

糖尿病の白血球機能に関する研究 —ロイコトリエン産生に及ぼすインスリンの影響—

岡山大学医学部第二内科学教室 (指導: 木村郁郎教授)

神 坂 謙

(平成5年11月25日受稿)

Key words: ロイコトリエン, インスリン, 糖尿病

緒 言

プロスタグランジン類の研究は、1930年、Kružok らがヒト精液が子宮筋を収縮させたことと報告したことに端緒を求めることができる。1935年、von Euler がこの物質にプロスタグランジン (以下PGs) の名を与えてから後、研究は久しく停滞していた。しかし、1963年、Bergström らがPGE₂の単離、構造決定に成功して以来、アラキドン酸代謝物質の研究は隆盛を極めた観がある。

本稿の主要なテーマであるロイコトリエン (以下LTs) は1979年、Samuelsson ら⁽¹⁾により発見された5-lipoxygenase系のアラキドン酸代謝産物である。LTsは当初、SRS-Aと呼ばれ、気管支喘息等のアレルギー性炎症において研究が進められたが、LTsは血管透過性の亢進、血管平滑筋細胞の遊走、収縮、白血球の遊走、粘着等の血管壁の病態生理に深く関わっていること⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾が報告され、動脈硬化に代表される血管障害に関する研究が進められてきている。

一方、血管障害を促進させる因子として、糖尿病状態、或いはインスリン抵抗性状態が関与するといわれており⁽⁵⁾、これらは、同時にアラキドン酸の代謝不全をきたす病態でもある。アラキドン酸の代謝異常、高インスリン血症に共通する標的器官のひとつとして血管が挙げられる。そこで血管障害に関わる相互の関連を探る目的で、本稿では、多核白血球 (Polymorphonuclear leukocytes, 以下PMN) をとり上げて研究を行った。PMNはアラキドン酸代謝を活発に行

い、代謝産物を放出する。一方、他の白血球や血小板との相互作用によって血管内皮へ影響を及ぼす。本稿ではPMNのLTs産生能に注目し、特にインスリンの影響について検討した。

対 象

正常者10名 (平均年齢58.6 ± 9.7歳)、II型糖尿病患者10名 (平均年齢59.1 ± 12.4歳) を対象とした。対象とした糖尿病患者の治療内容は食事療法のみ、もしくは食事療法および経口糖尿病薬によるものであり、インスリン療法を施行中の患者は対象より除外した。糖尿病のコントロールもほぼ安定しており、HbA1cの平均は7.23 ± 0.69%であった。

方 法

1. インスリンのPMNのLTs産生に及ぼす影響

PMNのLTs産生に及ぼすインスリンの影響を検討する目的で、PMN浮遊液を作製し、これに対して様々な刺激を加え、LTsの放出に与える影響をみた。PMNは正常群と糖尿病群から採取し、両群での各刺激物質によるLTs産生能の比較も併せて検討した。尚、Calcium ionophore A23187 (以下CaI) を1mlあたり、5μg加えることにより刺激した群をControlとした。他の被検群はCaI 5μgに加え、更にインスリン、グルコース等を加えることにより、刺激し、LTsを放出させた。以下の実験はすべて、このCaI単独刺激によるLTs産生、すなわちControlと、CaIを含む複数の刺激物質による

LTs 産生とを比較する様式により行なった。

1) PMN 浮遊液の作製

対象の被検者より、全血20 mlをヘパリン1,000 単位、デキストラン生食 2 mlを加えて採取し、30分間、静置した後、buffy coat を Ficoll-Hipaque に重層させ、30分間遠心分離し、最下層の多核白血球層を分離した。混入した赤血球を 1 ml の蒸留水で溶血させた後、1.8% NaCl 溶液を加え、1,000回転で10分間遠沈して、上清を捨て、沈殿した PMN を Tris ACM 液 (Tris buffer + human serum albumin + Ca + Mg) に浮遊させ、 1×10^7 /mlの細胞浮遊液に調整した。

2) PMN 浮遊液の LTs 産生に対する刺激物質

上述の PMN 浮遊液 1 ml を 37°C で 30 分間 preincubate した後、下記のような産生刺激物質を加えた。前述のごとく、CaI 5 μ g 単独により刺激した群を Control とした。

- (1) CaI 5 μ g/ml (Control)
- (2) CaI 5 μ g/ml + グルコース 1 mg/ml
- (3) CaI 5 μ g/ml + インスリン 150 μ U/ml
- (4) CaI 5 μ g/ml + グルコース 1 mg/ml + インスリン 50 μ U/ml
- (5) CaI 5 μ g/ml + グルコース 1 mg/ml + インスリン 150 μ U/ml

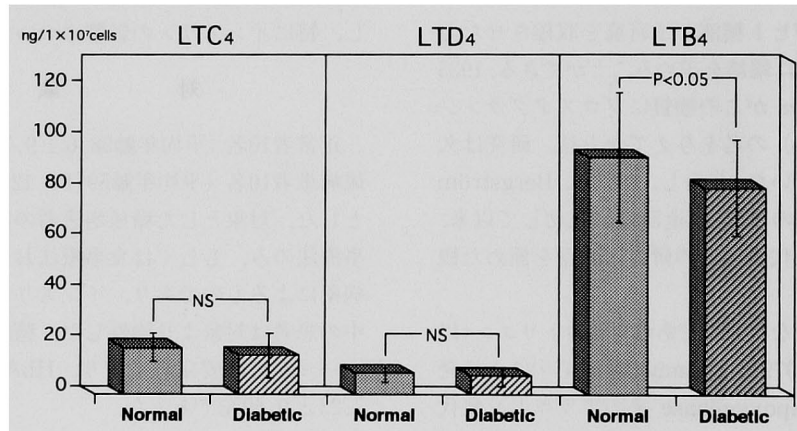


Fig. 1 LTs release from PMN stimulated by CaI. All values represent mean \pm SD.

