日消外会誌　17（1）：60～68，1984年

グルカゴンとアミノフィリン投与時の胆汁分泌とc-AMPの関連についての実験的研究

岡山大学第1外科
小　林　敏　幸

EXPERIMENTAL STUDIES ON RELATIONSHIP BETWEEN BILE PRODUCTION AND PLASMA CYCLIC AMP TO GLUCAGON AND AMINOPHYLLINE

Toshiyuki KOBAYASHI
1st Department of Surgery, Okayama University Medical School

雑種成犬を用いてglucagonとaminophylline投与後の胆汁分泌とcyclic AMP（以下c-AMP）の関係について検討した．正常犬ではglucagonとaminophyllineは血中c-AMPの上昇と利胆作用を有した．両物質は胆汁中のNa, Kの排出と水分量の増加作用を示したが，胆汁酸の分泌増加は認められず，胆汁酸非依存性分画に作用すると考えられた．閉塞性黄疸初期には胆汁流量の増加がみられたが後期では減少した．閉塞性黄疸時にもglucagon投与により血中c-AMPはよく反応したが，胆汁流量は増加しなかった閉塞性黄疸が進行するとglucagonに対する血糖値やIRIの反応も低下し肝機能障害のみならず膵内分泌機能も低下すると推測された．

索引用語：cyclic AMPと黄疸，glucagon, aminophylline, 胆汁酸非依存性分画

緒　言

肝毛細胆管に分泌された胆汁は胆汁酸依存性分画（以下BADF）と胆汁酸非依存性分画（以下BAIF）によって構成されていると考えられている[1]．BADFは肝細胞から毛細胆管への胆汁酸の能働輸送にともなって生じる浸透圧勾配による水分の移行により作られる．一方BAIFはNa-K ATPase, c-AMPの作用により産生される胆汁成分との説があるがその分泌機序，役割についてはなお確定されていない[2)3)]．

BAIFの分泌にc-AMPが関与している根拠としては，肝を標的臓器としadenyl cyclaseを賦活するglucagon, c-AMPの分解酵素であるphosphodiesteraseの阻害剤methylxanthine系薬剤そしてc-AMPの作用を現わすdibutyl c-AMPなどが胆汁中のBAIFを増加させることから推定されている[4)5)]．しかしglucagonやmethylxanthine系薬剤の投与によるc-AMPと胆汁分泌との関係に言及した報告はない．

著者は胆汁流量促進剤と考えられるglucagonおよびaminophyllineの胆汁流量に対する影響をc-AMPとの関連において検討し，同時に閉塞性黄疸時におけるglucagonの胆汁分泌に及ぼす影響についてイヌを用いて実験した．

実験方法

1．実験動物および麻酔

体重8kg～12kgの雑種成犬を用い18時間の絶食後にpentobarbital（20mg/kg）を静脈内投与した．

2．実験群

正常群，閉塞性黄疸1週群，3週群の3群とし，各群に8頭を使用した．

3．実験手技

上腹部正中切開にて開腹し胆嚢剔出後，総胆管を十二指腸直上部で2重結紮後切離し，肝側の総胆管にカテーテルを留置し閉腹した．

正常群では直後より実験を開始し，閉塞群ではカテーテルを閉鎖し皮下に埋没した．

実験中は下肢静脈からリンゲル液50ml/hrの輸液を行い胆汁流量の安定した後，glucagonを末梢静脈から50μgをone shotで投与し，10μg/kg・hrにて持続注入した．aminophyllineは20mg/kgをone shotで静注

＜1983年10月18日受理＞別刷請求先：小林　敏幸
〒721　福山市蔵王町3692　福山市市民病院外科

した．

4．検査事項および測定方法

1）肝機能検査

一般肝機能の指標としてのZTT, GPT, GOT, ALP, T-bilirubin, cholesterolはユニキット（中外）を使用しPaBA-3010にて測定した．

2）胆汁量，胆汁酸濃度，Na, K濃度

胆汁は胆管ドレナージを開放して30分後から15分間の胆汁量を4回採取し，その平均値を基礎分泌量とした．

glucagon, aminophylline投与後は15分間隔で胆汁を採取した．

胆汁酸濃度は3α-hydroxysteroid dehydrogenaseを用いた酵素法により測定した．

胆汁中のNa, K濃度は炎光比色法にて測定した．

3）血漿IRI

EDTAを加えた試験管に血液を採取し，直ちに4℃にて3,000rpm, 10分間の遠心分離を行い，IRI測定時まで−20℃にて凍結保存した．IRIの定量はデキストラン炭末法によるradioimmunoassay（insulin radioimmunoassay-kit ミドリ）により行った．

