

— 原 著 —

二抗体法による Gastrin の Radioimmunoassay

京都府立医科大学第2外科学教室 (主任 橋本勇教授)

原 田 善 弘

RADIOIMMUNOASSAY OF GASTRIN BY THE DOUBLE ANTIBODY METHOD

Yoshihiro HARADA

Second Department of Surgery, Kyoto Prefectural University of Medicine

Gastrin は、強力な胃液分泌作用を有する消化管ホルモンであり、胃十二指腸疾患の病態生理を究明する上に、Gastrin の血中濃度を測定することは不可欠である。

著者は自家抗 Gastrin 血清を作製し、また Wilson Co. の抗血清を用いて Gastrin の Radioimmunoassay に関する基礎的検討を行い、二抗体法による血中 Gastrin の測定に成功した。

空腹時血中 Gastrin 値は正常群で平均58pg/ml であり、各種消化器疾患患者と比較した場合特に有意の差は認められなかつた。また血中 Gastrin 値と胃酸分泌の間には feed back 機構が関与することが明らかにされた。手術後の Gastrin 値の変動をみると、迷走神経切断により Gastrin 値が上昇するという結果を得た。

I 緒 言

胃十二指腸潰瘍の発生原因については、従来より多くの学説によつて論じられている。しかしその多くは単一の原因について考察されてきたが、そこに述べられているごとき単一の原因のみによつて潰瘍が発生するとは考えられず、現在では胃粘膜に対する defensive factors と aggressive factors の両面からの力関係により潰瘍の発生が説明つけられている。すなわち defensive factors は、粘膜、粘膜血流などの粘膜抵抗を、aggressive factors は、酸、ペプシン、壁細胞数など粘膜障害因子を考え、これらの平衡関係が崩れた時に潰瘍が発生すると説明されている¹⁾。

胃酸は aggressive factors の重要な因子であるが、その分泌機構に関しては未知の点が多く今後に残された研究課題の1つである。胃液分泌における神経性因子については、Pavlov などの種々の研究により明らかとなつているが、体液性因子に関しては永い間研究の進展が見られなかつた。しかし最近になり消化管ホルモンの1つである Gastrin の強力な胃液分泌刺激作用が目され、胃液分泌機構を解明する新分野としてその研究成果が期

待されている。

1905年 J.S. Edkins²⁾ は、胃幽門部粘膜よりの抽出物を猫に静注することにより、胃液分泌が亢進することを報告した。彼はこの物質が食餌摂取により亢進する胃液分泌の hormonal な働きをするものと考え、“Gastrin”と命名した。しかしその後、1910年 Dale³⁾、1919年 Popielski⁴⁾、らにより追試され、この物質は胃幽門部に限らず他の臓器にも存在すると報告され、ついには1932年 Sacks⁵⁾らにより Gastrin は histamine と同一物質であるとして、Edkins の Gastrin 説は完全に否定されてしまつた。これらの混乱は主としてその抽出法に起因するものであるが、1938年 Komarov⁶⁾ は trichloric acetic acid を用いた新しい抽出法にて、Gastrin を histamine から分離することに成功し、Gastrin は再び脚光を浴びるようになった。さらに1944年 Rönnow & Uvnäs⁷⁾⁸⁾、1946年 Harper⁹⁾ らにより Gastrin の生理活性が立証された。

Gastrin の生化学的研究は1959年に始る Gregory & Tracyの一連の研究によりほぼ完成されたといつてよい。すなわち1959年に Gastrin の単離に成功¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾して以来、これの純化 (1963)¹³⁾、構造式の決定 (1964)¹⁴⁾¹⁵⁾、

さらには化学合成 (1964)¹⁶⁾に成功し, Gastrin 研究の基礎をきづいた。

Gastrin の構造式は Table 1 に示すごとく, 17個のアミノ酸が鎖状に連らなる Polypeptide であり, 12番目の Tyrosine に -SO₃H 基が導入された Gastrin II と, 導入されない Gastrin I に分類される。種属による構造上の相違は 5, 8, 10番目のアミノ酸が異なるのみである。

Gastrinの生理的活性部分は, C-末端 tetrapeptide(-Try-Met-Asp-Phe-NH₂) にあり, 機能的に最も重要な部位は aspartic carboxylic 残基と phenyl-alanine amide 残基にあることが明らかにされた¹⁷⁾。また種々の fragment のうち最も強力なる胃液分泌刺激作用のあるのは t-butyl-oxy carbonyl pentapeptide¹⁸⁾¹⁹⁾であり, これが化学合成され市販されるようになって以来, Gastrin の生理学的研究が急速に進歩した。

Gastrinの生理作用²⁰⁾²¹⁾²²⁾²³⁾²⁴⁾²⁵⁾²⁶⁾は胃液分泌, とくに塩酸分泌刺激に代表されるが, その mechanism は胃粘膜に対する各種の刺激, たとえば胃壁の拡張, 食物中の蛋白, アルコール, アルカリ性物質などの物理的, 化学的刺激が mucosal receptor を介して, 迷走神経の協力のもとに²⁷⁾²⁸⁾²⁹⁾幽門前庭部にある G細胞 (Solcia)³⁶⁾を

刺激し, Gastrin が血中に放出される。この Gastrin が壁細胞に直接作用, またはこの間に histamine が関与するとの説もあるが³¹⁾³²⁾, 壁細胞の塩酸分泌を促進する。Gastrin のその他の生理作用として, 軽度ではあるがペプシンの分泌, 消化管の筋収縮作用³³⁾, 膵胆道系に対し, 膵液, 胆汁の分泌亢進作用を有する。

Gastrin 分泌細胞は, 主として胃前庭部粘膜に存在すると推定される。Ferguson の電顕的検索によると³⁴⁾, Gastrin 細胞は胃前庭部胃小窩の底部にあり, 梨形状をなし, 幅の広い部分に核を有し, 基底膜に接し, 細い部分は microvilli として管腔内に面していると報告している。しかし光顕的には種々の説があり, McGuigan³⁵⁾ は Enterochromaffin 細胞, Carvalheria³⁶⁾ は Argyrophilic 細胞, Solcia³⁰⁾ は膵島にある δ細胞類似の細胞であると報告している。また McGuigan の最近の文献³⁷⁾によると, Gastrin 細胞はジアゾ染色でも嗜銀染色でも染色されず, 蛍光抗体法によつてのみしか証明できないと述べている。

Gastrin の生理作用が明らかになるにつれ, 各種消化器疾患の病態生理を究明するため, Gastrin の血中濃度を測定することが不可欠となつてきた。当初は Bioassay

Table 1

	Approximate Molecular Weight																		
	I	II	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Man	2096	2176	Glu-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂																
Hog	2114	2194	Glu-----Met-----NH ₂																
Dog	2038	2118	Glu-----Met-----Ala-----NH																
Cow&Sheep	2024	2104	Glu-----Val-----Ala-----NH ₂																
Cat	2040	2120	Glu------(Glu ₄ -----Ala)-----NH ₂																
Synthetic Gastrin-like																			
Tetrapeptide	630		Glu-----Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂																
Hexapeptide	815		Glu-----Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂																
Pancreozymin-Cholecystokinin	3884		Lys-(Ala-Gly-Pro-Ser)-Arg-Val-(Ileu-Met-Ser)-Lys-Asp-(Asp-Glu-His-Leu ₂ -Pro-Ser ₂)-Arg-Ileu-(Asp-Ser)-Arg-Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂																

* in Gastrin II; SO₃H is attached to Tyr in position 12

Structure of gastrin and related peptides.

