



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                     |                                                                                   |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | ラット脾島B細胞の刺激：放出連関の温度依存性に関する研究                                                      |
| Author(s)           | 丹羽, 光一                                                                            |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                             |
| Degree Name         | 博士(獣医学)                                                                           |
| Dissertation Number | 甲第3909号                                                                           |
| Issue Date          | 1996-03-25                                                                        |
| DOI                 | <a href="https://doi.org/10.11501/3112033">https://doi.org/10.11501/3112033</a>   |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/51331">https://hdl.handle.net/2115/51331</a> |
| Type                | doctoral thesis                                                                   |
| File Information    | 000000297225.pdf                                                                  |





ラット脾島B細胞の刺激－放出連関の  
温度依存性に関する研究

丹 羽 光 一



①

# ラット脾島B細胞の刺激－放出連関の 温度依存性に関する研究

材料と方法

1. 実験動物

2. 培養液の調製

3. 脾臓の摘出と脾臓細胞の採取

4. 脾臓細胞の培養と細胞の観察方法

5. 細胞の観察と細胞の測定

6. 細胞の観察と細胞の測定方法

7. 細胞の観察と細胞の測定方法

8. 細胞の観察と細胞の測定

9. インスリン細胞

10. 細胞の観察と細胞の測定

11. 結果

12. 結論

13. 参考文献

14. 謝辞

15. 索引

16. 図表

17. 表紙

18. 目次

19. 序文

20. 結論

21. 参考文献

22. 謝辞

23. 索引

24. 図表

25. 表紙

26. 目次

27. 序文

28. 結論

29. 参考文献

30. 謝辞

北海道大学大学院獣医学研究科  
比較形態機能学講座生理学教室

丹羽光一



## 目 次

|                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------|----|
| 緒論                                                        | 1  |
| 材料と方法                                                     | 5  |
| 1. 実験動物                                                   | 5  |
| 2. 灌流液の組成                                                 | 5  |
| 3. 摘出膵血管灌流標本の作製                                           | 5  |
| 4. 摘出膵血管灌流標本の灌流方法とサンプルの採取方法                               | 6  |
| 5. 膵島の単離と初代培養                                             | 7  |
| 6. 単離膵島標本の $[Ca^{2+}]_i$ 測定法                              | 8  |
| 7. 単離膵島標本の表面灌流方法                                          | 9  |
| 8. 灌流温度の調節                                                | 9  |
| 9. インスリン測定法                                               | 10 |
| 10. 温度係数の計算                                               | 11 |
| 11. 試薬                                                    | 11 |
| 結果                                                        | 12 |
| 1. ぶどう糖刺激によるインスリン分泌反応と $[Ca^{2+}]_i$ 変化                   | 12 |
| 2. ぶどう糖刺激による膵島のインスリン分泌反応の温度依存性                            | 14 |
| 3. ぶどう糖刺激による膵島の $[Ca^{2+}]_i$ 変化の温度依存性                    | 14 |
| 4. ぶどう糖刺激時のインスリン分泌と $[Ca^{2+}]_i$ の比率 (IS/Ca比) の温度依存性     | 16 |
| 5. ぶどう糖刺激時のインスリン分泌、 $[Ca^{2+}]_i$ 、及びIS/Ca比の温度係数          | 20 |
| 6. 高濃度 $K^+$ 、カルバミルコリン (CCh)、及びグリベンクラミドによるインスリン分泌反応の温度依存性 | 20 |



|                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 7. 高濃度K <sup>+</sup> 、CCh、及びグリベンクラミドによる[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> 変化の温度依存性                   | 22 |
| 8. 高濃度K <sup>+</sup> 、CCh、及びグリベンクラミドによる刺激時のインスリン分泌、[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> 、及びIS/Ca比の温度係数 | 23 |
| 考察                                                                                                 | 27 |
| 1. インスリン分泌と膵島[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> の相関                                                  | 27 |
| 1. 1. 2相性インスリン分泌反応と膵島[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> の時間的対応                                       | 27 |
| 1. 2. ぶどう糖刺激によるインスリン分泌反応の第1相と第2相の相違                                                                | 28 |
| 2. 温度の影響                                                                                           | 29 |
| 2. 1. ぶどう糖刺激によるB細胞の刺激-放出連関の温度依存性                                                                   | 29 |
| 2. 2. 膵島と単離B細胞の[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> 変化の温度依存性                                           | 30 |
| 2. 3. 高濃度K <sup>+</sup> 、CCh、及びグリベンクラミドによる刺激-放出連関の温度依存性                                            | 32 |
| 2. 4. B細胞の刺激-放出連関の特異性                                                                              | 33 |
| 要約                                                                                                 | 34 |
| 謝辞                                                                                                 | 37 |
| 引用文献                                                                                               | 38 |
| 英文要旨                                                                                               | 46 |



## 緒 論

分泌細胞が、神経伝達物質やホルモンなどの刺激を受けて酵素やイオンを細胞外に放出するまでの一連の過程は、刺激—放出連関と呼ばれる。刺激—放出連関の概念は、Douglasとその共同研究者による先駆的な研究(18, 19, 20, 21, 64)により確立された。元来この言葉は、副腎髄質細胞のカテコールアミン分泌における $\text{Ca}^{2+}$ の重要性を指摘するために用いられていたが(18)、現在では副腎髄質細胞のみならず、興奮性・非興奮性の全ての分泌細胞に共通して用いられている。刺激—放出連関に関するこれまでの研究は、分泌細胞の刺激—放出連関において、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ )の上昇が重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた(17, 38)。

刺激—放出連関に関するDouglasらの初期の実験では、副腎髄質細胞の細胞外液として、室温の細胞外液が用いられた(18, 19, 20, 21, 64)。一方、KnightとBaker(43)は、副腎髄質細胞の外液の条件、即ち温度、pHやイオン組成がカテコールアミン分泌に及ぼす影響を詳細に調べ、細胞外液の温度低下が分泌を抑制することを見いだした。彼らは、高濃度 $\text{K}^+$ やベラトリジンによって副腎髄質細胞から放出されるカテコールアミンが、温度の低下に依存して減少すること、そしてその温度係数( $Q_{10}$ )が2~3であることを報告した。神経伝達物質やホルモンの分泌の温度依存性を調べた様々な研究で、温度の低下による分泌の抑制は殆どないこと、あるいは $Q_{10}$ が2~4程度であることが報告されている(30, 37, 46, 76)。これに対し、膵島B細胞からのインスリン分泌は温度依存性が大きいことが知られており、単離膵島標本の表面灌流実験では、インスリン分泌の $Q_{10}$ は5~9であることが報告されている(5, 15)。

膵島B細胞はランゲルハンス島(膵島)に存在する内分泌細胞である。膵島は、ラットでは膵臓に約1万個存在する直径約200  $\mu\text{m}$ の内分泌器官である。膵島は少なくとも4種類の内分泌細胞、すなわちA、B、D、及びPP(F)細胞から構成され、このうちB細胞が最も多く、膵島の60~80%を占めている(24, 45, 63)。B細胞は、血中のぶどう糖濃度上昇に反応してインスリンを分泌する。膵血管灌流標本(13, 31)や単離膵島表面灌流標本(5, 25, 40, 59)を用い、それら標本に含まれるB細胞を高濃度ぶどう糖で刺激すると、インスリン分泌反応の時間経過は2相性になる。すなわち、インスリン分泌は持続的なぶどう糖刺激により、1) 一過性に急速に上昇して直ちに



下降した後、2) 緩やかに上昇し続ける。

B細胞のぶどう糖の感知からインスリン分泌に至る刺激-放出連関は、次のような過程から構成されている：1) ぶどう糖は、B細胞の細胞膜にあるぶどう糖輸送担体2型 (GLUT2) によって細胞内に取り込まれる；2) ぶどう糖は細胞質及びミトコンドリア内で代謝され、細胞質内のATP濃度が上昇する；3) 上昇したATPによってATP感受性 $K^+$ チャネルが閉鎖し、細胞膜が脱分極する；4) 電位感受性 $Ca^{2+}$ チャネル (VDCCs) が開いて細胞内に $Ca^{2+}$ が流入し、 $[Ca^{2+}]_i$ が上昇する；5) 開口放出によってインスリンが分泌される (4, 23, 56, 67, 75, 79, 82；図1)。このように細胞外液の栄養素の代謝が分泌の直接の刺激になっている点は、B細胞の刺激-放出連関の特徴である。

刺激-放出連関にぶどう糖代謝が組み込まれているため、低温によるぶどう糖代謝の抑制がインスリン分泌抑制の一因となっていることが考えられる。ところが、インスリン分泌の抑制の程度は、ぶどう糖代謝の抑制だけでは説明できないほど大きい。すなわち、ぶどう糖刺激によるインスリン分泌の温度依存性は、ぶどう糖代謝の温度依存性の数倍も大きいことがわかっている (5)。しかし、低温が、B細胞の刺激-放出連関のどの過程を抑制してインスリン分泌を減少させるかに関しては一致した結論が得られていない。

B細胞の刺激-放出連関に関する初期の研究では、インスリン分泌とB細胞の $[Ca^{2+}]_i$ との関係を調べるために、単離膵島標本を表面灌流して膵島からの $^{45}Ca^{2+}$ の外向き流束とインスリン分泌を測定する方法が主に取り入れられた。この手法を用い、ぶどう糖刺激期間中の膵島からの $^{45}Ca^{2+}$ の外向き流束とインスリン分泌に及ぼす低温の影響を調べた研究から、1) 低温は、B細胞への $Ca^{2+}$ 流入を減少させることでインスリン分泌を抑制する、という説 (5)、2) 低温はB細胞への $Ca^{2+}$ の流入には殆ど影響せずに、開口放出の過程を抑制することでインスリン分泌を抑制する、という対称的な説 (25) が提出された。これらの結論の違いは、 $[Ca^{2+}]_i$ を直接測定せずに、 $Ca^{2+}$ 外向き流束変化から $[Ca^{2+}]_i$ 動態を推定していることによると考えられる。

最近開発された $Ca^{2+}$ 感受性蛍光指示薬により、インスリン分泌と $[Ca^{2+}]_i$ の関係を、直接的に検討することが可能となり、B細胞の刺激-放出連関における $[Ca^{2+}]_i$ の役割が詳細に分析されてきた。Valdeolmillosら (78) は、マウスの膵島をぶどう糖で灌流している間は、膵島全体で $[Ca^{2+}]_i$ が同調して上昇と下降を繰り返す振動性変動を示すことを、蛍光指示薬であるIndo-1を用いて初めて報告した。その後、Roeら (71)



によって、膵島をぶどう糖で刺激すると、 $[Ca^{2+}]_i$ は若干減少した後に1～2分間一過性の上昇を示し、その後振動性変動に移行することが報告された。最近Gilonら(27)は、一個の膵島でぶどう糖刺激の際の $[Ca^{2+}]_i$ とインスリン分泌を同時測定し、 $[Ca^{2+}]_i$ とインスリン分泌の振動性変動の時相が一致していることを明らかにした。これらの報告にある実験は、全て37°C付近で行われた。

マウス腫瘍株化細胞(MIN6 cell; 74)、ob/obマウスB細胞(35)、及びラットB細胞(73)で、低温が $[Ca^{2+}]_i$ 動態に及ぼす影響が、 $Ca^{2+}$ 感受性蛍光指示薬を用いて調べられた。しかし、これらの研究でも、低温が $[Ca^{2+}]_i$ 上昇までの過程とそれ以降開口放出に至るまでのどちらの過程を抑制するのか、結論は得られていない。MIN6細胞の集団で $[Ca^{2+}]_i$ とインスリン分泌を同時測定した研究では、37°Cではぶどう糖による刺激期間中は $[Ca^{2+}]_i$ とインスリン分泌が同調して上昇したが、30°Cでは $[Ca^{2+}]_i$ とインスリン分泌はどちらもほぼ完全に抑制されることが報告された(74)。この結果から、低温によるインスリン分泌の抑制の一義的な過程は、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇反応の抑制にあると考えられる。一方ob/obマウスのB細胞では、温度を37°Cから30°Cに低下させても、ぶどう糖刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応の平均値は減少しなかったことが報告された(35)。またラットB細胞では、温度を37°Cから27°Cに低下させると、ぶどう糖刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の反応時間は遅延したが、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の振幅の大きさには影響しないことが報告された(73)。後者の二つの研究では、低温は、反応時間に遅れを生じさせること以外は $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応にほとんど影響していない。しかしこれらの研究ではインスリン分泌は測定されておらず、インスリン分泌の抑制と $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応の関係については言及されていない。

このように、ぶどう糖刺激によるインスリン分泌は他の分泌細胞と同様に $[Ca^{2+}]_i$ 上昇によって引き起こされることは明らかになっているが、低温によるインスリン分泌の抑制が、ぶどう糖の代謝から $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に至る過程を抑制することによるのか、あるいは $[Ca^{2+}]_i$ 上昇から開口放出に至る過程を抑制することによるのかは不明である。そこで、次の目的で本研究を計画した。1) ぶどう糖刺激による膵島の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応を、 $Ca^{2+}$ 感受性蛍光色素であるfura-2を用いて直接測定し、2相性のインスリン分泌反応における $Ca^{2+}$ の役割を確認する。2) 温度の低下が、ぶどう糖刺激によるインスリン分泌反応と $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応の相関に及ぼす影響を検討し、インスリン分泌の低温による抑制が、B細胞の刺激-放出連関における $[Ca^{2+}]_i$ 上昇までの過程とそれ以降の開口放出の過程のどちらの過程の抑制に起因するかを明らかにする。



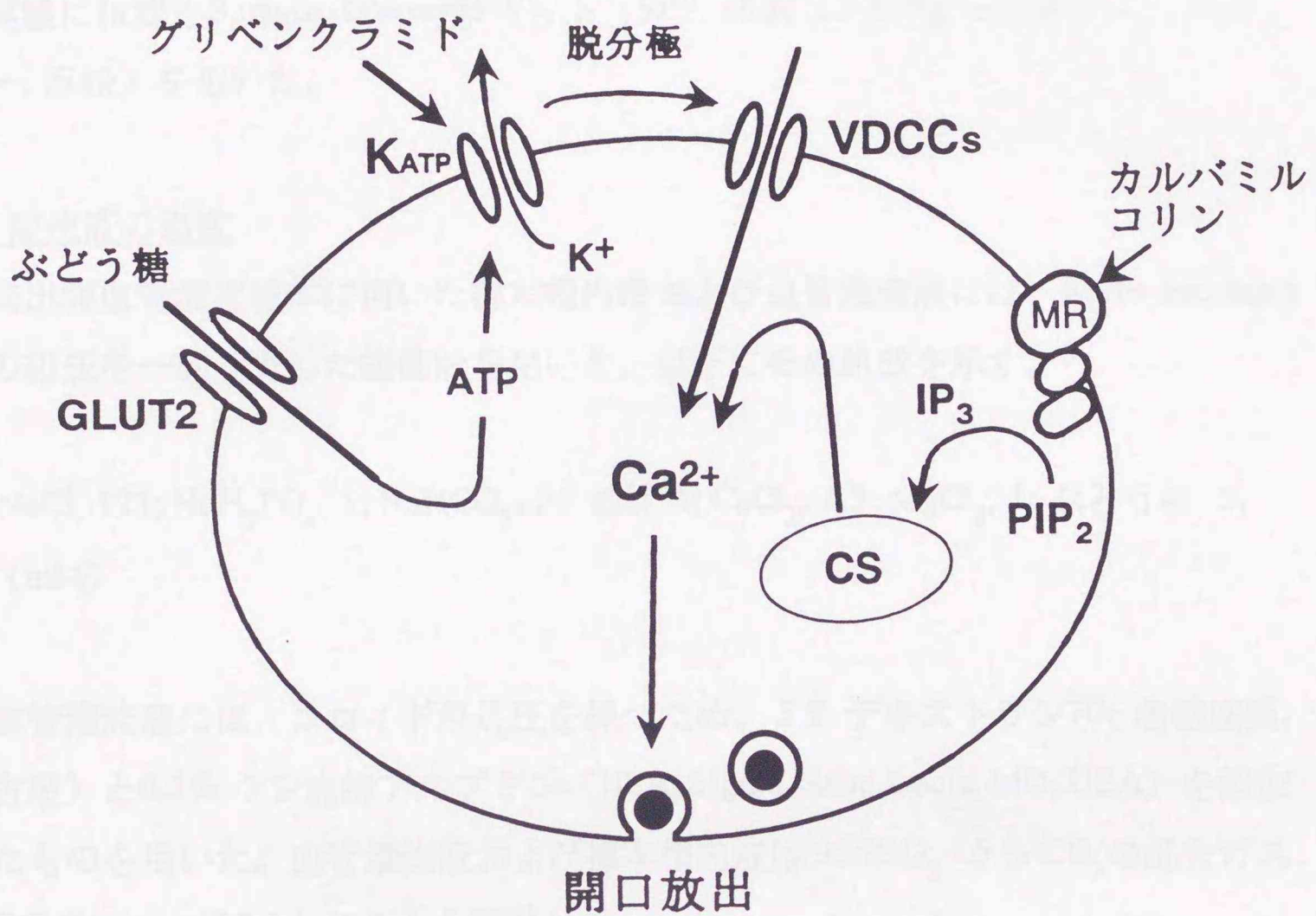


図1 B細胞の刺激-放出連関

GLUT2, ぶどう糖輸送担体 2 型 ; K<sub>ATP</sub>, ATP感受性K<sup>+</sup>チャネル ; VDCCs, 電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャネル ; MR, ムスカリン様アセチルコリン受容体 ; CS, Ca<sup>2+</sup>貯蔵部位 ; IP<sub>3</sub>, inositol 1,4,5-trisphosphate ; PIP<sub>2</sub>, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate.



