

神経因性疼痛発現における脊髄内 protein kinase の役割

矢島義識、島村昌弘、成田 年、鈴木 勉

星薬科大学薬品毒性学教室

Involvement of the spinal protein kinases in thermal hyperalgesia induced by sciatic nerve ligation in mice

Yoshinori Yajima, Masahiro Shimamura, Minoru Narita and Tsutomu Suzuki

Department of Toxicology, School of Pharmacy, Hoshi University

Summary: Partial sciatic nerve ligation in mice caused the marked and persistent decrease in thermal paw withdrawal latencies of the ipsilateral side. This thermal hyperalgesia was completely suppressed by chronically repeated intrathecal (i.t.) injections of the selective protein kinase C (PKC) inhibitor and protein tyrosine kinase (PTK) inhibitors. In contrast, repeated i.t. pretreatment with the selective protein kinase A (PKA) inhibitor failed to inhibit sciatic nerve ligation-induced thermal hyperalgesia. These findings provide evidence that the activation of PTK and PKC in the spinal cord following nerve injury is implicated in the expression of thermal hyperalgesia in nerve-ligated mice.

緒言

神経因性疼痛は、帯状疱疹後神経痛、complex regional pain syndrome (CRPS) などの神経損傷や機能障害などによって引き起こされる難治性疼痛である。神経因性疼痛患者は同一の原因疾患であっても神経の損傷、障害の程度などにより異なった症状を呈する場合があること、また他の神経因性疼痛患者と同様の症状を示しているも、同一の治療法で疼痛が改善されない場合も少なくないことなどから、神経因性疼痛の発症ならびにその維持機構は、非常に複雑なものであることが想定される。このように神経因性疼痛の原因や症状は患者によりさまざまであるが、痛覚過敏反応やアロディニアが神経因性疼痛患者に共通してみられる症状として知られている。

生体内において非常に重要な役割を担う酵素

の一つである protein kinase は、基質となる標的タンパク質をリン酸化することで、さまざまな生理反応を生み出すことが知られており、さらに海馬での長期増強などに代表されるシナプス可塑性を導く主要因子の一つとしてこれまで数多くの報告がなされている。一方、脊髄は単なる疼痛伝達の中継点としての役割だけでなく、神経因性疼痛においては神経損傷により引き起こされる脊髄の可塑的变化が、痛覚過敏反応やアロディニアを誘発する原因ではないかと考えられている。そこで本研究では、坐骨神経部分結紮モデルを用いて、神経損傷により誘発される熱痛覚過敏反応における脊髄内 protein kinase の役割について検討した。

方法

実験動物

ICR 系雄性マウス (25-30 g)

神経因性疼痛モデル

神経因性疼痛モデルは Seltzer らの方法をマウスに応用し、右側後肢の坐骨神経を半周だけ強度に結紮することにより作製した。また、坐骨神経を露出しただけで結紮しなかった群を sham 群とした。

痛覚過敏反応の測定

坐骨神経結紮による熱刺激に対する痛覚過敏反応の測定には、神経因性疼痛様症状をより客観的に評価できる足底熱刺激装置を用いて評価した。坐骨神経結紮前および結紮後の両足後肢の足底にそれぞれ熱刺激を加え、マウスが後肢を跳ねのけるまでの時間を疼痛閾値の指標とし、術前および術後 24 時間ごとにその変化を 1 日 1 回測定した。

Western blotting

坐骨神経結紮による脊髄における分子生物学的な変化を検討するために、sham 群ならびに坐骨神経結紮群の L4-L6 を含む脊髄を摘出し、遠心分離にて細胞膜標本を作製した。作製した脊髄分画膜標本を用いて、Western blot 法に従い、PKC アイソフォームの一つである PKC γ および PKA のタンパクレベルについて検討した。

結果および考察

坐骨神経を結紮することにより、結紮した側の後肢においてのみ著明かつ持続的な熱刺激に対する痛覚過敏反応が観察された。しかしながら、この熱刺激に対する痛覚過敏反応は、選択的 PKC 阻害薬である RO-32-0432 を繰り返し髄腔内処置することにより、コントロールレベ

ルにまで完全に回復した。また、坐骨神経結紮マウスから得られた脊髄膜標本を用いて、PKC γ のタンパクレベルを Western blot 法により検討したところ、坐骨神経結紮群では sham 群と比較して有意な PKC γ タンパクレベルの増加が認められた。さらに、PKC γ 遺伝子ノックアウトマウスを用いて同様の検討を行ったところ、野生型マウスで認められる熱痛覚過敏反応は、PKC γ 遺伝子ノックアウトマウスではほぼ完全に抑制された。それに対し、選択的 PKA 阻害薬である KT-5720 を繰り返し髄腔内処置しても、坐骨神経結紮による熱痛覚過敏反応は全く抑制されなかった。また、坐骨神経結紮マウスの脊髄膜標本を用いて、PKA タンパクレベルについて検討したが、sham 群と比較して何ら有意な変化は認められなかった。一方、protein tyrosine kinase (PTK) の阻害薬である genistein を用いて同様の検討を行ったところ、熱痛覚過敏反応はほぼ完全に抑制された。さらに、神経栄養因子受容体を介した PTK 活性を阻害する K-252a の繰り返し髄腔内処置によっても、この熱痛覚過敏反応は顕著に抑制された。

我々はすでに、坐骨神経結紮による熱痛覚過敏反応の発現には、脊髄における脳由来神経栄養因子 (BDNF) が非常に重要な役割を果たしていることを明らかにしている。さらに、PTK の下流には PKC が存在することが報告されていることから、神経損傷により誘発される熱痛覚過敏反応には、脊髄の BDNF により活性化された受容体型 PTK を介した PKC の持続的な活性化が、非常に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

神経因性疼痛下におけるモルヒネ誘発報酬効果の不形成と
 μ オピオイド受容体の機能的変化

尾崎 覚, 成田 年, 玉木寛子, 鈴木 勉
 星薬科大学薬品毒性学教室

Suppression of morphine-induced rewarding effect and changes in μ -opioid receptor function
 under neuropathic pain

Satoru Ozaki, Minoru Narita, Hiroko Tamaki, Tsutomu Suzuki

Department of Toxicology, School of Pharmacy, Hoshi University

Summary: The morphine-induced place preference observed in sham-operated mice was abolished in sciatic nerve-ligated mice. Considering the data obtained from *in vivo* microdialysis assay, the attenuation of morphine-induced place preference following sciatic nerve ligation may result from the decrease in the morphine-induced dopamine release in N.Acc. Furthermore, the increase of [³⁵S] GTP γ S binding to lower midbrain membranes including ventral tegmental area (VTA), which possesses high densities of μ -opioid receptors and plays a critical role in the rewarding effects of opioids, was significantly attenuated in nerve-ligated mice as compared to sham-operated mice. These results suggest that the decrease of μ -opioid receptor-mediated G-protein activation in the lower midbrain is, at least in part, implicated in the inhibition of morphine-induced rewarding effect under neuropathic pain.

