薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
104 (4) 362-373 (1984)

家兎皮膚炎症組織中の抗潰瘍性蛋白質の研究 (第3報¹⁾) ワクシニアウイルス
感染組織中の抗潰瘍活性ペプチド (Gly-Ser-His-Lys)

青沼 繁,^a 小浜靖弘,^a 円見和子,^a 青沼真一郎,^{*,a} 岡崎裕子,^a
宮脇 司,^a 鳥居憲三,^b 米田良三,^b 大原啓敬^b
大阪大学薬学部,^a 日本臓器製薬株式会社生物活性科学研究所^b

Studies on Anti-ulcerogenic Protein in Inflamed Rabbit Skin Tissues. III.¹⁾
Anti-ulcerogenic Peptide (Gly-Ser-His-Lys) Obtained
from Tissues Infected with Vaccinia Virus

SHIGERU AONUMA,^a YASUHIRO KOHAMA,^a KAZUKO ENMI,^a SHINICHIRO AONUMA,^{*,a}
YUKO OKAZAKI,^a TSUKASA MIYAWAKI,^a KENZO TORII,^b
RYOZO YONEDA^b and HIROYUKI OHHARA^b

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University,^a Yamadaoka 1-6,
Suita, Osaka, 565, Japan and Institute of Bio-Active Science,
Nippon Zoki Pharmaceutical Co., Ltd.,^b Kinashi,
Yashiro-cho, Kato-gun, Hyogo, 673-14, Japan

(Received October 26, 1983)

During our studies on the active moiety of anti-ulcerogenic protein in rabbit skin tissues infected with vaccinia virus, we obtained a tetrapeptide, Gly-Ser-His-Lys (GSHL), as the smallest essential residue. The action of this peptide widely covered against various experimental ulcers in rats induced by pylorus-ligation, restraint plus water immersion-stress (minimum effective dose, mg/kg, *i.v.*; 5.0), aspirin (5.0), histamine (5.0), cortisone (2.5/d), cysteamine (10) and acetic acid (1.0/d). In the respect of minimum effective dose, the effect of GSHL was 5–20 fold stronger than that of cimetidine, except for acetic acid-induced ulcers. Histological finding of acetic acid-induced ulcers revealed that GSHL treatment shortened an apparent defect of mucosa, a true defect of mucosa and rupture of muscaliris mucosae, and that it increased healing index and mucosal regeneration index. The peptide significantly decreased serum gastrin level, increased mucosal and stromal hexosamine contents and also increased mucosal blood flow in stress-treated rats. It significantly inhibited gastric secretion in pylorus-ligated rats. The mechanism of the action of GSHL appears to be due to the restorative effect against defected mucosa and anti-secretory effect.

Keywords—peptide; anti-ulcerogenic drug; stress-induced ulcer; acetic acid-induced ulcer; hexosamine; gastrin; gastric mucosal blood flow

ワクシニアウイルスに感染した家兎背部皮膚組織中の生理活性物質としてラットにおける幽門結紮潰瘍を抑制する蛋白質 Fr. I²⁾ を分離し、このものがウイルス感染よりも比較的緩和な炎症の場である家兎皮膚の Arthus 反応および浮腫組織並びに正常家兎皮膚組織中に存在しないことを明らかにした。¹⁾ Fr. I は分子量 69000 の高分子蛋白質であるが、²⁾ 本報では Fr. I よりさらに低分子活性成分 (Gly-Ser-His-Lys) を得、このものに実験的消化性潰瘍に対する抑制効果を認めたので報告する。

実験方法

物理化学的性質の分析 ポリアクリルアミドディスク電気泳動,³⁾ ドデシル硫酸 Na (SDS)-ポリアクリルアミドゲル電気泳動,³⁾ アミノ酸組成分析 (加水分解条件; 6N HCl, 110°C, 24 時間又は 2.5N NaOH, 110°C, 20 時間),⁴⁾ ダンシル-エドマン分解およびカルボキシペプチダーゼ A, B 法によるアミノ酸配列分析⁴⁾ はいずれも既報に従った。

Fr. I の BrCN 分解による活性成分の分離 既報²⁾により調製した Fr. I 1.0 g を 70% ギ酸 100 ml に溶解し, BrCN 1.0 g を加え室温, 暗所にて 24 時間攪拌した。反応後 10 倍量の蒸留水を加え, 凍結乾燥した。乾燥粉末の一部 (10 mg) を加水分解後アミノ酸分析を行い, Met が消失していることを確認した。分解物の乾燥粉末を 0.1 M 重炭酸アンモニウムに溶解し, 同緩衝液で緩衝化した Sephadex G-75 カラム (5.0×125 cm) で分画した。溶出液を紫外部 (UV) 235 nm の吸光度により分析し, Fr. I-1 (溶出液量 1459—1710 ml), Fr. I-2 (1207—1458 ml), Fr. I-3 (1045—1206 ml) および Fr. I-4 (900—1044 ml) の 4 画分に分け, 透析, 凍結乾燥した。幽門結紮潰瘍に対する抑制効果を有する (Table I) Fr. I-1 (収量 85 mg) を 0.1 M 重炭酸アンモニウムで緩衝化した Sephadex G-50 カラム (1.8×115 cm) で溶出後 UV 235 nm の吸光度により分析したところ, 1 本のピーク (溶出液量 110—150 ml) Fr. I-1-1 を得, 透析, 凍結乾燥した。次にこの画分を調製用ポリアクリルアミドゲル電気泳動装置 (東洋製作所製 CD-50) を用いて精製した。すなわち Fr. I-1-1 70 mg を 0.03 M トリス-HCl 緩衝液 (pH 6.7)-25% 蔗糖 8 ml に溶解し, 2.5% 濃縮ゲル 20 ml, 7.5% 分離用ゲル 80 ml からなるカラムに重層させ, 0.05 M トリス-グリシン緩衝液 (pH 8.3) を用いて 50 mA の一定電流で泳動した。溶出液は 2 ml/min の流速で分取し, UV 235 nm の吸光度で分析した。マーカーとして加えた 0.01% ブロムフェノールブルー (BPB) の直後に泳動されてくるピーク (BPB 溶出ピークを 0 として 8—26 ml に溶出される) を Fr. I-1-1-1 とした。Fr. I-1-1-1 をそのまま蒸留水で緩衝化した Sephadex G-200 カラム (3.5×125 cm) および Sephadex G-25 カラム (2.5×92 cm) を用いて順次溶出することにより高分子性ポリアクリルアミドおよび塩類などを除いた後凍結乾燥品として回収した。収量は 30 mg であった。なお, Fr. I-1-1-1 に続いて泳動されてくるブロードなピーク (27—95 ml) を Fr. I-1-1-2 として同様に凍結乾燥品として回収した。

