

Inhibitors of Post-binding Insulin Action in Serum of Patients with Liver Cirrhosis

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8389

肝硬変患者血清中におけるインスリン作用阻害物質に関する研究

金沢大学医学部内科学第一講座 (主任: 小林健一教授)

臼 田 里 香

(平成4年7月28日受付)

肝硬変におけるインスリン抵抗性発現の機序を解明するため、肝硬変患者血清中のインスリン作用阻害活性をラット脂肪細胞を用いて検討した。健常ラットより分離した脂肪細胞と肝硬変患者血清とを前孵置した後、脂肪細胞に対する¹²⁵I-インスリン結合率を測定すると、健常者血清で前孵置した場合に比しインスリン結合率に有意差は認められなかった。しかし、肝硬変患者血清と前孵置した健常ラット脂肪細胞を用い糖輸送率 (glucose clearance rate, GCR) を検討したところ、インスリン非刺激下 (basal), 刺激下 (stimulated) のいずれにおいても、健常者血清前孵置の場合に比し GCR は有意に低下していた。また、インスリン反応性の指標である (インスリン刺激下 GCR)/(非刺激下 GCR) は肝硬変患者血清前孵置で低下傾向を、(刺激下 GCR)-(非刺激下 GCR) は肝硬変患者血清前孵置で有意に低下していた。一方、インスリン非刺激下あるいは刺激下 GCR と血中インスリン値、他のインスリン拮抗ホルモン、血糖コントロールや肝機能の指標などとの間に有意な相関関係は認められなかった。次に、本阻害活性の安定性を56℃30分間熱処理、あるいは凍結融解により検討した。上記処置により、無処置血清の際みられたインスリン非刺激下および刺激下 GCR の低下はみられなくなり、インスリン作用阻害活性は失活した。また、肝硬変患者血清をモルカットⅡにて分子量分画しラット脂肪細胞糖輸送率に及ぼす影響をみたところ、分子量1万未満の分画に阻害活性が認められた。以上の結果より肝硬変患者血清中には、インスリン作用をインスリン受容体結合後、特に糖輸送のレベルにおいて阻害する活性が存在することが判明した。また、本阻害活性物質は、インスリンやその他の既知のホルモンとは無関係な未知の物質であり、比較的低分子領域の物質である可能性が示された。本活性は、肝硬変患者にみられるインスリン抵抗性の一因を担っている可能性があり、今後さらにこの阻害活性物質を解明することが、肝硬変での耐糖能異常を説明する糸口になると思われる。

Key words liver cirrhosis, insulin resistance, insulin receptor, glucose transport

肝臓は、空腹時における糖産生や食後の糖処理など生体での糖代謝の恒常性を司る重要な臓器の一つである。それ故、肝臓が障害を受けた場合耐糖能に異常をきたすことは容易に想像され、実際肝硬変 (liver cirrhosis, LC) のような慢性で高度の肝障害患者にブドウ糖負荷試験を施行すると、大多数が境界型もしくは糖尿病型を呈することが知られている¹⁾。LC患者における耐糖能異常の特徴は、血糖の基礎値は正常であるがブドウ糖負荷後高値を示す一方、血中インスリン値は基礎値より高値を呈し、ブドウ糖負荷後過剰分泌を示すことにある。現在、この耐糖能異常発現の機序に関しては必ずしも明らかになったとはいえないが、LCではブドウ糖負荷時、高血糖と共に高インスリン血症を伴うことが多く、インスリン抵抗性の果たす役割が強調されてきた²⁾。ただ、インスリン抵抗性は肝臓におけるインスリン抵抗性と、筋肉や脂肪組織など末梢組織におけるインスリン抵抗性に分けて考える必要がある。空腹時血糖値が主として肝臓からの糖産生によって規定されている³⁾ことを考慮すると、LCでは少なくとも肝糖産生は正常に保たれており、肝臓でのインスリン抵抗性はあまり問題にならないことになる。実際 Petrides ら⁴⁾は、LC患者にグルコースクランプを行い生理

的血中インスリン濃度における肝糖放出を検討したところ、LC患者でも肝糖放出は健常者と同様に抑制されることを報告している。このことは、LCにおけるインスリン抵抗性が肝臓よりも末梢組織に大きく影響を受ける可能性を示唆している。末梢組織での糖利用能の低下の原因としては、従来インスリン受容体レベルにおけるインスリン結合能の低下⁵⁾や、受容体以後でのインスリン作用の異常⁶⁾などが論じられてきた。しかし、LCという病態を考えると、糖利用を抑制する何らかの物質が血中に存在する⁷⁾可能性も考えておく必要がある。

そこで今回著者は、LC患者血清中にインスリン作用を阻害する活性が存在するか否かを検討するため、患者血清と前孵置した健常ラット脂肪細胞を用い、インスリン受容体結合率、インスリン刺激下および非刺激下での糖輸送動態を測定した。また、本活性と血中インスリン値や種々のインスリン拮抗ホルモンの関係、血糖コントロールや肝障害の程度との関係などを検討し、本活性が既知の物質に関連するか否かを推察した。更に、LC患者血清に熱処理、凍結融解処理あるいは分子量分画処理を加えることにより、本活性がどう変化するかについて検討した。

Abbreviations: BG, blood glucose; BSA, bovine serum albumin; C, control; Cort, cortisol; FBG, fasting blood glucose; FFA, free fatty acid; GCR, glucose clearance rate; GH, growth hormone; GLUT, glucose transporter; HbA_{1c}, glycohemoglobin A_{1c}; HPT, hepaplastin test; ICG, indocyanine green; IRI,

対象および方法

1. 対 象

対象とした肝硬変患者 (LC) 群は1986年4月から1989年9月までに金沢大学第1内科に通院もしくは入院中であった患者で、全例腹水、黄疸などを認めない代償期の肝硬変であり、腹腔鏡、肝生検所見より確定診断した。なお、病歴、家族歴、臨床症状および糖尿病網膜症などの合併症の有無により、一次性糖尿病の関与が明らかな場合は対象より除外した。また、臍疾患、腎疾患、内分泌疾患など他疾患の合併が明らかな場合および標準体重より+10%以上の肥満者も除外した。

¹²⁵I-インスリン結合率の測定には LC 群17名 (男性14名, 女性3名, 平均年齢61.1±2.3歳), 健常対照者 (control, C) 群8名 (男性7名, 女性1名, 平均年齢32.8±5.9歳) を対象とし, 糖輸送率の測定には LC 群28名 (男性11名, 女性17名, 平均年齢49.5±0.9歳), C群17名 (男性13名, 女性4名, 平均年齢30.2±1.1歳) を対象とした。

II. 方 法

1. 臨床検査

対象者に対し早朝空腹時に採血を行い, 血糖値 (blood glucose, BG), グリコヘモグロビン A_{1c} (glycohemoglobin A_{1c}, HbA_{1c}), 血清インスリン濃度 (immunoreactive insulin, IRI), 成長ホルモン (growth hormone, GH), コルチゾール (cortisol, Cort), 遊離脂肪酸 (free fatty acid, FFA) を測定した。なお, 血糖はグルコースオキシダーゼ法, IRI および Cort は栄研イムノケミカル研究所 (東京) 製キット, GH はダイナボット社 (東京) 製キットを用いそれぞれ RIA 法により, また血清遊離脂肪酸は和光純薬工業社 (大阪) 製の試薬を用いた酵素法により測定した。また対象となった LC 群中38名に75g 経口ブドウ糖負荷試験 (oral glucose tolerance test, OGTT) を施行し, 日本糖尿病学会の75g-OGTT の診断に関する委員会の勧告⁹⁾に従って判定した。

2. 遊離脂肪細胞の調整

市販ラット用固形飼料を自由に摂取させた体重130-150gのウィスター系雌性ラットを, ドライアイスにて窒息死させ, ただちに副睾丸周囲の脂肪組織を摘出した。コラゲナーゼ2 mg/ml (フナコシ, 東京) の入ったポリエチレン製のバイアル (20ml, Wheaton 社, Millville, U. S. A.) に細切した脂肪組織を入れ, 恒温槽内で37°C, 60分間振盪後, 消化組織を250μm ナイ