【緒言】

モルヒネは慢性投与により精神依存を形成するが、臨床においてがん患者にモルヒネを適切に使用した場合、精神依存が問題になることはほとんどない。我々はカラゲニンやホルマリンによる炎症性疼痛モデルにおいてモルヒネの報酬効果が形成されないことを既に明らかにしており、臨床報告を支持する結果を得ている^{1,2)}。近年、オピオイドが効きにくい難治性の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にさまざまな研究が行われている。最近我々は、坐骨神経結紮による神経因性疼痛モデルを作製し、モルヒネの報酬効果について検討したところ、炎症性疼痛時と同様にモルヒネの報酬

効果が認められないことを明らかにした。そこで本研究では、神経因性疼痛下におけるモルヒネ誘発報酬効果の抑制機構を解明する目的で、この坐骨神経結紮モデルにおける脳内 μ 受容体の機能的変化について検討した。

【方法】

本研究において、実験動物として ICR 系雄性マウスおよび SD 系雄性ラットを使用した。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、右後足坐骨神経を半周結紮することにより作製した³⁾。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。条件づけはプレ方式に従い 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。条件づけ開始の前日および 6 日間の条件づけが終了した翌日にそれぞれ pre- および post-test を行い、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、これらの値から CPP スコアを算出した。

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。

4. [³⁵S] GTPγS binding assay

手術後 4 日目に、マウスの中脳底部および橋・延髄領域を摘出した後、膜分画標本を作製した。これらのサンプルを μ 受容体作動薬であるモルヒネ、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 を用いて濾過した。その後、シンチレーションカクテル剤にて 12 時間放置し、液体シンチレーションカウンターにより放射活性を測定した。

【結果および考察】

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。一方、坐骨神経結紮群においてはモルヒネによる報酬効果は有意に抑制された。このことから、神経因性疼痛モデルにおいても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事実を裏付ける結果となった。

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が明らかになっている⁴⁾。そこで本研究では、マイクロダイアリ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について検討した。その結果、非結紮群におけるモルヒネによるドパミン遊離量の増加は、坐骨神経結紮群に比較して有意に減少した。これらの結果から、坐骨神経結紮による神経因性疼痛下ではモルヒネによる中脳辺縁ドパミン神経系の活性化作用が減弱しているために、モルヒネの報酬効果が抑制されたものと考えられる。

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。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、モルヒネによるすべての薬理効果が減弱していることが原因とも考えられる。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、疼痛時において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機能変化が起きている可能性を示唆しているものと考えられる。

モルヒネの第一作用点は μ オピオイド受容体であり、この受容体がモルヒネの薬理作用発現に必要不可欠であることは μ オピオイド受容体遺伝子欠損マウスを用いた研究で明らかにされている。実際、このマウスにおいてモルヒネの精神および身体依存は形成されない。そこで、坐骨神経結紮下における μ オピオイド受容体の機能変化の有無を明らかにするため、モルヒネによる μ オピオイド受容体を介した G タンパク質活性化作用を [35 S] GTP γ S binding assay にて評価した。腹側被蓋野を含む中脳底部では μ オピオイド受容体が高密度に分布しており、この領域はモルヒネの報酬効果発現に最も重要であることが知られているが⁴⁾、モルヒネは非結紮群の中脳底部の膜組織標本において強力かつ有意な G タンパク質活性化作用を示した。それに対して、坐骨神経結紮群におけるモル

ヒネの効果は有意に減弱していた。しかしながら、モルヒネの抗侵害効果発現に重要な橋/延髄領域の膜組織標本におけるモルヒネの G タンパク質活性化作用には両群間において有意な変化は認められなかった。つまり、神経因性疼痛下におけるモルヒネ誘発報酬効果の抑制は、モルヒネの報酬効果発現に重要な部位である腹側被蓋野を含む中脳底部での μ オピオイド受容体機能低下に一部起因している可能性が示唆された。また、モルヒネの脳室内投与により誘発される抗侵害効果が坐骨神経結紮下においても維持されているのは、抗侵害効果発現領域において μ オピオイド受容体機能が保持されているためと考えられる。

以上のことから、坐骨神経結紮による神経因性疼痛下におけるモルヒネ誘発報酬効果の抑制は、モルヒネの報酬効果発現に重要な部位である腹側被蓋野を含む中脳底部での μ 受容体機能低下によるドパミン神経系に対する活性化作用の減弱に一部起因している可能性が示唆された。しかしながら、この μ オピオイド受容体機能低下が、受容体の量的変化によるものなのか、あるいは受容体と G タンパク質の脱共役などいわゆる質的变化によるものかについては明確ではない。本シンポジウムではこれらの仮説や考察を背景に最新のデータをふまえて、これらの機序についての我々の見解を紹介する。

【引用文献】

- 1) Suzuki T, Kisimoto Y and Misawa M: Life Sci 59, 1667-1674 (1996)
- 2) Suzuki T, Kisimoto Y, Misawa M, Nagase H and Takeda F: Life Sci 64, PL 1-7 (1999)
- 3) Seltzer Z, Dubner R and Shir Y: Pain 43, 205-218 (1990)
- 4) Funada M, Suzuki T and Misawa M: Ann Psychiatry 5, 222-237 (1995)

Morphine 誘発報酬効果発現における イノシトールリン脂質代謝経路の役割

水尾 圭祐, 成田 年, 鈴木 勉
星薬科大学薬品毒性学教室

Role of the phosphatidylinositol metabolism cascade
in the morphine-induced place preference

Keisuke Mizuo, Minoru Narita and Tsutomu Suzuki

Department of Toxicology, School of Pharmacy, Hoshi University

Summary: The present study was to investigate the role of phosphatidylinositol metabolism cascade in the morphine-induced place preference. An i.c.v. pretreatment with specific antibody to G $\beta\gamma$ significantly and dose-dependently attenuated the morphine-induced place preference. Furthermore, morphine-induced place preference was completely blocked by i.c.v. injection of a selective inositol-1, 4, 5-triphosphate (IP₃) inhibitor xestospongin C. It has been shown that IP₃ production can be mediated by G $\beta\gamma$. Taken together, the present data suggest the possibility that the activation of phosphatidylinositol metabolism cascade via G $\beta\gamma$ subunit may contribute to the morphine-induced place preference.

緒言

近年、 μ -opioid 受容体刺激により phospholipase C (PLC) が活性化されることが報告され、opioid 神経系とイノシトールリン脂質代謝経路の関与が注目されている。

また、当教室における遺伝解析の結果、morphine 誘発報酬効果発現には inositolpolyphosphate-5-phosphatase (IP5Pase)、G-protein γ 4 subunit および phosphatidylinositol-3-kinase (PI3-K) など、イノシトールリン脂質代謝に関与している候補遺伝子が検出された。これらのことから morphine 誘発報酬効果にイノシトールリン脂質代謝経路が何らかの役割を果た

しているものと考えられる。そこで本研究では morphine 誘発報酬効果におけるこれらの関与について検討を行った。

方法

実験には体重 25-30 g の ddY 系雄性マウスおよび 7 週齢の SD 系雄性ラットを使用した。報酬効果の測定は conditioned place preference 法に従い、条件づけはカウンターバランス方式に従って、1 日 1 回 60 分間、計 6 日の条件づけを行った。

抗 G $\beta\gamma$ 抗体は morphine 投与 1 時間前に、また、選択的 IP₃ 阻害薬である xestospongin C

は morphine 投与の 10 分前にそれぞれ脳室内に投与した。

結果および考察

Morphine によって誘発される報酬効果は G-protein の $\beta\gamma$ subunit の特異的抗体を脳室内処置することにより有意に抑制された。この結果より、morphine の報酬効果発現には G-protein の $\beta\gamma$ subunit の活性化が一部関与していることが考えられる。

近年、 $G\beta\gamma$ subunit により PI3-K が活性化されることが報告された¹⁾。また、この PI3-K の活性化によって産生された PIP_3 がセカンドメッセンジャーとして PLC γ を活性化することが明らかにされている。さらに、morphine を連続投与することにより、腹側被蓋野における PLC γ の up-regulation が誘発されることが報告されている²⁾。また、近年、当教室において morphine の単回投与により PLC γ が活性化されることを明らかにしている³⁾。これらのことより、morphine 精神依存形成に PLC γ の活性化が重要な役割を担っている可能性が考えられる。

