薬剤介入による肥満糖尿病マウス膵β細胞機能障害の抑制効果　ーDiazoxideとPioglitazoneの作用および作用機序の比較検討ー

川崎　史子

糖尿病の管理において膵β細胞機能をいかに保護するかは重要な課題である．本研究では肥満糖尿病モデル動物C57BL/KsJ *db+/db+* マウス（以下 *db+/db+* マウス）に K_{ATP} チャネル開口薬diazoxideとthiazolidinedione系薬剤pioglitazoneによる介入を行い，膵β細胞機能障害の抑制効果およびその機序を比較検討した．6週齢 *db+/db+* マウスにdiazoxide（100 mg/kg・BW/day，経口）とpioglitazone（100 mg/kg・BW/day，経口）による12週間の介入を行った結果，血糖値は有意に改善した（$p<0.05$ vs 非介入）．膵ラ氏島の組織学的変化を検討したところ，両薬剤とも％膵ラ氏島面積を同一週齢の非介入 *db+/db+* マウスのそれと比較し，有意に増大させた（$p<0.001$）．またβ細胞比率は非介入マウスでは加齢と共に有意な減少（$p<0.01$）を認めるが，薬剤介入により非介入と比べて有意に増大した（$p<0.01$，pioglitazone vs 非介入）．さらに10週齢マウスに2週間，薬剤介入すると血糖，中性脂肪，遊離脂肪酸は低下するが，血中インスリン値はdiazoxideで増加，pioglitazoneではむしろ低下していた．血中アディポネクチン値は介入により増加したが，pioglitazoneでより顕著であり，両者併用ではさらに著明な増加をみた（$p<0.001$ vs 非介入）．インスリン感受性はpioglitazoneで有意に増強した（$p<0.01$ vs 非介入）が，diazoxideでは増強効果を認めなかった．Pioglitazoneにより膵ラ氏島内中性脂肪含量は減少する（$p<0.05$ vs 非介入）が，diazoxideでは変化をみなかった．膵ラ氏島のグルコース応答性インスリン分泌反応は，薬剤介入により改善した（$p<0.05$ vs 非介入）．*db+/db+* マウスの膵β細胞機能障害は両薬剤のいずれによっても抑制されることが明らかになったが，その機序としてdiazoxideは膵β細胞に直接作用し，高血糖の持続による膵β細胞のオーバーワークを抑制することでその機能を保護するものであり，加えて糖毒性の改善も細胞機能保護に寄与していると考えられた．一方，pioglitazoneはインスリン感受性増強による糖毒性の改善に加えて，膵β細胞における脂肪毒性の抑制も関与するものと思われた．

（平成15年6月9日受理）

Prevention of Pancreatic β-cell Damage by Pharmacological Intervention with Diazoxide and Pioglitazone in Obese Diabetic Mice

Fumiko KAWASAKI

Prevention of the progression of pancreatic β-cell dysfunction in diabetes mellitus is an important subject in the long-term management of this disease. The preventive effects of diazoxide

川崎医科大学　内科内分泌・糖尿病部門
〒701-0192 倉敷市松島577
e-mail address：fumiko@med.kawasaki-m.ac.jp

Division of Diabetes and Endocrine, Department of Medicine, Kawasaki Medical School：577 Matsushima, Kurashiki, Okayama, 701-0192 Japan

and pioglitazone on pancreatic β-cell damage were evaluated using C57BL/KsJ *db*+/*db*+ mice (*db*+/*db*+ mice) with an obese diabetic animal model. Long-term treatment (6－18 weeks of age in *db*+/*db*+ mice) with diazoxide (100 mg/kg daily p.o.) or pioglitazone (100 mg/kg daily p.o.) induced a significant reduction in the fasting blood glucose level ($p<0.05$ vs the untreated control, at 18 weeks of age). The % islet area was larger in both diazoxide- and pioglitazone-treated mice than in the untreated control *db*+/*db*+ mice ($p<0.001$). The β-cell ratio was also significantly larger in the pioglitazone-treated mice than in the control mice ($p<0.01$). In a short-term experiment (10－12 weeks of age), the plasma levels of glucose, triglyceride, and free fatty acid were significantly decreased by the treatment with diazoxide or pioglitazone. The plasma adiponectin level increased significantly in both the diazoxide- and pioglitazone-treated mice. This level was further increased by combined treatment with diazoxide and pioglitazone ($p<0.001$ vs control). Pioglitazone, but not diazoxide, significantly increased insulin sensitivity ($p<0.01$). Triglyceride content in pancreatic islets from the control mice was significantly reduced by the treatment with pioglitazone, but not by that with diazoxide ($p<0.05$). Impaired glucose-stimulated insulin secretion from pancreatic islets in the control mice was restored by the treatment with dizoxide or pioglitazone ($p<0.05$). The present results suggest that diazoxide directly reduces pancreatic β-cell overwork and improves the glucose toxicity in *db*+/*db*+ mice, resulting in control of β-cell damage. Pioglitazone, on the other hand, improves glucolipotoxicity by increasing insulin sensitivity and reducing fat accumulation in the islets in *db*+/*db*+ mice. (Accepted on June 9, 2003) *Kawasaki Igakkaishi 29(2): 115－130, 2003*

Key Words ① **Obese diabetic mice** ② **Diazoxide** ③ **Pioglitazone** ④ **Pancreatic β-cell damage**

はじめに

糖尿病はインスリンの作用不足によりさまざまな代謝異常をきたすが，なかでも糖代謝異常はもっとも特徴的なものであり，耐糖能異常という臨床的病態で現われる．我が国における糖尿病で大多数を占める2型糖尿病は，その発症および病態進展に関与する因子としてインスリン分泌不全とインスリン感受性低下（インスリン抵抗性）が挙げられる[1),2)]．インスリン分泌と糖尿病の関係については，若年発症糖尿病(Maturity onset diabetes of the young：MODY)の原因遺伝子の発見[3)]によって，糖尿病の病因論におけるインスリン分泌不全の重要性が認識されたが，日本人では特に重要であることが示唆されている[4)]．

インスリン分泌機構に影響する因子として高血糖と高脂肪酸血症が最近重要視されている．膵β細胞のグルコース認識能の低下によるインスリン分泌障害[5)]とインスリン抵抗性の存在はインスリン作用不足を引き起こし，高血糖とともに脂質代謝異常をきたす．長期にわたる高血糖によってもたらされるブドウ糖毒性（以下糖毒性）はインスリン分泌障害をさらに増強させる．糖毒性の機序として，Leahy の overwork 仮説が知られている[6)]．すなわち高血糖状態では膵β細胞が overwork を強いられる結果，インスリン分泌能は低下する．また糖毒性による膵β細胞機能障害はある程度，可逆性である[7),8)]．

一方，脂肪細胞から遊離される遊離脂肪酸の増加によって末梢骨格筋のインスリン作用低下や膵β細胞のインスリン分泌障害を引き起こすという脂肪毒性 (lipotoxicity) という概念が Lee らによって提唱されている[9)]．Zucker diabetic fatty (ZDF) ラットでは血糖値上昇の前から血

中脂肪酸上昇と膵ラ氏島内中性脂肪含量の増加を認めること，正常ラット膵ラ氏島を脂肪酸とともに培養すると，中性脂肪含量の増加とグルコース依存性インスリン分泌反応の低下が認められたことから，脂肪毒性と膵β細胞機能障害との関連が強く示唆されている[10].

