

# Tyr-Pro-Trp-Gly-NH<sub>2</sub>(Tyr-W-MIF-1)誘発性抗侵害作用におけるμ<sub>2</sub>オピオイド受容体の関与

渡邊廣行、米澤章彦、溝口広一、櫻田誓\*、櫻田司\*、櫻田忍  
東北薬科大学機能形態学教室  
\*第一薬科大学学生化学教室

## Involvement of μ<sub>2</sub>-opioid receptor on the antinociception induced by Tyr-Pro-Trp-Gly-NH<sub>2</sub>(Tyr-W-MIF-1)

Hiroyuki Watanabe, Akihiko Yonezawa, Hirokazu Mizoguchi,  
Chikai Sakurada\*, Tsukasa Sakurada\*, Shinobu Sakurada

Department of Physiology and Anatomy, Tohoku Pharmaceutical University  
\*Department of Biochemistry, Daiichi College of Pharmaceutical Sciences

Involvement of μ-opioid receptors on the antinociception induced by intrathecally (i.t.) administered Tyr-W-MIF-1 and the antagonistic property of Tyr-D-Pro-Trp-Gly-NH<sub>2</sub>, Tyr-W-MIF-1 analogue containing D-Pro<sup>2</sup>, were studied in the mouse paw-withdrawal test. Tyr-W-MIF-1 administered i.t. produced a dose-dependent antinociceptive effect. The antinociception was antagonized by the i.t. pretreatment with a selective μ-opioid receptor antagonist β-funaltrexamine, while the i.t. pretreatment with a selective μ<sub>1</sub>-opioid receptor antagonist naloxonazine failed to affect the antinociception. Moreover, D-Pro<sup>2</sup>-endomorphin-1, a selective μ<sub>2</sub>-opioid receptor antagonist, reduced the antinociception induced by Tyr-W-MIF-1, whereas Tyr-W-MIF-1-induced antinociception was not affected by D-Pro<sup>2</sup>-endomorphin-2, a selective μ<sub>1</sub>-opioid receptor antagonist. Furthermore, Tyr-W-MIF-1 analogue containing D-Pro<sup>2</sup> strongly antagonized the antinociceptive effect induced by Tyr-W-MIF-1 given i.t. These results indicate that Tyr-W-MIF-1 is a selective μ<sub>2</sub>-opioid receptor agonist and Tyr-W-MIF-1 analogue containing D-Pro<sup>2</sup> may act as the selective μ<sub>2</sub>-opioid receptor antagonist at the spinal cord level.

## 緒言

Tyr-W-MIF-1(Tyr-Pro-Trp-Gly-NH<sub>2</sub>)はヒト脳およびウシ脳から単離・同定された内因性のテトラペプチドであり、Tyr-MIF-1結合部位に極めて高い親和性を示すほか、μ受容体に対しても高い親和性を示すことが報告されている<sup>1-3)</sup>。また、Tyr-W-MIF-1を脳室内(i.c.v.)および脊髄くも膜下腔内(i.t.)に投与すると、熱刺激に対して抗侵害作用を発揮することも報

告されている<sup>4,5)</sup>。

一方μ受容体は、μ<sub>1</sub>/μ<sub>2</sub>受容体アンタゴニストであるβ-funaltrexamine、および選択的μ<sub>1</sub>受容体アンタゴニストであるnaloxonazineを用いた薬理学的手法により、μ<sub>1</sub>およびμ<sub>2</sub>受容体の2つのサブクラスに分類されてきた。さらに近年、内因性μオピオイドペプチドであるendomorphin-1およびendomorphin-2がそれぞれ選択的μ<sub>2</sub>およびμ<sub>1</sub>受容体のアゴニストであることが明らかになった。さらに、それらの

diastereoisomers である D-Pro<sup>2</sup>-endomorphin-1 および D-Pro<sup>2</sup>-endomorphin-2 が、それぞれ  $\mu_2$  および  $\mu_1$  受容体の特異的なアンタゴニスト活性を有することが報告されている<sup>6)</sup>。

本実験では、内因性  $\mu$  受容体アゴニストである Tyr-W-MIF-1 の i.t. 投与により示される抗侵害作用が、 $\mu$  受容体サブクラスのいずれを介して発揮されるかを、 $\beta$ -funaltrexamine、naloxonazine、D-Pro<sup>2</sup>-endomorphin-1 および D-Pro<sup>2</sup>-endomorphin-2 を用いて検討した。さらに、Tyr-W-MIF-1 の D-Pro<sup>2</sup> を導入した新規ペプチド (Tyr-D-Pro-Trp-Gly-NH<sub>2</sub>) の作用についても検討を行った。

## 実験方法

実験には ddY 系雄性マウス (22.25 g) を使用した。抗侵害効果の評価には paw-withdrawal 法を用いた。マウス右後肢足底部に熱刺激を与え、逃避反応を示す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 2.5-3.5 秒で反応を示すものを選択して用いた。また、刺激部位の損傷を最小限に抑えるため、最大刺激時間は 10 秒とした。得られた測定値より、% MPE (percent of maximum possible effect) を算出した。

## 実験結果

Tyr-W-MIF-1 の i.t. 投与により、用量依存的な抗侵害作用が認められた (Fig.1)。Tyr-W-MIF-1 誘発性抗侵害作用は、 $\mu$  受容体アンタゴニストである  $\beta$ -funaltrexamine (4.0 nmol, i.t.) 前処理により、有意に抑制されたが、選択的  $\mu_1$  受容体アンタゴニストである naloxonazine (4.0, 8.0  $\mu$ g, i.t.) 前処理によっては影響を受けなかった。さらに、 $\delta$  受容体アンタゴニストである naltrindole (0.033 nmol, i.t.) 前処理、および  $\kappa$  受容体アンタゴニストである nor-binaltorphimine (4.0 nmol, i.t.) 前処理も、Tyr-W-MIF-1 誘発性抗侵害作用になんら影響をおよぼさなかった (Fig.2)。

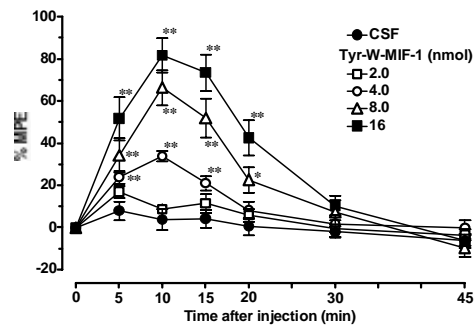


Fig.1 The antinociception induced by Tyr-W-MIF-1 in the mouse paw-withdrawal test. Various doses of Tyr-W-MIF-1 were administered i.t. in a volume of 2  $\mu$ L. Each point represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 10 mice. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01 vs. CSF-treated group.

一方、Tyr-W-MIF-1 誘発性抗侵害作用は、 $\mu_2$  受容体アンタゴニスト活性を示す D-Pro<sup>2</sup>-endomorphin-1 の i.t. 同時投与により有意に抑制されたが、 $\mu_1$  受容体アンタゴニスト活性を示す D-Pro<sup>2</sup>-endomorphin-2 との併用ではなんら影響を受けなかった (Fig.3)。

Tyr-D-Pro-Trp-Gly-NH<sub>2</sub> は、25-800 (pmol, i.t.) の用量範囲において抗侵害作用を示さなかった。Tyr-W-MIF-1 の抗侵害作用は Tyr-D-Pro-Trp-Gly-NH<sub>2</sub> の併用によって著しく抑制された。さらに、Tyr-D-Pro-Trp-Gly-NH<sub>2</sub> は、 $\mu_2$  受容体アゴニストである endomorphin-1 および DAMGO の抗侵害作用も有意に抑制したが、 $\mu_1$  受容体アゴニストである endomorphin-2 の抗侵害作用にはなんら影響を与えなかった (Fig.4)。

## 考察

これまでの研究から、Tyr-W-MIF-1 は  $\mu$  受容体に対し高い親和性を示し<sup>3)</sup>、i.c.v. および i.t. 投与により熱刺激に対して抗侵害作用を示す内因性の  $\mu$  オピオイドペプチドであることが明らかにされている<sup>4,5)</sup>。本実験においても、Tyr-W-MIF-1 の i.t. 投与により有意な抗侵害作用が認められた (Fig.1)。この Tyr-W-MIF-1 の抗侵害作用は、 $\mu$  受容体アンタゴニストで

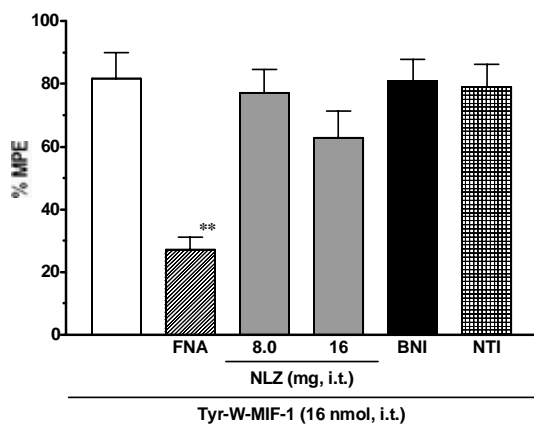


Fig.2 Effects of  $\beta$ -funaltrexamine (FNA), naloxonazine (NLZ), naltrindole (NTI) and *nor*-binaltorphimine (BNI) on the antinociception induced by i.t. administered Tyr-W-MIF-1 in the mouse paw-withdrawal test. FNA, NLZ and BNI were administered i.t. 24 h before i.t. treatment with peptide, and NTI was administered i.t. 10 min before i.t. treatment with peptide. Antinociceptive effects were measured 10 min after the treatment with Tyr-W-MIF-1. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 10 mice. \*\* $P < 0.01$  vs. Tyr-W-MIF-1 alone.

