

高血糖やグルコサミンがインスリン感受性におよぼす影響

Effects of hyperglycemia and glucosamine on insulin sensitivity

韓 艶 清* 押 田 芳 治** 北 越 香 織*
福 典 之* 佐 藤 祐 造**

Yanqing HAN* , Yoshiharu OSHIDA** , Kaori KITAKOSHI*
Noriyuki FUKU* , Yuzo SATO**

It has been reported that glucose toxicity was induced by chronic hyperglycemia and glucosamine. The present study was undertaken to determine the influence of 50% glucose and glucosamine infusion on *in vivo* glucose utilization in rats using the euglycemic clamp technique. Insulin was infused at a rate of 3 mU/kg/min in the awake condition. 50% glucose infusion rose blood glucose levels to more than 200mg/dl for 6 hr before the euglycemic clamp. Glucosamine (6.5mg/kg/min) was also infused for 6 hr before the euglycemic clamp. During the insulin infusion, plasma insulin levels reached around 30 μ U/ml and blood glucose was clamped at fasting level by periodic adjustment of glucose infusion. Glucose infusion rates (GIRs) during the euglycemic clamp in 50% glucose-infused rats (12.6 \pm 1.2 mg/kg/min) and in glucosamine-infused rats (9.1 \pm 0.9 mg/kg/min) were significantly lower than those in control rats (18.8 \pm 1.1 mg/kg/min, $p<0.01$ and $p<0.001$, respectively).

It could be suggested that hyperglycemia and glucosamine induce insulin resistance.

1. はじめに

2型糖尿病の主要な病態は、インスリン分泌不全とインスリン抵抗性である³⁾。それにより生じた高血糖はインスリン分泌能やインスリン感受性（インスリン抵抗性）を一層増悪させ、さらなる高血糖を招くという悪循環が成立する。最近の研究によると、このブドウ糖毒性（glucose toxicity）の本体はグルコサミンであると考えられる⁴⁾⁷⁾。

Euglycemic clamp 法は、ヒトやラットの末梢組織におけるインスリン感受性を定量的に評価する方法として数多く用いられ^{3) 6) 12) 11)}、特にインスリン感受性に対するトレーニング効果の評価およ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。

そこで本研究は、無拘束覚醒状態でラットに euglycemic clamp 法を実施し、高血糖やグルコサミンがインスリン感受性におよぼす影響について検討を加えた。

2. 対象および方法

対象は、10週齢雌性 Wistar 系ラット15匹（体重180-210 g）であり、ラットは室温23℃、12時間（照明：8：00～20：00）の明暗サイクル環境下で個別ケージにて飼育された。餌と水は自由摂取とした。

Euglycemic clamp 法実施6-7日前に、pentobarbital (40mg/kg. ip.) 麻酔下で、頸静脈と頸動脈にカテーテルを挿入した。その詳細は以下の通りである。すなわち、前頸部に切開を加え、右頸静脈と左頸動脈を露出し、カテーテルをそれぞれに挿入した。なお、前者がインスリンとグルコースなど注入用であり、後者が採血用である。カテーテル内での凝固防止のために、ヘパリンで溶解していた polyvinylpyrrolidone (PVP-30, NACALAI TESQUE INC.) を充填した。また、術後感染を防ぐ目的で、penicillin G（1万単位/kg）を静注し、gentamycin（0.5mg/kg）を筋注した。6-7日の回復期間を経て、18時間絶食後、euglycemic clamp 法を行った。clamp 実施時に、ラットを無作為に対照群、前処置と

* 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

** 名古屋大学総合保健体育科学センター

* Department of Sports Medicine, Graduate School of Medicine, Nagoya University

** Research Center of Health, Physical Fitness and Sports, Nagoya University

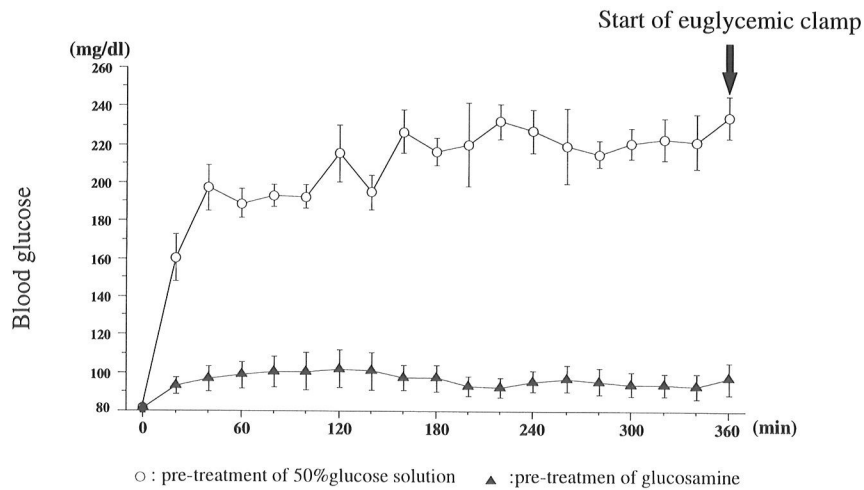


Fig.1 Changes in blood glucose levels 6 hr before starting the euglycemic clamp procedure

