

キヌレニン代謝産物のインスリン分泌に及ぼす影響： 分離ラ島の分泌能の再検討,及びそのラ島を用いたin vitro実験

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/2297/8719

キヌレニン代謝産物のインスリン分泌に及ぼす影響

—分離ラ島の分泌能の再検討, 及びそのラ島を用いた in vitro 実験—

金沢大学医学部第二内科 (主任: 竹田亮祐教授)

宮 元 進

(昭和53年4月26日受付)

本論文の要旨の一部は1973年第46回日本生化学会, 1974年第47回日本生化学会において発表した。

糖尿病発症の要因として, インスリンを合成し, 分泌している膵ランゲルハンス島(以下ラ島と略す)β細胞の障害が挙げられる。従来, β細胞のインスリン分泌機序に関する研究は個体全体, 膵全体または膵片を対象とした方法が用いられていた。近年, それらに加えて膵ラ島の分離法が開発され, 試験管内で膵β細胞のインスリン生合成, 分泌についての研究が可能となってきた。

ラ島分離法として, 徒手分離法¹⁾, 膵管結紮による分離法²⁾, コラーゲナーゼ処理法^{3,4)}が報告されたが, 操作が容易で採取率の優れたコラーゲナーゼ処理法が一般に用いられている。この方法は酵素処理法であるが故に, 膵ラ島分離過程でコラーゲナーゼ自体, 及びコラーゲナーゼ標品に僅かに混在するトリプシンなどによってβ細胞膜を損傷し, インスリン分泌機能を低下させるものと推定され^{5,6)}, それぞれのグループにより幾つかの改良がなされてきた^{7,8,9)}。しかし, これらの改良点は主として, 得られたラ島の採取率に関するものでラ島のインスリン分泌機能についての詳しい基礎的検討はなされていなかった。今回, 著者はLacyらのコラーゲナーゼ処理法⁴⁾を基にして, ラ島の機能に及ぼすコラーゲナーゼ処理の影響を検討し, より“intact”に近い状態のラ島を分離する条件を見い出した。

次いで, 著者はこの“intact”なラ島を用いて試験管内でキヌレニン代謝産物のインスリン分泌に及ぼす影響を検討した。キヌレニンはトリプトファン代謝の中間代謝産物であるが, これまで妊婦, ステロイド投与患者, 甲状腺機能亢進ラットの尿中にキヌレニン代謝産物の排泄が増加していることが報告されており, またそのような患者ではしばしば糖尿病状態, 高インス

リン血症を伴うことが知られていた^{9,13)}からである。又, キヌレニン代謝産物は構造的にキノリン核を有しており, このようなキノリン核を持った化学物質(8-オキシキノリン)は, 岡本耕造先生により古くから実験的糖尿病の発生試薬¹⁴⁾として用いられていたことにもよる。しかしながら, この8-オキシキノリンも含めてキノリン核を有するキヌレニン代謝産物のインスリン分泌に及ぼす影響についての研究はほとんどなされていなかった。最近になり, 岡本らによりキヌレニン代謝産物の内, キヌレニン酸, キサントレン酸, キナルジン酸, 8-オキシキナルジン酸がインスリン分泌作用を有することが明らかとなった^{15,22)}。

今回, 著者はこの“intact”な分離ラ島を用いてキヌレニン代謝産物であるキナルジン酸を用いてインスリン分泌に及ぼす影響を検討した結果, キヌレニン代謝産物の糖尿病発症について新知見を得たので報告する。

〔I〕ラ島の分離法および分離ラ島のインスリン分泌能の検討

実験材料および実験方法

1) 実験動物

体重200～250gのウィスター系雄ラットをオリエンタル固定飼料MFおよび水道水を与えて同一条件下で飼育後実験に供した。

2) ラ島分離法

ラットはペントバルビタール(50mg/kg)の腹腔内投与にて麻酔する。開腹後, 総胆管を十二指腸開口部で結紮し, 肝管の最終合流部へ屈曲させた21～23Gの翼状針を刺入し, ハンクス液(0.6%グルコースを

Effect of Kynurenine Metabolites on Insulin Release - Secretory characteristics of “intact” rat pancreatic islets and effect of kynurenine metabolites on insulin release from the “intact” islets -, **Susumu Miyamoto**. Second Department of Internal Medicine, School of Medicine Kanazawa University, Kanazawa.

