

Peripheral Thyroxine Metabolism of Young Rats and Experimental Diabetic Rats (II) Impairment of Peripheral Thyroxine Metabolism and Somatomedin Production in Streptozotocin-induced Diabetic Rats

| | |
|-------|---|
| 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 | http://hdl.handle.net/2297/7810 |

幼若ラットおよび実験的糖尿病ラットにおける 甲状腺ホルモン末梢代謝

II. ストレプトゾトシン糖尿病ラットにおける

甲状腺ホルモン代謝異常と成長障害因子の検討

金沢大学医学部小児科学講座 (主任: 谷口 昂教授)

西 脇 京 子

(昭和60年7月6日受付)

ストレプトゾトシン (streptozotocin, STZ) 糖尿病ラットにおいて、インスリン欠乏状態が、末梢 T_4 代謝およびソマトメジン (somatomedin, SM) 産生におよぼす影響を検討した。ウィスター系雄ラット (体重 160~200 g) に STZ を 50 mg/kg 尾静脈より投与し糖尿病を発症させインスリン投与量により 3 群にわけた。I 群; 40 単位/kg 週 1 回, II 群; 20 単位/kg 連日, III 群; 40 単位/kg 連日, すべて 5 週間投与した。対照群ラットには、生食 0.1 ml 皮下注を連日おこなった。体重、身長を計測を毎週行い、STZ 静注後 6 週目に屠殺し、血中甲状腺ホルモン (サイロキシン [thyroxine, T_4], フリーサイロキシン [free thyroxine, FT $_4$], トリヨードサイロニン [triiodothyronine, T_3], リバーストリヨードサイロニン [reverse triiodothyronine, r T_3]), SM 活性、血糖、イムノリアクティブインスリン (immunoreactive insulin, IRI) およびイムノリアクティブグルカゴン (immunoreactive glucagon, IRG)、大腿骨長および重量、肝の蛋白、グルコース、 T_3 、スルフハイドリール基 (sulfhydryl group, SH 基) 含量、および T_4 5' 脱ヨード活性を測定した。血清の SM 活性は、線維芽細胞の ^3H -チミジン (thymidine) の取り込み能により測定した。高血糖、低インスリン血症を呈し、著しく成長発育障害が認められた I 群ラットにおいては、すべての血清甲状腺ホルモン濃度と肝の T_4 5' 脱ヨード活性および肝のグルコース、 T_3 含量が低下していた。血清蛋白、肝の蛋白含量には対照群と差が認められなかった。肝の T_4 5' 脱ヨード活性の低下は、ジチオスレイトール (dithiothreitol) 添加にても回復しなかった。組織由来の脱ヨード阻害物質は証明されず、肝の SH 基含量も減少していなかった。このような T_4 代謝の異常は、インスリン投与量を増加させることにより改善した。SM 活性は、糖尿病状態では著しく低下しており、インスリン投与量を増加させても回復しなかった。以上より、インスリン欠乏状態は末梢 T_4 代謝の変化および肝の T_4 5' 脱ヨード酵素および SM の合成低下、細胞内グルコース欠乏をひきおこし、その結果、著明な成長発育障害をきたしてくるものと思われる。

Key words thyroxine, triiodothyronine, T_4 -5'-deiodinase, somatomedin, diabetes mellitus.

飢餓状態や神経性食思不振症などの低栄養状態下で、血清のトリヨードサイロニン (triiodothyronine, T_3) の低値およびリバーストリヨードサイロニン (reverse triiodothyronine, r T_3) の上昇が認められ、栄養状態が末梢のサイロキシン (thyroxine, T_4) 代謝

に密接に影響することが知られている¹⁾⁴⁾。さらに栄養素の中でも糖質の摂取量が、 T_4 の代謝にもっとも深く関係している⁵⁾⁶⁾。

糖尿病の病型にかかわらず血糖コントロールが不良でインスリン不足状態が続くと、甲状腺ホルモン代謝

Abbreviations: DTNB, 5,5'-dithiobis-12-nitrobenzoic acid; DTT, dithiothreitol; EDTA, ethylenediamine tetraacetate; FCS, fetal calf serum; FT $_4$, free thyroxine; GH, growth hormone; ^3H -TdR, ^3H -thymidine deoxyribose; IRG, immunoreactive glucagon; IRI,

異常をきたすことはすでに知られているが⁷⁾⁻¹⁰⁾, その発生機序については未だ不明の点が多い。インスリン、甲状腺ホルモンはともに成長発育にかかわるホルモンであり、小児では糖尿病状態におけるインスリン不足状態および甲状腺ホルモン動態の異常は、全体的な成長発育障害としてあらわれてくるが¹¹⁾⁻¹³⁾, その病態に関する詳細な解明は、まだみられない。そこで実験的糖尿病をきたす薬剤として知られている¹⁴⁾ストربتゾトシン (streptozotocin, STZ, シグマ社) を幼若ラットに投与し、糖尿病ラットを作製し、完全あるいは不完全なインスリン補充条件下での体重、身長、大腿骨長および重量、血中甲状腺ホルモン濃度、肝における $T_4 \rightarrow T_3$ への脱ヨード活性、血中ソマトメジン活性 (somatomedin activity, SM) について検討を加えた。

材料および方法

I. 動物

生後約 6 週、身長 32~34 cm、体重 160~200 g のウィスター系雄ラットに、氷冷生食水で溶解した STZ 溶液 (濃度 10 mg/ml) を、エーテル麻酔下で、体重あたり 50 mg/kg 尾静脈より 1 回投与した。尿糖陽性をもって糖尿病発症を確認したのち、STZ 静注 3 日目より 3 群にわけて、ブタモノコンポーネント レンテ型インスリン (porcine monocomponent lente insulin, ノボ社、デンマーク) 皮下注射により 5 週間のインスリン補充療法を開始した。I 群、体重 kg あたり 40 単位/週 1 回、II 群、体重 kg あたり 20 単位/日連日、III 群、体重 kg あたり 40 単位/日連日とした。対照群ラットには生食 0.1 ml 皮下注射を連日おこなった。

STZ 静注後 6 週目に、8 時間の絶食後エーテル麻酔下に下大静脈より採血後肝および大腿骨を採取した。最終のインスリン注射は I 群では屠殺前 7 日、II 群、III 群では 24 時間前に行った。

