

イヌ膵外分泌腺におけるアデノシン A₂/Ra 受容体の存在

山 岸 不 二 雄

信州大学医学部薬理学教室

(主任: 千葉茂俊教授)

Existence of Adenosine A₂/Ra-Receptors in Exocrine Glands of the Dog Pancreas

Fujio YAMAGISHI

Department of Pharmacology, Shinshu University School of Medicine

(Director: Prof. Shigetoshi CHIBA)

The effects of adenosine and inosine on pancreatic exocrine secretion were investigated in vascularly isolated and self-hemoperfused dog pancreas. All drugs were injected into tubing connected to the pancreaticoduodenal and splenic arteries through which the pancreas was perfused with the animal's own blood. Pretreatment with graded doses of adenosine (0.1-1.0 mg) increased secretin (0.025 clinical units)-stimulated secretory volume dose-dependently, and this effect was reversed by further pretreatment with theophylline (0.3mg), which suggested the existence of P₁-receptors in the exocrine glands. Inosine (1.0mg) did not affect secretin-stimulated secretion. Adenosine and inosine left dopamine (3 μg)-stimulated secretion unaffected. Since cyclic AMP is thought to be an important intracellular mediator of hydromineral secretion induced by secretin, not by dopamine, adenosine probably works through A₂/Ra-receptors, a subtype of P₁-receptors, which are linked to the activation of adenylate cyclase. Next, the cyclic AMP level of the pancreas was measured by radioimmunoassay. Tissue cyclic AMP increased significantly after adenosine (1.0 mg) and the increase was inhibited by pretreatment with theophylline (0.3 mg).

From these results, it is suggested that adenosine acts on A₂/Ra-receptors of the exocrine glands to enhance secretin-stimulated hydromineral secretion without conversion to inosine. *Shinshu Med. J.*, 34: 213-223, 1986

(Received for publication January 16, 1986)

Key words: adenosine, A₂/Ra-receptor, canine pancreas, cyclic AMP, exocrine secretion
アデノシン, A₂/Ra 受容体, イヌの膵臓, サイクリック AMP, 外分泌

I はじめに

Adenine nucleoside や nucleotide は、自律神経終末から放出される norepinephrine, acetylcholine とともに co-transmitter として放出されることが知られている¹⁾。さらに、全身的な低酸素状態の時

に種々の臓器、組織から放出される内因性の adenine nucleoside や nucleotide が膵臓に達して作用を及ぼす可能性も示唆されている²⁾。これら purine 化合物は、イヌの膵外分泌に対して作用を示さなかった³⁾、という報告があるが、他に膵外分泌に対する報告はほとんどない。著者は、予備実験として、イヌの自己血

Table 1 Criteria for distinguishing two types of purinergic receptors (Burnstock, 1978⁹⁾)

Receptor	Antagonist	Agonist potencies	Changes in cyclic AMP production	Induction of prostaglandin synthesis
P ₁	alkylxanthines (competitive)	adenosine >> AMP >> ADP >> ATP	Yes	No
P ₂	quinidine, imidazolines, etc. (not competitive)	ATP >> ADP >> AMP >> adenosine	No	Yes
Subclassification of the P ₁ -receptors into Ra and Ri subtypes (Londos et al., 1980 ¹⁰⁾), or into A ₁ and A ₂ subtypes (Van Calker et al., 1979 ¹¹⁾).				
Subtypes of P ₁	Agonist potencies	Adenylate cyclase	Stereospecificity	
Ra (A ₂)	NECA > adenosine > PIA	Activation	L-PIA = D-PIA (×100)	
Ri (A ₁)	PIA > adenosine > NECA	Inhibition	L-PIA > D-PIA	

NECA, 5'-N-ethylcarboxamideadenosine ; L-PIA, N⁶-L-phenylisopropyladenosine ; D-PIA, N⁶-D-phenylisopropyladenosine ; ADP, adenosine 5'-diphosphate ; AMP, adenosine 5'-monophosphate.

液灌流脾臓標本⁴⁾⁵⁾を用いて, adenosine, adenosine 5'-triphosphate, inosine を大量に局所に注射したが, Takeuchi らの報告 (1974)³⁾のように, 非刺激時の脾液分泌には変化がみられなかった。そこで本研究においては, secretin や dopamine 刺激時の adenine nucleotide や nucleoside の脾液分泌に対する作用を前述の灌流装置を用いて検討したので報告する。

なお, イヌにおいて, dopamine は secretin と同様, 脾外分泌腺に働いて, 水・電解質の分泌を刺激するが, secretin 刺激時にみられる組織中の cyclic AMP 濃度の上昇は伴わないと報告されている⁶⁾。これは cyclic AMP が secretin 刺激時の細胞内情報伝達物質である⁷⁾⁸⁾ということと対照的である。したがって, secretin と purine 化合物との相互作用を解析する上で dopamine と比較することは有意義と考えた。近年, adenosine 受容体の分類の上で adenylate cyclase を活性化するものと抑制するものが区別されている⁹⁾⁻¹¹⁾ (Table 1)。したがって本研究では, 脾臓組織中の cyclic AMP を radioimmunoassay を用いて測定し, adenosine 受容体の種類を推測した。

