Studies on Effects of Exogenous Insulin on Endogenous Insulin Release from Microdissected Islets of Mice

Kyugo ONOE and Tatsuo YAMAMOTO

Department of Internal Medicine, Tokushima University, Tokushima, Japan
(Professor : Tomozo Aburaya)

Hellerström (1964) described a method of the microdissection of islets in the mouse.

Insulin can be destroyed by lytic substances released from the acinar tissues, but it may be possible that secreted insulin from microdissected pancreatic islets is less exposed to the lytic effects of any acinar tissue.

The purpose of the present communication is to demonstrate a new approach to the mechanism of insulin synthesis and release from mammalian islets.

It was reported that islets isolated by this procedure have been used for in vitro studies on enzymatic activity and oxygen consumption of individual islets.

We have already previously reported that insulin secretion of one microdissected islet by stimulation of hexoses and hormones was measured by radio-immunoassay.

In this investigation we have studied the effects of exogenous insulin on endogenous insulin release from microdissected islets of mice.

Material and Methods

Mice weighting 15~25 gm were used.

1) Pancreatic islets microdissected from the pancreas of mice, injected with protamine zinc insulin (0.2 U/day or 0.4 U/day) for 14 days, were placed in incubation flasks with cold (4°C) Krebs-Ringer bicarbonate solution, PH 7.4 with 300 mg/dl glucose and incubated at 37°C for 2 hrs.

2) We observed blood sugar levels of mice after injection of insulin (P.Z. insulin 0.2 or 0.4 U) during administration of insulin (P.Z. insulin 0.2 U or 0.4 U/day) for 7 days.

Estimation of blood sugar was done by the glucose oxidase method.

3) Intact pancreatic islets microdissected from the pancreas of mice were placed in this incubation media with 300 mg/dl glucose.

Release of insulin into the incubation media was determined by the radio-immunoassay of Morgan & Lazarow.

We used one islet in this experiment, because secreted insulin concentration from one islet in the medium of this system is very high by our sensitive immunoassay technique.

Conculusion

1) We observed the effect of exogenous insulin on endogenous insulin release responding to glucose (300 mg/dl) from microdissected islets of normal mice in vitro.

Insulin contents of incubation media (Krebs-Ringer bicarbonate buffer PH 7.4) were measured by radio-immunoassay.

After injection of P.Z. insulin (0.2 U or 0.4 U/day) to mice for 14 days, insulin release responding to glucose from microdissected islets was about the same as that inhibited by exogenous insulin injection.

2) Blood sugar levels of mice of 5, 16, 20, 24 hours after injection of insulin (P.Z. insulin 0.2 or 0.4 U) during administration of insulin (P.Z. insulin 0.2 U or 0.4 U/day) for 7 days were 58~66 mg/dl. and were about the same as that of control.

We concluded that when the period and amount of administration of exogenous insulin is short, and little respectively, little insulin secretion from isolated pancreatic islets was not inhibited by exogenous insulin administration. (see pp. 1558~1561)

insulin の生成と放出, 分解に関する研究ことに 哺乳動物のラ氏島 (microdissection) による insulin 放出機構

insulin 投与による内因性 insulin 分泌に及ぼす影響

徳島大, 第2内科 (指導 油谷友三教授)

尾 上 久 吾
山 本 達 雄

(昭和44年4月3日受付)

糖尿病の治療の目的で外因性 insulin の投与を行なうが, その際の内因性の insulin の分泌がどうなるかを解明するために, 前もつて正常マウスに外因性 insulin の投与を行なつて, その後でそのマウスの膵臓のラ氏島を microdissection によつて切り出しブドウ糖が 300mg/dl の濃度に含まれた Krebs-Ringer bicarbonate buffer 中で2時間 incubate し, その medium 中に放出された insulin 量を radioimmunoassay 法で測定したところ, 対照にくらべて insulin の分泌は変らなかつた。即ち insulin の短期間の投与ではこの system の insulin 分泌の研究法では insulin の分泌の阻止はみとめられなかつた。

