

新 制
薬
121

京大附図

# 胃，膵におけるペプチド性医薬品の 分布，代謝動態に関する研究

岩 川 精 吾

胃，膵におけるペプチド性医薬品の  
分布，代謝動態に関する研究

岩 川 精 吾

# 目 次

## 総論の部

緒 言 .....	1
第 1 章 薬物の胃, 膵内挙動解析を目的とする臓器灌流法の確立 .....	2
第 1 節 ラット摘出胃灌流法の検討 .....	3
(1) 灌流実験法 .....	3
(2) 酸分泌制御薬物に対する反応性 .....	5
(3) 考 察 .....	10
第 2 節 ラット摘出膵灌流法の検討 .....	12
(1) 灌流実験法 .....	12
(2) 膵外分泌制御薬物に対する反応性 .....	14
(3) 考 察 .....	16
第 2 章 胃における secretin, elcatonin, aprotinin の挙動 .....	17
第 1 節 secretin, elcatonin, aprotinin の胃内代謝 .....	18
(1) secretin の代謝 .....	19
(2) elcatonin の代謝 .....	19
(3) aprotinin の代謝 .....	21
(4) 考 察 .....	26
第 2 節 secretin, elcatonin, aprotinin の胃内分布 .....	27
(1) secretin の分布 .....	27
(2) elcatonin の分布 .....	29
(3) aprotinin の分布 .....	30
(4) 考 察 .....	31
第 3 章 膵における secretin, elcatonin, aprotinin の挙動 .....	33
第 1 節 secretin, elcatonin, aprotinin の膵内代謝 .....	33
(1) secretin の代謝 .....	33
(2) elcatonin の代謝 .....	36
(3) aprotinin の代謝 .....	42
(4) 考 察 .....	45

第2節	secretin, elcatonin, aprotininの膵内分布	46
(1)	secretinの分布	46
(2)	elcatoninの分布	47
(3)	aprotininの分布	49
(4)	考 察	50
第4章	胃, 膵における secretinの特異的結合	51
第1節	secretinの胃における特異的結合	51
(1)	胃灌流法による結合特性の解析	51
(2)	細胞膜分画を用いた結合特性の解析	60
(3)	考 察	68
第2節	secretinの膵における特異的結合	69
(1)	膵灌流法による結合特性の解析	71
(2)	細胞膜分画を用いた結合特性の解析	77
(3)	考 察	85
結 論		87
謝 辞		90
実験の部		91
第1章	実験の部	91
第2章	実験の部	94
第3章	実験の部	96
第4章	実験の部	98
引用文献		102

## 緒 言

薬物の体内動態は薬効と密接に関連しており、それらを考慮した薬物治療が普及しつつある。特に標的組織における薬物挙動を正確に把握することは有効、安全な薬物療法を設定する上で重要な指針となる。

微量で作用を発現する生理活性ペプチドの臨床適用が近年着実に増大し、診断並びに治療薬としてペプチド性医薬品は重要な役割を果たしている。その体内動態に関する知見も集積しつつあり、<sup>1)</sup>体内から速やかに消失することがその挙動特性として認識されている。またその代謝は、蛋白分解酵素によるペプチド結合の解裂が主要な不活性化過程とされ、従来の薬物代謝酵素の関与した酸化、抱合反応等に基づくものと異なることが知られている。しかし肝、腎以外の臓器、組織におけるペプチド性医薬品の分布、代謝動態については不明の点が多い。一方、よりミクロな観点から単離細胞や細胞分画成分を用いた活性ペプチドの receptor (受容体) に関する検討が行われている。最近のこの分野における研究の進展はめざましく、これまで概念的でしかなかった receptor が実体として把握されるまでになっており、作用発現機序の解明に有用な情報を与えている。

胃と膵は食餌の消化、吸収の他、各種ペプチドホルモンの分泌を行い、生体の恒常性維持に重要な位置を占める臓器である。これら消化器は近密な連携を保ちながらその機能を発揮しており、各種のペプチド性医薬品はこれら臓器の疾患時にも診断、治療に活用されている。しかし胃、膵でのペプチド性医薬品の分布、代謝像は未だ明確となっていない。

そこで著者は臓器レベルでの薬物挙動を追跡する方法として、他の臓器、組織からの影響を無視し得る摘出臓器灌流法を改良して導入し、主にこの方法により胃、膵におけるペプチド性医薬品の挙動を解析した。すなわち構造的特徴を有する secretin, elcatonin (〔Asu<sup>1,7</sup>〕eel calcitonin), aprotinin をモデルペプチドとして選び、それらの標的臓器である胃、膵でのこれらペプチドの分布、代謝像を生物薬剤学的見地から比較解析すると共に secretin では活性発現と動態との関連を追求した。その結果、ペプチド性医薬品の臓器内動態及び薬効発現機序の解明上有用な基礎的知見を得ることができた。

以下、得られた結果を 4 章にわたり論述する。

## 第1章 薬物の胃，膵内挙動解析を目的とする臓器灌流法の確立

胃と膵は腹腔内で近接した位置を占め，それら相互の内，外分泌両面での連携は摂取された食餌の消化，吸収に重要な役割を担っている。またこれら器官の変調は消化性潰瘍等の疾患の要因となり，消化器臓器相関の点からも，胃，膵間の機能面での関連性は近年注目を集めている。<sup>2)</sup>しかし薬物のこれら器官への分布，代謝動態を検討した報告は少なく，薬物療法上からもその解明が望まれている。

胃における薬物挙動は胃粘膜からの薬物吸収機構に関する報告<sup>3)</sup>が主で，胃内での薬物動態を研究した報文は少なく，特に体内から速やかに消失するペプチド性医薬品での検討は乏しい。また膵内への薬物の分布特性，膵液への移行性は近年Hori, Okumuraら<sup>4,5)</sup>によりサルファ剤，経口糖尿病薬等の低分子量薬物について検討がなされ，薬物の脂溶性，分子容等の物理化学的因子が，その分布，膵液への移行性を支配していることが明らかにされた。しかし未だペプチドホルモン等の高分子量薬物については不明の点が多い。

薬物の臓器内動態を追跡する方法としては，

- (1) *in vivo* で薬物を投与後，臓器内濃度変化を観察する方法。
- (2) 臓器を摘出後，*in vitro* でそのスライス，単離細胞，細胞分画成分への薬物の移行性，結合性を検討する方法。
- (3) 臓器灌流法により薬物の灌流液中及び組織中濃度変化を観察する方法。

などに分類できるが，(1)の生体全体を用いる方法では他の各種臓器，組織からの影響を除外することが困難である。また(2)の*in vitro* 系では組織機能を充分維持できないと同時に薬物分布の方向性が考慮すべき問題点として残る。そこで(3)の臓器灌流法が，薬物の特定臓器への分布，代謝特性を解析する手段として有用であると考えられるが，摘出し灌流することによる臓器の生理機能への障害が問題となる。従って第1章では摘出実験系で最もその反応性が低下しやすいとされる外分泌能に着目し，灌流実験系における胃酸分泌能，膵液分泌能への各種薬物の影響を検討することにより，灌流胃，膵の生理機能を検討した。

## 第1節 ラット摘出胃灌流法の検討

胃灌流法はこれまで内分泌機序の解明に用いられてきたが、その灌流系の主な問題点としては胃の主要な機能である酸分泌能を欠損していることであった。<sup>6)</sup>酸分泌能を保持した灌流法はこれまでに供血動物を還流系内に組み込んだ方法<sup>7)</sup>や indomethacin 等の薬物で前処置後灌流を実施する方法<sup>8)</sup>が報告されているが、薬物の胃内動態を解析する上で供血動物や前処置薬物の影響を考慮しなければならず、これらの灌流法は不適當と言える。近年 Van Huis and Kramer<sup>9)</sup>は fluorocarbon を酸素供給体として灌流液に加え、ラット胃を灌流した場合、pilocarpine 投与で著明な酸分泌の亢進を認めたが、pentagastrin, histamine に対する反応性は乏しいことを報告している。

そこで各種の酸分泌刺激薬物に対しても反応し得る酸分泌能を保持した灌流法の確立を試みた。

### (1) 灌流実験法

薬物の酸分泌への影響を検討する方法として、Ghosh and Schild のラット胃内容灌流法<sup>10)</sup>が良好な感受性、再現性を有し、“Schild's rat”として採用されている。そこでその in vivo 実験法に対応する in vitro 胃灌流法の開発を目指した。

体重約 200g の Wistar 系雄性ラットを 15-20 時間絶食後灌流実験に供した。Fig.1 に示すように腹部大動脈よりカニューレを挿入し、腹腔動脈を経て左、右胃動脈に灌流液を 0.7ml/min の一定速度で注入、門脈より流出させた。

また胃腔内には食道よりカニューレを挿入し、クエン酸-リン酸緩衝液 (pH 6.6)<sup>11)</sup>を 1ml/min の流速で注入した。管腔側灌流液の pH を連続的に記録することにより酸分泌の経時変動を観察した。血管及び管腔とも一回灌流により検討し、灌流温度は 37°C とした。

酸分泌細胞である壁細胞は低酸素状態に対して脆弱で、速やかにその酸分泌能が低下することが知られている。<sup>9)</sup>そこでまず血管灌流液組成を設定する目的で histamine の刺激による酸分泌に及ぼす酸素の影響を検討した。その際肝灌流等数多くの臓器灌流に適用されている Krebs-Ringer 重炭酸緩衝液 (KRBB) を基本組成として用いた。検討は 95%O<sub>2</sub>-5%CO<sub>2</sub> 混合ガスを通気した KRBB,

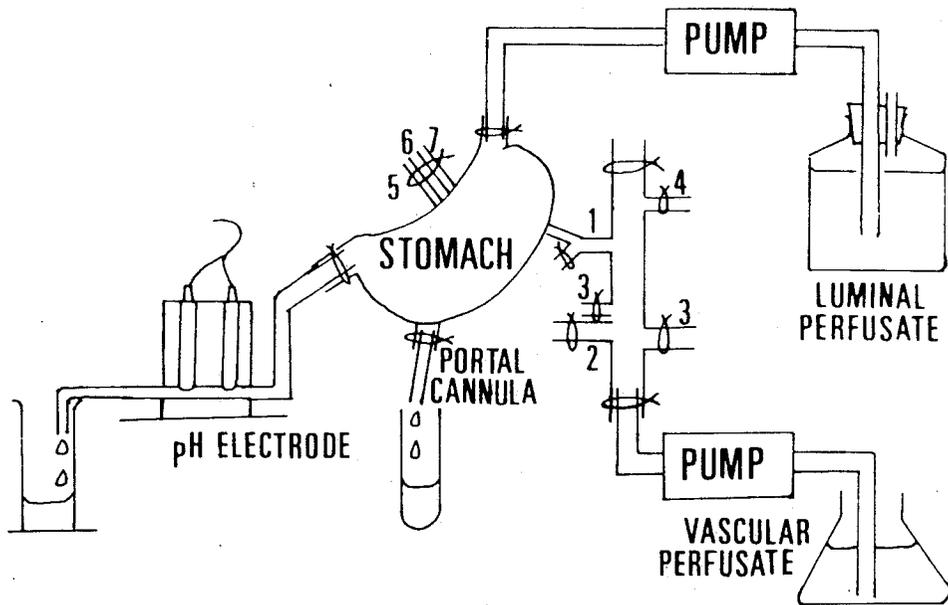


Fig. 1. Perfusion System of Isolated Rat Stomach

- 1; coeliac artery, 2; superior mesenteric artery,  
 3; renal artery, 4; superior suprarenal artery,  
 5; portal vein, 6; hepatic artery, 7; bile duct.

それに牛赤血球 25%を加え同様に混合ガスを通気した灌流液及びこれを $N_2$ ガスで置換した灌流液の三種を用いて行った。その結果、Fig.2に示すようにKRBB灌流時にはある程度の基礎分泌は認められるもののhistamineによる分泌亢進は得られず、牛赤血球を加え混合ガスを通気したKRBBを用いた場合のみhistamine刺激による酸分泌の促進が観察された。従って酸分泌時における酸素供給の重要性<sup>9)</sup>がこの灌流系においても明らかとなったため、血管灌流液として牛赤血球 25%を加え、95% $O_2$  - 5% $CO_2$ 混合ガスで通気したKRBBを以下の検討で使用した。

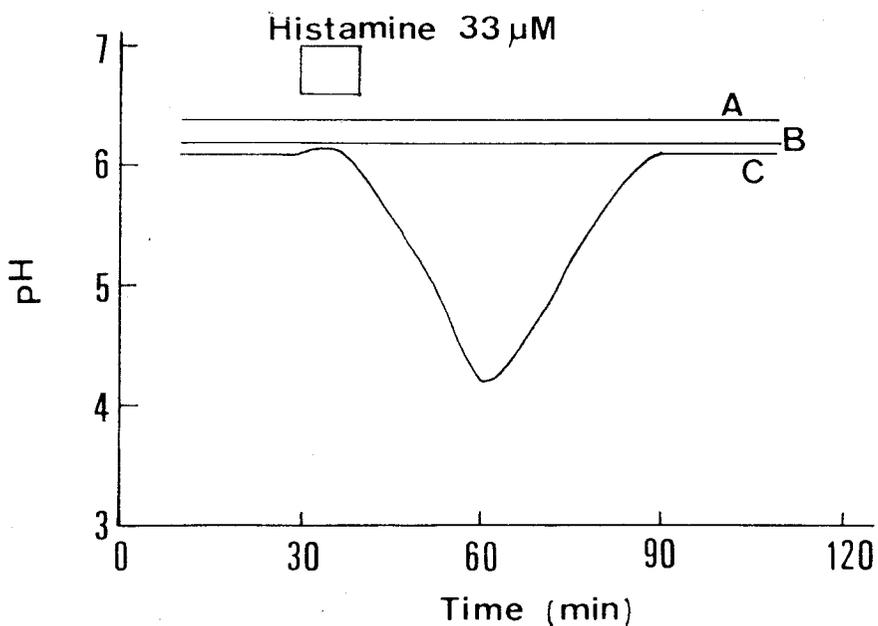


Fig. 2. Effect of Oxygen on Acid Secretion in Isolated Perfused Rat Stomach

A; N<sub>2</sub>-saturated dextran-KRBB containing 25% bovine erythrocytes, B; O<sub>2</sub>-saturated dextran-KRBB solution, C; O<sub>2</sub>-saturated dextran-KRBB containing 25% bovine erythrocytes.

(2) 酸分泌制御薬物に対する反応性

この灌流系における外分泌能を確かめるため各種の酸分泌刺激薬物を灌流し、その際の酸分泌動態を検討した。すなわち histamine, pilocarpine, cyclic AMP, dibutyryl cyclic AMP, theophylline を各々 10 分間 血管内に灌流し、30 分間の酸分泌量を測定した。(Table I)。

これら刺激薬物灌流により酸分泌は著明に増大し、histamine, cyclic AMP, dibutyryl cyclic AMP では濃度に依存した酸分泌の亢進が観察された。cyclic AMP の細胞膜透過性は dibutyryl cyclic AMP に比べ劣ることが

Table I. Stimulation of Acid Secretion by Various Stimulants in Isolated Perfused Rat Stomach

Stimulant	Concentration	Acid output ( $\mu\text{eq}/30 \text{ min}$ )
Histamine	24 $\mu\text{M}$	$0.95 \pm 0.08^{\text{a)}$
	33 $\mu\text{M}$	$2.90 \pm 0.28$
	65 $\mu\text{M}$	$4.44 \pm 0.74$
	130 $\mu\text{M}$	$4.29 \pm 0.53$
Pilocarpine	2.5 $\mu\text{M}$	$0.38 \pm 0.21$
	5.0 $\mu\text{M}$	$0.74 \pm 0.22$
Cyclic AMP	1.0 mM	$0.30 \pm 0.07$
	2.0 mM	$0.67 \pm 0.09$
	4.0 mM	$2.53 \pm 0.84$
Dibutyryl cAMP	0.1 mM	$1.00 \pm 0.58$
	0.2 mM	$4.77 \pm 0.76$
	0.4 mM	$4.63 \pm 1.47$
Theophylline	5.6 mM	$0.78 \pm 0.30$

Perfusion time of stimulant: 10 min.

a) Mean  $\pm$  S.E. of 3-4 experiments.

報告されており,<sup>12)</sup> 本灌流法によっても酸分泌の増大に必要な濃度が cyclic AMP では dibutyryl cyclic AMP より数倍高値を示した。

次に histamine  $\text{H}_2$  - receptor antagonist である cimetidine の histamine による酸分泌亢進に及ぼす影響を検討したところ, Fig.3 に示すように cimetidine は histamine による酸分泌を可逆的に抑制した。なお同様の結果が同じく histamine  $\text{H}_2$  - receptor antagonist の metiamide 灌流によっても得ら

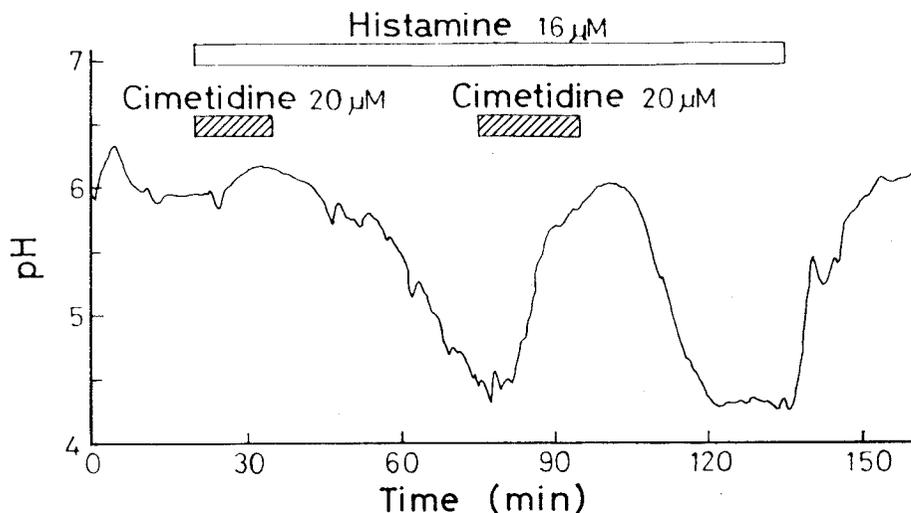


Fig. 3. Effect of Cimetidine on Acid Secretion Induced by Histamine in Isolated Perfused Rat Stomach

A representative of three experiments is shown.

れた。

各種の酸分泌刺激薬物に対しこの灌流系は良好に応答したが、生理的に酸分泌を制御している gastrin の最小有効 fragment, tetragastrin に対しては、成熟ラットの場合、酸分泌の亢進をほとんど示さなかった。

しかし未成熟ラットの胃に tetragastrin を投与すると Fig.4 A に示すように酸分泌の増大が観察され、tetragastrin に対する成熟ラットでの反応欠如が成長に伴う gastrin receptor の変動、胃粘膜内 pepsin 活性の変化等に起因することを推測させた。事実、ラットの胃粘膜中 pepsinogen 含量が生後 17 日齢まで成熟レベルの 20% 程度で一定しているのに対し、18 日齢以降急激に上昇し 30 日齢で成熟ラットと同じレベルに達することを Furihata ら<sup>13)</sup> は報告している。そこで胃粘膜中 pepsin 活性と酸分泌の関連性を明らかにすべく、pepsin の特異的阻害薬である pepstatin<sup>14)</sup> に着目し、その酸分泌に及ぼす影響を検討した。Fig.4 B は血管灌流液中に pepstatin (1 μM) を加え tetragastrin の作用を成熟ラットの胃を用いて検討したもので、pepstatin 存在時著明な酸分泌の増

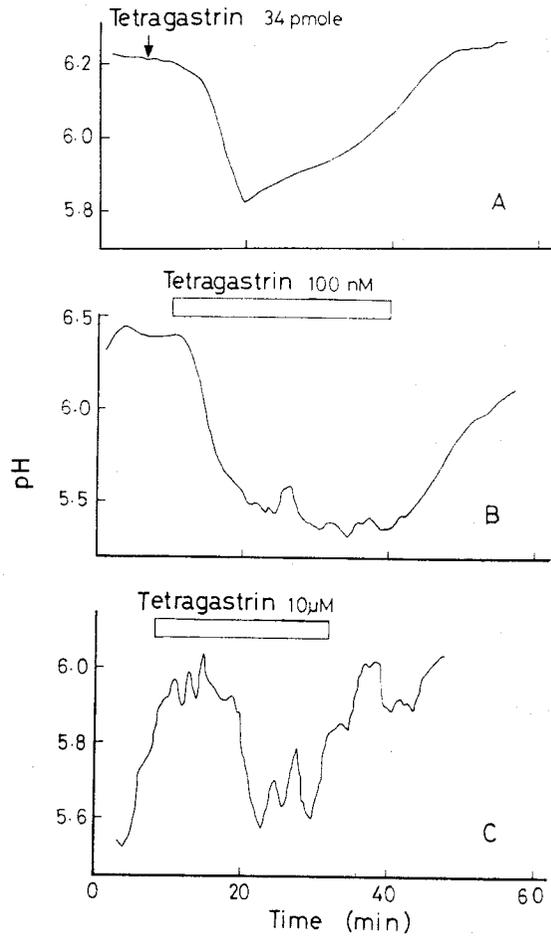


Fig. 4. Effect of Tetragastrin on Acid Secretion in Isolated Stomach

(A) Immature rat (32 g of body weight) stomach was perfused without pepstatin. (B) Adult rat (170 g) stomach was perfused with 1  $\mu$ M pepstatin. (C) Guinea pig (260 g) stomach was perfused without pepstatin. These data are representative of 3-7 experiments.

大が観察された。この結果はラット胃を灌流する場合、gastrinによる酸分泌が胃粘膜内 pepsin あるいはそれに類似した酵素により左右されることを示唆した。そのため胃粘膜中 pepsinogen 含量がラットより少ないモルモット胃 (Table II) を pepstatin を加えない条件下で灌流し、tetragastrin の酸分泌に及ぼす影響を同様に検討した。その結果 tetragastrin 灌流時モルモット胃からの酸分泌は pepstatin 非存在下においても増大することが認められた (Fig. 4 C)。

また pepstatin 存在下で histamine, tetragastrin による酸分泌動態を観察したところ、histamine, tetragastrin 共に酸分泌の亢進は迅速であったが、tetragastrin に比べ histamine 灌流時初期 5 分間は認むべき増大は得られなかった (Fig. 5)。既に James<sup>15)</sup> は in vivo 実験により histamine に比し、pentagastrin がより速やかに酸分泌を増大させることを報告しており、この結果は彼の観察<sup>15)</sup>とも対応する。

さらにそれ自体では酸分泌を刺激しない濃度である 10  $\mu$ M の theophylline を共存させることで tetragastrin に対する酸分泌反応性が顕著に改善し、その反応は gastrin 濃度に依存して増大した (Fig. 6)。theophylline は cyclic AMP を分解する phosphodiesterase の阻害薬であると共に adenosine receptor 拮抗薬の働きも有している。胃酸分泌にも adenosine "R" receptor が抑制的に関与していることが明らかにされており、<sup>16)</sup>この結果は adenosine receptor が gastrin による酸分泌に介在し、その分泌を調節している可能性を示唆した。

Table II. Pepsinogen Activity in the Gastric Mucosa of Rat and Guinea Pig

	Pepsinogen activity ( $\mu$ g tyrosine/min/mg protein)	n
Rat	118.0 $\pm$ 5.1 <sup>a)</sup>	3
Guinea pig	48.3 $\pm$ 4.0	3

a) Mean  $\pm$  S.E.

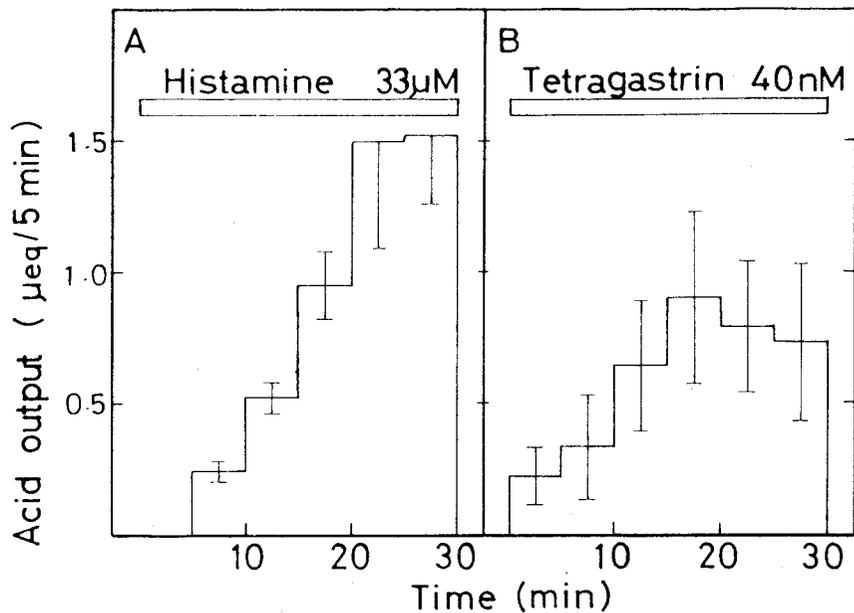


Fig. 5. Effect of Histamine and Tetragastrin on Acid Secretion in Isolated Perfused Stomach of Adult Rat

Histamine (A) or tetragastrin (B) was perfused for 30 min in the presence of  $1 \mu\text{M}$  pepstatin. The results represent the mean  $\pm$  S.E. of three (histamine) or seven (tetragastrin) experiments after subtracting basal secretion.

### (3) 考 察

薬物の胃内挙動を明らかにする目的で摘出胃灌流法の開発を試み、その生理機能について *in vitro* 系で最も脆弱とされる酸分泌能を指標として検討した。本研究で開発した系では血管灌流液中に赤血球を酸素運搬体として加える必要性を認めると共に、各種の酸分泌制御物質に適確に応答し得ることを見出した。また pepsin 阻害薬の pepstatin を血管灌流液に加えることで成熟ラット胃においても tetragastrin による酸分泌反応を増大させ得る等、gastrin によ

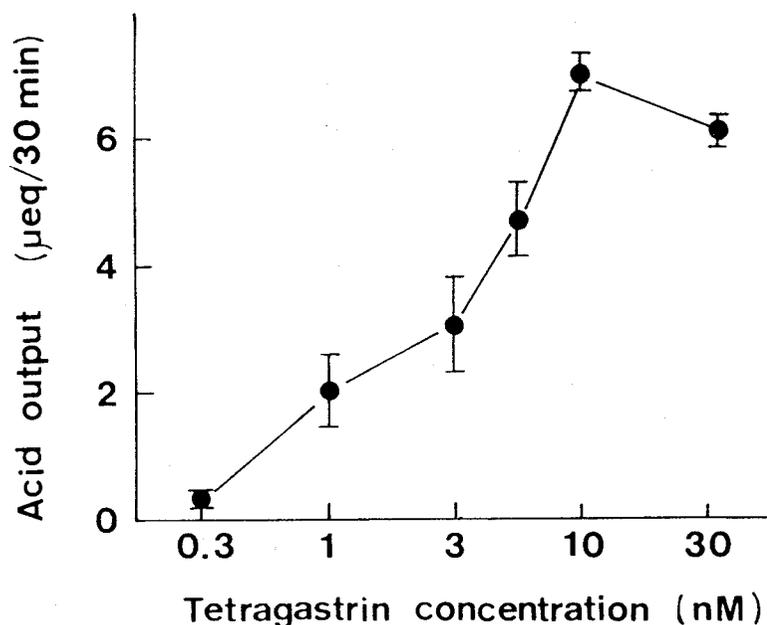


Fig. 6. Effect of Tetragastrin on Acid Secretion in Isolated Perfused Rat Stomach

Acid secretion was stimulated by the perfusion of tetragastrin (0.3-30 nM) for 10 min in the presence of 10 µM theophylline. Each point represents the mean value of 3-4 experiments with SEM indicated.

