Effects of Arginine and γ -Guanidinobutyramide on Insulin and Glucagon Secretion from the Perfused Rat Pancreas

**Takayoshi TOYOTA, Shin-ichiro SATO, Mikihiro KUDO
and Yoshio GOTO**

The Third Department of Internal Medicine, Hirosaki University School of Medicine

Buckle and Jones reported that γ -guanidinobutyramide had a hypoglycemic action. The role of γ -guanidinobutyramide in a metabolic pathway involving arginine was studied by Beeson et al. A stimulatory effect of arginine on insulin and glucagon secretion in a presence of glucose was demonstrated by many authors. In the present paper, an experimental effect of γ -guanidinobutyramide was studied in comparison with that of arginine on insulin and glucagon secretion from the perfused rat pancreas.

Male Wistar-albino rats (weighing between 200 and 250 g) were fasted for 20 hours before operation. The preparation of the isolated pancreas was made by the modified method of Grodsky. After Nembutal anesthesia, the stomach and spleen were removed. One block of the pancreas and the proximal portion of duodenum was taken out. A cannula was inserted into the celiac artery of the preparation. Effluent from the portal vein was collected in test tubes. Krebs-Ringer bicarbonate buffer containing 4.5% dextran was used as the perfusate. The buffer was equilibrated with 95% O₂ and 5% CO₂. The flow rate was adjusted to two ml per minute under a pressure of 50 to 100 mmHg. The temperature of the perfusate was 37° to 38°C. Arginine and γ -guanidinobutyramide was infused via a side arm at a rate of 0.2 ml per minute with a constant infusion pump. Insulin was measured by the method of Morgan and Lazarow. Glucagon was estimated by the method of Buchanan, i.e., ¹²⁵I-glucagon binding to antibody was separated from free ¹²⁵I-glucagon by dextran coated charcoal.

Infusion of arginine at a rate of 1 mg per minute in combination with glucose (50 mg%) produced both insulin and glucagon secretion. The peak of insulin was 32.4 ± 3.2 ng/ml at two minute and that of glucagon 2062 ± 106 pg/ml at the same time. The patterns of insulin and glucagon secretion were monophasic. In the presence of glucose (150 mg%), arginine produced insulin and glucagon secretion and they reached peak values with 39.0 ± 3.3 ng/ml and 3433 ± 127 pg/ml, respectively. The patterns of insulin and glucagon secretion were diphasic. On the contrary, infusion of γ -guanidinobutyramide at a rate of 200 μ g per minute in combination with glucose (50 mg%) produced a continuous secretion of insulin over 60 minutes. The secretion of insulin induced by γ -guanidinobutyramide was inhibited by an infusion of adrenergic beta-blocking agent (propranolol, 1 μ g per minute). The result suggested that γ -guanidinobutyramide-induced insulin secretion was modulated by adrenergic beta-receptor. Insulin secretion

induced by glucose (150 mg%) was enhanced, when γ -guanidinobutyramide was infused at a rate of 200 μ g per minute in combination with glucose (150 mg%). Glucagon secretion was inhibited by γ -guanidinobutyramide in the presence of glucose (50 mg%). However, in the presence of glucose (150 mg%) γ -guanidinobutyramide did not have any influence on glucagon secretion. In summary, γ -guanidinobutyramide has a stimulatory effect on insulin secretion but an inhibitory effect on glucagon secretion, and this effect is different from that of arginine. Further experimental research is necessary for the explanation of the different actions of arginine and γ -guanidinobutyramide.

(See pp. 998~1004)

インスリンおよびグルカゴン分泌におよぼす Arginine, γ -Guanidinobutyramide 作用

弘前大学医学部第3内科学教室

豊田 隆 謙, 佐藤 信一郎
工藤 幹彦, 後藤 由夫

(昭和49年3月9日受付)

インスリンおよびグルカゴン分泌におよぼす γ -guanidinobutyramide 作用をラット摘出臍灌流実験をもちい検討し, arginine 作用と比較した. γ -guanidinobutyramide はグルコース 50mg/dl の存在下でインスリン分泌を促進し, グルカゴン分泌を抑制した. このインスリン分泌は propranolol で抑制を受けた. Arginine はグルコース 50, 150mg/dl の存在下でそれぞれインスリンとグルカゴン分泌を促進した. γ -guanidinobutyramide の血糖降下作用は末梢組織のグルコース利用を促進している他に臍内分泌ホルモン作用を介している可能性が考えられる.