法により血中濃度を測定しようとする試みがなされ、Uvnäs & Emäs³⁸⁾, Lai³⁹⁾, 松尾⁴⁰⁾らの報告がみられるが、いずれも特異性、感度に問題があり、満足すべき結果は得られていない。

近年になり Radioimmunoassay 法が開発され、各種ホルモンの微量定量が可能となり、診断上、治療上に画期的な進歩をもたらしたが、Gastrin に対してもこの方法を取り入れるべく研究が進められた。

Radioimmunoassay 法の原理については後述するが、これを行うには、測定しようとする物質に対する特異性の高い、高力価の抗体を必要とする。1967年McGuigan は Gastrin の C-末端 Tetrapeptide (Tetragestrin) に対する抗体を作製し、初めて Gastrin の Radioimmunoassay に成功した⁴¹⁾⁴²⁾。本邦においては当教室の小玉らにより報告された C-末端 Hexapeptide (Hexagestrin) に対する抗体を用いての Radioimmunoassay が最初のものである⁴³⁾⁴⁴⁾。しかし生体内には消化管ホルモンの一種である Cholecystokinin-Pancreozymin が存在し、これと Gastrin の C-末端 pentapeptide が全く同一構造を有しているため、Tetragestrin 抗体や Hexagestrin 抗体にて Gastrin の Radioimmunoassay を行つた場合、交叉反応性が問題となる⁴⁵⁾⁴⁶⁾。したがって精度の高い、再現性のある Radioimmunoassay を行うには Gastrin の構成々分すべてに対する抗体が必要であり、1968年 McGuigan は合成ヒトガストリンに対する抗体⁴⁷⁾⁴⁸⁾を、1970年 Yallow & Berson はブタ抽出ガストリンに対する抗体作製に成功し、Gastrin の Radioimmunoassay の基礎をなした。

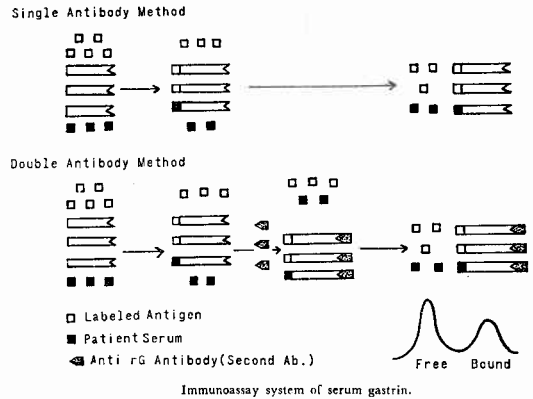
著者は今回、合成ヒトガストリン (1-17) に対する抗体作製を試み、その抗体および Wilson 社製の抽出ブタガストリンに対する抗体を用いて、Gastrin の Radioimmunoassay に対する基礎的検討を行つた。著者の用いた二抗体法による Radioimmunoassay は比較的容易で、再現性も高く、今後消化器疾患の病態生理の究明、および臨床面における Gastrin の研究に有意義なものと考えられる。さらにこの方法にて測定した血中 Gastrin 値より得られた新しい知見につき報告する。

II 基礎的問題の検討

II-1 Radioimmunoassay の原理とその問題点

Radioimmunoassay 法は1959年 Yallow & Berson により Insulin の測定⁵⁰⁾に初めて用いられた方法であるが、その後各種の蛋白性ホルモン、すなわち、Growth Hormone⁵¹⁾, Follicle-stimulating Hormone⁵²⁾, Luteinizing Hormone⁵²⁾, Thyroid-stimulating Hormone⁵³⁾, Adre-

Fig. 1



nocorticotrophic Hormone⁵⁴⁾などの測定にも応用されるようになった。

Radioimmunoassay 法は Fig. 1 に示すごとく放射性物質により標識された標識ホルモンと、標識されない非標識ホルモンが、その抗体に対して結合する際の競合反応を利用したものである⁵⁵⁾⁵⁶⁾。すなわち、標識ホルモンにそのホルモンに対する抗体を作用させると、抗原抗体複合体が形成されるが、この反応系に非標識ホルモンが加わると、非標識ホルモンは標識ホルモンと競合し、標識ホルモンと抗体との結合を阻止するように作用する。この反応系の標識ホルモンと抗体の量を一定にしておき、加える非標識ホルモンの量を増加させると、抗体と結合する標識ホルモンの量は減少する。この際、何らかの方法により非結合標識ホルモン (F) と結合標識ホルモン (B) を分離し、その放射能を測定し B/F を求めると、加えた非標識ホルモン量とは逆相関々係となる。予め既知量の非標識ホルモンにて B/F を求め standard curve を作成しておき、これを用いることにより未知の検体を測定することができる。

ところで Radioimmunoassay を行うにはつぎのような条件が必要であるといわれている⁵⁵⁾。

(1) 測定しようとする物質を純粋な形で得ることが可能で、しかもその物質に対する抗体を産生しうること。

(2) その抗原物質は放射性物質によつて標識が可能であり、標識によつて抗原性に变化をきたさないこと。

Gastrin の場合、その構造式は明らかとなつており、しかも化学合成されているため純粋な形のものを入手することは可能である。しかし分子量 2,100 で、これ単独で抗原とはなりえない haptane と考えられるため、抗

体作製には多くの問題点が存在する。

また放射性物質の導入に関して、Gastrin は 17 個のアミノ酸が鎖状に連なつた比較的安定した物質であるので、標識の際生じる変性は少なく、抗原性に変化をきたすことも少ない。放射性物質の導入方法として、Hunter & Greenwood の Chloramine T 法⁵⁷⁾による ¹²⁵I または ¹³¹I の導入が一般に用いられているが、この場合ヨードの導入基として Cystaine, Tyrosine, または Hystidine が必要とされている⁵⁸⁾。Gastrin では C-末端より 5 番目のアミノ酸が Tyrosine であり、この部位へのヨードの導入が可能である。

つぎに問題になるのは、F, B の分離法である。これに関して現在種々の方法^{59), 60)}が報告されているが、それぞれ一長一短があり、測定しようとするホルモンにより最良のものを選択する必要がある。Gastrin の定量には、二抗体法⁴⁷⁾, Charcoal 法⁴¹⁾, Resin 法⁴⁹⁾などが報告されているが、著者は操作が比較的簡単で、多くの検体が処理できること、damaged hormone があまり問題とならないこと、再現性が高いことなどにより、二抗体法による Gastrin の Radioimmunoassay を中心に検討を行った。

また Radioimmunoassay は抗原抗体反応を応用して行うものであるため、その反応が阻止されたり、非特異反応を起さないような至適な条件を整えなければならない。すなわち、反応液の緩衝液、pH、添加物質、反応時間、反応温度などを選択し、さらにすべての検体に対し同一条件下で反応させる必要がある。

以上のことより、Gastrin の Radioimmunoassay における最大の問題点は、haptane 抗原である Gastrin に対する抗体を作製することであり、しかも Radioimmunoassay に使用するには、かなり高力価の抗体が必要であり、同時に特異性の高いことが要求されるため、Gastrin の Radioimmunoassay は比較的困難な問題であるとされている。

II-2 抗 Gastrin 血清について

II-2-1 緒言

Radioimmunoassay には高力価の特異性の高い抗体を必要とするが、Gastrin は分子量約 2,100 の haptane と考えられ、これ単独では抗原性はなく、抗体作製は不可能と考えられる。従来より蛋白が抗原性を有するには少なくとも分子量 3,000 以上が必要であると考えられていたが、Gilliand & Prout⁶¹⁾, Boyd & Peart⁶²⁾ によりこの考えが必ずしも普遍的でないとして、小分子の Peptide

に対しても免疫原性を獲得させる方法が開発された。

haptane 抗原に対し、免疫原性を獲得させるためには、高分子の蛋白質 (Carrier protein) と結合させる必要があり、Carrier protein として従来より血清アルブミン、グロブリンが用いられている。蛋白質と peptide の結合物を作製する薬剤として近年多数開発されているが、1964 年 Goodfriend により発表された bradikinin や angiotensin の抗体作製に用いた carbodiimide がよく用いられ、その操作も簡単である。

1970 年小玉らは Gastrin の抗原性を検討するため、Gastrin の fragment である C-末端 tetrapeptide (Tetra-gastrin), および C-末端 hexapeptide (Hexagastrin) を用いて抗体作製を試みている。この報告⁴³⁾によると、Tetra-gastrin 単独の免疫では抗体価の上昇は全く認められず、やはり haptane であることが証明された。また Polyglutamic acid と結合した PGA-Tetra-gastrin, Bovin serum Albumine と結合した BSA-Hexagastrin について抗体作製を試み、BSA-Hexagastrin に対し比較的良好的な抗体価の上昇を認め、これを用いて Gastrin の Radioimmunoassay に成功している。しかし本抗体にては交叉反応性が問題となり、正確な Gastrin 値の測定が困難なため、Gastrin の全構成成分に対する抗体の作製が望まれていた。

II-2-2 自家血清の作製

1) 実験動物

免疫には体重約 2,000 g の白色成熟ウサギ、および約 300 g のモルモットを使用した。

2) 免疫抗原

各種動物における Gastrin の構造式は Table 1 に示すごとく非常に近似しており、しかも haptane であるため、抗原性を獲得させるには Carrier Protein が必要である。そこで Carrier Protein として分子量約 67,000 の Bovin Serum Albumin (以下 BSA と略記) を選び、これを 1-Ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyle) carbodiimide を用いて合成 Gastrin (1-17) と conjugate し、これを抗原とした (以下 BSA-Gastrin と記載)。

Conjugate の方法は McGuigan の文献^{42), 48)}を参考とし、つぎのごとき操作にて行つた。なお合成 Gastrin には Imperial Chemical Industries の synthetic human gastrin (1-17), BSA は Mann Research Lab. の製品、Carbodiimide には阪大蛋白研の water soluble carbodiimide を使用した。

