

ステロイド糖尿病における膵内分泌機能の検討

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: 打田, 諭 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8893

ステロイド糖尿病における膵内分泌機能の検討

金沢大学医学部内科学第一講座 (主任: 服部 信教授)

打 田 論

(昭和56年1月22日受付)

Key words ステロイド糖尿病, ベータメサゾン, 単離膵ラ氏島, インスリン, グルカゴン

ステロイド糖尿病は二次性糖尿病の中でも臨床的に頻回に遭遇する疾患の一つであり, 治療においても時々強いインスリン抵抗性がみられることがあり, その詳細な病態の解明はきわめて重要と思われる。

ところで, 副腎皮質が炭水化物の代謝に関与していることは古くよりよく知られていたが, 1941年にIngle¹⁾がラットにコーチゾンやコルチコステロンなどを投与することにより糖尿病状態を惹起しうることを報告してから, グルココルチコイドのもつ催糖尿作用に関して多くの研究がなされるようになった。以後, 動物種の相違によりグルココルチコイドに対する感受性が異なること, グルココルチコイドの化学構造の相違によっても糖尿病惹起作用が異なることなどが次第に明らかとなってきた²⁾⁻⁷⁾。一般に, ラットやモルモットなどに比べてイヌやネコではグルココルチコイドの催糖尿作用に対して強い抵抗性をもつことが知られている。

しかしながら, アロキサンやストレプトゾトシンなどにより, 多くの動物種に対して容易に糖尿病状態を作成できるようになった⁸⁾⁻¹¹⁾。今日では, グルココルチコイドの投与による糖尿病状態の作成, 及びその詳細な病態の解明はほとんどなされていないようである。

グルココルチコイドは膵外においてタンパク質や脂肪からの糖新生を増強すると同時に末梢組織での炭水化物利用を減弱させる¹²⁾⁻¹⁴⁾が, 膵内においてはラ氏島内のB細胞の数と容積を共に増加させる¹⁵⁾⁻¹⁷⁾ことがラットで確認されている。このようなグルココルチコイドの膵ラ氏島B細胞に及ぼす組織学的変化につい

ては, モルモット⁶⁾¹⁸⁾や, ラビット¹⁹⁾など他の動物においても比較的多く報告されており, これらの組織学的変化により, グルココルチコイドには糖尿病惹起作用があると同時に, アロキサンやストレプトゾトシンなどの他の糖尿病惹起性薬物による障害からラ氏島内B細胞を保護する作用もあるといわれている¹⁹⁾⁻²³⁾。

ステロイド糖尿病においては, *in vivo*において一般に末梢でのインスリン抵抗性が増大し, 高インスリン血症がみられるといわれている²⁴⁾が, *in vitro*におけるラ氏島内B細胞からのインスリン分泌に関しての報告ではかなりのばらつきがみられており, いまだ一定した見解は出ていない²⁵⁾⁻²⁷⁾。また, グルココルチコイドの長期間投与により作成したステロイド糖尿病時のラ氏島内B細胞機能に関してもほとんど知られていない。

グルココルチコイドの人間に対する数日間投与例, 及びクッシング症候群などでは共にグルカゴンの基礎値が高く²⁸⁾, アルギニン刺激に対するグルカゴンの反応も増強することが知られており²⁴⁾²⁹⁾, 临床上長期間のグルココルチコイド投与によってグルカゴン分泌が増強すると, 肝でのフォスホリラーゼ活性が高まりグリコーゲンの分解が盛んとなる結果, 血糖の調節異常が進行し病態がより複雑化する²⁹⁾³⁰⁾ものと考えられている。ところが, グルココルチコイドのラ氏島内A細胞に及ぼす効果を *in vitro* で検討した報告は比較的少なく, ましてやグルココルチコイドを数週間という長期間にわたって投与して作成したステロイド糖尿病状態でのA細胞機能についての報告は著者の調べ

Secretion of Insulin and Glucagon from Isolated Pancreatic Islets of the Steroid-Induced Diabetic Rats. Satoshi Uchida, Department of Internal Medicine (I), (Director: Prof. N. Hattori), School of Medicine, Kanazawa University.

た限りではなかった。

そこで、今回著者はステロイド糖尿病の成因及び病態に膵ラ氏島内 A 細胞, B 細胞機能がいかなる役割を果たしているのかをみるため、まずラットに合成ステロイドの 1 種であるベータメサゾン(4 週間)投与することによりステロイド糖尿病を作成し、次に作成されたステロイド糖尿病ラットの膵ラ氏島からのインスリン, グルカゴン分泌動態を主にブドウ糖濃度との関連において検討した。併せて、ステロイド糖尿病時におけるラ氏島内神経内分泌調節機能の変化をみるために、A 細胞, B 細胞に対するいくつかの刺激物質、及び抑制物質を使って若干検討を加えたので報告する。

材料および方法

I. ステロイド糖尿病ラット作成法

生後第 5 週齢のウィスター系雄性ラット 60 匹に対してベータメサゾンを経口的に 0.05 mg/day ~ 0.4 mg/day の投与量で各々 4 週間服用させた(表 1)。別に、コントロールとして同週齢のラット 20 匹を用い、ベータメサゾン投与群と同じ生理的条件下で飼育した。飼料は、実験期間中オリエンタル固形飼料 MF を使用した。ベータメサゾンは給水管の中に水道水と混ぜて入れ、毎日の飲水量をチェックした。1 週間の平均飲水量がコントロールに比して 80% 以下であったものは対象から除外した。ベータメサゾン投与後の体重、空腹時血糖、尿糖、死亡率などの変化を経時的にしらべた。また、ベータメサゾン 4 週間投与後における耐糖能をみるため、各グループに対して iv-GTT を施行し検討を加えた。iv-GTT の方法は、ラットを 24 時間絶

食として、その間飲料水のみを与えた後、ペントバルビタール(50 mg/kg, 腹腔内注入)麻酔下で、ブドウ糖 0.1g/kg をラット大腿静脈より 10 秒間で注入し、注入前、注入後 5 分, 10 分, 20 分, 30 分, 60 分目に鎖骨下静脈より 0.5 ml 採血し、血糖を測定した。なお、尿糖はテストテープ法、血糖はグルコースオキシダーゼ法により測定した。

II. 実験的ステロイド糖尿病ラットの単離膵ラ氏島からのインスリン, グルカゴン分泌動態の検査法

前項 I において得られた実験結果に基づき生後第 5 週齢のウィスター系雄性ラット 64 匹に対してベータメサゾンを 0.3 mg/day, 4 週間投与して作成し得たステロイド糖尿病ラット 40 匹を対象とした。

一晚絶食されたラットをペントバルビタール(50 mg/kg, 腹腔内)麻酔下に開腹し、Lacy らのコラゲナーゼ消化法³¹⁾に改良を加えた Okamoto らの方法³²⁾に従って、きわめて温和な条件下で膵ラ氏島を処理した。すなわち、総胆管を十二指腸開口部で結紮後、左右肝管の合流部付近から十二指腸開口部に向けて 23 ゲージの翼状針を挿入し、この翼状針を通して 0.6% ブドウ糖を含む Hanks 氏液を約 20 ml 注入し、膵外分泌組織を膨化させた。ついで、この膨化膵を十二指腸や胃などの周囲組織から分離し摘出した。摘出膵を眼科用ハサミにて約 2 ~ 3 mm の大きさに細切し、30 mg のコラゲナーゼ (CLS IV, 160U/mg, Worthington Biochemical Corp., Freehold/N. J.) と 100 mg の牛血清アルブミン (Sigma, 以下 BSA と略記) とを含む 5 ml の Hanks 氏液と共に 20 ml 容三角フラスコに入れ、37 °C の恒温水槽中で 11 分間激しく振盪 (150 ~ 200

