

## 主 題 2

オピオイド創薬の新展開

# 2-1

## マトリン型ルピンアルカロイドの抗侵害作用

肖平<sup>1</sup>、久保元<sup>1</sup>、東山公男<sup>1</sup>、○大宮茂<sup>1</sup>、大沢匡弘<sup>2</sup>、  
亀井淳三<sup>2</sup>、長瀬博<sup>3</sup>、李家実<sup>4</sup>、閻玉凝<sup>4</sup>

(星薬大・医薬研<sup>1</sup> 星薬大・医療薬学第二<sup>2</sup> 東レ(株)基  
礎研究所<sup>3</sup> 北京中医薬大<sup>4</sup>)

マメ科の *Sophora* 属植物には漢方薬として使われているものが多い、苦参 (*S. flavescens* の根)、山豆根 (*S. tonkinensis* の根)、苦豆子 (*S. alopecuroides* の根または種子) 等は代表的であり、それらは主に解熱、解毒、抗炎症、抗腫瘍、鎮痛等に用いられる。一方、成分的にはルピンアルカロイドを含有し、特に、マトリン型を主成分とする。マトリン型のうち、(+)-matrine (1) が天然で最もよく見られる成分である。アルカロイドと漢方薬の薬効との関係を明らかにする試みから、1 の解熱、抗炎症、抗腫瘍作用等<sup>1)</sup> については報告されている。我々は鎮痛作用について検討を加え、(+)-matrine (1) には pentazocine と同程度の抗侵害活性があり、その作用が主に  $\kappa$ -、部分的に  $\mu$ -オピオイド受容体を介して起こることを明らかとした。<sup>2)</sup>

天然には(+)-matrine (1) の立体異性体あるいは誘導体が数多く存在しており、入手可能な数種のマトリン型アルカロイド (Chart 1) について抗侵害活性を比較したので報告する。

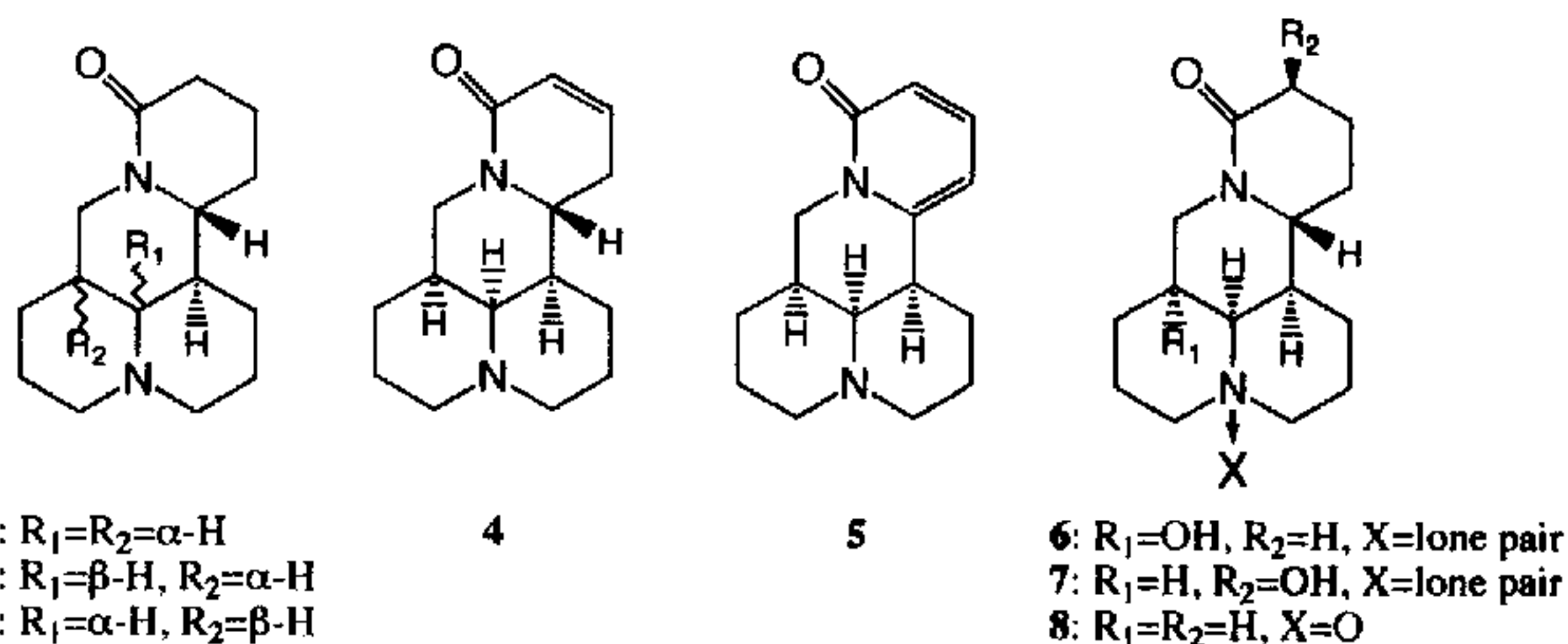


Chart 1.

## 実験方法

実験には、6週齢のICR系雄性マウスを用い、抗侵害効果は酢酸ライジング法およびtail-flick法により測定した。

酢酸ライジング法；薬物を皮下投与した30分後に、0.7% AcOHを10 ml/kgの割合で腹腔内に投与し、10分後から10分間に引き起こされるライジングの回数を測定した。

Tail-flick法；薬物投与前に反応潜時が2～3秒になるように輻射熱ランプの強度を調節した。また、cut-off timeは15秒に設定した。

オピオイド受容体拮抗薬；薬物は生理食塩水に溶解した溶液を用いた。選択的 $\mu$ -オピオイド受容体拮抗薬として $\beta$ -funaltrexamine (20 mg/kg, s.c.)を用い、薬物投与の24時間前に投与した。 $\delta$ -オピオイド受容体拮抗薬はnaltrindole (1 mg/Kg, s.c.)を用い、薬物投与の15分前に投与した。 $\kappa$ -オピオイド受容体拮抗薬はnor-binaltorphimine (20 mg/Kg, s.c.)を用い、薬物投与の3時間前に投与した。

## 実験の結果および考察

酢酸ライジング法では(+)-matrine (1)の立体異性体の(+)-allomatrine (2)および(-)-sophoridine (3)、水酸化体の(+)-sophoranole (6)に用量依存的な抗侵害効果がみられ、その強さは(+)-matrine (1)のそれぞれ1/3、1/3、および1/10であった。その他の誘導体では顕著な効果を示さなかった。これら効果を示した薬物の内、比較的作用の強い1の立体異性体である2および3に対してtail-flick法を用いて更に検討を加えた。1、2および3の抗侵害効果は投与後30分で最大値となり徐々に減少した。また、1 (10~100 mg/kg, s.c)と2 (30~180 mg/kg, s.c)は用量依存的に作用を示し、2効果は1の1/3あった。3は顕著な効果を示さなかった。

(+)-allomatrine (2)の作用機序を明らかにするために $\mu$ -、 $\delta$ -および $\kappa$ -オピオイド受容体の選択的拮抗薬である $\beta$ -funaltrexamine、naltrindole、nor-binaltorphimineを用いて、抗侵害作用に対する効

果を検討した。その結果、2 は nor-binaltorphimine によって顕著に拮抗され、 $\beta$ -funaltrexamine、naltrindole では殆ど影響を受けなかった (Fig. 1)。

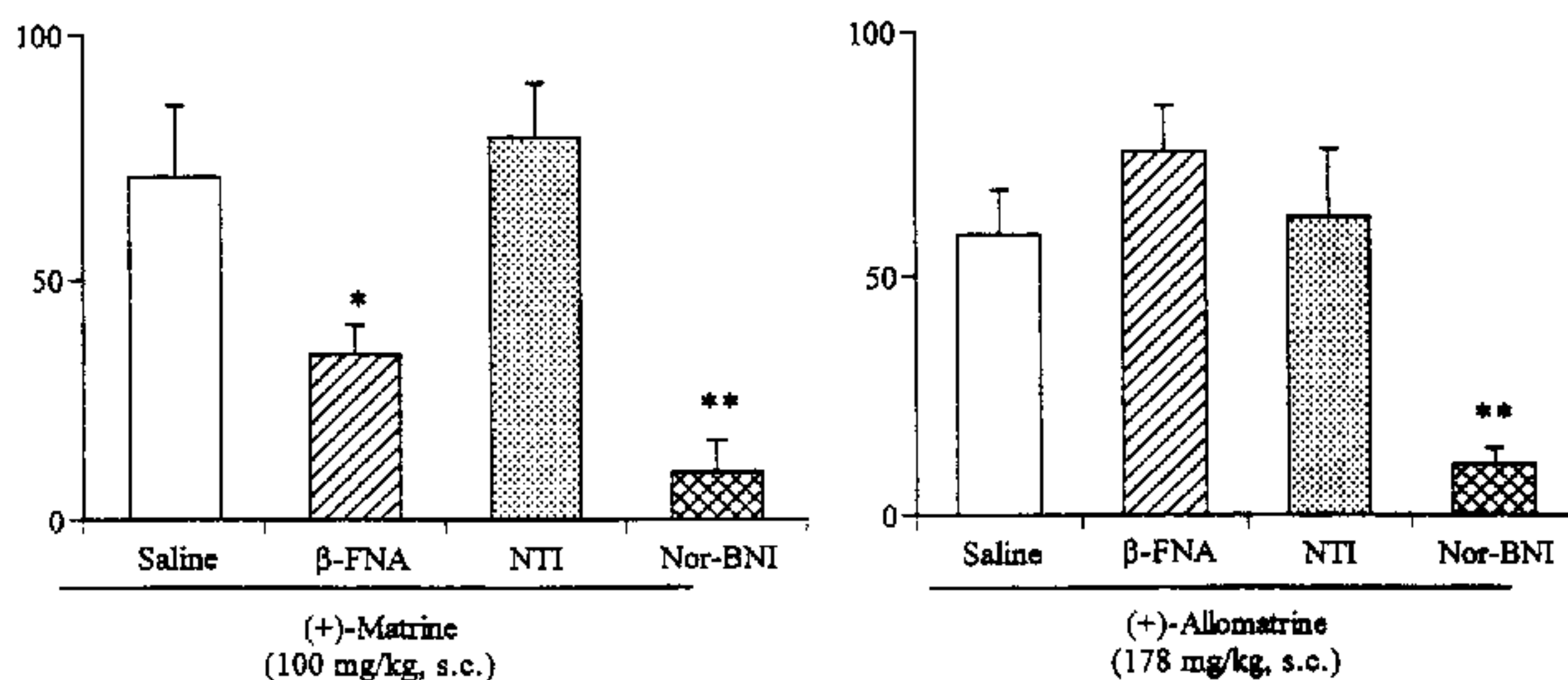


Fig. 1. Blockade of the antinociceptive effect of (+)-matrine (1) and (+)-allomatine (2)

このように、(+)-matrine (1) に水酸基 ((+)-sophoranol (6)、(-)-14 $\beta$ -hydroxymatrine (7)) あるいは N-oxide 基のような親水性基が存在すると抗侵害作用は弱くなる。特に、親水性の強い N-oxide 基を持つ (+)-matrine N-oxide (8) では作用が殆ど見られなかった。また、1 の D 環に二重結合を持つ (-)-sophocarpine (4) あるいは (-)-sophoramine (5) も有意な効果を示さなかった。立体異性体である (-)-sophoridine (3) は酢酸ライジング法では抗侵害作用を示したが、tail-flick 法では顕著な効果を示さなかった。(+)-allomatine (2) では 1 と同様  $\kappa$ -受容体を介して抗侵害作用を示した。興味あることに作用の強度は 1 の約 3/1 に減少したが、 $\kappa$ -受容体に対する選択性は増強された。

以上の結果から、マトリン型アルカロイドの抗侵害効果はアルカロイドの親油性および立体構造の変化が、作用の強さ、受容体の選択性などに微妙に関与しているものと考えている。

