

組織形態学を基盤としたヘテロ複核錯体を含む亜鉛および
4 価バナジウム錯体による抗糖尿病作用の評価に関する研究

2015

諸木 孝泰

目次

序章

第1章 [Zn(opt)₂]または[VO(opt)₂]の形態学的評価を用いた抗糖尿病活性の評価

1-1 緒言

1-2 C57BL/6J マウスと KK-A^yマウスの比較

1-2-1 材料及び方法

1-2-1-1 試薬

1-2-1-2 動物

1-2-1-3 群構成

1-2-1-4 生化学検査

1-2-1-5 病理組織学的検査

1-2-1-5-1 試薬調製

1-2-1-5-2 解剖

1-2-1-5-3 標本作製

1-2-1-5-4 形態学的評価

1-2-1-5-5 形態学的変化の定量的解析

1-2-1-6 統計解析

1-2-2 結果

1-2-2-1 体重、血糖値及び生化学検査

1-2-2-2 形態学的評価

1-2-3 考察

1-3 錯体投与群の比較

1-3-1 材料及び方法

1-3-1-1 試薬

1-3-1-2 動物

1-3-1-3 錯体の合成

1-3-1-4 投与及び群構成

1-3-1-5 生化学検査

1-3-1-6 病理組織学的検査

1-3-1-6-1 試薬調製

1-3-1-6-2 解剖

1-3-1-6-3 標本作製

1-3-1-6-4 形態学的評価

1-3-1-6-5 形態学的変化の定量的解析

1-3-1-7 統計解析

1-3-2 結果

- 1-3-2-1 体重、摂餌量、血糖降下作用及び生化学検査
- 1-3-2-2 形態学的評価
- 1-3-3 考察
- 1-4 小括

第2章 4価バナジウム錯体投与群における臓器重量測定から得られた毒性学的兆候の解析

- 2-1 緒言
- 2-2 材料及び方法
 - 2-2-1 試薬
 - 2-2-2 錯体合成、動物、投与、試薬調製、解剖及び臓器重量の測定
 - 2-2-3 標本作製
 - 2-2-4 形態学的評価
 - 2-2-5 精巢中金属の定量
 - 2-2-6 統計解析
- 2-3 結果
 - 2-3-1 動物の一般状態観察及び体重測定
 - 2-3-2 臓器重量の測定
 - 2-3-3 精巢の形態学的評価
 - 2-3-4 精巢中カルシウム、鉄及びバナジウム濃度の定量
- 2-4 考察
- 2-5 小括

第3章 亜鉛及び4価バナジウムを含むヘテロ複核錯体の抗糖尿病作用に関する検討

- 3-1 緒言
- 3-2 材料及び方法
 - 3-2-1 試薬
 - 3-2-2 動物
 - 3-2-3 合成
 - 3-2-3-1 3-fsa の合成
 - 3-2-3-2 錯体の合成
 - 3-2-4 錯体の物性評価
 - 3-2-5 XAFS を用いた構造解析
 - 3-2-6 錯体の分配係数の測定
 - 3-2-7 インスリン様作用の評価
 - 3-2-8 各錯体の投与
 - 3-2-9 生化学検査
 - 3-2-10 病理組織学的検査
 - 3-2-11 臓器中金属の定量

3-2-12 統計解析

3-3 結果

3-3-1 錯体の合成および物性パラメータ

3-3-2 錯体のインスリン様作用

3-3-3 錯体の血糖降下作用及び生化学検査

3-3-4 形態学的評価

3-3-5 臓器中バナジウムの定量

3-4 考察

3-4-1 物性評価

3-4-2 抗糖尿病活性

3-5 小括

総括及び将来への展望、謝辞、業績目録

引用文献

Appendices

略語一覽

Akt	protein kinase B
ALT	alanine aminotransferase
AST	aspartate aminotransferase
BN	boron nitrogen
BUN	blood urea nitrogen
BSA	bovine serum albumin
DMSO	dimethyl sulfoxide
Emal	ethyl maltol
ESR	electron spin resonance
EXAFS	extended X-ray absorption fine structure
FFA	free fatty acid
Fsa	formyl salicylic acid
Fsaen	formyl salicyliden ethylene diamine
Glc	gluconic acid
HE	hematoxylin and eosin
ICP-MS	inductively coupled plasma - mass spectrometry
IR	infrared spectroscopy
IRS	Insulin receptor substrate
Opt	1-oxy-2-pyridine-thiolate
PAS	periodic acid Schiff reaction
PDE	phosphodiesterase
PEG	polyethylene glycol
PTP1B	protein-tyrosine phosphatase 1B
STZ	streptozotocin
TG	triglyceride
TCHO	total cholesterol
UV/VIS	ultraviolet/visible
[V3HF]	vanadium(V)-3-hydroxy flavone complex
[VO(emal) ₂]	bis(ethyl maltolato)oxovanadium(IV) complex
[(VO) ₂ fsaen]	formyl salicyliden ethylene diamine di-oxovanadium(IV) complex
[VOH ₂ fsaen]	formyl salicyliden ethylene diamine oxovanadium(IV) complex
[VO(ka) ₂]	bis(kojato)oxovanadium(IV) complex
[VO(mal) ₂]	bis(maltolato)oxovanadium(IV) complex
[VO(opt) ₂]	bis(1-oxy-2-pyridine-thiolato)oxovanadium(IV) complex
[VOsalen]	salicyliden ethylene diamine oxovanadium(IV) complex
[(VO) ₂ (tart) ₂]	dinuclear oxovanadium(IV)-tartrate complex

[VOZnfsaen]	formyl salicyliden ethylene diamine oxovanadium(IV)-zinc(II) complex
XAFS	X-ray absorption fine structure
ZnCl ₂	zinc(II) chloride
[Zn(glc) ₂]	zinc(II) gluconate complex
[Zn ₂ fsaen]	formyl salicyliden ethylene diamine di-zinc(II) complex
[ZnH ₂ fsaen]	formyl salicyliden ethylene diamine zinc(II) complex
[Zn(opt) ₂]	bis(1-oxy-2-pyridine-thiolato)zinc(II) complex

序章

糖尿病は先天的あるいは後天的に膵臓のランゲルハンス島の B 細胞が破壊されることでインスリンの分泌不全を発症し、血糖値のコントロールが困難となる 1 型糖尿病 (IDDM: インスリン依存型) と、インスリン分泌はされるものの肥満などの生活習慣などが原因でインスリン抵抗性を発症する、あるいはインスリン分泌不全が起こりで血糖値のコントロールが困難となる 2 型糖尿病 (NIDDM: 非インスリン依存型) に分類される。近年、NIDDM の患者数は増加しており、2030 年までに日本で 552 万人を超えるといわれており、問題視されている。NIDDM は生活習慣病であることから、その病態改善のためには生活習慣の改善が強く提唱されているが、それとともに新規医薬品の創出も切望されている。¹

このような背景の中、1980 年代頃から亜鉛、バナジウム、銅、コバルト及びマグネシウム等の金属イオンが有する抗糖尿病作用に多くの研究者が着目してきた。しかし、金属イオンは水溶性が高く、消化管からの十分な吸収が期待できないため、イオンよりも脂溶性が高い金属錯体に関する研究が注目されてきた。上記の金属元素の内、亜鉛及びバナジウムの金属錯体は、金属元素の配位形式、すなわち O_4 、 N_4 、 S_4 、 N_2O_2 、 N_2S_2 もしくは S_2O_2 の 6 種類の配位構造をとる錯体が多数合成され、これらの錯体が示す血糖降下作用、耐糖能障害の改善効果及び糖尿病に関連する各種の血漿中生化パラメータの改善効果について錯体の化学構造との関連性が幅広く検討されている。²⁻⁸ また、これらの報告に加えて、亜鉛及びバナジウムの抗糖尿病作用メカニズムに関する報告もある。亜鉛の作用メカニズムについては、亜鉛が α -グルコシダーゼ阻害作用による食後血糖値の上昇抑制作用を示すこと、また Akt リン酸化の亢進や PDE 阻害作用を示すことが報告されている。⁹⁻¹¹ バナジウムの作用メカニズムについては、バナジウムが PTP1B の阻害によってインスリン活性の亢進作用を示すこと、PDE 阻害作用を示すこと、さらにはグリコーゲンの合成亢進作用を示すことが報告されている。^{12, 13} 代謝分析学分野においても、Fig. 1 に示す通り、脂肪細胞におけるグルコースの取り込み作用のメカニズムに基づいた報告を行ってきた。¹⁴

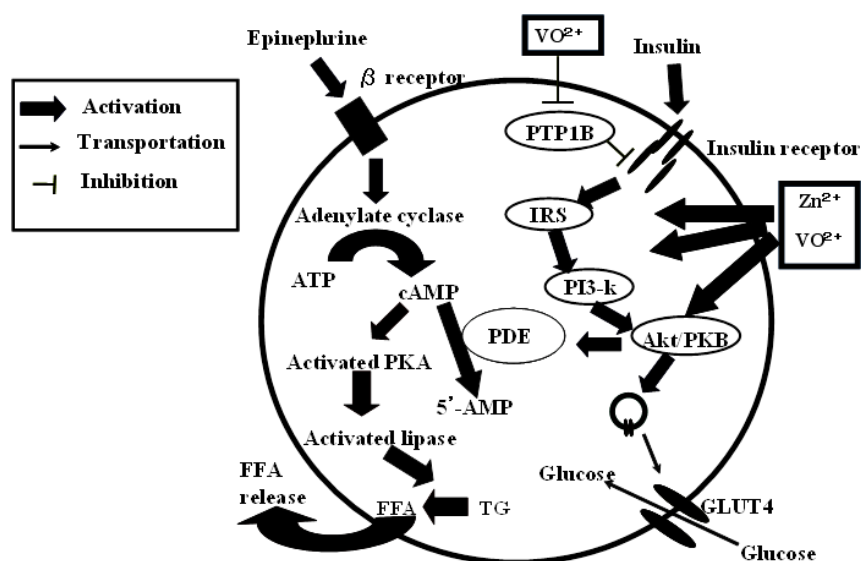


Fig. 1 A proposed mechanism for insulin-mimetic action of vanadyl and zinc ions and complexes in isolated rat adipocyte

上述のように、両金属錯体の抗糖尿病活性については血漿中生化パラメータ等の測定や、分子生物学的な検討結果について数多く報告されている。

金属イオンあるいは金属錯体が示す生理作用に関する研究では、上述のような生化学的パラメータによる評価や分子生物学的アプローチの他にも、形態学的評価や各種毒性評価が推進すべき研究分野として挙げられるが、代謝分析学分野ではこれまで着手していない。毒性評価としては、薬効薬理試験で用いる糖尿病モデル動物である STZ ラットで観測された毒性についての報告がある。この報告では、5 価バナジウムイオンを投与すると、症状として下痢及び脱水、組織変化として腎臓の障害が起こることが報告されている。¹⁵ また、健常ラットを用いた検討では、5 価バナジウムイオンから生じる酸化ストレスが、ラット肝細胞のミトコンドリアを障害すると報告されている。¹⁶ 亜鉛が示す毒性としては、ナノ粒子化した酸化亜鉛を健常ラットに経口投与すると、消化器系臓器の上皮細胞が障害され、膵炎等の症状を誘発するとされている。¹⁷ このように、バナジウムや亜鉛が示す毒性については各種の報告が散見されるが、医薬品開発で求められるような健常動物を用いた長期の反復投与毒性試験や遺伝毒性試験、安全性薬理試験、あるいはイヌなどの大動物を用いた評価等についての報告は乏しく、毒性評価における課題は多く残されている。一方、代謝分析学分野で着手していないもう一つの領域である形態学的もしくは免疫組織学的検査に関する研究手法は、全身の諸臓器を網羅的に評価することにより、薬効と毒性の両方を包括的に検出することが可能であるため、従来から行われている普遍的評価系である。末梢血液中の各生化学的パラメータの変動が生体内のホルモン変動や各種のフィードバック機構による生理応答をすべて反映した複合的な結果であるのに対し、病理組織学的検査は作用対象とする臓器の器質的改善効果を評価する方法である。この方法は、薬効評価における重要な検査項目であるにもかかわらず、金属錯体の抗糖尿病作用に関してはこれまで取り組めていなかった。以上のことから、本研究では金属錯体の抗糖尿病治療薬開発過程の中でこれまで着手していない研究領域の一つである形態学的評価を行うことを目的とし、その有用性について検討した。

形態学的評価に用いる組織切片の代表的染色法として、HE 染色法があげられる。HE 染色法は核をヘマトキシリン、細胞質や細胞外基質等をエオジンで染め分けることで組織の構造観察を容易にするため、染色された組織切片は病理診断及び各種判定に用いられる。¹⁸ HE 染色法に加えて利用される特殊染色法として、2 価金属イオンの沈着を検出するコッサ染色法や脂肪を検出するオイルレッド O 染色法、弾性繊維を染めるエラスチカワンギーソン染色、鉄色素を検出するベルリンブルー染色、消耗色素を検出するシュモール染色、胆汁色素を検出するホール法染色、ムコ多糖類を検出する PAS 染色やアルシアンブルー染色、マスト細胞を検出するトルイジンブルー染色などがあげられる。¹⁸ これらの各染色法により、目的とする組織成分の同定が可能となる。さらに抗原抗体反応を利用し、目的とするタンパク等の特異的に検出する免疫染色法も広く利用される。¹⁸

糖尿病患者では、高血糖状態が持続することで膵臓のランゲルハンス島の B 細胞が肥大し、慢性期では B 細胞が壊死することが知られている。形態学的検査は侵襲性が高い検査法であるため、糖尿病患者における薬効評価の指標とすることは困難であるが、化合物がヒトで発現し得る作用を予測する上で実験動物を用いた抗糖尿病作用の評価に、膵臓のランゲルハンス島をはじめとしたターゲット器官の形態学的検査を導入することは重要である。糖尿病モデル動物に金属イオンあるいは金属錯体を投与した後に、形態学的評価を行った研究成果は、少数ではあるが報告されている。Akgün-Dar 等は、4 価バナジウムイオンである VO_2^{+} を投与した STZ ラットについて、動脈の形態学的評価を行い、血

管変性が改善されることを報告している。¹⁹ また Subramanian 等は、[V3HF]を投与した STZ ラットでは、酸化ストレスが軽減されることによりランゲルハンス島の B 細胞への負荷が軽減されることを光学顕微鏡と電子顕微鏡を用いた観測で報告している。²⁰ さらに Dabros 等は 4 価バナジウム錯体である VO(mal)₂ または VO(ka)₂ を STZ ラットに投与し、細胞内小器官であるゴルジ装置の形態学的変化を電子顕微鏡で評価して、4 価バナジウム錯体がゴルジ装置の変性を軽減することを報告している。²¹ このように、金属イオンや金属錯体の抗糖尿病活性について形態学的評価を行った報告をいくつか確認できるが、生化学パラメータや分子生物学的研究に関する報告数と比べると少数である。標本作製の技術的問題、その作業の煩雑さ、さらには標本評価能力の専門性の高さもあり、一般的な評価方法として定着しにくい可能性が考えられるが、前述の通り実験動物を用いた形態学的評価はヒトでの作用を予測する上で重要な検査項目であることから、金属錯体の抗糖尿病作用の評価系の一つとして確立することは急務である。一方、糖尿病モデル動物を用いた形態学的評価に関する報告として、既存薬であるロシグリタゾンやピオグリタゾンを一定期間投与し、肝臓や膵臓の変化を観察し、病態改善について評価した報告がある。^{22, 23} これらの薬剤は糖尿病治療薬として臨床で使用されており、多くの研究者にとって入手することが容易であること、研究対象として臨床成績と比較できることなどの理由から深く研究が進められており、それゆえ形態学的評価まで十分に行われていると考えられる。

本研究の目的は、我々が報告してきた亜鉛錯体及び 4 価バナジウム錯体が示す器質的改善効果について新たに検討し、形態学的な観点から抗糖尿病作用を評価する方法を確立することである。これまでに報告してきた各錯体は、高い抗糖尿病活性を有することを確認しているが、いずれの錯体も病態を示す臓器での器質的改善効果については不明である。そこで第 1 章では、これまでの報告で用いてきた 2 型糖尿病モデルマウスである KK-A^y マウスと、系統的に健常動物に相当し、健常動物の代表的モデルとして KK-A^y マウスとの形態学的比較にしばしば用いられる C57BL/6J マウスを用いて、⁸³⁻⁸⁵ これらの動物の肝臓、膵臓及び腎臓を形態学的に観察し、KK-A^y マウスが形態学的評価を実施する上で適切な系統であるか、並びに評価に用いる週齢、すなわち 10 週齢から 14 週齢までを金属錯体の投与期間とする実験系が適切であるかを確認したので、その結果について論じる。さらに、opt を配位子とする亜鉛及び 4 価バナジウムの両金属錯体は、高い活性を示すことを過去に報告していることから、[Zn(opt)₂]及び[VO(opt)₂]を本研究の代表化合物として選定し、KK-A^y マウスに 4 週間反復経口投与の後、膵臓及び肝臓の形態学的評価を実施したので、その結果について論じる。第 2 章では、第 1 章の実験で実施した臓器重量測定の結果、4 価バナジウム錯体の投与に起因する可能性が強く疑われる精巣の小型化が認められたため、精巣の形態学的評価を実施したので、その結果について論じる。第 2 章の結果から、4 価バナジウム錯体はこれまで薬効用量として検討していた投与量で精巣に不可逆的且つ重篤な毒性を発現することが明らかとなった。生殖器の不可逆的な変化は医薬品としての利用を考慮する際に大きな障害となる。一方で、Chandra らはより毒性の高い 5 価バナジウムイオンが惹起する酸化ストレスにより誘導されるラット精細管の精子形成障害は、亜鉛イオンの同時投与により軽減されることを報告している。²⁴ 前述の通り 4 価バナジウムと亜鉛はそれぞれ異なるメカニズムで抗糖尿病作用を発現すると考えられていることから、両金属元素を一つの錯体の中に共存させることにより高い抗糖尿病活性を維持しつつ、薬物動態学的に同じ臓器に両金属元素が分布することで精巣をはじめとした 4 価バナジウムによる毒性変化を軽減できるヘテロ複核錯体を見出せる可能性があると考えた。そこで、第 3 章では亜鉛及び 4 価バナジウムの両金属元素を 1 分子の中に含有するヘテロ複核錯体を合

成し、その化学構造について各種の分光学的測定方法を用いて解析するとともに、同ヘテロ複核錯体を糖尿病モデル動物に投与し、形態学的評価に基づいて抗糖尿病活性を評価したので、その結果について論じる。

以下に、順次、本研究の結果を記す。

第1章 [Zn(opt)₂]または[VO(opt)₂]の形態学的評価を用いた抗糖尿病活性の

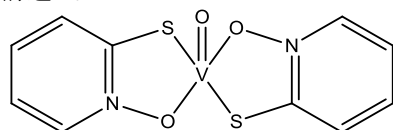
評価

1-1 緒言

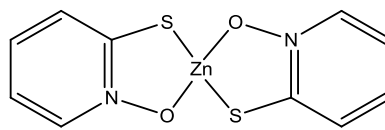
Opt は一般的にピリチオンと呼ばれるピリジンの誘導体である。opt は単体で抗菌活性を示すが、亜鉛と配位結合した錯体である亜鉛ピリチオン ([Zn(opt)₂]) が抗菌剤あるいは防腐剤としてシャンプーや化粧品に添加されている。[Zn(opt)₂]が示す抗糖尿病活性については、KK-A^yマウスに約 2 週間反復経口投与することで、随時血糖値、血漿中の TG、TCHO、BUN、レプチン及びインスリン濃度が正常化し、さらにアディポネクチン濃度が増加することが 2011 年に報告されている。²⁵ この報告では、[Zn(opt)₂]はピオグリタゾンよりも強力な血糖降下作用を示すこと、またピオグリタゾンと同等の酸化ストレスの軽減作用があることが明らかにされている。^{22, 23} また、opt を配位子とする[VO(opt)₂]は[Zn(opt)₂]と同様に高い抗糖尿病活性を示すことが報告されている。²⁶ [VO(opt)₂]を ob/ob マウスに約 2 週間反復経口投与すると、用量依存的に随時血糖値を低下させ、耐糖能障害を改善し、血中のインスリン及び TG 濃度を低下させることが明らかにされている。このように、opt を配位子とする亜鉛及び 4 価バナジウム錯体は、いずれも高い抗糖尿病活性を示す化合物である。序章で記した通り、本研究の目的は抗糖尿病活性の形態学的評価であることから、配位子による影響を排除する目的で、同じ配位子を有する錯体である[Zn(opt)₂]及び[VO(opt)₂]を投与物質として選定し、形態学的評価に供することとした。また、それぞれの錯体の比較対照物質として、[Zn(glc)₂]及び[VO(ema)₂]をそれぞれ選定した。[Zn(glc)₂]は食品添加物として厚生労働省で認可されており、摂取が推奨されていることから選定した。²⁷ また、[VO(ema)₂]はイギリスで治験薬として人に投与された実績がある化合物であることから選定した。²⁸ 本実験では、これらの亜鉛及び 4 価バナジウム錯体を 2 型糖尿病モデル動物である KK-A^yマウスに 4 週間反復経口投与し、従来手法である投与期間中の随時血糖値、投与期間終了後の血漿中 AST、ALT、TG、TCHO 及びインスリン濃度について評価するとともに、糖尿病の作用対象である肝臓、腎臓及び膵臓の形態学的評価を実施した。なお、錯体を投与した動物の評価に先立ち、本実験で用いた KK-A^yマウスの週齢の適切性を評価する目的で、遺伝的に健常動物に相当する同週齢の C57BL/6J マウスの形態学的評価を併せて実施し、KK-A^yマウスと比較した。

以下、1-2 項では C57BL/6J マウスと KK-A^yマウスの比較に関して論述し、1-3 項で錯体投与群の評価に関して論述する。

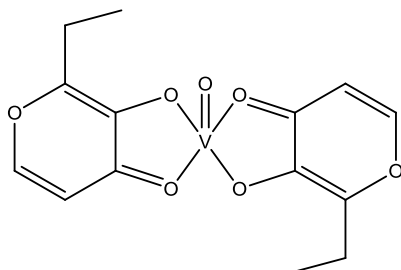
構造式



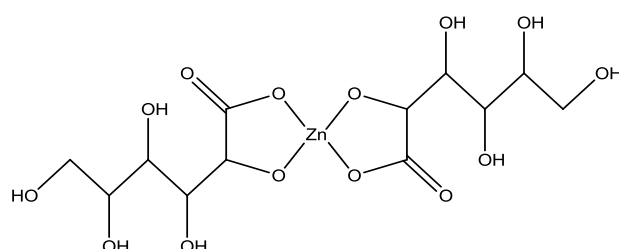
[VO(opt)₂]



[Zn(opt)₂]



[VO(ema)₂]



[Zn(glc)₂]

1-2 C57BL/6J マウスと KK-A^y マウスの比較

1-2-1 材料及び方法

1-2-1-1 試薬

リン酸水素二ナトリウム十二水和物 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)、リン酸二水素ナトリウム二水和物 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、ヘマトキシリン、ホルマリン、エタノール、メタノール、イソプロパノール、キシレン、グリセリンゼリー、過ヨウ素酸及び亜硫酸水素ナトリウムは和光純薬工業株式会社（大阪）より購入した。また、エオジン G 及びエンテランニューは株式会社メルク（東京）、オイルレッド O 及びフロキシシン B は Waldeck GmbH（ドイツ）からそれぞれ購入した。

1-2-1-2 動物

5 週齢の KK-A^y 雄性マウスおよび C57BL/6J マウスは日本クレア株式会社（東京）から購入した。実験期間中、すべての動物は京都薬科大学 (KPU) 中央動物研究センターで 12 時間周期の照明調節の下、固形飼料 (MF、オリエンタル酵母工業株式会社：東京) および水道水を自由摂取させ飼育した。KK-A^y マウスはプラスチック製飼育ケージで個別に、C57BL/6J マウスはプラスチック製飼育ケージで群毎 (4 匹/ケージ) に飼育した。すべての動物実験は、KPU 実験動物委員会により認可され、KPU の動物実験ガイドラインに従って行った。

1-2-1-3 群構成

群名	動物数	週齢
C57BL/6J*	4	5
	4	10
	4	14
KK-A ^y *	4	5
	4	10
	4	14

*: 1-3 項で記載する錯体投与群の対照群とするため、媒体である PEG400 を KK-A^y マウスに投与した。これに合わせて C57BL/6J にも投与した。

1-2-1-4 生化学検査

全ての動物の解剖前の血糖値を、グルコカード（アークレイ株式会社:京都）を用いて尾静脈血で測定した。また、エーテル麻酔下でヘパリン処理した器具を用いて腹部大静脈から血液を採取し、5000 rpm、4℃で 10 分間遠心分離して血漿を得た。得られた血漿中の AST、ALT、TG 及び TCHO を富士ドライケム（富士フィルムメディカル株式会社：東京）を用いて測定した。また血漿中インスリン濃度（Insulin）はレビス®インスリン - ラット T（株式会社シバヤギ：群馬）を用いて定量した。

1-2-1-5 病理組織学的検査

1-2-1-5-1 試薬調製（エオジン液、シッフ試薬、10%重亜硫酸ナトリウム水溶液、10%中性緩衝ホルマリン液、メタカルン液、オイルレッド O 液）

HE 染色に用いたエオジン液は、エタノールと純水を混合して調製した 95%エタノールを 780 mL、エオジン 1.0 g を溶解した溶液 100 mL、フロキシシン B 0.1 g を溶解した溶液 10 mL をそれぞれ混合し、これに酢酸 4 mL を加えて調製した。

10%中性緩衝ホルマリン液は Na₂HPO₄・12H₂O を 163.9 g と、NaH₂PO₄・2H₂O を 45.2 g 量り取り、9 L の純水に溶解し、これに 1 L のホルマリンを混合して調製した。

メタカルン液はメタノール、クロロホルム及び氷酢酸を 6:3:1 の割合で混合し、調製した。

PAS 染色に用いたシッフ試薬は次の手順で調製した。煮沸した純粋 500 mL に塩基性フクシン 2.5 g を突沸しないように少しずつ加えてよく攪拌し、50℃まで放冷した後、濾過した。1 mol/L 塩酸 50 mL を加えた後、約 25℃まで冷却し重亜硫酸ナトリウムを 2.5 g 加えて溶解した。この溶液を褐色瓶に入れて密栓し、暗所で約 24 時間放置した。また、亜硫酸水は染色の直前に 10%重亜硫酸ナトリウム 90 mL、1 mol/L 塩酸 75 mL を純水 1500 mL に溶解して調製した。

オイルレッド O 染色液は次の手順で調製した。オイルレッド O 0.3 g を 99%イソプロピルアルコール 100 mL に充分振盪しながら溶解し、オイルレッド O 保存液を作製した。調製後、十分飽和させるために 12 時間以上放置し、オイルレッド O 保存液と純水を 6:4 の割合であらかじめ別々に量り採り、オイルレッド O 保存液を激しく振盪しながら純水を少しずつ滴下して混合した。10 分後、濾紙でろ過し、オイルレッド O 染色液とした。調製後 2 時間以内に使用した。

1-2-1-5-2 解剖

エーテル麻酔下での採血後、腹部大動脈切断により動物を放血致死した。動物から肝臓、脾臓及び腎臓を採取し、10%中性緩衝ホルマリン液に浸漬した。また、眼球を採取し、メタカルン液に浸漬した。

1-2-1-5-3 標本作製（オートプロセッサ、包埋、薄切、染色）

肝臓は外側左葉、腎臓は右側を約 3 mm の厚みにナイフで切り出し、また脾臓は約 2/3 の大きさに切り分け、次の「自動包埋装置の設定条件 1」に示す条件で自動包埋装置を用いて包埋処理した後、薄切（ブロックを 3 μ m にスライスする工程）のためにパラフィンプロックを作製した。

自動包埋装置の設定条件 1

薬液	処理時間	設定温度
70%エタノール	3 時間	室温
80%エタノール	2 時間	室温
90%エタノール	1 時間	室温
95%エタノール	1 時間	室温
100%エタノール	1 時間	室温
100%エタノール	2 時間	室温
キシレン	20 分	室温
キシレン	40 分	室温
パラフィン	2 時間	60℃
パラフィン	2 時間	60℃
パラフィン	2 時間	60℃
パラフィン	2 時間	60℃

眼球は、メタカルン液に浸漬後 24 時間で 100%エタノールに移し替え、約 2 時間浸漬した後、次の「自動包埋装置の設定条件 2」に示す条件で自動包埋装置にかけ、ブロックを作製した。

自動包埋装置の設定条件 2

薬液	処理時間	設定温度
100%エタノール	1 時間	室温
100%エタノール	2 時間	室温
キシレン	20 分	室温
キシレン	40 分	室温
パラフィン	2 時間	60℃
パラフィン	2 時間	60℃
パラフィン	2 時間	60℃
パラフィン	2 時間	60℃

作製したブロックはマイクロトーム（ライカバイオシステムズ株式会社：東京）を用いて約 3 μm に薄切し、スライドガラスを 1 晩以上乾燥させた後、染色専用籠に入れ、次の「HE 染色手順」に示す手順で順次浸漬して HE 染色を実施した。染色後はエンテランニュー（封入剤）を切片上に乗せ、カバーガラスで封入した。さらに、腎臓の切片は HE 染色に加えて、「PAS 染色手順」に示す手順で PAS 染色を実施した。

HE 染色手順

薬液	浸漬時間
キシレン	5 分
キシレン	5 分
キシレン	5 分
100%エタノール	5 分
90%エタノール	5 分
80%エタノール	5 分
70%エタノール	5 分
流水洗	5 分
超純水	すすぎ
ヘマトキシリン液	20 分
流水洗	20 分
超純水	すすぎ
エオジン液	90 秒
70%エタノール	2～3 秒
80%エタノール	2～3 秒
90%エタノール	5 秒
100%エタノール	5 分
100%エタノール	5 分
キシレン	5 分
キシレン	10 分

PAS 染色手順

薬液	浸漬時間
キシレン	5 分
キシレン	5 分
キシレン	5 分
100%エタノール	5 分
90%エタノール	5 分
80%エタノール	5 分
70%エタノール	5 分
流水洗	3 分
超純水	すすぎ
0.5%過ヨウ素酸液	5 分
純水	1 分
純水	1 分
シッフ試薬	15 分
亜硫酸水	3 分
亜硫酸水	3 分
亜硫酸水	3 分
流水洗	3 分
純水	すすぎ
ヘマトキシリン液	3 分
流水洗	5 分
純水	すすぎ
70%エタノール	3 秒
80%エタノール	3 秒
90%エタノール	5 秒
100%エタノール	5 分
100%エタノール	5 分
キシレン	5 分
キシレン	10 分

また、10%中性緩衝ホルマリン液に浸漬固定した肝臓の一部を凍結標本の基質である O.C.T コンパウンドに入れて、液体窒素を用いて凍結ブロックを作製した。凍結ブロックはクリオスタット（ライカバイオシステムズ株式会社：東京）を用いて約 8 μ m に薄切し、次の「オイルレッド O 染色手順」に示す手順で、オイルレッド O 染色を実施した。染色後は加温したグリセリンゼリーを切片上に乗せ、カバーガラスで封入した。

オイルレッド O 染色手順

薬液	浸漬時間
純水	30 秒
60%イソプロパノール	1 分
オイルレッド O 染色液	15 分
60%イソプロパノール	2 分
純水	2 分
ヘマトキシリン液	5 分
流水洗	2 分

1-2-1-5-4 形態学的評価

作製した HE 染色標本を光学顕微鏡で観察した。また、肝臓についてはオイルレッド O 染色標本、腎臓については PAS 染色標本も観察した。肝臓及び膵臓の形態学的変化は 5 段階、(変化なし、軽度、中等度、強度、ごく強度)で評価した。²⁹

1-2-1-5-5 形態学的変化の定量的解析

肝臓及び膵臓の HE 染色標本はデジタルスライドスキャナー (NanoZoomer 2.2 Digital Pathology : 浜松ホトニクス株式会社: 静岡) を用いて、デジタルファイル (ndpi ファイル) を作成し、NDP.viewsoftware (浜松ホトニクス: 静岡) を用いて画像解析を実施した。肝臓は、肝臓切片全体と肝細胞中の白色部位 (脂肪滴) の面積を計測し、白色部位の割合を算出した。腎臓は、切片中の糸球体の面積の合計を算出した。膵臓は、膵臓切片全体とランゲルハンス島の面積を計測し、ランゲルハンス島が占める割合を算出した。

1-2-1-6 統計解析

測定したすべてのパラメータは平均値及び標準偏差で表し、有意水準を 5% として、Student の *t*-test 法により 2 群間比較検定を実施した。

1-2-2 結果

1-2-2-1 体重、血糖値及び生化学検査

5、10 及び 14 週齢の C57BL/6J マウスと KK-*A^y* マウスの体重、随時血糖値及び各種血漿中パラメータを Table 1-1 及び Table 1-2 に示した。KK-*A^y* マウスは体重及び随時血糖値が 10 及び 14 週齢、TG が 5、10 及び 14 週齢、TCHO 及びインスリン濃度が 14 週齢でそれぞれ C57BL/6J マウスに対して高値を示し、糖尿病状態を反映した結果であった。また、ALT はいずれの週齢でも C57BL/6J マウスと同程度であった。

Table 1-1 Body weight, blood glucose level, and plasma insulin concentration in 5-, 10-, and 14-week-old KK-A^y and C57BL/6J mice

Age (weeks)	Body weight (g)			Blood glucose level (mg/dL)			Insulin (pg/mL)		
	5	10	14	5	10	14	5	10	14
C57BL/6J	14.9±0.2	24.2±2.0	26.9±1.2	156±29	160±25	190±18	13.7±15.1	31.6±40.8	40.7±24.8
KK-A ^y	16.7±0.2	38.5±0.9*	45.2±5.0	209±16	517±45*	503±66*	105.8±130.1	90.7±94.8	153.5±24.7*

* $p < 0.05$ vs. age-matched control C57BL/6J mice.

