

ポ ス タ ー

1

電位依存性カルシウムチャンネル $\beta 3$ サブユニット欠損マウスにおける痛覚の検討

○ 村上 学、中川西修*、穂積壮一*、丹野孝一*、只野 武*、柳澤輝行、谷内一彦**、渡邊健彦⁺、木皿憲佐*

東北大・医・分子薬理、*東北薬大・薬理、**東北大・医・臨床薬理、⁺東北大・医・細胞薬理

(諸言)

中枢神経系における電位依存性カルシウムチャンネルは、前シナプスよりの神経伝達物質放出の際のカルシウム流入経路として重要である。電位依存性カルシウムチャンネルは、カルシウムが通る $\alpha 1$ と、その電流を修飾する β が機能上重要である¹⁾。我々は神経に豊富に存在するNタイプのカルシウムチャンネルの β サブユニットである $\beta 3$ の欠損マウスを作製し、その機能を解析している²⁾。

本研究は、この $\beta 3$ 欠損マウスにおける痛覚、及び中枢神経の変化を解明することを目的とした。 $\beta 3$ 欠損マウスにおいては脊髄後根細胞のNタイプのカルシウムチャンネルの数が減少し、各種痛覚刺激に対する反応が低下していることが認められた。

(実験方法)

マウス胚幹細胞を用いた遺伝子ターゲティング法により、 $\beta 3$ 欠損マウス(-/-)を作製した³⁾。

同マウス、および対照群マウス(+/-)より脊髄後根の神経細胞を単離し、パッチクランプ法により、バリウム電流を解析した。また、脊髄後角における各 β サブユニットの発現を*in situ hybridization*にて検討した。

N タイプのカルシウムチャンネルの阻害薬である ω -conotoxinGVIA^{1),4)} を脳室内に投与し、同薬物の特徴である shaker activity の発生の有無について観察した。

次に各種痛覚テスト (tail-flick test, formalin test, writhing test) を両群に行った。さらに 2 nmol/kg の ω -conotoxinGVIA を脊髄腔内に投与後、熱刺激 (tail-flick test) を行い、同薬による痛覚の変化を検討した。

(結果)

1) パッチクランプ

$\beta 3$ 欠損マウスの単離脊髄後根細胞において、高電位依存性のカルシウム電流量が減少しており、同細胞において N タイプのチャンネルが多く存在することから、 $\beta 3$ 欠損により、N タイプのチャンネル数が減少していると考えられた (図 1)。

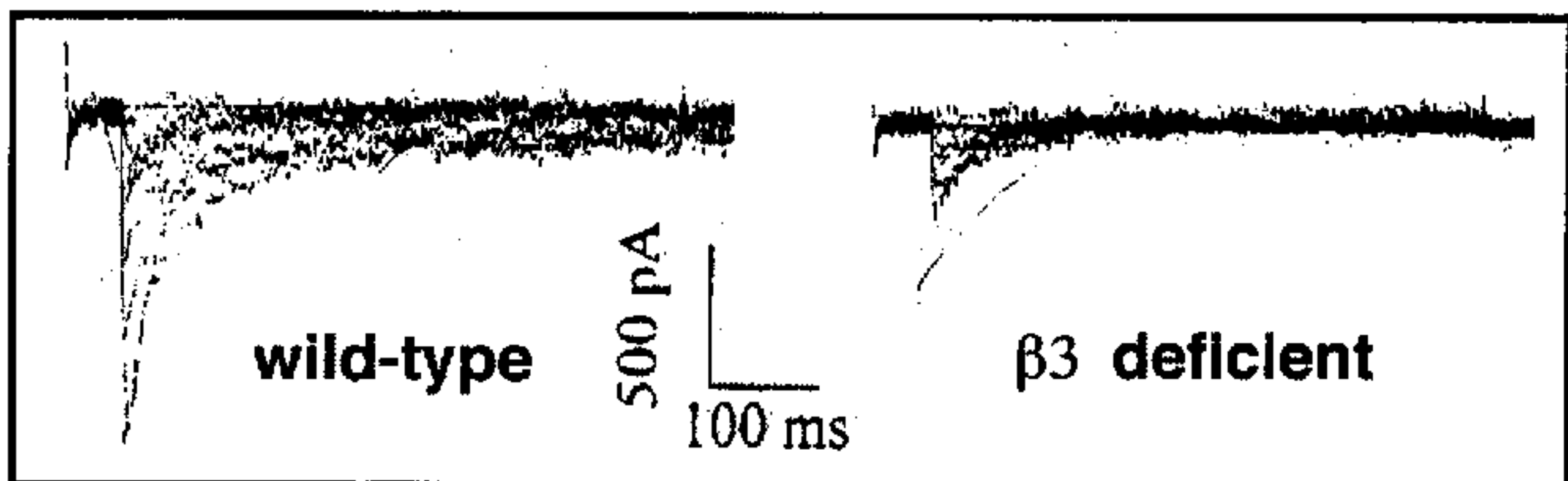


図 1 脊髄後根細胞における difference current

2) 各 β サブユニット mRNA 発現

in situ hybridization 法にて、脊髄後角における β サブユニットの mRNA 発現レベルを検討した。対照群では現在まで知られているすべての β サブユニット (1-4) の発現が認められた。 $\beta 3$ 欠損マウスでは $\beta 3$ 発現の欠損が確かめられ、かつ $\beta 4$ 遺伝子の発現が上昇していた。

3) ω -conotoxinGVIA の脳室内投与

ω -conotoxinGVIA を脳室内に投与したところ、両群のマウスで oliveira らの shaker activity が観察された⁴⁾。 $\beta 3$ 欠損により、shaker activity を起こすためには欠損マウスではより長い時間が必要であった (図 2)。

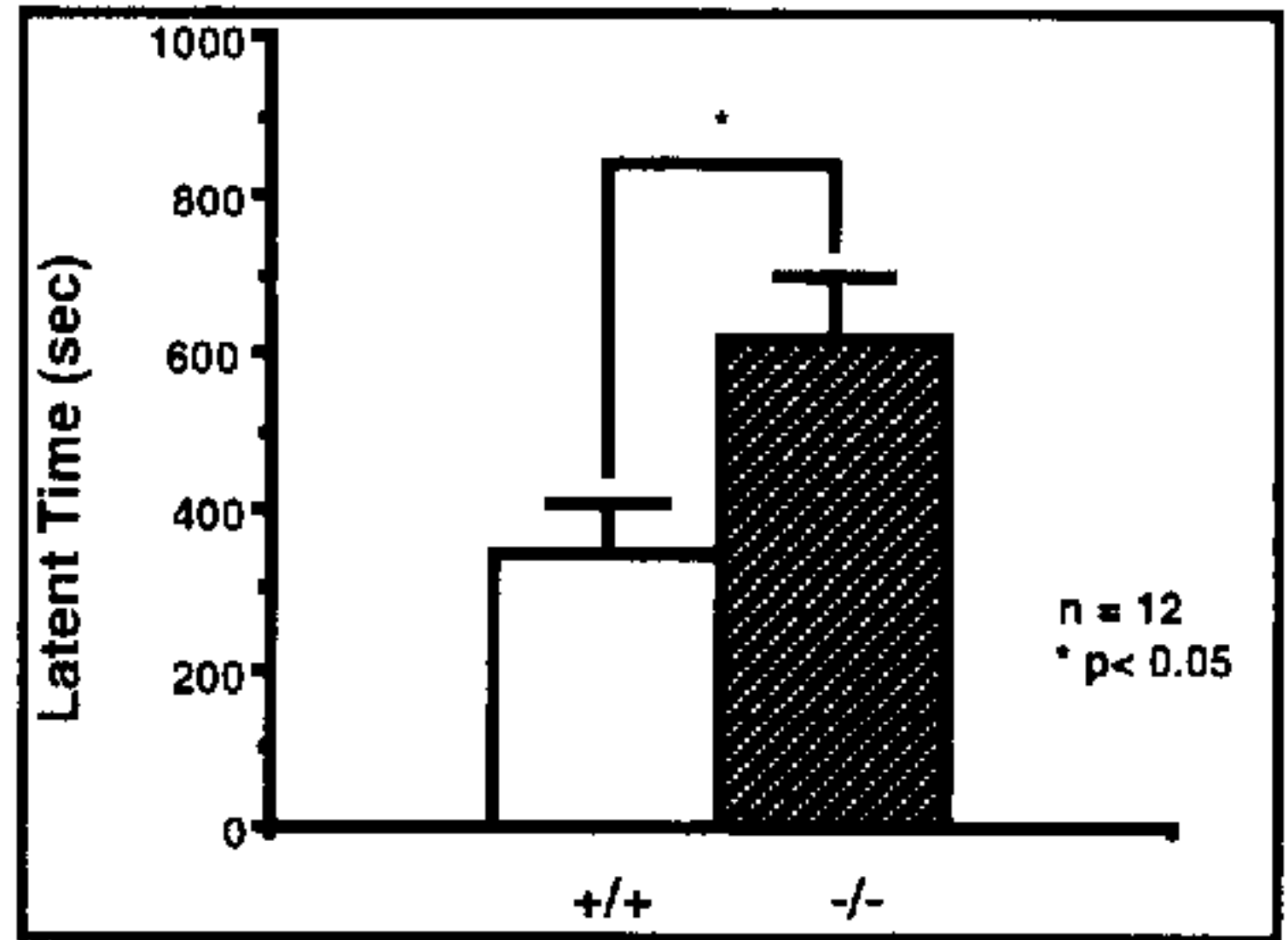


図 2 ω -conotoxinGVIA 脳室内投与による shaker activity 発生までの潜在時間
欠損マウスでは有意な延長が認められた。

4) 各種痛覚の検討

tail-flick test

$\beta 3$ 欠損マウスは tail-flick test における熱刺激に対してより高い閾値を示した。また、 ω -conotoxinGVIA の脊髄腔内への投与により、両群において閾値の上昇が認められた (図 3 a)。

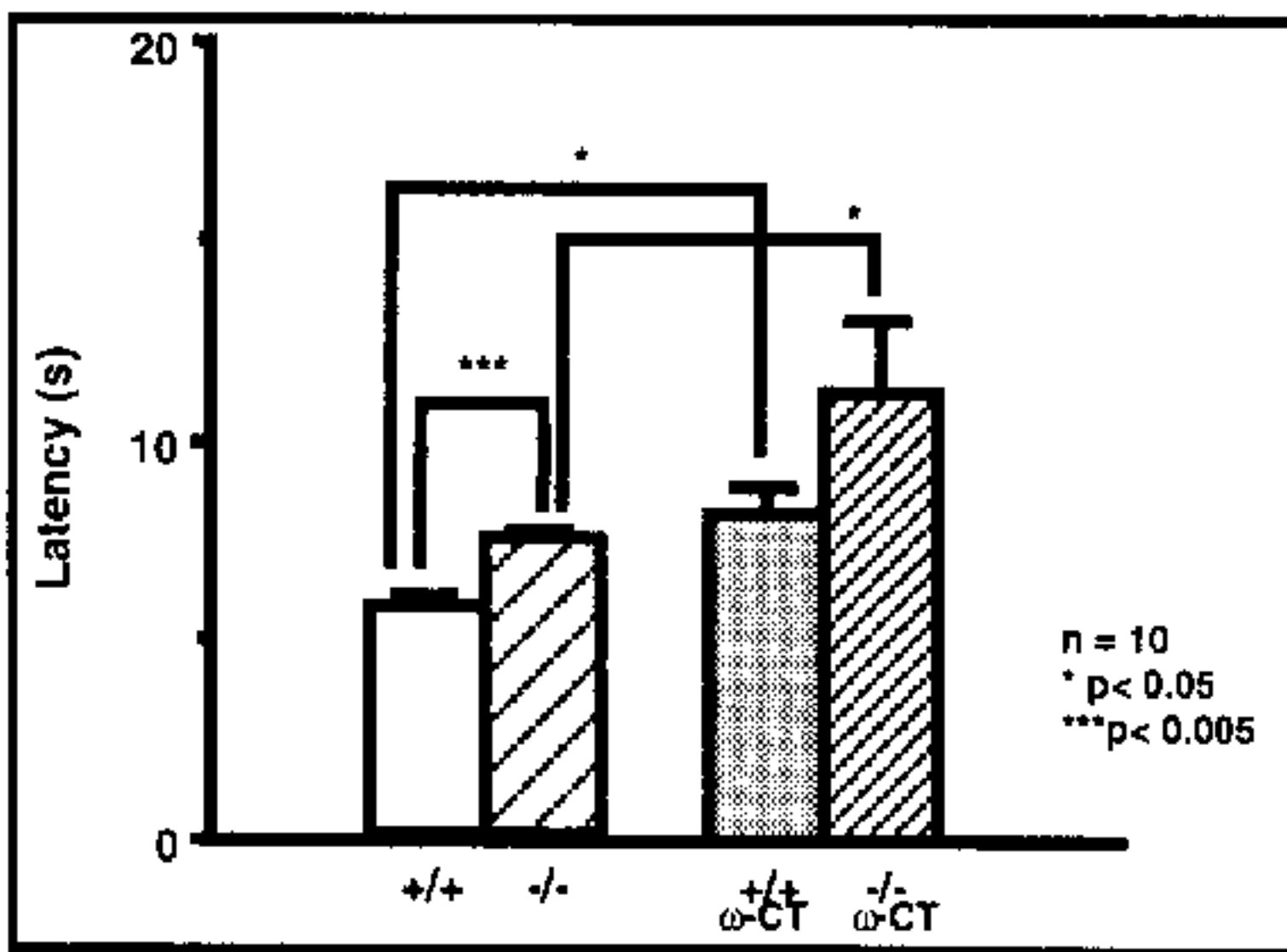


図 3 a tail-flick test

tail-flick test における潜時間の違い
欠損マウスは有意に長い潜時間を示した。
 ω -conotoxinGVIA は両群において潜時間を延長した

formalin test において $\beta 3$ 欠損マウスは early phase, late phase 共に有意に高い閾値を示した。その痛覚閾値は特に late phase においてより顕著に認められた (図 3 b)。

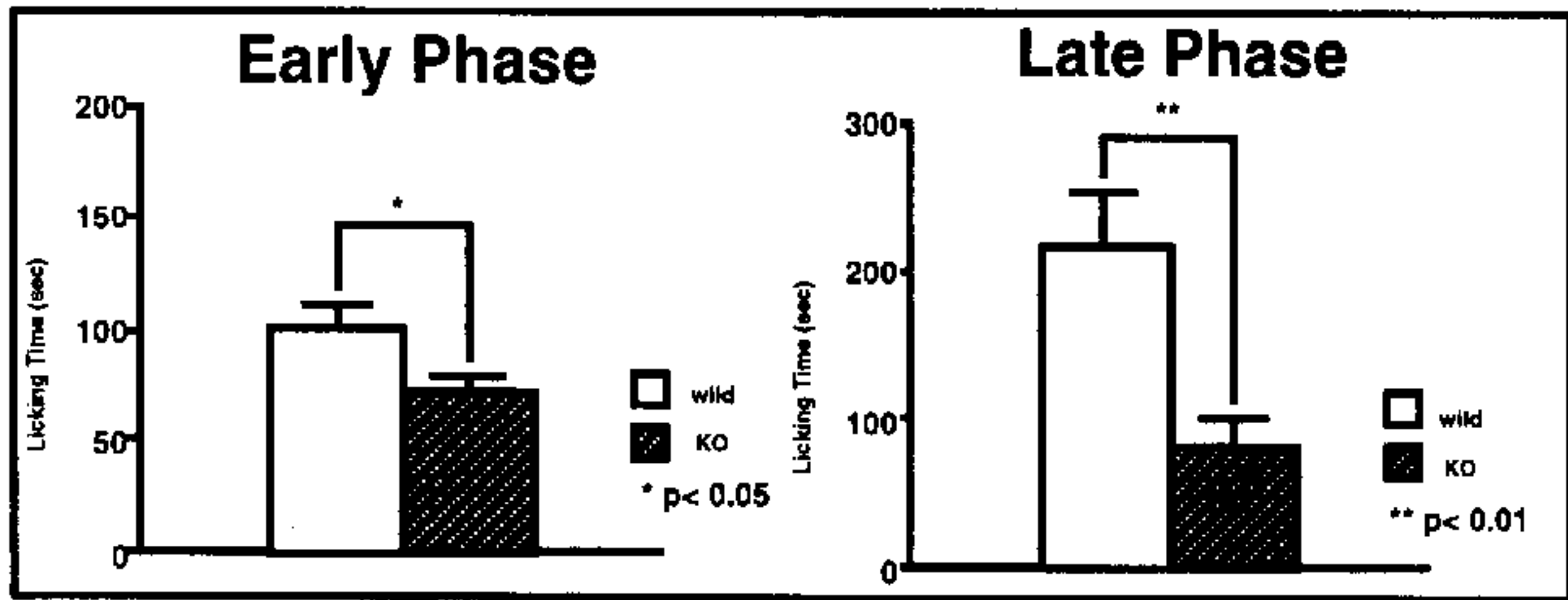


図 3 b formalin test における潜時間 wild: wild-type, KO: $\beta 3$ deficient

writhing test

writhing test においても $\beta 3$ 欠損マウスは化学刺激に対して有意に高い閾値を示した。

(考察)

$\beta 3$ 欠損マウスは各種痛覚実験において痛覚閾値が上昇していることが明かとなった。そのメカニズムとして、脊髄後根の神経細胞における高電位依存性、特に N タイプのカルシウム電流量の減少、それに附随しておこる流入カルシウムの低下ならびに痛覚伝達物質の前シナプスからの放出の低下が一因と考えられた。

$\beta 3$ 欠損マウスにおいて、上記の他に脊髄後角における $\beta 4$ サブユニットの代償的な発現レベルの上昇が認められた。この代償的上昇は他の β サブユニットには認められなかったこと、また他の組織では $\beta 4$ の上昇が認められなかったことから、脊髄後角に限定した変化と考えられた。これら発現の変化から、個々の β サブユニットの発現は組織特異的に制御されていると考えられた。

(文献)

- 1) Hofmann, F. et al., (1994). Ann. Rev. Neurosci. 17,399-418.
- 2) Scott, V. E. S., et al., (1996). Journal of Biological Chem. vol.271, 3207-3212.
- 3) Hogan, B. et al., (1994). Manipulating the mouse embryo (second edition). 352-367, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 4) Olivera, B.M. et al., (1984). Biochemistry 23(22):5087-90.

2

痛みの受容におけるヒスタミンH1受容体の役割： H₁受容体ノックアウトマウスを用いた研究

○Jalal Izadi Mobarakeh^{1,2}、櫻田忍³、渡辺武⁴、橋本保彦²、渡邊建彦¹、谷内一彦¹

東北大学医学系院・薬理¹、同麻酔科²、東北薬科大学・機能形態³、九州大学生体防御医学⁴

【緒言】

痛みの受容におけるヒスタミンH₁受容体の役割を明らかにするために、H₁受容体遺伝子ノックアウトマウス(H1KO)の様々な痛み刺激に対する閾値を調べた。用いた痛み刺激は、A δ やC線維を賦活させる温度、機械、化学的痛み誘発刺激である。痛みの受容は、グルタミン酸やサブスタンスPによって、末梢の受容器、脊髄後角、中枢において伝達される。ヒスタミンも局所において遊離されて、痛みや痒みの受容に重要な役割を果たすと考えられているが、薬理実験からは必ずしも明確な証拠はなかった。我々は以前にH1KOを作成し、そのマウスが野生型と比較して特異的な行動異常を示すことを報告している。本研究は、H1KOが体性痛と内臓痛刺激に対してどのような反応を示すか明らかにした研究である。さらに薬理実験として、光学異性体である*d*-chlorpheniramine (H₁拮抗作用が強い)と*l*-chlorpheniramine (H₁拮抗作用が弱い)を用いて痛みの受容に対する効果を調べた。

【実験方法】

本研究では、H1KO (-/-)とその野生型 (+/+), ヘテロ (+/-)を用いて実験を行った。H1KOはC57Bマウスに5世代以上バッククロスしたマウスをPCRでスクリーニングして使用した。用いた痛み刺激はthe hot plate試験、tail flick, tail pressure試験、paw withdrawal試験、formalin試験、capsaicin試験、そして酢酸と硫酸マグネシウムを用いたabdominal constriction試験である。Chlorpheniramineの効果調べた実験ではICR雄マウスを用いている。

【結果】

1. H1KO (-/-)マウスの Hot-plate、tail-flick、tail-pressure、paw-withdrawal試験

H1KOマウスの痛み刺激に対する反応は、上記4種類の痛み(体性痛)刺激に対して、野生型あるいはヘテロと比較して減弱した反応を

示した。熱刺激と機械刺激どちらに対しても HIKO マウスは弱い痛み受容反応を示した。ホットプレート試験は脊髄レベルとさらにその上位中枢の効果の総和である。ホットプレート試験において HIKO マウスが反応減弱を示したことから、中枢あるいは末梢における H1 受容体が痛みの受容に関係していることが示唆された。また反射の要素が主である paw-withdrawal 試験においても HIKO マウスは弱い痛み受容反応を示したことから、末梢側における H1 受容体も重要であると思われる。

2. *d*-chlorpheniramine と *l*-chlorpheniramine の温度、機械的痛み刺激受容に対する効果

ICR マウスを用いて、H1 受容体拮抗活性の強い *d*-chlorpheniramine と H1 受容体拮抗活性の弱い *l*-体投与して、痛み受容反応の変化を比較検討した。*d*-体を投与すると強く痛み受容反応が抑制されるが、*l*-体の効果は弱かった。光学異性体を用いた薬理実験からも H1 受容体遮断により痛み受容反応が減弱することが示唆された。

3. HIKO マウスのホルマリン試験

ホルマリン試験において、ホルマリン投与初期（第 I 相）、後期（第 II 相）とも痛み受容反応が、HIKO マウスで低下していた。ヘテロは野生型と HIKO が示した痛み反応の中間の反応を呈した。

4. HIKO マウスのカプサイシン試験

カプサイシンを後肢に背面に投与して直接 C 線維を刺激して痛み反応を調べた。HIKO は野生型に比較して有意に弱いカプサイシンに対する痛み反応を示した。またカプサイシン (0.2 nmol) を脊椎内に投与した時も HIKO は弱い痛み反応を呈した。カプサイシンは脊髄よりサブスタンス P を遊離させて痛みを引き起こすと考えられている。H1 受容体が後根神経節に存在することから、H1 受容体賦活がサブスタンス P の遊離を亢進していることが考えられる。

5. HIKO マウスの Abdominal stretching 行動

HIKO マウスの内臓痛に対する反応を、酢酸と硫酸マグネシウムによって惹起される Abdominal stretching 行動を用いて調べた。HIKO は酢酸および硫酸マグネシウムによる内臓痛に対して減弱した痛み反応を示した。

6. *d*-chlorpheniramine と *l*-chlorpheniramine の内臓痛の受容に対する効果

ICR マウスを用いて、H1 受容体拮抗活性の強い *d*-chlorpheniramine と H1 受容体拮抗活性の弱い *l*-体投与して、内臓痛受容反応の変化を検討した。*d*-体を投与すると強く内臓痛受容反応が抑制されるが、*l*-体の効果は弱かった。

[考察]

ヒスタミン神経系を介する痛みのコントロールに関して最近幾つか報

告されている。その多くは H2 受容体賦活が抗侵害作用を呈するという報告である。H1 受容体に関して、臨床的には H1 アンタゴニストが痛みを抑止する目的で使用されているが、H1 受容体の痛み受容に対する作用については明確なデータがなかった。その原因のひとつは、今まで行われてきた実験が薬理的な実験であり、特異的はアゴニストやアンタゴニストがないことによる。特異性の観点から、ノックアウトマウスを用いることは極めて大切なことである。本研究により初めて、痛みの受容、感作において H1 受容体が促進的に作用していることが明確になった。

【文献】

- Hough L.B. (1988) Cellular localization and possible functions for brain histamine: Recent Progress. *Prog. Neurobiol.* 30, 469-505.
- Inoue, I., Yanai, K., Kitamura, D., Taniuchi, I., Kobayashi, T., Niimura, K., Watanabe, T., Watanabe, T. 1996. Impaired locomotor activity and exploratory behavior in mice lacking histamine H₁ receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 13316-13320.
- Onodera, K., Yamatodani, A., Watanabe, T., and Wada H. 1994, Neuropharmacology of the histaminergic neuron system in the brain and its relationship with behavioral disorders, *Prog. Neurobiol.* 42, 685-702, 1994
- Sakurada, T., Katsumata, K., Yogo, H., Tan-No, K., Sakurada, S., Ohba, M., Kisara, K., 1995. The neurokinin-1 receptor antagonist, sendide, exhibits antinociceptive activity in the formalin test, *Pain.* 60, 175-180.
- Sakurada, S., Sato, T, Takahashi, N., Kawamura, S., Tan-no, K., Sakurada, T, Tadano, T., Fujimura, T., Kimie, M., Kisara, K., 1995. Role of MU-1 opioid receptor subtype on morphine-induced antinociception against responses to mechanical and chemical noxious stimuli in mice. *Neurosciences.* 21, 115-121.
- Sakurada, T., Katsumata, K., TAN-No, K., Sakurada, S., Kisara, K. 1992. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord, *Neuropharmacology* 12, 1279-1285.
- Schwartz, J.C., J. M. Arrang, M., Garbarg, H. Pollard., M. Ruat., 1991. Histaminergic transmission in the mammalian brain, *physiol. Rev.* 71, 1-51.
- Suzuki, T., Takamori, K., Takahashi, Y., Narita, M., Misawa, M., and Onodera K. The differential effects of histamine receptor antagonists on morphine- and U-50,488-induced antinociception in the mice. *Life Sci.* 54, 203-211, 1994
- Watanabe, T., Taguchi, Y., Shiosaka, S., Tanaka, J., Kubota, H., Terano, Y., Tohyama, M., Wada, H., 1984. Distribution of the histaminergic neuron system in the central nervous system of rats; A fluorescent immunohistochemical analysis with histidine decarboxylase as a marker. *Brain Res.* 295, 13-25.
- Yanai, K., Son, L. Z., Endou, M., Sakurai, E., Nakagawasai, O., Tadano, T., Kisara, K., Inoue, I., Watanabe, T., Watanabe, T., 1998. Behavioural characterization and amounts of brain monoamines and their metabolites in mice lacking histamine H₁ receptors. *Neuroscience.* 87, 479-487.

