

インスリン低血糖誘発時の膵自律神経およびグルカゴンの応答 正常および糖尿病ラットにおける検討

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9122

インスリン低血糖誘発時の膵自律神経およびグルカゴンの応答

—正常および糖尿病ラットにおける検討—

金沢大学医学部内科学第二講座 (主任: 馬淵 宏教授)

高 山 嘉 宏

低血糖からの血糖回復には、血中グルカゴン (immunoreactive glucagon, IRG) 反応が重要な役割をはたすとされている。しかし、この IRG 分泌が生体内において、膵島 A 細胞での低血糖自体あるいは相対的血糖降下により惹起されるか、または中枢神経におけるニューログルコペニアや血糖降下の認識により神経性に誘発されるか、は興味あるテーマである。そこで血糖変動と膵自律神経活動の関係を知る目的で、麻酔したラットを用いインスリン低血糖誘発時 (4 単位/kg, 静注) の大内臓神経および迷走神経膵臓枝の電気活動を直接連続測定し、さらにインスリン投与後早期の門脈血 IRG 濃度を測定した。その結果、1) 血糖はインスリン投与群 (n=5) では、前値平均 124 ± 7 mg/dl より30分間に 1.4 mg/dl・分の速度で降下し、この際、大内臓神経活動は、インスリン投与後13分より対照生食投与群 (n=5) に比し有意に増加し、この時点での血糖値は正常血糖値域内の 104 mg/dl に低下したのみであった。この活動はその後低血糖の成立とともに増加し続けた。2) 門脈血 IRG 濃度は、生食投与群 (n=4) では10分後 305 ± 87 pg/ml であったのに対し、インスリン投与群 (n=4) では10分後 1188 ± 106 pg/ml と明らかに有意の高値であった。またこの際のインスリン投与群の血糖値は前値 100 ± 4 mg/dl から10分後に 84 ± 3 へと平均 16 mg/dl の低下をみたのみで正常血糖値域であった。3) 大内臓神経電気活動は、軽度の低血糖成立下にグルコース投与 (250mg, 静注) を行った際、一過性血糖上昇に一致する一過性の減少を示し、その後の血糖降下とともに直ちに増加を示した。4) 膵迷走神経電気活動はインスリン投与群 (n=5) では低下傾向を示したが、生食投与群との間に有意差を認めなかった。以上の成績は、グルコースカウンターレギュレーション (glucose counterregulation, GCR) において低血糖が成立する以前の血糖の相対的降下が、自律神経系特に交感神経遠心性活動を迅速に増加させ、同時に IRG 分泌を早期に促進することを示唆する。次に、糖尿病状態がこの神経応答にどのような影響を与えるかを知る目的でストレプトゾトシン (streptozotocin, STZ) 投与による糖尿病ラットを用い同様の検討をした。その結果、糖尿病状態成立後、中間型インスリンによる血糖コントロールを行った (glucose controlled, GC) ラット (STZ-GC 群) では、インスリン 4U/kg 静注による低血糖誘発時、1) 大内臓神経活動応答は減弱遅延し (n=5)、同様の血糖降下を示した正常ラット群 (n=5) と比べ15分以降70分まで有意に低下していた。膵迷走神経活動はこの群では (n=5)、正常ラット群 (n=5) と同様に、血糖降下中および低血糖成立時でも無反応であった。2) さらに血糖コントロールを行わなかった (glucose uncontrolled, GU) ラット (STZ-GU 群) では、インスリン 8U/kg 投与後 (n=5)、血糖は前値 308 ± 30 mg/dl から毎分 2.3 mg/dl の急峻な降下を示したにもかかわらず、交感神経の応答は遅延し正常ラット群 (n=5) に較べ20分以後有意に低下していた。3) 門脈血 IRG 濃度は、STZ-GC 群では (n=4) インスリン投与10分後 667 ± 174 と、対照生食投与群 (n=4) の 200 ± 14 pg/ml に対し有意の高値を示した。しかしこの IRG レベルは、正常ラット群 (n=4) の反応に比し有意に低値であった。さらに STZ-GC ラットにおいては、生食投与群 (n=4) の 279 ± 51 pg/ml に対し、インスリン投与群 (n=4) では 396 ± 82 pg/ml と僅かの高値を示したがこの IRG 増加は有意でなかった。以上の一連の成績は、インスリン低血糖誘発時における正常血糖値域内の血糖降下が迅速に交感神経系賦活と IRG 分泌を惹起することを、さらにまた高血糖状態の持続がこれらの反応性を減弱させることを示す。したがって、GCR において自律神経系および IRG 分泌が、重要な役割を担っていることが示唆された。

Key words insulin-induced hypoglycemia, glucagon, autonomic nervous system

生体にとって血糖レベルを一定に保つこと、とりわけ血糖降下時に熱源を適切に動員することは、生体維持、特に中枢神経機能維持の観点より最も重要なホメオスタシス機構の一つである。中枢神経系は通常そのエネルギー源を大部分グルコースに

求めるが、脳はグルコースの産生も貯蔵も行えず循環系からの供給に依存しているため、重度の低血糖が遷延した場合には不可逆的な変化を被る。これに対し、生体ではこのような低血糖あるいは正常域内での血糖降下に対する防御機構、いわゆるグ

平成6年12月16日受付, 平成7年2月8日受理

Abbreviations: CRH, counterregulatory hormone; Ep, epinephrine; GC, glucose controlled; GCR, glucose counterregulation; GR neuron, glucose receptive neuron; GU, glucose uncontrolled; IDDM, insulin-dependent diabetes mellitus; IRG, immunoreactive glucagon; LHA, lateral hypothalamic area; NEp, norepinephrine; STZ, streptozotocin; VMH, ventromedial hypothalamus

ルコースカウンターレギュレーション (glucose counterregulation, GCR) が適切に動員され血糖が維持されている。従って、臨床的には、糖尿病患者においてインスリン治療等に伴う低血糖や急激な血糖低下が出現した際に、これを修復する防御機構が健全であるか否かは特に重要な問題となる。

近年、この GCR においては、内分泌性 (液性) および神経性調節機構が相互に影響を与えつつ作動するとされる。これらの調節機構の相対的重要性に関して、従来以下のように理解されていた¹¹⁻¹⁴⁾。すなわち、主要な役割を果たすのが内分泌性調節機構であり、そのうち膵グルカゴン (immunoreactive glucagon, IRG) が最も重要とされる。さらに、もし何らかの理由で IRG 反応が障害された場合、副腎髄質からのエピネフリン (epinephrine, Ep) 放出がこれを代償するとされている。これら IRG, Ep はともに肝での糖原分解を介しグルコース放出を促進する一方、Ep はインスリン分泌抑制や末梢直接作用を介し糖利用を抑制し、ともに血糖上昇へと導く。他方、低血糖時に動員されるコルチゾール、成長ホルモンは、少なくとも血糖低下からの急速な回復には重要な役割を果たさないとされている。そしてこれらのカウンターレギュラトリックホルモン (counterregulatory hormone, CRH) の分泌において、中枢神経系の関与が多数の研究者によって示唆されている¹⁵⁻¹⁹⁾。このうち IRG に限ってみても、その分泌において神経系の関与を示唆する事実が多数報告されている。その解剖学的背景として、膵ラ島部領域には豊富な副交感・交感神経線維 (cholinergic, catecholaminergic, peptidergic) がみられ、これらの神経終末が血管周囲のみならず、A および B 細胞などに非常に近接して分布していることが知られている^{10,11)}。さらに、大内臓神経遠位端の電気刺激が IRG 分泌を促進することが知られ¹²⁻¹⁶⁾、また迷走神経の電気刺激にても IRG 分泌を促進する¹²⁾との報告もある。一方、近年のイヌにおける研究では GCR において CRH のはたす役割は約 50% にすぎず¹⁸⁾、肝自動調整能¹⁹⁻²¹⁾、肝や末梢組織への交感神経あるいは副交感神経系の関与^{22,23)}、CRH の肝臓での感受性の増加²⁴⁾等の他の機構の関与も想定されている。そしてインスリン低血糖時のグルコース産生における、ホルモンを介した、あるいは直接的な肝臓へ神経系の関与も重要視されつつある。いずれにせよ、血糖のホメオスタシスにおける中枢神経系の役割は、従来、最も重要なテーマの一つであり、最近でもますます注目されるようになってきている。

ところが、GCR において最も重要とされる IRG 分泌についてさえも、その中枢神経系の関与について一定の見解を得ているとは言えない。インスリン低血糖時の IRG 分泌には中枢神経系が重要な役割をはたしているとする成績²⁵⁻²⁸⁾がある一方、Palmer ら^{29,31)}、Fried ら³²⁾、Corrall ら³³⁾は、ヒトにおいて交感神経切断、迷走神経遮断薬あるいは迷走神経切断にて、インスリン低血糖時の IRG 分泌が影響を受けないとも報告している。また他の可能性として、少なくともイヌでは Ep が膵 A 細胞を刺激し IRG 分泌を促すことから^{34,35)}、中枢神経から間接的に副腎を介して IRG 分泌を促しているとの説もある。さらにはまた、临床上重要な糖尿病患者の IRG 分泌についてのみをみても、主要な分泌支配因子について一致した見解がない。即ち 1973 年の Gerich らの報告³⁶⁾以来、インスリン依存型糖尿病 insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM) 患者においてインスリン低血糖時の膵 IRG の分泌不全が存在することが注目され、その機序として、膵 A 細胞の血糖に対する反応性の異常が想定

されている。その機序として Unger³⁷⁾は、膵島内インスリン・グルカゴン相互作用の観点から、インスリン欠乏とそれに伴う高血糖がこの IRG 反応低下の主要因であると提唱している。さらにまた、糖尿病性自律神経症を伴う IDDM 患者ではインスリン低血糖時に著しい IRG 分泌不全を認めることが多いことから^{38,39)}、膵 A 細胞に対する自律神経支配、あるいは交感神経-副腎髄質系の関与にも関心が寄せられている。このように、GCR における IRG 分泌が、生体内において実際どのような機序で調節されているかは、非糖尿病状態も含め、現在もなお十分に明らかにされてはいない。

