セクレチンの膵内外分泌に関する研究

第5編：天然ブタセクレチンのラット *in vivo* 及び *in vitro* 灌流膵における検討

神戸大学医学部第2内科学教室

坂本 長逸, 大槻 真, 尤 芳才
前田 光雄, 大木 篤, 寺師 克洋
森田 聡一郎, 馬場 茂明

Effect of Secretin on the Exocrine and Endocrine Pancreas Part V: Pancreatic Exocrine and Endocrine Responses to Secretin in Rats *in vivo* and *in vitro*

Choitsu SAKAMOTO, Makoto OTSUKI, Hosai YUU,
Mitsuo MAEDA, Atsushi OHKI, Katsuhiro TERASHI,
Soichiro MORITA and Shigeaki BABA

The Second Department of Internal Medicine,
Kobe University School of Medicine,
Kusunoki-cho, Ikuta-ku, Kobe 650, Japan

Secretin is an established stimulator of exocrine pancreatic function and has been reported by some to also stimulate insulin release both *in vivo* and *in vitro*. Contrary to these observations with natural porcine secretin, synthetic porcine secretin has been revealed to have no influence on insulin release but does stimulate glucagon release from the isolated perfused rat pancreas. Unphysiologically large doses of synthetic porcine secretin has also been confirmed in *in vivo* experiments to be capable of stimulating not only glucagon but also insulin secretion from the rat pancreas. Thus, the discrepancies between our previous results with synthetic porcine secretin and those obtained with natural porcine secretin may be due to the differences of the preparations of secretin or to the species differences of the experimental animals, or of the experimental system itself.

The present investigation was undertaken to determine the effect of natural porcine secretin on exocrine and endocrine secretions from the rat pancreas *in vivo* and *in vitro*.

Pancreases from Wistar male rats were isolated and perfused according to the technique of Kanno. A Krebs Ringer bicarbonate solution containing 4.6% dextran T-70, 0.25% bovine serum albumin and 50 mg/100 ml glucose was used as a perfusion medium. Commercially available secretin (Secrepan[®]; Eisai Co., Ltd., Tokyo, Japan: supplied as lyophilized powder containing 30% pure natural porcine secretin and stabilizer), an inactive placebo of secretin containing cysteine and alanine as stabilizers for natural secretin, and

100% pure natural porcine secretin without stabilizer were used as stimulants of pancreatic exocrine and endocrine secretions.

Overnight-fasted Wistar strain rats were used in the *in vivo* experiments. The rats were anesthetized with sodium pentobarbital by subcutaneous injection. The body temperature was held at 37°C by a heating pad. One of the following solutions was administered into the jugular vein by a single rapid injection: 1 and 50 U/kg natural porcine secretin (Secrepan®), and a comparable dose of the placebo of secretin. Blood samples were collected from the portal vein at -10, 0, 2.5, 5, 10, 30 and 60 min.

Immunoreactive insulin (IRI) was measured by polyethylene glycol radioimmunoassay. Immunoreactive glucagon (IRG) was determined by radioimmunoassay by means of dextran coated charcoal using antiserum 30 K. Rat insulin and porcine glucagon were used as standards in the IRI and IRG assays, respectively.

The lowest secretin concentration causing a significant increase in pancreatic flow rate and amylase output from the isolated perfused rat pancreas was 1 mU/ml. The maximal pancreatic flow rate and amylase output required a secretin concentration of 1 U/ml. Higher concentrations of secretin, however, resulted in lower responses of both pancreatic juice flow and amylase output. Commercial secretin at concentrations of 1 mU/ml to 2 U/ml in the presence of 50 mg/100 ml glucose did not cause an increase in the IRI concentration in the portal effluent above the basal value. Secretin at the concentration of inducing the maximal pancreatic exocrine secretion with 50 mg/100 ml glucose (1 U/ml) was infused for 10 min in the presence of 100 and 150 mg/100 ml glucose to determine whether a threshold level of glucose was required for the insulintropic action of secretin. Commercial secretin at a concentration of 1 U/ml elicited a significant short-termed increase in the IRI response to 100 and 150 mg/100 ml glucose, while 1 U/ml pure natural porcine secretin without stabilizer had no effect on IRI secretion, even when perfused with 100 or 150 mg/100 ml glucose. Perfusion with a stabilizing agent for secretin at a concentration similar to that in 1 U/ml commercial secretin in the presence of 100 and 150 mg/100 ml glucose elicited an IRI release comparable to that elicited by commercial secretin.

