



Plasma immunoreactive somatostatin levels in rat hypophysial portal blood : effect of glucagon administration

阿部, 廣己

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1979-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0300

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000300>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	あ べ ひろ み 阿 部 廣 己 （兵庫 県）
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	医博い第 292 号
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の日付	昭和 54 年 3 月 31 日
学 位 論 文 題 目	PLASMA IMMUNOREACTIVE SOMATOSTATIN LEVELS IN RAT HYPOPHYSIAL PORTAL BLOOD : EFFECT OF GLUCAGON ADMINISTRATION ラット下垂体門脈血漿中の免疫学的ソマトスタチン ーグルカゴン投与の影響ー
審 査 委 員	主 査 教 授 藤 田 拓 男 教授 山 口 延 男 教授 馬 場 茂 明

論 文 内 容 の 要 旨

Brazeau らによってヒツジの視床下部より見いだされた 14 コのアミノ酸からなるソマトスタチンは、中枢神経系に広く分布するが、なかでも視床下部正中隆起に高濃度に存在し、また直接、下垂体前葉細胞に働いて、成長ホルモンと甲状腺刺激ホルモンの分泌を抑制することが知られている。成長ホルモンの分泌は、視床下部から下垂体門脈血中に放出されるソマトスタチンと未知の成長ホルモン放出因子によって調節されていると考えられるため、下垂体門脈血中のソマトスタチンの動態を知ることは、成長ホルモンの分泌調節機構を解明するうえで重要な手がかりとなる。そこで、我々は鋭敏なソマトスタチンの radioimmunoassay を開発し、ラット下垂体門脈血中の免疫学的ソマトスタチン活性の性状と動態について観察した。

材料と方法

実験には、体重 300~400 g の Wistar 系雄ラットを用い、ウレタン麻酔下で Porter らの方法に準じて下垂体門脈血を採取した。即ち、parapharyngeal approach で下垂体を露出し、500 単位のヘパリンを静注したのち、下垂体茎を切断して下垂体を摘除した。次に、下垂体茎の中枢側断端から流出する下垂体門脈血を、断端に押しあてた内径 0.46 mm のテフロンチューブ内に withdrawal pump を用いて、毎分 $4.7 \mu\text{l}$ の割合で吸入した。このチューブは、吸入された血液が 3 分以内に氷冷されるように、先端部を残して ice bath につけ、採取中に起る血中ソマトスタチンの不活性化を防止した。また、20 分毎にチューブ内に小気胞を入れて採取した門脈血を経時的に区分し、一匹のラットから連続して 3 サンプルを採取した。脳室内にグルカゴンを投与する実験では、最初のサンプルを採取後、あらかじめ右側脳室に留置したカニューレより、0.1 M 酢酸を含む生理的食塩水に溶解し

た結晶グルカゴンをラット当り $10\mu\text{l}$ の容量で注入した。コントロール群のラットには、同量の溶解液のみを注入した。血漿ソマトスタチンは、酢酸-アセトン法で抽出した。即ち、希釈した結漿に 0.35 M 酢酸を含むアセトンの4倍量を加え、 $3,000\text{ r.p.m.}$ で15分間遠沈して上清をとり、沈殿は同量の酢酸アセトンで洗滌して再び遠沈して、この上清も先の上清に加えて減圧下でアセトンを除き、凍結乾燥して保存した。抽出率を知る目的で一部の血漿には外因性に合成ソマトスタチンを加えて、同様に抽出した。試料は直前に 0.05 M 磷酸緩衝液で溶解し、試料中のソマトスタチンを radioimmunoassay で測定した。抗血清には自家製の R 823 を用い、標識ホルモンには有村、Goy 両博士より提供された N-Tyrosyl-ソマトスタチンをクロラミンT法で標識したものを用いた。また、一部の実験では有村博士より提供された #101 抗血清も使用した。assay の最小検出量は 10 pg/ml でその抗原決定部位は $\text{Cys}^3\text{-Thr}^{12}$ であった。下垂体門脈血中のソマトスタチン活性のゲル透過分画の実験には $0.8\times 40\text{ cm}$ の sephadex G 25 カラムに試料をかけ、 0.1% ヒト血清アルブミンを含む 0.2 M 酢酸で溶出し、各 fraction を凍結乾燥したのち 0.05 M 磷酸緩衝液で溶解し免疫学的ソマトスタチンを測定した。

結 果

ラット血漿に加えた合成ソマトスタチンの回収率は $92\sim 96\%$ であった。抽出過程で酢酸を使用しなかったり、沈殿の洗滌を行わない場合には、それぞれ、 82% 及び 72% に低下した。R 823 及び #101 抗血清と標識ソマトスタチンとの結合に対する下垂体門脈血中のソマトスタチン活性の置換曲線は、合成ソマトスタチンの置換曲線とよく平行した (図1)。さらに Sephadex G 25 によるゲル透過では、下垂体門脈血中のソマトスタチン活性の約 75% は、合成ソマトスタチンと同一部位に溶出され、残りの 25% は void volume 直后と主要ピークの前に溶出された (図2)。これら3つの分画のソマトスタチン活性は、いずれも炭末処理によって消失した。ウレタン麻酔下のラット下垂体門脈血中の血漿ソマトスタチン値は、 $335\sim 1,500\text{ pg/ml}$ の間に分布し、その平均値 \pm 標準誤差は $778\pm 52\text{ pg/ml}$ であった。結晶グルカゴンを脳室内に投与すると、下垂体門脈血中ソマトスタチン値は溶解液のみを投与したコントロール群にくらべ、明らかに増加し、その頂値は投与後20分間に認められた。また、頂値とグルカゴン投与量との間には、用量反応関係が認められ、 $2\mu\text{g}$ 、 $10\mu\text{g}$ 、 $50\mu\text{g}$ の投与量に対する頂値の値は、前値を 100% として表わすと、それぞれ 157 ± 12 、 216 ± 43 、 $257\pm 7\%$ であった (図3)。

