

ノシセプチン誘発性疼痛関連行動における histamine の役割

○折戸 融¹, Jalal Izadi Mobarakeh², 谷内 一彦², 渡邊 建彦², 櫻田 司³, 櫻田 忍¹

¹東北薬大・機能形態、²東北大・医・薬理、³第一薬大・生化

Nociceptin-induced scratching, biting and licking in mice: involvement of spinal H₁ receptors.

Tohru Orito¹, Jalal Izadi Mobarakeh², Kazuhiko Yanai², Takehiko Watanabe²,

Tsukasa Sakurada³ and Shinobu Sakurada¹

¹Department of Physiology and Anatomy, Tohoku Pharmaceutical University, Sendai, Japan.

²Department of Pharmacology, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan.

³Department of Biochemistry, Daiichi College of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka, Japan.

Summary: Intrathecal injection of nociceptin at small doses (fmol order) elicited a behavioural response consisting of scratching, biting and licking (SBL) in ddY mice. The histamine H₁ receptor antagonist, *d*-chlorpheniramine, inhibited nociceptin-induced behavioural response in a dose-dependent manner. Histamine H₁ receptor knockout mice showed less SBL response to i.t. nociceptin when compared to their wild-type mice. These findings suggest that histamine-containing neurons in the mouse spinal cord may be involved in elicitation of scratching, biting and licking behaviour following i.t. injection of nociceptin.

緒言

ノシセプチンはアミノ酸配列がダイノルフィン A (dynA) と高い相同意を持つ 17 個のアミノ酸から成るペプチドであるにも関わらず、従来のオピオイド受容体 (μ 、 δ 、および κ 受容体) には結合せず、ORL-1 受容体に対し選択性に結合する。また、ORL-1 受容体に対する、オピオイド受容体アゴニストの親和性も低いことが明かとなっている^{1,2}。この、ノシセプチンをマウス及びラットの脳室内あるいは、脊髄クモ膜下腔内に投与した際に痛覚過敏 (hyperalgesia) あるいは鎮痛 (analgesia) を誘発するとの報告がなされている。一方、極めて低用量 (fmol order) のノシセプチンの i.t. 投与はマウスの両後肢による下腹部への scratching、両後肢への biting、licking 行動 (SBL 行動) を引き起こすことが見出されている³。マウスにおける hyperalgesia も同じ低用量の i.t. 投与により出現する⁴。

一方、我々はすでに histamine の i.t. 投与が SBL 行動を引き起こすことを見出している。この histamine 誘発性 SBL 行動は、ノシセプチンによって誘発される SBL 行動と非常に類似していること、さらに substance P (SP) などの神経化学伝達を介して誘発されることを明かにしている。そこで、今

回はノシセプチン誘発性 SBL 行動に対する脊髄内 histamine 神経系の関与を探る目的で、実験検討を行った。

実験方法

実験には体重 20-22g の ddY 系雄性マウス、そして histamine H₁ 受容体ノックアウトマウス (+/+, +/-, -/-) を用い、i.t.投与用薬物は人工脳脊髄液 (CSF) に溶解した。I.t.投与は、Hylden と Wilcox の方法を用い、無麻酔下で腰椎の 5 番と 6 番の間に注射針を挿入し、薬液を 5 μl / mouse の割合で直接投与した。行動の観察方法は、マウスを測定用の透明プラスチックケージの中へ一匹ずつ入れ自発行動の消失を確認した後、薬液を i.t.投与し、投与直後から測定を開始した。疼痛関連行動は SBL 行動を指標とし、その持続時間を累積時間 (sec) として表示した。

実験結果

ノシセプチン (fmol order) を i.t.投与することにより SBL 行動の発現が見られ、その行動は 3 fmol をピークとするベル型の用量反応曲線を示した。このノシセプチン誘発性 SBL 行動と類似した用量反応曲線が histamine (200-3200 pmol) を i.t.投与することにより得られた。すなわち、histamine 800~1000 pmol の投与により SBL 行動が最大値を示し、以後用量の増加 (1200~3200 pmol) に伴って SBL 行動が減少するベル型の用量反応曲線を示した (Fig. 1)。この histamine 誘発性 SBL 行動は histamine H₁ 受容体拮抗薬の d-chlorpheniramine、および NK₁ 受容体拮抗薬の CP-99,994 によって有意に抑制された。

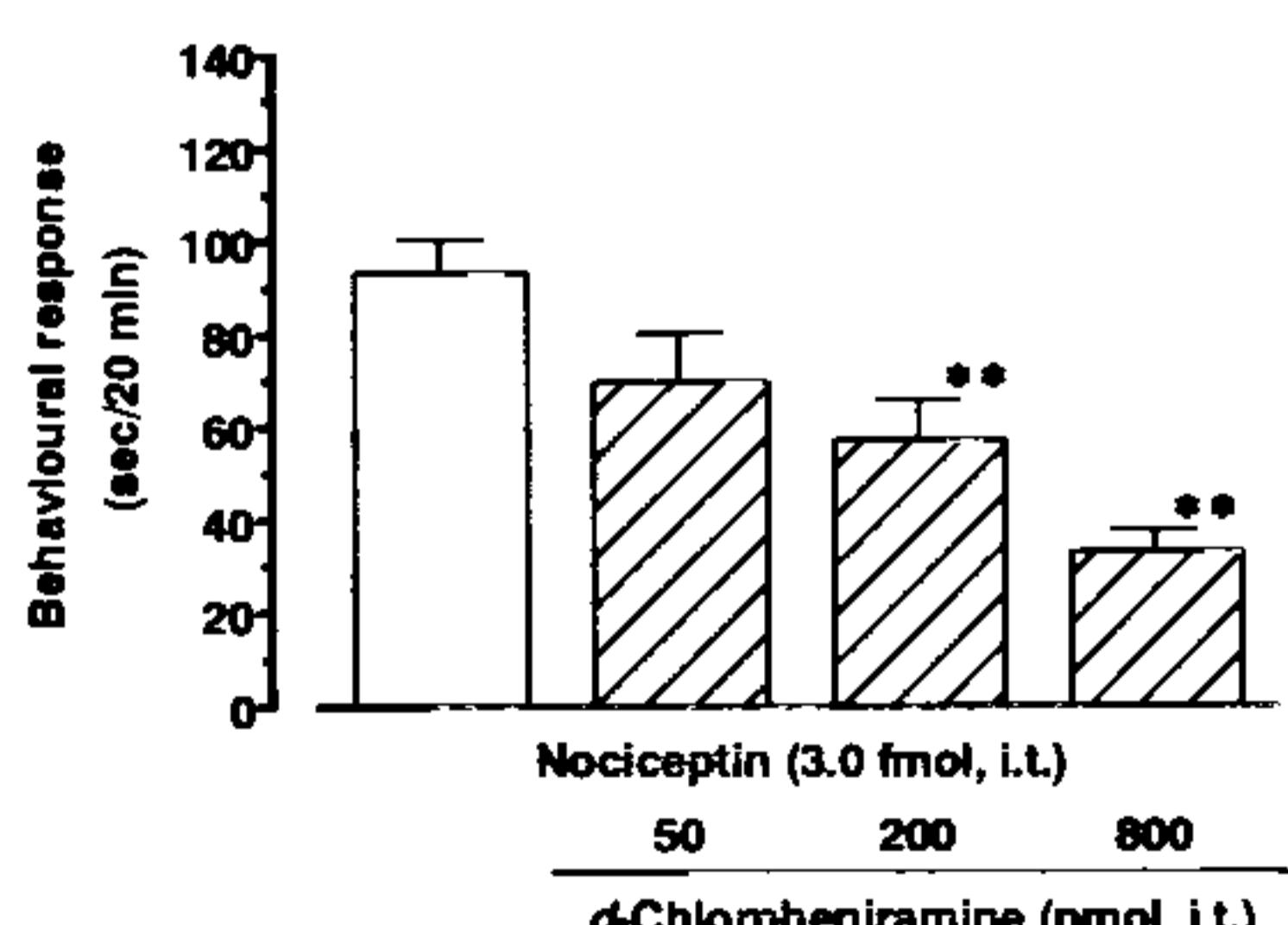
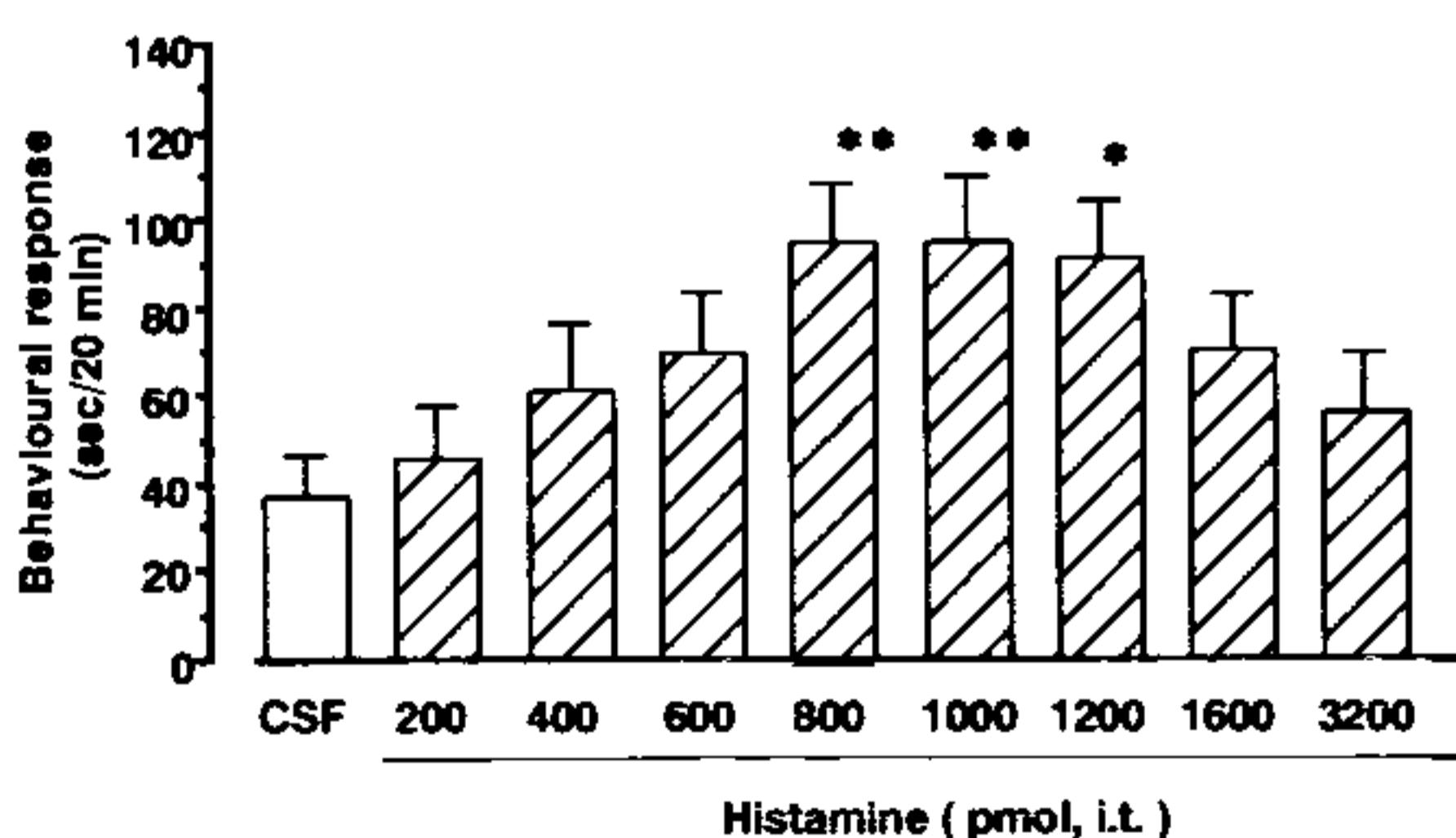


Fig.1 The effect of varying doses of histamine in the mouse. The duration of scratching, biting and licking induced by histamine (200-3200 pmol) was determined over a 20 min period starting immediately after injection. Each value represents the mean ± s.e.mean of ten mice in each group. *P<0.05, **P<0.01 when compared with CSF-controls.