On the other hand, 1 U/ml secretin elicited a significant increase in IRG secretion in the presence of 50 mg/100 ml glucose. Not only the commercial secretin but also 100% pure natural porcine secretin had the IRG-release stimulating effect. However, these effects of secretin were only observed in the presence of 50 mg/100 ml glucose. A high glucose concentration of 100 or 150 mg/100 ml in the perfusing fluid completely abolished the stimulating effect of secretin on the secretion of pancreatic IRG.

A bolus injection of 1 or 50 U/kg commercial secretin or an inactive placebo of secretin had no effect on portal plasma IRI and IRG levels *in vivo*.

It seems reasonable to conclude that porcine secretin, regardless of its preparation, has a stimulating effect on the pancreatic alpha-cell but no effect on the beta-cell in rats, though there may be species differences in responsiveness to the hormone derived from porcine intestine.

緒 言

従来より天然ブタセクレチンの投与が *in vitro* 及び *in vivo* の実験系で膵 β 細胞を刺激し、インスリン分泌反応を示す事はよく知られている^{3) 11) 14) 15) 19) 20) 25)}。一方、著者らは *in vitro* ラット灌流膵標本において、合成セクレチンが膵 β 細胞刺激作用を示さず逆に膵 α 細胞刺激作用を有することを明らかにしてきた²⁶⁾。このような合成セクレチンもラット *in vivo* の実験で、十二指腸内へ塩酸や 1-phenyl-1-hydroxy-n-pentane を注入した際得られる門脈血中セクレチン濃度¹⁶⁾ の十数倍高値に達するような濃度で投与するとインスリン分泌増加反応を示した。しかし *in vivo* におけるインスリン分泌反応も従来の報告^{3) 11) 14) 15) 19) 25)} では天然ブタセクレチン投与後の血中セクレチン濃度を測定していないため、直ちに薬理量のセクレチン投与に対する反応であると結論することはできない。更に合成セクレチンを用いた報告はほとんどなく、著者らの観察結果^{22) 26)} と天然ブタセクレチンの作用が異なるのは実験に用いた合成セクレチンの特異性による可能性も考えられる。そこで今回は、*in vitro* ラット灌流膵標本ならびに *in vivo* の実験系で天然ブタセクレチンの膵内外分泌作用を検討した。

実 験 方 法

1. *in vitro* ラット灌流膵標本

1) ラット標本：自由に摂食、摂水させた、体重 250–300 g の Wistar 系雄性ラットを用いて、菅野の方法¹³⁾ に準じて摘出灌流膵標本を作成した。すなわち膵臓を大腸、脾臓より分離し胆膵管の十二指腸端に金属針を挿入固定し、金属針遊離端に接続したチューブより膵液を流出させた。血管系は腹腔動脈と上腸間膜動脈に各々内径 1 mm のチューブを挿入して流入管とし、門脈内に内径 3 mm のチューブを挿入して流出管とした。灌流液は 4.6% Dextran T-70 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden), 0.25% bovine serum albumin (fraction V, Armour Pharmaceutical Co., Phoenix, Ariz.), 50 mg/dl ブドウ糖を含む Krebs Ringer bicarbonate buffer (KRBB) を用い、95% O₂, 5% CO₂ で通気し pH を約 7.4 に維持した。灌流液の流速は 2 ml/min とし摘出した灌流膵標本は KRBB で満たした容器中に浮置し 37°C に保った。

