

一酸化窒素は糖尿病マウスの運動量を増加させる

西山敦子¹⁾ 永田瑞生²⁾ 大和孝子¹⁾ 青峰正裕¹⁾²⁾

Nitric Oxide Enhances the Locomotor Activity of Spontaneously Diabetic Mice

Atsuko Nishiyama¹⁾ Tamaki Nagata²⁾ Takako Yamato¹⁾ Masahiro Aomine¹⁾²⁾

(2008年11月28日受理)

【序論】

一酸化窒素 (NO) はオゾン層の破壊に関与し、大気汚染の有害物質として知られている¹⁾。しかしながら、1980年 Furchgott と Zawadzki²⁾ によって、血管の内皮細胞由来弛緩因子 (Endothelium-Derived Relaxing Factor ; EDRF) が発見され、EDRF 物質の本体は NO であり³⁾、また、NO は L-アルギニン (Arg) から生成されることが明らかとなった⁴⁾⁵⁾。それ以後、NO は医学や生化学の分野において大きな注目を集め、NO 研究がスタートした。そして NO は生体内で様々な生理活性を示すことが次々と明らかとなった。最も広く知られている NO の生理作用は血管拡張作用である。NO は生体内で NO 合成酵素 (NOS) により Arg から L-シトルリンへと代謝される際に合成される。Arg が不足すると高血圧を発症することや⁶⁾、循環器系以外でも脳神経系や消化器系、呼吸器系など多くの組織や器官で作用していることが明らかとなっている¹⁾。このように NO が重要な生体内メッセンジャーであることが解明されて以来、薬剤として様々な NO 放出薬が開発され用いられてきた⁷⁾。

一方、平成14年に実施された「糖尿病実態調査」によると、日本の糖尿病患者は推定740万人、予備軍も含めると1620万人に達すると報告され⁸⁾、平成18年の同調査では、糖尿病患者は推定820万人、予備軍も含めると1870万人とその数は着実に増加している⁹⁾。糖尿病はインスリンの分泌作用不足に基づき、慢性高血糖症という特異的な代謝異常や蛋白・脂肪など広範囲の代謝異常をきたし、その結果、細小血管障害や神経障害などの慢性合併症を引き起こす疾患である¹⁰⁾。我が国の死亡原因としての糖尿病は平成17年調査で第11位であり、死因の上位とはなっていないが、糖尿病は主要な死亡

原因である脳卒中や虚血性心疾患などの重要な危険因子である¹¹⁾。糖尿病患者数は上記のように増加の一途をたどっており糖尿病の症状が現れたときにはすでに病状が進行している場合が多く、糖尿病に関連した合併症も重大な問題となっている。糖尿病治療には食事療法および運動療法が有効であり、それらを効率よく組み合わせて症状の改善あるいは糖尿病を予防していくことが重要である。

そこで今回糖尿病マウスと非糖尿病マウスを用い、NO 誘発物質である Sodium Nitroprusside (SNP) と Arg をマウスに投与し運動量にどのような影響を及ぼすのか、また、糖尿病マウスと非糖尿病マウスにそれらの物質の作用に違いがあるかを比較検討した。

【方法】

1. 実験動物

実験動物として、雄性的自然発症糖尿病マウス (KK/Ta マウス、以下 KK 群) とその対照として非糖尿病マウス (C57/BL マウス、以下 C57 群) を用いた。これらのマウスは中村学園大学アニマルセンターにおいて繁殖されたものである。また、週齢は KK 群 (n=10) が 35.4 ± 1.5 週、C57 群 (n=10) が 34.9 ± 2.4 週、体重は KK 群 36.1 ± 2.6 g、C57 群 30.9 ± 1.3 g であった。なお、本研究は「中村学園大学 (含む短期大学部) における動物実験のための指針」に基づいて行った。

2. 試薬

薬剤は、NO 誘発物質である Sodium Nitroprusside (SNP) (和光純薬、大阪) と L-アルギニン (Arg) (和光純薬) をそれぞれ 0.1mM と 1mM の濃度となるように蒸留水で溶解して使用した。

