幼若ラット臍単層培養 B 細胞の灌流

— 2-Deoxy-2-fluoroglucose と iodoacetic acid の効果の比較

兵庫医科大学病院

中央臨床検査部

若 林 茂, 香 川 昌 平

山 下 啓 子, 松 岡 瑛

Perifusion of Monolayer-Cultured B Cells of the Infant Rat:
A Comparative Study of the Effects of
2-Deoxy-2-Fluoroglucose and Iodoacetic Acid

Shigeru WAKABAYASHI, Shohei KAGAWA,
Keiko YAMASHITA and Akira MATSUOKA

Department of Clinical Pathology and Clinical Laboratory,
Hyogo College of Medicine,
1-1 Mukogawa-cho, Nishinomiya, 663 Japan

Cell culture techniques for monolayer islets of 3-week-old rat pancreases and the responsiveness of B cells are described. In this procedure, whole pancreatic tissues from 3-week-old rats were enzymatically dispersed and then cultured in a medium with 5.5mM glucose plus 1mM 2-deoxy-2-fluoroglucose or with 5.5mM glucose following a 3-day exposure to a medium with 5.5mM glucose plus 5 μ M iodoacetic acid. The use of 2-deoxy-2-fluoroglucose or iodoacetic acid allowed a selective deletion of fibroblasts, yielding large clusters that consisted mostly of islet cells. The immunocytochemical evaluation of the islet cells in these cultures showed that approximately 70% are B-cells, 20% A-cells, and 10% D-cells. On day 0, the response to 16.7mM glucose included only a small rise in insulin secreted during the first and the second phase, and the response to 10mM of leucine or 2-ketoisocaproate was monophasic. After being cultured for 7 days, all three secretagogues markedly stimulated insulin secretion by B cells cultured in both media, resulting in an enhancement of the biphasic pattern. However, quantitative relationships differed. Thus, the total response from B cells in 2-deoxy-2-fluoroglucose during a 30-min stimulation with glucose and leucine was significantly higher (1.6- and 1.9-fold respectively) than that from B cells in 5.5mM glucose, although there was no significant difference in insulin secretion evoked by 2-ketoisocaproate. Furthermore, in the former B cells, the amount of insulin secreted during the second phase was 84~94% of the total insulin secretion, and in the latter it was 66~76%. Addition of 1mM 3-isobutyl-1-methylxanthine and 10 μ M forskolin resulted in a significant increase in insulin secretion by B cells in 2-deoxy-2-fluoroglucose,

whereas there was no difference in the increase of insulin secretion induced by 16.7mM glucose and 200nM 12-o-tetradecanoyl phorbol-13-acetate. In monolayer cultures that had been maintained in both media for 15 days, the second phase of insulin secretion due to the secretagogues was slightly decreased, but the biphasicity in the response was well preserved.

In conclusion, the present results suggest that B cells of 3-week-old rats may be still immature, and that the medium with 2-deoxy-2-fluoroglucose is beneficial to the continued maturation of the B-cell function in vitro.

I 緒 言

新生児膵は glucose 等栄養物質刺激に対して低応答性であり、成熟膵にみられる多相的なインスリン分泌動態を示さない⁷⁾¹¹⁾¹⁷⁾²⁸⁾。このような機能的差異にもかかわらず、新生児膵は内分泌細胞—外分泌細胞比が相対的に高く²³⁾、また接着性にも秀れていることから単層培養の実験材料として繁用され、膵 B 細胞の機能・形態について数多くの情報を提供してきた¹³⁾²⁹⁾。近年著者らは、未成熟な新生児ラット膵 B 細胞が 2-deoxy-2-fluoroglucose およびその類以物質を添加した培地で培養したとき、成熟ラット膵島様の高い分泌応答を示すことを明らかにした¹⁷⁾²⁴⁻²⁶⁾。これらの知見はインスリン分泌応答が主として出生後に成熟化するという一般的な概念を支持するものであったが、B 細胞機能の in vivo での成熟化がどの時期に達成されるかは未だ十分に明らかにされていない。

本研究において、著者らは摂食内容が大きく変化を遂げる離乳期直前の生後 3 週齢ラット膵を新生児同様酵素消化法により単個細胞に分散後、単層培養し、そのインスリン分泌動態を灌流実験により捕捉した。また、初代培養系では線維芽細胞の旺盛な増殖によって膵島細胞の生育は妨げられ³⁾、膵島細胞の長期培養が困難なため、新生児ラット膵単層培養において線維芽細胞の除去に有効であった 2-deoxy-2-fluoroglucose³¹⁾および iodoacetic acid⁴⁾²¹⁾添加培地を用いて幼若ラット膵単層培養細胞を Day15 まで培養維持した。