2) 刺激方法および採液方法：天然ブタセクレチンとして Secrepan[®] (エーザイ株式会社) を用いた。この製剤には純度約 30% の天然ブタセクレチン (1 mg $\equiv$ 5000 U) とセクレチンの失活を防ぐために安定剤として cysteine, および alanine が添加されている。この天然ブタセクレチンを最終濃度が 1, 10, 100, 1000, 2000 mU/ml になるように灌流液で希釈し、灌流刺激は 20 分間とした。更にブドウ糖濃度と天然ブタセクレチンの膵内外分泌作用との関係を検討するため 100 mg/dl 及び 150 mg/dl の濃度のブドウ糖を含む灌流液で 20 分間灌流し、後半の 10 分間には 10 mU/ml または 1 U/ml 天然ブタセクレチン、両濃度の天然ブタセクレチンと同じ濃度の安定剤を含む placebo, あるいは cysteine 及び alanine を含まない 100% 純粋天然ブタセクレチン (1 mg $\equiv$ 15000 U: エーザイ株式会社提供) 1 U/ml の灌流刺激を加えた。

2. ラット *in vivo* の実験

1) ラット標本：*in vitro* と同様のラットを 15 時間絶食後実験に用いた。ラット標本は既に報告した方法²²⁾ に準じて作成した。

2)薬剤投与法：1 U/ml/kg B. W. 及び50 U/ml/kg B. W. に希釈した天然ブタセクレチンを一側頸静脈より単回投与した。50 U/ml/kg B. W. の天然ブタセクレチン投与群ではセクレチン投与60分後に50 U/ml/kg B. W. と同濃度の安定剤を含む placebo を頸静脈に単回投与した。セクレチン投与前、投与後2.5, 5, 10, 30, 60分に、また placebo 投与後2.5, 5, 10分に肝門部より約1 cm遠位でEDTA 2 Na (1.2mg/1 ml 血液), aprotinin (Trasylol[®], Bayer, Leverkusen, West Germany)を含む注射器を用いて門脈血を採取した。採取した門脈血は直ちに冷凍遠沈器にて血漿を分離し、インスリン、グルカゴン濃度測定まで-20℃に保存した。

3. 膵液採取

in vitro 及び in vivo の実験ともに膵液は、胆膵管十二指腸端に挿入、固定した金属針遊離端に接続しているシリコンチューブを10分毎に交換して採取し、膵液量測定 (μ l/10min) ののち 500 μ l 生理的食塩水に希釈してアミラーゼ活性測定まで-20℃に保存した。

4. インスリン (IRI), グルカゴン (IRG) 及びアミラーゼ活性の測定

灌流液中及び門脈血中のインスリン濃度はラットインスリンを標準とし、¹²⁵I 標識ブタインスリン (ダイナボット RI 研究所, 東京) と抗ブタインスリン血清 (清水製薬株式会社, 静岡) を用いたポリエチレングリコール法⁴⁾による radioimunoassay (RIA) で測定した。一方グルカゴン濃度は豚グルカゴンを標準とし、¹²⁵I 標識豚グルカゴン (Novo. Research Institute. Bagsvaerd. Denmark) と30 K抗体 (University of Texas Southwestern Medical School, Dallas, Tex.) を用いデキストランチャコール法による RIA で測定した¹⁾。

膵液中のアミラーゼ活性は色素殿粉法にて測定²⁾し、10分間の放出量 (Somogy Unit/10min) として表わした。

結 果

(A) in vitro 灌流膵における検討

1)膵外分泌反応……20分間の天然ブタセクレチン灌流刺激による膵外分泌反応を図1に示した。膵外分泌を刺激するセクレチンの最少有効濃度は1 mU/ml であり、1 U/ml の濃度で膵液量(29.2 $\pm$ 1.9 μ l/10min), アミラーゼ放出量(1398.6 $\pm$ 179.5 S. U. /10min)ともに最大となり、2 U/ml の濃度では両者ともかえって反応が低下した。

