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

神戸大学医学部第2内科

尤 芳 才, 大 槻 眞, 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

The Effect of Secretin on the Exocrine and Endocrine Pancreas
Part III. Exocrine and Endocrine Responses to Synthetic Secretin
in the Perfused Isolated Rat Pancreas

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

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

The effects of synthetic secretin on the rate of flow of pancreatic juice, the rate of output of amylase, and the rate of release of immunoreactive insulin (IRI) and immunoreactive glucagon (IRG) were simultaneously investigated in the isolated perfused rat pancreas. In this experimental system, factors other than the direct effect of hormonal stimulus on the pancreas, such as the autonomous nervous system or alteration of blood glucose concentrations, could be eliminated while simultaneously determining pancreatic exocrine and endocrine function.

Pancreases from male Wistar rats, weighing 250 ~ 300 g and fed ad libitum, were isolated and perfused according to the technique of Kanno. The pancreas was perfused with a Krebs Ringer bicarbonate solution of 4.6% dextran-T 70, 0.25% bovine serum albumin and 50 mg/100 ml glucose, and gassed constantly with a 95% O₂, 5% CO₂ mixture to achieve pH 7.4. Perfusate was administered into the superior mesenteric and celiac artery via a non-recirculating open circuit. Flow rate was kept at about 2.0 ml/min with the aid of a micro-tubing pump. The total portal effluent was collected in chilled tubes at 60 sec intervals for the measurement of IRI and IRG concentrations.

Synthetic secretin was applied by changing the medium reservoir. When the effect of secretin was studied, a 20-min basal period was followed by a 20-min stimulatory period and then a 20-min recovery period.

To determine whether secretin might require high glucose levels for an insulintropic action, an infusion of secretin at a concentration of 100 ng/ml was superimposed on 100 and 150 mg/100 ml glucose stimulation.

For measurement of pancreatic exocrine secretions, a calibrated capillary tube was attached to the free end of the pancreatic cannula, which was inserted into the distal end of the common duct at a point shortly before its entrance into the duodenum and tied in place. The proximal end of the bile duct was ligated. Every 10 min the capillary tube was replaced and the flow rate of the pancreatic juice was measured. The sample of juice was diluted with a 6% bovine serum albumin solution, and amylase activity was determined by the chromogenic method with blue-dyed starch polymer. Amylase activity was expressed as Somogyi units/10 min.

IRI was measured by polyethylene glycol radioimmunoassay. IRG was determined by radioimmunoassay with the talc absorption technique. Rat insulin and porcine glucagon were used as standards in IRI and IRG assays, respectively.

No changes of IRI levels in the perfusate were obtained with concentrations of synthetic secretin ranging from 0.01 ng/ml to 2 μ g/ml. Secretin had no influence on glucose-induced IRI release when superimposed on 100 or 150 mg/100 ml glucose stimulation. On the other hand, uniphasic IRG release was elicited by synthetic secretin in a dose-related fashion in the presence of 50 mg/100 ml glucose. However, secretin-induced IRG responses were completely abolished in the presence of 100 or 150 mg/100 ml glucose.

Contrary to our observations, most of the previous experiments have shown the insulintropic effect of secretin but have failed to demonstrate the glucagonotropic effect. Moreover, Santensanio et al. have revealed the suppressive effect of secretin on basal and alanine-stimulated IRG secretion in dogs. The reason for this discrepancy between their results and ours is not apparent. It seems that not only species differences but also the doses and the preparation of secretin used, and the levels of glucose concentration perfusing the pancreas have played a part in the contrasting results.

A dose-response relationship was obtained between synthetic secretin and the peak rates of the flow and output of amylase. Maximal flow rate of the pancreatic juice and amylase output were induced with a dose of secretin at 1 μ g/ml. Supramaximal stimulatory concentrations of secretin resulted in lower rates of release of fluid and amylase than with the maximally effective concentration.

Although secretin, an established stimulator of the exocrine pancreas, has been reported by some to stimulate IRI release and inhibit IRG secretion, the results of the present investigations are just the opposite. It is reasonable to conclude that secretin has no β -cytotropic effect but has an α -cytotropic effect.