II 実験材料および方法

1. 試薬

Collagenase (type I), 2-ketoisocaproate (KICA), 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA) は Sigma Chemical Co., 2-deoxy-2-fluoroglucose, forskolin, β -2-aminobicyclo-(2,2,1)-heptane-2-carboxylic acid (BCH) は Calbiochem-Behring Co., 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) は半井化学薬品, trypsin (1:250) は Difco Co., TCM199 (glucose-free) は日本製薬, ウシ胎児血清 (FBS) は HyClone Lab., ラット・インスリンは Novo Indust. よりそれぞれ購入した。また、インスリン・アッセイ・キット (RIA ビーズ・キット) はダイナボット, PAP キット (膵島細胞酵素抗体法染色試薬) は Dako Co., iodoacetic acid (IAA), その他の試薬は和光純薬の製品を使用した。

2. 幼若ラット膵島細胞の単層培養

生後 3 週齢の SD 系ラット (体重 35~40g) から摘出した膵組織を、新生児同様コラゲナーゼとトリプシンを用いて消化し単個細胞に分散後、16.7mM glucose, 10% FBS を含む TCM199 に浮遊した

1×10^6 cells/ml 密度の細胞を 10ml ずつ培養皿 (#3003; Falcon) に培養した¹³⁾¹⁶⁾。約 48 時間後、緩く接着した細胞をピペティングによって培養皿から剝離した後、 2.5×10^6 cells/ml 密度の細胞を 0.5ml ずつ組織培養用プラスチックシート (23φ; 和光純薬) に植え換え、同じ組成の培地でさらに 48 時間培養した (Day 0)。次いで、① 5.5mM glucose + 1mM 2-deoxy-2-fluoroglucose あるいは② 5.5mM glucose + 5 μM IAA で 3 日間培養して線維芽細胞を除去後、5.5mM glucose 培地で Day 15 まで培養を継続した。尚、培地は 2~3 日毎に交換した。

3. インスリン分泌・灌流実験

培養細胞が着床したプラスチックシート 2 枚を、直径 3.5cm の円形ホールを有するシリコンラバー・ガスケット (肉厚 3.5mm) の両側にセットし、外側を 2 枚の金属板で固定し灌流チャンバーを製作した¹¹⁾¹⁷⁾。37°C の恒温器内にチャンバーを設置し、ガスケットの上下に装着したテフロン細管 (内径 1 mm) の下側から、glucose-free, 0.5% FBS を含む TCM199 を用いて 30 分間前灌流後、各種刺激物質を含む TCM199 による 30 分間の本灌流を、また再び前灌流液による 20 分間の後灌流を行った。灌流速度は 0.5ml/min に設定し、2 分毎にサンプルを採取した。サンプルは -20°C で保存し、インスリン濃度はラット・インスリンを標準として RIA ビーズ固相法を用いて測定した。

4. 単層培養膵島細胞の鑑別染色

膵島に存在する A, B, D 各内分泌細胞は酵素抗体色法により同定した。Day 7 の培養細胞を 3.7% ホルマリン-PBS で固定後、0.3% H₂O₂-メタノールおよび 1% Triton X-100 で各 30 分間処理し、抗グルカゴン、抗インスリンおよび抗ソマトスタチン抗体とそれぞれ 4°C、16~20 時間インキュベートした。次いで、ペルオキシダーゼ標識抗体により 20 分間反応後、0.01% 3,3'-ジアミノベンチジンおよび 0.06% H₂O₂ を含む 0.05M トリス緩衝液 (pH 7.6) で染色した。染色標本の膵島細胞構成比は約 1000 個の細胞から算定した。

5. 統計学的処理

実験成績はすべて平均値土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's t-test により行った。

III 成 績

1 Day 0 の単層培養 B 細胞のインスリン分泌応答

刺激物質を含まない灌流液の導入に際し、Day 0 の培養 B 細胞は 30 分後に 0.25~0.50 ng/ml のインスリン分泌量を示し、以降 50 分間 0.1~0.2 ng/ml の基礎分泌レベルを維持した。16.7 mM glucose 刺激後 6 分に 0.96 ng/ml のインスリン分泌頂値が出現したが、10~30 分の後期相においては分泌レベルは 0.3~0.5 ng/ml と低値であった。10 μM forskolin および 1 mM IBMX 添加による glucose 刺激効果の増大は殆んど認められなかった。しかし、200 nM TPA 存在下では glucose 刺激によって後期相分泌は著明に増大し、最大分泌は 1.73 ng/ml であった。また、10 mM leucine, KICA, BCH および valine 刺激は低値の初期相分泌のみを誘起した (Fig. 1)。