含む)を約15~20 ml注入し、外分泌腺細胞間の間隙を広げて充分隣を膨化させた後膨化隣を摘出する。摘出隣は20~50 mlの冷ハanks液中で洗浄し、血液、脂肪織などを取り除く。摘出隣をハサミで5mm程度の小片にする。隣小片は25mg コラーゲナーゼ(CLS IV, ワシントン社製), 100mg 牛血清アルブミン(シグマ社製)を含む20 ml容三角フラスコに入れ、ハanks液を加え最終容量を5 mlにする。上記三角フラスコを密栓して、water bath incubatorで、37°C, 200回/分の振盪下で後述する時間でインキュベートし、隣小片を消化する。

この消化された隣組織を50 ml容の円錐形メスリンダーに移し換え、これに温ハanks液(室温放置)を50 mlの目盛り一杯まで加えて、約1分30秒~2分間静置後上清を約25 ml除去する。本操作後、合計8回の洗浄を行なうが、最初の4回は温ハanks液、残り4回は冷ハanks液を25 ml加え、同様に1分~1分30秒静置し上清を除去する。コラーゲナーゼ処理時間が15分以内の時は上記処理に加えて、1回目の温ハanks液を加えた後に先端を直径5mm程度にした駒込ピペットにて、消化した隣組織を吸入、噴出する操作を5~6回行ない、隣小片を約0.5mm程度の大きさにする。

冷ハanks液によるコラーゲナーゼ洗浄、および隣外分泌腺の除去が進むにつれてラ島が直線的に沈下するのが肉眼で見られる。最後の洗浄を終えた後、メスリンダーの内容を氷上に冷却したシャーレに移し、バックを黒くし解剖顕微鏡(10倍率)で鏡検しながら先端をラ島よりやや太くしたキャピラリーピペットを用いてラ島を採取す。ラ島は楕円形、円形と種々の形で認められるが、外分泌腺のように小葉構造はなく、充実性の塊で灰白色に見え、大きさは0.4~0.2mmである。

以上のようにして分離したラ島のうち、大きさのほぼ等しい、辺縁整なものを選択し、以下の実験に使用した。

3) 分離ラ島のインスリン分泌能についての検討

上記のようにして得たラ島を Krebs-Ringer 重炭酸緩衝液に5mM グルタミン酸ナトリウム, 5mM フマル酸ナトリウム, 5mM ビルビン酸ナトリウム, 0.2% 牛血清アルブミンおよび種々のインスリン分泌刺激、抑制物質を加えたメデウム0.5 mlに6個あて入れ、一定時間 O₂95%, CO₂5% 通気下、37°Cでインキュベートした。インキュベート後にメデウム中に放出されたインスリン量を2抗体法にて測定した。インスリン分泌能の検討にはグルコース、ソマトスタチ

ン(cyclized, Bachem社製), dibutyl-cyclic AMP(cAMP), 3-isobutylmethyl-xanthine(IBMx)などのインスリン分泌刺激、抑制物質を用いて行なった。

実験結果

1) コラーゲナーゼ処理時間とインスリン分泌量との関係

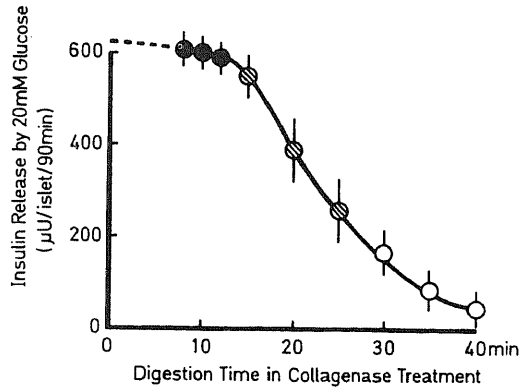


図1. コラーゲナーゼ処理時間と20mM グルコース刺激インスリン分泌量との関係

図1にコラーゲナーゼ処理時間と得られたラ島のグルコース刺激によるインスリン分泌量との関係を示した。コラーゲナーゼ処理を8, 10, 12分間行なった場合のラ島からのインスリン分泌量は570~600μU/islet/90minであった。15, 20, 25分間の処理にて得られたラ島から放出されたインスリン量はそれぞれ約550, 400, 250μU/islet/90minであり、30, 40分間の処理では約100, 50μU/islet/90minであった。以上の成績を得たので、以後の実験ではコラーゲナーゼ処理時間は10分間と25分間とし、得られたラ島のインスリン分泌について比較検討した。

2) 種々のグルコース濃度でのインスリン分泌能の検討

図2で示したように10分間のコラーゲナーゼ処理時間で得られたラ島からの各グルコース濃度に対するインスリン分泌量は、3mM, 6mMの低濃度グルコースでは約10μU/islet/90minであった。同じく、これらの低濃度グルコース存在下では、25分間のコラーゲナーゼ処理時間で得られたラ島のインスリン分泌量は約50μU/islet/90minであった。しかし、10mMグルコース濃度を境にして、10分間の処理で得られたラ島の方が、グルコース濃度の変化により鋭敏に反応するのに反し、25分間処理で得られたラ島のインスリ

ン分泌は鈍く、インスリン分泌量はそれぞれ $300\mu\text{U}/\text{islet}/90\text{min}$, $100\mu\text{U}/\text{islet}/90\text{min}$ であった。20~25mM グルコース濃度でインスリン分泌量はほぼプラトーに達し、10分間の処理で得られたラ島では約 $570\sim 600\mu\text{U}/\text{islet}/90\text{min}$ であり、25分間の処理で得られたラ島では $300\mu\text{U}/\text{islet}/90\text{min}$ であった。

