

# 高濃度ブドウ糖前処置のラット膵ラ島 インスリン分泌への影響

——調節因子としての細胞内遊離  $\text{Ca}^{2+}$  の役割——

長 澤 慶 尚

信州大学医学部老年医学教室

(指導 山田 隆司教授)

## Effects of the Pretreatment with High Glucose Concentrations on Insulin Release from Rat Pancreatic B-cells; An Important Role of Cytoplasmic Free $\text{Ca}^{2+}$ on the Regulation of Insulin Release

Yoshitaka NAGASAWA

Department of Geriatrics, Endocrinology and Metabolism,  
Shinshu University School of Medicine

(Director: Prof. Takashi YAMADA)

In an attempt to study insulin release in response to D-glucose and/or ionomycin *in vitro*, pancreatic islets were obtained from rats treated or not treated with D-glucose and the islets were then perfused or perifused initially with graded doses of D-glucose (1, 7-10mM), and subsequently stimulated with a large dose of D-glucose (20mM) or ionomycin (1 $\mu$ M). Insulin concentrations in the efflux of perfusion or perifusion and cytoplasmic free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) in the islets were determined.

A typical two-phase pattern of *in vitro* insulin release was found in response to *in vitro* addition of a large dose of D-glucose (20mM) when the islets were pre-exposed to a small dose of D-glucose *in vivo* or *in vitro*. In contrast, *in vitro* insulin release was high but not influenced by *in vitro* addition of a large dose of D-glucose when the islets were pre-exposed to a relatively high D-glucose concentration *in vivo* and *in vitro*. Less response of insulin release to a large dose of D-glucose (20mM) with increasing concentration of pretreated D-glucose is associated with a progressive decrease of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Since ionomycin induced full action on insulin release under such a condition, pretreatment with a relatively large dose of D-glucose desensitizes the islets to subsequent D-glucose stimulation.

Ionomycin increased  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  under all experimental conditions, but pretreatment with a moderate or relatively large dose of D-glucose is required for subsequent release of insulin.  
*Shinshu Med. J.*, 38: 63-76, 1990

(Received for publication September 30, 1989)

---

**Key words:** cytoplasmic free  $\text{Ca}^{2+}$ , basal glucose concentration, desensitization, insulin release, pancreatic B-cells

細胞内遊離  $\text{Ca}^{2+}$ , 基礎ブドウ糖濃度, デセンシタイゼーション, インスリン分泌, 膵B細胞

---

## I はじめに

生体のエネルギー代謝を一定条件下に保つため、血中ブドウ糖（血糖）濃度はほぼ一定の生理的範囲に保たれている。この保持には副腎皮質ホルモン、甲状腺ホルモン、グルカゴン、カテコールアミン等が役割を演じているが<sup>1)</sup>、最も重要な調節因子はインスリンである<sup>2)</sup>。すなわち、血糖が低下した場合、インスリン分泌が抑制される結果、血中のインスリン濃度は低下し、逆に血糖が上昇した場合、膵からのインスリン分泌が増加する結果、血中インスリン濃度が上昇する、というフィードバック機構を通じて、血糖を一定範囲内に保つようにインスリン分泌の調節が行われている<sup>3)</sup>。しかし、こうした調節機構は血糖値が一定の範囲内で変動した場合に限られ、長期間血糖値が上昇した場合、インスリン分泌は異なったパターンを示す可能性がある<sup>4)-10)</sup>。

実際に多くの内分泌腺において、強い刺激が繰り返し加えられた場合、*in vitro* で調べるとホルモン分泌の一定期間欠如することが知られており、この過程は *desensitization* と呼ばれている<sup>11)-15)</sup>。このような現象が膵からのインスリン分泌にも認められるか否かについては、現在まで報告がみられていない。この点について追求するため、今回(1)高濃度の D-glucose を持続注入したラットの膵を用いて、そのインスリン分泌能を *perfusion system* で検討し、(2)正常ラットより得たランゲルハンス島（ラ島）細胞を用いて、まず様々の D-glucose で前処置して条件づけを行った後、高濃度の D-glucose にさらして、そのインスリン分泌能を *perfusion study* で測定し、(3)最後に、ラ島細胞内遊離  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) の役割について *fura-2* を用いて検討を行った。

## II 材料および方法

## A 実験動物

実験には雄ウイスター系ラット（180～210g）98匹を用いた。

## B 持続的ブドウ糖投与と摘出膵灌流

随意に摂食を許し、明暗交代調節光下で飼育されたラットの外頸静脈に、45cm 長、0.6×1.2mm の silicone tube を cannulation し、皮下を通して肩に留置した。1日目は生理的食塩水を、0.2ml/h の速度で注入し、翌朝より 5% (0.28M)、および 50% (2.8M) D-glucose solution を、2.0ml/h の速度

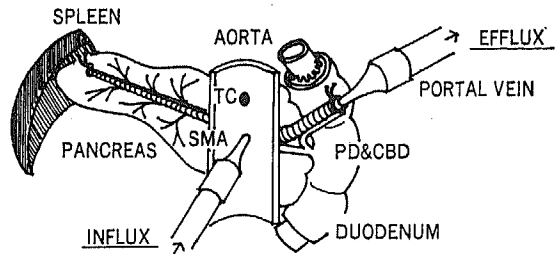


Fig. 1 Perfusion system of isolated pancreas. SMA=superior mesenteric artery. TC=truncus celiacus. PD=pancreatic duct. CBD=common bile duct.

で syringe pump を用いて24時間持続注入した。この間逐次、尾静脈から採血し、血糖値を測定した<sup>16)</sup>。翌日ラットを、5mg/100g 体重の sodium pentobarbital (Abbott Laboratories, North Chicago, IL, U.S.A.) を腹腔内に投与して麻酔した後開腹した。腸管を展開して膵を露出し、門脈・総胆管・腹腔動脈・上腸間膜動脈・腹部大動脈を残して微小脈管を結紮し、膵・十二指腸・脾・腹部大動脈を一塊として摘出した。この摘出膵 (Fig. 1) を、37°C に保温しつつ、腹腔動脈あるいは上腸間膜動脈に cannulation して灌流用緩衝液を注入し、門脈に cannulation して灌流液を採取した<sup>17)18)</sup>。灌流用緩衝液には KRB-HEPES 緩衝液 (Krebs-Ringer bicarbonate buffer with HEPES, pH7.4/containing 118.4mM NaCl, 4.69mM KCl, 1.2mM  $\text{MgCl}_2$ , 1.18mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.0mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.25mM  $\text{NaHCO}_3$ , 10mM HEPES, and 5mg/ml bovine serum albumin) を用い、ブドウ糖濃度を適宜調整した。あらかじめ 5.6mM の D-glucose を含む KRB-HEPES 緩衝液を、2.7ml/min の速度で10分間灌流した後、20分間20mM の D-glucose, KRB-HEPES 緩衝液で灌流して膵を刺激し、灌流液中に分泌されたインスリン濃度を経時的に、RIA (Insulin Radioimmunoassay Kit, Eiken Immunochemical, Tokyo, Japan) で測定した<sup>19)20)</sup>。スタンダードとして rat insulin (Novo, Copenhagen, Denmark) を用いた。

## C 膵ラ島の単離

ラットを 5mg/100g 体重の sodium pentobarbital で腹腔内麻酔した後開腹した (Fig. 2a, 2b)。総胆管三管合流部より上部から逆行性に cannulation し、Vater 乳頭部を鉗子で把持したうえで (Fig. 2c)

