

機関番号：17401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500392

研究課題名 (和文) インスリン作用モデル解析による新たな正常血糖域クランプ法の開発

研究課題名 (英文) Development of method of euglycemic hyperinsulinemic glucose clamp technique using analysis of insulin action in peripheral tissue

研究代表者

古川 昇 (FURUKAWA NOBORU)

熊本大学・大学院生命科学研究部・講師

研究者番号：90335795

研究成果の概要 (和文) : 血中インスリン濃度と、組織のインスリン濃度の two-compartment model を作成、正常血糖域クランプ法の data より、M 値に変わる新たなインスリン抵抗性を表す指標 ( $\alpha$ ) を算出した。高インスリン正常域血糖クランプ法開始後 60 分で算出した  $\alpha$  (60) は、M 値との間に相関係数  $r = 0.872$  と有意の高い相関を認め、新たなインスリン抵抗性を表す指標 ( $\alpha$ ) の有用性が示された。

研究成果の概要 (英文) : Analyzing the two-compartment model by using the relationship between plasma and peripheral tissue glucose concentration, we developed the new index  $\alpha$  for reflecting the insulin resistance. We demonstrated that highly correlation ( $r=0.872$ ) between M value and  $\alpha$  (60) which was calculated by pattern of glucose infusion rate during 60 min after hyperinsulinemic euglycemic glucose clamp technique. Our results showed that newly developed index  $\alpha$  was useful method for evaluating insulin resistance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学、生体材料学

キーワード：(1) インスリン抵抗性、(2) グルコースクランプ、(3) two-compartment model

## 1. 研究開始当初の背景

日本人の糖尿病の90%以上を占める2型糖尿病の病態は、インスリン感受性の低下（インスリン抵抗性）とインスリン分泌能の低下よりなっている。また、糖尿病治療において、インスリン分泌促進薬や臓器特異的なインスリン抵抗性改善薬が開発され、臨床応用されつつある。従って、今後は糖尿病の患者の病態を把握し、インスリン感受性低下が主たる病態であればインスリン抵抗性改善薬を、インスリン分泌能の低下が主たる病態であればインスリン分泌促進薬を用いることが求められる。そのために、2型糖尿病患者の多様な病態を把握する検査の重要性はこれまで以上に増してくるものと考えられる。

インスリン分泌能の低下については、早朝空腹時血中インスリン濃度や血中・尿中Cペプチドの測定などにより、その評価法は確立されている。インスリン抵抗性については、早朝空腹時のインスリン濃度と血糖値から算出するHOMA-IR (Homeostasis model assessment -IR)、あるいはブドウ糖を静脈注射し、血糖値と血中インスリン濃度をモデル解析することにより評価するMinimal Modelなどの評価法があるが、ベッドサイド型人工膵島を用いた正常血糖域クランプ法によるブドウ糖注入率より算出されたM値が最も正確に把握できる指標として用いられている。

正常血糖域クランプ法は血中インスリン濃度を100  $\mu$ u/mlとすると、肝臓での糖放出が10%以下に抑えられる(0.2~0.4mg/kg/min)という知見を基に、血中インスリン濃度を100  $\mu$ u/mlとし、肝臓からの糖放出を押さえた状態で、血糖値を一定に保つために、必要なブドウ糖投与量を定量化し、インスリン抵抗性を測定するものである。インスリン投与量としては、1.12 mU/kg/minまたは40 mU/m<sup>2</sup>/minのインスリン注入により目標インスリン濃度(100  $\mu$ u/ml)に到達できるとされている。血糖値が一定であれば、外部からのブドウ糖注入率(GIR; glucose infusion rate; mg/kg/min)が、骨格筋を中心とした末梢組織でのブドウ糖利用率とみなすことができ、GIRが末梢組織におけるインスリン抵抗性の指標M値となる。図1に実際にclampした際のdataを示す。一般的な目安としては、正常値は8.0~12.0 mg/kg/min、インスリン抵抗性がある場合には6.0 mg/kg/min以下となることが多い。実際にはインスリン濃度は患者間で異なるた

