

急性肝障害における耐糖能異常の成因に関する研究
ーD-ガラクトサミン投与ラットにおける脂肪細胞および筋肉組織の糖輸送動態並びにインスリン結合率に関する検討ー

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード: acute hepatitis, adipocyte, soleus muscle, glucose transport, insulin binding 作成者: 番度, 行弘 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8437

急性肝障害における耐糖能異常の成因に関する研究

—D-ガラクトサミン投与ラットにおける脂肪細胞および筋肉組織の
糖輸送動態並びにインスリン結合率に関する検討—

金沢大学医学部内科学第一講座 (主任: 小林健一教授)

番 度 行 弘

(平成5年2月10日受付)

急性肝障害に合併する耐糖能異常の成因を解明するため、D-ガラクトサミン投与により急性肝炎モデルラットを作成し、その遊離脂肪細胞および単離ヒラメ筋を用いて、糖輸送並びにインスリン結合について検討した。まずガラクトサミンのラット腹腔内投与により組織学的にさまざまな程度の肝細胞壊死が観察されたため、これらを軽症肝炎群と重症肝炎群の2群に分類した。ブドウ糖負荷試験での糖処理能は対照群に比し肝炎群で肝炎の重篤化に伴い有意に低下し、血清インスリン値は上昇していた。糖輸送の測定はラット副辜丸周囲脂肪組織より得た遊離脂肪細胞、あるいは単離ヒラメ筋を用いて行った。脂肪細胞のブドウ糖除去率 (glucose clearance rate, GCR: fl/cell·sec) は、インスリン非存在下 (非刺激下) および 10ng/ml インスリン存在下 (刺激下) 共に軽症肝炎群で対照群より増加傾向を示した。一方、重症肝炎群は軽症肝炎群に比し非刺激下 GCR の有意の低下 (6.9 ± 5.1 vs 13.6 ± 4.1 ; $p < 0.05$) と共に、刺激下 GCR の低下傾向を示した。次に、ヒラメ筋における糖輸送はインスリン非刺激下およびインスリン (100ng/ml) 刺激下のいずれの状態でも、対照群、軽症肝炎群、重症肝炎群の3群間で有意差を認めなかった。しかし、インスリン感受性の指標である非刺激下に対する刺激下ブドウ糖取り込みの比 (stimulated glucose uptake/basal glucose uptake, S/B) は、重症肝炎群で軽症肝炎群より有意 (1.43 ± 0.48 vs 1.77 ± 0.20 ; $p < 0.05$) に低値を示した。また重症肝炎群において血清インスリン値と S/B とは有意な正の相関関係 ($r = 0.77$; $p < 0.01$) を認めた。¹²⁵I-インスリンの遊離脂肪細胞、あるいは単離ヒラメ筋に対する特異的結合率は、上記3群間で有意差を認めなかった。以上より、1) 肝炎が軽症である場合は、軽度の耐糖能異常を認めるものの末梢組織における糖輸送は低下していないこと、2) 肝炎が重症化した場合、脂肪細胞での基礎ブドウ糖取り込みと、筋肉組織でのブドウ糖取り込みにおけるインスリン感受性の低下を認めること、3) この際、随伴する高インスリン血症が低下した筋肉組織での糖輸送をある程度まで回復させる可能性があること、4) 脂肪細胞と筋肉組織では糖輸送動態が異なっている可能性があることなど、が示された。これらの結果は、急性肝障害における耐糖能異常の成因に末梢での糖輸送動態が一部関与している可能性を示唆している。

Key words: acute hepatitis, adipocyte, soleus muscle, glucose transport, insulin binding

肝臓は血中からブドウ糖を取り込み、グリコーゲンとして蓄えたり解糖過程の中でエネルギー源として利用する一方、糖新生やグリコーゲンの分解により血中にブドウ糖を放出し、血糖値をほぼ一定に維持するよう機能している。それ故、何らかの原因で肝臓が障害されると、高率に耐糖能異常を伴うことは古くから知られていた¹⁾。このうち肝硬変を始めとする慢性肝疾患における耐糖能異常の成因に関しては、1) 肝臓での糖負荷後の糖処理能の低下²⁾、2) 高インスリン血症を伴う末梢でのインスリン抵抗性の存在³⁾が指摘されている。これに対し急性肝疾患における耐糖能異常の成因に関しては、ラット肝臓⁴⁾・ヒト赤血球⁵⁾やヒト単球⁶⁾を用いた実験でインスリン結合能の低下が指摘されているが、未だ不明の点が多い。特に筋肉や脂肪などインスリン作用の標的末梢組織での糖輸送やインスリン結合動態を検討した報告は見当たらない。そこで今回著者はガラ

クトサミン投与により急性肝障害ラットを作成し、これより分離した遊離脂肪細胞および単離ヒラメ筋を用いてその糖輸送動態およびインスリン結合率を測定し対照群と比較検討したので報告する。

材料および方法

1. 遊離脂肪細胞を用いた実験

1. 実験動物

生後5~6週齢、体重130~150gのウィスター系雄性ラットを実験に用いた。絶食期間に入るまで市販ラット用固形飼料と水道水を自由に与え飼育した。

2. 試薬および緩衝液

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。標識グルコー

Abbreviations: BG, blood glucose; BSA, bovine serum albumin; 2-DOG, 2-deoxy-D-glucose; FFA, free fatty acid; GCR, glucose clearance rate; GPT, glutamate pyruvate transaminase; IRI, immunoreactive insulin; KRB, Krebs-Ringer bicarbonate; T-Bil, total bilirubin; TCA, trichloroacetic acid

すは [U-¹⁴C]-D-グルコース (比活性 4.35 mCi/mmol, New England Nuclear 社, Boston, U. S. A) を, 標識インスリンは ¹²⁵I-インスリン (比活性 205 μCi/μg, New England Nuclear 社) を用いた. またアルブミンは牛血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) (fraction V, Armour 社, Kankakee, U. S. A.) を, その他の化学試薬類はすべて和光純薬工業社 (大阪) 製のものを使用した. 糖輸送およびインスリン結合率測定用の緩衝液として, Whitesell ら⁹⁾ の緩衝液を一部改変した Krebs-Ringer bicarbonate (KRB)-HEPES 緩衝液 (NaCl 135mM, KCl 2.2mM, CaCl₂ 2.5mM, MgSO₄ 1.25mM, NaH₂PO₄ 2.5mM, HEPES 10mM, 10mg/ml BSA, pH 7.4) を用いた.

3. 肝炎および対照群

1) ガラクトサミン投与群 (以下肝炎群: n=12) の作製

24時間の絶食後, D-ガラクトサミン 1.5g/kg を 10ml/kg の 5%グルコース液 (pH6.8) に溶解した後腹腔内に投与し, 以後自由摂食下に更に36時間飼育した.

2) 対照群 (n=12) の作製

24時間の絶食後, 5%グルコース液 10ml/kg のみを腹腔内に投与し, 以後自由摂食下に更に36時間飼育した.

4. 経口ブドウ糖負荷試験

肝炎群および対照群を36時間飼育した後, 負荷試験開始8時間前より再び絶食とし, 体重測定を行った. その後 1g/kg に相当する20%ブドウ糖液を専用注入器にて胃内投与し, 投与前, 投与後30分, 60分, 120分の各時間に尾静脈より採血し簡易血糖測定器 (DRI-CHEM 100[®], 富士フィルム, 神奈川) を用いて血糖測定を行った.

5. 脂肪細胞の分離

負荷試験終了後, 絶食や負荷試験によるストレスの影響を軽減する目的で引き続き2時間の自由摂食下に置いた. その後各群ラットを断頭屠殺し副睾丸周囲より脂肪組織を採取, 以後の実験に供した. 同時に肝組織の一部を採取し, ホルマリン固定後病理組織学的検索に供した. 同時に脱血操作により採血し, グルタミン酸-ピルビン酸トランスアミナーゼ (glutamate pyruvate transaminase, GPT), 血清インスリン (immuno-reactive insulin, IRI) の測定を行った. GPT は第一化学薬品社 (東京) 製キットを用いて, IRI はダイナボット社 (東京) 製キットにより放射免疫定量法 (radioimmunoassay) で測定した.

6. 脂肪細胞の調製

Rodbell¹⁰⁾ の方法に準じて行った. すなわち, コラゲナーゼ 3mg/ml (フナコン, 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, 45分間振盪後, 消化組織を 250 μm 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は Bürker-Türk 血球計算盤を用いて細胞数を算定した後, 以下の実験に供した.