突然変異系 C57BL/KsJ *db+/db+* マウスは，*db* すなわちレプチン受容体遺伝子 889Lys の下流イントロン内の点変異によるスプライシング異常を認め，レプチンに不応性である．レプチンは脂肪細胞から分泌され，摂食行動とエネルギー・ホメオスタシスに関わるペプチドホルモンである．このためホモ個体（*db+/db+*）は，生後，摂食行動が抑制されず肥満となり，著明なインスリン抵抗性が惹起され，高インスリン血症，高血糖，高中性脂肪血症をきたし，生後3－6ヶ月後には膵ラ氏島のβ細胞が萎縮し，高度のインスリン分泌不全に至る[11)~14)]．高度のインスリン抵抗性とインスリン分泌障害を呈する C57BL/KsJ *db+/db+* マウスは，肥満2型糖尿病のモデル動物として広範に実験使用されている．インスリン分泌不全に至る成因については何らかの遺伝的支配を示唆する報告[15]がみられるが，糖毒性および脂肪毒性の関与の可能性も含めて，未だ十分には解明されてはいない．

Diazoxide はグルコース代謝によって生じる細胞内 ATP の増加を，細胞膜の脱分極という電気刺激に変換する機構の中心的役割をになう K_{ATP} チャネル開口薬である．膵β細胞において K_{ATP} チャネルの開口はインスリン分泌抑制に働く．これまでに diazoxide を1型及び2型の糖尿病患者に投与し，耐糖能および膵インスリン分泌能の改善がみられたとの報告がある[16),17)]．この機序については動物実験結果などから様々な仮説があるが，未だ明確ではない．一方，thiazolidinedione 系薬剤である pioglitazone は，インスリン標的組織における糖利用を促進させ，血糖とともに血中インスリン値を低下させる．インスリン抵抗性の強い症例で効果はより顕著であることからインスリン抵抗性改善薬として2型糖尿病治療薬に用いられている．同じく thiazolidinedione 系薬剤である troglitazone については，肥満糖尿病モデル動物における耐糖能の改善作用あるいは膵β細胞破壊の防止効果をみた報告がある[18),19)]．しかし核内受容体型転写因子 peroxisome proliferator-activated receptors（PPAR）γを生体内標的分子とする thiazolidinedione 系薬剤が，どのような機序でインスリン感受性を増強し，膵β細胞機能保護に働くかは明らかではない．

本研究では肥満2型糖尿病モデル動物 C57BL/KsJ *db+/db+* マウスの糖尿病の病態進展防止の可能性を膵β細胞機能障害抑制の面から明らかにするため，発症早期から K_{ATP} チャネル開口薬 diazoxide と thiazolidinedione 系薬剤 pioglitazone による長期間（12週間）の介入を行い，膵ラ氏島の形態学的変化を比較検討した（実験1）．さらに短期間（2週間）の介入試験により，これら薬剤による膵β細胞障害抑制作用の生理，生化学的な解析を行った（実験2）．作用機構が異なる2薬剤による膵β細胞機能の保護作用およびその作用機序を比較検討することによって，*db+/db+* マウスにおける膵β細胞機能障害の進展機構が解明され，2型糖尿病の予防戦略に大きな貢献が期待される．

動物および方法

C57BL/KsJ *db+/db+* マウスの作製

突然変異系 C57BL/KsJ *db+/db+* マウス（以下 *db+/db+* マウス）は，生後，摂食行動が抑制されず肥満となり，著明なインスリン抵抗性が惹起され，糖尿病を発症する．この *db+/db+* マウスを得るため，非肥満で，*db* 遺伝子座にクロスリンクする misty（淡毛色の体毛）をマーカーとして有するヘテロ個体 *db+/+m*（以下 *db+/+m* マウス）を，Jackson Laboratory（Bar Harbor, ME, USA）より購入し，川崎医科大学動物実験施設において，交配・繁殖させた．misty（*+m/+m*）は体毛色の観察にて，*db+/+m* と *db+/db+* は肥満と特徴的な体つきの有無にて判定した．飼育は一般飼料（MF-オリエン

タル酵母，東京）と飲料水を自由に摂取させ，室温25℃下で行った．本実験は川崎医科大学動物実験委員会の承認を受け（No. 01-080），川崎医科大学動物実験指針に基づき実施した．

実験1

薬物介入による膵β細胞機能障害抑制効果を，膵ラ氏島の組織学的変化により検討するため，以下の実験を行った．

薬物介入プロトコール

生後第6週齢の *db+/db+* マウスを，D群（n＝6）；KATP チャネル開口薬 diazoxide（100 mg/kg・BW/day，経口）投与，P群（n＝6）；インスリン抵抗性改善薬 pioglitazone（100 mg/kg・BW/day，経口）投与，C群（n＝6）；vehicle 投与群の3群に分け，第18週齢まで12週間の薬物介入を行った．対照として同週齢の *db+/+m* マウスを用いた．Diazoxide（和光純薬工業，大阪）は弱アルカリ蒸留水（pH 9-10）に溶解して使用した．Pioglitazone は，武田薬品工業株式会社（大阪）より供与をうけ，0.5％ carboxymethylcellulose を含む蒸留水に混ぜ懸濁液とした．薬物投与は，経口的に胃ゾンデを用いて行った．なお薬物投与量の設定は既報を参考にした[20),21)]．介入期間中，体重および血糖を1週毎に測定した．血糖測定にはジエチルエーテル吸入麻酔下にてマウス眼窩静脈叢よりヘマトクリット管にて採取した血液を用いた．

膵ラ氏島の組織学的検討

薬物介入開始後，6週後（第12週齢）および12週後（第18週齢）に，膵臓を摘出し，ホルマリン固定・パラフィン包埋した後，4 µm の薄切スライド標本を作製した．一般染色として hematoxylin-eosin（HE）染色および azan 染色を行い，また抗インスリン抗体，抗膵ホルモン3種混合抗体（グルカゴン，ソマトスタチン，サブスタンスP）による免疫染色を行った．

免疫染色は酵素抗体法に従って行った．まず膵パラフィン切片を Lemosol®（和光純薬工業），エタノールにて脱パラ後，内因性ペルオキシダーゼ活性をブロックするため，3％過酸化水素加メタノールに10分間浸した．PBS（10 mM phosphate buffer saline，pH 7.0）で洗浄後，1次抗体反応としてモルモット抗インスリンポリクローナル抗体（ニチレイ社，東京）と25℃にて20分間インキュベーションした．PBS にて洗浄後，シンプルステイン MAX-PO（R）（ニチレイ社）を添加し，25℃にて30分間反応させた．PBS にて洗浄後，シンプルステイン DAB 溶液（ニチレイ社）を添加し，25℃にて7分間反応させ，発色させた．連続切片を用い，1次抗体として抗膵ホルモン3種混合抗体（ウサギ抗グルカゴン抗体：ウサギ抗ソマトスタチン：ウサギ抗サブスタンスP＝1：1：1，いずれもニチレイ社）による免疫染色を同様に行った．対比染色は hematoxylin にて行った．画像解析ソフト NIH image ver. 1.61 を使用して，膵組織全体面積と膵ラ氏島面積，膵ラ氏島内インスリン陽性および非陽性細胞数を計測し，％膵ラ氏島面積（膵面積あたり），％β細胞数（膵ラ氏島あたり）を算出した．

実験2

薬物介入による膵β細胞機能障害抑制効果について，生化学的検討を加えるため，以下の実験を行った．

薬物介入プロトコール

生後第10週齢の *db+/db+* マウスを，D群（n＝6）；diazoxide（100 mg/kg・BW/day，経口）投与，P群（n＝6）；pioglitazone（100 mg/kg・BW/day，経口）投与，D+P群（n＝6）；diazoxide（100 mg/kg・BW）＋pioglitazone（100 mg/kg・BW）経口投与，C群（n＝6）；vehicle 投与群の4群に分け，2週間薬物介入を行った．介入期間前後でジエチルエーテル吸入麻酔下にてマウス眼窩静脈叢より血液を採取し，直ちに血糖値測定後，血漿分離し，インスリン，中性脂肪（TG），遊離脂肪酸（NEFA），アディポネクチン濃度の測定まで－80℃で保存した．また介入終了後，インスリン感受性試験，さらに単離膵ラ氏島を用いたグルコース応答性インスリン分泌刺激試験，膵ラ氏島中性脂肪（TG）含有量の測定を行った．

血液生化学的マーカーの測定

血糖はDexter-Z®（バイエルメディカル，東京）を用いて酵素電極法で測定した．インスリン値はインスリン測定キット（森永生科学研究所，横浜）を用いてELISA法にて測定した．血中TG値，NEFA値はそれぞれトリグリセライドG-テストワコー，NEFA C-テストワコー（いずれも和光純薬工業）を用いて酵素法にて測定した．