3) ソマトスタチンのインスリン分泌におよぼす影響

図3で示したように、10分間のコラーゲナーゼ処

Insulin Release of Langerhans Islets isolated by Collagenase Treatment

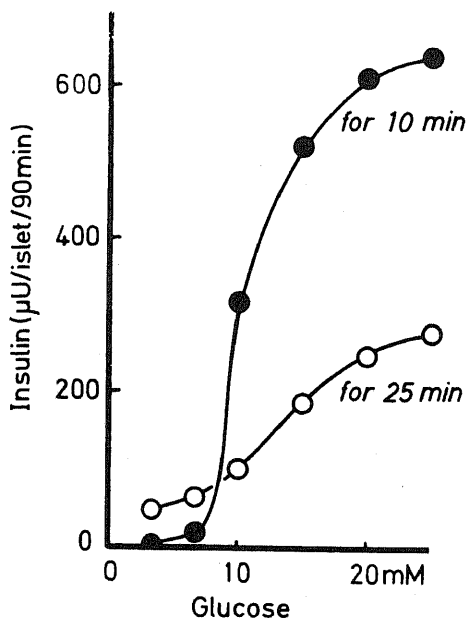


図2. 各コラーゲナーゼ処理時間で得られたラ島の種々グルコース濃度におけるインスリン分泌量の関係

理で得られたラ島では $10\text{ng}/\text{ml}$ のソマトスタチン濃度にて約50%のインスリン分泌の抑制が認められた。しかし、25分間の処理で得られたラ島ではソマトスタチンの抑制作用は $1000\text{ng}/\text{ml}$ の濃度でも認められなかった。

4) cAMP と IBMX のインスリン分泌に及ぼす影響 (表1)

10分および25分の処理時間で得られたラ島を用い、2mM cAMP と 1mM IBMX のインスリン分泌におよぼす影響を検討した。

20mM グルコース刺激によるインスリン分泌量は、10分間の処理で得られたラ島では、cAMP, IBMX を添加しても、グルコース単独の場合と比較して著明

Inhibition by Somatostatin

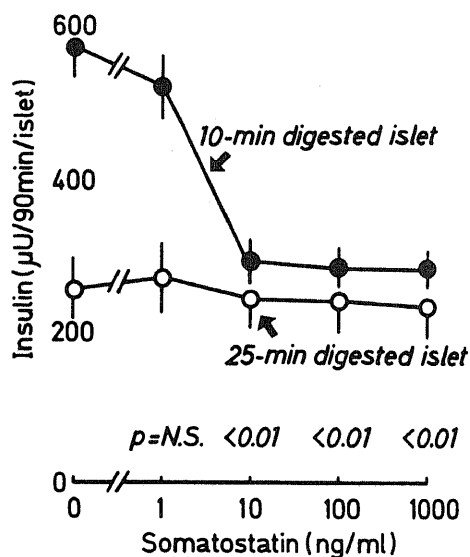


図3. 各コラーゲナーゼ処理時間で得られたラ島からの高濃度グルコース刺激インスリン分泌に与えるソマトスタチンの影響

表1 10分間、25分間のコラーゲナーゼ処理時間で分離したラ島の高濃度グルコース刺激インスリン分泌に及ぼす cAMP と IBMX の影響

	10 min digested islets ($\mu\text{U}/\text{islet}/90\text{min}$)	25 min digested islets ($\mu\text{U}/\text{islet}/90\text{min}$)
high glucose (20 mM)	549.0 ± 12.7 (100%)	280.1 ± 5.7 (100%)
high glucose +2 mM cAMP	569.8 ± 26.6 (104)	329.0 ± 17.9 (117*)
high glucose +1 mM IBMX	725.0 ± 41.4 (132)	501.9 ± 13.4 (178*)

* $p < 0.05$

Effect of Quinaldic Acid on Insulin Release from *Langerhans* Islet

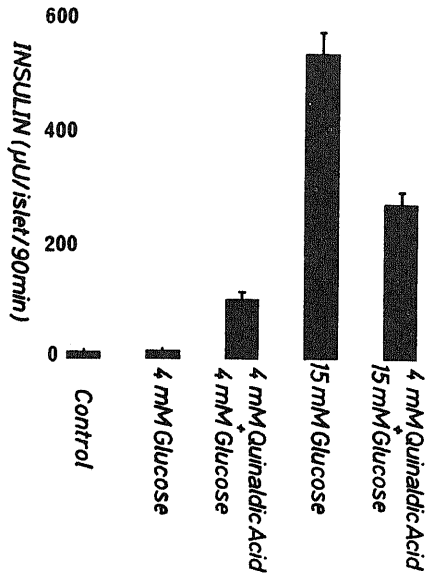


図4. キナルジン酸の分離ラ島のインスリン分泌に及ぼす影響

に増加しなかったが、25分間の処理にて得られたラ島ではこれらの添加により有意 ($P < 0.05$) に増加した。

小 括

コラーゲナーゼ処理時間とそれぞれの時間処理にて得られたラ島のインスリン分泌の関係を検討した結果、短時間処理 (8, 10, 12分間) で得られたラ島の高濃度 (20mM) グルコース刺激によるインスリン分泌量は $600 \mu\text{U}/\text{islet}/90\text{min}$ であり、これは従来の報告の約2.5~3倍という多量であった。しかも処理時間を0分に演繹した点のインスリン分泌量は図1より推定すると $600 \mu\text{U}/\text{islet}/90\text{min}$ 程度になる。すなわち、10分間前後の処理時間で得たラ島は、“intact” なラ島 (0分で分離されたラ島) が高濃度グルコース存在下で分泌するインスリン量とほぼ等しい量を分泌する能力を有すると考えられた。

