

## Dermorphin tetrapeptide 誘導体 Tyr-D-Arg-Phe- $\beta$ -Ala および Tyr-D-Arg-Phe- $\beta$ -Ala-NH<sub>2</sub> の鎮痛作用発現における $\mu_1$ 受容体の関与

結城 正幸, 溝口 広一, 渡邊 廣行, 林 貴史, 櫻田 誓,  
米澤 章彦, 櫻田 司, 櫻田 忍

### Differential Involvement of $\mu_1$ -Opioid Receptor on the Antinociception Induced by Dermorphin Tetrapeptide Analogues, Tyr-D-Arg-Phe- $\beta$ -Ala and Tyr-D-Arg-Phe- $\beta$ -Ala-NH<sub>2</sub>

Masayuki YUHKI, Hirokazu MIZOGUCHI, Hiroyuki WATANABE, Takafumi HAYASHI, Chikai SAKURADA,  
Akihiko YONEZAWA, Tsukasa SAKURADA and Shinobu SAKURADA

(Received November 22, 2003)

Involvement of  $\mu_1$ -opioid receptor on the antinociception induced by dermorphin tetrapeptide analogues Try-D-Arg-Phe- $\beta$ -Ala (TAPA) and Tyr-D-Arg-Phe- $\beta$ -Ala-NH<sub>2</sub> (TAPA-NH<sub>2</sub>) were determined in mice, using a tail-pressure test and formalin test. TAPA and TAPA-NH<sub>2</sub> injected i.c.v. and i.t. produced dose-dependent antinociception in both assays. In the tail-pressure test, the antinociception induced by i.c.v. and i.t. injected TAPA, but not TAPA-NH<sub>2</sub>, was significantly attenuated by the pretreatment with naloxonazine, selective antagonist for  $\mu_1$ -opioid receptor. Moreover, naloxonazine also significantly attenuated the antinociception induced by i.c.v. injected TAPA, but not TAPA-NH<sub>2</sub> in formalin test. In contrast, the antinociception induced by both TAPA and TAPA-NH<sub>2</sub> given i.t. was significantly attenuated by the pretreatment with naloxonazine in formalin test. The present results suggest that TAPA and TAPA-NH<sub>2</sub> should be considered to be selective agonist for  $\mu_1$ - and  $\mu_2$ -opioid receptors, respectively. The C-terminal amidation may be the critical portion for TAPA-NH<sub>2</sub> to distinguish  $\mu_1$ - and  $\mu_2$ -opioid receptors.

**Key words** —  $\mu$ -opioid receptor, dermorphin, tetrapeptides, naloxonazine, antinociception, mouse

中南米産カエルの皮膚から抽出された Dermorphin (Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-NH<sub>2</sub>)<sup>1)</sup> は、極めて強力な鎮痛作用と  $\mu$  オピオイド受容体に対する高い選択性を有している heptapeptide である<sup>2,3)</sup>。その内活性は、morphine の約 2 倍でありかつ [D-Ala<sup>2</sup>, NMePhe<sup>4</sup>, Gly-ol<sup>5</sup>] enkephalin (DAMGO) とほぼ同等であることから、dermorphin は  $\mu$  オピオイド受容体の完全作動薬であると考えられている。Dermorphin およびその誘導体を用いた構造活性相関の実験結果により、その  $\mu$  オピオイド受容体作動薬としての作用は、N 末端 tetrapeptide 部位に起因する事が明らかとなっ

ており、またその作用はアミノ酸配列が短くなる程弱くなる事が知られている<sup>2,4)</sup>。我々はこれまでに、dermorphin の 2 位の D-Ala および 4 位の Gly をそれぞれ D-Arg および  $\beta$ -Ala に置換した N 末端 tetrapeptide である Try-D-Arg-Phe- $\beta$ -Ala (TAPA) を合成し、TAPA の鎮痛作用がマウス脳室内 (i.c.v.) 投与、脊髄腔内 (i.t.) 投与および皮下 (s.c.) 投与のいずれにおいても morphine よりも極めて強力である事を報告している<sup>5,6,7)</sup>。この TAPA は、dermorphin と同様に  $\mu$  オピオイド受容体に対して高い選択性を持っており、その鎮痛作用は極めて選択的に  $\mu$  オピオイド受容体を介して発現する<sup>5)</sup>。この他に