Synthetic human gastrin (1-17) 9 ㏍を 0.05M po-

tassium phosphate buffer pH 7.5, 1.5ml に溶解し, これに dimethyl formamide 0.6ml, BSA 18mg, water soluble carbodiimide 90mg を順次添加し, この溶液をゆつくり攪拌しながら 4°C で15時間反応させ, さらに20°C で5時間反応させた。これを 0.15M NaCl・0.01M potassium phosphate buffer 1,000ml にて透析後, 凍結乾燥にて52mgの BSA-Gastrin を得た。

3) 免疫方法

白色ウサギに対しては BSA-Gastrin 2~5 mg を1回免疫量とし, これを complete Freund's adjuvant と water in oil の状態に混合したものを足蹠皮内に免疫注射した。免疫間隔は1~2週間とし, 耳静脈よりの採血により抗体価を測定しつつ約10カ月間免疫を継続した。

モルモットに対しては BSA-Gastrin 0.5~2 mg を1回免疫量とし, 心臓穿刺にて採血し, 抗体価を測定しつつ約6カ月間継続した。

4) 抗体の検出

白色ウサギ2羽に免疫を継続したが10カ月間では抗体価の上昇は全く認められなかった。

モルモットは12匹に免疫を行つたが, このうち2匹に約6週間後より軽度の抗体価の上昇を認め, このうち1匹が約6カ月後に Radioimmunoassay に使用可能な程度にまで抗体価が上昇した。

抗体の検出には gel filtration を用いた。Synthetic human gastrin を ^{125}I にて標識した ^{125}I -Gastrin を抗原とし, これを作製した抗血清と 4°C, 48時間反応させた後, Sephadex G-75 Column (1×75cm) にて elution した。1ml づつ分画採取しこれを well-type scintillation counter にて測定し Elution diagram を作成, 抗体価を検討した。

Fig. 2 は免疫開始後6カ月のモルモットより採取した血清の10倍希釈にて作成した Elution diagram である。12ml および30ml を中心にして二峰性の曲線が得られ, この血清に抗 Gastrin 抗体が存在することを示している。しかもこの2つの峰の占める面積がほぼ等しいことは, 10倍希釈血清にて Gastrin の Radioimmunoassay が可能であることを示している。

II-2-3 Wilson 血清の検討

最近, Wilson Laboratories より抗 Gastrin 血清が発売されたので, これを購入し検討を加えた。この血清は Yellow により作製されたもので, 豚の胃粘膜より抽出した粗 Gastrin を抗原とし, モルモットに免疫し得られたものである。この血清は human gastrin との反応性も

Fig. 2

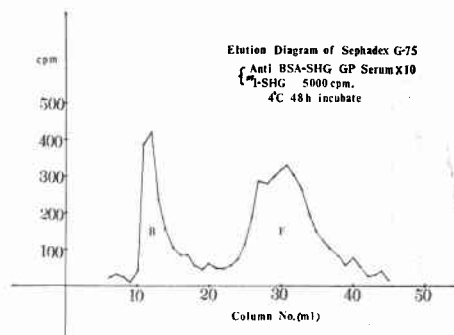
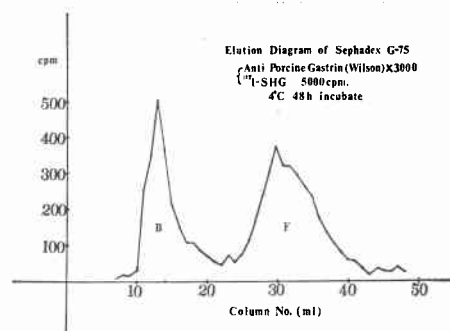


Fig. 3



高く, ヒト血清の Gastrin の Radioimmunoassay に充分使用しうることが立証されている⁴⁹⁾。

購入した Wilson 血清は Lot No. 150835 で, この抗血清と ^{125}I -Gastrin による gel filtration を行くと, **Fig. 3** に示すように, 3,000倍希釈にて二峰性の曲線が得られ, これにて Radioimmunoassay が可能であることを示している。

前述したように自家作製した抗合成 Gastrin 血清でも10倍希釈にて Radioimmunoassay は可能であるが, 多数の検体を処理するには量的に不足であるため, 以下 Wilson 血清を用いて Gastrin の Radioimmunoassay における基礎的検討および血中 Gastrin 値の測定を行つた。

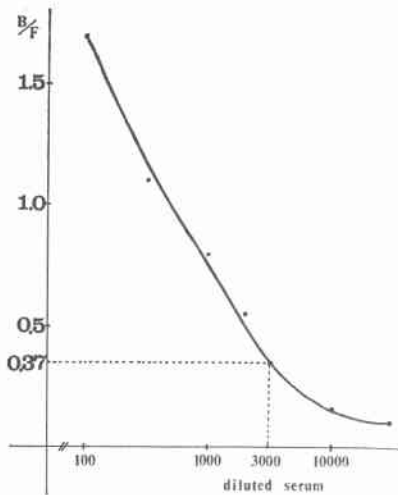
II-3 Radioimmunoassay の基礎的実験

II-3-1 抗 Gastrin 血清の抗体価測定

Lot No. 150835 の Wilson 血清, すなわち Guinea Pig Anti Porcine Gastrin Serum を用いた。

この抗血清の使用濃度を決定するため, 血清を段階希釈し, これと ^{125}I -Gastrin との結合能を検討したのが **Fig. 4** である。100倍希釈では B/F が1.70であるが, 3000倍希釈では0.37と下降し, Radioimmunoassay に用

Fig. 4 ^{125}I -SHG binding activity of Wilson's Serum (Lot No. 150835) determined by double antibody method



うるにはこれが稀釈の限界と考える。

II-3-2 Guinea Pig IgG の精製

二抗体法にて F, B を分離する場合、安定した沈降量を得るために、二次血清反応時一次血清と同様の抗原性を有する物質を反応液中に添加する必要がある。この目的で Guinea Pig IgG を精製したが、同時に二次血清作製の際にもその抗原として Guinea Pig IgG が必要である。作製方法は次の通りである。

モルモットより採取した血清を飽和硫酸にて 50% 塩析を 2 回行い粗 γ -G を抽出、さらに DEAE Column Chromatography にて IgG 分画を分離した。Radioimmunoassay に使用する際には 1 検体当たり 10 γ /0.1ml とした。

II-3-3 二次血清の作製

抗 Gastrin 抗体は IgG 分画に存在することが村上らの研究⁴⁾により確認されており、また Wilson 血清はモルモットにて作製されているので、二次血清として Anti Guinea Pig IgG を作製した。

Guinea Pig IgG を抗原とし、1 回 10mg を 1 週間々隔で白色ウサギに 3 回免疫注射した。これにて 128 倍の抗体価 (Oudin 法) の抗血清を得、また免疫電気泳動法にても明らかな沈降線が認められた (Fig. 5) ので、これを二次血清として用いることとした。

つぎに Radioimmunoassay に用いる場合の 1 検体当りの二次血清の使用量を検討した。Fig. 6 に示すように、二次血清 0.02ml で B/F が 0.386 と最高の沈降量を示すが、二次血清をさらに増量すると、B/F は漸減し、0.1

Fig. 5

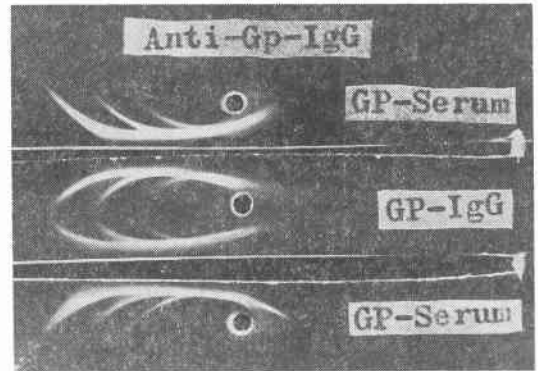
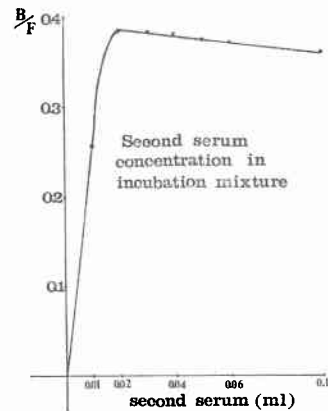


