

〔原著〕 NIDDM モデル・ラット及びグルコルチコイド 投与ラットにおけるインスリン抵抗性の研究

岩 岡 秀 明*

(平成3年12月3日受付, 平成3年12月11日受理)

要 旨

In vivo と in vitro の両面からモデル・ラットにおけるインスリン抵抗性の機序を検討した。グルコルチコイド投与ラット (Dex 群) は, 7~9 週齢の SD 系ラットにデキサメサゾン (Dex) を皮下注射し, 1 日投与群 (Dex 1), 2 日投与群 (Dex 2), を作製した。生後 2 日目の SD 系ラットに streptozotocin を腹腔内投与し, NIDDM モデル・ラット (DM 群) を作製した。グルコース・クランプ法は, 麻酔下に大腿動・静脈にカテーテルを留置し, 静脈側から微量注入ポンプにてインスリンとブドウ糖を注入し, 動脈側から 5 分毎に血糖値を測定し glucose disposal rate (GDR) を求めた。また $[3\text{-}^3\text{H}]\text{-glucose}$ を同時注入し肝の糖産生を求めた。PDE (insulin-sensitive phosphodiesterase) 活性化系は, 副睾丸脂肪組織より得た遊離脂肪細胞を用い PDE 活性を測定した。Dex 群: Dex 1 では少量インスリン投与時のみ末梢組織 (主に筋肉) の糖利用の低下と肝の糖産生抑制の低下が認められたが, 脂肪細胞での抵抗性はなかった。Dex 2 では少量, 大量インスリン投与時共末梢組織および肝の抵抗性に加えて脂肪細胞での抵抗性を認めた。DM 群: GDR, PDE 活性共にコントロールと有意差を認めなかった。以上より Dex 群のインスリン抵抗性は投与期間・標的臓器毎に異なる事が明らかとなった。またこの NIDDM モデル・ラットにインスリン抵抗性は認めず, 耐糖能低下はインスリン分泌の障害が主であると考えられた。In vivo グルコース・クランプ法と in vitro PDE 活性化系の組み合わせは, 種々のモデル・ラットのインスリン抵抗性の検討に有用であることが明らかとなった。

Key words: Glucose clamp study, Insulin-sensitive phosphodiesterase, Glucocorticoid, NIDDM model rats,

略語一覧: NIDDM: Non-insulin dependent diabetes mellitus, PDE: Phosphodiesterase, Dex: Dexamethasone, FPG: Fasting plasma glucose, GDR: Glucose disposal rate, MCR: Metabolic clearance rate of glucose

I. 緒 言

インスリン非依存型糖尿病 (以下 NIDDM) の成因として, インスリン分泌の低下とともにインスリン抵抗性^{1,2)}があげられている。この抵抗性を評価する方法と

して以前から種々の方法が考案されているが, DeFronzo らにより臨床応用された euglycemic hyperinsulinemic clamp³⁾ (以下グルコース・クランプ法) は, in vivo における優れた方法として現在広く用いられている。この方法の原理は, 一定量のインスリンを注入し血中インス

* 千葉大学医学部内科学第二講座

Hideaki IWAOKA: Analysis of Insulin Resistance in Glucocorticoid Treated and NIDDM Model Rats Using Glucose Clamp and Phosphodiesterase Activation Method.

Second Department of Internal Medicine, School of Medicine, Chiba University, Chiba 260.

Received December 3, 1991. Accepted December 11, 1991.

リン濃度がある値に保つ条件下で、血糖値を基礎値に維持するようにブドウ糖を注入すると、このブドウ糖注入量 (mg/kg/min) が *in vivo* におけるインスリン感受性を示す指標となるというものである。この注入量は全身の末梢組織 (主に筋肉) のブドウ糖利用を表す。また、 $[3-^3\text{H}]$ -ブドウ糖を同時注入することにより肝臓でのブドウ糖産生量を知ることができる⁴⁾。

一方、*in vitro* におけるインスリン抵抗性の研究としては現在、インスリンがレセプターに結合した後の障害が重要視されている。このポスト・レセプター障害を評価する指標の一つとして *insulin-sensitive phosphodiesterase* 活性^{5,6)} (以下 PDE 活性) があげられる。インスリンはレセプターに結合後何らかの *second messenger* を介し、脂肪細胞の膜結合性 *low Km cyclic AMP* PDE を活性化する。PDE により *cyclic AMP* が低下し、*hormone sensitive lipase* の活性を抑制することにより *antilipolytic action* を示す。この PDE 活性化系は、インスリンにより速やかに活性化される事より、インスリン作用の *cascade* の中でも初期の段階に位置しており、ポスト・レセプター障害のうちでも早期の段階の解析に有用である。牧野らは、この PDE 活性化系を用いてすでに、ストレプトゾトシン糖尿病ラット⁷⁾・KK マウス⁸⁾・肥満ラット¹⁰⁾等についてインスリン抵抗性を検討し、敏感にその病態を反映することを明らかにしてきた。

グルココルチコイド投与による耐糖能異常およびインスリン抵抗性は広く知られているが、その機序については未だ充分わかっていない。グルココルチコイドの過剰は、肝の糖産生を増加させ、末梢組織の糖利用を減少させる¹¹⁾ことは一般に認められているが、どのようなメカニズムによってインスリン作用に拮抗するのかは、充分理解されていないのが現状である。

たとえば、グルココルチコイド投与時のインスリンのレセプターへの結合能については、多数の報告があるが、その結果は、グルココルチコイドの種類・投与期間・対象となる組織・*in vivo* か *in vitro* かの違い等によってさまざまであり、レセプター結合後の異常が重要視されている¹²⁻¹⁷⁾。最近、このレセプター結合後の異常は細胞膜上の *glucose transporter* が減少することによって引き起こされるという報告¹⁸⁾がある。一方、最近 Stojanovska らはデキサメサゾン投与ラットにおける検討から、インスリン抵抗性は末梢組織のインスリン作用の減少ではなく、肝における一過性の糖産生増加に基づくという成績¹⁹⁾を発表している。

一方、Weir らが報告した新生児ストレプトゾトシン

糖尿病ラット^{20,21)}は新しい NIDDM モデル・ラットの1つと考えられている。生後2日目に少量のストレプトゾトシンを腹腔内投与することにより膵ランゲルハンス島のB細胞の部分的再生がおこり、生後6週目以降高血糖が出現してくる。このモデル・ラットのブドウ糖に対するインスリン分泌は著明に障害されているが、アルギニンに対する反応は保たれている。この点はヒトの NIDDM の特徴²²⁾と合致している。このモデル・ラットにおけるインスリン抵抗性についての検討では、脂肪細胞で抵抗性がみられるという報告²³⁾と、肝臓においてむしろ感受性が亢進しているという報告²⁴⁾があり評価が一定していない。

今回の研究の目的は、このグルコース・クランプ法と PDE 活性化系を用いて *in vivo*, *in vitro* の両面からグルココルチコイド投与ラットおよび NIDDM モデル・ラットにおけるインスリン抵抗性を検討することである。

II. 対象および方法

実験はすべて12時間の絶食後、午前9時から開始した。実験用のラットは日本エスエルシー株式会社 (静岡) から購入した。全てのラットは人工照明下に標準固形飼料および水を自由に摂食させて飼育した。

①グルココルチコイド投与ラット

生後7~9週齢の Sprague-Dawley (以下 SD) 系雄ラットにデキサメサゾン $400\mu\text{g/kg/day}$ 皮下注射し、デキサメサゾン1日投与群 (以下 Dex 1 群)、デキサメサゾン2日投与群 (以下 Dex 2 群) を作成した。無処置のラットをコントロール群として使用した。デキサメサゾン投与は毎日午後6時に行った。

②NIDDM モデル・ラット Weir らの方法²⁰⁾に準じ生後2日目の SD 系雄ラットに、pH 4.5, 0.1M クエン酸緩衝液に溶解したストレプトゾトシン 65mg/kg を腹腔内注射し作成した。コントロール群は同量の緩衝液のみ注射した。7~9週齢に腹腔内ブドウ糖負荷試験 (2g) を行い50分後の血糖値が 350mg/dl 以上のラットをモデル・ラットとして使用した。

③グルコース・クランプ法

グルコース・クランプ法は Leturque らの方法²⁵⁾に準じて行った。ペントバルビタール麻酔下 ($5\text{mg}/100\text{g}$ 腹腔内投与) でラットの大腿動・静脈にカテーテルを挿入した。動脈側から採血し、静脈側からインスリン・ブドウ糖・ $[3-^3\text{H}]$ -ブドウ糖を持続注入した。体温は $36\sim 37^\circ\text{C}$ に維持し、呼吸合併症を避けるため気管切開を施行した。ペントバルビタール麻酔および外科的侵襲は一

過性に血糖値を上昇させるため、実験は麻酔開始後30分以上経過し血糖値が定常状態に戻るのを待って開始した。200 μ l の採血を行い、基礎時の血糖値とインスリン濃度を測定した。

インスリン (porcine monocomponent actrapid insulin, Novo, Denmark) は1%の牛血清アルブミン (Sigma, St. Louis, MO, USA) を含む0.9%の生理食塩水に溶解し20 μ l/min の速度で注入し、血糖値を基礎状態にクランプするようにブドウ糖溶液 (5~20%) の注入量を調節した。インスリンおよびブドウ糖は微量注入ポンプ (日音, 日本) から注入した。インスリン注入量は low dose insulin infusion (5 mU/kg/min) および high dose insulin infusion (40 mU/kg/min) の2点についてグルコース・クランプ法を施行した。5分毎に20 μ l 採血し、すぐに微量遠沈器により血漿分離し、血糖値を測定した (Beckman glucose analyser 2, USA)。