7. 糖輸送率の測定

糖輸送率測定は, [U-¹⁴C]-D-glucose を用いた Kashiwagi ら¹¹⁾ の方法に準じて行った. 前処置として, 上記にて調製された遊離脂肪細胞 (4×10⁵ cell/tube) をインスリン非存在下 (非刺激下), 10ng/ml インスリン存在下 (刺激下) で KRB-HEPES 緩衝液を加え最終容量 0.9ml として恒温槽内で37°C, 30分間前孵置した. その後, 0.1 μCi [U-¹⁴C]-D-グルコース 0.1ml を加え全体で 1ml とし, 更に36°C, 60分間反応させた. 反応終了後, 細胞

浮遊液 0.4ml をあらかじめシリコンオイル (東京化成工業社, 東京) 500 μl を入れておいた微小遠心管に重層し, Beckman microfuge B (Beckman 社, Palo Alto, U. S. A) にて30秒間遠心した. この操作により上層, 中間層, 下層に, それぞれ脂肪細胞層, シリコンオイル, 緩衝液が分離されるので上層の脂肪細胞を綿棒ですくって採取した. 脂肪細胞の付着した綿棒及び下層に分離された緩衝液をそれぞれ別々にシンチレーションバイアルに移し, 液体シンチレーター (AQUASOL-2[®], Amersham 社, Greenwhich, U. S. A.) 5ml を加えた後, それらの放射活性を液体シンチレーションカウンタ (LSC-1000[®], アロカ社, 東京) にて測定した. 得られた放射活性 (cpm) は次の式により脂肪細胞一個あたり一秒間のブドウ糖除去率 (glucose clearance rate, GCR) (fl/cell·sec) として求めた. すなわち

$$\text{ブドウ糖除去率 (fl/cell·sec)} \\ = (\text{緩衝液の容量} \times \text{脂肪細胞の放射活性}) / (\text{緩衝液の放射活性} \\ \times \text{脂肪組織数} \times \text{反応時間})$$

8. インスリン特異結合率の測定

¹²⁵I-インスリン結合率の測定は Olefsky¹²⁾ の方法に準じて行った. すなわち遊離脂肪細胞 (4×10⁵ cell/tube) に種々の濃度の非標識インスリン (最終濃度 0~10² ng/ml) と ¹²⁵I-インスリン (最終濃度 0.2ng/ml) を混じ, 緩衝液で最終容量 1ml として37°C, 2時間孵置した. その後, 細胞浮遊液 400 μl をシリコンオイル入り微小遠心管に重層し, Beckman microfuge B にて遠心分離した. 上層の脂肪細胞に結合した ¹²⁵I-インスリンの放射活性をオートウェル (アロカ社) にて測定した. その際, それぞれのインスリン濃度での結合率より 100ng/ml 濃度における過剰の非標識インスリン存在下での結合率を非特異的結合として差し引いたものを特異結合とした. インスリン特異結合率 (%) は細胞浮遊液 400 μl 中に含まれる ¹²⁵I-インスリン全放射活性 (cpm) に対するインスリン特異結合 (cpm) の比率として求めた. すなわち

$$\text{インスリン特異結合率 (\%)} = \\ \{ (\text{各濃度非標識インスリン存在下} - 100\text{ng/ml 非標識インスリン存在下}) \text{脂肪細胞結合} \text{ } ^{125}\text{I-インスリン放射活性} / \text{ } ^{125}\text{I-インスリン全放射活性} \} \times 100$$

II. 単離ヒラメ筋を用いた実験

1. 実験動物

生後 6~7 週齢, 体重 180~190g のウィスター系雌性ラットを実験に用いた.

2. 試薬および緩衝液

標識グルコースとして, [³H] 2-デオキシ-D-グルコース (2-deoxy-D-glucose, 2-DOG) (比活性 6.3 mCi/mmol, New England Nuclear 社), および [¹⁴C]-L-グルコース (比活性 47.0 mCi/mmol, New England Nuclear 社) を, 標識インスリンとして ¹²⁵I-インスリン (比活性 208 μCi/μg, New England Nuclear 社) を用いた. 糖輸送測定用の緩衝液として Whitesell ら⁹⁾ の KRB-HEPES 緩衝液 (20mg/ml BSA を含む), インスリン結合率測定用の緩衝液として HEPES-Tris 緩衝液 (HEPES 50mM, Tris 50mM, NaCl 50mM, MgSO₄ 10mM, KCl 5mM, CaCl₂ 10mM, ethylenediaminetetraacetic acid 2mM, glucose 10mM, 10mg/ml BSA, pH8.0) を用いた. 尚, 糖輸送測定用緩衝液作成に用いた BSA は, 遊離脂肪酸 (free fatty acid, FFA) によるブ

ドウ糖取り込み阻害¹³⁾の影響を除外するため、FFA 非含有 BSA (fraction V, essentially fatty acid free, Sigma 社, St. Louis, U. S. A.) を用いた。

3. 肝炎および対照群

遊離脂肪細胞を用いた実験と同様の方法により、糖輸送測定用に肝炎群 (n=21) と対照群 (n=23) を、インスリン結合率測定用に急性肝炎群 (n=12) と対照群 (n=12) をそれぞれ別々に作製し、以後自由摂食下で引き続き48時間飼育した。

4. 単離ヒラメ筋の調製

48時間の摂食状態にて体重測定後断頭屠殺し、下腿よりヒラメ筋を分離し、両側の腱を絹糸で結び、錘 (0.2g) で 2mM ピルビン酸添加 KRB-HEPES 緩衝液 (5ml) 中につるした。また肝炎群のみ肝組織の一部を採取し、病理学的検索に供した。同時に脱血により採血し、GPT, 総ビリルビン (total bilirubin, T-Bil), IRI および血糖値の測定を行った。T-Bil は第一化学薬品社 (東京) 製キットによるアゾビリルビン法で、血糖はグルコース・オキソゲルコース法により測定した。ヒラメ筋の湿重量は 74.8 ± 1.1 mg (mean \pm SEM; n=136) であった。尚、以下に述べる糖輸送の測定とインスリン特異結合率の測定は別々の検体を用いて日時を変えて行った。

5. 糖輸送率の測定

前川ら¹⁴⁾の方法に準じて行った。すなわち、まず単離ヒラメ筋を内因性インスリン除去のため 2mM ピルビン酸添加 KRB-HEPES 緩衝液 (5ml) 中で恒温槽内で 25°C, 30分間、静置した。その後インスリン非存在 (非刺激下) もしくは 100ng/ml インスリン存在 (刺激下) で 25°C, 120分間前孵置した。次に、1mM 非標識 2-DOG, ³H 標識 2-DOG (1 μ Ci/tube), [¹⁴C]-L-グルコース (0.5 μ Ci/tube), およびインスリン非含有 (非刺激下) もしくは 100ng/ml のインスリン含有の (刺激下) 新しい緩衝液 (5ml) にヒラメ筋を移し更に30分間反応させた。4°C 生食にて2回洗浄後湿重量を測定し、30%水酸化カルシウム添加により100°C, 15分間で可溶化した後液体シンチレーター (ACS II®, アマージャム・ジャパン社, 東京) 20ml を加え、LSC-1000 (アロカ社) にて放射活性を測定した。尚、2-DOG 取り込みは筋 100mg 湿重量当りに補正して求めた (nmoles/100mg wet weight \cdot 30min)。また特異的 2-DOG 取り込みは、単純拡散、細胞間隙への取り込みとしての L-グルコース取り込みを 2-DOG 取り込みより除くことにより求めた。すなわち、

$$\text{特異的 2-DOG 取り込み (nmoles/100mg wet weight}\cdot\text{30min)} \\ = (2\text{-DOG 取り込み}) - (\text{L-グルコース取り込み})$$

6. インスリン特異結合率の測定

前川ら¹⁴⁾の方法に準じて行った。すなわち、まず単離ヒラメ筋を内因性インスリン除去のため 2mM ピルビン酸添加の HEPES-Tris 緩衝液 (5ml) 中で 25°C, 30分間孵置した。次にヒラメ筋を ¹²⁵I-インスリン (最終濃度 0.2ng/ml), 非標識インスリン (最終濃度 0, 500ng/ml) を含んだ新たな緩衝液 (5ml) に移し更に 15°C, 270分間反応させた。その後、4°C 生食にてヒラメ筋を2回洗浄した後湿重量を測定し、¹²⁵I-インスリンの放射活性をオートウェル (アロカ社) にて測定した。その際、非標識インスリン非存在下での値より 500ng/ml 濃度における過剰の非標識インスリン存在下での結合を非特異結合として差し引いた値をインスリン特異結合とした。インスリン特異結合率 (%) は緩衝液 5ml 中の ¹²⁵I-インスリン全放射活性 (cpm) に対するインス

リン特異結合 (cpm) の比率として求めた。
すなわち

$$\text{インスリン特異結合率 (\%)} = \\ \frac{\{^{125}\text{I-インスリン放射活性 (非標識インスリン非存在下} \\ - 500\text{ng/ml 非標識インスリン存在下)} / \text{総 } ^{125}\text{I-インスリン放射活性}\} \times 100}$$