ペプチドの合成 既報⁵⁾に従い固相法により Gly-Ser-His-Lys, Gly-His-Lys, Ser-His-Lys, His-Lys および Gly-Ser を合成し, アミノ酸組成分析, ダンシル-エドマン法によるアミノ酸配列分析又は元素分析により確認した。すなわち Boc-Lys(Z)-樹脂 (chloromethylated polystyrene) 又は Boc-Ser (OBzl)-樹脂に順次 Boc-アミノ酸又はその誘導体 (Boc-His (Tos), Boc-Ser (OBzl), Boc-Gly) をジシクロヘキシルカルボキシジイミド法により縮合させ, HF 法により樹脂および保護基を除去し, 粗ペプチドを得た。粗ペプチドをそれぞれ 0.05 M 酢酸で緩衝化した Sephadex G-15 カラム (4.5×64 cm) で溶出し, 低分子成分を除去後凍結乾燥品として, His-Lys (アミノ酸組成; His (1.00), Lys (0.99)). アミノ酸配列; $\overrightarrow{\text{His-Lys}}$, Ser-His-Lys (アミノ酸組成, Ser (0.87), His (1.00), Lys (1.11)). アミノ酸配列; $\overrightarrow{\text{Ser-His-Lys}}$ および Gly-Ser (アミノ酸組成; Gly (1.00), Ser (0.92)) を得た。粗 Gly-Ser-His-Lys および粗 Gly-His-Lys は Sephadex G-15 カラムで低分子成分を除去後 Amberlite CG-120 カラム (type III, Na⁺ 型, 1.8×155 cm) を用い, 0.8 N クエン酸 Na 緩衝液 (pH 7.0) で 55°C, 120 ml/h で溶出し, それぞれ 1023—1221 ml および 1353—1518 ml の溶出液を集め, Sephadex G-15 カラムで脱塩し, 凍結乾燥品として Gly-Ser-His-Lys (アミノ酸組成; Gly (1.00), Ser (0.99), His (1.06), Lys (1.11)). アミノ酸配列; $\overrightarrow{\text{Gly-Ser-His-Lys}}$, 元素分析値 Anal. Calcd Gly-Ser-His-Lys·CH₃COOH·H₂O (C₁₉H₃₅O₉N₇): C, 45.14; H, 6.98; N, 19.40. Found: C, 44.90; H, 6.93; N, 19.17) および Gly-His-Lys (アミノ酸組成; Gly (1.00), His (0.98), Lys (1.01)). アミノ酸配列; $\overrightarrow{\text{Gly-His-Lys}}$ を得た。このようにして得たペプチドはイオン交換樹脂; 日立カスタム #2611 カラム (0.9×40 cm), 溶媒; 0.8 N クエン酸 Na 緩衝液 (pH 7.5), 55°C, 60 ml/h, 検出; ニンヒドリン 30 ml/h を用いた液体クロマトグラフィー (日立液体クロマトグラフ 034) において Ser-His-Lys (溶出時間; 22.7 分), His-Lys (28.3 分), Gly-Ser-His-Lys (34.0 分) および Gly-His-Lys (44.7 分) とそれぞれ単一のピークを示すことを認めた。

抗潰瘍試験 体重 150—200 g の Wistar 系雄性ラットを 24 時間絶食後使用した。対照薬として硫酸アトロピン (和光純薬), シメチジン (Tagamet, 300 mg 錠, 300 mg/2 ml 注, SKF), ゲファルナート (ゲファニール, カプセル 50 mg, 注 1 ml 中 50 mg, 住友化学), セクレチン (セクレパン, 注 1 アンプル中 50 セクレチン単位, エーザイ) またはウロガストロン (ウガロン, カプセル 2.4 mg, 甘草末 44 mg 含有, 日本新薬) を用いた。検体は注射液を除き生理食塩水に溶解し, 酢酸又は HCl で pH 7.2—7.4 に調整した。検体は尾静脈内, 腹腔内, 皮下又は大腿筋に注射した。

i) 幽門結紮潰瘍—Shay ら⁶⁾の方法に準じエーテル麻酔下幽門部を結紮し, 幽門部を腹腔内に戻し縫合後直ちに検体を投与した。手術 18 時間後に断頭放血させ, 胃を摘出し 10% ホルマリンで固定後前胃部に生じた潰瘍

を Narumi ら⁷⁾の方法に従い次のように判定した。潰瘍係数 0; 正常, 1; うっ血, びらん又は点状出血, 2; 小潰瘍 (直径 2 mm 以下) 10 ケ以下, 3; 中潰瘍 (2—4 mm) 10 ケ以下又は小潰瘍 10 ケ以上, 4; 中潰瘍 10 ケ以上又は大潰瘍 (4 mm 以上), 5; 穿孔。胃液分泌について同様に手術 4 時間後に断頭放血させ、胃内に貯留した胃液を採取後その胃液量並びに pH を測定し、0.1 N NaOH を用いて pH 7.0 まで滴定し、酸度を算出した。

ii) 拘束水浸ストレス潰瘍——Takagi ら⁸⁾の方法を改変し検体を投与し、直ちに拘束水浸ストレスを負荷した。すなわち金鉗拘束ケージに拘束後、25°C の水槽内に胸骨剣状突起の深さまで浸し、4 時間後に断頭放血させ胃を摘出した。摘出胃を i) と同様にして固定後胃粘膜に発生した潰瘍の長さを計測し、その総和を潰瘍係数とした。またストレス負荷後断頭採血し、3000 r.p.m., 10 分、4°C にて遠心分離して血清を得、-20°C 以下で保存した。保存血清中のガストリンを定量するためデキストラン炭末法によるラジオイムノアッセイを大塚アッセイ研究所に依頼した。同様に、23°C、22 時間のストレス負荷を行い、検体を負荷直前および負荷開始から 11 時間目に投与し抗潰瘍活性を調べるとともに胃体部粘膜およびストローマ (粘膜下組織、筋層および漿膜を含む) 中のヘキサミン、シアル酸およびウロン酸含量を既報⁹⁾に従い測定した。更に 22 時間ストレス負荷ラットにつき負荷終了時における胃粘膜血流量を水素クリアランス式組織血流計 (ユニークメディカル、PHG-201) を用いて測定した。すなわち負荷終了直後にペントバルビタール Na 40 mg/kg, i.p. 麻酔下白金ワイヤー電極を胃体部に漿膜側より刺入し、不関電極を腹部皮下に固定した。水素ガスを 0.1 l/min, 30 秒間吸入させ、得られたクリアランスカーブをもとに Kety の理論式¹⁰⁾より実測血流量を算出した。なお同一ラットにつき 3 ケ所の血流量を測定し、その平均値をもって血流量とした。

iii) アスピリン潰瘍——Brodie ら¹¹⁾の方法に準じ、検体を投与後直ちにアスピリン (三井東圧化学) 200 mg/kg を経口投与し、4 時間後に断頭放血させ胃を摘出した。摘出胃は i) と同様にホルマリン固定し、胃粘膜に発生した潰瘍の面積を計測し、その総和を潰瘍係数とした。

iv) ヒスタミン潰瘍——Büchner ら¹²⁾の方法に準じ、検体を投与後直ちに、ヒスタミン・2HCl (和光純薬) 300 mg/kg を腹腔内に投与し、4 時間後に断頭放血させ胃を摘出した。摘出胃は i) と同様にホルマリン固定し、胃粘膜に発生した潰瘍の面積を計測し、その総和を潰瘍係数とした。

