

覚醒時と麻酔下におけるインスリン感受性の比較検討 — euglycemic clamp 法を用いて —

Comparison of insulin sensitivity between awake and anesthetized states

李 玲* 押田 芳治** 加古 真実**
島戸 真司*** 大崎 暢子* 佐藤 祐造**

Ling LI *, Yoshiharu OSHIDA **, Mami KAKO **
Shinji SHIMATO *** , Nobuko OHSAKI * , Yuzo SATO **

This study was undertaken to determine the effect of pentobarbital anesthesia (40mg/kg, i.p.) on in vivo insulin sensitivity. We performed the euglycemic clamp procedure (insulin infusion rate: 6.0mU/kg/min) in 8 awake and 9 anesthetized male Wistar rats. Mean body weights, and fasting blood glucose and plasma insulin concentrations were similar in the two groups. There was also no significant difference in blood glucose or plasma insulin levels during the clamp study between the two groups. Glucose disposal rate averaged over 60 ~ 90 min during the euglycemic clamp was significantly ($p < 0.01$) higher in awake rats (25.1 ± 2.9 mg/kg/min) than in anesthetized rats (14.3 ± 0.7 mg/kg/min). Glucose metabolic clearance rate was also found as shown in glucose disposal rate.

These results suggest that anesthesia reduces insulin sensitivity in rats.

はじめに

euglycemic clamp 法は末梢組織におけるインスリン作用を定量的に評価する手段として知られている。我々もヒトやラットに本法を実施し、身体トレーニング効果を判定してきた^{1,2,3,4}。すなわち、鍛練者（ラット）のインスリン感受性は非鍛練者に比して有意に亢進しており、さらに最近、肥満糖尿病患者に食事療法と運動トレーニングを併用し、減量させたところ、インスリン抵抗性が著明に改善した成績を報告している⁵。しかしながら、これまで我々はラットに euglycemic clamp 法を実施する際、ヒトと異なり、麻酔下で行ってきた。麻酔下の eu-

glycemic clamp 法においても十分に肝糖放出が抑制され、インスリン感受性の測定が可能とする報告がある一方で⁶、麻酔下では肝糖放出の抑制がみられず、また末梢組織でのグルコースの取り込みが減弱するとの報告がみられる^{7,8}。そこで、覚醒時および麻酔下のラットに euglycemic clamp 法を実施し、インスリン感受性の相違に関して検討を加えた。

対象および方法

対象は 8 ~ 12 週令の体重 210 ~ 270g の雄性 Wistar 系ラット 17 匹であり、無作為で覚醒群と麻酔群にわけた。ラットは室温 20℃ ~ 22℃、

* 名古屋大学大学院医学研究科社会医学系健康増進科学第一専攻

** 名古屋大学総合保健体育科学センター

*** 名古屋大学医学部

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

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

*** School of Medicine, Nagoya University

明暗サイクルが12時間（照明：0600～1800）の環境で、自由に餌と水を摂取する個別ケージにて飼育された。

覚醒群では euglycemic clamp 実施5～7日前に、まず、pentobarbital (40mg/kg, i.p.) 麻酔下で、カテーテルを挿入した。その詳細は以下の通りである。前頸部に切開を加え、右頸静脈と左頸動脈を露出し、サイラスチック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。5～7日の回復期間を経て、18時間の絶食後、ラットを蓋なしのケージに移し、頸静脈カテーテルを介して、6.0mU/kg/min の速度で、速効型インスリン (Actrapid MC, NOVO Nordisk, Denmark) を注入した。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 (glucose oxidase 法)。空腹時血糖に維持するように、20% (w/v) のグルコース液の注入速度を調節した。この手順に従い、90分にわたって、clamp を行い、血糖値が安定した後半30分のグルコースの注入速度により、グルコース注入率 (glucose disposal rate, GDR) とグルコース代謝率 (metabolic clearance rate of glucose, MCR) を算出した。

本条件下では肝臓よりの糖放出は抑制され、尿糖も陰性である。したがって、注入グルコース量がその個体で代謝されるグルコース量と一致することとなり、単位時間内に注入グルコース総量が、その個体のインスリン感受性を示す指標となりうる。したがって、GDR と MCR は個体のインスリン感受性を示すことになる⁹⁾。

一方、麻酔群は、pentobarbital (40mg/kg, i.p.) 麻酔下、既報のごとく¹⁰⁾、右大腿静脈にカテーテルを挿入し、覚醒群と同様に、インスリンを注入した。尾静脈より採血し、血糖値の測定を行い、グルコースの注入速度を調節した。clamp 後半30分間の GDR と MCR を求め、覚

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

	n	Body Weight(g)	Glucose(mg/dl)		Insulin(μ U/ml)	
			Basal Steady State	Basal Steady State	Basal Steady State	Basal Steady State
Awake	8	243 ± 13.6	75.8 ± 4.0	57.1 ± 1.4	8.2 ± 2.0	45.5 ± 7.0
Anesthetized	9	248 ± 11.1	72.4 ± 5.2	61.5 ± 2.4	8.6 ± 3.2	55.5 ± 19.0

Values are means ± S.E.

Table 2 Glucose disposal rate (GDR) and metabolic clearance rate of glucose (MCR) during the euglycemic clamp procedure

	n	GDR	MCR
Awake	8	25.1 ± 2.9 *	44.9 ± 5.3 *
Anesthetized	9	14.3 ± 0.7	23.7 ± 1.8

* P < 0.01

Values are means ± S.E.

