

Sulfonylurea剤の慢性投与によるインスリン分泌能の低下について

弘前大学大学院医学研究科内科系(臨床神経部門) 専攻4年
梅田 芳彦

目的

インスリン非依存型糖尿病 (non-insulin-dependent diabetes mellitus:NIDDM)の発症に至る経過として、膵におけるB cell massの低下が着目されている。NIDDMにおいては、インスリン抵抗性が高血糖発症の一次的要因とする見解が一般的であるが、NIDDMとして発症しても長期間の経過の後、膵B細胞からのインスリン分泌能が低下し、インスリン治療を必要とする症例が多々見られる。その原因として、膵B細胞の疲弊あるいはB cell massの低下が生じ、インスリン分泌不全が起こっているものと考えられている。膵B細胞が減少した糖尿病状態において経口血糖降下剤の慢性的な使用はB細胞の疲弊を招き、薬が効かなくなる(いわゆる二次無効)可能性が示唆されている^{1,2,3,4)}。このような状態において、Sulfonylurea剤(以下、SU剤と省略)およびインスリン治療を行い、残存B細胞に及ぼす影響を評価することは、適切な治療法を選択する上で重要な意義を持つ。今回の実験では、70%膵切除ラットを用いてB細胞が減少した状態のモデル動物をつくり、治療法の違いによって糖輸送蛋白GLUT2の発現量、及びB細胞のインスリン分泌能にどのような変化が起こるのかを検討した。

方法

1) 糖尿病ラットの作成

4週齢の雄のSprague-Dawleyラット(JCL, 東京, 日本, 以下、SDラットと省略)を用いて、Richardsら⁵⁾の定義に基づき膵全体の70%に相当する膵体尾部を切除した。切除後2週間をあけてグルコース2g/kgの経口糖負荷試験を行い、糖負荷後0分、30分、60分、120分に血糖を測定し、0分、60分に血中インスリン濃度を測定した。血糖値の測定には簡易血糖測定器(ノボアシスト®, Lifescan Inc., U.S.A.)を使用した。また血中インスリン濃度の測定にはEIAサンドイッチ法(インスリン測定キット, 森永生科学研究所, 東京, 日本)を用いた。経口糖負荷試験により耐糖能障害の程度の等しい3群に分け、それぞれグリベンクラミド(ダオニール®, Hoechst Marion Roussel社, 東京, 日本)を10mg/kg、18時に連日1回経口投与した群(以下Px.+D群、n=13)、インスリンペレット(LINPIANT®, LINSHIN社, Canada)(1/3本、release rate 2/3U/24h/implant for >40days)の上腹部皮下への植込群(以下、Px.+I群、n=13)、非治療群(以下、Px.群、n=13)とし4週間治療を行った。また、コントロールとして、normalの雄のSDラット群(以下、C群、n=13)を置き計4群とした。この間、術後3日目、7日目、14日目、21日目、28日目に午後18時の随時体重および随時血糖値を測定した。治療終了後、モノクローナル抗体を用いたラテックス凝集阻止反応法(DCA2000 HbA1cカートリッジ, バイエル・三共株式会社, 東京, 日本)により糖化ヘモグロビン(HbA1c)を測定し各群の血糖コントロール状態を比較した。

2) 膵ラ氏島の分離

Gotohら⁶⁾によるコラゲナーゼ膵管内注入法に若干の変更を加えラ氏島を分離した。コラゲナーゼ(collagenase S-1, 新田ゼラチン社, 大阪, 日本)をHanks' balanced salt solution(日水社, 東京, 日本、以下HBSSと省略)で1mg/mlの濃度に溶解し、氷冷下で4℃とした。ネンブタール(Dainabot社, Chicago, U.S.A.) 50mg/kgで麻酔し開腹し

た。十二指腸乳頭部をクランプし、21G翼状針を総胆管に肝門部から末梢に向けて刺入、糸で固定した。4℃の生理食塩水で腹部全体を冷却してから、コラゲナーゼ溶液6 mlを膵管内に逆行性に注入した。横隔膜を切開し、脱血させてから膨化した膵を摘出した。膵を30mlの組織培養フラスコ内で一時氷冷下で保存した後、37℃の恒温槽に18分間静置し、消化を進ませた。膵消化物を50ml遠心管に移し、冷却した2%newborn bovine serum (JRH Biosciences社, U. S. A., 以下NBSと省略) 加HBSSを加えて約50mlとして激しく攪拌し、186Gで1分間遠心後、上清を除去した。この操作を2回繰り返し、酵素反応を停止させた。沈殿物に2%NBS加HBSSを加え、ラ氏島浮遊液を作成した。500 μ mのステンレス製メッシュに通し、未消化物を除去し、同様に遠心後上清を吸引除去した。沈殿物を15mlの遠心管に移し10mlの2%NBS加HBSSで2回洗浄した。以上の操作で得られた沈殿物に5mlのHistopaque-1077 (Sigma社, St. louis, U. S. A.) を加えて攪拌し、その上に3mlのHBSSを静かに乗せて982Gで10分間遠心した。Histopaque-1077とHBSSとの境界層に浮遊する細胞をラ氏島とし、10%fetal calf serum (JRH Bioscience社, U. S. A., 以下、FCSと省略) 加Dulbecco's Modified Eagle Medium (Life Technologies, NY, U. S. A., 以下、DMEMと省略) 中に回収した。

3) グルコース応答能の評価

単離されたラ氏島の高グルコース、及びL-アルギニンに対するインスリン分泌能を検討する目的でラ氏島持続灌流を行った。分離したラ氏島を実体顕微鏡下にて観察し、直径150 μ mのラ氏島20個をハンドピックし、孔径0.45 μ mのシリンジフィルター (Corning社, N. Y., U. S. A.) に注入後、灌流速度0.8ml/minで持続灌流を行った。灌流液には2%NBS及び20mM HEPES添加後pHを7.4に調製したHBSSを37℃に保って使用した。

グルコース濃度50mg/dlの灌流液 (以下、Glu. 50と省略) にて30分間前灌流後、実験を開始した。すなわちGlu. 50で10分間灌流後、グルコース濃度300mg/dl (以下、Glu. 300と省略) で15分間刺激し、その後Glu. 50に戻して10分間灌流を行い、更に10mM L-アルギニン加Glu. 50で15分間刺激し、再びGlu. 50に戻して10分間灌流し実験を終了した。Glu. 50での灌流時は2分間隔で灌流液を採取、Glu. 300及びL-アルギニン加Glu. 50での刺激時は1分間隔で灌流液を採取した。各検体は速やかに冷凍保存し、後日インスリン濃度をRIA法 (インシュリン '栄研' ラジオイムノアッセイ・キット, 栄研科学, 東京, 日本) にて測定した。

また、インスリン分泌の第1相目を刺激開始後2分目から5分目までの3分間と定義し、第2相目を刺激開始後7分目から15分目までの8分間と定義して、灌流液のインスリン濃度と流量の積からインスリン分泌のarea under the curve (以下、AUCと省略) を計算した。

3) GLUT2の発現

Western blot法

Ogawaら⁷⁾の方法に準じ、膵ラ氏のGLUT2蛋白発現量をWestern blot法にて検討した。すなわち、実体顕微鏡下にてハンドピックした直径150 μ mの分離ラ氏島20個を、200 μ lのlysing solution (80mmol/l Tris-HCl (pH6.8), 10mmol/l EDTA, 10mmol/l phenylm-

ethylsulfonyl-fluoride(PMSF), 10mmol N-ethylmaleimide) に加え、sonicator(UD-201, 株式会社・トミー精工, 東京, 日本)を用いて、ラ氏島のホモジネートを作成した。蛋白はsodium dodecyl sulfate(以下、SDSと省略)を含有した10%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動し、トランスファー・バッファー (16.3mmol/l SDS, 488mmol/l glycine, 600mmol/l Tris, 20% methanol (pH9.2))を用いて、セミドライ式電気泳動転写装置にてニトロセルロース膜上にトランスファーした。GLUT2の同定はECL protein detection system(Amersham, Arlington Height, IL, U.S.A.)にて行った。まず、ニトロセルロース膜を室温にて蒸留水で10分間洗浄した。その後0.1%Tween20を含んだTris-buffered saline(20 mmol/l Tris, 150 mmol/l NaCl、以下、TTBSと省略)にて20分間洗浄し、5%の脱脂粉乳を含有したTTBSで1時間ブロッキングを行った。ブロッキング処理後TTBSにて10分間2回の洗浄を行った後、rabbit anti-rat GLUT2 antibody (East Acres®, U.S.A.) (希釈倍率1:200)にて1時間、室温下でインキュベーションした。更にTTBSにて15分間1回、5分間2回洗浄した後、donkey anti-rabbit IgG, horseradish peroxidase-linked whole antibody(Amersham, U.S.A.) (希釈倍率1:4000)にて1時間インキュベーションした。TTBSにて15分間1回、5分間2回洗浄した後、ECL detection reagentsで1分間室温にて反応させ、サランラップで包装した後15分以内に、ECL-Hyperfilm(Amersham, U.S.A.)に1分間感光させて現像処理を行った。

