

# イヌ膵静脈血中C-ペプチドの動態

## 第 三 編

### 外来性インスリンによる膵β細胞分泌に 対するフィードバック調節に関する研究

岡山大学医学部第三内科（主任：大藤 真教授）

仁 科 喜 章

（昭和55年1月28日受稿）

**Key words**：イヌC-ペプチド，外来性インスリン，  
膵β細胞分泌，フィードバック調節。

#### 結 言

従来，膵β細胞のインスリン分泌に関してインスリン自体による直接的フィードバック調節の存在が示唆されているが，それに対する否定的な見解も多く，いまだ明確な結論がなされていない現状である。

C-ペプチドが，膵β細胞より，インスリンと等モル分泌され<sup>1)</sup>，そのアミノ酸配列の違いから，免疫学的に種族特異性を有し<sup>2)3)4)5)</sup>他の種族のものと区別し得ると同時に，各種インスリンやインスリン抗体存在下でも，その測定系に影響を与えないことや，C-ペプチドの肝での取り込みがインスリンに比し少なく<sup>6)</sup>，代謝速度も遅い<sup>7)</sup>という事実から，血中におけるC-ペプチド濃度の測定は，外因性インスリン存在下での内因性インスリン分泌機能のより正確な指標とされている。

インスリン自体による膵β細胞に対するフィードバック調節の有無を調べるには，*in vivo*においては，できるかぎり他因子の影響を少なくするために，外来性インスリンを膵β細胞の近くより直接負荷し，その後の内因性インスリンの反応を分泌直後より短時間に経時的に観察する必要がある。

ヒトC-ペプチドのRadioimmunoassay<sup>8)9)</sup>が確立されて以来，外来性インスリン静注後の末

梢血中C-ペプチド(CPR)の変動を測定し，膵β細胞の内因性インスリン分泌動態を推測した報告はあるが直接，ヒト膵静脈血中のCPRの変動を経時的に測定することは，その実験材料および方法の極めて困難であり，その様な報告はみられない。

今回の実験では，麻酔犬を使用し，グルカゴン等の不純物をほとんど含まないとされるモノコンポーネント(MC)インスリンを直接膵動脈内に投与した際の膵静脈血中CPRの経時的変動を観察し，内因性インスリン分泌反応の指標とし，膵β細胞のインスリン自体によるフィードバック機構の有無について検討した。

#### 実験動物および実験方法

8～10kgの成熟犬を使用し，24時間絶食後，ネンブタール麻酔下に開腹し，前報<sup>10)11)</sup>同様にして，上膵十二指腸動脈(膵動脈)に負荷用の，また，同静脈(膵静脈)に採血用のT字型シリコンチューブを，そして大腿静脈にはカテーテルを挿入した。術後2～3時間後の血糖が落ち着くのを待って下記の負荷実験を行った。なお，イヌC-ペプチド(CPR)は前報<sup>10)11)</sup>にて発表した一抗体法，インスリン(IRI)は二抗体法<sup>12)</sup>によるRadioimmunoassayにて測定し，血糖はGlucose Oxidase法<sup>13)</sup>にて測定した。

(1)ブドウ糖(0.5g/kg)を膵動脈より急速注入

し、30分後にMCインスリン(小玉KK)0.1u/kgの急速負荷を行った。採血は、ブドウ糖注入前10分、0分、注入後2分、5分、10分、20分、30分、インスリン負荷後2分、5分、10分、20分、30分、45分、60分に行い、各サンプル中の血糖と血漿CPRを測定した。

(2)ブドウ糖50mg/kg/minを臍動脈より60分間持続注入しながら、30分後にMCインスリン0.1u/kgの急速負荷を行った。採血は、ブドウ糖注入前10分、0分、注入後2分、5分、10分、20分、30分、インスリン負荷後2分、5分、10分、20分、30分に行い各サンプルの血糖とCPRを測定した。

