イヌの膵臓の Met-enkephalin-Arg-Gly-Leu 様免疫活性を示す神経要素

——免疫組織化学的研究——

山梨医科大学第1解剖, 東北大学医学部第3内科*

下瀬川 徹*, 内田 隆, 小林 繁

京都大学医学部第2内科

井村 裕夫

静岡薬科大学生物薬品化学教室

望月 徹, 矢内原 千鶴子, 矢内原 昇

Met-enkephalin-Arg-Gly-Leu-Like Immunoreactivity-Containing
Nerve Elements in the Canine Pancreas
— An Immunohistochemical Study —

Tooru SHIMOSEGAWA[°], Takashi UCHIDA, Shigeru KOBAYASHI*,
Hiroo IMURA**, Tooru MOCHIZUKI,
Chizuko YANAIHARA and Noboru YANAIHARA***

*Department of Anatomy, Yamanashi Medical School, Yamanashi 409-38,

**Department of Medicine, Kyoto University Faculty of Medicine, Kyoto 606 and

***Laboratory of Bioorganic Chemistry, Shizuoka College of Pharmacy, Shizuoka 422, Japan

[°]Present address: The Third Department of Internal Medicine,
Tohoku University School of Medicine, Sendai 980

The occurrence and localization of Met-enkephalin-Arg-Gly-Leu (Met-Enk-Arg-Gly-Leu)-like immunoreactivity in the canine pancreas were studied by immunocytochemistry. For light microscopy, Bouin fixed and paraffin embedded sections were immunostained by the PAP method. For electron microscopy, ultrathin sections of 4% paraformaldehyde-fixed and Araldite embedded materials were immunostained by a protein A-colloidal gold method.

The results obtained were as follows:

- 1) In light microscopy, Met-Enk-Arg-Gly-Leu-like immunoreactivity was localized in nerve fibers of autonomic ganglion, in beaded nerve terminals around blood vessels of the exocrine parenchyma and pancreatic islet, in eighty-five out of one hundred and seventy-four ganglion cell somas of intra- and interlobular ganglia, and in ganglion cell somas and nerve fibers of neuro-insular complexes.
- 2) In electron microscopy, colloidal gold particles representing Met-Enk-Arg-Gly-Leu-like immunoreactivity were concentrated on secretory type granules of the ganglion cell somas

and on large cored synaptic vesicles of the nerve terminals around blood capillaries.

3) All the positive immunoreactions disappeared with preincubation of the anti-Met-Enk-Arg-Gly-Leu serum (dilution, 1:4,000) with Met-Enk-Arg-Gly-Leu (10 µg/ml). Immunostaining was not affected by preincubation of the antiserum with Met-enkephalin (10 µg/ml), Leu-enkephalin (10 µg/ml) and Met-enkephalin-Arg-Phe (20 µg/ml).

Out of the three precursors for a variety of opioid peptides throughout the body, i.e. preproenkephalin A, preproopiomelanocortin and preproenkephalin B, only preproenkephalin A contains Met-Enk-Arg-Gly-Leu. It is likely that the Met-Enk-Arg-Gly-Leu immunoreactive nerve elements presently studied contain not only it but also other preproenkephalin A-related peptides.

緒 言

遺伝子工学によるcDNAの構造解析法の確立によって, 1979年中西らによりプレプロオピオメラノコルチンの1次構造が明らかにされた⁶⁾。1982年には野田らによりプレプロエンケファリンA⁷⁾が, 柿谷らによりプレプロエンケファリンBの1次構造³⁾が明らかにされ, 内在性オピオイドペプチドがこれら前駆体によって3群に整理された。その結果, ウシ副腎髄質のクロム親和細胞由来のプレプロエンケファリンAには4個のMet-enkephalin (Met-Enk), 1個のLeu-enkephalin (Leu-Enk), Met-enkephalin-Arg-Phe (Met-Enk-Arg-Phe) および1個のMet-enkephalin-Arg-Gly-Leu (Met-Enk-Arg-Gly-Leu) が含有される事が明らかにされた⁷⁾。

Met-Enk-Arg-Gly-LeuはプレプロオピオメラノコルチンやプレプロエンケファリンBには含まれておらず, プレプロエンケファリンAにのみ含有されている。従って, 組織内にMet-Enk-Arg-Gly-Leuが見い出される事は, プレプロエンケファリンA関連ペプチドの存在を示している。

