



Title	心臓におけるオピオイドペプチドの分布とその生理的意義に関する研究
Author(s)	前田, 定秋
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/36596
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

心臓におけるオピオイドペプチドの 分布とその生理的意義に関する研究

前 田 定 秋

目 次

緒 言	-----	1
本 論	-----	2
第一章 心臓におけるエンケファリン含有神経の分布	-----	2
第一節 エンケファリン含有細胞および神経線維の分布	-----	3
第二節 エンケファリン含有細胞とサブスタンスPおよび VIP含有神経との関連	-----	9
第三節 エンケファリン含有細胞とカテコールアミン 含有神経との関連	-----	10
第四節 考察と小括	-----	13
第二章 摘出心房標本に対するオピオイド類の作用	-----	15
第一節 右心房の自動収縮に対する作用	-----	15
第二節 左心房の経壁電気刺激による収縮に対する作用	-----	19
第三節 考察と小括	-----	21
第三章 心筋Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase活性に対するオピオイド類の作用	-----	23
第一節 心筋Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase活性に対する作用	-----	23
第二節 Na ⁺ ,K ⁺ -ATPaseの阻害の組織および種特異性	-----	30
第三節 考察と小括	-----	33
第四章 総 括 と 結 論	-----	35
謝 辞	-----	38
引 用 文 献	-----	39

緒　　言

麻薬性鎮痛薬であるモルヒネに対する特異的な受容体（オピエート受容体）が哺乳類の脳内に存在することが1971年に Goldstein らにより明らかにされ¹⁾、さらに1975年 Hughes らによりブタ脳から二種類のペプチド、methionine-enkephalin (Met-Enk) および leucine-enkephalin (Leu-Enk) が単離され、これらが内因性モルヒネ様ペプチド（オピオイドペプチド）であることが明らかにされた²⁾。それ以後、 β -endorphin, dynorphin 等の種々のオピオイドペプチドが脳および下垂体より発見され³⁾⁻⁷⁾、それらペプチドの生体内での分布、生理的役割および薬理作用について数多くの研究がなされてきた。一方、心循環系に対するオピオイド類の作用は主として脳幹部のオピエート受容体を介する中枢作用と考えられてきた⁸⁾⁻¹⁰⁾。最近、心臓に Met-Enk、dynorphin を始めとする数種のオピオイドペプチドが存在することが bioassay および radioimmunoassay により明らかにされ¹¹⁾⁻¹³⁾、これらペプチドが心臓に対して直接作用を有している可能性が示唆されている。しかしながらオピオイドペプチドの心臓における分布についての詳細な組織化学的研究はなく、また、心臓に対するオピオイド類の直接作用についての薬理学的、生化学的研究も数少ない。

本研究では、オピオイドペプチドの心臓における生理的意義を追求する目的で、Met-Enk および Leu-Enk の心臓での分布とその存在形態について免疫組織化学的手法を用いて調べ、また摘出心房標本の収縮に対する種々のオピオイド類の作用について検討し、さらに、その作用機序を明らかにするため心筋の Na^+, K^+ -ATPase 活性に対する作用について検討した。

本 論

第一章 心臓におけるエンケファリン 含有神経の分布

オピオイドペプチドである Met-Enk と Leu-Enk は、中枢および末梢神經系に分布することが知られており^{3), 14)}、一次知覚神経の伝達物質と考えられている substance P (SP) の神経末端からの遊離を抑制すること¹⁵⁾、またマウス輪精管においてノルアドレナリン遊離の阻害により収縮を抑制すること¹⁶⁾など種々の薬理作用を有していることが報告されている。最近、これらのオピオイドペプチドが心臓に存在することが生化学的実験により明らかにされ¹¹⁾⁻¹³⁾、また、オピエート受容体の存在についても示唆されている^{17), 18)}。しかしながら心臓における Enk の存在形態および分布についての詳細な報告はない。本章では心臓における Met-Enk および Leu-Enk の詳細な分布について免疫組織化学的手法を用いて検討し、さらに心臓に存在することが知られている SP^{19), 20)} および血管拡張性小腸ペプチド (vasoactive intestinal polypeptide, VIP)^{21), 22)} を含有する神経線維との関連についても調べた。また、副腎や上頸神経節において Enk とカテコールアミンが同一細胞内に共存することが報告されている^{23), 24)}ことより、心臓における両物質の共存について検討するためカテコールアミンの分布についても調べた。

第一節 エンケファリン含有細胞および神経線維の分布

実験方法

実験動物として幼若ネコ（体重2.5-3.0kg）を用いた。動物をネンブタール麻酔下にて腹部大動脈より生理食塩水を注入することにより血液を流し出し、続いて氷冷 Zamboni 液²⁵⁾（2% パラホルムアルデヒド、0.2% ピクリン酸を含む pH 7.4 のリン酸緩衝液）で灌流固定を行った。心臓を摘出し左右の心室、心室中隔、左右の心房、大動脈、肺動脈等の各部位に分離した後、さらに同固定液に4°Cにて12時間浸漬固定を行った。その後、各試料を 20mM リン酸緩衝液（pH 7.4）を含む生理食塩水（Phosphate-buffered saline, PBS）で洗浄し、さらに 30% 蔗糖を含む PBS に4°Cにて24時間浸漬した。次に各試料を小さいブロックに分割し、液体窒素で冷却したイソペンタンを含む液体プロパンにより凍結後、クリオスタットにて 20-30 μm の厚さの凍結切片を作成し、卵白アルブミンを塗布した無蛍光スライドガラスに貼りつけ Coons らの方法²⁶⁾に従って間接蛍光抗体法を行った。一次抗体として家兔より作成した Met-Enk および Leu-Enk の抗血清を、また二次抗体として fluorescein-isothiocyanate (FITC) により標識された抗家兔イムノグロブリン山羊血清を用いた。各標本は落射型蛍光顕微鏡にて観察し写真撮影した後、ヘマトキシリニーエオジン染色して組織の確認を行った。

実験結果

ネコ心臓において Met-Enk あるいは Leu-Enk を含有する神経線維が観察され、両者とも心房において数多くみられ、心室ではほとんど認められ

なかつた。これらの Enk 含有神経線維は、心房の冠状静脈洞の近傍に存在する副交感神経節細胞の周囲に特に多く観察された (Fig. 1)。また、洞房結節近傍の筋組織においても Enk 含有神経線維が認められ、心筋中に侵入しているものもみられた (Fig. 2)。数は少ないが心房の冠血管周囲においても Enk 含有神経線維が観察された (Fig. 3)。

Met-Enk あるいは Leu-Enk を含む細胞が心房において豊富に観察された。しかしながら心耳および心室ではほとんど認められなかつた。隣接切片での実験により Met-Enk 含有細胞と Leu-Enk 含有細胞がまったく同様の分布および存在形態であることが示された。これらの Enk を含有する細胞の直径は $10\text{-}15 \mu\text{m}$ であり、単独あるいは集団を形成して存在し、長い突起 ($20\text{-}100 \mu\text{m}$) を有するものも認められた (Fig. 4)。洞房結節近傍に存在する副交感神経節に近接して Enk 含有細胞の集団が数多くみられ、一部のものはその突起を神経節の中に伸ばしていた (Fig. 5)。また、洞房結節周辺の筋組織中にも Enk 含有細胞がみられ、太く長い突起を心筋に沿って伸ばしているものも観察された (Fig. 6)。大動脈開口部と肺動脈開口部の間の結合組織中に分布する細い冠血管の周囲に数多くの Enk 含有細胞が認められ、一部の細胞はその突起を血管外膜にまで伸ばしているのが観察された (Fig. 7)。また、冠状静脈洞、洞房結節および下大静脈開口部周辺の神経束中にも比較的多くの Enk 含有細胞がみられ、一部の細胞はその突起を他の Enk 含有細胞に長く伸ばしていた (Fig. 8)。心房における Enk 含有細胞の分布について模式的に Fig. 9 に示した。

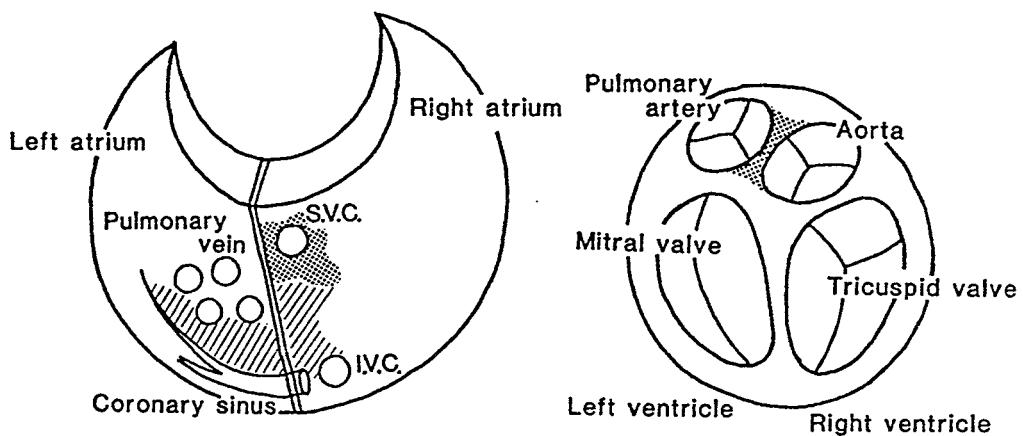


Fig. 9. Schematic representation of the distribution of Enk immunoreactive cells in feline heart. Dotted area represents heavily stained region, and striped area represents moderately stained region. (S.V.C ; Superior vena cava, I.V.C.; Inferior vena cava)

Legends

Fig. 1. Immunofluorescence micrograph of the coronary sinus region. Several varicose Met-Enk immunoreactive nerve fibers (arrows) are observed around some non-immunoreactive ganglionic cells. Bar indicates 50 μ m.

Fig. 2. Immunofluorescence micrograph near the sino-atrial node. Met-Enk immunoreactive nerve fibers (arrows) with varicosities are localized in the myocardium, penetrating into the musculature. Bar indicates 50 μ m.

Fig. 3. Immunofluorescence micrograph near the sino-atrial node. Leu-Enk immunoreactive nerve fiber is observed running along the coronary blood vessels. Bar indicates 50 μ m.