緒 言

一般に消化管ホルモンの作用を *in vivo* の実験系で検討すれば、生体における反応を最も正確に観察する事ができるが、反面自律神経系をはじめ、血糖値の変動や他の多くの体液性因子が複雑に関与しており、各反応ならびに作用機序を解明することは困難である。既に *in vivo* において、塩酸と 1-phenyl-1-hydroxy-n-pentane (PHP) の十二指腸内注入に対する内因性セクレチン増加、あるいは塩酸、PHP 投与による内因性セクレチン増加相当量の外因性セクレチン投与によってもインスリン分泌反応は認められなかった²³⁾²⁴⁾ ことを報告した。そこで、今回は消化管ホルモンの膵に対する直接作用を検討するのに最も適した方法である *in vitro* の摘出膵灌流標本系を用いて、セクレチンのラット膵における内分泌と外分泌に対する作用を検討した。

実験方法

摘出膵灌流標本は、体重250～300gのWistar系雄性ラットを用い、菅野の方法¹⁶⁾に基づいて作製した。すなわち、エーテル麻酔下で開腹し、胆膵管の十二指腸開口部に、金属針(内径0.5 mm, 長さ7 mm)を挿入固定し、その遊離端に容積を計算したシリコンチューブを接続した。腹腔動脈および上腸間膜動脈にそれぞれ内径1 mm のチューブを挿入し、灌流液は後述の Krebs Ringer bicarbonate buffer (KRBB) を定流ポンプを用いて、流速2 ml/min で注入した。門脈には内径3 mm のチューブを挿入し、灌流液の流出口とした。灌流膵は、十二指腸を付着したまま摘出し、37°C に保った KRBB 中に浮遊させた。灌流液は、KRBB にグルコース50 mg/100 ml, dextran T-70 4.6%, 牛アルブミン (Fraction V) 0.25%を加え、95% O₂, 5% CO₂ 混合ガスで通気し、pHを7.4に調整した。

本実験は、灌流標本が十分安定してから開始した。本実験は20分間の前灌流の後、種々の濃度のセクレチンを含む灌流液で20分間刺激し、さらに刺激終了後20分間の後灌流を行った。なおセクレチンは合成セクレチン(静岡薬大 矢内原教授合成, Lot NY-MK-5-73)を用いた。

さらにセクレチンの膵内分泌刺激に対するグルコース濃度の影響をみるために、灌流液中のグルコース濃度を50, 100および150 mg/100 ml と段階的に上昇させ、各グルコース濃度による20分間の刺激のうち、後半の10分間にセクレチン100 ng/ml 刺激を加えた。

門脈からの流出灌流液は1分毎に採取し、インスリン及びグルカゴン測定まで-20°C で保存した。なおグルカゴン測定には灌流液500 μ l に aprotinin (Trasylol[®], Bayer) を50 μ l 添加して保存した。インスリン濃度測定は、ラット・インスリンを標準とし、ポリエチレングリコール法を用いた radioimmunoassay (RIA) で測定した (IRI)。グルカゴン濃度測定は、30 K 抗体を用い、デキストランチャコール法の RIA で測定した (IRG)。

膵管十二指腸端に挿入した金属針の遊離端に接続したチューブを10分間毎に交換し、膵液量を測定 (μ l/10 min) 后、500 μ l の生理的食塩水に希釈し-20°C で保存した。アミラーゼ活性は blue-starch polymer (Pharmacia-塩野義) を用い、6% BSA 溶液で更に希釈して測定し、10分間当りの分泌量 (S. U. /10 min) で示した。

結 果

今回検討した合成セクレチン0.01 ng/ml から2 μ g/ml 濃度の刺激に対し、IRI 反応は全く認めなかったが、IRG 反応は0.1 ng/ml 以上のセクレチン刺激で認められ容量相関を認めた (Fig. 1)。

Fig. 1. The relationship between concentration of synthetic secretin and the maximal immunoreactive glucagon (IRG) in the pancreatic effluent. Each value represents the mean of 4 to 8 experiments.