v) コーチゾン潰瘍——Robert ら¹³⁾の方法に準じ、コーチゾンアセテート (和光純薬) 20 mg/kg を皮下に 1 日 1 回 4 日間連続投与し、5 日目に断頭放血させ胃を摘出した。検体はコーチゾンと同時に 1 日 1 回投与した。摘出胃は i) と同様にホルマリン固定し、胃粘膜に発生した潰瘍の面積を計測し、その総和を潰瘍係数とした。

vi) システアミン十二指腸潰瘍——Robert ら¹³⁾の方法に準じ、検体を投与後直ちにシステアミン・HCl (半井化学) 400 mg/kg を皮下に投与し、18 時間後に断頭放血させ十二指腸を摘出した。摘出十二指腸を i) と同様にホルマリン固定後発生した潰瘍の面積を計測し、その総和を潰瘍係数とした。

vii) 酢酸潰瘍——Takagi ら¹⁴⁾の方法を改変し、エーテル麻酔下開腹胃を露出させ、胃体漿膜下に 30% 酢酸溶液をラット 1 匹あたり 0.025 ml 又は 10% 酢酸溶液 0.05 ml を注入し、胃は腹腔内に戻し腹部を縫合後 10 日間検体を連日投与し、11 日目に断頭放血させ胃を摘出し、i) と同様にホルマリン固定後胃粘膜における円型潰瘍の面積を求め潰瘍係数とした。またホルマリン固定後の酢酸潰瘍粘膜標本を用い、潰瘍部中心のパラフィン切片 (厚さ 5 μ m) を常法に従い作成した。染色法はヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色, Van Gieson 染色, pH 2.5 アルシアンブルー染色および Cason 染色を行い組織学的観察に供した。この潰瘍部組織標本は梅原ら¹⁵⁾の方法に従い、潰瘍部の距離である粘膜欠損長 (a), 潰瘍面長 (b), 再生粘膜長 (c) および粘膜筋板欠損長 (d) について接眼マイクロメーターを用いて実体顕微鏡下で計測した。これらの数値から治癒指数 (A) 並びに粘膜再生指数 (B) を算出した。次に潰瘍底の膠原線維発育度は 6 段階 (発育度点数 0, 20, 40, 60, 80 および 100) の評価基準とし、潰瘍底膠原線維発育度 (C) を求めた。(C) を求めるための発育度点数の評価内容は次のように定めた。すなわち 0; 線維芽細胞が認められるが膠原線維は認められないもの, 20; 膠原線維が一視野に数個認められるもの, 40; 膠原線維が一視野の約 1/3 を占めるもの, 60; 膠原線維が一視野の約 1/2 を占めるもの, 80; 多数の膠原線維が潰瘍底に網状を呈するものおよび 100; 太い膠原線維が無数に走り、線維芽細胞が全く認められないものとした。なお、膠原線維の発育が 20 と 40 の間並びに 40 と 60 の間であると思われるものが観察された場合、それぞれの指数を 30, 50 とした。以上の方法により求めた各潰瘍指数の平均値 [(A)+(B)+(C)]/3 を総合治癒指数 (D) とし、検体の総合判定規準とした。

有意差検定 Student t-test を適用した.

実 験 結 果

抗潰瘍活性ペプチドの調製

ワクシニアウイルス感染組織より得た抗潰瘍活性蛋白質 Fr. I を BrCN 分解し、活性成分を検索した。活性検定は各画分につき同一投与量 (5.0 mg/kg, *i.p.*) で幽門結紮潰瘍試験を行い、有意な抑制活性を示す画分の精製を進めた。その結果 Table I に示すごとく、Sephadex G-75 カラムによる分画では最も小さな画分の Fr. I-1 にのみ幽門結紮潰瘍に対する有意な抑制活性がみられ、Fr. I-2—4 には抑制活性はみられず、特に高分子性画分である Fr. I-3—4 の抑制率は 0 であった。Fr. I-1 を精製して得た Fr. I-1-1 は 5.0 mg/kg, *i.p.* で 42% の有意な抑制活性を示すことを認めた。なお、Fr. I-1-1 は Fr. I に比べ活性の上昇がみられなかったが、BrCN 分解により得られた Fr. I-2—4 および Fr. I-1-2 に活性がみられないこと、更に Fr. I-1 が Sephadex G-50 カラムで一本のピーク (Fr. I-1-1) を示したことから、Fr. I-1-1 より強い活性を示す画分はなく、従って Fr. I-1-1 が Fr. I の活性成分と考えられた。このものの物理化学的性質を Table II に示すが、Fr. I-1-1 はディスク電気

TABLE I. Effects of Fractions Obtained by Cyanogen Bromide-Cleavage of Fr. I on Shay Ulcers in Rats

Sample ^{a)}	Dose (mg/kg, <i>i.p.</i>)	No. of rats	Ulcer index (mean±S.E.)	Inhibition (%)
Control	—	6	4.2±0.3	—
Fr. I	5.0	6	2.4±0.4**	43
Fr. I-1	5.0	6	2.8±0.4*	33
Fr. I-2	5.0	6	3.7±0.5	12
Fr. I-3	5.0	6	4.2±0.4	0
Fr. I-4	5.0	6	4.5±0.3	0
Control	—	10	4.3±0.3	—
Fr. I-1-1	2.5	10	3.5±0.5	19
Fr. I-1-1	5.0	10	2.5±0.4**	42
Fr. I-1-2	5.0	6	4.2±0.4	2

a) Sample or saline (3.0 ml/kg) as control was given immediately after pylorus ligation (18 h).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$: versus control.

TABLE II. Physico-Chemical Properties of Fr. I-1-1

Electrophoretic mobility	$M_{BPP}^a) = 0.62$ (12.5% polyacrylamide gel disc electrophoresis, 2 mA/tube, pH 8.9, 90 min) $M_{BPP}^a) = 0.72$ (15% polyacrylamide gel-0.1% SDS with and without 2-mercaptoethanol, 5 mA/tube, 5 h)
Molecular weight	10000 (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, marker; Fr. AA-1 (molecular weight, 9100), cytochrome c (12400), myoglobin (17800))
Amino acid composition	Asp (9.5 residues per 10000 g), Thr (3.3), Ser (3.2), Glu (10.8), Pro (3.4), Gly (4.1), Ala (9.3), Cys/2 (1.9), Val (5.4), Ile (2.1), Leu (11.0), Tyr (4.2), Phe (3.4), His (4.6), Lys (9.9), Arg (3.2), Hse, Met and Trp (less than 0.2) (6 N HCl, 110°C, 24 h or 2.5 N NaOH, 110°C, 20 h)
NH ₂ -Terminal amino acid sequence	$\overrightarrow{\text{Gly-Ser-His-Lys}}$ - (dansyl-Edman degradation)
COOH-Terminal amino acid	$\overleftarrow{\text{Leu}}$ (carboxypeptidase A and B digestion)

a) Relative mobility versus BPP.