前回, 我々はMet-Enkに対する抗血清を用いた免疫組織化学的研究により, Met-Enk様免疫活性がイヌの膵臓で神経要素に局在する事を報告した¹³⁾。今回, 我々はプレプロエンケファリンAに特異的に含有されるMet-Enk-Arg-Gly-Leuに対する抗血清を用いた光顕ならびに電顕免疫組織化学によりイヌの膵臓内のMet-Enk-Arg-Gly-Leu様免疫活性の局在を示し, 膵臓に含有されるオピオイドペプチドの前駆体について検討した。また, イヌの膵臓に存在するオピオイドペプチドの意義について形態学的立場から考察を加えたので報告する。

材 料 と 方 法

1. 抗 血 清

1次抗血清は合成Met-Enk-Arg-Gly-Leuをグルタルアルデヒド法でアスカリスプロテインに結合させ, この複合体でウサギを感作し得られた抗Met-Enk-Arg-Gly-Leu血清(R 0171)である。ラジオインムノアッセイの結果は, この抗血清と α -endorphin, β -endorphin, Met-EnkおよびLeu-Enkとの間に交差性がない事を明らかにしている。Met-Enk-Arg-Gly-Leu関連ペプチドであるH-Arg-Gly-Leu-OHは高濃度(2,000 fmol以上)で用いた場合, 軽度の交差性が認められる。抗血清作成の詳細な方法ならびにラジオインムノアッセイにおける, この抗血清の特異性については他誌に発表の予定である。

なお, 2次抗血清にはヤギ抗ウサギIgG (Miles Yeda)を200倍希釈で使用した。

2. 光顕免疫組織化学

1) 実験材料

雑種イヌ 6 頭 (体重 4.5~11kg, 雄 2 頭, 雌 4 頭) を用いた。ネンブタール®50 mg/kg body weight で麻酔し, 胸部大動脈から Bouin 固定液で灌流固定を行なった。灌流後, 脾臓および副腎を速かに摘出して小片にトリミング (厚さ 3 mm 以上にならないように注意した) した後, 室温でさらに 2 時間 Bouin 固定液で浸漬固定した。エチルアルコールで脱水後, キシレンで透徹しパラフィンに包埋した。厚さ 7 μ m の切片を作成して免疫組織化学の材料とした。

2) 方法

光顕免疫組織化学は PAP 法 (Sternberger)^{8) 15)} で行ない, 常にイヌの副腎髄質を対照とした。まず内在性ペルオキシダーゼを抑制するために脱パラフィンした切片を 3% 過酸化水素水で 30 分間処理した。その後, 切片に山羊血清をかけて室温に 60 分間静置し, 山羊血清をふきとって 1 次抗血清 (1:1,000~1:4,000) を重ねた。反応は 4℃ で 18 時間とした。2 次抗血清 (1:200) との反応は室温で 30 分間とし, ウサギ PAP 複合体 (Miles Yeda, 1:200) へと反応を進め, 最後に 3, 3'-ジアミノベンチジン・0.05% 過酸化水素混合液で発色させ, 0.02% 四酸化オスミウムで 1 分間処理した。各反応は湿箱内で行ない, 各過程間の切片の洗浄ならびに各抗血清および反応液の希釈は全て 0.01M, pH 7.2 リン酸緩衝液・塩化ナトリウム添加 (PBS) を用いた。

3) 免疫組織化学の特異性の検定

① 1 次抗血清の代わりに PBS または正常ウサギ血清 (1:100~1:500) をかけて PAP 法を行なった。

② 吸収試験

抗 Met-Enk-Arg-Gly-Leu 血清 (1:4,000) 1 ml に Met-Enk-Arg-Gly-Leu 10 μ g あるいは, Met-Enk 10 μ g (蛋白研), Leu-Enk 10 μ g (蛋白研), Met-Enk-Arg-Phe 20 μ g を各々加え, 4℃ で 1 晩反応させた後, 1 次抗血清の代わりに用いて PAP 法を行なった。この際, イヌ副腎髄質のクロム親和細胞を対照とした⁴⁾。