実験時間は約90分であり、インスリン注入開始後約60分でブドウ糖注入量は一定となった。最後の30分間のブドウ糖注入量の平均値を glucose disposal rate (GDR) とした。またブドウ糖利用は血糖値に依存するため、異なる血糖値間での比較をする際の指標として metabolic clearance rate of glucose (MCR) を使用した。MCR は GDR を血糖値で割ることにより求めた。最後の10分間に5分毎に200 μ l ずつ採血し、後述するブドウ糖の specific activity と定常状態 (steady state) のインスリン濃度を測定した。採血による体液量減少を防ぐため、採血毎に同量の生理食塩水を注入した。

④肝臓におけるブドウ糖産生

基礎時およびクランプ時の肝のブドウ糖産生は、[3- 3 H] ブドウ糖 (New England Nuclear Corp. Boston, MA, USA) の持続注入により算出した⁴⁾。最初に4 μ Ci を priming dose として静注し、その後0.2 μ Ci/min で持続静注した。ブドウ糖の specific activity は、基礎時およびクランプ時共に約60分間で定常状態となった。この状態ではブドウ糖の出現率 (rate of glucose appearance) と消失率 (rate of glucose disappearance) は等しくなる。この値は [3- 3 H] ブドウ糖の注入率 (dpm/min) を定常状態のブドウ糖の specific activity (dpm/mg) で割ることにより算出できる。基礎時の肝のブドウ糖産生は、このブドウ糖出現率に等しい。

グルコース・クランプ時の肝のブドウ糖産生は、ブドウ糖出現率から GDR を引くことにより算出した。

⑥ブドウ糖の specific activity およびインスリンの測定法

ブドウ糖の specific activity は血液を、Ba (OH)₂・

ZnSO₄ で除蛋白後、すぐに遠沈し、上清を、glucose oxidase 法によりブドウ糖濃度の測定に使用し、残りの aliquot は70°C で希釈水を蒸発させ、乾燥した残渣を0.2ml の水に溶解し、10ml の ACS 11 (Amersham, UK) を用い液体シンチレーション・カウンターで測定した。

インスリン測定用の血液は、4°C で遠沈し血漿を-20°C で凍結保存した。インスリンの測定は、Phadebes Insulin Test (Pharmacia Diagnostos AB, Uppsala, Sweden) を用いるラジオイムノアッセイにより測定した。

⑥インスリン感受性 PDE の測定

ラットの脂肪細胞はコラゲナーゼ法を用いて副睾丸脂肪組織から単離した。脂肪細胞は直ちに2%牛アルブミンを含む Krebs-Henseleit-Hepes buffer, pH 7.4 (KR-HA buffer) 中で、インスリンあるいは、KRHA buffer のみで、37°C にてインキュベートした。プレインキュベーションは10分間行った。インスリンと10分間インキュベーションした後、脂肪細胞を0.25M sucrose 10mM Tesbuffer (pH 7.0) で2回洗浄した後、Dounce tissue grinder (Type B) でホモゲナイズ、4000 $\times$ g で10分間遠沈し、上清をさらに30000 $\times$ g で30分間遠沈して得られたペレットを Kono らの報告⁵⁾に従って粗ミクロゾーム分画とし、この分画の PDE 活性を測定した。PDE 活性の測定は Kono らの方法⁵⁾により行った。すなわちサンプルを0.1 μ M の cyclic 3 H AMP (RCC, Amersham, UK) とともに30°C で5分間インキュベートし、生じた 3 H-AMP を蛇毒の 5'-nucleotidase にて 3 H adenosine に分解、これを AG1-x2 (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) のカラムクロマトグラフィーにて分解、液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測定して求めた。蛋白の測定は結晶化牛血清アルブミンを標準として Lowry らの方法²⁶⁾により行った。

⑦特異的インスリン結合の測定

遊離脂肪細胞に対する特異的インスリン結合は、脂肪細胞と [125 I] -インスリン (New England Nuclear Corp, Boston, MA, USA) を種々の濃度の非標識インスリンと共に KRHA buffer 中で、24°C, 1時間振とう後、Gammeltoft and Gliemann²⁷⁾ の方法に準じて、[125 I] -インスリン結合を分離測定した。すなわち、1時間のインキュベーション後、脂肪細胞を含むメディアム200 μ l をとり、フタル酸ジノリルを100 μ l 入れたマイクロチューブに移し、直ちに1000rpm, 30秒遠沈した。中間のオイル層でマイクロチューブを切断し、細胞層の放射活性をガンマカウンターにて計測した。その際、過

表 1. グルコース・クランプ法におけるコントロール群, デキサメサゾン投与群の特徴

	Insulin Infusion	N	BW (g)	FPG (mg/dl)	BPI (μ U/ml)	SSPI (μ U/ml)
Control	Low	7	194 $\pm$ 4.3	129 $\pm$ 9.1	36 $\pm$ 5.9	187 $\pm$ 18
	High	6	213 $\pm$ 8.4	152 $\pm$ 9.4	50 $\pm$ 11	2101 $\pm$ 279
Dex. 1 day	Low	6	200 $\pm$ 10	152 $\pm$ 5.8	45 $\pm$ 6.6	150 $\pm$ 13
	High	5	204 $\pm$ 10	146 $\pm$ 7.9	61 $\pm$ 10	1498 $\pm$ 116
Dex. 2 days	Low	5	210 $\pm$ 5.5	169 $\pm$ 9.9*	71 $\pm$ 18	232 $\pm$ 16
	High	6	187 $\pm$ 3.7*	185 $\pm$ 10*	73 $\pm$ 11	2025 $\pm$ 228

Values are means $\pm$ SEM. * $p < 0.05$ vs Control

BW: 体重, FPG: 空腹時血糖値, BPI: 基礎時のインスリン値, SSPI: クランプ時のインスリン値, Dex. 1 day: デキサメサゾン1日投与群, Dex. 2 days: デキサメサゾン2日投与群
デキサメサゾン2日投与群の high dose 時の体重が有意に低値を, low dose, high dose 時の空腹時血糖値が有意に高値を示した。

剰の非標識インスリン (28 μ M) 存在下での [125 I] -インスリン結合を非特異的インスリン結合 (全結合の4~20%) として差し引いた。また, TCA 法で測定した [125 I] -インスリンの分解は, 24°C 1時間で5%以下であった。

⑧統計学的検討

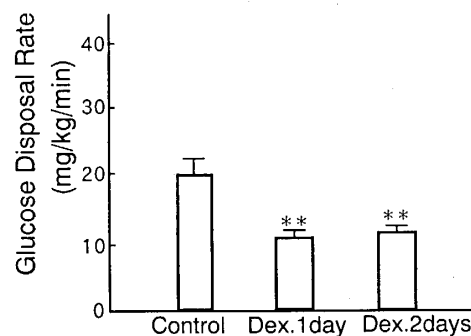
結果は means $\pm$ SE で示した。統計学的有意差の検定は unpaired Student's t test を用いた。

III. 結 果

①グルココルチコイド投与ラット

表1に, グルコース・クランプ法におけるコントロール群, Dex 1 群, Dex 2 群の基礎データを示す。体重は, Dex 2 群の high dose insulin (40mU/kg/min) で有意に低値を示した ($p < 0.05$)。空腹時血糖値 (FPG) は, Dex 2 群の low dose insulin (5mU/kg/min), high dose insulin とともに有意に高値を示した ($p < 0.05$)。basal plasma insulin (BPI) は, 有意差はなかったが, Dex 投与により上昇する傾向がみられた。steady state plasma insulin (SSPI) は, low dose insulin では約150~200 μ U/ml, high dose insulin では約1500~2000 μ U/ml と3群間に有意差を認めなかった。図1に GDR の結果を示す。上段の low dose 時は, コントロール群20.2 $\pm$ 1.6mg/kg/min に比し, Dex 1 群10.5 $\pm$ 0.9, Dex 2 群11.5 $\pm$ 0.6といずれも有意に低値を示した ($p < 0.01$)。一方, 下段の high dose 時は, コントロール群34.0 $\pm$ 3.3mg/kg/min, Dex 1 群30.4 $\pm$ 2.1と差がなく, Dex 2 群のみ23.5 $\pm$ 2.6と有意に低値を示した ($p < 0.05$)。図2に MCR の結果を示す。GDR と同様に上段の low dose 時は, コントロール群15.7 $\pm$

A Low Dose Insulin Infusion (5mU/kg/min)



B High Dose Insulin Infusion (40mU/kg/min)

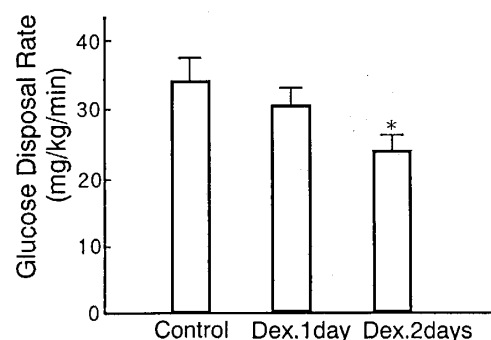


図 1. グルコース・クランプ法におけるコントロール群, デキサメサゾン1日投与群, デキサメサゾン2日投与群の glucose disposal rate

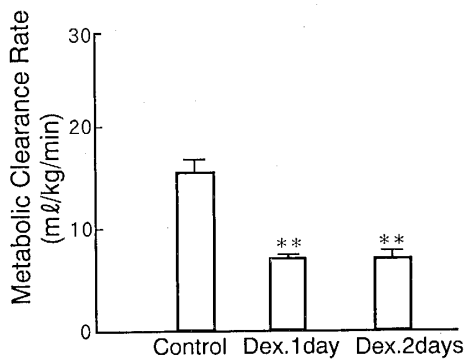
* $p < 0.05$ vs Control

** $p < 0.01$ vs Control

1.2ml/kg/min に比し, Dex 1 群7.0 $\pm$ 0.6, Dex 2 群7.0 $\pm$ 0.6といずれも有意に低値を示した ($p < 0.01$)。

