新生児ラット膵単層培養B細胞の灌流

—— 2-Deoxy-2-fluoroglucose の効果 ——

兵庫医科大学病院

中央臨床検査部

若 林 茂, 香 川 昌 平

中 尾 啓 子, 松 岡 瑛

Perfusion of Monolayer-Cultured B Cells of Neonatal Rat Pancreases
— Effect of 2-Deoxy-2-Fluoroglucose —

**Shigeru WAKABAYASHI, Shohei KAGAWA,
Keiko NAKAO and Akira MATSUOKA**

Department of Clinical Pathology and Clinical Laboratory,
Hyogo College of Medicine,
Nishinomiya, Japan

The effects of 2-deoxy-2-fluoroglucose in promoting the function of neonatal rat pancreatic B cells *in vitro* are presented. Functional studies of insulin secretion were carried out by perfusion procedures. At day 0 of culture, B cells showed a minimal monophasic insulin secretion in response to a 16.7 mM single dose of glucose, whereas in the presence of 10 μ M forskolin or 1 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, the same dose of glucose stimulated insulin secretion in a biphasic fashion. In contrast, after 7 days of culture in medium supplemented with 1 mM 2-deoxy-2-fluoroglucose, B cells showed an adult-like biphasic pattern regardless of the presence of forskolin or 3-isobutyl-1-methylxanthine. In addition, the stimulatory effect of either leucine or 2-ketoisocaproate was also significantly increased, when compared to that of B cells at day 0. Furthermore, when exposed to a linear gradient stimulation by glucose, these competent B cells secreted insulin in a dose-dependent fashion.

Moreover, in cultures supplemented with 2-deoxy-2-fluoroglucose the basal or stimulating levels of cAMP were about 20-fold higher than at day 0.

In conclusion, the data presented here demonstrate that the function of neonatal B cells matures during culture, and suggest that this effect of 2-deoxy-2-fluoroglucose may be mediated by activation of either adenylate cyclase or catabolic enzymes of amino acids in B cells.

I 緒 言

新生児ラット膵内分泌細胞の単層培養に際し, 酵素処理によって単離した膵細胞は培養中に再凝

集し、島状の内分泌細胞集団を形成する。この培養系では、内分泌細胞間の本来の相互関係が比較的保持された状態で培養可能とされ、また、in vivo実験において不可避な個体差・飼育環境から生ずる実験誤差を最小限に抑えることができる等の利点を有し、新生児ラット膵単層培養は内分泌細胞の機能・形態研究に少なからぬ役割を果たしてきた。しかし、この初代培養系における線維芽細胞の旺盛な増殖は、培養環境を悪化させ、膵島細胞の萎縮・機能低下をもたらし、比較的長期にわたる培養細胞の生活動態の研究を困難なものにしている。したがって、この培養系からの線維芽細胞の除去は、内分泌細胞研究のKey stepであり、これまで数多くの研究者によって種々の考案がなされてきた⁷⁾。

著者らは、2-deoxyglucose^{29,39)}、2-deoxy-2-fluoroglucose³⁵⁾³⁷⁾⁴⁰⁾、3-amino-3-deoxyglucose³³⁾およびiodoacetic acid³⁰⁾等の培養液への添加が、線維芽細胞の選択的除去並びにB細胞の生存・機能維持に有益であることを静置実験の成績より明らかにした。静置実験法は、インスリン分泌機能の定量的な解析に有用であるが、インスリン分泌応答が単一相ではなく、多相的・動的性格を有しているために、2-deoxyglucose等の添加培養の際にみられるB細胞機能変化を静置実験の結果からのみ評価し、結論を引き出すには限界がある。著者らは、B細胞のglucose等各種栄養物質刺激に対するインスリン分泌応答の培養期間中における推移を更に明らかにする目的で新生児ラット膵単層培養B細胞の灌流実験を実施し、その分泌応答を動的に把握し検討を加えた。

II 実験材料および方法

1. 試薬

Collagenase (type I), 2-ketoisocaproate (KICA), calf thymus DNAはSigma, trypsin (1:250)はDifco, 2-deoxy-2-fluoroglucose, forskolinはCalbiochem-Behring, 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)はAldrich, TCM 199 (glucose 不含)は日水製薬, 牛胎児血清 (FBS)はFlow, ラット・インスリンはNovoよりそれぞれ購入した。また、インスリン・アッセイ・キットはグイナボット, cAMPアッセイ・キットはヤマサ醤油より購入した。Glucose, leucineおよびその他の試薬は和光純薬の製品を使用した。