別に、肝細胞中の T_4 脱ヨード活性阻害物質の存在を検討するため、200 g 前後の成熟雌ラットを用いて、STZ 50 mg/kg 静注後インスリン補充なしに糖尿病状態下で 2 週間飼育したラットと、4 日間飢餓状態下で飼育したラットを作製した。

II. 方法

1. 体重、身長、測定

STZ 投与前およびインスリン補充開始後週 1 回、エーテル軽麻酔下で体重および身長 (仰臥位の頭尾長)

を測定した。

2. 大腿骨長および重量の測定

採取した大腿骨を室温で 3 日放置後、付着した筋肉片を剝離し、約 180°C の高温で 30 分間高温乾燥させたのち、骨長および骨重量を測定した。

3. 血中甲状腺ホルモン濃度の測定

下大静脈血中の甲状腺ホルモン濃度を、ラジオイムノアッセイ (radioimmunoassay, RIA) により定量した。 T_4 は、ガンマコート T_4 キット (日本トラベノール社、東京)、 T_3 は、栄研 T_3 リアキット (栄研、東京)、 rT_3 は、 rT_3 キット (ダイナボット社、東京)、遊離サイロキシシン (free thyroxine, FT_4) は、アマレックスフリー T_4 キット (アマシャム薬品、英国) を使用し定量した。

4. 血糖、血清蛋白、血中の遊離インスリン濃度およびグルカゴン濃度の測定

血糖は、0-トルイジンホウ酸法¹⁵⁾、血清蛋白は Lowry¹⁶⁾法を用いて測定した。

遊離インスリン (free immunoreactive insulin, フリー IRI) は、25% ポリエチレングリコール溶液を等容血清に加え、よく混合し 2,000 rpm 10 分間遠心した上清中のインスリン濃度を二抗体 RIA によるインスリン「栄研」キット (栄研、東京) を用いて定量した。グルカゴン (immunoreactive glucagon, IRG) もグルカゴンキット「第一」(第一ラジオアイソトープ、東京) を用いて定量した。

5. 肝細胞内のグルコース含量、蛋白含量、および総スルフハイドリール基 (total sulfhydryl groups, T-SH) 含量

摘出した肝を直ちに 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で灌流洗浄したのち、同じ緩衝液を用いて 20% ホモジネートを作製し、2,000 rpm 4°C 10 分間遠心し、その上清を用いて肝のグルコース含量を測定した。即ち、遠心上清に等容の 25% ポリエチレングリコール溶液を加え、よく混合したあと、2,000 rpm 10 分間遠心し、その上清中のグルコース含量を、0-トルイジンホウ酸法を用いて測定し、組織蛋白量で補正した。

肝の蛋白含量は、20% 肝ホモジネートを用い、Lowry¹⁶⁾法で測定した。

肝の T-SH 含量は、5,5'-ジチオビスニトロベンゾイックアシッド (5,5'-dithiobis-12-nitrobenzoic acid, DTNB, オリエンタル社) の SH 基の還元反応をみる Sedlak ら¹⁷⁾の変法によった。20% 肝ホモジネート 100 μ l と、0.2 M EDTA を含むリン酸緩衝液 1.5 ml、エ

immunoreactive insulin; MEM, minimal essential medium; PBS, phosphate buffer saline; RIA, radioimmunoassay; rT_3 , reverse triiodothyronine; SH, sulfhydryl group; SM, somatomedin; STZ, streptozotocin; T_4 , thyroxine; T-SH, total-sulfhydryl groups.

タノールに溶解した 0.01 M DTNB 溶液 100 μ l を 15 ml のガラス試験管中で混和し、さらにエタノール 8.3 ml を加えゴム栓をし振盪混和後 30 分間放置したのち、3,000 rpm 5 分間遠心した。その遠心上清の 412 nm における吸光度を測定し、1 モルの T-SH の吸光度 13,100 から計算により組織中の T-SH 基量をもとめた。

6. ジチオスレイトール添加前後の肝 T₄5'脱ヨード活性および肝の T₃含量の測定

1) ジチオスレイトール (DL-Dithiothreitol, DTT, シグマ社) 添加前の肝の T₄5'脱ヨード活性の測定

肝組織中の T₄5'脱ヨード活性を、Chopra¹⁰⁾の方法に従って測定した。即ち、37°C の恒温槽に静置した試験管内に、20% 肝ホモジネート遠心上清 500 μ l, 0.1 M リン酸緩衝液 500 μ l および 10 μ g/ml に調整した L-T₄ (L-thyroxine sodium salt, pentahydrate, 和光純薬) 溶液 100 μ l を加え、60 分間インキュベートした。インキュベート開始時および終了時に、試験管より混合液 0.2 ml 採取し、氷冷 99.5% エタノール 0.4 ml を加え、2,000 rpm 10 分間遠心したのち、上清中の T₃ を二抗体 RIA で測定し、蛋白 1 mg あたりの 60 分間の T₃ 生成量 (ng/時間/mg 蛋白) を計算により求めた。遠心上清の蛋白含量については、Lowry 法により測定した。

2) DTT 添加による肝 T₄5'脱ヨード活性の測定

1) と同様 Chopra¹⁰⁾の方法による *in vitro* の系に、DTT を緩衝液で 40 nM に調整したものを 50 μ l 添加し、蛋白 1 mg あたりの 60 分間の T₃ 産生をみた。

3) 肝の T₃ 含量の測定

1) の T₄5'脱ヨード活性測定時のインキュベート開始前の蛋白 1 mg あたりの T₃ 量をもって肝の T₃ 含量とした。

7. 糖尿病ラット、飢餓ラットの肝組織由来の T₄5'脱ヨード活性阻害物質の存在についての検討

雌対照ラット、糖尿病ラット、飢餓ラットより摘出した肝のホモジネート遠心上清中の T₄5'脱ヨード活性を、6. と同様に Chopra の方法で測定したあと、おのおの肝細胞中の T₄5'脱ヨード活性阻害物質の有無を検索する目的で同一の雄ラット肝の上清と等容に、雌対照ラット、糖尿病ラット、飢餓ラットの上清をまぜ上清混合液の T₄5'脱ヨード活性を測定し、抑制効果の有無をみた。