3

脊髄腔内における ORL-1 受容体の痛みへの関与 —Nociceptin 及び非ペプチド性合成 ORL-1 受容体拮抗剤を用いた薬理的検討—

○上野 義信, 朱雀 鉄城, 横井 智規, 中田 恵理子,
伊藤 文隆, 樽林 陽一, 長久 厚
ファイザー製薬株式会社・中央研究所

【緒言】

Opioid Receptor Like-1 (ORL-1) 受容体は,既存のオピオイド (μ , κ 及び δ) 受容体と類似したアミノ酸配列を有す G 蛋白質共役型の 7 回膜貫通型レセプターである¹⁾. ORL-1 受容体を発現させた細胞 (CHO 及び HEK) では,既存のオピオイド同様,アデニル酸シクラーゼ活性を抑制することが報告されている²⁾. また, ORL-1 受容体の内因性リガンドである Nociceptin も既存のオピオイドリガンドと高い相同性をもつことから,ORL-1 受容体は,オピオイドファミリーの一員として考えられている.

ORL-1 受容体及び Nociceptin は,中枢系 (大脳皮質,海馬,中隔部,扁桃体,視床下部,脳幹,脊髄など) に共局在・高発現しており^{3), 4)}, ORL-1 受容体を介した情報伝達は,様々な中枢性の生理機能に関与することが報告されている. しかしながら,ORL-1 受容体の痛覚伝達にかかわる役割については,いまだ統一された見解がなされていないのが現状である.

本研究では,ORL-1 受容体の内因性リガンドである Nociceptin および非ペプチド性合成 ORL-1 受容体拮抗剤 (Merck-Banyu 社) を用い,ラット脊髄腔内 (i.t.) における ORL-1 受容体の痛みへの関与について,薬理学的手法を用いて検討したので報告する.

【実験方法】

実験には,雄性 Sprague-Dawley 系ラット (4 週齢) を用いた. Nociceptin または非ペプチド性合成 ORL-1 受容体拮抗剤は生理食塩水もしくは 0.1% DMSO/生理食塩水に溶解した. I.t.投与は無麻酔下で行い,25 μ l 用マイクロシリンジを用いてラット腰椎の 5 番と 6 番の間の髄腔内へ 10 μ l/site/ラットの割合で投与した⁵⁾. 熱侵害受容閾値の測定には Tail-flick 法を, 圧侵害受容閾値の測定には Paw-pressure 法をそれぞれ用

い, Nociceptin (i.t.) 及び非ペプチド性合成 ORL-1 受容体拮抗剤 (i.t.) が, 熱侵害刺激または圧侵害刺激に対して及ぼす影響について調べた.

1. Tail-flick 法

ラットの尾部 (尾の先端より 3 cm) に熱刺激を与え, 尾を flick するまでの潜時を測定した. Nociceptin (i.t.) 及び非ペプチド性合成 ORL-1 受容体拮抗剤 (i.t.) が潜時に対して及ぼす影響を経時的に調べた.

拮抗実験

非ペプチド性合成 ORL-1 受容体拮抗剤 (5.5 nmol/site/ラット, i.t.) は, Nociceptin (3 nmol/site/ラット, i.t.) の i.t. 投与, 5 分前に同様にラットに無麻酔下で i.t. 投与し, Nociceptin (3 nmol/site/ラット, i.t.) の抗-熱刺激受容作用に対する非ペプチド性合成 ORL-1 受容体拮抗剤の及ぼす影響について経時的に調べた.

2. Paw-pressure 法

生理食塩水で溶解した λ -carrageenan (1%) をラット右側下肢足底に皮内投与 (0.1 ml/site/ラット) し, 急性炎症疼痛モデル動物を作成した. 圧侵害受容閾値の測定には Randall-selitto を用いた. Nociceptin は, 最初の測定の 10 分前, すなわちカラゲニン投与 3 時間 20 分後に i.t. 投与した. 急性炎症が顕著に現れる時間 (カラゲニン投与, 3.5-5.5 時間後) に, Nociceptin (i.t.) が圧侵害受容閾値に及ぼす影響を経時的に調べた.

【実験結果】

1-1) Nociceptin (i.t.) の熱侵害受容刺激に対する作用

Nociceptin (0.55-55 nmol/site/ラット) の i.t. 投与では, ラット Tail-flick 法を用いた熱侵害刺激に対し, 用量依存性的かつ時間依存的な抗-熱侵害受容効果が観察された (Fig. 1). I.t. 投与 10 分後における Nociceptin の ED50 値及び ED80 値は, それぞれ, 1.3 及び 3 nmol/site/ラットであった.

後述の非ペプチド性合成 ORL-1 受容体拮抗剤を用いた拮抗実験においては, Nociceptin の ED80 値である 3 nmol を用いた.

1-2) 低用量 Nociceptin (i.t.) の熱侵害受容刺激に対する作用

通常より弱い熱源を用いラット Tail-flick 法による, 低用量 Nociceptin (0.55 fmol-550 pmol/site/ラット) の熱侵害受容閾値に及ぼす影響を調べた (Fig. 2).

0.55 fmol-5.5 pmol/site/ラットの用量において, Nociceptin (i.t.) は, 熱侵

害閾値に対し統計的に有意な影響を何ら及ぼさなかった。

一方で、55 及び 550 pmol/site/ラットの用量において、Nociceptin (i.t.) は、用量依存的かつ時間依存的に熱侵害閾値を上昇させた。

これら結果より、Nociceptin (0.55 fmol-55 nmol/site/ラット, i.t.) は、ラット Tail-flick 法を用いた熱侵害刺激に対して、抗-熱侵害受容作用を示した (Fig. 1, 2)。

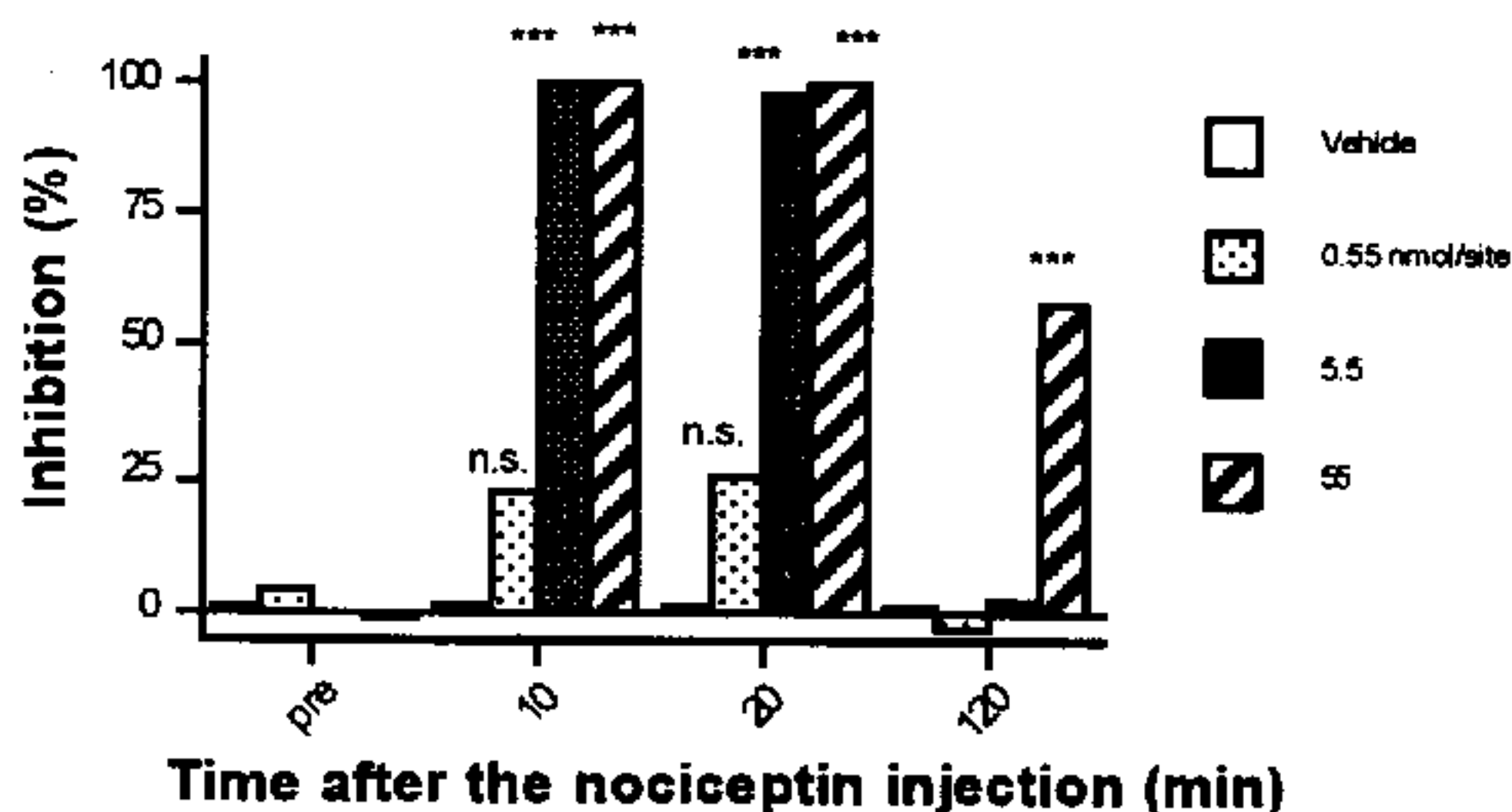


Fig. 1: Time effect of nociceptin on thermal-nociceptive threshold in rats tail-flick test.

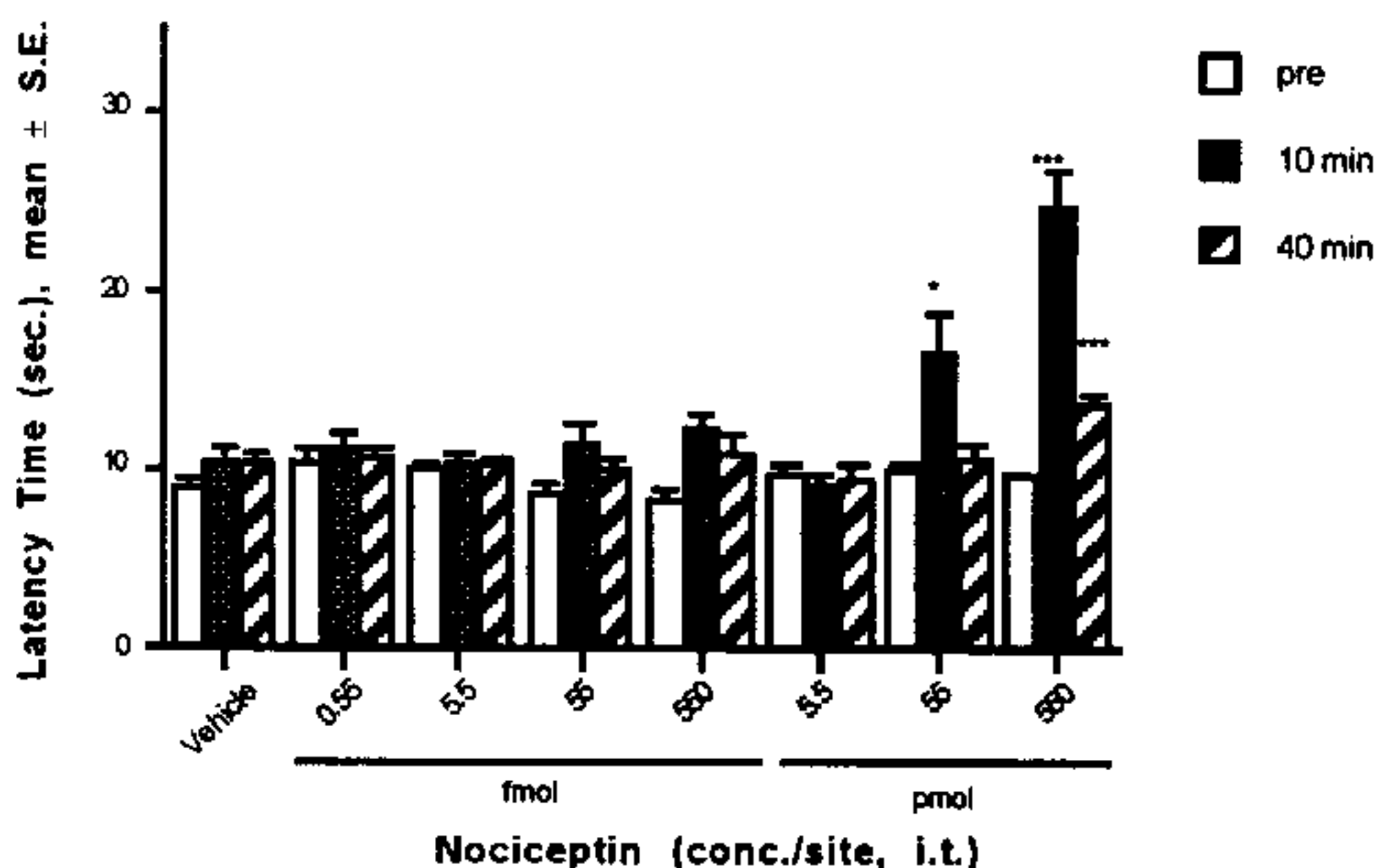


Fig. 2: Concentration effect of nociceptin on thermal-nociceptive threshold in rats tail-flick test.

1-3) 非ペプチド性合成 ORL-1 受容体拮抗剤 (i.t.) を用いた拮抗実験

非ペプチド性合成 ORL-1 受容体拮抗剤 (5.5 nmol/site/ラット, i.t.) を用い,ラット Tail-flick 法における熱侵害刺激に対するそれ自身の及ぼす作用及び,Nociceptin (3 nmol/site/ラット, i.t.) の抗-熱侵害受容作用に及ぼす影響について,それぞれ観察した(Fig. 3).

非ペプチド性合成 ORL-1 受容体拮抗剤 (5.5 nmol/site/ラット, i.t.) は,熱侵害刺激に対し,統計的に有意な作用を何ら及ぼさなかった.

一方で,非ペプチド性合成 ORL-1 受容体拮抗剤 (5.5 nmol/site/ラット, i.t.) の前処置により,Nociceptin (3 nmol/site/ラット, i.t.) の抗-熱侵害受容作用が 86% 消失した. この非ペプチド性合成 ORL-1 受容体拮抗剤 の Nociceptin に対する拮抗作用は,統計的に有意であった.

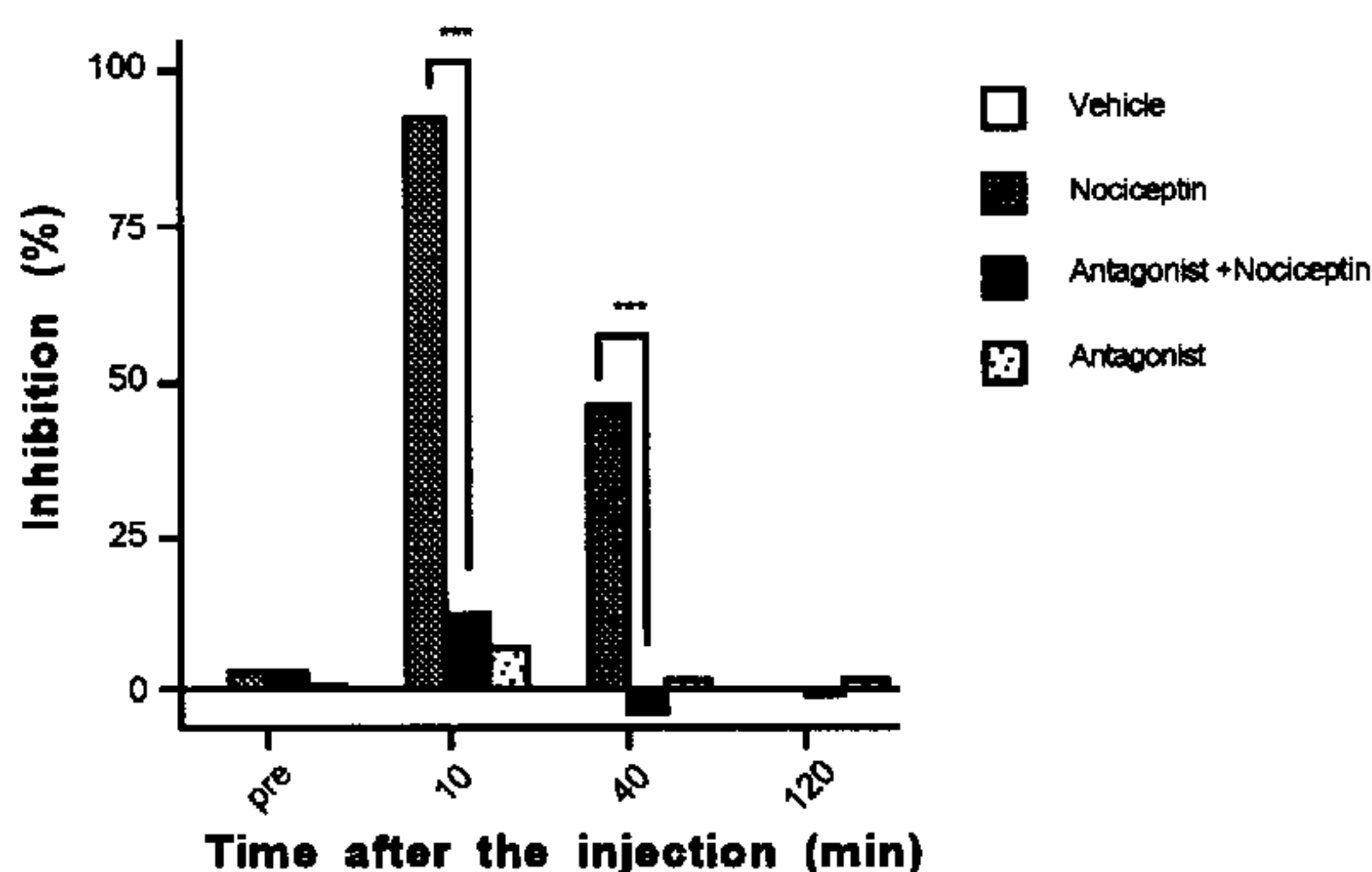


Fig. 3: Effect of ORL-1 receptor antagonist on nociceptin-induced anti-nociception in rats tail-flick test.

2) Nociceptin (i.t.) の圧侵害受容刺激に対する作用

急性炎症疼痛モデル動物を作成し,Randall-selitto を用いた圧侵害受容刺激に対する Nociceptin (i.t.) の作用を調べた(Fig. 4).

Nociceptin (0.055 - 5500 pmol/site/ラット i.t.)は,急性炎症疼痛モデルラットにおける圧侵害刺激に対しても用量依存的かつ時間依存的な,抗-圧侵害受容作用を示した. I.t.投与 10 分後における Nociceptin の ED50 値は 5 pmol/site/ラットであった.

