



ラット灌流臓を用いたグルカゴン分泌調節機構の研究： とくにブドウ糖によるグルカゴン分泌抑制機序 について

後藤，康生

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

1976-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0171

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000171>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・本籍 後 藤 康 生 (香川県)
 学位の種類 医学博士
 学位記番号 医博い第168号
 学位授与の要件 学位規則第5条第1項該当
 学位授与の日付 昭和51年3月31日
 学位論文題目 ラット灌流膵を用いたグルカゴン分泌調節機構の研究
 —とくにブドウ糖によるグルカゴン分泌抑制機序
 について—

審査委員 主査教授 井村 裕 夫
 教授 木村 修 治 教授 田中 千賀子

論文内容の要旨

はじめに

近年糖尿病では膵B細胞のみならずA細胞においてもブドウ糖に対する感受性が低下しているとの考え方が有力となっている。ブドウ糖によるインスリン分泌機構については従来より種々の研究がなされているが、ブドウ糖によるグルカゴン分泌抑制機序についてはなお明らかでない。そこで著者はラット灌流膵の系を用いて、種々の糖類、ブドウ糖の代謝産物並びに phosphodiesterase 阻害剤テオフィリンのグルカゴン分泌に及ぼす影響についてインスリン分泌と対比しながら検討を加え、ブドウ糖のグルカゴン分泌抑制機構についての解明を試みた。

方 法

Wistar 系雄ラットを用い、Grodsky らの方法に準じて膵標本を作製した。腹腔動脈より灌流液を注入し、門脈からの流出液を採取した。灌流液としては、0.25%ウシアルブミン、3.8%デキストラン Krebs-Ringer bicarbonate 緩衝液を使用し、95%O₂、5%CO₂の混合ガスにより平衡を保ち、pHは7.4、酸素分圧は350mmHgに維持した。膵標本並びに灌流液は37℃に保持し流量は2.1CC/minとした。

このような条件で以下の実験を行った。

(実験A) 4群のラット膵において以下の物質で60分間灌流した。

- ① ブドウ糖 2.8 mM (N=12)
- ② ブドウ糖 8.3 mM (N=6)

③ テオフィリン 5 mM + ブドウ糖 2.8 mM (N=5)

④ 果糖 16.7 mM + ブドウ糖 2.8 mM (N=6)

灌流開始 40 分後より ℓ -アルギニン塩酸塩を最終濃度 38 mM になるよう側管より注入し、20 分間灌流した。

(実験 B) 7 群のラット群においてブドウ糖 2.8 mM で 20 分間灌流した後以下の物質を 35 分間灌流した。

① ブドウ糖 2.8 mM (N=18)

② マンノース 16.7 mM + ブドウ糖 2.8 mM (N=6)

③ 3-O-methylglucose 10 mM + ブドウ糖 2.8 mM (N=4)

④ キシリトール 16.7 mM + ブドウ糖 2.8 mM (N=6)

⑤ D-glyceraldehyde 10 mM + ブドウ糖 2.8 mM (N=4)

⑥ Pyruvate 10 mM + ブドウ糖 2.8 mM (N=6)

⑦ ブタインスリン $1\mu\text{g}/\text{ml}$ + ブドウ糖 2.8 mM (N=4)

灌流開始 35 分後より ℓ -アルギニン塩酸塩を最終濃度 38 mM になるよう側管より注入し 20 分間灌流した。

これらの実験において門脈からの流出液中のインスリン並びにグルカゴンを測定した。インスリンは polyethylene glycol 法、グルカゴンは tale 法を用いた radioimmunoassay により測定した。

成 績

1. アルギニンによるグルカゴン並びにインスリン分泌に及ぼすブドウ糖の影響

ブドウ糖 8.3 mM 存在下でのアルギニン注入前のグルカゴン値は $20 \pm 8 \text{ pg}/\text{ml}$ であり、ブドウ糖 2.8 mM 下の $102 \pm 10 \text{ pg}/\text{ml}$ に比し有意に低い値を示した。アルギニンによるグルカゴン分泌はブドウ糖 2.8 mM 並びに 8.3 mM 下においてともに 2 相性を示したが、ブドウ糖 8.3 mM の場合の第 1, 2 相の頂値は、それぞれ 0.78 ± 0.25 , $0.40 \pm 0.05 \text{ ng}/\text{ml}$ とブドウ糖 2.8 mM の場合の 6.61 ± 0.88 , $2.23 \pm 0.44 \text{ ng}/\text{ml}$ に比し著明に低い値であった。一方アルギニン注入前のインスリン分泌並びにアルギニンによるインスリン分泌はともにブドウ糖の濃度を 8.3 mM と上昇させることにより、著明に促進された。