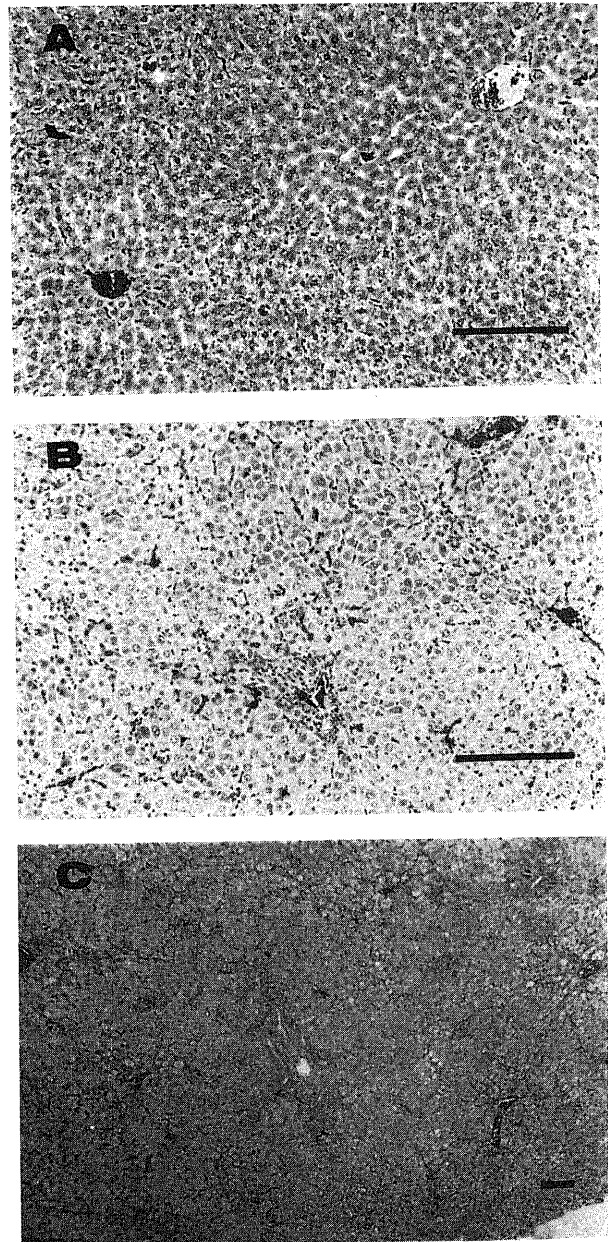


Fig. 1. Histology of the liver in D-galactosamine treated rat. (A) control rat. (B) Focal necrosis of the liver. Note parenchymal necrosis of uni- and multicellular involvement. Severe inflammatory infiltration of the entire liver lobule and periportal areas. (C) Submassive necrosis of the liver. Note swollen liver cells, severe piecemeal necrosis and infiltration of inflammatory cells to liver parenchyma. Periportal fields are enlarged and shows proliferation of bile ducts. HE stain. Bar indicates 100 μ m.

7. インスリン分解率の測定 {トリクロロ酢酸法¹⁵⁾, trichloroacetic acid (TCA) method による}

単離ヒラメ筋によるインスリン分解率の測定は、ヒラメ筋と270分間孵置後のインスリン特異結合率測定に使用した¹²⁵I 標識インスリン含有緩衝液を用いて行った。すなわち、緩衝液全体の¹²⁵I 放射活性を測定後、同緩衝液に TCA を添加し TCA 最終濃度7.5%とし15℃、270分孵置した。この操作により非分解標識インスリンは沈澱し、上清には分解された標識インスリン産物のみが残る。その後上清のみをピペットで分離しその放射活性を測定した。インスリン分解率は以下の式により求めた。

$$\text{インスリン分解率 (\%)} = \frac{\text{上清中の } ^{125}\text{I 放射活性}}{\text{緩衝液中の全 } ^{125}\text{I 放射活性}} \times 100$$

III. 統計学的処理

本実験の成績はすべて平均値±標準誤差 (mean±SEM) で表した。2群間の平均値の差の検定には Student の t 検定を用い、p<0.05を有意差ありとした。

成 績

1. 遊離脂肪細胞を用いた実験成績

1. 肝の病理組織像

肝炎群には種々の程度の肝障害像が認められたが、それらを肝細胞壊死の程度により組織学的に分類すると斑状壊死2例、巣状壊死4例、帯状壊死3例、亜広範壊死3例であった。そこで以後、肝炎群を更に軽症肝炎群 (斑状～巣状壊死; n=6) と重

症肝炎群 (帯状～亜広範壊死; n=6) の2群に分けて検討を行った。図1に対照群、軽症肝炎群 (巣状壊死)、重症肝炎群 (亜広範壊死) の代表的肝組織像を示した。

2. 体重、血清 GPT, IRI 値 (表1)

実験時 (ブドウ糖負荷前) の体重は対照群に比し軽症肝炎群、重症肝炎群で有意に低値であった。また血清 GPT 値は対照群に比し軽症および重症肝炎群で有意に高値であった。血清 IRI 値は、対照群に比し軽症および重症肝炎群全体で有意 (p<0.05) に高値を示した。また各3群間では値のばらつきが大きいため有意差には至らなかったが、肝炎の重症化に伴い高値を示す傾向にあった。

3. 経口ブドウ糖負荷試験 (図2)

負荷前値は肝炎の重症化に伴い対照群、軽症肝炎群、重症肝炎群の順で低値を示し (それぞれ 114.4±9.8mg/dl, 84.8±23.1mg/dl, 63.2±11.3mg/dl)、特に対照群と重症肝炎群の間には有意差が認められた (P<0.01)。負荷後は軽症及び重症肝炎群の血糖値は対照群に比し増加傾向を認めた。そこで次に、各群におけるブドウ糖処理能を評価するため、負荷前値に対する負荷後30分値の上昇度 (ΔBG₃₀) および負荷前値に対する負荷後血糖上昇度の総和 (areas under the curve representing above-basal levels of blood glucose, AUC_{BG}) を求めた (表2)。この結果、ΔBG₃₀は対照群に比し重症肝炎群で有意 (P<0.01) な増加を認め、AUC_{BG}は対照群、軽症肝炎群、重症肝炎群の順でいずれも有意な増加を示した。以上より急性肝障害の程度が重症化するにつれ、血糖は負荷前値で低下を、負荷後で

Table 1. Characteristics of rats using isolated adipocytes

Group	Body weight (g)	s-GPT (IU/l)	IRI (μU/ml)
Control (N=12)	156.6±5.9	27.6±4.6	16.2±3.6
Mild hepatitis (N=6)	145.8±8.8	130.7±44	28.8±14.9
Severe hepatitis (N=6)	135.7±5.3	843.0±957	56.7±50.0

s-GPT, serum glutamate pyruvate transaminase; IRI, immunoreactive insulin. *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001 compared by Student's t-test. Values are expressed as mean±SEM.

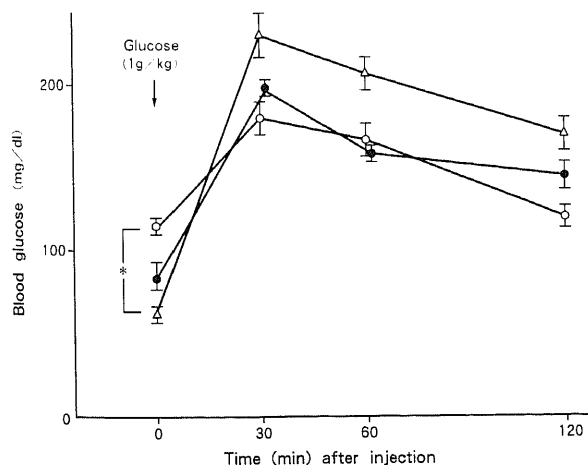


Fig. 2. Oral glucose tolerance test. Open circle, control group (n=12); closed circle, mild hepatitis group (n=6); open triangle, severe hepatitis group (n=6). Results are expressed as mean±SEM. *, p<0.01.

Table 2. ΔBG₃₀ and above-basal blood glucose levels during oral glucose tolerance test

	ΔBG ₃₀	AUC _{BG}
Control (N=12)	66.6±10.2	121.7±29.4
Mild hepatitis (N=6)	121.0±35.8	261.3±47.2
Severe hepatitis (N=6)	169.2±19.7	422.3±44.8

ΔBG₃₀, increments of stimulated levels of blood glucose at 30 min from basal blood glucose levels. AUC_{BG}, areas under the curve for blood glucose. **, p<0.01; ***, p<0.005 compared by Student's t-test. Values are expressed as mean±SEM.