2. 新生児ラット膵島細胞の単層培養

生後3～4日のSD系ラット膵より摘出した膵組織を、Lambert et al.¹⁹⁾の方法に従いcollagenaseとtrypsinによる酵素消化を施し、採取した単離細胞をglucose 16.7 mM, FBS 10%を含むTCM 199により培養した²⁵⁾。培養20時間後、組織培養用プラスチックシート (Lux, 43×50 mm:灌流実験用)およびプラスチック培養容器 (Falcon, #3001:cAMP測定用)に細胞を 1×10^6 cells/mlの密度で植え換え、同じ組成の培養液を用いて24時間培養した (Day 0)。次いで、glucose 5.5 mMあるいはglucose 5.5 mM + 2-deoxy-2-fluoroglucose 1 mMを含むTCM 199にて7日間培養を継続した (Day 7)。尚、培養液は灌流実験に供する迄に2～3度交換した。

3. 灌流実験

灌流実験はKawazu et al.¹⁶⁾の方法に従って実施した。培養細胞を含むプラスチックシート2枚を直径3.5 cmの円形ホールをもつ肉厚3.5 mmのシリコンラバー・ガasketの両側にセットし、2枚の金属板で固定した灌流チャンバーを作製した。この灌流チャンバーを37℃のインキュベーターに収め、2本のテフロン製細管 (内径1 mm)の一方からglucose-free, FBS 0.5%を含むTCM 199を20分間導入し灌流システムを安定化させた後、種々インスリン刺激物質を含むTCM 199を30

分間導入し本灌流を行った。次いで、再び前灌流液に戻して20分間の後灌流を行った。また、0.33 mM/minの濃度勾配をもつglucoseによる50分間の灌流を併せて行った。灌流速度は0.5 ml/minに設定し、灌流液は2分毎にフラクションコレクターにて分画採取した。また灌流サンプルは測定直前まで -20°C に保存し、インスリン濃度はラット・インスリンを標準としてRIA ビーズ固相法により測定した。

4. cAMP放出および細胞内cAMP量の測定

培養細胞を刺激物質を含まない1 mlのTCM 199で30分間プレ・インキュベーション後、 $10\mu\text{M}$ forskolin, 1 mM IBMX 存在・非存在下で、glucose 16.7 mMを含むTCM 199 1 mlを加え、30分間、 37°C でインキュベーションした。反応終了後、直ちに培養液を採取する一方、培養容器に6%トリクロロ酢酸1.2 mlを加え、水飽和エチルエーテルで数回洗浄を繰り返した後、凍結乾燥した。cAMPサンプルは -20°C で保存し、cAMPアッセイ・キット(RIA法)を用いて測定した。cAMP量は、それぞれの細胞内DNA量により補正した。

Fig. 1. Time course of insulin release with a square-wave glucose stimulation.

Monolayer islet cells at culture day 0 (A) or those that had been cultured for 7 days with 5.5 mM glucose supplemented with 1 mM 2-deoxy-2-fluoroglucose (B) were exposed to stimulants for 30 min after the first 20-min perfusion with nonstimulatory medium. Each point is the mean $\pm$ SEM of 6~26 experiments shown in the figure. [$\bullet$ ----- $\bullet$ 0 mM glucose, $\bullet$ — $\bullet$ 16.7 mM glucose, $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ 16.7 mM glucose + 10 μM forskolin, $\circ$ — $\circ$ 16.7 mM glucose + 1 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine]

Fig. 2. Time course of insulin release with a linear gradient glucose stimulation and dose-response curve for insulin release.

Monolayer islet cells that had been cultured in medium with 5.5 mM glucose supplemented with 1 mM 2-deoxy-2-fluoroglucose for 7 days (A) were exposed to a 0~15 mM glucose linear gradient. The dose-response curve was estimated from the data in Fig. 2A (Fig. 2B). Each point shows the mean $\pm$ SEM of 5 experiments.