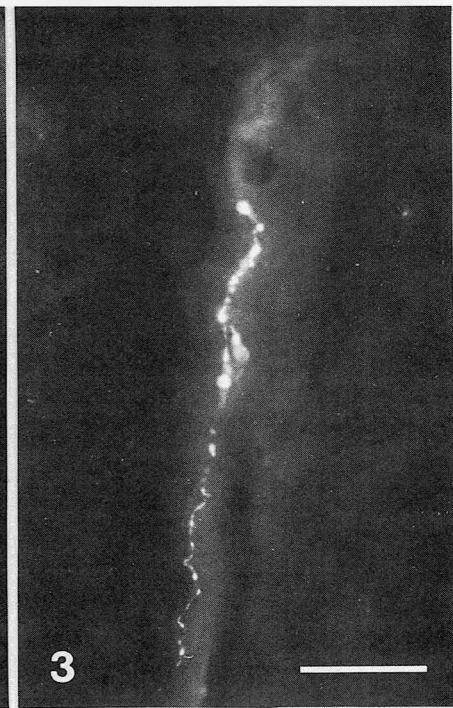
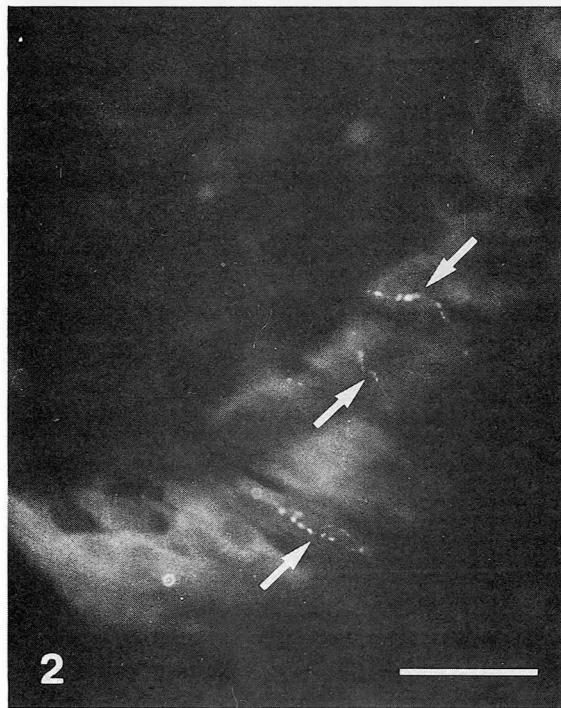
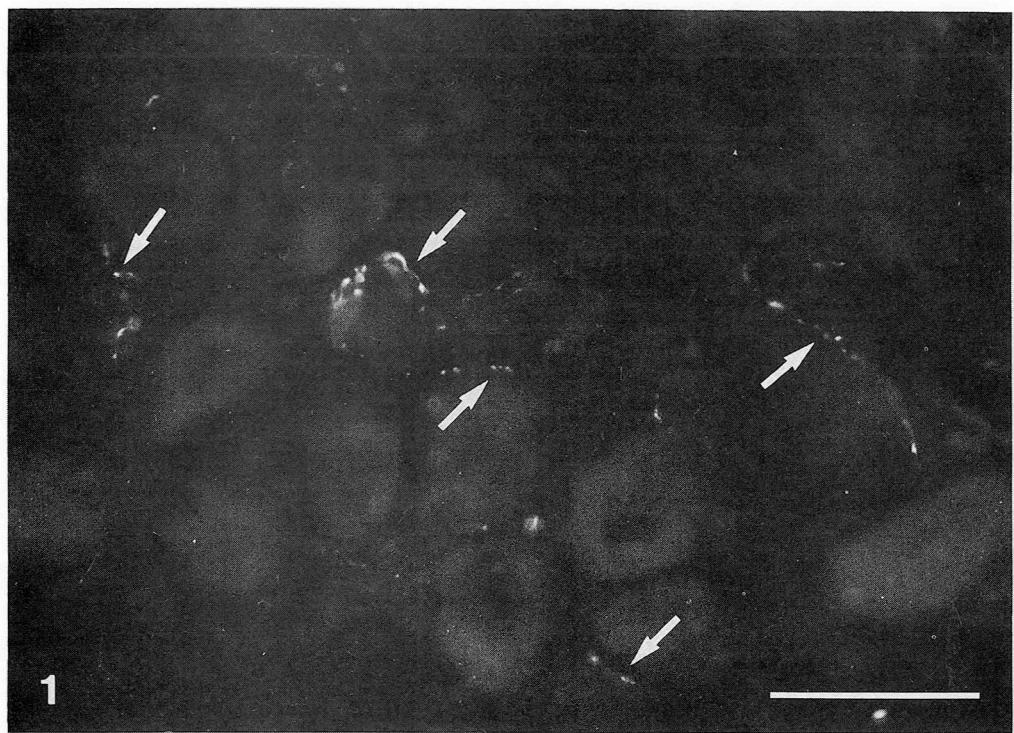
Fig. 4. Immunofluorescence micrograph between the aorta and pulmonary artery. Met-Enk immunoreactive cell clusters and single cells are present in the connective tissue. Bar indicates 50 μ m.

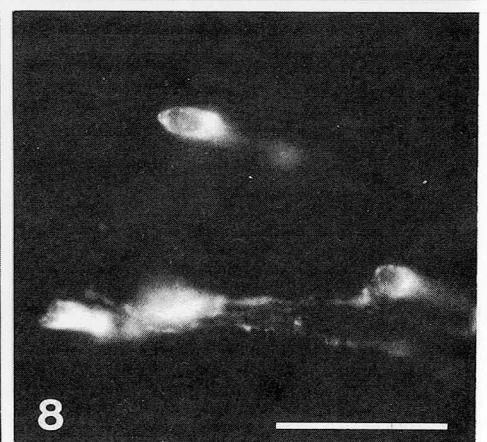
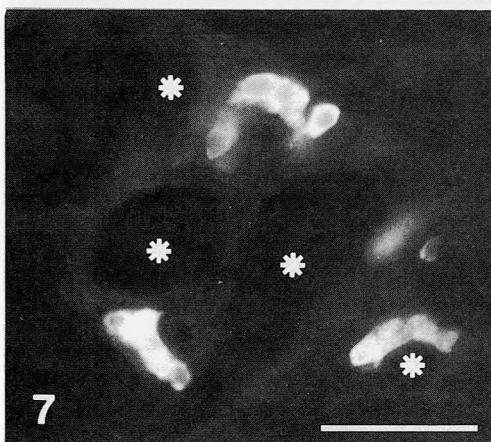
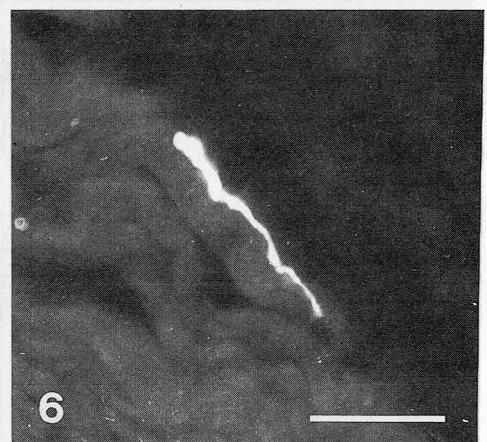
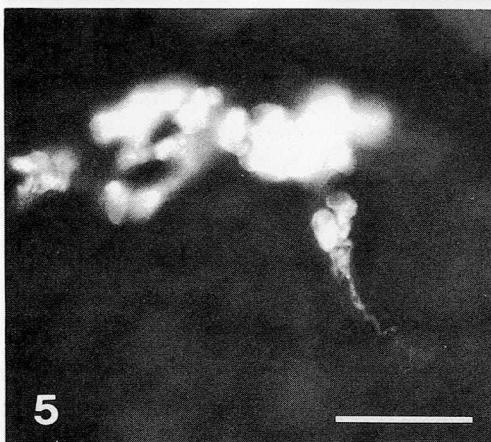
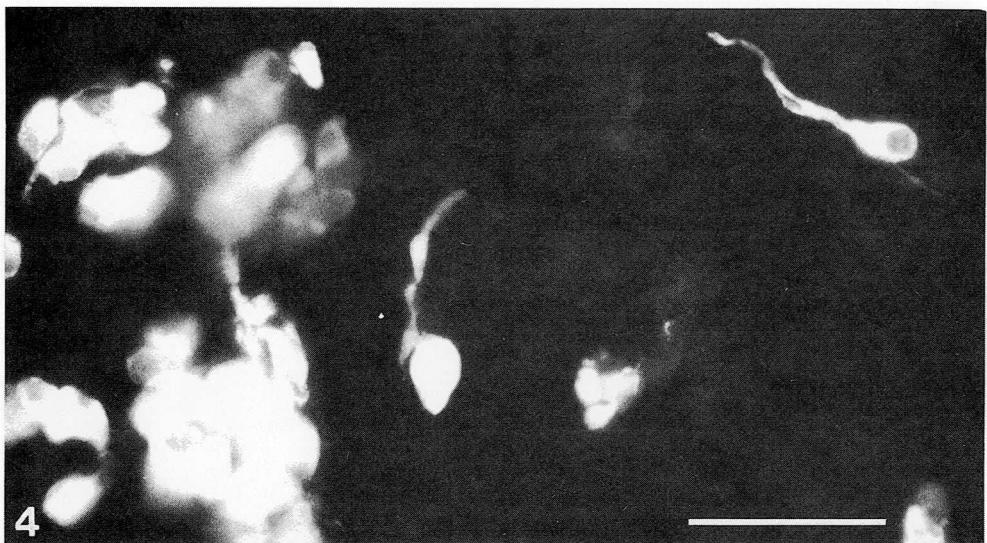
Fig. 5. Immunofluorescence micrograph near the sino-atrial node. Met-Enk immunoreactive cell cluster is observed to be closely contact with ganglion, and the single cells extend their processes in the ganglion. Bar indicates 50 μ m.

Fig. 6. Immunofluorescence micrograph near the sino-atrial node. Leu-Enk immunoreactive cell with long process is observed along the myocardium. Bar indicates 50 μ m.

Fig. 7. Immunofluorescence micrograph between the aorta and pulmonary artery. Several Leu-Enk immunoreactive cells are located around small blood vessels (asterisks). Bar indicates 50 μ m.

Fig. 8. Immunofluorescence micrograph near the sino-atrial node. Met-Enk immunoreactive cells extend their processes toward other Met-Enk immunoreactive cells. Arrow indicates the cell process terminated near other immunoreactive cell. Bar indicates 50 μ m.