4）肝組織中c-AMP，血漿中c-AMP

肝組織は採取後直ちに液体窒素にて−70℃に凍結した．その後TCA液にて除蛋白し，c-AMPの抽出を行いc-AMP測定時まで−20℃にて凍結保存した．

血漿c-AMPはEDTA加試験管に血液採取後，4℃にて3,000rpmの遠心分離を行い測定まで−20℃にて凍結保存した．

c-AMP測定はradioimmunoassay（Yamasa c-AMP Kit）によるデキストラン炭末法にて行った．

実験成績

1．正常群

1）glucagon投与による影響

a．肝機能検査

正常群8例の一般肝機能検査の成績はZTT 0.6±0.5, GPT 28±3U, GOT 20±6U, T-bilirubin 0.18±0.07mg/dl, ALP 4.0±0.7KAU, cholesterol 117±19 mg/dlであった（図1）．

b．胆汁量

基礎分泌量は0.9±0.1ml/15minであったが，glucagon投与（以下G投与）開始15分後から増加傾向となり，30分後には1.6±0.5ml/15minと有意に増加し，120分後においても胆汁量の増加は続いた．増加率は34〜190%であった（図2）．

図1　肝機能

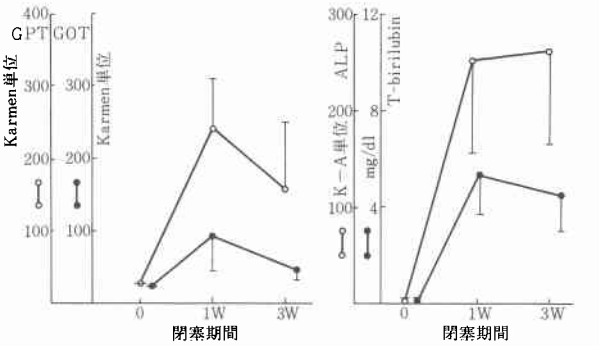
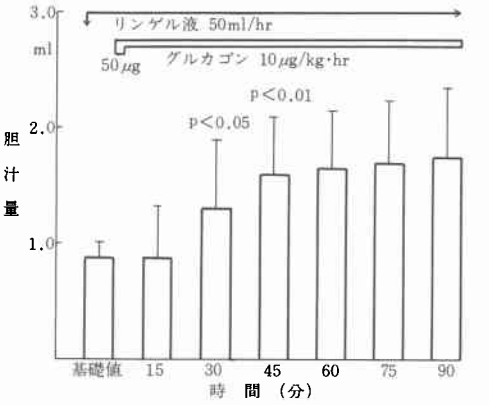


図2　グルカゴン投与による胆汁分泌量の変化（n=8）



c．胆汁中の胆汁酸濃度と排出量およびNa, K濃度と排出量（図3，4）．

胆汁酸濃度はG投与開始前55±5.4μmol/mlであったが，投与開始15分以後では39±11μmol/mlと有意な低下を示した．

G投与前の15分間の胆汁酸排出量は48.9±6.9μmol/15minであり，投与開始15分以後の胆汁酸排出量は60.9±21.5μmol/15minと軽度の増加が認められたが有意差はなかった．

Na濃度はG投与前166±12mEq/L，投与後159±12 mEq/Lと変化はなかったが，排出量は投与前145±21 μEq/15min，投与後246±53μEq/15minと著明な増加を示した．

K濃度はG投与前5.6±0.5mEq/L，投与後5.1±0.8mEq/Lと変化はなかったが，排出量は4.9±0.8 μEq/15min，投与後6.4±2.2μEq/15minと増加した．

以上のことよりglucagon投与による利胆作用は胆汁酸非依存性分画の増加によるものと考えられた．

図3　グルカゴン投与による胆汁成分の変動（正常群 n=8）

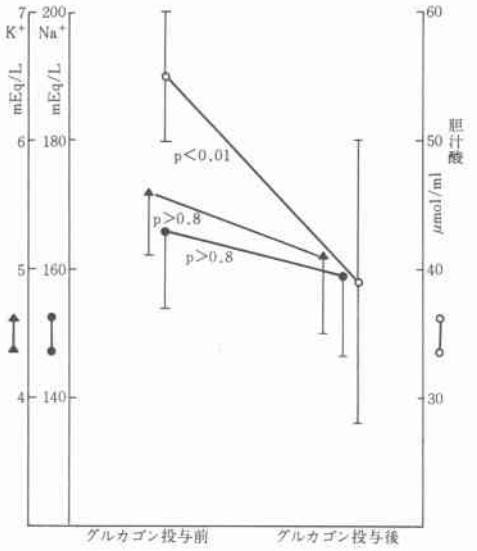
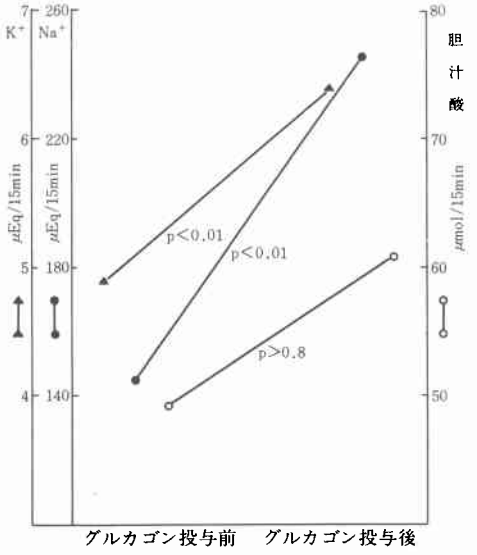


