高果糖食負荷ラットでのインスリン作用に対するアロプリノールの影響

Effects of allopurinol on insulin action in fructose-fed rats

姜　海　英*　小　池　晃　彦**　木　蘭*
夏　目　有紀枝*　王　忠　華*　成　憲　武***
押　田　芳　治**

Haiying JIANG *　Teruhiko KOIKE *　MU Lan *
Yukie NATSUME *　Zhonghua WANG *　Xianwu CHENG ***
Yoshiharu OSHIDA **

Objective: To investigate how allopurinol (a xanthine oxidase inhibitor) improves insulin action of rats fed with high-fructose diet. **Methods:** Male Wistar rats were randomly divided into 3 groups and each group was fed one of the following diets for 4 weeks: standard chow diet, high-fructose diet, and high-fructose diet plus allopurinol. A part of rats in the high-fructose diet plus allopurinol group were infused with a NOS inhibitor, N^G-monomethyl-L-arginine (L-NMMA), during the euglycemic clamp studies (insulin infusion rate: 3.0mU/kg/min). Insulin sensitivity index was assessed from the oral glucose tolerance test (OGTT). **Results:** Serum uric acid and plasma insulin concentrations were significantly decreased with allopurinol treatment. High-fructose feeding produced a marked decrease in insulin sensitivity index compared with standard chow diet feeding. Allopurinol treated high-fructose fed rats showed a significant increase in insulin sensitivity index, reaching a similar level as that of the standard chow diet feeding. Infusion of L-NMMA did not change the glucose infusion rate of high-fructose fed rats with allopurinol in the euglycemic clamp. **Conclusion:** Improvement of insulin action with allopurinol in fructose-fed rats may not be associated with increase in production of nitric oxide.

はじめに

近年、清涼飲料水などによる果糖の過剰摂取が、脂肪肝をともなった青少年肥満の原因となり、インスリン抵抗性の増加から２型糖尿病を引き起こす可能性が示唆されている[1-3]。一方、果糖過剰摂取は高尿酸血症も引き起こす。高尿酸血症は、肥満、高血圧、脂質代謝異常、耐糖能異常などのメタボリックシンドローム構成因子と合併することや、血清尿酸値が高いほどメタボリックシンドロームの発症頻度が増加することが示されている[4,5]。

キサンチン酸化酵素阻害剤であるアロプリノールは、高尿酸血症および痛風の治療薬として使用されている。また、アロプリノール投与は、高果糖食により誘発される高インスリン血症や高血圧、高中性脂肪血症を改善することから、尿酸がメタボリックシンドローム発症の直接の原因となる可能性も示された[6]。アロプリノールが、10代肥満者の本態性高血圧症を改善することも、高尿酸血症が代謝異常の上流に位置する可能性を示している[7]。一方、ラットの研究で、アロプリノールは、高尿酸血症により低下した血清硝酸塩 / 亜硝酸塩（NOx）産生を増加させることから、内皮細胞機能を改善する可能性がある[8]。糖尿病で低下するとされる一酸化窒素（NO）の産生がアロプリノール投与により回復し、脳血

*　名古屋大学大学院医学系研究科健康スポーツ医学分野博士課程
**　名古屋大学総合保健体育科学センター
***　名古屋大学循環器内科
*　Department of Sports Medicine, Graduate School of Medicine, Nagoya University
**　Research Center of Health, Physical Fitness and Sports, Nagoya University
***　Department of Cardiology, Nagoya University

流を改善することも、人の実験で示唆されている[9]。

本研究では、アロプリノールを高果糖食飼育ラットに投与し、インスリン抵抗性を改善するか否か、さらにNOの関与があるかどうかについて検討した。

対象および方法

７週齢のWistar系雄性ラットを室温20－22℃、明暗サイクルが12時間毎の環境下に、個別ケージで飼育した。餌および水は自由摂取させた。１週間の予備飼育後、無作為で普通食群、高果糖食群、高果糖食及びアロプリノール投与群の３群に分けた。アロプリノール（田辺三菱製薬会社、大阪；2.5mg/100g BW/day）は４週間経口投与し、普通食群と高果糖食群は同量の蒸留水を投与した。体重は週１回測定した。

