イヌの下垂体および松果体のモチリン様免疫活性

—組織化学的研究—

山梨医科大学第1解剖学教室

下瀬川 徹, 小林 繁

静岡薬科大学生物薬品化学教室

矢内原 千鶴子, 矢内原 昇

Motilin-like Immunoreactivity in the Canine Pituitary
and Pineal Glands
— A Histochemical Study —**Tooru SHIMOSEGAWA, Shigeru KOBAYASHI***
Chizuko YANAIHARA and Noboru YANAIHARA**Department of Anatomy, Yamanashi Medical School,
Yamanashi 409-38*,Laboratory of Bioorganic Chemistry, Shizuoka College of Pharmacy,
Shizuoka 422, Japan**

Motilin-like immunoreactivity in the canine pituitary and pineal glands shown by radioimmunoassay was re-investigated by histochemistry using anti-porcine motilin sera. Immunostaining of duodenal Mo cells was examined as a control. Tissues were fixed in Bouin's fluid and embedded in paraffin. Sternberger's peroxidase anti-peroxidase method was employed for histochemical reaction. Three lots of anti-motilin sera raised in rabbits (R1104, R1105, R1106) and one lot of anti-motilin serum raised in a guinea pig (GP2803) were used. An absorption test of the immunohistochemical reaction was performed using motilin (Mo 1-22), N-terminal fragment (Mo 1-17), or C-terminal fragment (Mo 7-22).

The results obtained were summarized as follows:

- 1) In the pituitary gland, endocrine cells showing motilin-like immunoreactivity were localized in the pars distalis and pars intermedia. In the pineal gland, pinealocytes showed no motilin-like immunoreactivity.
- 2) Pituitary endocrine cells were strongly stained with two lots of anti-motilin sera (R1104, R1105). No distinct reaction was demonstrated with two other anti-motilin sera (R1106, G2803).
- 3) The minimum concentration of antigens required for absorption of the immunohistochemical reaction was determined by their doubling-dilution. When R1105 anti-serum (1:1000) was pre-incubated with Mo 1-22, immunostaining of duodenal Mo cells re-appeared at a concentration of 0.1×2^{-8} g/l, whereas pituitary endocrine cells remained unstained at

a concentration of 0.1×2^{-10} g/l. Using Mo 7-22, immunostaining of pituitary endocrine cells was absorbed up to a concentration of 0.1×2^{-14} g/l, whereas duodenal Mo cells were positively stained at a concentration of 0.1×10^{-6} g/l.

These results were in agreement with the hypothesis that pituitary motilin-like immunoreactivity represents unknown peptides containing a C-terminal side amino acid sequence of motilin molecules.

緒 言

Brownらは1966年にイヌで十二指腸内のアルカリ化が胃体部囊の収縮運動を引き起こす事を示し、ここに胃運動に関連するホルモンの存在を推測した¹⁾。1972年にはブタ十二指腸粘膜からこの物質を抽出精製し²⁾モチリンと命名、1974年には22個のアミノ酸残基からなる1次構造を決定した¹⁰⁾。その後、化学合成¹³⁾、合成ブタモチリンを用いた抗血清の作成、ラジオイヌムノアッセイ (RIA)系の確立がなされた⁵⁾。更に合成モチリンフラグメントを用いた交差反応の検討から特定の部位に特異的な抗血清 (region specific antisera)が見出され、モチリンの種特異性¹⁰⁾、分子多様性および前駆体の存在の検討が可能になった⁴⁾¹²⁾。

RIAの結果はイヌ、サルおよびブタで消化管のほか脳にもモチリン様免疫活性が存在する事を示した⁹⁾¹⁷⁾。特にイヌでは下垂体前葉および松果体に高濃度のモチリン様免疫活性が検出されている¹⁷⁾。