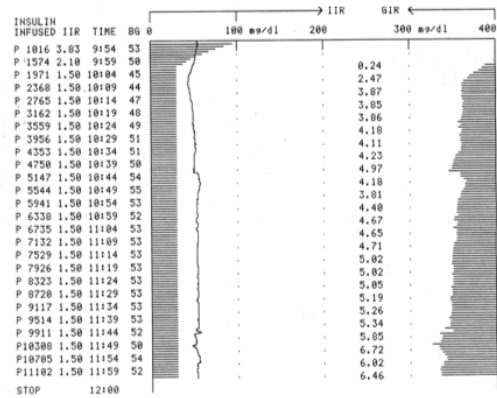


図1 正常血糖域クランプ法の結果(例)

折れ線グラフが血糖値、左側の棒グラフがインスリン注入率、右側の棒グラフがブドウ糖注入率をそれぞれ示す。クランプ開始後、90分~120分でインスリン作用が定常状態になると考えられており、この時点でのブドウ糖注入率を平均して、M値を算出することが多い。しかしながら、実際には例に示すように、ブドウ糖注入率は一定にはならず、徐々に増え続ける傾向を示す。

め、M値をsteady stateの血漿インスリン濃度で除し、さらに100を乗じたインスリン感受性指数や、steady stateでの血糖値でM値を除したMCR<sub>G</sub> (metabolic clearance rate of glucose)も用いられることがある。本法はインスリン治療中の患者にも適用可能であること、HOMA-IRより再現性に富むことなどの利点により、本邦において年間600件程度施行されている。

このように、末梢組織のインスリン抵抗性を評価する方法として確立された方法であり、肝の影響を排除し、筋肉・脂肪組織のインスリン抵抗性を評価できること、内因性インスリン分泌が枯渇した患者にも応用できること、などの利点を有するが、いくつかの問題点や今後明らかにすべき点が残っている。

## 2. 研究の目的

まず、本法は高インスリン血症という特殊な条件下での測定であり、脂肪分解が抑制され低遊離脂肪酸血症時のブドウ糖取り込みをみているため、末梢組織のブドウ糖取り込み率を過大に評価されている可能性がある。また、糖尿病患者においては肝のインスリン抵抗性の存在も指摘されており、その際には血漿インスリン濃度を100  $\mu$ u/mlまで上昇させても十分に肝糖放出を抑制することができず、末梢組織のブドウ糖取り込み率を過小評価してしまう可能性もある。さらに、

DeFronzo らの原法によるインスリン注入量では、血漿インスリン濃度が  $100 \mu\text{U/ml}$  まで達しないことが多く、著者らは基礎インスリン注入量を  $1.5 \text{ mU/kg/min}$  とすることにより血漿インスリン濃度を上げているが、どの程度のインスリン注入量が最適であるのか、統一されたものがない。また、評価基準についても、今後検証していく必要がある。

本研究では、このような問題点を解決するため、正常血糖域クランプ法におけるインスリン注入率と血中インスリン濃度、インスリン作用と血糖値の関係をそれぞれモデル化し、ブドウ糖注入率の経過を解析することにより、M 値の算出法を標準化する。さらに、予測モデルを用いることにより、これまでの2時間より短時間 (30分~60分) にM 値の算出が可能となるような検査法を開発する。

### 3. 研究の方法

#### (1) インスリン作用と血糖値の関係を表すモデルの作成

正常血糖域クランプ法の際に、血糖値を一定に保つために必要なブドウ糖注入量をインスリンの作用を反映していると考え、以下のモデルを作成、解析を進めた。血中インスリン濃度と、実際にインスリン作用を発揮する末梢のインスリン濃度の two-compartment model を作成することにより、1次遅れを有する model を作成した (図2)。(1)式及び(2)式を時間  $t$  の関数から複素数  $s$  の関数へラプラス変換することにより、血中インスリン濃度 (IRI) とブドウ糖注入率 (GIR) との関係式(5)式を導いた。さらに、逆ラプラス変換することにより GIR(t) と IRI(t) の関係式を求めた (3)式)。正常血糖域クランプ法を行い、血中インスリン濃度とブドウ糖注入率の関係から、以下のモデルを作成、解析を進めた。すなわち、血中インスリン濃度と、実際にインスリン作用を発揮する末梢のインスリン濃度の two-compartment model を作成することにより、1次遅れを有する model を作成した。これまでの正常血糖域クランプ法などの血中インスリン濃度とブドウ糖注入率との関係が明らかな data を収集し、血中インスリン濃度とブドウ糖注入率との関係のインディシャル応答をシミュレートし、最小自乗法により two-compartment model の各係数を算出した。