I は じ め に

insulin 治療を行なう場合, 外因性 insulin を投与した場合, その個体の内因性の insulin の分泌がいかなる影響を受けるかということは極めて大切であるにも拘らず, こうした目的の研究が極めて少ない。

長期にわたり insulin 投与を行なつた場合にはラ氏島の insulin 分泌は如何なる影響をうけるかについては形態学的な観察が Logothetopoulos⁸⁾⁷⁾ ら, Erlanson¹⁰⁾ ら及びごく最近横尾⁵⁾ らによつてなされている。しかし insulin の投与後の内因性の insulin の分泌についての研究はみられない。

こうした研究がなかつた原因の一つには外因性 insulin と内因性 insulin とが同一の sample で同時に測定できなかつたことによると思われるが我々は最近この目的で新しい方法を開発した。この方法では外因性 inswlin として魚の insulin を用いるものである¹³⁾。

ところが我々が一般に治療に用いているものは豚或いは牛の insulin である。従つてこうした哺乳動物の insulin を投与した場合には内因性 insulin はどうなるかという疑問が生ずる。この疑問を解決する目的のため insulin を投与しておいてラ氏島のみを取り出し, これを medium 中に入れて incubate すれば外来性の insulin はこの測定系には入らないことになる。しかしながら切り出されたラ氏島そのものには外来性 insulin の影響は及んでいるものと思われる。これは副腎摘出マウスでのラ氏島は分離された後もその影響を受けているという我々の報告からも推定できる¹⁶⁾。以上のような考慮の下に我々はこの実験を計画した。

II 実 験 方 法

- 1) 雄性マウスの体重約20gのものに insulin を皮下注射した後にその膵臓から約80倍の実体顕微鏡下で

白く光つてみえるラ氏島を切り出し Krebs-Ringer bicarbonate buffer PH 7.4 で $2 \sim 4^{\circ}\text{C}$ に保つてあるものの中にこのラ氏島を入れておく。対照は生理的食塩水を皮下注射したマウスのラ氏島を用いた。

2) incubation medium は Krebs-Ringer bicarbonate buffer PH 7.4 を用いた。

3) 以上の如くして切り出したラ氏島を 1 個取り出し 5 ml の incubation medium 中に投入して 37°C で 2 時間 incubate した。

4) そして medium を約 20 倍に希釈して medium 中に放出された insulin を radioimmunoassay (Morgan¹⁸⁾ ら) によつて測定した。

III 実験条件ならびに成績

1) 上記のマウスに夫々 0.2, 0.4U の insulin を 14 日間皮下注射した後に、約 18 時間絶食せしめ断頭にて殺し、膵ラ氏島を microdissection により切り出し、ブドウ糖濃度が 300mg/dl になるように加えられた medium 中にその一個を投入し 37°C 2 時間 incubate した後に medium 中に放出された insulin 量を測定した。Fig. 1 に示すように対照の生理食塩水投与群と比較して insulin 投与群では夫々 0.2, 0.4U 投与群でもブドウ糖による insulin 放出作用は大差を認めることができなかった。

2) 次に自由摂食の下で in vivo でマウスに insulin を 0.2U, 0.4U を夫々 7 日間投与した後、最後の insulin 注射後 5, 16, 20, 24 時間目における血糖を測定したが、Table 1 に示す如く insulin 0.2U, 0.4U の投与群でも著明な低血糖を起こしてはなかった。

3) 正常マウスで insulin の投与をうけていないマウスのラ氏島を入れた medium 中に insulin を $50\mu\text{U/ml}$ になるように加えた場合 300mg/dl のブドウ糖による内因性 insulin の分泌の促進に如何なる影響を及ぼすかを観察した。そうすると Table 2 に示すようにラ氏島を medium 中に入れておくとブドウ糖 + insulin では medium 中の insulin は $108 \pm 10.6\mu\text{U/ml}$ であるのに対し、ブドウ糖

Fig. 1. Insulin release responded to glucose (300mg/dl) in vitro from microdissected islets of mice injected protamine zinc insulin.