3. 運動量測定

運動量の測定は、SNP 0.1mM, SNP 1mM, Arg 0.1mM, Arg 1mM の4種類の溶液をマウスの腹腔内にそれぞれ0.8cc/kg体重ずつ投与し5分後に回転かご式運動量測定器(直径20cm, 円周約60cm, シナノ製作所)に入れ、自発運動量(回転数)を15分間毎に120分間記録した。また、コントロールとして、0.9%NaCl溶液を用いた実験も行った。実験は、室温が平均26.8℃, 湿度は平均57.8%の条件下で行った。なお、運動時間以外は、餌(配合飼料; CRF1, 日本クレア)及び水は自由摂取とした。

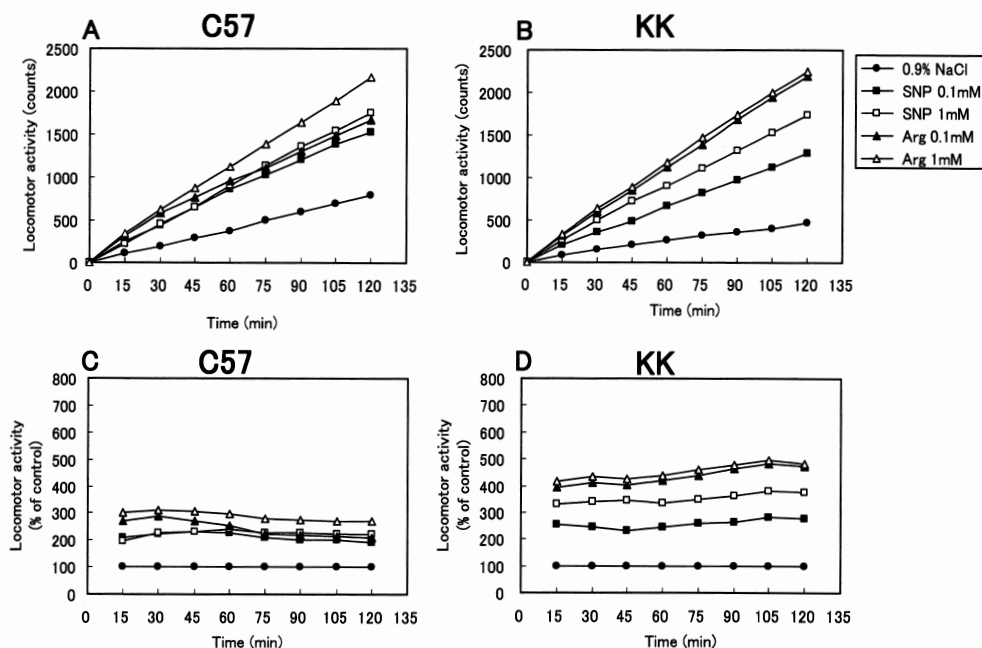
4. 統計処理

測定結果は平均値(Mean) ± 標準偏差(SD)で表し、統計的な有意差検定は、Studentのpaired及びnon-paired t-testによる検定を行い、 $p < 0.05$ で有意と判定した。

【結果】

図1AおよびBは、それぞれC57群マウスとKK群マウスにおいてコントロール(0.9%NaCl), SNP 0.1mM, SNP 1mM, Arg 0.1mM, Arg 1mMを投与した後120分間までの回転かごでの総回転数の累計を比較したものである。また、図1CおよびDはそれぞれAとBのコントロール値を100%とした場合の変化率を示している。C57群ではコントロール値と比較して全ての場合で運動量は顕著に増加した(図1A)。SNP, Argは各々濃度依存性に運動量を増加したが、その増加はArgにおいてとくに大であった。120分間の測定中、とくに前半の1時間に運動量が多い傾向にあった(図1C)。一方、糖尿病であるKK群においてもSNPやArgはC57群の場合と同様に濃度依存性に運動量を増加させたが、その増加はC57群よりも顕著であり、120分間の測定の後半(図1D)において運動量は増加する傾向があった。