また種々のグルコース濃度に対するインスリン分泌反応曲線から、10分間の処理で得られたラ島は長時間処理で得られたラ島に比べ、グルコース濃度に対しより鋭敏に反応していることが明らかとなった。

10分間の処理で得られたラ島は、ソマトスタチンに対する感受性を有しており、また、cAMP, IBMXのインスリン分泌増強作用は25分間の処理で得られたラ

表2 分離ラ島のインスリン分泌に及ぼすトリプトファン代謝産物の影響

	Insulin output ($\mu\text{U}/90 \text{ min}/\text{islet}$)
None	11±5
Quinaldic acid	132±23
8-Hydroxyquinaldic acid	147±30
Xanthurenic acid	80±17
Kynurenic acid	67±15
L-Tryptphan	19±10
L-Kynurenine	10±5
3-Hydroxy-L-kynurenine	18±11
Quinolinic acid	13±5
Quinaldylglycine	12±6

mean±SEM. Incubation medium contained a substance to be tested in a concentration (4 mM).

島の方がより著しかった。

以上の結果から短時間 (10分間) 処理で得られたラ島 (β 細胞) の細胞膜, Adenylate cyclase系, およびインスリン分泌機構はより “intact” な状態で保たれていることが推定された。

〔II〕キヌレニン代謝産物のインスリン分泌に及ぼす影響

〔I〕でのコラーゲナーゼ処理法の検討により、10分間のコラーゲナーゼ処理時間にてほぼ “intact” なラ島を得ることができると考え、次にこの分離ラ島を用いてキヌレニン代謝産物のインスリン分泌に及ぼす影響について検討した。

実験材料および方法

〔I〕の実験に同じ。

実験結果

1) キナルジン酸, 8-オキシキナルジン酸, キサントレン酸, キヌレニン酸, L-トリプトファン, L-キヌレニン, 3-オキシ-L-キヌレニン, キノリン酸, キナルジルグリシンの分離ラ島のインスリン分泌に及ぼす影響

表2に示したように、3.3mM グルコースを含むメデウムに上記の各物質 (4 mM) を添加した場合、キナルジン酸, 8-オキシキナルジン酸, キサントレン酸, キヌレニン酸にてインスリン分泌作用が認められた。

このうちでもキナルジン酸、8-オキシキナルジン酸によるインスリン分泌量がより著しかった。しかし、L-トリプトファン、L-キヌレニン、3-オキシ-L-キヌレニン、キノリン酸、キナルジルグリシンにてはインスリン分泌量はほぼ無添加時と差を示さなかった。

2) 低濃度(4mM)および高濃度(15mM)グルコース存在下でのキナルジン酸のインスリン分泌に及ぼす影響

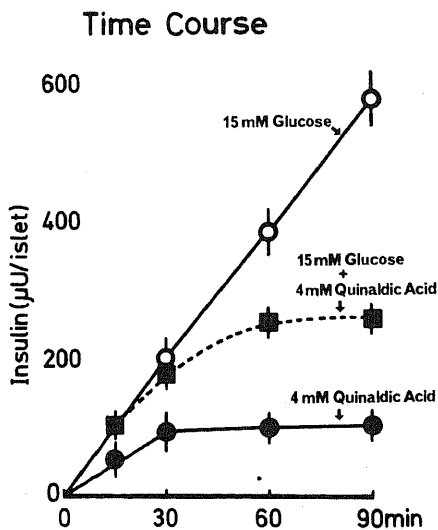


図5. 分離ラ島からのインスリン分泌の時間経過とキナルジン酸の影響

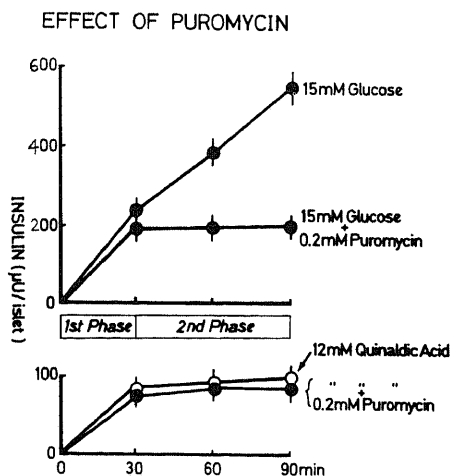


図6. 分離ラ島からのインスリン分泌の時間経過と puromycin の影響

図4に示したように、4mM グルコース存在下に、4mM キナルジン酸を添加するとラ島からのインスリン分泌量はグルコース単独時より増加した。しかし、15mM グルコース刺激によるインスリン分泌量は4mM キナルジン酸添加により約50%減少した。