第二節 エンケファリン含有細胞とサブスタンスPおよびVIP含有神経との関連

実験方法

前節と同様の方法でネコ心臓より凍結切片を作成し、SP と VIP について間接蛍光抗体法により免疫染色を行った。また、同一切片においてMet-Enk と SP の二重免疫染色を、その隣接切片で VIP の免疫染色を行った。二重染色では一次抗体として抗 SP モノクロナール抗体と抗 Met-Enk 家兎血清の混合液を、二次抗体として FITC 標識抗家兎イムノグロブリン山羊血清と rohdamine-isothiocyanate (RITC) 標識抗ラットイムノグロブリン山羊血清の混合液を用いた。VIP の染色には一次抗体として家兎で作成した抗 VIP 血清を用いた。

実験結果

SP あるいは VIP を含む神経線維が心房、心室ともに多数観察された。心房に分布する SP あるいは VIP 含有神経線維のうち一部のものは Enk 含有細胞に近接して分布していた。Figs. 10,11 に同一切片での Met-Enk と SP の二重染色の結果を示した。Enk 含有細胞の集団の中に SP 含有神経線維が分布しているのが観察された。この切片に隣接した切片においてVIP の染色を行うと (Fig. 12) 、Enk 含有細胞の集団の中に非常に多くの VIP 含有神経線維が分布しているのが観察された。個々の Enk 含有細胞について観察すると、SP あるいは VIP を含有する神経線維が Enk 含有細胞に近接して存在し、その周囲を取り囲んでいた (Figs. 13-15) 。

第三節 エンケファリン含有細胞とカテコールアミン含有神経との関連

心臓にカテコールアミン含有神経線維が分布することはよく知られており、また、カテコールアミンを含む小型の細胞 (small intensely fluorescent cell, SIF cell) の存在についても報告されている²⁷⁾⁻²⁹⁾。一方、副腎や上頸神経節において Enk とカテコールアミンが同一細胞に共存することが報告され^{23), 24)}、両者の機能的関連が示唆されている。本節では、カテコールアミンの心臓における分布についてグリオキシル酸法³⁰⁾を用いて調べ、Enk 含有細胞の分布との関連について検討した。

実験方法

幼若ネコを屠殺後、速やかに心臓を摘出し、4% パラホルムアルデヒド、0.5% グルタルアルデヒド、0.2% ピクリン酸、2% グリオキシル酸、15% 蔗糖を含む 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に4°Cで2時間浸漬した。その後、心臓を小さいブロックに分割して凍結、クリオスタッフにて20-30 μm の凍結切片を作成し、卵白アルブミンを塗布した無蛍光スライドガラスに貼りつけた。これを 4% パラホルムアルデヒド、2% グリオキシル酸、15% 蔗糖を含む 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に4°Cにて1時間浸漬した後、60°Cで30分間加温、キシリレン封入して落射型蛍光顕微鏡にて観察した。

実験結果

カテコールアミン蛍光を持った神経線維が心房、心室共に多数認められ、特に血管周囲および心筋中に数多く観察された。また、カテコールアミン蛍光を持つ細胞が心房において多数みられ、その直径は10-15 μmであり、

長い突起を有するものもみられた。これらの細胞は、特に洞房結節周辺、大動脈開口部と肺動脈開口部の間の副交感神経節周囲や冠血管周囲に数多く観察された(Figs. 16,17)。

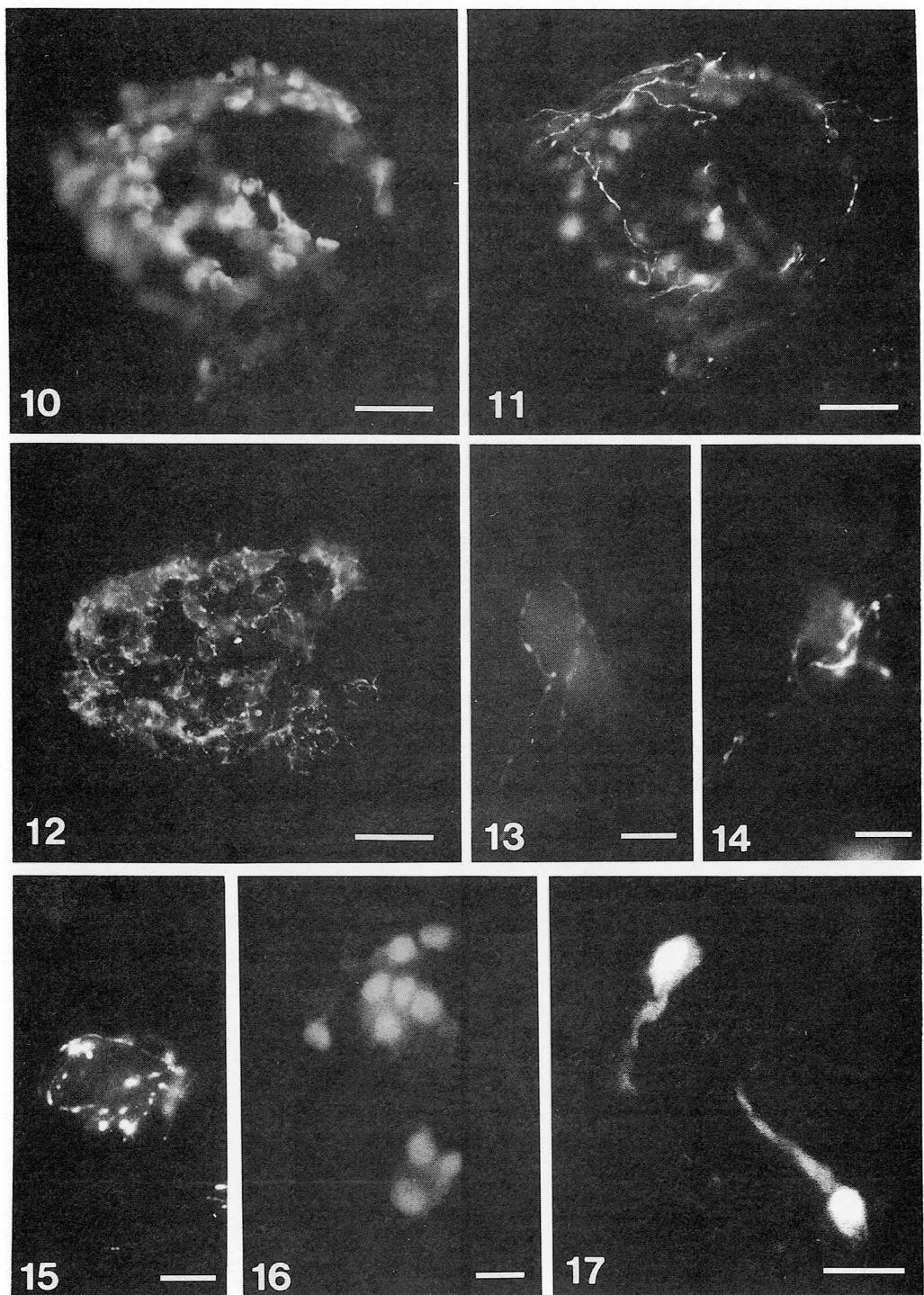
Legends

Figs. 10,11. Immunofluorescence micrographs near the sino-atrial node. Double immunostaining of Met-Enk (Fig.10) and substance P (Fig.11). Many Enk immunoreactive cells are observed in clusters (Fig.10) and several substance P immunoreactive nerve fibers are localized around Enk immunoreactive cells (Fig. 11). Bars indicate 50 μm .

Fig. 12. Immunofluorescence micrograph near the sino-atrial node, adjacent section of Figs.10,11. Many VIP immunoreactive nerve fibers form dense network over Met-Enk immunoreactive cells. Bar indicates 50 μm .

Figs. 13-15. Immunofluorescence micrographs near sino-atrial node (Fig.13) and between the aorta and pulmonary artery (Figs.14,15). Substance P immunoreactive nerve fibers with varicosities (Figs.13,14) and varicose VIP immunoreactive nerve fibers (Fig.15) are observed around Enk immunoreactive cells. Bars indicate 10 μm .

Figs.16,17. Histofluorescence micrographs between the aorta and pulmonary artery. Catecholamine-containing cell clusters (Fig.16) and single cells with processes (Fig.17) are present in the connective tissue. Bars indicate 20 μm .



第四節 考察と小括

心臓の支配神経である迷走神経および上頸神経節細胞の一部が Enk を含有していることが報告されており^{24), 31)}、また、著者もネコの迷走神経内に Enk 含有神経が存在することを確認している。これらのことより、本実験で観察された心臓の Enk 含有神経線維の由来は外来性であることが考えられるが、心臓に分布する Enk 含有細胞が長い突起を有していたことから Enk 含有神経線維の一部のものはこの細胞が由来と考えられる。

心臓における Enk 含有細胞の形態的特徴および分布は、カテコールアミン蛍光を有する細胞のそれと非常によく類似していた。心臓にカテコールアミンを含有する SIF cell が存在することが報告されており^{27) - 29)}、本実験で観察された Enk 含有細胞は SIF cell であると考えられる。Enk を含有する SIF cell の存在については、モルモットの上頸神経節³²⁾、ネコの腹腔神経節³³⁾、ヒト胎児の交感神経節³⁴⁾において報告されている。

SIF cell の機能に関しては現在のところ十分には明らかにされていないが、神経節内の介在神経、内分泌細胞、あるいは化学受容器としての役割を果たしていることが示唆されている^{34) - 36)}。本実験での Enk 含有細胞についての組織化学的所見を模式的に Fig. 18 に示したが、Met-Enk および Leu-Enk を含有する細胞は、その突起を他の Enk 含有細胞、副交感神経節細胞、血管、心筋に伸ばしていた。これらの結果より心臓の Enk は直接的に、あるいはカテコールアミンの作用を介して心機能および冠循環を調節していることが示唆された。また、SP あるいは VIP を含有する神経線維が Enk 含有細胞の周囲に密に分布していたことより、Enk の作用がこれらペプチドにより調節を受けている可能性が示唆された。SP が冠循環を調節

していること³⁷⁾や、VIP が心筋の収縮力を増強すること³⁸⁾が報告されており、これらペプチドの作用に Enk が関与している可能性も考えられた。

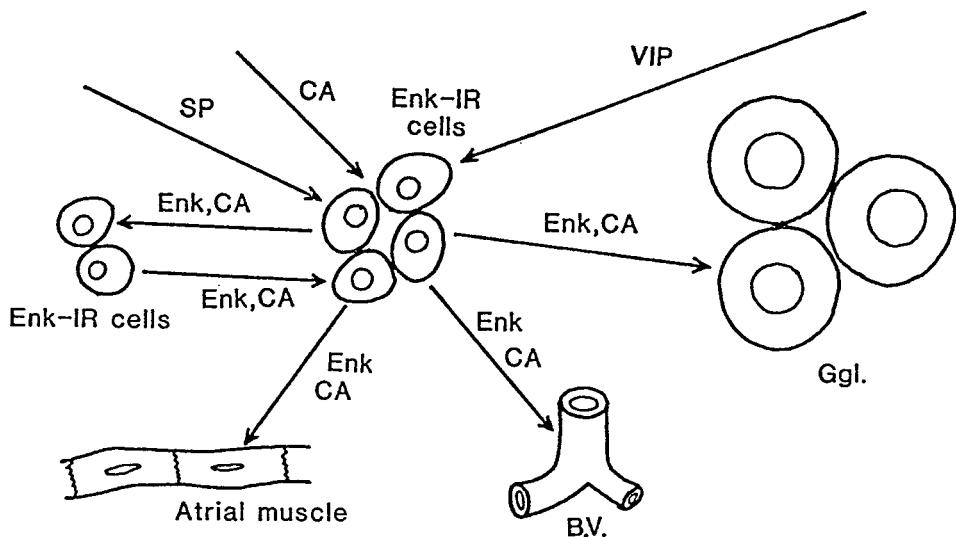


Fig. 18. Schematic representation of relationships between Enk immunoreactive cells and parasympathetic ganglion (Ggl.), blood vessels (B.V.) and atrial muscle cells. (CA; catecholamine)

