

ポ ス タ ー

P-1

ダイノルフィン誘導体による非オピオイド性の学習・記憶障害の改善作用

○平松正行¹，渡邊英里¹，井上かおり¹，亀山 勉¹，
安保明博²，佐々木有亮²

¹名城大・薬・薬品作用，²東北薬大・生化

我々はこれまでに，dynorphin A-(1-13)が，種々のモデル動物において学習・記憶障害を改善することを報告し，この作用が κ -オピオイド受容体拮抗薬である nor-binaltorphimine (nor-BNI) により抑制されることから，この改善作用は， κ -オピオイド受容体を介する作用であることを報告してきた．脳内に存在する dynorphin A は，主に κ -オピオイド受容体に結合し種々の中枢作用を発現すると考えられているが，オピオイド受容体拮抗薬では抑制されないような作用も合わせ持つことも報告されている．そこで今回，1位のチロシン残基がない dynorphin A-(2-13) やフェニルアラニン残基に置換した [Phe¹] dynorphin A-(1-13) を用いて，dynorphin A による非オピオイド性の作用について検討を行った．

【方 法】

実験には6-7週齢の ddY 系雄性マウス (30-38 g) または，SD 系の雄性ラット (250-350 g) を用いた．

自発的交替行動法：一酸化炭素 (CO) 負荷の5日または β -amyloid peptide (25-35) (A β ，8.7 nmol/mouse, i.c.v.) の投与7日後に行った．マウスをY字型迷路のいずれかのアームの端に入れ，8分間に入ったアームの数 (総エントリー数) を記録し，異なる3つのアームに連続して入った回数から自発的交替行動率を求めた．

ステップダウン型受動的回避学習法：CO負荷の7日またはA β の投与14日後に行った．訓練試行においてマウスに間欠的な電気ショックを

15 秒間負荷した。訓練試行の 24 時間後、訓練試行と同様にマウスをプラットホーム上のせ、のせてから床グリッドに下りるまでの時間(ステップダウン潜時)を測定した。

ステップスルー型受動的回避学習法：訓練試行では、ラットが暗室に入ると同時にギロチンドアを閉め、直ちに電気ショック (0.5 mA, 3 秒) を負荷した。訓練試行の 24 時間後に保持試行を行ない、ラットが暗室に移動するまでの潜時 (ステップスルー潜時) を測定した。メカミラミンは訓練試行の 30 分前に投与し、その 5 分後に dynorphin A を側脳室内投与した。

マイクロダイアリシス法：ラットをペントバルビタールで麻酔後、脳を定位に固定し、マイクロダイアリシス用ガイドカニューレを海馬に挿入した。手術の 3～7 日後、ダイアリシスプローブにリンゲル液 (10^{-5} M エゼリンを含む) を $2 \mu\text{l}/\text{分}$ の流速で還流し、透析液を 20 分毎に回収した。透析液中のアセチルコリン濃度は、電気化学検出器付きの HPLC により分析した。

【結 果】

1. CO 負荷により誘発される学習・記憶障害は、[Phe¹] dynorphin A-(1-13) および dynorphin A-(2-13) により有意に改善された。Dynorphin A-(2-13) の作用は、nor-BNI を側脳室内に同時投与しても拮抗されなかった。A β により誘発される学習・記憶障害も dynorphin A-(2-13) により有意に改善された。この作用は、nor-BNI を側脳室内に同時投与しても拮抗されなかった。

2. メカミラミンは、ステップスルー潜時を有意に短縮した。dynorphin A-(1-13) は、メカミラミンにより惹起される学習・記憶障害を有意に改善したが、この作用は、nor-BNI により拮抗されなかった。また、dynorphin A-(2-13) も、メカミラミンによる学習・記憶障害を有意に改善したが、この作用は、nor-BNI により拮抗されなかった。

3. メカミラミンを皮下投与すると、海馬におけるアセチルコリンの遊離が有意に減少した。Dynorphin A-(1-13) は、メカミラミンによるアセチルコリン遊離の減少を有意に抑制したが、この作用は、nor-BNI により拮抗されなかった。また、dynorphin A-(2-13) は、メカミラミンによるアセチルコリン遊離減少を有意に改善したが、この作用は、nor-BNI により拮抗されなかった。

4. Dynorphin A-(1-13) を単独投与することにより、海馬のアセチルコリンの遊離が僅かではあるが有意に減少した。一方、dynorphin A-(2-13) を単独投与しても、アセチルコリンの遊離には変化は認められなかった。

【考 察】

以上の結果より、1 位にチロシン残基がなくオピオイド活性を持たない dynorphin A-(2-13) やフェニルアラニン残基に置換した [Phe¹] dynorphin A-(1-13) においても、CO 負荷や A β 投与により誘発される学習・記憶障害、またはメカミラミンによる学習・記憶障害が改善されたこと、また、dynorphin A-(2-13) の作用は、nor-BNI によって拮抗されなかったことから、dynorphin A 誘導体による学習・記憶障害の改善作用には、κ-オピオイド受容体を介さない非オピオイド性の機序も関与していること、またこの作用には、少なくとも一部、海馬におけるアセチルコリンの神経伝達障害を改善する作用が関与していることが示唆された。

我々は昨年の本シンポジウムにおいて、dynorphin A と相同性が高いノシセプチンが、低用量でスコポラミンなどによる学習・記憶障害を改善することを報告した。今回用いた [Phe¹] dynorphin A-(1-13) は、N 末端がノシセプチンと同じアミノ酸配列 (FGGF) を持つ。今後、これらのペプチドの作用機序についても詳細に検討していく予定である。

P-2

Retro-nociceptin amideの鎮痛および学習促進作用

○ Yunden Jinsmaa¹, 園田壮司¹, Andrzej W. Lipkowski²,
竹島 浩³, 高橋正克⁴, 吉川正明¹

(¹京大・食糧科学研究所, ²Polish Academy of Sciences,
³久留米大・分子生命, ⁴長崎大・薬)

[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 methylesterがnociceptinレセプター(ORL₁)に親和性を示すこと、また脳室内投与の際にnociceptinとは逆に鎮痛作用および学習促進作用を示すnociceptinアンタゴニストであることを見出した¹⁾。さらにモルヒネと異なり本ペプチドには耐性形成がないことがわかった。しかし、retro-nociceptin methylesterのmethylester groupが外れやすいことからretro-nociceptin amideおよびそのすべてのアミノ酸をD-アミノ酸に変えた all(D) retro-nociceptin amideを合成し、retro-nociceptin methylesterとの活性を比較した。

また、本研究では ORL₁ knockout マウスでの鎮痛作用についても検討を行った。

[実験方法]

レセプターアッセイ

nociceptinレセプターアッセイはラット脳膜画分と [¹²⁵I][Tyr¹⁴]-nociceptinを用いて行った。

鎮痛作用

実験には体重22-24 gのddy系雄性マウスを使用した。ペプチドを脳室内投与後5分毎に鎮痛作用を tail-pinch 法によって測定した。マウスの脳室内に5日間連続でペプチドを投与した後、鎮痛テストにより耐性形成を検討した。

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 実験によって検討した。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. レセプターアッセイ

retro-nociceptin amide および all(D) retro-nociceptin amide は methylester より高い親和性を示した。all(D) retro-nociceptin amideは retro-nociceptin amideよりも7倍強力であった (Table1)。

Table 1. Affinity of retro-nociceptin for nociceptin receptor

	Peptide	IC ₅₀ (M)
nociceptin	1 17 F-G-G-F-T.....-A-N-Q	2.6 x 10 ⁻¹⁰
retro-nociceptin-OCH ₃	1 17 Q-N-A.....-T-F-G-G-F-OCH ₃	6.2 x 10 ⁻⁴
retro-nociceptin-NH ₂	Q-N-A.....-T-F-G-G-F-NH ₂	2.6 x 10 ⁻⁴
All (D) retro-nociceptin-NH ₂	DQ-DN-DA.....-DT-DF-G-G-DF-NH ₂	3.7 x 10 ⁻⁵

2. 鎮痛作用

これらのペプチドの鎮痛作用を tail-pinch法により検討したところ all(D) retro-nociceptin amide は methylester の 1/2の用量 (50nmole/mouse) で有意な鎮痛活性を示すことがわかった。

ORL₁ knockoutマウスを用いて鎮痛テストを行ったところ retro-nociceptin amide は鎮痛作用を示さなかった (Fig.1)。このことは retro-nociceptin amideは nociceptinレセプターのアンタゴニストであることを示唆している。

またmethylester 同様にこれらのペプチドは耐性形成が認められなかった (data not shown)。

3. 学習促進作用

nociceptinは学習抑制作用を示し、またORL₁ knockoutマウスは野性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)}。retro-nociceptin amide およびall(D) retro-nociceptin amide も methylester同様いずれも学習促進作用を示した (Fig. 2)。

retro-nociceptin は動脈内投与の際にnociceptin とは逆に血圧上昇作用を示すことがわかった (data not shown)。これらの結果はretro-

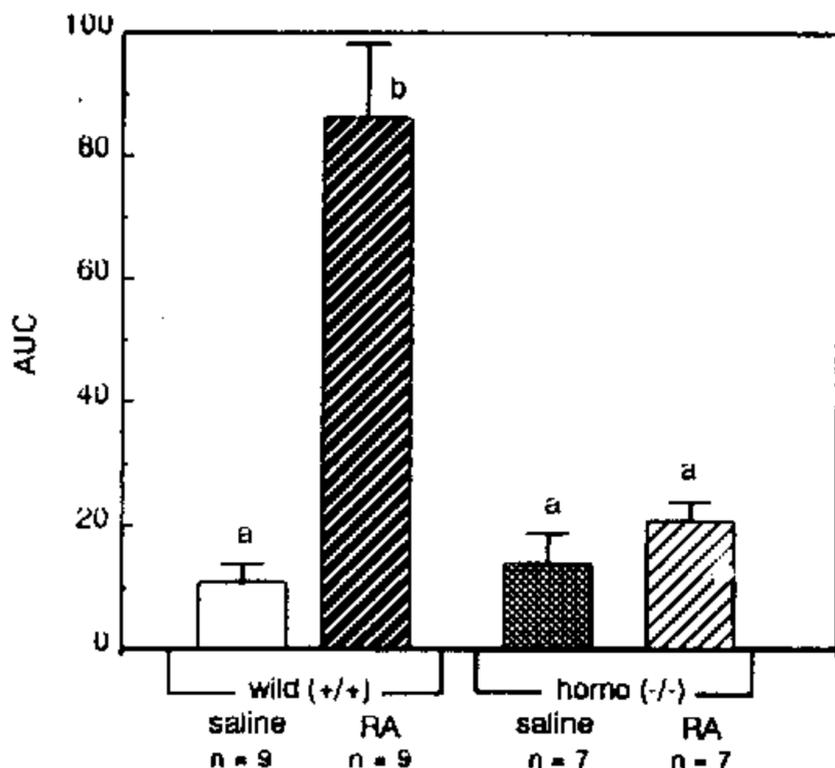


Fig. 1. Antinociceptive effect of retro-nociceptin amide (RA) in DRL1 knockout mice. Peptide (100 nmol/mouse) was given by i.c.v. administration and antinociceptive effect was measured by tail-pinch test. Statistical analysis was done by Student's t-test. Each point represents the mean \pm s.e.m. Results with different superscript letters are significantly different.

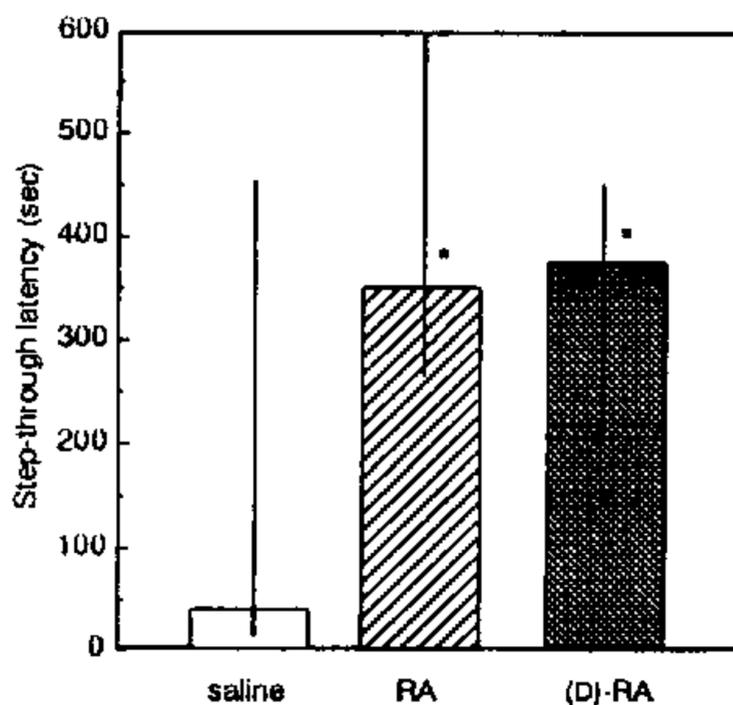


Fig. 2. Effect of retro-nociceptin amide (RA) and all(D) retro-nociceptin amide ((D)RA) on learning performance in mice. Peptide (100 nmol/mouse) was given by i.c.v. administration after the training. Statistical analysis was done by Mann-Whitney's U-test. Data are expressed as the median \pm quarter point. * $p < 0.05$ vs saline ($n = 18$)

nociceptin amideは中枢および末梢のいずれにおいても nociceptin アンタゴニストとして作用することを示唆している。retro-nociceptin amideはモルヒネのような副作用を持たない理想的な鎮痛薬のリード物質といえる。

[要約]

retro-nociceptin amideおよびall(D) retro-nociceptinはnociceptinレセプターに対してmethylesterより高い親和性を示した。retro-nociceptin amideは野性型マウスでは鎮痛作用を示すが、ORL1 knockout マウスにおいては鎮痛作用を示さないことがわかった。またこれらのペプチド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。両ペプチドはnociceptinとは逆に学習促進作用を示した。

[文献]

1. Jinsmaa, Yu. et al., Life Sciences (in press)
2. Devine, D. P. et al., Brain Res. 727, 225-229 (1996)
3. Manabe, T. et al., Nature. 394, 577-581 (1998)

P-3

緑葉Rubisco由来オピオイドペプチド rubiscolinの鎮痛および学習促進作用

○楊 樹長¹, Andrzej W. Lipkowski², 吉川正明¹

(¹京大・食糧科学研, ²Polish Academy of Science)

N末端にYPX配列 (x = 芳香族アミノ酸)を有するペプチドがオピオイド活性を示す例は多く知られている (β -casomorphin, hemorphin および endomorphin等)^{1,2)}。一方、我々はxが非芳香族アミノ酸であってもオピオイド活性を示す例をいくつか見い出してきた (gluten exorphin C: YPISLおよびneocasomorphin: YPVEPF)^{3,4)}。また、Tyr-MIF I (YPLG-NH₂)がオピオイド活性を有することも報告されている⁵⁾。今回、地球上で最も存在量の多いタンパク質として知られてる緑葉Rubisco (ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase) large subunit中に上記条件を満たすYPLDLという配列が存在することに着目し、当該ペプチドを合成したところ、マウス輸精管アッセイ系でオピオイド活性を示した。そこで本ペプチドの諸性質を解明すると共に酵素的生成条件を検討した。

【方法】

1. ペプチド合成、およびアミノ酸配列の解析

ペプチドはF-moc法によりpeptide synthesizer (Protein Technologies, PS3)で合成した。合成ペプチドはODS columnおよびphenetyl columnを用いてHPLCで精製した。ペプチドのアミノ酸配列はProtein Sequencer (Applied Biosystems, 492)で解析した。

2. GPIアッセイ、MVDアッセイ及びレセプターアッセイ

オピオイド活性はGPIおよびMVDアッセイにより検討した。ラット脳膜画分と[³H]deltorphin IIを用いて結合アッセイを行った。

3. 鎮痛及び学習テスト

鎮痛作用はtail-pinch法によりテストした。学習促進作用はstep-through装置を用いてpassive avoidance実験により検討した。

4. ペプチド酵素的遊離条件

Rubisco large subunit (100-117)に相当する YAA YPLDLFEEGSVTNMF および緑茶タンパクをpepsinまたは膵臓 elastase により2時間分解した後、leucine aminopeptidase (LAP)で1時間分解し(E/S=1/20), HPLCにより解析した。

[結果]

1. YPLDLおよびYPLDLFのオピオイド活性

GPI アッセイにおいてはYPLDL及びYPLDLFのオピオイド活性は弱かったが、MVD アッセイで強いオピオイド活性を示したことから、これらはいずれも δ -レセプターに選択的なオピオイドペプチドである (Table1)。レセプター結合アッセイの結果、YPLDLFはYPLDLより約2倍強力な δ -アゴニストであることがわかった。YPLDLおよびYPLDLFをそれぞれrubiscolin-5およびrubiscolin-6と命名した。

Table1. Opioid activity and receptor affinity of rubiscolin-5 and -6

Peptides	IC ₅₀ (μ M)		δ -receptor affinity IC ₅₀ (μ M)
	MVD	GPI	
YPLDL (rubiscolin-5)	51.0 \pm 6.6	1430 \pm 30	4.90 \pm 0.26
YPLDLF (rubiscolin-6)	24.4 \pm 3.6	> 2000	2.46 \pm 0.06

2. rubiscolin-5とrubiscolin-6の鎮痛作用

脳室内投与でrubiscolin-6はrubiscolin-5より強い鎮痛作用を示した (Fig. 1)。rubiscolin-6はまた腹内投与、経口投与でも鎮痛作用を示した。

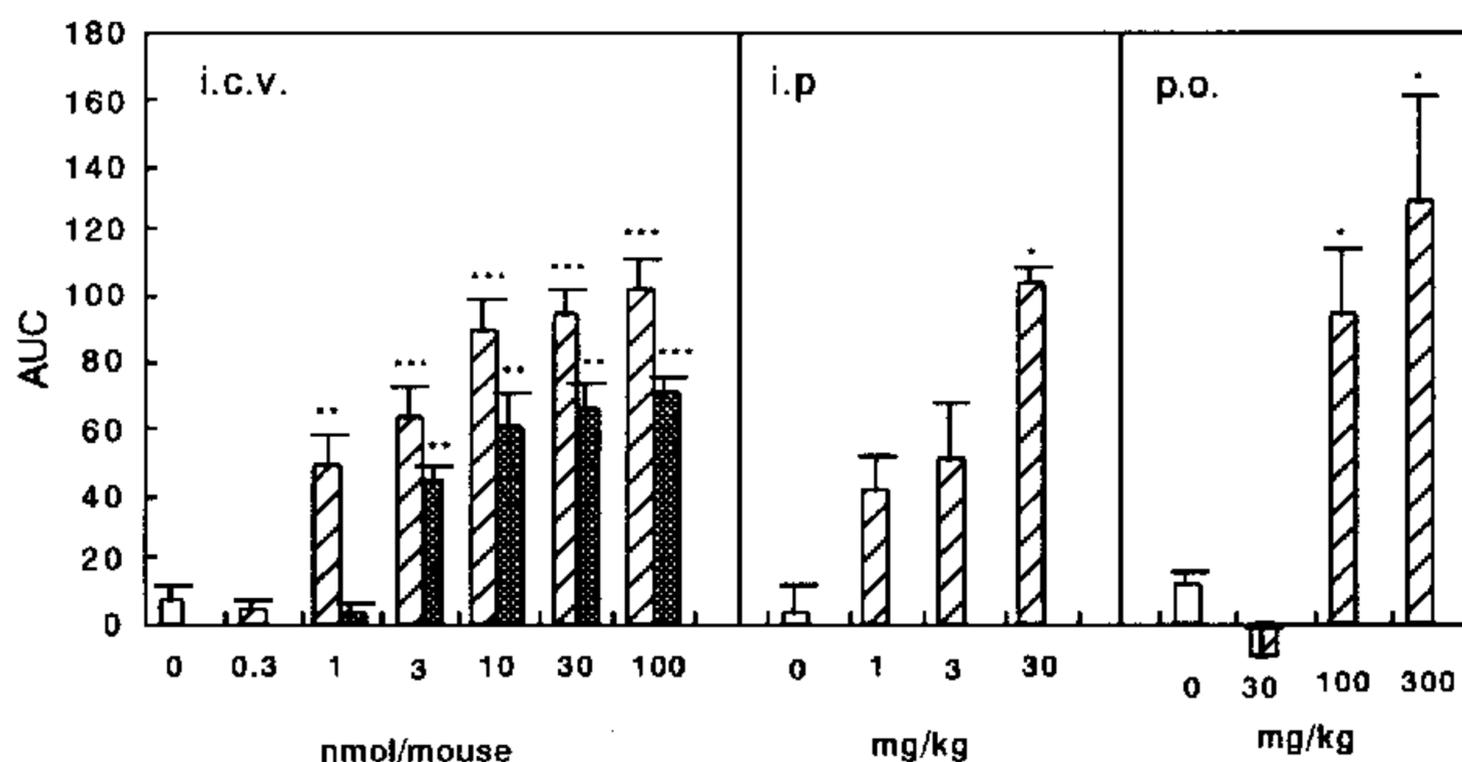


Fig.1. Analgesic effects of YPLDLF and YPLDL. \square YPLDLF \blacksquare YPLDL
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

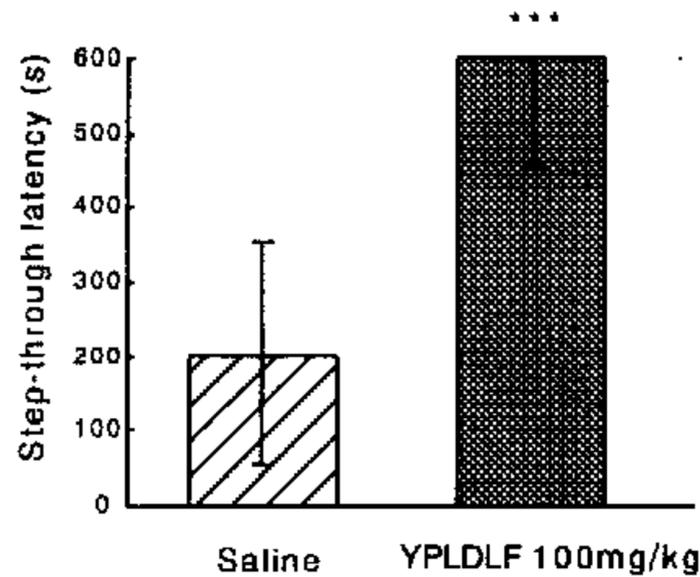


Fig.2. Improvement of learning performance in mice by oral administration of YPLDLF. *** P<0.001

3. rubiscolin-6による学習促進作用

rubiscolin-6は訓練後の経口投与 (100mg/kg) により学習を促進した(Fig. 2)。同様な効果は脳室内投与 (3nmol/mouse)で認められた (data not shown)。

4. rubiscolinの酵素的遊離条件

Rubisco large subunit (100-117)から、ペプシンおよびLAPの作用によってrubiscolin-5は派生した。一方、エラスタゼーおよびLAPの作用によってrubiscolin-5およびrubiscolin-6が派生した。また、rubiscolin-5およびrubiscolin-6は緑茶タンパクからも同様な条件で派生することがわかった。

【要約】

Rubiscoから派生するrubiscolin-5 (YPLDL)およびrubiscolin-6 (YPLDLF)は δ -オピオイドアゴニストであることがわかった。rubiscolin-6はrubiscolin-5より強い δ -オピオイド活性を示し、経口投与で鎮痛作用を示した。さらに本ペプチドは経口投与で有意な学習促進活性を示した。これらのペプチドはエラスタゼー及びLAPの作用によって緑茶タンパクから派生することがわかった。

References

1. Brantl V *et al.*, Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem 1979; 360:1211-1216
2. Zadina JE *et al.*, Nature 1997; 386:499-502
3. Fukudome S *et al.*, FEBS Lett 1993; 316:17-19
4. Jinsmaa Y *et al.*, Peptides 1999; 20:957-962
5. Zadina JE *et al.*, Life Sci 1992; 51:869-885

