



Title	胃酸分泌抑制物質の開発に関する基礎的研究
Author(s)	近藤, 覚
Citation	大阪大学, 1972, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/30788
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【4】

氏名・(本籍)	近藤 覚	
学位の種類	薬学博士	
学位記番号	第 2666 号	
学位授与の日付	昭和47年11月30日	
学位授与の要件	薬学研究科応用薬学専攻 学位規則第5条第1項該当	
学位論文題目	胃酸分泌抑制物質の開発に関する基礎的研究	
論文審査委員	(主査) 教授 青沼 繁 (副査) 教授 上原喜八郎 教授 岩田平八郎 教授 近藤 雅臣	

論 文 内 容 の 要 旨

緒 論

胃酸分泌ホルモンである gastrin は1964年に Gregory と Tracy により単離・構造決定された peptide であるが、その作用には胃腸管平滑筋に作用し収縮させるなど興味ある点を含んでいる。また胃酸分泌に関しては自律神経系による支配や体液性の支配など複雑に因子がからみあっている。それ故に胃の疾患である消化性潰瘍には多くの因子が知られているが、そのうち最も関連の深い胃酸分泌を中心にして gastrin 様 peptide を用いて、まずその調節について基礎的検討を加え、さらに胃酸分泌抑制物質の開発を試み、*B. subtilis* Hより新しい胃酸分泌抑制物質を単離した。

本 論

第一章 胃酸分泌の検定法に関する基礎的検討

胃酸分泌の検定法のうち現在最も繁用されている方法にラット幽門部結紮法、すなわち Shay Rat とラット胃内灌流法の二つがある。Shay Rat については結紮時間を4時間として絶食時間の検討を行い、48時間絶食が最も安定した結果が得られることがわかったが、tetragastrin に対する反応は50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (皮下) で14%増加とあまり明瞭には現われなかった。胃内灌流法については胃内の食物がなくなる24時間絶食のものを用い、tetragastrin に対する反応性を検討した。tetragastrin の投与方法に関しては腹腔内投与と静脈内投与の方が一過性のシャープな反応であることがわかったので、用量反応曲線を求めたところ Fig. 1 のような曲線が得られたので以下 tetragastrin の投与量20~40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で実験を行った。

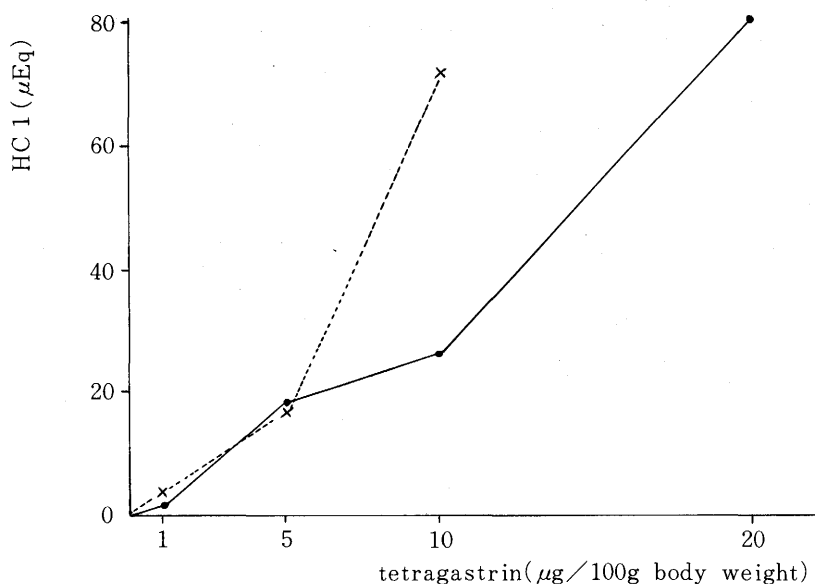


Fig. 1 Dose response to tetragastrin in the rat

第二章 Tetragastrin の胃酸分泌促進作用に関する生理化学的研究

体内における作用部位の確認の目的で、まず tetragastrin を Wilzbach 法にて ^3H 化し、精製してラットの体内分布を検討した。その結果 Table I のように臓器乾燥重量当りの放射能は肝臓及び腎臓などの代謝器管を除いて十二指腸に最も多く、胃には比較的少なかった。そこでさらに細胞間分布を検討する目的で最も著明な分布が観察された 3 分で radioautography を行った。tetragastrin の化学的性質を考慮し凍結切片とし胃及び十二指腸で検討した結果胃では粘膜部に明瞭な局在性の分布を示したのに反して十二指腸では粘膜部のヘマトキシリン染色部に一致して分布した。この様な十二指腸への特異的な分布がいかなる影響を及ぼしているのか検討した。tetragastrin は腸管に作用し収