0.4U : after injection of P.Z.I (0.4U/day) for 14 days.

0.2U : after injection of P.Z.I (0.2U/day) for 14 days.

Control : after injection of physiological salt solution for 14 days.

Table 1. Blood sugar levels of mice after injection of insulin (PZ Insulin 0.2 or 0.4U) during administration of insulin (PZ Insulin 0.2U or 0.4U/day) for 7 days.

	after injection of insulin			
	5hs.	16hs.	20hs.	24hs.
0.2U insulin	64	66	66	65
0.4U insulin	58	66	66	65
Control	66	67	66	65

n = 3 (mg/dl)

1560 insulin の生成と放出, 分解に関する研究ことに哺乳動物のラ氏島 (microdissection) による insulin 放出機構 (尾上, 山本)

Table 2. Effect of insulin added into the incubation medium on insulin release responded to glucose from microdissected islets of normal mice.

	Islet	Media before incubation		Media after incubation	
		Glucose (mg/dl)	Insulin (μ U/ml)	Insulin (μ U/ml)	
1	+	300	50	108 ± 10.6	(n = 5)
2	+	300	0	90 ± 11.5	(n = 3)
3	-	300	50	46 ± 1.9	(n = 3)

のみでは $90 \pm 11.5 \mu$ U/ml となつた。ラ氏島が入つておらずただブドウ糖と 50μ U/ml の insulin の加えられている medium では insulin 量は $46 \pm 1.9 \mu$ U/ml を示している。従つて medium 中に insulin を加えることによって内因性の insulin の放出は著明に抑制されている。

IV 考 察

これまで in vitro の実験で medium 中に insulin を加えて行なつた研究は、正常のラットのラ氏島を collagenase 法で取り出す方法が用いられ、medium 中でそのラ氏島を incubate し、その medium に一定量の insulin (ラット) を加えて行なわれた実験のみであるが、外因性 insulin は内因性 insulin 分泌速度に何らの変化を与えなかつたという (Malaisse¹³)。

Hansherger²³ らはブドウ糖投与後よりもモルモットにブドウ糖及び insulin を同時に投与した後の方が β 細胞の著しい degranulation は少ないことをみて insulin の投与は内因性 insulin には大した影響を与えないと述べている。

しかしこの成績は Logothetopoulos³⁾ の成績とはことなつている。又ネズミで長期にわたる insulin の注射では膵臓の insulin の著しい減少、 β 細胞の granulation 及び Zn の density の著減が報告されている⁸⁾¹¹⁾¹²⁾。

Logothetopoulos⁷⁾ は長期にわたる insulin 投与後の膵臓のラ氏島の電顕像を観察した。そして最も定型的な変化は β 細胞のひどい degranulation と Golgi 複合体の不活性並びに pregranule と考えられている spheroidal body の欠除であると述べている。又最近横尾らも insulin の3カ月間の家兎への投与は内因性 insulin の合成を抑えることを証明している。しかし緩徐な分泌はなお行なわれていると考えられると述べている。ごく最近 Frerichs らは ILA の測定でラットの膵組織を用いて incubation medium 中に加えられた insulin は insulin 分泌を inhibit しようことを suggest する成績を得ている。

しかし彼らは incubation 中に放出される insulin は組織により分解をうけることを計算に入れていないし、又 insulin を bioassay で測定している。我々の microdissection による実験では外分泌組織はあまり入らないため外分泌による分泌された insulin の破壊は極めて少ないと考えられる。本実験の成績は Malaisse¹³⁾ らの成績を裏づけるものである。