る酸分泌反応性が成熟度，種差，胃腺内 pepsin 活性により影響されやすいことも明らかとなった。他の摘出胃，胃粘膜，単離壁細胞を用いた *in vitro* 実験系においても gastrin に対する反応性を得ることは困難とされていたが，<sup>17)</sup> この灌流法では供血動物を灌流系内に組み込むことなく酸分泌が2時間以上持続し，また浮腫，胃腔内への出血等の組織障害も認められなかった。以上の結果はこの管腔，血管同時灌流法が，ほぼ正常な生理機能を保持していることを示し，薬物の胃への作用動態および胃内薬物挙動の解析に適した系であることを支持した。

## 第2節 ラット摘出膵灌流法の検討

前述した胃灌流法に比べ膵灌流法は insulin, glucagon等のホルモン分泌機序の検討に繁用されている。<sup>18-20)</sup>しかし薬物の膵内挙動を膵灌流法を用いて解析した報文は少なく、僅かに Okumura ら<sup>5)</sup>により経口糖尿病薬等の分布特性が報告されているにすぎない。また内分泌能と共に膵の主な生理機能とされる膵液分泌について膵灌流法により検討した報告は乏しい。<sup>21)</sup>その灌流法も十二指腸の一部も灌流する膵-十二指腸灌流法が採られており、ペプチド性医薬品の膵内挙動を正確に把握するには多くの活性ペプチドの産生部位である十二指腸からの影響を排除することが必要となる。すなわち十二指腸を灌流系より除いた膵灌流法を確立することが必要と考えられた。

そこで従来 Penhos らの膵-十二指腸灌流法<sup>18)</sup>を改良し、膵と十二指腸間の血管をすべて結紮後灌流を実施し、胃と同様に外分泌機能とその生理機能の指標とし、膵灌流法の確立を目指した。

### (1) 灌流実験法

摘出膵灌流法は Grodsky ら<sup>19)</sup>によりほぼ完成され、Sussman ら<sup>20)</sup> Penhos ら<sup>18)</sup>がその改良法を報告している。そこで完全に膵を摘出後灌流を実施する目的で Penhos らの in situ 灌流法を基にして改良を行った。

体重約 250 g の Wistar 系雄性ラットを用い、基本的には Penhos らの方法<sup>18)</sup>を採用し、胃灌流法と同じく、腹部大動脈よりカニューレを挿入し、灌流液を注入、門脈カニューレより流出させた。膵液採取用カニューレは総胆管の十二指腸開口部に設置した (Fig.7)。灌流温度は 37℃ とし、一回灌流により灌流液を 2 ml/min の一定速度で注入した。膵と十二指腸間の血管は縫合糸により注意深く結紮し、灌流開始 15 分間の安定期間中に灌流液の漏出、浮腫等の認められないことを確認後実験を実施した。灌流液は Krebs-Ringer 重炭酸緩衝液に 5.6mM glucose, 0.5% bovine serum albumin, 4.6% dextran70 を加え、95% O<sub>2</sub> - 5%CO<sub>2</sub>混合ガスを通気、pH7.4 に調整した溶液を使用した。

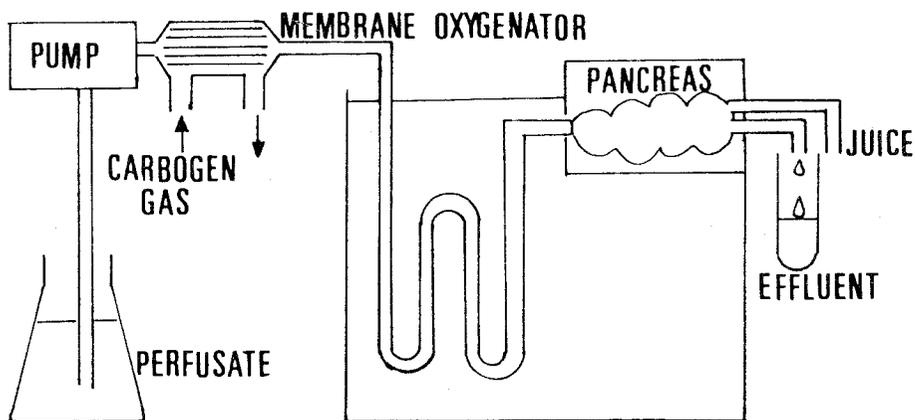


Fig. 7. Perfusion System of Isolated Perfused Rat Pancreas

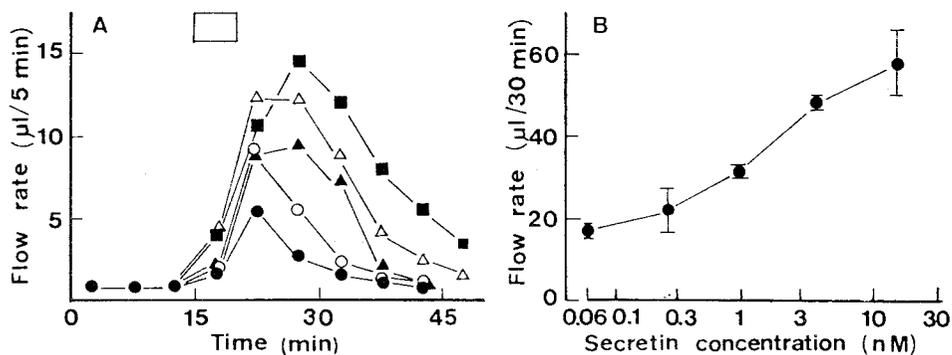


Fig. 8. Effect of Secretin on Pancreatic Juice Flow in Isolated Perfused Rat Pancreas

Pancreatic juice flow was stimulated by the perfusion of secretin (0.06–16 nM) for 5 min.

A; Changes of flow rate induced by the perfusion of secretin. ●: 0.06 nM, ○: 0.24 nM, ▲: 1.0 nM, △: 4.0 nM, ■: 16 nM. B; Relationship of secretin concentration and total juice volume for 30 min. Each point represents the mean value of 3–4 experiments. The vertical lines give the SEM.

## (2) 膵外分泌制御薬物に対する反応性

膵液分泌を促進するホルモンとして、secretin, pancreozymin の 2 種のペプチドが知られ、膵外分泌能検査薬として繁用されている。そこで膵灌流時にこれらペプチドを加え、膵液及び amylase 分泌の変化を検討した。まず secretin を 5 分間灌流した際の膵液分泌動態を観察したところ、secretin 灌流時膵液分泌速度の増大が灌流初期より認められ (Fig.8A), 30 分間の膵液分泌量も secretin 濃度に依存して増大した (Fig.8B)。

この結果は Tachibana<sup>22)</sup> が報告した secretin 静注時におけるラット膵からの膵液分泌挙動とも類似し、secretin に対する反応性がこの改良した灌流法でも保持されていることを示唆した。

次に pancreozymin を灌流時の amylase 分泌動態について検討したところ、Fig.9 に示すように膵液分泌の増大とともに膵液中 amylase 活性が pancreozymin 灌流により著明に上昇し、pancreozymin 灌流期間中ほぼ一定速度で分泌されていることを認めた。またこの amylase 分泌に及ぼす calcitonin の影

Table III. Effect of Elcatonin on Amylase Output Induced by Pancreozymin in Isolated Perfused Rat Pancreas

	Amylase output ( $\times 10^3$ U/20 min) <sup>a)</sup>	
	without elcatonin	with elcatonin
	0-20 min	20-40 min
Pancreozymin (50 mU/ml)	4.28 $\pm$ 0.66	3.78 $\pm$ 0.12
+ Elcatonin (7 nM)	4.92 $\pm$ 0.86	2.97 $\pm$ 0.58
+ Elcatonin (35 nM)	4.25 $\pm$ 0.70	1.83 $\pm$ 0.25 <sup>b)</sup>

a) Mean  $\pm$  S.E. of three experiments

b) Significantly different from pancreozymin alone (20-40 min),  $p < 0.05$ .

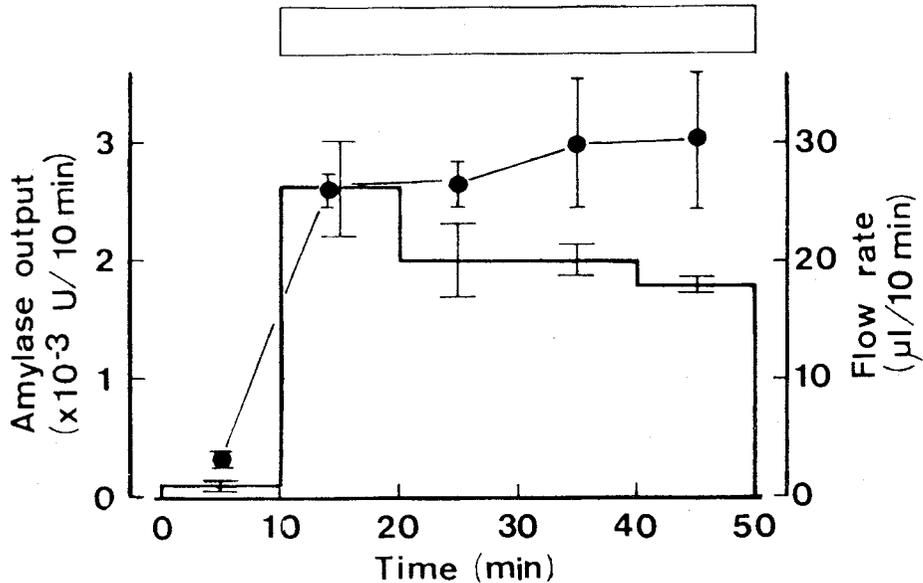


Fig. 9. Effect of Pancreozymin on Pancreatic Juice Flow and Amylase Secretion in Isolated Perfused Rat Pancreas

Pancreatic juice flow and amylase secretion were stimulated by the perfusion of pancreozymin (50 CHR mU/ml; as indicated by open column) during 40 min. Each point represents the mean of three experiments with SEM indicated. □: amylase output, ●: juice flow.

響も〔Asu<sup>1,7</sup>〕eel calcitonin(elcatonin)を用い追跡したが、従来の報告<sup>23)</sup>のごとく、amylase分泌がelcatoninにより抑制されることを認め(Table III), calcitoninの腓外分泌抑制作用面からの腓炎治療薬への応用<sup>24)</sup>を支持する結果が得られた。

以上の結果は、この摘出腓灌流法によっても腓がほぼ生理機能を保っていること、さらに生体内における状態に近い環境下で腓内での薬物挙動が解析可能であることを示している。

### (3) 考 察

胃灌流法に比べ膵灌流法を用いた報告は数多く認められたが,<sup>18-20)</sup> それを薬物挙動追跡に適用した報告はOkumuraら<sup>5)</sup>の経口糖尿病薬と他の薬物の膵内分布面での相互作用を論じたものが認められるにすぎず, それも膵と共に十二指腸の一部も灌流される方法が採られていた。そこで十二指腸と膵間の血管を結紮後灌流を実施することで膵のみを灌流し, ペプチド性医薬品の挙動解析に及ぼす十二指腸内内在性活性ペプチドの影響を除くこととした。この改良法によっても膵の外分泌能は保持されており, secretin, pancreozyminに良好な反応性を示すことが認められた。従ってこの摘出膵灌流法は薬物の膵内動態解析に有用な系であると考えられ, 前記の胃灌流法と共にペプチド性医薬品の胃, 膵内での代謝および分布特性について, 主にこの臓器灌流法により以下の三章で検討した。

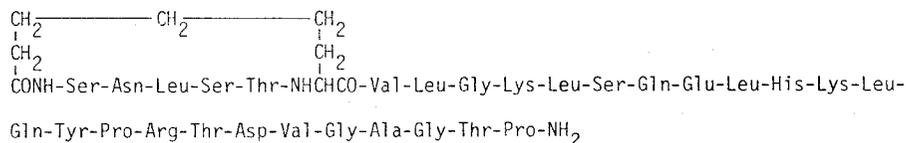
## 第2章 胃における secretin, elcatonin, aprotinin の挙動

胃における薬物動態の研究にはこれまで主に胃を吸収器官としてとらえたものが多く、低分子量薬物の場合、薬物の脂溶性、解離度などの物理化学的性質が胃上皮からの吸収特性や血液から胃への移行特性を支配していると考えられてきた。<sup>3)</sup>しかし薬物の分布、代謝臓器としての胃の位置づけは未だ不明確で、特にペプチド性医薬品の胃内挙動は検討がなされていない。そこで胃、脾を主な標的臓器とし、しかも構造的特徴を有する三種のペプチド、secretin, elcatonin, aprotininをモデル薬物として選び、胃内におけるこれらペプチド性医薬品の分布、代謝特性を先に確立したラット摘出胃灌流法により検討した。

Fig.10にそれらのアミノ酸配列を示す。secretinは27個のアミノ酸よりなる直鎖状の塩基性ペプチドで、主に十二指腸粘膜より産生され、胃に対し酸

His-Ser-Asp-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Glu-Leu-Ser-Arg-Leu-Arg-Asp-Ser-Ala-Arg-Leu-Gln-Arg-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH<sub>2</sub>

### A. Secretin (porcine)



### B. Elcatonin ([Asu<sup>1,7</sup>]eel calcitonin)

Arg-Pro-Asp-Phe-Cys-Leu-Glu-Pro-Pro-Tyr-Thr-Gly-Pro-Cys-Lys-Ala-Arg-Ile-Ile-Arg-Tyr-Phe-Tyr-Asn-Ala-Lys-Ala-Gly-Leu-Cys-Gln-Thr-Phe-Val-Tyr-Gly-Gly-Cys-Arg-Ala-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys-Ser-Ala-Glu-Asp-Cys-Met-Arg-Thr-Cys-Gly-Gly-Ala

### C. Aprotinin

Fig. 10. Amino Acid Sequence of Secretin, Elcatonin, and Aprotinin

分泌, gastrin分泌を抑制する enterogastrone活性を, 膵に対しては膵液, 重碳酸イオンの分泌を促進する作用を持つ。最近はこの作用に着目し, 膵外分泌機能検査の他に胃, 十二指腸潰瘍治療にも適応されている。<sup>25)</sup>

calcitoninは甲状腺(魚類では鰹後腺)より分泌されカルシウム代謝を調節するホルモンで, N末端部の1-7位が disulfide結合により環状構造を形成している。このペプチドの血清カルシウム濃度低下作用を利用し, 高カルシウム血症治療に用いられている他, gastrinおよび胃酸分泌の抑制作用を利用した消化性潰瘍治療への応用も注目されている。<sup>26)</sup>また近年ウナギ calcitonin の誘導体, [Asu<sup>1,7</sup>]eel calcitonin(elcatonin)が合成されその高活性および安定性により有用な calcitonin誘導体として繁用されている。このペプチドはウナギ calcitoninのN末端部の disulfide結合が ethylene結合に置換されている (Fig.10 B)。

aprotininは trypsin, kallikrein等の serine proteaseと強固な complexを形成し, それら酵素の活性を阻害する作用を持ち, 急性膵炎, ショック等に適用されている。このペプチドはその分子内に3個の disulfide結合を持ち, 球状構造を保っているため, 各種の蛋白分解酵素の作用を受け難いと報告されている。<sup>27)</sup>

これらペプチドの胃内挙動の追跡は,<sup>125</sup>I 標識ペプチド灌流時の流出液中および組織中の放射活性を測定するトレーサー法によると共にゲル濾過法によりペプチド分子の存在形態をも検討した。また radioimmunoassayによる検討も合わせて行った。

## 第1節 secretin, elcatonin, aprotininの胃内代謝

ペプチドホルモン等高分子量の活性ペプチドの体内挙動に関する研究は, ペプチドを<sup>3</sup>H, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>Iなどで標識後投与し, その放射活性の推移を観察するトレーサー法と Berson and Yalow<sup>28)</sup>により開発された radioimmunoassayにより追跡する方法が採られていた。トレーサー法は鋭敏な感度を有し, 微量で活性を発揮するペプチド性医薬品には有用である。しかしペプチドの体内での代謝性を考慮すると, 放射活性測定のみによる結果からペプチドの挙動を推察することはできないので, ゲル濾過法により分離定量し検討を行った。また

radioimmunoassayによる方法は抗体の抗原識別性が問題となり、ペプチド本体を測定しているか否かが結果を解析する上で重要となってくる。従ってradioimmunoassayによる検討は先のトレーサー法による結果と対照しつつその解析を行った。

### (1) secretinの代謝

secretinは典型的な不安定ペプチドであることが報告され、<sup>29)</sup>その血中半減期もヒトで2分と短かく、<sup>30)</sup>筋肉、脳、腎等の組織、臓器により代謝されることが報告されている。<sup>31)</sup> secretinはその分子内に tyrosine残基を含まないため<sup>125</sup>I 標識体の作成は困難とされていた。そこで、膵液分泌促進作用を有し、secretin抗血清に secretinと同一の結合能を示す〔Tyr<sup>1</sup>〕secretin<sup>32)</sup>の<sup>125</sup>I 標識体を secretinのトレーサーとして使用し、その胃内動態を検討した。

胃に<sup>125</sup>I-〔Tyr<sup>1</sup>〕secretin(0.1 nM)を10分間灌流し、門脈流出液と組織抽出液を Sephadex G-25を用いるゲル濾過法により分析した際の溶出パターンを Fig.11に示す。門脈流出液、組織抽出液ともに低分子分画に放射活性の増大が観察され、門脈流出液中の未変化体分画の割合は $54.0 \pm 0.6\%$  (mean  $\pm$  S.E.)に、組織抽出液中では $15.1 \pm 0.9\%$ に低下していた。

次に非標識 secretinを灌流し、門脈中に出現する immunoreactive secretinを測定したところ、その濃度は速やかに平衡に達したが、平衡後の濃度は灌流液よりも約40%低値を示した ( Fig.12 )。

以上の結果より secretinは胃内を通過中に絶えず代謝されていることが判明し、体内各部位での secretin代謝<sup>31)</sup>が、その血中消失速度の大きい要因となっているものと考えられた。

### (2) elcatoninの代謝

calcitoninは動物種によりそのアミノ酸配列が異なり、魚類の calcitoninは哺乳類の calcitoninに比べ強力な血清カルシウム低下作用を持つことが知られている。その高活性には魚類 calcitoninの生体内での安定性が一部寄与しているとの報告もある。<sup>1)</sup> eel calcitoninの誘導ペプチド、〔Asu<sup>1,7</sup>〕eel calci-

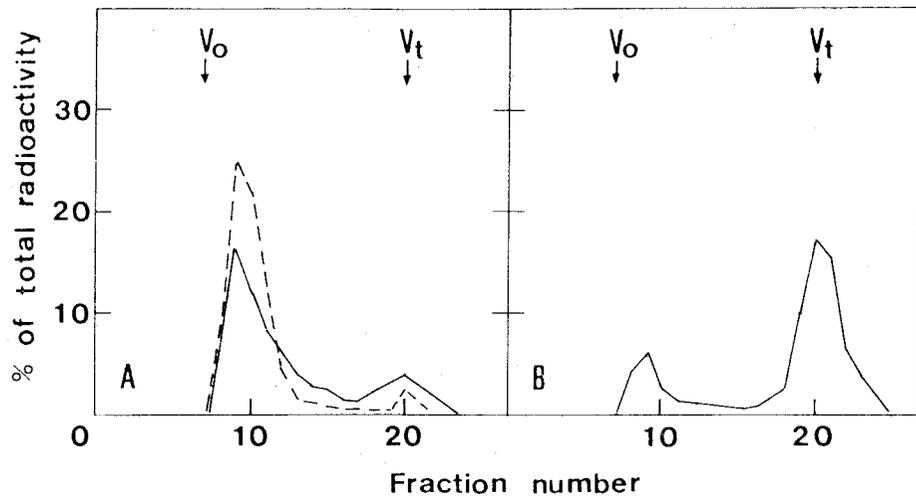


Fig. 11. Gel Filtration Profiles of Effluent and Tissue Extract from  $^{125}\text{I}$ -[Tyr<sup>1</sup>]secretin Perfusion

Samples taken 10 min after the beginning of the perfusion of  $^{125}\text{I}$ -[Tyr<sup>1</sup>]secretin were subjected to gel filtration on a 1.0 x 70 cm Sephadex G-25 column. The broken line represents the gel filtration profile of the standard secretin. A, effluent; B, tissue extract of stomach.  $V_o$ , void volume;  $V_t$ , column volume.

tonin (elcatonin)もブタ、ヒト calcitoninより組織 homogenate, 血液中での安定性に優れているとされる。<sup>33)</sup>そこで先の secretinの場合と同様に  $^{125}\text{I}$ -elcatoninを10分間灌流し、ゲル濾過法によりその代謝性を検討した。

Fig.13に示した放射活性の溶出パターンから門脈流出液, 組織抽出液とも低分子代謝物の増大を認め, 門脈流出液で未変化体分画の割合が  $65.0 \pm 1.0\%$ , 組織抽出液で  $38.3 \pm 0.3\%$ に減少した。またその際流出液の溶出パターンから未変化体分画と小分子分画の間に“shoulder”が認められ中間代謝物の生成が推察された。

次に elcatoninを灌流し, 門脈中に回収される elcatoninを radioimmuno-

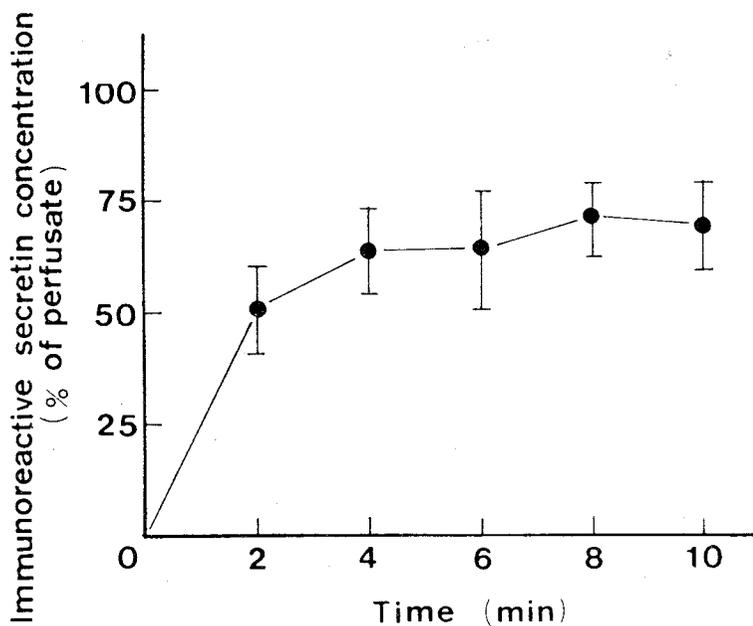


Fig. 12. Appearance of Immunoreactive Secretin in the Effluent from the Perfused Stomach during the Infusion of Secretin (70 pM)

Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of three experiments.

assayにより測定した結果、先の secretin 灌流時と同様にその流出液中濃度は灌流液濃度よりも約30%低い値で平衡となった。( Fig.14 )。

これらの結果は elcatonin も胃内を通過する際、絶えず一部が代謝されていることを示唆したが、その割合は secretin よりもやや小さいことが明らかとなった。

### (3) aprotinin の代謝

蛋白分解酵素阻害ペプチドの aprotinin は腎に集積することが知られており、

<sup>34)</sup>その血中消失はヒトで二相性を示し、各々の半減期が0.7時間と7時間であ

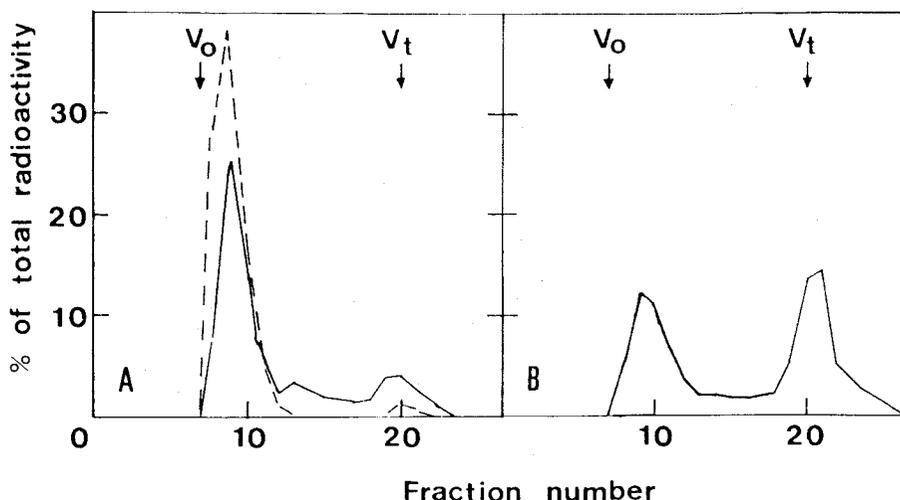


Fig. 13. Gel Filtration Profiles of Effluent and Tissue Extract from  $^{125}\text{I}$ -Elcatonin Perfusion

Samples taken 10 min after the beginning of the perfusion of  $^{125}\text{I}$ -elcatonin were subjected to gel filtration on a 1.0 x 70 cm Sephadex G-25 column. The broken line represents the gel filtration profile of the standard elcatonin. A, effluent; B, tissue extract of stomach.  $V_0$ , void volume;  $V_t$ , column volume.

ると報告されている。<sup>35)</sup>従って他のペプチドに比べ代謝速度が非常に遅いことが一つの特徴である。しかし腎以外の臓器における挙動は不明の点が多い。また aprotinin の酵素阻害活性にその分子内に存在する 3 個の disulfide 結合は重要な役割を担っていると考えられているが、<sup>36)</sup> disulfide 結合の有無による aprotinin の挙動変化について検討した報告は乏しい。そこで aprotinin を灌流しその胃内代謝動態を探ると共に disulfide 結合を修飾した誘導体 (還元 aprotinin, [S-carboxamidomethyl] aprotinin) を調製、<sup>36)</sup>それらの胃内での代謝を検討し、分子内 disulfide 結合の体内安定性への寄与を考察した。まず、それら修飾体の trypsin への結合性をディスク電気泳動法により分析し、

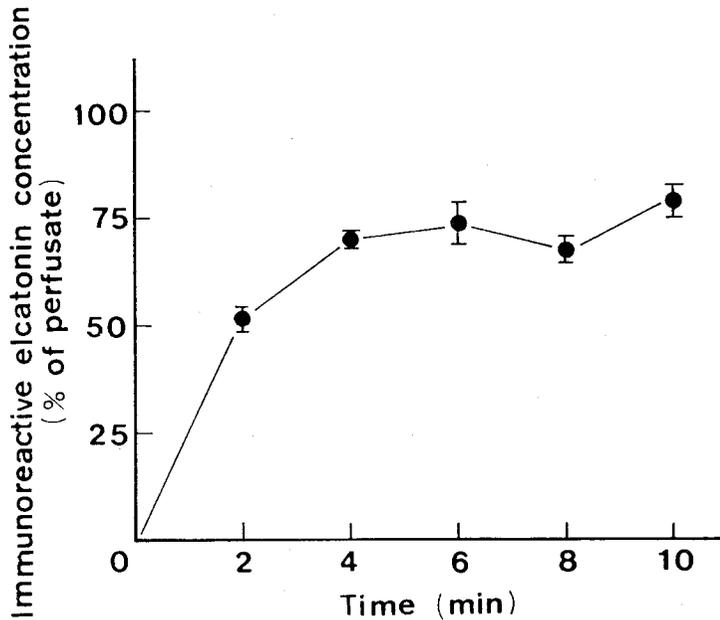


Fig. 14. Appearance of Immunoreactive Elcatonin in the Effluent from the Perfused Stomach during the Infusion of Elcatonin (0.3 nM)

Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of three experiments.

修飾体の酵素活性阻害の指標として検討した。その結果、未修飾 aprotinin の  $^{125}\text{I}$  標識体は 92% 以上が trypsin と結合したのに対し、 $^{125}\text{I}$ -還元 aprotinin,  $^{125}\text{I}$ -[S-carboxamidomethyl]-aprotinin では各々 30, 62% が trypsin と結合するにとどまった。この結果は Vincent and Lazdunski の報告<sup>37)</sup>とも対応し、分子内 disulfide 結合が aprotinin の酵素阻害活性に大きく寄与していることを示している。

ゲル濾過法により  $^{125}\text{I}$ -aprotinin の胃内代謝を検討したところ、Fig.15 に示すように門脈流出液、組織抽出液共に放射活性の大部分は未変化体分画に溶出された。

一方、還元 aprotinin の  $^{125}\text{I}$  標識体を灌流した際には未変化体の割合は著明に減少し、高分子量分画中放射活性が増大した ( Fig.16AB, Table IV )。

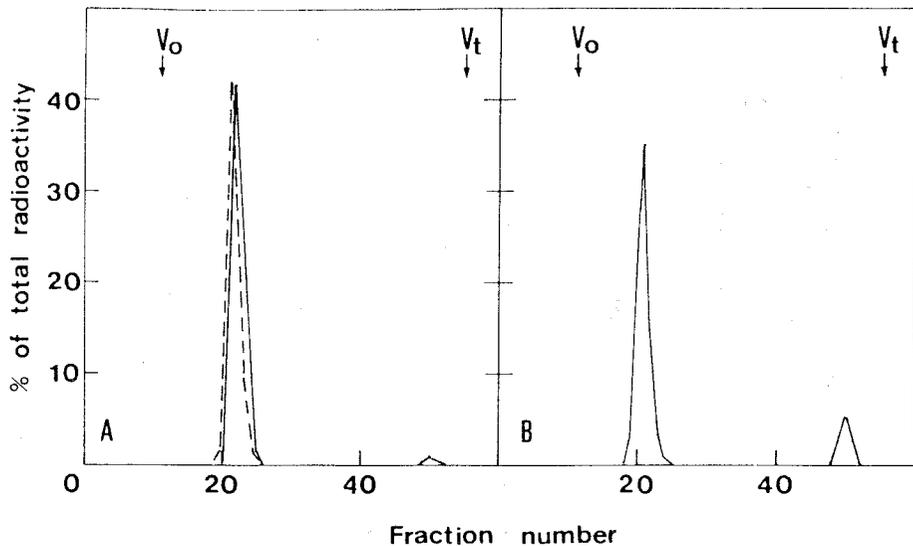


Fig. 15. Gel Filtration Profiles of Effluent and Tissue Extract from  $^{125}\text{I}$ -Aprotinin Perfusion

Samples taken 10 min after the beginning of the perfusion of  $^{125}\text{I}$ -aprotinin were subjected to gel filtration on 1.5 x 90 cm Toyopearl HW-55 column. The broken line represents the gel filtration profile of the standard aprotinin. A, effluent; B, tissue extract of stomach.

また還元 aprotinin の SH 基を carboxamidomethyl 化した  $^{125}\text{I}$  標識体を灌流した場合には低分子代謝物の顕著な増大を認めた (Fig. 16 CD, Table IV)。

以上の結果は, secretin, elcatonin に比べ aprotinin は胃内で代謝をうけにくいこと, またその胃内安定性にその分子内 disulfide 結合が寄与していることを示している。さらに disulfide 結合修飾体が容易に代謝されたことから, 分子内 disulfide 結合を持つ insulin の代謝に重要な glutathione-insulin transhydrogenase<sup>38)</sup> 類似の disulfide interchange enzyme が aprotinin 代謝の初期段階で介在しているものと予測された。

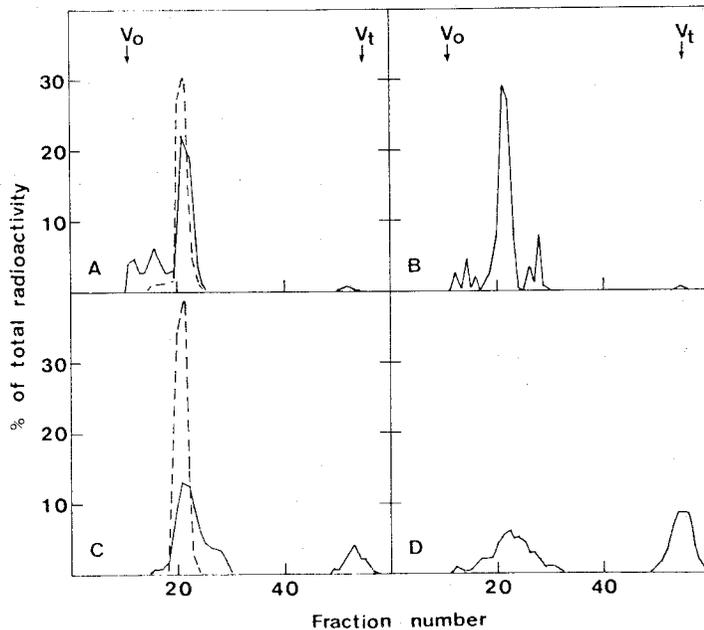


Fig. 16. Gel Filtration Profiles of Effluents and Tissue Extracts from  $^{125}\text{I}$ -Reduced Aprotinin (A,B) and  $^{125}\text{I}$ -[S-carboxamidomethyl]Aprotinin (C,D) Perfusion

Samples taken 10 min after the beginning of the perfusion of  $^{125}\text{I}$ -modified aprotinin were subjected to gel filtration on 1.5 x 90 cm Toyopearl HW-55 column. The broken line represents the gel filtration profiles of the tracer of modified aprotinin. A,C, effluent; B,D, tissue extract of stomach.