小 括

- 1) Met-Enk、Leu-Enk 含有細胞および神経線維が心房、特に洞房結節周辺、大動脈開口部と肺動脈開口部の間、冠状静脈洞および下大静脈開口部周辺に多数存在することが明らかになった。また、Enk 含有細胞には長い突起を有するものがあり、その突起を副交感神経節、血管、心筋に伸ばしていた。
- 2) Enk 含有細胞は、カテコールアミンを含有する SIF cell であることが示され、また、その周囲には SP および VIP 含有神経線維が密に分布していた。

第二章 摘出心房標本に対する オピオイド類の作用

オピオイド類の心循環系に対する作用は主として中枢神経系を介するものと考えられており⁸⁾⁻¹⁰⁾、オピオイド類の側脳室あるいは大槽内投与により血圧あるいは心拍数に変化が生じることが報告されているが³⁹⁾⁻⁴¹⁾、その変化は実験動物の種^{42), 43)}、オピオイドの種類⁴⁴⁾、麻酔薬投与の有無^{39), 45)}などにより大きく異なっている。一方、心臓に Enk や dynorphin を初めとするオピオイドペプチドが存在することが生化学的実験により示され¹¹⁾⁻¹³⁾、また、前章において Enk 含有細胞および神経線維が心房に多数分布し、副交感神経節や心筋と密接に関係していたことより心臓の収縮に対してオピオイド類が直接影響を与える可能性が考えられる。そこで本章ではラットの摘出心房標本を用いて、その収縮と心拍数に対する種々のオピオイド類の作用について検討した。

第一節 右心房の自動収縮に対する作用

オピエート受容体には μ , δ , κ の三つのサブタイプが存在し、それら受容体への結合の親和性の違いによりオピオイド類も三種類に分類されている^{46), 47)}。 μ -タイプとしてモルヒネ、 δ -タイプとして Met-Enk および Leu-Enk、 κ -タイプとして ethylketocyclazocine(EKC) および dynorphin (1-13)を用いて、右心房の自動収縮に対する作用について検討した。

実験方法

雄性 Sprague-Dawley (SD) 系ラット（体重250-300g）を屠殺後、心臓を摘出し95%O₂-5%CO₂で飽和した Krebs-Henseleit (KH) 液中で心房部分を切り離し、さらに右心房と左心房に分離した。KH液の組成は、118mM NaCl, 4.8mM KCl, 27mM NaHCO₃, 1mM KH₂PO₄, 1.2mM CaCl₂, 1.2mM MgCl₂ 11.1mM glucose とした。Fig. 19 に示したように恒温槽中の KH液を満たしたマグヌス管内に 1g の張力で右心房を懸垂し、その自動収縮をトランスペューサー、ポリグラフを介して記録した。標本を60分間 KH液中に放置し、その収縮が一定に達した後に各薬物を適用した。

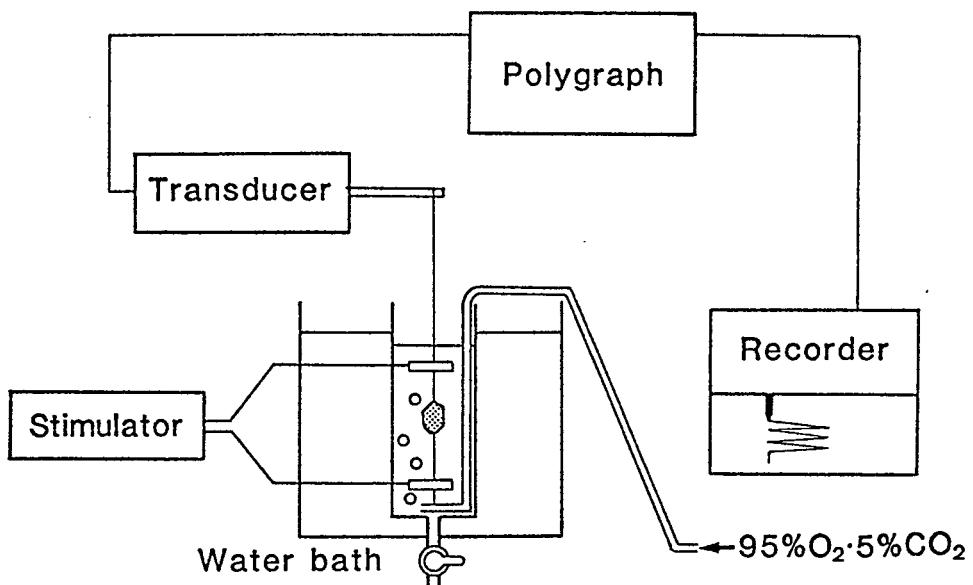


Fig. 19. Arrangement of apparatus for measuring the contraction of isolated rat atrium.

実験結果

右心房の自動収縮に対して μ -タイプのモルヒネ、 δ -タイプの Met-Enk および Leu-Enkは、100 μ Mの濃度を用いてもまったく影響を与えたなかった。

しかしながら、 κ -タイプの EKC は Fig. 20 に示したように時間経過に従って著明な収縮力の増強（陽性変力作用）と、同時に心拍数の減少（陰性変時作用）をひきおこした。また、 κ -タイプの dynorphin(1-13) も同様に陽性変力作用を示したが EKC と比べてその作用は小さかった（30 μM で約10%）。EKC の陽性変力作用は 10 μM 以上の濃度で顕著となり、50 μM

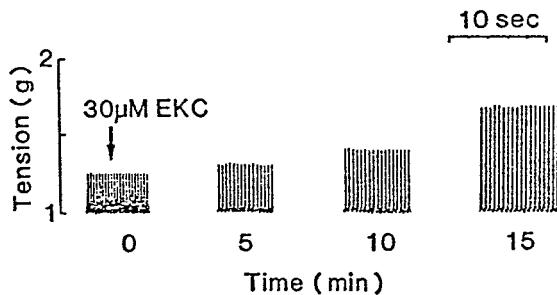


Fig. 20. Inotropic effect of ethylketocyclazocine (EKC) on spontaneously beating right atrium of rat heart. After equilibration, the atria were exposed to 30 μM EKC at time zero. Typical tracings from several experiments.

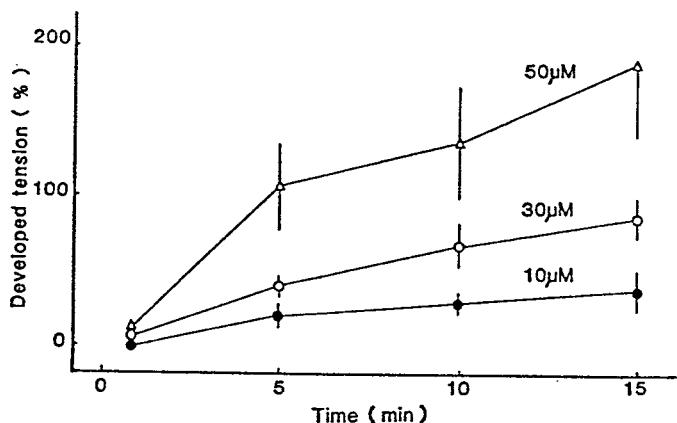


Fig. 21. Inotropic effect of EKC on spontaneously beating right atrium of rat heart. After equilibration, EKC was added to the medium to yield indicated final concentrations at time zero. Each point represents the mean of four separate experiments. Vertical lines indicate S.E.

まで用量依存性が認められた (Fig. 21)。また、EKC の陰性変時作用についても $10 \mu\text{M}$ から $50 \mu\text{M}$ の濃度で用量依存性が認められた (Fig. 22)。

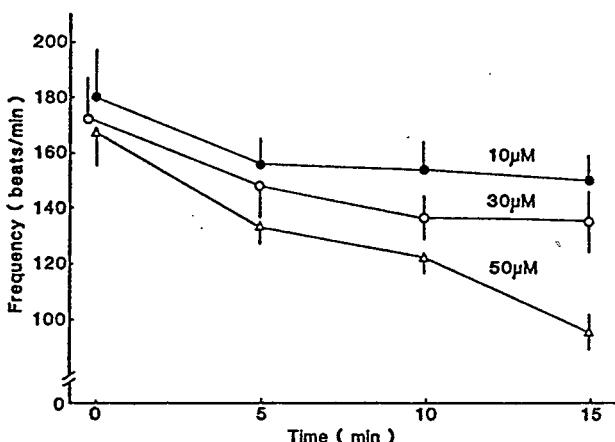


Fig. 22. Chronotropic effect of EKC on spontaneously beating right atrium of rat heart. After equilibration, EKC was added to the medium to yield indicated final concentrations at time zero. Each point represents the mean of five separate experiments. Vertical lines indicate S.E.

EKC の陰性変時作用に対するオピオイド拮抗薬のナロキソン、および抗コリン薬のアトロピンの影響を調べるために EKC の投与 30 分前に各薬物を適用した (Fig. 23)。 $100 \mu\text{M}$ のナロキソン単独により心拍数の減少 (約 30%) がみられたが、両薬物ともに EKC の作用にはまったく影響を示さなかった。

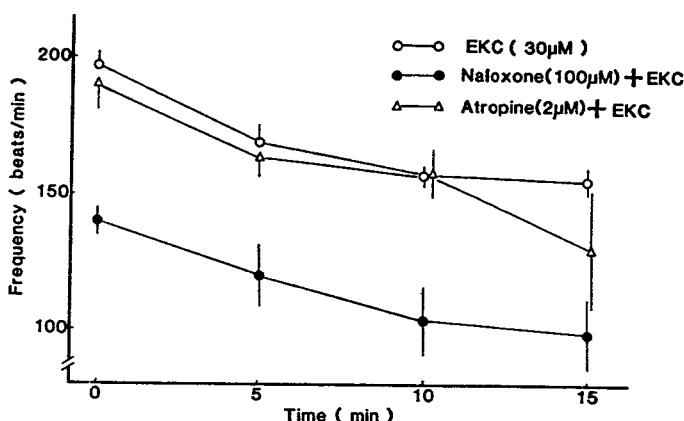


Fig. 23. Effect of naloxone or atropine on the negative chronotropic effects of EKC. Right atria were equilibrated for 60 min. Subsequently, an indicated concentration of naloxone or atropine was added to the medium. EKC (30 μ M) was added 30 min later at time zero. Each point represents the mean of four experiments. Vertical lines indicate S.E.

