— Note —

Simplification of the Intravenous Glucose Tolerance Test (ivGTT) in Rats

Junji MIZOGUCHI, Shigeo YAMADA, Tsuneo OHTAKI
and Tomonori IMAMICHI*

*Hatano Research Institute Food and Drug Safety Center, 729-5 Ochiai,
Hadano-shi, Kanagawa-ken 257, Japan, and *Department of
Physiology, Nippon Veterinary and Zootechnical
College, Musashino-shi, Tokyo 180.*

(Received 19 March 1985 / Accepted 21 June 1985)

A simplified technique was established for the intravenous glucose tolerance test (ivGTT) in unanesthetized rats. In order to evaluate the relation between insulin secretion, glucose load and glucose disappearance rate, precatheterized rats were given glucose ranging in dose from 0.25 to 2.0 g/kg bw by intravenous injection. A highly linear correlation was observed in glucose disappearance rate during a period of 4–32 min. A glucose load greater than 0.5 g/kg bw induced a maximum response in insulin secretion. Small blood samples were collected using the orbital bleeding technique at 4, 16 and 28 minutes after a glucose load of 1.0 g/kg bw had been given and then T_{1/2}, the time taken for the glucose level to fall by one half, was calculated. The mean T_{1/2} was significantly longer in alloxan- or cyproheptadin-diabetic rats than that in the intact. These data indicate that a glucose load of 1.0 g/kg administered by intravenous injection with the T_{1/2} calculated between 4 and 32 minutes would provide an accurate means of assessing pancreatic endocrine function.

ブドウ糖の静脈内投与による簡便なラット耐糖能試験法

溝口 順二・山田 茂夫・大滝 恒夫
今道友則*

(財)食品薬品安全センター秦野研究所

* 日本獣医畜産大学生理学教室

サイプロヘプタジン[14], ストレプトゾトシン[3], フロリジン[12]などの大量投与では, 膵ランゲルハンス氏島B細胞(以下, ラ氏島)に障害を与えることが知られており, 薬物の毒性試験においても膵内分泌機能検査が必要とされることが多い。

ラ氏島が障害を受けた時にはインスリンの分泌不足に

よる糖代謝の異常が主な症状となるため, その診断に際しては糖負荷試験が最も簡単で有用な検査法とされている[4]。

糖負荷試験は一定量の糖質を負荷した後の過血糖の程度やその後の血糖値の推移から膵ラ氏島の障害の有無を判定する方法である。糖の負荷方法には経口法と非経口

法とがあるが、ヒトでは主にブドウ糖を経口的に投与する方法が用いられ、ラットなどの実験動物においても経口投与法が繁用されている[4, 8]。経口投与法は投与が容易である反面、検査に長時間を要することや、消化管からの糖吸収能の影響を受けるなどの不利な点もある。

薬物の毒性試験の一環として臓器機能検査を実施する場合には、反応が鋭敏で特異性が高いこと、動物に対する負荷が軽いことの他に大量の動物を短時間で検査できることなどが要求される。本報では、ブドウ糖の単回静脈内投与後の血糖値の半減時間から腓ラ氏島の障害の有無を判定する簡便なラット糖負荷試験法について検討した。

実験には日本チャールズリバーから購入した8週齢のSD系雄ラットを用いた。血糖値はグルコースB-テスト・ワコー（和光純薬工業）を用いて酵素法により、血中インスリン濃度をインスリン・I-125・キット（ミドリ十字）を用いたラジオイムノアッセイにより測定した。血糖値およびインスリン濃度の日内変動の影響をさけるため、実験を全て11時から15時の間におこなった。各実験群にはそれぞれ6ないし11匹のラットをあてた。結果は平均と標準誤差で表わし、Student's t-テストにより5%を有意水準とした。

まず正常ラットでのグルコース投与後の血糖値の経時的変化およびグルコース投与量とインスリン分泌量の関係について調べた。実験には以下に示したWeeksの方法[13]でカニユーレを装着したラットを用いた。実験の前日に、エール麻酔下で右鼠径部を切開し大腿動脈を露出した。神経、結合組織を剝離した後、血管壁に小切開を加えポリエチレンチューブ（PE10, 20, Clay Adams;

USA）で自作したカニユーレを先端が腹大動脈に達するまで約6 cm 挿入し結さつ固定した。カニユーレの他端を鼠径部の切開口から皮下に通し頸部から体表に露出させて固定した。実験に供するまでカニユーレの内部をヘパリン加生理食塩水で満たし、端を閉じた。手術には約4分間を要した。翌日、これらの動物に無麻酔下で尾静脈よりグルコース（Dグルコース、メルク）50%（w/v）溶液を投与した。グルコースの投与量は体重1 kg 当り0.25g（1群）、0.50g（2群）、1.00g（3群）、2.00g（4群）とした。投与後、0, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 28, 32, 36, 56, 88分目にヘパリン処理した注射筒を用い、カニユーレを通して120μl ずつ採血し、0°C下で6,000回転で10分間遠心分離して、得られた血漿中の血糖とインスリン値を測定した。

