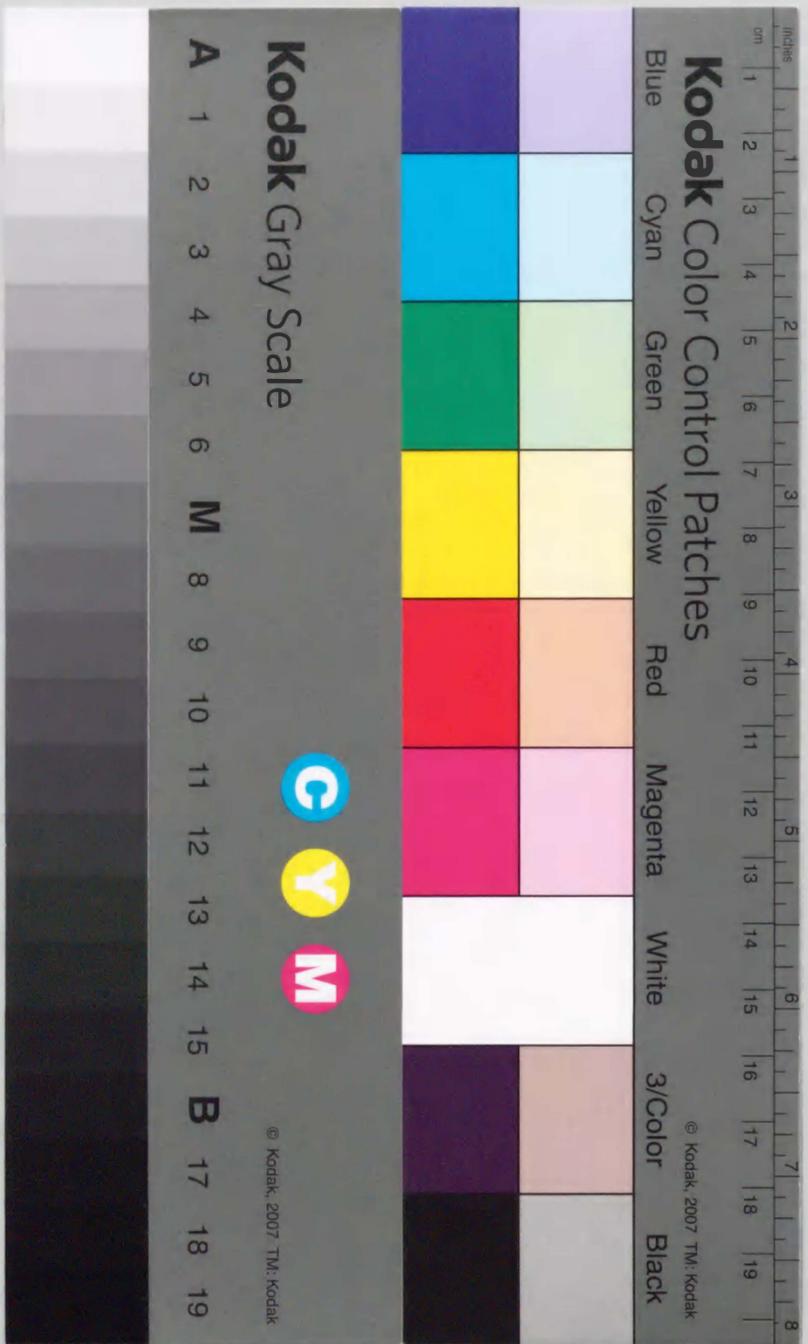


コレキシトキエン(CCK)受容体拮抗薬KSG-504の  
消火管機能に及ぼす作用の研究

山崎芳伸



目次

序論	1
第1部 CCK受容体に対するKSG-504の選択性の検討およびin vitro膵腺房細胞 CCK刺激amylase放出のKSG-504による抑制	7
序	7
実験材料および方法	7
実験結果	10
考察	17
第2部 KSG-504のin vivo膵機能に対する作用の検討	22
序	22
実験材料および方法	22
実験結果	25
考察	36
第3部 KSG-504の胆嚢、胃および腸管に対する作用の検討	40
序	40
実験材料および方法	40
実験結果	44
考察	54
第4部 末梢に投与したCCKにより生じる中枢作用に対するKSG-504の 作用の検討	58
序	58
実験材料および方法	58
実験結果	60
考察	70

結論

73

謝辞

75

引用文献

76

序論

cholecystokinin (CCK) は消化管および中枢神経系に存在するペプチドホルモンであり、1928年に Ivy と Oldberg により胆嚢収縮作用を有する物質として発見された<sup>1)</sup>。その後、1943年に Harper と Raper により膵臓からの消化酵素分泌を促進する物質が発見され、pancreozymin (PZ) と名付けられた<sup>2)</sup>。当初、両者は別々の物質と考えられていたが、1966年 Jorpes と Mutt により同一物質であることが明らかにされ<sup>3)</sup>、cholecystokinin-pancreozymin (CCK-PZ) もしくは cholecystokinin (CCK) と称せられるようになった。さらに1975年には Vanderhaeghen らにより脳領域における CCK 様の immunoreactivity が見い出され<sup>4)</sup>、CCK の中枢神経系における存在が証明された。

末梢において CCK は、摂食後十二指腸に流入した食物の刺激により十二指腸および小腸の I 細胞より放出され<sup>5)</sup> 消化管に対し様々な作用を示す (Fig. 1)。膵臓においては、

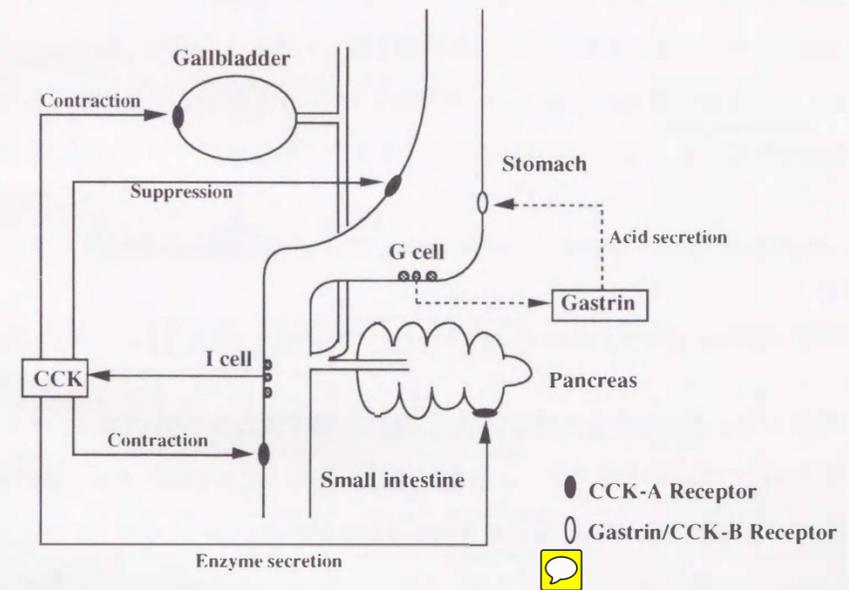


Fig. 1

Roles of CCK and gastrin in gastrointestinal tract.

膵腺房細胞よりの消化酵素の分泌を促進する<sup>6, 7, 8)</sup>とともにランゲルハンス島β細胞からの insulin の内分泌促進作用<sup>9, 10)</sup>も有する。また、胆道系においては、胆嚢および胆管収縮促進作用<sup>11, 12)</sup>を、胃および腸管においては、胃運動の抑制<sup>13)</sup>、腸管運動亢

進<sup>14, 15)</sup>などの作用を有している。一方、CCKとそのC末端ペプチドの配列が類似している gastrin は胃幽門前庭部のG細胞より放出され、胃酸分泌を促進する。CCKは中枢神経系にも存在しており、神経伝達物質もしくは神経調節因子として摂食<sup>16, 17)</sup>、不安<sup>18, 19)</sup>、運動<sup>20)</sup>、痛み<sup>21, 22)</sup>および記憶<sup>23)</sup>などに影響すると考えられているが、末梢に投与されたCCKによる行動、摂食などに対する作用も報告されており、その作用点に関していまだに解明されていない点がある (Fig. 2)。

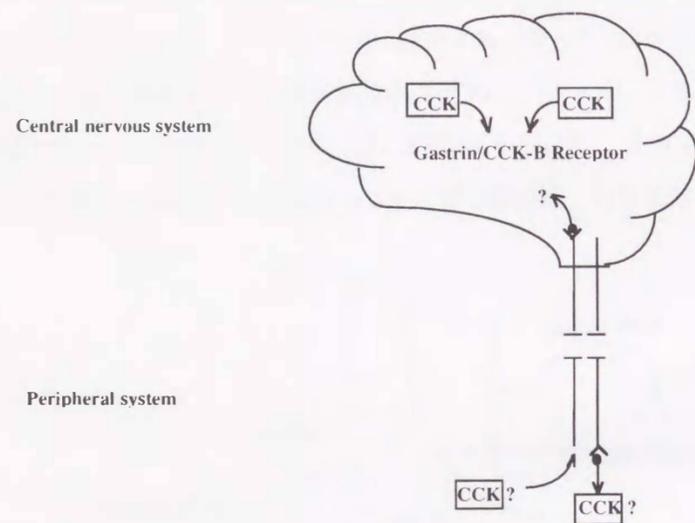


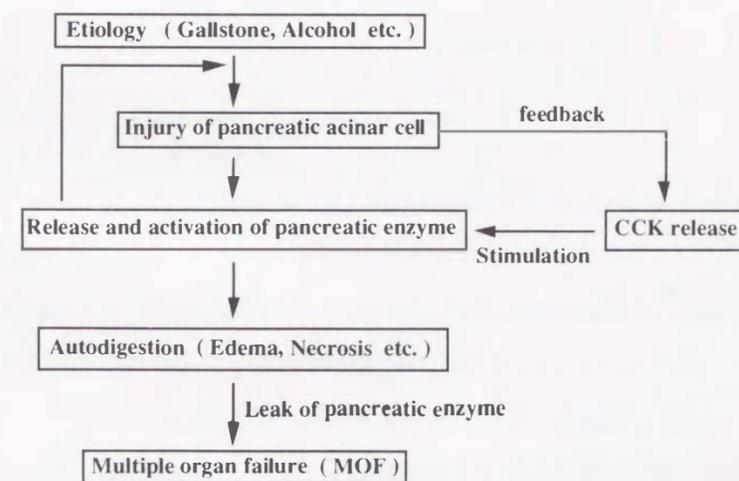
Fig. 2  
Roles of CCK in central nervous system.

CCKのホルモンとしての基本構造はアミノ酸33個で構成されるCCK-33である<sup>24)</sup>が、生理活性はC末端の8個のアミノ酸配列部位にあり、この8個のアミノ酸で構成されるCCK-8が生物活性上特に重要である<sup>25)</sup>。CCK-8はC末端から7番目のアミノ酸である tyrosine に硫酸基が結合している。さらに生体内には4個のアミノ酸からなるCCK-4や58個のアミノ酸からなるCCK-58が存在する。またカエルの皮膚より精製された10個のアミノ酸で構成される caerulein はC末端側8個のアミノ酸中7個がCCK-8と同一であり、CCKアナログとして用いられている。胃酸分泌を促進する gastrin もCCK-8と類似のC末端構造を有している。

これらCCKの作用を伝達する受容体に関しては、現在少なくとも二つの異なるタイプが報告されている。ひとつは消化管タイプCCK (CCK-A) 受容体であり、膵臓、胆嚢をはじめとする末梢組織および中枢神経系の一部に存在する<sup>26, 27)</sup>。CCK-A受容体はCCK-8に高親和性であり、その結合活性はgastrinに比べ1,000倍、CCK-4に比べ30,000倍強い<sup>28)</sup>。もうひとつは中枢神経系に存在している脳タイプCCK (CCK-B) 受容体であり<sup>29)</sup>、この受容体はCCK-8に対し非硫酸化CCK-8およびCCK-4に比べ10倍高い親和性を有している<sup>30)</sup>。この2種類の受容体に加え、gastrin受容体の胃腺における存在が提唱されていた<sup>31)</sup>が、1992年WankらによりCCK-B受容体の構造と同一である事が証明され<sup>32)</sup>、現在ではgastrin/CCK-B受容体とも呼ばれている。

CCKの疾病への関与に関しては、CCKおよびそのC末アナログである caerulein が、ラットの急性膵炎を発症させること<sup>33, 34)</sup>、および膵管内に胆汁酸を注入して作製した膵炎<sup>35)</sup>やcholine欠乏性ethionine添加食を投与して作製した膵炎<sup>36)</sup>を悪化させることより、CCKが膵炎の発症、進展に関与していると考えられている。急性膵炎の発症原因の大部分は、胆石による胆汁、膵液の膵管内への逆流と、アルコールの長期摂取による膵過刺激であり (Table 1)、これらの原因により膵腺房細胞が破壊され、膵内で消化酵素の活性化が生じ膵自己消化に至る。急性膵炎時には炎症による膵腺房細胞の壊死

Table 1 Hypothesis of the mechanism of the etiology and development on acute pancreatitis.



や障害により膵酵素の分泌が低下し、十二指腸内での膵酵素活性が低下する。その結果フィードバック機構を介する内因性のCCK分泌亢進が起こり、血中に増加したCCKは膵を刺激し、急性膵炎をさらに増悪、進展させると考えられている。またアルコールによる膵酵素外分泌がCCKにより相乗的に増加するとも言われている。わが国における膵炎の発症率は食文化の変化とともに確実に増加しており、CCKと膵炎の発症、進展との関係をさらに基礎および臨床において研究することは重要な課題である。とりわけ重症急性膵炎は厚生省より特定疾患に指定されており、より効果のある治療薬の開発が待ち望まれている。

近年、いくつかのCCK受容体に対する特異的拮抗物質が見い出され、CCKの生理作用の解明のための基礎研究に用いられている (Table 2)。CCK-A受容体拮抗物質はその構造より1) 環状ヌクレオチド誘導体である dibutyryl cyclic GMP<sup>37)</sup>、2) CCKのC末端側のアナログである CCK-27-32-amide<sup>38)</sup>、3) アミノ酸である glutamic acid 誘導体の proglumide<sup>39)</sup>、lorglumide (CR 1409)<sup>40)</sup>、loxiglumide (CR 1505)<sup>41)</sup>、tryptophan 誘導体の benzotript<sup>42)</sup>、4) benzodiazepine 誘導体である asperlicin<sup>43)</sup>、L-364,718<sup>44)</sup>、FK480<sup>45)</sup>に分類される。この内 proglumide および benzotript の CCK-A 受容体選択性は低く、どちらかというとな非選択的 CCK 受容体拮抗物質と言える。また gastrin / CCK-B 受容体拮抗薬としてはアミノ酸誘導体の CR 2194<sup>46)</sup>、benzodiazepine 誘導体の L-365,260<sup>47)</sup>などが報告されている。

Table 2 CCK receptor antagonists.

	CCK-A receptor		Gastrin/CCK-B receptor	
	selective	non-selective	selective	
1. Cyclic nucleotide derivative	db cGMP			
2. C-terminal analogue of CCK	CCK-27-32-amide			
3. Amino acid derivatives				
3-1) Glutamic acid derivatives	Lorglumide (CR-1409) Loxiglumide (CR-1505)	Proglumide	CR-2194	
3-2) Tryptophan derivative		Benzotript		
4. Benzodiazepine derivatives	Asperlicin L-364,718 FK-480		L-365,260 YM-022	

現在CCK-A受容体拮抗薬であるloxiglumideに関して、臨床治験が開始されており、ヒトCCKもしくは食事刺激膵外分泌を抑制する<sup>48)</sup>ことから、急性膵炎治療薬としての応用が検討されている<sup>49)</sup>。またloxiglumideの胆嚢痛<sup>50)</sup>および腸管疾患<sup>51)</sup>に対する臨床検討も同時に進められている。このようにCCK受容体拮抗薬の基礎的な意義に加え、臨床的にも急性膵炎をはじめCCKおよびCCK受容体の関与する消化管疾患に対する新しい治療薬としての展開が期待されている。

KSG-504 ((S)-arginium (R)-4-[-N-(3-methoxypropyl)-N-pentylcarbamoyl]-5-(2-naphthylsulfonyl) pentanoate monohydrate) (Fig. 3) はキッセイ薬品工業(株)中央研究所において合成された分子量669.84の非ペプチド性化合物である。

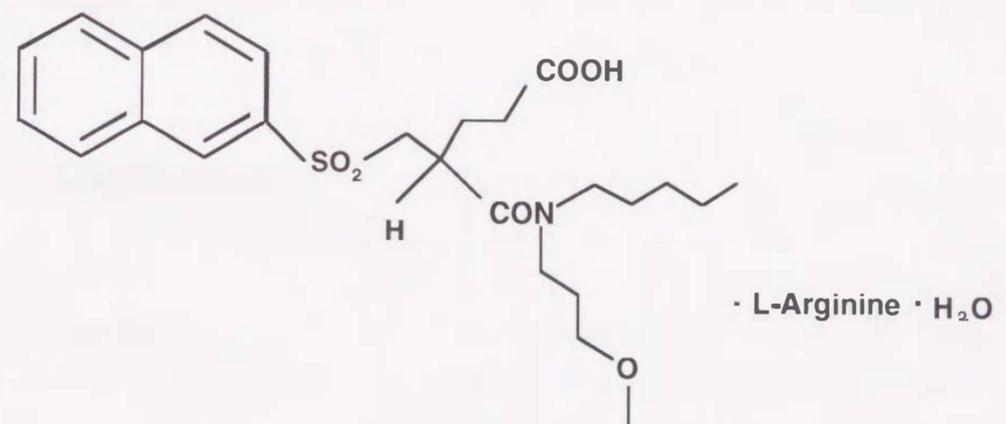


Fig. 3

Chemical structure of KSG-504, (S)-Arginium (R)-4-[-N-(3-methoxypropyl)-N-pentyl-carbamoyl]-5-(2-naphthylsulfonyl) pentanoate monohydrate.

本論文は、KSG-504のCCK受容体拮抗薬としての検討結果をまとめたもので、以下4部に分けて記述する。

KSG-504の膵および胆嚢膜標本のCCK-A受容体、脳のgastrin/CCK-B受容体に対する結合特性を検討するとともにin vitro膵腺房細胞に対するCCKをはじめとする各種受容体作用物質ならびに受容体以降の機構に対する作用を検討した(第1部)。

KSG-504のin vivo膵外分泌および膵内分泌に対する作用ならびに実験急性膵炎モデルに対する作用を検討し、急性膵炎治療薬としての可能性を考察した(第2部)。

in vitro および in vivo 胆嚢、胃および腸管の CCK により誘発される作用に対する KSG-504 の抑制作用を検討し、胆石疼痛、過敏性腸症候群をはじめこれら領域における疾患の治療薬としての可能性を考察した（第3部）。

末梢投与された CCK-8 により誘発される中枢作用に対する KSG-504 末梢投与の影響を検討し末梢 CCK の作用機序を考察した（第4部）。

## 第1部 CCK 受容体に対する KSG-504 の選択性の検討および in vitro 膵腺房細胞 CCK 刺激アミラーゼ放出の KSG-504 による抑制

### 序

ラット膵臓膜標本、イヌ胆嚢膜標本、モルモット大脳皮質膜標本への<sup>125</sup>I-CCK-8 結合に対する置換実験を行い、KSG-504 の CCK-A および gastrin / CCK-B 受容体に対する結合選択性を検討した。また in vitro ラット膵腺房細胞標本を用い、各種受容体刺激物質および Ca ionophore による膵 amylase 分泌に対する作用、in vitro モルモット回腸標本の acetylcholine 誘発収縮、histamine 誘発収縮および in vitro ラット胃標本の serotonin 誘発収縮に対する作用を調べ、CCK をはじめとする種々の受容体および受容体以降の伝達を介する反応に対する作用を検討した。

### 実験材料および方法

#### 1. 実験動物

Wistar 系雄性ラット（200 - 250 g）および Hartley 系雄性モルモット（350 - 530 g）を日本エスエルシー（浜松）より、雌雄雑犬（5 - 18 kg）を中島実験動物（名古屋）より購入し、恒温（23 ± 2 °C）および恒湿（55 ± 5 %）条件下1週間以上飼育したのち実験に供した。

#### 2. 使用薬物

KSG-504 および loxiglumide はキッセイ薬品工業（株）にて合成した。その他実験に使用した薬物は以下の通りである。CCK-8、gastrin-releasing peptide (GRP)、secretin および vasoactive intestinal peptide (VIP)（ペプチド研、箕面）、<sup>125</sup>I-CCK-8（New England Nuclear、USA）、collagenase type I、soybean trypsin inhibitor、bacitracin、Ca ionophore A23187、mepyramine、serotonin および cyproheptadine（Sigma、USA）、carbachol（Aldrich、USA）、BayK 8644（Calbiochem、USA）。

### 3. 実験方法

#### 1) ラット膵臓、イヌ胆嚢およびモルモット大脳皮質膜標本への $^{125}$ I-CCK-8 結合に及ぼす影響

放血致死させたラットより膵臓を、またモルモットより大脳皮質を摘出した。Chang らの方法<sup>5,2)</sup> に準じて、湿重量の 50 倍量の氷冷した 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.7) を加えてウルトラディスペーサーを用い 10 秒間ホモジナイズし、50,000 xg で 10 分間遠心分離した。さらに沈澱に同量の緩衝液を加え再遠心した。得られた沈澱に氷冷結合実験用緩衝液 (50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM dithiothreitol, 0.14 mg/ml bacitracin, 2 mg/ml bovine serum albumin (BSA)) を加え、再懸濁し膜標本とした。この標本の蛋白濃度は Lowry 法<sup>5,3)</sup> により求めた。

膵臓標本 (0.22 mg protein/ml) と 30 pM  $^{125}$ I-CCK-8 および各種濃度の被験薬を含む結合実験用緩衝液を 37°C で 30 分間インキュベート、また大脳皮質膜標本 (2 mg protein/ml) と 100 pM  $^{125}$ I-CCK-8 および被験薬を含む緩衝液を 37°C で 30 分間インキュベートした。反応液をろ過し、ろ紙 (GF/B; Whatman, England) を氷冷緩衝液 4 ml で 4 回洗浄したのち、ろ紙の放射能を  $\gamma$  カウンター (Auto-Gamma 5650; Packard, USA) で測定した。

また、放血致死させたイヌより胆嚢を摘出し、Chang らの方法<sup>5,2)</sup> に従い、湿重量の 10 倍量の 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) を加え 10 秒間ホモジナイズしたのち 50,000 xg 10 分間の遠心を 2 回行った。得られた沈澱に氷冷結合実験用緩衝液 (10 mM Hepes, 1 mM EGTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 130 mM NaCl, 0.25 mg/ml bacitracin, 0.2 mg/ml soybean trypsin inhibitor; pH 6.5) を加え再懸濁し膜標本とした。

胆嚢膜標本 (1.5 mg/ml) と 30 pM  $^{125}$ I-CCK-8 および被験薬を含む緩衝液を 25°C で 2 時間インキュベートした。反応液をろ過し、洗浄後ろ紙の放射能を測定した。

得られた $^{125}$ I-CCK-8 の結合量を総結合量とし、 $10^{-6}$  M CCK-8 を含む溶液中で得られた $^{125}$ I-CCK-8 結合量を非特異的結合量とした。CCK 受容体への特異的結合量は総結合量と非特異的結合量の差より求めた。見かけの解離定数(Kd)および最大結合部位濃度(Bmax)は Scatchard 解析<sup>5,4)</sup> より、また被験薬の阻害定数(Ki)は  $Ki = IC_{50} / (1 + L / Kd)$  (L は実験に用いた $^{125}$ I-CCK-8 の濃度)<sup>5,5)</sup> より求めた。

#### 2) in vitro ラット膵腺房細胞標本よりの amylase 放出に及ぼす影響

1 夜絶食したラットより膵臓を摘出し、大槻らの方法<sup>5,6, 5,7)</sup> に準じラットの膵腺房細胞標本を作製した。脂肪組織を剥離後、120 units/ml コラゲナーゼ、0.2% BSA、0.01% trypsin inhibitor、必須アミノ酸を含む Krebs-Henseleit 緩衝液 (KHB) (pH 7.35) を 5 ml 注入し、37°C にて 50 分間インキュベートした。ピペットを用いて機械的に破碎したのち、ナイロンメッシュ (150  $\mu$ m) でろ過し、4% BSA を含む KHB 緩衝液に重層し 50 xg で 4 分間遠心した。沈澱を 0.01% trypsin inhibitor、0.5% BSA および必須アミノ酸を含む Hepes-Ringer 緩衝液 (pH 7.35) 5 ml で 2 回洗浄したのち、300  $\mu$ g/ml の cycloheximide を含む Hepes-Ringer 緩衝液中 37°C にて 30 分間プレインキュベートし腺房細胞標本を調製した。

膵腺房細胞標本懸濁液と被験薬 (全量 1 ml) を 37°C にて 30 分間インキュベートしたのち、3,000 rpm で 20 秒間遠心 (KM-15200; クボタ、東京) した。上澄中の amylase 濃度を CM-amylase DEX 法 (アミラーゼ-B テストワコー; 和光、大阪) を用いて測定した。また、被験薬を加えていない膵腺房細胞懸濁液を超音波処理し細胞内に含まれる全 amylase 量を測定した。amylase 放出率は細胞内全 amylase 量に対するパーセントで表した。

#### 3) in vitro モルモット回腸標本の acetylcholine および histamine 収縮に及ぼす影響

放血致死させたモルモットより回腸を摘出し、縦走筋方向に長さ 20 mm の標本を作製した。標本は生物ガス (95% O<sub>2</sub>+5% CO<sub>2</sub>) を通気した 30 °C の Krebs 緩衝液を満たした 10 ml のマグナス槽内に 1 g の負荷をかけて懸垂した。発生した筋緊張の変化は等尺性トランスデューサー (SB-1T、日本光電、東京) を介しペン書きオシログラフ (Rectigraph 8S、三栄、東京) に記録した。

acetylcholine を累積的に添加して一定した収縮反応を得たのち、被験薬を処置して acetylcholine の各濃度の収縮曲線への影響を検討した。また、histamine を累積的に添加して一定した収縮反応を得たのち、被験薬を処置して histamine の各濃度の収縮曲線への影響を検討した。

4) in vitro ラット胃標本の serotonin 収縮に及ぼす影響

放血致死させたラットより胃底部を摘出し、縦走筋方向に長さ 10 mm、幅 2 mm の標本を作製した。標本は生物ガスを通気した 30 °C の Krebs 緩衝液を満たした 10 ml のマグナス槽に 1 g の負荷をかけて懸垂した。発生した筋緊張の変化は等尺性トランスデュサーを介しペン書きオシログラフに記録した。serotonin を累積的に添加して、一定した収縮反応を得たのち、被験薬を処置して serotonin の各濃度の収縮曲線への影響を検討した。

4. 統計処理

測定値は平均値 ± 標準誤差で表した。多群間での有意差の検定は Dunnett の多重比較検定法を、2 群間の検定は Student の *t*-test をそれぞれ用いて行った。また危険率が 5% 以下の場合を有意であると判定した。

実験結果

1. ラット膵臓、イヌ胆嚢およびモルモット大脳皮質膜標本への <sup>125</sup>I-CCK-8 結合に及ぼす影響

膵、胆嚢および大脳皮質膜標本への <sup>125</sup>I-CCK-8 の非特異的結合量は濃度に依存して直線的に増加し、特異的結合量は飽和的であった。また Scatchard 解析の結果は直線となり、これら膜標本における <sup>125</sup>I-CCK-8 の受容体はそれぞれ一種類であると考えられた。<sup>125</sup>I-CCK-8 の K<sub>d</sub> 値はラット膵膜標本で最も小さく、続いてイヌ胆嚢膜標本、モルモット大脳皮質膜標本の順であった (Table 3)。また、B<sub>max</sub> はラット膵膜標本 >> イヌ胆嚢膜標本 > モルモット大脳皮質膜標本の順であった。

ラット膵、イヌ胆嚢およびモルモット大脳皮質膜標本への <sup>125</sup>I-CCK-8 の結合は KSG-504 (Fig. 4) および CCK-8 により濃度依存的に置換された。ラット膵およびイヌ胆嚢膜に対する KSG-504 の K<sub>i</sub> 値はほぼ等しい値であった (それぞれ 173 nM および 283 nM) (Table 4)。他方、モルモット大脳皮質膜に対する K<sub>i</sub> 値は 413 μM と膵および胆嚢に比し 1,500 - 2,400 倍大きい値であった。これら 3 種類の標本に対する CCK-8 の K<sub>i</sub> 値は 0.242、0.528 および 5.82 nM であった。

Table 3 Scatchard analysis of the specific [<sup>125</sup>I]-CCK-8 binding.

