胃腸ホルモンに関する研究 (第1報¹⁾) クジラ胃よりガストリン
およびガストロン様物質の分離

可部野久俊, 山本政久, 橘 圀臣, 小林泰明,^{2a)} 村田敏郎^{2b)}

日水製薬株式会社第一研究部,^{2a)} 静岡薬科大学^{2b)}

Studies on the Gastrointestinal Hormons. I.¹⁾ Isolation of Gastrin
and Gastrone-like Substance from Whale Stomach

HISATOSHI KABENO, MASAHISA YAMAMOTO, KUNIOMI TACHIBANA,

YASUAKI KOBAYASHI,^{2a)} and TOSHIRO MURATA^{2b)}

Research Laboratory, Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.,^{2a)}
and Shizuoka College of Pharmacy^{2b)}

(Received December 14, 1968)

Gastrin (I) and gastrone-like substance (II) were extracted from the mucosa of the third stomach of the finback whale (*Balaenoptera physalus* L.). I is dialyzable and negative to both Ninhydrin and biuret reactions, but positive to the chlorimino reaction.

II is non-dialyzable, negative to Ninhydrin reaction, and positive to both biuret and chlorimino reactions. II contained 6—7% of hexose and 8—9% of amino sugar, and was assumed to be a glycoprotein or some glycoproteins.

The gastric secretion was elicited by the intravenous administration of 0.5—10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of I in the Schild rats, and the same response was elicited by the subcutaneous administration of 10—100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of I in the Heidenhain pouch dogs.

The inhibition of gastric secretion was observed by the intravenous doses of more than 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of II in the Shay method using pylorus-ligated rats.

Edkins³⁾ によって発見された gastrin は Gregory⁴⁾ 等によってその構造が明らかにされたが、近年になりそのアミノ酸配列は動物の種によって異なることが明らかになった。一方, gastrone は Brunswick 等⁵⁾ によってヒトの胃液中に発見され、現在まで enterogastrone,⁶⁾ urogastrone,⁷⁾ sialogastrone⁸⁾ がそれぞれ小腸, 尿およびダ液より分離されている。

著者等は胃酸分泌促進ホルモンである gastrin が胃粘膜に存在している事実から、その生理的な作用を考えると、それを抑制するホルモン (chalon) の存在も想定し得るので、この両者を分離しその作用を確認する目的で次の研究を行なった。

1. 原 料

原料に用いたナガスクジラの胃は Fig. 1 に示すように、食道に続いて順次に第1室、第2室、第3室、第4室となり、小腸に連っている。ナガスクジラの胃が胃腸ホルモンを抽出する原料として有利な点は、ペプシンおよび塩酸を外分泌する第2室の胃底腺領域と、gastrin を内分泌するといわれている幽門腺領域 (第3室) が明らかに区別されているということである。著者等はナガスクジラの第3室胃粘膜を原料としてクジラ gastrin (I) とクジラガストロン様物質 (II) を分離抽出した。

1) 日本薬学会第88年会で発表、東京、1968年4月。

2) Location: a) 1134-1 Kitano-machi, Hachioji-shi; b) Oshika, Shizuoka.

3) J.S. Edkins, *Proc. Roy. Soc. (London)*, **76**, 376 (1905); *J. Physiol. (London)*, **34**, 133 (1906).

4) R.A. Gregory, H.J. Tracy, *Gut*, **5**, 103 (1964).

5) A. Brunswick, J.V. Prohaska, T.H. Clarke, E.V. Kanbel, *J. Clin. Invest.*, **18**, 415 (1939).

6) T. Kosaka, R.K. S. Lim, *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **27**, 890 (1930).

7) D.J. Sandweiss, H.C. Falzstein, A.A. Furbman, *Am. J. Digest. Dis.*, **5**, 24 (1938).

8) C.F. Code, *Gastroenterology*, **34**, 210 (1958).