GLUT2蛋白の比較定量

Western blot法によって同定されたGLUT2蛋白は、現像されたフィルムをコンピュータ上でデジタル処理し、デンスitomーターソフトウェア (NIH image 1.56, National Institutes of Health, MD, U.S.A.)にて解析した。C群の1検体をスタンダードとして、各検体の相対的な蛋白量の比率を百分率で求め比較定量した。

免疫蛍光染色

コラゲナーゼ法によりラ氏島を分離する前に脾臓の組織を一部切り出し、中性ホルマリンで固定した後、パラフィン包埋し厚さ5 μ mの病理切片を作成した。切片は間接免疫蛍光染色法を用い、インスリンとGLUT2の二重染色を行った。

病理切片は脱パラフィン処理を行った後、phosphate-buffered saline(以下、PBSと省略)にて5分間3回洗浄し、0.3% H_2O_2 含有メタノールにて30分間ペルオキシダーゼのブロッキングを行い、PBSにて5分間3回洗浄した。その後、1%lamb serum(Gibco, Grand Island, NY, U.S.A.)含有PBSにて10分間ブロッキングし、rabbit anti-rat GLUT2 antibody加PBS(希釈倍率1:1000)及び、guinea pig anti-rat insulin antibody (DAKO®, CA, U.S.A.)加PBS (希釈倍率1:400)にて2時間インキュベーションした。更にPBSにて5分間3回洗浄した後、二次抗体donkey anti-rabbit IgG[F(ab)2 fragment]fluorescein isothiocyanate(以下、FITCと省略)-conjugated antibody(Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., PA, U.S.A.)加PBS (希釈倍率1:200)及び、donkey anti-guinea pig IgG Texas Red-conjugated antibody(Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., PA, U.S.A.)加PBS (希釈倍率1:400)にて室温下に1時間インキュベーションした。最後にPBSにて5分間3回、蒸留水にて10分間1回洗浄し染色を終了した。染色した

組織標本はレーザー顕微鏡LSM410(Carl Zeiss社, Germany)にて分光フィルターを用いて観察した。

4) インスリン含量の測定

GLUT2の測定に用いたラ氏島のホモジネートから10 μ lを採取し、2%NBS加PBSにて1000倍に希釈し、インスリン濃度をRIA法(インシュリン‘栄研’ラジオイムノアッセイ・キット, 栄研科学, 東京, 日本)にて測定。直径150 μ mのラ氏島1個当たりのインスリン含量を算出した。

5) 統計解析

統計解析にはANOVA (Scheffe's F)及びTwo group t-testを用い、 $P<0.05$ をもって有意とした。数値はmean $\pm$ SEで記載した。

結果

1) OGTTの結果 (Fig. 1)

術後14日目に行ったOGTTの検討ではPx. +D, Px. +I, Px. 群の3群では血糖値に有意差はみられなかった。糖負荷後30分値でPx. 群ではC群に比べ $213\pm 8\text{mg/dl}$ vs. $170\pm 7\text{mg/dl}$ と有意な血糖上昇をみとめた。インスリンについてはPx. +D, Px. +I, Px. 群とC群の比較では0分値で $47\pm 6\text{pg/ml}$ vs. $93\pm 12\text{pg/ml}$ 、及び60分値で $194\pm 25\text{pg/ml}$ vs. $398\pm 80\text{pg/ml}$ といずれも膵切除群で低下していた。

2) 随時血糖値及び体重の変化 (Fig. 2)

随時血糖は膵切除術後21、28日目ではPx. +I群 ($94\pm 7\text{mg/dl}$ 、 $96\pm 6\text{mg/dl}$)で有意に低下していた。術後35、42日目ではPx. +D群 ($120\pm 4\text{mg/dl}$ 、 $117\pm 3\text{mg/dl}$)で有意に上昇していた。

随時体重は術後3、7日目ではC群 ($112\pm 1\text{g}$ 、 $156\pm 2\text{g}$)が有意に高く、術後14、21、28、35日目ではPx. +D群で $190\pm 3\text{g}$ 、 $226\pm 4\text{g}$ 、 $268\pm 4\text{g}$ 、 $304\pm 5\text{g}$ と有意に低下していた。

(いずれも $P<0.05$)

3) ヘモグロビンA1c (HbA1c) (Fig. 3)

HbA1c値はPx. +D群、Px. +I群、Px. 群、C群の各群で、それぞれ $3.3\pm 0.06\%$ 、 $3.3\pm 0.05\%$ 、 $3.3\pm 0.06\%$ 、 $3.2\pm 0.05\%$ と差がなかった。

4) ラ氏島インスリン含量 (Fig. 4)

直径150 μ mのラ氏島一個あたりのインスリン含量はPx. +D群、Px. +I群、Px. 群、C群の各群で、それぞれ $517\pm 42\mu\text{U}$ 、 $539\pm 36\mu\text{U}$ 、 $619\pm 37\mu\text{U}$ 、 $573\pm 26\mu\text{U}$ と差がなかった。

5) ラ氏島灌流 (Fig. 5, 6, 7)

Glu. 300刺激によるインスリン分泌の第一相目 (AUC)はPx. +D群、Px. +I群、Px. 群、C群の各群で、それぞれ $41\pm 10\mu\text{U}$ 、 $47\pm 12\mu\text{U}$ 、 $51\pm 9\mu\text{U}$ 、 $53\pm 10\mu\text{U}$ と差がなかった。Glu. 300刺激によるインスリン分泌の第二相目 (AUC)ではPx. +D群で、C群に比べ $211\pm 27\mu\text{U}$ vs. $425\pm 75\mu\text{U}$ とインスリン分泌の有意な低下がみられた。

10mM L-アルギニン刺激によるインスリン分泌の第一相目 (AUC)はPx. +D群が、Px. +I群、Px. 群に比べ $35\pm 7\mu\text{U}$ vs. $65\pm 7\mu\text{U}$ 、 $69\pm 9\mu\text{U}$ とインスリン分泌の有意な低下が

みられ、インスリン分泌の第二相目 (AUC) ではPx. +D群で、C群に比べ $70 \pm 11 \mu\text{U}$ vs. $244 \pm 29 \mu\text{U}$ とインスリン分泌の有意な低下がみられた。(いずれも $P < 0.05$)

6) GLUT2の発現 (Fig. 8)

GLUT2の発現はPx. +D群、Px. +I群、Px. 群、C群の各群で、それぞれ $118 \pm 23\%$ 、 $125 \pm 38\%$ 、 $129 \pm 37\%$ 、 $90 \pm 10\%$ と各群間で有意差がなかった。

7) ラ氏島組織 (蛍光免疫染色) (Fig. 9)

ラ氏島組織ではB細胞内にインスリンの陽性染色像をみとめた。B細胞膜にはGLUT2の陽性染色像をみとめ、いずれの群においてもB細胞の空胞変性などの異常はみられなかった。形態学的には各群間で差はみとめなかった。

考察

治療開始前のOGTTではC群を除く3群間で血糖値に有意差はなかった。インスリン反応ではPx. を行った群でC群に比べ0分値、60分値が低下しており、70%膵切除によるB細胞容量の低下が示唆された。随時血糖はPx. +I群で治療開始後1, 2週目で有意な低下が見られたが、この理由としてはPx. +I群ではインスリンペレット植込みの効果のピークが1~2週目にあったためと考えられる。また、Px. +D群で治療開始後3, 4週目で血糖値の有意な高値をみとめたが、この現象はPx. +D群で徐々に耐糖能が悪化している可能性を示唆するものである。随時体重については、治療開始前では膵切除を行った群で低かったが、これは手術侵襲による影響と考えられた。また、治療開始後、Px. +D群で体重の増加が低下していた点については、SU剤を経口ゾンデにより強制的に服用させたことによるストレス負荷が原因と考えられた。以上のように、随時血糖の推移に若干の差がみられたものの、治療終了時のヘモグロビンA1c値には有意差がなかったことから、経過中の血糖コントロール状態は各群でほぼ等しいものと考えられた。

