

総説

ラット小腸糖吸収実習への携帯型血糖測定器の応用

清末 達人* 伊東 由里子** 山下 幸子*** 天本 理恵**
南里 宏樹* 水上 茂樹*

〈要 旨〉

糖尿病患者用の携帯型血糖測定器を使用するラット小腸における糖の消化・吸収に関する学生実習を企画した。グルコース6リン酸脱水素酵素とヘキソキナーゼを使用するグルコース定量法に比較すると、測定できる濃度範囲、精度、温度依存性など劣っている点もあるが、初心者でも容易に扱えること、測定時間の短さ(15~30秒)、サンプル量の少なさ(0.6~2 μl)、初期費用の安さなど多くの利点がある。この方法により、限られた実習時間内に、小腸粘膜上でグルコースが吸収されて漿膜側に輸送される様子を体験することが可能となった。

キーワード：携帯型血糖測定器 ラット反転小腸標本 Na⁺-依存性グルコース輸送体 学生実習 フロリジン

はじめに

4年前本学栄養学科に着任し生理学実習のスケジュールを組むにあたって、消化・吸収の項目は避けて通れないという認識を持った。小腸における糖あるいはアミノ酸の吸収実験を行うことをめざして、分光光度計を使ったアミノ酸吸収の予備実験を行ってみたが、専門外のことでなかなかうまくいかない。たまたま、携帯型血糖測定器(以下グルコーステスター)が目にとまり、血糖が測れるのなら、生理食塩水中のグルコースも測れるに違いないと直感し学生実習に取り入れることにした。延べ32匹のラットを使った学生実習ならびに予備実験の経験から、測定精度の点で物足りなさはあるものの、やり方を工夫すれば、予算と時間が限られた中で、十分な教育効果がある実習を実施できることがわかったのでここに紹介したい。

方法

1. 携帯型血糖測定器によるグルコース濃度の測定

グルコーステスターとして、アークレイ社製グルテストエースおよびグルテストエースR(Sanwa Kagaku Kenkyusho Co. Ltd., Nagoya)を使用した。後者は前者の改良型であり、測定に要する時間が30秒から15秒に短縮されている。グルコーステスターは本体部と着脱できる電極部からなり、電極部にはグルコースオ

キシダーゼとフェリシアン化カリウムが封入されている。未知の濃度のグルコース液が電極内に満たされると、グルコースオキシダーゼが働いてグルコン酸とフェロシアン化カリウムが生成される。フェロシアン化カリウムがフェリシアン化カリウムに戻るときに発生する電流量から、未知溶液のグルコース濃度を推定する。HEPES-タイロード液にグルコースを溶かして、200と500 mg/dlの溶液を作製した。その後順次希釈して250, 125, 62.5, 31.3 mg/dlの各溶液を作った。27°Cの室温にて、グルコーステスターを用いて行った4回の測定の平均と標準偏差を、グルコース6リン酸脱水素酵素/ヘキソキナーゼ法での測定値とを比較した。

2. グルコース6リン酸脱水素酵素/ヘキソキナーゼ法

グルコーステスターの性能を調べるために、グルコース濃度の定量法であるグルコース6リン酸脱水素酵素/ヘキソキナーゼ法¹⁾を用いて、先の4溶液のグルコース濃度を測定し、グルコーステスターでの測定値と比較した。ヘキソキナーゼの作用下で、未知濃度のグルコースをATPと反応させて、グルコース6リン酸を生成させ、グルコース6リン酸脱水素酵素の作用下で、グルコース6リン酸とNADP⁺との反応で生じるNADPH量を340 nmの吸光度変化により分光光度計(Hitachi, model 100-10)を用いて定量した。具体的には、それぞれのグルコース液から10 μlの試料を取り、NADP⁺ 3 mM, ATP-2Na 4 mM, MgCl₂ 3 mM, HEPES