ロンメッシュに通し, 緩衝液で3回洗浄した。得られた遊離脂肪細胞を計数盤で細胞数を算定した後, 恒温槽内に30分静置させ以下の実験に供した⁹⁾。なお, 本実験はすべて1%牛血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA, Fraction V) (Armour 社, Kankakee, U. S. A.) を含む Hepes-Krebs-Ringer-bicarbonate (KRB-Hepes) 緩衝液 (0.9% NaCl, 1.15% KCl, 1.22% CaCl₂, 2.11% KH₂PO₄, 3.8% MgSO₄·7H₂O, 1.3% NaHCO₃, 0.16M Na-pyruvate, 0.1M Na-fumarate, 0.16M Na-L-glutamate, 0.3M-(5.4%) glucose, pH 7.4) を用いた。また, 非標識インスリンはすべてモノコンポーネントブタインスリン (Novo 社, Copenhagen, Denmark) を用いた。その他の化学試薬類は和光純薬工業社のものを使用した。

3. ¹²⁵I-インスリン結合率の測定

¹²⁵I-インスリン結合率の測定は Olefsky らの方法¹⁰⁾¹¹⁾を一部変更して行った。前処置として遊離脂肪細胞2×10⁵個に患者空腹時血清100μlを添加し, 緩衝液で最終容量1mlとして37°C 1時間, 前孵置した後, 3回洗浄した。さらに, KRB-Hepes 緩衝液 (pH 7.6) で37°C 1時間孵置した後, インスリン受容体に結合した血清中のインスリンを除去するため緩衝液 (pH 7.0) で3回洗浄し, ¹²⁵I-インスリン結合率の測定に供した。すなわち, 遊離脂肪細胞 (2×10⁵個/tube) を0.2ng/mlの¹²⁵I-インスリン (比活性197μCi/μg, New England Nuclear 社, Boston, U. S. A.), 緩衝液と共に種々の濃度 (0~10⁴ng/ml) の非標識インスリンの存在下および非存在下で1mlとし, 16°C 2時間孵置した。反応終了後, 細胞浮遊液300μlをシリコンオイル (東京化成工業, 東京) 200μlを入れた微小遠心管に重層し, Beckman Microfuge B (Beckman Instruments 社, PaloAlto, U. S. A.) にて30秒間遠心した。上層に浮遊した脂肪細胞を綿棒ですくい, 放射活性をウエル型シンチレーションカウンター (Aloka 社, 東京) にて測定し, 脂肪細胞に対する¹²⁵I-インスリンの結合率を求めた。その際, 0.1ng/mlの濃度の非標識インスリン存在下における結合率から, 10⁴ng/ml濃度における過剰の非標識インスリン存在下における結合率を非特異的結合率 (nonspecific binding) として差し引いたものを特異的結合率 (specific binding) とし, 血清による阻害活性を以下の式で求めた。

$$\% \text{阻害率} = 100 - \left[\frac{\text{特異的結合率 (血清による)}}{\text{特異的結合率 (緩衝液による)}} \right] \times 100$$

Table 1. Clinical characteristics of the subjects whose serum used for ¹²⁵I-insulin binding assay

Group	Age (year)	Sex	HbA _{1c} (%)	IRI (μU/ml)	GH (ng/ml)
LC (n=17)	61.1±2.3*	M=14 F=3	4.3±0.2	13.1±2.6**	4.5±0.6***
C (n=8)	32.8±5.9	M=7 F=1	—	7.4±0.7	1.5±0.6

LC, liver cirrhosis; C, control; n, number of subjects; M, male; F, female; IRI, immunoreactive insulin; GH, growth hormone; —, not done; *, p<0.001; **, p<0.05; ***, p<0.01. Values are expressed as mean±SEM.

immunoreactive insulin; KRB, Krebs Ringer bicarbonate; LC, liver cirrhosis; OGTT, oral glucose tolerance test; PT, prothrombin time

4. 糖輸送率の測定

糖輸送率測定は, [U-¹⁴C]-D-glucose を用いた Kashiwagi らの方法¹²⁾ に準じて行った. 前処置として遊離脂肪細胞 2×10^6 個に患者空腹時血清 100 μ l を添加し, 最終容量 1 ml として 37 $^{\circ}$ C 1 時間, 前孵置した後, 緩衝液で 3 回洗浄した. 更に KRB-Hepes 緩衝液 (pH 7.4) で 37 $^{\circ}$ C 1 時間インキュベーションした後糖輸送率の測定に供した. すなわち, 遊離脂肪細胞 (2×10^6 個/tube) および 0.1 μ Ci [U-¹⁴C]-D-glucose (比活性 4.28 mCi/mmol, New England Nuclear 社) に最終濃度 100ng/ml の非標識インスリンの存在下 (stimulated) あるいは非存在下 (basal) で KRB-Hepes 緩衝液を加え 1 ml とし, 37 $^{\circ}$ C 1 時間孵置した. 次いで, 細胞浮遊液 300 μ l をあらかじめシリコンオイル 200 μ l を入れておいた微小遠心管に重層し, Beckman Microfuge B にて 30 秒間遠心後, 上層に浮遊した脂肪細胞を綿棒ですくった. 最下層の緩衝液層および脂肪細胞の付着した綿棒をそれぞれ別々に, あらかじめアクアゾール (AQUASOL-2, Amersham 社, Greenwich, U. S. A.) 5ml を入れておいたリキッドシンチレーションバイアルに加え, 液体シンチレーションカウンター (LSC-1000, Aloka 社) にて放射活性を測定し, [U-¹⁴C]-D-glucose の脂肪細胞への取り込み率 (糖輸送率, glucose transport rate) を求めた. 糖輸送率は下記の式で示す如く脂肪細胞 1 個当たり 1 秒間の糖輸送率 (glucose clearance rate, GCR) で表した.

$$\text{GCR (fl/sec} \cdot \text{cell)} = (\text{volume in medium} \times \text{cpm in cells} / \text{cpm in medium} \cdot \text{cells} \cdot \text{second}) \times 100$$

5. インスリン作用阻害活性の熱安定性試験

糖輸送率測定の LC 対象者のうち, 6 名 (男性 3 名, 女性 3 名, 平均年齢 41.7 ± 3.6 歳) に対し, それぞれの血清を 1) 加熱処理, 2) 凍結融解処理, を行ったうえで糖輸送率に対する影響を測定した.

1) 加熱処理

患者血清をあらかじめ 56 $^{\circ}$ C, 30 分間インキュベーションした後, ラット脂肪細胞と前孵置し同様の方法で糖輸送率を測定した. この値を, LC 群および C 群の無処理血清での値と比較し本活性の熱に対する耐性を検討した.

2) 凍結融解処理

患者凍結血清を常温で完全に融解した後, 再度凍結する処置を週 1 回計 4 回繰り返した後にラット脂肪細胞と前孵置し, 糖輸送率を測定した.

6. 血清の分子量による分画

糖輸送率測定の LC 対象者のうち, 5 名 (男性 3 名, 女性 2 名, 平均年齢 43.0 ± 4.2 歳) においては, モルカット II (日本ミリア工業, 米沢) を用い, 血清を分子量 1 万以上および 1 万

未満に分画した. それぞれの分画をラット脂肪細胞と前孵置した後, 糖輸送率を測定し, 本活性を示す物質の分子量を測定した.

7. 推計学的処理

結果はすべて, 平均値 \pm 標準誤差で示し, 有意差検定は Student の t-検定を用い, $p < 0.05$ を有意とした.

成 績

I. 肝硬変患者血清の ¹²⁵I-インスリン結合率に与える影響

ラット脂肪細胞を用いて, そのインスリン結合率に与える肝硬変患者血清の影響を調べた.

1. 対象者の臨床背景 (表 1)

用いた血清は, 肝硬変患者 (LC 群) と, その対照 (C 群) のもので, その血清の臨床的背景は次のようであった. すなわち, 血清 IRI 値は LC 群 13.1 ± 2.6 , C 群 $7.4 \pm 0.7 \mu\text{U/ml}$ ($p < 0.05$), また血清 GH 値は LC 群 4.5 ± 0.6 , C 群 $1.5 \pm 0.6 \text{ng/ml}$ ($p < 0.01$) でありいずれも LC 群で有意に上昇していた.

2. ¹²⁵I-インスリン結合率に対する阻害

ラット脂肪細胞におけるインスリン結合率は, いずれのインスリン濃度においても, 緩衝液のみで処理した場合と LC 群や C 群の血清で前孵置した場合で有意差は見られなかった (図 1).

II. 糖輸送率

次に, 患者血清の糖輸送率に与える影響をラット脂肪細胞を用いて調べた.

