

## ラットにおける caerulein 刺激下膵外分泌 におよぼす肝切除の影響

京都大学医学部第1外科学教室

平野 鉄也 真辺 忠夫 戸部 隆吉

肝切除後の膵外分泌系機能の変化を解明するために、ラットにおいて約70%肝切除後、経時的に caerulein 刺激時のアミラーゼ分泌能を検討した。生体下膵液中のアミラーゼ分泌量は肝切除後4日目、7日目とも単開腹群に比べ1.3倍 ( $p < 0.05$ ), 1.6倍 ( $p < 0.01$ ) に増加した。単離膵房細胞を用いた培養 (in vitro) 系における肝切除7日後の caerulein に対するアミラーゼの最大分泌反応は単開腹群 ( $10^{-9}M$ ) に比べより低い濃度 ( $10^{-10}M$ ) の caerulein で得られた。さらに肝切除後4日目、7日目の膵組織アミラーゼ含有量も単開腹群に比べ1.4倍 ( $p < 0.05$ ), 1.7倍 ( $p < 0.01$ ) に増加していた。これらの結果より肝切除後の膵腺房細胞ではアミラーゼ含有量の増加, caerulein に対する感受性の亢進など、膵外分泌系に著明な変化が生じることが明らかになった。

**Key words:** hepatectomy, exocrine pancreatic function, caerulein, amylase

### 緒 言

肝切除後の肝再生過程にインスリンやグルカゴンが深く関わっていること<sup>1)~3)</sup>は一般に認められており、肝と膵内分泌系は門脈系を介し、臓器相関の上からも密接な関係をもっていると考えられている。

一方、肝切除後には膵腺房細胞や膵外分泌系刺激ホルモンであるコレシストキニンやセクレチンにも著明な変化<sup>4)</sup>がみられ、肝切除術は膵外分泌系にも重要な影響を及ぼすことが明らかになりつつあるが、今回、われわれは肝切除後の膵外分泌系の機能的変化を検討するために、ラットにおいて肝切除後、経時的に生体における膵液中および分離膵腺房細胞を使用した培養系における caerulein 刺激時のアミラーゼ動態を観察したので報告する。

### 材料および方法

20匹の Wistar 系ラット (体重: 200~250g, 平均: 235g) を12時間絶食後、ペントバルビタールの腹腔内投与 (25mg/kg) による麻酔下、Higgins と Anderson の方法<sup>5)</sup>にて約70%の肝切除術を施行した。他の20匹のラットに同様の絶食、麻酔下で、開腹および肝の索引操作を行い単開腹群とした。術後、全動物は水分、固型食を自由に摂取させ、次の実験にそなえた。また、

術後、全動物について、その摂取食餌量を体重100g 当りの1日摂取量として計算し、食餌摂取量の差についても検討した。さらに、肝切除群については術後4日目、7日目にそれぞれ肝再生率 ( $10/7 \times$  切除量を全肝重量とした) を計算し、再生状態を確認した。

1. in-vivo 実験; 肝切除後4日目に、12時間絶食後、午前8:00~12:00に、5匹のラットに、ペントバルビタールの腹腔内投与 (25mg/kg) の麻酔下、caerulein (Sigma Chemical) 注入用のチューブ (PE 50, Clay Adams) を右側外頸静脈より上大静脈へ挿管後再開腹を行い、十二指腸近傍より膵胆管内へ挿管 (PE 10, Clay Adams) し、膵液胆汁の採取用とした。30分間の安定化の後、外頸静脈のカテーテルより caerulein を  $0.5\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{hour}$  の速度 ( $0.58\text{ml}/\text{hour}$ ) にて自動注入器を使用して持続静注し、膵外分泌腺酵素分泌を刺激した。caerulein は2時間持続静注し、1時間ごとに液を採取 ( $F_1, F_2$ ) し、膵液胆汁中のアミラーゼ活性を可溶スターチを基質とする Bernfeld の方法<sup>6)</sup>にて測定した。1単位のアミラーゼは1分間に1mg のマルトースを、スターチより遊離しうるものと定義し、caerulein 刺激時のアミラーゼ分泌量を  $\text{U}/\text{kg}\cdot\text{hour}$  にて表わした。同様の操作を肝切除後7日目 (5匹)、単開腹群術後4日目 (5匹)、7日目 (5匹)、正常ラット (5匹) にも施行した。