脳内のモチリン様免疫活性に関し、RIAの結果がその存在および分布を明らかにしているのに対し、形態学的な検討はほとんどなされていない³⁾¹⁰⁾。そこで我々は、組織化学的な方法を使ってイヌの下垂体と松果体を研究し、モチリン様免疫活性の局在と特性について検討を加えた。また、組織化学における従来の吸収試験に工夫を加え、その意義についても考察したので報告する。

材 料 と 方 法

1. 組織材料

雑種成犬4頭(体重3.7kg~15kg, 雄2頭, 雌2頭)を使用した。ペントバルビタールナトリウム50mg/kg体重の麻酔下に Bouin 液による灌流固定を行ない、速かに視床下部一下垂体を摘出した。2頭については視床下部一下垂体を矢状面方向に、残りの2頭については水平面方向にトリミングした。組織片の厚さは3mm以上にならないよう注意した。灌流固定した組織片を Bouin 液でさらに3時間浸漬固定した。その後、エタノール脱水、パラフィン包埋し、厚さ3 μ mの切片を作成した。4頭のうち2頭の松果体についても同様の方法で固定・包埋し、厚さ3 μ mの切片を作成した。これとは別に雑種成犬1頭(体重6.5kg, 雌)の十二指腸を室温で3時間 Bouin 液で浸漬固定し、厚さ3 μ mのパラフィン切片を作成して、免疫組織化学反応の特異性検定の対照とした。

2. 抗体および抗原

1) 合成ブタモチリンに対する抗血清, R 1104, R 1105, R 1106 (いずれも家兎抗モチリン), GP 2803 (モルモット抗モチリン) の4種類を1次抗血清として使用した。これらの血清のRIA上の特異性に関しては既に詳しい報告がなされている¹⁸⁾¹⁹⁾。

2次抗血清ならびに PAP 複合体 (Miles Yeda) は各々200倍希釈で用い、GP 2803を1次抗血清として用いた場合のみ2次抗血清に山羊抗モルモット IgG を40倍希釈で、PAP 複合体にモルモット PAP を20倍希釈で使用した。

Fig. 1. a), b) Endocrine cells containing motilin-like immunoreactivity in the central lower portion of the pars distalis (a), and pars intermedia (b) of a canine pituitary gland. A sagittal section. Arrowheads indicate a cell with a long process seen in the pars intermedia. PD: pars distalis RL: residual lumen PN: pars nervosa X 500. Primary antiserum, dilution 1:1000.

c) Distribution of motilin-like immunoreactivity containing cells in a horizontal section of a lower portion of the pituitary gland. Immunoreactivity containing cells are concentrated in a anterior central portion (ACP). The lateral wing (LW) contains few of them. X 50. Primary antiserum, dilution 1:1000.

d) A higher horizontal section of the pituitary gland. Motilin-like immunoreactivity containing cells are located around the pituitary stalk (PS) and the pars intermedia (arrowheads). X 50. Primary antiserum, dilution 1:1000.

2) 吸収試験に用いた抗原は、合成ブタモチリン (Mo1-22)、N端フラグメント (Mo1-17) および C端フラグメント (Mo7-22) の3種類である。

3. 光顕免疫組織化学

光顕免疫組織化学には PAP 法を用いた⁶⁾¹⁵⁾。まず内在性ペルオキシダーゼを抑制するために脱パラフィンした切片を3%過酸化水素水で処理し、次いで非特異的免疫グロブリンの吸着を抑える目的で山羊血清をかけて室温に静置した。1次抗血清との反応は、4°C13時間とし、その後2次抗血清、次に PAP 複合体へと反応を進め最後に3, 3'-ジアミノベンチジン・0.005%過酸化水素混合液で発色させた。これらの反応は湿箱内で行ない、1次・2次抗血清の希釈および各過程間の切片洗浄は全て0.01M, pH 7.2リン酸緩衝液・塩化ナトリウム添加 (PBS) を用いた。各反応時間は一定とした。