Table I Distribution of ^3H -tetragastrin into various tissues of rat

tissue	time after injection (min)		
	3	20	60
salivary gland	267.3 $\pm$ 16.7 ^{a)}	378.8 $\pm$ 61.3	463.4 $\pm$ 34.0
esophagus	107.7 $\pm$ 15.5	227.5 $\pm$ 74.2	646.5 $\pm$ 227.4
rumen	150.3 $\pm$ 16.3	380.6 $\pm$ 116.2	401.6 $\pm$ 14.5
glandular portion	327.4 $\pm$ 16.5	575.8 $\pm$ 85.2	642.8 $\pm$ 7.9
duodenum	8011.1 $\pm$ 872.0	1673.5 $\pm$ 212.7	1871.2 $\pm$ 211.3
jejunum	453.6 $\pm$ 138.3	1976.3 $\pm$ 901.8	1134.4 $\pm$ 78.8
ileum	252.3 $\pm$ 29.3	393.0 $\pm$ 46.8	1239.5 $\pm$ 386.5
blind gut	281.6 $\pm$ 46.0	518.8 $\pm$ 4.6	785.4 $\pm$ 86.5
colon	284.8 $\pm$ 22.8	342.3 $\pm$ 21.1	607.5 $\pm$ 84.6
pancreas	801.8 $\pm$ 207.3	486.6 $\pm$ 20.5	1097.6 $\pm$ 178.5
liver	5403.6 $\pm$ 452.1	3356.9 $\pm$ 124.6	1759.3 $\pm$ 88.3
kidney	2212.8 $\pm$ 174.0	1019.2 $\pm$ 57.1	1158.4 $\pm$ 22.9
blood	686.6 $\pm$ 37.1	507.8 $\pm$ 19.0	588.2 $\pm$ 6.6

a): dpm $\pm$ s. e. (n=3)/mg of dry weight of tissuedose : 2.66 $\times$ 10⁻⁵dpm/g of body weight of rat

縮させることが知られているので他の作用を検討する目的でまず外分泌に対する影響を amylase 活性を指標にして調べたがその作用を見い出すことが出来なかった。次に体液的な観点から検討した。S-hay Ratにより行い、十二指腸を切除したとき得られる胃液について測定した結果、Table IIに示すように胃液量及び胃酸に関して、切除しなかった対照に比べて tetragastrin に対する反応性が減少した。

Table II Effect of duodenectomy on gastric juice of rat

		volume a)	pH	total b) acid	pepsin c) activity
basal secretion	normal	2.2 $\pm$ 0.4	2.5 $\pm$ 0.1	73.5 $\pm$ 17.2	48.9 $\pm$ 5.2
	duodenectomy	2.1 $\pm$ 0.9	2.3 $\pm$ 0.4	53.9 $\pm$ 35.6	29.3 $\pm$ 14.4
response to tetragastrin (100 μ g/kg)	normal	3.3 $\pm$ 0.4	1.8 $\pm$ 0.1	99.6 $\pm$ 2.0	47.6 $\pm$ 4.5
	duodenectomy	1.2 $\pm$ 0.8*	3.1 $\pm$ 0.9	77.1 $\pm$ 24.1	41.1 $\pm$ 15.5

* Significant differences between normal and duodenectomy ($p < 0.05$)

a) ml/100g b. w. of rat

b) meq

c) μg of Tyr.

すなわち tetragastrin の胃酸分泌作用に十二指腸が関与している可能性を示唆した。さらに十二指腸粘膜抽出物を作成し、tetragastrin 投与によりいかなる変化を示すのか検討した。その結果を Table III に示すが粘膜の熱抽出物は胃酸分泌抑制作用を持つが tetragastrin 投与後一時間のものではその抑制活性は上昇した。

Table III Inhibitory activity of the extract of duodenal mucosa treated with tetragastrin

dose of tetragastrin ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0	50	100	300
percent inhibition of extract (%)	4	98	92	46

最近、L. R. Johnson らは胃及び十二指腸粘膜において gastrin 様 peptide が ^{14}C -leucine の取り込みを促進すると報告しているが、これらのことを考え合わせると十二指腸に分布した tetragastrin は胃酸分泌の調節を行う蛋白性の物質の生合成に関与している可能性を強く示唆する。

第三章 *B. subtilis* H の産生する胃酸分泌抑制物質の抽出・精製並びにその生理化学的研究

医薬品開発の目的で *B. subtilis* H から胃酸分泌抑制物質の抽出・精製を行った。培養は収量などの点から 72 時間振盪培養を行い 12 時間静置培養をし、その培養液を pH 3.0 とし等電点分画を行い得られた沈殿に強い胃酸分泌抑制作用及び十二指腸収縮抑制作用があることを認めた。このもの、精製

Table IV Fractionation of inhibitory substance of gastric acid secretion from culture

medium

Culture medium of bacteria

centrifuged (15,000g)

Sup

adjusted to pH 3.0 with 1N-HCl

Ppt (Fr. I)

extracted with ethanol-acetic acid-water, 95:10:95

Extract

silica-gel column chromatography

(butanol-acetic acid-water, 4:1:1)

Fr. II

Sephadex LH-20
 (ethanol-acetic acid-water, 95:10:95)

Fr. A

TLC

1) t-butanol

2) ethanol

Fr. A'