アディポネクチンはMaedaらの方法[22]に準じてWestern blot法にて測定した．まずSDS buffer で250倍希釈した血漿サンプルを100℃，5分間加熱処理後，12.5%ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し，PVDFメンブレン（Bio-Rad Lab., Calfornia, USA）にブロッティングした．ブロックエース（大日本製薬，大阪）でブロッキング後，一次抗体として1500倍希釈したウサギ抗マウスアディポネクティンポリクローナル抗体（大阪大学松澤佑次博士より供与）を用い，25℃にて120分間一次抗体反応を行った．洗浄後，2000倍希釈したHRT（horseradish peroxidase）標識抗ウサギIgG抗体（cell signaling Technolog. Inc, Beverly, MA, USA）を用いて25℃にて120分間二次抗体反応を行い，引き続き，ECL western blotting detection reagent（Amersham Biosciences Corp, Piscataway NJ, USA）にて蛍光発色を行った．蛍光シグナルはルミノ・イメージアナライザーLAS-1000 plus（富士写真フィルム，東京）にて検出し，Image Gauge ver. 3.4（富士写真フィルム）を用いて半定量的に解析した．

インスリン感受性試験

インスリンに対する感受性を検討するためインスリン負荷前後の血糖値を測定した．一晩絶食させた当該マウスに，ヒトレギュラーインスリン1単位/kg・BWを腹腔内注射した．インスリン投与前と投与後90分に尾静脈より採血し，血糖値を測定した．

膵ラ氏島の単離

膵ラ氏島はコラゲナーゼ消化法にて単離した．コラゲナーゼ溶液（4 mg/ml, collagenase XI, SIGMA CHEMICAL Co., St. Louis, MO, USA）をHKB（HEPES-Krebs buffer；119 mM NaCl, 4.75 mM KCl, 2.54 mM $CaCl_2$, 1.2 mM $MgSO_4$, 1.2 mM KH_2PO_4, 5 mM $NaHCO_3$, 20 mM HEPES, pH 7.4）にて作成した．マウスはジエチルエーテル吸入にて麻酔し，開腹後，頸動脈切断し脱血死させた．25ゲージ注射針とシリンジを用いてコラゲナーゼ溶液を少量ずつ膵組織全体に注入した後，膵組織を摘出，小ビニールパックに移し替え，さらにコラゲナーゼ溶液を加えて37℃，5分間継続的に振とうした．膵組織を50 mlコニカルチューブに移し，ボルテックスミキサーでさらに攪拌することで完全に消化した後，長ガラス試験管に移し，HKBを追加して懸濁した．静置すると膵ラ氏島は90秒以内に試験管底に沈下するため，単離膵外分泌細胞を含む上層のHKBをピペッティングにより取り除いた．同様の操作を3回繰り返し，最後に残った膵ラ氏島をガラスシャーレに移した．0.25 mg/mlとなるようにdimethylsulfoxideに溶解したdithizone溶液（和光純薬）を加え，ピンク色に染色される膵ラ氏島をSMZ1000実体顕微鏡（Nikon，東京）下，ピペットを用い採取した．

単離膵ラ氏島を用いたグルコース応答性インスリン分泌刺激試験

サイズマッチさせた膵ラ氏島を小試験管に用意し（膵ラ氏島4個/管），3 mMグルコース溶液中（5 mg/ml BSA添加HKB）で，プレインキュベーションした（37℃，60分間）．その後，上清を新鮮3 mMまたは16.7 mMグルコース溶液に替え，さらにインキュベーションした（37℃，60分間）．終了後，上清を採取し，インスリン測定（ELISA法）行うまで−80℃で保存した．

膵ラ氏島TG含有量の測定

膵ラ氏島TG含有量の測定は，Lee Yらの方法を用いて行った[9]．すなわち単離膵ラ氏島（32-65個）をPBSにて2回洗浄後，50 µlのhigh salt buffer（2 M NaCl, 2 mM EDTA, 50 mM sodium phosphate）を加え，さらに1分間sonicationにて膵ラ氏島を破壊した．12000 rpm 5分間遠心

した後，上清 10 μl と t-butanol 10 ml+triton-X-100：methyl alcohol（1：1）5 μl を混合した．ラ氏島内 TG 量は triglyceride（GPO-tender）kit（SIGMA DIADNOSTICS Inc., St. Louis, MO, USA）を用いて測定した．

解　析

全てのデータは平均値±標準誤差（mean ± SEM）で記した．多群間の比較は ANOVA を用い，有意差がある場合，各々の2群間の比較は対応のない Student's t-test を行い，$p<0.05$を有意差ありとした．統計検定には StatView-J ver. 5（SAS, NC, USA）を使用して行った．

結　果

実験 1
体重と空腹時血糖値の変化

db+/db+ マウスは，第5週齢より肥満の発現を認め，週齢とともに体重は著しく増加した（**Fig. 1**）．第18週齢ではコントロールの *db+/+m* マウスと比較し，約2倍であった（50±1 g vs 26±1 g, $p<0.001$）．薬物介入した D 群，P 群のいずれのマウスも介入直後の外見観察では C 群と特に差異を認めなかった．しかし P 群においては，介入開始2週目から他群と比し，体重増加がより顕著であり，介入開始3週目以降で，その増加は C 群，D 群に比較して有意であった（$p<0.01$）．介入期間終了時，P 群の平均体重は C 群と比べ22%増加していたが，D 群は C 群と有意な差を認めなかった（C 群 50±1 g，D 群 53±1 g，P 群 61±2 g：$p<0.01$，P 群 vs C 群）．

空腹時血糖値（**Fig. 2**）は，P 群および D 群いずれにおいても介入開始6週目以降，C 群に比し低く，介入終了時の空腹時血糖値は C 群 554±62 mg/dl，D 群 284±35 mg/dl，P 群 260

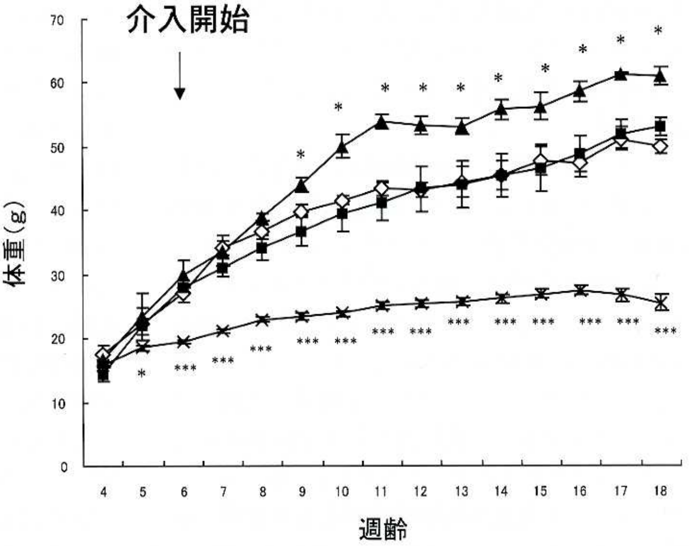

Fig. 1.　体重変化の比較．
diazoxide（100 mg/kg・BW/day，経口）投与群（■），pioglitazone（100 mg/kg・BW/day，経口）投与群（▲），vehicle 投与（C）群（◇），*db+/+m* マウス群（×）．
データは平均±標準誤差（n＝6），*P<0.05，***P<0.001 vs C 群

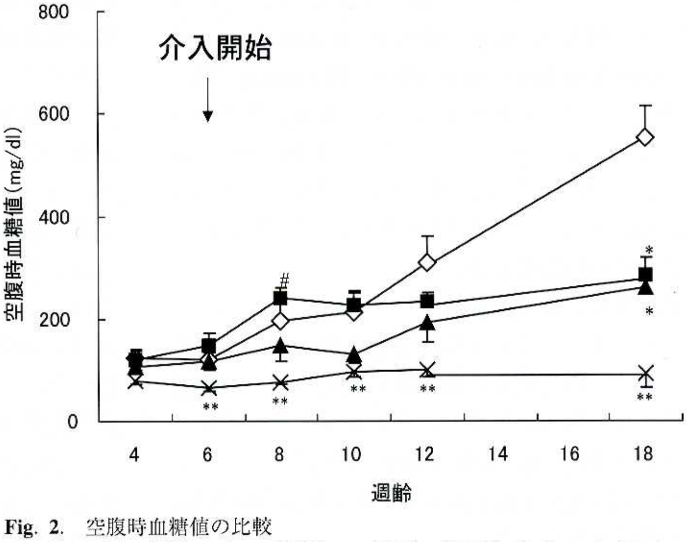

Fig. 2.　空腹時血糖値の比較
diazoxide（100 mg/kg・BW/day，経口）投与群（■），pioglitazone（100 mg/kg・BW/day，経口）投与群（▲），vehicle 投与（C）群（◇），*db+/+m* マウス群（×）．
データは平均±標準誤差（n＝6）．*P<0.05，**P<0.001 vs C 群，
#P<0.05 vs P 群．