下段の high dose 時は, コントロール群22.3 $\pm$ 1.4 ml/kg/min, Dex 1 群20.6 $\pm$ 0.7と差がなく, Dex 2

A Low Dose Insulin Infusion (5mU/kg/min)



B High Dose Insulin Infusion (40mU/kg/min)

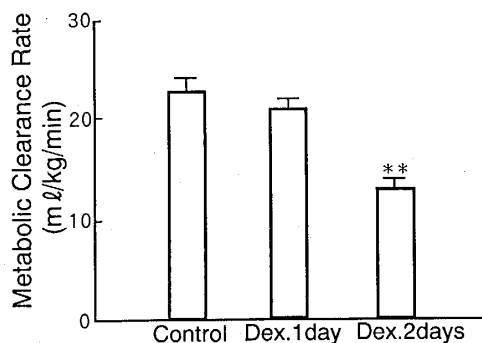


図 2. グルコース・クランプ法におけるコントロール群, デキサメサゾン1日投与群, デキサメサゾン2日投与群の metabolic clearance rate

** $p < 0.01$ vs Control

群のみ 12.8 ± 1.3 と有意に低値を示した ($p < 0.01$)。図3に肝のブドウ糖産生を示す。白抜きは基礎時の糖産生を, 斜線はグルコース・クランプ時の糖産生を示す。基礎時の糖産生は, デキサメサゾン投与により漸増した。斜線部/白抜き部で表される, インスリンによる糖産生の抑制効果は, Dex 1 群は low dose 時の抑制は不良であるが, high dose 時はコントロール群とほぼ同様に抑制された。一方, Dex 2 群は low dose, high dose 時とも抑制が不良であった。

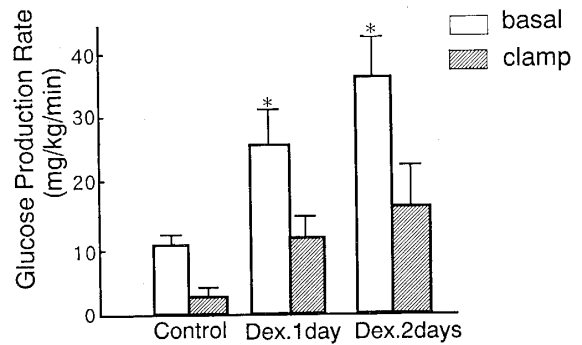
図4は PDE 活性である。図左の Dex 1 群はコントロール群と差がなかったが, 図右の Dex 2 群はコントロール群に比し各インスリン濃度で有意に低下がみられた ($p < 0.001$)。

また特異的インスリン結合はコントロール群 $4.7 \pm 0.3\%$ に比し, Dex 1 群 $3.3 \pm 0.2\%$, Dex 2 群 $2.9 \pm 0.2\%$ と共に有意に低下していた ($p < 0.05$)。

②NIDDM モデル・ラット

表2に, グルコース・クランプ法におけるコントロー

A Low Dose Insulin Infusion (5mU/kg/min)



B High Dose Insulin Infusion (40mU/kg/min)

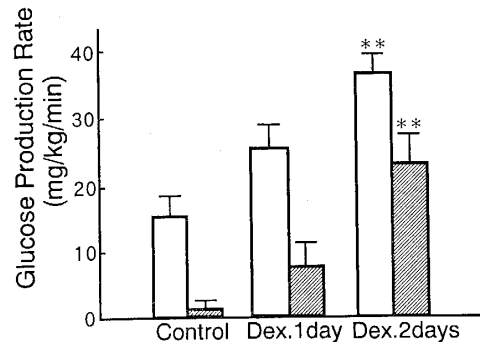


図 3. グルコース・クランプ法におけるコントロール群, デキサメサゾン1日投与群, デキサメサゾン2日投与群の肝の glucose production rate

* $p < 0.05$ vs Control

** $p < 0.01$ vs Control

ル群および NIDDM モデル・ラット群 (以下 DM 群) の基礎データを示す。FPG は DM 群の low dose のみ 222 ± 25 mg/dl と有意に高値を示した ($p < 0.05$)。BPI, SSPI はいずれも両群間で差がみられなかった。図5に GDR を示す。上段の low dose 時はコントロール群 9.4 ± 1.0 mg/kg/min, DM 群 14.5 ± 3.3 , 下段の high dose 時もコントロール群 26.9 ± 2.3 , DM 群 33.4 ± 4.1 といずれも有意差を認めなかった。

図6に MCR を示す。GDR と同様に low dose 時, コントロール群 6.6 ± 0.6 ml/kg/min, DM 群 6.8 ± 1.8 , high dose 時, それぞれ 18 ± 1.6 , 20.7 ± 1.9 といずれも有意差を認めなかった。

図7は PDE 活性である。各インスリン濃度にてコントロール群と DM 群とに差を認めなかった。

IV. 考 察

①グルココルチコイド投与ラット

デキサメサゾン1日投与におけるインスリン抵抗性

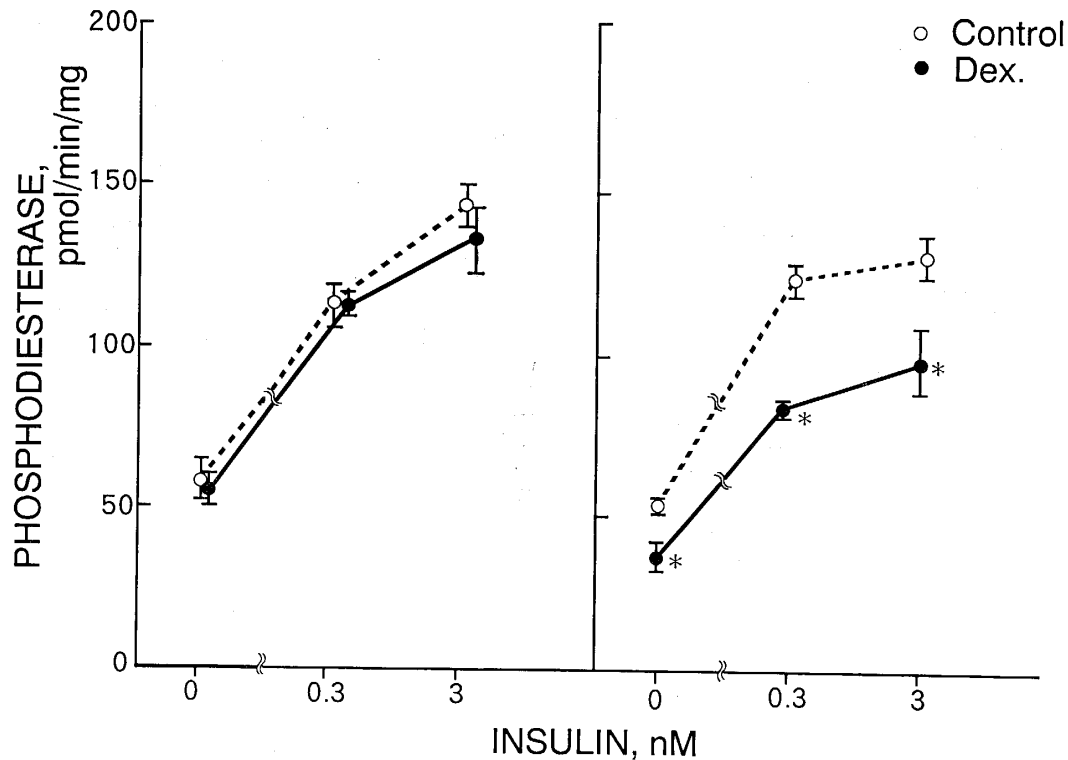


図 4. 脂肪細胞におけるコントロール群, デキサメサゾン投与 1 日群, デキサメサゾン投与 2 日群の insulin-sensitive phosphodiesterase 活性

* $p < 0.001$ vs Control

表 2. グルコース・クランプ法におけるコントロール群, 糖尿病群の特徴

	Insulin Infusion	N	BW (g)	FPG (mg/dl)	BPI (μ U/ml)	SSPI (μ U/ml)
Controls	Low	8	220 $\pm$ 8.6	141 $\pm$ 6	38 $\pm$ 5.7	123 $\pm$ 15
	High	6	210 $\pm$ 11	139 $\pm$ 11	36 $\pm$ 6.2	2659 $\pm$ 430
Diabetics	Low	5	210 $\pm$ 13	222 $\pm$ 25*	32 $\pm$ 3.5	141 $\pm$ 22
	High	4	220 $\pm$ 7.5	161 $\pm$ 14	44 $\pm$ 7.7	2432 $\pm$ 192

Values are means $\pm$ SEM. * $p < 0.05$ vs Controls

BW: 体重, FPG: 空腹時血糖値, BPI: 基礎時のインスリン値, SSPI: クランプ時のインスリン値
糖尿病群の low dose 時のみ FPG が有意に高値を示した。