緒 言

γ -guanidinobutyramide の構造は arginine (α -amino δ -guanidino-n-valeric acid) に類似しており, 生体では arginine 代謝過程の中間物質の1つとして, 哺乳動物に微量に存在する¹⁾²⁾. 本物質 1mg による白鼠横隔膜へのぶどう糖のとり込みはインスリン 832 単位に相当すると云われ¹⁾, in vivo では著明な血糖降下作用がみとめられる. Arginine を静脈投与すると血糖上昇作用がみられ, インスリン, グルカゴンあるいは成長ホルモンなどの分泌が増加する.

γ -guanidinobutyramide がインスリン分泌を促進することをすでにわれわれは確認しているが³⁾ その後 Aynsley-Green および Alberti⁴⁾ は in vivo で同様の成績を報告している. しかし本物質がグルカゴン分泌にどのように作用するかはまだ分っていない. われわれは γ -guanidinobutyramide の臍内分泌におよぼす作用について白鼠臍灌流実験をおこない arginine 作用と比較検討したのでその成績を報告する.

実 験 方 法

1 臍灌流実験法

Wistar 系雄白鼠 (200~250g) を20時間絶食させ Nembutal (30mg/kg) 麻酔後, 腹部正中線を切開し, Grodsky⁵⁾ の方法に準じて臍標本を作製した⁶⁾. 直腸側から臍を剝離し, 動静脈を結紮, 止血しながら12指腸下部までの臍を腸管から剝離した. 食道を切断した後, 胃および脾を切除し, 12指腸-臍標本ブロック (Fig. 1) を摘出し腹腔動脈から灌流液を注入した (1部の実験では腹部大動脈にカニユーレを挿入し, 腹腔動脈および上腸間膜動脈から灌流液を注入した). 流出液は門脈から採取出来るよう灌流装置にとりつけた. 灌流条件は温度37~38°C, 圧 50-100mmHg, 流量 2.0ml/min を維持した. 灌流液は 4.5% dextran-Krebs-Ringer bicarbonate buffer を用い, 95% O₂, 5% CO₂ 混合ガスで平衡を保った. Arginine および γ -guanidinobutyramide を側管から定量ポンプで 0.2ml/min の速度で注入した.

2 Arginine 作用

(1) 灌流装置に固定した臍標本を安定させるためにあらかじめぶどう糖を含まない灌流液で15~20分灌流し

Fig. 1. Preparation of the isolated rat pancreas.

た。その後ぶどう糖 (50mg%) を含む灌流液をもちいて実験を開始し、20分から arginine 液を側管から 1 mg/min の速度で20分間注入した。Arginine 注入中止後20分間はぶどう糖 (50mg%) を含む灌流液のみを注入した。(2)膵標本が安定してからぶどう糖 (150mg%) 液で灌流を開始し、20分から arginine 液を 1 mg/min の速度で 20分間注入した。Arginine 注入中止後 20分間はぶどう糖液 (150mg%) で灌流した。採取時間はぶどう糖注入開始後 10分まで 2 分毎、その後 5 分毎に 2 分間づつ採取し、arginine 注入開始後 10分まで 2 分毎、その後は 5 分毎に 2 分間づつ採取した。