SU剤刺激によるインスリン分泌はプロインスリンの増加なしにおこり、プロインスリンの産成を阻害することが報告されている^{4,8,9)}。Px. +D群ではB細胞からのインスリン分泌が持続的に刺激されるため、インスリン含量が低下していることが予測されたが、今回の実験ではラ氏島のインスリン含量は各群間で差がなかった。

一方、灌流実験ではPx. +D群で高グルコースに対する、インスリン分泌の第二相目と、L-アルギニン刺激に対する第一相目、二相目でインスリン分泌の有意な低下をみとめた。グルコース刺激によるインスリン分泌のメカニズムは、GLUT2を介するグルコースの細胞内への流入¹⁰⁾、グルコキナーゼによるグルコース6-リン酸への転化、解糖系、TCA回路での代謝、ATPの増加ないしATP/ADP比の上昇、それに引き続くATP感受性カリウムチャネルの閉鎖^{11,12)}、B細胞膜の脱分極、電位依存性カルシウムチャネルの開口、カルシウムイオンの細胞内への流入、インスリン分泌^{13,14,15)}、という一連の機構が解明されている。アルギニンについてはB細胞にATP産生をもたらし、ATP感受性カリウムチャネルの閉鎖を介して活動電位を発生させ、細胞内カルシウムイオン濃度の増加、インスリン分泌という機序が考えられている¹⁶⁾。

今回の実験結果はB cell massが低下した状態での慢性的なSU剤の投与により、生体内の残存膵ラ氏島細胞において、上記のインスリン分泌メカニズムのいずれかが障

害されていることを示唆している。これまで、同様の結果がグリベンクラミドとトルブタミドを用いたいくつかの実験で報告されており^{17, 18, 19, 20, 21)}、二次無効の原因の一つの可能性として、SU剤の持続的な刺激がB細胞膜の慢性的な脱分極をもたらし、結果的にそれ以上のSU剤刺激に対してB細胞の反応性が低下することが推測されている。実際に、in vivoの実験ではグリベンクラミドとトルブタミドの刺激により、K⁺-ATPチャネルの活動性とカルシウムイオンの流入が障害されることも報告されている²²⁾。今回著者は、インスリン分泌メカニズムのファースト・ステップであるGLUT2の変化について検討してみた。これまでin vivoにおける高血糖状態においては、インスリン分泌低下とGLUT2低下が同時に起こることが報告されており^{23, 24, 25, 26, 27)}、GLUT2の低下とB細胞の疲弊との関連を予測したが、今回GLUT2については有意差がみられなかった。従って、今回認められたインスリン分泌障害の原因としては、上述したインスリン分泌過程における、GLUT2による糖輸送よりも下流での障害を考えねばならない。

インスリン分泌障害を伴うⅡ型糖尿病モデル動物であるGKラットでは、膵B細胞でのATP産生に大きなウェイトを占めるグリセロールフォスフェート・シャトルの機能異常が示唆されており²⁸⁾、膵B細胞の疲弊とこのシャトル機能との関連についても今後検討が必要と思われる。

また、近年SU剤のレセプターが、ATP感受性カリウムチャネルと複合体を形成し、ATP感受性カリウムチャネルのregulatorとして働いていることが示されており²⁹⁾、このチャネルの機能異常や発現がB細胞の疲弊とどのように関わっているかも興味深い。

さらに、Zawalichら³⁰⁾はホスホリパーゼCとプロテインキナーゼCの活性化の障害が、高血糖下でのインスリン分泌の障害に関係していると述べている。これらの酵素はインスリン分泌の第二相目に関与しており、SU剤による慢性的な膵B細胞刺激がホスホリパーゼCとプロテインキナーゼCの活性化を障害し、インスリン分泌の第二相目を障害している可能性がある。従って、これら酵素に対するSU剤の影響についても今後、更に検討する必要性があらう。

結語

膵B細胞量が減少している状態において、SU剤の慢性投与がインスリン分泌能の低下を引き起こすことが示唆された。原因として、慢性的なインスリン分泌刺激による膵B細胞の疲弊が考えられた。従って、このような病態下においては、B細胞のインスリン分泌能低下を予防するためにはSU剤治療よりも、インスリン治療の方が適切であると考えられた。インスリン分泌能低下の原因として糖輸送膜蛋白GLUT2の減少を考えたが、GLUT2の発現量は各群間で差がなかった。

参考文献

- 1) Karam JH., Sanz E., Salomon E. et al.: Selective unresponsiveness of pancreas B-cells to acute sulfonylurea stimulation during sulfonylurea therapy in NIDDM. Diabetes, 35:1314-1320, 1986.
- 2) Filipponi P., Marcelli M., Nicoletti I. et al.: Suppressive effect of long-te-

rm sulfonylurea treatment on A, B, and D cells of normal rat pancreas. *Endocrinology*, 113:1972-1979, 1983.

3) Groop LC., Pelkonen R., Koskimies S. et al.: Secondary failure to treatment with oral antidiabetic agents in non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes Care*, 9:129-133, 1986.

4) Dunbar JC., Foa PP.: An inhibitory effect of tolbutamide and glibenclamide on the pancreatic islets of normal animals. *Diabetologia* 10:27-32, 1974.

5) Richards C., Fitzgerald PJ., Carol B. et al.: Segmental division of the rat pancreas for experimental procedures. *Lab. Invest.*, 13:1303-1321, 1964.

6) Gotoh M., Maki T., Satomi S. et al.: Reproducible high yield of rat islets by stationary in vitro digestion following pancreatic ductal or portal venous collagenase injection. *Transplantation*, 43:725-730, 1987.

7) Ogawa Y., Noma Y., Davalli AM. et al.: Loss of glucose-induced insulin secretion and GLUT2 expression in transplanted B-cells. *Diabetes*, 44:75-79, 1995.

8) Schatz H., Nierle C., Pfeiffer EF.: (Pro-)insulin biosynthesis and release of newly synthesized (pro-)insulin from isolated islets of rat pancreas in the presence of amino acids and sulfonylureas. *Eur J Clin Invest.*, 5:477-485, 1975.

9) Schatz H., Steinle D., Pfeiffer EF.: Long-term actions of sulfonylureas on (pro-)insulin biosynthesis and secretion. I. Lack of evidence for a compensatory increase in (pro-)insulin biosynthesis after exposure of isolated pancreatic rat islets to tolbutamide and glibenclamide in vitro. *Horm Metab Res*, 9:457-465, 1977.

10) Tal M., Matschinsky F., Liang Y. et al.: Expression and function of GLUT-1 and GLUT-2 glucose transporter isoforms in cells of cultured rat pancreatic islets. *J Biol Chem*, 267:17241-17247, 1992.

11) Nili I., Nicks JL., Aschcroft SJ.: The beta cell glibenclamide receptor is an ADP-binding protein. *Biochem J*, 268:713-718, 1990.

12) Siconolfi-Baez L., Banerj MA., Lebovitz HE.: Characterization and significance of sulfonylurea receptors. *Diabetes Care*[Suppl 3], 13:2-8, 1990.

13) Henquin JC., Meissner HP.: Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on ⁸⁶Rb fluxes and membrane potential in pancreatic B-cells. *Biochem Pharmacol*, 31:1407-1415, 1982.

14) Gillis KD., Gee WM., Hammoud A. et al.: Effects of sulfonamides on a metabolite-regulated ATP-sensitive K⁺ channel in rat pancreatic B-cells. *Am J Physiol*, 257:C1119-C1127, 1989.

15) Boyd AE.: Sulfonylurea receptors, ionchannels and fruit flies. *Diabetes*, 37:847-850, 1988.

16) Smith PA., Sakura H., Coles B. et al. Electrogenic arginine transport mediat-

es stimulus-secretion coupling in mouse pancreatic beta-cells. *J Physiol Lond*, 499:625-635, 1997.

17) Zawalich WS.: Phosphoinositide hydrolysis and insulin secretion in response to glucose are impaired in isolated rat islets by prolonged exposure to the sulfonylurea tolbutamide. *Endocrinology*, 125:281-286, 1989.

18) Bolaffi JL., Heldt A., Lewis LD. et al.: The third phase of in vitro insulin secretion: evidence for glucose insensitivity. *Diabetes*, 35:370-373, 1986.