は, low dose でのみ認められ末梢組織 (主に筋肉) の糖利用の低下と肝における糖産生抑制効果の低下が主であり, 脂肪細胞レベルでのインスリン抵抗性はみられなかった。一方, デキサメサゾン 2 日投与時は, 末梢組織の糖利用の低下, 肝の糖産生抑制効果の低下に加えて, 脂肪細胞のポストレセプターの障害も出現することが分かった。2 日目の結果は, 従来のヒトにおけるグルコース・クランプ法の報告^{11,15)}と一致する。しかしながら, この結果は, 最近の Stojanovaska らの報告¹⁹⁾と異なる。彼女らは, SD 系ラットにデキサメサゾン 10 μ g/day を 6 時間, 48 時間, 96 時間投与し, 覚醒状態でブドウ糖経

口投与試験を行い, double isotope 法によりインスリン抵抗性の検討をしている。その成績によると, デキサメサゾンによるインスリン抵抗性は 6 時間後から出現し, 48 時間まで持続したが, 96 時間後には正常に戻ったとしている。そしてこのインスリン抵抗性は, 全て肝の糖産生の増大に由来し末梢組織の糖利用には有意な変化はなかったとのべている。今回の成績との差異の原因として, ブドウ糖の投与経路の違いが考えられる。本研究は, 持続静注であり, 彼女らは, 経口投与である。Ishida らの犬における検討²⁸⁾では, ブドウ糖を経口投与した場合は, 肝におけるブドウ糖の uptake は, 68 $\pm$ 4 %

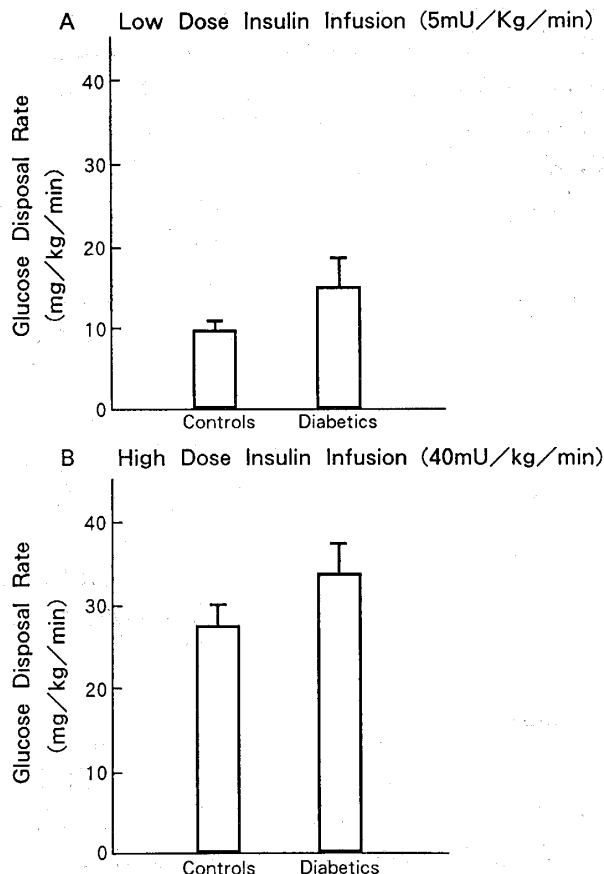


図 5. グルコース・クランプ法におけるコントロール群, 糖尿病群の glucose disposal rate

であるのに比し, 末梢静脈よりの注入では, $23 \pm 5\%$ と経口投与の方が有意に大きかったとしている。また Kelley らも正常人の内因性ブドウ糖を ^3H でラベルしたうえに, $1\text{-}^{14}\text{C}$ ブドウ糖を経口摂取させる研究²⁹⁾を行っている。その成績では経口摂取したブドウ糖の少なくとも 29% は Splanchnic tissue (肝及び消化管) に取り込まれ, 筋肉には 26% しか利用されなかったとしている。一方, DeFronzo はグルコース・クランプ時のブドウ糖利用とその組織分布を, 正常人および NIDDM で検討³⁰⁾している。血中インスリン濃度を約 $100\mu\text{U/ml}$ に設定した場合, 正常人の全身でのブドウ糖利用は 7mg/kg/min であり, NIDDM では約 35~40% 低下している。肝静脈カテーテル法を用いた検討では, Splanchnic uptake は両群とも 0.5mg/kg/min とわずかであり, 脳のブドウ糖利用も $1.0\sim 1.2\text{mg/kg/min}$ と一定している。すなわちグルコース・クランプ状態では, 全身のブドウ糖利用の 70% 以上は筋肉が占めていると報告した。これらの成績をふまえると, ブドウ糖を静注するグルコース・クランプ時のブドウ糖利用は主に筋肉であるが, ブドウ糖の経口摂取時は肝の uptake が増大することがわかる。

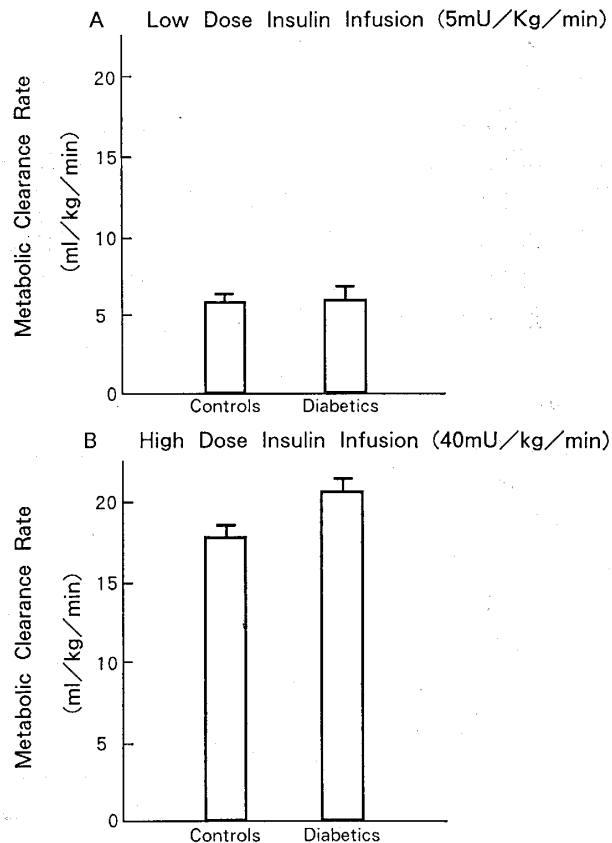


図 6. グルコース・クランプ法におけるコントロール群, 糖尿病群の metabolic clearance rate

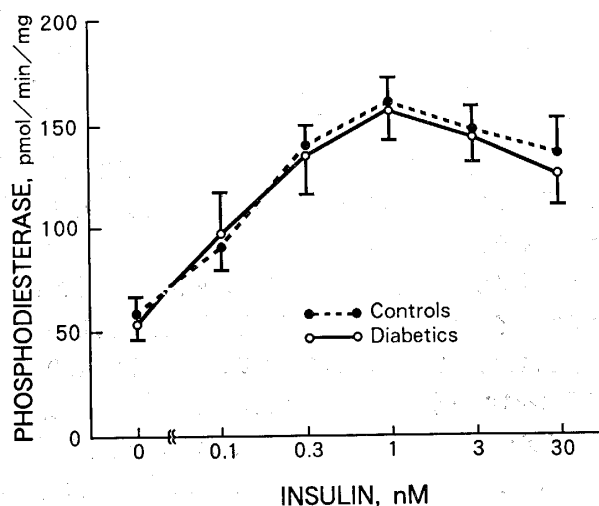


図 7. 脂肪細胞におけるコントロール群, 糖尿病群の insulin-sensitive phosphodiesterase 活性

Stojanovska らは同様な実験方法で, デキサメサゾン投与ラットにおいてブドウ糖経口摂取時は, 腸管由来のブドウ糖が血中に増加すると述べている³¹⁾。

従って本研究の成績と Stojanovska らの成績の違いは, ブドウ糖を静注するグルコース・クランプ法と, ブドウ糖を経口投与する double isotope 法の差によると

思われる。この点は、今後インスリン抵抗性を *in vivo* で検討する際に注意を要すると思われる。

また、本研究の実験条件が、麻酔下であることが成績に影響を与えた可能性は否定できないが、麻酔の影響をできるだけ除外するため、麻酔後血糖値が安定してから実験を開始・実験中体温を36~37°C に保つ・呼吸状態を良好に保つため気管切開を施行等の注意を払ったことよりあまり大きな点ではないと考える。この点は、麻酔下でグルコース・クランプ法を施行している他の報告^{25,32)}とほぼ同様な実験結果が得られていることから分かる。

さてインスリン抵抗性をレセプターレベルとポストレセプターレベルに分けて考えた場合、PDE 活性化系はインスリンにより速やかに活性化される事より、インスリン作用のカスケードの中でも初期の段階に位置しており、ポストレセプター障害のうちでも早期の段階の解析に有用である。牧野らは、すでに種々の病的状態における PDE 活性化系の変化について報告している。たとえばストレプトゾトシン糖尿病ラット⁷⁾ではインスリン感受性の亢進がみられたが、インスリン結合能も上昇し、インスリン結合量当りの PDE 活性でみても亢進がみられることより、レセプターと PDE 間の coupling の障害(シグナルの障害)はなかった。一方、KK mouse⁹⁾ や自然発症肥満ラット¹⁰⁾では、インスリン感受性および最大反応ともに低下していた。しかしインスリンレセプター結合能はむしろ増加しており、インスリン結合量当りの PDE 活性でみると低下がみられることより、レセプターと PDE 間の coupling の障害が示唆された。このように PDE 活性化系は諸種病態に敏感に反映しており、インスリン作用を検討する有力な指標といえる。