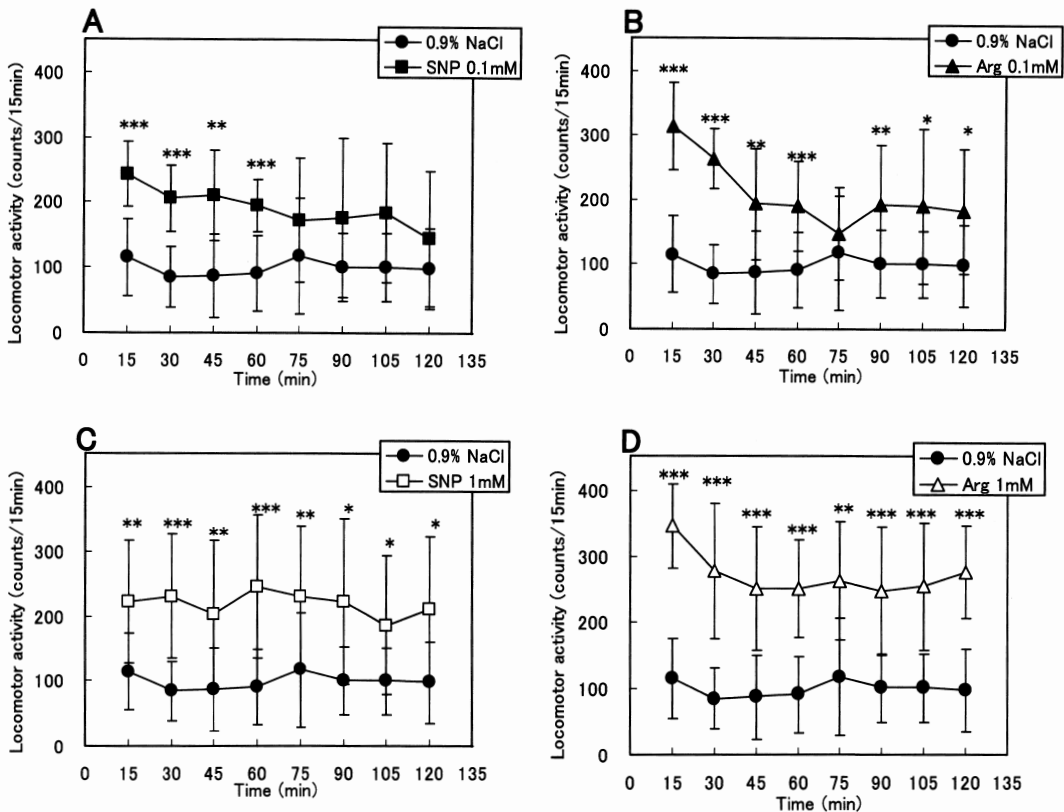
図2は、C57群においてSNPおよびArg作用下での15分間毎の回転かごの回転数をコントロール値と比較したものである。各薬剤を投与したいずれの場合においても運動量はコントロール値よりも増



《図1》非糖尿病マウス(C57群)と糖尿病マウス(KK群)の運動量へのSNPとArgの影響

AとBは、それぞれC57群とKK群における0.9%NaCl(コントロール), SNP 0.1mM, SNP 1mM, Arg 0.1mMおよびArg 1mMを投与した場合の120分間までの回転かごの総回転数の累計を示したものである。CとDは、AおよびBのコントロール値を基準(100%)とした変化率を示している。なお、データはC57群およびKK群それぞれ10匹の平均値を示している。

C57



《図2》C57群におけるSNPとArg投与下での15分間毎の運動量の比較

AはSNP 0.1mM, BはArg 0.1mM, CはSNP 1mM, DはArg 1mMの場合を示している。なお、データはC57群10匹の平均値と標準偏差を示す。

*印は0.9%NaCl(コントロール)とSNP, Argの間に統計的有意差が認められたことを示している(*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001)。

加しているのがわかる。とくにArgにおいて増加していたが、両薬剤により運動量は時間の経過に伴い減少傾向にあった。またKK群の場合においても、SNPよりもArgの方が運動量を増加させた(図3)。

さらにC57群とKK群において、SNPとArgの効果の比較が容易なようにまとめたものが図4である。図4AとBは、それぞれ図2と図3のデータをまとめたもので、図4CとDは、図4AおよびBのコントロール値を100%とした場合の変化率を示している。両群ともにSNP, Arg投与によりコントロールと比べ運動量は増加したが、とくに最初の15分間に運動量は多く、次第に減少していく傾向があった。コントロール(0.9%NaCl投与)に対する変化率でみると、C57群よりもKK群で顕著にSNP, Argで増加した。