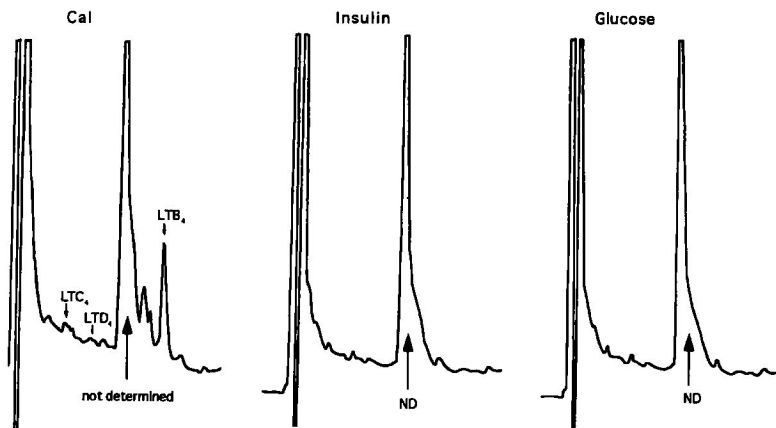


Fig. 2-1 The chromatogram of LTs obtained by stimulating with CaI, glucose or insulin.

(6) CaI 5 μ g/ml + グルコース 1 mg/ml + インスリン 250 μ U/ml

(7) CaI 5 μ g/ml + グルコース 3 mg/ml + インスリン 150 μ U/ml

3) PMN 浮遊液から検体の作製

37°Cにて30分間 incubate した後, 4 倍量のエタノールを加え, 反応を停止させた後, 遠沈し, 上清を蒸発乾固し, 40%エタノールに溶解し, 検体とした。

4) High performance liquid chromatography (以下 HPLC) による LTs の測定
検体は 2 台のポンプを使用した column switching method⁽⁶⁾を用いた HPLC により, 一斉展開し, LTC₄, LTD₄, LTB₄を同定し, 測定した. column switching method の原理について, 述べる。

まず検体を 1 台のポンプにより高圧六方切り替えバルブの 1 回路にセットした濃縮カラムに送り, 次に高圧六方切り替えバルブを切り替え, もう 1 台のポンプが濃縮カラムに捕捉された検

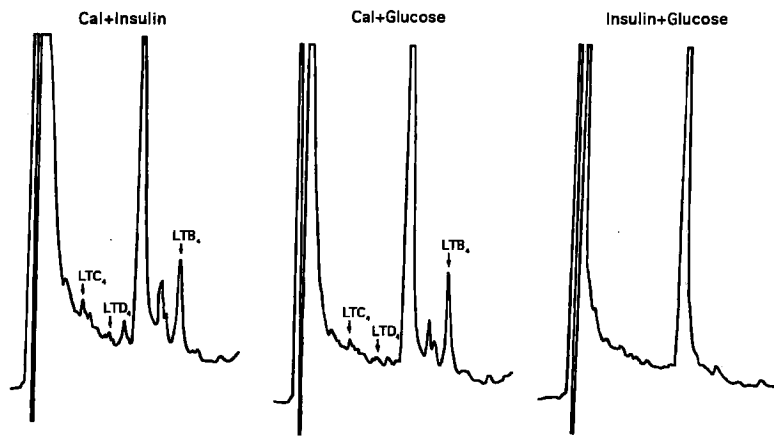


Fig. 2-2 The chromatogram of LTs obtained by stimulating with CaI + insulin 150 μ U/ml, CaI + glucose 1 mg/ml or glucose 1 mg/ml + insulin 150 μ U/ml.

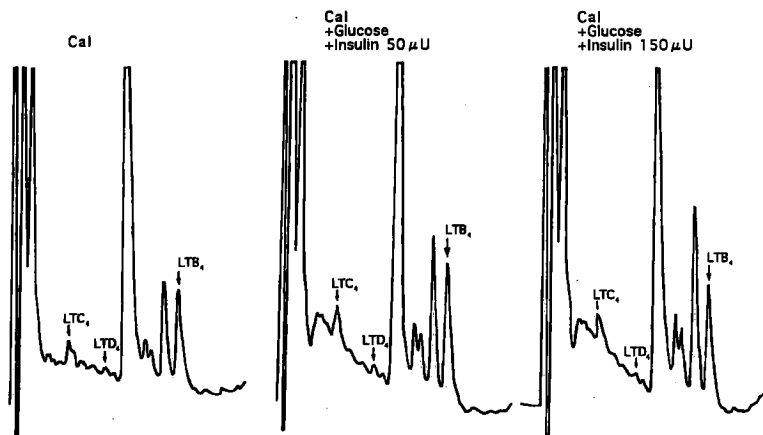


Fig. 2-3 The chromatogram of LTs obtained by stimulating with CaI, CaI + glucose 1 mg/ml + insulin 50 μ U/ml or CaI + glucose 1 mg/ml + insulin 150 μ U/ml.

