

## 覚醒ラットにおけるインスリンクランプ法に関して

### Euglycemic insulin clamp technique in awake rats

韓 艶 清\* 押 田 芳 治\*\* 越 中 敬 一\*\*  
水 越 俊 博\*\*\* 林 友 樹\*\*\* 佐 藤 祐 造\*, \*\*

Yanqing HAN \* Yoshiharu OSHIDA \*\*, \*\* Keiichi KOSHINAKA \*\*  
Toshihiro MIZUKOSHI \*\*\* Yuki HAYASHI \*\*\* Yuzo SATO \*, \*\*

#### Abstract

In recent years, changes in lifestyle have caused increases in insulin resistance as well as development of diabetes. For this reason, the clinical importance of the multiple risk factors syndrome, which is the main pathogenesis of arteriosclerotic diseases, has increased. Therefore, a precise evaluation of insulin resistance has become noticeable. Although there were many evaluation methods of insulin resistance in the past, nowadays the hyperinsulinemic euglycemic clamp method is supposed to be the most precise and reliable means for assessing the level of insulin action. However, as for its relatively complicated procedures, the technique has been rarely used. In this report, we summarized our experience and originality in rat studies that have been carried out for several years. Additionally, we tried to establish a simplified insulin clamp method in conscious animals.

#### 1、はじめに

周知のようにインスリンは膵ランゲルハンス島の $\beta$ 細胞から血中に放出され、標的臓器の受容体に結合して代謝調節などの生理作用を発揮するホルモンである。インスリン抵抗性とは“一定量のインスリンに対する血糖降下作用が正常に比し低下している状態”と定義されている<sup>(1)</sup>。近年ライフスタイルの変化によりインスリン抵抗性が増大し、糖尿病の発症、進展に寄与しているほか、動脈硬化性疾患の基礎となるマルチプルリスクファクター症候群の中心的な病態として、臨床的に重要性を増している。したがって、個体レベルのインスリン抵抗性を正確に評価することは必要である。インスリン抵抗性の評価方法は Table.1<sup>(2)</sup>を示したように、数多くあるが、hyperinsulinemic euglycemic clamp 法（インスリンクランプ法）は現時点でインス

リン感受性を定量的に評価する上で、もっとも正確、信頼できる方法であるとされている。<sup>(2)(3)(4)</sup>。我々はすでに本法を利用して、トレーニング効果など数多く報告してきた。<sup>(5)(6)(7)(8)(9)</sup>。しかしながら、実施時の手技は煩雑であることにより実用性に欠けるとの指摘も多いのが現状である<sup>(2)(4)</sup>。今回、我々は長年実施してきたラットに対する手技について、重要と思われる点を強調しながら記述する。

#### 2、インスリンクランプ法の理論

インスリンクランプ法は末梢組織、特に骨格筋にインスリン作用を定量的に評価する方法として開発された<sup>(10)</sup>。それ以来、ヒトや小動物に対して数多く使われてきた。本法は infusion pump を用いて、頸静脈に血中インスリン値を一定レベルに保つように速効型インス

\* 名古屋大学総合保健体育科学センター  
\*\* 名古屋大学大学院医学研究科社会医学系健康スポーツ医学  
\*\*\* 名古屋大学医学部  
\* Research Center of Health, Physical Fitness and Sports, Nagoya University  
\*\* Department of Sports Medicine, Graduate School of Medicine, Nagoya University  
\*\*\* School of Medicine, Nagoya University

Table.1 インスリン抵抗性の評価方法

<p>1. インスリン分泌を抑制して糖利用を測定する方法</p> <p>1)、hyperinsulinemic euglycemic clamp 法</p> <p>2)、SSPG 法</p> <p>2. ニマルモデル法</p> <p>3. HOMA 指数</p> <p>4. 空腹時 IRI 高値</p> <p>5. 75gOGTT</p> <p>6. インスリン負荷試験 (ITT)</p> <p>(インスリン受容体異常症など、高度のインスリン抵抗性が疑われる場合)</p>
--