図4　グルカゴン投与による胆汁酸，Na^+，K^+排出量の変動

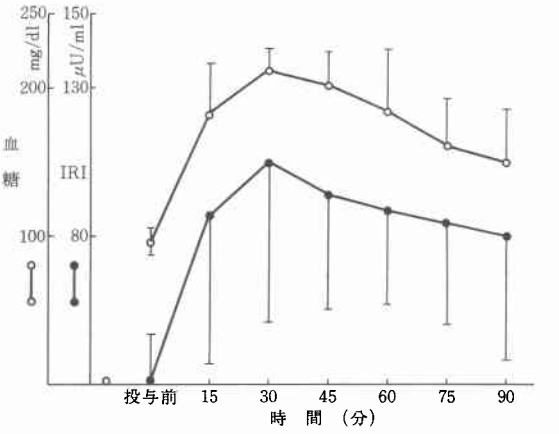


d. 血糖値，血漿IRI値

血糖はG投与前95±11mg/dlであったが，投与後は急上昇し，30分後には210±17mg/dlと最高値となり，その後漸減した．

血漿IRI値は投与前31±15μU/mlであったが，投与開始30分後には105±54μU/mlと最高値となり，血糖曲線とよく相関していた（図5）．

図5　グルカゴン投与による血糖，IRIの変化（n=8）



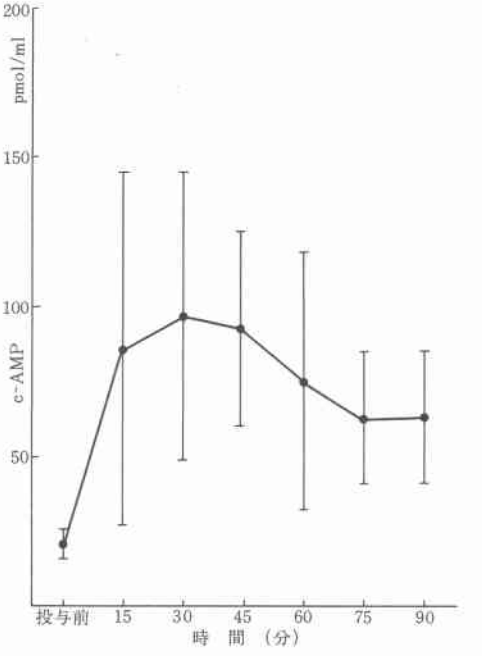
e. 血漿c-AMP

血漿c-AMPはG投与前21±5pmol/mlであったが，投与開始15分後には86±59pmol/ml，30分後には97±48pmol/mlと最高値となり，その後は漸減したが投与前に比べ有意な上昇を示した．G投与による血漿c-AMP増加の程度は投与前の2.7～20倍と反応に大きな幅が認められた（図6）．

f. 肝組織中c-AMP

肝組織中c-AMPはG投与前1.0±0.4pmol/mgで

図6　グルカゴン投与による血漿c-AMPの変動（n=8）



あったが，30分後には2.7±0.9pmol/mg と増加し，90分後には1.4±0.4pmol/mg と血漿中 c-AMP の変動と相関していた（図7）.

2）aminophylline 投与による影響

a．胆汁量

基礎分泌量は0.6±0.3ml/15min であったが，投与開始15分後より増加傾向となり，30分後には1.3±0.4ml/15min と有意な増加を示し，90分後においても胆汁分泌の増加が続いた.

胆汁中の胆汁酸濃度と排出量および Na, K 濃度と排出量は glucagon 投与の場合と類似の変化であった（図8，9）.

b．血糖値，血漿 IRI

血糖値は投与前80±13mg/dl であり投与15分後101±20mg/dl と軽度の増加を示したが血糖上昇は軽微であった.

血漿 IRI 値は投与前25±7μU/ml であり，投与15分後40±8μU/ml と軽度の上昇を示したがほとんど反応は認められなかった（図10）.