体を本カラムに送り出す方法である。この方法により、5倍に濃縮することが可能となり、同時に検体中に含まれた不純物の除去が可能となった。

2台のポンプには、Shimadzu LC-6A、および LC-3A を用いた。濃縮カラムとしては Shim-pack CLC-GODS を用い、これらの流方向、移動速度、測定時間をコントロールするシステムコントローラーとして Shimadzu SCL-6A を用いた。本カラムには逆相系カラムである Shim-pack CLC-ODS を用いた。紫外線吸光度計には、Shimadzu SPD-6A を、記録装置として Shimadzu CR6A を用いた。

移動相はアセトニトリル：水：メタノール：酢酸 = 990 : 990 : 300 : 1.5 とし、トリエチルアミンにて pH 5.6 に調整したものをを用いた。

2. インスリンの 5-HETE 産生に及ぼす影響について

1. と同様の方法で作製した PMN 浮遊液 1 ml に下記の刺激物質を加え、正常群において、5-HETE を column switching method を用いた HPLC により測定した。CaI 5 μ g 単独により PMN を刺激した群を Control とし、グルコース、インスリンを加えて刺激した群と比較検討した。

1) CaI 5 μ g/ml (Control)

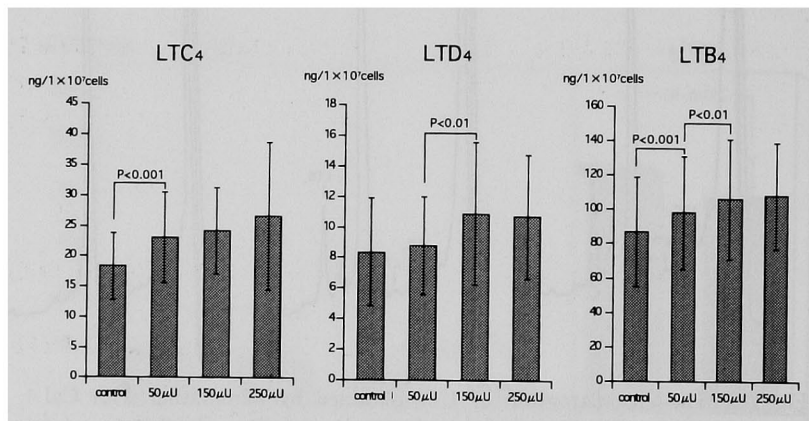


Fig. 3 LTs release from normal subjects' PMN stimulated by CaI only (control) and CaI + glucose 1mg + insulin of various concentration. All values represent mean \pm SD.

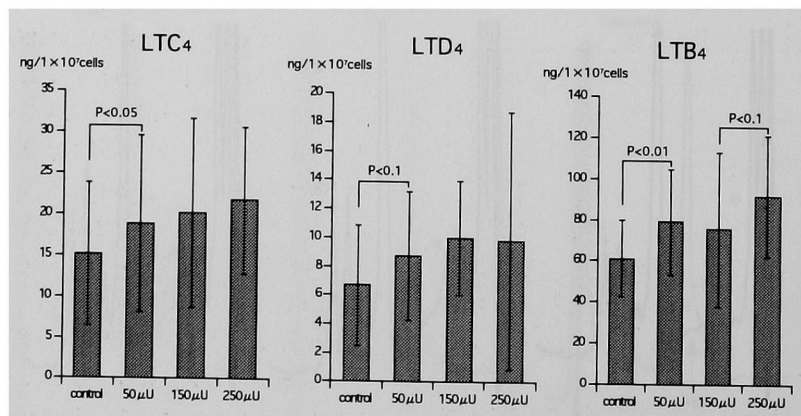


Fig. 4 LTs release from diabetic patients' PMN stimulated by CaI only (control) and CaI + glucose 1mg + various insulin concentration. All values represent mean \pm SD.

2) CaI 5 $\mu\text{g/ml}$ + グルコース 1 mg/ml + イ
ンスリン 150 $\mu\text{U/ml}$

3. インスリンの全血 LTs 産生に及ぼす影響に
ついて

被検者より全血15 ml を500単位のヘパリン加
で採血し, 3本の遮光容器に5 ml ずつ分注し,
1と同様に37°Cで30分間 preincubate した後,
以下のように刺激を加えて10分間 incubate を行
った. この実験も PMN の際と同様に CaI 5
 μg 単独により全血を刺激した群を Control と
した.

1) 全血の LTs 産生に対する刺激物質

- (1) CaI 5 $\mu\text{g/ml}$ (Control)
- (2) CaI 5 $\mu\text{g/ml}$ + グルコース 1 mg/ml + イン
スリン 150 $\mu\text{U/ml}$
- (3) CaI 5 $\mu\text{g/ml}$ + アラキドン酸 230 μg (\approx 150
 $\mu\text{M/ml}$)

2) 全血よりの検体の作製

incubate した後, 直ちに4倍量のエタノール
を加え, 反応を停止させた. これを3000回転で
30分間, 遠沈した後, 上清を蒸発乾固し, 50%
アセトニトリルに溶解, 10倍希釈した後, acetate
buffer により活性化した C18 Sep-pak cartridge
に 2 ml/min の速度で負荷, 80%エタノールに
より LTs を抽出し, 再び, 蒸発乾固した後, 40
%エタノールに溶解し, 検体とした. 検体は PMN
の際と同様に Column switching method を用
いた HPLC により, 一斉展開し, LTs を同定,
測定し, 全血算を施行し, WBC 1×10^7 あたり
に換算して, 比較検討した.

統計学的処理

統計学的方法としては, 独立2群間の検定に
は t-test, 関連2群間の検定には, paired t-test,
関連多群間の検定には 2元配置分散分析を用い
た.

結 果

1. インスリンの PMN の LTs 産生に及ぼす
影響について

1) CaI 単独刺激による正常群と糖尿病群の
LTs 産生能の比較

Fig. 1 に正常群と糖尿病群における LTs 産生
能の比較を示した. LTC₄, LTD₄ においては,
有意な産生能の差異を認めなかったが, LTB₄ は
糖尿病群において有意な産生低下を認めた.

