Somatostatinによるインスリン分泌抑制に 与える Ca^{++} 及び glucagon 投与の影響

— イヌ上臍十二指腸動脈内注入法による検討 —

金沢大学医学部第二内科

白 倉 教 臣, 吉 光 康 平, 相 良 宝 作, 岸 谷 正 雄
坂 戸 俊 一, 川 東 正 範, 中 林 肇, 竹 田 亮 祐

The Effect of the Intrapancreatic Calcium and Glucagon Administration
on the Somatostatin-Induced Inhibition
of Insulin and Glucagon Secretion in Dogs

Noriomi USUKURA, Kohei YOSHIMITSU, Hosaku SAGARA,
Masao KISHITANI, Schunichi SAKATO, Masanori KAWATO,
Hajime NAKABAYASHI and Ryoyu TAKEDA

The Second Department of Internal Medicine,
School of Medicine, University of Kanazawa,
Kanazawa, Japan

We made a study to determine if calcium and glucagon have an effect on insulin secretion, which is inhibited by somatostatin in normal dogs.

After an over-night fast, six mongrel dogs weighing 15 to 32 kg were anesthetized with an intravenous administration of sodium pentobarbital.

Calcium ($0.8 \text{ mg/kg.b.w. of } \text{CaCl}_2$) and glucagon (10^{-1} mg) were injected into the superior pancreaticoduodenal artery under the infusion of saline (1 ml/min) or cyclic somatostatin ($50 \mu\text{g bolus plus } 5 \mu\text{g/ml/min}$) through the pancreatic artery in 6 normal anesthetized dogs. Levels of plasma immunoreactive insulin (IRI) and glucagon (IRG) were estimated in the pancreatic vein and femoral artery by using the double antibody method and canine insulin standard and by employing anti-glucagon antibody AJ 15 (which cross-reacted with glucagon-like immunoreactivity) and the method of dextran-coated charcoal. The saline and somatostatin infusions were conducted on the same dog at 20 minute intervals. Blood samples were collected from the pancreatic vein every 5 seconds for 2 minutes and thereafter every 1 min until 5 minutes had elapsed and from the femoral artery every 1 min.

The results were the following: 1. The calcium levels of the pancreatic vein increased from 4 to more than 8 mEq/L within one minute, whereas those of the femoral artery did not change significantly. 2. Under the saline infusion, CaCl_2 evoked a sharp rise in the

pancreatic venous IRI levels which started 25 seconds after the injection, rose to a peak of thirteen folds from baseline at 40 seconds and lasted for almost 2 minutes, whereas under the somatostatin infusion, the peak level was reached at 55 seconds and affected only one third of those under the saline infusion. 3. IRI levels in the pancreatic vein under the saline infusion did not show any significant changes after the CaCl₂ injection and were higher than those under the somatostatin infusion at all points. 4. Under the somatostatin infusion, 10⁻¹ mg of glucagon did not induce any rise at all in IRI concentrations of the pancreatic vein. But when CaCl₂ was given just before the glucagon administration, a slight but significant rise in IRI was observed.

It is concluded that, in vivo, calcium has an insulin secretory effect under a normoglycemic state, and that somatostatin has an inhibitory action on both calcium- and cyclic-AMP-mediated insulin release.

緒 言

Brazeau ら⁽¹⁾により発見, 合成されたgrowth hormone release inhibiting hormone (以下 somatostatin と記す)は, 生体内で脳, 甲状腺, 消化管, 膵など広汎な部位に存在し, かつ外因性に投与された合成 somatostatin の作用からすると, 下垂体ホルモン (GH, TSH⁽²⁾)ばかりでなく膵⁽³⁾, 消化管ホルモン⁽⁴⁾⁽⁵⁾の分泌をも抑制する性質をもつことが明らかにされている。一方, 膵インスリン分泌過程にはCa⁺⁺の存在が必要であることもよく知られており, somatostatin がCa⁺⁺によるインスリン分泌機構に阻止の効果を発揮することがin vitro, あるいはラット膵灌流実験で示されているが, その抑制機序の詳細については多くの議論があり, いまだ一致した見解がない。膵動脈内への直接注入法によって, 上述の問題を検討した報告はないので, 今回我々はイヌを用いたin vivoでの膵動・静脈循環実験系を用いて, somatostatin の膵インスリン分泌に与える影響とCa⁺⁺の役割について検討を加えたので報告する。