当教室の中川らは、1) インスリン低血糖時の迅速かつ十分な IRG 反応が膵除神経犬および両側大内臓神経切断犬で著減し、また両側迷走神経切断犬について、正常犬と比較し IRG 反応に有意差を認めないことを報告⁴⁰⁾し、2) さらにインスリン投与 5 分後の早期に正常値域内の血糖降下 (96→89mg/dl) により、IRG 放出が惹起されること⁴¹⁾を見いだした。この実験事実はインスリン低血糖誘発時の IRG 放出が交感神経系の強いコントロール下にあり、また、早期 IRG 分泌が血糖の絶対値よりむしろ正常血糖域内の血糖降下が交感神経節前機構を介する神経性情報により促進されることを示唆する。

そこで本研究では、低血糖誘発時の IRG 分泌反応における膵自律神経機構の関与を知る目的で、麻酔ラットにおいて、大内臓神経または膵迷走神経活動の直接測定下にインスリン低血糖を誘発し、その変動を検討すると共に門脈血中の IRG 濃度も測定した。さらに、糖尿病状態が膵自律神経活動にいかなる変化をもたらすを知る目的で、ストレプトゾトシン (streptozotocin, STZ) 糖尿病ラットを用い同様の実験を行った。その結果、1) インスリン低血糖誘発時、124→104mg/dl の正常血糖域内の血糖降下にて早期に大内臓神経活動は賦活されるが、その際に膵副交感神経活動は変化しないこと、2) この時門脈血中の IRG 濃度が有意に増加すること、3) 糖尿病ラットでは一定期間の高血糖の持続がこれらの反応性を低下させること、を見いだしたので報告する。

対象および方法

1. 実験方法

1. 実験動物と実験前・中の処置

体重 250~350g の Wistar ラット (雄) を用い、一夜 12~16 時間絶食後、ウレタン (800mg/kg, 和光, 大阪) + α -クロロラコース (70mg/kg, 和光) を腹腔内に注射した。開腹下にインスリン注入用カテーテルを下大静脈に挿入した。

2. 採血方法

血糖測定用採血は腹部大動脈に挿入したカテーテルより行った。IRG 測定用採血は門脈の肝流入部直前に挿入したカテーテルより行った。

3. インスリン溶液の作成

低血糖誘発用のインスリンは、ブタ精製モノコンポーネント中性インスリン (Insulin Novo Actrapid MC, 山之内製薬, 東京) を生食水にて 2 倍に希釈し 4 または 8 単位/kg をボラスとして注入した。対照用には同量の生食水を注入した。

4. 神経電気活動の測定部位および測定系

既報の方法で⁴²⁾生体内の神経電気活動を測定した。大内臓神経の遠心性電気活動の測定部位は以下のようにした。すなわち、腹腔神経節からの膵臓枝には迷走神経が混在するとされて

いるので、左大内臓神経が副腎枝を分岐後に左腹腔神経節に入る直前で同神経を分離切断し、その遠心端を用いた。また迷走神経電気活動測定は、横隔膜直下で迷走神経後幹からの脾臓枝が脾臓へ入る直前の遠心端を用いた。この際、剥離切断した神経は流動パラフィンとワセリンの混合液で被覆し、神経の乾燥を防ぐよう細心の注意をはらった。これらの神経の遠心端を銀電極にのせプレアンプ MODEL: DPA-21E (DIA medical system Co., 東京) を通し増幅器 MODEL: DPA-100E (DIA medical system Co.) にて増幅した電気活動を、スパイクカウンターMODEL: DSE-325P (DIA medical system Co.) にてその5秒毎のスパイク数を連続測定した。これをオシロスコープMODEL: SS-5702 (日立電子 K. K., 東京) にて観察しながらデータレコーダーMODEL: A-64 (SONY magnescape Inc. 東京) に入力し、サーマルレコーダーMODEL: RF-85A (フクダ電子 K. K., 東京) 印画した。

5. 実験系の設定

実験目的に応じ以下のラットを作成した。すなわち、1) 正常ラット群; 実験前に無処置のラット, 2) 血糖コントロールをした (glucose controlled, GC) STZ 糖尿病ラット群 (STZ-GC 群); STZ (和光) 40mg/kg を尾静脈より静注し、一週間後に糖尿病状態が成立したことを確認した後、中間型インスリン (12U/kg/日、一週間皮下注, Humalin-N, 塩野義製薬, 東京) による血糖コントロールをした群, 3) 血糖コントロール

をしない (glucose uncontrolled, GU) STZ 糖尿病ラット (STZ-GU 群); 同量の STZ を投与し、二週間血糖コントロールをしなかった群, の3群である。

6. 採血時間および神経活動の測定時間

開腹, カテーテル挿入, ついで神経活動記録開始より, 20~30分間以上の平衡時間をおいて神経活動が安定するのを待ち, 実験を開始した。血糖は, -10, -5, 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90分に測定した。ある時点でのスパイク数は, 5秒毎に30秒間のスパイク数の平均を示した。

II. IRG 濃度測定法

門脈血漿中の IRG 濃度測定用血液は, 採取後直ちにアプロチニン (Bayer, Leverkusen, Germany) 1000単位+エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA2Na, 和光) 1.2mg/1ml・血液を含む氷冷試験管に移し, 冷却遠心にて血漿を分離した後, -20℃で保存した。IRG 測定には, 抗体 30K (Dr. R. H. Unger 提供, Texas 大学, U.S.A.) を用いる既報のラジオイムノアッセイ⁴⁾により2重測定した。

III. 統計学的検討

成績はすべて平均値±標準誤差 (SEM) で表した。推計学的処理には対応のある *t* 検定 (paired *t*-test) または2標本の *t* 検定 (two sample *t*-test) を用い, また3群間以上の比較においてはANOVA 後, Scheffe 検定を用い, いずれも $p < 0.05$ 以下を有意とした。

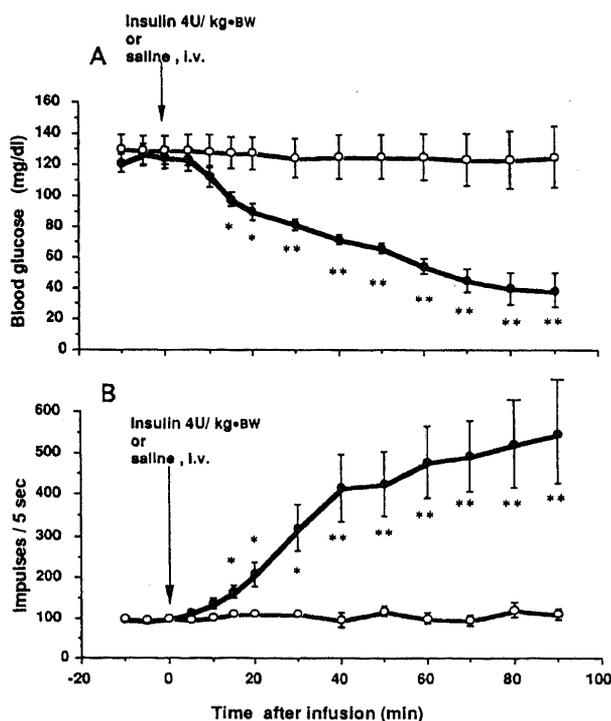


Fig. 1. Changes of arterial blood glucose levels (A) and efferent activities in the splanchnic nerve (B) after insulin or saline infusion in anesthetized normal rats. ○, saline-infused (intravenous, i.v.) rats (n=5); ●, insulin-infused (4U/kg·BW, bolus) rats (n=5). BW, body weight. Vertical bars indicate $\bar{x} \pm SE$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, vs. values of saline infused rats.

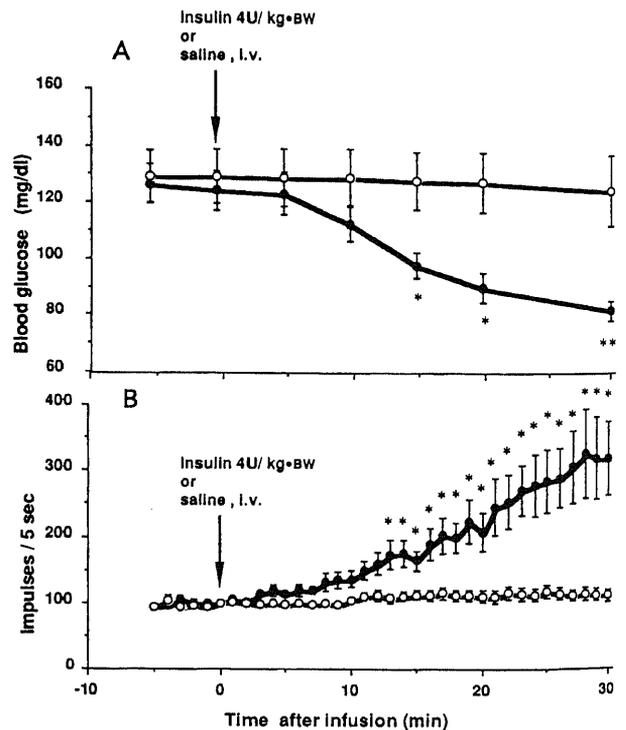


Fig. 2. Changes of arterial blood glucose levels (A) and efferent activities in the splanchnic nerve (B) after insulin or saline infusion in anesthetized normal rats for first 30 min of Fig. 1. ○, saline-infused (i.v.) rats (n=5); ●, insulin-infused (4U/kg·BW, bolus) rats (n=5). Vertical bars indicate $\bar{x} \pm SE$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, vs. values of saline infused rats.

