) Lehtinen, J. M., Hyvoanen, S. K., Uusitupa, M. & Puhakainen, E.: The effect of an aldose reductase inhibitor (sorbitol) on diabetic neuropathy. *Diabetologia*, 27, 303A (1984).

74) Raskin, P., Rosenstock, J., Challis, P.,

Ryder, S., Mullane, J. F., Gonzalez, R., Hicks, D., Smith, T. & Dvornik, D.: Effect of tolrestat on RBC sorbitol levels in diabetic subjects. *Diabetes*, 34 (suppl. 1), 7A (1985).

75) Malone, J. I., Harvey, R. C. & Putnam, J. C.: Sorbitol, inositol and phosphatidylinositol (PI) elevated in diabetic red cells. The influence of sorbinil. *Diabetes*, 32 (suppl. 1), 161A (1983).

76) 嘉門信雄, 道下一朗, 武田三昭, 酒井泰征, 坂井健志, 小泉順二, 馬淵宏, 竹田亮祐: 糖尿病患者における血清および赤血球ミオイノシトールについて. *糖尿病*, 27, 1044 (1984).

**Effects of Aldose Reductase Inhibitor upon Myo-inositol Uptake by Rat Sciatic Nerve and Human Erythrocytes** Nobuo Kamon, Department of Internal Medicine (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med. Soc.*, 98, 938—961 (1989)

**Key words** diabetes mellitus, diabetic neuropathy, sorbitol, myo-inositol, aldose reductase inhibitor

#### Abstract

This study was designed to explore the mechanism whereby myo-inositol transport into peripheral nerve and erythrocytes was impaired in a hyperglycemic milieu and to evaluate the effects of aldose reductase inhibitor upon decreased myo-inositol uptake and sorbitol accumulation in rat sciatic nerve and human erythrocytes. Myo-inositol was transported into rat sciatic nerve by two distinct transport systems, sodium-dependent saturable and sodium-independent unsaturable. The former was an energy-dependent, carrier-mediated active transport and was primarily responsible for myo-inositol transport into rat sciatic nerve. Medium glucose impaired the sodium-dependent myo-inositol uptake into nerve in a competitive fashion. Addition of 100  $\mu$  M ONO-2235, an aldose reductase inhibitor, in the glucose medium normalized the reduced sodium-dependent myo-inositol uptake into the nerve and inhibited nerve sorbitol accumulation. Addition of 10  $\mu$  M ONO-2235 in the medium prevented the reduced sodium-dependent myo-inositol uptake into the nerve to some extent, while it did not affect nerve sorbitol accumulation. These results suggest that ONO-2235 improves sorbitol accumulation and myo-inositol uptake in peripheral nerves and that ONO-2235 operates on nerve myo-inositol uptake via a mechanism other than sorbitol pathway inhibition. On the other hand, myo-inositol was transported into erythrocytes by a sodium- and energy-independent passive transport system. Medium glucose suppressed sodium-independent myo-inositol uptake into erythrocytes by an undetermined mechanism. Addition of ONO-2235 or ICI-128,436, another aldose reductase inhibitor, in the glucose medium did not affect the reduced sodium-independent



myo-inositol uptake into erythrocytes while it inhibited erythrocyte sorbitol accumulation in a dose-dependent manner. In addition, effects of ONO-2235 and ICI-128,436 upon erythrocyte myo-inositol and erythrocyte sorbitol concentrations were examined in glucose or meal load tests performed with and without administration of the inhibitor for each diabetic subject. Both of the inhibitors had inhibitory effects upon erythrocyte sorbitol accumulation but showed no essential effects upon erythrocyte myo-inositol concentration. These results suggest that the predominant myo-inositol uptake system in peripheral nerve differs from that in erythrocytes and that aldose reductase inhibitor inhibits erythrocyte sorbitol accumulation *in vitro* and *in vivo*. It is concluded that aldose reductase inhibitor has beneficial effects not only upon sorbitol metabolism but upon myo-inositol metabolism in peripheral nerve, that erythrocyte myo-inositol is not a suitable indicator of nerve myo-inositol, and that the erythrocyte-sorbitol test is useful as an indicator of the systemic availability of an orally administered aldose reductase inhibitor.