dermorphin 誘導体としては, TAPA の C 末端にアミド基を導入した Try-D-Arg-Phe- $\beta$ -Ala-NH<sub>2</sub> (TAPA-NH<sub>2</sub>) が Sasaki 等<sup>8)</sup> によって報告されており, この TAPA-NH<sub>2</sub> も TAPA と同様に  $\mu$  オピオイド受容体を介した強力な鎮痛作用を持つ事が知られている. 興味深い事に, C 末端にアミド基を持つ TAPA-NH<sub>2</sub> は, アミド基を持たない TAPA に比べ  $\mu$  オピオイド受容体に対する選択性がより高いことが明らかとなっている<sup>8)</sup>.

$\mu$  オピオイド受容体は, Pasternak 等により  $\mu_1$  オピオイド受容体および  $\mu_2$  オピオイド受容体の 2 つのサブクラスに分類されている<sup>9,10,11)</sup>. この両  $\mu$  オピオイド受容体サブクラスは,  $\mu_1$  オピオイド受容体がオピオイドペプチドとオピオイドアルカロイドの双方に等しく高い親和性を示すのに対し,  $\mu_2$  オピオイド受容体はオピオイドペプチドよりもオピオイドアルカロイドに対してより高い親和性を示すといった特徴的違いを持つ. またこの両  $\mu$  オピオイド受容体サブクラスは,  $\mu$  オピオイド受容体拮抗薬である naloxonazine に対する感受性の違いによっても分類可能であることが明らかとなっている. Naloxonazine は,  $\mu_1$  オピオイド受容体には非可逆的に結合するが,  $\mu_2$  オピオイド受容体には可逆的にしか結合しないとされた結合特性を持つ<sup>12,13)</sup>. 我々は近年, naloxonazine のこの結合特性を利用し,  $\mu$  オピオイド受容体作動薬の鎮痛作用を, naloxonazine (35 mg/kg s.c.投与 24 時間前処置) 感受性鎮痛 ( $\mu_1$  オピオイド受容体を介した鎮痛) と naloxonazine 非感受性鎮痛 ( $\mu_2$  オピオイド受容体を介した鎮痛) に分類した<sup>14,15)</sup>.

そこで本研究においては, naloxonazine を用い, dermorphin tetrapeptide 誘導体 TAPA および TAPA-NH<sub>2</sub> により誘発される鎮痛作用の発現に対する  $\mu_1$  オピオイド受容体および  $\mu_2$  オピオイド受容体の関与を, マウス tail-pressure 法および formalin 法において検討した.

### 実験材料および方法

全ての実験は, 東北薬科大学動物実験指針を遵守し, 動物実験委員会の承認を受けた動物実

験計画書に従って行った. 以下に示す全ての実験において使用動物数を削減し, また, 使用動物の苦痛を和らげる為に最大限配慮した.

#### 1. 使用動物

実験には 22 - 24 g の ddY 系雄性マウス (SLC, 静岡) を使用した. 実験に供するまで, 明暗サイクル 12 時間 (明期: 9:00 ~ 21:00, 暗期: 21:00 ~ 9:00), 室温 22  $\pm$  2  $^{\circ}$ C, 湿度 55  $\pm$  5% の一定環境下で飼育した. なお, 使用動物には固形飼料 (SLC F2, 日本クレア) および水道水を自由に摂取させ, 少なくとも 2 日以上実験室で予備飼育した.

#### 2. 使用薬物

TAPA (研究室にて合成), TAPA-NH<sub>2</sub> (研究室にて合成), naloxonazine (RBI, Natick, MA, USA) および  $\beta$ -funaltrexamine (RBI) を使用した. TAPA および TAPA-NH<sub>2</sub> は, 人工脳脊髄液 (126.6 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.3 mM CaCl<sub>2</sub>) に溶解した. Naloxonazine と  $\beta$ -funaltrexamine は, 滅菌生理食塩液に溶解し, 鎮痛試験の 24 時間前にマウスに s.c.投与した.