* 西南女学院大学 保健福祉学部 栄養学科 教授

** 西南女学院大学 保健福祉学部 栄養学科 助手

*** 西南女学院大学 保健福祉学部 栄養学科 3年

10 mM, グルコース 6 リン酸脱水素酵素 1.75 U/ml を含む溶液 (NaOH により pH 7.6 に調整) 1.985 ml と混合し、最後にヘキソキナーゼ溶液 (140 U/ml) を 5 μ l 加えることによって NADP⁺ が NADPH に変わる反応を開始させた。吸光度の変化からグルコース濃度を求めた。

3. ラット反転小腸標本を用いた糖の消化・吸収実験

実験に用いたラットの飼育ならびに実験にあたっては、「実験動物の飼養および保管等に関する基準」(昭和55年総理府告示第6号)に従い、実験動物に十分配慮した。解剖実習に使用した計32匹のラットから摘出した小腸を消化・吸収実験に用いた。エーテルならびにペントバルビタール麻酔下にてラットを開腹し、十二指腸部と直腸部を切断したのち、門脈、腸管膜動脈を含む腸管膜を切断し消化管を摘出した。十二指腸側からおよそ30 mlのグルコースを含まない HEPES-タイロド液を注入して小腸内容物を洗い流した。HEPES-タイロド液の組成 (mM) は次の通りである。NaCl 137, KCl 5.4, NaH₂PO₄ 0.16, MgCl₂ 0.5, CaCl₂ 1.8, グルコース 11mM, HEPES 5 (NaOH にて pH 7.4 に調整)。

Wilson と Wiseman²⁾の方法により小腸反転標本作製した。小腸をシャーレに入れてピンセットにて腸管膜の残存部と付着する脂肪を取り除いた後、7-8センチの長さで切断し、一方の端を結紮した。結紮部から直径1.5 mmのビニール管を押し込むことにより標本を反転させ、粘膜が外表面に、漿膜が内表面になるようにした³⁾。漿膜側に1.0 ml、粘膜側に5 mlの HEPES-タイロド液を入れた試験管内に標本を装着した。なお、付着している腸内細菌の影響を避けるため、粘膜側、漿膜側とも ampicillin および kanamycin を 50 μ g/ml 加えている。試験管内に入れた細いポリエチレン管を介して100%酸素ガスを持続的に吹き込みながら、36~37°Cの恒温槽にて50分間インキュベートした後、粘膜側および漿膜側の溶液のグルコース濃度をグルコーステスターを用いて測定した。また、タイロド液の Na⁺ を N-メチルグルカミン (N-methylglucamine) に置換する実験や、Na⁺依存性グルコーストランスポーター (SGLT1) の阻害薬であるフロリジン (phloridzin) を加えた実験を行った。今回の実験に用いた各種栄養塩、抗生物質、N-メチルグルカミン、フロリジン、ヘキソキナーゼ、グルコース 6 リン酸脱水素酵素、NADP⁺、ATP-2Na、HEPES などは Wako Pure Chemical Industry (Tokyo) より購入した。

インキュベーション開始後の漿膜側および、粘膜側

でのグルコース濃度変化の時間経過を調べるため、図4に示すような微量の試料を抜き取るための装置を使用した⁴⁾。試験管口部中心に固定したテフロン管に反転小腸標本の開口部を取り付けた。このテフロン管内に注射筒から延ばした細いポリエチレン管を挿入して、漿膜側の溶液から微量サンプルを取り出した。また、粘膜側においたポリエチレン管からもサンプルを取り出し、経時的にグルコーステスターにて測定した。

結果

1. 標準液のグルコース濃度測定

室温27°Cにおいて、種々の濃度のグルコースを含む HEPES-タイロド液を使って、グルコーステスター指示値と HK/G6PDH 法による測定値とを比較した (図1)。HK/G6PDH 法では、溶液作製濃度と測定値とがほぼ、直線関係にあるが、グルコーステスターの場合、100 mg/dl から 400 mg/dl 付近までは HK/G6PDH 法に比べ高値を、100 mg/dl 以下と 500 mg/dl では低値を示している。