Fig.2 Effect of d-chlorpheniramine on nociceptin-induced scratching, biting and licking response in mice. d-Chlorpheniramine was co-administered i.t. with nociceptin (3.0 fmol) in a total volume of 5 μl. The duration of scratching, biting and licking induced by nociceptin was determined over a 20 min period starting immediately after injection. Each value represents the mean ± s.e.mean of ten mice in each group. *P<0.05, **P<0.01 when compared with CSF-controls.

ノシセプチン誘発性 SBL 行動も histamine H₁ 受容体拮抗薬 (*d*-chlorpheniramine) の投与により有意に拮抗された (Fig. 2)。しかし、histamine H₂ 受容体拮抗薬の ranitidine, zolantidine によっては何ら影響を受けなかった。また、ノシセプチン誘発性 SBL 行動は histamine の抗体を処理することによっても有意に減弱した。

さらに、histamine H₁ 受容体ノックアウトマウスを用いて検討した。ノシセプチンを i.t. 投与すると、wild-type (+/+) においては ddY 系マウスと同程度の SBL 行動が出現するが、mutant (-/-) においては SBL 行動はほとんど観察されなかった。

考察

ノシセプチンの低用量 (3 fmol) を i.t. 投与することにより、SBL 行動が誘発され、この SBL 行動の発現機構の一つとして、ノシセプチンが脊髄レベルにおける SP 神経系からの SP の遊離を促進することが考えられている³⁾。

一方、最近我々は histamine を i.t. 投与することによっても SBL 行動を引き起こされることを見い出した。この histamine 誘発性 SBL 行動は、200-3200 pmol の間においてベル型の用量反応曲線を示し、SP やグルタミン酸の遊離促進が一因となり引き起こされるものと推察している。

ノシセプチン誘発性 SBL 行動は、H₁ 受容体拮抗薬、histamine 抗体によって有意に減弱されたことより、ノシセプチンによる SBL 行動の出現には histamine 遊離の関与も加えて考えなければならない。そこで、H₁ 受容体ノックアウトマウスを用いて実験を行った結果、wild-type (+/+) で見られた SBL 行動は、mutant (-/-) では著しく減少することが観察された。これらの結果より、ノシセプチン誘発性 SBL 行動の発現機構として、ノシセプチンは脊髄において histamine 神経系に作用し、histamine を遊離させ、H₁ 受容体を刺激することにより SBL 行動を引き起こしている可能性が示唆された。

1) Nicholson, J.R., Pasterson, S.J., McKnight, A.T., Br. J. Pharmacol., 120, 69 (1997)

2) Butor, J-L., Moisand, C., Mazarguil, H., Mollereau, C., Meunier, J.C., Eur. J. Pharmacol., 321, 97 (1997)

3) Sakurada, T., Katsuyama, S., Sakurada, S., Inoue, M., Tan-No, K., Kisara, K., Sakurada, C., Ueda, H., Sasaki, J., Br. J. Pharmacol., 127, 1712-18 (1999)

4) Sakurada, C., Sakurada, S., Katsuyama, S., Sasaki, J., Tan-No, K., Sakurada, T., Brain Res., 841, 85-92 (1999)

ラット脳内における opioid の顔面搔き動作誘発作用部位

川原田宗市, 山口朋美, 野島浩史, 倉石泰

富山医科薬科大学薬学部薬品作用学教室

Brain regions involved in facial scratching induced by opioid in rats

Soichi Kawaharada, Tomomi Yamaguchi, Hiroshi Nojima, Yasushi Kuraishi

Department of Applied Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences,

Toyama Medical and Pharmaceutical University

Summary: Opioids administered to the central nervous systems for pain relief frequently elicit itch as a side effect. The site of action is still unclear. We examined the brain sites of scratch response to a microinjection of morphine in rats. An injection into the spinal trigeminal nucleus produced the greatest number of scratching among the sites examined. This region may be important in the induction of itch.

緒言

搔痒を誘発する作用部位を検索した。

鎮痛を目的として morphineなどのオピオイドを硬膜外あるいは脊髄クモ膜下腔内に投与すると、副作用として痒みが起こる。また、オピオイド拮抗薬 naloxone が、この痒みを抑制し、難治性そう痒疾患の痒みにも有効であることから、オピオイドが中枢神経系において痒みの伝達あるいは増強に関与している可能性が推測される。しかし、その脳内の作用部位は明らかではない。

我々はこれまでに、マウスの大槽内に morphine を投与すると、naloxone 拮抗性の顔面搔痒反応（搔き動作）を引き起こすことを報告した(1)。

今回、morphine をラットの大槽内あるいは脳室内注射、および脳実質の諸部位に微量注射したときに現れる顔面搔き動作の回数を指標として、

実験方法

1. 実験動物

雄性 SD 系ラット（6-8 週齢）を使用した。

2. 薬物

Morphine hydrochloride (三共、東京) は、生理食塩水に溶解し、1-100 nmol/10 μL の用量を用いて、大槽内および脳室内に注射した。脳実質内への微量注射は 3 nmol/0.2 μL を用いて行い、一部の実験では naloxone (30 nmol)との混液を 0.2 μL の容量で微量注射した。

3. 行動実験

実験 3 日前に投与部位の背側頭蓋骨に 24G ガイドカニューレを埋め込んだ。実験当日、30G 注射針を用いて、無麻酔下、薬物を脳内の各部位に

投与した。行動を無人環境下でビデオカメラにより 120 分間撮影し、ビデオの再生により搔き動作を観察した。後肢による搔き動作を顔面、耳と頭部、体幹の 3 部位に分けて、約 1 秒間に数回の連続した搔き動作を 1 回として数えた。実験後に脳を摘出し、切片を作製して微量注射部位を確認した。

結果

Morphine (10-30 nmol)の大槽内投与は、顔面への搔き動作を用量依存的に増加した。そのピークは投与後約 30 分であった。このとき、顔面以外への搔き動作はほとんど現れなかった。一方、脳室内投与(10-100 nmol)は搔き動作を惹起しなかった。

大槽内近辺に位置する延髄および橋の実質内を主として morphine を微量注射した。延髄の三叉神経脊髄路核、三叉神経脊髄路およびその周辺への morphine の脳内微量注射は顕著な顔面への搔き動作を惹起した。大槽内投与と同様に投与後約 30 分が搔き動作数のピークであった(Fig.1)。このとき、耳と頭部、体幹への搔き動作はほとんど惹起しなかった。投与した部位の中で、延髄や橋の他の部位や、間脳、中脳へ投与したとき、搔き動作はほとんど見られなかった。

三叉神経脊髄路核への morphine 微量注射が惹起する顔面搔き動作に対するオピオイド受容体拮抗薬 naloxone の効果を検討した。Morphine 単独投与と、morphine と naloxone 同時投与を比較した。Naloxone の同時投与は、顔面への搔き動作を有意に抑制した。

考察

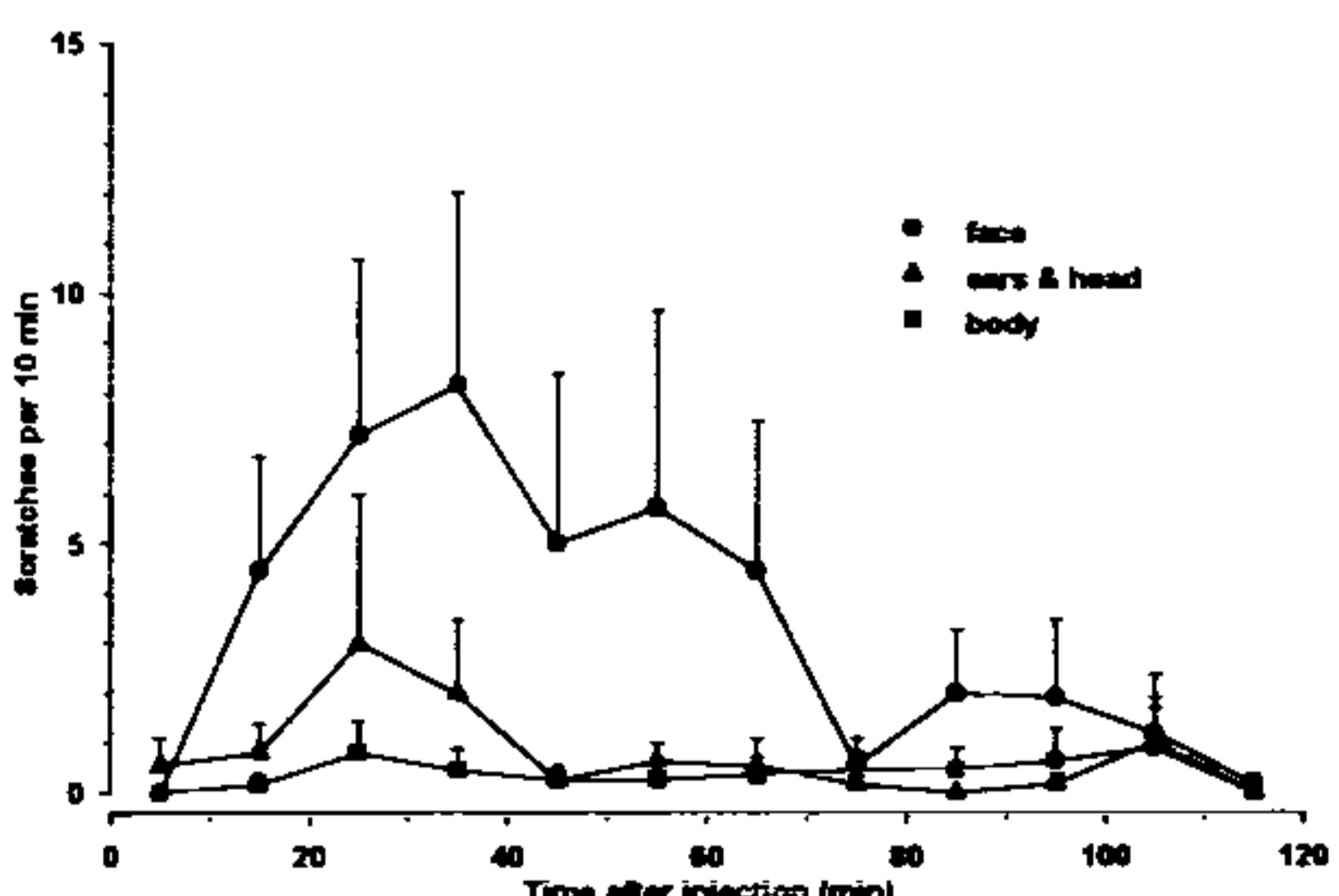
三叉神経脊髄路核への morphine 微量注射が、最も多くの搔き動作を惹起したことから、三叉神経脊髄路核の μ -オピオイドペプチド受容体が、大槽内注射した morphine の顔面搔き動作誘発作用に一部関与する可能性がある。

三叉神経脊髄路核の μ -オピオイドペプチド受容体が、末梢からの痒覚信号を伝達あるいは増強しているのかについては、今後さらに検討する必要がある。

引用文献

Tohda C., Yamaguchi T. and Kuraishi Y., Intracisternal injection of opioids induces itch-associated response through μ -opioid receptor in mice. Jpn. J. Pharmacol. 74: 74-77 (1997)

Fig.1. Time course of scratching after microinjection of morphine (3 nmol/0.2 μ L)



into the spinal trigeminal nucleus in rats. The numbers of scratches per 10 min after the injection are presented as means and S.E.M. from 11 rats.