Table.1 Body weight, and blood glucose and plasma insulin levels before and during the euglycemic clamp procedure

	Body Wt (g)	Glucose (mg/dl)		Insulin (μ U/ml)	
		Basal	clamp	Basal	clamp
Control(Normal) (5)	191 \pm 6	76 \pm 1	76 \pm 1	9 \pm 2	35 \pm 6
50%Glucose(5)	191 \pm 8	78 \pm 2	82 \pm 2	9 \pm 2	33 \pm 5
Glucosamine (5)	183 \pm 3	81 \pm 1	79 \pm 1	10 \pm 2	26 \pm 2

Values are means \pm SE.

The number of rats is shown in parentheses

して、clamp 開始前 6 時間、50% グルコース液を注入し、血糖値を 200mg/dl 以上に維持した群 (50% グルコース投与群)、clamp 実施前 6 時間、グルコサミンを 6.5mg/kg/min 注入した群 (グルコサミン投与群) の 3 群に分けた。

右頸静脈カテーテルを介して、3mU/kg/min の速度で、速効型インスリン (Actrapid MC, NOVO Nordisk, Denmark) を注入した。左頸動脈カテーテルより、10 分ごとに採血し、血糖値を測定した (YSI 2300A glucose analyzer, Yellow Springs Instrument CO, OH, USA)。20% (W/V) のグルコース液の注入速度を調節、空腹時血糖レベルを維持した。本操作に従い、90 分にわたって euglycemic clamp 法を行い、血糖値が安定した終了前 30 分間のグルコース注入速度よりグル

コース注入率 (glucose infusion rate, GIR) を算出した。

統計学的検定は、分散分析および Fisher PLSD post-hoc test を用いた。なお、各数値は平均値 \pm 標準誤差で示した。統計学的有意水準は 5% とした。

3. 成績

体重、空腹時血糖値および空腹時血漿インスリン濃度は 3 群間に有意差を認めなかった (Table 1)。

各群とも、クランプ中の血糖値は空腹時レベルに保たれ、クランプ中のインスリン濃度は 26-35 μ U/ml となり、生理的な高濃度レベルに達した。

Fig.1 は、50% グルコース投与群とグルコサミン投与群の clamp 開始前 6 時間の血糖値の推移を示したもの

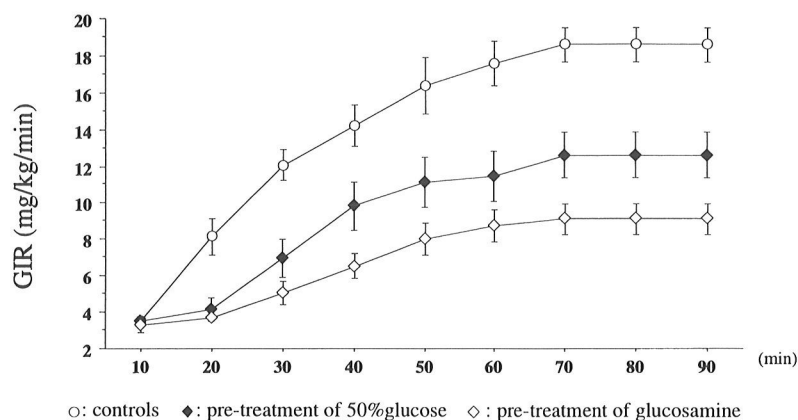


Fig.2 Glucose infusion rate (GIR) during the euglycemic clamp procedure

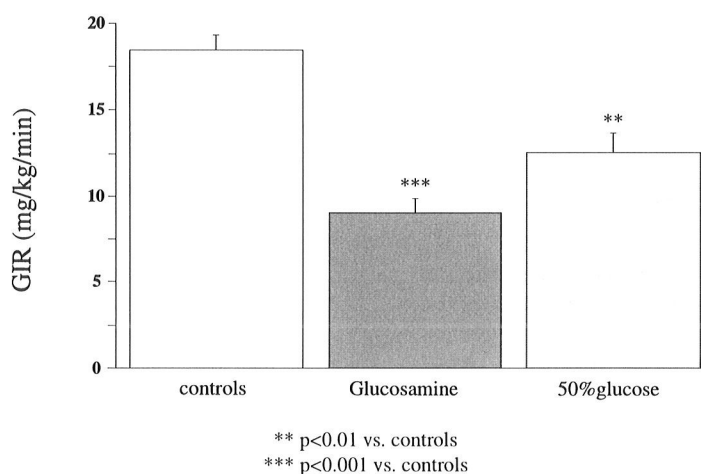


Fig.3 glucose infusion rate for the last 30 min during the euglycemic clamp procedure

である。50%グルコース投与群の血糖値は投与開始40分以降には常時 200mg/dl 以上となった。なお、50%グルコース投与群は clamp 開始10分後には空腹時血糖値に維持された。