泳動および SDS 電気泳動において、いずれも単一の挙動を示し、サブユニット構造を示さなかった。分子量は 10000 で 16 種類のアミノ酸からなり、構成アミノ酸の中では Leu, Glu, Lys, Asp および Ala が多く、Fr. I に存在した Trp および BrCN 分解により Met から生ずる Hse は検出されず、従って Fr. I-1-1 は Fr. I 分子中の C 末端側に位置するものと考えられる。N 末端側のアミノ酸配列は Gly-Ser-His-Lys- で C 末端アミノ酸は -Leu であった。

Fr. I-1-1 よりさらに低分子成分に活性成分を期待し、アミノ酸配列が決定された N 末端側テトラペプチド Gly-Ser-His-Lys (以下, GSHL と略す) を合成し、幽門結紮潰瘍に対する作用を検定した。その結果 Table III に示すごとく、GSHL は 1.0 mg/kg, *i.p.* 又は *i.v.* で有意な抑制作用を示すことを認めた。更に GSHL の断片ペプチド又は構造類似のペプチドについて GSHL と同一投与量で作用をみたが、いずれも活性は認められなかった。

GSHL の抗潰瘍活性

GSHL の種々の実験的潰瘍モデルにおける作用を幽門結紮潰瘍における有効量 1.0 mg/kg, *i.v.* を基本投与量

TABLE III. Effects of GSHL and Its Derivatives on Shay Ulcers in Rats

Sample ^{a)}	Dose (mg/kg)	Route	No. of rats	Ulcer index (mean±S.E.)	Inhibition (%)
Control	—	<i>i.p.</i>	10	4.1±0.3	—
GSHL	1.0	<i>i.p.</i>	10	2.5±0.4**	39
Control	—	<i>i.v.</i>	8	4.6±0.2	—
GSHL	1.0	<i>i.v.</i>	8	3.3±0.5*	28
Control	—	<i>i.p.</i>	6	4.0±0.4	—
Gly-His-Lys	1.0	<i>i.p.</i>	6	3.2±0.5	20
Ser-His-Lys	1.0	<i>i.p.</i>	6	4.0±0.3	0
His-Lys	1.0	<i>i.p.</i>	6	3.5±0.6	13
Gly-Ser	1.0	<i>i.p.</i>	6	4.0±0.4	0

a) Sample or saline (3.0 ml/kg, *i.p.*, 2.5 ml/kg, *i.v.*) as control was given immediately after pylorus ligation (18 h).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$: versus control.

TABLE IV. Effect of GSHL, Cimetidine or Atropine on Stress-Induced Ulcers in Rats

Sample	Dose (mg/kg)	Route	No. of rats	Ulcer index (mm, mean±S.E.)	Inhibition (%)
Stress-I ^{a)}					
Control	—	<i>i.v.</i>	21	13.6± 1.6	—
GSHL	1.0	<i>i.v.</i>	7	10.7± 2.2	21
GSHL	2.5	<i>i.v.</i>	7	8.1± 1.7	40
GSHL	5.0	<i>i.v.</i>	7	6.2± 0.9*	54
Cimetidine	25	<i>i.v.</i>	7	10.4± 2.1	24
Cimetidine	50	<i>i.v.</i>	7	3.6± 0.9**	74
Atropine	0.25	<i>i.v.</i>	7	10.4± 1.0	24
Atropine	0.5	<i>i.v.</i>	7	5.0± 1.2**	63
Stress-II ^{b)}					
Control	—	<i>i.p.</i>	10	102.7± 3.3	—
GSHL	1.0×2	<i>i.p.</i>	10	76.4± 4.2***	26
Fr. I-1-1-1	2.5×2	<i>i.p.</i>	10	72.3±10.5*	30

a) Stress-I; Sample or saline (2.5 ml/kg) as control was given once immediately before restraint plus water immersion at 25°C for 4 h.

b) Stress-II; Sample or saline (3.0 ml/kg) as control was given twice immediately before and 11 h after restraint plus water immersion at 23°C for 22 h.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$: versus control.

とし、投与量を増減 (0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10 mg/kg, *i.v.*) することにより有意な抑制作用を示す最小有効量を求め、対照薬と比較した。

ストレス潰瘍 Table IV に示すごとく、25°C, 4 時間の緩和なストレス条件では対照群の潰瘍係数は 13.6 ± 1.6 mm であったが、GSHL は 1.0—2.5 mg/kg, *i.v.* 1 回投与で抑制傾向を示し、5.0 mg/kg, *i.v.* では 54% の有意な抑制作用が認められた。シメチジン 50 mg/kg, *i.v.* およびアトロピン 0.5 mg/kg, *i.v.* も有意な抑制作用を示した。GSHL の抑制作用は最小有効量で比較するとシメチジンより 10 倍強く、アトロピンの 1/10 であった。23°C, 22 時間の強いストレス条件下では対照群の潰瘍係数は 102.7 ± 3.3 mm であったが、GSHL は 1.0 mg/kg, *i.p.* をストレス負荷直前およびストレス開始 11 時間後の 2 回投与することにより、26% の有意な抑制作用を示した。Fr. I-1-1-1 2.5 mg/kg $\times$ 2, *i.p.* も 30% の有意な抗潰瘍作用を示した。

アスピリン潰瘍 Table V に示すごとく、対照群における潰瘍係数は 49.6 ± 6.4 mm² であった。これに対し、アスピリン投与直前に GSHL を *i.v.* 投与したところ、5.0 mg/kg, *i.v.* において 50% の有意な予防効果を示した。10 mg/kg, *i.v.* では 55% の有意な予防効果であった。シメチジン 50 mg/kg, *i.v.* 並びにアトロピン 0.5—1.0 mg/kg, *i.v.* において、それぞれ 57%, 48—79% の予防効果を示した。最小有効量で比較すると GSHL の抑制作用はシメチジンより 10 倍強く、アトロピンの 1/10 であった。

ヒスタミン潰瘍 Table VI に示すごとく、対照群における潰瘍係数は 29.2 ± 3.5 mm² であった。これに対しヒスタミンの投与直前に GSHL を *i.v.* 投与したところ、5.0—10 mg/kg, *i.v.* において 49—65% の有意な予防効果を示した。シメチジンは 25 mg/kg, *i.v.* で 62% の予防効果を示し、アトロピン 0.5 mg/kg, *i.v.* では 67%

TABLE V. Effect of GSHL, Cimetidine or Atropine on Aspirin-Induced Ulcers in Rats

Sample ^{a)}	Dose (mg/kg, <i>i.v.</i>)	No. of rats	Ulcer index (mm ² , mean $\pm$ S.E.)	Inhibition (%)
Control	—	18	49.6 ± 6.4	—
GSHL	1.0	8	32.7 ± 7.8	34
GSHL	2.5	7	28.9 ± 6.7	42
GSHL	5.0	14	$24.8 \pm 4.2^{**}$	50
GSHL	10	14	$22.1 \pm 2.3^{**}$	55
Cimetidine	25	7	32.3 ± 5.2	35
Cimetidine	50	7	$21.5 \pm 9.8^*$	57
Atropine	0.25	7	37.8 ± 7.4	24
Atropine	0.5	7	$26.0 \pm 7.0^*$	48
Atropine	1.0	8	$10.6 \pm 6.6^{**}$	79

a) Sample or saline (2.5 ml/kg) as control was given immediately before administration of aspirin (200 mg/kg, *p.o.*), and ulcer formation was measured 4 h later.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$: versus control.