3 γ -guanidinobutyramide 作用

(1)膵標本を灌流装置に固定し、ぶどう糖 (50mg%) を含む灌流液で15分間灌流し、膵標本が安定してから、ぶどう糖の濃度を同一に維持しながら γ -guanidinobutyramide を 200 μ g/min の速度で30分間注入した。(2)膵標本が安定してから γ -guanidinobutyramide およびぶどう糖 (50mg%) を含む灌流液で灌流を開始し、20分目に propranolol (1 μ g/min) を注入した。Propranolol 注入中止後20分間は γ -guanidinobutyramide およびぶどう糖を含む灌流液を注入した。(3)膵標本が安定してからぶどう糖液 (150mg%) で灌流を開始し、20分目から γ -guanidinobutyramide を側管から 200 μ g/min の速度で20分間注入した。注入中止後20分間はぶどう糖液 (150mg%) で灌流した。採取時間はぶどう糖, arginine, propranolol, および γ -guanidinobutyramide の注入開始後10分まで 2 分毎に、それ以後は 5 分毎に 2 分間づつ採取した。全ての採取液に 0.1ml の Trasylol を加え、氷水中に入れ、測定まで -20°C で凍結保存した。

4 測定法

流出液中のインスリンは Morgan and Lazarow⁷⁾ 法に準じた方法で測定した⁸⁾。グルカゴンは 1 抗体法

(Buchanan)⁹⁾で測定した。すなわちグルカゴン抗体は清水製薬株式会社甲賀諭吉博士から提供をうけ 500 倍に稀釈し 0.1ml もちい、 ^{125}I -グルカゴンは CIS 製 (ミドリ十字) のものを 60 倍に稀釈し 0.1ml もちいた。測定試料または標準グルカゴン (Novo 社) 1 ml, 0.375% ヒトアルブミンを含む barbitol acetate buffer (pH 7.4) 1 ml を 4°C 48 時間 incubate した。結合グルカゴンと遊離グルカゴンの分離には 0.5% デキストランおよび 5% charcoal を等量加え、調整したものを 0.4ml もちい、1 時間放置後遠心し上清を捨て沈澱した charcoal の ^{125}I を Aloka Auto-gamma spectrometer で計測した。測定中のグルカゴン崩壊を防ぐために Trasylol 0.1ml (1000KIE) を使用した。

実験成績

1. Arginine によるインスリンおよびグルカゴン分泌

ぶどう糖 50mg% ではインスリンはほとんど分泌されない。ぶどう糖 50mg% を注入し 20 分目のインスリン値は $2.0 \pm 0.3 \text{ ng/ml}$ であり arginine 注入開始後 2 分で peak 値となり ($32.4 \pm 3.3 \text{ ng/ml}$)、インスリン分泌パターンは 1 相性であつた (Fig. 2)。これにたいしぶどう糖 150mg% の存在下では arginine によるインスリン分泌パターンは 2 相性を示めた。すなわちぶどう糖 150mg% のみを注入すると 2 相性にインスリン分泌が増加しその 20 分値は $21.3 \pm 2.4 \text{ ng/ml}$ となり arginine を注入することによりインスリンは $39.0 \pm 3.3 \text{ ng/ml}$ に増加した (Fig. 3)。

グルカゴンはぶどう糖 50mg% によつて減少し、灌流開始後 20 分値は $525 \pm 18 \text{ pg/ml}$ であり arginine 注入後 2 分で peak となつた。その値は $2062 \pm 106 \text{ pg/ml}$ であり、分泌パターンは 1 相性であつた (Fig. 2)。これにたいして、ぶどう糖 150mg% の存在下では arginine 注入により 2 相性のグルカゴン分泌を示めた。すなわち、ぶどう糖 150mg% で灌流し 20 分目のグルカゴン値は $126 \pm 8 \text{ pg/ml}$ であり arginine 注入により 2 分後のグルカゴン値は $3433 \pm 127 \text{ pg/ml}$ と増加した。その後 1 時減少し 15 分目に再び増加し $2296 \pm 103 \text{ pg/ml}$ となつた (Fig. 3)。

Fig. 2. Effect of arginine on insulin ($\square$ — $\square$) and glucagon ($\blacksquare$ — $\blacksquare$) secretion in combination with glucose (50mg%). Twenty minutes after the initiation of glucose (50mg%) perfusion, arginine was infused at a rate of 1 mg per minute.

Fig. 3. Effect of arginine on insulin ($\square-\square$) and glucagon ($\blacksquare-\blacksquare$) secretion in combination with glucose (150mg%). Twenty minutes after the perfusion of glucose (150mg%) started, arginine was infused at a rate of 1mg per minute.