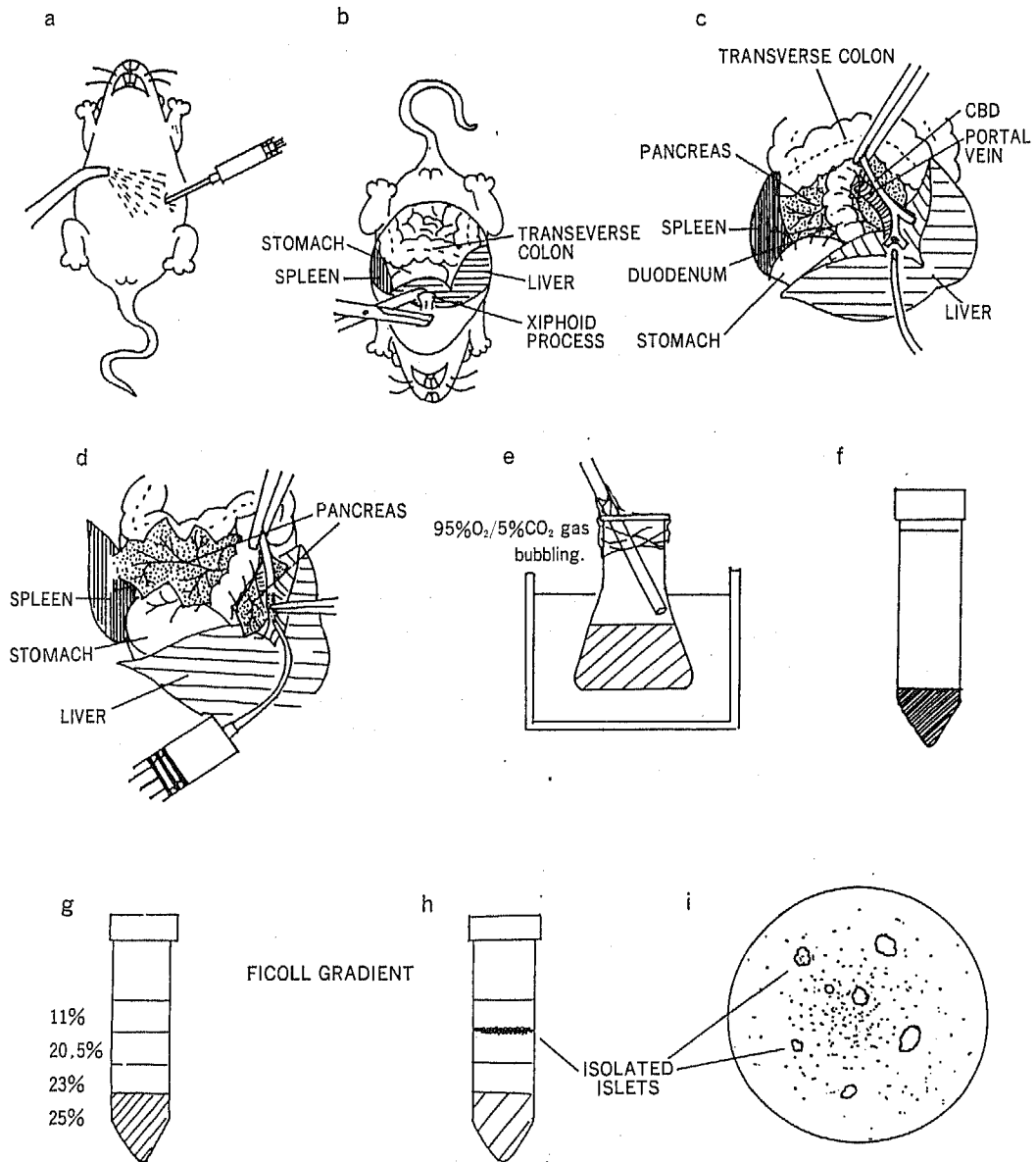


Fig. 2 Isolation of islets. (a) Rat was anesthetized by 5mg/100g BW sodium pentobarbital intraperitoneally, and spray alcohol on the abdomen. (b) Open the abdominal wall, turn rat around and then clip xiphoid process. (c) Clamp off common bile duct at its entry into the duodenum (ampulla of Vater), make a small partial cut through the left hepatic duct, and insert tubing into the partially cut duct. (d) Pump in approximately 15ml of chilled buffer with collagenase to inflate the pancreas. The pancreas was surgically resected and cleaned by removing fat, lymph, etc. (e) Roughly minced pancreas was incubated with the collagenase at 37°C for 16min. (f) Digested pancreas was washed three times by cold Hanks/BSA/glucose solution to stop the action of the collagenase. (g) Add 4ml of 25% ficoll to the pellet, and vortex. Make layer carefully by the other concentrations of ficoll (2ml each of 23%, 20.5% and 11% of one). Centrifuge at 800 G at 4°C for 15min. (h) The cleanest islets will be at the 11-20.5% interface, while those at the 20.5-23% level may be slightly under digested and more debris may be present. (i) Isolated islets.

0.5mg/mlのコラゲナーゼ (Serva Feinbiochemica, Heidelberg, F.R.G.)を加えた単離用の Hanks-HEPES 緩衝液 (Hanks solution containing 0.95 mM  $\text{CaCl}_2$ , 25mM  $\text{NaHCO}_3$ , 20mM HEPES, and 5mM D-glucose, saturated with 95%  $\text{O}_2$  and 5%  $\text{CO}_2$ , pH7.4) 15ml を注入した (Fig. 2d)。膨満した脾を切離し, 37°C で 95%  $\text{O}_2$ /5%  $\text{CO}_2$  gas で bubbling しながら16分間 incubation し, 脾を digest した (Fig. 2e)。氷冷した Hanks-HEPES 緩衝液を用いて3回洗浄し, コラゲナーゼの反応を停止した後 (Fig. 2f), ficoll gradient (25%, 23%, 20.5%, and 11% ficoll : 4°C 700G 15min) にかけて, 20.5%と11% ficoll の相間に単離したラ島が得られた (Fig. 2g, 2h)。これらを実体顕微鏡下に siliconized glass pipet にて採取した (Fig. 2i)<sup>21)-23)</sup>。

#### D 脾 perfusion 系

ラ島B細胞のインスリン分泌反応は, perfusion 系 (Fig. 3) を用いて測定した<sup>24)25)</sup>。Plastic perfusion chamber (Millipore Corp., Bedford, MA, U.S.A.) に 5 $\mu\text{m}$  pore size の Millipore filter を設置し, peristaltic pump に接続した。Filter 上に単離したラ島を浮置し, 37°C の incubation bath 内に置いた。Chamber の容量は 0.7ml であり, tube

と合わせて死腔は 1.8ml であった。1.0ml/min の速度で前述の Hanks-HEPES 緩衝液を用いて灌流し, 1分ごとに灌流液を sample として採取した。ラ島B細胞の刺激には, 種々の濃度の D-glucose と, ionomycin (Sigma, St. Louis, Mo, U.S.A.)<sup>26)-30)</sup>を用いた。灌流液のブドウ糖濃度は, 前刺激に用いる基礎濃度に合わせて, 最終濃度を 20mM とするに必要な高濃度 D-glucose, Hanks-HEPES 緩衝液を, 適宜調整して用いた。

