神経ペプチドgalaninの作用：単離ラット膵灌流系におけるグルコース刺激インスリン放出抑制効果

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 竹田, 康男 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7976

金沢大学十全医学会雑誌　第96巻　第5号　860－871　(1987)

神経ペプチド galanin の作用：単離ラット膵灌流系におけるグルコース刺激インスリン放出抑制効果

金沢大学医学部内科学第二講座（主任：竹田亮祐教授）

竹　田　康　男

(昭和62年10月1日受付)

Galanin はブタ上部小腸から単離された29アミノ酸残基からなる新しい神経ペプチドである．本研究では，単離ラット膵灌流系を用いて，galanin のグルコース刺激下，インスリン，C-ペプチド放出に及ぼす影響を検討した．まず合成 galanin を用い，galanin C 端特異 RIA 系を確立し，galanin 様免疫活性が，ラットおよびブタ消化管，膵に存在することを明らかにし，更にゲルろ過による検討にて，ラット膵においては ^{125}I-galanin に一致するピークとそれより大分子の二つピークより構成されることを明らかにした．単離ラット膵灌流実験における，galanin 単独刺激では，インスリン基礎分泌抑制傾向と刺激終了後に一相性のインスリン放出を認めた．この場合，グルカゴン分泌およびソマトスタチン分泌への影響はほとんど認められなかった．また，低濃度グルコース（150 mg %），高濃度グルコース（300 mg %）刺激下それぞれにおいて，10^{-8} M galanin の投与により，インスリン，C-ペプチド放出が抑制された．高濃度グルコース刺激下では，インスリンと C-ペプチドの放出は，10^{-7}～10^{-10} M galanin 投与により容量依存的に抑制された．以上の結果，galanin が膵 β 細胞においてインスリン分泌に抑制的に作用する新しい神経ペプチドであることを明らかにした．

Key words galanin, isolated rat pancreas perfusion, insulin and C-peptide release, galanin radioimmunoassay

1983年，Tatemoto ら[1]は，C 末端アミド構造を指標とするペプチド分離法により，ブタ上部小腸から29アミノ酸残基のペプチドを単離し，そのアミノ酸配列の N 末端が glycine，C 末端が alanine であることにより，galanin と命名した[2]．その後，ブタおよびげっ歯動物における免疫組織学的研究，ラジオイムノアッセイ（radioimmunoassay, RIA）による研究で，組織内分布および局在が検討された．その結果，galanin は脳および腸管に広範囲に存在する神経ペプチドであることが明らかにされた[3)~8)]．近年，ヒト消化管[9)10)]，副腎[11)]，下部尿路系[12)]においても galanin 様免疫活性の存在が証明された．Galanin は，化学的検索法により精製・単離されたペプチドであることから，その生理作用については不明な点が多い．発見者である Tatemoto ら[2)]は，ラット腸管・膀胱の収縮，イヌにおける容量依存的な血糖上昇作用を報告した．その後，膵ラ氏島周囲に galanin 含有神経が存在すること[14)]，各種動物においてインスリン分泌の放出抑制作用[13)~17)]などが報告され，galanin の膵ホルモンに及ぼす影響が示唆された．そこで，本研究では galanin の生理作用を追求する研究の一環として，まず合成 galanin を用い，特異 RIA 系を確立し，ラットおよびブタ消化管，膵の galanin 様免疫活性を検討した．ついで，単離ラット膵灌流系を用いて galanin の膵内分泌に及ぼす影響を検討した．

材料および方法

Ⅰ．ペプチド

Galanin およびその関連ペプチド，ヒト pancreatic polypeptide（PP），ブタ neuropeptide Y（NPY），

Abbreviations: B/F, bound/free; BSA, bovine serum albumin; cDNA, complementary desoxyribonucleic acid; GH, growth hormone; GRP, gastrin releasing peptide; IR-CP, immunoreactive C-peptide; IR-G, immunoreactive glucagon; IR-Gal, immunoreactive

peptide YY (PYY), vasoactive intestinal peptide (VIP), ラット C-ペプチド-I, N^{α}-tyrosylated ラット C-ペプチド-I, ソマトスタチン-14, N^{α}-tyrosylated ソマトスタチン-14 はいずれも静岡薬科大学生物薬品化学教室において，液相法または固相法により化学合成し，使用前にその純度を証明したものである．ラットインスリンおよびブタグルカゴンは Novo 社よりそれぞれ購入した．

II. RIA

1．抗 galanin 血清の作成

高純度合成ブタ galanin 10 mg とウシ血清アルブミン (bovine serum albumumin, BSA) (Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A) 20 mg を冷蒸留水 2 ml に溶解し，10 倍当量の水溶性カルボジイミド 400 mg を添加，pH 6.5 にて 18 時間反応させ，galanin-BSA 結合体を作成した．これを Sephadex G-10 (Pharmacia Fine Chemical, Uppsala, Sweden) カラム (2.1×90 cm) でゲルろ過し，高分子量画分を集め，凍結乾燥し galanin-BSA 結合体 26 mg を得た．この galanin-BSA 結合体 3 mg を生理食塩水 1.5 ml に溶解し，complete Freund's adjuvant 1.5 ml を加えオムニミキサーで乳化したのち，3 等分し，3 匹の家兎に注射免疫した．2 週間おきに上記の半量を用い注射免疫をくり返した結果，1 羽の家兎に高力価の血清 R1985 を得た．

2．Galanin 特異 RIA 系の確立

上記抗 galanin 血清 R1985 を用い，合成 galanin を標準抗原，^{125}I-合成 galanin を標識抗原とする特異 RIA 系（抗血清の最終希釈濃度 17,5000 倍）により測定した．なお標識抗原は，クロラミン T 法により標識化をおこない Sephadex G10 カラムにて精製した．標準希釈溶液として，0.5% BSA, 0.025 M エチレンジアミン四酢酸（和光純薬，東京），0.14 M 食塩を含む 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を用い，この溶液 0.4 ml に標準抗原溶液 (0.1 ml) あるいは未知検体溶液 (0.1 ml)，希釈抗血清溶液 (0.1 ml)，および希釈標識抗原溶液 (0.1 ml) を添加し，混合後，4 °C・48 時間反応させた．Bound/Free (B/F) 分離は 5 %ポリエチレングリコールを用いる二抗体法により行った．尚，本系の最小検出限界は 4 fmol/tube であった（図 1）．

3．インスリン RIA 系

ラットインスリン (Novo Research Institute, Copenhagen, Denmark) を標準抗原とし，モルモット抗ブタインスリン血清（最終希釈濃度 160,000 倍），^{125}I-インスリン（ダイナボット社，Tokyo, Japan）を用い確立した RIA 系により測定した．