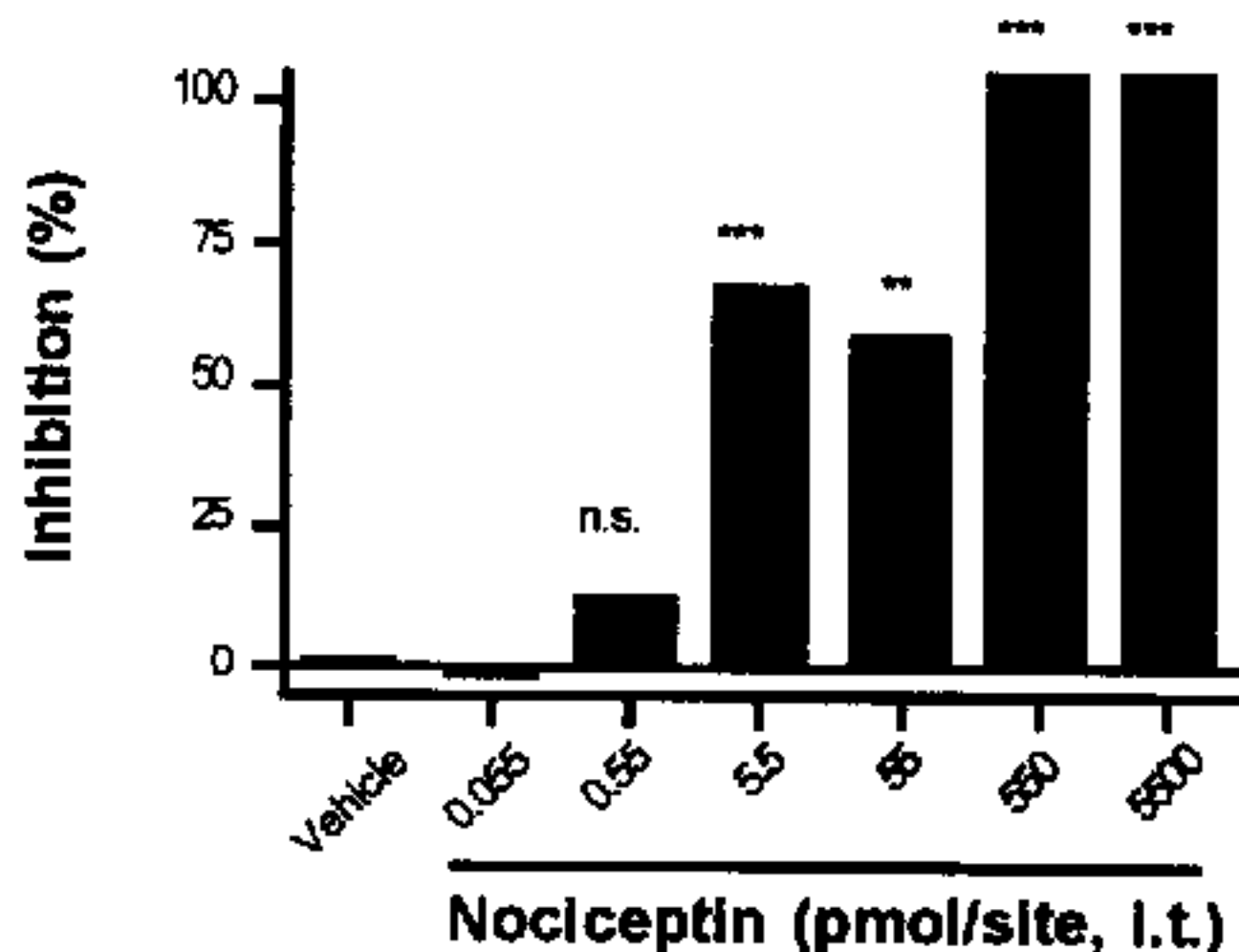


Fig. 4: Effect of nociceptin on mechanical-nociceptive threshold in rats carrageenan-induced hyperalgesia test.

【考察】

本研究では, Nociceptin が, ラット脊髄腔内において, Tail-flick 法を用いた熱侵害刺激, 及び急性炎症疼痛モデル動物を用いた圧侵害刺激のいずれに対しても抑制的に作用することを見い出した。

また, 非ペプチド性合成 ORL-1 受容体拮抗剤を用いることにより, 脊髄腔内における Nociceptin の示す抗-侵害刺激効果が, ORL-1 受容体を介した作用であることが明らかとなった。

これら結果から, ORL-1 受容体アゴニストは, 既存のオピオイド同様, 鎮痛薬として有用であることが示唆された。

【文献】

- 1) Meunier J. C. et al. *Nature*, **377**, 532-535 (1995)
- 2) Butour J. L., Meunier J. C. et al. *Eur. J. Pharmacol.* **321**(1), 97-103 (1997)
- 3) Fukuda K. et al. *FEBS Lett.*, **343**, 42-46 (1994)
- 4) Houtani T. et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **219**, 714-719 (1996)
- 5) Hylden J. L. K. and Wilcox G. L. *Eur. J. Pharmacol.*, **67**, 313-316 (1980)

4

選択的 ORL-1 受容体リガンドの *in vitro* でのアゴニストおよび アンタゴニスト作用の検討

○山田 善也、朱雀 鉄城、大橋雅津代、横山 政幸、伊藤 文隆、
樽林 陽一、長久 厚

ファイザー製薬株式会社・中央研究所

[緒言]

ORL-1 受容体は 1994 年にオピオイド受容体のホモログとしてクローニングされ、翌年、その内因性リガンドとして 17 個のアミノ酸よりなるノシセプチンが発見された。ORL-1 受容体を介する作用として、‘痛み’や‘記憶’に関連した生理作用等が報告されているが、より詳細な解析には ORL-1 受容体に選択的に生体内で安定なアゴニストやアンタゴニストの開発が重要である。

ノシセプチンの類縁体が多数合成される中で、1998 年に、マウス輸精管等の末梢組織の電気刺激収縮作用を指標に、初の選択的なペプチド性 ORL-1 受容体拮抗剤[Phe¹Ψ(CH₂-NH)Gly²]nociceptin-(1-13)-NH₂ が報告された。しかし、このペプチドは ORL-1 受容体発現細胞を用いた cAMP assay やラットの脊髄内投与では、アゴニスト活性を示すことが報告されている⁽¹⁾。

非ペプチド性 ORL-1 受容体リガンドとしては、Naloxone Benzoylhydrazone (NalBzoH)が知られている。しかしながら、NalBzoH は ORL-1 受容体拮抗作用を示すがその活性は弱く、Mu 受容体への拮抗作用も有している⁽²⁾。また、最近、相次いで ORL-1 受容体に選択的なリガンドの特許が公開され^(3, 4)、その活性が注目されている。

本研究では、これら ORL-1 受容体リガンドの *in vitro* での活性を評価し、ORL-1 受容体発現細胞を用いた場合と末梢組織を用いた場合では、異なる活性を示す場合があることを明らかにした。

[実験方法]

1. Binding assay

ヒト ORL-1 受容体発現細胞(HEK)膜標品、およびヒトオピオイド受容体(mu, kappa, delta) 発現細胞(CHO)膜標品を用い、SPA 法 (Amersham) で受容体結合実験を行なった。使用した^[3H]標識リガンドは、Table 1 に示した。結合活性

は、 $[^3\text{H}]$ 標識リガンドの結合を 50% 阻害する濃度 (IC₅₀ 値) で示した。

2. $[^{35}\text{S}]\text{GTP } \gamma \text{S}$ binding assay

各リガンドと膜標品を 400pM $[^{35}\text{S}]\text{GTP } \gamma \text{S}$ と SPA の共存下で 30 分インキュベートし、G 蛋白質の活性化にともなう $[^{35}\text{S}]\text{GTP } \gamma \text{S}$ 結合能の増加を指標に、アゴニスト活性およびアンタゴニスト活性を評価した。アゴニスト活性：各々のリガンドによる $[^{35}\text{S}]\text{GTP } \gamma \text{S}$ 結合の最大応答 (E_{max}) と、その 50% 濃度 (EC₅₀ 値) を求めた。アンタゴニスト活性：各リガンドによる、50nM ノシセプチン刺激で誘導される $[^{35}\text{S}]\text{GTP } \gamma \text{S}$ 結合の 50% 阻害濃度 (IC₅₀ 値) を求めた。

3. Mouse vas deferens contraction assay

ICR 系雄性マウスの輸精管を、Krebs-Henseleit 液に 0.2g の負荷で懸垂し、0.1Hz、5 msec の電気刺激で収縮を誘発した。10 μM ナロキソンの添加 20 分後から、各リガンドを累積添加し、収縮抑制率を測定した。アゴニスト活性：各リガンド添加前の収縮高を 100% とし、50% 抑制する濃度 (EC₅₀ 値) を求めた。アンタゴニスト活性：100nM のノシセプチン刺激で収縮抑制を誘導し、引き続き、各リガンドを累積添加し、ノシセプチンに対する拮抗作用を評価した。IC₅₀ 値はノシセプチン添加前の収縮高を 0%、100nM 添加の収縮高を 100% として求めた。

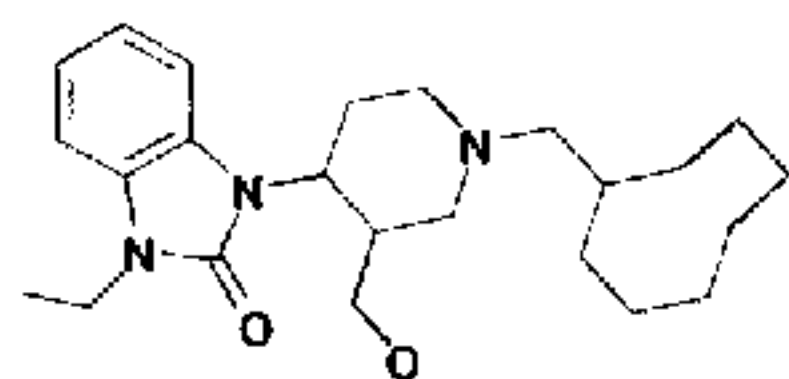
Table 1. Binding affinities of ORL-1 ligands for human ORL-1, mu, kappa and delta receptors.

Ligands	IC ₅₀ (nM)				Selectivity	
	ORL-1 [³ H]Nociceptin	mu [³ H]DAMGO	kappa [³ H]CI-977	delta [³ H]DPDPE	mu/ORL-1	kappa/ORL-1
Nociceptin	0.93	288	>1000	>10000	310	>1000
Pseudopeptide	7.4	811	>1000	>10000	110	>135
Compound-I	15	135	878	>10000	9.0	59
Compound-II	469	87	829	1894	0.19	1.8
NalBzoH	284	1.1	2.9	14	0.0039	0.010

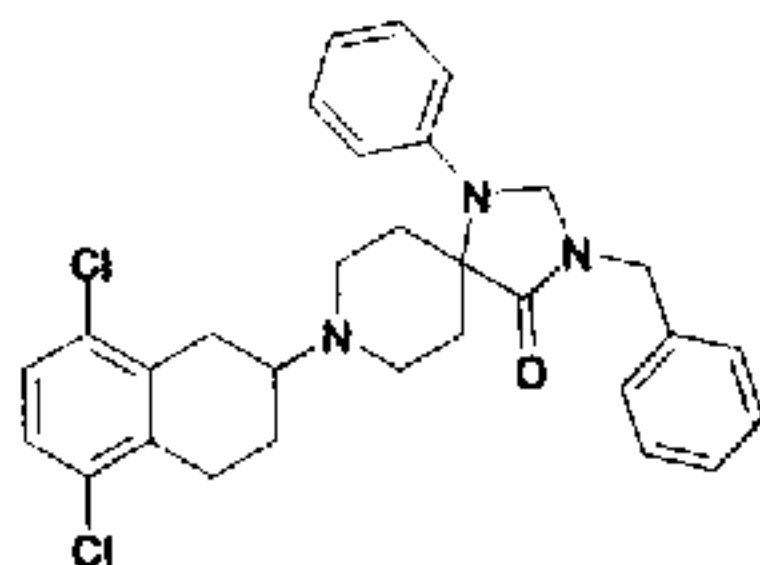
IC₅₀ values represent the mean of at least two independent experiments.

Pseudopeptide: [Phe¹Ψ(CH₂-NH)Gly²]nociceptin-(1-13)-NH₂

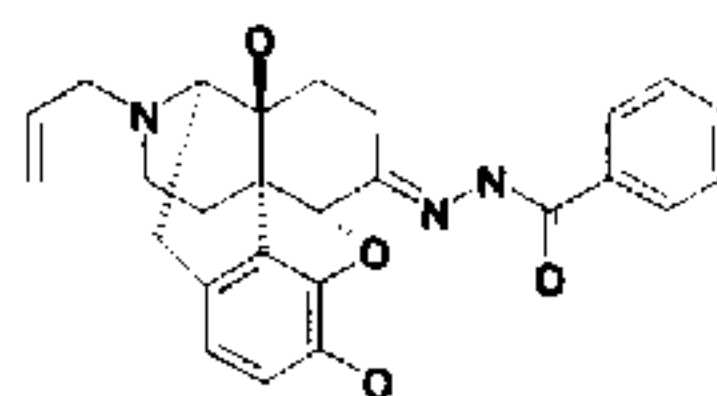
NalBzoH: Naloxone Benzoylhydrazone



Compound-I



Compound-II



NalBzoH

[結果]

1 ORL-1 受容体選択的結合活性

ノシセプチンと、その類縁体である [Phe¹Ψ(CH₂-NH)Gly²]nociceptin-(1-13)-NH₂ (以下、pseudopeptide と表記)、および3つの非ペプチド性低分子化合物について、ヒトの ORL-1 受容体や他のヒトオピオイド受容体 (mu、kappa および delta 受容体) に対する結合活性を検討した (Table 1)。ノシセプチンと pseudopeptide と Compound-I が選択的な ORL-1 受容体結合活性を示した。NalBzoH と Compound-II については、ORL-1 受容体への選択性は低かった。

2 アゴニスト活性

ORL-1 受容体に選択的なリガンドについて、ORL-1 受容体発現細胞膜標品を用いた [³⁵S]GTP γ S 結合活性で評価したところ (Fig.1)、pseudopeptide (EC₅₀=49nM, E_{max}=75%) はノシセプチン (EC₅₀=21nM) に迫るアゴニスト活性を示した。

マウス摘出輸精管標本を用いた、各リガンドの経壁電気刺激収縮における抑制作用では (Fig.2)、ノシセプチンの EC₅₀ 値は [³⁵S]GTP γ S 結合活性の EC₅₀ 値と同程度の 12 nM であったが、pseudopeptid の場合は、高濃度でアゴニスト活性が認められたにすぎず、ORL-1 受容体発現細胞を用いた系とは異なった結果が得られた。

一方、ORL-1 受容体への親和性が強い Compound-I には、どちらの系においても、アゴニスト活性は認められなかった。

3 アンタゴニスト活性

各リガンドのアンタゴニスト活性を比較検討した (Fig.3, 4)。

50nM ノシセプチン刺激で誘導される [³⁵S]GTP γ S 結合に対する阻害効果を指標としたところ (Fig.3)、Compound-I は強いアンタゴニスト活性を示し、IC₅₀ 値は 88nM であった。NalBzoH は、10 μ M で有意な活性を示した。Pseudopeptide は、この実験系ではアンタゴニスト活性は認められなかった。

ノシセプチンを 100 nM 作用させたマウス摘出輸精管標本に対するアンタゴニスト活性については (Fig.4)、pseudopeptide の IC₅₀ 値は 794 nM、Compound-I の IC₅₀ 値は 282 nM であった。

[考察]

選択的 ORL-1 受容体リガンドの in vitro でのアゴニストおよびアンタゴニスト作用を、ORL-1 受容体発現細胞膜標品への [³⁵S]GTP γ S 結合作用と、マウス摘出輸精管標本の経壁電気刺激収縮抑制作用で解析した。

低分子化合物については、どちらの評価系であっても同様の結果が得られた。

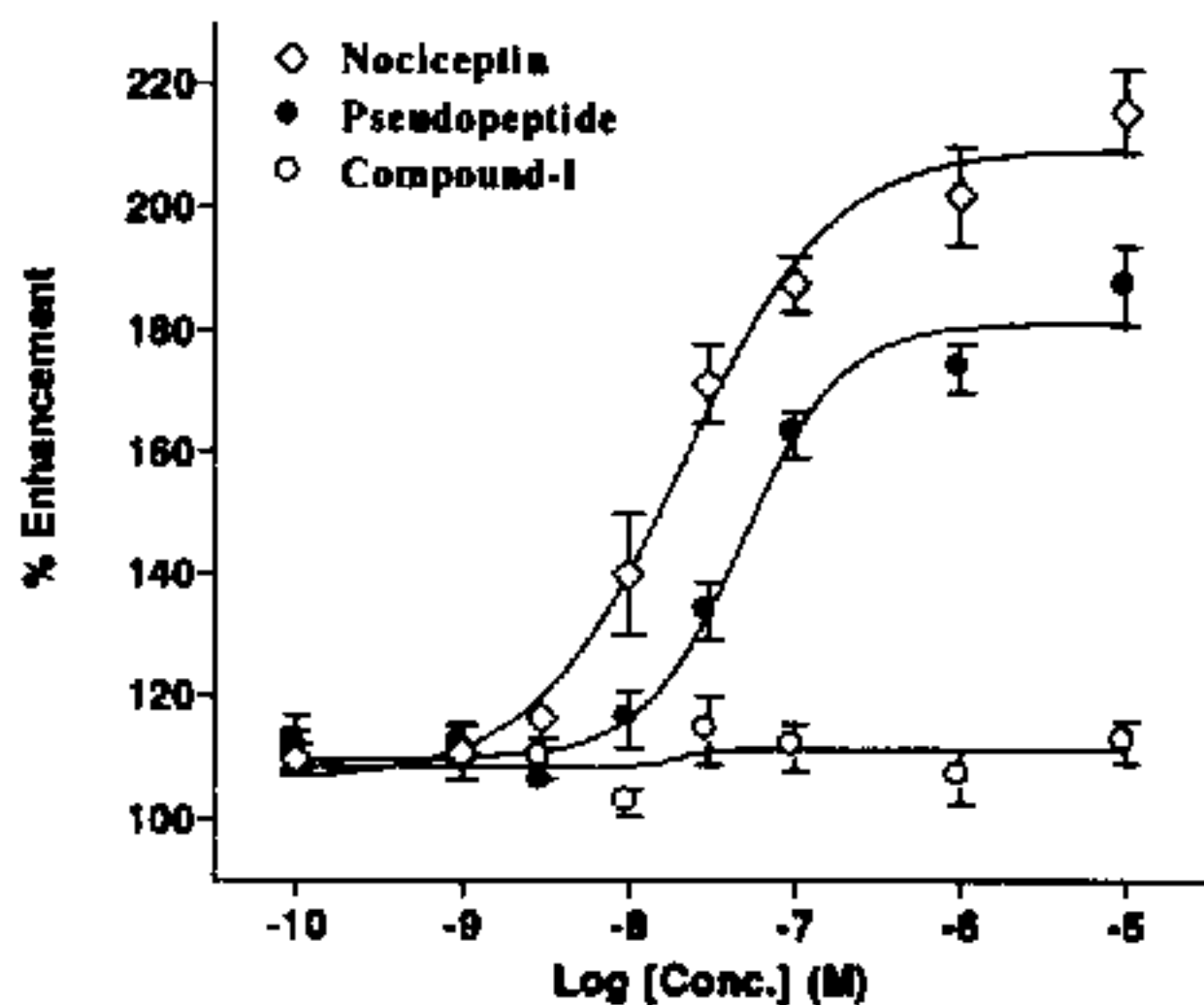


Fig. 1. Effect of agonist-induced stimulation of [³⁵S]GTPγS binding to human ORL-1 receptor-expressing HEK cell membranes.

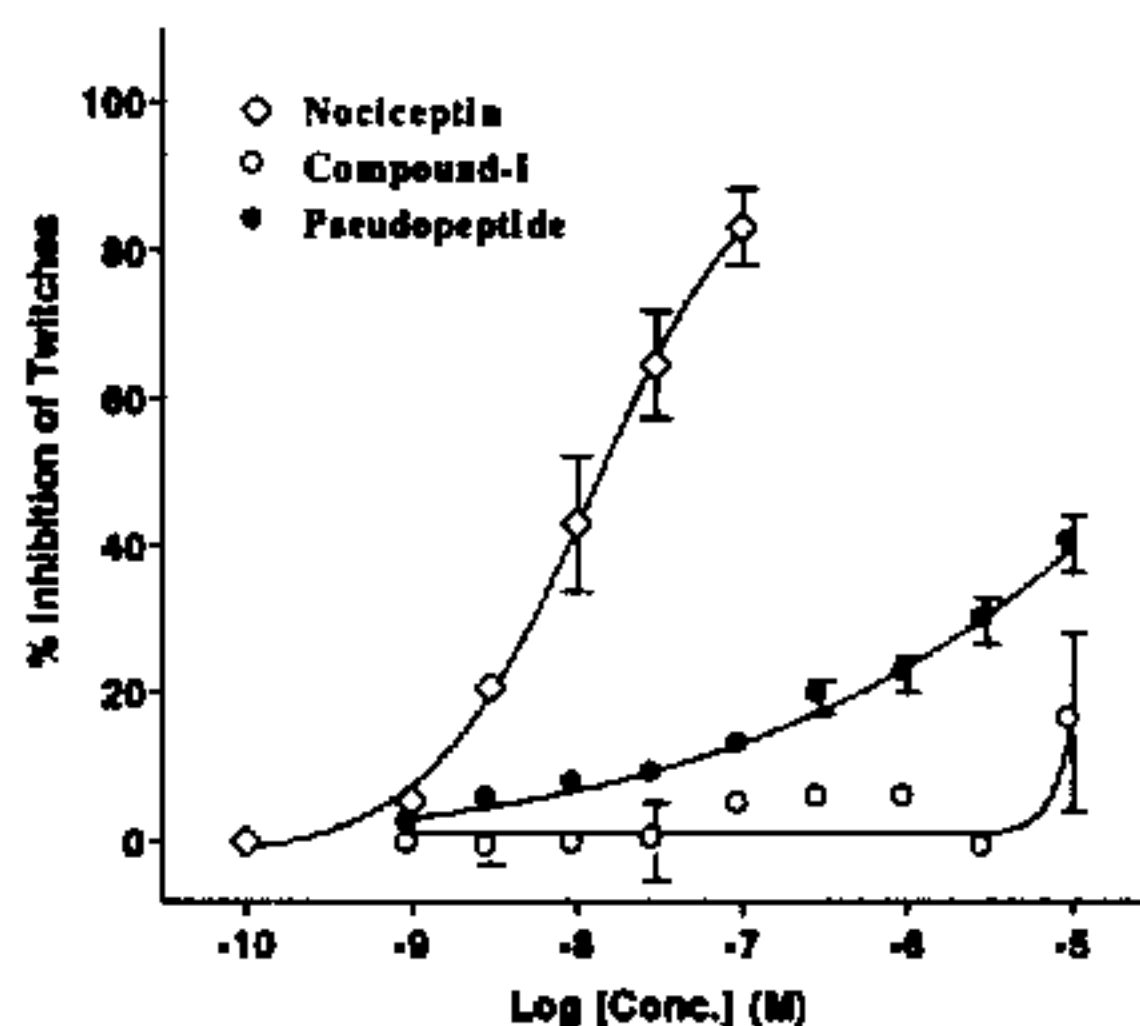


Fig. 2. Effect of agonist-induced inhibition of electrically-induced contraction of the mouse vas deferens in the presence of 10μM naloxone.