P-4

エンドモルフィン -1 および -2 の抗侵害作用に 対する μ - 受容体サブタイプの関与

○林貴史¹、櫻田忍¹、米澤章彦¹、竹下光弘²、藤村務³、村山季美枝³、
櫻田誓⁴、櫻田司⁴

¹東北薬大機能形態、²東北薬大第2薬剤、³順天堂大・医・中央機器
分析室、⁴第一薬大生化

[緒言] エンドモルフィン -1 および -2 は、1997年にその存在が確認された内因性の選択的 μ - 受容体リガンドである¹⁾。我々は両ペプチドの抗侵害作用がそれぞれ異なった μ - 受容体サブタイプを介して発現することをすでに報告した²⁾。今回、我々はモルヒネの代謝物、モルヒネ -6 β - グルクロナイドの抗侵害作用に関与している³⁾ μ - 受容体サブタイプの選択的アンタゴニストである 3- メトキシナルトレキソン (3-MNT) を用いて、エンドモルフィン -1 および -2 脊髄腔内 (i.t.) および脳室内 (i.c.v.) 投与時の抗侵害作用について検討した。

[実験方法] 実験には ddY 系雄性マウス (20 - 22 g) を用いた。抗侵害作用は paw-withdrawal 法により評価した。すなわち、マウスの右後肢足蹠に熱刺激を加え、この刺激から逃れるように足を引っ込めるまでの潜時を仮性疼痛閾値として評価した。マウスはあらかじめ刺激に対して 2 - 3 秒で反応するものを選択して用いた。また、刺激部位の損傷を最小限にするために最大刺激時間 (cut - off time) を 10 秒とした。得られた測定値から疼痛反応抑制効果として % of maximum possible effect (% MPE) を算出した。3-MNT はエンドモルフィン -1 および -2 を投与する 25 分前に皮下投与した。

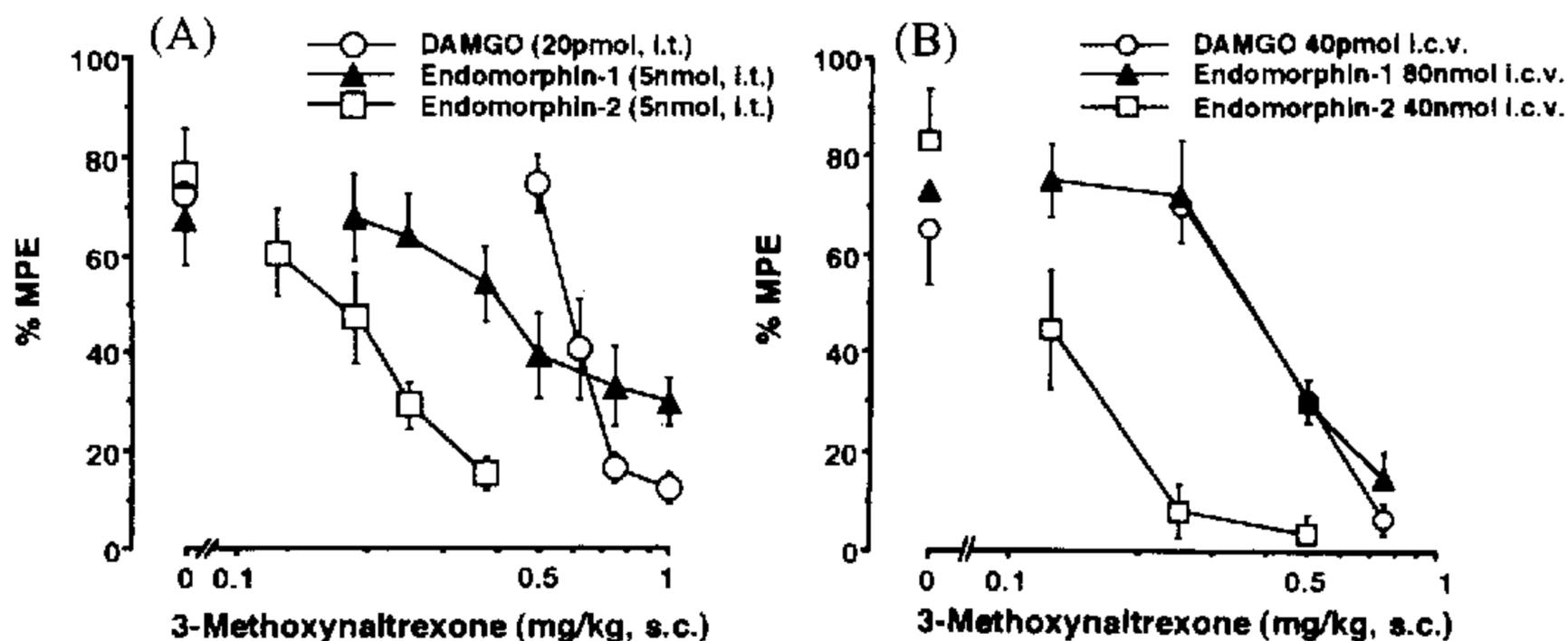


Fig.1 Effect of 3-methoxynaltrexone (3-MNT, mg/kg, s.c.) on (A) i.t. and (B) i.c.v. administered DAMGO-, endomorphin-1- and -2-induced antinociception in the paw-withdrawal test. Antinociceptive effect was measured 5 min after i.t. and i.c.v. administration of endomorphin-1 and -2, and 10 min after i.t. and i.c.v. administration of DAMGO. 3-MNT (mg/kg, s.c.) was given 25 min before administration of endomorphin-1 and -2, and 20 min before administration of DAMGO. The data are given as the mean \pm S.E.M. for 10 mice.

[結果および考察] エンドモルフィン-1 および-2 を i.t. および i.c.v. 投与すると用量依存的な抗侵害作用を示した。この作用は i.t. 投与では投与直後を、i.c.v. 投与では 5 分後をピークとし両方とも 10-20 分で作用は消失した。i.t. 投与では低用量にて強力な作用を示し ED50 値はエンドモルフィン-1 が 1.9 (0.59-6.11) nmol、エンドモルフィン-2 が 2.6 (1.51-4.47) nmol であった。また、i.c.v. 投与時の ED50 値はエンドモルフィン-1 が 35 (19.87-61.65) nmol、エンドモルフィン-2 が 13 (8.15-20.74) nmol であった。3-MNT は用量依存的にエンドモルフィン-1 および-2 の抗侵害作用を減弱させた。しかし、エンドモルフィン-1 および-2 の抗侵害作用に対する 3-MNT の 50% 抑制用量 (ID50 値) を比較すると、エンドモルフィン-2 はエンドモルフィン-1 の約 1/3 倍であり、低用量の 3-MNT により有意な作用減弱がみられた。さらに、エンドモルフィン-1 および-2 を i.t. 投与したときの用量反応曲線に対する 3-MNT (0.25 mg/kg; モルヒネの抗侵害作用には無影響であるがモルヒネ-6 β -グルクロナイドの作用を有意に減弱させる用量)³⁾ の影響を検討した。このときエンドモルフィン-1 の用量反応

曲線は 3-MNT に無影響であった。しかし、エンドモルフィン-2 の用量反応曲線は 3-MNT を前処理することにより大きく右へシフトし、ED50 値は約 3 倍に増加した。また、3-MNT を i.t. 投与したときも同様の結果を示した。3-MNT の抑制作用はエンドモルフィン-1 および-2 を i.c.v. 投与したときの方が i.t. 投与したときよりもやや強力であったが有意な差はみられなかった。

以上のことから、エンドモルフィン-1 と-2 は、それぞれ脳室内および脊髄腔内において μ -受容体の異なったサブタイプを介して抗侵害作用を示していることが示唆された。特にエンドモルフィン-2 による抗侵害作用は 3-MNT により有意に減弱することからモルヒネ-6 β -グルクロナイドの抗侵害作用に関与している μ -受容体サブタイプを介したものであることが示唆された。

[文献]

1. J.E. Zadina et al., A potent and selective endogenous agonist for the μ -opiate receptor, *Nature* 386 (1997), 499-502.
2. S. Sakurada et al., Differential involvement of μ -opioid receptor subtype in endomorphin-1- and -2-induced antinociception, *Eur. J. Pharmacol.* 372 (1999), 25-30.
3. G.P. Brown et al., 3-Methoxynaltrexone, a selective heroin / morphine-6 β -glucuronide antagonist, *FEBS Lett.* 412 (1997), 35-38.

P-5

糖尿病マウスの endomorphins 誘発抗侵害効果の減弱におけるコレシストキニンの関与

○圖子田康¹、長瀬博²、亀井淳三¹

¹星薬科大学薬物治療学教室、²東レ医薬品研究所

[緒言]

我々は、糖尿病マウスにおいて上位中枢の μ 受容体を介した抗侵害効果が減弱していることを報告している。また、糖尿病マウスにおける内因的な μ 受容体作動薬である endomorphin-1 (EM-1) の抗侵害効果は、 δ 受容体を介することにより、対照群マウスと同程度発現することを報告している。しかし、糖尿病マウスにおける endomorphin-2 (EM-2) の抗侵害効果は、対照群マウスに比べ減弱していることを報告している。コレシストキニンは、 μ 受容体作動薬および δ 受容体作動薬の抗侵害効果に対し拮抗作用を示すことが知られている。我々は、糖尿病マウスの侵害受容閾値の低下に CCK 神経系が一部関与していることを報告している。以上のことから、糖尿病マウスにおける EM-2 の抗侵害効果の減弱に CCK が関与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 誘発抗侵害効果に対する CCK アゴニストである CCK-8 の影響を、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た。侵害受容閾値は 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、選択的 δ_1 受容体作動薬である (-) TAN-67 は侵害受容閾値測定 10 分前に、CCK 受容体作動薬である CCK-8 は、EM-1 および EM-2、(-) TAN-67 投与 10 分前に、選択的 CCK_B 受容体拮抗薬である CI-988 は EM-2 投与 10 分前に、それぞれ脳室内投与した。

[実験結果]

Endomorphins 誘発抗侵害効果に対する CCK-8 の影響

EM-1 (10 μg) は、対照群および糖尿病マウスにおいてともに強い抗侵害効果を発現した (Fig. 1)。また、対照群および糖尿病マウスの EM-1 の抗侵害効果に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、糖尿病マウスの EM-2 による抗侵害効果は、対照群マウスのそれと比べ有意に減弱していた。単独で tail-flick 反応潜時に対し影響を与えない CCK-8 (1-10 ng) は、対照群マウスにおける EM-1 および EM-2 の抗侵害効果を用量依存的かつ有意に抑制したが、糖尿病マウスにおける EM-1 の抗侵害効果に対しては高用量でのみ抑制した (Fig. 1)。

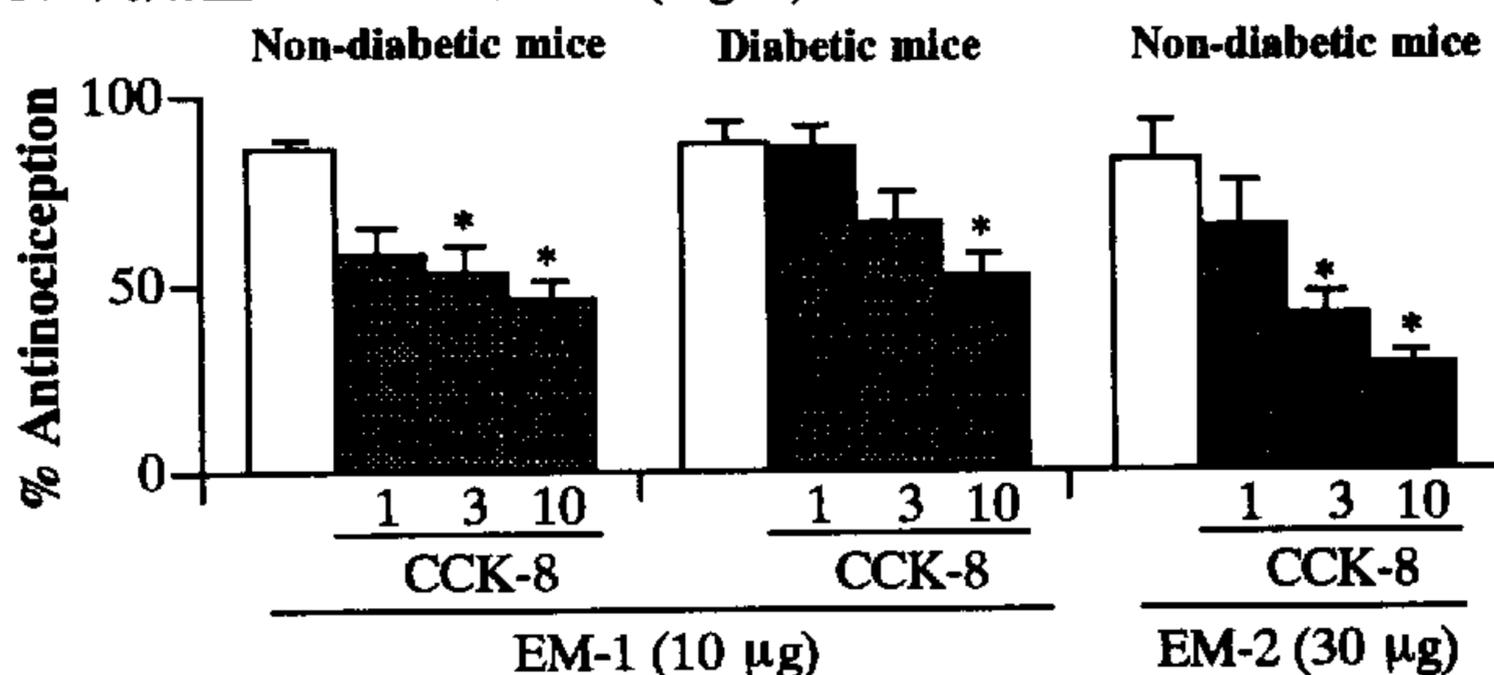


Figure 1

Effects of CCK-8 on the antinociceptive effects of EM-1 and EM-2 in diabetic and non-diabetic mice. Each column represents the mean with S.E. for 10-17 mice in each group. * $P < 0.05$ vs. the respective saline-treated group (open column).

糖尿病マウスの EM-2 誘発抗侵害効果の減弱に対する CI-988 の影響

糖尿病マウスにおける EM-2 (30 μg) の抗侵害効果は、対照群マウスのそれに比べ有意に減弱していた。しかし、糖尿病マウスの EM-2 誘発抗侵害効果は CI-988 (0.03-0.3 ng) により、用量依存的かつ有意に増強され CI-988, 0.3 ng 投与群では対照群マウスと同程度となった。

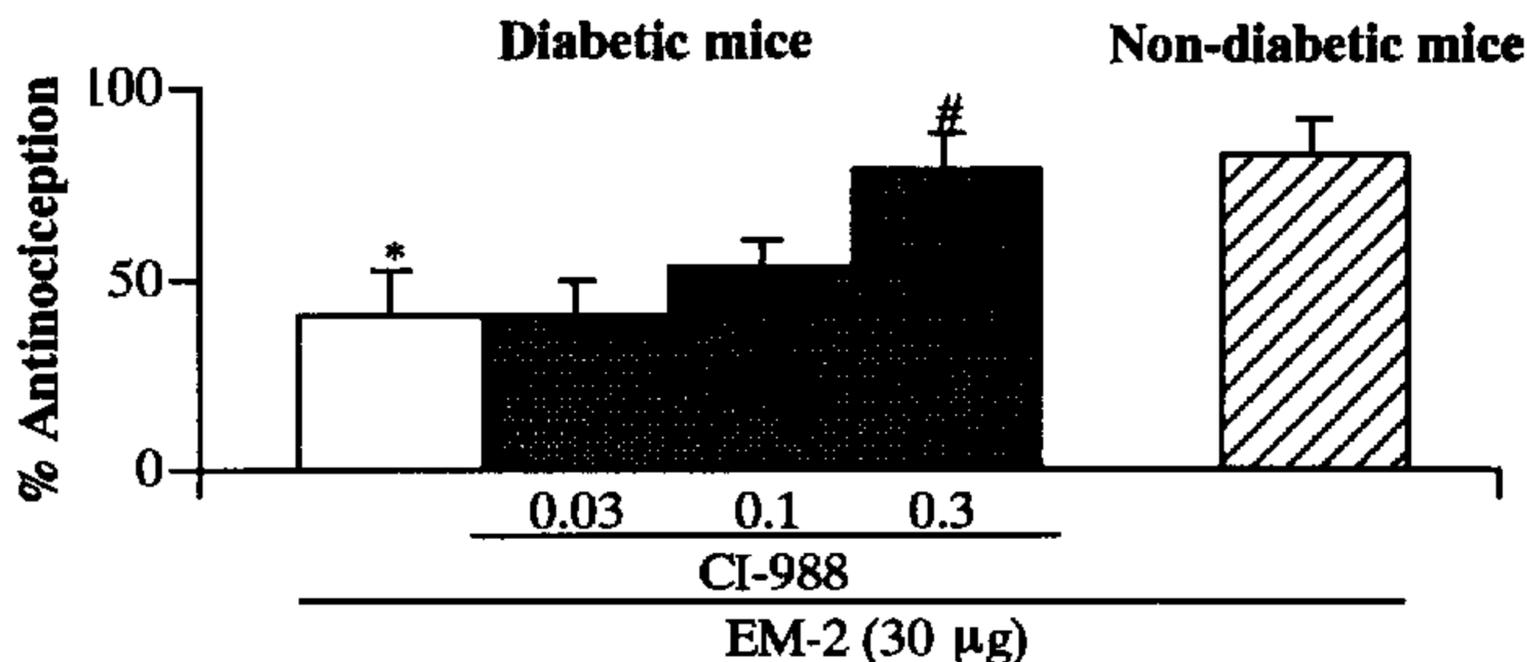


Figure 2

Effect of CI-988 on the antinociceptive effect of EM-2 in diabetic mice. Each column represents the mean with S.E. for 10-13 mice in each group. *P<0.05 vs. non-diabetic mice (hatched column). #P<0.05 vs. saline-treated diabetic mice (open column).

(-) TAN-67 誘発抗侵害効果に対する CCK-8 の影響

糖尿病マウスにおける (-) TAN-67 (30 μg) の抗侵害効果は、対照群マウスのそれと比べ有意に増大していた。CCK-8 (10 ng) は、対照群マウスの (-) TAN-67 の抗侵害効果を有意に抑制したが、糖尿病マウスでは抗侵害効果の減弱傾向はみられたものの有意な変化ではなかった (Fig. 2)。

[考察]

CCK-8 は対照群マウスにおいて EM-1、EM-2 および (-) TAN-67 の抗侵害効果を用量依存的かつ有意に抑制した。一方、CCK-8 は糖尿病マウスの EM-1 誘発抗侵害効果を高用量でのみ有意に抑制したものの、(-) TAN-67 の抗侵害効果に有意な影響を与えなかった。したがって、糖尿病マウスでは δ 受容体の抗侵害効果に対する CCK-8 による拮抗作用が減弱している可能性が考えられ、このことが糖尿病マウスの δ 受容体を介した EM-1 の抗侵害効果に対する CCK-8 の拮抗作用が、対照群マウスに比べ減弱していた原因であると推察される。一方、糖尿病マウスの EM-2 の抗侵害効果を CI-988 は用量依存的かつ有意に増強し、対照群マウスと同程度のものとなった。したがって、糖尿病マウスでの EM-2 誘発抗侵害効果の減弱に CCK_B 受容体が一部関与していることが示唆された。

○越智武洋、藤井 隆、元山行雄、後藤俊男
藤沢薬品工業・薬理研究所

緒言

FR140423は選択的COX-2 阻害作用を有する胃腸管障害の少ない強力な抗炎症・鎮痛剤である¹⁾。さらに、FR140423はモルヒネのような中枢性鎮痛剤の評価に用いられているD'Amour-Smith 法においても鎮痛作用を示し、その作用はオピオイドアンタゴニストのnaloxoneにより拮抗された。すなわち、FR140423は炎症部位でのCOX-2 抑制作用とモルヒネ様中枢性鎮痛作用を兼ね備えていた²⁾。

今回、FR140423の鎮痛作用をマウス・Haffner 法で検討し、中枢におけるFR140423の鎮痛作用メカニズムを解析した。選択的 μ -および δ -、 κ -オピオイド受容体アンタゴニストのnaloxonazine, β -funaltrexamine(β -FNA) およびnaltrindole, nor-binaltorphimineを用いて、末梢および中枢部位に投与したFR140423の作用メカニズムおよび作用部位を検討した。

実験方法

動物は ddY系雄性マウス 6週令を1群10匹として用いた。機械的侵害刺激による鎮痛作用の測定をHaffner の改良法に従って行った³⁾。薬物は、経口(p.o.)あるいは皮下(s.c.), 脊髄クモ膜下腔内(i.t.), 側脳室内(i.c.v.)に投与した。

マウス・脊髄神経膜画分へのオピオイド受容体結合実験をChenらの方法に従って行った⁴⁾。

結果および結論

- 1) FR140423(10-80 mg/kg, p.o.; 1-16 μ g/mouse, i.t.)は用量依存的な抗侵害刺激作用を示し、そのED₅₀値はそれぞれ21mg/kg および 3.1 μ g/mouseであった。しかし、FR140423 (8-64 μ g/mouse, i.c.v.)では抗侵害刺激作

用を示さなかった。FR140423は、鎮痛作用がみられた用量において、中枢興奮性や挙尾反応のようなモルヒネ様行動変化を起こさなかった。

- 2) FR140423の抗侵害刺激作用は、 δ -オピオイド受容体アンタゴニストの naltrindole(0.2 mg/kg, s. c. ; 10 μ g/mouse, i. t.)により完全に拮抗されたが、naltrindole(10 μ g/mouse, i. c. v.)では拮抗されなかった。
- 3) μ -オピオイド受容体アンタゴニストのnaloxonazineおよび β -FNA、 κ -オピオイド受容体アンタゴニストのnor-binaltorphimine(10 μ g/mouse, i. t.)は、FR140423の鎮痛作用に影響を及ぼさなかった。
- 4) FR140423(1-100 μ M)は、マウス脊髄神経膜画分への δ -オピオイド受容体に結合しなかった。

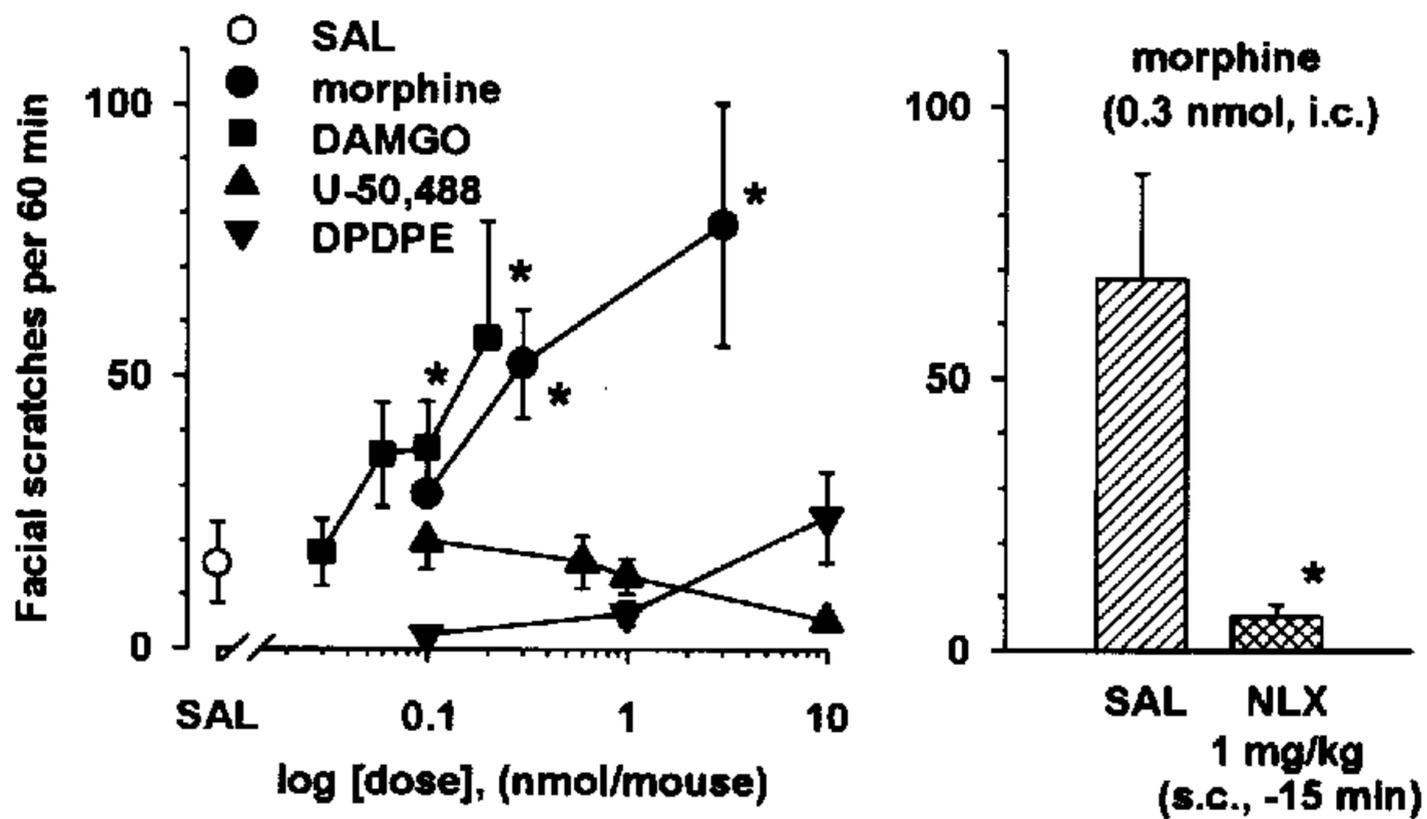
以上の実験結果より、FR140423は上位中枢ではなく脊髄の δ -オピオイド受容体に間接的に働いて抗侵害刺激作用を示すことが示唆された。

参 考 文 献

- 1) Ochi, T., Jobo-Magari, K., Yonezawa, A., Matsumori, K., Fujii, T., 1999. Anti-inflammatory and analgesic effects of a novel pyrazole derivative, FR140423. *Eur. J. Pharmacol.* 365, 259-266.
- 2) Ochi, T., Fujii, T., Motoyama, Y., Goto, T., 1999. The profile of FR140423, a novel anti-inflammatory compound, in yeast-induced rat hyperalgesia. *Jpn. J. Pharmacol.* 81, 94-98.
- 3) Takagi, H., Inukai, T., Nakama, M., 1966. A modification of Haffner's method for testing analgesics. *Jpn. J. Pharmacol.* 16, 287-294.
- 4) Chen, J., Smith, E. R., Cahill, M., Cohen, R., Fishman, J. B., 1993. The opioid receptor binding of dezocine, morphine, fentanyl, butorphanol and nalbuphine. *Life Sci.* 52, 389-396.