成績

1. 正常ラットにおけるインスリン低血糖誘発時（一部グルコース投与時）の膵自律神経および動脈血糖値の検討

1. インスリン低血糖誘発時の大内臓神経の検討（図1, 2）

インスリン 4U/kg または生食水をボラス投与すると、動脈血糖値は、生食群 (n=5) で前値 $129 \pm 10 \text{ mg/dl}$ より以後同等の値を保ったのに対し、インスリン投与群 (n=5) では、前値 $124 \pm 7 \text{ mg/dl}$ より毎分 1.4 mg/dl の降下を認め15分後には $98 \pm 5 \text{ mg/dl}$ へと有意に低下し、以後も低下を続け低血糖が成立した（図1）。その際に大内臓神経電気活動は、生食群で不変なのに対し、インスリン群では15分後90分までに、有意に増加しつづけた。そこで、この大内臓神経活動のインスリン投与後早期30分間の反応性につき、血糖値との関係をさらに詳細に検討した（図2）。インスリン又は生食投与後の早期30分間の大内臓神経活動を1分毎にみると、インスリン群では10分以後に急速に増加し始め13分以降は生食群に比し有意の増加となった。この13分目の外挿報による血糖値は 104 mg/dl であり、前値 124 から平均 20 mg/dl の低下で、明らかに正常血糖値域内であった。以上の事実は正常血糖域内の血糖降下が、大内臓神経を迅速に賦活することを示す。

2. インスリン低血糖誘発時の膵迷走神経の検討（図3）

インスリン 4U/kg または生食水をボラス投与すると、動脈血糖値は、生食群 (n=5) で前値 $118 \pm 5 \text{ mg/dl}$ より以後わずかに上昇傾向を示したのに対し、インスリン投与群 (n=5) で

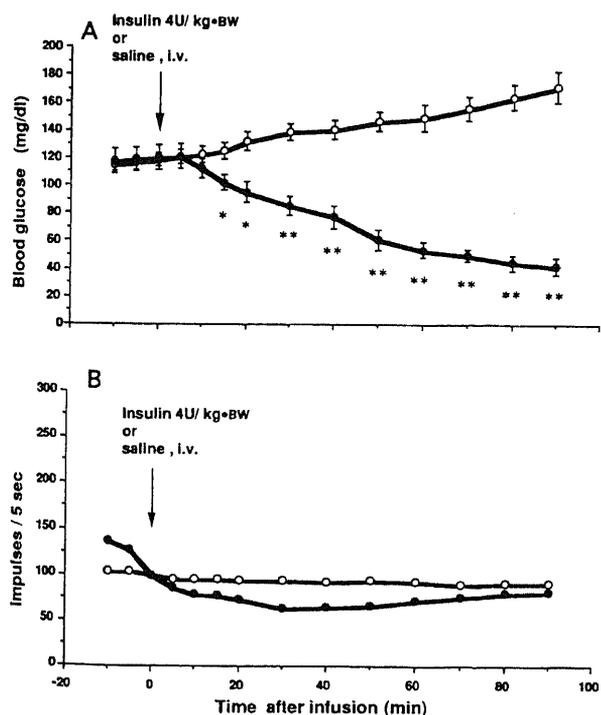


Fig. 3. Changes of arterial blood glucose levels (A) and efferent activities in the pancreatic vagal nerve (B) after insulin or saline infusion in anesthetized normal rats. ○, saline-infused (i.v.) rats (n=5); ●, insulin-infused (4U/kg·BW, bolus) rats (n=5). Vertical bars indicate $\bar{x} \pm \text{SE}$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, vs. values of saline infused rats.

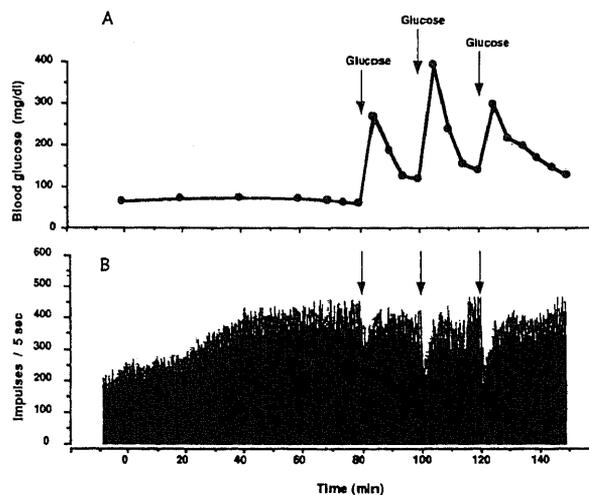


Fig. 4. Changes of arterial blood glucose levels (A) and efferent activities in the splanchnic nerve (B) after glucose bolus infusion (250 mg i.v.) in an anesthetized normal rat with marginal hypoglycemia.

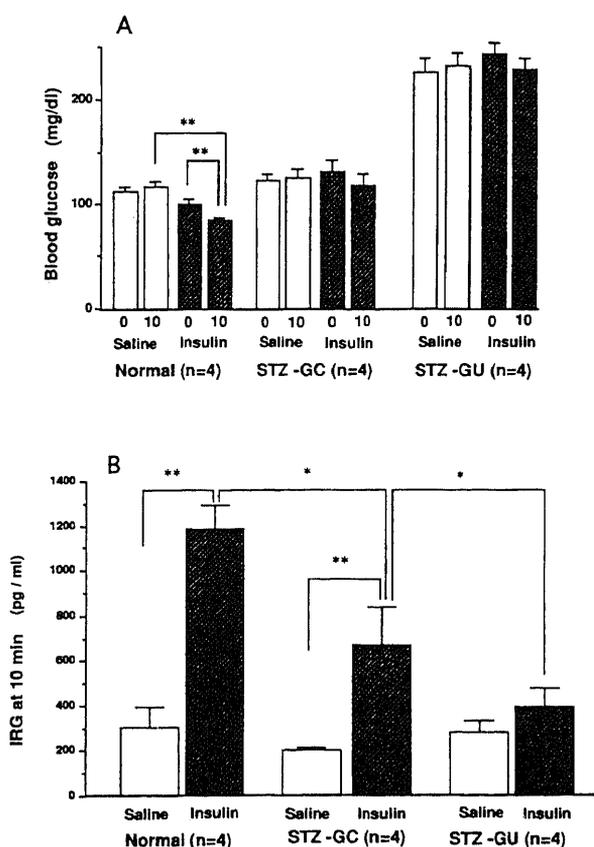


Fig. 5. Arterial blood glucose levels (A) in 0 and 10 min and IRG levels (B) in the portal vein in 10 min after insulin or saline infusion (i.v.) in anesthetized normal, glucose-controlled (STZ-GC) and -uncontrolled (STZ-GU) STZ diabetic rats. 0, 0 min; 10, 10 min. Vertical bars indicate $\bar{x} \pm \text{SE}$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

は、前値 $120 \pm 9 \text{ mg/dl}$ より毎分 1.1 mg/dl の降下を認め15分後には $102 \pm 6 \text{ mg/dl}$ へと有意に低下し、以後も低下を続け低血糖が成立した。インスリン低血糖誘発時の迷走神経幹枝の神経活動は低下傾向を示したが生食投与群との間に有意差を認めなかった。この成績で、血糖降下時及び低血糖成立後も少なくともラットでは、迷走神経系は変動しないことが示された。

3. 持続する正常下限域血糖値における大内臓神経速心性電気活動とそのグルコース投与に対する反応 (図4)

図4は血糖値と交感神経活動との興味ある関係を示す。血糖値をインスリン持続注入下に80分間にわたり71から 56 mg/dl の低血糖領域の上限に維持すると、交感神経活動は徐々に上昇した。図4の80, 100, 120分の時点でグルコース 250 mg のボラス投与により、血糖値は、前値 $56, 115, 136 \text{ mg/dl}$ より5分後にそれぞれ $264, 388, 294 \text{ mg/dl}$ へと上昇後低下した。それまで賦活されていた大内臓神経活動は、グルコース投与後直ちに一過性に低下し、その直後血糖が低下するに従い、再び迅速に賦活された。この事実、急速な血糖上昇が大内臓神経活動を迅速に抑制することを、またその後の血糖降下に対し迅速に賦活されることを示すと考えられる。

II. 正常ラットにおけるインスリン低血糖誘発時の門脈血IRG濃度および動脈血血糖値の検討 (図5)

以上の事実、正常血糖域内の血糖降下あるいは血糖上昇が中枢神経系で認識され、交感神経活動を賦活する事を示す。そこで実際にラットでこのような早期にIRGが放出されているか否かを、別群のラットの門脈血で検討した。図5に生食

($n=4$) およびインスリン ($n=4$) 投与群の前および10分後の動脈血血糖値、10分後の門脈血IRG濃度を示す。生食投与群の血糖は前値 $112 \pm 5 \text{ mg/dl}$ から10分後に $117 \pm 5 \text{ mg/dl}$ へと軽度増加したが、有意差はなかった。インスリン投与群の血糖は前値 $100 \pm 4 \text{ mg/dl}$ から10分後に $84 \pm 3 \text{ mg/dl}$ へと平均 16 mg/dl の有意の低下を認めたが、あきらかに正常血糖域であった。生食投与群の10分後の門脈血IRG濃度は $305 \pm 87 \text{ pg/ml}$ なのに対しインスリン投与群の10分後では $1188 \pm 106 \text{ pg/ml}$ と明らかに有意の高値であった。この事実は前述の交感神経活動測定結果を鑑みると、正常血糖域内の相対的血糖降下が早期に認識され、交感神経活動を亢進しそれがIRG放出を促している可能性を示唆した。

III. STZ糖尿病ラットにおけるインスリン低血糖誘発時の迷走神経および動脈血血糖値の検討

1. STZ糖尿病-血糖コントロール群におけるインスリン低血糖誘発時の大内臓神経の検討 (図6)

対照として図1で既に述べた正常群 ($n=5$) でのインスリン低血糖誘発時の動脈血血糖値と大内臓神経活動を示した。これに対し、STZ 40 mg/kg 投与後に血糖をインスリンにてコントロールした群 (STZ-GC群, $n=5$) では、インスリン 4 U/kg ボラス投与後、動脈血血糖値は、前値 $133 \pm 16 \text{ mg/dl}$ より毎分 1.4 mg/dl と正常群と同様の降下を示し、以後も低下を続け低血糖が成立した。血糖値は正常群との間に有意差を認めな

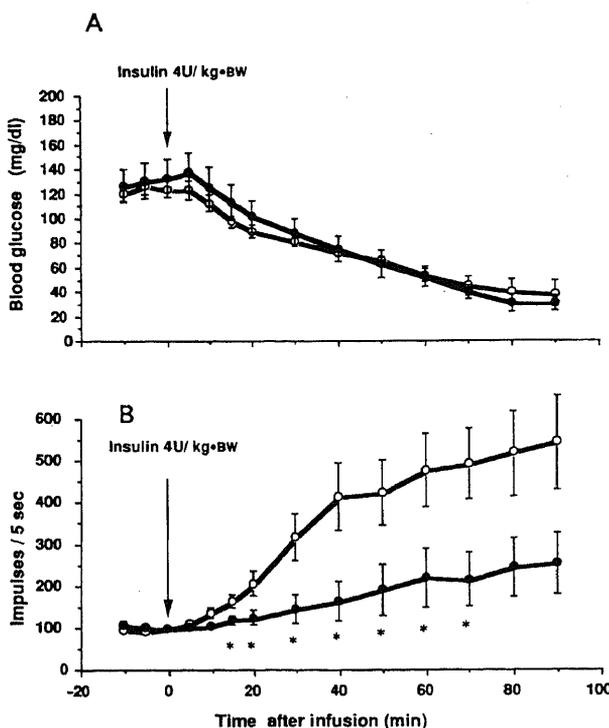


Fig. 6. Changes of arterial blood glucose levels (A) and efferent activities in the splanchnic nerve (B) after insulin ($4 \text{ U/kg} \cdot \text{BW}$, bolus, i.v.) infusion in anesthetized normal and glucose-controlled STZ diabetic rats. \circ , normal rats ($n=5$); \bullet , Glucose-controlled STZ diabetic rats ($n=5$). Vertical bars indicate $\bar{x} \pm \text{SE}$. * $p < 0.05$, vs. values of normal rats.