5. DNAの測定

培養細胞のDNA量は、Fujimoto et al.のmicrofluorometric法により、calf thymus DNAを標準として測定した⁶⁾。

6. 統計学的処理

実験成績はすべて、平均値 $\pm$ 標準誤差により表現し、各実験グループ間の有意差検定はStudent t-testにより行った。

III 成 績

1. 灌流実験

(1) 2-Deoxy-2-fluoroglucose添加培養B細胞のインスリン分泌動態

a) Glucoseの効果： 前灌流開始直後にみられる高いインスリン分泌は、本灌流開始前には約1 ng/mlにまで低下し、以後50分間の刺激物質を含まない灌流期間のインスリン濃度は、0.5~1.0 ng/mlの基礎分泌レベルを維持した。尚、この灌流初期の高いインスリン値は、灌流液を充滿する操作並びに損傷を受けた細胞から遊出したプロテアーゼによる $[^{125}\text{I}]$ インスリン分解等起因する人為的なものである^{16) 17)}。

Day 0 の培養B細胞は, glucose 16.7 mM による灌流開始後 4 分に 2.6 ng/ml の頂値を有し, 10 分以内に終了する一過性のインスリン分泌を示すにすぎず, 後期相分泌は認められなかった。一方, 2-deoxy-2-fluoroglucose 添加培養した Day 7 の培養B細胞は, 持続的なプラトー様後期相分泌を伴ったインスリン分泌動態を示した。この培養B細胞からの初期相並びに後期相分泌については明確に区別されず, 刺激開始後 4 分頃からインスリン分泌は急激に増大し, 10~30 分の後期相分泌期間に 8.2~11.2 ng/ml の高値を維持した。また, forskolin あるいは IBMX は, それぞれ 10 μ M, 1 mM の添加濃度で Day 0 の培養細胞から glucose 刺激に対応するインスリン分泌を促進し, 約 4 ng/ml の安定したレベルの後期相分泌を誘起した。しかしながら, 2-deoxy-2-fluoroglucose 添加培養B細胞においては, forskolin の添加は glucose による後期相分泌を有意に増大させたが, IBMX は glucose 刺激効果に影響を与えなかった (Figs. 1 A, 1 B)。

灌流液の glucose 濃度を 0~18 mM まで直線的に変化させた濃度勾配刺激に対し, Day 7 の 2-deoxy-2-fluoroglucose 添加培養細胞は刺激開始後 16~18 分頃よりインスリン分泌応答を開始し, 40 分後に頂値に達した (Fig. 2 A)。この結果から作成した glucose—インスリンの用量反応曲線は S 字状を呈し, “Km” 値は 8 mM-glucose と算出された (Fig. 2 B)。

Fig. 3. Time course of insulin release with a square-wave stimulation by leucine or 2-ketoisocaproate (KICA).

Monolayer islet cells at culture day 0 (A) or those that had been cultured for 7 days with 5.5 mM glucose supplemented with 1 mM 2-deoxy-2-fluoroglucose (B) were exposed to stimulants for 30 min after the first 20-min perfusion with nonstimulatory medium. Each point is the mean $\pm$ SEM of 5~7 experiments shown in the figure. [●—● 10 mM leucine, ○—○ 10 mM 2-ketoisocaproate (KICA)]

b) **Leucine および 2-ketoisocaproate の効果：** Leucine 10 mM および KICA 10 mM による Day 0 の培養細胞のインスリン分泌応答は，基礎分泌レベルを微かに増大させるにすぎなかった。しかし，2-deoxy-2-fluoroglucose 添加培養した Day 7 の B 細胞は，leucine, KICA のいずれの刺激に対しても後期相の著明に増大した分泌動態を示した。特に leucine による後期相分泌の増大は顕著であり，最大値は Day 0 の10倍以上に達した。同様に KICA の最大刺激効果も Day 0 の4～5 倍の増加を示した (Figs. 3 A, 3 B)。

(2) Glucose 単独培養 B 細胞のインスリン分泌動態

a) **Glucose の効果：** 7 日間 glucose 5.5 mM 単独培養した B 細胞は，glucose 16.7 mM 刺激に対する分泌応答性を殆んど消失していた。しかし，forskolin あるいは IBMX の添加は後期相分泌を増大させた (Fig. 4 A)。

b) **Leucine および 2-ketoisocaproate の効果：** Glucose 単独培養 B 細胞の Day 7 における leucine 10 mM および KICA 10 mM 刺激によるインスリン分泌応答は，Day 0 の培養 B 細胞におけるのと同程度の低い分泌レベルを示すにすぎなかった (Fig. 4 B)。

Fig. 4. Time course of insulin release with a square-wave stimulation by glucose, leucine or 2-ketoisocaproate (KICA).