3. 電顕免疫組織化学

1) 実験材料

4 頭のイヌ (体重 4~7kg, 雌 4 頭) を 4% パラホルム・1% グルタル添加リン酸緩衝液 (0.067M, pH 7.4) で胸部大動脈より灌流固定し, 同じ固定液で更に 2 時間浸漬固定を加えた。固定後, 組織片をエチルアルコールで脱水し, アラルダイトに包埋した。超薄切片 (銀色~銀金色の干渉色のもの) を Sorvall MT 5000 ミクロトームで作成し使用した。

2) プロテイン A-コロイド金法

Roth らの方法により^{10) 11)}, コロイド金粒子を作成し, プロテイン A (Pharmacia) に結合させた。直径約 6 nm のほぼ均一な粒子を使用した。

電顕免疫組織化学は, ニッケル製のグリッドを用いて以下のとおりに行なった。① 2% ウシ血清アルブミン (BSA) を含むリン酸緩衝液 (0.067M, pH 7.4-PB) に室温で 30 分間浸漬, ② 抗 Met-Enk-Arg-Gly-Leu 血清 (1:500~1:1,000; 2% BSA を含む PB で希釈) に 4℃ で 12~18 時間反応させ, その後 PB で洗浄, ③ プロテイン A-コロイド金液 (2% BSA を含む PB で希釈) で室温, 1 時間反応, ④ 水洗後, 酢酸ウラン・酢酸鉛で 2 重染色。

観察は日立 H-700 型電子顕微鏡で行なった。

3) 吸収試験

抗Met-Enk-Arg-Gly-Leu血清（1：500；2% BSAを含むPBで希釈）1 mlにMet-Enk-Arg-Gly-Leu 50 μ gを加え、4℃で12時間孵置した後、1次抗血清の代わりに用いて反応を行なった。この場合も、副腎髄質のクロム親和細胞を対照とした⁴⁾。

Fig. 1. Met-Enk-Arg-Gly-Leu-like immunoreactivity-containing nerve elements in the canine pancreas. All the sections shown here were immuno-stained with the R-0171 antiserum (1:2,000).

- a) A ganglion containing immuno-positive (white asterisks) as well as immuno-negative ganglion cell somas (arrow). Note immuno-positive nerve terminals near the ganglion cell somas (arrowheads). $\times 710$
- b) Nerve terminals with beaded appearance seen around a small blood vessel in the periacinar connective tissue. E: exocrine pancreas. $\times 830$
- c) Met-Enk-Arg-Gly-Leu-like immunoreactivity-containing nerve terminals (arrowheads) in the pancreatic islet (IT). They appeared around blood capillaries in the islet (c). E: exocrine pancreas. $\times 390$
- d) A neuro-insular complex in the canine pancreas. Immunoreactivity was shown in ganglion cell somas (asterisks) and nerve terminals (arrowheads) between endocrine cells of islet (IT). Immuno-positive nerve fibers were also seen in the nerve fiber bundles (arrow). $\times 330$

結 果

1. 光顕免疫組織化学

1) イヌの膵臓の Met-Enk-Arg-Gly-Leu 様免疫活性の局在

実験に使用した全てのイヌの膵臓内に Met-Enk-Arg-Gly-Leu 様免疫活性を示す神経線維、神経節細胞体ならびに神経—島複合体が見出された。Met-Enk-Arg-Gly-Leu 様免疫活性陽性の神経線維は数珠状をしており、膵臓の以下の部位に認められた。①膵内自律神経節の神経節細胞体の周囲 (Fig 1. a), ②小葉間ならびに腺房周辺を走行する血管の周囲 (Fig 1. b), ③Langerhans 島内の毛細血管の周囲ならびに内分泌細胞間。Langerhans 島内の毛細血管周囲には神経終末が多数認められた (Fig 1. c)。

小葉内ならびに小葉間の神経節の神経節細胞体にも Met-Enk-Arg-Gly-Leu 様免疫活性が認められた (Fig 1. a)。検索し得た神経節細胞全体の約50% (174個中85個) が Met-Enk-Arg-Gly-Leu 様免疫活性を示した。

Fig 1. dに示す様に、神経—島複合体では、神経節内の神経節細胞体と神経線維に Met-Enk-Arg-Gly-Leu 様免疫活性が出現した。

2) 免疫組織化学の特異性の検定

①1次抗血清の代わりにPBSを用いた場合および正常ウサギ血清を用いた場合のいずれでも膵臓内に特異的な免疫活性は出現しなかった。

②吸収試験 (光顕免疫組織化学)