2. in-vitro 実験; 肝切除後4日目に、12時間絶食

<1990年6月13日受理> 別刷請求先: 真辺 忠夫  
〒606 京都市左京区聖護院川原町54 京都大学医学部第1外科

後、ペントバルビタールの腹腔内多量投与にて屠殺し、すばやく膵組織を摘出し、コラゲナーゼ消化および震盪<sup>9)</sup>を用い、分離膵腺房細胞とし、トリプシンインヒビター (0.01%) (Cooper Diagnostics) Eagle の必須アミノ酸 (Gibco Laboratories) および牛血清アルブミン (0.1%) (Sigma Chemical) を含む pH 7.4 の HEPES リンゲル緩衝液 (NaCl 115mM, KCl 5mM, MgSO<sub>4</sub> 1mM, NO<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1mM, HEPES 10mM, CaCl<sub>2</sub> 1.26mM, グルコース 15mM) に再浮遊させ 10 分間の preincubation 後、30 分間 caerulein の各種濃度 (10<sup>-11</sup>, 10<sup>-10</sup>, 10<sup>-9</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-7</sup>M) 下にて incubation し、in-vitro でのアミラーゼ分泌量を検討した。アミラーゼ分泌量は浮遊液の上清中に分泌されたアミラーゼ量を、細胞内総アミラーゼ量の分泌率 (%) として表わした。肝切除後 7 日目 (5 匹), 単開腹群術後 4 日目 (5 匹), 7 日目 (5 匹), および正常ラット (5 匹) にも同様の操作を施行した。さらに、各ラットについて膵の一部を 0.5% トリトン X-100 (Fisher Scientific) を含むリン酸緩衝液中にて Brinkman Polytron (Brinkman, Instruments, Inc, Westbury, N.Y. U.S.A.) によりホモジナイズし、低速度遠沈 (150g, 10 分) 後、その上清中のアミラーゼ活性を Bernfeld の方法<sup>9)</sup>にて、また、DNA 濃度も仔牛胸腺 DNA を基準とし、LaBarca と Paigen の方法<sup>10)</sup>にて測定し、アミラーゼ活性を U/mg DNA として表わした。

結果はすべて平均値 mean ± 標準誤差 (SEM) として表わし、統計学的処理には Student の t-test を用い、p < 0.05 をもって有意差ありと判定した。

### 結 果

肝切除後のラットの摂取食餌量は 0.75 ± 0.14g/100 g・day となり、単開腹群 (0.73 ± 0.15g/100g・day), 正常ラット群 (0.69 ± 0.16g/100g・day) に比べ有意差はなかった。また、肝切除後 4 日目, 7 日目の肝再生率はそれぞれ 76 ± 3%, 94 ± 4% であった。

1. 生体下 caerulein 刺激実験: 肝切除後 4 日目の caerulein 刺激時 (0.5 μg/kg・hour) のアミラーゼ分泌量は 19,783 ± 1,786 U/kg・h (F<sub>1</sub>), 20,895 ± 1,983 U/kg・hour (F<sub>2</sub>) となり、単開腹群 (14,872 ± 1,014 U/kg・hour (F<sub>1</sub>), 15,214 ± 1,429 U/kg・hour (F<sub>2</sub>)), 正常ラット群 (14,082 ± 1,215 U/kg・hour (F<sub>1</sub>), 14,125 ± 1,256 U/kg・hour (F<sub>2</sub>)) に比べ有意に (p < 0.05) 増加した (Fig. 1a)。肝切除後 7 日目にはアミラーゼ分泌量は 25,347 ± 2,562 U/kg・hour (F<sub>1</sub>), 24,187 ± 2,256 U/kg・hour (F<sub>2</sub>) となり、単開腹群 (15,216 ± 2,211 U/kg・hour

(F<sub>1</sub>), 15,763 ± 2,192 U/kg・hour (F<sub>2</sub>)), 正常ラット群に比べ有意に (p < 0.01) 増加した (Fig. 1b)。