選択的 κ 受容体拮抗薬 norbinaltorphimine により誘発される 痒み関連反応

亀井淳三、長瀬博*

星葉科大学薬物治療学教室、*東レ医薬研究所

Norbinaltorphimine, a selective κ -opioid receptor antagonist, induces an itch-associated response in mice

Junzo Kamei, Hiroshi Nagase*

Department of Pathophysiology & Therapeutics, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hoshi University

*Pharmaceutical Research Laboratories, Toray Industries Inc.

Summary: We examined the possibility that scratching induced by norbinaltorphimine, a selective κ -opioid receptor antagonist, is due to an itch sensation, using compound 48/80 as control pruritogenic agent. When norbinaltorphimine was injected s.c. into the rostral back, mice scratched the skin around the injection site with their hind paws. Although the intensity of the scratching could not be compared because the dose and injection route were different, the character and time course of the scratching behavior induced by compound 48/80 injected i.d. were similar to those with norbinaltorphimine. The scratching behavior induced by norbinaltorphimine was dose-dependently and significantly inhibited by pretreatment with chlorpheniramine. Compound 48/80-induced scratching was also dose-dependently and significantly inhibited by p.o. pretreatment with chlorpheniramine. The scratching behavior induced by norbinaltorphimine was dose-dependently and significantly inhibited by pretreatment with U-50,488H, a κ -opioid receptor agonist. Unexpectedly, the scratching behavior induced by compound 48/80 was also dose-dependently and significantly reduced by pretreatment with U-50,488H. These results suggest that the injection of norbinaltorphimine into the rostral back of the mouse elicited scratching, which may be an itch-associated response. Furthermore, the scratching behavior produced by norbinaltorphimine may be due in part to the release of histamine followed by antagonism of κ -opioid receptors.

緒言

痒みとは、おもに皮膚疾患の症状であるが、その発現機序の詳細については、明らかにされていない。

Compound 48/80 などの起痒物質をマウスの皮下へ投与することにより、投与部位への後肢による scratching 行動が誘発されることが報告されている^{1,2)}。また、我々の研究において、選択的 κ 受容体拮抗薬である norbinaltorphimine の皮下投与によっても、これらの起痒物質と類似の scratching 行動が観察された。一方、搔痒感とオピオイド神経系とが、密接に関与していることが報告されている³⁾。したがって、norbinaltorphimine により誘発される scratching 行動が、痒み関連反応である可能性が考えられる。

そこで、本研究では、選択的 κ 受容体拮抗薬である norbinaltorphimine により誘発される scratching 行動について、痒みとの関連を検討した。

方法

実験には 6 週齢の ICR 系雄性マウスを用いた。Scratching 行動の計測・解析には、高感度電磁誘導式運動量センサー（NS-S01、ニューロサイエンス社製）およびその解析ソフトである MicroAct for Scratching Test（ニューロサイエンス社製）を用いた。すなわち、マウス両後肢に微細で強力なマグネットを装着し、後肢による scratching 行動に伴いマグネットからの磁力線によって発生したコイル電流を AC アンプで増幅し、解析用ソフトを用いて電位変換したのち、その情報を解析、収録し、マウス後肢による scratching 行動の回数として測定した。

結果

選択的 κ 受容体拮抗薬である norbinaltorphimine の皮下投与により、投与後 5 分以内に投与部位へのマウス後肢による scratching 行動が発現した。

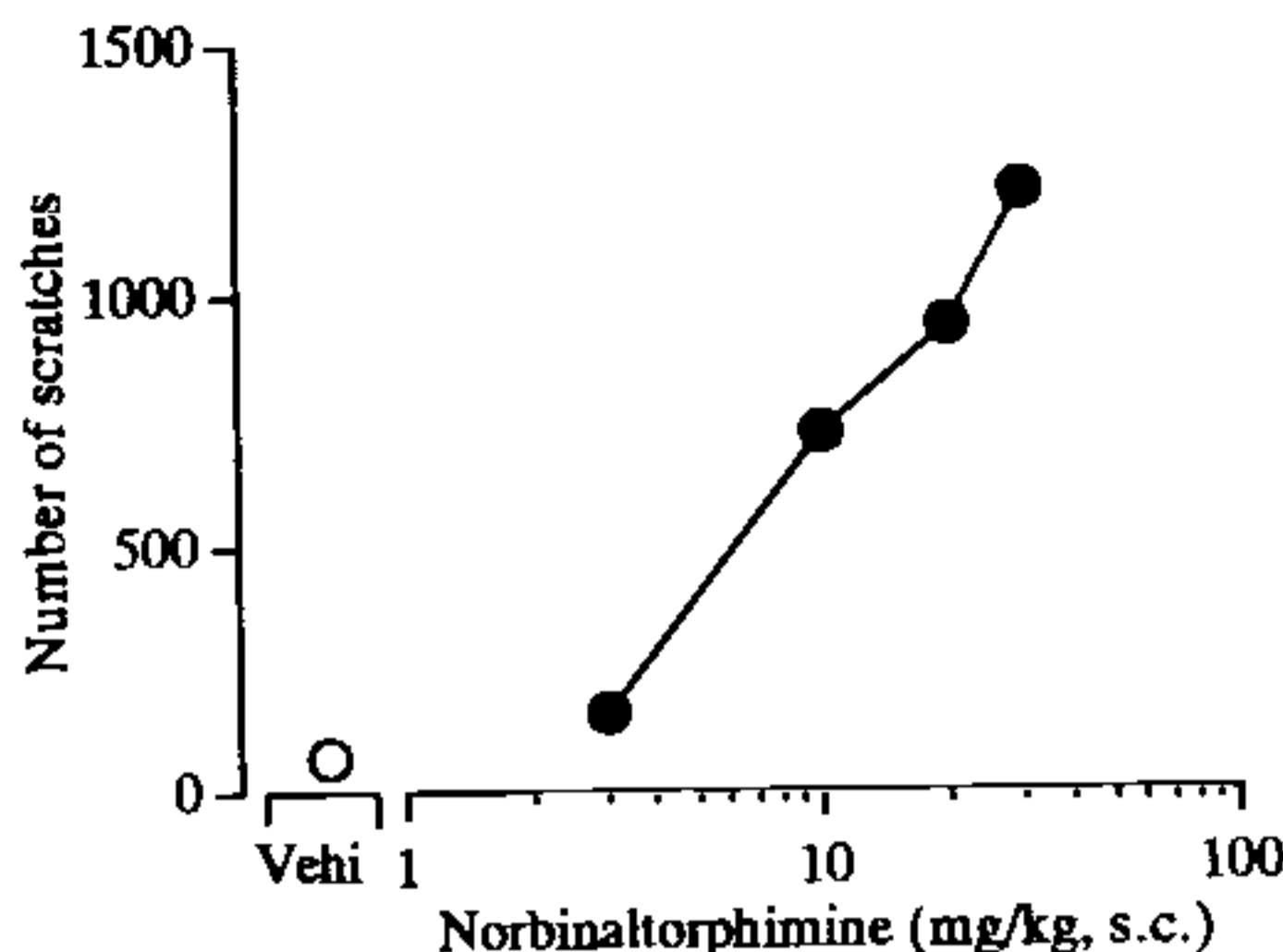


Figure 1. Dose-response curve for the scratch-inducing effect of norbinaltorphimine. Mice were given a s.c. injection of norbinaltorphimine or vehicle. The number of scratches in 60 min was plotted against the dose. Each point represents the mean with S.E. for 10 mice.

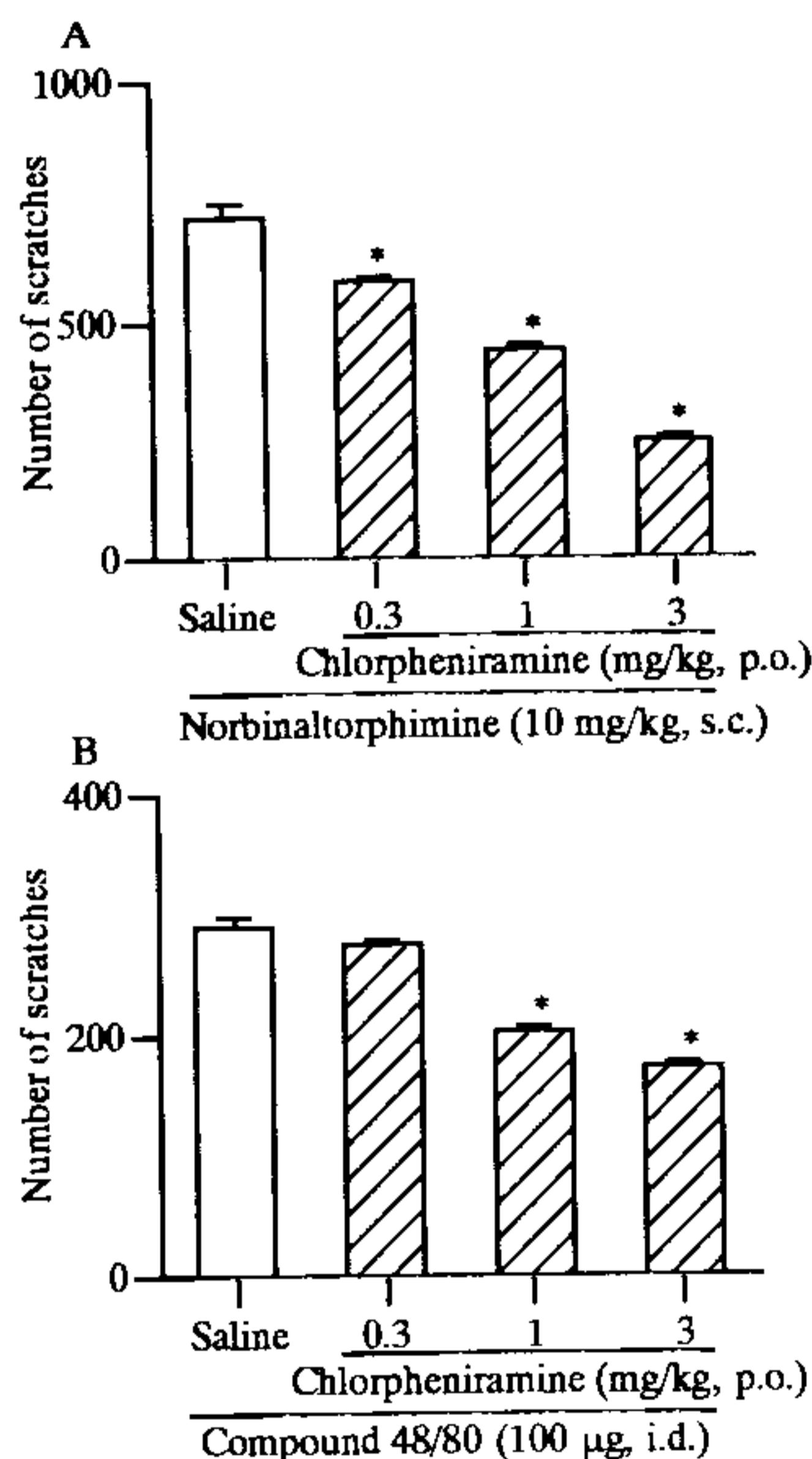


Figure 2. Effects of chlorpheniramine on norbinaltorphimine (A)- and compound 48/80 (B)-induced scratching. Chlorpheniramine was injected p.o. 60 min before the injection of norbinaltorphimine (10 mg/kg, s.c.) or compound 48/80 (100 µg, i.d.). The number of scratches in 60 min was plotted against the dose. Each point represents the mean with S.E. for 10 mice. *P<0.05 vs. saline-pretreated group.