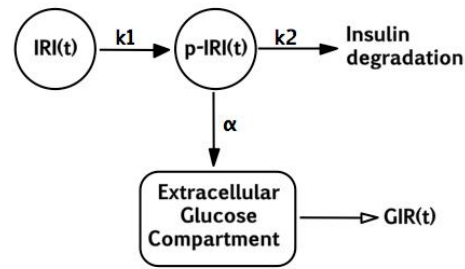


図2 血中インスリン濃度とインスリン作用の関係を表すモデル

IRI(t): 血中インスリン濃度  
 p-IRI(t): 末梢血インスリン濃度  
 GIR(t): ブドウ糖注入率  
 K1, K2: 移行係数  
 $\alpha$ : インスリン作用指数

$$\frac{d}{dt} p\text{-IRI}(t) = k_1 \cdot \text{IRI}(t) - k_2 \cdot p\text{-IRI}(t) \quad \dots (1)$$

$$\text{GIR}(t) = \alpha \cdot p\text{-IRI}(t) \quad \dots (2)$$

以上2式より

$$\text{GIR}(t) = \alpha \cdot K_1 \cdot e^{-k_2 \cdot t} \cdot \text{IRI}(t) \quad \dots (3)$$

#### (2) 正常域血糖クランプ法の data 収集

様々な程度のインスリン抵抗性を有する患者に正常域血糖クランプ法を施行し、1分毎のブドウ糖注入率と10分毎の血中インスリン濃度の data を収集する。さらに、定常状態における平均ブドウ糖注入率と血中インスリン濃度より、M 値を算出した。

#### (3) インスリン作用と血糖値の関係を表すモデルより新たな指標の作成

これらのデータから、two-compartment model の各係数を算出した。この中で、インスリン作用係数  $\alpha$  を用いて、M 値との比較検討を行った。

120分間クランプした際の  $\alpha$  ( $\alpha(120)$ ) と M 値の比較を行い、 $\alpha(120)$  の有用性について検証した。これまでに解析したモデルを用いて、retrospective にこれまでの data を解析、ブドウ糖注入率の経過をシミュレーションすることにより、two-compartment model におけるインスリン作用指数 ( $\alpha$ ) が M 値に変わる新たなインスリン抵抗性を表す指標となり得る

かどうか検証した。具体的には、120分間クランプした際の $\alpha$  ( $\alpha$  (120)) とM値の比較を行い、 $\alpha$  (120)の有用性について検証した。

より短時間で信頼性の高い $\alpha$ を求めることが可能かどうか検討した。30分間クランプした際の $\alpha$  (30)と、60分間クランプした際の $\alpha$  (60)を算出し、それぞれ $\alpha$  (120)及びM値との関係について検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) インスリン作用と血糖値の関係を表すモデルより新たな指標の作成

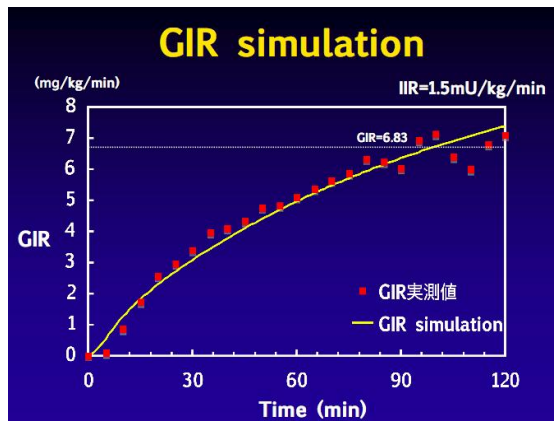


図3 モデルによるブドウ糖注入率のシミュレーション

赤点：ブドウ糖注入率(GIR)の実際の data  
黄線：今回作成したモデルでシミュレーションした際のブドウ糖注入率の予測図

図3に今回作成した two-compartment model によるブドウ糖注入率 (GIR)の予測と実測値を示す。 $\alpha$  (120)とM値の間には、相関係数 0.930 と有意の相関を認めた。また、 $\alpha$  (30) 及び $\alpha$  (60)とM値との相関係数は、それぞれ 0.642 及び 0.873 と有意の相関を認めた。