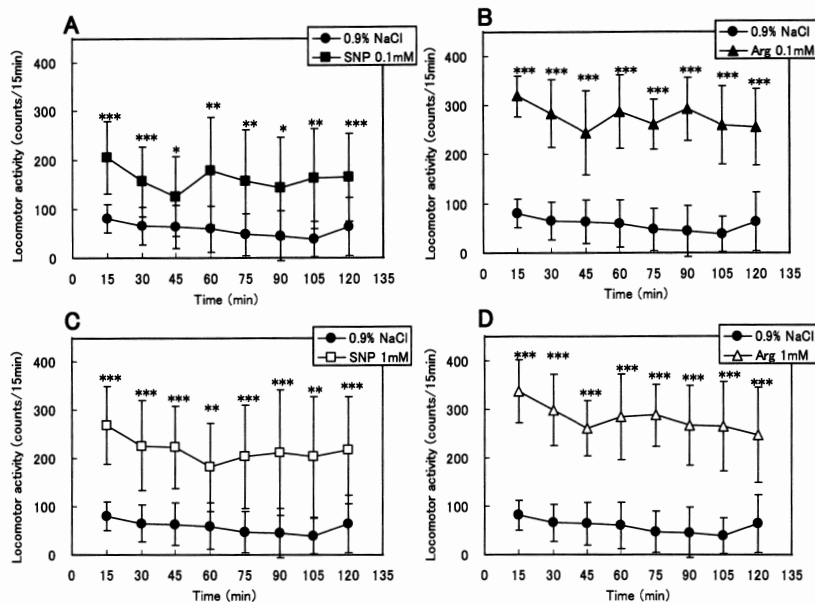
次にC57群とKK群において、SNPとArgの薬

剤別にそれらの効果を比較してみた(図5, 図6)。SNP投与後、15分間毎の回転かごの回転数を両群で比較したものを図5に、Argの場合を図6に示す。0.9%NaClでの15分間毎の回転かごの回転数はC57群の方がKK群より多いことが容易にわかる(図5A)。SNP 0.1mM投与において、C57群はKK群よりも作用初期に若干運動量は多かったが、後半では同程度の増加がみられた(図5B)。一方、SNP 1mMでは、両群間における運動量の差はほぼ消失した(図5C)。

Arg 0.1mMを投与した場合、SNP 0.1mMの場合とは異なりKK群が作用後半でC57群の運動量を上回った(図6B)。Arg 1mMでは、SNP 1mMの場合と同様に両群間での運動量の差は消失した(図6C)。