実験対象および方法

対象として雑種成犬 (15~32kg, 平均26kg) 6頭を用いて, 12~16時間絶食後pentobarbital 静脈内麻酔下に開腹し, Kanazawa ら⁽⁶⁾の方法に準じて既往⁽⁷⁾の如く, 上膵十二指腸動脈分枝内へカテーテルを挿入し, また上膵十二指腸静脈内へ体外静脈循環作成のためのカテーテルを挿入した。さらに, 大腿動脈内にも採血用のカテーテルを留置した。

実験は同一犬を用いて行ない, (1)生食水投与下でのCaCl₂投与の効果およびsomatostatin投与下でのCaCl₂投与の効果, (2)somatostatin投与下でのCaCl₂+glucagon投与の効果について検討した (Fig. -1)。即ち, 生食水, somatostatin はそれぞれ装着された上膵十二指腸動脈カテーテルより注入し, とくにsomatostatinは50μg/ml, 1mlを瞬時に注入し引き続き5μg/ml/min. の速度で持続注入器を用いて注入した。生食水またはsomatostatin投与開始後5分でCaCl₂ (0.8 mg/kg), ないしCaCl₂ (0.8mg/kg) に続いてglucagon 10⁻¹ mg/ml を同様に瞬時に上膵十二指腸動脈カテーテルより注入し, さらに引き続き生食水またはsomatostatinを持続注入した。

採血は上膵十二指腸静脈カテーテルより行ない, 生食水またはsomatostatin投与後に前採血を行なったのち, 5分後にCaCl₂またはCaCl₂+glucagonを投与し, 2分間は5秒間隔で連続採血し, 以後1分毎に5分まで採血した。大腿動脈からは1分間隔で採血した。また, somatostatin投与下でのglucagon 10⁻¹ mg, 1mlの単独投与の実験は別の雑種犬 (15~31kg, 平均23kg) 5頭を用いて全く同様の方法で行なった。

Fig. 1. Experimental protocol.

血中インスリン (IRI) はイヌ標準インスリンを標品に用いた2抗体法にて, 血中グルカゴン (IRG)は抗体 AJ 15 (non-specific antibody, 東大金東博士提供)を用いる dextran-coated charcoal 法にて分離を行なうラジオイムノアッセイ法にて測定した。また, 血糖は glucose oxidase 法, 血清Caは O. C. P. C. 法で測定した。統計学的な有意差検定は paired t test で行なった。

Fig. 2. The effects of intrapancreatic CaCl_2 and somatostatin infusion on the pancreatic venous plasma insulin levels in normal dogs.

成 績

(1) CaCl₂ による膵内分泌への影響と somatostatin 投与の効果 (Fig. 2, 3, 4, 5)

CaCl₂ 投与による膵静脈血の IRI の変化は Fig. 2 に示す如く, 生食水投与下では CaCl₂ 投与後40秒で著明な IRI 分泌反応がみられたが, somatostatin 投与下では55秒に頂値をみとめ, しかもその値は生食水投与下の頂値の約 1/3 に減少しており, 各時点でいずれも生食水投与下の IRI 値に比べて有意の低下を示していた ($P < 0.05$).

Fig. 3. The effects of intrapancreatic CaCl₂ and somatostatin infusion on the pancreatic venous plasma glucagon levels in normal dogs.