３週間飼育後、経口ブドウ糖負荷試験（OGTT）を行った。14時間絶食させたラットに50%D-glucose溶液（2g/kg BW）を経口投与し、投与前および投与15、30、60、90、120分後に尻尾より採血し、バイオセンサBF-5血糖測定機（王子計測機器株式会社、兵庫）で血糖値を測定した。血漿インスリン濃度はELISAキット（シバヤギ、群馬）を用いて測定した。尿酸の測定は酵素法が用いられた（長浜ライフサイエンスラボラトリー、長浜）。アロプリノール単回投与による尿酸低下作用は、絶食下でアロプリノール（2.5mg/100g BW）を投与し、１時間と２時間後に採血した。インスリン感受性指数（insulin sensitivity index）は、経口ブドウ糖負荷試験時の投与前、30、60、120分の血糖値とインスリン値を用いて、MatsudaとDeFronzoの計算公式：[10,000/（空腹時血糖値×空腹時インスリン値× OGTT時の平均血糖値× OGTT時の平均インスリン値）の平方根]によって計算した。この方法で評価されたインスリン感受性はインスリンクランプ法で評価される糖利用と高い相関がある（r=0.73, P<0.0001）と報告されている[10]。

インスリン抵抗性の評価のために、正常血糖高インスリンクランプ法を行った。OGTT試験３日後に、ペントバルビタール（sodium pentobarbital; 40mg/kg, i.p.）の麻酔下で、ラットの右頚静脈および左頚動脈にカテーテルを挿入する手術を行なった。回復期間を経て、16時間絶食後、非拘束下で正常血糖高インスリンクランプ法（インスリン注入率：3.0mU/kg BW/min）を実施した。右頚静脈に挿入したカテーテルは、インスリンおよび20%グルコース溶液注入に用いるとともに、本ルートを介して生理食塩水あるいはL-NMMA（1mg/kg BW/min）を投与した。L-NMMAはこの濃度で一酸化窒素合成酵素（NOS）を抑制したとの報告がある[11]。左頚動脈のカテーテルより10分ごとに採血し、血糖値を測定した。血糖値が空腹時レベルに維持されるように、グルコース溶液の注入速度を調節した。血糖値が安定するクランプの後半30分間のグルコース注入速度を用い、平均グルコース注入率（glucose infusion rate: GIR）を算出した。

データは平均値±標準誤差で示し、統計処理はone-way analysis of variance（ANOVA）検定、またはt検定（unpaired Student's t-test）で行った。

結果

１．基本特性

開始時と終了時の体重には、３群間に有意差を認めなかった（表１）。空腹時血糖値には、アロプリノール投与による変化を認められなかったが、空腹時血漿インスリン濃度は、普通食群（0.62±0.03ng/ml）と比較して高果糖食群で明らかに増加し（0.86±0.08ng/ml, P<0.05）、アロプリノール投与により（0.61±0.06ng/ml, P<0.05）有意に低下した。一方、高果糖食により増加した血清尿酸値もアロプリノールの投与により有意に低下した（P<0.05）。

２．アロプリノールの尿酸低下作用

アロプリノール投与１時間後の血清尿酸値は、３群ともに著明に低下した。血清尿酸値は、アロプリノール投与２時間後も低いレベルのまま維持された（P<0.01, 図１）。

３．アロプリノールのインスリン感受性増加作用

経口ブドウ糖負荷後の各時間ごとの血糖値には３群間に有意差は見られなかったが（図２）、負荷後30分と60分のインスリン値は、高果糖食群で明らかな高値を示した。アロプリノール群では、インスリン値が普通食群と同じレベルまで低下した（P<0.05, 図３）。インスリン

表１．基本特性

	普通食群 n＝8	高果糖食群 n＝9	高果糖食＋アロプリノール群 n＝8
開始時体重（g）	196.7±2.9	198.3±4.6	195.5±3.9
最終体重（g）	278.8±5.5	300.5±10.9	278.7±3.3
空腹時血糖値（mg/dl）	52.6±1.2	54.8±2.5	53.0±2.5
空腹時インスリン値（ng/ml）	0.62±0.03*	0.86±0.08	0.61±0.06*
空腹時尿酸値（mg/dl）	1.53±0.07*	1.83±0.07	0.78±0.13**