19) Gullo D., Rabuazzo AM., Vetri M. et al.: Chronic exposure to glibenclamide impairs insulin secretion in isolated rat pancreatic islets. *J Endocrinol Invest*, 14:287-291, 1991.

20) Henquin JC.: Tolbutamide stimulation and inhibition of insulin release: studies of underlying ionic mechanisms in isolated rat islets. *Diabetologia*, 18:151-160, 1980.

21) Hosokawa YA., Jack LL.: Parallel reduction of pancreas insulin content and insulin secretion in 48-h tolbutamide-infused normoglycemic rats. *Diabetes*, 46:808-813, 1997.

22) Agata MR., Massimo B., Carmela V. et al.: Glyburide and tolbutamide induce desensitization of insulin release in rat pancreatic islets by different mechanisms. *Endocrinology*, 131:1815-1820, 1992.

23) Thorens B., Weir GC., Leahy JL. et al.: Reduced expression of the liver/beta cell glucose transporter isoform in glucose-insensitive pancreatic beta-cells of diabetic rats. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87:6492-6496, 1990.

24) Unger RH.: Diabetic hyperglycemia: Link to impaired glucose transport in pancreatic B cells. *Science*, 251:1200-1205, 1991.

25) Ogawa A., Johnson JH., Ohneda M. et al.: Roles of insulin resistance and B-cell dysfunction in dexamethasone-induced diabetes. *J Clin Invest*, 90:497-504, 1992.

26) Orci L., Ravazzola M., Baetens D. et al.: Evidence that down-regulation of B-cell glucose transporters in non-insulin-dependent diabetes may be the cause of diabetic hyperglycemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87:9953-9957, 1990.

27) Thorens B., Wu YJ., Leahy JL. et al.: The loss of GLUT2 expression by glucose-unresponsive beta cells of db/db mice is reversible and is induced by the diabetic environment. *J Clin Invest*, 90:77-85, 1992.

28) 清野 裕: インスリン分泌不全の分子機構. *medicina*, 33(2), 228-229, 1996.

29) Nobuya I., Tohru G., John P. et al.: Reconstitution of γ -KATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science*, 270:1166-1170, 1995.

30) Zawalich WS.: Regulation of insulin secretion by phosphoinositide-specific phospholipase C and protein kinase C activation. *Diabetes Rev*, 4:160-176, 1996.

Fig.1(a) (b)

Changes in blood sugar levels(a)and plasma insulin levels(b) during OGTT.

The values are expressed as mean $\pm$ SE. *P<0.05

Fig2(a) (b)

Changes in blood sugar levels(a)and body weight(b)

The values are expressed as mean $\pm$ SE. *P<0.05

Fig.3

HbA_{1c} levels after treatment.

The values are expressed as mean $\pm$ SE.

Fig.4

Insulin contents per islet. (150 μ m diameter)

The values are expressed as mean $\pm$ SE.

Fig.5

Insulin secretion from perifused islets.

The values are expressed as mean $\pm$ SE.

Fig.6

Area under the curve of insulin secretion in 2nd phase of 300 mg/dl glucose stimulation.

The values are expressed as mean $\pm$ SE. *P<0.05

Fig.7(a) (b)

Area under the curve of insulin secretion in 1st phase(a)and 2nd phase(b) of 10mM L-Arginine stimulation.

The values are expressed as mean $\pm$ SE. *P<0.05

Fig.8

GLUT 2 expression evaluated by western blot.

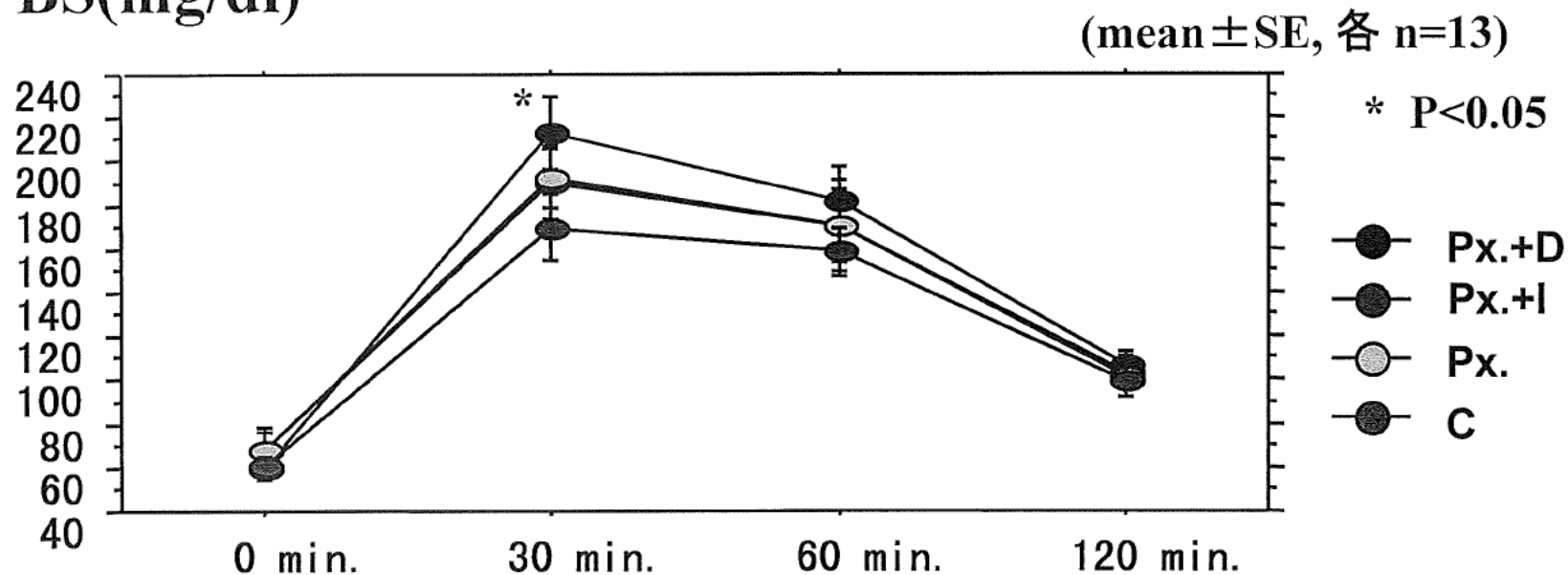
The values are expressed as mean $\pm$ SE.

Fig.9

Immuno-stained islets in each group.

GLUT2 and insulin were double-stained with indirect immnofluorescence using FITC and Texas Red respectively.

(a) BS(mg/dl)



(b) Insulin(pg/ml)