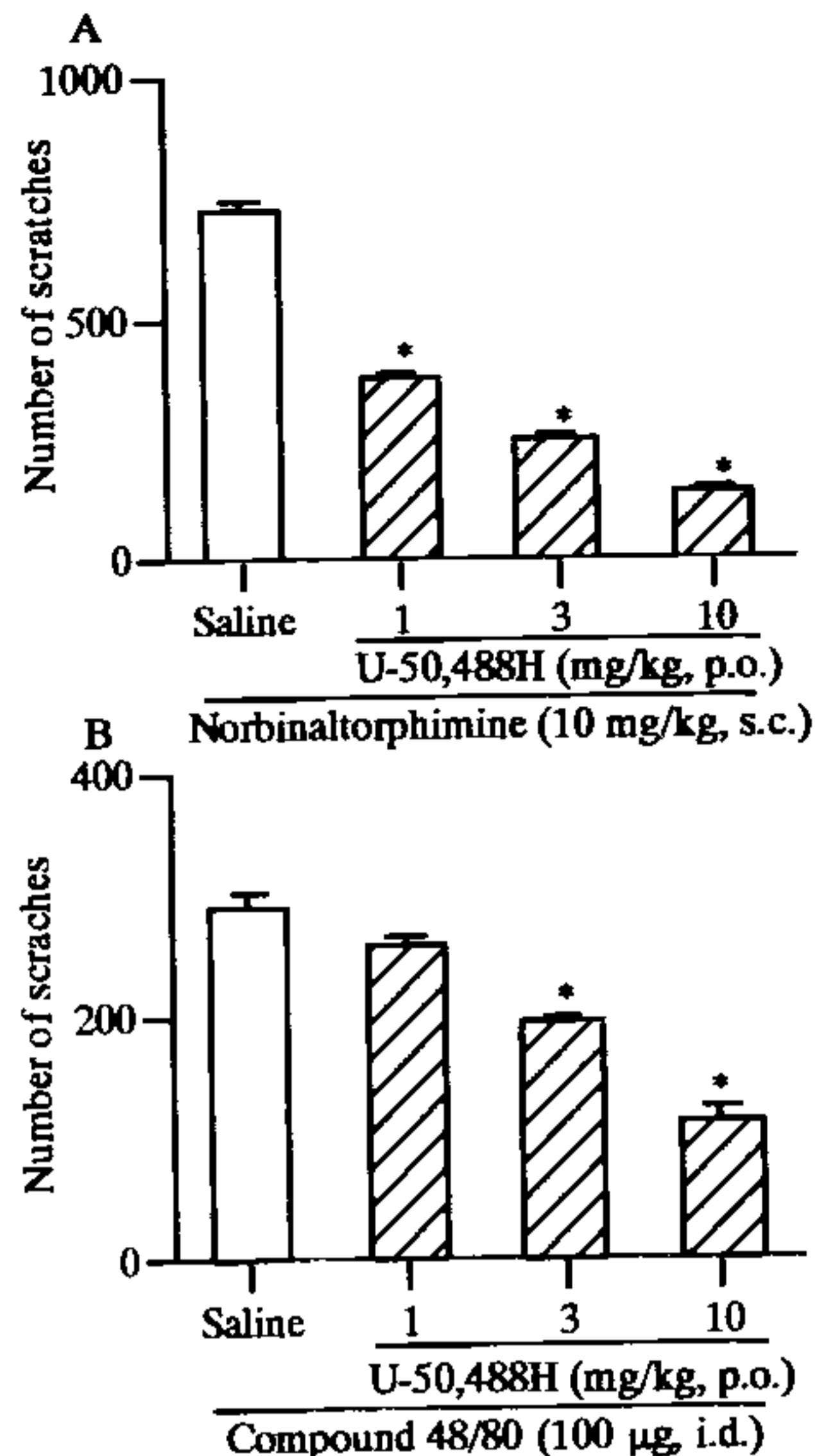


Figure 3. Effects of U-50,488H on norbinaltorphimine (A)- and compound 48/80 (B)-induced scratching. Chlorpheniramine was injected p.o. 60 min before the injection of norbinaltorphimine (10 mg/kg, s.c.) or compound 48/80 (100 µg, i.d.). The number of scratches in 60 min was plotted against the dose. Each point represents the mean with S.E. for 10 mice.
*P<0.05 vs. saline-pretreated group.

また、この行動は 60 分以上持続した。さらに、norbinaltorphimine は用量依存的(3 - 30mg/kg)に scratching 行動の回数を増大させた (Fig. 1)。一方、compound 48/80 (100 µg, i.d.) によっても norbinaltorphimine と同様の scratching 行動が認められた。

Norbinaltorphimine (30 mg/kg, s.c.) と compound 48/80 (100 µg, i.d.) により誘発された scratching 行動は、ともにヒスタミン H₁ 受容体拮抗薬である chlorpheniramine (0.3-3 mg/kg, p.o.) の前処置によって、用量依存的かつ有意に抑制された (Fig. 2)。さらに、κ受容体作動薬である U-50,488H (1 - 10 mg/kg, p.o.) の前処置によっても、norbinaltorphimine (30 mg/kg, s.c.) と compound

48/80 (100 µg, i.d.) により誘発された scratching 行動は、用量依存的かつ有意に抑制された (Fig. 3)。

考察

選択的 κ 受容体拮抗薬である norbinaltorphimine の皮下投与により、scratching 行動が誘発された。また、この norbinaltorphimine による scratching 行動の状態および時間経過は、起痒物質である compound 48/80 誘発 scratching 行動と同様であった。また、norbinaltorphimine は投与部位に対してのみ scratching 行動を引き起こし、顔など他の部位に対する scratching 行動を誘発することはなかった。この norbinaltorphimine により誘発された scratching 行動は、compound 48/80 により誘発された scratching 行動と同様に、ヒスタミン H_1 受容体拮抗薬である chlorpheniramine の前処置によって抑制されたことから、norbinaltorphimine により誘発された scratching 行動には肥満細胞からのヒスタミンの遊離が一部関与している可能性が示唆された。したがって、これらの結果は、norbinaltorphimine により誘発される scratching 行動が投与部位の皮膚に対する痒みに関連した行動である可能性を強く示唆している。

さらに、norbinaltorphimine により誘発される scratching 行動は κ 受容体作動薬である U-50,488H の前処置によって抑制されたことから、その痒み関連行動に κ 受容体を介した機序が一部関与している可能性が示唆された。一方、compound 48/80 により誘発される scratching 行動も κ 受容体作動薬である U-50,488H の前処置によって抑制された。モルヒネやフェンタニールにより誘発される痒みに脊髄後角に存在するヒスタミン感受性の痒み特異的ニューロン⁴⁾ の活性が重要であることが報告されている⁵⁾。一方、種々のオピオイド μ 受容体を介した薬理作用に対して κ 受容体作動薬が拮抗的な修飾作用を示すことが知られている⁶⁾。したがって、U-50,488H による痒み様反応の抑制は、脊髄後角に存在するヒスタミン感受性痒み特異的ニューロン⁴⁾ の活性を抑制することに起因している可能性が考えられる。

以上のことより、norbinaltorphimine により誘発される scratching 行動は、 κ 受容体の拮抗作用によるヒスタミンの遊離が一部関与した、痒み関連行動である可能性が示唆された。また、 κ 受容体作動薬が、止痒薬として有用である可能性も合わせて示唆している。

参考文献

1. Kuraishi, Y., Nagasawa, T., Hayashi, K. and Satoh, M.: Eur. J. Pharmacol. **275**, 229 (1995)
2. Andoh, T., Nagasawa, T., Satoh, M. and Kuraishi, Y.: J. Pharmacol. Exp. Ther. **286**, 1140 (1998)
3. Tohda, C., Yamaguchi, T., and Kuraishi, Y.: Jpn. J. Pharmacol. **74**, 77 (1997)
4. Andrew, D. and Craig, A.D.: Nature Neurosci. **4**, 72 (2001)
5. Schmelz, M.: Nature Neurosci. **4**, 9 (2001)
6. Pan, Z.Z.: Trends Pharmacol. Sci. **19**, 94 (1998)

新規オピオイド κ 受容体作動薬 TRK-820 のマウスにおける止痒作用

Kiyoshi Okano, 岡野清

東レ(株)医薬研究所医薬第1研究室

Antipruritic effect of a novel κ opioid receptor agonist TRK-820 in mice.

Kiyoshi Okano, Yuko Togashi, Hideo Umeuchi, Yoshitaka Yoshizawa, Toshiyuki Honda, Toshiaki Tanaka, Kuniaki Kawamura, Jun Utsumi, Takashi Endoh, Junzo Kamei* and Hiroshi Nagase

Toray Industries, Inc. Pharmaceutical Research Laboratories

*Faculty of Pharmacological Sciences Hoshi University

Summary: We have evaluated the effect of a specific kappa receptor agonist TRK-820 in murine pruritus model. Peroral administration of TRK-820 dose-dependently reduced the number of scratching behaviors induced by substance P or histamine. TRK-820 did not affect gross behaviors. The scratching inhibitory activity of TRK-820 was dose-dependently antagonized by kappa receptor antagonist nor-BNI. Typical antihistamines, ketotifen and chlorpheniramine, did not inhibit the SP-induced scratching behavior. These results indicate that TRK-820 has anti-pruritic effect against SP-induced and antihistamine-resistant pruritus via opioid kappa receptor.

緒言

臨床においてオピオイド μ 受容体作動薬 (morphine) が痒みを誘発し¹⁾、オピオイド μ 受容体拮抗薬 (naltrexone) が腎透析患者の痒みを抑えることが報告されている²⁾。一方、オピオイド κ 受容体作動薬とオピオイド μ 受容体作動薬は、鎮痛以外の薬理作用が相反していることが知られている³⁾。そこで我々は、 κ 受容体作動薬が止痒作用を有しているのではないかと考え、 κ 受容体作動薬 TRK-820⁴⁾ の止痒作用について検討した。

実験方法

止痒作用の評価:

Kuraishiらの方法⁵⁾に従った。試験前日に吻側背部を除毛した生後5週齢の雄性ICRマウスを観察用ケージに30分間以上収容し順化させてから、被験物質を経口投与し、30または60分後に起痒剤を吻側背部に50 μ l/siteの容量で皮内投与した。その直後より誘発される引っ掻き行動を無人環境下に30分間ビデオ撮影し、後日ビデオを再生して引っかき行動の回数を計数した。なお、マウスは通常約1秒間に数回引っ搔くが、この一連の行動を1回の引っ掻き行動とみなして計数した。

結果

(1) ICR 系マウスにおけるヒスタミン誘発引っかき行動に対する TRK-820 の抑制作用

TRK-820 は用量依存的にヒスタミン誘発引っかき行動を抑制し、ED50 値は 7.3 μ g/kg (95%信頼限界: 4.2~12.6 μ g/kg) であった(Fig.1)。抗アレルギー薬のケトチフェンおよび抗ヒスタミン薬のクロルフェニラミンも用量依存的にヒスタミン誘発引っかき行動を抑制し、ED50 値はそれぞれ 3.35 mg/kg (95%信頼限界: 0.554~20.3 mg/kg)、8.50 mg/kg (95%信頼限界: 1.73~25.5 mg/kg) であった(Fig.1)。