8. 血清中の SM 活性の測定

SM 活性は、培養ラット線維芽細胞の ³H-チミジン (³H-thymidine deoxyribose, ³H-TdR) 取りこみ能の違いをみる生物学的方法で測定した。成熟ラット尾より採取した皮膚片を、10% ウシ胎児血清 (Fetal calf

serum, FCS, Gibco Labo 社, 米国) を加えたイーグルミニマルエッセンシャル培地 (Eagles Minimal Essential Medium, MEM, 日水製薬) で、5% 炭酸ガス存在下のインキュベーター内で培養し、生育してきた線維芽細胞を継代培養して用いた。組織培養フラスコ 75 cm² (No.25110, コーニング社, 米国) にコンフルエントに生育した 4~5 代のラット線維芽細胞より培養液を除去し細胞表面をリン酸緩衝食水 (Phosphate Buffer Saline, PBS, Dulbecco PBS(-), 日水製薬) で 1 回洗滌後、0.02% EDTA, 0.02% トリプシン (Trypsin, Difco Labo, 米国) を含む PBS で 37°C 3 分間作用させピペッティングしたのち、10% FCS を含む MEM で細胞を 1 回洗滌後えられた線維芽細胞を、組織培養ディッシュ (No.3001, フェルコン社, 米国) に 1 × 10⁶ 細胞/ディッシュとなるよう分注した。10% FCS を加えた MEM で 24 時間培養後、48 時間 MEM 溶液にてスターベーションをかけたのち、10% 被検血清を加えた MEM にてさらに 18 時間培養した。その後 2 時間 1 μ Ci ³H-TdR (NET-027A, NEN 社, 米国) を添加して培養後、0.02% EDTA & トリプシン液で細胞を浮遊させグラスマイクロフィルター (Whatman LTd., 英国) 上に回収した。フィルターを乾燥後、1 l のトルエン中に DPO (2,5-Diphenyloxazole, 和光純薬) 4 g, POPOP (Bis [2-(5-phenyloxazolyl)]-benzen, 和光純薬) 50 mg を含むシンチレーション液 5 ml に溶解させ、液体シンチレーションカウンターにて細胞内に取り込まれた ³H-TdR の放射活性を測定した。対照群ラットの血清を被検血清とした線維芽細胞の ³H-TdR の取りこみを 1.0 としてあらわした。

9. 測定成績の統計学的処理

平均値の有意差検定は t 検定を用い、危険率 5% 以下をもって有意と判定した。

成 績

1. 身長、体重の変化

I 群, II 群ともに、対照に比し有意に、低身長 (I, p < 0.001; II, p < 0.01), 低体重 (I, II ともに p < 0.001) であった。III 群はコントロールと有意差がなかった (図 1, 表 1)。

2. 大腿骨長および骨重量

大腿骨長および骨重量に関しても、同様に、I 群, II 群は、コントロールに比し有意に短く (I, p < 0.001; II, p < 0.01), 骨重量も軽かった (I, p < 0.001; II, p < 0.02) が、III 群と対照との間には差はなかった (表 1)。

3. 血中甲状腺ホルモン濃度

I 群では、T₄ 2.2 ± 0.3 μ g/dl (p < 0.01), FT₄ 1.3 ±

0.4 ng/dl ($p < 0.01$), $T_3 44 \pm 3$ ng/dl ($p < 0.02$), $rT_3 1.8 \pm 1.0$ ng/dl ($p < 0.001$) とすべて対照 ($T_4 5.2 \pm 1.2$ μ g/dl, $FT_4 2.9 \pm 0.6$ ng/dl, $T_3 54 \pm 4$ ng/dl, $rT_3 8.2 \pm 0.3$ ng/dl) より低いが, II群では T_4 , T_3 は正常化し, III群では, rT_3 は 5.7 ± 0.5 ng/dl ($p < 0.001$) と低いが, それ以外は, 対照と差はなかった (図2).

4. 血糖, 血清蛋白, フリーIRI, IRG濃度

対照 (血糖値 209 ± 13 mg/dl, フリーIRI 43.8 ± 8.0 μ u/ml, IRG 118 ± 15 pg/ml) に比し, I群においては, 血糖 611 ± 55 , フリーIRI 14.0 ± 1.5 , IRG 253 ± 41 と,

有意な ($p < 0.001$) 高血糖, 低インスリン血症, 高グルカゴン血症を示し, II群では, 血糖値のみ 582 ± 64 と対照より有意に ($p < 0.001$) 高く, III群では, 血糖値, フリーIRI 値とも対照と差はなかった (表2).

5. 肝の T_3 含量, グルコース含量, 蛋白含量, T-SH 含量

I群では, T_3 含量 84 ± 28 ng/mg prot, グルコース含量 5 ± 3 mg/g wet weight と対照 (T_3 含量 163 ± 34 , グルコース含量 20 ± 3) に比し有意に ($p < 0.001$) に低いが, II, III群は, 対照とまったく差がなかった,