図7は両群における0.9%NaCl, SNP(0.1mM,

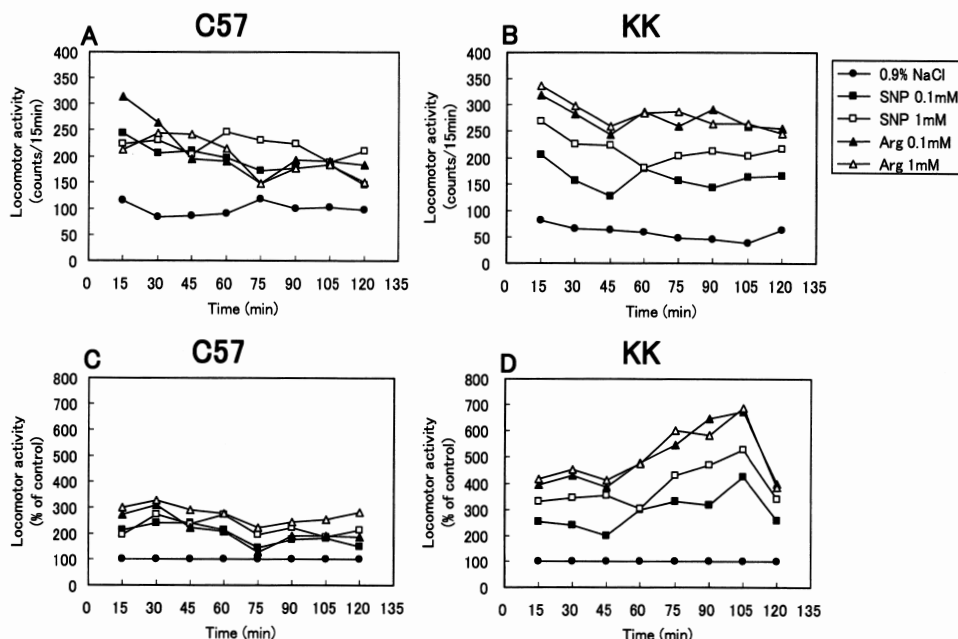
KK



《図3》KK群におけるSNPとArg投与下での15分間毎の運動量の比較

AはSNP 0.1mM, BはArg 0.1mM, CはSNP 1mM, DはArg 1mMを示している。なお、データはKK群10匹の平均値と標準偏差を示す。

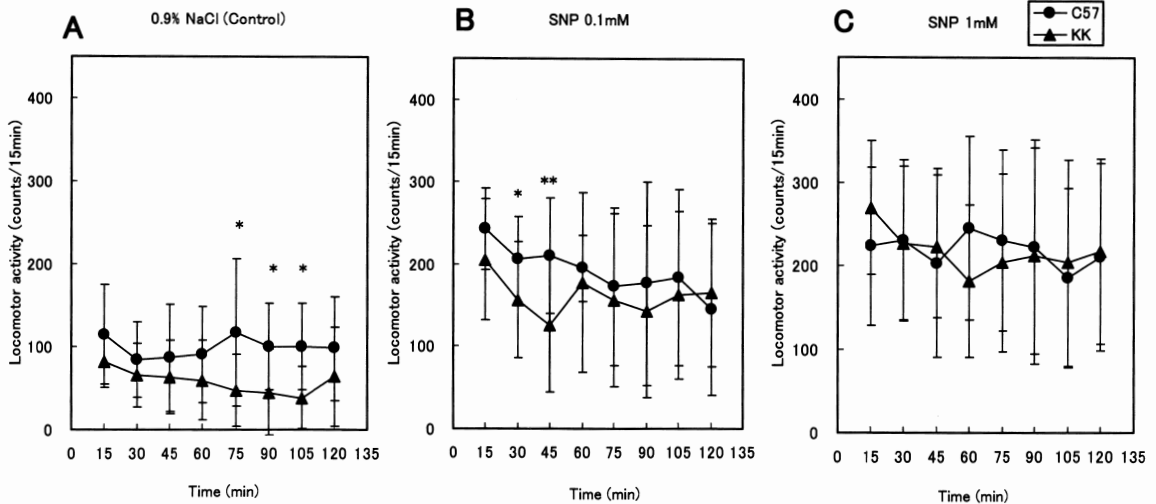
印は0.9%NaCl(コントロール)とSNP, Argの間に統計的有意差が認められたことを示している($p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。



《図4》C57群とKK群におけるSNPとArgによる運動量(15分間毎の運動量)への影響

両群において0.9%NaCl(コントロール), SNP 0.1mM, SNP 1mM, Arg 0.1mMおよびArg 1mMを投与後, 15分間毎の回転かごの回転数(AはC57群, BはKK群)を示している。CとDは, AおよびBのコントロール値を基準(100%)とした変化率を示している。なお、データはC57群およびKK群それぞれ10匹の平均値を示している。

SNP

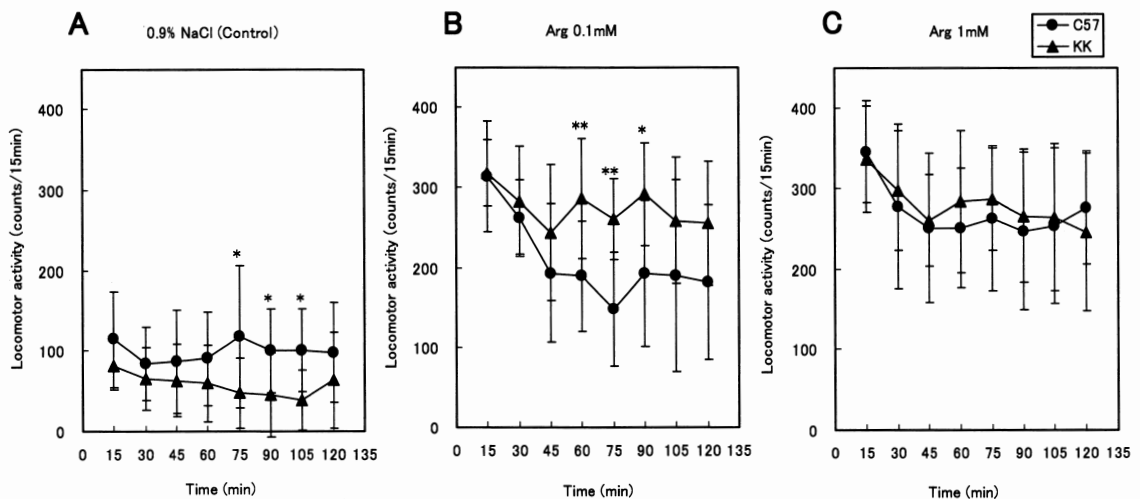


《図5》SNP投与によるC57群とKK群における15分間毎の運動量の比較

Aは0.9%NaCl(コントロール), BはSNP 0.1mM, CはSNP 1mMの場合を示している。なお, データはC57群およびKK群それぞれ10匹の平均値と標準偏差を示す。