副腎髄質のクロム親和細胞と同様、膵臓内の Met-Enk-Arg-Gly-Leu 様免疫活性神経要素の呈色反応は、抗 Met-Enk-Arg-Gly-Leu 血清 (1:4,000) 1 ml 当り Met-Enk-Arg-Gly-Leu を10 μ g 加える事により完全に消失した。抗 Met-Enk-Arg-Gly-Leu 血清 (1:4,000) 1 ml 当りに Met-Enk 10 μ g, Leu-Enk 10 μ g あるいは Met-Enk-Arg-Phe 20 μ g を加えた場合、いずれにおいても呈色反応は影響を受けなかった。

2. 電顕免疫組織化学

1) Met-Enk-Arg-Gly-Leu 様免疫活性の細胞内局在

Met-Enk-Arg-Gly-Leu 様免疫活性の細胞内局在はコロイド金粒子の集中で示される。Fig 2. aに示す様に、神経節細胞では細胞体の分泌果粒上にコロイド金粒子が集まった。核、粗面小胞体、

ミトコンドリア等の細胞内小器官への粒子の付着はきわめて少数であった。小葉間血管やLangerhans島内の毛細血管周囲に認められる神経終末では大型芯あり小胞（直径約85nmで中等度の電子密度を示す円形の芯あり小胞）にコロイド金粒子が集中した（Fig 2. b）。

Fig. 2. Subcellular localization of Met-Enk-Arg-Gly-Leu-like immunoreactivity in the canine pancreatic tissue.

- a) Immunoreactivity was shown in the secretory granules (arrowheads) of a ganglion cell soma. G: Golgi apparatus, M: mitochondrion. $\times 50,000$
- b) Immuno-positive dense-cored synaptic vesicles ($\phi 85$ nm) of a nerve fiber (NF) around a capillary. Inset: higher magnification of closed area in this picture. E: endothelial cell, S: Schwann cell. $\times 58,000$ Inset: $\times 110,000$

2) 吸収試験 (電顕免疫組織化学)

抗 Met-Enk-Arg-Gly-Leu 血清に Met-Enk-Arg-Gly-Leu を加えた混合液を 1 次抗血清の代わりに用いた場合、神経節細胞体の分泌果粒や神経終末の大型芯あり小胞に認められたコロイド金粒子の集中が消失した。これは副腎髄質のクロム親和細胞 (対照) についても同様であった。

考 按

1) イヌの膵臓の Met-Enk-Arg-Gly-Leu 様免疫活性の局在

前回、我々は Met-Enk 様免疫活性がイヌの膵臓で神経要素に局在している事を報告した¹³⁾。膵臓のエンケファリンに関しては、Langerhans 島の内分泌細胞にその局在が示されたという報告と、神経線維に局在が示されたという報告がある。すなわち、Polak らはヒトの膵臓で Met-Enk 様免疫活性が膵 Langerhans 島の内分泌細胞の一部に局在すると報告した⁹⁾。一方、Larsson らはネコの膵臓で Leu-Enk 様免疫活性が膵内自律神経節の神経節細胞体に近接する神経線維や小葉間の神経線維束内の神経線維に局在すると報告した⁵⁾。

今回、我々は Met-Enk-Arg-Gly-Leu 様免疫活性がイヌの膵臓で Met-Enk 様免疫活性と同様の分布を示す事を明らかにした¹³⁾。すなわち、膵臓内の自律神経節の神経節細胞体の周囲、小葉間の神経線維束内、小葉間や腺房周辺の血管の周囲、Langerhans 島内の毛細血管の周囲や内分泌細胞間に、数珠状をした Met-Enk-Arg-Gly-Leu 様免疫活性神経線維が分布していた。また膵内自律神経節の神経節細胞体の約 50% に Met-Enk-Arg-Gly-Leu 様免疫活性が示された。神経一島複合体では、Langerhans 島に近接する神経節の神経節細胞体や神経線維にその免疫活性が示された。

一方、Langerhans 島内の内分泌細胞には免疫活性は認められず、前回の我々の報告と¹³⁾、今回の研究の結果から膵臓内のエンケファリン様免疫活性が Langerhans 島の内分泌細胞には検出されず、膵内の神経要素に局在している事が明らかとなった。

