

ラット胃灌流におけるガストリン放出ペプチド（Gastrin Releasing peptide）の放出動態

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: 島崎, 英樹 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7725

ラット胃灌流におけるガストリン放出ペプチド (Gastrin Releasing Peptide) の放出動態

金沢大学医学部第二内科 (指導: 竹田亮祐教授)

島 崎 英 樹

(昭和59年3月13日受付)

血管系を灌流するラット胃灌流標本を用いてガストリンおよびガストリン放出ペプチド (Gastrin Releasing Peptide, 以下 GRP と略) の放出動態につき検討し, GRP の神経ペプチドとしての意義を明らかにせんと試みた。ガストリンと GRP の測定は、それぞれに特異的な抗体を用いたラジオイムノアッセイ法により行った。 10^{-3} ~ 10^{-9} M の範囲でのアセチルコリンの灌流により GRP はガストリンと共に用量反応性に増加した。 10^{-5} M のアトロピンで灌流するとアセチルコリン 10^{-4} M 刺激によるガストリンの反応は抑制されたが GRP の反応には影響は見られなかった。 10^{-4} M のヘキサメトニウムを用いるとアセチルコリン 10^{-4} M 刺激によるガストリンの反応は抑制されなかつたが GRP の反応は抑制された。 10^{-7} M の GRP (14-27) フラグメントの灌流は二相性のガストリンの反応をもたらした。灌流液中の GRP のゲル済過パターンでは GRP (14-27) よりも小さい分子量のフラグメントが見られた。以上の結果から、ラット胃では GRP は副交感神経節後線維のペプチド作動性ニューロンとしての意義を持ち、いわゆる神経ペプチドの一つであることが示唆された。

Key words Stomach Perfusion, Neuropeptide, Gastrin Releasing Peptide

GRP は McDonald らにより、ブタ胃底腺領域および腸管より単離された 27 個のアミノ酸残基よりなるポリペプチドであり、その C 末端デカペプチド配列では 20 位ヒスチジン残基を除きカエルより単離されたポンベシンと同一である^{1,2)}。ポンベシンの生物学的活性は C 末端ノナペプチド配列にあるとされるが、GRP の生物学的活性の検討の結果、脾液分泌の促進、種々の消化管ホルモン、特にガストリンの分泌促進など、ポンベシンと同様の作用を持つことが知られ、GRP は哺乳類におけるポンベシンであると考えられるようになった^{3~8)}。大塚⁹⁾らが、サブスタンス P が脊髄後索における神経伝達物質であることを指摘して以来、近年、いわゆる消化管ホルモンとして知られる Vasoactive Intestinal Polypeptide (以下 VIP と略) Cholecystokinine(以下 CCK と略)、サブスタンス P、ニューロテンシンなどのポリペプチドホルモンが脳腸管における神経伝達物質であるとの知見が得られるようになって

きた^{10~16)}。ポンベシンについても Moody ら¹⁰⁾はラット脊髄での灌流実験により、神経伝達物質としての可能性を指摘している。一方、Yanaihara ら¹⁷⁾はブタ組織中の免疫活性 GRP の検討で胃体部に高濃度の GRP 様免疫活性を報告しており、GRP の強いガストリン分泌刺激作用と関連して興味ある事実である。

消化管ホルモンの研究において神経因子や血中の干渉因子の関与を除外できる方法として、最近、膀胱灌流や胃灌流などの臓器灌流法が盛んに行われつつある^{18~26)}。本邦でも千葉らの胃灌流法による胃粘膜ソマトスタチンに関する一連の報告^{27~30)}がみられる。本研究では千葉ら²⁷⁾の胃灌流法を用いて、胃 GRP とガストリンの分泌動態を観察し、GRP が神経伝達物質として働いている可能性のあることを解明しようとした。

材料および方法

I. 実験動物

Release of Gastrin Releasing Peptide from the Perfused Rat Stomach -Effect of acetylcholine, atropin and hexamethonium-. Hideki Shimazaki, Department of Internal Medicine (II), (Director: Prof. R. Takeda), School of Medicine, Kanazawa University.

灌流実験に使用したラットは25°C、12時間昼夜のサイクルにて摂食自由で飼育した200~400gのウイスラー系雄性ラットである。実験には一晩絶食(飲水可)の後に使用した。

II. 胃灌流法

灌流液はKrebs Ringer Bicarbonate Buffer(以下KRBBと略)に4%デキストラン(T70, ファルマシア社), 5.5mMブドウ糖(和光純薬), フェノールレッド(和光純薬)を添加し, 95%O₂, 5%CO₂を送気しpH7.4に調整したものを使用した。灌流装置は図1に示すごとく充分に送気した灌流液をペリスタルティックポンプ(ワツソンマーロウ社)を用いて2ml/分の流速にて流し, 圧モニターにより灌流圧の変化を60~100mmHgに調整した。刺激薬物は灌流器直前のゴム管よりインフュージョンポンプ(ハーバード社, モデル975)を用い0.12ml/分の速度で側注した。この際の圧変化および流量の変化は無視しうるものと考えた。灌流胃は生理的食塩水を満たした300mlのビーカー中に置き全体を37°Cの恒温槽に入れ温度変化には細心の注意をはらった。灌流胃作製法は千葉ら^{27~30)}の方法によった。ペントバルビタール60mg/kg腹腔内投与にて麻酔し正中にて開腹した。口側は食道下端にて結紮, 切断した肛側を幽門側にて結紮し十二指腸よりドレインを入れた。動脈側は脾動脈と総肝動脈を結紮し左胃動脈よりの血流のみを保存して腹腔動脈よりカニュレーションを行い胃に灌流液を入れた。静脈側は脾靜脈, 上腸管膜静脈を結紮して灌流液の漏出を防ぎ左胃静脈より入る灌流液を門脈よりカニュレーションして採取した。採取液はフラクションコレクターを用いて2分間隔にて500KIU/tubeのアプロチニン(バイエル社)を入れた試験管に受け直ちに氷冷した。実験終了後, 1.5mlづつ分注し, -20°Cに凍結後さらに