1. 対象者の臨床背景 (表 2)

LC 群と C 群の間で空腹時血糖値 (fasting blood glucose,

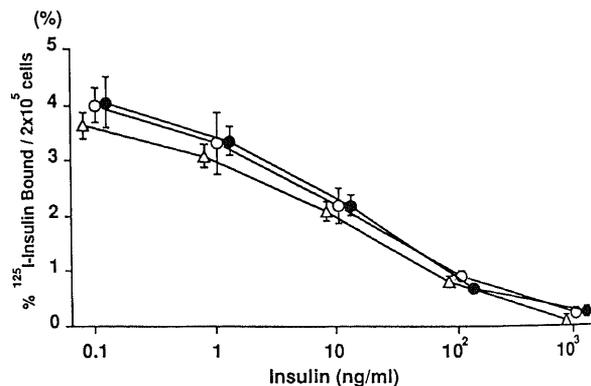


Fig. 1. Binding of ¹²⁵I-insulin to rat adipocytes in the presence of serum. ●-●, serum from liver cirrhosis (n=3); ○-○, control serum (n=3); △-△, buffer alone (n=5). Values are expressed as mean \pm SEM.

Table 2. Clinical characteristics of the subjects whose serum used for glucose transport assay

Group	Age (year)	Sex	HbA _{1c} (%)	FBG (mg/dl)	IRI ($\mu\text{U/ml}$)	GH (ng/ml)	Cort ($\mu\text{g/dl}$)	FFA (mEq/l)	ICG (%)	HPT (%)	PT (sec)
LC (n=28)	$49.0 \pm 0.9^*$	M=11 F=17	5.7 ± 0.2	93.3 ± 4.2	$17.1 \pm 1.9^{**}$	5.1 ± 1.0	13.4 ± 1.0	0.6 ± 0.1	32.1 ± 2.1	56.8 ± 4.4	14.1 ± 0.4
C (n=17)	30.2 ± 1.1	M=13 F=4	5.6 ± 1.1	88.7 ± 1.7	10.8 ± 1.2	3.6 ± 1.0	15.4 ± 0.9	0.3 ± 0.1	—	—	—

LC, liver cirrhosis; C, control; n, number of subjects; M, male; F, female; FBG, fasting blood glucose; IRI, immunoreactive insulin; GH, growth hormone; Cort, cortisol; FFA, free fatty acid; ICG, indocyanine green; HPT, hepaplantin test; PT, prothrombin time; —, not done; *, $p < 0.001$; **, $p < 0.05$. Values are expressed as mean \pm SEM.

FBG) および HbA_{1c} 値には明らかな差を認めなかったが、血清 IRI 値は LC 群 17.1 ± 1.9 と C 群 $10.8 \pm 1.2 \mu\text{U/ml}$ に比し LC 群で有意に高値を示した ($p < 0.05$)。一方、血清 GH 値、Cort 値、FFA 値はいずれも両群間で有意差を認めなかった。また、LC 群のうち25名に対して施行した 75g-OGTT の判定では、正常型2名、境界型10名、糖尿病型13名であった。

2. GCR への影響

GCR に及ぼす対象者血清の影響を検討するため、一部の症例を用いてインスリン用量反応曲線を作成した。脂肪細胞を KRB-Hepes 緩衝液のみで前処理した場合、インスリン濃度の上昇に伴い用量反応性に増加し、 10 ng/ml の濃度で最大となった。LC 患者および健常者の血清と前孵置した場合も、 $10 \sim 100 \text{ ng/ml}$ のインスリン濃度で最大となったが、LC 患者の血清は健常者の血清に比し $1 \sim 100 \text{ ng/ml}$ のインスリン濃度における GCR に明らかな抑制がみられた (図 2)。そこで、以上の基礎実験を基にインスリン刺激は 100 ng/ml の濃度で行うこととし、多数例の血清について以下の検討を行った。

インスリン非刺激下 GCR は、C 群 57.7 ± 2.9 、LC 群 $45.4 \pm 2.7 \text{ fl/s}\cdot\text{cell}$ と、また刺激下 GCR は、C 群 132.9 ± 8.2 、LC 群 $90.7 \pm 6.9 \text{ fl/s}\cdot\text{cell}$ といずれも LC 群で C 群に比し有意に低値を示した ($p < 0.005$) ($p < 0.001$) (図 3)。インスリン刺激下 GCR と非刺激下 GCR の比は、C 群 2.35 ± 0.16 、LC 群 2.02 ± 0.09 であり、LC 群で低値を示す傾向にあったが、統計学的有意差は認められなかった (図 4a)。一方、刺激下 GCR と非刺激下 GCR の差は、C 群 75.2 ± 7.4 、LC 群 $47.0 \pm 5.3 \text{ fl/s}\cdot\text{cell}$ であり、LC 群で C 群に比し有意に低下していた ($p < 0.005$) (図 4b)。

インスリン非刺激下 GCR、刺激下 GCR とともに、血清 IRI 値との間に有意な相関関係は認められなかった。また、非刺激下 GCR、刺激下 GCR はともに、空腹時 BG、HbA_{1c}、GH、

Cort、FFA などの各値のいずれとも有意な相関関係を認めなかった (データ省略)。

なお、肝予備能低下は耐糖能悪化をきたす一因として考えられているため¹³、肝硬変症における肝機能の評価の指標として、プロトロンビン時間 (prothrombin time, PT)、ヘパプラスチンテスト (hepaplantin test, HPT)、インドサイアニングリーン試験における15分後血中停滞率 (indocyanine green, ICG) を用い、インスリン非刺激下 GCR、刺激下 GCR との関連を検討したが、いずれとも有意な相関関係を認めるものはなかった (データ省略)。

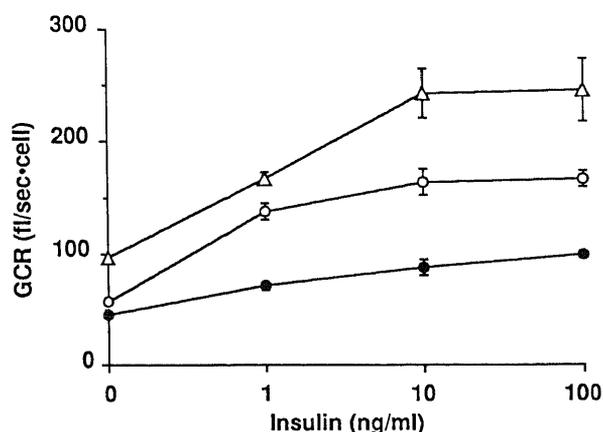


Fig. 2. Influence of preincubation with serum on insulin dose response of glucose clearance rate (GCR) of rat adipocytes. ●—●, serum from liver cirrhosis ($n=7$); ○—○, control serum ($n=5$); △—△, buffer alone ($n=3$). Values are expressed as mean \pm SEM.