(3)生理的基礎分泌条件下(ブドウ糖非投与時)において、臍動脈よりMCインスリン20mu/kg/minの5分間持続注入しながら、臍静脈より、負荷前10分、0分、負荷開始直後より20秒間隔で連続的に採血し、各サンプル中の血糖とCPRを測定した。

(4)合成イヌC-ペプチド0.2pM/kg/minを臍動脈より5分間持続注入しながら、臍静脈より実験(3)と同様に、負荷前10分、0分、負荷開始直後より20秒間隔で連続的に採血し、各サンプル中の血糖とIRIを測定した。

なお、図は、平均値と平均値誤差で表示しインスリン負荷前後の有意差はWilcoxonのSigned-rank testで求めた。

## 結 果

(1)ブドウ糖(0.5g/kg)臍動脈内急速注入後のMCインスリン(0.1u/kg)急速負荷(図-1)

ブドウ糖急速注入により、血糖は前値81mg/dlが5分後に279mg/dlと急速に上昇し頂値を示した後漸減し、インスリン負荷時には181mg/dlであり、負荷後30分ではほぼ基礎値まで回復し、60分後には49mg/dlと低血糖域にまで低下した。臍静脈血中CPR(臍CPR)は、ブドウ糖注入前が2.2pM/ml、注入後2分で6.7pM/mlと急速に頂値に達した後減少し、10分で3.6pM/mlまで低下した後再び漸増する二相性の分泌動態を示し、インスリン負荷直前には4.3pM/mlであった。インスリン(0.1u/kg)の急速負荷後より急速に減少し2分で2.6pM/mlに低下し、120分では2.4pM/mlの値まで低下した。大腿静脈血中CPRも臍CPRと同様の変動を示したが、ブドウ糖

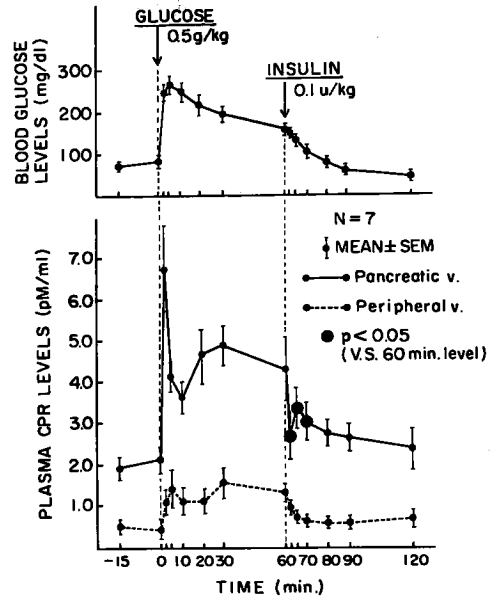


図1. ブドウ糖(0.5g/kg)臍動脈内急速投与後60分の外来性MCインスリン0.1u/kgの臍動脈内急速負荷に対する血糖と臍静脈血中ならびに末梢静脈血中C-ペプチドの変動。

刺激に対する初期の立ち上がりは臍CPRに比し少なく、やや遷延する傾向を示し、インスリン負荷に対する減少も臍CPR程著明ではなかった。

(2)ブドウ糖(50mg/kg/min)の60分間持続注入時のMCインスリン(0.1u/kg)の臍動脈内急速負荷(図-2)。

ブドウ糖持続注入により血糖(前値79mg/dl)は30分で393mg/dlにまで上昇し、インスリン(0.1u/kg)負荷後も400mg/dl前後の高血糖を維持した。臍CPR(前値3.1pM/ml)は2分以内に急速に頂値(6.6pM/ml)を示した後減少し、10分で4.9pM/mlと低下した後、インスリン負荷直前には5.2pM/mlとやや増加傾向を示したが、インスリン急速負荷直後より減少し、2分後には負荷前値に対し有意な低下(4.5pM/ml)を示した。大腿静脈血中CPRのインスリン負荷による影響は明らかではなかった。