c．血漿 c-AMP

図7　グルカゴン投与による肝 c-AMP の変化（n=6）

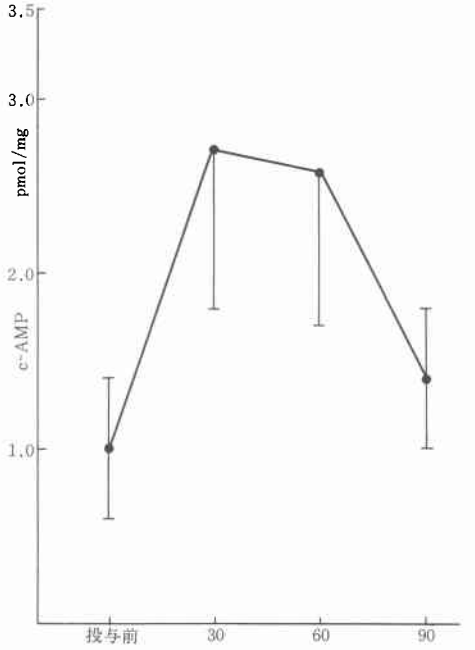


図8　アミノフィリン投与による胆汁分泌の変化（n=5）

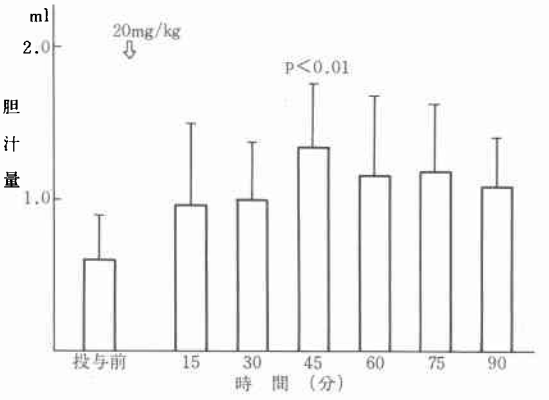


図9　アミノフィリン投与による胆汁成分の変動（n=5）

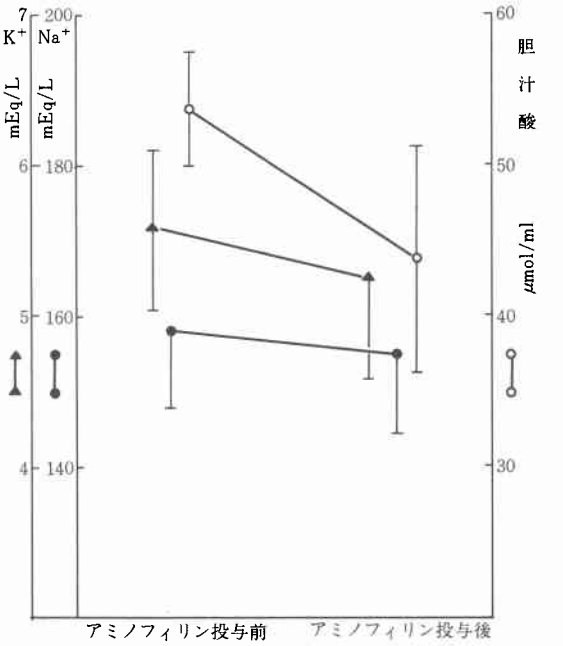
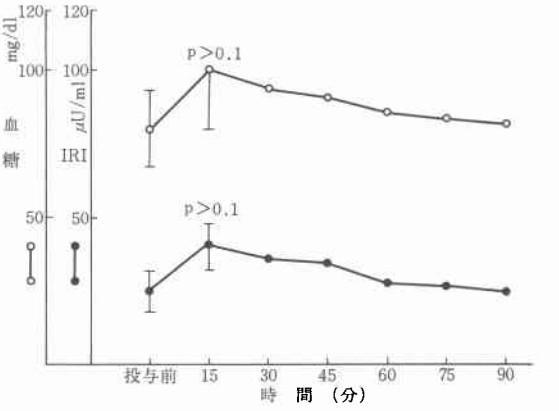


図10　アミノフィリン投与による血糖，IRI の変化



血漿中c-AMPは投与前28±8pmol/mlであったが，投与15分後には73±13pmol/mlと有意な増加を示し，90分後においても75±12pmol/mlと高値を示した（図11）．

2．閉塞性黄疸1週群に対するglucagon投与の影響

a．肝機能検査

胆管結紮1週間後の一般肝機能検査成績は，T-bilirubin 5.4±1.7mg/dl, ALP 259±96KAU, cholesterol 253±27mg/dlと胆道閉塞所見を示し，ZTT 1.9±0.87，GPT 242±73U, GOT 95±48Uと正常群に比べ軽度の肝機能の障害が認められた（図1）．

b．胆汁量

基礎分泌量は1.8±0.48ml/15minで正常群に比べ増加していたが，G投与後も胆汁量に変化は認められなかった（図12）．

c．胆汁中の胆汁酸濃度と排出量およびNa, K濃度と排出量

閉塞性黄疸解除後の30～90分の間の平均胆汁酸濃度は30.1±8.2μmol/mlと正常より低値であったが，G投与後は20.8±8.8μmol/mlと低下した．胆汁酸排出量も投与前54.5μmol/15minから投与後38.6μmol/15minと低下傾向となった．

