

## バナジル錯体のインスリン様作用とバナジウムの体内分布

藤澤 弥恵, 藤本 盛揮, 桜井 弘

(京都薬科大学)

### Insulin-mimetic effects of vanadyl complexes and distribution of total vanadium in STZ-rats treated with vanadyl complexes

Yae Fujisawa, Seiki Fujimoto and Hiroshi Sakurai

*Department of Analytical and Bioinorganic Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University*

Insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) is controlled by daily injection of insulin. Therefore, the study of development of insulin replacements upon oral administration is important. Vanadate, vanadyl ion and their complexes have been reported to have insulin-mimetic activities by *in vitro* and *in vivo* experiments. During investigations of insulin-mimetic vanadyl complexes, we have found a vanadyl-picolinate (VO-PA) complex, which was orally active and low toxic. Then we have synthesized vanadyl-pyridinecarboxaldehyde (VO-PCA) and vanadyl-quinalginate (VO-QA) as related complexes of VO-PA.

We tested first the insulin-mimetic activity of the complexes in inhibition of the release of free fatty acid (FFA) from isolated rat adipocytes treated with epinephrine. Both VO-PCA and VO-QA exhibited strong inhibitions, and thus we evaluated their insulin-mimetic effects on STZ-rats. In STZ-rats received *i.p.* injection of the complexes, normalization of blood glucose level was observed, but in STZ-rats received *p.o.* administration no normalization of blood glucose level was seen.

We determined total vanadium concentration in organs of STZ-rats received *i.p.* injection of VO-PCA by a neutron activation analysis method and found that vanadium was accumulated in bone and kidney.

In conclusion, both solubility of the complex and strong inhibition of FFA release from adipocytes are essential to obtain a good effect of the complex on oral administration.

原子番号23の遷移金属であるバナジウムの必須性は1971年, Hopkins ら<sup>1)</sup> によってラットおよびヒヨコにおいて報告された。しかし, 人での必須性は証明されていない。一方, 1977年 Cantley ら<sup>2)3)</sup> により5価バナジウムであるバナデートイオンが $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase 阻害作用を持っていることが見いだされ, その後バナジウムについての研究が広くなされるようになった。1980年, Dubyak ら<sup>4)</sup> はラット脂

肪細胞においてバナデートイオンがグルコースの取り込みを促進することを見だし、さらに1985年 Heylinger ら<sup>5)</sup>、続いて1987年 Meyerovitch ら<sup>6)</sup> はストレプトゾトシン (STZ) により実験的に糖尿病としたラット (STZラット) にバナデートイオンを添加した飲料水を与えると血糖値が正常化することを報告した。これらの研究が刺激となり、バナジウムのインスリン様作用が様々な形で研究されるようになった。最近では、5価バナジウム<sup>7)</sup>の他に4価バナジウムであるバナジルイオン<sup>8)-13)</sup> およびその錯体<sup>14)-17)</sup>のインスリン様作用も報告されている。

糖尿病は主にインスリン依存型 (IDDM) およびインスリン非依存型 (NIDDM) の二つに大別されるが、ともに膵臓ランゲルハンス島β細胞から分泌されるインスリンの作用不足により糖質の利用障害を生じたために、高血糖を主徴とする全身性の代謝性疾患である。なかでもインスリン依存型糖尿病 IDDM の治療はインスリンの筋肉注射に限られており、インスリンに代わりうる治療薬の開発が望まれている。そこで我々の研究室では、IDDM を対象とした経口糖尿病治療薬の開発をめざし血糖降下作用を持つ新しい物質として、生体微量元素の一つであるバナジウムに注目している。以前からバナジウムの血糖降下作用が報告されているが、投与の際、主に腎毒性を示すため薬としての開発は困難だった。そこで、我々は毒性の軽減を目的とし様々な配位子を用いてバナジウム錯体を合成している。また、ラットに対しては5価バナジウムは4価バナジウムより毒性は10倍以上も高く<sup>18)</sup>、体内ではほとんど還元されて4価バナジウムとして存在することが報告されているので<sup>19)</sup>、体内で安定でより毒性の少ない4価バナジウムを錯体合成に用いて研究することにした。