有意な増加傾向を示し、全体に耐糖能は悪化することが示された。

4. 糖輸送率 (図 3)

非刺激下 GCR (fl/cell·sec) は対照群, 軽症肝炎群, 重症肝炎群でそれぞれ 9.5 ± 0.9 , 13.6 ± 1.7 , 6.9 ± 2.1 であった (図 3A)。対照群に比べ軽症肝炎群は増加傾向 ($p < 0.1$) を, 重症肝炎群は低下傾向を示し, 重症肝炎群は軽症肝炎群より有意 ($P < 0.05$) に低値であった。次に刺激下 GCR はそれぞれ 56.3 ± 4.0 , 79.0 ± 12.2 , 55.5 ± 7.3 と有意差には至らなかったものの, 軽症肝炎群で増加傾向を認めた ($p < 0.2$)。また刺激下 GCR/非刺激下 GCR は, 対照群, 軽症肝炎群, 重症肝炎群でそれぞれ 6.2 ± 0.7 , 5.4 ± 0.8 , 9.9 ± 2.2 と各群間で有意差は認めなかった (図 3B)。以上より肝機能障害が比較的軽度の場合 (軽症肝炎群) は, 非刺激下及び刺激下 GCR はむしろ共に上昇傾向を示すが, 更に障害が重症化すると (重症肝炎群), 非刺激下および刺激下 GCR は共に低下傾向を示すことが判明した。

5. インスリン特異結合率 (図 4)

対照群, 軽症肝炎群, 重症肝炎群の 3 群間で比較すると, 非標識インスリン最終濃度 0, 0.1, 0.5, 1.0, 10, 100ng/ml の各濃度におけるそれぞれのインスリン特異結合率は, いずれの濃度においても 3 群間に有意差を認めなかった (図 4A)。次に上記 3 群の成績を Scatchard 解析¹⁰してみたが (図 4B), 3 群におけるインスリン受容体の結合親和性に明らかな差は認められず, 受容体数は対照群; $(11.7 \pm 1.3) \times 10^4$ 個/cell, 軽症肝炎群; $(12.1 \pm 1.2) \times 10^4$ 個/cell, 重症肝炎群; $(8.1 \pm 1.5) \times 10^4$ 個/cell と重症肝炎群が対照群に比し低下傾向 ($p < 0.2$) を認めた。

II. 単離ヒラメ筋を用いた実験成績

1. 糖輸送測定実験

1) 肝の病理組織像

ヒラメ筋を単離するのに用いた肝炎群は組織学的に斑状壊死 3 例, 巣状壊死 7 例, 帯状壊死 7 例, 亜広範壊死 4 例であった。そこで脂肪細胞を用いた実験同様, 軽症肝炎群 (斑状～巣状壊死; $n=10$) と重症肝炎群 (帯状～亜広範壊死; $n=11$) の 2 群に分けての検討を行った。

2) 体重, 血清 GPT, T-Bil, IRI, 血糖値 (表 3)

実験時 (断頭屠殺前) の体重は対照群を含めた 3 群間で有意差を認めなかった。血清 GPT 値は重症肝炎群が対照群に比し有意 ($p < 0.01$) に高値であった。血清 T-Bil および IRI 値も対照群に比し重症肝炎群で有意 ($p < 0.01$) 高値を示した。反対に血糖値は対照群に比し重症肝炎群で有意 ($p < 0.001$) に低値を示した。また, 血清 T-Bil, IRI 値はいずれも軽症肝炎群に比し重症肝炎群で有意 ($p < 0.05$) に高値を, 血糖値は有意 ($p < 0.05$) に低値を示した。

3) 糖輸送率 (図 5)

非刺激下 2-DOG 取り込み (nmols/100mg wet weight·30min) は対照群 20.1 ± 1.7 , 軽症肝炎群 21.9 ± 2.0 , 重症肝炎群 25.9 ± 3.0 と各群間に有意差を認めず, 刺激下 2-DOG 取り込みも対照群 31.6 ± 2.6 , 軽症肝炎群 38.4 ± 3.2 , 重症肝炎群 34.2 ± 3.1 と各群間に有意差を認めなかった (図 5A)。これに対し刺激下 2-DOG 取り込み/非刺激下 2-DOG 取り込み (stimulated 2-DOG uptake/basal 2-DOG uptake, S/B) はそれぞれ 1.62 ± 0.08 , 1.77 ± 0.06 , 1.43 ± 0.15 と重症肝炎群が軽症肝炎群に比し有意

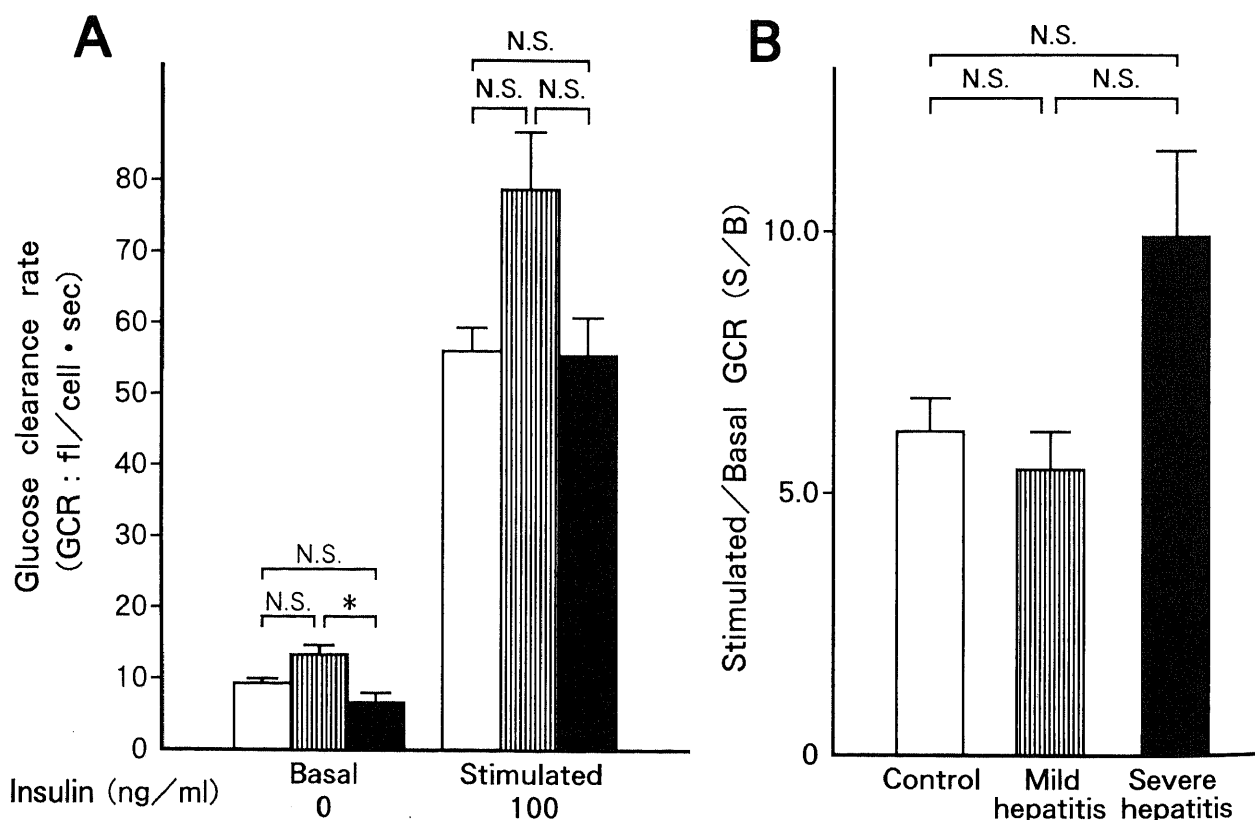


Fig. 3. Glucose clearance rate of isolated adipocytes. (A) GCR of basal and stimulated. (B) The ratio of stimulated GCR and basal GCR (S/B). Open bar, control group ($n=12$); hatched bar, mild hepatitis group ($n=6$); closed bar, severe hepatitis group ($n=6$); N.S., not significant; *, $p < 0.05$. Results are expressed as mean \pm SEM.

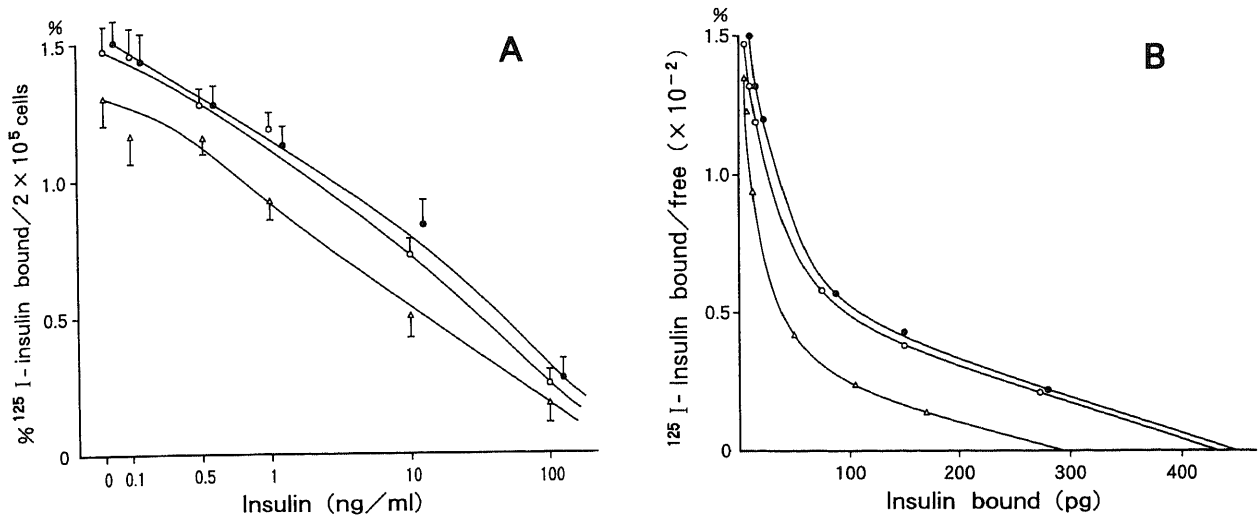


Fig. 4. Specific binding of insulin in isolated adipocytes. (A) ¹²⁵I-insulin specific binding curve of isolated adipocytes. Open circle, control group (n=12); closed circle, mild hepatitis group (n=6); open triangle, severe hepatitis group (n=6). Specific binding of insulin is expressed as percent of total ¹²⁵I-insulin added. Results are expressed as mean±SEM. (B) Scatchard plot of the insulin binding to isolated adipocytes. Open circle, control group; closed circle, mild hepatitis group; open triangle, severe hepatitis group.