また今回用いたイヌの自己血液灌流脾臓標本は, 4

時間以上にわたる実験においても, 終始 secretin や dopamine に対して安定した外分泌反応を示した⁴⁾⁵⁾。

II 実験方法

飲用水以外は24時間絶食とした雌雄雑種成犬 (9~16kg) をペントバルビタール Na (30mg/kg) で静脈麻酔し, 上腹部を正中切開した。実験中, 犬は人工呼吸下におき, 1時間ごとにペントバルビタール Na (5 mg/kg) を皮下注射した。十二指腸を長軸方向に切開して主脾管乳頭にポリエチレンの脾管カニューレ (外径1.2mm) を挿入し固定した後, 十二指腸を縫合して閉じた。脾と十二指腸, また脾と腸間膜との間の血行は, 主な動静脈を避けて連続的に結紮遮断した。その際, 副脾管も結紮した。総胆管にもポリエチレンカニューレを挿入して胆汁を体外に誘導した。胃幽門部は太い絹糸で結紮遮断して胃液が十二指腸に流入するのを防いだ。次にヘパリン Na (500 USP 単位/kg) を静注し脾臓の灌流を行った。上脾十二指腸動脈と脾動脈にカニューレをそれぞれ挿入し Harvard の peristaltic pump (Model 1210) によって自己大腿動脈からの血液で灌流した (Fig. 1)。なお, 脾動脈からの灌流は逆行性に行うので脾動脈の起始部を結紮した。次に下脾十二指腸動脈を結紮した。ヘパリン

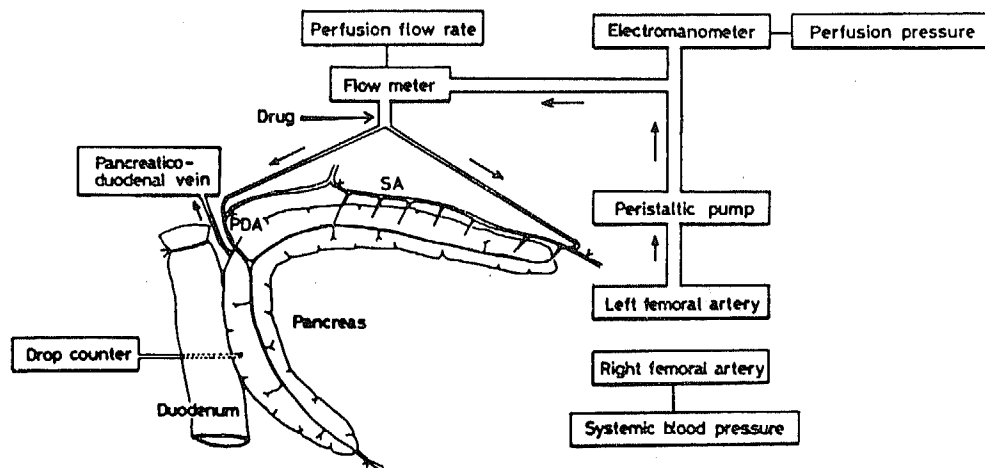


Fig. 1 Diagram of circuit for the perfusion of the pancreaticoduodenal and splenic arteries with blood from the femoral artery, at constant perfusion rates. The perfusion flow rate and perfusion pressure were measured by an electromagnetic flow meter (Nihon Kohden, MF-25) and a transducer (Nihon Kohden, RP-3), respectively.

Na は1時間ごとに 2,000 USP 単位/dog を追加静注した。

膵液の流量は膵管カニューレの先端に取り付けた drop counter でモニターし、メスシリンダーで測定した。膵液の蛋白濃度は、ウシ血清アルブミンを標準にして Bradford の方法¹²⁾にて測定した。重炭酸濃度は Corning の血液ガス分析器 (Model 165/2) によって測定した。膵組織中の cyclic AMP, cyclic GMP は以下の様にして測定した。採取した膵組織片をす速く液体窒素に浸した。次にその組織片を凍結乾燥し、50mg を正確に秤量し 6% トリクロル酢酸にて氷水で冷やしながらかほモジュナイズした。遠心後上清を取り、上清液に水飽和エーテルを加えてかくはんしトリクロル酢酸を抽出した。エーテル層を除去した液体を適当に希釈して assay kit (Yamasa Cyclic AMP (GMP) Assay kit, ヤマサ醬油) に供する試料とした。Kit の測定感度は、cyclic AMP の場合、10~1,000 fmoles/tube であり、cyclic GMP の場合、5~500 fmoles/tube である。

実験に用いた薬物は、secretin (エーザイ, 1 mg = 3.75×10^4 臨床単位), dopamine HCl (ICN), adenosine (和光), adenosine 5'-triphosphate 2Na (ATP, Hoechst), inosine (東京化成), papaverine HCl (大日本), diltiazem HCl (田辺), dilazep

(興和), theophylline (Sigma) である。薬物はすべて 0.9% 食塩水に溶かしたが、secretin はウシ血清アルブミンの入った 0.9% 食塩水に溶かした (アルブミン濃度は 0.1%)¹³⁾。薬物は 2 本の動脈カニューレに接続する Y 字型のタイゴンチューブの一部ゴム管の部分に 4 秒かけて動脈注射した。薬物投与は以下の順序で行った。(1) 反応が安定するまで secretin (0.025 臨床単位) あるいは dopamine (3 μ g) をくりかえして注射して対照値を取った。(2) Adenosine (0.1-1.0 mg), ATP (0.1-1.0 mg) あるいは inosine (1.0 mg) を前処置しておき、1 分後に同じ用量の secretin または dopamine を注射した (purine 化合物は低い用量から順次行った)。(3) さらに 1 分前に theophylline (0.3 mg) を前処置しておき、次に purine 化合物 (1.0 mg), その 1 分後に同じ用量の secretin または dopamine を注射した。