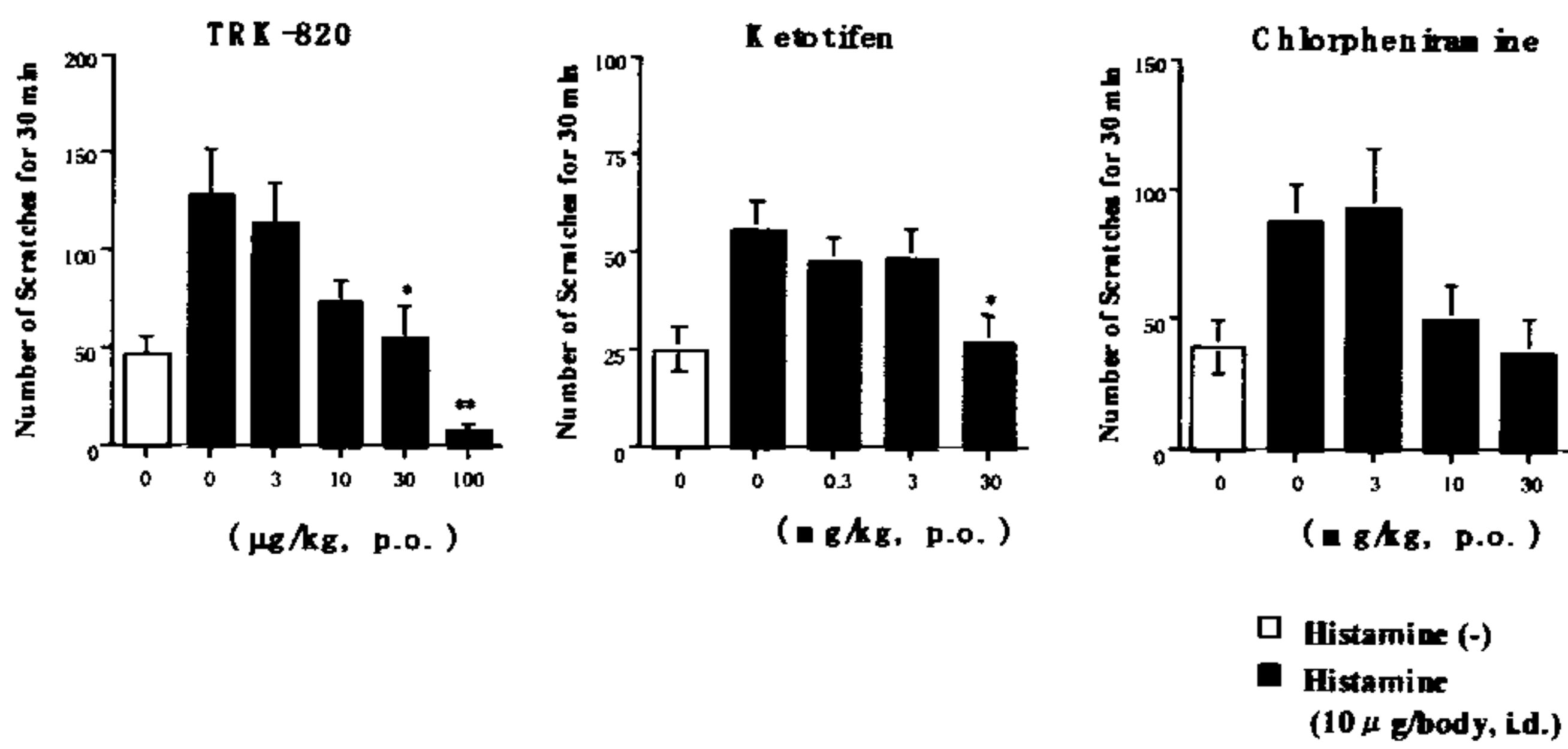


Fig.1, Effects of TRK-820 or Anti-histamine Drugs on the histamine induced Scratching in Mice.

mean \pm s.e. ($n=7 \sim 12$), * $p<0.05$, ** $p<0.01$ (Dunnett's test)

(2) ICR 系マウスにおけるサブスタンス P 誘発引っかき行動に対する TRK-820 の抑制作用

TRK-820 は用量依存的にサブスタンス P 誘発引っかき行動を抑制し、ED₅₀ 値は $19.6 \mu\text{g}/\text{kg}$ (95% 信頼限界 : $9.6 \sim 40.0 \mu\text{g}/\text{kg}$) であった (Fig.2)。一方、抗ヒスタミン薬のクロルフェニラミンおよび抗アレルギー薬のオキサトミドは引っかき行動を抑制しなかった。抗アレルギー薬のケトチフェンは高用量において引っかき行動を抑制したが、有意ではなかった。抗アレルギー薬のアステミゾールは、 $100 \text{ mg}/\text{kg}$ という高用量においてのみ、引っかき行動を有意に抑制した。 (Fig.2)。

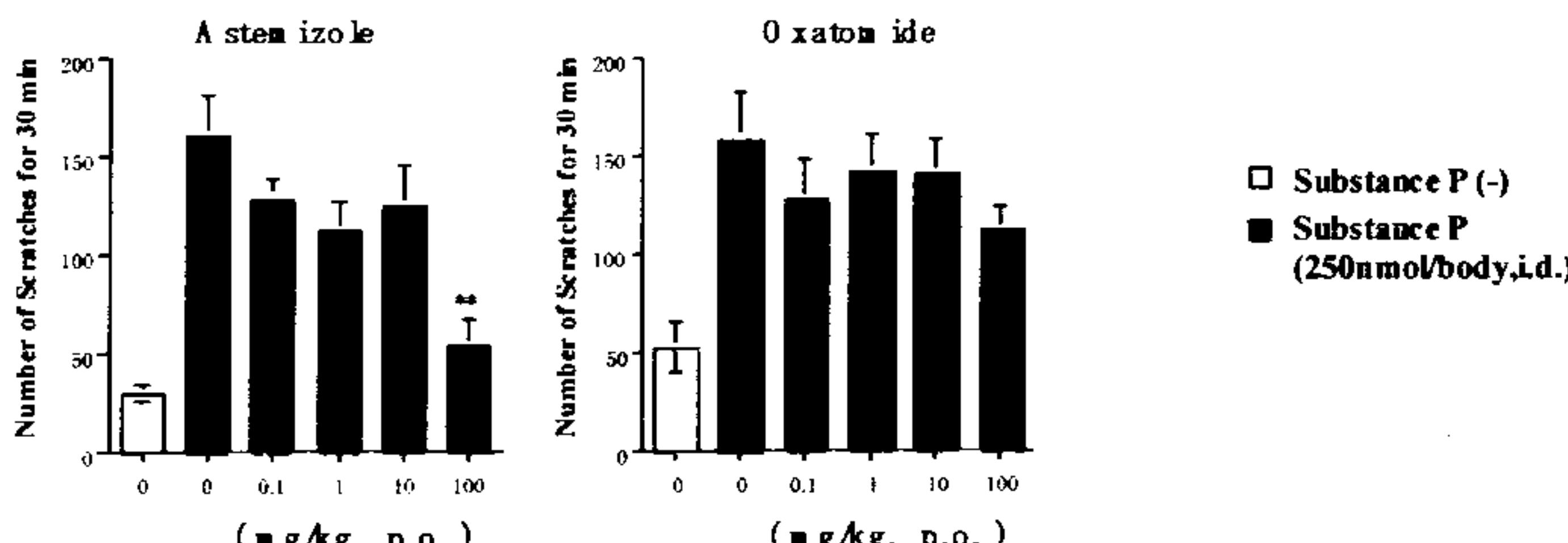
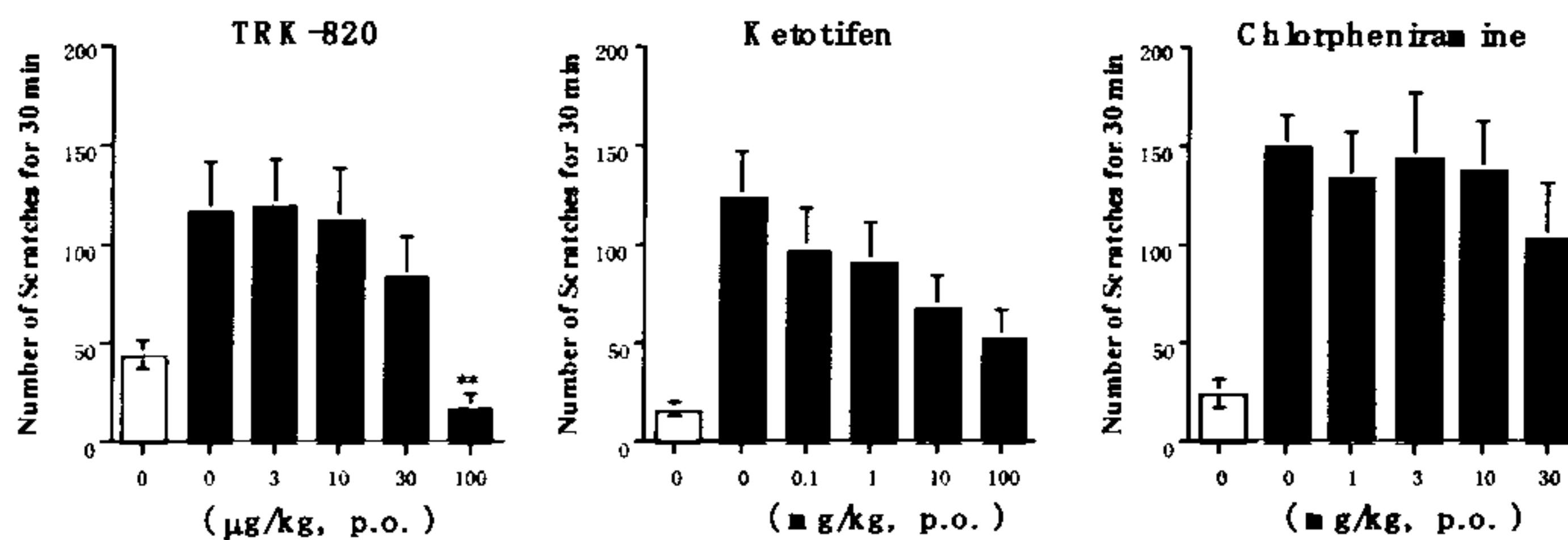


Fig.2, Effects of TRK-820 or Anti-histamine Drugs on the Substance P induced Scratching in Mice.

mean \pm s.e. ($n=8$), ** $p<0.01$ (Dunnett's test)

(3) ICR 系マウスにおける TRK-820 の引っかき行動抑制作用に対するオピオイド κ 受容体拮抗薬の作用

ICR 系マウスにオピオイド κ 受容体拮抗薬である nor-binaltorphimine (nor-BNI)を皮下投与し、24 時間後にサブスタンス P 誘発引っかき行動に対する TRK-820 (100 μ g/kg、経口投与)の抑制作用を評価した。その結果、TRK-820 の引っかき行動抑制作用は nor-BNI によって用量依存的に拮抗された。(Fig.3)。