ある $\beta$ -funaltrexamine前処理により有意に抑制されたが、選択的 $\mu_1$ 受容体アンタゴニストであるnaloxonazine前処理では影響を受けなかった (Fig. 2)。さらに、Tyr-W-MIF-1の抗侵害作用はD-Pro<sup>2</sup>-endormorphin-1同時投与により有意に抑制されたが、D-Pro<sup>2</sup>-endormorphin-2同時投与ではなら影響を受けなかった (Fig. 3)。これらの結果から、Tyr-W-MIF-1のi.t.投与による抗侵害作用の発現には、 $\mu_2$ 受容体が強く関与していることが示唆された。

$\mu$ 受容体は、薬理学的および生化学的研究から $\mu_1$ および $\mu_2$ 受容体に分類されている。これまでの研究からnaloxonazineは $\mu_1$ 受容体アンタゴニストであり $\beta$ -funaltrexamineは $\mu_1/\mu_2$ 受容体アンタゴニストであるが、 $\mu_2$ 受容体に特異的なアンタゴニストは見い出されていなかった。我々は、endormorphin-1アナログであるD-Pro<sup>2</sup>-endormorphin-1が特異的 $\mu_2$ 受容体アンタゴニスト活性を有することを明らかにした。しかし、

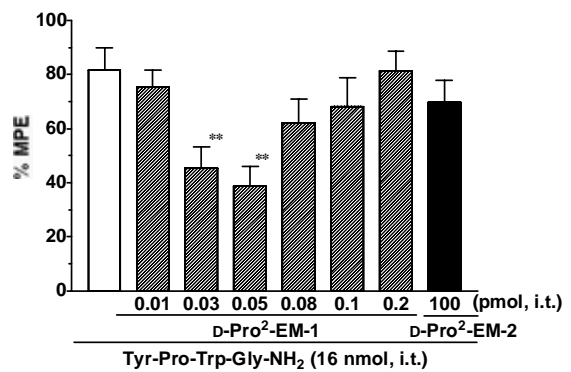


Fig.3 Effects of D-Pro<sup>2</sup>-endormorphin-1 and D-Pro<sup>2</sup>-endormorphin-2 on the antinociception induced by Tyr-W-MIF-1 in the mouse paw-withdrawal test. Tyr-W-MIF-1 was co-administered i.t. with D-Pro<sup>2</sup>-endormorphins. Antinociceptive effects were measured 10 min after treatment. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 10 mice. \*\* $P < 0.01$  vs. Tyr-W-MIF-1 alone.

D-Pro<sup>2</sup>-endormorphin-1の拮抗作用は用量依存的ではなくbell-shapeを示した。一方本実験において用いたTyr-D-Pro-Trp-Gly-NH<sub>2</sub>は、単独i.t.投与により鎮痛活性を示さず、 $\mu_2$ 受容体アゴニストであるDAMGO、endormorphin-1およびTyr-W-MIF-1の鎮痛作用に対し、用量依存的な拮抗作用を示した。これらの結果から、Tyr-D-Pro-Trp-Gly-NH<sub>2</sub>は $\mu_2$ 受容体の純粋なアンタゴニストである可能性が示唆された。

## 引用文献

- 1) Erchegey J. Kastin AJ. and Zadina JE., Isolation of a novel tetrapeptide with opiate and antiopiate activity from human brain cortex: Tyr-Pro-Trp-Gly-NH<sub>2</sub> (Tyr-W-MIF-1). Peptides 13, 623-631, 1992
- 2) Hackler L. Kastin AJ. Erchegey J and Zadina JE., Isolation of Tyr-W-MIF-1 from bovine Hypothalami. Neuropeptides 24, 159-164, 1993

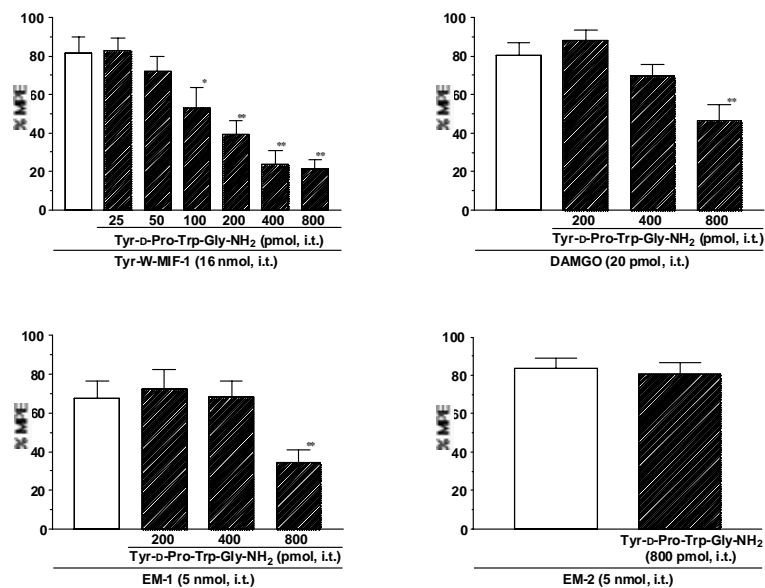


Fig.4 Effects of Tyr-D-Pro-Trp-Gly-NH<sub>2</sub> on the antinociception induced by i.t. administered Tyr-W-MIF-1, endomorphin-1 (EM-1), endomorphin-2 (EM-2) and DAMGO in the mouse paw-withdrawal test. Each agonist was co-administered i.t. with Tyr-D-Pro-Trp-Gly-NH<sub>2</sub>. The antinociceptive effects were measured 10, 5, 5 and 10 min after the treatment with Tyr-W-MIF-1, EM-1, EM-2 and DAMGO, respectively. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 10 mice. \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs. agonist alone.

- 3) Zadina JE. Paul D. Gergen KA. Ge L-J. Hackler L and Kastin AJ., Binding of Tyr-W-MIF-1 (Tyr-Pro-Trp-Gly-NH<sub>2</sub>) and related peptides to  $\mu_1$  and  $\mu_2$  opiate receptors. *Neurosci Lett* 215, 65-69, 1996
- 4) Gergen KA. Zadibe JE. Kastin AJ and Paul D., Intrathecal Tyr-W-MIF-1 produces potent, naloxone-reversible analgesia modulated by  $\alpha_2$ -adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* 298, 235-239, 1996
- 5) Gergen KA. Zadina JE. and Paul D. Analgesic effects of Tyr-W-MIF-1: a mixed  $\mu_2$ -opioid receptor agonist/ $\mu_1$ -opioid receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 316, 33-38, 1996
- 6) Sakurada S. Watanabe H. Hayashi T. Yuhki M. Fujimura T. Murayama K Sakurada C and Sakurada T., Endomorphin analogues containing D-Pro<sup>2</sup> discriminate different  $\mu$ -opioid receptor mediated antinociception in mice. *Br J Pharmacol* 137,

1143-1146, 2002

# CRF 受容体アゴニストの鎮痛効果に及ぼすオピオイド

## ペプチド加水分解酵素阻害剤の影響

岡 哲雄、小坂賢也、新野康弘、岩尾佳代子、赤堀一也、高橋 滋、  
張 鵬、金 幸祿、中林 大、荒井美治、小林広幸、吉川正信  
東海大学医学部薬理学教室

### Effects of opioid-peptide-hydrolyzing-peptidase inhibitors on the anti-nociception induced by CRF receptor agonists

Tetsuo Oka, Kenya Kosaka, Yasuhiro Niino, Kayoko Iwao, Kazuhito Akahori, Shigeru Takahashi, Zhang Peng, Jin Xing Lu, Masaru Nakabayashi, Yoshiharu Arai, Hiroyuki Kobayashi, Masanobu Yoshikawa  
Department of Pharmacology, School of Medicine, Tokai University, Isehara 259-1193, Japan

Summary: Previous studies showed that the anti-nociception induced by either the stress or the intra-third-ventricular (i.t.v.) administration of corticotropin releasing factor (CRF) was significantly augmented by the i.t.v. pretreatment of rats with the mixture of three peptidase inhibitors (PIs)(amastatin, captopril and phosphoramidon) that had been shown to prevent almost completely the hydrolysis of five endogenous opioid peptides, met-enk, leu-enk, met-enk-RF, met-enk-RGL and dyn A-(1-8). Additionally, the anti-nociception in rats pretreated with three PIs was antagonized by either the s.c. injection of naloxone or the i.t.v. administration of CRF antagonist. Thus, the results in the previous investigation indicated the involvement of short opioid peptides in both the stress- and the CRF- induced anti-nociception. In the present study, the effects of the i.t.v. administration of CRF receptor type 1 (CRF-R1) and CRF receptor type 2 (CRF-R2) agonists on tail-flick response of rats were examined. The i.t.v. injection of 0.1, 0.3, and 1.0 nmol of CRF, a CRF-R1 agonist, significantly and dose-dependently inhibited the tail-flick response of rats pretreated i.t.v. with the three PIs, while that of 0.1 and 1.0 nmol of either stresscopin or urocortin II, CRF-R2 agonists, did not inhibit the tail-flick response. The results suggest that short opioid peptides are release by CRF-R1 agonist but not by CRF-R2 agonist.

## 緒言

内在性オピオイドペプチドの中で、アミノ酸残基数が 5~ 8 のメチオニンエンケファリン (met-enk); ロイシンエンケファリン (leu-enk), met-enk-Arg<sup>6</sup>-Phe<sup>7</sup> (met-enk-RF), met-enk-Arg<sup>6</sup>-Gly<sup>7</sup>-Leu<sup>8</sup> (met-enk-RGL), およびダイノルフィンA-(1-8) [Dyn A-(1-8)] などは、脳の膜標本と 37 °C で 60 分間インキュベーションするとほぼ完全に加水分解される。しかし、3 種のペプチダーゼ阻害薬 (PIs) (アマスタチン、カプトプリル、ホスホラミドン) の 1 μM を共存させると、これら 5 種のオピオイドペプチドの加水分解はほぼ完全に阻止されることが私達の研究で明らかにされた<sup>1-4)</sup>。

また、3 種の PIs をラット脳の第 3 脳室に投与後に、これら 5 種のオピオイドペプチドを第 3 脳室に投与すると、PIs 非投与群に比べ、抗侵害効果は数百 ~ 数千倍増強された<sup>5-7)</sup>。

さらに、ストレスおよび CRF (corticotropin-releasing factor) による抗侵害効果は、3 種の PIs により有意に増強され、これはオピオイド受容体拮抗薬の naloxone、および CRF 受容体拮抗薬などにより有意に拮抗された。