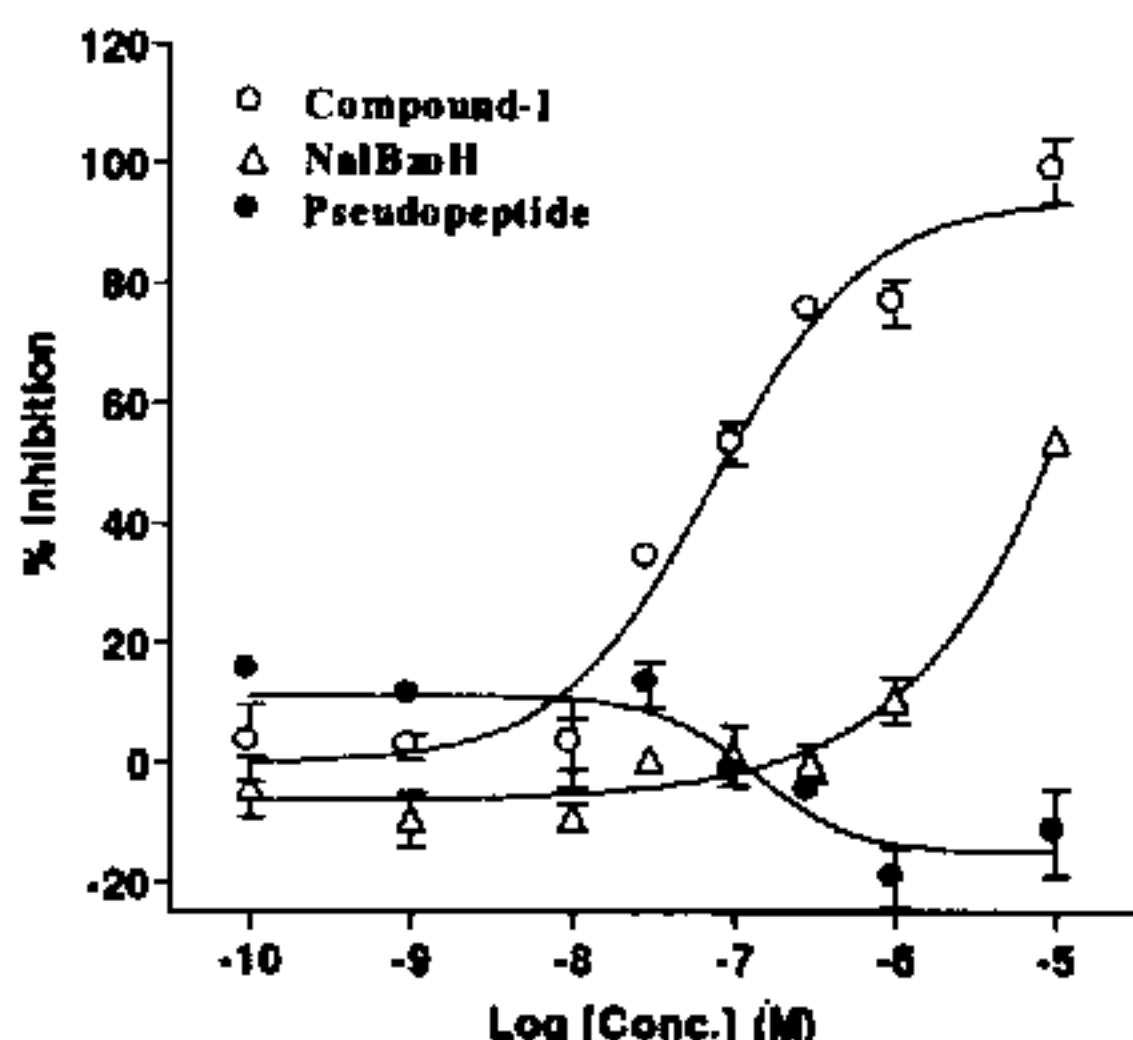


Fig. 3. Antagonism effect of nociceptin-induced stimulation of [³⁵S]GTPγS binding to human ORL-1 receptor-expressing HEK cell membranes.

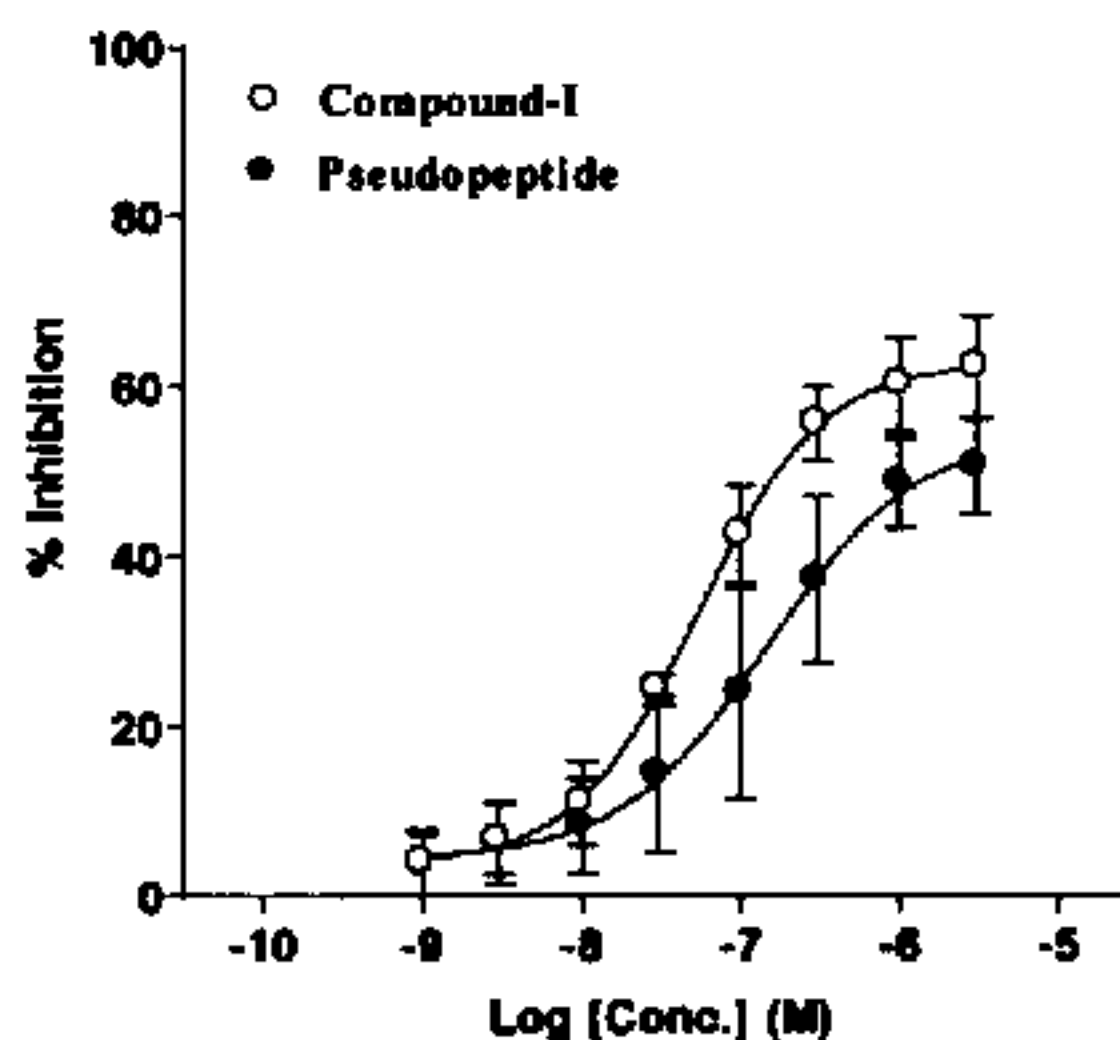


Fig. 4. Antagonism effect of nociceptin-induced inhibition of electrically-induced contraction of the mouse vas deferens in the presence of 10μM naloxone.

NalBzoH は、ORL-1 受容体に対して弱いながらもアンタゴニスト活性を示したが、mu 受容体には強いアンタゴニストとして作用し、かつ、kappa 受容体に対しては強いアゴニスト活性を示すことも見出した。これらのことから、ノシセプチンや ORL-1 受容体の生理作用を研究する tool としては、NalBzoH は適当ではないと考えられる。また、Compound-II は ORL-1 受容体に選択的な活性を示さなかった。一方、Compound-I は、ORL-1 受容体への選択性は高く、強いアンタゴニスト活性を持つので、ノシセプチンの生理作用を解析する上で、有用な tool となる。

ORL-1 受容体に選択的で強い結合活性を有するリガンドであっても、[Phe¹Ψ(CH₂-NH)Gly²]nociceptin-(1-13)-NH₂ は、ORL-1 受容体発現細胞を用いた場合にはアゴニスト活性を示し、末梢組織を用いた場合にはノシセプチンに対しアンタゴニスト活性を示すという結果が得られた。これらの知見は、ノシセプチンおよび ORL-1 受容体を介する生理作用の複雑さと思われる。昨年、マウスの脳に

において、ORL-1 受容体に 5 つの splicing variants が存在することが報告されたが⁽⁵⁾ 今回得られた結果は、末梢での ORL-1 受容体サブタイプの存在を示唆しているのかもしれない。あるいは、中枢と末梢の細胞では、ORL-1 受容体のシグナル伝達機構が異なる可能性もある。

[文献]

- 1 Carpenter K.J. & Dickenson, A.H. (1998) Evidence that [Phe¹Ψ(CH₂-NH)Gly²]nociceptin-(1-13)-NH₂, a peripheral ORL1 receptor antagonist, act as an agonist in the rat spinal cord. *Br. J. Pharmacol.*, 125, 949-951.
- 2 Brown G.P. & Pasternak G.W. (1998) ³H-Naloxone benzoylhydrazone binding in MOR-1-transfected chinese hamster ovary cells: Evidence for G-protein-dependent antagonist binding. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 286, 376-381.
- 3 (特許: EP -56514) F Hoffmann-La Roche AG (05-Aug-1998)
8-Substituted-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-4-one derivatives as agonists and/or antagonists of OFQ receptor.
- 4 (特許: WO-09854168) Banyu Pharm Co Ltd (03-Dec-1998)
2-Oxoimidazole derivatives as nociceptin modulators.
- 5 Pasternak G.W. et al.(1998) Identification and differential regional expression of KOR-3/ORL-1 gene splice variants in mouse brain. *FEBS Letters*, 435, 65-68.

5

新規オピオイドペプチドの抗侵害作用

○萩原正樹¹、宮前哲久¹、岡山 徹¹、

森川忠則¹、櫻田 司²、櫻田 忍³

富士薬品工業・研究部¹、第一薬科大学・生化学教室²、

東北薬科大学・機能形態学教室³

【緒言】

1981年南米産 *phyllomedusa sauvagei* の蛙の皮膚から単離された dermorphin (H-Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-NH₂) は N 端の 2 位に D 体アミノ酸を含有しており、強力な鎮痛活性を有し、かつ身体依存性の極めて弱い heptapeptide として見い出された。しかし、経口投与による鎮痛作用は弱いものであった。

一方、dermorphin の N 端 tetrapeptide (H-Tyr-D-Ala-Phe-Gly-OH) は opioid としての活性最小構造であり、これを基本骨格として、N 端の 2 位に D-Arg を導入した H-Tyr-D-Arg-Phe-Gly-OH および H-Tyr-D-Arg-Phe-β-ala-OH を合成した。その鎮痛活性は皮下投与で morphine の 20 倍以上あり鎮痛作用の持続時間は morphine の 2 倍以上であったが、経口投与では、morphine とほぼ同程度であった。

その後、dermorphin N-terminal tetrapeptide analogues の中から経口投与による鎮痛活性の強力なペプチドである 1-imino ethyl-Tyr-D-Cit-Phe-methyl-β-ala-OH (TCPA) が見い出された。

本実験では、TCPA の抗侵害作用および腸管運動抑制作用について morphine と比較検討した。さらに、opioid receptor subtype についても検討するために μ₁-opioid receptor antagonist である naloxonazine および β-funaltrexamine 前処理下における TCPA の作用についても検討した。

【実験方法】

実験には体重 20 - 30 g の ddY 系雄性マウスを実験に供するまで明暗サイクル 12 時間、室温 22 ± 2 °C、湿度 55 ± 5% の一定環境下で 2 日以上飼育したものを使用した。

マウス脳室内 (i.c.v.) および脊髄くも膜下腔 (i.t.) 投与の用量は5 μ l/mouse の割合で投与した。i.c.v. および i.t. 投与の方法はそれぞれ Haley and McComick および Hylden and Wilcox の方法に準じた。

Tail-pressure test

マウスの尾根部に 32 g/sec の割合で圧刺激を加え、もがき、刺激部位へのかみつき行動を指標として圧を測定し、これを疼痛反応閾値とした。なお、実験にはあらかじめ 100 - 300 g の加重に反応するマウスを選択して使用した。また、マウス尾根部の損傷を最小限に抑えるため、最大重量を 500 g とした。

Tail-flick test

マウスの尾部先端より 2 cm の部位に熱刺激を加え、尾を flick するまでの時間を測定した。なお、実験にはあらかじめ 2 - 4 秒の熱刺激によって反応するマウスを選択して使用した。また、マウス尾部の損傷を最低限に抑えるため、加える熱刺激時間を 10 秒以内とした。

Hot-plate test

熱板 (51 \pm 0.5 $^{\circ}$ C) の上にプラスチック製の透明な円柱 (直径20cm、高さ26cm) を置き、その中にラットを入れてから後肢の licking 行動を示すまでの時間を測定した。なお、実験にはあらかじめ 10 - 25 秒の熱刺激によって反応するラットを選択して使用した。ラットの熱刺激部位の損傷を最低限に抑えるため、最大熱刺激時間を 60 秒とした。

腸管炭末輸送

マウスを 24 時間絶食後、5%アラビアゴム懸濁液100ml に活性炭 5 g を溶かし、10 ml/kg をマウスに経口投与し、投与 30 分後に、マウスの腸管を取り出し、炭末の移動率を測定した。

【実験結果】

Tail-pressure test

TCPA 0.5 mg/kg を皮下投与すると投与 90 分後に約 90 %の抗侵害作用が得られ、その作用は 8 時間持続した。また、morphine 10 mg/kg の皮下

投与においても投与 30 分後に約 90 %の抗侵害作用が得られたが、投与 3 時間後にはほぼ投与前の値まで回復した。一方、TCPA 20 mg/kg 経口投与による抗侵害作用は投与 2 時間後に約 80 %の値を示し、その作用は 25 時間後にも回復しなかった。また、morphine 50 mg/kg 経口投与によって投与 90 分後に約 90 %の抗侵害作用が認められたが、投与 6 時間後にはほぼ回復した (fig.1, table 1)。

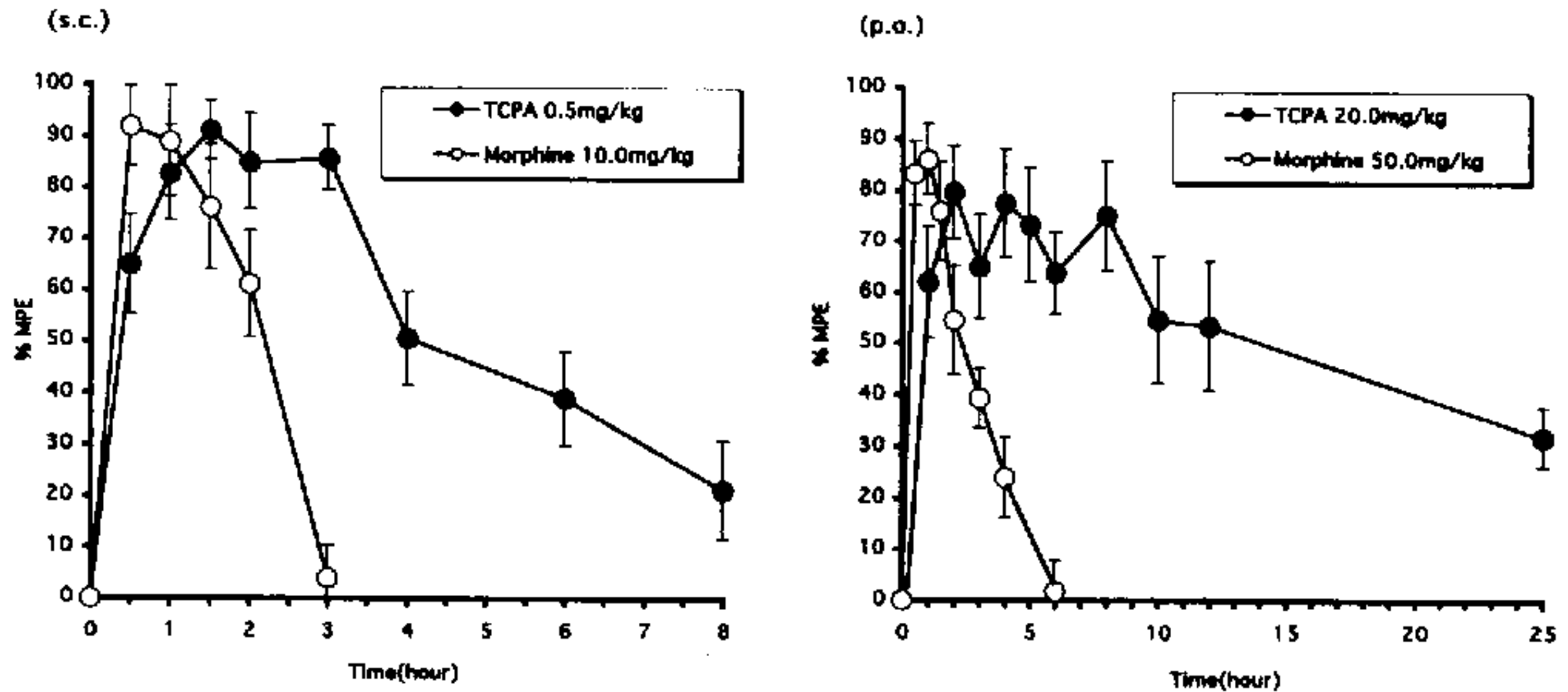


Fig.1 Antinociceptive activity of TCPA and morphine in mouse tail pressure test

Table 1 Antinociceptive Activity of TCPA and Morphine in Mouse Tail Pressure Test

Compounds	ED50	ED50 ^a	ED50
	mg/kg	mg/kg	ng/mouse
	s.c.	p.o.	i.c.v.
TCPA	0.17	3.7	0.33
Morphine	3.3	22.2	81

ED50 values were determined at the time of peak effect. For TCPA, this time was 1.5hr after s.c., 3hr after p.o. or 10min after i.c.v. For morphine, this time was 30min after s.c., 1hr after p.o. or 10min after i.c.v.

Tail-flick test

TCPA をマウスに i.c.v. および i.t. 投与すると用量依存的に抗侵害作用が認められ、それぞれの ED₅₀ 値は 3.6 (2.55 - 5.08) pmol および 0.62 (0.41 - 0.95) pmol であった。さらに、TCPA 10 pmol i.c.v. および 2 pmol i.t. 投与により約 95 % の抗侵害作用が認められたが、この作用は Naloxonazine および β -funaltrexamine によってほぼ完全に拮抗された。

腸管炭末輸送

TCPA 皮下投与時の腸管運動に対する影響を検討したところ、その 50 % 抑制 ID₅₀ 値は 0.75 mg/kg であった。TCPA の皮下投与時にみられる腸管運動 50 % 抑制用量 (ID₅₀) と 50 % 抗侵害作用用量 (ED₅₀) の比 (ID₅₀/ED₅₀) は 4.3 であり、morphine の ID₅₀/ED₅₀ は 0.97 であった。これらの結果から、TCPA は抗侵害用量の約 4 倍の用量で腸管運動抑制作用を発現するが、morphine は抗侵害作用の用量で腸管運動抑制作用を発現することが認められた。

【考察】

TCPA は μ -opioid receptor を介してその作用を発現させ、さらに抗侵害作用の持続性から推測して、極めて分解の遅いペプチドであると考えられる。また、TCPA の皮下投与時における腸管運動抑制作用および抗侵害作用との比較において、TCPA は morphine よりも抗侵害作用に特異性の高いペプチドであることが判明した。また、TCPA の抗侵害作用は μ 1-opioid receptor antagonist である naloxonazine によってほぼ完全に拮抗されたことから、 μ 1-opioid receptor を介して発現されると思われる。

6

Endomorphins の健忘誘発作用機序

○林 惠萍, 鵜飼 良

名城大学薬学部薬品作用学教室

【緒言】

オピオイド受容体は、少なくとも μ , δ および κ の3種のタイプに分類され、生体内で種々の生理反応に関わっている (Pan, 1998). 最近、4個のアミノ酸から成る内在性 μ -オピオイド受容体作動薬がウシの脳から発見され、endomorphins (endomorphin-1 および endomorphin-2) と命名された (Zadina et al., 1997). 我々は、endomorphins によって健忘が誘発され、その健忘は μ -オピオイド受容体を介することを既に報告した(第19回鎮痛薬オピオイドペプチドシンポジウム). そこで、今回は endomorphins の健忘誘発作用機序を μ_1 オピオイド受容体拮抗薬 naloxonazine を用いて明らかにしようとした.

【実験方法】

実験には、ddY系雄性マウス(体重28~38g)を用いた.

1) 自発的交替行動

マウスをY字型迷路のアームの先端に置き、8分間にわたって自由に動き回らせ、アームへの移動回数を記録した (Ukai et al., 1997). 8分間にマウスが入ったアーム数を total arm entries とし、この中でマウスが連続して異なる3つのアームを選択した回数を no. of alternation とした. そして、percent alternation を $([\text{no. of alternation}] / [\text{total arm entries} - 2]) \times 100$ の式から求め、自発的交替行動の指標とした. Endomorphins (i.c.v.) および naloxonazine (s.c.) は、それぞれ行動測定の15分前および24時間前に投与した.

2) 受動的回避学習

ステップダウン (step-down) 型の受動的回避学習装置を用いた (Ukai et al., 1997). 訓練試行では, 先ず, マウスを木製プラットホーム上に静かにのせ, マウスがプラットホームから床グリッド上へステップダウンした直後に間欠的な電気ショック (80V, D.C., 0.5 sec, 1 Hz) を負荷した. 保持試行は, 訓練試行の 24 時間後に行い, マウスを再びプラットホーム上にのせてステップダウンするまでの時間 (step-down latency: SDL) を測定し, これを学習の指標とした. なお, cut-off 時間の上限は 300 秒とした. Endomorphins (i.c.v.) は訓練試行直後, naloxonazine (s.c) は訓練試行の 24 時間前にそれぞれ投与した.

【結果と考察】

Endomorphin-1 (10 μ g) および endomorphin-2 (10 μ g) は, 受動的回避学習の SDL を有意に短縮させ, 健忘を誘発させた. この健忘誘発作用は naloxonazine (50 mg/kg) を前処置すると有意に拮抗された (Fig. 1). 自発的交替行動においては, endomorphin-1 (17.5 μ g) および endomorphin-2 (17.5 μ g) の投与によって percent alternation が有意に減少し, この減少も naloxonazine (50 mg/kg) の併用により抑制される傾向が認められた. 一方, total arm entries については有意な変化が見られなかった.

以上の結果より, endomorphin-1 および endomorphin-2 による健忘誘発作用は μ_1 オピオイド受容体を介することが示唆された. なお, endomorphins の健忘誘発作用におけるアセチルコリンおよびドパミン神経系の関与についても検討し, 報告する予定である.