#### 3. マウス i.c.v.投与および i.t.投与

マウス i.c.v.投与および i.t.投与は, それぞれ Haley and McCormick<sup>16)</sup> の方法および Hylden and Wilcox<sup>17)</sup> の方法に準じ, 10  $\mu$ l のハミルトンマイクロシリンジおよび 29 番ゲージの注射針を用いて行った. また投与容量は, 両投与方法ともに 5  $\mu$ l とした.

#### 4. Tail-pressure 法

Tail-pressure 法は, Sakurada 等<sup>18)</sup> の方法に従って行った. マウス尾てい部に 10 mmHg/s の加重率で漸増的圧力を加え, 尾加重部への biting 行動および licking 行動を引き起こす圧力を反応潜圧として測定した. 尾部組織の損傷を防ぐ為, 最大加圧は 100 mmHg に設定した. 実験には, 無処置時に 40 - 50 mmHg の反応潜圧を示したマウスのみを使用した. オピオイドペプチドの鎮痛作用は, 以下の式から算出した最

大有効反応率 (percent of the maximum possible effect: % MPE) で表した。

$$\text{最大有効反応率 (\%)} = [(P_1 - P_0) / (100 - P_0)] \times 100$$

なお P<sub>0</sub> および P<sub>1</sub> は、それぞれオピオイドペプチド投与前および投与後の反応潜圧とした。

## 5. Formalin 法

Formalin 法は、Sato 等<sup>15)</sup>の方法に従って行った。マウスを測定用の透明プラスチックケージ (22.0 cm × 15.0 cm × 12.5 cm) に 1 匹ずつ入れ、1 時間実験環境に順応させた。実験環境順応後、マウスにオピオイドペプチドを i.c.v. 投与あるいは i.t. 投与し、それぞれその 10 分あるいは 5 分後に、2 % formalin をマウス右後肢足蹠に 20 μl ずつ s.c. 投与した。右後肢に対する biting 行動および licking 行動を疼痛反応とみなし、その持続時間を formalin 投与後 10 分間測定した。オピオイドペプチドの鎮痛作用は、以下の式から算出した最大有効反応率 (percent of the maximum possible effect: % MPE) で表した。

$$\text{最大有効反応率 (\%)} = [(T_0 - T_1) / T_0] \times 100$$

なお T<sub>0</sub> および T<sub>1</sub> は、それぞれオピオイドペプチド非処置群および処置群における疼痛反応持続時間とした。

## 6. 統計処理

全ての実験は一群 10 匹で行い、鎮痛作用は平均 ± 標準誤差で表した。用量-反応曲線は、曲線解析プログラム GraphPad Prism (GraphPad

Software, Inc., San Diego, CA, USA) を用いて解析し、50 % 有効用量 (ED<sub>50</sub>) とその 95 % 信頼限界を算出した。各用量-反応曲線は、GraphPad Prism の統計処理解説書に従い、F 検定によって比較検定した。

## 実験結果

### 1. Tail-pressure 法における TAPA および TAPA-NH<sub>2</sub> 誘発鎮痛

TAPA および TAPA-NH<sub>2</sub> は、i.c.v. および i.t. の両投与経路において用量依存的な鎮痛作用を示した。TAPA の i.c.v. 投与および i.t. 投与における ED<sub>50</sub> 値 (95 % 信頼限界) は、それぞれ 0.97 (0.38 - 2.52) および 0.55 (0.44 - 0.68) pmol であったのに対し、TAPA-NH<sub>2</sub> の ED<sub>50</sub> 値はそれぞれ 4.40 (3.31 - 5.85) および 7.74 (4.91 - 12.20) pmol であった (Table 1)。また、TAPA の i.c.v. 投与および i.t. 投与により誘発される鎮痛作用は、naloxonazine (35 mg/kg) の s.c. 投与により有意に抑制され、用量反応曲線はそれぞれ 9.49 倍 (F = 79.53, P = 0.0002) および 9.44 倍 (F = 50.36, P = 0.0005) 有意に右にシフトした。Naloxonazine 前処置群における TAPA の i.c.v. 投与および i.t. 投与による ED<sub>50</sub> 値は、それぞれ 9.21 (8.21 - 10.32) および 5.19 (3.50 - 7.70) pmol であった。一方、TAPA-NH<sub>2</sub> の i.c.v. 投与および i.t. 投与により誘発される鎮痛作用は、naloxonazine の前処置により全く影響を受けなかった。Naloxonazine 前処置群における