なお、CRF 受容体には CRF-R1 と CRF-R2 の 2 種のタイプがあり、脳での分布および機能などが異なることが示唆されている。

そこで今回は、CRF-R1 および CRF-R2 とオピオイドペプチドとの関係について研究したので報告する。

## 実験方法

体重 180 ~ 220g の Wistar 系雄性ラットの第 3 脳室に、カニューレを介して 50 μl のマイクロシリンジとインフュージョンポンプを用い、10 μl / 分の速度で薬液を投与した。ペプチダーゼ阻害薬の混合液 (アマスタチン、カプトプリル、およびホスホラミドン、各 10 nmol) を投与する場合は、CRF-R1 あるいは CRF-R2 などのアゴニストを投与する 5 分前に投与した。CRF-R1 アゴニストとして CRF、CRF-R2 アゴニストとして stresscopin および urocortin II などを用いた。これらのアゴニストを投与後 5、10、15、30、45、60、75、90、105、および 120 分目に 55 °C の温水にラットの尾を入れ、ラットが尾を振る (tail-flick response, TFR) までの時間を測定した。なお、cut off time は 5 秒とした。Percent of maximal possible effect (%MPE) を以下の式で求め、

$$\%MPE = [(test\ latency - baseline\ latency) / (5 - baseline\ latency)] \times 100$$

抗侵害効果は、%MPE あるいは AUC (縦軸に %MPE、横軸に時間をとった場合の area under the curve) などの値で表した。

## 実験結果および考察

(1) ラットの第 3 脳室に CRF-R1 アゴニストの CRF の 0.1, 0.3, および 1.0 nmol を単独で投与した場合には、1.0 nmol の場合に投与後 10 分目にわずかな TFR の抑制が認められた。一方、3 種の PIs (各 10 nmol) を第 3 脳室に投与後に 0.1, 0.3, および 1.0 nmol の CRF を第 3 脳室に投与すると

AUC<sub>0-120min</sub>はPIs非投与群に比べ、いずれも有意に大きくなった。

(2) CRF-R2 アゴニストの stresscopin の 0.1 および 1 nmol、あるいは urocortin の 1 nmol など、ラット第 3 脳室に単独で投与した場合には、いずれも有意な TFR の変化は認められなかった。また、3 種の PIs 投与後にはこれらの CRF-R2 アゴニストを投与した場合も有意な抗侵害効果は認められなかった。

以上の今回の実験結果、および先回の実験結果から、ストレスおよび CRF 投与による抗侵害効果は、ストレス CRF 遊離 CRF と CRF-R1 との結合 オピオイドペプチドの遊離 オピオイドペプチドとミューオピオイド受容体との結合 抗侵害効果の順で現れることが示唆された。また、物理的あるいは化学的刺激による内在性オピオイドペプチドの遊離を観察する実験において、3 種の PIs を使用することの有用性が示された。

## 引用文献

- 1) Hiranuma T, Oka T. Effects of peptidase inhibitors on the [Met<sup>5</sup>]-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, 1986
- 2) Hiranuma T, Iwao K, Kitamura K, Matsumiya T, Oka T. Almost complete protection from [Met<sup>5</sup>]-enkephalin-Arg<sup>6</sup>-Gly<sup>7</sup>-Leu<sup>8</sup> (Met-enk-RGL) hydrolysis in membrane preparations by the combination of amastatin, captopril and phosphoramidon. *J Pharmacol Exp Ther.* 281(2):769-74, 1997
- 3) Hiranuma T, Kitamura K, Taniguchi T, Kanai M, Arai Y, Iwao K, Oka T. 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, 1998
- 4) Hiranuma T, Kitamura K, Taniguchi T, Kobayashi T, Tamaki R, Kanai M, Akahori K, Iwao K, Oka T. Effects of three peptidase inhibitors, amastatin, captopril and phosphoramidon, on the hydrolysis of [Met<sup>5</sup>]-enkephalin-Arg<sup>6</sup>-Phe<sup>7</sup> and other opioid peptides. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 357(3):276-82, 1998
- 5) Taniguchi T, Fan XT, Kitamura K, Oka T. Effects of peptidase inhibitors on the enkephalin-induced anti-nociception in rats. *Jpn J Pharmacol.* 78(4):487-92, 1998
- 6) Kitamura K, Akahori K, Yano H, Iwao K, Oka T. Effects of peptidase inhibitors on anti-nociceptive action of dynorphin-(1-8) in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 361(3):273-8, 2000
- 7) Kanai M, Takahashi S, Kosaka K, Iwao K, Kobayashi H, Oka T. [Met<sup>5</sup>]-enkephalin-Arg-Gly-Leu -induced antinociception is greatly increased by peptidase inhibitors

# Comparison of pharmacological profiles of morphine, fentanyl and oxycodone in ferrets

Arief Nurrochmad, Minoru Narita, Masahiko Ozaki,

Yoshinori Yajima and Tsutomu Suzuki

Department of Toxicology, Hoshi University School of Pharmacy and

Pharmaceutical Sciences, Tokyo Japan

**Summary:** The present study was designed to investigate the comparison of antinociception and emesis induced by morphine, fentanyl and oxycodone in ferrets. In Randall-Sellito test, morphine, fentanyl and oxycodone produced a dose-dependent antinociceptive effect in ferrets. Under these conditions, morphine at the dose of which had no antinociceptive effect significantly increased the number of retching and vomiting in ferrets. On the contrary, both fentanyl and oxycodone failed to induce the retching and vomiting responses in ferrets. These findings suggest that fentanyl and oxycodone may constitute a preferable and superior analgesics rather than morphine for pain treatment with lower frequency of emesis.

## Introduction

The World Health Organization's guidelines for the management of chronic cancer pain recommend that clinicians follow the analgesic ladder, reserving strong opioids such as morphine, fentanyl and oxycodone for the relief of moderate to severe cancer pain.<sup>1)</sup>

Morphine has long been "gold standard" for the treatment of moderate to severe cancer pain. However, morphine possesses several side-effects, particularly nausea, emesis, constipation and drowsiness, which have provoked the use of "opioid rotation" to alternative opioids.

Fentanyl, which is a potent synthetic analgesic, has a high affinity for  $\mu$ -opioid receptor and exhibits 50-100 times more potent analgesic activity than that of morphine. It should be noted

that the side-effects of fentanyl is less than that of morphine.

Oxycodone is a semi-synthetic opioid analgesic derived from the naturally occurring alkaloid, thebain. Oxycodone has good oral bioavailability and seems to be as potent analgesic action as morphine. Although oxycodone has been clinically used for over 80 years, but its pharmacological properties are still very poorly characterized.

The present study was designed to investigate the comparison of pharmacological profiles of morphine, fentanyl and oxycodone in ferrets.

## Materials and methods

### *Animal*

Male ferrets weighing 1-1.5 kg were obtained



from Marshall Research Labs (New York, USA). Ferrets were individually housed in a room kept at 22-25°C under a 12 hr light/dark cycle. They were given a standard cat diet (70-80 g/animal, Purina<sup>R</sup>; Ralstone Purina Co., St.Louis, MO, USA) and allowed free access water.

#### *Assessment of antinociceptive effect*

The antinociceptive effects induced by morphine, fentanyl and oxycodone were measured using Randall-Selitto test analgesy-meter (Muromachi Kikai Co., Ltd., Tokyo, Japan). The pressure was directly applied to the tail of the ferret via a negative-shape plunger. The tail withdrawal or vocalization was considered to be an antinociceptive response. The pressure force was shown as grams and the cut-off force was set at 354 g. Ferrets were administered subcutaneously (s.c.) with morphine, fentanyl or oxycodone, and the measurement of antinociception induced by these drugs was performed every 15 min after the injection. The antinociceptive effect was calculated as a percentage of maximum possible effect (% antinociception) according to the following formula: % antinociception = (test threshold – predrug threshold) / (354 – predrug threshold) x 100.

#### *Evaluation of emesis*

Before the measurement of emesis induced by morphine, fentanyl and oxycodone, ferrets were acclimatized for 30 min in individual cages. The emesis was evaluated by counting the number of

retching or vomiting for 30 min after the injections of these drugs. Retching was defined as any rhythmic abdominal contraction without expulsion, whereas vomiting was defined as any oral expulsion (solid or liquid). The onset time of retching or vomiting following the drug injection was recorded for each animal.

## **Result and Discussion**

In the present study, we showed here for the first time that morphine, fentanyl and oxycodone produced a dose-dependent antinociception in the ferret Randall-Selitto test. The maximal antinociceptive responses induced by morphine, fentanyl and oxycodone were reached at 30 min, 15 min and 15 min after the injection, respectively. The ED<sub>50</sub> values for the antinociception induced by morphine, fentanyl and oxycodone were 2.84 (2.48-3.24) mg/kg, 31.67 (26.74-37.42) µg/kg, and 1.02 (0.47-1.92) mg/kg, respectively.

Under these conditions, we next investigated the emetic response induced by these opioids in ferrets. Morphine produced an increase in the number of retching and vomiting with a peak time set at 5-10 min after the injection. The maximal dose of emetic response induced by morphine was 0.6 mg/kg, which had no antinociceptive effect in ferrets. Interestingly, the number of retching and vomiting was decreased at 1.2 mg/kg, that exhibited a weak antinociceptive effect in ferrets. Although the exact mechanisms of the bell-shaped emesis induced by morphine remain unclear, the results are consistent with the report of Thomson *et al.*<sup>2)</sup> that

higher dose of morphine has little emetic effect in ferrets.

Unlike morphine, fentanyl failed to induce retching and vomiting responses in ferrets when given s.c at the doses that produced antinociception (1-56 µg/kg). Barnes *et al.*<sup>3)</sup> also reported that fentanyl did not induce retching and vomiting responses in ferrets. Therefore, fentanyl may be usefull for the potent analgesic without severe emesis.

Although it has been reported that oxycodone induces emesis in clinical trials, oxycodone (0.01-3 mg/kg) at the dose of which produced antinociception unexpectedly caused no retching and vomiting responses in ferrets. This discrepancy observed between ferrets and human may be caused by the different administration route. Therefore, further experiments are needed.

All of these drugs could produce a marked antinociception through the µ-opioid receptor. It is known that lipid solubility and pharmacokinetic profile are considerably different among these drugs. This contention is supported by the finding that fentanyl and oxycodone have a lipid-soluble profile in octanol-buffer distribution coefficients than morphine. Therefore, fentanyl and oxycodone easily diffuse into the brain across the brain-blood barrier as compared to morphine. This may be a major reason why fentanyl and oxycodone can produce more potent antinociceptive responses than that of morphine without producing the central-controlled emesis.<sup>4)</sup>

Taken together with these findings, fentanyl and

oxycodone may be a preferable and superior analgesics rather than morphine for the treatment of severe pain with fewer side effects.