Table 1-2 Plasma concentration of ALT, TCHO, and TG in 5-, 10-, and 14-week-old KK-A^y and C57BL/6J mice

Age (weeks)	ALT (U/L)			T-CHO (mg/dL)			TG (mg/dL)		
	5	10	14	5	10	14	5	10	14
C57BL/6J	33±5	39±9	27±17	99±7	117±11	97±13	62±6	60±6	71±28
KK-A ^y	26±5	43±8	24±2	116±7	120±20	175±30*	137±28*	171±27*	200±66*

* $p < 0.05$ vs. age-matched control C57BL/6J mice.

1-2-2-2 形態学的評価

5、10 及び 14 週齢の C57BL/6J マウスと KK-A^yマウスの肝臓、膵臓、腎臓及び眼球の組織学的検査を行った。膵臓、肝臓及び腎臓の組織像を Fig. 1-1、Fig. 1-3 及び Fig. 1-5 に示し、1-2-1-5-5 項で実施した各臓器の定量的解析結果を Fig. 1-2、Fig. 1-4 及び Fig. 1-6 にそれぞれ示した。

膵臓は種々の消化酵素を分泌する外分泌腺である腺房細胞と種々のホルモンを分泌する内分泌腺であるランゲルハンス島を併せ持つ器官である。ランゲルハンス島は A 細胞、B 細胞、D 細胞及び PP 細胞からなり、それぞれグルカゴン、インスリン、ソマトスタチン及び膵ポリペプチドを分泌する。マウス及びラットのランゲルハンス島の内分泌細胞の分布は、外側から中心部に向かって A 細胞、D 細胞、B 細胞の順に分布しており、ヒトの分布と類似している。³⁰ 糖尿病患者の膵臓では、インスリン抵抗性の発症によりランゲルハンス島の B 細胞がインスリンを過剰に産生するために肥大することが知られており、糖尿病に見られる特徴的な形態変化の一つとして知られている。よって、KK-A^yマウスの膵臓の病態を把握するためにランゲルハンス島の形態学的評価を行った。^{31,32}

5 週齢の KK-A^yマウスのランゲルハンス島に変化は認められなかったが、10 及び 14 週齢では Fig. 1-1 に示すようにランゲルハンス島細胞の肥大及び細胞数の増加が認められ、ランゲルハンス島の大型化が認められた。C57BL/6J マウスではいずれの週齢でもランゲルハンス島の大きさは同程度であった。膵臓切片中でランゲルハンス島が占める割合は、10 週齢及び 14 週齢の KK-A^yマウスで C57BL/6J マウスに対し増加した (Fig. 1-2)。

肝臓は消化管で吸収された栄養物の処理や貯蔵、薬物及び毒性物質の解毒や排泄などの代謝の中枢として機能する。また、血液中に存在する種々のタンパク質、糖質、脂質の調整など血液性状の恒常性の保持、胆汁の生成と分泌、細網内皮系による生体防御作用などの多くの重要な役割を担っている。肝細胞に沈着する脂質は、肝細胞への脂質の過剰供給、代謝異常及び血中への放出の障害によって誘発される。³³ 肝細胞への脂質沈着は肥満やインスリン抵抗性によって誘発されることが知られていることから、KK-A^yマウスの肝臓の病態を把握するために肝細胞の脂質沈着について形態学的評価を行った。³⁴

5 週齢の KK-A^yマウスの肝臓では変化は認められなかったが、10 及び 14 週齢では Fig. 1-3 に示すように肝細胞の空胞化が認められた。肝細胞の空胞はオイルレッド O 染色で橙色を示し、脂肪滴であることが確認され、肝臓の変化は脂肪化であることが確認できた。C57BL/6J マウスではいずれの週齢でも肝臓の脂肪化は認められなかった。肝臓切片中で脂肪滴が占める割合は、10 週齢及び 14 週齢の KK-A^yマウスで C57BL/6J マウスに対し増加した (Fig. 1-4)。

腎臓は老廃物の排出とともに、再吸収機構を介して細胞外体液量、電解質組成及び酸 - 塩基平衡の調整といった生体に重要な役割を持ち、その他にもホルモンやペプチドの産生を担っている器官である。³⁵ 糖尿病の合併症の一つである糖尿病性腎症の初期変化として、メサンギウム基質の増生による糸球体の肥大が知られていることから、腎臓の KK-A^yマウスの病態を把握するために糸球体の形態学的評価を行った。³⁶

5 週齢の KK-A^yマウスに変化は認められなかったが、10 及び 14 週齢では Fig. 1-5 に示すように PAS 染色で桃色を示すメサンギウム基質の増加による糸球体の大型化が認められた。C57BL/6J マウスではいずれの週齢でも腎臓の糸球体の大きさは同程度であった。腎臓切片中で糸球体が占める面積の合計は、10 週齢及び 14 週齢の KK-A^yマウスで C57BL/6J マウスに対し増加した (Fig. 1-6)

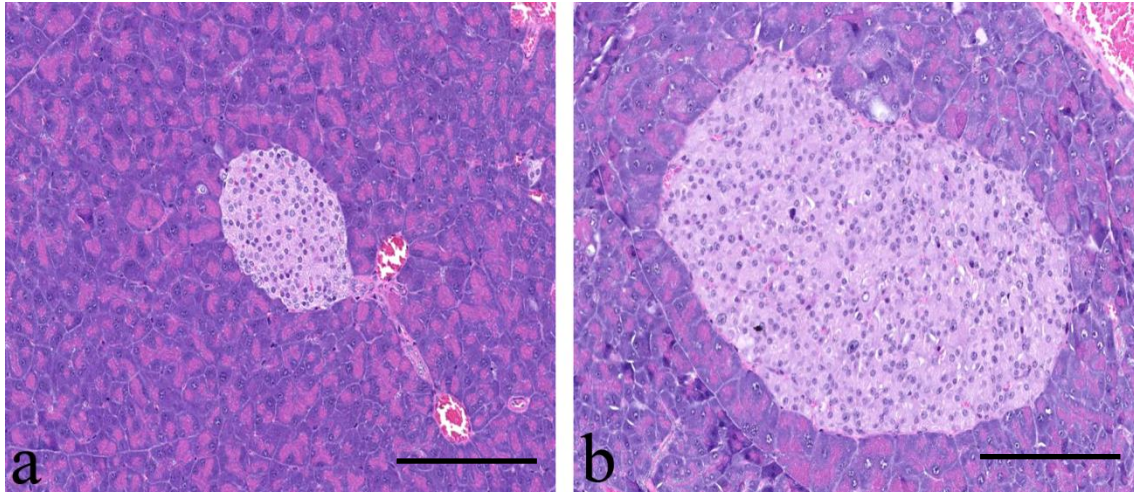


Fig. 1-1 Islet cells in 14-week-old C57BL/6J (a) and KK- A^y mice (b). Islet size and number of islet cells in C57BL/6J mice were within normal ranges. However, in KK- A^y mice, islet cells were more enlarged and the number of islet cells was higher than those in C57BL/6J mice. Hematoxylin-eosin staining (scale bar = 200 μ m).

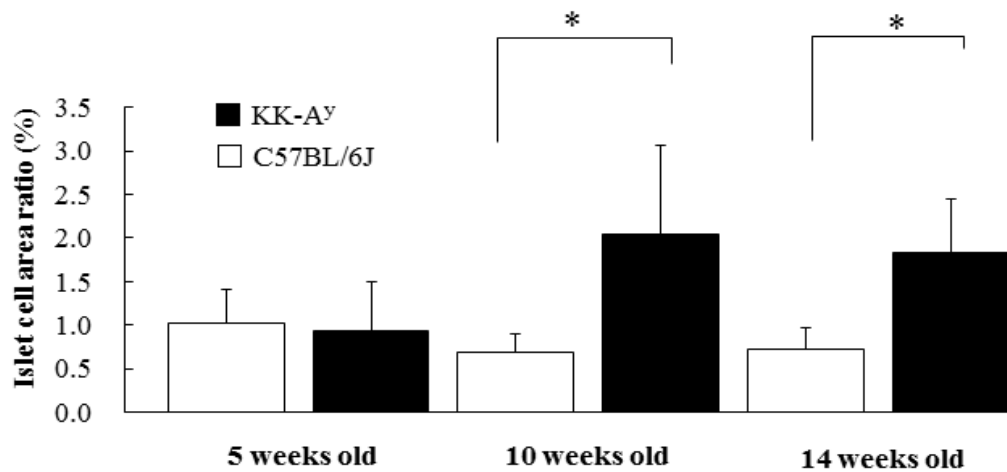


Fig. 1-2 Islet cell area ratio in pancreas of 5-, 10-, and 14-week-old C57BL/6J and KK- A^y mice. Islet cell hypertrophy was observed and the islet cell area ratio in the pancreas significantly increased in comparison to that of C57BL/6J mice. * p <0.05.

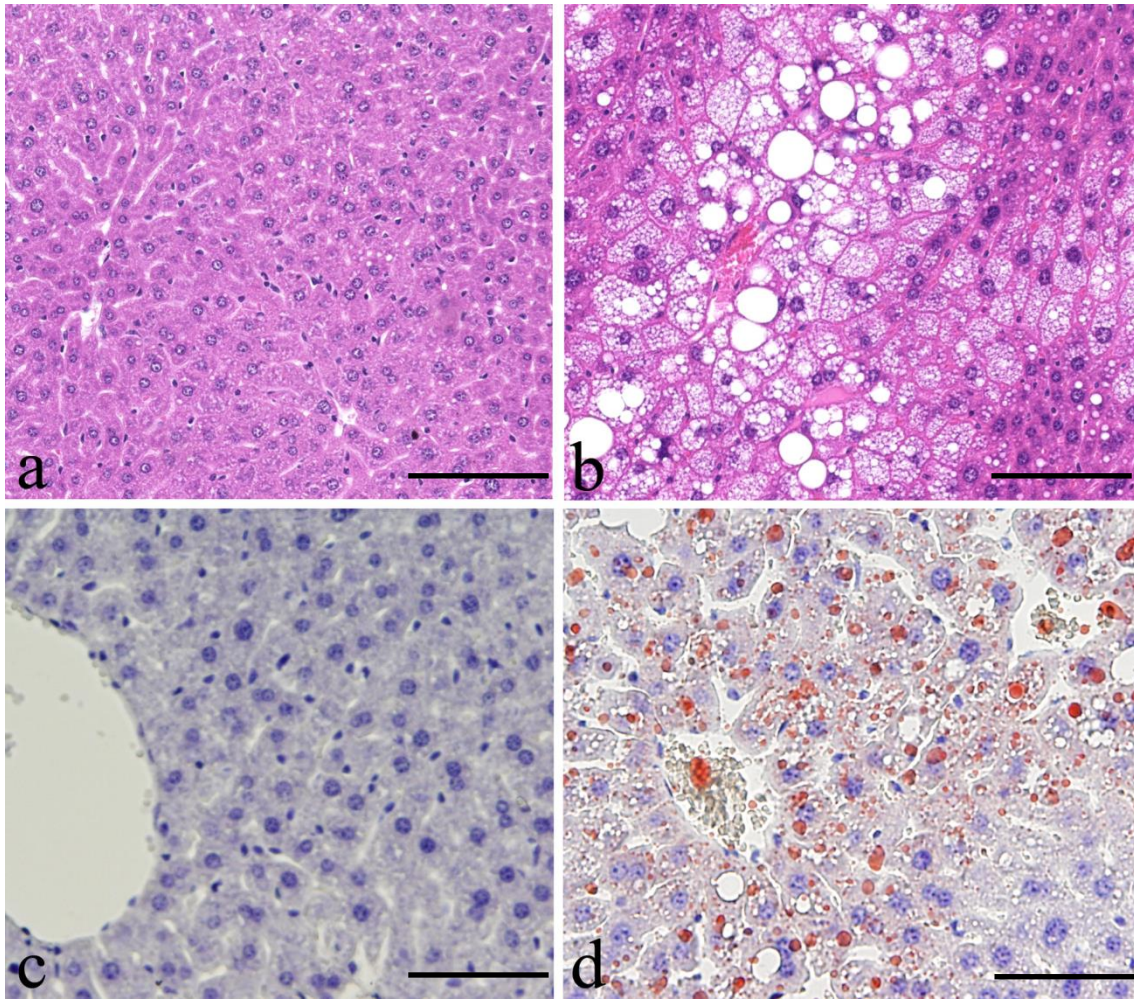


Fig. 1-3 Hepatic morphology in 14-week-old KK-A^y and C57BL/6J mice. Normal morphology in C57BL/6J mice (a) and centrilobular vacuolation of hepatocytes in KK-A^y mice (b) were seen. Hematoxylin-eosin staining. No staining in C57BL/6J mice (c) and oil red O-positive cells in KK-A^y mice (d) were seen. Oil red O staining (scale bar = 100 μm).

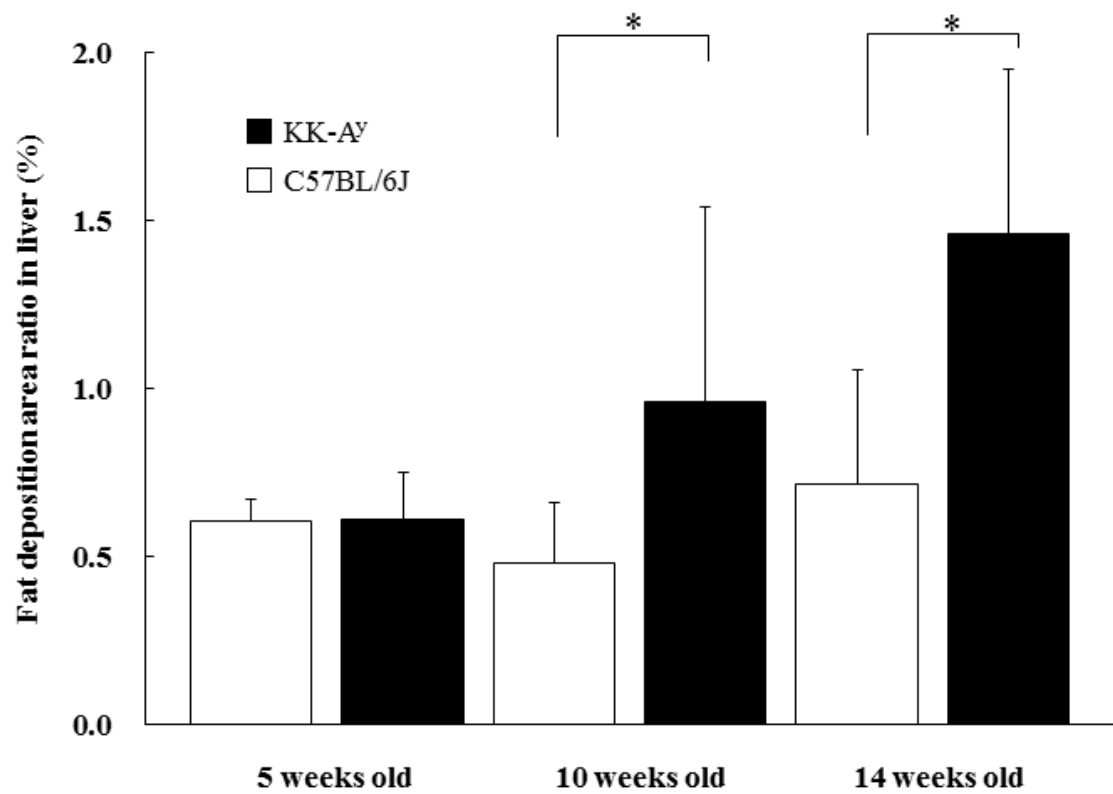


Fig. 1-4 Area ratio of fat deposition in liver of 5-, 10-, and 14-week-old KK-A^y and C57BL/6J mice. The index significantly increased in comparison to that of age-matched control C57BL/6J mice. * $p < 0.05$.

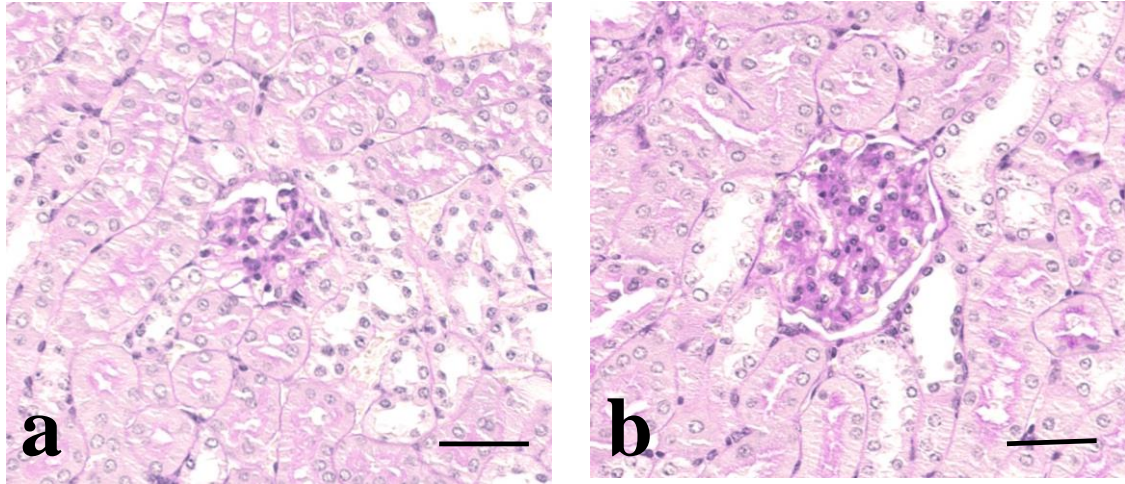


Fig. 1-5 Glomerular morphology in 14-week-old C57BL/6J (a) and KK-A^y mice (b). The size of glomerular and mesangial matrices was in the normal ranges. However, in KK-A^y mice, glomerular hypertrophy due to enlargement of the mesangial matrix was observed. Periodic acid-Schiff staining (scale bar = 50 μ m).

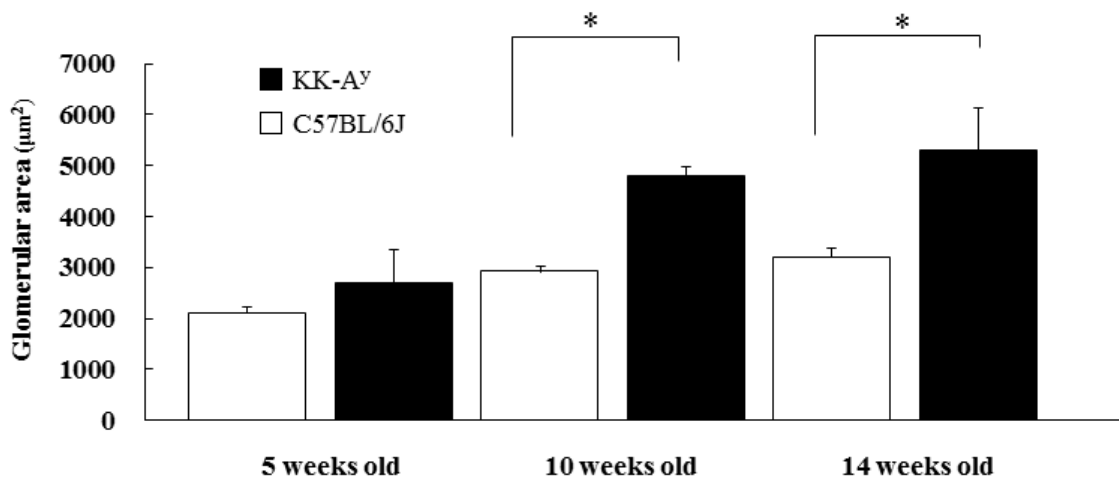


Fig. 1-6 Glomerular area in kidneys of 5-, 10-, and 14-week-old C57BL/6J and KK-A^y mice. The index significantly increased in comparison to age-matched control C57BL/6J mice. * p <0.05.

眼球では、いずれの週齢でも C57BL/6J マウス及び KK-A^y マウスの両方に異常は認められなかった (Fig. 1-7)。この結果から、錯体投与群では眼球の組織学的検査を実施しなかった。

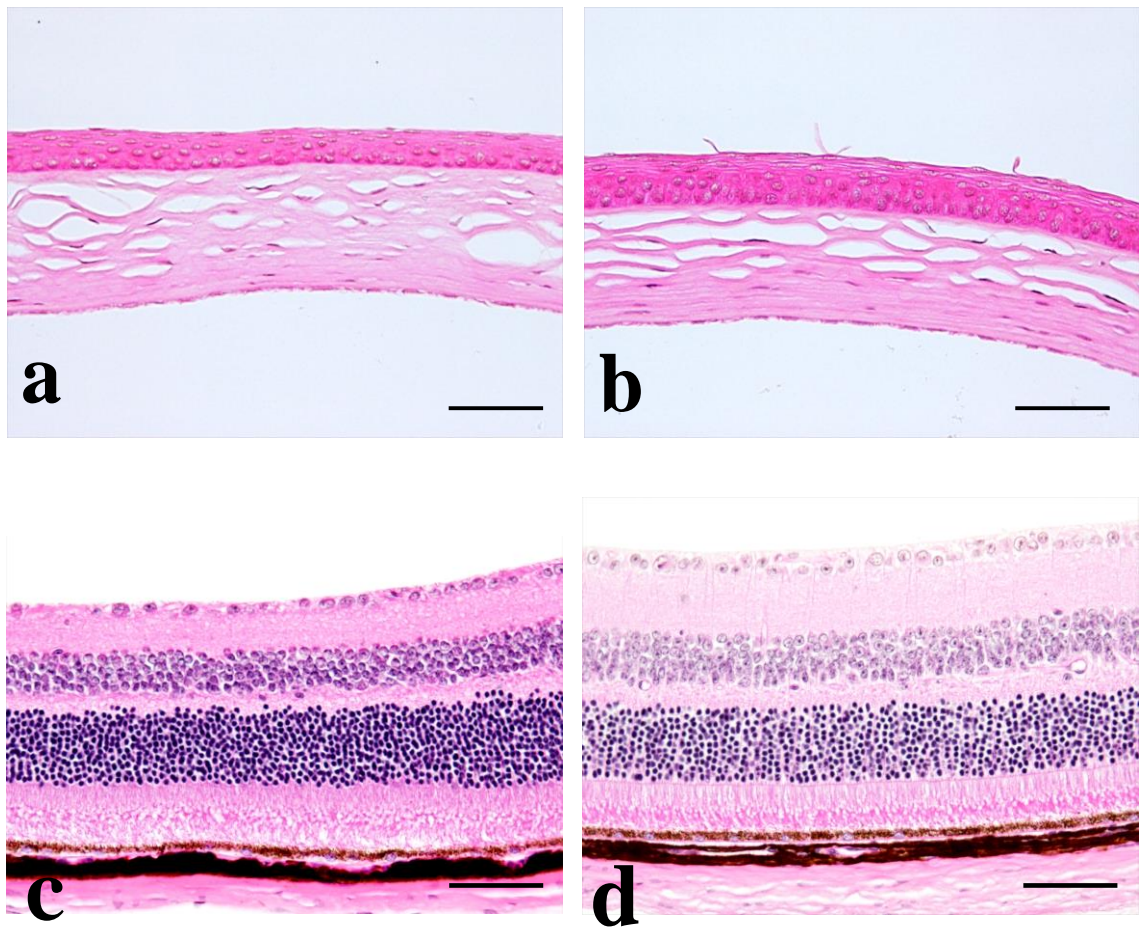


Fig. 1-7 Cornea in 14-week-old C57BL/6J (a) and KK-A^y mice (b). Retina in 14-week-old C57BL/6J (c) and KK-A^y mice (d) (scale bar = 50 μ m).

1-2-3 考察

錯体を投与した動物の評価に先立って実施した KK-A^y マウスと C57BL/6J マウスの比較の結果から、KK-A^y マウスは 10 週齢時には膵臓のランゲルハンス島の肥大、肝臓の脂肪滴沈着及び腎臓の糸球体肥大が確認され、いずれの変化も 14 週齢まで継続して認められた。KK-A^y マウスの膵臓、肝臓及び腎臓で認められた変化は、10 週齢から 16 週齢で認められるとの報告があり、本実験の結果は過去の報告とよく一致した。^{37, 38} また、本実験で実施したデジタル画像の定量的解析、すなわちランゲルハンス島や肝細胞の空胞が占める割合の算出や糸球体の面積の合計値の比較は、過去の報告では実施されていなかったが、本実験では統計的に明確な変化が確認できたことから、器質的变化が定量的に評価できることが明らかとなった。このことから、10 週齢の KK-A^y マウスに化合物を投与し、投与後の肝臓、膵臓及び腎臓を用いて定量的解析を実施するという試験デザインは、系統及び週齢ともに適切であると判断した。なお、眼球では形態学的変化は認められなかった。KK-A^y マウスは 16 週齢頃から角膜変性を発症するとの報告があることから、³⁹ 糖尿病性の眼球に対する影響を評価する週齢としては、本実験で用いた 10 から 14 週齢の KK-A^y マウスは適切ではないと考えられた。また、ヒトにおける糖尿病性網膜症は眼球の網膜に変性が起こるが、本実験の条件では Fig. 1-7 に示すように網膜に変化は認められなかった。

以上の結果をもって、事項に記す通り、錯体を投与した群の評価を行った。

1-3 錯体投与群の比較

1-3-1 材料及び方法

1-3-1-1 試薬

硫酸亜鉛 (ZnSO₄)、グルコン酸亜鉛 ([Zn(glc)₂])、ジンクピリチオン ([Zn(opt)₂])、酸化硫酸バナジウム (IV) (硫酸バナジウム:VOSO₄ · nH₂O)、1-オキシ-2-ピリジンチオール (opt)、エチルマルトール (emal)、ポリエチレングリコール 400 (PEG400)、酢酸、氷酢酸及びクロロホルムは和光純薬工業株式会社 (大阪) より購入した。VOSO₄ · nH₂O はキレート滴定 (指示薬:Cu-PAN (株式会社 同仁化学研究所: 熊本) により H₂O 数を決定した。その他の試薬は 1-2 項に記載の試薬を用いた。

1-3-1-2 動物

実験に用いた動物はすべて 1-2-1-2 項に記載の通りである。

1-3-1-3 錯体の合成

[VO(opt)₂]及び[VO(emal)₂]はいずれも文献に記載の方法で下記の通り合成した。^{25, 26, 28} [VO(opt)₂]は opt 及び VOSO₄ を pH5~6 の水溶液中で 2:1 の割合で混合し、沈殿を得た。[VO(emal)₂]は emal 及び VOSO₄ を pH5~6 の水溶液中で 2:1 の割合で混合し、沈殿を得た。元素分析は KPU 共同機器利用センターのスタッフが、パーキン・エルマー 2400 型元素分析計 (株式会社パーキン・エルマー: アメリカ) を用いて常温で測定した。

[VO(opt)₂]: 元素分析 (理論値、実測値 VO₃C₁₀H₈N₂S₂) : C(47.23, 47.08), H(4.30, 4.15)

[VO(emal)₂]: 元素分析 (理論値、実測値 VO₇C₁₄H₁₄) : C(37.62, 37.57), H(8.77, 8.73)

1-3-1-4 投与及び群構成

随時血糖値が高血糖(400～600 mg/dL)を示す10週齢のKK-A^yマウスに対し、[VO(opt)₂]、[VO(ema)₂]、[Zn(opt)₂]及び[Zn(glc)₂]を下表(群構成)に示す条件の通り投与した。いずれの錯体もPEG400に溶解あるいは懸濁し、金属ゾルデを用いて4週間毎日強制経口投与した(投与終了時14週齢)。投与量は毎日体重を測定し、体重に基づいて算出し、10 mL/kgで投与した。投与量は、次項に示す方法で測定した血糖値が、正常血糖を維持するように次の群構成に示す用量の範囲で随時調整した。なお、配位子による抗糖尿病作用がないことを確認する目的で、optのみを投与する群を設定した。

群構成

群名	動物数	投与物質	投与液量 (mL/kg)	投与用量 (μ mol V or Zn/kg)
nontreated KK-A ^y mice	4	PEG400*	10	-
Opt	4	opt	10	- **
[VO(opt) ₂]	5	[VO(opt) ₂]	10	7 – 59***
[VO(ema) ₂]	5	[VO(ema) ₂]	10	7 – 59***
[Zn(opt) ₂]	6	[Zn(opt) ₂]	10	11 – 76
[Zn(glc) ₂]	6	[Zn(glc) ₂]	10	11 – 76

*：錯体投与群の対照群とするため、媒体であるPEG400を投与した。

**：76 μ mol/kgを投与した。

***：投与期間中の投与量として、バナジウム錯体については7 – 59 μ mol V/kgと表記したが、細分類すると前半の2週間は30 – 59 μ mol V/kg、後半の2週間は低血糖を防ぐ目的で7 – 30 μ mol V/kgで投与した。

1-3-1-5 生化学検査

投与期間中、2日に1回の頻度でグルコカード(アークレイ株式会社:京都)を用いて尾静脈血で血糖値を測定した。解剖時、1-2-1-4項に記載の方法で血漿を採取し、各種生化学パラメータを測定した。

1-3-1-6 病理組織学的検査

1-3-1-6-1 試薬調製

エオジン液、10%中性緩衝ホルマリン液及びオイルレッドO染色液は1-2-1-5-1項に記載の手順で調製した。

1-3-1-6-2 解剖

1-2-1-5-2項に記載の手順と同様の手順で動物を放血致死させ、動物から肝臓、脾臓及び腎臓を採取し、10%中性緩衝ホルマリン液に浸漬した。

1-3-1-6-3 標本作製

1-2-1-5-3 項に記載の手順で、肝臓の HE 染色標本及びオイルレッド O 染色標本、腎臓及び脾臓の HE 染色標本を作製した。

1-3-1-6-4 形態学的評価

1-2-1-5-4 項に記載の通り、標本を観察し、評価した。

1-3-1-6-5 形態学的変化の定量的解析

1-2-1-5-5 項に記載の手順で、肝臓及び脾臓の定量的解析を行った。

1-3-1-7 統計解析

測定したすべてのパラメータは平均値及び標準偏差で表し、有意水準を 5%として、多群間比較検定を実施した。

1-3-2 結果

1-3-2-1 体重、摂餌量、血糖降下作用及び生化学検査

体重、摂餌量、血液生化学的検査の結果を Table 1-3、Table 1-4 及び Table 1-5 に示した。また、随時血糖値の測定結果を Fig. 1-8 及び Fig. 1-9 に示した。

Table 1-3 Body weight of C57BL/6J and KK-A^y mice at various time points

Groups	n	Body weight (g)				
		Before administration	1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks
C57BL/6J	5	24.2 ± 2.0	25.1 ± 1.3	25.2 ± 1.4	26.1 ± 1.1	26.9 ± 1.2
nontreated KK-A ^y mice	4	40.3 ± 3.0	42.5 ± 4.3	42.9 ± 5.0	43.7 ± 4.7	45.1 ± 5.1
[VO(opt) ₂]	5	41.2 ± 1.0	39.0 ± 4.0	39.8 ± 3.0	41.5 ± 2.1	43.3 ± 2.3
[VO(ema) ₂]	5	40.2 ± 2.5	39.6 ± 3.7	41.2 ± 2.8	42.7 ± 1.8	43.9 ± 2.0
[Zn(opt) ₂]	6	42.2 ± 2.4	43.4 ± 2.3	43.0 ± 2.3	44.3 ± 2.1	45.9 ± 2.1
[Zn(glc) ₂]	6	41.4 ± 1.9	43.4 ± 2.6	43.6 ± 2.8	44.4 ± 3.3	45.2 ± 3.5

Data are expressed as means ± SD.

