

^{31}P -NMR 測定のための新しい膵灌流方法

A new method of isolation and perfusion of rat pancreas for phosphorus nucleic resonance study.

松本 武久 (北海道大学 獣医学部 生理学講座) 村上 政隆 (同 上)
菅野 富夫 (同 上) 亘 弘 (同 上)
瀬尾 芳輝 (生理学研究所 分子生理研究系)

Takehisa Matsumoto
(Department of Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University)

Tomio Kanno
(Department of Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University)

Yoshiteru Seo

(Department of Molecular Physiology, National Institute for Physiological Sciences)

Masataka Murakami
(Department of Molecular Physiology, National Institute for Physiological Sciences)

Hiroshi Watari
(Department of Molecular Physiology, National Institute for Physiological Sciences)

キーワード

Nuclear Magnetic Resonance, Phosphorus Energy Metabolite, Pancreatic Exocrine Secretion, Perfused Pancreas Isolated, Acetylcholine

要 旨

Phosphorus nuclear magnetic resonance (^{31}P -NMR) was applied to measure phosphorus metabolites in the pancreas. Rat pancreatic gland was isolated and perfused with a modified Krebs-Henseleit solution at room temperature (25°C). Removal of the duodenum from the pancreas made it possible to record ^{31}P -NMR spectra only from the pancreatic tissue. ^{31}P signals of creatine phosphate (PCr), ATP and inorganic phosphate (Pi) were observed in all the glands. In different individual glands, the Signal intensity of PCr varied, but those of ATP were almost the same. The initial levels of all the phosphorus metabolites in individual glands remained almost unchanged during perfusion with the standard solution for 2 hours. When the perfusion was stopped, signal intensity of ATP and PCr decreased while Pi resonance increased and shifted to a higher magnetic field,

indicating tissue acidification. On re-perfusion, each resonance and tissue pH were restored to the respective initial resting levels. Continuous stimulation with 0.3 μ M acetylcholine (ACh) or 0.1 nM CCK-8 caused a markedly larger increase in pancreatic exocrine secretion than that observed in the perfused pancreas which was prepared by the previous method. Continuous stimulation with 0.1 μ M ACh caused a marked and sustained increase in pancreatic exocrine secretion. During the stimulation, the resonances of phosphorus energy metabolites and tissue pH remained almost unchanged. These results indicate that the isolated perfused rat pancreas which is prepared by our new method is a useful preparation for analysis of secretion-metabolism coupling in the exocrine pancreas.

膵組織内の高エネルギー磷酸化合物の動態を解析する目的で ^{31}P -NMR法を採用した。標本には摘出灌流ラット膵を使用し、従来の灌流膵標本には付きものであった十二指腸を膵組織から切り離すことによって、膵組織のみを灌流することに成功した。今回使用した摘出灌流ラット膵標本の膵外分泌刺激物質である Acetylcholine (ACh) 及び cholecystokinin-Octapeptide (CCK-8) に対する反応性は高く且つ安定しており、特に膵液分泌反応については従来の灌流ラット膵標本に比べて約2倍の反応性を示した。また、摘出灌流ラット膵標本を2時間灌流しても、組織内の高エネルギー磷酸化合物のレベルは、灌流初期のレベルと殆ど差が無く、安定していた。摘出灌流ラット膵標本の灌流を10分間停止することによって、膵組織内のクレアチン磷酸(PCr)は殆ど消失し、ATPは灌流停止前のレベルの約50%まで減少した。PCr及びATPの動態とは対照的に、無機磷酸(Pi)は著明に増加すると同時に、PiのNMR信号は高磁場側へ移動し、組織内のpHが低下したことを示した。灌流を再開することによって、ATP、Pi及び組織内pHは速かに、またPCrは徐々に、灌流停止前の各々のレベルまで回復した。また摘出灌流ラット膵標本を生理的濃度(0.1 μ M)のAChで刺激すると持続的な膵外分泌反応が観察されたが、膵組織内の高エネルギー磷酸化合物のレベルには著明な変化が見られなかった。これらの結果は、今回使用した摘出灌流ラット膵標本が、膵外分泌の反応性及び安定性に優れ、且つ膵組織内の高エネルギー磷酸化合物のレベルが灌流停止に対して可逆的に変化することを示しており、この標本が膵外分泌反応とエネルギー代謝との連関を解析する上で非常に有効であることを示している。

1. はじめに

近年、核磁気共鳴(NMR)法を摘出灌流臓器に適用することにより、灌流状態を変えながら様々な条件下で、しかも *in vivo* に近い状態で生体内エネルギー代謝の主役を成す高エネルギー磷酸化合物の組織内動態を経時的に観察するこ