Adenosine や ATP は膵臓においても強力な血管拡張作用を示したので、実験はすべて定流量灌流で行った。灌流量は 100 mmHg の灌流圧を得る値に固定した。さらに、adenosine や ATP によって引きおこされる灌流圧の低下が分泌反応に影響を与えている可能性を否定するために、特異的カルシウム拮抗薬である diltiazem と非特異的カルシウム拮抗薬である dilazep を持続的に infusion (Harvard, Model

Drops of pancreatic juice

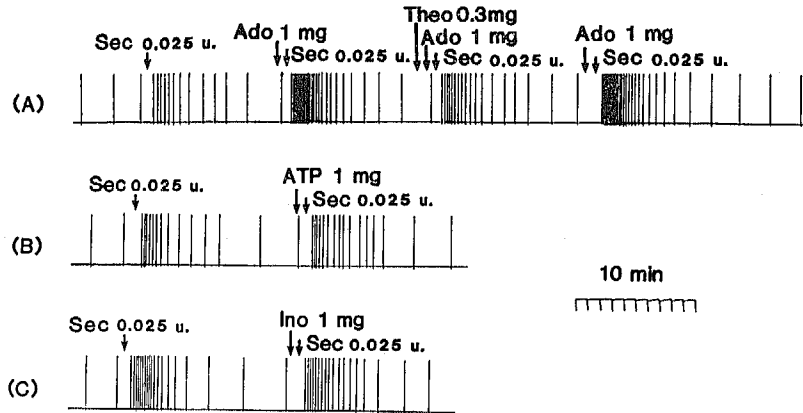


Fig. 2 Effects of 1 mg i.a. of adenosine (Ado), ATP and inosine (Ino) on secretin (0.025 units, i.a.)-stimulated secretion in three separate vascularly isolated and self-hemoperfused dog pancreas. Theophylline (Theo, 0.3 mg, i.a.) reversed the effect of adenosine on secretin-stimulated exocrine secretion.

901D) して灌流圧を低下させておき secretin に対する反応を検討した。Infusion rate は 0.1mg/min で行い、他の薬液を注入するゴム管の部位より約30 cm 離れた部位に infusion した。Papaverine の infusion も同様にして行った。Fig.1 に灌流率と灌流圧の測定法を示す。

すべての分泌反応は15分以内に終了したので分泌液は反応の始まりから15分間採取した。ただし膵管カニューレの死腔容積の分は最初に捨てた。

統計学的分析は paired *t*-test と unpaired *t*-test を用いて行い、0.05未満のP値をもって有意差があると判定した。

III 結 果

A Adenosine, ATP および inosine の secretin による膵液分泌に対する作用

灌流量は 100 mmHg の灌流圧のもとで 16.9±1.0 ml/min (mean±S.E., n=16) であった。Adenosine も ATP も非刺激時の分泌に影響を与えなかったが、secretin の1分前に前処置しておくこと secretin による外分泌量を増加させた。1.0mg の adenosine, ATP および inosine の前後での secretin に対する外分泌反応の典型例を Fig.2 に示す。Inosine (1.0mg) は非刺激時の分泌に対しても、secre-

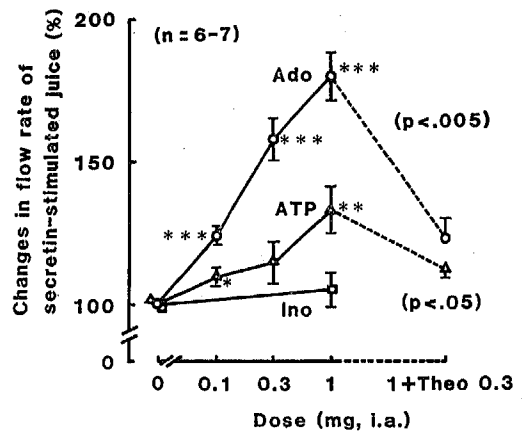


Fig. 3 Effects of adenosine (Ado, 0.1-1.0 mg, i.a.), ATP (0.1-1.0 mg, i.a.) and inosine (Ino, 1.0 mg, i.a.) on the secretory volume induced by secretin (0.025 units, i.a.). Pancreatic juice was collected for 15 min from the beginning of the secretory responses. All points indicate the mean values for the secretory volume in percentage and vertical bars standard errors from 6 to 7 experiments. **P*<0.02, ***P*<0.01, ****P*<0.005, when compared with the before value (100%). Theophylline (Theo, 0.3 mg, i.a.) significantly reversed the effects of adenosine (1.0 mg, i.a.) and ATP (1.0 mg, i.a.): *P* values in parentheses.

Table 2 Effects of secretin and dopamine on pancreatic exocrine secretion (n=6)

Secretagogues		Secretory volume (μ l/15 min)	Protein Concentration (mg/ml)	Bicarbonate Concentration (mmol/litre)
Resting state		68.8 \pm 16.3	26.5 \pm 1.9	20.3 \pm 3.1
Secretin				
(units, i. a.)	7.5×10^{-3}	78.0 \pm 16.7	25.4 \pm 2.0	31.5 \pm 8.2
	2.5×10^{-2}	360.0 \pm 54.0***	20.0 \pm 1.2*	62.9 \pm 4.6***
	7.5×10^{-2}	1025.0 \pm 106.4***	17.4 \pm 0.7*	93.0 \pm 9.8***
Dopamine				
(μ g, i. a.)	1	122.6 \pm 19.2	24.2 \pm 2.6	23.4 \pm 3.8
	3	362.6 \pm 34.5***	23.6 \pm 2.6	52.1 \pm 2.5***
	10	667.5 \pm 76.2***	17.2 \pm 0.9***	96.6 \pm 4.6***

Each value is the mean \pm S.E. Pancreatic juice was collected for 15 min from the beginning of the secretory responses.

