

高 CO₂ 吸入が糖負荷後の血糖値に及ぼす影響

Effects of high CO₂ inhalation on glucose tolerance in STZ-induced diabetic rats

福 典 之* 押 田 芳 治*, ** 韓 艶 清*
越 中 敬 一* 佐 藤 祐 造*, **

Noriyuki FUKU *, Yoshiharu OSHIDA *, **, Yanqing HAN *
Keiichi KOSHINAKA *, Yuzo SATO *, **

The present study was undertaken to examine the effects of high CO₂ inhalation on the glucose tolerance in STZ-induced diabetic rats using an oral glucose tolerance test (OGTT). In the "room air group" experiment: after a 18 h fast, glucose (2 g/kg body weight) was administered under room air condition. Blood samples were obtained at rest before glucose administration, and at 30 min intervals during the 120 min OGTT to measure blood glucose and serum insulin concentrations. In the "high CO₂ group" experiment: the rats inhaled 5 % CO₂ and 21 % O₂ for 60 min after glucose administration. The experimental protocol was the same as "room air group". During an OGTT, the blood glucose concentrations were significantly lower in high CO₂ group than in room air group (60 min: 251 ± 13 vs. 325 ± 24 mg/dl, p<0.001, 90 min: 229 ± 15 vs. 313 ± 15 mg/dl, p<0.001, 120 min: 219 ± 25 vs. 313 ± 25 mg/dl, p<0.01). Changes in serum insulin concentration in both groups were not found after glucose load. In conclusion, high CO₂ inhalation after glucose administration caused a decrease in blood glucose concentration with no change in serum insulin concentration.

I. 緒 言

安静空腹時におけるブドウ糖利用は、中枢神経系組織などの非インスリン依存性組織が主であり (60%)、骨格筋と肝臓はそれぞれ20%程度とされている¹⁾。しかしながら、ブドウ糖負荷によるインスリン刺激時には、糖利用の貢献率が劇的に変化するといわれている。すなわち、ブドウ糖とインスリン併存下における糖取り込みは、85%が骨格筋に、10%が肝臓に、5%が中枢神経系組織によると報告されている。したがって、ブドウ糖負荷後では、骨格筋が糖取り込みの主要な組織になる^{1) 4) 5)}。すでに、我々は、健常成人男性において、ブドウ糖経口投与後の混合ガス (5%CO₂ and 95% O₂) 吸入が大気吸入条件と比較し血糖値の上昇が抑制される事実を認め⁷⁾、骨格筋を中心としたインスリン依存組織での糖取り込みの促進の結果であると考えている。これまでのところ、高O₂下での筋刺激¹⁷⁾や持

久的トレーニング⁶⁾は骨格筋の糖取り込みや筋グリコーゲン含有量に影響をおよぼさないとの報告やCO₂の強力な血管拡張効果由来の血流量増加作用¹²⁾により骨格筋の糖取り込みが促進されるとの成績から²⁾、高CO₂吸入による影響と推察される。そこで、本研究では、ブドウ糖経口投与後の高CO₂ (5%) 吸入が血糖値の低下を促進するか否かを糖尿病モデルラットを用いて検討を加えた。

II. 対象および方法

1. 被験動物

実験には、9週齢のWistar系雄性ラット12匹を用いた。飼育期間中は、朝8時～夜8時までの12時間を明期、他の12時間を暗期とした。飼育室は、温度を22±1℃、湿度を60±5%に維持した。飼料は固形飼料を、飲料水は水道水を用い、ともに自由摂取とした。

* 名古屋大学大学院医学研究科健康・スポーツ医学
** 名古屋大学総合保健体育科学センター
* Division of Sports Medicine, Graduate school of Medicine, Nagoya University
** Research Center of Health, Physical Fitness and Sports, Nagoya University

2. 方法

ラット購入1週間の環境順応期間の後、経口ブドウ糖負荷試験法実施7日前に、Sodium pentobarbital (40 mg/kg body weight, i.p.) 麻酔下で、ラットの左頸動脈にカテーテルを挿入した。すなわち、前頸部に切開を加え、左頸動脈を露出し、カテーテルを挿入した。カテーテル内での凝固防止のために、ヘパリンで溶解した Polyvinylpyrrolidone (PVP-30, NACALAI TESQUE INC.) を充填した。さらに、術後感染を防ぐ目的で、Penicilin G (1万単位/kg body weight) を注入し、Gentamycin (0.5mg/kg body weight) を筋注した。左頸動脈に挿入したカテーテルはその末端をピンで封じ、前頸部皮下を經由させ、頭頂部に露出させた。同時に、ラットを糖尿病に至らせるために Streptozotocin (STZ, 55mg/kg body weight, Shigma, USA) をカテーテル挿入後に注入した。1週間の回復期間を経て、18間の絶食後に無拘束覚醒下で実験を開始した。まず、ラットの頸動脈から血液を採取し、空腹時血糖値および血清インスリン値を測定した。その後、20%ブドウ糖を経口ゾンデ針を用いて経口投与 (2 g /kg Body Weight) した。そして、その直後から高 CO₂ 吸入群として 5% CO₂ を吸入した。高 CO₂ は、横50cm、縦30cm、高さ25cm のチャンパー内に 5% CO₂、21% O₂、および74% N₂ の混合ガスを60分間循環させ、その後60分間は大気を循環させた。チャンパー内は呼気ガス分析装置でモニターし 5% CO₂ および21% O₂ になるように流入速度を調節した。対照条件として0.03% CO₂、20.93% O₂ および 79.04% N₂ の大気を循環させた群を設けた。ブドウ糖経口投与後の採血は、30分間隔で120分まで頸動脈カテーテルを介して行い、血糖値および血清インスリン濃度を測定した。

