

## Microdialysis 法を用いた骨格筋, 脂肪組織における インスリン作用の検討

Studies on insulin action in skeletal muscle and adipose tissue  
by using the microdialysis technique

押田 芳治\* 大沢 功\*  
佐藤 寿一\*\* 佐藤 祐造\*

Yoshiharu OSHIDA \*, Isao OHSAWA \*  
Juichi SATO \*\*, Yuzo SATO \*

The purpose of the present study was to elucidate the possibility that the in vivo insulin action in skeletal muscle and adipose tissue was determined by using of a two-step sequential euglycemic clamp procedure combined with a microdialysis technique in Wistar rats. When the insulin infusion rates were 6.0 and 30.0 mU/kg · min, the plasma insulin concentrations were 80-100 and 1,000  $\mu$  U/ml, respectively. The plasma glucose concentrations were maintained constant at the basal levels by the periodic adjustment of a variable amount of glucose infusion. The lactate concentrations in dialysate throughout the microdialysis correspond to the insulin-mediated glucose uptake of skeletal muscle or adipose tissue, and then reflect insulin action in these above tissues. The following result was obtained.

The insulin dose-response curve was observed in skeletal muscle and adipose tissue, when the lactate concentration in dialysate was plotted against the logarithm of the mean plasma insulin concentration.

This result suggests that the microdialysis technique provides a reliable estimate for the in vivo insulin action in skeletal muscle and adipose tissue.

### 緒 言

これまで、我々は euglycemic clamp 法を用いて、ヒトやラットの個体レベルにおける insulin action を定量化し、種々検討を行ってきた<sup>1)2)3)4)5)</sup>。すなわち、鍛練者(又はラット)のインスリン感受性は、非鍛練者(又はラット)に比して有意の高値を示し<sup>1)</sup>、非鍛練者も運動トレーニングを継続すれば、インスリン感受性が著明に亢進する成績を報告している<sup>2)</sup>。さらに、単純肥満者、II型肥満糖尿病患者のインスリン感受性は、健常者に比べ著しく低下しているものの、食事療法と運動ト

レーニングの併用により、明らかに改善する事実も認めている<sup>3)</sup>。

この euglycemic clamp 法は、あくまで個体全体の insulin action を表示しており、個々の器官、特にインスリンの末梢標的器官である骨格筋および脂肪組織での insulin action の発現の詳細については不明な点も少なくない。そこで、脳内神経伝達物質の検索に限定されていた microdialysis 法<sup>6)</sup>をラットの骨格筋、脂肪組織に応用し、in vivo 下でのこれらの組織における insulin action の測定が可能かどうかについて検討を加えたので報告する。

\* 名古屋大学総合保健体育科学センター

\*\* 名古屋大学医学部第三内科

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

\*\* The Third Department of Internal Medicine, Nagoya University School of Medicine

**Table 1** Plasma insulin and glucose levels before and during the study  
(insulin infusion rate : 6.0 and 30.0mU/kg · min)

	B. W. (g)	Insulin ( $\mu$ U/ml)			Glucose (mg/dl)		
		Basal	6.0	30.0	Basal	6.0	30.0
Control (6)	273 $\pm$ 6	33.4 $\pm$ 4.6	92.8 $\pm$ 16.3	1053.6 $\pm$ 74.3	66 $\pm$ 4	67 $\pm$ 3	68 $\pm$ 3

Values are means  $\pm$  SE

The number of rats is shown in parentheses.