## 材料と方法

### 1. 実験動物

実験には雄性Sprague-Dawley系ラット（SPF, 体重210-330 g ; 日本エス・エル・シー, 浜松）を用いた。

### 2. 灌流液の組成

摘出脾血管灌流標本に用いた標本槽内液および血管灌流液には、Krebs-Henseleit液の組成を一部変更した緩衝液を用いた。以下にその組成を示す。

NaCl, 121;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1;  $\text{NaHCO}_3$ , 25; KCl, 4;  $\text{CaCl}_2$ , 1.5;  $\text{MgCl}_2$ , 1; ぶどう糖, 5.  
(mM)

血管灌流液には、コロイド浸透圧を保つため、5% デキストラン70（名糖産業, 名古屋）と0.1% ウシ血清アルブミン（BSA; Sigma, Saint Louis, MO, USA）を添加したものをを用いた。血管灌流液および標本槽内液は95%  $\text{O}_2$  - 5%  $\text{CO}_2$ の混合ガスで飽和させ、pH 7.4となるよう調整した。

単離脾島標本の作製と表面灌流には、Krebs-Henseleit液の組成を一部変更した緩衝液に、4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid (HEPES)を添加した緩衝液（標準HEPES緩衝液）を用いた。以下にその組成を示す：

NaCl, 130;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1;  $\text{NaHCO}_3$ , 5; KCl, 5;  $\text{CaCl}_2$ , 2;  $\text{MgCl}_2$ , 1; HEPES, 10; ぶどう糖, 3（以上、mM）; BSA, 0.1%.

HEPES緩衝液にはNaOHを適量加えてpHを7.4に調整した。

### 3. 摘出脾血管灌流標本の作製

摘出脾血管灌流標本はKannoら（39）の方法に従って作製した。以下にその概



略を述べる。

- 1) 自由飲水下で一晩絶食させ、ラットをエーテルで麻酔し、背位に保定した。
- 2) 腹壁を白線に沿って剣状軟骨下まで切開し、さらに最後肋骨後縁を左右に切開し、腹腔を露出した。
- 3) 十二指腸を直腸および結腸から切り離し、次いで中結腸動脈・静脈を結紮後、切断した。
- 4) 下行結腸から脾臓を切り離し、前腸間膜動脈を露出させ、前腸間膜動脈と十二指腸終末部を結紮、切断した。
- 5) 胃大弯と脾臓の間の薄膜を剥離し、脾臓から分岐して大網内を走行する動・静脈を結紮し、大網を離断した。
- 6) 脾動・静脈を結紮した後、脾臓側で切断して脾臓を脾臓より遊離し、次に左胃動脈および後胃大静脈を結紮し、胃側で切断した。
- 7) 胃幽門部から十二指腸にかけて、脾臓から分岐する動・静脈を結紮した後、胃の近位で十二指腸を結紮し、胃側を切断した。
- 8) 腹腔動脈の支配領域の脾臓組織が途切れる部位で十二指腸を切断し、十二指腸カニューレを装着し、結紮・固定した。
- 9) 腹腔動脈および前腸間膜動脈を周囲の組織より剥離し、露出させた後、ポリエチレン製カニューレをそれぞれの動脈に挿入し、血管灌流を開始した。
- 10) 門脈に切開を入れてポリエチレン製カニューレを挿入し、灌流液の流出用とした。
- 11) 門脈をカニューレ挿入口の肝臓側で離断し、残りの結合組織を結紮・離断して腹腔より脾臓を遊離・摘出した。
- 12) 摘出した脾臓を37°Cに保った標本槽液内に浸した。以上の操作終了後、約30分灌流して標本を安定させた後、実験を開始した。

#### 4. 摘出脾血管灌流標本の灌流方法とサンプルの採取方法

血管灌流液は、ローラーポンプ (MP-101型; 東京理科, 東京) を用いて、腹腔動脈および前腸間膜動脈より流入させ、門脈より排出させた。流速は1.5 ml/minとした。標本槽内には、恒温槽内を走行するチューブを介して標本槽液を流入させた。

門脈より滴下する血管灌流液を、プラスチック試験管に1あるいは5分毎に採取



し、インスリンの測定に用いるまで-20°Cで保管した。

## 5. 膵島の単離と初代培養

膵島はLacyらの方法(44)に従ってラットより単離・採取した。以下にその概略を述べる。

- 1) ラットをエーテルで麻酔し、背位に保定した。
- 2) 腹部を切開して腹腔を露出し、腹大動脈からの放血により放血死させた。
- 3) 胆膵管を、十二指腸に至る直前で鉗子により閉塞した。
- 4) 肝臓の近位の総胆管にカニューレを膵臓側にむけて装着し、結紮・固定した。
- 5) 総胆管に装着したカニューレから、注射筒を用いて105~120 U/mlのコラゲナーゼ液 (Type IV; Worthington Biochemical Corp., NJ, USA) を15 ml注入し、膵臓を膨満させた。
- 6) 膵臓を腹腔から分離して、25 ml容量の三角コルベンに入れ、酸素を充分通気した後ゴム栓で密閉し、37°Cの恒温槽で振盪 (毎分100-120回) しながら40分間孵置した。
- 7) 孵置終了後、三角コルベン内に5 mlの標準HEPES緩衝液を加え、10 ml容量のピペットで数回、吸引・噴出を繰り返し、機械的に膵臓を破碎した。
- 8) コルベンの内容を10 ml容量のプラスチック試験管に移し、遠心した (30 × g, 30秒)。
- 9) 遠心後に上清を吸引して捨て、新たに標準HEPES緩衝液を10 ml加えた後、スポイトで内容を充分混和して再度遠心を行った。同様の作業を3回繰り返し、最終的に膵臓を10 mlの標準HEPES緩衝液に浮遊させた。
- 10) 直径100 mmのディッシュに標準HEPES緩衝液を10 ml入れ、そこに消化した膵臓の浮遊液を適量滴下した。
- 11) 実体顕微鏡下に膵臓の浮遊液の入ったディッシュを置き、マウスピースに接続した毛細管で膵島を採取し、標準HEPES緩衝液を10 ml入れたディッシュに移し変えた。
- 12) 10) と11) の操作を数回繰り返し、100-200個の膵島をディッシュに採取した。



採取した脾島を、ペニシリン (100 IU/ml) とストレプトマイシン (100  $\mu$ g/ml)、及び牛胎仔血清 (10 %) を添加した RPMI1640 培養液中に移し、5 %  $\text{CO}_2$ 、37°C の湿潤な環境下で初代培養した。脾島を長期間培養すると、ぶどう糖刺激に対する  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の上昇反応のパターンが異なってくることが報告されているため (28)、本研究では脾島を単離してから 1-2 日間以内に実験を行った。

## 6. 単離脾島標本の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 測定法

脾島を標準 HEPES 緩衝液で洗浄した後、3  $\mu$ M の fura-2 acetoxymethyl ester (AM) を含む 1 ml の標準 HEPES 緩衝液を入れた試験管内で、37°C で 60 分間振盪しながら孵置した。孵置中は試験管をアルミ箔で覆って遮光した。孵置終了後、試験管内に 9 ml の標準 HEPES 緩衝液を入れ、遠心 (30  $\times$  g, 30 秒) した後、上清液を吸引して試験管内の容量を約 1 ml とした。試験管はアルミ箔で遮光して、孵置終了後 30 分以上経過してから  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の測定に用いた。

Fura-2 を付加した脾島を細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  測定用チェンバーに移し、脾島を含むチェンバーを倒立顕微鏡 (TMD-2, Nikon, 東京) の載物部に固定した。細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  測定用チェンバーは、底面にカバーガラスを設置出来るように設計し、また標本槽の外側に恒温水を循環させ、灌流槽内の温度を一定に保てるように設計したものをを用いた。脾島を細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  測定用チェンバーに移して約 10 分間静置した後、ローラーポンプを用いて流速 0.7 ml/min で標本の表面灌流を開始した。標本槽内の灌流液の容量は、灌流液の加水と吸引を調整して一定 (約 100  $\mu$ l) に保った。

$[\text{Ca}^{2+}]_i$  はニコン P1 システム (Nikon, 東京) を用いて測定した。以下にその概略を述べる。

- 1) 20 倍の対物レンズを用いた。キセノンランプ (75 W) の励起光を、励起フィルター (380 および 340 nm, 半値幅  $\pm$  10 nm) を通過させた後、ダイクロイックミラーを用いて標本に照射した。紫外線による B 細胞の損傷を軽減するため (66)、励起フィルターを通過した励起光は、さらに減光フィルター (ND フィルター No16, Nikon, 東京) を通過させてから標本に照射した。
- 2) 標本からの蛍光は、510 nm の干渉フィルター (半値幅  $\pm$  20 nm) を通過させた後、



光電子増倍管で検出した。光電子増倍管に入る蛍光は、光路の前方にあるピンホールを絞って臍島からの蛍光のみとし、臍島周囲の蛍光を遮断した。

3) 光電子増倍管で検知した340 nmと380 nm励起による蛍光強度(それぞれF340、F380)の比(F340/F380; R)をコンピュータでリアルタイム処理し、その結果を逐一モニター画面上に写し出させた。測光間隔は5秒とした。得られたデータはフロッピーディスクに保存した。

$[Ca^{2+}]_i$ は、Rの値から、下記の式(32)を用いて算出した。

$$[Ca^{2+}]_i = Kd \times (R - R_{min}) / (R_{max} - R) \times \beta$$

ここでKdはfura-2の解離定数(224 nM)を、Rmaxはすべてのfura-2に $Ca^{2+}$ が結合したときの比を、Rminはfura-2が遊離しているときの比を、 $\beta$ は380 nmで励起したときの最小蛍光強度に対する最大蛍光強度の比を示している。

## 7. 単離臍島標本の表面灌流方法

臍島を標準HEPES緩衝液で洗浄した後、ほぼ同じ大きさ(直径約150  $\mu$ m)の臍島を30-60個、標準HEPES緩衝液を満たしたプラスチックホルダー(容量約330  $\mu$ l; Millipore Corp., Bedford, MA, USA)内に置いたナイロンメッシュ(口径20  $\mu$ m)上に移した。表面灌流はローラーポンプを用いて流速1ml/minで行った。標本を入れたプラスチックホルダーは、恒温槽内に固定した。プラスチックホルダーの下部にポリエチレンチューブを接続して表面灌流液を恒温槽外に導出し、滴下する表面灌流液を1.5、2、あるいは2.5分毎にプラスチック製試験管に採取した。採取した灌流液は、インスリン測定に用いるまで-20°Cで保存した。

## 8. 灌流温度の調節

摘出臍灌流標本の灌流実験では、37°Cに保った恒温槽内を走行するチューブを介して標本槽内液を流入させ、標本槽内の温度を35-37°Cに保った。



臍島標本の $[Ca^{2+}]_i$ 測定実験では、 $Ca^{2+}$ 測定用チェンバーの外側に恒温水を循環させ、標本槽内の灌流液の温度を正確に設定した。標本槽内の灌流液の温度の誤差は設定温度 $\pm 0.5^\circ C$ 以内であった。

臍島標本の表面灌流実験では、臍島を含むプラスチックホルダーを恒温槽の中に固定して、灌流液の温度を正確に設定した。プラスチックホルダー内の灌流液の温度の誤差は設定温度 $\pm 0.5^\circ C$ 以内であった。

## 9. インスリン測定法

灌流液中のインスリン濃度は、ラジオイムノアッセイ(RIA)で測定した。以下にその概略を記す。

- 1) サンプル及び標準曲線作製用のラットインスリン (Novo Nordisk Biolabs, Inc., U.K.)を2検体、300  $\mu l$ ずつ小試験管に分注した後、 $^{125}I$ で標識したブタインスリン(ICS Biochemicals Inc., CA, USA)、モルモット抗ラットインスリン血清 (Linco Research Inc., MO, USA)をそれぞれ100  $\mu l$ ずつ各試験管に分注してよく攪拌し、室温で24時間孵置した。
- 2) 各試験管に5 % ウシ $\gamma$ -グロブリン(Fraction II, III; Sigma, Saint Louis, MO, USA) 100  $\mu l$  を分注して攪拌し、10分後に20 % ポリエチレングリコール4000 (和光純薬, 大阪) 1 mlを分注して攪拌した後、1000  $\times g$ で20分間遠心した。
- 3) 上清を吸引した後、ガンマーカウンターで試験管中のペレットの放射活性を測定し、標準曲線よりインスリン濃度を求めた。

RIAの行程では、試薬は全て以下の組成のRIA用緩衝液に溶解して用いた。

NaCl, 110;  $NaH_2PO_4$ , 20;  $Na_2HPO_4$ , 20; ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 20 (以上、mM) ; sodium azide, 0.02; BSA (RIA grade, Sigma), 0.1; triton X, 0.1. (以上、%)



## 10. 温度係数の計算

実験で得られた、各刺激による刺激期間中の $[Ca^{2+}]_i$ とインスリン分泌、および $[Ca^{2+}]_i$ に対するインスリン分泌の比率については、それぞれの温度係数 ( $Q_{10}$ ) を求め、温度依存性について定量的な解析を行った。 $Q_{10}$ は、温度  $t+10^{\circ}C$  における化学反応速度と、 $t^{\circ}C$  における化学反応速度の比であり、化学反応の温度依存性の指標として用いられる (12)。

刺激期間中の平均 $[Ca^{2+}]_i$ と平均インスリン分泌、および平均 $[Ca^{2+}]_i$ に対する平均インスリン分泌の比率の対数を、絶対温度の逆数に対してプロットし、回帰直線をひいた (Arrhenius プロット, 図9)。回帰直線の傾き (Slope) を次式に代入して $Q_{10}$  を求めた (12)。

$$\text{Log } Q_{10} = -\text{Slope} \times (T_1 - T_2) / (T_1 \times T_2)$$

ここで $T_2$ は $T_1$ より $10^{\circ}C$ 低い温度を表す。本研究では、 $T_1$ と $T_2$ に、それぞれ $35^{\circ}C$ と $25^{\circ}C$  (それぞれ $308^{\circ}K$ 、 $298^{\circ}K$ ) を用いた。

## 11. 試薬

グリベンクラミドは三共株式会社 (東京) から供与された。塩化カルバミルコリンはSIGMA (Saint Louis, MO, USA) から購入した。



## 結 果

### 1. ぶどう糖刺激によるインスリン分泌反応と $[Ca^{2+}]_i$ 変化

高濃度のぶどう糖で膵島B細胞を刺激すると、2相性のインスリン分泌が引き起こされることが知られている(13, 31, 82)。この2相性のインスリン分泌と、 $[Ca^{2+}]_i$ 変化との対応を調べるために、ラットの摘出膵血管灌流標本と単離膵島表面灌流標本で、ぶどう糖刺激によるインスリン分泌と $[Ca^{2+}]_i$ 変化をそれぞれ調べた。灌流は35-37°Cで行った。

図2aは、灌流液中のぶどう糖濃度を5 mMから16.7 mMに上昇させたときの、膵血管灌流標本からのインスリン分泌を示している。高濃度ぶどう糖(16.7 mM)で灌流すると、インスリン分泌は急速に増加し、刺激開始後2分以内に最大値に達した後一旦減少した(第1相)。刺激開始後5分以降、インスリン分泌は緩やかに上昇し続けた(第2相)。

