

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K07884

研究課題名(和文) 1型糖尿病の脂質とタンパク質にも対応する新規追加インスリン投与法の開発

研究課題名(英文) New adjustmet method of inslin dose for fat and protein in type 1 diabetes

研究代表者

川村 智行 (Kawamura, Tomoyuki)

大阪公立大学・大学院医学研究科・客員准教授

研究者番号：60271186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：1型糖尿病患者におけるインスリン療法では、食事の糖質量に応じてインスリン量を調整するカーボカウント法が確立している。一方で、脂質・タンパク質を摂取した場合のインスリン調整方法は確立していないことが課題となっている。しかし実際の患者を用いた研究には限界がある。今回、ヒトとホルモンと消化管機能が似ているブタを実験的に1型糖尿病として、持続グルコースモニタリングを可能な状態にすることに成功した。つまり1型糖尿病患者のモデルとしてブタを使用できるようになった。今後、様々な組成を持った食事をこのブタに与えることで血糖値への影響を研究し、適切なインスリン療法の開発に役立てることができる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1型糖尿病の治療の進歩には目覚ましいものがある。しかし、実際には食事が血糖値に与える影響については未知な部分が多く血糖管理が困難なことも少なくない。1型糖尿病患者の生活における制限や予後への不安の原因になっている。今回、1型糖尿病モデルブタの作成に成功したことは、実際の患者では困難な様々な研究が可能となり、1型糖尿病患者の日常生活の質(QOL)の改善や、予後の改善につなげることができる。1型糖尿病患者の、QOLや予後の改善は、社会的・医療経済に与える好影響は大きいものであると考える。

研究成果の概要(英文)：In insulin therapy for patients with type 1 diabetes, the carbohydrate counting method, which adjusts insulin dose according to the sugar content in the diet, is well established. On the other hand, the method of adjusting insulin when lipid and protein are consumed has not been established, which is a challenge. However, studies using actual patients have limitations. In this study, we have succeeded in creating an experimental type 1 diabetic pig, which has similar hormonal and gastrointestinal functions to humans and is capable of sustained glucose molitarization. This means that pigs can now be used as models for type 1 diabetics. In the future, the effects on blood glucose levels can be studied by feeding the pigs a diet with various compositions, which can be used to develop appropriate insulin therapy.

研究分野：内分泌糖尿病

キーワード：1型糖尿病 インスリン療法

## 1．研究開始当初の背景

1型糖尿病は、小児期に発症することが多い疾患で有り、現在の医療では一旦罹患すると生涯インスリン注射による治療が必要な不治の疾患である。しかも、インスリン療法の発達した現在においても、**20** 歳代後半から腎症や網膜症などの長期合併症が高率に発生するため、医療経済的な重要性も非常に高い。したがって、その発症機序の解明、予防法・根治法の開発、予後の改善は医学的社会的に重要な命題である。近年の1型糖尿病のインスリン療法は、急速な進歩が見られ、遺伝子工学によりインスリンのアミノ酸配列を変異させることによって、皮下からの吸収を早めた超速効型インスリンと逆に皮下での滞留時間を長くした持効型インスリンの登場の一つのパラダイムシフトであった。これらのインスリンの登場により、インスリンの皮下注射で健常人のインスリン分泌に近似したインスリン動態を再現できるようになった。持効型インスリンは、一日**1**回の皮下注射で**24**時間以上の安定した血中インスリン濃度を維持することが出来るため、健常人で空腹時でも分泌されている基礎インスリンの役割を担うことが出来る。また食事量に応じた超速効型インスリンを食事前に投与することで、健常人において食事に応じて血糖値の上昇を抑制するために分泌される追加インスリンの役割をさせる。この食事量に応じた超速効型インスリンの調整方法は、食後血糖に最も大きな影響力をもつ炭水化物量に応じて調整する **carbohydrate counting**(カーボカウント)を用いることが推奨される。(川村智行編集責任：かんたんカーボカウント改訂版 医薬ジャーナル社 **2009**年、日本糖尿病学会編著：カーボカウントの手引 文光堂 **2017**年)一方で、一方で脂質・タンパク質を多く含む食事の場合には、カーボカウントの応じた糖質に対する追加インスリンだけでは食後 **3-4** 時間後以降の血糖上昇を認めることがある。そのような食事の場合には、カーボカウントに加えて脂質・タンパク質を考慮した追加インスリンの投与が必要である。しかし現時点では、日常生活で容易に使える脂質・タンパク質への追加インスリン投与法は確立していない。1型糖尿病患者の日常生活における食事の内容に応じた追加インスリンの投与方法の確立のためにはカーボカウントだけではなく、脂質・タンパク質による血糖上昇も管理することが、長期的な合併症予防のためには必須の課題である。