以上より、モデル解析から算出したインスリン作用指数は、M値と同様にインスリン抵抗性の指標として評価可能であり、クランプの時間を短縮できる可能性が示唆された。

##### (2) インスリン抵抗性指標 ( $\alpha$ ) によるインスリン抵抗性の評価

高インスリン正常域血糖クランプ法開始後、30分及び60分で算出した $\alpha$  (30)及び $\alpha$  (60)は、M値との間に相関係数  $r=0.635$  及び  $0.872$  と、いずれも有意の高い相関を認めた。このことより、高インスリン正常域血糖クランプ法開始後30分でもM値を推測することが十分に可能であるが、より精度を高めるためには、高インスリン正常域血糖クランプ法開始後60

分で算出した $\alpha$  (60)を用いることが望ましいと考える。以上、M値によらない、新たなインスリン抵抗性を表す指標 ( $\alpha$ ) の有用性が示された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計13件)

1. Oiso H, Furukawa N, Suefuji M, Shimoda S, Ito A, Furumai R, Nakagawa J, Yoshida M, Nishino N, Araki E. The role of class I histone deacetylase (HDAC) on gluconeogenesis in liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 404: 166-72, 2011(査読有)
2. Tsutsumi A, Motoshima H, Kondo T, Kawasaki S, Matsumura T, Hanatani S, Igata M, Ishii N, Kinoshita H, Kawashima J, Taketa K, Furukawa N, Tsuruzoe K, Nishikawa T, Araki E. Caloric restriction decreases ER stress in liver and adipose tissue in ob/ob mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 404: 339-44, 2011(査読有)
3. Kondo T, Sasaki K, Adachi H, Nakayama Y, Hatemura M, Matsuyama R, Tsuruzoe K, Furukawa N, Motoshima H, Morino (Koga) S, Yamashita Y, Miyamura N, Kai H, Araki E: Heat shock treatment with mild electrical stimulation safely reduced inflammatory markers in healthy male subjects. *Obesity Research and Clinical Practice* 4: e101-e109, 2010(査読有)
4. Nishioka H, Furukawa N, Shimoda S, Nishida K, Nakaura T, Maeda T, Goto R, Miyamura N, Awai K, Yamashita Y, Araki E: Predictors of coronary heart disease in Japanese patients with type 2 diabetes: Screening for coronary artery stenosis using multidetector computed tomography. *J Diabetes Invest* 1: 50-55, 2010(査読有)
5. 古川昇, 荒木栄一: 糖尿病地域医療連携パスにおける大血管障害の評価. *プラクティス* 27: 415-420, 2010(査読無)
6. 下田誠也, 西田健朗, 荒木栄一. インスリン療法の将来展望. *月刊糖尿病*. 1:117-123, 2009(査読無)
7. 古川昇, 末藤美星, 荒木栄一.  $\alpha$ リポ酸の薬理作用と臨床でのエビデンス. *内分泌・糖尿病科*. 28:151-155, 2009(査読無)
8. Nishida K, Shimoda S, Ichinose K, Araki