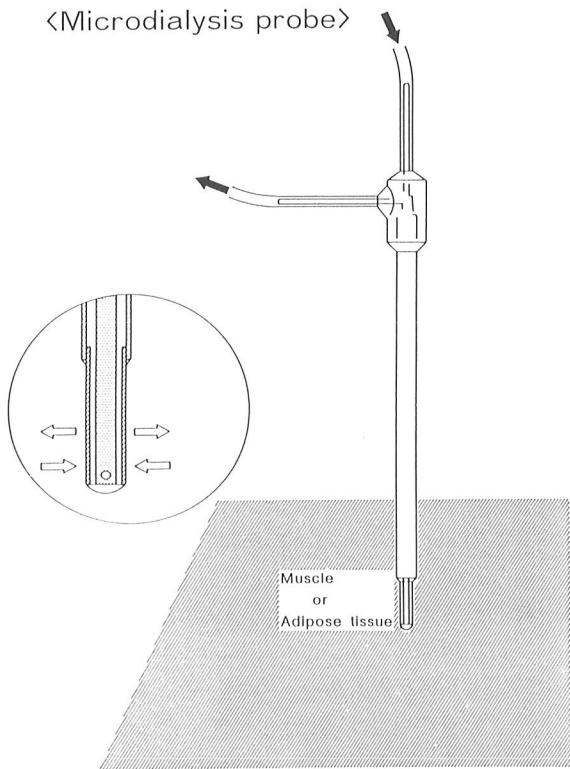
**対象および方法**

対象は、体重 270g 前後の18時間絶食された Wistar 系雄性ラット 6 例である。ネンプタール麻酔下 (40mg/kg), 頸静脈にカテーテルを留置し, インスリンと20%ブドウ糖液の注入用とした。全例にインスリン注入率 6.0, 30.0mU/kg · min の2段階インスリン注入 euglycemic clamp 法を各々75分間ずつ連続的に実施した。尾静脈より15分毎に血糖値を測定し, ブドウ糖注入量を調節することで, 空腹時血糖値に維持した。また, 血漿インスリン濃度測定のための採用も尾静脈より行った。各インスリン注入率の後半30分間のブドウ糖注入量 (glucose infusion rate, GIR) を, それぞれの血漿インスリン濃度における個体全体の insulin action の指標とした。

さらに, euglycemic clamp 法と同時に, 後述する microdialysis 法を併用した。すなわち, ラットの両側大腿筋 (vastus muscle) と両側ソケイ部脂肪組織に microdialysis probe を挿入 (Fig. 1),  $Ca^{2+}$  を半減した Krebs-Henseleit buffer (KHB) を microinjection pump (Fig. 2) を用い,  $1 \mu$  l/min の割合で各組織内に注入した。組織内に挿入された先端部にて, 注入 KHB と細胞間液とが透析され, その透析液を採取し, 乳酸濃度の測定を行い, 各血漿インスリン濃度における骨格筋, 脂肪組織の insulin action の指標とした。

なお, 数値は, 平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。

<Microdialysis probe>



**Fig. 1** Design of the microdialysis probe.

During the slow perfusion of the probe, chemicals and substances enter or leave the perfusion fluid by diffusion through the wall of the membrane.