Table 1. Effect of betamethasone on body weight, fasting blood sugar, glycosuria and mortality

Group I ~ V n=40	Betamethasone mg/day (total dose)	Body weight			Fasting blood sugar			Glycosuria %	Mortality %
		before	IInd week	gIVth week	before	IInd week	mg/dl IVth week		
I	0.05 (1.4)	91±5	138±4	220±16	98±10	104±8	108±12	0	12.5
II	0.1 (2.8)	88±4	130±11	201±10	101±8	101±10	114±11	0	0
III	0.2 (5.6)	85±8	126±12	185±15	95±7	108±19	171±25*	25	37.5
IV	0.3 (8.4)	89±6	129±15	146±10	97±10	127±15	241±14*	50	37.5
V	0.4 (11.2)	85±7	122±5	135±20	105±10	131±18	220±21*	75	62.5
Controls n=20		85±5	124±8	207±12	102±11	110±15	109±12	0	0

Data are expressed as M±SD

*p<0.001 vs before

回/分)して摘出膵切片をコラゲナーゼで処理した。消化した膵組織は沈澱法³¹⁾に準じて Hanks 氏液で数回洗浄, 沈澱をくり返し, 最後に実体顕微鏡下で毛細管ピペットを用いて沈澱物中よりラ氏島を採取した。

採取した単離ラ氏法を6個ずつ0.8 mlのインキュベーションメジウムを含む10 ml容目盛付ガラス管に入れ, O₂95% - CO₂5%の混合ガス通気下で60分間インキュベートした。インキュベーションメジウムには5mMピルビン酸ナトリウム, 5mMフマル酸ナトリウム, 5mMグルタミン酸ナトリウム, 2%BSAなどを含む Krebs - Ringer 重炭酸緩衝液 (pH 7.4)を用いた。このメジウム中に種々の濃度のブドウ糖, アルギニン, ノルエピネフリン, セロトニンなどを単独もしくは2つ以上混合して添加して, 単離ラ氏島からのインスリン分泌, 及びグルカゴン分泌に与える影響を検討した。

インスリンは Dinabott RI 研究所製キットを用いて二抗体法で, グルカゴンは Unger の方法により, 30Kを用い RIA 法で, 血糖はグルコースオキシダーゼ法で測定した。結果についての統計学的処理は student's t 検定によりおこなった。

成 績

I. ステロイド糖尿病ラットの生成

1. ベータメサゾン投与後の体重の変化

ベータメサゾンの比較的大量投与群であるグループ

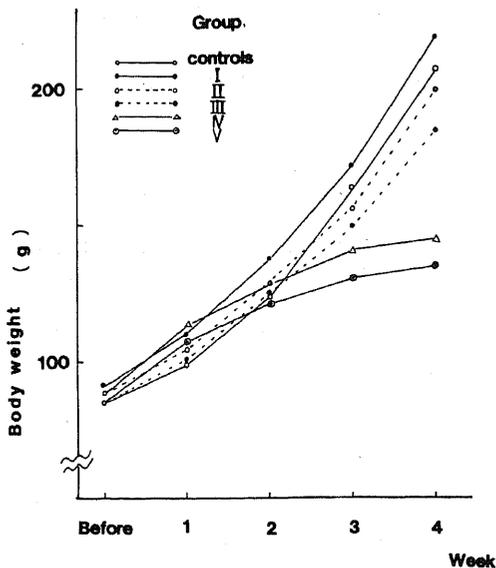


Fig. 1. Effect of betamethason on increase of mean body weight

IV, Vにおいては, 4週間投与後の体重増加がコントロールに比して有意に ($p < 0.005$) 少なかった(表1)。各グループの体重増加を経時的にみると, グループIV, グループVでは特にベータメサゾン投与後第3週目から第4週目にかけての体重増加が少なかった(図1)。投与後第3週目ではグループVのみコントロールに比して有意に ($p < 0.05$) 少なかった。

2. ベータメサゾン投与後の空腹時血糖値の変化 (表1, および図2)

ベータメサゾン投与後2週目迄は, いずれのグループにおいてもコントロールとの間に有意な血糖の変化はみられなかった。投与後3週目においては, コントロールに比してグループIII ($p < 0.05$), グループIV ($p < 0.001$), グループV ($p < 0.001$)の各群で有意に血糖値が上昇した。投与後4週目においては, グループIII~Vで有意に ($p < 0.001$) コントロールに比して血糖値の上昇をみた。

3. ベータメサゾン投与後の空腹時尿糖出現率

コントロール, およびグループI, IIでは陽性率が0%と低かったが, ベータメサゾンの投与量が増すにつれて陽性率は上昇した。ただし, グループIV, Vなどの大量投与群においても尿糖出現率はそれぞれ37.5%, 50%とそれ程高くはなかった(表1)。

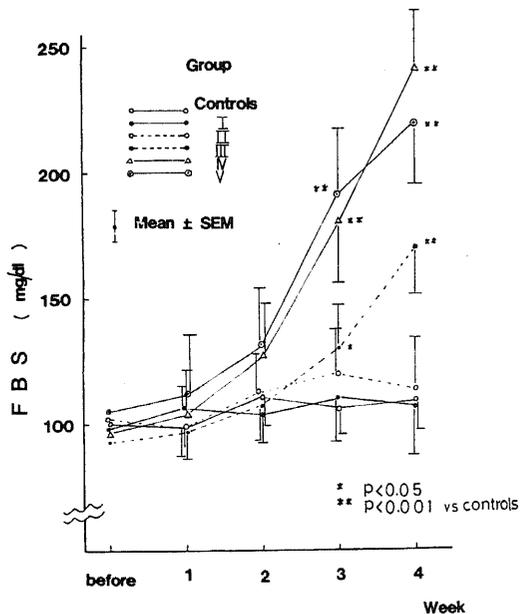


Fig. 2. Effect of betamethasone on fasting blood sugar

4. ベータメサゾン投与後の死亡率

コントロールでは死亡率が0%であったのに対して、ベータメサゾンの投与群では投与量が増すにつれて死亡率の増加がみられた。とくにベータメサゾン0.4 mg/day投与したグループVでは死亡率が62.5%と高率を示した。なお、死亡した12匹の開腹所見では、12匹中5匹(42%)にG-I系での潰瘍形成とその部位からの出血がみとめられた。

5. iv-GTTによるステロイド糖尿病状態の確認(図3)

グループIII~Vにおいては注入後5分~60分迄コントロールに比して有意($p < 0.001$)な血糖値の上昇をみた。グループIIにおいては、コントロールに比して空腹時血糖値は正常であったが、iv-GTTでの血糖上昇は、注入後5分、10分で $p < 0.01$ 、注入後20分~60分で $p < 0.05$ と、それぞれにおいて有意に高値であった。

II. 実験的ステロイド糖尿病ラットの単離膵ラ氏島からのインスリン、グルカゴン分泌動態

1. インスリン、グルカゴンの基礎分泌(図4, 図5)
3. 3mMのブドウ糖添加時におけるインスリン分泌

は、コントロール群(以下C群と略記)では、 $11.7 \pm 1.4 \mu\text{u}/\text{islet}/60\text{min}$ 、ステロイド糖尿病群(以下S群と略記)では、 39.3 ± 2.9 (平均値 \pm 標準誤差、以下略) $\mu\text{u}/\text{islet}/60\text{min}$ (以下インスリンの分泌量の単位は、すべて $\mu\text{u}/\text{islet}/60\text{min}$)と有意に($p < 0.001$)