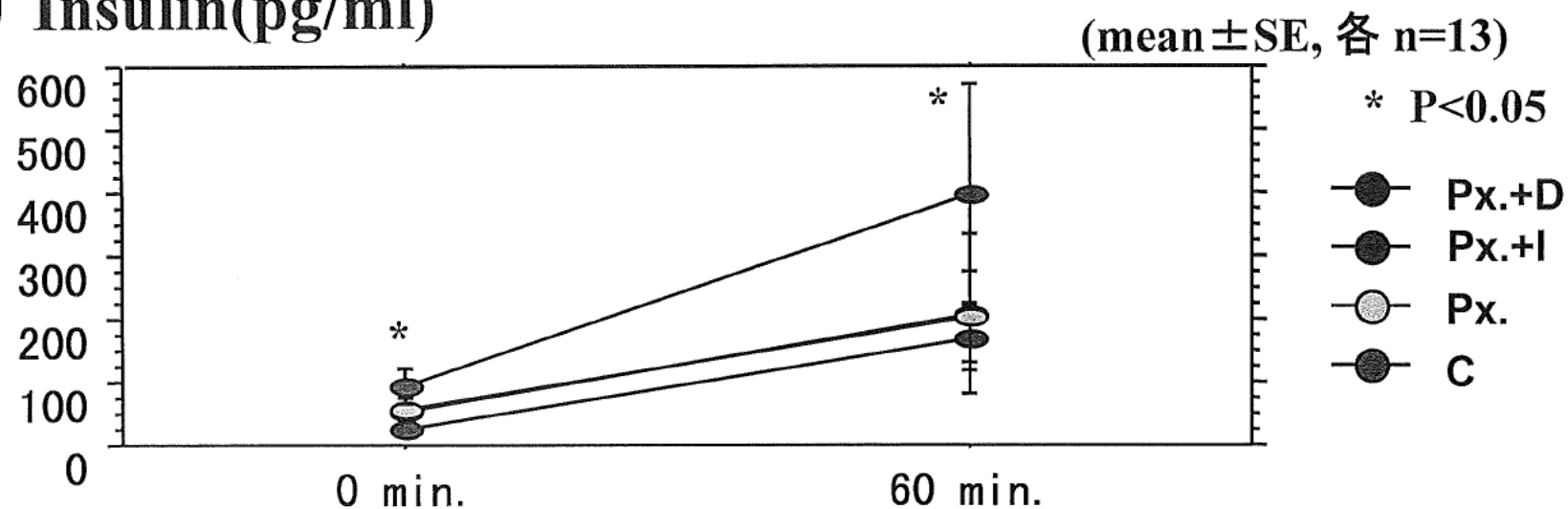
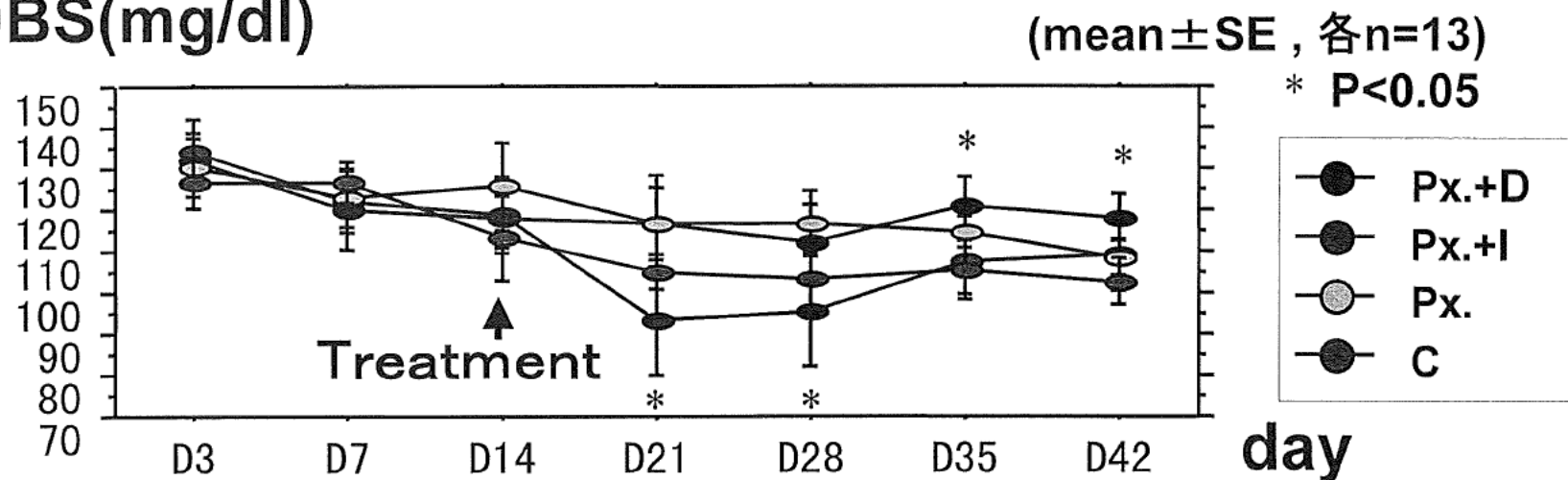


Fig.1

(a)BS(mg/dl)



(b)BW(g)