これまでの研究からバナジル-ピコリネート錯体 (VO-PA) が強いインスリン様作用を持ち、かつ毒性が低いことが明らかにされている<sup>17)</sup> ため、この錯体をリード化合物として今回新たにバナジル-ピリジンカルボキシアリデヒド錯体 (VO-PCA)、バナジル-キナルジン酸錯体 (VO-QA) を合成し、これらのインスリン様作用を *in vitro* および *in vivo* において検討した。また、*in vivo* において血糖正常化作用がみられたラットのバナジウムの体内分布を中性子放射化分析法により定量した。

## 実験方法

### 1. 錯体の合成と構造の決定

VO-PCA および VO-QA は硫酸バナジウムとピリジンカルボキシアリデヒドまたはキナルジン酸をそれぞれ1:3, 1:2の割合で湯浴中、5~7時間反応させ粉末として得た。構造の決定は可視吸収、赤外吸収、ESR, 磁化率, 元素分析により行った。

### 2. ラット脂肪細胞におけるエピネフリンによる脂肪酸 (FFA) 遊離に対するバナジル錯体の影響

Wistar 系雄 (200g) をエーテルで麻酔下頸動脈を切断し脱血死させ、副睾丸周辺から脂肪組織を摘出した。これをコラゲナーゼで処理し、細胞液とした後、薬物を加えさらに FFA 遊離を促進させるエピネフリンを添加し、細胞液中の FFA 濃度を測定した。

### 3. ストレプトゾトシン (STZ) 誘導実験糖尿病ラットへのバナジル錯体の投与

Wistar 系雄 (200g) に STZ 30mg/kg を尾静脈から数回投与し、実験的に糖尿病とした。血糖値から糖尿病であると判断したラットにバナジル錯体をバナジウムとして腹腔内投与の場合には 2.5mg/kg,

経口投与の場合には10mg/kgの割合で14日間一日一回投与を行った。

#### 4. バナジル錯体投与群の血清パラメーターのモニター

バナジル錯体を投与したラットの血糖値と体重は期間中毎日測定した。また、錯体の投与開始から0日、14日および28日後にインスリン、FFA、血中尿素窒素 (BUN)、トリグリセリド (TG) および総コレステロール (TCHO) を測定し、錯体のインスリン様作用を評価した。

#### 5. 錯体投与群における臓器中の総バナジウム量の定量

VO-PCA 腹腔内投与群のうち血糖正常化作用が見られたラットを14日間投与した後の5日目に11組織を摘出し、凍結乾燥した試料を京都大学原子炉実験所において中性子放射化分析法を用いて定量した。

### 結果および考察

VO-PA をリード化合物として合成した VO-PCA および VO-QA の構造式は可視吸収, 赤外吸収, ESR, 磁化率, 元素分析の結果から Fig. 1 のように推定した。両錯体とも DMSO 以外の溶媒には全く溶解しなかったので, 分配係数は測定できなかった。

これまでに我々の研究室ではラットにおいて血清グルコース濃度と血清 FFA 濃度が正の相関性を示していることを見いだしている。したがってラット脂肪細胞からの FFA 遊離を評価する系は *in vivo* における薬物のインスリン様作用を推測するのに有効であることを提案した。そこで, ラット脂肪細胞を用いて FFA 遊離に対するバナジル錯体の影響を評価した。エピネフリンにより FFA 遊離を促進した際, 両錯体の FFA 遊離抑制作用は硫酸バナジウム (ポジティブコントロール) よりも強く, その作用は濃度依存的であった。また, この作用をコントロール (100%) に対して, それを50%にまで抑制する錯体の濃度を  $IC_{50}$  として算出した。これまで, 硫酸バナジウムの  $IC_{50}$  値は 6.0mM, VO-PA 0.47mM, また, VO-PA をリード化合物として合成された VO-methyl picolinate の  $IC_{50}$  値は 0.45mM であったのに対し, VO-PCA のそれは 0.34mM, VO-QA は 0.28mM であった (Table 1)。したがって両錯体は *in vivo* でインスリン様作用を示すと考えられたので, STZ ラットに対するインスリン様作用を評価した。

