
原 著

長時間ペリフュージョン法を用いた、膵遊離腺房細胞からの
アミラーゼ分泌機構の研究
(インキュベーション法の残余刺激効果との比較検討)

島根県立中央病院地域医療科¹⁾, 石塚医院 (UTMB 客員教授)²⁾, 京都大学第一外科³⁾,
香川医科大学第一内科⁴⁾, テキサス大学ガルベストン分校 (UTMB) 外科⁵⁾
香川 勇¹⁾, 石塚 尋朗²⁾, 細谷 亮³⁾, 今村 正之³⁾,
佐藤 誠⁴⁾, J. C. Thompson⁵⁾

〔原稿受付：平成12年8月23日〕

The Long Term Perifusion System on Amylase Release From Dispersed
Acinar Cells—Comparative Study with Direct Incubation
Technique and Residual Stimulation

ISAMU KAGAWA¹⁾, JINROU ISHIZUKA²⁾, RYO HOSOTANI³⁾, MASAYUKI IMAMURA³⁾,
MAKOTO SATO⁴⁾ and JAMES C. THOMPSON⁵⁾

¹⁾ Department of General Medicine, Shimane Prefectural Central Hospital

²⁾ Ishizuka Clinic (Visiting Professor of University of Texas Medical Branch at Galveston)

³⁾ Department of Surgery and Surgical Basic Science, Graduate School of Medicine, Kyoto University

⁴⁾ First Department of Internal Medicine, Kagawa Medical School

⁵⁾ Department of Surgery, University of Texas Medical Branch at Galveston

We have modified the perfused guinea pig pancreatic acini system in order to obtain reproducible results in repeated secretagogue stimulation. No signs of tachyphylaxis were observed when cholecystokinin-8 (CCK-8) was administered as short pulse for 5 minutes and the interval between administrations were kept more than 90 minutes. Maximal amylase response was obtained at 10^{-8} M of CCK-8 and a supra-maximal significant inhibition on amylase release was observed with higher doses of CCK-8. Twenty minutes stimulation with 10^{-8} M of CCK-8 showed a biphasic response; while, 5 minutes stimulation showed a mono-phasic pattern. The results suggest that amylase response was highly influenced not only by the concentration of the secretagogue but also the duration of the stimulation in this perfusion system. The mechanism of this phenomenon may be comprehensive by the double-ligand-complex theory based on low and high affinity site on cell surface receptors.

Present address: Nakamura Clinic, Nakamura 48, Oki district, Shimane Prefecture, Japan

Key words: CCK-8, Perifusion system, Residual stimulation

索引用語: CCK-8, ペリフュージョン法, 残余刺激効果.

要 旨

ペリフュージョン法を用いて、長時間・反復刺激実験を行い、CCK-8 による膵腺房細胞からのアミラーゼ分泌機構を検討した。分画採取間隔を10分、CCK-8 の刺激時間を5分間と設定すると、最大効果は 10^{-8} M で得られ、それ以上高濃度ではピーク値の低下とともにピーク到達時間が遅延して反応曲線は右方偏位した。分画採取間隔を2分に設定してアミラーゼ値の細かい変化を見たところ、5分間刺激では濃度に拘わりなく一相性反応を示したが、20分間刺激の場合、 10^{-8} M 濃度では二相性反応が見られた。これらの現象には、インキュベーション法で確認されている残余刺激効果が関与していることが示唆された。

緒 言

外分泌機能を損なわず膵腺房細胞を遊離する技術の確立^{1,2)}は、CCK-8 受容体の研究に多大の知見をもたらした。近年、分子生物学的手法により、新たに脳を始めとする他臓器にも CCK-8 受容体が証明され、それらが体系的に分類されるにつれ、膵腺房細胞を用いた研究成果はやや古典的概念となりつつある。しかし、一度刺激した膵腺房細胞を十分に洗浄し無刺激状態で放置したにもかかわらずアミラーゼ分泌がみられる、いわゆる残余刺激効果³⁻⁵⁾をとってみても、未だその発現機序が十分に解明されているとはいえない。この興味ある現象は、親和性の異なる2種類の受容体により発現すると考えられているが⁴⁾、その根拠は主にインキュベーション法実験に基づくものである。この方法は再現性には優れているが、あくまでも静的実験法の範囲にとどまっている。

一方、ペリフュージョン法は、インキュベーション法のような静的手法と異なり、同じ細胞の反応を動的に観察できる特性を持っている。ペリフュージョン法は Burr et al.⁶⁾の膵組織片を用いたインスリン分泌機構の研究に始まり、その後、膵遊離腺房細胞を利用して膵外分泌機構の各種研究に応用されてきた。しかしペリフュージョン法では desensitization や細胞内外のカルシウムがアミラーゼ分泌パターンに影響を及ぼすことも報告されている⁷⁾。また他の組織を用いた実験でも、刺激を繰り返すと基線が上昇し、特に短い間隔で高濃度の刺激を与える場合、それが著しくなり Edvardson らはこれを selfpotentiating effect と呼んでいる⁸⁾。これらはむしろ、実験モデルとしての、ペリフ

ュージョン法の信頼性を損ねる要因となっている。実際、先に我々が報告した長時間反復刺激実験⁹⁾においても、再現性を得るための適切な条件設定が重要な課題であった。

しかし一方では、灌流液の採取間隔や CCK-8 刺激時間の設定を変えると、反応曲線に特徴的な変化がみられることも判明した。これには、インキュベーション法で報告されている残余刺激効果が関与していることが示唆された。以上のようなことを踏まえ、次のような項目について検討した。