2) CaI にインスリンまたはグルコースを加
えた際の LTs 産生能の比較

Fig.2-1 は正常群における CaI, グルコース,
インスリンにより PMN を刺激した際のクロマ
トグラムである. CaI 単独で刺激した際, LTs
の産生のピークを認めるが, グルコースのみ,
インスリンのみにより PMN を刺激した際は LTs
の産生は認められなかった. Fig.2-2 は CaI +
グルコース, CaI + インスリン, グルコース +
インスリンにより, PMN を刺激した際のクロ
マトグラムである. CaI + グルコース, 或いは
CaI + インスリンによる刺激では, LTs のピーク
を認めるが, CaI 単独で刺激した際と有意差は
認められなかった. 糖尿病群においても同様の

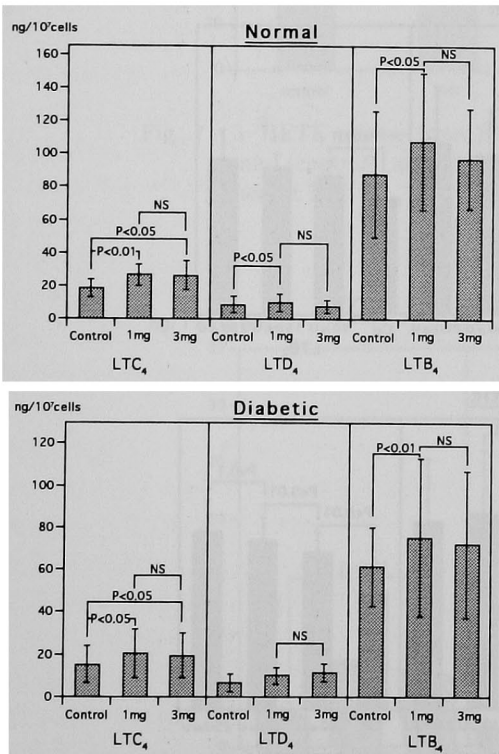


Fig. 5 LTs release from PMN stimulated by CaI only (control) and CaI + glucose 1 mg + insulin 150 μU . All values represent mean \pm SD.

結果が得られた。グルコース+インスリンでCaIを加えないものではピークを認めなかった。

3) CaI にインスリンおよびグルコースを加えた際の LTs 産生能 (絶対量) の比較

CaIに加え、グルコース濃度を 1 mg/ml (100 mg/dl に相当) に保った上で、インスリンに濃度勾配を与えると、Fig.2-3 に示すようなクロマトグラムが得られた。Fig. 3 に示す如く正常群においては、LTC₄でCaIのみで刺激したControlに比し、CaIに加えインスリン 50 μU を加えた群 (インスリン 50 μU 添加群) において有意な産生増加を認めた。LTD₄では、インスリン 50 μU 添加群に比しCaIに加えインスリン 150 μU を加えた群 (インスリン 150 μU 添加群) において有意な産生増加を認めた。LTB₄では、Control とインスリン 50 μU 添加群、インスリン 50 μU 添加群とインスリン 150 μU 添加群間

で、いずれも後者において有意な産生増加を認めた。

糖尿病群においても、Fig. 4 に示す如く、同様に、LTC₄および LTB₄は Control に比しインスリン 50 μU 添加群において有意な産生増加を認めた。Fig. 5 に示す如く、CaI にインスリン濃度をインスリン 150 μU に保った上で、グルコースに濃度差を与えた場合、LTs の産生能には正常群、糖尿病群ともに有意差を認めなかった。

4) CaI, インスリンとグルコースを加えた際の LTs 産生増加率の検討

Fig. 6 は Control を 1 とし、インスリン、CaI 等により刺激した群における LTs 産生増加率を検討した結果である。正常群、糖尿病群ともにインスリン濃度の上昇にともなう LTs 産生増加の有意性がより明瞭となっている。特に糖尿病群でこの傾向が顕著であった。

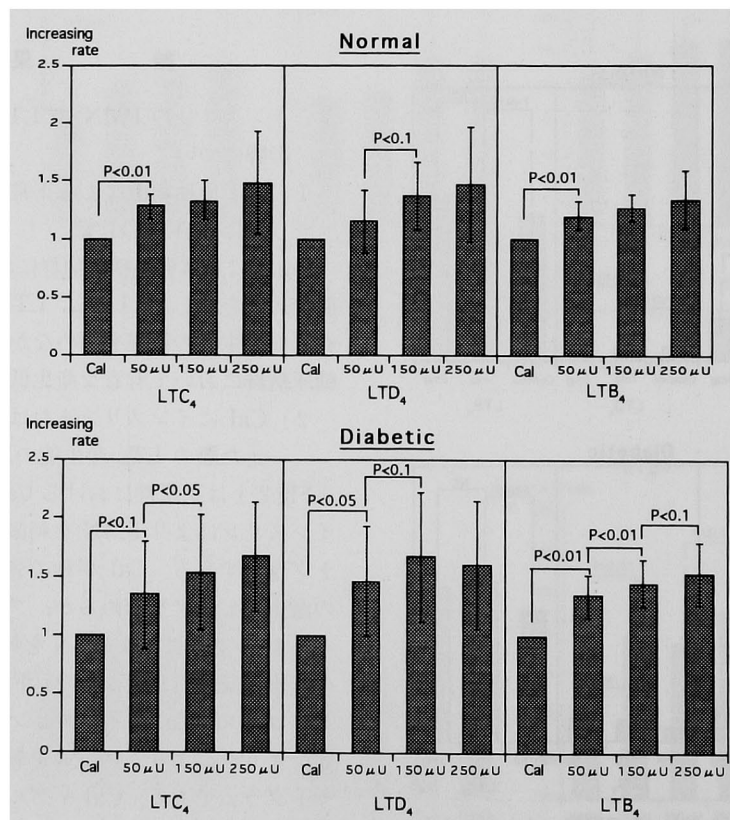


Fig. 6 Comparison of increasing rate of LTs release from PMN stimulated by CaI only (control) and CaI + glucose 1 mg + various insulin concentration. All values represent mean ± SD.