2. グルコーステスターの消化・吸収実験への応用

直線性にやや難はあるものの、簡便かつ再現性良くグルコース濃度が測れることがわかったので、ラット小腸を使った糖吸収に関する学生実習に応用した。腸管におけるグルコースの吸収の様子をわかりやすく示すため、粘膜側、漿膜側とも同一組成のタイロド液とした。図2に示すように、最初 205.5 \pm 4.0 mg/dl (平均 \pm 標準誤差) であったグルコース濃度が、50分間のインキュベーション後、粘膜側では 76.9 \pm 8.6 mg/dl に減少し、漿膜側は 315.8 \pm 21.1 mg/dl に増加した。

図3は、予備実験として Na⁺依存性グルコーストランスポーター (SGLT1) の阻害薬、フロリジン (phloridzin) の効果を調べたものである。図の左側は対照のフロリジン非存在下のもので、インキュベーション後に粘膜側でのグルコース濃度の減少、漿膜側での上昇が認められる。粘膜側にフロリジン 1 mM を加えると、対照でみられたグルコース濃度の変化は消失しており、フロリジンの SGLT1 阻害作用によるものと考えられる。

さらに、小腸微絨毛膜のグルコーストランスポーターが Na⁺依存性であることを確認するために、Na⁺-free の生理食塩水を使った実験も行った (n = 4、図には示さず)。タイロド液中の Na⁺ を N-メチルグルカミンに置換し、粘膜側、漿膜側とも同一のグルコース濃度 220 mg/dl からスタートした。50分間のインキュベーションの後、漿膜側のグルコース濃度は