安田和基 『臨床成人病』2001.8

リンを持続的に注入する。頻回（10分間隔）に血糖値を測定し、クランプ開始時の血糖値（空腹時）に維持するため、必要なグルコースを同時注入する。注入したインスリンは肝糖放出を抑制するので、注入されたグルコースは末梢組織で代謝されたグルコース量と等しくなると考えられる。このグルコース注入率 GIR (glucose infusion rate) をインスリン作用の指標として用いる。なお、STZ 誘発糖尿病ラットの場合、高血糖状態では血糖の上昇自体によって糖利用が上昇するため、この GIR 値をクランプ中の平均血糖値で除した MCR (Metabolic clearance rate for glucose) をインスリン感受性の指標として用いている。

3、インスリンクランプ法の前処置に、必要な器具、試薬および挿入用カテーテル

我々が使用している機器などは以下のものである。

- 1)、Infusion pump; JMS 社シリンジポンプ (MODEL SP-500) 2台 (Fig.1)。
- 2)、グルコース自動分析装置; YSI 2300 STAT PLUS 一台 (Fig.2)。
- 3)、手術に必要なもの; Fig.3を表示したように、A は主に頸動静脈を露出およびカテーテルを挿入する時に使う。B はカテーテル挿入時に血管を切開する際に用いられる。CはFig.11のようにカテーテルを頸部皮下に通す時に使用する。Dは縫合用具である。また、Eで血管を圧迫し、止血する。
- 4)、使用する試薬: (Fig.4);
  - a)、ヘパリンナトリウム注射液; 5000単位/5 ml (1バイアル)、使用時に原液0.4ml につき10ml の生理食塩水で希釈する。