## References

1. World Health Organization, *Cancer pain Relief and Palliative Care*, Report of a WHO expert committee. WHO Technical Report Series, 804. Geneva, Switzerland: WHO, 1990.
2. Thompson, P.I., Bingham, S., Andrews, P.R.L., Patel, N., Joel, S.P and Slevin, M.L. *Morphine 6-glucuronide: a metabolite of morphine with greater emetic potency than morphine in the ferret*. Br. J. Pharmacol., 106, 3-8, 1992.
3. Barnes, N.M., Bunce, K.T., Naylor, R.J and Rudd, J.A. *The actions of fentanyl to inhibit drug-induced emesis*. Neuropharmacology., 30,1073-83, 1991.
4. Narita, M., Imai, S., Itou, Y., Yajima, Y and Suzuki, T. *Possible involvement of µ<sub>1</sub>-opioid receptors in the fentanyl- or morphine-induced antinociception at supraspinal and spinal sites*. Life Sci., 70, 23421-54, 2002.

# 選択的セロトニン再取り込み阻害薬フルボキサミンの鎮痛作用

内田邦敏、本多基子、田辺光男、小野秀樹  
名古屋市立大学大学院薬学研究科 中枢神経機能薬理学

## Antinociceptive and antiallodynic effects of fluvoxamine, selective serotonin reuptake inhibitor

Kunitoshi Uchida, Motoko Honda, Mitsuo Tanabe and Hideki Ono  
Laboratory of CNS Pharmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,  
Nagoya City University

Summary: Antidepressant drugs are reported to be used as analgesics in clinical management of neuropathic pain. In the present study, we evaluated antinociceptive and antiallodynic effects of the selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) fluvoxamine by using normal and neuropathic pain mice. Fluvoxamine maleate (10-100 mg/kg, i.p.) produced a significant and dose-dependent antinociceptive effect in the paw pressure test. Fluvoxamine maleate (10, 30 mg/kg, i.p.) reduced tactile allodynia in neuropathic pain mice. The 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist ketanserin blocked the antiallodynic effect induced by fluvoxamine. Amitriptyline did not produce antinociceptive or antiallodynic effects in normal or neuropathic pain mice, respectively. These results suggest that 5-HT<sub>2A</sub> receptors are involved in the fluvoxamine-induced antiallodynic effect.

## 緒言

慢性疼痛は3~6ヶ月を超えて持続する痛みであり、急性痛のように警告信号としての生理学的意義はなく、それ自体が疾患であるという特徴がある。慢性疼痛は非ステロイド性抗炎症薬やオピオイドに抵抗性を示すことが多く、治療には局所麻酔薬、抗けいれん薬、GABA機能促進薬、向精神薬、抗うつ薬が用いられている。三環系抗うつ薬は抗コリン作用による副作用が強いものに対して選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) は抗コリン作用、 $\alpha_1$ アドレナリン受容体遮断作用、H<sub>1</sub>ヒスタミン受容体遮断作用が弱く副作用が少ないという特徴を持つ。臨床において SSRI の抗うつ作用発現は投与開始後2~3週間かかる

のに対し、慢性疼痛に対する作用は数日から2週間で現れる<sup>1, 2)</sup>ことから、抗うつ作用と慢性疼痛の作用機序は異なる可能性がある。そこで本研究は、SSRIの一つであるフルボキサミンの鎮痛作用について検討した。

## 実験方法

### 急性疼痛に対する作用

実験には5週齢の ddY 系雄性マウスを使用した。鎮痛作用の評価には paw pressure test を用い、逃避反応を起こすまでの潜時を測定した。フルボキサミンおよびアミトリプチリンは腹腔内投与した。フルボキサミン、アミトリプチリン投与直前を0分とし、結果は0分における潜時を

100%として百分率で表した。またアンタゴニストはフルボキサミン投与 20 分前に皮下投与した。

### 慢性疼痛に対する作用

実験には ddY 系雄性マウスを使用した。Seltzer らの方法<sup>3)</sup>により、4 週齢のマウスの右足後肢の坐骨神経を半周結紮することによって慢性疼痛モデルを作製した。手術後 7 日目にアロディニアの有無を確認後、実験を行った。抗アロディニア作用の評価には von Frey test を用いた。8 本の von Frey フィラメントを用いて、Chaplan らの方法で逃避反応の 50 % 閾値を測定した<sup>4)</sup>。フルボキサミンおよびアミトリプチリンは腹腔内投与した。フルボキサミン、アミトリプチリン投与直前を 0 分とし、アンタゴニストはフルボキサミン投与 20 分前に皮下投与した。

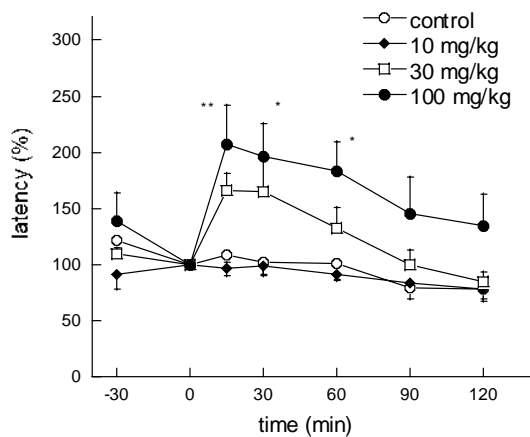


Fig. 1 Effect of fluvoxamine maleate (i.p.) in the paw pressure test in normal mice. Each point represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 6 mice per group. The significance of the differences between the control and test values was determined with the two-tailed multiple *t*-test with Bonferroni correction following ANOVA; \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ , (three comparisons in four groups)

## 結果

### 急性疼痛に対する作用

後肢への機械刺激に対して、マレイン酸フルボキサミンは 10 mg/kg では抗侵害受容作用を示さなかった。30 mg/kg では、抗侵害受容作用を示す傾向にあり、100 mg/kg で有意な抗侵害受容作用を示した (Fig. 1)。塩酸アミトリプチリンは、1 mg/kg、3 mg/kg、10mg/kg のいずれにおいても有意な抗侵害受容作用を示さなかった (Fig. 2)。

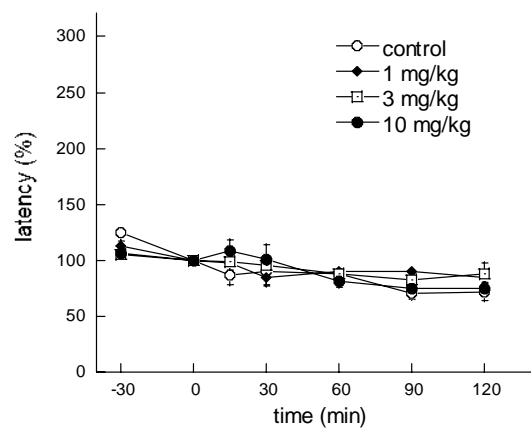


Fig. 2 Effect of amitriptyline HCl (i.p.) in the paw pressure test in normal mice. Each point represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 6 mice per group.

### 慢性疼痛に対する作用

神経因性疼痛モデルにおいてマレイン酸フルボキサミンは、10 mg/kg で抗アロディニア作用を示す傾向にあり、30 mg/kg で有意な抗アロディニア作用を示した (Fig. 3)。その作用は、酒石酸ケタンセリン (1, 3 mg/kg) によって有意に拮抗された (Fig. 4)。一方、塩酸アミトリプチリンは、3 mg/kg、10 mg/kg のいずれにおいても有意な抗アロディニア作用を示さなかった (Fig. 5)。

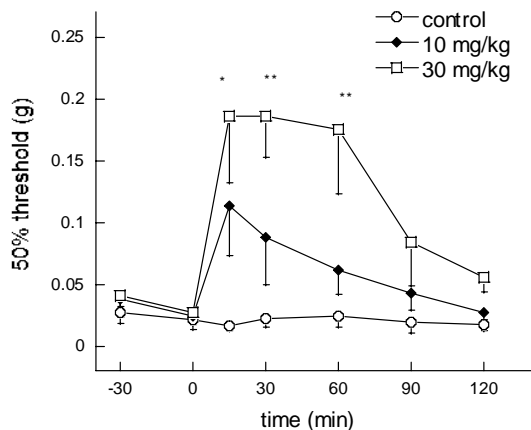


Fig. 3 Effect of fluvoxamine maleate (i.p.) in the von Frey test in neuropathic pain mice. Each point represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 6 mice per group. The significance of the differences between the control and test values was determined with the two-tailed multiple *t*-test with Bonferroni correction following ANOVA; \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ , (two comparisons in three groups)

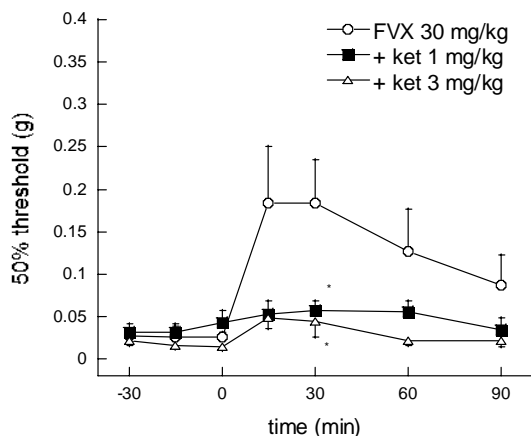


Fig. 4 Effect of ketanserin tartrate (s.c.) on the antiallodynic effect of fluvoxamine (30 mg/kg, i.p.) in the von Frey test in neuropathic pain mice. Each point represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 6 mice per group. The significance of the differences between the control and test values was determined with the

two-tailed multiple *t*-test with Bonferroni correction following ANOVA; \*  $p < 0.05$ , (two comparisons in three groups)

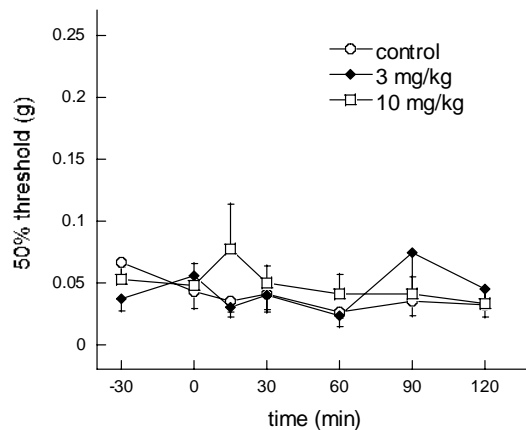


Fig. 5 Effect of amitriptyline HCl (i.p.) in the von Frey test in neuropathic pain mice. Each point represents the mean  $\pm$  S.E.M. of 6 mice per group.