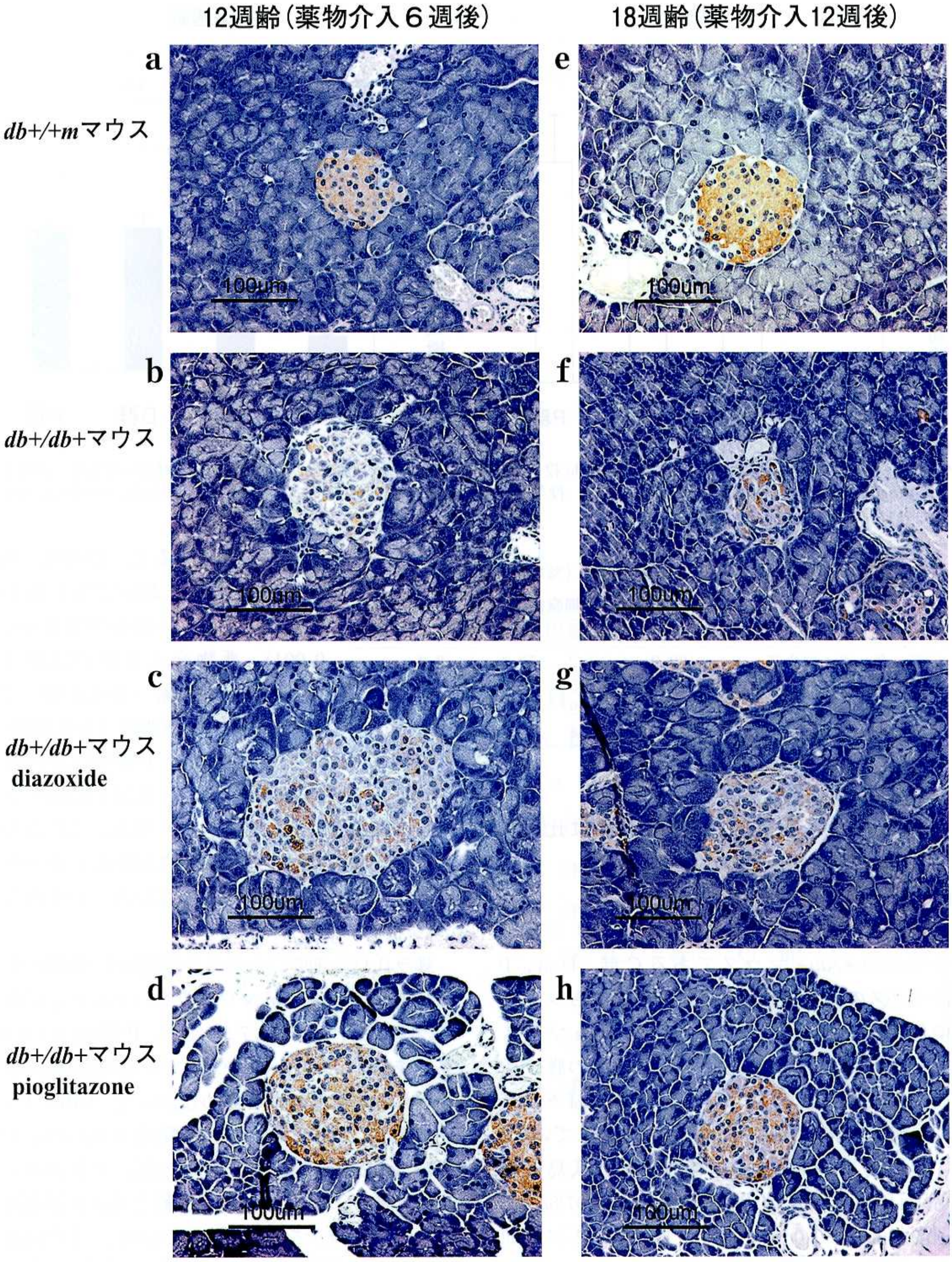

Fig. 3. 膵ラ氏島組織像の比較.
膵ラ氏島抗インスリン抗体による免疫染色組織像（×200）を示した．12週齢（介入６週後）の *db+/+m* マウス（**a**），*db+/db+* マウスＣ群（**b**），diazoxide 投与群（**c**），pioglitazone 投与群（**d**）
18週齢（介入12週後）の *db+/+m* マウス（**e**），*db+/db+* マウスＣ群（**f**），diazoxide 投与群（**g**），pioglitazone 投与群（**h**）

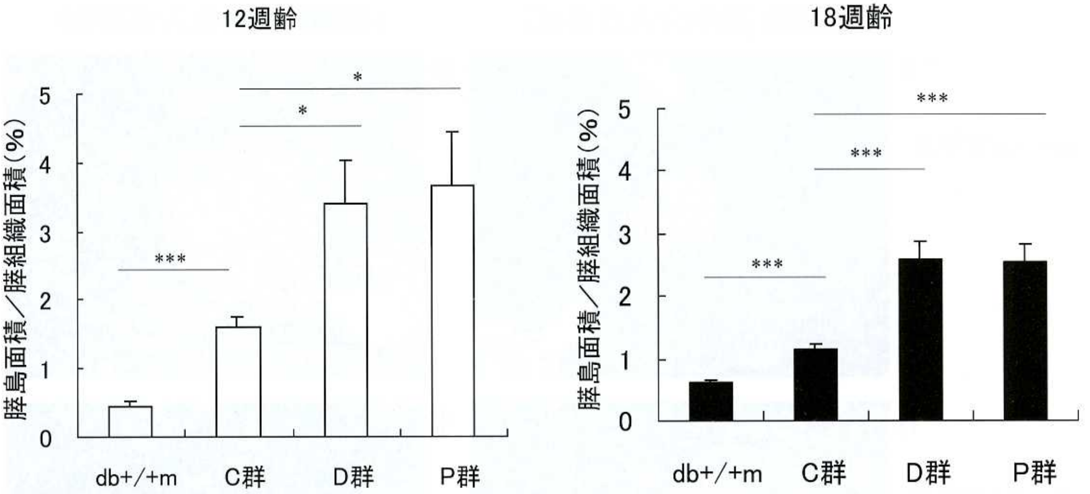

Fig. 4. 膵ラ氏島面積比の比較.
db+/+m；*db+/+m* マウス群，C 群；vehicle 投与群，D 群；diazoxide（100 mg/kg・BW/day，経口）投与群，P 群；pioglitazone（100 mg/kg・BW/day，経口）投与群，データは平均±標準誤差（n＝3）．*P＜0.05，***P＜0.001 vs C 群，

Table 1. 膵ラ氏島 β 細胞比率（%）の比較

	β細胞割合（%） 12週齢	β細胞割合（%） 18週齢	
C 群　db+/db+ マウス	82.2 ± 1.2	73.4 ± 2.2	
D 群　db+/db+ マウス	80.7 ± 1.5	77.3 ± 1.3	
P 群　db+/db+ マウス	82.8 ± 0.9	80.6 ± 1.2	**
db+/+m マウス	76.4 ± 3.4	77.8 ± 3.6	

**p＜0.01 vs C 群

±12 mg/dl といずれの介入群も C 群に比し有意に低値であった（p＜0.05 vs C 群）．

膵ラ氏島の組織学的変化

非糖尿病非肥満 *db+/+m* マウスおよび糖尿病肥満 *db+/db+* マウスである C 群，D 群，P 群マウスの典型的膵ラ氏島組織インスリン免疫染色像を **Figure 3** に示した．*db+/+m* マウスと *db+/db+* マウスを比較すると後者の膵ラ氏島は全般的に肥大し，大きさや形態が様々であり，ラ氏島内の β 細胞，非 β 細胞は混在していた．

非肥満 *db+/+m* マウス群の%膵ラ氏島面積（膵面積あたり）は12週齢で0.44±0.07%，18週齢で0.61±0.04%であり，加齢とともに増加傾向にあった（**Fig. 4**）．一方，C 群の%膵ラ氏島面積は12週齢で1.61±0.12%，18週齢で1.16±0.06%と加齢とともに有意に減少した（P＜0.01）．しかし両群の%膵ラ氏島面積を同一週齢で比較すると，12週齢，18週齢のいずれにおいても C 群が有意に増大していた（いずれも p＜0.001）．薬物介入 D 群の%膵ラ氏島面積は12週齢（介入 6 週）で3.39±0.64%，18週齢（介入12週）で2.59±0.28%，P 群ではそれぞれ3.65±0.77%，2.54±0.28%であり，加齢とともに減少した．また，これらの%膵ラ氏島面積は，同一週齢における C 群のそれと比較すると有意に増大していた（いずれも p＜0.001）．