次に、ぶどう糖刺激によるB細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 変化を調べるために、fura-2を取り込ませた一個の膵島を表面灌流し、蛍光顕微測光法により $[Ca^{2+}]_i$ を測定した。7例の測定結果を平均値 $\pm$ 標準誤差で図2bに示した。測定開始直後の無刺激時の $[Ca^{2+}]_i$ は、 $105 \pm 9$  nM ( $n=7$ )であった。灌流液中のぶどう糖濃度を5 mMから16.7 mMに上昇させると、 $[Ca^{2+}]_i$ は一過性に約4 nM減少した。その後 $[Ca^{2+}]_i$ は2相性の上昇反応を示した： $[Ca^{2+}]_i$ は上昇して最大値( $158 \pm 16$  nM)に達した後、減少して4~5分間最大値より僅かに低い濃度を維持した(第1相)；刺激開始後約8分以降、 $[Ca^{2+}]_i$ は上昇し始め、ぶどう糖による刺激期間中緩やかに上昇し続けた(第2相)。後半の緩やかな上昇は、しばしば上昇と下降を繰り返す振動性変動を伴っていた(7例中4例)。

これらの結果から、膵血管灌流標本からのインスリン分泌と膵島標本での $[Ca^{2+}]_i$ がぶどう糖刺激によって2相性の上昇を示すことがわかった。しかし、両者の上昇反応の第1相、第2相の時相は一致していなかった。このことは、それぞれの測定に用いた標本の違い、すなわち摘出灌流標本と、初代培養した単離膵島標本の性質の違いに起因すると考えられる。そこで、以後の実験は全て、同様の条



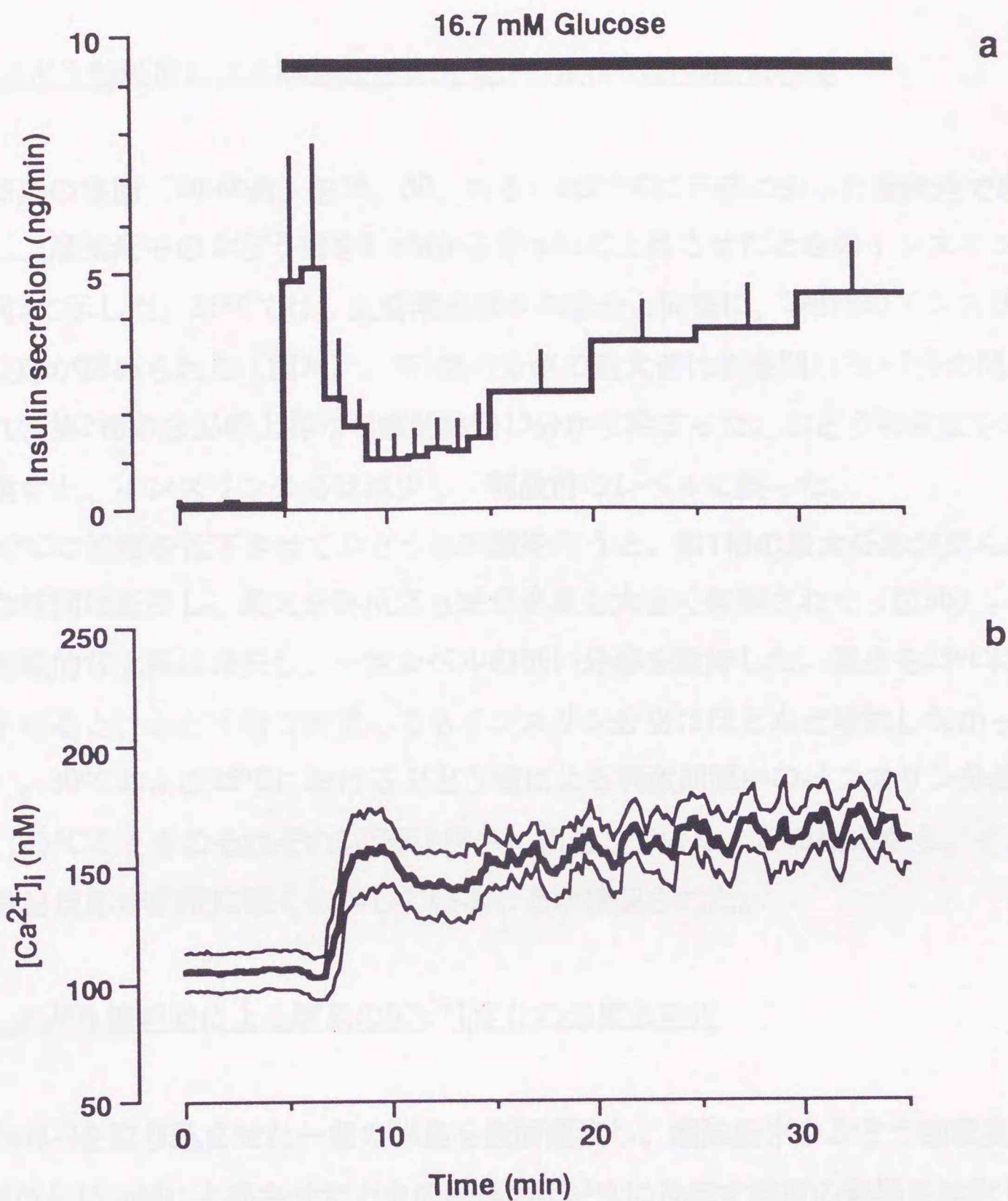


図2 ぶどう糖刺激によるインスリン分泌反応と $[Ca^{2+}]_i$ 変化

a; 灌流液中のぶどう糖濃度を5 mM から16.7 mMに上昇させたときの、摘出膵灌流標本からのインスリン分泌反応 (6例)。b; 灌流液中のぶどう糖濃度を5 mM から16.7 mMに上昇させたときの、膵島の $[Ca^{2+}]_i$ 変化 (7例)。値は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。文献57より改変・引用した。



件で単離・培養した膵島標本を用いて行った。

## 2. ぶどう糖刺激による膵島のインスリン分泌反応の温度依存性

膵島の集団 (30-60個) を35、30、あるいは25°Cに正確に保った灌流液で表面灌流し、灌流液中のぶどう糖を3 mMから15 mMに上昇させたときのインスリン分泌を図3に示した。35°Cでは、血管灌流標本の場合と同様に、2相性のインスリン分泌反応が認められた (図3a)。第1相の分泌の最大値は刺激開始後3-5分の間にみられ、第2相の分泌の上昇は刺激開始後13分から始まった。ぶどう糖濃度を3 mMに戻すと、インスリン分泌は減少し、刺激前のレベルに戻った。

30°Cに温度を低下させてぶどう糖刺激を行うと、第1相の最大分泌が見られる迄の時間は延長し、最大分泌反応も総分泌量も大きく抑制された (図3b)。第2相の持続的な上昇は消失し、一定レベルの低い分泌を維持した。温度を25°Cにさらに下げると、ぶどう糖で刺激してもインスリン分泌はほとんど増加しなかった (図3c)。30°Cおよび25°Cにおけるぶどう糖による刺激期間中のインスリン分泌総量は、35°Cのときのそれぞれ22%及び8%に相当していた。この結果から、インスリン分泌反応が温度に強く依存していることが確認された。

## 3. ぶどう糖刺激による膵島の $[Ca^{2+}]_i$ 変化の温度依存性

Fura-2を取り込ませた一個の膵島を表面灌流し、灌流液中のぶどう糖濃度を3 mMから15 mMに上昇させたときの膵島の $[Ca^{2+}]_i$ に及ぼす温度の影響を検討した。35°Cで、膵島を15 mMぶどう糖で刺激すると、5 mMから16.7 mMに上昇させたときと同様に、 $[Ca^{2+}]_i$ は最初に僅かに減少した後、2相性の上昇反応を示した (図4a)。無刺激時の $[Ca^{2+}]_i$ 濃度は $121.9 \pm 5.3$  nMであった。最初の $[Ca^{2+}]_i$ の減少は $10.2 \pm 1$  nMで、第1相の上昇の最大値は $237.9 \pm 10.1$  nMであった。刺激開始後7-12分後に第2相のゆっくりした持続的な上昇が始まり、実験に用いた膵島の半数 (10例中5例) ではこの第2相の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に振動性変動を伴っていた。ぶどう糖濃度を3 mMに戻すと $[Ca^{2+}]_i$ は減少して刺激前より若干高い一定の濃度に低下し、その濃度を維持した。個々の膵島から記録された、ぶどう糖刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応の平均値 (図5a) は、膵島からのインスリン分泌反応 (図3a) と時相的によく一致して



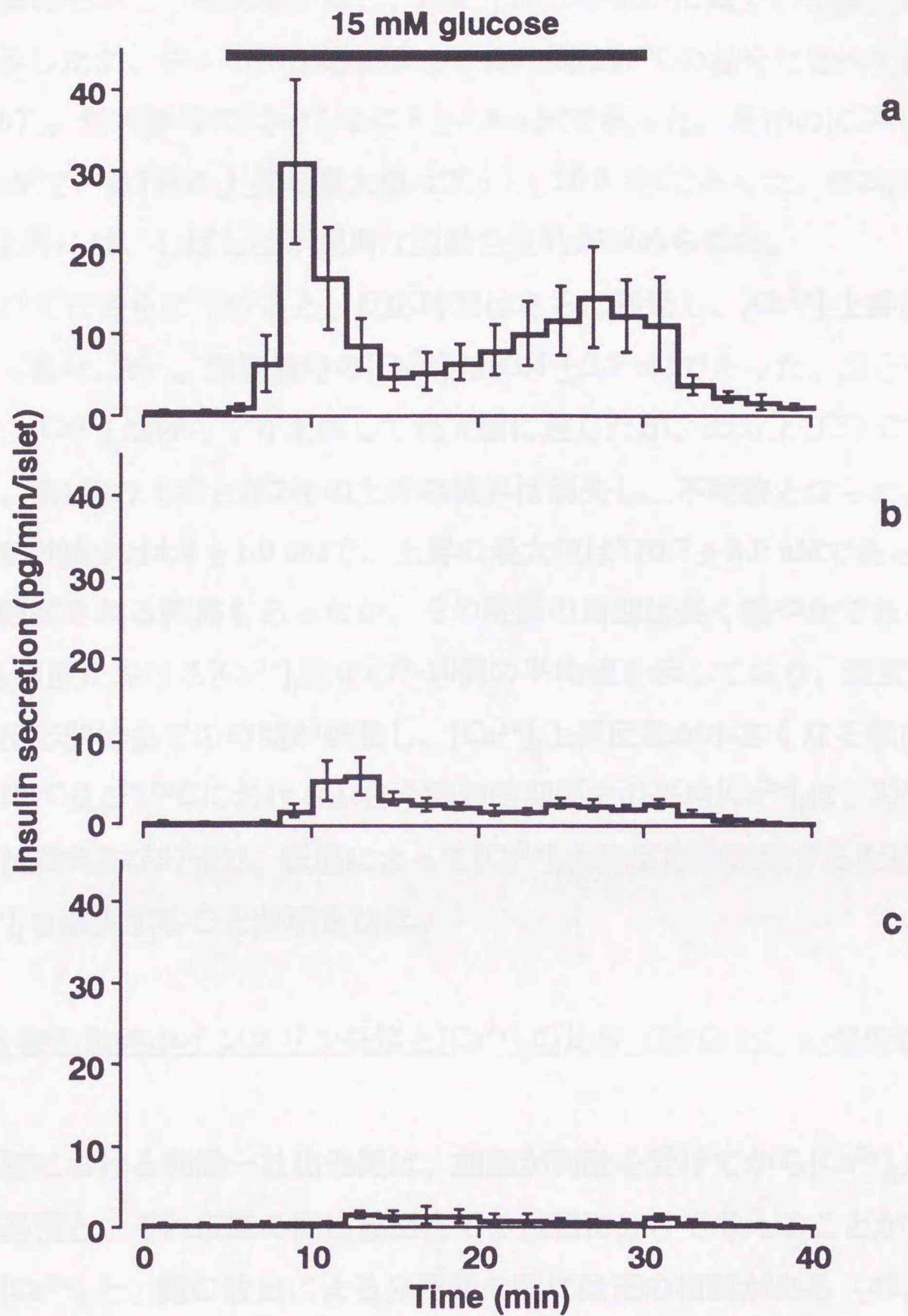


図3 ぶどう糖刺激による膵島からのインスリン分泌反応に及ぼす低温の影響

膵島の集団 (30-60) を異なる温度で灌流してぶどう糖刺激したときのインスリン分泌を示した: a, 35°C; b, 30°C; c, 25°C。灌流液中のブドウ糖濃度は3 mM から15 mMに上昇させた。値はそれぞれ4例の平均値  $\pm$  標準誤差で示した。文献58より引用した。



いた。

30°Cで膵島をぶどう糖刺激すると、 $[Ca^{2+}]_i$ は最初僅かに減少した後、2相性の上昇反応を示したが、各々の相が始まるまでの時間は35°Cの場合に比べて延長した(図4b, 5b)。無刺激時の $[Ca^{2+}]_i$ は $95.8 \pm 4.4$  nMであった。最初の $[Ca^{2+}]_i$ の減少は $6.4 \pm 0.3$  nMで、第1相の上昇の最大値は $206.1 \pm 20.8$  nMであった。第2相の持続的な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇には、しばしば不規則な振動性変動が認められた。

温度を25°Cにさらに下げると、反応時間はさらに遅延し、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応は抑制された(図4c, 5c)。無刺激時の $[Ca^{2+}]_i$ は $83.4 \pm 3.7$  nMであった。ぶどう糖で刺激すると、 $[Ca^{2+}]_i$ はゆっくり上昇して最大値に達したが、35および30°Cで見られたような、第1相の上昇と第2相の上昇の境界は消失し、不明瞭となった。最初の $[Ca^{2+}]_i$ 濃度の減少は $4.4 \pm 1.0$  nMで、上昇の最大値は $170.7 \pm 8.0$  nMであった。振動性変動が観察される膵島もあったが、その変動の周期は長く緩やかであった。

図5は各温度における $[Ca^{2+}]_i$ 変化の7-10例の平均値を示しており、温度を下げるにつれて反応開始までの時間が延長し、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応が小さくなる傾向が認められた。30°C及び25°Cにおけるぶどう糖刺激期間中の平均 $[Ca^{2+}]_i$ は、35°Cのときのそれぞれ73%及び57%で、低温によって $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応が遅延するだけでなく、平均 $[Ca^{2+}]_i$ も減少することが示された。

#### 4. ぶどう糖刺激時のインスリン分泌と $[Ca^{2+}]_i$ の比率(IS/Ca比)の温度依存性

分泌細胞における刺激-放出連関は、細胞が刺激を受けてから $[Ca^{2+}]_i$ が上昇するまでの過程と、それ以降の開口放出までの過程に分けて考えることが出来る。一般に、 $[Ca^{2+}]_i$ と、開口放出による分泌量の間には正の相関がある(42, 60)。そこで、 $Ca^{2+}$ が開口放出によるインスリン分泌を引き起こす効率の指標として、 $[Ca^{2+}]_i$ に対するインスリン分泌量の比率(IS/Ca比)を計算し、温度によりIS/Ca比がどのように変化するかを調べた。

図6は、ぶどう糖刺激によるIS/Ca比の経時的变化を、35°C、30°C及び25°Cについてそれぞれ示している。35°Cでは、ぶどう糖刺激を行うとIS/Ca比は増加して5分以内に最大値に達した後、減少した。刺激開始から11分以降、IS/Ca比は再び緩やかに増加し、刺激を停止すると減少した。第2相のIS/Ca比は、第1相よりも小さかった(図6a)。このIS/Ca比の経時的变化は、インスリン分泌の2相性変化(図