Fig. 1. Anatomical Structure of Stomach

2. I と II の抽出

抽出法の概略を Chart 1 に示す。

3. I と II の化学的性状

I と II の化学的性状を Table I に示す。I はセロファン膜により透析され、ニンヒドリン反応、ビウレット反応は共に陰性であり、クロールイミノ反応⁹⁾は陽性であった。II は非透析性であり、ニンヒドリン反応は陰性であり、ビウレット反応、クロールイミノ反応はいずれも陽性であった。また、

borate buffer (pH 9.2) による電気泳動では I, II 共陽極側に移動し、それぞれ 4.48—4.80, 1.92—2.08 に単一の泳動像を示した。

Chart 1. Preparation of Whale Gastrin and Whale Gastrone-like Substance

TABLE I. Chemical Properties of Whale Gastrin and Gastrone-like Substance

	Whale gastrin	Whale gastrone-like substance
Dialyse	dialysable	non-dialysable
Electrophoresis	+4.48—4.86	+1.92—2.08
Ninhydrin	—	—
Cl-imino reaction	+	+
Biuret reaction	—	+
Ultraviolet spectrum	$\lambda_{\max}$: 280—285 m μ	$\lambda_{\max}$: 260—265 m μ
Hexose		6—7%
Amino sugar		8—9%

+: positive, —: negative

9) F. Raindel, W. Hoppe, *Chem. Ber.*, **87**, 1103 (1954).

紫外吸収スペクトルでは Fig. 2 に示すように I では 280—285 $m\mu$ に, II では 260—265 $m\mu$ にそれぞれ極大吸収領域を示した. II は hexose¹⁰⁾ 6—7%, amino sugar¹¹⁾ 8—9% を含んでいた.

4. Histamine の定量

Parchast¹²⁾ 等の蛍光法で histamine の定量を行なった結果を Table II に示すが, I, II はいずれも 1 mg/10 g 以下の含量であり, 以下の生物活性試験には影響をおよぼさないものと考えられる.

5. I の生物活性試験

I の生物活性は胃液および胃酸分泌促進効果を指標として, シロネズミ胃内の灌流法およびハイデンハインポーチ犬¹³⁾ によって試験した.

シロネズミの胃内灌流法は Ghosh 等¹⁴⁾ の方法を改良した方法で行ない, Fig. 3 および Table III に示すように 0.5—10 $\mu\text{g/kg}$ 静脈注射で胃酸分泌促進効果が認めら

Fig. 2. UV Spectrum of Whale Gastrin and Whale Gastrone-like Substance

(1) whale gastrin
(2) whale gastrone-like substance

TABLE II. Histamine Contents of Whale Gastrin and Gastrone-like Substance

	Fluorescence intensity %	Histamine content mg/100 g	Recovery %
Histamin edihydrochloride	100	—	—
Whale gastrin No. 41	0	0	98.5
Whale gastrin No. 48	3.5	1.75	—
Whale gastrone-like substance No. 102	1.9	0.94	99.2
Whale gastrone-like substance GO2TD	5.4	2.71	102.4

Fig. 3. Gastric Secretory Effect of Whale Gastrin on Perfusion Rat

れた. これは gastrin 作用を有する tetrapeptide(carbobenzoxy-Try-Met-Asp-Phe-NH₂)¹⁵⁾ と同程度の効果であった.

ハイデンハインポーチ犬法においては, 10—100 $\mu\text{g/kg}$ 皮下注射で胃酸分泌促進効果が認められた. この胃酸分泌促進効果は Fig. 4 に示すように histamine による効果より持続的であり, Fig. 5 のように用量作用関係が得られた.

6. II の生物活性試験

II の生物活性試験は Shay¹⁶⁾ の幽門結紮ラット法によって行なった. その結果を Table IV に示すが, 60 $\mu\text{g/kg}$ 静脈注射以上において胃酸分泌抑制効果が認められた.

考 察

ナガスクジラの第3胃粘膜を熱水抽出し, pH 4.0 によって沈殿した部分を集め, iso-PrOH と K₂HPO₄ で

10) 佐藤敏子, 生化学, 33, 42 (1958).

11) 小林茂三郎, 村井京子, 浜紙ゾーン電気泳動法の実験, 南江堂, 1960, p. 202.

12) A. Parchast, A. Burkhalter, V.H. Cohn, *J. Pharm.*, 127, 182 (1959).

13) R. Heidenhain, *Pflüg. Arch. Ges. Physiol.*, 19, 148 (1879).

14) M.N. Ghosh, H.O. Schild, *Brit. J. Pharmacol.*, 13, 54 (1958).

15) 当研究室で合成した.