一方、現在までに見出されてきた選択的  $\kappa$ -受容体オピオイド受容体作動薬としては、-N-C-C-N(sp<sup>2</sup>) フェーマコフォーを持つ U-50488、

PD 117302、ICI 199441 等<sup>3)</sup>あるいは(-)-morphineの骨格を有するKT-95<sup>4)</sup>、TRK-820<sup>5)</sup>などがあるが、(+)-matrine(1) (+)-allomatrine(2)の構造はこれらとは異なり、新しい骨格の選択的κ-受容体オピオイド受容体を介する鎮痛薬としてこれからの発展が期待される。

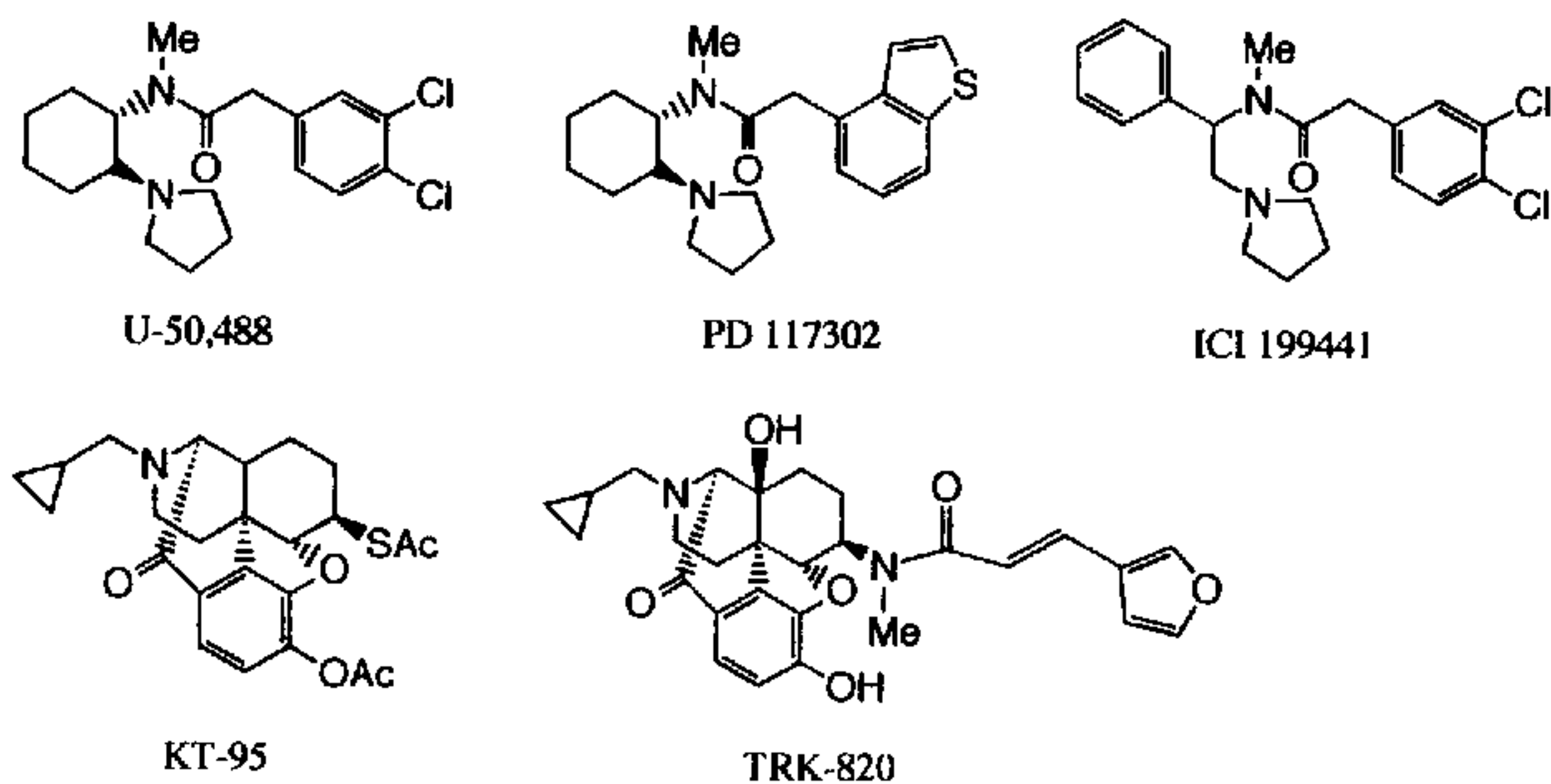


Chart 2.

[ 文 献 ]

- 1) S. Ohmiya, K. Saito and I. Murakoshi, *The Alkaloids* (ed. by G. A. Cordell), Academic Press, California, 1995, pp. 1-114.
- 2) J. Kamel, P. Xiao, M. Ohsawa, H. Kubo, K. Higashiyama, H. Takahashi, J.-S. Li, H. Nagase and S. Ohmiya (1997) *Eu. J. Pharmacol.* **337**, 223.
- 3) D. M. Zimmerman and L. D. Leader (1990) *Med. Chem.*, **33**, 895.
- 4) R. Hosoki, S. Niizawa, K. Kolke, T. Sagara, K. Kanematsu and I. Takayanagi (1996) *Arch. Internat. Pharm. Therap.*, **331**, 136.
- 5) H. Nagase, J. Hayakawa, K. Kawamura, K. Kawai, Y. Takezawa, H. Matsuura, C. Tajima and T. Endo (1998) *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 366.

# 2-2

## 東南アジア産薬用植物 *Mitragyna speciosa* に含有される新規鎮痛性インドールアルカロイドの化学的・薬理的展開

高山 廣光 (千葉大・薬 薬用資源教育研究センター)

アカネ科植物ミトラガイナ・スペシオーサ (*Mitragyna speciosa*) は、タイ国内では"Kratom"、マレーシアでは"Biak Biak"と呼ばれる伝承民間薬で、その葉部を咀嚼することによりモルヒネの代用やアヘンの禁断症状治療薬として使用されてきた<sup>1)</sup>。われわれは、本薬用植物が示す薬効の化合物レベルでの解明とこの知見を基盤とした新規医薬品開発のための先導物質創製を目的として、下記の研究を行った。

### 1) *Mitragyna speciosa* 含有成分の探索

神経薬理学的一次スクリーニングの結果、タイ産標記植物葉部のメタノール抽出エキスから得られたアルカロイド分画に比較的強い鎮痛活性が見出された。そこで、本植物含有アルカロイド成分の検索を詳細に行った。タイにて採集した植物からは、Corynanthe型インドールアルカロイドの Mitragynine (MG) (1) が主塩基 (粗アルカロイド分画の66%) として得られ、その他に3位, 20位の立体異性体3種と共に、インドール核が酸化された形の新塩基 7-hydroxy-indolenine体 (5) を得た (Fig. 1)<sup>2)</sup>。一方、マレーシア産同植物からは、上記5種の化合物に加え、5種の新微量成分 (6-10) を単離、構造決定することができた。これらの構造は、各種スペクトル解析や全合成により決定した (Fig. 2)<sup>3)</sup>。

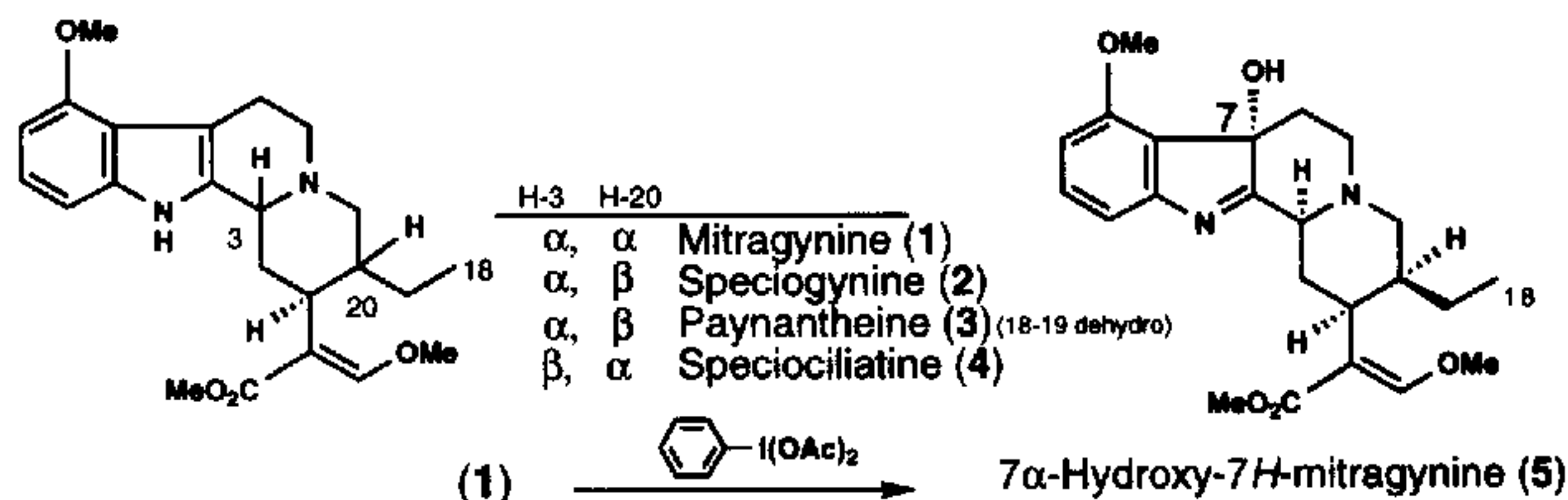


Fig. 1

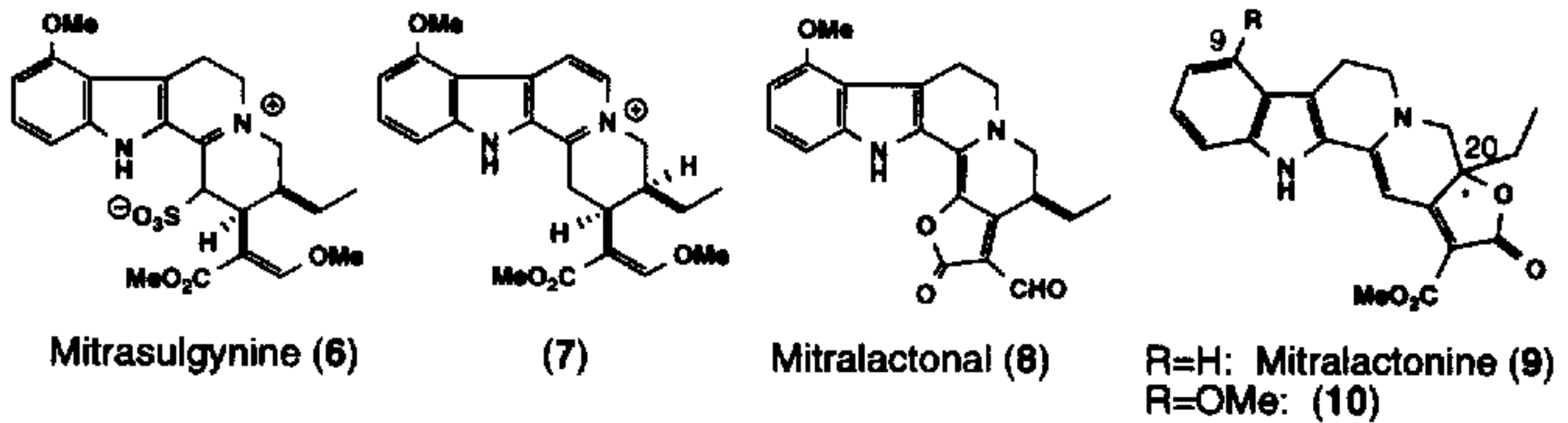


Fig. 2

II) Mitragynine の鎮痛活性と薬理的解析

主塩基 Mitragynine (MG) の鎮痛作用に関してはこれまでに Smith, Kline & French 社が検討しており、モルヒネの作用とは異なるものと結論付けられていた<sup>1)</sup>。しかし、摘出モルモット回腸を用いて検討したところ、オピオイド受容体に作用することが明かとなった<sup>4,5,6,7)</sup>。次に、モルモット大脳皮質膜標本を用い、各種オピオイド受容体に対する受容体結合実験を行った。その結果、MG は  $\mu$ -受容体に対して高親和性を示し、その強さはモルヒネと同程度であった。さらに、マウスを用いた *in vivo* における抗侵害作用を検討した結果、MG は脳室内投与およびクモ膜下腔内投与により濃度依存的な抗侵害作用を示したことから、中枢上位および脊髓レベルに作用し鎮痛作用を発現することが示唆された。