Asterisks indicate statistical significance at *p<0.02, **p<0.01 and ***p<0.005, when compared with the resting values.

tin 刺激時の分泌にも影響を与えなかった。Theophylline は弱い phosphodiesterase 阻害薬であるが、0.3mg では非刺激時の分泌にも、secretin 刺激による分泌にも影響を与えなかった。0.3mg の theophylline は adenosine と ATP の作用を阻害した。以上を6~7例についてまとめて Fig. 3 に示す。Adenosine も ATP も用量依存的に secretin による分泌量を増加させた。その作用は0.3mg の theophylline の前処置により有意に抑制された。対照値の絶対値を Table 2 に示す。0.025単位の secretin と3 μ g の dopamine はほぼ等しい膵外分泌刺激量であった。

B secretin 刺激によって得られる膵液の蛋白と重炭酸濃度に対する adenosine, ATP および inosine の作用

3種の purine 化合物は、非刺激時(基礎分泌)の膵液の蛋白、重炭酸濃度を変化させなかった。1.0 mg の adenosine, ATP および inosine 投与後、基礎分泌の膵液の蛋白濃度はそれぞれ、29.3 \pm 2.2, 25.4 \pm 2.6, 24.9 \pm 2.9mg/ml (mean \pm S.E., n=6) であり、重炭酸濃度はそれぞれ、16.5 \pm 3.5, 21.3 \pm 3.2, 24.1 \pm 3.6mmol/l (mean \pm S.E., n=6) であり Table 2 の値と比較して有意差はなかった。

0.1~1.0mg の adenosine と ATP は用量依存的に、0.025単位の secretin 刺激による膵液の重炭酸濃度を増加させ蛋白濃度を減少させた。6~7例についてまとめたものを Fig. 4 に示す。

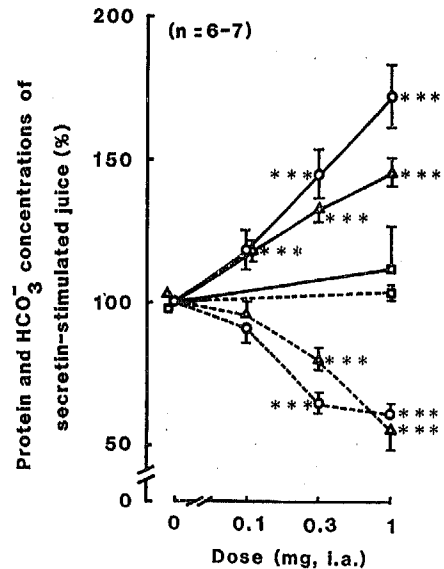


Fig. 4 Effects of adenosine (○, 0.1-1.0mg, i. a.), ATP (△, 0.1-1.0mg, i. a.) and inosine (□, 1.0 mg, i. a.) on the concentrations of protein (broken lines) and bicarbonate (solid lines) in the pancreatic juice stimulated by secretin (0.025 units, i. a.). Pancreatic juice was collected for 15 min from the beginning of the secretory responses. All points indicate mean values in percentage and vertical bars standard errors from 6 to 7 experiments. ***P<0.005, when compared with the previous value (100%).

Table 3 Absence of effects of adenosine, ATP and inosine on dopamine-stimulated pancreatic exocrine secretion (n=6)

Compounds	Secretory volume (%)	Concentrations (%)	
		Protein	Bicarbonate
Dopamine (3μg, i. a.)	100	100	100
After 1 mg i. a. of			
Adenosine	102.0±9.7	100.9±7.3	96.6±4.2
ATP	101.4±9.6	99.4±5.3	100.7±4.6
Inosine	99.1±3.9	96.5±2.5	99.3±1.8

Each value is the mean±S.E. in percentage. Pancreatic juice was collected for 15 min from the beginning of the secretory responses.

Table 4 Effects of adenosine, ATP and inosine on perfusion pressure (n=6)

Compounds	Dose (mg, i. a.)	Maximal decreases in perfusion pressure (mm Hg)		
		0.1	0.3	1.0
Adenosine		12.4±1.1	17.6±1.8	35.2±0.4
ATP		27.5±6.3	45.9±4.3	49.9±2.0
Inosine		NT	NT	7.0±0.8

Each value is the mean±S.E. NT: not tested.