凍結乾燥を行い測定時には0.3mlの蒸溜水に溶解してガストリンおよびGRPの測定に供した。

薬物刺激はまず約20分の前灌流を行い灌流条件が安定した後, 10分間の基礎分泌の時間相をとり行った。薬物の注入はインフュージョンポンプを用いて行った。薬物は下記のものを使用した。ブタGRPフラグメント(14-27)は静岡薬大生物薬品化学教室にて液相法で合成されたもの, ヘキサメトニウムは東京化成工業, アトロピンはメルク社, アセチルコリンは第一化学薬品のものを用いた。なお, 胃粘膜が充分に灌流されているかどうかを灌流液中にトリパンブルーを入れて検討した。また, 灌流胃の塩酸分泌がフィードバック機構によりガストリン分泌に影響を与えないか否かを検討するために, 胃内腔を食道から十二指腸に生食にて2ml/分の流量にて灌流し10⁻⁴Mアセチルコリン液による刺激実験を行った。

III. ラジオイムノアッセイ(Radioimmunoassay, RIAと略)

ガストリンの測定は合成ヒトガストリン17(以下G17と略)誘導体を抗原として家兔を免疫して, 静岡薬大生物薬品化学教室にて作製した抗血清R1303を最終希釈倍率49000倍にて用い, ¹²⁵I-G17を標識抗原, G-17を標準抗原とするRIA系により行った。1%ウシ血清アルブミン添加バルビタール緩衝液(0.02M, pH7.4)を用いBound/Free(以下BFと略)分離は二抗体法により行った。

GRPの測定は合成ブタGRPを抗原として家兔を免疫して, 静岡薬大生物薬品化学教室にて作製したC端特異抗血清R6903を最終希釈倍率5600倍にて用い, ¹²⁵I-ブタGRPを標識抗原, 合成ブタGRP(1-27)を標準抗原とするRIA系により行った。0.5%ウシ血清アルブミン, 0.025M, EDTA添加リン酸緩衝液(0.01M, pH7.4)を用い, BF分離は二抗体法によった。R6903はGRP(1-27), GRP(14-27), ボンベシンなどほぼ同じ交叉性を有しGRP(1-13)とは結合しないことからGRPのC端に特異的な抗血清と考えられている¹⁷⁾。

IV. ゲル汎過法

灌流液中のGRPの分子形をみるために以下の実験を行った。前記の灌流標本を用い10⁻⁴M濃度のアセチルコリンで20分間刺激し, 灌流液を塩酸・エタノール液(エタノール150ml, 塩酸2.25ml)中に滴下させ, デキストランおよび蛋白を沈殿させた。沈殿物を遠心分離(3000回転, 30分)により除き上清を凍結乾燥した。次にRIAに干渉する無機塩を除去するため, セファデックスG10にてゲル汎過を行いフラクション45~60の無機塩分画を除き残りのフラクションを再

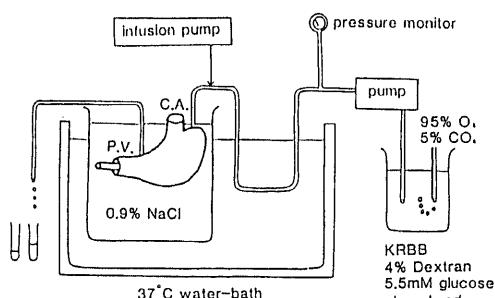


Fig. 1. Apparatus for vascular perfusion of isolated rat stomach. Peristaltic pump circulated Krebs Ringer Bicarbonate Buffer (KRBB) via Celiac Artery (C.A.) and Portal Vein (P.V.) through vasculature of stomach.

び凍結乾燥した。これには RIA の干渉因子となる塩および蛋白分解酵素が除去されていることになるので、凍結乾燥分画を 3M 酢酸にて溶解しセファデックス G50 のカラム (1.5×90 cm) にてゲル漏過を行い各フラクションにつき GRP の RIA を行った。

成 績

I. 灌流胃の検討

トリパンブルーを灌流した実験では胃粘膜はほぼ均等に染色され漿膜面よりも強く染色されるようであった。この際、外液および胃内腔には色素は漏出しなかった。

10^{-4} M アセチルコリン刺激前後の胃内腔の pH 変化の検討では、前が 7.8、刺激後が 7.9 であり、ほとんど変化がなかった。従って、この灌流実験系において胃酸分泌による影響はほとんど無視しうるものと考えた。また外来の迷走神経は食道下端とともに切断しているので、本灌流系におけるガストリン、GRP の変動は投与した薬物によるものと考えてよいと思われる。

II. GRP のガストリン分泌への効果

GRP の生物学的活性をもつ C 端フラグメントである合成ブタ GRP (14-27) を 10^{-7} M の濃度で 20 分間、灌流したところ、図 2 に示すごとく二相性の免疫活性ガストリンの放出が観察された。ガストリン基礎値 14 ± 3 pg/ml に対し GRP 灌流 4 分後には 118 ± 18 pg/ml と有意の上昇を示し、いったん低下したのち 14~18 分に再上昇した。また合成ボンベシンおよび合成ブタ GRP (1-27) についても同様の灌流実験を行