Table 1-4 Food consumption in C57BL/6J and KK-A^y mice at various time points

Groups	n	Food consumption (g/day)				
		Before administration	1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks
C57BL/6J (g: average of 4 animals)	4	1.8	1.9	2.1	2.4	2.2
nontreated KK-A ^y mice	4	5.3 ± 2.1	4.4 ± 1.2	4.8 ± 1.0	5.5 ± 1.6	5.3 ± 0.7
[VO(opt) ₂]	5	6.0 ± 2.4	4.1 ± 0.6	5.5 ± 0.5	4.8 ± 0.2	4.9 ± 0.2
[VO(ema) ₂]	5	5.3 ± 1.5	4.4 ± 1.1	5.1 ± 1.0	5.9 ± 1.3	5.3 ± 2.5
[Zn(opt) ₂]	6	5.4 ± 1.6	5.0 ± 0.8	6.7 ± 2.9	5.5 ± 0.4	4.4 ± 0.8
[Zn(glc) ₂]	6	5.8 ± 1.4	5.6 ± 0.7	6.2 ± 1.4	5.7 ± 2.2	5.4 ± 0.8

Data are expressed as means ± SD.

Table 1-5 Biochemical analysis of C57BL/6J, nontreated controls and KK-A^y mice treated with metal complexes for 4 weeks

Groups	AST (U/L)	ALT (U/L)	TG (mg/dL)	TCHO (mg/dL)	Insulin (pg/mL)
C57BL/6J	38 ± 11	27 ± 17	71 ± 28*	97 ± 13*	40.7 ± 24.8*
nontreated KK-A ^y mice	50 ± 8	24 ± 2	200 ± 66	175 ± 30	153.5 ± 24.7
[VO(opt) ₂]	51 ± 4	22 ± 1	185 ± 66	118 ± 18*	79.4 ± 80.6
[VO(ema) ₂]	54 ± 8	22 ± 2	158 ± 38	111 ± 15*	119.2 ± 67.7
[Zn(opt) ₂]	56 ± 7	22 ± 2	157 ± 25	130 ± 17*	111.8 ± 13.5*
[Zn(glc) ₂]	49 ± 10	29 ± 10	223 ± 63	150 ± 38	263.5 ± 79.5

Data are expressed as means ± SD. * $p < 0.05$ vs. nontreated KK-A^y mice (2-tailed Dunnett's test)

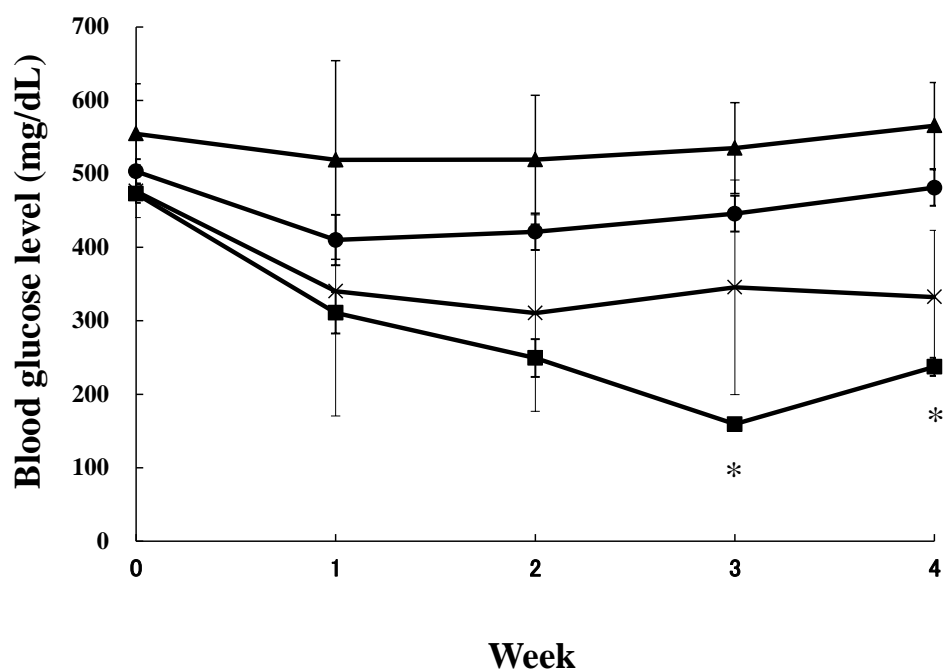


Fig. 1-8 Blood glucose levels in nontreated KK-A^y mice (●), and in mice receiving oral administration of [VO(opt)₂] (■), [VO(ema)₂] (×) and opt (▲) at a dose of 7–59 μ mol V/kg body mass for 4 weeks. Data are expressed as means \pm SD. * p < 0.05 vs. nontreated KK-A^y mice (2-tailed Dunnett's test).

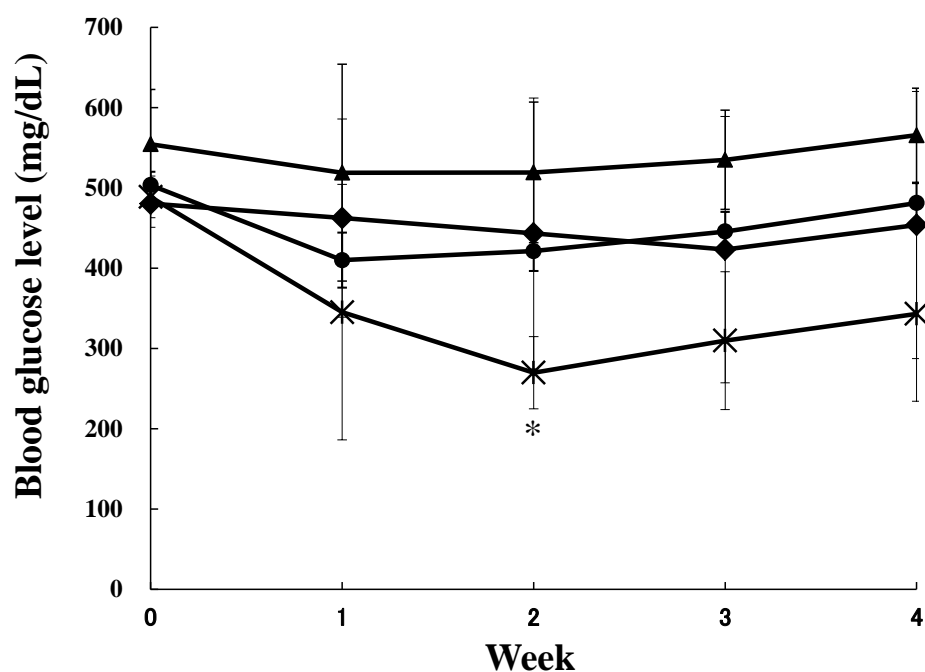


Fig. 1-9 Blood glucose levels in nontreated KK-A^y mice (●), and in mice receiving oral administration of [Zn(opt)₂] (*), [Zn(glc)₂] (◆) and opt (▲) at a dose of 11–76 μ mol Zn/kg body mass for 4 weeks. Data are expressed as means \pm SD. * p < 0.05 vs. nontreated KK-A^y mice (2-tailed Dunnett's test).

Table 1-3 及び Table 1-4 に示すように、媒体投与の KK-A^y マウスの群と各錯体投与群で体重及び摂餌量に差は認められなかった。

Fig. 1-8 及び Fig. 1-9 に示すように、[VO(opt)₂]及び[Zn(opt)₂]を投与した群では、投与期間中に随時血糖値が低下し、高血糖の改善が認められたが、[VO(ema)₂]、[Zn(glc)₂]及び配位子である opt を投与した群では、随時血糖値の低下は認められなかった。[VO(opt)₂]及び[Zn(opt)₂]の血糖降下作用に関しては、過去の検討と同程度であった^{25, 26}。

Table 1-5 に示すように、媒体投与の KK-A^y マウスの群と各錯体投与群で AST、ALT 及び TG に差は認められなかった。TCHO は、[VO(opt)₂]、[VO(ema)₂]及び[Zn(opt)₂]投与群で媒体投与の KK-A^y マウスの群に対して減少した。インスリンは、[Zn(opt)₂]投与群で対照群に対し減少し、[VO(opt)₂]及び[VO(ema)₂]投与群で減少傾向が認められた。

1-3-2-2 形態学的評価

形態学的評価の結果を Table 1-6 に示した。また、各錯体投与群の膵臓及び肝臓の組織像を Fig. 1-10 及び Fig. 1-12 にそれぞれ示した。また、1-3-1-6-5 項で実施した膵臓及び肝臓の定量的解析結果を Fig. 1-11 及び Fig. 1-13 に示した。

Table 1-6 及び Fig. 1-10 に示すように、膵臓ではランゲルハンス島の肥大が[Zn(opt)₂]群で改善した。また、Fig. 1-11 に示すように膵臓では、[Zn(opt)₂]投与群で膵臓切片中のランゲルハンス島が占める面積の割合が、媒体投与の KK-A^y マウスに対して減少傾向を示した。しかしながら、[VO(opt)₂]、[VO(ema)₂]及び[Zn(glc)₂]投与群では、ランゲルハンス島の大きさ及びランゲルハンス島が占める面積の割合は、媒体投与の KK-A^y マウスと同程度であった。なお、C57BL/6J マウスと各錯体投与群を比較した場合は、[Zn(opt)₂]投与群のみ有意差が認められなかった。

Table 1-6 Histological changes in the liver and pancreas after administration of complexes

Groups	Number of animals	Histological findings									
		Liver					Pancreas				
		Vacuolation / Hypertrophy, centrilobular					Hypertrophy, islet				
		-	1+	2+	3+	4+	-	1+	2+	3+	4+
C57BL/6J	4	4	0	0	0	0	4	0	0	0	0
nontreated KK-A ^y mice	4	0	1	3	0	0	0	4	0	0	0
[VO(opt) ₂]	5	2	3	0	0	0	0	5	0	0	0
[VO(ema) ₂]	5	2	2	1	0	0	1	4	0	0	0
[Zn(opt) ₂]	6	3	3	0	0	0	5	1	0	0	0
[Zn(glc) ₂]	6	2	2	1	1	0	1	5	0	0	0

Grade: -, none, 1+; minimal, 2+; mild, 3+; moderate, 4+; severe

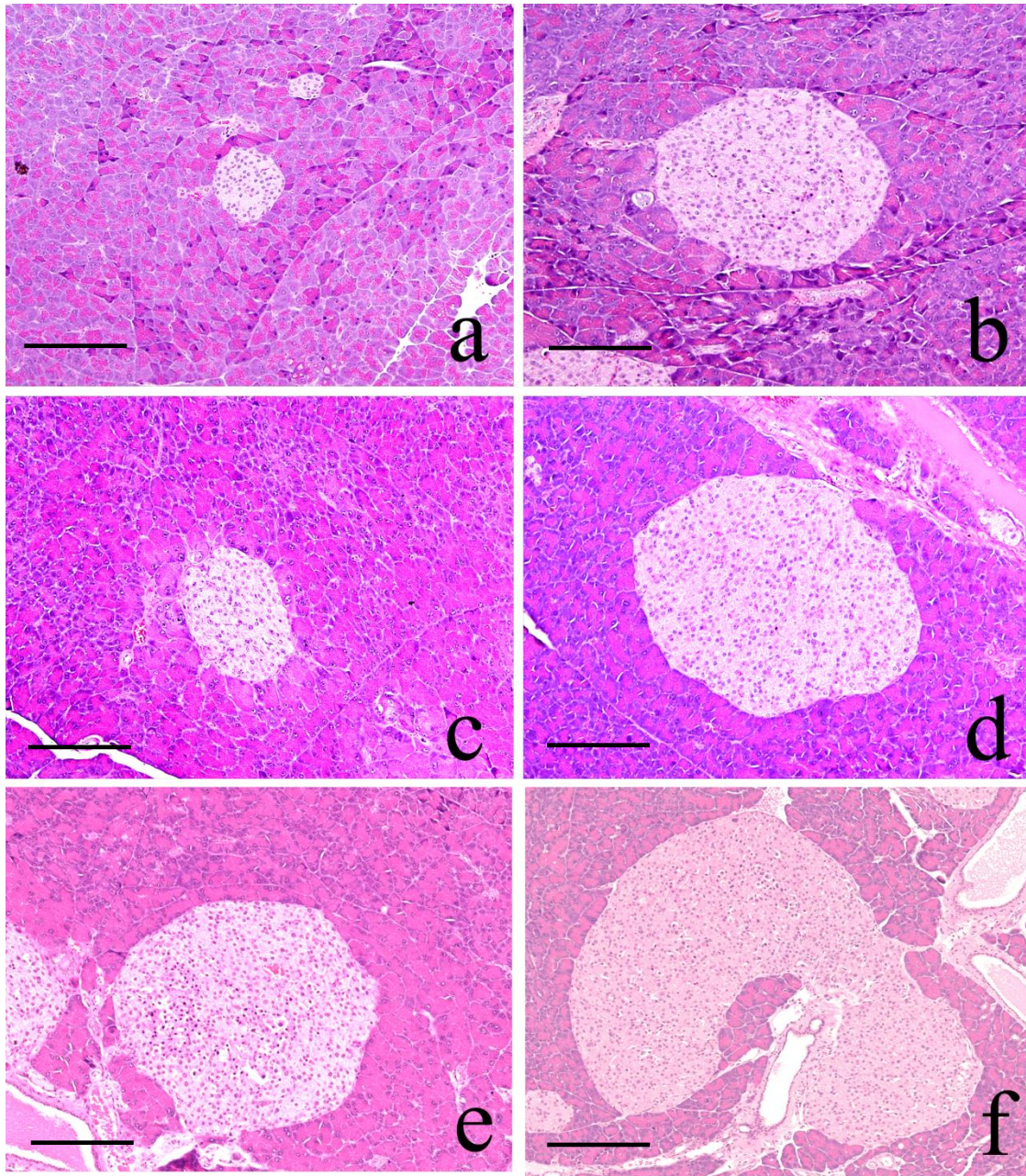


Fig. 1-10 Islet cells in 14-week-old C57BL/6J (a), nontreated KK- A^y mice (b), KK- A^y mice treated with [Zn(opt) $_2$] (c), [VO(opt) $_2$] (d), [Zn(glc) $_2$] (e) and [VO(ema) $_2$] (f). Islet size and number of islet cells in C57BL/6J mice were within normal range. However, in KK- A^y mice, islet cells were enlarged and the number of islet cells was higher compared with C57BL/6J mice. Islet cells of [Zn(opt) $_2$]-treated KK- A^y mice were similar in size to islet cells of C57BL/6J mice. Islet cells of [VO(opt) $_2$]-treated KK- A^y mice were similar in size to islet cells of nontreated KK- A^y mice. Hematoxylin-eosin staining, $\times 100$ (scale bar = 200 μm)

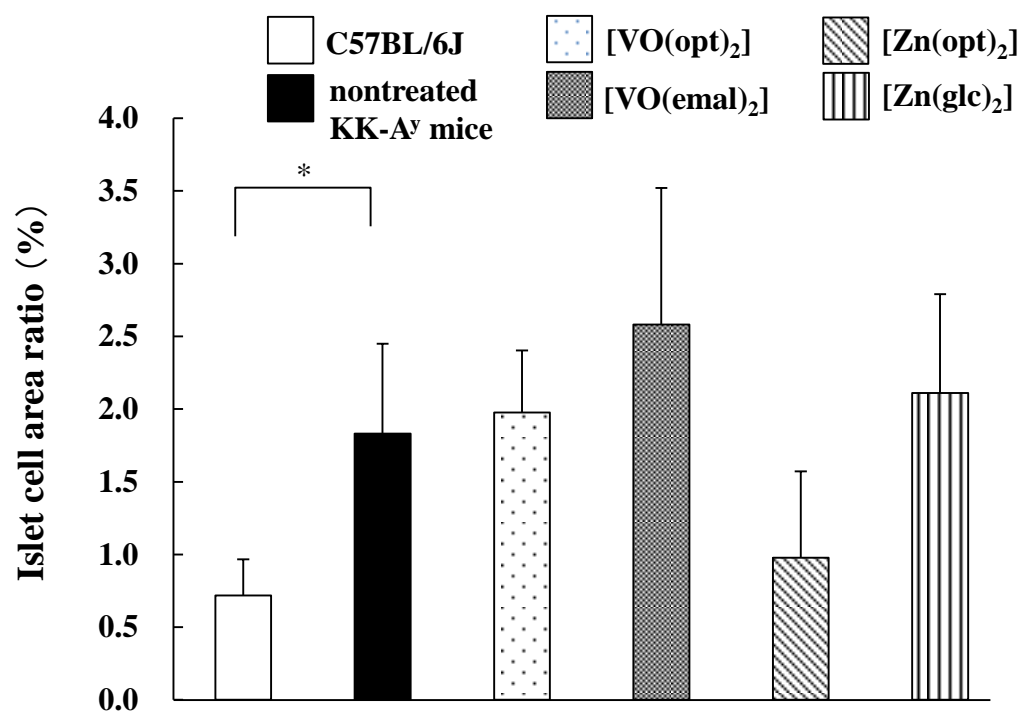
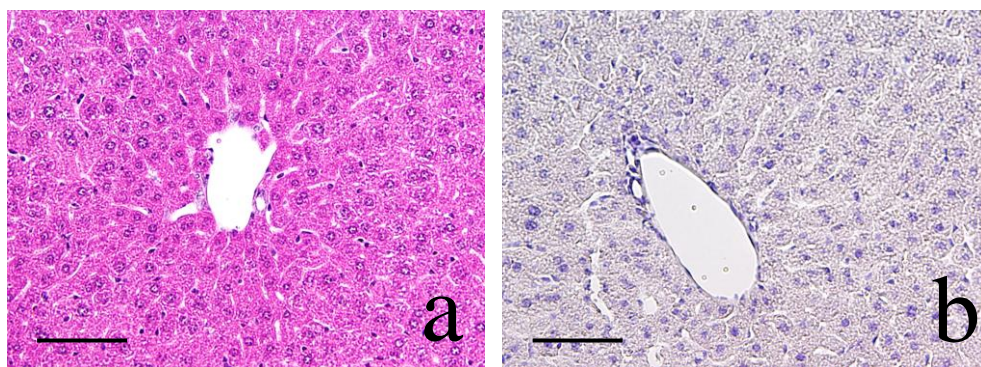
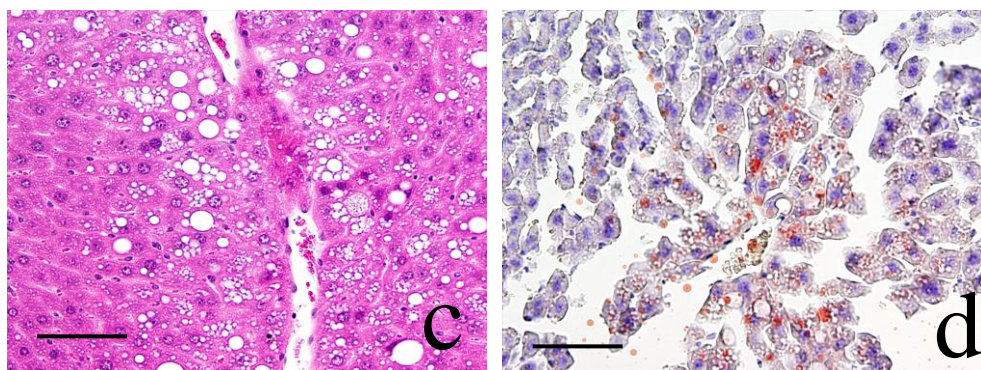


Fig. 1-11 Islet cell area ratio in pancreas of C57BL/6J mice, nontreated KK-A^y mice, and [VO(opt)₂]-, [VO(ema)₂]-, [Zn(opt)₂]-, and [Zn(glc)₂]-treated 14-week-old KK-A^y mice. Data are expressed as means \pm SD.

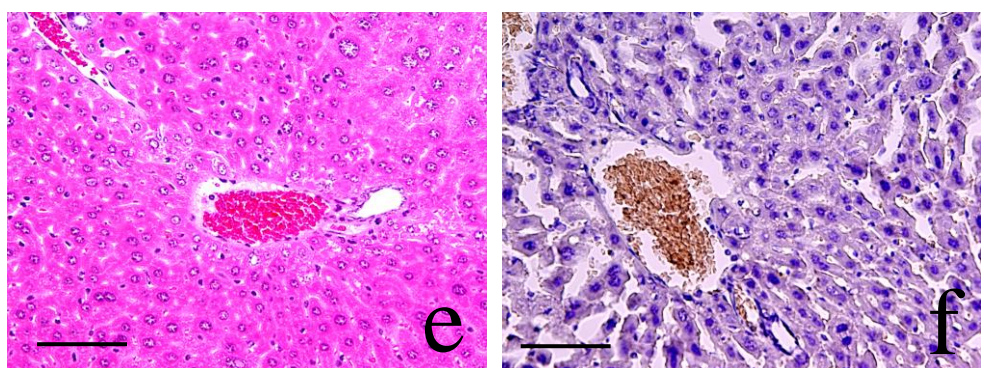
* $p < 0.05$ vs. nontreated KK-A^y mice.



a, b: C57BL/6J mice

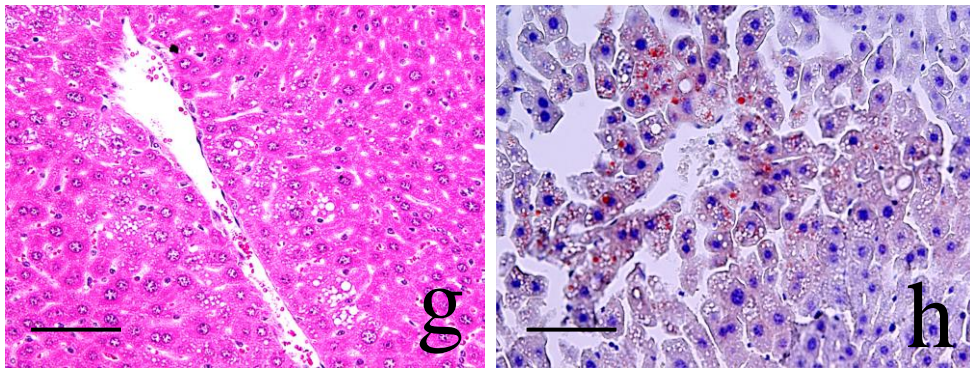


c, d : nontreated KK-A^y mice

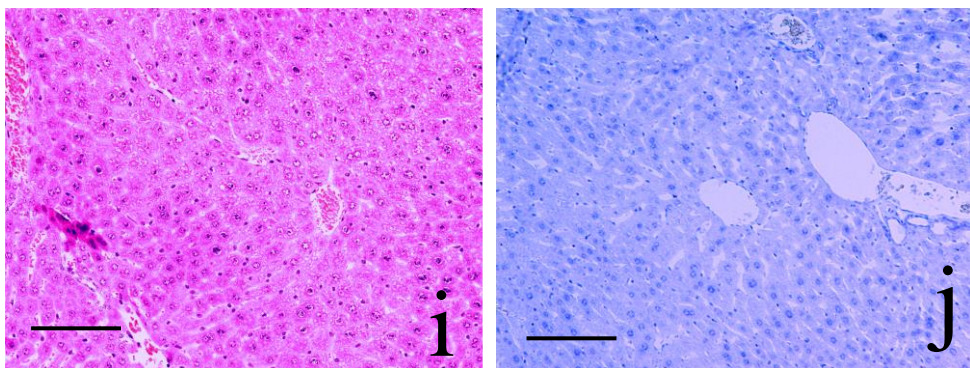


e, f : [Zn(opt)₂]- treated KK-A^y mice

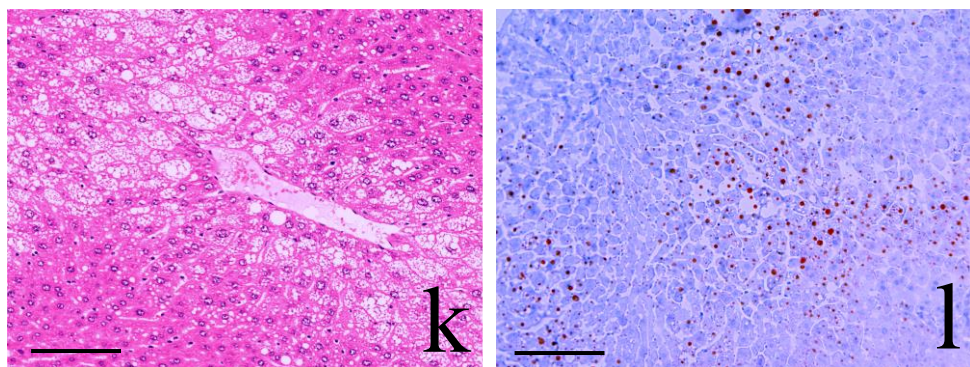
Fig. 1-12 Hepatic morphology in 14-week-old C57BL/6J mice (a), nontreated KK-A^y mice (c), [Zn(opt)₂]-treated KK-A^y mice (e), [VO(omal)₂]-treated KK-A^y mice (g), [VO(opt)₂]-treated KK-A^y mice (i) and [Zn(glc)₂]-treated KK-A^y mice (k). Oil red O-positive hepatocytes were observed in nontreated KK-A^y mice (d), [VO(omal)₂]-treated KK-A^y mice (h) and [Zn(glc)₂]-treated KK-A^y mice (l). However, oil red O-negative hepatocytes were observed in [Zn(opt)₂]-treated KK-A^y mice (f) and [VO(opt)₂]-treated KK-A^y mice (h), which was also the case in C57BL/6L mice (b). Hematoxylin-eosin staining and oil red O staining, ×200 (scale bar = 100 μm).



g, h: [VO(omal)₂]-treated KK-A^y mice



i, j : [VO(opt)₂]-treated KK-A^y mice



k, l : [Zn(glc)₂]-treated KK-A^y mice

Fig. 1-12– continued.