①. 腺房細胞を長時間反復刺激をしても、十分な再現性が得られる適切な実験条件

②. ペリフュージョン実験では、隔室の中に納めた腺房細胞を、一定速度で流れる灌流液で維持している。間歇的に CCK-8 を回路内に投与して刺激するため、細胞の刺激と洗浄を厳密に分けることはできない。刺激効果と洗浄効果が共存するペリフュージョン法に、残余刺激効果が発現する様子

③. CCK-8 の阻害物質の投与による、反応曲線への影響

材料および実験方法

1. 材料と方法

(1) 遊離腺房細胞の作成

腺房細胞の作成は Peikin ら²⁾の方法に準じて行った。実験動物として 150-200 g のモルモットを使用した。精製コラゲナーゼ (Cooper Biomedical Co., Worthington, Freehold, NJ) とトリプシンインヒビターを加えた標準液 5 ml を膵に注射膨化させた後、残った液とともにプラスチック容器に収め、37°C の恒温槽中で毎分160回の震盪を行った。10分毎にコラゲナーゼを含む新しい液 5 ml と交換し、同様の操作を3回繰り返した。ついで30秒間、容器を手で強く震盪させ膵組織を大まかに破碎した。更に孔径 1.25 mm と 1.0 mm のピペットを用い、各々10回ピペッティング操作を行い組織の細分化を行った。上清液を捨て、BSA 液で洗浄し 1000/rpm で10秒間遠心分離の操作を3回繰り返した。このようにして得られた遊離腺房細胞を実験に供した。細胞の viability の検討は trypan blue 染色法により灌流実験の前後で確認を行ったが、有意差はみとめていない。基礎実験の段階で電子顕微鏡でも観察を行っているが10数時間の長時間実験に耐えることを確認している。

(2) ペリフュージョン装置 (Fig. 1)

ペリフュージョン手技は Edwarson, Gilbert⁸⁾ の変法を用いたが、ペリフュージョン装置は Collins の方法¹⁰⁾ に準じ作成した。腺房細胞を収容する隔室は、Fig. 1 に示すようにディスポ注射器を利用し膜孔径70 ミクロンのポリエチレンの円板から、コルク栓穴開け器を用いて注射シリンジの内径に合わせた円盤を4枚作成する。そのうち2枚は少し口径の小さい穴開け器で同心円状に打ち抜きドーナツ状円盤とする。1枚の円盤を底に敷き、それに2枚のドーナツ円盤を重ねて側壁とした。一実験でこれを6個用意し、スタンドに立て、調製した acini を 20 ml の灌流液の中に移し、スターラで攪拌しながら、ビベットで各注射器に 3 ml ずつ分配する。グラスフィルターを通して溶液を自然落下させながら、4枚目の円盤で蓋をして acini

を封入するという原始的な方法を用いている。基礎実験の段階で各 chamber の蛋白量を測定比較したが大差はなく、操作がルーチン化され良質な acini が得られた場合、各隔室で反応曲線の形や値に差をみとめていない。隔室部分は 37°C の恒温槽に留置した。

(3) 灌流液と刺激物質

灌流液は Medium 199 (+HEPES) (Gibco, Grand Island, NY) に 0.1% の BSA と 0.1% のゲンタマイシンを添加して用いた。同じ灌流液に各種濃度の刺激物質を溶解し試料とした。灌流液の収容槽は刺激物質を含まない大容量のものと、各濃度の刺激資料を含むものを用意し、マグネットスターラで攪拌しながら酸素吸入を行った。BSA を添加しているが、酸素パルプの微調節で泡立ちのトラブルはなかった。ベリスタルティックポンプを用いて定速灌流を行い、回路の途中

Perifusion System

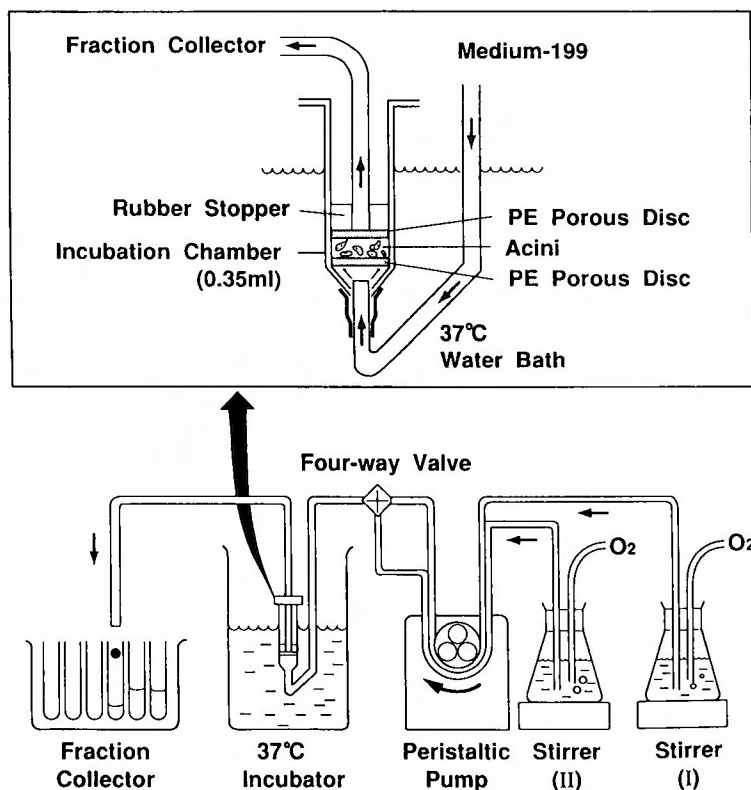


Fig. 1 Diagrammatic representation of perifusion setup. Oxygenated medium 199 in a flask was placed on stirrer (I), while test substance dissolved in medium 199 was placed on stirrer (II). Four way valve was used to allow either medium 199 alone or medium 199 with test substance through perifusion chamber.