Figure.1 JMS 社シリンジポンプ MODEL SP-500

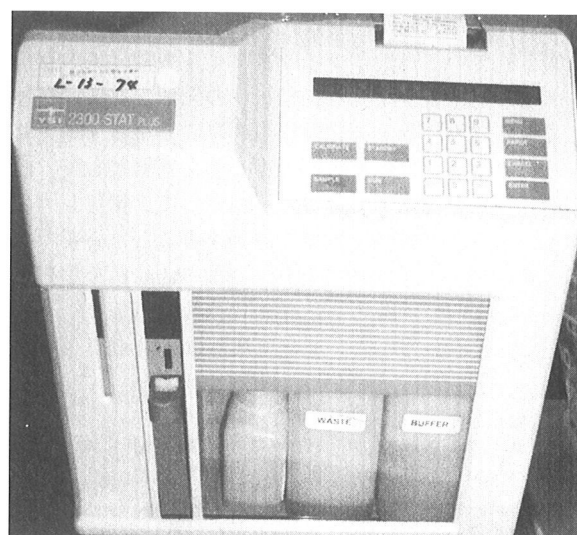


Figure.2 YSI 2300 STAT PLUS

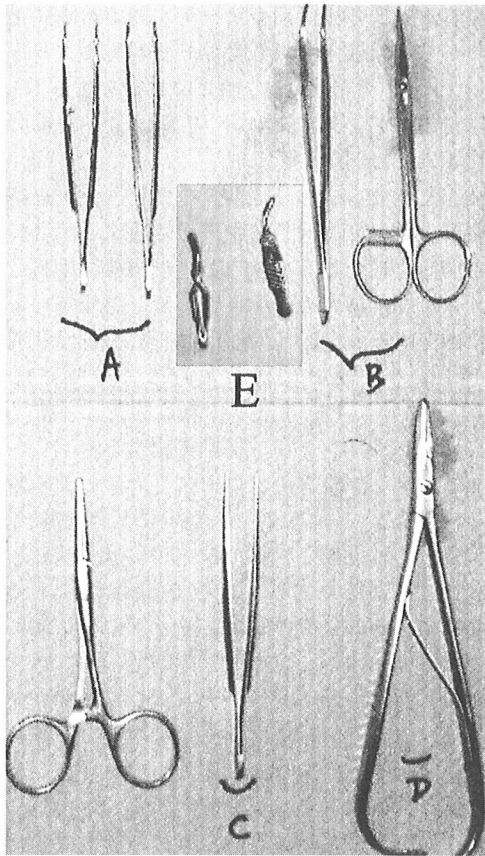


Figure.3 手術用器具

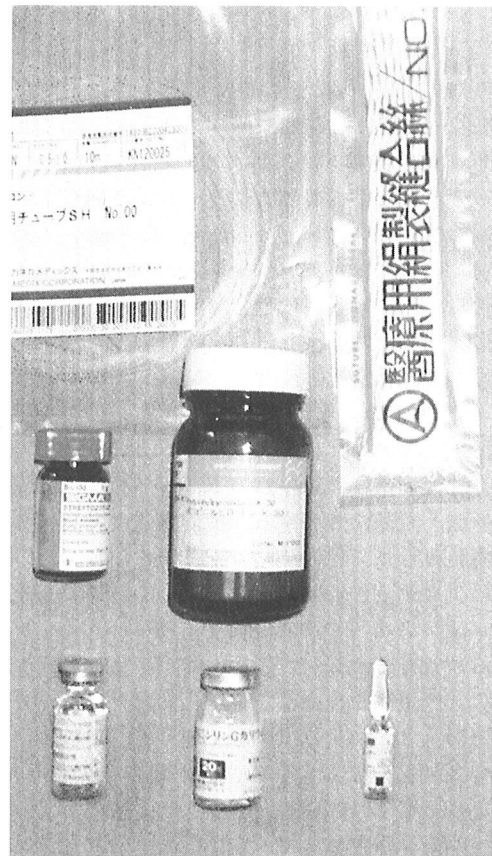


Figure.4 手術中使用する試薬及びカテーテル用チューブ

- b)、注射用ペニシリン G カリウム；20万単位／1バイアルの品を使用直前に1万単位に対して1 ml の生理食塩水で希釈する。冷蔵庫に保存する。
- c)、硫酸ゲンタマイシン注射液；10mg / ml (1アンプル)、生理食塩水で10倍に希釈し、冷蔵庫に保存する。
- d)、PVP 液；ポリビニルピロリドン K-30粉 (1バイアル 5 g) を希釈していないヘパリンナトリウム液で溶解し、一晩冷蔵庫に放置して、透明な粘液状になってから、使用する。
- 5)、挿入用カテーテル (Fig.5)；手術時挿入するカテーテルは事前に用意する。Fig.4の左上方にある医療用チューブ SN No.00、サイズ0.5-1.0を13-14cm 毎、挿入しやすいようにやや斜めの切口にする。切口より2.5cm (動脈用) および3 cm (静脈用) の処に医療用絹製縫合糸を縛り、脱オキシムタイプのボンドで固定させる。一晩、乾燥した後に使用する。

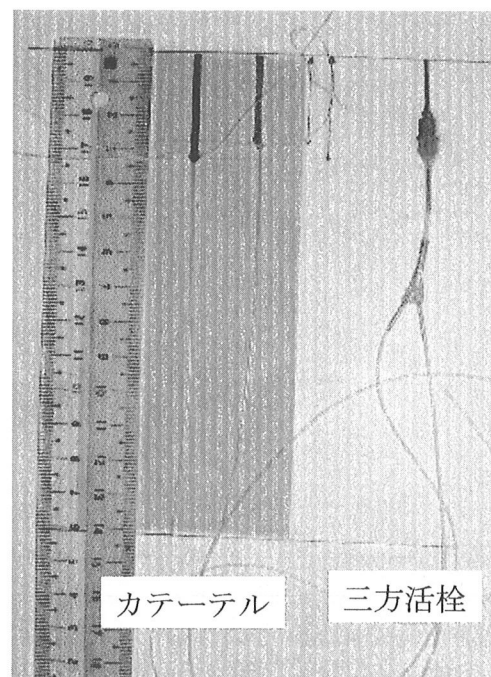


Figure.5 頸動脈用カテーテル (赤)  
頸静脈用カテーテル (黒)

#### 4、詳細なプロセス

対象；体重150-360gのラットを用いる。飼育条件は室温22-23℃，12時間（照明：8：00-20：00）の明暗サイクル環境下で、餌と水は自由に摂取とする。カテーテル挿入手術後は個別ケージにて飼育する。