Na, K濃度にはglucagonの投与による影響はみら

図11　アミノフィリン投与による血漿c-AMPの変化（n=5）

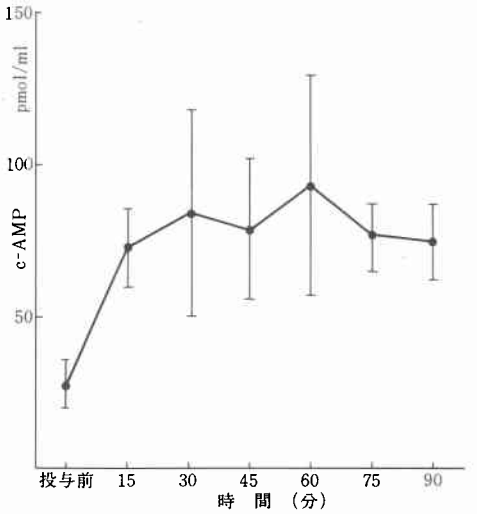


図12　閉塞性黄疸犬1週群に対するグルカゴンの胆汁分泌量に及ぼす影響（n=8）

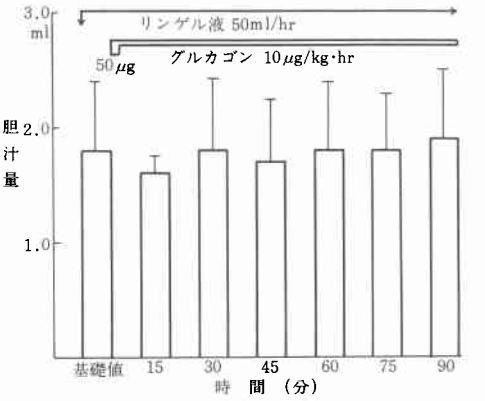
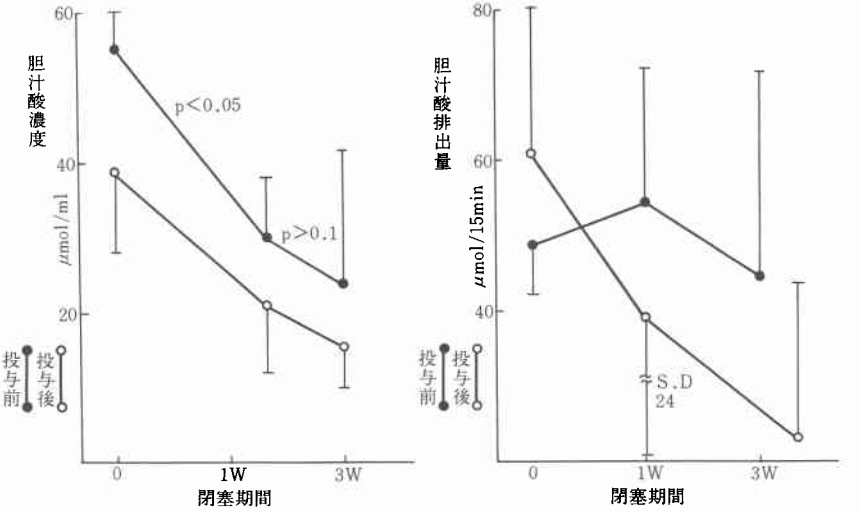


図13　グルカゴン投与による胆汁中胆汁酸の変動



れなかった（13，14）．

d．血糖値，血漿IRI

血糖値はG投与前87±9.6mg/dlであったが，投与45分後には198±36.2mg/dlと著明に増加し，その後も血糖値は高値であった．

血漿IRIは投与前7.8±4.5μU/mlと低値であったが，投与後においてもほとんど反応せず，正常群に比較して膵の内分泌機能に異常を生じていると考えられた（図15）．

e．血漿c-AMP

G投与前は24±5pmol/mlとほぼ正常値であったが，投与15分後に91±29pmol/mlと上昇し，30分後には96±59.2pmol/mlと最高値となり，その後漸減した．正常群に比較しc-AMPの上昇は高値であった（図16）．

3．閉塞性黄疸3週群に対するglucagon投与の影響

a．肝機能検査

胆管結紮3週間後ではT-bidlirubin 4.5±1.5mg/dl, ALP 263±92KAUと1週群と同様の胆道閉塞所見であったが，GPT 157±89U，GOT 46±19U，は1週群に比較し改善していた（図1）．

b．胆汁量

基礎分泌量は1.0±0.7ml/15minと1週群より減少しており，G投与後も流量に変化はなかった（図17）．

c．胆汁中の胆汁酸濃度と排出量およびNa. K濃度と排出量

1週群に比較し胆汁酸濃度は24±9μmol/mlと低下しており，G投与も15.6±4.8μmol/mlとさらに低下した．排出量は低下傾向であった．

Na濃度は投与前158±18mEq/L，投与後155±17mEq/Lと変化はなかった．K濃度は投与前4.3±0.5mEq/L, 投与後4.3±0.6mEq/Lと変化はなかった（図