とが可能になった。

これまで報告された膵臓のエネルギー代謝に関する研究は少なく、特に摘出灌流膵を用いた研究は数えるほどである^{1)~3)}。最近、Komabayashi⁴⁾は、摘出灌流膵標本を用いて ^{31}P -NMRによる生体内高エネルギー磷酸化合物動態の解析を行ない、Acetylcholine (ACh) 刺激時の膵組織内 ATP レベルの減少を報告した。しかしなが

受付年月日 昭和62年12月3日

別刷請求先 (〒444) 岡崎市明大寺町西郷中38 生理学研究所分子生理 村上政隆

ら、彼らが用いた標本は十二指腸を含んでおり、彼らが報告した³¹P-NMR スペクトルは膵組織だけからのものではない。今回の実験では、膵組織のみから成る摘出灌流ラット膵標本を用いることにより、³¹P-NMR スペクトルを膵組織のみから採取することが可能になり、窒息時及び生理的濃度 (0.1 μM) の ACh で膵外分泌反応を刺激した時の膵組織内高エネルギー燃酸化合物の動態を解析することができた。

2. 方法

実験には、体重 250~300 g の Wistar 系雄ラットの膵臓を使用した。50 mg/kg 体重のペントバルビタール・ナトリウム (Nembutal[®]) をラットの腹腔内に注射してラットを麻酔し、腹部を切開した。胆膵管の肝臓端を肝動脈と共に結紮し、胆膵管の十二指腸開口部に膵液採取用のカニューレを挿入した。胃及び十二指腸にかけて膵臓から分岐する動・静脈を結紮後、膵臓を胃・十二指腸から切り離した。前腸間膜動脈から血液供給を受けている膵組織部分を、腹腔動脈から血液供給を受けている膵組織部分⁵⁾から結紮離断した。また腹腔動脈と門脈を除くその他の動・静脈を結紮し、脾臓を膵臓から切り離した。腹腔動脈及び門脈に灌流用カニューレを挿入して、膵部分組織を灌流した (図 1)。

灌流液には、Krebs-Henseleit 変法液 (NaCl 117 mM, NaHCO₃ 25 mM, NaH₂PO₄ 1 mM, KCl 5.6 mM, CaCl₂ 2.5 mM, MgCl₂ 1 mM, ブドウ糖 5 mM, HEPES-NaOH 10 mM (pH 7.4)) を用いた。この液に膠質浸透圧を調節する目的でデキストラン T 70 を 5% (W/V) の濃度になるように加え、95% O₂/5% CO₂ 混合ガスで酸素化し、室温下 (25°C) において、2 ml/min の定流で、直径 10 mm の NMR 試料管内に固定した膵部分組織を灌流した。膵液採取用の胆膵管カニューレから流出す

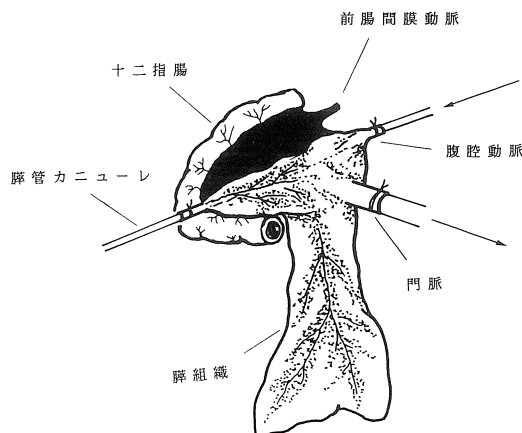


図 1 摘出灌流ラット膵標本の模式図と従来の灌流ラット膵標本との比較

腹腔動脈から血流支配を受けている膵組織部分 (白色で示した領域) のみを灌流し、前腸間膜動脈から血流支配を受けている膵組織部分 (黒色で示した領域) と十二指腸はいずれも血管連絡を断つた後、切除した。十二指腸及び黒色で示した膵組織部分を含めた全体像は従来の灌流ラット膵標本⁵⁾を示す。

る膵液と門脈から流出する灌流液を、ローラーポンプを用いて 10 ml/min の定流で NMR 試料管内に送り込まれた 250 mM Sucrose 溶液と共に、一定の高さに固定した排液用チューブから、別のローラーポンプを用いて NMR 試料管外へ排出した (図 2)。以上の操作を終了して 20 分以上経過した後、NMR 測定を開始した。