Tissue	n	K <sub>d</sub> (nM)	B <sub>max</sub> (fmol/mg protein)
Pancreas	8	0.18±0.02	1012±123
Gallbladder	7	0.31±0.03	52±2
Cerebral Cortex	9	0.88±0.11	20±3

n, number of experiments; K<sub>d</sub>, dissociation constant; B<sub>max</sub>, maximum binding site density.

Values represent mean±S.E.

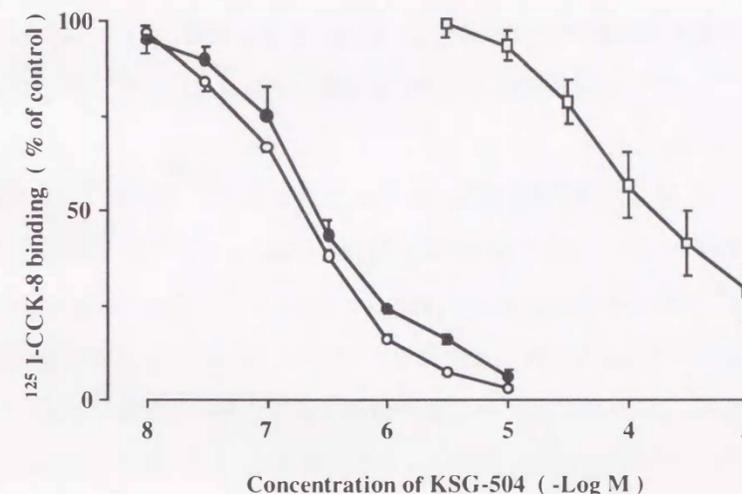


Fig. 4

Displacement of <sup>125</sup>I-CCK-8 binding by KSG-504 in rat pancreatic (○), canine gallbladder (●) and guinea pig cerebrocortical (□) membrane preparations. Specific binding of <sup>125</sup>I-CCK-8 is expressed as a percentage of control binding. Each point indicates the mean ± S.E. of 5-8 experiments.

Table 4 Effect of KSG-504 and CCK-8 on the [<sup>125</sup>I]-CCK-8 binding.

Drug	Tissue	n	IC <sub>50</sub> (M)	Ki (M)
KSG-504	Pancreas	8	(2.02±0.11)•10 <sup>-7</sup>	(1.73±0.09)•10 <sup>-7</sup>
	Gallbladder	5	(3.01±0.63)•10 <sup>-7</sup>	(2.83±0.57)•10 <sup>-7</sup>
	Cerebral Cortex	7	(4.60±2.15)•10 <sup>-4</sup>	(4.13±1.93)•10 <sup>-4</sup>
CCK-8	Pancreas	8	(2.82±0.09)•10 <sup>-10</sup>	(2.42±0.08)•10 <sup>-10</sup>
	Gallbladder	5	(5.79±0.78)•10 <sup>-10</sup>	(5.28±0.71)•10 <sup>-10</sup>
	Cerebral Cortex	7	(6.48±0.81)•10 <sup>-9</sup>	(5.82±0.72)•10 <sup>-9</sup>

n, number of experiments; IC<sub>50</sub> molar concentration of the drug producing 50% displacement of the specific binding; Ki, inhibition constant. Values represent mean±S.E.

2. in vitro ラット膵腺房細胞標本よりの amylase 放出に及ぼす影響

KSG-504 (10<sup>-7</sup> - 10<sup>-4</sup> M)は無刺激下の膵腺房細胞 amylase 放出に対し何ら影響を及ぼさなかった (Fig. 5)。

CCK-8 は 3X10<sup>-12</sup> M より濃度依存的に amylase 放出を促進し、3X10<sup>-10</sup> M で最大放出が生じた。GRP は 3X10<sup>-11</sup> M より amylase 放出を促進し、10<sup>-8</sup> M で最大反応が見られた。carbachol も濃度依存的に放出を促進し、3X10<sup>-6</sup> M で最大刺激を示した。A23187 および secretin も amylase 放出を促進し、それぞれ 3X10<sup>-5</sup> M および 10<sup>-7</sup> M で最大反応が見られた。VIP は 3X10<sup>-9</sup> M で最大促進を示したが、その効力は弱いものであった。また電位依存性 Ca チャンネルアゴニストである BayK 8644 は amylase 放出に対し何ら影響を及ぼさなかった。

他方 KSG-504 および loxiglumide は 10<sup>-10</sup> M の CCK-8 による膵腺房細胞からの amylase 放出を濃度に依存して抑制し、その IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ 1.9X10<sup>-6</sup> M および 2.2X10<sup>-6</sup> M であった (Fig. 6)。また、KSG-504 は CCK-8 の濃度反応曲線を右方シフトさせたが、CCK-8 の最大反応には影響を及ぼさなかった (Fig. 7A)。Shild Plot 解析の結果、傾きは 0.927、KSG-504 の pA<sub>2</sub> 値は 6.9±0.1 であった (Fig. 7B)。

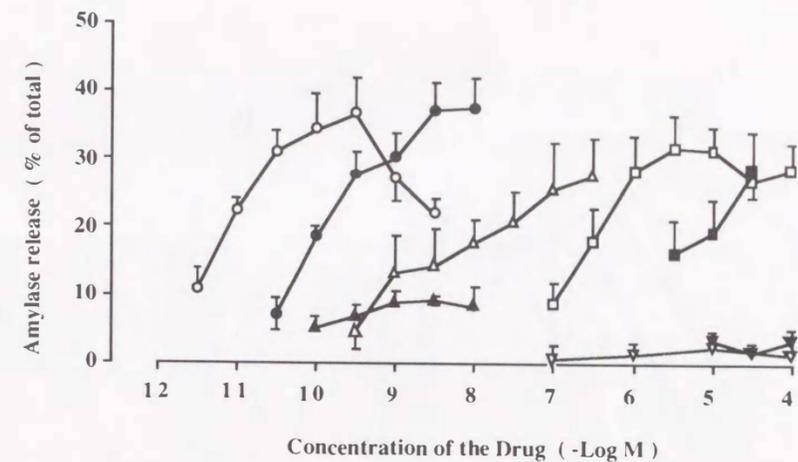


Fig. 5

Effects of KSG-504 (▽), CCK-8 (○), GRP (●), carbachol (□), A23287 (■), secretin (△), VIP (▲) or BayK 8644 (▼) on amylase release from isolated rat pancreatic acini. Amylase release was expressed as a percentage of the initial content in acinar cells. Each point indicates the means ± S.E. of 6-7 experiments.

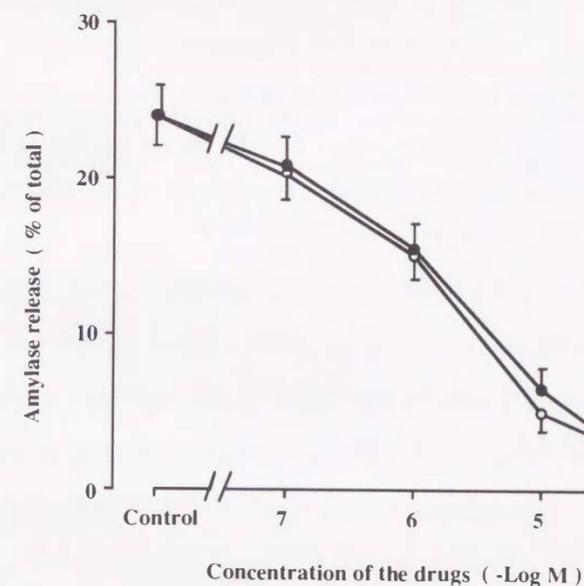
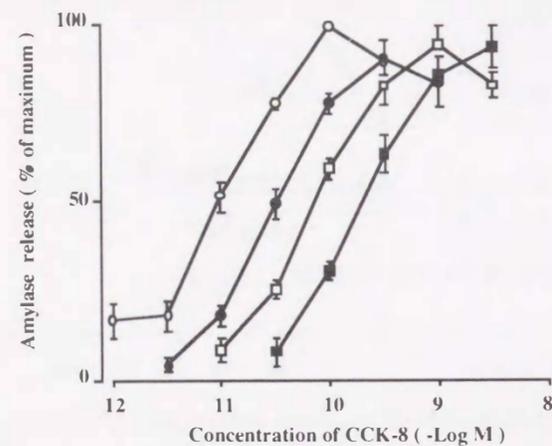


Fig. 6

Effects of KSG-504 (○) and loxiglumide (●) on amylase release stimulated by 10<sup>-10</sup> M CCK-8 from isolated rat pancreatic acini. Amylase release was expressed as a percentage of the initial content in acinar cells. Each point indicates the mean ± S.E. of 5 experiments.

A.



B.

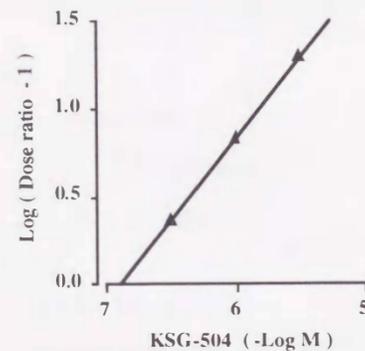


Fig. 7

Effects of KSG-504 on CCK-8-stimulated amylase release from isolated pancreatic acini of rats. (A); Amylase release stimulated by various concentrations of CCK-8 was determined in the control (○) or the presence of 0.3 (●), 1 (□) or 3 (■) μM KSG-504. Results are calculated as the percentage of maximal release in control experiment. Each point indicates the mean ± S.E. of 6 experiments. The Schild plot for inhibition of CCK-8-stimulated amylase release with increasing concentrations of KSG-504. (B); Linear-regression analysis shows a slope of 0.927 and pA<sub>2</sub> of 6.90.

KSG-504 ( $10^{-4}$  M) は carbachol ( $3 \times 10^{-6}$  M)、GRP ( $3 \times 10^{-9}$  M)、A23187 ( $10^{-5}$  M)、secretin ( $10^{-7}$  M) および VIP ( $3 \times 10^{-9}$  M) による amylase 放出に対し影響を及ぼさなかった (Fig. 8)。atropine ( $10^{-7}$  M) は carbachol による amylase 放出を著明に抑制した。

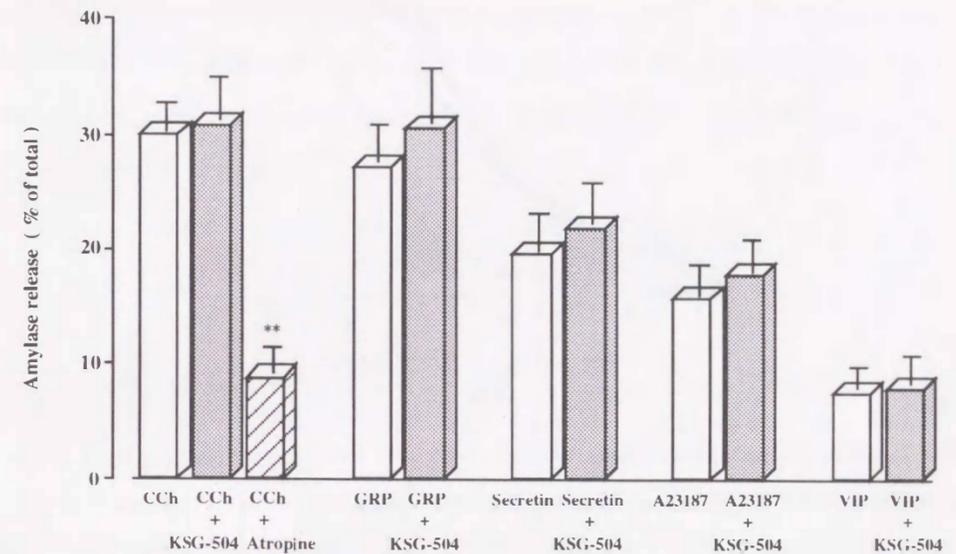


Fig. 8

Effects of KSG-504 ( $10^{-4}$  M) and atropine ( $10^{-7}$  M) on amylase release stimulated by  $3 \times 10^{-6}$  M carbachol (CCh),  $3 \times 10^{-9}$  M GRP,  $10^{-7}$  M secretin,  $10^{-5}$  M A23187 or  $3 \times 10^{-9}$  M VIP from isolated rat pancreatic acini. Amylase release was expressed as a percentage of the initial content in acinar cells. Each column indicates the mean ± S.E. of 6 experiments. \*\*; significantly different from CCh at  $P < 0.01$ .

### 3. in vitro モルモット回腸標本の acetylcholine および histamine 収縮に及ぼす影響

モルモットの in vitro 回腸標本に acetylcholine を累積的に適用すると濃度依存的な収縮が生じ、最大収縮高は  $10^{-4}$  M 適用時に  $3.06 \pm 0.16$  g ( $n=6$ )であった。KSG-504 は acetylcholine の濃度反応曲線に対し影響を及ぼさなかった (Fig. 9)。atropine ( $10^{-8}$  M) は acetylcholine の濃度反応曲線を右方にシフトさせた。

また、モルモットの回腸標本に histamine を累積的に添加すると濃度依存的な収縮が生じ、最大収縮高は  $10^{-4}$  M 適用時に  $3.28 \pm 0.25$  g ( $n=6$ )であった。KSG-504 は histamine の濃度反応曲線に対し影響を及ぼさなかった (Fig. 10)。histamine H<sub>1</sub> 受容体拮抗薬である mepyramine ( $3 \times 10^{-9}$  M) は histamine の濃度反応曲線を右方にシフトさせた。

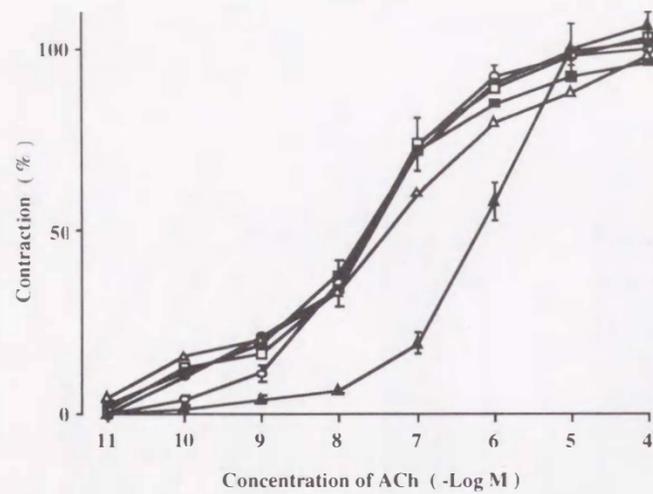


Fig. 9  
Effects of KSG-504 and atropine on the contractile response to acetylcholine in isolated ileum from guinea pigs. The maximum response of the dose-response curve for acetylcholine before treatment with each drug was taken as 100 percent. ○, Control; ●,  $10^{-7}$  M; □,  $10^{-6}$  M; ■,  $10^{-5}$  M; △,  $10^{-4}$  M KSG-504; ▲,  $10^{-8}$  M atropine. Each point indicates the mean  $\pm$  S.E. of 6 experiments.

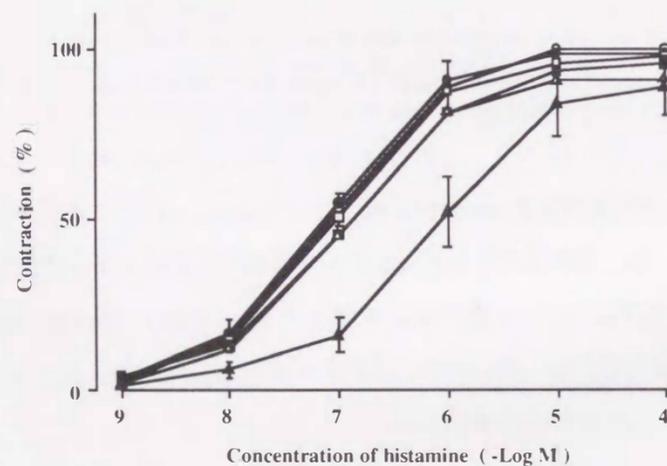


Fig. 10  
Effects of KSG-504 and mepyramine on the contractile response to histamine in isolated ileum from guinea pigs. The maximum response of the dose-response curve for histamine before treatment with each drug was taken as 100 percent. ○, Control; ●,  $10^{-7}$  M; □,  $10^{-6}$  M; ■,  $10^{-5}$  M; △,  $10^{-4}$  M KSG-504; ▲,  $3 \times 10^{-9}$  M mepyramine. Each point indicates the mean  $\pm$  S.E. of 6 experiments.

#### 4. in vitro ラット胃標本の serotonin 収縮に及ぼす影響

ラットの in vitro 胃標本に serotonin を累積的に添加すると濃度依存的な収縮が生じ、最大収縮高は  $10^{-4}$  M 適用時に  $2.24 \pm 0.28$  g (n=6) であった。KSG-504 は serotonin の濃度反応曲線に対し影響を及ぼさなかった (Fig. 11)。serotonin 受容体拮抗薬である cyproheptadine ( $10^{-6}$  M) は serotonin の濃度反応曲線を右下方にシフトさせた。

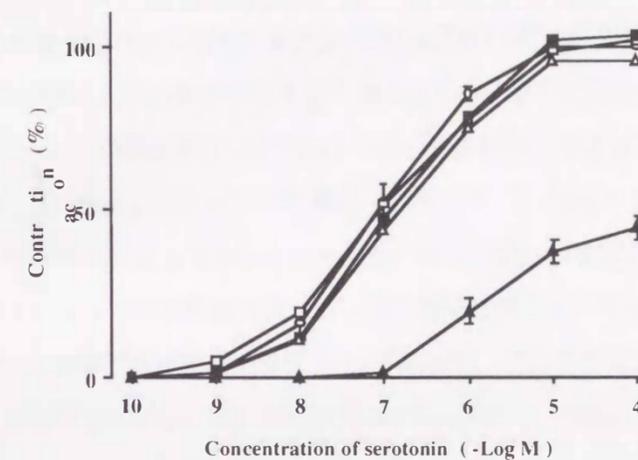


Fig. 11  
Effects of KSG-504 and cyproheptadine on the contractile response to serotonin in isolated gastric fundus from rats. The maximum response of the dose-response curve for serotonin before treatment with each drug was taken as 100 percent. ○, Control; □,  $10^{-6}$  M; ■,  $10^{-5}$  M; △,  $10^{-4}$  M KSG-504; ▲,  $10^{-6}$  M cyproheptadine. Each point indicates the mean  $\pm$  S.E. of 6 experiments.

#### 考察

ラット膵、イヌ胆嚢およびモルモット大脳皮質膜標本への  $^{125}$ I-CCK-8 結合実験の結果、それぞれの膜標本において一種類の受容体の存在が示された。今回のラット膵膜標本への  $^{125}$ I-CCK-8 結合の解離定数は 0.19 nM であり、Chang らの報告 (およそ 0.1 nM) <sup>5,2)</sup> に近い値が得られた。一方、イヌ胆嚢に対して CCK 受容体に関する報告がなされていない。今回のイヌ胆嚢の解離定数 0.31 nM は、モルモット (0.3 nM)、ウシ (0.6 nM) およびブタ (0.5 nM) での報告 <sup>5,8, 59, 60)</sup> とほぼ等しいものであった。モルモット大脳皮

質膜を用いた、今回の結果 (0.88 nM) は Innis と Synder の報告 (およそ 0.3 nM) <sup>29)</sup> よりやや大きい値であった。これらの結果より、今回用いたラット膵およびモルモット大脳皮質膜標本の CCK-8 に対する親和性は文献値と大きく異なること、さらにはイヌ胆嚢膜標本の CCK-8 に対する親和性も他種動物胆嚢で報告されている親和性とほぼ等しいことが判明し、以下の考察を行った。

<sup>125</sup>I-CCK-8 結合の Bmax はラット膵膜 >> イヌ胆嚢膜 > モルモット大脳皮質の順であり、膵と大脳皮質の CCK 受容体数には 50 倍の開きが見られた。Innis と Synder もラット膵臓の CCK 結合部位数はモルモット脳のおよそ 300 倍と報告しており<sup>29)</sup>、膵領域における CCK 受容体密度の高さが確認された。また、イヌ胆嚢の Bmax 値はモルモット胆嚢 (12 fmol/mg protein)<sup>58)</sup> およびウシ胆嚢 (101 fmol/mg protein)<sup>61)</sup> の Bmax 値と近い値であり種差は少ないと考えられるが、ラット膵臓とは 20 倍の開きが見られた。オートラジオグラフィーを用いた検討でも、ラット膵腺房細胞には少なくとも 5,000 - 10,000 の CCK 結合部位がある<sup>61)</sup> のに対しハムスター胆嚢平滑筋細胞では 2 つ程度<sup>62)</sup> と報告されており、胆嚢に比べ膵臓の CCK 受容体密度の方が高いと考えられる。

膵、胆嚢および大脳皮質膜標本において CCK-8 は <sup>125</sup>I-CCK-8 の結合をほぼ等しい効力で置換しており、CCK-8 の CCK-A および gastrin / CCK-B 受容体に対する結合親和性に差のないことが示された。一方 KSG-504 は膵および胆嚢膜標本での <sup>125</sup>I-CCK-8 の結合に対し、大脳皮質に比べ 1,500 - 2,400 倍高い置換能を示したことから、CCK-A 受容体に対し極めて高い選択性を有することが明らかとなった。

膵外分泌は消化管ホルモンである CCK、GRP、secretin、VIP および副交感神経伝達物質である acetylcholine によって調節されている。いずれの物質も腺房細胞膜にあるそれぞれの受容体に結合し刺激を伝達する。CCK-8、GRP および carbachol による分泌は細胞内 Ca 濃度の上昇を介して伝達される<sup>63, 64)</sup>。それ故、Ca ionophore である A23187 も膵外分泌を促進した。しかしながら電位依存性 Ca チャンネルアゴニストである BayK 8644 が全く影響を及ぼさなかったことより膵腺房細胞において電位依存性の Ca 流入経路は存在しないと考えられる。一方、secretin および VIP によるシグナルは細胞内 cAMP 濃度の上昇を介して伝達される<sup>65)</sup>。

KSG-504 が無刺激下膵腺房細胞よりの amylase 放出に対し何ら影響を及ぼさなかった

ことより、KSG-504 自身は CCK 受容体促進作用を全く持ち合わせていないことが明らかとなった。また、KSG-504 は CCK-8 による amylase 放出のみを競合的に阻害した。しかし他の受容体促進物質および受容体以降の機構を活性化する物質による amylase 放出には影響を及ぼさなかったこと、また in vitro モルモット回腸標本 acetylcholine 収縮、histamine 収縮、in vitro ラット胃標本 serotonin 収縮に影響を及ぼさなかったことより、KSG-504 が CCK 受容体以外の受容体および受容体以降の機構には影響を及ぼさない、CCK 受容体の競合的な拮抗薬であることが示された。

以上、KSG-504 は CCK-A 受容体に対し gastrin / CCK-B 受容体に比し 1,000 倍以上の選択性を有する、CCK 受容体に特異的かつ競合的な拮抗薬であることが明らかとなった。

なお参考データとして、キッセイ薬品工業 (株) において KSG-504 以外の CCK 受容体拮抗薬を合成し、ラット膵膜およびラット大脳皮質膜への <sup>125</sup>I-CCK-8 結合に及ぼす影響を検討した結果を、それぞれ Fig.12、Fig.13 に、またその IC<sub>50</sub> 値を Table 5 に示す。KSG-484 は KSG-504 のラセミ体である。CCK-A 受容体に対する選択性は benzodiazepine 誘導体 L-364,718 (S 体) が最も高く、L-365,260 (RS 体) が最も低いことが明らかとなった。しかしながら Fig.12、Fig.13 および Table 5 で使用した L-365,260 は当社で合成したラセミ体である。Lotti と Chang により報告されている<sup>47)</sup> L-365,260 は光学活性体 (R 体) であり、gastrin / CCK-B 受容体に対しより高い選択性を示している。これらの結果より、benzodiazepine 誘導体による CCK-A および gastrin / CCK-B 受容体の識別にはその立体構造が大きく関与していると考えられる。これら L-364,718 をはじめとする benzodiazepine 誘導体 (Table 2) は水への溶解性が極めて小さく、動物実験において胆汁中に析出し胆石の原因となることが知られている。glutamic acid 誘導体では lorglumide の CCK-A 受容体への親和性が最も強かったが、この化合物は細胞傷害性が比較的強かった。これは lorglumide の dipentyl 部位の脂溶性の高さが関与していると考えられる。loxiglumide は dipentyl 部位に ether 結合を加え脂溶性を低くした化合物であり、CCK-A 受容体に対する親和性は lorglumide に比べやや劣るが細胞傷害性がある程度改善されており臨床面での応用が進められている。しかしながら、loxiglumide はアミノ酸誘導体であり経口吸収などに問題が残ると共に、ラセミ体であるため 1 / 2

が不活性体である。

KSG-504 のラセミ体である KSG-484 は CCK-A 受容体に対し loxiglumide とほぼ同等の親和性および選択性を示した。R 体である KSG-504 は、光学分割されたことにより CCK-A 受容体に対する親和性および選択性がさらに向上した。一方 S 体である KSG-520 の CCK-A 受容体に対する選択性は KSG-504 より低く、CCK-A 受容体に高親和性の benzodiazepine 誘導体が S 体である事と異なった点は興味深い点であった。また KSG-504 (R 体) をラットの静脈内に投与した際、血中に KSG-520 (S 体) が検出されなかったことより、生体内では KSG-504 の異性化が生じないことが確認されている (未発表データ)。

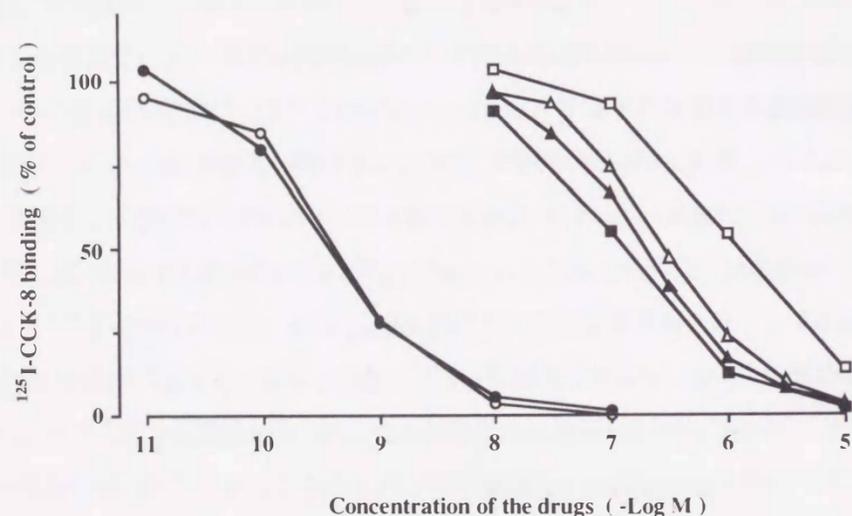


Fig. 12 Displacement of  $^{125}\text{I}$ -CCK-8 binding by CCK-8 (○), L-364,718 (●), pentagastrin (□), lorglumide (■), loxiglumide (△) and KSG-504 (▲) in rat pancreatic membrane preparation. Specific binding of  $^{125}\text{I}$ -CCK-8 is expressed as a percentage of control binding. Each point indicates the mean of 3-5 experiments.