2. アルギニンによるグルカゴン並びにインスリン分泌に及ぼすテオフィリンの影響

5 mM テオフィリンのみの添加でグルカゴン値は $276 \pm 55 \text{ pg}/\text{ml}$ と対照に比し有意に上昇した。アルギニンによるグルカゴン分泌の第 1, 2 相の頂値もそれぞれ 12.28 ± 1.73 , $4.85 \pm 0.89 \text{ ng}/\text{ml}$ と対照に比し明らかに高値であった。アルギニン注入前のインスリン分泌並びにアルギニンによるインスリン分泌はともにテオフィリン添加により促進された。

3. アルギニンによるグルカゴン並びにインスリン分泌に及ぼす各種糖類の影響

1) 16.7 mM 果糖添加の影響: 果糖単独ではグルカゴン分泌は有意に変化しなかったが、アルギニ

ンによるグルカゴン分泌は対照に比し抑制され、第1, 2相の頂値はそれぞれ 2.13 ± 0.59 , $0.91 \pm 0.11 \text{ ng/ml}$ であった。一方インスリンはアルギニンに対する反応のみが対照に比し明らかに促進された。

2) 16.7 mM マンノース添加の影響: マンノース単独ではグルカゴン分泌に有意の変化を認めなかったが、アルギニンによるグルカゴン分泌は対照に比し著明に抑制され、第1, 2相の頂値はそれぞれ 0.93 ± 0.28 , $0.29 \pm 0.02 \text{ ng/ml}$ であった。一方インスリン分泌はマンノース単独時並びにアルギニン投与後ともに著明に促進された。

3) 10 mM 3-O-methylglucose 添加の影響: 3-O-methylglucose 添加時のグルカゴン並びにインスリン分泌は単独時及びアルギニン投与後ともに対照に比し著変を認めなかった。

4) 16.7 mM キシリトール添加の影響: キシリトール単独ではグルカゴン分泌は有意に変化しなかったが、アルギニンによるグルカゴン分泌の第1, 2相の頂値はそれぞれ 4.69 ± 0.82 , $1.24 \pm 0.18 \text{ ng/ml}$ と第2相のみが対照に比し有意に低い値であった。インスリン分泌は対照と比較して著変を認めなかった。

4. アルギニンによるグルカゴン並びにインスリン分泌に及ぼすブドウ糖の代謝産物の影響

1) 10 mM D-glyceraldehyde 添加の影響: D-glyceraldehydeのみの添加ではグルカゴン分泌は変化しなかったが、アルギニンによるグルカゴン分泌は対照と比較して著明に抑制され、第1, 2相の頂値はそれぞれ 1.02 ± 0.33 , $0.37 \pm 0.07 \text{ ng/ml}$ であった。一方インスリン分泌は D-glyceraldehyde 単独時並びにアルギニン投与後ともに対照に比し著明に促進された。

2) 10 mM Pyruvate 添加の影響: Pyruvate 単独ではグルカゴン分泌は変化しなかったが、アルギニンによるグルカゴン反応は明らかに抑制され、第1, 2相の頂値はそれぞれ 1.72 ± 0.23 , $1.25 \pm 0.22 \text{ ng/ml}$ であった。一方インスリン分泌は対照と著変を認めなかった。

5. アルギニンによるグルカゴン分泌に及ぼすブタインスリンの影響

外因性ブタインスリン $1 \mu\text{g/ml}$ を添加してもアルギニン注入前並びにアルギニン注入後のグルカゴン分泌にはなんら影響を与えなかった。

考 案

膝ラ氏島内で代謝され得る糖はインスリン分泌を促すが、代謝されない糖はそれのみではインスリン分泌を促進しないことから、ブドウ糖によるインスリン分泌にはブドウ糖の代謝が重要であるとする説が提唱された。しかし一方では、ブドウ糖はB細胞膜のレセプターに作用してインスリン分泌を促進するというレセプター説も近年有力になりつつある。この場合細胞内の second messengerとして cyclic AMPが重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。またブドウ糖がグルカゴンの分泌を抑制する事実はよく知られているが、その機序についてはなお明らかではない。そこで著者はラット灌流腺を用いて、種々の糖類、ブドウ糖の代謝産物更にテオフィリンのグルカゴン分泌に及ぼす影響をインスリン分泌と対比しながら検討を加えた。

ブドウ糖を添加するとラ氏島内 cyclic AMP 濃度が上昇する事実より、ブドウ糖によるインスリン分泌には cyclic AMP が重要な役割を担っていると考えられている。ところが phosphodiesterase を阻害して細胞内 cyclic AMP を増加させるテオフィリンは、アルギニンによるグルカゴン並びにインスリン分泌をともに促進した。従ってブドウ糖によるグルカゴン分泌の抑制は、ブドウ糖投与時に見られるラ氏島内 cyclic AMP の増加に由来するとは考え難い。