4. 光顕免疫組織化学の特異性の検定

いずれの反応を行なう場合も、イヌ十二指腸のモチリン産生細胞 (Mo細胞) を対照とした。

1) 1次・2次抗血清の代わりに PBS を用いて反応を行なった。

2) 1次抗血清の代わりに、100倍、500倍、1000倍希釈の正常ウサギ血清をかけて3.に従って反応を行なった。

3) 抗原およびそのフラグメントの倍々希釈による吸収試験

イヌ下垂体のモチリン様免疫活性を示す細胞および十二指腸 Mo細胞 (対照) の吸収試験を行なった。まず、Mo1-22, Mo1-17 および Mo7-22 各々の $0.1 \times 2^{-1} \text{g/l}$ (PBS で溶解) 溶液を120 μl 作った。これらを倍々希釈して得られた抗原60 μl に同じ容量の R 1105血清 (1:500) を加え、最終濃度として抗原 $0.1 \times 2^{-4} \sim 0.1 \times 2^{-16} \text{g/l}$, R 1105・1000倍希釈の混合液を調整した。これらを4°Cで12時間静置した後、1次抗血清の代わりに用いて反応を行なった。

結 果

1. イヌの下垂体と松果体のモチリン様免疫活性細胞の形態と分布

1) 下垂体

Fig. 1 a, b に示すように下垂体の前葉ならびに中葉にモチリン様免疫活性を示す細胞が認められた。これは4頭のイヌについて同様であった。

前葉の陽性細胞は毛細血管腔に面し、大型で多角形ないし楕円形をしており細胞質が豊富だった (Fig. 1 a)。

中葉では約90%の実質細胞がモチリン様免疫活性を示した。残りの約10%は免疫活性を示さなかった。中葉のモチリン様免疫活性細胞は楕円形または紡錘形で密に配列していた。長い突起を毛細血管壁に伸ばすものも見られた (Fig. 1 b)。

Fig. 1 c は下垂体のモチリン様免疫活性細胞の分布を水平方向の切片で示す。陽性細胞は下垂体の正中部に集団をなす傾向がみられた。なお、前葉の側方部では散在性に分布していた。前葉の上方では、前葉と隆起葉の移行部に少数の陽性細胞が見られた (Fig. 1 d)。

中葉の陽性細胞の密度は上方で低く、下方では高い傾向があった。

神経葉にはモチリン様免疫活性を示す細胞や神経線維は認められなかった。

2) 松果体

松果体に関しては Table 1 に示すとおり R 1104, R 1105, R 1106, GP 2803 のいずれの抗血清を用い

でも松果体細胞に免疫活性は出現しなかった。松果体内の血管内皮細胞や細胞間結合組織にも軽い呈色反応が出現した。また被膜やクモ膜下腔の疎性結合組織も軽度の呈色反応を示した。

2. イヌ下垂体のモチリン様免疫活性の組織化学的特性

1) 免疫組織化学の特異性の検定

1次または2次抗血清の代わりにPBSをかけて反応を行った場合、対照である十二指腸のMo細胞および腺下垂体の内分泌細胞のいずれも免疫活性は出現しなかった。1次抗血清の代わりに正常ウサギ血清を用いた場合、100倍希釈で中葉の実質細胞に軽度ながら呈色反応が出現したが、500倍以上の希釈倍率では認められなかった。

2) 下垂体のモチリン様免疫活性細胞が各抗血清で示す免疫活性の強さの比較

R 1104, R 1105, R 1106, GP 2803の各血清（濃度1:500, 1:1000）で下垂体のモチリン様免疫活性細胞が示す免疫活性の強さをTable 1にまとめた。イヌの十二指腸のMo細胞を対照としている。R 1105で最も強い免疫活性がみられ、R 1104でも免疫活性が明かであった。しかし、R 1106では希釈濃度1:500でも弱い反応しか認められず1:1000の濃度では免疫活性は出現しなかった。GP 2803では1:500の濃度で用いても免疫活性は認められなかった。