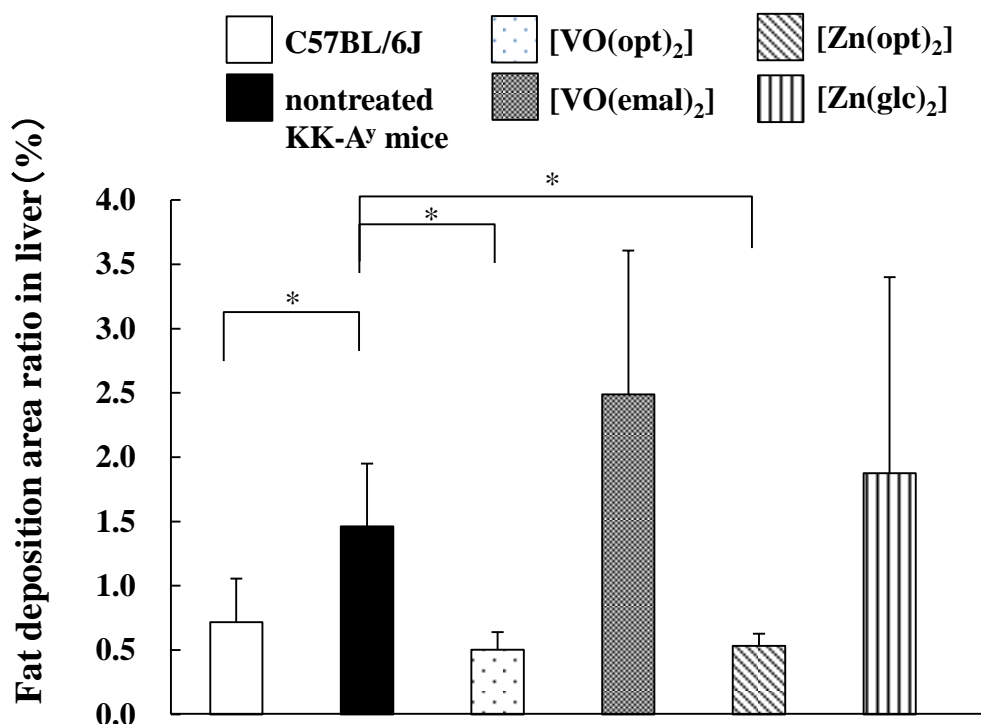


Fig. 1-13 Fat deposition area ratio in liver of C57BL/6J mice, nontreated KK-A^y mice, [VO(opt)₂]-, [VO(ema)₂]-, [Zn(opt)₂]-, and [Zn(glc)₂]-treated 14-week-old KK-A^y mice. Fat deposition indicated by hepatocellular vacuolation was observed in nontreated KK-A^y mice. Fat deposition area ratio in the liver of nontreated KK-A^y mice was significantly greater when compared with C57BL/6J mice, however, these measures were reversed in [Zn(opt)₂]- and [VO(opt)₂]-treated groups. Data are expressed as means \pm SD. * p <0.05 vs. nontreated KK-A^y mice

Table 1-6 及び Fig. 1-12 に示すように、肝臓では[Zn(opt)₂]及び[VO(opt)₂]投与群で肝細胞の空胞化が改善した。また、Fig. 1-13 に示すように肝臓切片中の脂肪滴が占める面積の割合が媒体投与の KK-A^y マウスに対して減少した。しかしながら[VO(ema)₂]及び[Zn(glc)₂]投与群では媒体投与の KK-A^y マウスと同程度であった。

腎臓では、すべての錯体投与群で媒体投与の KK-A^y マウスと比較して、形態学的な差は認められなかった。脾臓及び肝臓では病態の改善が認められたことから、4 週間以上の長期間の反復投与では腎臓での形態学的変化が確認できる可能性は否定できないが、本実験条件下では明確な改善は認められなかったと判断した。

1-3-3 考察

本実験は、新たな評価系の確立を目的として糖尿病モデル動物に亜鉛もしくは4価バナジウム錯体を投与し、糖尿病のターゲットとなる各臓器の形態学的観測を実施した。

膵臓では、[Zn(opt)₂]投与群でランゲルハンス島細胞が媒体投与の KK-A^yマウスに比べ小型化し、ランゲルハンス島細胞の面積が占める割合は対照群に対して減少傾向を示した。血漿中インスリン濃度は、対照群に比べ[Zn(opt)₂]投与群で低値が認められ、さらに[VO(opt)₂]及び[VO(ema)₂]投与群で低値傾向が認められた。抗糖尿病薬であるロシグリタゾンは、経口投与することで KK-A^yマウスのランゲルハンス島細胞の肥大を改善し、血漿中インスリン濃度も正常化すると報告されている。⁴⁰ また、ロシグリタゾンは血漿中インスリン濃度の正常化に加えてランゲルハンス島の炎症反応及び線維化を抑制することも報告されている。²² 本実験では、[Zn(opt)₂]投与群で血漿中インスリン濃度が無処置の KK-A^yマウス群に比べ低値を示したことから、[Zn(opt)₂]はインスリン抵抗性を改善し、ランゲルハンス島細胞のストレスを軽減したことで細胞の大きさが正常化したものと考えられた。よって、膵臓の形態学的改善とインスリン抵抗性の改善の両方を示すという点において、[Zn(opt)₂]はロシグリタゾンやピオグリタゾンと同様の抗糖尿病作用を示す可能性が示唆された。一方、[VO(opt)₂]及び[VO(ema)₂]は膵臓では形態学的改善を示さなかった。その理由としては、いくつかの仮説が考えられた。バナジウムは血糖降下作用を示すメカニズムとして、肝臓における糖新生の抑制が知られており、肝臓がターゲットの一つであると考えられる。^{41,42} このことから、血糖値の低下は確認できたものの、膵臓での器質的改善は本実験の条件下では認められなかった可能性が考えられた。また別の仮説として、毒性学的影響の可能性も次の通り考えられる。[VO(opt)₂]投与群でインスリンの低値が認められた2例及び[VO(ema)₂]投与群でインスリンの低値が認められた3例中1例は、第2章で記す通り、精巣の毒性変化が認められた (Fig. 2-1 及び Appendix 1)。インスリンは血糖降下作用があるホルモンであると同時に、細胞分裂を誘導する因子であることが知られている。⁴³ つまり、前述の通りターゲット臓器の差による原因が考えられると同時に、精巣をはじめとした何らかの毒性により、細胞の再生反応が全身で高まることでインスリンの消費量が増大していると示唆された。

2型糖尿病患者のランゲルハンス島はインスリン抵抗性の発症に伴ってB細胞が肥大あるいは増加し、最終的に壊死に至る。^{44,45} それゆえ上述の仮説の立証はできなかったが、本実験の結果は[Zn(opt)₂]が[VO(opt)₂]よりも糖尿病患者における膵臓の保護に有用であることを示唆すると考えられた。

肝臓では、肝細胞中の脂肪滴の減少が[Zn(opt)₂]及び[VO(opt)₂]投与群で認められ、脂肪滴が占める面積の割合は対照群に比べ減少した。抗糖尿病薬であるピオグリタゾンを投与した KK-A^yマウスでは、肝細胞の脂肪化が重篤に悪化したと報告されている。⁴⁶ これに対し、[Zn(opt)₂]及び[VO(opt)₂]投与群では肝臓の脂肪化の改善が認められたことから、[Zn(opt)₂]及び[VO(opt)₂]はピオグリタゾンのような肝毒性を示さないと考えられた。加えて、血漿中AST及びALT濃度の変化もいずれの群でも認められておらず、本実験条件下では、[Zn(opt)₂]及び[VO(opt)₂]が肝臓に傷害性の変化を与えないと考えられた。このほか、血漿中TGの濃度は錯体を投与した全ての群で変化が認められなかったが、肝臓の脂肪化が改善されていることから、これらの群では4週間以上の継続的な投与によって、血漿中TG濃度も改善される可能性が示唆された。さらに、[Zn(opt)₂]、[VO(opt)₂]及び[VO(ema)₂]投与群では対照群に比べて血漿中TCHOの低値が認められた。4価バナジウムイオンはコレステロール合成に関わる3-ヒドロキシ-3-グルタリル補酵素の阻害によってコレステロール合成を阻害し、血漿中コレステロールを低下する

ことが報告されており、また[Zn(opt)₂]も血漿中 TCHO を低下させることが報告されている。本実験の結果は[VO(opt)₂]、[VO(ema)₂]及び[Zn(opt)₂]が有するコレステロールの代謝改善能をよく反映した結果であると考えられた。^{25, 47}

膵臓の形態学的評価と血漿中インスリン濃度の測定結果、また肝臓の形態学的評価と血漿中 TCHO の測定結果をプロットした結果を Fig. 1-14 及び Fig. 1-15 に示した。Table 1-5 で示した生化学的検査結果と合わせて評価すると、本実験条件下では、血漿中インスリン濃度は[Zn(opt)₂]、[VO(opt)₂]及び[VO(ema)₂]投与群で低値あるいは低値傾向を示すが、膵臓のランゲルハンス島の形態学的改善が認められた群は[Zn(opt)₂]投与群のみであった。また血漿中 TCHO 濃度は[Zn(opt)₂]、[VO(opt)₂]及び[VO(ema)₂]投与群で低値を示したが、肝臓の形態学的改善が認められた群は[Zn(opt)₂]及び[VO(opt)₂]投与群のみであった。この結果は、従来の研究では末梢血中の各種生化学的パラメータをもって抗糖尿病活性を評価してきたが、生化学的検査に加えて形態学的評価が重要であることを示した。肝臓中の TCHO や TG を抽出して測定する方法として一般的に FOLCH 法が知られており、⁸⁶ この手法で測定を行えば形態学的変化との相関性が得られる可能性が高まることが期待される。このため、生化学検査と形態検査の関連性についてはさらなる見当が必要と考えられるが、従来行ってきた生化学検査の評価方法は血清中パラメータを測定するだけであり、本検討の結果は糖尿病治療薬の総合的な評価が従来の方法のみでは不十分であることを示唆している。

なお、ヒトでの血糖降下作用について報告がある[VO(ema)₂]は、本実験では血糖降下作用が認められなかった。本実験は同じ配位子を有する[VO(opt)₂]及び[Zn(opt)₂]との比較を主目的としたため、[VO(ema)₂]の投与量は[VO(opt)₂]と同量とし、また媒体も PEG400 とした。よって、本実験の条件下で実施した[VO(opt)₂]と同投与量では、[VO(ema)₂]は血糖降下作用を示さないと分かった。

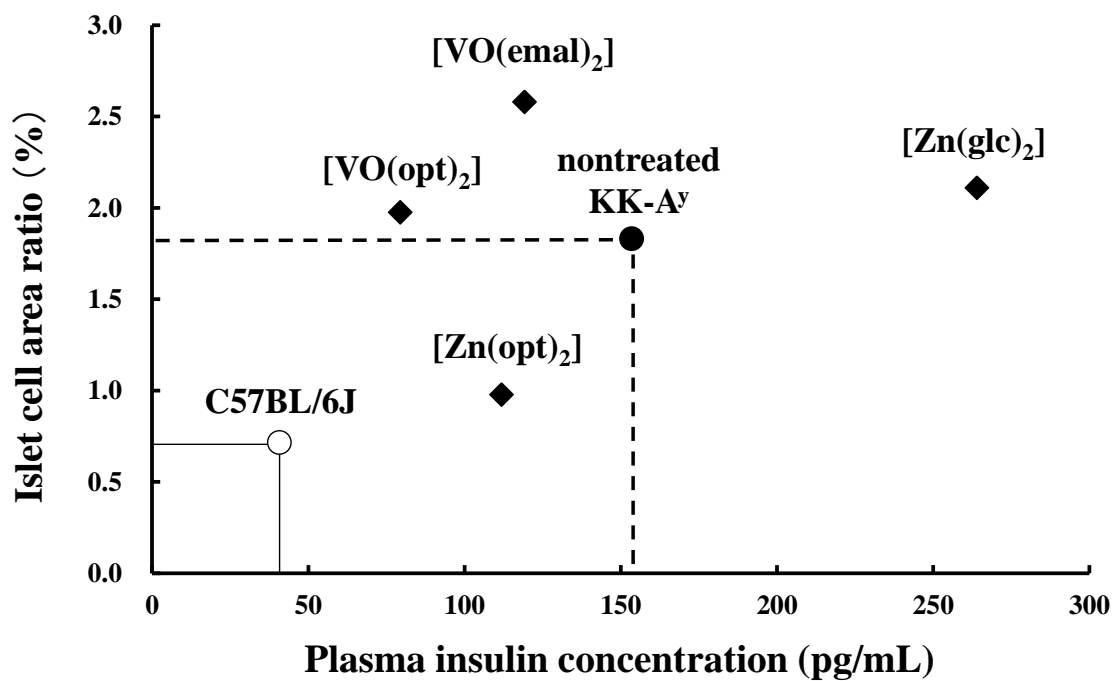


Fig. 1-14 Relationship between the biochemical and morphological analyses in the pancreas

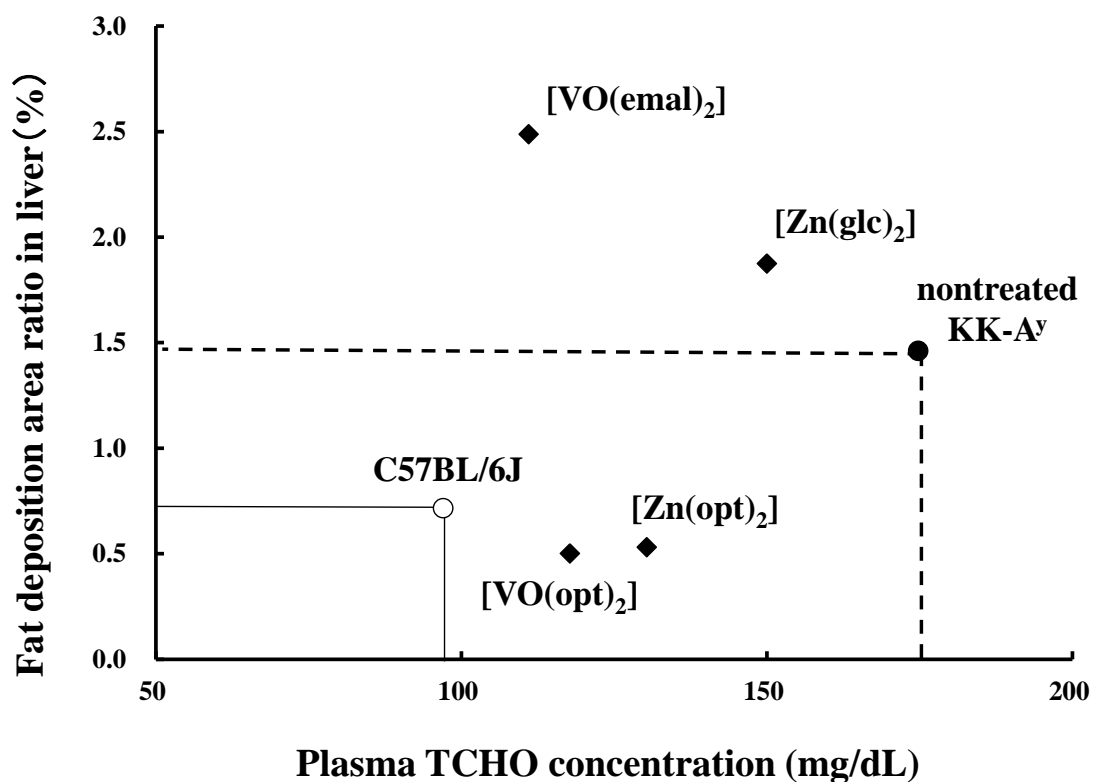


Fig. 1-15 Relationship between the biochemical and morphological analyses in the liver

1-4 小括

本実験の結果から、10週齢のKK-A^yマウスを用いた形態学的評価は妥当であると考えられた。また、[Zn(opt)₂]、[VO(opt)₂]及び[VO(ema)₂]は血糖降下作用や血漿中コレステロール濃度の減少を示し、加えて[Zn(opt)₂]及び[VO(opt)₂]は肝臓における形態学的改善効果を示した。しかしながら、膵臓における形態学的改善効果を示した錯体は[Zn(opt)₂]のみであった。これら形態学的改善効果の相違は、4価バナジウムと亜鉛の作用臓器の相違に起因する可能性や、次章で論述する毒性に起因する可能性が考えられた。このように、血漿中インスリン濃度等の生化学的パラメータの改善を同程度に示す錯体でも、各臓器での器質的改善作用には相違があることが確認できた。本実験の結果から、膵臓のランゲルハンス島の大きさや肝臓の脂質沈着の定量的解析によって、抗糖尿病作用の評価が可能かつ重要であることが明らかとなった。さらに、[Zn(opt)₂]は[VO(opt)₂]よりも優れた抗糖尿病活性を示すと判断できた。

第2章 バナジウム錯体投与群における臓器重量測定から得られた

毒性学的兆候の解析

2-1 緒言

バナジウムはホヤなどの一部の動物が有する元素であり、生体内において様々な生理活性を示す元素である。⁴⁸ バナジウムが示す毒性に関しては、5 価バナジウムイオンを投与された糖尿病モデル動物で重篤な下痢が誘発されること、また病理組織学的には、肝臓で肝細胞壊死及びミトコンドリアの空胞変性、腎臓で尿細管上皮の壊死及び小腸で粘膜上皮の壊死が誘発されることが報告されている。^{15, 49-52} これに加えて、精巣毒性として、5 価バナジウムイオンが産生する酸化ストレスに起因する精子形成異常が報告されている。⁵³ このように5 価バナジウムイオンに関しては多くの重篤な毒性が報告されている。それゆえ、薬理学的効果に関する研究は毒性が弱いとされている4 価バナジウムで多く報告されている。しかしながら、4 価バナジウムイオンである硫酸バナジウムの経口投与や飲水投与でも、動物の肝臓、腎臓、脾臓、膵臓及び骨でのバナジウムの蓄積が確認されており、各臓器への障害が懸念される。¹⁵

4 価バナジウム錯体である[VO(opt)₂]は高い抗糖尿病活性を有する錯体であり、毒性に関する報告は見当たらない。また、第1章で述べた通りAST、ALT及びBUNに変化は認められず、形態学的にも膵臓、肝臓及び腎臓では障害性の反応は確認されなかった。しかしながら、肝臓、膵臓及び腎臓への毒性は軽微と判断できたが、この他の臓器に関しては精査が不十分である。このような背景の中、第1章の検討の際に動物の臓器重量を測定した結果、[VO(opt)₂]投与群及び[VO(ema)₂]投与群の一部の個体で精巣重量の低下が認められた。5 価バナジウムイオンでは前述の通り精巣毒性が報告されているが、4 価バナジウムの精巣毒性、特に4 価バナジウム錯体が示す精巣毒性についての報告は乏しい。序章で論じたとおり、形態学的研究は薬効評価にとどまらず、臓器に生じる毒性変化を検出することができる。今回認められた精巣の変化を形態学的に精査することは、形態学的評価を本研究分野に組み込むうえで重要な検討の一つであると判断した。

本検討では、臓器重量で変化が認められた[VO(opt)₂]の4週間投与の動物に加えて、より早い段階での精巣への影響を精査する目的で2週間投与群を設定し、精巣を形態学的に評価した。さらに、精巣中のバナジウムを定量し、バナジウムの蓄積と毒性との関連性について検討した。なお、[Zn(opt)₂]及び[Zn(glc)₂]投与群の精巣は臓器重量に変化が認められなかったが、形態学的な変化がある可能性を考慮し、バナジウム錯体投与群と同様に評価した。

2-2 材料及び方法

2-2-1 試薬

[VO(opt)₂]及び[VO(ema)₂]の合成、投与及びHE染色に必要な試薬は、1-2-1-1項に記載の試薬を用いた。その他、硝酸銀、チオ硫酸ナトリウム、ケルンエヒトロート、硫酸アルミニウム、有害金属測定用の硝酸及び過酸化水素は和光純薬工業株式会社（大阪）より購入した。

2-2-2 錯体合成、動物、投与、試薬調製、解剖及び臓器重量の測定

錯体の合成手順、調製試薬、動物への投与及び解剖は第1章の1-2-1及び1-3-1項に記載の通りである。すなわち、高血糖を示す10週齢のKK-A^yマウスに、PEG400、[VO(opt)₂]、[VO(ema)₂]、[Zn(opt)₂]及び[Zn(glc)₂]を4週間毎日強制経口投与した。投与期間中、投与の前後で動物の一般状態を観察した。解剖後、動物から採取した肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺及び精巣の臓器重量を測定した。動物から採取した精巣は10%中性緩衝ホルマリン溶液に浸漬固定した。さらに、2週間投与の群を設定し、4週間投与の動物と同様に精巣の形態学的評価を実施した。動物の群構成は次の群構成に示す通りである。すべての動物実験は、KPU実験動物委員会により認可され、KPUの動物実験ガイドラインに従って行った。

群構成

群名	投与期間 (week)	動物数	投与物質	投与液量 (mL/kg)	投与用量 ($\mu\text{mol V or Zn/kg}$)
nontreated KK-A ^y mice	2	4	PEG400	10	-
[VO(opt) ₂]		3	[VO(opt) ₂]	10	30 – 59**
[VO(ema) ₂]		3	[VO(ema) ₂]	10	30 – 59**
[Zn(opt) ₂]		4	[Zn(opt) ₂]	10	11 – 76
[Zn(glc) ₂]		6	[Zn(glc) ₂]	10	11 – 76
nontreated KK-A ^y mice	4*	4	PEG400*	10	-
[VO(opt) ₂]		5	[VO(opt) ₂]	10	7 – 59**
[VO(ema) ₂]		5	[VO(ema) ₂]	10	7 – 59**
[Zn(opt) ₂]		6	[Zn(opt) ₂]	10	11 – 76
[Zn(glc) ₂]		6	[Zn(glc) ₂]	10	11 – 76

*：第1章で用いた群

**：投与期間中（4週間）の投与量として7 – 59 $\mu\text{mol V/kg}$ と表記したが、細分類すると前半の2週間は30 – 59 $\mu\text{mol V/kg}$ 、後半の2週間は低血糖を防ぐ目的で7 – 30 $\mu\text{mol V/kg}$ で投与した。すなわち、2週間投与群と4週間投与群の前半の2週間との間に投与量の差はない。

コッサ染色に用いた5%硝酸銀水溶液及び5%チオ硫酸ナトリウム水溶液は、硝酸銀またはチオ硫酸ナトリウムを10 g量り取り、純水200 mLに溶解して調製した。ケルンエヒトロート液は5%硫酸アルミニウム溶液を200 mL作製し、この溶液に0.2 gのケルンエヒトロートを加えた後約5分煮沸し、冷却後濾過して使用した。

2-2-3 標本作製

10%中性緩衝ホルマリン液で浸漬固定した精巣は左右ともに中央で半分に分割し、一方を第1章の

自動包埋装置の設定条件 1 で自動包埋装置を用いて包埋処理し、パラフィンブロックを作製した。作製したブロックはマイクローム(ライカバイオシステムズ株式会社:東京)を用いて約 3 μm に薄切し、第 1 章の HE 染色手順、次に示すコッサ染色手順で HE 染色及びコッサ染色を実施した。染色後はエンタランニューを切片上に乗せ、カバーガラスで封入した。なお、分割したもう一方の精巢は 2-2-5 項に示す通り、精巢中金属元素の定量に用いた。

コッサ染色手順

薬液	浸漬時間
キシレン	5 分
キシレン	5 分
キシレン	5 分
100%エタノール	5 分
90%エタノール	5 分
80%エタノール	5 分
70%エタノール	5 分
流水洗	5 分
超純水	すすぎ
5%硝酸銀水溶液	1 時間 (太陽光下)
超純水	すすぎ
5%チオ硫酸ナトリウム水溶液	5 分
流水洗	5 分
超純水	すすぎ
ケルンエヒトロート液	60 秒
流水洗	5 分
超純水	すすぎ
95%エタノール	5 分
95%エタノール	5 分
100%エタノール	5 分
100%エタノール	5 分
100%エタノール	5 分
キシレン	5 分
キシレン	5 分
キシレン	5 分

2-2-4 形態学的評価

作成した精巢の HE 染色及びコッサ染色標本を光学顕微鏡で観察した。精巢に認められた組織変化は 5 段階（変化なし、軽度、中等度、強度、ごく強度）で評価した。²⁹

2-2-5 精巢中金属の定量

標本作製時に分割した一方の精巢を減圧乾燥し、乾燥後トールビーカーに入れ、ホットプレート上で硝酸（有害金属測定用）及び過酸化水素を順次加え、湿式灰化した。灰化後、得られた白色の残渣を 7%硝酸（有害金属測定用）で溶解し、カルシウム、バナジウム及び鉄濃度をプラズマ発光質量分析法（ICPM8500：島津製作所、京都）により定量した。検量線（原子吸光測定用カルシウム、バナジウム及び鉄標準液：和光純薬工業株式会社）は下表のとりの濃度範囲で 5 または 6 ポイントを用いて作成し、それぞれの相関係数を有する一次直線を作成した。

検量線

	濃度範囲（ng/mL）	相関係数
カルシウム	0 - 500	0.973
バナジウム	0 - 100	0.997
鉄	0 - 500	0.999

2-2-6 統計解析

測定または計測したすべてのパラメータは平均値及び標準偏差で表した。また、精巢で認められた精細管の変性壊死、石灰化及びライディッヒ細胞の過形成の発現例数については、フィッシャーの検定法を用いて解析し、有意水準を 5%とした。

2-3 結果

2-3-1 動物の一般状態観察及び体重測定

体重測定の結果を Table 2-1 に示した。

投与期間を通じて動物の一般状態に異常はなく、体重もすべての群で同等の推移を示した。

2-3-2 臓器重量の測定

大きく変化が認められた臓器であった精巢と脾臓重量の測定結果を Table 2-2 に示した。なお、精巢の変化の影響で精巢重量の個体差が大きく、個体別の値で評価することが適切であったため、Table 2-2 は個体別の値を示した。この他に測定した臓器重量の結果は Appendix 2 及び Appendix 3 に示した。

精巢では、平均値で比較すると絶対重量及び体重に対する相対重量ともに異常は認められなかったが、個体別の値では、[VO(opt)₂]-4-1 及び 2 で明らかな低値が認められ、[VO(ema)₂]-4-2 も低値傾向にあり、これらの精巢は肉眼的にも白色化し、小型であった。

脾臓では、各錯体投与群で髄外造血の亢進を示す個体が散見された。亜鉛を投与すると、投与によって誘発される貧血に対する代償性変化として、脾臓の髄外造血が亢進することが知られている。⁵⁴ また、4 価バナジウムの投与では脾臓の巨核球の量が増加し、その大きさも増加することが報告されて

いる。⁵⁵ 本検討の結果もこれらの報告と同様の変化が起こったことで臓器重量の増加が認められたと考えられた。しかしながら、脾臓への影響は既知の事象であり、生体が不足した各種血球を補填するために起こす反応性の変化であることから、本検討での精査は実施しなかった。

この他、肺、心臓、肝臓及び腎臓では、媒体投与の **KK-A^y** マウスと比較して、特筆すべき差は認められなかった。

Table 2-1 Body weight in nontreated KK-A^y mice and KK-A^y mice treated with each complex for 4 weeks

Groups	Dosing period (weeks)	Number of animals	Weeks				
			Before administration	1	2	3	4
nontreated KK-A ^y mice	2	4	39.7 ± 2.1	42.0 ± 2.2	41.7 ± 2.5	-	-
[VO(opt) ₂]		3	40.2 ± 4.0	39.9 ± 4.0	41.7 ± 3.3	-	-
[VO(ema) ₂]		3	41.5 ± 3.4	42.4 ± 6.2	43.5 ± 5.0	-	-
[Zn(opt) ₂]		4	37.9 ± 4.9	39.8 ± 4.1	40.0 ± 4.4	-	-
[Zn(glc) ₂]		6	40.3 ± 3.8	42.2 ± 2.5	42.4 ± 2.1	-	-
nontreated KK-A ^y mice	4	4	40.3 ± 3.0	42.5 ± 4.3	42.9 ± 5.0	43.7 ± 4.7	45.1 ± 5.1
[VO(opt) ₂]		5	41.2 ± 1.0	39.0 ± 4.0	39.8 ± 3.0	41.5 ± 2.1	43.3 ± 2.3
[VO(ema) ₂]		5	40.2 ± 2.5	39.6 ± 3.7	41.2 ± 2.8	42.7 ± 1.8	43.9 ± 2.0
[Zn(opt) ₂]		6	42.2 ± 2.4	43.4 ± 2.3	43.0 ± 2.3	44.3 ± 2.1	45.9 ± 2.1
[Zn(glc) ₂]		6	41.4 ± 1.9	43.4 ± 2.6	43.6 ± 2.8	44.4 ± 3.3	45.2 ± 3.5

Table 2-2 Organ weight of testis and spleen in 4 weeks administration groups

Animal No.	Body weight (g)	Testis		Spleen	
		A	C	A	C
KK-A ^y -4-1	38.5	197.3	5.125	93.0	2.416
KK-A ^y -4-2	44.5	204.3	4.591	75.7	1.701
KK-A ^y -4-3	45.4	110.8	2.441	83.0	1.828
KK-A ^y -4-4	38.1	196.4	5.155	65.7	1.724
<hr/>					
[VO(opt) ₂]-4-1	41.5	99.8	2.405	84.7	2.041
[VO(opt) ₂]-4-2	40.1	76.6	1.910	191.0	4.763
[VO(opt) ₂]-4-3	41.9	194.7	4.647	72.5	1.730
[VO(opt) ₂]-4-4	40.8	236.5	5.797	75.7	1.855
[VO(opt) ₂]-4-5	36.5	192.9	5.285	95.4	2.614
<hr/>					
[VO(ema) ₂]-4-1	42.0	192.4	4.581	73.5	1.750
[VO(ema) ₂]-4-2	42.4	111.7	2.634	141.7	3.342
[VO(ema) ₂]-4-3	38.3	181.6	4.742	66.2	1.728
[VO(ema) ₂]-4-4	39.7	191.8	4.831	107.0	2.695
[VO(ema) ₂]-4-5	43.5	148.9	3.423	72.4	1.664

A: Absolute weight of organs (mg)

C: Comparative weight of organs (mg/g)

Table 2-2-continued

Animal No.	Body weight (g)	Testis		Spleen	
		A	C	A	C
[Zn(opt) ₂]-4-1	39.5	186.5	4.722	83.2	2.106
[Zn(opt) ₂]-4-2	40.2	207.9	5.172	137.2	3.413
[Zn(opt) ₂]-4-3	41.2	194.6	4.723	122.9	2.983
[Zn(opt) ₂]-4-4	43.9	214.0	4.875	127.8	2.911
[Zn(opt) ₂]-4-5	43.2	326.4	7.556	146.2	3.384
[Zn(opt) ₂]-4-6	44.2	151.8	3.434	162.6	3.679
[Zn(glc) ₂]-4-1	40.9	181.4	4.435	87.1	2.130
[Zn(glc) ₂]-4-2	39.1	234.9	6.008	92.6	2.368
[Zn(glc) ₂]-4-3	47.4	196.4	4.143	86.9	1.833
[Zn(glc) ₂]-4-4	43.4	197.4	4.548	162.9	3.753
[Zn(glc) ₂]-4-5	41.5	197.2	4.752	74.8	1.802
[Zn(glc) ₂]-4-6	41.6	235.1	5.651	129.1	3.103

A: Absolute weight of organs (mg)

C: Comparative weight of organs (mg/g)