Fig. 4. The effects of intrapancreatic CaCl₂ and somatostatin infusion on the femoral arterial plasma insulin and glucagon levels in normal dogs.

Fig. 5. The effects of intrapancreatic CaCl_2 and somatostatin infusion on serum Ca and plasma glucose levels in normal dogs.

Fig. 6. The effects of intrapancreatic saline infusion with or without glucagon (A), and of intrapancreatic somatostatin and glucagon infusion with or without CaCl_2 (B) on the pancreatic venous plasma insulin levels in normal dogs.

一方、IRGはFig. 3の如く、 CaCl_2 投与後とくに変化せず、また somatostatin 投与下では抑制傾向を示したものの大きな変動をみとめなかった。

大腿動脈血における変化をみると、somatostatin 投与後の IRI は生食水投与下のそれよりも有意に低値を示していたが、IRG についてはこの傾向はみられなかった (Fig. 4)。

次に、 CaCl_2 投与下の脾静脈血中の Ca 値は Fig. 5 の如く、投与 1 分後に頂値に達したが、大腿動脈血中 Ca 値には変化をみとめなかった。このことは、局所的な Ca 値の変動を惹起したことを示している。

(2) CaCl_2 と glucagon によるインスリン分泌に与える somatostatin 投与の効果 (Fig. 6)

次に脾動脈内 somatostatin 投与下で CaCl_2 瞬時注入に引き続いて、glucagon 10^{-1} mg, 1 ml を追加投与

した場合の効果を見てみると (Fig. 6 B), CaCl_2 単独投与時 (Fig. 2) と同程度の弱いインスリン分泌反応がみられた。しかし, 別の対照犬で脾動脈内 somatostatin 投与下に glucagon 10^{-1} mg, 1 ml を単独投与した場合には (Fig. 6 B), インスリン分泌は脾動脈内生食水投与下での glucagon 10^{-1} mg, 1 ml 投与時のそれ (Fig. 6 A) にくらべ完全に抑制され前値からむしろさらに低下する傾向をみた。

考 按

今回イヌを用いて行なった somatostatin および Ca^{++} の膵内分泌に与える影響について検討した実験成績を要約すると次のようである。(1) 生食水投与下に CaCl_2 (0.8 mg/kg) を上臍十二指腸動脈より直接膵内へ注入することにより, 膵の局所的な Ca 上昇と考えられる同静脈内 Ca 値を増加せしめ, CaCl_2 投与 1 分以内に強い IRI 分泌反応を惹起させることが出来た。(2) この CaCl_2 (0.8 mg/kg) による IRI 分泌反応は, $50 \mu\text{g/ml} + 5 \mu\text{g/ml/min.}$ の somatostatin 投与下では著しく抑制され, 生食水投与下の反応に比し約 1/2 に低下した。(3) glucagon 10^{-1} mg によるインスリン分泌刺激作用は本実験条件下の somatostatin 投与で完全に抑制され, CaCl_2 投与直後に同量の glucagon を投与しても, CaCl_2 単独投与時と同程度のインスリン反応がみられるだけで, 少なくとも両者の刺激が相加された過剰反応はみとめられなかった。

次に以上の成績を中心にして考察を加えてみたい。

まず上臍十二指腸動脈を介して CaCl_2 を直接膵内へ注入し, 膵における局所的な Ca 値を上昇させると投与 1 分以内に強い IRI 分泌反応が惹起された。この Ca^{++} の膵内分泌とくに膵インスリン分泌における役割については, 既に 1966 年 Grodsky ら⁽⁸⁾ によりはじめて報告され, Ca^{++} はインスリン分泌機序に Mg^{++} よりも重要であることが指摘された。その後この Ca^{++} の役割に関し Ca^{++} 自身はインスリン分泌を起こさず, ブドウ糖やトルブタマイドによるインスリン刺激機序に Ca^{++} が必要であるという考え⁽⁹⁾ が出されている。しかし, Kuzuya ら⁽¹⁰⁾ は, 同じようにイヌ脾動脈より直接 CaCl_2 を投与して脾静脈血中インスリン反応をみとめた事実から, Ca^{++} そのものがインスリン分泌作用を有すると報告しており, 我々の実験成績もこれを支持している。