3) 抗原の倍々希釈による吸収試験

Table 2に示すように下垂体のモチリン様免疫活性細胞の呈色反応は対照である十二指腸Mo細胞と同様Mo1-22およびMo7-22で吸収された。しかし、Mo1-17ではいずれの細胞の反応も吸収されなかった。Mo1-22では免疫活性を回復する抗原希釈濃度がMo細胞で $0.1 \times 2^{-8} \text{g/l}$ であったのに対し、下垂体の細胞では $0.1 \times 2^{-11} \text{g/l}$ で、両者の間に抗原量の差が認められた。Mo7-22では免疫活性を回復する抗原希釈濃度がMo細胞で $0.1 \times 2^{-6} \text{g/l}$ とMo1-22の場合より高濃度の抗原を必要とするのに対し、下垂体の細胞のそれは $0.1 \times 2^{-16} \text{g/l}$ と抗原を著しく低濃度にしないと免疫活性は回復しなかった。

Table 1. A comparison of the strength in immunostaining of the canine pituitary cells, pinealocytes and duodenal Mo cells to four kinds of region specific antisera (dilution, 1:500 and 1:1000).

Antiserum	Dilution	Duodenal Mo cells (Control)	Pituitary cells	Pinealocytes
R 1104	1:500	+++	++	—
	1:1000	++	+	—
R 1105	1:500	+++	+++	—
	1:1000	+++	++	—
R 1106	1:500	+++	±	—
	1:1000	++	—	—
GP2803	1:500	++	—	—
	1:1000	+	—	—

Symbols: — negative, ± equivocal, + slightly positive, ++ moderately positive, +++ intensely positive

Table 2. Absorption test of immunohistochemical reaction to the R 1105 antiserum (dilution, 1:1000 in PBS) in the canine duodenal Mo cells and pituitary cells.

Amount of peptides	Mo 1-22		Mo 7-22		Mo 1-17	
	Duodenal Mo cells	Pituitary cells	Duodenal Mo cells	Pituitary cells	Duodenal Mo cells	Pituitary cells
No peptide (Control)	+++	+++	+++	+++	+++	+++
0.1×2^2 g/l	-	-	-	-	+++	+++
0.1×2^3	-	-	-	-	+++	+++
0.1×2^4	-	-	-	-	+++	+++
0.1×2^5	-	-	-	-	+++	+++
0.1×2^6	-	-	+	-	+++	+++
0.1×2^7	-	-	+	-	+++	+++
0.1×2^8	+	-	++	-		
0.1×2^9	++	-	++	-		
0.1×2^{10}	++	-	+++	-		
0.1×2^{11}	+++	+	+++	-		
0.1×2^{12}	+++	+	+++	-		
0.1×2^{13}	+++	++	+++	-		
0.1×2^{14}	+++	++	+++	-		
0.1×2^{15}	+++	+++	+++	+		
0.1×2^{16}	+++	+++	+++	++		

The R 1105 antiserum was incubated with Mo 1-22, Mo 7-22 and Mo 1-17 at 4°C overnight before application to the sections. The amount of antigens were decided by a doubling-dilution method ($\times 0.1$ g/l of the diluted antiserum). Symbols: - negative, + slightly positive, ++ moderately positive, +++ intensely positive.

考 按

1. イヌの下垂体と松果体のモチリン様免疫活性細胞の局在とラジオインムノアッセイの結果との比較
我々はイヌの下垂体前葉および中葉にモチリン様免疫活性細胞が存在する事を組織化学的方法によって明らかにした。

矢内原らはイヌ十二指腸および“下垂体前葉”，“神経葉”，“松果体”のモチリン様免疫活性を測定し，各々3.9, 139.9 $\pm$ 37.4, 70.8 $\pm$ 18.6, 1058.1 pg/mg wet tissueと報告している¹⁷⁾。しかし，矢内原らが分析した組織片の形態学的検討はなされていない。矢内原らの研究では標本採取の際に“神経葉”に中葉の組織が混入していた可能性を仮定し，一方，十二指腸ではMo細胞の密度が低い事を考えると，イヌ下垂体についての彼らのラジオインムノアッセイの結果と今回行なった免疫組織化学的研究の結果はよく一致する。