値は平均値±標準誤差。nはラットの数。*P<0.05、**P<0.01 vs. 高果糖食群

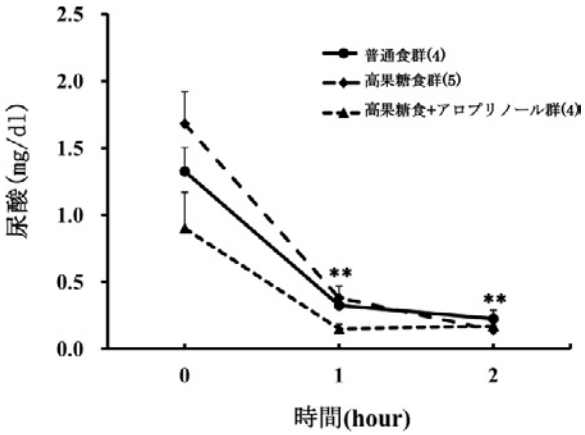

図１．単回のアロプリノール投与による尿酸値の変化
** P<0.01 vs. アロプリノール投与前
値は、平均値±標準誤差；(n) はラットの数

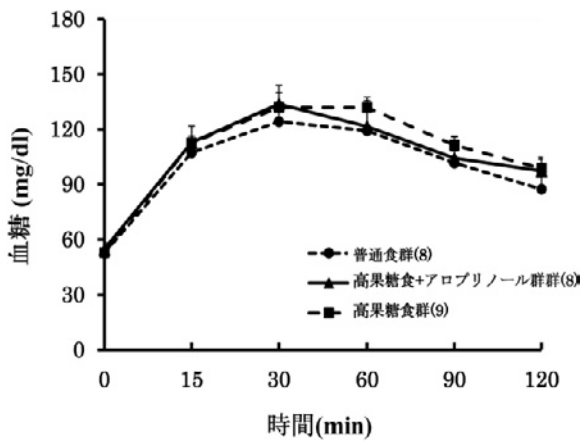

図２．経口ブドウ糖負荷試験時血糖変化

感受性指数は、普通食群と比べて高果糖食群で低値を示し、アロプリノール投与によって改善した（P<0.05, 図４）。

４．アロプリノールのインスリン感受性改善作用に対する L-NMMA の作用

アロプリノール投与により、高果糖食群でのインスリン感受性改善は、正常血糖高インスリンクランプ法でもみられた（data not shown）。生理食塩水あるいは L-NMMA のみの注入は空腹時の血糖値を変化しなかった。また、インスリン感受性指標である GIR 値は、生理食塩水群では10.3±0.5mg/kg BW/min; L-NMMA 群では 9.9±1.1mg/kg BW/min であり、有意差は認めなかった。