STZ ラットに両錯体をそれぞれ1日1回14日間, 腹腔内および経口投与した。この結果を VO-PCA

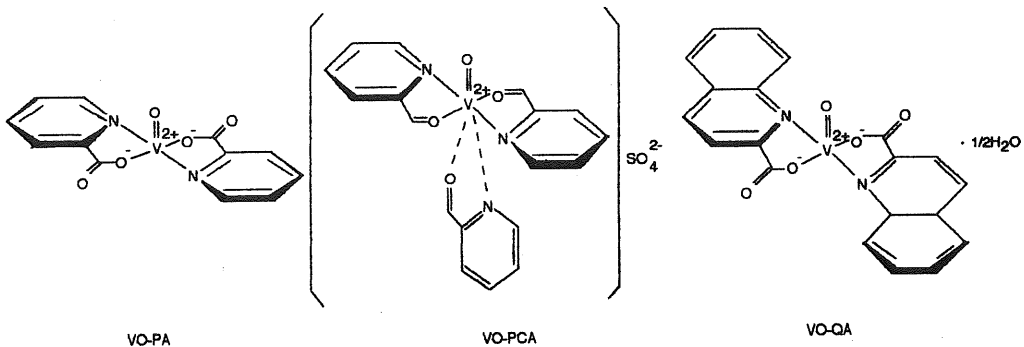
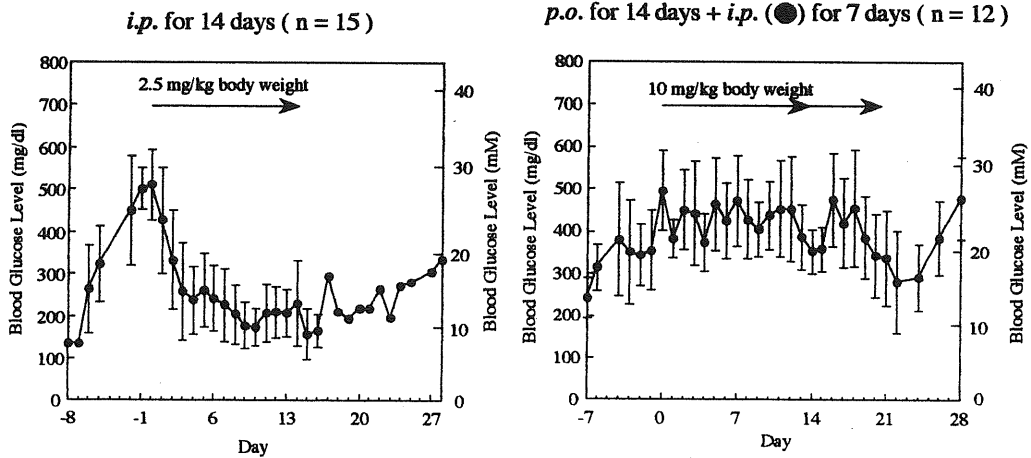


Fig. 1 Proposed structures of vanadyl-picolinate (VO-PA), vanadyl-pyridine carboxaldehyde (VO-PCA) and vanadyl-quinaldic acid (VO-QA)

**Table 1.** Inhibitory concentrations of FFA release from rat adipocytes ( $IC_{50}$ : mM)

vanadyl complex	$IC_{50}$ (mM)
$VO_4$	6.0
VO-PA	0.47
VO-MPA	0.45
(VO-methyl picolinate)	
VO-DPA	2.7
(VO-dipicolinate)	
VO-PAM	1.0
(VO-picolinamide)	
<b>VO-PCA</b>	<b>0.34</b>
<b>VO-QA</b>	<b>0.28</b>



**Fig. 2** Changes of blood glucose level in the STZ-rats treated with VO-PCA complex by daily administration  
Points are expressed as the means  $\pm$  SDs.