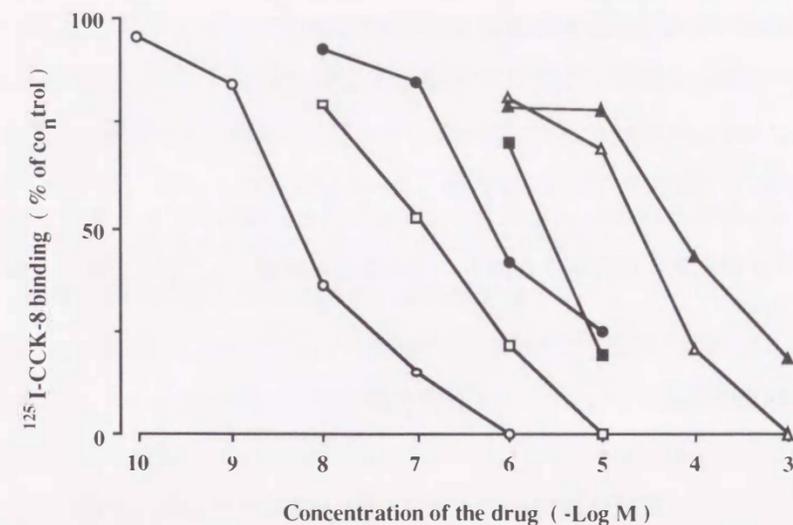


Fig. 13 Displacement of  $^{125}\text{I}$ -CCK-8 binding by CCK-8 (○), L-364,718 (●), L-365,260 (□), lorglumide (■), loxiglumide (△) and KSG-504 (▲) in rat cerebrocortical membrane preparation. Specific binding of  $^{125}\text{I}$ -CCK-8 is expressed as a percentage of control binding. Each point indicates the mean of 4-5 experiments.

Table 5 Effect of CCK-8 and CCK-antagonists on the  $^{125}\text{I}$ -CCK-8 binding.

Drug	Pancreas ( $\text{IC}_{50}$ ; M)	Cerebral Cortex ( $\text{IC}_{50}$ ; M)	Ratio (C.C./P)
CCK-8	$2.8 \times 10^{-10}$	$7.2 \times 10^{-9}$	26
L-364,718 (S)	$3.9 \times 10^{-10}$	$1.1 \times 10^{-6}$	2820
L-365,260 (RS)	$3.2 \times 10^{-8}$	$1.2 \times 10^{-7}$	4
Proglumide	$2.5 \times 10^{-4}$	$> 10^{-3}$	-
Lorglumide (RS)	$6.8 \times 10^{-8}$	$3.5 \times 10^{-6}$	52
Loxiglumide (RS)	$2.8 \times 10^{-7}$	$2.5 \times 10^{-5}$	86
KSG-484 (RS)	$3.4 \times 10^{-7}$	$2.1 \times 10^{-5}$	62
KSG-504 (R)	$2.1 \times 10^{-7}$	$7.5 \times 10^{-5}$	357
KSG-520 (S)	$3.3 \times 10^{-6}$	$1.7 \times 10^{-5}$	5

## 第2部 KSG-504のin vivo膵機能に及ぼす作用の検討

### 序

第2部では、KSG-504のin vivo膵外分泌および内分泌機能に対する作用ならびに実験急性膵炎モデルに対する作用を検討し、急性膵炎治療薬としての可能性を考察した。

### 実験材料および方法

#### 1. 実験動物

Wistar系雄性ラット(200 - 350 g)、日本白色種雄性ウサギ(2.3 - 3.2 kg、日本エスエルシー)、雌雄雑犬(5 - 13 kg)および雌ビーグル犬(7 - 12 kg、オリエンタル、東京)を用いた。

#### 2. 使用薬物

caerulein (ペプチド研)、enterokinase および benzoyl-arginine p-nitroanilide (BAPNA) (Sigma)、 $^{125}\text{I}$ -CCK-39 および CCK-8 特異的抗血清 (大塚アッセイ研、徳島)、gabexate mesilate (小野薬品、大阪) を実験に用いた。

#### 3. 実験方法

##### 1) 麻酔下ラット膵外分泌に及ぼす影響

ラット膵外分泌は白鳥らの方法<sup>6)</sup>に従って測定した。ラットを1夜絶食したのち、urethane (1.5 g/kg)の皮下投与にて麻酔し、気管および大腿静脈にカニューレを挿入した。腹部を正中切開し、肝間部に胆管にポリエチレンチューブ(PE-10、Becton Dickinson、USA)を挿入し、実験中胆汁を体外に流出させた。さらに十二指腸開口部に胆管にポリエチレンチューブ(PE-10)を挿入し、膵液を採取した。ラット膵外分泌に対するKSG-504の作用は以下の5通りの実験条件で検討した。

##### 1-a. CCK-8誘発膵外分泌

$1\text{ ng kg}^{-1}\text{ min}^{-1}$ のCCK-8を30分間静脈内に持続注入した。生理的食塩液投与群(生食

群)には生理的食塩液を $0.01\text{ ml/min}$ の流速で静脈内に持続注入した。KSG-504はCCK-8投与30分前より静脈内に持続注入した。膵液を30分毎に採取し、膵液中のamylase量を測定した。もう一つの方法として、 $0.5\text{ }\mu\text{g/kg}$ のCCK-8を静脈内に投与した。KSG-504はCCK-8投与の1分前に静脈内投与した。膵液を30分ごとに採取し、膵液量ならびに膵液中の蛋白、amylase、trypsin および lipase 量を測定した。

##### 1-b. カゼイン誘発血漿中CCK濃度および膵外分泌

10% casein 溶液を $2.3\text{ ml/30 min}$ の流速で30分間十二指腸内に持続注入した。生食群においては10% caseinの代わりに生理的食塩液を $2.3\text{ ml/30 min}$ の流速で十二指腸内に持続注入した。KSG-504はcasein投与30分前より静脈内に持続注入した。膵液を30分ごとに採取し、膵液中のamylase量を測定した。実験終了後、生食群およびcasein群のラットの下行大動脈よりheparin採血し血漿中CCK濃度を測定した。

##### 1-c. secretinとCCK-8の併用により誘発された膵外分泌

secretin ( $0.3\text{ ng kg}^{-1}\text{ min}^{-1}$ )単独、CCK-8 ( $1\text{ ng kg}^{-1}\text{ min}^{-1}$ )単独もしくはsecretinおよびCCK-8を同時に1時間静脈内に持続注入した。生食群には生理的食塩液を $0.01\text{ ml/min}$ の流速で静脈内に持続注入した。KSG-504はsecretinもしくはCCK-8投与の30分前より静脈内に持続注入した。膵液を1時間ごとに採集し、膵液量ならびに膵液中の重炭酸およびamylase量を測定した。

##### 1-d. 非刺激時の膵外分泌

KSG-504静脈内投与前30分間ならびに投与後30分間の膵液を採取し、膵液量および膵液中のamylase量を測定した。

##### 1-e. 十二指腸内投与したKSG-504の膵外分泌に対する影響

$1\text{ }\mu\text{g/kg}$ のCCK-8を静脈内に投与した。KSG-504はCCK-8投与10分前に十二指腸内投与した。膵液を30分ごとに採取し、膵液中のamylase量を測定した。

##### 2) 麻酔下イヌ膵外分泌に及ぼす影響

1夜絶食したイヌをpentobarbital ( $30\text{ mg/kg}$ )の静脈内投与にて麻酔し、気管および大腿静脈にカニューレを挿入したのち腹部を正中切開した。主膵管にポリエチレンチューブ(PE-50)を挿入し、膵液を20分ごとに採取したのち、膵液中のamylase量を測定した。 $0.1\text{ }\mu\text{g/kg}$ のCCK-8を静脈内投与し、膵アミラーゼ分泌量が一定になったのち、被験薬

を CCK-8 投与 1 分前に静脈内投与しその作用を検討した。

### 3) 麻酔下ウサギ膵外分泌に及ぼす影響

1 夜絶食したウサギを urethane (1.2 g/kg) の皮下投与にて麻酔し、気管および大腿静脈にカニューレを挿入したのち腹部を正中切開した。膵管にポリエチレンチューブ (PE-10) を挿入し膵液を 30 分ごとに採取したのち膵液中の amylase 量を測定した。2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の CCK-8 を 30 分毎に静脈内投与し、膵 amylase 分泌量が一定になったのち、被験薬を CCK-8 投与 1 分前に静脈内投与しその作用を検討した。

### 4) 覚醒下ラット膵内分泌に対する影響

ラットを 1 夜絶食して実験に用いた。KSG-504 投与 30 分前、15 および 60 分後に眼窩動脈より 0.5 ml ずつ heparin 採血した。血液を 3,000 rpm で 10 分間遠心 (KR-600P; クボタ) し血漿を得たのち血漿中の immunoreactive insulin (IRI) 濃度を測定した。ラット膵内分泌に対する KSG-504 の作用は以下の 3 通りの実験条件で検討した。

#### 4-a. glucose 誘発 insulin 分泌

ラットに glucose 1 g/kg を経口投与した。KSG-504 は glucose 投与 1 分前に静脈内投与した。

#### 4-b. glucose と CCK-8 の併用により誘発された insulin 分泌

ラットに glucose 1 g/kg を経口投与し直ちに CCK-8 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  を静脈内投与した。KSG-504 は glucose 投与 1 分前に静脈内投与した。

#### 4-c. 非刺激時の insulin 分泌

ラットに KSG-504 を静脈内投与し、その作用を検討した。

### 5) イヌの caerulein 誘発急性膵炎モデルに対する予防効果

1 夜絶食したイヌを pentobarbital (30 mg/kg) の静脈内投与にて麻酔し、気管および大腿動静脈にカニューレを挿入した後、caerulein (25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) を皮下投与し急性膵炎を作成した。KSG-504 を caerulein 投与の 30 分前より静脈内に持続注入し、経時的に heparin 採血を行い、血漿中の amylase および lipase 濃度を測定した。

### 6) ラットの caerulein 誘発急性膵炎モデルに対する治療効果

1 夜絶食したラットを urethane (1.5 g/kg) の皮下投与にて麻酔し、気管、頸動脈および大腿静脈にカニューレを挿入した後、caerulein (50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) を 1 時間ごとに計 4 回皮下投与し急性膵炎を作製した。KSG-504 および gabexate mesilate を最終 caerulein 投与の 30 分後より静脈内に持続注入し、経時的に heparin 採血を行い、血漿中 amylase および lipase 濃度を測定した。

### 4. 分析方法

amylase 濃度は amylase-B Test Wako を用い CM-amylase DEX 法にて測定した。蛋白濃度は Lowry 法<sup>5,3)</sup>にて測定した。trypsin 濃度は enterokinase を用いて trypsinogen を活性化<sup>6,7)</sup>したのち BAPNA 法<sup>6,8)</sup>にて測定した。lipase 濃度は Lipase kit A "Marupi" (大日本製薬、大阪) を用い BALB-DTNB 法にて測定した。重炭酸濃度は自動血液ガス測定システム (Sysmex AVL995; 東亜、東京) を用いて測定した。

血漿中の CCK は以下の方法を用いて測定した<sup>6,9)</sup>。2 ml の血漿を 2 ml の 0.5 M triethylamine と混合し、前もって 5 ml の acetonitrile と 10 ml の ethanol で洗浄しておいた Sep-Pak カートリッジ (Waters, Milford, MA, USA) を通過させた。20 ml の蒸留水で洗浄したのち、2 ml の acetonitrile /D.W. (50:50 v/v) で CCK を抽出し窒素気流下乾燥させた。乾燥させたサンプルを 0.2 ml の 0.03 M phosphate buffer (pH 7.6) に溶解し<sup>1,2,5</sup> I-CCK-39 と CCK-8 特異的抗血清を用いて CCK 濃度を測定した<sup>7,10)</sup>。

immunoreactive insulin (IRI) 濃度は Insulin 'Eiken' Radioimmunoassay Kit (栄研、東京) を用い two-antibody 法にて測定した。

### 5. 統計処理

測定値は平均値  $\pm$  標準誤差で表した。多群間での有意差の検定は Dunnett の多重比較検定法を、2 群間の検定は Student の *t*-test をそれぞれ用いて行った。また危険率が 5% 以下の場合を有意であると判定した。

実験結果

1. 麻酔下ラット膵外分泌に及ぼす影響

1-a. CCK-8 誘発膵外分泌

CCK-8 ( $1 \text{ ng kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ )の静脈内持続注入により膵 amylase 分泌量は有意に約 2.1 倍 ( $n=16$ ) に増加した (Fig. 14)。KSG-504 の静脈内持続注入はこの CCK-8 によるアミラーゼ分泌を用量依存的に抑制し、 $100 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$  の投与では生食群の分泌量にまで抑制した。KSG-504 の  $\text{ED}_{50}$  値は  $18 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$  であった。

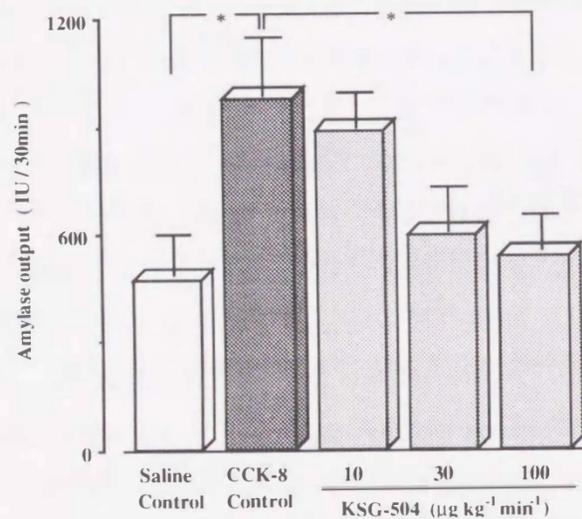


Fig. 14 Effects of KSG-504 on pancreatic amylase secretion induced by intravenous infusion of CCK-8 at a dose of  $1 \text{ ng kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$  in anesthetized rats. Intravenous infusion of KSG-504 was started 30 min before CCK-8 infusion. Each column indicates the mean  $\pm$  S.E. of 12-16 rats. \*: significantly different from CCK-8 control at  $P < 0.05$ .

CCK-8 ( $0.5 \mu\text{g/kg}$ )の静脈内投与により膵液分泌量は投与前の 2.4 倍に増加した (Table 6)。また、膵蛋白、amylase、trypsin および lipase 分泌量はそれぞれ 6.3、10.4、8.4 および 16.2 倍に増加した。KSG-504 を CCK-8 投与の 1 分前に静脈内投与する事により膵液および膵酵素分泌は用量依存的に抑制された。KSG-504 の CCK-8 誘発膵液ならびに膵蛋白、amylase、trypsin および lipase 分泌に対する  $\text{ED}_{50}$  値はそれぞれ 0.86、0.43、0.76、0.29 および 0.84  $\text{mg/kg}$  であった。

Table 6 Effect of KSG-504 on CCK-8 stimulated pancreatic exocrine secretion in anesthetized rats.

Group	Dose (mg/kg, i.v.)	n	Volume ( $\mu\text{l}/30\text{min}$ )	Protein (mg/30min)	Amylase (IU/30min)	Trypsin (ng/30min)	Lipase (U/30min)
Saline		7	24.1 $\pm$ 2.7	0.93 $\pm$ 0.25	177 $\pm$ 44	42 $\pm$ 16	7.8 $\pm$ 2.4
Control (CCK-8)		8	59.6 $\pm$ 3.3 ##	5.85 $\pm$ 0.25 ##	1832 $\pm$ 187 ##	352 $\pm$ 42 ##	126.5 $\pm$ 11.5 ##
KSG-504	0.3	8	48.6 $\pm$ 4.0	4.09 $\pm$ 0.42 **	1048 $\pm$ 135	235 $\pm$ 36 *	68.9 $\pm$ 14.4
	1	8	44.5 $\pm$ 3.1 **	3.67 $\pm$ 0.32 **	886 $\pm$ 87 *	200 $\pm$ 29 **	43.8 $\pm$ 11.5 *
	3	7	28.8 $\pm$ 2.9 **	2.10 $\pm$ 0.25 **	457 $\pm$ 67 **	119 $\pm$ 20 **	33.6 $\pm$ 8.3 **

The value represents mean $\pm$ S.E. of 7-8 rats. ## :  $P < 0.01$  vs saline group.

\* :  $P < 0.05$ , \*\* :  $P < 0.01$  vs control group.

1-b. casein 誘発血漿中 CCK 濃度および膵外分泌

生理的食塩液を十二指腸内に持続注入した生食群ラットの血漿中 CCK 濃度は  $0.91 \pm 0.25 \text{ pM}$  であった。一方、10% casein を十二指腸内に持続注入した casein 群ラットの血漿中 CCK 濃度は  $3.44 \pm 0.52 \text{ pM}$  に上昇した (Fig. 15)。また、casein の持続注入により膵 amylase 分泌量は  $226 \pm 28 \text{ IU}/30 \text{ min}$  から  $573 \pm 96 \text{ IU}/30 \text{ min}$  ( $n=18$ ) に増加した (Fig. 16)。しかしながら生理的食塩液の持続注入は膵 amylase 分泌に影響を及ぼさなかった (注入前  $218 \pm 48 \text{ IU}/30 \text{ min}$  および注入後  $228 \pm 61 \text{ IU}/30 \text{ min}$ ) ( $n=12$ )。KSG-504 の静脈内持続注入は casein による amylase 分泌を用量依存的に抑制し、 $50 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$  の投与では正常群の分泌量にまで抑制した。

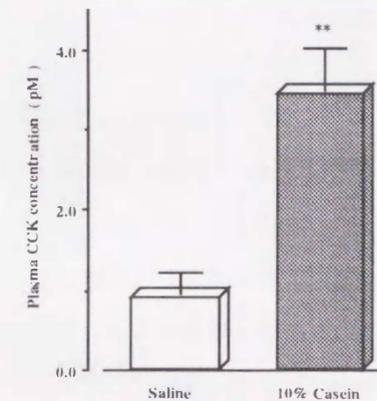


Fig. 15 Plasma CCK concentrations of normal rats and rats intraduodenally infused with 10% casein. Each column indicates the mean  $\pm$  S.E. of 12-18 rats. \*\*: significantly different from saline at  $P < 0.01$ .

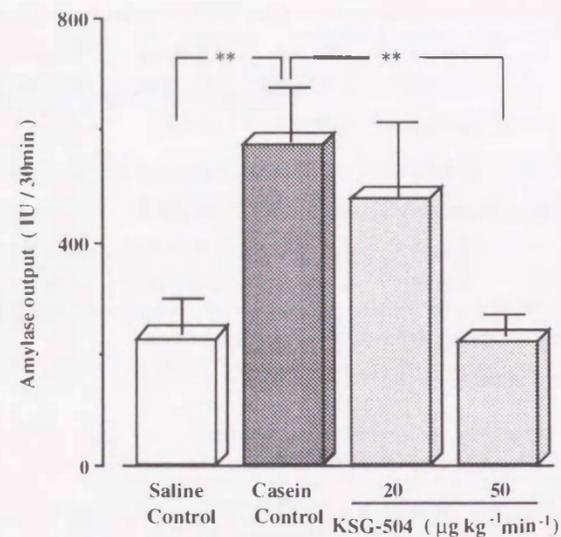


Fig. 16

Effects of KSG-504 on pancreatic amylase secretion induced by intraduodenal infusion of 10% casein in anesthetized rats. Intravenous infusion of KSG-504 was started 30 min before the casein infusion. Each column indicates the mean  $\pm$  S.E. of 12-18 rats. \*\*, significantly different from casein control at  $P < 0.01$ .

1-c. secretin と CCK-8 の併用により誘発された膵外分泌

膵重炭酸分泌量は secretin ( $0.3 \text{ ng kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) の持続注入、膵 amylase 分泌量は CCK-8 ( $1 \text{ ng kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) の持続注入によりそれぞれ約 2.5 倍および 6.1 倍に有意に増加した (Fig. 17)。また、膵液分泌量は secretin ならびに CCK-8 によりそれぞれ約 2 倍に有意に増加した。KSG-504 ( $100 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) の静脈内持続注入は secretin による膵液分泌および膵重炭酸分泌に対し影響を及ぼさなかったが、secretin による膵 amylase 分泌量を 1/2 に低下させた (Fig. 18)。CCK-8 を secretin と同時に静脈内に持続注入すると secretin 単独時よりも膵外分泌量が増加した (Table 7)。特に amylase の分泌量は有意に増加した。KSG-504 は CCK-8 と secretin の併用による膵液および重炭酸分泌量を secretin 単独時のレベルに抑制し、amylase 分泌量を secretin 単独時以下に抑制した。

1-d. 非刺激時の膵外分泌

$3 \text{ mg/kg}$  の KSG-504 を静脈内に投与すると、非刺激時の膵 amylase 分泌量は有意に抑制されたが、膵液分泌量は変化しなかった (Table 8)。

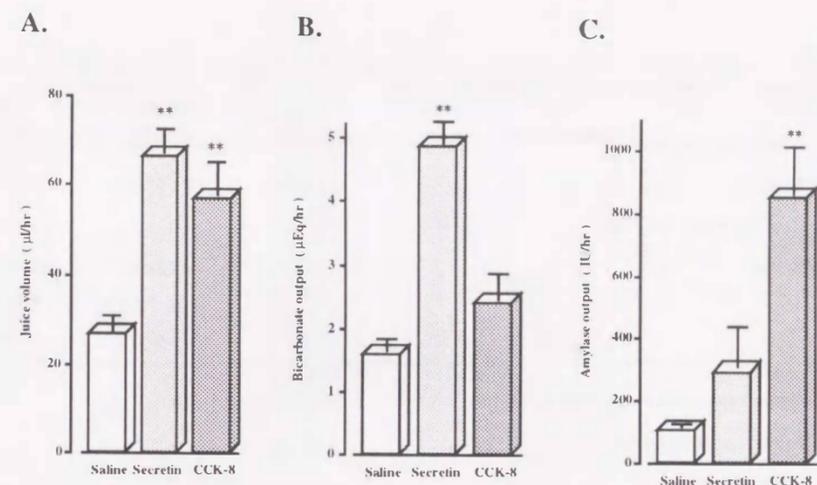


Fig. 17

Effects of intravenous infusion of secretin ( $0.3 \text{ ng kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) or CCK-8 ( $1 \text{ ng kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) on pancreatic juice volume (A), bicarbonate output (B) and amylase output (C) in anesthetized rats. Each column indicates the mean  $\pm$  S.E. of 5 rats. \*\*, significantly different from saline at  $P < 0.01$ .

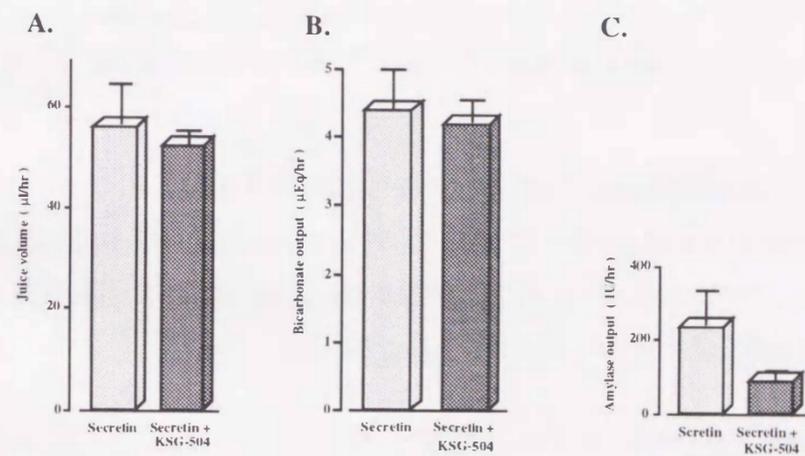


Fig. 18

Effects of KSG-504 on pancreatic juice volume (A), bicarbonate output (B) and amylase output (C) induced by intravenous infusion of secretin at a dose of  $0.3 \text{ ng kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ . Intravenous infusion of KSG-504 at a dose of  $100 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$  was started 30 min before secretin infusion. Each column indicates the mean  $\pm$  S.E. of 7-8 rats.