2)IRI 分泌反応……灌流液中のブドウ糖濃度が50mg/dl の場合には1 mU/ml から2 U/ml までの天然ブタセクレチン刺激を加えてもIRI 分泌増加反応は全く認められなかった。そこで100及び150 mg/dl の濃度のブドウ糖を含む灌流液で10分間前灌流ののち、同じ濃度のブドウ糖存在下に膵外分泌に対しては有効濃度の10mU/ml 天然ブタセクレチンあるいは同濃度の安定剤を含む placebo で10分間の灌流刺激を加えたが、IRI 分泌反応は認められなかった。

更に同じ実験条件下で、最大膵外分泌反応をきたす天然ブタセクレチン1 U/ml の灌流刺激を加えると、急峻なIRI 分泌反応を認め、その頂値は100mg/dl ブドウ糖存在下では4.6 $\pm$ 1.6ng/ml であり、150mg/dl ブドウ糖存在下では21.6 $\pm$ 6.2ng/ml であった。一方この濃度のブドウ糖存在下に天然ブタセクレチン1 U/ml と同濃度の安定剤を含む placebo で灌流刺激を加えると、セクレチン刺激時と同様の急峻なIRI 分泌反応を認め、各々の頂値にも有意な差はなかった。

そこで同濃度ブドウ糖存在下に安定剤等の挟雑物を含まない100%純粋天然ブタセクレチン1 U/ml の灌流刺激を加えたが、天然ブタセクレチンや placebo による刺激とは異なり、IRI 反応は全く

認められなかった。膵液量に基づく100%純粋天然ブタセクレチン1 U/ml と天然ブタセクレチン1 U/ml の生物活性には差がなく、10分間の両セクレチン製剤刺激とその後の10分間の膵液量の総和は、100%純粋製剤刺激で $23.0 \pm 1.8 \mu\text{l}/20\text{min}$ であり、30%純粋製剤刺激で $28.2 \pm 1.9 \mu\text{l}/20\text{min}$ であった。

3) IRG 分泌反応……天然ブタセクレチン1 U/ml 及び placebo 刺激によりブドウ糖50mg/dl 存在下では急峻な IRG 分泌増加反応を認め、頂値はそれぞれ $1688 \pm 133 \text{ pg/ml}$ 及び $1350 \pm 270 \text{ pg/ml}$ であった。又100%純粋天然ブタセクレチン1 U/ml 刺激でも低値ではあるが明瞭な IRG 分泌刺激作用を認め、前値 $71 \pm 17 \text{ pg/ml}$ から頂値 $136 \pm 4 \text{ pg/ml}$ に増加した。しかしブドウ糖100及び150 mg / dl 存在下では、これらの急峻な IRG 分泌反応は認められなかった。

Fig. 1. Time-course of pancreatic juice flow and amylase output in response to a 20-min perfusion with different concentrations of natural porcine secretin. Each value represents the mean $\pm$ SEM of 6 experiments.

Fig. 2. Effect of 10 mU/ml natural porcine secretin (top) and the inactive placebo of secretin (bottom) on IRI responses to 50, 100 and 150 mg/100 ml glucose. Secretin or placebo was superimposed on 100 and 150 mg/100 ml glucose stimulation. Each point represents the mean $\pm$ SEM of 4 experiments.

Fig. 3. Effect of 1 U/ml natural porcine secretin (top) and the inactive placebo (middle) on IRI responses to 50, 100 and 150 mg/100 ml glucose stimulation. Control experiments without secretin or placebo was shown at the bottom. Each point represents the mean $\pm$ SEM of 6 experiments.

Fig. 4. Effect of 100% pure natural porcine secretin without stabilizer at a concentration of 1 U/ml on IRI responses to 50, 100 and 150 mg/100 ml glucose stimulation. Secretin was superimposed on 100 and 150 mg/100 ml glucose stimulation. Each point represents the mean $\pm$ SEM of 4 experiments.