Fig. 4. Effect of γ -guanidinobutyramide on insulin ($\square-\square$) and glucagon ($\blacksquare-\blacksquare$) secretion in combination with glucose (50mg%). γ -Guanidinobutyramide was infused at a rate of 200 μ g per minute over 60 minutes.

Fig. 5. Effect of γ -guanidinobutyramide on insulin ($\square$ — $\square$) and glucagon ($\blacksquare$ — $\blacksquare$) secretion in combination with glucose (150mg%). Twenty minutes after the perfusion of glucose (150mg%) started, γ -guanidinobutyramide was infused at a rate of 200 μ g per minute.

Fig. 6. Effect of propranolol on insulin ($\square$ — $\square$) and glucagon ($\blacksquare$ — $\blacksquare$) secretion induced by γ -guanidinobutyramide in a presence of glucose (50mg%). Twenty minutes after the perfusion of glucose (50mg%) and γ -guanidinobutyramide started, propranolol was infused at a rate of 1 μ g per minute.

2. γ -guanidinobutyramide によるインスリンおよびグルカゴン分泌

ぶどう糖 50mg% を含む灌流液で15分間灌流した後、ぶどう糖濃度を同一に維持しながら γ -guanidinobutyramide を 200 μ g/min の速度で側管から注入するとインスリンは 4.8 ± 1.2 ng/ml から 19.0 ± 2.4 ng/ml に増加し、その後60分間インスリン分泌は持続した (Fig. 4)。ぶどう糖 150mg% の存在下で γ -guanidinobutyramide を注入するとインスリン値は 11.6 ± 5.6 ng/ml から 16.2 ± 4.5 ng/ml に増加した (Fig. 5)。これはぶどう糖刺激によるインスリン分泌を γ -guanidinobutyramide が促進的に作用していることを示めている。 γ -guanidinobutyramide によるインスリンの分泌は propranolol (1 μ g/min) の注入によって抑制をうけ、propranolol 注入中止後もインスリン分泌は抑制をうけたままであつた (Fig. 6)。

グルカゴン分泌は γ -guanidinobutyramide によって抑制をうけ (Fig. 4)、この抑制は propranolol 注入によって除去されず propranolol 注入中止後徐々にグルカゴン分泌が増加の傾向を示めた (Fig. 6)。ぶどう糖 150mg% の存在下ではグルカゴン分泌は抑制をうけ γ -guanidinobutyramide を注入してもグルカゴン分泌は抑制をうけたままであつた (Fig. 5)。

考 按

ぶどう糖刺激によるインスリン分泌機構の仮説の1つに glucoreceptor 説¹⁰⁾がある。すなわちぶどう糖がこの receptor に結合し、インスリン分泌の trigger になっていると考えられている。また adenylyl cyclase

活性が高まり, cyclic-AMP が増加してインスリン分泌を調整していると云う実験成績があり^{11)~13)}, ぶどう糖刺激によるインスリン分泌に cyclic-AMP が強く関与していることは間違いない. 解糖系のどのステップが重要かは分っていないが, ぶどう糖が膵β細胞にとり込まれ代謝される過程でインスリン分泌の信号が出るものと思われる. また膵β細胞内のぶどう糖濃度そのものがインスリン分泌を促進しており, β細胞内の glycogen が acid-amyloglucosidase によつて分解され細胞内のぶどう糖濃度が高まつてインスリン分泌が促進されると云う考えもある¹⁴⁾. Grodsky¹⁵⁾ の成績によると膵β細胞内のインスリンは labile insulin と stable insulin と云う2つの形で存在し, この両者の存在を仮定することによつてぶどう糖刺激によるインスリン分泌パターンが数式によつて計算されたものとよく一致すると云う.