Table 7 Effect of KSG-504 on secretin plus CCK-8 stimulated pancreatic exocrine secretion in anesthetized rats.

Group	Dose ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ , i.v.)	n	Volume ( $\mu\text{l}/\text{hr}$ )	$\text{HCO}_3^-$ ( $\mu\text{Eq}/\text{hr}$ )	Amylase (IU/hr)
Secretin		9	62.8 $\pm$ 4.5	5.07 $\pm$ 0.35	452 $\pm$ 118
Control (Secretin + CCK-8)		8	97.8 $\pm$ 17.3	6.57 $\pm$ 0.73	1480 $\pm$ 400 #
KSG-504	10	7	75.7 $\pm$ 10.5	5.37 $\pm$ 0.65	961 $\pm$ 243
	30	8	71.7 $\pm$ 7.1	4.81 $\pm$ 0.31	990 $\pm$ 339
	100	8	67.1 $\pm$ 4.0	4.93 $\pm$ 0.58	344 $\pm$ 70 *

The value represents mean $\pm$ S.E. of 7-9 rats. # : P<0.05 vs secretin treated group.

\* : P<0.05 vs control group.

Table 8 Effect of KSG-504 on basal pancreatic exocrine secretion in anesthetized rats.

Group	Dose ( $\text{mg}/\text{kg}$ , i.v.)	n	Volume ( $\mu\text{l}/30\text{min}$ )	Amylase (IU/30min)
Saline		10	21.5 $\pm$ 1.8	380 $\pm$ 71
KSG-504	1	9	19.7 $\pm$ 2.2	267 $\pm$ 79
	3	10	18.1 $\pm$ 1.2	176 $\pm$ 31 *

The value represents mean $\pm$ S.E. of 8-10 rats. \* : P<0.05 vs saline group.

#### 1-e. 十二指腸内投与した KSG-504 の膵外分泌に対する影響

CCK-8 (1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )の静脈内投与により膵 amylase 分泌量は有意に約 8.8 倍に増加した (Fig. 19)。KSG-504 の十二指腸内投与は CCK-8 による膵 amylase 分泌を用量に依存して抑制し、その ED<sub>50</sub> 値は 12.1  $\text{mg}/\text{kg}$  であった。

#### 2. 麻酔下イヌ膵外分泌に及ぼす影響

CCK-8 (0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )の静脈内投与により膵 amylase 分泌量は 314  $\pm$  74 IU/20min から 4,802  $\pm$  679 IU/20min に増加した (n=10)。KSG-504 および loxiglumide を CCK-8 投与の 1 分前に静脈内投与することにより、膵 amylase 分泌は用量依存的に抑制され、その ED<sub>50</sub> 値はそれぞれ 0.98  $\text{mg}/\text{kg}$  および 1.73  $\text{mg}/\text{kg}$  であった (Fig. 20)。

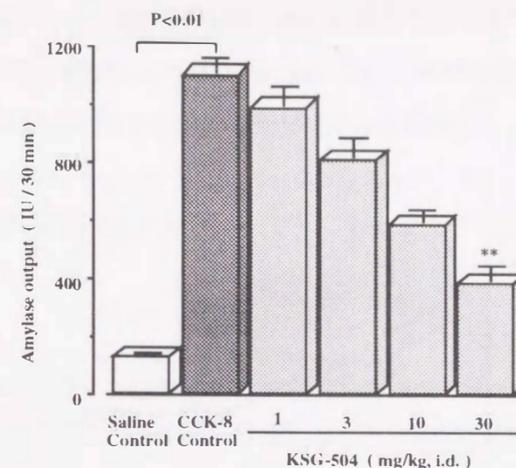


Fig. 19

Effects of KSG-504 on pancreatic amylase secretion induced by intravenous injection of CCK-8 at a dose of 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in anesthetized rats. Sodium carboxymethylcellulose (CMC, 0.5%) or KSG-504 was intraduodenally injected 10 min before CCK-8 injection. Each column indicates the mean  $\pm$  S.E. of 5 rats. \*\*: significantly different from CCK-8 control at P<0.01.

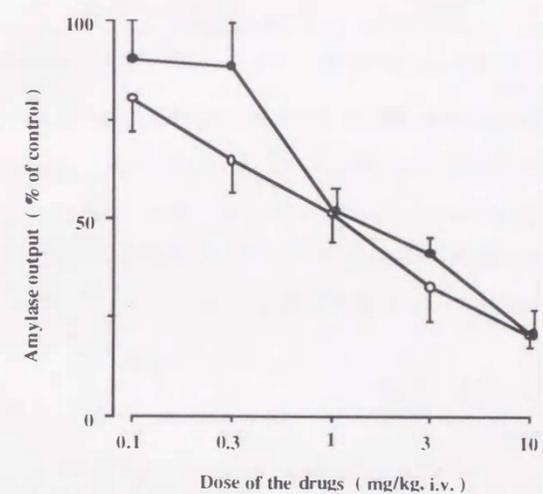


Fig. 20

Effects of KSG-504 (○) and loxiglumide (●) on pancreatic amylase secretion induced by intravenous injection of CCK-8 at a dose of 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in anesthetized dogs. Drugs were intravenously injected 1 min before CCK-8 injection. Each point was calculated as a percentage of the amylase secretion in the control group, and indicates the mean  $\pm$  S.E. of 5-6 dogs.

### 3. 麻酔下ウサギ膵外分泌に及ぼす影響

CCK-8 (2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) の静脈内投与により膵 amylase 分泌量は  $94 \pm 19 \text{ IU}/30\text{min}$  から  $1,047 \pm 88 \text{ IU}/30\text{min}$  に増加した ( $n=17$ )。KSG-50 および loxiglumide を CCK-8 投与の 1 分前に静脈内に投与することにより、膵 amylase 分泌は用量依存的に抑制され、その  $\text{ED}_{50}$  値はそれぞれ 1.1  $\text{mg}/\text{kg}$  および 2.4  $\text{mg}/\text{kg}$  であった (Fig. 21)。

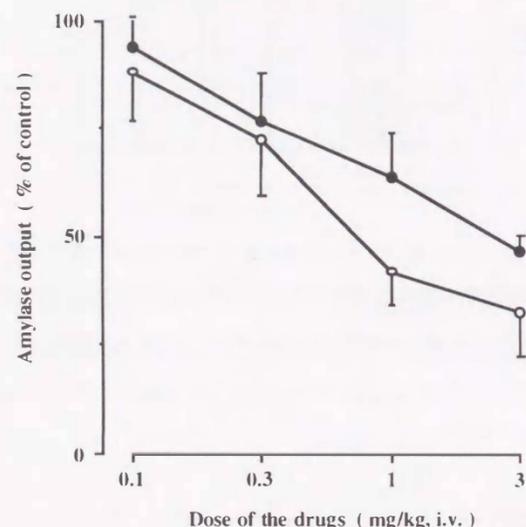


Fig. 21

Effects of KSG-504 (○) and loxiglumide (●) on pancreatic amylase secretion induced by intravenous injection of CCK-8 at a dose of 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in anesthetized rabbits. Drugs were intravenously injected 1 min before CCK-8 injection. Each point was calculated as a percentage of the amylase secretion in the control group, and indicates the mean  $\pm$  S.E. of 5-6 rabbits.

### 4. 覚醒下ラット膵内分泌に及ぼす影響

#### 4-a. glucose 誘発 insulin 分泌

glucose を 1  $\text{g}/\text{kg}$  経口投与すると投与 15 分後の血漿中 IRI レベルは約 4.6 倍に増加し、投与 60 分後には投与前のレベルに回復した (Table 9)。KSG-504 は glucose による血漿 IRI レベルに影響を与えなかった。

#### 4-b. glucose と CCK-8 の併用により誘発された insulin 分泌

CCK-8 (0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , i.v.) と glucose の併用により投与 15 分後の血漿中 IRI レベルは glucose 単独時の約 2 倍に増加した (Table 9)。KSG-504 はこの CCK-8 と glucose の併用による血漿 IRI レベルを glucose 単独時のレベルに抑制した。

#### 4-c. 非刺激時の insulin 分泌

KSG-504 は非刺激時の血漿中 IRI レベルに全く影響を及ぼさなかった (Table 9)。

Table 9 Effect of KSG-504 on the level of plasma IRI in conscious rats.

Treatment	Group	Dose (mg/kg, i.v.)	n	Pre	IRI ( $\mu\text{U}/\text{ml}$ )	
					15 min	60 min
Glucose p.o.	Control (Glucose)		7	14.7 $\pm$ 3.2	67.5 $\pm$ 9.2	15.7 $\pm$ 2.0
	KSG-504	3	7	9.2 $\pm$ 1.6	49.8 $\pm$ 5.8	13.1 $\pm$ 2.4
		10	7	10.9 $\pm$ 2.8	66.6 $\pm$ 6.1	18.0 $\pm$ 3.0
Glucose p.o. + CCK-8 i.v.	Glucose		7	13.0 $\pm$ 0.8	46.6 $\pm$ 7.9	27.8 $\pm$ 4.6
	Control (Glucose + CCK-8)		8	11.9 $\pm$ 2.1	84.5 $\pm$ 10.8 #	47.6 $\pm$ 9.9
	KSG-504	1	7	12.8 $\pm$ 1.9	51.4 $\pm$ 10.1 *	43.8 $\pm$ 6.6
		3	8	19.8 $\pm$ 4.6	43.4 $\pm$ 5.7 **	34.4 $\pm$ 9.9
Basal	Normal		9	11.8 $\pm$ 2.2	18.3 $\pm$ 2.7	9.4 $\pm$ 0.8
	KSG-504	3	9	14.8 $\pm$ 2.7	18.8 $\pm$ 4.1	22.5 $\pm$ 9.9
		10	9	11.7 $\pm$ 2.3	19.0 $\pm$ 4.5	12.7 $\pm$ 2.2

The value represents mean $\pm$ S.E. of 7-9 rats. #:  $P<0.05$  vs glucose treated group. \*:  $P<0.05$ , \*\*:  $P<0.01$  vs control group.

### 5. イヌの caerulein 誘発急性膵炎モデルに対する予防効果

麻酔下のビーグル犬に caerulein を皮下投与した 6 時間後の血漿中 amylase および lipase 濃度は投与前の約 20 倍に上昇した。KSG-504 を caerulein 投与の 30 分前より静脈内持続注入すると、血漿中 amylase および lipase 濃度は用量依存的に抑制された (Fig. 22、23)。特に KSG-504 100  $\mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$  の持続注入群では、amylase および lipase の上昇はほぼ完全に抑制された。caerulein 投与 6 時間後 (KSG-504 注入開始 6.5 時間後) の血漿中 amylase および lipase 上昇に対する KSG-504 の  $\text{ED}_{50}$  値はそれぞれ 21 および 18  $\mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$  であった。

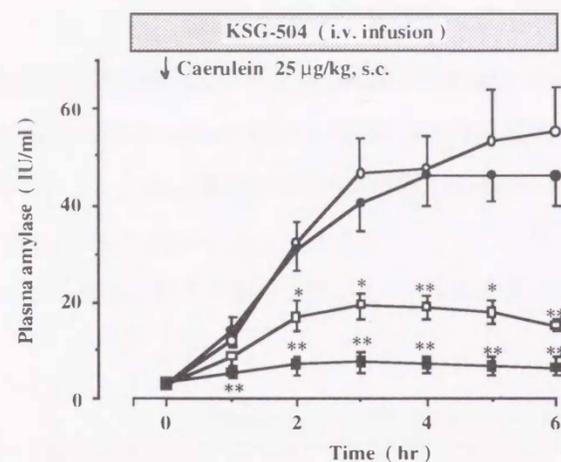


Fig. 22

Protective effects of KSG-504 on plasma amylase levels in dogs with caerulein-induced acute pancreatitis. Saline (○) or 10 (●), 30 (□) or 100 (■)  $\mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$  of KSG-504 was intravenously infused 30 min before the s.c. injection of caerulein (25  $\mu\text{g/kg}$ ). Each point indicates the mean  $\pm$  S.E. of 5 dogs. \* and \*\*; significantly different from saline-treated group at  $P < 0.05$  and 0.01, respectively.

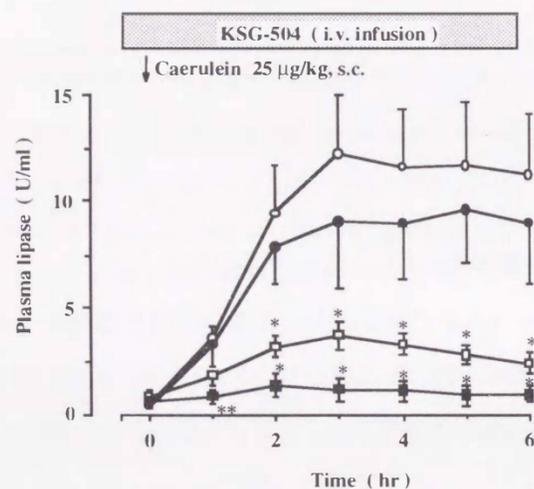


Fig. 23

Protective effects of KSG-504 on plasma lipase levels in dogs with caerulein-induced acute pancreatitis. Saline (○) or 10 (●), 30 (□) or 100 (■)  $\mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$  of KSG-504 was intravenously infused 30 min before the s.c. injection of caerulein (25  $\mu\text{g/kg}$ ). Each point indicates the mean  $\pm$  S.E. of 5 dogs. \* and \*\*; significantly different from saline-treated group at  $P < 0.05$  and 0.01, respectively.

#### 6. ラットの caerulein 誘発急性膵炎モデルに対する治療効果

麻酔下ラットの血漿中 amylase および lipase 濃度は caerulein の反復投与により上昇し、caerulein 初回投与 9 時間後には投与前の約 9.8 および 25 倍に達した。KSG-504  $300 \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$  を最終 caerulein 投与の 30 分後より静脈内持続注入すると血漿中 amylase および lipase 濃度上昇は有意に抑制された (Fig. 25、26)。一方、trypsin 阻害薬である gabexate mesilate の 100 および  $300 \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$  の持続注入は何ら影響を及ぼさなかった。

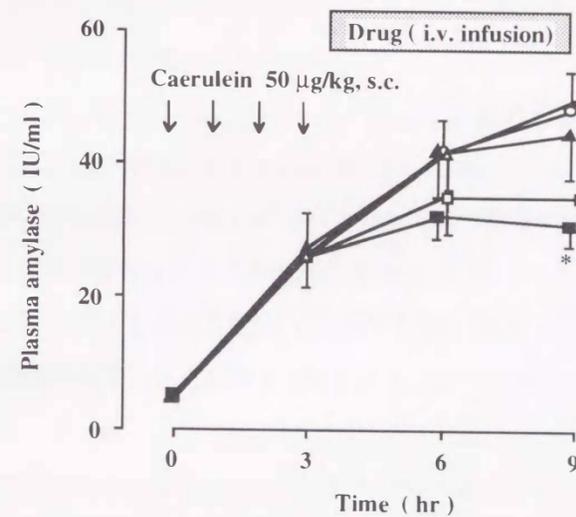


Fig. 24

Therapeutic effects of KSG-504 and gabexate mesilate on plasma amylase levels in rats with caerulein-induced acute pancreatitis. Saline (○),  $100 \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$  of KSG-504 (□),  $300 \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$  of KSG-504 (■),  $100 \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$  of gabexate mesilate (△) or  $300 \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$  of gabexate mesilate (▲) was intravenously infused 30 min after the final s.c. injection of caerulein (50  $\mu\text{g/kg}$ ). Each point indicates the mean  $\pm$  S.E. of 5-7 rats. \*; significantly different from saline-treated group at  $P < 0.05$ .

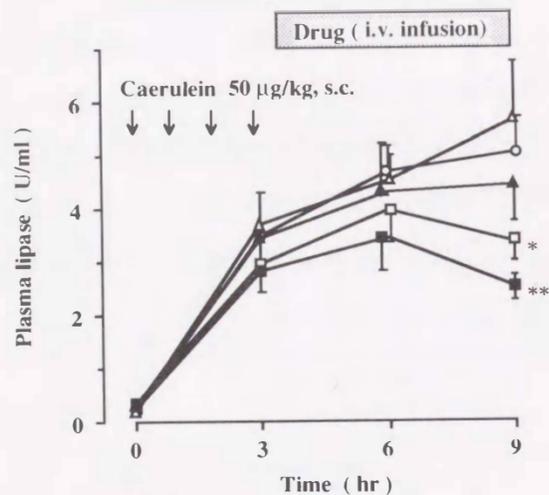


Fig. 25  
Therapeutic effects of KSG-504 and gabexate mesilate on plasma lipase levels in rats with caerulein-induced acute pancreatitis. Saline (○), 100 µg kg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> of KSG-504 (□), 300 µg kg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> of KSG-504 (■), 100 µg kg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> of gabexate mesilate (△) or 300 µg kg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> of gabexate mesilate (▲) was intravenously infused 30 min after the final s.c. injection of caerulein (50 µg/kg). Each point indicates the mean ± S.E. of 5-7 rats. \* and \*\*: significantly different from saline-treated group at P<0.05 and 0.01, respectively.

#### 考察

CCK を 0.5 - 2 ng kg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> の流速で静脈内に持続注入すると、食餌負荷により誘発される血中 CCK 濃度とほぼ等しい血中濃度が得られる<sup>71)</sup>と報告されている。麻酔下ラットに 1 ng kg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> の CCK-8 を静脈内持続注入すると、膵 amylase 分泌量は約 2 倍に増加した。KSG-504 がこの生理的な用量の CCK-8 により誘発される膵 amylase 分泌を用量依存的に抑制したことより、KSG-504 の CCK 受容体拮抗作用は in vivo 膵外分泌においても発現することが明らかとなった。続いて外因性 CCK により誘発された膵液および各種膵酵素分泌に対する KSG-504 の作用を検討した。CCK-8 (0.5 µg/kg, i.v.) により膵液量、蛋白、amylase、trypsin および lipase 分泌量はそれぞれ 2.4、6.3、10.4、8.4 および 16.2 倍に増加した。この結果は、森吉らの生理的 CCK-8 刺激によりラット膵液量、amylase および trypsin 分泌量が 3-6 倍に増加したという報告<sup>71)</sup>とよく一致している。

この CCK-8 による膵液分泌量ならびに今回測定した全酵素分泌量が KSG-504 により等しく抑制されたことより、KSG-504 は amylase のみでなく CCK により誘発される膵外分泌すべてを抑制することが明らかとなった。

血漿中 CCK 濃度は casein (蛋白) の十二指腸内持続注入により腸管の I 細胞より放出され上昇する (Fig. 1) と考えられている<sup>72)</sup>。一方、もうひとつの膵液分泌促進ホルモンである secretin 濃度は主に脂質の持続注入により上昇する<sup>69)</sup>と報告されている。今回 10% casein の十二指腸内持続注入により、血漿中 CCK 濃度の有意な上昇と膵 amylase 分泌量の有意な増加が観察された。よって casein 投与により促進される膵外分泌は内因性 CCK の放出を介すると考えられる。KSG-504 は casein 投与による膵 amylase 分泌を用量依存的に抑制した。以上より、KSG-504 は内因性 CCK により誘発される膵外分泌も抑制することが明らかとなった。

膵の重炭酸分泌は主に secretin を介している<sup>73, 74)</sup>と報告されている。今回の結果でも膵液分泌量と膵重炭酸分泌量は secretin の静脈内持続注入により有意に増加したが、amylase 分泌に対する作用は CCK に比べかなり弱い作用であった。次に CCK-8 による膵 amylase 分泌をほぼ完全に抑制する用量 (100 µg kg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>) の KSG-504 の secretin 誘発膵外分泌に対する影響を検討した。この用量の KSG-504 は secretin により誘発された膵液量および膵重炭酸量に全く影響を及ぼさなかったが、secretin による amylase 分泌量を約半分に減少させた。また KSG-504 は secretin と CCK-8 の併用により誘発された膵液量および膵重炭酸分泌量を secretin 単独時の分泌量にまで用量依存的に抑制した。一方 secretin と CCK-8 の併用による膵 amylase 分泌量は KSG-504 により secretin 単独時のレベル以下に減少した。非刺激時の膵基礎分泌に関しては、KSG-504 は膵 amylase のみ有意に抑制したが、膵液量に対しては影響を及ぼさなかった。in vitro ラット膵腺房細胞よりの secretin 刺激膵 amylase 放出に対し KSG-504 が何ら影響を及ぼさないことを第 1 部において報告した。よって、secretin 誘発による膵 amylase 分泌量が KSG-504 により減少したのは内因性 CCK が関与した amylase の基礎分泌を KSG-504 が抑制したためと考えられる。以上 KSG-504 は CCK により誘発される膵液および膵酵素分泌のみならず膵重炭酸分泌も抑制することが明らかとなった。

さらに KSG-504 は静脈内投与のみならず十二指腸内投与によっても CCK 誘発ラット

膵 amylase 分泌を抑制したことより、投与経路に関わらず膵 CCK-A 受容体に拮抗することが明らかとなった。

続いて KSG-504 の CCK 誘発膵 amylase 分泌に対する作用をイヌおよびウサギを用いて検討したところほぼ等しい効力での抑制がみられた。このことから KSG-504 は動物種にかかわらず CCK による膵外分泌を抑制することが明らかとなった。また、KSG-504 の効力は glutaramic acid 誘導体 loxiglumide の効力と比較して約 2 倍であった。

膵内分泌に関しては、外因性 CCK により insulin 分泌が促進されることが知られている<sup>9, 10)</sup>。さらに膵ランゲルハンス島における CCK 受容体の存在が証明されている<sup>75)</sup>。また、マウスにおいて CCK による膵 insulin 分泌が CCK-A 受容体拮抗薬である L-364,718 により拮抗されたこと<sup>76)</sup>より、CCK による膵内分泌作用は CCK-A 受容体を介すると考えられている。一方、ヒトの insulin 分泌において CCK は主なる分泌促進物質ではないとの報告もある<sup>77)</sup>。KSG-504 は 1 mg/kg の静脈内投与より外因性 CCK により誘発された IRI レベルを抑制したが、glucose 誘発ならびに非刺激時の基礎 IRI レベルには影響を及ぼさなかった。Karlsson らも loxiglumide および L-364,718 により外因性 CCK 誘発膵内分泌が抑制されたと報告している<sup>75)</sup>。しかしながら L-364,718 は glucose 誘発および非刺激時の insulin 分泌に影響を及ぼさない<sup>77, 78)</sup>。これら結果は KSG-504 を用いた結果とよく一致している。

続いて実験急性膵炎モデルに対する作用を検討したところ、KSG-504 前投与はイヌの caerulein 誘発膵炎モデルにおいて、用量依存的に血中 amylase および lipase 値の上昇を抑制した。この KSG-504 による caerulein 誘発膵炎予防効果は CCK-A 受容体への caerulein あるいは内因性に誘発された CCK の結合阻害を介したものと考えられる。また、ラットの caerulein 誘発膵炎作製後に KSG-504 を投与しても、膵炎は改善され、KSG-504 の治療的効果も確認された。KSG-504 は caerulein 投与後のフィードバック機構を介した内因性 CCK 増加による急性膵炎悪化を抑制し、膵の回復を早めたものと考えられる。また KSG-504 が胆汁、膵液の膵管内への逆流を目的とした closed duodenal loop (CDL) 誘発膵炎<sup>79)</sup>、胆汁成分である taurocholate を注入して作製した膵炎<sup>80)</sup> および代謝性膵障害モデルである ethionine 誘発膵炎<sup>80)</sup> モデルに対しても著明な改善作用を示すことが報告されており (Table 10)、CCK が急性膵炎の発症および進展に深く関

与していることが考えられると共に、KSG-504 の急性膵炎治療薬としての有用性が示唆された。

Table 10 Effects of KSG-504 on experimental acute pancreatitis models.