16) H. Shay, S.A. Komarov, F.F. Fels, D. Meranze, M. Gruenttein, H. Siplet, *Gastroenterolog*, 5, 43 (1945).

TABLE III. Gastric Secretory Effects of Whale Gastrin and Synthetic Tetragastrin on Perfusion Rats

Rat No.	Tetragastrin		Whale gastrin	
	Doses $\mu\text{g/kg}$	Area of pH reduction cm^2	Doses $\mu\text{g/kg}$	Area of pH reduction cm^2
219	0.5	7.5	0.5	8.9
314	1.0	9.0	1.0	11.0
339	1.0	11.5	1.0	15.4
331	2.0	9.8	2.0	10.8
218	5.0	21.0	3.75	18.7
310	10.0	25.5	10.0	23.2

The drugs were injected intravenously. The variations of pH in the perfused solution were recorded by the pH-recorder which was introduced from the glass electrode of pH-meter.

Chart speed: 1 cm/10 min (horizontal line), variation of pH: 3 cm/pH 1.0 (vertical line).

TABLE IV. Gastric Secretion Inhibitory Effect of Whale Gastrone-like Substances on Shay Rats

Doses $\mu\text{g/kg}$	No.	Means of inhibition		
		Gastric volume (%)	Free acid (%)	Total acid (%)
1000	20	81.6	90.7	75.5
500	18	67.2	82.2	73.8
250	19	45.3	55.4	49.7
125	51	59.4	45.4	54.5
60	12	53.3	46.7	40.1
30	18	16.7	26.4	21.7

wistar strain male rats, body weight 180—250 g, fasted for 48 hours

4 hours pyloric ligation

The drug was injected intravenously.

Fig. 4. Gastric Secretory Effects of Whale Gastrin and Histamine in a Heidenhain Pouch Dog

In the histogram of acid output, the lower lines of shaded areas show the output of free-acid, the upper lines show the output of total-acid.

処理した。このとき溶媒層より I を，ケーキより II を抽出した。I は DEAE-cellulose 吸着，溶出を行ない pH 4.0 洗脱し，凍結乾燥した。II は dialyze し，non-dialysable 部分を凍結乾燥した。I の化学的性状は Uvnäs,¹⁷⁾ Gregory⁴⁾ 等のブタ gastrin とよく一致しており，ナガスクジラの胃粘膜に含まれる gastrin

17) B. Uvnäs, *Acta Physiol. Scand.*, **6**, 97 (1945).

Fig. 5. Gastric Secretory Effects of Whale Gastrin and Histamine in a Heidenhain Pouch Dog

○: histamine·2HCl
△: whale gastrin

もブタのそれとほとんど同じものであろうと考えられる。しかし, amino 酸配列は動物の種により 1 部異なることが示されており, 今後さらに amino 酸配列の研究を行ない, ナガスクジラの gastrin 構造を明らかにしたい。

I の生物活性はシロネズミの胃内灌流法において $0.5\text{--}10\text{ }\mu\text{g/kg i.v.}$ によって胃酸分泌促進作用が認められたが, この範囲内においては投与量と pH 下面積の間に相関関係が認められた。また合成した tetrapeptide と比較するとその生物活性はほぼ同程度であった。Heidenhain pouch 犬法においては $10\text{--}100\text{ }\mu\text{g/kg s.c.}$ において胃酸分泌促進作用が認められ, histamine と同様に用量作用関係が得られた。I は histamine と比較してその効果は持続的であり, 投与後胃液・胃酸分泌促進作用が約 2 時間後まで認められた。II はその化学的性状より糖蛋白質であることが考えられる。その生物活性は $60\text{ }\mu\text{g/kg s.c.}$ 以上でシロネズミの胃酸分泌抑制効果を認めたが, 測定値にバラツキが多く, 用量反応曲線を求めるまでには至らなかった。