4．ラット C-ペプチド特異 RIA 系

標準抗原としては，合成ラット C-ペプチド-I，抗血清には家兎抗ラット C-ペプチド-I 血清 R 901，標識抗原として ^{125}I-ラット C-ペプチド-I とする C 端特異 RIA 系により行った．この系は，C-ペプチド I と II を同時に認識するが "peptide A" は認識されない系である[18]．

5．グルカゴン RIA 系

既報に準じ，ブタグルカゴン (Novo Research Institute, Copenhagen, Denmark) を標準抗原，抗グルカゴン血清 OAL 123（最終希釈濃度 140,000 倍）（大塚アッセイ研究所）を用いる RIA 系により行い，B/F 分離はデキストラン－炭末法により行った[19]．

6．ソマトスタチン RIA 系

ソマトスタチン-14 を標準抗原，^{125}I-N^{α}-tyrosylated-ソマトスタチン-14 を標識抗原とし，抗ソマトスタチン-14 血清（最終希釈濃度 60,000 倍）を用いる RIA 系により行った[20]．

III. 組織の抽出

ブタ組織は，ブタを窒素ガスにて窒息死させたのち，ただちに摘出した．ラットは，ウィスター系雄性ラット（体重：200～250 g）を用い 24 時間絶食後，無麻酔下で断頭し，ただちに臓器を摘出した．組織は秤量後，

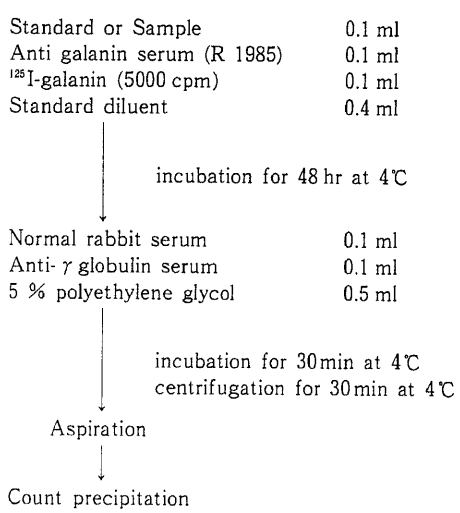

Fig. 1. Flow sheet of RIA specific for galanin. Standard diluent : 0.01 M phosphate buffer containing 0.025 M EDTA, 0.1 M NaCl and 0.5% BSA.

galanin; IRI, immunoreactive insulin; NPY, neuropeptide Y; PP, pancreatic polypeptide; RIA, radioimmunoassay; VIP, vasoactive intestinal polypeptide.

氷冷下5～10倍量の0.1M酢酸の存在でホモジナイズした．ホモジネートは沸騰水浴中で10分間加熱後，冷却，氷酢酸を加え，最終濃度を1.0Mとした．これを4°C，3,000回転にて30分間遠心し，上清を分離，残渣を1.0M酢酸で洗浄した．上清ならびに洗液を合わせて凍結乾燥し，RIA用検体とした．測定に際して，検体は0.01Mリン酸緩衝液（pH 7.4）に溶解した．

IV．ゲルろ過法

Galaninの組織内分子型をみるために，ブタ及びラット膵組織抽出物を用いてゲルろ過を行い検討した．上述の組織抽出検体を3M酢酸に溶解後，不溶物を遠心分離し，上清をSephadex G50 superfine (Pharmacia Fine Chemical, Uppsala, Sweden) (1.0×90.0 cm) カラムに添加してゲルろ過を行った．溶出液として3M酢酸をもちい，溶出液を各1.2 ml画分として採取後，凍結乾燥しRIA用検体とした．

V．単離ラット膵灌流実験

体重200～250 gのウィスター系雄性ラットを用い，飲水を制限せず約20時間絶食した後，ペントバルビタール50 mg/kgを腹腔内投与により麻酔した．Grodskyらの方法[21]に準じ，膵を摘出し単離ラット膵灌流標本を作成した．灌流液には，95% O_2-5% CO_2で飽和しpH 7.4，37°Cに調整した4%デキストラン70（名糖産業，Tokyo, Japan），グルコースを含むKrebs Ringer Bicarbonate緩衝液を用いた．腹腔動脈のカニューレより2.5 ml/minの流速で灌流した．門脈のカニュレーションにより得た灌流液は，1分毎にアプロチニンを添加したガラスチューブに氷冷下で採取し，測定まで−30°Cに凍結保存した．

VI．灌流実験におけるペプチドの投与法

合成ブタgalaninは，1M酢酸に溶解後，0.2% BSA含む生理的食塩水で希釈し，目的とする濃度に調整した．Galaninの投与は，インスリンの基礎分泌が安定した後，側管からインフュージョンポンプ（Harnard Apparatus, Model 975）にて0.1 ml/minの流量で注入した．インスリン分泌刺激は150 mg%および300 mg%グルコースの投与により行った．

VII．統計学的検定法

ペプチドと高濃度グルコースの同時投与におけるインスリンおよびC-ペプチドの放出量は，グルコース投与後の0～5分を第1相，5～20分間を第2相とした．第1相，第2相のそれぞれインスリンおよびC-ペプチド放出量と，第1相，第2相のインスリン放出総量を対照群と比較した．なお，得られた数値はすべて平均値±標準誤差であらわした．推計学的処理にはStudentのt検定を用い，5%未満の危険率をもって有意とした．

成　績

I．抗ブタgalanin血清とRIA系の確立

Galanin-BSA結合体を抗原として用い，家兎に免疫した結果，1匹の家兎より高力価の抗ブタgalanin血清R1985が得られた．本抗血清R1985の主要抗原認識部位を各種合成galanin関連ペプチドの交差反応性に基づき検討したところ，galanin (3-29位)，galanin (10-29位)，galanin (15-29位)の用量反応曲線は，いずれもgalanin（1－29)のそれに一致し，同等の交差反応性を示した．したがって，抗血清R1985の主要抗原認識部位は，C末端15－29配列以内に存在することが明らかになった．また，galaninのC端構造と類似のC端構造をもつneurokinin A, neurokinin B, neuromedin B, substance Pおよびgastrin releasing peptide (GRP) のほか，NPY, PYY, VIPの交差反応性は0.02%以下であった．膵ホルモンであるインスリン，グルカゴン，ソマトスタチン-14，ヒトPPとの交差反応性も認められなかった．ここに本抗血清R1985を用い，合成galaninを標準抗原，^{125}I-合成galaninを標識抗原とするgalanin C端特異RIAを確立するにいたった（図2）．