手術のプロセス；Euglycemic insulin clamp 法実施6-7日前に、ラットを pentobarbital (40 mg/kg.ip.) で麻酔させる。前、後頸部に毛を綺麗に剃り、前頸部には横に約2.5cm 切開を入れる。右鎖骨の上に皮下組織を取り除き、右頸静脈を露出し、Fig.3-A を示したピンセットで Fig.6 のように血管のみを持ち上げ、下に200  $\mu$  l 用のピペットチップを入れる。次に、左胸鎖乳突筋と胸骨舌骨筋との交差点の下に、左頸動脈を露出し、右頸静脈と同様に処理する。動静脈各々の遠端部を医療用絹製縫合糸で縛る。

次に、カテーテルに1 ml 用のシリンジで、注射用ペニシリンGカリウムを充たす。ピペットチップの上にある血管を Fig.3-B で示したピンセットで少し掴み出し、専用鉗で遠端部から適切な穴を開け、カテーテルを挿入する (Fig.7)。挿入口のすぐ下に医療用絹製縫合糸で結紮する。さらに、両端の糸を縛り付け、不要な糸を切る (Fig.8)。

術後感染を防ぐ目的で、右頸静脈に入れたカテーテルにより注射用ペニシリンGカリウム(1万単位/kg)

を静注する。その後、両カテーテル内で凝固防止のためにヘパリン原液で溶解したポリビニルピロリドンK-30 (PVP 液) で充填させ、虫ピンで栓をする (Fig.9)。さらに、硫酸ゲンタマイシン (0.5mg/kg) を脚の筋肉に筋注する (Fig.10)。

Fig.3-C のピンセットを使い、カテーテルを側～後頸部皮下に沿って、後頸部中央まで通す (Fig.11)。前頸部の切口を縫合する (Fig.12)。後頸部に露出したカテーテルを皮下に埋め込み、留めピン部分を医療用糸で固定する (Fig.13)。覚醒した後、飼育用個別ケージに返し、6-7日に術前と同じ条件で飼育する (Fig.14)。通常、4-5日で体重は回復し、術後6-7日目にインスリンクランプを実施する。

インスリンクランプのプロセス；カテーテル挿入後6-7日に経て、一晚(約16-18時間)絶食後、まず、体重を測定し、注入するインスリン量を決定する (Table.2参照)。インスリン溶液を20ml シリンジに入れ、Infusion pump に設置する。ラットの後頸部に固定したカテーテルの留めピンを取り除いて、中のPVP液を除去する。希釈したヘパリンナトリウム液でカテーテルを洗浄する。三方活栓 (Fig.5) を用いて、インスリン用のシリンジ、グルコース注入用のシリンジと結合させ、インスリンクランプを開始する (Fig.15)。

