

氏名	植田弘師
	うえだひろし
学位の種類	薬学博士
学位記番号	薬博第195号
学位授与の日付	昭和56年3月23日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
研究科・専攻	薬学研究科薬学専攻
学位論文題目	鎮痛活性ペプチド, Kyotorphin の脳組織からの分離, 同定とその薬理活性に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 高木博司 教授 山科郁男 教授 富田謙吉

論文内容の要旨

内在性オピオイドとは、動物に存在するモルヒネ様物質である。現在まで同定されている enkephalin をはじめとするすべてのオピオイド・ペプチドは、いずれもモルモット摘出回腸標本、マウス摘出輸精管標本、オピエート・レセプター (Op. レセプター) 結合試験などの *in vitro* のアッセイ法を用いて分離、精製されたものである。しかし、これらの方法での効力は、必ずしも鎮痛効力に対応するとは限らないということも指摘されている。そこで、著者は簡便で感度の良い鎮痛効力検定法を確立し、鎮痛効果そのものをアッセイ法とした、内在性オピオイドの探索を行ない、新物質を単離した。そして、これを「Kyotorphin」と命名した。さらに、この物質の薬理作用とくに鎮痛効果のメカニズムを明らかにする目的で本研究を行い、次のような新知見を得た。

1. モルヒネ様鎮痛活性物質検索のための鎮痛効力検定法の確立

新たに考案した大槽内投与法は、無麻酔でマウスの脳室内、とくに大槽内に正確に投与できる簡便な方法である。この方法とマウス tail pinch 法とを組み合わせ得られた鎮痛効力検定法は麻薬性鎮痛薬の鎮痛効果の検定に非常に特異的な方法であった。従来の側脳室内投与法では検出が困難であるとされた、エンケファリンをはじめとするいくつかのオピオイド・ペプチドの鎮痛効果もこの方法によれば高感度に検出できた。このことから、モルヒネ様鎮痛活性物質を検索するための *in vivo* アッセイ法として、この鎮痛効力検定法が適用できると考えられた。

2. モルヒネ様鎮痛活性物質の分離・精製及び同定

前述の鎮痛効力検定法を用い、モルヒネ拮抗薬 naloxone による拮抗されるモルヒネ様鎮痛活性物質の探索を行った。

ウシ脳のアセトン粉末、酢酸抽出、Sephadex G-50 によるゲルろ過、Dowex 50 w×2 によるイオン交換クロマトグラフィーを経て BioGel P-2 により精製し、単一物質であることを確認した。この物質は Tyr-Arg というアミノ酸配列をもつジペプチドであり、合成品とも一致した。さらに、合成 Tyr-Arg

は naloxone で拮抗される鎮痛効果を有することを確認し、「Kyotorphin」と命名した。

3. Kyotorphin の脳、脊髄内分布

高速液体クロマトグラフィーを用いた kyotorphin の分離・定量法の確立により、各種動物の全脳及びラット脳、脊髄内の分布を検討した。その結果、ラット、マウス、モルモット、ウサギのいずれの全脳においても、317~892 ng/g 組織の含量を示した。また、ラットにおいて kyotorphin は、脳では中脳、橋・延髄に、脊髄では背側部に高濃度見出だされた。この分布は morphin 及び電気鎮痛の作用部位、そして enkephalin 及び Op. レセプターの分布と平行関係にあることを明らかにした。

4. Kyotorphin の薬理作用

機械的刺激 (tail pinch 法) 及び熱的刺激 (hot plate 法) を用いた 2 種の鎮痛検定法により、大槽内投与された kyotorphin は naloxone により拮抗される鎮痛効果を示した。

しかし、kyotorphin は末梢摘出臓器標本や、脳の臓標本における種々の Op. レセプターに直接結合しないことから、この鎮痛効果は脳に存在する別の内在性オピオイドを介する間接的な効果であると推論した。そこで、最近多くの研究者らにより、ペプチド系神経伝達物質の有効候補として注目されつつある enkephalin について、kyotorphin による神経組織からの遊離及びその酵素分解に対する阻害作用を検討した。その結果、kyotorphin は線条体及び脊髄切片より methionine-enkephalin を脱分極的に遊離させる作用を示した。また、2 種の enkephalin 分解酵素、すなわちエンケファリナーゼ及びアミノペプチダーゼに対しても、kyotorphin は阻害作用を示した。これらの事実より、大槽内投与された kyotorphin は、脳内の enkephalin を遊離し、その遊離された enkephalin をさらに酵素分解から保護することにより鎮痛効果を生ずる、と結論した。

以上の知見から、脳組織から新しく単離した kyotorphin は、生体において enkephalin の遊離を介する疼痛制御を行っている可能性があることが強く示唆される。

論文審査の結果の要旨

今までの研究により、脳組織にモルヒネ様ペプチドの存在することが明らかにされ、すでに enkephalin や endorphin などのペプチドが単離された。本研究は従来の研究とは異なるアッセイ法を用いて新しい鎮痛活性物質を脳から単離しようと試みたものである。

著者植田は活性物質の鎮痛効力を微量の試料を用いて検定するために新しい方法として試料 (検体) をマウス大槽内に特殊な注射針で投与する方法を確立した。ウシ脳をすりつぶし、で脱脂後、酢酸で抽出し、acetone 抽出エキスをゲルろ過及びイオン交換クロマトグラフィーを用いて、鎮痛活性のある画分を精製し、単一物質を得た。さらにこの物質は Tyr-Arg のアミノ酸配列をもつジペプチドであることを明らかにし、kyotorphin と命名した。kyotorphin は、methionine-enkephalin の約 4 倍の鎮痛効力をもつことを明らかにした。このように小さなペプチドが鎮痛活性をもつことが明らかにされたことは極めて興味深い。

植田は Kyotorphin の脳内分布をしらべ、これが痛みの伝達や制御に関係の深い場所とされている脳幹及び脊髄背側部に多く含まれていることを明らかにした。

さらに kyotorphin の鎮痛作用機序を追究し、それが主として methionine-enkephalin を神経終末から遊離する作用によること、また一部は enkephalin 分解酵素を阻害作用も補助的に関係していることを明らかにした。

以上の知見は脳における内在性疼痛制御物質の薬理について極めて有意義な新知見を加えたものである。よって、本論文は薬学博士の学位論文として価値あるものと認める。