## 考察

本研究より、フルボキサミンはマウスにおいて抗侵害受容作用、抗アロディニア作用を持つことが示された。さらに、抗アロディニア作用はケタンセリンによって有意に拮抗された。フルボキサミンは、セロトニントランスポーターに作用しセロトニンの再取り込みを阻害するだけでなく、5-HT<sub>2A</sub> 受容体に親和性があるという報告<sup>5)</sup>もあることから、直接的もしくは間接的に 5-HT<sub>2A</sub> 受容体に作用し抗侵害受容作用、抗アロディニア作用を示したと考えられる。一方、セロトニン再取り込み阻害作用を持つアミトリプチリンは抗侵害受容作用、抗アロディニア作用を示さなかった。アミトリプチリンは 5-HT<sub>2A</sub> 受容体拮抗作用が強い<sup>6)</sup>ため抗侵害受容作用、抗アロディニア作用が現れなかった可能性がある。

痛覚に關与する 5-HT<sub>2A</sub> 受容体は脊髄後角で侵害受容一次求心性ニューロン終末において痛

覚伝達を促進し、抑制性介在ニューロンでは痛覚伝達を抑制する<sup>7)</sup>。また 5-HT<sub>2A</sub> 受容体は、傍小脳脚核、弧束核、延髄内腹側核や延髄中脳水道灰白質にも存在している<sup>8)</sup>。本研究によりフルボキサミンの抗アロディニア作用が 5-HT<sub>2A</sub> 受容体を介することが示唆された。

## 引用文献

- 1) 濱口真輔、鷹西敏雄、永尾勝、恵川六生、奥田泰久、北島敏光、慢性疼痛患者に対するマレイン酸フルボキサミンの使用、ペインクリニック, 22, 1135-1138 (2001)
- 2) 大山司郎、国芳雅広、西彰五郎、稲永和豊、SSRI が奏効した帯状疱疹後神経痛の 2 例, Jpn. J. Neuropsychopharmacol, 22, 283 (2002)
- 3) Seltzer Z, Dubner R, Shir Y., A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury, Pain, 43, 205-218 (1990)
- 4) Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL., Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw, J Neurosci Methods, 53, 55-63 (1994)
- 5) Hall H, Sallemark M, Wesel I., Acute effects of atypical antidepressants on various receptors in the rat brain, Acta Pharmacol Toxicol (Copenh), 54, 379-384 (1984)
- 6) Honda M, Nishida T, Ono H., Tricyclic analogs cyclobenzaprine, amitriptyline and cyproheptadine inhibit the spinal reflex transmission through 5-HT<sub>2</sub> receptors, Eur J Pharmacol, 458, 91-99 (2003)
- 7) 寺山隆司, 下行性痛覚制御系とセロトニン, 臨床神経科学, 21, 638-640 (2003)
- 8) Millan MJ., Descending control of pain, Prog Neurobiol, 66, 355-474 (2002)

# Vincristine 誘発痛覚過敏モデルマウスに対する Cytidine 5'-diphosphocholine (CDP-choline)の効果

遠藤和樹<sup>1</sup>、早川弘之<sup>1</sup>、亀井淳三<sup>2</sup>  
ヤマサ醤油株式会社医薬化成品事業部薬品化学<sup>1</sup>、星薬科大学薬物治療学<sup>2</sup>

## Cytidine 5'-diphosphocholine (CDP-choline) reverses the hyperalgesia in vincristine-treated mice

Kazuki Endo<sup>1</sup>), Hiroyuki Hayakawa<sup>1</sup>), and Junzo Kamei<sup>2</sup>).

<sup>1</sup>)Chem. and Pharmacol. Lab., Yamasa Corporation, Choshi, Chiba 288-0056, Japan <sup>2</sup>)Dept. of Pathophysiol. & Therap., Sch. of Pharm. and Pharmaceut. Sci., Hoshi Univ., Tokyo 142-8501, Japan

Summary: We studied the effect of CDP-choline on hyperalgesic components of vincristine-induced neuropathy as assessed using the tail-flick test. Naive mice treated with vincristine (first time 0.05mg/kg, i.p., after that 0.125 mg/kg, i.p.) twice a week for 8 weeks reveals the development of hyperalgesia. Vincristine-induced hyperalgesia were prevented when the daily treatment with CDP-choline (500 mg/kg/day, p.o.) was started the day of vincristine injection. These results suggest that chronic treatment of CDP-choline may have a therapeutic benefit in sensory peripheral neuropathy, which is induced as a side effect of vincristine in malignant tumors patients.

## 緒言

現在、種々の医薬品の副作用として末梢神経障害が生じることが知られており、多くの患者のQuality of lifeが損なわれている。対策として原因医薬品の可及的早期中止が求められるが、原疾患の治療継続に支障が生じること、また中止後も神経障害が不変あるいは悪化する例も多く報告され、この末梢神経障害に対し満足な効果を示す治療薬の開発が望まれている<sup>1)</sup>。なかでも白血病や悪性リンパ腫などを主とする多種類の悪性腫瘍の治療に用いられている抗癌剤vincristineは、そのdose limiting factorが四肢のしびれや疼痛、知覚障害などの末梢神経障害であり、強い障害が現われた場合にはvincristineの投与を中止し自然回復を待つという対処がなされて

おり原疾患の治療に支障をきたす。一方、Cytidine 5'-diphosphocholine(CDP-choline)は髄鞘の主要脂質であり、かつneuronの膜脂質として機能上重要なレシチンの生合成に必須な前駆体であること<sup>2)</sup>、さらには循環動態改善作用<sup>3)</sup>や脳浮腫時のNa<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase活性低下に対する改善作用<sup>2)</sup>などを示すことが報告されており、注射剤として頭部外傷などに伴う意識障害などに用いられてきたが<sup>4,5)</sup>、著者らは本化合物が経口投与で糖尿病性末梢神経障害に対し有効性を示す可能性を報告してきた<sup>6,7)</sup>

そこで今回、CDP-cholineの他の末梢神経障害に対する効果を広く検討すべく、vincristine投与により痛覚過敏モデルマウスを作製し、これを用いてCDP-cholineの薬剤誘発性末梢神経障害に対する有効性を検討した。

## 実験方法

### 1. Vincristine 誘発痛覚過敏モデル動物の作製

ICR 系雄性マウス(7週齢)に、生理食塩液に溶解した vincristine sulfate (初回投与のみ 0.05mg/kg, i.p., 2回目以降 0.125mg/kg, i.p)を、週1回もしくは2回投与し、これを10週間継続して行ない痛覚過敏を誘発した。

### 2. 熱的侵害刺激受容閾値解析試験(テイルフリック試験)

知覚神経障害は熱的侵害刺激受容閾値の変化を測定し評価した。すなわちテイルフリック測定装置を用いて、マウス尾部に50Wハロゲンランプに50Vの電圧を掛けた際に生じる光熱刺激に反応して尾を払いのけるまでの反応潜時を測定した。尚、テイルフリック試験は vincristine 投与開始前と投与開始から8週間後、10週間後に行ない、vincristine 投与群で生じる反応潜時の変化に対する CDP-choline 経口投与の効果を検討した。

### 3. CDP-choline の投与

CDP-choline (500mg/kg, p.o.)は蒸留水に溶解し1日1回連日投与した。また投与開始時期は vincristine 投与開始直後からとした。

## 結果

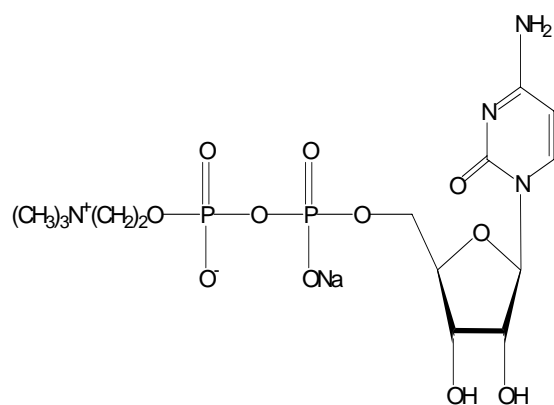


Fig.1. Chemical structure of cytidine 5'-diphosphocholine (CDP-choline)

Control 群では実験開始前の反応潜時と比

較し、8週間もしくは10週間経過後もほぼ同程度の10秒前後の反応潜時を呈し、侵害受容閾値に変化は認められなかった。これに対し vincristine 投与群では、週1回 (Fig. 2) もしくは週2回 (Fig. 3) 投与したどちらの場合においても8週間後には痛覚過敏症状が観察され、control 群との比較、vincristine 投与前の値との比較ともに反応潜時が有意に短縮していた。さらに10週間後では反応潜時が短くなり痛覚過敏症状が進行する傾向が見られた。この vincristine 投与により誘発される感覚異常に対し、CDP-choline は連日 500mg/kg の経口投与で顕著な効果を示した。CDP-choline 投与群では vincristine 投与を週1回 (Fig. 2) もしくは週2回 (Fig. 3) 行なったどちらの場合においても control 群との比較、vincristine 投与前の値との比較ともに有意な反応潜時の変化は認められなかった。

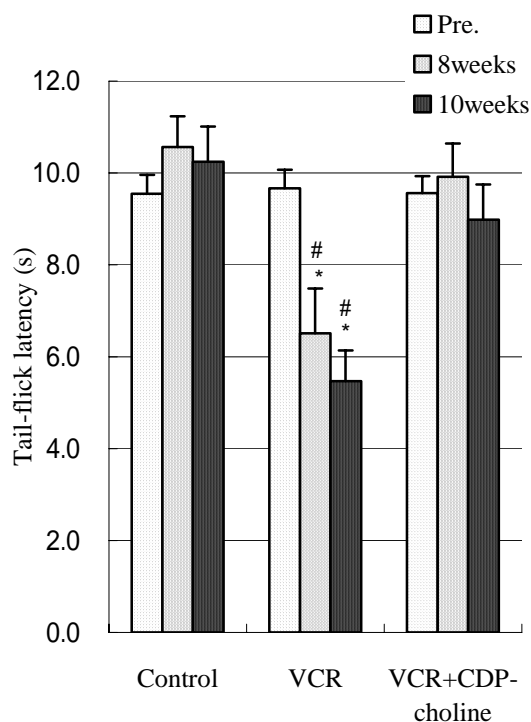


Fig. 2. Effect of the daily treatment with CDP-choline on the hyperalgesia in vincristine (VCR)-treated (once a week) mice. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. for ten mice. \* $P$ <0.05 compared with the control group. # $P$ <0.05 compared with the Pre-VCR treated group.