図14 胆汁中のNa, Kの変動

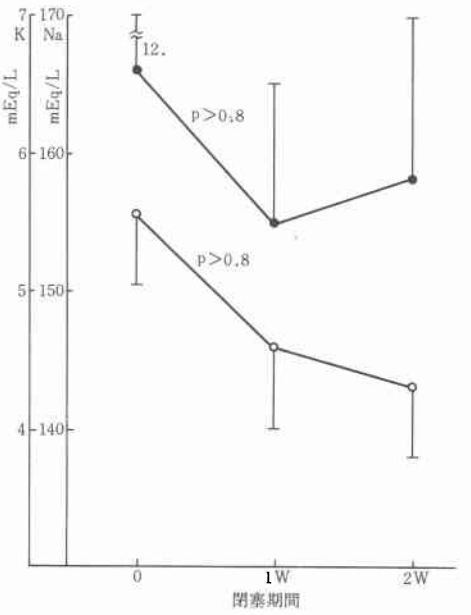


図15 閉塞性黄疸犬1週群におけるグルカゴン投与による血糖，IRIの変化（n=8）

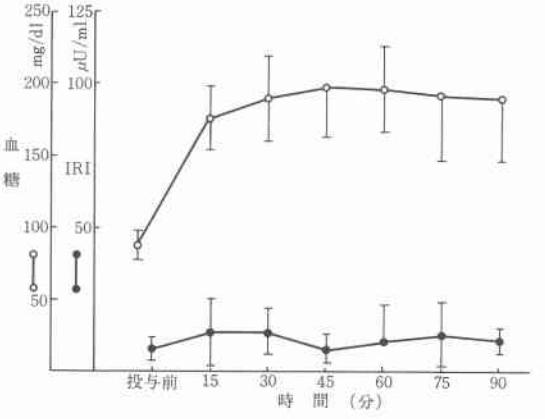


図16 閉塞性黄疸犬1週群におけるグルカゴン投与による血漿c-AMPの変化（n=8）

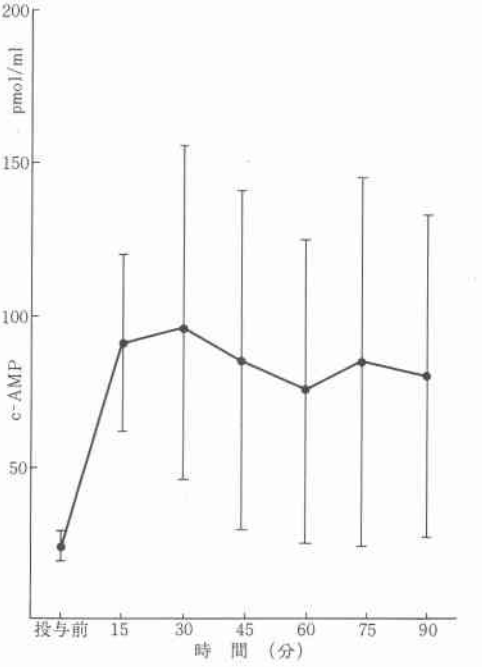


図17　閉塞性黄疸犬3週群に対するグルカゴンの胆汁分泌量に及ぼす影響（n=8）

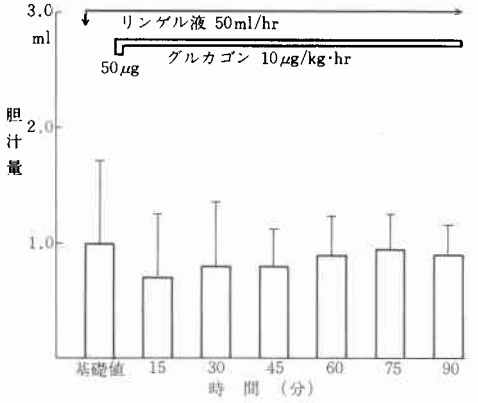
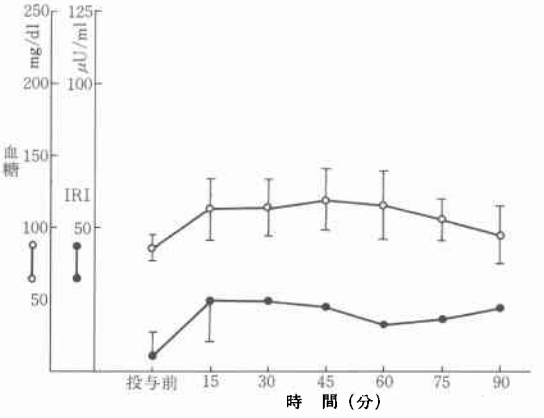


図18　閉塞性黄疸犬3週群におけるグルカゴン投与による血糖，IRIの変化（n=8）



13, 14).

d. 血糖値，血漿IRI

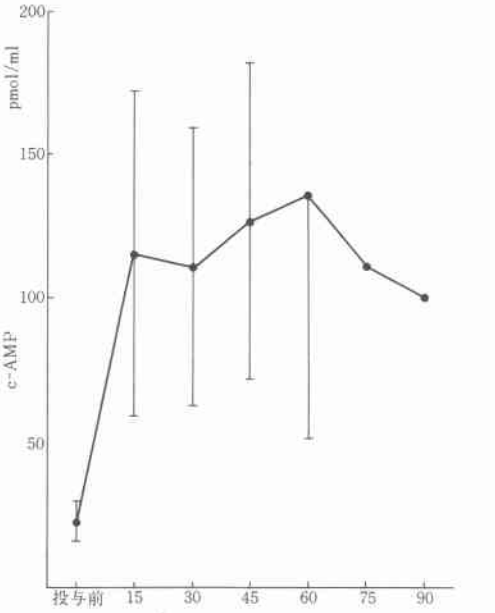
血糖値はG投与前86±9.0mg/dlで，投与開始45分後119±23mg/dlと最高値を示し，90分後には97±19mg/dlとなりglucagonに対する反応は正常群および1週群に比べ低反応であった．実験犬の中には低血糖となる例もあった．