- E, Shichiri M. What is artificial endocrine pancreas? Mechanism and history. *World J Gastroenterol.* 15:4105-4110, 2009(査読有)
9. Xue B, Pulinilkunnil T, Murano I, Bence KK, He H, Minokoshi Y, Asakura K, Lee A, Haj F, Furukawa N, Catalano KJ, Delibegovic M, Balschi JA, Cinti S, Neel BG, Kahn BB. Neuronal protein tyrosine phosphatase 1B deficiency results in inhibition of hypothalamic AMPK and isoform-specific activation of AMPK in peripheral tissues. *Mol Cell Biol.* 29: 4563-73. 2009(査読有)
  10. Adachi H, Fujiwara Y, Kondo T, Nishikawa T, Ogawa R, Matsumura T, Ishii N, Nagai R, Miyata K, Tabata M, Motoshima H, Furukawa N, Tsuruzoe K, Kawashima J, Takeya M, Yamashita S, Koh GY, Nagy A, Suda T, Oike Y, Araki E. Angptl 4 deficiency improves lipid metabolism, suppresses foam cell formation and protects against atherosclerosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 379: 806-1, 2009 (査読有)
  11. 下田誠也, 西田健朗, 荒木栄一. 人工膵島 . モダンフィジシャン 28:244-246, 2008(査読無)
  12. Kojima K, Motoshima H, Tsutsumi A, Igata M, Matsumura T, Kondo T, Kawashima J, Ichinose K, Furukawa N, Inukai K, Katayama S, Goldstein BJ, Nishikawa T, Tsuruzoe K, Araki E. Rottlerin activates AMPK possibly through LKB1 in vascular cells and tissues. *Biochem Biophys Res Commun.* 376: 434-438, 2008(査読有)
  13. 古川 昇, 宮村信博, 村田雄介, 竹田佳代, 松吉亜紀子, 松村 剛, 榊田典治, 荒木栄一. インスリン自己免疫症候群の2例: サプリメント ( $\alpha$ リポ酸) により発症したと考えられる例および DRB1\*0404 (非 Glu74, 非 Ser37) を有した例 . ホルモンと臨床 56:158-164, 2008(査読無)
- [学会発表] (計20件)
1. Furukawa N, Oiso H, Suefuji M, Ito A, Furumai R, Nakagawa J, Toshida M, Nishino N, Araki E: Impact of class I histone deacetylase on gluconeogenesis in liver. The 3rd Insulin Resistance in Metabolic Disease Forum, 2010/11/21, ホテル日航福岡、福岡
  2. 大磯 洋, 古川 昇, 末藤美星, 伊藤昭博, 古米亮平, 中川純一, 吉田 稔, 西野憲和, 荒木栄一: 糖代謝に影響するヒストン脱アセチル化酵素のアイソフォームの同定. 第48回日本糖尿病学会九州地方会, 2010/10/29-2010/10/30, 別府ビーコンプラザ、大分
  3. 長瀬博美, 古川 昇, 河島淳司, 高野優, 下田誠也, 本島寛之, 福島英生, 荒木栄一, 猪原淑子: 医学生における糖尿病食試食体験のアンケート調査. 第48回日本糖尿病学会九州地方会, 2010/10/29-2010/10/30, 別府ビーコンプラザ、大分
  4. 前田貴子, 下田誠也, 後藤理英子, 水流添 覚, 古川 昇, 河島淳司, 西岡裕子, 坂本文比古, 荒木栄一: ARB/利尿薬合剤及びARB/CCB併用による2型糖尿病患者の糖代謝への影響. 第48回日本糖尿病学会九州地方会, 2010/10/29-2010/10/30, 別府ビーコンプラザ、大分
  5. Oiso H, Furukawa N, Suefuji M, Ito A, Furumai R, Nakagawa J, Yoshida M, Nishino N, Araki E: The Effect of a Newly Generated Histone Deacetylase Inhibitor on Gluconeogenesis in Liver. The 70th Annual Meeting of American Diabetes Association, 2010/6/25-2010/6/29, Orange Country Convention Center, Orlando, USA, Poster
  6. 後藤理英子, 下田誠也, 水流添 覚, 古川 昇, 河島淳司, 前田貴子, 西岡裕子, 坂本文比古, 荒木栄一: 高血圧合併2型糖尿病患者におけるARB/利尿薬合剤およびARB/カルシウム拮抗薬併用の有用性の検討. 第53回日本糖尿病学会総会, 2010/5/27-2010/5/29, 岡山コンベンションセンターほか、岡山
  7. Furukawa N, Oiso H, Suefuji M, Ito A, Furumai R, Nakagawa J, Yoshida M, Nishino N, Araki E. The role of histone deacetylase on gluconeogenesis in liver. 15th Korea-Japan Symposium of Diabetes Mellitus. 2009年11月19-21日, International Convention Center Jeju, Jeju island, Korea
  8. 前田貴子, 下田誠也, 古川 昇, 水流添 覚, 河島淳司, 後藤理英子, 宮村信博, 荒木栄一. 膵全摘による糖尿病患者の糖代謝における特徴. 第47回日本糖尿病学会九州地方会. 2009年10月23-24日、リーガロイヤルホテル小倉、北九州
  9. 西岡裕子, 古川 昇, 下田誠也, 西田健朗, 前田貴子, 後藤理英子, 宮村信博, 荒木栄一. MDCTを用いた2型糖尿病患者における冠危険因子の検討. 第47回日本糖尿病学会九州地方会. 2009年