50個の単離したラ島を perfusion chamber に浮置し, 1.7mM, 5mM, 7.5mM, そして 10mM のブドウ糖基礎濃度の Hanks-HEPES 緩衝液で20分間灌流し, 平衡状態に達した条件下で sample を採取し, さらに10分間の基礎ブドウ糖濃度による灌流の後, 高濃度の D-glucose を用いて灌流液のブドウ糖濃度を直ちに 20mM に増加させて20分間刺激した。経時的に得た灌流液中のインスリン濃度を RIA で測定した。また ionomycin 刺激は, 高濃度 D-glucose 刺激と同じ前処置の後に, それぞれの基礎ブドウ糖濃度で 1  $\mu\text{M}$  の ionomycin を加えた Hanks-HEPES 緩衝液を用いて20分間刺激した。この間に経時的に得た灌流液中のインスリン濃度を RIA で測定した。

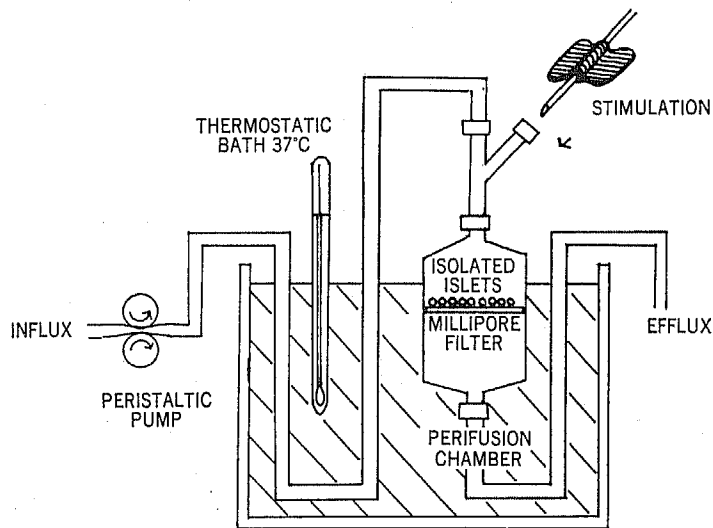


Fig. 3 Perifusion systems.

### E ラ島への fura-2 の load と細胞内遊離 $\text{Ca}^{2+}$ の測定

$\text{Ca}^{2+}$  感受性蛍光色素 fura-2 は, Grynkiewicz および Sussman らの方法<sup>31)32)</sup>でラ島に load した。

160個の単離したラ島を含む 5.0mM D-glucose, KRB-HEPES 緩衝液に, fura-2AM (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, U.S.A. : fura-2 Acetoxymethylester) を加えて 2 $\mu\text{M}$ /1ml とし, 37°C で20分間緩やかに振盪しつつ incubation した。この条件下で fura-2AM は, 細胞内に透過して細胞内の esterase により fura-2 となり, 細胞内遊離  $\text{Ca}^{2+}$  と当量比で結合する<sup>31)</sup>。Fura-2 を load したラ島は KRB-HEPES 緩衝液のブドウ糖基礎濃度を 1.7mM, 5mM, 7.5mM, そして 10mM として前処置した。これらを fluorometer (HITACHI F-4000; Hitachi, Tokyo, Japan) を用い, 励起波長 340nm, 放出波長 505nm で蛍光を測定した。細胞内に取り込まれなかった fura-2 を取り除くため 3 回同じ緩衝液で洗浄した後, 80個のラ氏島を 0.5ml 緩衝液に浮遊させて, thermostatic quartz cuvette (37°C) に入れ microstirrer にて攪拌しつつ, 蛍光が安定したところで D-glucose および ionomycin を加えて, それぞれ cuvette 内での濃度をブドウ糖 20mM, ionomycin 1 $\mu\text{M}$  として刺激し, 経時的に蛍光の変化を記録して  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  を測定した。コントロールとして D-glucose 濃度 1.7mM の KRB-HEPES 緩衝液による前処置の後, 同じ緩衝液で刺激して蛍光を測定した。

### F 統計

おのおの実験は予備実験の上, 3~4 回行われた。結果は平均土標準偏差として図に示した。統計は, インスリン分泌の各相の検定に Student's, t-test (paired) を用い,  $p$ -values  $< 0.05$  を有意とした。また基礎ブドウ糖濃度によるインスリン分泌の違いの検定に Student's t-test (unpaired) を用い,  $p$ -values  $< 0.05$  を有意とした。

## III 結 果

### A *In vivo* での高血糖刺激は *in vitro* でのインスリン分泌能に影響を与える

*In vivo* でのブドウ糖持続注入時の血糖値を Fig. 4 に示した。50% D-glucose solution を投与するとラットの血糖値は常に 16.7mM 以上となった。これに対して 5% D-glucose solution 投与中のラットの血糖値は正常に保たれていた。

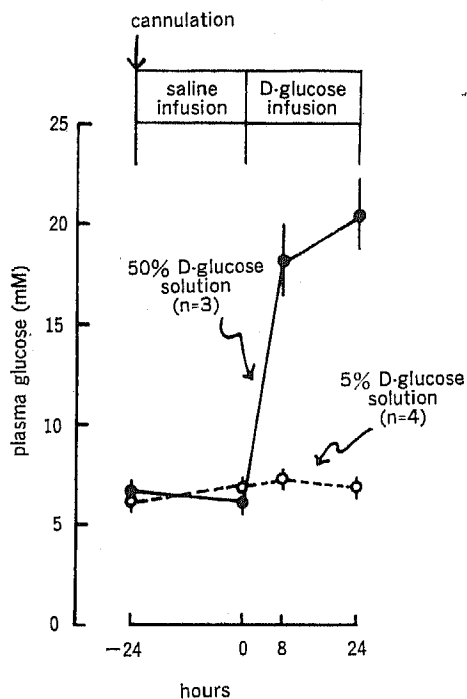


Fig. 4 *In vivo* addition of D-glucose on blood glucose in rats. For the first 24 hours, physiologic saline was administered, and subsequently, 5% D-glucose (○—○) or 50% D-glucose (●—●) was administered for 24 hours intravenously. Circles and vertical lines indicate mean  $\pm$  S.D.

Statistical analysis: ○ vs. ●,  $P < 0.01$ . (at 8 and 24 hours after glucose infusion)

こうしたブドウ糖液注入により, 血糖値を高濃度 (16.7mM 以上), および低濃度 (5mM 程度) に24時間保った条件のもとで脾を摘出し perfusion を行った (Fig. 5)。5% D-glucose solution で前処置した後に摘出した脾を5.6mM の D-glucose, KRB-HEPES 緩衝液で perfusion すると基礎インスリン分泌は10 pg/ml 程度であった。次いで 20mM の D-glucose で刺激すると, インスリン濃度は2分後には 100pg/ml まで上昇して, インスリン分泌の第一相を形成した。これに引き続き一旦減少した後に緩徐な上昇を持続する分泌の第二相が見られた。しかし, 50%の D-glucose solution 投与後に摘出した脾を用いた perfusion study で5.6mM の D-glucose, 20mM の D-glucose のいずれの刺激の場合も, 60pg/ml 程度の比較的高濃度のインスリン分泌がそのまま持続していた。

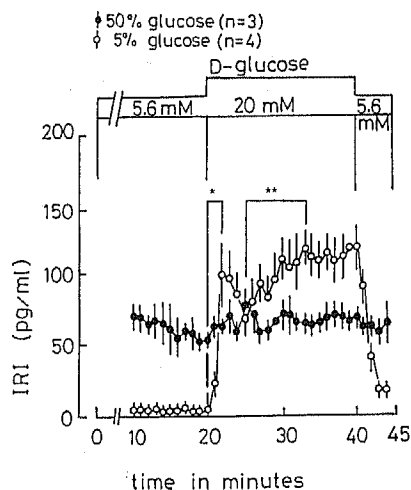


Fig. 5 *In vitro* effect of graded doses of D-glucose on insulin release. Isolated pancreas was obtained from the rats treated with 5% D-glucose (○—○) or 50% D-glucose (●—●) for 24 hours. The pancreas was first perfused with 5.6mM D-glucose for 20min, subsequently with 20 mM D-glucose for 20min and finally with 5.6 mM D-glucose for 5min. Perfusate was collected every one min to measure insulin concentrations. Circles and vertical lines indicate mean  $\pm$  S.D. IRI=immuno-reactive insulin.