膵ラ氏島全細胞に占める β 細胞比率（**Table 1**）は12週齢で *db+/+m* マウス群76.4±3.4%，C 群82.2±12%，D 群80.7±1.5%，P 群82.8±0.9%であり，*db+/db+* マウスでやや増加傾向がみられたが有意な差を認めなかった（**Table 1**）．18週齢では *db+/+m* マウス群77.8±3.6%，C 群73.4±2.2%，D 群77.3±1.3%，P 群80.6±12%であり，C 群において加齢と共に β 細胞比率の有意な減少を認めた（p＜0.01）．また18週齢における群間比較では P 群の β 細胞比率が C 群より有意に大であった（p＜0.01）．

実験 2

血液生化学マーカー

介入前（10週齢）と介入後（12週齢）の血糖値，血中インスリン値，血中TG値，血中NEFA値，血中アディポネクチン値（いずれも空腹時）を比較した（**Fig. 5, 6**）．10週齢（介入前）*db+/db+* マウスの空腹時血糖値は223±12 mg/dl，非介入C群の12週齢では256±25 mg/dlと上昇傾向を認めた（有意差なし）．一方，薬物介入群12週齢における空腹時血糖値はD群で192±29 mg/dl，P群で198±27 mg/dl，D+P群で156±11 mg/dlと，いずれの群も2週間の介入で低下傾向を示し，D+P群においてより顕著であった（P＝0.004，D+P群 vs C群）．

10週齢 *db+/db+* マウスの血中インスリン値は3.5±0.4 ng/ml，12週齢では3.3±0.4 ng/mlと変化がみられなかった．薬物介入群12週齢の血中インスリン値はそれぞれ，D群6.1±0.9 ng/ml，P群2.8±0.6 ng/ml，D+P群2.2±0.4 ng/mlであった．D群はC群に比し有意に高値（p＝0.017）であり，P群，D+P群ではやや低下傾向を示したが有意な差ではなかった．

血中TG値は10週齢で119±6 mg/dl，非介入群12週齢で171±15 mg/dlと有意な上昇をみとめた（p＝0.003）．薬物介入D群12週齢では105±13 mg/dl，P群117±23 mg/dl，D+P群102±15 mg/dlといずれの群でも有意に低下した（p<0.01，vs C群）．また血中NEFA値は介入前10

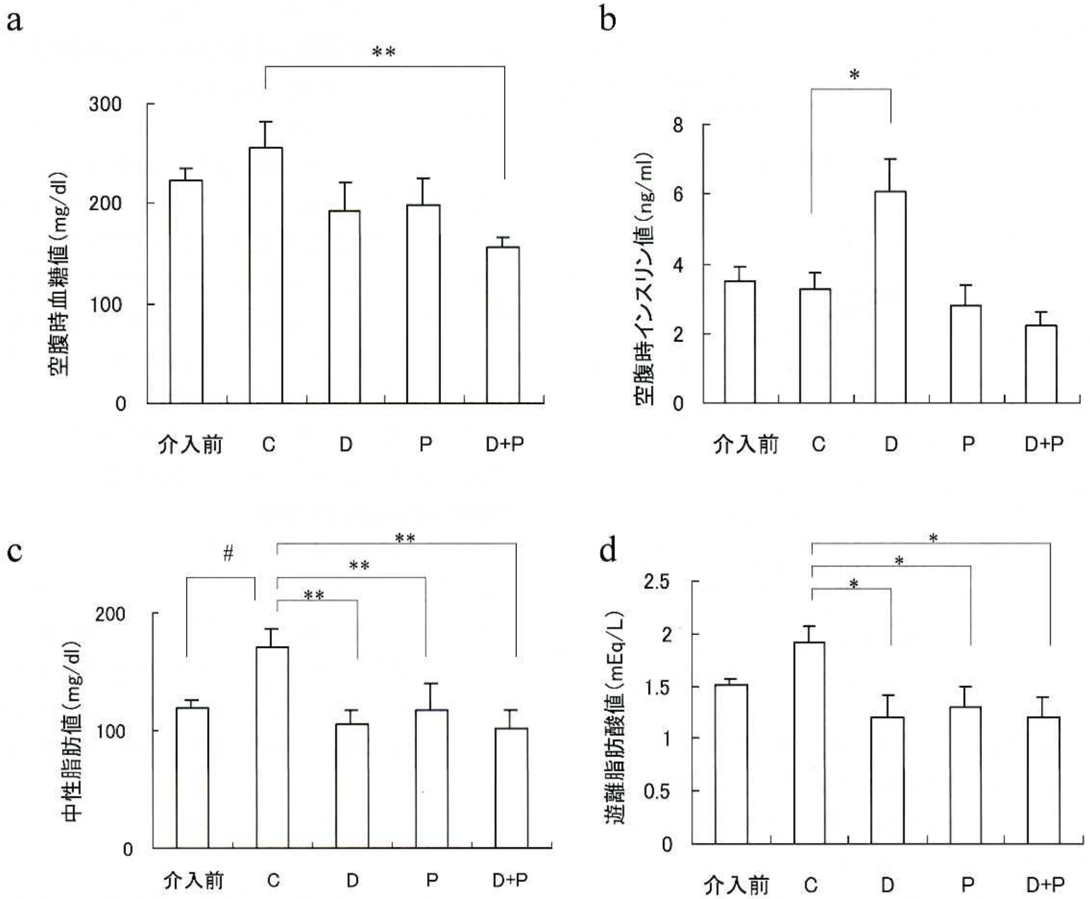

Fig. 5.　血液生化学マーカーの比較．
（**a**）空腹時血糖値，（**b**）空腹時インスリン値，（**c**）空腹時血中中性脂肪値，（**d**）空腹時血中遊離脂肪酸値．
D群；diazoxide（100 mg/kg・BW/day，経口）投与，P群；pioglitazone（100 mg/kg・BW/day，経口）投与，D+P群；diazoxide（100 mg/kg・BW）+pioglitazone（100 mg/kg・BW）経口投与，C群；vehicle投与群
データは平均±標準誤差（n＝6）．*P<0.05，**P<0.01 vs C群，#P<0.01 vs 介入前．

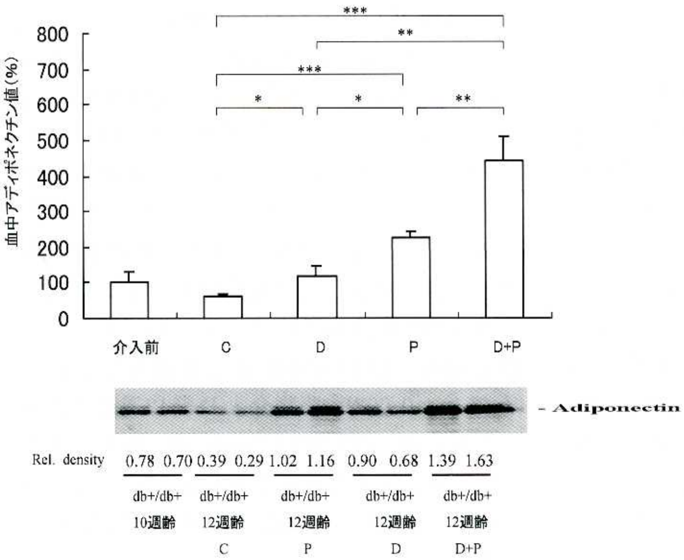

Fig. 6. 血中アディポネクチン量の比較.
D群;diazoxide (100 mg/kg・BW/day, 経口) 投与, P群;pioglitazone (100 mg/kg・BW/day, 経口) 投与, D+P群;diazoxide (100 mg/kg・BW) +pioglitazone (100 mg/kg・BW) 経口投与, C群;vehicle投与群.
薬剤介入前を100%とし, 平均±標準誤差 (n=6) で表した. *P<0.05, ***P<0.001 vs C群.