に設置した四方向バルブ (Hamilton Company, Reno, NV) で刺激物質の投与と中止の切り替えを行った。隔室を通過する灌流液の方向は下から上とし、液の採取はフラクシオンコレクターを用いて経時的に行った。

(4) アミラーゼ測定と表示

アミラーゼ濃度の測定には Phadebas 試薬 (Pharmacia Diagnostics, Piscataway, NJ) を用いた。それぞれの隔室ごとに得られた、一連の測定実測値の最大値を 100 として、各フラクシオンをパーセント濃度で表した。

2. 実験 1 (アミラーゼ分泌の自然経過)

実験 2 (灌流液の速度の影響)

実験 3 (Dose Response Curve)

実験 4 (刺激時間と分画採取間隔)

実験 5 (CCK-8 の拮抗阻害剤の影響)

3. 統計

すべての実験結果は平均値 $\pm$ SEM で表示し、統計は unpaired t-test を用いて、5% 以下の危険率をもって有意とした。

結 果

1. 実験 1 (アミラーゼ分泌の自然経過)

Fig. 2 には、腺房細胞を無刺激で放置した時のアミ

ラーゼ分泌の自然経過を示している。腺房細胞を作成後ただちに灌流を開始したが、灌流速度毎分 0.2 ml の条件下では、最初高値であるアミラーゼの値は約 1 時間で急速に低下し、2 時間後には安定した基線が得られた。このことから灌流開始 150 分後から刺激実験を開始することにした。灌流開始後 150 分と十数時間後に同等刺激を行って両者の反応の比較を行っているが、有意差はみとめていない。図には示していないが、約 20 時間を経過すると大幅に基線が上昇するため、これを実験時間の限界とした。

2. 実験 2 (灌流速度の影響)

灌流液の速度を変えた場合の影響について検討した。Fig. 3 には、ボンベシン (BBS) を用いた基礎実験の結果を示している。低速灌流では刺激の繰り返しに伴って基線が上昇する傾向がみられた。このことから、一連の実験は灌流速度を毎分 0.2 ml に設定して行った。

3. 実験 3 (Dose response curve)

各種濃度の CCK-8 を間欠的に 5 分間投与して dose response curve を求めた (Fig. 4)。同一検体を使用して約 15 時間かけた実験結果である。 10^{-8} M 濃度以下ではピーク値は濃度に比例して増加したが、 10^{-8} M 濃度で最大ピークとなった後、ピーク値は逆に低下した。

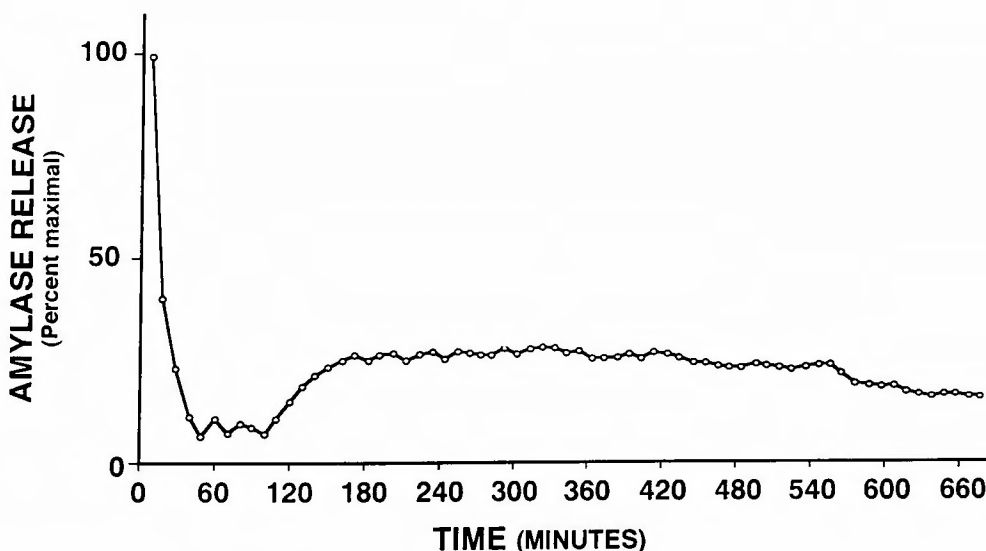


Fig. 2 Basal amylase release from perfused pancreatic acini. Rapid fall of amylase level was observed within 2 hours after setup of acini in the chamber.

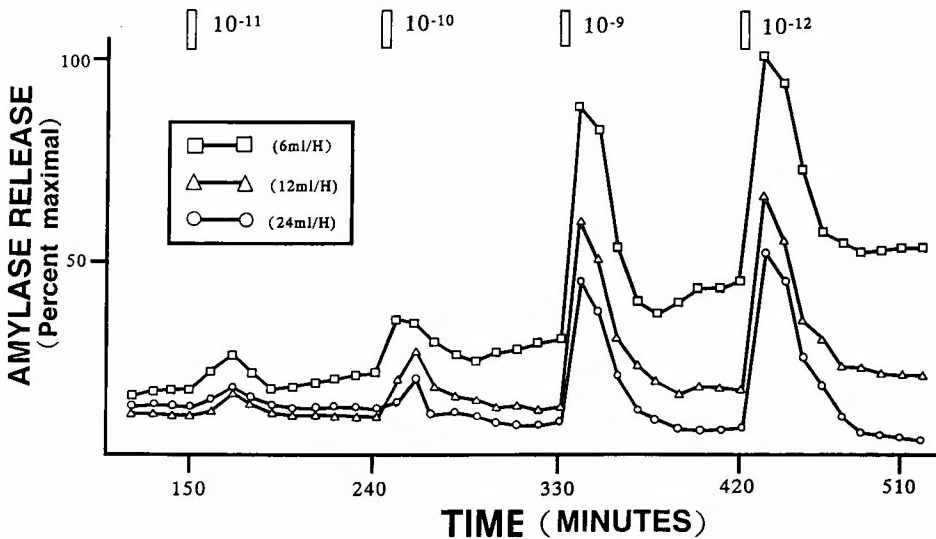


Fig. 3 Effect of perfusate flow rate. Data of bombesin are shown. At the flow rate of 6 ml/h, basal line showed uphill course; while it showed downhill course at the rate of 24 ml/h. We adopted 12 ml/h flow rate in our experiments.