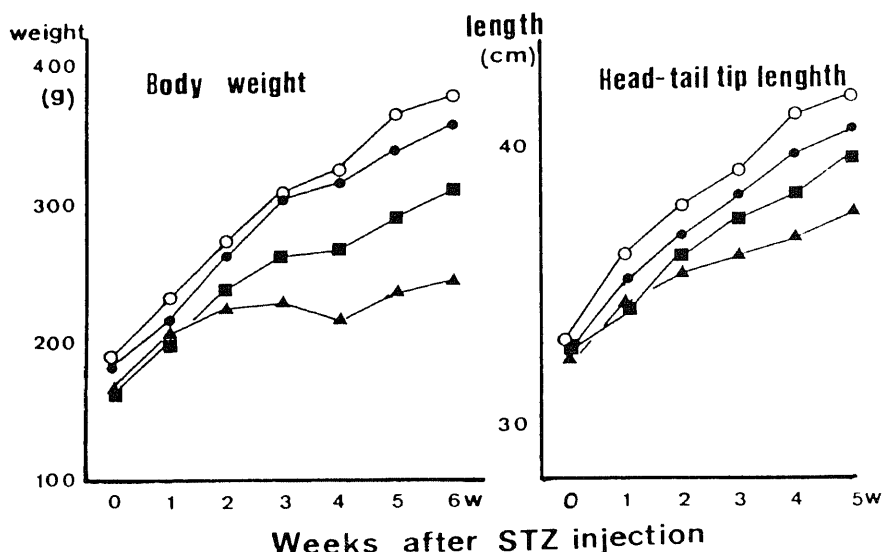


Fig. 1. Body weight gain and head-tail tip length of diabetic rats. Diabetes mellitus was induced by an intravenous injection of 50 mg/STZ/kg. Diabetic rats were divided into 3 groups based on the insulin doses. Group I (\blacktriangle , $n=5$), 40 u/kg once a week; group II (\blacksquare , $n=5$), 20 u/kg/day every day; group III (\bullet , $n=5$), 40 u/kg/day every day, for 5 weeks. Control rats (\circ , $n=5$) injected 0.1 ml saline daily. Body weight gain and head-tail tip length were measured weekly under ether anesthesia.

Table 1. Body weight, head-tail tip length, weight of femur and length of femur in diabetic (I, II, III) rats

| Experimental group | No. of rats | Body weight (g) | Head-tail tip length (cm) | Weight of femur (mg) | Length of femur (cm) |
|--------------------|-------------|------------------------|---------------------------|----------------------|----------------------|
| Group I | 5 | $242.9 \pm 25.5^{***}$ | $36.6 \pm 1.66^{***}$ | $375 \pm 41^{***}$ | $3.2 \pm 0.1^{***}$ |
| Group II | 5 | $310.7 \pm 20.9^{***}$ | $36.5 \pm 0.87^{**}$ | $460 \pm 29^*$ | $3.4 \pm 0.1^{**}$ |
| Group III | 5 | 356.4 ± 14.9 | 40.5 ± 0.87 | 496 ± 24 | 3.6 ± 0.1 |
| Control | 5 | 378.5 ± 30.6 | 41.6 ± 1.13 | 530 ± 64 | 3.7 ± 0.2 |

Value are expressed in mean \pm SD. *** , $p < 0.001$; ** , $p < 0.01$; * , $p < 0.02$ vs control. STZ-induced diabetic rats were divided into 3 groups based on the replacement doses of insulin; I, 40u/kg/day once a week; II, 20u/kg/day daily and III, 40u/kg/day daily for 5 weeks period. Saline treated rats served as control.

蛋白含量および T-SH 含量に関しては、糖尿病群と対照群では、まったく差がなかった (図 3)。

6. DTT 添加前後の肝 T₄5'脱ヨード活性

DTT 添加前, 肝の T₃産生量は, I 群 44±19 ng/時間/mg 蛋白と著明に低下しており, 対照 256±46 の約 6分の1の活性しか示さず, 有意に (p<0.001) に低かった。インスリン補充量を増加させたII, III群では, 165±28, 203±43 と T₃産生量は増し対照と差はなかった。

2mM の DTT 添加後の T₃産生量も, 対照 491±43 ng/時間/mg 蛋白に対して, I 群 89±27 と有意に (p<0.001) 低下しており, II 群 331±96, III 群 520±65 となり, 対照と有意差はなかった (図 4)。

7. 肝の T₄5'脱ヨード活性抑制物質の有無について

雄ラット肝ホモジネートとの混合前の脱ヨード活性は, 対照群の雌ラット 152.3±30.3 ng/時間/mg 蛋白に比し, 糖尿病ラット 58.0±18.3 (p<0.001), 飢餓ラット 115.6±16.0 (p<0.05) と低く, 混合後, 差はなくなり, 脱ヨード阻害物質の存在は否定的だった (図 5)。

8. 血中ソマトメジン活性

I 群では, 0.345±0.158 と有意に (p<0.001) に低く, II 群も 0.607±0.079 (p<0.01) と低かった。III 群の体重, 身長が, 対照と有意差なく成長したラットも 0.729±0.097 と対照 (1.00±0.21) よりも低かった (p<0.02) (図 6)。

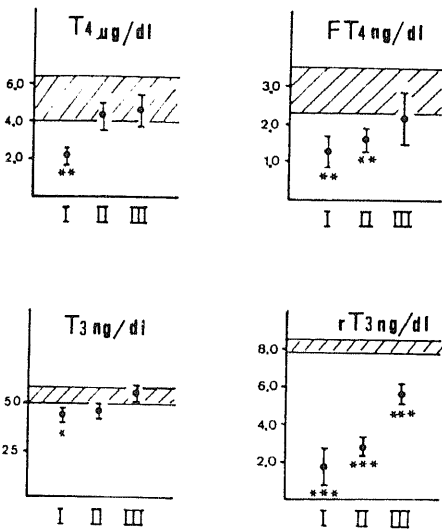


Fig. 2. Serum thyroid hormone (T₄, T₃, FT₄ and rT₃) concentrations of diabetic (I, II, III) rats. Each value represents the mean±SD of 5 rats. Hatched regions represent the values of control group. ***, p<0.001; **, p<0.01; *, p<0.02 vs control.

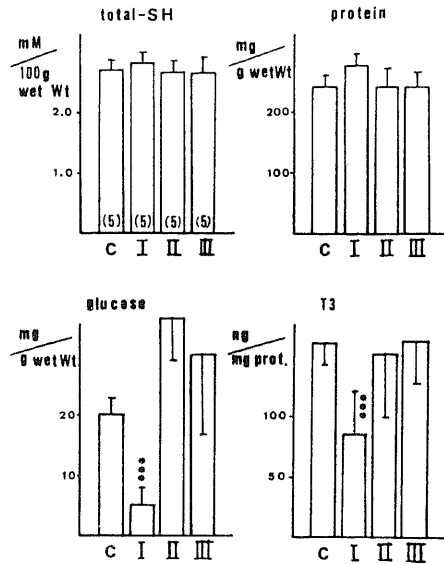


Fig. 3. Hepatic contents of total-SH groups, protein, glucose and T₃ in diabetic (I, II, III) rats. Vertical bars indicate SD. Number in parenthesis; number of rats. ***, p<0.001 vs control.