最近、PLC γ の活性化による IP_3 感受性 Ca^{2+} ストアーからの Ca^{2+} 遊離がさまざまな生理作用の発現に重要な役割を担っていることが明らかにされている⁴⁾⁵⁾。また、細胞内 Ca^{2+} の上昇により morphine の自己投与が増強すること、また、 Ca^{2+} によって活性化される calcium/calmodulin kinase II の選択的阻害薬の局所注入により morphine 誘発報酬効果が抑制されること⁶⁾⁷⁾ などから、morphine の精神依存発現と細胞内 Ca^{2+} 動態との関連が示唆されている。そこで、morphine 誘発報酬効果における

IP_3 の役割について検討を行ったところ、morphine 誘発報酬効果は選択的 IP_3 阻害薬である xestospongin C の脳室内処置により有意に抑制された。これらのことより脳内 IP_3 感受性 Ca^{2+} store からの Ca^{2+} 遊離が morphine 誘発報酬効果発現に一部関与している可能性が示唆される。

本研究の結果より、morphine 誘発報酬効果にはおそらく $G\beta\gamma$ を介した IP_3 の産生およびその代謝に関与する IP5Pase を含めた一連のイノシトールリン脂質代謝経路が関与する可能性が考えられ、遺伝解析の結果を支持するものとなった。

引用文献

1. Stoyanov B et al: Science **269**, 690-693 (1995)
2. Wolf DH, Numan S, Nestler EJ and Russell DS: J Neurochem **73**, 1520-1528 (1999)
3. 成田 年、大西織江、根本真記、青木 健、鈴木 勉:日神精薬理誌 **21**, 7-14 (2001)
4. Barker SA, Lujan D and Wilson BS: J Leukoc Biol **65**, 321-329 (1999)
5. Scharenberg AM and Kinet JP: Cell **94**, 5-8 (1998)
6. Kuzmin AV, Patkina NA and Zvartau EE: Brain Res **652**, 1-8 (1994)
7. Fan G-H, Wang L-Z, Qiu H-C, Ma L and Pei G: Mol Pharmacol **56**, 39-45 (1999)

モルヒネ耐性および身体的依存に対する グルタミン酸トランスポーター活性化薬 MS-153 による抑制効果

中川貴之、小澤 徹、山本梨絵、南 雅文、佐藤公道
京都大学薬学研究科生体機能解析学分野

Inhibitory effects of MS-153, a glutamate transporter activator on morphine tolerance and physical dependence

Takayuki Nakagawa, Tohru Ozawa, Rie Yamamoto, Masabumi Minami, Masamichi Satoh
Department of Molecular Pharmacology,
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

Summary: We investigated the effects of MS-153, which is reported to accelerate glutamate uptake, on the development of morphine tolerance and physical dependence in mice. Although MS-153 had no effects on the acute antinociceptive effects of morphine, co-administrations of MS-153 (1, 3 and 12.5 mg/kg, s.c.) during repeated morphine treatments significantly attenuated the development of tolerance to the antinociceptive effect of morphine and suppressed the naloxone-precipitated withdrawal signs (jumps and body weight loss). These results suggest that MS-153, a glutamate transporter activator, has an inhibitory effect on the development of morphine tolerance and physical dependence.

【緒言】

モルヒネなどの麻薬性鎮痛薬の連続的使用による耐性および依存性の形成は、興奮性神経伝達物質の一つであるグルタミン酸の受容体拮抗薬により抑制されること、さらに禁断症状発現時には青斑核などの脳部位において細胞外グルタミン酸濃度が上昇することなどが報告されており、脳内におけるグルタミン酸が重要な役割を果たしていることが示唆されている¹⁾。実際、NMDA 受容体に対して拮抗作用を有するケタミンは、臨床においてもモルヒネによる耐性・依存性の形成を軽減させる作用もあることから、モルヒネの鎮痛補助薬としても使用されている²⁾。しかしながら、NMDA 受容体アンタゴニストには、精神異常が現れるなどの副作用もあり、またそれ自体の耐性の問題も残されている。

一方、(R)-(-)-5-methyl-1-nicotinoyl-2-pyrazoline (MS-153) は、各種虚血モデルにおいて顕著な脳保護作用を示す薬物として見いだされ、そのメカニズムの一つとして虚血時の細胞外グルタミン酸

濃度の上昇の抑制が関与していることが示されている³⁾。最近、MS-153はグリア型グルタミン酸トランスポーターの一つであるGLT-1を過剰発現させたCOS-7細胞において、細胞外グルタミン酸の取り込みを促進する作用があることが報告された⁴⁾。本研究では、このグリア型グルタミン酸トランスポーターを活性化させる作用を有するMS-153の、モルヒネによる耐性および身体的依存の形成に対する影響を行動薬理的に検討した。

【実験方法】

実験動物

ddY 系雄性マウス (20 ~ 24 g)

侵害受容閾値の測定

塩酸モルヒネを単独あるいはMS-153 (MS-153は三井化学株式会社より御供与頂いた) と同時にマウス皮下に投与し、所定の時間後、tail pressure法により機械的侵害受容閾値を測定した。