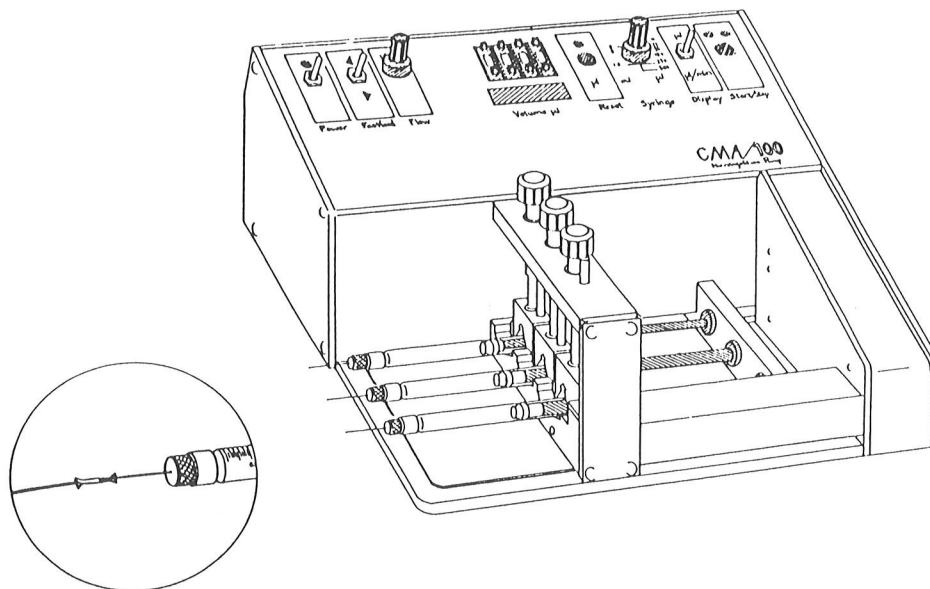


Fig. 2 The microinjection pump

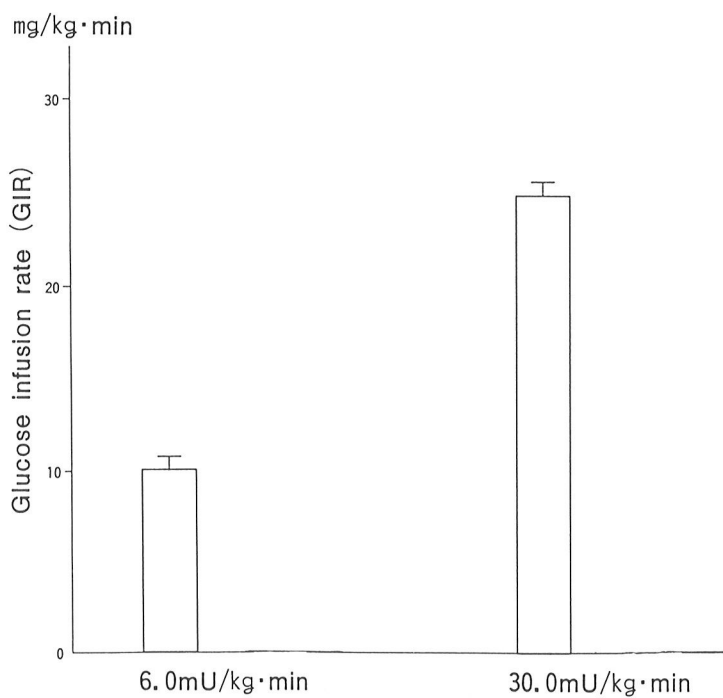


Fig. 3 Glucose infusion rate during the euglycemic clamp procedure (insulin infusion rate : 6.0 and 30.0 mU/kg·min)

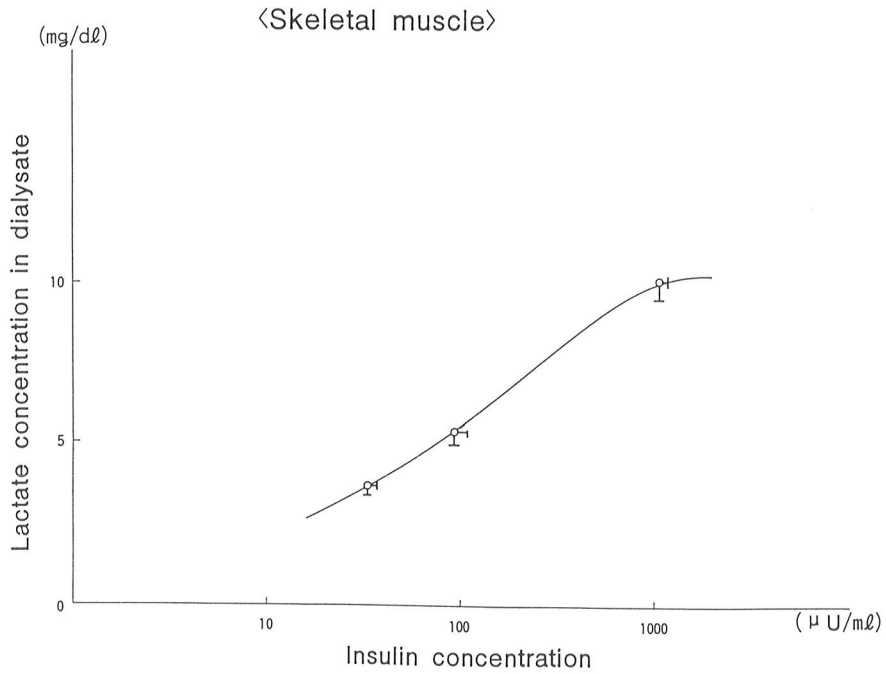


Fig. 4 In vivo insulin dose-response curve in skeletal muscle of rats for the lactate concentration in dialysate throughout the microdialysis.