Table 2. Serum free IRI, IRG, blood glucose and serum protein of diabetic (I, II, III) rats

| Experimental group | No. of rats | Free IRI (μU/ml) | IRG (pg/ml) | Glucose (mg/dl) | Protein (g/dl) |
|--------------------|-------------|------------------|-------------|-----------------|----------------|
| Group I | 5 | 14.0±1.5*** | 253±41*** | 611±55*** | 6.9±1.2 |
| Group II | 5 | 31.4±7.3 | 114±27 | 582±64*** | 7.0±0.2 |
| Group III | 5 | 68.7±29.7 | 59±15 | 297±129 | 6.7±0.2 |
| Control | 5 | 43.8±8.0 | 118±15 | 209±13 | 6.7±0.3 |

Values are expressed in mean±SD. ***, p<0.001 vs control value. As for the group I-III, See the foot note of Table I.

考 察

低 T_3 症候群で知られるように¹⁷⁾¹⁹⁾食餌性の糖質摂取が低下すると、サイロキシン代謝に変化がおこ

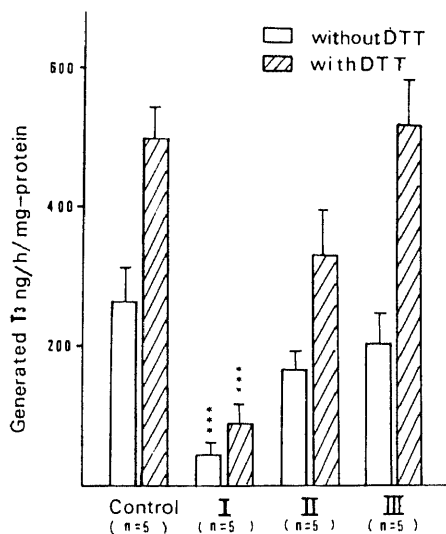


Fig. 4. Hepatic T_4 -5'-deiodinase activity of diabetic rats. Open columns indicate values without addition of DTT. Hatched columns indicate those with the addition of 2 mM DTT. Vertical bars indicate SD. ***, $p < 0.001$ vs control.

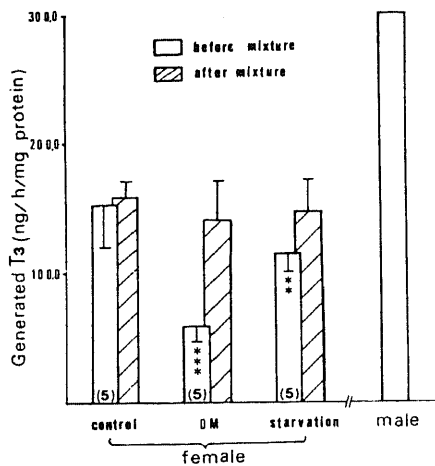


Fig. 5. Changes of hepatic T_4 -5'-deiodinase activity in female diabetic and starved rats before and after an equal mixture with male rat liver homogenate. Open columns indicate values before mixture; hatched columns, those after mixture; vertical bars, SD; ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.02$ vs control.

る⁵⁾⁶⁾。糖尿病によるインスリン不足状態は、細胞内糖質利用障害をきたし、そのために飢餓状態と同様にサイロキシン代謝に変化をきたすことは充分予想される。臨床的にも血糖コントロール不良時に、血中甲状腺ホルモン濃度に変化することが、すでに知られている^{7)~10)}。

今回、STZにより実験的に作製した糖尿病ラットで、5週間という比較的長期間のインスリン補充療法を行い、糖尿病状態が、サイロキシン代謝におよぼす影響を、肝の T_4 -5'脱ヨード活性を中心に検討した。また、この間の成長発育障害との関係についても、検討した。

糖尿病ラット I 群は、著しい高血糖、低インスリン血症を示し、インスリン不足状態が最も著しいと考えられるラットであるが、 T_4 、 T_3 、 rT_3 、 FT_4 すべての血中甲状腺ホルモン濃度が低下しており、かつ末梢における肝の T_4 -5'脱ヨード活性も著明に低下していた。また、この活性低下は、SH 基賦活剤である DTT 添加にても回復しなかった。インスリン補充量を増加させた II、III 群ではインスリン増量とともに血中甲状腺ホルモン濃度は正常化し、肝における T_4 -5'脱ヨード活性も回復した。インスリン不足状態における脱ヨード活性の低下については肝組織中の総 SH 基含量には変化はなく、DTT 添加にても活性の回復が認められないことより、 T_4 -5'脱ヨード酵素蛋白量自体の減少が原因

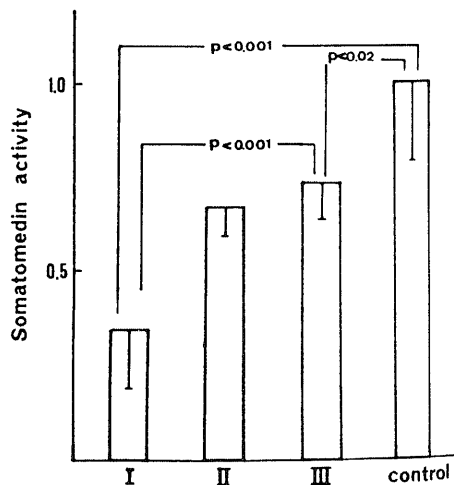


Fig. 6. Serum somatomedin activity of diabetic (I, II, III) rats. Somatomedin activity was measured by rat fibroblast 3H -T₄R uptake. The mean value of somatomedin activity from control group was arbitrarily defined as 1.0. Vertical bars indicate SD.