2. インスリンのPMNの5-HETEの産生に及ぼす影響について

Fig. 7に示す如く、5-HETEの産生も、インスリン、グルコースを加えた際、有意な産生の増加が認められた。

3. インスリンの全血LTs産生に及ぼす影響について

より生理的な状態に近い条件下におけるLTs産生能を表現するものとして、全血におけるLTs

産生能を検討した。正常群の結果をFig. 8に、糖尿病群の結果をFig. 9に示す。CaI 5 μ gのみで刺激したControlとCaIに加えアラキドン酸を加えた群(アラキドン酸添加群)とを比較すると、正常群におけるLTsの産生能には有意差を認めなかったが、糖尿病群においては、LTC₄、LTD₄、LTB₄ともにアラキドン酸添加群において有意なLTsの産生の増加を認めた。ControlとCaI+インスリン+グルコースを加えた群(イ

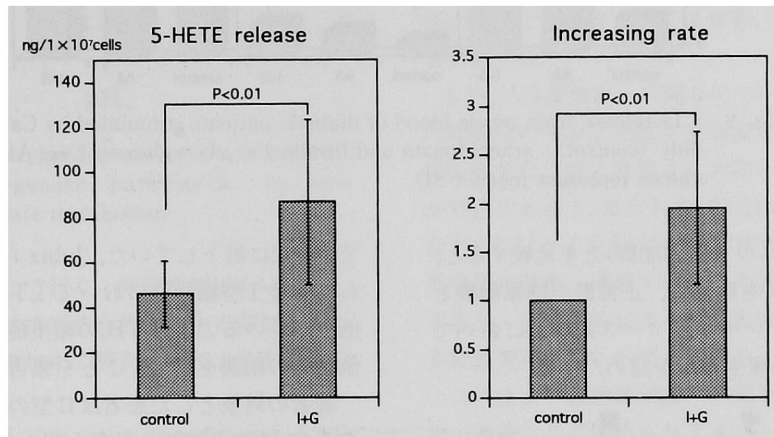


Fig. 7 5-HETE release from PMN of normal control stimulated by CaI only (control) and CaI + insulin + glucose. All values represent mean \pm SD.

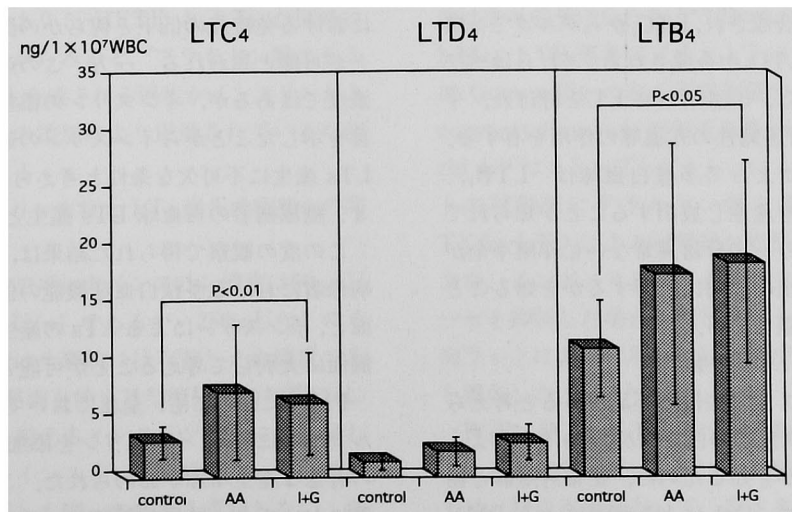


Fig. 8 LTs release from whole blood of normal control stimulated by CaI only (control) and arachidonate and insulin 150 μ U + glucose 1 mg. All values represent mean \pm SD.

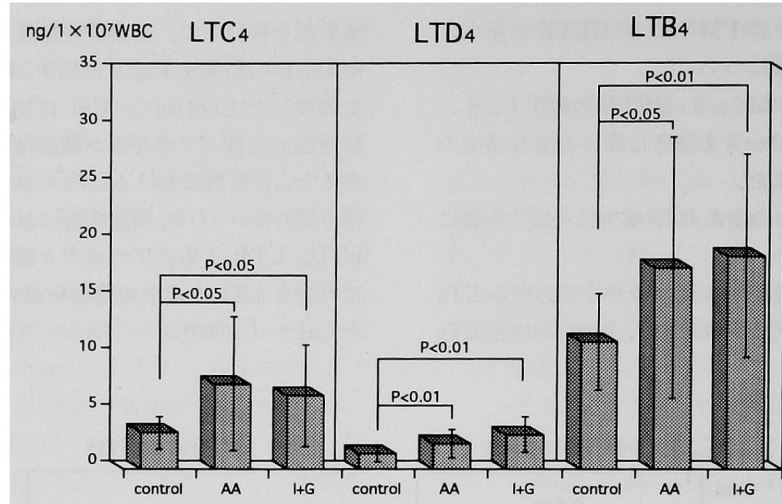


Fig. 9 LTs release from whole blood of diabetic patients stimulated by CaI only (control), arachidonate and insulin 150 μ U + glucose 1 mg. All values represent mean \pm SD.

ンスリン+グルコース添加群)とを比較すると、正常群の LTD₄を除いて、正常群、糖尿病群ともに、インスリン+グルコース添加群において有意な LTs の産生増加を認めた。

考 察

1. LTs の生合成と生理活性

LTB₄は LTA₄が加水分解されて生ずるが、白血球遊走促進等の生理活性を有する。LTC₄は LTA₄がグルタチオン-S-トランスフェラーゼの作用により生合成され、LTC₄からグルタミン酸がはずれて、LTD₄が合成される。これらはペプチド LT または、システニル LT と呼ばれ、平滑筋収縮、血管透過性の亢進等の作用を有する。CaI等の刺激によって多核白血球は LTB₄、LTC₄、LTD₄を産生し放出することが知られている。インスリンの分泌異常ないし作用不全がこの産生、放出に如何に影響するかを知ることは興味ある問題である。