Table 3. Characteristics of rats using isolated soleus muscle on the experiment of glucose transport

Group	B. W. (g)	s-GPT (IU/l)	T-Bil. (mg/dl)	IRI (μU/ml)	BG (mg/dl)
Control (N=23)	173.9±19	26.3± 6	0.08±0.06	19.6±10	177±39
Mild hepatitis (N=10)	179.3±19	307.3±502 **	1.24±0.41 *	19.6±12 **	148±37 ***
Severe hepatitis (N=11)	170.0±12	703.4±400	6.08±37.2 *	41.0±26 *	97±23 *

B. W., body weight; s-GPT, serum glutamate pyruvate transaminase; T-Bil, total bilirubin; IRI, immunoreactive insulin; BG, blood glucose. *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001 compared by Student's t-test. Values are expressed as mean±SEM.

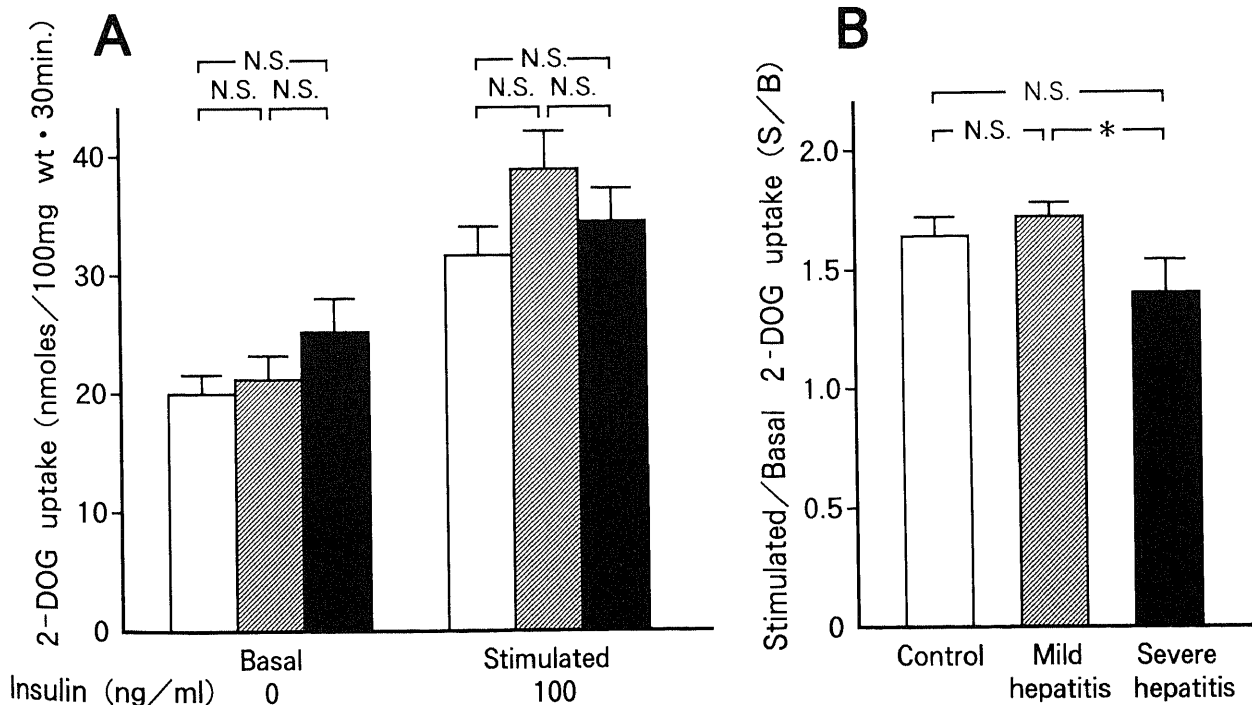


Fig. 5. Specific 2-DOG uptake of isolated soleus muscles. (A) 2-DOG uptake of basal and stimulated. (B) The ratio of stimulated and basal 2-DOG uptake (S/B). Open bar, control group (n=23); hatched bar, mild hepatitis group (n=10); closed bar, severe hepatitis group (n=11); N. S., not significant; *, p<0.05. Results are expressed as mean±SEM.

に低値 ($P < 0.05$) を示した (図 5B). 以上より肝炎の重症化に伴い, S/B は低下することが示された.

4) 血清 IRI 値と S/B の関係

重症肝炎群を血清 IRI 値により対照群の平均 $+2SD$ である $40 \mu\text{U/ml}$ を境界として 2 群に分けた. すなわち IRI が $40 \mu\text{U/ml}$ 以下を正インスリン血症群 ($n=6$) とし, $40 \mu\text{U/ml}$ 以上を高インスリン血症群 ($n=5$) とした. これら 2 群間において S/B は正インスリン血症群 1.16 ± 0.17 , 高インスリン血症群 1.75 ± 0.17 と両群間で有意差を認めた ($p < 0.05$) (図 6A). 更に血清 IRI 値と S/B 間の相関係数は $r = 0.77$ ($p < 0.01$) と両者間に有意な正の相関関係を認めた (図 6B).

2. インスリン特異結合率の測定実験

1) 肝の病理組織像

インスリン特異結合率の測定に用いた肝炎群は組織学的に斑

状壊死 2 例, 巣状壊死 4 例, 帯状壊死 4 例, 亜広範壊死 2 例であった. そこでこれまでの実験同様, 軽症肝炎群 ($n=6$) と重症肝炎群 ($n=6$) の 2 群に分けて検討を行った.

2) 体重, 血清 GPT, IRI 値 (表 4)

実験時 (断頭屠殺前) の体重は対照群に比し重症肝炎群が有意な低値を示した ($p < 0.05$). 血清 GPT 値は対照群に比し重症肝炎群で有意 ($p < 0.01$) な高値を示した. 一方, 血清 IRI 値は軽症, 重症肝炎群で増加傾向を示したものの各群間で有意差は認められなかった.

3) インスリン特異結合率 (図 7)

インスリン特異結合率は対照群 ($n=12$) $1.91 \pm 0.13\%$, 軽症肝炎群 ($n=6$) $1.39 \pm 0.15\%$, 重症肝炎群 ($n=6$) $1.65 \pm 0.18\%$ と 3 群間で有意差を認めなかった.

4) インスリン分解率

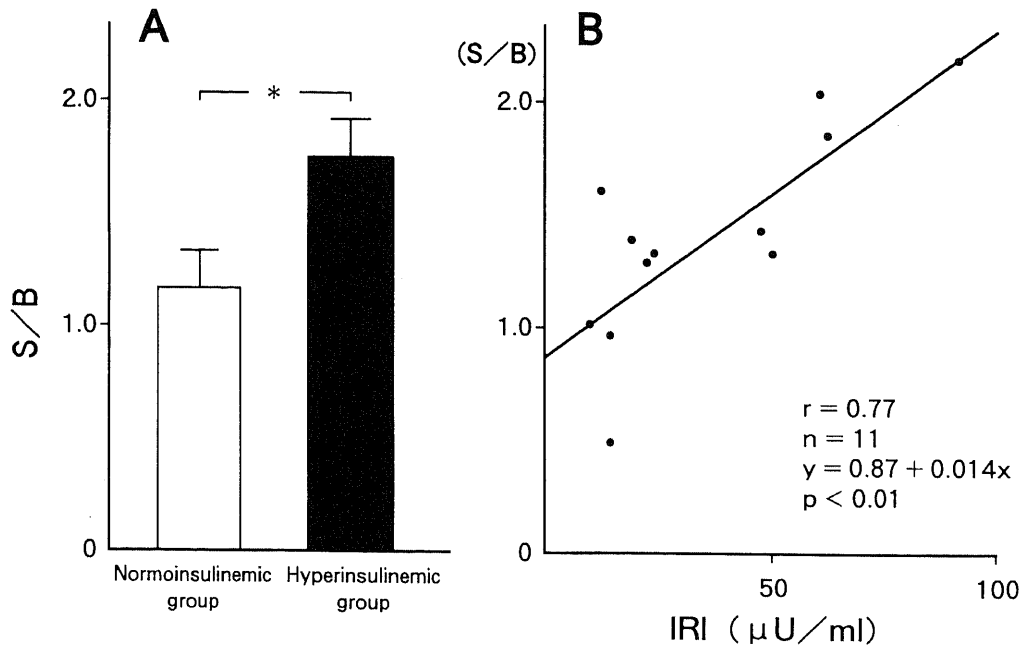


Fig. 6. Correlation between IRI and stimulated 2-DOG uptake/basal 2-DOG uptake (S/B) in severe hepatitis group. (A) S/B value of normoinsulinemic group and hyperinsulinemic group. (B) Correlation coefficient between IRI and S/B. Open bar, normoinsulinemic group ($n=6$); closed bar, hyperinsulinemic group ($n=5$) (A). Normoinsulinemia means that serum IRI is less than $40 \mu\text{U/ml}$. Hyperinsulinemia means that serum IRI is more than $40 \mu\text{U/ml}$. *, $p < 0.05$. Results are expressed as mean \pm SEM.

