Effect of Vasoactive Intestinal Polypeptide (VIP) on the Glucose-Induced Insulin Release from Isolated Perfused Pancreas in Streptozotocin-diabetic rats and Zucker obese rats

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/2297/8274

金沢大学十全医学会雑誌　第100巻　第3号　478−494 (1991)

Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) のインスリン放出に及ぼす影響：単離ラット膵灌流系を用いたストレプトゾトシン糖尿病ラットおよびZucker 肥満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：竹田亮祐）
増　永　高　晴
（平成3年4月12受付）

Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) は膵ラ氏島に存在し，神経ペプチドとしてインスリン放出増強作用を有することが知られている．今回，糖尿病および肥満状態における VIP のインスリン放出に及ぼす影響を解明する目的で，雄性ウィスター系ラットに各種濃度 (15, 30, 45, 60mg/kg) のストレプトゾトシン (streptozotocin, STZ) を投与して作製した糖尿病ラット，および Zucker 肥満ラットを用い，高濃度 (300mg/100ml) グルコース刺激インスリン放出反応，および VIP のインスリン放出増強効果を単離ラット膵灌流系にて検討した．STZ 糖尿病ラットの単離膵灌流実験にて，STZ (15mg/kg) 群ではインスリン放出反応は対照群と変化なく，STZ (30mg/kg) 群では高濃度グルコース単独刺激インスリン放出反応は低下したが，VIP によるインスリン放出増強作用は対照群に比し亢進していた．STZ (45mg/kg) 群では高濃度グルコース単独刺激インスリン放出反応はほとんど認められなかったが，VIP 投与下においてのみ低反応ながら明らかなインスリン放出反応が認められた．STZ (60mg/kg) 群では高濃度グルコース単独刺激時および VIP 投与下いずれにおいてもインスリン放出反応はほとんど認められなかった．Zucker ラットの単離膵灌流系における検討では，低濃度 (90mg/100ml) グルコース存在下，および高濃度 (300mg/100ml) グルコース刺激時のインスリン放出量は，いずれも非肥満群に比し肥満群にて高値を示したが，インスリン放出増加量 (300mg/100ml グルコース刺激時のインスリン放出総量−90mg/100ml グルコース存在下のインスリン基礎放出量；Δ-Insulin) は非肥満群に比し肥満群では低下していた．一方，VIP 投与によるグルコース刺激インスリン放出増強作用は両群において認められた．この増強作用を高濃度グルコース単独刺激に対する増加率で検討すると，放出総量では両群ほぼ同等であり，Δ-Insulin では肥満群にて高い増加率を示した．以上より，STZ (30, 45mg/kg) ラットおよび Zucker 肥満ラットにおいて，高濃度グルコース刺激に対するインスリン放出反応が低下しているにもかかわらず VIP に対する反応性は保持されていることが示された．

Key Words vasoactive intestinal polypeptide, isolated perfused pancreas, insulin, streptozotocin diabetic rat, Zucker obese rat

Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) は，1970年にブタの小腸から単離された[1]28個のアミノ酸からなる活性ペプチド[2]であり，中枢神経系，唾液腺，消化管，肺，泌尿生殖器[3]，心臓[4]等の神経組織に存在する神経ペプチドである．膵に関しては，膵内神経節に由来する VIP 神経が，膵内の血管や膵管の周囲，膵腺房

Abbreviations: B/F, bound/free; BSA, bovine serum albumin; IDDM, insulin dependent diabetes mellitus; NIDDM, non insulin dependent diabetes mellitus; PBS, phosphate buffer solution; RIA, radioimmunoassay; STZ, streptozotocin; VIP, vasoactive intestinal polypeptide

周囲，膵ラ氏島周囲に存在していることがヒト，イヌ，ラットで確認[5]され，特に膵ラ氏島周囲においてはVIP 神経が網目状に分布し，いくつかの神経線維は膵ラ氏島内に進入し内分泌細胞に到達していることが報告[5][6]されている．VIP は神経伝達物質として，膵血流増加作用，膵外分泌増強作用の他，膵内分泌ホルモンに対しては，インスリン，グルカゴン，ソマトスタチン放出または放出増強作用を有することが報告[7~14]されている．インスリン放出に関しては，VIP は他の神経ペプチドと比較して強力なインスリン放出増強作用[15]を有し，ヒトにおいても外因性に投与したVIP が血中インスリン，C－ペプチド濃度を上昇させたとの報告[16]もある．しかしながら，以上のような作用を有する VIP が糖尿病や肥満状態においてインスリン放出動態にいかなる影響をおよぼすかについては詳細な検討はなされていない．そこで本研究では，ヒトインスリン依存性糖尿病の実験モデルであり，膵β細胞よりのインスリン放出欠乏状態にあるストレプトゾトシン (streptozotocin, STZ) 糖尿病ラット，およびヒト若年発症肥満モデルであり，膵β細胞よりのインスリン放出過剰状態にある Zucker 肥満ラットの，2つの実験動物モデルにて摘出膵灌流系を用い，高濃度グルコース刺激インスリン放出におよぼす VIP の影響を検討した．また，VIP とインスリンの血中濃度，および VIP，インスリン，ソマトスタチン，グルカゴンの膵内含有量についても検討を加えた．

対象および方法

I．実験動物

1．STZ 糖尿病ラット

体重 200～250g のウィスター系雄性ラットを，一晩絶食させ，体重 1kg あたり STZ (和光，大阪) 15mg, 30mg, 45mg, 60mg の各々を腹腔内投与して作製した．STZ は0.1M クエン酸緩衝液 (pH 4.5) に溶解した後，ただちに使用した．対照群としては緩衝液のみを投与した群を用いた．それぞれ投与3週間後に実験に使用した．対照群を group-1, STZ (15mg/kg) 群を group-2, STZ (30mg/kg) 群を group-3, STZ (45mg/kg) 群を group-4, STZ (60mg/kg) 群を group-5 とした．

2．Zucker 肥満ラット

生後 10～12 週，体重 390～490g の Zucker 肥満 (fa/fa) 雄性ラットを用い，非肥満群として同週齢の体重 250～300g の Zucker 非肥満 (Fa/－) 雄性ラットを用いた．

II．組織の抽出

1．酢酸抽出 (VIP およびソマトスタチン測定用)

ラットは飲水を制限せず約12～14時間絶食後，無麻酔下で断頭し採血 (血糖，インスリン，VIP 測定用) 後，ただちに膵を摘出しドライアイスで凍結した．組織は秤量後，5～10倍量の0.1M 酢酸を加え沸騰水浴中で10分間加熱後冷却し，氷酢酸を加え最終濃度を1.0M 酢酸に調整したのちホモジナイズした．膵ホモジネートを，4°C，3000回転で30分間遠心し，上清を分離した．残渣に小量の1.0M 酢酸を加え再びホモジナイズ後，遠心分離した．上清を先の上清と合わせて凍結乾燥し－40°Cで保存し，VIP とソマトスタチン測定ラジオイムノアッセイ (radioimmunoassay, RIA) 用検体とした．測定に際しては，検体を0.01M のリン酸緩衝液 (phosphate buffer sulution, PBS) (pH7.4) に溶解した．

2．酸エタノール抽出 (インスリンおよびグルカゴン測定用)

酢酸抽出と同様に膵を摘出，秤量後，組織片 1g あたり 5ml の酸エタノール混合液 (99.5%エタノール 750ml, 36% 濃塩酸 15ml，蒸留水 250ml) を加え，ホモジナイズした．膵ホモジネートは4°Cで12時間保存後，4°C，3000回転で30分間遠心し上清を分離した．残渣に小量の酸エタノール混合液を加え再びホモジナイズし4°C1時間保存後遠心分離した．上清を先の上清と合わせ，これに25%アンモニア水を加え pH 7.5 に調整した後再び4°C，3000回転で10分間遠心分離した．上清を凍結乾燥し－40°Cで保存しインスリンとグルカゴン測定 RIA 用検体とした．

III．RIA

1．VIP 特異 RIA 系

標準抗原としては合成ブタ VIP (ペプチド研究所，箕面)，抗血清には家兎抗ブタ VIP 血清 R512 (最終希釈濃度168,000倍)，標準抗原には ^{125}I-VIP (大塚アッセイ研究所，徳島) を用いる RIA 系により行った．標準希釈液には0.5% bovine serum albumin (BSA) (Sigma, Chemical Co., St. Louis, U.S.A.)，0.025M ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (和光) を含む0.01M PBS を用いた．Bound/Free (B/F) 分離は10%ポリエチレングリコールを用いる2抗体法[17]により行った．

2．グルカゴン RIA 系

合成ブタグルカゴンを標準抗原とし，抗グルカゴン血清 OAL123 (最終希釈濃度124,000倍) (大塚アッセイ研究所) と標準抗原 ^{125}I－グルカゴン (大塚アッセイ研究所) を用いる RIA 系で行い，B/F 分離は2抗体法[18]により行った．

3．ソマトスタチン RIA 系

合成ソマトスタチンを標準抗原，^{125}I-N$^{\alpha}$-tyrosylated-ソマトスタチンを標準抗原とし，抗ソマトスタチン血清 OAL202（最終希釈濃度10,000倍）（大塚アッセイ研究所）を用いる RIA 系で行い，B/F 分離はデキストラン-炭末法[19]により行った．

4．インスリン RIA 系

インスリンはダイナボット社（Tokyo）のインスリンリアキットを用いた RIA 系により測定し，B/F 分離はビーズ法[20]により行った．標準曲線の作製にはラットインスリン（Novo Research Institute, Copenhagen, Denmark）を使用した．