印はC57群とKK群の間に統計的有意差が認められたことを示している ($p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。

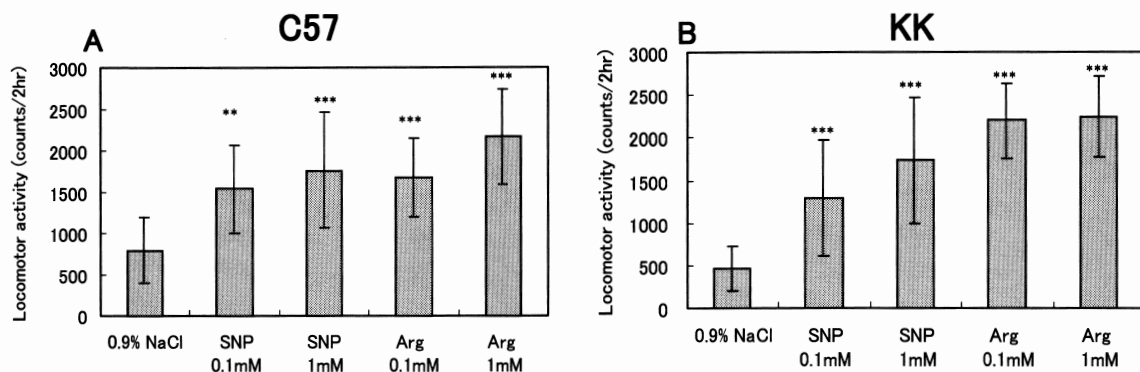
Arg



《図6》Arg投与によるC57群とKK群における15分間毎の運動量の比較

Aは0.9%NaCl(コントロール), BはArg 0.1mM, CはArg 1mMの場合を示している。なお, データはC57群およびKK群それぞれ10匹の平均値と標準偏差を示す。

印はC57群とKK群の間に統計的有意差が認められたことを示している ($p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。



《図7》C57 群と KK 群における 0.9%NaCl, SNP, Arg 投与 120 分間の運動量の総計の比較

A は C57 群, B は KK 群を示している。なお, データは C57 群および KK 群それぞれ 10 匹の平均値と標準偏差を示す。

* 印は 0.9%NaCl と SNP, Arg の間に統計的有意差が認められたことを示している (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, 0.9% NaCl vs. SNP 0.1mM, SNP 1mM, Arg 0.1mM, Arg 1mM)。

1mM), Arg(0.1mM, 1mM) を投与した際の 120 分間の回転かごの総回転数を比較したものである。0.9%NaCl(コントロール)投与と比較して, 2 種類の薬剤の二つの濃度でいずれも有意に両群マウスの運動量は増加した。そして最も運動量が増加した薬剤は両群とも Arg 1mM を投与した場合であった。とくに KK 群においてはコントロール値と比較して, 運動量は約 4.8 倍に増加した(図 7 B)。一方, C57 群の場合は, 約 2.7 倍であり KK 群の約半分に留まった(図 7 A)。

【考察】

SNP は NO 供与剤である。NO 供与剤とは NOS がなくとも NO を放出する物質で, SNP は化学反応だけで NO を放出することができる。また, Arg は NO の生成に関与する物質で, 生体内で NOS により Arg が L- シトルリンへ代謝される際に NO が生成される。NO の生理作用には, 血管平滑筋弛緩, 炎症反応抑制, 血小板凝集抑制, 白血球粘着抑制, 疼痛抑制, 神経伝達, 殺菌, 抗腫瘍などがある¹²⁾。

今回の実験において, NO 誘発物質である SNP と Arg を投与すると, 糖尿病マウスと非糖尿病マウスの両群ともこれら二つの薬剤に対し, 濃度依存性に運動量が増加した。このことより, 本実験の結果に主に関係があると思われる作用には, 血管平滑筋弛緩作用が挙げられ, この作用により血管が拡張し, 血流量が増加したことで運動量が増加したと考えられる。