膵グルカゴン分泌と Ca^{++} との関係については, 新生ラット膵の単層培養法で膜の Ca イオン透過性を促進させる Ca ionophore A 23187 を用いた実験で, Ca^{++} の上昇は IRG の上昇をみとめるが, 過剰な Ca^{++} の上昇は IRG 分泌に抑制的に働くという成績⁽¹¹⁾ が示されており, 一方, ラット膵灌流 in vitro の実験⁽¹²⁾ では, むしろ Ca^{++} の減少が IRG 分泌を起こすという。さらに, Iversen⁽¹³⁾ は Ca^{++} は IRI 分泌と同様に IRG 分泌にも必須のものであるとしている。今回の我々の成績では, 脾静脈血中の Ca 値の上昇がみられたにもかかわらず IRG 分泌は認められなかった。

次に, 我々の用いた somatostatin 投与下での Ca^{++} によるインスリン分泌反応は, 生食水投与下のそれに比べて約 1/2 に減少していた。既に我々が報告した⁽¹⁴⁾ ように同量の somatostatin を基礎状態で投与した場合には, IRI, IRG 分泌はともに強く抑制された。glucagon は cyclic-AMP を介してインスリン分泌を増加させることが知られているが, このインスリン分泌作用は本実験条件下では somatostatin によって完全に抑制されており, CaCl_2 投与に引き続いて glucagon を投与してもインスリン分泌に対する期待される両者の協調作用は認められず, somatostatin によるインスリン分泌抑制機序には cyclic-AMP 系と Ca^{++} の両者を介している可能性を示唆している。この点, 1974 年 Curry & Bunnett⁽¹⁵⁾ は, ラット膵灌流を用いる実験系で Ca^{++} 濃度を上げることにより, somatostatin による膵インスリン分泌抑制効果は解除されたとしている。さらに, Bhathena ら⁽¹⁶⁾ はラット単離ラ島細胞を用いてラ島内への ^{45}Ca uptake に与える somatostatin の影響を検討し, ラ島内への ^{45}Ca uptake の抑制がみられたことから somatostatin は Ca^{++} のラ島内へのとりこみ作用に影響を与えインスリン分泌を抑えると報告した。また, Wollheim ら⁽¹⁷⁾ は新生ラット膵の単層培養で細胞膜を通して Ca^{++} をとりこむ作用のある ionophore A 23187 を用いて実験を行ない, 細胞内 Ca^{++} を上

昇させてみても somatostatin のインスリン分泌抑制効果がみられることから, somatostatin の作用機点はおそらく B-細胞のインスリン分泌過程の late step にあるのだらうと推定している。一方, Efendic ら⁽¹⁸⁾は somatostatin 投与により単離ラ島への³H-cyclic-AMP の蓄積は減少するので, somatostatin のインスリン分泌抑制効果は細胞内の nucleotide の減少によるものと考察している。この考え方に対して, Gerich ら⁽¹⁹⁾はラット灌流腺を用いた実験で, somatostatin は細胞内 cyclic-AMP 系賦活を介する isoproterenol や theophylline のインスリンおよびグルカゴン分泌にも影響を与えることから, somatostatin の作用は cyclic-AMP レベルの変化を介するよりはむしろ cyclic-AMP 依存系に影響を与え発現される可能性があるとしている。一方, Oliver⁽²⁰⁾はラット単離ラ島を用いて, somatostatin は cyclic-AMP レベルを変化させることにより, Ca^{++} のとりこみを抑制するか, ないしは分泌細胞内での Ca^{++} の移動を抑制するのかもしれないと考察している。