215±7 mg/dl とほとんど変化がみられなかった。

である。漿膜側のグルコース濃度は60分以内でほぼ飽和していることがわかる。

図4は、インキュベーション時間と粘膜側、漿膜側それぞれのグルコース濃度変化との関係を調べたもの

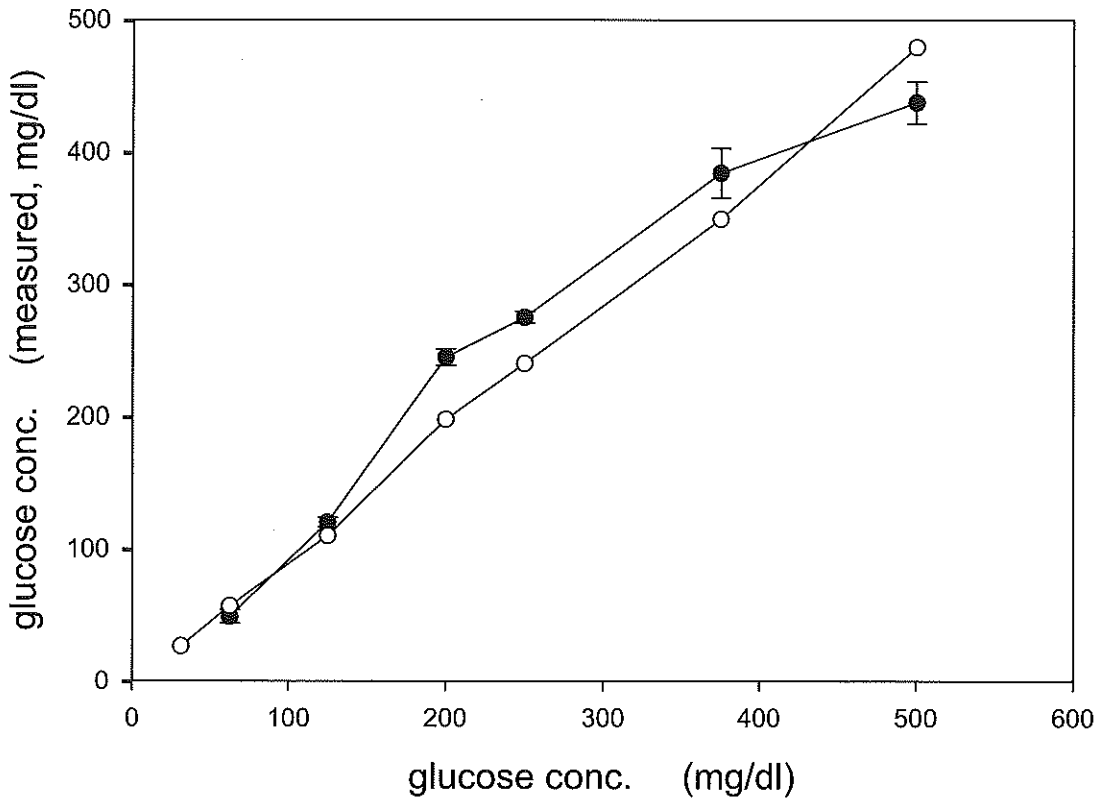


図1

携帯型グルコーステスター (●) とヘキソキナーゼ/グルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ法 (○) による標準液のグルコース濃度測定の結果の比較。

Figure 1

A comparison of the linearity of a portable glucose tester (filled circles) to the reference method (open circles) using a combination of enzymes, hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH). HEPES-buffered Tyrode's solution containing 31.25, 62.5, 125, 200, 250, 375, and 500mg/dl glucose were used. At the lowest concentration of 31.25 mg/dl, glucose tester showed a LO sign indicating less than 20 mg/dl.

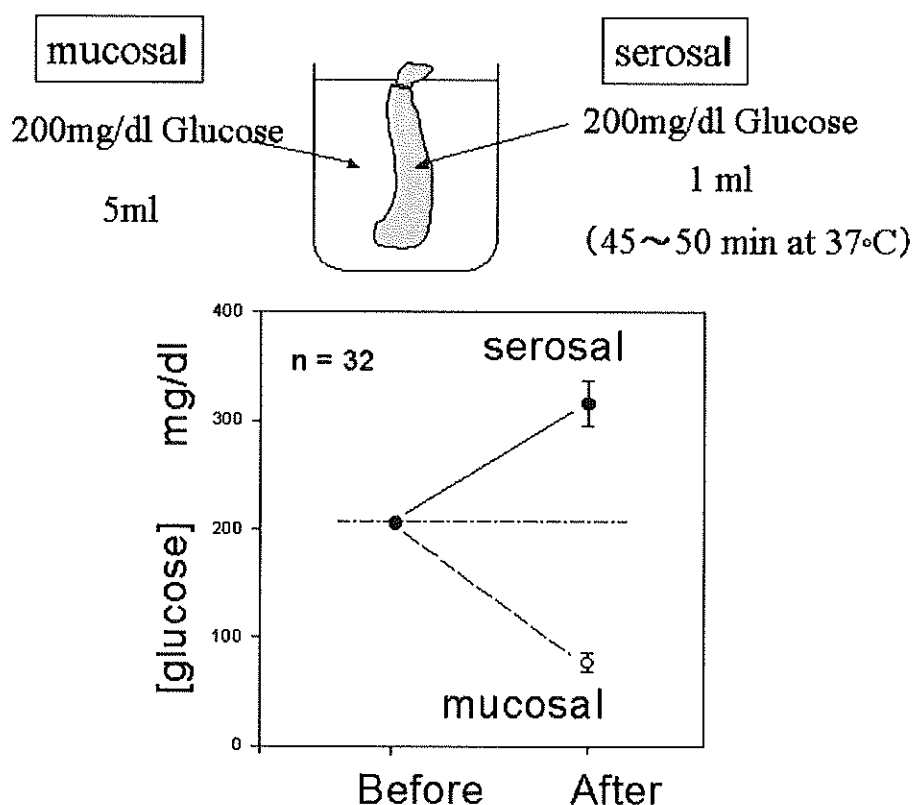


図 2

ラット小腸反転標本におけるグルコース吸収実験の結果。最初、粘膜側、漿膜側とも 200mg/dl のブドウ糖を含む同一のタイロード液で満たした。45～50 分 37°C でインキュベーション後、粘膜側ではグルコース濃度は著明に減少、逆に漿膜側では著しく増加した。

Figure 2

Measurements of glucose concentration in experiments of everted intestinal sac preparation from rats. Both mucosal and serosal sides of the preparation were immersed in a same HEPES-buffered Tyrode's solution containing 200mg/dl glucose. After 45 - 50 min incubation at 37°C, concentration of glucose was measured using a portable blood glucose tester.