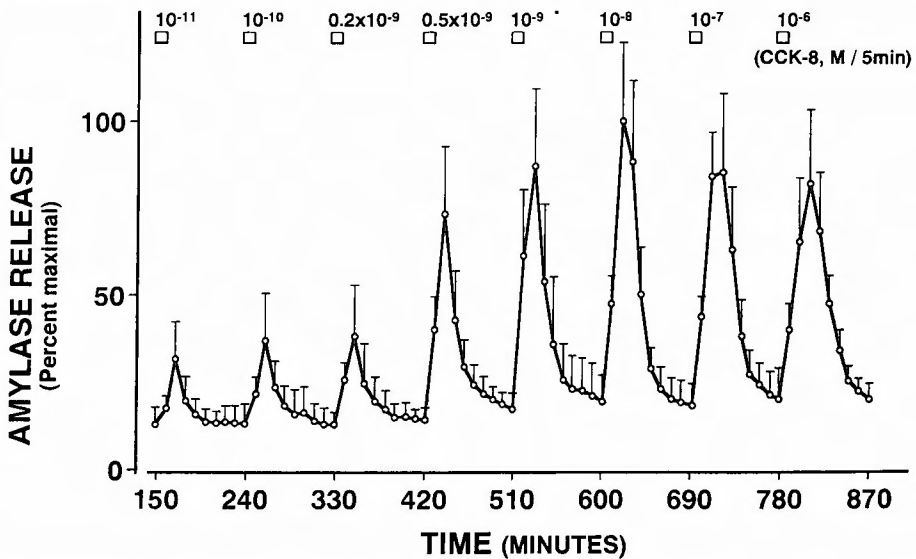


Fig. 4 Amylase release from pancreatic acini in response to increasing doses of CCK-8. CCK-8 was given at the doses shown, as 5-min pulse, at the time points shown by the boxes.

4. 実験4 (刺激時間と分画採取間隔)

Fig. 5 に示すように、 10^{-10} M・ 10^{-8} M・ 10^{-6} M 濃度の3段階の CCK-8 を投与し、2分間の液採取で細かい変化をみた。5分 (短時間) 刺激では各濃度とも一相性反応曲線を示した。しかし20分 (長時間) 刺激では、 10^{-10} M 濃度 (低濃度) で一相性の台形を示

したのに対し、 10^{-8} M 濃度 (最大有効値) で諸家の報告にもある二相性の反応曲線が現れ、 10^{-6} M 濃度 (高濃度) では一度上昇したアミラーゼ値は基底値まで復帰しなかった。

5. 実験5 (CCK-8 の拮抗阻害剤の影響)

Fig. 6 に示すように、長時間ペリフュージョン法の

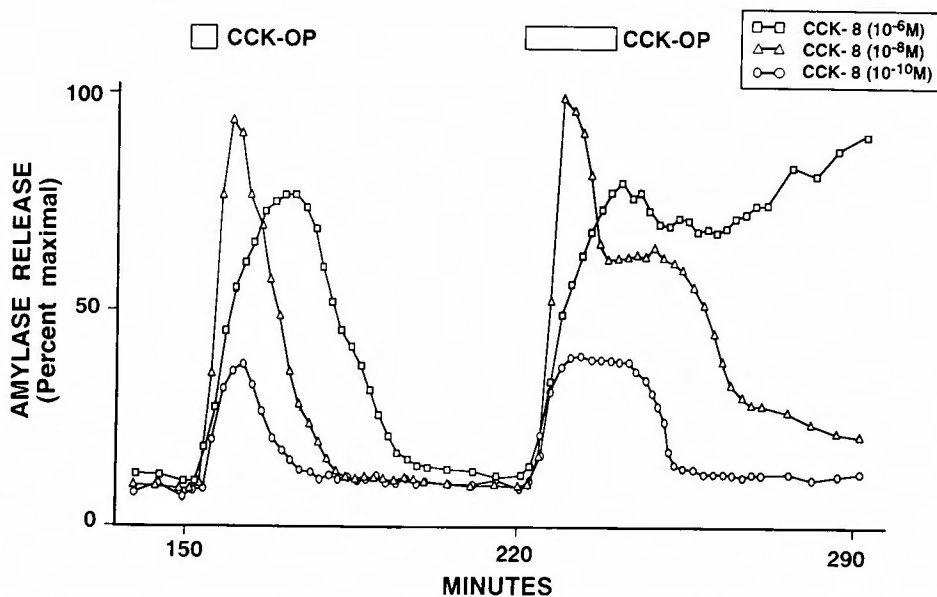


Fig. 5 Effect of duration of stimulation. The 20-minutes stimulation induced biphasic response pattern with maximal effective dose (10^{-8} M CCK-8); while the 5-min stimulation induced monophasic response.