Fig. 6 Radioimmunoassay of gastrin



ml で 0.359 と低下した。したがって Radioimmunoassay に用いる二次血清の量は 0.02ml とした。

II-3-4 Gastrin の放射性同位元素標識

Hunter & Greenwood の Chloramine T 法⁵⁷⁾⁶⁴⁾により synthetic human gastrin に ^{125}I を標識した。すなわち、ダイナボット社製 carrier free Na- ^{125}I 1 mci に、0.5M potassium phosphate buffer にて稀釈した Gastrin 2 μg /100 μl を加え、さらに Chloramine T 35 μg /10 μl を添加し、60 秒間反応させた後、250 μg NaHSO₃ にて反応を中止した。これを Sephadex G-10 Column Chromatography にて labelled Gastrin と free の ^{125}I を分離し、さらに Sephadex G-75 にて labelled Gastrin を精製した。現在ダイナボット社より ^{125}I -Gastrin が市販されており、以後の実験には簡便なるため、主としてこの製品を使用した。なおこの製品の比放射能は 400~500Ci/mg Gastrin である。

II-3-5 反応時間の検討

抗原抗体反応が充分行われるためには一定の時間が必要である。Fig. 7, Fig. 8 に示すように、最高の沈降量を得るには一次反応で48時間、二次反応で18時間を要した。この実験結果より、一次反応を48時間、二次反応を24時間の測定条件として採用した。

II-3-6 補体活性の問題について

Morgan⁶⁵⁾ らは二抗体法にてF, Bを分離する際の問題点として、被検血清中の補体活性によつて沈降反応が阻害されることを挙げている。したがつて充分なる沈降

量を得るためには補体活性を抑制する必要がある、著者はこの目的にて被検血清を予め56°C, 30分にて非動化し、さらに反応液中に 0.1M Na₂-EDTA 0.1ml を添加することを試みた。

同一血清についてこのような処理を行つた場合と、行わない場合を比較すると、処理群の方が沈降量が増加するため Gastrin 値は低下するが、その standard error は小さくなり、再現性の高いことが判明した (Table 2)。したがつて二抗体法の場合には、補体活性を阻止することが望ましいと考える。

Fig. 7 Radioimmunoassay of gastrin

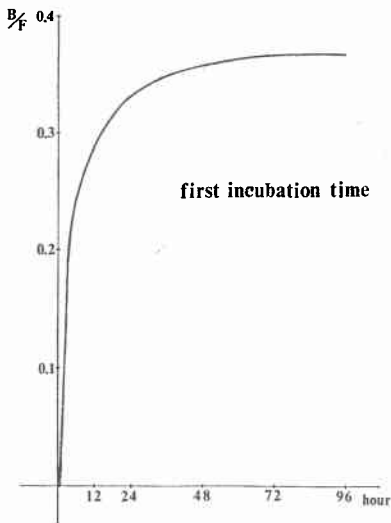


Fig. 8 Radioimmunoassay of gastrin

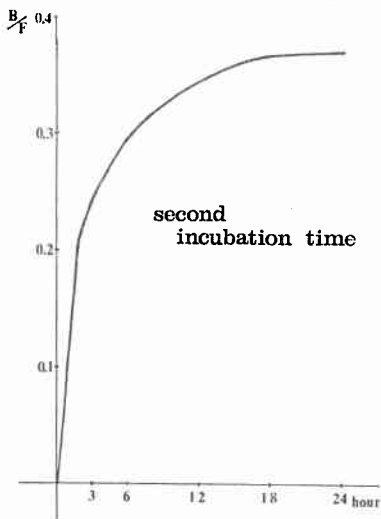


Table 2 Serum gastrin concentration measured in the presence and absence of EDTA and heat inactivation

No.	with EDTA and heat inactivation			without EDTA and heat inactivation		
	reproducibility	mean±s.e.		reproducibility	mean±s.e.	
1	13 11 14	13±2.7		14 14 18	15±3.3	
2	11 18 28	17±6.8		31 30 20	27±8.6	
3	34 46 41	40±9.3		70 58 86	71±19	
4	94 110 103	102±11		180 205 180	183±32	
5	110 94 120	108±18		165 150 130	140±25	
6	135 130 120	128±11		260 370 308	313±78	
7	250 310 280	280±42		430 320 380	380±78	

Table 3 Radioimmunoassay System for Measuring Serum Gastrin by Double Antibody Method

- (1) Initial Immune Incubation Mixture
 - Ea-PBS* 0.4 ml
 - Diluted Antiserum to Gastrin 0.1 ml
 - Serum Sample or Diluted SHG 0.1 ml
 - 0.1M Na₂EDTA 0.1 ml
 - ¹²⁵I-Labeled SHG 0.1 ml

4°C 48 h Incubate
 - (2) Second Immune Incubation Mixture
 - Initial Incubation Mixture
 - γ -globulin of Guinea-Pig (10%) 0.1 ml
 - Rabbit Antiserum to GP IgGx5 0.1 ml

4°C 24 h Incubate
 - (3) Reaction Mixture Centrifuged for 20 min. at 4000rpm.
 - (4) Radioactivity in Precipitates(B) and Supernatant (F) Determined by Scintillation Counter
- * EA-PBS: 0.1% Egg Albumin in 0.15M NaCl
0.01M Phosphate Buffer pH 7.4

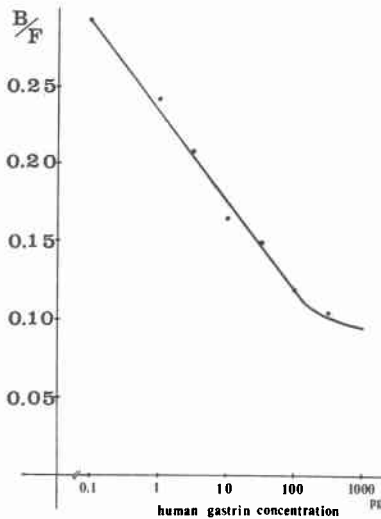
II-3-7 Assay System の作成

以上の基礎実験をもとに、Table 3 に示すような Gastrin の Radioimmunoassay System を作成した。以後の実験結果はすべてこの方法により得られたものである。

II-3-8 標準曲線の作成

I C I の synthetic human gastrin I を稀釈し、0.1~1,000pg/0.1ml の既知の標準溶液を作製し、各濃度における B/F を算出することにより標準曲線を作成した

Fig. 9 Radioimmunoassay calibration diagram



(Fig. 9).

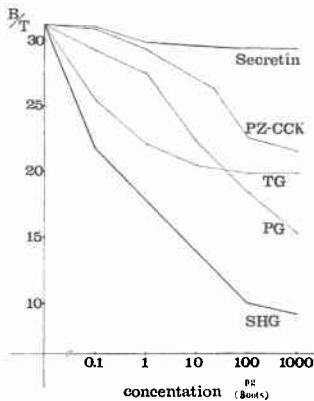
1 pg から 100pg の間で直線関係が得られ、実際に患者血清を測定する場合にはこれの10倍量、10~ 1,000 pg/ml の間で測定可能であった。

II-3-9 抗 Gastrin 血清の交叉反応性の検討

Wilson 血清の Gastrin への特異性を検討するため、各種非標識抗原の ¹²⁵I-Gastrin に対する競合抑制試験を Radioimmunoassay 法を用い行なつた (Fig.10).

従来より問題となつていた Pancreozymin-Cholecystokinin との交叉反応性は、本血清には極めて軽度であり、1,000Boots における B/F は Gastrin の 0.1pgに

Fig. 10 Comparative Immunoreactivities of Various Gastrin Fragments, PZ-CCK and Secretin



しか相当せず、Gastrin 値測定に際し、それに影響をおよぼすことは極めて少ないものとする。

Gastrin fragment である Tetragastrin, Pentagastrin に対しては合成 Gastrin の約10⁻²倍の反応性を示すが、Secretin には全く反応性を示さなかつた。

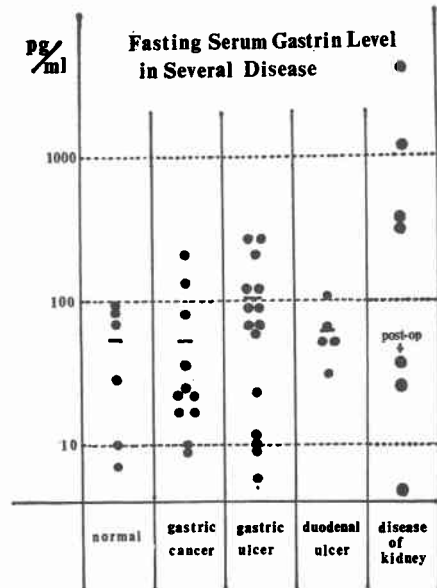
III 臨床例における血中 Gastrin 値の検討

III-1 空腹時血中 Gastrin 値

III-1-1 健康成人の Gastrin 値

Gastrin は胃液分泌の胃相を司る hormone であり、食物摂取による物理的、化学的刺激によりG細胞よりの Gastrin 分泌が促進される。したがつて対照群として、胃腸疾患を有しない健康成人を12時間絶食させた後の早朝空腹時に採血し、Gastrin 値を測定した (Fig.11).

