

一酸化窒素(NO)のインスリン作用に及ぼす効果 —euglycemic clamp法を用いた検討—

Effect of nitric oxide on insulin action in STZ-induced diabetic rats

李 玲* 押田 芳治**** 韓 艷清*
北越 香織* 福 典之*** 佐藤 祐造****

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

The present study was undertaken to determine the influence of nitric oxide (NO) on in vivo glucose utilization in STZ-induced diabetic rats using the euglycemic clamp technique. Insulin was infused at a rate of 3.0 mU/kg/min in the awake condition. Sodium nitroprusside (SNP), which was nitric oxide donor, and adenosine, which is NO independent vasodilator, were also given at a rate of 3ng/kg/min, and 1.5 μ mol/kg/min, respectively, during the euglycemic insulin clamp. Plasma insulin levels during the insulin infusion were 30 μ U/ml, and blood glucose was clamped at 140 mg/dl by periodic adjustment of i.v. glucose infusion rate. Metabolic clearance rate of glucose (MCR) in diabetic rats given SNP during the insulin clamp was 15.6±1.7 ml/kg/min, as compared to 8.3±0.8 ml/kg/min in diabetic control rats ($p<0.05$), and reached to 83% of level of normal rats (18.8±2.7 ml/kg/min). MCR in diabetic rats infused with adenosine (7.1±0.8) was similar to diabetic control rats. It could be concluded that NO stimulates whole body glucose utilization in diabetic rats.

はじめに

1980年に発見された内皮細胞由来弛緩因子⁶⁾の本体は、1987年に一酸化窒素(nitric oxide, NO)であることが証明された¹⁴⁾。その後の研究により、NOは生体のほとんどの臓器・組織で合成され、各々の臓器における生理機能の重要な調節因子として働くことが明らかとなった⁷⁻⁹⁾。生理的条件下では、NOは血管拡張、血流増加、末梢血管抵抗の減少などに寄与し、循環の調節に極めて重要な役割を果たしていると考えられる¹³⁾。最近、in vitroで、NOは骨格筋において、グルコースの取り込みを促進させる成績が報告された^{2,16,17)}。そこで、我々はNOがin vivoでのインスリン作用に及ぼす効果を明らかにするため、NO提供剤であるニトロプロピドナトリウム(sodium nitroprusside,

SNP)を、streptozotocin(STZ)誘発糖尿病ラットに投与し、覚醒下で既報のeuglycemic clamp法を実施して¹²⁾、検討を加えた。SNPのインスリン作用に及ぼす効果が単に血管拡張効果による可能性もあり、NO非依存性血管拡張剤であるアデノシン(adenosine)をも用い、検索をした。

対象および方法

Animals

対象は8~10週齢の体重200~250gの雄性Wistar系ラット20匹であり、室温20°C~22°C、明暗サイクルが12時間毎の環境下で、餌と水を自由摂取する個別ケージにて飼育された。

* 名古屋大学大学院医学研究科健康増進科学I

** 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健康増進医学

* First Division of Health Promotion Science, Graduate School of Medicine, Nagoya University

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

*** Division of Health Promotion Medicine, Graduate School of Medicine, Nagoya University

Pretreatment of animals:

euglycemic clamp 法実施 5～7 日前に、sodium pentobarbital (40mg/kg, i. p.) 麻酔下で、ラットの右頸静脈と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、右頸静脈と左頸動脈を露出し、サイラスティックカテーテルをそれぞれに挿入した。カテーテル内での凝固防止のために、ヘパリンで溶解していた polyvinylpyrrolidone (PVP-30, NACALAI TESQUE INC.) を充填した。さらに、術後感染を防ぐ目的で、penicillin G (1 万単位 /kg) を静注し、gentamycin (0.5mg/kg) を筋注した。右頸静脈と左頸動脈に挿入されたカテーテルはその末端をピンで封じ、頭頸部皮下を経由させ、頭頂部に露出させた。糖尿病は STZ (55mg/kg, Sigma, USA) を静注し作製した。

Euglycemic insulin clamp technique:

5～7 日の回復期間を経て、16 時間の絶食後、ラットを蓋なしのケージに移し、非拘束下で、euglycemic insulin clamp 法を実施した。右頸静脈に挿入されたカテーテルはインスリン、グルコースの注入用であり、本ルートに介して SNP (3ng/kg/min)、アデノシン (1.5μmol/kg/min) または生理的食塩水 (生食) も併用投与した。左頸動脈に挿入されたカテーテルは血糖値、血漿インスリン濃度測定ための採血用とした。clamp 中、速効型インスリン (Actrapid MC, NOVO Nordisk, Denmark) を 3.0mU/kg/min の注入率で、90 分間にわたって投与した。

左頸動脈カテーテルより 10 分毎に採血し、血糖値を測定 (電極法) し、糖尿病ラットでは、血糖値を 140mg/dl に維持するように、一方、健常ラットでは、

血糖値を空腹時レベルに保持するように、20% (w/v) グルコース液の注入速度を調節した。血糖値、グルコース注入速度が安定した clamp 後半 30 分のブドウ糖の注入量により、ブドウ糖注入率 (glucose disposal rate, GDR) を求めた (Fig. 1)。さらに糖尿病ラットと健常ラットにおける血糖値の相違の影響を除外するため、GDR を clamp 中の血糖値で補正し、ブドウ糖代謝率 (metabolic clearance rate of glucose, MCR) を求め、インスリン作用の指標とした。

なお、糖尿病ラットの euglycemic clamp 法は、インスリン注入開始後、血糖値が 140mg/dl 前後に低下した時点より実施した。

血漿インスリン濃度は、clamp 前および clamp 終了直後に採血し、RIA 法にて測定した。

数値は平均値±平均誤差で示し、統計学的な処理は one-way analysis of variance (ANOVA) 検定で行った。

成 績

1、体重、血糖値、血漿インスリン濃度

Table 1 に示したように、各群における体重に有意差は認められなかった。糖尿病群の空腹時血糖値は健常群より有意に高く ($p < 0.01$)、一方、糖尿病群の空腹時のインスリン濃度は健常群より有意に低かった ($p < 0.01$)。また、clamp 中の血糖値は健常群では空腹時レベルに保たれ、糖尿病群では 140mg/dl 前後に維持された。各群において、clamp 中のインスリン濃度は約 30μU/ml と、いわゆる physiological hyperinsulinemia に至った。

Table 1 Body weight, and plasma glucose, and insulin levels before and immediately after the euglycemic clamp procedure

	Body wt (g)	Glucose (mg/dl)		Insulin (μ U/ml)	
		Basal	clamp	Basal	clamp
Normal					
Saline(5)	212±9	73±2	70±2	15±3	30±4
Diabetic					
Saline(5)	202±10	220±9**	138±2	6±1**	33±4
SNP (5)	219±9	207±11**	142±3	6±1**	35±2
adenosine(5)	212±6	219±4**	134±4	6±1**	31±3

Values are means±SEM. The number of rats is shown in parentheses.

* * : $p < 0.01$ vs. normal saline

2、GDR (Fig. 1)

NO 提供剤である SNP の糖尿病ラットへの投与は、GDR を $20.8 \pm 2.3 \text{ mg/kg/min}$ と、糖尿病生食投与群 ($11.4 \pm 1.0 \text{ mg/kg/min}$) に比して有意に増大させた ($p < 0.001$)。一方、NO 非依存性血管拡張剤であるアデノシンの投与では、GDR を $8.9 \pm 1.1 \text{ mg/kg/min}$ と、糖尿病生食投与群に比して、低値傾向を示したが、有意差は見られなかった。

3、MCR (Fig. 2)

糖尿病生食投与群 ($8.3 \pm 0.8 \text{ ml/kg/min}$) は健常群 ($18.8 \pm 2.7 \text{ ml/kg/min}$) に比し、有意に低値であったが ($p < 0.001$)、SNP の投与により、MCR は $15.6 \pm 1.7 \text{ ml/kg/min}$ となり、健常群レベルの 83% までに達し、糖尿病生食投与群に比較して有意に高値であった ($p < 0.001$)。一方、アデノシンの投与では、MCR は増大せず ($7.1 \pm 0.8 \text{ ml/kg/min}$)、ほぼ生食投与群レベルであった。