応用として、CCK-8 の拮抗阻害剤であるアスペルリシンとプログルマイドの効果を調べた。最初の CCK-8 単独刺激の反応曲線を基準とすると、アスペルリシンにより濃度に比例して分泌抑制を受けている。再び

CCK-8 単独刺激を行うと、最初とほぼ同等の反応が見られたが、プログルマイド投与で再び著明な分泌抑制を受けている。

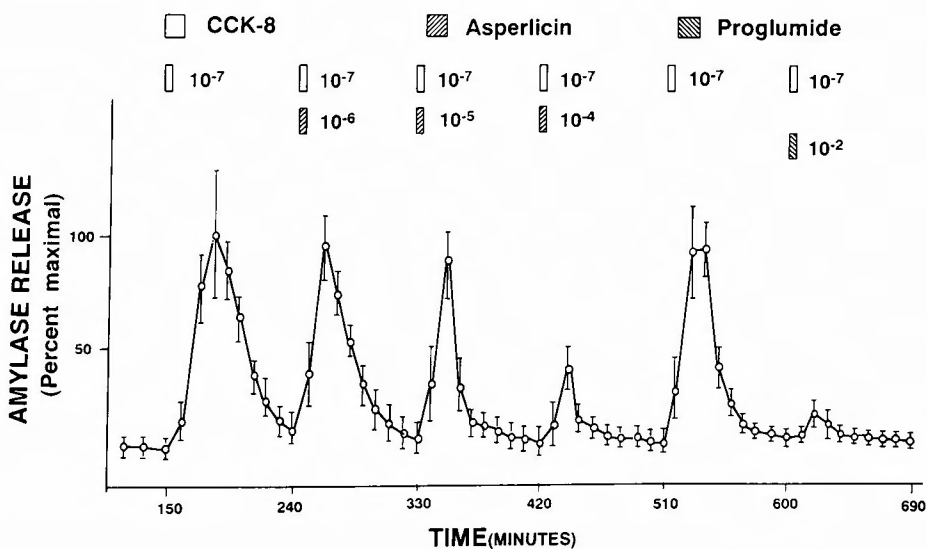


Fig. 6 Inhibitory effects of Asperlicin and Proglumide. The amylase response to 10^{-7} M CCK-8 was significantly inhibited in a dose dependent manner by Asperlicin. Initial response was recovered even after exposure to high dose of Asperlicin. Maximal inhibition was obtained with 10^{-2} M Proglumide.

考 察

我々は、省力化を兼ねて、一回の実験で刺激を数度繰り返す長時間実験を試みたが、同時にデータの再現性や信頼性を高める工夫も行った。ペリフュージョンの回路側に関する条件として灌流速度、刺激時間、刺激間隔について検討した。実験結果によると、それまで一般的に行われていた方法よりも低速度（毎分 0.2 ml）で灌流を行い、刺激を 5 分間という短時間にし、各刺激の間を 90 分と広く取れば、 10^{-6} M 濃度以下の範囲では基線が安定し、実験結果に再現性が得られることが確認された。

Frandsen ら¹¹⁾ は、ペリフュージョン法では刺激効果は 20 分程度しか持続しないと報告をしている。しかし我々の実験では、反応の消退も含めると 1 時間前後の持続が認められた。これは、Frandsen は 60 ml/h と高い灌流速度を採用しているのに対して、我々は 12 ml/h と低速度を採用した違いによると考えている。

Fig. 4 に示した Dose response curve については、各濃度曲線の細部を比較すると、 10^{-8} M 濃度（最大有効値）を境に二つのタイプに分かれることが判った。

すなわち Fig. 7 に示すように、低濃度では 20 分でピークに達する急峻な曲線を示すが、 10^{-6} M 濃度（最大有効値）を境として、ピーク値が低下するばかりでなくピーク到達時間も延長するため、反応曲線は全体として右方偏位をしている。この右方偏位は、a) アミラーゼ分泌の遷延、b) ピーク値の低下、c) ピーク到達時間の延長、の 3 つの要素が複合したものと考えられる。いずれも過剰な CCK-8 より増加する「レセプター①・②複数」結合や「レセプター②単独」結合により発現したと解釈が可能である。Fig. 11 は、Collins ら¹⁾ の仮説 (Fig. 9) で、右方偏位の機序を説明したものである。

最大効果値以上の CCK-8 で刺激を受けると、CCK-8 は過飽和になるため「レセプター①・②複数」や「レセプター②単独」結合の割合が増加する。CCK-8 の刺激が中止されると、結合解離の早い「レセプター①単独」や「レセプター①・②複数」結合から CCK-8 は容易に解離してウォッシュアウトされる。しかし、解離に時間がかかる「レセプター②単独」結合は長時間残存し、それがピークの到達時間の延長やアミラーゼ分泌の遷延に反映されると考えている。ピーク値が低下することについては「レセプター①・

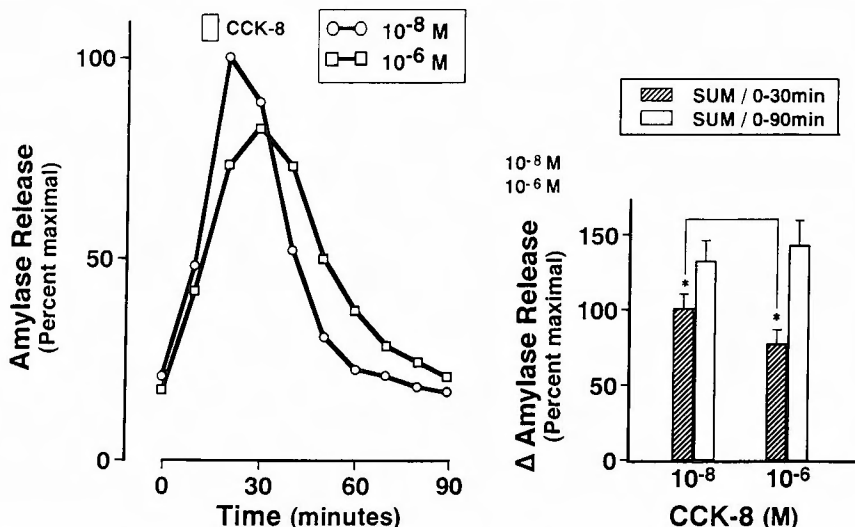


Fig. 7 Rightside shift of response curve in 10^{-6} M stimulation. (Left) The highest peak response was obtained in 10^{-8} M at 20 minutes after the onset of stimulation. In 10^{-6} M response curve, peak response time was delayed by 10 minutes. (Right) Hatched bar showed total amylase released during 30 minutes. The amylase release by 10^{-6} M CCK-8 is significantly reduced as compared with that by 10^{-8} M in 30-min fractions.