3) ラ島からのインスリン分泌の時間的経過に及ぼすキナルジン酸の影響(図5)

4mM キナルジン酸単独によるインスリン分泌は30分まで増加し、その後は増加しなかった。また、15mM グルコース刺激によるインスリン分泌は4mM キナルジン酸添加により、30分以後の増加が抑制された。

4) インスリン分泌に対する蛋白合成阻害剤(puromycin)とキナルジン酸のインスリン分泌に及ぼす影響との比較検討(図6)。

4mM キナルジン酸のインスリン分泌刺激作用に対する0.2mM puromycin 添加の効果をみたが、インスリン分泌は無添加時と変らなかった。

一方、高濃度(15mM)グルコース刺激によるインスリン分泌は、puromycin 添加により30分以後ほぼ完全に抑制された。

小 括

キヌレニン代謝産物などのインスリン分泌に対する効果を短時間処理にて得られた“intact”なラ島を用いて再検討したところ、キナルジン酸、8-オキシキナルジン酸、キヌレニン酸、キサントレン酸にインスリン分泌促進効果を認めた。

さらにキナルジン酸のラ島よりのインスリン分泌に対する影響を、低濃度および高濃度グルコース、puromycin 添加等の条件下で検討した結果から、キナルジン酸はインスリン分泌に対し2つの作用を有すると考えられた。すなわち、キナルジン酸は、(1)低濃度グルコース存在下でインスリン分泌を促進し、(2)高濃度グルコース刺激によるインスリン分泌を抑制する。キナルジン酸の后者(2)の作用は、puromycin 添加時のラ島からのインスリン分泌抑制態度から推して、インスリン生成過程の抑制に関係している可能性が考えられた。

また、キナルジン酸の抱合型代謝産物であるキナルジルグリシンにはインスリン分泌作用は認められなかった。

総括および考案

従来、豚ラ島分離法として一般的にLacyらが報じたコラーゲナーゼ量(12mg/ml)および処理時間(20

分間)を採用したコラーゲナーゼ処理法⁴⁾が広く利用されていた。しかし、この方法ではラ島を胼より分離する過程で、コラーゲナーゼおよびコラーゲナーゼ標品中に混在する蛋白分解酵素、外分泌腺細胞から遊離した蛋白分解酵素などがラ島の細胞表面に存在する種々のホルモンレセプターの機能を障害する可能性が考えられていた⁵⁾⁶⁾。これを解決する目的で蛋白分解酵素阻害剤などの添加が試みられていたが^{3)5)~8)}、得られたラ島の“intact”性を保持しているという明確な基礎的実験がなかった。一方、岡本らは多量の牛血清アルブミンやトラジロールをコラーゲナーゼ処理時に加えることにより、ラ島のインスリン分泌量が増加する結果を得て、Lacyらのコラーゲナーゼ処理法の再検討の必要性を指摘していた²³⁾。今回、著者はコラーゲナーゼ量を従来の方法の半分以下の量とし、さらにコラーゲナーゼ処理時間について種々検討し、各時間で得た分離ラ島のインスリン分泌能に与える影響について検討した。

連続的に種々のコラーゲナーゼ処理時間で得たラ島について、そのインスリン分泌の量的関係を検討すると、処理時間が25分前後で得られたラ島のインスリン分泌量は従来の報告とほぼ一致し、処理時間をより長くすればインスリン分泌量はより一層減少する結果が得られた。コラーゲナーゼ処理時間を10分前後に短縮すると、得られたラ島のインスリン分泌量は570~600 μ U/islet/90minとなり、従来の約2.5~3倍の値を示した。さらにグルコース濃度の変化に対してもより鋭敏に反応した。従って、コラーゲナーゼ処理時間を0分に演繹した時点のインスリン量は600 μ U/islet/90min前後と推定され、これがin vitro系での1個のintactなラ島の高濃度グルコース刺激によるインスリン分泌量と考えられた。

ソマトスタチンは最初視床下部より分離され²⁴⁾、成長ホルモン分泌抑制物質として報告されたが、その後インスリン・グルカゴンなど多くのホルモンの分泌をも抑制することが知られてきた^{25)~32)}。ソマトスタチンのインスリン分泌抑制作用は個体全体、胼灌流にて認められていたが²⁵⁾、胼分離ラ島を用いた場合には、その抑制作用は認められないと報告されていた⁶⁾。しかし、岡本らは分離ラ島を用いた場合でもin vivoと同様に抑制されることを明らかにした²³⁾。今回、長時間のコラーゲナーゼ処理時間で得られたラ島ではソマトスタチンのインスリン分泌抑制効果は認められず、短時間処理で得られたラ島では分泌抑制効果が認められた。これらの結果は胼ラ島分離過程でソマトスタチンのレセプターに障害が生じた可能性を示唆している。