考 察

糖尿病、特に 2 型糖尿病の特徴的な病態の一つにインスリン抵抗性が知られている。インスリン抵抗性の機構としては脂肪細胞や骨格筋細胞でのインスリンに反応する糖輸送担体 GLUT4 が減少していること、骨格筋細胞におけるインスリン受容体のチロキシナーゼ活性の低下していること、及び脂肪細胞から分泌される TNF- α 、あるいは遊離脂肪酸などがインスリン感受性の低下をもたらすことが考えられている¹⁰⁾。NO は骨格筋細胞より産生されることが判明されてから¹¹⁾、NO が骨格筋細胞の糖代謝におよぼす影響に関する研究は最近注目されている。Balon ら²⁾、Young ら¹⁸⁾、及び Roy ら¹⁶⁾は各々 *in vitro* での成績で、NO が骨格筋細胞におけるグルコースの取り込みを促進すると報告した。

今回、我々の成績は、NO 提供剤である SNP の投与により、MCR は糖尿病生食投与群に比較して有意に高値となり、健常群レベルの 83% までに増大した。この事実は、NO が糖尿病におけるインスリン感受性の低下を改善させることを示唆している。

インスリンによる血管拡張効果が末梢組織の糖の取り込みを促進させ、インスリン抵抗性状態下では、インスリンによる血管拡張作用は減弱されていることが知られている³⁾。最近、この現象は内皮細胞の NO 合成に依存していることが判明した¹⁷⁾。また、糖尿病（1 型、2 型とも）において、NO 合成が減弱していることも証明されている^{4,11,15)}。したがって、今回の結果は、SNP の投与が、NO の補充を介して、インスリ

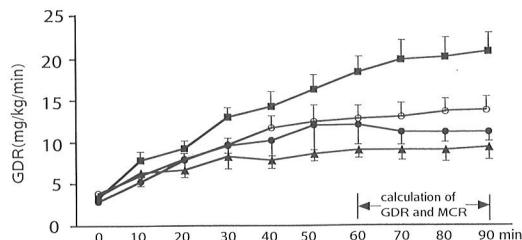


Fig. 1 Change in glucose disposal rates (GDR) during the euglycemic clamp procedure. (○) normal rats with saline; (●) diabetic rats with saline; (■) diabetic rats with sodium nitroprusside (SNP). (▲) diabetic rats with adenosine. Values are means \pm SEM.

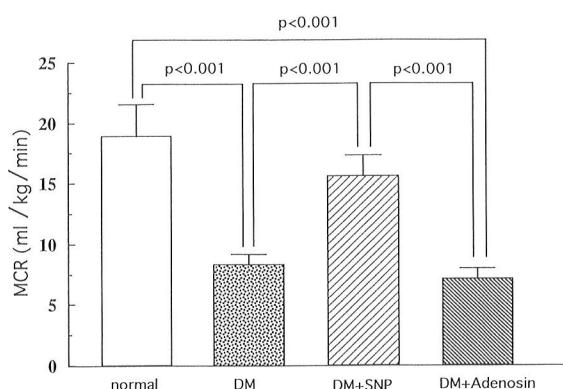


Fig. 2 Metabolic clearance rates of glucose (MCR) for the last 30 min during the euglycemic clamp procedure. SNP elicited increases of MCR in the diabetic rats, and the MCR, which was mediated by SNP, reached to the 83% of levels of normal rats, while the MCR, which was mediated by adenosine, was as low as those of the diabetic control rats. Data are means \pm SEM.

ン感受性を改善させたと考えられる。

NO がインスリン感受性を改善させる効果は単に血管拡張作用によるもの否かについて、糖尿病ラットに NO を介しない血管拡張剤であるアデノシンを投与し、検討を加えた。その結果、減弱したインスリン感受性は改善しなかった。すなわち、NO 非依存性の血管拡張効果はインスリン作用に影響を及ぼさないことが明らかとなった。NO のインスリン作用に及ぼすメカニズムに関して、本研究では、明らかにできなかつたが、いくつかの興味ある報告が見られる。Young ら¹⁸⁾は、NO がインスリン作用を介さず、骨格筋での糖輸送を促進させる事實を認めている。Etgen ら⁵⁾は SNP により、骨格筋細胞の糖の取込みの増大とともに、骨格筋細胞膜上の GLUT4 の蛋白量の増加も認めている。さらに、SNP による骨格筋細胞膜上の