* $P < 0.05$ vs 90-min fraction.

②複数」結合の方が「レセプター単独」結合よりアミラーゼ分泌力が弱いという特性に起因している。過剰な CCK-8 で「レセプター①・②複数」結合の全体に占める割合が増加するため、ピーク値が低下したと解釈している。

拮抗阻害剤を用いた Fig. 6 の反応曲線でも、細部を比較すると、CCK-8 単独ではピーク到達は30分であるが、アスペルリシンやプログルマイドの阻害剤を併用するとピーク値は低下するばかりでなく、その到達時間も20分と短縮し反応曲線は全体に左方偏位している。この現象も、上述のように複数の受容体により発現したものと解釈している。

当初、Dose response curve (Fig. 4) で示すように、各濃度いずれも一相性の反応曲線となり、諸家の報告^{7,11)}にある二相性曲線を観察できなかった。灌流液を10分間隔で採取するため、アミラーゼ値の大きな変動があっても短時間内に起きると、平均化されてしまってピークが消えて一相性曲線になってしまったと推論した。そのため灌流液採取間隔を2分間隔として細かくアミラーゼ値の変動を追うとともに、刺激時間の長さについても5分間と20分間の2種類を設定して、それぞれ比較した。Fig. 5 に示すように、5分(短時間)刺激では各濃度とも一相性反応曲線を示すに過ぎなかったが、20分(長時間)刺激の場合 10^{-10} M 濃度では一相性の台形となり、 10^{-8} M 濃度(最大有効

値)で諸家の報告にもある二相性の反応曲線が現れ、 10^{-6} M 濃度では一度上昇したアミラーゼ値は基底値まで復帰しなかった。このように刺激濃度は同じでも、刺激時間の長さによりアミラーゼ変動パターンに変化が現れることも判明した。この現象についても、前述の Collins ら⁴⁾の仮説に基づき解釈を試みた (Fig. 10)。

5分間の短時間刺激では、まず「レセプター①単独」結合による急峻なピークが出現するが、灌流液による洗浄作用で「レセプター①単独」結合は簡単に解離し、急速にアミラーゼ分泌は低下する。短時間刺激のため、「レセプター①・②複数」や「レセプター②単独」結合の発現は不十分で、反応曲線に影響は現れてこない。20分刺激で見られる二相性曲線の場合、最初の急峻なピークは「レセプター①単独」結合によるものであるが、これに続くプラトー部分には「レセプター①・②複数」結合によるアミラーゼ分泌力の低下や、「レセプター②単独」結合の解離遅延という特性が反映されていると解釈している。

我々の実験から得られた最大効果値を incubation 法や isolated pancreas 法のデータと比較しても、厳密な一致は見られない。Fig. 8 はペリフュージョン法で得られた30分と90分間分泌量を基に作成した dose response curve である。Collins ら⁴⁾のデータでは、インキュベーション法で求めた CCK-8 の最大効果値は、通常刺激効果では 0.3×10^{-9} M、残余刺激効果の

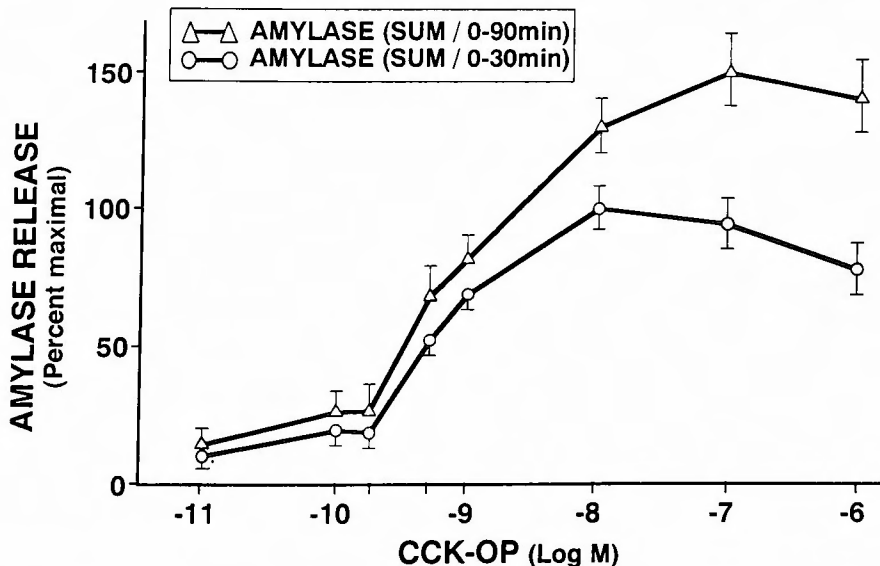


Fig. 8 Dose response curve of CCK-8. ○—○ showed dose response curve of CCK-8 based on the summation of amylase released during 30 minutes. In our perfusion system, maximal effective dose is found to be around 10^{-8} M concentration, which is greater than that in the established incubation method.

