

氏名	金子周司 かね こ しゅう じ
学位の種類	薬学博士
学位記番号	薬博第244号
学位授与の日付	昭和60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	内在性抗オピオイド物質のウシ脳組織からの精製、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

オピオイドペプチドの発見以来、内在性抗オピオイド物質の存在の可能性が海外の研究者らにより示唆されてきた。一方、既知の神経ペプチドの中にも、脳内投与によりオピオイド鎮痛を抑制する作用を示すものがあることがいくつか報告されている。しかし実際に脳組織から内在性抗オピオイド物質を精製した報告例はこれまでにない。そこで著者は抗オピオイド活性のスクリーニング法として簡便かつ高感度なモルモット回腸縦走筋標本における活性を指標に、未知の内在性抗オピオイド物質をウシ脳抽出物より単離精製しようと試みた。その結果二つの活性物質を得たが、その化学構造を解明したところ、これらは意外にも angiotensin I 及び II であることが判明した。Angiotensin (以下 AGT と略す) は元来、血中に存在する昇圧ペプチドとして知られていたが、近年抗 AGT 抗体を用いた研究により AGT 様免疫活性が中枢神経系にも広く存在していることが示唆されてきている。しかし実際に脳組織から AGT を単離したのは本研究が初めてである。また著者は AGT II がモルモット回腸あるいはマウスを用いた鎮痛検定法により、きわめて低用量でオピオイドの作用を減弱させることを明らかにした。以下に本研究の概要を示す。

#### 第1篇 内在性抗オピオイド物質のウシ脳組織からの精製と angiotensins としての同定

100頭分のウシ全脳(小脳を除く。約 40 kg)をアセトンで脱脂後、4℃下で酸抽出し、得られた抽出物からイオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相型カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーを組み合わせ、抽出操作を含めた全10段階の精製を行った。精製途中において抗オピオイド活性は二つの画分に認められていたが、それらは定性的に類似したものであったため、総活性量の多い画分を最終的に単離した。この単離された物質が予備実験により分子量約1000のペプチドであると推定されたことに基づき、アミノ酸分析、高速液体クロマトグラフィーによる同定および合成品との抗オピオイド活性の比較などを行い、その結果単離された物質は AGT I であることが明らかになった。その収量は約 10 nmol であった。またもうひとつの活性画分についても同様に検討し、AGT II であることを確認した。さらに著者は抽出

条件の検討などからこれらの AGT が血液成分からの contamination や artifact ではないと推論した。

### 第二篇 モルモット回腸縦走筋標本における angiotensins とオピオイドペプチドの相互作用

モルモット回腸縦走筋標本（以下 GPI と略す）は従来よりオピオイドの in vitro での効力検定法として広く用いられているものである。電気刺激下での GPI に対して低濃度 ( $10^{-11}\text{M}\sim 10^{-9}\text{M}$ ) の AGT I および II の前処置はともに Met-enkephalin の攣縮抑制作用の用量-反応曲線を右に平行移動させ、 $pA_2$  値の比較により、Naloxone の約 100 倍強力な拮抗活性を示した。しかし AGT I の作用は AGT I 転換酵素阻害剤である Captopril により、また AGT II の作用は AGT II レセプター拮抗薬である Saralasin により消失することから、この活性の本体は AGT II が AGT II レセプターに作用することに起因すると考えられた。一方、高濃度 ( $10^{-9}\text{M}\lt$ ) の AGT II は GPI を単独投与で収縮させるが、諸種オピオイドの前処置はこの収縮作用を減弱させた。また種々 blocker 類との組み合わせ実験によって、これらのオピオイドと AGT II の相互作用は ACh 遊離を介して起こること、すなわちオピオイドは ACh 遊離を抑制し、AGT II は促進することが示され、AGT II は GPI において生理的な抗オピオイド物質として働いていることが示唆された。

### 第三篇 マウス脳室内投与による angiotensin II の morphine 鎮痛に対する抑制作用

マウスを用いた tail pinch 法あるいは hot plate 法において、脳室内投与された AGT II (10 pmol) は同時投与された morphine (2.5 nmol) が引き起こす鎮痛効果に対して抑制作用を示した。tail pinch 法により用量反応性を検討したところ、AGT II はごく低用量 (0.1 pmol $\sim$ 10 pmol) で用量依存的に morphine の鎮痛効果を最大およそ 50% 減弱させることが明らかになった。また、AGT II の単独投与では痛覚反応性に変化は認められなかった。さらに AGT II は脳ホモジネート膜画分での  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$  いずれのオピオイド結合に対しても変化を与えなかったことから、脳内における AGT II の抗オピオイド作用はオピオイドレセプターを介するものではなく、生理学的な拮抗現象であると解釈された。

## 論文審査の結果の要旨

1975年、ブタ脳から最初のオピオイドペプチドとして enkephalin が単離、同定され、それ以来抗オピオイド物質が脳に存在することが予想されていたが、実際にその物質は今まで分離されていなかった。そこで本研究はウシ脳からそのような物質を単離することを意図して行われたものである。

まず抗オピオイド活性をしらべるため、モルモット回腸の縦走筋標本を用い、ウシ脳から抗オピオイド活性画分を選び出し、これを精製して二つの抗オピオイド物質を単離した。その化学構造を追究し、これらが angiotensin I 及び II であることを明らかにした。

これら二つのペプチドは昇圧ペプチドとしてすでに血液中に存在することは知られていたが、脳から単離されたのは初めてである。

angiotensin I 及び II はオピオイドレセプターには結合しないところから、他の作用機序が考えられた。そこでモルモット摘出回腸を用いて追究した結果、オピオイドが acetylcholine (ACh) 遊離抑制作用をもつものに対して、angiotensin は逆に ACh 遊離促進作用をもつことを明らかにした。

また angiotensin I は腸管壁の酵素によって angiotensin II に転換して抗オピオイド作用を示すこと

を証明した。

さらに angiotensin II の微量をマウス側脳室内投与すると、明らかに morphine の鎮痛作用を減弱することを明らかにした。

以上の知見から著者は脳から抗オピオイド物質として単離された angiotensin は、中枢神経系においてオピオイド物質の作用を制御する新しい因子として働いていることを示唆した。

以上の知見は脳の抗オピオイド物質について、全く新しい有意義な知見を提供したものである。

よって、本論文は薬学博士の論文として価値あるものと認める。

さらに昭和60年2月15日論文内容とそれに関連した事項につき試問を行った結果優秀と認定した。