Adenosine も ATP も secretin 刺激による分泌量を増加させ、また重炭酸濃度・重炭酸総分泌量を増加させた。一方、蛋白の総分泌量は有意な変化がなかった。すなわち、secretin (0.025 単位) による蛋白分泌量は6.98±0.71mg/15min (mean±S.E., n=6) であり、1.0mg のadenosine および ATP 処置後はそれぞれ8.66±1.38, 7.34±1.72mg/15 min (mean±S.E., n=6) であり有意な差は認められなかった。

C Adenosine, ATP および inosine の dopamine による膵液分泌に対する作用

1.0mg の adenosine, ATP および inosine を前処置しておいても dopamine (3μg) による分泌量、蛋白・重炭酸濃度に影響を与えなかった。6例についてまとめたものを Table 3 に示す。なお、対照値は Table 2 に示した。

D Adenosine, ATP および inosine に対する血管反応

Adenosine と ATP は灌流圧を用量依存的に減少させた。Adenosine や ATP に比較して inosine に対する反応は小さかった。6例についてまとめたものを Table 4 に示す。Adenosine (0.1-1.0mg) に対する血管反応が theophylline によって抑制され

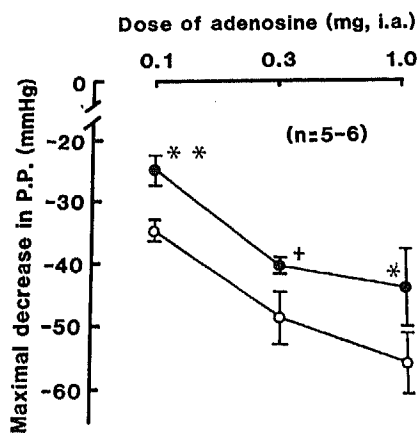


Fig. 5 Dose-response curves of vascular responses to adenosine (0.1-1.0 mg, i. a.) before (○) and after theophylline (0.3 mg, i. a., ●). All points are mean values for the maximal decrease in perfusion pressure (P. P.) and the vertical bars show the standard errors from 5 to 6 experiments. *P<0.05, **P<0.02, ***P<0.01.

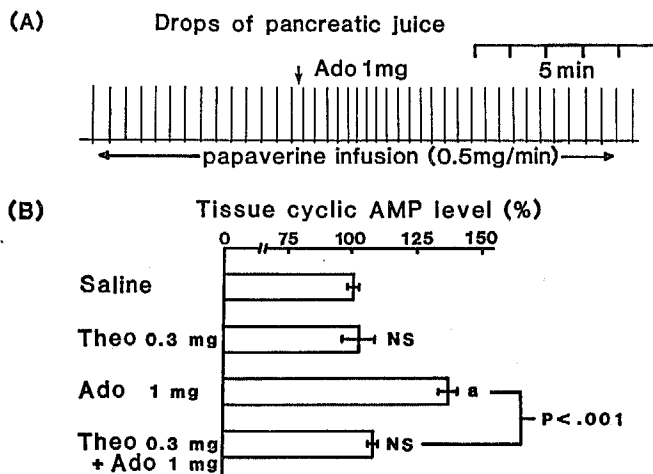


Fig. 6 (A) Effect of adenosine (Ado, 1.0 mg, i.a.) on papaverine (0.5 mg/min, i.a.)-stimulated pancreatic exocrine secretion, and (B) effect of adenosine (Ado, 1.0 mg, i.a.) on tissue cyclic AMP levels with or without theophylline pretreatment (Theo, 0.3 mg, i.a.). In the lower panel (B), Theo was injected 1 min prior to Ado. A piece of the pancreatic tissue was resected 5 min before drug administrations and 3 min after Ado (saline) or 4 min after Theo, from a random part of the pancreas. NS (not significant) and ^aP < 0.001, when compared with the value after saline. Top of the columns indicates the mean value for the tissue cyclic AMP level in percentage and the bars show the standard errors from 6 experiments.

ることを Fig. 5 に示す。Adenosine の用量を増して最大反応まで観察しなかつたので、阻害の形式が拮抗的であるか否か把握できなかつたが、theophylline (0.3mg) は有意に adenosine の反応を抑制した。

E secretin による膵液分泌に対する2種のカルシウム拮抗薬の作用

Adenosine と ATP の血管拡張作用が secretin 刺激による膵液分泌に影響を及ぼしている可能性を除外するために diltiazem や dilazep を infusion して灌流圧を低下させておき secretin の作用を再検討した。この2種のカルシウム拮抗薬を 0.1 mg/min で infusion しておく、灌流圧の減少は diltiazem において 47.7 ± 2.7 , dilazep において 17.7 ± 0.9 mm Hg (mean \pm S. E., $n=5$) であった。しかしながら infusion の間でも secretin 刺激による外分泌量に変化はみられなかつた。すなわち secretin (0.025 単位) の刺激による分泌量を 100% とすれば diltiazem の infusion の時 $103.3 \pm 5.5\%$, dilazep の時 $97.6 \pm 7.5\%$ (mean \pm S. E., $n=5$; $p>0.05$) であった。

F 膵組織の cyclic AMP と cyclic GMP に対する adenosine の作用

Fig. 6 に示すように、xanthine 誘導体でない phosphodiesterase 阻害薬である papaverine¹⁴⁾¹⁵⁾ を 0.5mg/min で infusion し、水・電解質分泌を亢進させておいた状態で adenosine を注射すると分泌量がわずかではあるが増加するという結果が得られた。この実験は4例行つたが、全例に一貫して観察された。

次に、膵組織中の cyclic AMP, cyclic GMP を radioimmunoassay で測定した。Fig. 6 に示す様に adenosine (1.0mg) 注入の3分後、膵組織を任意な場所から切除して、cyclic AMP を測定すると約37%増加していた。一方 cyclic GMP は、有意な増加を示さなかつた ($10.7 \pm 5.3\%$ の増加, mean \pm S. E., $n=6$; $p>0.05$)。この adenosine の作用は theophylline (0.3mg) の前処置により有意に抑制された。

