

57

 $\beta$ -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  $\beta$ -endorphin( $\beta$ -EP) の高感度の radioimmunoassay を確立し、血中及び組織中の  $\beta$ -EP 活性について検討した。

〔方法〕  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $^{125}\text{I}$   $\beta$ -EP の比活性は 100~200  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$  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、 $\alpha$ -EP、 $\gamma$ -EP、Met-enkephalin、Leu-enkephalin、 $\alpha\text{hACTH}$ 、 $\alpha$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -LPH と  $\beta$ -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℃ のもとにポリトンホモゲナイザーで homogenize し、沸騰水中で 10 分間加熱後 50000xg 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  $\beta$ -EP 活性が検出された。 $\beta$ -EP 以外に  $\beta$ -LPH 更に分子量の大きな precursor が存在した。

〔結論〕  $\beta$ -EP の鋭敏な radioimmunoassay を確立し、これを用いて、血中、組織中に  $\beta$ -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 眞

〔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 回家兎背面皮内数十ヶ所に注射して得た。tracer として [Tyr<sup>8</sup>]-SP (ペプチド研) を lactoperoxidase と  $\text{H}_2\text{O}_2$  を用いて  $^{125}\text{I}$  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〕 [Tyr<sup>8</sup>]-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  $^{125}\text{I}$ -[Tyr<sup>8</sup>]-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  $^{125}\text{I}$ -[Tyr<sup>8</sup>]-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 100ng 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 (5mM) > bacitracin (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) = mercaptoethanol (50mM) > phenylmethyl sulfonyl fluoride (2mM) > P-chloromercuriphenyl sulfonic acid (10mM) > Trasylol (2000 KIU/ml) であったので、以後、RIA 用 buffer には 10mM 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-RH,  $\beta$ -endorphin とは全く交叉反応を示さず、[Tyr<sup>8</sup>]-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 100~130 ng/g で、脳含量は 15 ng/g であった。また microwave 屠殺によるラット脳 SP 含量は 35 ng/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。