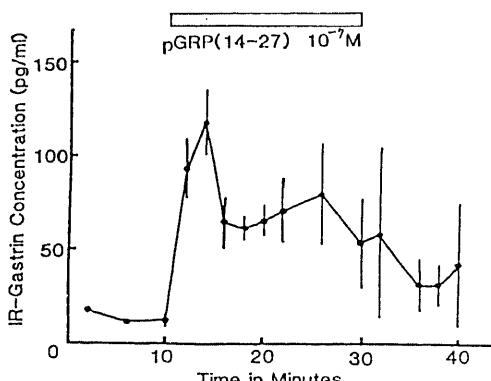


Fig. 2. Effect of exogenous porcine GRP (14-27) on Immunoreactive gastrin secretion. Transient peak is followed by phase of sustained gastrin secretion. Data are represented as the means \pm SEM from 3 experiments.

い、ほぼ同程度のガストリンの放出が観察された。

III. アセチルコリンの GRP およびガストリンへの効果

灌流液に溶解したアセチルコリンを最終濃度 10^{-4} M となるように灌流し図 3 のような反応を得た。灌流液中の免疫活性 GRP は基礎値 87 ± 12 pg/ml に対し有意の増加を示し最高濃度 209 ± 59 pg/ml にまで上昇した。また同時に測定した免疫活性ガストリンは基礎値、 56 ± 15 pg/ml から 257 ± 66 pg/ml へとやはり有意の増加を示した。

またアセチルコリン濃度が 10^{-6} ~ 10^{-3} M の範囲における免疫活性 GRP の用量反応性を検討した。図 4 は基礎値に対するピークの GRP の増加率 (%) で示してあるがアセチルコリン 10^{-4} M までは用量反応性に増加する傾向にあった。

IV. アトロピンの効果

さらにこのアセチルコリンの GRP および、ガストリンの分泌刺激作用に対しアトロピンがどのような影響を及ぼすか調べる目的で、まず基礎分泌の灌流液を採取した後、灌流液に溶解した硫酸アトロピンを最終濃度 10^{-5} M にて灌流し、さらにアセチルコリン 10^{-4} M を添加した。免疫活性ガストリン濃度はアトロピンおよびアセチルコリン灌流下において、有意の変動を示さなかつたが免疫活性 GRP はアセチルコリン添加後、基礎分泌に対し $284 \pm 134\%$ と有意の増加を示した。また、この系において、アトロピン灌流停止 10 分後にアセチルコリン添加によりガストリン分泌が増加することを確かめており灌流標本は損われていないものと考えた。この結果は、アトロピンはアセチルコリ

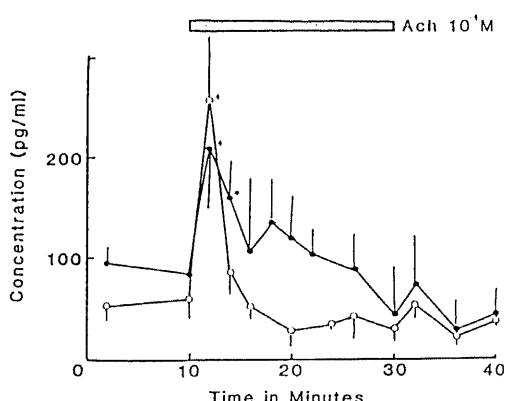


Fig. 3. Effect of 10^{-4} M acetylcholine on IR-Gastrin (open circle) and IR-GRP (closed circle). Data are represented as the means \pm SEM from 3 experiments. Asterisks denote significant increase from basal levels for 10 minutes ($p < 0.05$).

ン刺激によるGRP放出を抑制しないことを示している。

V. ヘキサメトニウムの効果

副交感神経節遮断剤として知られるヘキサメトニウムをアトロビンと同様に10分間の基礎分泌をみた後で灌流液に添加した。ヘキサメトニウムを最終濃度 10^{-4} Mにて10分間灌流し、さらにアセチルコリン

10^{-4} Mにて刺激した。免疫活性ガストリンはアセチルコリン添加2分後に基礎分泌に対し $511\pm 131\%$ と増加し、ヘキサメトニウム無添加の場合とほぼ同様の反応を示したが、免疫活性GRPはヘキサメトニウム灌流下では減少する傾向を示し、アセチルコリンを添加しても有意の増加を示さなかった。この系においてもヘキサメトニウム停止10分後、アセチルコリンのみの添加ではGRPの増加がみられるのを確認した。この結果はヘキサメトニウムがガストリンの放出は抑制し

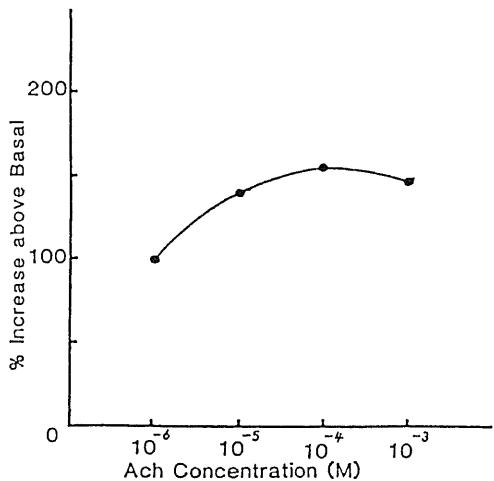


Fig. 4. Dose response curve for effect of acetylcholine on IR-GRP release. Each point is represented as the % increase of maximum GRP response stimulated by acetylcholine above basal GRP level.