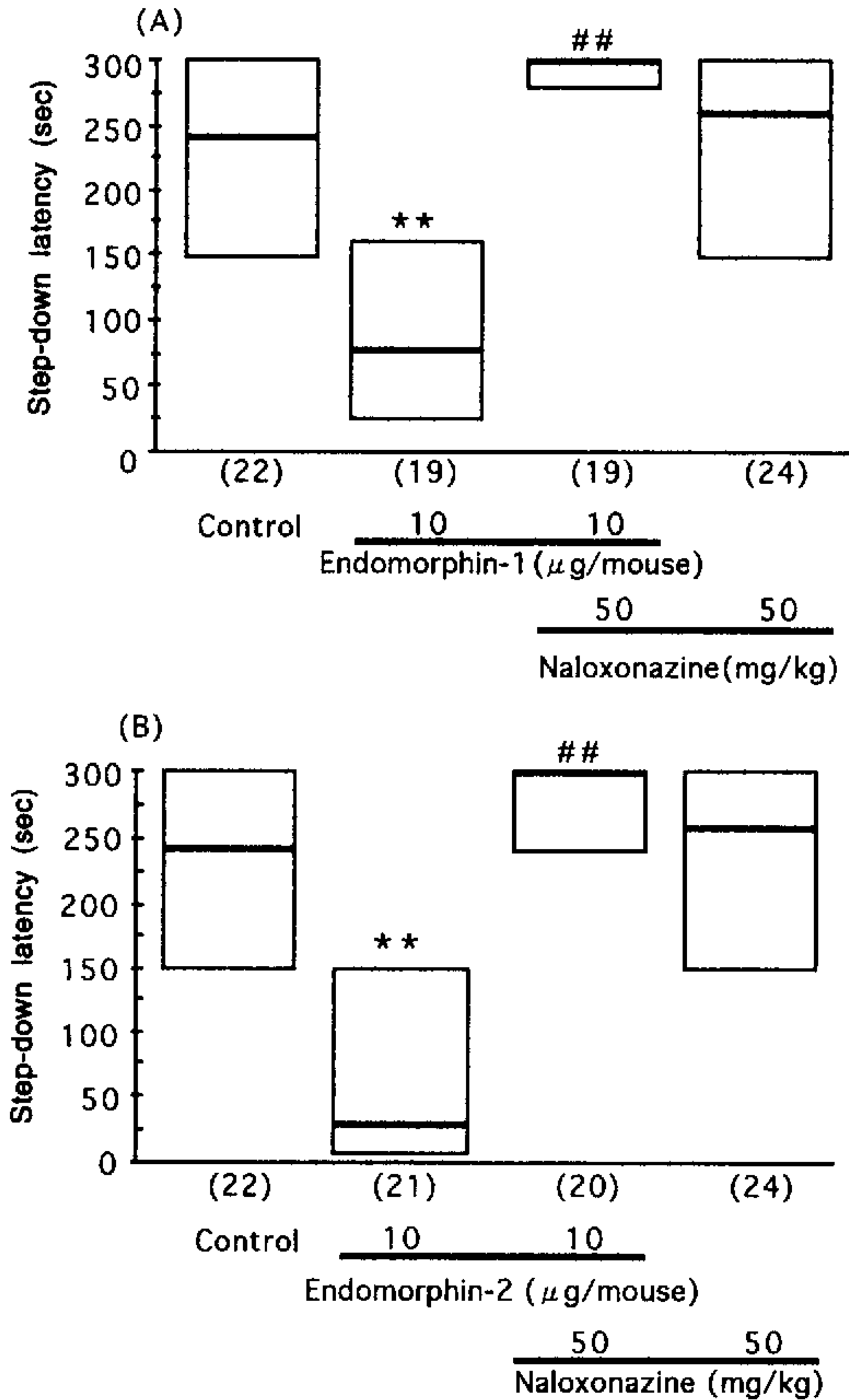


Fig. 1. Effects of endomorphin-1 (A), endomorphin-2 (B) and their combinations with naloxonazine on passive avoidance learning in mice. Data are shown as the median and interquartile ranges, which are the distances between the first and third quartile. The number of mice used is shown in parentheses. ** $P < 0.01$ vs. control; ## $P < 0.01$ vs. endomorphins.

【文献】

Pan, Z.Z. (1998) μ -Opposing actions of the κ -opioid receptor, Trends in Pharmacol. Sci. 19: 94-98.

Ukai, M., Itoh, J., Kobayashi, T., Shinkai, N. and Kameyama, T. (1997) Effects of the κ -opioid dynorphin A(1-13) on learning and memory in mice, Behav. Brain Res. 83: 169-172.

Zadina, J.E., Hackler, L., Ge, L.-J. and Kastin, A.J. (1997) A potent and selective endogenous agonist for the μ -opiate receptor, Nature 386: 499-502.

7

μ オピオイド受容体ノックアウトマウスの行動薬理学的特性

○船田正彦¹⁾, 曾良一朗²⁾, 原千高¹⁾

¹⁾第一薬大・薬理学教室, ²⁾ IRP, NIDA, NIH, Baltimore, MD, USA

[緒言]

モルヒネをはじめとするオピオイド作用薬は μ , δ および κ 受容体を介して鎮痛作用を発現し, 癌性疼痛治療において重要な役割を果たしている. オピオイド受容体の研究は, 1992年に δ 受容体遺伝子のクローニングが成功し, 以後 μ および κ 受容体遺伝子が相次いでクローニングされ3タイプともにG蛋白共役型で7回膜貫通型構造を有することが明らかになり, その機能がより詳細に検討されている¹⁾⁻³⁾.

近年, μ 受容体遺伝子のノックアウトマウス ($Mu(-/-)$ マウス) が作製され, マウスの行動を指標に μ 受容体の役割が検討されている⁴⁾. 薬理学的アプローチから, 現在までにオピオイド受容体間の相互作用の存在が示されており, この複雑な相互作用の解明に $Mu(-/-)$ マウスは有用なモデル動物であると考えられる.

本研究では, $Mu(-/-)$ マウスのモルヒネ誘発薬理作用を指標に, $Mu(-/-)$ マウスの特性について検討を行った.

[実験方法]

実験には, 体重20-30gの $Mu(-/-)$ マウス, 対照としてワイルド型の $Mu(+/+)$ マウスおよびヘテロ型の $Mu(+/-)$ マウスを用いた.

モルヒネ鎮痛作用: モルヒネ鎮痛作用の測定には, hot-plate法 (52~55℃, カットオフ潜時: 30秒) およびtail-flick法 (50~53℃, カットオフ潜時: 15秒) を用いた. 薬物投与前に, ベースライン潜時, すなわち熱刺激に対する閾値を測定し, 薬物投与20分後における潜時の測定を行った. 鎮痛効果は% of maximal analgesia [%MPE=100X (モルヒネ投与後の潜時-ベースライン潜時) / (カットオフ潜時-ベースライン潜時)]で示した. 実験には μ 受容体作用薬としてモルヒネ (s.c.), κ 受容体作用薬としてU-50,488H (s.c.) および δ 受容体作用薬として[D-Pen²,D-Pen⁵]enkephalin (DPDPE, i.c.v.) を使用した.

モルヒネ誘発自発運動促進作用：モルヒネ（10 mg/kg, s.c.）による運動量の変化を3時間にわたって測定した。

モルヒネ身体依存：モルヒネ慢性処置は、注射法によりモルヒネ（8-45 mg/kg, s.c.）を5日間漸増適用した。モルヒネ慢性処置開始から5日目に、オピオイド受容体拮抗薬ナロキソン（3 mg/kg）もしくは溶媒を皮下投与し、退薬症候の1つであるジャンピング行動の発現回数を測定した。

[結果]

鎮痛効果：熱侵害刺激に対するベースライン潜時を hot-plate 法および tail-flick 法で測定したところ、 $Mu(-/-)$ マウスにおいて潜時の短縮、すなわち痛覚閾値の低下が認められた (Fig. 1)。モルヒネ (3-56 mg/kg) 皮下投与によって対照である $Mu(+/+)$ マウスにおいて、著明かつ有意な鎮痛作用が発現した。また、 $Mu(+/-)$ マウスでは有意な鎮痛作用が発現し、その強度は $Mu(+/+)$ マウスにおける鎮痛作用の約 50% 程度であった。一方、 $Mu(-/-)$ マウスにおいては、モルヒネ鎮痛作用の発現は認められなかった (Fig. 2)。選択的 κ 作用薬 U-50,488H の投与では、 $Mu(+/+)$ マウス、 $Mu(+/-)$ マウスおよび $Mu(-/-)$ マウスで有意な鎮痛作用の発現が認められた。選択的 δ 作用薬 DPDPE の投与では、 $Mu(+/+)$ マウスにおいて著明かつ有意な鎮痛作用が発現した。また、 $Mu(+/-)$ マウスでは有意な鎮痛作用が発現し、その強度は $Mu(+/+)$ マウスにおける DPDPE の鎮痛作用の約 50% 程度であった。さらに、 $Mu(-/-)$ マウスにおいては、DPDPE 鎮痛作用の発現は認められなかった。

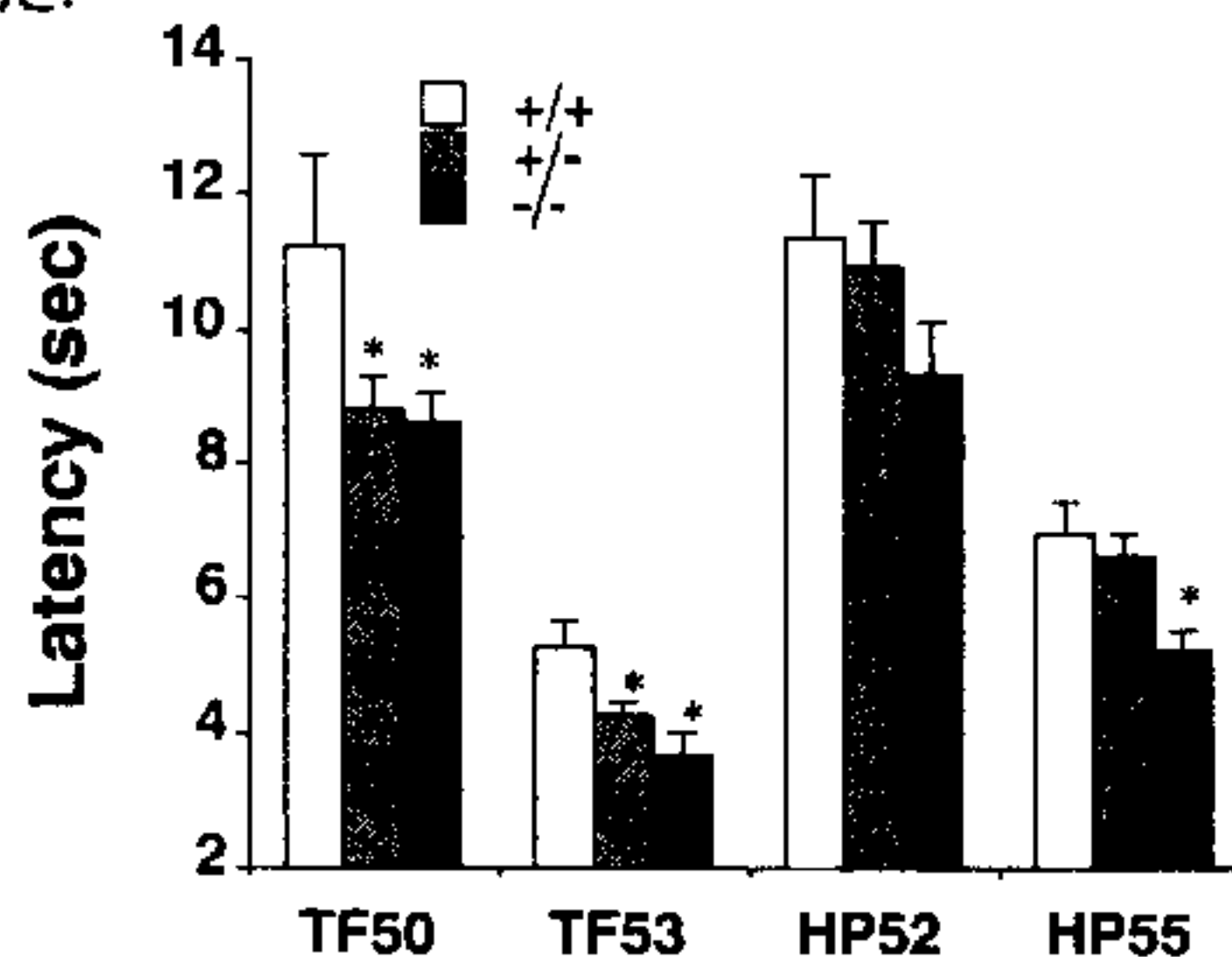


Fig.1 Latencies for nociceptive response in tail-flick (TF) and hot-plate (HP) tests in mice.

*P<0.05 compared with wild-type (+/+) control values.

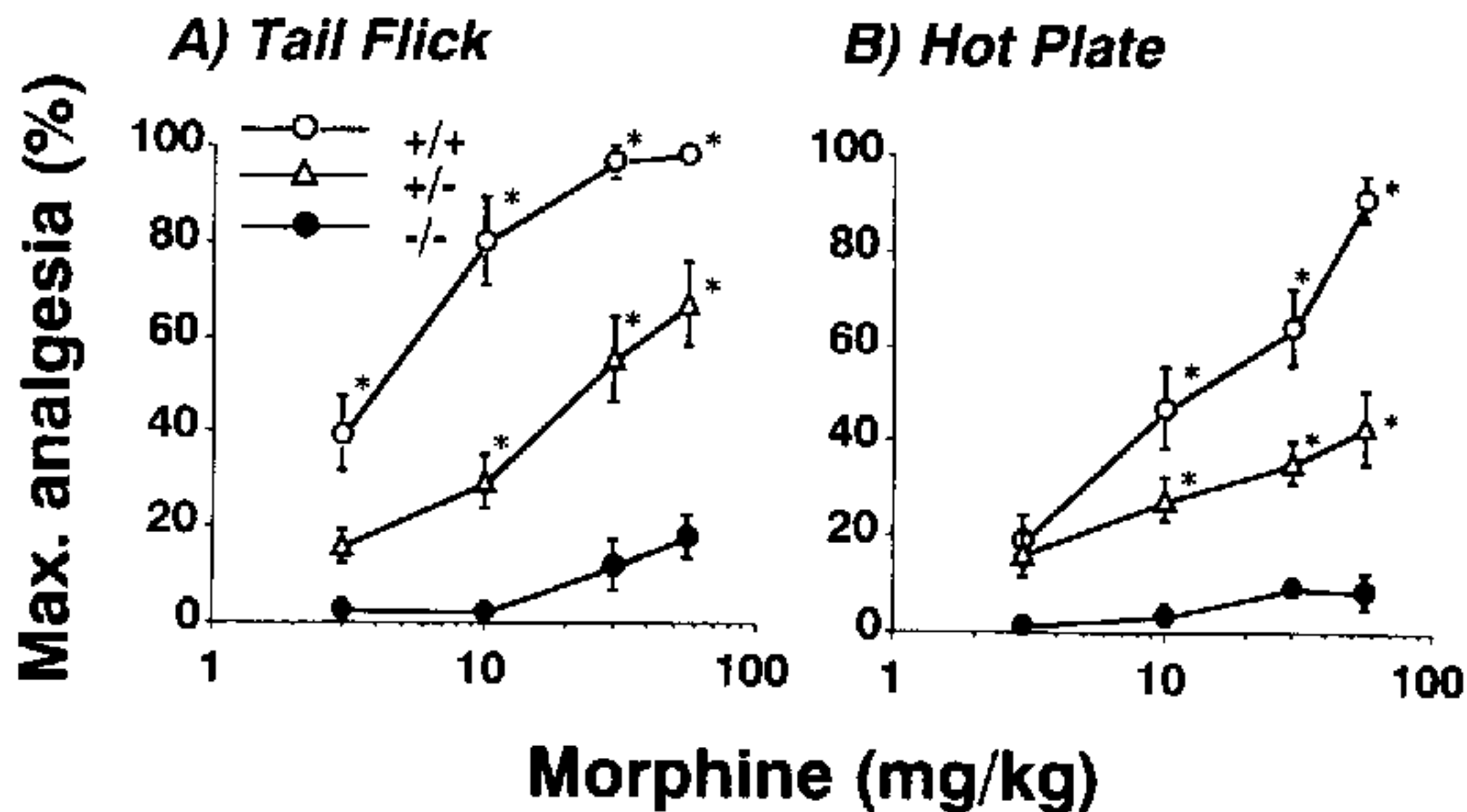


Fig.2 Latencies for nociceptive response in tail-flick (A: TF) and hot-plate (B: HP) tests in mice (wild-type (+/+), heterozygous (+/-) and homozygote (-/-) mice). *P<0.05 compared with preinjection control values for the appropriate genotype.

モルヒネ誘発自発運動促進作用：Mu(+/+), Mu(+/-) および Mu(-/-) マウスにおけるベースラインの運動量には有意な差は認められなかった。Mu(+/) マウスにおいてモルヒネ (10 mg/kg) 投与によって著明かつ有意な自発運動促進作用が発現した。また、Mu(+/-) マウスでは、自発運動促進作用は発現するが、その発現強度はMu(+/) マウスにおける自発運動促進作用の約50%程度であった。一方、Mu(-/-) マウスでは、モルヒネ自発運動促進作用の発現は認められなかった。

モルヒネ身体依存：モルヒネ慢性処置終了後、オピオイド受容体拮抗薬であるナロキソンを投与したところ、Mu(+/) マウスにおいて有意なジャンピングが発現した。また、Mu(+/-) マウスにおいても同様にジャンピングが発現し、その発現強度はMu(+/) マウスと同等であった。一方、Mu(-/-) マウスにおいては、ナロキソン投与によってジャンピングの発現は認められなかった。

[考察]

モルヒネの鎮痛作用発現、自発運動促進作用および身体依存形成においてμ受容体が重要な役割を果たしていることを確認した。また、U 50,488Hの鎮痛作用は、Mu(-/-) マウスで有意な影響を受けておらず、κ受容体作用薬の鎮痛作用はμ受容

体と独立して発現していることが明らかになった。一方, $\text{Mu}(-/-)$ マウスにおいて, DPDPE 鎮痛作用の発現は認められず, δ 受容体を介した鎮痛作用発現に μ 受容体の存在が不可欠であることが示唆された。DPDPE の鎮痛作用が発現しなかった点は, μ および δ 受容体の相互作用および今回使用した $\text{Mu}(-/-)$ マウスの特性という観点からさらに詳細な検討が必要である。

本研究において, モルヒネ身体依存形成に μ 受容体の存在が必須であることを確認した。興味あることに, $\text{Mu}(+/+)$ マウスおよび $\text{Mu}(+/-)$ マウスにおいて同程度のジャンピングが発現した。 $\text{Mu}(+/-)$ マウスの脳内 μ 受容体数は $\text{Mu}(+/+)$ マウスの約 50% であることが報告されている⁴⁾。したがって, モルヒネ身体依存形成の強度は μ 受容体数には依存せず, μ 受容体以降のセカンドメッセンジャー系の変化が重要であると考えられた。

オピオイド受容体を介した作用発現メカニズムについては, まだ, 解明されるべき疑問が残されており, μ 受容体遺伝子を欠損させたノックアウトマウスを用いた研究で, これまで蓄積されたオピオイド受容体機能に関するデータを確認するのみならず, 新しいデータを得ることができる。こうしたノックアウトマウスを研究に導入することによって, オピオイド受容体機能の新たな発見が期待できる。

Summary

	$\text{Mu}(+/+)$	$\text{Mu}(+/-)$	$\text{Mu}(-/-)$
Analgesia			
μ	+++	++	0
δ	+++	++	0
κ	+++	+++	+++
Locomotion	+++	++	0
Dependence	+++	+++	0

作用発現強度: +++ > ++ > 0 (=発現がみとめられない)

【文献】

- 1) Evans et al., Science **258**, 1925-1955 (1992)
- 2) Kieffer et al., Proc. Natl. Acad. USA., **89**, 12048-12052 (1992)
- 3) Min et al., Proc. Natl. Acad. USA., **91**, 9081-9085 (1994)
- 4) Sora et al., Proc. Natl. Acad. USA., **94**, 1544-1549 (1997)

8

ジヒドロエトルフィン含有経皮吸収製剤による鎮痛耐性と依存性に関する研究

○大森悟史¹、方 亮¹、林 輝朗¹、河瀬雅美²、
斎藤節生²、森本雍憲¹

¹城西大学薬学部 病院薬剤学教室、²臨床薬物化学教室

【緒 言】

ジヒドロエトルフィン(DHE)は、動物実験においてモルヒネの1000倍以上の強力な鎮痛作用を発現し、且つ身体依存性が低いユニークなオリパビン系化合物である¹⁾³⁾。第15回の本シンポジウムにおいて主題として取り上げられ、DHEの作用機序、耐性、依存性などについての討議が交わされた。しかし、DHEを臨床使用していた中国において、麻薬中毒者によるDHEの乱用が増し、高用量の服用により精神依存と身体依存が生じたことが報告された⁴⁾。疼痛治療を目的とした臨床使用時における耐性や依存性については、現在明らかになっていない。

経皮吸収型の鎮痛剤は、嚥下困難な末期癌患者、高齢者、小児、並びにその介護者において、服用が便利な製剤である。DHEは、極めて微量で鎮痛効果を発現すること、効果発現と消失が迅速であることなど⁵⁾、経皮吸収製剤に適した点を有することから、我々はDHEの製剤化を試みた。しかし、持続した血中濃度を維持させることにより、これまで以上の耐性や依存性を惹起する可能性があることから⁶⁾、今回、経皮吸収製剤の吸収評価に適した動物であるヘアレスラット⁷⁾を用いて、これらの課題について検討を行った。

【実験方法】

薬物 DHEは、城西大学薬学部臨床薬物化学教室で合成した。塩酸モルヒネ(MOR)および塩酸ナロキソンは、研究目的で購入したものを使用した。

実験動物 Wistar 由来の近交系の WBN/ILA-Ht ヘアレスラット (石川実験動物、埼玉) を実験に用いた⁷⁾。正常動物のほかに、疼痛モデルとして、実験前日に 2.5%ホルマリン 50 μ L を足蹠に投与したラットを使用した⁸⁾。

経皮吸収製剤の調製 DHE に、感圧接着性高分子基材 (styrene-isoprene-styrene block copolymer)、粘着付与剤 (rosin ester)、透過促進剤 (isopropyl myristate) を混合し、PET フィルム上に厚さ 75 μ m に塗布して、DHE を 70 μ g/cm² 含むテープ剤を調製した⁹⁾。

薬物投与 DHE を生理食塩水に溶解し、ヘアレスラットの背部皮下投与、あるいは大腿静脈留置カニューレから持続注入した。DHE テープ剤は、ヘアレスラットの腹部または背部の皮膚に直接貼付した。それぞれの投与方法における対照群には、生理食塩水あるいはプラセボ製剤を使用した。

血漿中 DHE 濃度 大腿動脈留置カニューレから血液を採取し、血漿を分離した。また、ラットの脳を採取し (小脳を取り除く)、メタノールでホモジナイズした。これらを固相抽出カラム (Bond Elut Certify[®]) で前処理した後、LC/MS/MS (liquid chromatography - tandem mass spectrometry) で測定した¹⁰⁾。

鎮痛効果 50-55°C の温水を使用した tail-flick 法で測定した¹¹⁾。Cut-off time は 10 秒とし、% of maximum possible effect [%MPE = (post-drug latency - pre-drug latency) / (cut-off time - pre-drug latency) × 100] を算出した。

身体依存 薬物投与終了後直ちに、塩酸ナロキソンを 5 mg/kg で腹腔内に投与し、ナロキソン投与後 1 時間の体重減少を測定した⁶⁾。

精神依存 アクリル性の白と黒の 2 つの部屋からなる conditioned place preference (CPP) 試験装置を作製した¹²⁾。あらかじめ各部屋への滞在時間に偏りがないラットをスクリーニングにより選出し、試験に供した。1 日目にラットに薬物を投与し、一方の部屋に 1 時間置いた。2 日目は、生理食塩水またはプラセボ製剤を投与し、他方の部屋に 1 時間置いた。これを 2 回繰り返した後 (4 日間)、5 日目に 2 つの部屋間の仕切りを取り外して各部屋への滞在時間を 15 分間測定し、preference for drug-paired place (time spent in drug-paired place - time spent in vehicle-paired place) を算出した。

【実験結果】

DHE と MOR の効力比較 正常ラットに DHE あるいは MOR を背部皮下投与し、鎮痛効果を測定した。%MPE の最大値と時間推移面積 (AUC) から算出した ED₅₀ は、DHE が 1.4-4.2 μ g/kg および MOR が 10.1-19.4mg/kg と、5000~7000 倍の効力比を示した。

血漿中 DHE 濃度と鎮痛効果の関係 正常ラットに DHE 0.9, 1.8, 3.6 および 9 μ g/hr/kg の注入速度で 4 時間静脈内注入し、血漿および脳内 DHE 濃度と鎮痛効果を測定した。DHE 濃度と鎮痛効果は注入速度に比例して上昇し、3.6 μ g/hr/kg で %MPE が 100% に達した。このときの血漿および脳内 DHE 濃度は 1.2 ng/mL および 3.7 ng/g tissue であった。鎮痛効果の有効血中濃度範囲は、0.3~1.2 ng/mL であった。