Table 1. ED<sub>50</sub> values for antinociception induced by TAPA and TAPA-NH<sub>2</sub> to mechanical noxious stimuli in mice pretreated with vehicle or naloxonazine.

| Drugs                | Injection route | ED <sub>50</sub> values |                    |      |
|----------------------|-----------------|-------------------------|--------------------|------|
|                      |                 | A: Vehicle              | B: Naloxonazine    | B/A  |
| TAPA                 | i.c.v.          | 0.97 (0.38-2.52)        | 9.21 (8.21-10.32)  | 9.49 |
|                      | i.t.            | 0.55 (0.44-0.68)        | 5.19 (3.50-7.70)   | 9.44 |
| TAPA-NH <sub>2</sub> | i.c.v.          | 4.40 (3.31-5.85)        | 5.86 (4.41-7.79)   | 1.33 |
|                      | i.t.            | 7.74 (4.91-12.20)       | 12.71 (5.91-27.33) | 1.64 |

Groups of mice pretreated s.c. with vehicle or naloxonazine (35 mg/kg) 24 hr before were injected i.c.v. or i.t. with various doses of TAPA and TAPA-NH<sub>2</sub>, and the antinociception induced by TAPA and TAPA-NH<sub>2</sub> was measured in tail-pressure test 10 min after the treatment. ED<sub>50</sub> values with their 95% confidence intervals were calculated by computer-associated curve fit program (GraphPad Prism).

Table 2. ED<sub>50</sub> values for antinociception induced by TAPA and TAPA-NH<sub>2</sub> to chemical noxious stimuli in mice pretreated with vehicle or naloxonazine.

| Drugs                | Injection route | ED <sub>50</sub> values |                  |       |
|----------------------|-----------------|-------------------------|------------------|-------|
|                      |                 | A: Vehicle              | B: Naloxonazine  | B/A   |
| TAPA                 | i.c.v.          | 0.15 (0.11-0.23)        | 3.99 (3.24-4.91) | 26.60 |
|                      | i.t.            | 0.34 (0.10-1.18)        | 6.17 (4.89-7.79) | 18.15 |
| TAPA-NH <sub>2</sub> | i.c.v.          | 4.18 (2.45-7.13)        | 3.12 (1.81-5.38) | 0.75  |
|                      | i.t.            | 1.47 (0.95-2.29)        | 6.35 (5.07-7.96) | 4.32  |

Groups of mice pretreated s.c. with vehicle or naloxonazine (35 mg/kg) 24 hr before were injected i.c.v. or i.t. with various doses of TAPA and TAPA-NH<sub>2</sub>. The antinociception (% MPE) induced by TAPA and TAPA-NH<sub>2</sub> was calculated from the time spent for biting or licking behavior in formalin test. Formalin (2.0 %) was injected s.c. in the plantar surface of the hind-paw of mice 10 and 5 min after the i.c.v. and i.t. treatment with peptides, respectively. ED<sub>50</sub> values with their 95% confidence intervals were calculated by computer-associated curve fit program (GraphPad Prism).

TAPA-NH<sub>2</sub> の i.c.v. 投与および i.t. 投与による ED<sub>50</sub> 値は, それぞれ 5.86 (4.41 - 7.79) および 12.71 (5.91 - 27.33) pmol であった. これに対し, TAPA-NH<sub>2</sub> の i.c.v. 投与および i.t. 投与により誘発される鎮痛作用は,  $\mu_1$  および  $\mu_2$  オピオイド受容体の非可逆的拮抗薬である  $\beta$ -funaltrexamine (40mg/kg) の s.c. 投与により, ほぼ完全に拮抗された (データ未掲載).