Table IV. Effect of the Modification of Disulfide Bonds on the Metabolism of  $^{125}\text{I}$ -Aprotinin in the Perfused Stomach

	Parent peptide fraction (%) <sup>a)</sup>	
	Effluent	Tissue extract
Control	90.9 ± 0.8	83.7 ± 2.2
Reduced aprotinin	48.1 ± 4.6 <sup>b)</sup>	65.8 ± 3.6 <sup>b)</sup>
[S-carboxamidomethyl]aprotinin	51.3 ± 3.0 <sup>b)</sup>	31.1 ± 5.7 <sup>b)</sup>

a) Mean ± S.E. of three experiments.

b) Significantly different from control ( $p < 0.05$ ).

Perfusion time: 10 min.

#### (4) 考 察

構造的特徴を有する三種のペプチド, secretin, elcatonin, aprotinin を胃に灌流し, 各々の胃組織中での代謝特性を比較検討した。その結果直鎖状ペプチドの secretin が最も不安定で, 一部環状の elcatonin がそれに続き, 球状ペプチドの aprotinin は代謝をうけにくいことが判明した。また aprotinin の胃内安定性に分子内 disulfide 結合の寄与していることが推察された。

ペプチド性医薬品はその体内半減期が短かく, 代謝クリアランスの大きいことが知られている。<sup>1)</sup> またアミノ酸残基数が多くなるとその体内半減期も延長することが gastrin,<sup>1)</sup> somatostatin<sup>39)</sup> で報告されている。この胃灌流法により得た知見もアミノ酸配列の相違, 特に disulfide 結合等の環状構造の有無がペプチドの代謝速度に影響を及ぼすことを明らかにした。これらの結果は生体全体での代謝像を反映する血液中での動態とほぼ対応しており, マクロな観点

では胃での代謝様式に特殊性が少ないことを示している。しかし胃におけるペプチドの作用発現作用持続にとって胃でのその動態は無視できないものであり、次節ではペプチドの胃内分布を検討した。

## 第2節 secretin, elcatonin, aprotinin の胃内分布

ペプチド性医薬品の体内分布はそれらの分子量、低脂溶性等の物理化学的性質に支配され、主に細胞外液中に分布するとされてきた。<sup>1)</sup> また近年細胞膜上に存在する receptor の活性ペプチドによる down regulation 等に認められる結合像の変化や、<sup>125</sup>I 標識ペプチドを用いた autoradiography による検討から一部のペプチドは細胞内に取り込まれることが明らかにされている。<sup>40)</sup> しかしこれらの検討はほとんどが生体内での生理的環境とは著しく異なる単離細胞等の実験系で行われたもので、活性ペプチドの分布の方向性が生物薬学的見地からも問題として残る。さらにペプチド性医薬品投与時の特定標的臓器における分布像を検討した報告は少なく、作用との関連からもその解明が望まれている。

そこで前節で得た secretin, elcatonin, aprotinin の胃内における代謝特性面での知見を基に、これらペプチドの胃内分布動態を検討した。

### (1) secretin の分布

secretin 静注後のラット組織中への分布は、Robbins<sup>ら</sup><sup>41)</sup>により<sup>125</sup>I-[Tyr<sup>6</sup>] secretin を用いて検討され、投与後 30 分迄腎、肝への放射活性の移行が大きく、それ以降 deiodination のため胃腔内への<sup>125</sup>I<sup>-</sup> の分布の増大することが報告されている。しかし放射活性測定のみによる検討のためその分布した放射活性の本態は不明のままであった。

そこで<sup>125</sup>I-[Tyr<sup>1</sup>] secretin を tracer として灌流し、胃から流出してくる門脈流出液中放射活性の推移を追跡すると共に組織内に分布した放射活性をゲル濾過法を用いて分析することにより胃への secretin の移行性を検討した。

Fig.17 に示すように流出液中放射活性は速やかに平衡に達したが、胃組織中総放射活性は時間と共に増大した。しかしゲル濾過法により求めた胃内未変

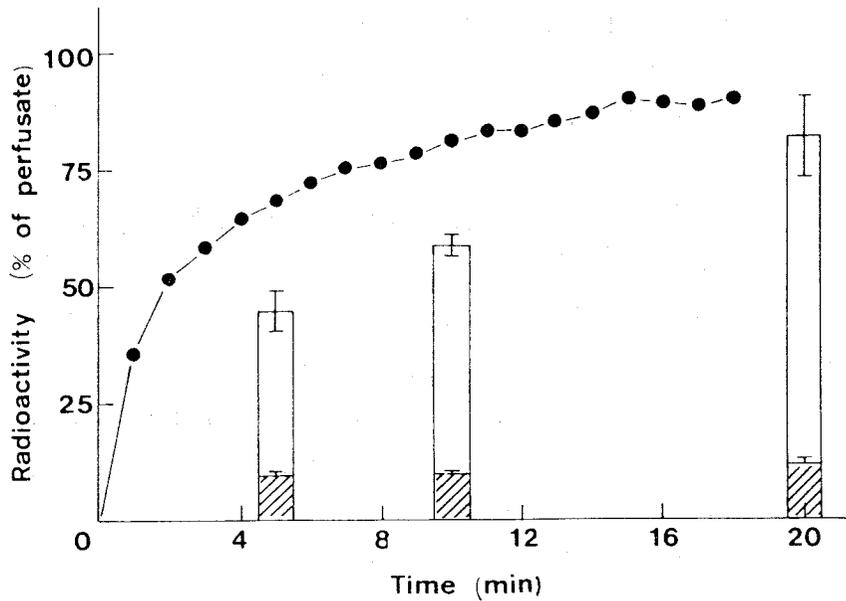


Fig. 17. Distribution of  $^{125}\text{I}$ -[Tyr<sup>1</sup>]secretin in Isolated Perfused Rat Stomach

Solid circles represent the total radioactivity in 1 ml of effluent, the total height of open columns is the total radioactivity per g of stomach, and the hatched columns represent the intact secretin concentration, determined by gel filtration, in the stomach. Data are expressed as percent of perfusate. Each point is the mean value of 3 experiments. The vertical lines give the S.E..

化体濃度比は約 10 %であった。

また inulin を灌流し、灌流胃標本の細胞外液容積を測定した結果、胃湿重量の  $7.0 \pm 0.4\%$  ( $n=3$ ) であった。

以上の結果は前節で述べた radioimmunoassay による結果とも対応し、胃内への secretin の分布は速やかで、主に細胞外液中の限られたスペースに分布しているものと考えられた。

(2) elcatoninの分布

elcatoninの体内動態は山内ら<sup>42)</sup>によりラットでの血中半減期は約5分と報告され、また同じ魚類 calcitoninである salmon calcitoninのラットでの体内分布は臓器、組織間で二種類の分布様式を示すことが Scarpaceら<sup>43)</sup>により

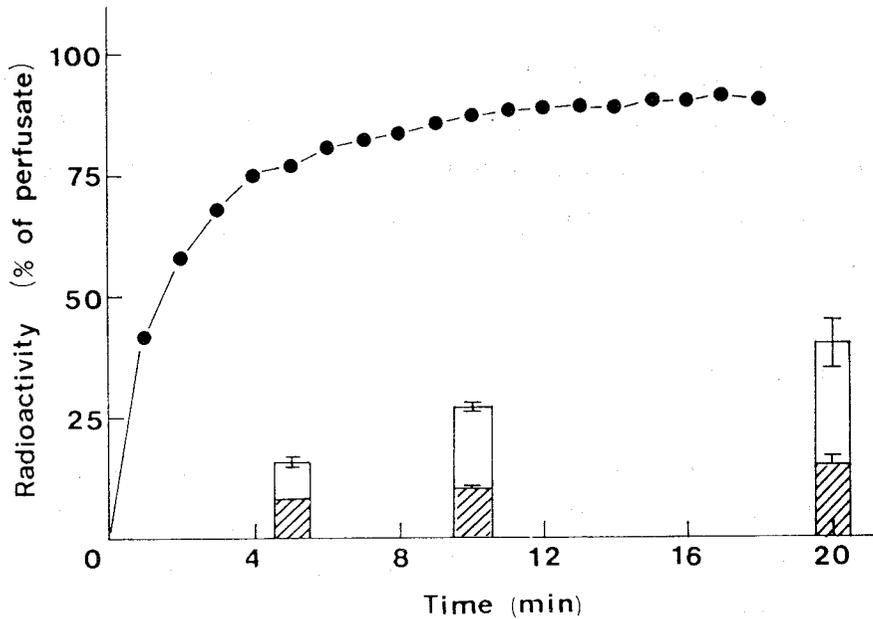


Fig. 18. Distribution of  $^{125}\text{I}$ -Elcatonin in Isolated Perfused Rat Stomach

Solid circles represent the total radioactivity in 1 ml of effluent, the total height of open columns is the total radioactivity per g of stomach, and the hatched columns represent the intact elcatonin concentration, determined by gel filtration, in the stomach. Data are expressed as percent of perfusate. Each point is the mean value of 3 experiments. The vertical lines give the S.E..

$^{125}\text{I}$  標識体を用いて明らかにされている。彼らによると肝は速やかな取り込みとそれに続く迅速な代謝を行い、一方腎、骨は持続性を示す蓄積と緩徐な代謝を行った。しかし胃内への calcitonin の分布は検討されておらず、elcatonin の胃内分布をトレーサー法により検討することにした。

$^{125}\text{I}$  標識 elcatonin の分布は Fig.18 に示すように速やかで secretin 灌流時と同様に門脈流出液中放射活性は短時間で平衡に達した。また胃組織内未変化体の割合も灌流期間中やや上昇傾向を示したもののほぼ一定で 20 分後の分布容積は  $0.15 \pm 0.02 \text{ ml/g wet weight}$  であった。

ラット腎に elcatonin は高濃度取り込まれることが腎皮質スライスおよび腎灌流法により明らかにされている。<sup>44)</sup> またラット腎内には elcatonin 結合部位の存在することを Yamamoto ら<sup>45)</sup> が報告した。しかし、この結果はラット胃内への elcatonin の分布は細胞外液中への分布が大部分を占めていることを示唆した。

### (3) aprotinin の分布

高い等電点 (pI 10.5) を示す塩基性ペプチドの aprotinin は serine protease と強固な complex を形成する他に、負電荷を持つムコ蛋白等に吸着する性質を有している。<sup>46)</sup> 胃灌流法により  $^{125}\text{I}$ -aprotinin を灌流し、その胃内への分布特性を検討した結果、Fig.19 に示すようにその分布速度の速いこと、またその分布容積は  $0.248 \pm 0.040 \text{ ml/g wet weight}$  であることを認めた。この値は先の secretin, elcatonin が示した値の約 2.5 倍であり、胃内への aprotinin の分布性は secretin, elcatonin に比べ大きいことが認められた。

また灌流液濃度を変化させてもその分布容積に変動は観察されなかった (Table V)。腎尿細管 brush border membrane への aprotinin の結合性を Just ら<sup>47)</sup> が検討し、その結合定数の小さいこと、一方結合部位数は多いことを報告している。一般にペプチドホルモンの receptor は高い結合定数と限られた結合部位数を示すことが知られているが、彼らの結果はこれら receptor の性状と対照的であった。従って aprotinin の胃内分布も特殊な取り込み、結合機構の寄与は小さく、胃の extracellular space に存在する serine protease やムコ多糖への結合<sup>27,46)</sup> が、比較的大きな aprotinin の分布容積の主因であろうと推測された。

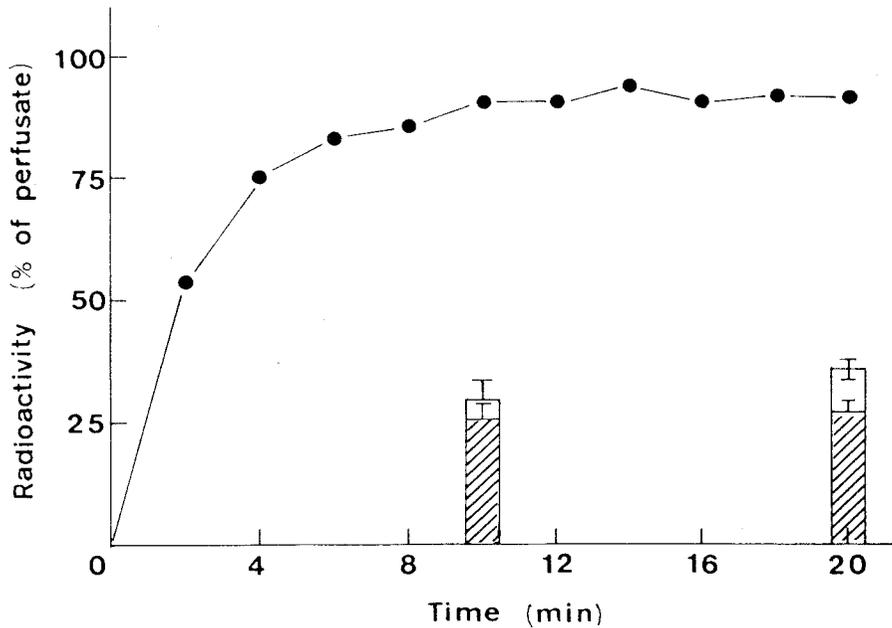


Fig. 19. Distribution of  $^{125}\text{I}$ -Aprotinin in Isolated Perfused Rat Stomach

Solid circles represent the total radioactivity in 1 ml of effluent, the total height of open columns is the total radioactivity per g of stomach, and the hatched columns represent the intact aprotinin concentration, determined by gel filtration, in the stomach. Data are expressed as percent of perfusate. Each point is the mean value of 3 experiments. The vertical lines give the S.E..

#### (4) 考 察

secretin, elcatonin, aprotininの胃内分布をラット摘出胃灌流法により検討し、これらペプチドの分布速度の速いこと、主に細胞外液中に分布することを認めた。aprotininはsecretin, elcatoninに比べその分布容積が大であ

Table V. Effect of Unlabeled Aprotinin on the Distribution of  $^{125}\text{I}$ -Aprotinin in the Perfused Stomach

Unlabeled aprotinin ( $\mu\text{M}$ )	Apparent volume of distribution (ml/g wet weight)
Control	$0.248 \pm 0.040^{\text{a)}$
0.23	$0.326 \pm 0.052$
2.30	$0.321 \pm 0.023$

a) Mean  $\pm$  S.E. of three experiments.

った。これは aprotinin の蛋白分解酵素への結合性や、その強い塩基性に由来するムコ多糖への結合性により、胃内に存在するこれら酵素や負電荷を有する多糖等に結合したためであると考えられた。

以上の結果は胃におけるこれらペプチドの分布に特殊な能動的取り込み機構の関与は少なく、濃度勾配に従った受動的拡散過程による分布が大部分を占めることを示した。ところで secretin は胃を主な作用器官とするにもかかわらず、胃内 secretin 結合部位 (receptor) の性状については不明の点が多い。その胃酸分泌抑制機序の解明にも結合部位における secretin の挙動を明らかにすることは有用な情報を提供するものと考えられる。そこで第 4 章では secretin に注目して、よりミクロな観点からその分布特性を精査し、作用機構との関連について検討を行うこととした。

### 第3章 膵における secretin, elcatonin, aprotininの挙動

前章において胃灌流法を用い secretin, elcatonin, aprotinin の胃内挙動を追跡し, disulfide結合の有無等によるペプチドの構造的特徴がそれらの胃内での代謝動態に反映することを明らかにした。またこれらペプチドの胃内分布速度は速く, 主に細胞外液中の限られたスペースに分布するものと考えられた。

膵における薬物挙動はHoriら<sup>4)</sup>により低分子量薬物の膵内分布, 膵液移行性の支配要因について検討がなされ, 薬物の分子容, 脂溶性が重要な役割を果たしていることが明らかにされた。しかしペプチド性医薬品についてはこれまでほとんど検討がなされていなかった。そこで前章で得た知見を基に secretin, elcatonin, aprotininの膵内での分布, 代謝像についてラット摘出膵灌流法により検討を実施し, 胃, 膵における活性ペプチドの挙動を比較検討した。

#### 第1節 secretin, elcatonin, aprotininの膵内代謝

膵内における活性ペプチドの代謝に関する研究は乏しく, 主に島細胞より分泌される insulinなどのホルモン合成時のプロセッシングに関する検討がほとんどであった。<sup>48)</sup>そこで前章で用いた手法を膵にも適用し, secretin, elcatonin, aprotininの膵内代謝を膵灌流法により検討すると共により詳細にペプチドの膵内代謝を明らかにする目的で各種の活性ペプチド共存時における secretinと elcatoninの代謝動態を比較検索した。

##### (1) secretinの代謝

胃に到達する secretinの一部は胃内で代謝されていることを灌流実験系で認め, 体内での速やかな消失に胃が一部関与していることを前章において指摘した。secretinの主な標的臓器の膵についてその代謝動態を明らかにすることは膵での作用機序解明の一助ともなると考えられる。そこでまず膵でも secretinが胃と同様に代謝されるか否かについて検討した。さらに各種ペプチド併用時

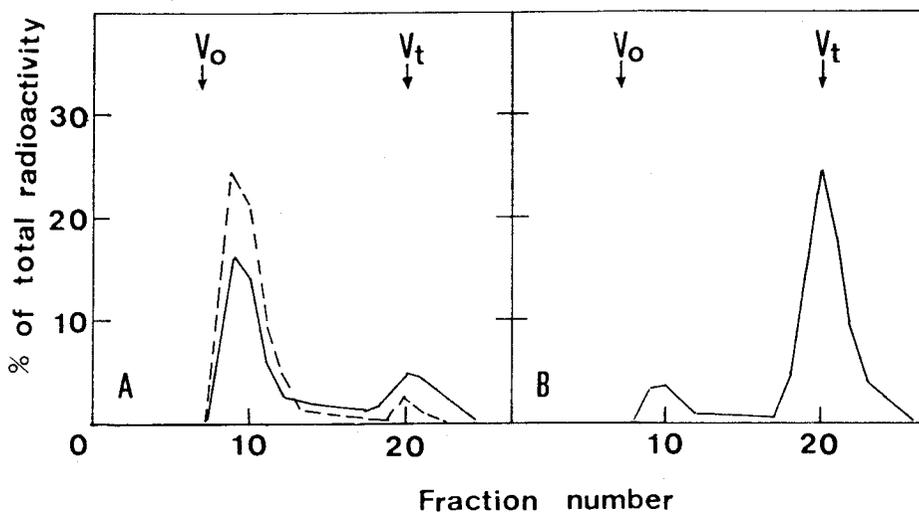


Fig. 20. Gel Filtration Profiles of Effluent and Tissue Extract from  $^{125}\text{I}$ -[Tyr<sup>1</sup>]secretin Perfusion

Samples taken 10 min after the beginning of the perfusion of  $^{125}\text{I}$ -[Tyr<sup>1</sup>]secretin were subjected to gel filtration on 1.0 x 70 cm Sephadex G-25 column. The broken line represents the gel filtration profile of the standard secretin. A, effluent; B, tissue extract of pancreas.  $V_0$ , Void volume;  $V_t$ , column volume.

における secretin の代謝についても考察を加えた。

Fig.20 に  $^{125}\text{I}$ -[Tyr<sup>1</sup>] secretin (約 0.1 nM) 灌流 10 分後における門脈流出液、組織抽出液中の放射活性をゲル濾過法により分析した結果を示すが、門脈流出液中未変化 secretin の割合は灌流液の  $57.6 \pm 6.6\%$  まで減少し、膵組織抽出液中では  $9.8 \pm 1.8\%$  の割合でしか未変化体分画に放射活性は出現しなかった。

また非標識 secretin を同時に灌流し、その代謝の飽和性について検討した。流出液中未変化体の割合に著明な変動は認められず、82nM secretin を加え灌流することで組織抽出液中の未変化体の割合が control の約 2 倍に上昇する

Table VI. Effect of Various Peptides on the Metabolism of  $^{125}\text{I}$ -[Tyr<sup>1</sup>]secretin in the Perfused Pancreas

Peptide	Intact secretin fraction (%) <sup>a)</sup>	
	Effluent	Tissue extract
Control	57.6 ± 6.6	9.8 ± 1.8
Secretin (16 nM)	67.6 ± 3.9	15.8 ± 4.4
Secretin (82 nM)	60.1 ± 0.3	20.2 ± 3.3 <sup>b)</sup>
Aprotinin (500 U/ml)	62.5 ± 2.2	10.3 ± 0.3
Insulin (100 mU/ml)	56.6 ± 7.6	8.9 ± 1.5
Elcatonin (100 nM)	63.8 ± 2.4	12.0 ± 2.5
Glucagon (3 μM)	67.8 ± 1.1	10.0 ± 2.0
Tetracosactide (3 μM)	59.6 ± 5.0	9.4 ± 0.7

a) Mean ± S.E. of three to five experiments.

b) Significantly different from control ( $p < 0.05$ ).

Perfusion time: 10 min.

ことを認めた (Table V)。しかし生理的濃度範囲ではほとんど secretin の膵内代謝に飽和性は存在しないものと考えられる。

また各種のペプチドホルモンを同じく同時灌流し secretin の膵内代謝への影響を検討したところ、使用した insulin, glucagon 等の共存により  $^{125}\text{I}$ -[Tyr<sup>1</sup>]secretin の代謝が顕著に変動する結果は得られなかった (Table W)。

次に非標識 secretin を灌流、その門脈中への出現性から secretin の膵内での代謝性を radioimmunoassay により検討した。門脈中への immunoreactive secretin の出現は速やかで、数分で灌流液濃度と平衡に達したが、平衡到達後 (1.5 - 5分) の灌流液に対する濃度比でみると 70 pM 灌流時で  $0.59 \pm 0.07$ 、350 pM 灌流時で  $0.67 \pm 0.02$  と灌流液よりも 30-40% 低値を示した (Fig. 21)。

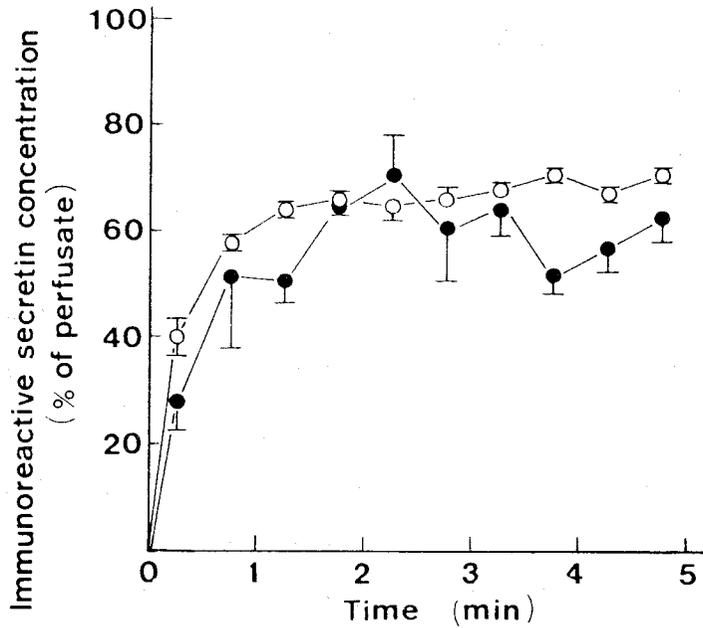


Fig. 21. Appearance of Immunoreactive Secretin in the Effluent from the Perfused Pancreas during the Infusion of Secretin (●: 70 pM, ○: 350 pM)

Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of 3 experiments.

以上の結果より，secretinは胃で認めたと同様に豚でも速やかに代謝されていることが明らかになった。しかし各種活性ペプチドの共存によってもその代謝像に変化は観察されなかった。

## (2) elcatoninの代謝

elcatoninは胃で一部が代謝されるがsecretinよりその程度は小さいことを前章第1節で認めた。Fig.22は $^{125}\text{I}$ -elcatonin(約0.1 nM)を豚に10分間灌流した際の門脈流出液，組織抽出液試料をゲル濾過法により分離したもので，その放射活性の分子量面での変化を示す。流出液中の未変化体分画に溶出される

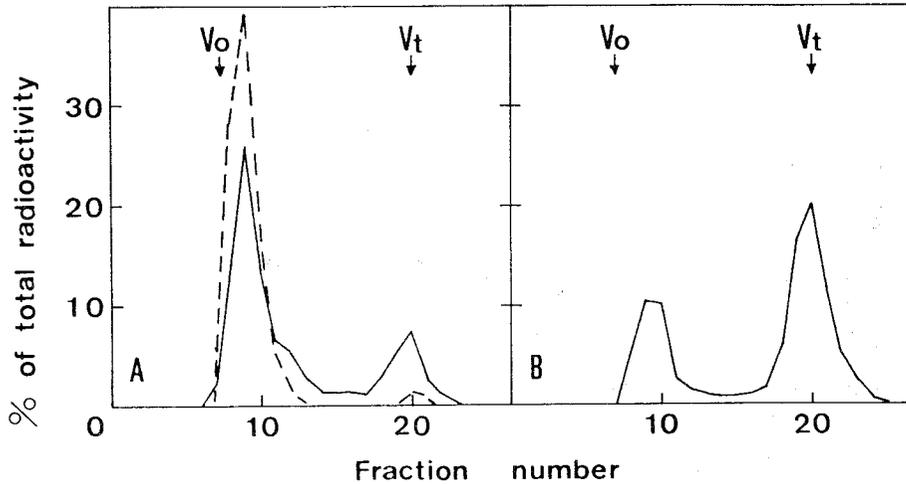


Fig. 22. Gel Filtration Profiles of Effluent and Tissue Extract from  $^{125}\text{I}$ -Elcatonin Perfusion

Samples taken 10 min after the beginning of the perfusion of  $^{125}\text{I}$ -elcatonin were subjected to gel filtration on 1.0 x 70 cm Sephadex G-25 column. The broken line represents the gel filtration profile of the standard elcatonin. A, effluent; B, tissue extract of pancreas.

放射活性は灌流液の  $66.1 \pm 4.4\%$  で、一方組織抽出液試料では  $26.3 \pm 2.8\%$  の放射活性が未変化体と同じ位置に溶出した。

また非標識 elcatonin 0.3 nM を灌流した場合、流出液中の immunoreactive elcatonin 濃度は速やかに上昇し、灌流液と平衡成立以降の流出液中濃度は灌流液の  $75.0 \pm 1.0\%$  であった (Fig. 23)。

以上の  $^{125}\text{I}$  標識体を用いたトレーサー実験および radioimmunoassay による結果を考慮すると膵内に入った elcatonin の 30% 前後が除去され、代謝をうけると結論できる。

次に elcatonin の膵内代謝過程に及ぼす各種ペプチドの影響について検討を行い、先の secretin 代謝の結果と比較した。Table VII は  $^{125}\text{I}$ -elcatonin とペプ

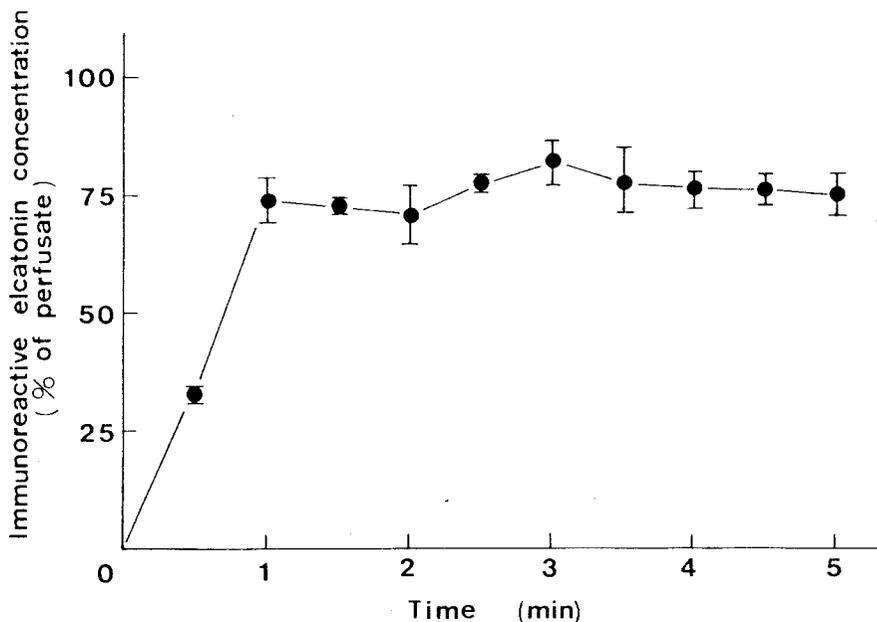


Fig. 23. Appearance of Immunoreactive Elcatonin in the Effluent from the Perfused Pancreas during the Infusion of Elcatonin (0.3 nM)

Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of 3 experiments.

チドを同時に 10 分間灌流した際の流出液，組織抽出液中放射活性をゲル 濾過法により分析し，未変化体の割合を測定したものである。aprotinin および insulin 共存により未変化体分画の割合が流出液，組織抽出液共，有意に増大し， $^{125}\text{I}$ -elcatonin の膵内代謝がこれらペプチドで著明に抑制され，先の secretin への影響と異なる結果を得た。Fig. 24 に insulin, aprotinin 共存時の典型的溶出パターンを示す。しかしこれら以外の glucagon, calcitonin 等のペプチドでは  $^{125}\text{I}$ -elcatonin の膵内代謝に大きな変動は認められなかった (Table VII)。

Table VII. Effect of Various Peptides on the Metabolism of  $^{125}\text{I}$ -Elcatonin in the Perfused Pancreas

Peptide	Intact elcatonin fraction (%) <sup>a)</sup>	
	Effluent	Tissue extract
Control	66.1 ± 4.4	26.3 ± 2.8
Aprotinin (500 U/ml)	81.4 ± 2.4 <sup>b)</sup>	42.3 ± 6.1 <sup>b)</sup>
Insulin (10 mU/ml)	88.5 ± 2.7 <sup>b)</sup>	45.8 ± 5.5 <sup>b)</sup>
Insulin (100 mU/ml)	88.3 ± 4.0 <sup>b)</sup>	44.5 ± 5.6 <sup>b)</sup>
Elcatonin (100 nM)	55.1 ± 7.5	17.6 ± 6.2
Human calcitonin (30 nM)	65.3 ± 11.9	19.6 ± 11.5
Porcine calcitonin (100 nM)	68.9 ± 7.5	17.7 ± 2.3
Salmon calcitonin (300 nM)	69.2 ± 2.7	20.0 ± 1.0
Glucagon (3 μM)	72.1 ± 11.2	30.0 ± 6.8
Tetracosactide (3 μM)	75.0 ± 5.9	27.6 ± 8.7

a) Mean ± S.E. of three to seven experiments.

b) Significantly different from control ( $p < 0.05$ ).