(3)生理的基礎分泌条件下でのMCインスリン(20mu/kg/min)の臍動脈内5分間持続投与〔図-3〕

空腹時血糖状態の基礎分泌条件下でのインスリン(20mu/kg/min)持続投与により、血糖は64mg/dl前後ではほぼ一定の値を示していた。

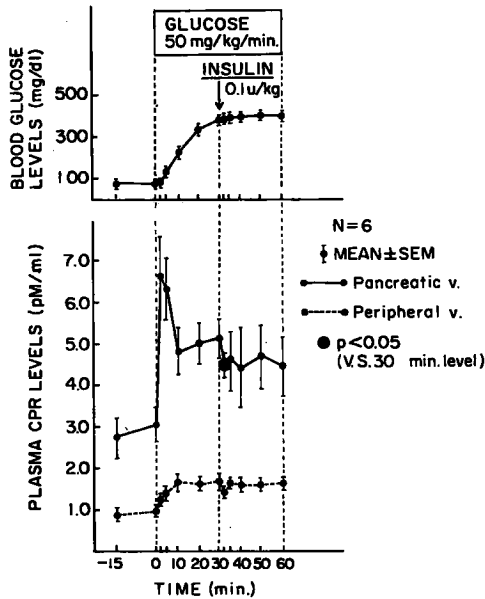


図2. ブドウ糖(50mg/kg/min) 臍動脈内60分間持続投与開始後30分の外来性MCインスリン0.1u/kgの臍動脈内急速負荷に対する血糖と臍静脈血中および末梢静脈血中C-ペプチドの変動。

(4)生理的基礎分泌条件下での合成イヌC-ペプチド(0.2pM/kg/min)の臍内5分間持続投与(図-4)

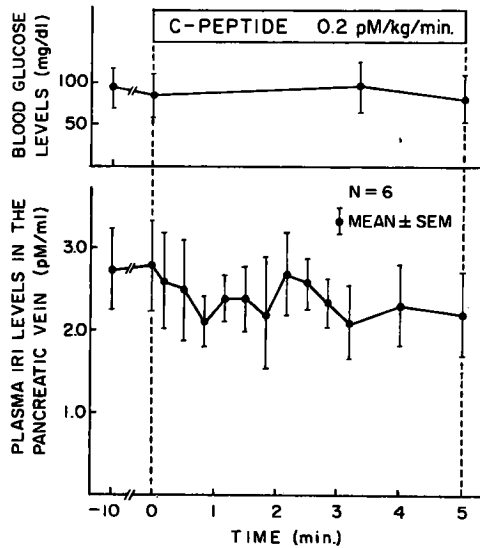


図4. 合成C-ペプチド(0.2pM/kg/min) 臍動脈内5分間持続投与に対する血糖と臍静脈血中インスリンの変動。

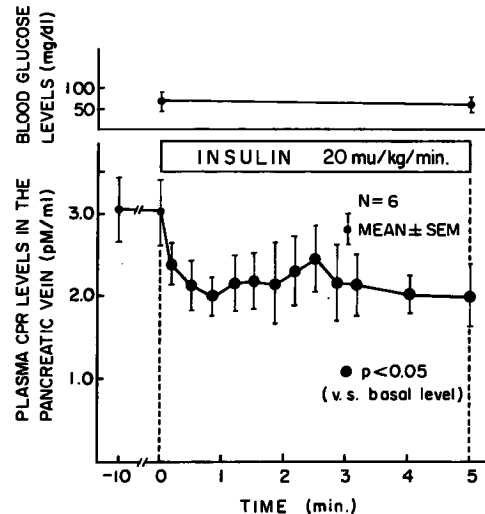


図3. 外来性MCインスリン(20mu/kg/min) 臍動脈5分間持続負荷に対する血糖と臍静脈血中C-ペプチドの変動

臍CPRは基礎値3.1pM/mlがインスリン負荷直後より著明に減少し始め、1分以内に2.1pM/mlと前値の65%にまで低下し、以後低値が持続して5分後にも同程度の分泌抑制がみられた。

