

55

opioid receptor assay と Met<sup>5</sup>-enkephalin  
ならびに  $\beta$ -endorphin の radioimmunoassay  
岡山大学 第三内科  
○小川紀雄  
Manitoba 大学 生理  
Henry G. Friesen

〔目的〕 opiate が特異的に結合する receptor が動物の脳に存在することが 1973 年に確認され、更に内因性モルヒネ様物質 (endorphins) の存在が明らかにされ、その生理的意義に興味がもたれている。我々は 4 つの異なる assay 系を確立し、total endorphins 活性 (T-E), Met<sup>5</sup>-enkephalin (M-ENK),  $\beta$ -endorphin-like immunoreactivity ( $\beta$ -END) 及び opioid receptor (Op-R) の濃度の分布をラット脳について比較検討した。

〔方法〕 ① ラット脳各部位の homogenate に対する [<sup>3</sup>H]-naloxone の特異結合を Op-R の濃度とした。

② ラット脳 homogenate を receptor, [<sup>3</sup>H]-naloxone を tracer, M-ENK を標準として radio receptor assay (RRA) を行った。③・④ M-ENK 又は  $\beta$ -END を各々 glutaraldehyde を用いて BSA と結合させ、adjuvant と共に家兎背皮内数十ヶ所に注射して抗血清を得た。tracer は各々 lactoperoxidase 法により <sup>125</sup>I で標識し、これらを用いて radioimmunoassay (RIA) を行った。3 種の抗 M-ENK 血清は 1 : 5000 で <sup>125</sup>I-M-ENK の約 35% が結合したが、最も交叉反応の低いもの (Leu<sup>5</sup>-ENK, Met<sup>5</sup>-ENK-amide, d-END,  $\beta$ -END と 1% 以下の交叉) を用いた。抗  $\beta$ -END 血清は 1 : 65000 で <sup>125</sup>I- $\beta$ -END の約 50% が結合し、 $\beta$ -LPH と 15% の交叉反応がみられた。

上記③④による測定用試料としては、ラットを microwave 照射により屠殺し、脳の各部位を酢酸で抽出し、そのままあるいは凍結乾燥により濃縮したものを用いた。脳抽出物を Sephadex カラムで分画し、RIA により  $\beta$ -END を測定すると合成  $\beta$ -END 溶出部位に検出されるものと大分子のものがみられ、前者は全体の約 80% であった。

〔結果・考按〕 Op-R は線条体に高濃度に認められ、視床下部、視床がこれに次ぎ、小脳には検出されなかった。RRA による T-E 及び RIA による M-ENK 濃度の分布は Op-R の分布と比較的類似しており、線条体及び視床下部に高濃度に検出された。しかるに  $\beta$ -END の分布はこれらとは異なり、線条体にはほとんど検出されず、視床下部に最も多く存在した。M-ENK と  $\beta$ -END の和は T-E と異なったが、構造式未定の endorphins の存在が知られていることからすれば当然のことといえる。以上のように個々の endorphins の分布は相互に異なっているので脳内の endorphins の動態を追求するには数種類の assay 系が必要と考えられる。

56

$\beta$ -endorphin の不活性化とその防御法に  
ついて  
岡山大学 第三内科  
○景山甚郷, 小川紀雄, 高原二郎,  
大藤 真

〔目的〕  $\beta$ -endorphin ( $\beta$ -E) は現在までに構造式が明らかにされている natural endorphins のうち最も強い作用を有し、下垂体に多量に含有されている。我々は  $\beta$ -E の radioimmunoassay (RIA) 開発途中に  $\beta$ -E がきわめて不安定であることを経験したので、 $\beta$ -E の不活性化とその防御法について検討した。

〔方法〕 ① まず、RIA 中の  $\beta$ -E tracer の degradation をみる目的で種々の薬剤を添加し、抗体への specific binding ( $\beta$ -E 100ng の存在下と非存在下での tracer の抗血清への結合の差) を二抗体法で測定、比較した。② 二抗体法と dextran coated charcoal (DCC) 法の場合の標準曲線を比較した。③ 蛋白分解酵素としてラット脳 cytosol 分画を用い  $\beta$ -E の不活性化とその防御法を検討した。すなわち、Wister 系雄ラット脳を生理食塩水で homogenate し、100,000×g 60 分間遠沈して得られた cytosol 分画を 15μg ずつ試験管に分注し、既知量の合成  $\beta$ -E と bacitracin 50μg/ml, trasylyol 2000 KIU/ml 又は phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF) 2mM を添加して、37℃で incubate した。反応は、酢酸で酸性化した後 5 分間煮沸して停止させ、2000×g 30 分間遠沈しその上清を  $\beta$ -E RIA で DCC 法を用いて測定した。

〔結果〕 ① 生体材料を添加しない場合においても、 $\beta$ -E tracer は RIA 中に不活化を受けた。specific binding は trasylyol, bacitracin, PMSF 又は benzamidin を加えた場合に control より大きく不活性化が防御されたが、mercaptoethanol 及び p-chloromercuriphenyl sulfonic acid は全く無効であった。② 更に trasylyol 存在下でも DCC 法での標準曲線は二抗体法のそれより急峻であった。これは主として後者の場合第二抗体と用いる比較的高濃度の血清成分の作用による可能性が考えられた。③ cytosol と  $\beta$ -E のみの群では 10 分、30 分、60 分後には添加した  $\beta$ -E 量の 34%, 17%, 9% が検出されたのみであった。bacitracin 添加群では 52%, 30%, 16%, trasylyol 添加群では 54%, 25%, 17% であった。37℃におけるラット脳 cytosol 存在下での  $\beta$ -E 活性の半減期は、5.5 分と極めて短かったが、bacitracin 添加群、trasylyol 添加群では 2 倍に延長した。しかし、PMSF は全く無効であった。

〔総括〕  $\beta$ -E RIA においては、生体材料を添加しない場合でも、抗血清等により  $\beta$ -E tracer の不活化がおこり、trasylyol が最もその防御力が強力であった。又、 $\beta$ -E はラット脳 cytosol よりすみやかに不活性化されるが、trasylyol 及び bacitracin は明らかにその半減期を増し不活性化が遅延した。