Monolayer islet cells that had been cultured for 7 days with 5.5 mM glucose alone were exposed to 16.7 mM glucose (A), and leucine or 2-ketoisocaproate at 10 mM (B) for 30 min after the first 20-min perfusion with nonstimulatory medium. Each point is the mean $\pm$ SEM of 3~14 experiments shown in the figure. [A: $\bullet$ — $\bullet$ 16.7 mM glucose, $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ 16.7 mM glucose + 10 μ M forskolin, $\circ$ — $\circ$ 16.7 mM glucose + 1 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine; B: $\cdots$ — $\bullet$ no stimulus, $\bullet$ — $\bullet$ 10 mM leucine, $\circ$ — $\circ$ 10 mM 2-ketoisocaproate (KICA)]

2. cAMP 放出および細胞内 cAMP 量

Day 0 の培養細胞では，1 mM IBMX，10 μ M forskolin 存在下での glucose 16.7 mM 刺激による cAMP 放出は，glucose 16.7 mM 単独刺激の9.7，34.1倍に増大した。一方，2-deoxy-2-fluoroglucose 添加培養した B 細胞の glucose 16.7 mM 存在下での cAMP 放出は，Day 0 の25.2倍の高値を示し，また，この cAMP 放出は IBMX, forskolin の添加によって8.4，41.2倍に増大した。細胞内

cAMP 量については, Day 0 と 2-deoxy-2-fluoroglucose 添加培養 B 細胞 (Day 7) の間に大きな差異はないが, IBMX, forskolin 存在下において前者では 14.8, 45.0 倍に, 後者では 13.5, 37.3 倍と, それぞれ細胞内 cAMP 量の著明な増大が認められた (Table 1)。

Table 1. Effect of 2-deoxy-2-fluoroglucose on the recovery of cAMP in cells and incubation medium.

Stimulus (mM)	cAMP release (fmol/ μ g DNA /30 min)		cAMP content (fmol/ μ g DNA)	
	day 0	day 7	day 0	day 7
Glc 0	55.6 $\pm$ 3.1	1103.1 $\pm$ 204.7	253.4 $\pm$ 14.5	334.7 $\pm$ 29.8
Glc 16.7	68.2 $\pm$ 15.3	1721.3 $\pm$ 89.7	252.9 $\pm$ 12.7	354.1 $\pm$ 6.9
Glc 16.7 + forskolin 0.01	2328.4 $\pm$ 57.7*	70899.0 $\pm$ 8359.9*	11383.8 $\pm$ 1387.0*	13210.1 $\pm$ 1008.5*
Glc 16.7 + IBMX 1.0	664.6 $\pm$ 45.6*	14459.8 $\pm$ 1090.8*	3735.5 $\pm$ 336.1*	4778.0 $\pm$ 487.2*

The results are shown as the mean $\pm$ SEM of 6 experiments.

*, $p < 0.001$ (against each stimulating level induced with 16.7 mM glucose at culture day 0 or day 7).

The culture DNA contents were $6.03 \pm 0.20 \mu\text{g/culture}$ ($n=6$) and $1.44 \pm 0.17 \mu\text{g/culture}$ ($n=6$) at day 0 and day 7, respectively.