IV．単離ラット膵灌流実験

各ラットとも，飲水を制限せず約16時間絶食した後，ペントバルビタール 50mg/kg 腹腔内投与により麻酔した．Grodsky ら[21]の方法に準じて膵を摘出し，単離ラット膵灌流標本を作製した．単離した膵は37°C の生理食塩中に懸垂した．灌流液には 95% O_2-5%-CO_2で飽和した4％デキストラン70（Pharmacia Fine Chemical, Uppsala, Sweden），0.2％BSA，90mg/100ml グルコース含有 Krebs Ringer Bicarbonate（KRB）緩衝液（pH 7.4）を用い，液温は37°C に保った．腹腔動脈のカニューレより 2ml/min. の流速で灌流した．門脈へのカニュレーションより流出した灌流液は，2分毎に 1000KIU アプロチニンを添加したスピッツ管に採取し，−40°C で測定時まで凍結保存した．

V．灌流実験における VIP およびグルコースの投与法

VIP は 1M 酢酸に溶解後，0.2%BSA を含む生理食塩水で希釈し目的とする濃度に調整した．グルコースは生理食塩水により目的とする濃度に希釈した．VIP およびグルコース溶液は側管よりインフュージョンポンプで 0.1ml/min. の流速で投与した．インスリンの基礎放出が安定した後，門脈より流出液を集めた．基礎放出安定後10分後より VIP 投与を開始し，20分後より 300mg/100ml グルコースを VIP と同時に側管より20分間注入した．なお，VIP 非投与群には側管より 0.2%BSA を含む生理食塩水のみを投与した．

VI．統計処理

インスリン放出については，300mg/100ml のグルコース刺激中の20分間の放出量を放出総量（Total Insulin）とした．また，この放出総量から，90mg/100ml グルコース単独存在下の基礎放出量（流出液採取開始から最初の10分間の放出量）の2倍を減じたものをインスリン放出増加量（Δ-insulin）として，各群間で比較検討した．なお，得られた数値はすべて平均値±標準誤差であらわした．推計学的処理には，Student の t 検定を用い，5％未満の危険率をもって有意とした．

成　　績

I．ラット単離膵灌流系における 300mg/100ml グルコース刺激インスリン放出におよぼす VIP の増強効果（図1）

200〜250g の正常ウィスター系雄性ラットを用い各濃度（10^{-10}M, 10^{-9}M, 10^{-8}M, 10^{-7}M）の VIP 注入開始10分後に 300mg/100ml グルコースを20分間同時注入した．図1の上段（A）は，VIP10^{-8}M 投与のインスリン放出増強作用を検討した結果を示す．VIP10^{-8}M 投与開始後10分間の VIP 単独投与時においては1相性のインスリン放出反応が認められた．この VIP 単独投与時のインスリン放出反応は 10^{-10}M, 10^{-9}M の VIP 投与時には認められず，10^{-7}M 投与時には認められ，放出量も 10^{-8}M と 10^{-7}M 投与時ではほぼ同等であった．VIP10^{-8}M と 300mg/100ml のグルコース同時投与時には，300mg/100ml グルコース単独刺激時の2相性のインスリン放出反応に比し有意に高値かつ高反応の2相性の放出反応が認められた．

図1の下段（B）は 300mg/100ml グルコース刺激20分間の放出総量を VIP 各濃度において検討した結果を示す．インスリン放出総量は VIP 非投与群の 3.03±0.28mU に対し VIP10^{-10}M 投与群では 4.55±0.72 mU, VIP10^{-9}M 投与群では 7.83±1.05mU, VIP 10^{-8}M 投与群では 11.63±0.25mU と用量依存性に上昇し，VIP10^{-7}M 投与群では 9.65±1.02mU と VIP10^{-8}M 投与群に比し低下傾向を示した．以上の結果より，VIP10^{-8}M 濃度が最大刺激濃度と考えられ，以下の実験には 10^{-8}M 濃度の VIP を使用した．

II．STZ 糖尿病ラットにおける検討

1．STZ 投与群における血糖，血中インスリン，VIP 値（表1）

STZ（15, 30mg/kg）群では血糖，インスリン値は対照群（STZ（0mg/kg）群）と有意差を示さなかったが，STZ（45, 60mg/kg）群では STZ 投与量の増加に従い用量依存性に血糖は上昇し（group-1, 130±5; group-4, 206±21; group-5, 408±13mg/100ml），インスリン値は低下した（group-1, 49.4±4.7; group-4, 22.9±4.2; group-5, 10.1±0.6μU/ml）. VIP 値については STZ 各投与量群間において一定の傾向を示さず，対照群とも有意差を認めなかった．

2．STZ 投与群における膵組織内インスリン，グル

カゴン，ソマトスタチン，VIP 含有量の検討（表 2）

STZ (15mg/kg) 群では膵組織内インスリン，グルカゴン，ソマトスタチン含有量は対照群と差を示さなかった．膵組織内インスリン含有量は，STZ (30, 45, 60mg/kg) 群で STZ 投与量の増加に伴い用量依存性に低下した (group-1, 2.64±0.07; group-3, 2.36±0.10; group-4, 1.27±0.26; group-5, 0.42±0.04 mU/mg 湿重量)．一方，ソマトスタチン含有量は STZ (45, 60mg/kg) 群で増加し，グルカゴン含有量は STZ (60mg/kg) 群で高値を示した．VIP 含有量は STZ (45, 60mg/kg) 群で対照群に比し低下傾向を示したが有意差を認めなかった (group-1, 11.9±2.1;

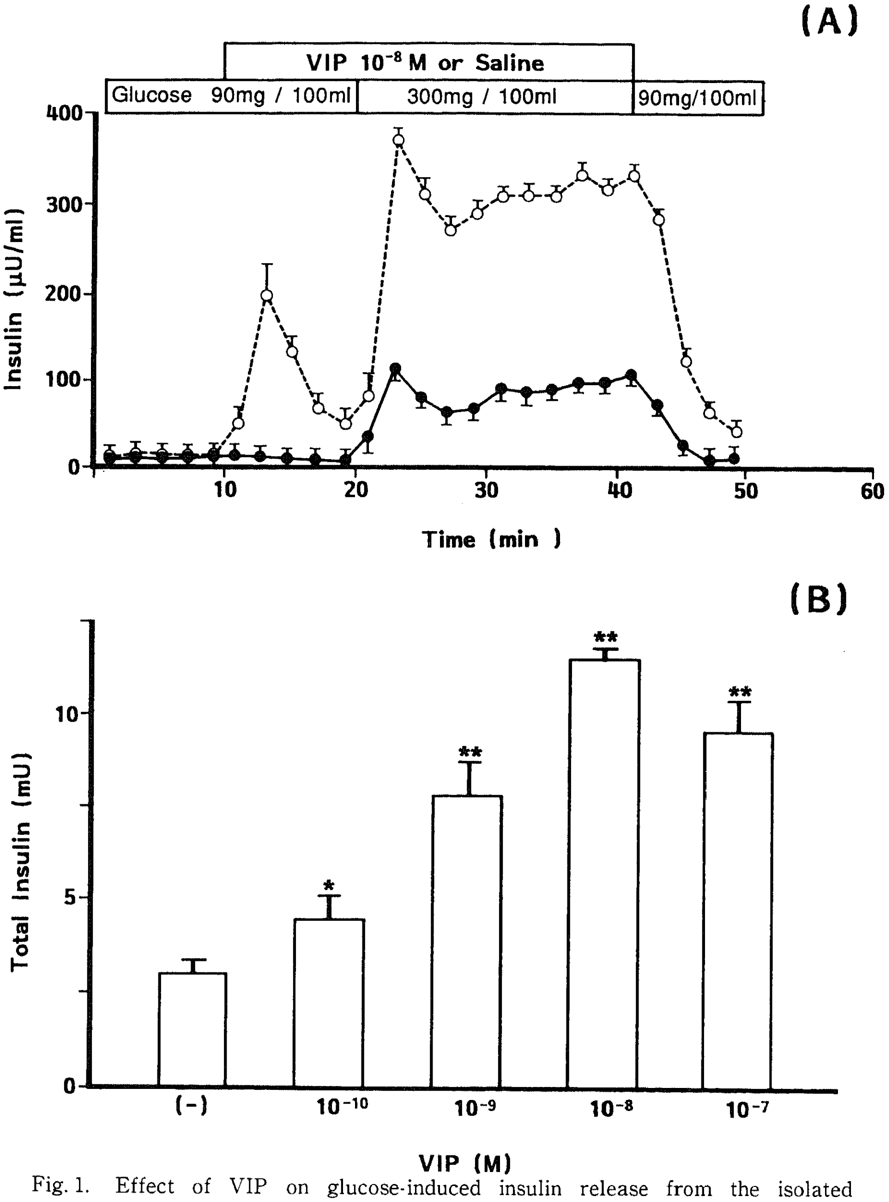

Fig. 1. Effect of VIP on glucose-induced insulin release from the isolated perfused rat pancreas. (A)○……○, the group with 10^{-8}M VIP; ●——●, the group without VIP. (B) total insulin was determined by integrating the areas of insulin release during 300mg/100ml glucose infusion. Results are presented as mean±SEM (n=4〜8). *$p<0.05$; **$p<0.001$ vs the group without VIP.