なお、右頸静脈に挿入されたカテーテルはインスリンとグルコースなどの注入用であり、左頸動脈は採血

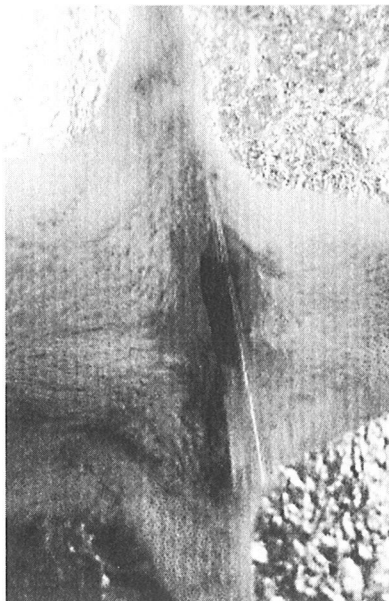


Figure.6 左頸静脈を露出

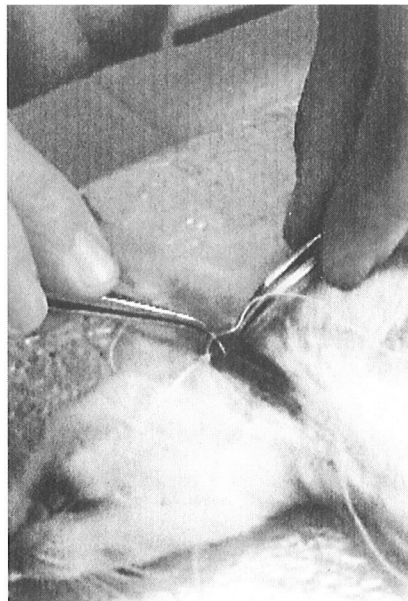


Figure.7 カテーテルを挿入

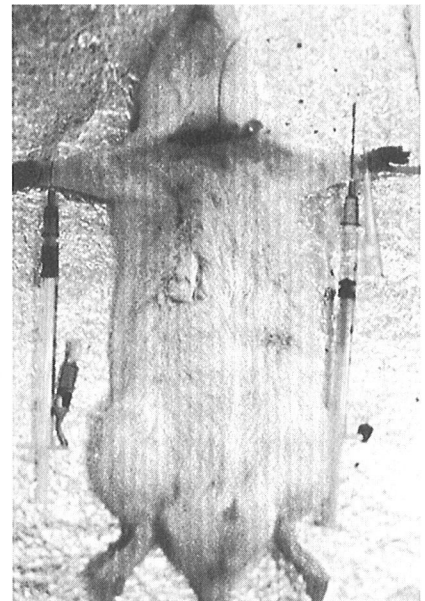


Figure.8 左右カテーテルの挿入後

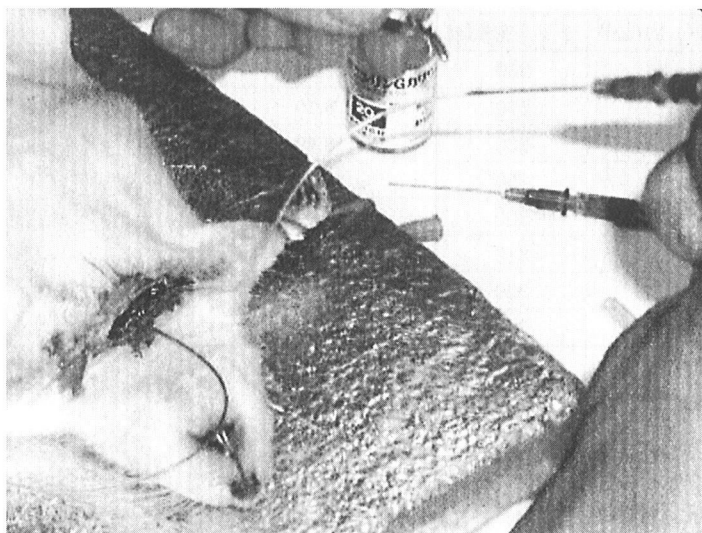


Figure.9 左頸静脈カテーテルにペニシリン G カリウムを注入し、PVP 液を充たす

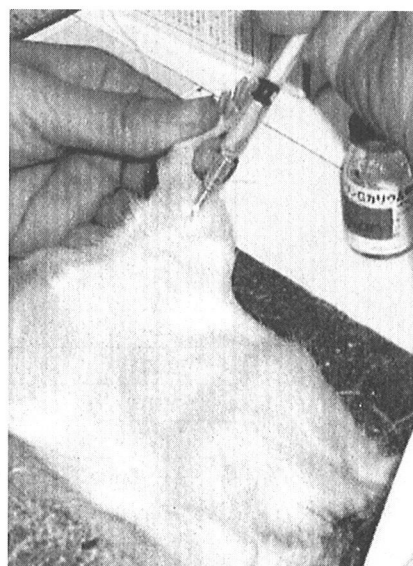


Figure.10 硫酸ゲンタマイシン注射液を下肢筋肉に注射する

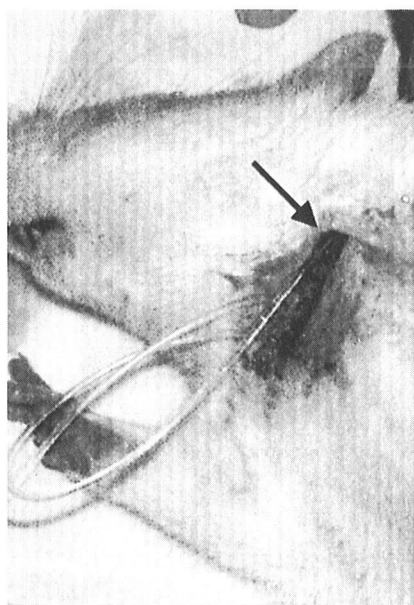


Figure.11 カテーテルを側～後頸部の皮下に通す

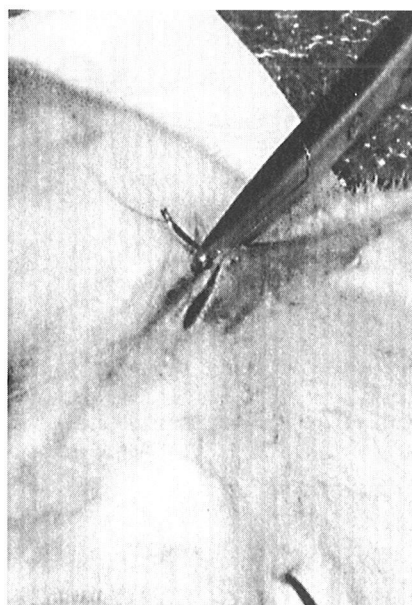


Figure.12 頸部の開口を縫合する



Figure.13 通り抜けたカテーテルを後頸部中央に固定する

Table.2 10ml インスリン注入液作成表 (3.0mU/kg/min)

Infusion pump の注入速度は 1.5ml/hr の場合

ラット重量(g)	インスリン液( $\mu$ l/10ml)	ラット重量(g)	インスリン液( $\mu$ l/10ml)
150	4.50	260	7.80
160	4.80	270	8.10
170	5.10	280	8.40
180	5.40	290	8.70