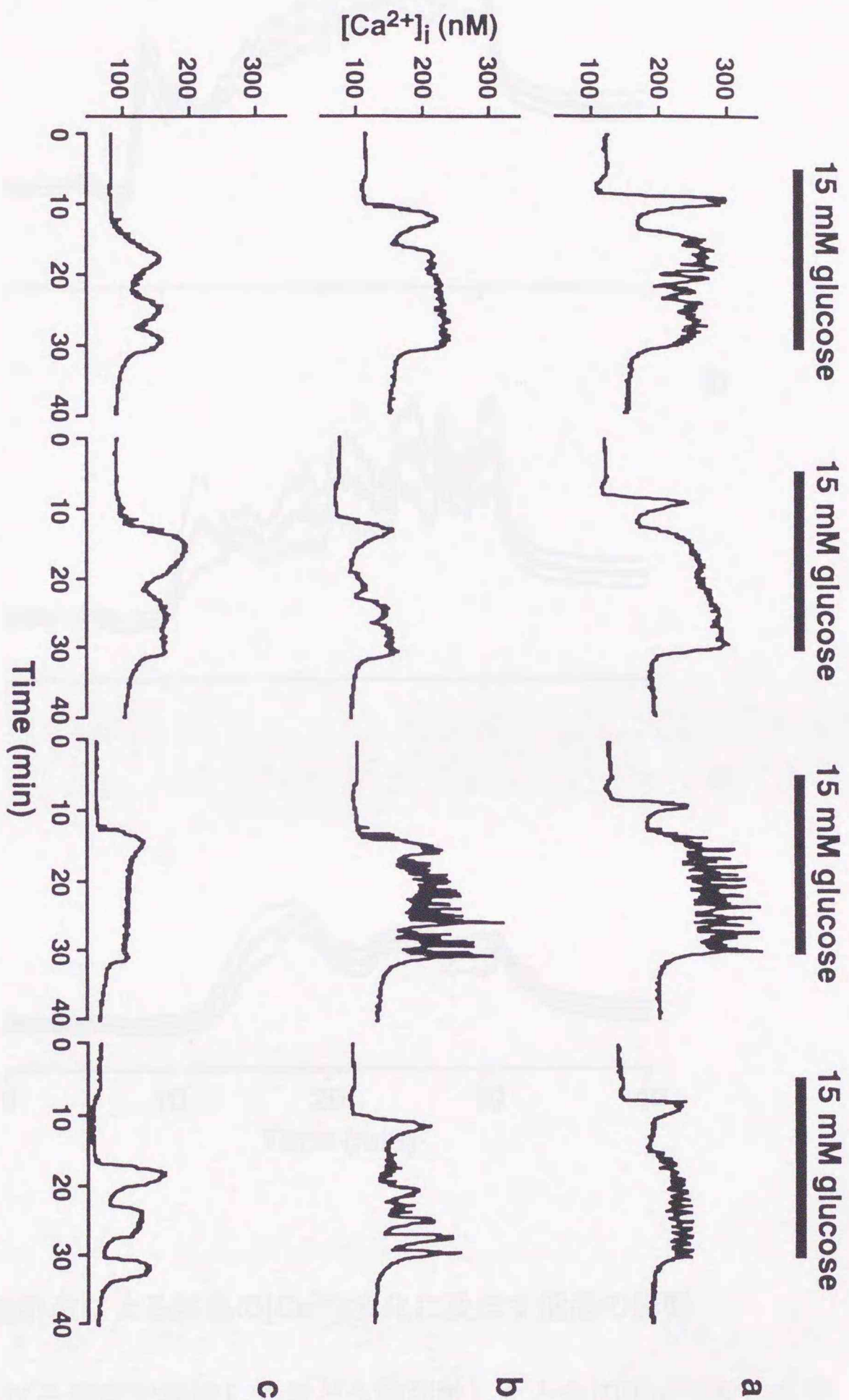


図4 ふどう糖刺激による個々の膵島の $[Ca^{2+}]_i$ 変化に及ぼす低温の影響の例

—個の膵島を、異なる温度で灌流してふどう糖刺激したときの $[Ca^{2+}]_i$ 変化の例を示した：a, 35°C, 10例中の4例；b, 30°C, 7例中の4例；c, 25°C, 7例中の4例。灌流液中のふどう糖濃度は3 mM から15 mMに上昇させた。文献58より引用した。



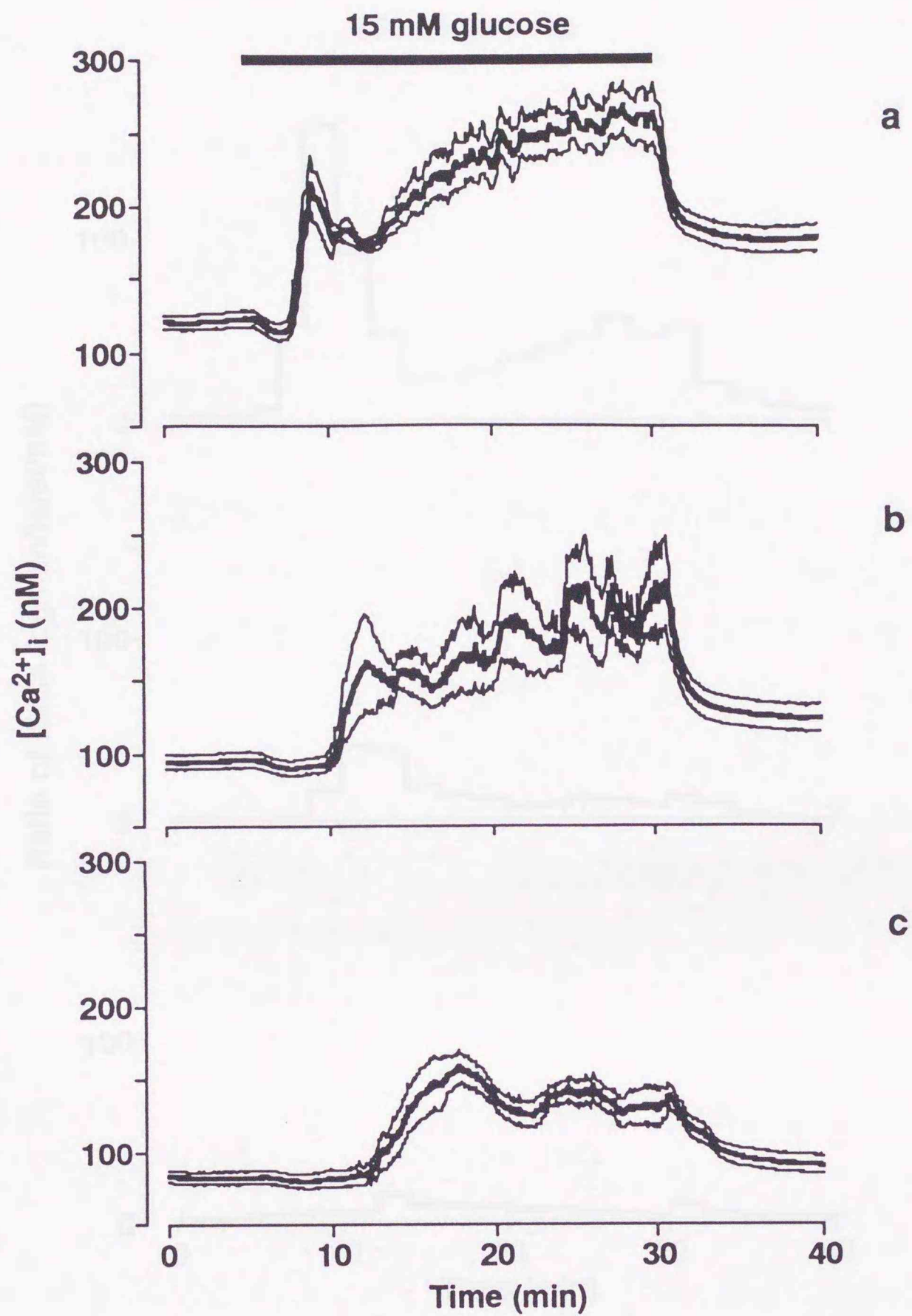


図5 ぶどう糖刺激による膵島の $[Ca^{2+}]_i$ 変化に及ぼす低温の影響

膵島を、異なる温度で灌流してぶどう糖刺激したときの $[Ca^{2+}]_i$ 変化を平均値 $\pm$ 標準誤差で示した（図4の例を含む）：a, 35°C, n=10; b, 30°C, n=7; c, 25°C, n=7。灌流液中のぶどう糖濃度は3 mM から15 mMに上昇させた。文献58より引用した。



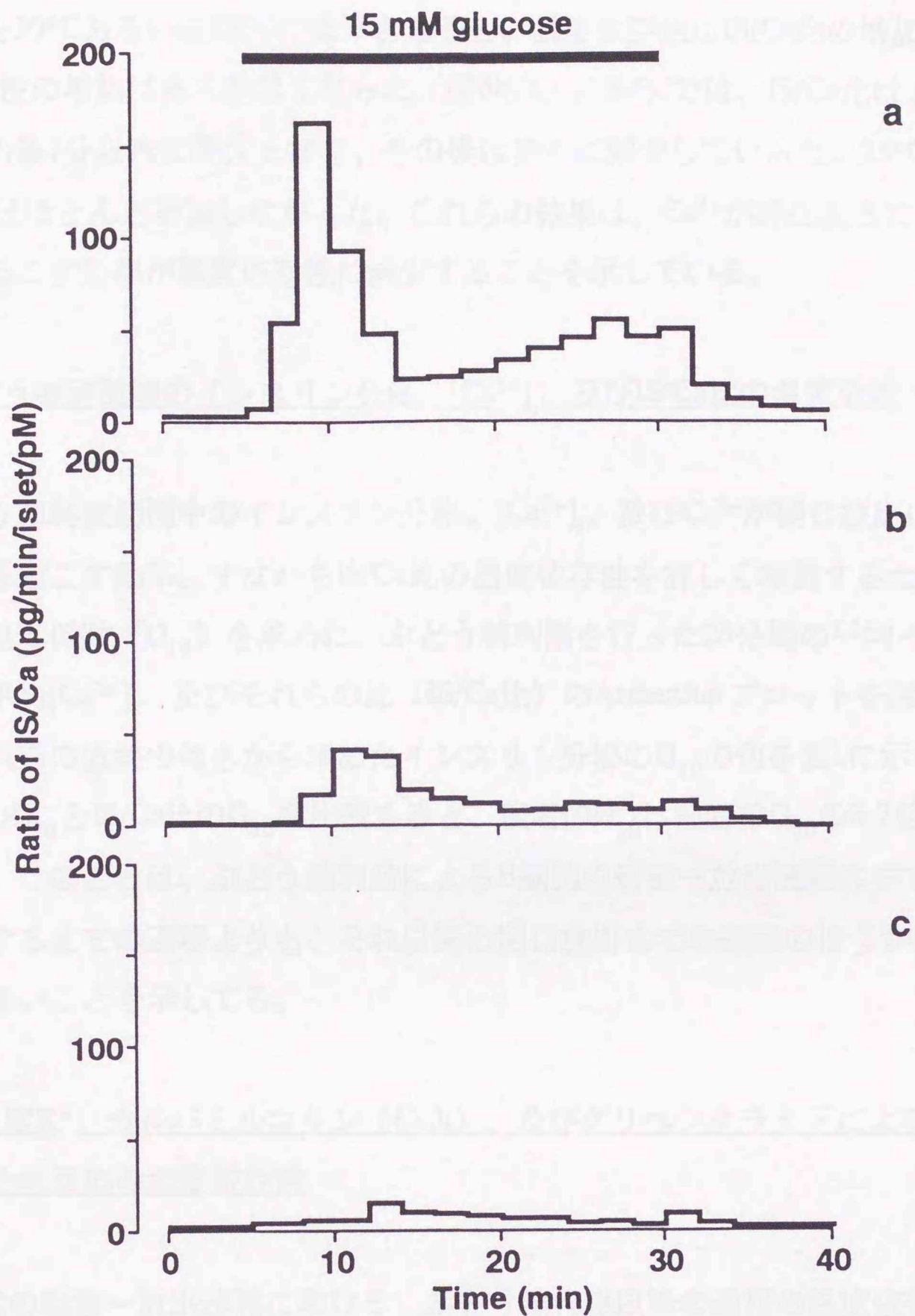


図6 ぶどう糖刺激による膵島のIS/Ca比の変化に及ぼす低温の影響

膵島を異なる温度で灌流してぶどう糖刺激したときの、インスリン分泌に対する $[Ca^{2+}]_i$ の比 (IS/Ca比) の経時的変化を示した: a, 35°C; b, 30°C; c, 25°C。インスリン分泌及び $[Ca^{2+}]_i$ は、それぞれ図3及び図6に示した値を用いた。 $[Ca^{2+}]_i$ の値は、インスリンのサンプル採取時間に対応した時間の平均値を用いた。文献58より引用した。



3a) に相応していた。

温度を30°Cあるいは25°Cに低下させると、温度依存性にIS/Ca比の増加は抑制され、2相性の増加は見られなくなった(図6b, c)。30°Cでは、IS/Ca比はぶどう糖刺激開始後7分以内に最大となり、その後は徐々に減少していった。25°CではIS/Ca比はほとんど増加しなかった。これらの結果は、 $\text{Ca}^{2+}$ が開口放出による分泌を引き起こす効率が温度依存性に減少することを示している。

#### 5. ぶどう糖刺激時のインスリン分泌、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 、及びIS/Ca比の温度係数

ぶどう糖刺激期間中のインスリン分泌、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 、及び $\text{Ca}^{2+}$ が開口放出による分泌を引き起こす効率、すなわちIS/Ca比の温度依存性を詳しく検討するため、それぞれの温度係数( $Q_{10}$ )を求めた。ぶどう糖刺激を行った25分間の平均インスリン分泌、平均 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 、及びそれらの比(IS/Ca比)のArrheniusプロットを図9aに示した。これらの直線の傾きから求めたインスリン分泌の $Q_{10}$ の値を表1に示した。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の $Q_{10}$ とIS/Ca比の $Q_{10}$ を比較すると、後者の $Q_{10}$ は前者の $Q_{10}$ の3.7倍に相当していた。このことは、ぶどう糖刺激によるB細胞の刺激-放出連関の中で、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇するまでの過程よりも、それ以降の開口放出までの過程のほうが温度依存性が大きいことを示している。

#### 6. 高濃度 $\text{K}^+$ 、カルバミルコリン(CCh)、及びグリベンクラミドによるインスリン分泌反応の温度依存性

B細胞の刺激-放出連関における、ぶどう糖代謝以降の過程の温度依存性を調べるために、分泌惹起機序の異なる高濃度 $\text{K}^+$ 、ムスカリン様アセチルコリン受容体を刺激するカルバミルコリン(CCh)、及びATP感受性 $\text{K}^+$ チャネルを閉鎖するグリベンクラミドによって引き起こされるインスリン分泌、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇反応、及びそれらの比(IS/Ca比)に対する温度の影響を調べた。図7は、高濃度 $\text{K}^+$ (30 mM)、CCh(100  $\mu\text{M}$ )、及びグリベンクラミド(2  $\mu\text{M}$ )で膵島を間欠的に刺激したときのインスリン分泌反応に及ぼす低温の影響を示している。35°Cでは、高濃度 $\text{K}^+$ で膵島を刺激すると、インスリン分泌は急速に上昇して最大値に達し、刺激を停止すると速やかに減少した(図7a)。温度を30°Cあるいは25°Cに低下させ