考察

キサンチン酸化酵素阻害剤であるアロプリノールは、

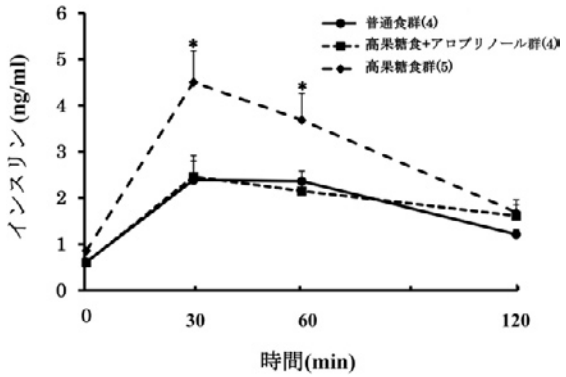

図３．経口ブドウ糖負荷試験時インスリン濃度変化
* P<0.05 vs. 普通食群、高果糖食＋アロプリノール群

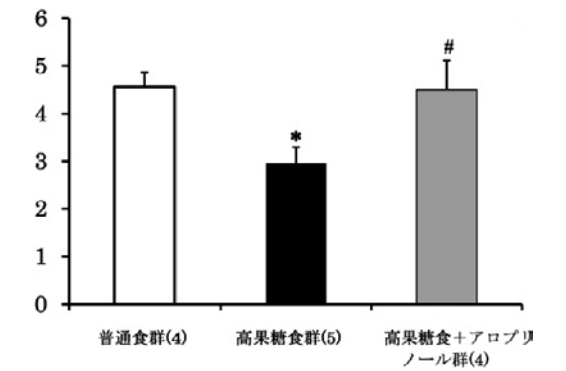

図４．インスリン感受性指数
*P<0.05 vs. 普通食群；#P<0.05 vs. 高果糖食群

尿酸の産生を抑制し、高尿酸血症および痛風の治療薬として使用されている。さらに、キサンチン酸化酵素は活性酸素を産生することから、アロプリノールは、その産生を抑制する。アロプリノールは、この抗酸化作用により高脂質血症、糖尿病で生じる血管内皮機能障害を改善すると報告されている[12,13]。近年、ラットのメタボリック症候群モデルで、アロプリノールの投与によりインスリン抵抗性を改善すること[6]や10代肥満者での本態性高血圧症を改善すること[7]が示され、高尿酸血症がこれらの代謝異常の上流に位置する可能性が指摘されている。このアロプリノールの作用メカニズムには、内皮機能低下の改善が関与する可能性がある[8,9]。本研究では、高果糖食誘発インスリン抵抗性に対するアロプリノールの効果における NO の関与を検討するために、インスリンクランプ法において、NO 合成酵素阻害剤の影響を検討した。

高果糖食ラットは、メタボリック症候群のモデルとして用いられる[6,14,18]。果糖は、甘味料として使われるコーンシロップに含まれ、清涼飲料水の過剰摂取は青少年肥満症や若者の２型糖尿病発症リスクを増加する[1－3]として、特に欧米では重要な社会問題となって

いる。日本人対象の調査においても、血清尿酸値の上昇に伴いメタボリックシンドローム発症頻度が高まり、インスリン抵抗性とも正の相関があることが示されている[15]。インスリン濃度の増加は、尿酸の再吸収を促進することで、血清尿酸値を上昇させる[16]。したがって、血清尿酸値の増加はインスリン抵抗性の増加に伴い起こる。

一方で、前述したように、尿酸の増加がインスリン抵抗性を高めることも報告されている。Nakagawa ら[6]は、アロプリノールが尿酸の低下作用によって高血圧、高トリグリセリド血症、高インスリン血症などのメタボリックシンドロームの病態を改善したことを示した。また、同様な効果が尿酸排泄促進薬であるベンズブロマロンの使用でも認められることから、アロプリノールの改善作用は、その活性酸素阻害を介するものではなく、尿酸低下が原因であることを示している。

尿酸は、内皮細胞の NO の産生を低下させ、内皮機能を障害することが報告されている[8,17]。内皮細胞の NO 産生の減少は、末梢での血流量を低下させ、主な糖代謝組織である骨格筋での糖の取り込みに影響する可能性が著者らの研究室より報告されている[18]。アロプリノールは高尿酸血症により低下した血清硝酸塩 / 亜硝酸塩（NOx）産生を増加することから、高尿酸血症による内皮機能障害を改善すると報告されている[8]。また、Dawson らは一酸化窒素合成酵素阻害薬（L-NMMA）に対する反応を指標として用い、アロプリノールが NO の産生を増加することにより、糖尿病患者の内頸動脈における反応性を改善する可能性を示した[9]。

アロプリノールは、尿酸または活性酸素による内皮機能障害を改善するのであれば、NO の産生を改善することでインスリン抵抗性の改善を引き起こすことが予想された。しかしながら、本研究では、インスリンクランプ法において、L-NMMA の投与により影響を受けなかった。したがって、今回の実験条件下では、高果糖食ラットでのアロプリノールのインスリン抵抗性改善効果は内皮細胞の NO の産生とは関連しない可能性が示唆された。高果糖食で誘発するインスリン抵抗性には、肝臓でのインスリン抵抗性も強く関与していることから内皮細胞非依存的な効果の可能性も考えられるが、そのメカニズムについては不明であり、さらなる検討を要する。