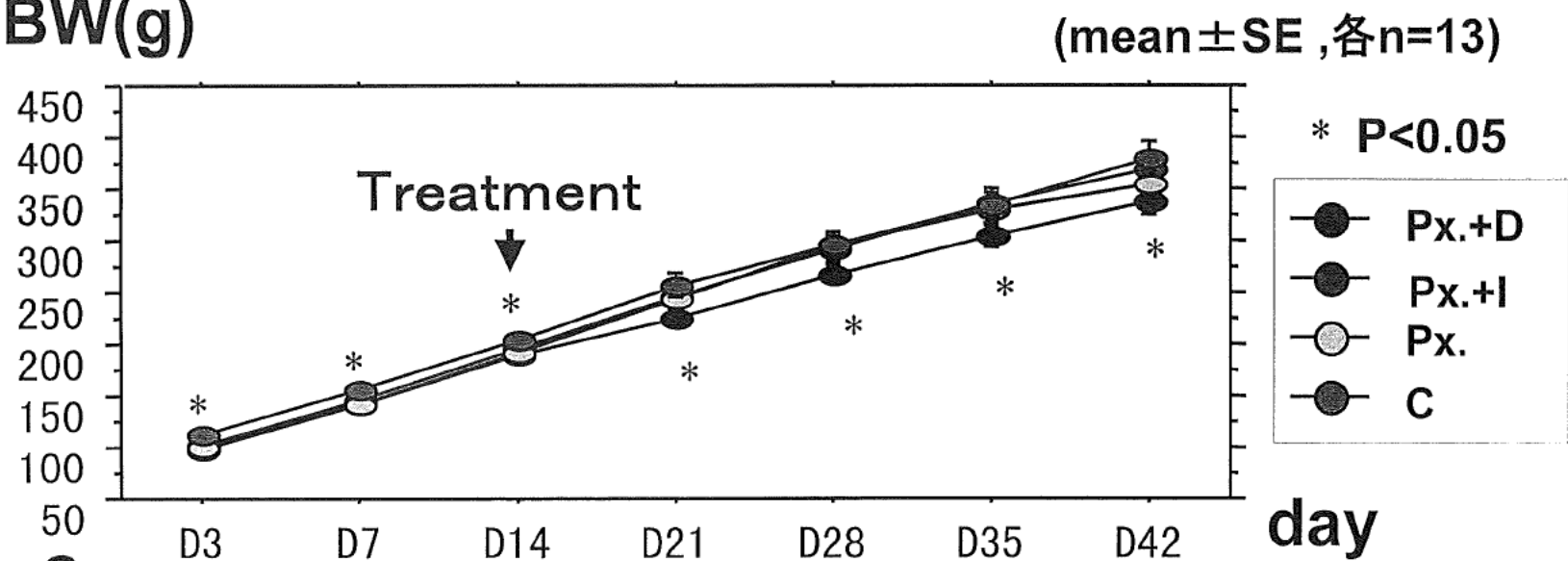


Fig.2

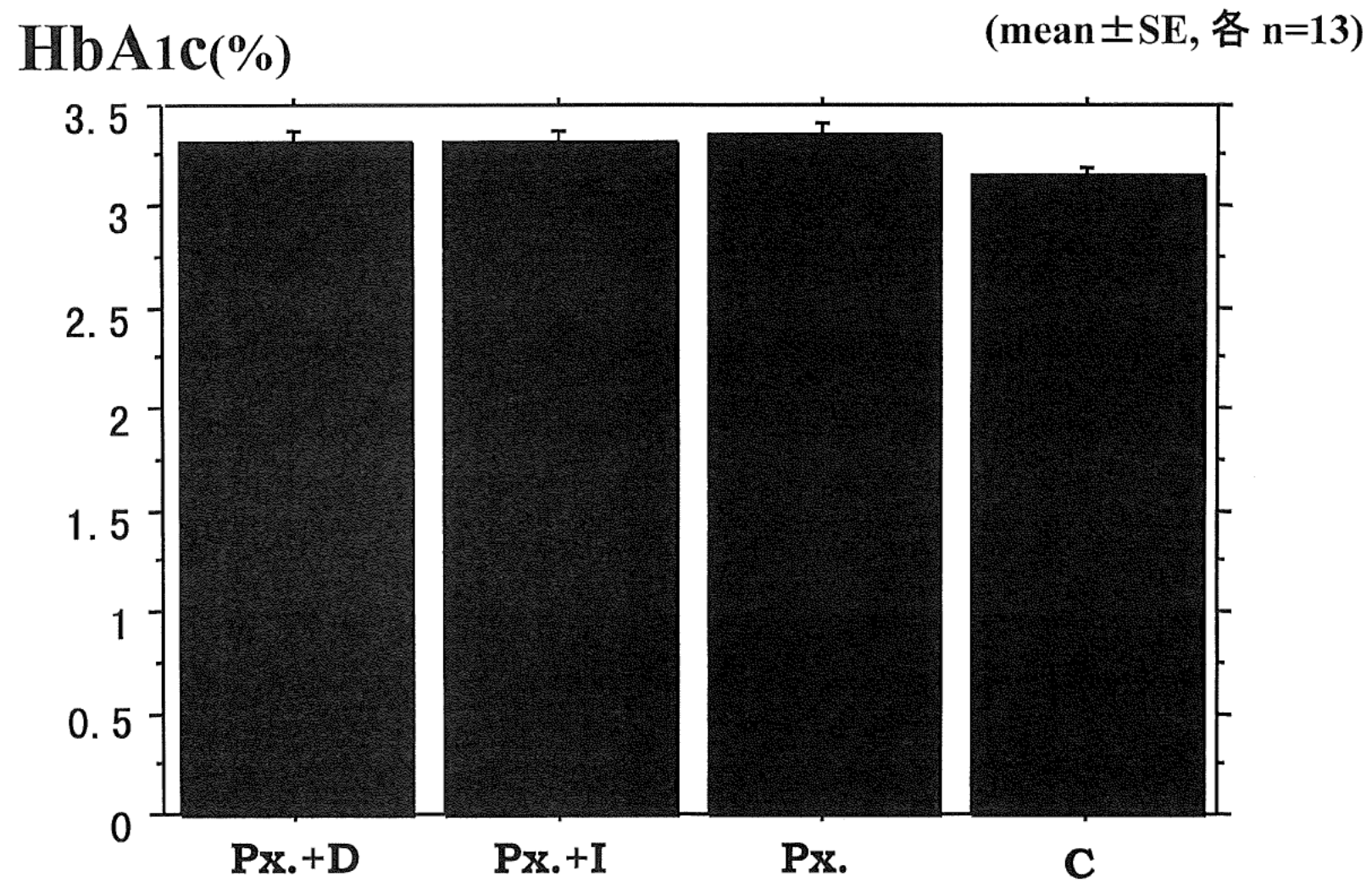


Fig.3

Insulin(μ U/islet)

(mean $\pm$ SE, 各 n=13)

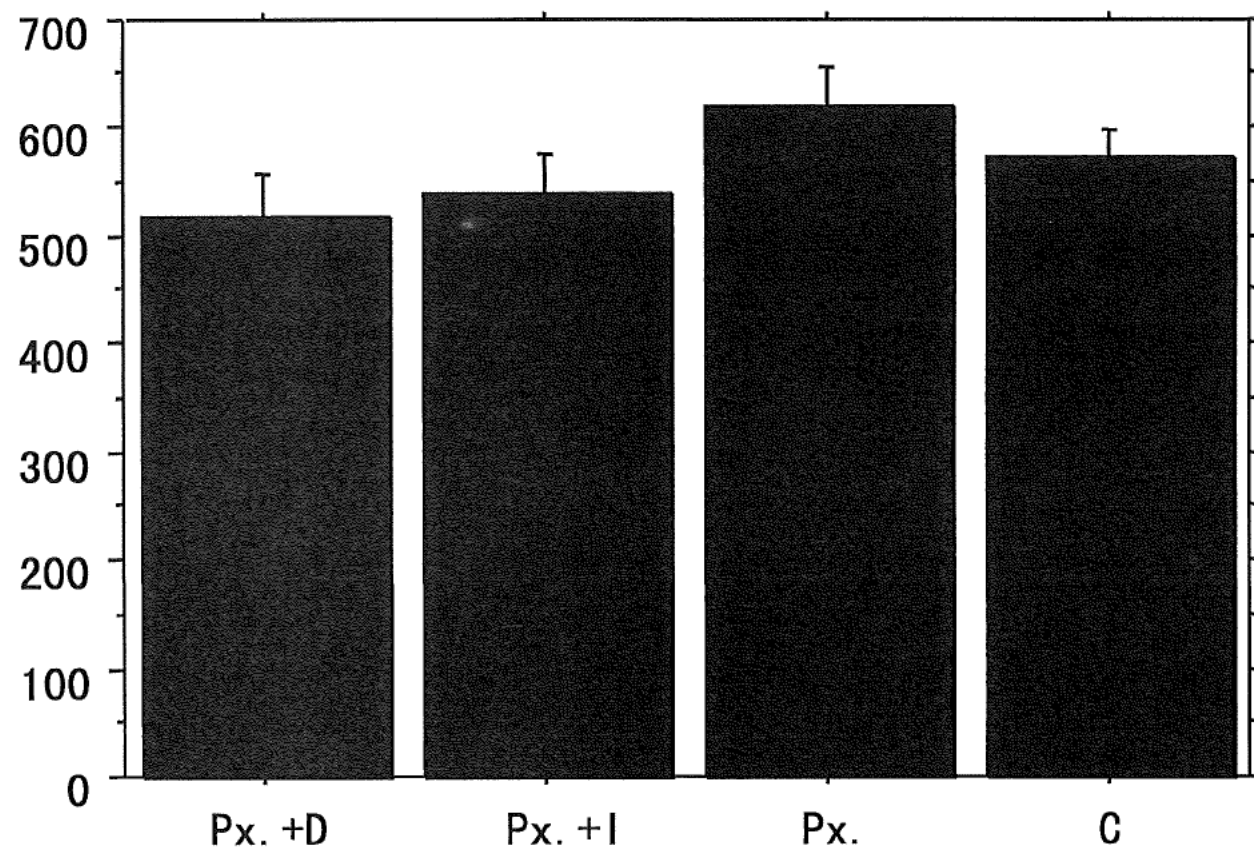


Fig.4

Insulin(μ U/ml)

(mean $\pm$ SE, 各n=13)