TABLE VI. Effect of GSHL, Cimetidine or Atropine on Histamine-Induced Ulcers in Rats

Sample ^{a)}	Dose (mg/kg, <i>i.v.</i>)	No. of rats	Ulcer index (mm ² , mean $\pm$ S.E.)	Inhibition (%)
Control	—	13	29.2 ± 3.5	—
GSHL	1.0	8	22.9 ± 10.7	22
GSHL	2.5	8	17.6 ± 9.2	40
GSHL	5.0	8	$14.9 \pm 5.1^*$	49
GSHL	10	8	$10.1 \pm 6.6^*$	65
Cimetidine	12.5	8	17.5 ± 6.3	40
Cimetidine	25	8	$11.2 \pm 6.5^*$	62
Atropine	0.25	8	18.9 ± 4.9	35
Atropine	0.5	7	$9.7 \pm 5.7^*$	67

a) Sample or saline (2.5 ml/kg) as control was given immediately before administration of histamine $\cdot$ 2HCl (300 mg/kg, *i.p.*), and ulcer formation was measured 4 h later.

* $p < 0.05$: versus control.

の効果を示した最小有効量で比較すると GSHL の抑制作用はシメチジンより 5 倍強く、アトロピンの 1/10 であった。

コーチゾン潰瘍 Table VII に示すごとく、対照群の潰瘍係数は $54.2 \pm 7.5 \text{ mm}^2$ であった。これに対し、コーチゾン処理と同時に GSHL を 4 日間投与したところ $2.5\text{--}10 \text{ mg/kg/d, i.v.}$ において 55—69% の有意な予防効果を示した。シメチジン 50 mg/kg/d, i.v. 並びにアトロピン $0.25 \text{ mg/kg/d, i.v.}$ において、それぞれ 81%, 51% の予防効果であった。最小有効量で比較すると GSHL の抑制作用はシメチジンより 20 倍強くアトロピンの 1/10 であった。

システアミン十二指腸潰瘍 Table VIII に示すごとく、対照群において十二指腸に発生した円型潰瘍の潰瘍係数は $17.2 \pm 2.8 \text{ mm}^2$ であった。これに対し、システアミン投与直前に GSHL を $i.v.$ 投与したところ 10 mg/kg, i.v. において 66% の有意な予防効果を示した。シメチジン 50 mg/kg, i.v. 並びにアトロピン 1.0 mg/kg, i.v. ではそれぞれ 94%, 84% の予防効果であった。最小有効量で比較すると GSHL の抑制作用はシメチジンより 5 倍強く、アトロピンの約 1/10 であった。

酢酸潰瘍 Table IX に示すごとく、30% 酢酸を注入した場合対照群における潰瘍係数は $22.1 \pm 2.7 \text{ mm}^2$ であった。これに対し、手術後に GSHL を 1 日 1 回 10 日間連続投与したところ、 $1.0\text{--}2.5 \text{ mg/kg/d, i.v.}$ において 56—76% の有意な治癒効果を示した。ゲファルナート $100\text{--}250 \text{ mg/kg/d, i.m.}$ 並びにセクレチン 100 U/kg/d, i.m. ではそれぞれ 40—52%, 39% の治癒効果であった。最小有効量で比較すると投与経路の相異はあるが

TABLE VII. Effect of GSHL, Cimetidine or Atropine on Cortisone-Induced Ulcers in Rats

Sample ^{a)}	Dose (mg/kg/d, <i>i.v.</i>)	No. of rats	Ulcer index (mm ² , mean $\pm$ S.E.)	Inhibition (%)
Control	—	10	54.2 ± 7.5	—
GSHL	1.0	7	32.7 ± 9.3	40
GSHL	2.5	6	$24.2 \pm 5.1^*$	55
GSHL	5.0	7	$23.2 \pm 8.6^*$	57
GSHL	10	7	$16.6 \pm 5.3^{**}$	69
Cimetidine	25	7	30.4 ± 8.4	44
Cimetidine	50	9	$10.2 \pm 3.8^{***}$	81
Atropine	0.125	5	32.6 ± 9.5	40
Atropine	0.25	5	$26.8 \pm 8.4^*$	51

a) Sample or saline (2.5 ml/kg) as control was given once daily during treatment of cortisone acetate (20 mg/kg/d, *s.c.* for 4 d) and in the following day.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; versus control.

TABLE VIII. Effect of GSHL, Cimetidine or Atropine on Cysteamine-Induced Duodenal Ulcers in Rats

Sample ^{a)}	Dose (mg/kg, <i>i.v.</i>)	No. of rats	Ulcer index (mm ² , mean $\pm$ S.E.)	Inhibition (%)
Control	—	10	17.2 ± 2.8	—
GSHL	1.0	8	10.1 ± 2.2	41
GSHL	2.5	8	8.8 ± 3.7	49
GSHL	5.0	8	8.5 ± 4.1	51
GSHL	10	8	$5.8 \pm 2.2^{**}$	66
Cimetidine	25	8	9.3 ± 4.2	46
Cimetidine	50	8	$1.0 \pm 0.9^{***}$	94
Atropine	0.25	8	10.8 ± 3.4	37
Atropine	1.0	8	$2.7 \pm 1.2^{***}$	84

a) Sample or saline (2.5 ml/kg) as control was given immediately before administration of cysteamine·HCl (400 mg/kg, *s.c.*), and ulcer formation was measured 18 h later.

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; versus control.

TABLE IX. Effect of GSHL, Gefarnate or Secretin on Acetic Acid-Induced Ulcers in Rats

Sample	Dose (mg/kg/d)	Route	No. of rats	Ulcer index (mm ² , mean±S.E.)	Inhibition %
Experiment-I ^{a)}					
Control	—	<i>i.v.</i>	17	22.1±2.7	—
GSHL	0.5	<i>i.v.</i>	10	19.8±2.6	10
GSHL	1.0	<i>i.v.</i>	10	9.7±1.6**	56
GSHL	2.5	<i>i.v.</i>	11	5.2±1.7***	76
Gefarnate	100	<i>i.m.</i>	13	13.3±1.3*	40
Gefarnate	250	<i>i.m.</i>	13	10.7±1.9**	52
Secretin	50 ^{c)}	<i>i.m.</i>	12	17.7±2.4	20
Secretin	100 ^{c)}	<i>i.m.</i>	13	13.4±1.3*	39
Experiment-II ^{b)}					
Control	—	<i>i.p.</i>	10	36.2±4.7	—
GSHL	0.25×2	<i>i.p.</i>	10	19.0±4.2*	48
Fr. I-1-1-1	1.25×2	<i>i.p.</i>	10	20.6±3.8*	43

a) Experiment-I; Sample or saline (2.5 ml/kg) as control was given once daily for 10 d after injection of 30% acetic acid (0.025 ml/rat) into gastric serosa.

b) Experiment-II; Sample or saline (3.0 ml/kg) as control was given twice daily for 10 d after injection of 10% acetic acid (0.05 ml/rat) into gastric serosa.

c) Unit/kg.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; versus control.