矢内原らがイヌ松果体に高いモチリン様免疫活性を報告しているのに対し，本研究では松果体細胞にその免疫活性を証明する事ができなかった。なお本研究では松果体内の血管内皮細胞や結合組織ならびに被膜やクモ膜下腔の組織に非特異的な呈色反応が認められた。従って，矢内原らの研究においては材料採取の際に血漿成分や被膜およびクモ膜下組織が“松果体”に混入して，これらが“免疫活性”を示した可能性を指摘したい。松果体細胞以外の成分が“松果体”に混入していたとすればRIAで高いモチリン様免疫活性が検出されることはあり得ると思われる。

2. イヌ下垂体のモチリン様免疫活性の組織化学的特性

1) 非特異反応である可能性の除外

本研究では組織化学の反応系で、1次、2次抗血清の代わりにPBSを用いた場合、下垂体にはモチリン様免疫活性を示す細胞は出現しなかった。従って、これらが内源性ペルオキシダーゼによる非特異的な呈色反応である事は否定される。

正常ウサギ血清を1次血清の代わりに用いた場合、100倍の希釈倍率で下垂体中葉に弱いながら呈色反応が出現した。これは、抗血清を高濃度で用いた場合、免疫グロブリンの非特異的な吸着による呈色反応が生ずる可能性を示唆している^{7) 8)}。

下垂体のモチリン様免疫活性細胞はR 1104, R 1105を1次抗血清として用いた場合、500倍以上の希釈倍率でも認められた。従ってこの反応は免疫グロブリンの非特異的な吸着による呈色反応ではありえない。

2) 下垂体のモチリン様免疫活性の抗血清の特異性への依存

矢内原らのRIAによる研究の報告によれば^{18) 19)}，R 1105はモチリンC端側にきわめて特異性が高く，GP 2803はN端側に特異的である。R 1104はC端側に特異的であるがR 1105に比べその特異性は低い。R 1106は抗原決定上，N端側が重要と考えられるが，GP 2803に比べるとその特異性は低い。

免疫組織化学ではR 1104, R 1105, R 1106のいずれを用いても対照である十二指腸Mo細胞の免疫活性に大きな差を生じなかった。一方，下垂体の免疫活性はC端特異抗血清である，R 1105で最も強く，同じくC端側に特異性を有するR 1104で明瞭であるのに対し，抗原決定上N端側が重要なR 1106ではきわめて弱い反応しか認められなかった。N端特異抗体であるGP 2803では下垂体に免疫活性は出現しなかった。この結果は，下垂体のモチリン様免疫活性が抗血清の特異性に依存的である事を示す。

山口らは，イヌの腸管抽出物の容量反応曲線が，R 1105では合成ブタモチリンのそれに平行するのに対してR 1106では両者が著しく異なる事を報告している^{10) 19)}。これはイヌのモチリンとブタのモチリンではN端構造に差異があるとの報告に一致する¹¹⁾。

免疫組織化学では，対照である十二指腸Mo細胞の免疫活性はR 1104, R 1105とR 1106で大きな差を生じなかった。一方，下垂体のモチリン様免疫活性はR 1105で最も強くR 1104でも明瞭であったがR 1106ではほとんど認められなかった。なお，対照の免疫活性もやや弱いので結果の解釈には慎重を要するが，N端特異抗体であるGP 2803では下垂体にモチリン様免疫活性細胞を示す事はできなかった。

従ってイヌの下垂体のモチリン様免疫活性はモチリンのC端側に類似した構造との交差であると考えられる。また，下垂体の細胞にはイヌの十二指腸モチリンのN端側に類似する部分は免疫活性を示す形では含まれていないと考えられる。