モルヒネによる耐性・依存性の誘導

塩酸モルヒネを10 mg/kgから45 mg/kgまで段階

的に用量を上げていき、毎日、午前9時と午後7時にマウスの皮下に投与した (Fig. 2, 5 参照)。

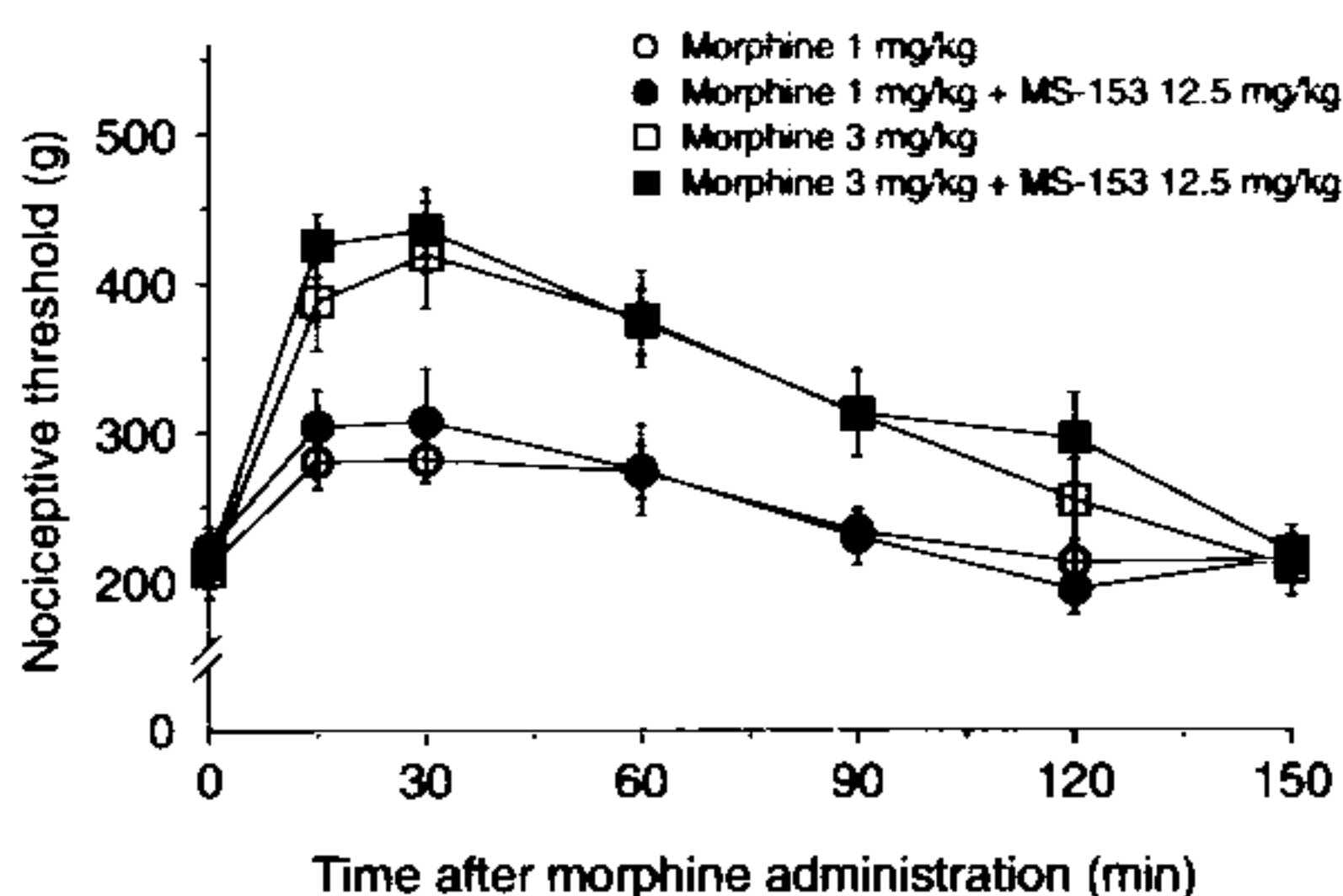
モルヒネ耐性形成の測定

モルヒネ反復投与1日目から4日目まで、午後2時に3 mg/kgの塩酸モルヒネ3 mg/kgのみを皮下投与し、モルヒネによる鎮痛効果を測定した。

禁断症状の誘発

5日目のモルヒネ最終投与から2時間後、ナロキソン10 mg/kgを腹腔内に投与し、誘発される典型的な禁断症状の一つである跳躍行動の回数を40分間計数した。また、ナロキソンを投与する直前のマウスの体重と、投与40分後の体重の差から、体重減少を測定した。

(a) Time course



(b) AUC

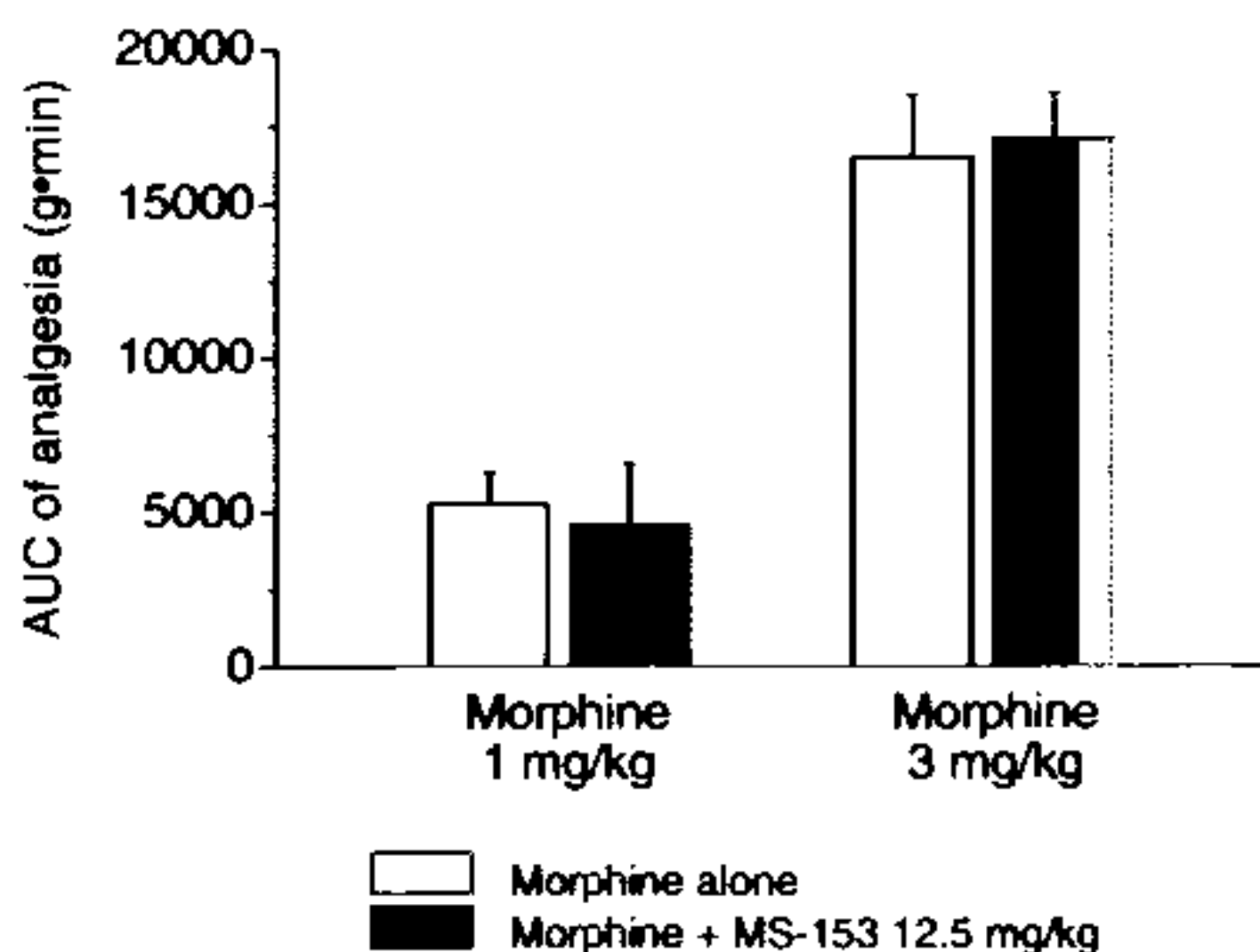


Fig. 1. Effects of MS-153 on the acute antinociceptive effect of morphine in the mouse tail pressure test. (a) Morphine (1 and 3 mg/kg) was administered subcutaneously at time 0 in combination with or without MS-153 (12.5 mg/kg). The nociceptive threshold at each point is presented as the mean \pm S.E.M of 9–11 animals. (b) The magnitudes of the effects of MS-153 on the acute morphine antinociception are presented as the AUC values of analgesia.

【結果】

1. モルヒネ急性投与による鎮痛効果に対するMS-153同時投与の効果

モルヒネの急性投与による鎮痛作用に対するMS-153同時投与の効果を検討した。しかしながら、モルヒネ (1 および 3 mg/kg) による鎮痛作用にMS-153 (12.5 mg/kg) は有意な変化を与えなかった (Fig. 1)。

2. モルヒネ反復投与による耐性形成に対するMS-153同時投与の効果

モルヒネ (10→45 mg/kg) およびMS-153をFig. 2のスケジュールに従ってマウスに投与した。モルヒネのみを反復投与したコントロール群においては、3 mg/kgのモルヒネの急性投与による鎮痛効果は、モルヒネ反復投与開始前 (1日目) と比較して、反復投与2日目においても顕著に減弱し、さらに3日目、4日目にはその鎮痛効果はほとんど見られなくなり、モルヒネに対する耐性が形成された。このモルヒネ耐性形成は、MS-153 (1、3あるいは12.5 mg/kg) の同時投与により濃度依存的に減弱され、モルヒネ反復投与2日目および3日目においては3 mg/kgおよび12.5 mg/kgのMS-153の同時投与により、モルヒネ単独投与群と比較して有意に耐性形成が減弱された。また、反復投与4日目においても、12.5 mg/kgのMS-153の同時投与により有意な耐性形成減弱作用が見られた (Fig. 3)。

