短 報

HPLC/RIA 法による EI マウス脳の生理活性ペプチド
(メチオニンエンケファリン) の測定HPLC/RIA Analysis of Biologically Active Peptide, Methionine
Enkephalin, in the Brain of Seizure-Susceptible EI Mouse小 出 誠 司* 大 西 博 片 山 雅 文
山 上 栄 川 北 幸 男

要旨: 遺伝てんかんモデルの EI マウスの痙攣と脳内オピオイド系との関係を明らかにするために、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と radioimmunoassay (RIA) を組み合わせた HPLC/RIA 法で、交叉物を除いた生理活性ペプチドの脳内メチオニンエンケファリン (ME) を EI とその母系である ddY マウスにおいて測定した。EI マウスは、生後28日から放り上げ刺激を加え、放り上げ刺激の有無で EI (+) と EI (o) に分けた。EI (+) マウスは、50日から不全発作、75日以降で強直間代発作を示した。25日では、EI の ME 量が海馬と中隔野で、50日では、発作間歇期の EI (+) と EI (o) の ME 量が、中隔野と大脳皮質で ddY に比べて有意に減少した。150日では、EI (+) と EI (o) の ME 量が、中隔野と大脳皮質と線条体で有意に低下した。EI マウス脳の ME の低下は、これまでに報告したオピオイド δ レセプターの up-regulation に対応しており、内因性 ME の減少が EI マウスの発作の病因に密接に関与していることを示唆する。

てんかん研究 1991; 9: 169-172

Key Words: EI mouse, methionine enkephalin, HPLC/RIA analysis, epilepsy

(受付: 1991年1月29日, 訂正: 1991年4月9日, 受理: 1991年4月22日)

はじめに

神経ペプチドの一種であるオピオイドペプチドは、痙攣に関与することが知られているが、脳内オピオイド系が痙攣に対して興奮系か抑制系か一定の結論に達していない²⁾。

われわれは既に、遺伝てんかんモデルである EI マウスを用いて、脳のオピオイド δ レセプターが対照群の ddY マウスに比べて up-regulate することを報告した^{7,8)}。また、radioimmunoassay (RIA) でメチオニンエンケファリン 様免疫活性

(ME-LI) を測定し、EI マウス脳で ME-LI が減少することを報告した⁴⁾。

RIA は微量なペプチドを特異的に定量できる利点はあるが、組織抽出物中の目的とする活性ペプチド以外にも、その前駆体や代謝物や他のペプチドと cross-react する可能性がある^{1,5)}。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は、構造の類似したオピオイドペプチドを異なる保持時間で分離溶出できる利点がある。HPLC と RIA を組み合わせることにより、目的とする活性ペプチドを正確に定量できる³⁾。

* 大阪市立大学医学部神経精神医学教室

〒545 大阪市阿倍野区旭町 1-5-7]

Seiji Koide, Hiroshi Onishi, Masafumi Katayama, Sakae Yamagami, Yukio Kawakita

Department of Neuropsychiatry, Osaka City University Medical School

Fig. 1 Methionine enkephalin content (fmol/mg protein) in discrete brain regions of 25-day-old, 50-day-old and 150-day-old El (+), nonstimulated El (o) and ddY strain mice

The values represent the mean $\pm$ SEM for 3 independent determinations. Each trial was run in duplicate. The two-tailed Student's *t* test was for data from 25-day-old mice, and analysis of variance followed by Scheffe's multiple range test for data from 50- and 150-day-old mice.

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. ddY mice

今回は、前報⁴⁾の ME-LI で、ddY マウスと比べて差のみられた脳の 4 部位について、HPLC/RIA 法を用いて、交叉物を含まない生理活性ペプチドのメチオニンエンケファリン (ME) を定量した。

方 法

El マウスを、生後 28 日から週 1 回の割合で、40 回の放り上げ刺激を行った。生後 50 日頃より不全発作、生後 75 日頃より強直間代発作を示した。放り上げ刺激の有無で El (+) と El (o) に分