Fig. 11



測定値は最高95pg/ml, 最低10pg/ml 以下であり、平均値は58±33pg/ml となつた。よつて本法における正常域は 100pg/ml 以下と考える。

III-1-2 各種疾患々者の Gastrin 値の検討

胃潰瘍15例、十二指腸潰瘍5例、胃癌11例、腎疾患7例の空腹時血中 Gastrin 値を測定し、比較検討した。それぞれの平均値は、胃潰瘍 101pg/ml, 十二指腸潰瘍62 pg/ml, 胃癌54pg/ml, 腎疾患1133pg/mlとなり、腎疾患々者で著明な高値を示した (Fig.11).

消化器疾患々者のうち胃潰瘍群でやや高値を示しているが、発生部位別にみると、高位潰瘍3例の平均値が

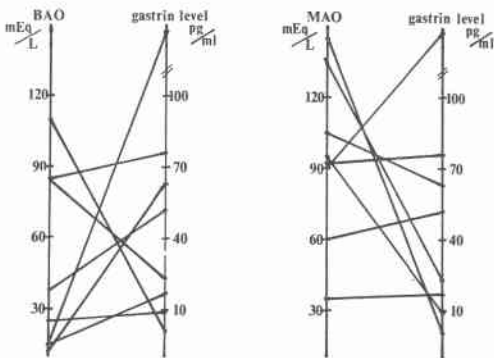
260pg/mlと高値を示すのに対し、胃角部および前庭部潰瘍は61pg/mlと対照群と大差はなかつた。高位潰瘍患者はいずれも50才以上の症例であり、これは McGuiganの報告⁶⁶⁾⁶⁷⁾にある年令的因子が関与しているものと考えられる。

胃癌の占拠部位による Gastrin 値の差異をみると、噴門癌17pg/ml、胃体部癌23pg/ml、前庭部癌58pg/ml、幽門狭窄 152pg/ml となり、幽門部に近づくにしたがつて高値を示した。

III-1-3 胃液酸度と Gastrin 値の相関性

胃潰瘍または十二指腸潰瘍患者8例につき空腹時 Gastrin 値と胃液酸度の関係を検討した (Fig.12)。Basal acid output, Maximum acid output いずれの場合も、高

Fig.12 Serum Gastrin Level and Gastric Secretion



い値の症例ほど Gastrin 値は低い傾向になつた。すなわち Gastrin 値と胃液酸度は逆相関々係にあり、Gastrin 分泌は胃内pHにより規制されており、両者の間に feedback 機構が存在することを物語っている。

III-2 薬剤刺激に対する Gastrin 値の変動

III-2-1 Histamine 刺激

胃潰瘍患者2例に Histalog 法による胃液酸度と血中 Gastrin 値の変動を比較した (Fig.12)。

刺激直後より胃液酸度の急上昇を認めるが Gastrin 値はむしろ低下し、胃液酸度が下降を始める時点において Gastrin 値の上昇を認めた。

Kahlson³¹⁾³²⁾ や Johnson⁶⁸⁾ らは、Gastrin が直接壁細胞に作用するのではなく、Histamine を介して胃液分泌がなされるとの仮説を立てているが、この点より興味ある結果といえる。

III-2-2 Gastrin 刺激

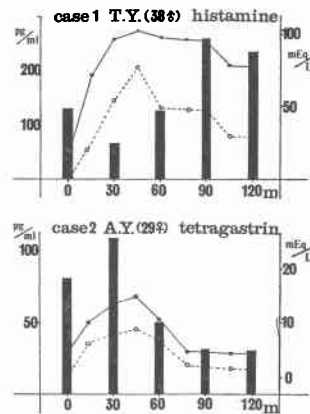
胃潰瘍患者3例に対し、Gastrin fragment である Te-

tragastrin または Pentagastrin 4 γ /kg筋注後の血中Gastrin の変動を調べた。この場合には当然のことながら、血中 Gastrin 値の上昇にともなつて胃液酸度も上昇を認めた。なお Fig.12 には Tetragastrin によるものを示したが、Pentagastrin 刺激においてもほぼ同様の変動を示した。

III-2-3 Insulin 刺激

Insulin 刺激による胃液分泌亢進は、低血糖に基因する迷走神経刺激によるものとされている。十二指腸潰瘍2例、胃潰瘍1例に Hollander test を行い、その後の胃液酸度、Gastrin 値、血糖値を測定した (Fig.13)。

Fig. 13 Gastrin levels in response to stimulation(1)



血糖値はInsulin刺激後30分から60分の間20~30mg/dlと低値を示し、これと同時に高 Gastrin血症および胃液分泌の亢進を認めた。すなわち迷走神経刺激によりGastrin 分泌が促進され、その結果胃液酸度が上昇するものと考えられ Gastrin 分泌に迷走神経が関与していることを示唆するものである。

III-2-4 食餌刺激

食餌内容によつて Gastrin 値の上昇に相違のあることが想像されるが、今回は食パン2片および牛乳 200ml 摂取後の Gastrin 値の変動をみた。食後30~60分の間で Gastrin値の上昇を認め、その後は漸減した (Fig.13)。しかし症例によりこれと異つた変動を示すものもあり今後試験食を作製し、一定の刺激となるよう考慮する必要がある。

III-3 胃切除術と Gastrin 値

胃癌および消化性潰瘍に対する外科的治療が、Gastrin にいかなる変動をきたすか検討を加えた。胃癌群、潰瘍群ともにG細胞領域を含めた胃切除術にて、空腹時 Gastrin 値はそれぞれ下降を認め 22pg/ml、23pg/ml とな

Fig. 14 Gastrin levels in response to stimulation(2)

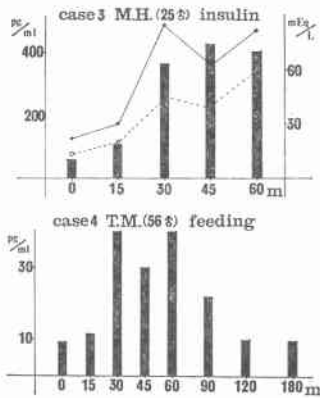
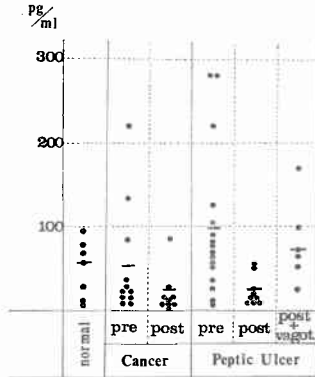


Fig. 15 Fasting Serum Gastrin Level in Gastric Disease Pre- and Post-operation



つた (Fig.14). 前庭部領域の切除にて Gastrin 値の低下をきたすのは当然であるが、胃全摘術を行つた症例でも Gastrin 値は 0 とはならないことから、Gastrin 分泌は胃前庭部に限らず、その他の臓器、十二指腸、小腸、膵臓などにも存在することが推測される。

胃十二指腸潰瘍に、胃切除術と合せて迷走神経切断術を施行した群は、空腹時 Gastrin 値が 73pg/ml となり、単に胃切除にとどめた症例の 23pg/ml に比べかなりの高値を示したことは興味深い。

IV 考 察

消化管ホルモンである Gastrin 研究の歴史は古く、1905年の J.S. Edkins²⁾ に逆のぼるが、実際の研究に進展をみたのは、1964年の Gregory & Tracy¹⁶⁾ の化学合成々功以後のことである。その後 Gastrin の生理作用が明らかになるにつれ、その強力な胃酸分泌刺激作用が注目され消化器疾患との関連性を 究明すべく血中 Gastrin

の定量化が急がれた。一方、各種蛋白性ホルモンに対する Radioimmunoassay 法が開発され、輝かしい成果を収めている点より、Gastrin に対してもこの方法を導入すべく研究が進められた。

Radioimmunoassay を行う場合、測定しようとする物質に対する特異性の高い、高力価の抗体を作製することが第一条件であるが、とくに Gastrin においては、生体内に一部構造を同じくする Pancreozymin-Cholecystokinin が存在するため、これとの交叉反応性が常に問題となつてくる⁴⁵⁾⁴⁶⁾。数年前より小玉ら⁴³⁾は Gastrin の Radioimmunoassay の検討をすすめており、当初 Gastrin の 1 fragment である Hexagastrin に対する抗体を作製し、これにて Gastrin の定量を試みていたが、Pancreozymin-Cholecystokinin との交叉性が問題となり、Pancreozymin-Cholecystokinin が血中にどの程度存在するかが不明であり、正確な Gastrin 値の測定には、合成 Gastrin 抗体を使用した Radioimmunoassay が必要であることを報告している。