2. 糖尿病と LTs 産生

一般にインスリンの作用不足があると考えられている糖尿病患者の白血球が LTs をどのように産生するのかを知るために、正常対照群と糖尿病群において、CaI による刺激による PMN の LTs 産生能を検討したところ、結果 1. の 1) の如く PMN の LTB₄産生能は糖尿病群におい

て、有意に低下していた。Jubiz ら⁽⁷⁾、Draper⁽⁸⁾らは男性 I 型糖尿病において LTB₄の産生能が低下していること、LTB₄の産生能の低下は血糖値と負の相関を示したことを報告している。

著者の対象とした患者は II 型の糖尿病患者であるが、やはり同様の結果が得られた。PMN の LTB₄の生理活性は前述の如く、白血球の走化性亢進であり、著者の成績は試験管内のものであるが *in vivo* でも同様のことがあるとすればインスリン欠乏状態、ないしインスリン抵抗性下における免疫能の低下と何らかの関連を伺うことが可能と思われる。一方、この産生低下は高濃度ではあるが、インスリンの添加により、改善を示したことからインスリンの適正な作用が LTs 産生に不可欠な条件と考えられる。

3. 糖尿病患者の白血球 LTs 産生とインスリン

この度の観察で得られた結果は、前述の糖尿病患者における多核白血球機能の低下という側面と、インスリンによる LTs の産生増加という側面に大別して考えることが可能と思われる。

PMN においても、全血においても、CaI、グルコースに加え、インスリンを添加すると、LTs の有意な産生増加が認められた。これは、正常群においても、糖尿病群においても認められたが、糖尿病群においてより顕著であった。インスリンに濃度勾配を与えると、LTs 産生が濃度

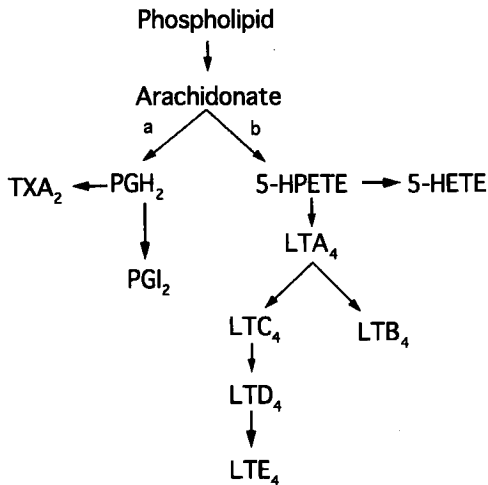


Fig. 10 Cyclooxygenase pathway(a) and 5-lipoxygenase pathway(b) in arachidonate metabolism.

依存性に増加して行く。糖尿病群においても、同様に、LTsは濃度依存性に産生の増加がみられた。これは増加率で検討するとより明瞭となった。

5-HETEもインスリンおよびグルコースを添加した際、有意な産生の増加が認められた。Fig.10は細胞膜よりアラキドン酸が遊離しLTsが生合成される過程、いわゆるアラキドン酸カスケードの模式図であるが、インスリン、グルコース添加により5-HETEとLTsが同時に増加することからみると、アラキドン酸より5-HPETEが生合成される過程がインスリンおよびグルコースの添加により促進されている可能性が示唆される。

4. 高インスリン血症とLTs産生の病態への関与

今回の実験で用いたインスリン濃度は50 μ U/ml から250 μ U/ml であるが、250 μ U/ml のインスリン濃度は生理的には存在しえぬ濃度である。しかし、肥満を伴うII型糖尿病の初期には、100 μ U/ml を超えるインスリン濃度にはしばしば遭遇する。インスリン抵抗性、ないし、糖尿病はかならずしも同一の病態を意味しない。前者においては、血中インスリン濃度は概ね、高値を示すが、II型糖尿病においては、同一患者

においてさえ、高インスリン血症を示す時期もあれば、インスリン欠乏を呈することがある。以下、この度の実験結果より得られた高インスリン血症がもたらすLTsの産生増加、およびLTsの過剰が如何に病態に関与しうるかを考察したい。

生体内におけるLTs産生の第一段階である、細胞膜よりアラキドン酸を遊離させる酵素としては、フォスホリパーゼA₂、フォスホリパーゼC等が知られているが、この段階については今なお解明されていない点が多い。高インスリン、PMNによるLTsの産生増加による影響が発現する器官としては血管、特に動脈が重要であろう。

LTsの血管病変への関与については、分単位の短時間のうちに完成する病変と、年余に亘って完成されて行く病変とに大別して考えることが可能であろう。すなわち、前者はLTC₄、LTD₄などのペプチドLTsの直接作用がもたらす血管平滑筋の収縮、換言すれば、血管攣縮への関与であり、後者は約10年を経て完成するといわれる動脈硬化病変への関与である。

これはまず冠動脈攣縮への関与に関する研究が一步先んじて進められてきた。

5. LTsと冠動脈病変

Roth⁽²⁾らはペプチドLTsがネコの冠動脈を収縮させたことを報告している。その他にも、ペプチドLTsが冠攣縮に関与しているという報告は多々見受けられる。^{3)4)9)Burke⁽¹⁰⁾らはLTC₄、LTD₄、LTE₄等のペプチドLTによるヒトおよびGuinea-Pigの左心室収縮能の低下、およびcoronary flow rateの低下を報告した。Takiguchiら⁽¹¹⁾はストレプトゾトシンによる糖尿病ラットの冠動脈にアラキドン酸を灌流させるとTXA₂、LTD₄による冠攣縮が観察されたこと、また、インドメサシンによりシクロオキシゲナーゼを抑制した場合、正常ラットに比し、糖尿病ラットにおいて有意に冠攣縮が増強することを報告した。}

PGE₁、PGE₂、LTC₄には血管新生作用のあることが報告されている。⁽¹²⁾⁽¹³⁾動脈硬化巣においては、特に内膜において、新生血管が豊富であることが知られており⁽¹⁴⁾、新生血管よりの出血が壁内血栓を形成し、より高度な動脈の狭窄を