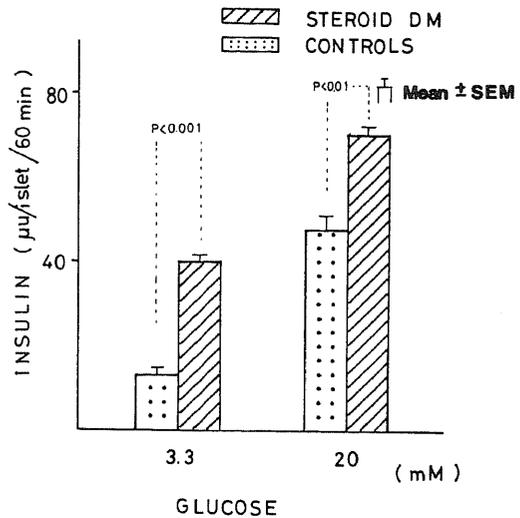


Fig. 4. Relationship between glucose concentration and insulin secretion

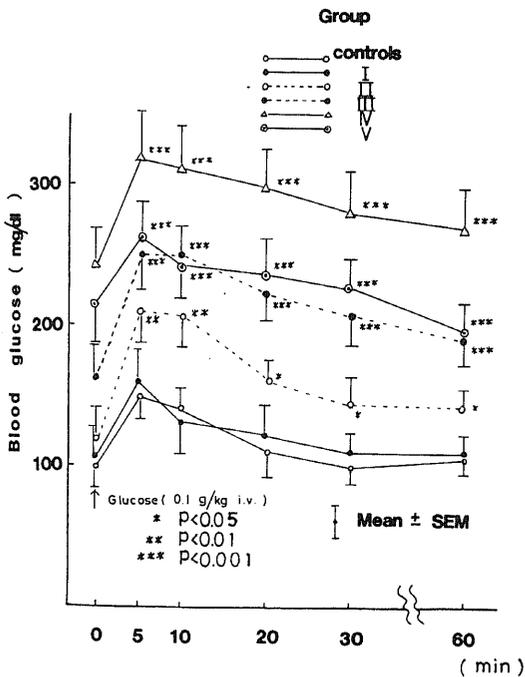


Fig. 3. iv-GTT in the diabetic groups and controls at IVth week

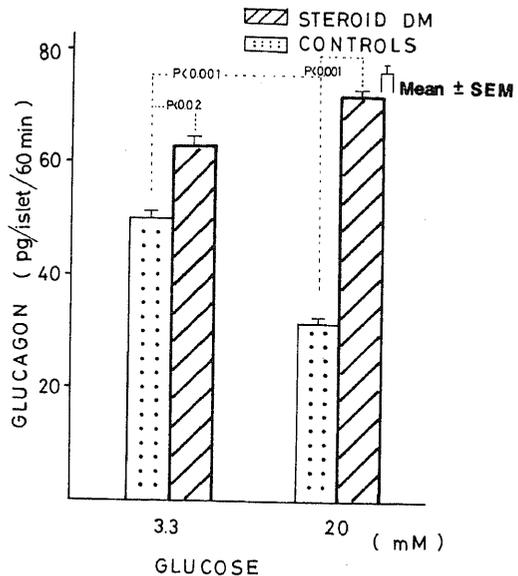


Fig. 5. Relationship between glucose concentration and glucagon secretion

S群で高値であった。グルカゴン分泌でも、C群では 51.6 ± 3.2 pg/islet/60min, S群では 63.1 ± 2.5 pg/islet/60min (以下グルカゴンの分泌量の単位は、すべて pg/islet/60min) と S群の方が有意に ($p < 0.01$) 高値であった。

2. 高濃度ブドウ糖存在下でのインスリン、グルカゴン分泌 (図4, 図5)

20mMのブドウ糖添加時でのインスリン分泌は、C群では 48.2 ± 3.5 , S群では 70.5 ± 3.3 と S群の方が有意に ($p < 0.02$) 高値であった。また、グルカゴン分泌ではC群が20mMのブドウ糖添加により、

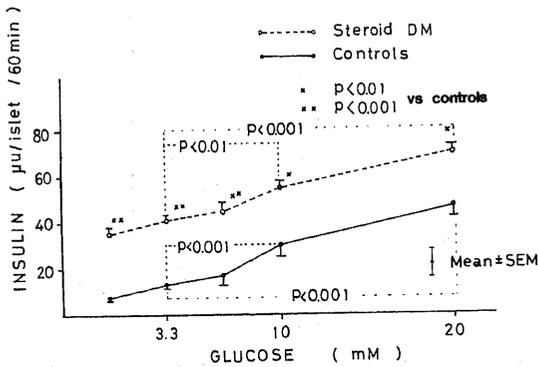


Fig. 6. Dose response curve between glucose concentration and insulin secretion

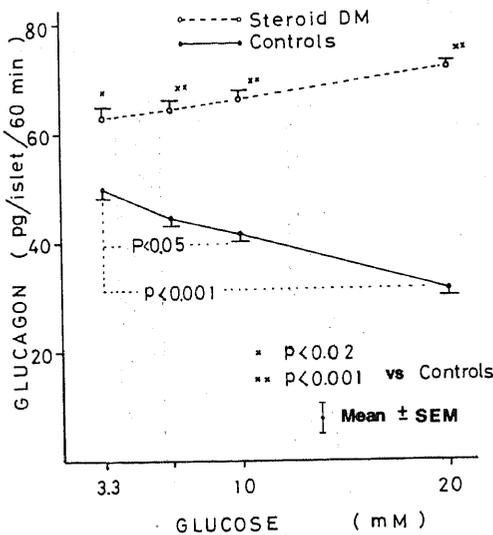


Fig. 7. Dose response curve between glucose concentration and glucagon secretion

3.3mMブドウ糖添加時にくらべて有意に抑制された (51.6 ± 3.2 vs 33.5 ± 2.9 , $p < 0.001$) のに対して、S群ではこの抑制がみられずむしろ奇異上昇 (63.1 ± 2.5 vs 72.2 ± 2.3) がみとめられた。

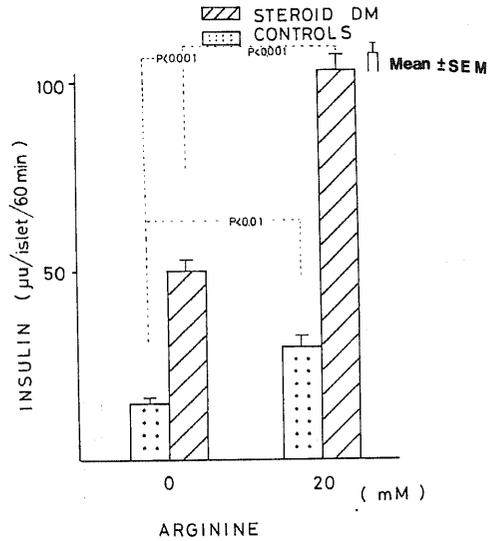


Fig. 8. Relationship between arginine concentration and insulin secretion

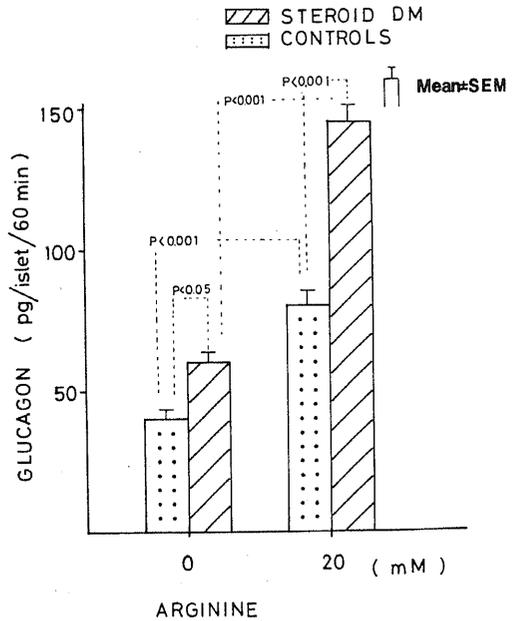


Fig. 9. Relationship between arginine concentration and glucagon secretion

3. ブドウ糖濃度とインスリン分泌, グルカゴン分泌との用量反応性についての検討 (図6, 図7)

3.3mM, 5mM, 10mM, 20mMの各ブドウ糖濃度におけるインスリン分泌 (図6), グルカゴン分泌 (図7) をみると, インスリン分泌ではいずれの濃度下においてもS群の方がC群よりも有意 (3.3mM, 5mM では $p < 0.001$, 10mM, 20mM では $p < 0.01$) であり, 両群ともにブドウ糖濃度の上昇に伴ってインスリン分泌は増加した. また, グルカゴン分泌ではブドウ糖濃度の上昇に伴ってC群では有意に減少した (10mM では $p < 0.05$, 20mM では $p < 0.001$) のに比して, S群ではむしろ上昇する傾向がみとめられた.