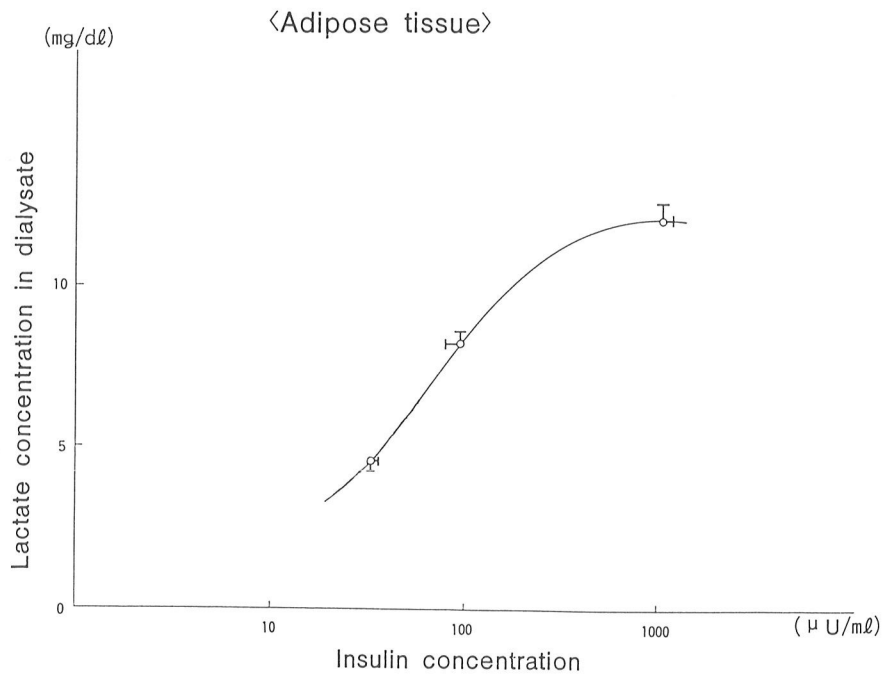


Fig. 5 In vivo insulin dose-response curve in adipose tissue of rats for the lactate concentration in dialysate throughout the microdialysis.

## 成 績

### 1. 血漿インスリン濃度, 血糖値 (Table 1)

空腹時血漿インスリン濃度は  $30 \mu\text{U/ml}$  前後であり, インスリン注入率  $6.0\text{mU/kg} \cdot \text{min}$  では  $80 \sim 100 \mu\text{U/ml}$ ,  $30.0\text{mU/kg} \cdot \text{min}$  では  $1,000 \mu\text{U/ml}$  前後に達した。一方, 血糖値は, 20%ブドウ糖液の注入量の調節により, ほぼ空腹時レベルに維持された。

### 2. GIR (Fig. 3)

インスリン注入率  $6.0\text{mU/kg} \cdot \text{min}$  の GIR は,  $10.30 \pm 0.80\text{mg/kg} \cdot \text{min}$  であり,  $30.0\text{mU/kg} \cdot \text{min}$  の注入率では,  $24.27 \pm 0.79\text{mg/kg} \cdot \text{min}$  であった。これらの数値は, 従来の euglycemic clamp 法より得られたものとはほぼ一致する<sup>(4)(5)</sup>。

### 3. 骨格筋における microdialysis (Fig. 4)

各血漿インスリンレベルにおける microdialysis 法により得られた乳酸濃度は, Fig. 4のごとく容量依存曲線を呈した。血漿インスリン濃度が空腹時レベルでの乳酸濃度は  $3.76 \pm 0.29\text{mg/dl}$  であり, インスリン注入率  $6.0\text{mU/kg} \cdot \text{min}$  換言すれば, 血漿インスリン濃度が submaximal なレベルでは,  $5.37 \pm 0.39\text{mg/dl}$ , 注入率  $30.0\text{mU/kg} \cdot \text{min}$ , すなわち血漿インスリン濃度が maximal なレベルでは  $10.23 \pm 0.59\text{mg/dl}$  となった。

### 4. 脂肪組織における microdialysis (Fig. 5)

透析液中の乳酸濃度は, 血漿インスリン濃度が空腹時レベルで  $4.50 \pm 0.25\text{mg/dl}$ , submaximal レベルで  $8.26 \pm 0.44\text{mg/dl}$ , maximal レベルで  $12.05 \pm 0.67\text{mg/dl}$  と, 骨格筋同様, 容量依存曲線が得られた。

## 考 察

我々は euglycemic clamp 法を用いて, 主に個体のトレーニング効果の評価をインスリン感受性の定量化で行ってきた<sup>(1)(2)(3)(4)(5)</sup>。しかしながら, どの組織にトレーニング効果が発現されるかについ

て, 諸家の見解は一致していない。これまでの in vitro での成績によれば, Richter ら<sup>(7)</sup>はラットの後肢の還流実験より骨格筋であると推察している。一方 Rodnick ら<sup>(8)</sup>は骨格筋のみならず, 単離脂肪細胞や肝静脈カテーテル法を用い, 脂肪組織および肝においてもトレーニング効果が出現すると結論づけている。これらの報告は, 骨格筋, 脂肪組織, 肝での insulin action に関するトレーニング効果の評価について, 同一条件で実施されていない。しかも, 骨格筋, 脂肪組織での検討は in vivo の状態で行われていない。