著者は BSA-Gastrin を抗原とし、抗 Gastrin 抗体の作製を試み、約 6 カ月の免疫にて抗体価の上昇を認め、10 倍稀釈にて Gastrin の Radioimmunoassay に使用可能な抗血清の作製に成功した。しかし多くの検体を処理する上には、さらに高力価の血清が必要であり、今後追加免疫を行い抗体価の上昇を計る必要がある。Yellow & Berson⁴⁹⁾ は豚胃粘膜よりの抽出 Gastrin を抗原とし、抗 Gastrin 血清を作製したが、良好な抗血清を得るに約 2 年間の歳月を要している。このことより haptane 抗体の作製には長期にわたる免疫が必要であることを痛感する。

Radioimmunoassay における Free と Bound の分離には二抗体法と、Charcoal および Resin などの吸着剤を用いる一抗体法とがある。これらの吸着剤を用いた場合、Free の ¹²⁵I-Gastrin を完全に吸着することは不可能であり、また damaged hormone をも吸着することから、鋭敏性、再現性にも不安が残るため、F、B の分離には二抗体法を用いた。

二抗体法による問題点は non-specific inhibitor によつて沈降反応が抑制されることにあるが、これは補体活性によるものと考えられており⁶⁵⁾、熱処理および EDTA の添加により阻止することは可能である。Table 2 に示したごとく、このような処理を行うことにより、測定値はやや低下するが、再現性は上昇し、良好な結果を得ている。

著者の作成した Assay System は Table 3 に示した

通りであるが、この方法にて血中 Gastrin 値10～1,000 pg/ml の間での測定が可能であり、また測定する患者血清は 100pg/ml 以下のものが大多数を占めているため、臨床的に充分使用できるものと考えられる。しかし Zollinger-Ellison 症候群のごとき 1,000pg/ml を越える症例では、患者血清を稀釈して測定する必要がある。Gastrin の Radioimmunoassay の際、常に問題となる Cholecystokinin-Pancreozymin との交叉反応性も極めて軽微であり、抗 Tetragastrin 抗体や抗 Hexagastrin 抗体に比べこの血清の優秀性を示しており、より正確な Gastrin 値の測定が可能となった。

最近、Charcoal 法による Gastrin Kit が発売されたが、この方法と二抗体法を比較した結果、測定値にかなり高い相関性が得られたため、今後この方法による Gastrin の Radioimmunoassay にも期待するところ大である⁷⁰⁾。

健康人の血中 Gastrin 値は、その測定に使用する抗血清の相違や、F、B の分離方法が異なるため、各施設によりまちまちの値が報告されており、未だ確一化されていない。著者の行つた二抗体法による健康人平均値は 58.0 pg/ml であり、正常域は 100pg/ml 以下と考えているが、Yallow & Berson⁶⁹⁾ は Resin 法により 75pg/ml 以下、McGuigan⁶⁶⁾⁶⁷⁾ は二抗体法により 165±28pg/ml、また Temperly⁷¹⁾ は Dextran coated charcoal 法にて 84±6 pg/ml を正常値と報告している。本邦での報告例は未だ少ないが、大倉⁷²⁾⁷³⁾ が Resin 法にて 1.9ng/ml とかなりの高値を報告しているほか、松尾⁷⁴⁾ が Resin 法にて 50～180pg/ml、谷内⁷⁵⁾ が二抗体法にて 18.6pg/ml と 100pg/ml 以下を正常値としている者が多い。また最近発売になつた Dextran coated charcoal 法による Gastrin Kit での正常値は、増岡⁷⁶⁾ が 105±28.7pg/ml、小玉⁷⁰⁾ が平均 39.2pg/ml と報告している。

McGuigan⁶⁶⁾⁶⁷⁾ は高令者になるにしたがつて空腹時血中 Gastrin 値は高くなると報告しており、その原因として加齢による萎縮性胃炎が進展し、胃内 pH が上昇するため、Gastrin 分泌が促進されると述べている。著者は胃液酸度と血中 Gastrin 値の比較を行つたが、これらは逆相関々係にあり、血中 Gastrin 値が胃内 pH の影響を受けることは明らかで、他のホルモン分泌と同様に feed back 機構が存在するものと考えられる。

各種消化器疾患々者の空腹時 Gastrin 値を比較した場合、正常群と有意の差は認めず、ただ高位潰瘍のみが 260pg/ml とかなりの高値を示したにすぎなかつた。ま

た他施設の報告でも十二指腸潰瘍における血中 Gastrin 値は正常群に比べやや高値をとる傾向にはあるが、明らかな差とはなっていない。従来 Gastrin は胃十二指腸潰瘍の aggressive factors の1つとして考えられていたが、Zollinger-Ellison 症候群のごとき異常な高値を示す場合は例外として、通常みられる胃十二指腸潰瘍に対して aggressive factor として作用するとは考えにくい。しかし今回測定した症例群は、すでに潰瘍を形成している者ばかりであり、しかも空腹時 Gastrin 値という静的な観察にすぎないため、今後、潰瘍の発生初期、急性期、慢性期などに分け比較し、さらに食餌刺激、薬剤刺激に対する反応性を検討すれば、正常群との有意の差を生じることも考えられるので、現時点では、Gastrin を aggressive factors から除外することは尚早であろう。

胃癌症例で癌占拠部位が幽門部に近づくにしたがつて血中 Gastrin 値が高値を示しているが、今回は部位別比較のため、胃の一領域のみに限局した比較的早期の症例を選んでおり、癌の進行度と関係があるものと思われる。さらに進行し幽門部領域全体に広く浸潤した胃癌では G 細胞も犯され、Gastrin 値は低下すると考えられるが、G 細胞が健全な状態にあれば、癌による物理的刺激、食物の停滞による化学的刺激、さらには幽門狭窄による胃内圧亢進が G 細胞を刺激するため、幽門部に近づくにしたがつて Gastrin 値が上昇するものと考えられる。

今回研究対象となつた症例群中、腎疾患群のみが著明な高 Gastrin 血症を示したことは注目されるが、このことより Gastrin が腎臓で分解または排泄されることが推測される。しかしこれら症例で必ずしも胃液酸度は高くなく、また潰瘍性病変も認められないことから、異常に増加している Gastrin は、抗 Gastrin 抗体との Immunoreactivity は存在するが、生理活性基はなんらかの変化を受けていることも想像される。なお、腎移植後の腎機能の改善された1症例では Gastrin 値は 38pg/ml と正常値にまで減少していた。

Gastrin と胃液分泌機構に関していろいろ論じられているが、著者の行つた薬剤刺激、食餌刺激によりその一部が解明、実証されたものと考えられる。すなわち、食餌刺激、Insulin 刺激により血中 Gastrin 値が上昇し、Histamine 刺激により一時的に Gastrin 値が低下することより、Gastrin 分泌は食餌摂取による化学的、物理的刺激により促進され、また迷走神経の支配をも受けている。さらに血中に遊離した Gastrin は直接壁細胞に作用する

のではなく、Kahlson⁸¹⁾82) や Johnson⁸³⁾ らの提唱したごとく、histamine store cell に作用し、Histamine の放出を促し、この Histamine の刺激により壁細胞の胃液分泌がなされるのであろう。また胃液酸度が上昇し、胃内pHが低下すれば、feed back 機構により Gastrin 分泌が抑制されるのであろう。しかし胃液分泌はこのような単一な Mechanism のみによるのではなく、他の消化管ホルモン、Secretin, Gastron, Cholecystokinin-Pancreozymin などと競合相乗作用が加味し、もつと複雑なものであろうと推察されるが、今回の実験によりその一部が解明されたものと考えられる。

胃切除術に伴う血中 Gastrin 値の変化を比較すると、Gastrin 分泌領域である胃前庭部切除により Gastrin 値は当然低下するが、これに迷走神経切断術を併用した場合、単に胃切除を施行した群より有意の差をもつて血中 Gastrin 値が高値を示していることが注目される。Holle⁸¹⁾や田北⁸²⁾らは迷走神経前庭枝に Gastrin 分泌を抑制する因子が含まれていることを推定しているが、小玉、芳竹らは実験の結果より、この説を否定している。また今回の実験における迷走神経切断後の高 Gastrin 血症の原因として Holle らの説を挙げるには、普通切除の場合必ず迷走神経前庭枝が切断されていることより根拠とはなり得ない。したがってその原因として、迷切による胃液酸度の低下による刺激や、胃運動低下に伴う胃内容物の停滞が Gastrin 分泌を促進すること、さらには Gastrin 分泌抑制因子である Secretin や Gastrin が迷切により変動を受け、二次的に Gastrin 値が上昇すること、迷切による脾よりの Gastrin 分泌増進などの因子が考えられる。いずれにせよ、今回の実験結果のみから結論を出すことはできないが、迷走神経切断後の Gastrin 変化については、胃幽門部以外の Gastrin 産生細胞よりの Gastrin 分泌に関し、多くの重要な問題が存在することを示唆している。