○野島浩史，谷下田雄一，山口朋美，倉石 泰
富山医科薬科大学 薬学部 薬品作用学

【目的】除痛の目的でヒトに morphine などの opioid を硬膜外や脊髄くも膜下腔内に投与したときに現れる副作用の中で，頻度の高いものの一つが，痒である。Opioid μ -受容体に親和性の高いアゴニストである morphine や fentanyl は痒みの発生率が高いのに対して，opioid μ -受容体の部分アゴニストである buprenorphine や butorphanol は痒みの発生率が低い。また，難治性の，痒性疾患の痒みが opioid 受容体拮抗薬により改善される。我々は，各 opioid 受容体サブタイプに選択的なアゴニストをマウスに大槽内注射して，顔面への搔き動作惹起作用を比較したところ， μ -受容体アゴニストの morphine と DAMGO が用量依存的に搔き動作を惹起するのとは対照的に， κ -受容体アゴニストの U-50,488 と δ -受容体アゴニストの DPDPE は搔き動作を惹起しないこと，さらに morphine によるこの搔き動作が opioid 受容体拮抗薬 naloxone の皮下注射により抑制されることを既に報告した（図，文献1）。このように中枢神経系における μ -opioid 受容体とその内因性リガンドは痒覚の発現の伝達，調節機構において重要な役割を果たしていると考えられる。本実験では，末梢性に惹起した痒覚関連反応に関与する opioid の主たる作用部位を明らかにする目的で，naloxone を脊髄くも膜下腔内および大槽内に投与して調べた。起痒物質の吻側背部皮内注射により惹起される後肢による搔き動作と，足裏への起痒物質の注射により惹起される噛み動作を搔痒反応の指標として（文献2）検討した。



Opioid 受容体サブタイプ選択的アゴニストの大槽内注射によるマウス顔面掻き動作 (左図) と morphine の大槽内注射により惹起された顔面への掻き動作に対する naloxone (NLX) の抑制効果 (右図) (文献 1 を改変)

例数=7~15, * $p < 0.05$ (SAL との比較)

【実験方法】

雄性 ICR 系マウス (5~7 週令) を用いた。起痒物質として, serotonin, histamine, substance P を用い, 100 nmol/site の用量を投与した。掻痒反応は, 起痒物質を後肢足裏に 20 μ L の容量で注射したときに現れる噛み動作 (biting) の時間, あるいは吻側背部に 50 μ L の容量で皮内注射した時に現れる掻き動作 (scratching) の回数を測定して定量した。 μ -opioid 受容体拮抗薬の naloxone は皮下; 脊髄くも膜下腔内および大槽内にそれぞれ, 起痒物質の投与 15 分前, 5 分前, 10 分前に投与した。

【結果および考察】

マウス足裏への serotonin の投与は、投与部位への biting を惹起した。この biting の反応時間は、naloxone (0.3, 1 mg/kg) の皮下投与により用量依存的に減少した。また、naloxone (1, 10 nmol) の大槽内投与によっても用量依存的に減少した。しかし、脊髄くも膜下腔内に 10 nmol の用量を投与しても biting の反応時間に全く影響しなかった。一方、serotonin を吻側背部に皮内注射して惹起された scratching の回数は、naloxone (1 mg/kg) の皮下投与により減少し、10 nmol の大槽内投与によっても減少した。Histamine あるいは substance P を吻側背部に皮内注射して惹起された scratching の回数も、naloxone (1 mg/kg) の皮下投与により減少し、10 nmol の大槽内投与によっても減少した。以上の結果から、末梢性に惹起した搔痒反応に、脳内の opioid 受容体が関与することが明らかになり、脊髄内の opioid 受容体の関与は少ないことが示された。

【文献】

1. Tohda, C., Yamaguchi, T. and Kuraishi, Y.: Intracisternal injection of opioids induces itch-associated response through μ -opioid receptors in mice. *Jpn. J. Pharmacol.*, 74, 77-82 (1997)
2. Hagiwara, K., Nojima, H. and Kuraishi, Y.: Serotonin-induced biting of the hind paw is itch-related response in mice. *Pain Res.*, 14, 53-59 (1999)

ウリジン誘導体の催眠及び鎮痛作用
—ウリジン受容体と活性の関係—

○木村敏行¹、清水寛美¹、米本栄香¹、渡辺和人¹、
近藤繁美²、Ing Kang Ho³、山本郁男¹

¹北陸大学薬学部衛生化学教室、²日水製薬(株)、
³ミシシッピ大学医学部薬毒理学教室

【目的】

核酸であるウリジンは断眠ラット脳幹より抽出された睡眠促進物質の1つであり、その脳室内注入はラットの自然睡眠を増強させることが報告されている。¹⁾ さらに、ウリジンはマウス自発運動量減少²⁾などの中枢抑制作用が知られていることから、我々は、ウリジンが中枢系における抑制性の神経伝達物質様作用を有していると推察、ウリジン受容体の存在を提唱している。³⁾

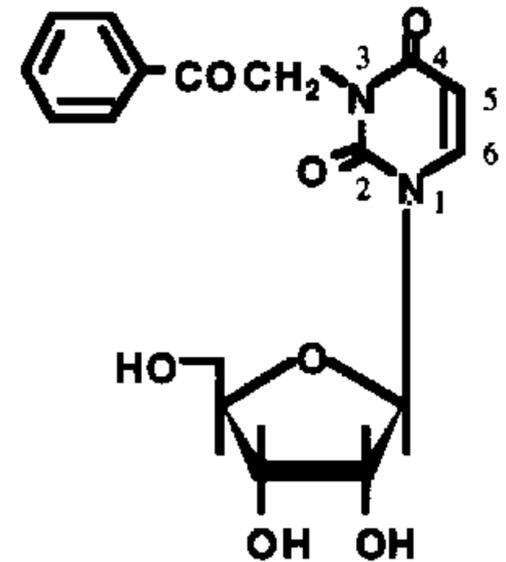


Fig. 1 Structure of N³-Phenacyluridine

これまで、ウリジンを化学的に修飾した化合物を合成し中枢作用を検討した結果、ウリジン N³ 位置換体は、単独催眠をはじめバルビツレート及びベンゾジアゼピン睡眠増強作用、運動失調作用、抗不安作用を有することが明らかとなった。⁴⁻⁸⁾ 誘導体の中でも特に N³-フェナシルウリジン (Fig. 1) はマウス脳室内 (i.c.v.) 投与により最強の催眠作用を有した。今回、ウリジン N³ 位置換体には上記薬理作用の他、鎮痛作用をも有することを明かとした。さらに広範な中枢抑制作用を評価する目的で N³-フェナシルウリジンをはじめ関連誘導体の鎮痛作用について検討した。

【方法】

実験には ddY 系雄性マウス (体重 23-28 g) を用い、鎮痛作用は tail pinch 法、hot plate 法及び酢酸ライジング法により測定した。試験化合物は 1% Tween-80 生理食塩液に溶解後、マウスに i.c.v. 投与した。

Tail pinch 法：マウス尾根部を鉗子で挟み 15 秒以内に防御反応を示さなかったマウスを陽性として測定した。Cut off time は 15 秒とした。

Hot plate 法：55℃に加熱した熱板上にマウスを置き、熱刺激によって出現する反応（跳躍、足裏をなめる）を示すまでの時間を測定した。Cut off time は 60 秒とした。

酢酸ライジング法：0.7% 酢酸を 1.0 ml/kg の割合で腹腔内に投与し、15 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。

【結果および考察】

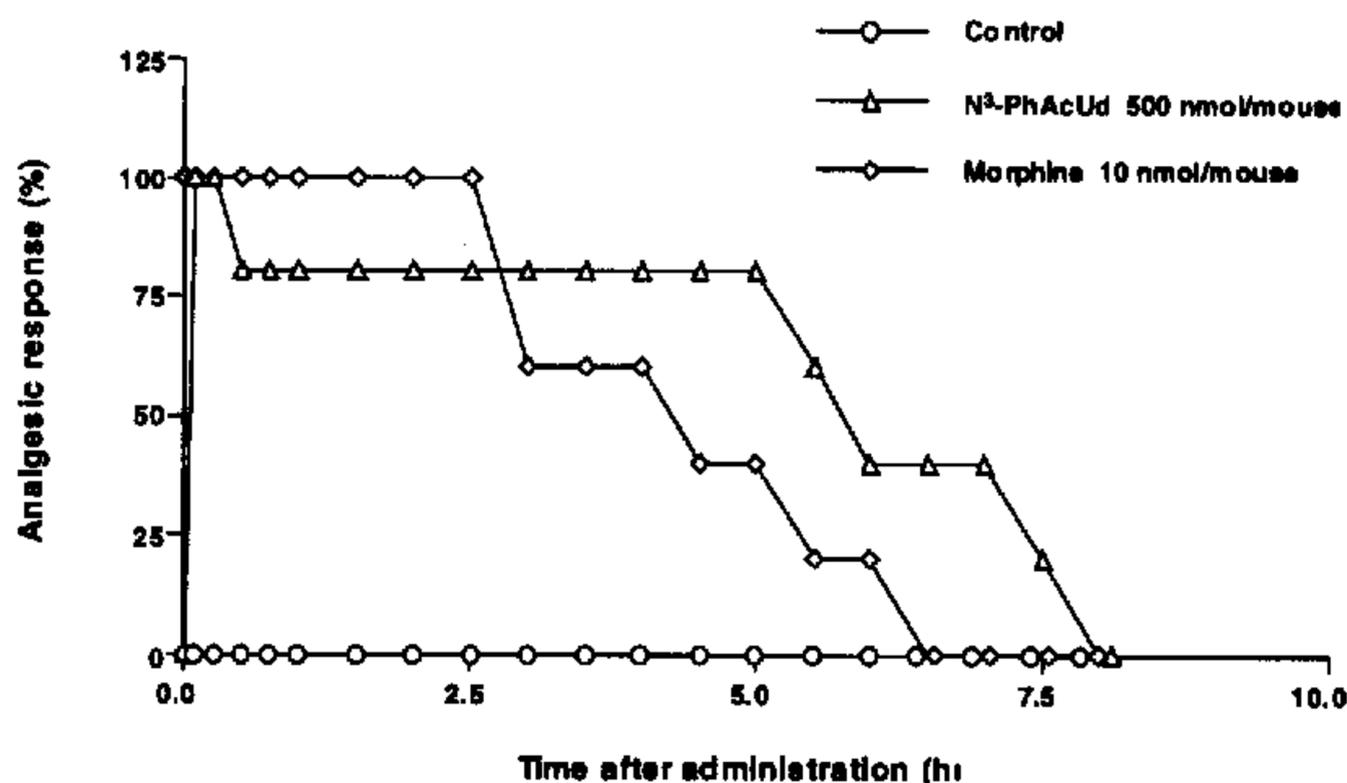


Fig. 2 Effects of N³-phenacyluridine on tail pinch test by i.c.v. injection to mice

N³-フェナシルウリジンは、500 nmol/mouse, i.c.v. の用量で tail pinch 法において鎮痛作用を有し、その作用は投与 6.5 時間後まで継続、比

較として用いたモルヒネ 10 nmol/mouse とほぼ同等の作用であった (Fig. 2)。

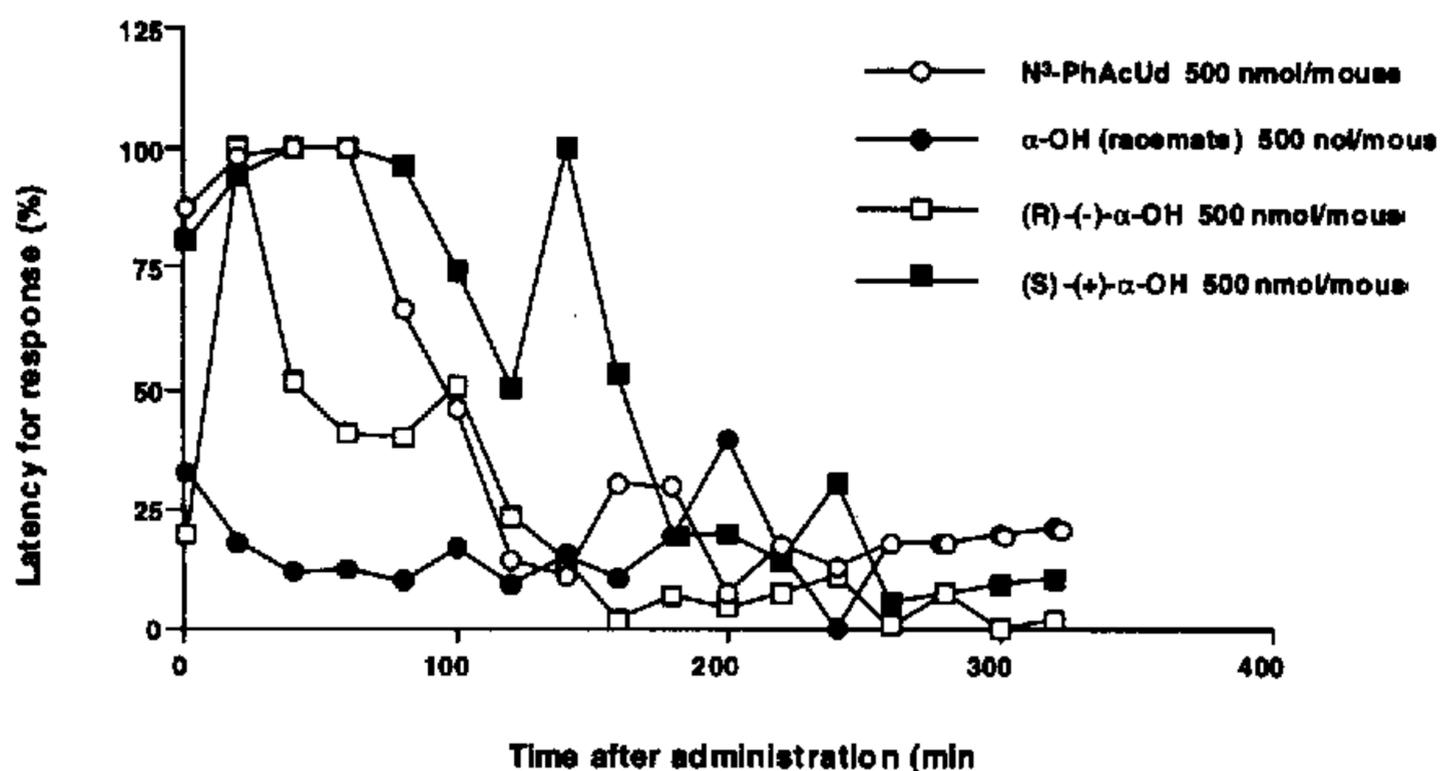


Fig. 3 Effects of N³-phenacyluridine and its metabolites on hot plate test by i.c.v. injection to mice

Hot Plate 法において、Fig. 3 に示すように N³-フェナシルウリジンの疼痛反応出現遅延は投与後 2 時間まで持続した。本化合物の活性代謝物である N³-(S)-(+)-α-ヒドロキシ-β-フェネチルウリジンは異性体の N³-(R)-(-)-α-ヒドロキシ-β-フェネチルウリジン及びラセミ体より強い鎮痛作用を示し、これまで報告してきた催眠作用及びウリジン受容体への親和性^{9,10)}との間に相関性が認められた。

酢酸ライジング法において、N³-フェナシルウリジンは i.c.v.投与において用量依存的な鎮痛作用を示し、ED₅₀は 19.4 nmol/mouse であった。

以上の結果、N³-位置換ウリジンはこれまで報告した催眠作用の他、鎮痛作用を含む広範な中枢抑制作用を有し、その作用にはウリジン受容体が関与している可能性が示唆された。今後、他の鎮痛作用に関与するレセプター (オピオイド受容体) に対する影響も検討する予定である。

References

- 1) Komoda, Y., Ishikawa, M., Nagasaki, H., Iriki, M., Honda, K., Inoue, S., Higashi, A., Uchizono, K., Uridine, a sleep-promoting substance from brainstems of sleep-deprived rats. *Biomed. Res.*, **4**, 223-228 (1983).
- 2) Krooth, R. S., Hsiao, W. L., Lam, G. F. M., Effects of natural pyrimidines and of certain related compounds on the spontaneous activity of the mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **207**, 504-514 (1978).
- 3) Yamamoto, I., Kimura, T., Watanabe, K., Kondo, S., Ho, I. K., Receptors of uridine and its derivatives. *Sleep Res.*, **22**, 512 (1993).
- 4) Yamamoto, I., Kimura, T., Tateoka, Y., Watanabe, K., Ho, I. K., *N*³-Benzyuridine exerts hypnotic activity in mice. *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 4088-4090 (1985).
- 5) Yamamoto, I., Kimura, T., Tateoka, Y., Watanabe, K., Ho, I. K., *N*-Substituted oxopyrimidines and nucleosides: structure-activity relationship for hypnotic activity as central nervous system depressant. *J. Med. Chem.*, **30**, 2227-2231 (1987).
- 6) Yamamoto, I., Kimura, T., Tateoka, Y., Watanabe, K., Ho, I. K., Hypnotic activity of *N*³-benzylthymidine on mice. *Life Sci.*, **41**, 2791-2797 (1987).
- 7) Yamamoto, I., Kimura, T., Watanabe, K., Tateoka, Y., Ho, I. K., Action mechanism for hypnotic activity of *N*³-benzyluridine and related compounds, in: Inoue, S., Krueger, J. M. (Eds.), Endogenous sleep factors, SPB Academic Publishing bv, The Netherlands, pp. 133-142 (1990).
- 8) Yamamoto, I., Kuze, J., Kimura, T., Watanabe, K., Kondo, S., Ho, I. K., The potent depressant effects of *N*³-phenacyluridine in mice. *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 514-516 (1994).
- 9) Kimura, T., Miki, M., Kobana, K., Yao, S. C., Watanabe, K., Kondo, S., Ho, I. K., Yamamoto, I., Hypnotic mechanism of *N*³-phenacyluridine: formation of active metabolites and their binding affinity on synaptic membrane. *Nucleic Acid Symposium Series*, **35**, 61-62 (1996).
- 10) Kimura, T., Miki, M., Watanabe, K., Kondo, S., Ho, I. K., Yamamoto, I., 2000, Metabolism of a novel hypnotic, *N*³-phenacyluridine, and hypnotic and sedative activities of its enantiomer metabolites in mice. *Xenobiotica*, **30**, 643-653 (2000).