一般に運動を行うと身体組織(主に骨格筋, 心筋)での酸素の需要が高まる。そのために必要な酸素を供給するため呼吸数が増加し, 多くの酸素を肺から

血液に取り込むようになる。あわせて心拍出量が増加し, 各組織への酸素の供給が増すようになる¹³⁾。運動による糖質代謝への影響として, ①運動した筋肉でのインスリン感受性の改善, ②糖質摂取後の血中インスリンレベルの上昇抑制, ③運動筋の有酸素的代謝能力の上昇, ④筋グリコーゲンへの蓄積増加などが認められている¹³⁾。ヒトでは摂取された糖質の 8 割以上は骨格筋で代謝されていることが知られており, 全身の糖質代謝機能に大きな影響を与えている。骨格筋での糖利用はグルコース輸送体(GLUT4)によるグルコースの取り込みに依存している。運動は筋肉の GLUT4 濃度を増加させることによりグルコースの取り込みを増加させる傾向がある。つまり, 運動は全身の代謝機能を向上させる。

また, 呼吸中には NO が少量含まれているが, 運動中は呼吸中 NO の排出速度が増加する。これは単に換気量の増加によるものではなく, NO の生成増加と考えられる。これらのことから, 運動時には体内での NO の増加が必要であると考えられる。加えて NO の生理作用により血流量が増加することで酸素の供給が順調に進むようになり, マウスの運動量が増加したのではないかと考えられる。

次に糖尿病の影響について考察する。C57 群と KK 群において 0.9%NaCl を投与したときの運動量を比較すると, KK 群マウスの 120 分間の回転数は平均 465 回転であり, C57 群マウスでは平均 794 回転で, KK 群の運動量は C57 群の約 60%であった。紀らの報告¹⁴⁾においても両群の運動量の差には今回同様の結果が得られており, 糖尿病状態による運動機能の低下や体重過多を反映した結果ではないかと考えられる。

また、Arg の反応が非糖尿病マウスより糖尿病マウスでより大きかったのは Arg にインスリンの分泌促進作用があるためではないかと推測される。アミノ酸はブドウ糖非存在下でもインスリン分泌を刺激する。必須アミノ酸であるロイシン, Arg, リジンが最も強力なインスリン分泌刺激作用を持っており, Arg とリジンはロイシンよりも強力な膵 β 細胞刺激作用を有する。これらのアミノ酸はブドウ糖上昇によって生ずるインスリン分泌と独立して起こる¹⁵⁾。

膵 β 細胞から分泌されるインスリンは血中ブドウ糖濃度の調節に重要な役割を果たしており, 膵 β 細胞は血中ブドウ糖濃度を認識して, インスリン分泌を調節している。

現在までに明らかとなったブドウ糖によるインスリン分泌機構は, まずブドウ糖が, 膵 β 細胞膜に存在する GLUT を通して細胞内に取り込まれ解糖系に入り代謝される。その結果, 産生された ATP が ATP 感受性 K^+ チャンネルを閉じ, 細胞膜の脱分極を引き起こす。脱分極により電位依存性 Ca^{2+} チャンネル (VDCC) が開き, 細胞内のカルシウムが流入し, この細胞内 Ca^{2+} の濃度の上昇がインスリン分泌を引き起こす¹⁶⁾。

Arg は, 陽性電荷を帯びた状態で細胞内に輸送され β 細胞膜を脱分極させると考えられている。その脱分極が VDCC を活性化させ, Ca^{2+} の流入を引き起こし, 細胞質 Ca^{2+} 濃度を増加させる。この特有の作用様式によって, Arg ではなぜブドウ糖と異なり, 糖尿病患者でインスリンの急速な分泌を誘発するのかを説明できる¹⁵⁾。

運動時には, 筋肉でのエネルギー需要が著明に増大し, エネルギー基質として血液中より脂肪酸やブドウ糖を取り込み利用するようになる。このブドウ糖をエネルギーとして取り込むのに必須なホルモンがインスリンである¹⁶⁾。すなわち, 運動時の糖取り込みにはインスリンが必須であるため, Arg によってインスリンの分泌が促進されることにより, より多くのブドウ糖がエネルギーとして筋肉に取り込まれ, 糖尿病マウスの運動量が増加した可能性が示唆された。

また, 現在のところ 2 型糖尿病の発症機構に NO が関わっているという確実な証拠はなく, NO が膵 β 細胞機能を抑制するとか, インスリン作用にかかわっていることは証明されていない¹⁷⁾。