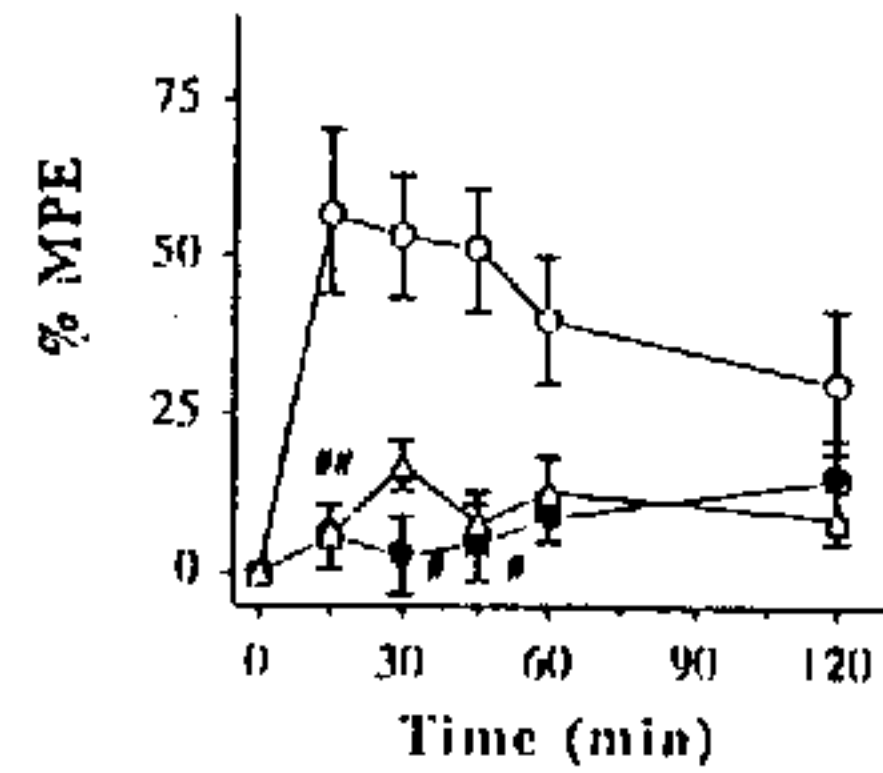
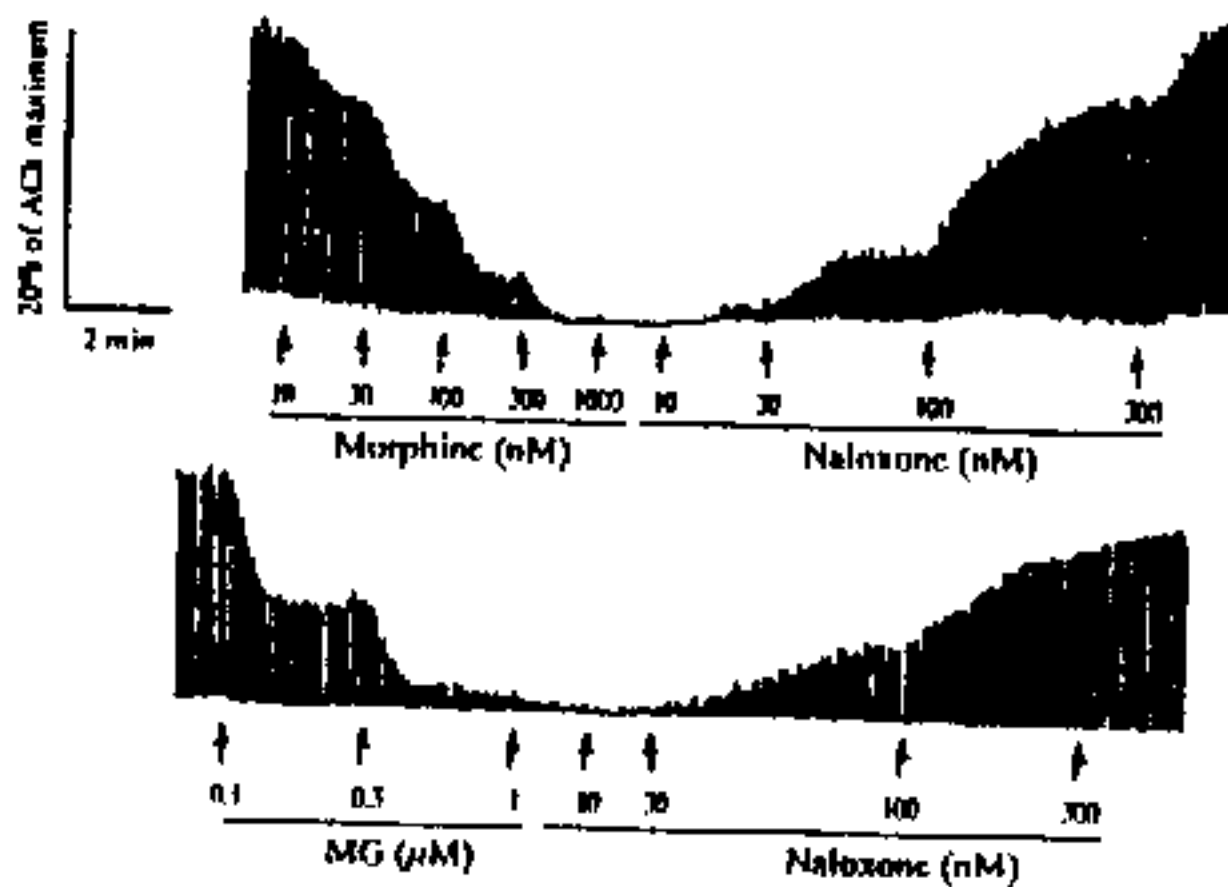


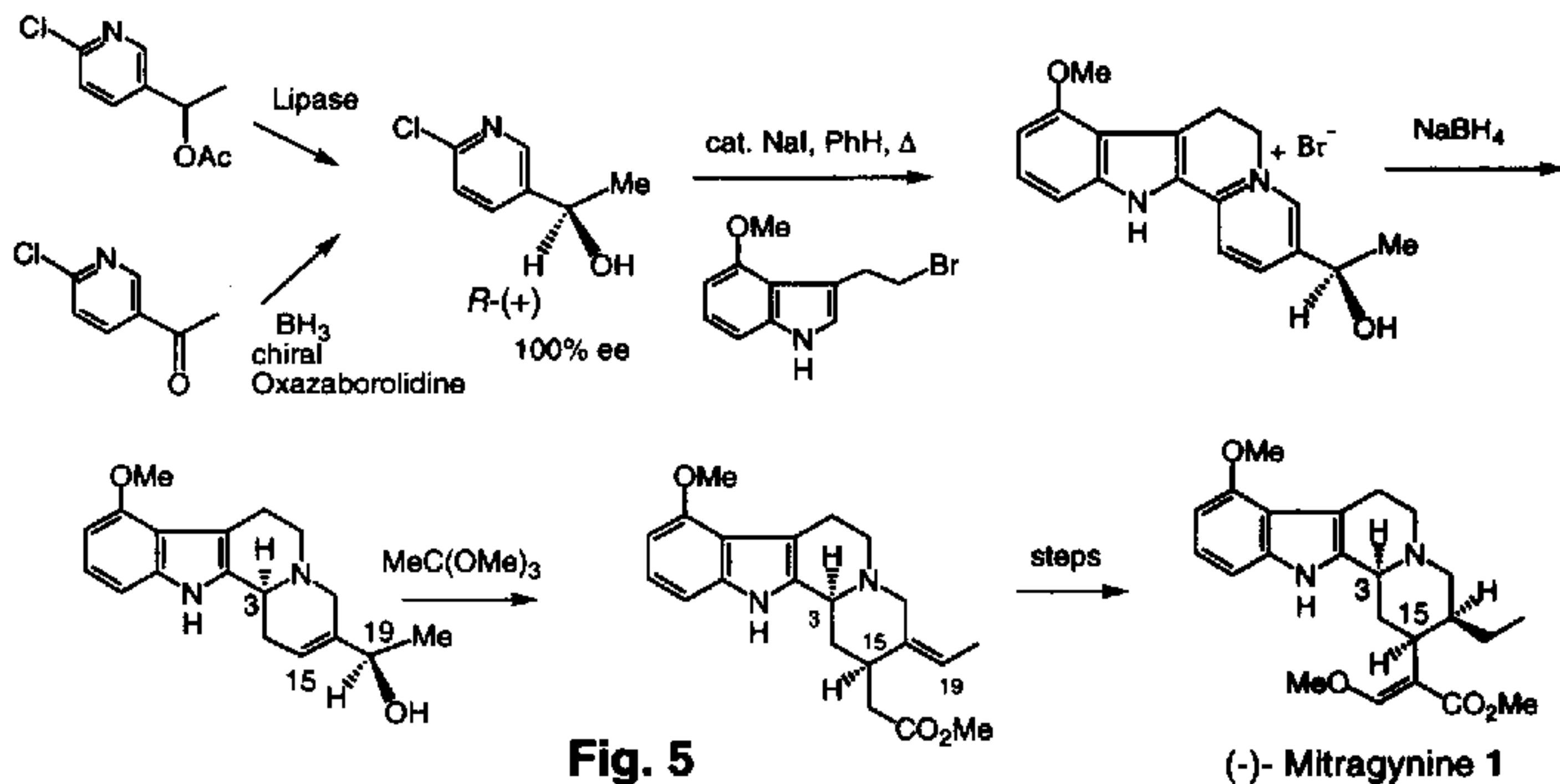
Fig. 4: Effects of naloxone on antinociceptive activity of i.c.v. administered mitragynine (MG, 30  $\mu$ g/mouse  $\circ$ ) in the tail-flick test. Naloxone was administered 15 min before MG ( $\bullet$ ). Naloxone alone ( $\Delta$ ).

	[ <sup>3</sup> H]DAMGO ( $\mu$ -sites)	[ <sup>3</sup> H]DPDPE ( $\delta$ -sites)	[ <sup>3</sup> H]U-69593 ( $\kappa$ -sites)	$\mu/\delta$	$\mu/\kappa$
MG	7.63 $\pm$ 0.20	6.88 $\pm$ 0.22	5.74 $\pm$ 0.24	6	83
MGPI	9.55 $\pm$ 0.39	8.18 $\pm$ 0.22	6.88 $\pm$ 0.32	23	467
Mor	7.94 $\pm$ 0.29	6.04 $\pm$ 0.13	6.16 $\pm$ 0.17	80	60
DAMGO	8.90 $\pm$ 0.14	6.37 $\pm$ 0.26	4.87	339	10,715

Table 1:  $\text{pIC}_{50}$  and selectivities of mitragynine (MG), mitragynine pseudoindoxyl (MGPI) and morphine for opioid receptors determined by inhibition experiments in guinea pig brain homogenates.