基礎分泌条件下でのC-ペプチド(0.2pM/kg/min)の持続的負荷による血糖および臍IRIの有意な変動は認められなかった。

考 察

今回の実験で、イヌ臍動脈内に外来性MCインスリン(0.1u/kg)の急速投与および5分間持続投与を行った際の臍静脈血中CPRの抑制率は、高血糖状態(400mg/dl)では-13.5%血糖が高血糖より低下しつつある状態(180mg/dl)では-41%そして空腹時血糖が維持された基礎分泌条件下では-35.6%の抑制を示した。また、生理的に上昇し得る程度のC-ペプチド量(0.2pM/kg/min)の持続投与による臍静脈血中IRIは有意の変動を示さなかった。以上の成績は、血糖状態の変化による強弱はあるが、外来性インスリンの臍β細胞に対する直接的フィードバック調節の存在を証明したものである。そして、Horwitzら<sup>14)</sup>も、ヒトにインスリン低血糖をおこさせた実験で、血中CPRの抑制が、血糖が前値に復した後まで持続していたことよりインスリン自体による抑制を示唆している。一方Shimaら

<sup>15)</sup>はヒトで、インスリンとブドウ糖を同時に負荷することにより、低血糖による影響を除き血糖を空腹時レベルに維持した場合には血中CPRの抑制は認められなかったことより、外来性インスリン投与時の内因性インスリン分泌の抑制は、低血糖を介する二次的な現象であると主張している。Horwitzらも、低血糖による、カテコラミン放出の影響や膵β細胞内代謝に与えた低血糖の影響が遷延している可能性も否定できないとしている。いづれにしてもヒト末梢血中CPRの反応は、膵β細胞より分泌されたインスリンとC-ペプチドが一度肝での取り込みを受けて体循環に入った後の結果であり、両者の肝・腎での取り込みや代謝速度の違い<sup>6)7)</sup>等によりある程度修飾された状態をみることになり、膵β細胞分泌における微妙な分泌動態を正しく反映しているとは思えない。このことは、今回のイヌ膵静脈血中と大腿静脈血中でのCPRの反応からも推測することができる。in vitroの実験で、Beisherら<sup>16)</sup>は人工膵島を用い、空腹時血糖レベルでのインスリン添加によるCPRの抑制はみられるが、ブドウ糖刺激後のインスリン投与では、CPRの抑制は認めなかったとしている。Liljenquistら<sup>17)</sup>も長時間インスリン負荷を行うと、ブドウ糖刺激によるCPR分泌は有意に抑制されたと報告している。これらin vitroにおける実験系では、膵β細胞周囲の環境がそれぞれで異なるため今回のin vivoにおける成績と多少違ってくる可能性も考えられるが、Sodoyezら<sup>18)19)</sup>のハムスターを使用したin vitroおよびin vivoの実験でインスリン自体の内因性インスリン分泌抑制は、インスリン分泌刺激の強弱によって決定されるとする見解は今回の成績とよく一致するものである。その他、インスリンのフィードバック作用に肯定的な報告は、Rappaportら<sup>20)</sup>やIversenら<sup>21)</sup>のイヌを用いた成績、ラット膵を用いたFreichsら<sup>22)</sup>やAmmonら<sup>23)</sup>、ネズミラ島を用いたLoretiら<sup>24)</sup>の報告にみられる。特にAmmonらは、外来性インスリンが、膵β細胞内のNADPH/NADP比を減少させることにより直接的に内因性インスリン分泌を抑制している可能性を示唆したものと注目される。さらに、インスリン抗体を直接膵β細胞の灌流液中に添加した実験<sup>25)26)27)</sup>では、灌流液中の内因性インスリンがインスリン抗体と結合し、膵β