Table 1. Plasma levels of glucose, insulin and VIP in rats treated with various doses of STZ

Group	STZ (mg/kg)	Glucose (mg/100ml)	Insulin (μU/ml)	VIP (pg/ml)
1	0	130±5	49.4±4.7	66.5±12.9
2	15	133±3	45.9±7.5	77.8±8.8
3	30	147±7	40.8±5.0	73.6±5.8
4	45	206±21**	22.9±4.2**	68.9±4.5
5	60	408±13**	10.1±0.6**	72.3±12.9

Values are expressed in mean ± SEM (n=4~6).
**p<0.001 vs group-1 value

Table 2. VIP, insulin, glucagon and somatostatin-like immunoreactivities in the pancratic extracts of rats treated with various doses of STZ

Group	STZ (mg/kg)	VIP (ng/g wet wt)	Insulin (mU/mg wet wt)	Glucagon (μg/g wet wt)	Somatostatin (ng/g wet wt)
1	0	11.9±2.1	2.64±0.07	2.86±0.18	27.7±2.2
2	15	10.3±1.6	2.70±0.30	2.72±0.16	29.5±4.9
3	30	11.1±1.2	2.36±0.10*	2.97±0.41	32.9±3.7
4	45	8.8±0.9	1.27±0.26**	4.02±1.23	39.0±4.7*
5	60	8.3±0.8	0.42±0.04**	4.93±0.60*	64.0±4.6**

Values are expressed in mean ± SEM (n=4~6).
*p<0.05, **p<0.001 vs group-1 value

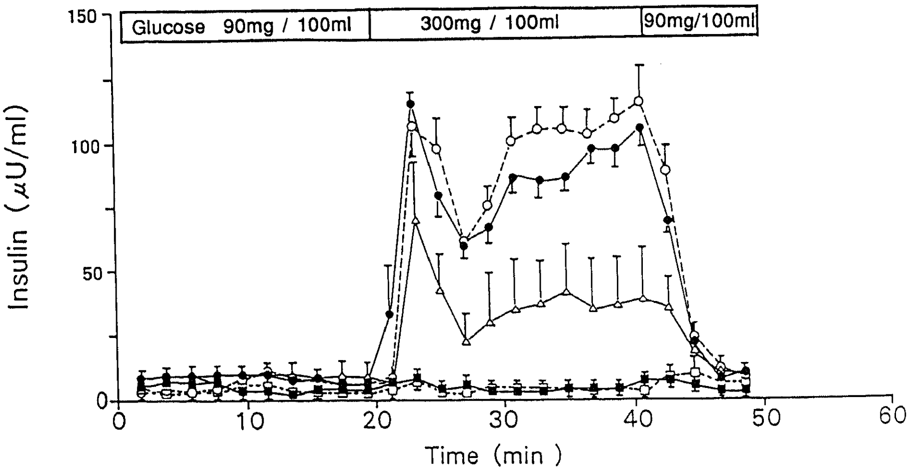

Fig. 2. Changes of 300mg/100ml glucose-induced insulin release from the isolated perfused rat pancreas treated with various doses of STZ (●——●, 0; ○……○, 15; △——△, 30; ■——■, 45 and □……□, 60mg/kg). Results are presented as mean±SEM (n=5~8).

group-4, 8.8±0.9; group-5, 8.3±0.8ng/g 湿重量).

3. 高濃度グルコース刺激時のインスリン放出に及ぼすストレプトゾトシンの影響 (図2, 4)

STZ (15mg/kg) 群では, 300mg/100ml グルコース刺激により対照群 (STZ(0mg/kg) 群) と同様の2相性のインスリン放出反応が認められ, 300mg/100ml グルコース刺激中の放出総量でも3.45±0.30mU と対照群の3.03±0.28mU と有意差を示さなかった. STZ (30mg/kg) 群では2相性のインスリン放出反応が認められたが, 1相, 2相共対照群に比し低反応であり, 放出総量でも1.13±0.68mU と対照群に比し有意に低下していた. STZ (45, 60mg/kg) 群では, インスリン放出反応はほとんど認められなかった.

2) STZ 糖尿病ラットにおける高濃度グルコース刺激時のインスリン放出に及ぼす VIP の増強効果

i. インスリン放出パターンの検討 (図1 (A), 図3)

[対照群 (STZ (0mg/kg) 群) は図1 (A) に示す.]

STZ (15mg/kg) 群 (図3 (A)) では, VIP 投与による300mg/100ml グルコース刺激時のインスリン放出増強反応は, 図1 (A) に示す対照群と1相, 2相共変化しなかった. STZ (30mg/kg) 群 (図3 (B)) では, 対照群や STZ (15mg/kg) 群同様, VIP 投与により300mg/100ml グルコース単独刺激時の2相性の放出反応は1相, 2相共いずれも有意に増大した. しかし, 対照群の VIP 投与下 300mg/100ml グルコース刺激時のインスリン放出反応と比較すると1相, 2相共低下していた. STZ (45/kg) 群 (図3 (C)) では, 300mg/100ml グルコース単独刺激時には殆どインスリン放出は認められなかったが, VIP 投与により低反応ながらインスリン放出が認められた. また, 90mg/100ml グルコース存在下 VIP 単独刺激時に低反応ながら1相性の放出反応が認められたが, 続く VIP 存在下 300mg/100ml グルコース刺激による2相性のインスリン放出増強反応は認められなかった. STZ (60mg/kg) 群 (図3 (D)) では, 300mg/100ml グルコース単独刺激時および VIP 存在下 300mg/100ml グルコース刺激時いずれにても, ほとんどインスリン放出反応は認められなかった.

ii. インスリン放出総量の検討 (図4)

VIP10^{-8}M 投与下 300mg/100ml グルコース刺激20分間のインスリン放出総量は対照群の 11.63±0.25 mU に対し, STZ (15mg/kg) 群では 11.98±0.43 mU と変化なく, STZ (30mg/kg) 群では8.58±0.70 mU と対照群に比較し有意に低下していた. 一方, 300mg/100ml グルコース単独刺激時のインスリン放出に対する VIP の増強効果を放出総量の増加率でみると, 対照群3.8倍, STZ (15mg/kg) 群3.5倍, STZ

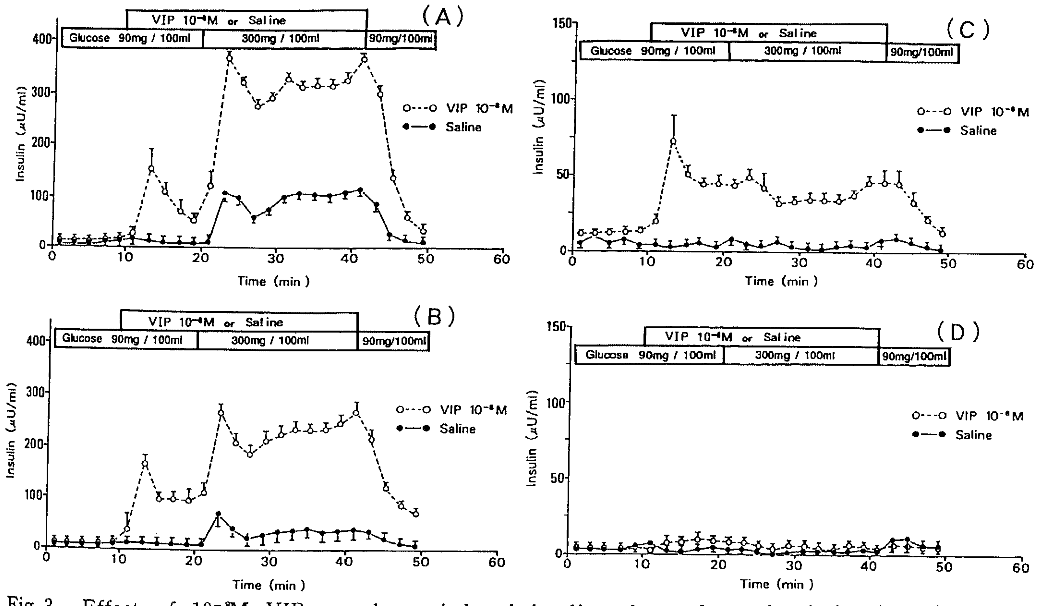

Fig. 3. Effect of 10^{-8}M VIP on glucose-induced insulin release from the isolated perfused rat pancreas treated with various doses of STZ; A, 15mg/kg; B, 45mg/kg; C, 30mg/kg and D, 60mg/kg. ○……○, the group with 10^{-8}M VIP; ●——●, the group without VIP. Results are presented as mean±SEM (n=5~8).