Fig.2 は、euglycemic clamp 中の各群の10分毎の GIR の変動を示したものである。clamp 後半30分間には、50%グルコース投与群 (12.6±1.2mg/kg/min)、グルコサミン投与群 (9.1±0.9mg/kg/min) は、対照群 (18.8±1.1mg/kg/min) に比して有意に低値であった (Fig. 3)。

4. 考察および結論

1980年代半ばより、glucose toxicity theory が提唱されるようになってきた²⁾¹⁰⁾。glucose toxicity は主にインスリン分泌の面から検討され、glucose desensitization と狭義の glucose toxicity に大別される。glucose desensitization

は比較的短期間の高濃度グルコース暴露による、膵臓ランゲルハンス島β細胞のグルコース刺激に対する感受性の低下であり、高濃度グルコース暴露の中断により是正される。すなわち、この変化は可逆的である。一方、狭義の glucose toxicity は長時間の高濃度グルコース刺激に対し不応またはそれに近い状態となり、その変化は非可逆であるという⁹⁾。

また、高血糖により細胞内に入った過剰的なグルコースはグルコーゲン合成か解糖かのいずれかに利用されるが、最近のグルコサミン由来のインスリン抵抗性に関する研究⁷⁾によれば、解糖系に入ったグルコースはグルコース-6-リン酸を経て、フルクトース-6-リン酸 (F-6-P) になるが、そのうち一部は GFAT (glucosamine F-6-P aminotransferase) によりグルコサミンに転換される。生成されたグルコサミンが、GLUT4 の細胞内から細胞膜へのトランスロケーションを障害

し、インスリン刺激によるグルコースの細胞内への取り込みを抑制させ、インスリン抵抗性を惹起させると考えられている⁷⁾。しかしながら、そのメカニズムの詳細は必ずしも明らかになっていない。

そこで、今回我々は、6時間におよぶ高血糖状態の持続やグルコサミン投与がインスリン感受性に与える影響を明らかにするために、無拘束覚醒状態下のラットに euglycemic clamp 法を行い、検討を加えた。

その結果、インスリン感受性の指標となる GIR は、50%グルコース投与群とグルコサミン投与群において、対照群と比較して顕著に低下していた。特にグルコサミン投与群は50%グルコース投与群に比して、さらに低値であった。この成績は他の研究結果と一致している¹⁾⁴⁾⁷⁾。

本条件下の血漿インスリン濃度では、必ずしも肝糖放出が抑制されたと言えず⁸⁾、したがって、GIR の相違がインスリン感受性の差とは断言できない。今後、肝糖放出が完全に抑制される高濃度のインスリン注入率の euglycemic clamp 法を行い、検索をすすめる予定である。

参考文献

- 1) Balkan B, Dunning BE. Glucosamine inhibits glucokinase in vitro and produces a glucose-specific impairment of in vivo insulin secretion in rats. *Diabetes*. 43 (10):1173-9, 1994.
- 2) Bonner-Weir S, Trent DF and Weir GC ; Partial pancreatectomy in the rat and subsequent defect in glucose-induced insulin release. *J Clin Invest*, 71 ; 1544-1553,1983
- 3) DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E. Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. *Diabetes Care*. 15 (3) :318-68, 1992.
- 4) Giaccari A, Morviducci L, Zorretta D, Sbraccia P, Leonetti F, Caiola S, Buongiorno A, Bonadonna RC, Tamburrano G. In vivo effects of glucosamine on insulin secretion and insulin sensitivity in the rat: possible relevance to the maladaptive responses to chronic hyperglycaemia. *Diabetologia*. 38 (5) :518-24, 1995.
- 5) James DE, Kraegen EW, Chisholm DJ. Effects of exercise training on in vivo insulin action in individual tissues of the rat. *J Clin Invest*. 76 (2) :657-66, 1985.
- 6) Oshida Y, Yamanouchi K., Hayamizu S., Sato Y.: Long-time mild jogging increases insulin action despite no influence on body mass index or VO₂max. *J Appl Physiol* 66: 2206-2210, 1989.
- 7) Rossetti L, Hawkins M, Chen W, Gindi J, Barzilai N. In vivo glucosamine infusion induces insulin resistance in normoglycemic but not in hyperglycemic conscious rats. *J Clin Invest*. 96 (1) :132-40, 1995.
- 8) Sato Y, Iguchi A., Sakamoto N.: Biochemical determination of training effect using insulin clamp technique. *Horm Metab Res* 16: 463-468, 1984.
- 9) Shima K ; Molecular mechanisms of glucose toxicity ; *Diab J*, 23 ; 41-47,1995
- 10) Unger RH, Grundy S ; Hyperglycaemia as an inducer as well as a consequence of impaired islet cell function and insulin resistance ; implications for the management of diabetes; *Diabetologia*, 28 ; 119-121,1985.
- 11) 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.
- 12) 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.

(1999年12月7日受付)