細胞周囲のフリーインスリンの低下をきたすことにより、インスリン自体による膵β細胞の分泌抑制が解除された結果と思われる膵β細胞内の著明な脱顆粒を認めたと報告している。

その他、最近では、Carolinesら<sup>28)</sup>は、ブドウ糖刺激に対するラット膵β細胞内膜電位の活動は、外来性インスリンを添加すると、用量反応的に抑制されたことを報告している。

一方、インスリンの自動調節機構の存在に否定的な報告も多くみられる。Grodosky<sup>29)</sup>とMalaisse<sup>30)</sup>らは、ラット単離う島の灌流実験で、高濃度のサカナインスリンの存在下でも、ブドウ糖刺激により多相性の分泌反応を示したとしSandoら<sup>31)</sup>は麻酔犬を使用した実験系で、外来性に投与したカツオインスリンによる内因性インスリン分泌の抑制には、血糖の低下を必要条件とし、カツオインスリン自体の直接的抑制はなかったとし、Turnerら<sup>32)</sup>も、ヒトにサカナインスリンを投与した時の内因性インスリン分泌の抑制は、低血糖を介する二次的なものであると報告している。彼らと著者の成績が相対立する理由は今のところ不明であるが、実験動物および実験方法の違いや、内因性インスリン分泌の指標としてCPRを用いず、サカナインスリンと免疫学的に交叉反応を示さないインスリン抗体を用いたRadioimmunoassayにて測定していること、また、サカナインスリンが彼らの主張するように生物学的活性が他の種のインスリンと同じ力価を力価を有するとはいえ、アミノ酸構造に大きな違いのあるインスリンが哺乳動物の膵β細胞に同種のインスリンと同じ様に作用するとは思えない等の問題点があげられる。

## 結 語

種々の血糖状態での外来性インスリンのイヌ膵動脈内負荷実験を行い、膵β細胞分泌能の指標として膵静脈血中C-ペプチド濃度(膵CPR)の分泌動態を測定し、インスリン自体の膵β細胞に対する直接的フィードバック調節の存在を確認する下記のごとき結果を得た。

1) 外来性インスリン0.1u/kgの膵動脈内急速投与による膵CPRの分泌抑制率は、高血糖が維持された状態では13.5%であるのに対し、高血糖が基礎値に低下しつつある過程において41%であった。

2) 空腹時血糖レベルの維持された基礎分泌条件下での外来性インスリン20 $\mu$ g/kg/minの豚動脈内5分間持続注入による豚CPRの分泌抑制率は35.6%であった。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました恩師大藤真教授ならびに直接御指導下さった河西浩一講師をはじめ、御協力頂いた糖尿病研究班の諸先生に厚く感謝致します。