Perfusion time: 10 min.

calcitonin 代謝に及ぼす活性ペプチドの影響については、これまでに porcine calcitonin 皮下投与時に aprotinin を共存させると投与部位での代謝が低下することや、<sup>49)</sup> insulin がヒト乳癌細胞での  $^{125}\text{I}$ -salmon calcitonin の代謝を抑制することが報告されているが、<sup>50)</sup> aprotinin, insulin による calcitonin 代謝抑制機序は不明であった。そこで典型的な蛋白分解酵素による elcatonin の不活性化に及ぼす aprotinin, insulin の影響について in vitro において radioimmunoassay により検討した。その結果 aminopeptidase や carboxy-

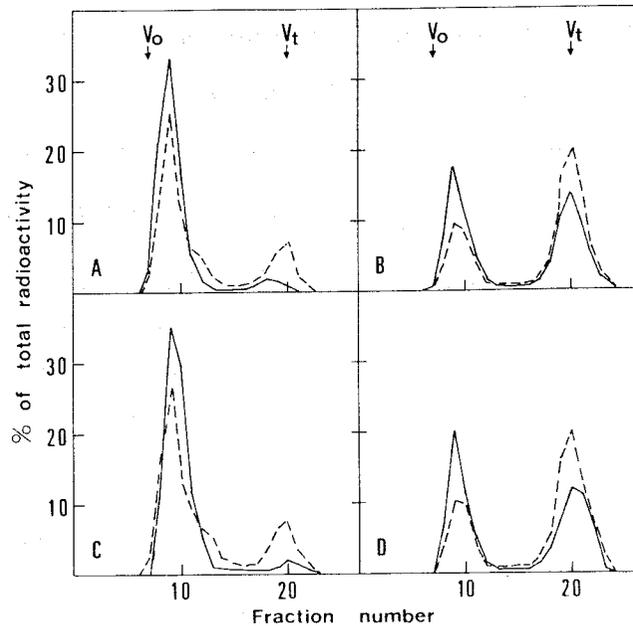


Fig. 24. Gel Filtration Profiles of Effluents and Tissue Extracts from the Concomitant Perfusion of  $^{125}\text{I}$ -Elcatonin with Aprotinin and Insulin

Samples, taken 10 min after the beginning of the concomitant perfusion of  $^{125}\text{I}$ -elcatonin with aprotinin (500 U/ml; A,B) or insulin (10 mU/ml; C,D), were subjected to gel filtration on 1.0 x 70 cm Sephadex G-25 column. The broken line represents the gel filtration profiles of samples obtained from control experiment. A,C, effluent; B,D, tissue extract of pancreas.

peptidase 等の exopeptidase では elcatonin の不活性化が顕著ではなかったが、trypsin, chymotrypsin 等の endopeptidase 共存により immunoreactive elcatonin 濃度の急速な低下が観察された (Fig.25)。そこで aprotinin を加え elcatonin の不活性化速度を測定したところ、trypsin, chymotrypsin に

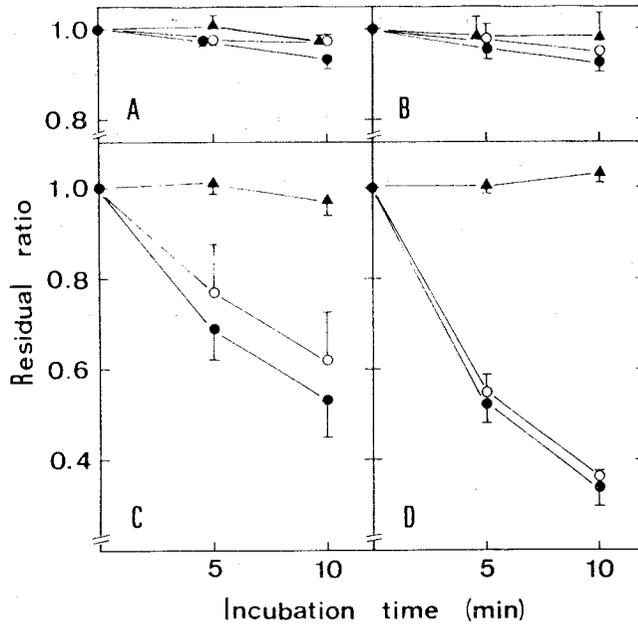


Fig. 25. Effect of Aprotinin and Insulin on Inactivation of Elcatonin by Proteases

Elcatonin (5.7 nM) was incubated with several proteases at 37°C in the presence of aprotinin (500 U/ml; ▲) or insulin (200 mU/ml; ○). Solid circle represents the value of control experiments. Each point is the mean ± S.E. of 3-4 experiments. A, leucine aminopeptidase (10 µg/ml); B, carboxypeptidase A (10 µg/ml); C, trypsin (0.1 µg/ml), D, chymotrypsin (10 µg/ml).

よる不活性化が著明に抑制された。しかし insulin にはこの抑制効果は認められなかった。

aprotininは trypsinあるいは kallikrein等の serine protease と安定な complexを形成し、その酵素活性を阻害する。<sup>27)</sup> 従って豚灌流実験で認めた aprotininの elcatonin代謝抑制作用は豚の細胞表面に存在する serine pro-

teaseに対する阻害活性に由来することが示唆された。しかし insulin の作用はこれら酵素への直接作用では説明されなかった。近年 insulin が膵機能を調節する作用を持ち、<sup>51)</sup> 島細胞および腺房細胞にその receptor の存在することが報告されている。<sup>52)</sup> insulin は膵細胞膜蛋白の代謝回転を及ぼし、細胞膜蛋白分解酵素レベルが変動することによって、insulin による elcatonin 膵内代謝抑制の発現した可能性も考えられる。以上の知見は活性面のみならず代謝面についてもペプチド間相互作用を考慮すべきであることを示した。

(3) aprotinin の膵内代謝

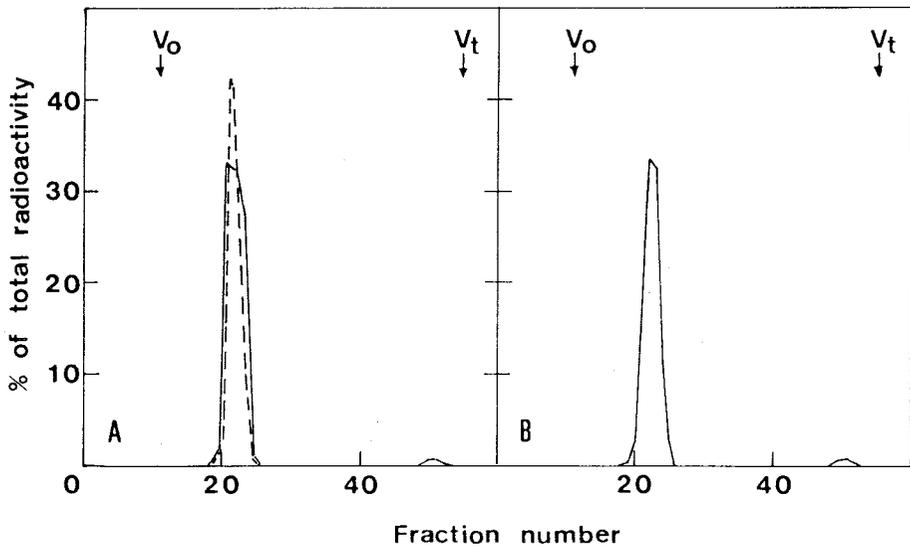


Fig. 26. Gel Filtration Profiles of Effluent and Tissue Extract from <sup>125</sup>I-Aprotinin Perfusion

Samples taken 10 min after the beginning of the perfusion of <sup>125</sup>I-aprotinin were subjected to gel filtration on a 1.5 x 90 cm Toyopearl HW-55 column. The broken line represents the gel filtration profile of the standard aprotinin. A, effluent; B, tissue extract of pancreas.

前章で胃内における aprotinin の挙動を検討しその分子内 disulfide 結合が胃組織内での aprotinin の安定性に寄与していることを明らかにした。そこで膵においても aprotinin の代謝特性について分子内 disulfide 結合の影響を主に検討することとした。

$^{125}\text{I}$ -aprotinin を膵内に灌流した結果、Fig.26 に示すように門脈流出液、組織抽出液試料共にほとんど未変化体として存在していることがゲル濾過法により認められた。またこの未変化体の割合は非標識 aprotinin (0.23 または 2.3  $\mu\text{M}$ ) 共存灌流下でもほとんど変化しないことが認められた。(Table VIII)。

Table VIII. Effect of Unlabeled Aprotinin on the Metabolism of  $^{125}\text{I}$ -Aprotinin in the Perfused Pancreas

Unlabeled aprotinin ( $\mu\text{M}$ )	Intact aprotinin fraction (%) <sup>a)</sup>	
	Effluent	Tissue extract
Control	91.4 $\pm$ 2.4	94.9 $\pm$ 3.8
0.23	96.2 $\pm$ 1.0	94.3 $\pm$ 2.3
2.30	92.0 $\pm$ 3.1	94.4 $\pm$ 3.0

a) Mean  $\pm$  S.E. of three experiments.

Perfusion time: 10 min.

次に aprotinin 分子内の disulfide 修飾体を  $^{125}\text{I}$  標識後、膵内に灌流し aprotinin の膵内代謝への分子内 disulfide 結合の寄与を考察した。Fig.27 のゲル濾過パターンが示すように、還元体および S-carboxamidomethyl 化体とも未変化体として存在する割合は、著明に低下した (Table IX)。特に  $^{125}\text{I}$ -還元 aprotinin では高分子量分画に溶出される放射活性が増大することを認め、内因性の SH 基を含む物質との間で分子間 disulfide 結合の形成されたことが推察された。

以上の結果は前章での胃内代謝の結果と類似し，胃，膵共に aprotinin は難代謝性であること，その分子内 disulfide 結合がその安定性に大きく寄与していることを明確にした。

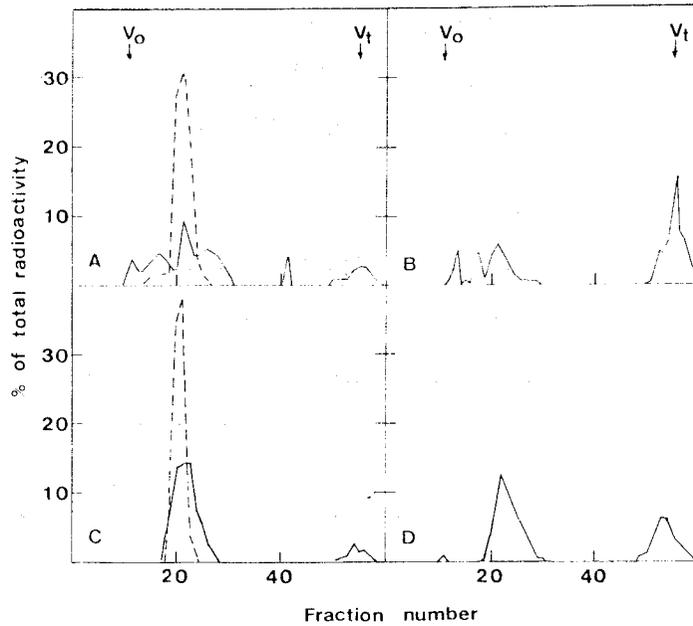


Fig. 27. Gel Filtration Profiles of Effluents and Tissue Extracts from  $^{125}\text{I}$ -Reduced Aprotinin (A,B) and  $^{125}\text{I}$ -[S-carboxamidomethyl]Aprotinin (C,D) Perfusion

Samples taken 10 min after the beginning of the perfusion of  $^{125}\text{I}$ -modified aprotinin were subjected to gel filtration on 1.5 x 90 cm Toyopearl HW-55 column. The broken line represents the gel filtration profile of the tracer of modified aprotinin. A,C, effluent; B,D, tissue extract of pancreas.

Table IX. Effect of the Modification of Disulfide Bonds on the Metabolism of  $^{125}\text{I}$ -Aprotinin in the Perfused Pancreas

	Parent peptide fraction (%) <sup>a)</sup>	
	Effluent	Tissue extract
Control	91.4 ± 2.4	94.9 ± 3.8
Reduced aprotinin	28.3 ± 3.4 <sup>b)</sup>	12.7 ± 4.9 <sup>b)</sup>
[S-carboxamidomethyl]aprotinin	57.5 ± 5.3 <sup>b)</sup>	25.4 ± 3.2 <sup>b)</sup>

a) Mean ± S.E. of three experiments.

b) Significantly different from control ( $p < 0.05$ ).

Perfusion time: 10 min.

#### (4) 考 察

secretin, elcatonin, aprotinin の膵内代謝を膵灌流法により比較検討した結果、前章の胃灌流法を用いて解析した結果と同様に直鎖状ペプチドの secretin が最も不安定で、一部環状構造を有する elcatonin がこれに続き、aprotinin は disulfide 結合を分子内で保持した状態では安定であることが判明した。膵への血流量（心拍出量の 1.3%<sup>53)</sup>）を考慮するとこれらペプチドの全身的消失に対する膵の寄与は少ないと考えられるが、secretin の膵内代謝が非常に速い事実は secretin の膵液分泌促進作用の持続性を一部制御していることが推測できる。またペプチド間の代謝面での相互作用を検討したところ、elcatonin の膵内代謝が insulin, aprotinin により抑制されることを認めた。aprotinin の抑制作用は膵内に存在する serine protease 阻害に基づくことが示唆されたが、insulin の抑制機序にはより複雑な機構の介在していることが推察された。

外因性 somatostatin の膵への取り込みを犬を用いた膵灌流法により検討し

たKawaiらの報文<sup>54)</sup>によると、この14個のアミノ酸からなる一部環状ペプチドは膵を一回通過する毎に50-80%の割合で取り込まれる。またその際insulin, glucagonも約20%が取り込まれることも報告されている。従って著者の得た知見とこれらの知見を考察すると、これまで肝、腎に比べ考慮されることの乏しかった膵も各種活性ペプチドの取り込み、代謝臓器として無視し得ないことが明らかとなった。

## 第2節 secretin, elcatonin, aprotininの膵内分布

前章で secretin, elcatonin, aprotininの胃内への分布は細胞外液中が主であることを認めたが、膵内への活性ペプチドの分布は、放射性同位元素で標識したペプチドを静注し、その放射活性の推移を検討したもの<sup>41)</sup>がほとんどで、分布した放射活性物質の本態を詳細に追跡した報告はなされていない。

そこで前節で得た膵内代謝の知見を基に、secretin, elcatonin, aprotininの膵内分布像を比較検討した。

### (1) secretinの分布

Robbinsら<sup>41)</sup>は<sup>125</sup>I-[Tyr<sup>6</sup>] secretin静注後の膵への放射活性の移行性を追跡し、膵造影剤としてのsecretinの可能性を検討した。しかし膵内に取り込まれた放射活性は少なく、その有用性は否定され、その後研究は進展していない。従って膵に分布した放射活性物質中に占める未変化体の割合など詳細は不明の点が多い。

Fig.28に<sup>125</sup>I-[Tyr<sup>1</sup>] secretin灌流時における放射活性の推移とゲル濾過法により求めた膵組織中での未変化体の割合を示す。流出液中の放射活性は数分以内に平衡に達した。ゲル濾過法により測定した流出液と灌流液との灌流10分後におけるsecretin濃度比は $0.55 \pm 0.07$ であり、組織と灌流液との濃度比は $0.11 \pm 0.02$ であった。組織中に分布した小分子量の放射活性は灌流時間の経過に伴って増大することを認めたが、未変化体の組織中濃度はほぼ一定であった。膵液中への放射活性の移行は灌流期間中ほとんど検出されなかった。

次に主に細胞外液中に分布するinulinを灌流しその膵中濃度を測定した結果、

灌流液の  $15.8 \pm 1.2\%$  ( $n=3$ ) の値を示した。このため secretin の分布は主に細胞外液中に限られたスペースに分布しているものと考えられた。

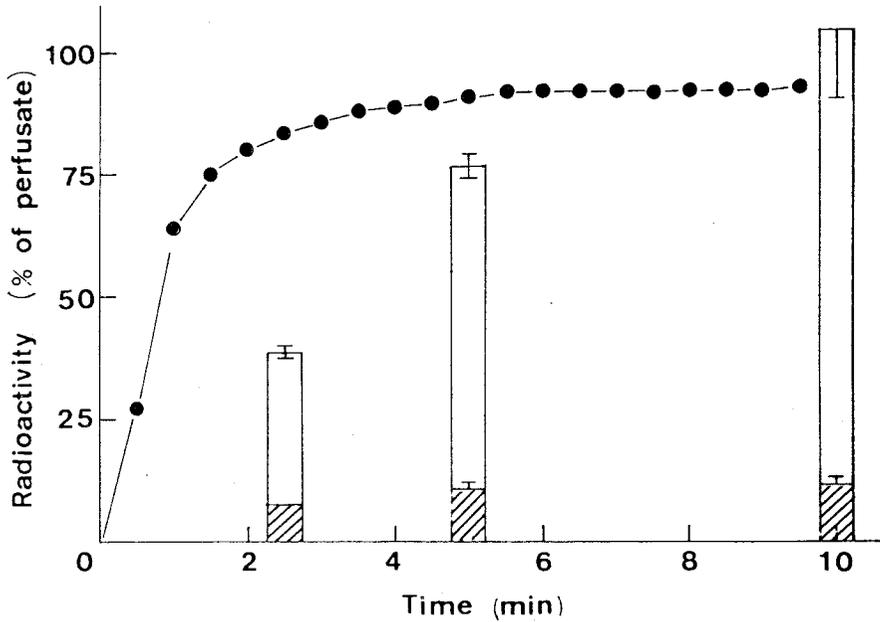


Fig. 28. Distribution of  $^{125}\text{I}$ -[Tyr<sup>1</sup>]secretin in Isolated Perfused Rat Pancreas

Solid circles represent the total radioactivity of effluent, total height of open columns represents the total radioactivity in the pancreas, and the hatched columns represent the intact secretin concentration, determined by gel filtration study, in the pancreas. Each point is the mean value of three experiments. The vertical lines give the S.E..

(2) elcatoninの分布

$^{125}\text{I}$ -elcatoninを灌流し前節で用いたゲル濾過法により組織中 elcatonin濃

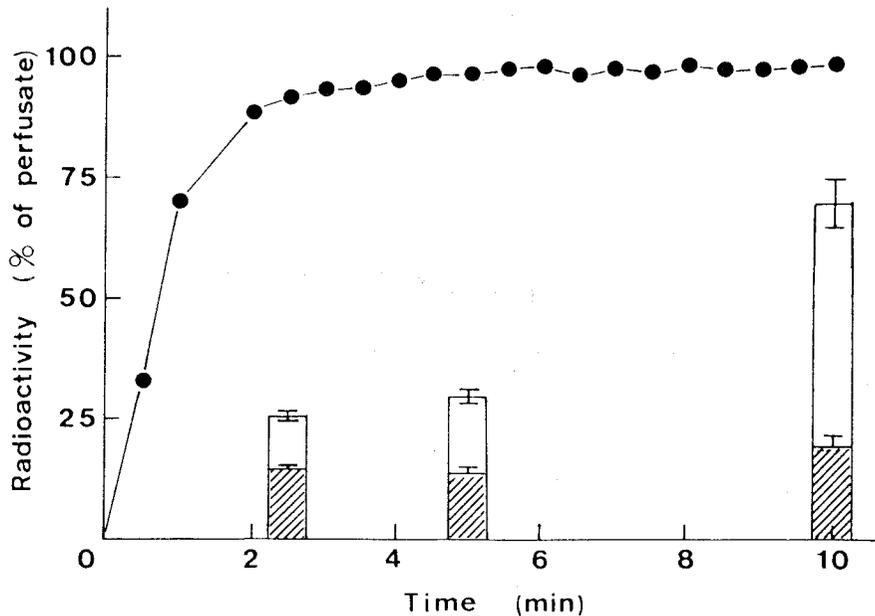


Fig. 29. Distribution of  $^{125}\text{I}$ -Elcatonin in Isolated Perfused Rat Pancreas

Solid circles represent the total radioactivity of effluent, total height of open columns represents the total radioactivity in the pancreas, and the hatched columns represent the intact elcatonin concentration, determined by gel filtration study, in the pancreas. Each point is the mean value of 3-7 experiments. The vertical lines give the S.E..

度の時間変化を検討した。Fig.29はその結果を示したもので、門脈流出液中放射活性が平衡に達すると共に組織中未変化体濃度も速やかに一定の値を維持した。灌流10分時の灌流液に対する組織中 elcatonin の濃度比は  $0.18 \pm 0.02$  であった。secretin の場合と同様に時間の経過に伴い組織中小分子量 fragment の増大が認められた。また非標識 elcatonin 100nM を加え灌流を行ったが、その時の灌流液に対する組織中濃度比は標識体単独灌流時との間で変動せず、その分布に濃度依存性を示さなかった。一方腎では灌流法により組織中に elcatonin

が高濃度集積されることが明らかにされている。<sup>44)</sup>腎とは異なり膵には elcatonin の分布に特殊な取り込み機構の介在している可能性が胃と同様に少ないものと考えられ、膵の細胞外液中の限られたスペースに elcatonin は大部分分布するものと推察された。

(3) aprotinin の分布

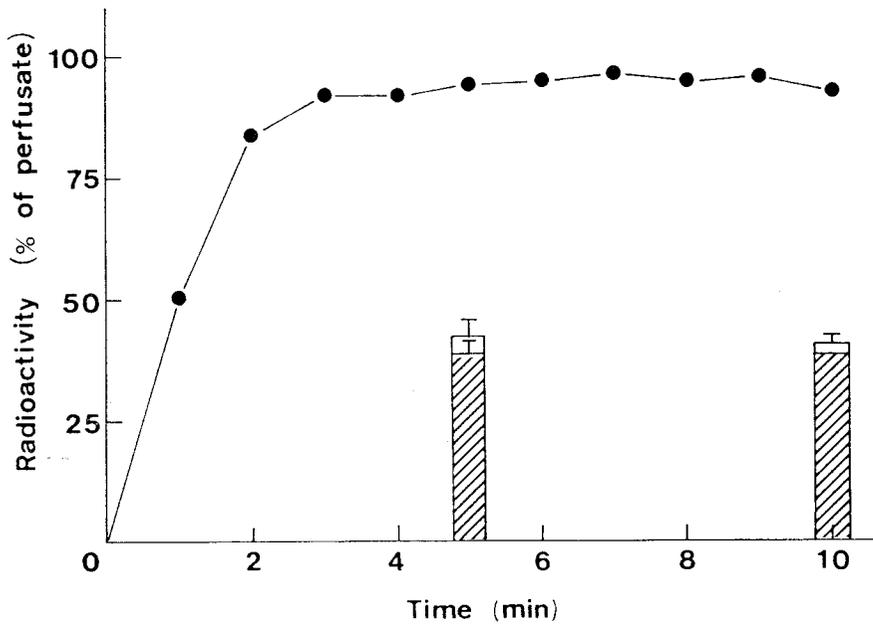


Fig. 30. Distribution of  $^{125}\text{I}$ -Aprotinin in Isolated Perfused Rat Pancreas

Solid circles represent the total radioactivity of effluent, total height of open columns represents the total radioactivity in the pancreas, and the hatched columns represent the intact aprotinin concentration, determined by gel filtration study, in the pancreas. Each point is the mean value of three experiments. The vertical lines give the S.E..

aprotininは難代謝性であることを前節(3)ですでに明らかにした。<sup>125</sup>I-aprotininを灌流し、その分布を検討した結果をFig.30に示す。ゲル濾過法により求めた組織中aprotinin濃度は灌流液濃度の $38.6 \pm 2.1\%$ を示した。またこの分布容積は非標識aprotinin 10, 100 nMを加え、灌流した場合にも変動を認めなかった。

aprotininはムコ多糖やserine proteaseに結合することが知られているが、<sup>46)</sup>secretin, elcatoninに比べ大きい分布容積を示したことは、aprotininが膵内のextracellular spaceに存在するこれらの物質に結合していることを示唆した。

#### (4) 考 察

secretin, elcatonin, aprotininの膵内分布を比較検討し、その分布速度の早いこと、これらペプチドは主に細胞外液中の限られたスペースに分布することを認めた。secretin, elcatoninに比べて高いaprotininの膵内分布性は、aprotininの持つ蛋白分解酵素やムコ多糖への結合特性より推察すると、胃と同様に膵のextracellular spaceに存在する酵素や多糖への非特異的吸着に因るものと考えられる。

従って先に検討した胃内分布の結果と総合すると、これらペプチドの胃、膵内分布像に顕著な臓器間変動は認められなかった。またその分布は腎でのelcatonin, aprotininの集積<sup>34,44)</sup>のような特殊な取り込み過程の寄与は小さく、主に拡散過程によって胃、膵内に分布しているものと考えられる。しかし分布像と作用との関連を解析するには、受容体への活性ペプチドの分布、結合特性を明らかにする必要がある。そこで次章では胃、膵を共に主な標的臓器とするsecretinを選択し、胃、膵内受容体レベルでのsecretinの挙動解析を試みた。

## 第4章 胃，膵における secretin の特異的結合

前章までに secretin, elcatonin, aprotinin の胃，膵内における分布，代謝動態について検討を行い，secretin が他のペプチドに比べて代謝されやすいこと，ペプチドの構造的特徴が臓器内安定性，分布特性にも影響を及ぼしていること等を明らかにしてきた。これらペプチドの内，胃と膵に対して対照的作用を発揮する secretin に注目し，その胃，膵内受容体の性状を明確にする目的で標的臓器レベル，細胞膜レベルから secretin の胃，膵での作用動態，分布動態，結合動態について対比検討した。

従来の receptor への結合性についての解析は，細胞分画成分，単離細胞等を用いて実施したものがほとんどであった。生理的環境下で receptor への活性ペプチドの結合性を検討した報文は，insulin receptor を *in vivo* において確認した Zeleznik and Roth の報告<sup>55)</sup>腎灌流系で peritubular membrane に insulin receptor の存在を証明した Petersen らの報告<sup>56)</sup>等僅かである。そこで前章までの検討に用いた灌流実験系により secretin の胃，膵での特異的結合について解析を試みた。

### 第1節 secretin の胃における特異的結合

secretin の酸分泌抑制作用は選択的で gastrin 刺激時の酸分泌を抑制するのに対して，histamine による酸分泌を抑制しないことが *in vivo* 動物実験により既に報告されている。<sup>57)</sup>そこでまず胃灌流法により secretin の胃酸分泌に及ぼす作用動態について検討を行い，次に secretin の作用動態を支配する分布特性について secretin receptor に対応する特異的結合部位が同じ灌流実験系で認められるか否かに注目し検討を行った。

#### (1) 胃灌流法による結合特性の解析

胃灌流法により gastrin 刺激時の酸分泌への secretin の影響を検討したところ，Fig.31A に示すように secretin 併用時に酸分泌が抑制される現象は認め

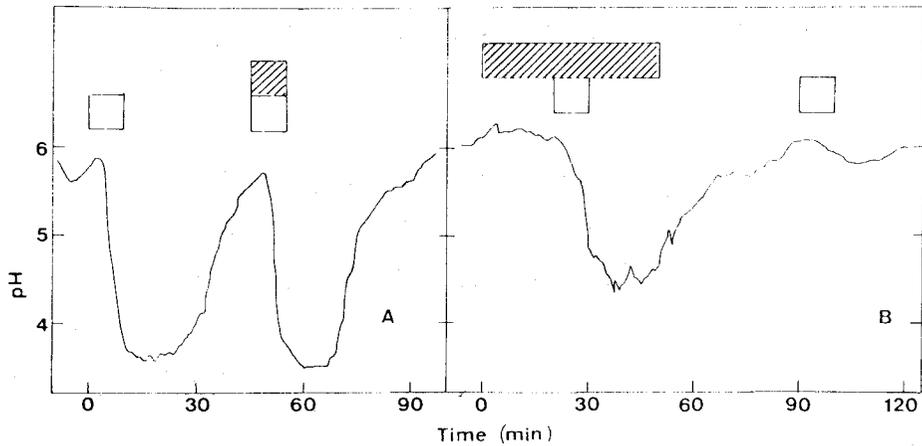


Fig. 31. Effect of Secretin on Gastrin-Induced Acid Secretion in Perfused Rat Stomach

The ordinate represents pH of luminal effluent as an index of acid secretion. Acid response to gastrin was significantly improved by the inclusion of  $10 \mu\text{M}$  theophylline in the vascular perfusate, so that this perfusion experiment was performed in the presence of  $10 \mu\text{M}$  theophylline. Although secretin did not directly inhibit acid secretion stimulated by gastrin (A), the pretreatment of secretin in the presence of gastrin significantly reduced the second response to gastrin (B). The perfusion periods of gastrin and secretin are indicated by open and hatched column, respectively.

られなかった。しかし secretin と gastrin を共存灌流後、gastrin を単独で灌流した場合、gastrin への反応性が顕著に低下することを認めた (Fig.31 B)。Table X はこの結果を 30 分間の酸分泌量としてまとめたもので、secretin 併用時には酸分泌の低下は認められないのに対して、secretin 併用後の 2 回目の gastrin 刺激による酸分泌量は著明に減少した。この結果は gastrin による酸

分泌を secretin が直接的、競合的に抑制しているのではないことを示唆した。

secretin は gastrin の gastrin receptor への結合を非競合的に阻害すること、<sup>58)</sup> 胃粘膜からの重炭酸イオンの分泌<sup>59)</sup> や somatostatin 分泌<sup>60)</sup> を促進することが報告され、また in vivo 実験においても secretin の酸分泌抑制発現には遅れが認められる。<sup>61)</sup> 従って secretin の酸分泌抑制作用にはこれら因子が複雑に関与しているものと考えられるが、この点に関しては secretin 結合部位との関連も含め(3)で考察する。

次にその作用を制御する secretin receptor について胃灌流法により検討を試みた。実験条件としては胃内に分布した <sup>125</sup>I 標識 secretin への非標識 secretin の影響を追跡する方法を採った。すなわち <sup>125</sup>I-[Tyr<sup>1</sup>] secretin を一定時間灌流後、灌流液のみで灌流することで細胞外液等に拡散している標識体を除き、その後非標識 secretin を灌流液中に添加し灌流を行った。

その結果 Fig. 32 に示すように非標識 secretin 添加後、門脈流出液中放射活性に一過性のピークが生じ、結合放射活性の置換を認めた。これは胃内で結合

Table X. Effect of Coadministered (A) or Preadministered (B) Secretin on Gastrin-induced Acid Secretion in the Perfused Stomach

	Acid secretion ( $\mu\text{eq}/30 \text{ min}$ )	% of first response	n
(A) 1 nM Gastrin	$4.56 \pm 0.77^{\text{a}}$	100	5
+ 10 nM Secretin	$4.62 \pm 0.33$	101.3	
(B) 1 nM Gastrin + 10 nM Secretin	$4.65 \pm 0.49$	100	3
2nd Response by 1 nM Gastrin	$1.58 \pm 0.66^{\text{b}}$	34.0	

a) Mean  $\pm$  S.E.

b) Significantly different from initial response ( $p < 0.05$ ).