3) 倍々希釈系を用いた吸収試験で示された下垂体のモチリン様免疫活性の組織化学的特性

我々はC端特異抗体であるR 1105を用いてMo1-22およびそのフラグメントであるMo1-17, Mo7-22の倍々希釈系による吸収試験を十二指腸Mo細胞を対照として行なった。その結果，Mo1-22, Mo7-22で下垂体のモチリン様免疫活性細胞は完全に吸収されるがMo1-17では全く吸収されない事が示された。この結果は下垂体のモチリン様免疫活性がモチリンC端側類似構造との交差であるとの仮説を支持する。

Mo1-22のかわりに Mo7-22を用いると、十二指腸の Mo 細胞が免疫活性を回復する抗原希釈濃度は高濃度にずれた。一方、下垂体では Mo7-22 を著しく低濃度にしないと免疫活性が回復しなかった。従ってイヌの十二指腸のモチリンと下垂体のモチリン様免疫活性物質ではブタモチリンの C 端側フラグメントとの交差性が異なると思われる。つまり下垂体のモチリン様免疫活性の起源は、十二指腸モチリンとは異なるペプチドであろうと推定される。

3. 方法論上の改善点

我々はブタモチリンおよびその N 端フラグメントと C 端フラグメントの倍々希釈系による吸収試験を行なうことによってイヌの十二指腸モチリンと下垂体のモチリン様免疫活性物質の分子構造の類似性を論じた。

従来の吸収試験では抗体に対して充分量と思われる（抗体の絶対量が示されていないのが常であるが）抗原を加えて組織と反応させた。従って、交差反応が予想される物質の交差性を確認する意味でしか利用されず、目的とするペプチドと組織内抗原との性状の比較について言及する事は不可能であった。

この度の研究に導入した倍々希釈による吸収試験では N 端、C 端フラグメントを含む数種類のフラグメントを入手できる限り、組織切片上の反応から組織内抗原の性状をある程度予測できる事を示した。この点は、これまでの“ワンポイントの吸収試験”との大きな差である。

要 約

イヌの下垂体および松果体のモチリン様免疫活性の局在と特性を組織化学的に検討した。下垂体のモチリン様免疫活性について 4 種類の部位特異的抗血清（region specific antisera）を用いてその反応性を比較した。さらに合成ブタモチリンとその複数のフラグメントの倍々希釈系による吸収試験という新しい手法によって下垂体のモチリン様免疫活性物質の性状を十二指腸のモチリンと比較した。

得られた結果は以下のとおりである。

1) イヌの下垂体前葉および中葉にモチリン様免疫活性細胞が検出された。松果体細胞には免疫活性は出現しなかった。

2) 下垂体のモチリン様免疫活性は抗血清に依存的である。C 端特異血清である R 1105 で免疫活性が最も強く、同じく C 端側に特異的な R 1104 でも明瞭であった。一方、N 端側に特異性を有する R 1106 では 500 倍の希釈倍率で微弱な呈色反応がみられただけであった。N 端特異抗血清 GP 2803 では免疫活性は出現しなかった。

3) 下垂体のモチリン様免疫活性は合成ブタモチリン（Mo1-22）およびその C 端フラグメント（Mo7-22）で吸収された。

4) C 端特異抗血清である R 1105 について Mo1-22 の倍々希釈系による吸収試験を行なうと、下垂体のモチリン様免疫活性細胞と十二指腸の Mo 細胞とでは吸収に要する最少抗原濃度に差があった。C 端フラグメント Mo7-22 を抗原とした倍々希釈による吸収試験でこの差は著しく拡大した。

以上の結果から、下垂体のモチリン様免疫活性はモチリンの C 端側に類似した十二指腸モチリンとは異なるペプチドとの交差反応によって生じている事が推測された。

文 献

- 1) Brown, J.C., Johnson, L.P. and Magee, D.F.: Effect of duodenal alkalization on gastric