血漿IRIは1週群と同様glucagonにほとんど反応を示さなかった（図18）．

e. 血漿c-AMP

G投与前は23±7pmol/mlとほぼ正常値を示したが，投与開始15分後には116±55.9pmol/mlと上昇し，60分後には136±84pmol/mlと最高となった．正常群および1週群に比べてc-AMPの上昇は高度であり，最高値となる時間が遅れる傾向を示した（図19）．

図19　閉塞性黄疸犬3週群におけるグルカゴン投与による血漿c-AMPの変化（n=8）



考　察

glucagonとmethylxanthine系薬剤はイヌに対して利胆作用をもっている．それらの物質の肝内での作用部位が毛細胆管であることはerythritol, mannitolが毛細胆管から分泌され細胆管，胆管では分泌も再吸収もうけず，しかも毛細胆管からの胆汁分泌量に平行して胆汁中に排泄される性質を利用して明らかにされている[4)~7)]．

一方，上記物質と同様に胆汁酸非依存性分画（BAIF）を増加させることによって利胆作用をもつsecretin, gastrin II, caerulein, VIPなどの作用部位は細胆管，胆管と考えられている[7)8)11)]．

Khedisらはglucagon投与により胆汁分泌は増加したが胆汁中の胆汁酸濃度は低下し胆汁酸排出の絶対量の増加は軽微であると述べ，同時にerythritol clearanceが胆汁分泌に平行して増加することより，作用部位は毛細胆管胆汁のBAIF成分であると結論している[4)]．

著者の成績でも胆汁分泌は34～190%と増加し，胆汁中のNa, Kの分泌量も胆汁量に比例して増加したが，胆汁酸濃度は低下して胆汁酸分泌量には軽度の増加が認められたのみであった．

aminophyllineの胆汁分泌におよぼす影響についての報告はないが，同系薬剤のtheophyllineについては

利胆作用が認められ，その作用部位はglucagonと同様に毛細胆管胆汁のBAIF成分の増加が起ると考えられている[5)10)].

今回のaminophylline投与による成績では胆汁分泌の増加率は60～200%であり，胆汁中の胆汁酸濃度は低下したが，Na, Kの分泌量は胆汁量に比例して増加した．すなわちaminophyllineもtheophylline同様の作用部位に作用し利胆効果をあらわすと考えられた．

glucagonの利胆作用の1つの機序として肝血流の増加による胆汁分泌の促進が考えられるが，Khedisらおよび Shoemakerらの^{198}Auによる肝血流量測定では著者が行った程度の投与量では肝血流には変化は認められないとされている[4)].

insulinはイヌで毛細胆管からのBAIF[12)]を増加するとされているが，その作用機序は不明である．glucagon投与によるinsulinの分泌増加が胆汁分泌を促進するという仮説は今回の実験成績とは合致しなかった．

glucagon投与による血漿c-AMPと肝組織c-AMPの増加は兎ではよく相関するとされている[13)]．今回のイヌの実験でも同様のことが観察された．

著者の成績ではglucagon投与後の血漿c-AMP値の上昇（すなわち肝組織c-AMPの増加）と平行して胆汁分泌の増加が認められた．

c-AMPは上皮細胞からの水分，電解質の調節に関与していると考えられている．以上よりglucagonの利胆にsecond messengerのc-AMPが関与していると考えられた[14)].

aminophyllineの利胆機序については，その代謝産物の胆汁中への排泄による浸透圧差により胆汁分泌が促進されるという仮説は，methylxanthine系薬物は尿中に排泄されることから否定的であり，また肝血流量に関しても影響しないとされている．

insulinとの関係についても今回の実験でaminophylline投与により一過性のinsulinの増加が認められたが，胆汁分泌とは無関係であった．

methylxanthine系薬剤のaminophyllineはc-AMP分解酵素のphosphodiesteraneを阻害し，細胞内のc-AMPを増加させてその作用を発現すると考えられている．今回の実験でも血漿c-AMPはaminophylline投与により上昇し胆汁分泌の増加も平行して認められたことより，aminophyllineの利胆作用にc-AMPが関与していることが示唆された．

Morrisらはc-AMP誘導体のdibutyl c-AMPの投与によりBAIFの増加が認められたと報告している[15)].

glucagon, methylxanthine系薬剤，dibutyl c-AMP投与により毛細胆管のBAIFの分泌亢進がおこることより，c-AMPが胆汁分泌のBAIFに関与していると諸家[4)5)15)]が推定しているが今回の実験でもc-AMPが胆汁分泌と密接な関係があると推察された．

閉塞性黄疸群では閉塞性黄疸1週群の胆汁分泌量は増加していたがglucagonによる利胆作用は認められなかった．胆汁成分では水分，Na, Kの排出増加は認められたが，胆汁酸濃度は低下していた．

閉塞性黄疸初期のBAIFの分泌増加には毛細胆管とDisseの肝細胞間隙の短縮とtight junctionの解離によりDisse腔から直接に毛細胆管へ組織液が流出することや胆管，細胆管の上皮細胞からの分泌亢進，再吸収障害などの要因が考えられる[16)17)].