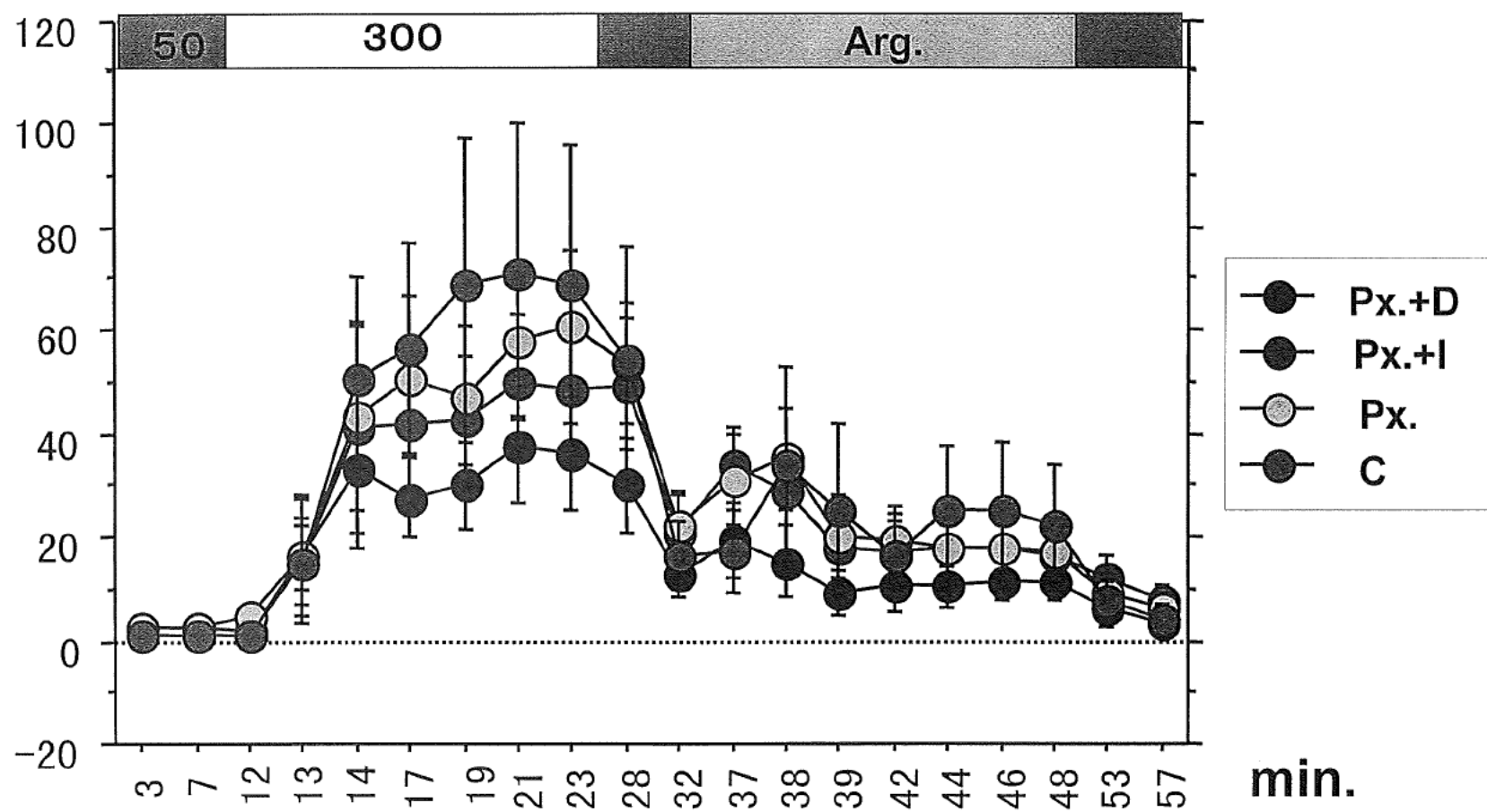


Fig.5

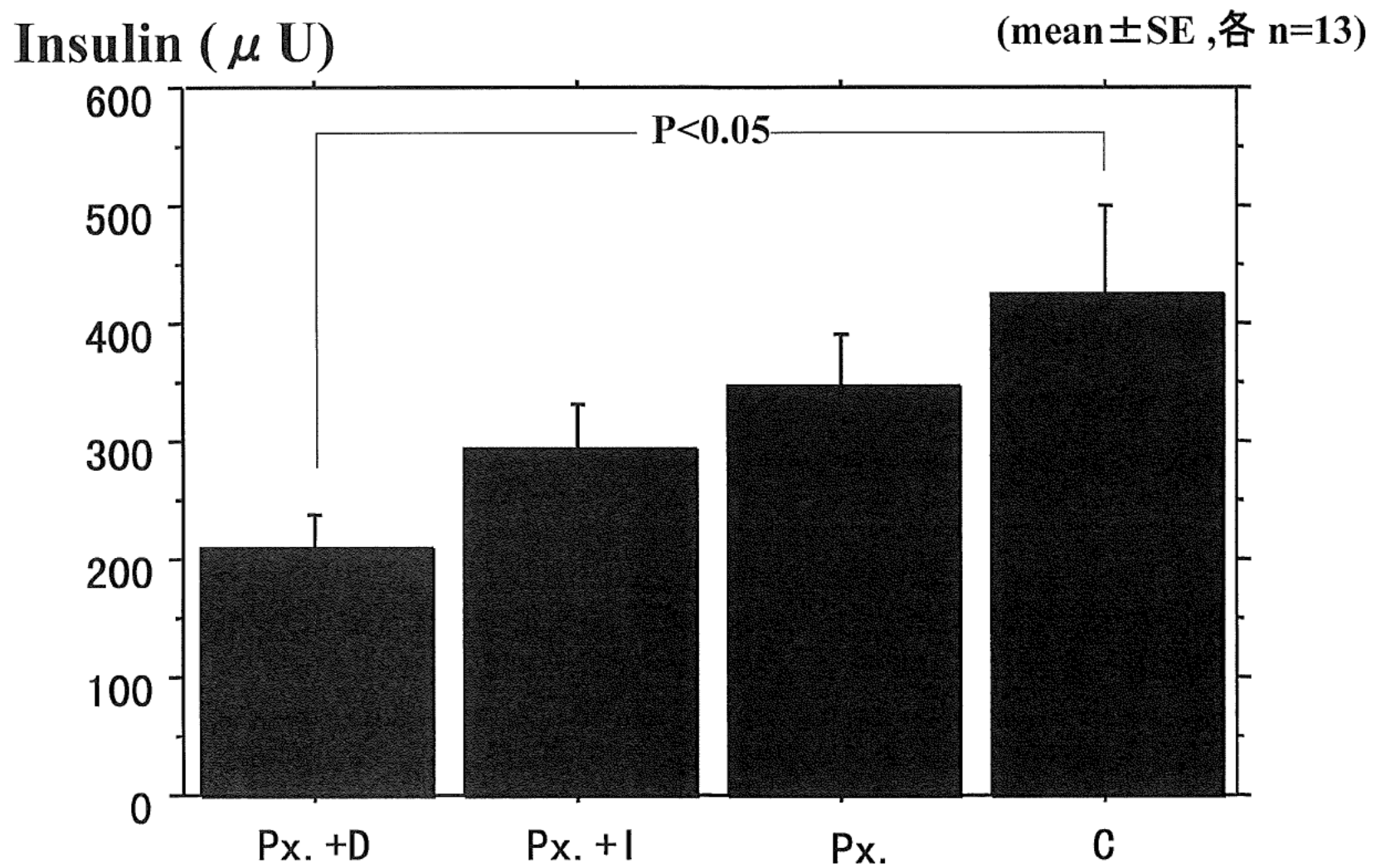
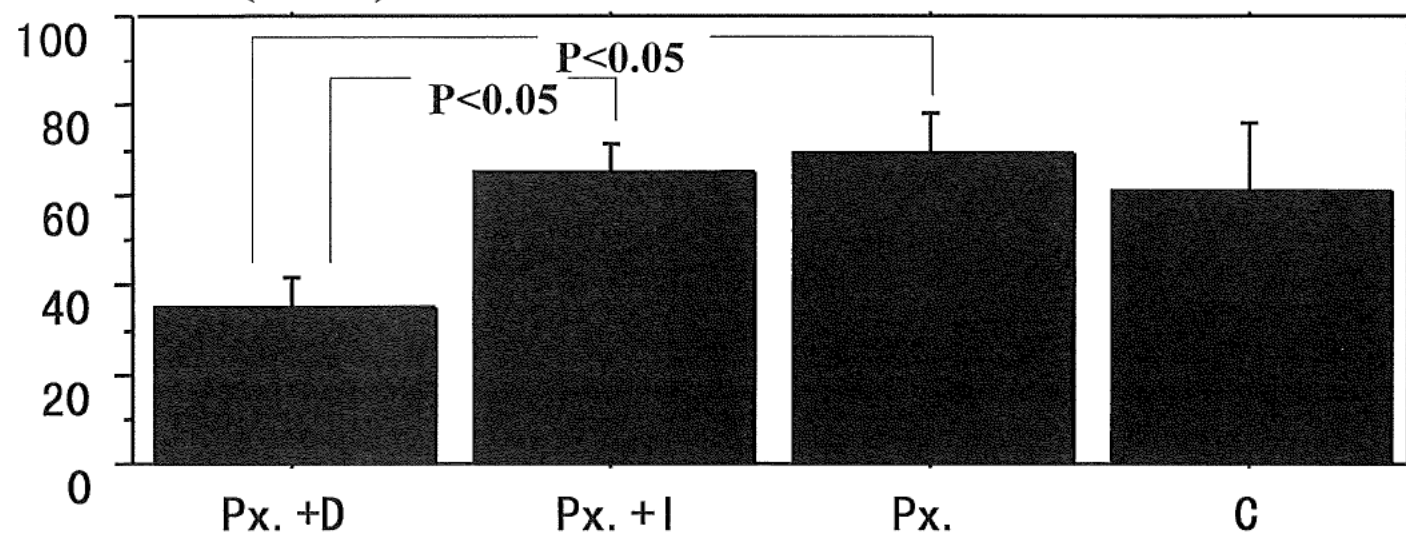


Fig.6

(a) Insulin (μ U) (mean $\pm$ SE, 各 n=13)



(b) Insulin (μ U) (mean $\pm$ SE, 各 n=13)