190	5.70	300	9.00
200	6.00	310	9.30
210	6.30	320	9.60
220	6.60	330	9.90
230	6.90	340	10.20
240	7.20	350	10.50
250	7.50	360	10.80

\*この Table.2 は覚醒下での分量を表わしている。

\*\*High dose glucose clamp の場合、インスリン液を 10 倍にする。

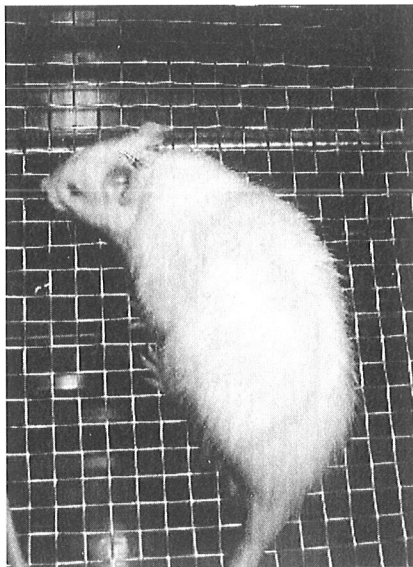


Figure.14 カテーテル挿入術後のラット



Figure.15 インスリンクランプの実際

用である。10分ごとに採血し、血糖値を測定する (YSI 2300 STAT PLUS Yellow Springs Instrument CO, OH, USA)。グルコース液は市販日本薬局方の20% (W/V)ブドウ糖静注液を使用し、注入速度を調節、空腹時血糖レベルに維持する。本操作に従い、90分にわたって、Euglycemic insulin clamp 法を行い、血糖値が安定した終了前30分のグルコース注入速度よりグルコース注入率 (glucose infusion rate, GIR) を算出する。糖尿病ラットの場合は MCR (Metabolic clearance rate for glucose) を

算出する。それぞれインスリン作用の指標として用いることができる。

## 5、終わりに

Euglycemic insulin clamp 法は、インスリン感受性に対するトレーニング効果の評価及びインスリン抵抗性についての判定などに、よく利用されてきた<sup>10)20)31)</sup>。インスリン作用の指標として用いられるグルコース注入