## 2. Formalin 法における TAPA および TAPA-NH<sub>2</sub> 誘発鎮痛

TAPA および TAPA-NH<sub>2</sub> は, i.c.v. および i.t. の両投与経路において用量依存的な鎮痛作用を示した. TAPA の i.c.v. 投与および i.t. 投与における ED<sub>50</sub> 値は, それぞれ 0.15 (0.11 - 0.23) および 0.34 (0.10 - 1.18) pmol であったのに対し, TAPA-NH<sub>2</sub> の ED<sub>50</sub> 値はそれぞれ 4.18 (2.45 - 7.13) および 1.47 (0.95 - 2.29) pmol であった (Table 2). また, TAPA の i.c.v. 投与および i.t. 投与により誘発される鎮痛作用は, naloxonazine の s.c. 投与により有意に抑制され, 用量反応曲線はそれぞれ 26.60 (F = 76.73, P = 0.0001) 倍 および 18.15 倍 (F = 149.9, P = 0.001) と極めて大きく有意に右にシフトした. Naloxonazine 前処理群における TAPA の i.c.v. 投与および i.t. 投与による ED<sub>50</sub> 値は, それぞれ 3.99 (3.24 - 4.91) および 6.17 (4.89 - 7.79) pmol であった. 一方, naloxonazine は TAPA-NH<sub>2</sub> の i.t. 投与によ

り誘発された鎮痛作用を有意に抑制したが, TAPA-NH<sub>2</sub> の i.c.v. 投与により誘発される鎮痛作用には全く影響を与えなかった. TAPA-NH<sub>2</sub> の i.t. 投与による用量反応曲線は, naloxonazine の前処置により 4.32 倍 (F = 63.48, P = 0.004) 有意に右にシフトした. Naloxonazine 前処理群における TAPA-NH<sub>2</sub> の i.c.v. 投与および i.t. 投与による ED<sub>50</sub> 値は, それぞれ 3.12 (1.81 - 5.38) および 6.35 (5.07 - 7.96) pmol であった. また, TAPA-NH<sub>2</sub> の i.c.v. 投与および i.t. 投与により誘発される鎮痛作用は,  $\beta$ -funaltrexamine の s.c. 投与により著しく抑制された (データ未掲載).

## 考 察

$\mu$  オピオイド受容体にサブクラス ( $\mu_1$  および  $\mu_2$  オピオイド受容体) が存在する事は, 種々の薬理学的実験によって証明されている.  $\mu_1$  オピオイド受容体が上位中枢における鎮痛, acetylcholine や prolactin の遊離, 食欲抑制などに関与しているのに対し,  $\mu_2$  オピオイド受容体は脊髄における鎮痛, 呼吸抑制, 腸管輸送抑制などに関与している事が報告されており, その生理機能の違いが明らかにされている<sup>19,20</sup>. 実際に,  $\mu_1$  および  $\mu_2$  オピオイド受容体の作動薬である DAMGO の i.c.v. 投与および i.t. 投与により誘発される鎮痛作用は, それぞれ  $\mu_1$  オピオイド受容体および  $\mu_2$  オピオイド受容体を選

択的に介して発現する事を、我々もこれまでに報告している<sup>14,21)</sup>。本研究の tail-pressure 法を用いた鎮痛試験において、TAPA の i.c.v. 投与および i.t. 投与により誘発される鎮痛作用は、naloxonazine の前処置により有意に拮抗されたが、TAPA-NH<sub>2</sub> の i.c.v. 投与および i.t. 投与により誘発される鎮痛作用は、naloxonazine の前処置により全く影響を受けなかった。この実験結果は、上位中枢および脊髄の両部位において、機械刺激に対する TAPA および TAPA-NH<sub>2</sub> の鎮痛作用は、それぞれ  $\mu_1$  オピオイド受容体および  $\mu_2$  オピオイド受容体を選択的に介して発現している事を強く示唆している。また本実験結果から、上位中枢および脊髄の両部位に、鎮痛作用の発現に関与している  $\mu_1$  オピオイド受容体および  $\mu_2$  オピオイド受容体が共に存在する事が初めて明らかとなった。