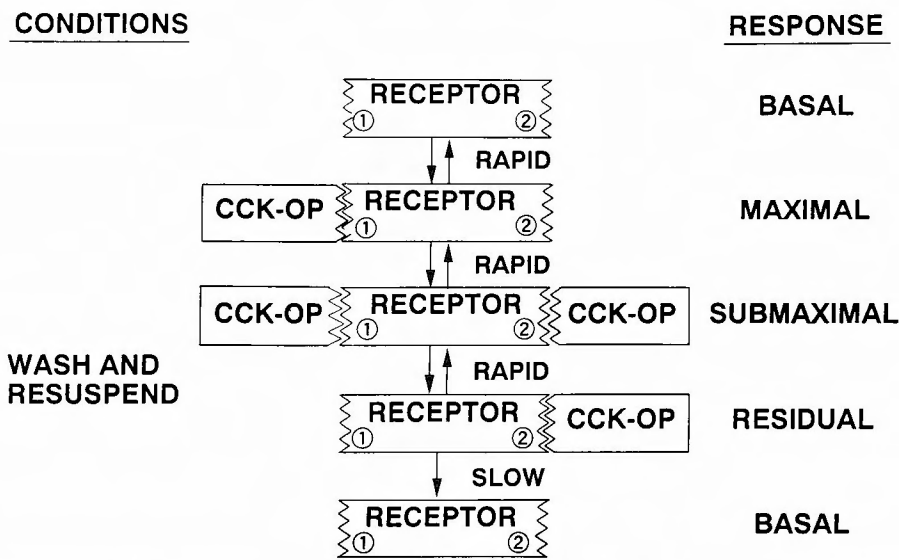


Fig. 9 Illustration of double ligand complex theory by Collins⁴⁾ and coworkers. They proposed the following conditions: 1) site 1 of CCK-receptor has a high affinity, and occupation of this site is prerequisite for occupation of site 2. 2) the dissociation of CCK-8 from site 1 is rapid; and 3) the dissociation of CCK-8 from site 2 is rapid when site 1 is occupied but is slow when site 1 is vacant, and 4) double-ligand-complex induces sub-maximal efficacy in comparison to the single-ligand-receptor complex.

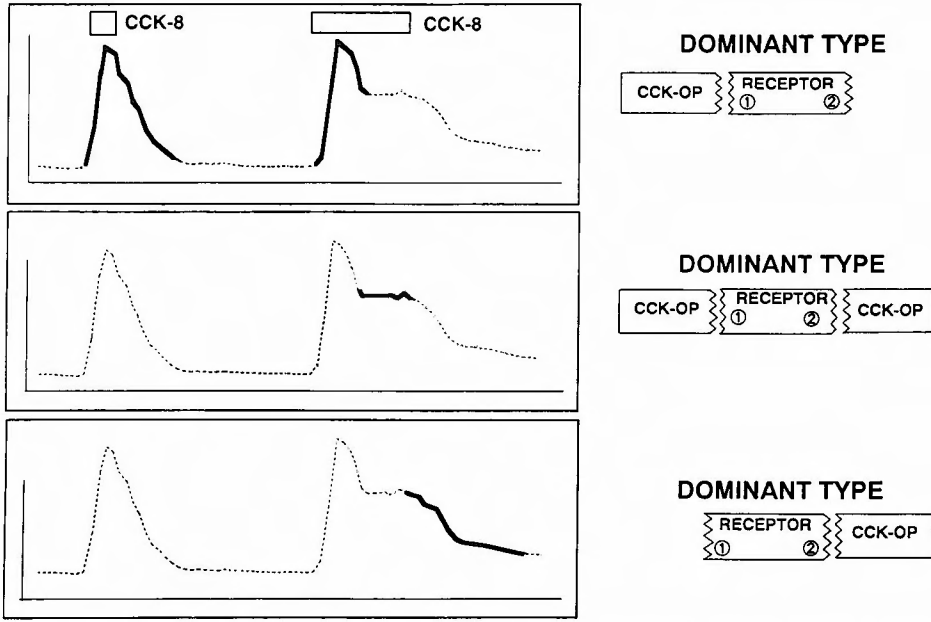


Fig. 10 Mono/biphasic pattern of response curve. Soon after the start of stimulation, site 1-ligand-complex is dominant, however, longer exposure of acinar cells to excessive CCK-8 causes emergence of double-ligand and site 2-ligand-complex. In the perfusion system, these different types of complex exist at the same time. The transient ratio of complex may cause different changing pattern in response curve. The length of exposure time of 5 and 20 minutes stimulation resulted in mono and biphasic patterns, respectively.