テープ剤適用時の血中濃度と鎮痛効果 正常ラットの腹部 (0.28cm², 20 μ g) あるいは背部 (0.50cm², 35 μ g) の皮膚に DHE テープ剤を貼付し、血漿中 DHE 濃度と鎮痛効果を測定した。製剤貼付 1~2 時間後から有効血中濃度を維持し (0.7 ng/mL 付近)、8~24 時間後にテープ剤を剥離するまで持続的な鎮痛効果を発現した。

疼痛モデルにおける鎮痛耐性 疼痛モデルラットに、1 日 1 回 DHE の背部皮下投与 (2 μ g/kg) あるいはテープ剤 (腹部, 0.28cm², 20 μ g) 5 時間貼付を数日間繰り返す、鎮痛効果を測定した。皮下投与 5 日目の鎮痛効果の AUC は、投与初日と比較して 32% 減少した。一方、テープ剤 4 日目の AUC は 18% 減少し、さらに 5 日目に皮下投与 (2 μ g/kg) を行ったところ、皮下投与のみ繰り返す群の 5 日目の AUC と同様であった。

持続注入時およびテープ剤適用時の身体依存 正常ラットに対し、MOR (8mg/hr/kg)、DHE (1.8 μ g/hr/kg)、生理食塩水 (0.5 μ L/hr) の 24 時間持続静脈内注入、あるいは DHE テープ剤 (背部, 0.50cm², 35 μ g)、プラセボ製剤 (背部, 0.50cm², 0 μ g) の 24 時間貼付を行い、投与終了後直ちに身体依存を測定した。DHE および MOR の持続注入群では有意な体重減少が認められたが、テープ剤適用群には認められなかった (Fig.1)。

テープ剤適用時の精神依存 正常ラットにDHE (2 μ g/kg)、MOR (10mg/kg)、生理食塩水の背部皮下投与、あるいはDHE テープ剤 (腹部, 0.13cm²-9 μ g, 0.28cm²-20 μ g および 0.38cm²-27 μ g) 2時間貼付の薬物条件付けを2回、対照条件付け2回を行い、精神依存を測定した。DHE およびMOR の皮下投与群、テープ剤0.38cm² 貼付群では有意な薬物嗜好性が認められたが、テープ剤0.13, 0.28cm² 適用群には認められなかった (Fig 2)。

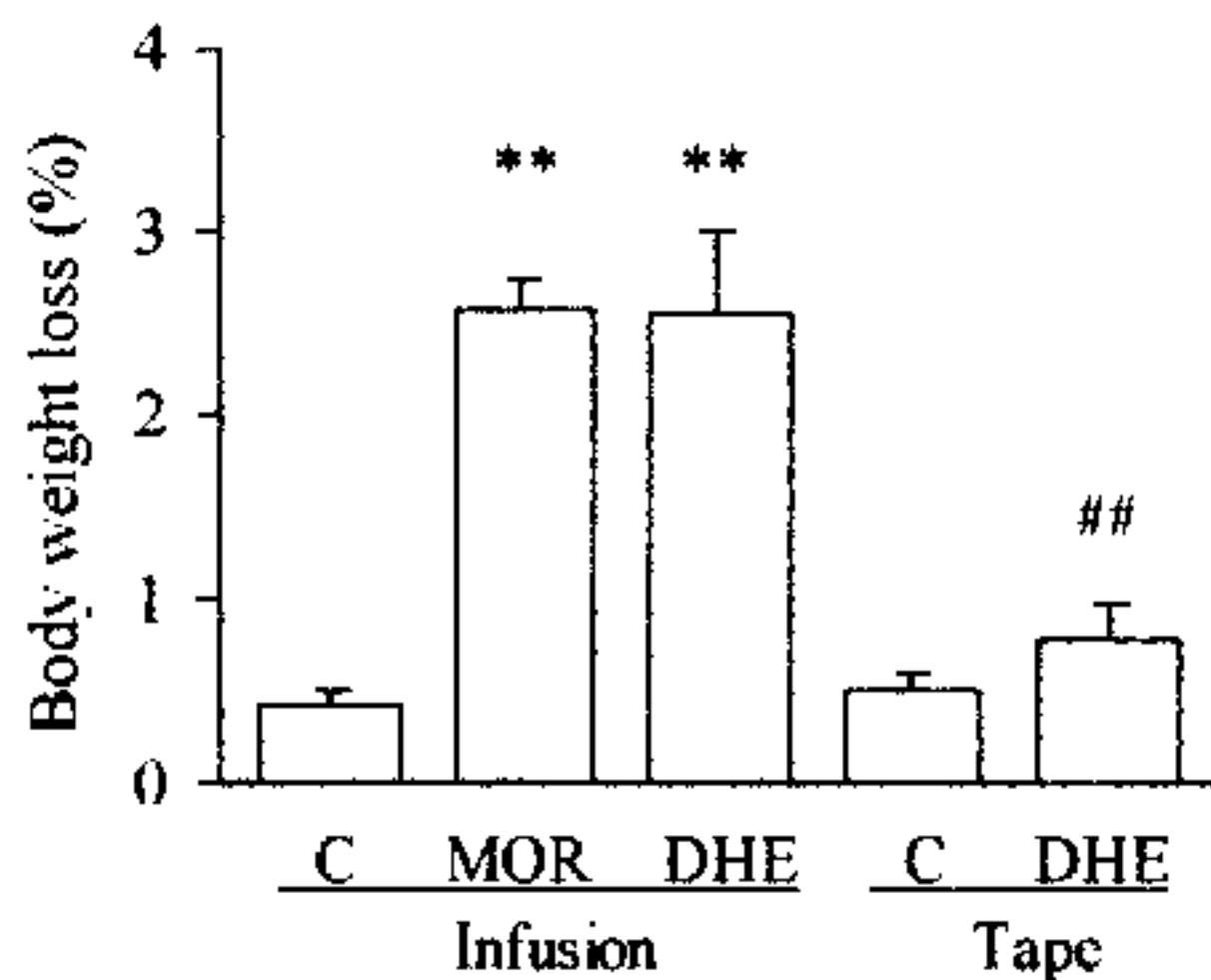


Fig 1 Naloxone-precipitated (5mg/kg i.p.) body weight loss in hairless rats treated 24 hours infusion of MOR (8mg/hr/kg), DHE (1.8 μ g/hr/kg), or transdermal application of DHE tape (dorsal, 0.5cm², 35 μ g). Each column represents the mean \pm S.E. of 6 rats. ** p<0.01 vs. control infusion group (Dunnett's test). ## p<0.01 vs. DHE infusion group (Dunnett's test).

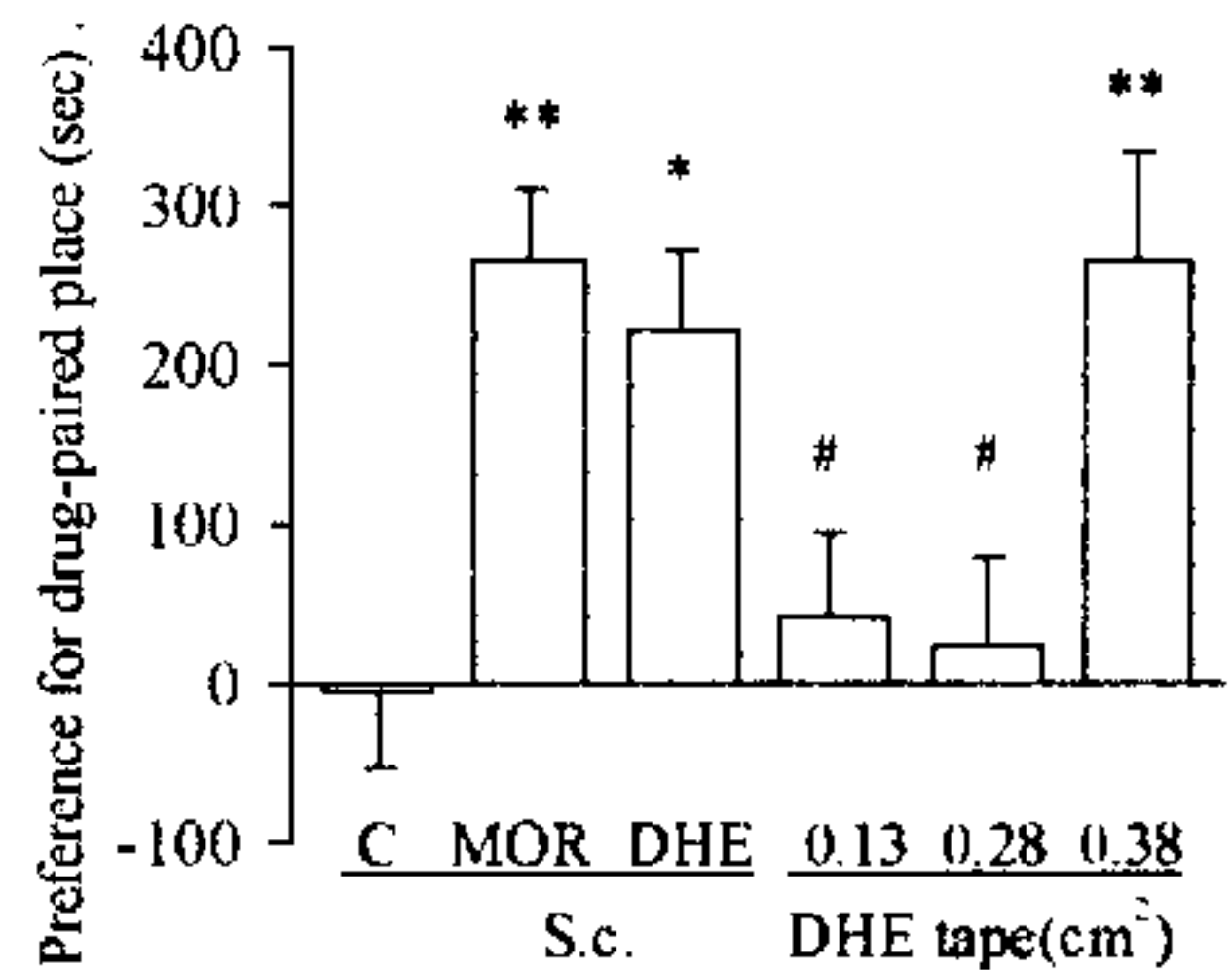


Fig 2 Place conditioning produced by s.c. injection of MOR (10mg/kg), DHE (2 μ g/kg) or transdermal application of DHE tape (abdominal, 0.13cm²-9 μ g, 0.28cm²-20 μ g and 0.38cm²-27 μ g). Each column represents the mean \pm S.E. of 8 rats. * p<0.05, ** p<0.01 vs. control group (Dunnett's test). # p<0.05 vs. DHE s.c. group (Dunnett's test).

【考 察】

今回調製したDHEのテープ剤は、効果の発現は緩やか(1~2時間)であるが、8~24時間まで持続的な鎮痛効果を維持することができた。しかし一方で、DHEの持続注入や繰り返し皮下投与により、MORに匹敵する身体依存と精神依存が認められ、DHEの麻薬管理がMORと同様にきわめて重要であることを支持した。

MORやDHEは、正常動物(疼痛なし)で明らかな鎮痛耐性を発現すると報告されている³⁾ことから、今回疼痛モデルを用いて検討を行ったところ、経皮吸収剤の4日間繰り返し投与における鎮痛耐性は認められなかった。

また、正常動物への持続注入により発現した身体依存は、同レベルの血中薬物濃度を維持しうるテープ剤適用時には認められなかった。これら投与方法による身体依存発現の違いの原因はわからないが、DHE、MOR 持続注入時の鎮痛効果が8~12時間で消失するのに対して、テープ剤適用時には24時間持続することと関連があると思われる、さらなる検討が必要である。

CPP 試験による精神依存は、テープ剤0.13, 0.28 cm² 適用群では認められなかったが、0.38cm² 貼付群で有意に発現した。この結果から、経皮吸収製剤においても過量摂取により精神依存を発現する可能性が示唆され、注射剤、舌下剤などの速効性製剤と同様に厳重な管理が必要と言える。しかし、0.28 cm² 貼付群でも緩やかではあるが有効な血中濃度を持続できることから、テープ剤からの薬物放出をコントロールすることにより、精神依存を軽減できると考えられた。

【謝 辞】

本研究の遂行にあたり、特にCPP試験の実施に際し、懇切なご指導を賜りました星薬科大学薬品毒性学教室 鈴木勉教授に、厚く感謝の意を表します。

【引用文献】

- 1) M. Huang, et al., *Acta Pharmacol. Sin.*, 3, 9-13 (1982)
- 2) M. Huang, et al., *Acta Pharmacol. Sin.*, 3, 81-84 (1982)
- 3) S. Tokuyama, et al., *Biol. Pharm. Bull.*, 16, 774-777 (1993)
- 4) Z.-M. Liu, et al., *Chin. Bull. Drug Depend.*, 4, 223-231 (1995)
- 5) S. Tokuyama, et al., *Biol. Pharm. Bull.*, 19, 477-479 (1996)
- 6) T. Nakaki, et al., *Psychopharmacology*, 73, 215-218 (1981)
- 7) 杉林堅次ら, *製薬工場*, 8, 543-545 (1984)
- 8) T. Suzuki, et al., *Life Sciences*, 59, 1667-1674 (1996)
- 9) 大森悟史ら, *薬剤学*, 59, S127 (1999)
- 10) 大森悟史ら, *薬物動態*, 13, S206 (1998)
- 11) D. M.-C. Ouellet, et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 281, 713-720 (1997)
- 12) T. Suzuki, et al., *Psychopharmacology*, 105, 9-12 (1991)

9

マウス小腸蠕動運動に及ぼすデルモルフィン誘導体 H-Tyr-D-Arg-Phe-β-Ala-OH の抑制効果

○新島富紀枝、高橋則男、中川西 修、只野 武、
丹野孝一、木皿憲佐

(東北薬大・薬理)

緒言

デルモルフィン (H-Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-NH₂) は南アメリカ産のカエル *Phyllomedusa sauvagei* の皮膚から単離された heptapeptide で、第2残基に自然界では細菌類以外には存在しないとされていた D 体のアミノ酸を有し、構造的にも極めてユニークなオピオイドペプチドである。

Broccardo ら¹⁾ はデルモルフィンの2位の D-Ala を L-Ala で置換するとほとんど活性を示さないことを明らかにし、D-Ala はその強力なオピオイド活性にとって必要不可欠な存在であると報告している。また、その強力な活性発現のための最小構造は、N末端の tetrapeptide であることが明らかにされている²⁾。一方、Takagi ら³⁾ によってウシ視床下部から単離・同定されたキョートルフィン (H-Tyr-Arg-OH) の鎮痛作用が、2位の Arg を D-Arg で置換することにより著しく増強する⁴⁾。

Sakurada ら⁵⁻¹⁰⁾ はデルモルフィンおよび [D-Arg²]-キョートルフィンの2種のペプチドに着目し、[D-Arg²]-デルモルフィン誘導体を多数合成し、その構造活性相関について詳細に検討を行っている。その過程で脳室内、脊髄クモ膜下腔内および皮下投与の際、モルヒネより極めて強力かつ持続的な侵害刺激抑制作用を示し、経口投与に至ってもモルヒネと同等な作用を示す [D-Arg², β-Ala⁴]-デルモルフィン (1-4) (TAPA) を見出した^{8, 9)}。その上、TAPA の身体的依存形成能はモルヒネよりも著しく弱い^{9, 11)}。

μ-オピオイド受容体は μ1 および μ2 受容体に細分類さ

れている。 $\mu 1$ 受容体を介して発揮される作用としては、カタレブシー、脊髄上位脳を介する鎮痛などがあり、 $\mu 2$ 受容体を介しての作用として呼吸抑制、徐脈、腸管運動抑制、脊髄鎮痛等があげられる¹²⁻¹⁵⁾。マウスのtail-pressure法およびホルマリン法におけるTAPAの侵害刺激抑制作用は、 $\mu 1$ 受容体拮抗薬のナロキソネジンによって有意に拮抗されることから、TAPAは $\mu 1$ 受容体の選択的アゴニストであると考えられている¹⁶⁾。しかしながら、侵害刺激抑制作用以外のTAPAの作用機序についての詳細な検討はなされていない。

本研究では、TAPAをマウスの脳室内に投与した際の小腸蠕動運動に及ぼす効果についてモルヒネおよびDAMGOのそれと比較検討を行った。

実験方法

使用動物 実験には体重27gのddY系雄性マウスを使用し、実験開始14時間前から絶食、自由飲水とした。

炭末輸送能の測定 5%炭末を含む10%アラビアゴム懸濁液を0.1mL/10gの割合で経口投与した。30分後、動物を頸椎脱臼により殺し、胃幽門部から盲腸までを小腸として注意深く取り出した。次いで胃幽門部から輸送された炭末の先端までの長さを測定し、小腸全長に対する炭末の移動距離の割合を移動率とした。TAPA、DAMGOおよびモルヒネは人工脳脊髄液(CSF)に溶解し、炭末投与の5分前に脳室内(i.c.v.)投与した。ナロキソネイジン(35mg/kg, s.c.)、 β -フナルトレキサミン(40mg/kg, s.c.)およびノルビナルトルフィミン(0.2 μ g, i.c.v.)は実験開始の24時間前にナルトリンドール(0.1mg/kg, s.c.)およびナロキソン(10mg/kg, i.p.)はそれぞれTAPA投与15分および5分前に投与した。

結果および考察

TAPA(10-100pmol)、モルヒネ(0.25-4nmol)およびDAMGO(20-80pmol)の脳室内投与によって用量依存的な炭末輸送能の抑制、すなわち小腸蠕動運動の抑制が認められた。対照のCSFを投与した群の移動率に対するTAPA、モルヒネおよびDAMGOの50%抑制用量を表1に示す。

Table 1. Inhibitory Effect of TAPA, Morphine and DAMGO on Gastrointestinal Transit in Mice

Compounds	ID50 values	Potency
TAPA	30.5 (5.0 - 187.3) pmol	39.3
Morphine	1.2 (0.5 - 2.9) nmol	1.0
DAMGO	50.0 (18.6 - 134.3) pmol	24.0

Value in parentheses are 95% confidence limits. Each compounds was administered intracerebroventricularly 5 min before orally injection of charcoal meal. Mice were sacrificed 30 min after injection of charcoal meal.

オピオイドの腸管運動抑制作用は脳内 μ 2 受容体を介して発現される¹²⁾とされているが、モルヒネおよび DAMGO による炭末輸送の抑制作用は μ 受容体拮抗薬の β -フナルトレキサミンならびに μ 1 受容体拮抗薬のナロキソネイジンによって有意に拮抗された。このことから、モルヒネおよび DAMGO の腸管運動抑制作用には脳内 μ 2 受容体のみならず μ 1 受容体も関与していることが判明した。

一方、TAPA の炭末輸送の抑制作用はナロキソンによって完全に拮抗されたが、他の拮抗薬によっては無影響であった。この結果は選択的 μ 1 受容体アゴニストである [Lys⁷]-デルモルフィン i.c.v. 投与による腸管運動抑制作用に対し、ナロキソンは完全に拮抗作用を示すが、ナロキサネイジンは無影響であるとの Improtta と Broccardo¹⁷⁾ の報告と一致する。最近、Schuller ら¹⁸⁾ は MOR-1 遺伝子のエクソン 1 ノックアウトマウスを用い、種々の μ 受容体アゴニストの鎮痛作用を検討した結果、モルヒネと DAMGO は鎮痛作用を示さないが、モルヒネ-6 β -グルクロナイドおよびヘロインでは鎮痛作用が認められ、モルヒネ-6 β -グルクロナイドの作用はナロキソネイジンや β -フナルトレキサミンで拮抗されると報告している。

これらのことを考慮すると、 μ 受容体には β -フナルトレキサミンに非感受性の受容体が存在し、TAPA i.c.v. 投与による腸管運動抑制作用は β -フナルトレキサミン非感受性の μ 受容体を介して発現する可能性が示唆された。

参考文献

1. Broccardo M. et al. *Br. J. Pharmacol.* **73**, 625-631 (1981)
2. Salvadori S. and Tamatis R. *Farmaco [Sci.]* **10**, 669-673 (1982)
3. Takagi H. et al. *Nature* **282**, 410-412 (1979)
4. Takagi H. et al. *Eur. J. Pharmacol.* **55**, 109-111 (1979)
5. Sato T. et al. *Peptides* **6**, 35-40 (1985)
6. Kisara K. et al. *Br. J. Pharmacol.* **87**, 183-189 (1986)
7. Sato T. et al. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **242**, 654-659 (1987)
8. Chaki K. et al. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **31**, 439-444 (1988)
9. Chaki K. et al. *Br. J. Pharmacol.* **95**, 15-22 (1988)
10. Sakurada S. et al. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **263**, 793-799 (1992)
11. Chaki K. et al. *Neuropeptides* **13**, 83-88 (1989)
12. Heyman J. et al. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **245**, 238-243 (1988)
13. Johnson N. et al. *Mol. Pharmacol.* **26**, 477-483 (1984)
14. Ling G.S.F. et al. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **232**, 149-155 (1985)
15. Pasternak G. W. and Wood P. *Life Science* **38**, 1889-1898 (1986)
16. Sato T. et al. *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **20**, 581-586 (1998)
17. Improta G. and Broccardo M. *Neuropharmacology* **33**, 977-981 (1994)
18. Schuller A.G.P. et al. *Nature Neuroscience* **2**, 151-156 (1999)

ホルマリン足蹠内投与による脊髄内一酸化窒素の増加と L-NAME の効果

○奥田一博¹, 櫻田 誓², 高橋三津雄¹, 山田達夫¹,
渡邊千寿子³, 安藤隆一郎³, 櫻田 司²

¹福岡大・医・内科健康管理科, ²第一薬大・生化,

³東北薬大・実験動物センター

【緒言】

ホルマリンを用いた炎症性疼痛モデルが、二相性の侵害刺激行動を示すことは旧知の事実である^{1,2)}。マウスおよびラットを用いたホルマリンモデルにおいて、脊髄内の一酸化窒素 (NO) が第二相目の侵害刺激行動に関与すること³⁾が、行動薬理学的に証明されている。その一方でラットの脳波はホルマリンテストの第二相目で slow wave を示し、sleep state であることを報告⁴⁾している。第二相目で sleep 状態であるとするれば、これまで侵害刺激行動の指標とされてきた flinching 行動の再評価が必要であると考え、licking/biting 行動を観察項目に加え比較検討することとした。今回、NO 合成阻害剤である L-NAME とその isomer である D-NAME を脊髄内投与し、ホルマリン誘発性 flinching および licking/biting に対する影響を検討した。さらに、脊髄内 NO とグルタミン酸 (Glu) 遊離量の定量を行い、第一相および第二相目疼痛反応との相関性について生化学的に検討したので併せて報告する。

【実験方法】

実験動物及び準備操作

Sprague-Dawley 系雄性ラット 250 g 前後を実験 3 - 7 日前にエーテル麻酔または pentobarbital sodium 麻酔下に第1・第2腰髄 (L1/L2) より椎弓切除および硬膜切開を施行し、クモ膜下腔内 (intrathecal: i.t.) に先端が第5から第6腰髄に到達するよう U 字型マイクロダイアリスプローブ (MDプローブ) と薬物投与用の i.t. cannula を挿入・留置した。