IV 考 察

本研究において, 著者らは灌流実験によって培養膵 B 細胞の機能変化をより正確に捉え, 未成熟な分泌機能を示す B 細胞が 2-deoxy-2-fluoroglucose の添加培養によって成熟ラット膵島に類似した二相性の分泌応答能を獲得していることを実証した。新生児膵の低反応性インスリン分泌は, 静置実験同様, 膵単層培養細胞の灌流実験においても確認され, 細胞形態, in vivo あるいは in vitro 等実験系の差異にかかわらず, 未成熟な膵島に特徴的なものであると考えられる^{9) 11) 13) 24)}。すなわち, 培養初期の単層培養 B 細胞に認められた glucose 刺激に対応する一相性の分泌応答は, in vivo 実験, あるいは膵組織片の灌流実験の成績とも一致した^{16) 17) 20)}。従来, 新生児膵の低反応性分泌応答については B 細胞内 cAMP 濃度および五炭糖回路の glucose 代謝の減少と関係しているものと考えられてきた^{1) 10) 37)}。特に, adenylate cyclase を直接活性化する forskolin, あるいは phosphodiesterase を阻害する IBMX の添加によって, Day 0 の B 細胞が glucose 刺激に対応して二相性分泌を示した成績は, 新生児膵 B 細胞が glucose 刺激のみではインスリン分泌を誘起し, 且つそれを持続するための有効な細胞内 cAMP 濃度を保持し得ないという従来の見解を支持するものである^{10) 38)}。同様に, Day 0 において leucine, KICA 刺激が低反応性であったことは, これら栄養物質と glucose の代謝経路が異なっていることより, 新生児 B 細胞の低反応性分泌応答については, 糖代謝のみならずアミノ酸異化の全般的低下からも併せ考えられるべきである³⁷⁾。

成熟膵島が, glucose, leucine あるいは KICA 刺激期間にスパイク様初期相と持続的な後期相からなる二相性分泌動態を示すことはよく知られている^{8) 11) 32)}。なかでも, glucose が膵島において cAMP 産生作用を有するために, glucose と cAMP の両者は不可分に結びついてインスリン分泌刺激機序の解明, また一方, 膵島培養に際してはその細胞機能および細胞形態に及ぼす有益な作用と関連させて議論されてきた²⁶⁾。Rabinovitch et al.²⁷⁾ は高濃度 glucose, IBMX あるいは Br $\cdot$ cAMP 等,

細胞内cAMP量を増大させる物質が、胎児・新生児B細胞の機能維持・増殖に有益であることを報告した。著者らも2-deoxyglucose, 2-deoxy-2-fluoroglucose添加培養B細胞の生存・機能亢進が細胞内cAMPの増大と関連している可能性を示唆した^{39) 40)}。しかしながら、胎児・新生児の未成熟な機能を成熟化に導く因子、およびその機序については現在、尚明らかではない。

本灌流実験の成績に示される様に、2-deoxy-2-fluoroglucose添加培養したDay 7のB細胞が、glucose刺激に対し二相性分泌動態を示し、成熟臍島に類似した分泌機能を獲得していることは明らかである。また、このglucose感受性は、IBMX添加による影響を受けなかった。これらの結果は、2-deoxy-2-fluoroglucose添加培養B細胞がglucose刺激に対して後期相分泌を誘起するに十分なadenylate cyclaseの活性化をはじめ、成熟臍島に特徴的な分泌機構を備えていることを示唆している。特にcAMPの関与は、Day 7の培養細胞のglucose 16.7mM刺激下でのcAMP放出が、Day 0のIBMX存在下でのそれと比べ2.6倍にも増大していたことによって支持される。しかし、インスリン分泌、cAMP放出あるいは細胞内cAMP量が、forskolin, IBMX存在下において、必ずしも平行関係になかったことは、インスリン分泌がcAMPのみならず他の因子によって調節されていることを示唆している。また、このcAMP濃度の上昇は、臍島細胞の再凝集および細胞の伸展にも影響を及ぼしているものと考えられる^{22) 26)}。

摂食後の栄養物質の血中濃度は、矩形的に急激な増大を示すのではなく緩徐に上昇する。このin vivoの刺激条件に類似したglucose濃度勾配刺激法は、インスリン分泌閾値や用量反応曲線を求める上で有用である^{4) 18)}。2-Deoxy-2-fluoroglucose添加培養B細胞は、glucose濃度勾配刺激に対応して用量反応的にインスリンを分泌した。インスリン分泌閾値は約4 mM-glucose、“Km”値は8 mM-glucoseを示し、この成績は成熟ラット臍島並びに2-deoxy-2-fluoroglucose添加培養細胞の静置実験の結果ともよく一致していた^{14) 21) 23) 35) 37)}。