であることが考えられる。また、肝細胞由来の T_4 、 $5'$ 脱ヨード活性阻害物質の存在については否定的であった。Gavin ら²⁰⁾は、同様に糖尿病状態下での T_4 、 $5'$ 脱ヨード活性の低下について検討しているが、非蛋白結合SH基の含量とも関係しないとしている。またインスリン補充開始後、 T_4 、 $5'$ 脱ヨード活性正常化までに時間的な差があることより、今回の結果から示唆されたと同様に活性型の酵素蛋白量が低下していることを指摘している。その他に、インスリンと脱ヨード酵素蛋白量に関する報告としては、飢餓状態のラットに、グルコースを再投与した時に、肝の T_4 、 $5'$ 脱ヨード活性の回復には、補酵素の影響はなく、インスリン、グルカゴンの糖代謝調節ホルモンが、 T_4 、 $5'$ 脱ヨード酵素合成に関与していることが報告されている²¹⁾。また培養細胞系を用いた実験では、甲状腺および肝細胞において、インスリン、グルコースが直接甲状腺ホルモン合成を促進させ、末梢の T_4 → T_3 脱ヨード活性を亢進させることが観察されている^{22)~24)}。以上よりインスリンが、甲状腺におけるホルモン合成および肝細胞内の T_4 → T_3 脱ヨード酵素量を介し、サイロキシン代謝とかかわっていることが認められた。またインスリン欠乏が、視床下部 TRH 含量を低下させ、下垂体よりの TSH 分泌を低下させることも報告されている²⁵⁾。このようにインスリンは、視床下部-下垂体-甲状腺系および末梢サイロキシン代謝のすべてのレベルで、甲状腺ホルモン代謝に影響を与えていると考えられる。

今回の成績では、 rT_3 が T_3 と同様に低値を示した。糖尿病患者に、経口的に T_4 を投与し T_4 の代謝回転を調べた Pittman ら²⁶⁾の報告では糖尿病状態下、 T_3 産生低下とともに rT_3 のクリアランスが低下することを指摘している。今回の検討で rT_3 の低下も認められたことより、長期間のインスリン不足状態では T_4 → rT_3 への T_4 、 $5'$ 脱ヨード酵素も低下をきたし血清 rT_3 が低下した可能性が考えられる。

若年型糖尿病では、適切なインスリン治療がなされないと、モリヤック症候群 (Mauriac's Syndrome) で知られるように低身長をきたしてくる^{27)~30)}。血糖コントロール不良時、成長ホルモン (Growth Hormone, GH) 分泌は、かえって亢進していることも認められており³¹⁾³²⁾コントロール不良時の糖尿病状態下では、ラロン型小人症 (Laron type dwarfism) でみられるような、過剰な GH が存在するにもかかわらず、低身長をきたしてくる状態となっている³³⁾。臨床的には、糖尿病状態下でのソマトメジン活性については、種々の報告があり一定しないが^{33)34)~38)}、インスリン注入ポンプを使って厳格に血糖コントロールをすることにより GH 分泌が正常化することや³⁹⁾⁴⁰⁾、低身長を呈する若

年型糖尿病で、インスリン治療強化することにより、成長発育およびソマトメジン活性も正常化したことより⁴¹⁾、糖尿病状態下の発育障害因子として、肝におけるソマトメジン産生以後のレベルに障害がきたしていることが考えられた。

今回、従来よく用いられた軟骨細胞とはちがった線維芽細胞を用い、10%被検血清で培養後の 3H -TdR の取りこみ能のちがいに血清ソマトメジン活性を評価してみたが、身長、体重の発育が著しく障害された I 群ラットでは、線維芽細胞の 3H -TdR 取りこみは、著しく抑制されており、また発育が、対照ラットと差がないようにインスリン補充された糖尿病ラットでも、対照に比べ有意に低下していた。

最近、Vassilopoulou-Sellin ら⁴²⁾は、ラット肝細胞よりソマトメジンを抽出し、飢餓ラット、糖尿病ラットの肝で、ソマトメジン含有量が低下していることを示している。また、Miller ら⁴³⁾により NSILG (non-suppressible insulin like growth factor) の肝細胞での合成分泌に、インスリン投与量が関与していることが報告されていることより、肝細胞レベルでのソマトメジン産生に、成長ホルモン、栄養状態とともにインスリンが強く関与していると考えられる。

血清中のソマトメジン阻害因子については検討しなかったが、飢餓時、下垂体摘除時、低栄養状態下で、血清中に、ソマトメジン阻害因子が存在することが報告されており^{44)~48)}、糖尿病状態下では、成長発育障害が認められない III 群ラットにおいても、ソマトメジン活性の低下がみられたことは、阻害因子の存在に矛盾しないものと思われた。

結 論

糖尿病状態下におけるサイロキシン代謝異常および成長障害因子について検討した結果、次の結論をえた。

1. 著しい高血糖、低インスリン血症を示すラットでは、 T_4 、 T_3 、 rT_3 、 FT_4 のすべての血中甲状腺ホルモン濃度は低値を示した。
2. 肝の T_4 → T_3 への脱ヨード活性は、著しい糖尿病状態の時、著明に低下しており、これは DTT 添加にても回復せず、酵素蛋白量の減少のためと思われた。組織由来の脱ヨード活性阻害因子は証明されなかった。
3. 上記の甲状腺ホルモンの異常は、十分なインスリン補充によって rT_3 以外は、正常に回復した。また、脱ヨード活性も、同様に、十分なインスリン補充によって正常化した。
4. 成長発育障害のみられたラットでは、同時に、血中の T_3 値が低く、臨床的に、インスリン不足の指標として T_3 値の測定が有用と思われた。

5. 血中ソマトメジン活性は、糖尿病状態では著明に低下し、成長発育障害の一因とみなされた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました谷口昂教授に深謝致します。また終始直接御指導、御鞭撻頂いた佐藤保助教授、鈴木祐吉講師はじめ、研究に御協力頂きました教室員の皆様に感謝致します。