デキサメサゾン1週間投与後のラット脂肪細胞³³⁾については、インスリン感受性および最大反応の両者の低下がみられた。この低下はインスリン結合能の減少と、PDE レベルの障害の両者が考えられた。今回の結果は、デキサメサゾン投与1日目ではインスリン結合能の低下のみ認められ、投与2日目に PDE 活性も低下が認められた。1日目の結合能と PDE 活性との discrepancy の解釈として、インスリン結合能の低下のみでは spare receptor が存在するため PDE 活性に影響を及ぼさないが、デキサメサゾン投与2日目にはポストレセプターの PDE 活性化系に直接障害が及ぶためと考えられる。

グルココルチコイド投与時のインスリン・レセプター tyrosine kinase 活性については、Truglia らは、デキサメサゾンを投与した SD 系ラットの脂肪細胞で、イン

スリン・レセプターのリン酸化と tyrosine kinase 活性を検討した結果、コントロールと差がなかったと報告³⁴⁾している。また Block and Buse も、cortisone acetate を投与した Wistar 系ラットの骨格筋について *in vivo* で、インスリン・レセプターの tyrosine kinase 活性を検討し、やはりコントロールと差がなかったとしている³⁵⁾。

今回の研究により、デキサメサゾン投与ラットにおけるインスリン抵抗性は末梢組織・肝にまず現れ、つぎに脂肪細胞に出現することが明らかとなった。この理由は不明であるが、1つには *in vivo* と *in vitro* による違いが考えられる。*in vivo* におけるデキサメサゾン投与時のインスリン抵抗性は、他の液性(グルカゴン等)³⁶⁾・神経性因子の関与も考えられるが、今回の *in vitro* における脂肪細胞ではそのような因子の関与は考えられない。また、インスリン標的臓器毎にグルココルチコイドに対する感受性が異なっている可能性もある。

②NIDDM モデル・ラット

新生児期 ストレプトゾトシン 投与 ラットは、Weir ら^{20,21)}、橋本ら³⁷⁾の報告によるとラ氏島の灌流系においてブドウ糖に対するインスリン分泌反応は著明に低下しているが、アルギニンに対する反応は保たれていること・血糖は生後一時正常化し6週齢から再び軽度から中等度の高血糖(200~350mg/dl)を呈すること等よりヒトの NIDDM の特徴を現していると考えられる。しかし、今回の実験結果からはヒトの NIDDM のもう一つの大きな特徴であるインスリン抵抗性は認められなかった。

Maloff and Boyd は、このモデル・ラットの脂肪細胞の glucose transport activity と glucose oxidation を検討しコントロールと差がなかったと報告³⁸⁾している。一方、Trent らは、このモデル・ラットの脂肪細胞で glucose oxidation と脂質への転換の障害を報告²³⁾している。これら実験結果の相違の原因は不明だが、実験条件の違いによる可能性がある。牧野らは、成熟ラットにストレプトゾトシンを静注し作成した重症糖尿病ラットにおいて PDE 活性を検討した結果、インスリン感受性の亢進を報告⁷⁾している。この結果と今回のモデル・ラットとの違いについては、おそらくインスリン欠乏の程度の違いによるものと考えられる。グルコース・クランプ法における末梢組織のブドウ糖利用については、Kergoat and Portha もコントロールと差がなかったと報告²⁴⁾している。これらの報告を総合するとこのモデル・ラットの耐糖能の障害は、主にインスリン分泌の低下によるものであり、インスリン抵抗性はないと結論さ

れる。したがって本モデル・ラットは厳密な意味ではヒトの NIDDM モデル・ラットとはいえないと考えられる。

V. 結 語

本研究により種々のモデル・ラットのインスリン抵抗性の解析に *in vivo* グルコース・クランプ法と *in vitro* PDE 活性化系の組み合わせが、有用であることが明らかとなった。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御指導、御校閲を賜った恩師千葉大学医学部第二内科学教室吉田 尚教授に深甚なる謝意を表します。本研究を直接御指導、御援助下さった千葉大学医学部第二内科講師牧野英一博士、橋本尚武博士に心より感謝いたします。また終始御激励と御協力を頂いた千葉大学第二内科糖尿病研究室の皆様深く御礼申し上げます。

なお本論文は学位審査論文である。

SUMMARY

To investigate the mechanism of insulin resistance in non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM), I performed both *in vivo* and *in vitro* studies in two types of insulin resistant model rats. One is glucocorticoid treated rats, that was produced by subcutaneous injection of dexamethasone to male Sprague-Dawley rats (SD), at the age of 7 to 9 weeks. The rats were divided to three groups, one-day injection of dexamethasone (Dex 1), two-days injection of dexamethasone (Dex 2) and non-treated controls. The other is NIDDM model rats (DM), that was produced by intraperitoneal injection of streptozotocin (65 mg/kg) into two days old neonatal male SD rats. As a *vivo* study, hyperinsulinemic euglycemic clamp technique with 3H-glucose infusion was used for the assessment of both peripheral and hepatic insulin resistance, and as a *vitro* study, insulin-sensitive phosphodiesterase (PDE) activation method for the assessment of insulin resistance at the postreceptor level in isolated fat cells. Dex 1 showed decreased peripheral glucose utilization and poor suppression of hepatic glucose production at only low dose insulin infusion (5 mU/kg/min) but not at high dose insulin infusion (40 mU/kg/min), and revealed no insulin resistance in the fat cells. Dex 2 showed not only decreased peripheral glucose utilization and poor suppression of hepatic glucose production both at low and high dose insulin

infusion, but also revealed marked insulin resistance in the fat cells. DM rats showed no insulin resistance both in *vivo* and *in vitro* studies. These results suggest that insulin resistance of glucocorticoid varies depending on the duration of its administration and target organs of insulin. Glucose intolerance of this NIDDM model rats is mainly due to impairment of insulin secretion. It is suggested that the combination of *in vivo* glucose clamp study and *in vitro* PDE activation system is useful tool for the assessment of insulin resistance in various model rats.

文 献

- 1) Reaven GM: Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* **37**: 1595-1607, 1988.
- 2) Firth RG, Bell PM, Marsh HM, Hansen I and Rizza RA: Postprandial hyperglycemia in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. Role of hepatic and extrahepatic tissues. *J Clin Invest* **77**: 1525-1532, 1986.
- 3) DeFronzo RA, Tobin JD and Andres R: Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* **237**: E214-223, 1979.
- 4) Steele R: Influence of glucose loading and of injected insulin on hepatic glucose output. *Ann NY Acad Sci* **82**: 420-430, 1959.
- 5) Kono T, Robinson FW and Sarver JA: Insulin-sensitive phosphodiesterase. Its localization, hormonal stimulation, and oxidative stabilization. *J Biol Chem* **250**: 7826-7835, 1975.
- 6) Makino H and Kono T: Characterization of insulin-sensitive phosphodiesterase in fat cells. II. Comparison of enzyme activities stimulated by insulin and by isoproterenol. *J Biol Chem* **255**: 7850-7854, 1980.
- 7) Makino H, Osegawa M, Kanatsuka A and Suzuki T: Increased sensitivity of insulin-sensitive phosphodiesterase to insulin in fat cells from streptozotocin diabetic rats. *Endocrinology* **113**: 646-650, 1983.
- 8) Osegawa M, Makino H, Kanatsuka A, Suzuki T, Hashimoto N and Yoshida S: Modulation of insulin action by fasting: A study using a phosphodiesterase activation system in rat fat cells. *Horm Metab Res* **17**: 633-636, 1985.
- 9) Makino H, Kanatsuka A, Suzuki T, Kuriyashiki S, Hashimoto N, Yoshida S and Nishimura M: Insulin resistance of fat cells from spontaneously diabetic KK mice. Analysis of insulin-sensitive phosphodiester-