II．ラット，ブタ組織内galanin様免疫活性と存在様式

本研究のgalanin特異RIA系を用い，ラットおよびブタ抽出物中のgalanin様免疫活性濃度を測定した．ラットおよびブタ消化管組織全体にgalanin様免疫活性を認めた（表1，2）．ブタに比較しラット消化管における免疫活性濃度は低値であるが，食道を除く消化管全体にほぼ均一に免疫活性を認めた．一方ブタでは，免疫活性濃度は，胃噴門部，下部消化管に高値を認めた．この結果は，Bishopら[9]により報告された各組織におけるgalanin様免疫活性濃度よりやや低値であるが，組織内分布は，ほぼ一致するものであった．膵抽出物においても比較的高濃度のgalanin様免疫活性をラット，ブタ組織中に認めた．ラット膵抽出物では0.65±0.26 fmol/mg湿重量（n=5），ブタ抽出物では9.16±3.90 fmol/mg湿重量（n=5）であった．

ブタ膵抽出物におけるgalanin様免疫活性の希釈曲線は図3に示すようにブタgalanin標準曲線と並行であるが，ラット膵抽出物においては，並行性を認めなかった．

ついで，膵抽出物のゲルろ過による検討を行った．ブタ膵抽出物のゲルろ過による検討では，^{125}I-galaninと同一の位置にのみ溶出する単一のピークを認めるのに対し，ラット膵抽出物では^{125}I-galaninに一致するピークとそれより高分子画分に溶出する二つのピーク

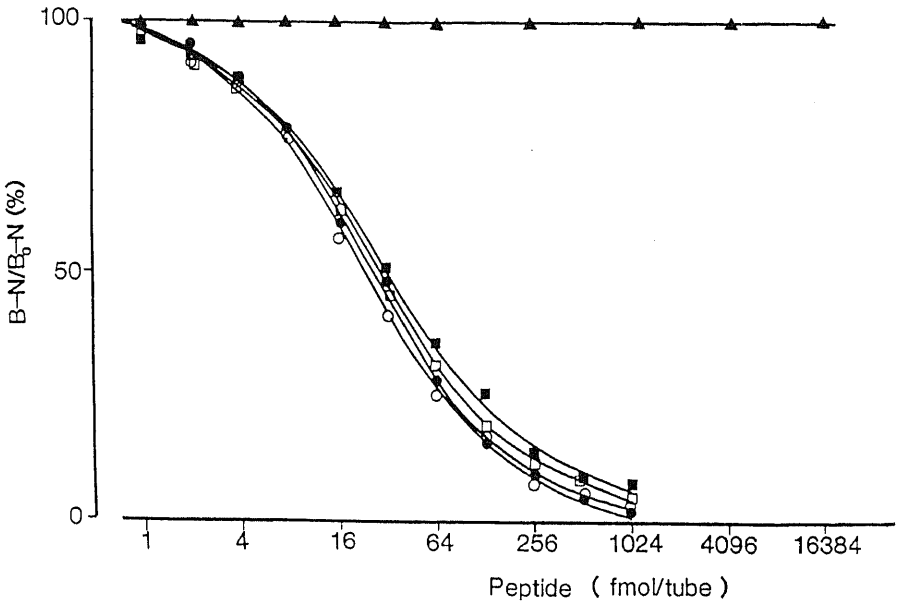

Fig. 2. Displacement of curves of synthetic galanin fragments in the galanin RIA with antiserum (R1985). Assay conditions are those described in Fig. 1. (●——●), galanin (1-29); (○——○), galanin (3-29); (■——■), galanin (10-29); (□——□), galanin (15-29). RIA showed no cross-reactivity with gastrointestinal peptides (▲——▲) such as GRP, neurokinin A, neuromedin B, substance P, human PP, NPY, PYY, VIP, insulin, glucagon and somatostatin.

Table 1. Galanin-like immunoreactivity in porcine gastrointestinal tissues

Tissue	Immunoreactivity*
Esophagus	1.97±0.73
Stomach	
cardia	7.10±3.38
corpus	2.05±1.00
antrum	2.47±0.89
Duodenum	
proximal	2.40±0.68
distal	2.67±0.76
Jejunum	
proximal	2.89±0.48
distal	4.12±0.62
Ileum	
proximal	5.18±0.75
distal	5.64±1.65
Colon	9.63±2.68
Rectum	11.70±1.12
Pancreas	9.16±3.90

*fmol galanin equivalent per mg wet weight of tissue Values are expressed in mean ± SEM. n=5

Table 2. Galanin-like immunoreactivity in rat gastrointestinal tissues

Tissue	Immunoreactivity*
Esophagus	0.17±0.17
Forestomach	1.07±0.32
Adenostomach	0.90±0.19
Duodenum	1.16±0.36
Jejunum	1.14±0.52
Ileum	1.19±0.42
Colon	0.95±0.34
Pancre	0.65±0.26

*fmol galanin equivalent per mg wet weight tissue. Values are expressed in mean ± SEM. n=5

を認めた（図4）.

Ⅲ. 単離ラット膵灌流

1. Galanin 単独投与による効果

10^{-7} M および 10^{-8} M galanin 単独投与において，100 mg %グルコース存在下において注入直後に，インスリンおよびグルカゴンの両免疫活性濃度の上昇が小さ

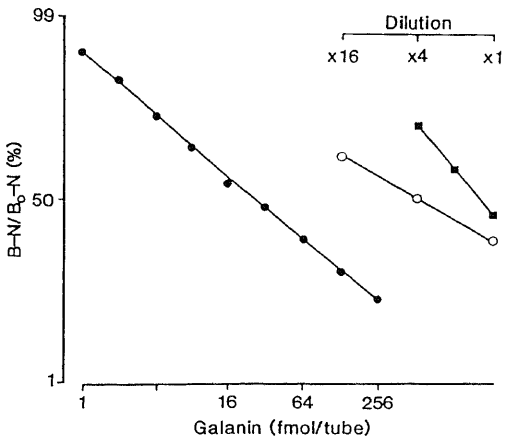

Fig. 3. Dilution curves of porcine (○——○) and rat tissue extracts of pancreas (■——■) and dose-response curve of standard synthetic galanin (●——●) in galanin RIA with antiserum R1985.

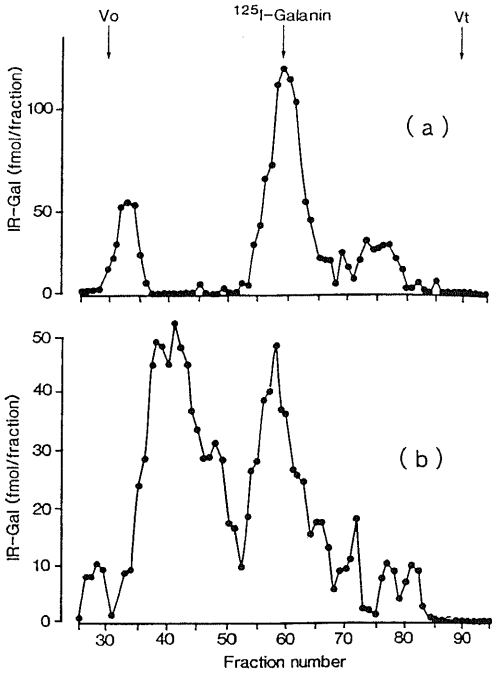

Fig. 4. Elution profile of immunoreactive galanin (IR-Gal) on gelfiltration of porcine (a) and rat (b) tissue extracts of pancreas.