3. 分析

血糖値 (blood glucose) は、採血の終了後すみやかにグルコースオキシダーゼ法を用いた自動血糖分析装置 (YSI 2300 STAT glucose analyzer, Yellow Springs Instrument, CO, OH, USA) により測定した。残りの血液を 4 °C、3000rpm で15分間遠心分離した後、上清部の血清を1.5ml 用のマイクロチューブに回収した。回収した血清は、-25°C のフリーザーで冷凍保存した。その後、RIA 法 (Phadeseph Insulin RIA, Pharmacia AB, Stockholm, Sweden) により血清インスリン値を測定した。

4. 統計解析

得られた成績は、すべて平均±標準偏差で示した。大気吸入群と高 CO₂ 吸入群の比較は、繰り返しのある二元配置分散分析 (two-way ANOVA) を用いた。さらに two-way ANOVA で有意性が認められたものに対して各々の時間の有意差検定を行った。この検定には対応のない t 検定 (unpaired t-test) を用いた。有意水準は p < 0.05 とした。

Ⅲ. 結 果

高 CO₂ 吸入群および大気吸入群における空腹時の体重、血糖値および血清インスリン値を Table 1 に示した。STZ の投与により高 CO₂ 群と大気吸入群の両群とも血糖値は高値 (202 ± 6 vs. 207 ± 7mg/dl, ns) を、血清インスリン値は低値 (6.0 ± 2.0 vs. 6.0 ± 0.7 μ U/ml, ns) を示し、糖尿病状態に至ったことが確認された。なお、両群間に有意差はなかった (Table 1)。

高 CO₂ 吸入群および大気吸入群におけるブドウ糖経口投与後の血糖値の経時的変化を Fig.1 に示した。高

Table 1. Body weight, and plasma glucose and insulin levels before the glucose administration

	body wt (g)	Glucose (mg/dl)	Insulin (μU/ml)
Room air (6)	208 ± 14	203 ± 7	6 ± 1
High CO ₂ (6)	206 ± 9	202 ± 6	6 ± 2

Values are means ± SD.

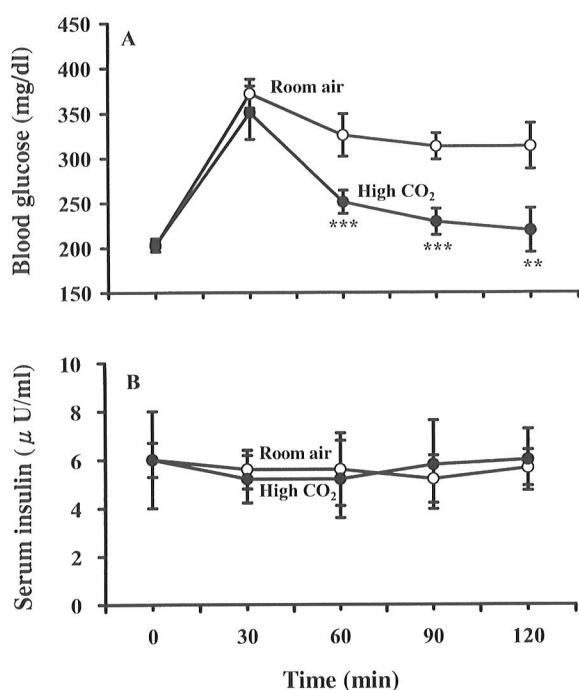


Figure 1. Changes in blood glucose (A) and serum insulin (B) levels with time during an oral glucose tolerance test obtained in the groups of normal air (open) and high CO₂ (filled). Values are mean \pm SD for six rats. **significantly different from room air groups, $p < 0.01$. ***significantly different from room air groups, $p < 0.001$.