ホルマリンテスト

ホルマリンは生理食塩液で希釈しすべて 5.0 % (v/v) となるように調製したものを右後肢足蹠に 50 μ l 皮下投与した。ホルマリン投与後、5分毎に90分間 flinching 回数と licking/biting 時間を計測し、透析液は 10分毎に採取した。

薬物投与

L-NAME および D-NAME は人工脳脊髄液 (ACSF) で溶解し、400 nmol / 10 μ l に調製した。i.t. 投与はホルマリン足蹠内投与10分前に施行することとし、i.t. cannula より各々の薬物を10 μ l、さらに ACSF を10 μ l 追加投与した。

測定法

1) 行動薬理学的的方法

ラットを測定用プラスチックケージの中へ一匹ずつ入れ、約 1 時間放置し、自発運動の消失を確認した後、ホルマリンを足蹠内へ投与した。

2) 生化学的定量法

1.0 % Isoflurene 吸入麻酔下に、あらかじめ埋め込んだ MD プロブをとりだし inlet より ACSF で10 μ l / 分で灌流した。30 分間平衡状態にした後、10 分毎に 2 回採取した。この2 回の平均濃度を基準値 (baseline) とした。サンプルは、ホルマリン投与後、10 分毎に90分間採取した。各時間の dialysate は、NO 分析用とアミノ酸分析用に分注し各々定量測定を行った。各測定結果は基準値に対する % baseline として表わした。NO は Nitrite (NO_2^-) と Nitrate (NO_3^-) に酸化されているため、Nitrate は β -NADPH と *Aspergillus nitrate reductase* で還元させたのちさらに Nitrite を氷酢酸とヨウ化カリウムで NO gas として NO Analyser (Sievers Inc) を用い測定した。アミノ酸分析は逆相 HPLC を用い、OPA 誘導体化法にて測定を行った。

【実験結果】

1. 行動薬理学的侵害刺激行動

第一相 (0-5 min)

flinching および licking/ biting に対し L-NAME 400nmol 投与は抑制効果を示さなかった。

第二相 (10-90 min)

flinching は L-NAME 400nmol 投与により著しい抑制効果を受けたが、licking/ biting に対しては無影響であった。

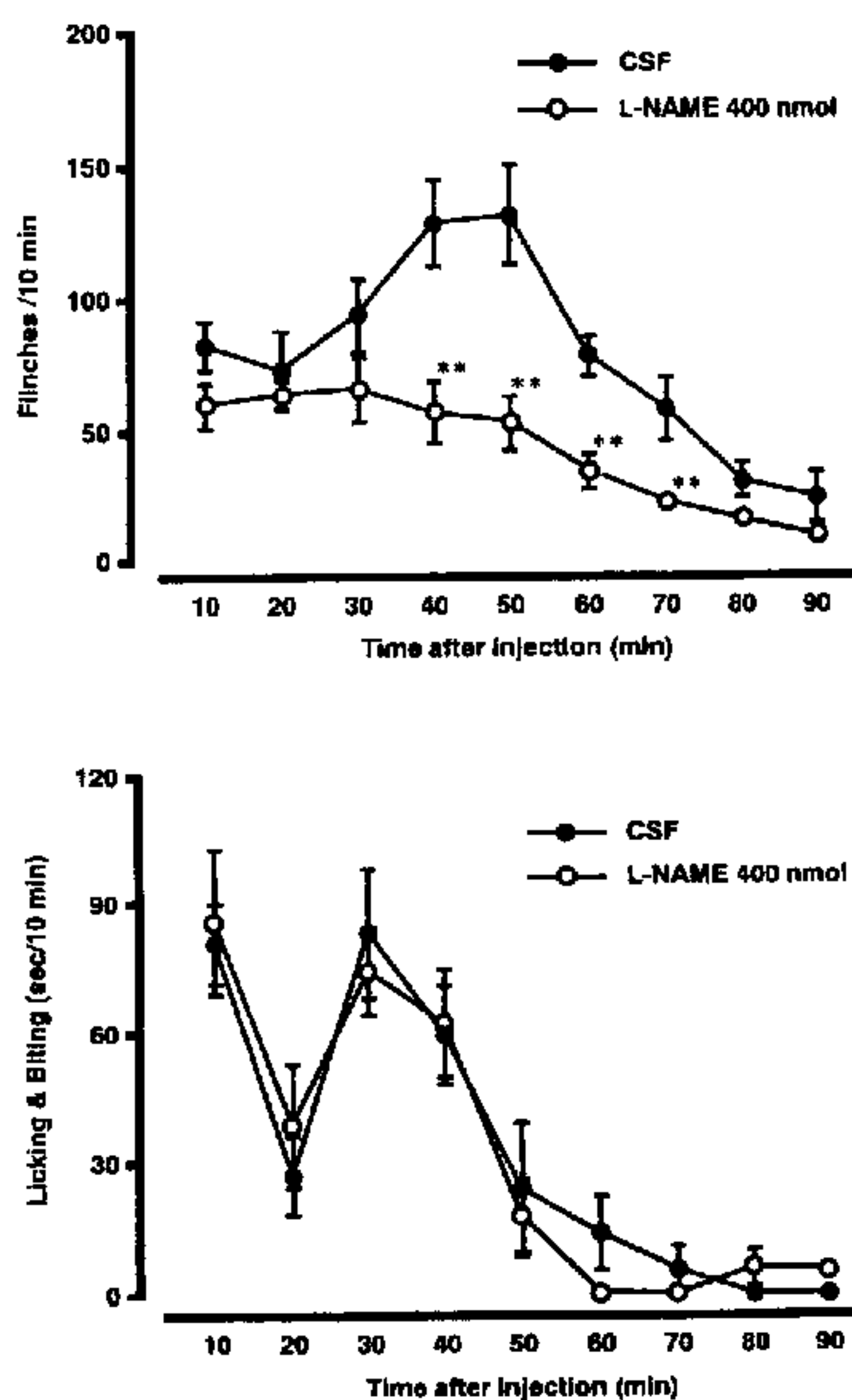


Fig. 1. Effect of intrathecal administration of L-NAME on formalin (5.0 %)-induced flinching (upper) and licking/biting (lower) behaviors in rats. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ significant difference compared to CSF control group (Dunnett's test).

2. 生化学的測定結果

第一相 (0-10 min)

NO と Glu レベルはいずれも L-NAME 400 nmol により有意に減少した。

第二相 (10-90 min)

NO はホルマリン投与 20-30, 40-50 後に L-NAME 400 nmol による有意な減少を示した。Glu は CSF control 群, D-NAME 群および L-NAME 群の間で有意な差を認めなかった。

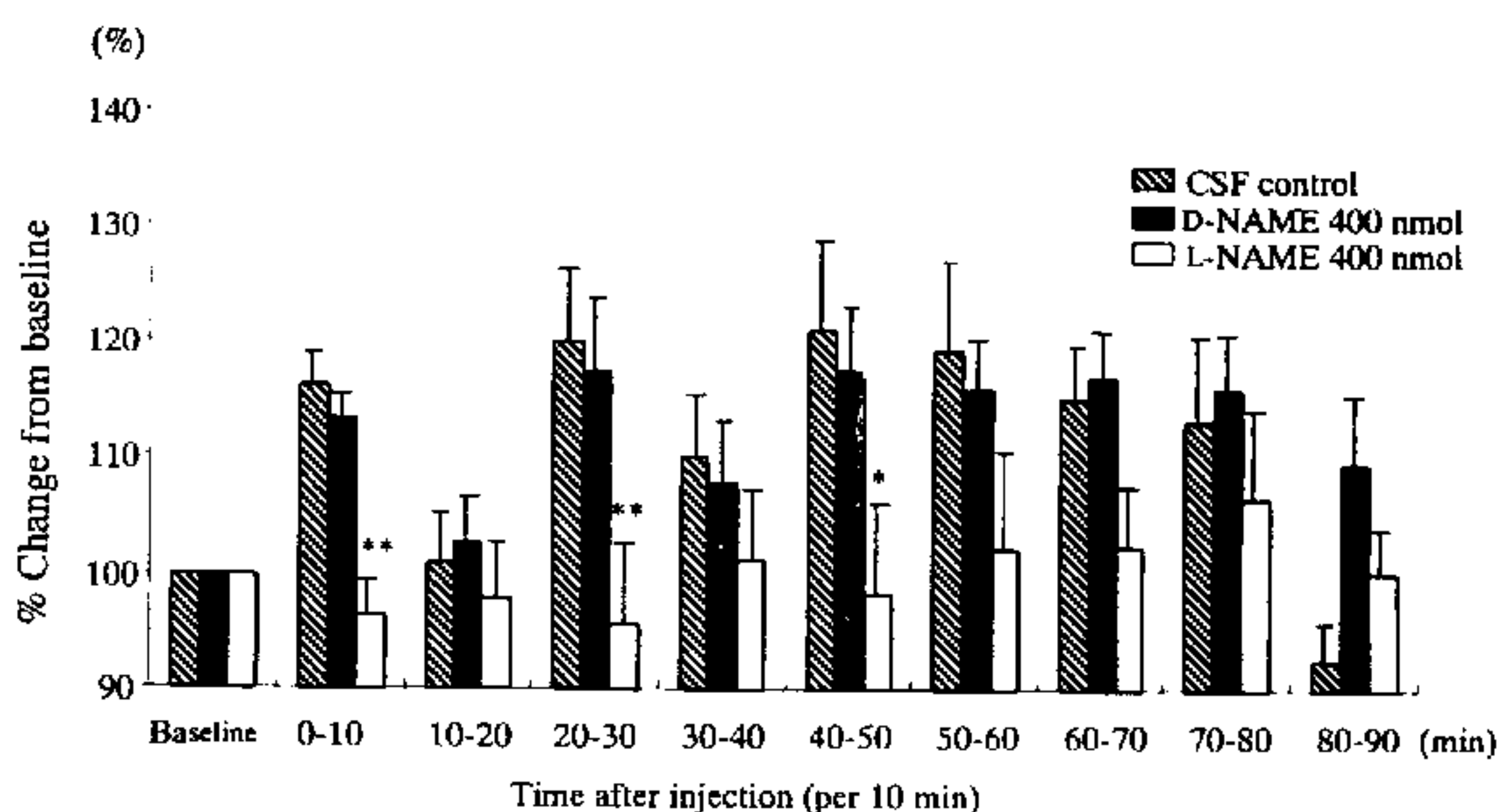


Fig. 2. Effect of intrathecal administration of L-NAME on formalin (5.0 %)-induced release of nitric oxide. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ significant difference compared to CSF control group (Dunnett's test).

【考察】

本研究ではホルマリン誘発性第一相目反応において NO および Glu レベルの増加が L-NAME により有意に抑えられたにもかかわらず、flinching、licking/biting 行動は抑制されなかった。このことはホルマリン投与による急性侵害刺激行動に対し NO 合成酵素阻害剤が無効であることを示すものである。第二相目では NO がホルマリン投与 20 - 30 分後および、40 - 50 分後で NO レベルが増加したが、この増加は

licking/biting 行動の peak と一致し、flinching 行動の peak (40 - 50 分) とも一致することがわかった。L-NAME 400nmol 投与によりホルマリン投与 20 - 30 分後に見られる NO の増加は抑制されたにもかかわらず、licking/biting に対しては統計学上有意な抑制効果は認められなかった。以上のことから、NO レベルの変化と侵害刺激行動との間に相関性は認められなかった。また、Ichinoseら⁴⁾ (1999) の指摘したようにラットはホルマリン投与 40 - 70 分後で脳波上 sleep state を示すとの報告から、flinching のみを指標とした L-NAME の侵害刺激抑制効果の判定には慎重に対処する必要があると思われる。

【文献】

- 1) Dubuisson, D. and Dennis, S.G. **Pain** 4. 161-174 (1977)
- 2) Goto, T. et al. **Anesthesiology** 80. 409-416 (1994)
- 3) Malmberg, A. B. and Yaksh, T.L. **Pain** 54. 291-300 (1993)
- 4) Ichinose, F. et al. **Pain** 80. 251-256 (1999)

糖尿病マウスにおける endomorphin-1 および endomorphin-2 誘発抗侵害効果

○圖子田 康¹、長瀬 博²、亀井 淳三¹

¹星薬大・医療薬学第二、²東レ・基礎研

[緒言]

我々は糖尿病マウスにおいてオピオイド μ 受容体を介した抗侵害効果が減弱し、その代償として δ 受容体を介した抗侵害効果が増強していることを報告している。したがって、内因的な μ 受容体作動薬である endomorphin-1 (EM-1) および endomorphin-2 (EM-2) の抗侵害効果が糖尿病マウスにおいて変化していることが考えられる。そこで本研究では、EM-1 およびEM-2 誘発抗侵害効果を対照群および糖尿病マウスにおいて比較検討した。

[実験方法]

実験には4週齢のICR系雄性マウスを用いた。糖尿病はストレプトゾトシン(200 mg/kg)を尾側静脈より投与することにより誘発し、その溶媒であるクエン酸緩衝液を同様に投与したものを対照群とした。この投与2週間後より実験を開始し、血糖値が400 mg/dl以上の物を糖尿病とした。痛覚閾値の測定はtail-flick法を用いて測定した。抗侵害効果は% Antinociceptionを算出することにより評価した。また、最大刺激時間(cut off time)は15秒とした。EM-1 およびEM-2は脳室内に投与した。

[実験結果]

1. Endomorphin-1 (EM-1) および endomorphin-2 (EM-2) の抗侵害効果に及ぼす糖尿病の影響

EM-1は対照群および糖尿病マウスにおいてともに用量依存的な

抗侵害効果を発現した。また、対照群および糖尿病マウスのEM-1の抗侵害効果には有意な差は認められなかった。一方、EM-2も対照群および糖尿病マウスにおいて用量依存的な抗侵害効果を発現したものの、EM-1に比べ、その抗侵害効果は弱かった。また、糖尿病マウスにおけるEM-2の抗侵害効果は、対照群マウスのそれに比べた減弱が認められた。

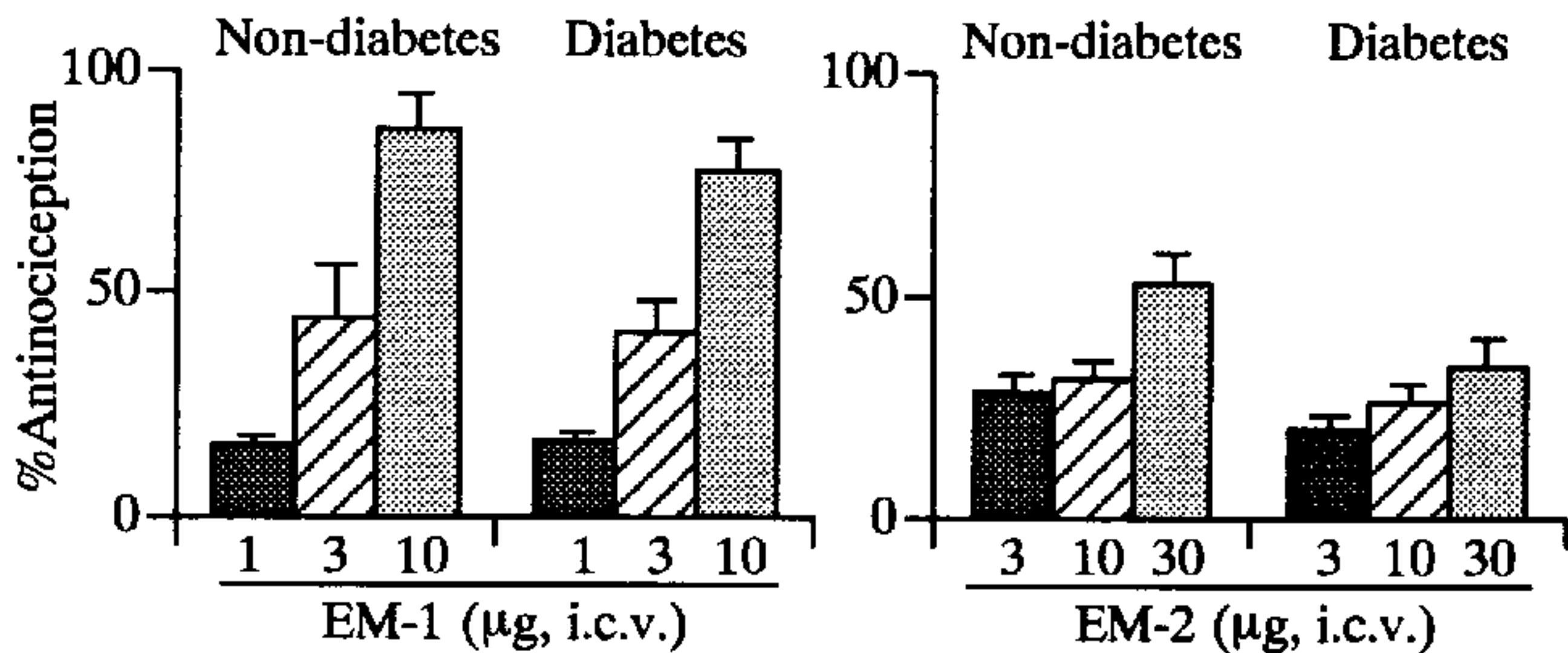


Figure 1

The antinociceptive effects of endomorphin-1 (1, 3, 10 µg, i.c.v.) and endomorphin-2 (3, 10, 30 µg, i.c.v.) in non-diabetic and diabetic mice. The antinociceptive effect was assessed 10 min after the injection of EM-1 or EM-2.

2. EM-1 およびEM-2 誘発抗侵害効果に対する各種オピオイド拮抗薬の影響

対照群マウスにおけるEM-1 誘発抗侵害効果はオピオイド μ 受容体拮抗薬である β -フナルトレキサミン (β -FNA) および選択的オピオイド μ_1 受容体拮抗薬であるナロキサネイジン (NXZ) により有意に抑制された。しかし、糖尿病マウスにおけるEM-1 誘発抗侵害効果は、 β -FNA およびNXZ のいずれによっても抑制されなかった。一方、EM-2 による抗侵害効果は対照群および糖尿病マウスとも、 β -FNA およびNXZ により有意に抑制された。

対照群マウスおよび糖尿病マウスにおけるEM-1 およびEM-2 誘発抗侵害効果はオピオイド κ 受容体拮抗薬であるノルピナルトルフィン (nor-BNI) により有意な影響を受けなかった。

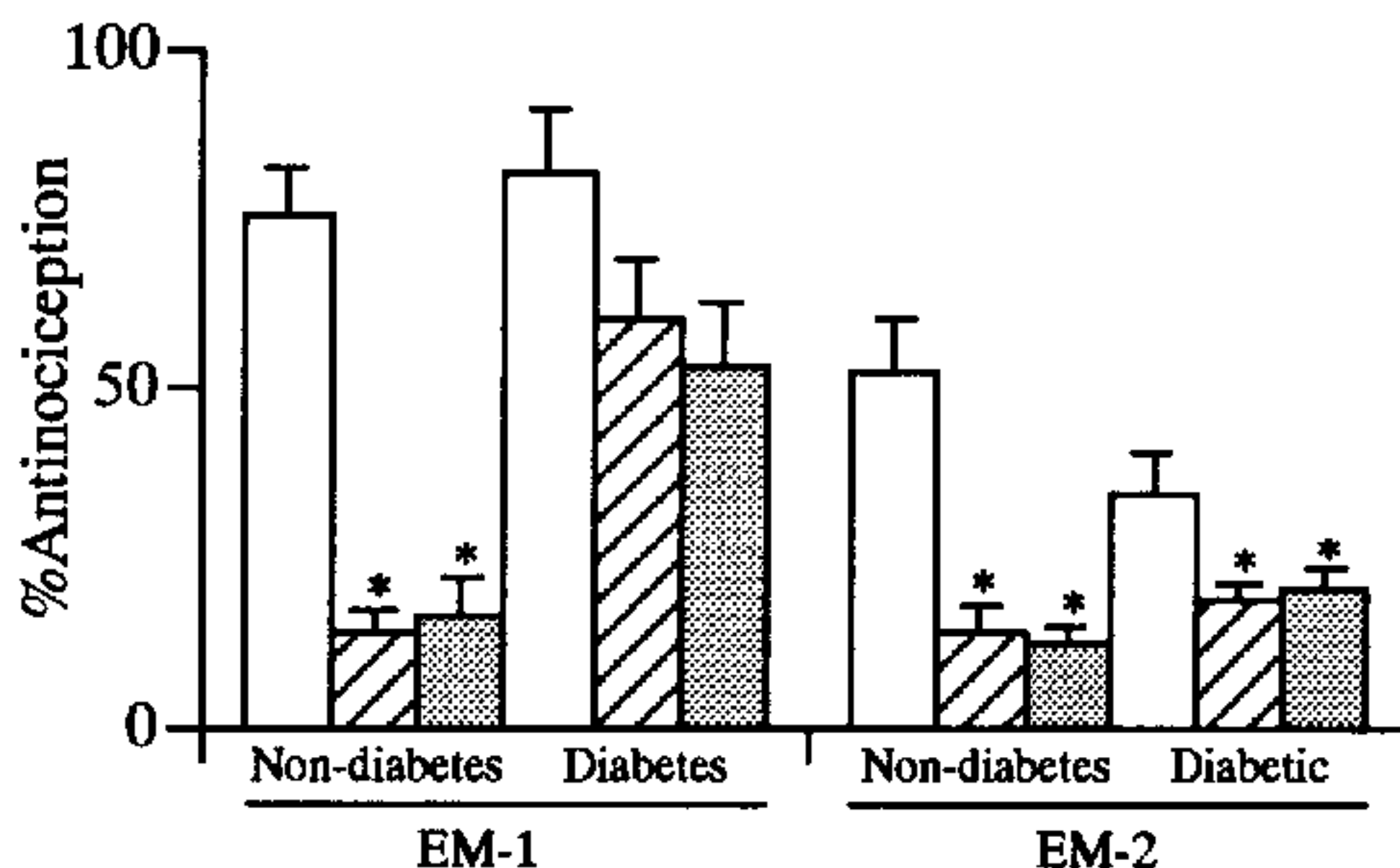


Figure 2

Effects of β -funaltrexamine (β -FNA, 20mg/kg, s.c., hatched column) and naloxonazine (NXZ, 35mg/kg, s.c., dotted column) on the antinociceptive effects of EM-1 (10 μ g, i.c.v.) and EM-2 (30 μ g, i.c.v.) in diabetic and non-diabetic mice. β -FNA and NXZ were injected s.c. 24 hour before testing. Each column represents the mean with S. E. for 15 mice in each group. * $P < 0.05$ vs. respective saline-treated group (open column).