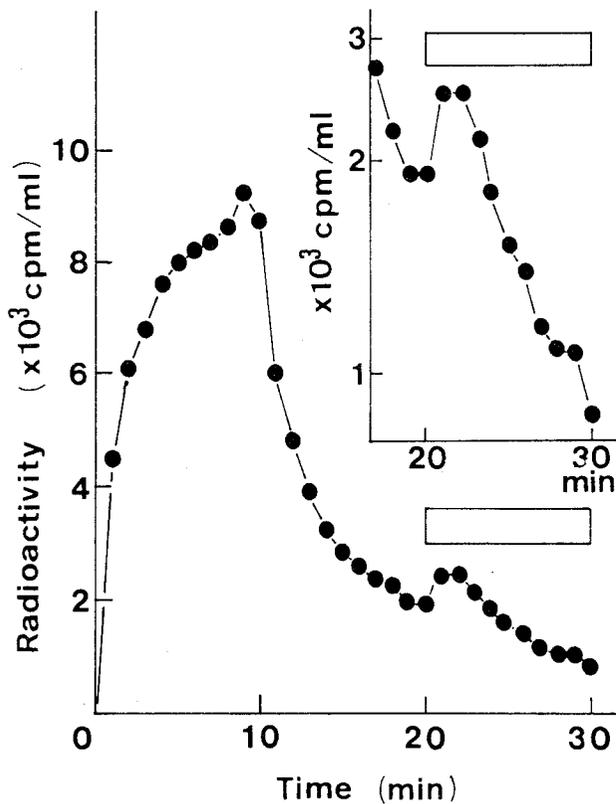


Fig. 32. Effect of Unlabeled Secretin on the Concentration of  $^{125}\text{I}$ -[Tyr<sup>1</sup>]secretin in Effluent from Isolated Perfused Rat Stomach

Labeled secretin was perfused for 10 min, followed by 10 min perfusion without secretin. During the last 10 min, perfusion medium supplemented with unlabeled secretin (20 nM) was perfused (as indicated by open column). The displacement phenomenon is clearly demonstrated semilogarithmically in the inset. Each point represents the mean of three experiments.

していた標識 secretinが大量の非標識体により置換され, 門脈流出液中に標識体が増大したためと考えられた。

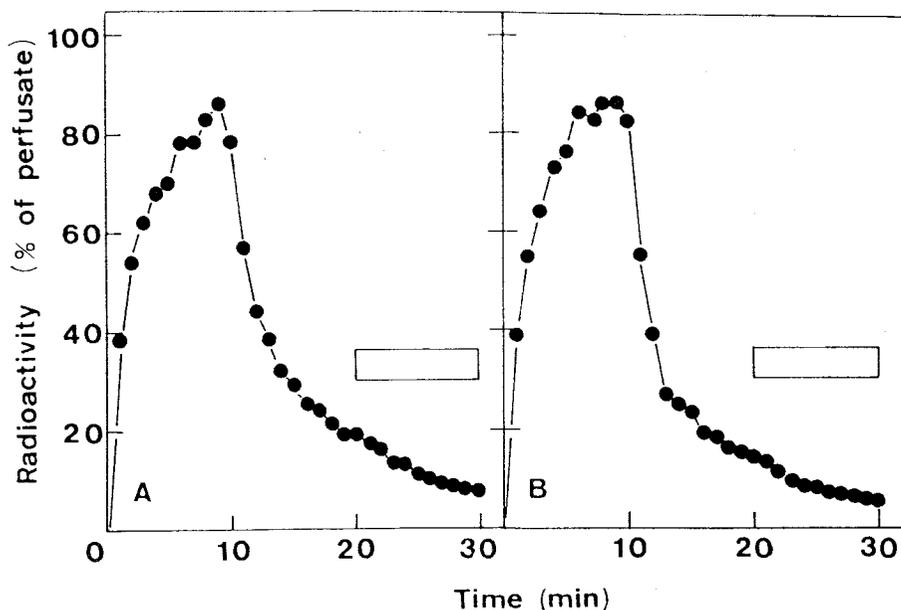


Fig. 33. Effect of Vasoactive Intestinal Peptide (A) or Glucagon (B) on the Concentration of  $^{125}\text{I}$ -[Tyr<sup>1</sup>] secretin in Effluent from Isolated Perfused Rat Stomach

Labeled secretin was perfused for 10 min, followed by 10 min perfusion without secretin. During the last 10 min, perfusion medium supplemented with unlabeled vasoactive intestinal peptide (0.2  $\mu\text{M}$ ; A) or glucagon (0.6  $\mu\text{M}$ ; B) was perfused (as indicated by open column).

次に secretin と多くのアミノ酸配列が共通する glucagon, vasoactive intestinal peptide (VIP) を非標識体として加え結合部位の識別性について検討を行った。しかしこれらペプチドでは標識 secretin の結合置換現象は認められず (Fig.33), その部位の識別性の高いことが示唆された。

活性ペプチドの receptor 解析にはこれまで細胞分画成分, 単離細胞等が主に

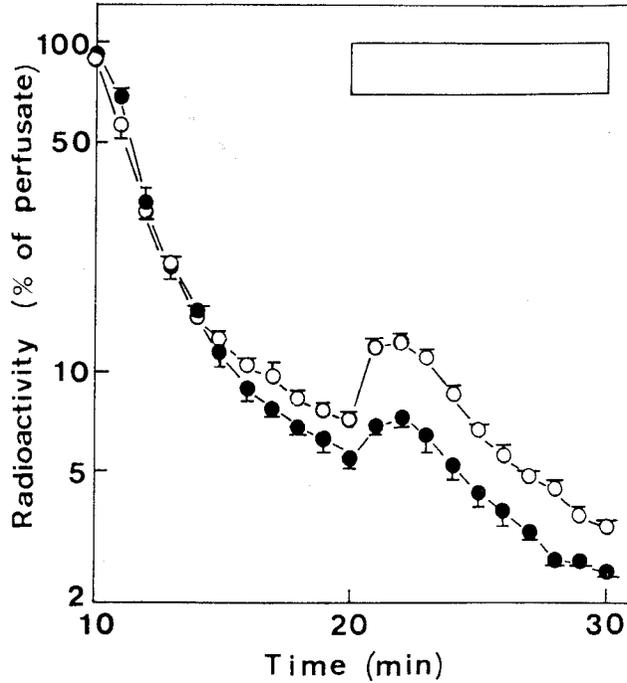


Fig. 34. Effect of Tetragastrin on the Concentration of  $^{125}\text{I}$ -[Tyr<sup>1</sup>]secretin in Effluent from Isolated Perfused Rat Stomach

Labeled secretin was perfused for 10 min, followed by 10 min perfusion without secretin. During the last 10 min, perfusion medium supplemented with 20 nM secretin was perfused as indicated by open column. Tetragastrin (137 nM) was perfused from the start of perfusion. By adding tetragastrin in the perfusate, the displacement phenomenon was significantly increased. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of five (control) or three (tetragastrin) experiments. The points of tetragastrin-treated group at 20 nM secretin perfusion period were significantly different from control. ○, tetragastrin 137 nM; ●, control.

用いられており，標的臓器レベルにおける receptor への結合特性はほとんど解明されていない。以上の結果はこれまで不明であった secretin の胃内結合部位への結合特性を臓器灌流法の応用により解析し得ることを示唆している。また結合置換現象で認めたピークが小さいことよりその結合部位は，胃内の限局した部位に分布していることが推察された。

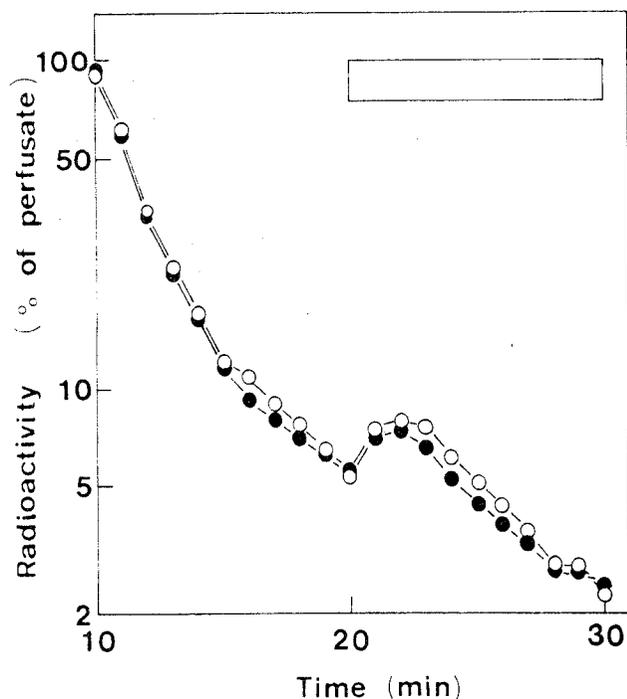


Fig. 35. Effect of Histamine on the Concentration of  $^{125}\text{I}$ -[Tyr<sup>1</sup>]secretin in Effluent from Isolated Perfused Rat Stomach

Labeled secretin was perfused for 10 min, followed by 10 min perfusion without secretin. During the last 10 min, perfusion medium supplemented with 20 nM secretin was perfused (as indicated by open column). Histamine (0.1 mM) was perfused from the start of perfusion. ○, histamine 0.1 mM; ●, control.

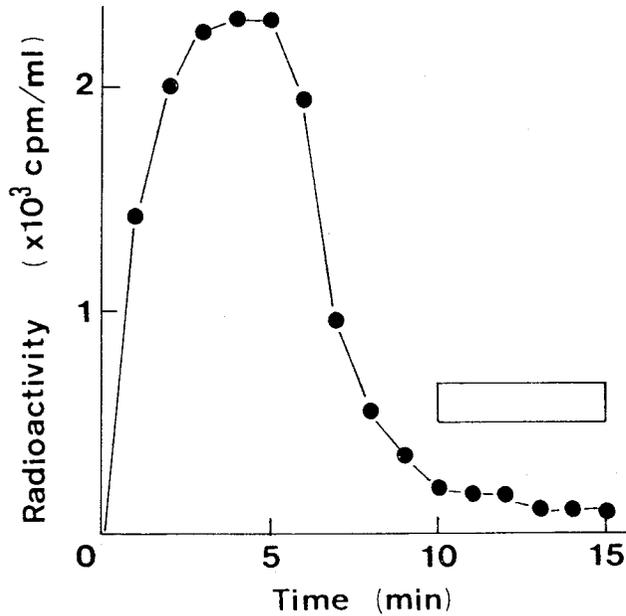


Fig. 36. Effect of Unlabeled Elcatonin on the Concentration of  $^{125}\text{I}$ -Elcatonin in Effluent from Isolated Perfused Rat Stomach

Labeled elcatonin was perfused for 5 min, followed by 5 min perfusion without elcatonin. During the last 5 min, perfusion medium supplemented with unlabeled elcatonin (60 nM) was perfused (as indicated by open column).

gastrinは胃酸分泌，膵外分泌相方を促進する作用を持ち，secretin はそれらの作用に対し胃では抑制的に，一方膵では促進的に作用を發揮する。<sup>62)</sup>そこで次に対照的な胃，膵間での gastrin, secretin相互作用についてその結合面から解析する目的で胃灌流法により gastrinの secretin結合部位への影響を検討した。

まず胃において secretinと反対作用を持つ gastrinの影響について，その最小活性ペプチドである tetragastrin を非標識体として用い灌流実験を行った

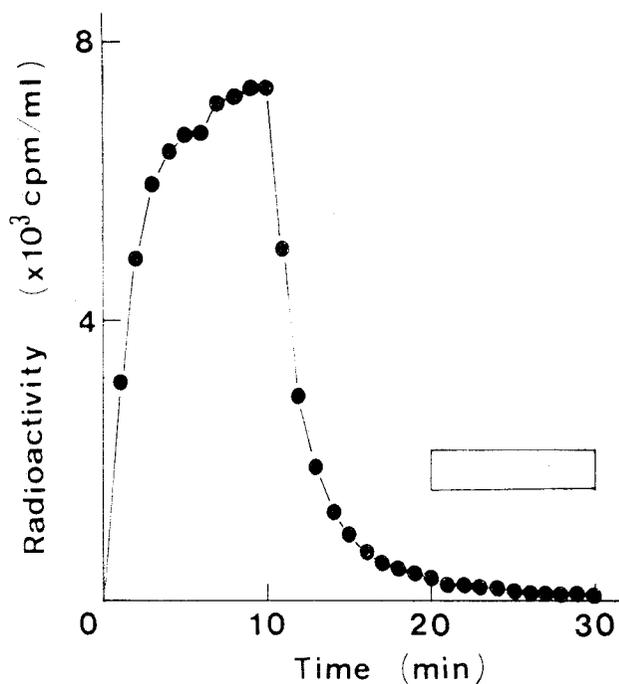


Fig. 37. Effect of Unlabeled Aprotinin on the Concentration of  $^{125}\text{I}$ -Aprotinin in Effluent from Isolated Perfused Rat Stomach

Labeled aprotinin was perfused for 10 min, followed by 10 min perfusion without aprotinin. During the last 10 min, perfusion medium supplemented with unlabeled aprotinin ( $2.3 \mu\text{M}$ ) was perfused (as indicated by open column).

が、結合置換現象は認められなかった。そこで次に灌流開始時より tetragastrin ( $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $137 \text{ nM}$ )を加え, secretin の結合置換実験を行ったところ, tetragastrin共存により置換され門脈中に出現する放射活性が顕著に増大した (Fig. 34)。さらにこの置換増大効果は human [Leu<sup>15</sup>] gastrin I ( $50 \text{ nM}$ )灌流によっても認められた。しかし gastrinと同様に酸分泌促進作用持つ histamine  $0.1 \text{ mM}$ を灌流した場合には controlとの間で差は認められなかつ

た (Fig.35)。

この結果は胃内 secretin 結合部位が gastrin により調節されていることを示唆しており，胃内結合部位レベルでの相互作用が secretin と gastrin 間で存在することを示した。

一方 elcatonin, aprotinin でも secretin の場合と同様の結合置換現象が生じるか否かについて検討したが，elcatonin, aprotinin では胃内での非標識体による  $^{125}\text{I}$  標識体の置換現象は認められなかった (Fig.36, Fig.37)。従って胃内へのこれらペプチドの分布は，細胞外液中への分布が大部分を占め，特殊な結合機構の介在していないことが予測される。

胃内 secretin receptor の性状については細胞レベル，細胞膜レベルにおいても検討がなされていない。そこで secretin receptor が存在するとされる胃粘膜の血管細胞膜に着目し，それへの secretin の結合性を次に検討することとした。

## (2) 細胞膜分画を用いた結合特性の解析

胃灌流実験により胃内 secretin receptor の存在が予測されたので，さらによりミクロな観点からその特性を明確にするため胃細胞膜分画への secretin の結合性について検討を行った。

胃粘膜より血管側細胞膜 basolateral membrane 分画を得る方法は，近年 Culp and Forte により dextran を用いる密度勾配遠心法によりウサギの胃から精製する方法<sup>63)</sup>が報告されているにすぎない。そこでより迅速かつ簡便に得る方法として Inui らが報告した腎尿細管 basolateral membrane vesicle 調製法<sup>64)</sup>を参考として，まず分別遠心法によりラット胃粘膜より粗製細胞膜 (crude plasma membrane) 分画を得，この分画に Percoll を 10% (v/v) の濃度となるよう加えた後， $48,000\times g$  で 30 分間遠心分離を行って，細胞膜を分離，精製した (Chart 1)。

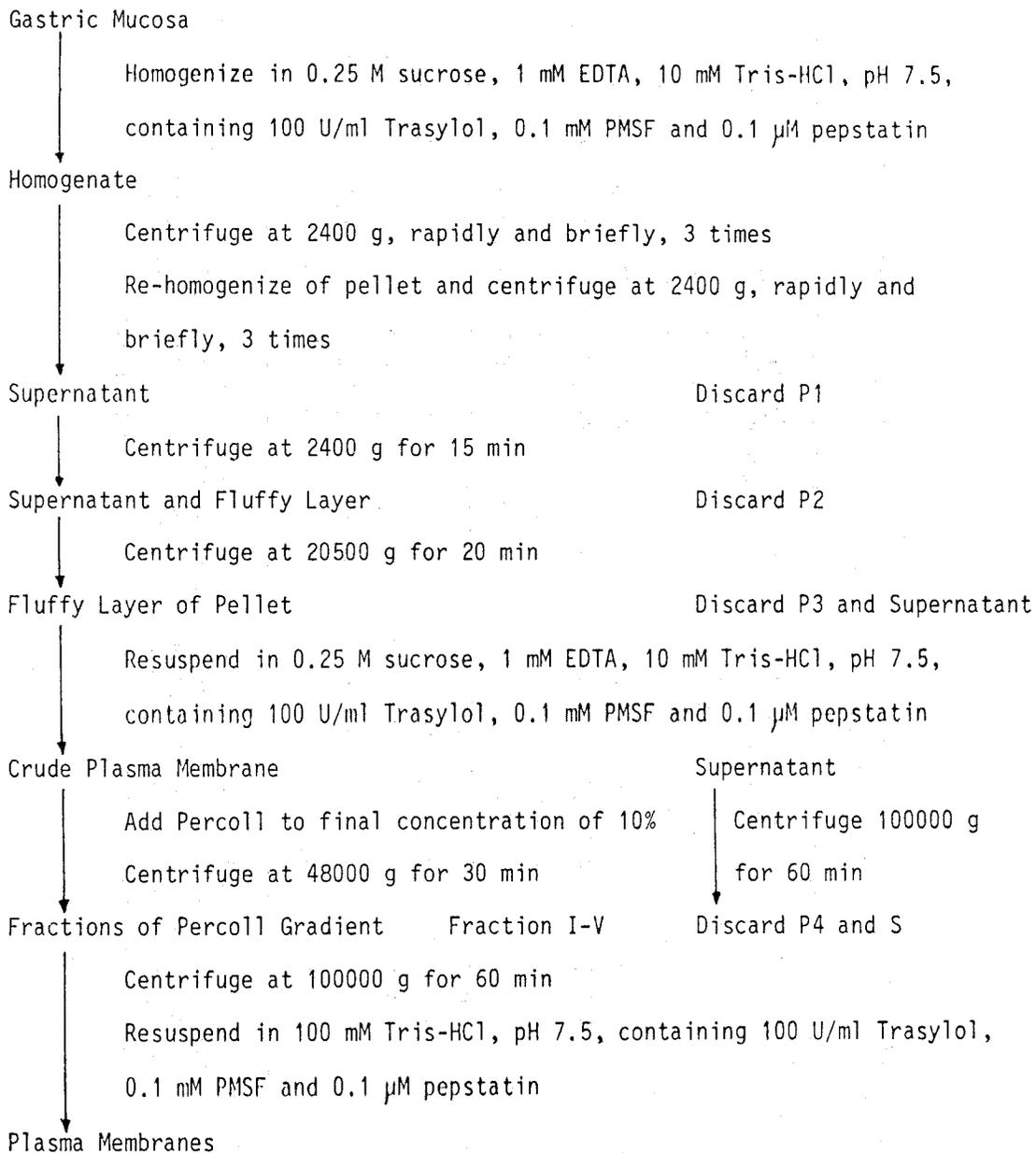


Chart 1. Preparation of Plasma Membranes from Rat Gastric Mucosa

Table XI. Distribution of Marker Enzymes, Protein and Secretin Binding Sites during Preparation of Basolateral Membrane Fraction from Rat Gastric Mucosa

	(Na <sup>+</sup> +K <sup>+</sup> )-ATPase	5'-Nucleotidase	Alkaline phosphatase	(K <sup>+</sup> +H <sup>+</sup> )-ATPase	Acid phosphatase	Cytochrome c oxidase	Protein	Secretin binding
H	7.8±0.9	1.2±0.1	34.8±5.2	17.2±2.8	279±25	13.9±2.7	100.0	6.2±0.5
P1	13.8±4.0	0.6±0.1	19.0±1.5	16.8±1.7	171±26	11.0±2.0	21.3±1.8	5.3±1.2
P2	2.9±0.4	1.1±0.1	14.2±4.8	24.3±4.7	316±81	27.8±9.4	31.7±0.5	8.6±1.2
P3	8.1±4.7	4.0±0.1	24.8±2.6	12.1±5.4	980±15	59.5±7.3	1.4±0.1	6.6±1.7
P4	10.2±5.9	6.0±0.2	55.2±14.2	29.2±8.5	434±13	3.2±0.7	3.5±0.8	5.6±2.3
S	5.9±1.7	0.7±0.1	46.8±2.4	2.4±1.0	275±7	0.2±0.03	37.6±1.4	—
CPM	42.9±8.3	5.0±0.7	82.3±26.1	157.0±29.1	541±60	17.4±2.7	4.4±0.7	8.6±3.1
Fr. II	81.7±2.1	10.4±1.7	72.5±8.8	100.3±25.3	392±76	1.6±0.4	0.3±0.03	29.1±4.3
Fr. III	90.1±8.8	5.2±1.0	112.8±17.5	170.4±31.2	374±23	2.5±0.2	0.4±0.04	8.0±5.7
Fr. IV	40.8±7.4	4.3±0.9	96.7±18.2	206.6±37.3	431±11	5.8±0.7	0.7±0.1	8.3±1.2
Fr. V	5.7±2.7	6.7±1.0	60.3±23.1	90.6±18.1	579±94	35.4±2.5	0.7±0.1	3.9±1.6

Each value represents the mean± S.E. for 3-4 experiments, and expressed as specific activity (nmol/min per mg protein)(Δ 0.0 D./min per mg protein for cytochrome c oxidase, fmol/mg protein for secretin binding). Protein was expressed as percent of homogenate. Enzyme and secretin binding activities in each Percoll fraction were determined after the removal of Percoll. These activities in Fr. I were not able to be determined from the low recovery of membrane material.

Table Xは上記の遠心分画法により得た分画中の指標酵素の分布を検討したもので、crude plasma membrane分画中にbasolateral membraneのmarkerとされる $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ ATPaseが約5倍精製された。そしてこの分画をPercoll密度勾配遠心法により分離、遠心管上層より1 mlずつ分取し指標酵素の分布パターンを検討した。 $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ ATPase活性はfr. No. 11付近にピークが存在し、一方小腸等で管腔側細胞膜、apical membraneのmarkerとされるalkaline phosphataseは遠心管下層に活性ピークが認められた。(Fig. 38)。そこで次に上層より6 mlずつ5つのfraction (Fr. I~V)にまとめ各々のfraction中への酵素分布を検討した。

Table Xに示すように $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ ATPase活性のピークが存在したFr. II (上層より7-12 mlの分画)ではその比活性がhomogenateの10倍以上に上昇し、plasma membrane markerの5'-nucleotidase比活性も約8倍となった。またalkaline phosphataseの混入も少なく、胃でapical並びにtubulovesicular membraneの指標とされる $(\text{K}^+ + \text{H}^+)$ ATPase活性<sup>63)</sup>も他のfractionに比べ低い値を示した。さらにmitochondriaやlysosomeの混入はcytochrome c oxidase活性、acid phosphatase活性の測定より僅かであると考えられた。

この方法による $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ ATPase活性の精製度は先に報告されたdextranを用いた調製法<sup>63)</sup>と同等であり、しかも短時間で調製可能な点を考慮すると、本法は感受性の高いreceptorを多く含む細胞膜分画の調製法として優れたものと考えられる。そこでこれら各分画と<sup>125</sup>I-[Tyr<sup>1</sup>]secretinの結合性を検討し、secretinのsubcellular componentへの結合特性を比較した。その結果、basolateral membrane分画のFr. IIが最も高い結合性を示したのに対し、他の分画ではhomogenateと同程度の低値であった(Table X)。

次にsecretinのbasolateral membrane分画への結合の時間経過を検討したところ、incubate開始30秒後にはほぼ結合は平衡に達し、また1分後に非標識体を1  $\mu\text{M}$ となるよう添加した場合、急速な結合置換が生じ標識体の結合率は急速に低下した(Fig. 39)。

以上の結果は先の灌流実験で認めたsecretinの結合置換現象が、胃粘膜basolateral membraneに存在するreceptorへの速やかな結合、置換特性に起因することを示唆している。

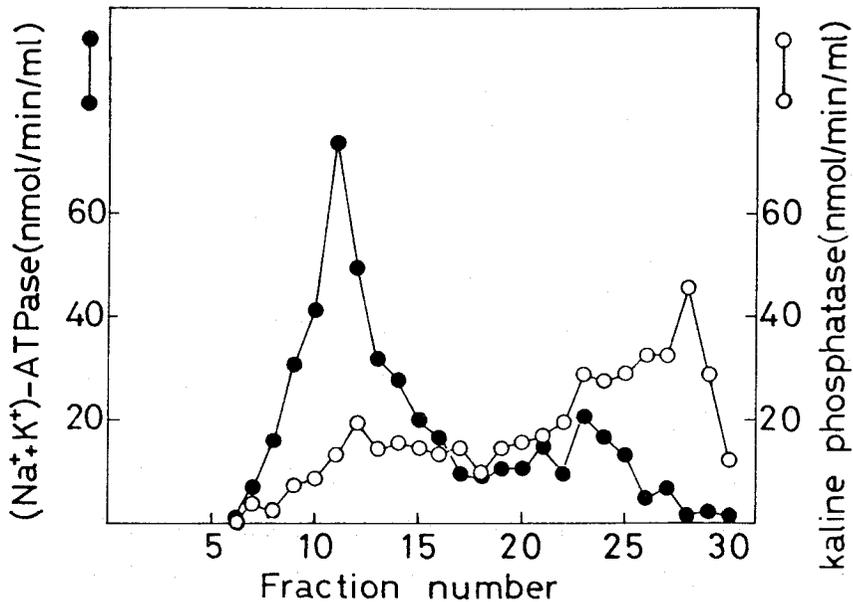


Fig. 38. Distribution of Marker Enzymes on Percoll Gradient

The Percoll gradient was collected from the top into 30 fractions of 1 ml. ●, (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATPase; ○, alkaline phosphatase.

また<sup>125</sup>I標識 secretinの結合に及ぼす secretinとその類似ペプチドの影響を検討したところ、非標識 secretin濃度に依存して標識体の結合は低下した (Fig. 40)。類似ペプチドのVIPは高濃度においてのみ結合低下作用を有したが、glucagonは1 μMでも secretinの結合に変動を与えなかった。

Scatchard plotによりその結合性を解析したところ、二種類の結合部位の存在することが推察され (Fig. 40 inset), 高親和性結合部位の解離定数(Kd<sub>1</sub>)は2.5 ± 1.4 nM, 最大結合部位数 (n<sub>1</sub>)は0.6 ± 0.3 pmol/mg proteinを示し、低親和性結合部位のKd<sub>2</sub>は133 ± 2 nM, n<sub>2</sub>は15.8 ± 3.8 pmol/mg proteinであった。

著者の検討と同時期にGespachら<sup>65)</sup>はラットの胃底腺より分別遠心法により細胞膜分画 (20,000 × g分画)を調製し、それへの secretinの結合性を報告した。彼らも二種類の結合部位が存在することを認め、またVIP, glucagonが

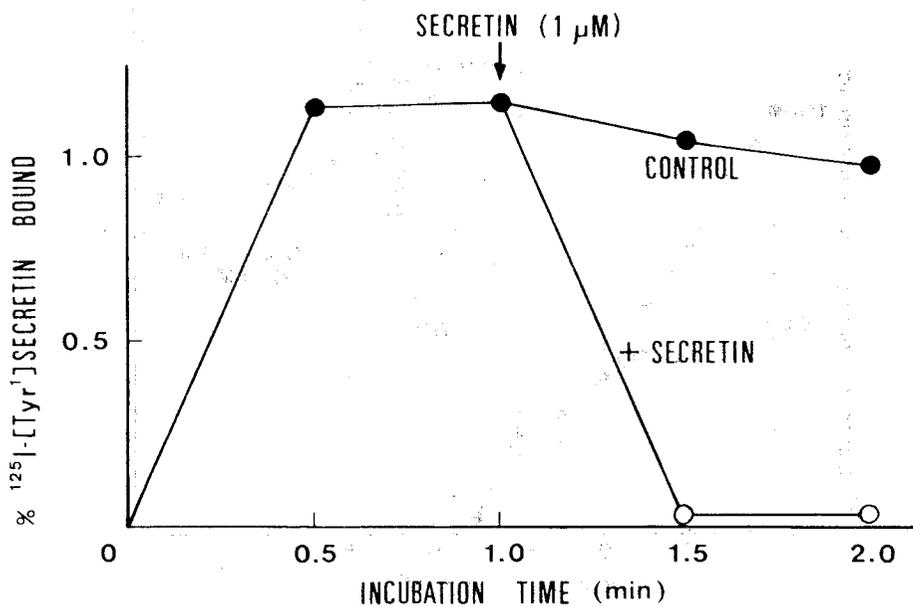


Fig. 39. Time Course of  $^{125}\text{I}$ -[Tyr<sup>1</sup>]secretin Binding to Basolateral Membrane Fraction from Rat Gastric Mucosa

Basolateral membrane fraction (18.2  $\mu\text{g}$  of protein) was incubated with  $^{125}\text{I}$ -[Tyr<sup>1</sup>]secretin at 25°C. Dissociation of tracer from basolateral membrane fraction was observed after the addition of 1  $\mu\text{M}$  unlabeled secretin (○). Each point is a mean of 3 determinations.

secretinの膜結合性に及ぼす影響も上記の結果と同様であった。VIPは細胞膜レベルでsecretinの結合性を高濃度領域でのみ抑制したが、通常のVIP濃度では起こり得ないものと考えられる。

次に先の灌流実験と同じ137 nM tetragastrin共存時におけるsecretinの細胞膜結合性を検討したところ、tetragastrin共存よりsecretinの結合性が灌流実験と対応する形で増大した(Fig.41)。高親和性部位に注目して、両逆数プロットによりその変動を解析した結果、主に結合部位数がgastrinにより

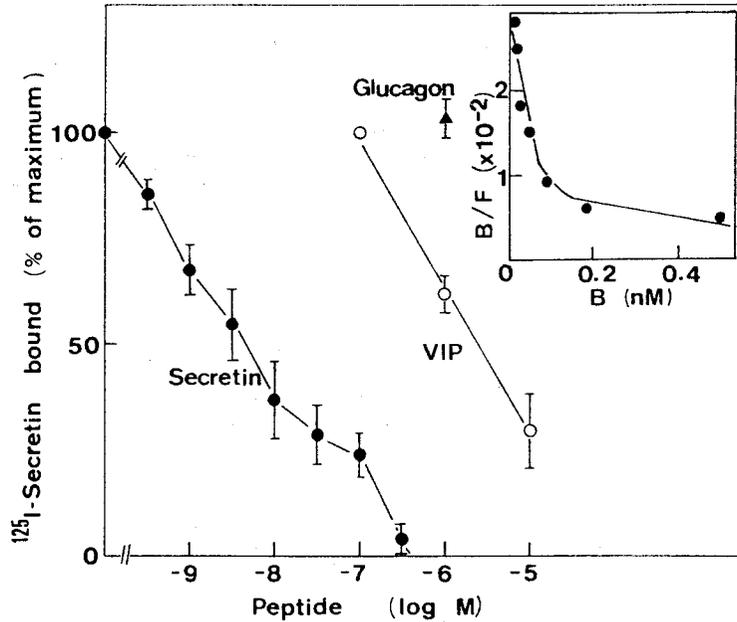


Fig. 40. Effect of Secretin, VIP or Glucagon on Binding of  $^{125}\text{I}$ -Secretin to Plasma Membranes from Rat Gastric Mucosa

Plasma membrane fraction ( $108 \pm 8 \mu\text{g/ml}$  of protein) was incubated with  $^{125}\text{I}$ -secretin ( $0.3 \text{ nM}$ ) plus increasing concentrations of unlabeled secretin (●), VIP (○), and  $1 \mu\text{M}$  glucagon (▲). Each point is the mean  $\pm$  S.E. of three separate experiments. Inset is a Scatchard plot of a representative experiment.