Model	Species	Effects
1. Caerulein-induced pancreatitis	Rat, Dog	Plasma Amylase, Lipase ↓ Pancreatic wet weight ↓ Mitigation of histological changes
2. Closed duodenal loop (CDL)-induced pancreatitis	Rat	Plasma Amylase, Lipase ↓ Pancreatic wet weight ↓ Mitigation of histological changes
3. Taurocholate-induced pancreatitis	Rat	Plasma Amylase, Lipase ↓ Pancreatic wet weight ↓ Ascites ↓ Mitigation of histological changes
4. Ethionine-induced pancreatitis	Mouse	Elongation of the survival of mice

### 第3部 KSG-504の胆嚢、胃および腸管に対する作用の検討

#### 序

CCK および gastrin は末梢において膵臓<sup>2, 6, 7, 8, 9, 10)</sup>のみならず他の消化管に対しても様々な生理活性を有している。すなわち、CCK-A 受容体を介し胆嚢収縮を亢進<sup>1, 11, 12)</sup>、胃運動を抑制<sup>13)</sup>、腸管運動を亢進<sup>14, 15)</sup>し、gastrin/CCK-B 受容体を介し胃酸分泌を亢進<sup>8, 1, 8, 2)</sup>する。さらには、これら消化管の病態に対するCCKの関与も報告されており、胆石疼痛の緩解<sup>5, 0)</sup>や過敏性腸症候群<sup>5, 1)</sup>に対するCCK-A 受容体拮抗薬の臨床応用ならびに消化管潰瘍に対するgastrin / CCK-B 受容体拮抗薬<sup>4, 6)</sup>の臨床応用が検討されている。そこで第3部では、1) 胆嚢、2) 胃、3) 腸管におけるCCK-8あるいはpentagastrinの作用に対するKSG-504の影響を検討し、これら領域のCCKの関与が考えられる疾患に対する治療薬としての可能性を考察した。

#### 実験材料および方法

##### 1. 実験動物

ICR系雄性マウス(25 - 40 g)、Wistar系雄性ラット(156 - 178 g)、Hartley系雄性モルモット(300 - 510 g)、日本白色種雄性ウサギ(2.3 - 3.7 kg)および雌雄雑犬(2.3 - 3.2 kg)を実験に用いた。

##### 2. 使用薬物

L-364,718、proglumide および benzotript はキッセイ薬品にて合成した。pentagastrin (ペプチド研)、cimetidine および卵黄 (Sigma) を用いた。

##### 3. 実験方法

###### 3-1) 胆嚢系に及ぼす影響

###### 1) in vitro モルモット胆嚢標本のCCK-8誘発収縮に及ぼす影響

放血致死させたモルモットより胆嚢を摘出し、輪走筋方向に長さ10mm、幅2mmのたんざく状標本を作製した。標本は生物ガス(95% O<sub>2</sub>+5% CO<sub>2</sub>)を通気した37°CのKrebs緩衝液を満たした10mlのマグナス槽内に1gの負荷を掛けて懸垂した。10<sup>-8</sup> MのCCK-8を1時間ごとに槽内に添加して、一定の収縮が得られたのち、被験薬をCCK-8添加の5分前に処置し影響を検討した。発生した筋緊張の変化は等尺性トランスデューサー(SB-1T、日本光電)を介しペン書きオシログラフ(Rectigraph 8S、三栄)に記録した。

###### 2) 麻酔下モルモット胆嚢のCCK-8誘発収縮に及ぼす影響

モルモットをurethane (0.75 g/kg) および chloralose (30 mg/kg) の皮下注射により麻酔し、気管および頸静脈にカニューレを装着した。腹部を正中切開し、胆嚢底部に小孔を開けチューブ(No6、ヒビキ、東京)を挿入して結紮した。チューブの末梢端には三方活栓を連結し、その一端にはインフュージョンポンプ(SS-1215、アトー、東京)を、他端には圧トランスデューサー(P23XL、Gould、USA)を接続した。胆嚢内には37°Cに加温した生理的食塩液を0.06 ml/minの流速で持続注入した。15分毎に30 ng/kgのCCK-8を静脈カニューレより投与し、一定の収縮が得られたのち、KSG-504をCCK-8投与の1分前に静脈カニューレより投与して作用を検討した。胆嚢内圧の変化は圧トランスデューサーを介しペン書きオシログラフに記録した。

###### 3) 麻酔下イヌ胆嚢のCCK-8誘発収縮に及ぼす影響

イヌをpentobarbital (30 mg/kg) の静脈内投与により麻酔し、気管および大腿静脈にカニューレを装着した。腹部を正中切開したのち、胆嚢底部に小孔を開けチューブ(No6)を装着し、37°Cの生理的食塩液を0.2 ml/minの流速で持続注入した。30分毎に0.1 μg/kgのCCK-8を静脈カニューレより投与し、一定の収縮が得られたのち、被験薬をCCK-8投与の1分前に静脈カニューレより投与して作用を検討した。胆嚢内圧の変化は圧トランスデューサーを介しペン書きオシログラフに記録した。

#### 4) 覚醒下マウスのCCK-8および卵黄誘発胆嚢排出能促進作用に及ぼす影響

両試験において評価系確立のための基礎検討および薬効評価を実施した。マウスを7時間絶食、絶水したのち、胆嚢排出能（胆嚢内胆汁排出能）を刺激するためCCK-8あるいは卵黄を投与した。一定時点においてマウスを屠殺して胆管を結紮し、胆嚢を摘出した。ただちに胆嚢重量を求め胆嚢内胆汁量とした（以下胆汁量と略す）。なお、胆嚢自体の重量は1 mg前後のため本実験では測定重量そのものを便宜的に胆汁量とし、胆嚢排出量の指標として用いた。

##### 4-a. CCK 誘発試験

CCK-8の用量-反応関係を見るため、CCK-8 0.01 - 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  を皮下投与し、15分後に胆汁量を測定した。さらには、CCK-8 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  を皮下投与して、5 - 30分後の胆汁量を測定し経時変化を観察した。対照群には1% BSAを含む生理的食塩液を皮下投与した。KSG-504の薬効評価試験では、静脈内投与1分後にCCK-8 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  を皮下投与し15分経過後に胆汁量を測定した。

##### 4-b. 卵黄誘発試験

卵黄刺激による胆嚢排出能促進を見るため、まず5 - 30%の乾燥卵黄末懸濁液 1 mg/body を経口投与して、15分後に胆汁量を測定した。次に20%卵黄液を1 ml/body 経口投与したのち5~30分間経時的に胆嚢排出能の変化を観察した。対照群には蒸留水 1 ml/body を経口投与した。また無処置対照群（正常群）を設け蒸留水投与の影響を比較検討した。KSG-504の薬効評価に際しては、被験薬静脈内投与1分後に20%卵黄液を1 ml/body 経口投与し、その15分後に胆汁量を測定した。

#### 5) in vitro ウサギ胆管末梢部のCCK-8誘発収縮に及ぼす影響

放血致死させたウサギより胆管末梢部（総胆管末端膨大部）を山田と飯塚の方法<sup>8,3)</sup>に従って摘出し、縦走筋方向に高さ8 mm、上辺2 mm、下辺3 mmの台形状標本を作製した。標本は生物ガスを通気した37°CのKrebs緩衝液を槽内に満たした10 mlのマグナス槽内に0.5gの負荷をかけて懸垂した。10<sup>-8</sup> MのCCK-8を槽内に添加し一定の運動が得られたのち、KSG-504を累積的に添加し影響を検討した。

#### 3-2) 胃に及ぼす影響

##### 1) 覚醒下ラットのCCK-8誘発胃排出能遅延作用に及ぼす影響

評価系に関する基礎検討およびKSG-504の薬効評価を行った。ラットを16時間絶食後さらに4時間絶食・絶水して実験に供した。CCK-8の至適用量を決定するため、まず3 - 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ のCCK-8を皮下投与し、その5分後に蒸留水 20 ml/kg を経口負荷した。負荷10分後にラットを屠殺し、噴門、幽門を結紮後胃を摘出して重量を測定した。胃内容物を除去後に再度秤量して、それらの差から胃内容物を求め、胃排出量の指標とした。

次にCCK-8 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  を皮下投与後、蒸留水 20 ml/kg を経口負荷し、5 - 20分間の胃排出能経時変化を観察した。

KSG-504の尾静脈内投与1分後にCCK-8 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  を皮下投与し、その10分後に胃排出能を測定した。

##### 2) 麻酔下ラットのpentagastrin誘発胃酸分泌に及ぼす影響

16時間絶食したラットをurethane麻酔（1.2 g/kg s.c.）し、大腿静脈にカニューレを挿入した。腹部を正中切開し前胃部に加えた小切開より胃内を洗浄したのちに胃内にカニューレを挿入した。胃幽門部を結紮したのち胃内に37°Cに加温した2 mlの生理的食塩液を注入した。pentagastrinを300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  皮下投与したのち、30分毎に胃内に挿入したカニューレより胃液を採取し、0.01N水酸化ナトリウム溶液を用いて滴定する事により胃酸分泌量を測定した。KSG-504はpentagastrin投与の1分前に静脈カニューレより投与、cimetidineはpentagastrin投与の30分前に十二指腸内に投与した。

#### 3-3) 腸管に及ぼす影響

##### 1) in vitro モルモット回腸標本のCCK-8誘発収縮に及ぼす影響

放血致死させたモルモットより回腸を摘出し、縦走筋方向に長さ20 mmの標本を作製した。標本は生物ガスを通気した30°CのKrebs緩衝液を満たした10 mlのマグナス槽内に1 gの負荷をかけて懸垂した。10<sup>-8</sup> MのCCK-8を30分ごとに槽内に添加して、一定の収縮が得られたのち、KSG-504をCCK-8添加の5分前に処置し影響を検討した。

2) 麻酔下ウサギ十二指腸および空腸運動に及ぼす影響

16時間絶食したウサギを urethane 麻酔 (1.2 g/kg s.c.) し、気管および大腿静脈にカニューレを挿入した。腹部を正中切開し、十二指腸および空腸にバルーンを挿入した。バルーン内には 37°C に加温した蒸留水を内圧が 5-10 cmH<sub>2</sub>O になるよう注入した。0.1 μg/kg の CCK-8 を静脈カニューレより投与し、一定の収縮が得られたのち、KSG-504 を CCK-8 投与の 1 分前に静脈内投与し作用を検討した。バルーン内圧の変化は圧トランスデューサーを介しペン書きオシログラフに記録した。

4. 統計処理

測定値は平均値 ± 標準誤差で表した。多群間での有意差の検定は Dunnett の多重比較検定法を、2 群間の検定は Student の *t*-test をそれぞれ用いて行った。また危険率が 5% 以下の場合を有意であると判定した。

実験結果

1. 胆嚢に及ぼす影響

1) in vitro モルモット胆嚢標本の CCK-8 誘発収縮に及ぼす影響

モルモットの摘出胆嚢標本に 最大刺激濃度である 10<sup>-8</sup> M の CCK-8 を適用すると 1.4 ± 0.2 g (n=11) の収縮が得られた。papaverine および verapamil は濃度依存的に CCK-8 による収縮を抑制したが、atropine および hexamethonium は何ら影響を及ぼさなかった (Fig. 26)。また、benzotript および proglumide (Table 2) は CCK-8 による収縮にほとんど影響を及ぼさなかった (Fig. 27)。L-364,718、lorglumide、loxiglumide および KSG-504 は CCK-8 による収縮を濃度依存的に抑制し、その IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ 2.6 × 10<sup>-8</sup> M、3.8 × 10<sup>-7</sup> M、2.5 × 10<sup>-6</sup> M および 1.9 × 10<sup>-6</sup> M であった。

2) 麻酔下モルモット胆嚢 CCK-8 誘発収縮に及ぼす影響

麻酔下モルモットに CCK-8 を静脈内投与すると 1 ng/kg より用量依存的な収縮が生じ 30 ng/kg で最大収縮 (23.8 ± 0.9 cmH<sub>2</sub>O, n=12) が得られた。KSG-504 は 0.1 mg/kg

より用量依存的に CCK-8 30 ng/kg による収縮を抑制し、3 mg/kg の静脈内投与で 93.4% の抑制を示した (Fig. 28)。KSG-504 の ED<sub>50</sub> 値は 0.23 mg/kg であった。

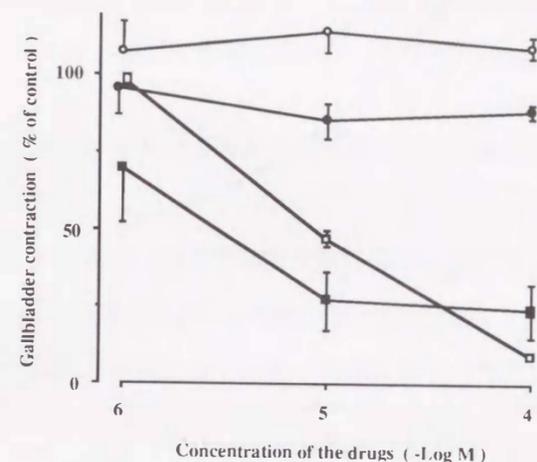


Fig. 26

Effects of atropine (○), hexamethonium (●), papaverine (□) and verapamil (■) on the contractile response to 10<sup>-8</sup> M CCK-8 in isolated gallbladder from guinea pigs. Drugs were added to the bath 5 min before adding CCK-8. Each point indicates the mean ± S.E. of 5 experiments.

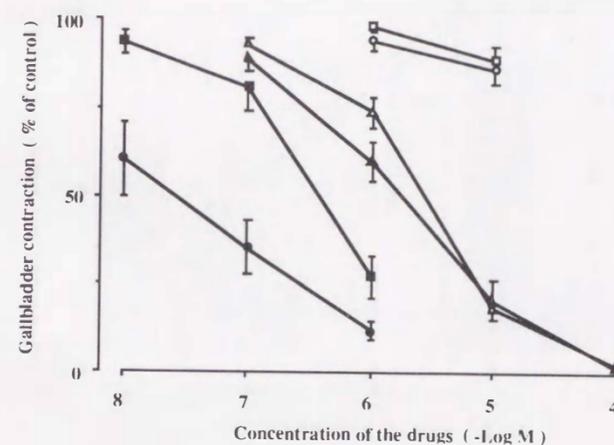


Fig. 27

Effects of benzotript (○), L-364,718 (●), proglumide (□), lorglumide (■), loxiglumide (△) and KSG-504 (▲) on the contractile response to 10<sup>-8</sup> M CCK-8 in the isolated gallbladder from guinea pigs. Drugs were added to the bath 5 min before adding CCK-8. Each point indicates the mean ± S.E. of 5 experiments.

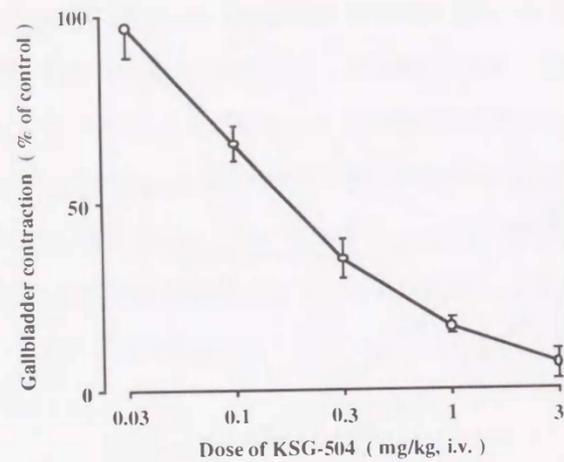


Fig. 28  
Effects of KSG-504 on gallbladder contraction induced by intravenous injection of CCK-8 at a dose of 30 ng/kg in anesthetized guinea pigs. KSG-504 was administered intravenously 1 min before the CCK-8 injection. Each point was calculated as a percentage of the contraction in the control group, and indicates the mean  $\pm$  S.E. of 8 guinea pigs.

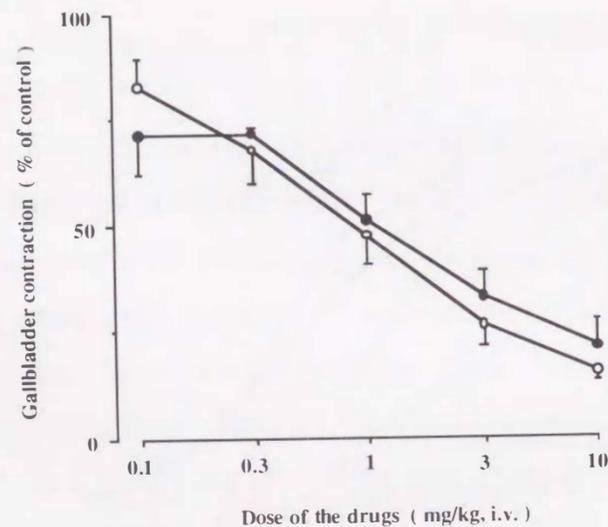


Fig. 29  
Effects of KSG-504 (○) and loxiglumide (●) on gallbladder contraction induced by intravenous injection of CCK-8 at a dose of 0.1  $\mu$ g/kg in anesthetized dogs. Drugs were intravenously injected 1 min before CCK-8 injection. Each point was calculated as a percentage of the gallbladder contraction in the control group, and indicates the mean  $\pm$  S.E. of 5-6 dogs.

### 3) 麻酔下イヌ胆嚢CCK-8誘発収縮に及ぼす影響

イヌ胆嚢内圧はCCK-8 0.1  $\mu$ g/kgの静脈内投与により9.9  $\pm$  1.3 cmH<sub>2</sub>Oから21.9  $\pm$  1.6 cmH<sub>2</sub>Oに上昇した。KSG-504およびloxiglumideはCCK-8による収縮を用量依存的に抑制し、そのED<sub>50</sub>値はそれぞれ0.84および1.16 mg/kgであった (Fig. 29)。

### 4) 覚醒下マウスのCCK-8および卵黄誘発胆嚢排出能促進作用に及ぼす影響

#### 4-a. CCK-8誘発試験

CCK-8皮下投与15分後の胆汁量は用量依存的に減少し、1  $\mu$ g/kgで対照群の16%に低下した (Fig. 30-A)。最大刺激用量のCCK-8 1  $\mu$ g/kgを皮下投与して胆汁量の変化を経時的に測定した結果、5分後において既に対照群の17%であり、15分後には8%まで低下し、最低となった。30分後には15分後よりやや増加していた (Fig. 30-B)。以上の結果からKSG-504の薬効評価はCCK-8 1  $\mu$ g/kg皮下投与の15分後に行った。

KSG-504の静脈内投与は3 mg/kgより用量に依存してCCK-8による胆汁量減少を抑制し、50 mg/kgではほぼ完全抑制を生じた (Fig. 31)。ED<sub>50</sub>値は13.3 mg/kgであった。

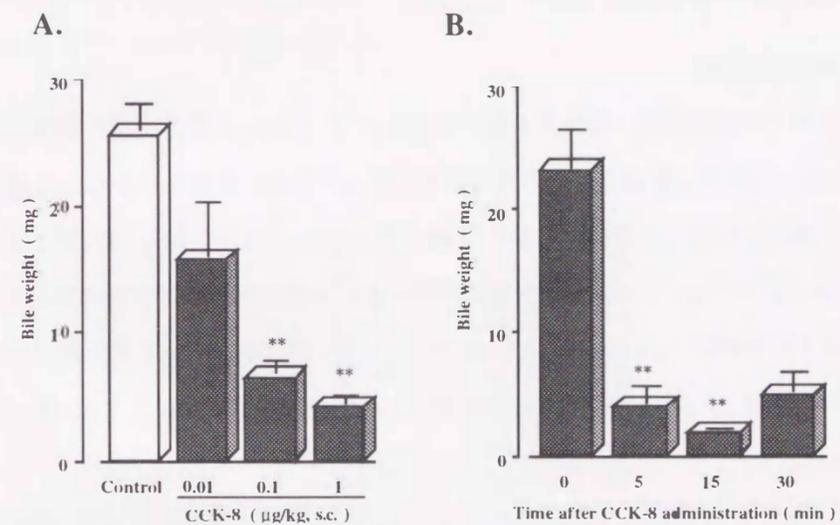


Fig. 30  
Effects of CCK-8 on gallbladder emptying in conscious mice. A; CCK-8 (0.01-1  $\mu$ g/kg) was administered subcutaneously 15 min before the gallbladder isolation. B; CCK-8 at a dose of 1  $\mu$ g/kg was administered subcutaneously 0-30 min before the gallbladder isolation. Each column indicates the mean  $\pm$  S.E. of 5-8 mice. \*\*; significantly different from control (A) or 0 min (B) at P<0.01.

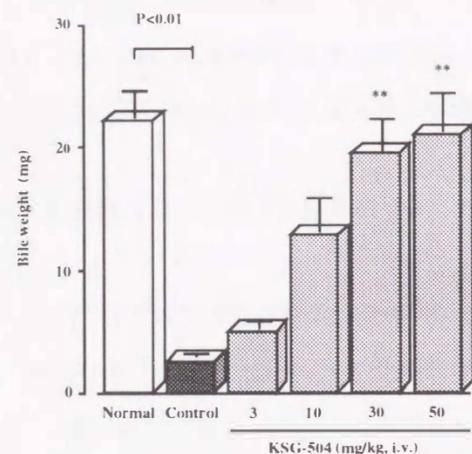


Fig. 31

Effects of KSG-504 on gallbladder emptying induced by subcutaneous injection of CCK-8 at a dose of 1  $\mu$ g/kg in conscious mice. KSG-504 was administered intravenously 1 min before the CCK-8 injection. Each column indicates the mean  $\pm$  S.E. of 9-10 mice. \*\*; significantly different from control at  $P<0.01$ .

#### 4-b. 卵黄誘発試験

蒸留水または各種濃度の卵黄液を経口投与して 15 分後に胆嚢排出量を観察した結果を図 32-A に示した。蒸留水のみを経口投与によっても胆汁量はわずかながら減少した。卵黄液は濃度に依存した胆嚢排出能の促進作用を示し 20%卵黄投与群の胆汁量は対照群の 21%に低下した。20%卵黄液を経口投与したのちの胆汁量は 5、15、30 分後にそれぞれ対照群の 53%、13%、15%に低下し、15 分以降において最大減少が認められた (Fig. 32-B)。このことから 20%卵黄を 1 ml/body 経口投与して、15 分後に薬効評価を行った。

KSG-504 は 3 mg/kg より用量依存的に卵黄誘発胆嚢排出能促進作用を抑制し、50 mg/kg ではほぼ完全に抑制した (Fig. 33)。ED<sub>50</sub>値は 9.6 mg/kg であった。

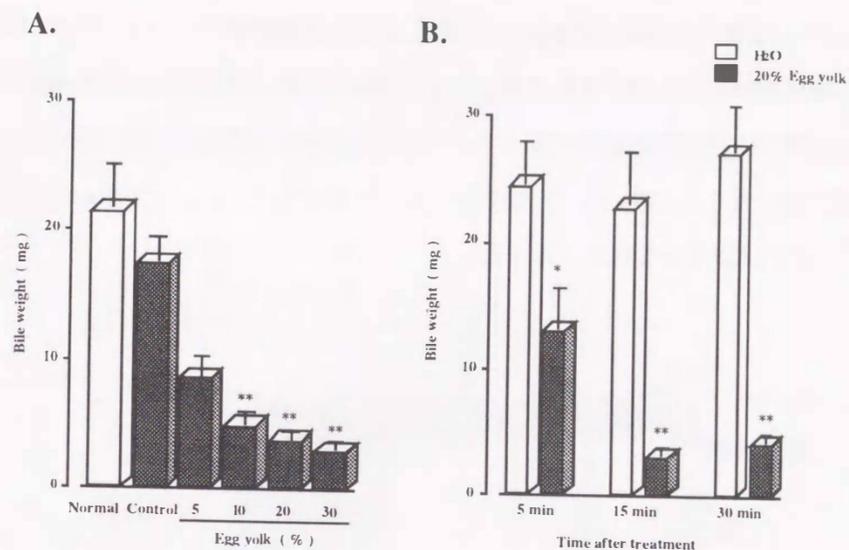


Fig. 32

Effects of egg yolk suspension on gallbladder emptying in conscious mice. A; Egg yolk suspension (5-30%) at a volume of 1 ml/body was administered orally 15 min before the gallbladder isolation. B; Distilled water or a 20% egg yolk suspension (1 ml/body) was administered orally 5-30 min before the gallbladder isolation. Each column indicates the mean  $\pm$  S.E. of 7-10 mice. \* and \*\*; significantly different from control (A) or H<sub>2</sub>O (B) at  $P<0.05$  and  $P<0.01$ , respectively.

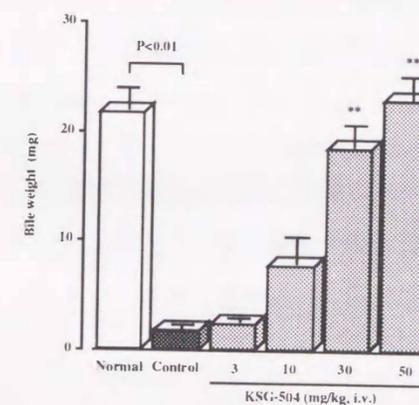


Fig. 33

Effects of KSG-504 on gallbladder emptying induced by oral administration of a 20% egg yolk suspension (1 ml/body) in conscious mice. KSG-504 was injected intravenously 1 min before the egg yolk administration. Each column indicates the mean  $\pm$  S.E. of 8-10 mice. \*\*; significantly different from control at  $P<0.01$ .

5) in vitro ウサギ胆管末梢部標本のCCK-8誘発収縮に及ぼす影響

ウサギの摘出胆管末梢部標本に最大刺激濃度である  $10^{-8}$  M の CCK-8 を適用すると静止張力の上昇および振幅の増大が見られ、30分以上持続した。(Fig. 34)。このCCK-8による持続収縮に対してKSG-504を累積的に添加すると  $10^{-6}$  M より収縮抑制作用が生じ、 $10^{-5}$  M ではほぼ完全な抑制がみられた。

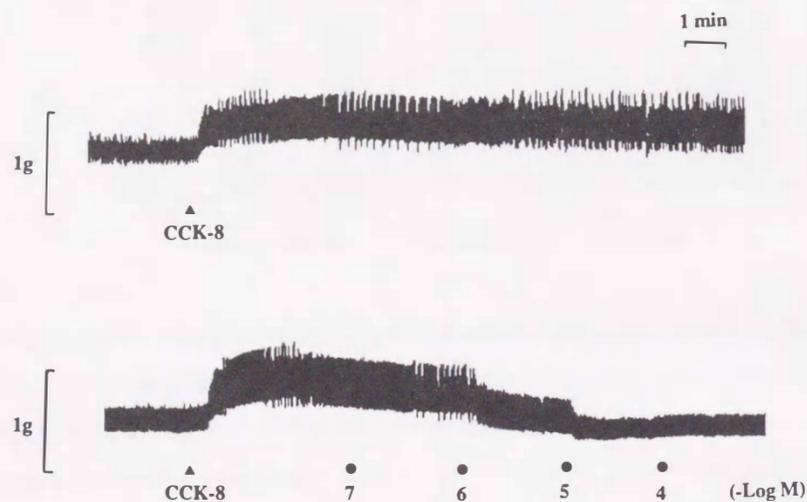


Fig. 34

Representative recordings of the contractile response to  $10^{-8}$  M CCK-8 in the terminal cavity of the bile duct from rabbit. The lower trace shows the effects of KSG-504 ( $10^{-7}$  -  $10^{-4}$  M) on the CCK-8 response.

2. 胃に及ぼす影響

1) 覚醒下ラットCCK-8誘発胃排出能遅延作用に及ぼす影響

CCK-8による胃排出能遅延作用の検討結果をFig. 35に示した。CCK-8 3-100  $\mu$ g/kgを皮下投与して5分後に蒸留水20 ml/kgを経口負荷し、その10分後の胃内容物を測定した。

対照群の胃内容物は  $1.758 \pm 0.126$  gであったが、CCK-8の投与により用量依存的に増加し、10  $\mu$ g/kg、100  $\mu$ g/kgではそれぞれ  $3.052 \pm 0.144$ 、 $3.947 \pm 0.105$  gであった。次にCCK-8 30  $\mu$ g/kg処置ラットおよび対照ラットに蒸留水を負荷して経時的に胃内容物を測定した。対照群における胃内容量は経時的に減少した。一方、CCK-8投与群も同

様に減少したものの対照群と比較して明らかに排出は遅延しており、5、10、20分後の胃内容量は対照群のそれぞれ179、257、240%であった。以上の結果からCCK-8 30  $\mu$ g/kgを投与して対照群との差が最大である蒸留水負荷10分後に薬効評価を行うこととした。

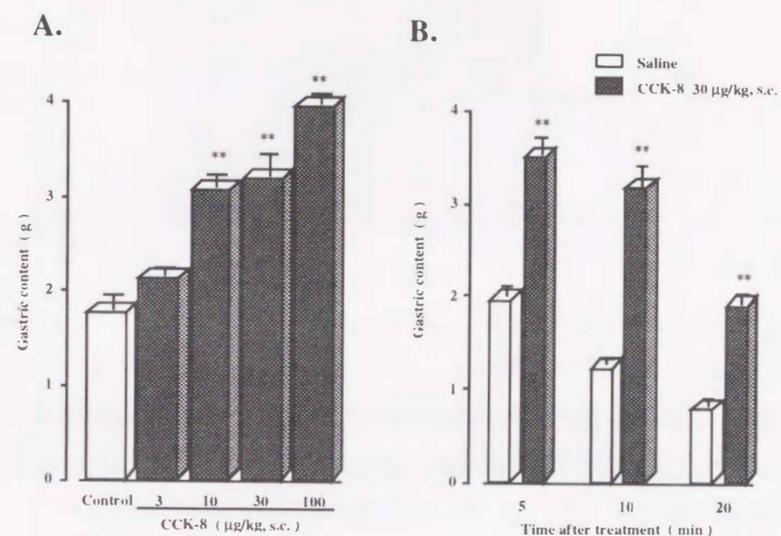


Fig. 35

Effects of CCK-8 on gastric emptying in conscious rats. A; CCK-8 (3-100  $\mu$ g/kg) was injected subcutaneously 5 min before the oral administration of distilled water, and the stomach was isolated 10 min later. B; Saline or CCK-8 at a dose of 30  $\mu$ g/kg was injected subcutaneously 5 min before the oral administration of the distilled water, and the stomach was isolated 5-20 min later. Each column indicates the mean  $\pm$  S.E. of 5-6 rats. \*\*, significantly different from control (A) or saline (B) at  $P < 0.01$ .