NMR 測定には、Bruker 社製 WM360wb を使用した。この時、³¹P 共鳴周波数を 145.8 MHz、パルス幅を 5 μ 秒 (15°パルス)、スペクトル幅を 10 kHz、パルス繰り返し時間を 0.3 秒に調整し、2 k 個のデータポイントから成る FID を 1000 回 (5 分間) 積算した後、フーリエ変換を行なった。尚、¹H デカップリングは行なわなかった。

一般に生体から得られる³¹P-NMR スペクトルには、ATP の α 位磷酸 (α-ATP) と ADP の α 位磷酸 (α-ADP)、また ATP の γ 位磷酸 (γ-ATP) と ADP の β 位磷酸 (β-ADP) の各々

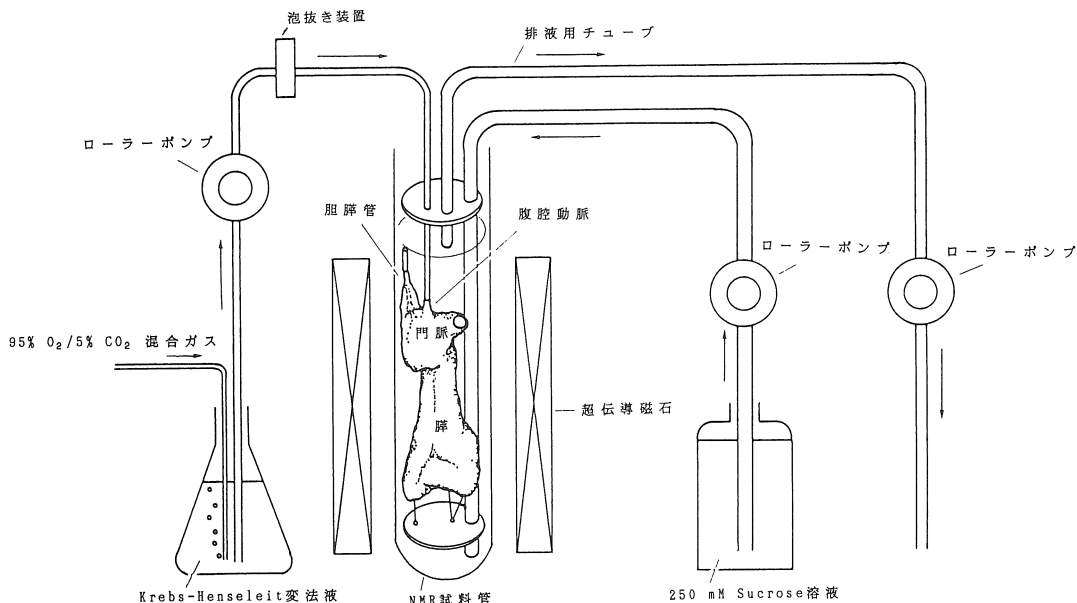


図2 実験システムの模式図

摘出灌流ラット膵標本を直径10mmのNMR試料管内に固定し、ローラーポンプを用いて定流灌流(2 ml/min)しながらNMR測定を行なった。標本からの排出液は、ローラーポンプによって送り込まれるSucrose溶液(10ml/min)と共に、別のローラーポンプを用いて吸引し、試料管外へ除去した。

のNMR信号が同じ位置に重畳して出現する⁹⁾。したがって、今回の実験では組織内の無機リン酸(Pi)及びクレアチンリン酸(PCr)の各レベルは、各々のNMR信号が占める面積を、またATPのレベルはATPのβ位リン酸(β-ATP)のNMR信号が占める面積を指標にした。また組織内のpHは、PiのNMR信号の化学シフト値をSeoら⁷⁾の式に代入して算出した。

3. 結果

NMR試料管内では標本からの膵液の連続的採取は困難なため、膵液採取はNMR測定とは別に行なった。0.3 μM Acetylcholine (ACh)による刺激は、摘出灌流ラット膵標本における

単位時間当りの膵液流量と膵消化酵素放出量を著しく増大させた(図3 A)。特に単位時間当りの膵液流量は、従来の灌流ラット膵標本⁸⁾(図3 B)に比べて、約3倍量の反応を引き起こした。また、AChと同様に膵外分泌刺激物質として広く用いられているcholecystokinin octapeptide (CCK-8)を0.1 nMの濃度で摘出灌流ラット膵標本を刺激すると、単位時間当りの膵液流量と膵消化酵素放出量は著しく増大した(図4 A)。単位時間当りの膵消化酵素放出量は、従来の灌流ラット膵標本⁸⁾で見られる反応量とほぼ等しいにもかかわらず(図4 B)、膵液流量は約2倍の反応量であった(図4)。いづれの刺激物質によって引き起こされる膵外分泌反応も、今回使用した摘出灌流ラット膵標本においては、明確な