しかし arginine によるインスリン分泌の機構はほとんど分っていない. われわれの成績によるとぶどう糖濃度が 50mg% と云う低濃度の条件では arginine 刺激によるインスリン分泌が1相性であり, ぶどう糖濃度が 150mg% の条件では2相性の分泌パターンを示めた. Arginine によるインスリン分泌にはぶどう糖の存在が必要であることは Edgar ら¹⁶⁾ によつて報告されている. ところが non-metabolized amino acid analogue として α-aminoisobutyric acid あるいは 2-aminobicyclo (2,2,1) heptane-2-carboxylic acid にもインスリン分泌作用¹⁷⁾があるので arginine が細胞内に入り代謝される過程が必要なのかどうか疑問がのこる. 膵β細胞膜の receptor に arginine が作用しぶどう糖刺激によるインスリン分泌を調整しているのかもしれない.

γ-guanidinobutyramide は構造的にも arginine に類似していて, 哺乳動物に微量に存在する¹⁸⁾ものであるが, ぶどう糖 50mg% の存在下でインスリンを持続的に分泌させる. γ-guanidinobutyramide のこの作用は arginine と共通した guanidine 基によるものと考えられる. Aynsley-Green ら⁴⁾ は本物質が acetylcholine を放出させることと膵β細胞への cation exchange の2つの作用を介してインスリン分泌をおこさせるものだろうと報告している. また γ-guanidinobutyramide はぶどう糖刺激によるインスリン分泌をさらに増加させる作用のあることがみとめられた. 本物質によるインスリン分泌が propranolol によつて抑制をうけると云う成績から考えると adrenergic beta-receptor を介している可能性がある. Beta-receptor 刺激でインスリン分泌が促進されることは証明されており¹⁸⁾¹⁹⁾, われわれも膵灌流実験によつて isoproterenol がインスリン分泌を促進することを確認しているが, その分泌パターンは1相性である. ところが γ-guanidinobutyramide によるインスリン分泌が持続的であることから考えると必ずしも beta-receptor を刺激すると云うだけでは説明しきれない. おそらく本物質が細胞内にはいり代謝される過程がインスリン分泌増加に関与しているのであろう. しかしこのことがインスリン合成を高める結果なのかどうかは分らない. Arginine と γ-guanidinobutyramide 作用のうえでもつとも異なる点は arginine がぶどう糖 50mg% および 150mg% の存在下でもグルカゴン分泌を促進するのにたいし γ-guanidinobutyramide はグルカゴン分泌を抑制することである. γ-guanidinobutyramide のインスリンおよびグルカゴン分泌にたいするこのような作用から類推するとぶどう糖の作用によく似ている. ぶどう糖がグルカゴン分泌を抑制する事実はよく知られており²¹⁾²²⁾, われわれも膵灌流実験ですでにこのことを証明しているが²³⁾, 何故ぶどう糖がグルカゴン分泌を抑制するのか分らない. Norepinephrine がグルカゴン分泌を促進し²⁰⁾²⁴⁾, isoproterenol がこれを抑制すると云う成績²⁰⁾から考えると adrenergic alpha-receptor がグルカゴン分泌を促進し beta-receptor がこれを抑制すると云えるが, もし γ-guanidinobutyramide が beta-receptor を刺激するためにグルカゴン分泌を抑制すると仮定すると propranolol によつてグルカゴン分泌抑制が除去されてもよいと思われる. しかしわれわれの成績は逆の結果を示めている. しかも propranolol 注入中止後徐々にグルカゴンが分泌されてくるので adrenergic mechanism でこの現象を説明するには限界がある.

しかしいづれにせよ γ-guanidinobutyramide がインスリン分泌を促進しグルカゴン分泌を抑制する事実は本物質の血糖降下作用を説明するのに都合がよい.

結 語

白鼠灌流腺におよぼす arginine および γ -guanidinobutyramide 作用を検討し次の結論をえた。

1. Arginine はぶどう糖 50mg% の存在下ではインスリンおよびグルカゴンとともに1相性に分泌させる。しかしぶどう糖 150mg% の存在下ではともに2相性の分泌パターンを示めす。
2. γ -guanidinobutyramide は arginine 作用とは異なつてぶどう糖 50mg% の存在下でインスリン分泌の持続作用がみられ、propranolol 注入によつて抑制をうける。またぶどう糖 150mg% の存在下では、ぶどう糖刺激によるインスリン分泌をさらにたかめる作用がみとめられる。
3. γ -guanidinobutyramide はぶどう糖 50mg% の存在下でグルカゴン分泌を抑制する。しかし propranolol によつてこの抑制は除かれぬが propranolol 注入中止後徐々にグルカゴン分泌の増加がみとめられる。ぶどう糖 150mg% の存在下では γ -guanidinobutyramide はグルカゴン分泌を完全に抑制する。