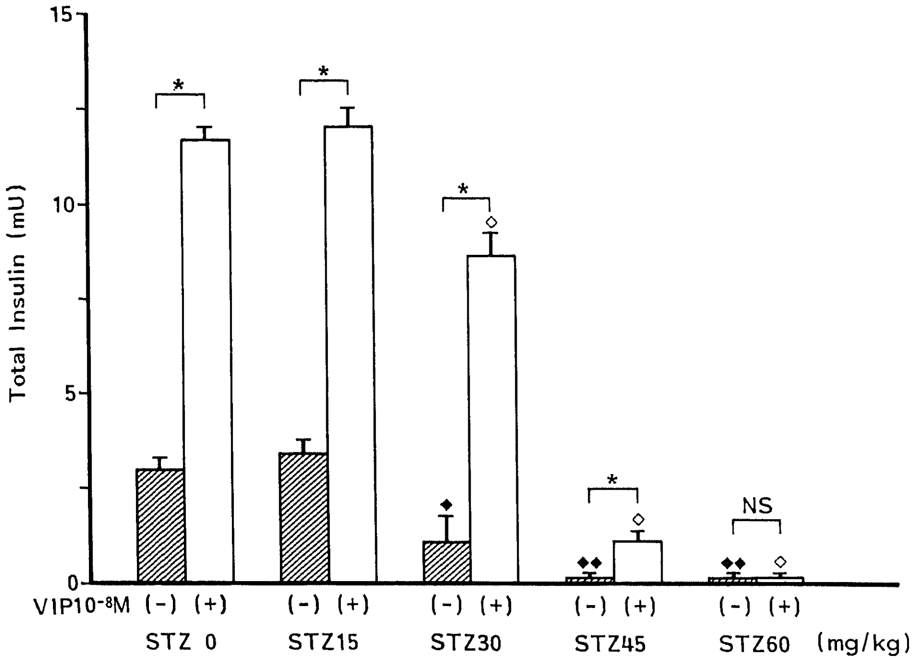

Fig. 4. Integrated response to 10^{-8}M VIP of insulin release during 300mg/100ml glucose infusion from the isolated perfused rat pancreas treated with various doses of STZ (0, 15, 45, 30 and 60mg/kg). Total insulin was determined by integrating the areas of insulin release during 300mg/100ml glucose infusion. Results are presented as mean±SEM (n=5~8).
◇, p<0.001 vs control rat (STZ 0mg/kg) with 10^{-8}M VIP.
◆, p<0.01 ; ◆◆, p<0.001 vs control rat without 10^{-8}M VIP.
*, p<0.001 ; NS, not significant.

Table 3. Plasma levels of glucose, insulin and VIP in Zucker rats

	Glucose (mg/100ml)	Insulin (μU/ml)	VIP (pg/ml)
Lean	121±8	35.0±5.8	63.3±26.0
Obese	134±11	116.1±30.4*	84.8±30.3

Values are expressed in mean ± SEM (n=4).
* p<0.05 vs lean value

Table 4. VIP, insulin, glucagon and somatostatin-like immunoreactivities in the pancreatic extracts of Zucker rats

	VIP (ng/g wet wt)	Insulin (mU/mg wet wt)	Glucagon (μg/g wet wt)	Somatostatin (ng/g wet wt)
Lean	10.6±1.2	2.62±0.27	2.66±0.55	32.3±5.7
Obese	9.1±3.2	4.64±0.64*	2.73±0.30	65.5±12.5*

Values are expressed in mean ± SEM (n=4).
* p<0.05 vs lean value

(30mg/kg) 群7.6倍といずれも有意であり，特に STZ (30mg/kg) 群において著明であった．STZ (45mg/kg) 群ではグルコース単独刺激時にはインスリン放出反応がほとんど認められず VIP 投与下でのみ放出反応が認められたが，放出総量は1.15±0.03mU と対照群に比較して著明に低下していた．STZ (60mg/kg) 群では VIP 投与にてもグルコース単独刺激時同様インスリン放出反応はほとんど認められなかった．

Ⅲ．Zucker 肥満ラットにおける検討

1．Zucker ラットにおける血糖，血中インスリン，VIP 値 (表3)

血糖値は両群間に差を認めず，インスリン値は非肥満群35.0±5.8μU/ml に対し肥満群 116.1±30.4μU/ml と肥満群において有意に高値を示した．血中 VIP 値は非肥満群 63.3±26.0pg/ml に対し肥満群 84.8±30.3pg/ml と肥満群で高い傾向を示したが有意差は認めなかった．

2．Zucker ラットにおける膵組織内インスリン，グルカゴン，ソマトスタチン，VIP 含有量の検討 (表4)

インスリン含有量は血中レベル同様，肥満群で4.64±0.64mU/mg 湿重量と非肥満群 2.62±0.27mU/mg 湿重量に比し有意に高値を示した．また，同様にソマトスタチン含有量も肥満群では非肥満群に比し有意に高値を示した．グルカゴンおよび VIP 含有量については両群間で差を認めなかった．

3．Zucker 肥満ラットの単離膵灌流系における検討

1）Zucker 肥満ラットにおけるグルコース刺激によるインスリン放出反応 (図5，7)

90mg/100ml グルコースを含む基礎灌流時のインスリン基礎放出は，非肥満群 4.84±1.20μU/ml に対し，肥満群では 153.2±19.0μU/ml と有意に高値を示した．続く 300mg/100ml グルコース刺激時には，両群とも基礎放出に比し有意に高反応のインスリン放出が認められ，非肥満群では2相性の放出パターンを呈したが，肥満群では2相性パターンは不明瞭であった．300mg/100ml グルコース単独刺激20分間の放出総量は，非肥満群 6.58±0.98mU に対し肥満群では 12.0±1.12mU と肥満群にて有意に高値を示したが，90mg/100ml グルコース単独存在下の基礎放出量を放出総量から減じた放出増加量Δ-Insulin は，非肥満群 6.22±1.02mU に対し肥満群では3.42±0.62mU と放出総量とは逆に肥満群にて有意に低下していた．

2）Zucker 肥満ラットにおける高濃度グルコース刺激時にインスリン放出におよぼす VIP の増強効果 (図6)

両群とも，VIP10^{-8}M 投与により 90mg/100ml グルコース存在下においてインスリン放出反応が認められ，肥満群において高値を示した．続く VIP10^{-8}M と 300mg/100ml グルコースとの同時刺激時には，両群とも 300mg/100ml グルコース単独刺激時の放出反応に比較して有意に高値の放出反応が認められた．しかし，肥満群では VIP 存在下の 300mg/100ml グルコース刺激に対し非肥満群に認められたような2相性のインスリン放出増強反応は不明瞭であり，なだらかな1

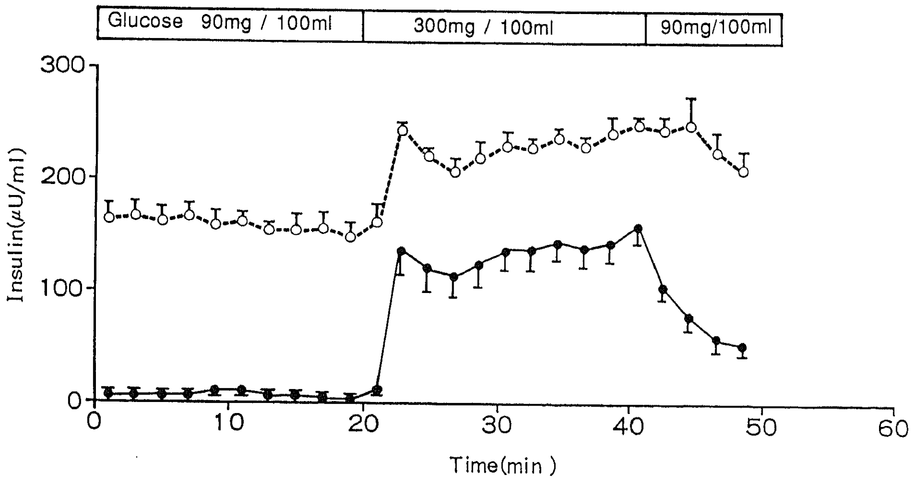

Fig. 5. Changes of glucose-induced insulin release from the isolated perfused pancreas of Zucker rats (○……○, obese and ●——●, lean). Results are presented as mean±SEM (n=5).

相性の放出反応が認められた．

3）Zucker 肥満ラットにおける高濃度グルコース刺激時のインスリン放出総量および放出増加量におよぼす VIP の増強効果（図7）

VIP10^{-8}M 投与下 300mg/100ml グルコース刺激時の放出総量は非肥満群 10.44±0.90mU に対し肥満群では 18.26±1.44mU と肥満群において有意に高値を示した．また，300mg/100ml グルコース単独刺激時のインスリン放出に対する VIP の増強効果を，放出総量の増加率でみると，非肥満群1.59倍，肥満群1.52倍とほぼ同等であり，両群とも VIP により有意に増強された．