2-3-3 精巢の形態学的評価

精巢の形態学的評価の結果を Table 2-3、組織像を Fig. 2-1 に示した。

精巢は、精子形成が行われる精細管とそれを取り巻く間質から構成される。精細管内は基底膜側から生殖細胞である精祖細胞、精母細胞及び精子細胞の順に内腔側に向かって配列し、またセルトリ細胞が精細管基底膜に沿って精祖細胞の合間に配列し、強固なタイトジャンクションにより血液精巢関門を形成する。間質は血管とリンパ管が走行し、その間にテストステロンを産生するライディッヒ細胞が存在する。⁵⁶

Table 2-3 に示すように、[VO(opt)₂]または[VO(ema)₂]を2週間または4週間投与した群の1～2例で精細管の鉍質沈着が認められ (Fig. 2-1b、矢印部)、鉍質沈着が認められない精細管でも精細管内の細胞の変性壊死が認められた (Fig. 2-1c、矢印部)。変性壊死が認められた精細管内ではセルトリ細胞の壊死も確認でき、血液精巢関門の破綻が確認された。また、間質ではライディッヒ細胞の過形成が認められた (Fig. 2-1d、矢印部)。精細管の鉍質沈着が認められたエリアは、2価金属イオンの沈着を証明するコッサ染色に対して陽性反応を示した (Fig. 2-1e、黒色部)。

[Zn(opt)₂]及び[Zn(glc)₂]を投与した群の精巢では、2週間及び4週間投与のいずれにおいても変化は認められなかった (Fig. 2-1f)。

2-3-4 精巢中カルシウム、鉄及びバナジウム濃度の定量

精巢中金属の定量結果を Table 2-4 に示した。また、Table 2-3 の形態学的評価の Grade をスコア化し、バナジウム濃度との相関性をプロットした結果を Fig. 2-2 に示した。

錯体を投与しなかった群とバナジウム錯体を投与した群のうち精巢に変化が認められなかった動物の精巢中金属量については、カルシウム及び鉄濃度は同程度、バナジウムはどちらの群も定量下限未満 (7 ng/mL) であった。精巢に鉍質沈着及び変性壊死が認められた精巢では、カルシウム及び鉄濃度は明らかに増加しており、バナジウムも定量下限以上の濃度が確認された。形態学的変化と精巢中バナジウム濃度の相関係数は 0.98 となり、高い相関性を示した。なお、上述の定量下限未満とは、測定に供した臓器中の総バナジウム量が作成した検量線の検出限界以下であったことを示すものであり、バナジウムが精巢に全く分布しなかったことを示すものではない。

Table 2-3 Histological changes in the testis after administration of complexes

Groups	Dosing periods (weeks)	Number of animals	Blood glucose level (mg/dL)	Histological findings											
				Seminiferous tubule										Leydig cell	
				Degeneration/Necrosis					Mineralization					hyperplasia	
				-	1+	2+	3+	4+	-	1+	2+	3+	4+	-	+
nontreated	2	4	421 ± 99	4	0	0	0	0	4	0	0	0	0	4	0
KK-A ^y mice	4	4	481 ± 99	4	0	0	0	0	4	0	0	0	0	4	0
[VO(opt) ₂]	2	3	364 ± 136	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	2
	4	5	237 ± 61*	4	0	0	0	1	3	0	0	1	1	3	2
[VO(ema) ₂]	2	3	457 ± 57	2	1	0	0	0	3	0	0	0	0	3	0
	4	5	332 ± 91	5	0	0	0	0	4	0	0	0	1	4	1
[Zn(opt) ₂]	4	6	454 ± 166	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0
[Zn(glc) ₂]	4	6	360 ± 104	6	0	0	0	0	6	0	0	0	0	6	0

Grading scores: -, none; +, slight; ++, moderate; +++, strong; +++++, sever

**p*<0.05 vs. nontreated KK-A^y mice

Table 2-4 Measurement of element concentrations in the testes after 2 or 4 weeks of repeated administration

Groups	Mineralization in the testes	Number of animals	Dosing period (weeks)	Vanadium (µg/g dry weight)	Calcium (µg/g dry weight)			Iron (µg/g dry weight)		
nontreated	-	4	2	B.L.Q.	472	±	775	121	±	20
KK-A ^y mice	-	4	4	B.L.Q.	322	±	136	125	±	24
[VO(opt) ₂]	-	1	2	B.L.Q.	371			133		
	+	2		33	106000			573		
	-	3	4	B.L.Q.	237	±	207	113	±	24
	+	2		36	209000			552		
[VO(ema) ₂]	-	3	2	B.L.Q.	387	±	344	122	±	22
	+	0		-	-			-		
	-	4	4	-	415	±	278	109	±	3
	+	1		22	188000			557		

B.L.Q.: Below the lower limit of quantification

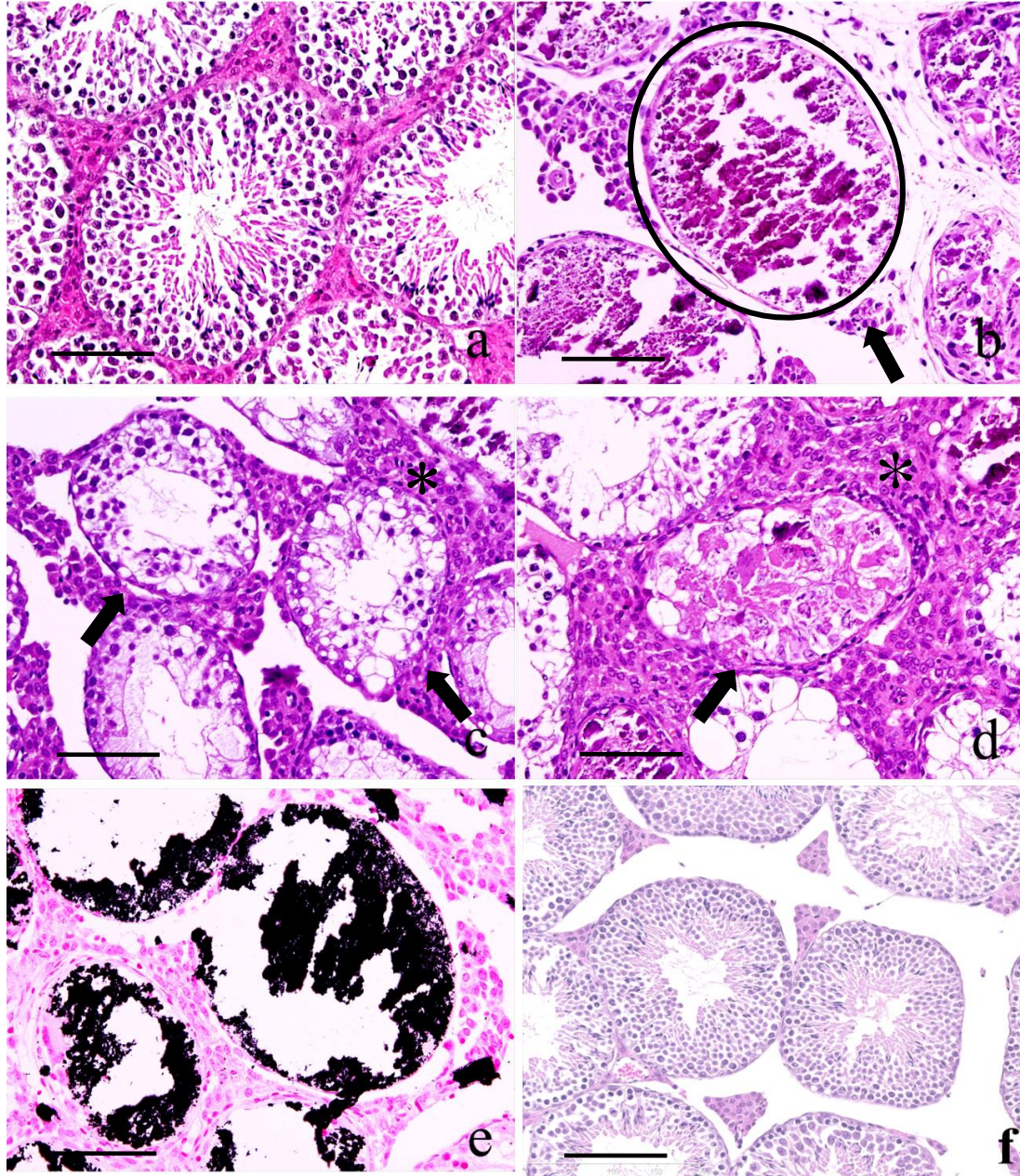


Fig. 2-1 Testicular morphology in KK-A^y mice exposed to [VO(opt)₂] or [Zn(opt)₂] for 4 weeks. (a) No abnormal changes in control animals. (b) Mineralization of the seminiferous tubules (arrow) in KK-A^y mice exposed to [VO(opt)₂]. (c) Vacuolation of Sertoli cells and seminiferous epithelium in the seminiferous tubules (arrows) and Leydig cell hyperplasia (*) in KK-A^y mice exposed to [VO(opt)₂]. (d) Seminiferous tubular necrosis (arrow) and Leydig cell hyperplasia (*) in KK-A^y mice exposed to [VO(opt)₂]. Hematoxylin and eosin staining, x 200. (e) von Kossa staining in the same area as (b). (f) No abnormal changes in KK-A^y mice exposed to [Zn(opt)₂]. Hematoxylin and eosin staining, x 200. (scale bar = 100 μm)

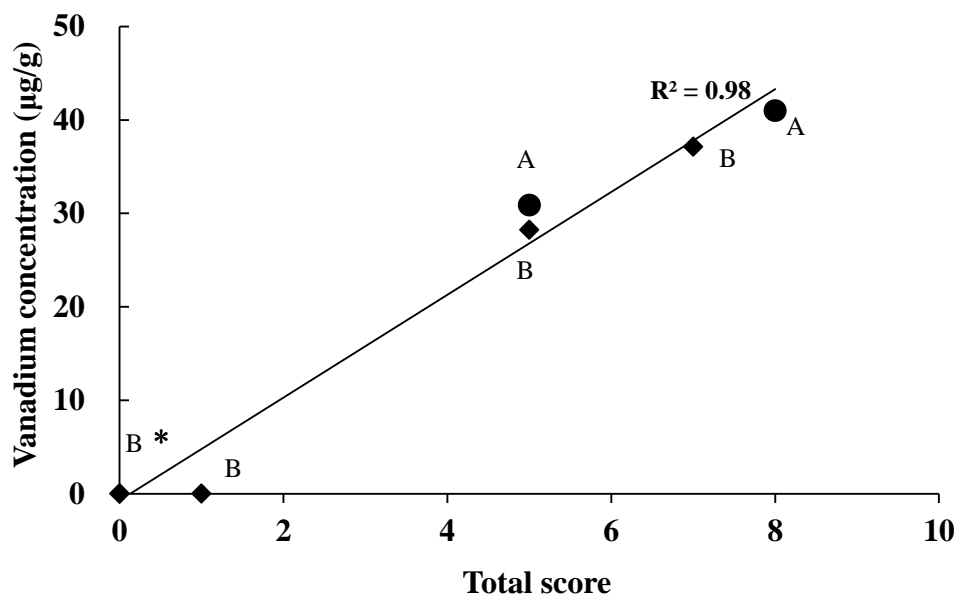


Fig. 2-2 Correlations between individual histopathological changes grade and vanadium concentration in the testis at [VO(opt)₂]-treated group. Total score means the degeneration/necrosis, mineralization or Leydig cell hyperplasia grade as + : 1, ++ : 2, +++ : 3, and ++++ : 4 correlated with Table 2-3 (*: 3 animals with no abnormal changes). A: 4 week administration group; B: 2 weeks administration group.

2-4 考察

本検討では、[VO(opt)₂]及び[VO(ema)₂]の投与により KK-A^yマウスの精巣に誘発された毒性、すなわち精細管内の上皮細胞の変性壊死、鉍質沈着及びライディッヒ細胞の過形成が検出された。これまで報告されているバナジウム投与に起因する形態学的評価では、肝細胞、腎臓尿管上皮細胞、小腸粘膜上皮細胞の壊死及び精巣での精子形成異常が報告されているが、本検討で認められたような精巣の鉍質沈着のような重篤な変化は報告されていない。^{15, 49, 51-53} この精巣の変化は、これまでの抗糖尿病作用を評価した動物実験においても検出されておらず、今回初めて明らかとなった変化であった。さらに、精子への分化の起点となる精祖細胞も壊死していたことから、不可逆的な毒性変化であった。

鉍質沈着が認められた精巣中のバナジウム濃度は、鉍質沈着が認められていない精巣に比べて高値を示し、カルシウム及び鉄濃度も高値であった。精巣は、梗塞などでセルトリ細胞を含む精上皮細胞が凝固壊死に陥った場合、精細管内の異物除去系が働かず、壊死に続発して異栄養性石灰沈着が起こることが知られている。⁵⁷ 本検討では梗塞巣は明らかではなかったが、精細管の変性壊死に続発して起こった石灰沈着であると考えられる。すなわち、バナジウムが精細管を傷害した後、精細管内では異物除去系が働かなかったと考えられ、これによりカルシウムや鉄と同様にバナジウムが蓄積したものと考えられる。それゆえ、鉍質沈着が認められなかった精巣中ではバナジウムが検出されなかったものと考えられた。精巣中に認められた変性壊死、鉍質沈着及びライディッヒ細胞の過形成の組織変化のグレードを軽度：1点、中等度：2点、強度：3点、ごく強度：4点として計数し、精巣中バナジウム濃度との関連性を Fig. 2-2 に示した。その結果、相関係数は 0.98 となり、非常に高い相関性が認められた。健常動物のマウス及びラットでは、自然発生的に精巣の鉍質沈着が認められることはあるが、自然発生で認められる鉍質沈着はほとんどが局所的な変化であり、本検討のように精巣全域にわ

たって認められることはない。また、KK-A^yマウスは糖尿病モデル動物であり、肝臓や脾臓では糖尿病状態を表す組織病変は認められているが、精巣の鉍質沈着は知られていない。金属元素が誘発する精巣毒性としては、カドミウムによる毒性がよく知られている。カドミウムは精巣の血管内皮細胞を傷害することで、その血管を通じて栄養を供給されている細胞に壊死性の変化を誘発する。⁵⁸ しかしながら、カドミウムは血管障害から精巣毒性を誘発するため、血管に栄養を供給されるライディッヒ細胞も壊死させ、また今回の病変とは異なり血管周囲に病変が限局的に分布するとされている。よって、今回の病変の発現機序と、カドミウムの作用機序とは異なると考えられた。

Table 2-5 Total administration amount for 2 or 4 weeks

Complexes	Dosing period (weeks)	Total administration vanadium amount (mg/kg of body weight)
[VO(opt) ₂]	2	22.3 ± 0.4
[VO(ema) ₂]		22.5 ± 0.0
[VO(opt) ₂]	4	30.6 ± 3.2
[VO(ema) ₂]		37.5 ± 2.4

Table 2-5 に各バナジウム錯体の投与期間中におけるバナジウムの総投与量を示した。本検討で認められた精巣の変化は、2 週間投与群と 4 週間投与群のいずれにおいても認められているが、期間に応じた発現例数の増加や、程度の増強は認められていない。また、Table 2-5 に示した総投与量と Table 2-3 に示した組織変化の発現例数または強度との間にも明確な相関性は認められない。この理由については次のように考察した。本検討では、第 1 章で記した通り、動物が正常血糖値を示すように投与量を増減させながら投与した。その結果、投与開始から 2 週間までの投与用量は 30 - 59 $\mu\text{mol V/kg}$ であったが、2 週間以降は 7 - 30 $\mu\text{mol V/kg}$ となった。このことから、投与開始後 2 週間までの間、すなわち投与開始初期は高濃度の錯体を投与したことになり、この影響で不可逆的で重篤な組織変性が精巣で起こったと考えられた。さらにこの変化は投与 2 週間で完結し、投与 4 週間後まで進行または回復しなかったために、2 週間投与群と比較して 4 週間投与群で発生例数及び程度に差がなかったと考えられた。

ライディッヒ細胞の過形成は、下垂体から分泌される黄体ホルモンの血中濃度の上昇に伴ってテストステロンを産生するために誘発される場合と、精上皮細胞が精子形成の障害を受けた際にパラクライン因子を放出することによって誘発される場合とが知られている。⁵⁹ バナジウム投与によるライディッヒ細胞への影響として、5 価バナジウムイオンの塩である NaVO₃ の投与により血漿中のテストステロン濃度が減少することが報告されているが、ライディッヒ細胞の過形成についての記載はなく、本検討の結果とは一致しない。⁵³ これらのことから、本検討で認められたライディッヒ細胞の過形成は、4 価バナジウム錯体の投与により精上皮細胞が障害され、これによる二次的な変化として誘発されたものと考えられた。

ここまで論じたような精巣の毒性が 5 価バナジウムイオン (NaVO₃) では検出されなかったことについては、薬物動態学的に 4 価バナジウム錯体の方が精巣へのバナジウムの分布が多かった、あるいは消化管からの吸収量が多かった可能性が考えられたが、NaVO₃ 投与のデータは取得できておらず、

本検討結果からは明らかではなかった。また、精巣毒性を示す個体と示さない個体が明確であり、境界となる病変を示す個体が認められなかった。バナジウムに対する感受性の個体差が考えられたが、この原因についても本検討結果からは明らかではなかった。

なお、亜鉛錯体投与群では精巣に変化は認められなかった。第1章で示した通り、 $[\text{Zn}(\text{opt})_2]$ はバナジウム錯体投与群と同等に血糖降下作用を示しているが、精巣に影響は与えなかったと判断した。

以上のことから、 $[\text{VO}(\text{opt})_2]$ または $[\text{VO}(\text{emal})_2]$ の経口投与により、バナジウムが精細管に直接障害を与え、精細管の変性壊死及び鉍質沈着を誘発し、鉍質沈着が起こる際にバナジウムも鉄やカルシウムと同様に蓄積するものと考えられた。また、 $[\text{VO}(\text{opt})_2]$ 及び $[\text{VO}(\text{emal})_2]$ の両錯体で認められたことから、他の4価バナジウム錯体の投与でも誘発される可能性が考えられた。しかしながら、今回見られた変化はKK-A^yマウスに認められた変化であり、背景データが豊富な健常動物に投与した際に同じ変化が起こるとは限らず、本系統特有の変化である可能性を否定できない。よって、本検討で認められた精巣毒性が、4価バナジウム錯体の特異的毒性であると断定するためには、さらなる検討が必要と考えられた。

2-5 小括

$[\text{VO}(\text{opt})_2]$ 及び $[\text{VO}(\text{emal})_2]$ の経口投与により、KK-A^yマウスの精巣に重篤な毒性変化が出ることが明らかとなった。また、他の4価バナジウム錯体でも同様の毒性が誘発される可能性もある。今回検出された精巣毒性はKK-A^yマウス特有の変化である可能性を否定できないが、不可逆的な重篤な変化であることから、4価バナジウム錯体の医薬品としてのポテンシャルを評価する上で確認すべき重要な毒性の一つと考えられた。特に、これまで薬効用量、すなわち抗糖尿病活性を発揮し、その他の重篤な毒性が発現しない用量として検討されてきた投与量で重篤な精巣毒性が検出されたことは、重大な問題である。よって、今後の4価バナジウム錯体の抗糖尿病活性に関する研究を進めるうえで、当該毒性は着目すべき重要な問題の一つと考えられた。

第3章 亜鉛及びバナジウムを含むヘテロ複核錯体の抗糖尿病作用に関する検討

3-1 緒言

序章でも論じた通り、亜鉛、バナジウム、銅、コバルト及びマグネシウム等の金属元素と糖尿病との関連については、多くの研究者によって検討されてきた。これらの研究報告の中には単核錯体のみではなく、複核錯体に関する報告もある。ホモ複核 4 価バナジウム錯体である $[(VO)_2(tart)_2]$ は *in vitro* および *in vivo* でインスリン様作用ならびに血糖降下作用を示すことが報告されている。^{60, 61} この他にも血糖降下作用を示す複核 4 価バナジウム錯体は報告されているが、⁶² 一つの化学構造内に亜鉛と 4 価バナジウムを共に含むヘテロ複核錯体に関する報告はない。第 1 章で述べた通り、亜鉛と 4 価バナジウムが示す抗糖尿病作用はそれぞれ作用機序が異なると考えられることから、亜鉛と 4 価バナジウムを同時に投与することで、低用量で高活性を示す可能性が期待される。また、4 価バナジウム錯体は第 2 章で述べた通りの毒性を示すが、一方で 5 価バナジウムイオンが示す酸化ストレスによる精巢の障害（精子形成の阻害）は、亜鉛を同時に投与することで軽減されとの報告がある。²⁴ 亜鉛と 4 価バナジウムの錯体 2 種類を同時に投与するという手法であれば、それぞれの錯体が分布する臓器に相違が出る可能性が高いと考えられるが、ヘテロ複核錯体であれば亜鉛と 4 価バナジウムが同じ臓器に分布すること、すなわち時空間的に亜鉛と 4 価バナジウムが共存することが期待できるため、高活性に加えて 4 価バナジウムに起因する毒性の軽減も期待できると考えられた。²⁴

亜鉛と 4 価バナジウムのヘテロ複核錯体である $[VOZnfsaen]$ は、複核錯体の配位子として代表的な H_4fsaen が亜鉛及び 4 価バナジウムと配位子：亜鉛：4 価バナジウム=1:1:1 で配位する錯体であり、亜鉛は O_4 配位形式、バナジウムは N_2O_2 配位形式をとる。⁶³ $[VOZnfsaen]$ の合成方法は既に報告されており、構造については、同じ配位子で他の金属を用いたヘテロ複核錯体の構造式から、Fig. 3-1 に示す構造が推定されている。⁶⁴ しかしながら、これら錯体に関する報告は 1980 年代のものが多く、構造式を確定するための物性データは元素分析及び IR スペクトルのみであり、十分とはいえない。そこで、本実験では $[VOZnfsaen]$ を既報告に従って合成し、その各物性データを取得することにより、推定されている構造を明確なものとした後、KK-A^yマウスを用いて抗糖尿病活性を評価した。また、 $[VOZnfsaen]$ と比較する目的で、 H_4fsaen を配位子とする $[VOH_2fsaen]$ 、 $[ZnH_2fsaen]$ 、 $[(VO)_2fsaen]$ を合成し、*in vitro*のインスリン様活性を評価した。動物実験の評価方法は、従来の生化学的検査方法に加えて、第 1 章及び第 2 章で論じたとおり肝臓及び精巢の形態学的評価を行った。

3-2 材料及び方法

3-2-1 試薬

塩化亜鉛、サリチル酸、エチレンジアミン、ヘキサメチレンテトラミン、塩酸、水酸化ナトリウム、ベンゼン、アンモニア水、過酸化水素、塩化バリウム及び NEFA-C テストワコーは和光純薬工業株式会社（大阪）より購入し、コラゲナーゼ（type II）、(±)-エピネフリン（アドレナリン）、及び牛血清アルブミン（BSA:fraction V）はシグマ社（セントルイス、アメリカ合衆国）より購入した。その他の試薬は、第 1 章及び第 2 章に記載した試薬を用いた。

3-2-2 動物

7 週齢の Wister 系ラット（雄性）は清水実験材料株式会社（京都）から購入した。5 週齢の KK-A^y マウス（雄性）は日本クレア株式会社（東京）から購入した。本実験の期間中、すべての動物は京都薬科大学（KPU）中央動物研究センターで 12 時間周期の照明調節の下、固形飼料（MF、オリエンタル酵母工業株式会社：東京）および水道水を自由摂取させ飼育した。すべてのマウスはプラスチック製飼育ケージで個別に飼育した。すべての動物実験は、KPU 実験動物委員会により認可され、KPU の動物実験ガイドラインに従って行った。

3-2-3 合成

3-2-3-1 3-fsa の合成

H₄fsaen の合成に必要な 3-fsa を文献記載の方法で次のように合成した。⁶⁵ サリチル酸とヘキサメチレンテトラミンを水に溶解して 16 時間加熱還流した後、塩酸を混合して黄色の沈殿を得た。沈殿を減圧乾燥後、ベンゼン中で加熱しながら攪拌した。残渣をろ過した後、ベンゼンを全濃縮して淡黄色の沈殿を得た。この沈殿をアンモニア水に溶解し、50℃で加熱しながら 10%塩化バリウム水溶液と水酸化ナトリウム水溶液を加えて黄色の沈殿を得た。この沈殿を塩酸で洗浄し、残渣を熱水に溶解して再結晶化させ、淡茶褐色の針状結晶として 3-fsa を得た。

3-2-3-2 錯体の合成

[VOH₂fsaen]、[ZnH₂fsaen]及び[VOZnfsaen]は文献記載の方法で次のように合成した。⁶³ 炭酸ナトリウム水溶液に溶解した 3-fsa と適量のエチレンジアミンを混合し、水溶液中で H₄fsaen を生成させ、VOSO₄ もしくは ZnSO₄ を配位子：金属＝1:1 の割合で攪拌し、濾過して得られた茶褐色または黄白色の沈殿物を減圧乾燥して[VOH₂fsaen]もしくは[ZnH₂fsaen]を得た。[VOZnfsaen]は合成した[VOH₂fsaen]を水酸化リチウム／メタノール溶液に溶解し、VOH₂fsaen：ZnCl₂＝1:1 の割合で攪拌し、淡青色の沈殿物を減圧乾燥して[VOZnfsaen]を得た。[(VO)₂fsaen]は[VOH₂fsaen]と同様の手順で VOSO₄ を配位子：金属＝1:3.5 の割合で攪拌し、吸引濾過して得られた緑色の沈殿物を減圧乾燥して得た。

3-2-4 錯体の物性評価

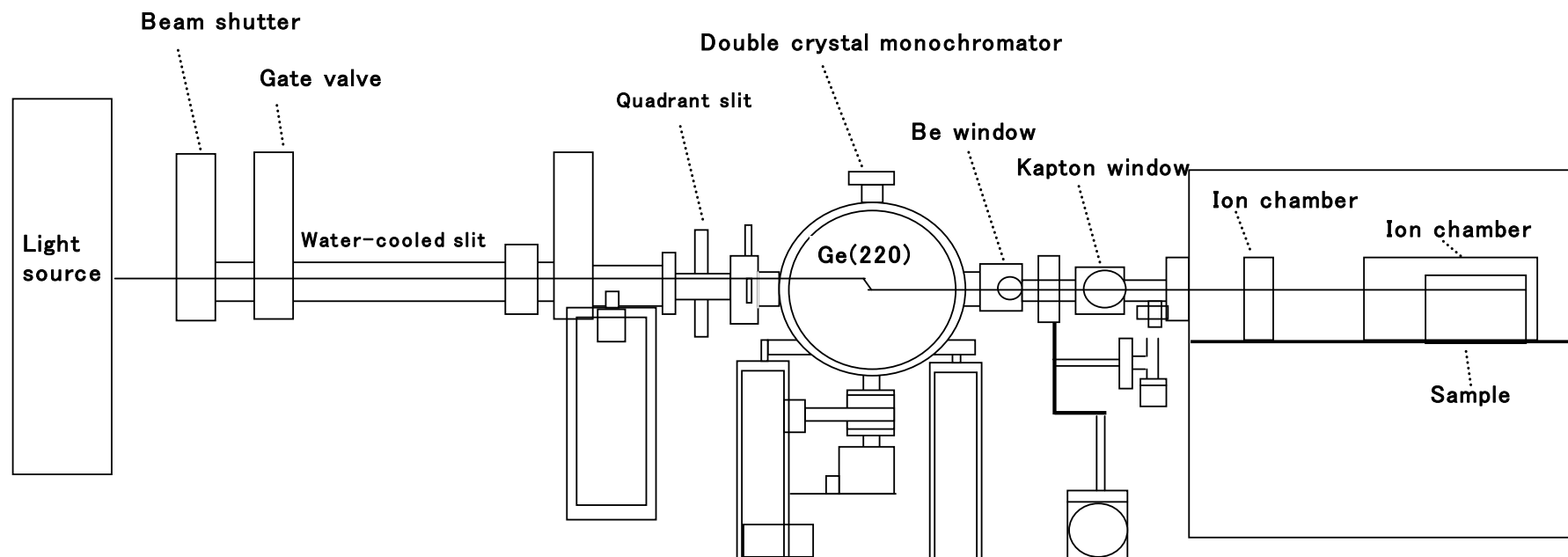
合成した錯体は元素分析、赤外吸収スペクトル（IR スペクトル）、質量分析（MS）、高分解能質量分析（HRMS）、電子スピン共鳴スペクトル（ESR スペクト）及び磁化率を測定して構造を推定した。IR

スペクトルは Shimadzu FTIR-8100A (株式会社 島津製作所：京都) を用いて KBr 錠剤法により測定した。ESR スペクトルは JEOL JES-RE1X spectrometer (日本電子株式会社：東京) を用いて測定した。ESR スペクトルの測定条件は、マイクロ波出力 5 mW、変調周波数 100 kHz、変調磁場巾 0.63 mT、応答時間 0.03 秒、掃引磁場 340 ± 100 mT 及び掃引時間 8 分であり、磁場の補正には酸化マグネシウム粉末中に焼結したマンガン(II)イオンに基づくスピン結合定数 (8.69 mT) を用いた。g 値の標準物質としてリチウム-テトラシアノキノジメタンラジカル (Li-TCNQ、 $g=2.00252$) を用いた。ESR スペクトルは室温および液体窒素温度 (77 K) で測定した。磁化率は磁気天秤 MSB-MKI (シェアウッドサイエンティフィック社：ケンブリッジ、イギリス) を用いて室温で測定した。磁気モーメント μ_{eff} は磁化率より算出した。質量分析および元素分析は KPU 共同機器利用センターのスタッフにより測定された。質量分析は JMS-GCmate (日本電子株式会社：東京) を用い EI (+) イオン化法で測定し、また HRMS (JEOL JMS-SX 102AQQ: 日本電子株式会社) を用いた分析にはマトリックスとしてチオグリセロールまたは 3-ニトロベンジルアルコール (3-NOBA) を用いて FAB (+) イオン化法で測定した。元素分析はパーキン・エルマー-2400 型元素分析計 (株式会社パーキン・エルマー：アメリカ) を用いて常温で測定した。

金属の元素分析は、錯体をメスフラスコに量りとり、硝酸及び過酸化水素を加えてホットプレート上で加熱しながら灰化し、得られた白色残渣を 7% 硝酸 (有害金属測定用) で溶解し、ICP-MS (ICPM-8500: 株式会社 島津製作所：京都) を用いてバナジウムおよび亜鉛を定量した。検量線 (原子吸光測定用バナジウム標準液、亜鉛標準液：和光純薬工業株式会社：大阪) は、バナジウムでは 0-500 ppb の濃度範囲で作製し、相関係数は 0.998 の一次直線であった。また、亜鉛では 0-1000 ppb の濃度範囲で作製し、相関係数は 0.998 の一次直線であった。また、内部標準試料として全てのサンプルにガリウム (原子吸光測定用ガリウム標準液：和光純薬工業株式会社：大阪) を 200 ppb となるように加え、イオン化率の指標とした。