胼 β 細胞のインスリン分泌機構にAdenylate cyclase系が関与していることが考えられている^{33)~37)}。cAMPはAdenylate cyclaseによって生成され、phosphodiesteraseにて分離されるが、IBMXはphosphodiesterase阻害剤として知られている。cAMP、IBMX添加によってグルコース刺激インスリン分泌量の増加率は長時間処理で得られたラ島の方が、短時間処理で得られたラ島より著明であり、長時間処理で得られたラ島ではcAMP合成能の低下が考えられ、短時間で得られたラ島では細胞内Adenylate cyclase系がより“intact”な状態で保たれていると考えられた。

このように、10分前後のコラーゲナーゼ処理時間で得たラ島は、インスリン分泌量、グルコース濃度の変化に対する反応性、ソマトスタチンによる感受性、およびcAMP、IBMXなどの効果からより“intact”に近い状態のラ島と考えられた。

次いで著者は、この短時間コラーゲナーゼ処理で得たラ島を用いてキヌレニン代謝産物のインスリン分泌に対する影響を検討した。

ラットにL-トリプトファンを投与すると低血糖が生ずることは古くから知られた事実であり³⁸⁾³⁹⁾、その機序として肝でのグルコース新生の障害が考えられていたが⁴⁰⁾、最近このグルコース新生の阻害説は疑問視されつつある⁴¹⁾。トリプトファン代謝は通常NAD産生に向っているが、キヌレニンは中間代謝産物として存在し、キナルジン酸、8-オキシキナルジン酸などへの代謝とNAD産生の代謝方向との分岐点に位置している。岡本は哺乳動物のトリプトファン代謝が、甲状腺ホルモンやステロイドホルモンの影響を受けてキノリン核を有するキヌレニン代謝産物生成の方向へ偏向する機構を酵素レベルから明らかにした⁴²⁾⁴³⁾。一方、臨床的にはキヌレニン代謝産物が尿中に増加しているステロイド投与患者、あるいは妊婦、また動物実験では甲状腺機能亢進ラット等で糖尿病状態または高インスリン血症が高頻度に合併しやすいことが観察されている^{9)~13)}。さらに、ストレプトゾトシン糖尿病ラットでは肝や胼ラ島のNAD量の減少が知られている⁴⁴⁾⁴⁶⁾。加えて、キノリン核を有する物質で糖尿病発症に関与する薬物として、8-オキシキノリンによる実験的糖尿病¹⁴⁾、キサントレン酸による催糖尿病作用に関する報告がある⁴⁶⁾⁴⁷⁾。その他、キノホルム投与患者に胼 β 細胞の退行変性を認める報告もある⁴⁸⁾。このようにキノリン核を持った物質が糖尿病の発生に関係していることが知られていたが、インスリン分泌に及ぼす影響を与えているかについてはこれまで研究されていなかっ

た。岡本らはキヌレニン代謝産物のうち、キヌレニン酸、キサントレン酸、8-オキシキナルジン酸、キナルジン酸がインスリン分泌作用を有することを明らかにした¹⁵⁾⁻²²⁾。今回、短時間処理で得られたラ島で再検討が同様な成績を得た。さらにキヌレニン代謝産物のうち、キナルジン酸を用いてインスリン分泌に及ぼす作用を検討した結果、キナルジン酸は、(1)ラ島β細胞内で分泌準備状態のインスリンを放出させる作用と、(2)インスリン合成過程を阻害する作用を有していると考えられた。

ところでキナルジン酸はキヌレニンの最終代謝産物として、通常尿中に排泄されている物質であり⁴⁹⁾⁵⁰⁾、ラットではその一部はグリシンと抱合してキナルジルグリシンとして尿中に排泄されることは知られているが⁵¹⁾、この抱合型代謝産物にはインスリン分泌作用は証明されなかった。キナルジン酸は亜鉛 (Z^{++}) の強いキレート剤である⁵²⁾のに対し、キナルジルグリシンは Z^{++} などの金属と錯化合物を形成しにくい物質であるから、キナルジン酸のインスリン分泌機序としてはラ島β細胞・β顆粒中の貯蔵型インスリン⁵³⁾ (Z^{++} -結合インスリン) の Z^{++} がキナルジン酸とキレートし、インスリンは Z^{++} free となってβ顆粒から放出されるのであろうと考えられる。

したがって、キノリン核を持ったキヌレニン代謝産物(非抱合型)が生体内で過剰産生の状態になると一過性にインスリン分泌過剰状態をひきおこし、さらにインスリン合成過程を阻害することにより究極的にβ細胞内のインスリン量の減少を招来すると推定される。このように、今回の分離ラ島を用いた *in vitro* 実験にて明らかにされたキノリン核を持ったキヌレニン代謝産物のインスリン分泌に及ぼす作用は、甲状腺機能亢進ラット、ステロイド投与患者、妊婦等における2次性の高インスリン血症あるいは糖尿病の発症機序の1つとして考えられるのではないかと思われた。また、最近、成人型糖尿病患者にも尿中のキヌレニン代謝産物の排泄が増加していることが報告され⁵⁴⁾、1次性糖尿病の発症にもキヌレニン代謝産物の過剰産生が関連している可能性が示唆される。