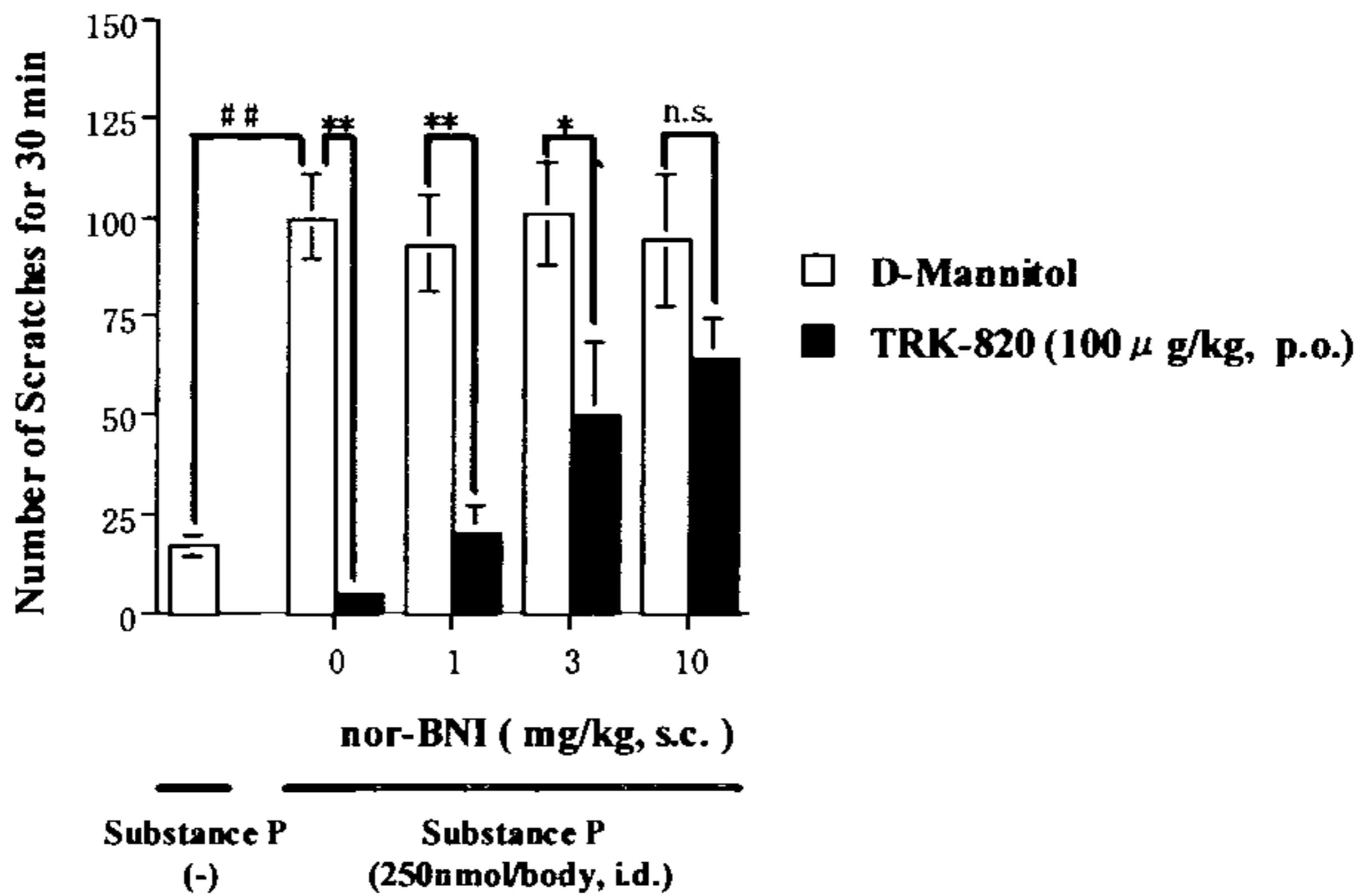


Fig.3, Effect of nor-BNI on the Scratching-inhibitory Effect of TRK-820 in Mice.

mean \pm s.e. ($n=8$), n.s.: not significant

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, ## $p<0.01$ (unpaired t-test)

考察

オピオイド κ 受容体作動薬であるTRK-820は、抗アレルギー薬や抗ヒスタミン薬が有効なヒスタミン誘発引っ搔き行動モデルだけでなく、抗アレルギー薬や抗ヒスタミン薬が効きにくいサブスタンスP誘発引っ搔き行動モデルにおいても用量依存的な引っ搔き行動抑制作用を示したことから、止痒作用(痒み抑制作用)を有すると考えられる。さらに、オピオイド κ 受容体拮抗薬であるnor-BNIによりTRK-820の引っ搔き行動抑制作用は拮抗されたことから、TRK-820は κ 受容体を介して止痒作用を発現することが示唆された。

引用文献

1. Ballantyne, J.C., Loach, A.B., Carr, D.B. : Pain 33, 149-160 (1988)
2. Peer, G., Kivity, S., Agami, O., Fireman, E., Silverberg, D., Blum, M., Iaina, A., : Lancet 348, 1552-1554 (1996)
3. Zhizhong, Z. E. : TiPS. 19, 94-98 (1998)
4. Nagase, H., Hayakawa, J., Kawamura, K., Kawai, K., Takezawa, Y., Matsuura, H., Tajima, C., Endoh, T. : Chem. Pharm. Bull. 46, 366-369 (1998)
5. Kuraishi, Y., Nagasawa, T., Hayashi, K., Satoh, M. : Eur. J. Pharmacol. 275, 229-233 (1995)

学習性無力マウスに対するオピオイドおよびその関連化合物の作用

鶴飼 良、鈴木真紀子、佐藤志保、間宮隆吉

名城大学薬学部 薬品作用学教室

Effects of opioid and its related compounds on the learned helplessness in mice

Makoto Ukai, Makiko Suzuki, Shiho Satoh and Takayoshi Mamiya

Department of Chemical Pharmacology

Faculty of Pharmacy, Meijo University

Summary: We investigated the involvement of opioid system in the learned helplessness, an index of depression in mice. Animals pre-exposed to inescapable electric shock were treated with either morphine, naloxone or U-50,488H. Stimulation of κ -opioid system by U-50,488H reversed the escape failure induced by shock pre-exposure, whereas μ -opioid system did not affect the failure. Furthermore, the attenuation of escape failure by U-50,488H was antagonized by MR2266, an opioid receptor antagonist. These results suggest that κ -opioid system has an important role in the learned helplessness model of depression.

緒言

現在、我が国で用いられている主な三環系抗うつ薬は、口渴、便秘、排尿障害、起立性低血圧、不整脈など、様々な副作用を生じる。これらは治療の妨げとなるため、副作用のより少ない抗うつ薬が望まれている。このような背景をもとに登場したのが、SSRI（選択的セロトニン再取り込み阻害薬）であり、欧米諸国ではうつ病治療の第一選択薬となっている。これらの薬物はセロトニントランスポーターに作用してセロトニン作動性神経系の伝達機能を増強する。また、うつ病以外にも強迫神経症、恐怖症、不安神経症、精神分裂病（陰性症状）など、様々な精神障害に対して適応が拡大し、モノアミンのなかでもセロト

ニンの機能と精神症状の関連性に注目が集まっている。一方、オピオイド受容体作動薬や拮抗薬は大脳皮質での K⁺刺激によるセロトニンの遊離を調節する。逆にセロトニンがモノルヒネによるドーパミン遊離を抑制するなど、オピオイド神経系はセロトニン神経系と深く関わっている。また、 μ -および κ -オピオイド受容体作動薬には抗うつ作用があり、精神疾患治療薬として有用である可能性が示唆されているが、不明な点も多い。

ヒトのうつ状態を反映した動物モデルの作製にはストレス負荷が用いられており、学習性無力、強制水泳、尾懸垂などがある。しかし、抗うつ薬のスクリーニング試験として強制水泳や尾懸垂試験が特異的であるとは言い

難い。一方、学習性無力とは動物を逃避不可能な電気ショックに曝すと、逃避できないことを学習し、その結果、逃避可能状況下であっても逃避しなくなる状態である¹⁾。この様な状態を呈する動物では、前脳でのセロトニン遊離の減少、GABA_A受容体の減少、視床下部などでのノルアドレナリン含量の増加など、神経化学的にもうつ病患者と類似しているため、うつ病モデルとして有用性が高いと言われている²⁾。そこで、今回は逃避不可能電気刺激負荷により学習性無力マウスを作製し、能動的条件回避反応を指標として、オピオイドおよびその関連化合物について検討した。

方法

5~6週齢の ddY 系雄性マウス（日本 SLC）を用いた。室温 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ および明期を 8:00~20:00 とした恒温室で飼育し、餌および水は自由に摂取させた。Morphine hydrochloride（塩野義製薬）、endomorphins、dynorphin A-(1-13)（ペプチド研究所）、naloxone hydrochloride（Sigma）および U-50,488H（Upjohn）はそれぞれ生理食塩液に溶解した。MR2266 は 5% 酒石酸で溶解させたのち生理食塩液で希釈した。

実験にはマウス用オペラント装置（MED-PC Associates, Inc., USA）を用いた。学習性無力マウスの作製は、装置内にマウスを入れ、電気刺激（0.6 mA, 30 秒間）を 30 秒間隔で 30 回負荷した。また、装置内のレバー押し行動により電気刺激を回避できるようにした（能動的回避反応）。1 日 30 試行を行い、能動的回避反応の逃避失敗回数を 5 日間記録した。統計処理は一元配置分散分析後、多重検定を行い、危険率が 5% 以下のとき有意差ありと見なした。

結果

μ -オピオイド受容体作動薬の morphine (3-30 mg/kg, s.c.) やオピオイド受容体拮抗薬の naloxone (10 および 30 mg/kg,

i.p.) は能動的回避反応の逃避失敗回数に対して特に影響を及ぼさなかった。一方、 κ -オピオイド受容体作動薬の U-50,488H (1-10 mg/kg, i.p.) は逃避失敗回数を有意に減少させた (Fig. 1)。U-50,488H による逃避失敗回数の減少は、オピオイド受容体拮抗薬の MR2266 (10 mg/kg, s.c.) の併用により有意に緩解された。