Statistical analysis:  $*=P<0.01$ ,  $**=P<0.05$ .

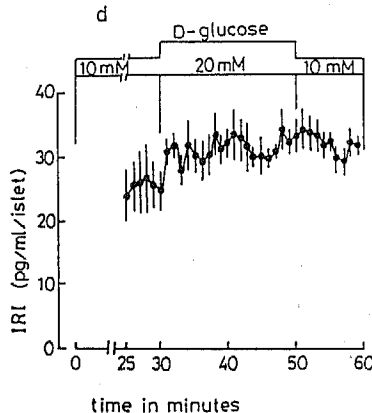
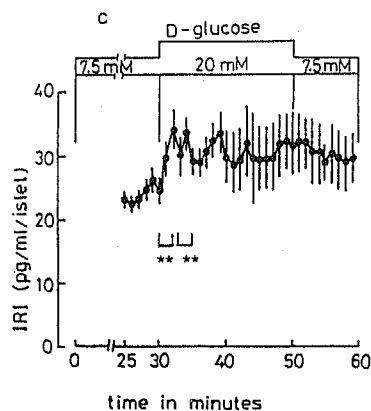
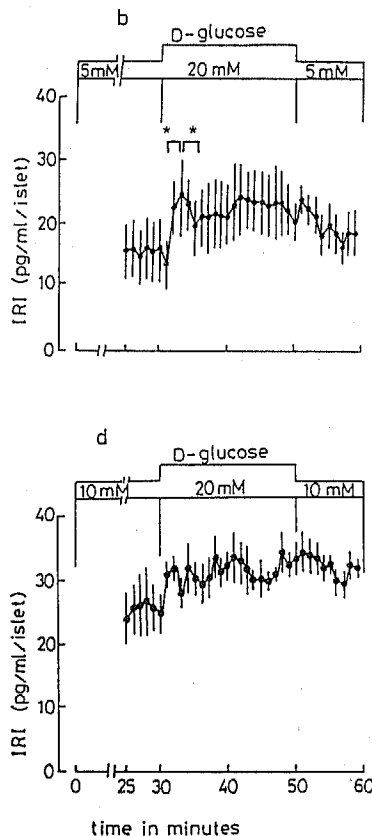
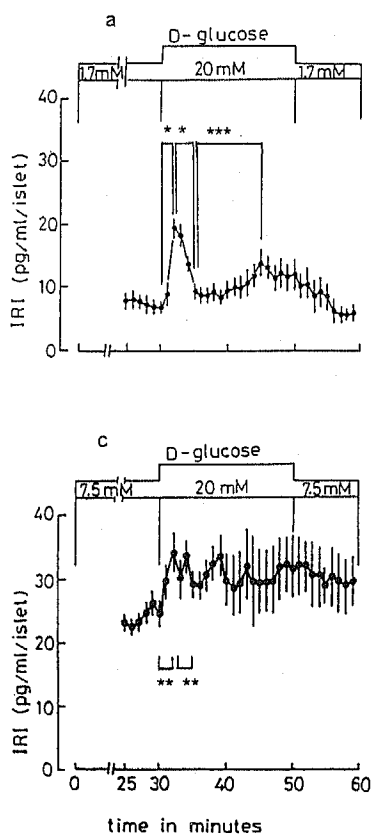


Table 1 Effects of pretreatment with graded doses of D-glucose on the basal insulin release

Basal glucose concentration (mM)	Immuno-reactive insulin (pg/ml)	
1.7 (n = 8)	8.59±3.51	
5.0 (n = 8)	15.3±8.14	**
7.5 (n = 8)	25.5±7.23	*
10.0 (n = 8)	25.8±9.52	**

Statistical analysis : \* =  $P < 0.01$ , \*\* =  $P < 0.05$ .

### B ラ島B細胞のインスリン分泌反応は前処置に用いたブドウ糖濃度が高い程低下する

正常ラットより得たラ島B細胞を種々の濃度の D-glucose を用いて灌流した後、20mM のD-glucose で刺激し、これに対するインスリン分泌反応を perfusion system により測定した (Fig. 6)。ブドウ糖基礎濃度が、1.7mM (Fig. 6a) と低い場合、単離したラ島B細胞は 20mM の D-glucose 刺激に反応し二相性のインスリン分泌を示した。ここで、前処置に用いたブドウ糖濃度を 1.7mM から 5mM, 7.5mM, 10mM と高くすると、分泌されるインスリンの基礎値は濃度依存性に増加するものの (Table 1), 次に加えられた 20mM の D-glucose 刺激に対する反応性は次第に純くなり二相性のパターンは失われていった (Fig. 6a, 6b, 6c, 6d)。

### C D-glucose により引き起こされるラ島B細胞内遊離 $Ca^{2+}$ の上昇は前処置に用いたブドウ糖濃度に依存して低下する

Fura-2AM を load したラ島B細胞を種々の濃度

の D-glucose で前処置し、最終的に 20mM のブドウ糖濃度で刺激した時の  $[Ca^{2+}]_i$  濃度の変化を, fluorometer を用いて蛍光を経時的に測定した (Fig. 7A, 7B)。

1.7mM のブドウ糖基礎濃度 (Fig. 7A-a) では, ラ島B細胞の  $[Ca^{2+}]_i$  は D-glucose 刺激により速やかに増加し, 数分で最大となった。蛍光は刺激後30分以上持続した。ところが D-glucose による前処置の濃度が 5mM (Fig. 7A-b), 7.5mM (Fig. 7A-c), 10mM (Fig. 7A-d) と高くなっていくと,  $[Ca^{2+}]_i$  の反応の立ち上がりは遅延し, その最大反応は低下した。蛍光の測定値から  $[Ca^{2+}]_i$  を換算した結果を示すと (Fig. 7B), D-glucose の基礎濃度が上昇するにつれて, ラ島B細胞の  $[Ca^{2+}]_i$  の 20mM D-glucose 刺激に対する反応性は低下していた。

### D Ionomycin (Ca ionophore) によるインスリン分泌と細胞内遊離 $Ca^{2+}$ の増加反応は D-glucose の基礎濃度が高くても減弱することなく保たれる種々の D-glucose 基礎濃度による前刺激後, iono-

Fig. 6 Effects of pretreatment with graded doses of D-glucose (1.7mM-10mM) on insulin release induced by large dose of D-glucose (20mM). Isolated islets were obtained from untreated rats. The islets were first perfused with graded doses of D-glucose (a-1.7mM, b-5mM, c-7.5mM, d-10mM) for 30min, subsequently with 20mM D-glucose and finally with respective basal doses of D-glucose (1.7mM-10mM). Circles and vertical lines indicate mean±S.D. Mean±S.D. of each point refers to the 4 independent experiments.