## 2．研究の目的

本研究の目的は、『**1型糖尿病患者における、カーボカウントに加えて脂質・タンパク質摂取にも対応できる新規追加インスリン投与法の開発**』である。

1型糖尿病のインスリン療法における追加インスリンの調整方法としてのカーボカウント法は世界的にもほぼ認知され確立してきた。しかし、食事中の脂質・タンパク質による血糖上昇の抑制方法については十分に解明されていない。この研究では、まずその点を解明することから始める。

## 3．研究の方法

食事中の脂質やタンパク質では、カロリーだけではなくその両者の組成や種類による影響も考慮することが必要であると考えられる。そのため、様々な食事が食後血糖に与える影響を網羅的に検証することが必要となる。しかし、1型糖尿病患者に、網羅的に特に極端な組成の食事を食べてもらうことは不可能である。

そこで本研究では、人の消化器官に近いことが知られているブタを用いた研究を計画している。マイクロミニブタを1型糖尿病のモデル動物にすることで、人では出来ない様々な組成の食事

による血糖変動を検証し、その血糖変動を抑制するためにインスリン療法を開発することを目的とする。また同時並行で、1型糖尿病患者をもちいた食事と食後血糖の変動に関する臨床研究を行うことで、両者の疑問点や課題を補完することで、より臨床に直接還元できるインスリン療法を開発したいと考えている。

）1型糖尿病のモデル動物を用いた動物実験

**Step 1.** マイクロプタをもちいた1型糖尿病モデルの作成：プタの内分泌・代謝、消化管機能は人間に非常に近く、疾病のモデル動物として適していることが知られている。生後3ヶ月のマイクロプタにストレプトゾトシンを静脈投与することによりインスリン分泌能を低下させるとともにインスリンポンプ療法を開始することで、1型糖尿病モデルを作成する。全身麻酔下で中心静脈カテーテルを留置することで経時的採血を可能にする。血糖値、インスリン、血中CPR、グルカゴンの日内変動を測定し、内因性インスリン分泌能、グルカゴン分泌量などの評価し、1型糖尿病モデルとしての有用性を評価する。

**Step 2.** 1型糖尿病マイクロプタを用いた飼料組成と食後血糖値とそして追加インスリン量の研究：栄養成分の配合が異なった各種飼料を与えることの血糖値の影響を検証する。投与飼料は、糖質、脂質、タンパク質の標準的バランスの飼料、脂質量やタンパク質量の多い飼料、脂質だけ、またはタンパク質だけの飼料を与えた場合の血糖値の変動、血中でのグルカゴン、遊離脂肪酸、インクレチンの変動などを検討する。得られた知見を元に、追加インスリンの至適投与方法を検討する。

**Step 3.** 1型糖尿病マイクロプタを用いたGLP-1製剤、抗グルカゴン受容体抗体の投与とインスリン必要量の研究：GLP-1製剤や抗グルカゴン受容体抗体によるグルカゴン作用抑制が与えるインスリン必要量への影響について1型糖尿病モデルプタを用いて検討する。

）1型糖尿病の患者さんの実生活に基づいた臨床研究

持続血糖モニター付きインスリンポンプ療法（SAP）を実施中の1型糖尿病患者さんを対象（同意取得後）に、食事とインスリン投与方法の違いにおける食後血糖変動を検討する。

**Step 1.** 基礎インスリンの再設定：一般的なインスリンポンプ療法の基礎インスリンの設定は、入院した条件で1食ずつ絶食を行い血糖変動が起こらないように基礎注入量を設定する。本研究では、外来通院中の対象患者さんに日常生活の中で絶食や食事時間の変更を行うことで基礎インスリンの再設定を行う。また短い絶食時間では前の食事の影響が排除できていない可能性を考慮し、絶食の一つ前の食事の脂質・タンパク質を出来るだけ含まない食事とする。

**Step 2** 脂質・タンパク質に対する新規追加インスリン投与方法の確立：日常生活における至適投与量の確立を目指すので、まず昼食に限定して実施する。現代の日本人が日常で摂取することの頻度の多い食事の中で、脂質とタンパク質を多く含む食品の平均組成を分析する。そのような食事に対して、カーボカウントに追加して脂質とタンパク質に対応するインスリンを投与する。