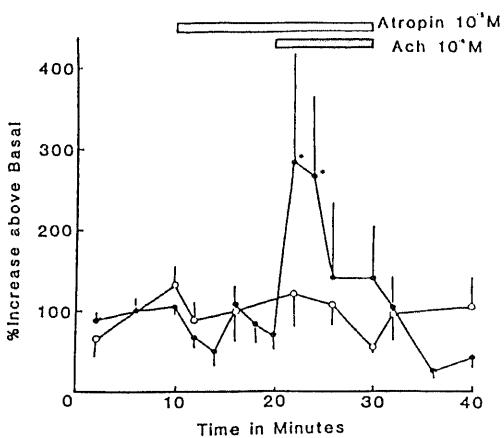


Fig. 5. Effect of 10^{-5} M atropin on acetylcholine stimulated IR-Gastrin (open circle) and IR-GRP (closed circle) release. Data are represented as the means \pm SEM from 3 experiments. Asterisks denote significant increase from basal level between 10-20 minutes ($p < 0.01$).

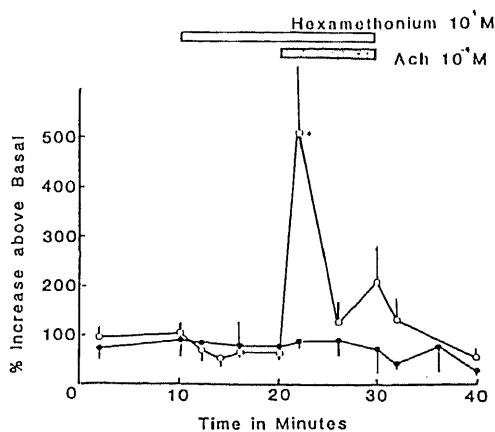


Fig. 6. Effect of 10^{-4} M hexamethonium on acetylcholine stimulated IR-Gastrin (open circle) and IR-GRP (closed circle) release. Data are represented as the means \pm SEM from 3 experiments. Asterisks denote significant increase from basal level between 10-20 minutes ($p < 0.001$).

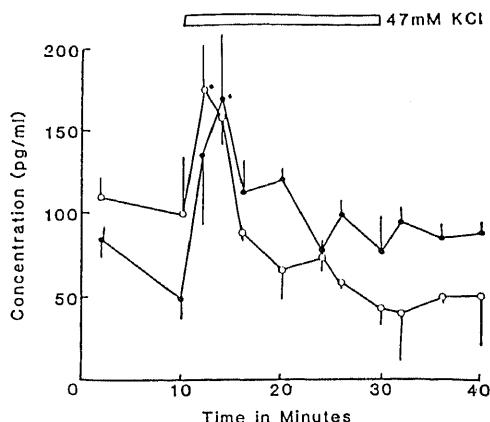


Fig. 7. Effect of 47mM KCl on IR-Gastrin (open circle) and IR-GRP (closed circle) release. Data are represented as the means \pm SEM from 3 experiments. Asterisks denote significant increase from basal level for 10 minutes ($p < 0.05$).

ないが GRP の放出は抑制することを示している。

VI. 47 mM KCl 溶液の効果

神経細胞を脱分極させるのに細胞外液のカリウム濃度を上げるために灌流液の KCl 濃度を 10 倍の 47 mM と高めた。免疫活性ガストリンは基礎分泌 105 ± 16 pg/ml から 173 ± 27 pg/ml へ、免疫活性GRPは基礎分泌 66 ± 11 pg/ml から 170 ± 39 pg/ml へといずれも有意の増加を示した。この場合の反応は一過性のものであった。

VII. 胃灌流液中に放出される GRP の分子形についての検討

GRP は 27 個のアミノ酸よりなるが、胃灌流液中にこの 27 個のものが放出されているのか、あるいはそれより分子量の異なるものが放出されているのかを知る目的で、アセチルコリンで刺激して採取した灌流液について、ゲル漏過実験を行った。その結果、図 8 に示すごとく、大部分の GRP 様免疫活性は GRP (14-27) よりも小さいところにあり、GRP(14-27) と GRP (1-27) の間にはそれより小さいピークが見られた。しかし GRP (1-27) より大きな分子形のものは認められなかった。

考 察

代表的な神経伝達物質であるアセチルコリンについては、その合成、分解、放出機構が明らかにされ化学的伝達のモデルとなっている³¹⁾。さらにノルアドレナリン、ドーパミン、セロトニンなどのアミン類やグリシンなども神経伝達物質とされているが、近年、注目されているものにサブスタンス P を代表とするいわゆる Neuropeptide がある。サブスタンス P は、大塚

ら^{9,13,14)}により脊髄後索に局在し神経の電気的刺激により遊離され、またサブスタンス P の投与により後根神経線維の脱分極がおこることなどが解明され、しだいに、神経伝達物質として認められつつある。一般に、ある物質が神経伝達物質と証明されるには次のような条件が必要とされる。その物質が神経に局在すること、神経刺激によりその物質が放出されること、その物質をシナプスに投与することにより神経刺激と同等の効果をあらわすこと、さらにその物質の合成分解の経過が明らかであること、などである。GRP が神経線維に局在することに関しては、Iwanaga ら³²⁾の報告がある。彼らは GRP に特異的な抗体 R 6902 を用いて peroxidase-anti-peroxidase 法（以下 PAP 法と略）によりラット胃組織では神経線維が陽性に染まることを証明している。同様に Dockray ら³³⁾はポンベシンに対する抗体を用いて、ラット胃では神経線維にポンベシン免疫活性が見られるが粘膜細胞には見られないとしている。いずれにしても、ラット消化管では GRP は神経線維に局在していると考えられる成績である。