3-2-5 XAFS を用いた構造解析⁶⁶

解析手法の詳細は Appendix 4 に記した。[VOZnfsaen] は 4 価バナジウムと亜鉛を含むヘテロ複核錯体であり、後述するように ESR スペクトルから 4 価バナジウムが N_2O_2 配位を取ることは確認できたが、亜鉛が O_4 配位形式をとるといふ科学的根拠が乏しい。そこで次の通り XAFS スペクトルを測定し、EXAFS 領域から 4 価バナジウム及び亜鉛の配位数と結合距離を推定することで、4 価バナジウム及び亜鉛の配位状態を確認した。XAFS スペクトル測定は立命館大学 SR センター Beam Line 4 (BL-4) で行った。次ページに BL-4 の概略図を示す。Ge (220) 二結晶モノクロメーターで単色化を行い、4 価バナジウム K-edge の測定では入射 X 線強度の検出に N_2 を充填した全長 5 cm のイオンチェンバーを用い、透過 X 線の検出には N_2 85% : Ar 15% 混合ガスを



立命館大学 SR センターBL4 の模式図

充填した全長 30 cm のイオンチェンバーを用いた。亜鉛 K-edge の測定では入射及び透過 X 線の検出にそれぞれ N₂ 50% : Ar 50% 混合ガスを充填した 5 及び 30 cm のイオンチェンバーを用いた。

正しいパラメータを求めるために、FEFF 8.20 及び FEFFIT のプログラムを用いて非線形最小二乗計算を行い、*r* 空間で理論値と測定値のフィッティングを行った。⁶⁷ なお、理論値の算出には 4 価バナジウムでは[VOsalen] の X 線結晶構造解析法の結果から得られている座標を、亜鉛では[Zn(OH₂)₆]²⁺を含む水溶液を標準試料として *N* を固定した。⁶⁸⁻⁷¹

3-2-6 錯体の分配係数の測定

分配係数 ($\log P$) は化合物を Hepes buffer (pH 7.4) および octanol を 1:1 で混合した媒体に溶解し、室温で 12 時間激しく攪拌した後、分液ロートを用いて Hepes buffer 層と octanol 層を分離し、octanol 層または Hepes buffer 層の紫外吸収スペクトル (Agilent-8453 spectrometer、Agilent 社：東京) を測定して、化合物の濃度を測定することにより求めた。計算には $\log P = \log (C_{\text{octanol}}/C_{\text{hepes}})$ を用いた。ここで C_{octanol} は octanol 層における化合物の濃度、 C_{hepes} は hepes 層における化合物の濃度である。

3-2-7 インスリン様作用の評価

合成した錯体の FFA 放出抑制活性は中井らの方法に従い測定した。⁷² 7-8 週齢の Wistar 系雄性ラットを麻酔下で放血致死させた後、副腎丸周辺の脂肪組織を摘出し、コラゲナーゼ含有クレブスリンゲルビカルボネート (KRB) -BSA 緩衝液 (120 mM NaCl, 1.27 mM CaCl₂, 1.20 mM MgSO₄, 4.75 mM KCl, 1.20 mM KH₂PO₄, 24 mM NaHCO₃, 2% BSA, pH 7.4) 中で 1 時間、37°C でインキュベートし、脂肪細胞を分散させた。分散した脂肪細胞を無菌ガーゼに通し、KRB-BSA 緩衝液で 3 回洗浄した後、細胞数が 1-1.5 × 10⁶ cell/ml となるように分注した。次に、全ての細胞液に最終濃度が 5 mM となるようにグルコースを加えた後、錯体を加え、37°C で 30 分間プレインキュベートした。4 価バナジウムの酸化による影響を除外するために、アスコルビン酸 (最終濃度 500 μM) を DMSO または水に溶解し、細胞液に加えた。また、同条件下で比較するため全ての細胞液が 2% DMSO となるようにした。プレインキュベート後、エピネフリンを最終濃度が 10 μM となるように加え、37°C で 3 時間インキュベートした。その後、3000 rpm、4°C で 10 分間遠心分離し、細胞下層の KRB-BSA 緩衝液中の FFA 濃度を NEFA-C テストワコーを用いて測定した。錯体の FFA 放出抑制活性は、エピネフリンのみを作用させた脂肪細胞から放出される FFA 量を 100% として、それを 50% まで抑制する錯体の濃度を IC₅₀ 値として求めた。

3-2-8 各錯体の投与

高血糖 (400~600 mg/dL) を示す 10 週齢の KK-A^y マウスに対し、PEG400 に懸濁した[VOZnfsaen] を 1 日 1 回ゾンデを用いて 14 日間毎日強制経口投与した。投与量は毎日体重を測定し、体重に基づいて算出し、10 mL/kg body weight で投与した。投与量は、バナジウムおよび亜鉛の合計量として 65 - 196 μmol/kg body weight とした。

3-2-9 生化学検査

投与期間中、2 日に 1 回の頻度でグルコカード (アークレイ株式会社：京都) を用いて尾静脈血で随時血糖値を測定した。

投与期間終了後、エーテル麻酔下でヘパリン処理した器具を用いて腹部大静脈から血液を採取し、5000 rpm、4℃で10分間遠心分離して血漿を得た。得られた血漿中のAST、ALT及びTCHOを富士ドライケム（富士フイルムメディカル株式会社：東京）を用いて測定した。また血漿中インスリン濃度はレビス®インスリン-ラットT（株式会社シバヤギ：群馬）を用いて定量した。

3-2-10 病理組織学的検査

第1章及び第2章に記載した内容と同様の手順で肝臓及び精巣を採取し、病理組織標本を作製し、形態学的評価を実施した。

3-2-11 臓器中金属の定量

肝臓及び標本作製時に分割した一方の精巣を減圧乾燥し、乾燥後トールビーカーに入れ、ホットプレート上で硝酸（有害金属測定用）及び過酸化水素を順次加え、湿式灰化した。灰化後、得られた白色の残渣を1%硝酸（有害金属測定用）で溶解し、バナジウム及び亜鉛濃度（精巣はバナジウムのみ）を誘導結合プラズマ質量分析法（ICPM-8500: 株式会社 島津製作所：京都）により定量した。検量線（原子吸光測定用バナジウム及び亜鉛標準液：和光純薬工業株式会社）は0-500 ppmの濃度範囲で5または6ポイントを用いて作成し、それぞれの相関係数を有する一次直線を作成した。また、第1章で採取した[VO(opt)₂]及び[VO(ema)₂]を投与した個体から採取した肝臓中のバナジウム濃度を、[VOZnfsaen]を投与した動物と比較する目的で測定した。

3-2-12 統計解析

測定または計測したすべてのパラメータは平均値及び標準偏差で表し、有意水準を5%として、2群間比較ではStudentのt-testにより、また多重比較ではDunnet法により検定を実施した。

3-3 結果

3-3-1 錯体の合成および物性パラメータ

構造式を Fig. 3-1、ESR スペクトルを Fig. 3-2 及び Fig. 3-3、XAFS スペクトルを Fig. 3-4 に示し、物性パラメータを Table 3-1、ESR スペクトルの解析結果と文献値を Table 3-2、XAFS スペクトルの解析結果を Table 3-3 に示した。

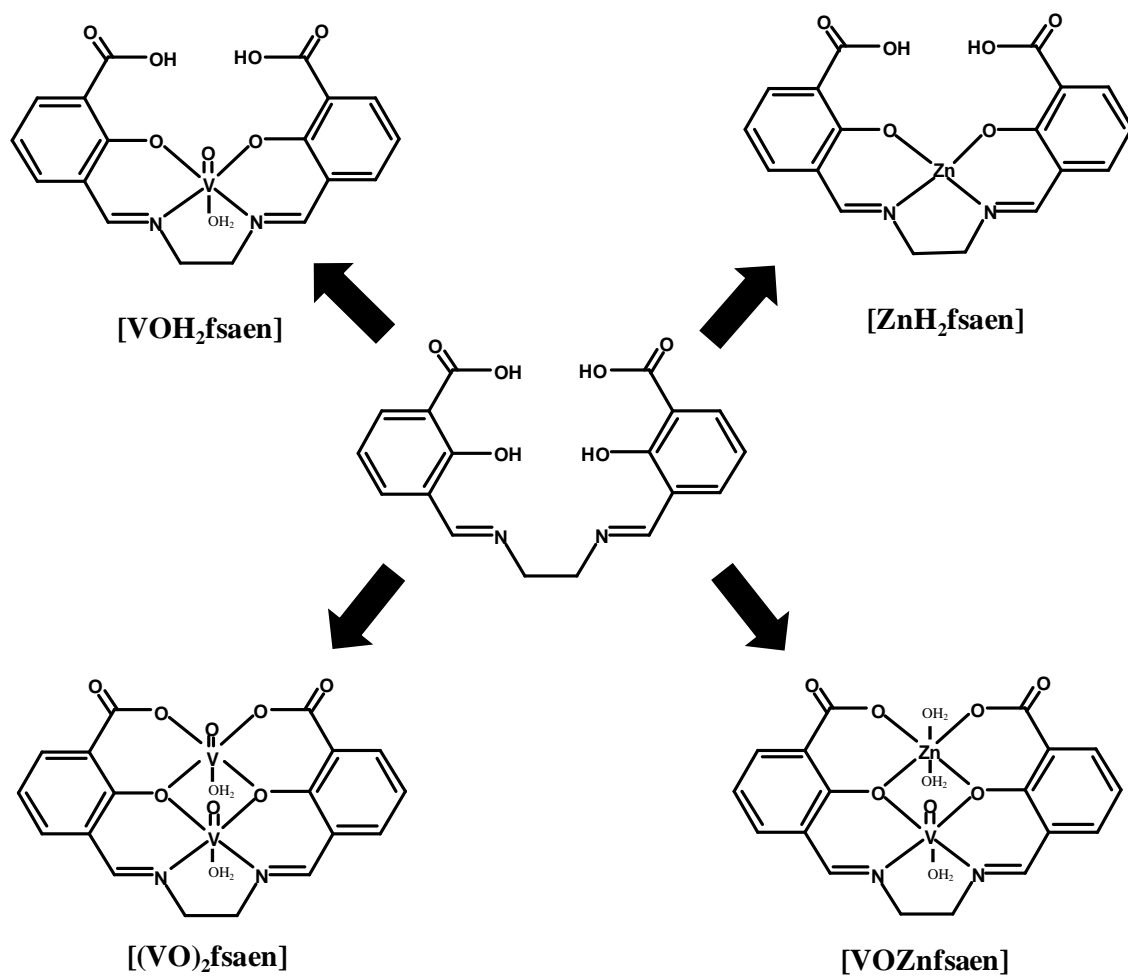


Fig. 3-1 Structures of ligand (H_4fsaen) and prepared metal complexes

Table 3-1 Physicochemical parameters of the metal complexes

Compounds	Elemental analysis					IR spectrum		
	Calcd./found					KBr disc		
	C(%)	H(%)	N(%)	V(%)	Zn(%)	$\nu_{\text{V=O}}$ cm^{-1}	$\nu_{\text{C=N}}$ cm^{-1}	$\nu_{\text{C=O}}$ cm^{-1}
H ₄ fsaen-3H ₂ O	59.77/59.58	4.63/4.51	7.74/7.85	-	-	-	1649	1698
[VOH ₂ fsaen]-1.6H ₂ O	48.03/48.00	3.85/3.78	6.22/6.24	11.32/11.88	-	990	1655	-
[(VO) ₂ fsaen]-3.3H ₂ O	41.98/41.92	2.97/3.34	5.43/5.51	19.78/20.72	-	990	1655	-
[VOZnfsaen]-2.9H ₂ O	40.40/40.22	3.31/2.98	5.23/5.31	9.46/8.80	12.14/12.50	993	1642	-
[ZnNa ₂ fsaen]-1.7H ₂ O	43.74/43.68	3.14/2.90	5.67/5.82	-	13.13/13.08	-	1634	1699

Compounds	Mass spectrum		UV/VIS absorption spectrum			Magnetic susceptibility	Partition coefficient
	FAB ⁺						
	[M+H] ⁺	Mw	λ (nm) (ϵ : M ⁻¹ cm ⁻¹)			μ_{eff}	log <i>P</i>
H ₄ fsaen-3H ₂ O	357	356	336 (7610)	402 (7880)		-	-0.91
[VOH ₂ fsaen]-1.6H ₂ O	422	421	352 (10800)	529 (140)	706 (74)	1.71	-1.74
[(VO) ₂ fsaen]-3.3H ₂ O	487	486	351 (24800)	705 (608)		1.28	-0.79
[VOZnfsaen]-2.9H ₂ O	-	-	342 (18600)	587 (151)		1.82	-1.07
[ZnNa ₂ fsaen]-1.7H ₂ O	-	-	379 (10900)			-	-

-: not detected

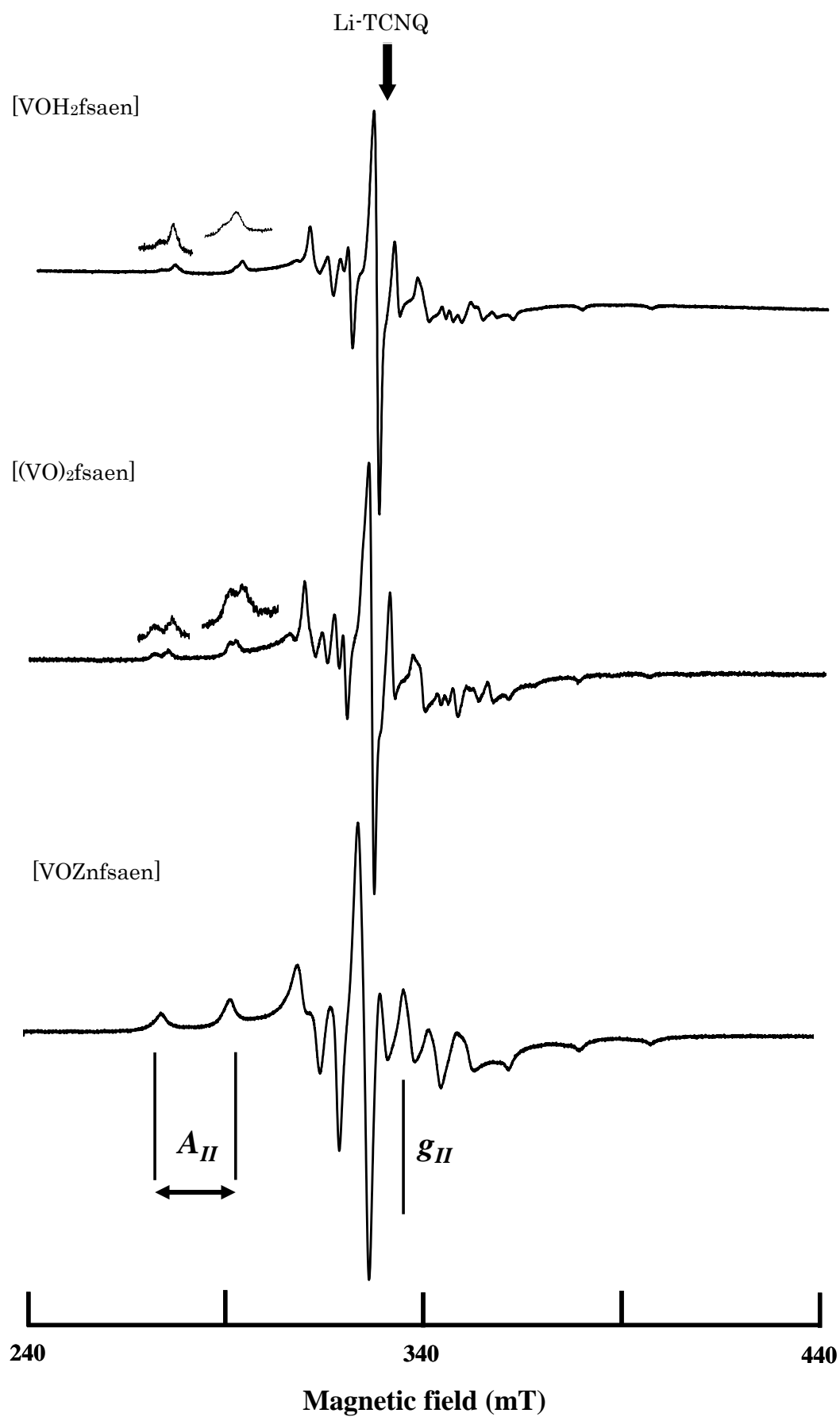
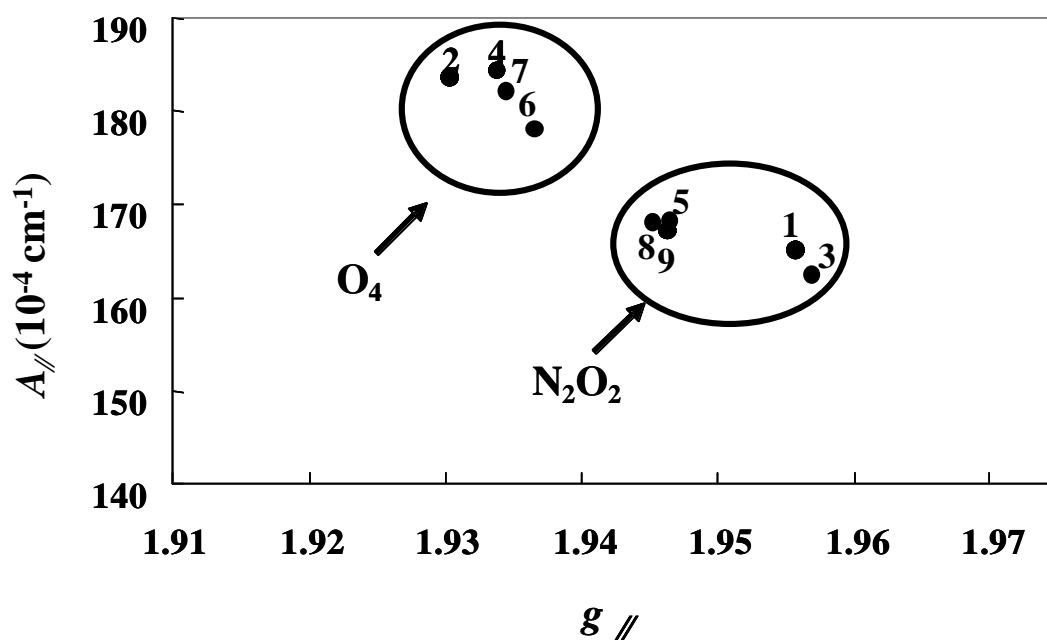
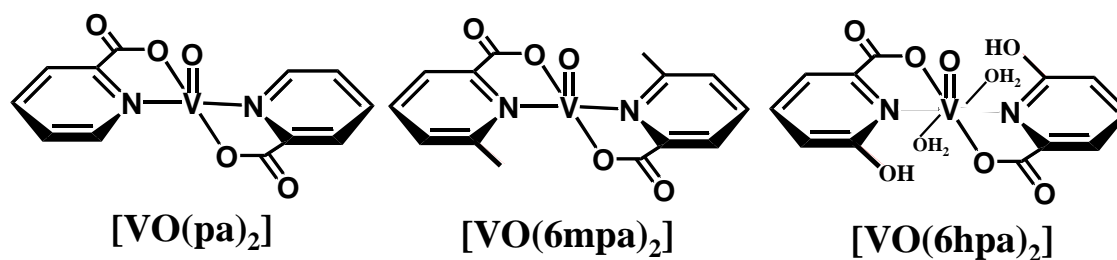


Fig. 3-2 The ESR spectra of VO²⁺ complexes in DMSO at 77 K

Table 3-2 ESR parameters of for the metal complexes

Complexes	Solvent	ESR parameters							Assumed Coordination modes
		g-factor			A-value				
		g_0	g_{II}	g_{\perp}	A_0	A_{II}	A_{\perp}		
1	[VOH ₂ fsaen] • 1.6H ₂ O	DMSO	1.978	1.956	1.989	89.4	165	51.5	N ₂ O ₂
2*			1.978	1.929	1.994	89.3	183	45.5	O ₄
3	[(VO) ₂ fsaen] • 3.3H ₂ O	DMSO	1.975	1.956	1.985	90.8	163	38.3	N ₂ O ₂
4			1.975	1.934	1.996	90.8	184	44.2	O ₄
5	[VOZnfsaen] • 2.9H ₂ O	DMSO	1.982	1.945	2.001	90.0	169	50.4	N ₂ O ₂
6	[VO(6hpa) ₂] • 2.9H ₂ O	H ₂ O	1.966	1.936	1.981	107.3	178	72.6	O ₄
7	VOSO ₄ • 4.0H ₂ O	H ₂ O	1.972	1.933	1.992	109.3	181	73.3	O ₄
8	[VO(pa) ₂] • 1.0H ₂ O	H ₂ O	1.980	1.945	1.998	93.4	168	53.5	N ₂ O ₂
9	[VO(6mpa) ₂]	DMSO	1.981	1.941	2.002	92.2	164	53.4	N ₂ O ₂

*: Weak signal

Fig. 3-3 Relationship between the hyperfine coupling constant, the A-value (A_{II}), and the universal constant, the g-factor (g_{II}), for the vanadyl complexes with N₂O₂ and O₄ coordination modes

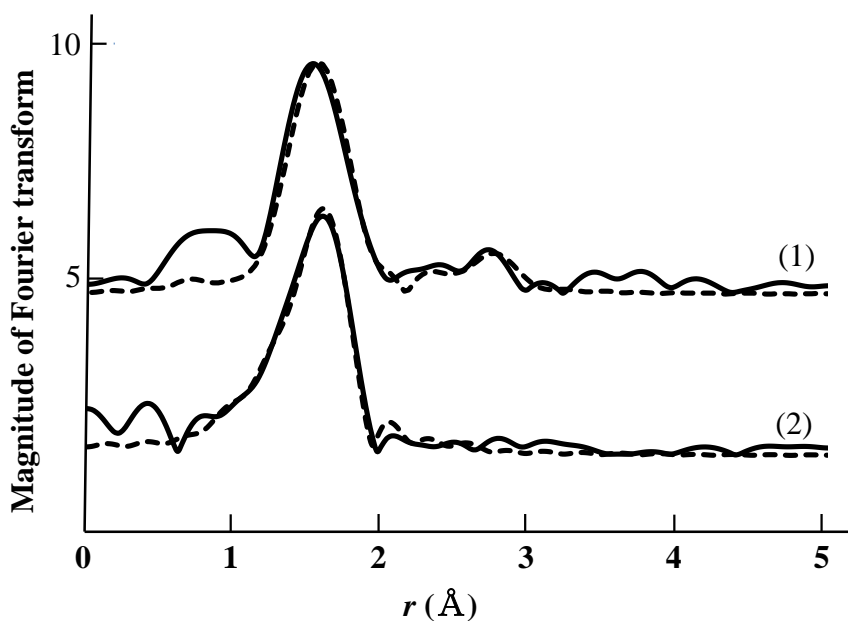


Fig. 3-4 Fourier transforms of EXAFS oscillations for [VOZnfsaen] over the k range of 24 – 110 nm⁻¹. Curves (1) and (2) are vanadium and zinc spectra, respectively. Found: solid line, calcd.: dashed line

Table 3-3 Parameters of EXAFS spectral analysis of [VOZnfsaen]

Complex	Coordination state		Bond length (pm)	σ (pm)	n
[VOZnfsaen]	N ₂ O ₂	V=O	164 ± 11	7 ± 10	1
		V-O	195 ± 6	5 ± 12	2
		V-N	206 ± 10	5 ± 11	2
		V-Zn	297 ± 10	10 ± 10	1
	O ₄	Zn-O	202 ± 0.5	8 ± 3	4

元素分析の結果、[VOH₂fsaen]及び[ZnH₂fsaen]は金属：配位子＝1：1、[(VO)₂fsaen]は金属：配位子＝2：1、[VOZnfsaen]はバナジウム：亜鉛：配位子＝1：1：1 の比を示し、理論値と実測値がよく一致した。⁶³

UV/VIS スペクトルは配位子と比べ、吸収極大波長の明らかなシフトが見られた。IR スペクトルでは C = N の伸縮振動に基づく 1650 cm⁻¹ 付近の吸収帯がシフトし、V = O の伸縮振動に基づく吸収帯が [VOH₂fsaen]及び[(VO)₂fsaen]は 990 cm⁻¹ 付近、[VOZnfsaen]は 993 cm⁻¹ に検出された。[VOH₂fsaen]及び[(VO)₂fsaen]の質量分析では錯体に基づくピークが検出された。[VOH₂fsaen]の磁化率は理論値付近であったが、[(VO)₂fsaen]の磁化率は理論値よりも低い値を示したため、反強磁性相互作用を示す可能性が考えられた。

[VOH₂fsaen]及び[VOZnfsaen]の ESR スペクトルでは、室温 (RT) および液体窒素温度 (LNT) の両温度で 4 価バナジウムに基づく特有のスペクトルが検出された (Fig. 3-2)。過去の報告で、Table 3-2 に示した各 4 価バナジウム錯体の ESR スペクトルから得られた g_H 値及び A_H 値と比較した結果、今回

の錯体から得られた g_H 値及び A_H 値から、 $[\text{VOH}_2\text{fsaen}]$ 及び $[\text{VOZnfsaen}]$ の 4 価バナジウムは N_2O_2 型配位形式をとると推定された (Fig. 3-3)。⁷³ $[(\text{VO})_2\text{fsaen}]$ の ESR スペクトルにはバナジルに基づく 2 種類のシグナルが検出され、それぞれを解析したところ N_2O_2 型配位のバナジウムと O_4 型配位のバナジウムの両方が存在すると推定された。以上の結果から、 $[\text{VOH}_2\text{fsaen}]$ は金属：配位子=1：1 で配位した N_2O_2 配位型の錯体、 $[(\text{VO})_2\text{fsaen}]$ は金属：配位子=2:1 で配位した N_2O_2 型配位と O_4 型配位の両方がある複核錯体、 $[\text{VOZnfsaen}]$ はバナジウム：亜鉛：配位子=1：1：1 でバナジウムが N_2O_2 配位型、亜鉛が O_4 配位型の複核錯体であると推定した。

EXAFS スペクトルの解析結果では、Fig. 3-4 に示した r 空間、すなわち得られたシグナルからバックグラウンドを除去して抽出したスペクトルを、フーリエ変換により動径構造関数に変換したグラフにおいて測定値（実線）と理論値（破線）がよく一致し、金属元素の第一配位圏における配位原子の結合距離及び原子間距離が明らかとなった。また、バナジウムが N_2O_2 配位形式、亜鉛が O_4 配位形式をとることを予測して解析を実施したことから、 $[\text{VOZnfsaen}]$ の構造は Fig. 3-1 に示した通りの配位形式をとると考えられた。なお、 $[\text{VOH}_2\text{fsaen}]$ 及び $[(\text{VO})_2\text{fsaen}]$ の EXAFS スペクトルの解析結果は示さなかったが、推定された構造式として水分子を付加した構造を記し、 $[\text{ZnH}_2\text{fsaen}]$ は水分子の有無について評価に足る物性データが得られていないため、水分子は記さなかった。

以上のことから、 $[\text{VOH}_2\text{fsaen}]$ 、 $[\text{ZnH}_2\text{fsaen}]$ 、 $[(\text{VO})_2\text{fsaen}]$ 及び $[\text{VOZnfsaen}]$ は Fig. 3-1 に示した通り、金属：配位子がそれぞれ 1:1、1:1、2:1 及び 2:1 で配位する錯体であると判断した。

3-3-2 錯体のインスリン様作用

エピネフリンで白色脂肪細胞を刺激すると FFA が放出されるが、インスリンはインスリンレセプターを介して細胞内で PDE を活性化することで FFA の放出を抑制する。4 価バナジウムや亜鉛はインスリンシグナル経路を活性化する、あるいは 4 価バナジウムは PTP1B を阻害して FFA の放出を抑制する。¹⁴ そこで、エピネフリンで刺激したラット白色脂肪細胞から放出される FFA 濃度を測定することにより、各種錯体のインスリン様作用を評価した。抑制評価の指標としてエピネフリンで刺激して放出される FFA 量を 100% として (control)、50% 抑制するときのサンプル濃度を IC_{50} 値として比較した。その結果、全ての錯体は濃度依存的に FFA 放出を抑制した。 IC_{50} 値は金属あたりの濃度として評価し Table 3-4 に示した。FFA の放出抑制活性は $[(\text{VO})_2\text{fsaen}]$ 、 $[\text{VOH}_2\text{fsaen}]$ 、 $[\text{VOZnfsaen}]$ の順であった。 $[\text{ZnH}_2\text{fsaen}]$ では活性が認められなかった。過去の報告では分配係数と FFA 放出抑制活性の間には相関性が認められており、本検討の結果でも分配係数が大きい $[(\text{VO})_2\text{fsaen}]$ が $[\text{VOH}_2\text{fsaen}]$ よりも高活性であった、しかしながら、 $[\text{VOZnfsaen}]$ と $[\text{VOH}_2\text{fsaen}]$ 及び $[(\text{VO})_2\text{fsaen}]$ の間には分配係数に相関する傾向は認められなかった。

Table 3-4 Estimated IC₅₀ values for the complexes and ions

Samples	IC ₅₀ (μM)
[VOH ₂ fsaen]	267 ± 10
[ZnH ₂ fsaen]	Not determined
[(VO) ₂ fsaen]	195 ± 39
[VOZnfsaen]	379 ± 53
VOSO ₄	270 ± 80
ZnSO ₄	362 ± 9

3-3-3 錯体の血糖降下作用及び生化学検査

ラットの白色脂肪細胞を用いた FFA 濃度測定により、[VOZnfsaen]は血糖降下作用のポテンシャルがあることが確認できた。[(VO)₂fsaen]や[VOH₂fsaen]に比べ、FFA 放出抑制活性は低活性であったが、第1章及び第2章の結果から4価バナジウム錯体は精巣毒性を発現する可能性が高いこと、またバナジウムが示す酸化ストレスによる精巣毒性を亜鉛が軽減する可能性が報告されていることから、KK-A^yマウスを用いて[VOZnfsaen]の血糖降下作用を評価した。²⁴

随時血糖値の測定結果を Fig. 3-5 に示した。また、生化学検査の結果を Table 3-5 に示した。

Fig. 3-5 に示すように、[VOZnfsaen]を投与した群では投与2日目から血糖降下が認められ、その後経日的に随時血糖値が減少し、投与6日目及び8日目以降に nontreated の KK-A^yマウスに対して低値を示した。Table 3-5 に示すように、生化学検査では、AST 及び ALT は nontreated の KK-A^yマウスと同程度であり、TCHO 及びインスリンは低値を示した。