次に代謝され得る糖であるマンノース並びに果糖は、ブドウ糖同様にアルギニンによるグルカゴン分泌には抑制的に働く事実が明らかとなった。これら糖類は同時にインスリン分泌を促進するので、この増加したインスリンを介してグルカゴン分泌が抑制された可能性も考えられる。しかしブタインスリンを添加してもアルギニンによるグルカゴン分泌にはなんら変化が見られなかった。したがって糖類によるグルカゴン分泌の抑制は、恐らくその際に増加したインスリンを介する二次的な現象ではないかと考えられる。

一方代謝されない糖である 3-0-methylglucose はグルカゴン分泌になんら影響を与えなかった。このことはグルカゴン分泌は代謝されてエネルギーを産生する物質によって抑制される可能性を示唆する。しかし一方、マンノース並びに果糖のアルギニンによるグルカゴン分泌抑制作用も、これら糖類が代謝されたことに由来するのではなく膵A細胞にも存在すると考えられている glucoreceptor に結合することにより発現したとも説明できる。

そこで五炭糖回路に入って代謝されるキシリトール、及びブドウ糖の代謝産物である D-glyceraldehyde 並びに Pyruvate のグルカゴン分泌に及ぼす影響を観察したところ、アルギニンによるグルカゴン分泌はこれらを添加することによりいずれも抑制された。今回のラット遊離膵の灌流実験において、アルギニンによるグルカゴン分泌を抑制するブドウ糖、マンノース、果糖などの糖類、並びに糖の代謝産物である D-glyceraldehyde, Pyruvate はいずれもラ氏島内で代謝され、かつ ATP 濃度を維持することが知られている。

これらの事実はこのような実験条件下におけるアルギニンによるグルカゴン分泌には、膵A細胞内におけるブドウ糖の代謝が大きい役割を演じていることを示唆するものである。またブドウ糖のA細胞への作用は必ずしも単純なものではないと考えられているので、今回の実験もA細胞における glucoreceptor の存在を否定するものではないが、ブドウ糖のA細胞内における代謝もグルカゴン分泌の重要な因子であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

ブドウ糖は生理的に最も重要なインスリン分泌刺激物質であり、同時にグルカゴン分泌抑制物質として知られている。近年糖尿病患者ではブドウ糖によるインスリン分泌機構に障害があるのみでなく、血糖上昇に対してグルカゴン分泌が抑制されない事実が明らかにされ、膵A、B両細胞に異常があるものと推定されている。ブドウ糖のグルカゴン分泌抑制の機構はまだ明らかでないが、これを解明するこ

とは、糖尿病の成因究明にもつながる重要な課題であると言えよう。そこで本研究者は、ラット遊離灌流腔を用いてブドウ糖のグルカゴン分泌抑制作用の機序を研究した。

実験方法としては、ラット腔を胃・十二指腸・脾とともに一つのブロックとして摘出し、腹腔動脈より灌流液を注入し、門脈からの流出液を採取した。分泌刺激としてはアルギニンを選び、これに対する腔グルカゴンの反応に、種々の糖質やその代謝産物がどのように影響するかを観察した。

アルギニンを注入するとグルカゴンの分泌は促進されたが迅速に分泌される第1相と、緩徐に分泌される第2相が認められた。16.7 mMのブドウ糖、果糖、マンノースはいずれもアルギニンによるグルカゴン分泌の第1相、第2相をともに抑制した。一方これらの糖はインスリン分泌を促進したので、インスリンを介するグルカゴン分泌抑制の可能性を検討するため、外来性にインスリンの灌流を行ったが、アルギニンによるグルカゴン分泌には影響は見られなかった。

次に代謝されない糖 3-O-methylglucose の灌流はグルカゴン分泌に有意の影響を及ぼさなかった。また細胞内で代謝されて解糖系に入ると考えられるキシリトールは、アルギニンによるグルカゴン分泌の第2相のみを有意に抑制した。また解糖系の中間産物である D-glyceraldehyde は 10 mMの濃度でアルギニンによるグルカゴン分泌を抑制し、インスリン分泌は促進した。また同じく代謝産物である Pyruvate はアルギニンによるグルカゴン分泌を有意に抑制したが、インスリン分泌には影響をしなかった。

ブドウ糖によるインスリン分泌の機構としてはグルコレセプターを介する機構と、ブドウ糖の代謝を介する機構の2つが考えられており、前者が有力である。しかし本研究の成績から考えると、少なくともアルギニンに対するグルカゴン反応で見ると、A細胞内でのブドウ糖の代謝がグルカゴンの分泌調節に大きい役割を演じているものと考えられる。

以上本研究は、従来知見の乏しいブドウ糖によるグルカゴン分泌抑制の機序について遊離灌流腔を用いて研究したもので、キシリトールやブドウ糖の代謝産物もグルカゴン分泌に抑制的に作用するとの新しい知見を得、A細胞内でのブドウ糖代謝の重要性を指摘した価値ある業績と認める。よって本研究者は医学博士の学位を得る資格があると認める。