Fig. 2. Effect of 10 ng/ml synthetic secretin on IRI and IRG release in the pancreatic effluent and the flow rate of pancreatic juice and amylase output.

合成セクレチンによる IRG 反応は刺激開始直後短時間内に認められ、刺激を20分間持続させても反応は5分以内に前値にまで低下した (Fig. 2)。一方、膵外分泌反応は、刺激開始後10分目から20分目には最大となり、刺激中止後も反応が持続した。

合成セクレチン刺激で IRI 反応が認められなかったのは、灌流液中のグルコース濃度が50 mg/100 ml と低い為かもしれないので、グルコース濃度を100 mg/100 ml, 150 mg/100 ml に段階的に上昇させ、各濃度の20分間の灌流のうち、後半10分間に 100 ng/ml のセクレチン刺激を加えた。グルコース濃度を50 mg/100 ml から100 mg/100 ml に上昇させると、第1相の IRI 反応は認められたが、そこへ100 ng/ml のセクレチン刺激を加えても、IRI 反応は認められなかった。またグルコース濃度を150 mg/100 ml に上昇させると、2相性の IRI 反応を認めたが、そこへセクレチン刺激を加えても、それ以上の IRI 反応は認められずグルコースのみのコントロール群と差はなかった (Fig. 3)。一方、セクレチン100 ng/ml に対する IRG 反応は、グルコース50 mg/100 ml 濃度下では、1相性の反応を認めたが、グルコース濃度を100 mg/100 ml 及び150 mg/100 ml にすると抑制された (Fig. 4)。

Fig. 3. Effect of 100 ng/ml synthetic secretin on IRI responses to 50, 100 and 150 mg/100 ml glucose. 100 ng/ml secretin was superimposed for 10 min on 50, 100, and 150 mg/100 ml glucose stimulation. Each value represents the mean $\pm$ SEM of 5 experiments.

Fig. 4. Effect of 100 ng/ml synthetic secretin on IRG responses to 50, 100 and 150 mg/100 ml glucose. Each value represents the mean of 4 experiments.

Fig. 5. The relationship between concentration of synthetic secretin and the peak flow rate of pancreatic juice and the peak amylase output. Each value represents the mean $\pm$ SEM of 8 to 12 experiments.

グルコース 50 mg/100 ml 濃度下で、0.01 ng/ml から 1000 ng/ml の種々のセクレチン濃度に対し、膵液量およびアミラーゼ分泌量の頂値は容量相関的に増加した。ところが 2000 ng/ml のセクレチン刺激では、1000 ng/ml の際の膵液量、アミラーゼ分泌量の頂値が $25.1 \pm 2.4 \mu\text{l}/10\text{min}$, $1125.8 \pm 107.3 \text{ S. U.}/10\text{min}$ であったのに対し、各々 $17.6 \pm 1.8 \mu\text{l}/10\text{min}$ 及び $529.5 \pm 63.3 \text{ S. U.}/10\text{min}$ と却って減少した (Fig. 5)。

考 案

In vivo における実験系での消化管ホルモンの作用の検討は、生体での反応を最も正確に観察することができる。しかし、その際には自律神経系をはじめ血糖値の変動や他の多くの体液性因子が複雑に関与する事が考えられ、反応の作用機序を解明するのは困難である。一方、灌流標本を用いた実験系では、自律神経系、麻酔条件、血糖値の変動、採血によるストレスなどの影響もなく、投与する消化管ホルモンの膵に対する直接作用を観察することができる。従って、セクレチンのラット膵における内分泌及び外分泌に対する作用を、生体に出来る限り近い条件で、しかも出来るだけ単純化した実験系である摘出膵灌流標本を用いて検討した。