また、前回報告した Met-Enk 様免疫活性神経要素と、今回検討した Met-Enk-Arg-Gly-Leu 様免疫活性神経要素の分布がきわめて類似していることから、両免疫活性は同一の神経要素に局在しているものと考えられた。未発表ではあるが、我々はイヌ膵臓内の自律神経節の 2 μ m の連続切片で Met-Enk 様免疫活性と Met-Enk-Arg-Gly-Leu 様免疫活性が同一の神経節細胞体に局在する事を確認している。

2) イヌの膵臓に含有されるオピオイドペプチドの前駆体

Bruni らはヒトの膵臓で¹⁾、Houck らはブタの膵臓で²⁾、それぞれの膵臓抽出物中に β -endorphin 様免疫活性が存在すると報告した。一方、Stern らは、モルモットの膵臓でその抽出物中に β -endorphin 様免疫活性は検出されず、プレプロエンケファリン A 関連ペプチド、すなわち Met-Enk, Leu-Enk, Met-Enk-Arg, Met-Enk-Lys, Leu-Enk-Lys, Met-Enk-Arg-Phe, Met-Enk-Arg-Gly-Leu の免疫活性が認められると報告した¹²⁾¹⁴⁾。これらラジオイムノアッセイの結果は、膵臓のオピオイドペプチドの前駆体の可能性としてプレプロオピオメラノコルチンとプレプロエンケファリン A の 2 つが考えられる事を示している。

我々の免疫組織化学的研究は、プレプロエンケファリン A に特異的に含有される Met-Enk-Arg-Gly-Leu がイヌの膵臓の神経要素に存在する事を明らかにした。この事は、動物種差を考慮しなければならないものの、Stern らのラジオイムノアッセイの結果と合致する。すなわち、膵臓の神経要素に含有されるオピオイドペプチドの前駆体としてプレプロエンケファリン A が重要と考えら

れる。

前回の報告で，我々はMet-Enk様免疫活性がイヌの膵臓で神経要素に局在する事を示したが，その前駆体については不明であった¹³⁾。今回の研究は，イヌの膵臓内神経要素に含有されるオピオイドペプチドの前駆体としてプレプロエンケファリンAが考えられる事を免疫組織化学的に明らかにした。

3) 膵臓のエンケファリン含有神経要素の意義

前回，我々はMet-Enk様免疫活性神経線維が膵内分泌機能を調節する他に，Langerhans島の毛細血管腔への神経分泌を介して，膵外分泌機能へも影響している可能性を指摘した¹³⁾。

今回の研究は，Met-Enk-Arg-Gly-Leu様免疫活性神経線維がMet-Enk様免疫活性神経線維と同様の分布をする事を明らかにした。電顕免疫組織化学では神経終末の大型芯あり小胞にMet-Enk-Arg-Gly-Leu様免疫活性が局在した。これらの所見は，Met-Enk-Arg-Gly-LeuがMet-Enkとともに神経終末から分泌され，直接あるいは血流を介して標的器官に作用する可能性を考えさせる。Met-Enkと同様，Met-Enk-Arg-Gly-Leuも膵臓の内外分泌機能の調節に関与している可能性が形態学的に示唆された。

結 語

PAP法を用いた光顕免疫組織化学とプロテインA—コロイド金法を用いた電顕免疫組織化学により，イヌの膵臓のMet-Enk-Arg-Gly-Leu様免疫活性の局在を検討し，以下の結果を得た。

- 1) Met-Enk-Arg-Gly-Leu様免疫活性はイヌの膵臓の神経線維，自律神経節細胞，神経—島複合体に局在していた。
- 2) Met-Enk-Arg-Gly-Leu様免疫活性陽性の神経線維は数珠状をしており，膵内自律神経節の神経節細胞体の周囲，小葉間の神経線維束内，小葉間や腺房周辺の血管の周囲，Langerhans島内の内分泌細胞間や島内の毛細血管周囲に分布していた。
- 3) 検索し得た膵内自律神経節細胞全体の約50%にMet-Enk-Arg-Gly-Leu様免疫活性が認められた。神経—島複合体の神経節細胞にもMet-Enk-Arg-Gly-Leu様免疫活性が認められた。
- 4) 電顕免疫組織化学で，Met-Enk-Arg-Gly-Leu様免疫活性は神経節細胞体の分泌果粒ならびに神経終末の大型芯あり小胞に局在する事が示された。
- 5) 光顕および電顕のいずれにおいても，Met-Enk-Arg-Gly-Leu様免疫活性は，抗Met-Enk-Arg-Gly-Leu血清をMet-Enk-Arg-Gly-Leuと孵置する事により消失した。抗Met-Enk-Arg-Gly-Leu血清をMet-Enk，Leu-EnkあるいはMet-Enk-Arg-Pheと孵置した場合，いずれにおいても免疫活性は影響されなかった。