Statistical analysis : \* =  $P < 0.01$ , \*\* =  $P < 0.02$ , \*\*\* =  $P < 0.05$ .

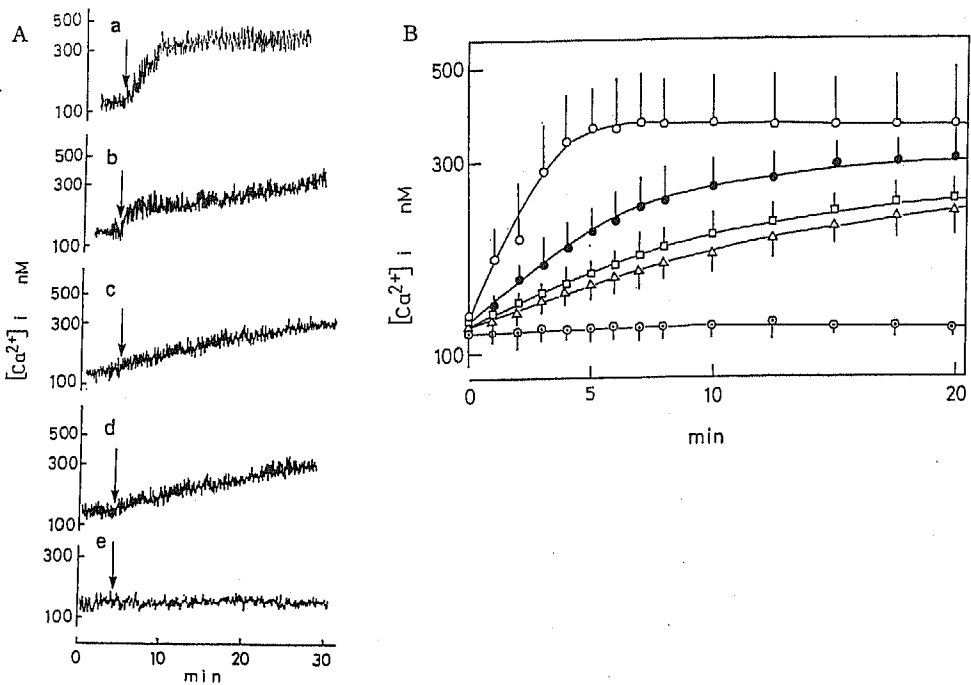


Fig. 7 Effects of pretreatment with graded doses of D-glucose (1.7mM-10mM) on an increase of cytoplasmic free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration induced by large dose of D-glucose (20mM). The islets, obtained from untreated rats and loaded with  $2\mu\text{M}$  fura-2AM, were suspended in  $500\mu\text{l}$  of basal incubation medium in a thermostatic quartz cuvette ( $37^\circ\text{C}$ ). They were first incubated with graded doses of D-glucose (a-1.7mM, b-5mM, c-7.5mM, d-10mM, e-1.7mM) for over 10min until the fluorescent activities reached steady state. Subsequently,  $2\mu\text{l}$  of concentrated doses of D-glucose were added as indicated by arrow, and incubated with 20mM (a-d) D-glucose. 1.7 mM D-glucose was added in control study "e".

In (B), absolute increase of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  was calculated and the data were expressed as mean  $\pm$  S.D. Mean  $\pm$  S.D. of each point refers to 3 independent experiments. Pretreatment dose of D-glucose is a-1.7mM ( $\bigcirc$ — $\bigcirc$ ), b-5mM ( $\bullet$ — $\bullet$ ), c-7.5mM ( $\square$ — $\square$ ) or d-10mM ( $\triangle$ — $\triangle$ ) respectively, and "e" is control ( $\odot$ — $\odot$ ).  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  = cytoplasmic free calcium concentration.

Statistical analysis: a- $\bigcirc$  vs. c- $\square$ , a- $\bigcirc$  vs. d- $\triangle$ , a- $\bigcirc$  vs. e- $\odot$ , b- $\bullet$  vs. e- $\odot$ , c- $\square$  vs. e- $\odot$ ,  $P < 0.01$ . a- $\bigcirc$  vs. b- $\bullet$ , c- $\square$  vs. d- $\triangle$ ,  $P < 0.05$ . (at 5min after glucose stimulation)

mycin (Ca ionophore) 刺激を合わせ加えた場合、ラ島B細胞のインスリン分泌反応がどのようになるかを Fig. 8 に示す。

D-glucose の基礎濃度が 1.7mM の条件下では (Fig. 8a),  $1\mu\text{M}$  の ionomycin 刺激によるインスリン分泌はごくわずかしき認められなかった。然るに D-glucose の基礎濃度が 5mM, 7.5mM, 10mM に

なると、インスリンの基礎分泌値は D-glucose の濃度に依存して増加していた (Table 1)。一方, ionomycin 刺激をさらに加えると、速やかにインスリン濃度は上昇しておよそ  $40\sim 50\text{pg/ml}$  程度の最大値に達する peak を形成した (Fig. 8b, 8c, 8d)。この第一相分泌は3分程度続いたが、D-glucose の基礎濃度が上昇しても有意な差をしめさなかった。その後は



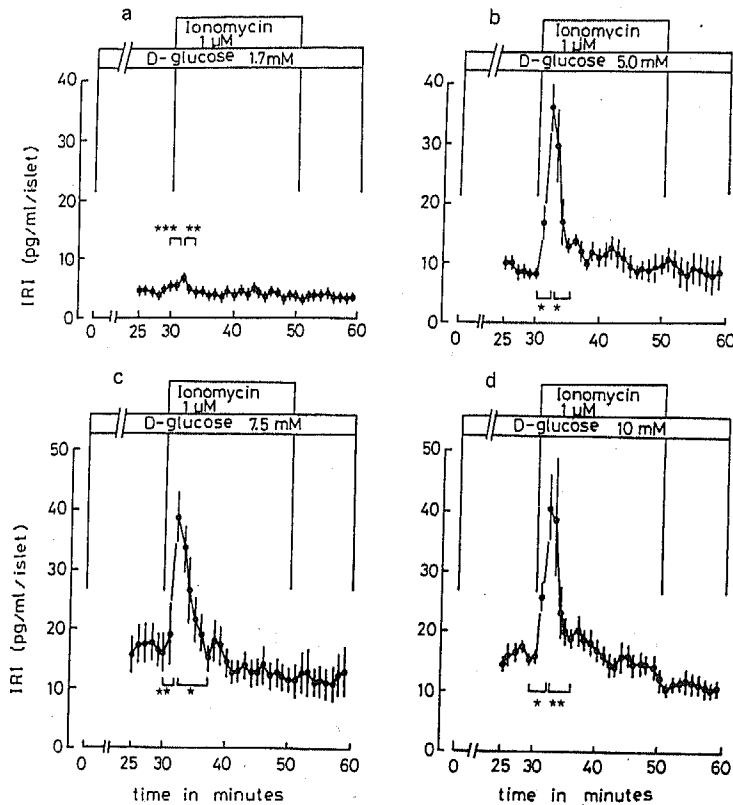


Fig. 8

Effects of pretreatment with graded doses of D-glucose (1.7mM-10mM) on insulin release induced by ionomycin. The islets were obtained from untreated rats and perfused with graded doses of D-glucose (1.7 mM-10 mM) for 60min. During this perfusion, 1 $\mu$ M of ionomycin was added for 20 min. Circles and vertical lines indicate mean $\pm$ S.D. Mean $\pm$ S.D. of each point refers to 4 independent experiments.