KSG-504は0.3 mg/kg静脈内投与より用量に依存してCCK-8による胃内容物遅延を抑制し、 $ED_{50}$ 値は3.78 mg/kgであった (Fig. 36)。しかしながら30 mg/kgにおいても完全な抑制は認められず最大抑制率は64.0%であった。

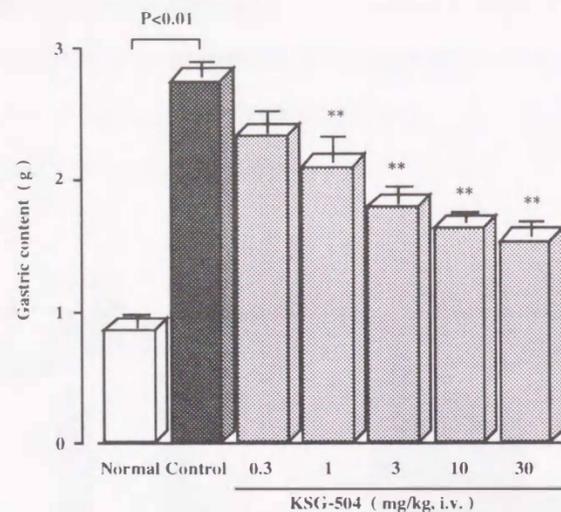


Fig. 36

Effects of KSG-504 on the delay of gastric emptying induced by subcutaneous injection of CCK-8 at a dose of 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in conscious rats. KSG-504 was administered intravenously 1 min before CCK-8 injection. Each column indicates the mean  $\pm$  S.E. of 8-9 rats. \*\*: significantly different from control at  $P<0.01$ .

## 2) 麻酔下ラットのペンタガストリン誘発胃酸分泌に及ぼす影響

pentagastrin 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の皮下投与による胃酸分泌は 0.5 - 1 時間後に最大となり 30.9  $\pm$  4.9  $\mu\text{Eq}/30\text{min}$  に達した ( $n=8$ )。この pentagastrin 刺激胃酸分泌に対し KSG-504 (3 - 30  $\text{mg}/\text{kg}$ ) の静脈内投与は何ら影響を及ぼさなかった (Fig. 37)。一方、cimetidine 30 $\text{mg}/\text{kg}$  の十二指腸内投与では、有意な酸分泌抑制が見られた。

## 3. 腸管に及ぼす影響

### 1) in vitro モルモット回腸標本の CCK-8 誘発収縮に及ぼす影響

モルモットの摘出回腸標本に  $10^{-8}$  M の CCK-8 を適用すると  $2.54 \pm 0.17$  g ( $n=6$ ) の収縮が得られた。KSG-504 は CCK-8 による収縮を濃度依存的に抑制しその  $\text{IC}_{50}$  値は  $3.0 \times 10^{-6}$  M であった (Fig. 38)。

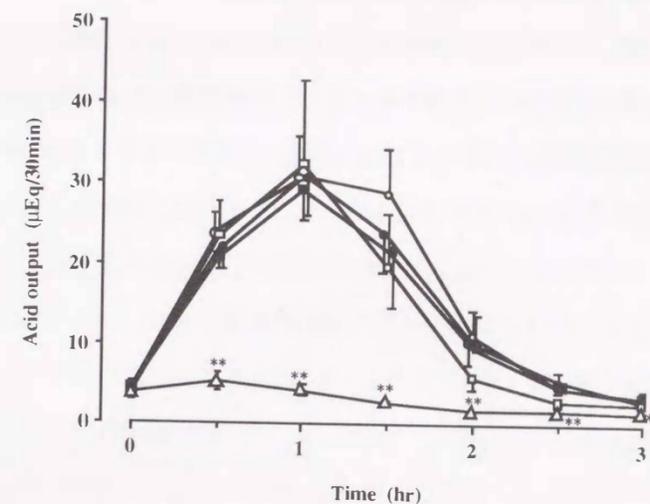


Fig. 37

Effects of KSG-504 and cimetidine on gastric acid output induced by subcutaneous injection of pentagastrin at a dose of 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in anesthetized rats. Saline (○), or 3 (●), 10 (□) or 30 (■)  $\text{mg}/\text{kg}$  of KSG-504 was administered intravenously 1 min before the pentagastrin injection. Cimetidine (Δ) at a dose of 30  $\text{mg}/\text{kg}$  was administered intraduodenally 30 min before the pentagastrin injection. Each point indicates the mean  $\pm$  S.E. of 6-8 rats. \*\*: significantly different from saline at  $P<0.01$ .

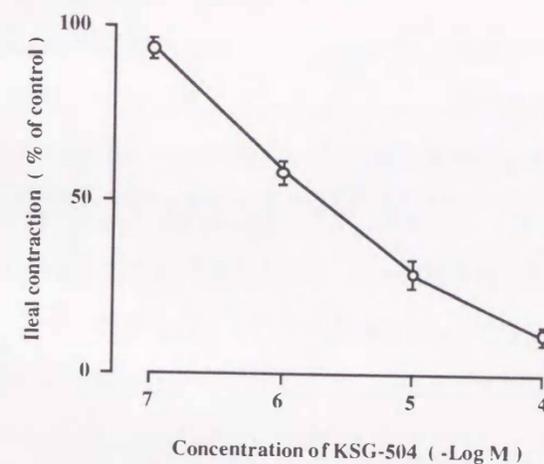


Fig. 38

Effects of KSG-504 on contractile response to  $10^{-8}$  M CCK-8 in the isolated ileum from guinea pigs. The preparation was treated with KSG-504 5 min before the application of CCK-8. Each point indicates the mean  $\pm$  S.E. of 6 experiments.

2) 麻醉下ウサギの十二指腸および空腸運動に及ぼす影響

麻醉下ウサギに CCK-8 を静脈内に投与すると 0.01  $\mu\text{g}/\text{kg}$  より一過性の十二指腸内圧および空腸内圧の上昇がみられ 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  で一定した収縮が得られた (Fig. 39)。KSG-504 は 1  $\text{mg}/\text{kg}$  より用量依存的に CCK-8 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  による十二指腸および空腸の収縮を抑制し、10  $\text{mg}/\text{kg}$  の投与で 100% の抑制を示した。

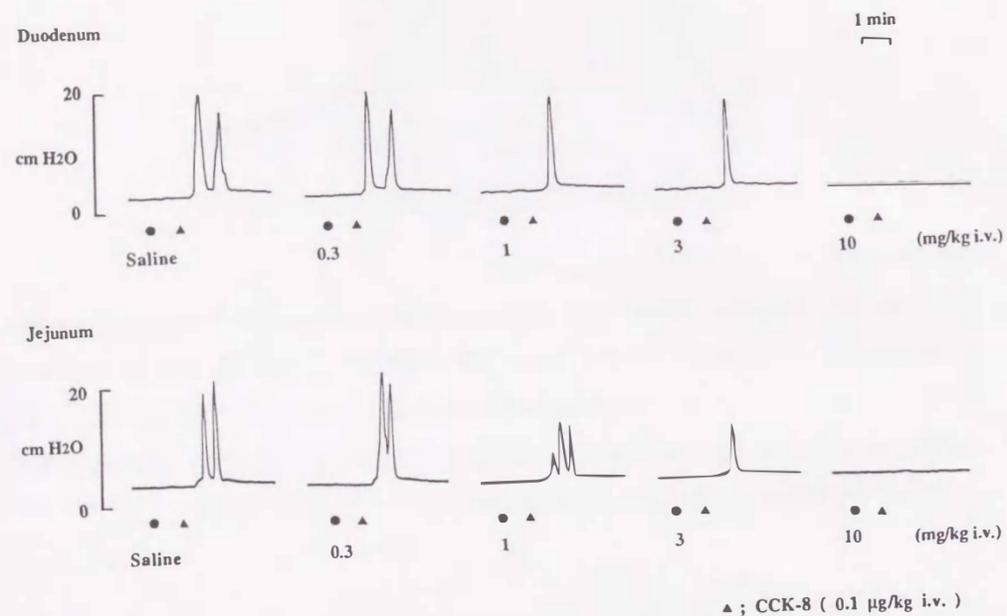


Fig. 39 Representative recordings of the effects of KSG-504 on duodenum and jejunum contraction induced by intravenous injection of CCK-8 at a dose of 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in anesthetized rabbits. The dose of KSG-504 (0.3-10  $\text{mg}/\text{kg}$ , i.v.) is shown in the figure.

考察

摘出モルモット胆嚢の CCK-8 誘発収縮に対し atropine および hexamethonium は何ら影響を及ぼさず、CCK による収縮が胆嚢平滑筋に存在する CCK 受容体を介し生じることが確認された。CCK による収縮は CCK がその受容体に結合したのち、細胞内への Ca 流入が活性化され誘発される。それ故、細胞内への Ca 流入を抑制する papaverine およ

び verapamil により CCK 誘発収縮が抑制された。この CCK 誘発収縮に対する種々の CCK-A 受容体拮抗薬の効力は L-364,718 > lorglumide > KSG-504 > loxiglumide の順であり、序論で示したラット膵ホモジネートへの  $^{125}\text{I}$ -CCK-8 結合を置換する効力順と同じであった。つまりこれら CCK-A 受容体拮抗薬による胆嚢収縮抑制作用は CCK-A 受容体に対する結合親和性に依存することが確認された。一方、benzotript および proglumide の作用は  $10^{-5}$  M まで添加しても観察されず、これら化合物の CCK-A 受容体拮抗作用は今回検討した他 CCK-A 受容体拮抗薬に比べ弱いことが明らかとなった。また KSG-504 の CCK-8 誘発収縮に対する  $\text{IC}_{50}$  値 ( $1.9 \times 10^{-6}$  M) は、第 1 部で示した摘出ラット膵腺房細胞からの CCK-8 誘発アミラーゼ放出に対する KSG-504 の拮抗作用の  $\text{IC}_{50}$  値 ( $1.9 \times 10^{-6}$  M) と等しく、KSG-504 は膵および胆嚢の CCK の作用に等しい抑制作用を有する事が明らかとなった。

KSG-504 は in vivo においても CCK-8 誘発モルモットおよびイヌ胆嚢収縮を著明に抑制した。イヌ胆嚢に対する効力 ( $\text{ED}_{50}$ ; 0.84  $\text{mg}/\text{kg}$ ) は、第 2 部で報告したイヌ膵外分泌に対する効力 ( $\text{ED}_{50}$ ; 0.98  $\text{mg}/\text{kg}$ ) とほぼ等しく、in vivo においても KSG-504 が膵および胆嚢に対し同等の作用を示すことが明らかとなった。また、KSG-504 の胆嚢に対する効力は loxiglumide の 1.3 - 1.4 倍であった。

さらに覚醒動物の胆嚢機能に対する KSG-504 の作用をみるため、マウスを用いて胆嚢排出能の評価系について検討を行った。CCK-8 により胆嚢内胆汁量は用量依存的に減少し、1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  皮下投与の 15 分後では残存する胆汁量は対照群の 10% 程度であった。30 分後において胆嚢内胆汁量はやや増加したが、原因としては CCK-8 の作用が減衰し、胆汁の再貯留が起こったことが考えられる。次に卵黄を経口投与して胆嚢排出能促進作用を検討した。蒸留水の投与によっても胆嚢内胆汁量の軽度減少が認められた。胃酸が内因性 CCK を介して膵外分泌を刺激することが知られており、胃酸を含む蒸留水の十二指腸内流入によるものかもしれない。卵黄の経口投与により胆嚢内胆汁量は濃度に依存して減少し、20% 卵黄投与 15 分後では CCK-8 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  投与時と同程度であった。卵黄が食餌性刺激として内因性 CCK を遊離し、胆嚢収縮を惹起したものと思われる。

KSG-504 は両試験系において、用量に依存した胆嚢排出能抑制作用を示した。しか

しながら、本試験で得られた KSG-504 の  $IC_{50}$  値は 10 mg/kg 前後であり、モルモット、イヌにおける CCK-8 誘発胆嚢収縮抑制作用に比べて明らかに弱かった。マウスでは他種の *in vivo* 胆嚢収縮試験に比べて 10 倍以上の CCK-8 を投与していることが原因と考えられるが、詳細はさらに検討の必要があろう。本試験において CCK-8 および卵黄によるマウス胆嚢排出能促進作用を KSG-504 がほぼ等しい用量で抑制したことより、KSG-504 は生理的刺激によって内因性に遊離された CCK の胆嚢収縮作用も抑制し得ることが示された。

摘出ウサギ胆管末梢部の自発性律動収縮は CCK-8 の添加により亢進した。ウサギ胆管末梢部は組織学的に胆管をとりまく輪状筋構造を有し、いわゆる Oddi 筋を形成している<sup>84)</sup>。Oddi 筋は胆汁排泄において重要な役割を担うものであり、Oddi 筋の弛緩<sup>85)</sup>もしくは収縮<sup>86)</sup>により胆汁が十二指腸に排泄される。CCK の作用に関しては、CCK アナログである caerulein により摘出モルモット胆管末梢部の収縮が著明に促進されること<sup>87)</sup> および *in vivo* イヌ胆汁排泄量が静脈内投与された CCK により抑制されること<sup>88)</sup> より Oddi 筋運動を促進するという説と、イヌ Oddi 筋圧が静脈内に持続投与された CCK により低下したこと<sup>89)</sup> より Oddi 筋運動を抑制するという説が存在し、現在に至っている。今回の摘出ウサギ胆管末梢部を用いた結果は前者の説を支持するものであった。この摘出ウサギ胆管末梢部における CCK-8 の作用に対し KSG-504 が濃度依存的な抑制作用を示したことより、胆管末梢部においても胆嚢と同様、CCK の作用に拮抗することが明らかにされた。

胃の自動運動は CCK により抑制されることが知られており<sup>13)</sup>、この作用は CCK-A 受容体を介すると考えられている。今回ラットにおいて、CCK-8 が用量依存的に胃内容物の腸管内への排出を遅らせることを確認した。KSG-504 の静脈内前投与により、胃内容量は用量依存的に減少し、CCK-8 による胃排出能遅延に対する拮抗作用が認められた。しかしながら 30 mg/kg においても正常群より胃内容量は多く、最大抑制率は 64.0% にとどまった。胃には CCK-A 受容体のみならず gastrin/CCK-B 受容体が存在しており、CCK-8 による胃排出能遅延作用には一部 gastrin/CCK-B 受容体が関与しているかもしれないが、詳細は不明である。この CCK-8 によるラット胃排出能の遅延を KSG-504 が用

量依存的に最大 64% まで抑制した事より、KSG-504 は胃における CCK-A 受容体を介した反応にも拮抗作用を有する事が明らかになった。

<sup>125</sup>I-CCK-8 結合実験において、KSG-504 の CCK-A 受容体への選択性が gastrin / CCK-B 受容体に比べ 1,000 倍以上高いことを第 1 部において報告した。pentagastrin により促進されたラット胃酸分泌に対し、cimetidine が完全抑制を示したのに反し KSG-504 がまったく影響を及ぼさなかったことより、KSG-504 は *in vivo* において gastrin / CCK-B 受容体を介する反応に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

KSG-504 は *in vitro* モルモット回腸 CCK-8 誘発収縮に対しても膵腺房細胞および摘出胆嚢標本における作用とほぼ等しい効果 ( $IC_{50}=3.0 \times 10^{-6}$  M) を示した。また *in vivo* 腸管においても KSG-504 の CCK 拮抗作用が確認された。

以上、KSG-504 は胆嚢、胃および腸管において外因性および内因性 CCK により惹起される反応に対し、CCK-A 受容体を介して著明な拮抗作用を示すが、gastrin/CCK-B 受容体を介する反応には影響を及ぼさないことが明らかとなった。これらの結果より KSG-504 は胆石疼痛や過敏性腸症候群などの胆嚢、胆管末梢部、胃および腸管領域において、CCK-A 受容体を介して CCK が関与していると考えられている疾患の治療薬となりうると考察される。

## 第4部 末梢に投与したCCKにより生じる中枢作用に対するKSG-504の作用の検討

### 序

CCKは中枢神経系においても主にgastrin/CCK-B受容体を介し神経伝達物質として様々な作用<sup>18, 19, 20, 21, 22, 23)</sup>を示す事が報告されている(Fig. 2)。他方、末梢に投与されたCCKにより鎮静<sup>90)</sup>、睡眠延長<sup>91)</sup>、鎮痛<sup>92)</sup>、摂食抑制<sup>16, 17)</sup>などの中枢作用が惹起されることも報告されているが、この末梢投与されたCCKによる作用が末梢および中枢のどの様なCCK受容体を介するのか解明されていない。そこで第4部では、CCK-8末梢投与により生じるこれら中枢作用に対するCCK-A受容体拮抗薬KSG-504末梢投与の作用を検討し、末梢に投与されたCCKにより惹起される中枢作用がどの受容体を介して生じるのかを考察した。

### 実験方法

#### 1. 実験動物

ICR系雄性マウス(24 - 36 g)、Wistar系雄性ラット(102 - 128 g)および日本白色種雄性ウサギ(1.6 - 3.2 kg)を用いた。

#### 2. 使用薬物

thiopental(田辺製薬、大阪)、chlorpromazine(吉富製薬、大阪)およびaminopyrine(Aldrich、USA)を実験に用いた。

#### 3. 実験方法

##### 1) ウサギ血漿および脳脊髄液内KSG-504濃度の測定

ウサギをurethane(1.2 g/kg)の皮下投与により麻酔し、大腿動脈にカニューレを挿入した。KSG-504 10 mg/kgを耳静脈より投与したのちに、経時的に大腿動脈カニューレよりheparin採血した。KSG-504投与30分後に頭蓋骨後頭果と第1頸椎の間に27ゲージの針(テルモ、東京)を刺し脳脊髄液を約1 ml採取した。またKSG-504 0.5 mg kg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>

を耳静脈より2時間持続注入して経時的にheparin採血するとともに、投与開始2時間後に脳脊髄液を採取した。血液は3,000 rpmで10分間遠心(KR-600P; クボタ)して血漿を得た。血漿および脳脊髄液0.5 mlに0.1 N塩酸1 mlを加えたのちdiethylether 5 mlで抽出した。3,000 rpmで5分間遠心分離したのち、ether層を蒸留水1 mlで洗浄し、窒素気流下溶媒を除去した。残留物を300 μlの高速液体クロマトグラフィー(HPLC)用移動層に溶解させ測定用試料とした。HPLCはLC-800(日本分光工業、八王子)を、カラムはInertsil ODS-2(GLサイエンス、東京)を用い、232 nmの吸光度を測定して定量を行った。移動層はacetonitrile/phosphate buffer(pH 3.0)(45:55 v/v)、流速は1 ml/min、カラム温度は55 °Cとした。

##### 2) マウスの自発運動量に及ぼす影響

自発運動量記録装置(Animex A0、島津製作所、京都)を用い、1群4匹のマウスをプラスチックケージ(30X20X12 cm)に入れ、入れた直後もしくは6時間馴れさせたのちに被験薬を投与し、自発運動量を経時的に測定した。KSG-504もしくはchlorpromazineを静脈内投与、CCK-8を皮下投与、およびCCK-8とKSG-504を併用して実験を行った。相互作用はKSG-504をCCK-8の1分前に投与して検討した。

##### 3) マウスにおけるthiopental誘発睡眠に及ぼす影響

マウスにthiopental 35 mg/kgを静脈内投与し、正向反射の消失を指標として睡眠の持続時間に対する作用を検討した。なお実験はthiopental投与1分前にKSG-504もしくはchlorpromazineを静脈内投与、thiopental投与5分前にCCK-8を皮下投与、およびKSG-504投与1分後にCCK-8を処置しその5分後にthiopentalを投与して行った。

##### 4) マウスにおける酢酸writhingに及ぼす影響

マウスに0.6% v/v酢酸を10 ml/kg腹腔内投与し、その5分後より15分間のwrithing回数を測定した。なお実験は酢酸投与1分前にKSG-504もしくはaminopyrineを静脈内投与、酢酸投与5分前にCCK-8を皮下投与、およびKSG-504投与1分後にCCK-8を処置しその5分後に酢酸を投与して行った。

#### 5) ラットの摂食量に及ぼす影響

ラットに 10:00~18:00 の間、標準飼料を自由に摂取させ、それ以外は絶食として 4 日間飼育した<sup>9,3)</sup>。5 日目にラットを個別ケージに移し、午前 10 時に約 12 g の標準飼料を与え 30 分間の摂食量を測定した。なお実験は KSG-504 を静脈内投与しその 1 分後より測定、CCK-8 を皮下投与しその 10 分後より測定、および CCK-8 皮下投与 1 分前に KSG-504 を投与して行った。

#### 4. 統計処理

測定値は平均値 ± 標準誤差で表した。多群間での有意差の検定は Dunnett の多重比較検定法を、2 群間の検定は Student の *t*-test をそれぞれ用いて行った。また危険率が 5% 以下の場合を有意であると判定した。

#### 実験結果

##### 1. ウサギ血漿および脳脊髄液内 KSG-504 濃度

麻酔下ウサギに KSG-504 10 mg/kg を静脈内投与した 5 分後の血漿中濃度は  $84.5 \pm 14.4 \mu\text{g/ml}$ 、また 30 分後は  $26.2 \pm 9.9 \mu\text{g/ml}$  であった (Fig. 40-A)。一方、KSG-504  $0.5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$  を静脈内に持続注入した 30 分後の血漿中濃度は  $59.2 \pm 7.4 \mu\text{g/ml}$  であり、120 分まで一定した血漿中濃度が保たれた (Fig. 40-B)。しかしながら KSG-504 10 mg/kg 投与 30 分後および  $0.5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$  持続注入開始 120 分後の脳脊髄液中の濃度はいずれも検出限界 ( $50 \text{ ng/ml}$ ) 以下であった。

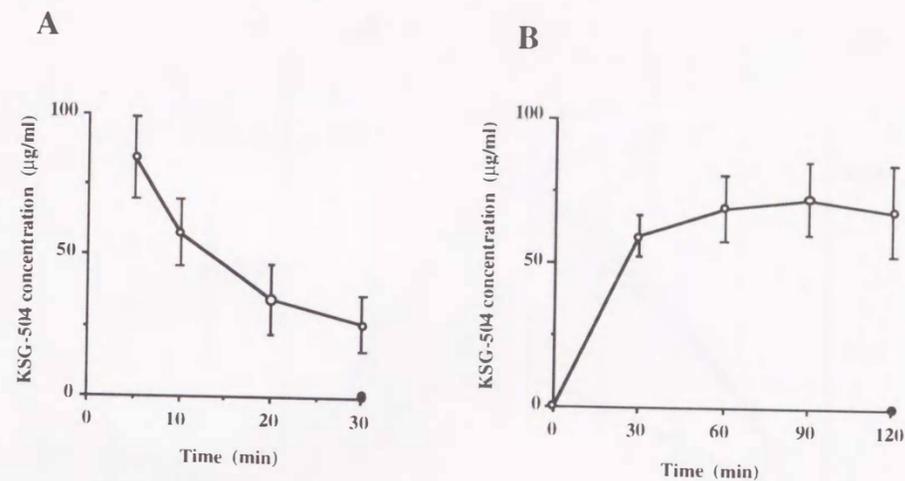


Fig. 40

Plasma (○) and cerebrospinal fluid (●) concentrations of KSG-504 in anesthetized rabbits. A: 10 mg/kg of KSG-504 was injected intravenously. B:  $0.5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$  of KSG-504 was infused intravenously for 120 min.

#### 2. マウスの自発運動量に及ぼす影響

##### 1) KSG-504 単独作用

マウスの自発運動量を Animex 法で測定すると、時間経過とともに累積カウント数が増加した。生理的食塩液を 10 ml/kg 静脈内投与した対照群の 60 分間のカウント数は、ケージに馴化させていない場合  $1897 \pm 223$  (Fig. 41-A) であったが、ケージに馴化させた場合は  $424 \pm 127$  (Fig. 41-B) と少なかった。馴化の有無にかかわらず、KSG-504 1、3、10 および 30 mg/kg の静脈内投与は自発運動に全く影響を及ぼさなかった。一方、chlorpromazine の 1 mg/kg の静脈内投与ではマウスをケージに馴化させていない場合は有意な運動量の減少が投与後 60 分間にわたり認められた。

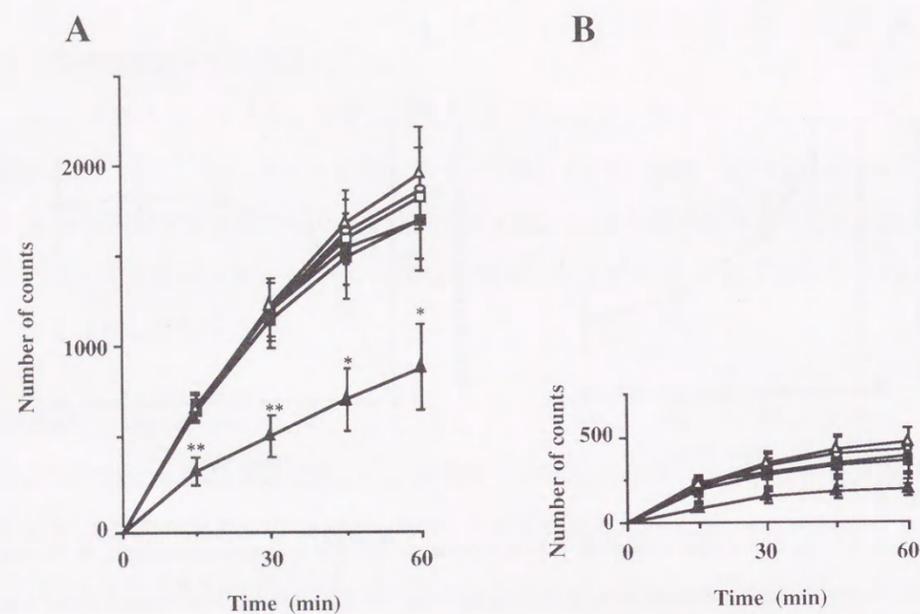


Fig. 41  
Effects of KSG-504 and chlorpromazine (CPZ) on the spontaneous motility of mice. Spontaneous motility was measured by the Animex method. A: The drug was administered intravenously to mice not acclimated to the test cage. B: The drug was administered intravenously to mice acclimated to the test cage for 6 hrs. ○, Saline; ●, 1 mg/kg; □, 3 mg/kg; ■, 10 mg/kg; △, 30 mg/kg of KSG-504; ▲, 1 mg/kg of CPZ. Each point indicates the mean ± S.E. of 6 experiments. \* and \*\*, significantly different from saline treated group at  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively.