2 Day 7 の単層培養 B 細胞のインスリン分泌応答

2-Deoxy-2-fluoroglucose 添加培地で培養した B 細胞は、Day 7 において glucose 刺激に対応して初期相頂値 2.16 ng/ml、後期相頂値 2.11 ng/ml を有する二相性応答を示した。Forskolin, IBMX および TPA 添加は、後期相分泌レベルを非添加の 138~204% に増大させた (Fig. 2 A)。Leucine, KICA, BCH 刺激もまた二相性応答を誘起し、後期相頂値はそれぞれ 2.76, 1.70, 3.58 ng/ml であった。しかし、valine 刺激による分泌応答は基礎分泌と同じレベルに留まった (Fig. 2 B)。

Fig. 1. Dynamics of insulin secretion due to glucose, leucine or 2-ketoisocaproate. Monolayer cultures on day 0 were perfused for 30 min after a 30-min pre-perfusion with non-stimulatory medium. Each point is the mean $\pm$ SEM for the number of experiments shown in the figure.

[A: 0mM glucose $--\bullet--$, 16.7mM glucose $\bullet$, 16.7mM glucose + 10 μ M forskolin $\blacktriangle$, 16.7mM glucose + 1mM 3-isobutyl-1-methylxanthine $\circ$, 16.7mM glucose + 200nM 12-o-tetradecanoyl phorbol-13-acetate $\triangle$; B: 10mM leucine $\bullet$, 10mM 2-ketoisocaproate (KICA) $\circ$, 10mM β -2-aminobicyclo-(2.2.1)-heptane-2-carboxylic acid $\blacktriangle$, 10mM valine $\triangle$]

IAA 処理後5.5mM glucose で培養した Day 7 の B 細胞は, glucose 刺激に対し二相性応答を示し, 初期相および後期相の頂値はそれぞれ1.38, 1.04ng/mlであった。Forskolin, IBMX 添加によって後期相分泌は軽度上昇するにすぎなかったが, TPA 添加によって後期相頂値は4.45ng/mlと顕著な増大を示した (Fig. 2 C)。Leucine, KICA, BCH 刺激は二相性応答を誘起したが, valine 刺激は後期相分泌を誘起しなかった (Fig. 2 D)。

3. Day15の単層培養 B 細胞のインスリン分泌応答

Day15の 2-deoxy-2-fluoroglucose 添加培養 B 細胞において glucose 刺激に対する二相性応答能は保持されており, 最大分泌は初期相2.79ng/ml, 後期相1.61ng/mlであった。Forsklin, IBMX, TPA 存在下での glucose 刺激効果の増大は後期相分泌に依存し, 非添加の160~327%であった (Fig. 3 A)。また, leucine, KICA, BCH 刺激もまた二相性分泌応答を示し, 後期相頂値はそれぞれ2.28, 1.57, 1.35ng/mlであった。Valine 刺激は一相性応答を誘起するにすぎなかった (Fig. 3 B)。IAA 処理後5.5mM glucose 培養した Day15の B 細胞は glucose 刺激に対して二相性応答を示し, 初期相および後期相の頂値はそれぞれ1.63, 1.36ng/mlであった。また, 後期相における TPA 存在下での glucose 刺激効果は357%増大したが, forskolin, IBMX 存在下では有意な分泌増大効果は認

Fig. 2. Dynamics of insulin secretion due to glucose, leucine or 2-ketoisocaproate. Monolayer cultures that had been maintained for 7 days in medium with either 5.5mM glucose and 1mM 2-deoxy-2-fluoroglucose (A, B) or with 5.5mM glucose after a 3-day exposure to a medium with 5.5mM glucose and 5μM iodoacetic acid (C, D) were perfused for 30 min after a 30-min pre-perfusion with non-stimulatory medium. Each point is the mean $\pm$ SEM for the number of experiments shown in the figure.