Pańkowska が提唱するFPUの考えに準じた追加インスリンの投与方法を試みるが、安全のためにインスリン/カーボ比×FPUの50%を投与量として開始する。その結果としての食後血糖変動に応じた至適投与量や投与時間を検討する。FPUの考え方では、脂質とタンパク質の比率や素材を考慮せずに総カロリーとして扱うが、本研究では、同様の組成で種類が異なるもの（ステーキ1食：437 kcal, タンパク質19 g, 脂質33 gと、秋刀魚2匹；428 kcal, タンパク質22 g, 脂質34 g）、カロリーは同等で組成の違いが大きいもの（ささみ300g：330 kcal, タンパク質75 g, 脂質3 gと、オリーブオイルの塩キャベツ：キャベツ150 g, オリーブオイル35 g, 315 kcal, タンパク質0 g, 脂質35 g）といった食事の血糖値への影響と至適インスリン投与方法についても検討する。以上の結果と経験に基づいて、カーボカウントに加えてタンパク質と脂質も考

慮した新規追加インスリン投与法を開発し、その指導演法も確立する。

**Step 3** カーボカウントのみと新規追加インスリン投与法の無作為比較研究：インスリンポンプ療法中の1型糖尿病患者さん40名を、無作為に2つのグループに分け、一方はカーボカウントのみの追加インスリン、もう一方はStep 2で確立した新規追加インスリン投与法を実施してもらい、6ヶ月間の血糖管理に関する比較研究を行う（HbA1c、低血糖頻度、血糖変動指数など）

#### 4. 研究成果

##### ）動物実験

人を対象とした研究では、再現性の問題と負荷食品の負担の問題があり、動物実験が必須と考えられる。そこで、1型糖尿病のモデルとしてブタを用いた研究が必要であると考えてきた。

第1段階、取り扱いの利便性を考慮してマイクロミニブタを素材として使用した。

マイクロミニブタを麻酔下において、頸静脈内にカテーテルを留置し、頸背部にカテーテルの投与口を保持することで、薬物の静脈投与と採血が随時可能な状況を確認した。そしてアボット社のフリースタイルリブレを皮下に留置し、持続的に血糖モニタリングを可能な状態とした。続いて膵細胞の破壊を目的にストレプトゾトシン **STZ** (**200 mg/kg**) を静注した。その結果、静注の数時間後より、血糖値の上昇から、糖尿病状態であることを確認した。また、インスリンポンプを用いて静脈内からの持続インスリン注入を試みたが、ブタの体動によって脱落してしまい失敗に終わった。その後、数日の血糖値をモニタリングには成功したが、ブタを糖尿病状態で長期管理することはできなかった。実験後のブタの剖検では、膵島の障害を確認できたが、間質性腎炎からの腎不全状態を起こしておりことが判明した。この結果より、ストレプトゾトシン投与量や投与法には再検討が必要であることがわかった。

第2段階、引き続きマイクロミニブタを素材とした。

マイクロミニブタの2頭を麻酔下において、中心静脈カテーテルを留置した。1頭#1にはアボット社フリースタイルリブレを皮下に留置し、もう1頭#2には、**Dexcom G6** を頸部剃毛後に装着して持続的に血糖モニタリングを可能な状態とした。その後、**STZ** 溶液を静脈内にインフュージョンポンプで **2ml/min** の速度で投与した。#1に対して、1回目は **50mL** シリンジを用いて、**250mg/3mL/kg** を投与した。#2に対して、1回目は **20mL** シリンジを用いて、**150mg/mL/kg** を投与した。まず、1回投与とした。血糖値が一定の数値 (**150mg/mL**) 以上に上がらないときは2回目を投与するとしたが、投与量の異なる2個体とも **150mg/mL** 以上を示したため、1回の投与のみとした。

2頭のマイクロミニブタに一定濃度の **STZ** を静脈内投与して高血糖状態を作製し、維持管理できた。

インスリン投与は、**STZ** 投与の翌日より、両者とも **300mg/dL** 以上の高血糖であることを確認後、トレシーバインスリン（ノボ社）**3** 単位-**5** 単位を血糖値確認しながら、高値にならないように、前日の状態に応じて、毎日変則 **1** 回皮下に投与した。

飼料は、馴化検疫・試験期間中は標準食 **MP-A**（オリエンタル酵母工業株式会社）を中心に与えた。食欲がない時は、マルチラック（中部飼料株式会社）ブタ用固型飼料を加えて給餌を確実にさせた。給餌量は、モデル作製後は **200g/day** とし、その後 **300g/day** とした。糖尿病が著しいため2カ月終了後から **400g/day** 給餌した。

**Step2** において、タンパク高純度の飼料として#1にホエイカゼイン **100g**+アスパルテーム **2g**、ホエイカゼイン **200g**+アスパルテーム **4g**、ホエイカゼイン **300g**+アスパルテーム **6g** もしくはザバス **86.4g**；アスパルテーム **1.7g** を1回ずつ給餌し、#2にホエイカゼイン **100g**+アスパル

チーム **2g** , 卵白カゼイン **100g**+ アスパルテーム **2g** , 卵白カゼイン **300g**+ アスパルテーム **6g** を **1** 回ずつ給餌した。