- motility. *Gastroenterology*, 50: 333–339, 1966.
- 2) Brown, J.C., Cook, M.B. and Dryburgh, J.R.: Motilin, a gastric motor activity-stimulating polypeptide, final purification, amino acid composition, and C-terminal residues. *Gastroenterology*, 62: 401–404, 1972.
- 3) Chey, W.Y., Escoffery, R., Roth, F., Chang, T.M., You, C.H. and Yajima, H.: Motilin-like immunoreactivity (MLI) in the gut and neurons of peripheral and central nervous system. *Regul. Peptides*, Suppl. 1: S19, 1980.
- 4) Christofides, N.D., Bryant, M.G., Ghateij, M.A., Kishimoto, S., Buchan, A.M.J., Polak, J.M. and Bloom, S.R.: Molecular forms of motilin in the mammalian and human gut and human plasma. *Gastroenterology*, 80: 292–300, 1981.
- 5) Dryburgh, J.R. and Brown, J.C.: Radioimmunoassay for motilin. *Gastroenterology*, 68: 1169–1176, 1975.
- 6) Graham, R.C. and Karnovsky, M.J.: The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney; ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.*, 14: 291–302, 1966.
- 7) Grube, D. and Weber, E.: Immunoreactivities of gastrin (G-) cells. *Histochemistry*, 65: 223–237, 1980.
- 8) Grube, D.: Immunoreactivities of gastrin (G-) cells. *Histochemistry*, 66: 149–167, 1980.
- 9) Nagai, K., Yanaihara, C., Yanaihara, N., Shimizu, F., Kobayashi, S. and Fujita, T.: Motilin immunoreactivity in gastrointestinal, pituitary and brain tissue. *Regul. Peptides*, Suppl. 1: S78, 1980.
- 10) Nilaver, G., Defendini, R., Zimmerman, E.A., Beinfeld, M.C. and O'Donohue, T.L.: Motilin in the Purkinje cell of the cerebellum. *Nature*, 295: 597–598, 1982.
- 11) Poitras, P., Reeve, J.R., Hunkapiller, M.W., Hood, L.E. and Walsh, J.H.: Purification and characterization of canine intestinal motilin. *Regul. Peptides*, 5: 197–208, 1983.
- 12) Shin, S., Imagawa, K., Shimizu, F., Hashimura, E., Nagai, K., Yanaihara, C. and Yanaihara, N.: Heterogeneity of immunoreactive motilin. *Endocr. jap.*, 1: 141–149, 1980.
- 13) Shimizu, F., Imagawa, K., Mihara, S. and Yanaihara, N.: Synthesis of porcine motilin by fragment consideration using three protected peptide fragments. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 49: 3594–3596, 1976.
- 14) Schubert, H. and Brown, J.C.: Correction to the amino acid sequence of porcine motilin. *Can. J. Biochem.*, 52: 7–8, 1974.
- 15) Sternberger, L.A.: *Immunocytochemistry*. 2 Ed. Wiley, New York, 1979.
- 16) 山口 建, 阿部 薫, 矢内原昇: Motilin の radioimmunoassay. *日本消化器病学会誌*, 74: 1458–1459, 1977.
- 17) 矢内原千鶴子, 佐藤晴子, 矢内原昇: motilin 免疫活性の組織内分布, 59–64. *消化管ホルモン研究会編集, 「モチリンおよび他のペプチド」*, 中外医学社, 東京, 1980.
- 18) Yanaihara, C., Sato, H., Yanaihara, N., Naruse, S., Forssmann, W.G., Helmstaedter, V., Fujita, T., Yamaguchi, K. and Abe, K.: Motilin-, substance P- and somatostatin-like immunoreactivities in extracts from dog, tupaia and monkey brain and G-I tract, 269–283. Ed. by M. Grossman, V. Speranza, N. Basso and E. Lezocche, *Gastrointestinal hormones and pathology of the digestive system*, Plenum Publishing Corporation, New York, 1978.
- 19) Yanaihara, N., Yanaihara, C., Nagai, K., Shimizu, F., Yamaguchi, K. and Abe, K.: Motilin-like immunoreactivity in porcine, canine, human and rat tissues. *Biomedical Research*, 1: 76–83, 1980.

(受付日: 58. 7. 4)