3. ナロキソン誘発禁断症状に対するMS-153同時投与の効果

モルヒネ反復投与5日目のモルヒネ最終投与か

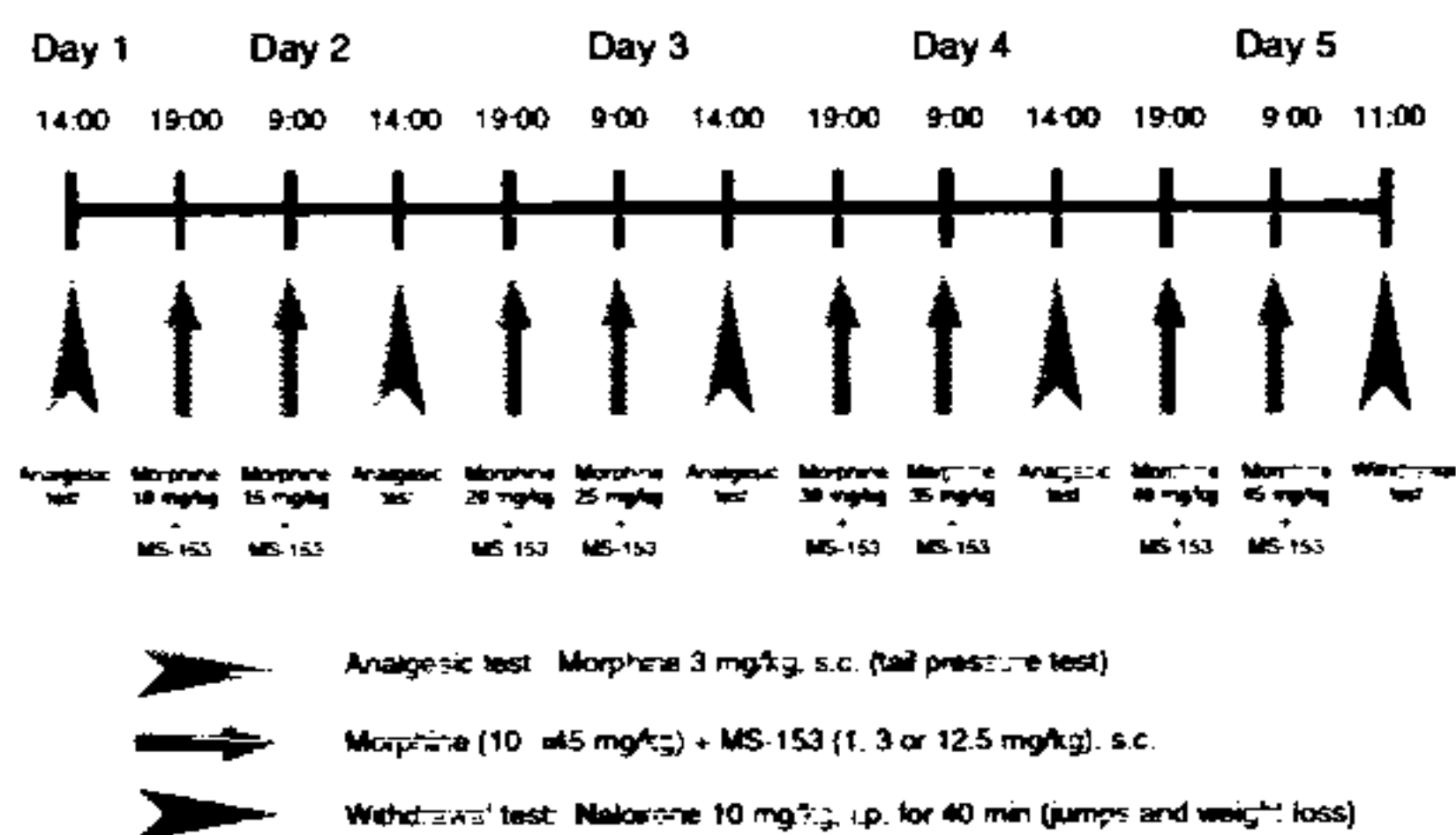


Fig. 2. Treatment schedule of morphine and MS-153

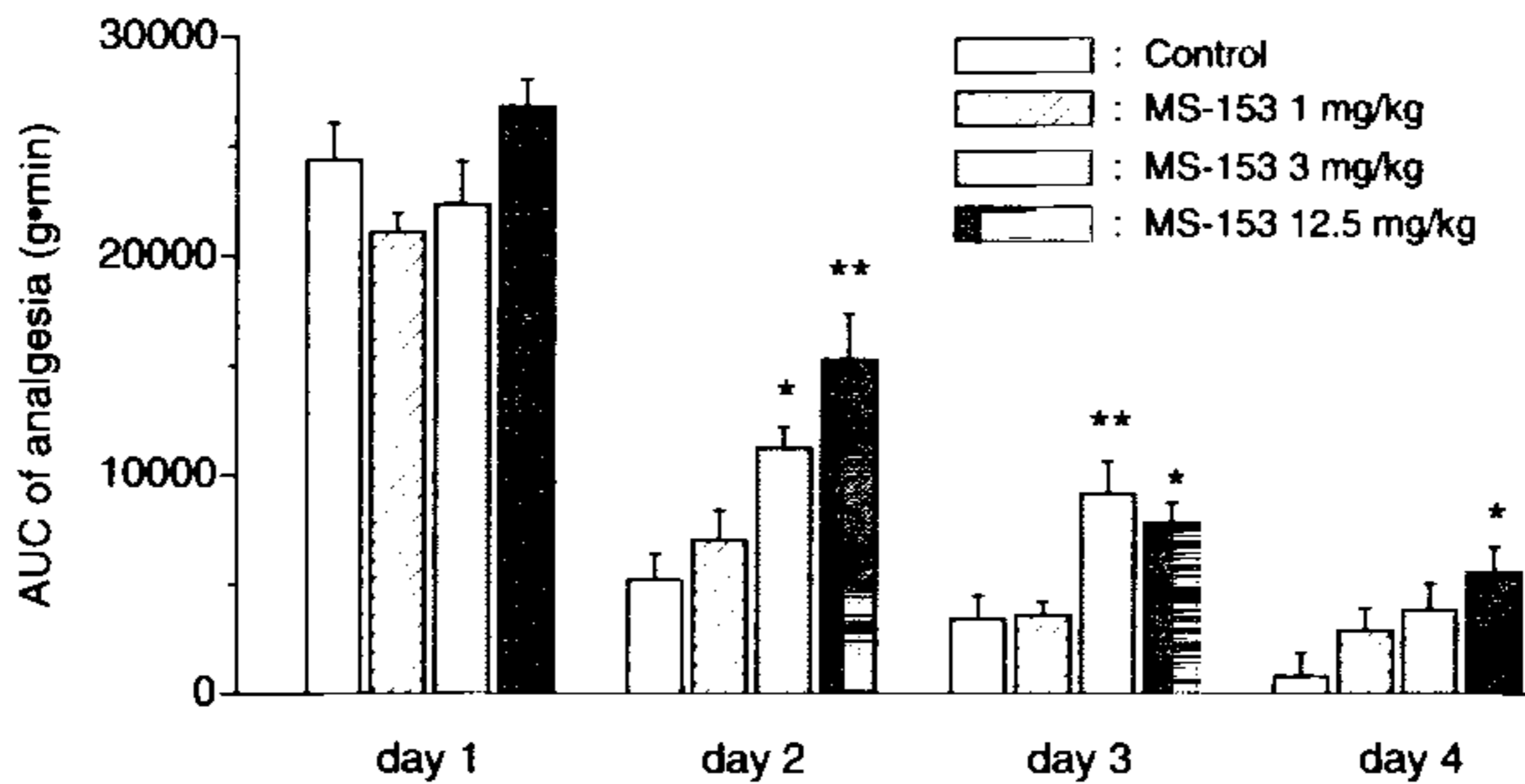


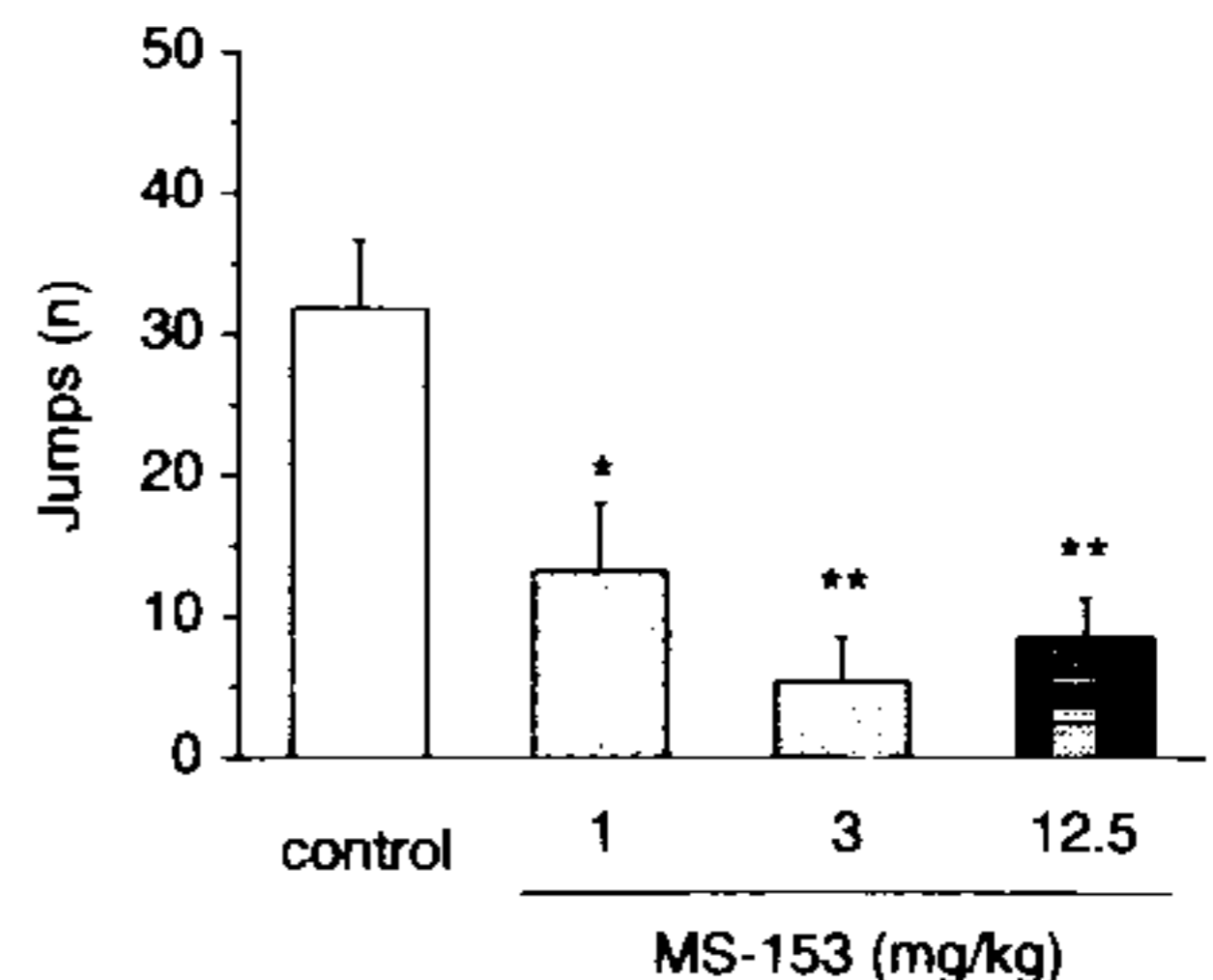
Fig. 3. Effects of co-administrations of MS-153 with morphine on the development of tolerance to the morphine antinociception. Mice were repeatedly treated with morphine at progressively increasing doses in combination with MS-153 at doses of 1, 3 and 12.5 mg/kg or without it as described in Fig.2. For measurement of morphine tolerance, the antinociceptive effects of single s.c. administration of morphine (3 mg/kg) were measured on day 1-4. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control group on each day (Dunnett's multiple comparison test). $n = 9-11$.