なお、本論文の要旨は、第27回日本糖尿病学会にて発表した。

文 献

- 1) Chopra, I. J., Chopra, U., Smith, S. R., Reza, M. & Solomon, D. H.: Reciprocal changes in serum concentrations of 3,3',5'-triiodothyronine (reverse T_3) and 3,3',5'-triiodothyronine (T_3) in systemic illnesses. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **41**, 1043-1049 (1975).
- 2) Nicod, P., Burger, A., Staeheli, V. & Vallotton, M. B.: A radioimmunoassay for 3,3',5'-triiodo-L-thyronine in unextracted serum: Method and clinical result. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **42**, 823-829 (1976).
- 3) Danforth, E., Desilets, E. J., Horton, E. S., Sims, E. A. H., Burger, A. G., Braverman, L. E., Vagenakis, A. G. & Ingbar, S. H.: Reciprocal changes in serum triiodothyronine (T_3) and reverse triiodothyronine (rT_3) induced by altering the carbohydrate content of the diet. *Clin. Res.*, **23**, 573A (1975).
- 4) Vagenakis, A. G., Burger, A., Portnay, G. I., Rudolph M., O'Brien, J. T., Azizi, F., Arky, R. A., Nicod, P., Ingbar, S. H. & Braverman, L. E.: Diversion of peripheral thyroxine metabolism from activating to inactivating pathways during complete fasting. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **41**, 191-194 (1975).
- 5) Spalding, S. W., Chopra, I. J., Serwin, R. S. & Lyall, S. S.: Effect of caloric restriction and dietary composition on serum T_3 and reverse T_3 in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **42**, 197-200 (1976).
- 6) Suda, A. K., Pitmann, C. S., Shimizu, T. & Chambero J. B. Jr.: The production and metabolism of 3,5,3'-triiodothyronine and 3,3',5'-triiodothyronine in normal and fasting subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **47**, 1311-1319 (1978).
- 7) Naeje, R., Golstein, J., Clumeck, N., Meinhold, H., Wenzel, K. W. & Vanhaelst, L.: A low T_3 syndrome in diabetic ketoacidosis. *Clin. Endocrinol.*, **8**, 467-472 (1978).
- 8) Alexander, C. M., Kaptein, E. M., Lum, S. M. C., Spencer, C. A., Kumar, D. & Nicoloff, J. T.: Pattern of recovery of thyroid hormone indices associated with treatment of diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **54**, 362-366 (1982).
- 9) Gilani, B. B., MacGillivray, M. H., Voorhess, M. L., Mills, B. J., Riley, W. J. & MacLaren, N. K.: Thyroid hormone abnormalities at diagnosis of insulin-dependent diabetes mellitus in children. *J. pediat.*, **105**, 218-222 (1984).
- 10) Saunders, J., Hall, S. E. H. & Sönksen, P. H.: Thyroid hormone in insulin requiring diabetes before and after treatment. *Diabetologia*, **15**, 29-32 (1978).
- 11) Jivani, S. K. M. & Rayner, P. H. W.: Does control influence the growth of diabetic children? *Arch. Dis. Childh.*, **48**, 109-115 (1973).
- 12) Tattersall, R. B. & Pyke, D. A.: Growth in diabetic children. Studies in identical twins. *Lancet*, **17**, 1105-1109 (1973).
- 13) Nash, H.: Growth failure, somatomedin and growth hormone levels in juvenile diabetes mellitus.-A pilot study. *Aust. N. Z. J. Med.*, **9**, 245-249 (1979).
- 14) Rakieten, N., Rakieten, M. L. & Nodkarini, M. V.: Studies on the diabetogenic actions of streptozotocin. *Cancer Chemother. Rep.*, **29**, 91-98 (1963).
- 15) Hultman, E.: Rapid specific method for determination of aldosesaccharides in body fluids. *Nature*, **183**, 108-109 (1959).
- 16) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.: Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 256-267 (1961).
- 17) Sedlak, J. & Lindsay, R. H.: Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.*, **25**, 192-205 (1968).
- 18) Chopra, I. J.: A study of extrathyroidal conversion of thyroxine (T_4) to 3,3',5'-triiodothyronine (T_3) *in vitro*. *Endocrinology*, **101**, 453-461 (1977).
- 19) Chopra, I. J., Solomon, D. H., Chopra, U., Wu, S.-Y., Fisher, D. A. & Nakamura, Y.:

- Pathways of metabolism of thyroid hormone. *Rec. Progr. Horm. Res.*, **34**, 521-567 (1978).
- 20) **Gavin, L. A., McMahon, F. A. & Moeller, M.**: The mechanism of impaired T_3 production from T_4 in diabetes. *Diabetes*, **30**, 694-699 (1981).
- 21) **Gavin, L. A. & Moeller, M.**: The mechanism of recovery of hepatic T_4 -5'-deiodinase during glucose-refeeding: Role of glucagon and insulin. *Metabolism*, **32**, 543-551 (1983).
- 22) **Sato, K. & Robbin, J.**: Thyroid hormone metabolism in primary cultured rat hepatocytes: Effect of glucose, glucagon and insulin. *J. Clin. Invest.* **68**, 475-483 (1981).
- 23) **Brisson-Lougarre, A., Bulm, C. & De Nayer, Ph.**: Action of insulin on thyroid protein synthesis in dogs. *Horm. Metab. Res.* **10**, 396-400 (1978).
- 24) **Ahn, C. S. & Rosenberg, I. N.**: Glucose dependence of thyrotropin stimulated thyroid hormone formation. *Endocrinology*, **107**, 1861-1866 (1980).
- 25) **González, C., Montoya, E. & Jofín, T.**: Effect of streptozotocin diabetes on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in the rat. *Endocrinology*, **107**, 2099-2103 (1980).
- 26) **Pittman, C. S., Suda, A. K., Chanber, J. B. & Ray G. Y.**: Impaired 3,5,3'-triiodothyronine (T_3) production in diabetic patients. *Metabolism*, **28**, 333-338 (1979).
- 27) **Guest, C. M.**: The Mauriac syndrome. Dwarfism, hepatomegaly, and obesity with juvenile diabetes mellitus. *Diabetes*, **2**, 415-417 (1953).
- 28) **Pond, H.**: Some aspects of growth in diabetic children. *Postgrad. Med. J.*, **46**, 616-623 (1970).
- 29) **Jackson, R. L., Holland, E. & Chatman, I. D.**: Growth and maturation of children with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Care*, **1**, 96-107 (1978).
- 30) **Birkbeck, J. A.**: Growth in juvenile diabetes mellitus. *Diabetologia*, **8**, 221-224 (1972).
- 31) **Bruck, E. & MacGillivray, M. H.**: Interaction of endogenous growth hormone, cortisol and catecholamines with blood glucose in children with brittle diabetes. *Pediat. Res.*, **9**, 535-541 (1975).
- 32) **Hayford, J. T., Danny, M. M., Hendrix, J. A. & Thompson, R. G.**: Integrated concentration of growth hormone in juvenileonset diabetes. *Diabetes*, **29**, 391-398 (1980).
- 33) **Phillips, L. S. & Vassilopoulou-Sellin, R.**: Somatomedin. *New Engl. J. Med.*, **302**, 371-380 (1980).
- 34) **Cohen, M. P., Jasti, K. & Rye, D. L.**: Somatomedin in insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **45**, 236-239 (1977).
- 35) **Winter, R. J., Phillips, L. S., Klein, M. N., Traisman, H. S. & Green, O. C.**: Somatomedin activity and diabetic control in children with insulin-dependent diabetes. *Diabetes*, **28**, 952-954 (1979).
- 36) **Winter, R. J., Phillips, L. S., Green, O. C. & Trisman, H. S.**: Somatomedin activity in the Mauriac syndrome. *J. pediat.*, **96**, 598-600 (1980).
- 37) **Ashton, I. K., Dorman, T. L., Pocock, A. E., Turner, R. C. & Bron, A. J.**: Plasma somatomedin activity and diabetic retinopathy. *Clin. Endocrinol.*, **19**, 105-110 (1983).
- 38) **Rieu, M. & Binoux, M.**: Serum levels of insulin-like growth factor (IGF) and IGF binding protein in insulin-dependent diabetics during an episode of severe metabolic decompensation and the recovery phase. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **60**, 781-785 (1985).
- 39) **Thamborlane, W. V., Sherwin, R. S., Koivisto, U., Hendler, R., Genel, M. & Felig, P.**: Normalization of the growth hormone and catecholamine response to exercise in juvenile-onset diabetic subjects treated with portable insulin infusion pump. *Diabetes*, **28**, 785-788 (1979).
- 40) **Green, O. C., Winter, R. J., Traisman, H. S. & Phillips, L. S.**: Somatomedin deficiency in the Mauriac syndrome. *Diabetes*, **27**, (Supp. 1), 479 (1978).
- 41) **Tambowlance, W. V., Hintz, R. L., Bergman, M., Genel, M., Felig, P. & Sherwin, R. S.**: Insulin-infusion-pump treatment of diabetes. Influence of improved metabolic control on plasma somatomedin level. *New Engl. J. Med.*, **305**, 303-307 (1981).
- 42) **Vassilopoulou-Sellin, R., Phillips, L. S., Oyedeji, C. O. & Samaan, N. A.**: Metabolic regulation of somatomedin activity in rat liver. *J. Endocr.*, **101**, 257-261 (1984).
- 43) **Miller, L. L., Schalch, D. S. & Draznin, B.**: Role of the liver in regulating somatomedin activi-