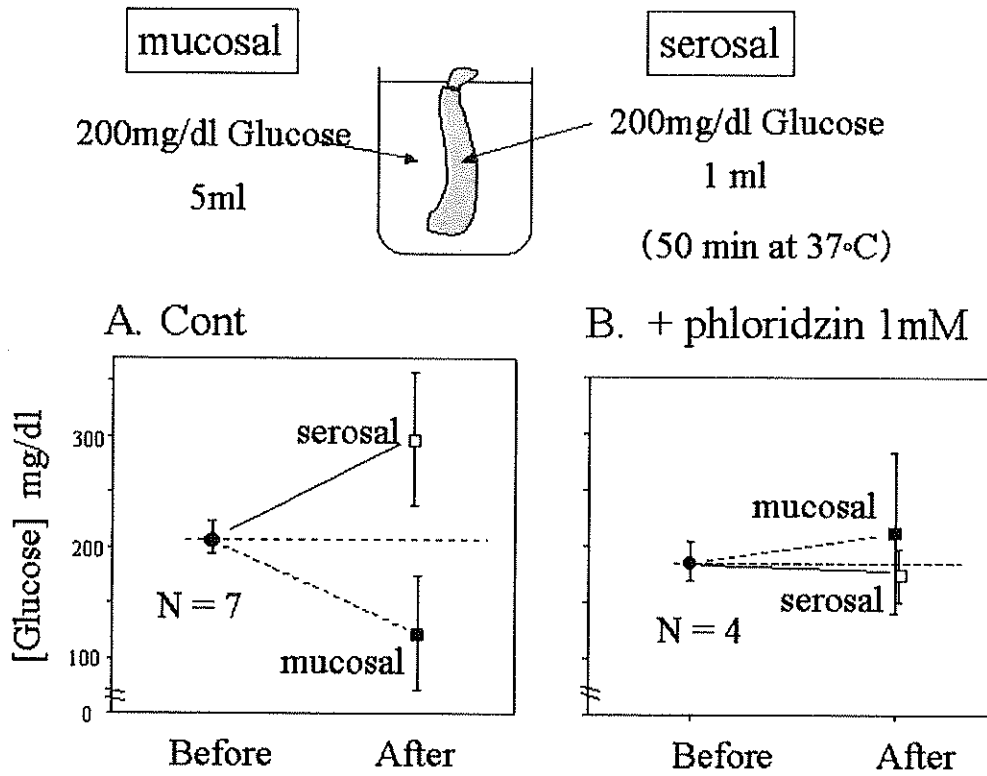
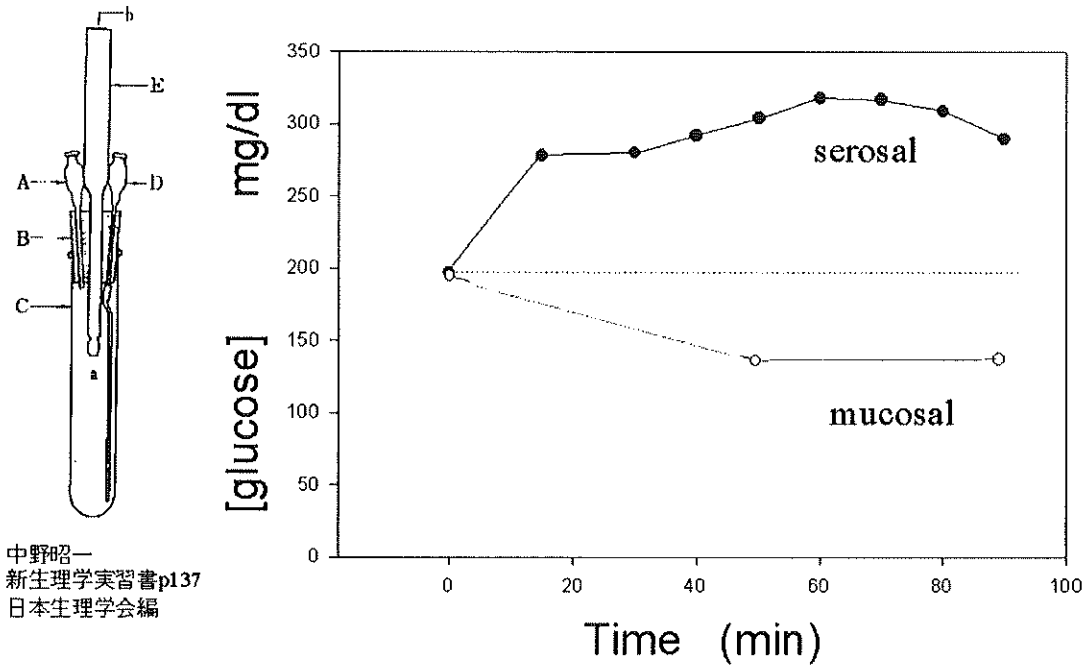