- 10月23-24日リーガロイヤルホテル小倉、北九州
10. 後藤理英子, 下田誠也, 古川昇, 水流添 寛, 河島淳司, 前田貴子, 西岡裕子, 坂本文比古, 荒木栄一. 高血圧合併2型糖尿病患者におけるARB/利尿薬合剤の有用性の検討. 第47回日本糖尿病学会九州地方会. 2009年10月23-24日リーガロイヤルホテル小倉、北九州
  11. 西田健朗, 渡辺栄一郎, 岩下真一, 山田聡子, 下田誠也, 水流添 寛, 古川昇, 谷川富夫, 廣瀬豊樹, 丸山英樹, 荒木栄一. アキレス腱反射の定量化の試み. 第52回日本糖尿病学会総会. 2009年5月22-23日、大阪国際会議場、大阪
  12. 渡辺栄一郎, 西田健朗, 下田誠也, 水流添 寛, 古川昇, 廣瀬豊樹, 丸山英樹, 荒木栄一. 当院における外来での新規インスリン導入患者と入院での新規インスリン導入患者の比較検討. 第52回日本糖尿病学会総会. 2009年5月22-23日、大阪国際会議場、大阪
  13. 西岡裕子, 古川昇, 下田誠也, 西田健朗, 前田貴子, 後藤理英子, 荒木栄一. 糖尿病患者の冠動脈疾患スクリーニングにおけるMDCTの有用性の検討. 第52回日本糖尿病学会総会. 2009年5月22-23日、大阪国際会議場、大阪
  14. 大磯 洋, 古川昇, 末藤美星, 伊藤昭博, 古米亮平, 中川純一, 吉田 稔, 西野憲和, 荒木栄一. 新規ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬による糖代謝調節機序の解析. 第52回日本糖尿病学会総会. 2009年5月22-23日、大阪国際会議場、大阪
  15. 西岡裕子, 古川昇, 下田誠也, 西田健朗, 前田貴子, 後藤理英子, 荒木栄一. 糖尿病患者の冠動脈疾患スクリーニングにおけるMDCTの有用性の検討. 第106回日本内科学会総会. 2009年4月10-12日、東京国際フォーラム、東京
  16. 西田健朗, 下田誠也, 榊田典治. 分かりやすい人工臓器講座 「人工臍島とは」. 第46回日本人工臓器学会大会. 2008年11月27-29日六本木アカデミーヒルズ、東京
  17. 後藤理英子, 下田誠也, 古川昇, 水流添 寛, 西田健朗, 荒木栄一. 2型糖尿病患者におけるオルメサルタンの糖・脂質改善作用に関する検討. 第46回日本糖尿病学会九州地方会. 2008年10月10-11日、石橋文化センター、久留米
  18. 古川昇, 末藤美星, 松本和也, 大磯洋, 水流添 寛, 本島寛之, 竹田佳代, 荒木栄一. Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性プ

ロテインキナーゼによるインスリン遺伝子転写調節. 第46回日本糖尿病学会九州地方会. 2008年10月10-11日石橋文化センター、久留米

19. 古川昇, 阪口雅司, 福田一起, 宮村信博, 荒木栄一. 妊娠27週に劇症1型糖尿病を発症したが、満期経膈分娩にて出産し得た一例, PPAR $\gamma$ 活性誘導効果の関与. 第51回日本糖尿病学会総会. 2008年5月22-24日、東京国際フォーラム、東京
20. 末藤美星, 古川昇, 松本和也, 大磯洋, 水流添寛, 本島寛之, 村田雄介, 竹田佳代, 荒木栄一. インスリン遺伝子転写活性機構におけるカルシウム・カルモジュリン依存性プロテインキナーゼの関与. 第51回日本糖尿病学会総会. 2008年5月22-24日東京国際フォーラム、東京

〔図書〕(計3件)

1. 古川昇, 荒木栄一: DPP-4阻害薬のその他の作用. DPP-4阻害薬のすべて(清野裕編集)p80-85, 先端医学社, 2010
2. 荒木栄一, 下田誠也, 岩下晋輔: 人工臍島. 糖尿病ナビゲーター, p390-391 メディカルビュー社, 2010
3. 西田健朗, 下田誠也, 榊田典治: 糖尿病学の進歩 2009, 診断と治療社, 2009

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

古川 昇 (FURUKAWA NOBORU)

熊本大学・大学院生命科学研究部・講師  
研究者番号: 90335795

### (2) 研究分担者

下田 誠也 (SHIMODA SEIYA)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教  
研究者番号: 60398203