い放出ピークとして認めた．その後，両者ともにその放出が抑制される傾向を示した．なお，インスリンに関しては，galanin による刺激中止後に 1 相性の免疫活性濃度の上昇を認めた．10^{-9} M galanin の単独投与においても，刺激終了後のインスリン放出を認めたが，10^{-8} M galanin 投与に比較すると低値であった．以上の結果より，以下の実験に 10^{-8} M galanin を使用した．一方，グルカゴン放出に関しては，刺激終了後も有意な変化を観察しなかった．なお，本灌流系において，galanin によるソマトスタチンの分泌刺激は全く認められなかった（図 5）．

2．グルコース刺激によるインスリンと C-ペプチド放出に及ぼす 10^{-8} M galanin の抑制効果

1）低濃度グルコース（150 mg %）刺激に対する抑制効果

10^{-8} M galanin の投与開始 10 分後に 150 mg %グルコースを同時投与し，20 分間投与を継続した．10^{-8} M galanin の存在下，150 mg %グルコースによるインスリン放出総量は 70.1±15.6 ng（n=5）であり，一方，対照群として 150 mg %グルコース単独投与の場合 113.5±19.6 ng（n=5）であった．すなわち，10^{-8} M galanin 存在下，150 mg %グルコースによるインスリン放出総量は，有意ではないが低下の傾向を示した．しかし，第 1 相のインスリン放出に関しては，10^{-8} M galanin 投与で 8.7±2.8 ng であり，対照群 18.3±2.1 ng に比し有意の低下を示した．

C-ペプチドの放出についても，10^{-8} M galanin 投与で総放出量 27.1±5.8 ng であるのに対し，対照群は

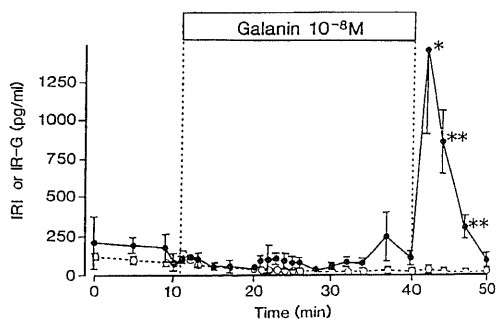

Fig. 5. IRI (●——●) and IR-G (○·····○) levels from isolated rat pancreas when perfused with the medium containing 10^{-8} M galanin. Results are presented as Mean ± SEM (n=5). Values of stastical significance are *, $p<0.05$ and **, $p<0.01$ vs basal levels.

42.2±4.6 ng であり，インスリンと同様有意ではないが放出量の低下傾向を認めた．また，第 1 相の C-ペプチド放出刺激に関しても，インスリン放出のそれと同様有意の低下を認めた（表 3）．

2）高濃度グルコース（300 mg %）刺激に対する抑制効果

10^{-8} M galanin の存在下，300 mg %グルコースに

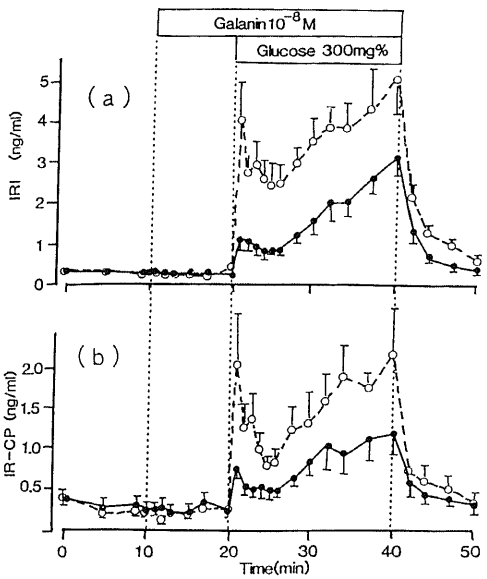

Fig. 6. Effect of 10^{-8} M galanin on 300 mg % glucose-induced insulin (a) and C-peptide (b) release. (●——●) with 10^{-8} M galanin and (○ ……○) without galanin. Result are presented as Mean ± SEM (n=5～9).

よるインスリン放出総量は 72.7±9.3 ng (n=6) であったのに対し，300 mg %グルコース単独投与による対照群放出総量は，165.9±27.3 ng (n=10)であった．すなわち，10^{-8} M galanin の存在下，300 mg %グルコースによるインスリン放出は対照群に比し約43.8%に低下した．また，第1相，第2相，総量のいずれにおいても，有意のインスリン放出の低下が認められた．

同条件下，C-ペプチドの放出総量は 25.2±6.4 ng (n=5) であった．一方，対照群では 60.8±12.2 ng (n=5)であった．すなわち，対照群に比し，C-ペプチドの放出も約 41.4%に低下し，インスリン放出の低下に並行しており，その第1相および放出総量の両者について有意の低下を示した（図6）．

3）300 mg %グルコース刺激によるインスリンとC-ペプチド放出に及ぼす galanin 濃度の効果

Galanin 濃度を 10^{-7}，10^{-9}，10^{-10}M とし，10^{-8} M galanin 投与の場合と同様の方法により galanin 投与開始 10 分後に，300 mg %グルコースを 20 分間同時注入した，高濃度グルコースによるインスリン放出は，10^{-7} M galanin 濃度の投与により，10^{-8} M の場合と同様，第1相，第2相および総量において放出を有意に抑制した．10^{-9} M galanin によってもインスリン放出

Table 3. Effect of 10^{-8}M galanin on 150mg% glucose-induced insulin and C-peptide release from isolated perfused rat pancreas

		Integrated released IRI and IR-CP (ng equivalent)		
		1st phase	2nd phase	Total
IRI	Control	18.3±2.1	95.2±17.6	113.5±19.6
	10^{-8}M galanin	8.7±2.8*	61.5±13.4	70.1±15.6
IR-CP	Control	7.2±0.3	35.0± 4.4	42.2± 4.6
	10^{-8}M galanin	3.2±1.2*	23.9± 5.1	27.1± 5.8