### III) 主塩基 Mitragynine の不斉全合成

鍵化合物である MG を化学的手段により容易に供給可能なルートの確立を目的として、不斉全合成を計画した。酵素反応あるいはケトンの不斉還元によって得られた光学活性二級アルコールピリジン誘導体を出発原料として、4-methoxyindoleとの縮合、還元によりアリルアルコール体を得た。これをクライゼン転位に付して立体選択的に側鎖を導入し、集約的ルートによる光学活性な Mitragynine (1) の合成法を開拓できた<sup>9</sup>。



### IV) Mitragynine 関連化合物の合成と構造活性相関の検討

MG に顕著な鎮痛活性が見出されたことから、その異性体や各種誘導体を合成し、構造活性相関の検討と作用発現に必要な化学構造を考察した。

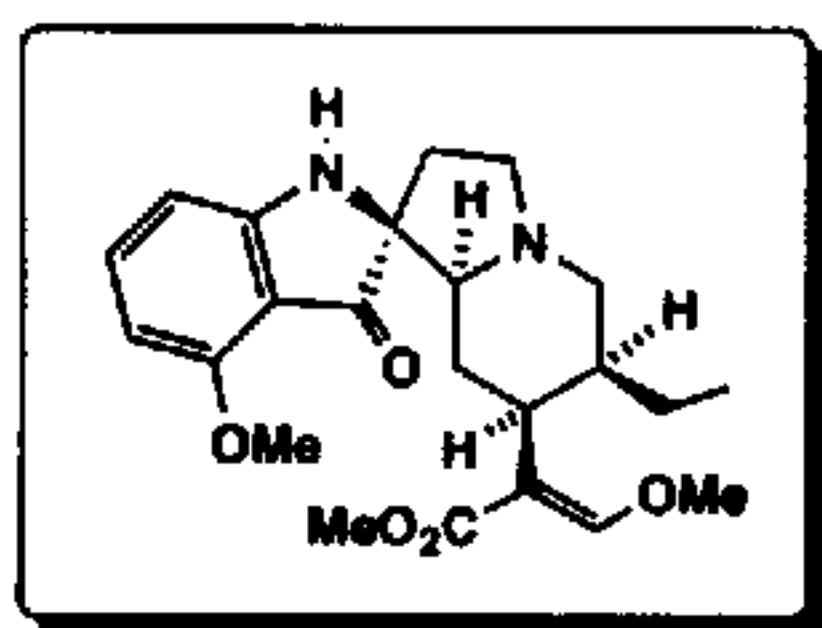
まず、MG のインドール核における各種酸化誘導体を調製し、鎮痛活性を評価した。この中で、特に、Mitragynine pseudoindoxyl (MG-PI) (11)<sup>9, 10</sup> は、モルモット回腸、マウス輸精管標本におけるオピオイド受容体刺激作用がモルヒネの20~40倍強力であることが明らかとなった。さらに、本化合物は、 $\mu$ -、 $\delta$ -受容体に作用することにより鎮痛活性を発現していることが示された。(Fig. 6)

ミトラガイナアルカロイドはインドール核の9位にメトキシ基を有することが化学構造的特徴である。漢薬 "釣藤鈎" の成分であり、本官能基が欠如した形の化合物 Corynantheidine (12) や Hirsutine では鎮



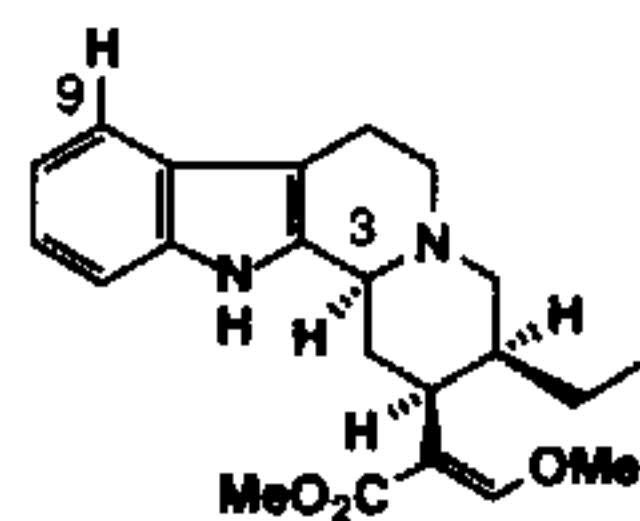
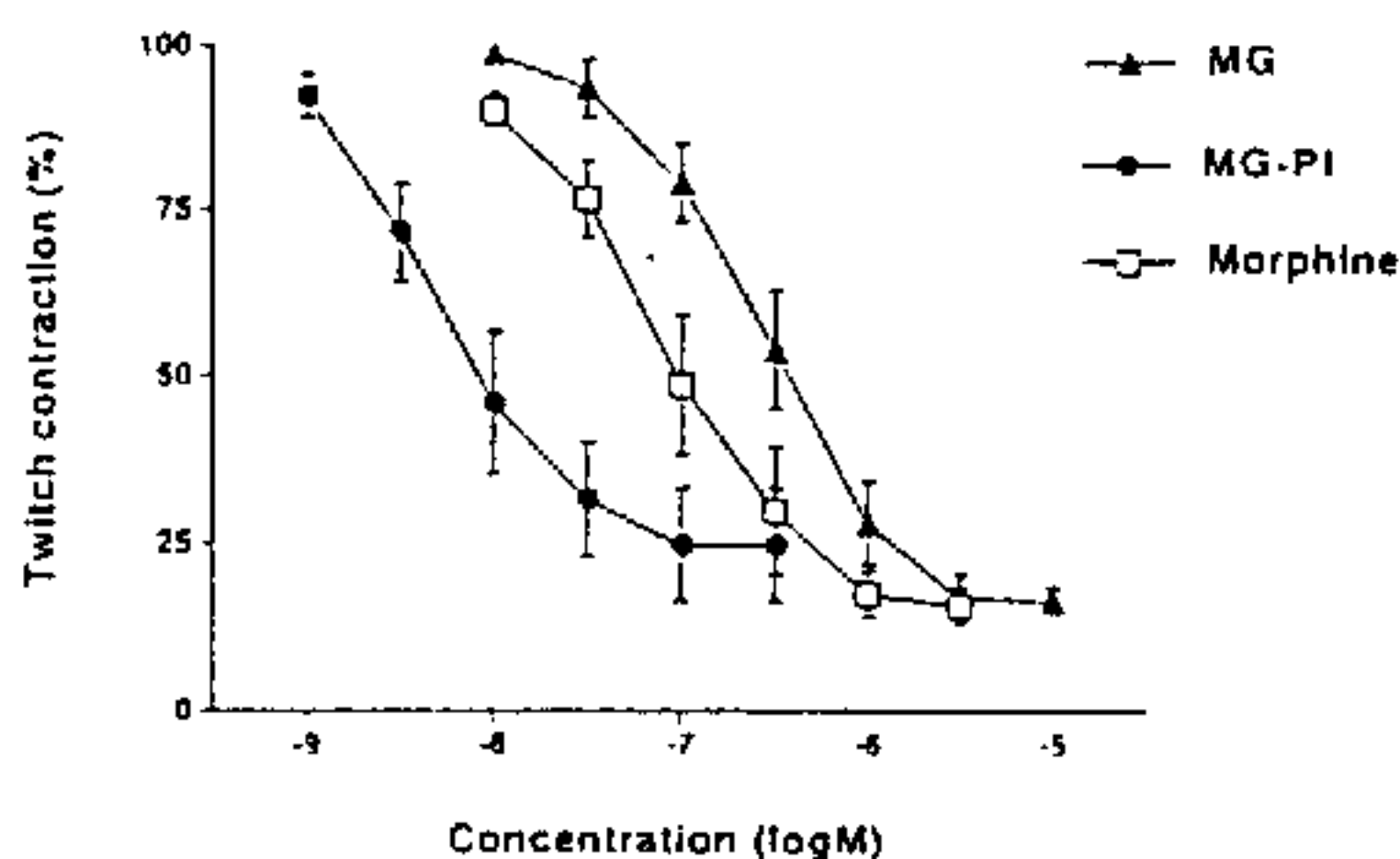
痛活性を全く示さなかったことから、9-Methoxyl 基の存在が必須であることが明かとなった。また、N-oxide 誘導体 (13) の活性評価の結果、三級窒素(N<sub>b</sub>)孤立電子対の存在も活性発現に必要であることがわかった。(Fig. 7) MG (1) はC/D環がtransquinolizidine型を有し、分子全体が平面性を有している。(Fig. 8) cis-Quinolizidine型のSpeciociliatine(4)の鎮痛効力との比較により、分子全体が折れ曲がった型 (folded-form) よりも平面型 (extended-form) の方が、オピオイド活性に有利であることが示された。さらにエチル側鎖の立体配置などについて検討することにより、作用発現の構造的要因について明らかにした。

また、分子軌道法を用いた計算によりMG (あるいは MG-PI) とモルヒネには三次元的構造上の相同性がほとんど見られないことが明かとなった。したがって、ミトラガイナルカロイドが既存のオピオイドアゴニストとは化学構造を全く異にすることから、新たな鎮痛薬開発先導化合物として位置づけることができると考えている。

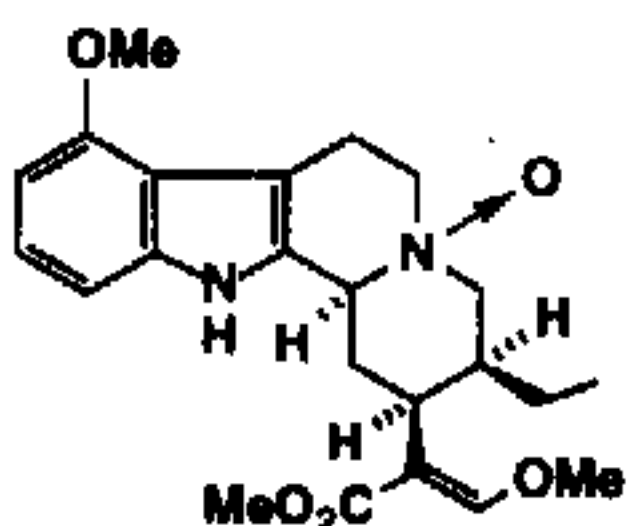


Mitragynine pseudoindoxyl (11)

Fig. 6



Corynantheidine (12)



Mitragynine N-oxide (13)