本論文の要旨は1973年日本内分泌学会東部々会総会で発表した。

参 考 文 献

- 1) Buckle, A.L.J. & Jones, H.E. : Horm. Metab. Res. 3 : 71, (1971).
- 2) Beeson, M.F., Buckle, A.L.J. & Jones, H.E. : Horm. Metab. Res. 3 : 188, (1971).
- 3) 豊田隆謙, 佐藤信一郎, 後藤由夫 : 日内分泌誌, 47 : 830, (1972).
- 4) Aynsley-Green, A. & Alberti, K.G.M.M. : VIII Congress of the International Diabetes Federation, Excerpta Medica, 280 : 31, (1973).
- 5) Grodsky, G.M., Batts, A.A., Benett, L.L., Vcella, C., McWilliams, N.B. & Smith, D.F. : Amer. J. Physiol., 205 : 638, (1963).
- 6) 豊田隆謙, 工藤幹彦, 菊池宏明, 後藤由夫 : 糖尿病, 16 : 308, (1973).
- 7) Morgan, C.R. & Lazarow, A. : Proc. Soc. exp. Biol. Med., 110 : 29, (1962).
- 8) 豊田隆謙, 佐藤信一郎, 後藤由夫 : 臨床病理, 20 : 663, (1972).
- 9) Buchanan, K. & McCarroll, A.M. : Radioimmunoassay methods ed. by Kirkham, K.E. & Hunter, W.M. (1971), 266, Churchill, Livingstone.
- 10) Cerasi, E. & Luft, R. : Horm. Metab. Res. 2 : 246, (1970).
- 11) Basabe, J.C., Lopez, N.L., Viktora, J.K. & Wolff, F.W. : Diabetes, 20 : 457, (1971).
- 12) Malaisse, W.J., Malaisse-Lagae, F. : J. Lab. Clin. Med., 72 : 438, (1968).
- 13) Charles, M.A., Fanska, R., Schmid, F.G., Forsham, P.H. & Grodsky, G.M. : Science, 179 : 569, (1973).
- 14) Lundquist, I. : Horm. Metab. Res., 4 : 151, (1972).
- 15) Grodsky, G.M. : J. Clin. Invest., 51 : 2047, (1972).
- 16) Edgar, P., Rabinowitz, D. & Merimee, T.J. : Endocrinology, 84 : 825, (1969).
- 17) Lambert, A.E., Kanazawa, Y., Orci, L., Burr, I.M., Christensen, H.N. & Renold, A.E. : Proc. Soc. exp. Biol. Med., 137 : 377, (1971).
- 18) Turtle, J.R., Littleton, G.K. & Kipnis, D.M. : Nature (London), 213, 727, (1967).
- 19) Howell, S.L. & Montague, W. : Biophim. Biophys. Acta, 320 : 44, (1973).
- 20) Toyota, T., Sato, S., Kudo, M. & Goto, Y. : 投稿予定
- 21) Ohneda, A. Parada, E., Eisentraut, A.M. & Unger, R.H. : J. Clin. Invest., 47 : 2305, (1968).
- 22) 豊田隆謙, 佐藤信一郎, 工藤幹彦, 後藤由夫 : 糖尿病, 17 : 103, (1974).
- 23) Samols, E., Tyler, J.M. & Marks, V. : Glucagon, molecular physiology, clinical and therapeutic implications, ed. by Lefebvre, J. & Unger, R.H., (1972), 151, Pergamon Press Oxford.
- 24) Samols, E., Tyler, J.M. & Marks, V. : Glucagon, molecular physiology, clinical and therapeutic implications, ed. by Lefebvre, J. & Unger, R.H., (1972), 151, Pergamon Press Oxford.