[A, C: 0mM glucose ---, 16.7mM glucose ●, 16.7mM glucose + 10μM forskolin ▲, 16.7mM glucose + 1mM 3-isobutyl-1-methylxanthine ○, 16.7mM glucose + 200nM 12-o-tetradecanoyl phorbol-13-acetate △; B, D: 10mM leucine ●, 10mM 2-ketoisocaproate (KICA) ○, 10mM β-2-aminobicyclo-(2.2.1)-heptane-2-carboxylic acid ▲, 10mM valine △]

Fig. 3. Dynamics of insulin secretion due to glucose, leucine or 2-ketoisocaproate. Monolayer cultures that had been maintained for 15 days in medium with either 5.5mM glucose and 1mM 2-deoxy-2-fluoroglucose (A, B) or with 5.5mM glucose and 5 μ M iodoacetic acid (C, D) were perfused for 30 min after a 30-min pre-perfusion with non-stimulatory medium. Each point is the mean $\pm$ SEM for the number of experiments shown in the figure.

[A, C: 0mM glucose -- $\bullet$ --, 16.7mM glucose $\bullet$, 16.7mM glucose + 10 μ M forskolin $\blacktriangle$, 16.7mM glucose + 1mM 3-isobutyl-1-methylxanthine $\circ$, 16.7mM glucose + 200nM 12-o-tetradecanoyl phorbol-13-acetate $\triangle$; B, D: 10mM leucine $\bullet$, 10mM 2-ketoisocaproate (KICA) $\circ$, 10mM β -2-aminobicyclo-(2.2.1)-heptane-2-carboxylic acid $\blacktriangle$, 10mM valine $\triangle$]

められなかった (Fig. 3 C)。Leucine, KICA 刺激により誘起された後期相の最大分泌は $1.59, 1.09$ ng/ml であったが, BCH, valine は後期相分泌を殆んど誘起しなかった (Fig. 3 D)。

4. 単層培養膵島細胞の鑑別染色

2-Deoxy-2-fluoroglucose 添加培養した細胞では A, B, D 細胞はそれぞれ $19.6 \pm 1.7, 70.2 \pm 2.1, 9.9 \pm 0.4$ %, また, IAA 処理後 5.5 mM glucose 培養した細胞ではそれぞれ $18.9 \pm 1.3, 68.3 \pm 0.4, 8.8 \pm 0.9$ % であった。

IV 考 察

本研究において著者らは生後 3 週齢の幼若ラット膵より調製した単層培養細胞の灌流実験を施行し, 種々刺激物質に対するインスリン分泌応答を検討した。

幼若ラット膵の単層培養は, まず新生児膵同様摘出した全膵組織をトリプシン-コラゲナーゼによって酵素消化した。得られた膵細胞の培養皿への接着・伸展は新生児に比べ遅延し, 約 48 時間の前培養期間を必要としたが¹⁶⁾, 内分泌細胞からなるクラスターの形成が位相差顕微鏡下に認められた。2-Deoxy-2-fluoroglucose, IAA によって線維芽細胞は選択的に除去され, 2 種の培養条件下における Day 7 の培養膵島細胞に占める B 細胞の比率は約 70% であった¹²⁾²⁰⁾。

Glucose, アミノ酸等刺激に対する Day 0 の培養 B 細胞のインスリン分泌は全般的に低値を示し, その機能は尙未成熟であることが示唆された。従来より, 胎児・新生児膵における低反応性インスリン分泌応答についてはアデニレートシクラーゼ系の低活性と関連して論議されてきた¹⁾⁹⁾。しかしながら, 幼若ラット膵培養 B 細胞は細胞内 cAMP 量を増加させる forskolin $10 \mu\text{M}$ ¹⁵⁾, IBMX 1 mM ¹⁹⁾ の添加によっても glucose 刺激による後期相分泌レベルの増大は認められなかった。これは, 培養初期の新生児ラット膵単層培養 B 細胞が同じ薬剤の存在下で glucose 刺激に対応して著明な後期相分泌の増大を示した成績とは異なっていた^{27)~29)}。しかし, C キナーゼの活性化剤として知られる TPA 200 nM ¹⁸⁾ 存在下では, 特に後期相において分泌レベルの著明な増大が認められ, その頂値は非添加の 3 倍以上であった。これらの知見は, A キナーゼ系, C キナーゼ系のインスリン分泌への関与がラットの加齢によって異なっていることを示しており興味深く思われる。