グルコース濃度 50 mg/100 ml 下で 0.01~2000 ng/ml の合成セクレチン刺激に対し、IRI 分泌は認められなかった。セクレチンのインスリン分泌に対する作用として、分泌させるとする報告^{3) 5) 6) 7) 9) 11) 13) 17) 18) 20) 21) 28)}と、分泌させないとする報告^{1) 4) 12) 14) 26) 27)}が見られる。この様な相反する報告は、使用したセクレチン製剤の種類をはじめ、投与量、実験動物あるいは、in vivo, in vitro など実験方法の違いによるものと思われる。今までの、セクレチンによりインスリン分泌の起るという報告は、すべて抽出セクレチンを用いたものであり、この様な抽出セクレチンには、CCK-PZ²⁰⁾など他の消化管ホルモンが混在しており、それらによってインスリン分泌がもたらされた可能性も考えられる。混在物のない合成セクレチンを用い、0.01 ng/ml の低濃度から膵外分泌反応が抑制される高濃度セクレチン (2000 ng/ml) まで種々の濃度の刺激を加えても、IRI 反応が見られなかった。またヒトでは、セクレチンが、グルコース刺激に対する IRI 分泌反応を特異的に potentiate するとされているが^{19) 20)}、ラット灌流膵標本系では合成セクレチンは、グルコースによる IRI 反応を potentiate し

なかった。すなわち PHP や塩酸の十二指腸内注入時に見られる内因性セクレチン濃度²⁰⁾より、はるかに高濃度のセクレチン刺激に対し、グルコース濃度 50 mg/100 ml から 150 mg/100 ml 範囲で、IRI 反応が認められなかった事は、セクレチンはラット膵 β 細胞に対する直接作用を有していないものと思われる。

一方 IRG 分泌に対するセクレチンの作用に関しては、一定した見解がなく、影響しないとする報告^{2) 8) 13)}と、逆に、抑制的に働くとする報告²⁵⁾がある。ところが、今回の検討で、従来の報告と異り、グルコース 50 mg/100 ml の濃度下では明らかな 1 相性の IRG 反応を認めた。alanine や arginine に対する IRG 反応は、2 相性である¹³⁾のに対し、セクレチンによる IRG 反応が第 1 相のみであり、20 分間の刺激にも拘らず、第 2 相の反応がなかった事から、セクレチンはラット膵の α 細胞における IRG 合成に作用するのではなく、IRG 分泌機構のみに作用すると思われる。このようなセクレチンによる IRG 反応は、グルコース 50 mg/100 ml 存在下で、0.01 ng/ml から 1000 ng/ml の種々の濃度のセクレチン刺激に対し、容量相関的に増加した。更に、グルコース 50 mg/100 ml 下でのセクレチン刺激に対する IRG 反応は、100 mg/100 ml 及び 150 mg/100 ml のグルコース濃度で抑制されたことから、セクレチンの IRG 分泌刺激作用は、非特異的なものではなく、ラット膵 α 細胞に対する、セクレチンの特異的かつ直接作用であるといえる。セクレチンに IRG 分泌作用が見られないとする Dudle ら⁸⁾や Iversen¹³⁾の報告は、ヒト、イヌにおける観察であり、またセクレチン濃度も今回の検討に比し低濃度である。ラットを用いた in vivo の検討でも、10 ng/kg/min の合成セクレチン 20 分間持続注入では、IRG 分泌を認めなかったが、これは投与量が門脈血中セクレチン濃度が 200 pg/ml 前後に上昇する程度の低濃度であること及び血糖値が in vivo では 150 mg/100 ml 前後であることによると考えられる。今回の検討でも、グルコース濃度が、50 mg/100 ml の場合には、明らかな IRG 反応を認めたが、100 mg/100 ml、150 mg/100 ml の場合には、IRG 反応が抑制されていた事とも一致し、過去のセクレチンには IRG 分泌作用がないとする報告との差異は、使用動物の種属差、刺激セクレチン濃度及びグルコース濃度にあると考えられた。