文 献

1. Rubenstein, A. H., Clark, T. L., Melani, F., and Steiner, D. F.: Secretion of proinsulin C-peptide from pancreatic beta cells and its circulation in blood. *Nature* **224**, 697-669, 1969.
2. Steiner, D. F., Hallund, D., Rubenstein, A. H., Cho, S., and Bayliss, C.: Isolation and properties of proinsulin, intermediate forms, and other minor components from crystalline bovine insulin. *Diabetes* **17**, 725-736, 1968.
3. Tager, H. S., and Steiner, D. F.: Primary Structures of the proinsulin connecting of the rat and the horse. *J. Biol. Chem.* **247**, 7936-7940, 1972.
4. Peterson, J. D., Nehlich, S., Oyer, P. E., and Steiner, D. F.: Determination of the amino acid sequence of the monkey, sheep, and dog proinsulin C-peptide by a semi-micro Edman degradation procedure. *J. Biol. Chem.* **247**, 4866-4871, 1972.
5. Chance, R. E.: Amino acid sequences of proinsulins and Intermediates. *Diabetes* **21** (Suppl. 2), 461-467, 1972.
6. Katz, A. I., and Rubenstein, A. H.: Metabolism of Proinsulin, insulin, and C-peptide in the rat. *J. Clin. Invest.* **5**, 1113-1121, 1973.
7. Oyama, H., Horino, M., Matsumura, S., Kobayashi, K., and Suetsugu, N.: Immunological half-life of porcine proinsulin C-peptide. *Horm. Metab. Res.* **7**, 520-521, 1975.
8. Melani, F., Rubenstein, A. H., Oyer, P. E., and Steiner, D. E.: Identification of proinsulin and C-peptide in human serum by a specific immunoassay. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **67**, 148-155, 1970.
9. Kaneko, T., Oka, H., Munemura, M., Oda, T., Yamashita, K., Yanaihara, N., Hashimoto, T., and Yanaihara, C.: Radioimmunoassay of human proinsulin C-peptide using synthetic human connecting peptide. *Endocrinol. Jap.* **21**, 141-145, 1974.
10. 仁科喜章, イヌの豚静脈血中C-ペプチドの動態(第一編) イヌC-ペプチドの測定法の検討ならびにブドウ糖およびアルギニン負荷によるC-ペプチドの変動. 岡山医学会雑誌, **92**, 237-245, 1980.
11. 仁科喜章, イヌの豚静脈血中C-ペプチドの動態(第二編) 中枢神経系作動物質のイヌ豚 $\beta$ 細胞におよぼす影響. 岡山医学会雑誌, **92**, 247-257, 1980.
12. Morgan, C. R., and Lazarow, A.: Immunoassay of insulin using a two-antibody system. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, **116**, 29-32, 1962.
13. Kühl, C.: Dipping procedure for blood glucose determination with Dextrostix and the Eytone reflectance meter. *Acta. Med. Scand.* **197**, 467-469, 1975.
14. Horwitz, D. L., Rubenstein, A. H., Reynolds, C., Molnar, G. D., and Yanaihara, N.: Prolonged suppression of insulin release by insulin induced hypoglycemia: demonstration by C-peptide assay. *Horm. Metab. Res.* **7**, 449-452, 1975.
15. Shima, K., Morishita, S., Sawazaki, N., Tanaka, R., and Tarui, S.: Failure of exogenous insulin to inhibit insulin secretion in man. *Horm. Metab. Res.*, **9**, 441-443, 1977.
16. Beisher, W., Schmid, M., Kerner, W., Keller, L., and Pfeifer, E. F.: Dose insulin play a role in the regulation of its own secretion?, *Horm. Metab. Res.* **10**, 168-169, 1978.
17. Liljenquist, J. R., Keller, U., and Rubenstein, A. H.: Inhibition of insulin secretion by exogenous insulin