4. アルギニン刺激によるインスリン, グルカゴン分泌 (図8, 図9)

3.3mMのブドウ糖存在下, 20mMのアルギニン添加時におけるインスリン分泌は, 両群ともに基礎分泌に比して有意に (C群 $p < 0.01$, S群 $p < 0.001$) 高値を示した (図8). またグルカゴン分泌でも両群共アル

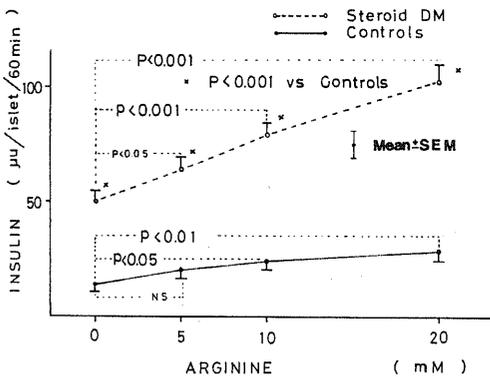


Fig. 10. Effect of arginine on insulin secretion

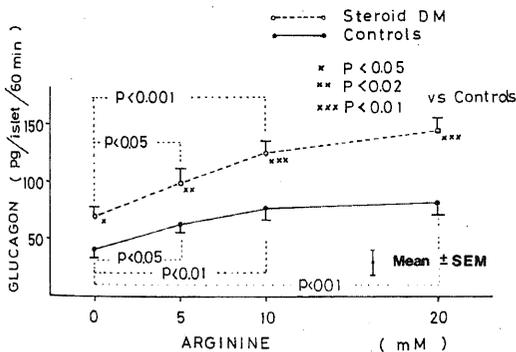


Fig. 11. Effect of arginine on glucagon secretion

ギニン刺激により基礎分泌に比して有意に ($p < 0.001$) 高値を示した (図9).

5. アルギニン濃度とインスリン分泌, グルカゴン分泌との用量反応性についての検討 (図10, 図11)

3.3mMのブドウ糖存在下で5mM, 10mM, 20mMの各アルギニン添加時におけるインスリン分泌は, 両群共アルギニン濃度の上昇に伴ってインスリン分泌も基礎分泌に比して増加を示した (C群では10mM, 20mMで有意, S群では5mM, 10mM, 20mMのいずれにおいても有意) また, いずれの濃度下においてもS群の方がC群よりも有意に ($p < 0.001$) 高値を示した. グルカゴン分泌においても, やはりアルギニン濃度の上昇に伴って基礎分泌に比して両群共有意な増加がみとめられ (図11), しかもいずれの濃度下においてもS群の方がC群よりも有意に高値であった.

6. ノルエピネフリン添加時のインスリン, グルカゴン分泌 (図12)

3.3mMのブドウ糖存在下で $2.67 \times 10^{-8}M$, $5.34 \times 10^{-8}M$, $5.34 \times 10^{-7}M$ の各ノルエピネフリン添加時におけるインスリン分泌, グルカゴン分泌は図12に示したように, $5.34 \times 10^{-8}M$ 以上の濃度のノルエピネフリン

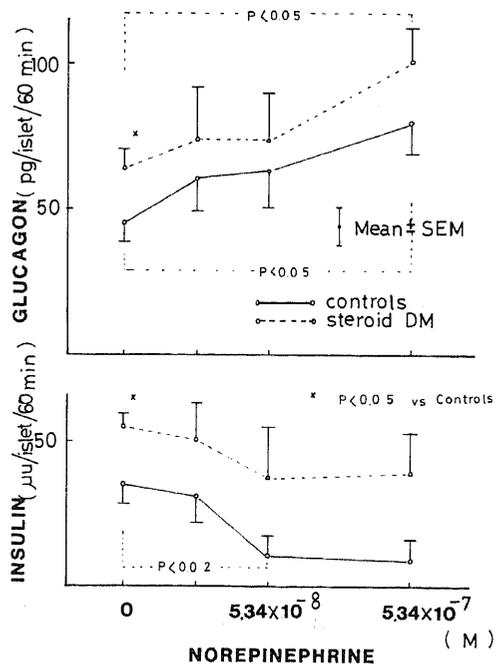


Fig. 12. Effect of norepinephrine concentration on insulin and glucagon secretion

ンによりC群では有意に ($p < 0.02$) インスリン分泌の抑制がみられたのに対して, S群では弱い抑制傾向がみられたにすぎなかった. グルカゴン分泌では, 両群共にノルエピネフリン無添加時に比して有意な ($5.34 \times 10^{-7}M$ で $p < 0.05$) 増加を示した.

7. セロトニン添加時のインスリン, グルカゴン分泌 (図 13, 図 14, 図 15)

3.3mM のブドウ糖存在下で 1.0mM, 2.5mM, 5.0mM の各セロトニン添加時におけるインスリン分泌, グルカゴン分泌は図 13 に示したように, 両群共インスリン分泌においてもグルカゴン分泌においても有意な変化はみとめられなかった.

ところが, 図 14 および図 15 に示したように両群共セロトニンは, アルギニンによるインスリン分泌, ならびにグルカゴン分泌の増強を有意に (セロトニン濃度 0.5mM では, C群S群とともに $p < 0.05$, 2.5mM ではインスリン分泌が両群ともに $p < 0.001$, グルカゴン分泌がC群では $p < 0.05$, S群では $p < 0.001$) 抑制した.