セクレチン刺激に対し、アミラーゼ分泌量、膵液量は共に、刺激開始後 10 分間の方が、10 分目から 20 分目よりも低かった。これはグルカゴンが膵外分泌を抑制する事¹⁰⁾が知られている如く、セクレチン刺激による内因性 IRG 分泌反応の作用により、膵外分泌反応が、抑制された為とも考えられる。しかしながら、IRG 反応は、セクレチン刺激開始後 5 分以内のみで、しかも open circuit の灌流系である為、一過性の内因性 IRG の上昇が、20 分間のセクレチン刺激による膵外分泌反応を、持続的に抑制するとは考えられない。また、刺激直後 10 分間の膵外分泌反応は低反応であるが、セクレチン刺激直後より認められるので、膵酵素合成の抑制ではなく、膵外分泌細胞膜における分泌機構の抑制であると考えられる。さらに、2000 ng/ml のセクレチン刺激による膵外分泌反応が 1000 ng/ml の場合より減少している事は、Oswald ら²²⁾がイヌを用いた実験で、maximal dose の 8.0 C. U./kg のセクレチン刺激は、submaximal dose の 1.0 C. U./kg の刺激に比し、膵液中蛋白分泌量は却って減少するが、acinar 細胞中の zymogen 顆粒は増加しているという観察と一致し、セクレチンが膵外分泌酵素の合成を抑制するのではなく、分泌機構を抑制することが考えられた。

結 語

1. 摘出ラット膵灌流標本を用い、合成セクレチンの膵内・外分泌に及ぼす影響を検討した。
2. 合成セクレチンは、ラット膵 β 細胞に対し、IRI 分泌作用を認めなかった。

3. 合成セクレチンは, グルコース 50 mg/100 ml 下では, IRG 分泌作用を有したが, グルコース 100 mg/100 ml, 150 mg/100 ml 下では, IRG 分泌作用は抑制された。

4. グルコース 50 mg/100 ml 濃度下で, 合成セクレチン濃度と IRG 分泌反応とは容量相関々係を認めた。

5. 合成セクレチンに対する膵外分泌反応は, 1000 ng/ml の濃度までは容量相関的に増加したが, 2000 ng/ml の濃度では却って減少した。

稿を終るにあたり, 合成セクレチンを御提供いただいた静岡薬科大学矢内原昇教授に深謝致します。

文 献

- 1) Allan, W. and Tepperman, H.M.: Stimulation of insulin secretion in the rat by glucagon, secretin and pancreozymin: Effect of aminophylline. *Life Sci.*, 8: 307-317, 1969.
- 2) Buchanan, K.D., Vance, J.E. and Williams, R.H.: Insulin and glucagon release from isolated islets of Langerhans: Effect of enteric factors. *Diabetes*, 18: 381-386, 1969.
- 3) Boyns, D.R., Jarrett, R.J. and Keen, H.: Intestinal hormones and plasma insulin: an insulintropic action of secretin. *Brit. Med. J.* 1: 676-679, 1967.
- 4) Boyns, D.R., Jarrett, R.J. and Keen, H.: Intestinal hormones and plasma insulin. *Lancet*, i: 409-410, 1966.
- 5) Chisholm, D.J., Young, J.D. and Lazarus, L.: The gastrointestinal stimulus to insulin release, I. Secretin. *J. Clin. Invest.* 48: 1453-1460, 1969.
- 6) Danielsson, Å. and Lernmark, A.: Effects of pancreozymin and secretin on insulin release and the role of the exocrine pancreas. *Diabetologia*. 10: 407-409, 1974.
- 7) Deckert, T.: Stimulation of insulin secretion by glucagon and secretin. *Acta Endocrinol (Kbh)*. 57: 578-584, 1968.
- 8) Dudle, 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.
- 9) Dupré, J., Curtis, J.D., Unger, R.H., Waddell, R.W. and Beck, J.C.: Effects of secretin, pancreozymin or gastrin on the release of the endocrine pancreas to administration of glucose or arginine in man. *J. Clin. Invest.* 48: 745-757, 1969.
- 10) Dyck, W.P., Rudick, J., Hoexter, B. and Janowitz, H.D.: Influence of glucagon on pancreatic exocrine secretion. *Gastroenterology*, 56: 531-537, 1969.
- 11) Enk, B.: Secretin-induced insulin release. II. Dose-response relation. *Acta Endocrinol. (Kbh)*. 82: 312-317, 1976.
- 12) Glick, Z., Baile, C.A. and Mayer, J.: Insulintropic and possible insulin-like effects of secretin and cholecystkinin-pancreozymin. *Endocrinol.*, 86: 927-931, 1970.
- 13) Guidoux-Grassi, L. and Felber, J.P.: Effect of secretin on insulin release by rat pancreas. *Diabetologia*. 4: 391-392, 1968.
- 14) Hinz, M., Katsilambros, N., Schweitzer, B., Raptis, S. and Pfeiffer, E.F.: The role of the exocrine pancreas in the stimulation of insulin secretion by intestinal hormones. *Diabetologia*, 7: 1-5, 1971.
- 15) Iversen, J.: Secretion of glucagon from the isolated perfused canine pancreas. *J. Clin. Invest.*, 50: 2123-2136, 1971.