考 察

本実験において、我々はウレタン麻酔下のラット下垂体門脈血漿中に免疫学的ソマトスタチンを検出し、その性質について検討した。ソマトスタチンは血中で分解されやすいと言われているが、我々の行った基礎的検討では in vitro において血中に加えた合成ソマトスタチンの免疫活性は 0°C では50分間、 37°C では5分間は明らかな低下は見られなかった。従って採血中のソマトスタチン活性の低下は無視出来る程度と考えられる。下垂体門脈血中のソマトスタチン活性は、その標識ソマトスタチンに対する置換曲線が合成ソマトスタチンによるそれと平行すること、及びゲル透過分画において大部分が合成ソマトスタチンと同一部位に溶出されることから、ほぼ合成ソマトスタチンと同一物質と

考えられる。しかし、ゲル濾過分画の大分子領域に見られる2つの小さなソマトスタチン活性の peak については、合成ソマトスタチンを加えたホルモン除去血漿からの抽出物を分画した場合には認められないので、抽出や分画過程での人工産物とは考えにくい。同様な大分子ソマトスタチン活性については、ラットの脾や胃の灌流液や抽出物のゲル濾過分画にも見い出されソマトスタチンの前駆物質の可能性も示唆されているが、その詳細は明らかではない。

今回の実験では、ラット下垂体門脈血中の血漿ソマトスタチン値の平均は、 778 pg/ml で末梢血中のそれ(50 pg/ml 以下)にくらべて明らかな高値を示した。この濃度差はソマトスタチンが視床下部から下垂体門脈血中に放出されて、下垂体前葉からの成長ホルモンや甲状腺刺激ホルモンの分泌調節に関与している可能性を示唆している。結晶グルカゴンの脳室内投与によって下垂体門脈血中のソマトスタチンには、用量反応関係を有する明らかな増加がみられた。グルカゴンの視床下部ソマトスタチン分泌促進の機序は明らかではないが、グルカゴンは **adenylate-cyclase** の活性を上げる事が知られているので、**adenylate-cyclase-cyclic AMP** 系の関与も考えられる。

また、この成績は、視床下部からソマトスタチンの分泌動態を観察する上で、下垂体門脈血中のソマトスタチン活性の測定が極めて重要な方法になりうることを示している。

論文審査の結果の要旨

下垂体ホルモンの分泌動態を検討するには色々な方法があるが、最近神経内分泌学の進歩に伴い視床下部と下垂体の連絡経路が特に重要視されており、視床下部と下垂体を結ぶ唯一の血管である下垂体門脈系の機能が注目されている。本研究者は直接下垂体門脈系から血液を採取する方法を世界に先がけて確立し、これを用いてラット下垂体門脈血中の免疫学的ソマトスタチンを測定し、下垂体ホルモンの分泌機序を検討したものである。

ソマトスタチンは視床下部から分離精製された成長ホルモン及び甲状腺刺激ホルモンの分泌を抑制する視床下部ホルモンであり、広く中枢神経系に分布するが、ことに正中隆起に多く、神経終末の顆粒中に存在する。このことからソマトスタチンが下垂体ホルモンの分泌を調節するためには下垂体門脈系を通して直接下垂体に達するであろうと想像されていたが、技術的困難のために現在までこれを直接証明したものはない。

体重 $350\sim 450$ グラムのウィスター系雄ラットに於てウレタン麻酔下に傍咽頭法によって下垂体を露出し、下垂体柄を切断した後下垂体を摘除し、下垂体柄の断端にテフロン管を挿入し $4.7\text{ }\mu\text{l/分}$ の速度で下垂体門脈血をハーバード吸入ポンプで採取し、20分ごとに氷冷試験管に分画し、血漿分離の後5倍量の冷生塩水を加え混合液の20分の1量の 0.35 M アセトンを含む 98% アセトンを加え1分間 $3,000$ 回転で15分間遠心し更に酸性アセトンを加えて沈澱を洗滌し上清を合わせアセトンを除きした後凍結乾燥し、測定直前に $\text{pH } 7.6$ の 0.05 M 磷酸バッファーに溶解した。ソマトスタチンの測定は特異的高感度のラジオイムノアッセイによった。

下垂体門脈血から抽出されたソマトスタチンは三つのピークをつくり、第三のピークが合成ソマト

スタチンに一致した。平均基礎値は $778 \pm 52 \text{ pg/ml}$ であり、グルカゴンを脳室内に注射すると有意且つ投与量依存的な上昇が見られた。これらのソマトスタチン値は末梢血中でのレベル即ち 50 pg/ml 以下で測定感度以下の値と比べてはるかに高く、視床下部から分泌され下垂体門脈を通過して下垂体に達するソマトスタチンは局所ホルモンとして下垂体前葉細胞を直接刺激する可能性が強い。グルカゴンは正中隆起からのソマトスタチン分泌を刺激するとともに、犬の脾及びラットの胃からのソマトスタチンの分泌をも刺激することが知られており、又サイクリック AMP が脾及び胃からのソマトスタチンの放出を増加させるので下垂体-視床下部系へのソマトスタチンの放出にもサイクリック AMP 系の関与する可能性がある。

本研究はラット下垂体門脈血中のソマトスタチンの測定に初めて成功したものであり、従来技術的困難のために殆んど知見の得られなかった視床下部ホルモンの下垂体への動きを直接証明したばかりでなく、グルカゴンによるソマトスタチンの増加を示してその生理的意義を解明する手がかりを与え重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって本研究者は医学博士の学位を得る資格があると認める。