組織中の cyclic AMP と cyclic GMP の値は、薬物投与前でそれぞれ、 2.55 ± 0.47 pmol/mg dry weight と 82 ± 16 fmol/mg dry weight (mean \pm S. E.,

n=6)であった。

IV 考 察

灌流実験の利点は、*in vitro*の実験と異なり反応を主体レベルに戻して考え易いことである¹⁶⁾。

今回の実験結果よりイヌの膵外分泌腺に adenosine A₂/Ra 受容体の存在が示唆された。同様にして膵の血管系にも P₁ 受容体の存在が示されたが subtype は不明である。

Dopamine による膵液分泌と組織中の cyclic AMP との関係についてはさまざまな報告があり、議論の余地がある。Dopamine によって組織の cyclic AMP が増加するといわれるものに、ラットの膵臓 (*in vivo*)¹⁷⁾、イヌの膵臓の腺房 (*in vitro*)¹⁸⁾などが報告されている。一方、*in vivo* でイヌに dopamine を静脈注射した際に組織の cyclic AMP の増加を認めなかった⁶⁾という報告がある。Dopamine によるイヌの膵外分泌は、dopamine D₂ 受容体の選択的拮抗薬である sulpiride¹⁹⁾によって抑制される²⁰⁾²¹⁾。したがって dopamine による膵外分泌は、イヌにおいては adenylate cyclase の活性化をおこさない D₂ 受容体¹⁹⁾を介するものと考えられる。前述のような cyclic AMP の増加を引き起こすという報告は、種差と実験系の違いによって説明できると思われる。また dopamine は secretin と同様、水・重炭酸分泌を刺激する²⁰⁾が細胞内情報伝達物質として cyclic AMP を介さないという点で興味深い。さらに adenosine と ATP は secretin の作用のみを増強し、dopamine の作用に影響を与えなかったという今回の実験結果からそれら purine 化合物の作用部位が P₁ 受容体の subtype である A₂/Ra 受容体 (Table 1) であることが推測される。

Theophylline は alkylxanthine の一種で P₁ 受容体の拮抗薬である²²⁾²³⁾、しかし大量に用いると phosphodiesterase (PDE) 阻害作用によって膵液分泌を引き起こす。今回用いた灌流装置に 1.0mg の theophylline を動脈注射するとわずかではあるが分泌量が増加するとされている³⁾。そこで本研究では theophylline は 0.3mg という用量を用いた。また PDE 阻害薬である nicardipine, papaverine なども膵液分泌を刺激することから²⁴⁾²⁵⁾、cyclic nucleotides の細胞内における生理的役割が示唆される。Adenosine は、xanthine 誘導体でない PDE 阻害薬である papaverine の膵外分泌作用を増強させるこ

とからも作用部位が A₂/Ra 受容体であることが推測される。

比較のため用いた ATP の作用は、theophylline で抑制されるので作用部位が P₁ 受容体であると思われるが、ATP が主として作用しているのか、adenosine を含む代謝産物 (ADP, AMP) が主として作用しているのか不明である²⁶⁾。この実験で、0.3mg の adenosine の方が 1.0mg の ATP より作用が強いという結果が得られた (Fig. 3)。このことは P₁ 受容体の agonist potency が adenosine ≥ AMP ≥ ADP ≥ ATP である⁹⁾ (Table 1) ことと符合すると思われる。

Inosine を大量に投与しても adenosine や ATP のような作用が観察されなかったことから、adenosine や ATP は、inosine に代謝されてから作用するのではないと考えられる。しかし構造上の類似性から、inosine も purine 受容体に作用するとの推測もあるが²⁷⁾今回の実験では inosine は有意な作用を示さなかった。

膵灌流量の変化は、組織栄養供給、酸素供給の変化、ひいては外分泌量の変化を引き起こす可能性が示唆されている²⁸⁾。Adenosine も ATP も強力な血管拡張作用があるので今回は定流量灌流で実験を行った。しかし adenosine や ATP による灌流圧の低下が組織圧の低下、さらには外分泌量の変化を引き起こす可能性を除外しなくてはならない。そこでカルシウム拮抗薬を2種類使用して灌流圧を低下させておき、secretin による外分泌を再検討したが、外分泌量には変化がみられなかった。したがって、adenosine や ATP の外分泌に対する作用は灌流圧の低下を介して発現するのではないと考えられる。また今回用いたのと同じ灌流装置にて verapamil の作用が報告されているが²⁹⁾、定圧灌流下であるにもかかわらず secretin による分泌に影響を与えなかった。したがってカルシウム拮抗薬は secretin が主として作用する腺管細胞に対して直接作用は殆んどないと考えられる。

Secretin の重炭酸分泌作用は、adenosine, ATP の前処置によって増強した。一方、secretin による蛋白分泌総量是不変であったが、膵液中の蛋白濃度は adenosine や ATP の前処置によって有意に減少した。細胞外カルシウムイオンは、膵腺房細胞からの蛋白(消化酵素)の分泌において重要であることが示されている³⁰⁾³¹⁾ので、これらの purine 化合物、特に adenosine が細胞内へのカルシウムイオン流入を抑