VIP 投与下における放出増加量Δ-Insulin での検討では，非肥満群 10.10±0.76mU に対し肥満群では

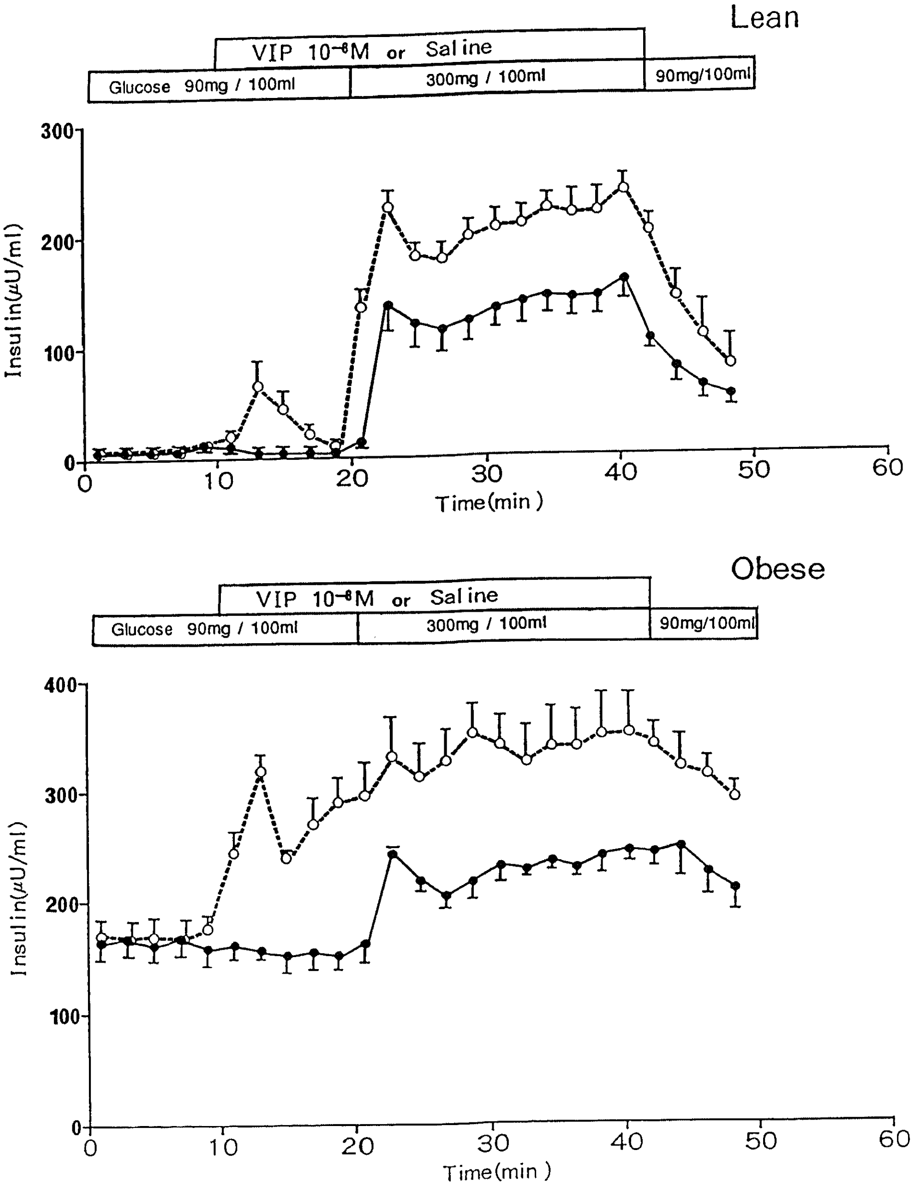

Fig. 6. Effect of 10^{-8}M VIP on glucose-induced insulin release from the isolated perfused pancreas of Zucker obese and lean rats. ○……○, the group with 10^{-8}M VIP ; ●——●, the group without VIP.
Results are presented as mean±SEM (n=5).

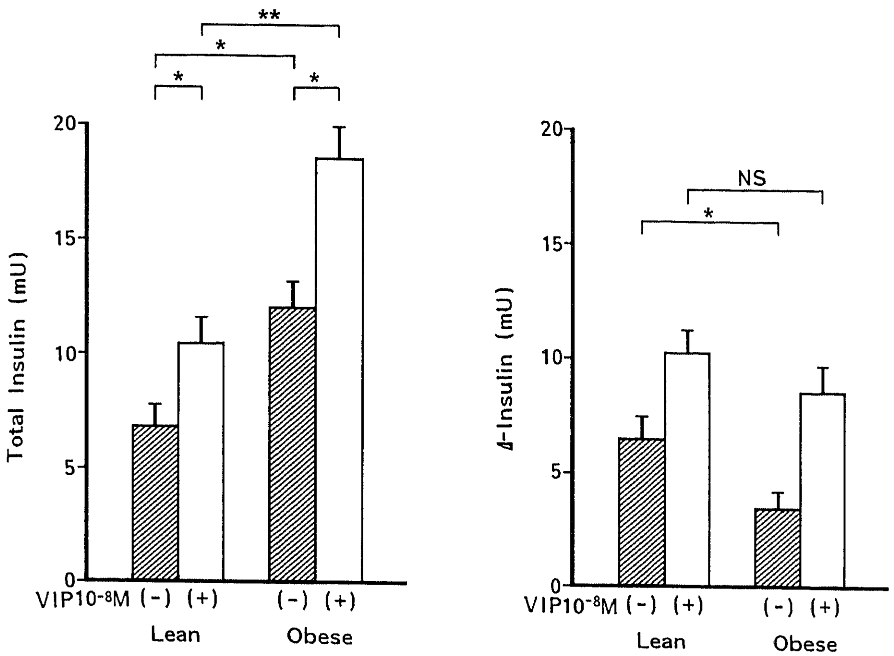

Fig. 7. Integrated response to 10^{-8}M VIP of insulin release from isolated perfused pancreas of Zucker obese and lean rats. Total insulin was determined by integrating the areas of insulin release during 300mg/100ml glucose infusion. Δ-insulin was determined by subtracting double the amount of insulin release during 90mg/100ml glucose infusion (0〜10min) from the amount of insulin release during 300mg/100ml glucose infusion (20〜40min). Results are presented as mean±SEM (n=5). *, $p<0.05$; **, $p<0.01$; NS, not significant

8.38±1.20mU と有意差を認めなかった．しかし，300mg/100ml グルコース単独刺激時の Δ-Insulin に対する VIP と 300mg/100ml グルコース同時刺激時の Δ-Insulin の増加率は非肥満群の1.59倍に対し肥満群では2.45倍と肥満群にて高い増加率を示した．

考　　察

I．VIP によるインスリン放出反応

VIP のインスリン放出作用とインスリン放出増強作用は，成熟ラット[7)-10)]のみならず新生仔ラット[11)]や胎仔ラット[12)]においても報告されている．単離ラット膵灌流実験において，Szecowka ら[8)]は，基礎灌流液中にグルコースを含まない場合，VIP 刺激によるインスリン放出作用は認められず，基礎灌流液中に低濃度のグルコース (4.4mmol/l) を含む場合に，VIP 単独刺激により 1 相性のインスリン放出が認められたことを報告した．続いて，高濃度グルコース (16.7mmol/l, 33.3mmol/l) 刺激時の 2 相性のインスリン放出反応に対し VIP は 1 相目の放出反応を有意に増強させたことを報告した．また，間中ら[9)]は，高濃度グルコース (16.7mmol/l) 刺激時の 2 相性のインスリン放出反応に対し VIP が 1 相，2 相共有意に増強させたと報告した．本研究でも，低濃度グルコース (90mg/100ml) 存在下において，VIP 単独刺激により 1 相性のインスリン放出が認められた．また，VIP は高濃度グルコース (300mg/100ml) 刺激時の 2 相性の放出反応を 1 相，2 相共有意に増強させた．この結果はほぼ従来の報告[8)9)]と一致した．

II．STZ 糖尿病ラットにおけるインスリン放出反応

STZ は膵 β 細胞の DNA を破壊する[22)]ことにより，特異的に β 細胞の変性，破壊をひきおこす催糖尿病物質[23)]である．この STZ を成熟ラットに投与した場合，用量依存性に催糖尿病作用[24)]を有することが知られている．各種投与量の STZ 糖尿病ラットを用いた本研究でも，STZ 投与量が増加するに従い血糖の上昇と血中インスリン値，膵インスリン含有量の低下を認めた．STZ 糖尿病ラットの膵 VIP に関しては Kishimoto らの報告[25)]以外詳細な検討はなされていない．Kishimoto ら[25)]は STZ 50mg/kg 投与ラットの膵内 VIP 神経の組織学的検討を行い以下の報告をした．す

なわち，①STZ 投与後早期 (48時間) においては，電顕的には STZ の急性毒性によると思われる神経変化が認められるものの，光顕的，免疫細胞化学的には STZ 非投与群と変化なかった．②STZ 投与後長期 (6ヶ月) においては，長期間の糖尿病性代謝異常によると推測される VIP 神経と VIP 神経節細胞の消失と著明な変性を認めた．本研究における STZ (45, 60mg/kg) 群では，STZ 投与後3週間目に VIP 神経の変性と減少があり，VIP 含有量の低下傾向を示したと推測された．STZ (45, 60mg/kg) 群の血中 VIP 値は，膵 VIP 含有量の低下傾向にもかかわらず対照群と差を認めなかった．これは，血中 VIP 値が膵のみならず他臓器の VIP 含有量[26]や肝や腎での VIP 代謝[27]の影響を受けるためと考えられた．

単離ラット膵灌流系における検討では，高濃度グルコース刺激に対するインスリン放出反応は，STZ 投与量が増加するに従い低反応から無反応となった．STZ (30mg/kg) 群では，血糖，血中インスリン値は対照群と有意差を認めなかったが，膵インスリン含有量は有意に低下し，膵灌流系において高濃度グルコースに対するインスリン放出反応が低反応であった．Lucke ら[28]は，STZ 30mg/kg 投与した成熟ウィスター系ラットにおいて，正常血糖と，膵β細胞数および膵インスリン含有量の低下を報告した．また，Junod ら[24]は，STZ 25mg/kg 投与した成熟ウィスター系ラットでは，空腹時の血糖とインスリン値は対照群と差はなかったが，糖負荷試験時に耐糖能障害を認めたことを報告した．これらの報告は本研究の結果とほぼ一致した．以上よりSTZ (30mg/kg) 群はヒトでの軽症糖尿病または耐糖能障害と同様の状態にあると推定された．この STZ (30mg/kg) 群において，高濃度グルコース単独刺激時のインスリン放出反応が低反応であったにもかかわらず，VIP 投与によるインスリン放出総量の増加率 (7.6倍) が対照群の増加率 (3.8倍) より高値を示した．このことより，軽症糖尿病または耐糖能障害の状態において，グルコースに対する反応性が低下しているにもかかわらず VIP に対する反応性は亢進していることが示唆された．STZ (45mg/kg) 群では，高血糖と血中および膵組織中インスリンが低値を示した．この STZ (45mg/kg) 群において，高濃度グルコース単独刺激時のインスリン放出反応がほとんど無反応であり，VIP 投与下でのみインスリン放出反応が認められた．これらにより，グルコース刺激に対する反応性が廃絶した後も VIP に対する反応性が残存することが示唆された．