CO₂ 吸入群のブドウ糖経口投与後60、90、および120分の血糖値は、大気吸入群と比較し有意な低値を示した (60min : 251 \pm 13 vs. 325 \pm 25mg/dl, $p < 0.001$, 90min : 229 \pm 15 vs. 313 \pm 15mg/dl, $p < 0.001$, 120min : 219 \pm 25 vs. 313 \pm 25mg/dl, $p < 0.01$; Fig.1-A)。血清インスリン値はブドウ糖の経口投与後においても増大せず、両群間の有意差は認められなかった (Fig.1-B)。

Ⅳ. 考 察

本研究の主要な知見は、1型 (インスリン依存型) 糖尿病モデルである STZ 誘発糖尿病ラットを用い、ブドウ糖経口投与後の高 CO₂ 吸入 (5%) が、大気吸入群と比較し、血清インスリン値の変化を伴わないで血糖値の低下を促進したことである。すでに我々は、健康成人男性において、5% CO₂ と 95% O₂ の混合ガスを吸入させると、大気を吸入した条件と比較し血糖値の低下が促進される事実を認めており⁷⁾、本研究成績と一致している。

Mishra et al.¹²⁾ は、ラットにおける高 CO₂ 吸入後の全

身血流配分変化を検討し、その結果、高 CO₂ 吸入は骨格筋血流量を安静レベルの 3 ~ 4 倍に増加させることを報告している。また、Baron et al.²⁾ は、安静時の 3 倍に骨格筋血流量を増加させるように血管拡張物質であるメタコリンを投与すると骨格筋の糖取り込みが増加する事実を認めている。したがって、ブドウ糖経口投与後の高 CO₂ 吸入による骨格筋の糖取り込み促進のメカニズムは、血流量の増加による可能性が考えられる。

また、糖尿病は、インスリン作用の絶対的あるいは相対的不足により生じる持続的高血糖を主徴候とする代謝疾患であり、1型糖尿病と2型 (インスリン非依存型) 糖尿病に大別される。ストレプトゾトシンは、アロキサと同様に、膵臓のランゲルハンス島の β 細胞を特異的に破壊し、絶対的インスリン欠乏状態にすることで実験的に1型糖尿病モデルを作成することができる⁹⁾。実際、本研究においても、STZ 投与7日後の空腹時血清インスリン値は、4.0 ~ 8.0 μ U/ml と極めて低値であり、空腹時血糖値は200mg/dl 前後と高値を示し、糖尿病に至ったと考えられる。さらに、ブドウ糖経口投与後のインスリンの追加分泌はみられず、本研究で作成した STZ 誘発糖尿病ラットは1型糖尿病モデルマウスといえる。

骨格筋にブドウ糖を取り込むメカニズムには、インスリンを介するものとインスリンを介さないものがあり、これらは、異なる細胞内情報伝達経路を介して糖の取り込みが行われているといわれている¹⁶⁾²⁰⁾。インスリンを介しない糖の取り込みは、運動などの筋収縮刺激時^{13) 14)} および低酸素刺激時^{15) 19)} が知られている。本研究で用いたラットは、1型糖尿病モデルラットであり、膵臓からのインスリン分泌は著しく低下していた。したがって、ブドウ糖経口投与後の高 CO₂ 吸入による血糖値の低下促進作用は筋収縮刺激や低酸素刺激と同様にインスリンを介しない糖取り込みの促進である可能性が示唆される。インスリンを介しない糖取り込みに関しては、最近、一酸化窒素 (NO) やアデノシンが関与しているとの報告がなされている⁸⁾。すなわち、筋収縮などによって放出された NO やアデノシンが autocrine または paracrine として働き、骨格筋糖輸送単体 (GLUT4) の細胞膜上へのトランスロケーションを促進するというものである^{10) 18)}。GLUT4 は、糖取り込みの律速段階であると考えられているので、NO やアデノシンは糖取り込みを規定する重要な因子である。一方、Carr et al.³⁾ は、ラットを高 CO₂ に暴露すると血管内皮細胞由来の NO 放出を増大させることによって血管拡張を促進するという報告をしている。このような事実から、高 CO₂ 吸入は、NO 産生を亢進させ、糖

取り込みの増大を促した可能性がある。

V. 結 語

本研究では、STZ 誘発糖尿病ラットを対象として、ブドウ糖経口投与後の高 CO₂ (5%) 吸入が耐糖能に及ぼす影響について検討した。その結果、高 CO₂ 吸入群は、大気吸入群と比較し、血清インスリン値の変化を伴わないで、血糖値の有意の低下を招いた。負荷されたブドウ糖の85%以上は骨格筋に取り込まれることが知られており、高 CO₂ 吸入群の血糖値の低下は骨格筋の糖取り込み亢進に起因すると考えられた。そのメカニズムとして CO₂ による血流量増大効果に基づくものと推察された。さらに、ブドウ糖経口投与後のインスリン追加分泌がみられないことから、インスリン非依存的な機構を介して、ブドウ糖は骨格筋に取り込まれた可能性も示唆された。