け、El (+) マウスは刺激 3 日後の発作間歇期に断頭した。4°C で脳を 4 部位に切り出し、1 M 酢酸中で 90°C、15 分間加熱し、氷冷後ホモジナイズして遠心した。上清の一部を凍結乾燥後 0.5% トリフルオロ酢酸 (TFA) に溶解し、Sep-Pak C₁₈ cartridge を用いて 50% アセトニトリル (CH₃CN): 50% 0.05% TFA で peptide-rich fraction を溶出した。逆相 HPLC カラム (Chemcosorb 7-ODS-H, 80-Å, ϕ 4.6 $\times$ 250 mm) を使用し、移動相には、0.05% TFA を用い CH₃CN 濃度 20~40% で 40 分間の直線勾配溶出を行った。ME の保持時間に相当する画分を回収し、凍結乾燥後 ME の RIA を行った。RIA は、前報に従った⁴⁾。対照群としては、El の母系の ddY マウスを用いた。蛋白定量は、Lowry 法に従った。統計学的処理は、*t* 検定、一元配置分散分析で行った。

結 果

El マウス脳の ME 量は、ddY マウスに比べて一般に低値を示した。El (+) と El (o) マウス脳の ME 量は、全部位で有意な差はみられなかった。25 日では海馬と中隔野で、El マウスの ME 量が、ddY マウスに比べて有意に低下した。50 日では、El (+) と El (o) の ME 量が、中隔野と大脳皮質で、ddY マウスに比べて有意に減少した。150 日では、El (+) と El (o) の ME 量が、中隔野、大脳皮質、線条体で、ddY マウスに比べて有意に低下した (Fig. 1)。前報の抽出方法に比較した今回の方法の Recovery Study の結果は、25.1 $\pm$ 6.1% であった。

考 察

Table 1 に、これまでのオピオイド δ レセプターの結合実験^{7,8)} および ME-LI の測定の結果⁴⁾ と、今回の成績をまとめて示した。 δ -receptor の上向きの矢印は、El マウス脳の δ レセプター密度が ddY マウスに対して増加することを意味し、ME-LI と ME の下向きの矢印は、El マウス脳の ME-LI と ME が ddY に比べて減少することを意味する。

前回の結果⁴⁾から、El マウス脳の ME-LI の減少が、オピオイド δ レセプターの up-regulation

Table 1 Results of opioid delta receptor (δ -receptor), methionine enkephalin-like immunoreactivity (ME-LI) and methionine enkephalin (ME) in the brain of ddY and E1 mice

	25-day-old			50-day-old			150-day-old		
	δ -receptor	ME-LI	ME	δ -receptor	ME-LI	ME	δ -receptor	ME-LI	ME
cerebral cortex	→	→	→	→	→	↓	↑	↓	↓
hippocampus	↑	↓	↓	↑	↓	→	↑	→	→
septal area	↑	→	↓	↑	↓	↓	↑	↓	↓
striatum	→	→	→	→	→	→	→	↓	↓

を生じることを示したが、25日の中隔野と150日の海馬と線条体においては、ME-LIと δ レセプターに対応がみられなかった。今回、対応しなかったのは、ME-LIの測定値には、ME以外にもME抗体がcross-reactするが δ レセプターに結合しない代謝物や前駆体などが含まれる可能性があり^{1,5)}、HPLC/RIA法⁸⁾で正確に生理活性ペプチドのMEを測定した。

前報のME-LIの測定値に比べて、今回測定したME量は、約10~20%を示している。この値とRecovery Studyの結果から、前報のME-LIは、20~60%の交叉物を含んでいたと考えられる。HPLC/RIA法により、この交叉物を除いた結果が、Fig. 1である。レセプターとの対応については、新たに対応のみられた部位、ME-LIの結果と変わらない部位、対応を失った部位があり、すべてをレセプターとの対応で説明することはできなかった (Table 1)。

放り上げ刺激前の25日のE1マウスの海馬と中隔野で、中隔野においては、さらに50日と150日でもMEが減少し、レセプター密度の増加と対応している。生後50日と150日の海馬については、ME量は三群間で差はなかったが、 δ レセプターはE1マウス脳でddYマウスに比べてup-regulateしている。これについては、小川⁶⁾が示唆したペプチドの慢性的放出低下状態に相当し、測定上のペプチドは減少していないが、レセプターはup-regulateし、ニューロンの機能自体は低下した状態と考える。したがって、放り上げ刺激前の生後25日から生じている海馬と中隔野の内因性MEの減少は、E1マウスの痙攣素因に関与すると考えられる。