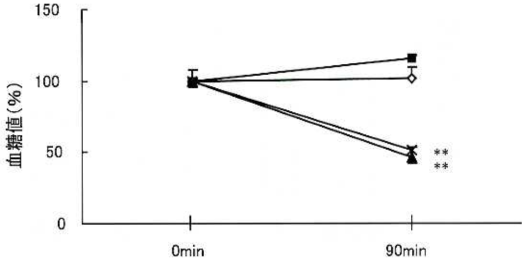

Fig. 7. インスリン感受性の比較.
D群;diazoxide (100 mg/kg・BW/day, 経口) 投与 (■), P群;pioglitazone (100 mg/kg・BW/day, 経口) 投与 (▲), D+P群;diazoxide (100 mg/kg・BW) +pioglitazone (100 mg/kg・BW) 経口投与 (×), C群;vehicle投与群 (◇)
インスリン注射前血糖値を100%とし, 平均±標準誤差 (n=4) で表した. **P<0.01 vs C群.

週齢で1.5±0.1 mEq/L, 12週齢では1.9±0.2 mEq/Lと上昇傾向を認めたが, 12週齢D群では1.2±0.2 mEq/L, P群1.3±0.2 mEq/L, D+P群1.2±0.2 mEq/Lであり, いずれもC群と比して有意な低下を示した (p<0.05).

血中アディポネクチン値は介入前10週齢を100%とすると, 12週齢ではC群で61±7%, D群で122±26%, P群で226±20%, D+P群で442±70%であった. C群は2週間の加齢により低下を認めたが, 薬物介入群は有意に増加しており, 増加の程度はD群<P群<<D+P群の順であった (p<0.05:D群vs C群, p<0.001:P群, D+P群vs C群).

インスリン感受性

インスリン注射 (1単位/kg・BW) 90分後の血糖値はP群, D+P群で注射前血糖値の46±4%, 51±2%まで低下した (p<0.01 vs C群). 一方, C群では102±8%, D群では116±1%と変化を認めなかった (**Fig. 7**).

単離膵ラ氏島グルコース応答性インスリン分泌反応

3 mMグルコース添加時のインスリン基礎分泌量は薬物非介入C群, 薬物介入D群, P群では差はみられないが, D+P群において他群より有意に高値であった(P<0.05). 16.7 mMの高濃度グルコース添加時のインスリン分泌量は薬物介入の3群ともC群に比し, 高値を呈した. また各群において3 mMグルコース添加時と比較すると, C群で8.5倍, D群で13.5倍, P群で18倍, D+P群で9.5倍と著明な増加を認めた (**Table 2**).

単離膵ラ氏島内TG含量

膵ラ氏島内TG含量はC群65.6±7.6 ng/islet, D群67.3±7.3 ng/islet, P群43.3±3.6 ng/islet, D+P群45.9±2.5 ng/isletであった (**Fig. 8**). C群と比較してP群, D+P群で有意に低下したが, D群ではC群との間に差はみられなかった (P群, D+P群いずれもp<0.05 vs C群).

考 察

本研究では過食による肥満, インスリン過分泌, 高血糖さらにインスリン分泌不全に至る肥満糖尿病動物モデルであるC57BL/KsJ *db+/db+* マウスに対して, 血糖上昇が顕在化し始め

Table 2. 薬物介入後の単離膵ラ氏島におけるグルコース応答性インスリン分泌反応

	n	G3.0mM	G16.7mM
Control 群	4	0.19 ± 0.05	1.61 ± 0.31*
Diazoxide 群	4	0.20 ± 0.03	2.69 ± 0.44* #
Pioglitazone 群	4	0.23 ± 0.08	4.14 ± 0.51* ##
Diazoxide, Pioglitazone 併用群	4	0.41 ± 0.04##†	3.88 ± 0.49* ##

Diazoxide 群；diazoxide（100 mg/kg・BW/day，経口）投与，Pioglitazone 群；pioglitazone（100 mg/kg・BW/day，経口）投与，diazoxide, pioglitazone 併用群；diazoxide（100 mg/kg・BW）+pioglitazone（100 mg/kg・BW）経口投与，C群；vehicle 投与群．データは平均±標準誤差（n＝4）．*P＜0.001 vs G3.0mM 群，##P＜0.01 vs C 群，#P＜0.05 vs C 群，†P＜0.001 vs D 群

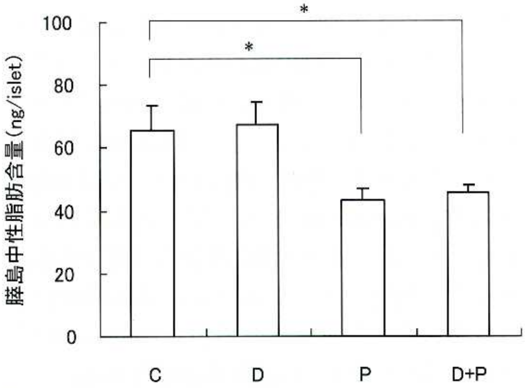

Fig. 8. 膵ラ氏島内中性脂肪含量の比較．
D 群；diazoxide（100 mg/kg・BW/day，経口）投与，P 群；pioglitazone（100 mg/kg・BW/day，経口）投与，D+P 群；diazoxide（100 mg/kg・BW）+pioglitazone（100 mg/kg・BW）経口投与，C 群；vehicle 投与群．平均±標準誤差（n＝4）．*P＜0.05vs C 群．

る6週齢より12週間の長期にわたって，diazoxide および pioglitazone による介入を行ない，膵β細胞機能障害の進展阻止を試みた．その結果，薬物非介入 *db+/db+* マウスの膵ラ氏島面積比，β細胞比率は経過とともに低下がみられ，ラ氏島サイズの大小不同が顕著になり，全体に縮小する一方，薬剤介入によって18週齢における膵ラ氏島面積比およびβ細胞比率は顕著に保たれた．血糖レベルは薬剤介入によって正常化しないまでも，非介入群と比べて明らかな改善を認めた．さらに膵ラ氏島のグルコース応答性インスリン分泌反応を両薬剤とも著明に改善した．これらの所見は，経過とともに顕著となる *db+/db+* マウスβ細胞機能低下を糖尿病発症早期からの薬剤介入によって抑制しうることを明確に示すものである．

K_{ATP} チャネル開口薬 diazoxide あるいはその誘導体による膵インスリン分泌能および耐糖能の改善効果を示唆するものとして，1型モデル動物，残存膵，移植膵ラ氏島あるいは培養細胞を用いた報告[20),23)~25)]とともに肥満2型モデル動物においてインスリン抵抗性改善を示唆する報告[26),27)]がみられる．我々は既に，streptozotocin 誘発糖尿病ラットに diazoxide を長期投与した結果，膵β細胞が機能的かつ形態学的に保持されることを報告[28)]したが，自然発症2型糖尿病モデル動物に，発症当初から長期間介入し，膵β細胞機能障害抑制効果について形態学的，機能的に解析した報告はこれまでにみられない．一方，pioglitazone についても実験動物においてインスリン抵抗性改善効果に加えて膵β細胞機能保護効果を示唆する報告があるが，diazoxide と同様に，長期間介入による膵β細胞機能障害の抑制効果を形態学的，機能的に検討した報告はない．Fujiwara らは5ヶ月の高齢 *db+/db+* マウスに troglitazone を投与し，膵β細胞の形態学的検討を行ったが，かなり進行した糖尿病状態のものであり，糖尿病発症初期のものとは異なっている[18)]．

Diazoxide による耐糖能改善の機序として，体重増加の抑制とそれに伴うインスリン感受性の増強によることを示唆する報告[26),27)]がみられる．しかし，インスリン抵抗性が一般に認められない自己免疫性の1型糖尿病患者における耐糖能改善効果[16)]を説明するには困難である．本研究では diazoxide 投与群の体重は非介入群と同様であり，インスリン感受性試験においてもインスリン作用増強効果は認められなかった．また空腹時血中インスリン濃度も pioglitazone 群と比べて明らかに高値であり，インスリン抵抗性改善が diazoxide の耐糖能改善機序あるいは膵β細胞機能障害抑制機序とは考えにくい．