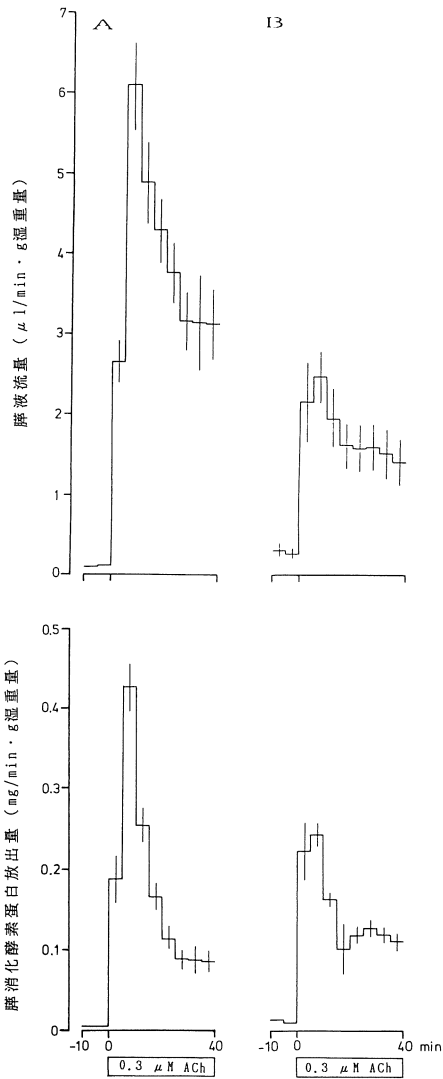


図3 0.3 μM Acetylcholine 刺激によって引き起こされる膵外分泌反応の標本毎の比較。

0.3 μM Acetylcholine (ACh)による刺激の開始前後の5分毎に膵液流量(上図)と膵消化酵素蛋白放出量(下図)を測定した。カラムはAChを含む灌流液で摘出灌流ラット膵標本(A)あるいは従来の灌流ラット膵標本⁸⁾(B)を40分間灌流した期間を示す。各値は5例の平均値±標準誤差を示す。

二相性の反応であり、各例毎の量的なばらつきは小さかった(図3-4)。

³¹P-NMR 測定を動物の生体組織や細胞を用いて行なうと、殆ど同じようなスペクトルが得られる。今回の実験で使用した摘出灌流ラット膵標本から得られた³¹P-NMR スペクトルを、他の研究者^{9)~11)}に報告された生体組織の³¹P-NMR スペクトルを参考にして、また PCr の NMR 信号の化学シフト値を 0 ppm として、他の磷酸化合物の NMR 信号の化学シフトを -10~25 ppm

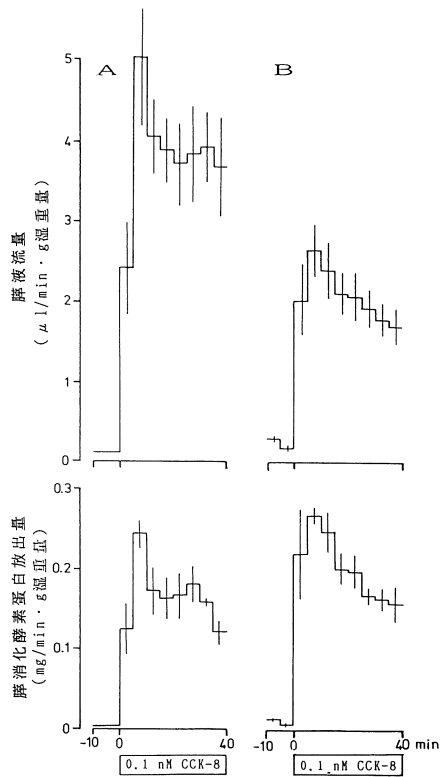


図4 0.1 nM CCK-8刺激によって引き起こされる膵外分泌反応の標本毎の比較。

0.1 nM CCK-8による刺激の開始前後の5分毎に膵液流量(上図)と膵消化酵素蛋白放出量(下図)を測定した。カラムはCCK-8を含む灌流液で摘出灌流ラット膵標本(A)あるいは従来の灌流ラット膵標本⁸⁾(B)を40分間灌流した期間を示す。各値は5例の平均値±標準誤差を示す。