Table 4. Characteristics of rats using isolated soleus muscle on the experiment of insulin binding

Group	Body weight (g)	s-GPT (IU/l)	IRI ($\mu\text{U/ml}$)
Control (N=12)	200.0 ± 10.2	24.3 ± 7.9	17.6 ± 11.2
Mild hepatitis (N=6)	193.0 ± 28.4 *	402.5 ± 323 **	21.5 ± 8.6
Severe hepatitis (N=6)	187.5 ± 8.8	690.3 ± 525	26.8 ± 11.2

s-GPT, serum glutamate pyruvate transaminase; IRI, immunoreactive insulin. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ compared by Student's t-test. Values are expressed as mean \pm SEM.

インスリン分解率は0.2ng/mlのインスリン濃度で対照群17.6±3.2% (n=12)、軽症、重症を含めた肝炎群17.9±3.9% (n=12)と両群間で有意差を認めなかった。

考 察

1906年 Naunyn¹⁾が、糖尿病は肝機能異常を病因とすると提唱して以来、肝疾患に伴う耐糖能異常の成因については多数の研究がなされてきた。しかし、そのほとんどは肝硬変等の慢性肝疾患に関するものであり、急性肝疾患時における耐糖能異常に関する報告は比較的乏しい。ヒト急性肝炎急性期においては経口ブドウ糖負荷試験上、多くの症例で耐糖能異常が認められ、その際血中インスリンは高反応を示すことが報告¹⁷⁾¹⁸⁾されている。一方、D-ガラクトサミンがラットの腹腔内に投与された場合、用量依存性に急性肝障害を惹起し、その肝組織像はヒト急性肝炎の変化に類似することより¹⁹⁾、急性肝炎モデルとして有用と考えられている。今回作成したガラクトサミン投与ラットでもヒト急性肝炎と同様な耐糖能の変化と高インスリン血症が観察された。このことは、本急性肝炎モデルラットが、その肝組織像ばかりでなく、糖代謝動態においてもヒト急性肝炎に類似した病態をもち、耐糖能異常の成因を解明する上で有用であることを示している。これまでヒト急性肝炎では赤血球⁷⁾や単球⁸⁾におけるインスリン結合能の低下が指摘されている。また、D-ガラクトサミン投与により作成した急性肝障害ラットにおいて、膵ラ氏島内インスリン含有量の増加とインスリン分泌亢進が認められていること²⁰⁾より、急性肝炎でも肝硬変同様¹⁵⁾、末梢組織におけるインスリン抵抗性の存在が推測されていた。と

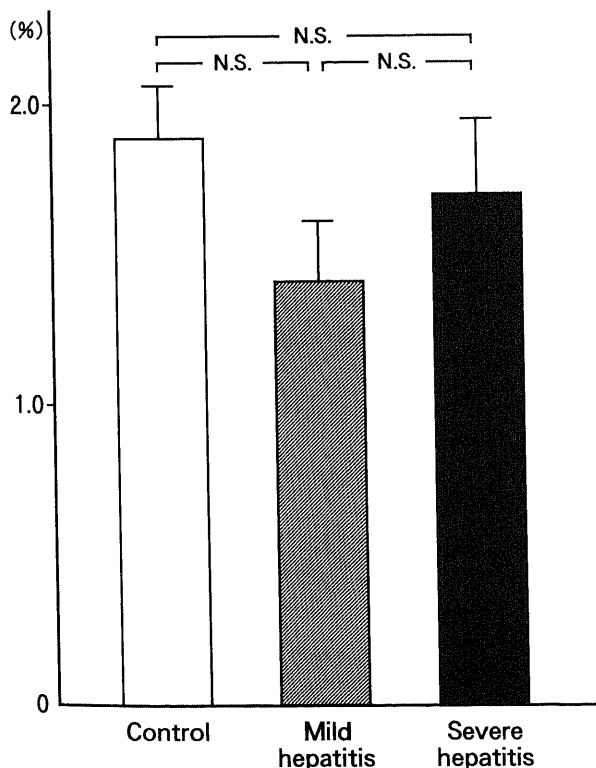


Fig. 7. ¹²⁵I-insulin specific binding to isolated soleus muscle. Open bar, control group (n=12); hatched bar, mild hepatitis group (n=6); closed bar, severe hepatitis group (n=6); N.S., not significant. Results are expressed as mean±SEM.

ころが、末梢でのインスリン依存性ブドウ糖処理組織である筋肉や脂肪組織を用いた試験管内での検討はこれまでなされていない。今回著者はこの点を検討するため、まず比較的材料の得やすい遊離脂肪細胞を用いてガラクトサミン投与ラットの糖輸送率およびインスリン結合率を検討した。しかしその糖輸送率(GCR)は予想に反して、対照群に比し軽症肝炎群で非刺激下および刺激下共むしろ上昇傾向を示しており、この際血清 IRI 値の上昇を伴っていた。一方、重症肝炎群では、軽症肝炎群に比し非刺激下 GCR が有意に低下し、刺激下 GCR も低下傾向を示した。以上の成績は末梢組織でのインスリン抵抗性の存在を否定的なものにすると共に、軽症肝炎群では末梢組織におけるインスリン感受性が反対に亢進している可能性をも推測させた。しかしながら末梢でのインスリン依存性ブドウ糖処理に及ぼす脂肪組織の占める比重はごく僅かであり、その最大標的組織は筋肉²¹⁾とされているため、つぎに単離ヒラメ筋を用いて更に検討を行った。単離ヒラメ筋における糖輸送は、非刺激下及び刺激下での 2-DOG 取り込みともに対照群、軽症肝炎群、重症肝炎群の3群間で有意差を認めなかった。しかし、インスリン感受性の指標である S/B は軽症肝炎群に比し重症肝炎群で有意に低下していた。また重症肝炎群における血清 IRI 値と S/B との間に有意な正の相関関係が認められた。これらの成績は一部脂肪細胞での成績と異なるものであったが、つぎの3点においておおよそ共通するものであった。すなわち、1) 耐糖能障害の軽度な軽症急性肝炎ラットでは、末梢組織(筋肉・脂肪組織)での糖輸送は非刺激下及び刺激下ともに正常ラットに比し低下していないこと、2) 肝炎が重症化すると、末梢組織におけるインスリン依存性糖輸送が低下傾向を示すこと、3) 血清 IRI 値とインスリン刺激下ブドウ糖取り込みの間に正相関を示す傾向があることなどである。以上の結果で特に興味深いのは3)の事実である。一般に、持続的高インスリン血症状態では、下降調節(down-regulation)の機序を介したインスリン受容体数の減少²²⁾²³⁾や、受容体結合後の情報伝達の障害²⁴⁾により末梢組織でのインスリン感受性の低下が生じるという、今回の結果とはむしろ逆の現象が知られており、このことが肝硬変をはじめとする慢性肝疾患での末梢組織におけるインスリン抵抗状態の成因のひとつと考えられている²⁵⁾。しかしながら、急性肝炎に伴う高インスリン血症は比較的短期間かつ可逆性の変化であり、慢性肝疾患における長期的高インスリン血症状態とは糖輸送動態に及ぼす影響がかなり異なる可能性がある。この点に関しては、ラットを比較的短期間(5時間~14日間)の高インスリン血症状態においたこれまでのいくつかの報告^{26)~28)}から高インスリン血症が末梢組織での糖輸送動態に次の2つの効果を及ぼす可能性が示唆されている。すなわち短期的効果として細胞全体のタンパク含量増加を伴う成長促進効果による糖輸送、糖代謝活性の増大を、長期的効果としてインスリン抵抗性の発現をもたらす可能性である。今回の実験では、糖輸送の測定をD-ガラクトサミン投与48~52時間後に行っていることより、このうちの短期的効果が主に発現した可能性がある。すなわち短期的効果によるインスリン感受性増強効果が軽症肝炎群の脂肪細胞で認められた糖輸送増大傾向をもたらした可能性がある。更に、ヒラメ筋を用いた実験において重症肝炎群での血清 IRI 値と S/B 値との間に強い正の相関関係を認めたことは、肝炎の重症化に伴う筋肉での糖輸送の低下に対し、高インスリン血症が前述した短期的効果からインスリン感受性を高め、結果