Values are expressed in mean ± SEM of 5 rats.
*P<0.05 vs cotrol value

Table 4. Effect of 10^{-10}～10^{-7}M galanin on 300mg% glucose-induced insulin (IRI) release from isolated perfused rat pancreas

Galanin added	Integrated released IRI (ng equivalent)		
	1st phase	2nd phase	Total
Control	31.5±6.4	134.4±21.6	165.9±27.3
10^{-10}M	27.4±7.0	138.2±24.7	165.6±31.5
10^{-9} M	16.5±5.7	82.1±19.4	98.5±22.4
10^{-8} M	7.8±2.2*	64.9± 8.6*	72.7± 9.3*
10^{-7} M	9.1±3.1*	57.5±20.3*	66.6±23.2*

Values are expressed in mean ± SEM. n=6～10
*p<0.05 vs control value

Table 5. Effect of 10^{-10}～10^{-7}M galanin on 300mg% glucose-induced C-peptide (IR-CP) release from isolated perfused rat pancreas

Galanin added	Integrated released IR-CP (ng equivalent)		
	1st phase	2nd phase	Total
Control	11.2±2.8	49.8±11.0	60.8±12.2
10^{-10}M	5.8±1.4	42.4±11.6	48.2±12.6
10^{-9}M	7.4±3.8	29.4±12.2	36.8±15.4
10^{-8}M	2.6±0.8*	22.8± 6.0	25.2± 6.4*
10^{-7}M	2.0±1.0*	10.0± 3.8**	12.0± 2.3*

Values are expressed in mean ± SEM. n=6
*p<0.05, **P<0.01 vs control value

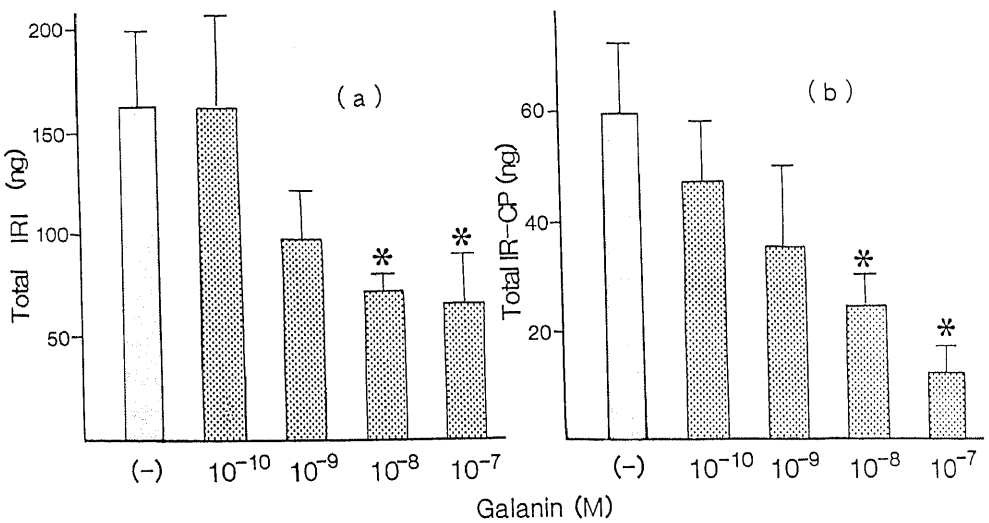

Fig. 7. Total IRI (a) and IR-CP (b) release induced by 300 mg % glucose in the presence of 10^{-10}～10^{-7} M galanin. Results are presented as Mean ± SEM (n=5～9). Values of statiscal significance are *, p<0.05 vs control level.

は抑制される傾向を示した（表4）. C-ペプチドの放出についても，10^{-7} M galanin によりその第1相と第2相の放出ならびに放出総量において，また，10^{-8} M galanin では第1相の放出および放出総量についてそれぞれ有意の抑制を示した. Galanin の 10^{-9} M および 10^{-10} M 濃度の投与では，有意ではないが抑制傾向を示した（表5）.

以上，galanin は，図7に示すように，対照群に対して用量依存的に 300 mg %グルコース刺激下におけるインスリン放出を抑制した．また，同時に C-ペプチドの放出もインスリンと並行して抑制されることを明らかにした．

考 察

合成 galanin を抗原とし家兎で産生した抗 galanin 血清 R1985 は，合成 galanin 関連ペプチドおよび構造類似の脳一腸ペプチドの交差反応性から galanin に特異的であることを証明した．次に本抗血清を用い，^{125}I-合成 galanin を標識抗原とし，合成 galanin を標準抗原とする RIA 系を確立した．本 RIA 系は galanin C 端に特異的であり，最小検出限界は 4 fmol/tube と高感度であった．本 RIA 系を用い，ラットおよびブタ消化管，膵抽出物を検討したところ，広範囲に galanin 様免疫活性が存在することを確認した．膵組織においても比較的高濃度の galanin 様免疫活性が検出された．ブタに比しラット抽出物中の免疫活性濃度が低値であった．これは本 RIA 系がブタ特異 RIA 系であり，ラット galanin のアミノ酸配列がブタのそれと異なるためと推定された[2)10)]．ゲルろ過による検討にてもブタ膵においては ^{125}I-galanin に一致する単一の

ピークを認めるのに対し，ラット膵は ^{125}I-galanin に一致する位置とそれより早く溶出する二つのピークより形成された．Bauer ら[10)22)]もヒト，ネコ副腎，ヒト腸管において同様二つのピークより形成されることを報告し，大分子 galanin の存在を明らかにした．以上の結果より galanin の種差によるアミノ酸配列，分子型が異なることが推定された．ブタ galanin につづき，ウシ galanin の cDNA 解析にてその前駆体の構造決定がなされたが[23)24)]，他の動物種におけるアミノ酸配列は不明である．今後，各種動物の galanin の構造決定することにより更に詳細な検討が期待される．

Galanin は，もともと化学的検索により単離されたことから，その生理作用が明らかでなかったが，最近発表された Rokaeus[24)]の総説には，in vivo, in vitro にて様々な生理作用が報告されている．そのなかでも，galanin は単離当初より，用量依存的な血糖上昇作用が認められ，膵ホルモンに及ぼす影響が示唆され，その後，イヌ，マウス，モルモットにおけるインスリン分泌抑制作用が明らかにされた[13)~17)]．一方免疫組織学的にも，藤田および岩永は，ブタ膵には本血清 R1985 を用いて，galanin 含有神経の存在を確認し（私信），Dunning ら[14)]も，イヌ，ラ氏島周囲に同様 galanin 含有神経の存在を認めている．膵ラ氏島周囲における galanin 含有神経存在及び，比較的高濃度免疫活性の膵組織における存在は，膵機能におけるこのペプチドの生理学的役割の可能性が示唆されるが，ラット膵内分泌に及ぼす影響に関しては，詳細な検討はなされていない．これらの知見に基づいて，単離ラット膵灌流系を用い，高純度の合成ブタ galanin を投与することによりラット膵内分泌ホルモンへの影響を検討した．この結果，低濃度グルコース存在下，galanin の単独投与により，インスリン分泌は，有意ではないが低下傾向を示した．また，galanin 投与終了時に，インスリン分泌の一相性の放出を認めた．これは，galanin によるインスリン分泌抑制によるリバウンド現象によることが考えられたが，その詳細な理由については不明である．本条件下では，galanin によるグルカゴン分泌およびソマトスタチン分泌への影響はほとんどみられなかった．