ty : Effects of streptozotocin diabetes and starvation on the synthesis and release of insulin-like growth factor and its carrier protein by the isolated perfused rat liver. *Endocrinology*, **108**, 1256-1271 (1981).

44) Phillips, L. S., Belosky, D. C. & Reichard, L. A. : Nutrition and somatomedin V. Action and measurement of somatomedin inhibitor (s) in serum from diabetic rats. *Endocrinology*, **104**, 1513-1518 (1979).

45) Phillips, L. S., Vassilopoulou-Sellin, R., & Reichard, L. A. : Nutrition and somatomedin VIII. The somatomedin inhibitor in diabetic rat serum is a general growth cartilage inhibitor. *Diabetes*, **28**,

919-924 (1979).

46) Phillips, L. S. & Scholz, T. D. : Nutrition and somatomedin, IX. Blunting of insulin-like activity by inhibitor in diabetic rat serum. *Diabetes*, **31**, 97-104 (1982).

47) Salmon, W. D. Jr : Interaction of somatomedin and a peptide inhibitor in serum of hypophysectomized and starved, pituitary intact rats. *Adv. Metab. Disord.*, **8**, 183-199 (1975).

48) Phillips, L. S., Belosky, D. C., Young, H. S. & Reichard, L. A. : Nutrition and somatomedin VI. Somatomedin activity and somatomedin inhibitory activity in sera from normal and diabetic rats. *Endocrinology*, **104**, 1519-1524 (1979).

**Peripheral Thyroxine Metabolism of Young Rats and Experimental Diabetic Rats (II)
Impairment of Peripheral Thyroxine Metabolism and Somatomedin Production in Streptozotocin-induced Diabetic Rats** Kyoko Nishiwaki, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 — *J. J. Med. Soc.*, **94**, 697-706 (1985)

Key words: thyroxine, triiodothyronine, T4-5'-deiodinase, somatomedin, diabetes mellitus

Abstract

Effect of insulin deficiency on peripheral thyroxine (T4) metabolism and somatomedin (SM) production were examined in streptozotocin (STZ)-treated rats. Overt diabetes mellitus was induced in male Wistar rats (160-200g) by an intravenous injection of 50mg/kg STZ. After the induction, they were divided into 3 groups for the replacement dose of insulin; I, 40u/kg/day one a week; II, 20u/kg/day daily; and III, 40u/kg/day daily, for 5 weeks. Saline-treated rats served as controls. Body weight gain and head-tail tip length were measured weekly. At 6th week after the STZ injection, rats were sacrificed and serum thyroid hormone levels (T4, free-T4, triiodothyronine [T3] and reverse T3,) SM activity, blood glucose, immunoreactive insulin (IRI) and glucagon (IRG), length and weight of femoral bone, hepatic contents of protein, glucose, T3 and sulfhydryl groups, and T4-5'-deiodinase activity were determined. Serum SM activity was estimated by fibroblast ³H-thymidine uptake. Impairment of growth was observed in severe hyperglycemic and hypoinsulinemic diabetic rats. Serum thyroid hormone levels, hepatic T4-5'-deiodinase activity, glucose and T3 contents were also significantly reduced in growth retarded diabetic rats. Reduced T4-5'-deiodinase activity was not recovered by the addition of dithiothreitol. Neither the tissue-derived inhibitory factor T4-5'-deiodinase nor the decrease in hepatic sulfhydryl groups content was observed. All of these abnormalities in T4 metabolism were normalized by increasing doses of insulin. SM activity was also extremely low in diabetic state, but was not restored by the increment of insulin doses. In brief, insulin deficiency produces the severe alteration in peripheral T4 metabolism, the decrease in synthesis of hepatic-T4-5'-deiodinase and SM, and the intracellular deprivation of glucose. It is suggested that all these changes result in a marked retardation of growth.