謝辞

本研究の一部は、財団法人昭和報公会平成22年度の学術研究助成によるものである。

参考文献

1. Dennison BA, Rockwell HL, Baker SL. Excess fruit juice consumption by preschool-aged children is associated with short stature and obesity. Pediatrics, 99(1): 15-22, 1997.
2. Schulze MB, Manson JE, Ludwig DS, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Hu FB. Sugar-sweetened beverages, weight gain, and incidence of type 2 diabetes in young and middle-aged women. JAMA, 292(8): 927-34, 2004.
3. Johnson RJ, Perez-Pozo SE, Sautin YY, Manitius J, Sanchez-Lozada LG, Feig DI, Shafiu M, Segal M, Glassock RJ, Shimada M, Roncal C, Nakagawa T. Hypothesis: could excessive fructose intake and uric acid cause type 2 diabetes? Endocr Rev, 30(1): 96-116, 2009.
4. Choi HK, Ford ES. Prevalence of the metabolic syndrome in individuals with hyperuricemia. Am J Med, 120(5):442-47,2007.
5. Lohsoonthorn V, Dhanamun B, Williams MA. Prevalence of hyperuricemia and its relationship with metabolic syndrome in Thai adults receiving annual health exams. Arch Med Res, 37(7):883-9,2006.
6. Nakagawa T, Hu H, Zharikov S, Tuttle KR, Short RA, Glushakova O, Ouyang X, Feig DI, Block ER, Herrera-Acosta J, Patel JM, Johnson RJ. A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. Am J Physiol Renal Physiol, 290(3):F625-31, 2006.
7. Feig DI, Soletsky B, Johnson RJ. Effect of allopurinol on blood pressure of adolescents with newly diagnosed essential hypertension: a randomized trial. JAMA, 300(8):924-32, 2008.
8. Khosla UM, Zharikov S, Finch JL, Nakagawa T, Roncal C, Mu W, Krotova K, Block ER, Prabhakar S, Johnson RJ. Hyperuricemia induces endothelial dysfunction. Kidney Int, 67(5): 1739-42, 2005.
9. Dawson J, Quinn T, Harrow C, Lees KR, Weir CJ, Cleland SJ, Walters MR. Allopurinol and nitric oxide activity in the cerebral circulation of those with diabetes: a randomized trial. Diabetes Care, 32(1):135-7, 2009.
10. Matsuda M, DeFronzo RA. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. Diabetes Care, 22(9): 1462-70, 1999.
11. Gardiner SM, Kemp PA, March JE, Bennett T. Cardiac and regional haemodynamics, inducible nitric oxide synthase (NOS) activity, and the effects of NOS inhibitors in conscious, endotoxaemic rats. Br J Pharmacol, 116(3):2005-16, 1995.
12. Cardillo C, Kilcoyne CM, Cannon RO 3rd, Quyyumi AA, Panza JA. Xanthine oxidase inhibition with oxypurinol improves endothelial vasodilator function in hypercholesterolemic but not in hypertensive patients. Hypertension, 30(1Pt1):57-63, 1997.
13. Butler R, Morris AD, Belch JJ, Hill A, Struthers AD. Allopurinol normalizes endothelial dysfunction in type 2 diabetics with mild hypertension. Hypertension, 35(3):746-51, 2000.
14. Koshinaka K, Oshida Y, Han YQ, Ohsawa I, Sato Y. The effect of nitric oxide synthase inhibitor on improved insulin action by

pioglitazone in high-fructose-fed rats. Metabolism, 53(1): 22-7, 2004.
15. Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda E, Nagai R, Yamakado M. Association between serum uric acid, metabolic syndrome, and carotid atherosclerosis in Japanese individuals. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 25(5):1038-44, 2005.
16. Facchini F, Chen YD, Hollenbeck CB, Reaven GM. Relationship between resistance to insulin-mediated glucose uptake, urinary uric acid clearance, and plasma uric acid concentration. JAMA, 266(21):3008-11, 1991.
17. Kang DH, Park SK, Lee IK, Johnson RJ. Uric acid-induced C-reactive protein expression: implication on cell proliferation and nitric oxide production of human vascular cells. J Am Soc Nephrol, 16(12):3553-62, 2005.
18. Oshida Y, Tachi Y, Morishita Y, Kitakoshi K, Fuku N, Han YQ, Ohsawa I, Sato Y. Nitric oxide decreases insulin resistance induced by high-fructose feeding. Horm Metab Res, 32(9):339-42, 2000.