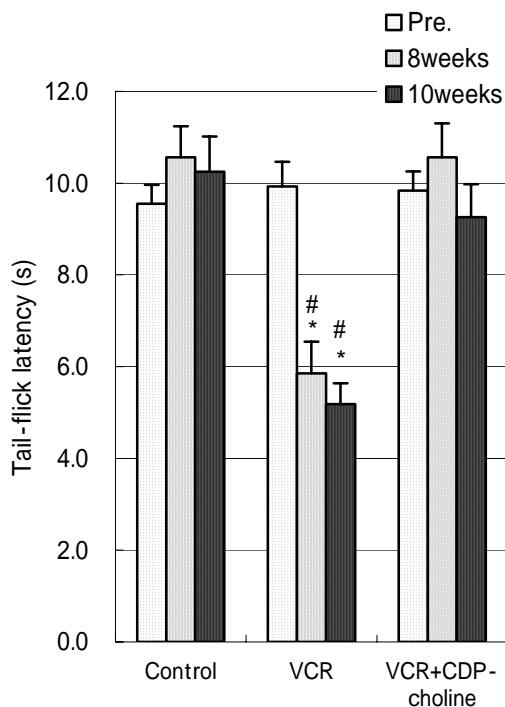


Fig. 3. Effect of the daily treatment with CDP-choline on the hyperalgesia in vincristine (VCR)-treated (twice a week) mice. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. for ten mice. \* $P$ <0.05 compared with the control group. # $P$ <0.05 compared with the Pre-VCR treated group.

## 考察

Vincristine は主に白血病や悪性リンパ腫などを適応とする抗癌剤であるが、副作用として高頻度にしびれ感、四肢疼痛、知覚異常などの末梢神経障害を生じることが知られている。Vincristine は末梢神経の軸索の微小管を障害して軸索変性を惹起するとされているが、詳細な作用機序は明らかでない。またこの副作用に有効な治療薬はなく、強い抹消神経障害が現われた場合は投与を中止し自然回復を待つという対処がなされており、原疾患の治療を継続するうえでの dose limiting factor となっている。

今回、vincristine 慢性処置マウスにおいて投与開始から 8 ないし 10 週間後には顕著な痛覚過敏が認められ、ヒトでの知覚神経障害を反映したモデルになり得ると考えられる。この知覚神経障害モデルに対し、

CDP-choline は経口投与で効果を示したことから、vincristine の副作用の一つである末梢神経障害、特に知覚神経異常に対し経口投与で有効性を示す可能性が示唆された。

今後、CDP-choline の作用メカニズムを明らかにする必要があるが、既に中枢神経系において $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATPase 活性低下に対する改善作用や循環動態改善作用が報告されていることから、末梢神経系においても同様の作用メカニズムが予想され、これらの点について検討を加える予定である。

## 引用文献

1. 中村ら, 1998. 末梢神経障害を起こす薬剤. 月刊薬事 40, (4) 469-473.
2. Julio, J., Guillermo, F., 1995. CDP-choline: Pharmacological and clinical review. Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol. 17, (Suppl. B), 1-54.
3. Watanabe, S., et al. 1975. Effects of various cerebral metabolic activators on glucose metabolism of brain. Folia Psychiat. Neurol. Jpn. 29, 67-76.
4. Shimamoto, k., Aramaki, Y., 1975. Therapeutic mechanisms of cytidine diphosphate choline (CDP-choline). J. Takeda Res. Lab. 34, (2) 189-201.
5. Hazama, T., Hasegawa, T., Ueda, S., Sakuma, A., 1980. Evaluation of the effect of CDP-choline of poststroke hemiplegia employing a double-blind controlled trial, Assessed by a New Rating Scale for Recovery in Hemiplegia, Int. J. Neurosci. 11, 211-225.
6. Endo, K., Hayakawa, H., Tamura, N., Kamei, J., 2003. Cytidine 5'-diphosphocholine (CDP-choline) reverses both the hyper- and hypoalgesia in streptozotocin-induced diabetic mice. J. Pharmacol. Sciences 91 (Supple.1), 117P.
7. 遠藤ら, 2003. STZ 誘発糖尿病マウスの知覚神経障害に対する Cytidine 5'-diphosphocholine(CDP-choline) の効果. J. Jpn. Diabetes Society 46, (Supple.1), S-260.

# Vincristine 誘発痛覚過敏マウスにおける [D-Ala<sup>2</sup>,NMePhe<sup>4</sup>,Gly<sup>5</sup>-ol]enkephalin (DAMGO) 誘発 抗侵害効果の減弱に対する脊髄 NO-cGMP 経路の関与

田村直也、齋藤顕宜、亀井淳三  
星薬科大学薬物治療学教室

**Possible involvement of spinal NO-cGMP pathway in the attenuation of  
[D-Ala<sup>2</sup>,NMePhe<sup>4</sup>,Gly<sup>5</sup>-ol]enkephalin (DAMGO)-induced antinociception in  
vincristine-induced hyperalgesia in mice**

Naoya Tamura, Akiyoshi Saitoh, Junzo Kamei  
Department of Pathophysiology & Therapeutics, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences,  
Hoshi University, Tokyo, Japan

Summary: Several lines of evidence indicate that vincristine, a widely used chemotherapeutic agent, produces a painful neuropathy in humans. Our recent study showed that the treatment with vincristine (0.125 mg/kg, i.p.) twice a week for six-weeks in mice caused thermal hyperalgesia in the tail-flick test. In the present study, we examined the antinociceptive effect of the intracerebroventricularly (i.c.v.) injected [D-Ala<sup>2</sup>,NMePhe<sup>4</sup>,Gly<sup>5</sup>-ol]enkephalin (DAMGO), a  $\mu$ -opioid receptor agonist, on vincristine-induced hyperalgesia in mice. The antinociceptive potency of i.c.v. DAMGO (1.0 – 5.6 pmol) in vincristine-treated mice was lower than that in naïve mice. Intrathecal (i.t.) pretreatment with N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 10 – 56 nmol), a non-specific NO synthase (NOS) inhibitor, attenuated DAMGO-induced antinociception in naïve mice, but not in vincristine-treated mice. I.t. pretreatment with L-arginine (30 – 300 pmol), a substrate of NOS, increased the antinociceptive effect of DAMGO in vincristine-treated mice to the level observed in naïve mice. Furthermore, i.t. pretreatment with 8-bromoguanosine 3', 5'-cyclic monophosphate (0.3 – 1.0 nmol), a cell-permeable cGMP analog, potentiated DAMGO-induced antinociception in vincristine-treated mice, but not in naïve mice. These results suggest that the attenuation of DAMGO-induced antinociception in vincristine-treated mice may be due, at least in part, to the dysfunction of spinal NO/cGMP cascade.

## 緒言

急性白血病や悪性リンパ腫などに対する抗悪性腫瘍薬として広く用いられている vincristine は、その副作用として手足の腫れや痛みなど、

有痛性の神経障害が起きることが報告されている。一部の患者では、この神経障害の発症により vincristine の使用量が制限され、治療に悪影響を及ぼすことが報告されている。この vincristine によって起こる疼痛は、一般に

morphine の有効性が認められない求心路遮断性疼痛の一つであると考えられており、有効な治療法は確立されていない。したがって、患者の QOL のみならず vincristine の治療効果を向上するものとして、この神経障害の改善が期待されている。Vincristine を反復投与したラットにおいて、機械刺激、熱刺激に対する痛覚過敏が認められることが報告されている<sup>(1)</sup>。また、当教室では、vincristine を週 2 回、6 週間腹腔内投与したマウスにおいて、tail-flick test における侵害受容閾値の低下が認められ、その低下に脊髄における NO、cGMP レベルの減少が関与していることを報告している。

Morphine の上位中枢の  $\mu$  受容体を介した抗侵害効果の発現に、脊髄の  $\alpha_2$  受容体、muscarine 受容体の活性化が関与することが報告されている<sup>(2,3)</sup>。また、脊髄における NO は、norepinephrine、acetylcholine の遊離に対して促進的に働くことが報告されている<sup>(4)</sup>。また、muscarine 受容体を介した抗侵害効果の発現に、脊髄 NO-cGMP 経路が関与していることが報告されている<sup>(5)</sup>。したがって、vincristine 誘発疼痛マウスの脊髄における NO、cGMP レベルの減少は、上位中枢の  $\mu$  受容体を介した抗侵害効果の発現に何らかの影響を及ぼすことが考えられる。

そこで本研究では、vincristine 誘発痛覚過敏に対する、 $\mu$  受容体作動薬である D-Ala<sup>2</sup>,N-Me-Phe<sup>4</sup>,Gly<sup>5</sup>-ol]-enkephalin (DAMGO) の脳室内投与による抗侵害効果、ならびに、脊髄 NO-cGMP の関与について検討を行った。

## 実験方法

### 1. 使用動物

実験には 4 週齢の ICR 系雄性マウスを用いた。Vincristine は初回投与量を 0.05 mg/kg として腹腔内投与し、以降、0.125 mg/kg の用量で週 2 回、6 週間腹腔内投与した。また、溶媒である生理食塩水を同様に投与したものを対照

群とした。

### 2. 侵害受容閾値の測定

侵害受容閾値は、tail-flick 法に従い測定した。50 W の白色ランプに 50 V の電圧をかけた際に生じる熱刺激をマウス尾部に与え、この際生じる尾の払い除け反応まで時間（反応潜時）を測定した。なお、最大刺激時間（cut-off time）は、組織障害を起こさない範囲内で、30 秒に設定した。抗侵害効果は、% maximal possible effect (%MPE) を算出することにより評価した。