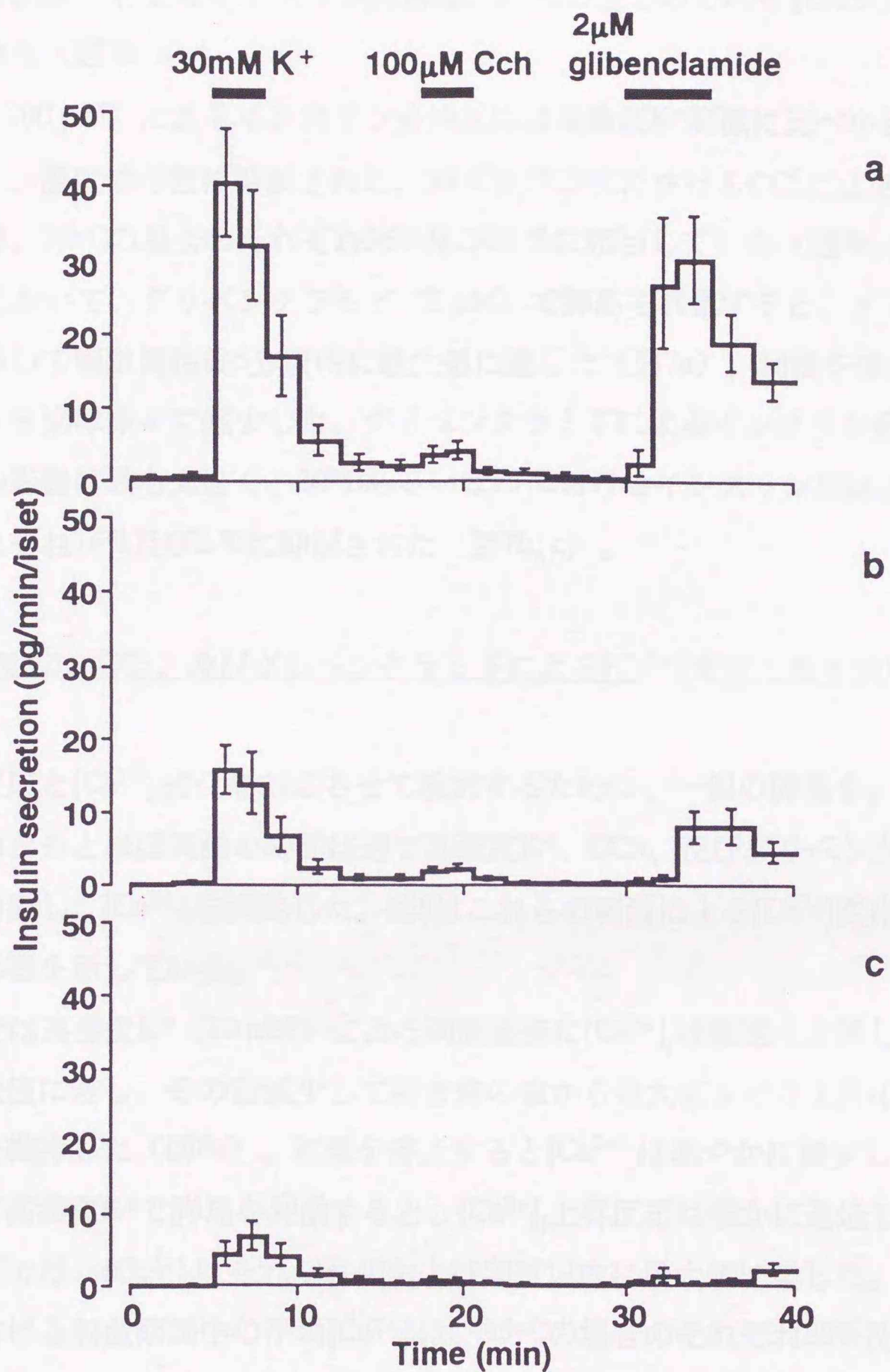


図7 高濃度K<sup>+</sup>、CCh、及びグリベンクラミドによる膵島からのインスリン分泌反応に及ぼす低温の影響

膵島を、3 mMのぶどう糖を含む灌流液を用いて異なる温度で灌流し、高濃度K<sup>+</sup> (30 mM)、CCh (100 μM)、及びグリベンクラミド (2 μM) で間欠的に刺激したときのインスリン分泌を示した：A, 35°C, n=4; B, 30°C, n=4; C, 25°C, n=5。値は平均値 ± 標準誤差で示した。文献58より引用した。



ると、高濃度 $K^+$ によるインスリン分泌は、 $35^{\circ}C$ の場合のそれぞれ41%及び19%に抑制された（図7b, c）。

CCh（ $100\text{ }\mu\text{M}$ ）によるインスリン分泌反応は高濃度 $K^+$ 刺激に比べ小さかったが（図7a）、温度依存性に抑制された。 $30^{\circ}C$ 及び $25^{\circ}C$ におけるCChによるインスリン分泌は、 $35^{\circ}C$ の場合のそれぞれ56%及び23%に相当していた（図7b, c）。

$35^{\circ}C$ において、グリベンクラミド（ $2\text{ }\mu\text{M}$ ）で膵島を刺激すると、インスリン分泌は上昇して刺激開始後5分以内に最大値に達した（図7a）。刺激を停止するとインスリン分泌は徐々に減少した。グリベンクラミドによるインスリン分泌に対する温度の影響は最も大きく、 $30^{\circ}C$ あるいは $25^{\circ}C$ におけるインスリン分泌は $35^{\circ}C$ の場合のそれぞれ16%及び2%に抑制された（図7b, c）。

#### 7. 高濃度 $K^+$ 、CCh、及びグリベンクラミドによる $[Ca^{2+}]_i$ 変化の温度依存性

分泌反応と $[Ca^{2+}]_i$ 変化を対応させて検討するために、一個の膵島を、インスリン分泌のときとほぼ同様の時間経過で高濃度 $K^+$ 、CCh、及びグリベンクラミドによって刺激し、 $[Ca^{2+}]_i$ を測定した。図8はこれらの刺激による $[Ca^{2+}]$ 変化に及ぼす温度の影響を示している。

$35^{\circ}C$ では高濃度 $K^+$ （ $30\text{ mM}$ ）による刺激直後に $[Ca^{2+}]_i$ は急速に上昇して25秒以内に最大値に達し、その後減少して刺激前の値から最大値までの上昇の60%程度の濃度を維持した（図8a）。刺激を停止すると $[Ca^{2+}]_i$ は速やかに減少した。温度を下げて高濃度 $K^+$ で膵島を刺激すると、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応は僅かに遅延した。 $30^{\circ}C$ 及び $25^{\circ}C$ では、 $[Ca^{2+}]_i$ はそれぞれ40および50秒以内に最大値に達した。 $30^{\circ}C$ 及び $25^{\circ}C$ における刺激期間中の平均 $[Ca^{2+}]_i$ は、 $35^{\circ}C$ の場合のそれぞれ89%及び56%で、インスリン分泌と異なり温度による抑制は小さかった（図8b, c）。

$35^{\circ}C$ において膵島をCCh（ $100\text{ }\mu\text{M}$ ）で刺激すると、 $[Ca^{2+}]_i$ 刺激開始直後に上昇して、35秒以内にピークに達し、刺激を停止すると直ちに減少した（図8a）。CCh刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応は温度を下げると僅かに遅延した； $30^{\circ}C$ 及び $25^{\circ}C$ では、 $[Ca^{2+}]_i$ はそれぞれ40及び35秒以内に最大値に達した。 $30^{\circ}C$ 及び $25^{\circ}C$ における刺激期間中の平均 $[Ca^{2+}]_i$ は、 $35^{\circ}C$ の場合のそれぞれ75%及び70%で、インスリン分泌と異なり温度による抑制は小さかった（図8b, c）。



グリベンクラミド刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応は、高濃度 $K^+$ やCChによる反応よりも、低温による抑制の程度が大きかった。グリベンクラミド ( $2\mu M$ ) で刺激すると、 $35^\circ C$ では $[Ca^{2+}]_i$ は速やかに上昇した後、一定の値 ( $233 \pm 21\text{ nM}$ ) に達し、刺激期間中ほぼその濃度を維持した (図8a)。温度を低下させると、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇速度は遅延した； $[Ca^{2+}]_i$ が最大値に達するまでの時間は $35^\circ C$ 、 $30^\circ C$ 、及び $25^\circ C$ でそれぞれ3分、4.5分、及び5分以内であった。刺激期間中の平均 $[Ca^{2+}]_i$ は温度に依存して減少し、 $30^\circ C$ 及び $25^\circ C$ における平均 $[Ca^{2+}]_i$ は、 $35^\circ C$ の場合のそれぞれ64及び55%であった (図8b, c)。グリベンクラミドによって上昇した $[Ca^{2+}]_i$ は、刺激を停止しても低下せず、刺激後少なくとも2分間は刺激中と同じ値を維持した。

#### 8. 高濃度 $K^+$ 、CCh、及びグリベンクラミドによる刺激時のインスリン分泌、 $[Ca^{2+}]_i$ 、及びIS/Ca比の温度係数

高濃度 $K^+$ 、CCh、及びグリベンクラミドによるインスリン分泌、 $[Ca^{2+}]_i$ 変化、及びIS/Ca比の温度依存性を検討するために、それぞれの温度係数 ( $Q_{10}$ ) を求めた。 $Q_{10}$ の計算には、高濃度 $K^+$  (3分間)、CCh (3分間)、及びグリベンクラミド (5分間) による刺激期間中の平均インスリン分泌、平均 $[Ca^{2+}]_i$ 、及びそれらの比 (IS/Ca比) を用いた。それぞれの刺激によるインスリン分泌、 $[Ca^{2+}]_i$ 、及びIS/Ca比のArrheniusプロットを図9b-cに示した。これらの直線の傾きから算出した $Q_{10}$ の値を表1に示した。

いずれの刺激を用いた場合でも、 $[Ca^{2+}]_i$ の $Q_{10}$ に比べIS/Ca比の $Q_{10}$ が大きかった。このことは、高濃度 $K^+$ 、グリベンクラミドによる脱分極による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇、あるいはCChによる細胞内 $Ca^{2+}$ 貯蔵部位からの動員による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の過程よりも、それ以降の開口放出の過程のほうが、温度に対する感受性が高いことを示している。



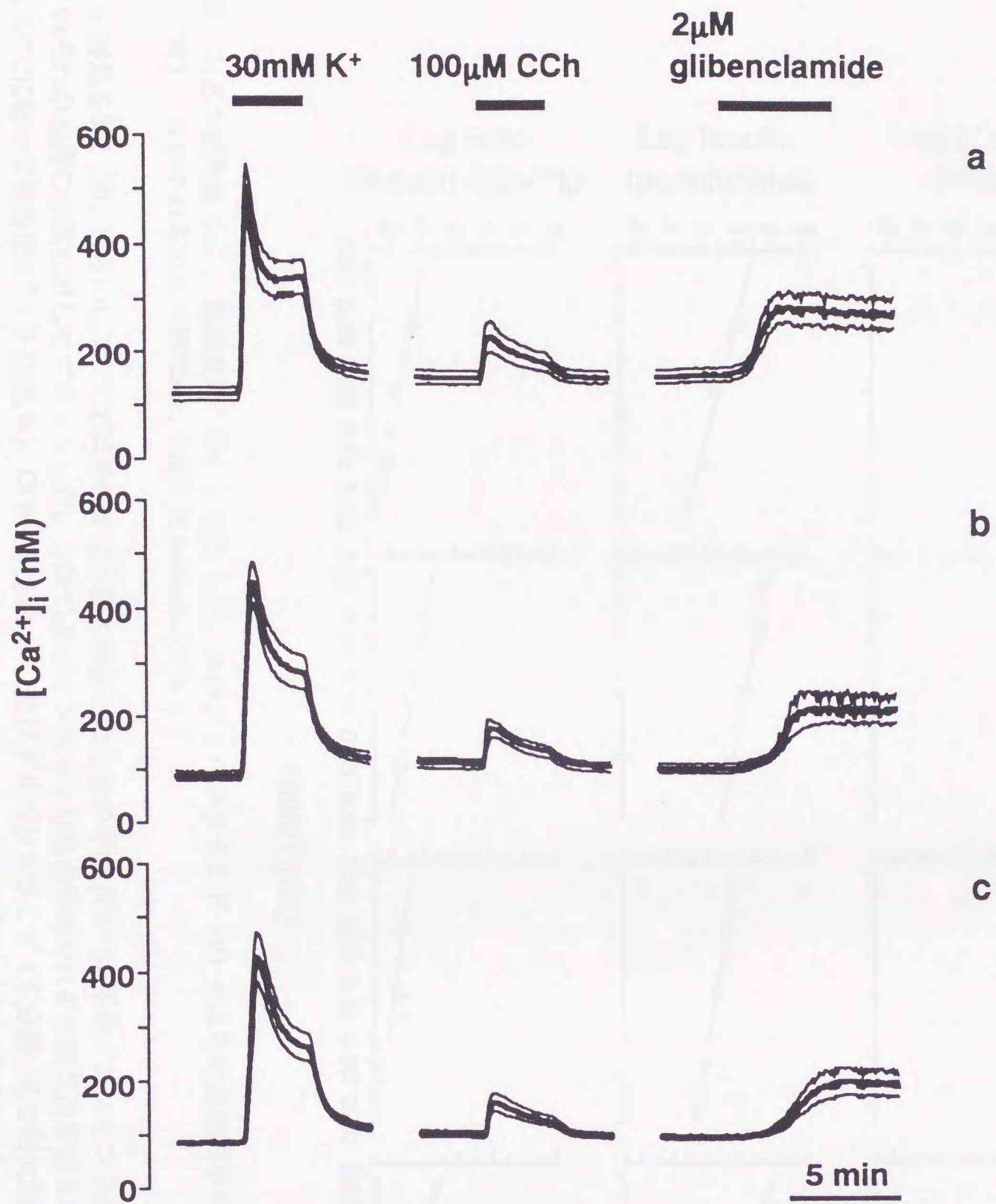


図8 高濃度 $K^+$ 、CCh、及びグリベンクラミドによる膵島の $[Ca^{2+}]_i$ 変化に及ぼす低温の影響

膵島を、3 mMのぶどう糖を含む灌流液を用いて異なる温度で灌流し、高濃度 $K^+$  (30 mM)、CCh (100  $\mu$ M)、及びグリベンクラミド (2  $\mu$ M)で間欠的に刺激したときの $[Ca^{2+}]_i$ を示した：a, 35°C; b, 30°C; c, 25°C。値は4例 (a, b) あるいは5例 (c) の平均値  $\pm$  標準誤差で示した。刺激の終了から次の刺激の開始の間には約10分間の間隔を置いた。文献58より引用した。



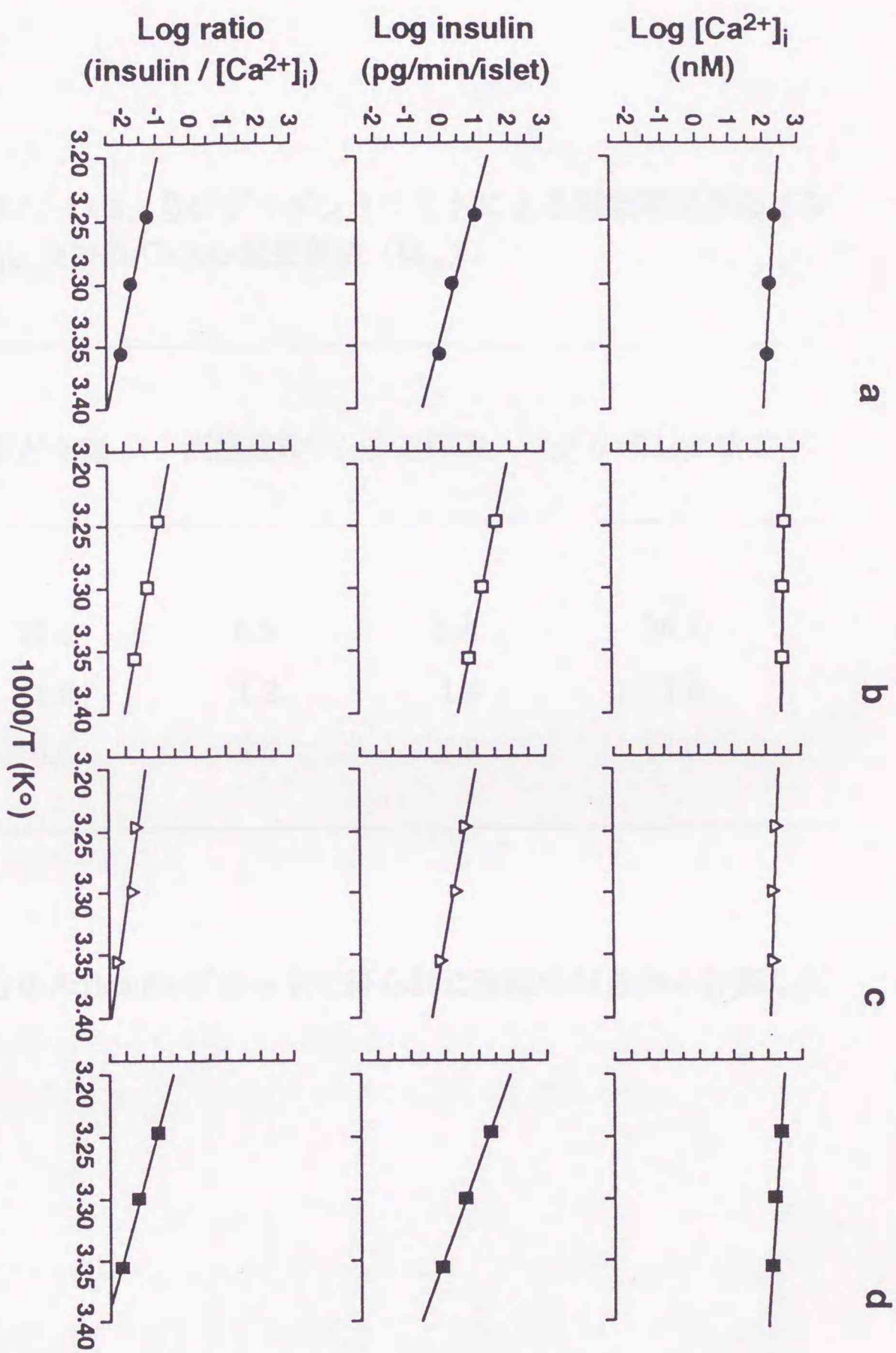


図9 ふどう糖刺激 (a)、高濃度K<sup>+</sup> (b)、CCh (c)、及びグリベンクラミド (d) による刺激期間中の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (上段)、インスリン分泌 (中段)、及びそれらの比 (IS/Ca比, 下段) のArrheniusプロット

a; 膵島を35、30、あるいは25°Cで25分間ふどう糖で刺激したときの平均 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>、平均インスリン分泌量、及びそれらの比 (IS/Ca) の値の対数をそれぞれの温度の逆数に対してプロットした。 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>及びインスリン分泌の値はそれぞれ図5及び図3から引用した。b-d; 膵島を35、30、あるいは25°Cにおいて高濃度K<sup>+</sup> (3分間, b)、CCh (3分間, c)、及びグリベンクラミド (5分間, d)で間欠的に刺激したときの各々の平均 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>、平均インスリン分泌量、及びそれらの比 (IS/Ca) の値の対数を、それぞれの温度の逆数に対してプロットした。 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>及びインスリン分泌の値はそれぞれ図8及び図7から引用した。温度係数はこれらのプロットの直線の傾きから計算した (材料と方法参照)。文献58より引用した。