3倍以上増大することを認めた (Table XII)。

先の臓器レベルでの結果とこの細胞膜レベルの結果より胃内 secretin receptor が gastrin により調節されていることが示され, secretin の胃での活性発現に, この相互作用が寄与していることを推察させた。

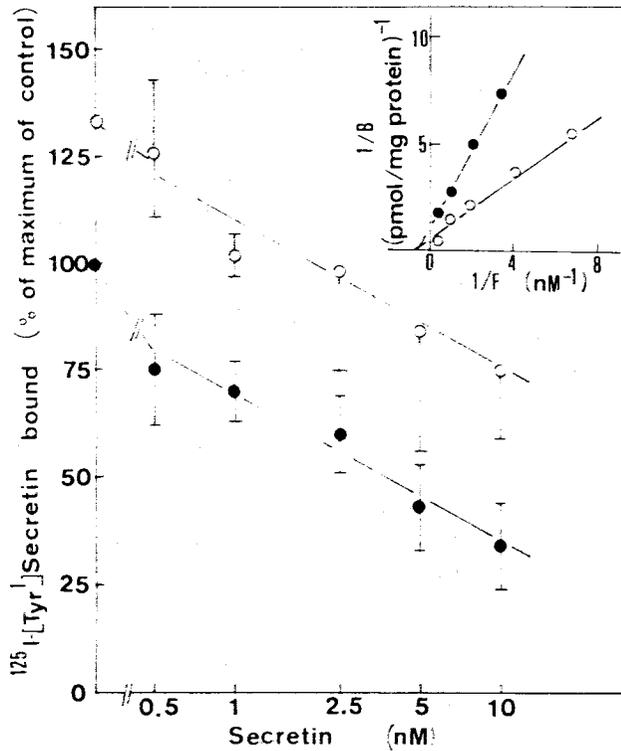


Fig. 41. Effect of Tetragastrin on Secretin Binding to Plasma Membranes from Rat Gastric Mucosa

Plasma membrane fraction ( $166 \pm 14$   $\mu\text{g}/\text{ml}$  of protein) was incubated with  $^{125}\text{I}$ -[Tyr<sup>1</sup>]secretin (60 pM) and tetragastrin (137 nM) plus increasing concentration of unlabeled secretin at  $25^\circ\text{C}$  for one minute. Each point is the mean  $\pm$  S.E. of three separate experiments.  $\circ$ , tetragastrin 137 nM;  $\bullet$ , control. Inset is a double-reciprocal plot of binding data from a representative experiment.

Table XII. Effect of Tetragastrin on the Binding Characteristics of  $^{125}\text{I}$ -[Tyr<sup>1</sup>]secretin to Plasma Membranes from Gastric Mucosa

	Kd (nM)	n (pmol/mg protein)
Control	$6.4 \pm 4.5^{\text{a)}$	$0.6 \pm 0.2$
With tetragastrin	$10.2 \pm 1.2$	$2.1 \pm 0.1^{\text{b)}$

a) Mean  $\pm$  S.E. of three experiments.

b) Significantly different from control ( $p < 0.05$ ).

### (3) 考 察

胃灌流実験により胃内に secretin の特異的結合部位の存在することを認め、胃粘膜細胞分画成分への secretin の結合性より、その結合部位が血管側細胞膜 basolateral membrane にあることを明らかにした。さらにその分画への結合特性と灌流法による結果が対応したことから、灌流法により secretin 結合動態を追跡し得ることが判明した。また secretin の酸分泌抑制作用を灌流法により検討し、その抑制発現までに遅れを認め、gastrin 由来の酸分泌に対する抑制作用が直接的拮抗作用でないことを示唆した。

胃における secretin 結合能が gastrin の存在により、増大することを灌流実験ならびに細胞膜への結合実験相方で観察した。そして細胞膜分画への結合パラメータの解析によってその変動は、結合部位数の増大に起因することが示唆された。活性ペプチド、薬物間の相互作用を細胞膜への結合性から追究した報告は乏しく、VIP がネコ submandibular gland への muscarinic cholinergic agonist の結合性を増大させること、<sup>66)</sup> 膵細胞膜 somatostatin 結合部位が C-CK (cholecystokinin-pancreozymin) により調節されること<sup>67)</sup> 等わずかである。また secretin はラット胃の細胞分画成分への gastrin の結合性を非競合的に阻

害することが報告されている。<sup>58)</sup>

本節の知見は gastrin が secretin 結合部位を直接制御していることを示唆しており、先の報告<sup>58)</sup>と合わせて考察すると、secretin と gastrin receptor 相互においてその結合能を調節していることが推察された。そこで次に酸分泌作用との関連について考察を進めた。

Grossman の仮説によると胃、膵では gastrin, CCK, secretin はひとつの receptor に働き、そこに存在する gastrin (CCK) 部位と secretin 部位は相互に影響を及ぼしあっているとされている。<sup>62)</sup> また gastrin 大量投与時には胃内 gastrin 結合部位に down regulation の生じることが報告されている。<sup>68)</sup> 以上を総合するとその作用と結合との関連について、次の解釈が可能となる。すなわち、酸分泌反応において gastrin と secretin の作用を比較した場合、初期においては secretin に対する gastrin の優先性が存在し、酸分泌の増大を認める。そして gastrin receptor の活性化が起こると同時に gastrin によって secretin 結合能も増大し、secretin の酸分泌抑制作用が増強される。また同時に gastrin receptor の down regulation も生じ、それらに伴って酸分泌の低下が起こり酸が過剰分泌しない方向で調節されていることが考えられた。

事実、松尾は Heidenhain pouch 犬を用いて摂食後の gastrin と酸分泌動態について検討し、<sup>69)</sup> gastrin 分泌には二峰性の分泌ピークが摂食後認められるのに対して、最初のピークの時にのみ酸分泌の増大を観察した。すなわち二度目の反応性低下を交感神経性抑制機構の関与によるものと考察したが、secretin もその抑制に一部介在していることを本節の知見は示唆している。

これらペプチドの結合する細胞を特定することはできなかったが、secretin 結合部位の gastrin による直接的調節は酸分泌の生理的制御に有用な因子として働いている可能性が考えられる。次節ではラット膵で同様の検討を行い、secretin 結合部位の性状を胃、膵間で比較することとした。

## 第 2 節 secretin の膵における特異的結合

secretin の膵外分泌促進作用については、数多くの報告が認められ、<sup>21)</sup> 第 1 章第 2 節でも濃度依存性を示す膵液分泌の増大が膵灌流法により確認できた。膵内 secretin 結合部位については、これまでにネコ、モルモット膵の単離細胞、

細胞膜を用いた報告がいくつかなされている。<sup>70,71)</sup> しかしラット膵内 secretin 結合部位については検討されておらず, また胃, 膵内 secretin 結合部位を同様な実験条件下で比較解析した例は未だ報告されていない。そこでまず前節と同じく灌流実験法を用いて臓器レベルでの secretin 結合部位について検討を行った。

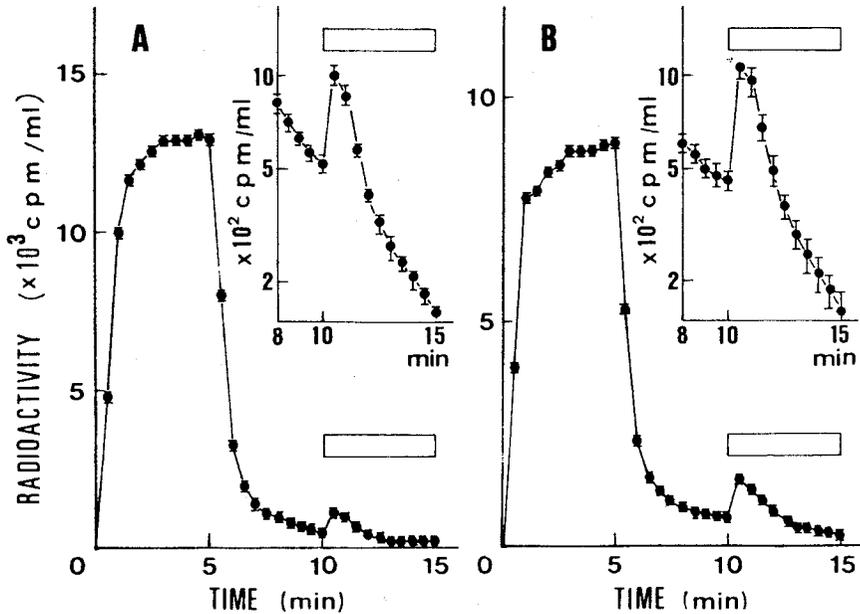


Fig. 42. Effect of Unlabeled Secretin on the Concentration of  $^{125}\text{I}$ -Secretin (A) or  $^{125}\text{I}$ -[Tyr<sup>1</sup>]secretin (B) in Effluent from Isolated Perfused Rat Pancreas

Labeled secretin was perfused 5 min, followed by 5 min perfusion without secretin. During the last 5 min, perfusion medium supplemented with unlabeled secretin (20 nM) was perfused (as indicated by open column). The displacement phenomenon is clearly demonstrated semilogarithmically in the inset. Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of three (A) or four (B) experiments.

(1) 膝灌流法による結合特性の解析

前節で検討した方法を膝灌流法に適用して実験した結果, Fig.42に示すように膝内で結合していた標識 secretinが非標識 secretinにより置換され,門脈流

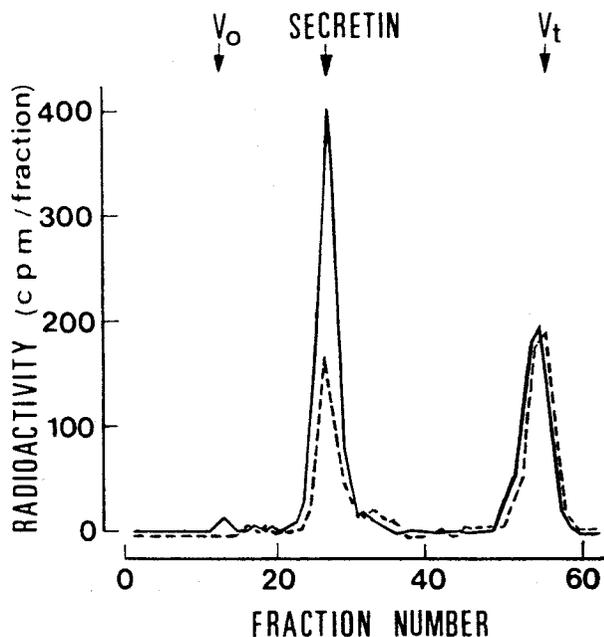


Fig. 43. Gel Filtration Profiles of Effluents from  $^{125}\text{I}$ -[Tyr<sup>1</sup>] secretin Perfusion

The effluents, which were collected at the time of one minute before (---) and one minute after the beginning of perfusion with unlabeled secretin (2  $\mu\text{M}$ ) (—), were subjected to gel filtration on 1.5 x 90 cm Toyopearl HW-55 column eluted with 3 M guanidine-HCl and 2.4 M formic acid at 4°C. The column was calibrated with blue dextran as a void volume marker ( $V_0$ ), native secretin (SECRETIN) and  $^{125}\text{I}$ -tyrosine to indicate the internal volume ( $V_t$ ).

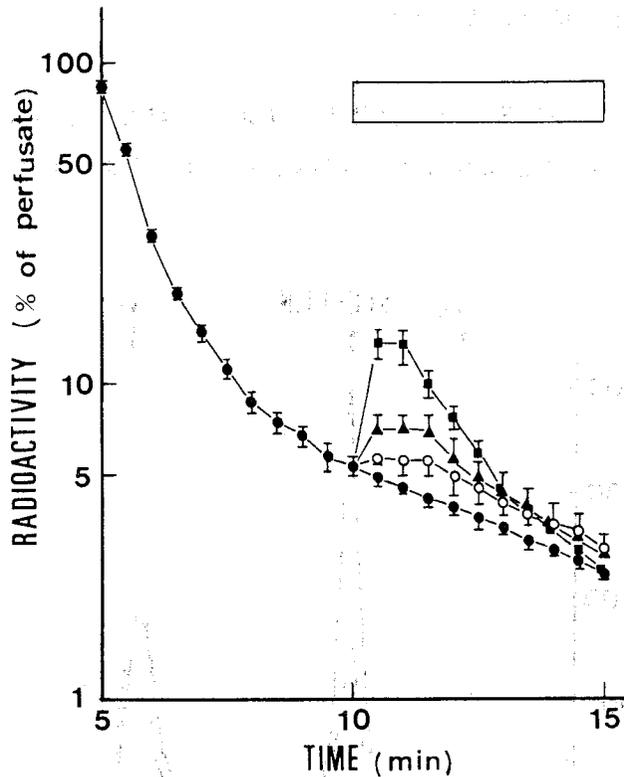


Fig. 44. Effect of Unlabeled Secretin on the Concentration of  $^{125}\text{I}$ -[Tyr<sup>1</sup>]secretin in the Effluent from Isolated Perfused Rat Pancreas

A dose-dependent displacement was observed by the perfusion with unlabeled secretin; 15 nM (■), 3 nM (▲), 0.6 nM (○) and without unlabeled secretin (●). Each point represents the mean  $\pm$  S.E. of at least 3 experiments.

出液に放射活性の一過性ピークが形成されることを認めた。この現象は  $^{125}\text{I}$ -[Tyr<sup>1</sup>]secretinあるいは  $^{125}\text{I}$ -secretinいずれの標識体灌流時においても観察された。

しかも  $^{125}\text{I}$ -[Tyr<sup>1</sup>]secretinの主な代謝物である  $^{125}\text{I}$ -tyrosine 灌流時には secretinによる  $^{125}\text{I}$ -tyrosineの置換は観察されず、結合置換が代謝物によ

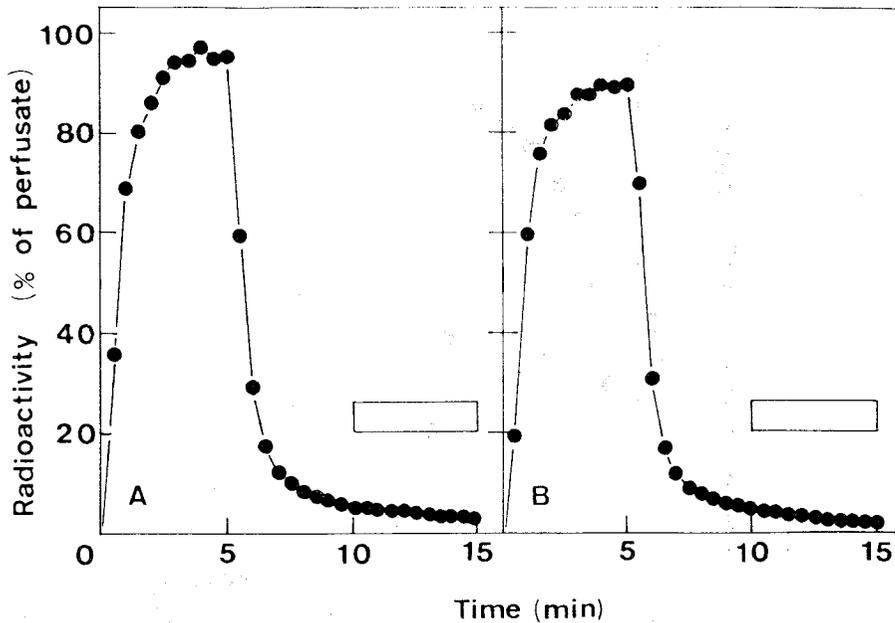


Fig. 45. Effect of VIP (A) or Glucagon (B) on the Concentration of  $^{125}\text{I}$ -[Tyr<sup>1</sup>]secretin in Effluent from Isolated Perfused Rat Pancreas

Labeled secretin was perfused for 5 min, followed by 5 min perfusion without secretin. During the last 5 min, perfusion medium supplemented with unlabeled VIP (1.5  $\mu\text{M}$ ; A) or glucagon (0.6  $\mu\text{M}$ ; B) was perfused (as indicated by open column).

るものでないことが明らかとなった。そこで置換され流出液中に増大した放射活性の性状を明らかにする目的で非標識 secretin 灌流前後の門脈流出液をゲル濾過法により分析した。膵内で代謝され生成した小分子量物質の存在が認められたが、置換され門脈中に出現した放射活性の大部分は secretin 溶出位置と同一位置にあることを認めた (Fig.43)。従って結合 secretin は代謝されることなく置換され流出液中に現れることが明らかとなった。

secretin が灌流環境下の膵において特異的結合部位に競合的結合を示すことを

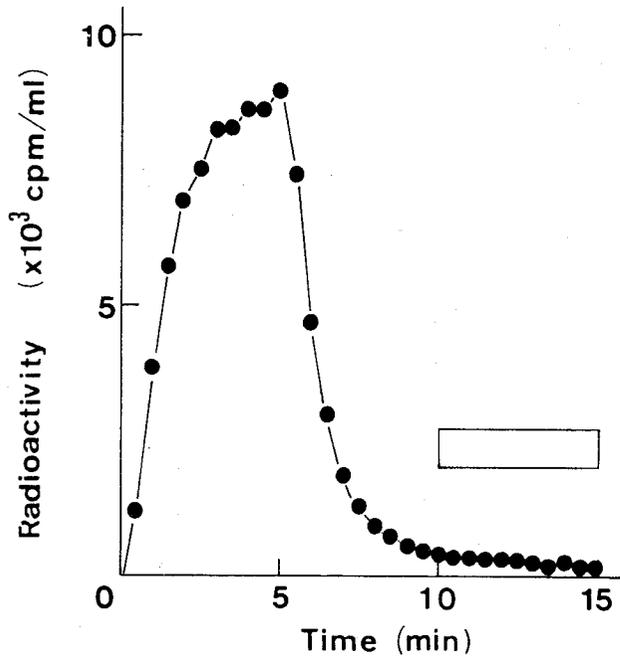


Fig. 46. Effect of Unlabeled Elcatonin on the Concentration of <sup>125</sup>I-Elcatonin in Effluent from Isolated Perfused Rat Pancreas

Labeled elcatonin was perfused for 5 min, followed by 5 min perfusion without elcatonin. During the last 5 min, perfusion medium supplemented with unlabeled elcatonin (60 nM) was perfused (as indicated by open column).

確認する目的で、標識 secretin の置換に及ぼす各種濃度の非標識 secretin の影響を検討した。Fig. 44 に示すように標識 secretin は非標識 secretin 濃度に依存して置換されること、膵で secretin は比較的高親和性の結合特性を示すことが認められた。また置換された絶対量が灌流液濃度に比べ少ないことから、secretin 結合部位が膵内の限られた部位に局在していることが推察された。

次に膵内 secretin 結合部位の識別性を検討するため、構造類似ペプチドの V

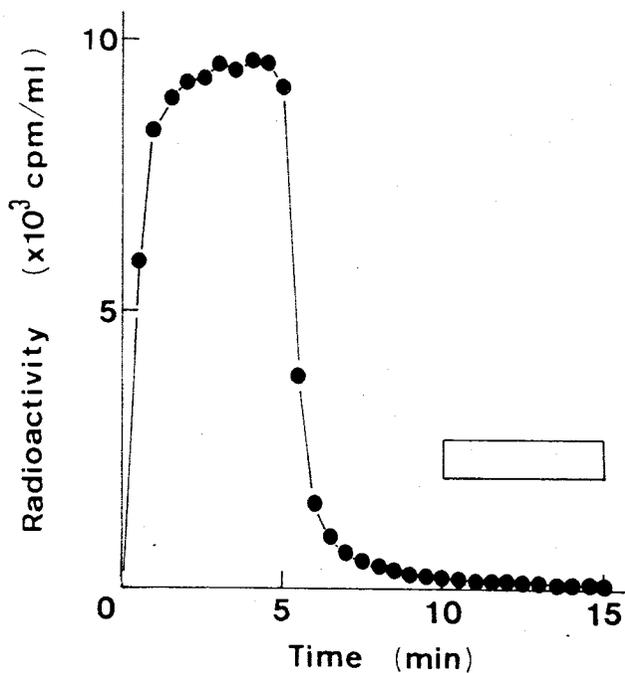


Fig. 47. Effect of Unlabeled Aprotinin on the Concentration of <sup>125</sup>I-Aprotinin in Effluent from Isolated Perfused Rat Pancreas

Labeled aprotinin was perfused for 5 min, followed by 5 min perfusion without aprotinin. During the last 5 min, perfusion medium supplemented with unlabeled aprotinin (2.3 μM) was perfused (as indicated by open column).

I P, glucagonを非標識体として灌流した。しかし、これらペプチド灌流時門脈流出液中放射活性に変化は認められなかった (Fig.45)。従って胃と同様に灌流法により認めた膵内結合部位は高い識別性を有していることが明らかとなった。

一方 elcatonin, aprotininでは結合置換現象は観察されず、その分布結合特性が secretinと異なることを膵でも認めた (Fig.46, Fig.47)。

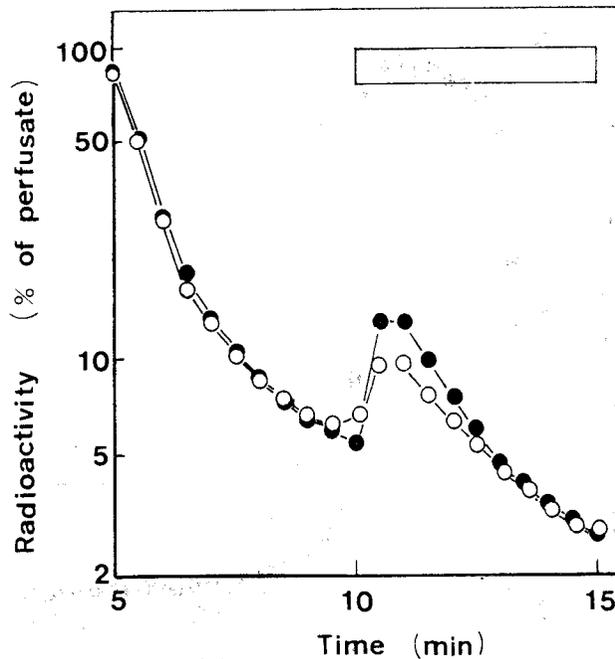


Fig. 48. Effect of Tetragastrin on the Concentration of  $^{125}\text{I}$ - $[\text{Tyr}^1]$ secretin in Effluent from Isolated Perfused Rat Pancreas

Labeled secretin was perfused for 5 min, followed by 5 min perfusion without secretin. During the last 5 min, perfusion medium supplemented with unlabeled secretin (20 nM) was perfused (as indicated by open column). Tetragastrin (137 nM) was perfused from the start of perfusion. ○, tetragastrin 137 nM; ●, control.

胃で認めた gastrin による secretin 結合性の調節が膵でも観察されるか否かについて検討したところ、胃とは異なり control と tetragastrin 共存の間で著明な変動は認めなかった (Fig. 48)。secretin 結合部位の性状が胃と膵の間で異なることも示唆されたため、次に細胞膜分画を用いて膵内 secretin 結合部位について精査した。

(2) 細胞膜分画を用いた結合特性の解析

ラット膵からの細胞膜分画の調製は先に述べた胃粘膜よりの細胞膜分画精製法を準用し分別遠心法, Percoll密度勾配遠心法により行った (Chart 2)。まず crude plasma membrane分画を分別遠心法により調製し, この分画に

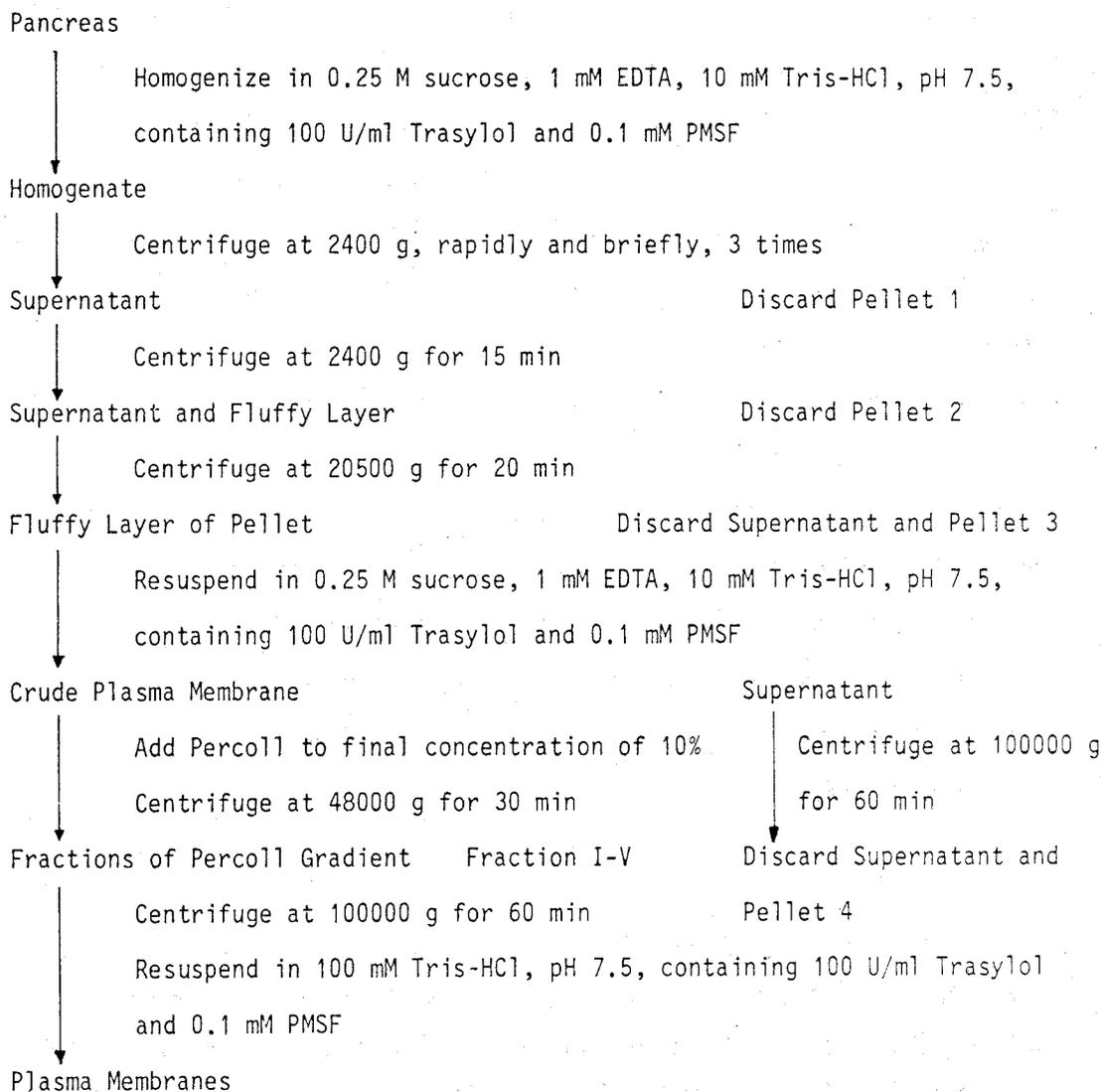


Chart 2. Preparation of Plasma Membranes from Rat Pancreas

Table XIII. Distribution of Marker Enzymes and Protein in the Fractions Obtained during Purification of Plasma Membranes from Rat Pancreas

	5'-Nucleotidase		Cytochrome c oxidase		Amylase		Protein
	sp. act.	%	sp. act.	%	sp. act.	%	%
Homogenate	5.3±0.5	100	3.7±0.4	100	1.1±0.1	100	100
Pellet 1	4.0±0.7	25.6	2.9±0.6	27.5	1.0±0.1	33.5	35.3
Pellet 2	2.9±0.4	12.1	6.6±2.3	38.1	1.3±0.1	25.3	21.3
Pellet 3	4.7±0.2	2.6	7.1±1.4	6.5	0.9±0.2	2.4	2.8
Crude plasma membrane	25.4±1.7	16.9	2.9±0.7	2.6	0.1±0.1	0.3	3.4
Pellet 4	11.8±2.6	23.6	0.9±0.1	2.7	0.6±0.1	6.4	10.7
Supernatant	6.6±1.5	29.6	0.2±0.1	1.2	1.0±0.1	23.2	24.7
Plasma membrane	52.0±7.4	3.1	0.3±0.1	0.1	N.D.	0.0	0.3

The specific activity of 5'-nucleotidase is expressed in nmol/min per mg protein; that of cytochrome c oxidase is in  $\Delta$  O.D./min per mg protein; that of amylase is in  $10^3$  units/30 min per mg protein. N.D., not detectable. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. of three preparations. % represents the percentage of the enzyme activity found initially in the homogenate.