2. 培養実験: 肝切除後 4 日目の分離膵腺房細胞での caerulein 刺激時のアミラーゼ分泌量は、単開腹群, 正常ラット群とはほぼ同様の値を示し (Fig. 2a), 3 群とも caerulein 10<sup>-9</sup>M にて最大分泌量が得られた (Fig. 2b) が、肝切除後 7 日目には最大分泌量が得られる caerulein 量は 10<sup>-10</sup>M に移動し、単開腹群, 正常ラット群の 10<sup>-9</sup>M より低い濃度を示し、明らかに caerulein 刺激に対し異なった反応を示した。膵組織アミラーゼ含有量は肝切除後 4 日目には 629 ± 42 U/mg DNA となり、単開腹群 (453 ± U/mg DNA), 正常ラット群 (415 ± 19 U/mg DNA) に比べ有意に (p < 0.05) 増加

Fig. 1 Changes in amylase secretion in response to caerulein at 4 days (a) and 7 days (b) after hepatectomy. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01

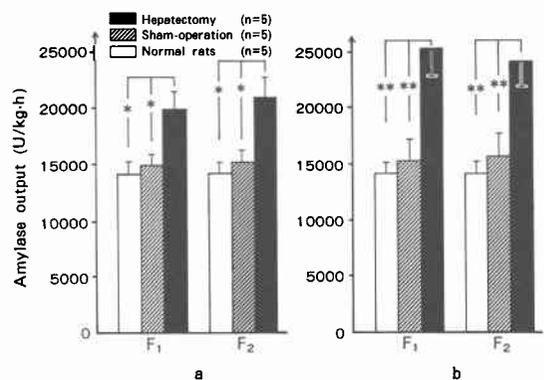
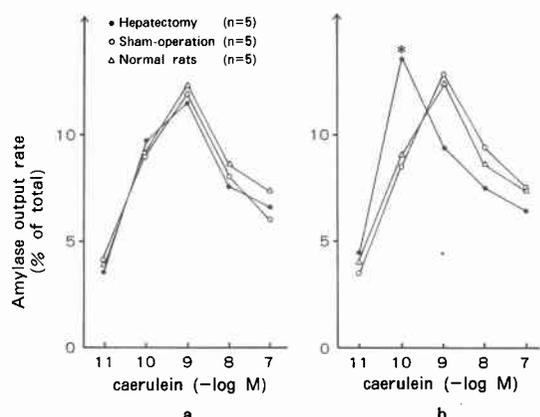
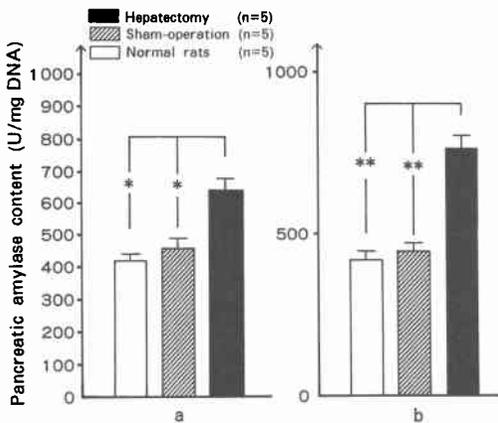


Fig. 2 Changes in amylase output rate in response to various concentration of caerulein at 4 days (a) and 7 days (b) after hepatectomy. \*p < 0.05 vs sham-operation



**Fig. 3** Changes in pancreatic amylase content at 4 days (a) and 7 days (b) after partial hepatectomy. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$



した(**Fig. 3a**)が、肝切除後7日目にはさらに、 $761 \pm 42$  U/mg DNAとなり、単開腹群 $441 \pm 22$  U/mg DNA)、正常ラット群に比べ有意に ( $p < 0.01$ ) 増加した (**Fig. 3b**)。

#### 考 察

ラットにおいて肝切除後、生体下にて caerulein 刺激 ( $0.5 \mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{hour}$ ) 下のアミラーゼ分泌量が有意に増加しているのが観察された。

さらに、分離膵腺房細胞を使用した培養系にては肝切除後 caerulein に対するアミラーゼ分泌の反応性が、単開腹群や正常ラット群に比べ高まるのが観察された。さらに、肝切除後には膵組織アミラーゼ含有量が、単開腹群や正常ラット群に比べ、有意に増加していることが明らかになった。