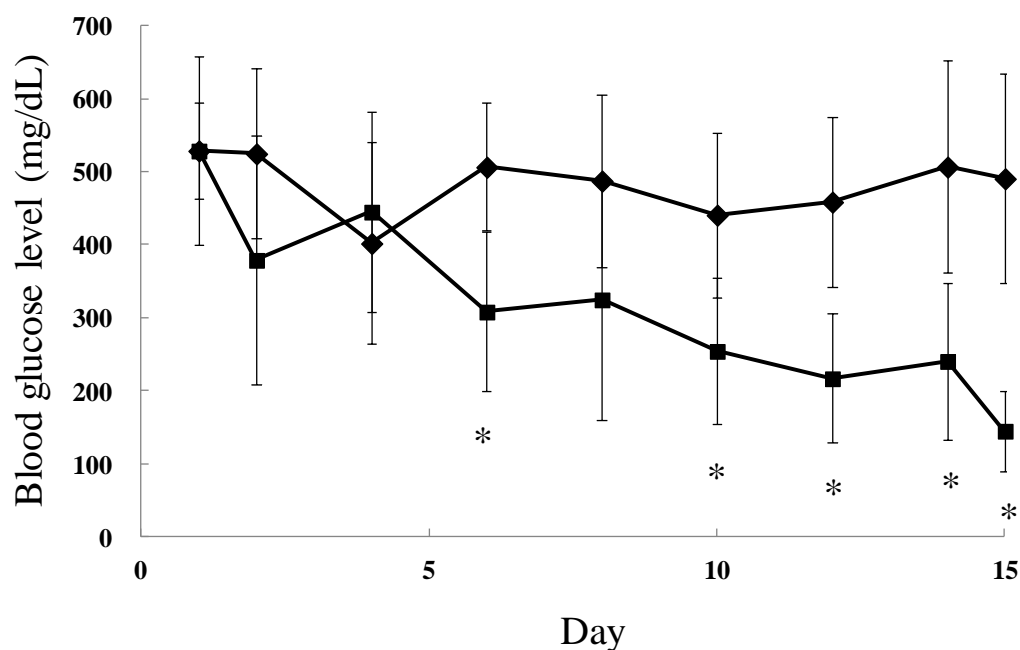


Fig. 3-5 Blood glucose levels in nontreated KK-A^y mice (◆) and mice receiving oral administration of [VOZnfsaen] (■) at a dose of 65 - 196 μmol metal kg⁻¹ body weight for 2 weeks. Data are expressed as means ± SD. **p* < 0.05 vs. nontreated KK-A^y mice (Student's *t*-test)

Table 3-5 Plasma concentration of AST, ALT, and TCHO in [VOZnfsaen]-treated KK-A^y mice

	AST (U/L)	ALT (U/L)	TCHO (mg/dL)	Insulin (pg/mL)
nontreated KK-A ^y *	50 ± 8	24 ± 2	175 ± 30	153.5 ± 24.7
[VOZnfsaen]	57 ± 13	23 ± 4	94 ± 13**	29.1 ± 19.3**

*: Reference data from first chapter

***p* < 0.05 vs. nontreated KK-A^y

3-3-4 形態学的評価

[VOZnfsaen]投与群の肝臓及び精巣の組織像を Fig. 3-6 及び Fig. 3-7、組織学的検査の結果を Table 3-6 に示した。

Table 3-6 及び Fig. 3-6 に示すように、肝臓では nontreated の KK-A^y マウスで 4 例中 3 例に中等度、1 例に軽度の小葉中心性の肝細胞空胞化（脂肪沈着、矢印部）が認められたのに対し、[VOZnfsaen]投与群では 6 例中 1 例に軽度の脂肪沈着が認められたのみであった。このことから、錯体の投与によって、脂肪沈着が軽減されたことが確認された。また、Table 3-6 及び Fig. 3-7 に示すように精巣では形態学的な変化は認められなかった（Fig. 3-7b、矢印部が鉍質沈着）。

以上のことから、[VOZnfsaen]はこれまでに報告されている 4 価バナジウム及び亜鉛錯体と同様に肝臓の器質的改善効果を示し、[VO(opt)₂]や[VO(ema)₂]が示すような精巣毒性を示さなかった。^{74, 75}

Table 3-6 Result of morphological analysis

Groups	Dosing periods (weeks)	Number of animals	Histological findings									
			Liver					Testis				
			Vacuolation / Hypertrophy, Centrilobular					Mineralization				
			-	1+	2+	3+	4+	-	1+	2+	3+	4+
nontreated KK-A ^y mice	2	4	0	1	3	0	0	4	0	0	0	0
[VOZnfsaen]	2	6	5	1	0	0	0	6	0	0	0	0

Grading scores: -, none; 1+, slight; 2+, moderate; 3+, strong; 4+, sever

**p* < 0.05 vs. nontreated KK-A^y mice (control)

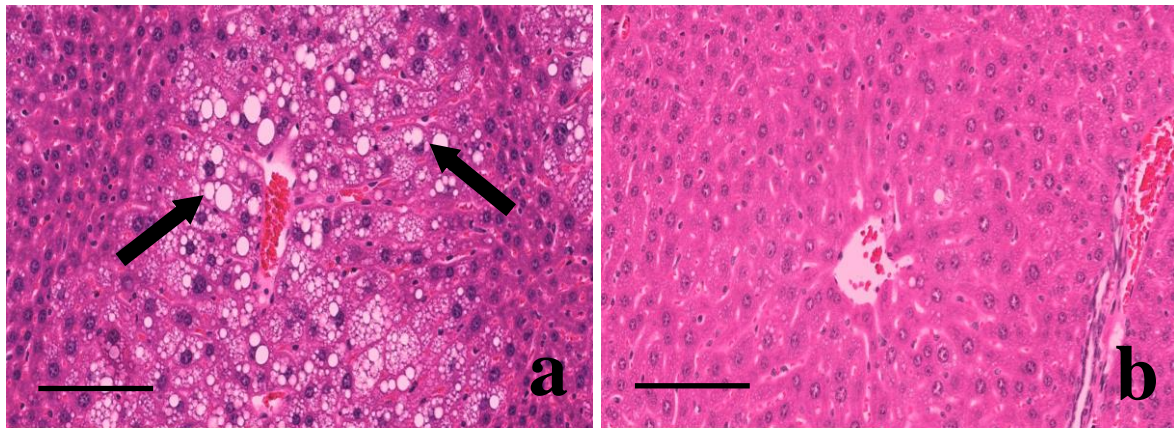


Fig. 3-6 Morphological analysis of the liver in KK- A^y mice exposed to [VOZnfsaen] for 2 weeks. (a) Fat deposition observed hepatocyte in nontreated KK- A^y mice. (b) No abnormal changes in KK- A^y mice exposed to [VOZnfsaen] for 2 weeks. Hematoxylin and eosin staining (scale bar=100 μ m).

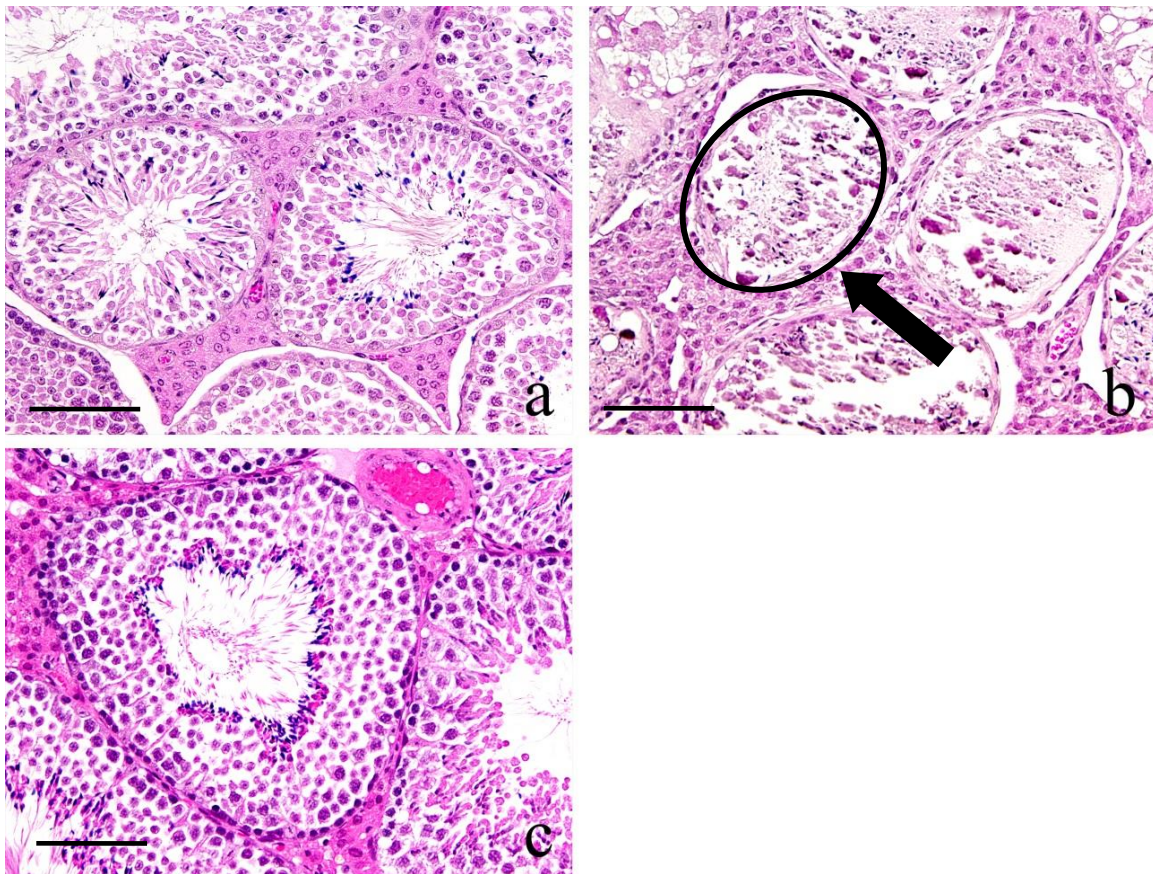


Fig. 3-7 Testicular morphology in KK- A^y mice exposed to [VO(opt) $_2$] or [VOZnfsaen] for 2 weeks. (a) No abnormal changes in nontreated KK- A^y mice. (b) Mineralization of the seminiferous tubules in KK- A^y mice (arrow) exposed to [VO(opt) $_2$] for 2 weeks. (c) No abnormal changes in KK- A^y mice exposed to [VOZnfsaen] for 2 weeks. Hematoxylin and eosin staining (scale bar = 100 μ m).

3-3-5 臓器中バナジウムの定量

臓器中バナジウム及び亜鉛の定量結果を Table 3-7 及び Table 3-8 に示した。

Table 3-7 に示すように、2 週間の反復投与をした動物の肝臓中バナジウム量については、[VOZnfsaen] が[VO(opt)₂]及び[VO(ema)₂]に対し高値を示し、[VO(opt)₂]と[VO(ema)₂]は同程度であった。なお、[VO(opt)₂]及び[VO(ema)₂]を 4 週間反復投与した動物の肝臓中バナジウム量は、それぞれ 2 週間の動物と同程度であった。[VOZnfsaen]及び[Zn(opt)₂]群の肝臓中亜鉛量は、[Zn(glc)₂]、[VO(opt)₂]または[VO(ema)₂]と比較して高値を示した。

2 週間の反復投与をした動物の精巣中バナジウム量については、精巣に変化が認められた個体のバナジウム量に比べ、[VOZnfsaen]投与群は低値であった。

Table 3-7 Concentration of vanadium and zinc in the liver

Complexes	Dosing period (weeks)	Vanadium (µg/g)	Zinc (µg/g)
[VOZnfsaen]	2	25.4 ± 4.46*	48.4 ± 13.2**
[VO(opt) ₂]	2	8.85 ± 4.00	-
[VO(ema) ₂]	2	9.74 ± 2.65	-
[VO(opt) ₂]	4	7.58 ± 1.35	14.4 ± 1.9
[VO(ema) ₂]	4	7.98 ± 1.94	15.0 ± 2.7
[Zn(opt) ₂]	4	B.L.Q	40.6 ± 20.7**
[Zn(glc) ₂]	4	B.L.Q	18.6 ± 3.7

* $p < 0.05$ vs. [VO(opt)₂] or [VO(ema)₂] ** $p < 0.05$ vs. [Zn(glc)₂], [VO(opt)₂] or [VO(ema)₂]

B.L.Q: below the limit of quantification

Table 3-8 Concentration of vanadium in testis and number of affected animals

Complexes	Dosing period (weeks)	Number of animals	Number of affected animals	Vanadium (µg/g)
[VOZnfsaen]	2	6	0	0.45±0.28
[VO(opt) ₂]	2	3	2	33*

*: Average of affected animals in [VO(opt)₂] group

3-4 考察

3-4-1 物性評価

本実験では、これまでに抗糖尿病活性について検討したことがなく、報告もされていない4価バナジウム及び亜鉛を含むヘテロ複核錯体である[VOZnfsaen]を合成し、その物性を評価するとともに、FFA放出抑制活性及び血糖降下作用について評価した。

[VOZnfsaen]の元素分析及びIRスペクトルは理論値または文献値とよく一致した。⁶³ ESRスペクトルから算出したESRパラメータの $g_{||}$ 値及び $A_{||}$ 値を他の錯体のデータ（文献値）と比較すると、4価バナジウムが N_2O_2 配位型をとることが推察された。EXAFSスペクトルでは、4価バナジウムの第一配位圏にV=O、V-O及びV-Nの結合のシグナルが得られ、亜鉛の第一配位圏にZn-Oの結合のシグナルが得られた。さらに、EXAFSスペクトルの解析結果から4価バナジウム及び亜鉛にはそれぞれ1及び2分子の水分子が配位していることが推定された。以上のことから、[VOZnfsaen]は4価バナジウム：亜鉛：配位子=1：1：1の割合で、Fig. 3-1に示した構造に水分子が付加した構造をとる錯体であることが明らかとなった。また、亜鉛錯体は六配位正八面体構造、四配位正四面体構造もしくは四配位で配位子と同一平面上に亜鉛原子が存在する構造をとることがある。報告では亜鉛錯体が、正四面体構造をとるときの亜鉛原子と配位原子の結合距離は208 pm、一方、四配位で同一平面上にあるときの結合距離は195 pmとされている。⁷⁶⁻⁷⁹ 本検討の結果である202 pmという結合距離は、報告と比較して四配位で正四面体構造をとるときと同一平面上にあるときの結合距離の中間程度であった。このことから、[VOZnfsaen]の亜鉛原子は配位結合する原子と同一平面上よりも少しひずんだ場所に位置していると推察された。

また、[VOZnfsaen]と比較の目的で合成及び物性評価した[VOH₂fsaen]及び[(VO)₂fsaen]は元素分析、IRスペクトル、磁化率、質量分析及びESRスペクトル解析の結果から、いずれもFig. 3-1に示した構造を有すると考えられた。

本実験では、H₄fsaenを配位子とする錯体として、前述の錯体の他に亜鉛複核錯体である[Zn₂fsaen]の存在が予想される。この錯体については合成を試みたが、成功することはできなかった。単核錯体である[ZnH₂fsaen]のX線粉末回折を試みた報告では、[ZnH₂fsaen]は N_2O_2 配位形式から得られるシグナルの分解能が十分でなく、構造を特定するための十分な強度のシグナルが得られなかったとされている。⁸⁰ [ZnH₂fsaen]の亜鉛原子がO₄配位形式ではなく N_2O_2 配位形式をとっていることは、IRスペクトルの結果からも推定できるが、本検討で複数回にわたり合成を試みたものの合成手順は確立できなかったことから、この錯体は不安定であることが伺える。さらに、文献では[Zn₂fsaen]は合成できなかったとされている。⁸⁰ これらのことから、亜鉛原子はH₄fsaenの N_2O_2 配位の場合において比較的不安定であり、このことが影響して亜鉛のホモ複核錯体の形状を維持することができず、合成できなかったと考えられた。

3-4-2 抗糖尿病活性

KK-A^yマウスへの投与では、投与2日目から血糖値の低下が認められ、投与14日目まで継続して認められた。これまで4価バナジウムまたは亜鉛の単核錯体、あるいは4価バナジウムのホモ複核錯体が血糖降下作用を示すことは報告されているが、本検討は4価バナジウム及び亜鉛のヘテロ複核錯体が血糖降下作用を示す初めての結果となった。また、血漿中パラメータの測定では、TCHO及びイン

スリンの低下が認められた。形態学的評価では、肝臓の脂質沈着が改善した。肝臓中バナジウム及び亜鉛の定量では、[VOZnfsaen]を投与した群が高値を示した。肝細胞への脂質沈着が軽減されたことに関して、本検討結果からはそのメカニズムは明らかではなかったが、バナジウム量は[VO(opt)₂]や[VO(ema)₂]と比べて薬物動態的に肝臓への分布が多かったこと (Table 3-7)、亜鉛量は[Zn(opt)₂]と同程度に肝臓へ分布したこと、錯体投与により肝臓の脂質代謝能が改善された可能性が高いと考えられた。一方、第2章で述べた通り、4価バナジウム錯体の投与により精巣に不可逆的な変性壊死が発現する可能性が示唆されたが、[VOZnfsaen]を投与した KK-A^yマウスの精巣では形態学的変化は認められず、精巣中金属量の定量でも、精巣から検出されたバナジウム量はわずかであった。以上のことから、[VOZnfsaen]は血糖降下作用を示す投与量では、薬物動態的に精巣へは分布しにくく、精巣毒性を発現しない錯体であると言えた。

以上のことから、[VOZnfsaen]は抗糖尿病活性を示し、一方で精巣毒性を示さないことが明らかとなった。この理由は本検討からは明らかとはならなかったが、亜鉛と4価バナジウムを共存させたことによる亜鉛の4価バナジウム毒性軽減効果が関与している可能性が考えられた。よって、[VOZnfsaen]は抗糖尿病活性を示す初めてのヘテロ複核錯体であることが見い出され、また2週間の反復投与という条件下において、高活性でありながら精巣毒性を誘発するリスクが小さい錯体であると考えられた。

本実験からは、ヘテロ複核錯体を用いた抗糖尿病作用に関する研究の第一歩であり、主として従来の生化学的パラメータによるアプローチを実施していたため、脾臓の形態学的評価など、検討すべきいくつかの重要なデータが不足している。これらの課題については、今後の研究成果に期待する。

3-5 小括

ヘテロ複核錯体として、H₄fsaenを配位子とする二核錯体である[(VOZn)fsaen]を合成し、その物性評価ならびに抗糖尿病活性を評価した。物性評価では、ESR及びEXAFSスペクトル等の結果から、錯体の化学構造を特定した。

抗糖尿病活性の評価では、10週齢の雄性 KK-A^yマウスに2週間経口投与し、投与期間中の随時血糖値及び投与期間終了後の血漿中インスリン濃度の低下が認められた。また、肝臓の形態学的評価では脂質沈着を改善し、精巣では精細管の変化は認められなかった。

以上の結果から、[(VOZn)fsaen]は生化学パラメータのみならず、器質的改善効果を示し、かつ精巣毒性を示さないヘテロ複核錯体であることが明らかとなった。

総括及び将来への展望

本論文では、亜鉛及び4価バナジウム錯体の抗糖尿病活性の評価方法の一つとして、形態学的方法を組み入れることが可能であり、生化学パラメータ測定とは必ずしも相関性がなかったことから、形態学的な検討が錯体の生理活性を評価する上で重要であることを見出した。

同じ配位子を有する[Zn(opt)₂]または[VO(opt)₂]をそれぞれKK-A^yマウスに4週間反復経口投与し、血糖降下作用が確認された状態の肝臓及び膵臓の形態学的評価を実施した結果、[Zn(opt)₂]または[VO(opt)₂]投与群のどちらでも肝臓の脂質沈着に改善効果が認められたが、ランゲルハンス島の肥大の改善は[Zn(opt)₂]投与群でのみ認められた。血漿中インスリン濃度はどちらの錯体投与群でも改善が認められたことから、本検討の結果は、錯体の抗糖尿病活性を評価する際には血漿中生化学パラメータのみではなく、形態学的な定量結果を併せて検討することが重要であると示した。

一方、[VO(opt)₂]及び[VO(ema)₂]を投与した動物では、精巣で重篤な毒性変化が認められた。すなわち、精細管内の全ての細胞の変性壊死または石灰沈着が認められた。このことから、4価バナジウム錯体は精巣で重篤な毒性を示す可能性が示唆されたが、既知の報告から亜鉛と同時に投与することで4価バナジウムの精巣毒性が軽減される傾向が予測された。そこで、亜鉛と4価バナジウムのヘテロ複核錯体を投与すれば、4価バナジウムが持つ毒性を軽減するとともに、両金属元素が異なる機序で作用することから高活性な錯体を見出せる可能性があるかと判断し、検討を行った。

ヘテロ複核錯体として、H₄f₃saenを配位子とする[VOZnf₃saen]を合成し、その物性評価ならびに抗糖尿病活性を評価した。物性評価では、特にESRスペクトル及びEXAFSスペクトルの解析結果から、錯体の化学構造を特定した。抗糖尿病活性の評価では、血糖降下作用並びに血漿中インスリン濃度の低下を示した。形態学的評価では、肝臓の脂質沈着を改善し、精巣における変性は認められなかった。以上の結果から、[VOZnf₃saen]は血漿中パラメータのみならず、器質的改善効果を示すヘテロ複核錯体であり、かつ、精巣に対する毒性を示さない錯体であることが明らかとなった。

本実験では、初めて亜鉛と4価バナジウムのヘテロ複核錯体が抗糖尿病活性を示したこと、及び形態学的評価が重要な評価系の一つであることを述べた。また、ヘテロ複核錯体が抗糖尿病作用を示したことから、亜鉛および4価バナジウムの単核錯体の併用投与による効果や、薬物動態学的な観点から亜鉛と4価バナジウムが組織に共存して分布することによる相加あるいは相乗効果について、今後は深く追及していくことが必要と考える。また、ヘテロ複核錯体による糖尿病病態の形態的改善効果については肝臓のみしか議論されておらず、膵臓における検査も今後の課題と考える。

謝辞

本実験を行うにあたって終始ご指導とご鞭撻を賜りました京都薬科大学 安井 裕之教授に謹んで深謝申し上げます。また、ご助言及びご協力をいただきました神戸女子大学 吉川 豊教授に心から感謝申し上げます。

本実験の病理組織検査において、終始ご指導いただきました関西医科大学 螺良 愛郎教授、義澤 克彦講師に謹んで感謝いたします。

錯体の構造解析についてご指導いただきました立命館大学 小堤 和彦教授に深謝申し上げます。

EXAFS スペクトルの測定及び解析におきましてご協力を賜りました立命館大学 片山 真祥助教に感謝申し上げます。

本実験に協力していただいた京都薬科大学 内藤 行喜助手ならびに学生諸氏に謝意を表します。

最後に温かく見守り続けてくれた妻と子供たちに心から感謝いたします。

なお、本論文中使用した Fig. 及び Table は、論文目録に記載する各報文の出版社から転載許可を得ています。転載許可をいただいた、日本毒性病理学会、International Institute of Anticancer Research、Royal Society of Chemistry 及び Bentham Science に深謝申し上げます。

論文目録

学位論文の基礎となる報文

- 1) T. Moroki, Y. Yoshikawa, K. Yoshizawa, A. Tsubura, and H. Yasui: Morphological characterization of systemic changes in KK-Ay mice as an animal model of type 2 diabetes. *In Vivo*, 27, 465-472 (2013).
- 2) T. Moroki, Y. Yoshikawa, K. Yoshizawa, A. Tsubura, and H. Yasui: Testicular mineralization in KK-Ay mice treated with an oxovanadium complex. *J. Toxicol. Pathol.*, 26, 329-333 (2013).
- 3) T. Moroki, H. Yasui, Y. Adachi, K. Yoshizawa, A. Tsubura, K. Ozutsumi, M. Katayama, and Y. Yoshikawa: New insulin-mimetic and hypoglycemic hetero-binuclear zinc(II)/oxovanadium(IV) complex. *Cur. Inorg. Chem.*, 4, 54-58 (2014).
- 4) T. Moroki, Y. Yoshikawa, K. Yoshizawa, A. Tsubura, and H. Yasui: Morphological analysis of the pancreas and liver in diabetic KK-Ay mice treated with zinc and oxovanadium complexes. *Metallomics*, 6, 1632-1638 (2014).

引用文献

- 1 AB. Olokoba, OA. Obateru, and LB. Olokoba: Type 2 diabetes mellitus: A review of current trends. *Oman. Med. J.* **27**, 269-273 (2012).
- 2 Y. Yoshikawa, E. Ueda, K. Kawabe, H. Miyake, T. Takino, H. Sakurai, and Y. Kojima: Development of new insulinomimetic zinc(II) picolinate complexes with a $\text{Zn}(\text{N}_2\text{O}_2)$ coordination mode: structure characterization, in vitro, and in vivo studies. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **7**, 68–73 (2002).
- 3 Y. Yoshikawa, Y. Adachi, and H. Sakurai: A new type of orally active anti-diabetic Zn(II)-dithiocarbamate complex. *Life Sci.*, **80**, 759–766 (2007).
- 4 Y. Adachi, J. Yoshida, Y. Kodera, T. Kiss, T. Jakusch, EA. Enyedy, Y. Yoshikawa, and H. Sakurai: Oral administration of a zinc complex improves type 2 diabetes and metabolic syndromes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **351**, 165-170 (2006).
- 5 Y. Yoshikawa, M. Kondo, H. Sakurai, and Y. Kojima: A family of insulinomimetic zinc(II) complexes of amino ligands with $\text{Zn}(\text{Nn})$ ($n=3$ and 4) coordination modes. *J. Inorg. Biochem.*, **99**, 1497–1503 (2005).
- 6 H. Sakurai, and A. Tsuji, in: *Vanadium in the Environment, Part 2: Health Effects*, ed. JO. Nriagu, Wiley, New York, vol. **2**, pp. 297–315 (1998).
- 7 H. Sakurai, K. Fujii, S. Fujimoto, Y. Fujisawa, K. Takechi, and H. Yasui, in: *Structure-activity relationship of insulin-mimetic vanadyl complexes with $\text{VO}(\text{N}_2\text{O}_2)$ coordination mode*. *ACS Symposium Series 711*, ed. AS. Tracy and DC. Chans, American Chemical Society, Washington DC, pp. 344–352 (1998).
- 8 H. Sakurai, Y. Fujisawa, S. Fujimoto, H. Yasui, and T. Takino: Role of vanadium in treating Diabetes. *J. Trace Elem. Exp. Med.*, **12**, 393–401 (1999).
- 9 Y. Naito, Y. Yoshikawa, and H. Yasui: Cellular mechanism of zinc–hinokitiol complexes in diabetes mellitus. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **84**, 298–305 (2011).
- 10 X. Tang, and NF. Shay: Zinc has an insulin-like effect on glucose transport mediated by phosphoinositol-3-kinase and Akt in 3T3-L1 fibroblasts and adipocytes. *J. Nutr.*, **131**, 1414–1420 (2001).
- 11 Y. Yoshikawa, R. Hirata, H. Yasui, M. Hattori, and H. Sakurai: Inhibitory effect of CuSO_4 on α -glucosidase activity in ddY mice. *Metallomics*, **2**, 67–73 (2010).
- 12 W. Basuki, M. Hiromura, Y. Adachi, K. Tayama, M. Hattori, and H. Sakurai: Enhancement of insulin signaling pathway in adipocytes by oxovanadium(IV) complexes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **349**, 1163–1170 (2006).
- 13 M. Hiromura, Y. Adachi, M. Machida, M. Hattori, and H. Sakurai: Glucose lowering activity by oral administration of bis (allixinato)oxidovanadium(iv) complex in streptozotocin induced diabetic mice and gene expression profiling in their skeletal muscles. *Metallomics*, **1**, 92–100 (2009).
- 14 H. Sakurai, A. Katoh, and Y. Yoshikawa: Chemistry and biochemistry of insulin-mimetic vanadium and zinc complexes. trial for treatment of diabetes mellitus. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **79**, 1645-1664 (2006).
- 15 JL. Domingo, M. Gomez, DJ. Sanchez, JM. Llobet, and CL. Keen.: Toxicology of vanadium compounds in diabetic rats: the action of chelating agents on vanadium accumulation. *Mol. Cell. Biochem.*, **153**, 233–240 (1995).
- 16 H. Mir-Jamal, S. Fatemeh, GK. Mahmoud, and P. Jalal: Toxicity of vanadium on

- isolated rat liver mitochondria: a new mechanistic approach. *Metallomics*, **5**, 152-166 (2013).
- 17 SH. Seok, WS. Cho, JS. Park, Y. Na, A. Jang, H. Kim, Y. Cho, T. Kim, JR. You, S. Ko, BC. Kang, JK. Lee, J. Jeong, and JH. Che: Rat pancreatitis produced by 13 week administration of zinc oxide nanoparticles: biopersistence of nanoparticles and possible solutions. *J. Appl. Toxicol.*, **33**, 1089-1096 (2013).
 - 18 水口國雄: 最新染色法の全て. 医歯薬出版株式会社, p.3-143 (2011).
 - 19 K. Akgün-Dar, S. Bolkent, R. Yanardag, and S. Tunali: Vanadyl sulfate protects against streptozotocin-induced morphological and biochemical changes in rat aorta. *Cell Biochem. Funct.*, **25**, 603-609 (2007).
 - 20 SI. Pillai, SP. Subramanian, and M. Kandaswamy: Evaluation of antioxidant efficacy of vanadium-3-hydroxyflavone complex in streptozotocin-diabetic rats. *Chem. Biol. Interact.*, **204**, 67-74 (2013).
 - 21 W. Dabroś, AM. Kordowiak, D. Dziga, and R. Gryboś: Influence of bis(maltolato)oxovanadium(IV) on activity of galactosyltransferase (GalT) and morphology of rat liver Golgi apparatus in control and streptozotocin diabetes. *Pol. J. Pathol.*, **49**, 67-76 (1998).
 - 22 HB. Jones, AL. Bigley, J. Pemberton, and KJ. Randall: Quantitative histopathological assessment of retardation of islets of langerhans degeneration in rosiglitazone-dosed obese ZDF rats using combined insulin and collagens (I and III) immunohistochemistry with automated image analysis and statistical modeling. *Toxicol. Pathol.*, **41**, 425-444 (2013).
 - 23 C. Evans-Molina, RD. Robbins, T. Kono, SA. Tersey, GL. Vestermarck, CS. Nunemaker, JC. Garmey, TG. Deering, SR. Keller, B. Maier, and RG. Mirmira: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation restores islet function in diabetic mice through reduction of endoplasmic reticulum stress and maintenance of euchromatin structure. *Mol. Cell. Biol.*, **29**, 2053-2067 (2009).
 - 24 AK. Chandra, R. Ghosh, A. Chatterjee, and M. Sarkar: Vanadium-induced testicular toxicity and its prevention by oral supplementation of zinc sulphate. *Toxicol. Mech. Methods*, **17**, 175-187 (2007).
 - 25 Y. Yoshikawa, A. Murayama, Y. Adachi, H. Sakurai, and H. Yasui: Challenge of studies on the development of new Zn complexes ($\text{Zn}(\text{opt})_2$) to treat diabetes mellitus. *Metallomics*, **3**, 686-692 (2011).
 - 26 S. Takeshita, I. Kawamura, T. Yasuno, C. Kimura, T. Yamamoto, J. Seki, A. Tamura, H. Sakurai, and T. Goto: Amelioration of insulin resistance in diabetic ob/ob mice by a new type of orally active insulin-mimetic vanadyl complex: bis(1-oxy-2-pyridinethiolato)oxovanadium(IV) with $\text{VO}(\text{S}_2\text{O}_2)$ coordination mode. *J. Inorg. Biochem.*, **85**, 179-186 (2001).
 - 27 厚生労働省発食安第 0329001 号、平成 16 年 3 月 29 日、資料 6-1
 - 28 KH. Thompson, J. Lichter, C. LeBel, MC. Scaife, JH. McNeill, and C. Orvig: Vanadium treatment of type 2 diabetes: a view to the future. *J. Inorg. Biochem.*, **103**, 554-558 (2009).
 - 29 W. Kaufmann, B. Bolon, A. Bradley, M. Butt, S. Czasch, RH. Garman, C. George, S. Gröters, G. Krinke, P. Little, J. McKay, I. Narama, D. Rao, M. Shibutani, and R. Sills: Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse central and peripheral nervous systems. *Toxicol. Pathol.*, **40**, 9S-10S (2012).
 - 30 高橋道人、福島昭治: 伊東毒性病理学 丸善出版株式会社 406-407 (2013).
 - 31 S. Lillioja, DM. Mott, BV. Howard, PH. Bennett, H. Yki-Javinen, D. Freymond, BL. Nyomba, F. Zurlo, B.