的に筋での糖輸送低下を代償していると考えられることも可能かもしれない。

次に、2) で述べた急性肝炎の重症化により糖輸送が低下する原因に関しては、まず D-ガラクトサミン自体による脂肪細胞や筋肉組織への直接的な障害の可能性を考えておかなければならないが、光学顕微鏡所見上は否定的とされている⁹⁾。次に、高インスリン血症下での下降調節に基づく受容体数減少の可能性も考えられるが、単離ヒラメ筋のインスリン特異結合率を検討した今回の成績では、耐糖能低下の著明な重症肝炎群においても明らかなインスリン受容体結合の低下を指摘できなかった。一方、今回は検討していないが、一般に急性肝障害では成長ホルモン、コルチゾール、カテコールアミン等のいわゆるインスリン拮抗ホルモンの増加が報告されている。これら拮抗ホルモンの末梢組織における糖輸送阻害作用は、タンパク合成などを介しある程度持続的であることが知られており^{30)~32)}、今回の糖輸送低下の要因のひとつとなった可能性が考えられる。一方、今回の成績は脂肪組織のみにおいて正常群に比し軽症肝炎群で糖輸送の増大傾向を示した点など、急性肝炎時の糖輸送動態が脂肪細胞と筋肉とで一部異なる可能性をも示している。この点に関して Wardzala ら²⁹⁾は、ラットを2週間の持続的高インスリン血症状態においたところ、脂肪細胞ではインスリン刺激下糖輸送活性が2~3倍の亢進を認めたのに対し、単離ヒラメ筋におけるインスリン刺激下細胞内ブドウ糖代謝は10~20%の僅かな亢進のみに止まった事実を報告している。この実験成績は、高インスリン血症による糖輸送増大作用がヒラメ筋よりも脂肪細胞においてより強く現れる可能性を示唆している。加えて James ら³³⁾も、雄性ウィスターラットに高インスリン血症下でのグルコースクランプ法を施行した実験で、40~95分のクランプ続行により筋肉組織におけるグルコース利用率は不変であったにも拘わらず、脂肪組織のそれは60~70%増加したと報告している。すなわち今回の実験成績において、軽症肝炎群のインスリン刺激下糖輸送の増大傾向がヒラメ筋に比し脂肪細胞でより顕著であった理由として、高インスリン血症による糖輸送増大効果に対する脂肪組織の感受性の高さが関与した可能性も考えられた。

以上の急性肝炎モデルラットでの成績には慢性肝疾患の代表である肝硬変でのこれまでの報告と異なる点が幾つか認められる。即ち、従来肝硬変患者では肝臓でのインスリン分解低下も加わり末梢レベルにおいて高インスリン血症が認められることが知られ、ヒト肝硬変患者の筋肉⁹⁾、赤血球³⁴⁾、単球^{35)~36)}でのインスリン結合率とブドウ糖取り込みの低下や、グルコースクランプ法を用いた検討で、末梢組織における糖処理能の低下を認める⁵⁾³⁷⁾³⁸⁾ことなど、末梢組織におけるインスリン抵抗性の存在が明らかにされている。これに対して、今回の急性肝炎モデルラットでの成績は肝硬変と同様の高インスリン血症を伴う耐糖能異常を示したにも拘わらず、明らかな末梢組織でのインスリン抵抗性を認めず、軽症例ではむしろインスリン刺激下糖輸送の増大傾向を認めた。また肝硬変では一般に高インスリン血症に伴う下降調節の機序により末梢組織におけるインスリン抵抗性を生ずるのに対し、急性肝炎モデルラットでのインスリン感受性は、これとは反対に血清 IRI 値と一部正相関を示していた。このことは急性肝炎における耐糖能異常の成因が肝硬変のそれとはやや異なる可能性を示している。更に糖負荷試験での有意な耐糖能悪化にもかかわらず、末梢組織での明らかなイン

スリン抵抗性を認めなかったことは、急性肝炎時の耐糖能異常の成因を考える場合、肝臓を主体とした他の組織での糖処理能の異常も検討する必要があることを推測させる。肝硬変では、肝細胞周囲の繊維化や肝内シャント³⁹⁾、グルコキナーゼ活性の低下⁹⁾、および肝エネルギー荷電の低下⁹⁾等のため、肝臓での糖負荷後の糖処理能が低下しているとの報告が多く、これも耐糖能異常の一因として考えられている。一方、急性肝障害の肝臓でのブドウ糖負荷後のブドウ糖処理能に関して、Bachmann ら⁶⁾は D-ガラクトサミン急性肝障害時、末梢血インスリン増加に先立ち肝細胞膜インスリンレセプターが減少することを報告し、肝におけるインスリン抵抗性発現の主な原因と推測した。今回、肝臓での糖利用に関しては検討していないが、末梢組織でのインスリン作用動態のみで急性肝炎時の耐糖能異常を説明するのは困難なことから、今後この点に関する検討も必要であろう。

結 論

今回著者は急性肝炎時における末梢組織でのインスリン作用動態を明らかにするため、D-ガラクトサミン急性肝障害ラットを作成し、その遊離脂肪細胞および単離ヒラメ筋における糖輸送率、インスリン結合率に関し検討した。その結果、

1. ブドウ糖負荷試験において、対照群に比し軽症肝炎群、重症肝炎群と肝障害が重症化するにつれ血糖値は負荷前で低下を、負荷後は負荷前値に比し有意な上昇傾向を示し、全体に耐糖能は悪化した。
2. 血清 IRI 値は急性肝炎の重症化に伴い対照群に比し有意な上昇を認めた。
3. 遊離脂肪細胞を用いた実験において軽症肝炎群では対照群に比し、インスリン非刺激下およびインスリン刺激下 GCR とも上昇傾向を認めた。重症肝炎群は軽症肝炎群に比し、非刺激下 GCR の有意な低下および刺激下 GCR の低下傾向を示した。なお、刺激下 GCR/非刺激下 GCR は3群間で有意差を認めなかった。
4. 脂肪細胞ではインスリン結合率は重症肝炎群で対照群に比し低下傾向を認めたが、3群間で有意差を認めなかった。
5. 単離ヒラメ筋を用いた実験においてインスリン非刺激下およびインスリン刺激下 2-DOG 取り込みは3群間で有意差を認めなかったが、刺激下 2-DOG 取り込み/非刺激下 2-DOG 取り込み (S/B) は重症肝炎群で軽症肝炎群に比し有意な低値を示した。
6. 単離ヒラメ筋において重症肝炎群では血清 IRI 値と S/B との間には $r=0.77$ と有意な正の相関関係を認めたが、インスリン結合率は3群間で有意差を認めなかった。

以上より、D-ガラクトサミン投与急性肝障害ラットの末梢組織における糖輸送は、脂肪組織と筋肉組織で異なった動態を示す可能性が考えられた。また、糖負荷試験での明らかな耐糖能悪化にもかかわらず筋組織を中心とした末梢組織での糖輸送は対照群と比較しわずかな低下しか認めなかったことより、急性肝炎における耐糖能異常は末梢組織以外の(おそらくは肝での)糖処理能異常も互いに絡み合ったうえで形成されるものと思われる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を頂いた恩師小林健一教授に深

く感謝の意を表します。また、本研究に関し、直接御指導と御助言を賜った第一内科宮腰久嗣前講師(現厚生連高岡病院内科部長代理)、大沢謙三助手ならびに第一内科第一研究室の諸兄に感謝いたします。また、肝の病理に関し御協力頂きました本学第二病理齋藤勝彦先生に心から感謝いたします。なお、本論文の一部は、第33回及び第34回日本糖尿病学会において発表した。