一方、2-deoxy-2-fluoroglucose添加培養はleucine, KICA刺激に対してもglucose刺激におけるのと同様、後期相の高いインスリン分泌応答を示した。この2-deoxy-2-fluoroglucose添加培養B細胞のglutamine代謝が、leucineあるいはKICA存在下で亢進することは既に報告したが³⁷⁾、灌流実験における後期相分泌の出現とglutamine代謝の成績からみて、2-deoxy-2-fluoroglucose添加培養はB細胞のアミノ酸異化を増大させることにより、代謝エネルギーを補充し、インスリン分泌を誘起している可能性が推察される。このことは、成熟ラット臍島にみられるleucineおよびKICAのインスリン分泌刺激効果がglutamine代謝の亢進と関連しているというSener et al.²⁸⁾の考えともよく一致している。

以上述べた様に、内分泌細胞を選択的に生存させ、且つB細胞機能の成熟化を刺激する2-deoxy-2-fluoroglucoseの効果はその同族体である2-deoxyglucoseの効果と類似していた³⁸⁾。これらデオキシ糖は細胞内で糖ヌクレオチドへ変換され、糖蛋白質・糖脂質の糖鎖合成を阻害することが知られている。近年2-deoxy-2-fluoroglucoseによるFriend白血球細胞の造血能の増大²⁾、またperin-eris cultifera卵母細胞の成熟化に伴うGDP-mannoseの減少³⁾等、糖鎖の細胞分化に及ぼす効果が次第に明らかにされつつあるが、2-deoxy-2-fluoroglucoseによるB細胞機能の成熟化機構における糖蛋白質・糖脂質の関与についての検討は今後の研究課題である。

V 結 語

本研究において、著者らは灌流実験によって単層培養臍B細胞のインスリン分泌機能の変化を動

的に把握し、未成熟な低反応性分泌応答を示す新生児膵B細胞が2-deoxy-2-fluoroglucose添加培養によって、glucose, leucineおよび2-ketoisocaproate刺激に対し成熟膵様の二相性分泌応答能を獲得していることを実証した。また、glucose濃度勾配刺激法より算出した分泌閾値並びに“Km”値は静置実験から得られた成績とよく一致した。加えて、2-deoxy-2-fluoroglucose添加培養細胞のcAMP応答の増大を認めた。

本研究に用いた新生児膵単層培養細胞は、ホルモン分泌機能の研究に有用であると考えられる。

文 献

- 1) Andersson, A. and Hellerström, C.: Metabolic characteristics of isolated pancreatic islets in tissue culture. *Diabetes*, 21 (supple 2): 546–554, 1972.
- 2) Bosman, G.J. C.G.M., Boer, P. and Steyn-Parvé, E.P.: Inhibitors of protein glycosylation inhibit the differentiation of Friend erythroleukemia cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 696: 285–289, 1982.
- 3) Bulet, P., Hoflack, B., Porchet, M. and Verbert, A.: Study of the conversion of GDP-mannose into GDP-fucose in nereids: A biochemical marker of oocyte maturation. *Eur. J. Biochem.*, 144: 255–259, 1984.
- 4) Curry, D.L.: Insulin secretory dynamics in response to slow-rise and square-wave stimuli. *Am. J. Physiol.*, 221: 324–328, 1971.
- 5) De Gasparo, M., Milner, G.R., Noris, P.D. and Milner, R.D.G.: Effect of glucose and amino acids on foetal rat pancreatic growth and insulin secretion in vitro. *J. Endocr.*, 77: 241–248, 1978.
- 6) Fujimoto, W.Y., Teague, J. and Williams, R.H.: Fibroblast monolayer cultures in scintillation counting vials: Metabolic and growth experiments using radioisotopes and a microfluorometric DNA assay. *In Vitro*, 13: 237–244, 1977.
- 7) Fujimoto, W.Y.: Purification of neonatal rat pancreatic monolayer cultures for endocrine cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 162: 241–244, 1979.
- 8) Gerber, P.P.G., Trimble, E.R., Wollheim, C.B., Renold, A.E. and Miller, R.E.: Glucose and cyclic AMP as stimulators of somatostatin and insulin secretion from the isolated, perfused rat pancreas: A quantitative study. *Diabetes*, 30: 40–44, 1981.
- 9) Grill, V., Asplund, K., Hellerström, C. and Cerasi, E.: Decreased cyclic AMP and insulin response to glucose in isolated islets of neonatal rats. *Diabetes*, 24: 746–752, 1975.
- 10) Grill, V., Lake, W. and Freinkel, N.: Generalized diminution in the response to nutrients as insulin-releasing agents during the early neonatal period in the rat. *Diabetes*, 30: 56–63, 1981.
- 11) Grodsky, G.M., Batts, A.A., Bennett, L.L., Vella, C., McWilliams, N.B. and Smith, D.F.: Effects of carbohydrates on secretion of insulin from isolated rat pancreas. *Am. J. Physiol.*, 205: 638–644, 1963.
- 12) Heinze, E. and Steinke, J.: Insulin secretion during development: Response of isolated pancreatic islets of fetal, newborn and adult rats to theophylline and arginine. *Horm. Metab. Res.*, 4: 234–236, 1972.
- 13) Hellerström, C., Lewis, N.J., Borg, H., Johnson, R. and Freinkel, N.: Method for large-scale isolation of pancreatic islets by tissue culture of fetal rat pancreas. *Diabetes*, 28: 769–776, 1979.
- 14) Henquin, J.C.: Tolbutamide stimulation and inhibition of insulin release: Studies of the underlying ionic mechanism on isolated rat islets. *Diabetologia*, 18: 151–160, 1980.
- 15) Kagawa, S., Wakabayashi, S., Nakao, K., Mimura, K.