Percollを10% ( $V/V$ ) となるよう加え密度勾配遠心法により精製した。Table XIII に各分画中の指標酵素の分布を示すが、crude plasma membrane分画に細胞膜の指標とされる5'-nucleotidaseは約5倍精製された。次にPercoll密度勾配遠心法によりこの分画を精製した。Fig.49にその際の5'-nucleotidaseとmitochondriaの指標とされるcytochrome c oxidaseの分布パターンを示す。5'-nucleotidase活性のピークはfr.No.10(上層より10ml)付近に認めら

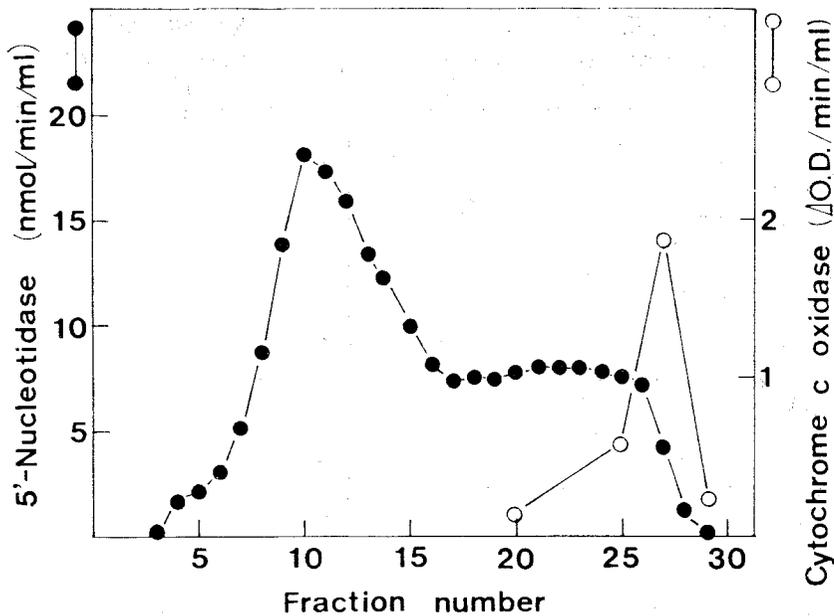


Fig. 49. Distribution of Marker Enzymes on Percoll Gradient

The Percoll gradient was collected from the top into 30 fractions of 1 ml. ●, 5'-nucleotidase; ○, cytochrome c oxidase.

れたため、上層から8-12mlの分画を採取、細胞膜分画として用いた。この分画中の5'-nucleotidase比活性はhomogenateの10倍に上昇し、他の細胞内成分の混入も比較的少ないことが認められた (Table XIII)。

そこでまず豚細胞分画成分への secretin の結合性を検討したところ、細胞膜分画が最も高い結合性を示し、5'-nucleotidase の分布と secretin 結合性の間に良好な相関が観察された (Fig.50)。次に細胞膜に結合した放射活性の性状をゲル濾過法により分析した結果、大部分の結合放射活性は未変化 secretin の位置に溶出された (Fig.51)。これらの結果より主な secretin 結合部位は細胞膜に局在しており、secretin は未変化体としてその receptor に結合していることが明らかとなった。

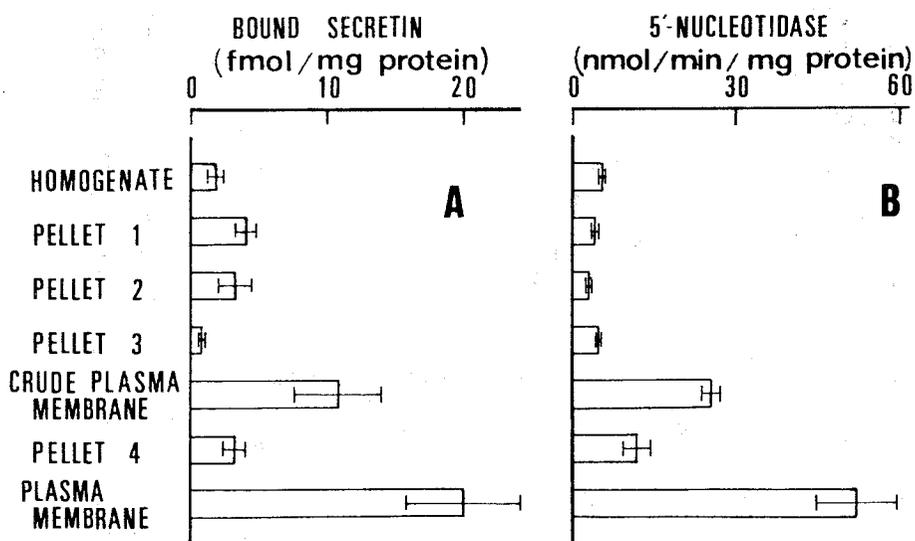


Fig. 50. Distribution of Specific Secretin Binding (A) and 5'-Nucleotidase (B) in Various Fractions

Each subcellular fraction (30-100  $\mu$ g of protein) was incubated with  $^{125}$ I-[Tyr<sup>1</sup>]secretin (60 pM) at 25°C for one minute. To determine the specific binding, 2.5  $\mu$ M secretin was added to parallel incubations. Each column represents the mean  $\pm$  S.E. of 3-4 experiments.

さらに細胞膜分画への secretin の結合特性について精査したところ, Fig. 52 に示すようにその結合速度は早く, 1 分以内に平衡状態に達し, 非標識 secretin を加えることで標識体の結合率は急速に低下した。また  $^{125}$ I-secretin の結合は非標識 secretin を加えることにより濃度依存的に抑制された (Fig. 53)。VIP は高濃度存在時のみ secretin の結合を抑制したが, 1  $\mu$ M glucagon には抑制作用は認められなかった。Scatchard plot により secretin 結合部位の解析を行ったところ, 2 種類の結合部位が存在することを認めた (Fig. 53, inset)。高親和性結合部位の解離定数 ( $K_{d1}$ ) は  $1.1 \pm 0.2$  nM, 最大結合部位数 ( $n_1$ ) は  $0.7 \pm 0.2$  pmol/mg protein であり, 低親和性結合部位の  $K_{d2}$  は  $133 \pm 2$  nM,  $n_2$

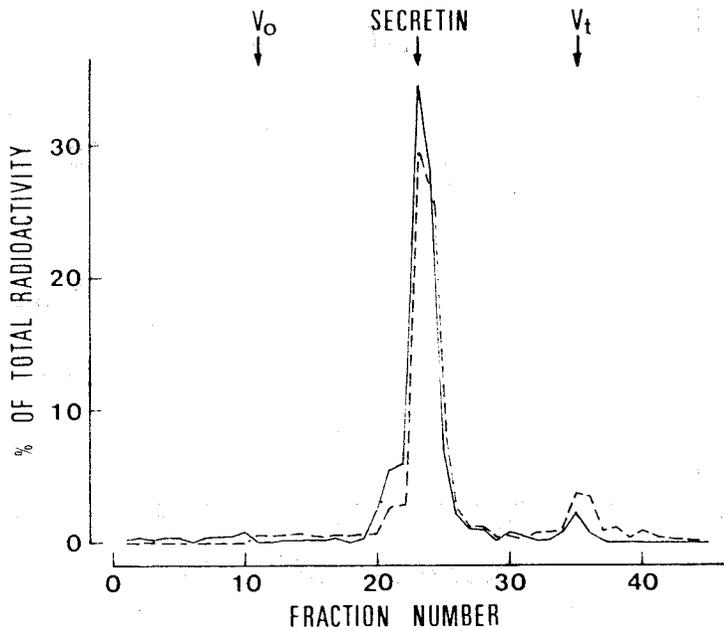


Fig. 51. Gel Filtration Profile of Membrane-Associated Radioactivity

Pancreatic plasma membranes (100  $\mu$ g of protein) were incubated with  $^{125}\text{I}$ -[Tyr<sup>1</sup>]secretin (0.3 nM) at 4°C for 10 min. Bound radioactivity, separated by centrifugation at 20500 g for 20 min at 4°C, was extracted with 1 ml of 5.4 M guanidine-HCl and 2.4 M formic acid. The extract was subjected to gel filtration on 0.9 x 62 cm Toyopearl HW-55 column eluted with 0.1 M acetic acid at 4°C. The broken line represents the gel filtration profile of the standard tracer of secretin.

は  $16.8 \pm 3.8$  pmol/mg proteinを示した。

VIPはneuro-acinarシナプスにおいて酵素分泌を調節する neurotransmi-

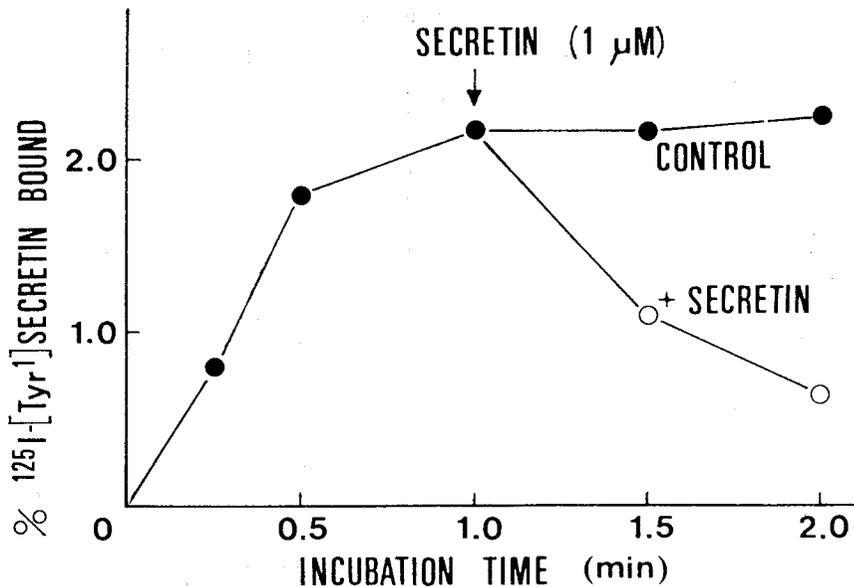


Fig. 52. Time Course of  $^{125}\text{I}$ -[Tyr<sup>1</sup>]secretin Binding to Plasma Membranes from Rat Pancreas

Plasma membrane fraction (51  $\mu\text{g}$  of protein) was incubated with  $^{125}\text{I}$ -[Tyr<sup>1</sup>]secretin (60 pM) at 25°C. Dissociation of tracer from plasma membranes was observed after the addition of 1  $\mu\text{M}$  unlabeled secretin at an equilibrium (○). Each point is the mean of 3-6 determinations.

terと考えられている。<sup>72)</sup> 一方 secretinは腺房中心細胞, 導管細胞に働き重炭酸イオンに富む膵液を分泌させるホルモンとされている。<sup>73)</sup> 先の灌流法でVIPは結合した secretinを置換する能力を示さなかったが, 一方細胞膜分画への結合では secretinの結合が高濃度のVIPにより抑制された。しかし今回の結果より胃の場合と同様に生理的環境下においてVIPは膵内での secretinの結合に影響を及ぼすことは少ないものと推測された。

次に gastrin共存時における secretinの細胞膜結合性を検討したが, 灌流実

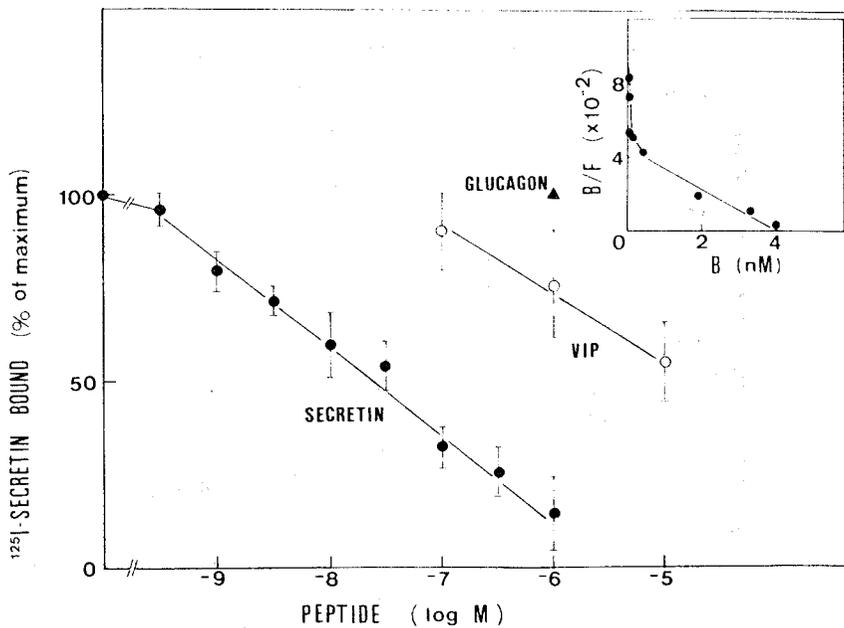


Fig. 53. Effect of Secretin, VIP or Glucagon on Binding of  $^{125}\text{I}$ -Secretin to Pancreatic Plasma Membranes

Plasma membrane fraction ( $200 \pm 10 \mu\text{g/ml}$  of protein) was incubated with  $^{125}\text{I}$ -secretin ( $0.3 \text{ nM}$ ) plus increasing concentrations of unlabeled secretin ( $\bullet$ ), VIP ( $\circ$ ), and  $1 \mu\text{M}$  glucagon ( $\blacktriangle$ ). Each point is the mean  $\pm$  S.E. of 4 separate experiments. Inset is a Scatchard plot of a representative experiment.

験で得た結果と同様， tetragastrinはsecretinの結合性に顕著な影響を及ぼさなかった (Fig.54)。従って胃，膵間で secretin receptor の存在形態に相違のあることが明らかであり，膵内 secretin結合部位は gastrinによる調節を受けていないと推測される。

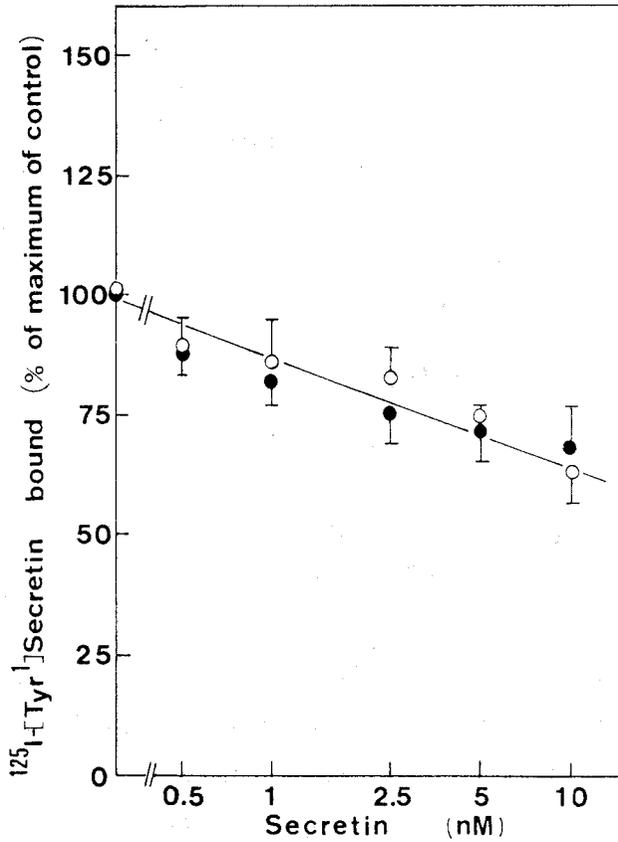


Fig. 54. Effect of Tetragastrin on Secretin Binding to Plasma Membranes from Rat Pancreas

Plasma membrane fraction ( $164 \pm 6$   $\mu\text{g/ml}$  of protein) was incubated with  $^{125}\text{I}$ -[Tyr<sup>1</sup>]secretin (60 pM) and tetragastrin (137 nM) plus increasing concentration of unlabeled secretin. Each point is the mean  $\pm$  S.E. of three experiments. ○, tetragastrin 137 nM; ●, control.

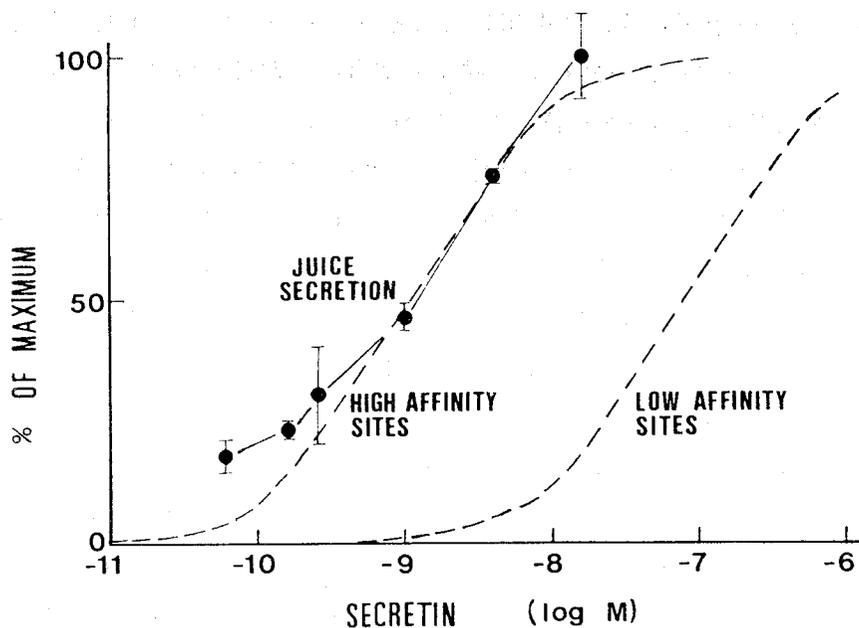


Fig. 55. Relationship between the Concentration of Secretin to Stimulate Juice Secretion in Perfused Pancreas and to Occupy the High Affinity Binding Sites on Pancreatic Plasma Membranes

——, juice secretion as percent maximum, ----, theoretical occupancy curves (as percent of maximum) for the high and low affinity binding sites.

### (3) 考 察

膵内に secretin の特異的結合部位の存在することを灌流法により認め、その結合部位への結合性は細胞膜分画への secretin 結合実験より得た結果と良好な対応を見せた。前節の知見および以上の結果は receptor への secretin 結合特性の解析が灌流実験系を用いた方法によっても可能なことを示唆した。近年、Petersenら<sup>56)</sup>は同様の手法を用いたラット腎灌流法により、peritubular membrane に insulin receptor の存在することを明らかにした。各種活性ペプ

チドの receptor 解析に灌流法を用いることはひとつの有用な手段と考えられる。

Scatchard plot による解析で二種類の結合部位が細胞膜に存在することを認めた。低親和性結合部位を腓灌流法では検出することは出来なかったが、これは washing 期間中 (Fig. 42, 5 - 10 分) に低親和性部位に結合した標識体が遊離したためと推測される。ラット腓内において secretin と VIP の receptor は相互に独立して存在していることが Robberecht らにより最近明らかにされた。<sup>74)</sup> 彼らは adenylate cyclase 活性と <sup>125</sup>I - VIP の細胞膜への結合性から得た知見によって結合部位を三つの subtype に分類した。すなわち (1) high-affinity secretin receptor (Kd 約 0.3 nM), (2) low-affinity secretin receptor (Kd 約 300 nM) と (3) VIP - preferring receptor の三つである。また Schulz ら<sup>75)</sup> はラット腓より counterflow technique により導管細胞を分離し、腺房細胞よりも secretin による adenylate cyclase 活性の感受性の高いことを報告している。またその活性を 50% 上昇させる secretin 濃度は約 1 nM であるとしている。著者の得た高親和性結合部位 (Kd : 1 nM) は彼らの報告<sup>74,75)</sup> とも対応し、腺房中心細胞、導管細胞由来の細胞膜上 secretin receptor の結合特性を反映していることが推察される。Fig. 55 は secretin の高親和性および低親和性結合部位への結合性と第 1 章の腓灌流法により得た secretin の腓液分泌促進作用をグラフに示したものである。実験条件に種々の相違はあるが、腓液分泌の上昇と secretin の高親和性結合部位への占有度との間に良好な相関が認められた。

胃とは異なり secretin 結合部位が gastrin により調節されていないことを認め、胃、腓内 secretin 結合部位の性状、存在形態に相違のあることを明らかにした。この相違を究明するにはさらに検討を進めなければならないが、これらの知見は胃、腓における各種ペプチドによる機能調節機序を解明する上で、有用な視点を与えるものと考えられる。

以上著者は4章にわたり構造的特徴を有する secretin, elcatonin, aprotinin をモデルペプチドとして選び、ラット胃、膵内でのこれらペプチド性医薬品の分布、代謝像を比較検討した結果次のような新発見を得た。

#### I 薬物の胃、膵内挙動解析を目的とした摘出臓器灌流法の確立

従来のラット胃灌流法は胃の主な生理機能である酸分泌能が欠落しており、生理的機能を保持した系であると言いがたい。そこで灌流液組成等条件を種々検討した結果、赤血球が酸素供給体として必要であること、また pepsin 阻害薬物の存在が有効であることを認め、牛赤血球および pepstatin を灌流液中に添加する灌流方法を確立した。この方法により tetragastrin, histamine 等の各種刺激薬物による著明な酸分泌亢進および抑制薬物の cimetidine 等による分泌低下が観察できた。

一方膵灌流法はこれまで十二指腸の一部も灌流する方法が殆どどの報告で採られていた。しかし消化管に存在するペプチド類の影響を除くため膵と十二指腸間の血管結紮後、灌流を実施した。この改良法によっても secretin によりその濃度に依存した膵液分泌の増大を、また pancreozymn 灌流では膵液, amy-lase 分泌の著明な亢進を認めた。以上の結果より、この胃灌流法、膵灌流法がほぼ生理機能を保持し、しかも薬物の臓器内動態と薬効の関連を他の臓器組織から独立して解析し得る、有用な実験系であることが証明された。

#### II 胃における secretin, elcatonin, aprotinin の挙動

薬理効果を支配する薬物の臓器内挙動を解析するため、<sup>125</sup>I 標識体を用いたゲル濾過法および radioimmunoassay によりペプチド類の代謝特性を比較検討した結果、直鎖状ペプチドの secretin が最も不安定で、一部環状の elcatonin がそれに続き、球状ペプチドの aprotinin は胃で代謝を殆ど受けなかった。しかし安定であった aprotinin もその分子内 disulfide 結合を修飾した場合、代謝され易くなることが認められ、生体内安定化における disulfide 結合の寄与が明らかとなった。胃組織中への分布性は aprotinin > elcatonin > secretin の順となったが、その分布容積は小さく細胞外液中の限られたスペースに主に分布し、一部は細胞膜にも結合しているものと推測された。

### Ⅲ 膵における secretin, elcatonin, aprotininの挙動

先に明らかにした胃におけるこれらペプチドの分布, 代謝特性と比較する目的で膵灌流法により同様の検討を行った。その結果, 直鎖状ペプチドの secretinが代謝を受けやすく, これらペプチドの代謝性の順序は胃と同様であった。さらに aprotininでは disulfide結合の有無によりその膵内安定性も大きく変動した。またそれらの分布像は胃への分布特性と類似した傾向を示し, これらペプチドの分布, 代謝動態に胃, 膵間で著明な変動は認められなかった。次にペプチドの構造がその代謝動態に及ぼす影響を更に解析した。その際 aprotininは難代謝性を示したため, secretin, elcatoninについて各種ペプチド共存時の膵内代謝の変動を検討した。elcatoninの代謝が同様な環状構造を有する insulin, aprotininで抑制されたのに対し, これらペプチドは secretin 代謝に影響を及ぼさなかった。従ってペプチドの構造的特徴がその臓器内挙動をも支配する要因であり, 代謝面でのペプチド間相互作用も無視できないことが明らかとなった。

### Ⅳ 胃, 膵における secretinの特異的結合

これらペプチドの内, secretinは胃, 膵を共に主な標的臓器とするにもかかわらず, 胃内結合部位 (receptor) の性状は不明のままであった。そこでまず灌流法により gastrinによる酸分泌への secretinの作用を検討した結果, その抑制効果が直接的競合作用でなく, その作用発現に遅延性が存在し, 複雑な機序が介在することが明らかとなった。次に同じ灌流法を用いて secretin 結合部位の解析を試みた結果, 胃内に分布した<sup>125</sup>I標識 secretinの非標識 secretinによる結合置換現象を認めた。しかし構造の類似する glucagon, vasoactive intestinal peptideには標識 secretinを置換する効果が認められず, 胃内に secretinの特異的結合部位が存在することを灌流法により明らかにした。この結合部位の局在性を検討する目的でペプチドホルモンの receptorが存在する細胞膜に着目して胃粘膜より血管側細胞膜に富む分画を分離, 精製した。そしてその分画への secretinの結合性を他分画への結合性と比較した結果, 血管側細胞膜分画が最も高い結合性を示し, その結合特性は灌流法により得た結果と対応することを認めた。さらに灌流法および細胞膜分画への結合性相方の解析より secretin結合部位への secretin結合能が gastrinにより増大することを認めた。

以上の結果は、胃内 secretin結合部位の性状を初めて明らかにしたものであり、secretinの酸分泌抑制作用に secretin receptorでの gastrinとの相互作用が関与していることを示唆している。

一方膵内にも secretinの特異的結合部位が存在することを灌流法により認め、さらに細胞分画成分への secretinの結合性よりその結合部位が細胞膜上にあることを明らかにした。しかし胃と異なり結合部位レベルでの secretin と gastrin の相互作用は認められず、胃、膵間で secretin receptorの性状に相違のあることが確認された。またその結合部位への secretinの占有度と膵液分泌作用の間に緊密な関連を認め、この膵内結合部位の薬効調節における重要性を明らかにした。胃、膵共に灌流法で得た secretin結合部位の特性は細胞膜分画への結合性と良好な対応を示し、生理的機能を保持した系で secretinの作用と結合性の関連を解析することができた。

以上、著者は摘出臓器灌流法によりペプチド性医薬品の胃、膵内挙動がペプチド自体の構造的特徴に起因する因子により変動することを明らかにした。また secretinでは胃、膵結合部位への結合特性を灌流法により解析すると共にその結合特性を細胞膜分画を用いて明らかにした。本研究はペプチド性医薬品の体内動態並びに薬効発現機序の解明上、有益な基礎的知見になり得るものと考ええる。

## 謝

## 辞

終りに臨み、本研究に際して終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました京都大学 堀 了平教授並びに奥村勝彦助教授 に深甚なる謝意を表します。

また種々の有益な御助言と御指導を戴いた京都大学 乾 賢一講師、神谷 晃助手並びに薬剤部職員一同に深謝すると共に、実験の一部に御協力戴いた鍵本順子修士、駒田富佐夫修士、瀬崎陽子学士、小西紀美学士、森洋子学士、佐川玲子学士に深く感謝します。

更に薬学奨励研究生として採用して戴いた日本学術振興会並びにその研究生事業の実施に御尽力された大阪大学川崎近太郎名誉教授に衷心より謝意を表します。

# 第 1 章 実 験 の 部

## 第 1 節 ラット摘出胃灌流法の検討

### (1) 試薬および試料溶液の調製

histamine diphosphate, pilocarpine hydrochlorideは半井化学のもの、cyclic AMP, dibutyryl cyclic AMPはSigma社のもの、tetragastrinは三亜薬品のもの、cimetidineはSmith-Kline - 藤沢社のも、pepstatinはペプチド研究所のものを用いた。他の薬物、試薬は市販特級品を使用した。牛赤血球は血液保存液 (ACD液; 45mM sodium citrate, 23mM citric acid, and 74mM glucose)中に採取した牛血液をKrebs-Ringer重炭酸緩衝液 (KRBB)で用時充分洗浄したものを用いた。血管灌流液はKrebs-Ringer重炭酸緩衝液に先の洗浄牛赤血球を25% ( $V/V$ )の割合で加え、膠質浸透圧保持のため4.6% ( $W/V$ ) dextran 70を添加し、95%  $O_2$  - 5%  $CO_2$ 混合ガスを充分通気、pH 7.4に調整したものを使用した。Krebs-Ringer重炭酸緩衝液の組成をTable Iに示す。胃腔内灌流液は0.616mM  $Na_2HPO_4$ , 0.092mM citric acid, 154mM NaClからなりpH 6.6を示す緩衝液を用いた。<sup>11)</sup>

### (2) 灌流実験法

体重150-250gのWistar系雄性ラットを用い、水の摂取は自由とした条件下で15-20時間絶食させ、pentobarbital (40mg/kg, i.p.)で麻醉下、以下の手技を行った。まず頸部で迷走神経を切断し、気管切開を施した。次に腹部正中線に沿って開腹、上腸間膜動脈、脾動脈を結紮した。脾臓を摘出後、腹部大動脈にカニューレ (外径: 1.2mm)を先端が腹腔動脈と上腸間膜動脈の間になるよう挿入固定し、heparin (500U/kg)をカニューレより注入した。十二指腸より下方の腸はGrodskyらの方法<sup>19)</sup>に従って除去し、食道より外径2mmのカニューレを胃内に挿入するとともに左胃動脈を結紮しないよう注意深く噴門上部で結紮固定した。次に十二指腸を一部切開し、食道カニューレより加温した生理食塩水を注入、胃腔内を洗浄後、カニューレ (外径: 3mm)を

Table I. Composition of Krebs-Ringer Bicarbonate Buffer

NaCl	116.0 mM
KCl	4.7 mM
CaCl <sub>2</sub>	2.5 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.2 mM
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.2 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25.0 mM

十二指腸切開部より挿入し幽門部で結紮した。胃腔内灌流液を 1 ml/min の流速で注入し、胃からの流出液が透明となった時点で幽門側カニューレを pH 電極に接続する。その流出液の pH が安定となるのを確めた後、腹部大動脈カニューレから血管灌流液を 0.7 ml/min の流速で灌流すると共に左、右腎動脈、肝動脈、門脈、総胆管を結紮した。続いて直ちに門脈下部に切開を施し、腹部大動脈を腹腔動脈上部で結紮、門脈切開部にカニューレ（外径：1.5 mm）を挿入した。これらの手法によってラット血液から血管灌流液への移行に伴う胃への血流の途絶を避けることができた。灌流温度は 37 °C とした。

雄性モルモット（230-260 g）、未成熟ラット（Wistar 系雄性：30-50 g）を用いた場合も同様の手技を行ったが、未成熟ラットの血管灌流液および胃腔内灌流液の流速は各々 0.2 ml/min、0.5 ml/min とした。