制した³²⁾結果 secretin 刺激による蛋白分泌が減少したという可能性もある。しかし、secretin による蛋白分泌の総量が不変であったこと、dopamine による蛋白分泌に影響を及ぼさなかったことからそれとは異なる機構によると思われる。Table 2 に示すように、secretin も dopamine も用量依存的に膵液の蛋白濃度を減少させた。また、この変化は膵液分泌量に依存的でもあるので、古くから提唱されている“wash-out”の概念 (secretin の刺激によって水・電解質分泌がおこり消化酵素が洗い流されること³³⁾) が adenosine や ATP によっておこる膵液中の蛋白濃度の減少の原因の1つと考えられる。さらに補足的な説明として、イヌの膵臓は secretin に反応して主として水・電解質を分泌するが、ラットやモルモットの膵臓は secretin 刺激によってある程度蛋白も分泌する³⁴⁾。したがってイヌの場合は特に“washout”が著明に観察されるものと考えられる。

P₁ 受容体は細胞膜の表面に存在し⁹⁾⁻¹¹⁾、その subtype である A₂/Ra 受容体は Table 1 に示すように adenylate cyclase を活性化して細胞内の cyclic AMP 濃度を上昇させる。今回の実験において、adenosine は膵臓組織中の cyclic AMP を増加させ、その作用は theophylline の前処置によって抑制された。したがって adenosine の作用部位は A₂/Ra 受容体と結論される。しかし cyclic AMP の変化が主として外分泌腺のものだけを反映しているとは *in vivo* の本実験からは断定できない。細胞内の情報伝達物質として重視される cyclic AMP を adenosine が増加させたが adenosine 単独投与では膵液分泌量が増加しなかったという点については、cyclic AMP を増加させるが分泌の trigger としてはまだ subthreshold である可能性もある。したがって cyclic AMP の増加分、増加率、turn-over rate についてさらに検討を加える必要があると思われる。

今回の実験では、灌流量が約17ml/min なので薬液を4秒かけて動脈注射したときの膵臓でのピークの薬物濃度が概算できる。たとえば、0.1mg の adenosine の場合、約0.33mM となる。ただし灌流実験なので、

その薬物濃度は一過性であり、1分後に secretin を注入する時点ではかなり濃度が低下していると予想される。いずれにしても、secretin 刺激下での膵外分泌に作用を及ぼす最小濃度と adenosine, ATP の膵外分泌における生理学的、病態生理学的意義については今後研究の必要があると思われる。

V 結 語

イヌの定位自己血液灌流膵臓標本を用いて3種の purine 化合物である adenosine, ATP および inosine の膵外分泌に対する作用を検討し、以下の結論を得た。

1. Adenosine, ATP および inosine は、非刺激時の膵外分泌に影響を及ぼさなかった。

2. Adenosine と ATP は secretin 刺激による水・重炭酸分泌を増強したが theophylline を前処置すると作用が抑制される。したがって、adenosine も ATP も P₁ 受容体に作用すると思われる。また inosine にはそのような作用がなかったので、adenosine も ATP も inosine に代謝されないで作用すると思われる。

3. Adenosine は papaverine (PDE 阻害薬) の膵液分泌作用を増強したので P₁ 受容体でも cyclic AMP を増加させる A₂/Ra subtype に作用することが推測された。組織中の cyclic AMP は adenosine 投与後有意に増加し、theophylline はその作用を抑制した。

4. 以上の結果よりイヌの膵外分泌腺には adenosine A₂/Ra 受容体が存在すると結論された。

なお本論文の要旨は、第72回日本薬理学会関東部会 (1985年6月) および第59回日本薬理学会総会 (1986年4月) において発表した。

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜りました千葉茂俊教授ならびに岩月和彦助教を始めとする薬理学教室諸兄に深く感謝します。

文 献

- 1) Burnstock, G.: The cotransmitter hypothesis, with special reference to the storage and release of ATP with noradrenaline and acetylcholine. In: Cuello, A. C. (ed.), Cotransmission, pp.151-163, Macmillan Press, London, 1982
- 2) Bachier, S., Kraupp, O., Conca, W. and Raberger, G.: The effects of NECA (adenosine-5'