Fig. 5. Effect of glucose concentrations in the perfusate on secretin-stimulated IRG release. Each point represents the mean $\pm$ SEM of 4 to 6 experiments.

Fig. 6. Effect of bolus injection of 1 or 50 U/kg natural porcine secretin on IRI (open circle in the top), IRG (closed circle in the top) and pancreatic exocrine secretions (bottom). Each value represents the mean $\pm$ SEM of 7 experiments.

(B) in vivo 実験系における検討

in vitro 灌流膵標本は神経系及び体液性因子が除外されているので、これらの諸因子が存在する in vivo の標本において天然ブタセクレチンの膵内外分泌反応を検討した。1 U/ml/kg B. W. 及び 50 U/ml/kg B. W. の濃度の天然ブタセクレチンを静脈内に単回投与しても、門脈血中 IRI 濃度はセクレチン投与前後で有意な変化を認めなかった。一方門脈血中 IRG 濃度は 50 U/ml/kg B. W. の濃度の天然ブタセクレチン刺激で前値 263 ± 73 pg/ml から頂値 491 ± 129 pg/ml にまで増加傾向を認めたが、同濃度の安定剤を含む placebo 刺激にても同様な増加傾向が観察された。アミラーゼ放出量の頂値は 1 U/ml/kg B. W. 及び 50 U/ml/kg B. W. の濃度の天然ブタセクレチン刺激で差がなかったが、膵液量は 1 U/ml/kg B. W. 刺激に対する頂値 $11.2 \pm 1.2 \mu\text{l}/10\text{min}$ に比べ 50 U/ml/kg B. W. 刺激では $31.4 \pm 1.6 \mu\text{l}/10\text{min}$ と有意に増加した ($P < 0.05$)。

考 按

天然ブタセクレチンが IRI 分泌刺激作用を有することは in vivo in vitro の実験で報告されてきた^{3) 11) 14) 15) 19) 20) 25)}。しかし従来報告とは異なり合成セクレチンには in vitro 灌流膵標本で膵 β 細胞刺激作用を全く認めず²⁶⁾、薬理量と思われる大量を in vivo の系で投与するとはじめて IRI 分泌刺激作用を認めた²²⁾。従来報告とこのような著者らのラットにおける合成セクレチンの作用との違いの原因としては、用いられているセクレチン製剤の差、あるいは実験に使用した動物の種族差が考えられる。そこでセクレチン製剤の差による膵内分泌刺激作用を天然ブタセクレチンを用いて、in vitro 灌流膵標本及び in vivo 実験で検討した。

セクレチンの IRI 分泌刺激作用は高濃度ブドウ糖存在下で増強されることが知られている^{14) 15)}。Fahrenkrug ら⁸⁾は健常ヒトにおいてブドウ糖持続投与下に天然ブタセクレチン 16 pmol/kg を静脈内単回投与すると有意な IRI 分泌増加反応を認めたと報告しているし、Dupre ら⁷⁾ Dudl ら⁵⁾も健常ヒトを対象にブドウ糖持続投与下における天然ブタセクレチンの IRI 分泌増加反応を報告している。本実験ではブドウ糖 50 mg/dl のもとでは IRI 分泌増加反応は全く認められなかったが、100 及び 150 mg/dl の濃度のブドウ糖存在下で天然ブタセクレチン 1 U/ml の灌流刺激を加えると急峻な IRI 反応が認められた。しかしながらセクレチン 1 U/ml と同濃度の安定剤を含む placebo 刺激でも同程度の急峻な IRI 分泌増加を認め、100% 純粋天然ブタセクレチン 1 U/ml の刺激では IRI 分泌増加は全く認められなかった。このような事実から天然ブタセクレチン自体にはラット膵 β 細胞に対する直接刺激作用はないものと考えられる。あるいは天然ブタセクレチン 1 U/ml と 100% 純粋天然ブタセクレチン 1 U/ml による IRI 分泌刺激作用の差は含まれる安定剤だけではなく、力価の差があるのかもしれない。しかし灌流膵における膵外分泌刺激作用から検討すると天然ブタセクレチン 1 U/ml と 100% 純粋天然ブタセクレチン 1 U/ml 刺激による膵液量は、両製剤中のセクレチン生物活性がほぼ等しいことを示している。従って高濃度ブドウ糖存在下における急峻な IRI 分泌反応は天然ブタセクレチン製剤中に含まれる安定剤によるものと思われた。従来報告されている天然ブタセクレチンの IRI 分泌刺激作用も製剤中に存在するかもしれない諸種の安定剤による可能性も考えられる。