本研究では神経刺激によって胃組織より GRP が放出されることを観察したが、この際の神経刺激として、アセチルコリンおよび KCl 溶液による脱分極刺激を用いた。もちろん胃組織中の神経線維や迷走神経を電気刺激する方が望ましいが、灌流実験という制約上アセチルコリンという化学的神経刺激を用いた。 10^{-3} ~ 10^{-6} M 濃度のアセチルコリン刺激で GRP は放出されたが刺激直後にはほぼ最大の反応がみられた。このパターンは 10^{-3} から 10^{-6} M のいずれの濃度においてもほぼ同じであり放出される GRP の量も用量反応性に増大するもの大きな差はない。この GRP の放出量が神経伝達物質として適當かどうかはこの実験系で推定することは困難であるが Moody ら¹⁶⁾のラット脊髄標本の灌流実験ではやはり 40 fmol とほぼ同程度の放出量であった。また刺激するアセチルコリンは不安定な物質であり、シナプス間に到達するまでの分解などを考慮すると灌流液中の生理的濃度を設定するのは困難である。本実験では Maklouf ら^{20,21)}が胃灌流実験で用いたガストリン分泌をきたすメサコリン濃度を参考として前記の濃度とした。また、もう一つの刺激として用いた KCl は Otsuka ら^{13,14)}のサブスタンス P の放出実験を参考とし 47 mM 濃度とした。細胞外液のカリウム濃度を 4.7 mM から 47 mM に高めれば神経脱分極には充分な刺激になると思われる。ただし、この場合には灌流されるすべての神経線維が脱分極すると考えられるので、刺激の特異性を欠くと思われる。

次に、副交感神経刺激と考えられるアセチルコリン刺激による GRP の放出がみられたのでさらにその特

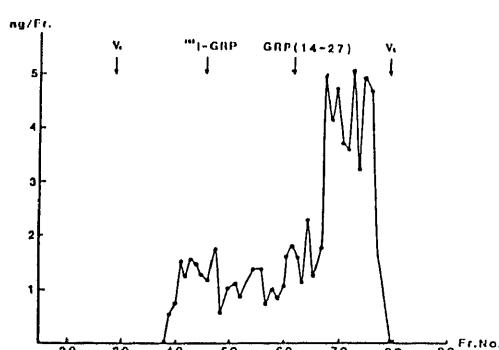


Fig. 8. Gel filtration profiles of the rat stomach perfusate from isolated rat stomach on Sephadex G-50 column (1.5 × 90 cm). GRP-like immunoreactivities are represented by ng/Fraction. V_o, Void Volume; V_t, Total Volume.

異性を検討するため、神経節遮断剤であるヘキサメトニウムと節後線維-効果器遮断剤であるアトロビンの効果をみた。その結果、アトロビン 10^{-9} M の濃度では、ガストリン分泌は抑制されるが GRP 分泌には影響なく、ヘキサメトニウム 10^{-4} M の濃度ではガストリン分泌には影響ないが GRP 放出は抑制される、という結果を得た。近年、ガストリン分泌調節機構の一つとして、ソマトスタチンによる抑制が注目されている。Maklouf ら²⁰⁾は、本研究と同様のラット胃灌流実験において、アトロビンはポンベシンによるガストリン分泌を抑制しないこと、ソマトスタチン抗血清はポンベシンによるガストリン分泌を増大すること、メサコリンはガストリンとポンベシンの両者を放出させること、などの結果を得て図 9 に示したようなモデルを提唱している。すなわち G 細胞はポンベシン（あるいは GRP）ニューロンによる促進とパラクリン細胞からのソマトスタチンによる抑制という二重支配を受けている、という仮説である。本研究の結果はこの仮説に矛盾しない。つまりアトロビンを灌流した場合は神経節での遮断はないからアセチルコリンにより GRP は放出されるが、節後線維-効果器の遮断によりソマトスタチン分泌は増大し、これが、GRP による促進効果を相殺してガストリン分泌を抑える。一方、ヘキサメトニウムの場合は神経節を遮断し GRP の放出はおこらないがアセチルコリンはソマトスタチンの放出を抑制し、これがガストリンの分泌増大につながると考えることができる。胃灌流系で迷走神経刺激がソマトスタチンを抑制することは証明されている¹⁹⁾。しかし同様

の胃灌流実験系において VIP の関与も指摘されており²⁴⁾また交感神経遮断剤イソプロテレノールの効果も云われているので²⁵⁾ Maklouf のモデルによる機序と断定するのは問題があろう。今のところは、GRP が副交感神経節後ニューロンの神経伝達物質として作動している可能性を指摘するに止めたい。