我々の実験条件下での somatostatin 投与下のインスリン分泌反応は, Ca^{++} 投与に引き続く glucagon 投与により B-細胞内 cyclic-AMP を上昇せしめるようにしても, Ca^{++} 単独投与の場合と差を示さなかったので, むしろ Wollheim のいうように分泌過程の late step に somatostatin の作用点があるように思われる。また, somatostatin 投与下に glucagon 投与を行なうと早期にインスリン分泌の低下がみられたが, 外因性に与えた glucagon で内因性 somatostatin が分泌されるという報告⁽²¹⁾もみられるので, 外因性 glucagon により刺激された somatostatin によって更に IRI 分泌抑制が加わった可能性も否定出来ない。

最後に我々の成績で, somatostatin 投与下の大腿動脈血中 IRG 抑制が十分にみられなかった点は, IRG 測定が膵グルカゴンに specific でない非特異抗体を用いて行なわれたことによるものと理解したい。

ま と め

雑種成犬を麻酔下に開腹し, 膵十二指腸静脈にカテーテルを装着して体外循環経路を作成して, 膵十二指腸動脈に直接 CaCl_2 および somatostatin を注入, 膵十二指腸静脈血の IRI, IRG, Ca および血糖を測定し, 次の結果を得た。

- (1) CaCl_2 の膵内注入によりインスリン分泌を認めた。
- (2) CaCl_2 によるインスリン分泌作用は somatostatin により明らかに抑制された。
- (3) グルカゴンによるインスリン分泌は somatostatin により完全に抑制された。しかし, Ca^{++} はこの完全抑制をある程度解除した。

これらの成績から, Ca^{++} はイヌで正常血糖のもとでインスリン分泌作用をもっている。また, somatostatin のインスリン分泌抑制作用は Ca^{++} あるいは cyclic-AMP に関与したインスリン分泌機点ではたらいっていることが示唆された。

本論文の要旨は第 6 回アジア・オセアニア内分泌学会 (1978 年 1 月, シンガポール) で口演発表した。

終りに本実験での電解質測定に御協力頂いた金沢大学医学部附属病院検査部第 1 生化学主任笹島技師および同測定室諸氏, ならびに側面の御助力を頂いたミドリ十字 KK 研究所々長須山博士に謝意を表します。

文 献

- 1) Brazeau, P., Vale, W., Burgus, R., Ling, N., Butcher, M., River, J. and Guillemin, R.: Hypothalamic Polypeptide that Inhibits the Secretion of Immunoreactive Pituitary Growth Hormone. Science 179: 77-79, 1973.
- 2) Siler, T.M., Yen, S.S.C., Vale, W. and Guillemin, R.: Inhibition by Somatostatin on the Release of TSH Induced in Man by

Thyrotropin-Releasing Factor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 38: 742–745, 1974.

3) Koerker, D.J., Ruch, W., Chideckel, E., Palmer, J., Goodner, C.J., Ensink, J. and Gale, C.C.: Somatostatin: Hypothalamic Inhibitor of the Endocrine Pancreas. *Science* 184: 482–485, 1974.

4) Bloom, S.R., Mortimer, C.H., Thrner, M.O., Besser, G.M., Hall, R., Gomez-Pan, A., Roy, V.M., Russel, R.C.G., Coy, D.H., Kastin, A.J. and Schally, A.V.: Inhibition of Gastrin and Gastric-acid Secretion by Growth-Hormone Release-Inhibiting Hormone. *Lancet* 2: 1106–1109, 1974.

5) Gomez-Pan, A., Reed, J.D., Albinus, M., Shaw, B., Hall, R., Besser, G.M., Coy, D.H., Kastin, A.J. and Schally, A.V.: Direct Inhibition of Gastric-acid and Pepsin Secretion by Growth-Hormone Release-Inhibiting Hormone in Cats. *Lancet* 1: 888–890, 1975.