率GIRは主に二つ因子によって決定される。すなわち、注入された外因性グルコースに対する筋肉組織などの末梢組織の利用率と肝臓からの糖放出率である。我々の先行研究により、覚醒状態で得られたグルコース注入率GIRは麻酔状態下比べ、70%増加した<sup>10)</sup>。その原因として、麻酔状態下では、麻酔のストレスより肝臓から糖の放出が十分抑制されず、さらに、筋肉での糖取り込みの減弱も考えられている。したがって、覚醒状態下のインスリンクランプを推奨したい。

インスリンクランプ法は、現時点では末梢組織、特に骨格筋のインスリン抵抗性評価のための最適な方法である<sup>10)</sup>。今後とも、インスリン抵抗性に関する実験系では、本法が必要である。最近、分子生物学手法が日進月歩の発展に遂げ、*in vitro* 実験系との組み合わせが必要となってくると思われる。

## 6、参考文献

- (1) 花房俊昭：『糖尿病学』112-125、1999。
- (2) 安田和基：『臨床成人病』1005-1010、東京医学社2001。8。
- (3) 前川 聡：『診断と治療』1929-1933、医学書出版社1996。9。
- (4) 三家登喜夫、上田量也、南條輝志男：『日本臨床』431-436、糖尿病(3)56巻・1998年増刊号。
- (5) Wu,W., Oshida,Y., Yang,W-P., Li,L., Ohsawa,I., Sato,J., Iwao,S., Johansson, B-L., Wahren,J. and Sato,Y.: Effect of C-peptide administration on whole body glucose utilization in STZ-induced diabetic rats. *Acta Physiol Scand* 157:253-258, 1996.
- (6) Li L, Oshida Y, Kusunoki M, Yamanouchi K, Johansson BL, Wahren J, Sato Y.: Rat C-peptide I and II stimulate glucose utilization in STZ-induced diabetic rats. *Diabetologia* 42: 958-964. 1999.
- (7) Y.Oshida, Y.Tachi, Y.Morishita, K.Kitakoshi, N.Fuku, Y-Q.Han, I.Ohsawa, Y.Sato.: Nitric oxide decreases insulin resistance induced by high-fructose feeding. *Horm. Metab.Res.* 32 339-342. 2000.
- (8) Kitakoshi, Y.Oshida, N.Nakai, Y-Q. Han, Y.Sato.Effect of Troglitazone and Voluntary Running on Insulin Resistance Induced High Fat Diet in the Rat. *Horm. Metab.Res.* 33 365-369. 2001.
- (9) Y-Q. Han, Y. Oshida, L.Li, K-I. Koshinaka, N. Fuku, K. Yamanouchi, Y. Sato.: Effect of voluntary wheel-running on insulin sensitivity and responsiveness in high-fat-fed rats. *Endocrine Journal* 48(5), 551-555. 2001.
- (10) DeFronzo RA, et al: Glucose clamp technique: a model for quantify insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 273 : 214-223, 1979.
- (11) DeFronzo RA. Bonadonna RC. Ferrannini E.: Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. *Diabetes Care.* 15(3):318-68, 1992.
- (12) Yamanouchi K., Nakajima H., Shinozaki T., Chikada K., Kato K., Oshida Y., Ohsawa I., Sato J., Sato Y., Higuchi M., Kobayashi S.: Effects of daily physical activity on insulin action in the elderly. *J Appl Physiol* 73: 2241-2245, 1992.
- (13) Yang W.P., Oshida Y., Wu W., Sato J., Ohaswa I., Sato Y.: Effects of daily voluntary on in vivo insulin action in rat skeletal muscle and adipose tissue as determined by the microdialysis technique. *Int J Sports Med* 16: 99-104, 1995.
- (14) 李玲、押田芳治、加吉真実、島戸真司、大崎暢子、佐藤祐造：覚醒時と麻酔下におけるインスリン感受性の比較検討。総合保健体育科学 19(1)：67-70。1996。
- (15) 前川 聡：『日本臨床』248-251、現代臨床機能検査（上巻）55巻・1997年増刊号。

(2003年1月10日受付)