Goberna ら⁹⁾がラット in vivo の実験においてセクレチンは膵外分泌組織内の血管系、リンパ管系が正常であるとき IRI 分泌刺激作用を示すと報告している。既に明らかにした著者らの合成セクレチン静脈内大量投与²²⁾や諸家の報告^{3) 11) 14) 15) 19) 25)}に認める in vivo におけるセクレチンの IRI 分泌

刺激作用はセクレチンの膵血流量増加作用^{17) 18) 21)}を介したものである可能性がある。従って灌流膵標本において膵外分泌がセクレチンに充分反応しているにもかかわらずIRI分泌反応を認めないのは、セクレチン刺激後も灌流液の流速が一定であるからかもしれない。一方in vivoにおける天然ブタセクレチン1及び50 U/kg B. W.の投与もIRI分泌刺激作用を示さなかったが、天然ブタセクレチン50 U/kg B. W.に対する膵液分泌反応はほぼ合成セクレチン1 μ g/kg B. W.の静脈内単回投与に対する膵液分泌反応に相当し²²⁾、この濃度の合成セクレチン投与ではIRI分泌反応は認められなかった²²⁾。すなわち50 U/kg B. W.の濃度の天然ブタセクレチン刺激はIRI分泌を刺激する薬理量としては投与量が不足であったものと思われる。

更に灌流膵標本では天然ブタセクレチン1 U/mlに相当するplacebo刺激がIRI分泌増加作用を示したにもかかわらず、in vivoの系では50 U/kg B. W.に相当するplacebo刺激でIRI分泌反応が認められなかった。in vitro灌流膵標本においても最大膵外分泌反応をきたす天然ブタセクレチン1 U/mlに相当するplacebo刺激ではIRI分泌反応を認め、10 mU/mlに相当するplaceboではIRI分泌反応を認めていない。このようにin vivoの系では天然ブタセクレチンのsubmaximal doseに相当するplaceboを用いたためにIRI分泌反応が認められなかったのかもしれない。

すなわち、天然ブタセクレチンはin vitro、およびin vivoの実験系においてラット膵 β 細胞に対しては直接刺激作用を有さず、安定剤によるとと思われる膵 β 細胞刺激作用を除いて合成セクレチンのラット膵 β 細胞への作用とほぼ一致した。従来報告されている天然ブタセクレチンの膵 β 細胞刺激作用はヒトおよびイヌを対象とした実験が多く^{11) 14) 15) 19) 23)}、製剤中に混在するかもしれない他のペプチドや安定剤の作用も否定しきれないが、ラットを用いた私達の実験結果と相反したのかもしれない。すなわちラットとヒト、イヌ膵 β 細胞はブタセクレチンに対する感受性に差がある可能性がある。

in vitroラット灌流膵標本では100%純粋天然ブタセクレチン刺激でもIRG分泌増加が観察され合成セクレチンのラットin vitro灌流膵標本における作用と一致した²⁶⁾。すなわちラットではブタセクレチンはその製剤いかにかわらず膵 α 細胞刺激作用を有しているものと思われる。一方、Holstら^{10) 12)}はブタを用いた実験でブタセクレチンはヒト及びイヌに対するIRG分泌抑制作用^{23) 24)}とは異なり、IRG分泌に何らの影響も与えなかったと報告しており、ブタセクレチンの膵 α 細胞への作用は膵 β 細胞への作用と同様に、動物種族間で異なっているものと思われる。