- Swinburn, and C. Bogardus: Impaired glucose tolerance as a disorder of insulin action. Longitudinal and cross-sectional studies in Pima Indians. *N. Engl. J. Med.*, **318**, 1217-1225 (1988).
- 32 G. Kloppel, L. Mattias, K. Habich, M. Oberholzer, and PU. Heitz: Islet pathology and the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus revisited. *Surv. Synth. Pathol. Res.*, **4**, 110-125 (1985).
- 33 高橋道人、福島昭治: 伊東毒性病理学 丸善出版株式会社 235-236 (2013).
- 34 H. Yki-Jarvinen, and J. Westerbacka: The fatty liver and insulin resistance. *Curr. Mol. Med.*, **5**, 287-295 (2005).
- 35 高橋道人、福島昭治: 伊東毒性病理学 丸善出版株式会社 273-276 (2013).
- 36 F. Chiarelli, S. Gaspari, and ML. Marcovecchio: Role of growth factors in diabetic kidney disease. *Horm. Metab. Res.*, **41**, 585-593 (2009).
- 37 H. Iwatsuka, A. Shino, and Z. Suzuoki: General survey of diabetic features of yellow KK mice. *Endocrinol. Jpn.*, **17**, 23-35 (1970).
- 38 M. Okazaki, Y. Saito, Y. Uda, M. Maruyama, H. Murakami, S. Ota, T. Kikuchi, and K. Oguchi: Diabetic nephropathy in KK and KK-A^y mice. *Exp. Anim.*, **51**, 191-196 (2002).
- 39 H. Watanabe, C. Katakami, S. Miyata, and A. Negi: Corneal disorders in KK-A^y mouse: a type 2 diabetes model. *Jpn. J. Ophthalmol.*, **46**, 130-139 (2002).
- 40 RE. Buckingham, KA. Al-Barazanji, CDN. Toseland, M. Slaughter, SC. Connor, A. West, B. Bond, NC. Turner, and JC. Clapham: Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, rosiglitazone, protects against nephropathy and pancreatic islet abnormalities in Zucker fatty rats. *Diabetes*, **47**, 1326-1334 (1998).
- 41 A. Kiersztan, A. Modzelewska, R. Jarzyna, E. Jagielska, and J. Bryla: Inhibition of gluconeogenesis by vanadium and metformin in kidney-cortex tubules isolated from control and diabetic rabbits. *Biochem. Pharmacol.*, **63**, 1371-1382 (2002).
- 42 G. Vardatsikos, MZ. Mehdi, and AK. Srivastava: Bis(maltolato)-oxovanadium(IV)-induced phosphorylation of PKB, GSK-3 and FOXO1 contributes to its glucoregulatory responses. *Int. J. Mol. Med.*, **24**, 303-309 (2009).
- 43 本郷利憲、廣重力: 標準生理学 第5版 医学書院 910-918 (2001).
- 44 S. Lillioja, DM. Mott, BV. Howard, PH. Bennett, H. Yki-Jarvinen, D. Freymond, BL. Nyomba, F. Zurlo, B. Swinburn, and C. Bogardus: Impaired glucose tolerance as a disorder of insulin action. Longitudinal and cross-sectional studies in Pima Indians. *N. Engl. J. Med.*, **318**, 1217-1225 (1988).
- 45 G. Kloppel, L. Mattias, K. Habich, M. Oberholzer, and PU. Heitz: Islet pathology and the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus revisited. *Surv. Synth. Pathol. Res.*, **4**, 110-125 (1985).
- 46 RS. Weinstock, FT. Murray, A. Diani, GA. Sangani, MB. Wachowski, and JL. Messina: Pioglitazone: in vitro effects on rat hepatoma cells and in vivo liver hypertrophy in KK-A^y mice. *Pharmacology*, **54**, 169-178 (1997).
- 47 S. Tunali, and R. Yanardag: Effect of vanadyl sulfate on the status of lipid parameters and on stomach and spleen tissues of streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacol. Res.*, **53**, 271-277 (2006).
- 48 DC. Crans, JJ. Smee, E. Gaidamauskas, and L. Yang: The chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds. *Chem. Rev.*, **104**, 849-902 (2004).

- 49 H. Imura, A. Shimada, M. Naota, T. Morita, M. Togawa, T. Hasegawa, and Y. Seko: Vanadium toxicity in Mice: Possible impairment of lipid metabolism and mucosal epithelial cell necrosis in the small intestine. *Toxicol. Pathol.*, **41**, 842-856 (2012).
- 50 AW. Obianime, M. Gogo-Abite, and II. Roberts: The effects of ammonium metavanadate on biochemical, hormonal, haematological and histopathological parameters of the female Wistar rats. *Niger. J. Physiol. Sci.*, **24**, 187-194 (2009).
- 51 CI. Wei, MA. Al. Bayati, MR. Culbertson, LS. Rosenblatt, and LD. Hansen: Acute toxicity of ammonium metavanadate in mice. *J. Toxicol. Environ. Health.*, **10**, 673-687 (1982).
- 52 MJ. Hosseini, F. Shaki, MG. Khansari, and J. Pourahmad: Toxicity of vanadium on isolated rat liver mitochondria: a new mechanistic approach. *Metallomics*, **5**, 152-166 (2013).
- 53 AK. Chandra, R. Ghosh, A. Chatterjee, and M. Sarkar: Amelioration of vanadium-induced testicular toxicity and adrenocortical hyperactivity by vitamin E acetate in rats. *Mol. Cell. Biochem.*, **306**, 189-200 (2007).
- 54 H. Yanagisawa, Y. Miyakoshi, K. Kobayashi, K. Sakae, I. Kawasaki, Y. Suzuki, and J. Tamura: Long-term intake of a high zinc diet causes iron deficiency anemia accompanied by reticulocytosis and extra-medullary erythropoiesis. *Toxicol. Lett.*, **191**, 15-19 (2009).
- 55 TI. Fortoul, G. Piñón-Zarate, ME. Diaz-Bech, A. González-Villalva, P. Mussali-Galante, V. Rodriguez-Lara, L. Colin-Barenque, M. Martinez-Pedraza, and LF. Montañó: Spleen and bone marrow megakaryocytes as targets for inhaled vanadium. *Histol. Histopathol.*, **23**, 1321-1326 (2008).
- 56 高橋道人、福島昭治: 伊東毒性病理学 丸善出版株式会社 302-303 (2013).
- 57 毒性病理組織学 日本毒性病理学会編 p.288 (2000).
- 58 WC. Prozialeck, JR. Edwards, and JM. Woods: The vascular endothelium as a target of cadmium toxicity. *Life Sci.*, **79**, 1493-1506 (2006).
- 59 International Harmonization of Nomenclature and Diagnostic Criteria (INHAND): Proliferative and Non-Proliferative Lesions of the Male Reproductive and Mammary Systems of the Rat and Mouse. A Joint Publication of the American, British, European, and Japanese Societies of Toxicologic Pathology. 52S-53S. (2012).
- 60 H. Sakurai, K. Tsuchiya, M. Nukatsuka, J. Kawabe, S. Ishikawa, H. Yoshida, and M. Komatsu: Insulin-mimetic action of vanadyl complexes. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **8**, 193-200 (1990).
- 61 H. Sakurai, S. Funakoshi, and Y. Adachi: New developments of insulinomimetic dinuclear vanadyl(IV)-tartrate complexes. *Pure Appl. Chem.*, **77**, 1629-1640 (2005).
- 62 B. Ramachandran, M. Kandaswamy, V. Narayanan, and S. Subramanian: Insulin mimetic effects of macrocyclic binuclear oxovanadium complexes on streptozotocin-induced experimental diabetes in rats. *Diabetes Obes. Metab.*, **5**, 455-461 (2003).
- 63 O. Kahn, and P. Tola: Synthesis and magnetic properties of $\text{VOB(fsa)}_2\text{en} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ with $\text{B} = \text{Mn}$ and Zn and $\text{H}_4(\text{fsa})_2\text{en} = N,N'$ -bis(2-hydroxy,3-carboxybenzylidene)-1,2-diaminoethane. *Inorg. Chim. Acta*, **31**, L405-L406 (1978).

- 64 O. Kahn, J. Galy, Y. Journaux, J. Jaud, and I. Morgenstern-Badarau: Synthesis, crystal structure and molecular conformations, and magnetic properties of a $\text{Cu}^{\text{II}} - \text{VO}^{\text{II}}$ heterobinuclear complex: interaction between orthogonal magnetic orbitals. *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 2165-2176 (1982).
- 65 JC. Duff, and EJ. Bills: Reactions between hexamethylenetetramine and phenolic compounds. Part I. A new method for the preparation of 3- and 5-aldehydosalicylic acids. *J. Chem. Soc.*, 1987 (1932).
- 66 太田 俊明 編 : X線吸収分光法 - XAFS とその応用 - . IPC, 55-65 (2002).
- 67 M. Newville, B. Ravel, D. Haskel, JJ. Rehr, EA. Stern, and Y. Yacoby: Analysis of multiple-scattering XAFS data using theoretical standards. *Physica. B.*, 154-156 (2008/2009).
- 68 MAK. Ahmed, H. Fjellvag, A. Kjekshus, and B. Klewe: New oxovanadium(IV) complexes with mixed ligands - synthesis, thermal stability, and crystal structure of $(\text{VO})_2(\text{acac})_2(\mu\text{-OEt})_2$ and $(\text{VO})_2(\text{thd})_2(\mu\text{-OEt})_2$. *Anorg. Allg. Chem.*, **630**, 2311-2318 (2004).
- 69 JA. Bonadies, WM. Butler, VL. Pecoraro, and C. Carrano: Novel reactivity patterns of (*N,N'*-ethylenebis(salicylideneaminato))oxovanadium(IV) in strongly acidic media. *J. Inorg. Chem.*, **26**, 1218-1222 (1987).
- 70 T. Taguchi, T. Ozawa, and H. Yashiro: REX2000: yet another XAFS analysis package. *Physica. Scripta*, **T115**, 205-206 (2005).
- 71 AL. Ankudinov, C. Bouldin, JJ. Rehr, EA. Stern, and Y. Yacoby: Parallel calculation of electron multiple scattering using Lanczos algorithms. *Phys. Rev. B.*, **65**, 104-107 (2002).
- 72 M. Nakai, H. Watanabe, C. Fujiwara, H. Kakegawa, T. Satoh, J. Takada, R. Matsushita, and H. Sakurai: Mechanism on insulin-like action of vanadyl sulfate: studies on interaction between rat adipocytes and vanadium compounds. *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 719-725 (1995).
- 73 H. Yasui, A. Tamura, T. Takino, and H. Sakurai: Structure-dependent metallokinetics of antidiabetic vanadyl-picolinate complexes in rats: studies on solution structure, insulinomimetic activity, and metallokinetics. *J. Inorg. Biochem.*, **91**, 327-338 (2002).
- 74 T. Moroki, Y. Yoshikawa, K. Yoshizawa, A. Tsubura, and H. Yasui: Testicular Mineralization in KK- A^{y} Mice Treated with an Oxovanadium Complex. *J. Toxicol. Pathol.*, **26**, 329-333 (2013).
- 75 T. Moroki, Y. Yoshikawa, K. Yoshizawa, A. Tsubura, and H. Yasui: Morphological analysis of the pancreas and liver in diabetic KK- A^{y} mice treated with zinc or oxovanadium complexes. *Metallomics*, **6**, 1632-1638 (2014).
- 76 V. Migliorati, G. Mancini, S. Tatoli, A. Zitolo, A. Filippini, DS. Panfilis, DA. Cicco, and P. D'Angelo: Hydration properties of the Zn^{2+} ion in water at high pressure. *Inorg. Chem.*, **52**, 1141-1150 (2013).
- 77 SK. Koutmou, A. Casiano-Negroni, MM. Getz, S. Pazicni, JA. Andrews, EJ. Penner-Hahn, MH. Al-Hashimi, and AC. Fierke: NMR and XAS reveal an inner-sphere metal binding site in the P4 helix of the metallo-ribozyme ribonuclease P. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA*, **107**, 2479-2484 (2010).
- 78 SM. Sajidu, I. Persson, WR. Masamba, and EM. Henry: Mechanisms of heavy metal sorption on alkaline clays from Tundulu in Malawi as determined by EXAFS. *J. Hazard Mater.*, **158**, 401-409 (2008).
- 79 AJ. Dent, D. Beyersmann, C. Block, and SS. Hasnain: Two different zinc sites in bovine 5-aminolevulinic acid dehydratase distinguished by extended X-ray absorption fine structure. *Biochemistry*, **29**, 7822-7828 (1990).

- 80 P. Tola, O. Kahn, C. Chauvel, and H. Coudanne: Intramolecular ferrimagnetic coupling in Cu(II) – Ni(II) and Cu(II) – Mn(II) heterobinuclear complexes. *Nouv. J. Chim.*, **1**, 467-473 (1977).
- 81 Kynoch Press. International tables for X-ray crystallography, 3 (1962).
- 82 市田浩三, 吉本富士市: “スプライン関数とその応用”, 教育出版, 東京, (1976).
- 83 AR. Diani, GA. Sawada, BA. Hannah, KS. Jodelis, MA. Connell, CL. Connell, TJ. Vidmar, and BM. Wyse: Analysis of pancreatic islet cells and hormone content in the spontaneously diabetic KK-A^y mouse by morphometry, immunocytochemistry and radioimmunoassay.. *Virchows Arch.*, **412**, 53-61 (1987).
- 84 AR. Diani, GA. Sawada, NY. Zhang, BM. Wyse, CL. Connell, TJ. Vidmar, and MA. Connell: The KK-A^y mouse: a model for the rapid development of glomerular capillary basement membrane thickening. *Blood Vessels*, **24**, 297-303 (1987).
- 85 Jcl マウス・ラットのルーツを語る: Jcl NEWS No.6 (1995).
- 86 J.Folch, M. Lees, and GHS. Sloane: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509 (1957).

引用文献 83－86 は口述発表時の指摘を受けて追加した文献である。

Appendices

Appendix 1 Individual plasma insulin concentration and testis toxicity score in nontreated controls and KK-A^y mice treated with metal complexes for 4 weeks

No.	Insulin (pg/mL)	Testis toxicity score*
KK-A ^y -1	123.2	0
KK-A ^y -2	143.6	0
KK-A ^y -3	175.4	0
KK-A ^y -4	171.8	0
VO(opt) ₂ -1	7.1	5
VO(opt) ₂ -2	21.6	8
VO(opt) ₂ -4	179.3	0
VO(opt) ₂ -5	109.8	0
VO(ema) ₂ -1	79.2	0
VO(ema) ₂ -2	66.7	5
VO(ema) ₂ -3	65.8	0
VO(ema) ₂ -4	177.2	0
VO(ema) ₂ -5	207.3	0
Zn(opt) ₂ -1	121.5	0
Zn(opt) ₂ -2	117.1	0
Zn(opt) ₂ -3	95.3	0
Zn(opt) ₂ -4	94.4	0
Zn(opt) ₂ -5	125.6	0
Zn(opt) ₂ -6	117.1	0
Zn(glc) ₂ -1	180.1	0
Zn(glc) ₂ -2	172.8	0
Zn(glc) ₂ -3	365.9	0
Zn(glc) ₂ -4	312.2	0
Zn(glc) ₂ -5	316.4	0
Zn(glc) ₂ -6	234.3	0

*: Reference the second chapter

Appendix 2 Organ weight of lung, heart, liver, spleen, kidney and testis in 2 weeks administration groups

Animal No.	Body weight	Lung		Heart		Liver		Spleen		Kidney		Testis	
		A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C
KK-A ^y -2-1	37.9	145.4	3.836	137.6	3.631	1807.0	47.678	109.2	2.881	459.7	12.129	167.8	4.427
KK-A ^y -2-2	37.3	141.6	3.796	155.1	4.158	1412.4	37.866	81.0	2.172	478.2	12.820	182.2	4.885
KK-A ^y -2-3	41.4	157.9	3.814	173.3	4.186	1573.0	37.995	76.6	1.850	430.4	10.396	177.5	4.287
KK-A ^y -2-4	41.7	169.0	4.053	174.5	4.185	1815.1	43.528	79.5	1.906	447.0	10.719	180.1	4.319
Animal No.	Body weight	Lung		Heart		Liver		Spleen		Kidney		Testis	
		A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C
VO(opt) ₂ -2-1	35.6	147.5	4.143	119.9	3.368	1563.7	43.924	90.1	2.531	417.2	11.719	163.4	4.590
VO(opt) ₂ -2-2	37.1	181.6	4.895	184.9	4.984	1531.8	41.288	163.4	4.404	506.3	13.647	123.6	3.332
VO(opt) ₂ -2-3	40.3	184.4	4.576	148.1	3.675	1771.7	43.963	152.7	3.789	514.2	12.759	112.1	2.782
Animal No.	Body weight	Lung		Heart		Liver		Spleen		Kidney		Testis	
		A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C
VO(ema) ₂ -2-1	44.6	152.8	3.426	171.9	3.854	1709.3	38.325	80.6	1.807	525.8	11.789	195.2	4.377
VO(ema) ₂ -2-2	36.8	162.4	4.413	142.3	3.867	1546.1	42.014	157.3	4.274	456.2	12.397	123.1	3.345
VO(ema) ₂ -2-3	43.0	171.8	3.995	173.6	4.037	1597.0	37.140	148.3	3.449	467.9	10.881	214.9	4.998
Animal No.	Body weight	Lung		Heart		Liver		Spleen		Kidney		Testis	
		A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C
Zn(opt) ₂ -2-1	40.6	163.2	4.020	182.2	4.488	1667.1	41.062	113.4	2.793	456.0	11.232	168.5	4.150
Zn(opt) ₂ -2-2	33.8	159.4	4.716	144.2	4.266	1599.3	47.317	120.3	3.559	416.2	12.314	188.4	5.574
Zn(opt) ₂ -2-3	43.8	167.5	3.824	200.9	4.587	1541.6	35.196	123.9	2.829	423.0	9.658	194.9	4.450
Zn(opt) ₂ -2-4	33.9	163.9	4.835	284.8	8.401	1375.5	40.575	118.2	3.487	362.1	10.681	185.2	5.463
Animal No.	Body weight	Lung		Heart		Liver		Spleen		Kidney		Testis	
		A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C
Zn(glc) ₂ -2-1	37.4	137.3	3.671	160.3	4.286	1535.6	41.059	87.6	2.342	443.7	11.864	175.4	4.690
Zn(glc) ₂ -2-2	40.1	148.7	3.708	182.9	4.561	1333.4	33.252	75.2	1.875	449.5	11.209	191.6	4.778
Zn(glc) ₂ -2-3	38.1	148.9	3.908	147.2	3.864	1494.1	39.215	100.6	2.640	427.4	11.218	189.1	4.963
Zn(glc) ₂ -2-4	40.2	129.7	3.226	186.0	4.627	1284.3	31.948	76.4	1.900	374.0	9.303	185.0	4.602
Zn(glc) ₂ -2-5	42.4	167.7	3.955	176.0	4.151	1568.5	36.993	88.0	2.075	457.2	10.783	209.1	4.932
Zn(glc) ₂ -2-6	40.3	140.9	3.496	144.6	3.588	1410.7	35.005	77.4	1.921	476.9	11.834	221.8	5.504

A: Absolute weight of organs (mg), C: Comparative weight of organs (mg/g)

Appendix 3 Organ weight of lung, heart, liver, spleen, kidney and testis in 4 weeks administration groups

Animal No.	Body weight	Lung		Heart		Liver		Spleen		Kidney		Testis	
		A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C
KK-A ^y -4-1	38.5	146.8	3.813	154.7	4.018	1592.0	41.351	93.0	2.416	452.8	11.761	197.3	5.125
KK-A ^y -4-2	44.5	170.4	3.829	180.9	4.065	1688.9	37.953	75.7	1.701	520.0	11.685	204.3	4.591
KK-A ^y -4-3	45.4	208.9	4.601	243.1	5.355	2033.8	44.797	83.0	1.828	497.0	10.947	110.8	2.441
KK-A ^y -4-4	38.1	154.4	4.052	148.9	3.908	1638.4	43.003	65.7	1.724	496.4	13.029	196.4	5.155

Animal No.	Body weight	Lung		Heart		Liver		Spleen		Kidney		Testis	
		A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C
VO(opt) ₂ -4-1	41.5	154.6	3.725	161.8	3.899	1556.3	37.501	84.7	2.041	460.6	11.099	99.8	2.405
VO(opt) ₂ -4-2	40.1	150.0	3.741	164.3	4.097	2001.0	49.900	191.0	4.763	483.2	12.050	76.6	1.910
VO(opt) ₂ -4-3	41.9	159.8	3.814	170.3	4.064	1481.3	35.353	72.5	1.730	410.5	9.797	194.7	4.647
VO(opt) ₂ -4-4	40.8	161.9	3.968	177.1	4.341	1613.6	39.549	75.7	1.855	500.2	12.260	236.5	5.797
VO(opt) ₂ -4-5	36.5	148.2	4.060	145.4	3.984	1640.9	44.956	95.4	2.614	417.5	1143.8	192.9	5.285

Animal No.	Body weight	Lung		Heart		Liver		Spleen		Kidney		Testis	
		A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C
VO(ema) ₂ -4-1	42.0	147.0	3.500	162.6	3.871	1358.9	32.355	73.5	1.750	416.3	9.912	192.4	4.581
VO(ema) ₂ -4-2	42.4	159.2	3.755	165.8	3.910	1821.5	42.960	141.7	3.342	482.3	11.375	111.7	2.634
VO(ema) ₂ -4-3	38.3	157.8	4.120	143.5	3.747	1254.5	32.755	66.2	1.728	451.4	11.786	181.6	4.742
VO(ema) ₂ -4-4	39.7	165.4	4.166	144.1	3.630	1866.4	47.013	107.0	2.695	526.6	13.264	191.8	4.831
VO(ema) ₂ -4-5	43.5	133.3	3.064	182.5	4.195	1505.2	34.602	72.4	1.664	394.5	9.069	148.9	3.423

Animal No.	Body weight	Lung		Heart		Liver		Spleen		Kidney		Testis	
		A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C
Zn(opt) ₂ -4-1	39.5	158.0	4.000	158.0	4.000	1633.3	41.349	83.2	2.106	452.7	11.461	186.5	4.722
Zn(opt) ₂ -4-2	40.2	168.7	4.197	169.0	4.204	1717.3	42.719	137.2	3.413	495.9	12.336	207.9	5.172
Zn(opt) ₂ -4-3	41.2	177.8	4.316	173.7	4.216	1571.4	38.141	122.9	2.983	433.4	10.519	194.6	4.723
Zn(opt) ₂ -4-4	43.9	180.6	4.114	175.3	3.993	1645.3	37.478	127.8	2.911	478.3	10.895	214.0	4.875
Zn(opt) ₂ -4-5	43.2	163.9	3.794	171.8	3.977	1830.9	42.382	146.2	3.384	420.9	9.743	326.4	7.556
Zn(opt) ₂ -4-6	44.2	178.7	4.043	155.6	3.520	1654.1	37.423	162.6	3.679	452.3	10.233	151.8	3.434

Animal No.	Body weight	Lung		Heart		Liver		Spleen		Kidney		Testis	
		A	C	A	C	A	C	A	C	A	C	A	C
Zn(glc) ₂ -4-1	40.9	160.7	3.929	142.3	3.479	1605.9	39.264	87.1	2.130	522.6	12.778	181.4	4.435
Zn(glc) ₂ -4-2	39.1	165.8	4.240	200.5	5.128	1669.9	42.708	92.6	2.368	494.9	12.657	234.9	6.008
Zn(glc) ₂ -4-3	47.4	162.5	3.428	181.9	3.838	2580.2	54.435	86.9	1.833	589.9	12.445	196.4	4.143
Zn(glc) ₂ -4-4	43.4	169.3	3.901	190.6	4.392	1974.2	45.488	162.9	3.753	515.8	11.885	197.4	4.548
Zn(glc) ₂ -4-5	41.5	137.3	3.308	179.4	4.323	1392.8	33.561	74.8	1.802	424.6	10.231	197.2	4.752
Zn(glc) ₂ -4-6	41.6	170.0	4.087	171.5	4.123	1695.7	40.762	129.1	3.103	543.5	13.065	235.1	5.651

A: Absolute weight of organs (mg), C: Comparative weight of organs (mg/g)

Appendix 4 Method of XAFS data analysis

測定試料は窒化ホウ素と混合し、錠剤形成器を用いてペレット状にし、マイラー製のフィルムに厳封して用いた。また試料と BN の混合比は式

$$\frac{I}{I_0} = \exp(-\mu x)$$

を用いて $\ln(I_0/I)$ が 1 になるように混合量を調節した。ただし、 I_0 は入射 X 線強度、 I は透過 X 線強度、 x は試料の厚さ (cm) および μ は試料の線吸収係数 (cm^{-1}) である。錯体の性質上ペレット形成が困難な錯体については、5-7 枚のメンブレンテープに均一に錯体を付着させ、これを重ねて測定に用いた。

測定によって得られた EXAFS スペクトルにはバックグラウンド (μ_s) が含まれており、 μ_s は吸収端前の当該吸収端に関与しないプレエッジバックグラウンド (μ_{pre}) と吸収端後の滑らかに減少する部分のポストエッジバックグラウンド (μ_{post}) の二つに分けて除去した。 μ_{pre} については Victoreen の式⁸¹に定数項を加えた次式 $\mu_{\text{pre}}(\lambda) = A + C\lambda^3 - D\lambda^4$ を用いて、吸収端前のデータに対して最小二乗近似し、除去した。 μ_{post} についてはいくつかの推定方法が確立されているが、本実験では区分キュービックスプライン法により μ_{post} を推定した⁶⁷。

光電子の波数を変数とした $\chi(k)$ を計算するために、光電子が放出される閾値である吸収端のエネルギー E_0 を、吸収端の midpoint として決定した。 E_0 を決定した後、次式によってエネルギー E を光電子の波数 k に変換した。

$$k = 2\pi \frac{\sqrt{2m(E - E_0)}}{h}$$

ここで、 m は電子の質量、 h はプランク定数である。この k を用いて次式により $\chi(k)$ を求めた。

$$\chi(k) = \frac{\mu(k) - \mu_s(k)}{\mu_0(k)}$$

μ_0 はエッジジャンプである。また EXAFS 振動は平面波単散乱理論により次式で表される⁸²。

$$\chi(k) = S_0^2 \sum_i \frac{N_i F_i(k_i)}{k_i r_i^2} e^{-2(k_i^2 \sigma_i^2)} \sin(2k_i r_i + \phi_i(k_i))$$

添え字の i は配位圏の番号を示す。 N_i は配位数、 $F_i(k_i)$ は後方散乱強度、 k_i は i 番目の配位圏の波数、 r_i は結合距離、 σ_i は Debye-Waller 因子、 $\phi_i(k_i)$ は位相シフトである。 S_0^2 は多体効果による振幅の減衰因子である。

次にフーリエ変換で、いろいろな周波数成分を持つ k 空間の関数を次式により r 空間の動径構造関数 $F(r)$ に変換して各成分を分離した。

$$F(r) = \sqrt{\frac{1}{2\pi}} \int_{k_{\min}}^{k_{\max}} k^3 \chi(k) w(k) \exp(-2ikr) dk$$

ここで $w(k)$ は次に示す窓関数である。

$$w(k)= \begin{cases} \frac{1}{2} - \frac{1}{2} \cos \frac{\pi(k-k_{\min})}{\Delta k} & k_{\min} \leq k \leq k_{\min} + \Delta k \\ \frac{1}{2} + \frac{1}{2} \cos \frac{\pi(k-k_{\max}+\Delta k)}{\Delta k} & k_{\min} + \Delta k \leq k \leq k_{\max} - \Delta k \\ & k_{\max} - \Delta k \leq k \leq k_{\max} \end{cases}$$

$\chi(k)$ はそのままフーリエ変換するのではなく k^3 の重みをつけて計算した。窓関数 $w(k)$ において

$$\Delta k = 1.5 \times 10^{-3} \text{ pm}^{-1}$$

とし、 $\chi(k)$ が 0 となる k_{\min} および k_{\max} の値をとった。

単元素からなる物質では位相因子を入れてフーリエ変換を行い、動径構造関数 $F(r)$ のピークが正しい結合距離を与えるようにすることができるが、複数の元素を含む場合は位相因子の補正をせずにフーリエ変換するため、実際の結合距離より 20 - 50 pm 短いところにピークが位置することになる。

正しいパラメータを求めるために、FEFF 8.20 のプログラムを用いて計算した $F_i(k_i)$ および $\varphi_i(k)$ を用いて FEFFIT のプログラムによる非線形最小二乗計算を行い、 r 空間でのフィッティングを行った⁶⁷。 $F_i(k_i)$ および $\varphi_i(k)$ の算出には 4 価バナジウムでは[VOsalen] の X 線結晶構造解析法の結果から得られている座標を、亜鉛では[Zn(OH₂)₆]²⁺を含む水溶液を標準試料として N を固定した⁶⁸⁻⁷¹。