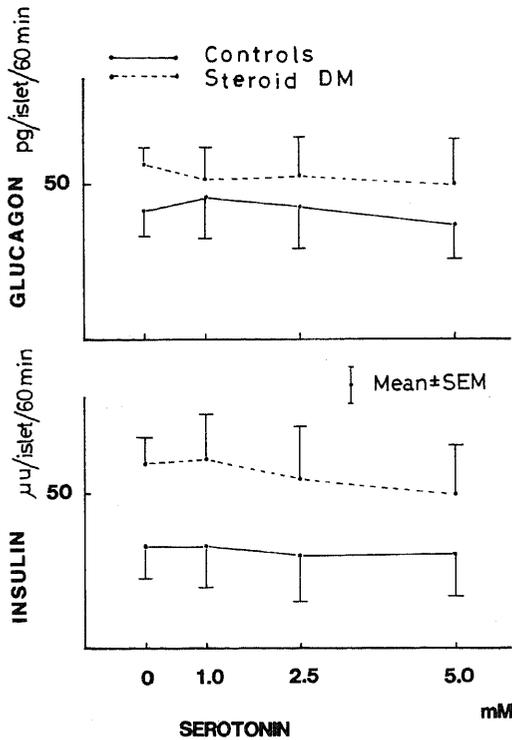


Fig. 13. Effect of serotonin concentration on insulin and glucagon secretion

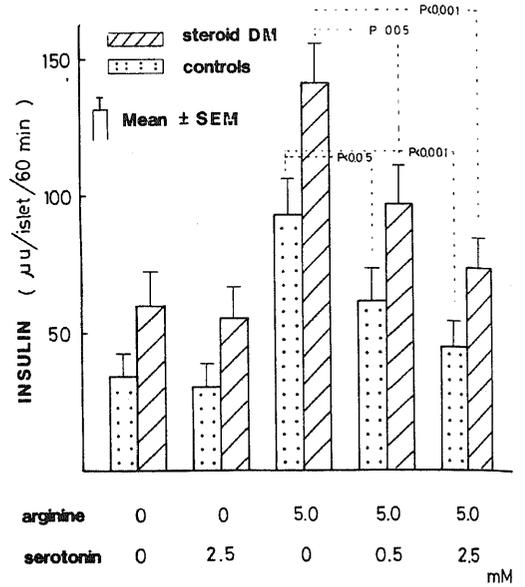


Fig. 14. Effect of serotonin on insulin secretion stimulated by arginine

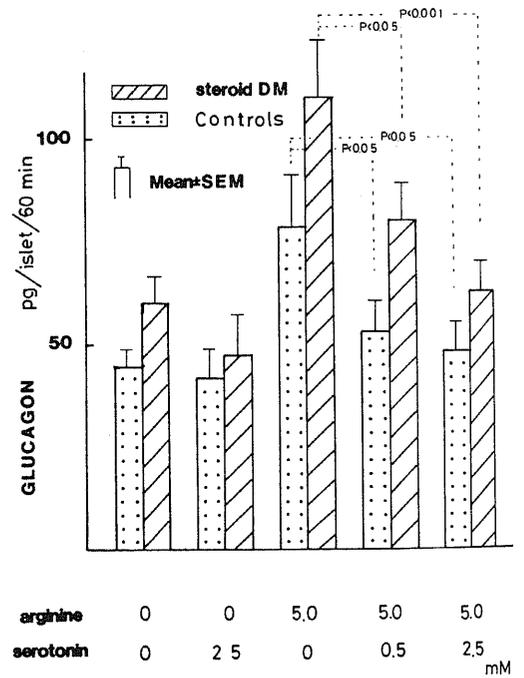


Fig. 15. Effect of serotonin on glucagon secretion stimulated by arginine

考 察

今回の実験結果により、合成ステロイドの1つであるベータメサゾンによっても比較的容易に糖尿病状態を作り出すことが可能であることがはじめて明らかとなった。

ベータメサゾン 0.3 mg/day, 及び 0.4 mg/day 投与群では、体重の増加が投与後第3週目、第4週目においてコントロールに比して有意に低かったが、この原因として1つには、糖尿病状態の進行により代謝障害が増強したこと、もう1つには、飼料の摂取量が減弱したことなどが考えられる。

ベータメサゾン投与後の血糖の推移をみると、特にベータメサゾン 0.3 mg/day, および 0.4 mg/day 投与群では、投与後第3週目以降より著しい空腹時血糖値の上昇がみられたが、ベータメサゾン 0.4 mg/day 投与群では、血糖値の上昇と同時に死亡率も著明に高くなり、今回の実験系では、ベータメサゾン 0.3 mg/day を4週間投与して作成したステロイド糖尿病ラットを対象とすることにした。

ただし、空腹時血糖値の上昇がベータメサゾン 0.3 mg/day, 0.4 mg/day 投与群に比して軽度であったグループ(ベータメサゾン 0.1 mg/day, 0.2 mg/day 投与群)においても、ベータメサゾン投与後4週間目での iv - GTT の結果をみると、明らかに耐糖能異常を示しているものが多くあり、今後少しでも生理的投与量に近い量のグルココルチコイドの投与による糖尿病状態の観察には適するものと思われた。

ベータメサゾンの長期大量投与によって作成されたステロイド糖尿病ラットの膵ラ氏島を使った今回の実験結果では、ステロイド糖尿病ラットの単離膵ラ氏島 B細胞からのインスリン分泌は、基礎分泌においても、またアルギニン刺激においてもコントロールに比して有意に高く、この結果はこれ迄に報告されている²⁷⁾グルココルチコイドの1回投与ないしは数日間投与によるラ氏島内 B細胞の分泌能の増強結果と同様であった。また、ラ氏島内 A細胞の分泌能についてもグルココルチコイド数日間投与による A細胞機能の増強結果³³⁾と同じく、長期間投与によってもやはり A細胞のグルカゴン分泌能は著明に亢進していることがわかった。

臨床的には、成人型糖尿病においても若年型糖尿病においても共にアルギニンに対するグルカゴン反応は増強しており、適切な治療後には反応に改善がみられる^{34)~39)}ことが知られており、グルココルチコイドの投与によっても同様にグルカゴンの基礎値と共にアルギ

ニン刺激によるグルカゴン反応が増強することが報告されている²⁴⁾²⁸⁾が、今回の実験結果より、in vitro においてもやはりアルギニン刺激によるグルカゴン分泌は増強していることが明らかとなった。

グルココルチコイドのラ氏島 A細胞機能の増強効果に関しては、グルココルチコイドが直接的に A細胞に作用して A細胞のグルカゴン合成能を高めるためではなく³³⁾、むしろグルココルチコイドの投与によってラ氏島をとりまく周囲の環境に変化が生じ、その二次的効果として A細胞機能が増強するものと推測されている。例えば、生体内では長期間のグルココルチコイド投与によってアラニンを主体とした高アミノ血症が生ずることが知られており^{40)~44)}、こうした A細胞をとりまく周囲の環境の変化も in vivo においては、ラ氏島内 A細胞機能の増強に対して重要な要素となるものと思われる。

今回の著者の in vitro の実験結果では、高濃度ブドウ糖存在下でのラ氏島からのインスリン分泌量は、長期間グルココルチコイド投与群の方がコントロールに比して有意に高値であり、同時にグルカゴン分泌量においてもコントロールに比して有意に高かった。しかも、コントロールでは高濃度ブドウ糖によるグルカゴン分泌の抑制がみられたのに対して、長期間グルココルチコイド投与群では高濃度ブドウ糖によるグルカゴン分泌の抑制が欠如しており、Müller らの報告⁴⁵⁾にもみられるようにグルカゴンの奇異上昇がみとめられた。

ストレプトゾチン糖尿病ラットでは、ラ氏島内 A細胞からのグルカゴン分泌が増強しており、しかも高濃度ブドウ糖によるグルカゴン分泌の抑制がみとめられなかったが、十分な量のインスリンを投与してやることによってブドウ糖によるグルカゴン分泌の抑制がみとめられるようになったとの報告⁵¹⁾にもあるように、一般に生体内において糖尿病時に観察される高グルカゴン血症は、主にインスリン欠乏に基づく二次的の結果であるとする考え方^{52)~54)}は多くみられる。

ところが、糖尿病患者におけるブドウ糖負荷時のグルカゴン反応の欠如が、Su 剤や十分な量のインスリン投与による適切な治療の後でも改善しなかったとの報告^{46)~49)}も多くみられ、その原因としては内因性インスリンのグルコースに対する反応性の欠如とラ氏島内 A細胞自身の中での機能異常などが考えられているが、今回著者の得た実験結果では、十分な内因性インスリンの存在下においてもなお A細胞のブドウ糖に対する反応性が欠如していたことより、ステロイド糖尿病時のグルカゴン分泌異常には Gerich らの報告⁴⁹⁾