以上の結果から，イヌの膵臓のオピオイドペプチドは神経要素に局在しており，その前駆体としてプレプロエンケファリンAが重要と考えられた。また，Met-Enk-Arg-Gly-Leuが膵内外分泌機能の調節に関与している可能性が形態学的に示唆された。

文 献

- 1) Bruni, H.F., Watkins, W.B. and Yen, S.C.C.: β -Endorphin in the human pancreas. J. Clin. Endocrinol. Metab., 49: 649–651, 1979.
- 2) Houck, J.C., Chang, C.M. and Kimball, C.D.: Pancreatic beta-endorphin-like polypeptides. Pharmacology, 23: 14–23, 1981.
- 3) Kakidani, H., Furutani, Y., Takahashi, H., Noda, M., Morimoto, Y.,

Hirose, T., Asai, M., Inayama, S., Nakanishi, S. and Numa, S.: Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine β -neo-enkephalin/dynorphin precursor. *Nature*, 298: 245–249, 1982.

4) Kobayashi, S., Uchida, T., Ohashi, T., Fujita, T., Imura, H., Mochizuki, T., Yanaihara, C. and Yanaihara, N.: Met-enkephalin-Arg-Gly-Leu-like immunoreactivity in adrenal chromaffin cells and carotid body chief cells of the dog and monkey. *Biomed. Res.*, 4: 201–210, 1983.

5) Larsson, L.I.: Innervation of the pancreas by substance P, enkephalin, vasoactive intestinal polypeptide and gastrin/CCK immunoreactive nerves. *J. Histochem. Cytochem.*, 27: 1283–1284, 1979.

6) Nakanishi, S., Inoue, A., Kita, T., Nakamura, M., Chang, A.C.Y., Cohen, S.N. and Numa, S.: Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin- β -lipotropin precursor. *Nature*, 278: 423–437, 1979.

7) Noda, M., Furutani, Y., Takahashi, H., Toyosato, M., Hirose, T., Inayama, S., Nakanishi, S. and Numa, S.: Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin. *Nature*, 295: 202–206, 1982.

8) Pearse, A.G.E.: *Histochemistry. Theoretical and Applied. Vol. 1. Preparative and optical Technology* 4th Ed, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1980.

9) Polak, J.M., Sullivan, S.N., Bloom, S.R., Facer, P. and Pearse, A.G.E.: enkephalin-like immunoreactivity in the human gastrointestinal tract. *Lancet*, 1: 972–974, 1977.

10) Roth, J., Bendayan, M. and Orch, L.: Ultrastructural localization of intracellular antigens by the use of protein A-gold complex. *J. Histochem. Cytochem.*, 26: 1074–1081, 1978.

11) Roth, J.: The protein A-gold (pAg) technique- A qualitative and quantitative approach for antigen localization on thin sections, 107–133. Ed. by G.R. Bullock and P. Petrusz, *Techniques in Immunocytochemistry vol. 1*, Academic Press, London, 1982.

12) Sakamoto, M., Nakao, K., Yoshimasa, T., Ikeda, Y., Suda, M., Takasu, K., Shimbo, S., Yanaihara, N. and Imura, H.: Occurrence of methionine-enkephalin-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸ with methionine-enkephalin, leucine-enkephalin and methionine-enkephalin-Arg⁶-Phe⁷ in human gastric antrum. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 56: 202–204, 1983.

13) 下瀬川徹, 内田 隆, 小林 繁, 伊藤正毅, 柴田 昭: イヌの膵臓の Met-enkephalin 様免疫活性を示す神経要素, 一組織化学的研究—。日本内分泌学会雑誌, 60: 44–53, 1984.

14) Stern, A.S., Wurzbarger, R.J., Barkey, R. and Spector, S.: Opioid polypeptides in guinea pig pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 6703–6706, 1982.

15) Sternberger, L.A.: *Immunocytochemistry* Second Ed, Wiley, New York, 1979.

(受付日: 58. 12. 7)