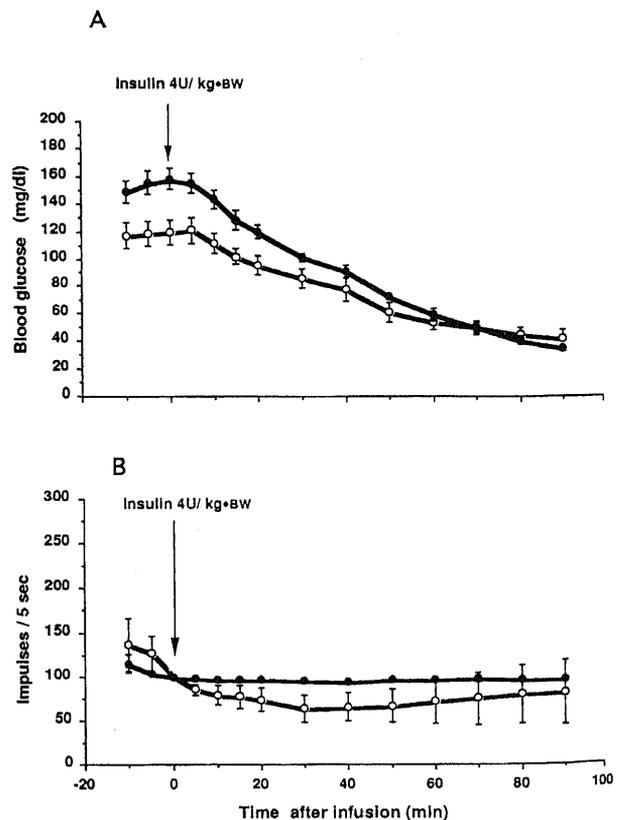


Fig. 7. Changes of arterial blood glucose levels (A) and efferent activities in the pancreatic vagal nerve (B) after insulin ($4 \text{ U/kg} \cdot \text{BW}$, bolus, i.v.) infusion in anesthetized normal and glucose-controlled STZ diabetic rats. \circ , normal rats ($n=5$); \bullet , Glucose-controlled STZ diabetic rats ($n=5$). Vertical bars indicate $\bar{x} \pm \text{SE}$.

かった。その際、大内臓神経電気活動の反応は、正常群に対し15分から70分の間有意に低い値を示した。この事実は、STZ糖尿病-血糖コントロールラットでは、短期間の高血糖状態より中枢あるいは末梢の交感神経系においてその迅速な反応性がみられないことを示唆する。

2. STZ糖尿病-血糖コントロール群におけるインスリン低血糖誘発時の膵迷走神経の検討 (図7)

対照として図3で既に述べた正常群 (n=5) でのインスリン低血糖誘発時の動脈血血糖と膵迷走神経活動を示した。これに対し、STZ-GC群 (n=5) では、インスリン 4U/kg ボーラス投与後、動脈血血糖値は、前値 158±8mg/dl より毎分 1.9mg/dl と正常群の1.1より大きい降下を示し、以後も低下を続け低血糖が成立した。その際、膵迷走神経活動は、反応せず正常群との間に有意差を認めなかった。

3. STZ糖尿病-血糖非コントロール群におけるインスリン低血糖誘発時の大内臓神経の検討 (図8)

対照として図1で既に述べた正常群 (n=5) でのインスリン低血糖誘発時の動脈血血糖値と大内臓神経活動を示した。これに対し、STZ投与後血糖コントロールを行わなかった群 (STZ-GU群: n=5) では、インスリン 8U/kg ボーラス投与後、動脈血血糖値は、前値 308±30mg/dl より毎分 2.3mg/dl と正常群の1.4より急峻な降下を示し、以後も低下を続けた。その際、大内臓神経電気活動の反応は、正常群に対し20分以降有意に低い値を示した。著者らは、既に正常ラットにおいて、

高血糖状態からのインスリン低血糖誘発が、迅速な大内臓神経活動を惹起することを報告したが⁴⁴、今回の検討では、糖尿病の持続がこの反応性をも低下させると思われた。

IV. STZ糖尿病ラットにおけるインスリン低血糖誘発時の門脈血 IRG および動脈血血糖値の検討 (図5)

中間型インスリンにて血糖コントロールを行った STZ-GC群では、インスリン 4U/kg 投与後 (n=4)、血糖は前値平均 131±12mg/dl から10分後には平均 118±11mg/dl へ低下した。この10分後の門脈血 IRG 濃度は、生食投与群の 200±14pg/ml に対しインスリン投与群では 667±174pg/ml と有意の高値を示し、また正常ラット群に対し有意の低値であった。中間型インスリンによる血糖コントロールを行わなかった STZ-GU群では、インスリン 8U/kg 投与後 (n=4)、血糖は前値平均 244±11mg/dl から10分後には平均 229±11mg/dl へ低下した。この10分後の門脈血 IRG 濃度は、生食投与群の 279±51pg/ml に対しインスリン投与群では 396±82pg/ml と僅かの高値を示したが有意の変化でなかった。また STZ-GC 群に対し有意の低値であった。これらの成績は、高血糖状態の持続による大内臓神経自身あるいは中枢神経系の反応性の低下が IRG 分泌の低下をもたらしたことを示唆する。

考 察

著者は今回の一連の実験において、ウレタン・α-クロラロース麻酔ラットを用い、インスリン低血糖誘発時の血糖降下が正常ラットにおいて迅速な大内臓神経活動の増加をもたらすことを示した。動物実験では、とりわけ今回の検討のような神経活動の評価が主体となる場合には、麻酔法の選択が問題となる。一般に動物実験で広く用いられているバルビタール麻酔は、交感神経節前線維の発火頻度を低下させること⁴⁵、2-デオキソ-D-グルコース投与時のカテコールアミン反応を減少させること⁴⁶、さらに膵への迷走神経系情報を減弱させることなどが指摘されている⁴⁷。このため著者は麻酔時の神経系抑制が比較的低いとされるウレタン・α-クロラロース麻酔を用いた。Matsukawa らは⁴⁸、ネコを用いウレタンまたは α-クロラロース麻酔下で、血圧・脈拍・大内臓神経腎臓枝の神経活動を検討した。これによると、ウレタン・α-クロラロースともに血圧・脈拍等の心血管動態には影響を与えないことが報告されている。また、Havel ら⁴⁹は、イヌにおいて大内臓神経系は低血糖では賦活されるが、低血圧・低酸素では賦活されないことを報告している。従って、麻酔による循環動態の変動が大内臓神経活動の変化をもたらしたことは考えにくい。一方で大内臓神経腎臓枝についても⁴⁸、ウレタン麻酔は麻酔後30分前後に一過性の交感神経活動の低下をもたらし、α-クロラロース麻酔は投与1時間以後軽度の安定した交感神経活動の賦活を示すと報告されている。しかし、今回正常ラットにおける検討では、ウレタン・α-クロラロース麻酔下での対照生食投与群で、約2時間のあいだ終始安定した大内臓神経と迷走神経の活動を示したので、本麻酔はラットにおける自律神経系の評価を行うのに支障ないものと考えられる。

今回の正常ラットにおける検討で著者は、4U/kg のインスリン投与を行い低血糖を誘発した。その際、1) 血糖は前値 124mg/dl から13分後 104mg/dl の正常血糖域内で降下し、この時、大内臓神経が有意に賦活されること、2) 別群ラットにおいて、門脈血 IRG 濃度を測定し、生食投与10分後では

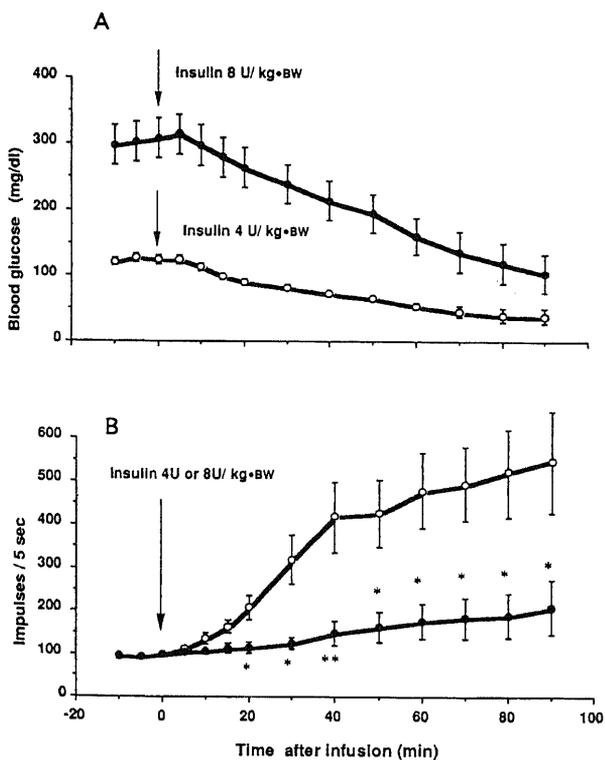


Fig. 8. Changes of arterial blood glucose levels (A) and efferent activities in the splanchnic nerve (B) after insulin (4 or 8U/kg·BW, bolus, i.v.) infusion in anesthetized normal and Uncontrolled STZ diabetic rats. ○, normal rats (n=5); ●, Uncontrolled STZ diabetic rats (n=5). Vertical bars indicate $\bar{x} \pm SE$. *p<0.05, **p<0.01, vs. values of normal rats.