P-9

無拘束ラットによるモルヒネの血漿コルチコステロン上昇作用と視床下部室傍核ドパミン代謝回転の相関

○岸岡史郎、深澤洋滋、清水典史、福永優子、前田武彦、
山本博之
和歌山県立医科大学薬理学教室

緒言

モルヒネを投与すると corticotropin-releasing factor (CRF) 遊離を介して視床下部-下垂体-副腎皮質系 (HPA-axis) が活性化され、ラットでは血漿コルチコステロン (PCS) が上昇する。我々は、このモルヒネによる PCS 上昇が、オピオイド受容体拮抗薬またはドパミン (DA) D_2 受容体拮抗薬処置により消失することを明らかにしてきた (1)。一方、これまで視床下部室傍核 (PVN) はノルアドレナリン作動性神経の神経支配を受け HPA-axis の活性化に重要な役割を果たしていると報告されてきた (2)。しかし近年、PVN は DA 作動性神経の神経支配も受け、CRF の分泌調節に DA 神経系が関与していることが示唆されている (3)。また、Ahtee らは、モルヒネ投与により視床下部の DA 代謝回転が亢進することを報告している (4)。すなわち、モルヒネによる HPA-axis の活性化には、PVN の DA 作動性神経の関与が示唆されているが、これに関する報告はされていない。

これまで、脳内モノアミン含量は摘出脳組織から測定されてきたため、個々の動物におけるその経時変化を観察することが困難であった。しかし、脳 Microdialysis 法が開発され、無拘束動物における脳細胞外液中モノアミンとその代謝産物の経時変化を観察できるようになった。

今回、Microdialysis 法に従い、モルヒネ i.p.投与後の視床下部 PVN における細胞外液中 DA、3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) および homovanillic acid (HVA) の経時変化ならびに PCS 上昇作用の経時変化を同時に観察することにより、モルヒネの PCS 上昇作用における PVN の DA 神経系の関与について検討した。

実験方法

実験にはSD系雄性ラットを使用した。Microdialysisには膜長1mmのProbe (CMA11、BAS)を使用した。実験に先だってPaxinos and Watsonの脳図譜に従いMicrodialysisのためのGuide Cannulaを植込み (AP; -1.3 mm、L; 0.3 mm、D; -8.7 mm)、同時に、連続採血のためのCannulaを右外頸静脈に挿入固定した。術後3日間の回復期間をおいて実験を行なった。Microdialysis probeにはリンゲル液を1 μ l/minの流速で灌流し、サンプルは30分間隔で採取した。血漿モルヒネおよびPCS測定のための採血 (0.4 ml) は、1時間間隔で行なった。いずれもモルヒネ (5または10mg/kg) 投与後5時間の経時変化を観察した。DA、DOPACおよびHVA溶液 (5×10^{-7} M)のMicrodialysis probeによる回収率は、それぞれ $6.11 \pm 0.64\%$ (n=7)、 $7.48 \pm 0.77\%$ (n=7) および $8.28 \pm 0.72\%$ であった。DAおよびその代謝産物ならびに血漿モルヒネの測定はHPLC-ECD法に従い、PCSの測定は蛍光法に従った。

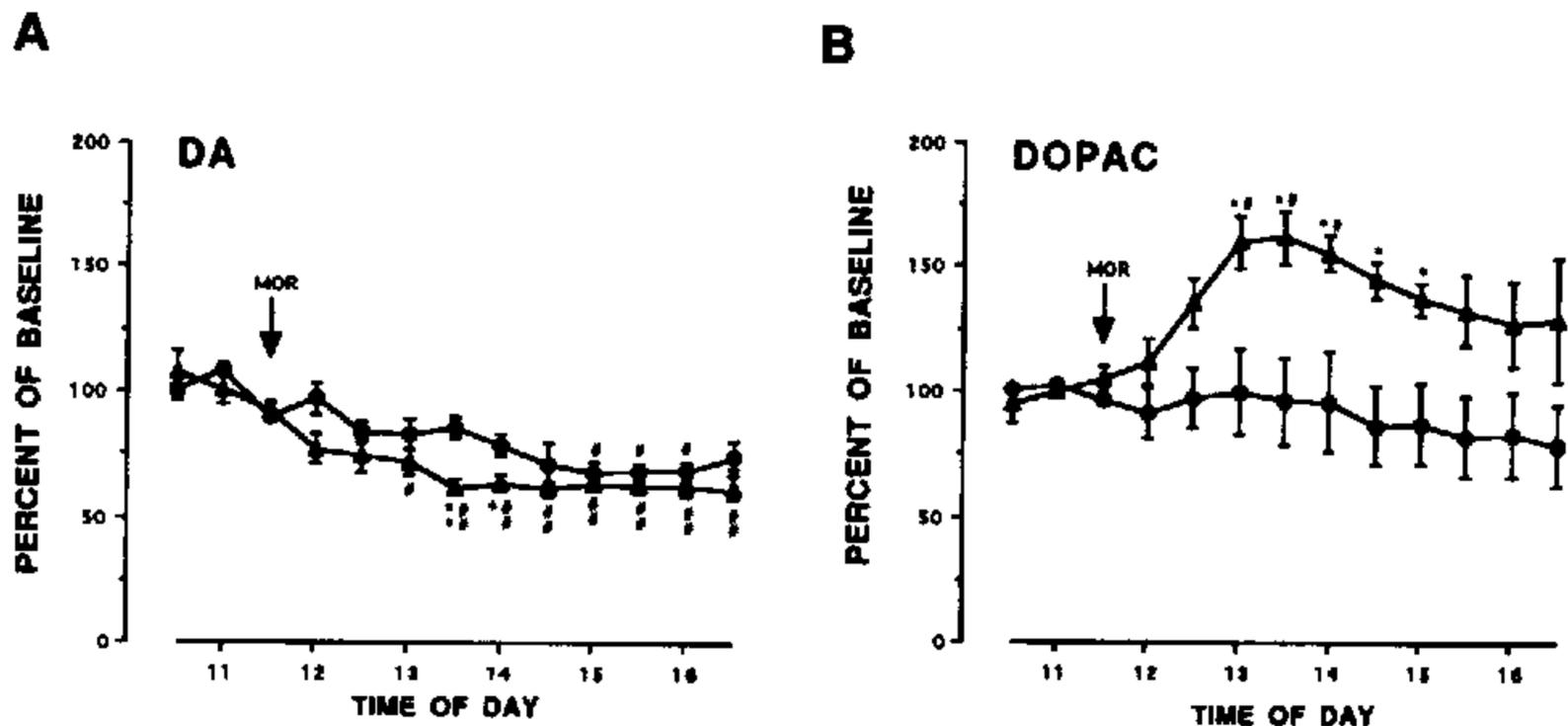


Fig. 1. Time-course of extracellular dopamine (DA; A) and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC; B) levels in the hypothalamic paraventricular nucleus, after the administration of morphine (MOR) 5 mg/kg, i.p. (closed circle; n=3) and 10 mg/kg, i.p. (closed triangle; n=4). Perfusates were collected every 30 min and each value was expressed as the percent of the mean three baseline outputs. Each point represents the mean and vertical bars indicate the S.E.M. Vs. baseline control, ## $P < 0.01$, # $P < 0.05$. Vs. respective closed circle, * $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

結果および考察

モルヒネ 10 mg/kg 投与により、PVN の DA 量がモルヒネ投与後 1.5~5 時間有意に減少した (Fig. 1A)。DOPAC 量は逆にその投与後 1.5~3.5 時間有意に増加し (Fig. 1B)、HVA 量も増加傾向にあった (データは示さず)。すなわち、モルヒネ投与により DA の代謝回転が亢進すると考えられた。しかし、モルヒネ 5 mg/kg では、DA 量は減少したものの、DOPAC および HVA 量には著明な影響は認められなかった。

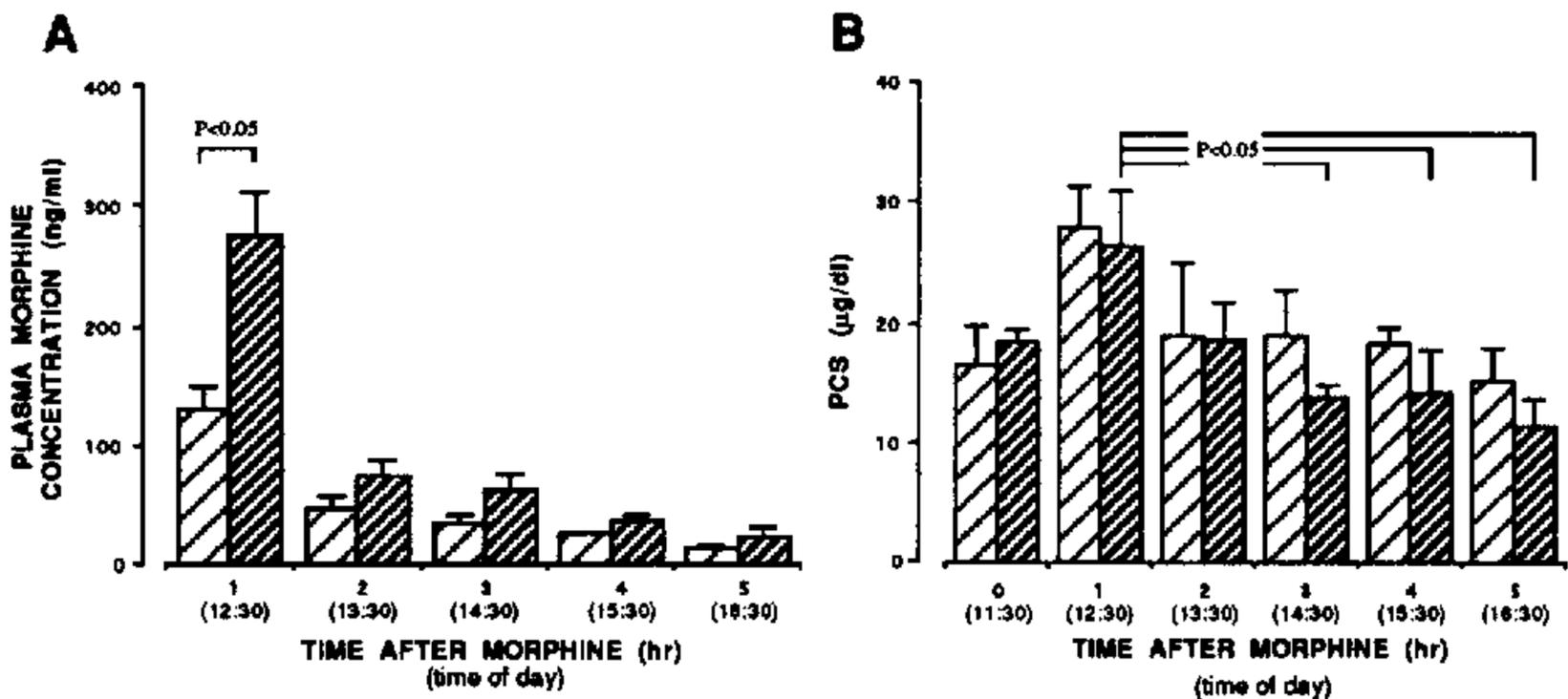


Fig. 2. Time-course of plasma morphine concentration (A) and plasma corticosterone level (PCS; B) after the administration of morphine 5 mg/kg, i.p. (lightly hatched column; n=3) and 10 mg/kg, i.p. (heavily hatched column; n=4). Blood samples were collected immediately before and every 1 hr after morphine. Each column represents the mean and vertical bars indicate the S.E.M.

血漿モルヒネ濃度は、モルヒネ (5 および 10 mg/kg) 投与 1 時間後に最高値を示し、モルヒネ 10 mg/kg 投与 2 時間以降の血漿モルヒネ濃度は、PVN の DA 代謝回転の亢進が明らかでなかったモルヒネ 5 mg/kg 投与 1 時間後のそれよりも低値を示した (Fig. 2A)。DA および DOPAC 量の有意な変化がモルヒネ投与 1.5 時間後より認められたことから、DA 代謝回転の亢進は血漿モルヒネ濃度上昇の経時変化に一致せず、それが低下した後に出現すると考えられた。

Suemaru らは、モルヒネ 20 mg/kg, i.p. 投与 15 分後には血中 adrenocorticotrophic

hormone が、30 分後には PCS が有意に増加したことを報告している (5)。すなわち、モルヒネ投与 15~30 分後には HPA-axis がすでに賦活されていると考えられる。本実験においては、PCS 値はモルヒネ投与 1 時間後に最大値を示し、2 時間後以降はコントロール値にまで低下した (Fig. 2B)。また、PCS 値の経時変化は、血漿モルヒネ濃度のそれと類似していた。しかし、DA 代謝回転の亢進は少なくともモルヒネ投与後 1.5~3.5 時間に認められたことから、モルヒネによる DA 代謝回転の促進は、それによる PCS 上昇作用の消失後に出現したと考えられる。以上の結果より、PVN の DA 神経系がモルヒネによる HPA-axis 活性化に関与していない可能性が示唆された。

引用文献

- 1) 山西徹治：モルヒネの単回投与および禁断による血漿コルチコステロン上昇におけるドパミン D2 受容体の関与 和歌山医学 44(2), 189-206 (1993)
- 2) Leibowitz SF, Diaz S and Tempel D. : Norepinephrine in the paraventricular nucleus stimulates corticosterone. Brain Res 1989; 496: 219-227
- 3) Liposits Zs and Paull WK. : Association of dopaminergic fibers with corticotropin releasing hormone (CRH)-synthesizing neurons in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. Histochemistry 1989; 93: 119-127
- 4) Ahtee L, Attila LMJ, Carlson KR and Haikala H. : Changes in brain monoamine metabolism during withdrawal from chronic oral self-administration of morphine and in response to a morphine challenge in the withdrawn state. J Pharmacol Exp Ther 1989; 249: 303-310
- 5) Suemaru S, Hashimoto K and Ota Z. : Effects of morphine on hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF), norepinephrine and dopamine in non-stressed and stressed rats. Acta Med Okayama 1985 39: 463-470

P-10

乳房切断術中でのナロキソン鎮痛効果の発現 体性感覚誘発電位とストレスホルモン変動を基盤 として—

新井としみ¹, 内野博之¹, 一色 淳¹, 渡辺泰雄²

¹東京医科大学麻酔学教室, ²薬理学教室

基礎医学実験においては, オピオイド系鎮痛薬の競合的拮抗薬であるナロキシンの鎮痛効果に関する報告はある。しかしながら, 臨床研究においてはナロキソン鎮痛に関する所見は少ない。本研究は, 手術侵襲および麻酔リスクの少ない乳房切断術を中心として, 鎮痛効果発現が期待される少量ナロキシンの薬理効果をフェンタニル併用群で体性感覚誘発電位 (SEP) ならびにストレス関連ホルモンである ACTH および β -エンドルフィンの変動を基盤として考究した。

【対象と方法】

対象は中枢神経系に異常を認めない 20~70 歳 (ASA 分類 1~2) の乳癌予定手術患者 20 名で, 事前に研究の主旨を十分に説明し同意を得た。

患者は無作為に以下の 4 群に分類した。すなわち, 1) フェンタニル 5 μ g/kg (以下同様) 単独投与群 (F 群), 2) フェンタニル+ナロキソン 0.25 μ g/kg/h 持続投与群 (FN0.25 群), 3) フェンタニル+ナロキソン 0.5 μ g/kg/h 持続投与群 (FN0.5 群), 4) フェンタニル+ナロキソン 1.0 μ g/kg/h 持続投与群 (FN1.0 群) とした。

前投薬としてアトロピン 0.5mg とヒドロキシジン 25mg あるいは 50mg を筋注した。手術室入室後 SEP 測定のための電極を装着し, プロポフォール 1mg/kg を静脈内に注入後刺激し, コントロール値を測定した。導入はプロポフォール 1mg/kg, フェンタニル 5 μ g/kg, ベクロナウム 0.15mg/kg を静脈内投与し十分な麻酔深度を得た後, 気管挿管した。維持は亜酸化窒素 66%, 酸素 33%, 呼気終末イソフルラン濃度 0.8%, 呼気終末二酸化炭素分圧 30~35mmHg を保つように調節呼吸を行い, 各群毎に設定量のナロキソンを導入時から測定終了時まで持続投与した。

SEP 測定については, 既報の如く日本光電社製 Neuropack II を使用した。測定時間は執刀前, 手術開始 30 および 60 分後の 3 時点とした。刺激電極は手関節正中神経で末梢側を陽性, 中枢側を陰性とし, 基準電極は前額部, 導出電極は Shagass 点にそれぞれ装着した。刺激条件は刺激時 0.2msec の矩形波, 刺激強度 15mA, 周期 2Hz, Hi cut 100Hz, Low cut 50Hz, 200 回加算, 解析時間 50msec とした。測定された SEP 波形から頂点潜時を計測し, 刺激から 13msec 前後の陽性頂点を P13 とし,

19msec 前後の陰性頂点を N19 とした。また P13 の頂点と N19 の頂点 (peak to peak) を振幅として計測し変動を解析した。

血中の ACTH ならびに β -エンドルフィンの測定は Radio Immuno Assay 法にて施行した。測定時間は執刀前、手術開始 30 および 60 分後の 3 時点とした。

統計学的解析は、一元配置分散分析法 (Fishers test) を用いて比較し、 $p < 0.05$ を有意とした。尚、得られた成績は平均値および標準偏差で示した。

【結果】

1) SEP の経時的変動

各群の latencyP13 および latencyN20 の経時的変動は、全ての群において注入前と比較すると有意な変動は認められなかった。一方、各群の amplitude の経時的変動は、F 群において注入前と比べると 30 および 60 分後に増加傾向を認めた (Fig. 1)。FN1.0 群においては、注入前と比べると注入 30、60 分後にそれぞれ有意な減少が認められ ($p < 0.05$)、FN0.25、FN0.5 群においては、注入 30、60 分後に減少傾向が認められた (Fig. 1)。

各群で比較したところ、注入前では各群変化が認められなかったが、注入 30 分後では F 群と比較してナロキソン併用群では有意に減少した (Fig. 1)。注入 60 分後では FN1.0 群は F 群と比較して有意に減少したが、FN0.25、FN0.5 群においては有意ではないが減少を示した (Fig. 1)。

2) ACTH の経時的変動

ACTH の変動は、注入 30 分後では F 群と比べるとナロキソン併用群 (FN 群) において有意な低下が認められた。注入 60 分後では、F 群と比べると FN0.5 群において有意な低下が認められたが、FN1.0 群の値は F 群とほぼ同値であった ($p < 0.05$)。

注入前の値と比較すると、注入 30 分後に F、FN1.0 群では有意な増加を認め、注入 60 分後ではすべての群で有意な増加を認めた ($p < 0.05$)。

3) β -エンドルフィンの経時的変動

各群の β -エンドルフィンの変動は、注入 30 および 60 分後において F 群と比べるとナロキソン併用群において有意な低下が認められた ($p < 0.05$)。

注入前と注入 30、60 分後で比較すると、F 群は増加傾向を認め、ナロキソン併用群では減少傾向を認めた。

【まとめ】

今回の研究から、フェンタニル少量単独投与では十分な鎮痛効果が得られなかったと思われる結果が、少量ナロキシソンの併用により鎮痛効果の増強を認める結果となった。すなわち、ヒトにおいて $1 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$

以下のナロキソンは鎮痛増強効果を促すことが明らかとなった。従来の基礎医学的研究成績を考慮すると、少量ナロキソンによる鎮痛効果は、神経終末に存在する κ -オピオイド受容体を介すエンケファリン遊離促進によるものと考えられる。

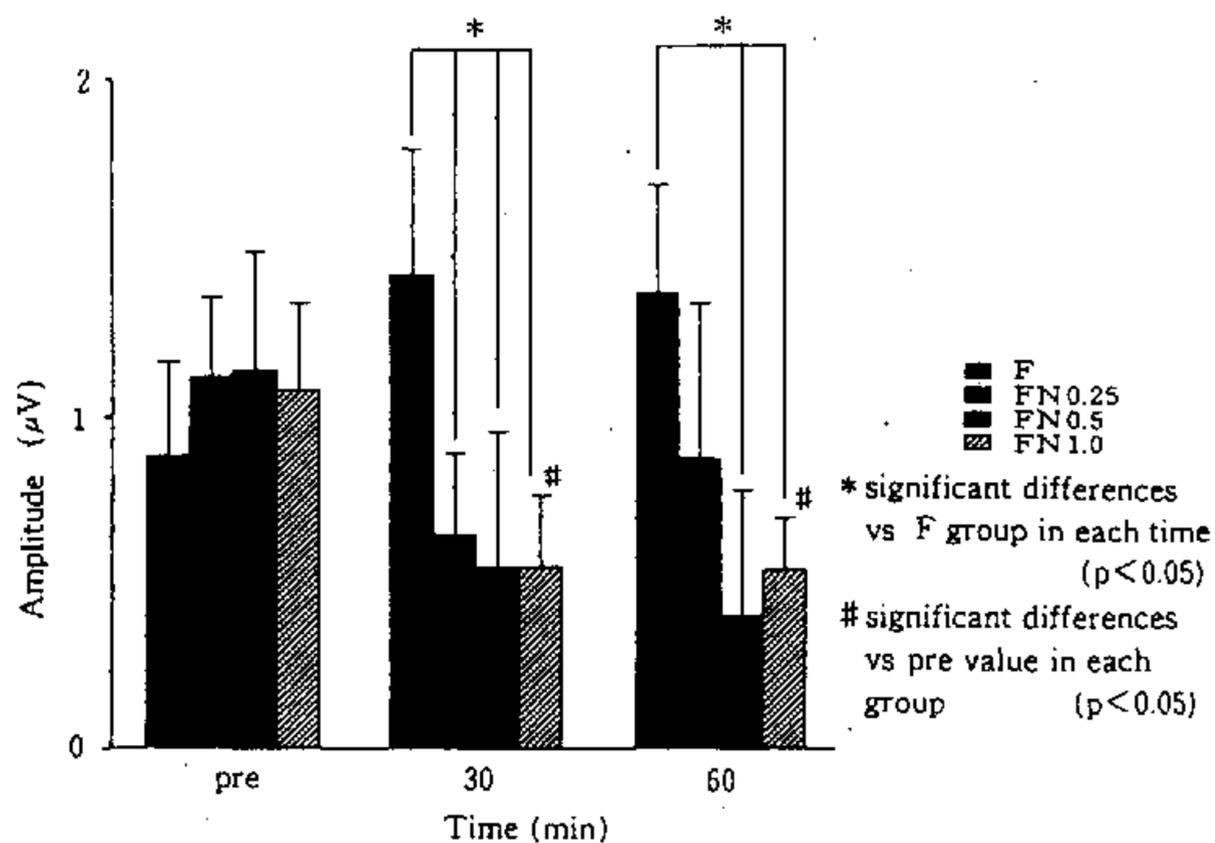


Fig. 1 Changes in SEP amplitude.

P-11

新規鎮痛薬 OT-7100 の急性および末梢神経因性疼痛モデルにおける痛覚過敏改善効果

○佐藤誠治¹, 安田恒雄¹, 岩本武史¹, 三木新也¹, 吉永至宏¹, 藤原寛¹, 野口光一², 仙波恵美子³

¹ 株式会社大塚製薬工場栄養研究所, ² 兵庫医科大学解剖学第二講座, ³ 和歌山県立医科大学解剖学第二講座

新規合成化合物 OT-7100 (5-n-butyl-7-(3, 4, 5-trimethoxybenzoylamino) pyrazolo [1,5-a] pyrimidine) の痛覚過敏抑制作用をラットの実験的疼痛モデルにおいて検討した. 実験モデルとしてはイースト誘発疼痛モデルおよびサブスタンス P 誘発疼痛モデルならびに末梢神経因性疼痛のモデルとされている坐骨神経絞扼性損傷モデル (Bennett モデル)¹⁾ を用いた.

イースト誘発疼痛モデルにおいて OT-7100 は 3 および 10 mg/kg 経口投与により低下した圧刺激による疼痛閾値を回復させた. 代表的な非ステロイド性抗炎症薬インドメタシンも 1 および 3 mg/kg 経口投与によりイースト誘発疼痛モデルの低下した疼痛閾値を回復させた. サブスタンス P 誘発疼痛モデルにおいて OT-7100 は 0.1 - 3 mg/kg 経口投与により低下した圧刺激に対する疼痛閾値を回復させたが, インドメタシンはサブスタンス P 誘発疼痛モデルでは作用を示さなかった (Fig 1). Bennett モデルにおいて OT-7100 は 10 および 30 mg/kg 連続経口投与により低下した損傷足の圧刺激に対する疼痛閾値を回復させたが, 非損傷足の疼痛閾値には影響を与えなかった (Fig 2). この時, OT-7100 が有意な作用を発現するまでに 3 日程度の時間を要し, また作用の消失にも同程度の時間を要した. Bennett モデルにおいて OT-7100 は熱刺激に対する損傷足と非損傷足の反応潜時の差で示される痛覚過敏に対しても抑制作用を示した. インドメタシンは Bennett モデルの圧刺激に対する疼痛閾値に対して作用を示さなかった (Table 1). 麻薬性鎮痛薬モルヒネは経口投与では Bennett モデルの損傷足の疼痛閾値に有意な作用を示さなかった. 臨床において末梢神経因性疼痛の治療に用いられている三環系抗うつ薬アミトリプチリンおよび抗痙攣薬クロナゼパムは Bennett モデルにおいて低下した損傷足の疼痛閾値を回復させたが, 同時に非損傷足の疼痛閾値も上昇させた. この場合も Bennett モデルの疼痛閾値が有意に変化するまでに数日を要し, また作用の消失にも 1~2 日を要した.

これらの結果から、OT-7100 は既存の薬剤とは異なる、末梢神経因性疼痛を改善する新たなタイプの鎮痛剤となる可能性が示唆される。

参考文献：

1) Bennett GJ and Xie YK: A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33, 87-107, 1988.

