

57

 β -Endorphin の radioimmunoassay に関する検討

京都大学第2内科

○中尾一和、隠岐尚吾、中井義勝、
井村裕夫

〔目的〕 内因性 opioid peptides の中で最も強力な作用を有すると考えられている β -endorphin(β -EP) の高感度の radioimmunoassay を確立し、血中及び組織中の β -EP 活性について検討した。

〔方法〕 β -EP 抗血清は粗製ブタ ACTH 製剤をモルモットに免疫して得たもので、最終希釈60万倍で使用した。標準用及び標識用 β -EP は Li より提供されたものを用いた。

標識はクロラミン T 法により実施し、Quso G-82にて精製した。得られた ^{125}I β -EP の比活性は $100\sim 200 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ であった。測定はすでに報告している ACTH の radioimmunoassay (Horm Metab Res (Suppl) 5:7 1975) に準じて実施した。B と F の分離はタルク法によった。

本法の最小検出量は 1 pg で、 α -EP、 γ -EP、Met-enkephalin、Leu-enkephalin、 α -ACTH、 α -MSH とは交叉反応を示さなかったが、Li より提供されたヒト β -LPH とはモル比で約 100% の交叉反応を呈した。

そのため Biogel P-60、Sephadex G-100 の種々の size のカラムを用いて、size heterogeneity を検討し β -LPH と β -EP をゲル口過で分離して測定した。

血液は silicic acid を用いて抽出し、組織は蒸留水を加えて 4°C のもとにポリロンホモゲナイザーで homogenize し、沸騰水中で10分間加温後 $50000 \times g$ で遠心分離し、その上清を凍結乾燥したものを用いた。

〔結果〕 ヒト血中、ACTH 産生腫瘍組織中、正常胎盤組織中及び rat の下垂体、脳組織中に β -EP 活性が検出された。 β -EP 以外に β -LPH 更に分子量の大きな precursor が存在した。

〔結論〕 β -EP の鋭敏な radioimmunoassay を確立しこれを用いて、血中、組織中に β -EP の存在することを証明した。その生理的意義は興味深く、分泌動態についても検討中である。

58

Substance P の Radioimmunoassay

岡山大学 第三内科

○山脇泰秀、小川紀雄、高原二郎、
大藤 真

〔目的〕 脳と腸管から抽出され、血圧下降と atropine によって拮抗されない腸管収縮作用を有する substance p (SP) は生体に広く分布することが知られると共に、最近では神経伝達物質として注目を集めている。我々は SP の radioimmunoassay (RIA) の開発を試みたので報告する。

〔方法〕 抗血清は glutaraldehyde を用いて SP (ペプチド研) - BSA conjugate を作成、 $250 \mu\text{g}$ SP equivalent を Freund complete adjuvant と共に3週間々隔で2回家兎背面部皮内数十ヶ所に注射して得た。tracer として $[\text{Tyr}^8]$ -SP (ペプチド研) を lactoperoxidase と H_2O_2 を用いて ^{125}I で標識し、Sephadex G-10 カラムで精製したものをを用いた。B・F の分離は dextran coated charcoal 法を用いた。

〔結果〕 $[\text{Tyr}^8]$ -SP をヨード化後 Sephadex G-10 カラムで精製すると2つの大きな峰がみられ、void volume にみられる第1峰が ^{125}I - $[\text{Tyr}^8]$ -SP であったが、その峰の下降部が抗血清に最もよく結合した。得られた抗血清は5000倍希釈で加えた ^{125}I - $[\text{Tyr}^8]$ -SP の約40% が結合した。RIA 中の SP の不活化を防止する目的で、各種の薬剤の影響をみたところ、抗血清への特異結合 (SP 100 ng の存在下と非存在下の場合の tracer の抗血清への結合の差) は mercaptoethanol (5 mM) > bacitracin ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$) = mercaptoethanol (50 mM) > phenylmethyl sulfonyl fluoride (2 mM) > P-chloromercuriphenyl sulfonic acid (10 mM) > Trasylol ($2000 \text{ KIU}/\text{ml}$) であったので、以後、RIA 用 buffer には 1 mM の mercaptoethanol を添加した。この RIA 系で SP は 3 pg から 30 ng まで用量反応関係がみられ、最少検出量は 3 pg であった。またこの抗血清は TRH, LH-RH, somatostatin, VIP, neurotensin, MSH-RIH, β -endorphin とは全く交叉反応を示さず、 $[\text{Tyr}^8]$ -SP のみが50%の交叉反応を示し、SP に特異的な抗血清であった。この RIA によるラット下垂体 SP 含量は $100\sim 130 \text{ ng}/\text{g}$ で、脳含量は $15 \text{ ng}/\text{g}$ であった。また microwave 屠殺によるラット脳 SP 含量は $33 \text{ ng}/\text{g}$ と断頭法による値の約2倍であった。〔総括〕 特異的かつ、高感度の substance P の radioimmunoassay を確立した。