は Table IV に示すように行い、最後に ethanol 中で結晶化させた。結晶は分解点 255℃ であり針状であった。得られた胃酸分泌抑制物質を 6N-HCl、10 あるいは 20 時間加水分解を行い、構成アミノ酸としては Asp3、Glu3、Val3、Ile2、Leu9 が検出され、また分解物を石油エーテルで抽出後 TLC で展開する脂肪酸の存在が認められた。この胃酸分泌抑制物質の IR スペクトルはペプチドのアミド結合に帰属される吸収を示した。以上のことよりこの物質はアミノ酸及び脂肪酸より成るペプチドリピドであろうと推測される。

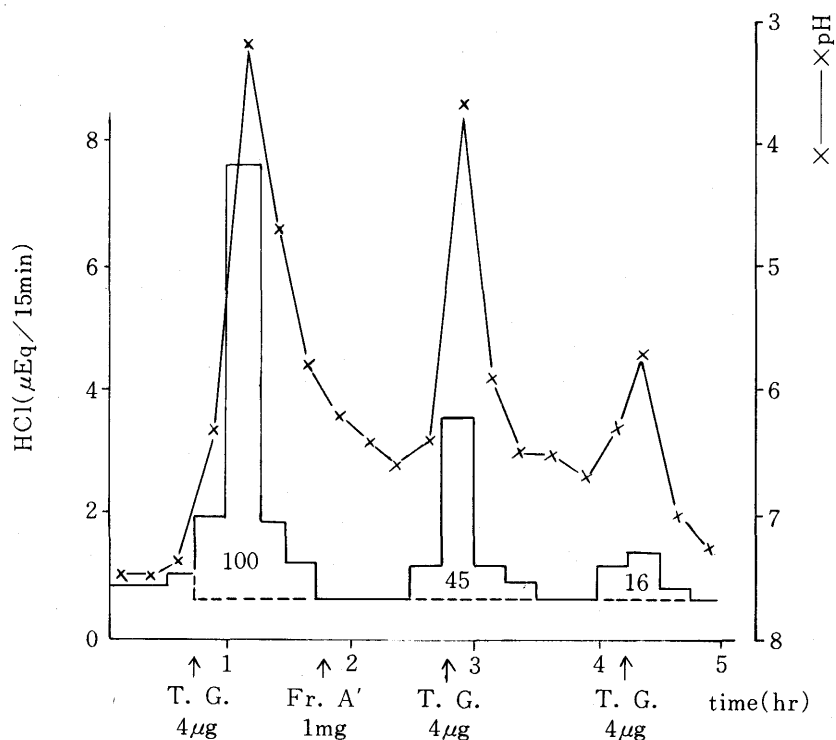


Fig. 2 Inhibition of gastric acid secretion after injection of Fr. A' in a rat with Ghosh and Schild's method.

administration : intravenous injection of certain dose of sample per 100g body weight.

T. G. : tetragastrin

この物質の胃酸分泌抑制作用をラットを用いた胃内灌流法で検討した結果 Fig. 2 に示すように持続的な抑制活性があることが認められた。モルモットの十二指腸を用いてマグヌス法で検討すると、histamine の収縮作用に対して強く抑制し洗浄後でもかえって強い抑制活性が見られた。またこのものには界面活性作用がありヒツジ赤血球で測定すると S D S と同程度作用があった。

この胃酸分泌抑制物質の菌体における存在部位は Weibull らの方法に準じて分画した細胞壁、細胞膜それに細胞質の各画分を酢酸酸性50%エタノール・水で抽出し抽出物で胃酸分泌抑制活性、十二指腸収縮抑制活性及び溶血活性を調べた結果、Table V に示すように細胞質画分に活性が多く存在した。

Table V Distribution of the inhibitory substance in the subcellular fraction of *B. subtilis* H

fraction	inhibitory activity (%)		hemolytic activity (%) c)
	gastric acid a)	contraction b)	
cell wall	0	5	50
ghost	0	0	0
cytoplasm	78	33	100

a) Gastric acid secretion was measured with the perfused rat stomach.

10mg/kg of each fraction was administrated.

b) Duodenum of guinea-pig was contracted by histamine 50ng/ml.

27μg/ml of each fraction was used.

c) Sheep red cell was used.

hemolytic activity was calculated from the equation : hemolytic induced by 0.4mg/ml of each fraction×100/hemolysis induced by S.D.S.(25μg/ml).

結 論

1. tetragastrin のラット体内分布を検討し、胃、小腸に分布することを認め、さらに radioautography で確認し、胃では粘膜部に明瞭な局在性の分布を示すが十二指腸では粘膜部のヘマトキシリン染色部に一致して分布した。

2. 十二指腸での tetragastrin は胃酸分泌を調節する物質の出現に関与している可能性がある。

3. *B. subtilis* H から胃酸分泌を抑制するペプチドリビドを単離した。

4. この胃酸分泌抑制物質は十二指腸の収縮に対して抑制的に作用する。

論文の審査結果の要旨

テトラガストリンの体内分布を検討し、十二指腸により分布することを認め、あわせて *B. subtilis* H から胃酸分泌を抑制するペプチドリピドを単離し、テトラガストリンとの関係において、新知見を得たので、薬学博士としての価値ある論文と認める。