にもあるように、膵ラ氏島 A 細胞内での機能異常が最も重要な要素であることがわかった。

しかも、ストレプトゾトシン糖尿病などのインスリン欠乏時においては、Gut グルカゴンが過剰に分泌されることも最近報告されてきており⁵⁷⁾、特に *in vivo* でのインスリン欠乏時の高グルカゴン血症を論ずる時には膵グルカゴンと Gut グルカゴンとを厳密に区別する必要があると思われた。

今回の著者の実験では、膵ラ氏島をコラゲナーゼ処理により分離した *in vitro* の実験であり、以上の様な周囲の環境からの直接的な影響や Gut グルカゴンの影響などは無視できるものと思われた。

ラ氏島内 A 細胞からのグルカゴン分泌に関してこのように多くの意見があり、一定した見解を出し得ないのは、1 つにはグルカゴンというホルモン自体が非常に不安定であり、アッセイ系が難しいこと、および *in vitro* ではラ氏島の分離に使用されるコラゲナーゼのタイプによっても A 細胞からのグルカゴン分泌能が異なることが報告されている⁵⁵⁾⁵⁶⁾⁵⁸⁾ ように、コラゲナーゼ処理によってラ氏島内 A 細胞がきわめて障害を受けやすいことなどもその理由の 1 つと考えられる。

今回の著者の実験では、コントロールにおいてブドウ糖によるグルカゴン反応が正常にみられたことにより、コラゲナーゼ処理によっても A 細胞は障害を受けなかったものと思われた。

ステロイド糖尿病時における膵ラ氏島内神経内分泌調節機構の変化に関しては、ほとんど知られていない。一般に健常者では、膵からのインスリン分泌は α レセプターアゴニストにより抑制される^{59)~61)} ことが知られており、ノルエピネフリンは健常者において内因性インスリン分泌を抑制し、同時にグルカゴン分泌を刺激することも報告されている^{62)~65)}。 *in vivo* では、インスリン依存性糖尿病患者でノルエピネフリンによるインスリン分泌の抑制が、ブドウ糖濃度の変化によってもみとめられなかったとの報告⁶⁶⁾がみられるが、今回著者の *in vitro* における実験結果でも軽度ながらノルエピネフリンによるインスリン分泌の抑制がコントロールに比して減弱していたことにより、ベータメサゾン長期投与によるステロイド糖尿病時には、ラ氏島内の神経内分泌調節機構の一部に変化が生じているものと思われた。

また、セロトニンもラ氏島内にも多く含有され⁶⁷⁾⁶⁸⁾、セロトニンはインスリン分泌、グルカゴン分泌共に抑制することが膵灌流実験で報告されている⁶⁹⁾。ところが、単離膵ラ氏島ではセロトニンに対する感受性が低

下することが知られており⁵⁶⁾⁶⁹⁾⁷⁰⁾、今回著者の得た実験結果でも、長期間グルココルチコイド投与ラットの単離膵ラ氏島ではコントロールと同様生理的ブドウ糖濃度下においてセロトニンによるインスリン分泌、グルカゴン分泌の有意な抑制はみとめられなかった。

しかしながら、長期間グルココルチコイド投与群においてもコントロールと同様にアルギニン刺激によるインスリン分泌、グルカゴン分泌の増強は共にセロトニンによって有意に抑制されたことにより、長期間グルココルチコイド投与により作成されたステロイド糖尿病時においてもセロトニン系を介するラ氏島の神経内分泌調節機構は保持されているものと思われた。

結 論

ステロイド糖尿病時のインスリン、グルカゴン分泌動態を解明することを目的として、長期間グルココルチコイド投与により作成した実験的ステロイド糖尿病ラット膵より分離したラ氏島を用いて *in vitro* の実験を行ない以下の結論を得た。

I. 実験的ステロイド糖尿病ラットの作成では、合成ステロイドの 1 つであるベータメサゾンを 0.3 mg/day、4 週間経口的に投与することにより高率に糖尿病状態を作成し得た。

II. 実験的ステロイド糖尿病ラットの単離膵ラ氏島からのインスリン、グルカゴン分泌動態では、

1. 3.3mM のブドウ糖存在下におけるインスリン、グルカゴンの基礎分泌は、コントロールに比して有意に上昇していた。

2. インスリン分泌では、コントロールと同様にブドウ糖濃度に対して用量反応的な増加がみとめられた。ところが、グルカゴン分泌では、コントロールが高濃度ブドウ糖により有意に抑制されたのに対して、この抑制がみられず、むしろ奇異上昇がみとめられた。

3. アルギニン刺激によるインスリン、グルカゴン分泌の増加は、コントロールに比して有意に高値であった。

4. コントロールではノルエピネフリン添加によりインスリン分泌が有意に抑制されたのに対して、この抑制は軽度であった。

グルカゴン分泌では、コントロールと同様ノルエピネフリンによる有意な増加がみとめられた。

5. コントロールと同様、セロトニンによるインスリン分泌、グルカゴン分泌の有意な抑制はみられなかった。しかし、両群どちらにおいてもセロトニンはアルギニン刺激によるインスリン分泌、グルカゴン分泌の増加を有意に減少させた。

以上の結果より、ステロイド糖尿病の成因、および病態には膵ラ氏島内 A 細胞機能の障害が強く関与していることが推測された。

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜った恩師服部信教授に深甚の謝意を表します。また本研究の遂行にあたり、終始御指導、御助言を戴いた早川浩之講師に深く感謝いたします。併せて終始直接の御指導、御教示を戴いた能登裕助手に厚く御礼申し上げます。さらに多大な御協力を頂いた第一内科第 1 研究室の諸兄に感謝致します。

なお、本論文の要旨は第 23 回 (1980 年)、および第 24 回 (1981 年) 日本糖尿病学会総会において発表した。

文 献

- 1) Ingle, D. J. : The production of glycosuria on the normal rat by means of 17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone. *Endocrinology*, **29**, 649-652 (1941).
- 2) Ingle, D. J., Sheppard, R., Evans, J. S. & Kuizenga, M. H. : A comparison of adrenal steroid diabetes and pancreatic diabetes. *Endocrinology*, **37**, 341-356 (1945).
- 3) Ingle, D. J. : The production of experimental glycosuria in the rat. P 229-253. In G. pincus (ed), *Recent Progr. Hormone Res.*, II, Academic Press Inc., New York, 1948.
- 4) Lazarow, A. & Bermann, J. : The Production of diabetes in rats with cortisone and its relation to glutathione. *Anat. Rec.*, **106**, 215-216 (1950).
- 5) Ingle, D. J., Prestrud, M. & Nezamis, J. E. : Effects of administering large doses of cortisone acetate to normal rats. *Am. J. Physiol.*, **66**, 171-175 (1951).
- 6) Hausberger, F. X. & Ramsay, A. J. : Steroid diabetes in guinea pigs : effects of cortisone administration on blood and urinary glucose, nitrogen excretion fat deposition, and the islets of Langerhans. *Endocrinology*, **53**, 423-435 (1953).
- 7) Hausberger, F. X. & Ramsay, A. J. : Steroid diabetes in guinea pigs : effects of hydrocortisone administration on blood and urinary glucose, nitrogen excretion, fat deposition, and the islets of Langerhans. *Endocrinology*, **56**, 533-540 (1955).
- 8) Dunn, J. S., Sheehan, H. L. & Mclethie, N. G. B. : Necrosis of the islets of Langerhans produced experimentally. *Lancet*, **1**, 484-487 (1943).
- 9) Bailey, C. C. & Bailey, O. T. : The production of diabetes mellitus in rabbits with alloxan. Preliminary report. *JAMA*, **122**, 1165-1166 (1943).
- 10) Dunn, J. S. & Mclethie, N. G. B. : Experimental alloxan diabetes in rats. *Lancet*, **2**, 384-387 (1943).
- 11) Rakieten, N., Rakieten, M. L. & Nadkarui, M. V. : Studies on the diabetogenic action of streptozotocin. *Cancer Chemotherapy Rept.*, **29**, 91-98 (1963).
- 12) Wells, B. B. : The Influence of crystallin compounds separated from the adrenal cortex on glyconeogenesis. *Mayo Clinic Proc.*, **15**, 565-573 (1940).
- 13) Segaloff, A. & Many, A. S. : The role of adrenal steroids and ACTH in glyconeogenesis. *Endocrinology*, **49**, 390-400 (1951).
- 14) Welt, I. D., Stetten, De W. Jr., Ingle, D. J. & Morley, E. H. : Effect of cortisone upon rate of glucose production and oxidation in the rat. *J. Biol. Chem.*, **197**, 57-66 (1952).
- 15) Franckson, J. R. M., Gepts, W., Bastenie, P. P., Conard, V., Nordier, N. & Kovacs, L. : Observations sur le diabète stéroïde expérimental du rat. *Acta Endocrinol.*, **14**, 153-169 (1953).
- 16) Houssay, B. A., Rodrigueg, R. R. & Cardeza, A. F. : Prevention of experimental diabetes with adrenal steroids. *Endocrinology*, **54**, 550-552 (1954).
- 17) Wellmann, K. F. & Volk, B. W. : Modification of streptozotocin-induced diabetes in rats by pretreatment with cortisone. *Diabetologia*, **13**, 331-337 (1977).
- 18) Wellmann, K. F. & Volk, B. W. : Fine structure of pancreas in cortison-treated guinea pigs and rabbits. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **100**, 334-338 (1976).
- 19) Volk, B. W. & Lazarus, S. S. : Protection by cortisone pretreatment against diabetes. *Arch. Pathol.*, **73**, 363-370 (1962).
- 20) Lazarus, S. S. & Volk, B. W. : Studies on a