グルコースの投与により血糖は急激に上昇し、いずれの投与群においても2分目に最高濃度に達した（1群229.2±8.9, 2群361.3±10.9, 3群520.5±19.1, 4群763.5±28.4mg/dl）。その後は減少に転じたが2相性の減少経過をたどった。第1相は2分から36分までの急激に減少する部分で、第2相はそれに続く88分までの緩慢に減少する部分である。血糖値は第1の減少相をへて、36分目には1群で144.5±2.7, 2群で166.3±12.6, 3群で203.0±17.5, 4群で208.4±28.3mg/dl まで減少したが、この減少相では血糖の減少率と時間経過に直線関係が認められた。そこで最少二乗法により4分から32分までの血糖値の減少式を求めたところ、どの群の減少経過も一次式で表わされ全変動の約97%がこの理論式で説明された。Table 1 A には1.0mg/kg 投与群の減少式を示した。この減少式から血糖値が半分になる時間

Table 1. Blood glucose regression line and T 1/2 calculated by the method of least squares after a 1.0g/kg bw glucose load

(A) Multiple sampling by A. abdominal catheterization.

No.	Y =	aX + b	r	T 1/2 (min)
1	Y =	-10.5X + 555	-0.99	24.5
2	Y =	-11.6X + 533	-0.99	21.0
3	Y =	- 9.7X + 484	-0.99	24.3
4	Y =	- 8.3X + 465	-0.99	27.6
5	Y =	- 6.0X + 454	-0.99	36.1
6	Y =	- 7.1X + 472	-0.98	31.1
Mean ± S. E. of T 1/2				27.4 ± 2.2

Values were calculated between 4 and 32 min.

(B) Triple samling by orbital vein puncture.

No.	Y =	aX + b	r	T 1/2 (min)
1	Y = -13.1X + 555		-0.99	19.2
2	Y = -12.2X + 524		-0.99	19.5
3	Y = -11.3X + 536		-0.99	21.8
4	Y = -10.7X + 506		-0.99	21.6
5	Y = -9.5X + 555		-0.99	27.2
6	Y = -8.4X + 448		-0.99	24.8
7	Y = -8.0X + 515		-0.99	30.4
8	Y = -9.5X + 522		-0.96	25.6
9	Y = -11.7X + 485		-0.94	18.7
10	Y = -6.9X + 555		-0.94	38.1
11	Y = -6.2X + 480		-0.94	36.7
Mean $\pm$ S. E. of T 1/2				25.8 $\pm$ 2.0

Values were calculated for 4, 16 and 28 min.

(T1/2) を求めたところ 1 群 42.3 ± 2.1 分, 2 群 28.8 ± 0.7 分, 3 群 27.4 ± 2.2 分, 4 群 21.5 ± 1.5 分であった。

血中インスリン濃度は血糖の上昇に伴って急激に増加し 2 分目には最高濃度に達したが, インスリン濃度の有意な増加 ($p < 0.05$) は血糖が急激に減少した第 1 の減少相に相当する時期においてのみみられ, グルコース投与後 36 分目にはほぼ投与前の濃度に戻った。グルコースを 0.5g/kg 以上投与した群でのインスリンの最高濃度および 36 分間の総放出量に有意差はなかった。

つぎにカニューレにより腹大動脈から頻回に採血した場合と, 眼窩静脈叢から 3 回のみ採血した場合について半減時間を比較した (Table 1 B)。後者においてはグルコース 1.0g/kg を投与した後 4, 16, 28 分目に外径 1.6 mm のガラス毛细管を用いて Riley の方法 [9] により無麻酔下で眼窩静脈叢から採血した。この場合の血糖値の減少経過も, カニューレにより頻回に採血した場合と同様に一次式で表わされ, またそれから求めた半減時間も 25.8 ± 2.0 分とカニューレにより頻回に採血して求めた場合の 27.4 ± 2.2 分と差がなかった。

そこでグルコース 1.0g/kg を静脈内投与した後 4, 16, 28 分目に眼窩静脈叢から採血する方法により膵内分泌機能の異常が検出できるか否かを調べた (Fig. 1)。実験的膵内分泌機能障害ラットの作出にはサイプロヘプタジン 10mg/kg の 14 日間経口投与, あるいはアロキサン 40mg/kg の単回静脈内投与によった。サイプロヘプタジンは膵ラ氏島に空胞変性を [14], アロキサンは壊死をおこすことが知られている [5]。膵内分泌機能障害群

での半減時間は, サイロヘプタジン群で 85.6 ± 10.9 分, アロキサン群では 192.2 ± 60.0 分と正常群より有意に延長した。各群のグルコース投与前のインスリン濃度には差がなかったが, サイプロヘプタジン群, アロキサン群ではグルコースを投与してもインスリン濃度はほとんど上昇しなかった。

内分泌機能試験では本来目的とするホルモンを直接測定すべきであるが, 測定が困難であることなどからホルモンの標的器官の変化をパラメーターとする場合が多い。血糖値がインスリンの動態を把握するための良いパラメーターであることは, 本実験において観察されたように, 膵ラ氏島障害ラットではグルコース投与後の血糖値の半減時間が有意に延長したことからも明らかである。