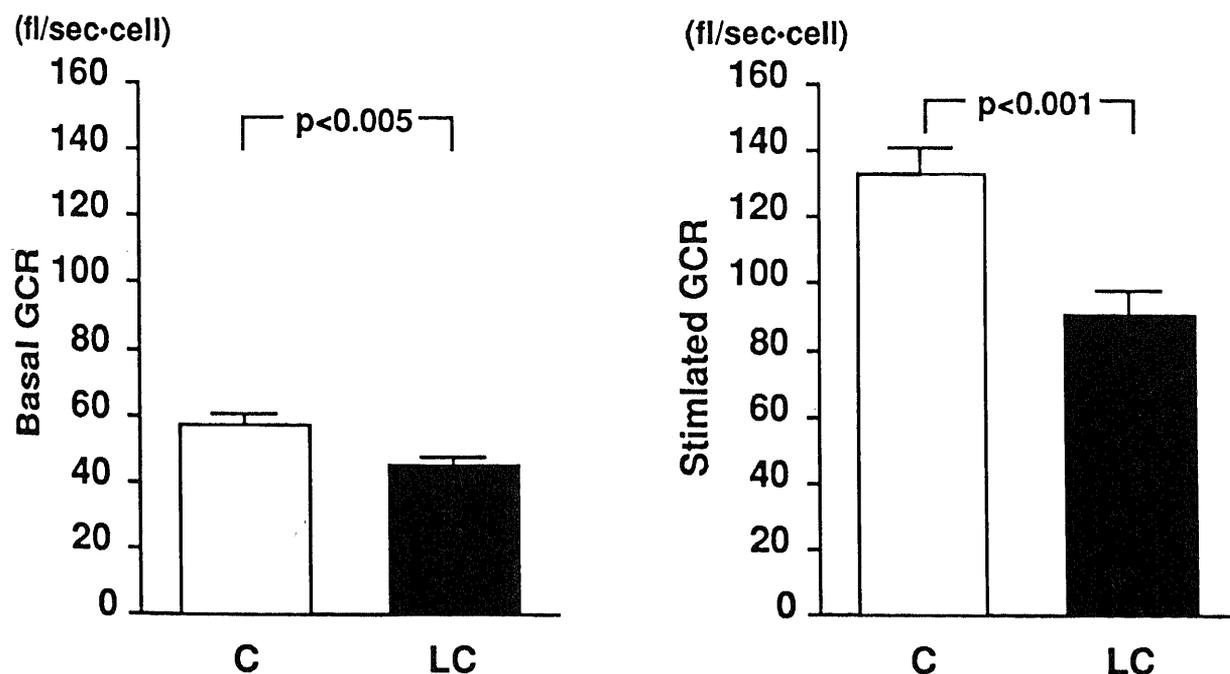


Fig. 3. Basal and insulin stimulated (100 ng/ml) glucose clearance rate of rat adipocytes in the presence of control and LC patient's serum. Values are expressed as mean \pm SEM. GCR, glucose clearance rate; C, control ($n=17$); LC, liver cirrhosis ($n=28$).

Ⅲ. LC 患者血清中の糖輸送阻害活性を示す物質の熱安定性
LC 群 6 名の加熱処理血清を用いて糖輸送率を測定すると、
インスリン非刺激下 GCR 79.7 ± 3.7 , 刺激下 GCR 147.9 ± 7.1 fl/s·cell となり、無処理時の非刺激下 GCR 63.5 ± 3.6 , 刺激下 GCR 116.0 ± 6.5 fl/s·cell に比しいずれも有意に高値を示し ($p < 0.02$, $p < 0.005$) 加熱により阻害活性は失活した (図 5).

また、上記 6 名の凍結融解操作処理血清を用いた場合は、非

刺激下 GCR は 75.7 ± 2.4 fl/s·cell であり、無処理時の非刺激下 GCR 76.8 ± 2.4 fl/s·cell との間に有意な差を認めなかったが、刺激下 GCR では 140.9 ± 7.0 fl/s·cell となり、無処理時の刺激下 GCR 112.5 ± 5.7 fl/s·cell に比べて有意に高値を示し ($p < 0.02$), 凍結融解によっても阻害活性が減少することが分かった (図 6).

Ⅳ. 血清中の糖輸送阻害活性を示す物質の分子量の推定
LC 群 5 名の血清をモルカット II で分子量 1 万以上と 1 万未

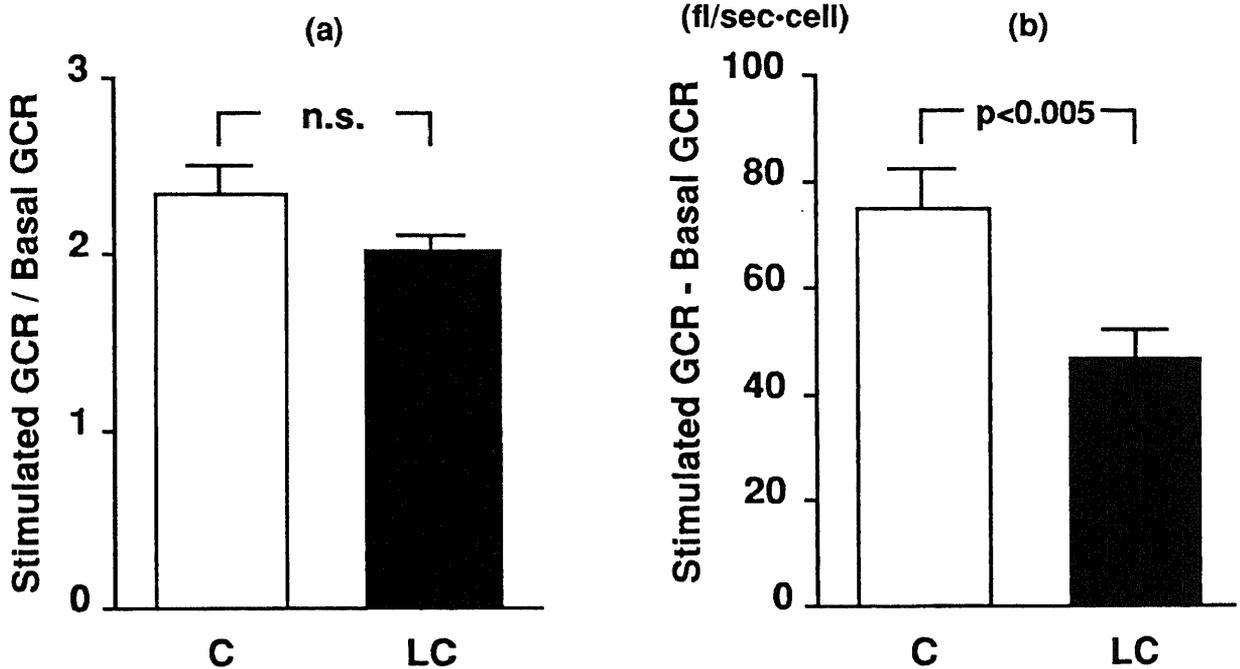


Fig. 4. The ratio (a) and difference (b) between stimulated GCR and basal GCR. Values are expressed as mean \pm SEM. GCR, glucose clearance rate; C, control (n=17); LC, liver cirrhosis (n=28).

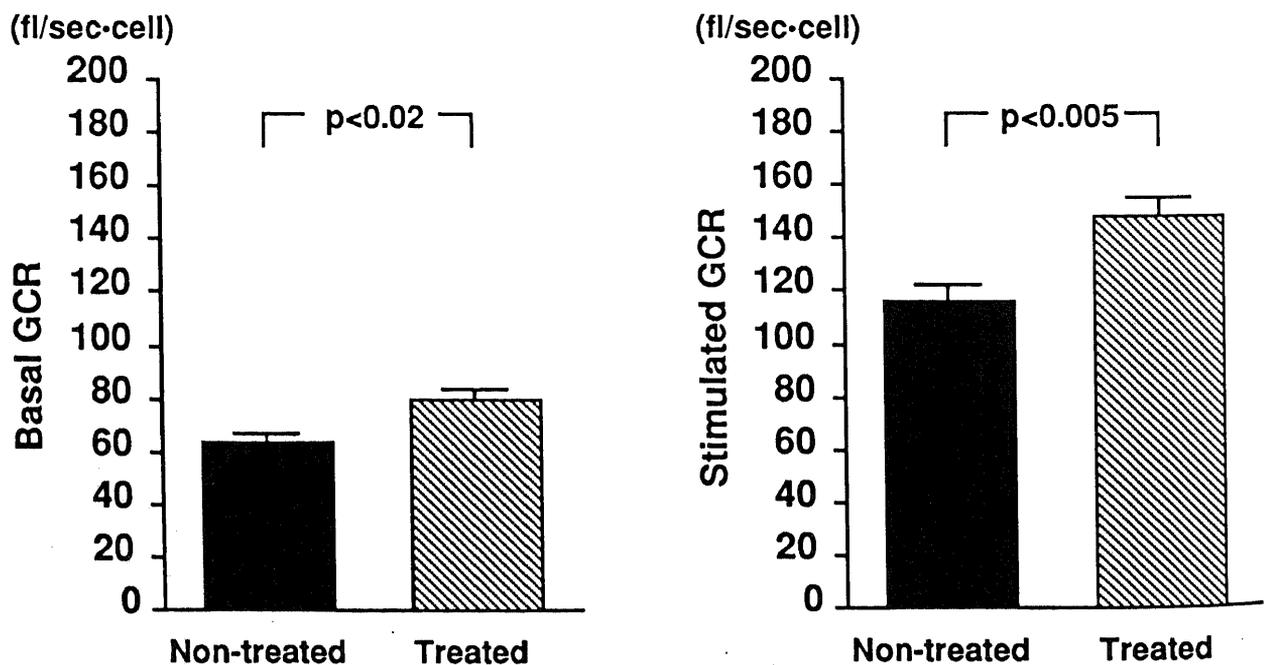


Fig. 5. Effect of heated serum of cirrhotics on glucose clearance rate. Non-treated shows that non-treated serum was used (n=6). Treated shows that heated serum was used. Values are expressed as mean \pm SEM. GCR, glucose clearance rate.