そこで, euglycemic clamp 法実施中に, 骨格筋, 脂肪組織に microdialysis 法を併用して, 同一条件下で, 同時に組織別の in vivo insulin action の検討を加えた。microdialysis 法は, Ungersteg<sup>(6)</sup>によれば, in vivo で細胞の活動に応じて変動する代謝産物, 伝達物質, ブドウ糖などの栄養素の検討に極めて有用であると主張している。一方, Espinal ら<sup>(9)</sup>は, 骨格筋 (soleus muscle) の glucose uptake に応じて乳酸産生量が増加すると報告している。実際, 今回の検討成績において, 血漿インスリン濃度の上昇にしたがい個体レベルの GIR の増大が認められ, さらに, 骨格筋, 脂肪組織での透析液中の乳酸濃度の増加もみられた。したがって, 骨格筋, 脂肪組織における in vivo insulin action の測定には, microdialysis 法が有力な手段となり得るものと考えられる。

また, 今回の euglycemic clamp 法と microdialysis 法の併用により, 多段階の血漿インスリン濃度での insulin action の測定が可能となった。具体的には, Olefsky ら<sup>(10)</sup>が報告しているように, 血漿インスリン濃度が submaximal ではインスリンレセプターレベルを反映するインスリン感受性を, maximal では, ポストレセプター部由来のインスリン反応性の検討が容易となり, 種々の条件下での骨格筋や脂肪組織における insulin action の特徴 (レセプター部位やレセプター以降のステップ) が把握可能になったと思われる。

## References

- 1) Sato, Y., A. Iguchi, and N. Sakamoto. (1984) : Biochemical determination of training effects using insulin clamp technique. *Horm. Metab. Res.* 16 : 483-486
- 2) Oshida, Y., K. Yamanochi, S. Hayamizu, Y. Sato. (1989) : Long-term mild jogging increases insulin action despite no influence on body mass index or  $\dot{V}O_{2max}$ . *J. Appl. Physiol.* 66 : 2206-2210.
- 3) Ishiguro, T., Y. Sato, Y. Oshida, K. Yamanouchi, M. Okuyama, N. Skamoto. (1987) The relationship between insulin sensitivity and weight reduction in simple obese and obese diabetic patients. *Nagoya J. Med. Sci.* 49 : 61-69.
- 4) 岡田節朗, 佐藤祐造, 山本 親, 押田芳治, 井口昭久, 坂本信夫 (1988) : 糖尿病の運動療法に関する研究 (第13報) — 副腎髓質摘出ラットにおけるインスリン感受性の変動—糖尿病 31 : 733-737.
- 5) 押田芳治, 山之内国男, 楠 正隆, 岡田節朗, 大沢 功, 佐藤祐造 (1989) 成人病の運動療法の理論的背景 — 交感神経・副腎髓質系のインスリン感受性に及ぼす影響— 体力研究 72 : 47-52.
- 6) Ungerstedt, U. (1986) : Microdialysis— A new bio-analytical sampling technique : *Current Separations.* 7 : 43-46
- 7) Richter, E. A. , L. P. Garetto, M. H. Goodman, N. B. Ruderman. (1982) : Muscle glucose metabolism following exercise in the rat. Increased sensitivity to insulin. *J. Clin. Invest.* 67 : 785-793.
- 8) Rodnick, K. J., W. L. Haskell, A. L. Swislocki, J. E. Foley, and G. M. Reaven. (1987) : Improved insulin action in muscle, liver and adipose tissue in physically trained human subjects. *Am. J. Physiol.* 253 : E489-E495.
- 9) Espinal, J., L. Dohm, E. A. Newsholme. (1983) : Sensitivity to insulin of glycolysis and glycogen synthesis of isolated soleus muscle strips from sedentary, exercised and exercised-trained rats. *Biochem. J.* 212 : 453-458.
- 10) Olefsky, J. M., O. G., Kolterman., and J. A. Scarett, (1982) : insulin action and resistance in obesity and noninsulin-dependent type II diabetes mellitus. *Am. J. Physiol.* 143 : E15-E30.

(1990年11月30日受付)