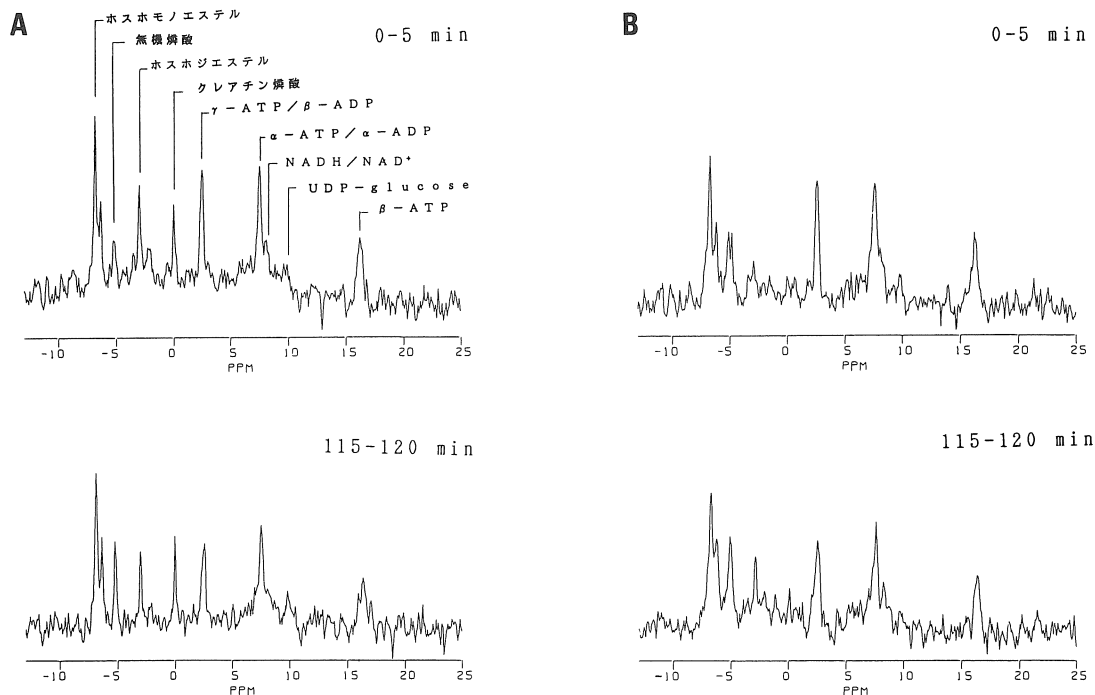


図5 摘出灌流ラット膵標本から得られた膵組織の ^{31}P -NMRスペクトル

クレアチン磷酸のNMR信号が大きい標本(A)あるいは小さい標本(B)において、NMR測定開始後0~5分(上図)及び115~120分(下図)に採取した ^{31}P -NMRスペクトルを示した。

の範囲で表わした(図5)。膵組織の ^{31}P -NMRスペクトル上には、Pi, PCr, γ -ATP及び β -ADP, α -ATP及び α -ADP, NADH及びNAD⁺, β -ATP, UDP-glucoseの各NMR信号が認められた。その他に、糖磷酸やAMPを含むホスホモノエステルやホスホジエステルのNMR信号も認められた。またPiのNMR信号には、細胞内だけでなく、灌流液中の磷酸イオンの成分も含まれている。

摘出灌流ラット膵標本の全例において、PCrとATPのNMR信号が認められたが、ATPのNMR信号が全例において大きかったにもかかわらず、PCrのNMR信号の大きさは各例によっ

て大きく異なっていた(図5)。また他の磷酸化合物のNMR信号の大きさは、ATPと同様に全例においてほぼ一定していた。標本を2時間灌流しても、PCr及びATPを初めとして、各磷酸化合物のNMR信号の大きさは灌流初期の値と殆ど変わりなかった(図5)。しかし、10分間の灌流停止は膵組織の ^{31}P -NMRスペクトルに著明な変化を引き起こした(図6)。PCrのNMR信号は灌流停止開始直後から速かに減衰し、10分以内に完全に消失した(図6)。またATPのNMR信号(β -ATP)は10分以内に灌流停止前のレベルの約50%まで減衰した(図6)。一方、PiのNMR信号は灌流停止開始後10分以内