- latent diabetic state in cortisone-alloxan treated rabbits. *Diabetes*, **13**, 54-59 (1964).
- 21) Volk, B. W., Lazarus, S. S. & Wellmann, K. F. : Beta cell structure in latent and chronic diabetes in the rabbit. *Diabetes*, **14**, 792-804 (1965).
- 22) Volk, B. W., Wellmann, K. F. & Lazarus, S. S. : Fine structure of rabbit pancreatic B cells in cortisone-alloxan induced subdiabetes. *Lab. Invest.*, **14**, 1375-1391 (1965).
- 23) Wellmann, K. F., Brancato, Py Lazarus, S. S. & Volk, B. W. : Rabbit beta cell ultrastructure and insulin radioimmunoassay in experimental subdiabetes. *Arch. Pathol.*, **84**, 251-263 (1967).
- 24) Marco, J., Calle, C., Roman, D., Diaz-Fierros, M., Villanueva, M. L. & Valverde, I. : Hyperglucagonism induced by glucocorticoid treatment in man. *N. Engl. J. Med.*, **288**, 128-131 (1973).
- 25) Like, A. A. & Chick, W. L. : Pancreatic beta cell replication induced by glucocorticoids in subhuman primates. *Am. J. Pathol.*, **75**, 329-348 (1974).
- 26) Malaisse, W. J., Malaisse-Lagae, F., Lacy, P. E. & Wright, P. H. : Insulin secretion by isolated islets in presence of glucose, insulin, and anti-insulin serum. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, **124**, 497-500 (1967).
- 27) Malaisse, W. J., Malaisse-Lagae, F., McCraw, E. F. & Wright, P. H. : Insulin secretion "in vitro" by pancreatic tissue from normal, adrenalectomized and cortisol-treated rats. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, **124**, 924-928 (1967).
- 28) Wise, J. K., Hendler, R. & Felig, P. : Influence of glucocorticoids on glucagon secretion and plasma amino acid concentrations in man. *J. Clin. Invest.*, **52**, 2774-2782 (1973).
- 29) Sutherland, E. W. & Cori, C. F. : Effect of hyperglycemic-glycogenolytic factor and epinephrine on phosphorylase. *J. Biol. Chem.*, **188**, 531-543 (1951).
- 30) 島 健二, 松山辰男 : グルカゴン"ポリペプチドホルモン"(三浦義彰, 鎮目和夫編), 283-317頁, 東京, 朝倉書店. 1973年.
- 31) Lacy, P. E. & Kostianovski, M. : Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes*, **16**, 35-39 (1967).
- 32) Okamoto, H., Noto, Y., Miyamoto, S., Mabuchi, H. & Takeda, R. : Inhibition by somatostatin of insulin release from isolated pancreatic islets. *FEBS letters*, **54**, 103-106 (1975).
- 33) Marco, J., Calle, C., Hedo, J. A. & Villanueva, M. L. : Enhanced glucagon secretion from pancreatic islets by prednisolone-treated mice. *Diabetologia*, **12**, 307-311 (1976).
- 34) Ohneda, A., Ishii, S., Horigome, K. & Yamagata, S. : Glucagon Response to arginine after treatment of diabetes mellitus. *Diabetes*, **24**, 811-819 (1975).
- 35) Seino, Y., Goto, Y., Kurahashi, H., Sakurai, H., Ikeda, M., Kadowaki, S., Inoue, Y., Mori, K., Taminato, T. & Imura, H. : Alteration of plasma glucagon response to arginine after treatment in patients with diabetes mellitus. Cushing syndrome and hypothyroidism. *Horm. Metab. Res.* **9**, 28-32 (1977).
- 36) Gerich, J. E., Tsalikian, E., Lorenzi, M., Schneider, V., Vohannon, N. V., Gustafson, G. & Karam, J. H. : Normalization of fasting hyperglycemia and excessive glucagon responses to intravenous arginine in human diabetes mellitus by prolonged infusion of insulin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **41**, 1178-1180 (1975).
- 37) Gossain, V. V., Matute, M. L. & Kalkhoff, R. K. : Relative influence of obesity and diabetes on plasma alpha-cell glucagon. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **38**, 238-243 (1974).
- 38) Unger, R. H., Agnilar-Parada, E., Müller, W. A. & Eisentraut, A. M. : Studies of pancreatic alpha cell function in normal and diabetic subjects. *J. Clin. Invest.*, **49**, 837-848 (1970).
- 39) Raskin, P., Aydin, I. & Unger, R. H. : Effect of insulin on the exaggerated glucagon response to arginine stimulation in diabetes mellitus. *Diabetes*, **25**, 227-229 (1976).
- 40) Assan, R., Rosselin, G. & Dolais, J. : Effects sur la glucagonémie des perfusions et ingestions d'acides aminés. *Journ. Annu. Diabetol. Hôtel Dieu*, **7**, 25-41 (1967).
- 41) Ohneda, A., Parada, E. & Eisentraut, A. M. :