- 16) Kanno, T.: Calcium-dependent amylase release and electrophysiological measurements in cells of the pancreas. *J. Physiol.* 226: 353–358, 1972.
- 17) Kraegen, E.W., Chisholm, D.J., Young, J.D. and Lazarus, L.: The gastrointestinal stimulus to insulin release. II. A dural action of secretin. *J. Clin. Invest.*, 49: 524–529, 1970.
- 18) Lerner, R.H. and Porte, D. Jr.: Uniphasic insulin responses to secretin stimulation in man. *J. Clin. Invest.*, 49: 2276–2280, 1970.
- 19) Lerner, R.L. and Porte, D. Jr.: Studies of secretin-stimulated insulin responses in man. *J. Clin. Invest.*, 51: 2205–2210, 1972.
- 20) Lerner, R.L.: The augmentation effect of secretin on the insulin response to known stimuli: specificity for glucose. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 45: 1–9, 1977.
- 21) Mahler, R.J. and Weisberg, H.: Failure of endogenous stimulation of secretin and pancreozymin release to influence serum insulin. *Lancet*, i: 448–451, 1968.
- 22) Oswaldo, M., Paulette, P. and Henri, S.: Blocking of protein pancreatic secretion by maximal secretin infusion in the dog. *Am. J. Gastroente.* 67: 468–472, 1977.
- 23) 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 I-Phenyl-I-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。日内分泌会誌; 54: 1116–1124, 1978.
- 24) 坂本長逸, 大槻 真, 前田光雄, 岡野邦泰, 森田聡一郎, 寺師克洋, 小林 登, 馬場茂明: セクレチンの膵内外分泌作用に関する研究: 第2編。十二指腸内塩酸ならびに 1-Phenyl-1-hydroxy-n-Pentane 注入と合成セクレチン静脈内投与に対する, 門脈血中インスリン及び膵グルカゴン分泌について, 日内分泌会誌. 55: 877–886, 1979.
- 25) Santensanio, F., Faloona, G.R. and Unger, R.H.: I Inhibition of alanine-stimulated glucagon secretion by secretin in the dog. *Horm. Metab. Res.*, 5: 425–427, 1973.
- 26) Schaffalitzky de Muckadell, O.B., Fahrenkrug, J. and Kuhl, C.: Plasma insulin concentration during physiological variations in immunoreactive plasma secretin. *Horm. Metab. Res.*, 8: 253–256, 1976.
- 27) Schatz, H., Otto, J., Hinz, M., Maier, V., Nierle, C. and Pfeiffer, E.F.: Gastrointestinal hormones and function of pancreatic islets. *Endocrinol.*, 94: 248–253, 1974.
- 28) Unger, R.H., Ketterer, H., Eisentraut, A. and Dupré, J.: Effect of secretin on insulin secretion. *Lancet*, ii: 24–26, 1966.
- 29) Unger, R.H., Ketterer, H., Dupré, J. and Eisentraut, A.M.: The effects of secretin, pancreozymin and gastrin on insulin and glucagon secretion in anesthetized dogs. *J. Clin. Invest.*, 46: 630–645, 1967.