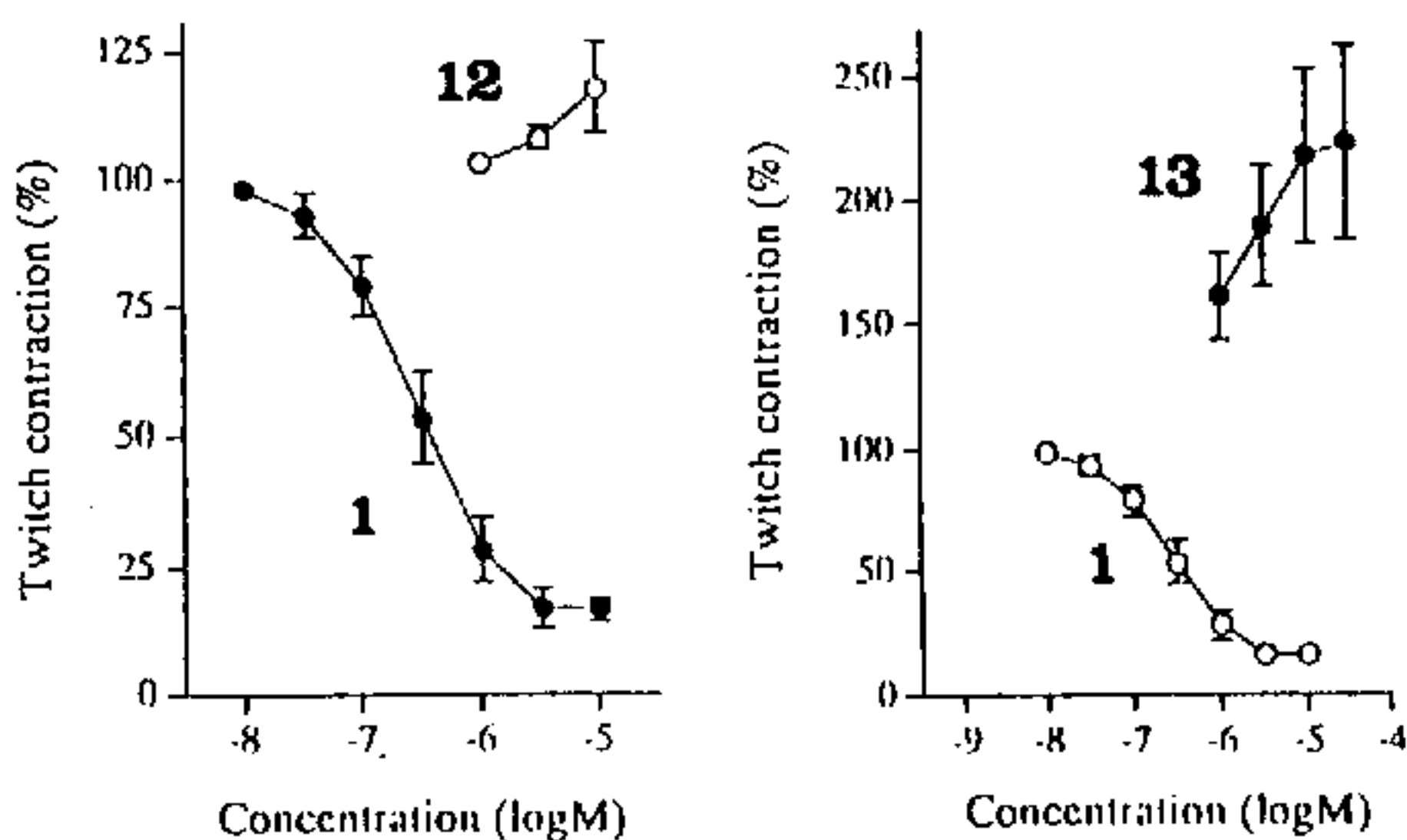
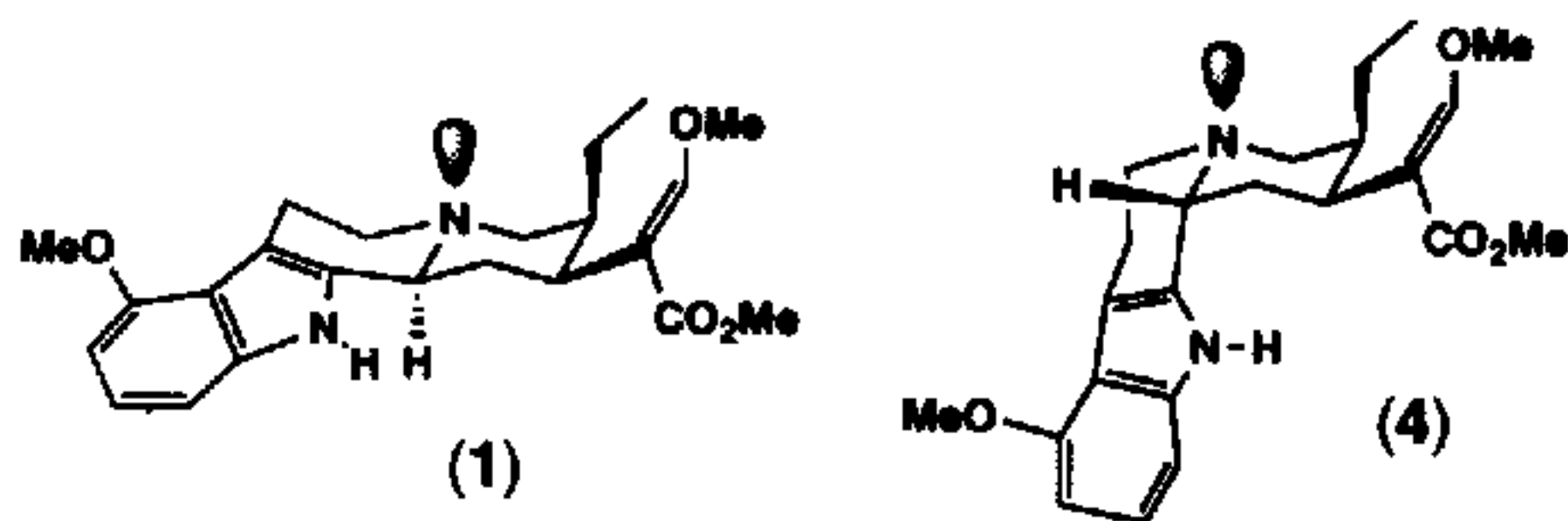


Fig. 7



**Fig. 8**

## References

- 1) K. L. R. Jansen and C. J. Prast, *J. Ethnopharmacology*, **23**, 115 (1988).
- 2) D. Ponglux, S. Wongseripipatana, H. Takayama, M. Kikuchi, M. Kurihara, M. Kitajima, N. Aimi, and S. Sakai, *Planta Medica*, **60**, 580 (1994).
- 3) H. Takayama, M. Kurihara, M. Kitajima, I. M. Said, and N. Aimi, *Tetrahedron*, **54**, 8433 (1998).
- 4) K. Matsumoto, M. Mizowaki, T. Suchitra, H. Takayama, S. Sakai, N. Aimi, and H. Watanabe, *Life Sciences*, **59**, 1149 (1996).
- 5) K. Watanabe, S. Yano, S. Horie, and L. T. Yamamoto, *Life Sciences*, **60**, 933 (1997).
- 6) S. Thongpradichote, K. Matsumoto, M. Tohda, H. Takayama, N. Aimi, S. Sakai, and H. Watanabe, *Life Sciences*, **62**, 1371 (1998).
- 7) K. Watanabe, S. Yano, S. Horie, L. T. Yamamoto, H. Takayama, N. Aimi, S. Sakai, D. Ponglux, P. Tongroach, J. Shan, and P. K. T. Pang, in "Recent Advances in Pharmacological Research on Traditional Herbal Medicine." Gordon and Breach, Science Publishers, Inc. (1998), in press.
- 8) H. Takayama, M. Maeda, S. Ohbayashi, M. Kitajima, S. Sakai, and N. Aimi, *Tetrahedron Letters*, **36**, 9337 (1995).
- 9) J. E. Zarembo, B. Douglas, J. Valenta, and J. A. Weisbach, *J. Pharmaceutical Sci.*, **63**, 1407 (1974).
- 10) H. Takayama, M. Kurihara, S. Subhadhirasakul, M. Kitajima, N. Aimi, and S. Sakai, *Heterocycles*, **42**, 87 (1996).

## 2-3 糖尿病マウスにみられる allodynia および hyperalgesia 発症機序

○亀井 淳三、大澤 匡弘  
星薬科大学医療薬学第2研究室

### 【はじめに】

糖尿病時には、侵害刺激に対する感受性が亢進することが認められている。近年、我々は糖尿病動物におけるオピオイド受容体を介した抗侵害作用が変化しており、その原因として protein kinase C (PKC) 活性の上昇<sup>1)</sup> および細胞内カルシウム量の上昇<sup>2)</sup> が関与していることを報告している。有痛性神経障害モデルラットの脊髄において PKC 活性の上昇による痛覚伝達系の亢進が起きていることが報告されている<sup>3)</sup>。一方、カルシウムは痛覚伝達に重要な役割を果たしていることが知られており、カルシウムチャネル阻害薬により脊髄での痛覚伝達が抑制されることが報告されている<sup>4)</sup>。さらに、カルシウムチャネル阻害薬により hyperalgesia が抑制されることも報告されている<sup>5)</sup>。そこで本研究では、糖尿病マウスにおける allodynia および hyperalgesia 発症機序を明らかにする一環として、糖尿病時に認められる allodynia および hyperalgesia に対する PKC および細胞内カルシウムの関与を検討した。

### 【方法】

実験には、4週齢の ICR 系雄性マウスを用いた。ストレプトゾトシン (STZ; 200 mg/kg) または、その溶媒であるクエン酸緩衝液を尾側静脈より投与したものを糖尿病および対照群マウスとした。STZ 投与後 2 週間経過したものを実験に用いた。侵害受容閾値の測定は輻射熱による tail-flick 反応潜時を測定することにより行った。熱刺激は、白色光ランプ (50 W) に 25-80 V の電圧をかけることにより与えた。最大刺激時間 (cut-off time) は、組織の障害を考慮して、30 秒に設定した。PKC 活性化薬の phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu)、PKC 阻害薬の calphostin C および細胞内 Ca<sup>2+</sup>量を増加させる薬物である

thapsigargin は、それぞれ tail-flick 潜時測定の前1時間前に投与した。細胞内  $Ca^{2+}$  量を減少させる薬物である ryanodine は tail-flick 潜時測定の前15分前に髄腔内投与した。また、カプサイシンは tail-flick 潜時測定の前24時間前に投与した。薬物はすべて、髄腔内に投与した。

### 【結果】

#### 1. 糖尿病マウスに認められる allodynia および hyperalgesia

図1に示すように、対照群マウスにおいて、25 および 35V の電圧負荷による熱刺激は、tail-flick 反応を起こさなかった。しかし、負荷電圧を 50V にまで増加させた際には、tail-flick 反応が認められた。さらに、負荷電圧を 65 および 80V まで増加させた時には、tail-flick 反応潜時はそれぞれ、約 3 秒および 2.2 秒へとそれぞれ短縮した。一方、糖尿病マウスにおいては、負荷電圧 35 V の熱刺激から tail-flick 反応が認められ、それ以降、電圧に依存した tail-flick 反応潜時の短縮が認められた(図1)。糖尿病マウスにおける 35 および 50 V の熱刺激を与えた際の tail-flick 反応潜時は、対照群マウスと比べ有意に短縮していた。しかし、25、60 および 80V の負荷電圧による熱刺激の際の tail-flick 反応潜時には、糖尿病および対照群マウスの間に有意な差は認められなかった。

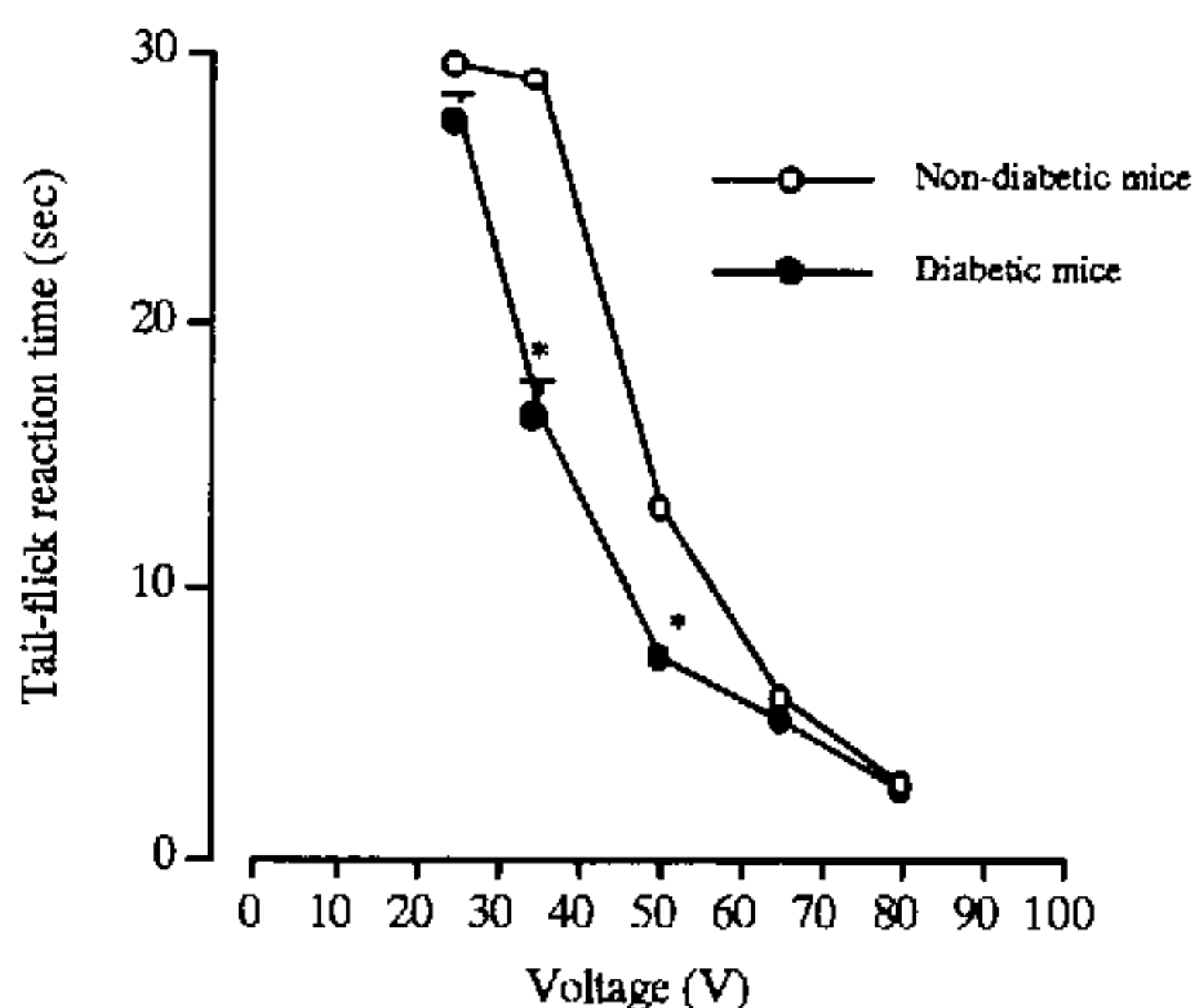


Fig. 1. Tail-flick latency at various intensities of heating in diabetic and non-diabetic mice. Each point represents the mean with S.E. for 10 mice in each group. \* $P < 0.05$  compared with respective non-diabetic mice.