TABLE X. Effect of GSHL or Gefarnate on Distance of Ulcerated Area in Histological Preparation of Acetic Acid-Induced Ulcers in Rats

Sample ^{a)}	Dose (mg/kg/d)	Route	No. of rats	Distance (mm, mean±S.E.) ^{b)}			
				<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>
Control	—	<i>i.v.</i>	17	3.0±0.2	3.0±0.2	1.8±0.1	5.2±0.2
GSHL	0.5	<i>i.v.</i>	6	1.7±0.3*	1.7±0.3*	2.1±0.1	4.0±0.3*
GSHL	1.0	<i>i.v.</i>	12	1.8±0.2***	1.8±0.2***	1.9±0.1	3.8±0.2***
GSHL	2.5	<i>i.v.</i>	10	1.8±0.3**	1.7±0.2**	1.7±0.2	3.7±0.5**
Gefarnate	100	<i>i.m.</i>	12	2.2±0.3*	2.3±0.3	2.1±0.1	4.3±0.3*
Gefarnate	250	<i>i.m.</i>	12	2.6±0.2	2.7±0.3	1.6±0.1	4.7±0.3

a) Sample or saline (2.5 ml/kg) as control was given once daily after injection of 30% acetic acid (0.025 ml/rat) into gastric serosa.

b) Distance *a*; apparent defect of mucosa, *b*; true defect of mucosa (base of ulcer), *c*; regeneration of mucosal layer, *d*; rupture of muscularis mucosae.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; versus control.

TABLE XI. Effect of GSHL or Gefarnate on Healing of Acetic Acid-Induced Ulcers in Rats

Sample ^{a)}	Dose (mg/kg/d)	Route	No. of rats	Healing (mean±S.E.) ^{b)}			
				<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>
Control	—	<i>i.v.</i>	17	43.0±2.3	38.5±2.0	38.8±1.5	40.1±1.4
GSHL	0.5	<i>i.v.</i>	6	58.9±6.9*	57.6±5.7**	41.7±4.0	52.4±4.1**
GSHL	1.0	<i>i.v.</i>	12	52.9±2.9*	50.7±3.3**	40.8±2.9	48.2±2.4**
GSHL	2.5	<i>i.v.</i>	10	55.4±4.3*	52.1±3.7**	45.0±4.0	50.9±3.2***
Gefarnate	100	<i>i.m.</i>	12	47.6±3.2	49.3±3.5*	43.3±2.2	46.8±2.0**
Gefarnate	250	<i>i.m.</i>	12	44.0±3.0	38.2±2.2	36.7±1.9	39.6±1.6

a) Sample or saline (2.5 ml/kg) as control was given once daily after injection of 30% acetic acid (0.025 ml/rat) into gastric serosa.

b) *A*; healing index = $(1-b/d) \times 100$, *B*; mucosal regeneration index = $[c/(b+c)] \times 100$, *C*; collagen fiber proliferation index, scored depending on proliferation degree as follows: 0, 20, 40, 60, 80 and 100, *D*; general healing index = $(A+B+C)/3$. See Table X for distance *a*, *b*, *c* and *d*.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; versus control.

GSHL の治癒効果はゲファルナートの約 100 倍強いと推定された。10% 酢酸 0.05 ml を注入した場合、対照群における潰瘍係数は $36.2 \pm 4.7 \text{ mm}^2$ であったが、これに対し、手術後に GSHL 0.25 mg/kg, *i.p.* を 1 日 2 回 10 日間連続投与したところ、48% の有意な治癒効果を示した。Fr. I-1-1-1 1.25 mg/kg $\times$ 2/d, *i.p.* も 43% の効果を示した。

30% 酢酸を 0.025 ml 注入し、検体を 1 日 1 回 10 日間連続投与した後組織標本を作成し、潰瘍の各距離並びに指数による判定を行った。Table X に示すごとく、粘膜欠損長 (a)、潰瘍面長 (b) および粘膜筋板欠損長 (d) の計測値において GSHL は 0.5—2.5 mg/kg/d, *i.v.* 投与で有意な減少が認められた。ゲファルナート 100 mg/kg/d, *i.m.* においては粘膜欠損長 (a) 並びに粘膜筋板欠損長 (d) で有意な減少が認められた。

これらの実測値より指数を求め Table XI に示した。Table XI より治癒指数 (A) において GSHL は 0.5—2.5 mg/kg/d, *i.v.* で有意な増加がみられた。粘膜再生指数 (B) において GSHL は 0.5—2.5 mg/kg/d, *i.v.* 並びにゲファルナートは 100 mg/kg/d, *i.m.* で有意な増加が認められた。膠原線維発育指数 (C) では GSHL 2.5 mg/

TABLE XII. Effect of GSHL, Cimetidine or Urogastron on Serum Gastrin Level in Rats under Stress

Sample	Dose (mg/kg)	Route	No. of rats	Serum gastrin level (pg/ml, mean $\pm$ S.E.)	Change (%) ^{b)}
Non-stress Control	—	<i>i.v.</i>	24	33.8 ± 3.2	—
Stress ^{a)} Control	—	<i>i.v.</i>	24	211.5 ± 20.2	—
GSHL	0.5	<i>i.v.</i>	16	$119.6 \pm 16.5^{**}$	43
GSHL	2.5	<i>i.v.</i>	15	$92.3 \pm 8.7^{***}$	56
GSHL	10	<i>i.v.</i>	17	$114.2 \pm 9.5^{***}$	46
Cimetidine	50	<i>i.v.</i>	10	$63.6 \pm 6.9^{***}$	70
Urogastron	0.1	<i>i.p.</i>	10	$75.2 \pm 9.2^{***}$	64

a) Sample or saline (2.5 ml/kg) as control was given immediately before restraint plus water immersion at 25°C for 4 h.

b) From stress-control.

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$: versus stress-control.

TABLE XIII. Effect of GSHL, Cimetidine or Atropine on Gastric Secretion in Pylorus-Ligated Rats

Sample ^{a)}	Dose (mg/kg, <i>i.v.</i>)	No. of rats	Gastric secretion (mean $\pm$ S.E.)			
			Volume (ml/rat)	pH	Acidity (meq/l)	Acid output (meq)
Control	—	22	4.09 ± 0.21	1.09 ± 0.02	84.5 ± 2.2	0.349 ± 0.023
GSHL	0.5	8	3.64 ± 0.33	1.17 ± 0.06	77.2 ± 3.0	0.284 ± 0.036
GSHL	1.0	8	$2.33 \pm 0.45^{***}$	$2.07 \pm 0.39^{***}$	$69.4 \pm 7.4^*$	$0.175 \pm 0.046^{***}$
GSHL	2.5	8	$3.26 \pm 0.23^*$	$1.24 \pm 0.05^{**}$	$71.7 \pm 2.6^{**}$	$0.232 \pm 0.015^{**}$
GSHL	5.0	8	$2.76 \pm 0.24^{**}$	$1.69 \pm 0.24^{***}$	$68.1 \pm 5.7^{**}$	$0.187 \pm 0.021^{***}$
GSHL	10	13	$2.78 \pm 0.51^*$	$1.50 \pm 0.15^{**}$	$67.7 \pm 6.0^{**}$	$0.205 \pm 0.055^{**}$
Cimetidine	25	8	3.92 ± 0.52	$1.63 \pm 0.38^*$	$69.6 \pm 8.4^*$	0.264 ± 0.043
Cimetidine	50	8	$2.78 \pm 0.51^{**}$	$2.12 \pm 0.74^*$	$67.6 \pm 11.7^*$	$0.204 \pm 0.047^{**}$
Cimetidine	100	6	$2.10 \pm 0.43^{***}$	$1.71 \pm 0.30^{**}$	$44.0 \pm 3.3^{***}$	$0.088 \pm 0.016^{***}$
Atropine	0.125	6	$2.06 \pm 0.29^{***}$	$1.25 \pm 0.05^{**}$	$71.6 \pm 8.3^*$	$0.153 \pm 0.037^{***}$
Atropine	0.25	10	$1.37 \pm 0.33^{***}$	$1.88 \pm 0.20^{***}$	$62.2 \pm 3.7^{***}$	$0.088 \pm 0.020^{***}$
Atropine	0.5	8	$1.76 \pm 0.37^{***}$	$3.69 \pm 0.66^{***}$	$43.9 \pm 9.4^{***}$	$0.081 \pm 0.026^{***}$
Atropine	1.0	5	$1.34 \pm 0.47^{**}$	$4.96 \pm 0.84^{***}$	$16.5 \pm 9.6^{***}$	$0.021 \pm 0.011^{***}$