ラット胎児は母体から供給される glucose・アミノ酸等を主な栄養源として必要なエネルギーを獲得しているが, 出生後は高脂質, 低炭水化物を含有する母乳 (熱含量としての組成をみると脂質が 70%, 炭水化物が 6% を占める) を栄養源としている⁸⁾。血中 glucose の恒常性を維持するために, 新生児ラットは乳酸を主な前駆体として糖新生を行い, glucose の恒常性を維持しており, その割合は必要な glucose 量の約 8 割に達するといわれている⁶⁾。したがって, 膵をはじめ末梢組織では glucose は TCA 回路でエネルギー源として利用されず, glucose 酸化は全般的に低下していると考えられる。加えて, 乳酸の高い代謝回転のためにアミノ酸も糖新生に利用される機会は少く, 成熟ラットとは異なっている²²⁾。乳児期におけるこの様な代謝適応の結果として幼若ラット膵のインスリン分泌低下が招来された可能性が考えられる。

一方, glucose, leucine 等栄養物質刺激に対して, Day 7, 15 の培養 B 細胞は 2 種いずれの培養条件下においても成熟膵島様の典型的な二相性パターンを示した⁷⁾¹⁴⁾³²⁾。これら培養 B 細胞のインスリン分泌機能を詳細に比較検討するために, 電算機 (HP3000-30; Hoeulett Packard) を用いて分泌応答を初期相 (t_0 -10min) および後期相 (t_{10} -30min) に分け, それぞれの積算分泌量と 30 分間の総分泌量を算出した (Table 1)。Day 0 の培養 B 細胞では glucose, leucine, KICA 刺激による総インスリン分泌量は $8.23, 0.24, 0.05 \text{ ng}$ と低値を示し, 総分泌量の 54~100% を初期相分泌が占めてい

Table 1. Comparison of the total insulin secreted during the 30 min period of stimulation with glucose, leucine or 2-ketoisocaproate.