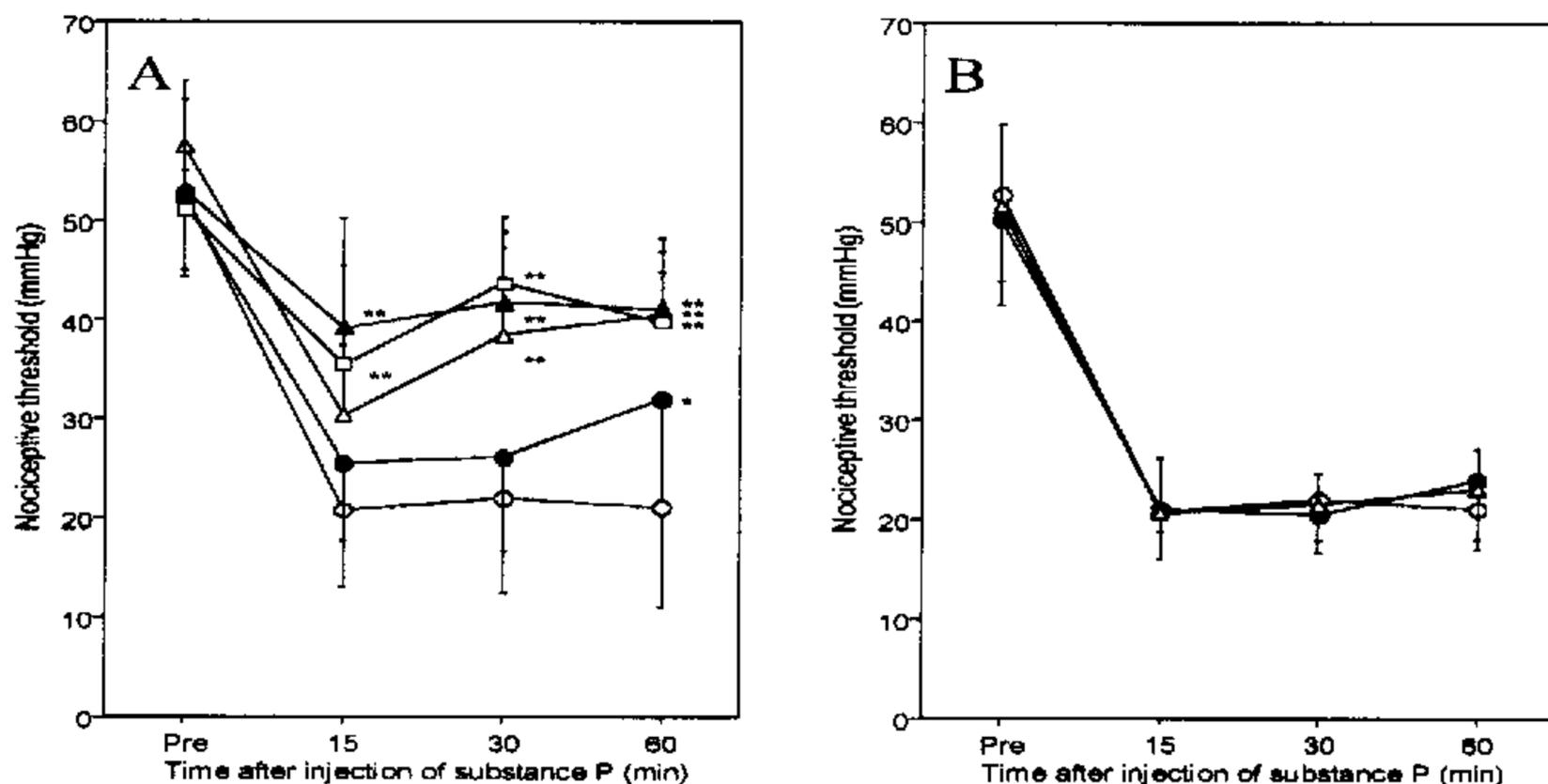


Fig 1. Time course of inhibitory effects of OT-7100 and indomethacin on nociceptive threshold in substance P-induced hyperalgesia in rats. The agent was administered orally 1 hr before injection of substance P (25 ng/site) into the left hind paw. Data are expressed as mean \pm SD, n=7 rats per group. In panel A: ○: control, ●: OT-7100 - 0.1 mg/kg, △: OT-7100 - 0.3 mg/kg, ▲: OT-7100 - 1 mg/kg, □: OT-7100 - 3 mg/kg. In panel B: ○: control, ●: indomethacin - 3 mg/kg, △: indomethacin - 10 mg/kg. *p<0.05, **p<0.01 vs. control, Dunnett's multiple comparison test.

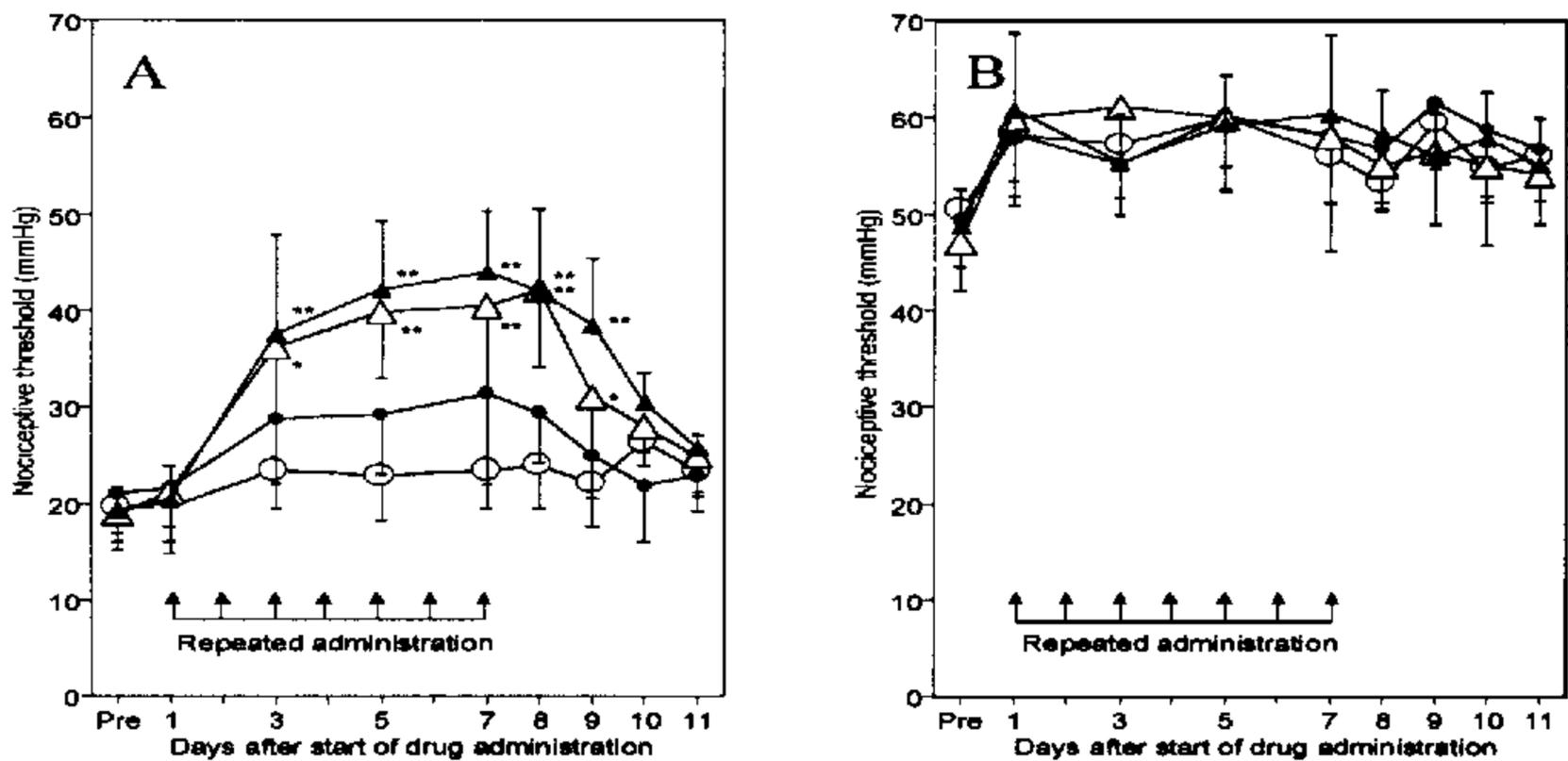


Fig 2. Time course of inhibitory effects of OT-7100 on hyperalgesia measured by the noxious mechanical pressure-evoked hind paw withdrawal reflex in the Bennett model in rats (A, injured paw and B, uninjured paw: ○: control, ●: OT-7100 - 3 mg/kg, △: OT-7100 - 10 mg/kg, ▲: OT-7100 - 30 mg/kg). The agent was administered orally once daily for 7 days. Data are expressed as mean \pm SD, n=6-7 rats per group. *p<0.05, **p<0.01 vs. control, Dunnett's multiple comparison test.

Table 1. Effects of various drugs on nociceptive threshold in the Bennett model

Drug	Class	Mechanism	Pain threshold	
			Injured	Uninjured
OT-7100	Analgesic	Under study	↑	→
Indomethacin	NSAID	COX inhibitor	→	→
Amitriptyline	Antidepressant	NE, 5-HT uptake Inhibitor	↑	↑
Clonazepam	Anticonvulsant	Benzodiazepine agonist	↑	↑
Morphine	Opiate	Opiate agonist	↗	↑

P-12

神経因性疼痛下におけるモルヒネ誘発報酬効果およびドパミン遊離作用の検討

○尾崎 覚、成田 年、矢島義識、水尾圭祐、
青木壺江、鈴木 勉

星薬科大学薬品毒性学教室

【緒言】がん疼痛治療にモルヒネが一般的に使用されるようになってきたが、日本国内においては未だモルヒネの依存性を懸念するためかモルヒネでの治療を躊躇するケースが見られる。しかし、最近の WHO の報告によると、鎮痛を目的として麻薬性鎮痛薬の投与を受けているがん患者では精神依存が形成されないことが明らかにされている。また我々は動物実験においても、カラゲニンやホルマニンによる炎症性疼痛下ではモルヒネの報酬効果が形成されないことを報告している (1, 2)。近年、オピオイドが効きにくい難治性慢性疼痛として神経因性疼痛が問題視されており、この疼痛メカニズムを解明するためさまざまな研究が行われている (3)。しかしながら、神経因性疼痛下におけるモルヒネの報酬効果の検討はこれまで全く行われていない。そこで本研究では、坐骨神経を結紮した神経因性疼痛モデルを用いて、モルヒネ誘発報酬効果ならびにモルヒネの報酬効果発現に重要な中脳辺縁ドパミン神経系の投射先である側坐核におけるドパミン遊離作用について検討した。

【方法】本研究において、動物には ICR 系雄性マウスおよび SD 系雄性ラットを使用した。仮性慢性疼痛モデルは、Seltzer らの方法をマウスおよびラットに応用し (4)、右後足坐骨神経を半周結紮することにより作製した。また、坐骨神経を結紮しないで同様の手術を行った動物を非結紮群とした。これらの動物は手術後 4 日目より以下の実験にて使用した。

1. Conditioned Place Preference (CPP) 法

報酬効果は conditioned place preference (CPP) 法を用いて評価した。条件づけはカウンターバランス方式に従い 1 日 1 回行い、1 日目にモルヒネ 5 mg/kg あるいは溶媒を皮下投与したマウスを白あるいは黒の区画に 60 分間閉じ込め、2 日目にはそれぞれ 1 日目とは逆の操作を行い、これを 6 日間繰り返した。また、条件づけ期間中、モルヒネの代わりに、その溶媒のみの投与を続け、条件づけを行った群を溶媒対照群とした。6

日間の条件づけが終了した翌日を test session とし、モルヒネあるいは溶媒のいずれも処置せずに 15 分間、白・黒の区画を自由に行き来させることにより、それぞれの区画に滞在する時間を測定した。

2. *Microdialysis* 法

ペントバルビタール麻酔下、ラットの坐骨神経を結紮し、その直後に脳定位固定装置に固定した。ステレオ用ガイドおよびマニピレーターを用いてガイドカニューレを側坐核に植え込み、固定後、ダミーカニューレを挿入した。ドパミンは高速液体クロマトグラフ装置、プレカラム分離用カラム、電気化学検出器、恒温水循環器、シグナルクリナーおよびデガッサーから構成される HPLC-ECD システムにて分離定量を行った。手術後 4 日目に、生理食塩液あるいはモルヒネ 8 mg/kg を皮下投与し、投与前のドパミンのピーク面積を 100 %、すなわちベースラインとして、各時間のピーク面積をベースラインに対する百分率で表し評価した。

3. *Tail-flick* 法

モルヒネ (5 mg/kg, s.c., 1, 5.6, 10 nmol/mouse, i.c.v.) をマウスに投与し、皮下投与の場合は投与後 30 分に、脳室内投与の場合は投与後 10 分に、それぞれ抗侵害効果の測定を行った。抗侵害効果は tail-flick 法を用いて評価した。マウスの尾に輻射熱刺激を加え、マウスが輻射熱により尾を振り上げるまでの時間を測定した。また、マウスの尾の損傷を避けるために測定限界を 10 秒に設定した。

【結果・考察】坐骨神経を結紮していない非結紮群において、モルヒネ 5 mg/kg の皮下投与により有意な報酬効果の発現が認められた。しかしながら、坐骨神経結紮群においてはモルヒネの報酬効果が有意に抑制された。このことから、臨床において疼痛下ではモルヒネの精神依存が形成されないという報告は、この神経因性疼痛モデルにおいても同様に確認することができた。モルヒネの報酬効果の発現には中脳辺縁ドパミン神経系の活性化が非常に重要な役割を果たしていることから (5)、本研究では、マイクロダイアリシス法により中脳辺縁ドパミン神経系の投射先である側坐核におけるドパミンの量的変化を検討した。その結果、非結紮群におけるモルヒネによるドパミンレベルの上昇は、坐骨神経結紮群に比較して有意に減弱した。このことから、坐骨神経結紮による神経因性疼痛下では中脳辺縁ドパミン神経系の活性が低下しているために、モルヒネの報酬効果ならびにドパミン遊離作用が有意に抑制されたものと考えられる。炎症性疼痛モデルにおいて、モルヒネ誘発報酬効果の抑制は κ オピオイド受容体の拮抗薬を前処置することにより消失することから、我々は炎症性疼痛下では κ オピオイド神経系の機能が亢進している可能性を示唆している (2)。したがって、坐骨

神経結紮による神経因性疼痛下においても κ オピオイド神経系の機能亢進によりモルヒネの報酬効果が抑制されている可能性が考えられるが、今後、このような検討についても詳細に行う予定である。

神経因性疼痛はモルヒネなどのオピオイドに抵抗性を示す痛みであることが知られている (6)。つまり、坐骨神経結紮下におけるモルヒネ誘発報酬効果の抑制は、モルヒネの薬理効果そのものが減弱しているためとも考えられる。そこで tail-flick 法を用いて、坐骨神経結紮マウスにおけるモルヒネの抗侵害効果を検討したところ、モルヒネ 5 mg/kg の皮下投与により誘発される抗侵害効果は非結紮群と比較して坐骨神経結紮群において有意に減弱していた。しかしながら、モルヒネの脳室内投与により誘発される抗侵害効果の用量反応曲線は両群において有意な変化は認められなかった。このように、脳内においてモルヒネの抗侵害効果の発現が維持されているにも関わらずモルヒネの報酬効果が抑制された事実は非常に興味深い。すなわちこれらの結果は、モルヒネの報酬効果の発現およびドパミン遊離に関与する経路において特異的に何らかの変化が起きていることを示唆しているものと考えられる。以上のことから、神経因性疼痛下においてもモルヒネ誘発報酬効果が抑制され、この抑制には中脳辺縁ドパミン神経系終末の側坐核におけるドパミン遊離作用の減弱に起因していることが明らかにされた。

【引用文献】

- 1) Suzuki T, Kisimoto Y and Misawa M: Formalin- and carrageenan-induced inflammation attenuates place preferences produced by morphine, methamphetamine and cocaine. *Life Sci* 59, 1667-1674 (1996)
- 2) Suzuki T, Kisimoto Y, Misawa M, Nagase H and Takeda F: Role of the κ -opioid system in the attenuation of the morphine-induced place preference under chronic pain. *Life Sci* 64, PL 1-7 (1999)
- 3) Malmberg AB, Chen C, Tonegawa S and Basbaum AI: Preserved acute pain and reduced neuropathic pain in mice lacking PKC γ . *Science* 278, 279-283(1997)
- 4) Seltzer Z, Dubner R and Shir Y: A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 43, 205-218 (1990)
- 5) Funada M, Suzuki T and Misawa M: Role of mesolimbic dopamine system in morphine dependence. *Ann psychiatry* 5, 1-15 (1995)
- 6) Ossipov MH, Lopez Y, Nichols ML, Bian D and Porreca F: Inhibition by spinal morphine of the tail-flick response is attenuated in rats with nerve ligation injury. *Neurosci Lett* 199, 83-86 (1995)

P-13 神経傷害性モデルマウスにおける痛覚過敏に対する ボツリヌス毒素C3の抑制効果

○内田 仁司、叶 迅、井上 誠、植田 弘師
長崎大・薬・分子薬理

緒言

ニューロパチーの代表的な動物モデルである神経傷害性マウスでは、C線維が退縮してできた間隙に、A線維が突起を伸長して侵入し、A線維を介する触刺激が痛み刺激として伝達されることから、疼痛に対する過敏応答が起こっていると考えられる。またボツリヌス毒素C3は、低分子量G蛋白質であるRhoをADPリボシル化して不活性化する。その結果、ミオシン軽鎖ホスファターゼの活性化によるストレスファイバーの形成などの形態学的変化が抑制される。このことから、ボツリヌス毒素C3がニューロパチー時に起こる知覚神経の形態変化を抑制することにより、痛覚過敏やニューロパシックペインを抑制する可能性があると考え実験を行った。

結果および考察

本研究では、実験7日前に部分的に坐骨神経を結紮した神経傷害性モデルマウスに対してホルマリン試験を行った。1.0%ホルマリンを結紮を施した右後肢の足蹠に20 μ l皮下投与し、投与後0-10分間を第1相目、10-30分間を第2相目としてその間のlickingおよびbiting行動を侵害反応とみなし反応時間を計測した。神経傷害性モデルマウスでは、shamマウスと比較すると、第1相反応は変化しないが第2相反応は有意に増加した。またこの痛覚過敏は結紮した側にのみ認められた。ボツリヌス毒素C3(1, 3, 10 pg)を結紮を行う1時間前に脊髄クモ膜下腔内に投与すると、神経傷害性モデルマウスで認められた第2相

反応の増加が用量依存的に抑制された。しかし第1相反応あるいは sham マウスにおける反応には無影響であった。このようにボツリヌス毒素C3が神経傷害時の痛覚過敏を特異的に抑制したことから、神経傷害時の可塑的形態変化には Rho が関与していることが示唆された。このことから今後ボツリヌス毒素C3の臨床への応用が期待される。

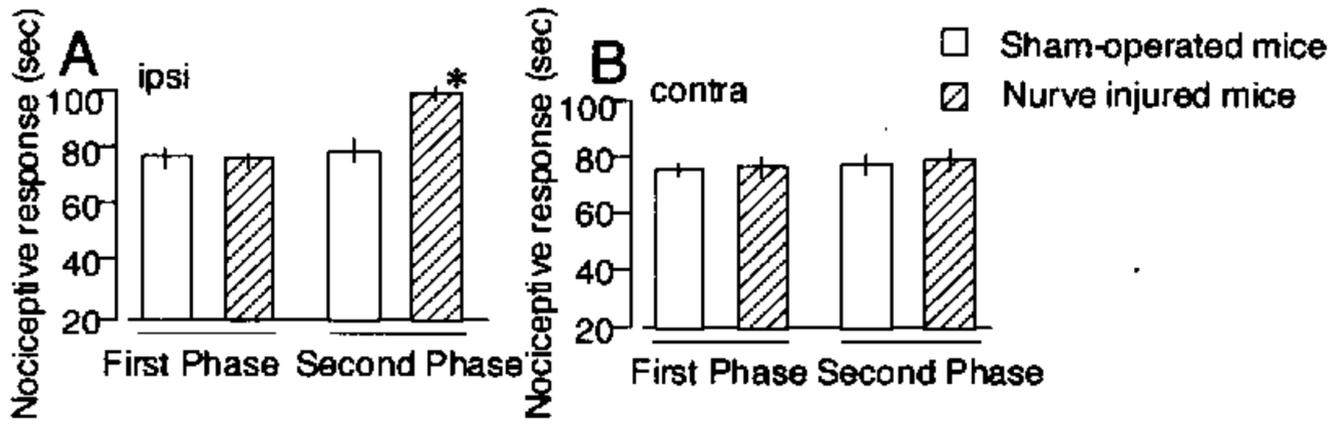


Fig.1 Formalin test in mice with partial sciatic nerve injury. First phase and second phase represent the sum of biting and licking response during 0 to 10 min to 30 min after injection of formalin, respectively. Formalin was injected ipsilaterally (A) or contralaterally (B) to the site of surgery.

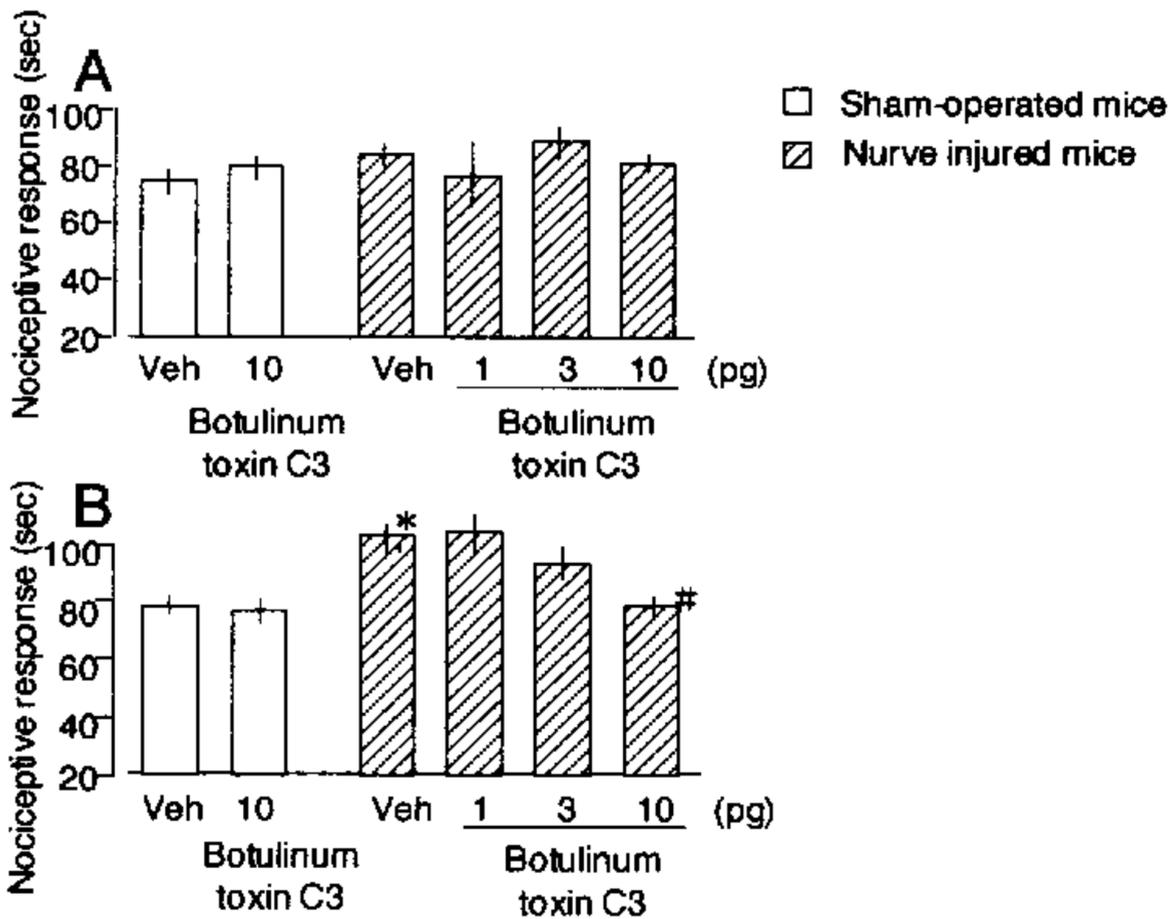


Fig.2 Effect of botulinum toxin C3 on the first phase (A) or the second phase (B) biting and licking responses in sham-operated mice or mice with nerve injury. Botulinum toxin C3 pretreatment was performed 1h before surgery. Formalin was injected ipsilaterally to the site of surgery.