これらの変化は肝再生が肝重量的にはほぼ完成する時期 (7日) においても持続しており、膵内分泌のみならず膵外分泌も肝再生により影響をうけることが明らかとなった。caerulein に対するアミラーゼ分泌反応の亢進は肝切除後の肝再生過程において、膵腺房細胞でのアミラーゼ合成能の亢進、caerulein に対する感受性の亢進、肝切除後の膵外分泌系での多様な変化を示唆している。肝切除後の肝再生過程および肝再生維持過程には、肝におけるエネルギー代謝も亢進しており<sup>14)</sup>、膵外分泌系におけるこれらの変化は、肝切除後のホメオスタシスを維持するための適応とも考えられる。このことは膵ホルモン動態からもとらえられ、肝切除後の肝再生過程にはインスリンやグルカゴンの

消費が亢進している<sup>1)-5)11)</sup>ことから裏付けられる。また、一方、肝切除後には消化管ホルモンである CCK、セクレチン分泌も高まっている<sup>6)</sup>ことを考えると、膵外分泌系は再生肝構築に必要とされる栄養素の消化・吸収に作用し、膵内分泌とともに合目的に、肝再生に作用する可能性が考えられ、今後、膵腺房細胞における消化管ホルモン、膵ホルモン受容体の検索などが必要と考えられた。

#### 文 献

- 1) Bucher NLR, Swaffield MN: Regulation of hepatic regeneration in rats by synergistic action of insulin and glucagon. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 1157-1160, 1975
- 2) Bucher NLR, Wier GC: Insulin, glucagon, liver regeneration and DNA synthesis. *Metabolism* 25: 1423-1425, 1976
- 3) Price JB Jr, Takeshige K, Max MH et al: Glucagon as the portal factor modifying hepatic regeneration. *Surgery* 72: 74-82, 1972
- 4) Ozawa K, Yamada T, Honjo I: Role of insulin as a portal factor in maintaining the viability of liver. *Ann Surg* 180: 716-719, 1974
- 5) Caruana JA, Gage AA: Increased uptake of insulin and glucagon by the liver as a signal for regeneration. *Surg Gynecol Obstet* 150: 390-394, 1980
- 6) Hirano T, Manabe T, Yamaki K et al: Endocrine and exocrine pancreas and gut hormones in partially hepatectomized dogs. *Surg Res Comm* 8: 1-6, 1990
- 7) Higgings GM, Anderson RM: Experimental pathology of the liver: I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* 12: 186-202, 1931
- 8) Bernfeld P: Amylase  $\alpha$  and  $\beta$ . *Methods Enzymol* 1: 149-158, 1955
- 9) Powers RE, Saluja AK, Houliban MJ et al: Diminished agonist-stimulated inositol triphosphate generation block stimulus-secretion coupling in mouse pancreatic acini during diet-induced experimental pancreatitis. *J Clin Invest* 77: 1668-1674, 1986
- 10) LaBarca C, Paigen K: A simple, rapid and sensitive DNA assay procedure. *Anal Biochem* 102: 334-352, 1980
- 11) 平野鉄也, 真辺忠夫, 山本健一郎ほか: イヌにおける肝切除後の膵内分泌系の変化について. *日消外会誌* 22: 2634-2639, 1989

**Effect of Hepatectomy on Caerulein Stimulated Pancreatic Exocrine Function in Rats**

Tetsuya Hirano, Tadao Manabe and Takayoshi Tobe  
First Department of Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University

To clarify the exocrine pancreatic function after hepatectomy, changes in amylase secretion in response to caerulein were investigated in 70% hepatectomized rats. In the early state (4 days) after hepatectomy, in-vivo caerulein stimulated amylase output was significantly higher than in sham-operated and normal rats. In the recovering stage (7 days) after hepatectomy, amylase output was also significantly increased. In the in-vitro incubation system, the caerulein concentration for the maximum amylase output was  $10^{-10}$ M 7 days after hepatectomy and shifted to a lower concentration than in the sham-operated or normal rats. The amylase content was significantly higher both 4 and 7 days in rats of hepatectomy than in the sham-operated and normal rats. These findings suggest that an increase in amylase synthesis and in sensitivity of acinar cells to caerulein occur in the pancreas after hepatectomy.

**Reprint requests:** Tadao Manabe First Department of Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University  
54 Shogoin-Kawaracho, Sakyo, Kyoto, 606 JAPAN

---