a) Sample or saline (2.5 ml/kg) as control was given immediately after pylorus ligation (4 h).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$: versus control.

TABLE XIV. Effect of GSHL on Hexosamine, Sialic Acid and Uronic Acid Contents in Mucosa and Stroma of Glandular Portion in Rats under Stress

Sample ^{a)}	Glandular portion	No. of rats	Hexosamine ^{b)} (μ g glucosamine hydrochloride)	Sialic acid ^{b)} (μ g <i>N</i> -acetyl neuramic acid)	Uronic acid ^{b)} (μ g glucuronic acid)
Control	Mucosa	13	290 $\pm$ 33	31.4 $\pm$ 1.5	30.8 $\pm$ 1.7
	Stroma	5	145 $\pm$ 3	33.1 $\pm$ 1.1	26.0 $\pm$ 2.7
GSHL	Mucosa	13	605 $\pm$ 58***	28.5 $\pm$ 1.6	32.3 $\pm$ 3.8
	Stroma	5	202 $\pm$ 11**	41.5 $\pm$ 3.4*	29.1 $\pm$ 3.4

a) Sample (5.0 mg/kg $\times$ 2, *i.p.*) or saline (3.0 ml/kg $\times$ 2, *i.p.*) as control was given twice immediately before and 11 h after restraint plus water immersion at 23°C for 22 h.

b) Data are mean $\pm$ S.E. of the values per 100 mg of wet tissue.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$: versus control.

TABLE XV. Effect of GSHL on Gastric Mucosal Blood Flow in Rats under Stress

Sample	No. of rats	Gastric mucosal blood flow (ml/min/100 g, mean $\pm$ S.E.)	Change (%) ^{b)}
Non-stress			
Control	6	64.4 $\pm$ 3.6	—
Stress ^{a)}			
Control	6	21.4 $\pm$ 1.2	—
GSHL	6	28.8 $\pm$ 1.6**	35

a) Sample (1.0 mg/kg $\times$ 2, *i.p.*) or saline (3.0 ml/kg $\times$ 2, *i.p.*) as control was given twice immediately before and 11 h after restraint plus water immersion at 23°C for 22 h.

b) From stress-control.

** $p < 0.01$: versus stress-control.

kg/d, *i.v.* 並びにゲファルナート 100 mg/kg/d, *i.m.* において増加傾向がみられた。以上、指数 (A), (B) および (C) より求めた総合治癒指数 (D) では GSHL 0.5—2.5 mg/kg/d, *i.v.* 並びにゲファルナート 100 mg/kg/d, *i.m.* において有意な増加が認められた。

ストレス負荷時血清ガストリン値 Table XII に示すごとく、未処置ラットの血清ガストリン値は 33.8 $\pm$ 3.2 pg/ml であった。しかし拘束水浸ストレスを負荷したラットでは 211.5 $\pm$ 20.2 pg/ml と未処置ラットの 6 倍以上の上昇が認められた。これに対し拘束水浸負荷直前に GSHL を *i.v.* 投与したところ、0.5 mg/kg, *i.v.* で 119.6 $\pm$ 16.5 pg/ml となり、ストレス対照群の値より 40% 以上の有意な抑制効果を示した。ところが 2.5—10 mg/kg, *i.v.* と増量しても 0.5 mg/kg, *i.v.* の効果と同等であった。シメチジン 50 mg/kg, *i.v.* 並びにウロガストロン 0.1 mg/kg, *i.p.* では 60% 以上の抑制効果を示した。

胃液分泌 Table XIII に示すごとく、幽門結紮による胃液量, pH, 胃酸濃度および胃酸量は対照群においてそれぞれ 4.09 $\pm$ 0.21 ml/rat, 1.09 $\pm$ 0.02, 84.5 $\pm$ 2.2 meq/l および 0.349 $\pm$ 0.023 meq であった。これに対し結紮直後に GSHL を *i.v.* 投与したところ、1.0 mg/kg, *i.v.* の用量から有意な抑制効果がみられたが、2.5—10 mg/kg, *i.v.* と増量を行っても 1.0 mg/kg *i.v.* とほぼ同等の効果であった。シメチジン 50—100 mg/kg, *i.v.* 並びにアトロピン 0.125—1.0 mg/kg, *i.v.* は著明な抑制効果を示した。

ストレス負荷時の胃体部粘膜中のヘキソサミン含量 Table XIV に示すごとく、拘束水浸ストレスを負荷したラット胃体部粘膜およびストローマ中のヘキソサミン含量はそれぞれ 290 $\pm$ 33 μ g/100 mg 組織および 145 $\pm$ 3 μ g/100 mg であったが、ストレス負荷直前および負荷後 11 時間目の 2 回 GSHL 5.0 mg/kg, *i.p.* を投与したラットではそれぞれ 605 $\pm$ 58 μ g/100 mg および 202 $\pm$ 11 μ g/100 mg と著明な増加が認められた。また、GSHL はストローマ中のシアル酸含量をも有意に増加したが、粘膜中のシアル酸、ウロン酸およびストローマ中のウロン酸含量には影響を示さなかった。

ストレス負荷時の胃体部粘膜血流量 Table XV に示すごとく、拘束水浸ストレスを負荷したラット胃体部

粘膜血流量はストレスを負荷しない正常ラットの約 1/3 に低下したが、ストレス負荷ラットに GSHL 1.0 mg/kg $\times$ 2, *i.p.* を投与することにより血流量が有意に増加することを認めた。

考 察

ワクシニアウイルス感染組織中の抗潰瘍蛋白質 Fr. I より低分子活性成分として GSHL を得た。このものは Fr. I の BrCN 分解により得られた活性ポリペプチド Fr. I-1-1-1 の N 末端側のアミノ酸配列からなるテトラペプチドであり、Fr. I-1-1-1 と同様に幽門結紮潰瘍、ストレス潰瘍および酢酸潰瘍に対して抑制作用を示すことから Fr. I 中の重要な活性発現部位と考えられる。また GSHL のアミノ酸配列はこれまで報告されているペプチドおよび蛋白質中にはみられず、新しいものであった。