表1 ぶどう糖、高濃度K<sup>+</sup>、CCh、及びグリベンクラミドによる刺激期間中のインスリン分泌、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>、及びIS/Ca比の温度係数 (Q<sub>10</sub>)

|                                  | ぶどう糖 | 高濃度K <sup>+</sup> | CCh | グリベンクラミド |
|----------------------------------|------|-------------------|-----|----------|
| インスリン分泌                          | 11.6 | 6.5               | 5.4 | 26.7     |
| [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> | 1.8  | 1.2               | 1.4 | 1.8      |
| IS/Ca比                           | 6.6  | 5.6               | 3.8 | 13.0     |

それぞれの値は、図9のArrheniusプロットで得られた直線の傾きから計算した (材料と方法参照)。



## 考 察

膵島は少なくとも4種類の内分泌細胞から構成されており、膵島全体から記録されるfura-2の蛍光は、B細胞からの蛍光と、B細胞以外の細胞群からの蛍光の総和である。しかし、以下の報告に基づけば、今回測定した膵島からの蛍光比の変化は、主にB細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 変化を反映していると考えて良いであろう：1) 膵島を構成する細胞の60-80%はB細胞である(24, 45, 63)；2) 単一の膵島で $[Ca^{2+}]_i$ 動態とインスリン分泌を同時測定した研究で、ぶどう糖刺激、アセチルコリン(ACh)刺激、及びATP感受性 $K^+$ チャネルを閉鎖して脱分極を引き起こすトルブタミドによる刺激を行うと、膵島全体で測定した $[Ca^{2+}]_i$ 動態とインスリン分泌とが同調して上昇することが示されている(27)。

### 1. インスリン分泌と膵島 $[Ca^{2+}]_i$ の相関

#### 1.1. 2相性インスリン分泌反応と膵島 $[Ca^{2+}]_i$ 変化の時間的対応

膵摘出灌流標本(13, 31)や単離膵島表面灌流標本(5, 25, 40, 59)を高濃度ぶどう糖で灌流すると、インスリン分泌は一過性の上昇とそれに続く持続的な上昇から成る2相性の反応を示すことが以前から知られていた。今回の結果でも膵摘出灌流標本(図2a)、単離膵島表面灌流標本(図3a)ともにぶどう糖刺激によるインスリン分泌は2相性であり、2相性のインスリン分泌が、膵島自体の内在的な性質によることが確認された。

多くの分泌細胞の刺激-放出連関と同様に、膵島B細胞からのインスリン分泌は、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇によって引き起こされる(61, 67, 82)。初期の研究でMeissner(53, 54)は、ぶどう糖で刺激したとき、膵島B細胞の活動電位が、一過性の脱分極とそれに引き続く反復性の脱分極から成る2相性の活動電位を示すことから、2相性のインスリン分泌は、2相性の膜電位変化とそれに伴うイオンの流入に起因することを指摘した。その後、ぶどう糖刺激による膵島B細胞の活動電位が $Ca^{2+}$ の流出入によって形成されることが明らかとなった(16, 49, 75)。 $[Ca^{2+}]_i$ 変化とインスリン分泌の対応を研究するために、これまで主に膵島からの $^{45}Ca^{2+}$ 外向き流



束の測定法が用いられてきたが、最近開発された $\text{Ca}^{2+}$ 感受性蛍光指示薬を用いたここ数年の研究で、次のような結果が得られている：1) ぶどう糖刺激期間中の膵島全体の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を記録すると、膵島全体で $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が同調して上昇と下降を繰り返す振動性変動を示し(78, 80)、急激な高濃度ぶどう糖刺激を行うと、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は一過性の上昇の後に振動性変動に移行した(71)；2) 一個の膵島で $[\text{Ca}^{2+}]_i$ とB細胞の膜電位を同時測定すると、ぶどう糖刺激によって $[\text{Ca}^{2+}]_i$ と膜電位は同調して上昇と下降を繰り返した(34, 75)；3) 一個の膵島で $[\text{Ca}^{2+}]_i$ とインスリン分泌を同時測定してぶどう糖刺激を行うと、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の振動性変動に同調してインスリン分泌も振動性の変動を示した(7, 27)。

今回、個々の膵島から記録したぶどう糖刺激による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇反応の平均値は2相性を示しており(図5a)、第1相の一過性の上昇とそれに続く第2相の持続的な上昇は、膵島の集団からのインスリン分泌の第1相、第2相とそれぞれ時間的によく一致していた(図3a)。本研究結果とこれまでの報告は、膵島の集合をぶどう糖刺激したときに観察される2相性のインスリン分泌が、個々の膵島の2相性の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇反応の総和を反映していることを示唆している。

個々に分散したB細胞では、ぶどう糖刺激による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇反応のパターンが細胞によって異なり(29, 36, 65, 84)、また、個々に分散したB細胞の集合からのインスリン分泌も明確な2相性とはならない(62, 63)。ぶどう糖刺激による2相性の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 動態及びインスリン分泌反応は、B細胞が膵島という細胞集団を構成している場合に認められる特有の生理的現象であると考えられる。

#### 1.2. ぶどう糖刺激によるインスリン分泌反応の第1相と第2相の相違

本研究では、 $\text{Ca}^{2+}$ がインスリンの開口放出を引き起こす効率の指標として、IS/Ca比を用いた。ぶどう糖刺激によるインスリン分泌及び $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇反応の第1相におけるIS/Ca比、すなわち単位 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ あたりのインスリン分泌は、第2相のそれよりも高かった(図6a)。この結果は、単位 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ あたりのインスリンの開口放出の効率が、第2相よりも第1相のほうが良いこと、すなわち第1相と第2相のインスリン分泌を構成するB細胞の細胞内機序に、質的あるいは量的な相違が存在することを示している。

この現象は、分泌顆粒が、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇に即座に反応して開口放出しうる顆粒群とそれ以外の顆粒群に分かれていることを反映しているのかもしれない。分泌顆



粒の細胞膜からの距離が、開口放出のパターンに影響するという考えは古くからB細胞(31)で指摘されており、また最近副腎髄質細胞からのカテコールアミン分泌(55)でも指摘されている。

次に、ぶどう糖刺激の際の $[Ca^{2+}]_i$ 以外の主な情報伝達因子であるサイクリックAMP(cAMP)が影響している可能性がある。cAMPは開口放出を増強する(3, 67)。高濃度のぶどう糖刺激を行うと、膵島内のcAMP濃度は上昇して10分以内に最大となり、その後はゆっくりと減少する(69, 85)ことが報告されている。今回、第2相よりも第1相のほうが $[Ca^{2+}]_i$ 当たりのインスリン分泌が多かったのは、cAMPによる開口放出の増強効果によるのかもしれない。

最後に、開口放出の過程に関与する蛋白キナーゼが、第1相と第2相で異なる可能性が考えられる。Zawalichら(86)は、ぶどう糖刺激によるインスリン分泌の第1相、第2相には、それぞれカルモジュリン感受性キナーゼ、Cキナーゼが寄与しているという考えを提案している。

本研究の結果からは細胞内シグナル伝達機構の詳細を検討することは出来ないが、おそらく、以上の機構の全て、あるいは一部分がインスリン分泌の第1相と第2相におけるIS/Ca比の相違に関与しているであろう。

## 2. 温度の影響

### 2.1. ぶどう糖刺激によるB細胞の刺激-放出連関の温度依存性

ぶどう糖刺激によるインスリン分泌が低温により抑制されることが、灌流標本(14, 46)や単離膵島標本(5, 25, 40, 59)で報告されている。Atwaterらは、単離膵島表面灌流標本を用いてぶどう糖刺激によるインスリン分泌と $^{45}Ca^{2+}$ の外向き流束を同時に測定し、それらの温度依存性を検討した(5)。それによると、灌流温度を37°Cから27°Cに低下させると、ぶどう糖刺激による $^{45}Ca^{2+}$ 外向き流束の増加はわずかに抑制されただけであったが( $Q_{10}=2$ )、インスリン分泌は大きく抑制された( $Q_{10}=9$ )。この結果から彼らは、低温は、ぶどう糖代謝による $Ca^{2+}$ 流入よりも、それ以降の開口放出を抑制することでインスリン分泌を抑制すると結論した。Kikuchiら(40)も単離膵島標本を用いた実験で同様の結論を得ている。一方、Escobarら(25)も単離膵島標本を用い、ぶどう糖刺激によるインスリン分泌と $^{45}Ca^{2+}$ の外向き流束を測定し、灌流液中の $Ca^{2+}$ 濃度を増加させると、温度を



37°Cから27°Cに低下させても、インスリン分泌は殆ど抑制されないことを報告した。この結果から彼らは、 $[Ca^{2+}]_i$ を一定に保つことが出来れば低温によるインスリン分泌の抑制はおこらないと考え、低温によるインスリン分泌の抑制は、細胞内への $Ca^{2+}$ の流入が減少することが主な要因であると結論した。

本研究では、fura-2を用いて、ぶどう糖刺激による膵島の $[Ca^{2+}]_i$ 動態を直接測定し、インスリン分泌と対応させてそれぞれの温度依存性を調べた。その結果、ぶどう糖刺激期間中の膵島 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応は、低温によって反応開始までの時間が延長するだけでなく、反応の平均値も減少することが明らかとなった（図5）。また、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇以後の開口放出の温度依存性の指標であるIS/Ca比の $Q_{10}$ は、 $[Ca^{2+}]_i$ の $Q_{10}$ の3.7倍であった。これらの結果は、1) ぶどう糖刺激によるインスリン分泌の刺激-放出連関において、ぶどう糖代謝から $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に至る一連の過程と、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇以降の開口放出の過程の両方が低温によって抑制を受けるが、2) 後者のほうに、より大きな温度感受性があることを示唆している。従来の研究では $^{45}Ca^{2+}$ 外向き流速の変化から $[Ca^{2+}]_i$ 濃度を推定していたために結論が一致しなかった膵B細胞の刺激-放出連関の温度依存性の特徴が、本研究によって明らかになったと言えるであろう。

ぶどう糖のB細胞への取り込みの速度(48)や、細胞内におけるぶどう糖の燐酸化や消費量(26)が低温で抑制を受けることが報告されており、低温による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応の抑制の原因の一部となっていると考えられる。一方、膵島を一定時間ぶどう糖で刺激した後の細胞内ATP濃度は、38°Cと28°Cで殆ど変わらなかったという報告もあるが、この報告では刺激中の細胞内ATP濃度変化の時間経過は測定されていない(59)。低温による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応の抑制が、ぶどう糖代謝の抑制に起因することを証明するためには、ぶどう糖刺激期間中の細胞内ATP濃度を経時的に測定し、低温の効果を調べる必要があるであろう。

## 2.2. 膵島と単離B細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 変化の温度依存性

最近、Rojasらは、単離したラットB細胞で $[Ca^{2+}]_i$ を測定し、温度を37°Cから27°Cに低下させると、ぶどう糖刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応は遅延するが上昇の大きさは影響を受けないことを報告した(73)。この結果によれば、低温によるインスリン分泌の抑制は、その原因のほとんどすべてが $[Ca^{2+}]_i$ 上昇以降の開口放出の機序に帰せられることになる。これに対し本研究では、ぶどう糖刺激による膵



島の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応が、低温によって遅延するだけでなく、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の最大値や、刺激期間中の $[Ca^{2+}]_i$ 平均値も減少することが初めて明らかとなった。

Rojasらの研究結果と本研究結果の相違は、用いた標本の性質の違いによると考えられる。膵島をぶどう糖で刺激すると、再現性の高い2相性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応が引き起こされる(7, 34, 71, 及び本研究・図4a)。一方、単離したB細胞では、2相性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応は殆ど見られず、 $[Ca^{2+}]_i$ 変化のパターンは細胞によって異なる(29, 36, 65, 84)。Rojasらの報告(73)の中では言及されていないが、単離したB細胞でも、複数の細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 変化の平均値は低温によって減少している可能性がある。このことを検証するためには、B細胞の集合標本を用いてぶどう糖で刺激したときの $[Ca^{2+}]_i$ 変化とインスリン分泌の温度依存性を調べる必要があるだろう。

膵島内のB細胞間、あるいはB細胞とA、D細胞間にはギャップジャンクション(細隙結合)が存在する(52, 62)。イオンや低分子の物質はギャップジャンクションを通過して細胞間を移動することが出来、このことは膵島、あるいはB細胞の集塊をぶどう糖で刺激したときに、 $[Ca^{2+}]_i$ 動態が同調して変化することの一因となっていると考えられている(33, 62)。Mearsらの報告(51)では、膵島内にある状態でのB細胞間のギャップジャンクションのコンダクタンスは、温度を $38^{\circ}C$ から $30^{\circ}C$ に低下させると21%減少することが認められている。鳥胚の心筋においても、温度の低下によるギャップジャンクションのコンダクタンスの減少が報告されている(11)。膵島全体の $[Ca^{2+}]_i$ 動態に及ぼす影響が、単離B細胞のそれより大きいのは、ギャップジャンクションの透過性が低温によって低下することを反映しているのかもしれない。

ぶどう糖刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応の前に、一過性の $[Ca^{2+}]_i$ の減少が観察された(図4、5)。マウス膵島(7, 34, 71)、マウス単離B細胞(36)、及びラット単離B細胞(84)で、ぶどう糖刺激による一過性の $[Ca^{2+}]_i$ の減少が報告されており、B細胞のぶどう糖に対する生理的な反応であると考えられている。マウス膵島を用いた研究では、小胞体にある $Ca^{2+}$ ポンプの阻害薬であるthapsigarginを前処置しておく、ぶどう糖刺激による一過性の $[Ca^{2+}]_i$ の減少はおこらないことから、 $[Ca^{2+}]_i$ の減少は小胞体への $Ca^{2+}$ の取り込みによって引き起こされると考えられている(72)。本研究では、温度を低下させると、ぶどう糖刺激による $[Ca^{2+}]_i$ の減少の程度は小さくなることが示された。この結果は、一過性の $[Ca^{2+}]_i$ の減少が、ATPに依存した $Ca^{2+}$ ポンプによる小胞体への取り込みであるという考え方を支持



するものである。

### 2.3. 高濃度 $K^+$ 、CCh、及びグリベンクラミドによる刺激-放出連関の温度依存性

ぶどう糖以外の、高濃度 $K^+$  (15)、スルフォニルウレア、及びムスカリン様アセチルコリン受容体刺激 (46) のいずれの刺激によるインスリン分泌も低温によって抑制されることが報告されており、これは今回の研究でも確かめられた。高濃度 $K^+$ は、脱分極によるVDCCsからの $Ca^{2+}$ 流入を引き起こす。グリベンクラミドはATP感受性 $K^+$ チャネルを閉鎖して脱分極を引き起こし、その結果VDCCsから $Ca^{2+}$ が流入する (1, 67, 77)。一方AChやCChなどのムスカリン作動性アセチルコリン受容体刺激は、細胞内 $Ca^{2+}$ 貯蔵部位からの遊離と細胞外からの $Ca^{2+}$ 流入の両方を引き起こすことにより $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させ、このうち $Ca^{2+}$ 貯蔵部位からの $Ca^{2+}$ 遊離は、 $PIP_2$ の加水分解産物である $IP_3$ によって引き起こされる (8, 68, 83及び図1)。本研究では、高濃度 $K^+$ 、グリベンクラミド、あるいはCChのいずれの刺激下においても、 $[Ca^{2+}]_i$ に比べてIS/Cs比の $Q_{10}$ が大きいことが示された (表1)。このことから、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の経路に係わらず、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇以降の開口放出の過程の温度依存性が、低温によるインスリン分泌減少の主因となっていることが明らかとなった。