大脳皮質については、E1マウス脳のME量の減少が、不全発作発現期の50日以降で生じているが、 δ レセプター密度の増加は、少し遅れて強直間代発作発現期の75日以降で生じている⁸⁾。また、E1(o)とE1(+)でME量に差がなかったことから、発作発現に伴う大脳皮質の内因性MEの低下は、痙攣の結果ではなく、痙攣発現の病因に関与すると考えられる。

これまでの成績から、E1マウス脳でのオピオイド δ レセプターのup-regulationは、内因性MEの減少から生じ、enkephalinergic neuronの機能低下が、E1マウスの発作の病因に密接に関与していると考えられる。

本論文の要旨は第23回日本てんかん学会(平成元年10月)、ならびに第33回日本神経化学会(平成2年10月)において発表した。

文 献

- Desiderio, D.M. (1984) Analytical measurements of endogenous peptides. In: Analysis of Neuropeptides by Liquid Chromatography and Mass Spectrometry (Desiderio, D.M. ed.), 75-113, Elsevier, Amsterdam.
- Frenk, H. (1983) Pro- and anticonvulsant actions of morphine and the endogenous opioids: Involvement interactions of multiple opiate and non-opiate systems. Brain Res Rev 6, 197-210.
- Hong, J.-S., Yoshikawa, K., Hendren, R.W. (1983) Measurement of β -endorphin and enkephalins in biological tissues and fluids. In: Methods in Enzymology (Conn, P.M. ed.), vol. 103, 547-564, Academic Press, New York.
- 小出誠司, 大西 博, 山上 栄, 川北幸男(1991) 発育に伴う E1 マウス脳のメチオニンエンケファ

- リン様免疫活性の変化. てんかん研究 9, 48-53.
- 5) Loeber, J.G., Verhoef, J. (1981) High-pressure liquid chromatography and radioimmunoassay for the specific and quantitative determination of endorphins and related peptides. In: Methods in Enzymology (Langone, J.J. eds.), vol. 73, 261-275, Academic Press, New York.
 - 6) 小川紀雄 (1989) 脳ホルモン受容体. 神経進歩 33, 91-99.
 - 7) Onishi, H., Soma, T., Yamagami, S., Kawakita, Y. (1989) Alteration of opioid receptors in seizure-susceptible El mouse brain. Neurochem Res 14, 31-35.
 - 8) Soma, T., Onishi, H., Koide, S., Yamagami, S., Kawakita, Y. (1989) Opioid delta receptor alteration in the brain of seizure-susceptible El mouse. In: Bioinformatics (Hatase, O., Wang, J.H. eds.), 343-346, Elsevier, Amsterdam.

Summary

HPLC/RIA Analysis of Biologically Active Peptide, Methionine Enkephalin, in the Brain of Seizure-Susceptible El Mouse

Seiji Koide, Hiroshi Onishi, Masafumi Katayama,
Sakae Yamagami, Yukio Kawakita

Biologically active peptide, methionine enkephalin (ME) except cross-reactive substances from methionine enkephalin-like immunoreactivity, was quantified by a technique of high performance liquid chromatography coupled with radioimmunoassay in the brain of El mice (seizure-susceptible strain) to elucidate the relation between seizures and the opioid system. The El mice were divided into El (+) and El (o) depending on whether stimulated or not. The El (+) mice were tossed-up from 28 days after birth, first exhibited abortive seizures at 50 days of age and developed generalized convulsions after 75 days. The ME content in 25-day-old El mice was significantly decreased in the hippocampus and septal area, as compared with the corresponding regions in ddY mice (seizure-nonsusceptible strain; the mother strain of El). This content in both 50-day-old El (+) and El (o) mice was significantly reduced in the septal area and cerebral cortex. It was further shown that the ME content in both 150-day-old El (+) during interictal periods and El (o) mice was markedly decreased in the septal area, cerebral cortex and striatum. The decrease of ME in the El mouse brain was generally compatible with our previous studies concerning the up-regulation of opioid delta receptors in this species. These results suggest that the reduction of endogenous ME could be involved in the pathogenesis of seizures in the El mouse.

J. Jpn. Epil. Soc. 1991 ; 9 : 169-172

(received: January 29, 1991, revised: April 9, 1991, accepted: April 22, 1991)