Statistical analysis: \* =  $P < 0.01$ , \*\* =  $P < 0.02$ , \*\*\* =  $P < 0.05$

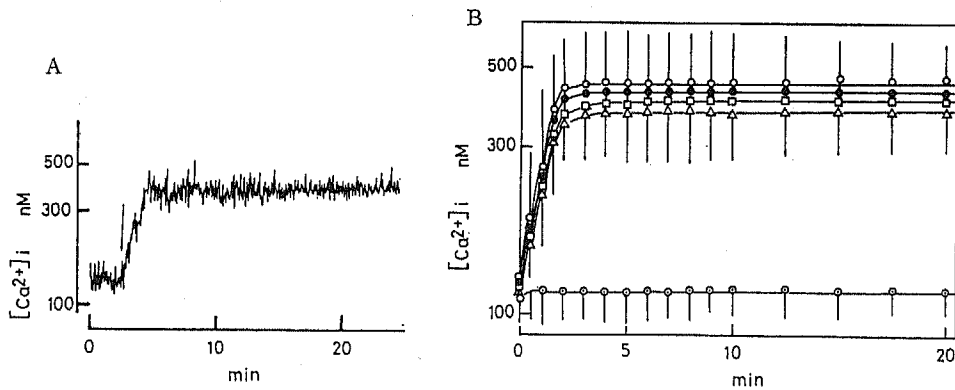


Fig. 9 Effects of pretreatment with graded doses of D-glucose (1.7mM-10mM) on increase in  $[Ca^{2+}]_i$  induced by 1  $\mu$ M ionomycin. The islets were obtained from untreated rats.

In (B), absolute increase of  $[Ca^{2+}]_i$  was calculated and the data were expressed as mean $\pm$ S.D. Mean $\pm$ S.D. of each point refers to 3 independent experiments. Pretreatment dose of D-glucose is a-1.7mM (○-○), b-5mM (●-●), c-7.5mM (□-□) or d-10mM (△-△) respectively, and "e" is control (⊙-⊙).

Statistical analysis: a-○, b-●, c-□, and d-△, vs. e-⊙,  $P < 0.01$  (at 3min after stimulation)

ionomycin の刺激が続いているにもかかわらずインスリン分泌が低下し、軽度のインスリン分泌を認めるに過ぎなかった。

Fura-2 を load した単離ラ島を 1.7mM から 10mM の D-glucose 基礎濃度にて前処置し、さらに 1  $\mu$ M の ionomycin で刺激して蛍光を測定すると (Fig. 9A), D-glucose の基礎濃度に関係なく刺激直後より急峻に  $[Ca^{2+}]_i$  は増加して、2 分程で最大となり、反応が持続した。換算値から  $[Ca^{2+}]_i$  の反応を分析すると、用いた D-glucose の濃度に関係なく  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇することが判明した (Fig. 9B)。

#### IV 考 察

人間やラットに糖を負荷するとインスリンが分泌されるが、その分泌は始めの急峻な増加と、これに引き続いた緩やかな増加とからなり、二相性分泌として広く理解されている<sup>33)-37)</sup>。今回の実験においても、5% D-glucose solution を持続注入して刺激し、血糖が正常に保たれたラットより得た脾臓が、20mM の D-glucose に反応して典型的な二相性分泌を示した。また、無処置ラットより得た単離ラ島も、少量の D-glucose で前処置した場合、その後の 20mM の D-glucose 刺激に反応し、典型的な二相性インスリン分泌を示した。一方これに対し、糖尿病でしばしば第二相の緩やかなインスリン分泌は見られながらも第一相の急峻なインスリン分泌を欠くことが知られており<sup>5)6)38)39)</sup>、糖負荷に対する第一相および第二相からなるインスリン分泌が最も生理的な分泌の形態なのであろう。

こうした生理的 二相性分泌は血糖の変化によってどのように影響されるのであろうか。この疑問に答えるため、ラットに 24 時間にわたり比較的大量の D-glucose を投与したところ、このラットから摘出した脾臓は、*in vitro* で加えた少量の D-glucose 刺激時にも高インスリン分泌相を示し、ついで与えた大量の D-glucose に反応せずそのままのインスリン分泌が持続した。

こうした二相性インスリン分泌の欠如は、確かに異常であり、従来の血糖—インスリンのフィードバック機構で説明することができないが、あるいは *in vivo* における糖刺激が強すぎて、しかも長時間 (24 時間) にわたりすぎたため、脾臓ラ島 B 細胞のインスリン貯蔵が枯渇し、その turn over が最高に達する結果生じたものかも知れない。しかし、この仮説は、*in vivo*

の hyperglycemic clamp による報告や<sup>40)</sup>、さらに長時間のブドウ糖持続注入をした実験でインスリンの貯蔵が残っていた<sup>9)</sup> ことより、考え難いと思われる。したがって、インスリン貯蔵は枯渇せず、正常とは異なる機構で糖刺激が受け取られるため (いわゆる desensitization<sup>11)-15)</sup>、インスリンの二相性分泌が消失する可能性が強いと考えられる。

このような疑問に答えるために、より単純化した系での検討が要求されるため、次に単離ラ島を用いた *in vitro* の D-glucose による刺激実験を行った。Fig. 6 に示したように、ラ島をさまざまな濃度の D-glucose により 30 分間の perfusion を行くと、その使用した D-glucose の濃度に比例してインスリン分泌が増加しており、従来から述べられている血糖—インスリン相関関係<sup>3)</sup> が確認された。しかしこれらのラ島をさらに高濃度の D-glucose で刺激すると、低濃度の D-glucose で前処置した場合にのみ典型的な二相性インスリン分泌がみられ、以下前処置に用いた D-glucose が増加するにつれて第一相分泌が次第に減弱し、ついには第一相、第二相ともに見られない緩やかなインスリン分泌に移行した。言いかえれば、ごく短時間 (30 分) であっても高血糖状態があるだけで、次に来る過血糖を抑制することができなくなるわけで、生体のホメオスタシスからいえば大変な不都合という他ない。今回ラ島内インスリン含量を測定していないが、糖による前処置が僅か 30 分間しか行われておらず、また他のインスリン分泌刺激 (ionomycin : Fig. 8b, 8c, 8d) により分泌を引き起こし得た点から、ラ島 B 細胞内のインスリンが枯渇しているとは考えられず、こうしたインスリン分泌の二相性の欠如には、インスリン分泌における desensitization と言えるような新しい機構が関与しているものと考えてよいだろう。