- ase. *Diabetes* **34** : 844-849, 1985.
- 10) Suzuki T, Makino H, Kanatsuka A, Kuriyashi S, Hashimoto N and Yoshida S: Insulin-sensitive phosphodiesterase and insulin receptor binding in fat cells from spontaneously obese rats. *Diabetologia* **28** : 286-290, 1985.
- 11) Rizza RA, Mandarino LJ and Gerich JE: Cortisol-induced insulin resistance in man: Impaired suppression of glucose production and stimulation of glucose utilization due to a postreceptor defect of insulin action. *J Clin Endocrinol Metab* **54** : 131-138, 1982.
- 12) De Pirro R, Green A, Yung-Chin Kao M and Olefsky JM: Effects of prednisolone and dexamethasone in vivo and in vitro: Studies of insulin binding, deoxyglucose uptake and glucose oxidation in rat adipocytes. *Diabetologia* **21** : 149-153, 1981.
- 13) De Pirro R, Bertoli A, Fusco A, Testa I, Greco AV and Lauro R: Effects of dexamethasone and cortisone on insulin receptors in normal human male. *J Clin Endocrinol Metab* **51** : 503-507, 1980.
- 14) Fantus IG, Ryan J, Hizuka N and Gorden P: The effect of glucocorticoids on the insulin receptor: An in vivo and in vitro study. *J Clin Endocrinol Metab* **52** : 953-960, 1981.
- 15) Pagano G, Cavallo-Perin P, Cassader M Bruno A, Ozzello A, Masciola P, Dall'omo AM, and Imbimbo B: An in vivo and in vitro study of the mechanism of prednisone-induced insulin resistance in healthy subjects. *J Clin Invest* **72** : 1814-1820, 1983.
- 16) Knutson VP: The acute and chronic effects of glucocorticoids on insulin receptor and insulin responsiveness. *J Biol Chem* **261** : 10306-10312, 1986.
- 17) Beck-Nielsen, H, De Pirro R and Pedersen, O: Prednisone increases the number of insulin receptors on monocytes from normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab* **50** : 1-4, 1980.
- 18) Horner HC, Munck A and Lienhard GE: Dexamethasone causes translocation of glucose transporters from the plasma membrane to an intracellular site in human fibroblasts. *J Biol Chem* **262** : 17696-17702, 1987.
- 19) Stojanovska L, Rosella G and Proietto J: Evolution of dexamethasone-induced insulin resistance in rats. *Am J Physiol* **258** : E748-756, 1990.
- 20) Bonner-Weir S, Trent DF, Honey RN and Weir GC: Responses of neonatal rat islets to streptozotocin. Limited B-cell regeneration and hyperglycemia. *Diabetes* **30** : 64-69, 1981.
- 21) Weir GC, Clore ET, Zmachinski CJ and Bonner-Weir S: Islet secretion in a new experimental model for non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes* **30** : 590-595, 1981.
- 22) Palmer JP, Benson JW, Walter RM and Ensink JW: Arginine-stimulated acute phase of insulin and glucagon secretion in diabetic subjects. *J Clin Invest* **58** : 565-570, 1976.
- 23) Trent DF, Fletcher JD, May JM, Bonner-Weir S and Weir GC: Abnormal islet and adipocyte function in young B-cell-deficient rats with near-normoglycemia. *Diabetes* **33** : 170-175, 1984.
- 24) Kergoat M and Portha B: In vivo hepatic and peripheral insulin sensitivity in rats with non-insulin-dependent diabetes induced by streptozotocin. Assessment with the insulin-glucose clamp technique. *Diabetes* **34** : 1120-1126, 1985.
- 25) Leturque A, Burnol AF, Ferre P and Girard J: Pregnancy-induced insulin resistance in rat: assessment by glucose clamp technique. *Am J Physiol* **246** : E25-31, 1984.
- 26) Lowry OH, Rosebrough J and Farr AL: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193** : 265-275, 1951.
- 27) Grammeltoft S and Gliemann J: Binding and degradation of ¹²⁵I-insulin by isolated rat fat cells. *Biochem. Biophys Acta* **320** : 16-32, 1973.
- 28) Ishida T, Chap Z, Chou J, Lewis R, Hartley C, Entman M and Field JB: Differential effects of oral, peripheral intravenous, and intraportal glucose on hepatic glucose uptake and insulin and glucagon extraction in conscious dogs. *J Clin Invest* **72** : 590-601, 1983.
- 29) Kelly D, Mitrakou A, Marsh H, Schwenk F, Benn J, Sonnenberg G, Arcangeli M, Aoki T, Sorensen J, Berger M, Sonksen P and Gerich J: Skeletal muscle glycolysis, oxidation, and storage of an oral glucose load. *J Clin Invest* **81** : 1563-1571, 1988.
- 30) DeFronzo R: The triumvirate: b-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes* **37** : 667-687, 1988.
- 31) Stojanovska L, Rosella G and Proietto J: Dexamethasone-induced increase in the rate of appearance in plasma of gut-derived glucose following an oral glucose load in rats. *Metabolism* **40** : 297-301, 1991.
- 32) Terretaz J and Jeanrenaud B: In vivo hepatic and peripheral insulin resistance in genetically obese (fa/fa) rats. *Endocrinology* **112** : 1346-1351, 1983.

- 33) Osegawa M, Makino H, Kanatsuka A, Suzuki T and Yoshida S: Effects of change in serum insulin in response to dexamethasone and adrenalectomy. *Metabolism* **33**: 754-759, 1984.
- 34) Truglia JA, Hayes GR and Lockwood DH: Intact adipocyte insulin-receptor phosphorylation and in vitro tyrosine kinase activity in animal models of insulin resistance. *Diabetes* **37**: 147-153, 1988.
- 35) Block NE and Buse MG: Effects of hypercortisolemia and diabetes on skeletal muscle insulin receptor function in vitro and in vivo. *Am J Physiol* **256**: E39-48, 1989.
- 36) Marco J, Calle C, Roman D, Diaz-Fierros M, Villanueva ML and Valverde I: Hyperglucagonism induced by glucocorticoid treatment in man. *N Engl J Med* **288**: 128-131, 1973.
- 37) Hashimoto N, Kanatsuka A, Makino H, Sakurada M, Iwaoka H, Yoshida S and Horie H: Abnormal calcium handling by perfused pancreatic islets from neonatal streptozotocin diabetic model rats. *Metabolism* **36**: 827-833, 1987.
- 38) Maloff BL and Boyd BK: Physiologic and cellular insulin action in a glucose-intolerant model of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes in rats. *Diabetologia* **29**: 295-300, 1986.

1日1回投与可能な抗不安薬

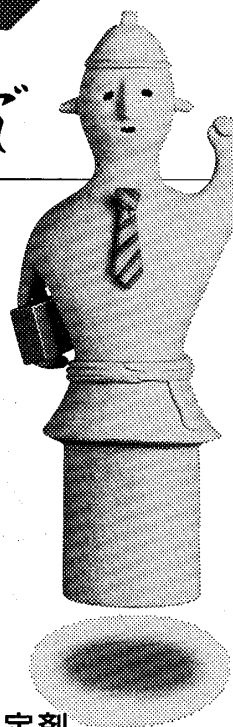
MEILAXで

リラックス

メイラックスは
特に不安・抑うつ・睡眠障害
に対して有効な
ベンゾジアゼピン系薬剤です

特 性

- 1 1日1回投与が可能です
- 2 抗不安作用と運動系機能抑制作用の分離性に優れています
- 3 神経症に確かな効果を発揮します
- 4 自律神経失調症など各種心身症における多彩な愁訴を早期に改善します
- 5 副作用が少なく使いやすい抗不安薬です