わが国においては従来より胃十二指腸潰瘍の外科的療法として、広範囲胃切除術が広く行われてきたが、術後の酸分泌面からみても良好な結果となつている。しかしこの手術法が胃十二指腸潰瘍の発生原因、術後の消化吸収などを考慮に入れた上での治療法として最適なものであるか否か、もう一度検討される必要が生じてきた。

最近、消化性潰瘍に対する手術法⁸⁴⁾85)86)87)として、幽門洞切除兼選択的迷走神経切断術、選択的迷走神経切断術兼幽門形式、および近位選択的迷走神経切断のみの方法など、迷切を中心とする手術法の報告が増えつつあ

る。これら迷切を加えることにより、胃臓器をできるだけ温存して、しかも潰瘍治療に良好な結果を得られれば理想的である。今後これら手術法に対する実験的裏付けが必要であり、その手段の1つとして Gastrin の Radioimmunoassay がますます有用となるのであろう。これにより、胃液分泌の生理、迷切の意義などが明らかとなり、胃十二指腸潰瘍に対する正しい治療法が確立されることであろう。

V 結 語

Gastrin の Radioimmunoassay を目的とし、抗 Gastrin 血清の作製を試み、約6カ月間の免疫後、10倍稀釈血清にて Radioimmunoassay に使用可能なる抗血清を得た。

Wilson血清 Lot No. 150835を用い二抗体法にてGastrin の Radioimmunoassay System を作成し、血中 Gastrin 値の測定を行つたが、本方法による測定可能域は10～1,000pg/ml であり、臨床的に充分活用できるものである。

この Assay System における健康人空腹時血中 Gastrin 値の平均は58±33pg/ml であるが、100pg/ml 以下であれば一応正常値と考えている。これと各種消化器疾患々者の Gastrin 値を比較した場合、高位潰瘍にて280pg/ml と高値を示しているほかは、胃角部、十二指腸潰瘍、胃癌ともに有意の差は認めず、aggressive factor として Gastrin を考える場合、動的な変化に注目する必要がある。また腎疾患群で著しい高 Gastrin 血症を認めたことより、Gastrin は腎にて分解または排泄されることが推測される。

胃液分泌の Mechanism は複雑で不明な点も多いが、食餌刺激、薬物刺激を行うことによりその一部が明らかとなり、とくに Gastrin が壁細胞を刺激する際、Histamine を介してなされることが推察され、また Gastrin と胃液酸度の間には feed back 機構が存在することが示唆される。

胃切除術にて Gastrin 値は低下するが、これに迷走神経切断術を併用すると、単に胃切除を行つた症例よりも高い血中 Gastrin 値を得た。この点に関して今後さらに検討を加える必要があり、消化性潰瘍に対する迷切の意義、手術適応に対する諸問題など、解決されるべき多くの課題が残されている。

稿を終るに臨み、ご指導、ご校閲を頂いた恩師橋本勇教授ならびに小玉正智講師に深甚なる謝意を表す。

文 献

- 1) 増田正典：胃十二指腸潰瘍のすべて，歴史，9—14，南江堂，東京，1971.
- 2) Edkins, J.S.: The chemical mechanism of gastric secretion. *J. Physiol. (Lond.)* 34, 133—144, 1906.
- 3) Dale, H.H., et al.: The physiological action of β -iminazolyethylamine. *J. Physiol.*, 41, 318—344, 1910.
- 4) Popielski, L.: Die Wirkung der Organextrakte und die Theorie der Hormone. *Münch. Med. Wschr.*, 59, 534—535, 1912.
- 5) Sacks, J., et al.: Histamine as the hormone for gastric secretion. *Am. J. Physiol.*, 101, 331—338, 1932.
- 6) Komarov, S.A.: Gastrin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 38, 514—516, 1938.
- 7) Uvnäs, B.: The part played by the pyloric region in the cephalic phase of gastric secretion. *Acta Physiol. Scand.*, 4, Suppl. 13, 1—86, 1942.
- 8) Uvnäs, B.: The gastric secretory excitant from the pyloric mucosa. *Acta Physiol. Scand.*, 6, 97—107, 1943.
- 9) Harper, A.A.: The effect of extracts of gastric and intestinal mucosa on the secretion of HCl by the cat's stomach. *J. Physiol.* 105, 31, 1946.
- 10) Gregory, R.A. & H.J. Tracy: The preparation and properties of gastrin. *J. Physiol. (Lond.)*, 149, 70—71, 1959.
- 11) Gregory, R.A. & H.J. Tracy: The further purification of gastrin; Secretory responses in a human subject. *J. Physiol. (Lond.)*, 154, 52—53, 1960.
- 12) Gregory, R.A. & H.J. Tracy: The preparation and properties of gastrin. *J. Physiol. (Lond.)*, 156, 523—543, 1961.
- 13) Gregory, R.A. & H.J. Tracy: Constitution and properties of two gastrins extracted from hog antral mucosa. *J. Physiol.* 169, 18—19, 1963.
- 14) Gregory, R.A. & H.J. Tracy: The constitution and properties of two gastrins extracted from hog antral mucosa. *Gut*, 5, 103—117, 1964.
- 15) Gregory, H., et al.: Structure of gastrin. *Nature (Lond.)*, 204, 931—933, 1964.
- 16) Gregory, R.A., et al.: Human gastrin; Isolation and synthesis. Isolation of two gastrins from human antral mucosa. *Nature (Lond.)*, 209, 583—585, 1966.
- 17) Gregory, R.A.: The isolation and chemistry of gastrin. *Gastroenterology*, 51, 953—958, 1966.
- 18) Kanturek, S. & M.I. Grossman: Acid response to gastrin and related peptides. *Gastroenterology*, 50, 650—652, 1966.
- 19) Morley, J.S.: Structure-function relationships in gastrin-like peptides. *Proc. Roy. Soc., B.* 170, 97—111, 1968.
- 20) McGuigan, J.E., et al.: Studies with antibodies to gastrin; Radioimmunoassay in human serum and physiological studies. *Gastroenterology*, 58, 139—150, 1970.
- 21) Brooks, A.M. et al.: Effect of combinations of histamine and pentagastrin on gastric secretion in man and dog. *Gastroenterology*, 58, 470—475, 1970.
- 22) Cohen, M.M. et al.: Caffeine and pentagastrin stimulation of human gastric secretion. *Gastroenterology*, 61, 440—444, 1971.
- 23) 和田武雄：ガストリンとその臨床的意義，内科，25, 208—214, 1970.
- 24) 瀬尾 功ほか：ガストリン様ペプチドの基礎と臨床，総合臨床，20, 303—308, 1971.
- 25) 松尾 裕：胃液分泌の神経体液性調節機構と消化性潰瘍の成因について，京都医学会雑誌，21, 21—27, 1971.
- 26) 笹川力ほか：テトラガストリンによる胃液分泌検査法 (Gastrintest)，ホルモンと臨床，18, 606—612, 1970.
- 27) Jaffe, B.M. et al.: Immunochemical measurement of the vagal release of gastrin. *Surgery*, 68, 196—201, 1970.
- 28) Stening, G.F. et al.: Gastric acid response to pentagastrin and histamine after extragastric vagotomy in dog. *Gastroenterology*, 59, 364—371, 1970.
- 29) Walsh, J.H. et al.: The effect of atropine on plasma gastrin response to feeding. *Gastroenterology*. 60, 16—21, 1971.
- 30) Solcia, E. et al.: Studies on the G cells of the pyloric mucosa, the probable site of gastrin secretion. *Gut*, 10, 379—388, 1969.
- 31) Kahlson, G. et al.: Mobilization and formation of histamine in the gastric mucosa as related to acid secretion. *J. Physiol.* 174, 400—416, 1964.
- 32) Kahlson, G. et al.: Accelerated mobilization and formation of histamine in the gastric mucosa evoked by vagal excitation. *J. Physiol.* 190, 455—463, 1967.
- 33) Cameron, A.J. et al.: Comparison of effects of gastrin, cholecystokinin-pancreozymin, secretin and glucagon on human stomach muscle in vitro. *Gastroenterology*. 59, 539—545, 1970.
- 34) Ferguson, D.J.: Structure of antral gastric mucosa. *Surgery*, 65, 280—291, 1960.