## 2. 糖尿病マウスに認められる allodynia および hyperalgesia に対するカプサイシン前処置の影響

糖尿病マウスにおいて認められた、負荷電圧 35 および 50V の熱刺激に対する tail-flick 反応潜時の対照群マウスのそれと比べた短縮は、対照群マウスの tail-flick 潜時に影響を与えない用量のカプサイシン (0.56 nmol) の 24 時間前処置により延長し、対照群マウスとほぼ同程度にまで回復した (図 2)。

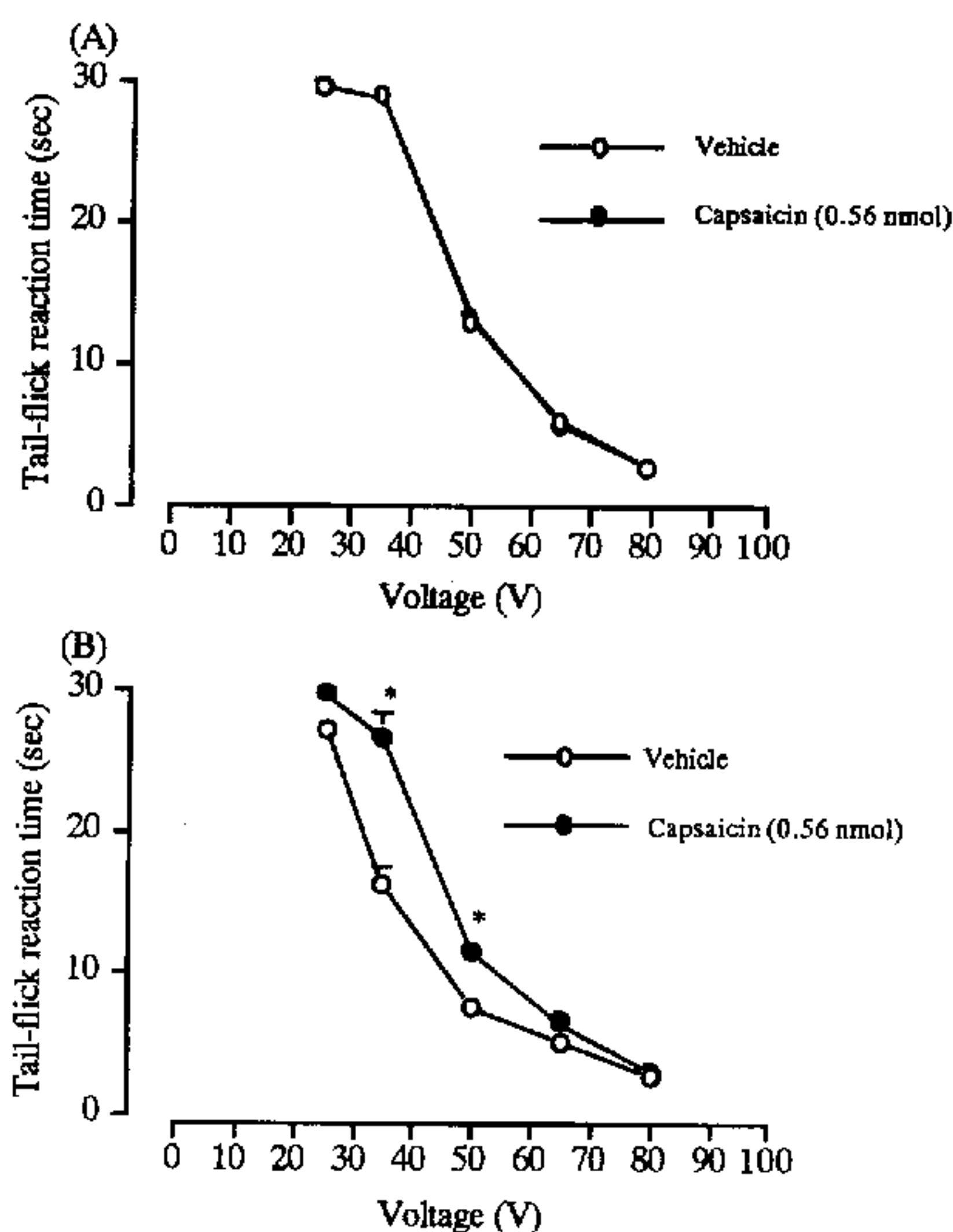


Fig. 2. Effect of capsaicin on tail-flick latency at various intensities of heating in non-diabetic (A) and diabetic (B) mice. Capsaicin (0.56 nmol) and its vehicle were injected i.t. 24 h before testing. Each point represents the mean with S.E. for 10 mice in each group. \* $P < 0.05$  compared with respective vehicle-treated group.

## 3. Allodynia および hyperalgesia の発現における PKC の関与

糖尿病マウスにおける負荷電圧 35 および 50V の熱刺激での tail-flick 潜時は、PKC 阻害薬である calphostin C (3 pmol, i.t.) 投与によ

り延長し、対照群マウスとほぼ同程度にまで回復した。また、PKC 活性化薬である PDBu (100 pmol, i.t.) は、対照群マウスにおける負荷電圧 35 および 50V の熱刺激に対する tail-flick 反応潜時を短縮させたが、糖尿病マウスにおける tail-flick 反応潜時に対しては有意な影響を与えなかった。一方、protein kinase A 阻害薬である KT5720 (10 pmol, i.t.) は、対照群および糖尿病マウスにおける tail-flick 反応潜時に対し、有意な影響を与えなかった。また、対照群マウスにおける PDBu (100 pmol, i.t.) による tail-flick 反応潜時の短縮は、カプサイシン (0.56 nmol, i.t., 24 時間前処置) により有意に延長した。

4. Allodynia および hyperalgesia の発現における細胞内  $Ca^{2+}$  の関与  
対照群マウスの tail-flick 反応潜時に影響を与えない用量の ryanodine (0.3 - 1 nmol, i.t.) により糖尿病マウスにおける負荷電圧 35 および 50V の熱刺激での tail-flick 反応潜時は用量依存的かつ有意に延長し、1 nmol 投与により、対照群マウスとほぼ同程度にまで回復した。また、thapsigargin (0.3 - 1 nmol, i.t.) は対照群マウスにおける 35 および 50 V の熱刺激を加えた際の tail-flick 反応潜時を用量依存的かつ有意に短縮させたが、糖尿病マウスにおける tail-flick 潜時に対しては何ら影響を与えなかった。一方、対照群マウスにおける thapsigargin (1 nmol, i.t.) による tail-flick 反応潜時の短縮は、カプサイシン (0.56 nmol, i.t., 24 時間前処置) により有意な影響を受けなかった。

#### 【考察】

対照群マウスにおいて、PKC 活性化薬である PDBu により allodynia および hyperalgesia が発現し、糖尿病マウスでみられる allodynia および hyperalgesia が PKC 阻害薬である calphostin C により消失した。また、対照群マウスにおける PDBu 誘発の allodynia および hyperalgesia がカプサイシン処置により抑制されたこと、さらに、糖尿病マウスにおける allodynia および hyperalgesia もカプサイシン処置により消失したことから、糖尿病マウスにみられる allodynia および hyperalgesia の発現に、糖尿病マウスにおける脊髄での PKC 活性の上昇による substance P 神経系の機能亢進が一部関与している可能

性が示唆された。

一方、対照群マウスにおいて、小胞体の  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase を阻害し細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  量を増加させる thapsigargin により、allodynia および hyperalgesia が認められた。このことから、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  量の上昇により allodynia および hyperalgesia が発現することが明らかとなった。また、thapsigargin による allodynia および hyperalgesia はカプサイシンにより有意な影響を受けなかったことから、脊髄での痛覚伝達物質の遊離を上昇しているのではなく、一次求心線維以降の脊髄侵害受容神経に影響を与え、allodynia および hyperalgesia を発現することが示唆された。また、糖尿病マウスに認められる allodynia および hyperalgesia は、小胞体の  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを阻害し、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  量を減少させる ryanodine により抑制されたことから、脊髄での細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  量の上昇が関与していることが示唆された。

これらのことより、糖尿病時における PKC 活性の亢進が、細胞内カルシウム量の上昇をきたし、一次求心線維からのサブスタンス P などの伝達物質の遊離亢進および一次求心線維以降の脊髄侵害受容神経における伝達亢進を介して、allodynia および hyperalgesia を発現している可能性が示唆される。

#### 【文献】

- 1) Ohsawa, M. and Kamei, J.: Possible involvement of protein kinase C in the attenuation of DAMGO-induced antinociception in diabetic mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 339, 27-31 (1997).
- 2) Ohsawa, M., Nagase, H. and Kamei, J.: Role of intracellular calcium in modification of m- and d-opioid receptor-mediated antinociception by diabetes in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, in press (1998)
- 3)Coderre, T.: Contribution of protein kinase C to central sensitization and persistent pain following tissue injury, *Neurosci. Lett.*, 140, 181-184 (1992).
- 4) Malmberg, A.B. and Yaksh, T.L.: Voltage-sensitive calcium channels in spinal nociceptive processing: Blockade of N- and P-type channels inhibits formalin-induced nociception. *J. Neurosci.*, 14, 4882-4890 (1994)
- 5) Bowersox, S.S., Gadbois, T., Singh, T., et al.: Selective N-type neuronal voltage-sensitive calcium channel blocker, SNX-111, produces spinal antinociception in rat models of acute, persistent and neuropathic pain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 279, 1243-1249 (1996)

## 2-4 アロディニアの発現機構

○南 敏明<sup>1</sup>、森 秀磨<sup>1</sup>、伊藤誠二<sup>2</sup>

<sup>1</sup>大阪医科大学麻酔科学教室、<sup>2</sup>関西医科大学医化学教室

最近、痛みの発症機構として末梢組織からの入力インパルスの増大とともに、脊髄の神経細胞での反応性の亢進によるシナプス可塑性、すなわち機能的、構造的な変化が痛覚伝達に重要な機構であると考えられてきている。演者らはマウス髄腔内に投与したプロスタグランジン (PG) E<sub>2</sub> と PGF<sub>2α</sub> が生理活性物質としてはじめてアロディニア (非侵害性刺激による痛みの反応) を誘発することを見いだした (1,2)。一次求心性神経の痛覚伝達に関与する神経伝達物質はグルタミン酸が知られているが、薬理学的実験から、PGE<sub>2</sub> と PGF<sub>2α</sub> によるアロディニアはグルタミン酸 - 一酸化窒素 (NO) を介することを示し、PG によるアロディニアは中枢性の興奮性の増大に起因することを明らかにした (3-8)。

ノシセプチンは、17 個のアミノ酸からなるペプチドで、その構造はオピオイドペプチドのなかではダイノルフィン A に類似している (9-11)。演者らはマウス髄腔内にノシセプチンを投与し、脊髄における痛覚反応を検討し以下の知見を得た。