投与されたグルコースは, 膵ラ氏島の B 細胞を直接刺激してインスリンの分泌を促す [2]。ラットでのグルコースの単回静脈内投与では, 0.5g/kg 以上であればインスリンの最大分泌反応を引き起すことが知られた。しかしインスリンの分泌は, 膵ラ氏島に対する血糖値のフィードバック作用のみで調節されているのではなく, 胃腸ホルモン [1] や自律神経 [11] などの関与もおおきい。このことはグルコースの経口投与では静脈内へ投与した時よりもより多くのインスリン分泌を促すことでも明らかであるが [7], グルコースを静脈内に投与する本法ではこれらの影響をさけることができる。

ヒトでの静脈内投与による糖負荷試験には Lundback や Roger らの方法がある [6, 10]。これはグルコース

Fig. 1. Blood glucose regression lines and insulin secretory responses to glucose during 28 min after intravenous glucose load (1.0 g/kg) in intact and in diabetic rats. Values are means $\pm$ S. E. of 7-11 determinations. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ compared with intact.

25g を静脈内投与後、経時的に採血し片対数グラフ上に描かれる血糖値の減衰直線より減衰係数を求め比較する方法であるが、糖負荷後の血糖値は指数函数的下降経過をとるため10分間隔で6回の採血が必要である[6]。しかしラットにおいては本実験で明らかなように、グルコース投与後4分から32分までの血糖値の減少経過は直線式で表わされた。従ってこの間の任意な時間に3回採血することにより容易に血糖の半減時間を算出できた。また動脈、静脈いずれから採血しても半減時間に差はなかった。

静脈内投与による糖負荷試験の利点としては、短時間で済むこと、消化管からの糖吸収能の影響がないことなどのほかに、糖同化能を係数化できることが挙げられている。今回の実験においても、サイプロヘプタジン 1 mg/kg 投与群での半減時間は 35.0 ± 6.6 分であったが、投与量を 10mg/kg に増やすと半減時間も 85.6 ± 10.9 分に延長した。したがって本法においても膵ラ氏島の障害を段階的に評価し得る可能性がある。通常われわれはグルコース 1.0g/kg を静脈内投与した後の血糖の半減時間が正常ラットの平均 $\pm$ 標準偏差 $\times$ 2倍の範囲からはず

れたときには、その動物の膵内分泌機能には異常があると診断している。

(本論文の概要は、第17回日本実験動物学会で発表した。)

要 約

ブドウ糖をラットの静脈内に投与したあとの血糖の半減時間 ($T_{1/2}$) から判定する簡便な耐糖能試験法について検討した。ブドウ糖投与後の血糖の変化を留置カニューレ装着ラットをもちいて調べた。血糖は糖の投与後2分目に最高濃度に達したあと減少に転じたが、4分から32分までの減少経過は一次式で表わされた。インスリンの最大分泌反応のみられたブドウ糖 1.0g/kg を投与したあと 4, 16, 28分目に眼窩静脈叢から採血し、得られた血糖の減少式から半減時間を求めたところ 25.8 ± 2.0 分であった。この方法によりアロキサンおよびサイプロヘプタジン投与による実験的膵内分泌障害ラットの半減時間を比較したところ、いずれも正常群より有意に延長した。

文 献

- [1] Brown, J. C., Dryburgh, J. R., Ross, S. A., and Dupre, J. (1975). *Recent. Prog. Horm. Res.* **31**, 295-319.
- [2] Donald, L. C., Leslie, L. B., and Gerold, M. G. (1968). *Endocrinol.*, **83**, 572-584.
- [3] Junod, A., Lambert, A. E., Stauffacher, W., and Renold, A. E. (1969). *J. Clin. Invest.*, **48**, 2129-2139.
- [4] 葛谷信貞 (1970). 糖尿病, **13**, 1-7.
- [5] Lukens, F. D. W. (1948). *Physiol. Rev.*, **28**, 304-330.
- [6] Lundback, K. (1962). *Brit. Med. J.*, **2**, 1507-1513.
- [7] McIntyre, N., Holdsworth, C. D., and Turner, D. S. (1965). *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **25**, 1317-1324.
- [8] National Diabetes Data Group (NIH). (1979). *Diabetes*, **28**, 1039.
- [9] Riley, V. (1960). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **14**, 751-754.
- [10] Roger, L. L., and Daniel, P. Jr. (1971). *J. Clin. Endocrinol.*, **33**, 409-417.
- [11] Steffens, A. B. (1975). *Am. J. Physiol.*, **226**, 1738-1744.
- [12] Wintero, R. W., Shultz, R. B., and Krehl, W. A. (1952). *Endocrinol.*, **50**, 388-398.
- [13] Weeks, J. R., and Jows, J. A. (1960). *Proc. Soc. Biol. Med.*, **104**, 646-648.
- [14] Wold, J. S., Longnecker, D. S., and Fischer, L. J. (1971). *Tox. Appl. Pharmacol.*, **19**, 188-201.