他の内分泌線と同様に<sup>27)28)41)42)</sup>、脾臓のインスリン分泌に  $Ca^{2+}$  が必要とされている点から<sup>35)37)43)-47)</sup>、まず考えられることは、こうした二相性インスリン分泌の消失が細胞内  $Ca^{2+}$  の異常によって生じたとする考えであろう。この考えを確かめるため、前述した 20 mM D-glucose 負荷実験時のラ島 B 細胞内遊離  $Ca^{2+}$  を測定した。すでに報告されたのと同様に、確かに二相性インスリン分泌の見られる場合に、細胞内  $Ca^{2+}$  は最も強く増加したが<sup>48)</sup>、インスリン分泌の第一相が減弱するにつれて、 $Ca^{2+}$  の増加は次第に減少した。したがって、インスリン分泌の第一相の欠如に、細胞内  $Ca^{2+}$  の増加異常が強く関与するものと思われる。

しかしここに測定された細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度だけで、インスリン分泌の全てを説明することは困難であると思われる<sup>49)</sup>。すでに示したように、ラ島を種々の濃度の D-glucose で前処置すると、その基礎濃度に依存してインスリン分泌は増加したが、細胞内遊離  $\text{Ca}^{2+}$  濃度はまったく変化を示さなかった。仮に  $\text{Ca}^{2+}$  がインスリン分泌の唯一の key とすれば、「 $\text{Ca}^{2+}$  濃度の増加の程度とインスリン分泌の増加の程度は確かに平行するが、 $\text{Ca}^{2+}$  の増加は一過性のため測定時までには減弱した。」と考える他はない。だが Fig. 7A に示したように、 $\text{Ca}^{2+}$  の増加が30分以上続いていることからこの考えは妥当でない。さらに Fig. 9A に示したように、ionomycin により  $\text{Ca}^{2+}$  の増加が生じるにもかかわらず、インスリン分泌は Fig. 8 に示したように、同時に投与された D-glucose により強く規定されていた。したがって、糖の濃度と細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  とは、複雑に絡み合いながらインスリン分泌を行っていると考えられ、その真相の究明は今後に残された課題である。

## V 結 語

膵ラ島よりのインスリン分泌は、加えられた糖刺激の強さによって増加し、典型的な場合二相性反応を示すとともに、細胞内遊離  $\text{Ca}^{2+}$  も同時に増加した。しかし強い糖刺激に続いてさらにより強い糖刺激が加えられると、第一相のインスリン反応は次第に減少し、同時に細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  増加も減弱した。こうしたインスリン分泌の程度と細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の変動との明瞭な相関は、ionomycin- $\text{Ca}^{2+}$  増加によるインスリン分泌の際にはみられず、糖と  $\text{Ca}^{2+}$  が複雑に絡み合ってインスリン分泌を行うことが推論された。

本論文の要旨は、第32回日本糖尿病学会総会（1989年4月金沢）および、第62回日本内分泌学会学術総会（1989年6月東京）、第7回富士ホルモカンファレンス（1989年7月箱根）において発表した。

稿を終えるにあたり、御指導御校閲頂きました信州大学医学部老年医学教室 山田隆司教授、高須信行助教授、小宮一郎助手に深謝致します。

## 文 献

- 1) Tepperman, J. : Endocrine function of the pancreas. In : Tepperman, J. (ed.), Metabolic and endocrine physiology, 4th ed., pp.239, Year book medical publishers, Inc., Chicago, 1980
- 2) Zawulich, W.S. : Insulin biosynthesis, structure, storage, and release. In : Marble, A., Krall, L.P., Bradley, R.F., Christlieb, A.R. and Soeldner, J.S. (eds.), Joslin's Diabetes Mellitus, 12th ed., pp.65, Lea and Febiger, Philadelphia, 1985
- 3) Unger, R.H. and Foster, D.W. : Diabetes mellitus, Islet cell hormone responses in fuel regulation. In : Wilson, J.D. and Foster, D.W. (eds.), Williams' textbook of endocrinology, 7th ed., pp.1031-1032, Saunders Corp., Philadelphia, 1985
- 4) Grill, V., Westberg, M. and Ostenson, C.G. : B cell insensitivity in a rat model of non-insulin-dependent diabetes : Evidence for a rapidly reversible effect of previous hyperglycemia. J Clin Invest, 80 : 664-669, 1987
- 5) Lerner, R.L. and Porte, D.Jr. : Acute and steady-state insulin responses to glucose in nonobese diabetic subjects. J Clin Invest, 51 : 1624-1631, 1972
- 6) Cerasi, E., Luft, R. and Efendić, S. : Decreased sensitivity of the pancreatic beta cells to glucose in prediabetic and diabetic subjects. Diabetes, 21 : 224-234, 1972
- 7) Giroix, M.H., Portha, B., Kergoat, M., Bailbe, D. and Picon, L. : Glucose insensitivity and amino-acid hypersensitivity of insulin release in rats with non-insulin-dependent diabetes : A study with the perfused pancreas. Diabetes, 32 : 445-451, 1983
- 8) Dimitriadis, G., Cryer, P. and Gerich, J. : Prolonged hyperglycaemia during infusion of glucose and somatostatin impairs pancreatic A- and B-cell responses to decrements in plasma glucose in normal man : Evidence for induction of altered sensitivity to glucose. Diabetologia, 28 : 63-69, 1985
- 9) Leahy, J.L., Cooper, H.E., Deal, A. and Weir, G.C. : Chronic hyperglycemia is associated with impaired glucose influence on insulin secretion : A study in normal rats using chronic *in vivo* glucose infusions. J Clin Invest, 77 : 908-915, 1986