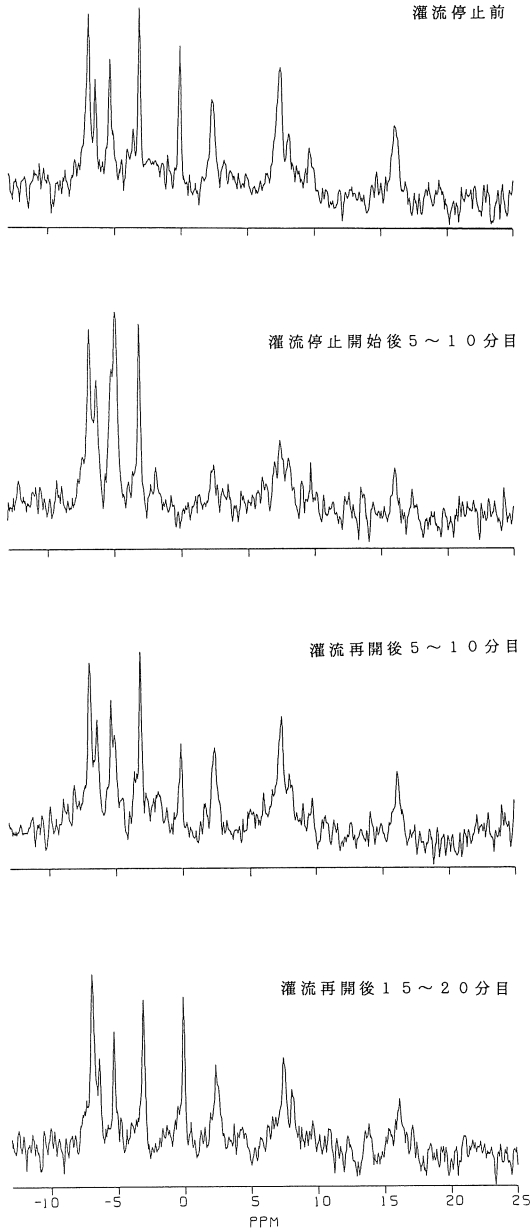


図6 灌流停止による³¹P-NMR スペクトルの経時的変化

10分間の灌流停止の開始前, 開始後5~10分目, 灌流再開後5~10分目及び15~20分目に5分毎の³¹P-NMR スペクトルを摘出灌流ラット膀胱標本から採取した。

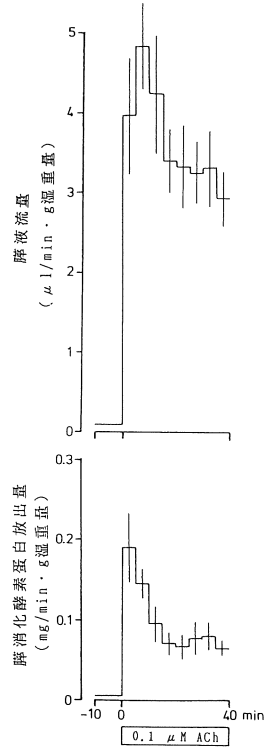


図7 0.1 μM Acetylcholine 刺激によって引き起こされる膵外分泌反応の経時的変化

0.1 μM Acetylcholine (ACh) によって刺激された摘出灌流ラット膀胱標本において, 5分間毎に唾液流量と膵消化酵素蛋白放出量を測定した。カラムはAChを含む灌流液で標本を40分間灌流した期間を示す。各値は5例の平均値±標準誤差を示す。

に, 灌流停止前のレベルの約3倍まで増大した。更に Pi の NMR 信号は高磁場側へ 0.13 ppm 移動し, 組織内 pH が灌流停止前に比べて, 0.15 pH unit 低下したことを示した。標本の灌流を再開すると, PCr の NMR 信号は 20 分以内に, その他の磷酸化合物の NMR 信号及び組織内 PH は 10 分以内に灌流停止前の各々のレベルまで回復した (図6)。

低濃度 (0.1 μM) の ACh による刺激は摘出灌流ラット膀胱標本において著明な膵外分泌反応を引き起こした (図7)。単位時間当りの膵消化

酵素放出量は刺激開始後5分以内に刺激前のレベルの25倍まで、また単位時間当りの膵液流量は10分以内に48倍まで増加した(図7)。その後、両者とも減少するが、残りの刺激期間中、前者は刺激前のレベルの約8倍量の反応が、後者は約30分量の反応が持続した(図7)。等濃度のAChで刺激した膵組織の ^{31}P -NMRスペクトルを図8に示した。ACh刺激開始後、PCrのNMR信号は有意ではない($P>0.1$)が、増大する傾向が見られた。またその他の磷酸化合物のNMR信号は、刺激的開始後も変化を示すことなく安定していた。