第二節 左心房の収縮に対する作用

ラットにおいて心拍数の減少が収縮力の増強を誘発することが報告されている^{48), 49)}ので、前節の右心房において認められた κ -タイプのオピオイドによる陽性変力作用が心拍数の減少による二次的なものか否かを検討するため左心房の経壁電気刺激により誘発される収縮に対する作用について検討した。

実験方法

第一節と同様の方法により作成したラットの左心房を KH液中に懸垂し、白金双極電極により1.5Hz, 4msec duration の矩形波にて経壁電気刺激を行った (Fig. 19 参照)。

実験結果

EKC は、30-100 μM の濃度において用量依存的に収縮力の増強をひきおこした (Fig. 24)。また、EKC と同様に κ -タイプのオピオイドである dynorphin(1-13) も用量依存的に収縮力の増強をひきおこした (Fig. 25)。他のタイプのモルヒネ、Met-Enk、Leu-Enk は収縮にまったく影響を与えたかった。 κ -タイプのオピオイドによる陽性変力作用は、 β 遮断薬のプロプロラノロール (5 μM)、 Ca^{2+} の細胞内流入を阻害するベラパミール (0.1 μM)、ジルチアゼム (1 μM)、およびオピオイド拮抗薬のナロキソン (100 μM) によりまったく影響を受けなかった。

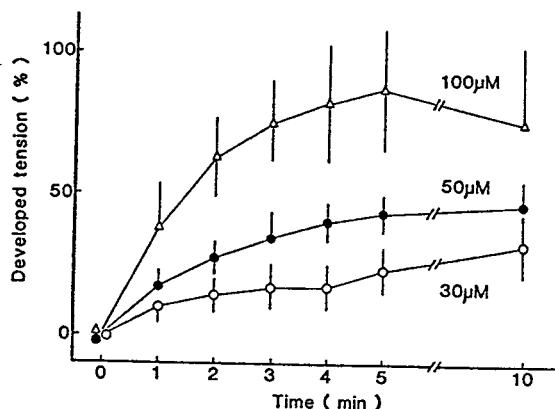


Fig. 24. Inotropic effect of EKC on electrically stimulated left atrium of rat heart. Left atria were electrically stimulated at 1.5 Hz. After equilibration, EKC was added to the medium to yield indicated final concentrations at time zero. Each point represents the mean of four to eight separate experiments. Vertical lines indicate S.E.

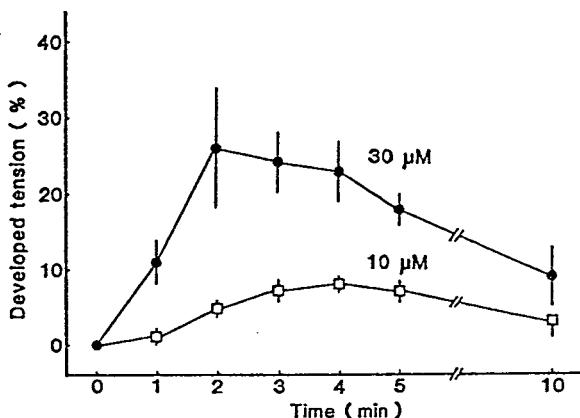


Fig. 25. Inotropic effect of dynorphin(1-13) on electrical-ly stimulated left atrium of rat heart. After equilibration, dynorphin(1-13) was added to the medium to yield indicated final concentrations at time zero. Each point represents the mean of five separate experiments. Vertical lines indicate S.E.

第三節 考察と小括

ラットの摘出心房標本の収縮に対して μ および δ -タイプのオピオイドは何ら影響を示さなかった。Saunders ら⁵⁰⁾も種々の δ -タイプのオピオイドを用いてラット摘出心房の収縮に対する作用を検討し、まったく影響を与えないことを報告している。一方、 κ -タイプのオピオイドである EKC が陰性変時作用を示したが、この作用はアトロビン、ナロキソンにより拮抗されなかつたことよりムスカリニック受容体あるいはオピエート受容体の関与は少ないものと考えられた。100 μ Mのナロキソン単独により心拍数の低下がみられたが、低濃度(1-10 μ M)では変化がなかつたことよりオピエート受容体を介するものではなく、ナロキソンの非特異的な作用と考えられる。右心房の自動収縮に対してみられた κ -タイプのオピオイドによる陽性変力作用は、左心房の経壁電気刺激により誘発された収縮に対してもみ

られたことより、EKC および dynorphin(1-13) による収縮力の増強は、心拍数の減少により生じた二次的なものではないことが示され、これらオピオイドが陽性変力作用を有することが明らかとなった。Laurent らは EKC および dynorphin(1-13) のラット大槽内投与により血圧の低下がひきおこされるが、静脈内投与では血圧に著明な変化はみられなかつたと報告している⁵¹⁾。彼らの報告と本章での結果を考えあわせると、EKC あるいは dynorphin(1-13) を静脈内に投与した場合には中枢神経系を介する降圧作用と心臓への直接作用による昇圧作用とが現れ、その結果、血圧に著明な変化がおこらない可能性も考えられる。EKC および dynorphin(1-13) の陽性変力作用は、 β 遮断薬あるいは Ca^{2+} -channel 遮断薬により影響を受けなかつたことよりアドレナリン系あるいは Ca^{2+} -channel との関与は少ないことが示唆された。

小 括

ラットの摘出心房標本の収縮に対して κ -タイプのオピオイドである EKC が著明な陰性変時作用と陽性変力作用を有すること、また dynorphin(1-13) が陽性変力作用を有していることを見いたした。他のタイプ（ μ および δ ）のオピオイドには、これらの作用はまったく認められなかつた。

第三章 心筋 Na^+, K^+ -ATPase 活性に対するオピオイド類の作用

心筋 Na^+, K^+ -ATPase 活性の変化は、心筋の収縮に大きく影響を与えることが知られており、その活性の抑制はウババインの強心作用の主たる作用機序と考えられている^{52), 53)}。一方、オピオイド類と Na^+, K^+ -ATPase との関連については、モルヒネの投与により脳の Na^+, K^+ -ATPase 活性は増加するが、*in vitro* の系ではモルヒネあるいは Met-Enk はまったく影響を与えないことが報告されている^{54) - 56)}。しかしながら心筋 Na^+, K^+ -ATPase に対するオピオイド類の作用についての報告はない。脳と心臓の Na^+, K^+ -ATPase は、その性質が異なっていることが報告されており^{57), 58)}、オピオイド類が心筋の本酵素活性に対して異なった作用を有する可能性が考えられる。前章において、 κ -タイプのオピオイドである EKC と dynorphin(1-13) が著明な陽性変力作用を有することを明らかにした。そこで本章では、その陽性変力作用の機序を解明する目的で心筋 Na^+, K^+ -ATPase 活性に対するオピオイド類の作用について検討した。

第一節 心筋 Na^+, K^+ -ATPase 活性に対する作用

実験方法

心筋 Na^+, K^+ -ATPase の部分精製は Jørgensen の方法⁵⁹⁾に準じて行った。雄性 SD 系ラット（体重100-200g）を屠殺後、心臓を摘出し組織重量の10倍量の 0.25M 蔗糖、1mM EDTA、0.1% デオキシコール酸を含む 20mM

imidazole緩衝液 (pH 7.25) でホモゲナイズした。ホモジネートを $10,000 \times g$ で15分間遠心分離した後、その上清を採り $100,000 \times g$ で1時間の遠心分離を行った。得られた沈査（ミクロゾーム分画）を 0.32M 蔗糖、1mM EDTAを含む 20mM imidazole 緩衝液 (pH 7.25) にて溶解し、その液を 1.5 mg/ml ドデシル硫酸ナトリウム、3mM ATP、2mM EDTAを含む 50mM imidazole 緩衝液 (pH 7.25) 中にて22°Cで30分間のインキュベーションを行った。その液を 0.1mM EDTA、5mM imidazole を含む蔗糖 (10%, 15%, 25%) により密度勾配遠心分離を行い、10%と15%の境界の層を取り 5mM imidazole 緩衝液 (pH 7.25) で希釈後、 $78,000 \times g$ で1時間の遠心分離を行った。得られた沈査を 0.32M 蔗糖、1mM EDTA を含む 20mM imidazole 緩衝液 (pH 7.25) に溶解し酵素標品とした。

Na^+, K^+ -ATPase 活性は $\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase 活性および Mg^{2+} -ATPase 活性を測定し、その差より求めた。 $\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase 活性は、25mM imidazole 緩衝液 (pH 7.25), 3mM MgCl₂, 140mM NaCl, 20mM KCl, 3mM ATP, 酵素蛋白を含む反応液で、また Mg^{2+} -ATPase活性は 25mM imidazole 緩衝液 (pH 7.25), 3mM MgCl₂, 3mM ATP, 酵素蛋白を含む反応液で37°C、15分間のインキュベーションを行い、生成した無機リンをFiske-SubbaRow の方法⁶⁰⁾に準じて定量することにより測定した。

K^+ -phosphatase 活性は、25mM imidazole緩衝液 (pH 7.25), 3mM MgCl₂ 30mM KCl, 3mM p-nitrophenyl phosphate, 酵素蛋白を含む液を37°Cで30分間インキュベートし、生成した p-nitrophenol を定量することにより測定した。

Na^+ 依存性のリン酸化は 25mM imidazole 緩衝液 (pH 7.25), 0.2mM MgCl₂, 100mM NaCl, 10 μM [γ -³²P]ATP ($5-8 \times 10^{14}$ cpm/mmol), 酵素蛋白

白を含む液を0°Cで20秒間インキュベートした後、5% トリクロロ酢酸を加えて反応を停止し、反応液をフィルター（0.45 μm）で吸引濾過後、フィルターの放射活性を測定することにより行った。

蛋白定量は牛血清アルブミンを標準物質として Lowry らの方法⁶¹⁾に準じて行った。

実験結果

ラット心筋の Na^+, K^+ -ATPase 活性は30 μMの dynorphin(1-13) により著明に抑制された。この阻害には酵素蛋白と dynorphin(1-13) とのプレインキュベーションが必要であり、最大の阻害（約60%）は20分間のプレインキュベーションにおいて認められた（Fig. 26）。

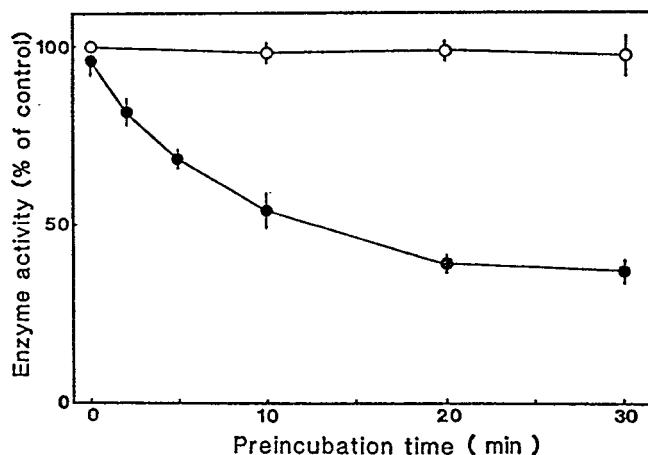


Fig. 26. Inhibition of rat cardiac Na^+, K^+ -ATPase activity by dynorphin(1-13). The enzyme was preincubated with (closed circles) or without (open circles) 30 μM dynorphin-(1-13) at 37°C in a volume of 0.04 ml. The reaction was carried out for 15 min by addition of 0.06 ml of reaction mixture. The control activity was $1.08 \pm 0.13 \mu\text{mole Pi/mg protein/min}$. Each point represents the mean of three separate experiments \pm S.E.