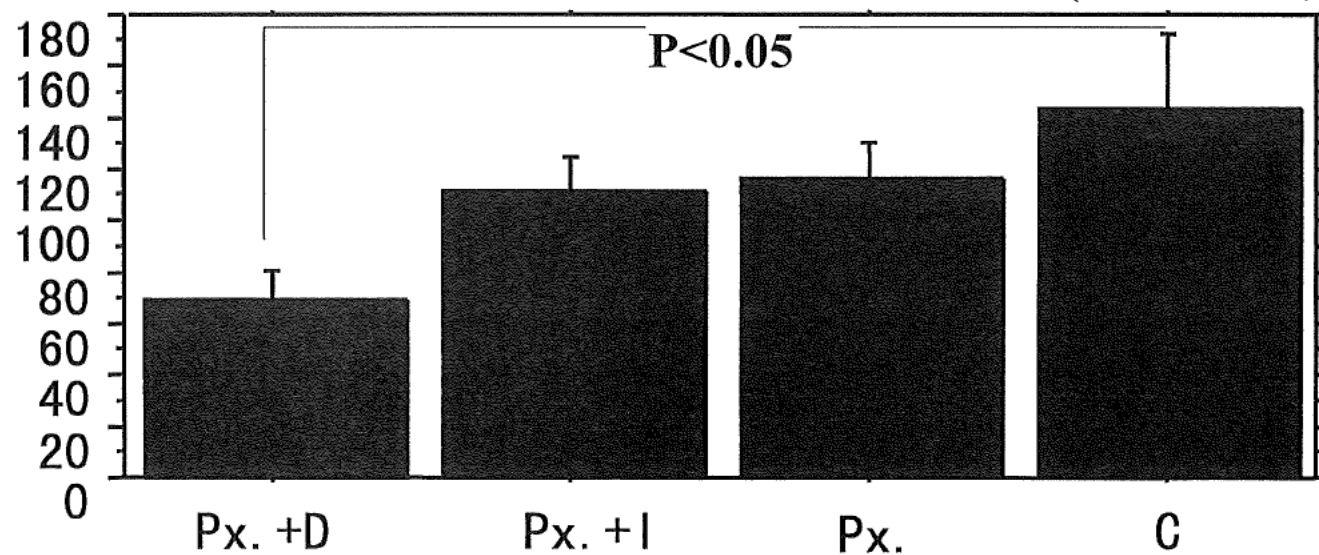


Fig.7

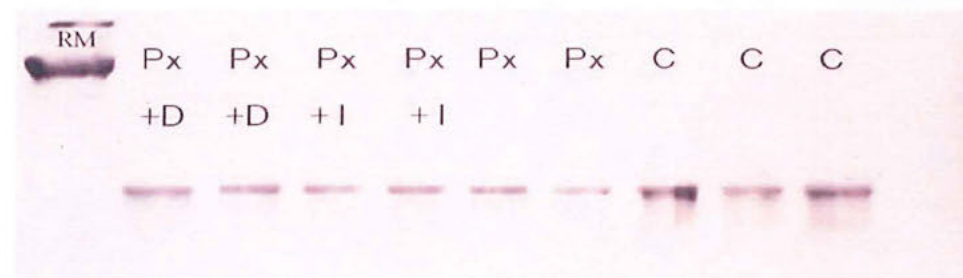
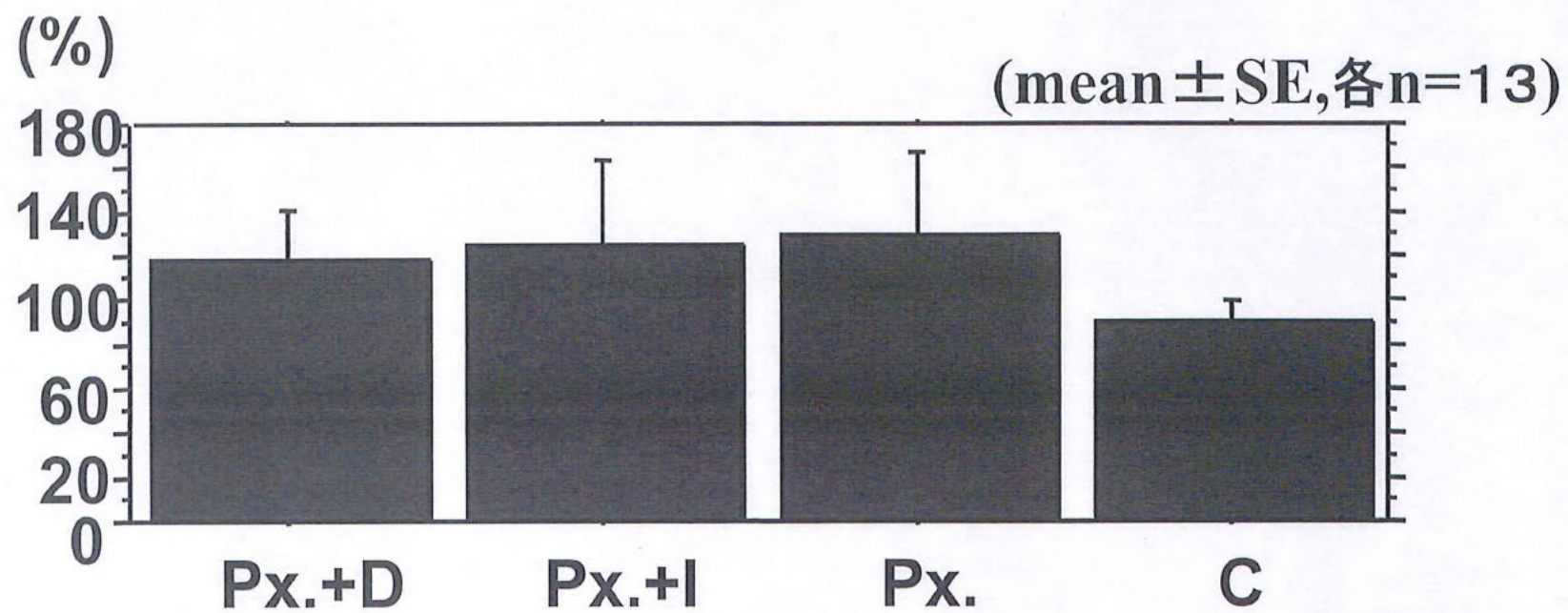


Fig.8

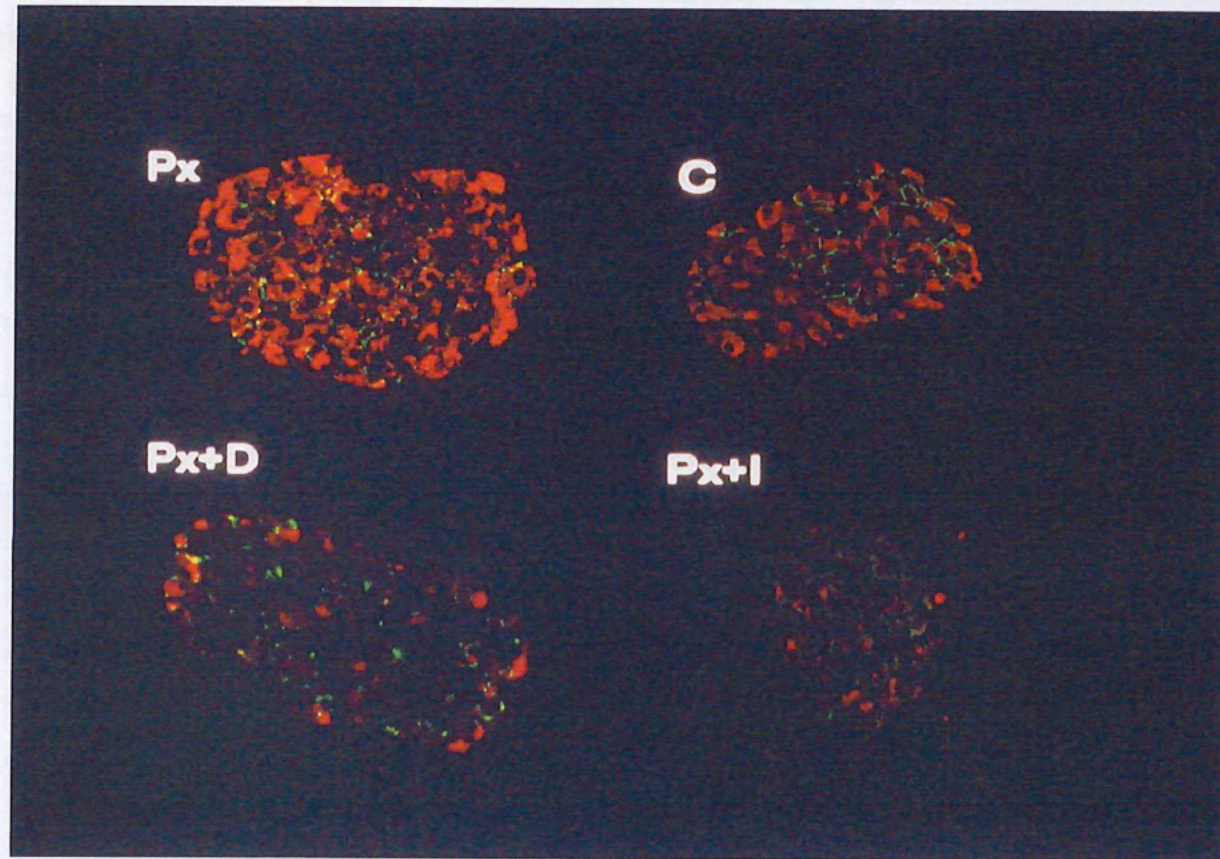


Fig.9