### 3. 使用薬物

[D-Ala<sup>2</sup>, N-Me-Phe<sup>4</sup>, Gly<sup>5</sup>-ol]-enkephalin (DAMGO) は、侵害受容閾値測定の前 10 分前に脳室内投与した。L-arginine、N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)、8-bromoguanosine 3', 5'-cyclic monophosphate (8-Br-cGMP) は、いずれも DAMGO 脳室内投与 10 分前に髄腔内投与した。

## 結果

### DAMGO の抗侵害効果

対照群マウスおよび vincristine 処置マウスにおいて、DAMGO (1.0 – 5.6 pmol) の脳室内投与により、用量依存かつ有意な抗侵害効果が認められた。しかしながら、vincristine 処置マウスにおける抗侵害効果は、対照群マウスのそれに対して有意に減弱していた (Fig. 1)。

### DAMGO の抗侵害効果に対する L-NAME の影響

対照群マウスにおける DAMGO 誘発抗侵害効果は、非選択的 NOS 阻害薬である L-NAME (10 - 56 nmol) の髄腔内投与により、用量依存かつ有意に減弱した。しかしながら、vincristine 処置マウスにおける DAMGO 誘発抗侵害効果に対して、L-NAME による影響は何ら認められなかった (Fig. 2)。

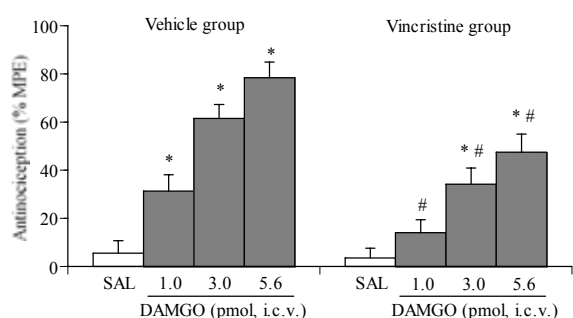


Fig. 1. Antinociceptive effects of DAMGO in vincristine- and vehicle-treated mice. Nociceptive threshold was determined by tail-flick test. DAMGO was injected intracerebroventricularly (i.c.v.) 10 min before testing. Experiments were conducted 6 weeks after vincristine or vehicle treatment. Each column represents the mean with S.E. for 10-12 mice in each group. \* $P < 0.05$  compared with the respective saline (SAL)-treated group. # $P < 0.05$  compared with the respective vehicle-treated group.

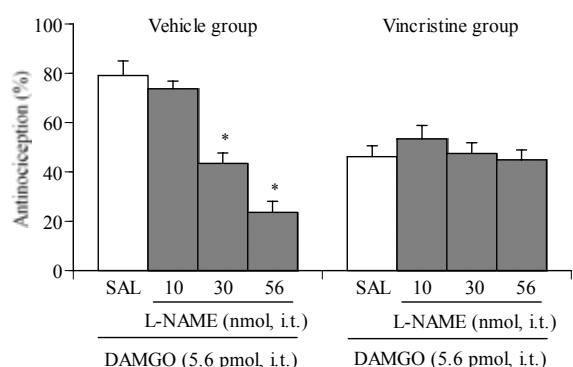


Fig. 2. Effects of L-NAME, a non-specific NOS inhibitor, on the antinociceptive effects of DAMGO in vincristine- and vehicle-treated mice. Nociceptive threshold was determined by tail-flick test. L-NAME was injected intrathecally (i.t.) 10 min before i.c.v. treatment with DAMGO. Experiments were conducted 6 weeks after vincristine or vehicle treatment. Each column represents the mean with the S.E. for 10-11 mice in each group. \* $P < 0.05$  compared with the respective saline (SAL)-DAMGO-treated group.

### DAMGO の抗侵害効果に対する L-arginine の影響

Vincristine 処置マウスにおける DAMGO 誘発抗侵害効果は、NO 合成酵素 (NOS) の基質である L-arginine (30 – 300 pmol) の髄腔内投与により、用量依存かつ有意に増強し、対照群マウスと同程度のもとなった。また、対照群マウスにおける DAMGO 誘発抗侵害効果に対して、L-arginine による影響は何ら認められなかった (Fig. 3)。

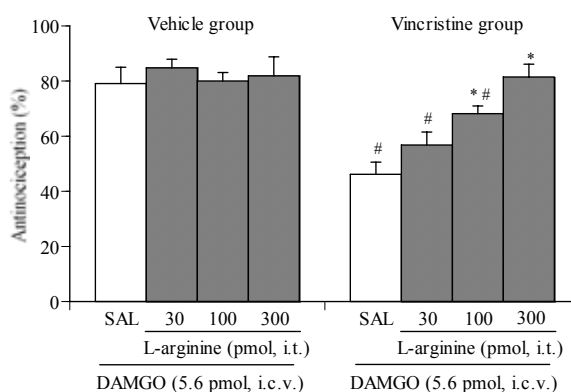


Fig. 3. Effects of L-arginine, a substrate of nitric oxide synthase (NOS), on the antinociceptive effects of DAMGO in vincristine- and vehicle-treated mice. Nociceptive threshold was determined by tail-flick test. L-arginine was injected i.t. 10 min before i.c.v. treatment with DAMGO. Experiments were conducted 6 weeks after vincristine or vehicle treatment. Each column represents the mean with the S.E. for 10-11 mice in each group. \* $P < 0.05$  compared with the respective saline (SAL)-DAMGO-treated group. # $P < 0.05$  compared with the respective vehicle-treated group.

### DAMGO誘発抗侵害効果に対する 8-Br-cGMP の影響

Vincristine 処置マウスにおける DAMGO 誘発抗侵害効果は、cGMP の誘導体である 8-Br-cGMP (0.3 - 1.0 nmol) の髄腔内投与により、用量依存かつ有意に増強し、対照群マウスと同程度のもとなった。また、対照群マウスにおける DAMGO 誘発抗侵害効果に対して、8-Br-cGMP による影響は認められなかった (Fig. 4)。

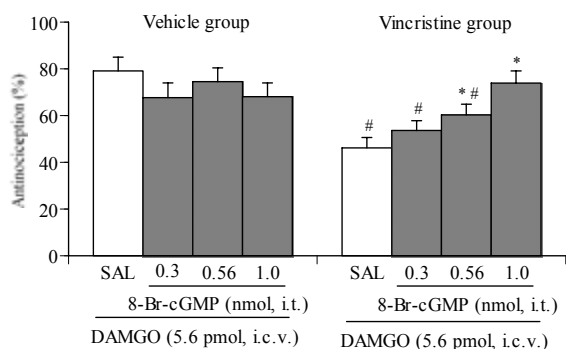


Fig. 4. Effects of 8-Br-cGMP, a cell-permeable cGMP analog, on the antinociceptive effects of DAMGO in vincristine- and vehicle-treated mice. Nociceptive threshold was determined by tail-flick test. 8-Br-cGMP was injected i.t. 10 min before i.c.v. treatment with DAMGO. Experiments were conducted 6 weeks after vincristine or vehicle treatment. Each column represents the mean with the S.E. for 10-11 mice in each group. \* $P < 0.05$  compared with the respective saline (SAL)-DAMGO-treated group. # $P < 0.05$  compared with the respective vehicle-treated group.

## 考 察

Vincristine 処置マウスにおいて、 $\mu$  受容体作動薬である DAMGO の脳室内投与による抗侵害効果の有意な減弱が認められた。対照群マウスにおける DAMGO 誘発抗侵害効果は、L-NAME の髄腔内投与により有意に減弱したが、vincristine 処置マウスにおける DAMGO 誘発抗侵害効果に対して、L-NAME による影響は認められなかった。一方、vincristine 処置マウスにおける DAMGO 誘発抗侵害効果は、L-arginine ならびに 8-Br-cGMP の髄腔内投与により有意に改善され、対照群マウスにおける抗侵害効果と同程度のものとなった。

本研究の結果より、vincristine 誘発痛覚過敏に対する DAMGO 誘発抗侵害効果の減弱に、脊髄 NO および cGMP レベルの減少が一部関与している可能性が示唆された。

また、DAMGO 誘発抗侵害効果の減弱が、減少した NO による norepinephrine や acetylcholine の遊離量の減少による結果であるかなど、さらなる検討が必要であり、当日は、 $\alpha_2$  受容体作動薬ならびに、muscarinic 受容体作動薬による抗侵害効果を検討した結果についても発表する予定である。

## 引用文献

- (1) Aley K. O., Reichling D. B., Levine J. D., (1996) Vincristine hyperalgesia in the rat: a model of painful vincristine neuropathy in humans. *Neuroscience*, 73, 259-265
- (2) Song H. K., Pan H. L., Eisenach J. C., (1998) Spinal nitric oxide mediates antinociception from intravenous morphine. *Anesthesiology*, 89, 215-221
- (3) Detweiler D. J., Eisenach J. C., Tong C., Jackson C., (1993) A cholinergic interaction in  $\alpha_2$  adrenoceptor-mediated antinociception in sheep. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 265, 536-542
- (4) Xu Z., Tong C., Pan H. L., Cerda S. E., Eisenach J. C., (1997) Intravenous morphine increases release of nitric oxide from spinal cord by an  $\alpha$ -adrenergic and cholinergic mechanism. *J. Neurophysiol.*, 78, 2072-2078
- (5) Iwamoto E. T., Marion L., (1994) Pharmacologic evidence that spinal muscarinic analgesia is mediated by an L-arginine/nitric oxide/cyclic GMP cascade in rats., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 271, 601-608

# カラゲニン炎症性痛覚過敏に対する鍼鎮痛効果

## —末梢のオピオイド受容体の関わりについて—

関戸玲奈、田口辰樹<sup>1)</sup>、石丸圭荘<sup>1)</sup>、北小路博司、咲田雅一<sup>2)</sup>

明治鍼灸大学臨床鍼灸医学 教室、<sup>1)</sup> 明治東洋医学院専門学校、<sup>2)</sup> 明治鍼灸大学外科学教室

### Effects of acupuncture analgesia in carrageenan-induced hyperalgesia

#### —The involvement of the peripheral opioid receptors—

Reina Sekido, Tatsuki Taguchi<sup>1)</sup>, Keisou Ishimaru<sup>1)</sup>, Hiroshi Kitakoji, Masakazu Sakita<sup>2)</sup>

Department of Clinical Acupuncture and Moxibustion, Meiji University of Oriental Medicine,

<sup>1)</sup>Meiji school of Oriental Medicine, <sup>2)</sup>Department of Surgery, Meiji University of Oriental Medicine,

Kyoto, Japan

Abstract: This study investigated the effects of electroacupuncture (EA) on the development of hyperalgesia during carrageenan-induced inflammation and whether opioid receptors in peripheral tissues participate in electroacupuncture analgesia (EAA). EA produced a significant increase in PPT and lasted for 24 h after carrageenan injection. PPT elevations were antagonized dose-dependently by NTI (opioid receptor antagonist), nor-BNI (opioid receptor antagonist) or CTOP ( $\mu$  opioid receptor antagonist) i.pl. injection from immediately, 1 h or 3 h after EA, respectively. These results suggest that EA trigger the release of each opioid peptides at different time stage and activate three opioid receptor in peripheral tissues.