6) Kanazawa, Y., Kuzuya, T., Ide, T. and Kosaka, K.: Plasma insulin response to glucose in femoral, hepatic and pancreatic veins in dogs. *Am. J. Physiol.* 211: 442–448, 1966.

7) 中林 肇, 吉光康平, 岸谷正雄, 上田 操, 川東正範, 白倉教臣, 竹田亮祐: Somatostatin の膵内分泌に及ぼす影響 — イヌ上臍動脈内注入法による検討 — *日本内分泌学会雑誌* 52: 218–226, 1976.

8) Grodsky, G.M. and Bennett, L.L.: Cation requirements for insulin secretion in isolated perfused pancreas. *Diabetes* 15: 910–913, 1966.

9) Curry, D.L., Bennett, L.L. and Grodsky, G.M.: Requirement for calcium ion in insulin secretion by the perfused rat pancreas. *Am. J. Physiol.* 214: 174–178, 1968.

10) Kuzuya, T., Kajinuma, H. and Ide, T.: Effect of Intra-pancreatic Injection of Potassium and Calcium on Insulin and Glucagon Secretion in Dogs. *Diabetes* 23: 55–60, 1974.

11) Wollheim, B.C., Blondel, B., Renold, A.E. and Sharp, G.W.G.: Calcium Induced Glucagon Release in Monolayer Culture of the Endocrine Pancreas. Studies with Ionophore A 23187. *Diabetologia* 12: 287–294, 1976.

12) Devis, G., Somers, G. and Malaisse, W.J.: Dynamics of Calcium-Induced Insulin Release. *Diabetologia* 13: 531–536, 1977.

13) Iversen, J. and Hermansen, K.: Calcium, Glucose and Glucagon Release. *Diabetologia* 13: 297–303, 1977.

14) 白倉教臣, 吉光康平, 岸谷正雄, 川東正範, 中林 肇, 竹田亮祐: Somatostatin 投与早期の膵内分泌におよぼす影響 — 犬上臍動脈内注入法による検討 — *日本内分泌学会雑誌* 52: 417, 1976.

15) Curry, D.L. and Bennett, L.L.: Reversal of Somatostatin Inhibition of Insulin Secretion by Calcium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60: 1015–1019, 1974.

16) Bhathena, S.J., Perrino, P.V., Voyles, N.R., Smith, S.S., Wilkins, S.D., Coy, D.H., Schally, A.V. and Recant, L.: Reversal of Somatostatin Inhibition of Insulin and Glucagon Secretion. *Diabetes* 25: 1031–1040, 1976.

17) Wollheim, C.B., Blondel, B., Renold, A.E. and Sharp, G.W.G.: Somatostatin Inhibition of Pancreatic Glucagon Release from Monolayer Cultures and Interactions with Calcium. *Endocrinology* 101: 911–919, 1977.

18) Efendic, S., Grill, V. and Luft, R.: Inhibition by Somatostatin of Glucose Induced 3': 5'-Monophosphate (cyclic AMP) Accumulation and Insulin Release in Isolated Pancreatic Islets of the Rat. *FEBS letters* 55: 131–133, 1975.

19) Gerich, J.E., Lovinger, R. and Grodsky, G.M.: Inhibition by Somatostatin of Glucagon and Insulin Release from the Perfused Rat Pancreas in Response to Arginine, Isoproterenol and Theophylline: Evidence for a Preferential Effect on Glucagon Secretion. *Endocrinology*

- 96: 749–754, 1975. 20) Oliver, J.R.: Inhibition of Calcium Uptake by Somatostatin in Isolated Rat Islets of Langerhans. *Endocrinology* 99: 910–913, 1976.
- 21) Patton, G.S., Ipp, E., Dobbs, R.E., Orci, L., Vale, W. and Unger, R.H.: Pancreatic immunoreactive somatostatin release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 2140–2148, 1977.