この機序としてグルコースと VIP のインスリン放出に至る経路の違いが推測される．一般にグルコース刺激によるインスリン放出機序は，グルコースが膵β細胞のグルコース受容体や糖輸送体を介して細胞膜脱分極 (電圧依存性 Ca^{2+} 経路) や細胞内小器官からの Ca^{2+} 遊離をひき起こし，細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させることによると説明されている．また，インスリン非依存型糖尿病 (non insulin dependent diabetes mellitus, NIDDM) モデルラットにおけるグルコース刺激時のインスリン放出障害の機序については Ca^{2+} の流入，流出障害が関与するとの報告[29]もなされている．一方，VIP が各種細胞に対して膜受容体と結合後，細胞内 cAMP 濃度を上昇させることが報告[30]されており，ラット膵β細胞にも VIP の特異的受容体が存在することが Anteunis ら[31]により報告されている．β細胞内の cAMP 濃度の上昇がグルコース刺激時のインスリン放出反応を増強することは従来より報告[32)33]されている．また，β細胞内の cAMP 濃度の上昇が細胞内の Ca^{2+} の上昇を伴わないでインスリン放出を誘発することも確認[33]されている．これらより，VIP によるインスリン放出および放出増強作用には，受容体－cAMP 系を介する経路が関与していると推定される．また，辻ら[34]は NIDDM モデルラットの単離膵ラ氏島において，細胞内 cAMP を非特異的に増加させる forskolin 刺激を行なったところ，糖尿病群では対照群と同等，またはそれ以上のインスリン放出を示したと報告し，糖尿病群において cAMP 系は保持されていると推測した．以上より，本研究において，STZ (30mg/kg) 群ではグルコース刺激経路が障害をうけた後も cAMP 系が保持されたため，VIP によるインスリン放出増強作用は対照群より亢進し，STZ (45mg/kg) 群ではグルコース刺激経路が廃絶した後も cAMP 系が残存したため，VIP 刺激時のみインスリン放出を起こしたと考えられた．

一般に，糖尿病状態において，グルコースに対するβ細胞の感受性が低下または消失した後も，グルコース以外の刺激物質に対する感受性は保持されていると考えられている．NIDDM に関しては，ヒト NIDDM の患者[35]，および新生仔期に STZ を投与したラット[34)36)37]や部分膵摘ラット[37]などの NIDDM モデルラットでは，インスリン放出反応がグルコース刺激では低下しているが，アルギニンやイソプロテレノールなどのグルコース以外の刺激物質では良好に保たれていることが報告[34)~38]されている．その原因として，高血糖に残存β細胞がさらされることによるグルコースに対する選択的反応性の低下[39]，あるいは再生β細胞固有の異常等が推測されている．インスリン依存型糖

尿病 (insulin dependent diabetes mellitus, IDDM) に関しては，Ganda ら[40]はヒト IDDM の発症前または発症早期のインスリン放出反応を検討し，グルコース静注に対するインスリン放出がほとんど認められなかったのに対し，アルギニン，グルカゴン，トリプタマイドに対しては低反応ながら放出が認められたと報告した．本研究では，初めて神経ペプチド VIP と IDDM モデルラットを用いて，ヒトの糖尿病におけると類似の病態について同様の検討を行なった．その結果，糖尿病ではβ細胞のグルコース刺激に対する選択的反応性低下が認められるとする従来の知見[34)~40)]にほぼ一致する成績が得られた．

Ⅲ．Zucker 肥満ラットにおけるインスリン放出反応

Zucker 肥満ラットは，1961年 Zucker ら[41]により報告された遺伝性肥満ラットであり肥満，高インスリン血症，高脂血症と末梢組織におけるインスリン抵抗性を認めるが，高血糖は伴わず，ヒト肥満と類似しておりヒト若年発症肥満のモデル[42]とされている．高インスリン血症が肥満の主因とされている．この高インスリン血症の原因は，組織学的に膵ラ氏島の数の増加と肥大[43]に加え，β細胞自体よりのインスリン放出の異常亢進[44]に依るとされている．本研究でも従来の報告[41)~43)]同様，肥満群において血中インスリン値，および膵インスリン含有量は非肥満群に比し高値を示し，血糖値には差を認めなかった．また，膵 VIP 含有量は肥満群と非肥満群との間に差を認めなかった．血中 VIP 値と肥満との関連について，ヒトの高度肥満において血中 VIP が高値を示し中性脂肪と高い相関を示すことより，VIP が肥満の成因や肥満における高インスリン血症の成因に一部関与している可能性が報告[45)46)]されている．しかし，本研究において，血中 VIP 値は肥満群において高値を示す傾向が認められたが有意差は認められなかった．

グルコース刺激に対するインスリン放出について，Schade ら[44]は，単離膵ラ氏島の灌流実験を行い，グルコース 30mg/100ml 時の基礎放出時，および 300mg/100ml の高濃度グルコース刺激時いずれもラ氏島１個あたりのインスリン放出量は肥満群において有意に高値を示したと報告し，このインスリンの過剰放出は遺伝的要因によるか，または末梢組織におけるインスリン抵抗性に続発したものと推定した．また，Curry ら[47]は，Zucker ラットを用いた膵灌流実験で種々グルコース濃度 (75, 125, 200, 300mg/100ml) 刺激時のインスリン放出反応を検討し，各濃度で肥満群では非肥満群に比しインスリン放出は高値を示したと報告した．本研究における摘出膵灌流実験でも，低濃度 (90mg/100ml) および高濃度 (300mg/100ml) グルコース投与下のインスリン放出は，いずれも肥満群では非肥満群に比し高値を示した．これは従来の報告[44)47)]と一致した．

一方，Curry ら[47]は非肥満群に対する肥満群のインスリン過剰放出反応は，75mg/100ml および 125mg/100ml 濃度のグルコース投与下において最も顕著に認められたと報告し，高濃度グルコース (200mg/100ml, 300mg/100ml) 刺激時の反応性の低下を指摘した．また，遺伝性肥満マウス (ob/ob) を用いた分離膵ラ氏島培養実験において，60mg/100ml グルコースの基礎培養時では，肥満群では非肥満群に比しインスリン放出量は増大したが，150mg/100ml 濃度とするとインスリン放出の増加量は逆に低下したと報告[48]されている．本研究でも，インスリン放出増加量 (300mg/100ml グルコース刺激時のインスリン放出総量－90mg/100ml グルコース存在下のインスリン基礎放出量；Δ-Insulin) は肥満群では非肥満群に比較し有意に低値を示した．以上より，Zucker 肥満ラットではグルコースが高濃度になるとインスリン反応性が低下してくることが示唆された．

グルコース以外の刺激としてロイシン，アラニン，アルギニンなどのアミノ酸による刺激の検討では，インスリン放出反応は基礎放出時，刺激時いずれにおいても肥満群が非肥満群に比し高値高反応を示したと報告[44)49)]されている．摘出膵灌流標本を用いた本研究においては，低濃度 (90mg/100ml) グルコース存在下では VIP 刺激により両群ともインスリン放出反応が認められ，肥満群において高値を示した．高濃度グルコース (300mg/100ml) 刺激時でも両群とも VIP 投与によるインスリン放出増強作用が認められ，肥満群において高値を示した．この増強作用を高濃度グルコース単独刺激に対する増加率で検討すると，放出総量では非肥満群1.59倍，肥満群1.52倍とほぼ同等あり，Δ-Insulin では非肥満群1.59倍，肥満群2.45倍と肥満群にて高い増加率を示した．以上より，肥満群において，高濃度グルコースに対する反応性が低下しているにもかかわらず VIP に対する反応性が保持されていることが示唆された．また，本研究において肥満群では VIP 存在下の高濃度グルコース刺激によるインスリン放出増強反応が非肥満群に比較し不明瞭であった点については，肥満ラットのβ細胞異常によると予想されるが詳細は不明であり今後の検討を要する．

以上の如く，本研究ではインスリン放出の欠如と過

剰という正反対のインスリン放出異常を呈する STZ 糖尿病ラットおよび Zucker 肥満ラットが，いずれも高濃度グルコース刺激に対してインスリン放出障害を有することを明かにした．ついで，これらのラットの膵が神経ペプチド VIP によるグルコース刺激インスリン放出増強作用を保持していることを明らかにした．

結 論

インスリン欠乏型糖尿病と高インスリン血症 (肥満) という対照的な膵内分泌異常状態において，VIP のインスリン放出に及ぼす影響を解明する目的で，STZ 糖尿病ラットと Zucker 肥満ラットを用い，以下の検討を行なった．単離ラット膵灌流系を用い，まず正常ウィスター系雄性ラットにて高濃度グルコース刺激インスリン放出に及ぼす VIP の最大刺激濃度を決定した．次に，ウィスター系雄性ラットに各種濃度の STZ (15, 30, 45, 60mg/kg) を腹腔内投与し作製した糖尿病ラット，および生後10〜12週の Zucker 肥満ラットについて高濃度グルコース刺激に対するインスリン放出反応と，VIP のインスリン放出増強効果を検討した．さらに，両ラットにおける血中 VIP，インスリン値および VIP，インスリン，グルカゴン，ソマトスタチンの膵内含有量についても検討を加えた．得られた結果は以下の如く要約された．