今回得られた高濃度 $K^+$ による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応の $Q_{10}$ は1.2であった。この値は、さまざまなVDCCsで報告されているコンダクタンスの $Q_{10}$  (1.4~1.6) に近く (2, 41, 81)、脾島B細胞のVDCCsも同様に温度依存性が小さいことを示唆している。グリベンクラミドで刺激したときの $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応に対する低温の影響は、高濃度 $K^+$ によるそれよりも大きく、特に $[Ca^{2+}]_i$ が最大値に達するまでの時間が延長した (図8)。グリベンクラミドと同じスルフォニルウレアであるグリピジドの中枢神経組織への結合が、低温で抑制されることが報告されており (47)、また、心臓においてATP感受性 $K^+$ チャネルのコンダクタンスが低温で抑制されることが報告されている (50)。グリベンクラミドによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応の温度依存性が、高濃度 $K^+$ によるそれよりも大きいのは、グリベンクラミドのB細胞への結合、ATP感受性 $K^+$ チャネル、及びVDCCsの温度感受性の全てが反映されていることによるのかもしれない。



#### 2.4. B細胞の刺激—放出連関の特異性

B細胞からのインスリン分泌が低温で大きく抑制されることはこれまでの報告や本研究結果により明らかであるが、分泌の温度依存性は、以下の通り細胞の種類によって様々であり、低温によって分泌がむしろ増強される例もある：1) 牛副腎髄質細胞では、高濃度 $K^+$ 、ベラトリジン刺激によるカテコールアミン分泌の $Q_{10}$ はそれぞれ2、3であった(43)；2) アルギニンやACh刺激によるグルカゴン分泌は温度を $37.5^{\circ}C$ から $28^{\circ}C$ に下げても殆ど抑制されず(46)、アルギニン刺激によるグルカゴン分泌は温度を $37^{\circ}C$ から $19^{\circ}C$ に下げるとむしろ増加した(37)；3) ラット下垂体細胞集団では、低張液、あるいは甲状腺刺激ホルモン放出ホルモンによって引き起こされる甲状腺刺激ホルモンの分泌は、23、37、及び $43^{\circ}C$ で殆ど変わらなかった(30)；4) ラット脳線状体では、酢酸刺激によって引き起こされるドーパミン分泌の $Q_{10}$ は3.6だった(22)。5) モルモット精管では、電気刺激による精管交感神経終末からのノルアドレナリン分泌は、温度を $36^{\circ}C$ から $26^{\circ}C$ に低下させると1.6倍増加した(76)。

本研究結果及び他の報告で、ぶどう糖代謝に依存しない刺激を用いた場合でも、インスリン分泌の $Q_{10}$ は5以上であることが示されていることから、B細胞の刺激—放出連関の温度依存性は、ぶどう糖代謝の温度依存性を差し引いても他の細胞に比べて大きいと考えられる。本研究は、低温によるインスリン分泌の抑制が、刺激の種類に係わらず、主として $[Ca^{2+}]_i$ 上昇以降の開口放出の温度依存性に帰せられることを明らかにした。他の分泌細胞に比較してB細胞の分泌の温度依存性が大きいのは、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇以降の開口放出の過程の温度感受性が特に大きいことによるのかもしれない。

細胞膜の透過性を人工的に上げた副腎髄質細胞をもちいた解析では、顆粒膜がATPや $Ca^{2+}$ によって開口放出可能な状態になる段階(priming)に温度依存性があることが報告されている(9)。しかし、この温度依存性が、開口放出を構成する様々な分子のうちのいずれに帰せられるのか、あるいはいずれの分子間の相互作用の温度依存性に帰せられるかについては不明である。開口放出の分子機構については、近年急速に研究が進んできており(6, 10)、B細胞でも開口放出に関与する蛋白質が明らかになりつつある(70)。今回の研究で示唆されたB細胞の刺激—放出連関の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇以降の大きな温度依存性は、これらの蛋白質の特性によって説明できる可能性がある。



## 要 約

1) 本研究では、膵島B細胞の刺激-放出連関の温度依存性に関する機構を探る目的で、i) ぶどう糖刺激による2相性のインスリン分泌反応と、膵島の細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) の相関を検討し、ii) 低温が $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇の過程とそれ以降の開口放出の過程に及ぼす影響を解析した。

2) 摘出膵血管灌流標本を、16.7 mMのぶどう糖を含む灌流液で灌流すると、2相性のインスリン分泌が引き起こされた；インスリン分泌反応は、第1相の急速な上昇と下降、及びその後続く緩やかで持続的な2相目の上昇から構成されていた。

3) 膵島を、16.7 mMのぶどう糖を含む、35-37°C に保った灌流液で灌流すると、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は最初僅かに減少した。その後 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は急速な一過性の上昇を示し、ついで緩やかな上昇、あるいは振動性変動に移行するという、2相性の上昇反応を示した。膵島から記録された $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇反応の第1相および第2相は、膵血管灌流標本からのインスリン分泌の第1相および第2相と時間的に一致していなかった。そこで、インスリン分泌を、膵島の表面灌流標本から記録して $[\text{Ca}^{2+}]_i$ と比較した。

4) 30-60個の膵島を、35°C において15 mMのぶどう糖で刺激すると、第1相の急速な上昇と下降、及びその後続く緩やかで持続的な上昇から成る2相性のインスリン分泌が引き起こされた。個々の膵島を、35°C において15 mMのぶどう糖で刺激すると、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は最初僅かに減少した後、2相性の上昇反応を示した。膵島から記録されたインスリン分泌の第1相、第2相の上昇は、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇反応の第1相、第2相の上昇と時間的に一致しており、二相性のインスリン分泌が二相性の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇反応によって引き起こされることを確認した。

5) 低温がインスリン分泌反応に及ぼす影響を調べるために、灌流液の温度を低下させて膵島を灌流した。灌流温度を30°Cに低下すると、ぶどう糖刺激 (15 mM) によるインスリン分泌反応は遅延し、第1相及び第2相の分泌はどちらも抑制され



た。温度をさらに低下させ25°Cにすると、インスリン分泌反応は、ほぼ完全に抑制された。ぶどう糖刺激によるインスリン分泌反応の温度係数 ( $Q_{10}$ ) は11.6と計算された。

6) 低温が膵島の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応に及ぼす影響を検討する目的で、灌流液の温度を低下して膵島を灌流した。灌流温度を30°Cに低下すると、2相性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応は遅延し、抑制された。灌流温度をさらに25°Cに低下すると、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応はさらに遅延し、2相性の上昇反応が不明瞭となった。ぶどう糖刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応の  $Q_{10}$  は1.8と計算された。

7) B細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇がインスリンの開口放出を引き起こす効率の温度依存性を定量化するために、ぶどう糖刺激期間中の、平均 $[Ca^{2+}]_i$ に対する平均インスリン分泌量の比 (IS/Ca) の  $Q_{10}$  を求めた。IS/Ca比の  $Q_{10}$  は6.6で、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応の  $Q_{10}$  の約3.7倍であった。以上の結果から、ぶどう糖刺激による2相性のインスリン分泌の抑制は、主にB細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応以降の開口放出の過程の温度依存性によることが示唆された。

8) B細胞の刺激-放出連関の温度依存性をさらに詳しく調べるために、高濃度  $K^+$ 、ムスカリン様アセチルコリン受容体の作動薬であるカルバミルコリン (CCh)、及びATP感受性 $K^+$ チャネルを閉鎖させるグリベンクラミド刺激による膵島からのインスリン分泌反応、及び $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応に及ぼす温度の影響を調べた。

9) 高濃度  $K^+$  (30 mM) 刺激による刺激期間中 (3分間) のインスリン分泌反応及び $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応の  $Q_{10}$  は、それぞれ 6.5及び1.2と計算された。高濃度 $K^+$ による刺激期間中のIS/Ca比の  $Q_{10}$  は5.6で、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応の  $Q_{10}$  の4.6倍大きかった。

10) CCh (100  $\mu$ M) 刺激による刺激期間中 (3分間) のインスリン分泌反応及び $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応の  $Q_{10}$  は、それぞれ 5.4及び1.4と計算された。CChによる刺激期間中のIS/Ca比の  $Q_{10}$  は3.8で、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応の  $Q_{10}$  の2.7倍大きかった。

11) グリベンクラミド (2  $\mu$ M) 刺激による刺激期間中 (5分間) のインスリン



分泌反応及び $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応の $Q_{10}$ は、それぞれ26.7及び1.8と計算された。グリベンクラミドによる刺激期間中のIS/Ca比の $Q_{10}$ は13で、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応の $Q_{10}$ の7.2倍大きかった。高濃度  $K^+$ 、CCh、及びグリベンクラミドいずれの刺激を用いた場合でも、IS/Ca比の $Q_{10}$ よりも、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応の $Q_{10}$ が大きかったことから、低温によるインスリン分泌の抑制は、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の経路に係わらず、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇以降の温度依存性に起因することが示唆された。

1 2) 以上の結果から、膵島B細胞のインスリン分泌と $[Ca^{2+}]_i$ の関係、及び膵島B細胞の刺激-放出連関の温度依存性について、次の結論を得た：1, 膵島の集合をぶどう糖刺激したときに観察される2相性のインスリン分泌反応は、個々の膵島の2相性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応の総和を反映している；2, 低温は、ぶどう糖の刺激による膵島B細胞の刺激-放出連関のうち、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に至る過程と、それ以後の開口放出の過程の両方を抑制してインスリン分泌を減少させる；3, 前者の過程より後者の過程が温度に対する感受性は大きく、低温によるインスリン分泌の抑制は、主として開口放出の過程の温度感受性に帰せられる。



## 謝 辞

本研究を遂行し、論文を作製するにあたり、終始懇切丁寧なご指導・ご督励を頂きました、菅野富夫教授（北海道大学獣医学研究科比較形態機能学講座生理学教室）に心より感謝致します。また、副査として本論文を閲覧し、ご指導・ご助言を頂きました中里幸和教授（同薬理学教室）、斉藤昌之教授（同生化学教室）、そして葉原芳昭助教授（同生理学教室）に深く感謝致します。

最後に、研究を遂行するにあたり的確なご指導を頂きました澁谷泉助教授（産業医科大学医学部第一生理学教室）、そして多大なるご協力を頂いた北海道大学獣医学研究科比較形態機能学講座生理学教室の教室員の皆様に謝意を表します。



## 引用文献

1. Abrahamsson, H., Berggren, P.-O. and Rorsman, P. (1985) Direct measurements of increased free cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  in mouse pancreatic  $\beta$ -cells following stimulation by hypoglycemic sulfonylureas. *FEBS Lett.* 190: 21-24
2. Acerbo, P. and Nobile, M. (1994) Temperature dependence of multiple high voltage activated  $\text{Ca}^{2+}$  channels in chick sensory neurons. *Eur. Biophys. J.* 23: 189-195
3. Ämmälä, C., Ashcroft, F. M. and Rorsman, P. (1993) Calcium-independent potentiation of insulin release by cyclic AMP in single  $\beta$ -cells. *Nature (Lond.)* 363: 356-358
4. Arkhammar, P., Nilson, T., Rorsman, P. and Berggren, P.-O. (1987) Inhibition of ATP-regulated  $\text{K}^{+}$  channels precedes depolarization-induced increase in cytoplasmic free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in pancreatic  $\beta$  cells. *J. Biol. Chem.* 262: 5448-5454
5. Atwater, I., Goncalves, A., Herchuelz, A., Lebrun, P., Malaisse W. J., Rojas, E. and Scott, A. (1984) Cooling dissociates glucose-induced insulin release from electrical activity and cation fluxes in rodent pancreatic islets. *J. Physiol. (Lond.)* 348: 615-627
6. Bennett, M. K. and Scheller, R. H. (1993) The molecular machinery for secretion is conserved from yeast to neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2559-2563
7. Bergsten, P. (1995) Slow and fast oscillations of cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  in pancreatic islets corresponded to pulsatile insulin release. *Am. J. Physiol.* 268: E282-E287
8. Biden, T. J., Peter-Riesch, B., Schlegel, W. and Wollheim, C. B. (1987)  $\text{Ca}^{2+}$ -mediated generation of inositol 1,4,5-trisphosphate and inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate in pancreatic islets; studies with  $\text{K}^{+}$ , glucose, and carbamylcholine. *J. Biol. Chem.* 262: 3567-3571
9. Bittner, M. A. and Holz, R. W. (1992) A temperature-sensitive step in exocytosis. *J. Biol. Chem.* 267: 16226-16229
10. Burgoyne, R. D. and Morgan, A. (1995)  $\text{Ca}^{2+}$  and secretory-vesicle dynamics. *Trends Neurosci.* 18: 191-196



11. Chen, Y. H. and DeHaan, R. L. (1993) Temperature dependence of embryonic cardiac gap junction conductance and channel kinetics. *J. Membr. Biol.* 136: 125-134
12. Cornish-Bowden, A. (1972) Basic principles of chemical kinetics. In: *Principles of Enzyme Kinetics*, ed. Cornish-Bowden, A. Butterworths., Sidney/ Wellington/ Durban/ Toronto. pp 1-13.
13. Curry, D. L., Bennett, L. L. and Grodsky, G. M. (1968) Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas. *Endocrinology* 83: 572-584
14. Curry, D. L. and Curry, K. P. (1970) Hypothermia and insulin secretion. *Endocrinology* 87: 750-755
15. Dawson, C. M., Lebrun, P., Herchuelz, A., Malaisse, W. J., Goncalves, A. A. and Atwater, I. (1986) Effect of temperature upon potassium-stimulated insulin release and calcium entry in mouse and rat islets. *Horm. Metab. Res.* 18: 221-224
16. Dean, P. M. and Matthews, E. K. (1970) Electrical activity in pancreatic islet cells: effect of ions. *J. Physiol. (Lond.)* 210: 265-275
17. Douglas, W. W. (1968) Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells. *Br. J. Pharmacol.* 34: 451-474
18. Douglas, W. W. and Rubin, R. P. (1961) The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. *J. Physiol. (Lond.)* 159: 40-57
19. Douglas, W. W. and Rubin, R. P. (1963) The mechanism of catecholamine release from the adrenal medulla and the role of calcium in stimulus-secretion coupling. *J. Physiol. (Lond.)* 167: 288-310
20. Douglas, W. W. and Rubin, R. P. (1964) Stimulant action of barium on the adrenal medulla. *Nature (Lond.)* 203: 305-307
21. Douglas, W. W., Kanno, T. and Sampson, S. R. (1967) Effects of acetylcholine and other medullary secretagogues and antagonists on the membrane potential of adrenal chromaffin cells: an analysis employing techniques of tissue culture. *J. Physiol. (Lond.)* 188: 107-120
22. Drepeau, P. and Nachshen, D. A. (1988) Effects of lowering extracellular and cytosolic pH on calcium fluxes, cytosolic calcium levels, and transmitter release in presynaptic nerve terminals isolated from rat brain. *J. Gen. Physiol.* 91: 305-315



23. Efrat, S., Tal, M. and Lodish, H. F. (1994) The pancreatic  $\beta$ -cell glucose sensor. *Trends Biochem. Sci.* 19: 535-538
24. Epple, E. and Brinn, J. E., (1987) Comparative cytology of the islet organ. In: *The Comparative Physiology of the Pancreatic Islets; Zoophysiology Vol.21*, eds. Burggren, W., Ishii, S., Langer, H., Neuweiler, G., and Randall, D. J. Springer-Verlag., Berlin/ Heidelberg/ New York/ London/ Paris/ Tokyo. pp 28-39.
25. Escolar, J. C., Hoo-Paris, R., Castex, C. and Sutter, B. C. J. (1987) Effect of low temperature on glucose-induced insulin secretion and ionic fluxes in rat pancreatic islets. *J. Endocrinol.* 115: 225-231
26. Escolar, J. C., Hoo-Paris, R., Castex, C. and Sutter, B. C. J. (1989) Effect of low temperature on glucose-induced insulin secretion and glucose metabolism in isolated pancreatic islets of the rat. *J. Endocrinol.* 125: 45-51
27. Gilon, P., Shepherd, R. M. and Henquin, J. C. (1993) Oscillations of secretion driven by oscillations of cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  as evidenced in single pancreatic islets. *J. Biol. Chem.* 268: 22265-22268
28. Gilon, P., Jonas, J. C. and Henquin, J. C. (1994) Culture duration and conditions affect the oscillations of cytoplasmic calcium concentration induced by glucose in mouse pancreatic islets. *Diabetologia* 37: 1007-1014
29. Grapengiesser, E., Gylfe, E. and Hellman, B. (1992) Glucose sensing of individual pancreatic  $\beta$ -cells involves transitions between steady-state and oscillatory cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$ . *Cell Calcium* 13: 219-228
30. Greer, M. A., Greer, S. E. and Maruta, S. (1990) Hyposmolar stimulation of secretion of thyrotropin, prolactin, and luteinizing hormone does not require extracellular calcium and is not inhibited by colchicine, cytochalasin B, ouabain, or tetrodotoxin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 193: 203-209
31. Grodsky, G. M. (1972) A threshold distribution hypothesis for packet storage of insulin and its mathematical modeling. *J. Clin. Invest.* 51: 2047-2059
32. Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R. Y. (1985) A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260: 3440-3450