GSHL の抗潰瘍作用について実験的急性潰瘍並びに慢性潰瘍に対する予防あるいは治癒効果を検討した。その結果、GSHL は急性潰瘍のストレス潰瘍、アスピリン潰瘍、ヒスタミン潰瘍、コーチゾン潰瘍およびシステアミン潰瘍において、2.5—10 mg/kg, *i.v.* の用量で有意な予防効果が認められた。一方、慢性潰瘍である酢酸潰瘍に対し GSHL 1.0—2.5 mg/kg/d, *i.v.* 投与によって有意な抑制効果を示した。このような GSHL の抗潰瘍作用を対照薬と有意な抑制効果を示す最小有効量で比較してみると、GSHL は急性潰瘍においてシメチジンの 5—20 倍の効果を示し、慢性潰瘍では投与経路の相異もあるので正確な比較にならないがゲファルナートの約 100 倍程度の効果を示した。

消化性潰瘍発生には胃粘膜関門、胃粘膜被ふく層、粘液物質、局所粘膜血流などの防御因子と胃液分泌などの攻撃因子のバランスが重要とされている。¹⁶⁾ 拘束水浸ストレスにおいては胃液分泌は増加し、さらに局所循環の変化が粘膜の虚血を招き、その持続によりライソゾーム酵素の遊離を促しムコ多糖の合成阻害や解重合を招いて粘膜の胃液に対する自己防御作用が消失することにより攻撃因子と防御因子のアンバランスを来たして、潰瘍が発生することが知られている。¹⁷⁾ GSHL はストレス負荷ラットにおいて低下した粘膜血流量および減少したムコ多糖体の主成分であるヘキソサミン含量を有意に増加するとともに上昇した血清中ガストリンレベルを有意に低下させ、防御および攻撃因子の両面からその抗潰瘍作用を発現したと考えられる。また、GSHL の抗胃液分泌作用は幽門結紮ラットにおいても認められた。GSHL がガストリンレベルおよび胃液分泌に対して用量を増加しても抑制効果の増強を示さないにもかかわらず、各種潰瘍モデルに対しては用量依存性の強い抑制効果を示し、GSHL の抗潰瘍作用機作にその粘膜保護作用が大きく寄与していることが強く示唆された。さらに酢酸潰瘍における治癒効果について病理組織学的に検討したところ、GSHL は粘膜欠損長、潰瘍面長および粘膜筋板欠損長を縮小し、治癒指数並びに粘膜再生指数を増加し、酢酸によって損傷を受けた粘膜に対し修復効果を示すことが病理組織学的にも証明された。

結 論

ワクシニアウイルス感染組織中の抗潰瘍活性蛋白質 Fr. I より低分子活性成分として Gly-Ser-His-Lys (GSHL) を得た。このものはラットにおける幽門結紮潰瘍に対して 1.0 mg/kg, *i.v.* 又は *i.p.* の投与により有意に潰瘍を抑制した。GSHL はラットにおける各種実験的消化性潰瘍に対しても有意な抑制作用を示し、効果を最小有効量 (mg/kg, *i.v.*) で示すとそれぞれ拘束水浸ストレス潰瘍; 5.0, アスピリン潰瘍; 5.0, ヒスタミン潰瘍; 5.0, コーチゾン潰瘍; 2.5/d, システアミン潰瘍; 10 および酢酸潰瘍; 1.0/d, であり、酢酸潰瘍を除きシメチジンの 5—20 倍の抑制効果を示した。GSHL は酢酸潰瘍において病理組織学的にも胃粘膜欠損長、潰瘍面長および粘膜筋板欠損長を縮小し、治癒指数並びに粘膜再生指数を増加し、損傷粘膜に対し修復作用を示した。GSHL は幽門結紮による胃液分泌亢進を抑制し、またストレス潰瘍時の上昇した血清中ガストリンレベルを約 1/2 に低下させるとともに低下した胃粘膜およびストローマ中ヘキソサミン含量を約 2 倍に上昇させ、さらに低下した胃粘膜血流量を有意に増加させることを認め、胃粘膜に対する保護作用と胃液分泌抑制作用が GSHL の主な抗潰瘍活性発現機作であることが強く示唆された。

引 用 文 献

- 1) 第 2 報: 青沼 繁, 小浜靖弘, 藤本成子, 米田雅子, 楠森雅子, 薬誌, 99, 889 (1979).

- 2) 青沼 繁, 小浜靖弘, 屋敷伸治, 陳 英俊, 江川 宏, 大西 昇, 薬誌, **96**, 1247 (1976).
- 3) 青沼 繁, 小浜靖弘, 中陳静男, 屋敷伸治, 江川 宏, 日本内分泌, **50**, 1468 (1974).
- 4) S. Aonuma, Y. Kohama, Y. Komiyama, S. Fujimoto, M. Nomura, *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 417 (1980).
- 5) S. Aonuma, Y. Kohama, T. Makino, I. Yoshitake, K. Hattori, K. Morikawa, Y. Watanabe, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 612 (1983).
- 6) H. Shay, S. A. Komarov, S. S. Fels, D. Meranze, M. Gruenstein, H. Siplet, *Gastroenterology*, **5**, 43 (1945).
- 7) S. Narumi, Y. Hirata, K. Gomaibashi, M. Kanno, *J. Takeda Res. Lab.*, **29**, 85 (1970).
- 8) K. Takagi, Y. Kasuya, K. Watanabe, *Chem. Pharm. Bull.*, **12**, 465 (1964).
- 9) T. Mimura, M. Iwai, T. Terada, I. Kohda, K. Tsujikawa, K. Maeda, S. Aonuma, *J. Pharm. Dyn.*, **6**, 449 (1983); T. Mimura, I. Kohda, K. Maeda, M. Iwai, Y. Sasaki, S. Aonuma, T. Momose, *ibid.*, **6**, 527 (1983); T. Bitter, H. M. Muir, *Anal. Biochem.*, **4**, 330 (1962).
- 10) S. S. Kety, C. F. Schmidt, *Am. J. Physiol.*, **143**, 53 (1945).
- 11) D. A. Brodie, B. J. Chase, *Gastroenterology*, **53**, 604 (1967).
- 12) F. Büchner, P. Siebert, P. J. Molloy, *Beit. Path. Anat.*, **81**, 391 (1928).
- 13) A. Robert, J. E. Nezamis, C. Lancaster, J. N. Bodalamenti, *Digestion*, **11**, 199 (1974).
- 14) K. Takagi, S. Okabe, R. Saziki, *Jpn. J. Pharmacol.*, **19**, 418 (1969).
- 15) 梅原千治, 田林忠綱, 治療, **47**, 89 (1965).
- 16) H. W. Davenport, *Gastroenterology*, **47**, 142 (1964); H. W. Davenport, *Mayo Clin. Proc.*, **50**, 507 (1975); S. Dai, C. W. Ogle, *Eur. J. Pharmacol.*, **30**, 86 (1975); 三宅健夫, 村上元庸, 酒井正彦, 森賀本幸, 最新医学, **37**, 442 (1982).
- 17) 川井啓市編, “消化管粘膜の防御機構,” 第1版, 医学図書出版, 東京, 1982, pp. 39—124.