以後の実験では酵素蛋白と薬物とのプレインキュベーション時間を20分として反応を行った。心筋 Mg^{2+} -ATPase 活性はオピオイド類によりまったく影響を受けなかった。Table 1 に心筋 Na^+, K^+ -ATPase 活性に対する種々のオピオイド類の作用を示した。 μ -タイプのモルヒネおよび δ -タイプの Met-Enk、Leu-Enk は1mMの濃度を用いてもほとんど本酵素活性に影響を与えたかった。一方、 κ -タイプの EKC と dynorphin(1-13) は著明な阻害作用を示した。

Opioids	(M)	Na^+, K^+ -ATPase activity (% of control)
Morphine	10^{-3}	93 ± 5
[Met ⁵]-enkephalin	10^{-3}	96 ± 4
[Leu ⁵]-enkephalin	10^{-3}	85 ± 2
Dynorphin(1-13)	10^{-4}	17 ± 1
Ethylketocyclazocine	5×10^{-4}	33 ± 3

Table 1 Effect of various opioids on cardiac Na^+, K^+ -ATPase activity of rat. The enzyme was preincubated with each drug for 20 min at 37°C, and then the reaction was carried out for 15 min. The control activity was $0.84 \pm 0.21 \mu\text{mole Pi/mg protein/min}$. Each value represents the mean of four separate experiments ± S.E.

種々の κ -タイプのオピオイドによる Na^+, K^+ -ATPase 活性の阻害の用量反応曲線を強心配糖体のウワバインと比較して Fig.27 に示した。dynorphin(1-13) と dynorphin(1-17) の IC₅₀ 値は各々 $12 \mu\text{M}$ 、 $21 \mu\text{M}$ となり、ウワバインの IC₅₀ 値($150 \mu\text{M}$)と比較して小さい値を示した。 $10 \mu\text{M}$ dynorphin(1-13) と 0.5mM EKC による Na^+, K^+ -ATPase 活性の阻害に対するナロキソン ($1\text{-}100 \mu\text{M}$) の作用を検討したがまったく影響を示さなかった。

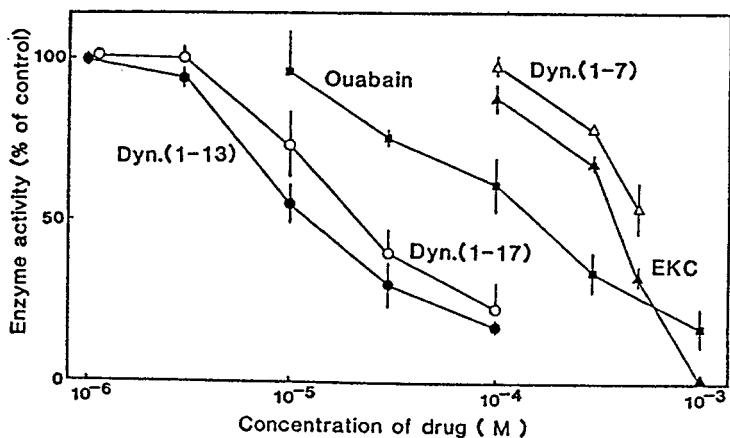


Fig. 27. Dose-response curves of cardiac Na^+,K^+ -ATPase activity versus the concentrations of κ -type opiate agonists. The control activity was $1.08 \pm 0.13 \mu\text{mole Pi/mg protein/min}$. Each point represents the mean of four separate experiments \pm S.E.

Na^+,K^+ -ATPase 活性に対する dynorphin(1-13) の阻害作用の機序について解析するため dynorphin(1-13) 存在下、非存在下において ATP の濃度を変化させて酵素活性を測定し、Lineweaver-Burkプロット⁶²⁾を行った (Fig. 28)。dynorphin(1-13) は ATP の酵素への親和性 (K_m 値) には変化を与えず、最大反応速度 (V_{max} 値) を低下させた。 Na^+ 濃度および K^+ 濃度を変化させて同様の解析を行い各々の K_m 値、 V_{max} 値を求めた (Table 2)。ATP の場合と同様に dynorphin(1-13) は Na^+ および K^+ の酵素への親和性には変化を与えず、最大反応速度を低下させた。

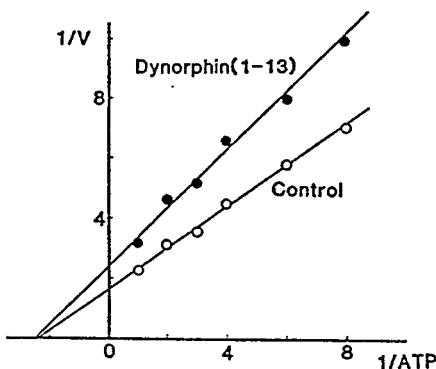


Fig. 28. Effect of dynorphin(1-13) on the kinetics of activation of cardiac Na^+,K^+ -ATPase by ATP. The enzyme was preincubated with (closed circles) or without (open circles) 10 μM dynorphin(1-13) for 20 min at 37°C, and then the enzyme assay was carried out. The concentration of ATP was varied as shown in the figure. Result is representative of three separate experiments. V is expressed as $\mu\text{mole Pi/mg protein/min}$. The specific activity of the enzyme was 0.76 $\mu\text{mole Pi/mg protein/min}$ under the standard assay condition.

		Control	+ Dynorphin(1-13) (10 μM)
ATP	K_m	0.43	0.41
	V_{max}	0.63	0.41
Na^+	K_m	8.92	8.70
	V_{max}	0.28	0.13
K^+	K_m	3.85	3.51
	V_{max}	0.22	0.10

Table 2 Effect of dynorphin(1-13) on K_m and V_{max} values of Na^+,K^+ -ATPase for ATP, Na^+ and K^+ . K_m and V_{max} values are expressed as mM and $\mu\text{mole Pi/mg protein/min}$, respectively.

Na^+, K^+ -ATPase は Na^+ 依存性のリン酸化反応と K^+ 依存性の脱リン酸化反応の二つの部分反応により ATP の加水分解を行う。この Na^+ 依存性のリン酸化反応と K^+ 依存性の脱リン酸化反応に対する dynorphin(1-13) の作用を心筋より調製した Na^+, K^+ -ATPase 酵素標品を用いて検討し、 Na^+, K^+ -ATPase に対する作用と比較した (Fig. 29)。 Na^+ 依存性リン酸化反応および K^+ 依存性脱リン酸化反応 (K^+ -phosphatase 活性) とともに dynorphin(1-13) により阻害された。 K^+ -phosphatase 活性と Na^+, K^+ -ATPase 活性の dynorphin(1-13) による阻害はまったく同様の用量反応曲線を示したが、 Na^+ 依存性のリン酸化反応の阻害には Na^+, K^+ -ATPase 活性を阻害する濃度と比較して高濃度を必要とした。

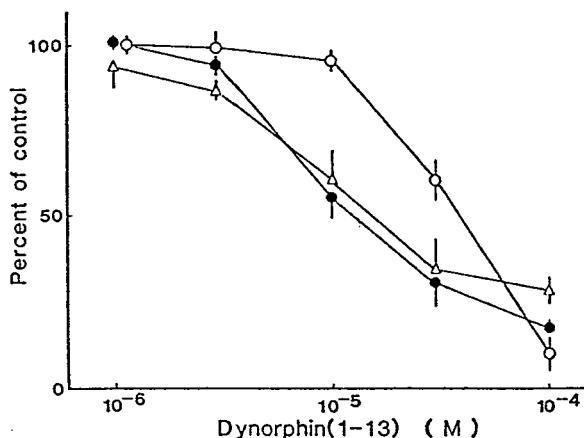


Fig. 29. Effect of dynorphin(1-13) on Na^+ -dependent phosphorylation (open circles), K^+ -stimulated phosphatase activity (open triangles) and Na^+, K^+ -ATPase activity (closed circles) of the cardiac enzyme of rat. The control activities for Na^+ -dependent phosphorylation, K^+ -stimulated phosphatase and Na^+, K^+ -ATPase were 0.12 ± 0.01 nmole/mg protein/min, 0.10 ± 0.02 $\mu\text{mole p-nitophenol}/\text{mg protein}/\text{min}$ and 1.23 ± 0.15 $\mu\text{mole Pi}/\text{mg protein}/\text{min}$, respectively (mean \pm S.E.). Each point represents the mean of four separate experiments \pm S.E.

第二節 Na^+, K^+ -ATPase の阻害の組織および種特異性

Na^+, K^+ -ATPase は組織によりその性質が異なっていることが報告されており^{57), 58)}、また、同じ組織の酵素でも動物の種によって性質が異なっていることが示唆されている⁶³⁾。そこで前章においてみられた dynorphin(1-13)、EKC による Na^+, K^+ -ATPase 活性の阻害作用の組織および種特異性について検討した。

実験方法

ラットの脳、腎臓から DeRobertis⁶⁴⁾ および Jørgensen⁵⁹⁾ の方法に準じて Na^+, K^+ -ATPase の部分精製を行った。また、モルモット、イヌ、ウシの各動物の心臓から第一節と同様の方法により Na^+, K^+ -ATPase の部分精製を行った。

実験結果

ラットの心臓、脳、腎臓の Na^+, K^+ -ATPase 活性に対する dynorphin(1-13) の作用について比較すると (Fig. 30)、心臓の酵素において最も強い阻害がみられ、脳の酵素では 0.1mM の濃度で約30%の弱い阻害しか認められず、また、腎臓の酵素は dynorphin(1-13) によりほとんど影響を受けなかった。EKC の作用についても比較すると (Fig. 31)、dynorphin(1-13) の場合と同様に心臓の酵素において最も強い阻害作用が認められたが、脳の酵素においても比較的強い阻害がみられた。腎臓の酵素では 1mM の濃度で約30%の弱い阻害しかみられなかった。

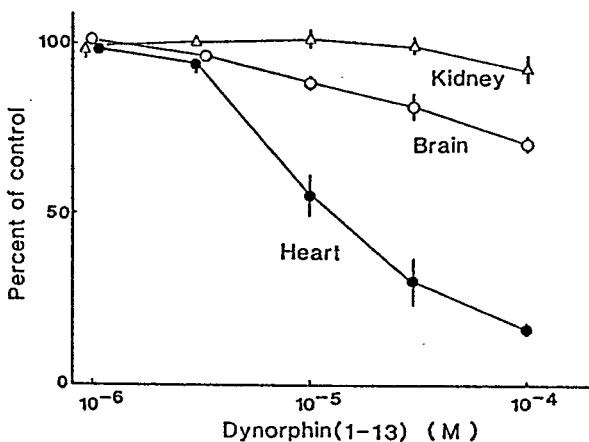


Fig. 30. Effect of dynorphin(1-13) on the activity of Na^+,K^+ -ATPase of brain, heart and kidney. The control activities were 6.46 ± 0.85 (brain), 0.94 ± 0.09 (heart) and 9.20 ± 0.96 (kidney) $\mu\text{mole Pi/mgprotein/min}$ (mean \pm S.E.). Each point represents the mean of three separate experiments \pm S.E.