満に分画した後、2つの分画の糖輸送率に及ぼす影響を検討した(図7)。インスリン非刺激下 GCR は無処理血清を用いた場合 78.4 ± 2.4 、分子量1万以上の分画血清を用いた場合 97.9 ± 3.8 、1万未満の分画を用いた場合 79.0 ± 3.6 fl/s·cell となり、無処理血清と分子量1万未満の分画に阻害活性がみられたが、1万以上の分画では阻害活性が著しく減少していた ($p < 0.01$)。刺激下 GCR は、無処理血清で 106.9 ± 7.1 、分子量1万以上で 143.5 ± 2.6 、1万未満で 104.2 ± 2.8 fl/s·cell であり、非刺激下 GCR と同様、無処理と分子量1万未満の分画に阻害活性がみられた ($p < 0.001$)。

考 察

肝硬変に耐糖能異常を伴うことは古くより知られているが²⁾、その発現機序についてはなお完全な解明をみていない。これまでの報告では、膵ラ氏島よりの内因性インスリン分泌機能の変化¹⁰⁾、肝細胞の障害や肝内外副血行路の形成によるブドウ糖利用機構の変化¹¹⁾、血中インスリン拮抗物質の増加¹²⁾、インスリン標的細胞の異常¹³⁾、等が挙げられているが、近年高インスリン血症を基盤としたインスリン抵抗性の関与が強調されている。ただ、肝硬変のような病的状態では、インスリン抵抗

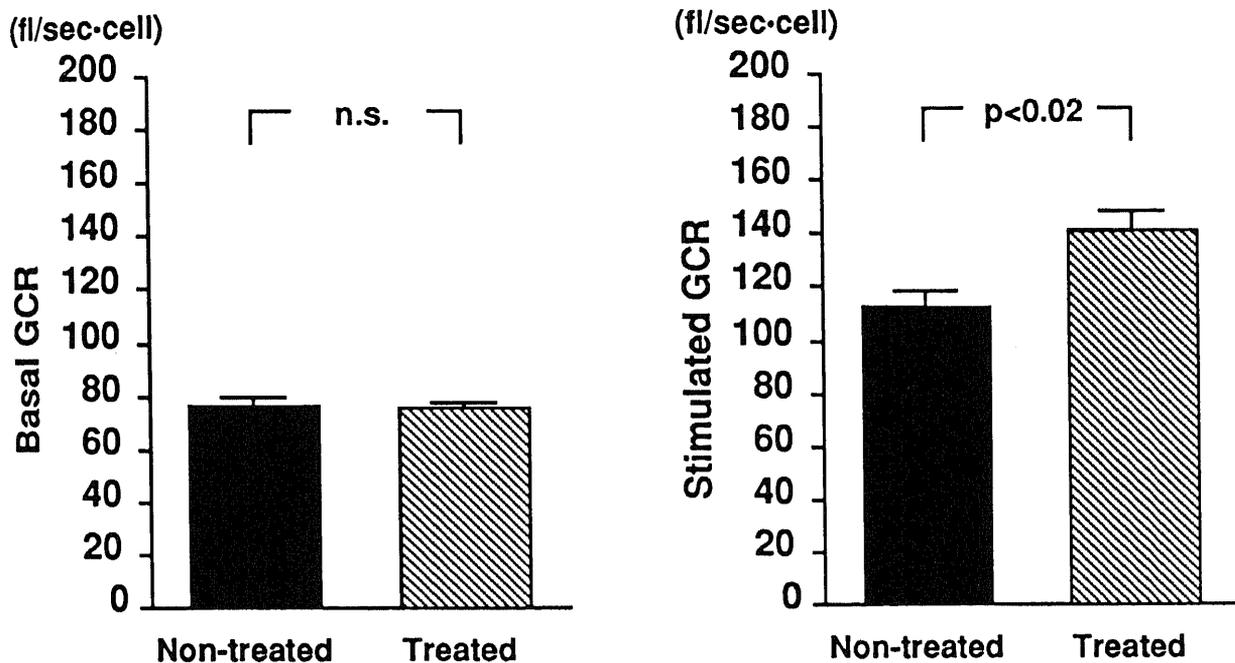


Fig. 6. Effect of freezing and thawing of cirrhotics serum on glucose clearance rate. Non-treated shows that non-treated serum was used (n=6). Treated shows that frozen and thawed serum was used. Values are expressed as mean±SEM. GCR, glucose clearance rate.

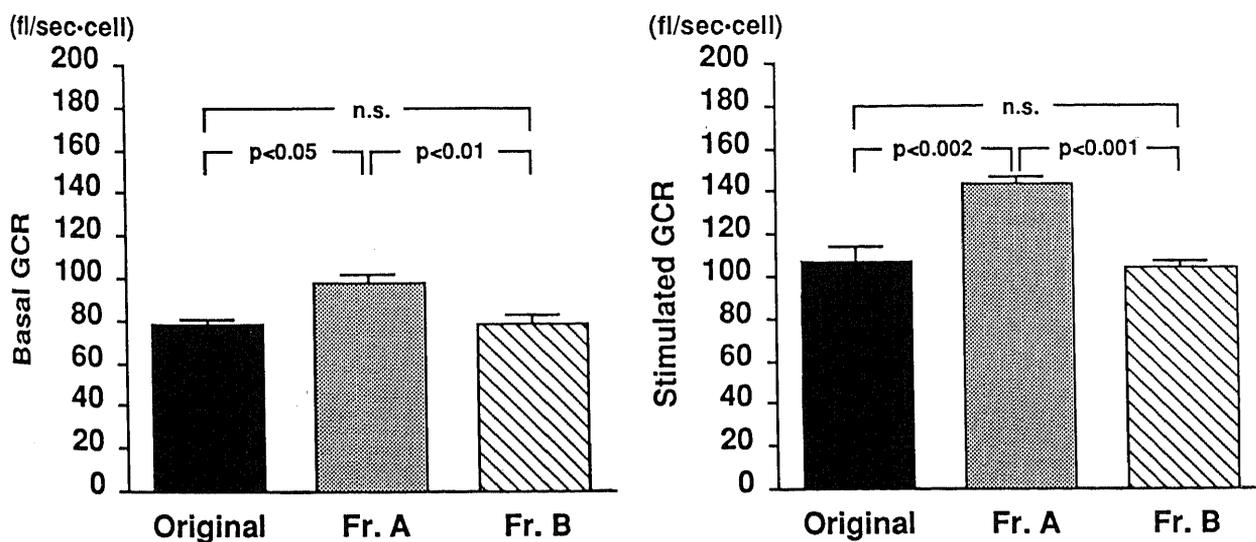


Fig. 7. Effect of fractionized serum on glucose clearance rate. Original shows that not fractionated serum was used (n=5). Fraction A (Fr. A) shows that fractionized serum of molecular weight above 10,000 was used. Fraction B (Fr. B) shows that the serum of molecular weight below 10,000 was used. Values are expressed as mean±SEM. GCR, glucose clearance rate.

性をきたす何らかの未知の物質が血中に存在する可能性を常に考えておく必要がある。実際、Dzurikova らは、ラット横隔膜における糖利用を指標とした方法で肝硬変患者血清中に糖利用を阻害する活性が存在することを報告しているが¹⁹⁾、そのメカニズムに関しては現在必ずしも明らかではない。そこで今回著者は、肝硬変患者血清中にインスリン作用を阻害する活性が存在するか否か、また、阻害活性が存在するとしたらインスリン作用のどのステップで阻害するのかを、ラット脂肪細胞における¹²⁵I-インスリン結合率、糖輸送率を指標として検討した。