- N-ethylcarboxamide) and of adenosine on glucagon and insulin release from the in situ isolated blood-perfused pancreas in anesthetized dogs. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 320 : 67-71, 1982
- 3) Takeuchi, O., Satoh, S. and Hashimoto, K. : Secretory and vascular responses to various biogenic and foreign substances of the perfused canine pancreas. *Jpn J Pharmacol*, 24 : 57-73, 1974
 - 4) Hashimoto, K., Satoh, S. and Takeuchi, O. : Effects of dopamine on pancreatic secretion of the dog. *Br J Pharmacol*, 43 : 739-746, 1971
 - 5) Iwatsuki, K., Ikeda, K. and Chiba, S. : Effects of nitroprusside on pancreatic juice secretion in the blood-perfused canine pancreas. *Eur J Pharmacol*, 79 : 53-60, 1982
 - 6) Iijima, F., Iwatsuki, K. and Chiba, S. : Effects of dopamine on exocrine secretion and cyclic nucleotide concentration in the dog pancreas. *Eur J Pharmacol*, 92 : 191-197, 1983
 - 7) Case, R.M., Johnson, M., Scratcherd, T. and Sherratt, H.S.A. : Cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate concentration in the pancreas following stimulation by secretin, cholecystokinin-pancreozymin and acetylcholine. *J Physiol (Lond)*, 223 : 669-684, 1972
 - 8) Case, R.M. and Scratcherd, T. : The actions of dibutyryl cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and methylxanthines on pancreatic exocrine secretion. *J Physiol (Lond)*, 223 : 649-667, 1972
 - 9) Burnstock, G. : A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In : Bolis, L. and Straub, R.W. (ed.), *Cell membrane receptors for drugs and hormones*, pp.107-118, Raven Press, New York, 1978
 - 10) Londos, C., Cooper, D.M.F. and Wolff, J. : Subclasses of external adenosine receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77 : 2551-2554, 1980
 - 11) Van Calker, D., Muller, M. and Hamprecht, B. : Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J Neurochem*, 33 : 999-1005, 1979
 - 12) Bradford, M.M. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72 : 248-254, 1976
 - 13) Singer, M.V., Becker, S., Solomon, T.E. and Grossman, M.I. : Effect of adding albumin to solutions of secretin on pancreatic volume and bicarbonate response. *Scand J Gastroenterol*, 16 : 625-628, 1981
 - 14) Iwatsuki, K. and Chiba, S. : Effect of papaverine on pancreatic exocrine secretion in the dog. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 248 : 314-321, 1980
 - 15) Kukovetz, W.R. and Pösch, G. : Inhibition of cyclic 3', 5'-nucleotide-phosphodiesterase as a possible mode of action of papaverine and similarly acting drugs. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 267 : 189-194, 1970
 - 16) 菅野富夫 : Ⅷ臓器機能の生理化学 (分離臓器を用いて) 7) 腺灌流, 代謝, 20 : 669-676, 1983
 - 17) Vaysse, N., Esteve, J.P., Brenac, B., Moatti, J.P. and Pascal, J.P. : Action of dopamine on cyclic AMP-tissue level in the rat pancreas. Interaction with secretion. *Biomedicine*, 28 : 342-347, 1978
 - 18) Vaysse, N., Laval, J., Senarens, C., Esteve, J.P. and Ribet, A. : Dopamine-stimulated cyclic AMP and binding of [H^3] dopamine in acini from dog pancreas. *Biochim Biophys Acta*, 720 : 378-383, 1982
 - 19) Kebebian, J.W. and Calne, D.B. : Multiple receptors for dopamine. *Nature*, 277 : 93-96, 1979
 - 20) Iwatsuki, K., Iijima, F. and Chiba, S. : Effects of hydergine on pancreatic exocrine secretion in the isolated, blood-perfused pancreas of the dog. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 261 : 328-334, 1983
 - 21) Satoh, Y., Satoh, H. and Honda, F. : Dopamine receptor blocking activity of sulpiride in

- the canine exocrine pancreas. *Jpn J Pharmacol*, 30 : 689-699, 1980
- 22) Burnstock, G. : Purinergic receptors in the heart. *Circ Res [Supple]*, 46 : 175-182, 1980
 - 23) Daly, J.W., Bruns, R.F. and Snyder, S.H. : Adenosine receptors in the central nervous system : Relationship to the central actions of methylxanthines. *Life Sci*, 28 : 2083-2097, 1981
 - 24) Iwatsuki, K., Ikeda, K. and Chiba, S. : Effect of nicardipine on pancreatic exocrine secretion in the dog. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 9 : 587-594, 1982
 - 25) Yamagishi, F., Homma, N., Haruta, K., Iwatsuki, K. and Chiba, S. : Effects of synthesized phosphodiesterase inhibitors, DM 9278 and HWA 285, on pancreatic exocrine secretion of the dog. *Jpn J Pharmacol*, 39 : 131-136, 1985
 - 26) Collis, M.G. and Pettinger, S.J. : Can ATP stimulate P₁-receptors in guinea-pig atrium without conversion to adenosine? *Eur J Pharmacol*, 81 : 521-529, 1982
 - 27) Olsson, R.A., Khouri, E.M., Bedynek, J.L., JR. and McLean, J. : Coronary vasoactivity of adenosine in the conscious dog. *Circ Res*, 45 : 468-478, 1976
 - 28) Augier, D.A., Boucard, J.P., Pascal, J.P., Ribet, A. and Vaysse, N. : Relationships between blood flow and secretion in the isolated perfused canine pancreas. *J Physiol (Lond)*, 221 : 55-69, 1972
 - 29) Iwatsuki, K., Ikeda, K. and Chiba, S. : Effects of verapamil on pancreatic exocrine secretion induced by dopamine, secretin and pancreozymin in the dog. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 9 : 165-172, 1982
 - 30) Kanno, T. : Calcium-dependent amylase release and electro-physiological measurements in cells of the pancreas. *J Physiol (Lond)*, 226 : 353-371, 1972
 - 31) Eimerl, S., Savion, N., Heichal, O. and Selinger, Z. : Induction of enzyme secretion in rat pancreatic slices using the ionophore A-23187 and calcium. *J Biol Chem*, 249 : 3991-3993, 1974
 - 32) Guthrie, J.R. and Nayler, W.G. : Interaction between caffeine and adenosine on calcium exchangeability in mammalian atria. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 170 : 249-255, 1978
 - 33) Singh, M. and Webster, P. : Neurohormonal control of pancreatic secretion. *Gastroenterology*, 74 : 294-309, 1978
 - 34) Robberecht, P., Deschodt-Lankman, M., Lammens, M., De Neef, P. and Christophe, J. : Effects of secretin and vasoactive intestinal polypeptide on hydrolase secretion and cyclic AMP levels in the pancreas of five animal species. *Gastroenterol Clin Biol*, 1 : 519-525, 1977

(61. 1. 16 受稿)