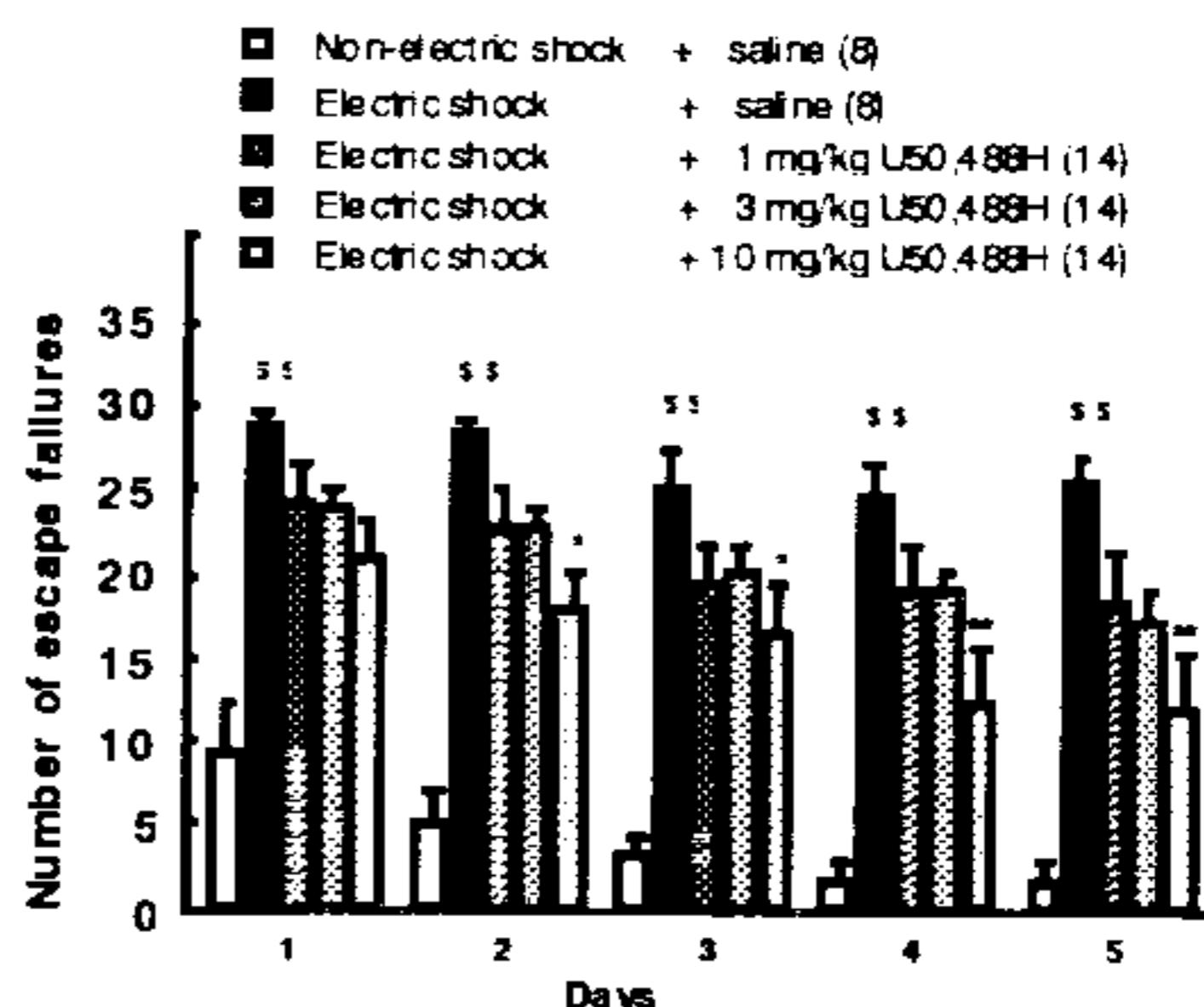


Fig. 1 Effects of U-50,488H on the number of escape failures in active conditioned avoidance response for five days in mice pre-exposed to inescapable electric shock. Each column represents the mean \pm S.E.M. **P<0.01 vs. non-electric shock + saline, *P<0.05; ***P<0.01 vs. electric shock + saline.

考察

学習性無力マウスに対して、 μ -オピオイドではなく、 κ -オピオイド受容体作動薬が緩解作用を示したことから、学習性無力には κ -オピオイド受容体を介したシグナル伝達が重要な働きを担っていることが示唆された。

引用文献

- 1) Seligman, ME & Beagley, G J Comp Physiol Psychol, 88, 534 (1975).
- 2) Sherman, AD et al.: Pharmacol Biochem Behav, 16, 449 (1982).

謝辞

本研究の一部は、文部科学省・日本学術振興会の科学研究費と文部科学省学術フロンティア推進事業の助成によるものであり、ここに深く感謝致します。

Spinorphinの新しい生理活性機能

• 羽里忠彦、山本行男、島村眞里子、植田弘師¹⁾

東京都臨床医学総合研究所、長崎大学¹⁾

New bioactive functions of Spinorphin

Tadahiko Hazato, Yukio Yamamoto, Mariko Shimamura, Hiroshi Ueda¹⁾

Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Nagasaki University¹⁾

Summary: Spinorphin, an endogenous factor that inhibits enkephalin-degrading enzymes from spinal cord was a new neuropeptide. It showed analgesia in a different manner compared with morphine. Its analgesia may be caused by an inhibitory activity toward enkephalin-degraded enzyme, dipeptidyl peptidase III(DPPIII).

緒言

オピオイドペプチドが脳内より見出されて以来、副作用がない夢の鎮痛薬としてケラトルファン等のプロテアーゼ阻害物質が数多く報告してきた¹⁾。我々は、臨床との共同研究で、ヒト脳脊髄液中に同様な性状を有する化合物が存在していることを突き止めた。そこで、エンケファリンを分解する酵素をそれぞれ精製し、それらの酵素の阻害活性を指標とした方法で、生体を探索した。その結果、ウシ脊髄に高濃度存在しているエンケファリン調節因子を見出し、脊髄由来よりSpinorphin (Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr)と命名した²⁾。本物質は、中枢での痛みや好中球の炎症等の制御に活性があることが分かってきた³⁾。最近、生理的な濃度のSpinorphinがブラジキニン(BK)を用いた発痛試験で鎮痛活性を有し、PTX非感受性を示した。この研究成果より、本物質が、新たな疼痛制御機構で活性発現している可能性が考えられた。今回、Spinorphin関連化合物と本物質を駆使し、エンケファリン分解酵素DPPIIIの阻

害活性が、鎮痛にどのように関与しているのかを検討した。

実験方法

研究材料：Spinorphinとその関連化合物は、伊藤ハム・ヘルスサイエンス事業部より提供して頂いた。

サル脳可溶画分の調整：脳可溶画分は、次の方法より調整した。脳を生理食塩水で洗つた後、25mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.0)を加えて、ポリトリロンホモジナイザーで攪拌し、50,000 xgで15分間遠心し、その上清をDE52-celluloseカラムにとうした。充分量の緩衝液で洗い、カラムに吸着した酵素を150mM NaClを含んだ緩衝液で溶出した。この部分精製した酵素を用いて、DPPIIIの酵素活性を測定した。

酵素活性の測定：脳より調整した酵素を用い、DPPIIIの合成基質Arg-Arg-β-naphtyl amideを用いて測定した。反応系は、最終濃度25mM Tris-HCl(pH 7.4) 緩衝液で30 μg bestatinと合成基質200 μM、合成化

物を加えた1 mlの系で測定した。37°C,60分間反応し、遊離した β -naphthylamineは、10% Tween20を含む1 M 酢酸緩衝液(pH 4.2)に溶かした0.1% Fast Garnet GBCを1 ml加えて呈色した。反応試験管を室温で30分間放置した後、分光光度計OD₅₂₅で測定した。

鎮痛試験：実験には、ddy系雄性マウス(20-22g)を使用した。Spinorphinとその関連化合物、leuhistinは、生理食塩水で溶解し、同時投与で用いた。未梢性鎮痛検定法は、以下の方法で行った。無麻酔下でマウスを布製の筒の中にいれ、筒に開けた穴から四肢を出し、宙振り状態で水平に保持した。左後肢は屈曲反射の軌跡を記録した。薬物投与は、50ul用のマイクロシリンジと皮下針を先端部分に取り付けたポリエチレン製カニューレにあらかじめ薬液を充填しておき、左後肢足趾皮下に挿入することを行った。挿入に伴う屈曲反射が消失した後、salineによって屈曲反射が認められないのを確認してから、実験を開始した。薬物の鎮痛作用は、2回のBK(2pmol)誘発性屈曲反射の大きさの平均に対する薬物処理各時間での抑制率で評価した。

結果と考察

今回、Spinorphinとその関連化合物を用いて、エンケファリン分解酵素に対して、強力に阻害する物質があるかを探索した。その結果、Fig.1に示すように、関連化合物(VVYPWT,LVVYPW,VVYPW)は、エンケファリン代謝酵素のDPPIIIに対してそれぞれある程度の阻害活性が観測された。しかし、VYPWT,YPWT,PWT,VYPW,YPW,VYPのSpinorphin関連化合物は、殆ど本酵素に対して阻害効果を示さなかった。そこで、DPP IIIに対してある程度阻害効果

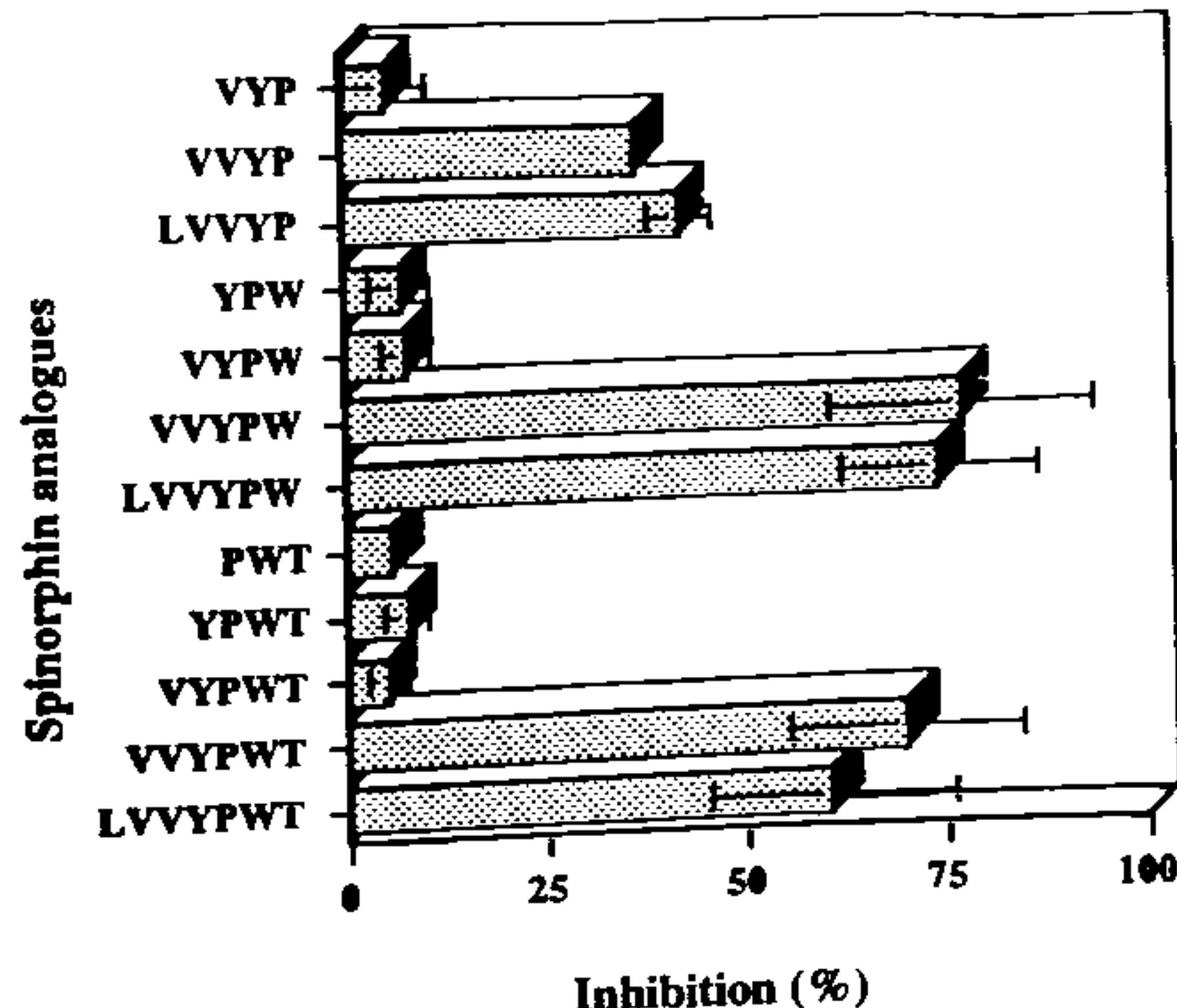


Fig. 1. Effects of spinorphin analogues on DPPIII enzyme activity. DPPIII enzyme activity was measured in the presence of various spinorphin analogues (5 μ g/ml). Inhibition (%) was expressed relative to the control value without a spinorphin analog. Data were the means \pm SD of two determinations of three different experiments.

Table 1

IC₅₀ of Dipeptidyl Peptidase III Inhibitors against Enkephalin-Degrading Enzymes in Mammalian Tissues

	IC ₅₀ (μ g/ml)		
	Spinorphin	Tynorphin	Leupeptin
Human neutrophil ^a			
DPP III	4.2	0.029	>10
Monkey brain ^b			
AP	3.3	>10	>10
DPP III	1.4	0.086	>10
NEP	10	>10	>10
ACE	2.4	>10	>10
Porcine kidney ^b			
DPP III	>100	>100	0.036

^a The value of the mean by two determinations for five different experiments.

^b The value of the mean by two determinations for four different experiments.