305±87pg/mlであったのに対しインスリン投与群では10分後1188±106pg/mlと有意の高値であること、を示した。そこで、この相対的血糖低下時のIRG分泌が神経性、体液性(血糖)のいずれの調節を主にうけているかに興味をもたれる。この点につき、教室の中川らが、大内臓神経切断犬および脾除神経犬において、インスリン低血糖時のIRG分泌反応が著減することを既に報告した⁴⁰。このことは低血糖誘発時のIRG分泌が、交感神経系の強い支配を受けていることを示す。また、イヌにおいてインスリン低血糖誘発時に、96から86mg/dlへの血糖低下により、インスリン負荷後5分から門脈血中にIRG分泌が惹起されること、また10分に頂値を示す早期相が存在することを報告した⁴¹。この事実は、本実験の時間的経過ともよく符号し、正常血糖域内の血糖低下がIRG分泌を促すことを示唆する。そして、血糖の正常域内でのわずかの低下が中枢神経系で認識され、交感神経を介し膵島A細胞に作用しIRG分泌を促進しているとの仮説を想起させる。

さて、低血糖時のIRG分泌については、血糖値がある閾値以下になると惹起される、あるいは、相対的血糖低下により惹起される、など未だ一定の見解を見ない。周知の如く脾からのIRG分泌は、脾を灌流するグルコース濃度の低下それ自体により促進されることが、Vanceらによる単離膵島実験⁵⁰やIversenによる摘出膵灌流実験⁵¹において知られている。しかしVanceらの実験は、血糖は60→30mg/dl、Iversenは150→25または50mg/dlの降下の絶対的低血糖下での検討である。ところが、前述のようにイヌにおいてインスリン低血糖誘発時に、96から86mg/dlへの血糖低下により、インスリン負荷後5分からIRG分泌が惹起されること、また10分に頂値を示す早期相が存在することが我々により見出されている⁴¹。一方Gerichらは、ヒトにおいてブドウ糖注入中止後30分間の187→112mg/dlの正常域内の血糖低下によりIRG分泌がおきることを報告した⁵²。また、Santiagoら⁵³は、正常人で95→60mg/dlと同様に200→100mg/dlの正常域内の血糖低下によりIRG分泌がおきることを報告した。さらに、Gauthierら⁵⁴は、非インスリンであるフロリジンを用い109→91mg/dlの僅かな血糖低下を誘発した際IRG分泌の顕著な増加がおきることを示した。これらの報告は、絶対的低血糖だけではなく相対的血糖低下がIRG分泌を促すことを示唆する。これに対しDeFronzoら⁵⁵は、60分間250～300mg/dlの高血糖に維持したあと、インスリンによる急激な血糖低下を起しても、末梢静脈血中のIRG濃度は増加を示さないことを報告した。またAmielら⁵⁶Mitrakouら⁵⁷は、グルコースクランプ法により血糖の降下スピードは末梢静脈血中のCRHの反応に影響を与えず、血糖の45～68mg/dlにその閾値があるとした。しかし、上記のDeFronzo、Amiel、MitrakouらのIRG濃度の検討は末梢静脈血についてであり、今回著者がみたような門脈血中IRG濃度の変動については検討されていない。今回の成績は相対的血糖低下が中枢神経系で認識され、その遠心路として大内臓神経が賦活され、少なくとも門脈血中ではIRG濃度が顕著に増加していることを示した。また図4で低血糖領域の上限で賦活された交感神経活動は、グルコース投与により血糖が高血糖域まで上昇すると速やかに減少し、その後の血糖降下とともに、再度賦活された。さらに著者は高血糖域からのインスリン投与による血糖降下も交感神経活動を迅速に増加させる成績をえている⁴¹。したがって動脈血糖値の相対的降下は中枢神経系で鋭

敏に認識され、交感神経遠心性情報となりIRG分泌を促進することが想定される。

さて、このような相対的血糖低下が、どこで認識され、交感神経遠心性情報となるかは、たいへん興味深い。中枢神経系において、血糖調節に寄与する部位は、以前より視床下部に存在するとされている。このうちいわゆる満腹中枢は腹内側核(ventromedial hypothalamus, VMH)に存在し、一方摂食中枢は外側野(lateral hypothalamic area, LHA)に存在する。また、これらの中枢はそれぞれグルコース投与にたいし、興奮的に働く神経細胞(glucose receptive neuron, GR neuron)および抑制的に反応する神経細胞(glucose sensitive neuron)が存在することが知られている^{58,59}。また、他の研究者も、中枢神経系の血糖認識部位について視床下部^{60,61}、特にVMHおよびLHAを挙げている。最近Borgら⁶²は、低血糖時のCRH分泌の反応性低下が、LHAでなくVMHの破壊でおきることを示した。このことは、該当中枢としてVMHがより重要であることを示す。ところが、DiRoccoら⁶³は、前脳の切断を行い2-デオキシン-D-グルコース投与に対する交感神経-副腎系を介する血糖増加が起きること、脳幹部切断にてこの反応が消失することから、脳幹部も該当中枢の候補となることを示した。Ritterら⁶⁴もこの見解を支持している。また、Caneら⁶⁵は、イヌにおいて両総頸動脈にユーグリセミック・クランプを実行し、それ以外の末梢にインスリン低血糖を誘発してもCRH分泌に有意差を認めなかった。一方、イヌにおいてBiggersら⁶⁶は、インスリン低血糖時、両総頸動脈、両椎骨動脈領域をグルコース注入によってユーグリセミック・クランプするとIRG、Ep、ノルエピネフリン(norepinephrine, NEp)の増加反応が著しく減少することを示した。これらの事実は、血糖認識部位として、前脳だけでは有効に反応せず、後脳領域、あるいは前脳および後脳両方の血糖変動が交感神経賦活に際し必要であることを示すと思われる。今回の著者の成績は血糖変動の認識部位を特定していないが、やはり中枢神経系の関与を強く支持していると考えたい。また、血糖認識部位として、肝・門脈領域において門脈血中のグルコースを感知する、グルコースセンサーの存在が知られ、門脈内へのグルコース投与がイヌの食物摂取を抑制ことが報告された⁶⁷。さらに最近、インスリン低血糖時、全身の血糖値が変化しない程度のグルコースを門脈内へ注入すると、Ep、NEp、IRG分泌の抑制を認めたとする報告がある⁶⁸。しかし、今回の実験は全身の低血糖を誘発しており動脈-門脈間のグルコース濃度差も生じにくく、肝・門脈領域グルコースセンサーの交感神経賦活への関与は少ないと思われる。

今回の検討では著者は4U/kgという比較的大量のインスリン投与を行い低血糖を誘発した。そこで、インスリンそれ自身の中枢神経作用を考察しておく必要がある。Oomura^{58,59}は、インスリンを直接微量注入したとき、LHAのGRニューロンが賦活的に反応することを報告した。この事実は、今回の実験において、インスリン低血糖誘発時の大内臓神経の賦活が、血糖低下によるのではなくインスリンの直接の作用による可能性を示す。しかし、Oomuraは、GRニューロンに対し直接大量のインスリンを投与している。また、前述のBiggersら⁶⁶の、インスリン低血糖時、両総頸動脈・両椎骨動脈領域のグルコース注入によるユーグリセミック・クランプがIRG、Ep、NEpの増加反応を著しく減少させるとの報告は、中枢神経系ではインスリン自体ではなく、血糖によって神経応答が変化している可能性

が高いことを示す。そしてインスリン自身は血液脳関門を通過しないとされることから、今回の検討ではインスリンそれ自身ではなく血糖の変動が中枢神経系で認識され交感神経を賦活したと考えた。

さて、視床下部おもに VMH, LHA で血糖の降下を認識した中枢神経系の応答は、間脳レベルで相互に関係をもちながら自律神経系の統御を行い、遠心路として、交感神経系では弧束核・脊髄中間質外側細胞核を、迷走神経系では背側迷走神経運動核や疑核を介して、効果器(本研究では膵内分泌)の機能を修飾するとされる⁶⁹⁾。事実、組織学的にも膵島部領域には豊富な副交感・交感神経線維がみられ、これらの神経終末が血管周囲のみならず、AおよびB細胞などに非常に近接して分布していることが知られており¹⁰¹⁾、この神経系のはたす役割が注目されてきた。一方で、大内臓神経¹²⁻¹⁶⁾あるいは迷走神経¹⁷⁾遠位端の電気刺激がいずれも IRG 分泌を促進することが知られている。したがって、インスリン低血糖により惹起された中枢神経系におけるグルコペニアが交感あるいは副交感神経遠心性線維を介して低血糖時 IRG 分泌反応に影響を及ぼすことが想定されてきた。従来、低血糖時イヌ単離膵より大量の NEp が放出されることが知られており⁷⁰⁾、さらにラット単離膵でも⁷¹⁾低血糖時の IRG 放出がフェントラミンにより強く抑制されることから、この IRG 分泌には交感神経の α 受容体機構が関与すると報告されている。また Ahren ら⁷²⁾は、大内臓神経の電気刺激の際起る NEp 放出と同程度の NEp の灌流にて、IRG 分泌が起きることを示した。これらの事実、低血糖時膵ラ氏島において、交感神経末端より NEp 放出され、IRG 分泌を促すことを強く示唆する。しかし、今回の検討のように実際に、この低血糖誘発時の大内臓神経電気活動それ自体を血糖の変動と併行して直接測定したという報告はない。さらにインスリン低血糖誘発時の膵迷走神経の反応にも興味をもたれる。迷走神経遠位端の電気刺激が IRG 分泌を促進するとの報告もあるが⁷³⁾、今回の検討では、インスリン低血糖誘発時に、迷走神経活動は増加せずむしろ低下した。この事実は、少なくとも IRG 分泌に関して、膵迷走神経が関与しないことを示唆した。次に、インスリンとグルカゴンの相互作用に関して、Samols ら⁷⁴⁾はイヌ膵灌流実験により、インスリンが IRG 分泌を抑制するインスリリングルカゴンネガティブフィードバックシステムの存在を見いだした。従って、今回の実験で外因性のインスリン投与が膵ラ氏島A細胞に直接 IRG の分泌を促したとは、とても考えられない。これらの事実は、血糖降下時の IRG 分泌が大内臓神経により賦活したことを強く示唆する。