しかし我々の実験では魚の insulin を犬に投与した場合 xylitol によつて分泌が促進された内因性の insulin は外因性の insulin により完全に抑制されていたが、低血糖が起きるという条件がそれに加わつていた。しかし低血糖が起きない程度の外因性 insulin 投与では内因性の insulin は分泌はそれほど抑えられていなかった。

以上のことより外因性の insulin 投与では内因性の insulin 生合成ならびに分泌を抑制するが低血糖の起きない程度の投与量であるならば、内因性の insulin の分泌の抑制は少ないかもしれない。血糖を下げ糖尿病の代謝異常を改善するためには insulin の投与は現在では不可欠であるので、生体における生合成ならびに分泌を正常化せしめる insulin 投与量の決定をいかにするか、という問題は極めて重要であるので、

更に検討を加えることが必要である。

この *in vitro* の実験でも血糖値の低下は著明でなかつたのである。従つて *insulin* の短期間の投与では *insulin* 低血糖のおきていない条件ではブドウ糖に対するラ氏島の内因性 *insulin* 分泌はそれほど抑制されないものと考えられる。

V 結 論

1) マウスに *insulin* を短期間投与した場合、著明な低血糖の症状のみられない状態では、*microdissect* されたラ氏島のブドウ糖に対する *insulin* 分泌は対照と変わらず、従つてこうした条件でのブドウ糖による *insulin* 分泌は外因性 *insulin* によつて抑制されなかつた。

2) しかし正常マウスから分離されたラ氏島のブドウ糖による *insulin* 放出作用は *medium* 中に *insulin* を加えることによつて、抑制された。(油谷教授の御指導を深謝します。)

文 献

- 1) MALAISSE, W.J., MALAISSE-LAGAE, F., LACY, P.E., and WRIGHT, P.M. : *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 124, 497, 1967.
- 2) HANSHERGER, F.X., RAMSAY, A.J., *Anat. Rec.*, 112, 341, 1952.
- 3) LOGOTHETOPOULOS, J., KANEKO, M., WRENAHALL, G.A., BEST, C.H., in *Metabolism of Pancreatic Islets*, BROLIN, S.E., HELIMANS, B., KNOUSTON, H. : ed., Pergamon Press, Ltd., 1964, 333.
- 4) FRERICHS, H., REICH, U., CREUTZFELDT, W., *Klin. Wschr.*, 43, 136, 1965.
- 5) 横尾定美, 奥村賢太郎 : 日内分泌誌, 44, 728, (1968).
- 6) MALAISSE, W.J., MALAISSE-LAGAE, F., and WRIGHT, P.H., *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* 126, 74, 1967.
- 7) LOGOTHETOPOULOS, J. : *Diabetes*, 15, 823, 1966.
- 8) LOGOTHETOPOULOS, J., KRAICER, J. and BEST, C.H. : *Diabetes*, 10, 367, 1961.
- 9) CHU, C.P. and GOODNER, C.J. : *Endocrinology*, 82, 296, 1968.
- 10) ENLANDSEN, S.L., WELLS, L.J. and LAZAROW, A. : *Anat. Rec.*, 157, 415, 1967.
- 11) LATTI, J.S. and HARVEY, H.T. : *Anat. Rec.*, 82, 281, 1942.
- 12) HAIST, R.E. : *Physiol. Rev.*, 24, 409, 1944.
- 13) 尾上久吾, 小橋邦雄, 藤中真一, 矢田健太郎 : 医学のあゆみ, 67, 395, (1968).
- 14) 尾上久吾 : 糖尿病, 12, 250, (1969), 第11回日本糖尿病学会総会, (1968).
- 15) MORGAN, C.R., and LAZAROW, A. : *Diabetes*, 12, 115, 1963.
- 16) 油谷友三, 尾上久吾, 小橋邦雄, 山本達雄ら : 日内分泌誌, 44, 80, (1968).