インスリンはその作用の第一段階として、細胞膜に存在するインスリン受容体に結合することが必要なため、まず、患者血清のインスリン受容体結合に及ぼす影響を検討した。しかし、LC 群とC群の間でラット脂肪細胞に対する¹²⁵I-インスリン結合率に有意差は認められず、肝硬変患者血清中には、¹²⁵I-インスリン結合を阻害する活性は存在しないものと思われた。肝硬変症におけるインスリン受容体については、以前より肝硬変患者の末梢血単球を用いた検討により、インスリン受容体数の減少が明らかにされている。一般に高インスリン血症を伴う場合、受容体の下降調整 (down-regulation) の機序を介してインスリン受容体を減少させ、その結果インスリン感受性低下を招くと考えられている^{20,21)}。Greco らは、末梢血単球のインスリン受容体数と空腹時インスリン濃度との間に有意の負の相関関係を認めたとし、肝硬変患者にみられる受容体の減少は下降調整の結果であると結論づけている^{22,23)}。一方、Blei らは、肝硬変患者単球におけるインスリン結合率の低下は、高インスリン血症を示すもののみだけでなく、正インスリン血症の患者でも見られることから、下降調整以外の機序も考えられるとしている⁵⁾。今回の成績では、従来の報告の如く空腹時インスリン値はLC群でC群に比し有意に高値であり高インスリン血症を認めたものの、ラット脂肪細胞に対する¹²⁵I-インスリン結合率には両群間で有意差を認めなかった。この点については、今回の実験が試験管内での検討で、健常ラット脂肪細胞を患者血清と37°C 1時間前孵置した後、インスリン結合率を測定しているという実験条件に問題があるのかも知れない。また、このような短時間の反応では下降調整発現の閾値には至らなかった可能性も考えられる。

次に、肝硬変患者血清がインスリン受容体結合後のステップに及ぼす効果を検討するため、患者血清と前孵置したラット脂肪細胞におけるインスリン刺激下での糖輸送を測定した。これまで、肝硬変患者血清を用いてラット脂肪細胞における糖輸送を測定した報告はない。今回糖輸送率を指標にした検討で、LC 群血清のインスリン刺激下 GCR (stimulated GCR) への影響はC群に比し有意に低下しており、肝硬変患者血清中にインスリン作用を糖輸送のレベルで阻害する活性が存在することを見いだした。ただ、インスリン非刺激下 GCR (basal GCR) を比較してみると、刺激下 GCR と同様に LC 群でC群に比し有意に低下していた。このことは、肝硬変患者血清中にインスリンとは無関係に糖輸送を阻害する活性が存在するという可能性をうかがわせる。しかし刺激下 GCR と非刺激下 GCR の比は、LC 群においてC群より低値を示す傾向にあり、また両者の差はLC 群でC群に比し有意に低下していたことより、肝硬変患者血清中には、ラット脂肪細胞におけるインスリンの糖輸送促進作用を阻害する活性が存在するものと考えられた。ところで、糖輸送に関するインスリン用量反応曲線を見ると、LC 群

ほどではないにしてもC群でも緩衝液のみで前処理した場合に比し非刺激下 GCR および刺激下 GCR の低下がみられている。この点より正常血清にも多少の阻害活性が存在するものと思われる。LC 群とC群血清中の阻害活性の量的な問題がLC 群のインスリン抵抗性に関係するのかもしれない。また、インスリン非刺激下 GCR の低下した原因は不明だが、肝硬変患者血清中にはインスリン作用阻害活性というよりもむしろ細胞障害性に働く物質が多く存在している可能性も考えられる。しかし、ラット脂肪細胞を全く同様の条件で前孵置したインスリン結合率測定の際、LC 群とC群血清の間で有意差が見られなかったことより、肝硬変患者血清が細胞障害性に働いている可能性は低いものと思われた。またここ数年の間に、細胞膜での糖の取り込みには糖輸送担体 (glucose transporter, GLUT) という蛋白が関与していることが明らかになり、少なくとも5種類の糖輸送担体がクローニングされている²⁴⁾。脂肪細胞においては GLUT 1 (赤血球型) と GLUT 4 (筋・脂肪型) が発現しているが、GLUT 1 は基礎状態の糖輸送に関与し、GLUT 4 はインスリン刺激により、細胞内プールから細胞膜上へ急速に転位され²⁵⁾、糖輸送の急速な増大に寄与している。今回の結果は、肝硬変患者血清が GLUT 4 のみならず GLUT 1 の働きを抑制する可能性をも示すが、詳細な分子機構については今後の課題であろう。ところで、肝硬変におけるインスリン受容体結合後の障害に関しては、既に Cavallo-Perin らが、肝硬変患者の遊離脂肪細胞における最大糖輸送能の低下を明らかにし、受容体結合以降のレベルの異常を示唆している²⁶⁾。また、生体内では、Petrides らがグルコースクランプ法と間接熱量計を用いた検討により、肝硬変患者では糖新生よりもむしろ末梢組織における受容体および受容体結合以降の両者の障害の存在を示唆している²⁷⁾。

一般に受容体以降の障害を考える場合、標的細胞自身に問題があるのか、あるいは血中インスリン拮抗物質がその障害に関与しているかどうかが問題となる。肝硬変は後天的な疾患であり、インスリン標的細胞自体に先天的に異常があるとは考えにくく、そこで著者は受容体結合後におけるインスリン拮抗物質の解明について更に検討を進めた。インスリン拮抗物質としては、まず抗インスリン抗体の存在、インスリン分解活性、そしてインスリン拮抗ホルモンの増加などが問題となる¹⁸⁾。今回、抗インスリン抗体に関しては検討しなかったが、対象者にはインスリン使用者が存在していないなど、抗インスリン抗体の存在が示唆されるような臨床所見はみられず、その存在は否定的である。次に、インスリン分解活性については、Blazar ら²⁸⁾が、インスリン依存性糖尿病で血中のインスリン分解活性が増加し、その結果、肝や脂肪組織内でインスリン分解が促進されインスリン抵抗性の一因となると推測した。しかし、彼らは、インスリン分解活性の代謝過程やその細胞レベルでの阻害部位については検討しておらず、その詳細な機序は不明である。肝硬変でインスリン分解活性が高いとする報告は今までになく、以前の当教室でのトリクロロ酢酸法を用いた検討でも、肝硬変でインスリン分解活性が上昇しているという成績は得られていない (未発表データ)。次に、インスリン拮抗ホルモンに関しては、肝硬変では血中成長ホルモン^{29,30)}、グルカゴン¹⁷⁾、遊離脂肪酸³¹⁾が上昇し、これらがインスリン抵抗性の一因を成すという報告が以前よりある。今回の成績では、糖輸送を測定した対象者の血中 GH, FFA, Cort 値は、LC 群とC群との間に

有意差を認めず、糖輸送阻害活性とインスリン拮抗ホルモンとの間にも有意な相関関係はみられなかった。なお、¹²⁵I-インスリン結合率を測定した対象者の血中 GH 値は前述の如く LC 群で C 群に比し有意に上昇していたものの、FFA および Cort 値に関しては有意差は認められなかった。グルカゴンに関しては今回検討していないため結論を下すには至らなかったが、既に宮本³⁰は、肝硬変患者を対象にしグルコースクランプ法を用いた検討により、クランプ前値において GH およびグルカゴン値は正常群と有意差を認めず、FFA はむしろ正常群より有意に低値を示したことが、さらにこれらのインスリン拮抗ホルモンとブドウ糖の代謝消失率との間に有意な相関関係が認められなかったことより、これらのインスリン拮抗物質がインスリン抵抗性の主因になっている可能性は少ないと結論づけている。以上より、肝硬変患者血清中には、抗インスリン抗体、インスリン分解活性、インスリン拮抗ホルモンなどは無関係な未知のインスリン作用阻害活性が存在していると推察された。

血中 IRI 値に関しては、今までの報告と同様に明らかに LC 群で C 群に比し高値を示していたが、インスリン非刺激下 GCR や刺激下 GCR と IRI との間には有意な相関関係はみられなかった。このことは、糖輸送阻害活性は高インスリン血症とは無関係に存在する可能性を示しているものと思われる。即ち、本活性により糖輸送レベルでの障害が発現することにより末梢でのインスリン抵抗性が出現し、その結果として高インスリン血症をきたしている可能性も考えられる。