Diazoxideのインスリン抵抗性改善効果を示唆したAizawaらの報告[27]では肥満糖尿病ラットに8週間投与し，対照ラットとは明らかな体重増加の抑制がみられる．今回の我々の実験では，対照群と体重差はないこと，インスリン感受性への影響はないことを示しており，実験条件の違いによって異なる結果が生じた点は否定出来ない．Kullinらはstreptozotocinによって引き起こされる膵ラ氏島の形態学的障害，グルコース酸化，インスリン分泌能低下がdiazoxideおよびdiazoxide誘導体によって防止しうることから，これら K_{ATP} チャネル開口薬がstreptozotocinの膵β細胞毒性に対して何らかの作用機序により軽減すると報告している[25]．我々のstreptozotocin誘発糖尿病ラット膵β細胞機能障害のdiazoxideによる改善効果をみた報告[28]もあわせて考えると，インスリン抵抗性改善とは異なる作用機序によるdiazoxideの膵β細胞機能保護効果が強く示唆される．

一般に糖尿病における膵β細胞機能障害の機序として糖毒性（glucose toxicity）と脂肪毒性(lipotoxicity)が注目されている[29),30]．K_{ATP} チャネル開口薬による膵β細胞機能改善作用の機序としては，高血糖による恒常的な膵β細胞に対するインスリン分泌刺激に拮抗してインスリン分泌を抑制することで膵β細胞の疲弊を防止することが想定される．その結果，膵β細胞のグルコース刺激インスリン分泌反応は保持され，耐糖能の改善とともに糖毒性は改善する．Diazoxide投与群にみられる血糖改善，グルコース応答性インスリン分泌反応改善，インスリン基礎値上昇は膵β細胞機能改善作用を示すものであり，そこには糖毒性の改善が大きく寄与するものと思われる．

一方，薬剤非介入 *db+/db+* マウスでは血中脂肪酸および膵ラ氏島内TG含量の増加がみられることから，脂肪毒性の関与が示唆される．インスリン分泌障害の程度は膵ラ氏島内TG量と相関すると報告されている[31]．しかし脂肪毒性がインスリン分泌障害にどの程度関与するかについては必ずしも明確ではない．diazoxide投与群ではインスリン基礎値上昇に伴い血中TG値，NEFA値の明らかな低下が認められたが，膵ラ氏島内のTG量は減少しておらず，diazoxideによる膵β細胞機能改善が脂肪毒性の軽減を介するものとは考えにくい．

本研究ではpioglitazoneと比べて程度は低いがdiazoxideによる血中アディポネクチン値の増加を初めて明らかにした．アディポネクチンの生理作用はいまだ明らかになっていないが，抗動脈硬化作用以外にも脂肪酸酸化を活性化し，脂肪酸，糖代謝にも生理活性を持つ可能性が報告されている[32)~36]．脂肪細胞から分泌されるアディポネクチンは内臓脂肪面積やインスリン抵抗性と逆相関し，糖尿病状態で血中アディポネクチン値は減少する[32),33]．Diazoxideによるアディポネクチン増加の機序については不明であるが，pioglitazoneとの併用介入群において血中アディポネクチン値は単独介入群と比較してさらに増加していることからdiazoxideによる血中アディポネクチン増加はpioglitazoneとは別の経路を介する可能性も推察される．

Pioglitazone投与群の空腹時血糖値は非介入コントロール群と比較して，diazoxide群と同様に明らかに低下するが，その時の血中インスリン値は非介入コントロール群よりもむしろ低い傾向にあった．このことは膵β細胞機能障害のあるコントロール群では，高血糖の是正に十分なインスリン分泌がみられないが，pioglitazone群ではインスリン抵抗性改善により少量のインスリンで血糖が低下していることを示唆するものである．インスリン感受性試験の結果は，pioglitazoneによる顕著なインスリン抵抗性改善効果を示しており，インスリン抵抗性改善による耐糖能改善は糖毒性の解除につながり，膵β細胞機能改善をもたらす．

最近，thiazolidinedione系薬剤によるインスリン抵抗性改善機序として脂肪細胞の分化促進とそれにともなうアディポサイトカインの分泌調節が注目されており，とりわけアディポネクチンはこれら薬剤によって増加し，インスリン作用増強とそれに伴う耐糖能改善に働くと考え

られている[22]．本研究でも pioglitazone 群では他群に比し，血中アディポネクチン濃度の上昇は顕著であった．アディポネクチンと膵β細胞機能との直接的な関連については未だ明らかではなく今後の検討課題である．

一般に thiazolidinedione 系薬剤の投与により TG 値，NEFA 値の低下がみられるとの報告が多くみられる[19),37),38]．本研究では血中レベルのみならず膵ラ氏島内の TG 含量も pioglitazone 群で明らかに減少しており，脂肪毒性の解除も膵β細胞機能改善に寄与している可能性を示唆した．脂肪毒性と膵β細胞機能の関連を示すものとして，Zucker fatty rat を用いた実験では血糖上昇の前に血中 TG 値，NEFA 値の上昇がみられ，膵ラ氏島内 TG 含量は増加すること，単離膵ラ氏島を troglitazone 溶液中で培養すると膵ラ氏島内 TG 含量は低下し，インスリン分泌反応は改善することが報告された[9),39]．さらに Zucker diabetic fatty rat に troglitazone を 7 週間投与し，膵ラ氏島内 TG 量の低下とβ細胞機能改善をみたとの報告[19]は我々の成績と同様に，thiazolidinedione 系薬剤による膵β細胞機能改善効果が脂肪毒性の解除を介するものであることを強く示唆するものといえる．

本研究の目的は K_{ATP} チャネル開口薬 diazoxide と thiazolidinedione 系薬剤である pioglitazone による膵β細胞機能保護作用とその機序に関する相同性を検討することにある．今回の実験結果では diazoxide は膵β細胞に直接作用し，高血糖の持続によるβ細胞のオーバーワークを抑制することで膵β細胞機能を保護するもので，糖毒性の改善もそれに寄与していると考えられた．一方，pioglitazone の作用機序としてはインスリン感受性増強による糖毒性の改善に加えて，膵β細胞における脂肪毒性の抑制も関与するものと思われた．これらの作用機序の違いは両者の併用によって耐糖能はより改善するという結果に反映している．

本研究は肥満 2 型モデル動物である *db+/db+* マウスの膵β細胞機能障害の進展過程を形態と機能の両面から解析するとともに，作用の異なる 2 つの薬剤の介入によって，その膵β細胞機能障害は抑制しうることを明らかにした．2 型糖尿病の病態進展抑制の上で，膵β細胞機能障害をいかに抑制し，機能保持を行うかは極めて重要な課題である．2 型糖尿病発症防止を試みた幾つかの大規模臨床試験[40)~42]は発症前からの薬剤介入により，耐糖能の悪化は阻止しうることを明らかにした．今後，早期からの薬剤介入による 2 型糖尿病の病態進展阻止の試みは益々重要視されるものと考えられるが，本研究は膵β細胞機能保護の面から薬剤介入の意義を明確に示したものであり，臨床における試みの理論的根拠を提供するものといえる．

謝　　　辞

稿を終えるにあたり，終始ご指導，ご校閲を賜りました川崎医科大学内科学（内分泌・糖尿病）教室　加来浩平教授に深甚なる謝意を表します．本研究において直接ご指導いただいた同　松田昌文講師，井上寛講師に深く感謝いたします．また実験を遂行するにあたり抗アディポネクチン抗体を供与いただきました大阪大学大学院医学系研究科分子制御内科学　松澤佑次教授，また膵ラ氏島単離のご指導を賜りました大分医科大学薬理学仁木一郎教授，pioglitazone を御供与くださいました武田薬品工業株式会社に感謝申し上げます．

本研究の一部は川崎医科大学プロジェクト研究費（代表：加来浩平11-403，12-506，12-507，13-503，13-507）の援助によって行われた．なお，本文の要旨は第44回日本糖尿病学会年次学術集会（2001年 4 月18日，京都），第45回日本糖尿病学会年次学術集会（2002年 5 月18日，東京），37th annual meeting of European Association for the Study of Diabetes（2001. 9 .11，Glasgow），38th annual meeting of European Association for the Study of Diabetes（2002. 9 . 5，Budapest）において発表した．

参 考 文 献

1) DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferannini E：Pathogenesis of NIDDM：a balanced overview. Diabetes Care 15：318－368, 1992

2) Taylor SI, Accili D, Imai Y：Insulin resistance or insulin deficiency：which is the primary cause of NIDDM? Diabetes Care 43：735－740, 1994

3) Fajans SS, Bell GI, Polonsky KS：Mechanisms of disease：Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of Maturity-Onset Diabetes of the Young. N Engl J Med 345：971－980, 2001