1．正常ウィスター系雄性ラットを用いた単離ラット膵灌流系において，VIP は高濃度グルコース刺激インスリン放出を増強し，この増強効果は VIP10^{-8}M で最大であった．

2．STZ 糖尿病ラットにおいて，血糖値は STZ 投与量の増加とともに用量依存性に上昇し血中インスリン値は低下した．血中 VIP 値は各群間に差を示さなかった．

3．STZ 糖尿病ラットにおいて，膵インスリン含有量は STZ 投与量の増加とともに用量依存性に低下し，ソマトスタチン含有量は STZ (45, 60mg/kg) 群で，グルカゴン含有量は STZ (60mg/kg) 群で高値を示した．膵 VIP 含有量は STZ (45, 60mg/kg) 群で低下傾向を示した．

4．STZ 糖尿病ラットの単離ラット膵灌流系において，STZ (15mg/kg) 群のインスリン放出反応は対照群と有意差を示さなかった．STZ (30mg/kg) 群では高濃度グルコース単独刺激によるインスリン放出が障害されていたが VIP によるインスリン放出増強作用は対照群に比し亢進していた．STZ (45mg/kg) 群においては高濃度グルコース単独刺激によるインスリン放出反応はほとんど認められなかったが，VIP 投与下では低反応ながら明らかなインスリン放出反応が認められた．STZ (60mg/kg) 群では高濃度グルコース単独刺激時，および VIP 投与下いずれもインスリン放出反応はほとんど認められなかった．

5．Zucker ラットにおいて，血糖値には肥満群，非肥満群とで差がなかったが，血中インスリン値，膵インスリン含有量は肥満群において高値を示した．血中 VIP 値，膵 VIP 含有量は両群間で有意差を示さなかった．膵ソマトスタチン含有量は肥満群において高値を示し，膵グルカゴン含有量は両群間で有意差を示さなかった．

6．Zucker ラットの単離ラット膵灌流系にて低濃度 (90mg/100ml)，および高濃度 (300mg/100ml) グルコース刺激時のインスリン放出量は，いずれも肥満群において高値を示した．しかし，インスリン放出増加量 (300mg/100ml グルコース刺激時のインスリン放出総量－90mg/100ml グルコース存在下のインスリン基礎放出量；Δ-Insulin) は肥満群にて有意に低下していた．

7．低濃度 (90mg/100ml) および高濃度グルコース (300mg/100ml) 刺激時，Zucker 両ラット群とも VIP 投与によるインスリン放出増強作用が認められ，肥満群において高値を示した．この増強作用を高濃度グルコース単独刺激に対する増加率で検討すると，放出総量は両群ほぼ同等であり，Δ-Insulin については肥満群で高い増加率を示した．

以上より，グルコース刺激に対し軽度ないし中等度のインスリン放出障害をもつ STZ 糖尿病 (30, 45mg/kg) ラット，および高濃度グルコース刺激に対するインスリン反応が低下している Zucker 肥満ラットにおいて，グルコース刺激インスリン放出に対する VIP の増強作用は対照群と同等かそれ以上であることが認められた．従って，両ラットともグルコースに対するインスリン放出経路が障害されても，VIP に対する感受性は保持していると考えられた．

謝 辞

稿を終えるにあたり御指導，御校閲をたまわった竹田亮祐教授に深甚の謝意を捧げます．また，本研究の遂行にあたり，直接御指導，御協力いただいた竹田康男助手に深謝致します．また，御協力いただきました上野敏男先生はじめ，第二内科第五研究室の諸先生に心から感謝いたします．

なお，本論文の要旨は，第73回日本消化器病学会総会 (1987年) 第30回日本糖尿病学会総会 (1987年京都)，第8回日本肥満学会 (1987年仙台)，第74回日本消化器病学会総会 (1988年仙台)，第8回膵ホルモン研究会 (1988年東京)，第8回国際内分泌病学会 (1988年京都) にて発表した．

文　　献

1) **Said, S. I. & Mutt, V.:** Polypeptide with broad biological activity. Science, **169**, 1217-1218 (1970).

2) **Said, S. I. & Mutt, V.:** Structure of the porcine vasoactive intestinal octacosapeptide: The amino-acid sequence. Use of kallikrein in its determination. Eur. J. Biochem., **42**, 581-589 (1974).

3) **Fahrenkrug, J.:** Vasoactive intestinal polypeptide: Measurement, distribution and putative neurotransmitter function. Digestion, **19**, 149-169 (1979).

4) **Weihe, E. & Reinecke, M.:** Peptidergic innervation of the mammalian sinus nodes: vasoactive intestinal polypeptide, neurotensin, substnace P. Neurosci. Lett., **26**, 283-288 (1981).

5) **Bishop, A. E., Polak, J. M., Green, I. C., Bryant, M. G. & Bloom, S. R.:** The location of VIP in the pancreas of man and rat. Diabetologia, 18, 73-78 (1980).

6) **Larsson, L. I., Fahrenkrug, J., Holst, J. J. & Schafflitzky de Muckadell, O. B.:** Innervation of the pancreas by vasoactive intestinal polypeptide (VIP) immunoreactive nerves. Live Sci., **22**, 773-780 (1978).

7) **Szecowka, J., Lins, P. E., Tatemoto, K. & Efendic, S.:** Effect of porcine intestinal heptacosapeptide and vasoactive intestinal polypeptide on insulin and glucagon secretion in rats. Endocrinology, **112**, 1469-1473 (1983).

8) **Szecowka, J., Sandberg, E. & Efendic, S.:** The interaction of vasoactive intestinal polypeptide (VIP), glucose and arginine on the secretion of insulin, glucagon and somatostatin in the perfused rat pancreas. Diabetologia, **19**, 137-142 (1980).

9) **間中英夫, 矢内原千鶴子, 佐々木英夫, 矢内原昇:** 単離ラット膵灌流系における insulin 放出動態に及ぼす VIP/PHI 関連 peptide の影響. Peptide Hormones in Pancreas 4 (堀野正治編), 第 1 版, 171-180頁, Biomedical Research Foundation, 東京, 1984.

10) **Arilla, E., Prieto, J. C., Lopez-Martinez, J. M. & Goberna, R.:** Somatostatin action on insulin secretion induced by chicken and porcine vasoactive intestinal polypeptide in the perfused rat pancreas. Horm. Metab. Res., **13**, 314-317 (1981).

11) **Bataille, D., Jarrousse, C., Vauclin, N., Gespach, C. & Rosselin, G.:** Effect of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and gastric inhibitory peptide (GIP) on insulin and glucagon release by perifused newborn rat pancreas. *In* P. P. Foa, J. S. Bajaj & N. L. Foa (eds.), Glucagon, Its Role on Physiology and Clinical Medicine, 1st ed. p255-270, Springer-Verlag Press, New York/ Berlin, 1977.

12) **Rowley, W. H., Fletcher, D. J., Dudek, R. W. & Brinn, J. E.:** Vasoactive intestinal polypeptide enhances hormone content and insulin release in cultured fetal rat islets. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **186**, 165-169 (1987).

13) **Hermansen, K.:** Effects of substance P and other peptides on the release of somatostatin, insulin, and glucagon in vitro. Endocrinology, **107**, 256-261 (1980).

14) **Jensen, S. L., Fahrenkrug, J., Holst, J. J., Nielsen, O. V. & Schaffalitzky, O. B.:** Secretory effects of VIP on isolated perfused porcine pancreas. Am. J. Physiol., **235**, E387-E391 (1978).

15) **竹田康男, 橋本佳己, 矢内原千鶴子, 加藤郁夫, 山本栄仁, 望月　徹, 矢内原昇, 竹田亮祐:** 高濃度 glucose 刺激 insulin 放出に及ぼす各種神経 peptide の影響. Peptide Hormones in Pancreas 6 (赤沼安夫編), 第 1 版, 81-88頁, Biomedical Research Foundation, 東京, 1986.

16) **山下裕一, 磯本浩晴, 掛川てる夫, Fahrenkrug, J., Pederson, J. H.:** 外因性 VIP と PHM のヒト膵内分泌に及ぼす影響. Peptide Hormones in Pancreas 7 (小坂樹徳編), 第 1 版, 325-329頁, Biomedical Research Foundation, 東京, 1987.

17) **Yanaihara, c., Sakagami, M., Mochizuki, T., Sato, H., Yanaihara, N., Iwanaga, T., Fujii, S. & Fujita, T.:** Immunoreactive VIP (vasoactive intestinal polypeptide) in canine intestinal mucosa and muscle. Biomed. Res., **1**, 449-455 (1980).

18) **富永真琴, 丸橋成次郎, 蛯谷　功, 佐々木英夫:** グルカゴン RIA キットの基礎的検討. ホルモンと臨床., **28**, 1323-1327 (1980).

19) **石神文嗣, 清水文夫, 申貞　均, 今川健一, 矢内原昇:** ラット組織中免疫活性ソマトスタチンの分子多様性について. 日本内分泌病学会誌., **56**, 547 (1980).

20) **清野 裕, 井村裕夫:** インスリン測定の意義に関する新しい考え方とビーズ法を用いた新しいインスリン測定キットの基礎的, 臨床的検討. 医学と薬学., 9, 1881-1888 (1983).