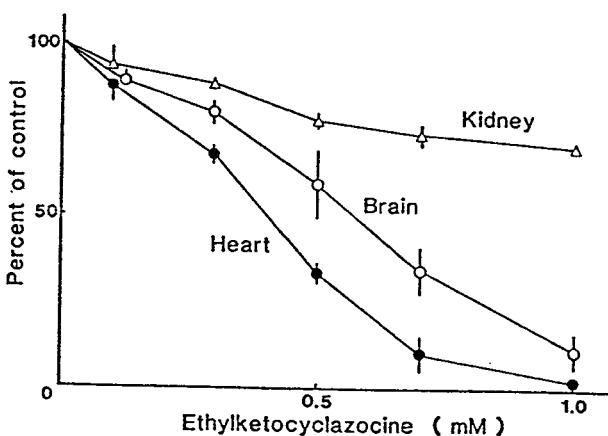


Fig. 31. Effect of EKC on the activity of Na^+,K^+ -ATPase of brain, heart and kidney. Each point represents the mean of four separate experiments \pm S.E. See legend to figure 30 for other details.

ラット、モルモット、イヌ、ウシの心筋 Na^+,K^+ -ATPase 活性に対する dynorphin(1-13) の阻害作用について比較検討した (Fig. 32)。ラット心筋の酵素において最も強い阻害がみられ、モルモットおよびイヌの心筋

の酵素では 0.1mM の濃度で約30%の弱い阻害しかみられなかつた。また、ウシ心筋の酵素においては、dynorphin(1-13)による阻害作用はほとんど

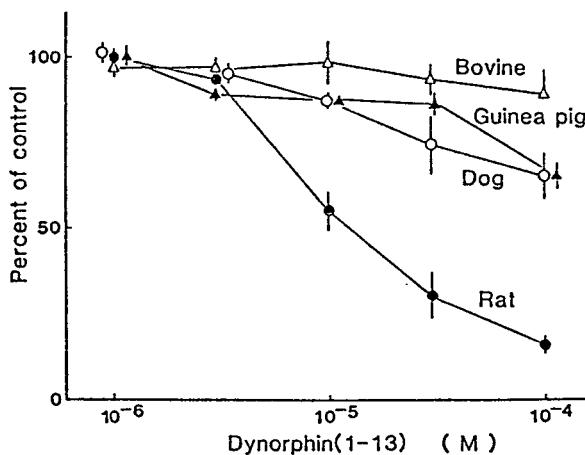


Fig. 32. Effect of dynorphin(1-13) on the activity of cardiac Na^+,K^+ -ATPase of several species. The control activities were 0.94 ± 0.09 (rat), 0.90 ± 0.17 (guinea pig), 1.57 ± 0.10 (dog) and 1.27 ± 0.07 (bovine) $\mu\text{mole Pi/mg protein/min}$ (mean \pm S.E.). Each point represents the mean of three or four separate experiments \pm S.E.

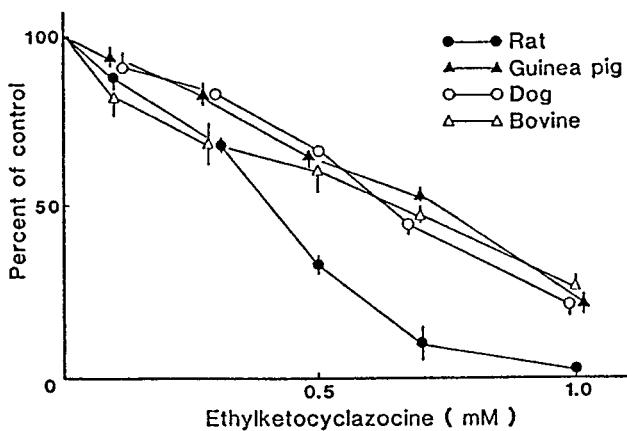


Fig. 33. Effect of EKC on the activity of cardiac Na^+,K^+ -ATPase of several species. Each point represents the mean of three separate experiments \pm S.E. See legend to figure 32 for other details.

認められなかった。EKC による阻害作用の種差について Fig. 33 に示したが、dynorphin(1-13) と同様にラット心筋の酵素において最も強い阻害がみられたが、その他の動物の心筋の酵素においても比較的強い阻害が認められた。

第三節 考察と小括

種々のオピオイド類の中で κ -タイプのものがラット心筋の Na^+, K^+ -ATPase 活性を阻害し、その阻害の強さは強心配糖体のウバインに匹敵あるいはそれ以上であった。このことと前章の摘出心房の収縮に対して κ -タイプの dynorphin(1-13)、EKC が陽性変力作用を有していた結果から、これらオピオイドが Na^+, K^+ -ATPase の阻害を介する強心作用を有していることが示唆された。他の μ -および δ -タイプのオピオイドには阻害作用はみられなかつたことより、心筋 Na^+, K^+ -ATPase の阻害が κ -タイプに特異的な作用であることが示されたが、これらの作用がナロキソンにより拮抗されなかつたことよりオピエート受容体を介する可能性は少ないと考えられる。dynorphin(1-13) による Na^+, K^+ -ATPase の阻害作用を Lineweaver-Burk プロットにより解析した結果、dynorphin(1-13) は ATP、 Na^+ 、 K^+ の酵素に対する親和性には影響せず、最大反応速度を低下させていた。このことは dynorphin(1-13) が本酵素の ATP、 Na^+ 、 K^+ による活性化部位とは異なった部位に作用して、その活性を阻害していることが考えられた。 Na^+, K^+ -ATPase の部分反応である Na^+ 依存性リン酸化反応と K^+ 依存性脱リン酸化反応に対する dynorphin(1-13) による阻害の用量反応曲線から Na^+, K^+ -

ATPase の阻害は主に脱リン酸化過程の阻害によるものと考えられた。

脳、心臓、腎臓より調製した Na^+, K^+ -ATPase の dynorphin(1-13) あるいは EKC による阻害作用に著明な差がみられたことより、 Na^+, K^+ -ATPase の性質が組織により異なっていることが示唆された。また dynorphin(1-13) あるいは EKC による心筋 Na^+, K^+ -ATPase の阻害作用がラット、モルモット、イヌ、ウシの各動物によりその程度に差が認められたことから心筋の本酵素の性質が動物の種によって異なっていることが考えられた。

小 括

- 1) 種々のオピオイド類の中で κ -タイプの dynorphin(1-13) と EKC がラット心筋の Na^+, K^+ -ATPase 活性を著明に阻害した。
- 2) dynorphin(1-13) はラット心筋の Na^+, K^+ -ATPase に対する ATP、 $\text{Na}^+、\text{K}^+$ の親和性には影響を与えず、最大反応速度を減少させることにより本酵素活性を阻害した。
- 3) dynorphin(1-13) は Na^+, K^+ -ATPase の部分反応のうち主に脱リン酸化過程を阻害することにより本酵素活性を阻害していることが示された。
- 4) dynorphin(1-13) と EKC による Na^+, K^+ -ATPase 活性の阻害作用に組織による差が認められ、心筋の酵素に対して最も強い阻害を示した。
- 5) 心筋 Na^+, K^+ -ATPase 活性に対する dynorphin(1-13) と EKC の阻害作用に種差が認められ、ラットの酵素に対して最も強い阻害を示した。

第四章 総括と結論

1. 総 括

オピオイド類の心循環系に対する作用は、主として脳幹の血管運動中枢に分布するオピエート受容体を介する作用と考えられているが、その作用はオピオイドのサブタイプ⁴⁴⁾、投与方法^{65), 66)}により、また、実験動物の種^{42), 43)}によっても異なっており、その作用機序は明確にはされていない。最近、生化学的研究により心臓にオピオイドペプチドが存在することが報告され、オピオイド類が心臓に対して直接作用を有している可能性が考えられている。そこで本研究では心臓における内因性オピオイドペプチドの存在様式と分布について組織化学的方法により調べ、さらにオピオイド類の心臓に対する直接作用について薬理学的、生化学的に検討を行った。

内因性オピオイドペプチドである Met-Enk、Leu-Enk のネコ心臓における免疫組織化学的実験により、これらペプチドを含有する神経線維および神経細胞が心房の洞房結節周辺、大動脈開口部と肺動脈開口部の間、冠状静脈洞および下大静脈開口部周辺に局在し、副交感神経節、血管、心筋と密接に関係していることが示された。これらの結果より心臓に存在する Met-Enk、Leu-Enk を始めとするオピオイドペプチドが心機能、特にその収縮に対して何らかの役割を果していることが示唆された。

副腎のクロマフィン細胞や上頸神経節の SIF cell 中に Enk が存在し、カテコールアミンの遊離の調節を行っている可能性が報告されている^{23), 32)}。本実験においても Enk がカテコールアミンを含有する SIF cell に存在していることが示され、心臓における Enk の作用がカテコールアミンと密接に関係している可能性が考えられた。また、Enk を含有する SIF

cell に近接して SP および VIP を含む神経線維が密に分布していたことより、SIF cell からの Enk 遊離がこれらペプチドにより調節を受けていることが考えられ、心臓に対する Enk の作用と SP、VIP が密接に関与していることが示唆された。

摘出心房標本の収縮に対するオピオイド類の作用を検討した結果、 κ -タイプの EKC と dynorphin(1-13) が著明な陽性変力作用を示した。この作用はオピエート受容体を介さない作用と考えられ、また、アドレナリン系あるいは Ca^{2+} -channel との関与もないことが示された。そこで EKC、dynorphin(1-13) による陽性変力作用の機序を調べる目的で、心筋の Na^+ , K^+ -ATPase に対するオピオイド類の作用を検討した。その結果、種々のオピオイド類の中で κ -タイプのものがウバインに匹敵する著明な心筋 Na^+ , K^+ -ATPase 活性の阻害作用を有することが明らかとなった。

摘出心房標本の収縮に対する作用と心筋 Na^+ , K^+ -ATPase 活性に対する作用の結果から κ -タイプのオピオイドである EKC と dynorphin(1-13) は心筋 Na^+ , K^+ -ATPase の阻害を介する陽性変力作用を有することが示された。

2. 結 論

- 1) Met-Enk、Leu-Enk 含有細胞および神経線維が心房、特に洞房結節周辺、大動脈開口部と肺動脈開口部の間、冠状静脈洞および下大静脈開口部周辺に多数存在することが明らかとなり、また、これらの細胞および神経線維が副交感神經節、心筋、血管と密接に関係していることが示された。
- 2) 心臓の Enk 含有細胞はカテコールアミンを含有する SIF cell であることが示され、また、その細胞の周囲には SP および VIP 含有神経線