ここで、迷走神経について若干の考察を述べる。今回の検討で、膵迷走神経はインスリン低血糖に対し反応を認めなかった。解剖学的には前述のように膵島領域には豊富な副交感神経も神経終末を認めこの役割について多くの検討がなされている。迷走神経の電気刺激では、インスリン分泌が惹起されること⁷⁴⁻⁷⁶⁾、また、迷走神経の切断をすると経口糖負荷時のインスリン反応が減弱すること⁷⁷⁾が知られ、迷走神経は、膵ラ氏島においては主に血糖上昇時のインスリン分泌に関与すると考えられている。実際に Nijjima らは、頸動脈あるいは LHA へのグルコース負荷⁴²⁾にて膵迷走神経が賦活されることを示した。また、ここには示さなかったが、著者も末梢静脈からのグルコース負荷時、膵迷走神経が賦活されることを確認した。一般にインスリン使用中の糖尿病患者などで、低血糖時の副交感神経症

状として、悪心・あくび・空腹感等が出現するとされる。しかし今回の検討では、膵副交感神経は変動を認めなかった。このことは、迷走神経系において、臓器別の反応性に多様性があることを示すか、あるいは、上記の症状が末梢の副交感神経症状ととらえるものではなくニューログルコペニアによる中枢神経症状ととらえるべきものであると思われた。

次に、低血糖誘発時にみられる臨床症状と交感神経系応答の関係について若干の考察をのべる。正常人でグルコースクランプ法を用い段階的に血糖を下げ低血糖を誘発すると、IRG・Ep 等の CRH の分泌の閾値が血糖 70mg/dl 前後にあり、動悸・発汗・振戦等の自律神経症状の出現が 60mg/dl 前後でみられ、さらに血糖が 50mg/dl 前後に達すると空腹感・思考力低下・ふらつき等の中枢神経症状の出現がみられることから、それぞれの血糖閾値に階層性があると報告されている⁷⁸⁾。今回の検討で、正常閾の血糖降下(124→104mg/dl)で大内臓神経が賦活されたことと、一般的にいわれる、血糖 50~60mg/dl 前後で自律神経症状が見られることとは血糖値の乖離がみられる。この点は、それぞれの臓器(この場合膵臓、心臓、汗腺等)に分布する交感神経系の賦活には、血糖閾値あるいは血糖降下スピードに多様性が存在すると理解される。事実、前述の Havel ら⁴⁹⁾は、大内臓神経系は低血糖では賦活されるが、低血圧・低酸素では賦活されないことを報告した。このことは、一般的に交感神経神経を賦活する状態が存在しても、それぞれの原因に対応した臓器への交感神経のみが賦活されることを示す。従って、今回検討した低血糖に対する交感神経系の反応性の面においても、臓器別に多様な反応性をもつ可能性を示すので、さらに検討が必要と思われる。

今回の STZ 糖尿病ラットにおける検討で、たかだか1週間の高血糖状態の持続が、血糖降下に対する大内臓神経の反応性を低下させる成績をえた。このような糖尿病状態での交感神経の反応性の低下が末梢神経自身の障害によるのか、中枢神経系の血糖認識機構の変異によるのかは臨床的にも重要である。前述の如く、正常人にインスリン低血糖を誘発した際、自律神経症状(副交感・交感神経刺激症状)が現れ、さらに血糖が低下すると、中枢神経症状として記名力低下等の精神症状が始まり、さらに意識障害、昏睡へと進むとされている。糖尿病臨床の場合においては、昏睡にいたる以前に現れる自律神経症状が、重症低血糖にいたる前の警告反応として役立ち、また交感神経神経を介する CRH の分泌が重症低血糖の成立を妨げていると理解されている。ところが近年、このような自律神経症状が出現せず、突然意味不明の言動や異常行動を呈し、昏睡に陥る無自覚性低血糖の存在が問題となっている。この無自覚性低血糖は、糖尿病患者の約 20% にみられ、IDDM 患者では罹病期間の延長に従ってさらに増加し 50% にも達することが報告されている⁷⁹⁾。さらに、糖尿病性自律神経障害を有する患者においては低血糖からの回復に関与する CRH の反応が低下すること²⁾、また、末梢自律神経障害自身が交感神経刺激症状の発現を妨げていることが知られている。しかし一方、IDDM 患者で、臨床的に自律神経障害が検出されるよりかなり以前から、低血糖に対するカテコールアミン反応が低下することが報告されている⁸⁰⁾。臨床的に自律神経障害が無く、しかも低血糖時のカテコールアミン反応が正常でも無自覚性低血糖をみる症例もあることから、より高次の自律神経中枢や血糖認識機構の異常の存在も疑われている。この点に関しては現在でも不明の点が多

く、さらに検討がある。今回の実験において著者は、STZ 投与後に高血糖が1週間持続した状態で、さらに1週間中間型インスリンで血糖コントロールした群 (STZ-GC 群) としない群 (STZ-GU 群) においての大内臓神経の反応性および IRG 分泌がともに、減弱していることを認めた。Courteix ら⁸¹⁾ は、STZ 糖尿病ラットにおいて、下肢の圧刺激による痛覚反応が3週目以後に減弱し、また尾の冷水刺激に対する反応が2週目以後減弱することを示している。また、STZ 糖尿病ラットにおける神経伝導速度が、4週後に低下するとの報告⁸²⁾ もある。したがって、今回の STZ-GC 群では1週間、STZ-GU 群では2週間の短期間高血糖にさらされた状態では、大内臓神経自体はまだその機能が低下していない可能性がある。とすれば、高血糖の一定期間持続が、中枢神経系での血糖認識機構の異常を比較的早期に引き起こしている可能性が想定される。最近、先行する低血糖が、後のインスリン低血糖にたいする CRH の応答を低下させることが、Lingenfeller ら⁸³⁾、Veneman ら⁸⁴⁾ により報告されている。この点、今回の STZ-GC 群で中間型インスリンによる血糖コントロール中に低血糖が成立していたかどうかが問題になる。しかしながら、高血糖が持続した STZ-GU 群でもより速い血糖降下時の交感神経活動応答の減弱遅延を認めた。以上の点を総合的に考えると、先行する低血糖、高血糖いずれもが、この血糖降下時の交感神経応答低下をきたしうることを示唆していることになる。従って、GCR における高次血糖認識機構と交感神経遠心性活動の特異な役割を想定される。

結 論

インスリン低血糖誘発時の腓自律神経活動 (大内臓神経および迷走神経腓臓枝) を麻酔ラットにおいて直接測定し、インスリン投与後早期の門脈血中の IRG 分泌と腓自律神経機構の関与を検討した。正常ラット、血糖コントロールをした STZ 糖尿病ラットおよび血糖コントロールをしない糖尿病ラットに対し、それぞれインスリン低血糖を誘発し、以下の成績をえた。

1. 正常ラット群では、インスリン 4U/kg 投与後、正常血糖域内の血糖降下によって、大内臓神経活動は、生食投与群に対し有意の増加を示した。また、低血糖成立後もさらに増加を続けた。また軽度の低血糖誘発下にグルコース投与 (250mg, 静注) を行うと、一過性血糖上昇に一致する一過性の大内臓神経活動の減少を認めた。一方、腓迷走神経電気活動は低下傾向を示したが、生食投与群との間に有意差を認めなかった。

2. 別群ラットにおける、インスリン 4U/kg 投与10分後の門脈血 IRG 濃度は生食投与群に対し明らかに有意の高値であった。またこの時のインスリン投与群の血糖値は平均 16mg/dl の低下をみたのみで正常血糖域であった。

3. 血糖コントロールを行った STZ-糖尿病ラット群では、インスリン 4U/kg 投与後、大内臓神経活動は正常血糖域内で有意の増加を示したが、正常ラット群に対し、減弱遅延を示した。この群での門脈血 IRG 濃度は、正常ラット群に比し、有意の低下であった。一方、腓迷走神経活動は、正常ラット群と同様に血糖降下中および低血糖成立時でも無反応であった。さらに血糖コントロールを行わなかった STZ-糖尿病ラット群ではインスリン 8U/kg 投与後、血糖の急峻な降下にも関わらず、大内臓神経の応答は減弱し、門脈血 IRG 濃度も、最も低値を示した。

以上の成績は、インスリン低血糖誘発時における正常血糖域

内の相対的血糖降下が迅速に交感神経系を賦活し、これが迅速な IRG 分泌を促し、また高血糖状態の持続がこの反応性を低下させることを示すものである。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました恩師馬淵 宏教授ならびに竹田亮祐名誉教授に深謝いたします。また、終始直接ご指導いただきました金沢大学健康管理センター中林 肇教授に深く感謝し、併せて本研究の遂行に際して多大なる御協力を頂きました新潟大学第一生理学教室新島 旭教授ならびに金沢大学医学部第二内科第二研究室の先生方に感謝いたします。なお、本論文の要旨は第12回日本肥満学会 (1991年, 横浜)、第14回膵ホルモン研究会 (1993年, 東京)、第15回 International Diabetes Federation (1994年, 神戸) にて発表した。

文 献

- 1) Cryer, P. E.: Glucose counterregulation in man. *Diabetes*, **30**, 261-264 (1981).
- 2) Cryer, P. E. & Gerich, J. E.: Glucose counterregulation, hypoglycemia, and intensive insulin therapy in diabetes mellitus. *New Eng. J. Med.*, **313**, 232-241 (1985).
- 3) Gerich, J., Davis, J., Lorenzi, M., Rizza, R., Bohannon, N., Karam, J., Lewis, S., Kaplan, R., Schultz, T. & Cryer, P.: Hormonal mechanisms of recovery from insulin-induced hypoglycemia in man. *Am. J. Physiol.*, **236**, E380-E385 (1979).
- 4) Rizza, R., Cryer, P. & Gerich, J.: Role of glucagon, catecholamines, and growth hormone in human glucose counterregulation: effects of somatostatin and combined α - and β -adrenergic blockade on plasma glucose recovery and glucose flux rates after insulin-induced hypoglycemia. *J. Clin. Invest.*, **64**, 62-71 (1979).
- 5) Unger, R. H., Eisentraut, A. M., McCall, M. S. & Madison, L. L.: Measurements of endogenous glucagon in plasma and the influence of blood glucose concentration upon its secretion. *J. Clin. Invest.* **41**, 682-89 (1962).
- 6) Goldfien, A., Zileli, S., Despointes, R. H. & Bethune, J. E.: The effect of hypoglycemia on the adrenal secretion of epinephrine and nor-epinephrine in the dog. *Endocrinology*, **62**, 749-57 (1958).
- 7) Cryer, P. E.: Glucose homeostasis and hypoglycemia. *In* J. D. Wilson & D. W. Foster (eds.), *William's Textbook of Endocrinology*, 7th ed., p989-1017, Saunders, Philadelphia, 1985.
- 8) Garber, A. J., Cryer, P. E., Santiago, J. V., Haymond, M. W., Pagliara, A. S. & Kipnis, D. M.: The role of adrenergic mechanism in the substrate and hormonal response to insulin-induced hypoglycemia in man. *J. Clin. Invest.*, **8**, 7-15 (1976).
- 9) Ikeda, H.: Adrenal medullary secretion in response to insulin hypoglycemia in dogs with transection of the spinal cord. *Tohoku J. Exp. Eed.*, **85**, 153-68 (1968).
- 10) Woods, S. & Porte, D. Jr.: Neural control of the endocrine pancreas. *Physiol. Rev.*, **54**, 596-619 (1974).
- 11) Smith, P. H. & Porte, D. Jr.: Neuropharmacology of pancreatic islets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **16**, 269