対照群マウスにおけるEM-1およびEM-2誘発抗侵害効果はオピオイド δ 受容体拮抗薬であるナルトリンドール (NTI) により有意な影響を受けなかった。一方、糖尿病マウスにおけるEM-1誘発抗侵害効果は、NTIにより有意に抑制された。また、糖尿病マウスにおけるEM-1誘発抗侵害効果は選択的オピオイド δ_1 受容体拮抗薬である7-ベンジリデンナルトレキソン (BNTX) の脳室内投与により有意に抑制されたが、選択的オピオイド δ_2 受容体拮抗薬であるナルトリベン (NTB) では有意な影響を受けなかった。また、糖尿病マウスにおけるEM-2誘発抗侵害効果はNTIによってなんら影響を受けなかった。

[考察]

対照群マウスにおけるEM-1誘発抗侵害効果およびEM-2誘発抗侵害効果は、 μ 受容体拮抗薬である β -FNAおよび μ_1 受容体拮抗薬であるNXZにより有意に抑制され、 κ 受容体拮抗薬であるnor-BNIおよび δ 受容体拮抗薬であるNTIでは有意な影響を受けなかったこ

とから μ 受容体、特に μ_1 受容体を介してその抗侵害効果を発現することが示唆された。

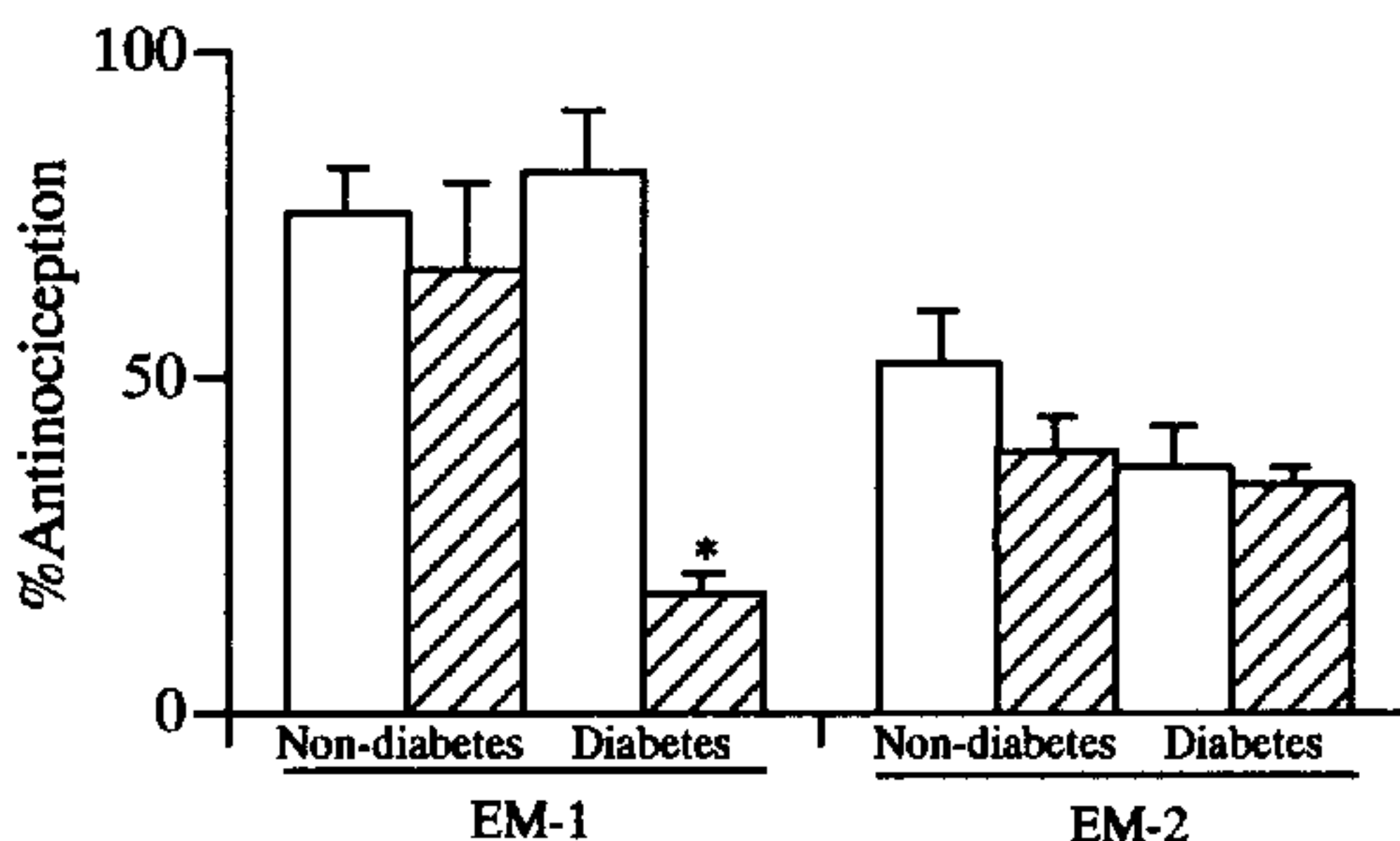


Figure 3

Effects of naltrindole (NTI, 1mg/kg, s.c., hatched column) on the antinociceptive effects of endomorphin-1 (10 μ g, i.c.v.) and endomorphin-2 (30 μ g, i.c.v.) in diabetic and non-diabetic. NTI was injected s.c. 15 min before administration of EM-1 or EM-2. Each column represents the mean with S. E. for 15 mice in each group. * $P < 0.05$ vs. respective saline treated group (open column).

糖尿病マウスにおける EM-1 誘発抗侵害効果は、 κ 受容体拮抗薬である nor-BNI では有意な影響を受けず、 μ 受容体拮抗薬である β -FNA あるいは μ_1 受容体拮抗薬である NXZ により抑制傾向を示したものの、有意な影響は受けなかった。一方、糖尿病マウスにおける EM-1 誘発抗侵害効果は δ 受容体拮抗薬である NTI および選択的 δ_1 受容体拮抗薬である BNTX の脳室内投与により有意に抑制された。したがって、糖尿病マウスにおける EM-1 誘発抗侵害効果は、上位中枢での δ_1 受容体を介してその抗侵害効果を発現することが示唆された。しかし、糖尿病マウスにおける EM-2 誘発抗侵害効果は、 κ 受容体拮抗薬である nor-BNI および δ 受容体拮抗薬である NTI では有意な影響を受けず、 μ 受容体拮抗薬である β -FNA および μ_1 受容体拮抗薬である NXZ により有意に抑制されたことから、対照群マウスと同様に、 μ_1 受容体を介して抗侵害効果を発現することが示唆された。

エピバチジン誘導体ABT-594の抗侵害作用

○林 貴史¹、折戸 融¹、内山 弘子¹、鈴木 奈緒子¹、
轡 基治¹、新井 絹恵¹、米澤 章彦¹、櫻田 忍¹、
鈴木 勉²

¹東北薬大・機能形態、²星薬大・薬品毒性

緒言

エピバチジンは、エクアドルに生息するカエル、*Epipedobates tricolor*の皮膚から発見されたアルカロイドであり、モルヒネよりもはるかに強力な抗侵害作用をもつことがマウスを用いた実験結果から明らかにされている。エピバチジンは、モルヒネのようにオピオイド受容体を介して抗侵害作用を示すのではなく、神経性ニコチン性アセチルコリン受容体を介して作用する新種の鎮痛物質である。しかし、このように強力な抗侵害作用を示す反面、他に強力な毒性作用も持ち合わせている。この抗侵害作用と毒性を切り離すため、様々なエピバチジン誘導体の検討がなされた結果、ABT-594が合成された。ABT-594は、エピバチジンのpyridine環の5位が2-azetidinylmethoxyl基に置換された構造をとっている。この化合物は、強力な神経性ニコチン性アセチルコリン受容体リガンドであり、エピバチジンのように強力な抗侵害作用を示すことが報告されている。さらにABT-594は、抗侵害作用を示す用量において副作用が弱く、非常に有用な化合物である。

本研究では、このエピバチジン誘導体ABT-594の抗侵害作用の特性を明らかにすることを目的に、formalin test、hot-plate test、tail-flick testおよびtail-pressure testを用いて検討した。

実験方法

使用動物

実験には、体重20-24 gのddY系雄性マウスを使用した。動物は、明暗サイクル12時間、室温 22 ± 2 °C、湿度 55 ± 5 %の一定環境下で2日以上飼育したものをを使用した。

Formalin test

マウスを測定用プラスチックケージに1匹ずつ入れ、よく測定環境に順応させて自発運動の消失を確認した後、2 % formalin液を右後肢足蹠内に20 μ Lの割合で皮下投与した。その直後から投与部位に対するlicking行動の持続時間を測定した。また、2 % formalin液投与直後から10分間を第1相、10-30分までの20分間を第2相とした。

Hot-plate test

熱板(53 ± 0.5 °C)の上にプラスチック製フレームを置き、その中にマウスを入れてから後肢のlicking行動を示すまでの時間を測定した。なお、実験にはあらかじめ10-20秒の熱刺激によって反応するマウスを選択して使用した。マウスの熱刺激部位の損傷を最小限に押さえるため、熱刺激時間を60秒以内とした。

Tail-flick test

マウスの尾部先端より2 cmの部分に熱刺激を加え、尾がflickするまでの時間を測定した。なお、実験にはあらかじめ熱刺激によって2-3秒で反応を示すマウスを選択して使用した。また、マウス尾部の損傷を最小限に押さえるため、加える熱刺激時間を10秒以内とした。

Tail-pressure test

マウスの尾根部に10mmHg/sec.の割合で圧刺激を加え、もがき、刺激部位への噛み付き行動を示す圧力を測定し、これを疼痛反応閾値とした。なお、実験にはあらかじめ40-50mmHgの圧力で反応するマウスを選択して使用した。また、マウス尾根部の損傷を最小限に押さえるため、加える最大圧力は100mmHgとした。

実験結果

Formalin test

ABT-594(0.0125-0.2 μ mol/kg、s.c.)は、第1相及び第2相の侵害反応を用量依存的に抑制して抗侵害作用を示した。ED₅₀値は第1相において0.034(0.018-0.066) μ mol/kg、第2相において0.050(0.022-0.114) μ mol/kgであった。

ニコチン性アセチルコリン受容体拮抗薬であるメカミラミンを前処理した群においては、ABT-594(s.c.)の抗侵害作用が有意に減弱された。一方、ナロキソンを前処理した群においては、ABT-594(s.c.)の抗侵害作用は減弱されず、単独投与群と同程度の作用を示した。

Hot-plate test

ABT-594(0.05-0.4 μ mol/kg、s.c.)は、投与5分後において用量依存的に抗侵害作用を示した。また、ED₅₀値は0.128(0.054-0.300) μ mol/kgであった。

Formalin testと同様にメカミラミンを前処理した群においては、ABT-594(s.c.)の抗侵害作用が有意に減弱された。ナロキソンを前処理した群においてABT-594(s.c.)を投与しても、抗侵害作用は減弱されなかった。

Tail-pressure test

ABT-594(0.4-1.6 μ mol/kg、s.c.)は、投与5分後において用量依存的に抗侵害作用を示し、投与後60分で効力が消失した。ABT-594(s.c.)投与5分後におけるED₅₀値は、0.98(0.606-1.584) μ mol/kgであった。

また、メカミラミンを前処理した群において、ABT-594(s.c.)の抗侵害作用は有意に減弱された。

Tail-flick test

ABT-594はformalin test、hot-plate test、およびtail-pressure testで抗侵害作用を示す用量(0.4-1.6 μ mol/kg、s.c.)の範囲では、有意な抗侵害作用は得られなかった。

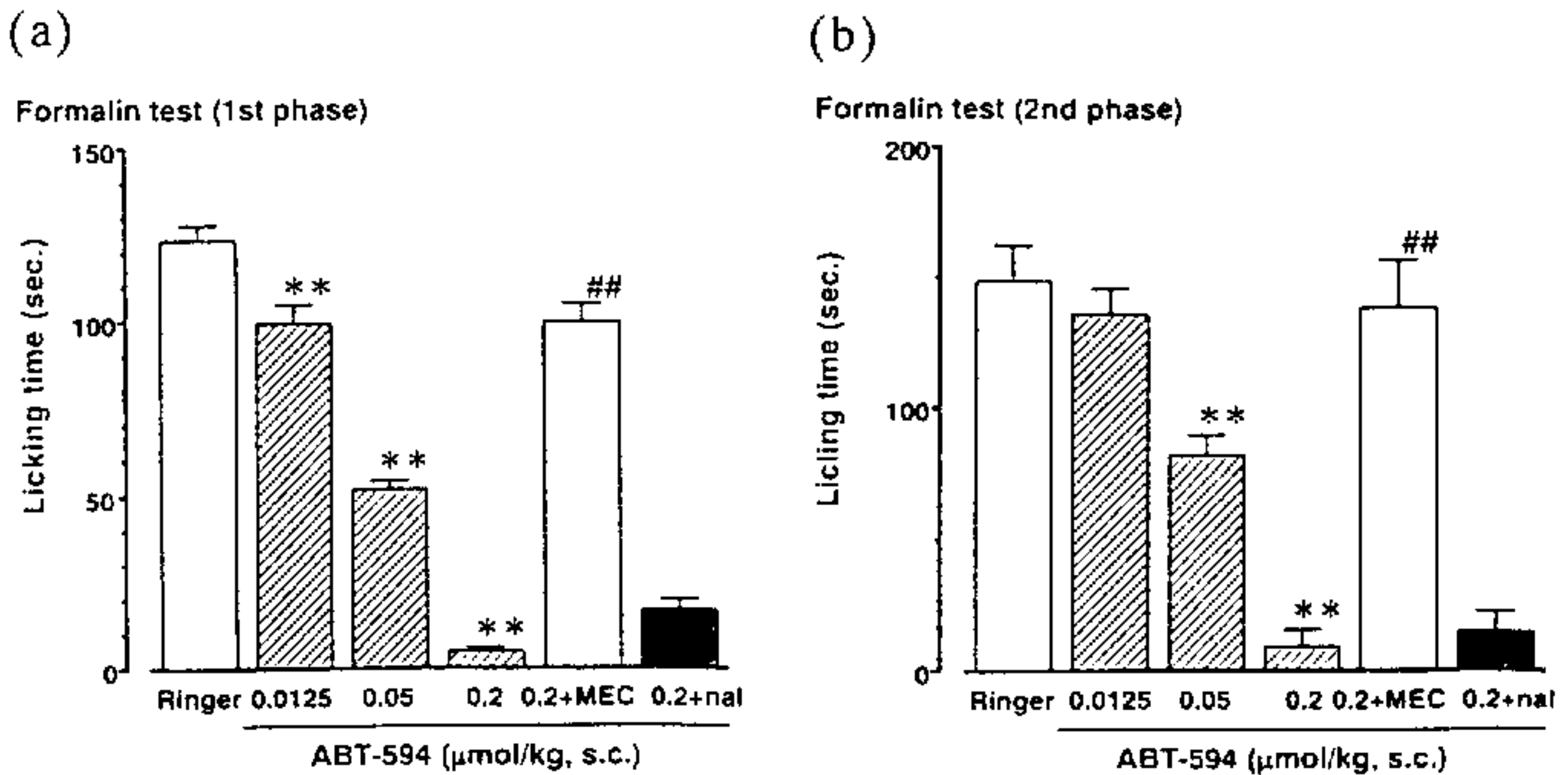


Figure 1.

Antinociceptive effect of s.c. administered ABT-594 in 1st phase (a) and 2nd phase (b) of the formalin test. Each value represents the mean \pm S.E.M. for 10 mice. Mecamiramine (MEC) was given 1mg/kg i.p. 10min. before s.c. administration of ABT-594. Naloxone (nal) was given 5mg/kg i.p. 10min. before s.c. administration of ABT-594. **p < 0.01 when compared with Ringer control. ##p < 0.01 when compared with 0.2 μ mol/kg ABT-594 injected s.c. in the mice.

考察

3種の異なった侵害刺激 (formalin test、hot-plate test、tail-pressure test) に対してABT-594(s.c.)は、低用量の範囲において用量依存的な抗侵害作用を示した。一方、熱刺激によるtail-flick testでは有意な抗侵害作用が認められなかったことから、ABT-594の抗侵害作用はmorphineとは異なった作用点を有することが示唆された。

ABT-594(s.c.)の抗侵害作用は、ニコチン性アセチルコリン受容体拮抗薬であるメカミラミンを前処理した群において有意な減弱がみられたが、ナロキソン前処理群ではこのような抗侵害作用の減弱はみられなかった。これらの結果から、ABT-594の抗侵害作用がオピオイド受容体を介したのではなく、ニコチン性アセチルコリン受容体を介したものであることが示唆された。

13

Nociceptin antagonist の鎮痛および学習促進作用

○ Yunden Jinsmaa, 吉川正明
(京都大・食糧科学研究所)

[緒言]

我々はnociceptinのN-末端とC-末端を逆転させた配列を持つretro-nociceptinのC-末端alcoholがnociceptinレセプター (ORL₁) に親和性を示すこと、またnociceptinとは逆の鎮痛作用を持つnociceptinアンタゴニストであることを見出し、第18回鎮痛薬・オピオイドシンポジウム(京都)で報告した¹⁾。今回、retro-nociceptinのC-末端をmodifyし、retro-nociceptin alcoholより強いアンタゴニスト活性が見られるかどうかを検討した。また、最近nociceptinは学習及び記憶を阻害すること、nociceptinレセプター knock out マウスは野生型マウスより学習及び記憶が高いことが報告されている^{2,3)}。そこでnociceptinアンタゴニストは学習及び記憶に対して促進作用を示すかどうかをも検討した。

[実験方法]

レセプターアッセイ

ラット脳膜画分と^[125I]-Tyr¹⁴nociceptinを用いて結合アッセイを行った。

鎮痛作用

ddy系雄性マウス(体重22-24 g)にペプチドを脳室内投与し、5分間おきに鎮痛作用をtail-pinch法によって測定した。

学習促進作用

学習能に対する効果をstep-through装置による、passive avoidance実験

により検討した。ペプチドを訓練直後に脳室内投与し、24時間後にテストを行った。

[実験結果]

1. nociceptinアンタゴニストの設計

retro-nociceptinのC-末端は遊離のもの及びメチルエステル、アミドに置換したものを合成し、レセプター親和性を測定した。メチルエステル及びアミドにした場合に結合活性はalcoholの場合より2倍強力であった (Table1.)。両ペプチドは100 nmol/mouseで脳室投与際に鎮痛作用を示した。また、retro-nociceptinメチルエステルはモルヒネと異なり連用しても鎮痛効果の低下 (耐性形成) が認められなかった。

Table.1. Receptor affinity of retro-nociceptins

Peptide		IC50 (M)
nociceptin		
[Tyr ¹⁴] nociceptin	¹ Phe-Gly-Gly-Phe . . . Tyr-Ala-Asn-Gln ¹⁷	1.1 x 10 ⁻¹²
retro-nociceptin		
Pheol	¹ Gln-Asn-Ala- . . . Phe-Gly-Gly-Pheol ¹⁷	2.0 x 10 ⁻⁵
Phe-OCH ₃	Gln-Asn-Ala- . . . Phe-Gly-Gly-Phe-OCH ₃	1.0 x 10 ⁻⁵
Phe-NH ₂	Gln-Asn-Ala- . . . Phe-Gly-Gly-Phe-NH ₂	1.0 x 10 ⁻⁵
Phe-OH	Gln-Asn-Ala- . . . Phe-Gly-Gly-Phe-OH	> 10 ⁻⁴

2. nociceptinアンタゴニストの学習効果

retro-nociceptinメチルエステルの学習能に対する効果をstep-through装置を用いて検討した。ペプチドは100 nmole /mouseの脳室内投与により学習促進作用を示した (Fig. 1)。

以上のようにretro-nociceptin類はnociceptinアンタゴニストとして最初の物質であり、脳室内投与により鎮痛作用及び学習促進作用を示す

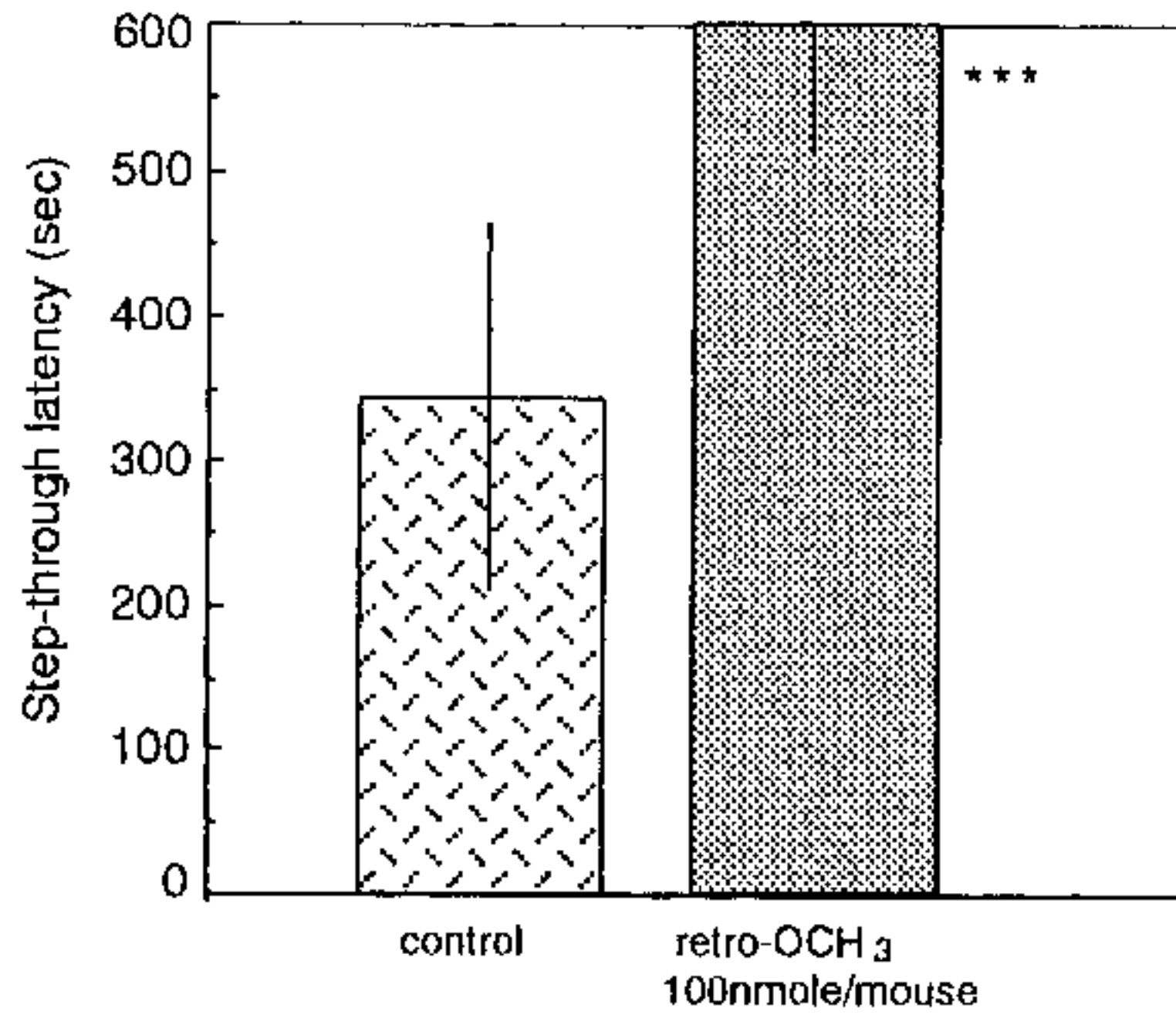


Fig. 1. Effect of retro-nociceptin-OCH₃ on learning performance in mouse. *** p < 0.01 vs saline

が、オピオイドのような耐性形成及び学習阻害作用を持たない理想的な鎮痛薬のリード化合物として興味深い物質である。

【要約】

新規合成ペプチド retro-nociceptinメチルエステル及びアミドは nociceptin レセプターに対して強力な親和性を示した。これらのペプチドは鎮痛作用を示した。

retro-nociceptinメチルエステルはnociceptinとは逆に学習促進作用を示した。

【文献】

1. Yunden, J. et al., 鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム 要旨集, 25-27 (1997)
2. Devine, D. P. et al., Brain Res. 727, 225-229 (1996)
3. Manabe, T. et al., Nature. 394, 577-581 (1998)