図 3

粘膜側から漿膜側へのグルコースの取り込みは、 Na^+ 依存性グルコース輸送体 (SGLT) の特異的阻害剤であるフロリジン (1mM) によってほぼ完全に抑制された。

Figure 3

Transport of glucose from mucosal to serosal space was completely blocked in the presence of 1 mM phloridzin, an inhibitor of the Na^+ -dependent glucose transporter (SGLT1).



中野昭一
 新生理学実習書p137
 日本生理学会編

図 4

左図に示す装置を用いて、インキュベーション開始後、漿膜側と粘膜側のグルコース濃度を経時的に計測した。試験管の中央のテフロン管の一方の端 (a) に反転小腸標本を装着、他方の端 (b) から細いポリエチレン管 (直径約 0.5mm) を挿入して、漿膜に囲まれた部分の溶液を採取した。

Figure 4

An typical example of the changes in serosal and mucosal glucose levels after the start of incubation at 37 °C. One end of the everted intestinal preparation was ligated to the end (a) of a Teflon tube (E). Through a thin polyethylene tube (diameter around 0.5 mm, not shown in the figure) placed in this Teflon tube (E), serosal samples were collected periodically. Mucosal samples were collected through another polyethylene tube.

考察

1. グルコーステスターの長所と短所

グルコーステスターの長所について列挙すると、以下のようなになる。

①初期費用が安価： 実売価格は1台1万円程度であり、消耗品の電極は1枚120円程度である。ラット1匹あたり標本が5本とれるとして、インキュベーション前の対照サンプルが4個、インキュベーション後の粘膜側、漿膜側のサンプルが10個で、あわせて14回の測定となる。電極のコストは一匹あたり2千円以下である。

②操作が簡単： 測定は電極を本体にセットし電極先端をテスト液に浸すだけなので、全くの初学者にも可能である。再現性も問題ない。100 mg/dlのグルコース溶液を7人の学生に測らせてみたところ、平均値は100 mg/dl、最大値は105 mg/dl、最小値は94 mg/dlであった。

③測定時間が短い(15あるいは30秒)： 酵素反応の終了時点で吸光度変化を測定するHK/G6PDH法では、1サンプルの測定に少なくとも4分は必要である(平均すると4.3分、n=14)。前述のように、1匹のラットから5本の反転小腸標本を作製するとして、サンプル数は14個となり、分光光度計が1台だけの場合、それだけで60分必要となる。限られた実習時間内(135分)に測定を終了するためには2台以上の分光光度計を用いる必要があるが、指導する教員に限られるため実際は不可能である。

④サンプル量が少ない(0.6または2 μ l)： 図4のような試験管を用いると、粘膜側、漿膜側から経時的にサンプルを取り、グルコース濃度とインキュベーション時間との関係を調べることができる。それなりに手間がかかるため、まだ、実際の実習には取り入れていないが、グルコース吸収の時間経過と漿膜側へのグルコース輸送の時間経過を比べるなどの実験に応用できると思われる。

一方、グルコーステスターの短所としては、

①測定精度が悪い： 特性が直線ではなく上に凸であるため、100 mg/dlおよび400 mg/dl付近は比較的正確な値を表示するが、100 mg/dl以下および500 mg/dlでは著しく低めに、125 mg/dlから400 mg/dlにかけては高めに表示される(図1)。