- (1976).
- 12) Bloom, S. R., Edwards, A. V. & Vaughan, N. J. A.: The role of the sympathetic innervation in the control of plasma glucagon concentration in the calf. *J. Physiol.*, **233**, 457-466 (1973).
 - 13) Bloom, S. R. & Edwards, A. V.: The release of pancreatic glucagon and inhibition of insulin in response to stimulation of the sympathetic innervation. *J. Physiol.*, **253**, 157-173 (1975).
 - 14) Kaneto, A., Kajinuma, H. & Kosaka, K.: Effect of splanchnic nerve stimulation on glucagon and insulin output in the dog. *Endocrinology*, **96**, 143-150 (1975).
 - 15) Bloom, S. R. & Edwards, A. V.: Certain pharmacological characteristics of the release of pancreatic glucagon in response to stimulation of the splanchnic nerve. *J. Physiol.*, **280**, 25-35 (1978).
 - 16) Bloom, S. R. & Edwards, A. V.: Pancreatic endocrine responses to stimulation of the peripheral ends of the splanchnic nerves in the conscious adrenal ectomized calf. *J. Physiol.*, **308**, 39-48 (1980).
 - 17) Kaneto, A., Miki, E. & Kosaka, K.: Effect of vagal stimulation on glucagon and insulin secretion. *Endocrinology*, **95**, 1005-1010 (1974).
 - 18) Frizzell, R. T., Hendrick, G. K., Brown, L. L., Lacy, D. B., Donahue, E. P., Carr, R. K., Williams, P. E., Parlow, A. F., Stevenson, R. W. & Cherrington, A. D.: Stimulation of glucose production through hormone secretion and other mechanisms during insulin-induced hypoglycemia. *Diabetes*, **37**, 1531-1541 (1988).
 - 19) Soskin, S., Essex, H., Herrick, J. & Mann, F.: The mechanism of regulation of the blood sugar by the liver. *Am. J. Physiol.*, **124**, 558-567 (1938).
 - 20) Hers, H. G.: The control of glycogen metabolism in the liver. *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 167-189 (1976).
 - 21) Bolli, G., DeFeo, P., DeCosmo, G., Ventura, M., Campbell, P., Brunetti, P. & Gerich, J. E.: Role of hepatic autoregulation in defense against hypoglycemia in man. *J. Clin. Invest.*, **74**, 1623-1631 (1985).
 - 22) Shimazu, T., Fukada, A. & Ban, T.: Reciprocal influences of the ventromedial and lateral hypothalamic nuclei on blood glucose level and liver glycogen content. *Nature (Lond)*, **210**, 1178-1179 (1966).
 - 23) Fagius, J., Niklasson, F. & Berne, C.: Sympathetic outflow in human muscle nerves increases during hypoglycemia. *Diabetes*, **35**, 1124-1129 (1986).
 - 24) Sacca, L., Cryer, P. E. & Sherwin, R. S.: Blood glucose regulates the effects of insulin and counterregulatory hormones on glucose production in vivo. *Diabetes*, **28**, 533-536 (1979).
 - 25) Bloom, S., Edwards, A. & Vaughan, N.: The role of the sympathetic innervation in the control of plasma glucagon concentration in the calf. *J. Physiol.*, **233**, 457-466 (1973).
 - 26) Bloom, S., Edwards, A. & Vaughan, N.: The role of the automatic innervation in the control of glucagon release during hypoglycemia in the calf. *J. Physiol. (Lond)*, **236**, 611-623 (1973).
 - 27) Bloom, S., Vaughan, N. & Russell, R.: Vagal control of glucagon release in man. *Lancet*, **2**, 546-549 (1974).
 - 28) Sasaki, K., Mathuhashi, A., Murabayashi, S., Aoyagi, K., Baba, T., Mathunaga, M. & Takabe, K.: Hormonal response insulin-induced hypoglycemia in patients with Shy-Drager syndrome. *Metabolism*, **32**, 977-981 (1983).
 - 29) Havel, P. J., Parry, S. J., Stern, J. S., Akpan, J. O., Gingerich, R. L., Taborsky, G. J. & Curry, D. L.: Redundant parasympathetic and sympathoadrenal mediation of increased glucagon secretion during insulin-induced hypoglycemia in conscious rats. *Metabolism*, **43**, 860-866 (1994).
 - 30) Palmer, J., Henry, D., Benson, J., Johnson, D. & Ensinnck, J.: Glucagon response to hypoglycemia in sympathectomized man. *J. Clin. Invest.*, **57**, 522-525 (1976).
 - 31) Palmer, J., Wermer, P., Hollander, P. & Ensinnck, J.: Evaluation of the control of glucagon secretion by the parasympathetic nervous system in man. *Metabolism*, **28**, 549-552 (1979).
 - 32) Fried, B., Corral, R., Ratcliffe, J., Ashby, J. & McClellent, E.: Autonomic neural control mechanisms of substrate and hormonal responses to acute hypoglycemia in man. *Clin. Endocrinol.*, **14**, 425-433 (1981).
 - 33) Corral, R. & Frier, B.: Acute hypoglycemia in man: Neural control of pancreatic islet cell function. *Metabolism*, **30**, 160-164 (1981).
 - 34) Iversen, J.: Adrenergic receptors and the secretion of glucagon and insulin from the isolated, perfused canine pancreas. *J. Clin. Invest.*, **52**, 2102-2116 (1973).
 - 35) Ivy, R., Adkins, B., Williams, P., Neal, D. & Cherrington, A. D.: The role of epinephrine in counterregulation in hypoglycemia induced by insulin infusion (Abstract). *Diabetes*, **36**, 25A (1987).
 - 36) Gerich, J. E., Langlois, M., Noacco, C., Karam, J. H. & Forsham, P. H.: Lack of glucagon response to hypoglycemia in diabetes: evidence for an intrinsic pancreatic alpha cell defect. *Science*, **182**, 171-173 (1973).
 - 37) Unger, R. H.: Insulin-glucagon relationships in the defense against hypoglycemia. *Diabetes*, **32**, 575-583 (1983).
 - 38) Maher, T. D., Tanenberg, R. J., Greenberg, B. Z., Hoffman, J. E., Doe, R. P. & Goetz, F. C.: Lack of glucagon response to hypoglycemia in diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes*, **26**, 196-200 (1977).
 - 39) Hepburn, D. A., MacLeod, K. M. & Frier, B. M.: Physiological, symptomatic and hormonal responses to acute hypoglycemia in type 1 diabetic patients with autonomic neuropathy. *Diabetic Medicine*, **10**, 940-949 (1994).
 - 40) 中川 淳, 中林 肇, 臼倉教臣, 高桑 健, 皆川冬樹, 伊藤利之, 竹田亮祐: Insulin 低血糖時の glucagon 反応に与える somatostatin の効果 (II) - 大内臓神経切断犬での検討 - . *Peptide Hormones in Pancreas 7* (小坂樹徳編), 第 1 版,