GLUT4 の蛋白量の増大は PI3 キナーゼ阻害剤であるワートマニンには抑制されなかった成績も報告した。その一方、NO 効果はワートマニンにより抑制されると、Zeng らは主張している¹⁹⁾。以上、NO のインスリン作用、糖代謝におけるメカニズムについては、現在のところ、一定の見解が得られていない。今後、一層、これらに関して検討を加える予定である。

結 語

STZ 誘発糖尿病ラットに NO 提供剤である SNP を投与し、euglycemic clamp 法を実施したところ、GDR、MCR の有意の増大を認めた。以上の事実は NO が糖尿病により減弱したインスリン作用を改善させる可能性を示唆しているものと思われる。

参考文献

- 1) Balon, TW., Nadler, JL. Nitric oxide release in present from incubated skeletal muscle preparations. *J. Appl. Physiol.* 77 (6): 2519-2521, 1994.
- 2) Balon, TW., Nadler, JL. Evidence that nitric oxide increases glucose transport in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 82 (1): 359-363, 1997.
- 3) Baron, AD. Cardiovascular actions of insulin in human: implications for insulin sensitivity and vascular tone. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 7: 961-987, 1993.
- 4) Calver, A., Collier, J., Vallance, P. Inhibition and stimulation of nitric oxide synthesis in the human forearm arterial bed of patients with insulin-dependent diabetes. *J. Clin. Invest.* 90: 2548-2554, 1992.
- 5) Etgen, GJJr., Fryburg, DA., Michael Gibbs, E. Nitric oxide stimulates skeletal muscle glucose transport through a calcium/contraction-and phosphatidylinositol-3-kinase-independent pathway. *Diabetes* 46: 1915-1919, 1997.
- 6) Furchtgott, R F., Zawadzki, TV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376, 1980.
- 7) Giaid, A., Saleh, D. Reduced expression of nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *New Engl J Med* 333: 214-221, 1995.
- 8) Huang, PL., Huang, Z., Mashimo, H., Bloch, KD., Moskowitz, MA., Bevan, J. A., Fishman, M.C. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 377: 239-242, 1995.
- 9) Huang, Z., Huang, PL., Panahian, N., Dalkara, T., Fishman, MC., Moskowitz, MA. Effect of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science* 265: 1883-1885, 1994.
- 10) 葛谷 健編著：インスリン、分子メカニズムから臨床へ、講談社、東京、1996
- 11) Laakso, M., Edelman, SV., Berchtel, G., Baron, AD. Impaired insulin-mediated skeletal muscle blood flow in patients with NIDDM. *Diabetes* 41: 1076-1083, 1992.
- 12) 李 玲、押田芳治、羅偉権、中尾千登世、B-L. JOHANSSON、J. WAHREN、矢内原昇、佐藤祐造：ラット C - ペプチドのエンザイムノエッセイ測定法の確立。総合保健体育科学 20 (1): 85-90, 1997
- 13) Moncada, S., Palmer, RMG., Higgs, EA. Nitric oxide : physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43: 109-142, 1991.
- 14) Palmer, RM., Ferrige, AG., Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526, 1987.
- 15) Pieper, GM. Review of alterations in endothelial nitric oxide production in diabetes. *Hypertension* 31: 1047-1060, 1998.
- 16) Roy, D., Perreault, M., Marette, A. Insulin stimulation of glucose uptake in skeletal muscles and adipose tissues in vivo is NO dependent. *Am. J. Physiol.* 274 (Endocrinol. Metab. 37): E692-E699, 1998.
- 17) Scherrer, U., Randin, D., Vollenweider, P., Vollenweider, L., Nicod, P. Nitric oxide accounts for insulin's vascular effects in human. *J. Clin. Invest.* 94: 2511-2515, 1994.
- 18) Young, ME., Radda, GK., Leighton, B. Nitric oxide stimulates glucose transport and metabolism in rat skeletal muscle in vitro. *Biochem. J.* 322: 223-228, 1997.
- 19) Zeng, G., Quon, MJ. Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin. *J. Clin. Invest.* 98: 894-898, 1996.

(1998年12月4日受付)