21) **Grodsky, G. M. & Fanska, R, E.:** The in vitro perfused pancreas. *In* J. Handmann & B. O'Malley (eds.), Methods in Enzymology, 1st ed. p364-372, Academic Press, New York, 1975.

22) **Yamamoto, H., Uchigata, Y. & Okamoto, H.:** DNA strand breakes in pancreatic islets by in vivo administration of alloxan or streptozotocin. Biochem. Biophys. Res. Commun., **103,** 1014-1020 (1981).

23) **Junod, A., Lambert, A. E., Orci, L., Pictet, R., Gonet, A. E. & Renold, A. E.:** Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **126,** 201-205 (1967).

24) **Junod, A., Lambert, A. E., Stauffacher, W. & Renold, A. E.:** Diabetogenic action of streptozotocin: Relationship of dose to metabolic response. J. Clin. Invest., **38,** 2129-2139 (1969).

25) **Kishimoto, S., Shimizu, S., Kambara, A., Okamoto, K., Koh, H., Yamamoto, M., Tamaru, T., Kajiyama, G., Miyoshi, A. & Yanaihara, N.:** VIPergic innervation of diabetic pancreas in rats. Peptides, **4,** 451-458 (1984).

26) **Belai, A., Lincoln, J., Milner, P., Crowe, R., Loeshe, A. & Burnstock, G.:** Enteric nerves in diabetic rats: increase in vasoactive intestinal polypeptide but not substance P. Gastroenterology, **89,** 967-976 (1985).

27) **Henriksen, J. H., Staun-Olsen, P., Borg Mogensen, N. & Fahrenkrug, J.:** Circulating endogenous vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in patients with uraemia and liver cirrhosis. Eur. J. Clin. Invest., **16,** 211-216 (1986).

28) **Lucke, s., Ziegler, B., Weidlich, K., Barowski, U., Besch, W. & Hahn, H. J.:** The effects of subdiabetogenic streptozotocin doses on rat beta cell volume and functions. Biomed. Biochim. Acta., **44,** 167-171 (1984).

29) **Hashimoto, N., Kanatsuka, A., Makino, H., Sakurada, M., Iwaoka, H., Yoshida, S. & Horie, H.:** Abnormal calcium handling by perifused pancreatic islets from neonatal streptozotocin diabetic model rats. Metabolism, **36,** 827-833 (1987).

30) **O'Dorisio, M. S., Wood, C. L., Wenger, G. D. & Vassalo, L. M.:** Cyclic AMP-dependent protein kinase in molt 4b Lymphoblasts: Identification by photoaffinity labeling and activation in intact cells by vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and peptide histidine isoleucine (PHI). J. Immunol., **134,** 4078-4086 (1985).

31) **Anteunis, A., Hejblum, G., Astesano, A., Marie, J. C., Hoa, D. H. B., Kergoat, M., Portha, B. & Rosselin, G.:** Evidence for the presence of VIP recepters in pancreatic B cells by quantitative electron microscopic autoradiography. C. R. Acad. Sci., **3,** 357-360 (1986).

32) **Sharp, G. B. G.:** The adenylate cyclase-cyclic AMP system in islets of langerhans and role in the control of insulin release. Diabetologia, **16,** 287-296 (1979).

33) **Wollheim, C. B., Ullrich, S. & Pozzan, t.:** Glyceraldehyde, but not cyclic AMP-stimulated insulin release is preceded by a rise in cytosolic free Ca^{2+}. Fed. Eur. Biochem. Soc., **177,** 17-22 (1984).

34) **辻 和雄, 田港朝彦, 清野 裕, 宇佐美勝, 津田謹輔, 北野則和, 武田 純, 福本博文, 黄 範, 黒瀬 健, 井村裕夫:** II型糖尿病モデル rat における insulin 分泌の特性. Peptide Hormones in Pancreas 7 (小坂樹徳編) 第1版, 63-68頁, Biomedical Research Foundation, 東京, 1987.

35) **Pfeifer, M. A., Halter, J. B. & Porte Jr, D.:** Insulin secretion in Diabetes mellitus. Am. J. Med., **70,** 579-588 (1981).

36) **Bonner-Weir, S., Trent, D. F., Honey, R. N. & Weir, G. C.:** Responses of neonatal rat islets to streptozotocin. Limited B-cell regeneration and hyperglycemia. Diabetes, **30,** 64-69 (1981).

37) **Weir, G. C., Clore, E. T., Zmachinski, C. J. & Bonner-Weir, S.:** Islet secretion in a new experimental model for non-insulin-dependent diabetes. Diabetes, **30,** 590-595 (1981).

38) **Bonner-Weir, S., Trent, D. F. & Weir, G. C.:** Partial pancreatectomy in the rat and subsequent defect in glucose-induced insulin release. J. Clin. Invest., **71,** 1544-1553 (1983).

39) **Leahy, J. L., Cooper, H. E., Deal, D. A. & Weir, G. C.:** Chronic hyperglycemia is associated

with impaired glucose influence on insulin secretion. J. Clin. Invest., **77**, 908-915 (1986).

40) **Ganda, O. P., Srikanta, S., Brink, S. J., Morris, M. A., Gleason, R. E., Soeldner, J. S. & Eisenbarth, G. S.**: Differential sensitivity to β-cell secretagogues in "Early," type I diabetes mellitus. Diabetes, **33**, 516-521 (1984).

41) **Zucker, T. F. & Zucker, L. M.**: Heredity obesity in the rat associated with high serum fat and cholesterol. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **110**, 165-171 (1962).

42) **Zucker, L. M. & Antoniades H. N.**: Insulin and obesity in the Zucker genetically obese rat "fatty". Endoclinology, **90**, 1320-1330 (1972).

43) **York, D. A., Steinke, J. & Bray, G. A.**: Hyperinsulinemia and insulin resistance in genetically obese rats. Metabolism, **21**, 277-284 (1972).

44) **Schade, D. S. & Eaton, R. P.**: Insulin secretion by perfused islets from the obese Zucker rat. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **149**, 311-314 (1975).

45) **Tomkin, G. H., Ardill, J., Lafferty, H. & Darragh, A.**: Vasoactive intestinal polypeptide in obesity. Int. J. Obes., **7**, 153-160 (1983).

46) **Barreca, T., Franceschini, R., Messina, V., Cataldi, A., Salvemini, M. & Rolandi, E.**: Plasma somatostatin and vasoactive intestinal polypeptide responses to an oral mixed test meal in obese patients. Horm. Res., **31**, 234-237 (1989).

47) **Curry, D. L. & Stern, J. S.**: Dynamics of insulin hypersecretion by obese Zucker rats. Metabolism, **34**, 791-796 (1985).

48) **Beloff-Chain, A., Newman, M. E. & Mansford, K. R. L.**: Factors influencing insulin and glucagon secretion in lean and genetically obese mice. Horm. Metab. Res., **9**, 33-37 (1977).

49) **Bryce, G. F., Hope, H. & Wiggan, G.**: Amino acid induced release insulin and glucagon in the genetically obese Zucker rat. Abst. 36th annual Meeting of American Diabetes Assoc., San Francisco, California, 356 (1976).

Effect of Vasoactive Intestinal Polypeptide (VIP) on the Glucose-Induced Insulin Release from Isolated Perfused Pancreas in Streptozotocin-diabetic rats and Zucker obese rats

Takaharu Masunaga, Department of Internal Medicine (Ⅱ), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., **100**, 478−494 (1991)

Key words vasoactive intestinal polypeptide, isolated perfused pancreas, insulin, streptozotocin-diabetic rat, Zucker obese rat

Abstract

Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) has been known to be a neuropeptide which is present in the islets of mammalian animals and capable of stimulating insulin release. In the present study the author attempted to examine first the insulin release induced by a high concentration (300 mg/100 ml) of glucose and then the effect of VIP on glucose-induced insulin release from the isolated perfused pancreas, in streptozotocin (STZ)-diabetic rats and Zucker obese rats. Male wistar rats were treated with a graded dose of STZ (group-1, 0; -2, 15; -3, 30; -4, 45; -5, 60 mg/kg). The degree of insulin release from the isolated perfused pancreas was the same level in group-2 (STZ 15 mg/kg) and group-1 (control). In the absense of VIP, insulin response to a high concentration of glucose decreased in group-3 (STZ 30 mg/kg). VIP enhanced the glucose-induced insulin release. The effect of VIP was more significant in group-3 than in group-1. In group-4 (STZ 45 mg/kg), insulin response to a high concentration of glucose was eradicated, but the response to glucose was definitely observed when VIP was present, though it was decreased compared to that in group-1. In group-5

(STZ 60 mg/kg), insulin did not respond at all to glucose with or without VIP. Insulin response to glucose at either low (90 mg/100 ml) or high concentration (300 mg/100 ml) increased in Zucker obese rat. Δ -insulin, which was determined by subtracting the amount of insulin released during 90 mg/100 ml glucose infusion from the amount of insulin released during 300 mg/100 ml glucose infusion, decreased in Zucker obese rat. An enhanced effect of VIP on glucose-induced insulin release was present in Zucker obese as well as lean rats. The increment of total insulin which was induced by VIP during 300 mg/100 ml glucose infusion was the same degree in obese and lean rats. The increment of Δ -insulin by VIP stimulation was more enhanced in obese rats than in lean rats. These results indicate that, in both mild diabetic rats (group-3 and -4) and Zucker obese rats, VIP-stimulated insulin release is well preserved when the insulin response to high concentration glucose is decreased.