### 実験方法

マウス (雄、体重 20 ± 2 g) を用い、無麻酔下にノシセプチン、その他の薬剤 5 μl を髄腔内に投与した。アロディニアは、一群を 6 匹とし対照は生食 5 μl 投与群とした。薬剤投与 5 分後より、5 分毎にアロディニアを 50 分間観察しスコアで表した。アロディニアのスコアは、0: 変化なし、1: 触覚刺激を加えようとする筆から逃げる、啼く、2: 触覚刺激により激しく啼く、勢いよく逃げるとした。痛覚過敏反応は、一群を 10 匹とし対照は生食 5 μl 投与群とした。髄腔内投与 15 分後にホットプレート試験 (55 °C) を行い、熱刺激に対する逃避反応時間を指標とした。

### ノシセプチンによる痛覚反応

髄腔内投与したノシセプチンは生理的濃度で、非侵害性刺激に対してアロディニアを、侵害性刺激に対して痛覚過敏反応を誘発し、図 1 にみられるように、その用量応答曲線は明らかに異なっている。痛



覚過敏反応が 0.1 fg-1 ng/マウスの広範な非常に低用量でみられるのに対し、アロディニアは 1 pg-500 pg の濃度でベル型の用量応答曲線を示す。ノシセプチンによるアロディニアおよび痛覚過敏反応は、グリシンで用量依存性にブロックされたが、ムシモール (GABA<sub>A</sub> 受容体作動薬)、バクロフェン (GABA<sub>B</sub> 受容体作動薬) ではブロックできなかった (図 2)。ノシセプチンによるアロディニアおよび痛覚過敏反応は、ナロキソンではブロックできなかったため、ノシセプチンによるアロディニアおよび痛覚過敏反応は、グリシンの作用を抑制するか、前シナプスからのグリシンの遊離を抑制することが痛覚反応の誘因であると考えられる (12)。

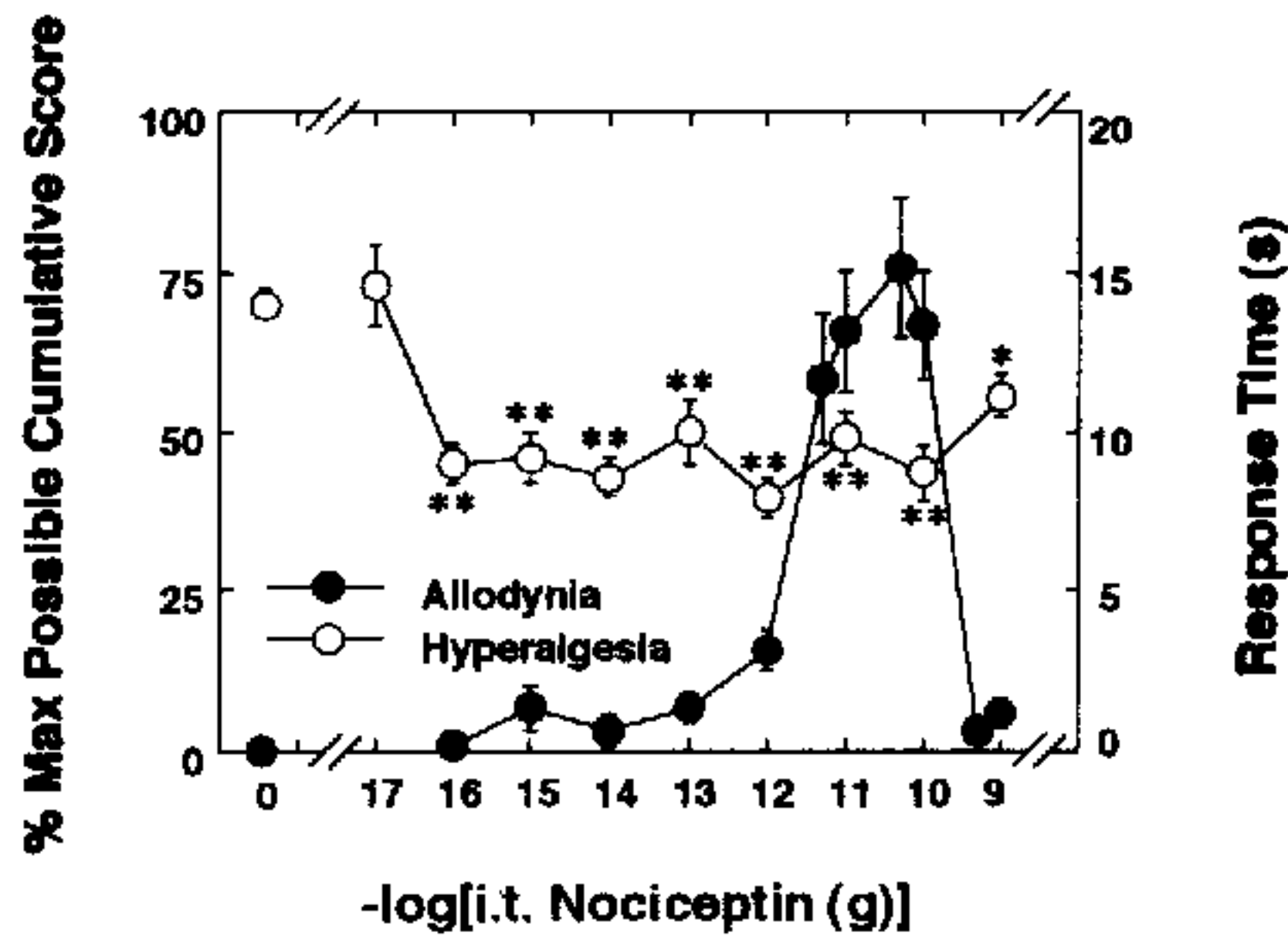


図 1. ノシセプチンによる痛覚反応の用量依存

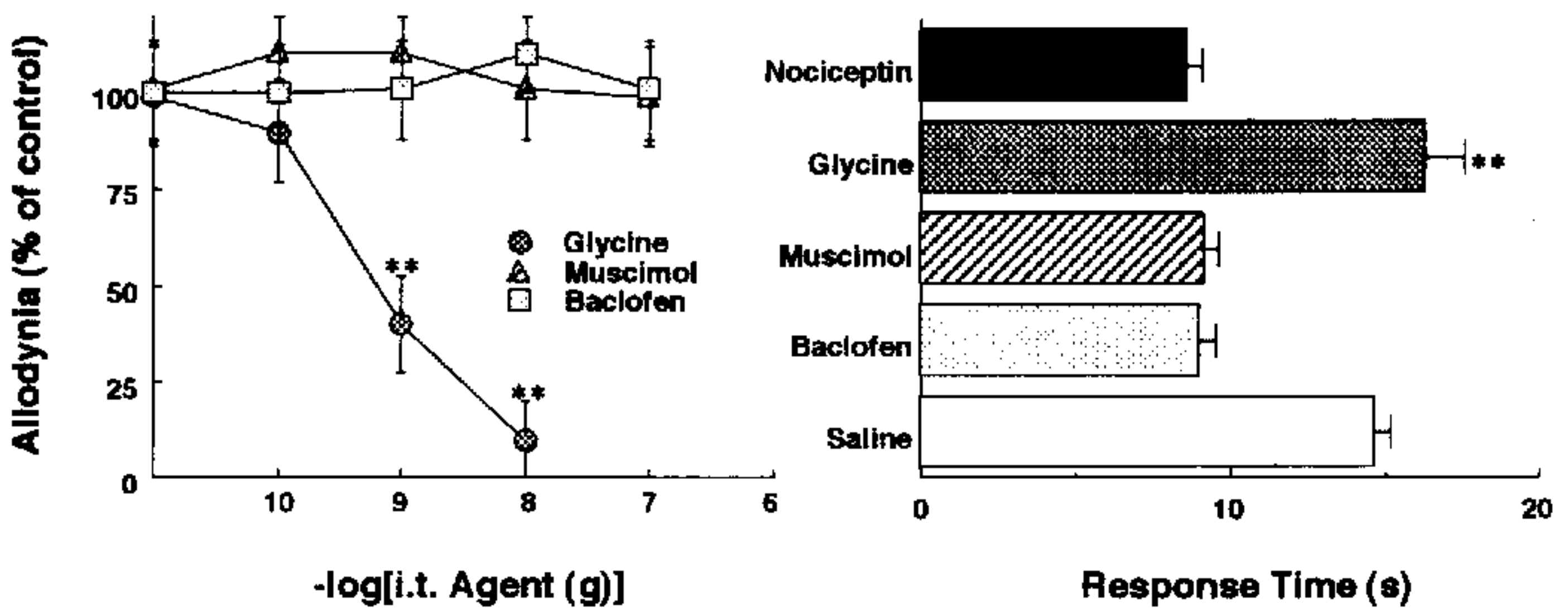


図 2. ノシセプチンの痛覚反応のグリシンによる抑制

### PGD<sub>2</sub> によるアロディニアの抑制作用

脊髄でのアロディニアにおける PG の相互作用について検討した結果、PGD<sub>2</sub> は PGE<sub>2</sub> によるアロディニアを抑制した (13)。さらに、PGD<sub>2</sub> はノシセプチンによるアロディニアを抑制した (図 3) (14)。以上の結果より、内因性に PGD<sub>2</sub> が非侵害性触覚刺激により誘発されるアロディニアの拮抗物質として存在している可能性が示唆された。PGD<sub>2</sub> 結合活性が脊髄の後角に集中しており、さらに PGD<sub>2</sub> はヒト、サルだけでなく齧歯類の中樞神経系でも *in vivo*、*in vitro* ともに生成される一番主要なアラキドン酸代謝物であるため、内因性に PGD<sub>2</sub> が非侵害性触覚刺激により誘発されるアロディニアが生じないよう痛覚伝導において重要な役割を果たしていると考えられる。