- 35) McGuigan, J.E.: Gastric mucosal intracellular localization of Gastrin by immunofluorescence. *Gastroenterology*, 55, 315—327, 1968.
- 36) Carvalheira, A.F. et al.: Cytochemical and Ultrastructural observations on the argentaffin and argyrophil cells of the gastro-intestinal tract in mammals, and their place in the APUD series of polypeptide-secreting cells. *Histochemie*, 14, 33—46, 1968.
- 37) McGuigan, J.E. et al.: Correlative immunohistochemical and light microscopic studies of the gastrin cell of the antral mucosa. *Gastroenterology*, 60, 223—236, 1971.
- 38) Uvnäs, B. & S. Emäs: A method for biologic assay of gastrin. *Gastroenterology*, 40, 644—648, 1961.
- 39) Lai, K.S.: Studies on gastrin; A method of biological assay of gastrin. *Gut*, 5, 327—333, 1964.
- 40) 松尾 裕: Gastrin の Bioassay, 医学のあゆみ, 63, 235—239, 1967.
- 41) McGuigan, J.E.: Antibodies to the carboxyl-terminal tetrapeptide of gastrin. *Gastroenterology*, 53, 697—705, 1967.
- 42) McGuigan, J.E.: Antibodies to the carboxyl-terminal tetrapeptide amide of gastrin in guinea pigs. *J. Lab. & Clin. Med.* 71, 964—970, 1968.
- 43) 小玉正智ほか: Gastrin の Radioimmunoassay. 抗体作製への試み. 京府医大誌, 79, 93—100, 1970.
- 44) 村上健二: ガストリンの Radioimmunoassay に関する研究. 京府医大誌, 79, 207—222, 1970.
- 45) McGuigan, J.E.: Antibodies to the C-terminal tetrapeptide amide of gastrin; Assessment of antibody binding to cholecystokinin-pancreozymin. *Gastroenterology*, 54, 1012—1017, 1968.
- 46) Charters, A.C. et al.: Secretory and immunohistochemical properties of gastrin and pancreozymin cholecystokinin. *Gastroenterology*, 57, 156—158, 1969.
- 47) McGuigan, J.E.: Immunohistochemical studies with synthetic human gastrin. *Gastroenterology*, 54, 1005—1011, 1968.
- 48) McGuigan, J.E.: Studies of the immunohistochemical specificity of some antibodies to human gastrin. *Gastroenterology*, 56, 429—438, 1969.
- 49) Yallow, R.S. & S.A. Berson: Radioimmunoassay of gastrin. *Gastroenterology*, 58, 1—14, 1970.
- 50) Yallow, R.S. & S.A. Berson: Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J. Clin. Invest.* 39, 1157—1175, 1960.
- 51) 入江 実ほか: Radioimmunoassay による人成長ホルモン; 測定法の実際と正常値, 最新医学, 26, 1059—1064, 1971.
- 52) 玉田太朗: FSH と LH の Radioimmunoassay: 測定法の実際と正常値. 最新医学, 26, 1065—1072, 1971.
- 53) 福地 稔ほか: TSH. 最新医学, 26, 1079—1084, 1971.
- 54) 福地 稔ほか: ACTH. 最新医学, 26, 1085—1090, 1971.
- 55) 鎮目和夫ほか: Radioimmunoassay, Radioimmunoassay 法の原理. 3—10, 朝倉書店, 東京, 1970.
- 56) 井村裕夫ほか: Radioimmunoassay の原理と問題点. 最新医学, 26, 1027—1034, 1971.
- 57) Hunter, W.M. & F.C. Greenwood; Preparation of Iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature*, (Lond.) 194, 495—496, 1962.
- 58) 倉田邦夫: 標識ホルモン作製法の理論と実際, 最新医学, 26, 1035—1040, 1971.
- 59) 入江 実: Radioimmunoassay, F と B の分離法. 63—78, 朝倉書店, 東京, 1970.
- 60) 熊原雄一ほか: 結合型 (B) と遊離型 (F) の分離法. 最新医学, 1041—1048, 1971.
- 61) Gilliland, P.F. & T.E. Prout: Immunologic studies of octapeptides, II. Production and detection of antibodies to oxytocin. *Metabolism*, 14, 918—923, 1965.
- 62) Boyd, G.W. & W.S. Peart: The production of high-titer antibody against free angiotensin II. *Lancet*, 2, 129—133, 1968.
- 63) Goodfriend, T.L. et al.: Antibodies to bradykinin and angiotensin; A use of carbodiimides in immunology. *Science*, 144, 1344—1346, 1964.
- 64) Morley, J.S. et al.: Iodination and the biological activity of gastrin. *Nature*, 228, 58—59, 1970.
- 65) Morgan, C.R. et al.: Further studies of an inhibitor of the two antibody immunoassay system. *Diabetes*, 13, 579—584, 1964.
- 66) McGuigan, J.E. et al.: Serum gastrin concentrations in pernicious anemia. *New Eng. J. Med.* 12, 358—361, 1970.
- 67) Trudeau, W.L. & J.E. McGuigan: Serum gastrin levels in patients with peptic ulcer disease. *Gastroenterology*, 59, 6—12, 1970.
- 68) Johnson, L.R.: Control of gastric secretion; no room for histamine? *Gastroenterology*, 61, 106—118, 1971.
- 68) 小玉正智ほか: ガストリン構造の末端 Hexapeptide における抗原決定基の検討. 最新医学, 27, 1845—1852, 1972.
- 70) 小玉正智ほか: Gastrin の Radioimmunoassay, *Medical Postgraduates*, 12, 150—153, 1974.

- 71) Temperley, J.M. et al.: Bioassay and radioimmunoassay of plasma gastrin in a case of Zollinger-Ellison syndrom. *Scand. J. Gastroent.* 6, 735—738, 1971.
- 72) 大倉久直ほか：テトラガストリン抗血清によるガストリンのラジオイムノアッセイ。医学のあゆみ, 76, 492—494, 1971.
- 73) 大倉久直ほか：ガストリンのラジオイムノアッセイ第3報。日消誌, 68, 1249—1250, 1971.
- 74) 松尾裕ほか：最近開発された Radioimmunoassay；ガストリン, 最新医学, 26, 1091—1096, 1971.
- 75) 谷内 昭ほか：二抗体法による血中 Gastrin の Radioimmunoassay とその臨床的応用知見。医学のあゆみ, 78, 529—530, 1971.
- 76) 増岡忠道ほか：Gastrin の Radioimmunoassay. *Medical Postgraduates*, 11, 238—245, 1973.
- 77) Konturek, S.J. et al.: Evidence for an enterogastric reflex for the inhibition of acid secretion. *Gastroenterology*, 61, 667—674, 1971.
- 78) Brooks, A.M. et al.: Effect of secretin and cholecystokinin on Pentagastrin-stimulated gastric secretion in man. *Gastroenterology*, 59, 114—119, 1970.
- 79) Hansky, J. et al.: Effect of secretin on serum gastrin as measured by immunoassay. *Gastroenterology*. 61, 62—68, 1971.
- 80) Lucien, H.W. et al.: Inhibitory effects of a purified enterogastron, secretin and cholecystokinin on histamine-stimulated gastric acid secretion. *Gastroenterology*. 59, 707—711, 1970.
- 81) Holle, F. et al.: Neue Wege der Chirurgie des gastro-duodenal Ulkus. *Med. Klin.* 62, 441—450, 1967.
- 82) 田北周平ほか：消化性潰瘍に対する迷走神経切断合併術式の検討, 手術. 26, 444—456, 1972.
- 83) 小玉正智ほか：胃切除術と血中ガストリンの動態。外科, 35, 534—538, 1973.
- 84) Ochsner, A. et al.: The surgical treatment of peptic ulcer; A critical analysis of results from subtotal gastrectomy and from vagotomy plus partial gastrectomy. *Surgery*. 67, 1017—1028, 1970.
- 85) Everett, M.T. et al.: Selective and total vagotomy plus Pyloroplasty; A comparative study of gastric secretion and motility in dogs. *Ann. Surg.* 171, 31—35, 1970.
- 86) Jordan, P.H. et al.: A prospective evaluation of vagotomy-pyloroplasty and vagotomy-anterectomy for treatment of duodenal ulcer. *Ann. Surg.* 172, 547—563, 1970.
- 87) Sawyers, J.L. et al.: Selective gastric vagotomy with antrectomy or pyloroplasty. *Ann. Surg.* 174, 541—547, 1971.