つぎに低濃度（150 mg %），高濃度（300 mg %）グルコース刺激によるインスリンと C-ペプチド分泌への galanin の作用を検討した．その結果，インスリンと C-ペプチドの放出は用量依存的に galanin により抑制されることが明らかになった．以上の結果，著者は galanin が，ラット膵灌流系において初めてインスリン，C-ペプチド分泌に対して抑制的に働く新しい神経ペプチドであることを明らかにした．

Galanin の C 端部アミノ酸配列は，GRP や substance P のほかブタ脊髄から単離された neurokinin A[25)]，neurokinin B[25)]，nouromedin B[26)]のアミノ酸配列と比較的構造が類似している．しかし，galanin を除きこれらのペプチドはいずれも in vivo の実験系でインスリン分泌亢進作用が報告されている[27)~29)]．また，われわれ[30)]も，本研究の単離ラット膵灌流系において，これらペプチドが，グルコース刺激インスリン分泌に対して放出亢進作用を示すことを確認している．これらの知見は，galanin とこれら構造類似のペプチドの間で受容体認識機序において明らかに異なることを示唆している．今後，galanin を含めてこれらの構造類似ペプチドの受容体認識機構について詳細な検討が必要と思われた．

Galanin のインスリン分泌の抑制機序は明らかでないが，インスリン分泌を抑制するペプチドであるソマトスタチン[31)]や，抑制型のペプチドとしてのオピオイドペプチド，カテコラミンの関与も考えられる．今回の実験においては，galanin 単独刺激時に灌流液中のソマトスタチンの濃度には変化を認めなかったことより galanin のインスリン分泌抑制にはソマトスタチンの関与は少ないと思われるが，パラクラインとしての局所的な作用などは否定できない．また，本研究の in vivo 系で galanin のインスリン放出抑制作用についてその機序の解明は今後の課題であるが，最近 Ahren ら[16)]は，galanin のインスリン分泌抑制の機序の一つとして，マウス膵ラ氏島において，グルコース刺激による細胞質内 free Ca^{2+} の上昇を galanin が抑制することを明らかにした．この事より，galanin のインスリン分泌の抑制機序の一つとして Ca チャンネルの関与が示唆された．

本研究において，C-ペプチドの放出もインスリンと同様抑制された．プロインスリンのプロッセシングにより β 細胞でインスリンと C-ペプチドが等モル比で生成することが知られていること[32)]から，galanin は，直接 β 細胞に作用し，両者の分泌を抑制している可能性が考えられた．著者の成績では，C-ペプチド分泌量はモル比でインスリン分泌量の約 67% にしか相当しなかったが，その理由として今彼使用したラット C-ペプチドの RIA 系はラット C-ペプチド I，II を同等に認識するが，その C 末端を欠く "peptide-A" を認識しない[33)]ためと推定される．このことを考慮にいれると単離ラット膵灌流系において galanin はインスリンと C-ペプチドをほぼ等モルで抑制しているものと推定された．

Galanin は，中枢にも広範囲に分布しており，その生理作用として下垂体ホルモンへの影響も報告されてい

る．Bauer ら[34]は，galanin のヒト末梢静脈投与において，growth hormone（GH）の放出刺激を報告している．ラット脳室内注入実験においても，GH の放出[35]及びプロラクチン放出[36]が認められている．なお，プロラクチンの放出亢進作用に関しては，VIP の関与が示唆された．ブタ，モルモット，ヒト腸管神経叢においては，VIP と galanin が共存していることが明らかにされている[4)9)]．インスリン分泌亢進作用を持つ VIP[37]と分泌抑制作用の galanin の共存は，膵 β 細胞においても相互にインスリン分泌調整に関与している可能性が考えられる．

神経系において，galanin は，ドーパミン，アセチルコリンの放出抑制，電気刺激によるシナプス反射抑制など，抑制型に作用するペプチドであることが報告[38)~40)]されている．最近では，脳室内注入による食欲亢進作用[41]，褐色細胞腫において galanin の組織内濃度の高値も報告[11]され，galanin の多彩な生理作用が示唆されるにいたった．本研究で初めて，in vitro 膵灌流系を用い，神経ペプチド galanin が強力なインスリンと C-ペプチドの放出抑制物質であることを明らかにした．Galanin は抑制型神経ペプチドとして今後生体内における意義，生理作用の解析が必要であると考えられた．

結　　論

神経ペプチド galanin の生体内における生理作用を追求する一環として，合成 galanin を用いて，以下の結論を得た．

1．合成 galanin を用いて，galanin C 端特異 RIA 系を確立した．

2．ラット，ブタ消化管全域に，galanin 様免疫活性の存在を認めた．膵にも比較的高濃度の免疫活性を認めた．

3．ラット，ブタ膵内の分子存在様式を検討した結果，ブタ膵では ^{125}I-galanin に一致する単一の免疫活性であるのに対し，ラット膵では，^{125}I-galanin に一致する免疫活性とそれより大分子型の免疫活性の 2 者の存在を認めた．

4．ラット単離膵灌流系において，galanin 単独刺激ではインスリン放出の抑制傾向と刺激終了後の一相性の免疫活性の上昇を認めた．グルカゴン，ソマトスタチンの放出に関しては変化を認めなかった．

5．低濃度，高濃度グルコース刺激下において，10^{-8} M galanin は，インスリンと C-ペプチドの放出を有意に抑制した．

6．Galanin は，高濃度グルコース刺激下において，用量依存的にグルコース刺激時のインスリンと C-ペプチド放出を抑制した．

以上の結果は，galanin が膵 β 細胞において，インスリンと C-ペプチド放出に抑制的に作用する新しい神経ペプチドであることを示した．

謝　　辞

稿を終えるにあたり御指導，御校閲をたまわった竹田亮祐教授に深甚の謝意を表します．また，本研究の遂行にあたり，終始，御指導御援助いただいた静岡薬科大学生物薬品化学教室，矢内原昇教授，大阪大学医学部付属病院，矢内原千鶴子教授，山梨医科大学第一解剖，小林繁教授に深謝いたします．また御協力いただきました上野敏男講師はじめ，第二内科第五研究室の諸先生，静岡薬科大学生物薬品化学教室の諸先生に心から感謝いたします．

なお，本論文の要旨は，第 26 回日本消化器病学会（1984 年，札幌）．第 28 回日本糖尿病学会学術総会（1985 年，大津），第 58 回内分泌学会学術総会（1985 年，名古屋），第 8 回 Gut Hormone カンファレンス（1985 年，静岡），第 12 回日本内分泌神経内分泌分科会（1985 年，松本），第 6 回膵ホルモン研究会（1985 年，東京），第 6 回国際消化管ホルモンシンポジウム（1986 年，カナダ）にて発表した．

文　　献

1） **Tatemoto, K. & Mutt, V.**: Chemical determination of polypeptide hormones. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, **75**, 4115-4119 (1978).