醒群と比較検討を行った。

また、数値は平均値 ± 平均誤差で示し、統計学的な処理は t 検定で行った。

成 績

表1に示したように、覚醒群と麻酔群における体重、空腹時血糖、空腹時血漿インスリン濃度の有意差は認められなかった。また、両群とも、クランプ中の血糖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45～55 μ U/mlとなり、生理的高濃度のレベルに達した。

表2は両群のGDRとMCRを示した。覚醒群のGDRは麻酔群に比して有意に高かった (P < 0.01)。GDRをclamp中の血糖値で補正されたMCRも同じ傾向を示し、覚醒群のレベルは麻酔群に比較し、有意に大であった (P < 0.01)。

考 察

euglycemic clamp 法は個体のインスリン感受性を定量的に測定する方法として、数多く用いられ、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。eu-

glycemic clamp 法で求められる GDR や MCR は、2つ重要な因子によって決定される¹¹⁾。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の利用率と肝臓よりの糖放出率である。今回の我々の研究結果は麻酔下状態でのラットの GDR は覚醒状態に比して顕著に低下していた。この結果は他の成績と一致している^{8,12,13)}。

euglycemic clamp 法では、注入されたグルコースは主に筋肉に取り込まれ、総注入量の 70～80% を占めると報告されている¹¹⁾。Pénicaud ら⁸⁾ は [3-³H] で標識されたグルコースを用い、euglycemic clamp 法を麻酔下と覚醒状態のラットに、それぞれ実施し、麻酔下では覚醒時に比して、筋のグルコース取り込み量が 30% 減少する事実を認めている。その原因として、麻酔下では姿勢制御に働く soleus や adductor longus などの筋肉でのグルコースの取り込みの著減や脳での糖利用の減少を挙げている。

麻酔下での肝臓からの糖放出に関する研究は、必ずしも一致した結論に至っていない。Pénicaud らの報告によると、Pentobarbital 麻酔開始数分間のみ、一過性に肝糖放出は増大したが、その後、覚醒時のレベルまで回復したという。一方、Harsha Rao⁷⁾ は麻酔下での euglycemic clamp 法による血液の喪失が肝糖放出の増大を招き、GDR の低下を惹起させることを認めている。Terrettaz ら¹⁴⁾ も麻酔下における肝臓よりの糖放出の関与を示唆している。いずれにしても、euglycemic clamp 法より求めた GDR は麻酔により低下することが明らかとなり、覚醒状態のラットの euglycemic clamp 法が確立された以上、今後は覚醒時でインスリン感受性の検討を行わなければならないと思われる。

結 語

麻酔下および覚醒時に各々 euglycemic clamp 法を実施した。その結果、麻酔下で得られた GDR は、覚醒時に比して有意に低値であり、麻酔による影響が示唆された。今後、ラットのインスリン作用の判定には、覚醒時の eu-

glycemic clamp 法の実施が望ましいと思われる。

参 考 文 献

- 1) Sato Y., Iguchi A., Sakamoto N.: Biochemical determination of training effect using insulin clamp technique. *Horm Metab Res* 16: 463-486, 1984.
- 2) Oshida Y., Yamanouchi K., Hayamizu S., Sato Y.: Long-time mild jogging increases insulin action despite no influence on body mass index or $\dot{V}O_{2max}$. *J Appl Physiol* 66: 2206-2210, 1989.
- 3) 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.
- 4) Yang W. P., Oshida Y., Wu W., Sato J., Ohsawa I., Sato Y.: Effect of daily voluntary running 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.
- 5) Yamanouchi K., Shinozaki T., Chikada K., Nishikawa T., Ito K., Shimizu S., Ozawa N., Suzuki Y., Maeno H., Kato K., Oshida Y., Sato Y.: Daily walking combined with diet therapy is a useful means for obese NIDDM patients not only to reduce body weight but also to improve insulin sensitivity. *Diabetes Care* 18 (6): 775-778, 1995.
- 6) Nishimura H., Kuzuya H., Okamoto M., Yamada K., Kosaki A., Kakehi T., Inoue G., Kono S., Imura H.: Postreceptor defect in insulin action in streptozotocin-induced diabetic rats. *Am J Physiol* 256 (Endocrinol Metab 19): E624-E630, 1989.
- 7) Harsha Rao R.: Changes in insulin sensitivity from stress during repetitive sampling in anesthetized rats. *Am J Physiol* 262: R1033-R1039, 1992.
- 8) Pénicaud L., Ferre P., Kande J., Leturque A., Issad T., Girard J.: Effect of anesthesia on glucose production and utilization in rats. *Am J Physiol* 252: E365-E369, 1987.
- 9) DeFronzo RA., Tobin J., Andres R.: Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 237: E214-E223, 1979.
- 10) Oshida Y., Ohsawa I., Sato J., Sato Y.: Effects of adrenalectomy on in vivo insulin-stimulated glucose utilization in relation to glycolysis in rat peripheral tissue. *Endocrine Journal* 40: 99-106, 1993.
- 11) DeFronzo RA., Jacot E., Jequier E., Maeder E., Wahren J., Felber JP.: The effect of insulin and the disposal of intravenous glucose: Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetes* 30: 1000-1007, 1981.

- 12) Smith D., Rossetti L., Ferrannini E., Johnson CM., Cobelli C., Toffolo G., Katz LD., DeFronzo RA.: In vivo glucose metabolism in the awake rat: Tracer and insulin clamp studies. *Metabolism* 36: 1167-1174, 1987.
- 13) Hawkins RA., Miller AL., Cremer JE.: Measurement of the rate of brain glucose utilization by rat brain in vivo. *J Neurochem* 23: 917-923, 1974.
- 14) Terrettaz J., Jeanrenaud B.: in vivo hepatic and peripheral insulin resistance in genetically obese (fa/fa) rats. *Endocrinology* 112: 1346-1351, 1983.

(1995年12月4日受付)