VI. 参考文献

- 1) Baron, A. D., G. Brechtel, P. Wallace, and S. V. Edelman; Rates and tissue sites of non-insulin and insulin mediated glucose uptake in humans. *Am. J. Physiol.* 255(18): E769-E774, 1988.
- 2) Baron, A. D., M. Tarshoby, G. Hook, E. N. Lazaridis, J. Cronin, A. Johnson, and H. O. Steinberg; Interaction between insulin sensitivity and muscle perfusion on glucose uptake in human skeletal muscle: evidence for capillary recruitment. *Diabetes*, 49(5): 768-774, 2000.
- 3) Carr, P., J. E. Graves, and L. Poston; Carbon dioxide induced vasorelaxation in rat mesenteric small arteries precontracted with noradrenalin is endothelium dependent and mediated by nitric oxide. *Pflugers. Arch.* 423(3-4): 343-345, 1993.
- 4) DeFronzo, R. A., E. Ferrannini, R. Hendler, J. Wahren, and P. Felig; Influence of hyperinsulinemia, hyperglycemia, and route of glucose administration on splanchnic glucose exchange. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 5173-5177, 1978.
- 5) DeFronzo, R. A., R. Gunnarsson, O. Bjorkman, M. Olsson, and J. Wahren; Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in non-insulin dependent (type 2) diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 76: 149-155, 1985.
- 6) Fujise, T., T. Terao, and S. Nakano; Effects of endurance training under hyperoxia on serum and tissue lipid levels in rats. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* 17(2): 67-73, 1992.
- 7) Fuku, N., K. Kobayashi, and M. Narusawa; Effects of high carbon dioxide inhalation on glucose tolerance curve during OGTT in healthy men. Abstracts book of XXXIII IUPS, Russia, P014.04, 1997.
- 8) Hayashi, T., J. E. P. Wojtaszewski, and L. J. Goodyear; Exercise regulation of glucose transport in skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 273(36): E1039-E1051, 1997.
- 9) 今堀和友, 山川民夫, 生化学辞典, 第2版, 東京化学同人, 東京, 1992
- 10) Kapur, S., S. Bedard, B. Marcotte, C. H. Cote, and A. Marette; Expression of nitric oxide synthase in skeletal muscle. *Diabetes*, 46: 1691-1700, 1997.
- 11) Kolterman, O. G., R. S. Gray, J. Griffin, P. Burstein, J. Insel, J. A. Scarlett, and J. M. Olefsky; Receptor and postreceptor defects contribute to the insulin resistance in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 68(4): 957-969, 1981.
- 12) Mishra, S. K., and J. L. Haining; Measurement of local skeletal muscle blood flow in animals by the hydrogen electrode technique. *Muscle & Nerve*, 3: 285-288, 1980.
- 13) Neshler, R., I. E. Karl, and D. M. Kipnis; Dissociation of effects of insulin and contraction on glucose transport in rat epitrochlearis muscle. *Am. J. Physiol.* 249: C226-C232, 1985.
- 14) Ploug, T., H. Galbo, and E. A. Richter; Increased muscle glucose uptake during contractions. No need for insulin. *Am. J. Physiol.* 247: E726-E731, 1984.
- 15) Ren, J-M, E. A. Gulve, G. D. Cartee, and J. O. Holloszy; Hypoxia causes glycogenolysis without an increase in percent phosphorylase a in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 263 (26): E1086-E1091, 1992.
- 16) Wallberg-Henriksson, H., S. H. Constable, D. A. Young, and J. O. Holloszy; Glucose transport into rat skeletal muscle: interaction between exercise and insulin. *J. Appl. Physiol.* 65(2): 909-913, 1988.
- 17) Wolfe, B. R., T. E. Graham, and J. K. Barclay; Hyperoxia, mitochondrial redox state, and lactate metabolism of in situ canine muscle. *Am. J. Physiol.* 253(22): C263-C268, 1987.
- 18) Young, M. E., G. K. Radda, and B. Leighton; Nitric oxide stimulates glucose transport and metabolism in rat skeletal muscle in vitro. *Biochem. J.* 322: 223-228, 1997.
- 19) Zierath, J. R., T. S. Tsao, A. E. Steinbit, J. W. Ryder, D. Galuska, and M. J. Charron; Restoration of hypoxia-stimulated glucose uptake in GLUT4-deficient muscles by muscle specific GLUT4 transgenic complementation. *J. Biol. Chem.* 273(33): 20910-20915, 1998.
- 20) Zierler, K.; Whole body glucose metabolism. *Am. J. Physiol.*, 276: E409-E426, 1999.

(2000年12月15日受付)