それぞれ、摂取させることに成功した。これによってタンパク質高純度の飼料摂取による血糖値への影響を検証できることが確認出来た。

また、**STZ** 投与数日後の採血検体をもちいて、ブタ血清 **C** ペクチドを測定したが、**STZ** 投与前に比べて著明に低値、感度以下まで低下していた。さらに剖検後、両者とも膵切片において、膵島を見つけることが出来ず、**STZ** によって膵島を破壊しインスリン依存性状態に出来ていたことを確認した。

#### ) 臨床研究

インスリン療法中の1型糖尿病の患者さんに油、タンパク質の多い食事を食べていただいた場合の検討を行った。

第1段階、患者さんに血糖変動を見ていただいた研究を中心に行ってきました。持続血糖モニタリングを装着して、寿司をできるだけ多く摂取してもらった。その結果、30貫程度までは、カーボカウントだけで食後血糖を管理できることが確認できた。次に糖質の無い、ステーキ肉だけの摂取でも、追加インスリンなしでは3時間後から明確な血糖上昇があることが分かった。そして、夕方に焼き肉を中心とした自由飲食をすると、食後4 - 5時間からの血糖上昇があり、翌朝の高血糖になることが実証された。

第2段階、食パンや糖質の多い食品だけを摂取して、カーボカウントを用いて食後血糖が十分管理できていることを確認、食事摂取なしでは、血糖変動の無いことを確認した状態で、オリーブオイルまたはサラダ油のみを **30g (270kcal)** 摂取してもらったが、それだけでは血糖上昇が無いことが確認できた。つまり、たんぱく質の多い、ステーキでは血糖上昇があるが、脂質だけの摂取では血糖上昇が起らないことが実証された。

第3段階、タンパク質の種類の違いが血糖上昇に与える影響を検証した。牛肉や鶏肉だけでも血糖上昇を認めため、各種の魚類を試みた、牛肉や鶏肉と同量のたんぱく質を含むフグやキハダマグロでは血糖上昇が確認された一方で、イカやちりぢりめんじゃこ、の摂取は血糖値上昇を認めなかった。このようにたんぱく質の種類によって血糖上昇への影響が違うことが判明した。

第4段階、スポーツマンから始まり最近では一般にも各種プロテイン強化食品の摂取が盛んにおこなわれている。1型糖尿病がプロテイン強化食品を摂取した場合の対応は明確になっていない。そこで、プロテイン強化食品の中でもプロテイン純度の高い食品を1型糖尿病患者に摂取してもらい血糖変動を確認した。通常摂取量の2倍量を追加インスリンなしで摂取してもらった結果、血糖上昇は認めなかった。したがって、通常のプロテイン強化食品の摂取では、カーボカウントにしたがって含有糖質にしたがったインスリン量の追加だけで問題ないものを思われる。

#### 結論

今回は、マイクロミニブタをもちいて、1型糖尿病モデルを作成することが出来た。

しかし、1型糖尿病モデルブタに各種栄養バランスの飼料を食べさせての血糖値への影響を検証するところまでは行かなかった。

臨床研究では、タンパクの種類による血糖値への影響と違うことが判明しているが、その再現性と要因の検証が今後の課題である。1型糖尿病モデルブタを用いた動物実験をさらに続けて、タンパク質や脂質摂取による1型糖尿病における血糖値への影響とその要因を検証する予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1 . 発表者名 柚山賀彦、川村智行
2 . 発表標題 1型糖尿病モデルブタ作成および皮下Flash Glucose Monitoring留置による血糖管理方法の確立に関する検討
3 . 学会等名 62回日本糖尿病学会年次学術集会
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 N. Nishikawa, Y. Yuyama, Y. Hotta, K. Hashimura, Y. Kashihara, T. Hashimoto, M. Hirose, T. Higashide, S. Aono, T. Kawamura
2 . 発表標題 Is menarche in type 1 diabetes still delayed?
3 . 学会等名 ISPAD 2019 (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Y. Yuyama, T. Kawamura, N. Nishikawa, T. Hirose, Y. Kashihara, T. Hashimoto, T. Hamazaki
2 . 発表標題 Review of high dose insulin injection treatments for diabetic ketoacidosis occurred to type 1 diabetes patients in our hospital
3 . 学会等名 ISPAD 2019 (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 川村智行
2 . 発表標題 Effect of fat and protin on post-prandiatl glood glucose level
3 . 学会等名 ISAPAD 2018 (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1. 発表者名 柚山賀彦、川村智行、関あずさ
2. 発表標題 マイクロニビッグによる1型糖尿病モデル作製及び皮下グルコースセンサー留置
3. 学会等名 66回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------