新発売
健康適用

持続性心身安定剤

④
⑤
⑥
⑦
⑧
⑨
⑩
⑪
⑫
⑬
⑭
⑮
⑯
⑰
⑱
⑲
⑳
㉑
㉒
㉓
㉔
㉕
㉖
㉗
㉘
㉙
㉚
㉛
㉜
㉝
㉞
㉟
㊱
㊲
㊳
㊴
㊵
㊶
㊷
㊸
㊹
㊺
㊻
㊼
㊽
㊾
㊿
㏀
㏁
㏂
㏃
㏄
㏅
㏆
㏇
㏈
㏉
㏊
㏋
㏌
㏍
㏎
㏏
㏐
㏑
㏒
㏓
㏔
㏕
㏖
㏗
㏘
㏙
㏚
㏛
㏜
㏝
㏞
㏟
㏠
㏡
㏢
㏣
㏤
㏥
㏦
㏧
㏨
㏩
㏪
㏫
㏬
㏭
㏮
㏯
㏰
㏱
㏲
㏳
㏴
㏵
㏶
㏷
㏸
㏹
㏺
㏻
㏼
㏽
㏾
㏿
㐀
㐁
㐂
㐃
㐄
㐅
㐆
㐇
㐈
㐉
㐊
㐋
㐌
㐍
㐎
㐏
㐐
㐑
㐒
㐓
㐔
㐕
㐖
㐗
㐘
㐙
㐚
㐛
㐜
㐝
㐞
㐟
㐠
㐡
㐢
㐣
㐤
㐥
㐦
㐧
㐨
㐩
㐪
㐫
㐬
㐭
㐮
㐯
㐰
㐱
㐲
㐳
㐴
㐵
㐶
㐷
㐸
㐹
㐺
㐻
㐼
㐽
㐾
㐿
㑀
㑁
㑂
㑃
㑄
㑅
㑆
㑇
㑈
㑉
㑊
㑋
㑌
㑍
㑎
㑏
㑐
㑑
㑒
㑓
㑔
㑕
㑖
㑗
㑘
㑙
㑚
㑛
㑜
㑝
㑞
㑟
㑠
㑡
㑢
㑣
㑤
㑥
㑦
㑧
㑨
㑩
㑪
㑫
㑬
㑭
㑮
㑯
㑰
㑱
㑲
㑳
㑴
㑵
㑶
㑷
㑸
㑹
㑺
㑻
㑼
㑽
㑾
㑿
㒀
㒁
㒂
㒃
㒄
㒅
㒆
㒇
㒈
㒉
㒊
㒋
㒌
㒍
㒎
㒏
㒐
㒑
㒒
㒓
㒔
㒕
㒖
㒗
㒘
㒙
㒚
㒛
㒜
㒝
㒞
㒟
㒠
㒡
㒢
㒣
㒤
㒥
㒦
㒧
㒨
㒩
㒪
㒫
㒬
㒭
㒮
㒯
㒰
㒱
㒲
㒳
㒴
㒵
㒶
㒷
㒸
㒹
㒺
㒻
㒼
㒽
㒾
㒿
㓀
㓁
㓂
㓃
㓄
㓅
㓆
㓇
㓈
㓉
㓊
㓋
㓌
㓍
㓎
㓏
㓐
㓑
㓒
㓓
㓔
㓕
㓖
㓗
㓘
㓙
㓚
㓛
㓜
㓝
㓞
㓟
㓠
㓡
㓢
㓣
㓤
㓥
㓦
㓧
㓨
㓩
㓪
㓫
㓬
㓭
㓮
㓯
㓰
㓱
㓲
㓳
㓴
㓵
㓶
㓷
㓸
㓹
㓺
㓻
㓼
㓽
㓾
㓿
㔀
㔁
㔂
㔃
㔄
㔅
㔆
㔇
㔈
㔉
㔊
㔋
㔌
㔍
㔎
㔏
㔐
㔑
㔒
㔓
㔔
㔕
㔖
㔗
㔘
㔙
㔚
㔛
㔜
㔝
㔞
㔟
㔠
㔡
㔢
㔣
㔤
㔥
㔦
㔧
㔨
㔩
㔪
㔫
㔬
㔭
㔮
㔯
㔰
㔱
㔲
㔳
㔴
㔵
㔶
㔷
㔸
㔹
㔺
㔻
㔼
㔽
㔾
㔿
㕀
㕁
㕂
㕃
㕄
㕅
㕆
㕇
㕈
㕉
㕊
㕋
㕌
㕍
㕎
㕏
㕐
㕑
㕒
㕓
㕔
㕕
㕖
㕗
㕘
㕙
㕚
㕛
㕜
㕝
㕞
㕟
㕠
㕡
㕢
㕣
㕤
㕥
㕦
㕧
㕨
㕩
㕪
㕫
㕬
㕭
㕮
㕯
㕰
㕱
㕲
㕳
㕴
㕵
㕶
㕷
㕸
㕹
㕺
㕻
㕼
㕽
㕾
㕿
㖀
㖁
㖂
㖃
㖄
㖅
㖆
㖇
㖈
㖉
㖊
㖋
㖌
㖍
㖎
㖏
㖐
㖑
㖒
㖓
㖔
㖕
㖖
㖗
㖘
㖙
㖚
㖛
㖜
㖝
㖞
㖟
㖠
㖡
㖢
㖣
㖤
㖥
㖦
㖧
㖨
㖩
㖪
㖫
㖬
㖭
㖮
㖯
㖰
㖱
㖲
㖳
㖴
㖵
㖶
㖷
㖸
㖹
㖺
㖻
㖼
㖽
㖾
㖿
㗀
㗁
㗂
㗃
㗄
㗅
㗆
㗇
㗈
㗉
㗊
㗋
㗌
㗍
㗎
㗏
㗐
㗑
㗒
㗓
㗔
㗕
㗖
㗗
㗘
㗙
㗚
㗛
㗜
㗝
㗞
㗟
㗠
㗡
㗢
㗣
㗤
㗥
㗦
㗧
㗨
㗩
㗪
㗫
㗬
㗭
㗮
㗯
㗰
㗱
㗲
㗳
㗴
㗵
㗶
㗷
㗸
㗹
㗺
㗻
㗼
㗽
㗾
㗿
㘀
㘁
㘂
㘃
㘄
㘅
㘆
㘇
㘈
㘉
㘊
㘋
㘌
㘍
㘎
㘏
㘐
㘑
㘒
㘓
㘔
㘕
㘖
㘗
㘘
㘙
㘚
㘛
㘜
㘝
㘞
㘟
㘠
㘡
㘢
㘣
㘤
㘥
㘦
㘧
㘨
㘩
㘪
㘫
㘬
㘭
㘮
㘯
㘰
㘱
㘲
㘳
㘴
㘵
㘶
㘷
㘸
㘹
㘺
㘻
㘼
㘽
㘾
㘿
㙀
㙁
㙂
㙃
㙄
㙅
㙆
㙇
㙈
㙉
㙊
㙋
㙌
㙍
㙎
㙏
㙐
㙑
㙒
㙓
㙔
㙕
㙖
㙗
㙘
㙙
㙚
㙛
㙜
㙝
㙞
㙟
㙠
㙡
㙢
㙣
㙤
㙥
㙦
㙧
㙨
㙩
㙪
㙫
㙬
㙭
㙮
㙯
㙰
㙱
㙲
㙳
㙴
㙵
㙶
㙷
㙸
㙹
㙺
㙻
㙼
㙽
㙾
㙿
㚀
㚁
㚂
㚃
㚄
㚅
㚆
㚇
㚈
㚉
㚊
㚋
㚌
㚍
㚎
㚏
㚐
㚑
㚒
㚓
㚔
㚕
㚖
㚗
㚘
㚙
㚚
㚛
㚜
㚝
㚞
㚟
㚠
㚡
㚢
㚣
㚤
㚥
㚦
㚧
㚨
㚩
㚪
㚫
㚬
㚭
㚮
㚯
㚰
㚱
㚲
㚳
㚴
㚵
㚶
㚷
㚸
㚹
㚺
㚻
㚼
㚽
㚾
㚿
㜀
㜁
㜂
㜃
㜄
㜅
㜆
㜇
㜈
㜉
㜊
㜋
㜌
㜍
㜎
㜏
㜐
㜑
㜒
㜓
㜔
㜕
㜖
㜗
㜘
㜙
㜚
㜛
㜜
㜝
㜞
㜟
㜠
㜡
㜢
㜣
㜤
㜥
㜦
㜧
㜨
㜩
㜪
㜫
㜬
㜭
㜮
㜯
㜰
㜱
㜲
㜳
㜴
㜵
㜶
㜷
㜸
㜹
㜺
㜻
㜼
㜽
㜾
㜿
㝀
㝁
㝂
㝃
㝄
㝅
㝆
㝇
㝈
㝉
㝊
㝋
㝌
㝍
㝎
㝏
㝐
㝑
㝒
㝓
㝔
㝕
㝖
㝗
㝘
㝙
㝚
㝛
㝜
㝝
㝞
㝟
㝠
㝡
㝢
㝣
㝤
㝥
㝦
㝧
㝨
㝩
㝪
㝫
㝬
㝭
㝮
㝯
㝰
㝱
㝲
㝳
㝴
㝵
㝶
㝷
㝸
㝹
㝺
㝻
㝼
㝽
㝾
㝿
㞀
㞁
㞂
㞃
㞄
㞅
㞆
㞇
㞈
㞉
㞊
㞋
㞌
㞍
㞎
㞏
㞐
㞑
㞒
㞓
㞔
㞕
㞖
㞗
㞘
㞙
㞚
㞛
㞜
㞝
㞞
㞟
㞠
㞡
㞢
㞣
㞤
㞥
㞦
㞧
㞨
㞩
㞪
㞫
㞬
㞭
㞮
㞯
㞰
㞱
㞲
㞳
㞴
㞵
㞶
㞷
㞸
㞹
㞺
㞻
㞼
㞽
㞾
㞿
㟀
㟁
㟂
㟃
㟄
㟅
㟆
㟇
㟈
㟉
㟊
㟋
㟌
㟍
㟎
㟏
㟐
㟑
㟒
㟓
㟔
㟕
㟖
㟗
㟘
㟙
㟚
㟛
㟜
㟝
㟞
㟟
㟠
㟡
㟢
㟣
㟤
㟥
㟦
㟧
㟨
㟩
㟪
㟫
㟬
㟭
㟮
㟯
㟰
㟱
㟲
㟳
㟴
㟵
㟶
㟷
㟸
㟹
㟺
㟻
㟼
㟽
㟾
㟿
㠀
㠁
㠂
㠃
㠄
㠅
㠆
㠇
㠈
㠉
㠊
㠋
㠌
㠍
㠎
㠏
㠐
㠑
㠒
㠓
㠔
㠕
㠖
㠗
㠘
㠙
㠚
㠛
㠜
㠝
㠞
㠟
㠠
㠡
㠢
㠣
㠤
㠥
㠦
㠧
㠨
㠩
㠪
㠫
㠬
㠭
㠮
㠯
㠰
㠱
㠲
㠳
㠴
㠵
㠶