- in normal man as demonstrated by C-peptide assay *Diabetes*, 27, 563–570, 1978.
18. Sodoyez, J. C., Sodoyez, G. F., and Foa, P. P.: Evidence for an insulin-induced inhibition of insulin release by isolated islets of langerhans. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 130, 568–571, 1969.
  19. Sodyetz, J. C., Sodoyez, G. F., and rossen, R. M., and Foá, P. P. Function of the pancreatic b-cells in hamsters bearing a transplantable islets cell tumor. *Metabolism*, 18, 433–438, 1969.
  20. Rappaport, A. M., Ohira, S., Coddling, J. A., Empey, G., Kalnins, A., Lin, B. J., and Haist, R. E.: Effects on insulin output and on pancreatic blood flow of exogenous insulin infusion into an in situ isolated portion of the pancreas. *Endocrinology*, 91, 168–176, 1972.
  21. Iversen, J., and Miles, E. W.: Evidence for a feedback inhibition of insulin on insulin secretion in the isolated, perfused canine pancreas. *Diabetes*, 20, 1–9, 1971.
  22. Frerichs, H., Reich, V., and Creutzfeldt, W.: Insulinsekretion in vitro I. Hemmung der glucoseinduzierten Insulin abgabe durch insulin. *Klin. Wochschr.* 43, 136–140, 1965.
  23. Ammon, H. P. T., and Verspohl, E.: Pyridine nucleotides in pancreatic islets during inhibition of insulin release by exogenous insulin.: *Endocrinology* 99, 1469–1476, 1976.
  24. Loreti, L., Dunbar, J. C., Chen, S., Foá, P. P.: The autoregulation of insulin secretion in the isolated pancreatic islets of lean (obob) and obese-hyperglycemic (obob) *Diabetologia* 10, 309–315, 1974.
  25. Gregor, W. H., Martin, J. M., Williamson, J. R., Lacy, E., and Kipnis, D. M.: A study of the diabetic syndrome produced in rats by anti-insulin serum. *Diabetes* 12, 73–81, 1963.
  26. Logothetopoulos, J., Davidson, J. K., Haist, R. E., and Best, C. E.: Degranulation of beta cells and loss of beta cells and loss of pancreatic insulin after infusions of insulin antibody or glucose. *Diabetes* 14, 493–500, 1965.
  27. Ziegler, M., Hahn, H. J., and Klatt, D.: Influence of isolated insulin antibodies on the insulin secretion of the islets of Langerhans in vitro. *Diabetologia* 8, 148–149, 1972.
  28. Carolines, P., Matschinsky, F., Lacy, P. E., and Conant, S.: Electrophysiological evidence for the autoregulation of  $\beta$ -cell secretion by insulin. *Biochem. Biophys. Acta* 497, 408–414, 1977.
  29. Grodsky, G. M., Curry, D. L., Bennett, L. L., and Rodrigo, J. J.: Stimulators and inhibitors of insulin secretion: Physiological and pharmacological interfacial interferences and antagonisms. *Acta Diab. Latina*, 5 (Suppl.) 1, 140–161, 1968.
  30. Malaisse, W. J., Malaisse, L. F., Lacy, P. E., and Wright, P. H.: Insulin secretion by isolated islets in presence of glucose, insulin and anti-insulin serum *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 124, 497–500, 1967.
  31. Sando, H., Kanazawa, Y., and Kuzuya, T.: Effect of bonito insulin on endogenous insulin secretion in dogs. *Am. J. Physiol.* 218, 1357–1362, 1970.
  32. Turner, R. C., Johnson, P. C.: Suppression of insulin release by fish-insulin-induced hypo-glycemia: with reference to the diagnosis of insulinoma. *Lancet* 1, 1483–1485, 1973.

**Immunoreactive dog C-peptide levels in pancreatic vein**  
**Part III: Study of the feedback regulation of pancreatic B cell secretion**  
**by exogenous insulin**

**Yoshiaki NISHINA**

Third Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School,

Okayama, Japan

(Director : Prof. T. Ofuji)

Feedback regulation of insulin secretion from dog pancreatic B cells by exogenous insulin was demonstrated. Dog C-peptide immunoreactivity (CPR) concentration in the superior pancreaticoduodenal (pancreatic) vein was measured as an index of endogenous insulin secretion from B cells.

Exogenous monocomponent (MC) insulin was administered into superior pancreaticoduodenal (pancreatic) artery of normal dogs which had various concentrations of blood glucose.

When the blood glucose level was maintained at about 400 mg/dl, bolus injection of MC insulin (0.1 u/kg) into the pancreatic artery caused about 8.3% suppression of CPR level in the pancreatic vein. However, when the blood glucose concentration was approximately 180 mg/dl, suppression of the CPR level in the pancreatic vein was about 41%.

With a fasting blood glucose concentration, exogenous MC insulin caused about 35% suppression of CPR level, but exogenous dog C-peptide (0.2 pM/kg/min) infusion did not affect the IRI concentration in the pancreatic vein.