今回の実験において, Arg 0.1mM と 1mM における運動量にあまり差が見られなかったのは, NOS に限りがある Arg 0.1mM を投与した状態の NO 産生が限界に達していたのではないかとということ

と, また, Arg 1mM でより多くの NO が産生されたとしても, 血管の拡張に限度があって, 濃度を上げて血流量に変化が現れなかったのではないかと可能性が示唆される。

さらに, NO には運動量を増加させる効果があるということがわかったが, 生理的な循環調節機能や記憶など重要な中枢機能に関する影響を保持する一方, 敗血症性ショック¹⁸⁾, 発がん作用など, NO は多くの分野において諸刃の剣的な作用を有する。NO は体内で多くても少なくとも, 体に悪影響を引き起こすため NO 誘発物質を常用するのは危険性が伴う可能性が考えられる。

【総括】

NO 誘発物質である Sodium Nitroprusside (SNP) と L-アルギニン (Arg) を用い, NO が運動機能に及ぼす影響について糖尿病マウスと非糖尿病マウスで比較検討した。

0.9%NaCl を投与した場合, 両群を比較すると, 糖尿病マウスの方が非糖尿病マウスよりも運動量は少なかった。一方, 両群とも両薬剤により濃度依存性に運動量は増加した。また, 変化率では糖尿病マウスの方が非糖尿病マウスよりも大であった。薬剤別に比較すると両群とも Arg 1mM 作用下で最も運動量が増加した。

今回の実験において, NO は非糖尿病および糖尿病マウスの運動量を増加させることがわかった。今回の結果をそのままヒトにあてはめることはできないが NO はヒトに対しても種々の運動機能回復や増強効果を発揮するのではないかと期待される。

【参考文献】

1. 吉村哲彦 (1999) NO (一酸化窒素) — 宇宙から細胞まで. p21, p89, 共立出版, 東京.
2. Furchgott RF, Zawadzki JV. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288, 373-376.
3. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327, 524-526.
4. Sakuma I, Stuehr DJ, Gross SS, Nathan C, Levi R. (1988) Identification of arginine as a precursor of endothelium-derived relaxing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 8664-8667.
5. Rees DD, Palmer RM, Hodson HF, Moncada S.

- (1989) A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. *Br. J. Pharmacol.*, 96, 418-424.
6. Wakabayashi Y, Yamada E, Yoshida T, Takahashi H. (1994) Deficiency of endogenous arginine synthesis provokes hypertension by exhausting substrate arginine for nitric oxide synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 205, 1391-1398.
 7. 片山佳樹 (1997) NO 放出薬と生物学・医学への応用. 52(5), pp955-961, 最新医学社, 大阪.
 8. 財団法人厚生統計協会 (1999) 国民衛生の動向・厚生
の指標. 49(9), 89.
 9. 厚生労働省健康局総務課生活習慣病対策室 (2008) 平成 18 年国民健康・栄養調査結果の概要. 30-31.
 10. 岡村富夫, 戸田昇 (1997) 別冊・医学のあゆみ 内分泌・代謝疾患. p90, p190, 医歯薬出版, 東京.
 11. 財団法人厚生統計協会 (2007) 国民衛生の動向・厚生
の指標. 54(9), 89.
 12. 室田誠逸 (1996) NO の基礎と臨床. p27, メディカルレビュー, 東京.
 13. 岸恭一, 上田伸男編 (1999) NEXT 運動生理学. p25, p45, 講談社, 東京.
 14. 紀麻有子, 平塚圭子, 大和孝子, 青峰正裕 (2001) 糖尿病マウスにおけるコーヒーとその主要成分の運動生理学的効果. 中村学園大学紀要, 第 33 号, 167-176.
 15. 金澤康則徳, 春日雅人, 柏木厚典, 門脇孝, 河盛隆造, 田嶋尚子監訳 (2007) ジョスリン糖尿病学 第 2 版. p104, p123, メディカル・サイエンス・インターナショナル, 東京.
 16. 門脇隆, 河盛隆造, 渥美義仁編集 (1995) 実験医学別冊 メディカル用語ライブラリー 糖尿病 分子メカニズムから病態・診断・治療まで. pp48-51, p108, 羊土社, 東京.
 17. 谷口直之, 鈴木敬一郎 (1999) NO の生理作用と疾患. p66, 羊土社, 東京.
 18. 平田結喜緒 (1996) 別冊・医学のあゆみ NO のすべて. pp228-232, 医歯薬出版, 東京.