	Insulin release	16.7 mM Glucose	16.7 mM Glucose + 10 μ M Forskolin	16.7 mM Glucose + 1 mM IBMX	16.7 mM Glucose + 200 μ M TPA	10 mM Leucine	10 mM 2-Ketoisocaproate
day 0							
	First phase (ng/10-15 min)	4.45 $\pm$ 1.71(13)	2.54 $\pm$ 0.37(10)cJMS	3.67 $\pm$ 0.76(12)cJMS	9.70 $\pm$ 0.64(16)cJMS***	0.13 $\pm$ 0.09(14)	0.05 $\pm$ 0.05(14)
	Second phase (ng/15-30 min)	3.78 $\pm$ 1.64(13)	4.55 $\pm$ 2.47(10)cJMS	1.48 $\pm$ 0.57(12)cJMS	24.39 $\pm$ 3.56(16)cJMS***	0.11 $\pm$ 0.07(14)	0 (14)
	Total release (ng/10-30 min)	8.23 $\pm$ 3.27(13)	5.09 $\pm$ 2.34(10)cJMS	5.15 $\pm$ 1.14(12)cJMS	34.09 $\pm$ 3.42(16)cJMS***	0.24 $\pm$ 0.10(14)	0.05 $\pm$ 0.05(14)
day 7							
IAA- treated	First phase (ng/10-15 min)	4.39 $\pm$ 0.78(10)JMS	8.06 $\pm$ 1.69(10)cJMS	1.67 $\pm$ 0.52(8) cJMS	5.41 $\pm$ 3.43(8) JMS	5.29 $\pm$ 2.11(8) aJMS***	5.41 $\pm$ 0.26(6) aJMS***
	Second phase (ng/15-30 min)	13.10 $\pm$ 1.43(10)aJMS***	26.33 $\pm$ 1.40(10)cJMS***	19.87 $\pm$ 1.00(8) cJMS	54.56 $\pm$ 6.44(6) cJMS***	16.34 $\pm$ 2.38(8) aJMS***	10.67 $\pm$ 2.78(6) aJMS***
	Total release (ng/10-30 min)	17.49 $\pm$ 1.29(10)aJMS*	32.39 $\pm$ 2.92(10)cJMS***	21.54 $\pm$ 1.83(8) cJMS	62.17 $\pm$ 8.97(6) cJMS***	21.63 $\pm$ 2.56(8) aJMS***	16.08 $\pm$ 2.67(6) aJMS***
2dFG- treated	First phase (ng/10-15 min)	3.91 $\pm$ 1.49(11)JMS	4.56 $\pm$ 2.12(12)JMS	8.58 $\pm$ 5.27(5) JMS	3.17 $\pm$ 1.34(6) JMS	2.33 $\pm$ 0.71(5) JMS	3.26 $\pm$ 0.43(5) JMS
	Second phase (ng/15-30 min)	23.16 $\pm$ 2.76(11)JMS	55.00 $\pm$ 2.19(12)JMS	29.59 $\pm$ 4.24(5) JMS	60.75 $\pm$ 10.23(4) JMS	37.80 $\pm$ 2.37(5) JMS	16.99 $\pm$ 1.45(5) JMS
	Total release (ng/10-30 min)	27.07 $\pm$ 2.92(11)JMS	59.56 $\pm$ 3.19(12)JMS	38.17 $\pm$ 9.32(5) JMS	63.93 $\pm$ 11.33(4) JMS	40.12 $\pm$ 2.76(5) JMS	20.25 $\pm$ 1.59(5) JMS
day 15							
IAA- treated	First phase (ng/10-15 min)	3.26 $\pm$ 1.46(8) JMS	4.50 $\pm$ 1.43(6) JMS	3.92 $\pm$ 1.43(8) JMS	6.60 $\pm$ 1.84(6) JMS	0.63 $\pm$ 0.24(10)JMS	8.18 $\pm$ 1.89(8) JMS
	Second phase (ng/15-30 min)	11.45 $\pm$ 0.59(8) JMS	18.47 $\pm$ 2.17(6) JMS	19.72 $\pm$ 2.18(8) JMS	55.47 $\pm$ 12.85(6) JMS	15.09 $\pm$ 2.91(10)JMS	7.38 $\pm$ 2.34(8) JMS
	Total release (ng/10-30 min)	14.91 $\pm$ 1.45(8) JMS	23.17 $\pm$ 3.46(6) JMS	23.63 $\pm$ 0.94(8) JMS	62.11 $\pm$ 15.48(6) JMS	15.71 $\pm$ 2.99(10)JMS	15.56 $\pm$ 3.35(8) JMS
2dFG- treated	First phase (ng/10-15 min)	6.08 $\pm$ 0.84(17)JMS	7.87 $\pm$ 2.68(8) JMS	15.43 $\pm$ 2.15(8) JMS	14.10 $\pm$ 1.86(6) JMS	2.01 $\pm$ 0.78(4) JMS	5.84 $\pm$ 0.57(4) JMS
	Second phase (ng/15-30 min)	17.78 $\pm$ 4.80(17)JMS	42.49 $\pm$ 2.05(8) JMS	32.26 $\pm$ 5.28(8) JMS	70.19 $\pm$ 0.78(6) JMS	18.57 $\pm$ 1.16(4) JMS	9.35 $\pm$ 0.92(4) JMS
	Total release (ng/10-30 min)	23.84 $\pm$ 5.05(17)JMS	50.35 $\pm$ 4.04(8) JMS	47.69 $\pm$ 6.01(8) JMS	84.28 $\pm$ 2.57(6) JMS	20.58 $\pm$ 1.77(6) JMS	15.19 $\pm$ 0.88(4) JMS

The data on the total insulin secretion were obtained by integrating the area under the curves in Figs. 1, 2 and 3. The results are shown as the mean $\pm$ SEM for the number of experiments as shown in the table. IAA: iodoacetic acid, 2dFG: 2-deoxy-2-fluoroglucose, IBMX: 3-isobutyl-1-methylxanthine, TPA: 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate.

Compared with a) values of day 0, b) values of IAA-treated, c) values of 16.7mM glucose stimulation, d) values of day 7, ***p<0.001, ***p<0.01, **p<0.02, *p<0.05, NS not significant.

た。これに対して、IAA 処理後5.5mMglucose で培養した Day 7 の B 細胞からの glucose,leucine, KICA 刺激に対する総分泌量は Day 0 に比べ大幅な増大を示し、後期相分泌が総分泌量の66~76% を占めていた。さらに、2-deoxy-2-fluoroglucose 添加培養細胞の glucose,leucine,KICA 刺激による総分泌量は IAA 処理細胞の126~185%に増大し、また後期相分泌が占める割合も84~94%に達した。Day15に至ると glucose,leucine,KICA 刺激に対する総分泌量は IAA 処理培養細胞では Day 7 の73~97%に、また2-deoxy-2-fluoroglucose 添加培養では51~88%にそれぞれ減少していた。