次に外因性に投与した GRP が迷走神経刺激と同様なガストリン分泌作用を持つか否かが問題となろう。本実験で、灌流液中に投与した 10^{-7} M 濃度の GRP により明らかにガストリンの二相性の分泌がみられた。GRP のガストリン分泌作用について McDonald ら⁵⁾は、ヒト末梢血で 300 pmol/kg の GRP 投与により血清ガストリンが上昇したと報告している。しかし問題は、この 10^{-7} M 濃度が生理的レベルか薬理的レベルかという点であろう。灌流液中の免疫活性 GRP をそのまま絶対値で比較することはできないが、免疫活性として測定した GRP の最大値は 300 pg/ml 前後にとどまり、これはモル濃度にして 10^{-13} M にしかならない。Suzue ら³⁴⁾によればラット脊髄ニューロンに脱分極をおこさせるのに必要な GRP の閾値は 7×10^{-9} M であるという。本研究では、 10^{-8} M 濃度の GRP ではガストリン分泌が弱く一定の値が得られなかったので 10^{-7} M 濃度の GRP を用いた結果を示したが 10^{-8} M 濃度でもガストリン分泌は見られる。GRP の不安定性を考えると免疫活性は低めにでている可能性もある。おそらくシナプス間では 10^{-8} M から 10^{-10} M の間の濃度で GRP が作用していると推定され、灌流液の測定ではより低い値が測定されるのであろう。

次に灌流液中の GRP のゲル汎過法による検討では GRP (1-27) や GRP (14-27) よりも小さい分子量の分画に多くの免疫活性が見られた。GRP のアミノ酸配列より考えて、アルギニン残基とグリシン残基の間で切れた GRP (18-27) である可能性があるが実際にこの小さなフラグメントが神経伝達物質として働くかどうかは不明である。アセチルコリンの分子量は 186、GRP (14-27) の分子量は 1651 である。シナプス間の伝達では、分子量の大きさはあまり問題とされていない。胃粘膜組織の抽出物のゲル汎過では GRP (1-27) と GRP (14-27) に主なピークが見られていること³⁵⁾から、むしろ、放出された GRP が速やかに分解されてより小さなフラグメントとなって検出されると考えた方が妥当である。灌流液は酸・エタノール液中に滴下して氷冷し酵素などによる分解を最大限に防いだが、神経末端より放出されたと考えられる GRP が血管内に入りさらに灌流チューブを通ってくる間の温度は 37°C でありその間の分解は避けられないものと思われる。なお最近 Schusdziarra ら²⁶⁾は、著者と同様のラッ

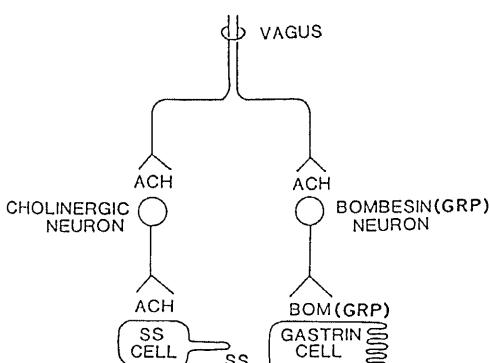


Fig. 9. Model to describe antral control of gastrin secretion. A postganglionic cholinergic, inhibitory neuron innervating somatostatin (SS) cell and a postganglionic peptidergic, excitatory neuron innervating gastrin cell. Both postganglionic neurons are under preganglionic cholinergic neuron control. The Schema is modified from Maklouf's schema.

ト胃灌流実験を行い、抗ボンベシン抗体を用いてRIAを行い、灌流液中にはボンベシン(1-14)の単一のピークが見られたという報告をしている。本研究の成績との相違は用いた抗体や抽出法の違いによるものであろう。いずれにしろGRP(1-27)のような大きな分子形は存在しないようである。

本研究で著者はGRPが胃において神経伝達物質であることを解明する目的で灌流実験を行ったが、この胃灌流法は血管系を灌流する実験系である。現在のところGRPニューロン末端が血管壁に接していわゆるNeurocrineとして働いているという直接的な証明はなされていない。また、ヒト末梢血においてGRPを測定した成績では、血中GRPのRIA法の問題が解決されたにもかかわらず食事などによっては有意のGRP変動は示されていない³⁵⁾。つまり末梢血のGRPのRIAは胃だけでなく他の消化管組織より放出され血管内に漏れ出たGRP総量を測定しているため循環ホルモンとしての働きをとらえることがないためと考えられる。しかし、単離した胃灌流系では胃神経組織から放出されるGRPのみが測定される。胃灌流系は完全なin vivoの系とも異なっているが、神経ペプチドの興奮-放出連関の機序は、むしろこうした単純化した灌流系や細胞培養系などによって解明されるべきものと考えられる。

さらに最近、興味ある成績としてSchultzbergら³⁶⁾は免疫組織化学的にラットの上腹腔神経節にあるボンベシン免疫活性が腸管との神経を切断することにより消化し、神経を結紩することにより、その末梢側にボンベシン免疫活性が蓄積されることを証明した。この成績は腸管壁にボンベシン(GRP)ニューロンが求心性神経として存在することを示していると思われる。本研究では迷走神経がGRPニューロンを刺激し放出されたGRPがガストリン分泌を刺激するという遠心性経路を推定した。遠心性と求心性の両方にGRPが存在するのか、迷走神経刺激でみられるGRPは求心性線維関係でガストリン分泌には無関係なのか、様々な可能性が考えられる。またTacheら³⁷⁾³⁸⁾は脳室に投与したGRPは血中ガストリンを上昇させるが胃酸分泌を抑制すると報告しており胃と脳の両方に存在するGRPの相互関係に興味がもたれる。最近Fletcherら²⁹⁾はヒト血中にGRPを投与すると15分位で一過性的ガストリン分泌がおこるがアトロピン投与によりこれが持続すると報告している。これらの知見は図9のような単純な模式図では説明できない。GRPの生理的役割については、まだ不明の点が多く、in vivoでGRPが果して本研究で示したようにガストリン分泌促進効果を発揮し、さらに胃液分泌にまで関与しているかどうか