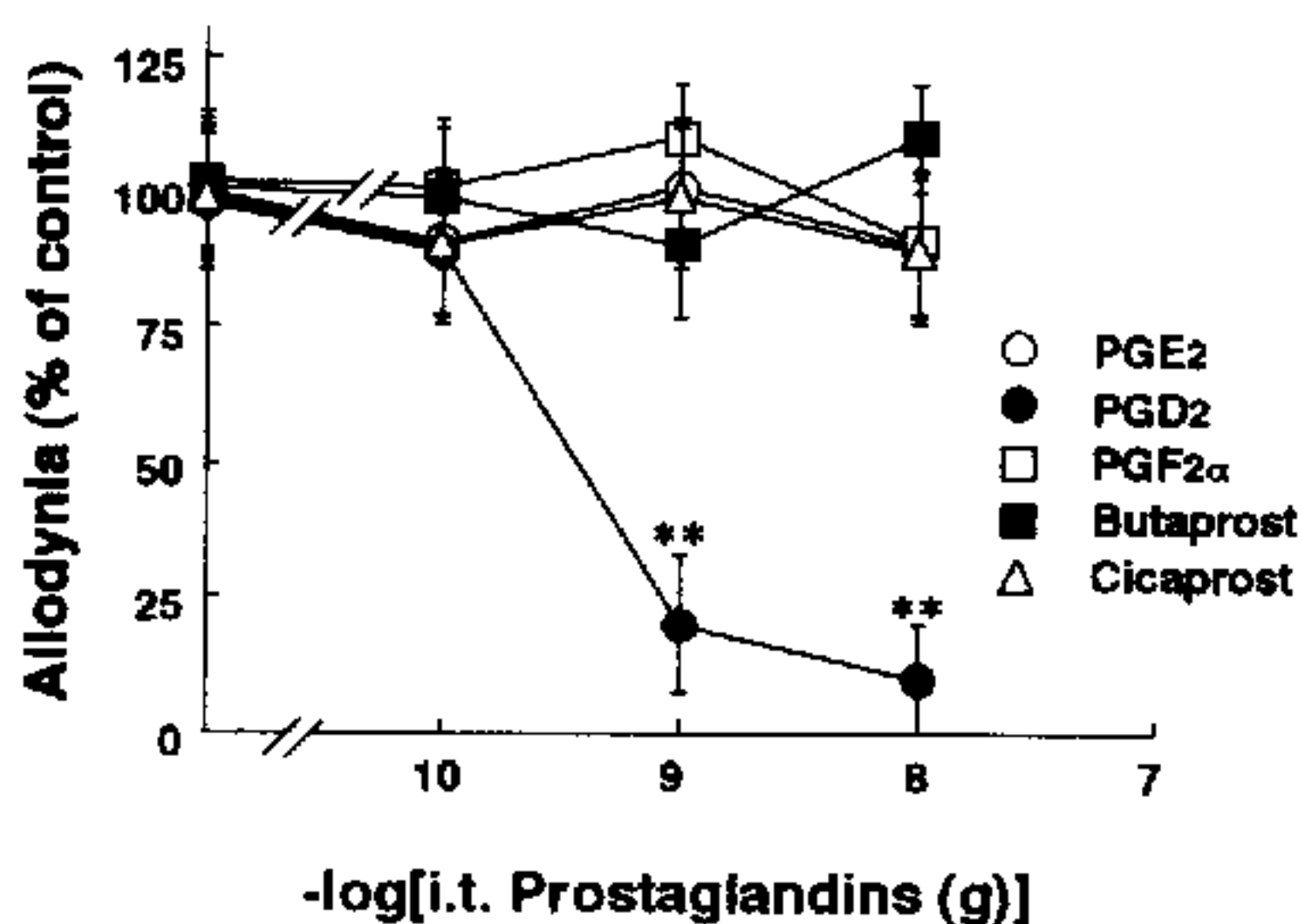


図 3. PGD<sub>2</sub> によるノシセプチンのアロディニアの抑制

## ノシスタチンによるアロディニアの抑制作用

ウシノシセプチン前駆体は 176 アミノ酸からなり、プロセシングペプチドにより、ノシセプチン以外に bPNP-2 から bPNP-5 の 4 種類のペプチドの存在が予想された。それらのペプチドはそれ自体用いた用量では痛覚反応を誘発しなかったが、図 4 に示すように、bPNP-3 はノシセプチンのアロディニアを用量依存的に抑制したことから、ノシスタチンと名付けた。ノシスタチンはノシセプチンだけでなく  $\text{PGE}_2$  のアロディニアさらに、ノシセプチンと  $\text{PGE}_2$  の痛覚過敏反応も抑制する。ノシセプチンとノシスタチンはいずれも脊髄後角の第 I、II 層に局在し、ノシスタチンの抗体をマウス髄腔内に前投与するとノシセプチンのアロディニアの域値が低下したことから、内因性のノシスタチンがノシセプチンの作用を抑制することが示唆される (15,16)。 $\text{PGD}_2$  とノシスタチンはいずれも  $\text{PGE}_2$  とノシセプチンのアロディニアの誘発を抑制することから、PG 系とオピオイド系は痛覚伝達に相互に作用することが考えられる。

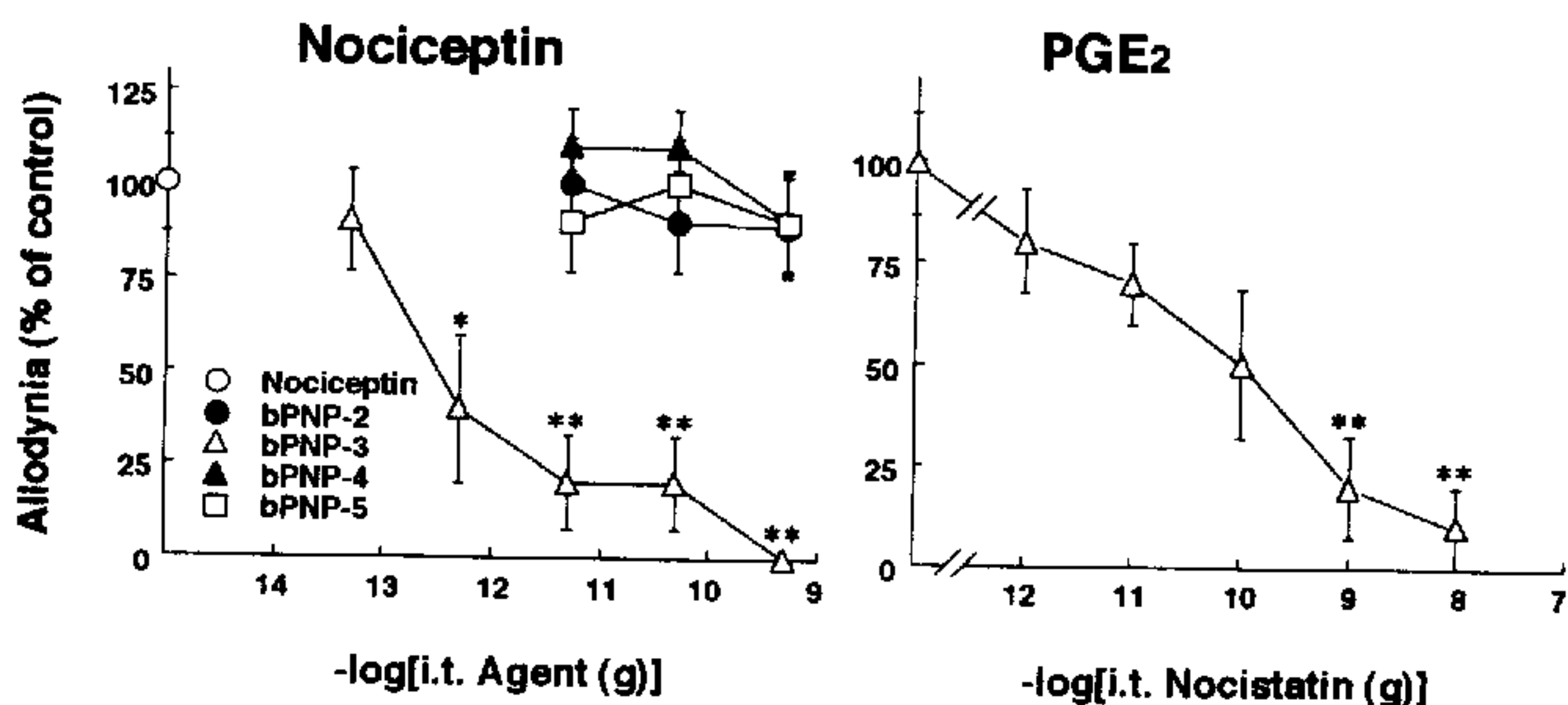
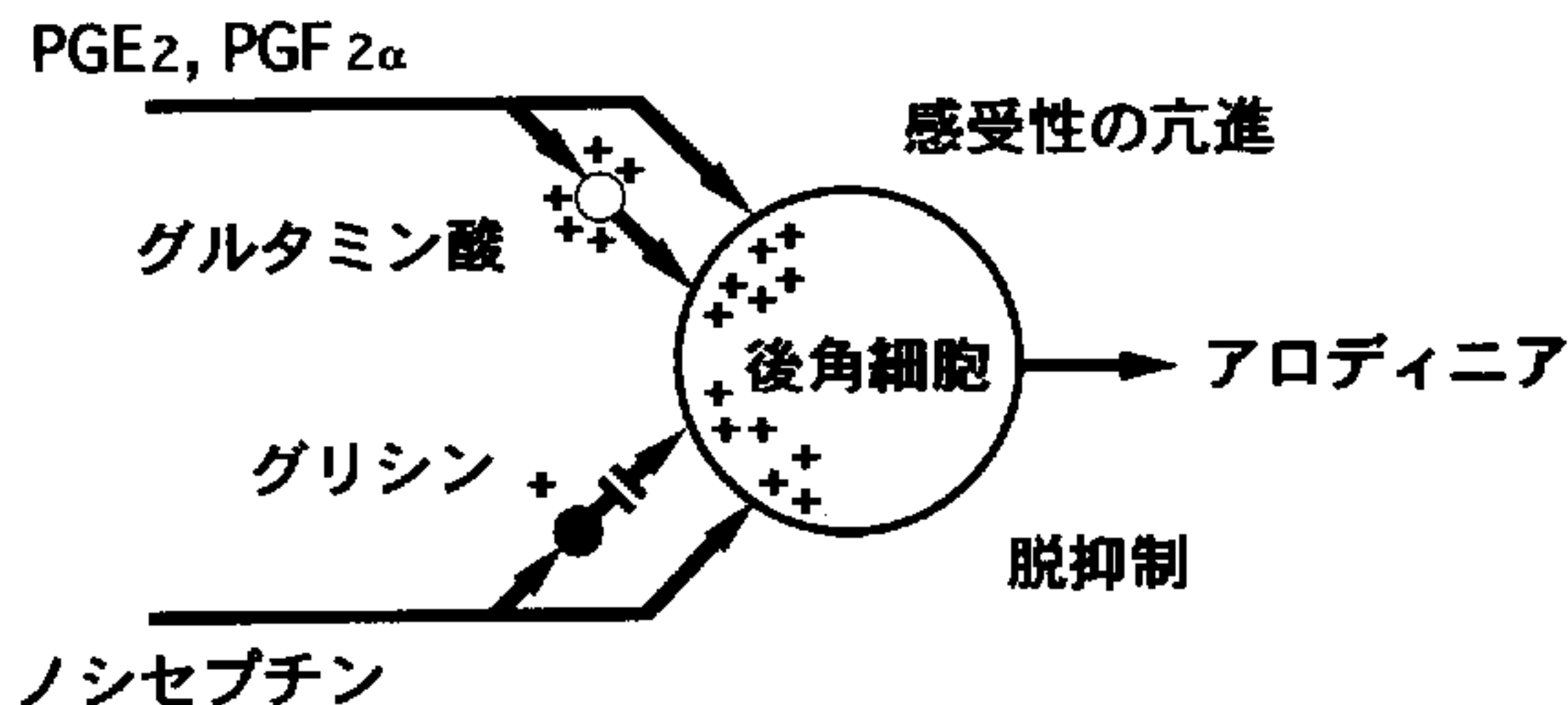


図 4. ノシスタチンによる痛覚反応の抑制

## アロディニアの発現機構

PGによるアロディニアは、グルタミン酸受容体拮抗薬で抑制され、ノシセプチンによるアロディニアは、グリシンの同時投与で抑制されることから、アロディニアの発現機序にはグルタミン酸に対する感受性の亢進とグリシンによる抑制作用の脱抑制の少なくとも二つの機構が存在することが明らかとなった(図5)。



## 参考文献

- (1) Minami, T. et al. Pain 50 (1992) 223-229.
- (2) Minami, T. et al. Pain 57 (1994) 217-223.
- (3) Minami, T. et al. Pain 57 (1994) 225-231.
- (4) Minami, T. et al. Pain 61 (1995) 285-290.
- (5) Nishihara, I. et al. Neurosci. Lett. 196 (1995) 57-60.
- (6) Minami, T. et al. Neurosci. Lett. 201 (1995) 239-242.
- (7) Ito, S. et al. Proceeding of the 8th World Congress on Pain, Progress in Pain Research and Management, Vol. 8, IASP Press, Seattle, pp.323-332, 1997.
- (8) Sakai, M. et al. Br. J. Pharmacol. 123 (1998) 890-894.
- (9) Meunier, J.C. et al. Nature 377 (1995) 532-535.
- (10) Reinscheid, R.K. et al. Science 270 (1995) 792-794.
- (11) Okuda-Ashitaka, E. et al. Mol. Brain Res. 43 (1996) 96-104.
- (12) Hara, N. et al. Br. J. Pharmacol. 121 (1997) 401-408.
- (13) Minami, T. et al. J. Pharmacol. Exp. Ther. 278 (1996) 1146-1152.
- (14) Minami, T. et al. Br. J. Pharmacol. 122 (1997) 605-610.
- (15) Okuda-Ashitaka, E. et al. Nature 392 (1998) 286-289.
- (16) Minami, T. et al. Br. J. Pharmacol. in press.