参考文献

- 1) Malmberg AB and Basbaum AI: Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. *Pain* 76, 215-218 (1998)
- 2) Seltzer Z, Dubner R and Shir Y: A novel behavioural model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 43, 205-218 (1990)
- 3) Mayer DJ, Mao J, Holt J and Price DD: Cellular mechanisms of neuropathic pain, morphine tolerance, and their interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 7731-7736 (1999)
- 4) Woolf CJ, Shortland P and Coggeshall RE: Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature* 355, 75-78 (1992)
- 5) Narumiya S and Morii N: Rho rene products, botulinum C3 exoenzyme and cell adhesion. *Cell Signal* 5, 9-19 (1993)
- 6) Arar C, Ott MO, Toure A and Gacon G: Structure and expression of murine mgcRacGAP: its developemental regulation suggests a role for the Rac/MgcRacGAP signaling pathway in neurogenesis. *Biochem J* 343, 225-230 (1999)
- 7) Olienik C, Aktories K and Meyer DK: Differential expression of the small GTP-binding proteins RhoA, RhoB, Cdc42u and Cdc42b in developing rat neocortex. *Brain Res Mol Brain Res* 70, 9-17 (1999)
- 8) Essler M, Amano M, Kruse HJ, Kaibuchi K, Weber PC and Aepfelbacher M: Thrombin inactivates myosin light chain phosphatase via Rho and its target Rho kinase in human endothelial cells. *J Biol Chem* 273, 21867-21874 (1998)
- 9) Wojciak-Stothard B, Williams L and Ridley AJ: Monocyte adhesion and spreading on human endothelial cells is dependent on Rho-regulated receptor clustering. *J Cell Biol* 145, 1293-1307 (1999)
- 10) Barth H, Olenik C, Sehr P, Schmidt G, Aktories K and Meyer DK: Neosynthesis and activation of Rho by Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor (CNF1) reverse cytopathic effects of ADP-ribosylated Rho. *J Biol Chem* 274, 7407-7414 (1999)

慢性疼痛モデルマウスにおける 末梢性疼痛試験法を用いた過敏応答の検出と カプサイシンクリームの有効性の検定

○藤原富美子、井上誠、植田弘師
長崎大・薬・分子薬理

緒言

本研究では、末梢性疼痛試験法を用いて、異なるモダリティーの侵害受容器を刺激する種々の発痛物質を投与した時の疼痛反応に対するカプサイシンクリームの抑制効果と、慢性疼痛モデルマウスにおける過敏応答、そしてその過敏応答に対するカプサイシンクリームの抑制効果について検討した。

結果・考察

1. 種々の発痛物質誘発性侵害反応に対するカプサイシンクリームの抑制効果

代表的な発痛物質であるブラジキニンをマウスの右側後肢足蹠皮下に投与すると、用量依存的な侵害性屈曲反応が認められ(Fig.1A)、この反応は3時間前にマウスの同足後肢足蹠に0.01~0.1%のカプサイシンクリームを塗布することにより用量依存的に抑制された(Fig.1A,B)。また0.1%カプサイシンクリーム塗布1時間後で見られる十分な疼痛抑制効果は少なくとも6時間後まで持続し9時間後、12時間後ではその効果の時間依存的な減弱が認められた(Fig.1C)。そこで、他の発痛物質であるノシセプチン、ATP、プロスタグランジン₂アゴニスト(PGI₂アゴニスト)が誘発する用量依存的屈曲反応に対して0.1%カプサイシンクリームを1時間前に塗布して検討したところ、ノシセプチン(Fig.2A)、ATP(Fig.2B)の反応は抑制されたが、PGI₂アゴニスト(Fig.2C)の反応には無影響であった。このことからブラジキニン、ノシセプチンはSPを一次痛覚伝達物質とするカプサイシン感受性のType IのC線維を、ATPはグルタミン酸(Glu)を一次痛覚伝達物質とするカプサイシン感受性のType IIのC線維を、そしてPGI₂アゴニストはGluを一次痛覚伝達物質とするカプサイシン非感受性のA線維を刺激することが明らかになった。

2. 糖尿病性および神経傷害性慢性疼痛モデルマウスにおける侵害刺激に対する過敏応答とカプサイシンクリームの疼痛抑制効果

ストレプトゾトシン(200mg/kg)をマウスの尾静脈に投与し、血清グルコース値が300mg/dl以上のものを糖尿病マウスとした(Ohsawa, M. et al, 1998)。基剤を3時間前に塗布した糖尿病マウスの右側後肢足蹠皮下にブラジキニンを投与したときの用量依存的屈曲反応曲線は、正常時のそれと比べて100~1000倍低用量側にシフトしており過敏応答が認められた(Fig.3A)。この過敏応答は0.1%カプサイシン

クリームを 3 時間前に塗布することにより顕著に抑制された。また同様の過敏応答は、 PGI_2 アゴニストにおいても認められ(Fig.3B)、この過敏応答は 0.1%カプサイシンクリームを 3 時間前に塗布することにより顕著に抑制された。一方、坐骨神経の半結紮により作成した神経傷害性モデルマウス (Malmberg and Basbaum 1998) においてもブラジキニン(Fig.4A)、 PGI_2 アゴニスト(Fig.4B)に対する 1000 倍もの過敏応答が認められ、この過敏応答も 0.1%カプサイシンクリームを 3 時間前に塗布することにより顕著に抑制された。以上のことから、慢性疼痛モデルマウスにおいてブラジキニン並びに PGI_2 アゴニスト誘発性の疼痛反応は 100~1000 倍もの過敏応答を起こし、しかもその過敏応答がカプサイシンクリームにより顕著に抑制されるという 2 つのことが明らかになった。今後臨床へのさらなる応用が期待される。

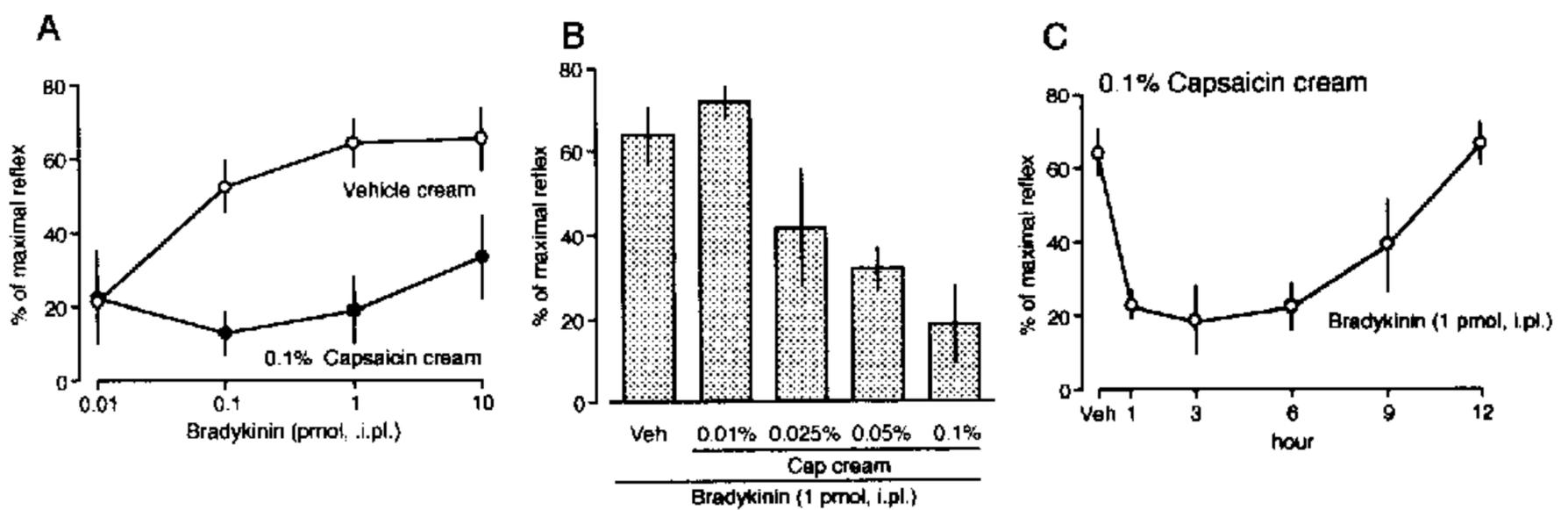


Fig.1 Inhibition of Bradykinin-induced nociceptive responses with Capsaicin cream. A: Bradykinin (0.01-10 pmol, i.pl.)-induced responses were inhibited with 0.1% Capsaicin cream. B: Dose dependent inhibition of Bradykinin (1 pmol, i.pl.)-induced responses with Capsaicin cream (0.01-0.1%). Capsaicin cream was treated 3 hr before drug injection (A,B). C: Inhibition of Bradykinin (1 pmol, i.pl.)-induced responses with 1, 3, 6, 9, 12 hr after 0.1% Capsaicin cream treatment.

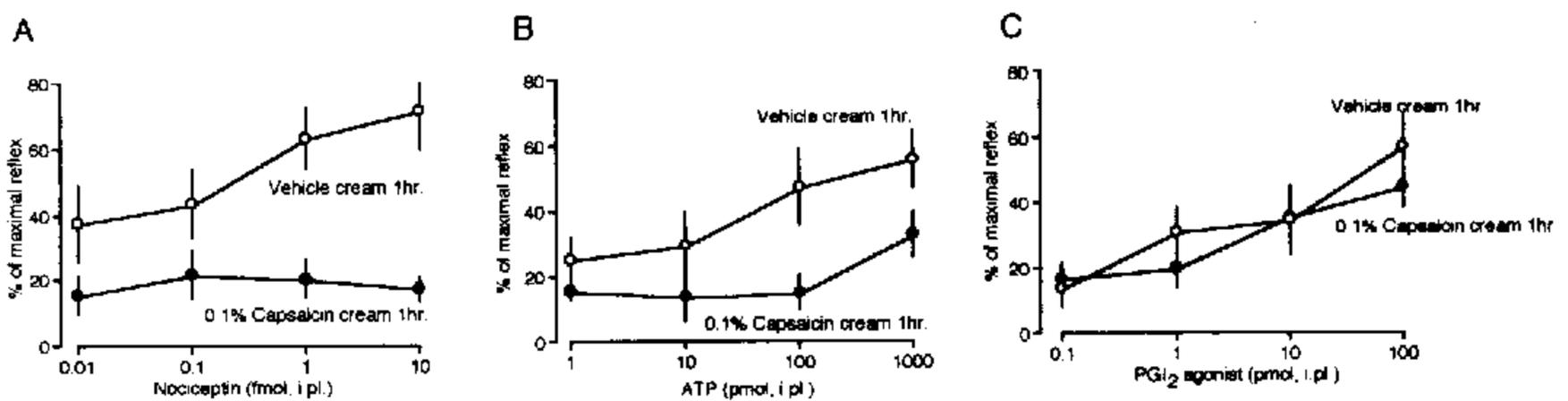


Fig.2 Inhibition of various nociceptive responses with 0.1% Capsaicin cream. Cream was treated 1 hr before drug injection. Nociceptin (A) and ATP (B)-induced responses were inhibited by 0.1% Capsaicin cream treatment, but no effect in PGI_2 agonist-induced responses (C).

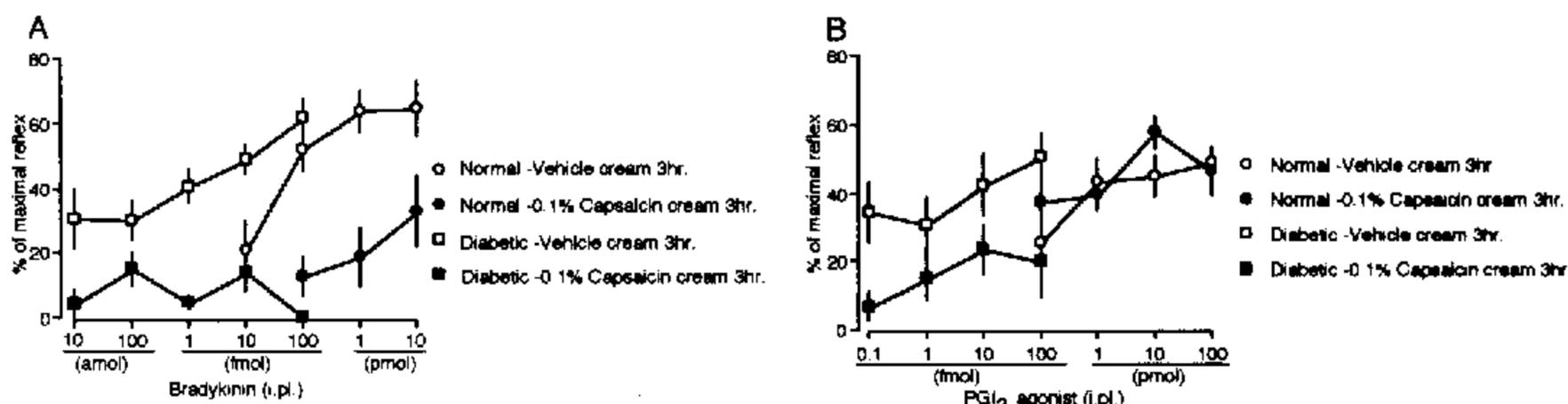


Fig.3 Inhibition of nociceptive responses with Capsaicin cream in diabetic mice. Capsaicin cream was treated 3hr before drug injection. A: Inhibition of Bradykinin responses with Capsaicin cream in normal and diabetic mice. B: Inhibition of PGI₂ agonist induced responses in diabetic mice, but no effect in normal mice.

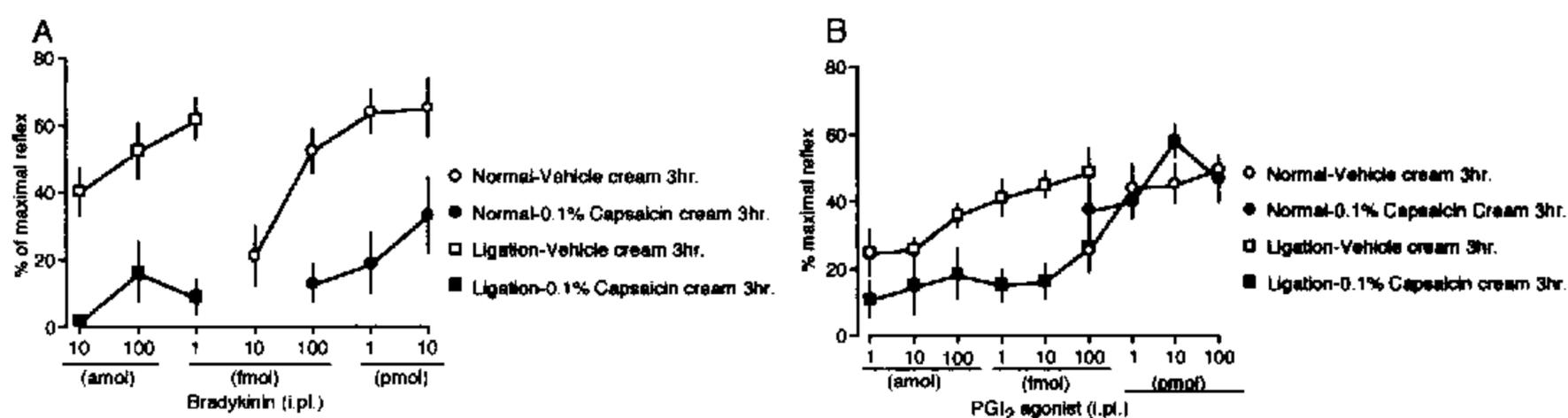


Fig.4 Inhibition of nociceptive responses with Capsaicin cream in Ligation mice. Capsaicin cream was treated 3hr before drug injection. A: Inhibition of Bradykinin responses with Capsaicin cream in normal and Ligation mice. B: Inhibition of PGI₂ agonist induced responses in Ligation mice, but no effect in normal mice.

謝辞

今回実験で使用した ONO-54918-07 (PGI₂ アゴニスト)は小野薬品より、カプサイシンクリームは丸石製薬より供与していただいた。

参考文献

1. Inoue, M., Kobayashi, M., Kozaki, S., Zimmer, A. and UEDA, H. (1998) Nociceptin/orphanin FQ-induced nociceptive responses through substance P release from peripheral nerve endings in mice. Proc. Natl.Acad.Sci. USA, 95, 10949-10953.
2. UEDA, H. and Inoue, M. (2000) In vivo signal transduction of nociceptive response by kyotorphin (tyrosine-arginine) through G α_{11} and inositol trisphosphate-mediated Ca²⁺ influx. Mol. Pharmacol. 57,108-15.

3. Inoue, M and UEDA, H. (2000) Protein kinase C-mediated acute tolerance to peripheral μ -opioid analgesia in the bradykinin-nociception test in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 293, 662-669.
4. Inoue, M., Shimohira, I., Yoshida, A., Zimmer, A., Takeshima, H., Sakurada, T. and UEDA, H. (1999) Dose-related opposite modulation by nociceptin/orphanin FQ of substance P-nociception in the nociceptors and spinal cord. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 291, 308-313.
5. Ye, Xun, Inoue, M. and UEDA, H. (2000) Botulinum toxin C3 inhibits hyperalgesia in partial sciatic nerve injury mice. *Jpn. J. Pharmacol.* 83, 161-163.
6. UEDA, H., Matsunaga, S., Inoue, M., Yamamoto Y. and Hazato, T. (2000) Complete inhibition of purinoceptor agonist-induced nociception by spinorphin, but not by morphine. *Peptides*, In press.
7. Ohsawa, M., Kashiwazaki, T. and Kamei, J. (1998) Modulation of the formalin-induced nociceptive response by diabetes: possible involvement of protein kinase C. *Brain Res.* 803, 198-203.
8. Malmberg, A.B. and Basbaum, A.I. (1998) Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. *Pain* 76,215-222.

P-15

帯状疱疹痛モデルマウスの疼痛反応に及ぼす新規抗けいれん薬 gabapentin の効果

○高崎 一朗¹, 野島 浩史¹, 白木 公康², 倉石 泰¹

富山医科薬科大学・¹薬・薬品作用学, ²医・ウイルス学

【研究の背景】

Gabapentin (1-(aminomethyl)-cyclohexaneacetic acid, Fig.1)は、中枢移行性のよい GABA 類縁体としてデザインされた抗けいれん薬である。近年、gabapentin は種々の神経痛に有効で比較的副作用の少ないことが注目されているが、鎮痛作用機序は未だ明らかではない。本研究では、gabapentin の鎮痛作用機序を解明する一端として、最近我々が開発した帯状疱疹痛モデルマウス^(1, 2)を用い、gabapentin の鎮痛効果を調べた。

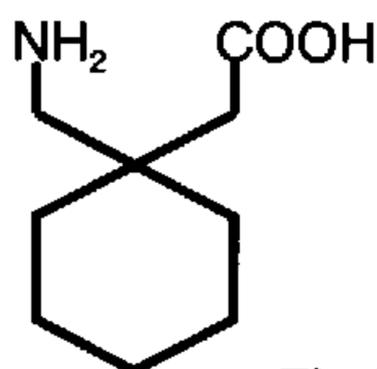


Fig.1 Chemical structure of gabapentin

【実験方法】

実験動物

雌性 BALB/c マウス (実験開始時 6 週齢) を使用した。

HSV-1 感染

マウスを pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) 麻酔下、右後肢および腹部をバリカンと除毛クリームを用いて脱毛した。3 日後、除毛したマウスの右後肢膝関節下部の表皮を乱切し、HSV-1 (7401H 株) 1×10^6 plaque-forming units/10 μ l を滴下・塗布することでウイルスに感染させた。

疼痛反応の測定

疼痛反応の測定は 0.03 g および 1.20 g の von Frey filaments を使用した。Von Frey filaments を後肢足蹠に適用したときに誘発される逃避反応を疼痛反応の指標とした。

薬物投与

Gabapentin は水道水に溶解し pH を 7-7.4 に合わせ、10-100 mg/kg の用量で経口投与した。局所投与は 10-100 μ g を生理食塩水に溶解し、脊髄くも膜下腔内、大槽内および側脳室内投与は 5 μ l、後肢足蹠への皮下注射は 20 μ l の容量で投与した。Morphine は生理食塩水に溶解し、1-5 mg/kg の用量で皮下注射した。 μ オピオイド受容体アンタゴニストの naltrexone は生理食塩水に溶解し、1 mg/kg の用量で gabapentin あるいは morphine 投与の 15 分前に皮下投与した。薬効の検討は接種 6 日目に行い、一部の実験では接種 6 日目と 7 日目に行った。

【実験結果】

HSV-1 接種 5 日後、接種部位と同じ神経支配領域の背部に皮疹が出現し、以後皮疹が帯状を形成し悪化していった。非侵害性および侵害性刺激に対する反応性は接種 4 日目まで変化しなかったが、5 日目より共に増大し、少なくとも 8 日目まで持続した。Gabapentin および morphine の単回投与は HSV-1 感染による疼痛反応を用量依存的に抑制した。Morphine (5 mg/kg) は 1 日 2 回反復投与すると、3 回目から鎮痛効果が明らかに減弱したが、gabapentin (100 mg/kg) を 1 日 2 回反復投与しても、4 回目までは効果が全く減弱しなかった。Morphine (5 mg/kg) の鎮痛効果は naltrexone の前処置により抑制されたが、gabapentin (100 mg/kg) の鎮痛効果は抑制されなかった。Gabapentin の脊髄くも膜下腔内投与は、HSV-1 感染による疼痛反応を用量依存的に抑制した。一方、後肢足蹠、大槽内および側脳室内投与では鎮痛作用は見られなかった。本研究の結果を表 1 にまとめた。

表1. 実験成績のまとめ

投与	用量 (gabapentin)	結果	Morphine
経口	10-100 mg/kg	○	○ (皮下)
脊髄くも膜下腔内	10-100 μ g	○	n.d.
足蹠皮下	10-100 μ g	×	n.d.
大槽内	10-100 μ g	×	n.d.
側脳室内	10-100 μ g	×	n.d.
Naltrexone 前処置 による鎮痛作用	100 mg/kg	抑制されない	抑制
急性耐性	100 mg/kg \times 4	形成されない	形成

【結論】

本研究の成績は, gabapentin が帯状疱疹に伴う疼痛の治療に有効であり, その鎮痛作用は morphine とは異なり, μ オピオイド受容体を介さず, また耐性などの副作用が形成され難いことを示唆する。また gabapentin の鎮痛作用部位の主体は, 脊髄であることが示唆された。

【文献】

1. Takasaki I, Andoh T, Shiraki K and Kuraishi Y.: Allodynia and hyperalgesia induced by herpes simplex virus type-1 infection in mice. Pain 86 (2000) 96-101.
2. Takasaki I, Andoh T, Nitta M, Takahata H, Nemoto H, Shiraki K, Nojima H and Kuraishi Y.: Pharmacological and immunohistochemical characterization of mouse model of acute herpetic pain. Jpn. J. Pharmacol. (in press)

P-16

ラット脊髄膠様質における興奮性シナプス伝達に対するノシセプチンの作用

○羅層、熊本栄一、古江秀昌、吉村恵(佐賀医科大学・生理学)

はじめに

ノシセプチンは、ORL₁ (orphan receptor-like 1) 受容体に高い親和性を示す一方、 μ 、 δ 、 κ 型オピオイド受容体には殆ど親和性を示さない、新しく発見された内因性物質である。ノシセプチンやORL₁受容体は脊髄後角に高い密度で存在し、また、炎症モデルラットでノシセプチンを脊髄腔内投与すると行動学的に鎮痛が起こることが示されている。それ故、ノシセプチンは脊髄後角レベルで内因性の鎮痛に働いている可能性がある。

ところで、脊髄に入力する末梢からの侵害性感覚情報はA δ 線維やC線維により後角の第2層(膠様質)へ伝えられ、そこで痛み情報の修飾や統合が行なわれると考えられている。我々は以前¹⁾、 μ 型や δ 型オピオイド受容体の活性化により膠様質における興奮性シナプス伝達が抑制されることを明らかにした。今回、ノシセプチンが膠様質における興奮性シナプス伝達にどのような作用を及ぼすか調べた。

方法

7~8週令の成熟SDラットを用いた。ウレタン(1.2 g/kg)の腹腔内投与による麻酔を行なった後、脊髄を摘出し酸素負荷したクレブス液(1~3°C)に浸した。ピプラトームを用い、L4~L5腰髄から後根を付けた厚さ600 μ mの横断スライスを作製し、記録チェンバー内に固定した。95%O₂-5%CO₂で飽和したクレブス液(36°C)で1時間灌流した後記録を行なった。実体顕微鏡下で膠様質は比較的透明な帯として視認出来た。膠様質細胞にホールセル・パッチクランプ法を適用し、膜電位を-70 mVに固定すると自発性のグルタミン酸作動性EPSCが観察された。後根を吸引電極で刺激すると同じ保持電位でEPSCが誘起された。神経刺激誘起EPSCがA δ 線維とC線維のいずれの興奮に由来するかの判定は刺激の強さとEPSCの潜時により行なった。感覚神経から膠様質細胞に至る興奮性入力は一シナプス性、或いは多シナプス性に起こるが、EPSCがこれらのいずれに由来するかの判定は以前²⁾と同様に行なった。即ち、A δ 線維誘起の場合には、20 Hzの神経刺激に応答して潜時が一定である時、C線維誘起の場合には、1 Hzの神経刺激に応じてfailureが観測されない時、EPSCを単シナプス性とした。尚、EPSCに対するノシセプチンの作用を調べる時、パッチ電極内液にK⁺チャネル阻害剤(Cs⁺, TEA)とGタンパク作用抑制剤(GDP- β -S)を加え、