維が密に分布していたことより、Enk がこれらペプチドと密接な関係を有していることが示唆された。

- 3) 摘出心房標本の収縮に対して κ -タイプのオピオイドである EKC が著明な陰性変時作用と陽性変力作用を、また、dynorphin(1-13) が陽性変力作用を有していることが明らかとなった。
- 4) 心筋の Na^+, K^+ -ATPase 活性に対して κ -タイプのオピオイドである EKC と dynorphin(1-13) が著明な阻害作用を有することが明らかとなつた。このことより EKC と dynorphin(1-13) の陽性変力作用は、心筋 Na^+, K^+ -ATPase の阻害を介したものであることが示唆された。

謝　　舌辛

稿を終えるにあたり、終始、御懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました恩師、大阪大学薬学部、岩田平太郎教授、　大阪大学歯学部、猪木令三教授に心より感謝致します。また、免疫組織化学的研究の御指導、御鞭撻を賜りました大阪大学歯学部、赤井三千男教授に深謝致します。

さらに、本研究に御協力いただきました大阪大学歯学部薬理学教室、第一口腔解剖学教室ならびに大阪大学薬学部薬理学教室の皆様に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) Goldstein, A., Lowney, L. I. and Pal, B. K. (1971)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 68, 1742-1747.
- 2) Hughes, J., Smith, T. W., Kosterlitz, H. W., Fothergill,
L. A., Morgan, B. A. and Morris, H. R. (1975) Nature, 258,
577-579.
- 3) Elde, R., Hökfelt, T., Johansen, O. and Terenius, L. (1976)
Neuroscience, 1, 349-351.
- 4) Linnoila, R. I., DiAugustine, R. P., Miller, R. J., Chang,
K. J. and Cuatrecasas, P. (1978) Neuroscience, 3, 1187-1196.
- 5) Miller, R. J., Chang, K. J., Cooper, B. and Cuatrecasas, P.
(1978) J. Biol. Chem., 253, 531-538.
- 6) Goldstein, A., Tachibana, S., Lowney, L. I., Hunkapiller, M.
and Hood, L. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 6666-
6670.
- 7) Watson, S. J., Akil, H., Ghazarossian, V. E. and Goldstein,
A. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 1260-1263.
- 8) Bellet, M., Elghozi, J. L., Meyer, P., Pernollet, M. G. and
Schmitt, H. (1980) Brit. J. Pharmacol., 71, 365-369.
- 9) Holaday, J. W. (1983) Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 23,
541-594.
- 10) Hassen, A. H., Feuerstein, G. and Faden, A. I. (1983)
Peptides, 4, 621-625.
- 11) Spampinato, S. and Goldstein, A. (1983) Neuropeptides, 3,
193-212.
- 12) Lang, R.E., Hermann, R.; Dietz, D., Gaida, W., Ganten, D.
Kraft, K. and Unger, T. (1983) Life Sci., 32, 399-406.

- 13) Weihe, E., McKnight, A. T., Corbett, A. D., Hartschuh, W., Reinecke, M. and Kosterlitz, H. W. (1983) Life Sci., 33, 711-714.
- 14) Hughes, J., Kosterlitz, H. W. and Smith, T. W. (1977) Brit. J. Pharmacol., 61, 639-647.
- 15) Mudge, A. W., Leeman, S. E. and Fischbach, G. D. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 526-530.
- 16) Waterfield, A.A., Smokcum, R. W. J., Hughes, J., Kosterlitz, H. W. and Henderson, G. H. (1977) Eur. J. Pharmacol., 43, 107-116.
- 17) Saxon, M. E., Ivanitsky, G. R., Beloyartsev, F. F., Safranova, V. G., Kokoz, Yu. M. and Freydin, A. A. (1982) Gen. Physiol. Biophys., 1, 447-452.
- 18) Ruth, J. A. and Eiden, L. E. (1984) Neuropeptides, 4, 101-108.
- 19) Wharton, J., Polak, J. M., McGregor, G. P., Bishop, A. E. and Bloom, S. R. (1981) Neuroscience, 6, 2193-2204.
- 20) Papka, R. E., Furness, J. B., Della, N. G. and Costa, M. (1981) Neurosci. Lett., 27, 47-53.
- 21) Weihe, E. and Reinecke, M. (1981) Neurosci. Lett., 26, 283-288.
- 22) Weihe, E., Reinecke, M. and Frossmann, W. G. (1984) Cell Tissue Res., 236, 527-540.
- 23) Schultzberg, M., Lundberg, J.M., Hökfelt, T., Trenius, L., Brandt, J., Elde, R. P. and Goldstein, M. (1978) Neuroscience, 3, 1169-1186.
- 24) Schultzberg, M., Hökfelt, T., Terenius, L., Elfvin, L. G., Lundberg, J. M., Brandt, J., Elde, R. P. and Goldstein, M. (1979) Neuroscience, 4, 249-270.

- 25) Zamboni, L. and De Martino C. (1967) *J. Cell Biol.*, 35, 148A.
- 26) Coons, A. H., Leduc, E. H. and Connolly, J. M. (1955) *J. Exp. Med.*, 102, 49-60.
- 27) Jacobowitz, D. (1967) *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 158, 227-240.
- 28) Ellison, J. P. and Hibbs, R. G. (1974) *J. Mol. Cell Cardiol.*, 6, 17-26.
- 29) Papka, R. E. (1974) *Cell Tissue Res.*, 154, 471-484.
- 30) Imai, H., Kimura, H. and Maeda, T. (1982) *Acta Histochem. Cytochem.*, 15, 798-806.
- 31) Lundberg, J. M., Hökfelt, T., Nilsson, G., Terenius, L., Rehfeld, J., Elde, R. and Said, S. (1978) *Acta Physiol. Scand.*, 104, 499-501.
- 32) Kummer, W., Heym, Ch., Colombo, M. and Lang, R. (1986) *Acta Embryol.*, 174, 401-105.
- 33) Julé, Y., Clerc, N., Niel, J. P. and Condamin, M. (1986) *Neuroscience*, 18, 487-498.
- 34) Hervenon, A., Pickel, V. M., Joh, T. H., Reis, D. J., Linnoila, H. and Miller, R. J. (1981) *Cell Tissue Res.*, 214, 33-42.
- 35) Taxi, J. (1979) In : *International Review of Cytology*, (Dourne, G. H. and Danielle, J. F., Eds), vol.57, pp. 283-343, Acad. Press, New York.
- 36) Williams, T. H. and Palay, S. L. (1969) *Brain Res.*, 15, 17-34.
- 37) Losay, J., Mroz, E., Tregear, G. W., Leeman, S. E. and Gamble, W. J. (1977) In : *Substance P* (Von Euler, U.S. and Pernow, B., Eds), pp. 287-294, Raven Press, New York.

- 38) Said, S. I., Bosher, L. P., Spath, J. A. and Kontos, H. A. (1972) *Clin. Res.*, 20, 29.
- 39) Yukimura, T., Unger, T., Rascher, W., Lang, R. E. and Ganten, D. (1981) *Clin. Sci.*, 61, 3495-3505.
- 40) Laubie, M., Schmitt, H., Vincent, M. and Remond, G. (1977) *Eur. J. Pharmacol.*, 46, 67-71..
- 41) Bolme, P., Fuxe, K., Agnati, L. F., Bradley, R. and Smythies, J. (1978) *Eur. J. Pharmacol.*, 48, 319-324.
- 42) Galosy, R. A., Clarke, L. K., Vasco, M. R. and Crawford, I. L. (1981) *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 5, 137-175.
- 43) Lang, R. E., Bruchner, U. B., Kempf, B., Rasher, W., Sturm, V., Unger, T., Speck, G. and Ganten, D. (1982) *Clin. Exp. Hypertens.*, 4, 249-269.
- 44) Wei, E. T., Lee, A. and Chang, J. K. (1980) *Life Sci.*, 26, 1517-1522.
- 45) Sander, G. E., Giles, T. D., Quiroz, A. C., Coy, D. H. and Kastin, A. J. (1982) *Eur. J. Pharmacol.*, 78, 467-470.
- 46) Chang, K. J. and Cuatrecasas, P. (1979) *J. Biol. Chem.*, 254, 2610-2618.
- 47) Laslie, F. M., Chavkin, C. and Cox, B. M. (1980) *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 214, 395-402.
- 48) Langer, G. A., Brady, A.J., Tan, S. T. and Serena, S. D. (1975) *Circ. Res.*, 36, 744-752.
- 49) Temma, K., Akera, T. and Brody, T. M. (1981) *Eur. J. Pharmacol.*, 76, 361-370.
- 50) Saunders, W. S. and Thornhill, J. A. (1985) *Brit. J. Pharmacol.*, 85, 513-522.
- 51) Laurent, S. and Schmitt, H. (1983) *Eur. J. Pharmacol.*, 96, 165-169.

- 52) Schwartz, A., Lindenmayer, G. E. and Allen, J. C. (1975) *Pharmacol. Rev.*, 27, 3-134.
- 53) Langer, G. A. (1981) *Biochem. Pharmacol.*, 30, 3261-3264.
- 54) Desaiyah, D. and Ho, I. K. (1977) *Biochem. Pharmacol.*, 26, 89-92.
- 55) Jain, M. L., Curtis, B. M. and Bakutis, E. V. (1974) *Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol.*, 7, 229-232.
- 56) Lee, D. Z. and Sun, A. Y. (1984) *Neurochem. Res.*, 9, 669-678.
- 57) Sweadner, K. J. (1979) *J. Biol. Chem.*, 254, 6060-6067.
- 58) Fambrough, D. M. and Bayne, E. K. (1983) *J. Biol. Chem.*, 258, 3926-3935.
- 59) Jørgensen, P. L. (1974) *Biochim. Biophys. Acta*, 356, 36-52.
- 60) Fiske, C. H. and SubbaRow, Y. (1925) *J. Biol. Chem.*, 66, 375-400.
- 61) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.*, 193, 265-295.
- 62) Lineweaver, H. and Burk, D. (1934) *J. Am. Chem. Soc.*, 56, 658-666.
- 63) Matsuda, T. and Iwata, H. (1985) *Biochem. Pharmacol.*, 34, 2343-2346.
- 64) DeRobertis, E., DeLores Arnaiz, G. R., Alberici, M., Butcher, R. W. and Sutherland, E. W. (1967) *J. Biol. Chem.*, 242, 3487-3493.
- 65) Florez, J., McCarthy, L. E. and Borison, H. L. (1968) *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 163, 448-455.
- 66) Feldberg, W. and Wei, E. (1981) In : Central Nervous System. Mechanisms in Hypertension (Buckley, J. J. and Ferrario, C. M., Eds), pp. 229-234. Raven Press, New York.