- 277-283 頁, Biomed. Res. Found., 東京, 1987.
- 41) Nakagawa, A., Nakabayashi, H., Usukura, N., Takakuwa, T., Minagawa, F., Ito, T., Fujii, S., Takayama, Y., Igawa, T. & Takeda, R.: Early secretory response of glucagon to insulin-induced hypoglycemia in dogs. *Biomed. Res.*, 9, 59-63 (1988).
- 42) Nijima, A., Kannan, H. & Yamashita, H.: Neural control of blood glucose homeostasis; Effect of microinjection of glucose into hypothalamic nuclei on efferent activity of pancreatic branch of vagus nerve in the rat. *Brain Res. Bull.*, 20, 811-815 (1988).
- 43) Nakabayashi, H., Dobbs, R. E. & Unger, R. H.: The role of glucagon deficiency in the Houssay phenomenon of dogs. *J. Clin. Invest.*, 61, 1355-1362 (1978).
- 44) 高山嘉宏, 中林 肇, 中川 淳, 藤井寿美枝, 竹田亮祐, 新島 旭: Glucose counterregulation と自律神経活動 (IV). 糖尿病, 33, 246 (1990).
- 45) Skovsted, P., Price, M. L. & Price, H. L.: The effects of shortacting barbiturates on arterial pressure, preganglionic sympathetic activity and barostatic reflex. *Anesthesiology*, 33, 10-18 (1970).
- 46) Taborsky, G. J. Jr., Halter, J. B., Baum, D., Best, J. D. & Porte, D. Jr.: Pentobarbital anesthesia suppresses basal and 2-deoxy-D-glucose-stimulated plasma catecholamines. *Am. J. Physiol.*, 247, R905-R910 (1984).
- 47) Taborsky, G. J. Jr., Paquette, T. L., Pfeifer, M. A. & Gingerrich, R. L.: Pentobarbital suppresses basal and reflexive pancreatic polypeptide release in dogs. *Am. J. Physiol.*, 249, E577-E583 (1985).
- 48) Matsukawa, K. & Ninomiya, I.: Anesthetic effects on tonic and reflex renal sympathetic nerve activity in awake cats. *Am. J. Physiol.*, 256, R371-R378 (1989).
- 49) Havel, P. J., Veith, R. C., Dunning, B. E. & Taborsky, G. J.: Pancreatic noradrenergic nerve are activated by neuroglucopenia but not by hypotension or hypoxia in the dog. *J. Clin. Invest.*, 82, 1538-1545 (1988).
- 50) Vance, J. E., Buchanan, K. D., Challoner, D. R. & Williams, R. H.: Effect of glucose concentration on insulin and glucagon release from isolated islets of Langerhans of the rat. *Diabetes*, 17, 187-193 (1968).
- 51) Iversen, J.: Secretion of glucagon from the isolated, perfused canine pancreas. *J. Clin. Invest.*, 50, 2123-2136 (1971).
- 52) Gerich, J. E., Schneider, V., Dippe, S. E., Langlois, M., Naoacco, C., Karam, J. H. & Forsham, P. H.: Characterization of the glucagon response to hypoglycemia in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 38, 77-82 (1974).
- 53) Santiago, J. V., Clarke, W. L., Shah, S. D. & Cryer, P. E.: Epinephrine, norepinephrine, glucagon and growth hormone release in association with physiological decrements in the plasma glucose concentration in normal and diabetic man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 51, 877-883 (1980).
- 54) Gauthier, C., Vranic, M. & Hetenyi, G.: Importance of glucagon in regulatory rather than emergency responses to hypoglycemia. *Am. J. Physiol.*, 238, E131-E140 (1980).
- 55) DeFronzo, R. A., Anders, R., Bledsoe, T. A., Boden, G., Faloona, G. A. & Tobin, J. D.: A test of the hypothesis that the rate of fall in glucose concentration triggers counterregulatory hormonal responses in man. *Diabetes*, 26, 445-452 (1987).
- 56) Amiel, S. A., Simonson, D. C., Tamborlane, W. V., DeFronzo, R. A. & Sherwin, R. S.: Rate of glucose fall does not affect counterregulatory hormone responses to hypoglycemia in normal and diabetic humans. *Diabetes*, 36, 518-522 (1987).
- 57) Mitrakou, A., Ryan, C., Veneman, T., Mookan, M., Janssen, T., Kiss, I., Durrant, J., Cryer, P. & Gerich, J.: Hierarchy of glycemic thresholds for counterregulatory hormone secretion, symptoms, and cerebral dysfunction. *Am. J. Physiol.*, 260, E67-E74 (1991).
- 58) Oomura, Y.: Central mechanism of feeding. *In* M. Kotani (ed.), *Advances in Biophysics*, 1st ed., vol. 5, p65-142, Tokyo Univ. Press, Tokyo, 1973.
- 59) Oomura, Y.: Glucose as a regulator of neural activity. *In* A. J. Szabo (ed.), *Advances in Metabolic Disorders*, 1st ed., vol. 10, p31-63, Academic Press, New York, 1983.
- 60) Himsworth, R. L.: Hypothalamic control of adrenaline secretion in response to insufficient glucose. *J. Physiol. (LOND)*, 206, 411-417 (1970).
- 61) Woods, S. C. & Porte, D. Jr.: Neural control of the endocrine pancreas. *Physiol. Rev.*, 54, 596-619 (1976).
- 62) Borg, W. P., Doring, M. J., Sherwin, R. S., Borg, M. A., Brines, M. L. & Shulman, G. I.: Ventromedial hypothalamic lesions in rats suppress counterregulatory responses to hypoglycemia. *J. Clin. Invest.*, 93, 1677-1682 (1994).
- 63) DiRocco, R. J. & Grill, H. J.: The forebrain is not essential for sympathoadrenal hyperglycemic response to glucoprivation. *Science*, 204, 1112-1114 (1974).
- 64) Ritter, R. C., Slusser, P. G. & Stone, S.: Glucoreceptors controlling feeding and blood glucose: Location in the hindbrain. *Science*, 213, 451-453 (1981).
- 65) Cane, A. P., Artal, R. & Bergman, R. N.: Putative hypothalamic glucoreceptors play no essential role in the response to moderate hypoglycemia. *Diabetes*, 35, 268-277 (1986).
- 66) Biggers, W. D., Myers, R. S., Neal, L., Stison, R., Cooper, B. N., Jaspán, B. J., Williams, E. P., Cherrington, D. A. & Frizzell, T. R.: Role of brain in counterregulation of insulin-induced hypoglycemia in dogs. *Diabetes*, 38, 7-17 (1989).
- 67) Russek, M.: Demonstration of the influence of a hepatic glucosensitive mechanism on food intake. *Physiol. Behav.*, 5, 1207-1209 (1970).
- 68) Donovan, C. M., Hamilton-Wessler, M., Halter, J. B. & Bergman, R. N.: Primacy of liver glucosensors in the sympathetic response to progressive hypoglycemia. *Physiology*, 91, 2863-2867 (1994).

- 69) Novin, D., Rogers, R. C. & Hermann, G.: Visceral afferent and efferent connections in the brain. *Diabetologia*, 20, 331-336 (1981).
- 70) Christensen, N. J. & Iversen, J.: Release of large amounts of nor-adrenaline from the isolated perfused canine pancreas during glucose deprivation. *Diabetologia*, 9, 396-399 (1973).
- 71) Hisatomi, A., Maruyama, H., Orci, L., Vasko, M. & 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).
- 72) Ahren, B., Veith, R. C. & Taborsky, G. J.: Sympathetic nerve stimulation versus pancreatic norepinephrine infusion in the dog: 1) Effects on basal release of insulin and glucagon. *Endocrinology*, 121, 323-331 (1987).
- 73) Samols, E., Tyler, J. M. & Marks, V.: Glucagon-insulin interrelationships. In P. J. Lefebvre & R. H. Unger (ed.), *Glucagon, Molecular Physiology, Clinical and Therapeutic Implications*, 1st ed., p151-174, Pergamon Press Inc., New York, 1972.
- 74) Frohman, L. A., Ezdinli, E. Z. & Javid, R.: Effect of vagotomy and vagal stimulation on insulin secretion. *Diabetes*, 16, 443-448 (1967).
- 75) Kaneto, A., Kosaka, K. & Nakao, K.: Effects of stimulation of the vagus nerve on insulin secretion. *Endocrinology*, 80, 530-536 (1967).
- 76) Daniel, P. M. & Henderson, J. R.: The effect of vagal stimulation on plasma insulin and glucose levels in the baboon. *J. Physiol. (London)*, 192, 317-326 (1967).
- 77) Hakanson, R., Liedberg, G. & Lundquist, I.: Effect of vagal denervation on insulin release after oral and intravenous glucose. *Experientia (Basel)*, 27, 460-461 (1977).
- 78) Mitrakou, A., Mokan, M., Ryan, C., Veneman, T., Cryer, P. & Gerich, J.: Influence of plasma glucose rate of decrease on hierarchy of responses to hypoglycemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 76, 462-465 (1993).
- 79) Cryer, P. E., Binder, C., Bolli, G. B., Cherrington, A. D., Gale, E., Gerich, J. E. & Sherwin, R. S.: Hypoglycemia in IDDM. *Diabetes*, 38, 1193-1199 (1989).
- 80) Cryer, P. E.: Decreased sympathochromaffin activity in IDDM. *Diabetes*, 38, 405-409 (1989).
- 81) Courteix, C., Eschaliar, A. & Lavarenne, J.: Streptozotocin-induced diabetic rats: behavioural evidence for a model of chronic pain. *Pain*, 53, 81-88 (1993).
- 82) Tomlinson, D. R., Robinson, J. P., Compton, A. M. & Keen, P.: Essential fatty acid treatment-effects on nerve conduction, polyol pathway and axonal transport in streptozotocin diabetic rats. *Diabetologia*, 32, 655-659 (1989).
- 83) Lingenfelter, T., Renn, W., Sommerwerck, U., Jung, M., Buettner, U., Zaiser-Kaschel, H., Kaschel, R., Eggstein, M. & Jakober, B.: Compromised hormonal counterregulation, symptom awareness, and neurophysiological function after recurrent shortterm episodes of insulin-induced hypoglycemia in IDDM patients. *Diabetes*, 42, 610-618 (1993).
- 84) Veneman, T., Mitrakou, A., Mokan, M., Cryer, P. & Gerich, J.: Induction of hypoglycemia unawareness by asymptomatic nocturnal hypoglycemia. *Diabetes*, 42, 1233-1237 (1993).

Responses of Pancreatic Autonomic Nervous Activities and Glucagon to Plasma Glucose Fall in Normal and STZ-induced Diabetic Rats Yoshihiro Takayama, Department of Internal Medicine (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., 104, 162—174 (1995)

Key words insulin-induced hypoglycemia, glucagon, autonomic nervous system

Abstract

The mechanisms underlying the neuroendocrine response, particularly that of glucagon, to insulin-induced hypoglycemia or fall of plasma glucose are still controversial. The aim of the present study is to determine how the pancreatic autonomic nervous system and plasma glucagon level react to changes of plasma glucose levels. Male Wistar rats were anesthetized with urethane and α -chloralose. Efferent firing activity in the splanchnic or pancreatic vagal nerve (SNA, PVNA) was measured in situ. In normal rats injected with a bolus of 4 U/kg insulin, after 13 min the SNA increased to a significantly higher level than that of the saline-injected control rats, where the plasma glucose level only fell from 124 to 104 mg/dl (n=5, each). The SNA thereafter increased 5-fold over 90 min with ongoing glucose fall. Plasma glucagon levels in the portal vein 10 min after the insulin injection showed 3.9-fold the level seen in the saline-injected rats, accompanying a glucose change from 100 to 84 mg/dl (n=4, each). The increased SNA dropped immediately after repeated glucose injections. To determine if the diabetic state modifies responses of the pancreatic autonomic nervous activities and glucagon secretion to glucose fall, rats were made diabetic by injecting 40 mg/kg of streptozotocin (STZ). In STZ-induced diabetic rats whose hyperglycemia was confirmed for 7 days and controlled with 12 U/kg of intermediate-type insulin for the following 7 days (STZ-GC), injection of 4 U/kg of insulin induced a glucose fall similar to that in the normal rats. However, response of the SNA to this

glucose fall in the STZ-GC rats was significantly diminished over 15 to 70 min, as compared to the normal rats (n=5, each). Moreover, in STZ diabetic rats left untreated for 14 days (STZ-GU), injection of 8 U/kg of insulin induced a more rapid glucose fall from 308 mg/dl. But the SNA responses were significantly diminished over 20 to 90 min, as compared to the normal rats (n=5, each). Plasma glucagon levels in the portal vein 10 min after the injections increased to a significant level of 3.3-fold the level seen in the saline-injected STZ-GC rats but only 1.4-fold in STZ-GU (n=4, each). These glucagon increases in the STZ-GC and GU rats were significantly lower than that in the normal rats. The PVNA tended to decrease after the insulin injection in both the normal and STZ-GC rats (n=5, each). These results indicate that a subtle but rapid glucose fall within the euglycemic range increases SNA and glucagon secretion, showing no glycemc threshold in triggering their increases, even though they are influenced by the diabetic state.