を有したSpinorphin関連化合物が濃度依存的に阻害活性があるか詳細に検討し、IC₅₀値を求めた。その結果、N末端とC末端のアミノ酸がはずれた化合物VVYPWが本物質と比較して16.5倍と強力な阻害効果を有することを見出した(Table. 1)。そこで、我々は、強力なDPP III阻害物質として

Tynorphinと命名した⁴。Tynorphinが脳中に存在するエンケファリン分解酵素アミノペプチデース(AP),ニュートラルエンドペプチデース(NEP),アンギオテンシンコンバーティングエンザイム(ACE)にどのような阻害効果を有するかを検討した。その結果、Tynorphinは、Spinorphinと比較すると、AP,NEP,ACEに対して殆ど阻害効果を有さなかった。更に、腎臓等に存在しているDPP IIIに対してても本物質は殆ど阻害活性を示さなかった⁵。このように、DPP IIIに対して特異的で強力な阻害効果を有する特色のある物質は、殆ど現在までに報告されていない。この酵素に対する阻害形式は拮抗的に 7.5×10^{-8} Mを示し、水に可溶の低分子化合物である。

一方、Spinorphinは、BKを用いた薬理試験で、容量依存的に発痛抑制効果を示し50%抑制率が28pmolであることが分かっている⁶。更に、モルヒネ等のオピオイド化合物は、抗侵害性効果をPTX(百日咳毒素)の前処理により拮抗される。しかし、Spinorphinの効果はPTX非感受性で、新たな情報伝達機構で発現していると考えている。そこで、DPPIIIの阻害物質Tynorphinとleuhistin(1nmol)との併用で、BK誘発性侵害反応に対する鎮痛作用を検討した。鎮痛活性を5分-30分の時間反応曲線面積(ACU),10分、20分、30分値での鎮痛率から50%鎮痛効果率(ED₅₀値)を算出し、Spinorphinと比較すると、ほぼ同程度であった(Table. 2)。Morphine, DAMGOおよびU-69593のED₅₀値がそれぞれ340pmol, 33pmolおよび1.4nmolであることより、DPP IIIの阻害物質Tynorphinは、かなり強い鎮痛活性を有する物質と思われる。

Table 2 Comparison between SPINORPHIN and TYNORPHIN on the bradykinin-induced flexor responses in mice.

	ED ₅₀ (pmol)	
	SPINORPHIN	TYNORPHIN
AUC	28 (1.3-628.2)	38 (4.6-317.5)
10 min	76 (9.1-633.3)	23 (2.6-203.9)
20 min	7 (0.2-205.8)	37 (3.8-357.5)
30 min	95 (10.1-895.2)	66 (9.1-479.5)

Values in parenthesis are 95% confidence limits. A minimum of 3 doses with 6 animals per dose were used to construct dose response curves.

以上、Spinorphinとその関連化合物よりこの新しい痛みの伝達機構には、エンケファリン分解酵DPP IIIが重要な役割を果たしている可能性が示唆された。今後、プロテアーゼに抵抗性があるDPP III阻害物質を天然物等より探索研究すれば、新しい鎮痛薬の可能性も考えられる。

文 献

- 1) Dikken, A.: Nature, 320, 681 (1986)
- 2) Nishimura, K. and Hazato, T.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 194, 713 (1993)
- 3) Yamamoto, Y., Kanazawa, T., Shimamura, M., Ueki, A. and Hazato, T.: Life Sciences, 62, 1769 (1998)
- 4) Yamamoto, Y., Hashimoto, J., Shimamura, M., Yamaguchi, T. and Hazato, T.: Peptides, 21, 503 (2000)
- 5) Hashimoto, J., Yamamoto, Y., Kurosawa, H., Nishimura, K. and Hazato, T.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 273, 393 (2000)
- 6) Ueda, H., Matsunaga, S., Inoue, M., Yamamoto, Y. and Hazato, T.: Peptides, 21, 1215 (2000)

内在性オピオイドペプチドのミューオピオイド受容体 アゴニストによる遊離

岡 哲雄、小坂賢也、金井昌之、赤堀一仁、中林 大、

高橋 滋、岩尾佳代子、小林広幸、荒井美治

東海大学医学部薬理学教室

Release of endogenous opioid peptides by μ -opioid receptor agonists

Tetsuo Oka, Kenya Kosaka, Masayuki Kanai, Kazuhito Akahori, Masaru Nakabayashi,
Shigeru Takahashi, Kayoko Iwao, Hiroyuki Kobayashi, Yoshiharu Arai

Department of Pharmacology, School of Medicine, Tokai University

Summary: The hydrolysis of [Met⁵]-enkephalin (met-enk), leu-enk, met-enk-Arg⁶-Phe⁷, met-enk-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸, and dynorphin-(1-8) by membrane preparation is almost completely prevented by the mixture of three peptidase inhibitors (PIs), amastatin, captopril and phosphoramidon. Additionally, anti-nociceptive effects produced by the intra-third-ventricular (i.t.v.) administration of these endogenous opioid peptides are augmented more than 100 fold by the i.t.v. pretreatment of rats with three PIs. Unexpectedly, anti-nociceptive effects produced by the i.t.v. injection of morphine and DAMGO, that are not hydrolyzed by the peptidases, are significantly enhanced by the i.t.v. pretreatment of rats with three PIs, although those induced by ketocyclazocene or [D-Pen^{2,5}]-enk are not change by three PIs. The evidences indicate that μ -opioid receptor agonists release endogenous opioid peptides.

緒言

[Met⁵]-enkephalin (met-enk)、leu-enk、met-enk-Arg⁶-Phe⁷、met-enk-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸、およびdynorphin-(1-8)などのアミノ酸残基数8以下の比較的短い内在性オピオイドペプチドは、膜標本と37℃で60分間incubationすることにより、ほぼ完全に加水分解されることが示された^{1,2}。また、膜標本による5種の内在性オピオイドペプチドの加水分解は、3種のペプチダーゼ阻害剤(PIs)(アマスタチン、カプトプリル、ホスホラミドン)を共存させると、ほぼ完全に阻止できることが明らかにされた^{1,2}。なお、3種のPIsのなかのどの2種の組合せでも、加水分解を完全に阻止することはできないことも示された。つまり、これら5種のペプチドは、3種のペプチダーゼで、しかも3種のペプチダーゼのみで加水分解されることが示された。また、これら3種のペプチダーゼはいずれも、オピオイド受容体の極めて近くに存

在することが示唆された。つまり、シナプス前末端から遊離されたペプチドは、3種のペプチダーゼにより加水分解不活性化され、作用が終了することが示唆された。これら5種の内在性オピオイドペプチドを、ラット脳の第3脳室に投与後に認められる抗侵害効果は、3種のPIsの混合液を前投与することにより、100倍以上大きくなることが示された^{5,6)}。なお、ペプチダーゼで加水分解されないことが知られているモルヒネの抗侵害効果は、PIsの混合液により増強されないことが予想された。しかし、予想に反して、今回の実験で、モルヒネの抗侵害効果もPIsの混合液により有意に増強されることが示された。

実験方法

体重200g前後のWistar系雄性ラットの第3脳室に、カニューレを介して薬液を10μl/minの速度で投与後、15分毎に120分目まで55℃の温水を用いtail-flick response(TFR)を測定し、%MPE(maximal possible effect)を求めた。また、必要に応じてAUC(area under the curve)値も求めた。

実験結果

1. 第3脳室に①生理食塩液10μlを投与後10分目にモルヒネ10nmolを投与した群、②アマスタチン(A)、カプトブリル(C)、およびホスホラミドン(P)の各10nmolを含む混合液(ACP)を投与後10分目にモルヒネ10nmolを投与した群、ならびに、③AC各10nmol、④AP各10nmol、および⑤CP各10nmolなどを含む混合液を投与後10分目にモルヒネ10nmolを投与した群などで、モルヒネ投与後15分毎に120分目までTFRを測定し、AUC_{0-120min}値を求めた。その結果、AUC_{0-120min}値は、①群に比べ、②群は有意に大きかった。しかし、③、④、および⑤群は、①群に比べ、有意の差は認められなかった。

2. モルヒネの代わりに、DAMGO([D-Ala², N-Me-Phe⁴, Gly-ol]-enk)0.1nmolを第3脳室に投与し、1と同様に5群に分けて、実験を行った。その結果、AUC_{0-120min}値は、①群に比べ、②群は有意に大きかった。しかし、③、④、および⑤群は、①群に比べ、有意の差は認められなかった。

3. モルヒネの代わりにケトサイクラゾシン10nmol、あるいは[D-Pen^{2,5}]-enk10nmolを第3脳室に投与し、1の①と②群と同様に実験を行った。その結果、ACPによる抗侵害効果の増強作用は、ケトサイクラゾシンと[D-Pen^{2,5}]-enkの場合には認められなかった。

考察

モルヒネやケトサイクラゾシンはペプチダーゼで不活性化されないと考えられている。また、DAMGOや[D-Pen^{2,5}]-enkはペプチダーゼで極めて不活性化され難いと考えられている。

したがって、実験を行う前には、これらのオピオイドの効果は、PIs で影響されないと予想された。しかし、予想に反して、モルヒネと DAMGO の抗侵害効果は ACP で前処置することにより有意に大きくなつた。この予期せぬ結果は、モルヒネや DAMGO によりペプチダーゼで不活性化される抗侵害効果を有するペプチド（たとえば、met-enk、leu-enk など）が遊離されると仮定すれば説明し易い。実際、外から投与した met-enk の抗侵害効果も、ACP では著しく増強されるが、AC、AP、および CP などでは増強の程度は小さい⁹。これまでの私達の研究¹⁻⁴⁾で、5種のオピオイドペプチドはいずれも抗侵害効果を有し、しかもその効果が ACP で著しく大きくなることから、モルヒネおよび DAMGO で遊離されるペプチドは、5種のオピオイドペプチドのなかの 1種あるいは 2種以上である可能性が高いと思われた。

引用文献

1. Hiranuma T, Oka T. (1986) Effects of peptidase inhibitors on the [Met⁵]-enkephalin hydrolysis in ileal and striatal preparations of guinea-pig: almost complete protection of degradation by the combination of amastatin, captopril and thiorphan. *Jpn J Pharmacol.* 41(4):437-46.
2. Hiranuma T, Iwao K, Kitamura K, Matsumiya T, Oka T. (1997) Almost complete protection from [Met⁵]-enkephalin-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸ (Met-enk-RGL) hydrolysis in membrane preparations by the combination of amastatin, captopril and phosphoramidon. *J Pharmacol Exp Ther.* 281(2):769-74.
3. Hiranuma T, Kitamura K, Taniguchi T, Kanai M, Arai Y, Iwao K, Oka T. (1998) Protection against dynorphin-(1-8) hydrolysis in membrane preparations by the combination of amastatin, captopril and phosphoramidon. *J Pharmacol Exp Ther.* 286(2):863-9.
4. Hiranuma T, Kitamura K, Taniguchi T, Kobayashi T, Tamaki R, Kanai M, Akahori K, Iwao K, Oka T. (1998) Effects of three peptidase inhibitors, amastatin, captopril and phosphoramidon, on the hydrolysis of [Met⁵]-enkephalin-Arg⁶-Phe⁷ and other opioid peptides. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 357(3):276-82.
5. Taniguchi T, Fan XT, Kitamura K, Oka T. (1998) Effects of peptidase inhibitors on the enkephalin-induced anti-nociception in rats. *Jpn J Pharmacol.* 78(4):487-92.
6. Kitamura K, Akahori K, Yano H, Iwao K, Oka T. (2000) Effects of peptidase inhibitors on anti-nociceptive action of dynorphin-(1-8) in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 361(3):273-8.