さて、血清中のインスリン作用阻害物質については、Marshall³¹がインスリン非依存性糖尿病患者血清を用い、ラット横隔膜でのグリコーゲン合成を指標として測定したのが最初の報告である。その後あまり検討されていなかったが、Dean³²が、また宮腰³³がそれぞれ、インスリン非依存性糖尿病患者血清中に受容体以降のレベルでインスリン作用を阻害する活性が存在することを報告している。さらに Dean³²は、本活性を示す物質は分子量1,000以下の極めて低分子物質であり、また、酸、塩基、熱処理に安定であったと報告している³⁶。糖尿病以外の疾患では、Harrison³⁴は、黒色表皮症、および多発性卵巣囊腫の患者血清中にラット脂肪細胞の脂肪生成を阻害する活性を見だし³⁷、また、Misbin³⁵は黒色表皮症患者血清中にみられる阻害物質はきわめて低分子ながらも血清中では高分子物質と硬に結合して存在し、さらに酸、塩基、熱処理に安定であると報告している³⁸。また、Folli³⁹は、健康ラット肝細胞を用いて、尿毒症患者血清中にインスリン結合やチロシンキナーゼ活性、自己リン酸化、受容体親和性などに対するインスリン作用を阻害する物質を見だし、血清を透析して検討した結果当物質は比較的的低分子領域に属すると述べている³⁹。今回の肝硬変患者における糖輸送阻害活性物質は、熱、凍結融解処理に不安定で、分子量1万未満の物質であると推定された。上記疾患で報告されているインスリン阻害活性とは、熱に対する反応性など異なる点もあり、従って同一物質とは断定し難いが、肝硬変での耐糖能異常の一因を成している可能性は十分に考えられる。最近、Marshall⁴⁰は種々のアミノ酸を加えた緩衝液で前孵置したラット脂肪細胞における糖輸送を測定し、アミノ酸のインスリン阻害作用を検討している。その結果、ブドウ糖、インスリンの存在下で、ある種のアミノ酸、特にL-グルタミン酸が細胞のインスリン反応性を低下させ、糖輸送機構発現を障害し最終的に蛋白合成の低下につながると述べ、アミノ酸が細胞内のイ

ンスリン作用を調節している可能性があるとして述べている。今回肝硬変患者血清中のアミノ酸組成に関しては検討しなかったが、肝性昏睡時のグルタミンの上昇はよく知られている。今回の対象者は非代償期の肝硬変患者に限られていたものの、肝硬変ではアミノ酸代謝異常がみられる点やアミノ酸が低分子であることから、患者血清中に認められた糖輸送阻害物質は、ある種のアミノ酸である可能性も否定はできない。今後、アミノ酸との関連など本物質の解明にさらに詳細な検討が必要であろう。

このように、肝硬変患者血清中に存在する糖輸送作用阻害活性の本体については現在のところ不明な点が多い。今回認めた糖輸送阻害活性は、PT、HPT、ICG とも有意な相関関係はみられず、本活性は肝障害の程度とは無関係と思われた。また、今回認めたインスリン阻害活性と空腹時血糖値や HbA_{1c} との間には有意な相関関係がみられなかった。対象となった肝硬変患者は、いずれも比較的血糖コントロールが良好に保たれている点を合わせて考えると、本活性が肝硬変の耐糖能に対しそれほど大きな影響を与えているとは考えにくい。しかし、本物質が肝硬変患者のインスリン抵抗性の一因を成す可能性は高く、今後本物質をさらに解明することが、インスリン非依存性糖尿病をはじめ種々の疾患にみられるインスリン抵抗性の原因究明の糸口になる可能性も考えられる。

結 論

肝硬変にみられる末梢組織でのインスリン抵抗性発現の機序を解明するため、肝硬変患者血清と前孵置したラット脂肪細胞における ¹²⁵I-インスリン結合率、糖輸送率を測定し、患者血清中にインスリン作用阻害活性が存在するか否かを検討した。さらに、本活性と既知のホルモン等との関連や、本活性の熱あるいは凍結融解処理に対する影響、本活性を示す物質の分子量についても併せて検討し、以下の結論を得た。

1. LC 群の血清は ¹²⁵I-インスリン結合率に C 群血清同様、阻害活性を示さなかった。

2. LC 群血清は、インスリン非刺激下 GCR、刺激下 GCR のいずれにも C 群血清に比べ低下させる阻害がみられた。インスリン反応性の指標である (刺激下 GCR)/(非刺激下 GCR) は LC 群で低下傾向を示し、(刺激下 GCR)-(非刺激下 GCR) は LC 群で有意に低下していた。

3. LC 群において、インスリン非刺激下 GCR、刺激下 GCR と血清 IRI、GH、Cort、FFA 値との間にはそれぞれいずれも有意な相関関係は認められなかった。

4. LC 群において、インスリン非刺激下 GCR、刺激下 GCR と FBG、HbA_{1c} 値との間にはいずれも有意な相関関係は認められなかった。

5. LC 群において、インスリン非刺激下 GCR、刺激下 GCR と PT、HPT、ICG 値との間にはいずれも有意な相関関係は認められなかった。

6. LC 群において、糖輸送阻害活性は56℃30分の加熱処理、または頻回の凍結融解処理にて失活した。

7. LC 群において、患者血清をモルカット II で分子量分画した後糖輸送率を測定すると、インスリン非刺激下 GCR、刺激下 GCR ともに分子量1万未満の分画に糖輸送阻害活性がみられた。

以上の結果より、肝硬変患者血清中に、インスリン受容体結

合後においてインスリンの糖輸送促進作用を阻害する活性が存在していた。本活性を示す物質は、高インスリン血症やその他の既知のホルモンとは無関係な未知の物質であり、また、血糖コントロールや肝障害の程度には影響を受けない、血清中の比較的分子量の物質であると思われる。本活性は肝硬変患者にみられるインスリン抵抗性の一因である可能性が考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました金沢大学第一内科小林健一教授に深甚なる謝意を捧げます。また、終始直接御指導いただき、本研究に多大なる御助言、御協力をいただきました宮腰久嗣講師に心から感謝の意を表します。最後に御協力いただきました当教室の諸先生方に重ねて厚くお礼申し上げます。

なお本論文の要旨は第29回、第30回、第31回日本糖尿病学会総会(1986年山口, 1987年京都, 1988年東京)、第13回国際糖尿病学会(1988年シドニー)および第9回国際内分泌学会(1992年ニース)において発表された。

文 献

- 1) Cruetfeldt, W., Frerichs, H. & Sickinger, K.: Liver disease and diabetes mellitus. *Prog. Liver Dis.*, **3**, 371-407 (1970).
- 2) Megyesi, C., Samols, E. & Marke, V.: Glucose tolerance and diabetes in chronic liver disease. *Lancet*, **2**, 1051-1055 (1967).
- 3) Cahill, G. F. Jr.: Physiology of insulin in man. *Diabetes*, **20**, 785-799 (1971).
- 4) Petrides, A. S., Groop, L. C., Riely, C. A. & DeFronzo, R. A.: Effect of physiologic hyperinsulinemia on glucose and lipid metabolism in cirrhosis. *J. Clin. Invest.*, **88**, 561-571 (1991).
- 5) Blei, A. T., Robbins, D. C., Drobný, E., Baumann, G. & Rubenstein, A. H.: Insulin resistance and insulin receptors in hepatic cirrhosis. *Gastroenterology*, **83**, 1191-1199 (1982).
- 6) Iversen, J., Vilstrup, H. & Tygstrup, N.: Kinetics of glucose metabolism relation to insulin concentrations in patients with alcoholic cirrhosis and in healthy persons. *Gastroenterology*, **87**, 1138-1143 (1984).
- 7) Dzurikova, V., Niederland, T. T., Cernáček, P. & Dzurik, R.: Isolation of an inhibitor responsible for abnormal glucose utilization in liver disease. *Acta Diabetol. Lat.*, **11**, 277-282 (1974).
- 8) 小坂樹徳, 赤沼安夫, 後藤由夫, 羽倉稜子, 平田幸正, 川手亮三, 葛谷 健, 三村悟郎, 中山秀男, 坂本伸夫, 繁田幸男: 糖尿病の診断に関する委員会報告. *糖尿病*, **25**, 859-866 (1982).
- 9) Rodbell, M.: Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J. Biol. Chem.*, **239**, 375-380 (1964).
- 10) Olefsky, J. M.: Effect of dexamethasone on insulin binding, glucose transport, and glucose oxidation by isolated rat adipocytes. *J. Clin. Invest.*, **56**, 1499-1508 (1975).
- 11) Marshall, S. & Olefsky, J. M.: Effects of insulin incubation on insulin binding, glucose transport, and insulin degradation by isolated rat adipocytes. Evidence for hormone induced desensitization at the receptor and postreceptor level. *J. Clin. Invest.*, **66**, 763-772 (1980).
- 12) Kashiwagi, A., Verso, M. A., Andrews, J., Vasquez, B., Reaven, G. & Foley, J. E.: In vitro insulin resistance of human adipocytes isolated from subjects with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.*, **72**, 1246-1254 (1983).
- 13) 小坂淳夫, 山吹隆寛: 肝疾患時にみられる糖代謝異常. *糖尿病*, **11**, 252-282 (1968).
- 14) Shankar, T. P., Solomon, S. S. & Duckworth, W. C.: Studies of glucose intolerance in cirrhosis of the liver. *J. Lab. Clin. Med.*, **102**, 459-469 (1983).
- 15) Proietto, J., Dudley, F. J., Aitken, P. & Alford, F. P.: Hyperinsulinemia and insulin resistance of cirrhosis. The importance of insulin hypersecretion. *Clin. Endocrinol.*, **21**, 657-665 (1984).
- 16) Sotaniemi, E. A., Keinanen, K., Lahtela, J. T., Arranto, A. J. & Kairaluoma, M.: Carbohydrate intolerance associated with reduced hepatic glucose phosphorylating and releasing enzyme activities and peripheral insulin resistance in alcoholics with liver cirrhosis. *J. Hepatol.*, **1**, 277-290 (1985).
- 17) Marco, J., Diego, J., Villanueva, M. L., Diaz-Fierros, M., Valverde, I. & Segovia, J. M.: Elevated plasma glucagon levels in cirrhosis of the liver. *N. Engl. J. Med.*, **289**, 1107-1111 (1973).
- 18) Olefsky, J. M.: Insulin resistance in humans. *Gastroenterology*, **83**, 1313-1321 (1982).
- 19) Dzurikova, V., Niederland, T. R., Brixova, E., Dzurik, R., Hupkova, K. & Holoman, J.: Abnormal carbohydrate metabolism in patients with liver cirrhosis; in vitro study. *Diabetologia*, **8**, 202-205 (1972).
- 20) Lesniak, M. A. & Roth, J.: Regulation of receptor concentration by homologous hormone. Effect of human growth hormone on its receptor in IM-9 lymphocytes. *J. Biol. Chem.*, **251**, 3720-3729 (1976).
- 21) Gavin, J. R., III, Roth, J., Neville, D. M., Jr., Meyers, P. D. & Buell, D. N.: Insulin-dependent regulation of insulin receptor concentrations: A direct demonstration in cell culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 84-88 (1974).
- 22) Greco, A. V., Bertoli, A., Ghirlanda, G., Manna, R., Altomonte, L. & Rebuzzi, A. G.: Insulin resistance in liver cirrhosis: Decreased insulin binding to circulating monocytes. *Horm. Metab. Res.*, **12**, 577-581 (1980).
- 23) Greco, A. V., Bertoli, A., Caputo, S., Altomonte, L., Manna, R. & Ghirlanda, G.: Decreased insulin binding to red blood cells in liver cirrhosis. *Acta Diabetol. Lat.*, **20**, 251-256 (1983).
- 24) Bell, G.: Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care*, **13**, 941-945 (1990).
- 25) Cushman, S. W. & Wardzala, L. J.: Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. *J. Biol.*