文 献

- 1) Naunyn, B.: Glykosurie und Diabetes durch experimentelle Insulte und Krankheiten der Leber. Der Diabetes Mellitus. In H. Nothnagel (ed.), *Spezielle Pathologie und Therapie*, Band VI, 1st ed., p56-66, Alfred Holder, Wien, 1906.
- 2) 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).
- 3) 田中純次, 小沢和恵, 上山康男, 戸部隆吉: 肝疾患に伴う耐糖能異常. *総合臨牀*, 33, 1519-1523 (1984).
- 4) Leatherdale, B. A., Chase, R. A., Rogers, J., Alberti, K. G. M. M., Davis, P. & Record, C. O.: Forearm glucose uptake in cirrhosis and its relationship to glucose tolerance. *Clin. Sci.*, 59, 191-198 (1980).
- 5) Vannini, P., Forlani, G., Marchesini, G., Ciavarella, A., Zoli, M. & Pisi, E.: The euglycemic clamp technique in patients with liver cirrhosis. *Horm. Metabol. Res.*, 16, 341-343 (1984).
- 6) Bachmann, W., Haslbeck, M., Bottger, I., Hepp, K. D. & Mehnert, H.: Reduced insulin binding to hepatic plasma membranes in D-galactosamine-treated rats. *Diabetologia*, 17, 101-109 (1979).
- 7) 西村泰行: 急性肝炎における赤血球インスリン受容体の変動-肝細胞障害度との関連-. *日消誌*, 84, 239-246 (1987).
- 8) 金剛隆弘, 高森成之, 平海良雄, 中林富雄, 千丸博司, 牧野邦雄, 瀧野辰郎, 葛谷覚元: 肝疾患時の糖代謝異常に関する研究-インスリン受容体による検討-. *肝臓*, 22, 173-178 (1980).
- 9) Whitesell, R. R. & Gliemann, J.: Kinetic parameters of transport of 3-O-methylglucose and glucose in adipocytes. *J. Biol. Chem.*, 254, 5276-5283 (1979).
- 10) Rodbell, M.: Metabolism of isolated fat cells. *J. Biol. Chem.*, 239, 375-380 (1964).
- 11) Kashiwagi, A., Verso, M. A., Andrews, J., Vasques, 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).
- 12) 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).
- 13) Randle, P. J., Garland, P. B., Hales, C. N. & Newsholme, A.: The glucose fatty-acid cycle -its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus-. *Lancet*, 1, 785-789 (1963).
- 14) 前川 聡, 小林 正, 大角誠治, 渡辺修明, 繁田幸男: ラット単離 Soleus 筋におけるインスリン作用機序の解明-インスリン結合および 2-deoxyglucose 取り込みに対するインスリン作用の基礎的検討-. *糖尿病*, 27, 697-705 (1984).
- 15) Bennet, T. P.: Membrane filtration for determining protein in the presence of interfering substances. *Nature*, 213, 1131-1132 (1967).
- 16) Scatchard, G.: The attractions of proteins and ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 51, 660-672 (1949).
- 17) Chupin, M., Charbonnel, B., Bodic, L. L., Grolleau, J. Y., Chupin, F. & Guillon, J.: Glucose tolerance in viral hepatitis. *Diabetes*, 27, 661-669 (1978).
- 18) 大橋謙次, 千丸博司, 中林富雄, 朴 孝憲, 吉徳克仁, 奥野忠雄, 瀧野辰郎, 富増寛夫, 高森成之: 急性肝炎における耐糖能異常について-インスリン受容体による検討-. *肝臓*, 26, 305-310 (1985).
- 19) Keppler, D., Lesch, R., Reutter, W. & Decker, K.: Experimental hepatitis induced by D-galactosamine. *Exp. Mol. Pathol.*, 9, 279-290 (1968).
- 20) 朴 孝憲, 千丸博司, 大橋謙次, 吉徳克仁, 奥野忠雄, 瀧野辰郎, 富増寛夫: D-galactosamine 急性肝障害ラットのインスリン分泌能-単離腓ラ島灌流による検討-. *医学のあゆみ*, 136, 71-72 (1986).
- 21) DeFronzo, R. A., Jacot, E., Jequier, E., Maeder, E., Wahren, J. & Felber, J. P.: The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose: results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetes*, 30, 1000-1007 (1981).
- 22) Lesniak, M. A. & Roth, J.: Regulation of receptor concentration by homologous hormone. *J. Biol. Chem.*, 251, 3720-3729 (1976).
- 23) Gavin, J. R., Roth, J., Neville, D. M., Meyts, P. D. & Buell, D. N.: Insulin-dependent regulation of insulin receptor concentration in cell culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 71, 84-88 (1974).
- 24) Marangou, A. G., Weber, K. M., Boston, R. C., Aitken, P. M., Heggie, J. C. P., Kirsner, R. L. G., Best, J. D. & Alford, F. P.: Metabolic consequences of prolonged hyperinsulinemia in humans: evidence for induction of insulin insensitivity. *Diabetes*, 35, 1383-1389 (1986).
- 25) 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).
- 26) Trimble, E. R., Weir, G. C., Gjinovci, A., Assimacopoulos-jeannet, F., Benzi, R. & Renold, A. E.: Increased insulin responsiveness in vivo and in vitro consequent to induced hyperinsulinemia in the rat. *Diabetes*, 33, 444-449 (1984).
- 27) Kobayashi, M. & Olefsky, J. M.: Effect of experimental hyperinsulinemia on intracellular glucose metabolism of isolated adipocytes. *Diabetologia*, 17, 111-116 (1979).

- 28) Young, D. A., Uhl, J. J., Cartee, G. D. & Hollszy, J. O.: Activation of glucose transport in muscle by prolonged exposure to insulin: effect of glucose and insulin concentration. *J. Biol. Chem.*, **261**, 16049-16053 (1986).
- 29) Wardzala, L. J., Hirshman, M., Pofcher, E., Horton, E. D., Mead, P. M., Cushman, S. W. & Horton, E. S.: Regulation of glucose utilization in adipose cells and muscle after long-term experimental hyperinsulinemia in rats. *J. Clin. Invest.*, **76**, 460-469 (1985).
- 30) Rizza, R. A., Mandario, L. J. & Gerich, J. E.: Effect of growth hormone on insulin action in man: mechanisms of insulin resistance, impaired suppression of glucose production, and impaired stimulation of glucose utilization. *Diabetes*, **31**, 663-669 (1982).
- 31) Livingstion, J. N. & Lockwood, D. H.: Effect of glucocorticoids on the glucose transport system of isolated fat cells. *J. Biol. Chem.*, **250**, 8353-8360 (1975).
- 32) Joost, H. G., Weber, T. M., Cushman, S. W. & Simpson, I. A.: Activity and phosphorylation state of glucose transporters in plasma membranes from insulin-, isoproterenol-, and phorbol ester-treated rat adipose cells. *J. Biol. Chem.*, **262**, 11261-11267 (1987).
- 33) James, D. E., Burleigh, K. M. & Kraegen, E. W.: Time dependence of insulin action in muscle and adipose tissue in the rat in vivo: an increasing response in adipose tissue with time. *Diabetes*, **34**, 1049-1054 (1985).
- 34) 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).
- 35) 金剛隆弘, 高森成之, 平海良雄, 中林富雄, 千丸博司, 牧野邦雄, 瀧能辰郎, 葛谷覚元: 肝疾患時の糖代謝異常に関する研究—インスリン受容体による検討—. *肝臓*, **22**, 173-178 (1981).
- 36) 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. *Endocrinology*, **105**, 1426-1431 (1979).
- 37) 宮本市郎, 能登 裕, 森丘理香, 番度行弘, 西村泰行, 真田 陽, 宮腰久嗣, 服部 信: 肝硬変のインスリン抵抗性について—Euglycemic Clamp 法による検討—. *糖尿病*, **30**, 605-611 (1987).
- 38) 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**, 561-570 (1991).
- 39) Arranto, A. J., Rautio, A. & Sotaniemi, E. A.: Pericellular collagen in alcoholics with liver cirrhosis. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **35**, 121-135 (1982).

Studies on the Pathogenesis of Glucose Intolerance in Acute Liver Injury—An Examination on Glucose Transport and Insulin Binding to Adipocytes or Soleus Muscle Isolated from D-galactosamine-treated Rats Yukihiro Bando, Department of Internal Medicine (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med Soc.*, **102**, 260—271 (1993)

Key words acute hepatitis, adipocytes, soleus muscle, glucose transport, insulin binding

Abstract

To clarify the pathogenesis of glucose intolerance in acute liver injury, model rats with acute hepatitis were developed by intraperitoneal injection of D-galactosamine, and glucose transport and insulin binding to isolated adipocytes and soleus muscles were investigated. As various degrees of hepatic necrosis were observed by histological examination, the galactosamine-treated rats were divided into two subgroups, those with mild hepatitis (mild hepatitis group) and those with severe hepatitis (severe hepatitis group). The glucose-disposal capacity to orally administered glucose was significantly decreased in hepatitis groups compared with the control group. Serum insulin levels in hepatitis groups were higher than those in the control group. Basal and insulin-stimulated glucose transports were estimated in adipocytes isolated from the epididymal fat pads or in isolated soleus muscles. Glucose clearance rates (GCR; $\text{fl}/\text{cell} \cdot \text{sec}$) of adipocytes at both basal and insulin (10 ng/ml)-stimulated states were slightly elevated in the mild hepatitis group compared with the control group. On the other hand, basal GCR was significantly decreased in the severe hepatitis group compared with that in the mild hepatitis group (6.9 ± 5.1 vs 16.6 ± 4.1 ; $p < 0.05$), and stimulated GCR showed a slight decrease in the severe hepatitis group. Glucose transport in soleus muscles, both in basal and insulin (100 ng/ml)-stimulated states, was the same in galactosamine-treated rats and control rats. However, the ratio of insulin-stimulated glucose uptake to basal glucose uptake (S/B), an index of insulin sensitivity, was significantly decreased in the severe hepatitis group compared with that in the mild hepatitis group (1.43 ± 0.48 vs 1.77 ± 0.20 ; $p < 0.05$). In the severe hepatitis group, there was a significant positive correlation between basal serum IRI and S/B ($r = 0.77$; $p < 0.01$). Specific binding of ^{125}I -labelled insulin to adipocytes or soleus muscles showed no difference among the three groups. These results indicate that 1) In mild hepatitis rats which have a mild deterioration of

glucose tolerance, glucose transport in both adipocytes and soleus muscles are not necessarily decreased. 2) In severe hepatitis rats which have a severe deterioration of glucose tolerance, basal GCR at adipocytes and insulin sensitivity of glucose transport at the muscles are significantly decreased compared with the mild hepatitis group. 3) Hyperinsulinemia may partially restore the decreased glucose transport in the severe hepatitis group. 4) The regulatory mechanism of glucose transport may be somewhat different between adipocytes and muscle tissues. In conclusion, decreased insulin sensitivity at peripheral tissues may be partially responsible for glucose intolerance in acute liver injury.