## 2) CCK-8 単独作用

1% BSA を含む生理的食塩液を 10 ml/kg 皮下投与したケージに馴化させてないマウスを対照群とした。これに対し、CCK-8 1 および 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の皮下投与は何ら影響を及ぼさなかったが、100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の投与により有意な運動量の減少が投与後 30 分間にわたり認められた (Fig. 42)。

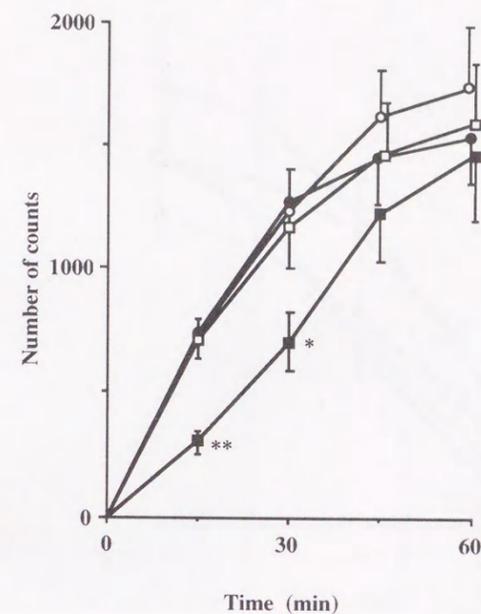


Fig. 42  
Effects of CCK-8 on the spontaneous motility of mice. The drug was administered subcutaneously to mice not acclimated to the test cage. ○, Saline; ●, 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; □, 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; ■, 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of CCK-8. Each point indicates the mean ± S.E. of 8 experiments. \* and \*\*, significantly different from saline treated group at  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively.

## 3) CCK-8 による自発運動量減少に対する KSG-504 の作用

CCK-8 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の皮下投与によりマウスの自発運動量は対照群と比べ投与後 15 分間で 41%、30 分間で 57% に減少した。100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の CCK-8 による投与後 30 分間にわたる有意な自発運動量減少は、KSG-504 3、10 および 30  $\text{mg}/\text{kg}$  を CCK-8 投与 1 分前に静脈内投与する事により用量依存的に拮抗された (Fig. 43)。

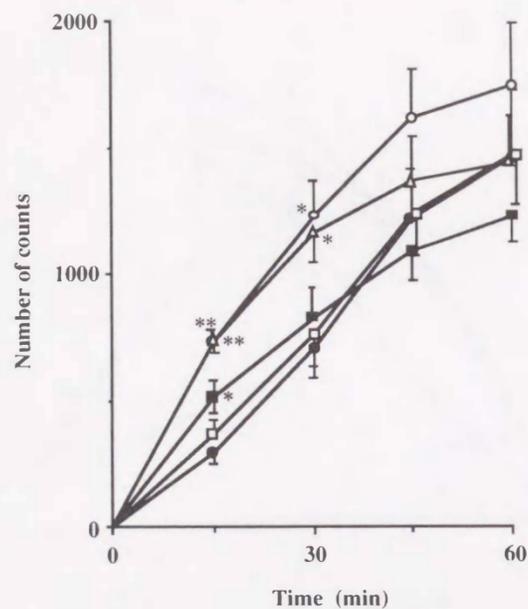


Fig. 43

Effects of KSG-504 on the decrease of the spontaneous motility of mice induced by 100 µg/kg of CCK-8. The drug was administered to mice not acclimated to the test cage. ○, Saline; ●, CCK-8 100 µg/kg; □, CCK-8 100 µg/kg + KSG-504 3 mg/kg; ■, CCK-8 100 µg/kg + KSG-504 10 mg/kg; △, CCK-8 100 µg/kg + KSG-504 30 mg/kg. CCK-8 was administered subcutaneously 1 min after the intravenous injection of KSG-504. Each point indicates the mean ± S.E. of 8 experiments. \* and \*\*, significantly different from CCK-8 100 µg/kg treated group at  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively.

### 3. マウスにおける thiopental 誘発睡眠に及ぼす影響

#### 1) KSG-504 単独作用

生理的食塩液を 10 ml/kg 静脈内投与した対照群の thiopental による正向反射消失時間は  $264 \pm 22$  秒であった。これに対して KSG-504 1、3、10 および 30 mg/kg の静脈内投与は全く影響を及ぼさなかった (Fig. 44-A)。一方 chlorpromazine 3 mg/kg の静脈内投与では、有意な正向反射消失時間の延長が認められた。

#### 2) CCK-8 単独作用

1% BSA を含む生理的食塩液を 10 ml/kg 皮下投与したマウスを対照群とした。CCK-8 1 および 10 µg/kg の皮下投与は影響を及ぼさなかったが、100 µg/kg の投与により有意な延長 ( $746 \pm 172$  秒) が認められた (Fig. 44-B)。

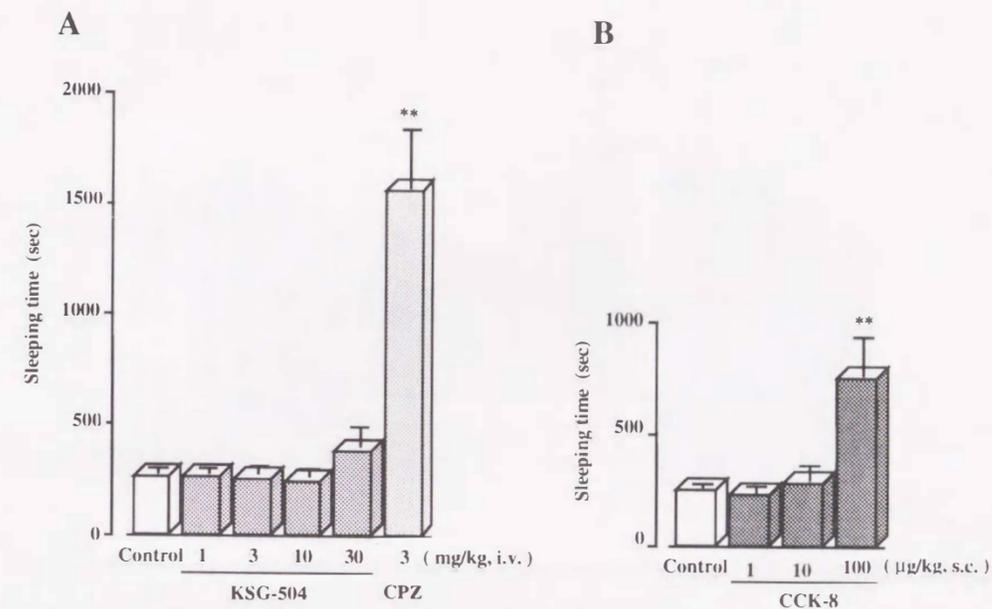


Fig. 44

Effects of KSG-504, chlorpromazine (CPZ) and CCK-8 on the thiopental-induced sleep in mice. A: The drug was administered intravenously 1 min before the thiopental (35 mg/kg, i.v.) injection. B: CCK-8 was administered subcutaneously 5 min before the thiopental injection. Sleeping time was defined as the time (sec) to restore the righting reflex in mice. Each column indicates the mean ± S.E. of 10-11 mice. \*\*: significantly different from control at  $P < 0.01$ .

#### 3) CCK-8 による thiopental 睡眠延長に対する KSG-504 の作用

CCK-8 100 µg/kg の皮下投与はマウスの thiopental 誘発睡眠時間を対照群のおよそ 3 倍に延長した。この 100 µg/kg の CCK-8 による睡眠延長に対し、KSG-504 0.3 - 30 mg/kg の 1 分前投与は用量に依存した延長抑制作用を示し、10 および 30 mg/kg の投与では有意な抑制がみられた (Fig. 45)。

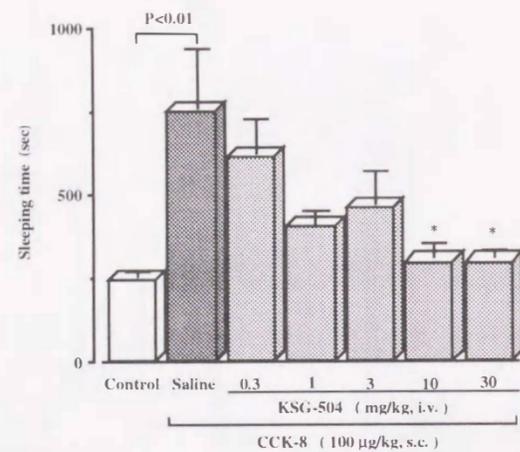


Fig. 45

Effects of KSG-504 on the CCK-8-induced prolongation of thiopental-induced sleep in mice. KSG-504 was administered intravenously 1 min before the CCK-8 injection (100 µg/kg, s.c.), and thiopental (35 mg/kg, i.v.) was administered 5 min later. Each column indicates the mean ± S.E. of 10 mice. \*: significantly different from the saline treated group at  $P < 0.05$ .

#### 4. マウスにおける酢酸 writhing に及ぼす影響

##### 1) KSG-504 単独作用

生理的食塩液を 10 ml/kg 静脈内投与した対照群では酢酸投与 5 分後からの 15 分間で  $42.7 \pm 2.5$  回の writhing が観察された。これに対して KSG-504 1、3、10 および 30 mg/kg の静脈内投与は全く影響を及ぼさなかった (Fig. 46-A)。一方 aminopyrine 10 mg/kg の静脈内投与では有意な writhing 数の減少が認められた。

##### 2) CCK-8 単独作用

1% BSA を含む生理的食塩液を 10 ml/kg 皮下投与したマウスを対照群とした。これに対して CCK-8 1、10 および 100 µg/kg の皮下投与は影響を及ぼさなかったが、300 µg/kg の投与により有意な減少 ( $38.1 \pm 3.2$  回) が認められた (Fig. 46-B)。

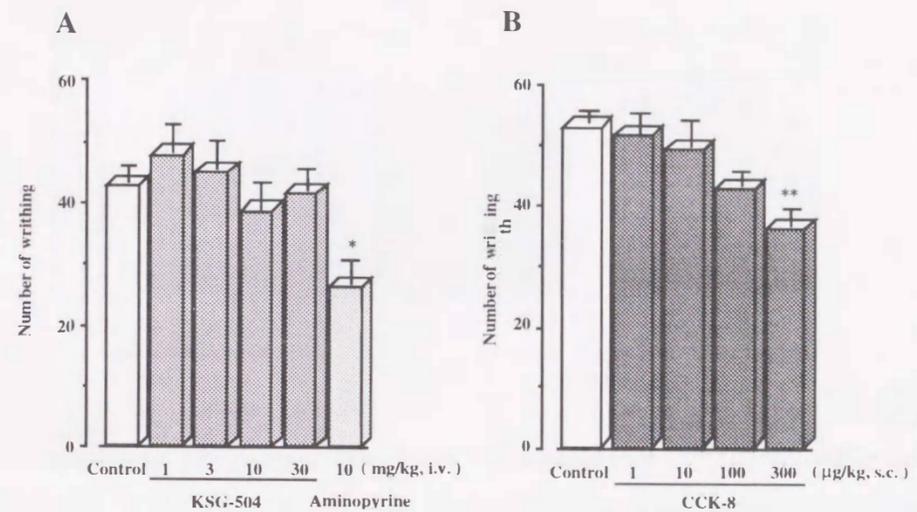


Fig. 46

Effects of KSG-504, aminopyrine and CCK-8 on the acetic acid-induced writhing in mice. A: The drug was administered intravenously 1 min before the injection of 0.6% acetic acid (10 ml/kg, i.p.). B: CCK-8 was administered subcutaneously 5 min before the injection of acetic acid. Each column indicates the mean ± S.E. of 14 mice. \* and \*\*; significantly different from control at  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively.

##### 3) CCK-8 による酢酸 writhing 抑制に対する KSG-504 の作用

CCK-8 300 µg/kg の皮下投与によりマウスの writhing 数は対照群のおよそ 75% に減少した。この 300 µg/kg の CCK-8 による writhing 数減少に対して KSG-504 1 mg/kg の 1 分前投与は影響を及ぼさなかったが、3、10 および 30 mg/kg の投与により writhing 数減少の抑制傾向がみられた (Fig. 47)。

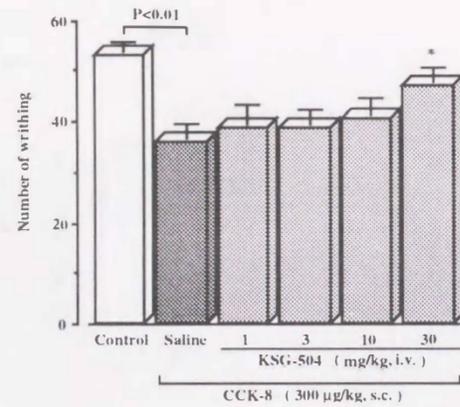


Fig. 47

Effects of KSG-504 on the CCK-8-induced decrease of acetic acid-induced writhing in mice. KSG-504 was administered intravenously 1 min before CCK-8 administration, and 0.6% acetic acid (10 ml/kg, i.p.) was injected 5 min later. Each column indicates the mean  $\pm$  S.E. of 14 mice. \*: significantly different from the saline treated group at  $P < 0.05$ .

## 5. ラットの摂食量に及ぼす影響

### 1) KSG-504 単独作用

生理的食塩液を 2 ml/kg 静脈内投与した対照群の投与後 30 分間の摂食量は  $2.20 \pm 0.12$  g/100 g であった。これに対して KSG-504 1、3、10 および 30 mg/kg の静脈内投与は全く影響を及ぼさなかった (Fig. 48-A)。

### 2) CCK-8 単独作用

1% BSA を含む生理的食塩液を 1 ml/kg 皮下投与したラットを対照群とした。これに対して CCK-8 1 および 10  $\mu$ g/kg の皮下投与は影響を及ぼさなかったが、100  $\mu$ g/kg の投与により有意な摂食量の減少 ( $1.74 \pm 0.12$  g/100 g) が認められた (Fig. 48-B)。

### 3) CCK-8 による摂食量減少に対する KSG-504 の作用

CCK-8 100  $\mu$ g/kg の皮下投与によりラットの摂食量は対照群のおよそ 70% に減少した。この 100  $\mu$ g/kg の CCK-8 による摂食量減少に対して KSG-504 3、10 および 30 mg/kg の 1 分前投与は用量に依りて摂食量の減少を抑制し、10 および 30 mg/kg の投与では有意な抑制がみられた。 (Fig. 49)。

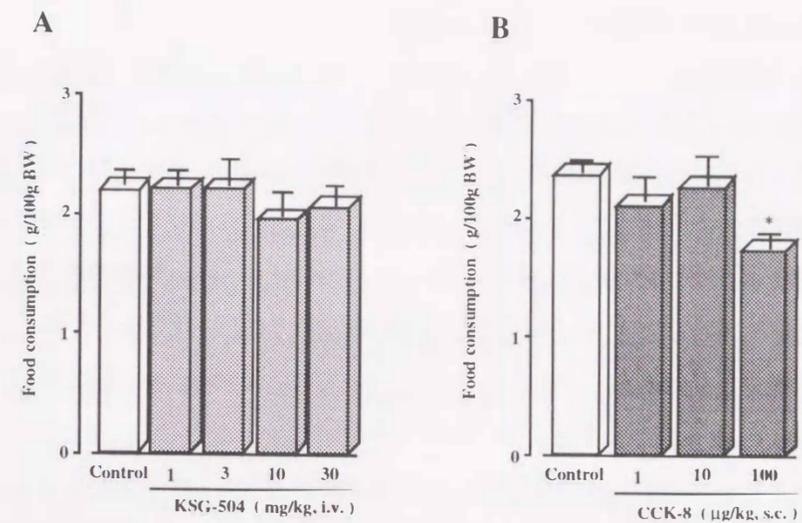


Fig. 48

Effects of KSG-504 and CCK-8 on satiety in rats. A: KSG-504 was administered intravenously. B: CCK-8 was administered subcutaneously. Each column indicates the mean  $\pm$  S.E. of 8 rats. \*: significantly different from control at  $P < 0.05$ .

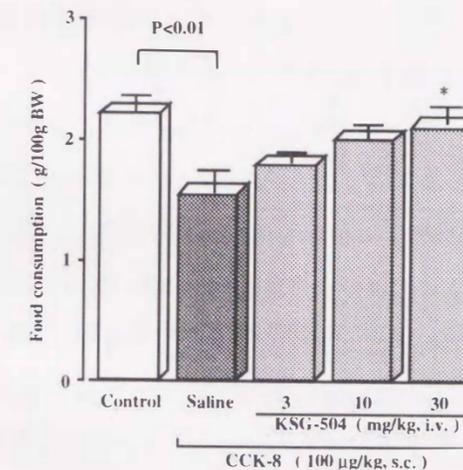


Fig. 49

Effects of KSG-504 on the decrease of food consumption induced by 100  $\mu$ g/kg of CCK-8 injection in rats. KSG-504 was administered intravenously 1 min before the CCK-8 injection. Each column indicates the mean  $\pm$  S.E. of 8 rats. \*: significantly different from the saline treated group at  $P < 0.05$ .

## 考察

末梢に投与した KSG-504 の作用点が中枢、末梢いずれなのかを解明するため、KSG-504 の中枢への移行性を検討した。中枢への移行性は KSG-504 を静脈内に投与した後の脳脊髄液への移行量より評価した。HPLC による定量に必要な量の脳脊髄液を、血液を混入させることなく簡便に採取するため、実験には urethane 麻酔下のウサギを用いた。第 2 部で報告したように麻酔下ウサギにおける CCK-8 誘発膵外分泌に対する KSG-504 静脈内投与時の ED<sub>50</sub> 値は 1.1 mg/kg であるが、その約 10 倍量の KSG-504 を静脈内投与した 30 分後の脳脊髄液中に KSG-504 は検出されなかった。また、ラット膵外分泌に対する ED<sub>50</sub> 値の 30 倍量の KSG-504 を持続注入した 120 分後の脳脊髄液中にも KSG-504 は検出されなかった。これらの事から KSG-504 は中枢移行性の乏しい化合物であり、末梢投与時には末梢 CCK-A 受容体のみ作用することが確認された。

マウス自発運動量を Animex 法で測定したところ、マウスをケージに馴化させていない時のカウントは 6 時間馴化させた時の約 4.5 倍であった。ケージに馴化させていない時のカウントには探索行動による自発運動量が含まれており、馴化させた場合は探索行動以外の自発運動量のみを反映している。いずれの条件下においても KSG-504 はマウスの自発運動量に全く影響を及ぼさなかった。他の CCK-A 受容体拮抗薬である A65186 の腹腔内単独投与も運動量に影響を及ぼさないことが報告されている<sup>90)</sup>。一方、CCK-8 の皮下投与では 100 µg/kg の投与により有意な運動量の抑制がみられた。しかしながら CCK-8 を腹腔内に投与した場合には、10 µg/kg より運動量抑制作用が発現しており<sup>90)</sup>、末梢 CCK による自発運動抑制には腹腔内求心性神経が関与していると考えられる。さらには末梢に投与した CCK-8 による自発運動抑制作用が KSG-504 の前投与により拮抗された事より、この作用は末梢 CCK-A 受容体を介した作用であると思われる。

Zetler はマウスの hexobarbital 誘発睡眠時間が CCK-8 の皮下投与により延長され、その ED<sub>50</sub> 値が 230 µg/kg であると報告している<sup>91)</sup>。今回我々が検討したマウスの thiopental 誘発睡眠も 100 µg/kg の CCK-8 により有意に延長された。また、マウス酢酸 writhing 数も高用量の CCK-8 (ED<sub>50</sub>; 790 µg/kg, s.c.) により抑制され、末梢投与された CCK の一部が中枢に移り鎮痛作用が生じると報告されている<sup>92)</sup>。今回の試験においても 300 µg/kg の皮下投与で有意な鎮痛作用が認められた。しかしながらこの CCK-8 に

よる thiopental 誘発睡眠延長作用および酢酸 writhing 抑制作用が KSG-504 の前投与により用量依存的に阻害されたことより、100 µg/kg もしくは 300 µg/kg といった高用量の CCK-8 の末梢投与によるこれらの作用は末梢 CCK-A 受容体を介して生ずると考えられる。CCK は末梢において直接消化管などの効果器に存在する受容体に作用するばかりでなく、一部副交感神経節後神経のコリン作動性神経に作用し acetylcholine の遊離を促進すると共に、GABA 作動神経にも作用し GABA 遊離を促進し、抑制性にも働くことが報告されている<sup>94)</sup>。CCK 末梢投与による鎮痛作用の一部にはおそらく GABA 作動神経の関与が考えられ、これら抑制性神経に対する CCK の作用点における CCK-A 受容体の存在が示唆された (Fig. 50)。

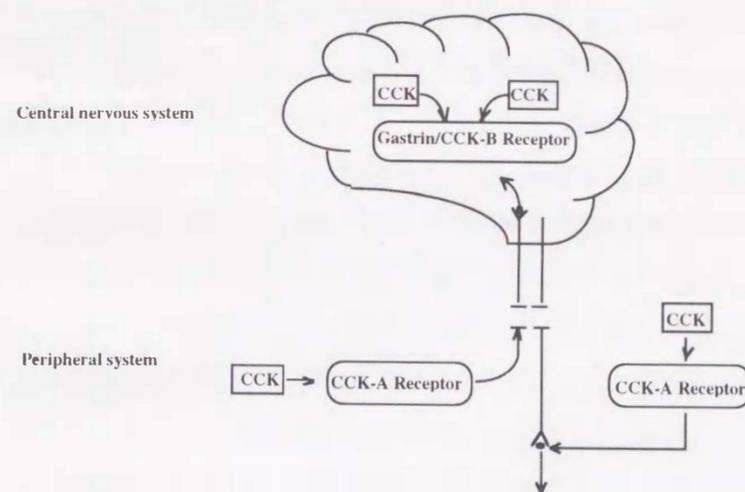


Fig. 50

Roles of CCK-A and gastrin / CCK-B receptors in central nervous and peripheral systems.

ラットの摂食量は 100 µg/kg の CCK-8 の皮下投与により有意に抑制された。一方、腹腔内への投与では 8 µg/kg で摂食抑制が認められている<sup>16)</sup>。また CCK の中枢投与では摂食抑制がほとんど見られなかったこと<sup>95)</sup>より、CCK の摂食に対する影響は主に末梢からの求心性刺激によるとも報告されている。実際フェレットの求心性神経活動が CCK により惹起されることが Blackshaw と Grundy により報告<sup>96)</sup>されている。今回検討した CCK による摂食抑制作用が KSG-504 の前投与により用量依存的に抑制された事より、CCK 末梢投与による摂食抑制は求心性神経活動を経由しており、末梢に存在する

CCK-A 受容体を介すると思われる (Fig. 50)。

今回検討したマウス自発運動、マウス睡眠、マウス鎮痛およびラット摂食に対する CCK-8 の作用は皮下投与した場合 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  以上で発現した。一方、第 3 部で報告したように CCK-8 は覚醒下マウスの胆嚢排出能に対し 0.01  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の皮下投与より用量依存的な抑制を示し、その  $\text{ED}_{50}$  値は 0.02  $\mu\text{g}/\text{kg}$  であった。よって CCK のこれら行動に対する作用は消化管ホルモンとしての作用を発現する用量の 10,000 倍を要することが判明した。また、これら行動に対し KSG-504 の単独投与が何ら影響を及ぼさなかったことより、末梢における内因性 CCK がこれら中枢作用を単独で誘発する可能性は少ないと考えられる。

以上、末梢に投与した KSG-504 の中枢移行性が極めて低いこと、および末梢に投与した CCK-8 の各種行動に対し同じく末梢に投与した KSG-504 が用量依存的な阻害を示したことより、末梢に投与された CCK により生じる中枢作用は腹腔内の抑制性神経および求心性神経に存在する CCK-A 受容体を介して生じるものと考えられる。

## 結論

CCK 受容体拮抗薬、KSG-504 の消化管機能および中枢機能に及ぼす作用を研究し、以下の成績を得た。

第 1 部では、KSG-504 の膵および胆嚢膜標本の CCK-A 受容体、大脳皮質の gastrin / CCK-B 受容体に対する結合特性を検討するとともに CCK をはじめとする各種受容体作用物質ならびに受容体以降の機構に対する作用を検討した。KSG-504 は各種膜標本への  $^{125}\text{I}$ -CCK-8 の結合をそれぞれラット膵膜標本 ( $K_i=173 \text{ nM}$ )、イヌ胆嚢膜標本 ( $K_i=283 \text{ nM}$ )、モルモット大脳皮質膜標本 ( $K_i=413 \mu\text{M}$ ) の効力で抑制した。これらの知見より KSG-504 は gastrin / CCK-B 受容体よりも、CCK-A 受容体に対し高い選択性を有することが判明した。さらに KSG-504 は CCK-8 刺激 *in vitro* ラット膵腺房細胞標本よりの amylase 放出を濃度依存的に抑制したのに対し、GRP、secretin、VIP、carbachol および A23187 刺激 amylase 放出には影響を及ぼさなかった。また KSG-504 は *in vitro* モルモット回腸標本における acetylcholine 誘発収縮及び histamine 誘発収縮、*in vitro* ラット胃標本における serotonin 誘発収縮に影響を及ぼさなかった。以上の結果より KSG-504 は CCK 以外の受容体を介する機構及び受容体以降の機構に対しては作用を有さない CCK-A 受容体に特異的かつ競合的な拮抗薬であることが明らかとなった。

第 2 部では、*in vivo* 膵機能に対する KSG-504 の作用を検討した。KSG-504 は麻酔下ラットにおける外因性 CCK 誘発膵外分泌を静脈内投与および十二指腸内投与により用量依存的に抑制したが、secretin 誘発膵外分泌には影響を及ぼさなかった。KSG-504 は麻酔下ラットにおいて、casein の十二指腸内投与により放出された内因性 CCK による膵外分泌も有意に抑制した。KSG-504 は麻酔下イヌおよびウサギにおける CCK-8 誘発膵外分泌を用量依存的に抑制した。また、覚醒下ラットにおける外因性 CCK 誘発膵内分泌を抑制したが、glucose 誘発膵内分泌には影響を及ぼさなかった。さらに KSG-504 は caerulein 誘発急性膵炎モデルに対し予防効果および治療効果を示した。以上より KSG-504 は投与経路ならびに動物種にかかわらず、外因性 CCK および内因性 CCK により誘発される膵外分泌を抑制し、急性膵炎モデルにおいて予防および治療効果を有することが明らかとなった。