4) Matsuda M, Kawasaki F, Tamechika Y, DeFronzo RA, Kaku K：Contribution of the Pancreas, Peripheral Tissues, and Liver in the Increment in Plasma Glucose after Oral Glucose Load. Diabetes 51 (suppl 2)：A331, 2002

5) Malaisse WJ：Metabolic signaling of insulin secretion. Diabetes Rev 4：145－149, 1996

6) Leahy JL：Impaired b-cell function with chronic hyperglycemia："overworked b-cell" hypothesis. Diabetes Rev 4：298－319, 1996

7) Kosaka K, Kuzuya T, Akanuma Y, Hagura R：Increase in insulin response after treatment of overt maturity-onset diabetes is independent of the mode of treatment. Diabetologia 18：23－28, 1980

8) MacDonald MJ, Efendic S, Ostenson CG：Normalization by insulin treatment of low mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase and pyruvate carboxylase in pancreatic islets of the GK rats. Diabetes 45：886－890, 1996

9) Lee Y, Hirose H, Ohneda M, Johnson JH, McGarry JD, Unger RH：β-cell lipotoxicity in the pathogenesisi of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats：Impairment in adipocyte-β-cell relationships. Proc Natl Acad Sci USA 91：10878－10882, 1994

10) Unger RH：Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity -dependent NIDDM：genetic and clinical implications. Diabetes 44：863－870, 1995

11) Hummel KP, Dickie MM, Coleman DL：Diabetes, a new mutation in the mouse. Science 153：1127－1128, 1966

12) Coleman DL：Obese and diabetes：two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. Diabetologia 14：141－148, 1978

13) Orland MJ, Permutt MA：Quantitative analysis of pancreatic proinsulin mRNA in genetically diabetic (*db/db*) mice. Diabetes 37：341－347, 1987

14) Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, Friedman JM：Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. Nature 379：632－635, 1996

15) Kaku K, Province M, Permutt MA：Genetic analysis of obesity-induced diabetes associated with limited capacity to synthesize in sulin in C57BL/KS mice：evidence for polygenic control. Diabetologia 32：636－643, 1989

16) Greenwood RH, Mahler RF, Hales CN：Improvement in insulin secretion in diabetes after diazoxide. Lancet 1：444－447, 1976

17) Bjork E, Berne C, Kampe O, Wibell L, Oskarsson P and Karlsson FA：Diazoxide treatment at onset preserves residual insulin secretion in adults with autoimmune siabetes. Diabetes 45：1427－1430, 1996

18) Fujiwara T, Horikoshi H, Yazaki Y, Kadowaki T：Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. J Clin Invest 101：1354－1361, 1998

19) Higa M, Zhou YT, Ravazzola M, Baetens D, Orci L, Unger RH：Troglitazone prevents mitchondrial alterations, β cell destruction, and diabetes in obese prediabetic rats. Proc Natl Acad Sci USA 96：11513－11518, 1999

20) Rasmussen SB, Sorensen TS, Hansen JB, Mandrup-Poulsen T, Hornum L, Markholst H：Functional rest through intensive treatment with insulin and potassium channel openers preserves residual b-cell function and mass in actually diabetes BB rats. Horm metab Res 32：294－300, 2000

21) Shimaya A, Kurosaki E, Nakano R, Hirayama R, Shibasaki M, Shikama H：The novel hypoglycemic agent YM440 normalizes hyperglycemia without changing body fat weight in diabetic db/db mice. Metabolism 49：411－417,

2000

22) Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, Nagaretani H, Matsda M, Komuro R, Ouchi N, Kuriyama H, Hotta K, Nakamura T, Shimomura I, Matsuzawa Y：PPARγ ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. Diabetes 50：2094－2099, 2001

23) Leahy JL, Bumbalo LM, Chen C：Diazoxide causes recovery of beta-cell glucose responsiveness in 90% pancreatectomized diabetic rats. Diabetes 43：173－179, 1994

24) Hiramatsu S, Hoog A, Moller C and Grill V：Treatment with diazoxide causes prolonged improvement of b-cell function in rat islets transplanted to a diabetic environment. Metabolism 49：657－661, 2000

25) Kullin M, Li Z, Hansen JB, Bjoek E, Sandler S and Karlsson FA：K_{ATP} channel openers protect rat islets against the toxic effect of streptozotocin. Diabetes 49：1131－1136, 2000

26) Alemzadeh R, Slonim AE, Zdanowicz MM, Maturo J：Modification of insulin resistance by diazoxide in obese zucker rats. Endocrinology 133：705－712, 1993

27) Aizawa T, Taguchi N, Sato y, Nakabayashi T, Kobuchi H, Hidaka H, Nagasawa T, Ishihara F, Itoh N and Hashizume K：Prophylaxis of genetically determined diabetes by diazoxide：a study in a rat model of naturally occurring obese diabetes. J Pharmacol Exp Ther 27：194－199, 1995.

28) Matsuda M, Kawasaki F, Mikami Y, Takeuchi Y, Saito M, Eto M, Kaku K：Rescue of beta-cell exhaustion by diazoxide after the development of diabetes mellitus in rats with streptozotocin-induced diabetes. European Journal of Pharmacology 453：141－148, 2002

29) Yki-Jarvinen H：Glucose toxicity. Endocrine Rev 12：415－31, 1992

30) Poitout V, Robertson RP : Minireview：secondary β-cell failure in type 2 diabetes-a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. Endocrinology 143：339－342, 2002

31) Shimabukuro M, Zhou YT, Levi M, Unger RH：Fatty acid- induced β cell apoptosis：a link between obesity and diabetes. Proc Natl Acad Sci 95：2498－2502, 1998

32) Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida m, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Hanafusa T, Matsuzawa Y：Plasma concentrarions of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patient. Arterioscler thromb Vasc Biol 20：1595－1599, 2000

33) Hotta K, Funahashi T, Bodkin NB, Ortmeyer HK, Arita Y, Hansen BC, Matsuzawa Y：Circulating concentrarions of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in Rhesus monkeys. Diabetes 50：1126－1133, 2001

34) Fruebis O, Tsao T, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MRS, Yen FT, Bihain, BE and Lodish HF：Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. Proc Natl Acad Sci USA 98：2005－2010, 2001

35) Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T：Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. Nature Med 8：1288－1295, 2002

36) Combs TP, Wagner JA, Berger J, Doebber T, Wang W, Zhang BB, Tanen M, Berg AH, Orahilly S, Savage DB, Chatterjee K, Weiss S, Larson PJ, Gottesdiener KM, Gertz BJ, Charron MJ, Scherer PE, Moller DE：Induction of adipocyte complement-regurates protein of 30 kilodaltons by PPARγ agonists：a potential mechanism of insulin sensitization. Endcrinology 143：998－1007, 2002

37) Suzuki A, Yasuno T, Kojo H, Hirosumi J, Mutoh S and Notsu Y：Alteration in expression profiles of a series of diabetes-related genes in db/db mice following treatment with thiazolidinediones. Jpn J Pharmacol 84：113－123, 2000

38) Vikramadithyan RV, Chakrabarti R, Misra P, Premkumar M, Kumar SKB, Rao CS, Ghosh A, Reddy KN, Uma C,

Rajagopalan R：Euglycemic and hypolipidemic activity of PAT5A：a unique thiazolidinedione with weak peroxisome proliferator activated receptor gamma activity. Metabolism 49：1417－1424, 2000

39）Shimabukuro M, Zhou YT, Lee Y, Unger RH：Troglitazone lowers islet fat and restores beta cell function of zucker diabetic fatty rats. J Biological Chemistory 273：3547－3550, 1998

40）Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, Nathan DM；Diabetes Prevention Program Research Group：Reduction in the Incidence of Type 2 Diabetes with Lifestyle Intervention or Metformin. N Eng J Med 346：393－403, 2002

41）Azen SP, Peters RK, Berkowitz K, Kjos S, Xiang A, Buchanan TA：TRIPOD（TRoglitazone In the Prevention Of Diabetes）：a randomized, placebo-controlled trial of troglitazone in women with prior gestational diabetes mellitus. Control Clin Trials 19：217－31, 1998

42）Chiasson JL, Josse RG, Gomis R, Hanefeld M, Karasik A, Laakso M；STOP-NIDDM Trail Research Group：Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus：the STOP-NIDDM randomised trial. Lancet 359：2072－7, 2002