本研究の formalin 法を用いた鎮痛試験において、TAPA の i.c.v. 投与により誘発される鎮痛作用は、naloxonazine の前処置により有意に拮抗されたが、TAPA-NH<sub>2</sub> の i.c.v. 投与により誘発される鎮痛作用は、naloxonazine の前処置により全く影響を受けなかった。この実験結果は、tail-pressure 法における実験結果と極めて一致するものであった。これに対し、TAPA および TAPA-NH<sub>2</sub> の i.t. 投与により誘発される鎮痛作用は共に、naloxonazine の前処置により有意に抑制された。しかしながら、naloxonazine の鎮痛作用抑制効果は TAPA-NH<sub>2</sub> において極めて弱く、TAPA の用量反応曲線が 18.15 倍右にシフトしたのに対し、TAPA-NH<sub>2</sub> の用量反応曲線は 4.32 倍右にシフトしたにすぎなかった。我々は以前、同様の現象を DAMGO において発見している。DAMGO の i.t. 投与により誘発される鎮痛作用は、機械刺激に対しては  $\mu_2$  オピオイド受容体を介して発現するが<sup>14)</sup>、formalin 法においては naloxonazine によって有意な拮抗を受ける。TAPA-NH<sub>2</sub> の場合と同様に、DAMGO の用量反応曲線は naloxonazine の前処置により 2.67 倍右にシフトするにすぎない。Formalin 法において、TAPA-NH<sub>2</sub> および DAMGO の i.t. 投与によって誘発される鎮痛作用は、共に  $\beta$ -

funaltrexamine の前処理によって完全に消失することから、この鎮痛作用は  $\mu_1$  オピオイド受容体と  $\mu_2$  オピオイド受容体の双方を介して発現するものと考えられる。この事実は、侵害刺激の種類が異なることにより、その抑制作用機序（鎮痛作用機序）も異なる可能性を示している。機械刺激の場合とは異なり、formalin による侵害刺激の抑制には、脊髄  $\mu_1$  オピオイド受容体の方が  $\mu_2$  オピオイド受容体よりもより強く関与しているのかもしれない。

本研究において、TAPA および TAPA-NH<sub>2</sub> の鎮痛作用は、それぞれ  $\mu_1$  オピオイド受容体および  $\mu_2$  オピオイド受容体を選択的に介して発現していることが明らかとなった。TAPA および TAPA-NH<sub>2</sub> のアミノ酸配列上の違いが、C 末端のアミド基だけであることを考えると、この現象は極めて興味深いものである。Dermorphin 誘導体は C 末端側から酵素による代謝を受け、またペプチド C 末端のアミド基は酵素による代謝に対して保護効果を持つ事から、従来 dermorphin 誘導体 C 末端アミド基は誘導体の安定化に寄与していると考えられていた<sup>22,23)</sup>。本研究において我々は、ペプチド C 末端のアミド基が、結合する受容体を認識する上で極めて重要な役割を担っていることを、世界で初めて発見した。現時点では、この C 末端のアミド基がどの様に受容体の認識に関わっているのか全く不明である。 $\mu$  オピオイド受容体 (<sup>3</sup>H] DAMGO 結合部位、主に  $\mu_2$  オピオイド受容体) はマイナスに帯電しているため、オピオイドペプチドの C 末端にアミド基を導入しプラス帯電を増やすことによって、その親和性は上昇するという報告<sup>8)</sup> もあり、受容体とペプチドの帯電状態が受容体認識に関わっている可能性も考えられる。しかし、 $\mu_1$  オピオイド受容体および  $\mu_2$  オピオイド受容体の立体構造が確定していない現在、その仕組みを解明するにはさらなる研究が必要となるであろう。