- and Matsuoka, A.: Maintenance of pancreatic endocrine cells of the neonatal rat: Part VI- Effects of medium with fructose and 2-deoxyglucose. *Ind. J. Biochem. Biophys.* (in press).
- 16) Kawazu, S., Kanazawa, Y., Ikeuchi, M., Hayashi, M. and Kosaka, K.: The dynamics of insulin release from monolayer-cultured pancreatic cells in a new perfusion system. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 156: 197–200, 1977.
- 17) Kikuchi, M., Rabinovitch, A., Blackard, W.G. and Renold, A.E.: Perfusion of pancreas fragments: A system for the study of dynamic aspects of insulin secretion. *Diabetes*, 23: 550–559, 1974.
- 18) Kobayashi, K., Ise, H., Tsumura, Y., Kagawa, S. and Matsuoka, A.: A new approach to kinetic analysis of glucose-induced insulin release by Hill's equation. *Endocrinol. Japon.*, 24: 367–373, 1977.
- 19) Lambert, A.E., Blondel, B., Kanazawa, Y., Orci, L. and Renold, A.E.: Monolayer cell culture of neonatal rat pancreas: Light microscopy and evidence for immunoreactive insulin synthesis and release. *Endocrinology*, 90: 239–248, 1972.
- 20) Lavine, R.L., Chick, W.L., Like, A.A. and Makdisi, T.W.: Glucose tolerance and insulin secretion in neonatal and adult mice. *Diabetes*, 20: 134–139, 1971.
- 21) Landgraf, R., Kotler-Brajtburg, J. and Matschinsky, F.M.: Kinetics of insulin release from the perfused rat pancreas caused by glucose, glucosamine, and galactose. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 68: 536–540, 1971.
- 22) Maes, E. and Pipeleers, D.: Effects of glucose and 3',5'-cyclic adenosine monophosphate upon reaggregation of single pancreatic B-cells. *Endocrinology*, 114: 2205–2209, 1984.
- 23) Malaisse, W.J., Sener, A., Herchuelz, A. and Hutton, J.C.: Insulin release: The fuel hypothesis. *Metabolism*, 28: 373–386, 1979.
- 24) Minz, D.H., Levey, G.S. and Schenk, A.: Adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate and phosphodiesterase activities in isolated fetal and neonatal rat pancreatic islets. *Endocrinology*, 92: 614–617, 1973.
- 25) Murakoso, K., Tsumura, Y., Nakao, K., Kagawa, S. and Matsuoka, A.: Effect of alloxan on the incorporation of D-glucose into cultured pancreatic endocrine cells of the rat. *Chem. Pharm. Bull.*, 28: 837–842, 1980.
- 26) Ohgawara, H., Carroll, R., Hofmann, C., Takahashi, C., Kikuchi, M., Labrecque, A., Hirata, Y. and Steiner, D.F.: Promotion of monolayer formation in cultured whole pancreatic islets by 3-isobutyl-1-methylxanthine. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 75: 1897–1900, 1978.
- 27) Rabinovitch, A., Quigley, C. and Rechler, M.M.: Growth hormone stimulates islet B-cell replication in neonatal rat pancreatic monolayer cultures. *Diabetes*, 32: 307–312, 1983.
- 28) Sener, A., Hutton, J.C. and Malaisse, W.J.: The stimulus-secretion coupling of amino acid – induced insulin release: Synergistic effect of L-glutamine and 2-keto acids upon insulin secretion. *Biochim. Biophys. Acta*, 677: 32–38, 1981.
- 29) Shimizu, S., Jha, B., Kagawa, S., Nakao, K., Yoshida, K., Wakabayashi, S. and Matsuoka, A.: The effect of 2-deoxy-D-glucose on insulin release by neonatal rat B cells in culture. *Endocrinol. Japon.*, 30: 255–260, 1983.
- 30) Shimizu, S., Kagawa, S., Nakao, K., Wakabayashi, S., Mimura, K. and Matsuoka, A.: Effect of iodoacetic acid on maintenance of pancreatic endocrine cells of the neonatal rat. *Endocrinol. Japon.*, 31: 253–261, 1984.
- 31) Schmidt, M.F.G., Biely, P., Kratky, Z. and Schwarz, T.: Metabolism of 2-deoxy-2-fluoro-D-[³H]glucose and 2-deoxy-