かは断言できないしかし、神経ペプチドとしてGRPの局在は明らかであるので、こうした実験をつみ重ねることにより生体におけるGRPの果たす役割が解明されるものと期待したい。

結論

ラット胃灌流実験系を用いてGRPの放出動態を検討し以下の結果を得た。

- 1) 10^{-7} M濃度GRPによりガストリンは二相性の分泌を示す。
- 2) アセチルコリン刺激によるGRP放出はヘキサメトニウム 10^{-4} Mにより抑制されるがアトロピン 10^{-5} Mによっては抑制されない。
- 3) 47mM KCl溶液による脱分極刺激はGRPを放出させる。
- 4) 灌流液中のGRP分子量はGRP(14-27)よりも小さいフラグメントである。

以上のことよりGRPは胃においては副交感神経系統後ニューロンにおいて神経伝達物質として作動している可能性があることが示唆された。

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、また終始、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、井口和明修士、岩原邦宏修士、神戸大学第三内科、千葉勉博士に深謝いたします。

文献

- 1) McDonald, T. J., Nilssen, G., Vagne, M., Ghatei, M., Bloom, S. R. & Mutt, M.: A gastrin releasing peptide from the porcine non-antral gastric tissue. Gut, 19, 767-774 (1978).
- 2) McDonald, T. J., Jornvall, H., Nilsson, G., Vagne, M., Ghatei, M., Bloom, S. R., & Mutt, V.: Characterization of a gastrin releasing peptide from porcine non-antral gastric tissue. Biochem. Biophys. Res. Commun., 90, 227-233 (1979).
- 3) McDonald: Non-amphibian bombesin-like peptide, p407-412, In S. R. Bloom & J. M. Polak (ed.), Gut Hormones, 2nd ed. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1981.
- 4) Brown, M., Marki, W. & Rivier, J.: Is gastrin releasing peptide mammalian bombesin? Life Sci., 27, 125-128 (1980).
- 5) McDonald, T. J., Ghatei, M., Bloom, S. R., Adrian, T. E., Mochizuki, T., Yanaihara, C. & Yanaihara, N.: Dose-response comparisons of

- canine plasma gastrenteropancreatic hormone response to bombesin and the porcine GRP. *Regul. Peptides*, 5, 125-137 (1983).
- 6) 矢内原昇・山下裕一・大久保正士・岩原邦宏：ボンペシンとガストリン放出ペプチド. *日本臨床*, 40, 5, 114-120 (1982).
- 7) Fletcher, D. R., Shulkes, A. & Hardy, K. J.: The effect of atropin on bombesin and gastrin releasing peptide stimulated gastrin, pancreatic polypeptide and neuropeptidin release in man. *Regul. Peptides*, 7, 31-40 (1983).
- 8) Lezoche, E., Basso, N. & Speranza: Action of bombesin in man, p419-424, In S. R. Bloom & J. M. Polak (ed.), *Gut Hormones*, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1981.
- 9) Otsuka, M. & Konishi, S.: Release of Substance P-like immunoreactivity from isolated spinal cord of newborn rat. *Nature*, 264, 83-84 (1976).
- 10) Hökfelt, T., Johanssen, O., Ljungdahl, A., Lundberg, J. M. & Schultzberg, M.: Peptidergic neurons. *Nature*, 284, 515-521 (1980).
- 11) Lundberg, J. M., Angard, A., Fahrenberg, J., Hökfelt, T. & Mutt, V.: VIP in cholinergic neurons of exocrine glands. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, 1651-1655 (1980).
- 12) Standler, J. M., Javoy-Agid, F., Cesslin, F., Legland, J. C. & Agid, Y.: CCK8-immunoreactivity distribution in human brain. *Brain Res.*, 243, 176-179 (1982).
- 13) Otsuka, M. & Yanagisawa, M.: The effects of substance P and Baclofen on mononeurons of isolated spinal cord of the newborn rat. *J. Exp. Biol.*, 89, 201-214 (1980).
- 14) Akagi, H., Otsuka, M. & Yanagisawa, M.: Identification by HPLC of immunoreactive Substance P released from isolated rat spinal cord. *Neurosci. Letters*, 20, 257-263 (1980).
- 15) Helmstaedter, V., Feurle, G. E. & Forsmann, W. G.: Ultrastructural source of neuropeptidin in the gut mucosa. *Cell Tissue Res.*, 184, 445-451 (1979).
- 16) Moody, T. W., Thoa, N. B., O'Donohue, T. L. & Jacobowitz, D. M.: Bombesin-like peptides in rat spinal cord. *Life Sci.*, 29, 2273-2279 (1981).
- 17) Yanaihara, N., Yanaihara, C. & Mochizuki, T.: Immunoreactive GRP. *Peptide*, 2(suppl 2), 185-190 (1981).
- 18) Martindale, R., Levin, S. & Alfin-Slater, R.: Effect of caerulein and bombesin on insulin and glucagon secretion from the isolated perfused rat pancreas. *Regul. Peptides*, 3, 313-324 (1982).
- 19) Saffouri, B., Weir, G. V., Bitar, K. N. & Maklouf, G. M.: Gastrin and somatostatin secretion by perfused rat stomach. *Am. J. Physiol.*, 238, 495-501 (1980).
- 20) Duval, J. W., Saffouri, B. & Maklouf, G. M.: Stimulation of gastrin and somatostatin secretion from the isolated rat stomach by bombesin. *Am. J. Physiol.* 241, 242-247 (1981).
- 21) Pederson, R. A., McIntosh, C. H. S., Mueller, M. K. & Brown, J. C.: Absence of a relationship between immunoreactive gastrin and somatostatin secretion in the perfused rat stomach. *Regul. Peptides*, 2, 53-60 (1981).
- 22) McIntosh, C., Pedersson, R., Mueller, M. & Brown, J.: Autonomic nervous control of gastric somatostatin from the perfused rat stomach. *Life Sci.*, 29, 1477-1483 (1981).
- 23) Martindale, R., Kauffmann, G. L., Levin, S., Walsh, J. H. & Yamada, T.: Differential regulation of gastrin and somatostatin secretion from isolated perfused rat stomach. *Gastroenterology*, 83, 240-244 (1982).
- 24) Pederson, R., O'Dorisio, T., Hove, V., McIntosh, C., Mueller, M., Brown, J. & Cataland, S.: Vagal release of IR-VIP and IR-Gastrin from the isolated rat perfused stomach. *Molecular and cellular endocrinology*, 23, 225-231 (1981).
- 25) Koop, H., Behrens, I. & McIntosh, C.: Adrenergic modulation of gastric somatostatin release in rats. *Febs. Letters*, 118, 2, 248-250 (1980).
- 26) Schusdziarra, V., Bender, H. & Pfeiffer, E. F.: Release of bombesin-like immunoreactivity from the isolated perfused rat stomach. *Regul. Peptides*, 7, 21-29 (1983).
- 27) Chiba, T., Seino, Y., Goto, Y., Kadokawa, S., Tanimoto, T., Abe, H., Kato, Y., Matsukura, S., Nozawa, M. & Imura, H.: Somatostatin release from isolated perfused rat stomach. *Biophys. Res. Commun.*, 82, 2, 731-737 (1978).
- 28) 千葉 勉・門脇誠三・田港朝彦・千原和夫・藤田拓男消化管ホルモン(II), (消化管ホルモン研究会編) 236-243頁, 医学図書出版, 東京, 1982.