㠷
㠸
㠹
㠺
㠻
㠼
㠽
㠾
㠿
㡀
㡁
㡂
㡃
㡄
㡅
㡆
㡇
㡈
㡉
㡊
㡋
㡌
㡍
㡎
㡏
㡐
㡑
㡒
㡓
㡔
㡕
㡖
㡗
㡘
㡙
㡚
㡛
㡜
㡝
㡞
㡟
㡠
㡡
㡢
㡣
㡤
㡥
㡦
㡧
㡨
㡩
㡪
㡫
㡬
㡭
㡮
㡯
㡰
㡱
㡲
㡳
㡴
㡵
㡶
㡷
㡸
㡹
㡺
㡻
㡼
㡽
㡾
㡿
㢀
㢁
㢂
㢃
㢄
㢅
㢆
㢇
㢈
㢉
㢊
㢋
㢌
㢍
㢎
㢏
㢐
㢑
㢒
㢓
㢔
㢕
㢖
㢗
㢘
㢙
㢚
㢛
㢜
㢝
㢞
㢟
㢠
㢡
㢢
㢣
㢤
㢥
㢦
㢧
㢨
㢩
㢪
㢫
㢬
㢭
㢮
㢯
㢰
㢱
㢲
㢳
㢴
㢵
㢶
㢷
㢸
㢹
㢺
㢻
㢼
㢽
㢾
㢿
㣀
㣁
㣂
㣃
㣄
㣅
㣆
㣇
㣈
㣉
㣊
㣋
㣌
㣍
㣎
㣏
㣐
㣑
㣒
㣓
㣔
㣕
㣖
㣗
㣘
㣙
㣚
㣛
㣜
㣝
㣞
㣟
㣠
㣡
㣢
㣣
㣤
㣥
㣦
㣧
㣨
㣩
㣪
㣫
㣬
㣭
㣮
㣯
㣰
㣱
㣲
㣳
㣴
㣵
㣶
㣷
㣸
㣹
㣺
㣻
㣼
㣽
㣾
㣿
㤀
㤁
㤂
㤃
㤄
㤅
㤆
㤇
㤈
㤉
㤊
㤋
㤌
㤍
㤎
㤏
㤐
㤑
㤒
㤓
㤔
㤕
㤖
㤗
㤘
㤙
㤚
㤛
㤜
㤝
㤞
㤟
㤠
㤡
㤢
㤣
㤤
㤥
㤦
㤧
㤨
㤩
㤪
㤫
㤬
㤭
㤮
㤯
㤰
㤱
㤲
㤳
㤴
㤵
㤶
㤷
㤸
㤹
㤺
㤻
㤼
㤽
㤾
㤿
㥀
㥁
㥂
㥃
㥄
㥅
㥆
㥇
㥈
㥉
㥊
㥋
㥌
㥍
㥎
㥏
㥐
㥑
㥒
㥓
㥔
㥕
㥖
㥗
㥘
㥙
㥚
㥛
㥜
㥝
㥞
㥟
㥠
㥡
㥢
㥣
㥤
㥥
㥦
㥧
㥨
㥩
㥪
㥫
㥬
㥭
㥮
㥯
㥰
㥱
㥲
㥳
㥴
㥵
㥶
㥷
㥸
㥹
㥺
㥻
㥼
㥽
㥾
㥿
㦀
㦁
㦂
㦃
㦄
㦅
㦆
㦇
㦈
㦉
㦊
㦋
㦌
㦍
㦎
㦏
㦐
㦑
㦒
㦓
㦔
㦕
㦖
㦗
㦘
㦙
㦚
㦛
㦜
㦝
㦞
㦟
㦠
㦡
㦢
㦣
㦤
㦥
㦦
㦧
㦨
㦩
㦪
㦫
㦬
㦭
㦮
㦯
㦰
㦱
㦲
㦳
㦴
㦵
㦶
㦷
㦸
㦹
㦺
㦻
㦼
㦽
㦾
㦿
㧀
㧁
㧂
㧃
㧄
㧅
㧆
㧇
㧈
㧉
㧊
㧋
㧌
㧍
㧎
㧏
㧐
㧑
㧒
㧓
㧔
㧕
㧖
㧗
㧘
㧙
㧚
㧛
㧜
㧝
㧞
㧟
㧠
㧡
㧢
㧣
㧤
㧥
㧦
㧧
㧨
㧩
㧪
㧫
㧬
㧭
㧮
㧯
㧰
㧱
㧲
㧳
㧴
㧵
㧶
㧷
㧸
㧹
㧺
㧻
㧼
㧽
㧾
㧿
㨀
㨁
㨂
㨃
㨄
㨅
㨆
㨇
㨈
㨉
㨊
㨋
㨌
㨍
㨎
㨏
㨐
㨑
㨒
㨓
㨔
㨕
㨖
㨗
㨘
㨙
㨚
㨛
㨜
㨝
㨞
㨟
㨠
㨡
㨢
㨣
㨤
㨥
㨦
㨧
㨨
㨩
㨪
㨫
㨬
㨭
㨮
㨯
㨰
㨱
㨲
㨳
㨴
㨵
㨶
㨷
㨸
㨹
㨺
㨻
㨼
㨽
㨾
㨿
㩀
㩁
㩂
㩃
㩄
㩅
㩆
㩇
㩈
㩉
㩊
㩋
㩌
㩍
㩎
㩏
㩐
㩑
㩒
㩓
㩔
㩕
㩖
㩗
㩘
㩙
㩚
㩛
㩜
㩝
㩞
㩟
㩠
㩡
㩢
㩣
㩤
㩥
㩦
㩧
㩨
㩩
㩪
㩫
㩬
㩭
㩮
㩯
㩰
㩱
㩲
㩳
㩴
㩵
㩶
㩷
㩸
㩹
㩺
㩻
㩼
㩽
㩾
㩿
㪀
㪁
㪂
㪃
㪄
㪅
㪆
㪇
㪈
㪉
㪊
㪋
㪌
㪍
㪎
㪏
㪐
㪑
㪒
㪓
㪔
㪕
㪖
㪗
㪘
㪙
㪚
㪛
㪜
㪝
㪞
㪟
㪠
㪡
㪢
㪣
㪤
㪥
㪦
㪧
㪨
㪩
㪪
㪫
㪬
㪭
㪮
㪯
㪰
㪱
㪲
㪳
㪴
㪵
㪶
㪷
㪸
㪹
㪺
㪻
㪼
㪽
㪾
㪿
㫀
㫁
㫂
㫃
㫄
㫅
㫆
㫇
㫈
㫉
㫊
㫋
㫌
㫍
㫎
㫏
㫐
㫑
㫒
㫓
㫔
㫕
㫖
㫗
㫘
㫙
㫚
㫛
㫜
㫝
㫞
㫟
㫠
㫡
㫢
㫣
㫤
㫥
㫦
㫧
㫨
㫩
㫪
㫫
㫬
㫭
㫮
㫯
㫰
㫱
㫲
㫳
㫴
㫵
㫶
㫷
㫸
㫹
㫺
㫻
㫼
㫽
㫾
㫿
㬀
㬁
㬂
㬃
㬄
㬅
㬆
㬇
㬈
㬉
㬊
㬋
㬌
㬍
㬎
㬏
㬐
㬑
㬒
㬓
㬔
㬕
㬖
㬗
㬘
㬙
㬚
㬛
㬜
㬝
㬞
㬟
㬠
㬡
㬢
㬣
㬤
㬥
㬦
㬧
㬨
㬩
㬪
㬫
㬬
㬭
㬮
㬯
㬰
㬱
㬲
㬳
㬴
㬵
㬶
㬷
㬸
㬹
㬺
㬻
㬼
㬽
㬾
㬿
㭀
㭁
㭂
㭃
㭄
㭅
㭆
㭇
㭈
㭉
㭊
㭋
㭌
㭍
㭎
㭏
㭐
㭑
㭒
㭓
㭔
㭕
㭖
㭗
㭘
㭙
㭚
㭛
㭜
㭝
㭞
㭟
㭠
㭡
㭢
㭣
㭤
㭥
㭦
㭧
㭨
㭩
㭪
㭫
㭬
㭭
㭮
㭯
㭰
㭱
㭲
㭳
㭴
㭵
㭶
㭷
㭸
㭹
㭺
㭻
㭼
㭽
㭾
㭿
㮀
㮁
㮂
㮃
㮄
㮅
㮆
㮇
㮈
㮉
㮊
㮋
㮌
㮍
㮎
㮏
㮐
㮑
㮒
㮓
㮔
㮕
㮖
㮗
㮘
㮙
㮚
㮛
㮜
㮝
㮞
㮟
㮠
㮡
㮢
㮣
㮤
㮥
㮦
㮧
㮨
㮩
㮪
㮫
㮬
㮭
㮮
㮯
㮰
㮱
㮲
㮳
㮴
㮵
㮶
㮷
㮸
㮹
㮺
㮻
㮼
㮽
㮾
㮿
㯀
㯁
㯂
㯃
㯄
㯅
㯆
㯇
㯈
㯉
㯊
㯋
㯌
㯍
㯎
㯏
㯐
㯑
㯒
㯓
㯔
㯕
㯖
㯗
㯘
㯙
㯚
㯛
㯜
㯝
㯞
㯟
㯠
㯡
㯢
㯣
㯤
㯥
㯦
㯧
㯨
㯩
㯪
㯫
㯬
㯭
㯮
㯯
㯰
㯱
㯲
㯳
㯴
㯵
㯶
㯷
㯸
㯹
㯺
㯻
㯼
㯽
㯾
㯿
㰀
㰁
㰂
㰃
㰄
㰅
㰆
㰇
㰈
㰉
㰊
㰋
㰌
㰍
㰎
㰏
㰐
㰑
㰒
㰓
㰔
㰕
㰖
㰗
㰘
㰙
㰚
㰛
㰜
㰝
㰞
㰟
㰠
㰡
㰢
㰣
㰤
㰥
㰦
㰧
㰨
㰩
㰪
㰫
㰬
㰭
㰮
㰯
㰰
㰱
㰲
㰳
㰴
㰵
㰶
㰷
㰸
㰹
㰺
㰻
㰼
㰽
㰾
㰿
㱀
㱁
㱂
㱃
㱄
㱅
㱆
㱇
㱈
㱉
㱊
㱋
㱌
㱍
㱎
㱏
㱐
㱑
㱒
㱓
㱔
㱕
㱖
㱗
㱘
㱙
㱚
㱛
㱜
㱝
㱞
㱟
㱠
㱡
㱢
㱣
㱤
㱥
㱦
㱧
㱨
㱩
㱪
㱫
㱬
㱭
㱮
㱯
㱰
㱱
㱲
㱳
㱴
㱵
㱶
㱷
㱸
㱹
㱺
㱻
㱼
㱽
㱾
㱿
㲀
㲁
㲂
㲃
㲄
㲅
㲆
㲇
㲈
㲉
㲊
㲋
㲌
㲍
㲎
㲏
㲐
㲑
㲒
㲓
㲔
㲕
㲖
㲗
㲘
㲙
㲚
㲛
㲜
㲝
㲞
㲟
㲠
㲡
㲢
㲣
㲤
㲥
㲦