もたらし、心筋梗塞のような重篤な病変へと移行する可能性が示唆される。高インスリン血症の下で LTC₄ の産生が増せば、このような様式による血管障害への関与も考えられる。

6. LTs と動脈硬化

Bailey ら⁽¹⁵⁾は1985年、高コレステロール食を与えた rabbit にステロイド剤、及び、或いは非ステロイド系消炎剤を投与したところ、さらなる高コレステロール血症がもたらされるにも拘わらず、atherosclerotic plaque の形成が抑制されたことを報告した。それによれば、シクロオキシゲナーゼを阻害してシクロオキシゲナーゼ系の代謝産物の生合成を抑制する非ステロイド剤よりもシクロオキシゲナーゼ系、リポキシゲナーゼ系双方の代謝産物の生合成を抑制するステロイド剤の方が atherosclerotic plaque の抑制率が高く、動脈硬化の initiation にシクロオキシゲナーゼ系の代謝産物のみならず、LTs を代表とするリポキシゲナーゼ系の代謝産物も濃密に関わっていることを示した結果であると考えられる。

動脈硬化の成因に関しては Ross⁽¹⁶⁾の“response to injury hypothesis”が著名であるが、1986年の改訂版によれば、内皮障害に端を発し、増殖性病変に至る動脈硬化の過程に Ross は2つの経路を想定している。第1の経路は、内皮の障害に始まり、その部位にマクロファージが付着し内膜に侵入、LDL を貪食し泡沫細胞となり fatty streak を形成、さらに病変が進展し、あるものは direct に fatty plaque を形成し、あるものは内膜の剝離を起こしつつ増殖性病変を形成するという経路である。第2の経路は、内皮障害が発生した直後に、さまざまな成長因子、サイトカインの関与によりすぐさま中膜から内膜への平滑筋の遊走を引き起こし増殖性病変を形成するという経路である。この内皮細胞障害から増殖性病変に至る過程における LTs の関与を示す報告が多々なされている。

Feinmark⁽¹⁷⁾らはブタ大動脈の内皮細胞が PMN が産生した LTA₄ を LTC₄、LTD₄ に変換可能であることを示し、Claesson⁽¹⁸⁾らはヒト内皮細胞が PMN が産生した LTA₄ を LTC₄、LTD₄、LTE₄ に変換可能であることを示した。

この現象はスチール現象と呼ばれているが、障害を受けた内皮細胞に浸潤した PMN、マクロファージ等の LTs 産生細胞より LTA₄ が放出され、この LTA₄ を内皮細胞がスチール現象により LTC₄、LTD₄ へと変換し、これらシステニル LTs が内皮細胞自体の透過性を亢進させ、障害をより一層増悪させる可能性を示唆するものといえよう。

Yokode⁽¹⁹⁾らは酸化 LDL を取り込んだマクロファージから形成された泡沫細胞により PGE₂、LTC₄ が産生されることを報告した。Lehr ら⁽²⁰⁾によれば、酸化 LDL が白血球の内皮細胞への接着を促進し、LTs がこの白血球/内皮細胞間の interaction の mediator となるという。De Caterina ら⁽²¹⁾はヒト血管より採取した fatty plaque、fibrous plaque が LTB₄ を産生することを報告した。以上は Ross の第1の経路への関与を示唆する報告と考えられる。Ross の第2の経路を direct に支持するものとして Hirosumi ら⁽²²⁾の報告がある。Hirosumi らは平滑筋の遊走という局面において多核白血球やマクロファージが産生した LTB₄ が血小板由来の12-hydroxyeicosatetraenoic acid (12-HETE) とともに血管平滑筋の遊走因子として作用することを報告している。以上述べてきた如く、現在も尚、動脈硬化巢の進展過程へ LTs が関与している可能性が示されつつある。

結 論

1. CaI, グルコースの存在下で、インスリンの PMN、全血 LTs 産生に及ぼす影響を検討した。

2. 正常群と糖尿病群において、CaI による刺激による PMN の LTs 産生能を検討したところ、LTB₄ 産生能は糖尿病群において、有意に低下していた。

3. PMN に CaI, グルコースに加え、種々の濃度のインスリンを添加すると、LTs は正常群、糖尿病群ともにインスリン濃度依存性に有意に産生が増加した。

4. LTs の産生増加率で検討すると、この傾向はより明瞭となり、糖尿病群におけるインスリンによる産生増加はより顕著であった。

5. PMNの5-HETEの産生もCaIにグルコース、インスリンの添加により、有意に増加した。

6. 全血におけるLTs産生能は、Controlとアラキドン酸添加群との比較においては、糖尿病群で、LTC₄、LTD₄、LTB₄ともにアラキドン酸添加群において有意な産生の増加を認めた。Controlとインスリン+グルコース添加群とを比較すると、正常群のLTD₄を除いて、正常群、糖尿病群ともに、インスリン+グルコース添加

群において有意なLTsの産生増加を認めた。

稿を脱するにあたり、御指導、御校閲を賜りました恩師木村郁郎教授、並びに木畑正義講師に深甚なる謝意を表します。

尚、本稿の内容は第32回日本糖尿病学会年次学術集会(1989年、金沢)ならびに第33回日本糖尿病学会年次学術集会(1990年、東京)、および第21回日本動脈硬化学会総会(1989年、東京)において発表した。