4. 考察

これまでに多く使用されてきた膵臓の灌流標本では十二指腸が膵組織に付着し且つ血管連絡があるため、膵組織と同時に十二指腸も灌流しなければならなかった^{8),12)}。Kanno¹³⁾はラットを用いて、膵組織から十二指腸に連絡する血管を総て結紮することによって膵組織のみを灌流したが、前腸間膜動脈のみを経由して灌流液を膵組織に流入させたため、組織の僅かな領域(図1の黒色で示した領域)しか灌流できなかった。この時、腹腔動脈に血流支配を受けている領域(全膵組織の $\frac{2}{3}$ 以上の領域)は十分に灌流されず、低酸素状態に陥っていると考えられ、実際に刺激によって得られる外分泌反応量は極端に少ない¹³⁾。今回使用した摘出灌流ラット膵標本では、膵組織と十二指腸との間の血管連絡を断ち、十二指腸を除外し、しかも腹腔動脈に主たる血流支配を受けている膵組織領域のみを灌流することに成功した。摘出灌流ラット膵標本においてAChあるいはCCK-8によって引き起こされる膵外分泌反応は、従来用いられてきた標本⁸⁾における反応に比べて著しく大きい。特にエネルギー依存性の高い膵液の分泌¹⁴⁾は、従来の標本⁸⁾とは比べものにならない程の反応を示した。これ

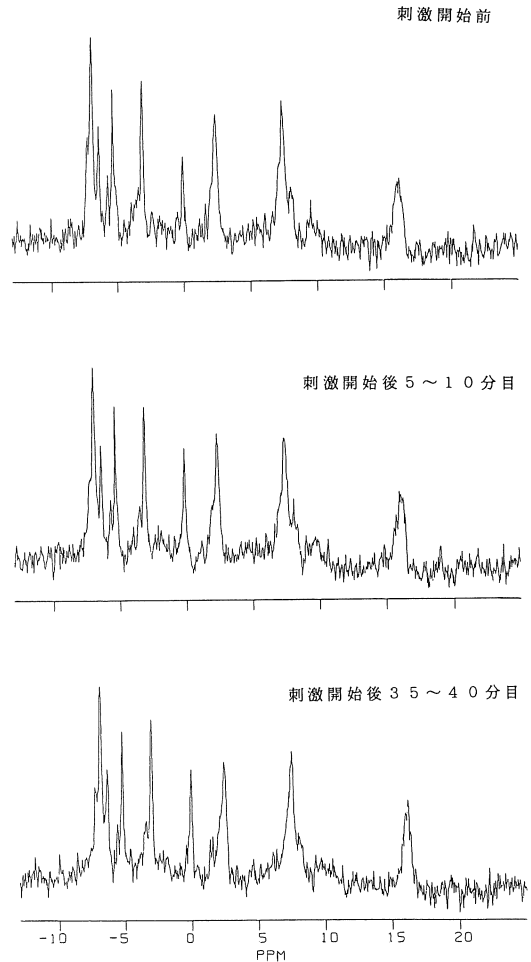


図8 0.1 μM Acetylcholine 刺激時に見られる膵組織の ^{31}P -NMR スペクトル

0.1 μM Acetylcholine で刺激された摘出灌流ラット膵標本で得られた刺激開始前、開始後5~10分目及び35~40分目の ^{31}P -NMR スペクトルを示す。各スペクトルは5例のデータを集積したものである。

らの結果は、今回使用した摘出灌流ラット膵標本示している。Komabayashi ら⁴⁾は、木村ら¹²⁾の方法によって作成した灌流ラット膵標本を0.1 μM AChで刺激すると、 ^{31}P -NMR スペクトル上からPCrとATPのNMR信号が消失したことを報告した。一方、今回の我々の実験では、

摘出灌流ラット膵標本を等濃度 (0.1 μM) の ACh で刺激すると、外分泌反応は著明に亢進するにもかかわらず、高エネルギー磷酸化合物の膵組織内レベルの大きな変化は見られなかった。これらの標本による結果の差は、Komabayashi⁴⁾が用いた標本では組織への酸素供給が十分に本が従来の標本に比べて、十分に酸素を供給されていることを示唆している。また摘出灌流ラット膵標本は膵組織のみからの NMR スペクトルの測定を可能にした上、これまでの標本では考慮せざるを得なかった十二指腸の膵機能におよぼす影響を無視できるようにした。

灌流臓器標本における灌流停止は、組織を窒息状態に陥れ、酸化物磷酸化による ATP 産生の速度を減少させる。今回使用した摘出灌流ラット膵標本でも、灌流停止によって膵組織内の PCr は速かに減少し、それに続いて ATP が徐々に減少する。これらの反応は、膵組織内に Lohmann 反応系が存在していることを示唆しており、膵組織においても PCr は貯蔵型高エネルギー磷酸化合物 (Phosphagen) として、Lohmann 反応系を介して、エネルギー供給の上で重要な役割を担っていると考えられる。PCr 及び ATP が灌流停止処置に対して可逆的な変化を示したことは、今回使用した摘出灌流ラット膵標本が普通の灌流状態では代謝的に安定していることを示唆している。