の場合を例として Fig. 2 に示した。両錯体の腹腔内投与群は投与開始より 2～3 日で血糖値の正常化が見られ、投与終了後約 10 日目までは正常値を維持したが、その後は徐々に上昇した。しかし、投与期間中、体重の減少と腎毒性の指標である BUN の上昇が見られた (Table 2)。一方、経口投与群では両錯体とも血糖値の正常化は見られず、血清パラメーターの変動も観察されなかった (Table 2)。

続いて、血糖正常化が見られた VO-PCA を腹腔内投与したラットの主要臓器におけるバナジウムの分布を調べたところ腎臓および骨に多く取り込まれていることがわかった (Fig. 3)。これまで検討された錯体によるバナジウムの体内分布結果と今回の結果を肝臓中の濃度に対する比として Table 3 に表した。検討したバナジル化合物はほとんど脾臓へ分布しなかったが、腎臓への分布量は化合物によって変動した。また、骨へ多くのバナジウムが分布することが分かった。同投与群の肝臓、腎臓における画

**Table 2.** Changes of serum parameters in the STZ-rats treated with VO-PCA by daily *i.p.* injections or *p.o.* administrations

Treatment		Glucose (mg/dl)	Insulin ( $\mu$ U/ml)	FFA (mEq/L)	BUN (mg/dl)	TG (mg/dl)	TCHO (mg/dl)
Normal rats after fasting of 15 hours		164.6 $\pm$ 25.2	16.6 $\pm$ 9.1 (25.7 $\pm$ 12.1)	0.702 $\pm$ 0.146 (0.340 $\pm$ 0.070)	9.5 $\pm$ 1.9 (16.3 $\pm$ 5.8)	60.3 $\pm$ 4.0 (48.8 $\pm$ 11.6)	54.3 $\pm$ 11.3 (46.3 $\pm$ 4.4)
STZ rats + VOSO <sub>4</sub>	16 days	105.6 $\pm$ 7.9	(3.0)		(64.0)		
STZ rats + VO-PCA ( <i>i.p.</i> ) after fasting of 15 hours	0 days	512.0 $\pm$ 83.3 **	2.1 $\pm$ 1.7	1.149 $\pm$ 0.180 **	20.6 $\pm$ 5.4 **	71.1 $\pm$ 10.5 *	59.0 $\pm$ 10.4 **
	14 days	230.4 $\pm$ 102.0	3.5 $\pm$ 1.1	0.795 $\pm$ 0.215	89.7 $\pm$ 39.4	55.6 $\pm$ 19.1	95.9 $\pm$ 25.0
	28 days	335.5	9.4	0.787	28.5	107.0	114.5
STZ rats + VO-PCA ( <i>p.o.</i> ) after fasting of 15 hours	0 days	496.4 $\pm$ 94.8 **	7.5 $\pm$ 12.2	0.890 $\pm$ 0.220 *	20.3 $\pm$ 4.5	43.2 $\pm$ 9.7	44.0 $\pm$ 8.8 **
	14 days	353.6 $\pm$ 52.6	6.3 $\pm$ 6.0	0.720 $\pm$ 0.180	23.4 $\pm$ 8.9	45.3 $\pm$ 8.1	59.6 $\pm$ 10.1
	28 days	479.4 $\pm$ 98.2	4.9 $\pm$ 3.1	0.690 $\pm$ 0.080	33.7 $\pm$ 12.0	44.6 $\pm$ 8.4	98.8 $\pm$ 27.0

Data are expressed as the means  $\pm$  SDs for 11 rats (*i.p.*) or 12 rats (*p.o.*).

\*, \*\*: significant difference from the control at  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively.