膠様質細胞後膜に対するノシセプチン作用をブロックして行なった。

結果

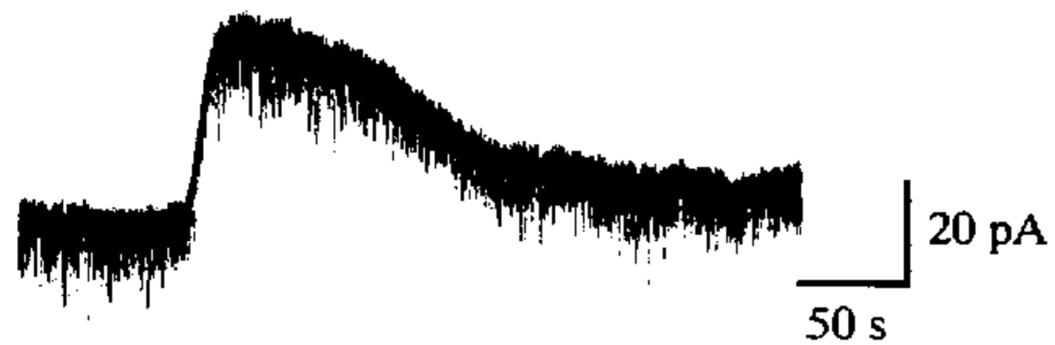
ノシセプチン誘起膜電流

膠様質細胞にノシセプチン(1 μ M)を灌流投与した所、-70 mVの保持電位で外向き電流が誘起された(図1)。この振幅は 27.0 ± 3.3 pA(n=17)であった。この作用は濃度依存性であり、濃度が増加すると電流振幅は大きくなった。濃度-応答曲線をヒルの式に従って解析した所、EC₅₀は0.23 μ Mであった。コントロールとノシセプチン存在下の各々で電流-電圧曲線を調べて解析した結果、ノシセプチン作用により膜コンダクタンスは増加し、ノシセプチン電流の逆転電位はパッチ電極内液とクレブス液の組成から計算されるK⁺の平衡電位に等しいことが明らかになった。又、ノシセプチン電流は小さな内向き整流性を示した。

ノシセプチン(1 μ M)誘起外向き電流に対する種々の薬物の作用を調べた所、TTX(1 μ M; n=4)、ナロキソン(1 μ M; n=4)、ノシスタチン(1 μ M; n=4)の各々は、有意な作用を示さなかった。一方、ORL₁受容体の特異的なアンタゴニストとして知られている[Phe¹Ψ(CH₂-NH)Gly²]ノシセプチン-(1-13)-NH₂(1 μ M)はノシセプチン電流を45%(n=4)減少させた。

NOC 1 μ M

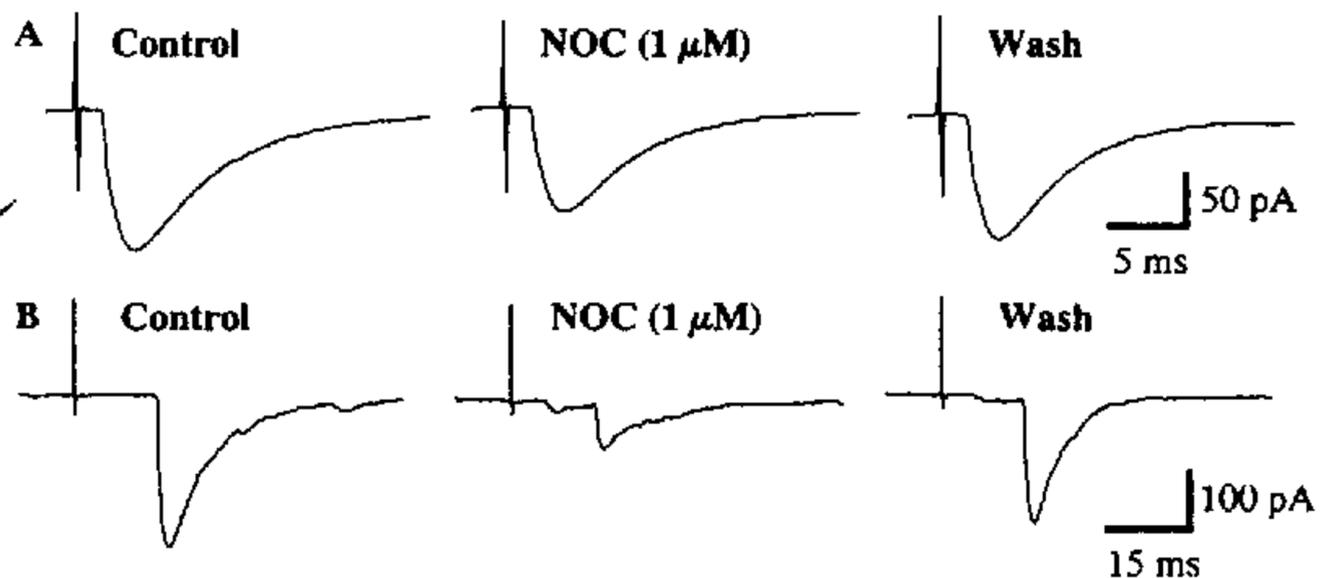
図1 ノシセプチン(NOC; 1 μ M)誘起外向き電流



興奮性シナプス電流に対するノシセプチンの作用

ノシセプチン電流が誘起されない条件下で興奮性シナプス伝達に対するノシセプチンの作用を調べた所、ノシセプチン(1 μ M)は自発性EPSCの頻度や振幅に全く影響しなかった。一方、単シナプス性のA δ 線維やC線維誘起EPSCはノシセプチン(1 μ M)により可逆的に抑制された(図2 A,B)。

図2 ノシセプチン(NOC; 1 μ M)によるA δ 線維誘起EPSC(A)、C線維誘起EPSC(B)の抑制作用



考察

ノシセプチンは膠様質細胞に対しては K^+ チャネルを活性化して膜を過分極させた。この作用はTTXにより抑制されないことから膠様質細胞への直接作用であると考えられる。このノシセプチン作用はナロキソンやノシスタチン存在下で影響を受けない一方、 $[Phe^1\Psi(CH_2-NH)Gly^2]$ ノシセプチン-(1-13)- NH_2 により抑制された。このことは、ノシセプチンの過分極作用が ORL_1 受容体活性化によることを示唆する。

又、ノシセプチンは単シナプス性の $A\delta$ 線維やC線維誘起EPSCを抑制した。このノシセプチン作用として、(1)感覚神経終末におけるグルタミン酸放出量の抑制と(2)シナプス後細胞におけるグルタミン酸感受性減少の2つが考えられるが、後者の可能性はノシセプチンが自発性EPSPの振幅に影響しないことから否定される。即ち、ノシセプチンは感覚神経終末へ作用すると結論される。感覚神経細胞に存在する電位依存性 Ca^{2+} チャネルはノシセプチンにより抑制されることが知られているので、ノシセプチンは神経終末において活動電位発生に伴った Ca^{2+} 流入量を減少することによってグルタミン酸放出量を減少していると考えられる。

結論

痛み情報伝達の制御が行なわれる膠様質において興奮性シナプス伝達に対するノシセプチンの作用を調べた。ノシセプチンは ORL_1 受容体を介して K^+ チャネルを活性化することにより膜を過分極すること、そして、1次感覚神経の $A\delta$ やC線維終末に作用してグルタミン酸放出量を抑制することを明らかにした。これらのシナプス伝達抑制作用はノシセプチンの鎮痛作用に寄与することが示唆される。

参考文献

1. Kohno, T., Kumamoto, E., Higashi, H., Shimoji, K. & Yoshimura, M.; J. Physiol. (Lond.) **518**, 803-813, 1999.
2. Ataka, T., Kumamoto, E., Shimoji, K. & Yoshimura, M., Pain **86**, 273-282, 2000.

P-17

ラット脊髄後根神経節培養細胞における IL-1 β 誘発性サブスタンス P 遊離

森岡 徳光、武田 和美、花田 智彦、秀 和泉、
井上 敦子、○仲田 義啓

(広島大学医学部総合薬学科薬効解析科学)

一次知覚神経は痛覚伝達に関与する神経群である。皮膚などの末梢組織で受容された侵害情報は一次知覚神経を伝播して後根から脊髄後角に入力される。この情報は神経伝達物質の放出を介して、さらに上位中枢へと伝達される。これらの神経伝達物質の一つであるサブスタンス P はアミノ酸 11 個からなる神経ペプチドであり、一次知覚神経細胞体において生合成、貯蔵されている。

一方、インターロイキン 1 β (IL-1 β) は炎症時などにマクロファージなどより分泌されるサイトカインであり、痛覚に対する閾値が低下する状態である痛覚過敏の発症に関与していることが報告されている。そこで今回、ラット脊髄後根神経節初代培養細胞 (DRG 細胞) において、IL-1 β によるサブスタンス P 遊離のメカニズムについて検討した。

Wistar 系雄性成熟ラットより脊髄後根神経節を単離し、酵素処理分散法により初代培養細胞を作成した。培養液中のサブスタンス P は C-18 SEP-PAK カラム (Waters 社) により前処理し、ラジオイムノアッセイにより定量した。またサブスタンス P 前駆体プレプロタキキニン mRNA、およびシクロオキシゲナーゼ-2 (COX2) mRNA 量はリボヌクレアーゼプロテクションアッセイで解析した。

IL-1 β 0.1ng/ml 処置により時間依存的にサブスタンス P 遊離が誘発され、処置 6 時間後にサブスタンス P 遊離量は最大となった。その後は減

少するものの処置 24 時間までサブスタンス P 遊離増大は維持された。さらに処置 6 時間において、IL-1 β は濃度依存的にサブスタンス P 遊離を誘発した。この IL-1 β 誘発性サブスタンス P 遊離は、EGTA、及び IL-1 receptor antagonist 併用により有意に抑制された。これらの結果から、IL-1 β は IL-1 受容体を介し、細胞外 Ca²⁺ 依存的にサブスタンス P 遊離を誘発していることが示唆される。IL-1 β 誘発性サブスタンス P 遊離の作用機序について、まずサブスタンス P 生合成能に対する影響を検討した。IL-1 β 6 時間処置(0.001~10ng/ml)によりプレプロタキキニン mRNA 量の有意な変化は認められなかったことから、IL-1 β 誘発性サブスタンス P 遊離は生合成能増大により引き起こされるのではないことが示された。次にプロスタグランジン系の関与について COX 阻害剤を用いて検討した。COX には、ほとんどの組織に一定に発現している COX-1 と、炎症性刺激などに応じて誘導される COX-2 の 2 種類が存在する。IL-1 β 誘発性サブスタンス P 遊離は、非選択的 COX 阻害剤であるインドメタシン (1 μ g/ml)、およびアスピリン(0.1mM)併用により有意に抑制された。また、COX-2 選択的阻害剤である NS-398(1 μ M)、及びデキサメサゾン(1 μ M)併用によりほぼ完全に抑制された。さらに DRG 細胞において、IL-1 β 0.1ng/ml 処置 1 時間後に COX2 mRNA 発現が認められ、3 時間後に最大となった。その後は徐々に減少するものの、処置 24 時間後まで発現誘導が維持された。さらに IL-1 β による COX-2 mRNA 発現誘導は IL-1 receptor antagonist 併用により有意に抑制された。一方、IL-1 β は COX-1 mRNA 発現には影響を及ぼさなかった。これらの結果から、IL-1 β 誘発性サブスタンス P 遊離は、COX-2 を介したプロスタグランジン産生系が関与することで引き起こされている可能性が考えられる。また、8-bromo-cAMP あるいは 8-bromo-cGMP 処置により、DRG 細胞培養液中へのサブスタンス P 遊離量を無処置群

に比べ有意に増大した。

以上の結果より、DRG 細胞において、IL-1 β は COX2 \sim PGs \sim cAMP 系を介したメカニズムによりサブスタンス P 遊離を誘発する可能性が示唆された。また、8-bromo-cGMP によってもサブスタンス P 遊離が誘導されたことから、DRG 細胞においては NO \sim cGMP 系を介したサブスタンス P 遊離機構の存在も予想される。

P-18

Regulation of [³H]norepinephrine release by δ and κ -2 opioid receptors in human cortex slices

Eun-Young Park

Department of Pharmacology and Institute for Medical Sciences,
Chonbuk National University Medical School, Chonju, Chonbuk, 560-182,
Republic of Korea

Regulations of neurotransmitter release by opioids are well established in mammalian brain. To characterize the regulatory function of opioids on high potassium-evoked release of [³H]norepinephrine (NE) from human cortex slices, we investigated the effects of opioid agonists for μ -, δ -, and κ -receptors, and their sensitivities to competitive opioid antagonists, CTOP, nor-binaltorphimine (nor-BNI) and naltrindole were compared. Fifteen mM of potassium evoked calcium-dependent NE release of 35 % of total tissue content. DPDPE and [D-Ala²]deltorphin II (Delt-II), selective agonists for opioid δ 1-, δ 2-receptors, and ethylketocyclazocine (EKC) were capable of inhibiting K⁺-stimulated release of NE. However, DAMGO or U69593 did not influence NE release even in micromolar doses, indicating that μ - or κ -receptors are not involved. The inhibitory effects of DPDPE and Delt-II were not influenced by CTOP or nor-BNI, but antagonized by low dose of naltrindole and naloxone. The effect of EKC was antagonized by nor-BNI, naloxone and bremazocine, but not by CTOP and naltrindole. Furthermore, among the endogenous opioid peptides tested, Met-enkephalin more potently inhibited the norepinephrine release than β -endorphin and dynorphin A(1-13). These results suggest that δ and κ -2 opioid receptors play major role in regulation of norepinephrine release in human cerebral cortex.

P-19

Heterogeneity of δ -opioid receptors in human cerebral cortex

Ran-Sook Woo

Department of Pharmacology and Institute for Medical Sciences,
Chonbuk National University Medical School, Chonju, Chonbuk, 560-182,
Republic of Korea

In this study, receptor binding profiles of opioid ligands for subtypes of opioid δ -receptors were examined employing [3 H] D-Pen², D-Pen⁵-enkephalin ([3 H] DPDPE) and [3 H]Ile^{5,6}-deltorphan II ([3 H]Ile-Delt II) in human cerebral cortex membranes. [3 H]DPDPE labeled a single population of binding sites with apparent affinity constant (Kd) of 2.72 ± 0.21 nM and maximal binding capacity (Bmax) value of 20.78 ± 3.13 fmol/mg protein. Homologous competition curve of [3 H]Ile-Delt II was best fit by the one-site model (Kd : 0.82 ± 0.07 nM). Bmax value (43.65 ± 2.41 fmol/mg) for [3 H]Ile-Delt II was significantly greater than that for [3 H]DPDPE. DPDPE, [D-Ala², D-Leu⁵]enkephalin (DADLE) and 7-benzylidenaltrexone (BNTX) were more potent in competing for the binding sites of [3 H]DPDPE than for those of [3 H]Ile-Delt II. On the other hand, deltorphan II (Delt II), [D-Ser²,Leu⁵,Thr⁶]enkephalin (DSLET), naltriben (NTB) and naltrindole (NTI) were found to be equipotent in competing for [3 H]DPDPE and [3 H]Ile-Delt II binding sites. Adenylyl cyclase assay and GTP γ S binding study showed clear distinction of coupling of G protein with different receptor types.

These results suggest that there are subtypes of opioid δ -receptors in human cerebral cortex, and these sites are G-protein-linked, physiologically functioning receptors.

P-20

μ 受容体遺伝子各種エクソンのアンチセンス前処置による μ 受容体作動薬誘発数種薬理効果に対する影響

○今井 哲司¹、成田 年¹、矢島 義識¹、溝口 広一²、
曾良 一郎³、Leon F. Tseng²、鈴木 勉¹

¹ 星薬科大学薬品毒性学教室、² ウィスコンシン医科大学麻酔科、
³ 東京都精神医学総合研究所精神薬理研究部門

【緒言】 μ 受容体は、クローニングされる以前から薬理的ならびに生化学的検討により、便宜的に μ_1 および μ_2 受容体に分類されてきた。しかしながら、現在までに単一の μ 受容体遺伝子のみしか同定されていない。それにもかかわらず、薬理的あるいは分子生物学的検討により、数多くの μ 受容体リガンドの反応性の違いが報告されていることから、最近分子レベルでの μ 受容体の細分化、すなわち μ 受容体遺伝子のスプライスバリエーションによるサブタイプの存在の可能性が提唱されている。現在までのところ、 μ 受容体遺伝子には 10 個のエクソンが同定されており、これらの組み合わせの違いから 7 種類のスプライスバリエーション由来の μ 受容体サブタイプの存在が報告されている (1)。1995 年に Pasternak らは、 μ 受容体遺伝子の各エクソンに対するアンチセンス核酸 (AS-ODN) を用いることにより、morphine およびその代謝産物である M6G 誘発抗侵害効果に關与する μ 受容体サブタイプの相違を報告している (2)。すなわち、これらのことは単一の μ 受容体遺伝子より発現するスプライスバリエーション由来のそれぞれの μ 受容体サブタイプが、生体内において異なる生理的機能を有している可能性を示唆している。そこで本研究では、それらの μ 受容体サブタイプの有する生理的機能を評価するために、 μ 受容体遺伝子各種エクソンの AS-ODN 前処置による、 μ 受容体作動薬誘発抗侵害効果および消化管輸送能抑制効果に対する影響について検討した。

【方法】 本研究では、実験動物として ddY 系雄性マウスおよび μ 受容体遺伝子エクソン-1 あるいはエクソン-2 および 3 欠損マウスを使用した。薬物は全て脳室内 (i.c.v.) に投与した。

AS-ODN の投与

AS-ODN の投与は Pasternak らの方法 (2) に従い、1 日目、3 日目および 5 日目に AS-ODN あるいは溶媒として生理食塩液をマウスの脳室内 (i.c.v.) に投与した。な

お、投与は 1 日 1 回とし、それぞれの薬理試験は AS-ODN 最終投与の 24 時間後に行った。

抗侵害効果の評価

抗侵害効果は tail-flick 法を用いて評価した。実験には tail-flick 輻射熱刺激装置を用い、マウスの尾根部から 1-2 cm の部分へ局所的に輻射熱刺激 (100 V) を加えた。マウスが輻射熱により尾を振り上げる反応を仮性疼痛反応とみなし、その発現までの時間 (潜時: latency) を測定した。薬物投与前に basal latency として 2 回、また薬物投与 5、10、15、30 および 60 分後に test latency としてそれぞれ 1 回測定を行った。マウスの尾の損傷を考慮し、10 秒を測定限界 (cut off time) とし、抗侵害効果は以下の式により算出した。

$$\% \text{ Antinociception} = (\text{test latency} - \text{basal latency}) \times 100 / (\text{cut off time} - \text{basal latency})$$

消化管輸送能 (GIT) 抑制効果の評価

消化管輸送能抑制効果は、morphine の i.c.v. 投与 5 分後に charcoal を経口投与し、その 20 分後に腸管を摘出して、腸管の長さおよび charcoal の移動距離を測定することによって以下の式に従い算出した。

$$\% \text{ GI-transit (GIT)} = \text{charcoal 移動距離} \times 100 / \text{腸管の全長}$$

[³⁵S] GTPγS binding assay

マウスの脳標本を morphine、guanosine-5'-diphosphate (GDP) および [³⁵S] GTPγS を含む assay buffer にてインキュベートし、その 2 時間後に glass filter を用いて濾過を行った。次に、glass filter を Tris-HCl buffer で洗浄した後、Soluene-350 および Hionic Fluor を含む scintillation counting vial に移しインキュベートし、組織標本の放射活性を液体シンチレーションカウンターを用いて測定した。

【結果・考察】本実験において、morphine は用量依存的かつ著明な抗侵害効果を示し、これらの効果は、μ 受容体拮抗薬である β-FNA の前処置によりほぼ完全に拮抗されたが、δ 受容体拮抗薬あるいは κ 受容体拮抗薬の前処置により何ら影響を受けなかった。さらに、morphine 誘発消化管輸送能抑制効果に対する各種受容体拮抗薬の影響を検討したところ、β-FNA の前処置によってのみこの効果が拮抗されたことから、morphine 誘発抗侵害効果ならびに消化管輸送能抑制効果は μ 受容体を介して発現していると考えられる。次に、μ 受容体遺伝子のエクソン-1、2、3 および 4 に対する AS-ODN を使用して、morphine 誘発抗侵害効果に対する影響について検討した。

Morphine の i.c.v. 投与により誘発される抗侵害効果はエクソン-1、2、3 および 4 に対するそれぞれの AS-ODN の前処置により、saline 前処置群と比較して有意な抑制が認められた。また、 μ 受容体遺伝子のエクソン-1 あるいはエクソン-2 および 3 欠損マウスを使用し、これらのマウスにおける morphine 誘発抗侵害効果の発現について検討した。Morphine 誘発抗侵害効果は、 μ 受容体遺伝子エクソン-1 あるいはエクソン-2 および 3 欠損マウスにおいてほぼ完全に消失した。さらには、これらのマウスの脳内における morphine による G-protein 活性化作用を検討するために、morphine 存在下での [35 S] GTP γ S 結合量の変化を検討した。野生型マウスの脳内において、morphine による [35 S] GTP γ S 結合量の著明な増加が見られたのに対し、 μ 受容体遺伝子エクソン-1 あるいはエクソン-2 および 3 欠損マウスの脳内においては morphine による [35 S] GTP γ S 結合量の増加は全くみられなかった。これらの結果より、i.c.v. 投与による morphine 誘発抗侵害効果は、脳内の μ 受容体遺伝子エクソン-1、2、3 および 4 由来の μ 受容体サブタイプを介して発現している可能性が示唆された。さらに、 μ 受容体遺伝子エクソン-1、2、3 および 4 に対する AS-ODN 前処置による、morphine 誘発消化管輸送能抑制効果について検討したところ、興味深いことにこの効果はエクソン-1 および 4 に対する AS-ODN の前処置によってのみ有意に抑制された。以上のことより、morphine の i.c.v. 投与により誘発される消化管輸送能抑制効果は、脳内の μ 受容体遺伝子エクソン-1 および 4 由来の μ 受容体サブタイプを介して発現している可能性が示唆された。本実験の結果より、脳内において少なくとも、2つのエクソンの組み合わせより成る μ 受容体サブタイプが存在し、それぞれが抗侵害効果あるいは消化管輸送能抑制効果といった異なる作用の発現を独自に調節している可能性が示唆された。

【引用文献】

- 1) Pan, Y.X., Xu, J., Bolan, E., Chang, A., Mahurter, L., Rossi, G. and Pasternak, G.W.: Isolation and expression of novel alternatively spliced mu opioid receptor isoform, MOR-1F. FEBS Lett 466, 337-340 (2000)
- 2) Rossi, G., Pan, Y.X., Brown, G.P. and Pasternak, G.W.: Antisense mapping the MOR-1 opioid receptor: evidence for alternative splicing and a novel morphine-6 β -glucuronide receptor. FEBS Lett 369, 192-196 (1995)
- 2) 成田 年: 新しいタイプのオピオイドペプチドによる G-protein 活性化機構の検討: [35 S] GTP γ S 結合実験の有用性とその応用. 日本精神薬理学雑誌 18, 107-116 (1998)