文 献

- 1) Samuelsson B, Borgeat P and Hammarström S: Introduction of a nomenclature: Leukotrienes. *Prostaglandins* (1979) **17**, 785-787.
- 2) Roth DM and Lefer AM: Studies on the mechanism of leukotriene induced coronary artery constriction. *Prostaglandins* (1983) **26**, 573-581.
- 3) Letts LG, Newman DL, Greenwald SE and Piper PJ: Effect of intra-coronary administration of leukotriene D₄ in the anesthetized dog. *Prostaglandins* (1983) **26**, 563-572.
- 4) Michelassi F, Landa F, Hill RD, Lowenstein E, Watkins WD, Petkau AJ and Zapol WM: Leukotriene D₄: A potent coronary artery vasoconstrictor associated with impaired ventricular constriction. *Science* (1982) **217**, 841-843.
- 5) Reaven GM: Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* (1988) **37**, 1595-1607.
- 6) 寺尾泰次: 高速液体クロマトグラフィー; プロスタグランジン研究法(上), 山本尚三, 鹿取 信編, 東京化学同人, 東京 (1986) pp 75-79.
- 7) Jubiz W, Draper RE, Gale J and Nolan G: Decreased leukotriene B₄ synthesis by polymorphonuclear leukocytes from male patients with diabetes mellitus. *Prostaglandins Leukotrienes Med* (1984) **14**, 305-311.
- 8) Draper RE and Jubiz W: Decreased leukotriene synthesis by leukocytes from patients with diabetes mellitus. *Clin Res* (1983) **31**, 54a.
- 9) Woodman OL and Dusting G J: Coronary vasoconstriction induced by leukotrienes in the anesthetized dog. *Eur J Pharmacol* (1983) **86**, 125-128.
- 10) Burke JA, Levi R, Guo ZG and Corey EJ: Leukotriene C₄, D₄ and E₄: Effects on human and guinea pig cardiac preparations in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* (1982) **221**, 235-241.
- 11) Takiguchi Y, Umemura K, Hashimoto H and Nakashima M: Involvement of thromboxane and leukotriene in arachidonate induced coronary constriction in diabetic rats. *Diabetologia* (1989) **32**, 337-341.
- 12) Foam DM and Auerbach R: PGE₂ and angiogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med* (1983) **172**, 214-218.
- 13) 林 純子, 井藤英喜, 金安淑江, 森田育男, 室田誠逸, 足羽紀子, 石井壽晴: 動脈硬化と血管新生: インスリン様成長因子, プロスタグランディンE₂およびロイコトリエンC₄の in vivo における管腔形成作用. *動脈硬化* (1990) **18**, 625-630.
- 14) Barger AC, Beeuwkes R, Lainey LL and Silverman KJ: Hypothesis: Vasa vasorum and neovas-

- cularization of human coronary arteries. *N Engl J Med* (1984) **310**, 175–177.
- 15) Bailey JM and Butler J : Anti-inflammatory drugs in experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis* (1985) **54**, 205–212.
 - 16) Ross R : The pathogenesis of atherosclerosis— an update. *N Engl J Med* (1986) **314**, 488–500.
 - 17) Feinmark JF and Cannon PJ : Endothelial cell leukotriene C₄ synthesis results from intracellular transfer of leukotriene A₄ synthesized by polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* (1986) **261**, 16466–16472.
 - 18) Claesson HE and Haeggström J : Human endothelial cells stimulate leukotriene synthesis and convert granulocyte released leukotriene A₄ into leukotrienes B₄, C₄, D₄, and E₄. *Eur J Biochem* (1988) **173**, 93–100.
 - 19) Yokode M, Kita T, Kikawa Y, Ogorochi T, Narumiya S and Kawai C : Stimulated arachidonate metabolism during foam cell transformation of macrophages with oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* (1988) **81**, 720–729.
 - 20) Lehr HA, Hubner C, Finckh B, Angermuller S, Nottle D, Beisiegel U, Kohlschutter A and Messer K : Role of leukotrienes in leukocytes adhesion following systemic administration of oxidatively modified human low density lipoprotein in hamsters. *J Clin Invest* (1991) **88**, 9–14.
 - 21) De Caterina R, Mazzone A, Giannessi D, Sicari R, Pelosi W, Lazzarini G, Azzara A, Forder R, Carey F, Caruso D, Galli G and Mosca F : Leukotriene B₄ production in human atherosclerotic plaque. *Biomed Biochim Acta* (1988) **47**, 182–185.
 - 22) Hirosumi J, Nomoto A, Ohkubo Y, Sekiguchi C, Mutoh S, Yamaguchi and Aoki H : Inflammatory responses in cuff induced atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* (1987) **64**, 243–254.

Insulin and leukotrienes production

Ken KAMISAKA

Second Department of Internal Medicine,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. I. Kimura)

Leukotrienes (LTs) are able to be produced by whole blood cells as well as polymorphonuclear leukocytes (PMN). To investigate whether these production rates were affected by insulin, LTs from PMN or whole blood cells were measured in 10 diabetic patients and 10 normal subjects using HPLC.

The production rate of LTB_4 from PMN was lower in diabetic patients than in normal subjects. When PMN were stimulated by $CaI+glucose+insulin$, the LTs production rate was significantly increased compared with that after stimulation by CaI alone in both normal subjects and diabetic patients. LTs production rates were significantly increased in a dose-dependent manner.

5-HETE release from PMN showed significant increase when PMN were stimulated by $CaI+glucose+insulin$.

Comparing LTs release from CaI -stimulated whole blood with that after $CaI+arachidonate$ stimulation, there was no significant difference in normal subjects. In diabetic subjects, LTC_4 , LTD_4 and LTB_4 release stimulated by $CaI+arachidonate$ was significantly higher than those stimulated by CaI alone. Comparing CaI with $CaI+glucose+insulin$ as a stimulator of LTs release, the latter was significantly more potent than that of the former in both normal subjects and diabetic patients.

Blood cells obtained from diabetic patients produced less LTs, but high concentrations of insulin combined with glucose restored LTs production. Production of LTC_4 was markedly promoted by these stimulants in diabetic patients. These findings regarding insulin action suggest mechanisms in the condition of hyperinsulinemia, i. e. they induce vasoconstriction and progression of atherogenesis, related to endothelial cell damage, and smooth muscle cell proliferation.