- 10) Brunzell, J.D., Robertson, R.P., Lerner, R.L., Hazzard, W.R., Ensink, J.W., Bierman, E.L. and Porte, D. Jr. : Relationships between fasting plasma glucose levels and insulin secretion during intravenous glucose tolerance tests. *J Clin Endocrinol Metab*, 42 : 222-229 1976
- 11) Takasu, N., Sato, S., Yamada, T., Makiuchi, M., Furihata, R. and Miyakawa, M. : The different modes of action of thyrotropin and prostaglandin  $E_1$  on the cyclic adenosine 3'5'-monophosphate synthesis in human thyroid, as studied by sequential stimulations. *Hormone Metab Res (Stuttgart)*, 8 : 206-211, 1976
- 12) Takasu, N., Charrier, B., Mauchamp, J. and Lissitzky, S. : Modulation of adenylate cyclase/cyclic AMP response by thyrotropin and prostaglandin  $E_2$  in cultured thyroid cells. *Eur J Biochem*, 90 : 139-146, 1978
- 13) Green, D.A. and Clark, R.B. : Adenylate cyclase coupling proteins are not essential for agonist-specific desensitization of lymphoma cells. *J Biol Chem*, 265 : 2105-2108, 1981
- 14) Rapoport, B., Filetti, S., Takai, N. and Seto, P. : Studies on the desensitization of the cyclic AMP response to thyrotropin in thyroid tissue. *FEBS Lett*, 146 : 23-27, 1982
- 15) Kraiem, Z., Alkobi, R. and Sadeh, O. : Sensitization and desensitization of human thyroid cells in culture : Effects of thyrotrophin and thyroid-stimulating immunoglobulin. *J Endocrinol*, 119 : 341-349, 1988
- 16) Komiya, I. and Unger, R.H. : Absence of glucopenic inhibition of the insulin response to arginine at the onset of diabetes in BB/W rats. *Diabetologia*, 31 : 225-227, 1988
- 17) Grodsky, G.M. and Fanska, R.E. : The *in vitro* perfused pancreas. *Methods Enzymol*, 39 : 364-372, 1975
- 18) Hisatomi, A., Maruyama, H., Orci, L., Vasko, M. and Unger, R.H. : Adrenergically mediated intrapancreatic control of the glucagon response to glucopenia in the isolated rat pancreas. *J Clin Invest*, 75 : 420-426, 1985
- 19) Yalow, R.S. and Berson, S.A. : Immunoassay of endogeneous plasma insulin in man. *J Clin Invest*, 39 : 1157-1175, 1960
- 20) Herbert, V., Lau, K.S., Gottlieb, C.W. and Bleicher, S.J. : Coated charcoal immunoassay of insulin. *J Clin Endocrinol Metab*, 25 : 1375-1384, 1965
- 21) Lacy, P.E. and Kostianovsky, M. : Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes*, 16 : 35-39, 1967
- 22) Shibata, A., Ludvigsen, C.W. Jr., Naber, S.P., McDaniel, M.D. and Lacy, P.E. : Standardization of a digestion-filtration method for isolation of pancreatic islets. *Diabetes*, 25 : 667-672, 1976
- 23) Gotoh, M., Maki, T., Halban, P., Mutkoski, R., Satomi, S. and Monaco, A. : Reproducibly high yield of rat islets by secretory digestion after intra-ductal collagenase injection (abstract). *Diabetes*, 34 [suppl] : 169A, 1985
- 24) Kalkhoff, R.K., Siegesmund, K.A. and Dragen, R.F. : Tolubutamide perfusion of rat islets : Sequential changes in calcium, phosphorus, sodium, potassium, and chlorine in single beta cells. *J Clin Invest*, 72 : 478-482, 1983
- 25) Bandisod, M.S. : Effect of arginine and glucagon on perfused purified beta cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 151 : 948-953, 1988
- 26) Wollheim, C.B. and Pozzan, T. : Correlation between cytosolic free  $Ca^{2+}$  and insulin release in an insulin-secreting cell line. *J Biol Chem*, 259 : 2262-2267, 1984
- 27) Fried, R.M. and Tashjian, A.H. Jr. : Unusual sensitivity of cytosolic free  $Ca^{2+}$  to changes in extracellular  $Ca^{2+}$  in rat C-cells. *J Biol Chem*, 261 : 7669-7674, 1986
- 28) Haller-Brem, S., Muff, R., Petermann, J.B., Born, W., Ross, B.A. and Fischer, J.A. : Role of cytosolic free calcium concentration in the secretion of calcitonin gene-related

- peptide and calcitonin from medullary thyroid carcinoma cells. *Endocrinology*, 121 : 1272-1277, 1987
- 29) Yada, T., Russo, L.L. and Sharp, G.W.G. : Phorbol ester-stimulated insulin secretion by RINm5F insulinoma cells is linked with membrane depolarization and an increase in cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. *J Biol Chem*, 264 : 2455-2462, 1989
- 30) Geschwind, J.F., Hiriart, M., Glennon, M.C., Najafi, H., Corkey, B. E., Matschinsky, F.M. and Prentki, M. : Selective activation of  $\text{Ca}^{2+}$  influx by extracellular ATP in a pancreatic  $\beta$ -cell line (HIT). *Biochim Biophys Acta*, 1012 : 107-115, 1989
- 31) Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R.Y. : A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, 260 : 3440-3450, 1985
- 32) Sussman, K.E., Leitner, J.W. and Draznin, B. : Cytosolic free-calcium concentrations in normal pancreatic islet cells : Effect of secretagogues and somatostatin. *Diabetes*, 36 : 571-577, 1987
- 33) Wollheim, C.B., Kikuchi, M., Renold, A.E. and Sharp, G.W.G. : The roles of intracellular and extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in glucose stimulated biphasic insulin release by rat islets. *J Clin Invest*, 62 : 451-458, 1978
- 34) Piperleers, D., in'tVeld, P., Maes, E. and Van de Winkel, M. : Glucose-induced insulin release depends on functional cooperation between islets cells. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 79 : 7322-7325, 1982
- 35) Zawulich, W., Brown, C. and Rasmussen, H. : Insulin secretion : Combined effects of phorbol ester and A23187. *Biochem Biophys Res Commun*, 117 : 448-455, 1983
- 36) Kanatsuka, A., Makino, H., Sakurada, N., Hashimoto, N., Yamaguchi, T. and Yoshida, S. : Biphasic insulin response to high glucose and a role of protons and calcium. *Endocrinology*, 120 : 77-82, 1987
- 37) Blachier, F. and Malaisse, W.J. : Effect of exogeneous ATP upon inositol phosphate production, cationic fluxes and insulin release in pancreatic islet cells. *Biochim Biophys Acta*, 970 : 222-229, 1988
- 38) Palmer, J.P., Benson, J.W., Walter, R.M. and Ensink, J.W. : Arginine-stimulated acute phase of insulin and glucagon. *J Clin Invest*, 58 : 565-570, 1976
- 39) Vague, P. and Moulin, J.P. : The defective glucose sensitivity of the B cell in non insulin dependent diabetes. Improvement after twenty hours of normoglycaemia. *Metabolism*, 31 : 139-142, 1982
- 40) Dimitriadis, G.D., Pehling, G.B. and Gerich, J.E. : Abnormal glucose modulation of islet A-and B-cell responses to arginine in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes*, 34 : 541-547, 1985
- 41) Wollheim, C.B. and Sharp, G.W.G. : Regulation of insulin release by calcium. *Physiol Rev*, 61 : 914-973, 1981
- 42) Tasaka, K., Stojilkovic, S.S., Izumi, S. and Catt, K.J. : Biphasic activation of cytosolic free calcium and LH responses by gonadotropin-releasing hormone. *Biochem Biophys Res Commun*, 154 : 398-403, 1988
- 43) Hoenig, M. and Sharp, G.W.G. : Glucose induces insulin release and a rise in cytosolic calcium concentration in a transplantable rat insulinoma. *Endocrinology*, 119 : 2502-2507, 1986
- 44) Arkhammar, P., Nilsson, T., Rorsman, P. and Berggren, P.O. : Inhibition of ATP-regulated  $\text{K}^+$  channels precedes depolarization-induced increase in cytoplasmic free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in pancreatic  $\beta$ -cells. *J Biol Chem*, 262 : 5448-5454, 1987
- 45) Gylfe, E. : Glucose-induced early changes in cytoplasmic calcium of pancreatic  $\beta$ -cells studies with time-sharing dual-wavelength fluorometry. *J Biol Chem*, 263 : 5044-5048, 1988
- 46) Nescher, R., Praiss, M. and Cerasi, E. : Immediate and time-dependent effects of glucose

- on insulin release : Differential calcium requirements. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 117 : 409-416, 1988
- 47) Nilsson, T., Arkhammar, P., Rorsman, P. and Berggren, P.O. : Inhibition of glucose-stimulated insulin release by  $\alpha_2$ -adrenoceptor activation is paralleled by both a repolarization and a reduction in cytoplasmic free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. *J Biol Chem*, 263 : 1855-1860, 1988
- 48) Nilsson, T., Arkhammar, P. and Berggren, P.O. : Dual effect of glucose on cytoplasmic free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration and insulin release reflects the  $\beta$ -cell being deprived of fuel. *Biochem Biophys Res Commun*, 153 : 984-991, 1988
- 49) Prentki, M. and Matschinsky, M. :  $\text{Ca}^{2+}$ , c-AMP, and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion. *Physiol Rev*, 67 : 1185-1248, 1987

(1. 9. 30 受稿)

---