P-21

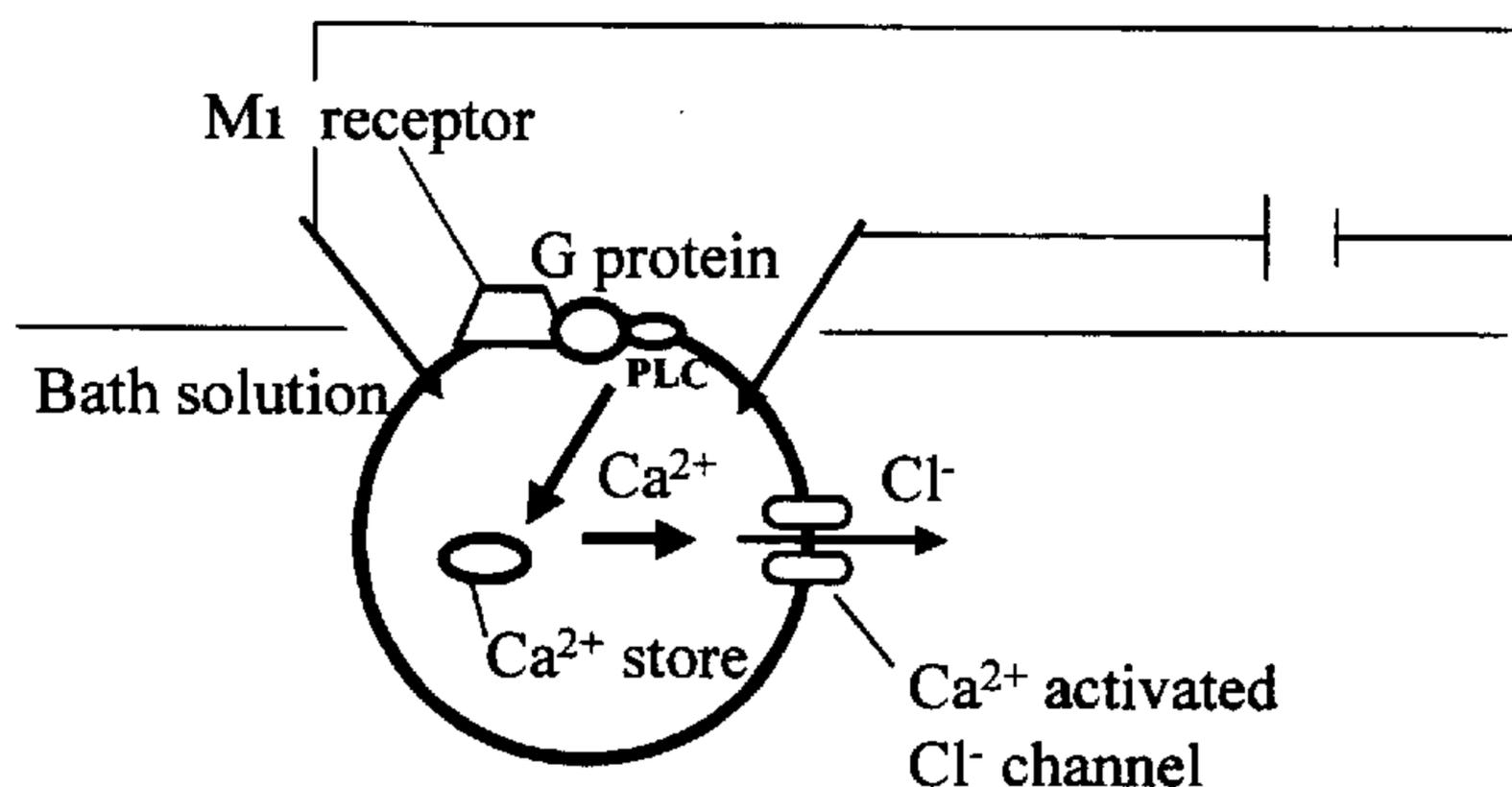
高濃度塩酸モルヒネのムスカリン M1 受容体に及ぼす影響

○¹永瀬喜久、²谷山紘太郎、¹澄川耕二

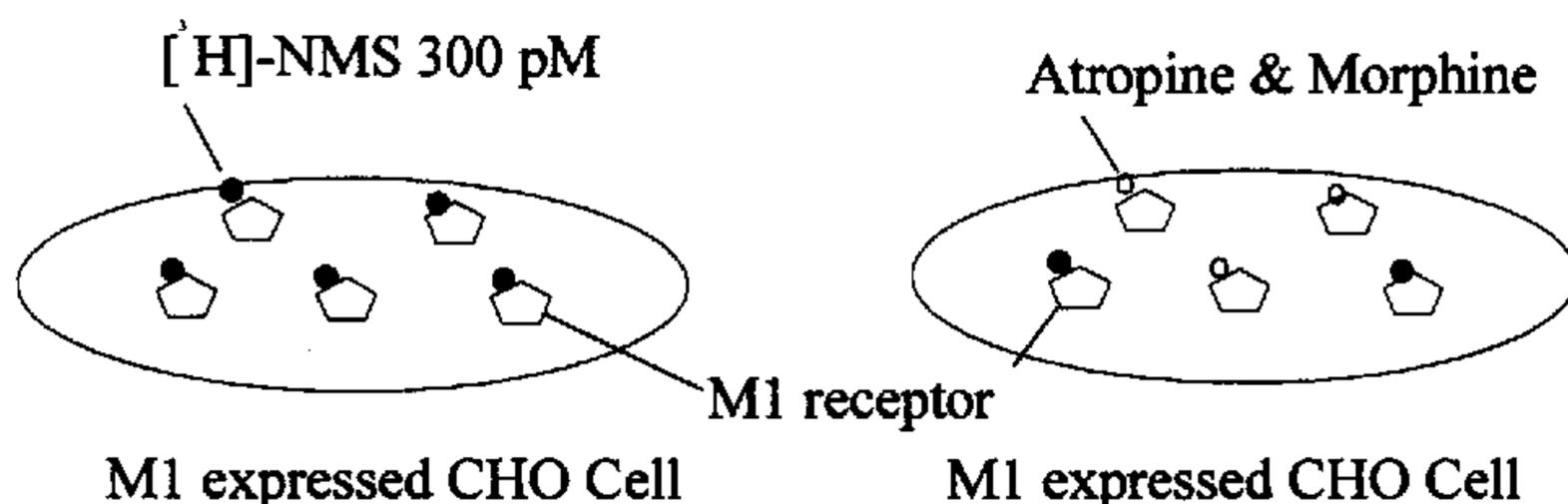
長崎大学医学部 ¹麻酔学教室、²第二薬理学教室

鎮痛薬として広く用いられるモルヒネには、中枢神経系に由来する薬理作用として、オピオイド受容体を介した鎮痛作用の他に、催眠、呼吸抑制、咳反射の抑制、悪心、嘔吐などがある。今回、モルヒネの大量投与の際に生じる意識レベルの低下、いわばモルヒネの持つ催眠作用について、意識の維持、記憶、学習への関与が特に重要だと認識されているムスカリン受容体との関係を検討した。ムスカリン受容体には5つのサブタイプがあるが、その中でも特に大脳に豊富に分布している M1 受容体の cDNA、cRNA を使用した。方法：単一受容体の研究においてすぐれた細胞内情報伝達系を構築できるアフリカツメガエル卵母細胞にラットのムスカリン M1 受容体の cRNA を injection して 2、3 日後に二電極膜電位固定法を用いて、モルヒネ前処置無しの時と前処置後でのアセチルコリン 100 nM で生じる内向きの Cl⁻ 電流を観察し、比較検討した。

二電極 膜電位固定法



また、Chinese Hamster Ovary (CHO) Cell に M1 受容体の cDNA を組み込んだ Plasmid DNA をリポフェクチン法にて Transfection し、発現した M1 受容体に対する $[^3\text{H}]\text{-N-methylscopolamine}$ 300 pM の結合能をモルヒネがどの程度抑制するかどうかをコントロールのアトロピンと比較した。



結果：ラット M1 受容体を発現したアフリカツメガエル卵母細胞にアセチルコリン 100 nM を作用させると、平均 712.7 nA の内向き Cl⁻電流が観察された。モルヒネ前処置後に再びアセチルコリン 100 nM を投与したところ、10 μM のモルヒネは 24.7%、100 μM のモルヒネは 32.8%、1 mM のモルヒネは 74.4%の抑制作用を示した。

CHO 細胞に発現させた M1 受容体に対して、アトロピンは濃度依存的に 300 pM の $[^3\text{H}]\text{-NMS}$ の結合能を抑制し、モルヒネは高濃度の 1 mM が約 50%の抑制効果を持つことが判明した。

考察：モルヒネは一般的な投与量においては、昏睡をきたすようなことはないが、難治性の癌性疼痛を軽減する目的で、多量のモルヒネ投与を余儀なくされた者には、しばしば深い昏睡状態が生じ、その状態を拭い去るこ

とができないことがある。今回の実験結果から高濃度塩酸モルヒネには、ムスカリン受容体の機能を抑制する働きがあることが示唆された。このことはモルヒネが、抑制性ニューロンを抑制しているアセチルコリン作動性ニューロンに対して抑制的に働き、抑制性ニューロンの作用を増強させることにより意識レベルの低下が生じている可能性があると言える。このようにモルヒネの持つ様々な副作用の中には、ムスカリン受容体が関与しているものがあるようだ。

ビッグダイノルフィンのアポトーシス誘導

○丹野孝一¹、Lars Terenius²、Irina Gilva²、Tatjana Yakovleva²、Kyrill Reznikov²、木皿憲佐¹、Georgy Bakalkin²

¹東北薬大・薬理学、²カロリンスカ研・臨床神経科学

【緒言】

ダイノルフィンAをマウスやラットの脊髄クモ膜下腔内へ投与した際、神経障害に基づく後肢麻痺を惹起し、この作用はオピオイド受容体拮抗薬で拮抗されないことが報告されており、ダイノルフィン類の非オピオイド機構を介する作用の存在が明らかにされている。また、ラットの脊髄に損傷を加えた際、損傷部位においてプロダイノルフィンのmRNAが有意に上昇することが報告されている。これらの報告から、神経障害とダイノルフィンとの関連性が推測される。しかしながら、この点についての詳細は不明である。

本研究ではこの点を細胞レベルで解明することを目的としてダイノルフィンが細胞毒性を示すのか否か、もし細胞毒性を示すのであれば、それはアポトーシスの誘導に起因するものか否かについて検討を加えた。

【実験方法】

1. 細胞培養

HcLa 細胞およびNG108-15細胞をそれぞれ10%牛胎仔血清とペニシリン・ストレプトマイシンを添加したIscoveおよびDMEM/NUT, MIX, F12培養液を用いて5% CO₂、37°Cの環境下で継代培養した。

2. トランスフェクション

細胞内へのプラスミドあるいはペプチドのトランスフェクションはリポフェクタミン法あるいはエレクトロポレーション法により行なった。

3. 細胞毒性の測定

トリパンブルー分染法あるいはMTS法により測定した。MTS法は96wellのマイクロプレート中で培養した細胞にMTS/PMS試薬を添加し、2時間培養後マイクロプレートリーダーを用いて492nmの波長で吸光度を測定し、その値から生存細胞数を算出した。

4. アポトーシス細胞の検出

①形態的特徴による検出

3.7%ホルムアルデヒドで細胞を固定後ヘキスト33258とヨウ化プロピジウムで蛍光染色し、細胞縮小、クロマチン凝縮および核の断片化が認められた細胞をアポトーシス細胞とし、蛍光顕微鏡下でその細胞数を計測した。

②フローサイトメトリーによる検出

70%エタノールで細胞を固定後ヨウ化プロピジウムで蛍光染色し、フローサイトメトリーにてアポトーシス細胞を検出した。

【結果および考察】

1. ダイノルフィンおよびその関連ペプチドの細胞毒性

プロダイノルフィン発現プラスミド(DNAとして1 μ g/ml)をHeLa細胞にリポフェクタミン法によりトランスフェクションし、その72時間後にトリパンブルー分染法により生存細胞数を計測したところ、対照の約50%まで有意に減少した。次いでプロダイノルフィン由来のペプチド類でその効果を比較検討したところ、ダイノルフィンA(1.76および3.52 nmol/ml)は約75%まで生存細胞数を有意に減少させたが、ダイノルフィンB(3.52 nmol/ml)およびダイノルフィンB-29(1.76 nmol/ml)は有意な効果を示さなかった。一方、Lys-Argを挟んでダイノルフィンAとダイノルフィンBの構造を有するビッグダイノルフィン(0.44-1.76 nmol/ml)は濃度依存的に生存細胞数を減少させ、1.76 nmol/mlの濃度においては約50%まで有意に減少させた。

ビッグダイノルフィンを経電ポレーション法によりHeLa細胞およびNG108-15細胞にトランスフェクションした際にも生存細胞数の減少が認められた。しかしながら、ビッグダイノルフィンを培養液中に直接添加した際、生存細胞数に有意な効果は認められなかった。

さらに、オピオイド受容体拮抗薬であるナロキソンはビッグダイノルフィンとの同時トランスフェクションおよび培養液中へ添加したいずれの場合にもビッグダイノルフィンによる生存細胞数の減少を抑制しなかった。

MTS法においてもビッグダイノルフィン (0.26 nmol=1050ng/well) のトランスフェクションによって約50%の生存細胞数の減少が確認されたが、ダイノルフィンAアナログのDAKLI (0.48 nmol/well) およびビッグダイノルフィンやダイノルフィンAと同じく塩基性ペプチドのポリリジン (1050 ng/well) は生存細胞数に有意な効果を示さなかった。

以上の結果から、プロダイノルフィン由来のペプチド中でビッグダイノルフィンのトランスフェクションは極めて強力な細胞毒性を示すことが判明した。また、この細胞毒性は非オピオイド機構を介し、ビッグダイノルフィンの構造に特異的な作用であることが判明した。

2. ビッグダイノルフィンのアポトーシス誘導

HeLa細胞にビッグダイノルフィン (1.76 nmol/ml) をトランスフェクションし、48時間後にアポトーシス細胞を形態的特徴に基づき観察したところ、対照の約5倍のアポトーシス細胞が確認された。また、フローサイトメトリーを用いた実験においてもビッグダイノルフィンによるアポトーシスの誘導が認められた。すなわち、正常細胞に対するアポトーシス細胞の割合が対照では2.29%であったのに対し、ビッグダイノルフィンをトランスフェクションした細胞では11.25%と約5倍高い割合であった。

以上の結果から、ビッグダイノルフィンの細胞毒性はアポトーシスの誘導に起因することが判明した。

P-23

モルヒネのヒト癌細胞増殖抑制ならびに
放射線感受性亢進作用

○山口美知子、辻田俊也、轟木幸子、澄川耕二
長崎大学医学部麻酔学教室

〈緒言〉 近年モルヒネは、その鎮痛以外の薬物作用も注目されており、細胞増殖抑制やアポトーシスにも関与している可能性がある。我々は、ヒト乳癌培養細胞を用い、モルヒネの細胞増殖に与える影響、ならびに、放射線感受性に与える影響を検討した。

〈方法〉 ヒト乳癌細胞培養株 MCF-7 は 10%FBS 加 DMEM を用い培養し、モルヒネ添加群は、培養 24 時間後に培地をモルヒネ含有培地に交換した。モルヒネの影響を以下の方法により解析した。

MTT assay : モルヒネ添加 5 日後、培地に MTT を加え、4 時間培養後、生細胞ミトコンドリアで生成する暗青色色素による吸光度変化により生細胞数を測定した。

FACScan : モルヒネ添加後 72 時間までの細胞周期の変化を、ヨウ化プロピジウムで DNA を染色し、FACScan を用い、解析した。

Colony formation assay : モルヒネ 1 μ M または 1mM を添加し、24 または 72 時間後 0 から 8 Gy の X 線を照射した。照射 24 時間後に細胞を 100mm ディッシュに捲き直し、モルヒネ非添加 10%FBS 加 DMEM で 14 日間培養した。14 日後培地を吸引し、ギムザ染色の後、コロニー数を計測した。統計手法は ANOVA を用い、0.05% を有為水準とした。

〈結果〉 MTT assay における生細胞数は対照群に比しモルヒネ 100 μ M、1mM、2.5mM 添加群では有為に減少していた。FACScan での細胞周期解析では、モルヒネ 1mM 添加群では 24 時間後より G0/G1 期の細胞の増加と S 期の減少がみられた。Colony formation assay では、モルヒネ 1mM 添加 72 時間後に X 線 8Gy を照射した群は、モルヒネ非添加群に対し、有為に放射線感受性が亢進していた。

<考察> 今回の結果は、モルヒネが MCF-7 の増殖を抑制するとともに、放射線感受性を亢進させることを示している。モルヒネ存在下での細胞周期は、G0/G1 期が増加しており、このことが放射線感受性亢進に関与すると考えられる。

<結語> モルヒネはヒト乳癌培養細胞 MCF-7 において細胞増殖を抑制し放射線感受性を亢進させる。

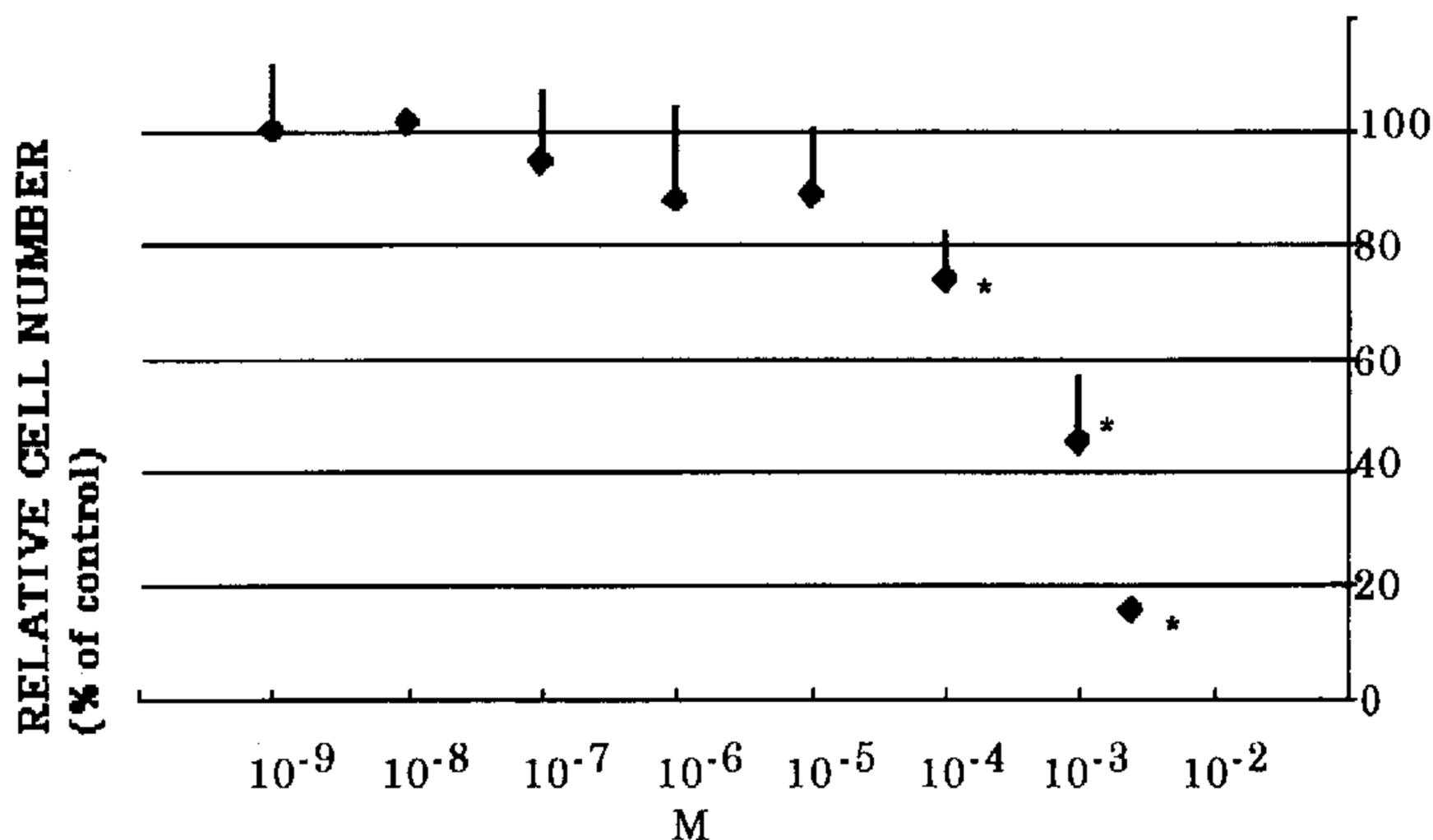


図1 モルヒネによる細胞増殖抑制
MTT assay により、生細胞数を測定した。
Mean ± SD *P < 0.01 vs. control

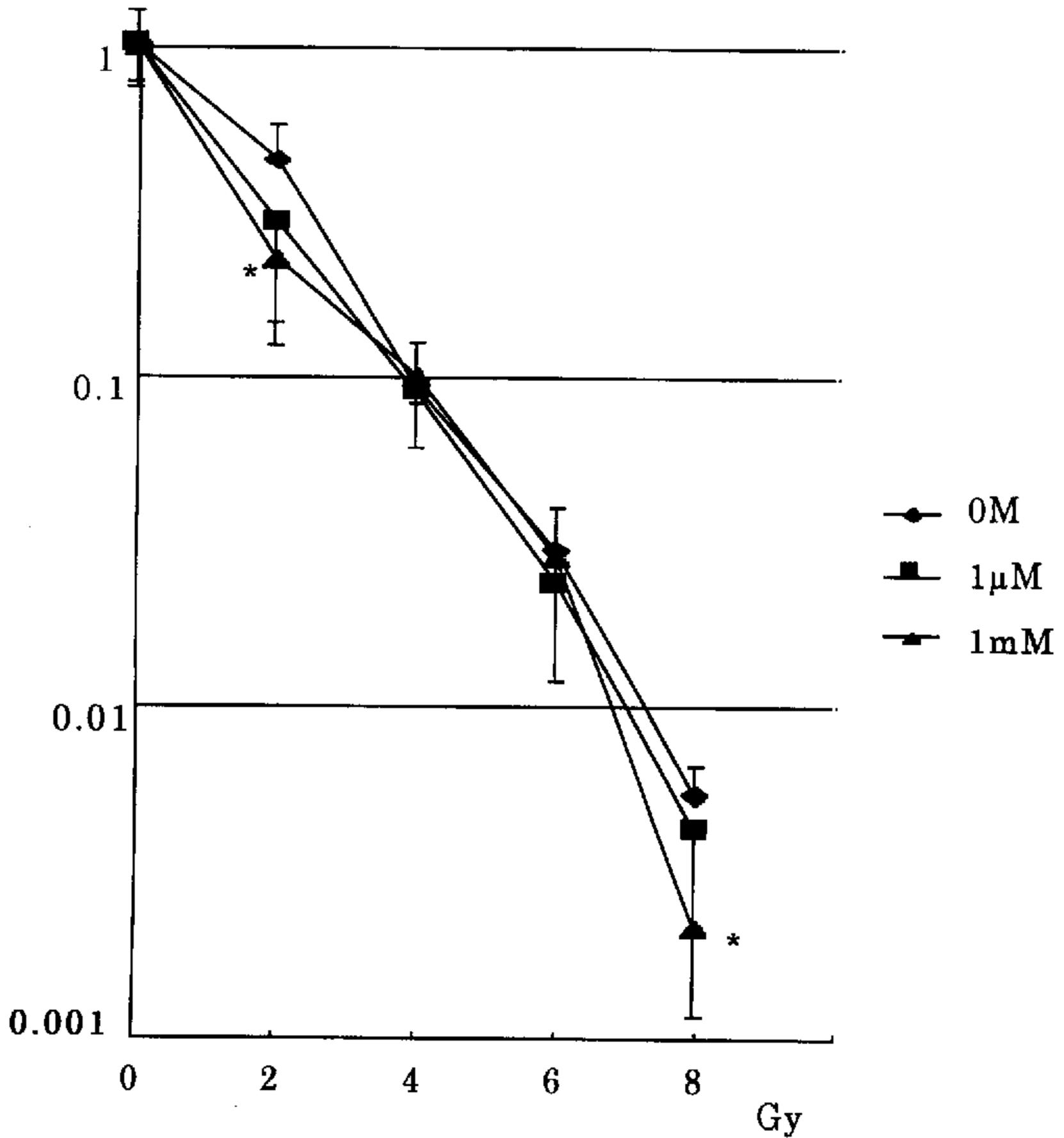


図2 モルヒネ添加72時間後の放射線感受性の変化
 X線非照射細胞のコロニー形成能を1としたときの、割合を示す。
 Mean±SD *P<0.05 vs. 0M