### (3) 酸分泌測定および胃粘膜中 pepsinogen の定量

胃腔内灌流液は pH 3.8 - 6.6 の範囲内で pH 値と酸滴定値の間に直線的な相関が認められている。<sup>11)</sup>そこで胃腔からの流出液中 pH を pH 記録計 (TOA CD R 12-A) を用いて連続的に記録すると共に、単位時間における酸分泌量を Hori らの方法<sup>11)</sup>および pH スタット (TOA HSM-10A) を用いた 0.01N NaOH による滴定値から求めた。胃酸分泌刺激薬物灌流時の酸分泌量は、薬物灌流前に求めた基礎分泌量を酸分泌総量から差し引き、刺激分泌量として示した。

胃粘膜中 pepsinogen の定量は、Kumegawa らの方法<sup>76)</sup>に従って行った。

## 第 2 節 ラット摘出脾灌流法の検討

### (1) 試薬および試料溶液の調製

secretin はエーザイ社より供与された比活性 3110 Crick, Haper and Raper units /mg で他の消化管ホルモンを含まないブタ腸からの抽出精製品を使用した。pancreozymine は Boots 社のもの、elcatonin ([Asu<sup>1,7</sup>]eel calcitonin) は東洋醸造社より提供された 4000 MRC units/mg の合成品を用いた。他の薬物、試薬は市販特級品を使用した。灌流液は Krebs-Ringer 重炭酸緩衝液に 0.5% 牛血清 albumin, 4.6% dextran 70 を加え、95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub> 混合ガスを通気、pH 7.4 に用時調製した溶液を使用した。

### (2) 灌流実験法

Wistar 系雄性ラット (体重 250-300g) を pentobarbital (40mg/kg, i.p.) 麻酔下、Penhos らの方法<sup>18)</sup>に従って脾を摘出し、灌流を行ったが、その際、脾と十二指腸間の血管も結紮した。その手技を以下に記す。

腹部正中線に沿って開腹、食道を左胃動脈と共に結紮し、続いて胃と脾間の血管も胃側で結紮した。幽門部にカニューレを挿入し右胃動脈と共に結紮後、胃を切除した。次に脾動脈を結紮、脾臓を切除後、直腸および小腸の一部に付着する腸間膜を剥離した。脾が腸から分離できた部位から十二指腸下部にかけてまとめて結紮し、十二指腸下部から直腸上部まで腸を切除した。残った十二指腸内を生理食

塩水で洗浄後，カニューレを挿入し，臍と十二指腸間の血管を注意深く結紮した。次に左，右腎動脈，肝動脈，胆管を結紮すると共に総胆管の十二指腸開口部より臍液採取用カニューレ（PE-10，Clay-Adams社）を挿入した。続いて腎動脈下部の腹部大動脈にカニューレ（外径：1.5mm）を挿入し，その先端が上腸間膜動脈と腎動脈の間になるよう固定した。灌流を約0.5ml/minの流速で開始すると共に，門脈にカニューレ（外径：1.5mm）を挿入，腹腔動脈上部の腹部大動脈を結紮し臍を摘出，灌流装置に設置した。この時点で灌流速度を2.0ml/minに上げ，灌流実験にこの臍標本を用いた。恒温槽を用いて灌流温度が37℃となるよう調整した。灌流は一回灌流により行い，灌流開始15分間は安定期間とし，薬物の灌流はその後に実施した。

### (3) 臍液分泌および amylase 活性の測定

臍液分泌量は Tachibana の方法<sup>22)</sup>により測定を行い，臍液中 amylase 活性の測定は Caraway 法<sup>77)</sup>を用いて行った。

## 第 2 章 実 験 の 部

### 第 1 節 secretin, elcatonin, aprotinin の胃内代謝

#### (1) ラット摘出胃灌流法

Wistar 系雄性ラット（体重 180-220g）を用い，実験の部第 1 章第 1 節(2)に記した方法により行ったが，ペプチドの灌流器具への吸着を防止する目的で血管灌流液に 0.5% 牛血清 albumin を添加した。薬物の灌流は胃腔内灌流液の pH が安定後（灌流開始約 15 分後）行った。

#### (2) 試薬および試料溶液の調製

secretin, elcatonin は実験の部第 1 章第 1 節(1)に記したものをを用いた。<sup>125</sup>I - [Tyr<sup>1</sup>] secretin は第一ラジオアイソトープ社のものを使用した。aprotinin は Boehringer Mannheim 社のものを用い，その還元体および S - carboxa-

midomethyl 化体は Liu and Meienhofer の方法<sup>36)</sup>により調製し、ゲル滲過法を用いて精製した。Na<sup>125</sup>I は New England Nuclear 社のものを使用した。elcatonin, aprotinin 等の<sup>125</sup>I 標識は Hunter and Greenwood の報告した chloramine T 法<sup>78)</sup>により行い、ゲル滲過法により精製した。精製標識体分画は凍結乾燥を行い、使用時まで -25°C に保存した。これら標識体の比放射能は約 100  $\mu$ Ci/ $\mu$ g であった。secretin は不安定なペプチドとして知られ、<sup>29)</sup>また精製した<sup>125</sup>I - [Tyr<sup>1</sup>] secretin 試料を再度精製しても約 10% 前後の低分子量分子の混在が認められた。そこで secretin の<sup>125</sup>I 標識体としては低分子量分子（主に<sup>125</sup>I - tyrosine）の混入が 10% 以下であったものを使用した。他の試薬は市販特級品を使用した。

### (3) secretin, elcatonin, の胃内代謝

<sup>125</sup>I 標識ペプチド灌流時には門脈流出液、組織抽出液試料をゲル滲過法により分析することでペプチドの胃内代謝を検討した。すなわち灌流終了後、直ちに胃を摘出、5.4M guanidine-HCl, 2.4M formic acid からなる抽出液（5 ml）中に浸し、細切後 homogenate を作製、24,000  $\times$  g で 10 分間遠心分離を行った。組織から抽出液中への放射活性の回収率は 70-80% であった。また門脈流出液は 2,000  $\times$  g で 10 分間遠心分離を行い、血球を分離、上清をゲル滲過試料とした。secretin, elcatonin 灌流時には Sephadex G-25F (1  $\times$  70 cm) を、aprotinin 灌流時には Toyopearl HW55 F (1.5  $\times$  90 cm) を用いてゲル滲過を行い、3M guanidine-HCl, 2.4M formic acid で溶出した。溶出液は 3 ml づつフラクションコレクター（LKB 2110 あるいは Gilson 80 F）を使用し採取した。各々のカラムは Blue dextran, standard<sup>125</sup>I 標識ペプチド、<sup>125</sup>I-tyrosine を用いて、void volume (Vo), 未変化ペプチド溶出 volume, internal volume (Vt) を各々同定した。未変化ペプチド量は standard<sup>125</sup>I 標識ペプチド溶出分画中に出現する放射活性により算出した。上記の抽出、分析操作は 0 - 4°C で実施した。

非標識 secretin あるいは elcatonin 灌流時には門脈流出液中濃度を radio-immunoassay により測定した。secretin では第一ラジオアイソトープ社のキットを使用し、一方 elcatonin は Orimo らの報告した二抗体法<sup>79)</sup>により定量し

た。

#### (4) $^{125}\text{I}$ -修飾 aprotinin と trypsin との結合性

$^{125}\text{I}$ -修飾 aprotinin (約 1 nM) と trypsin (Sigma社 type IX, 14  $\mu\text{M}$ ) を 25°C で 5 分間 incubate 後, その試料を 15% polyacrylamide pH 4.3 を用いるディスク電気泳動法<sup>80)</sup>により分析した。泳動終了後はゲルをスライサー (Miles社) を用いて切断, ゲル中放射活性の分布を測定した。

## 第 2 節 secretin, elcatonin, aprotinin の胃内分布

### (1) $^{125}\text{I}$ 標識ペプチドの分布容積の測定

総論の部第 2 章第 1 節でゲル透過法により求めた組織抽出液中の未変化体分率と総放射活性濃度の積により胃内未変化体濃度を算出した。

### (2) 細胞外液容積の測定

inulin (3 mg/ml) を灌流, 分布平衡に到達した 10 分後に胃を摘出, 組織中 inulin 濃度を Dische and Borenfreund の方法<sup>81)</sup>により定量し, 細胞外液容積を測定した。

## 第 3 章 実 験 の 部

### 第 1 節 secretin, elcatonin, aprotinin の脾内代謝

#### (1) ラット摘出脾灌流法

体重 250 g 前後の Wistar 系雄性ラットを用い実験の部第 1 章第 2 節(2)に記した方法により灌流を行った。薬物の灌流は灌流開始から 15 分間の安定期間経過後実施した。

## (2) 試薬および試料溶液の調製

実験の部第2章第1節(2)に記したものを使用すると共に porcine monocomponent insulin と porcine glucagon は Novo 社のものを用いた。salmon calcitonin は Sandoz 社のもの、porcine calcitonin は Armour 社のもの、human calcitonin はペプチド研究所のものを使用した。tetracosactide (ACTH (1-24)) は第一製薬のもの、pancreozymin は Bootz 社のものを用いた。

## (3) secretin, elcatonin, aprotinin の膵内代謝

<sup>125</sup>I 標識ペプチド灌流時には門脈流出液、組織抽出液試料を実験の部第2章第1節(3)に記したゲル濾過法により分析することでペプチドの膵内代謝特性を比較検討した。

非標識の secretin あるいは elcatonin を灌流しその代謝性を検討する場合には、radioimmunoassay により門脈流出液中に出現するペプチド濃度を実験の部第2章第1節(3)に記載した方法により測定した。

## (4) elcatonin の蛋白分解酵素による不活性化

leucine aminopeptidase (type III-CP), carboxypeptidase A (type I), trypsin (type IX), chymotrypsin (type II) は Sigma 社のものを用いた。elcatonin (5.7 nM) を各種の蛋白分解酵素と共に 37 °C で 10 分間、膵灌流溶液中で incubate を行い、残存 elcatonin 濃度を radioimmunoassay により定量した。<sup>79)</sup>

## 第2節 secretin, elcatonin, aprotinin の膵内分布

### (1) <sup>125</sup>I 標識ペプチドの分布容積の測定

実験の部第2章第2節(1)に記した方法により測定を行った。

## (2) 細胞外液容積の測定

inulin (3mg/ml) の灌流を行い、実験の部第2章第2節(2)に記載した方法により豚の細胞外液容積を測定した。

# 第4章 実験の部

## 第1節 secretin の胃内における特異的結合

### (1) 試薬および試料溶液の調製

secretin は比活性 16,000 Crick, Haper, and Raper units/mg のエーザイ社より供与されたものを用い、その  $^{125}\text{I}$  標識化は Chey らの方法<sup>82)</sup>により行い、Sephadex G-15/G-50 fine (7/3, w/w) カラム (0.8×15cm) で精製後、再度 Sephadex G-50 F (1.0×70cm) でゲル濾過を行った。そして凍結乾燥を行い使用時まで -25℃ で保存した。Na $^{125}\text{I}$  はフランス原子力庁 (ミドリ十字) のものを使用した。 $^{125}\text{I}$ -[Tyr<sup>1</sup>] secretin は第一ラジオアイソトープ社より供与されたものを Sephadex G-50 で精製後、使用した。vasoactive intestinal peptide は Calbiochem 社の合成品、glucagon は Novo 社の抽出精製品を使用した。human[Leu<sup>15</sup>]-gastrin I は Beckman 社の合成品を使用した。Percoll は Pharmacia 社のものを用いた。他の試薬は市販特級品を使用した。

### (2) ラット胃粘膜 basolateral membrane 分画の調製

Inui らが報告したラット腎皮質からの basolateral membrane vesicles 調製法<sup>64)</sup>を参考とし、Percoll 密度勾配遠心法を適用し胃粘膜より basolateral membrane の分離、精製を行った。

体重 190-230 g の Wistar 系雄性ラットの胃を摘出、氷冷下の buffer A (0.25M sucrose, 10mM Tris-HCl (pH 7.5) containing 1mM EDTA, 0.1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 100U/ml Trasylol, 0.1μM pepstatin) 中に浸し、胃壁に付着した内容物を取り除いた。胃粘膜を剥

離し，秤量後 Dounce homogenizer により 7 倍容の buffer A 中で homogenate を作成し， $2400 \times g$  に到達後直ちに停止する方法で 3 回遠心分離した。沈渣を集め最初の半分の容量の buffer A 中で再び homogenize を行った。そして再度  $2400 \times g$  で上記の方法により 3 回遠心分離を行った。沈渣 (P1) を得，上清を  $2400 \times g$  で 15 分間遠心し，沈渣 (P2) を分離した。さらにその上清を  $20,500 \times g$  で 20 分間遠心，沈渣 (P3)，と上清の間の fluffy layer を採取した。Teflon Potter homogenizer を使用して，27 ml buffer A 中でこの fluffy layer の homogenize (1000rpm, 10 strokes) を行い crude plasma membrane 分画を得た。それに Percoll を 3 ml 加え  $48,000 \times g$ ，30 分間遠心分離 (Hitachi RP 50T rotor) を行い，上層より 6 ml ずつ Hitachi DGF-U density gradient fractionator を用い採取，7-12 ml 間の分画を basolateral membrane に富む分画とした。採取した分画は Percoll を除く目的で buffer A で希釈後， $100,000 \times g$ ，60 分間遠心分離を行った。さらに得た細胞膜分画は buffer B (100mM Tris-HCl (pH 7.5) containing 0.1mM PMSF, 50U/ml Trasylol, and 0.1  $\mu$ M pepstatin) 中で suspend し，再び  $100,000 \times g$ ，60 分間遠心分離を行った。最終的に得られた沈渣は buffer B 中で 27 ゲージの注射針 (0.4  $\times$  20mm) を用い suspend した。上記の操作はすべて  $0-4^{\circ}\text{C}$  で行った。

指標酵素の測定は以下の方法で行った。

( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-ATPase ; Jørgensen の方法<sup>83)</sup>

5'-nucleotidase ; Widnell and Unkeless の方法<sup>84)</sup>

( $\text{K}^+ + \text{H}^+$ )-ATPase ; Culp and Forte の方法<sup>63)</sup>

acid phosphatase ; Scalera らの方法<sup>85)</sup>

cytochrome c oxidase ; Peters らの方法<sup>86)</sup>

蛋白質は 10% トリクロル酢酸で試料を前処理し，牛血清 albumin を標準として，Lowry らの方法<sup>87)</sup> により測定した。

### (3) secretin の結合実験

細胞分画成分 (30-100  $\mu$ g 蛋白) と 60 pM <sup>125</sup>I 標識 secretin を 2% 牛血清 albumin 含有の buffer B (pH 7.5) 200  $\mu$ l 中で  $25^{\circ}\text{C}$  1 分間 incubate を行

った。結合体の分離は迅速濾過法により実施した。すなわち氷冷した2%血清 albuminを含む buffer B 1 mlを反応液中に加えて結合を停止させ, cellulose acetate filter (Millipore社) で迅速濾過を行なう。filterは氷冷した buffer B 7 ml で洗浄後, filter中の放射活性を測定した。特異的結合量は2.5  $\mu$ M secretin共存時における非特異的結合量を全結合量から差し引くことで求めた。非特異的結合量は加えた放射活性の1-2%であった。

## 第2節 secretinの豚内における特異的結合

### (1) 試薬および試料溶液の調製

実験の部第4章第1節(1)に記したものをを用いた。

### (2) ラット豚 plasma membrane分画の調製

実験の部第4章第1節(2)に記載したラット胃粘膜 basolateral membrane 分画調製法に準じて行った。

体重190-230gのWistar系雄性ラットの豚を摘出し, 秤量後細切し, 5倍容のbuffer A (0.25M sucrose, 10mM Tris-HCl (pH 7.5) containing 1mM EDTA, 0.1mM PMSF and 100U/ml Trasylol) 中でDounce homogenizerを使用し homogenateを作成した。次に2400 $\times$ gに到達直後直ちに停止する方法で3回遠心分離を行い, 沈渣(P1)を得た。上清を2400 $\times$ gで15分間遠心し, 沈渣(P2)を得る。更にその上清を20500 $\times$ gで20分間遠心分離を行った。上清を除去後, fluffy layerを採取し, buffer A中でTeflon Potter homogenizerを用いて, 1000rpm, 10strokes homogenizeを行い, crude plasma membrane分画とした。Percoll 3 mlをこの分画に加え全量を30 mlとして, 48,000 $\times$ g, 30分間遠心分離を行う。上層から8-12 mlの分画を5'-nucleotidase活性の分布より plasma membrane分画として使用した。次にPercollを除く目的でbuffer Aで希釈し, 100,000 $\times$ g, 60分間遠心分離を行った。得た沈渣はbuffer B (100mM Tris-HCl (pH 7.5) containing 0.1

mM PMSF and 100U/ml Trasylol )中に suspendし, 再び  $100,000 \times g$  で 60 分間遠心分離を行った。最終的に得た沈渣は buffer B 中で 27 ゲージの注射針を用い suspendした。上記の一連の操作は  $0 - 4^{\circ}\text{C}$  で実施した。

指標酵素の測定は実験の部第 4 章第 1 節(2)に記載した方法により行ったが, amylase 活性は Caraway 法<sup>77)</sup>で測定した。蛋白質は Lowry らの方法<sup>87)</sup>により測定した。

### (3) secretin の結合実験

実験の部第 4 章第 1 節(3)に記した方法により検討した。

## 引用文献

- 1) H.P.J. Bennet and R. McMartin, *Pharmacol. Rev.*, **30**, 247 (1979).
- 2) 阿部道夫, *医学のあゆみ* **105**, 917(1978)。
- 3) L.S. Schanker, in "Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition," ed. by B.N. La Du, H.G. Mandel, and E.L. Way, Williams and Wilkins Co., Baltimore 1971, pp.20.
- 4) R. Hori, M. Arakawa, and K. Okumura, *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 1135 (1978); M. Arakawa, K. Okumura, and R. Hori, *J. Pharm. Sci.*, **69**, 27 (1980).
- 5) K. Okumura, M. Arakawa, and R. Hori, *J. Pharm. Sci.*, **69**, 157 (1980).
- 6) B. Saffouri, G.C. Weir, K.N. Bitar, and G.M. Makhoulouf, *Am. J. Physiol.*, **238**, G495 (1980).
- 7) K. Kowalewski and R. Scharf, *Can. J. Surg.*, **15**, 153 (1972).
- 8) M.-A. Pilot, *J. Physiol. (London)*, **296**, 113 (1979).
- 9) G.A. Van Huis and M.F. Kramer, *Gut*, **22**, 713 (1981).
- 10) M.N. Ghosh and H.O. Schild, *Br. J. Pharmacol.*, **13**, 54 (1958).
- 11) R. Hori, K. Okumura, K. Inui, N. Nakamura, A. Miyoshi, and T. Suyama, *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 1974 (1977).
- 12) D. Fromm, J.H. Schwarz, and R. Quijano, *Gastroenterol.*, **69**, 453 (1975).
- 13) C. Furihata, T. Kawachi, and T. Sugiyama, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**, 705 (1972).
- 14) H. Umezawa, *Methods Enzymol.*, **45**, 678 (1976).
- 15) R.M.V. James, *J. Physiol. (London)*, **212**, 181 (1971).
- 16) J.G. Gerber, S. Fadul, N.A. Payne, and A.S. Nies, *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **231**, 109 (1984).
- 17) F.R. Brennan, D. Arbakov, J.S. Stefankiewicz, and W.G. Groves, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **149**, 725 (1975);

- P. Holton and J. Spencer, *J. Physiol. (London)*, **255**, 465 (1976); T. Berglin, H. Helander, and K.J. Obrink, *Acta Physiol. Scand.*, **97**, 401 (1976); E. Dial, W.J. Thompson and G.C. Rosenfeld, *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **219**, 585 (1981).
- 18) J.C. Penhos, C.-H. Wu, J.C. Basabe, N. Lopez, and F.W. Wolff, *Diabetes*, **18**, 733 (1969).
  - 19) G.M. Grodsky and R.E. Fanska, *Methods Enzymol.*, **39**, 364 (1975).
  - 20) K.E. Sussman, G.D. Vaughan, and R.F. Timmer, *Metabolism*, **15**, 466 (1966).
  - 21) T. Kanno, T. Saga, and M. Yamamoto, *Jpn. J. Physiol.*, **26**, 101 (1976).
  - 22) S. Tachibana in "GEP Endocrine System," ed. by T. Fujita, Igaku Shoin, Tokyo, 1973, pp.174.
  - 23) K. Iwatsuki and K. Hashimoto, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **3**, 159 (1976).
  - 24) H. Goebell, R. Amman, Ch. Herfarth, J. Hotz, M. Knoblauch, M. Schmid, J. Jaeger, A. Akovbiantz, E. Linder, K. Abt, E. Nuesch, and E.A. Barth, *Scand. J. Gastroenterol.*, **14**, 881 (1979).
  - 25) D.C.H. Sun and H. Shay, *Gastroenterol.*, **38**, 570 (1960); J.E. McGuigan and M.M. Wolfe, *Gastroenterol.*, **79**, 1324 (1980); L. Demling, W. Domschke, J.-F. Riemann, S. Domschke, H. Ruppin, O. Junge, and E. Wunsh, *Scand. J. Gastroenterol.*, **11**, 135 (1976).
  - 26) 折茂 肇, 吉野 彰, 藤田拓男, *骨代謝*, **6**, 139 (1971).
  - 27) G. Haberland and R. McConn, *Fed. Proc.*, **38**, 2760 (1979).
  - 28) S.A. Berson and R.S. Yalow, *J. Clin. Invest.*, **38**, 1996 (1959).
  - 29) M.I. Grossman, *Gastroenterol.*, **57**, 767 (1969).
  - 30) W.Y. Chey, R.A. Rhodes, and H.H. Ta, in "Gut Hormones,"

- ed. by S.R. Bloom, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1978, pp.193.
- 31) J.C. Thompson, O.L. Llianos, R.K. Teichmann, A. Scafmeier, and P.L. Rayfold, *World J. Surg.*, **3**, 469 (1979).
  - 32) N. Yanaihara, M. Sakagami, H. Sato, K. Yamamoto, T. Hashimoto, C. Yanaihara, Z. Ito, K. Yamaguchi, and K. Abe, *Gastroenterol.*, **72**, 803 (1977).
  - 33) h. Yamauchi, M. Shiraki, T. Oyama, M. Otani, M. Matsuo, and H. Orimo, *Endocrinol. Japon.*, **24**, 245 (1977); H. Yamauchi, M. Shiraki, M. Otani, M. Matsuo, and H. Orimo, *Endocrinol. Japan.*, **24**, 281 (1977).
  - 34) V.D. Arzdts, K.-O. Raker, P. Torok, and E. Habermann, *Arzneim. Forsch.*, **20**, 667 (1970).
  - 35) H. Kaller, K. Pattzshe, L.A. Weger, adn F.A. Horster, *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, **2**, 79 (1978).
  - 36) W.-K. Liu and J. Meienhofer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **31**, 467 (1968).
  - 37) J.P. Vincent and M. Lazdunski, *Biochemistry*, **11**, 2967 (1972).
  - 38) C.A. Taylor and P.T. Varandani, *Diabetologia*, **21**, 464 (1981).
  - 39) N. Vaysse, L. Pradayrol, C. Susini, J.A. Chayvialle and A. Ribbet, in "Gut Hormones, 2nd. Ed.," ed. by S.R. Bloom and J.M. Polak, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1981, pp.358.
  - 40) I.D. Goldfine, *Biochim. Biophys. Acta*, **650**, 53 (1981).
  - 41) P.L. Robbins, E.B. Silberteiu, and D.L. Fortman, *Int. J. Nucl. Med. Biol.*, **4**, 118 (1977).
  - 42) 山内広世, 白木正孝, 折茂 肇, 墳本敏彦, 桜田豊三, 渡辺 晋, *骨代謝*, **12**, 378 (1979)。
  - 43) P.J. Scarpace, W.F. Neuman, and L.G. Raisz, *Endocrinol.*, **100**, 1260 (1977).

- 44) H. Katayama, A. Kamiya, K. Okumura, Y. Ishikawa, S. Kitazawa, and R. Hori, *J. Pharm. Dyn.*, **3**, s-19 (1980).
- 45) I. Yamamoto, R. Morita, M. Fukunaga, S. Dokoh, C. Shigeno, K. Torizuka, and T. Noda, *Endocrinol.*, **108**, 698 (1981).
- 46) R.W. Stoddart and J.A. Kierman, *Histochemie*, **34**, 275 (1973).
- 47) M. Just, G. Erdmann, and E. Haberman, *Naunyn-Schmiedberg's Arch. Pharmacol.*, **300**, 57 (1977).
- 48) D.F. Steiner, W. Kemmler, J.L. Clark, P.E. Oyer, and A.H. Rubenstein, in "Handbook of Physiology," Sec. 7, Vol. 1, ed. by D.F. Steiner and N. Freinken, American Physiol. Soc., New York, 1972, pp.175.
- 49) J.A. Parsons, B. Raffery, R.W. Stevenson, and J.M. Zanelli, *Br. J. Pharmacol.*, **66**, 25 (1979).
- 50) D.M. Findlay, V.P. Michelangeli, J.M. Mosely, and T.J. Martin, *Biochem. J.*, **196**, 513 (1981).
- 51) M. Korc, Y. Iwamoto, H. Sankaran, J.A. Williams, and I.D. Goldfine, *Am. J. Physiol.*, **240**, G63 (1981).
- 52) E.J. Vespohl, D. Schenzle, and H.P.T. Ammon, *Biochim. Biophys. Acta*, **716**, 258 (1982); H. Sankaran, Y. Iwamoto, M. Korc, J.A. Williams, and I.D. Goldfine, *Am. J. Physiol.*, **240**, G63 (1981).
- 53) Y. Sasaki and N.H. Wagner, *J. Appl. Physiol.*, **30**, 879 (1971).
- 54) K. Kawai, L. Orci, and R.H. Unger, *Endocrinol.*, **110**, 660 (1982).
- 55) A.J. Zeleznik and J. Roth, *J. Clin. Invest.*, **61**, 1363 (1978).
- 56) J. Petersen, J. Kitaji, W.C. Duckworth, and R. Rabkin, *Am. J. Physiol.*, **243**, F126 (1982).
- 57) H.A. El Mushid, R. Hakansen, G. Liedberg, and F. Sundler, *J. Physiol. (London)*, **305**, 249 (1980).
- 58) K. Takeuchi, G.R. Speir, and L.R. Johnson, *Am. J. Physiol.*,

- 237, E284 (1979).
- 59) M.T. Dayton and J. Schlegel, *J. Surg. Res.*, **35**, 319 (1983).
  - 60) R. Saffouri, J.W. Duval, A. Arimura, and G.M. Makhoul, *Gastroenterol.*, **86**, 839 (1984).
  - 61) W.Y. Chey, M.S. Kim, K.Y. Lee, and T.M. Chang, *Am. J. Physiol.*, **240**, G239 (1981).
  - 62) M.I. Grossman, *Lancet* *i*, 1088 (1970).
  - 63) D.J. Culp and J.G. Forte, *J. Memb. Biol.*, **59**, 135 (1981).
  - 64) K. Inui, T. Okano, M. Takano, S. Kitazawa, and R. Hori, *Biochim. Biophys. Acta*, **647**, 150 (1981).
  - 65) C. Gespach, D. Betaille, N. Vauclin, G. Rosselin, L. Moroder, and E. Wunsch, *Peptides*, **2**, 247 (1981).
  - 66) J.M. Lundberg, B. Hedlund, and T. Bartfai, *Nature*, **295**, 147 (1982).
  - 67) C. Sakamoto, I.D. Goldfine, and J.A. Williams, *J. Biol. Chem.*, **259**, 9623 (1984).
  - 68) G.R. Speir, K. Takeuchi, W. Peitsch, and L.R. Johnson. *Am. J. Physiol.*, **242**, G243 (1982).
  - 69) 松尾 裕 "消化管ホルモン" 山田隆司, 伊藤 漸編, 医歯薬出版 東京, 1976, pp.1.
  - 70) S. Milutinovic, I. Schulz, and G. Rosselin, *Biochim. Biophys. Acta*, **436**, 113 (1976).
  - 71) J.P. Christophe, T.P. Conlon, and J.D. Gardner, *J. Biol. Chem.*, **251**, 4629 (1976).
  - 72) G.T. Pearson, J. Singh, M.S. Daoud, J.S. Davison, and O.H. Petersen, *J. Biol. Chem.*, **256**, 11025 (1981).
  - 73) V. Mutt, in "Gastrointestinal Hormones," ed. by G.B.J. Glass, Raven Press, New York, 1980, pp.85.
  - 74) P. Robberecht, M. Waelbroeck, M. Noyer, P. Chatelain, P. De Neef, W. König, and J. Christophe, *Digestion*, **23**, 201 (1982).
  - 75) I. Schulz, K. Heil, A. Kribben, G. Sachs, and W. Haase, in

- "Biology of Normal and Cancerous Exocrine Pancreatic Cells," ed. by A. Ribet, L. Pradayrol, and C. Susini, Elsevier/North-Holland Biochemical Press, Amsterdam, 1980, pp.3.
- 76) M. Kumegawa, T. Takuma, S. Hosoda, S. Kunii, and Y. Kanda, *Biochim. Biophys. Acta*, **543**, 243 (1978).
- 77) W.T. Caraway, *Am. J. Clin. Pathol.*, **32**, 97 (1959).
- 78) W.N. Hunter and F.C. Greenwood, *Nature*, **194**, 495 (1962).
- 79) H. Orimo, H. Yamauchi, T. Ohyama, M. Matuo, and M. Otani, *Gen. Comp. Endocrinol.*, **31**, 482 (1977).
- 80) R.A. Reisfeld, U.J. Lewis, and D.E. Williams, *Nature*, **195**, 281 (1962).
- 81) Z. Dishe and E. Borenfreund, *J. Biol. Chem.*, **192**, 281 (1951).
- 82) T.-M. Chang and W.Y. Chey, in "Gastrointestinal Hormones," ed. by G.B.J. Glass, Raven Press, New York, 1980, pp.797.
- 83) P.L. Jørgensen, *Methods Enzymol.*, **32**, 277 (1974).
- 84) C.C. Widnell and J.C. Unkeless, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **61**, 1050 (1968).
- 85) V. Scalera, C. Storelli, V. Storelli-Joss, W. Haase, and H. Murer, *Biochem. J.*, **186**, 177 (1980).
- 86) T.J. Peters, M. Müller, and C. de Duve, *J. Exp. Med.*, **136**, 1117 (1972).
- 87) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).