第3部では、in vitro もしくは in vivo 胆嚢、胃および腸管機能に対する KSG-504 の作用を検討した。KSG-504 は in vitro および麻酔下モルモット、麻酔下イヌならびに覚醒下マウス胆嚢の外因性もしくは内因性CCK誘発収縮を用量依存的に抑制した。KSG-504 は摘出ウサギ胆管末梢部のCCK-8刺激収縮を抑制した。KSG-504 は覚醒下ラットCCK誘発胃運動抑制作用を阻害したが、麻酔下ラットの pentagastrin 誘発胃酸分泌には影響を及ぼさなかった。KSG-504 は in vitro モルモット回腸および麻酔下ウサギ十二指腸ならびに空腸のCCK誘発収縮を抑制した。以上、KSG-504 は胆嚢、胆管末梢部、胃および腸管において外因性および内因性CCKにより惹起される反応に対し、CCK-A受容体を介して著明な拮抗作用を示すが、gastrin /CCK-B受容体を介する反応には影響を及ぼさないことが明らかとなった。

第4部では、CCK-8の末梢投与により誘発される各種中枢作用に対するKSG-504の作用を検討した。麻酔下ウサギの末梢に投与したKSG-504の脳脊髄液中濃度は検出限界以下であり、KSG-504の中樞移行性が極めて低いことが明らかとなった。KSG-504 (1-30 mg/kg, i.v.)の単独投与はマウス自発運動量、マウス睡眠、マウス鎮痛およびラット摂食量に影響を及ぼさなかった。CCK-8 (100 もしくは 300 µg/kg, s.c.)はマウス自発運動量抑制、マウス睡眠延長、マウス鎮痛およびラット摂食抑制作用を示した。KSG-504 は CCK-8 末梢投与によるこれら行動変化に対し用量依存的な抑制を示した。以上の結果から、末梢に投与されたCCKにより生じる中枢作用は末梢の抑制性神経および求心性神経に存在するCCK-A受容体を介して生じることが示唆された。

以上、第1部から第4部までの研究から次の結論を得た。KSG-504はCCK-A受容体に対し選択的かつ競合的な化合物であり、急性膵炎をはじめとする膵臓ならびに胆嚢、胃、腸管領域においてCCKを介し発症もしくは進展すると考えられている疾患に対する有用な治療薬になりうるとともに、CCKの生理的な機能を解明するに有益な化合物であることを見出すことが出来た。

## 謝辞

稿を終わるにあたり、本論文の発表の機会を賜り、かつ御指導と御校閲を頂きました富山医科薬科大学薬学部薬物生理学教室 竹口紀晃教授に深甚なる謝意を表します。また、御校閲を頂きました富山医科薬科大学和漢薬研究所生物試験部門 渡邊裕司教授ならびに富山医科薬科大学和漢薬研究所臨床利用部門 倉石 泰教授に深謝致します。

本研究に際し、多大の御支援と発表の機会を頂きましたキッセイ薬品工業株式会社 神澤邦雄会長、神澤陸雄社長ならびに常務取締役研究開発本部長 岩垂正矩博士に深く感謝致します。さらに、種々の御援助を頂きましたキッセイ薬品工業株式会社取締役創薬研究部 味澤幸義部長、取締役開発企画部長 倉科喜一博士、開発研究部長 飯塚欣二博士、創薬第二研究所長 赤羽増夫博士ならびに創薬第一研究所長 北澤牧雄博士に深く感謝致します。

実験に御協力頂きましたキッセイ薬品工業株式会社創薬第二研究所 小林 護副主任研究員、品川和彦氏、武田裕夫氏、臨床開発部 椿 敦係長、杉浦 勝氏ならびに関係各位に感謝の意を表します。

実験材料を合成して頂きましたキッセイ薬品工業株式会社創薬研究部 合成スタッフの諸氏に感謝の意を表します。

最後に本研究を陰で支えて頂いた家族に感謝致します。

1996年9月4日

引用文献

1. Ivy, A.C., and Oldberg, E. (1928) A hormone mechanism for gallbladder contraction and evacuation. *Am. J. Physiol.* **86**, 599-613.
2. Harper, A.A., and Raper, H.S. (1943) Pancreozymin, a stimulant of the secretion of pancreatic enzymes in extracts of the small intestine. *J. Physiol. (Lond.)* **102**, 115-125.
3. Jorpes, J.E., and Mutt, V. (1966) Cholecystokinin and pancreozymin, one single hormone? *Acta Physiol. Scand.* **66**, 196-202.
4. Vanderhaeghen, J.J., Signeau, J.C., and Gepts, W. (1975) New peptide in the vertebrate CNS reacting with antigastrin antibodies. *Nature* **257**, 604-605.
5. Buchan, A.M.J., Polak, J.M., Solcia, E., Capella, C., Hudson, D., and Pearse, A.G.E. (1978) Electron immunohistochemical evidence for the human intestinal I cell as the source of CCK. *Gut* **19**, 403-407.
6. Green, G.M., and Lyman, R.L. (1972) Feedback regulation of pancreatic secretion as a mechanism for trypsin inhibitor-induced hypersecretion in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **140**, 6-12.
7. Kim, C.K., Lee, K.Y., Wang, T., Sun, G., Chang, T.-M., and Chey, W.Y. (1989) Role of endogenous cholecystokinin on vagally stimulated pancreatic secretion in dogs. *Am. J. Physiol.* **257**, G944-G949.
8. Padfield, P.J., Garner, A., and Case, R.M. (1989) Patterns of pancreatic secretion in the anesthetized guinea pig following stimulation with secretin, cholecystokinin octapeptide, or bombesin. *Pancreas* **4**, 204-209.
9. Dupré, J., and Beck, J.C. (1966) Stimulation of release of insulin by an extract of intestinal mucosa. *Diabetes* **15**, 555-559.
10. Karlsson, S., and Ahrén, B. (1992) Cholecystokinin and the regulation of insulin secretion. *Scand. J. Gastroenterol.* **27**, 161-165.
11. Hopman, W.P.M., Kerstens, P.J.S.M., Jansen, J.B.M.J., Rosenbusch, G., and Lamers, C.B.H.W. (1985) Effect of graded physiologic doses of cholecystokinin on gallbladder contraction measured by ultrasonography. *Gastroenterology* **89**, 1242-1247.
12. Konturek, J.W., Konturek, S.J., Kurek, A., Bogdal, J., Oleksy, J., and Rovati, L. (1989) CCK receptor antagonism by loxiglumide and gallbladder contractions in response to cholecystokinin, sham feeding and ordinary feeding in man. *Gut* **30**, 1136-1142.
13. Kuwahara, A., Ozawa, K., and Yanaihara, N. (1986) Effects of cholecystokinin-octapeptide on gastric motility of anesthetized dogs. *Am. J. Physiol.* **251**, G678-G681.
14. Mukhopadhyay, A.K., Thor, P.J., Copeland, E.M., Johnson, L.R., and Weisbrodt, N.W. (1977) Effect of cholecystokinin on myoelectric activity of small bowel of the dog. *Am. J. Physiol.* **232**, E44-E47.
15. Kellow, J.E., Miller, L.J., Phillips, S.F., Haddad, A.C., Zinsmeister, A.R., and Charboneau, J.W. (1987) Sensitivities of human jejunum, ileum, proximal colon, and gallbladder to cholecystokinin octapeptide. *Am. J. Physiol.* **252**, G345-G356.
16. Dourish, C.T., Ruckert, A.C., Tattersall, F.D., and Iversen, S.D. (1989) Evidence that decreased feeding induced by systemic injection of cholecystokinin is mediated by CCK-A receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **173**, 233-234.
17. Reidelberger, R.D., Varga, G., and Solomon, T.E. (1991) Effects of selective cholecystokinin antagonists L364,718 and L365,260 on food intake in rats. *Peptides* **12**, 1215-1221.
18. Ravard, S., and Dourish, C.T. (1990) Cholecystokinin and anxiety. *Trends Pharmacol. Sci.* **11**, 271-273.
19. Singh, L., Lewis, A.S., Field, M.J., Hughes, J., and Woodruff, G.N. (1991) Evidence for an involvement of the brain cholecystokinin B receptor in anxiety. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 1130-1133.
20. Asin, K.E., Bednarz, L., Nikkel, A.L., Gore, P.A.Jr, Montana, W.E., Cullen, M.J., Shiosaki, K., Craig, R., and Nadzan, A.M. (1992) Behavioral effects of A71623, a highly selective CCK-A agonist tetrapeptide. *Am. J. Physiol.* **263**, R125-R135.
21. Wang, X.J., Fan, S.G., Ren, M.F., and Han, J.S. (1989) Cholecystokinin-8 suppressed <sup>3</sup>H-etorphine binding to rat brain opiate receptors. *Life Sci.* **45**, 117-123.
22. Higgins, G.A., Nguyen, P., and Sellers, E.M. (1992) Morphine place conditioning is differentially affected by CCK<sub>A</sub> and CCK<sub>B</sub> receptor antagonists. *Brain Res.* **572**, 208-215.
23. Itoh, S., Takashima, A., Igano, K., and Inoue, K. (1989) Memory effect of caerulein and its analogs in active and passive avoidance responses in the rat. *Peptides* **10**, 843-848.
24. Mutt, V., and Jorpes, J.E. (1968) Structure of porcine cholecystokinin-pancreozymin. *Eur. J. Biochem.* **6**, 156-162.
25. Springer, C.J., and Calam, J. (1988) Cholecystokinin cleavage to cholecystokinin-octapeptide in vivo and in vitro: accelerated cleavage in acute pancreatitis. *Gastroenterology* **95**, 143-150.
26. Tokunaga, Y., Cox, K.L., Coleman, R., Concepcion, W., Nakazato, P., and Esquivel, C.O. (1993) Characterization of cholecystokinin receptors on the human gallbladder. *Surgery* **113**, 155-162.
27. Moran, T.H., Robinson, P.H., Goldrich, M.S., and McHugh, P.R. (1986) Two brain cholecystokinin receptors: implications for behavioral actions. *Brain Res.* **362**, 175-179.
28. Jensen, R.T., Lemp, G.F., and Gardner, J.D. (1982) Interactions of COOH-terminal fragments of cholecystokinin with receptors on dispersed acini from guinea pig pancreas. *J. Biol. Chem.* **257**, 5554-5559.
29. Innis, R.B., and Snyder, S.H. (1980) Distinct cholecystokinin receptors in brain and pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 6917-6921.
30. Saito, A., Goldfine, I.D., and Williams, J.A. (1981) Characterization of receptors for cholecystokinin and related peptides in mouse cerebral cortex. *J. Neurochem.* **37**, 483-

490.

31. Soll, A.H., Amirian, D.A., Thomas, L.P., Reedy, T.J., and Elashoff, J.D. (1984) Gastrin receptors on isolated canine parietal cells. *J. Clin. Invest.* **73**, 1434-1447
32. Wank, S.A., Pisegna, J.R., and Weerth, A. (1992) Brain and gastrointestinal cholecystokinin receptor family: structure and functional expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 8691-8695.
33. Lampel, M., and Kern, H.F. (1977) Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue. *Virchows Arch. A. (Pathol. Anat.)* **373**, 97-117.
34. Tani, S., Otsuki, M., Itoh, H., Fujii, M., Nakamura, T., Oka, T., and Baba, S. (1987) Histologic and biochemical alterations in experimental acute pancreatitis induced by supramaximal caerulein stimulation. *Int. J. Pancreatol.* **2**, 337-348.
35. Evander, A., Ihse, I., and Lundquist, I. (1981) Influence of hormonal stimulation by caerulein on acute experimental pancreatitis in the rat. *Eur. Surg. Res.* **13**, 257-268.
36. Niederau, C., Liddle, R.A., Ferrell, L.D., and Grendell, J.H. (1986) Beneficial effects of cholecystokinin-receptor blockade and inhibition of proteolytic enzyme activity in experimental acute hemorrhagic pancreatitis in mice. *J. Clin. Invest.* **78**, 1056-1063.
37. Peikin, S.R., Costenbader, C.L., and Gardner, J.D. (1979) Actions of derivatives of cyclic nucleotides on dispersed acini from guinea pig pancreas. *J. Biol. Chem.* **254**, 5321-5327.
38. Spanarkel, M., Martinez, J., Briet, C., Jensen, R.T., and Gardner, J.D. (1983) Cholecystokinin-27-32-amide. *J. Biol. Chem.* **258**, 6746-6749.
39. Hahne, W.F., Jensen, R.T., Lemp, G.F., and Gardner, J.D. (1981) Proglumide and benzotript: members of a different class of cholecystokinin receptor antagonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 6304-6308.
40. Makovec, F., Bani, M., Chisté, R., Revel, L., Rovati, L.C., and Rovati, L.A. (1986) Differentiation of central and peripheral cholecystokinin receptors by new glutamic acid derivatives with cholecystokinin-antagonistic activity. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **36**, 98-102.
41. Setnikar, I., Bani, M., Cereda, R., Chisté, R., Makovec, F., Pacini, M.A., Revel, L., Rovati, L.C., and Rovati, L.A. (1987) Pharmacological characterization of a new potent and specific nonpolypeptide cholecystokinin antagonist. *Arzneim. Forsch./Drug Res.* **37**, 703-707.
42. Gardner, J.D., and Jensen, R.T. (1984) Cholecystokinin receptor antagonists. *Am. J. Physiol.* **246**, G471-G476.
43. Chang, R.S.L., Lotti, V.J., Monaghan, R.L., Birnbaum, J., Stapley, E.O., Goetz, M.A., A-Schönberg, G., Patchett, A.A., Liesch, J.M., Hensens, O.D., and Springer, J.P. (1985) A potent nonpeptide cholecystokinin antagonist selective for peripheral tissues isolated from *Aspergillus alliaceus*. *Science* **230**, 177-179.
44. Chang, R.S.L., and Lotti, V.J. (1986) Biochemical and pharmacological characterization of an extremely potent and selective nonpeptide cholecystokinin antagonist. *Proc. Natl.*

*Acad. Sci. USA* **83**, 4923-4926.

45. Ito, H., Sogabe, H., Nakarai, T., Sato, Y., Tomoi, M., Kadowaki, M., Matsuo, M., Tokoro, K., and Yoshida, K. (1994) Pharmacological profile of FK480, a novel cholecystokinin type-A receptor antagonist: comparison to loxiglumide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **268**, 571-575.
46. Revel, L., Ferrari, F., Makovec, F., Rovati, L.C., and Impicciatore, M. (1992) Characterization of antigestrin activity in vivo of CR2194, a new R-4-benzamido-5-oxo-pentanoic acid derivative. *Eur. J. Pharmacol.* **216**, 217-224.
47. Lotti, V.J., and Chang, R.S.L. (1989) A new potent and selective non-peptide gastrin antagonist and brain cholecystokinin receptor (CCK-B) ligand: L-365,260. *Eur. J. Pharmacol.* **162**, 273-280.
48. Hildebrand, P., Beglinger, C., Cyr, K., Jansen, J.B.M.J., Rovati, L.C., Zuercher, M., Lamers, C.B.H.W., Setnikar, I., and Stalder, G.A. (1990) Effects of a cholecystokinin receptor antagonist on intestinal phase of pancreatic and biliary responses in man. *J. Clin. Invest.* **85**, 640-646.
49. Rovati, L.C. (1991) Perspectives of CCK antagonists in pancreatic research and clinical use. *Int. J. Pancreatol.* **8**, 215-226.
50. Malesci, A., De Fazio, C., Festorazzi, S., Bonato, C., Valentini, A., Tacconi, M., Bekkering, M., Giacobelli, G., D'Amato, M., and Rovati, L.C. (1992) Dose-response effects of oral loxiglumide on postprandial gall-bladder emptying in man. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **42**, 1359-1362.
51. Meier, R., Beglinger, C., Thumshirn, M., Meyer, B., Rovati, L.C., Giacobelli, G., D'Amato, M., and Gyr, K. (1993) Therapeutic effects of loxiglumide, a cholecystokinin antagonist, on chronic constipation in elderly patients: a prospective, randomized, double-blind, controlled trial. *J. Gastrointest. Mot.* **5**, 129-135.
52. Chang, R.S.L., Lotti, V.J., Chen, T.B., and Kunkel, K.A. (1986) Characterization of the binding of [<sup>3</sup>H]-L-364,718: A new potent, nonpeptide cholecystokinin antagonist radioligand selective for peripheral receptors. *Mol. Pharmacol.* **30**, 212-217.
53. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
54. Scatchard, G. (1949) The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **51**, 660-672.
55. Cheng, Y.-C., and Prusoff, W.H. (1973) Relationship between the inhibition constant ( $K_i$ ) and the concentration of inhibitor which cause 50 per cent inhibition ( $I_{50}$ ) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **22**, 3099-3108.
56. Otsuki, M., and Williams, J.A. (1982) Effect of diabetes mellitus on the regulation of enzyme secretion by isolated rat pancreatic acini. *J. Clin. Invest.* **70**, 148-156.
57. 藤井正俊, 大槻 真, 中村隆彦, 岡林克典, 谷 聡, 藤澤貴史, 小出 亮, 馬場茂明

- (1989) 新しい proglumide 誘導体 loxiglumide の膵腺房細胞 CCK 受容体拮抗作用. 日消誌. **86**, 77-82.
58. V.-Schrenck, T., Moran, T.H., H.-Erian, P., Gardner, J.D., and Jensen, R.T. (1988) Cholecystokinin receptors on gallbladder muscle and pancreatic acinar cells: a comparative study. *Am. J. Physiol.* **255**, G512-G521.
59. Steigerwalt, R.W., Goldfine, I.D., and Williams, J.A. (1984) Characterization of cholecystokinin receptors on bovine gallbladder membranes. *Am. J. Physiol.* **247**, G709-G714.
60. Schjoldager, B., Park, J., Johnsen, A.H., Yamada, T., and Rehfeld, J.F. (1991) Cionin, a protochordate hybrid of cholecystokinin and gastrin: biological activity in mammalian systems. *Am. J. Physiol.* **260**, G977-G982.
61. Rosenzweig, S.A., Miller, L.J., and Jamieson, J.D. (1983) Identification and localization of cholecystokinin-binding sites on rat pancreatic plasma membranes and acinar cells: a biochemical and autoradiographic study. *J. Cell Biol.* **96**, 1288-1297.
62. Aoki, T., Ueno, T., Toyonaga, A., Sakata, R., Kimura, Y., Gondo, K., Inuzuka, S., Torimura, T., Yoshida, H., Sasaki, E., and Tanikawa, K. (1991) Radiographic evidence of cholecystokinin octapeptide receptors in the hamster gallbladder. *Scand. J. Gastroenterol.* **26**, 1165-1172.
63. Yule, D.I., and Gallacher, D.V. (1988) Oscillations of cytosolic calcium in single pancreatic acinar cells stimulated by acetylcholine. *FEBS Lett.* **239**, 358-362.
64. Tsunoda, Y., Stuenkel, E.L., and Williams, J.A. (1990) Oscillatory model of calcium signaling in rat pancreatic acinar cells. *Am. J. Physiol.* **258**, C147-C155.
65. Zhou, Z.-C., Gardner, J.D., and Jensen, R.T. (1987) Receptors for vasoactive intestinal peptide and secretin on guinea pig pancreatic acini. *Peptides* **8**, 633-637.
66. Shiratori, K., Shimizu, K., Watanabe, S., Takeuchi, T., and Moriyoshi, Y. (1989) Effect of CCK antagonist CR1409 and CR1505 on rat pancreatic exocrine secretion in vivo. *Pancreas* **4**, 744-750.
67. Maroux, S., Baratti, J., and Desnuelle, P. (1971) Purification and specificity of porcine enterokinase. *J. Biol. Chem.* **246**, 5031-5039.
68. Hayakawa, T., Kondo, T., Yamazaki, Y., Inuma, Y., and Mizuno, R. (1980) A simple and specific determination of trypsin in human duodenal juice. *Gastroenterol. Jpn.* **15**, 135-139.
69. Green, G.M., Taguchi, S., Friestman, J., Chey, W.Y., and Liddle, R.A. (1989) Plasma secretin, CCK, and pancreatic secretion in response to dietary fat in the rat. *Am. J. Physiol.* **256**, G1016-G1021.
70. Himeno, S., Tarui, S., Kanayama, S., Kuroshima, T., Shinomura, Y., Hayashi, C., Tateishi, K., Imagawa, K., Hashimura, E., and Hamaoka, T. (1983) Plasma cholecystokinin responses after ingestion of liquid meal and intraduodenal infusion of fat, amino acids, or hydrocholic acid in man: analysis with region specific radioimmunoassay. *Am. J. Gastroenterol.* **78**, 703-707.
71. 森吉百合子. (1989) ラット膵外分泌に対するコレシストキニンとセクレチンの相互作用の検討. 日消誌 **86**, 2425-2433.
72. Liddle, R.A., Green, G.M., Conrad, C.K., and Williams, J.A. (1986) Proteins but not amino acids, carbohydrates, or fats stimulate cholecystokinin secretion in the rat. *Am. J. Physiol.* **251**, G243-G248.
73. Schaffalitzky, M.O.B., Fahrenkrug, J., Watt-Boolsen, S., and Worning, H. (1978) Pancreatic response and plasma secretin concentration during infusion of low dose secretin in man. *Scand. J. Gastroenterol.* **13**, 305-311.
74. Gyr, K., Beglinger, C., Fried, M., Grötzinger, U., Kayasseh, L., Stalder, G.A., and Girard, J. (1984) Plasma secretin and pancreatic response to various stimulants including a meal. *Am. J. Physiol.* **246**, G535-G542.
75. Sakamoto, C., Goldfine, I.D., Roach, E., and Williams, J.A. (1985) Localization of saturable CCK binding sites in rat pancreatic islets by light and electron microscope autoradiography. *Diabetes* **34**, 390-394.
76. Karlsson, S., and Ahrén, B. (1992) CCK-8-stimulated insulin secretion in vivo is mediated by CCK<sub>A</sub> receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **213**, 145-146.
77. Schmidt, W.E., Creutzfeldt, W., Höcker, M., Nustede, R., Choudhury, A.R., Schleser, A., Rovati, L.C., and Fölsch, U.R. (1991) Cholecystokinin receptor antagonist loxiglumide modulates plasma levels of gastro-entero-pancreatic hormones in man. *Eur. J. Clin. Invest.* **21**, 501-511.
78. Karlsson, S., and Ahrén, B. (1989) Effects of three different cholecystokinin receptor antagonists on basal and stimulated insulin and glucagon secretion in mice. *Acta. Physiol. Scand.* **135**, 271-278.
79. Ha, S., Satake, K., Hiura, A., Sowa, M., and Nishiwaki, H. (1994) Effect of a new cholecystokinin receptor antagonist (KSG-504) on the early stage of the healing process in acute pancreatitis induced in rats by the closed duodenal loop technique. *Pancreas* **9**, 501-507.
80. 小林 護, 品川和彦, 杉浦 勝, 長沢達也, 赤羽増夫, 味澤幸義. (1996) 各種急性膵炎モデルに対する新しい CCK-A 受容体拮抗薬 KSG-504 の作用. 日薬理誌. **107**, 183-195.
81. Ghosh, M.N., and Schild, H.O. (1958) Continuous recording of acid gastric secretion in the rat. *Brit. J. Pharmacol.* **13**, 54-61.
82. Soll, A.H. (1978) The interaction of histamine with gastrin and carbamylcholine on oxygen uptake by isolated mammalian parietal cells. *J. Clin. Invest.* **61**, 381-389.

83. 山田健二, 飯塚元洋. (1983) ウサギ摘出 Oddi 括約筋および十二指腸における Timepidium bromide の作用. 応用薬理 **26**, 793-801.
84. 東 洋. (1973) ウサギ Oddi 括約筋および十二指腸標本における経壁刺激反応および自律神経薬作用の相違. 日薬理誌. **69**, 711-720.
85. Miranda, M., Espinoza, M., and Csendes, A. (1981) Manometric characteristics of the extrahepatic biliary tract in dogs. *Dig. Dis. Sci.* **26**, 417-422.
86. Scott, R.B., Strasberg, S.M., E.-Sharkawy, T.Y., and Diamant, N.E. (1984) Fasting canine biliary secretion and the sphincter of Oddi. *Gastroenterology* **87**, 793-804.
87. 工藤順康, 大内みち子, 市河三太. (1981) 胆管末梢部の各部位における経壁刺激、自律神経作動薬効果の差異. 日平滑筋誌. **17**, 35-46.
88. Pozo, M.J., Salido, G.M., and Madrid, J.A. (1990) Action of cholecystokinin on the dog sphincter of Oddi : influence of anticholinergic agents. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* **98**, 353-360.
89. 矢田清吾, 古味信彦. (1988) Cholecystokinin-octapeptide およびテトラガストリンの胃、十二指腸並びに乳頭部括約筋運動に及ぼす影響について. 日平滑筋誌. **24**, 101-111.
90. Britton, D.R., Yahiro, L., Cullen, M.J., Kerwin, J.F.Jr, Kopecka, H., and Nadzan, A.M. (1989) Centrally administered CCK-8 suppresses activity in mice by a "peripheral-type" CCK receptor. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **34**, 779-783.
91. Zetler, G. (1980) Effects of cholecystokinin-like peptides on rearing activity and hexobarbital-induced sleep. *Eur. J. Pharmacol.* **66**, 137-139.
92. Zetler, G. (1980) Analgesia and ptosis caused by caerulein and cholecystokinin octapeptide (CCK-8). *Neuropharmacology* **19**, 415-422.
93. Setnikar, I., Bani, M., Cereda, R., Chisté, R., Makovec, F., Pacini, M.A., and Revel, L. (1987) Anticholecystokinin activities of loxiglumide. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **37**, 1168-1171.
94. 谷山紘太郎, 齊藤尚亮, 楠 正人, 田中千賀子. (1987) 腸壁内神経の消化管運動調節機構. 自律神経. **24**, 310-316.
95. Della-Fera, M.A., Coleman, B.D., and Baile, C.A. (1990) CNS injection of CCK in rats: effects on real and sham feeding and gastric emptying. *Am.J.Physiol.* **258**, R1165-R1169.
96. Blackshaw, L.A., and Grundy, D. (1990) Effects of cholecystokinin (CCK-8) on two classes of gastroduodenal vagal afferent fibre. *J.Auton.Nerv.Syst.* **31**, 191-202.