結 語

天然ブタセクレチンのラットin vitro灌流膵標本及びin vivo静脈内単回投与に対する膵内外分泌反応を検討した結果、以下の成績を得た。

1. in vitro灌流膵標本では膵外分泌を刺激する天然ブタセクレチンの最大量は1 U/mlであり、2 U/mlの濃度では逆に膵外分泌反応は低下した。
2. 灌流液中のブドウ糖濃度が100mg/dl及び150mg/dlの時には、天然ブタセクレチン1 U/ml及びplacebo刺激で急峻なIRI分泌増加を認めたが、100%純粋天然ブタセクレチン1 U/ml刺激では、IRI分泌増加を認めなかった。
3. 灌流液中のブドウ糖濃度が50mg/dlの時には100%純粋天然ブタセクレチン1 U/ml刺激で、IRG分泌増加反応を認めたが、ブドウ糖濃度が100mg/dl以上の時には基礎値にまで抑制された。
4. 天然ブタセクレチン1 U/ml/kg B. W.及び50 U/ml/kg B. W.の濃度の静脈内単回投与では門脈血中IRI、IRG分泌増加反応は認められなかった。

稿を終るにあたり、天然ブタセクレチン (Secrepan[®]), 100%純粋天然ブタセクレチンを提供していただいたエーザイ株式会社に深謝いたします。

文 献

- 1) Aguilar-Parada, E., Eisentraut, A.M. and Unger, R.H.: Brief scientific communication. Pancreatic glucagon secretion in normal and diabetic subjects. *Am. J. Med. Sci.*, 257: 415–419, 1969.
- 2) Ceska, M., Birath, K. and Brown, B.: A new and rapid method for the clinical determination of α -amylase activities in human serum and urine. *Clin. Chim. Acta*, 26: 437–444, 1969.
- 3) Danielsson, A. and Lernmark, A.: Effect of pancreozymin and secretion on insulin release and the role of the exocrine pancreas. *Diabetologia*, 10: 407–409, 1974.
- 4) Desbuquois, B. and Aurbach, G.D.: Use of polyethylene glycol to separate free and antibody-bound peptide hormones in radioimmunoassay. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 33: 732–738, 1971.
- 5) Dudl, R.J., Lerner, R.L., Ensink, J.W. and Williams, R.H.: The effect of secretin on pancreatic glucoregulatory hormones in man. *Horm. Metab. Res.*, 5: 250–253, 1973.
- 6) Dupre, J., Curtis, J.D., Unger, R.H., Wadell, R.W. and Beck, J.C.: Effects of secretin, pancreozymin or gastrin on the response of the endocrine pancreas to administration of glucose or arginine in man. *J. Clin. Invest.*, 48: 745–757, 1969.
- 7) Dupre, J., Chisholm, D.J., McDonald, T.J. and Rabinovitch, A.: Effects of secretin on insulin secretion and glucose tolerance. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 53: 1115–1121, 1975.
- 8) Fahrenkrug, J., Schaffalitzky de Muckadell, O.B. and Kuhl, C.: Effect of secretin on basal- and glucose-stimulated insulin secretion in man. *Diabetologia*, 14: 229–234, 1978.
- 9) Goberna, R., Fussgänger, R.D., Raptis, S., Telib, M. and Pfeiffer, E.F.: The role of the exocrine pancreas in the stimulation of insulin secretion by intestinal hormones. II. Insulin responses to secretin and pancreozymin in experimentally-induced pancreatic exocrine insufficiency. *Diabetologia*, 7: 68–72, 1971.
- 10) Holst, J.J., Fahrenkrug, J. and Schaffalitzky de Muckadell, O.B.: Secretin does not inhibit glucagon secretion in pigs. *Horm. Metab. Res.*, 10: 448, 1978.
- 11) Isaac, R., Nivez, M.P., Ardaillou, R. and Meyrier, A.: Insulin responses to glucose and secretin in uraemic and normal subjects. *Europ. J. Clin. Invest.*, 2: 475–482, 1972.
- 12) Jensen, S.L., Fahrenkrug, J., Holst, J.J., Kükl, C., Nielsen, O.V. and Schaffalitzky de Muckadell, O.B.: Secretory effects of secretin on isolated perfused porcine pancreas. *Am. J. Physiol.*, 235: E381–E386, 1978.
- 13) Kanno, T.: Calcium dependent amylase release and electrophysiological measurements in cells of the pancreas. *J. Physiol. (Lond.)*, 226: 353–371, 1972.
- 14) Lerner, R.L. and Porte, D., Jr.: Uniphasic insulin responses to secretin stimulation in man. *J. Clin. Invest.*, 49: 2276–2280, 1970.
- 15) Lerner, R.L. and Porte, D., Jr.: Studies of secretin-stimulated insulin responses in man. *J. Clin. Invest.*, 51: 2205–2210, 1972.
- 16) 大槻 真, 坂本長逸, 前田光雄, 尤 芳才, 山崎富生, 岡野邦泰, 馬場茂明: セクレチンの膵内外分泌作用に関する研究。第1編十二指腸内塩酸ならびに l-phenyl-l-hydroxy-n-pentane 注入と合成セクレチン静脈内投与に対する血中セクレチン濃度と膵外分泌反応の比較。日内分泌誌, 54:

- 1116–1124, 1978. 17) Papp, M., Varga, B., Fally, G. and Feher, S.: Humoral regulation of pancreatic blood flow. *Mater. Med. Pol.*, 9: 190–193, 1977.
- 18) Papp, M., Feher, S., Varga, B. and Fally, G.: Humoral influences on local blood flow and external secretion of the resting dog pancreas. *Acta Med. Acad. Sci. Hung.*, 34: 185–198, 1977. 19) Persson, Tb. and Lerner, L.: Serum insulin concentration after alpha-adrenergic blockade and secretin in diabetics. *Acta Endocrinol. (Kbh.)*, 71: 331–337, 1972.
- 20) Pfeiffer, E.F., Telib, M., Ammon, J., Melani, F. and Ditschuneit, H.: Direkte Stimulierung der Insulinsekretion in vitro durch Sekretin. *Dtsch. Med. Wochenschr.*, 90: 1663–1337, 1965. 21) Polansky, D.B. and Safaie-Shirazi, S.: Simultaneous measurement of pancreatic blood flow, endocrine, and exocrine secretion in conscious dogs. *Surg. Forum*, 28: 91–93, 1977.
- 22) 坂本長逸, 大槻 真, 前田光雄, 大木 篤, 尤 芳才, 森田聡一郎, 小林 登, 寺師克洋, 馬場茂明: セクレチンの膵内外分泌作用に関する研究。第4編, 合成セクレチンのラット in vivo における膵内外分泌作用。日内分泌誌, 56: 199–207, 1980.
- 23) Santeusano, F., Faloona, G.R. and Unger, R.H.: Suppressive effect of secretin upon pancreatic alpha cell function. *J. Clin. Invest.*, 51: 1743–1749, 1972.
- 24) Santeusano, F., Faloona, G.R. and Unger, R.H.: Inhibition of alanine-stimulated glucagon secretion by secretin in the dog. *Horm. Metab. Res.*, 5: 425–427, 1973.
- 25) Serrano-Rios, M., Hawkins, F.G., Escobar-Jimenez, F. and Rodriguez-Minon, J.L.: The effect of aminophylline on insulin release induced by secretin and cholecystokinin-pancreozymin in normal humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 38: 194–199, 1974.
- 26) 尤 芳才, 大槻 真, 坂本長逸, 前田光雄, 大木 篤, 森田聡一郎, 小林 登, 寺師克洋, 馬場茂明: セクレチンの膵内外分泌作用に関する研究。第3編, ラット灌流膵における合成セクレチンによる膵内外分泌反応。日内分泌誌, 56: 171–179, 1980.