②温度による誤差が大きい： グルコーステスターは温度に敏感であり、測定にあたっては室温、テスト液の温度に十分配慮する必要がある。

③測定限界がある(600 mg/dl以上、20 mg/dl以下は表示されない)： この点は特に問題で、上限を超えた場合はグルコースを含まない液で2倍希釈するなどして対処できるが、下限に満たない場合の対処法はない。理想的には、グルコース6リン酸脱水素酵素/ヘキソキナーゼ法あるいはグルコースオキシダーゼ法などによる予備の測定装置を準備しておくべきであろう。

2. グルコーステスターを用いた小腸での糖の消化・吸収の学生実習の意義

解剖生理学、栄養学などの教科書に記載されているので、学生たちは十分承知しているはずであるが、粘膜側ではグルコース濃度が減少し、反対側の漿膜側でのグルコース濃度が著しく上昇する様子を目の当たりにして、新鮮な驚きを感じたようである。実習では、この他に、グルコースの他に麦芽糖あるいはショ糖を加えると漿膜側のグルコース濃度がグルコース単独の場合に比べてさらに大きく上昇すること、粘膜側にでんぷんを単独で加えても漿膜側のグルコース濃度は増加しないことを確認する実験も併せて行っている。

SGLT1の特異的阻害剤フロリジン(1 mM)によりグルコースの吸収と粘膜側から漿膜側への輸送が完全に阻止された(図3)。従来より、グルコース吸収の機構には、SGLT1による能動輸送とは別に受動的な機構があると言われてきたが、最近の研究では、その実態は粘膜側におけるグルコース濃度上昇によって活性化されるGLUT2であることが明らかにされた⁵⁾。今回の実験条件ではこの機構はあまり働いていないと推察される。

謝辞

ラット小腸を用いた糖の消化・吸収実習の手引き書をこころよく提供していただき、実践的なノウハウまで伝授していただいた日本大学医学部國分眞一郎教授、山下俊一助教授、和田義之博士に、また貴重なご助言を賜った国際学院埼玉短期大学の今井重之博士に感謝いたします。

血糖測定器を用いたグルコース吸収実験

文献

- 1) Slein MW. in Methods of enzymatic analysis (Bergmeyer HU ed.), p117, Academic Press, New York, 1965.
- 2) Wilson TH, Wiseman GW. The use of everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface. J Physiol (Lond) 123: 116-125, 1954
- 3) 星猛 糖の吸収 新・生理学実習書 第7章 消化器 日本生理学会編 南江堂、東京、1991, 129-134
- 4) 中野昭一 アミノ酸の吸収 新・生理学実習書 第7章 消化器、日本生理学会編 南江堂、東京、1991, 134-139
- 5) Kellett GL. The facilitated component of intestinal glucose absorption. J. Physiol.(Lond), 531.3, 585-595, 2001

An Application of Portable Blood Glucose Tester for Student's Practice of Intestinal Carbohydrates Digestion and Absorption in Rats

Tatsuto Kiyosue, Yuriko Ito, Sachiko Yamashita, Rie Amamoto,
Hiroki Nanri, Shigeki Minakami.

< Abstract >

We applied portable blood glucose tester, for self-measurement of plasma glucose levels in patients with diabetes mellitus, for a student's practice to see the mechanisms of glucose absorption in rat intestine. As a reference method to measure glucose concentration accurately, an assay system employing a combination of hexokinase and glucose 6-phosphate dehydrogenase was used. As compared to the reference method, the glucose tester tended to give lower values at glucose concentrations less than 100 mg/dl and at 500 mg/dl (the highest concentration tested). At concentrations ranging from 100 to 400 mg/dl, the tester showed higher values than the reference. Using everted intestinal sac preparations from rats, we successfully demonstrated that glucose is transported from the mucosal space to the serosal space, and that phloridzin, an inhibitor of Na⁺-dependent glucose transporter, can block this process.

Keywords : portable blood glucose tester, everted rat intestinal sac preparation, Na⁺-dependent glucose transporter, student's practice, phloridzin