しかし、総分泌量に対する後期相分泌の割合は前者では47~96%、後者では62~90%であり、二相性分泌分泌応答能は保持されていた。

一方、forskolin,IBMX 添加は2種いずれの培養条件下においても Day 7,15の総分泌量を非添加の123~220%に増大した。また、TPA 添加は総分泌量を Day 7 では非添加の236~355%、Day15 では354~417%増大させた。以上の成績は、幼若ラット膵単層培養 B 細胞のインスリン分泌応答が 5.5mMglucose (IAA 処理後) および5.5mMglucose+1 mM 2-deoxy-2-fluoroglucose 培地において Day 7 までの培養期間中に成熟膵島様の変化を遂げていること、また、2-deoxy-2-fluoroglucose が B 細胞機能の成熟化により有効に作用していることを示唆するものであった。著者らは以前に幼若ラット膵単層培養 B 細胞機能の成熟化には高濃度 glucose よりも生理的濃度の glucose が適していることを明らかにした¹⁰⁾³⁰⁾。したがって、生理的濃度の glucose による効果に加えて、2-deoxy-2-fluoroglucose による複合糖質糖鎖の合成阻害作用が培養 B 細胞の種々酵素および細胞膜表面の糖鎖構造の性状・分布を変化させ、インスリン分泌機能の成熟化に有利に作用したも

のと考えられる²⁵⁾。しかし、本研究に用いた 2 種の培地も長期間に亘る B 細胞の機能維持には十分なものではなかった。また、Day 0 において glucose 刺激によるインスリン分泌応答を増強しなかった forskolin, IBMX が、Day 7, 15 においては著明な分泌増強効果を示したことから、培養 B 細胞の機能成熟化過程においてアデニレートシクラーゼ系の活性化が関与している可能性が示唆された。加えて、TPA 添加によって著明なインスリン分泌増大が認められたことは、C キナーゼが後期相分泌を誘起する重要な因子であることを示唆するものである。²⁹⁾³⁰⁾

上述した様に、インスリン分泌を制御している因子は加齢・培養といった in vivo, in vitro の要素によって変化を遂げており、これらを体系的に理解することは膵 B 細胞機能の成熟化機能機構を解明する上で重要である。本研究に用いた幼若ラット膵単層培養系もまた、ホルモン分泌機能に及ぼす種々物質の直接的作用並びに長期的影響を体系的に理解する上での有用な情報源になりうるものとする。

V 結 語

酵素消化法により調製した幼若ラット膵島細胞を単層培養し、種々刺激物質に対するインスリン分泌応答を灌流実験により検討し、以下の成績を得た。

1) 幼若ラット膵単層培養 B 細胞は、Day 0 において glucose, アミノ酸等刺激に対し低反応性応答を示し、その機能は尙未成熟であった。

2) IAA 処理および 2-deoxy-2-fluoroglucose 添加培養により線維芽細胞は除去され、Day 15 までの培養期間において膵島細胞の生存が確認された。

3) IAA 処理および 2-deoxy-2-fluoroglucose 添加培養により、培養 B 細胞は glucose, アミノ酸等刺激に対して二相性応答を示した。また、2-deoxy-2-fluoroglucose は培養 B 細胞機能の成熟化に有利に作用した。