稿を終るに臨み、御指導、御校閲を賜った恩師、竹田亮祐教授に深甚の謝意を表します。また終始、御指導、御教示を頂いた富山医科薬科大学生化学、岡本宏教授、金沢大学第二内科・馬淵宏講師に深く感謝致します。併せて、本研究遂行に際し、御助言を頂いた金沢大学第一生化学・米山良昌教授、第二生化学・久野滋教授に厚く御礼申し上げます。さらに、多大な御協力を頂きました金沢大学第二内科第1研究室各位に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Hellerström, C. : Acta Endocr. 45, 122 (1964).
- 2) Keen, H., Sells, R., Jarret, R. J. : Diabetologia 1, 28 (1965).
- 3) Moskalewski, S. : Gen. Comp. Endocrinol. 5, 342 (1965).
- 4) Lacy, P. E., Kostianovsky, M. : diabetes 21, 35 (1967).
- 5) Krause, U., Puchinger, H., Wacker, A. : Horm. Metab. Res. 5, 325 (1973).
- 6) Effendic, S., Luft, S., Grill, V. : FEBS Letters 42, 169 (1974).
- 7) Kuo, W. N., Hodgins, D. S., Kuo, J. F. : J. Biol. Chem. 248, 2705 (1973).
- 8) Löffler, G., Tratschold, I., Schweitzer, T., Lohman, E. : Horm. Metab. Res., Suppl. 1, 41 (1969).
- 9) Yalow, R. S., Berson, S. A. : J. Clin. Invest. 39, 1157 (1960).
- 10) Doar, J. W. H., Stamp, T. C. B., Wynn, V., Path, F. C., Audhya, T. K. : Diabetes, 18, 633 (1969).
- 11) Perley, M., Kipnis, D. M. : New Engl. J. Med. 274, 1237 (1966).
- 12) Alexander, R. W., Forsham, P. H., Grodsky, G. M. : Metabolism 18, 248 (1969).
- 13) Spellacy, W. N., Gwetz, J. C., Greenberg, b. z., Ellis, J. : Amer. J. Obst. and Gynec. 92, 11 (1965).
- 14) Okamoto, K. : Acta Scholae, Med. Univ. Kyoto. 27, 43 (1949).
- 15) Okamoto, H., Miyamoto, S., Mabuchi, H., Yoneyama, Y., Takeda, R. : Biochem. Biophys. Res. Commun. 53, 1297 (1973).
- 16) Okamoto, H., Miyamoto, S., Mabuchi, H., Takeda, R. : Biochem. Biophys. Res. Commun. 59, 623 (1974).
- 17) 能登 裕・宮元 進・岡本 宏 : 医学のあゆみ, 19, 196 (1974).
- 18) 宮元 進・馬淵 宏・能登 裕・竹田亮祐・岡本 宏 : 生化学, 46, 697 (1974).
- 19) 能登 裕・宮元 進・馬淵 宏・竹田亮祐・岡本 宏 : 生化学, 46, 697 (1974).
- 20) 岡本 宏・米山良昌・宮元 進・馬淵 宏・竹