ら2時間後にナロキソン (10 mg/kg) を腹腔内に投与し、誘発される典型的な禁断症状である跳躍行動の回数と体重の減少を測定した。ナロキソンによって誘発される跳躍行動は、MS-153 (1, 3 および 12.5 mg/kg) の同時処置により有意に抑制された。また、禁断症状誘発後の体重減少も、MS-153 (12.5 mg/kg) の同時処置の時、コントロール群と比較して有意な抑制効果が見られた (Fig. 4)。

4. MS-153によるモルヒネ依存形成およびナロキソン誘発禁断症状発現に対する効果

MS-153によるナロキソン誘発禁断症状抑制効果が、モルヒネによる依存性の形成過程を抑制しているのか、それとも禁断症状の発現を抑制しているのかを、MS-153を処置するタイミングをFig. 5のように変えて検討した。上記の結果と同様に、MS-153 (10 mg/kg) を毎回、モルヒネと同時投与することにより、ナロキソンにより誘発される跳躍行動および体重減少は、モルヒネ単独投与群と比較して有意に抑制された。また、MS-153を1日目から4日目までのみ同時投与し、5日目には投与しなかった群においても、コントロール群と比較して有意な抑制作用が見られた。しかしながら、5日目のみMS-153を同時投与した群においては、ナロキソン誘発禁断症状に有意な変化は見られなかった (Fig.6)。