コリン性作動薬はラット膵組織からの消化酵素放出の増大と共に、膵組織の酸素消費速度を上昇させる¹⁵⁾。これは、分泌反応が亢進している膵外分泌細胞ではミトコンドリアの酸化的磷酸化による ATP 産生の速度が上昇していることを為されていなかったことを示唆する。また、我々が使用した摘出灌流ラット膵標本では、ACh 刺激によって引き起こされた分泌反応で消費された ATP の不足分を補い得る程に、ミトコンドリアの ATP 産生の速度が上昇していると考えられ、膵組織は十分な酸素供給を受けていると考えら

れる。

今回、我々が使用した摘出灌流ラット膵標本で観察された ACh 及び CCK-8 刺激による膵外分泌反応の著明な亢進、灌流停止実験で見られる高エネルギー磷酸化合物の可逆的な変化、また低濃度の ACh 刺激では高エネルギー磷酸化合物のレベルは変化をしないことは、摘出灌流ラット膵標本が代謝的に非常に安定しており、膵における外分泌反応とエネルギー代謝との関連を研究する上で非常に有効な手段であることを示している。

文 献

- 1) T. Kanno, A. Saito and N. Ikei: Dose-dependent effects of acetylcholine stimulating respiratory chain and secretion of isolated perfused rat pancreas. *Biomed. Res.*, 4 : 175-186, 1983.
- 2) I. Shibuya and O. Kanno: Calcium-dependent secretory, and redox response to CCK-8 in isolated perfused rat pancreas. *Am. J. Physiol.*, 248 (Cell Physiol. 17): C 228-C 234, 1985.
- 3) T. Kanno and T. Matsumoto: Influence of extracellular [Ca²⁺] on secretory and redox responses to CCK-8 in perfused rat pancreas. *Am. J. Physiol.*, 251 (Cell Physiol. 20): C 10-C 16, 1986.
- 4) T. Komabayashi, K. Watanabe, T. Izawa, et al.: ³¹P-NMR studies of energy metabolism in rat pancreas treated with trypsin inhibitor. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 53 : 249-252, 1986.
- 5) T. Kanno, T. Matsumoto, J. Kawahara, et al.: Functional discrimination between the regions perfused with blood flow via the superior mesenteric artery and via the coeliac artery in the rat pancreas. *Biomed. Res.*, 6 : 55-58, 1985.
- 6) J.J.H. Ackerman, P.J. Bore, D.G. Gadian, et al.: N.m.r. studies of metabolism in perfused organs. *Phil. Thans. R. Soc. Lond.*, B289 : 425-436, 1980.
- 7) Y. Seo, M. Murakami, H. Watari, et al.: Intracellular pH detection by a ³¹P-NMR tech-

- nique. The second dissociation constant of phosphoric acid in biological system. *J. Biochem.* 94 : 729-734, 1983.
- 8) T. Kanno, T. Suga and M. Yamamoto : Effects of oxygen supply on electrical and secretory responses of humorally stimulated acinar cells in isolated rat pancreas. *Jap. J. Physiol.*, 26 : 101-115, 1976.
- 9) C.T. Burt, T. Glonek and M. Bárány : Analysis of phosphate metabolites, the intracellular pH, and the state of adenosine triphosphate in intact muscle by phosphorus nuclear magnetic resonance. *J. Biol. Chem.*, 251 : 2584-2591, 1976.
- 10) D.K. Hoult, S.J.W. Busby, D.G. Gadian, et al.: Observation of tissue metabolites using ^{31}P nuclear magnetic resonance. *Nature*, 252 : 285-287, 1974.
- 11) G. Navon, S. Ogawa, R.G. Shulman, et al.: ^{31}P nuclear magnetic resonance studies of Ehrlich ascites tumor cells. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S. A.*, 74 : 87-91, 1977.
- 12) 木村文男, 下沢純子, 齊藤文子, 他 : Insulin 分泌研究のための新しい膝灌流方法. *日薬理誌 (Folia Pharmacol. Japon.)*, 77 : 213-220, 1981.
- 13) T. Kanno : The electrogenic sodium pump in the hyperpolarizing and secretory effects of pancreozymin in the pancreatic acinar cell. *J. Physiol. (London)*, 245 : 559-616, 1975.
- 14) S.L. Bonting, J.J.H.H.M. De Pont and J.W.C.M. Jansen : The role of sodium ions in pancreatic fluid secretion in the rabbit. *J. Physiol. (London)*, 309 : 533-546, 1980.
- 115) H. Bauduin, M. Colin and J.E. Dumont : Energy sources for protein synthesis and enzymatic secretion in rat pancreas in vitro. *Biochim. Biophys. Acta*, 174 : 722-733, 1969.