2） **Tatemoto, K., Rökaeus, Å., Jornvall, H., McDonald, T. J. & Mutt, V.**: Galanin－a novel biological active peptide from porcine intestine. FEBS Lett., **164**, 124-128 (1983).

3） **Rökaeus, Å., Melander, T., Hökfelt, T., Lundberg, J. M., Tatemoto, K., Carlquist, M. & Mutt, V.**: A galanin-like peptide in the central nervous system and intestine of the rat. Neurosci. Lett., **47**, 161-166 (1984).

4） **Melander, T., Hökfelt, T., Rökaeus, Å., Fahrenkrug, J., Tatemoto, K. & Mutt, V.**: Distribution of galanin-like immunoreactivity in the gastrointestinal tract of several mammalian species. Cell Tissue Res., **239**, 253-270 (1985).

5） **Cheung, A., Polak, J. M., Bauer, F. E., Cadieux, A., Christofides, N. D., Springall, D. R. & Bloom, S. R.**: Distribution of galanin immunoreactivity in the respiratory tract of pig, guinea pig, rat and dog. Thorax, **40**, 889-896 (1985).

6） **Ekblad, E., Rökaeus, Å., Håkanson, R. & Sundler, F.**: Galanin nerve in the rat gut : distribution, origin and projection. Neuroscience, **16**, 355-363 (1985).

7） **Skofitsch, G. & Jacobowitz, D. M.**: Quanti-

tative distribution of galanin-like immunoreactivity in the rat central nervous system. Peptides., 7, 609-613 (1986).

8) **Melander, T., Hökfelt, T. & Rökaeus, Å.**: Distribution of galanin-like immunoreactivity in the rat central nervous system. J. Com. Neuro., **248**, 475-517 (1986).

9) **Bishop, A. E., Polak, J. M., Bauer, F. E., Christofides, N. D., Carlei, F. & Bloom, S. R.**: Occurrence and distribution of a newly discovered peptide, galanin, in the mammalian enteric nervous system. Gut, **27**, 849-857 (1986).

10) **Bauer, F. E., Adrian, T. E., Christofides, N. D., Ferri, G. L., Yanaihara, , N., Polak, J. M. & Bloom, S. R.**: Distribution and molecular heterogeneity of galanin in human, pig, guinea pig, and rat gastrointestinal tracts. Gastroenterology, **91**, 877-883 (1986).

11) **Bauer, F. E., Hacker, G. W., Terenghi, G., Adrian, T. E., Polak, J. M. & Bloom, S. R.**: Localization and molecular forms of galanin in human adrenals: elevated levels in pheochromocytomas. J. Clin. Endocrinol. Metab., **63**, 1372-1378 (1986).

12) **Bauer, F. E., Christofide, N. D., Hacker, G. W., Blank, M. A., Polak, J. M. & Bloom, S. R.**: Distribution of galanin immunoreactivity in the genitourinary tract of man and rat. Peptides, **7**, 5-10 (1986).

13) **McDonald, T. J., Dupre, J., Tatemoto, K., Greenberg, G. R., Radziuk, J. & Mutt, V.**: Galanin inhibits insulin secretion and induces hyperglycemia in dogs. Diabetes, **34**, 192-196 (1985).

14) **Dunning, B. E., Ahrén, B., Veith, R. C., Bottcher, G., Sundler, F. & Tabrosky, G. J. JR.**: Galanin: a novel pancreatic neuroptide. Am. J. Physiol., **251**, E127-E133 (1986).

15) **Lindskog, S. & Ahrén, B.**: Galanin: effect on basal and stimulated insulin and glucagon secretion in the mouse. Acta Physiol. Scand. **129**, 305-309 (1987).

16) **Ahrén, B., Arkhammar, P., Berggren, P. O. & Nilsson, T.**: Galanin inhibits glucose-stimulated insulin release by a mechanism involving hyperpolarization and lowering of cytoplasmic free Ca^{2+} concentration. Biochem. Biophy. Res. Commun., **140**, 1059-1063 (1986).

17) **McDonald, T. J., Dupre, J., Greenberg, G. R., Tepperman, F., Brooks, B., Tatemoto, K. & Mutt, V.**: The effect of galanin on canine plasma glucose and gastroenteropancreatic hormone responses to oral nutrients and intravenous arginine. Endocrinology, **119**, 2340-2345 (1986).

18) **Yanaihara, C., Ozaki, J., Nishida, T., Nishida, T., Iizuka, Y.. Yanaihara, N. & Kaneko, T.**: Immunological studies on synthetic rat and guinea pig C-paptides. *In* S. Baba, T. Kaneko & N. Yanaihara (ed.), Proinsulin, Insulin, C-peptide, Excerpta Medica, p87-93, Amsterdam-Oxford, 1980.

19) **Nishino, T., Kodaira, T., Shin, S., Imagawa, K. Shima, K., Yanaihara, C. & Yanaihara, N.**: Glucagon radioimmunoassay with use of antiserum to glucagon C-terminal fragment. Clin. Chem., **27**, 1690-1697 (1981).

20) **Yanaihara, N., Sato, H., Sakura, N. & Yanaihara, C.**: Somatostatin radioimmunoassay with ^{125}I-N$^{\alpha}$-tyrosyl-somatostatin. Endocrinol. Japon., **25**, 95-103 (1978).

21) **Grodsky, G. M. & Fanska, R. E.**: The in vitro perfused pancreas. *In* J. Handmann and B. O' Malley (eds.), Methods in Enzymology, p364-372, Academic Press, New York, 1975.

22) **Bauer, F. E., Adrian, E., Yanaihara, N, Polak, J. M. & Bloom, S. R.**: Chromatographic evidence for high-molecular-mass galanin immunoreactivity in pig and cat adrenal glands. FEBS Lett., **201**, 327-331 (1986).