結論として、本研究の結果から TAPA および TAPA-NH<sub>2</sub> は、それぞれ選択的  $\mu_1$  オピオイド受容体および  $\mu_2$  オピオイド受容体の作動薬である事が明らかとなった。また、TAPA-NH<sub>2</sub> の C 末

端に導入されたアミド基は,  $\mu_1$  オピオイド受容体および  $\mu_2$  オピオイド受容体を認識する上で極めて重要な部位である可能性が示唆された。

## REFERENCES

- 1) Montecucchi P. C., de Castiglione R., Piani S., Gozzini L., Erspamer V., *Int. J. Pept. Protein Res.*, **17**, 275-283 (1981).
- 2) Broccardo M., Erspamer V., Falconieri Erspamer G., Importa G., Linari P., Melchiorri P., Montecucchi P. C., *Br. J. Pharmacol.*, **73**, 625-631 (1981).
- 3) Krumins S., *Neuropeptides*, **9**, 93-102 (1987).
- 4) Salvadori S., Sarto G., Tomatis R., *Int. J. Protein Res.*, **19**, 536-542 (1982).
- 5) Chaki K., Sakurada S., Sakurada T., Sato T., Kawamura S., Kisara K., Watanabe H., Suzuki K., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **31**, 439-444 (1988).
- 6) Sasaki Y., Matsui M., Taguchi M., Suzuki K., Sakurada S., Sato T., Sakurada T., Kisara K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **120**, 214-218 (1984).
- 7) Sato T., Sakurada S., Sakurada T., Kisara K., Sasaki Y., Suzuki K., *Peptides*, **6**, 35-40 (1985).
- 8) Sasaki Y., Ambo A., Suzuki K., *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 2316-2318 (1991).
- 9) Nishimura S. L., Recht L. D., Pasternak G. W., *Mol. Pharmacol.*, **25**, 29-37 (1984).
- 10) Pasternak G. W., Childers S. R., Snyder S. H., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **214**, 455-462 (1980).
- 11) Wolozin B. L., Pasternak G. W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6181-6185 (1981).
- 12) Pasternak G. W., *Clin. Neuropharmacol.*, **16**, 1-18 (1993).
- 13) Elliott J., Smart D., Lambert D. G., Traynor J. R., *Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol. Sec.*, **268**, 447-450 (1994).
- 14) Sakurada S., Zadina J. E., Kastin A. J., Katsuyama S., Fujimura T., Murayama K., Yuki M., Ueda H., Sakurada T., *Eur. J. Pharmacol.*, **372**, 25-30 (1999).
- 15) Sato T., Sakurada S., Takahashi N., Sakurada T., Tan-No K., Wako K., Kisara K., *Eur. J. Pharmacol.*, **369**, 183-187 (1999).
- 16) Haley M. J., McCormick W. G., *Br. J. Pharmacol.*, **12**, 12-15 (1957).
- 17) Hylden J. L. K., Wilcox G. L., *Eur. J. Pharmacol.*, **167**, 313-316 (1980).
- 18) Sakurada S., Watanabe T., Sakurada T., Ando R., Kisara K., Sasaki Y., Suzuki K., *J. Pharm. Pharmacol.*, **38**, 230-232 (1986).
- 19) Heyman J. S., Williams C. L., Burks T. F., Mosberg H. I., Porreca F., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **245**, 238-243 (1988).
- 20) Pasternak G. W., Wood P. J., *Life Sci.*, **38**, 1889-1898 (1986).
- 21) Sakurada S., Hayashi T., Yuhki M., Fujimura T., Murayama K., Yonezawa A., Sakurada C., Takeshita M., Zadina J. E., Kastin A. J., Sakurada T., *Brain Res.*, **881**, 1-8 (2000).
- 22) Chaki K., Sakurada S., Sakurada T., Kisara K., Suzuki K., *Life Sci.*, **46**, 1671-1678 (1990).
- 23) Negri L., Improta G., *Pharmacol. Res. Commun.*, **16**, 1183-1194 (1984).