- 29) Chiba, T., Tanimoto, T., Kadowaki, S., Abe, H., Chihara, K., Matsukura, S., Goto, Y. & Fujita, T.: Effects of insulin and pancreatic polypeptide on gastric somatostatin release. *Diabetes*, **29**, 292-295 (1980).
- 30) Chiba, T., Kadowaki, S., Tanimoto, T., Chihara, K., Seino, Y., Matsukura, S. & Fujita, T.: Effects of anti-somatostatin γ -globulin on gastrin release in rats. *Gastroenterology* **81**, 321-326 (1981).
- 31) Hubbard, J. I.: Microphysiology of vertebrate neuromuscular transmission. *Physiol. Rev.*, **53**, 3, 674-723 (1973).
- 32) Iwanaga, T.: GRP/Bombesin-like immunoreactivity in the neurons and paraneurons of the gut and lung. *Biomed. Res.*, **40**, 1, 93-104 (1983).
- 33) Dockray, G. J., Vaillant, C. & Walsh, J. H.: The neuronal origin of bombesin-like immunoreactivity in the rat gastrointestinal tract. *Neurosci.*, **4**, 1561-1568 (1979).
- 34) Suzue, T., Yanaihara, N. & Otsuka, M.: Action of vasopressin, GRP and other peptides on neurons of newborn rat spinal cord in vitro. *Neurosci. Letters*, **26**, 137-142 (1981).
- 35) 大久保正士・岩原邦宏・望月徹・矢内原千鶴子・矢内原昇：消化管ホルモン(III)（消化管ホルモン研究会編），94-101頁，医学図書出版，東京，1983。
- 36) Schultzberg, M. & Dalsgaard, C. J.: Enteric origin of bombesin immunoreactive fiber in the rat celiac-superior mesenteric ganglion. *Brain Res.* **269**, 190-195 (1983).
- 37) Tache, Y., Marki, W., Rivier, J., Vale, W. & Brown, M.: Central nervous system inhibition of gastric secretion in the rat by GRP, a mammalian bombesin. *Gastroenterology*, **81**, 298-302 (1981).
- 38) Tache, Y.: Bombesin, central nervous system action to increase gastric mucus in rats. *Gastroenterology*, **83**, 75-80 (1982).

Release of Gastrin Releasing Peptide from the Perfused Rat Stomach—Effect of Acetylcholine, Atropin and Hexamethonium— Hideki Shimazaki, Department of Internal Medicine (II) (Director: Ryoyu Takeda), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 - J. Juzen Med. Soc., **93**, 352-360 (1984)

Key words: Stomach Perfusion, Neuropeptide, Gastrin Releasing Peptide

Abstract

Release of gastrin and Gastrin Releasing Peptide (GRP) from the rat stomach was investigated using an isolated, vascularly perfused rat stomach preparation. Gastrin and GRP were measured by the radioimmunoassay system using region specific antibodies R1303 and R6903.

Infusion of 10^{-3} - 10^{-8} M acetylcholine caused a significant increase in gastrin secretion and concomitant increase in GRP levels in the perfusate in a dose related manner. Infusion of 10^{-5} M atropin inhibited the gastrin response but had no effect on the increase in GRP levels.

Conversely, infusion of 10^{-4} M hexamethonium had no effect on the gastrin response but it abolished the increase in GRP levels. Infusion of 10^{-7} M GRP fragment(14-27) caused a biphasic increase in gastrin secretion.

Gel filtration profiles of GRP in the perfusate indicated that the released GRP fragment was smaller than GRP(14-27). These results suggest that GRP is released from a postganglionic, peptidergic neurons in the rat stomach and that GRP may be a member of neuropeptides.