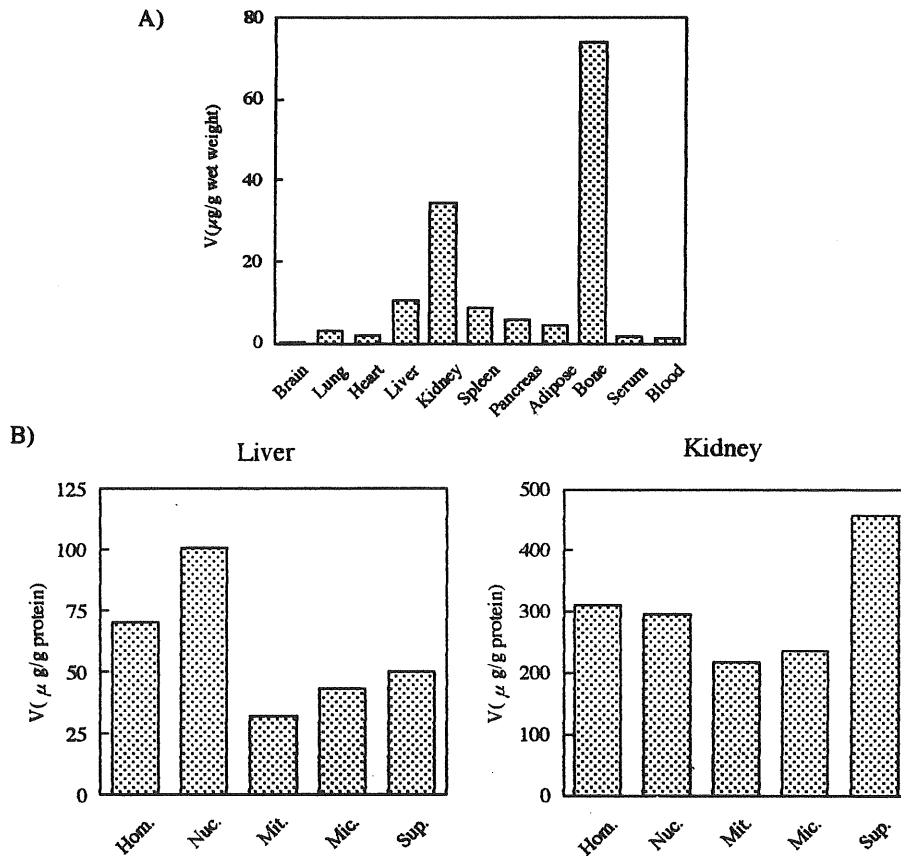
分への分布も測定したところ蛋白あたりで肝臓では核、腎臓では上清に多くの蓄積が見られた (Fig. 3)。

以上の結果より、今回合成した2つの錯体の腹腔内投与では血糖正常化が見られたが、経口投与では有効性を見出すことができなかった。経口投与で効果を得るためには、強いFFA遊離抑制作用に加えて、錯体の溶解性が要因の一つであると考えられた。また、これまでのバナジル錯体およびVO-PCA投与群のバナジウムは骨へ分布するため、投与終了後は骨から血中へ再放出されることによりしばらく正常血糖値を維持するのではないかと考えた。

謝辞：バナジウムの放射化分析でお世話になった京都大学原子炉実験所の高田実弥および松下緑治両博士に感謝申し上げます。

## 参 考 文 献

- 1) L. L. Hopkins, Jr. and H. E. Mohr, *NEW YORK*, pp.195, 1971
- 2) L. C. Cantley, Jr., L. Josephson, R. Warner, M. Yanagisawa, C. Lechene and G. Guidotti, *J. Biol. Chem.*, **252**, 7421, 1977
- 3) L. C. Cantley, Jr. and P. Aisen, *J. Biol. Chem.*, **254**, 1781, 1979
- 4) G. R. Dubyak and A. Kleinzeller, *J. Biol. Chem.*, **255**, 5306, 1980
- 5) C. E. Heylinger, A. G. Tahiliani, and J. H. McNeil, *Science* (Washington, D. C.), **227**, 1474, 1985
- 6) J. Meyerovitch, Z. Farfel, J. Sock and Y. Shechter, *J. Biol. Chem.*, **262**, 6658, 1987
- 7) Y. Shechter, *Diabetes*, **39**, 1-5, 1990
- 8) S. Ramanadham, J. J. Mongold, R. W. Brownsey, G. H. Cros, and J. H. McNeill, *Am. J. Physiol.*, **257**.