- Characterization of response of circulating glucagon to intraduodenal and intravenous administration of amino acids. *J. Clin. Invest.*, **47**, 2305-2322 (1968).
- 42) Rocha, D., Müller, W. A., & Fallona, G. R. : Glucagon-stimulating activity of 20 amino acids. *Clin. Res.*, **20**, 58-68 (1972).
- 43) Wise, J. K., Hendler, R. & Felig, P. : Evaluation of alpha cell function by infusion of alanine in normal, diabetic and obese subjects. *N. Engl. J. Med.*, **288**, 487-490 (1973).
- 44) Müller, W. A., Faloona, G. R. & Unger, R. H. : The effect of alanine on glucagon secretion. *J. Clin. Invest.*, **50**, 2215-2218 (1971).
- 45) Müller, W. A., Faloona, G. R. A., Faloona, G. R. & Unger, R. H. : Abnormal alpha-cell function in diabetes. Response to carbohydrate and protein ingestion. *N. Engl. J. Med.* **283**, 109-115 (1970).
- 46) Unger, R. H., Madison, L. L. & Müller, W. A. : Abnormal alpha-cell function in diabetics : response to insulin. *Diabetes*, **21**, 301-307 (1972).
- 47) Gerich, J. E., Langlois, M., Noacco, C., Lorenzi, M., Karam, J. H. & Forsham, P. H. : Comparison of the suppressive effects of elevated plasma glucose and free fatty acid levels on glucagon secretion in normal subjects. *J. Clin. Invest.*, **58**, 320-325 (1976).
- 48) Seino, Y., Ikeda, M., Kurohashi, H., Taminato, T., Sakurai, H., Goto, Y., Inoue, Y., Kadowaki, S., Mori, K. & Imura, H. : Failure to suppress plasma glucagon concentrations by orally administered glucose in diabetic patients after treatment. *Diabetes*, **27**, 1145-1150 (1978).
- 49) Gerich, J. E., Langlois, M., Noacco, C., Karam, J. H. & Forsham, P. H. : Lack of glucagon response to hypoglycemia in diabetes. *Science*, **182**, 171-172 (1973).
- 50) Buchanan, K. D. & Mawhinney, W. A. A. : Insulin control of glucagon release from Insulin deficient rat islets. *Diabetes*, **22**, 801-803 (1973).
- 51) Buchanan, K. D. & Mawhinney, W. A. A. : glucagon release from isolated pancreas in streptozotocin-treated rats. *Diabetes*, **22**, 797-800 (1973).
- 52) Buchanan, K. D. & McCarroll, A. M. : Abnormalities of glucagon metabolism in untreated diabetes mellitus. *Lancet*, **2**, 1394-1395 (1972).
- 53) Raskin, P., Fujita, Y. & Unger, R. H. : Effect of Insulin-glucose infusions on plasma glucagon levels in fasting diabetics and nondiabetics. *J. Clin. Invest.*, **56**, 1132-1138 (1975).
- 54) Raskin, P., Aydin, I. & Unger, R. H. : The effect of acute and chronic insulin administration on plasma IRG levels in human diabetes. *Metabolism*, **25**, 1531-1533 (1976).
- 55) Johnson, D. G., Ensink, J. W., Koerker, D., Palmer, J. & Goodner, C. J. : Inhibition of insulin secretion by somatostatin in the rat pancreas perfused in situ. *Endocrinology*, **96**, 370-374 (1975).
- 56) Norfleet, W. J., Dagliara, A. S., Haymond, M. & Matschinsky, F. : Comparison of alpha and beta cell secretory responses in islets isolated with collagenase and in the isolated perfused pancreas of rats. *Diabetes*, **24**, 961-970 (1975).
- 57) Matsuyama, T. & Foa, P. D. : Plasma glucose, insulin, pancreatic and enteroglucagon levels in normal and depancreatized dogs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **147**, 97-102 (1974).
- 58) Oliver, J. R., Williams, V. L. & Wright, P. H. : Studies on glucagon secretion using isolated islets of Langerhans of the rat. *Diabetologia*, **12**, 301-306 (1976).
- 59) Porte, D. Jr. : A receptor mechanism for the inhibition of insulin release by epinephrine in man. *J. Clin. Invest.* **46**, 86-94 (1967).
- 60) Senft, G., Sitt, R., Losert, W., Schultz, G. & Hoffmann, M. : Hemmung der Insulininkretion durch Alpha - Rezeptoren stimulierende Substanzen. *Naunyn Schmiedeberg Arch. Pharmak. exp. Path.*, **260**, 309-323 (1968).
- 61) Robertson, R. P., Halter, J. B. & Porte, D., Jr. : A role for alpha-adrenergic receptors in abnormal insulin secretion in diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.*, **57**, 791-795 (1976).
- 62) Porte, D. Jr. & Williams, R. H. : Inhibition of insulin release by norepinephrine in man. *Science*, **152**, 1248-1250 (1966).

- 63) **Robertson, R. P. & Porte, D. Jr.** : Adrenergic modulation of basal insulin secretion in man. *Diabetes*, **22**, 1-8 (1973).
- 64) **Silverberg, A. B., Shah, S. D., Haymond, M. W. & Cryer, P. E.** : Norepinephrine : Hormone and neurotransmitter. *Clin. Res.*, **25**, 564A (1976).
- 65) **Schade, D. S. & Eaton, R. P.** : The regulation of plasma ketone body concentration by counterregulatory hormones in man. *Diabetes*, **26**, 989-996 (1977).
- 66) **Schade, D. S. & Eaton, R. P.** : The metabolic response to norepinephrine in normal versus diabetic man. *Diabetologia*, **15**, 433-439 (1978).
- 67) **Falk, B. & Hellman, B.** : Evidence for the presence of biogenic amines in pancreatic islets. *Experientia*, **19**, 139-140 (1963).
- 68) **Cegrell, L.** : The occurrence of biogenic amines in the mammalian endocrine pancreas. *Acta Physiol. Scand.* **314**(Suppl.), 1-60 (1968).
- 69) **Pontiroli, A. E., Micossi, P. & Foa, P. P.** : Effects of serotonin, of its biosynthetic precursors and of the antiserotonin agent on the release of glucagon and insulin from rat pancreas. *Horm. Metab. Res.*, **10**, 200-203 (1978).
- 70) **Ekholm, Ry Ericson, L. E. & Lundquist, I.** : Monoamines in the pancreatic islets of the mouse. Subcellular localization of 5-hydroxytryptamine by electron microscopic autoradiography. *Diabetologia*, **7**, 339-348 (1971).

Secretion of Insulin and Glucagon from Isolated Pancreatic Islets of the Steroid-Induced Diabetic Rats. Satoshi Uchida, Department of Internal Medicine (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920. — *J. Jusen Med. Soc.*, **90**, 182–195 (1981).

Key words: Steroid-induced diabetes mellitus, Betamethasone, Isolated pancreatic islet, Insulin, Glucagon.

Abstract

The insulin and glucagon secretion from isolated pancreatic islets of experimentally steroid-induced diabetic and normal rats (controls) was investigated.

The results obtained were as follows:

1. Large doses of betamethasone (0.3mg/day, administered orally for 4 weeks) produced a high percentage of diabetic rats.
2. Basal insulin and glucagon secretion from the pancreatic islets of the diabetic rats on 3.3 mM glucose were significantly (insulin, $P < 0.001$, glucagon, $P < 0.02$) higher than those of the rats of the controls.
3. The insulin secretion was exaggerated in proportion to the glucose concentration in each group, but the exaggeration was significantly ($P < 0.01$) higher in the diabetic rats than in the controls.

The glucagon secretion was not inhibited at high glucose concentrations in diabetic rats, while it was significantly ($P < 0.001$) inhibited in the controls.

4. The exaggeration of insulin and glucagon secretion by arginine was significantly (insulin, $P < 0.001$, glucagon, $P < 0.02$) higher in the diabetic rats than in the controls at each concentration of arginine.
5. The inhibition of insulin secretion by norepinephrine in diabetic rats was not significant, while norepinephrine inhibited significantly ($P < 0.02$) insulin secretion in the controls.

Glucagon secretion was significantly ($P < 0.05$) increased by norepinephrine in each group.

6. The inhibition of insulin and glucagon secretion by serotonin was not significant in either group, but a significant inhibitory effect of serotonin on the exaggerated insulin and glucagon response to arginine stimulation was observed in each group.

From these observations, it is suggested that A-Cell dysfunction of pancreatic islets may be one important factor in steroid-induced diabetes mellitus.