(a) Jumps



(b) Body weight loss

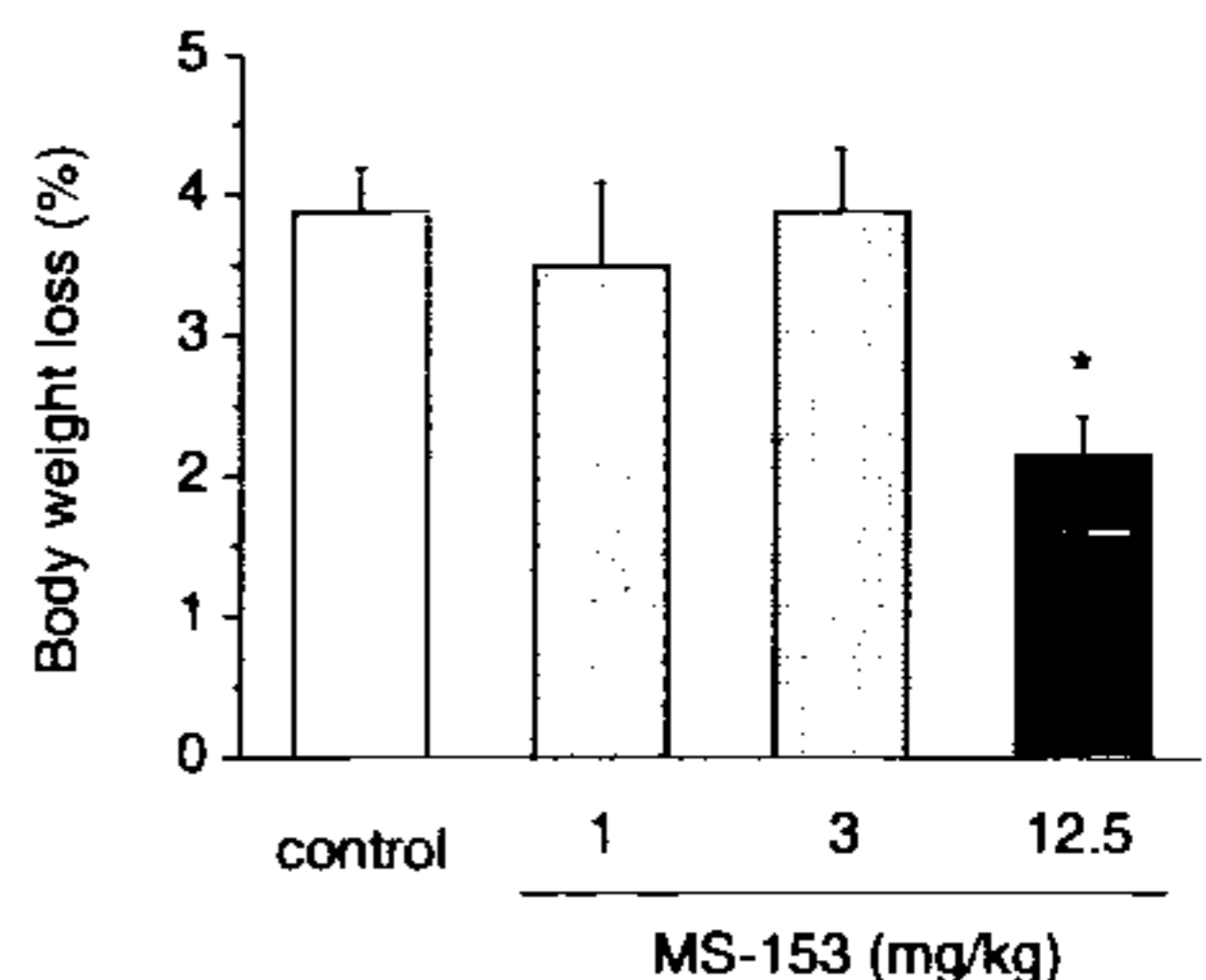


Fig. 4. Effects of co-administrations of MS-153 with morphine on the naloxone-precipitated withdrawal signs in morphine dependent mice. On day 5, mice were administered with naloxone (10 mg/kg, i.p.) 2 h after the final administration of morphine, and the naloxone-precipitated withdrawal jumps (a) and body weight loss (b) were measured for 40 min. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control (Dunnett's multiple comparison test). $n = 9-11$

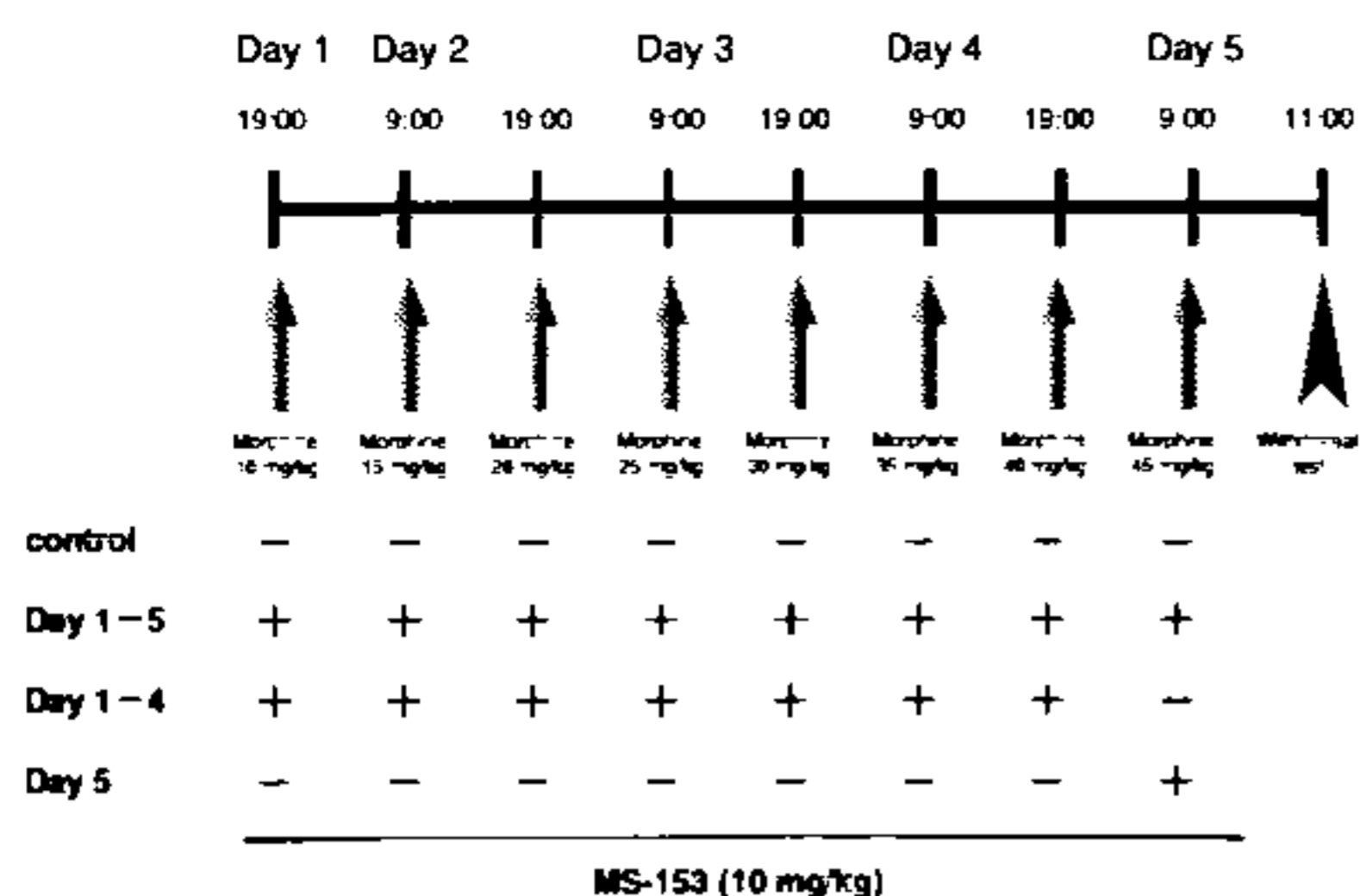


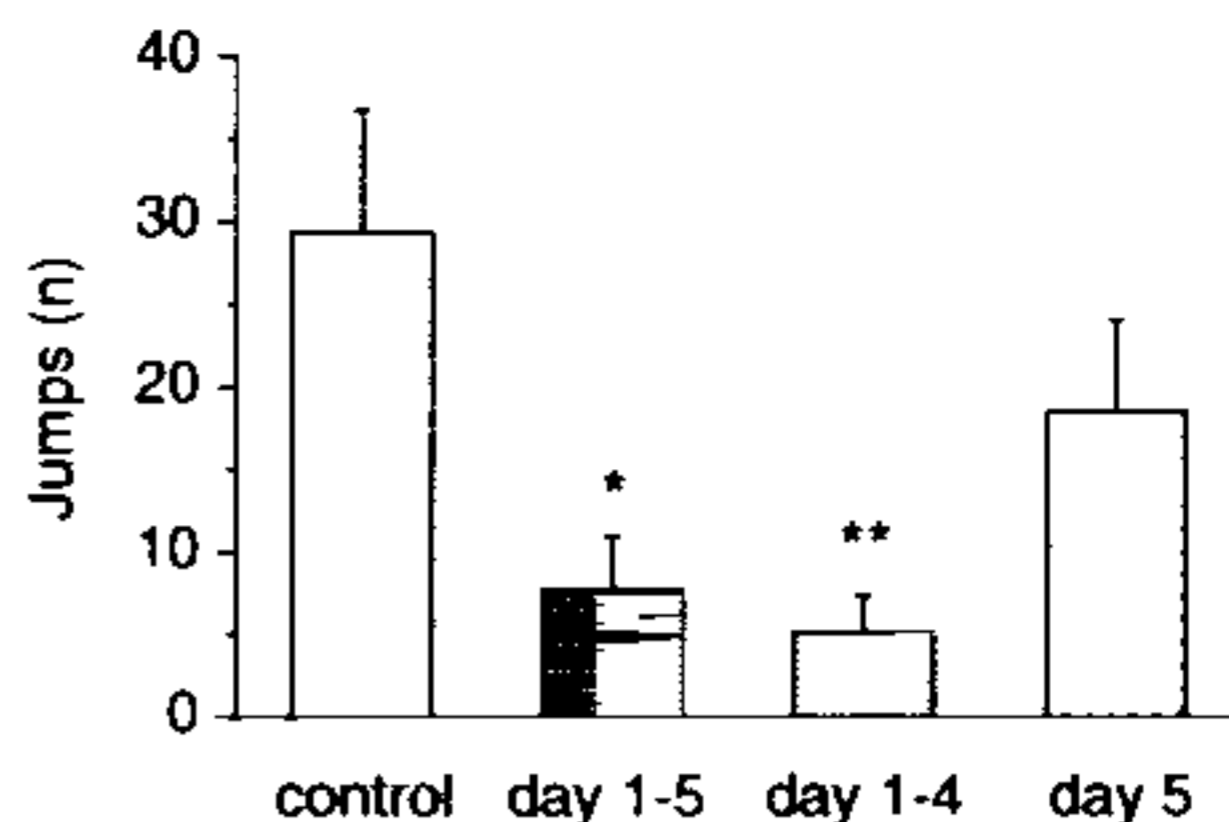
Fig. 5. Treatment schedule of morphine and MS-153