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-Parve, E.P.: Inhibitors of protein glycosylation inhibit the differentiation of friend erythroleukemia cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 696: 285-289, 1982.
- 3) Braaten, J.T., Lee, M.J., Schenk, A. and Minz, D.: Removal of fibroblastoid cells from primary monolayer cultures of rat neonatal endocrine pancreas by sodium ethylmercurithiosalicylate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 61: 426-432, 1974.
- 4) Braaten, J.T., Jarfors, U., Smith, D.S. and Minz, D.: Purification of monolayer cell cultures of the endocrine pancreas. *Tissue Cell*, 7: 747-762, 1975.
- 5) Bulet, P., Hoflrcck, B., Porchet, M. and Verbert, A.: Study of the conversion of GDP-mannose in nereids: A biochemical marker of oocyte maturation. *J. Biochem.*, 144: 255-259, 1984.
- 6) Ferre, P., Pegorier, J.P. and Girard, J.: The effect of inhibition of gluconeogenesis in suckling newborn rats. *Biochem. J.*, 162: 209-212, 1977.
- 7) 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.
- 8) Girard, J.R., Ferre, P., Pegorier, J.P., Turlan, P., Manoubi, L.E. and Callikan, S.: Glucose metabolism in the newborn rat. *Biochem. Soc. Trans.*, 9: 369–370, 1981.
- 9) 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.
- 10) Hellerstrom, 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.
- 11) 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.
- 12) Kostianovsky, M., McDaniel, M.L., Still, M.F., Codilla, R.C. and Lacy, P.E.: Monolayer cell culture of adult rat islets of Langerhans. *Diabetologia*, 10: 337–344, 1974.
- 13) 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.
- 14) Malaisse, W.J., Sener, A., Herchuelz, A. and Hutton, J.C.: Insulin release: The fuel hypothesis. *Metabolism*, 28: 373–386, 1979.
- 15) Miyazaki, K., Goldman, M.E. and Kebabian, J.W.: Forskolin stimulates adenylate cyclase activity, adenosine 3', 5'-monophosphate production and peptide release from the intermediate lobe of the rat pituitary gland. *Endocrinology*, 114: 761–766, 1984.
- 16) 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.
- 17) Nakao, K., Kagawa, S., Wakabayashi, S. and Matsuoka, A.: Maintenance of pancreatic endocrine cells of the neonatal rat: VII. The effect of 3-amino-3-deoxyglucose on insulin secretion from perfused B cells. *Endocrinol. Japon.*, 33: 561–573, 1986.
- 18) Nishizuka, Y., Takai, Y., Kishimoto, A., Kikkawa, U. and Kaibuchi, K.: Phospholipid turnover in hormone action. *Recent Progr. Horm. Res.*, 40: 301–345, 1984.
- 19) Rabinovitch, A., Cuendet, G.S., Sharp, G.W.G., Renold, A.E. and Mintz, D.: Relation of insulin release to cyclic AMP content in rat pancreatic islets maintained in tissue culture. *Diabetes*, 27: 766–773, 1978.
- 20) 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.
- 21) 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.
- 22) Snell, K.: Regulation of protein metabolism during postnatal development. *Biochem. Soc. Trans.*, 9: 367–368, 1981.
- 23) Sodoyez-Goffaux, F., Sodoyez, J.C. and Foa, P.P.: Effects of gestational age, birth and feeding on the insulinogenic response to glucose and tolbutamide by fetal and newborn pancreas. *Diabetes*, 20: 586–591, 1971.
- 24) Wakabayashi, S., Kagawa, S., Nakao, K., Mimura, K. and Matsuoka, A.: Maintenance of pancreatic endocrine cells of the neonatal

- rat: IV. The effect of 3-amino-3-deoxyglucose. *Endocrinol. Japon.*, 31: 657-664, 1984.
- 25) 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.
- 26) Wakabayashi, S., Kagawa, S., Nakao, K., Mimura, K. and Matsuoka, A.: Maintenance of neonatal endocrine cells of the rat: III. Effect of 2-deoxy-2-fluoroglucose on the response to glucose, leucine and 2-deoxyisocaproate. *Horm. Metab. Res.*, 16: 672-673, 1984.
- 27) 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臍培養 B 細胞の機能維持に関する研究. *兵医学会誌*, 10: 31-44, 1985.
- 28) 若林 茂, 香川昌平, 中尾啓子, 松岡 瑛: 新生児ラット臍単層培養 B 細胞の灌流: 2-Deoxy-2-fluoroglucose の効果. *日内分泌会誌*, 61: 1259-1269, 1985.
- 29) 若林 茂, 香川昌平, 中尾啓子, 松岡 瑛: 新生児ラット臍単層培養 B 細胞機能の成熟化に及ぼす glucose 濃度の影響. *日内分泌会誌* 62: 1163-1180, 1986.
- 30) 若林 茂, 香川昌平, 中尾啓子, 青木政幸, 松本正道, 山村武平, 宇都宮譲二, 松岡 瑛: 幼若ラット臍単層培養 B 細胞機能に関する研究. p165-173, 赤沼安夫, *Peptide Hormones in Pancreas 6*, Biomedical Research Foundation, 東京 1986.
- 31) Yoshida, K., Kagawa, S., Murakoso, K., Nakao, K., Haito, K., Shimizu, S. and Matsuoka, A.: Long-term effect of 2-deoxy-2-fluoroglucose on maintenance in culture of the neonatal B cell of the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 108: 279-285, 1982.
- 32) Zawulich, W.S., Dye, E.S., Rognstad, R. and Matschinsky, F.M.: On the biochemical nature of triose- and hexose-stimulated insulin secretion. *Endocrinology*, 103: 2027-2034, 1978. (受付日: '87. 3. 30)