閉塞性黄疸の持続が3～4週間以上になるとグリソン鞘の線維化，胆管増生などの肝構築状態にも変化がおこるとされており[18)19)]，著者の実験でも3週群では1週群に比較して胆汁量，胆汁酸排出量は低下していた．すなわち閉塞期間が長期になるほど肝細胞の胆汁分泌や胆汁酸合成能が低下するとともに細胆管の障害も進行すると推測された．

閉塞性黄疸解除時のglucagon投与が胆汁分泌に影響しなかった理由としては，閉塞性黄疸初期では，BAIFは増加した状態であり，glucagon投与による利胆が現われなかったと考えられる．

閉塞性黄疸が進むと血漿c-AMPの反応は正常群以上の反応を示して上昇するにもかかわらず利胆作用が生じないことについてはc-AMPの排泄経路の1つである胆道の閉塞により，見かけ上血漿c-AMPが上昇しても肝細胞内での増加は軽微であるなどの因子が考えられるが明確にはできなかった[20)22)].

閉塞性黄疸時にはglucagon投与によるinsulin反応の低下が認められたが，閉塞性黄疸時には膵内分泌ホルモンの産生や放出に障害が生じているものと考えられた．

結　論

正常犬ではglucagonとaminophyllineは血中のc-AMPの上昇と利胆作用を有し，胆汁酸非依存性分画に作用すると考えられた．

閉塞性黄疸時のglucagon投与によりc-AMPはよく反応したが胆汁量には変化がなかった．閉塞性黄疸の進行によりglucagon投与によるinsulin反応に低

下がみられた.

本論文の要旨は第16回日本消化器外科学会で発表した.

稿を終るにのぞみ, 御指導, 御校閲いただいた折田薫三教授また直接御指導, 御授助いただいた三村久助教授に深謝する. また御支援, 御協力を頂いた小児外科グループに深く感謝の意を表する.

文　献

1) Forker EL: Two sites of bile formation as determined by mannitol and erithritol clearance in guinea pig. J Clin Invest **46**: 1189—1195, 1967
2) 木谷健一：胆汁酸依存胆汁と胆汁酸非依存胆汁. 医のあゆみ　**108**: 275—281, 1979
3) Erlinger S, Dhumeaux D, Mechanisms and control of secretion of bile water and electrolites. Gastroenterology **66**: 281—304, 1974
4) Kedis A, Dumont M, Erlinger: Influence of glucagon on canalicular bile production in the dog. Biomedicine **21**: 176—181, 1974
5) Erlinger S, Dumont M: Influence of theophylline on bile formation in the dog. Biomedicine **19**: 27—32, 1973
6) Jones RS, Geist RE, Hall AD: The choleretic effects ofglucagon and secretin in the dog. Gastroenterology **60**: 64—68, 1971
7) Russell TR, Searle GL, Jones RS: The choleretic mechanisms of sodium taurocholate, secretin and glucagon. Surgery **77**: 498—504, 1975
8) Domschke W, Domschke S: Bilirubin metabolism and bile secretion. Liver and Bile **23**: 167—173, 1977
9) Jones RS, Grossman MI: Choleretic effects of secretin and histamin in the dog. Amer J Physiol **217**: 532—535, 1969
10) Barnhart JL, Combes: Effect of theophylline on hepatic excretory function. Am J Physiology **227**: 194—199, 1974
11) Boyer JL, Bloomer JR: Canalicular bile secretion in man. J Clin Invest **54**: 773—781, 1974
12) Snow RJ, Jones RS: The effect of insulin on bile salt independent canalicular secretion. Surgery **83**: 458—462, 1978
13) Jerum G, Hardy KJ: The cyclic AMP response to glucagon. Diabetes **26**: 81—87, 1977
14) Grantham JJ, Orloff J: Effect of prostaglandin E1 on the permeability response of isolated collecting tubule to vasopressin, adenosine 3,5-monophosphate and theophylline. J Clin Invest **47**: 1154—1161, 1968
15) Morris TQ: Choleretic response to cyclic AMP and theophylline in the dog. Abstracts of papers, 1972, p187
16) Ropper H: Mechanism of cholestasis. Liver and Bile **23**: 189—201, 1977
17) 白川洋一, 玉熊正悦：胆道閉塞解除後の胆汁分泌. 医のあゆみ　**115**: 911—919, 1980
18) 佐藤寿雄, 小山研二：閉塞性黄疸の病態生理. 外科 **36**: 426—433, 1974
19) 石川浩一, 玉熊正悦：閉塞性黄疸. 東京, 医歯薬出版, 1977, p45—59
20) Francavilla A, Pansini F, Sanson F: Effect of glucagon infusion on plasma cyclic AMP in patients with cholestatic hepatitis and obstructive jaundice. Clin Chim Acta **75**: 351—157, 1977
21) Kaminski DL, Brown WH, Deshpande YG: Effect of glucagon on bile c-AMP secretion. Am Physiol Society **238**: 119—123, 1980
22) Ferid M, Charles YG: Urinary excretion of adenosine 3,5-monophosphate and guanosine 3,5-monophosphate. Eng J Med **286**: 1382—1387, 1972