- 田亮祐 : 糖尿病 16 (Supple), 51 (1973).
- 21) 岡本 宏・宮元 進・馬淵 宏・竹田亮祐・氏家俊光 : 生化学, 45, 494 (1973).
- 22) Okamoto, H. : First International Meeting on Tryptophan Metabolism : Biochemistry, Pathology and Regulation. Padova, Italy 1974.
- 23) Okamoto, H., Noto, Y., Miyamoto, S., Mabuchi, H., Takeda, R. : FEBS Letters 54, 103 (1975).
- 24) Brazeau, P., Vale, W., Burgus, R., Ling, N., Butcher, M., Rivier, J., Gullemin, R. : Science 179, 77 (1973).
- 25) Alberti, K. G. M. M., Christensen, N. J., Christensen, S. E., Hansen, Aa. P., Iversen, J., Lundbeak, K., Sever-Hansen, K., Ørskov, H. : Lancet 2, 1299 (1973).
- 26) Koerker, D. J., Ruch, W., Chideckel, E., Palmer, J., Goodner, C. J., Ensinnck, J., Gale, C. G. : Science 184, 482 (1974).
- 27) Gerich, J. E., Lorenzi, M., Schneider, V., Kwan, C. W., Karam, J. H., Guillemin, R., Forsham, P. H. : Diabetes 23, 876 (1974).
- 28) Curnow, R. T., Carey, R. M., Tayler, A., Johanson, A., Murad, F. : New Engl. J. Med. 292, 1385 (1975).
- 29) Weeke, J., Hansen, Aa. P., Lundbeak, K. : J. Clin. Endocrinol. Metab. 41, 168 (1975).
- 30) Copinschi, G., Leclercq-Meyer, V., Virasoro, A., L'Hermit, M., Vanhaelst, L., Goldstein, J., Leclercq, R., Fery, F., Pobin, C. : Horm. Metab. Res. 8, 226 (1976).
- 31) Yen, S. S. C., Siler, T. M., DeVane, G. W. : New Engl. J. Med. 290, (1974).
- 32) Rosenthal, J., Escobar-Jimenez, F., Raptis, S., Pfeiffer, E. F. : Lancet 2, 772 (1976).
- 33) Turtle, J. R., Kipnis, D. M. : Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 797 (1967).
- 34) Charles, M. A., Fanska, R., Schmid, F. G., Forsham, P. H., Grodsky, G. M. : Science 179, 569 (1973).
- 35) Grill, V., Cerasi, E. : J. Biol. Chem. 249, 4196 (1974).
- 36) Hellman, B., Idahl, L. A., Lernmark, A., Täljedal, I.-B. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 71, 3405 (1974).
- 37) Montague, W., Cook, J. R. : Biochem. J. 122, 115 (1971).
- 38) Mirsky, A., Perisutti, R., Jinks, R. : Endocrinol. 60, 318 (1957).
- 39) Mirsky, A., Perisutti, G., Diengott, D. : Endocrinol. 59, 369 (1956).
- 40) Lardy, H. A. : Amer. J. Clin. Nutr. 24, 764 (1971).
- 41) McDaniel, H. G., Boshell, B. R., Reddy, W. J. : Diabetes. 22, 713 (1973)
- 42) Okamoto, H., Okaga, F., Hayaishi, O. : J. Biol. Chem. 246, 7759 (1971).
- 43) 岡本 宏 : 生化学, 46, 758 (1974).
- 44) Shein, P. S., Cooney, A., Vernon, M. L. : Cancer Res. 27, 2324 (1967).
- 45) Shein, P. S. : Cancer Res. 29, 1226 (1969).
- 46) Kotake, Y., Inada, J. : Proc. Japan Acad. 28 65 (1952).
- 47) 古武弥人 : 生化学 34, 884 (1975)
- 48) 武内忠男ら : 医学のあゆみ 83, 479 (1972)
- 49) Takahashi, H., Kaihara, M., Price, J. M. : J. Biol. Chem. 223, 750 (1956).
- 50) Takahashi, H., Price, J. M. : J. Biol. Chem. 233, 150 (1958).
- 51) Kaihara, M. : J. Biol. Chem. 235, 136 (1960).
- 52) Lumme, P. : Ann. Acad. Sci. Fennica 68, 7 (1955).
- 53) Maske, H. : Diabetes 6, 335 (1957).
- 54) Khattab, M., Abul-Fadl, M., Khalafallah, A., Hamza, S. : J. Egypt. Med. Assoc. 55, 531, (1972).

A b s t r a c t

An improved collagenase-digestion procedure for the isolation of "intact" islets from rat pancreas was described and the effect of kynurenine metabolites on insulin release from the "intact" islets was studied. The critical step in this procedure was in

the shortening of the collagenase-digestion time of pancreatic pieces.

In the presence of 20mM glucose, the islets isolated by the digestion of collagenase for 10 minutes (10 min-digested islets) released a remarkably high amount of insulin as much as 570-600 uU/islet/90 min. This insulin level was two or three times higher than the amount of insulin released from the islets isolated by the digestion of collagenase for 25 minutes (25 min-digested islets).

Somatostatin inhibited the 20 mM glucose-induced insulin release from the 10 min-digested islets, but the inhibitory effect of somatostatin was not observed in the 25 min-digested islets.

From these results and from other available evidences, it was thought that the "intact" islets was isolated by the improved mild collagenase digestion method.

Using the "intact" rat islets, the effect of kynurenine metabolites on insulin release was studied. Quinaldic acid and 8-hydroxyquinaldic acid, end-metabolites of kynurenine, were shown to release insulin from the islets of rats. In the stimulating effect of kynurenine metabolites on insulin release, both kynurenic acid and xanthrenic acid were found to be somewhat less active than quinaldic acid, but L-kynurenine, 3-hydro-L-kynurenine, quinolinic acid, L-tryptphan and quinaldylglycine did not cause the insulin release. Twenty mM glucose stimulated insulin release for the first 30 minutes (first phase) of incubation, followed by distinctly increasing release during the subsequent 60 minutes (second phase). Addition of 4 mM quinaldic acid to an incubation medium containing 20 mM glucose caused an almost complete inhibition in the second phase of glucose-induced insulin release, while the first phase was insensitive to quinaldic acid. There have been many papers reporting the increased level of kynurenine metabolites, such as kynurenic acid and xanthrenic acid, in the urine of steroid-treated patients, pregnant woman and hyperthyroid rats. The present results indicated that kynurenine metabolites such as quinaldic acid and 8-hydroxy quinaldic acid caused the insulin release from isolated islets and inhibited glucose-induced insulin release. Thus, it was supported that an excessive formation of some kynurenine metabolites due to disorder in tryptphan metabolism was involved in the pathogenesis of hyperinsulinemia or diabetic state.