【考察】

本研究結果から、MS-153は、モルヒネの急性投与による鎮痛効果には影響を与えないが、モルヒネ反復投与時にMS-153を同時処置すると、耐性の形成、およびナロキソン誘発禁断症状（跳躍行動および体重減少）を有意に減弱させることが示された。さらに、モルヒネを反復投与する5日間のうち、1日目から4日目までMS-153を同時投与した群においてもナロキソン誘発禁断症状は有意に抑制されたが、5日目だけMS-153を同時投与した群においては、有意な抑制効果は見られなかった。このことは、今回の投与スケジュールにおいては、MS-153はモルヒネによる身体的依存の形成過程を抑制したものと考えられる。

モルヒネによる耐性および依存の形成にはグルタミン酸神経系が深く関与していることが指摘されている^{1,2)}。我々はこれまでに、このグルタミン酸神経系の調節に深く関与していることが知られているグルタミン酸トランスポーターの一つであるGLT-1の遺伝子発現が、モルヒネ依存ラットの幾つかの脳部位において有意に減少していることを報告している³⁾。MS-153は、COS-7細胞に発現させたGLT-1を活性化させ、グルタミン酸の取り込みを促進させる作用を有していることが報告されていることから⁴⁾、MS-153は脳内のグルタミン酸トランスポーター（おそらくGLT-1）を活性化させることにより、グルタミン酸神経伝達を抑制的に調節し、モルヒネによる耐性および身体的依存の形成を抑制したものと考えられる。また、MS-153のようなグルタミン酸トランスポーター活性化薬が、モルヒネ連続投与の際の補助薬、あるいは

(a) Jumps



(b) Body weight loss

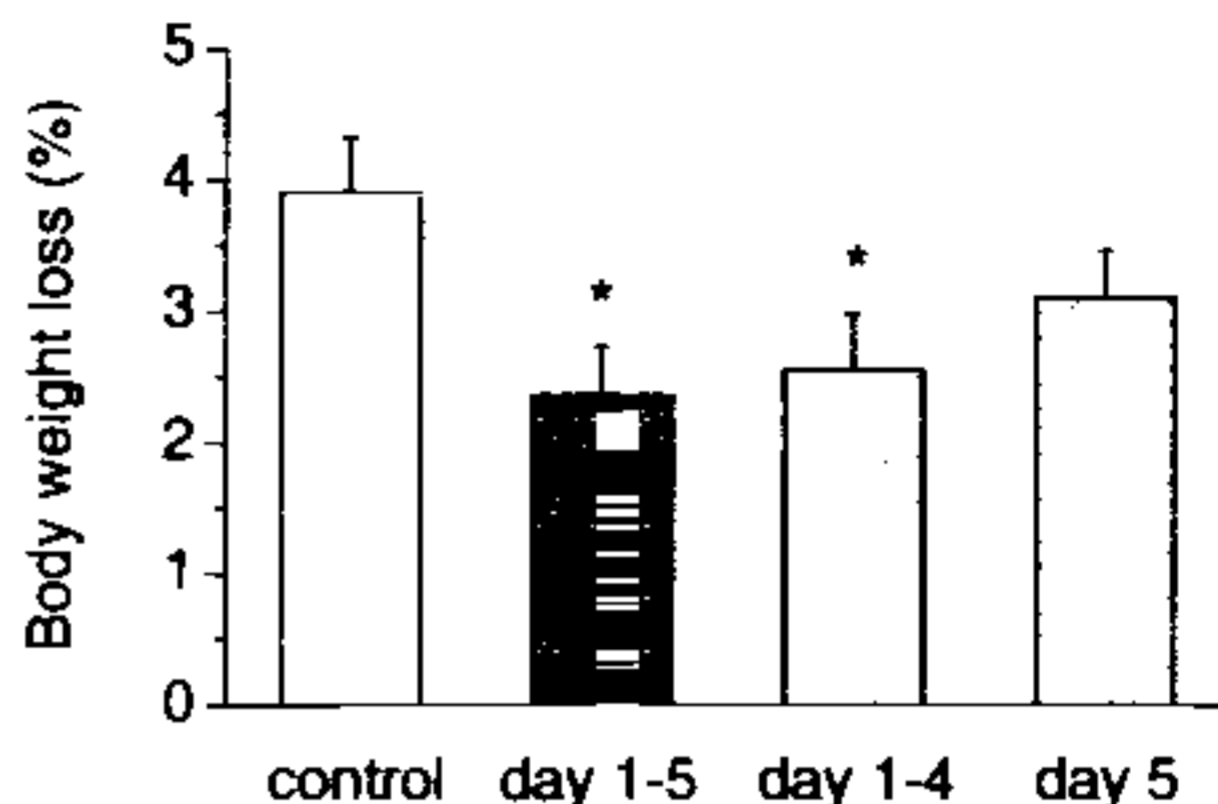


Fig. 6. Effects of MS-153 on the development of morphine dependence and the expression of morphine withdrawal. Mice were repeatedly treated with morphine in combination with MS-153 at a dose of 10 mg/kg either for day 1-5, for day 1-4, only on day 5, or without (control) as described in Fig. 5. On day 5, naloxone (10 mg/kg, i.p.)-precipitated withdrawal jumps (a) and body weight loss (b) were measured during 40 min. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control (Mann-Whitney U -test). $n = 10$.

は禁断症状に対する治療薬になりうる可能性も考えられる⁶⁾。

【引用文献】

- Zhu H., Rockhold R. W., Ho I.K.: Jpn. J. Pharmacol., **76**, 1-14 (1998).
- Yang, C.Y., Wong, C.S., Chang, J.Y., Ho, S.T.: Can. J. Anaesth., **43**, 379-383 (1996).
- Umemura, K., Gemba, T., Mizuno, A., Nakashima, M.: Stroke, **27**, 1624-1628 (1996).
- Shimada, F., Shiga, Y., Morikawa, M., Kawazura, H., Morikawa, O., Matsuoka, T., Nishizaki, T., Saito, N.: Eur. J. Pharmacol., **386**, 263-270 (1999).
- Ozawa, T., Nakagawa, T., Shige, K., Minami, M. and Satoh, M.: Brain Res., in press (2001)
- Nakagawa, T., Ozawa, T., Shige, K., Yamamoto, R., Minami, M. and Satoh, M.: Eur. J. Pharmacol., **419**, 39-45 (2001)