33. Gylfe, E., Grapengiesser, E. and Hellman, B. (1991) Propagation of cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in clusters of pancreatic  $\beta$ -cells exposed to glucose. *Cell Calcium* 12: 229-240
34. Hattori, M., Kai, R. and Kitasato, H. (1994) Effects of lowering external  $\text{Na}^+$  concentration on cytoplasmic pH and  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in mouse pancreatic  $\beta$ -cells: mechanism of periodicity of spike-bursts. *Jpn. J. Physiol.* 44: 283-293
35. Hellman, B., Gylfe, E., Grapengiesser, E., Panten, U., Schwanstecher, C. and Heipel, C. (1990) Glucose induces temperature-dependent oscillations of cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  in single pancreatic  $\beta$ -cells related to their electrical activity. *Cell Calcium* 11: 413-418
36. Herchuelz, A., Pochet, R., Pastiels, C. and Van Praet, A. (1991) Heterogenous changes in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induced by glucose, tolubutamide and  $\text{K}^+$  in single rat pancreatic B cells. *Cell Calcium* 12: 577-586
37. Hoo-Paris, R., Jourdan, M. L., Moreau-Hamsany, C. and Wang, L. C. H. (1991) Plasma glucagon, glucose, and free fatty acid concentrations and secretion during prolonged hypothermia in rats. *Am. J. Physiol.* 260: R480-R485
38. 菅野富夫 (1992) 刺激-放出連関 (stimulus-secretion coupling). *医学のあゆみ* 160: 177
39. Kanno, T., Suga, T. and Yamamoto, M. (1976) Effects of oxygen supply on electrical and secretory responses of humorally stimulated acinar cells in isolated rat pancreas. *Jpn. J. Physiol.* 26: 101-115
40. Kikuchi, M., Wollheim, C. B., Cuendet, G. S., Renold, A. E. and Sharp, G. W. G. (1978) Studies on the dual effects of glucose on  $^{45}\text{Ca}^{++}$  efflux from isolated rat islets. *Endocrinology* 102: 1339-1349
41. Klöckner, U., Schiefer, A. and Isenberg, G. (1990) L-type Ca-channels: similar  $Q_{10}$  of Ca-, Ba- and Na-conductance points to the importance of ion-channel interaction. *Eur. J. Physiol. (Pflügers Arch.)* 415: 638-641
42. Knight, D. E. and Baker, P. F. (1982) Calcium-dependence of catecholamine release from bovine adrenal medullary cells after exposure to intense electric fields. *J. Membr. Biol.* 68: 107-140
43. Knight, D. E. and Baker, P. F. (1983) Stimulus-secretion coupling in isolated bovine adrenal medullary cells. *Q. J. Exp. Physiol.* 68: 123-143



44. Lacy, P. and Kostianovsky, M. (1967) Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 16: 35-39
45. Lacy, P. E. and Greider, M. H. (1979) Anatomy and ultrastructural organization of pancreatic islets. In: *Endocrinology* Vol.2, eds. DeGroot, L. J., Cahill Jr, G. F., Odell, W. D., Martini, L., Potts Jr, J. T., Nelson, D. H., Steinberger, E., and Winegrad, A. I. Grune & Stratton., New York/ San Francisco/ London. pp 907-920
46. Loubatières-Mariani, M. M., Chapal, J., Peuch, R., Lignon, F. and Valette, G. (1980) Different effects of hypothermia on insulin and glucagon secretion from the isolated perfused pancreas. *Diabetologia* 18: 329-333
47. Lupo, B. and Bataille, D. (1987) A binding site for [<sup>3</sup>H]glipizide in the rat cerebral cortex. *Eur. J. Pharmacol.* 140: 157-169
48. Malaisse, W. J., Giroix, M.-H., Malaisse-Lagae, F. and Sener, A. (1986) 3-O-methyl-D-glucose transport in tumoral insulin-producing cells. *Am. J. Physiol.* 251: C841-C846
49. Matthews, E. K. and Sakamoto, Y. (1975) Electrical characteristics of pancreatic islet cells. *J. Physiol. (Lond.)* 246: 421-437
50. McLarnon, J. G., Hamman, B. N. and Tibbits, G. F. (1993) Temperature dependence of unitary properties of an ATP-dependent potassium channel in cardiac myocytes. *Biophys. J.* 65: 2013-2020
51. Mears, D., Sheppard Jr., N. F., Atwater, I. and Rojas, E. (1995) Magnitude and modulation of pancreatic  $\beta$ -cell gap junction electrical conductance *in situ*. *J. Membr. Biol.* 146: 163-176
52. Meda, P., Chanson, M., Pepper, M., Giordano, E., Bosco, D., Traub, O., Willecke, K., El Aoumari, A., Gros, D., Beyer, E. C., Orci, L. and Spray, D. C. (1991) *In vivo* modulation of connexin 43 gene expression and junctional coupling of pancreatic B-cells. *Exp. Cell Res.* 192: 469-480
53. Meissner, H. P. (1976) Electrical characteristics of the beta-cells in pancreatic islets. *J. Physiol. (Paris)* 72: 757-767
54. Meissner, H. P. and Atwater, I. J. (1975) The kinetics of electrical activity of beta cells in response to a "square wave" stimulation with glucose or glibenclamide. *Horm. Metab. Res.* 8: 11-16



55. Neher, E. and Zucker, R. S. (1993) Multiple calcium-dependent processes related to secretion in bovine chromaffin cells. *Neuron* 10: 21-30
56. Newgard, C. B. and McGarry, J. D. (1995) Metabolic coupling factors in pancreatic  $\beta$ -cell signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 689-719
57. Niwa, K., Horikoshi, H. and Kanno, T. (1995) Troglitazone (CS-045) potentiates glucose-induced biphasic insulin secretion in the absence of potentiation of  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in rat pancreatic islets. *Biomed. Res.* 16: 345-351
58. Niwa, K., Shibuya, I. and Kanno, T. Temperature dependence of processes proximal and distal to glucose-induced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  rise in stimulus-secretion coupling in rat pancreatic islets. *Biol. Signals* (In press)
59. Ohta, M., Nelson, D., Nelson, J., Meglasson, M. D. and Erecinska, M. (1990) Oxygen and temperature dependence of stimulated insulin secretion in isolated rat islets of Langerhans. *J. Biol. Chem.* 265: 17525-17532
60. Pace, C. S., Travin, J. T., Neighbors, A. S., Pirkle, J. A. and Greider, M. H. (1980) Use of a high voltage technique to determine the molecular requirements for exocytosis in islet cells. *Diabetes* 29: 911-918
61. Penner, R. and Neher, E. (1988) The role of calcium in stimulus-secretion coupling in excitable and non-excitable cells. *J. Exp. Biol.* 139: 329-345
62. Pipeleers, D. (1984) Islet cell interactions with pancreatic B-cells. *Experientia* 40: 1114-1125
63. Pipeleers, D., In't Veld, P., Maes, E. and Van De Winkel, M. (1982) Glucose-induced insulin release depends on functional cooperation between islet cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 7322-7325
64. Poisner, A. M. and Douglas, W. W. (1966) The need for calcium in adrenomedullary secretion evoked by biogenic amines, polypeptide, and muscarinic agents. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 123: 62-64
65. Pralong, W.-F., Bartley, C. and Wollheim, C. B. (1990) Single islet  $\beta$ -cell stimulation by nutrients: relationship between pyridine nucleotides, cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  and secretion. *EMBO J.* 9: 53-60



66. Pralong, W.-F., Spät, A. and Wollheim, C. B. (1994) Dynamic pacing of cell metabolism by intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  transients. *J. Biol. Chem.* 269: 27310-27314
67. Prentki, M. and Matschinsky, F. M. (1987)  $\text{Ca}^{2+}$ , cAMP, and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin release. *Physiol. Rev.* 67: 1185-1248
68. Prentki, M., Glennon, M. C., Thomas, A. P., Morris, R. L., Matschinsky, F. M. and Corkey, B. E. (1988) Cell-specific patterns of oscillating free  $\text{Ca}^{2+}$  in carbamylcholine-stimulated insulinoma cells. *J. Biol. Chem.* 263: 11044-11047
69. Rabinovitch, A., Grill, V., Renold, A. E. and Cerasi, E. (1976) Insulin release and cyclic AMP accumulation in response to glucose in pancreatic islets of fed and starved rats. *J. Clin. Invest.* 58: 1209-1216
70. Regazzi, R., Wollheim, C. B., Lang, J., Theler, J.-M., Rossetto, O., Montecucco, C., Sadoul, K., Weller, U., Palmer, M. and Thorens, B. (1995) VAMP-2 and cellubrevin are expressed in pancreatic  $\beta$ -cells and are essential for  $\text{Ca}^{2+}$ - but not for  $\text{GTP}\gamma\text{S}$ -induced insulin secretion. *EMBO J.* 14: 2723-2730
71. Roe, M. W., Lancaster, M. E., Mertz, R. J., Worley III, J. F. and Dukes, I. D. (1993) Voltage-dependent intracellular calcium release from mouse islets stimulated by glucose. *J. Biol. Chem.* 268: 9953-9956
72. Roe, M. W., Mertz, R. J., Lancaster, M. E., Worley III, J. F. and Dukes, I. D. (1994) Thapsigargin inhibits the glucose-induced decrease of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in mouse islets of Langerhans. *Am. J. Physiol.* 266: E852-E862
73. Rojas, E., Carroll, P. B., Ricordi, C., Boschero, A. C., Stojilkovic, S. S. and Atwater, I. (1994) Control of cytosolic free calcium in cultured human pancreatic  $\beta$ -cells occurs by external calcium-dependent and independent mechanisms. *Endocrinology* 134: 1771-1781
74. Sakurada, M., Kanatsuka, A., Saitoh, T., Makino, H., Yamamura, K., Miyazaki, J., Kikuchi, M. and Yoshida, S. (1993) Relation between glucose-stimulated insulin secretion and intracellular calcium accumulation studied with a superfusion system of a glucose-responsive pancreatic  $\beta$ -cell line MIN6. *Endocrinology* 132: 2659-2665
75. Santos, R. M., Rosario, L. M., Nadal, A., Garcia-Sancho, J., Soria, B. and Valdeolmillos, M. (1991) Widespread synchronous  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscillations due to bursting electrical activity in single pancreatic islets. *Eur. J. Physiol. (Pflügers Arch.)* 418: 417-422



76. Stjärne, L. and Alberts, P. (1985) Influence of temperature on stimulus-secretion coupling in the sympathetic nerves and on neuromuscular transmission, in guinea-pig vas deferens. *Acta Physiol. Scand.* 125: 181-194
77. Sturgess, N. C., Ashford, M. L. J., Cook, D. L. and Hales, C. N. (1985) The sulphonylurea receptor may be an ATP-sensitive potassium channel. *Lancet* 2: 474-475
78. Valdeolmillos, M., Santos, R. M., Contreras, D., Soria, B. and Rosario, L. M. (1989) Glucose-induced oscillations of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration resembling bursting electrical activity in single mouse islets of Langerhans. *FEBS Lett.* 259: 19-23
79. Valdeolmillos, M., Nadal, A., Contreras, D. and Solia, B. (1992) The relationship between glucose-induced  $\text{K}^{+}_{\text{ATP}}$  channel closure and the rise in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in single mouse pancreatic  $\beta$ -cells. *J. Physiol. (Lond.)* 455: 173-186
80. Valdeolmillos, M., Nadal, A., Soria, B. and García-Sancho, J. (1993) Fluorescence digital image analysis of glucose-induced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscillations in mouse pancreatic islets of Langerhans. *Diabetes* 42: 1210-1214
81. van Lunteren, E., Elmslie, K. S. and Jones, S. W. (1993) Effects of temperature on calcium current of bullfrog sympathetic neurons. *J. Physiol. (Lond.)* 466: 81-93
82. Wollheim, C. B. and Sharp, G. W. G. (1981) Regulation of insulin release by calcium. *Physiol. Rev.* 61: 914-973
83. Wollheim, C. B. and Biden, T. J. (1986) Second messenger function of inositol 1,4,5-trisphosphate: Early changes in inositol phosphates, cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$ , and insulin release in carbamylcholine-stimulated RINm5F cells. *J. Biol. Chem.* 261: 8314-8319
84. Yada, T., Kakei, M. and Tanaka, H. (1992) Single pancreatic  $\beta$ -cells from normal rats exhibit an initial decrease and subsequent increase in cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$  in response to glucose. *Cell Calcium* 13: 69-76
85. Zawalich, W. S., Karl, R. C., Ferrendelli, J. A. and Matschinsky, F. M. (1975) Factors governing glucose induced elevation of cyclic 3'5' AMP levels in pancreatic islets. *Diabetologia* 11: 231-235
86. Zawalich, W., Brown, C. and Rasmussen, H. (1983) Insulin secretion: combined effects of phorbol ester and A23187. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 117: 448-455



# Temperature effects on stimulus-secretion coupling in rat pancreatic B cells.

Koichi Niwa

Laboratory of Physiology, Department of Biomedical Sciences,  
Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University,  
Sapporo 060, Japan

The present study was designed to examine 1) the correlation between the secretory response of insulin and the dynamics of cytoplasmic calcium concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) induced by glucose and 2) the effects of lowering temperature on the processes proximal and distal to  $Ca^{2+}$  signaling in pancreatic B cells.

Glucose (15 mM) caused a biphasic increase in insulin secretion in perfused pancreatic islets of rat at 35°C: that is, the secretory response consisted of a transient increase followed by a nadir (first phase) and gradual increase (second phase). Glucose caused a biphasic increase in  $[Ca^{2+}]_i$  in fura-2-loaded islets at 35°C, a transient increase (first phase) followed by a gradual increase (second phase) on which recurrent  $Ca^{2+}$  spikes were frequently superimposed. Time courses of the first and the second phases of the  $[Ca^{2+}]_i$  increase corresponded to those of the insulin secretion, suggesting that the biphasic insulin secretion is underlain by the biphasic  $[Ca^{2+}]_i$  increase.

The insulin secretion and the  $[Ca^{2+}]_i$  increase were decreased by lowering temperature to 30 or 25°C with a temperature coefficient ( $Q_{10}$ ) of 11.6 and 1.8, respectively. The ratio of glucose-induced insulin secretion to the  $[Ca^{2+}]_i$  increase (IS/Ca) was calculated to represent the efficiency of  $Ca^{2+}$  to cause exocytosis. The  $Q_{10}$  value of the ratio of IS/Ca was calculated to be 3.7 times greater (6.6) than that of the  $[Ca^{2+}]_i$  increase, suggesting that the exocytotic process is more sensitive to temperature than the  $[Ca^{2+}]_i$  increase.

The effects of lowering temperature on the insulin secretion and the  $[Ca^{2+}]_i$  increase induced by high  $K^+$  (30 mM), carbamylcholine (CCh; 100 mM), and glibenclamide (2 mM) were also examined. The  $Q_{10}$  values of the ratios of IS/Ca in the responses to high  $K^+$ , CCh, and glibenclamide were 5.6, 3.8, and 13.0, respectively. These values were greater than the  $Q_{10}$  values of corresponding  $[Ca^{2+}]_i$  responses (1.2, 1.4, and 1.8, respectively), suggesting that the inhibition of insulin secretion could be attributed to temperature sensitivity of the exocytotic process regardless of the cause of  $[Ca^{2+}]_i$  increase.

It is concluded that: 1) the glucose-induced biphasic insulin secretion is underlain by the biphasic  $[Ca^{2+}]_i$  increase; 2) lowering temperature inhibits both processes proximal and distal to  $Ca^{2+}$  signaling in response to glucose; and 3) the latter process is more sensitive to temperature than the former in rat pancreatic B cells.