- 2-fluoro-D-[³H]mannose in yeast and chick-embryo cells. *Eur. J. Biochem.*, 87: 55–68, 1978.
- 32) Tomita, T. and Scarpelli, D.G.: Interaction of cyclic AMP and alloxan on insulin secretion in islets perfused in vitro. *Endocrinology*, 100: 1327–1333, 1977.
- 33) Wakabayashi, S., Kagawa, S., Nakao, K., Yoshida, K., Mimura, K. and Matsuoka, A.: Maintenance of pancreatic endocrine cells of the neonatal rat: Part-IV The effect of 3-amino-3-deoxyglucose. *Endocrinol. Japon.*, 31: 657–664, 1984.
- 34) Wakabayashi, S., Kagawa, S., Nakao, K., Mimura, K. and Matsuoka, A.: Maintenance of neonatal rat B cells in glucose-depleted medium: Effect of medium with galactose and 2-deoxyglucose. *J. Endocr.*, 103: 377–381, 1984.
- 35) Wakabayashi, S., Kagawa, S., Nakao, K., Mimura, K. and Matsuoka, A.: Maintenance of neonatal endocrine cells of the rat: Effect of 2-deoxy-2-fluoroglucose on the responses to glucose, leucine and 2-ketoisocaproate. *Horm. Metab. Res.*, 16: 672–673, 1984.
- 36) 若林 茂, 香川昌平, 中尾啓子, 三村幸一, 松岡 瑛: 新生児ラット膵培養B細胞の機能維持, *医学のあゆみ*, 132: 596–597, 1985.
- 37) 若林 茂, 香川昌平, 中尾啓子, 松岡 瑛: 新生児ラット膵単層培養B細胞機能の成熟に及ぼす 2-deoxy-2-Fluoroglucose の効果, *日内分泌会誌*, 61: 592–604, 1985.
- 38) 若林 茂, 香川昌平, 中尾啓子, 松岡 瑛: 2-デオキシグルコースおよびヨード酢酸による新生児ラット膵培養B細胞の機能維持に関する研究, *兵医学会誌*. (印刷中).
- 39) Yoshida, K., Kagawa, S., Murakoso, K. and Matsuoka, A.: Effect of 2-deoxy-D-glucose on maintenance in culture of neonatal B cell of rat. *In Vitro*, 20: 756–762, 1984.
- 40) Yoshida, K., Kagawa, S., Murakoso, K., Nakao, K., Shimizu, S., Wakabayashi, S., Haito, K., Tanaka, N., Jha, B. and Matsuoka, A.: Maintenance of neonatal endocrine cells of the rat: Part-I Effects of 2-deoxyglucose and 2-deoxy-2-fluoroglucose. *Horm. Metab. Res.*, 16: 120–124, 1984.
- (受付日: '85. 6. 10)