原材料はナガスクジラの第 3 胃粘膜を筋肉と切り離し, よく洗浄して用いたのであるから, 他の臓器その他に由来するものではなく胃粘膜に特異的なものと考えられる。

実 験 の 部

I の抽出方法 南氷洋で捕獲されたナガスクジラの胃を -25° に凍結して保存し, その第 3 胃を原料とした。原料は 5° で 1 夜放置して解凍し, 第 3 室の粘膜と筋肉をメスで切り離し, 粘膜 10 kg を細切し, 水 20 kg を加え 30 min 沸騰させた。冷後, 上澄液を傾斜して除き, 残渣に 10 kg の水を加え, 同様にして 30 min 沸騰させ, 先の上澄液と合わせ, 1 夜冷所 (5°) に放置した。抽出液を濾取し, 濾液を AcOH で pH 4.0 とし冷所に 1 夜放置した。生成した沈殿を遠心分離し, 希 NH_4OH で pH 10 の溶液となるように溶解し (400 ml), この溶液に K_2HPO_4 200 g および iso-PrOH 240 ml を加えて 30 min はげしく振り混ぜた後遠心分離する。iso-PrOH 層を取り, 2 倍量の ether を加えてはげしく振り混ぜ, 静置して分離した水層を分取した。この溶液を 50° の恒温槽中で加熱し, ether 臭がなくなったら DEAE-cellulose (diethylaminoethylcellulose) 10 g を加え, 30 min かきまぜた。DEAE-cellulose 吸着物を濾過して集め, 十分水洗した後, 0.1N NaOH 50 ml ずつで 2 回溶出し, 溶出液を AcOH で pH 4.0 とし 5° に 1 夜放置する。生成した沈殿を集め凍結乾燥した。

II の抽出方法 前記 iso-PrOH 分画で得たケーキを 10 倍量の水に溶解し, セロファンチューブで流水中, 5° , 72 hr dialyse し, non-dialysable の部分を凍結乾燥した。

電気泳動 東洋濾紙 No. 2 ($40\text{ cm}\times 20\text{ cm}$) を用い, borate buffer (pH 9.2) を溶媒として 40 V/cm で 4 hr 電気泳動を行なった。濾紙を乾燥後 Reindal⁹⁾ 等の方法で peptide の呈色を行ない, 小林¹¹⁾ の方法で糖の呈色を行なった。

Histamine の定量 I または II の 1% 溶液 10 ml に 1N NaOH 2 ml および OPT 溶液 (*o*-phthalaldehyde の 1% EtOH 溶液) 0.5 ml を加えて良くかきまぜる。4—5 min 後, 3N HCl 1 ml を加え, ゆっくりかきまぜて蛍光光度計用セルに移し, 励起フィルター 365, 選択フィルター 47 を用い, 日立蛍光光度計 (FPL 2 型) で比蛍光した。

シロネズミの胃内灌流法 体重 $180\text{--}250\text{ g}$ のウィスター系雄シロネズミを 48 hr 絶食させた後, 25% ウレタン溶液 $0.7\text{ ml}/100\text{ g}$ を皮下に注射する。シロネズミは約 45 min 後に完全な麻酔状態にはいる。 $34\pm 0.5^{\circ}$ に保持した恒温箱内の手術台にシロネズミを移し, 気管切開を行なう。次に開腹し, 前胃部大彎側に切開を加え, 生理食塩水で胃内残物を洗い出した後, 切開口を縫合する。次に幽門に近い十二指腸部に切開を加え, 幽門を通過して胃内に直径 2 mm のポリエチレン管を挿入し, 血管を傷つけないようにして結紮固定する。一方, 直径 2 mm のポリビニール管を口より挿入し, 食道を通し, 前胃まで到達せしめ, 食道と共に結紮固定する。このポリビニール管より 34° 前後に暖めた pH 8.5 の NaOH 溶液を 1 ml/min の速度で持続注入ポンプ (早川電機製 SIP-11 型) で注入する。十二指腸に挿入したカニューレ内の灌流液が清澄になった後, 腹部切開口を縫合し, カニューレの先端を毛細管ガラス電極をセットした U 字管に結合する。シロネズミの胃内を灌流した液は, 幽門よりポリエチレン管を通過して毛細管ガラス電極にふれ, 卓上記録計 (東亜電波製 EPR-10A 型) によって連続的に pH が記録される。

Heidenhain pouch 犬法 Heidenhain¹³⁾ の方法にしたがって, あらかじめ処理したイヌを用いて 15 min 毎に貯留した胃液を集め, 胃液量を測定したのち, 0.1N NaOH 溶液で free acid および total acid を測定した。