- Chem., 255, 4758-4762 (1980).
- 26) Cavallo-Perin, P., Cassader, M., Bozzo, C., Bruno, A., Nuccio, P., Dall'Omo, A. M., Marucci, M. & Pagano, G.: Mechanism of insulin resistance in human liver cirrhosis. Evidence of a combined receptor and postreceptor defect. *J. Clin. Invest.*, 75, 1659-1665 (1985).
- 27) Petrides, A. S., Riely, C. A., Groop, L. C. & DeFronzo, R. A.: The glucose-fatty acid cycle does not explain the insulin resistance of cirrhosis. *Gastroenterology*, 92, 1763 (1987).
- 28) Blazar, B. R., Whitley, C. B., Kitabchi, A. E., Tsai, M. Y., Santiago, J., White, N., Strntz, F. B. & Brown, D. M.: In vivo chloroquine-induced inhibition of insulin degradation in a diabetic patient with severe insulin resistance. *Diabetes*, 33, 1133-1137 (1984).
- 29) Samann, N. A., Stone, D. B. & Eckhardt, R. D.: Serum glucose, insulin, and growth hormone in chronic hepatic cirrhosis. *Arch. Intern. Med.*, 124, 149-152 (1969).
- 30) Riley, W. J. & McCann, V. J.: Impaired glucose tolerance and growth hormone in chronic liver disease. *Gut*, 22, 301-305 (1981).
- 31) Riggio, O., Merli, M., Cantafora, A., DiBiase, A., Lalloni, L., Leonetti, F., Miazzo, P., Rinaldi, V., Rossi-Fanelli, F., Tamburrano, G. & Capocaccia, L.: Total and individual free fatty acid concentrations in liver cirrhosis. *Metabolism*, 33, 646-651 (1984).
- 32) 宮本市郎: 肝硬変のインスリン抵抗性について—インスリン非依存性糖尿病との比較検討—. *十全医会誌*, 100, 544-558 (1991).
- 33) Marsh, J. B. & Haugaard, N.: The effect of serum from insulin-resistant cases on the combination of insulin with the rat diaphragm. *J. Clin. Invest.*, 31, 107-110 (1952).
- 34) Dean, B., Peluso, I. & Harrison, L. C.: A post binding inhibitor of insulin action. Increased concentrations in the plasma of non-insulin-dependent diabetic subjects. *Diabetes*, 33, 450-454 (1984).
- 35) 宮腰久嗣, 臼田里香, 家城恭彦, 永井幸広, 番度行弘, 宮本市郎, 大沢謙三, 真田 陽, 能登 裕, 服部 信: インスリン非依存性糖尿病患者における血中インスリン作用阻害物質. *医学のあゆみ*, 149, 239-240 (1989).
- 36) Dean, B., Hocking, A. & Harrison, L. C.: Isolation of a post-binding inhibitor of insulin action from the sera of non-insulin-dependent diabetics. *Diabetes Res.*, 5, 51-57 (1987).
- 37) Harrison, L. C., Dean, B., Clark, S. & Ward, G.: Insulin resistance, acanthosis nigricans, and polycystic ovaries associated with a circulating inhibitor of postbinding insulin action. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 60, 1047-1052 (1985).
- 38) Misbin, R. I., Green, A., Alvarez, I. M., Almira, E. C., Dohm, G. L. & Caro, J. F.: Inhibition of insulin-stimulated glucose transport by factor extracted from serum of insulin-resistant patient. *Diabetes*, 37, 1217-1225 (1988).
- 39) Folli, F., Sinha, M. K., Brancaccio, D. & Caro, J. F.: Insulin resistance in uremia: In vitro model in the rat liver using human serum to study mechanisms. *Metabolism*, 35, 989-998 (1986).
- 40) Marshall, S. & Monzon, R.: Amino acid and regulation of insulin action in isolated adipocytes. Selective ability of amino acids to enhance both insulin sensitivity and maximal insulin responsiveness of the protein synthesis system. *J. Biol. Chem.*, 264, 2037-2042 (1988).
- 41) Traxinger, R. R. & Marshall, S.: Role of amino acids in modulating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. *J. Biol. Chem.*, 264, 20910-20916 (1989).

Inhibitors of Post-binding Insulin Action in Serum of Patients with Liver Cirrhosis Rika Usuda, Department of Internal Medicine (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., **101**, 778—788 (1992)

Key words liver cirrhosis, insulin resistance, insulin receptor, glucose transport

Abstract

To clarify the mechanism of insulin resistance in liver cirrhosis, inhibitory activities of insulin action in the serum of patients with liver cirrhosis were investigated by insulin binding experiment using rat adipocytes. ^{125}I -insulin binding of adipocytes was not significantly changed by the addition of serum from cirrhotic patients. The serum from cirrhotic patients distinctly inhibited the basal or insulin (100 ng/dl) stimulated glucose transport (glucose clearance rate, GCR). The ratio (stimulated GCR/basal GCR) and the difference (stimulated GCR-basal GCR), which are markers for insulin responsiveness, were lower in the treatment of cirrhotics serum than in that of control serum. There were no significant correlations between basal or stimulated GCR and the levels of serum insulin, insulin counter regulatory hormones, blood sugar or liver function test. In order to characterize the nature of this inhibitory activity, effects of heating (56°C 30 min), or freezing and thawing of the serum on glucose transport were studied. These treatments decreased the inhibitory activity of the serum on basal and insulin stimulated GCR. Using fractionized serum from patients with cirrhosis by Molcut II, the inhibitory activity was found in fraction less than molecular weight of 10,000 dalton. These findings indicate that the inhibitory activity on post binding insulin action, at glucose transport level, is present in the serum of patients with liver cirrhosis. The inhibitor might be one of causes of insulin resistance in liver cirrhosis. To characterize this inhibitor and its pathophysiologic function need further investigations, from which the mechanism of glucose intolerance in liver cirrhosis will be clarified.