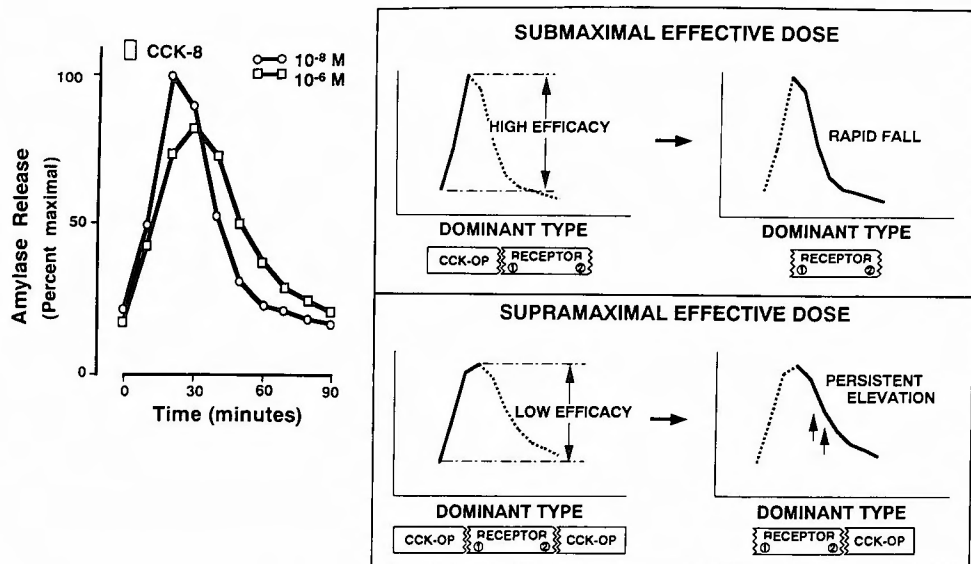


Fig. 11 Rightside shift of response curve. In the supramaximal stimulation, double-ligand-complexes are dominant because of excessive CCK-8. These complexes cause low efficacy following the reduction of peak value and rightside shift of response curve.

それは 10^{-7} M である。我々のデータの30分間分泌量から得られた Dose response curve の最大効果値は 10^{-8} M 濃度で、通常刺激と残余刺激の中間に位置している。ペリフュージョン法では刺激効果と洗浄効果が共存するため、残余刺激効果の影響が現れたと考えている。

ペリフュージョン法では、すべての細胞が均一に CCK-8 に曝露されていると仮定すれば「レセプター①単独」結合だけが過不足なく全体の細胞に行き渡った時点で刺激を中止すれば、急峻なピークを伴った一相性の曲線が得られる筈である。最大のピーク値を持ち、且つ一相性曲線が得られた 10^{-8} M 濃度・5分間刺激は、その条件に最も当てはまる設定であったと思われる。

このように、ペリフュージョン法により最大効果値以上で観察された右方偏位や二相性曲線は、インキュベーション法で明確に区別されている通常刺激効果と残余刺激効果が複合して発現したものと考えられる。刺激と洗浄が共存するペリフュージョン法にして初めて観察できたものであり、インキュベーション法のような静的実験では確認できなかった現象といえる。

一方、この実験系では、遊離腺房細胞の長時間保存の問題がある。我々は、常温下で半閉鎖回路を用いて実験を行ったが、約15時間を過ぎると灌流液の混濁が

みられた。この経験から感染には細心の注意が必要で、使用する回路や容器を厳密に滅菌し、閉鎖回路にすることが望ましいと思われる。腺房細胞を収める隔室部分は 37°C 恒温槽で支持する必要があるが、回路全体を低温室に保存する工夫も必要であろう。我々は灌流液に抗生物質を添加して使用したが、他の添加物、例えば BSA 等による細菌感染の問題も無視出来ないと考えている。

結 語

従来行われてきたペリフュージョン法に工夫を加え、適切な条件下で CCK-8 の反復刺激実験を試みた。刺激濃度や刺激時間の変化が、膵腺房細胞のアミラーゼ分泌に及ぼす効果について検討を行った。濃度を変えると反応曲線が左右に偏位することや、刺激時間を延長させることで二相性反応曲線が得られることも明らかになった。これらの現象は、インキュベーション法で推論されている親和性の異なる受容体の相互作用により発現したものと考えられる。この長時間・反復ペリフュージョン法は複数受容体を持つ各種細胞の作用機序の解明に有益であると考えている。

追 記

本研究の要旨は第27回日本膵臓学会大会で報告した。

文 献

- 1) Williams JA, Korc M, Dormer RL: Action of secretagogues on a new preparation of functionally intact, isolated pancreatic acini. *Am J Physiol* 235: E517-E524, 1978.
- 2) Peikin SR, Rottman AJ, Gardner JD, et al: Kinetics of amylase release by dispersed acini prepared from guinea pig pancreas. *Am J Physiol* 235: E743-E749, 1978.
- 3) Jensen RT, Lemp GF, Gardner JD: Interaction of cholecystokinin with specific membrane receptors on pancreatic acinar cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 2079-2083, 1980.
- 4) Collins SM, Jensen RT, Gardner JD, et al: Cholecystokinin-induced persistent stimulation of enzyme secretion from pancreatic acini. *Am J Physiol* 240: G459-G465, 1981.
- 5) Sankaran H, Goldfine ID, Williams JA: Relationship of cholecystokinin receptor binding to regulation of biological functions in pancreatic acini. *Am J Physiol* 242: G250-G257, 1982.
- 6) Burr IM, Balant L, Renold AE: Perfusion of rat pancreatic tissue in vitro: Substrate modification of theophylline-induced biphasic insulin release. *J Clin Invest* 49: 2097-2105, 1970.
- 7) Imamura K, Wakasugi H, Shinozaki H: Dynamic analysis of secretagogue-induced amylase secretion from rat pancreatic acini studied by perfusion system. *Jpn J Physiol* 33: 687-698, 1981.
- 8) Edwardson JA, Gilbert D: Application of an in-vitro perfusion technique to studies of luteinizing hormone release by rat anterior hemi-pituitaries: Self-potential by luteinizing hormone releasing hormone. *J Endocrinol* 68: 197-207, 1976.
- 9) Singh P, Asada I, Thompson JC, et al: Somatostatin inhibits VIP-stimulated amylase release from perfused guinea pig pancreatic acini. *Am J Physiol* 254: G217-G223, 1988.
- 10) Collins TJ: The use of perfused female mice pituitary fragments to study luteinizing hormone (LH) secretion. *Biol Reprod* 32: 161.
- 11) Frandsen EK: Amylase release from perfused immobilized acini from rat pancreas. In: *Biology of Normal and Cancerous Exocrine Pancreatic Cells*, edited by Ribel A, Pradayrol L, and Susini C. New York: Elsevier/North-Holland, 1980, p. 27-37. (INSERM Symp. No. 15)