23) **Rökaeus, Å. & Brownstein, M. J.**: Construction of a porcine adrenal medullary cDNA library and nucleotide sequence analysis of two clones encoding a galanin precursor. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **83**, 6287-6291 (1986).

24) **Rökaeus, Å.**: Galanin: a newly isolated biologically active neuropeptide. Trends Neurosci., **10**, 158-164 (1987).

25) **Kimura, S., Okada, M., Sugita, Y., Kanazawa, I. & Munekata, E**: Novel neuropeptides neurokinin α and neurokinin β, isolated from porcine spinal cord. Proc. Japan Acad., **59**, 101-104 (1983).

26) **Minamino , N., Kangawa, K. & Matsuo, H.**: Neuromedin B : A novel bombesin-like peptide identified in porcine spinal cord. Biochem. Biophy. Res. Commun., **114**, 541-548 (1983).

27) McDonald, T. J.: Non-amphibian bombesin-like peptides. In S. R. Bloom and J. M. Polak (eds.), Gut Hormones, 2nd ed., p407-412, Churchill Livingstones, Edinburgh, 1981.

28) 矢内原昇，山下裕一，大久保正士，岩原邦宏：ボンベシンとガストリン放出ペプチド．日本臨床 **40**, 1088-1094 (1982).

29) Namba, M., Ghatei, T. E., Adrian, T. E. Bacarese-Hamilton, A. J., Mulderry, P. K. & Bloom, S. R.: Effect of neuromedin B on gut hormone secretion in the rat. Biomed. Res., **5**, 229-234 (1984).

30) 竹田康男，橋本佳巳，矢内原千鶴子，加藤郁夫，山本栄仁，望月 徹，矢内原昇，竹田亮祐：高濃度 glucose 刺激 insulin 放出に及ぼす各種神経 peptide の影響．Peptide Hormone in Pancreas 6（赤沼安夫編）81-88頁，Biomedical Research Foundation, 東京，1986.

31) Efendic, S., Luft, R. & Grill, V.: Effect of somatostatin on glucose induced insulin ralease in isolated perfused rat pancreas and isolated rat pancreatic islets. FEBS Lett., **42**, 169-172 (1974).

32) Rubenstein, A. H., Clark, J. L., Melani, F. & Steiner, D.: Secretion of proinsulin, C-peptide by pancreatic beta cell and its circulation in blood. Nature (Lond), **244**, 697-699 (1969).

33) Yanaihara, C., Ozaki, J., Nishida, N., Yanaihara, N. & Kaneko, T.: Immunoreactive rat C-peptides I and II in glucose perfusate of isolated pancreas. *In* D. Brandenburg and A. Wollmer (eds.), Insulin, chemistry, structure and insulin related hormones, p651-657, Walter de Gruyter & Co., Berlin. New York, 1980.

34) Bauer, F. E., Ginsberg, L., Venetikou, M., Mackay, D. J., Burrin, J. M. & Bloom, S. R.: Growth hormone release in man induced by galanin, a new hypothalamic peptide. Lancet, **2**, 192-195 (1986).

35) Ottlecz, A., Samason, W. K. & Mccann, S. M6: Galanin: Evidence for a hypothalamic site of action to release growth hormone. Peptides, **7**, 51-53 (1986).

36) Koshiyama, H., Kato, Y., Inoue, T., Murakami, Y., Ishikawa, Y., Yanaihara, N. & Imura, H.: Central galanin stimulates pituitary prolactin secretion in rats: possible involvement of hypothalamic vasoactive intestinal polypeptide. Neurosci. Lett., **75**, 49-54 (1987).

37) Schebalin, M., Said, S. I. & Makhlouf, G. M.: Stimulation of insulin and glucagon secretion by vasoactive intestinal peptide. Am. J. Physiol., E197-200 (1977).

38) Nordstrom, O., Melander, T., Hokfelt, T., Bartfai, T. & Goldstein, M.: Evidence for an inhibitory effect of the peptide galanin on dopamine release from the median eminence. Neurosci. Lett., **73**, 21-26 (1987).

39) Yau, W. M., Dorsett, J. A. & Youther, M. L.: Evidence for galanin as inhibitory neuropeptide on myenteric chorinergic neurons in the guinea pig small intestine. Neurosci. Lett., **72**, 305-308 (1986).

40) Yanagisawa, M., Yagi, N., Otsuka, M., Yanaihara, C. & Yanaihara, N.: Inhibitory effect of galanin on the isolated spinal cord of the newborn rat. Neurosci. Lett., **70**, 278-282 (1986).

41) Kyrkouli, S. E., Stanley, B. G. & Leibowitz, S. F.: Galanin: stimulation of feeding induced by medial hypothalamic injection of this novel peptide. Eur. J. Phamacol., **122**, 159-160 (1986).

Inhibitory Effect of Galanin on Glucose-induced Insulin Release from Isolated Perfused Rat Pancreas Yasuo Takeda, Department of Internal Medicine (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920—J. Juzen Med. Soc., **96**, 860—871 (1987)

Key words: galanin, isolated rat pancreas perfusion, insulin and C-peptide release, galanin radioimmunoassay

Abstract

Galanin, which was originally isolated from porcine intestine, has been known to be a neuropeptide with 29 amino acid residues. In the present study, a porcine galanin specific radioimmunoassay system was developed using anti-galanin serum R1985, which was raised in a rabbit by immunizing synthetic porcine galanin-bovine serum albumin conjugate. This antiserum was found to recognize the C-terminal 15-29 sequence and proved to be specific for porcine galanin. Using this radioimmunoassay, distribution of immunoreactive (IR) galanin in rat and porcine gastrointestinal tract and pancreas were investigated. The immunoreactivity was widely distributed in the gastrointestinal tract and pancreas. Gelfiltration analysis revealed that IR galanin in the tissue extracts of rat pancreas contained, as a major component, a galnin-like peptide with a larger form component. Further, the effect of galanin upon the release of some pancreatic hormones was investigated in the basal perfusion medium of the isolated rat pancreas. 10^{-8} M galanin did not show any effect on the release of glucagon and somatostatin, while the insulin release was weakly reduced by 10^{-8} M galanin, followed by a marked increase beyond the basal level immediately after stopping of the perfusion with galanin. When the isolated rat pancreas was perfused with a medium containing either 150 or 300 mg % glucose, the release of immunoreactive insulin and C-peptide was significantly suppressed by the presence of 10^{-8} M galanin. Galanin concentration ranging from 10^{-10} to 10^{-7} M produced a dose-dependent suppression of insulin and C-peptide release induced by 300 mg % glucose. The present results indicate that a novel neuropeptide in the pancreas, galanin, is a potent inhibitor on insulin secretion from the pancreatic β cell.