**Fig. 3** A) Organ distribution of total vanadium in STZ-rats treated with VO-PCA by daily *i.p.* injections

Organs were removed and lyophilized.

B) Subcellular distribution of total vanadium in the liver and kidney in STZ-rats treated with VO-PCA by daily *i.p.* injection

Liver and kidney were homogenized and separated into the four subcellular fractions. The fractions were lyophilized.

Hom: whole homogenate, Nuc: nucleus, Mit: mitochondrion, Mic: microsome, Sup: supernatant

Total vanadium concentrations were determined by neutron activation analysis at Kyoto Univ. Nuclear Res. Inst..

**Table 3.** Distributional ratios of total vanadium in the bone, renal and pancreas to that in the liver

vanadyl complex	method	bone/liver	renal/liver	pancreas/liver	V μg/wetg liver
VOSO <sub>4</sub>	<i>i.p.</i>	1.05	2.09	0.78	23.30
VO-PYR	<i>i.p.</i>	2.13	1.90	0.83	17.26
VO-PA	<i>i.p.</i>	34.96	7.37	0.33	0.23
VO-MPA	<i>i.p.</i>	10.96	3.31	0.65	1.29
VO-MPA	<i>p.o.</i>	3.27	2.80	0.46	0.84
VO-PCA	<i>i.p.</i>	6.94	3.23	0.57	10.64

VO-PYR: vanadyl-pyrrolidine dithiocarbamate

H904, 1989

- 9) R. A. Pederson, S. Ramanadham, A.M.J. Buchan, and J. H. McNeill, *Diabetes*, **38**, 1390, 1989
- 10) M. C. Cam, R. A. Pederson, R. W. Brownsey, and J. H. McNeill, *Diabetologia*, **36**, 218, 1993
- 11) S. Dai, K. H. Thompson and J. H. McNeill, *Pharmacol. Toxicol.*, **74**, 101, 1994
- 12) G. H. Cros, M. C. Cam, J. J. Serrano, G. Ribes, and J. H. McNeill, *Mol. Cell. Biochem.*, **153**, 191, 1995
- 13) H. Sakurai, K. Tsuchiya, M. Nukatsuka, M. Sofue, and J. Kawada, *J. Endocrinol.*, **126**, 451, 1990
- 14) H. Sakurai, K. Tsuchiya, M. Nukatsuka, J. Kawada, S. Ishikawa, H. Yoshida, and M. Komatsu, *J. Clin. Biochem.*, **8**, 193, 1990
- 15) (a) J. H. McNeill, V. G. Yuen, H. R. Hoveyda, and C. Orvig, *J. Med. Chem.*, **35**, 1489, 1992  
(b) V. G. Yuen, C. Orvig, and J. H. McNeill, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **73**, 55, 1995  
(c) J. H. McNeill, V. G. Yue, S. T. Dai and C. Orvig: Increased potency of vanadium using organic ligands. *Mol. Cell. Biochem.* **153**, 175, 1995  
(d) P. Caravan, L. Gelmini, N. Glover, F. G. Herring, H. Li, J. H. McNeill, S. J. Retting, I. A. Setyawari, E. Shuter, Y. Sun, A. S. Tracey, V. G. Yuen and C. Orvig, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 12759, 1995
- 16) H. Watanabe, M. Nakai, K. Komazawa and H. Sakurai, *J. Med. Chem.*, **37**, 876, 1994
- 17) H. Sakurai, K. Fujii, H. Watanabe and H. Tamura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **214**, 1095, 1995
- 18) H. Ueki, Y. Yamasaki, K. Higo, T. Motoyashiki, H. Kawabata, and T. Morita, *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 214, 1995
- 19) D. M. Barnes, D. B. Sykes, J. J. Smith, and D. S. Miller, *J. Cell Physiol.*, **164**, 304, 1995