## 緒言

鍼鎮痛効果は中枢神経系内の内因性オピオイドペプチドやセロトニン、ノルアドレナリン等の神経伝達物質を介した下行性疼痛抑制系の賦活により引き起こされることが人や正常動物を対象とした研究から明らかにされてきた<sup>1)</sup>。近年、多くの動物実験や臨床研究により中枢のみならず、末梢の炎症組織内においても免疫細胞がオピオイドペプチドを産生し、これら末梢のオピオイドペプチドが鎮痛効果をもたらすことが明らか

となってきた<sup>2)</sup>。すなわち、Steinらは炎症状態の動物にある種の環境刺激を与えると炎症部位の免疫細胞からオピオイドペプチドが放出され、それらが末梢神経に存在するオピオイド受容体に作用することにより、炎症部位の痛みが抑制されることを報告している。このように、炎症性の疼痛のコントロールには免疫系と末梢神経のオピオイド受容体が関わっていると考えられている。一方、現在では様々な疼痛の緩和に鍼治療が用い

られているが、炎症性の疼痛に対する鍼鎮痛効果やその作用機序はほとんど研究されていない。そこで、本研究では急性炎症モデルであるカラゲニン炎症性痛覚過敏モデルを用いて、鍼通電(EA)が痛覚過敏に及ぼす影響を検討した。さらに鍼鎮痛における末梢の $\mu$ 、 $\kappa$ 、 $\delta$  オピオイド受容体の関与を検討した。

## 実験方法

### 1、実験動物

実験には9~11週齢のSprague-Dawley系雄性ラットを用いた。

### 2、カラゲニン炎症性痛覚過敏モデル

起炎物質である2%カラゲニンをエーテル麻酔下で26G注射針を用い、ラットの左後肢足底に0.1ml皮下投与して作成した。

### 3、痛覚閾値の測定

痛覚閾値の測定には加圧式鎮痛効果測定装置(Ugo Basile社)を用いて、左後肢の足背に加圧し、後肢の逃避反応を起こすまでに要した付加重量(g)をpaw pressure threshold(PPT)とした(Randall Selitto Test)。PPTの測定は、15分間の安静の後に2分おきに2回行い、その平均値を読みとり、カラゲニン投与15分前と投与直前、カラゲニン投与3時間後、4時間後、5時間後、7時間後、9時間後、さらに24時間後の計8回行った。

### 4、鍼通電方法

鍼通電には直径0.2mm・長さ30mmのステンレス鍼を用い、鍼を左後肢の前脛骨筋に2ヶ所(足三里相当部位とその下約7mm)、深さ5mm

まで刺入し、カラゲニン投与3時間後のPPT測定後直ちに開始した。鍼通電条件は、持続時間が0.1msの双極波を用い(Trimix 101H 日本メディックス製)、頻度は3Hzとし1時間の通電を行った。

### 5、使用薬物

$\mu$ 、 $\kappa$ 、 $\delta$  オピオイド受容体拮抗薬であるCTOP、NTI、nor-BNIはそれぞれ蒸留水に溶解し、0.1ml中に各々の投与量が含まれるように調整し、鍼通電の1時間前に炎症部位の足底内に投与した。

### 6、統計解析

統計解析は、統計解析用ソフト(Statistica for Macintosh Release 4.1J)を用い、Huynh Feldt補正下で二元配置分散分析を行った後、多重比較はTukey法を用いて検定した。有意水準は5%以下とし、すべてのデータは平均値 $\pm$ 標準偏差(mean $\pm$ SD)で表した。

## 結果

### 1、カラゲニン投与によるPPTの変化(Figure 1)

カラゲニンの皮下投与により、投与前(0h)には $84.0 \pm 13.4$ gであったPPTが投与3時間後に $54.2 \pm 14.2$ gと最も低下し痛覚過敏を生じた。また、投与24時間後においても $57.5 \pm 8.3$ gと痛覚過敏の持続が観察された。

### 2、カラゲニン炎症性痛覚過敏モデルにおける鍼通電(EA)の影響(Figure 1)

カラゲニンの皮下投与により投与3時間後にPPTは $59.6 \pm 19.1$ gまで低下し痛覚過敏を生じた。しかし、EA終了直後からPPTは $89.4 \pm 16.8$ gと上昇し、EA終了20時間後においても $85.2 \pm$

23.2g とその効果は持続し、コントロール群に比し有意な上昇が見られた。

### 3、鎮痛効果に対する CTOP の足底内投与の影響 (Figure 2)

すべての群において、カラゲニン投与3時間後

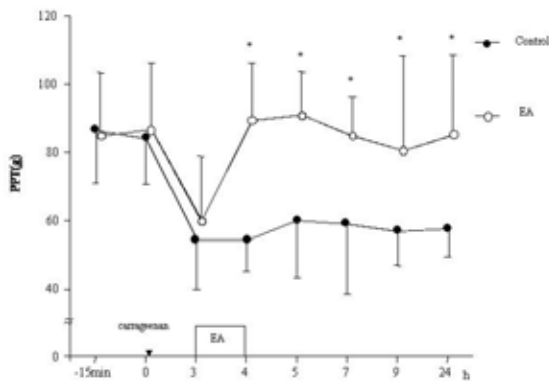


Figure 1. Effects of EA during hyperalgesia elicited by carrageenan-induced inflammation. EA was started from 3 h after carrageenan injection. The results are expressed as mean  $\pm$  SD.  $n=6$  per group. \* $P<0.001$  (control vs. EA).

に PPT はコントロール群とほぼ同程度まで低下し、痛覚過敏を生じた。しかし、2.5  $\mu$ g+EA 群では EA 終了後、PPT は vehicle+EA 群と同程度まで上昇した。一方、5.0  $\mu$ g+EA 群では EA 終了1時間後まで PPT は上昇したが、EA 終了3時間後から PPT は低下し (46.2  $\pm$  4.0g)、その後はコントロール群とほぼ同様の傾向を示した。また、10.0  $\mu$ g+EA 群においても、PPT は 5.0  $\mu$ g+EA 群とほぼ同様の経過を示し、EA 終了3時間後から PPT は低下した。このように CTOP の炎症部位の足底内投与により、EA で生じた PPT の上昇は EA 終了3時間後から用量依存性に抑制された。

### 4、鎮痛効果に対する NTI の足底内投与の影響 (Figure 3)

25  $\mu$ g+EA 群においては EA 終了直後に PPT は 103.3  $\pm$  19.7g まで上昇し、カラゲニン投与24時間後においても PPT は上昇していた。しかし、50  $\mu$ g+EA 群、100  $\mu$ g+EA 群では EA 終了直後よ

り PPT はそれぞれ 58.1  $\pm$  17.5g、68.8  $\pm$  13.4g と低下し、その後もコントロール群とほぼ同様の傾向を示した。このように NTI の炎症部位の足底内投与により、EA で生じた PPT の上昇は EA 終了直後から用量依存性に抑制された。

### 5、鎮痛効果に対する nor-BNI の足底内投与の影響 (Figure 4)

EA により生じた PPT の上昇は 50  $\mu$ g の nor-BNI の足底内投与ではほとんど影響されな

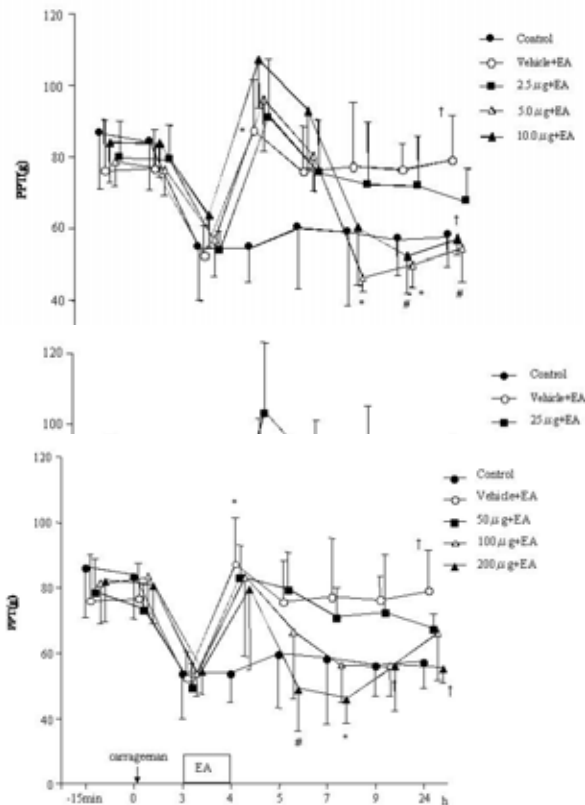


Figure 4. Effects of i.p. injection of nor-BNI on EAA during hyperalgesia elicited by carrageenan-induced inflammation. nor-BNI was administered by i.p. injections (0.1ml) of the inflamed paw 1h before EA. EA was started from 3 h after carrageenan injection. The results are expressed as mean  $\pm$  SD.  $n=6$  per group. \* $P<0.001$ , # $P<0.01$  JP<0.05 (control vs. Vehicle+EA, Vehicle+EA vs. 50  $\mu$ g+EA, Vehicle+EA vs. 100  $\mu$ g+EA, Vehicle+EA vs. 200  $\mu$ g+EA).

った。しかし、200  $\mu$ g の nor-BNI の足底内投与により、EA 終了1時間後から PPT は 49.2  $\pm$  13.0g と抑制される傾向が見られた。また、その後 PPT はコントロール群とほぼ同様の推移を示した。このように nor-BNI の炎症部位の足底内投与によ



り、EA で生じた PPT の上昇は EA 終了 1 時間後から用量依存性に抑制される傾向が見られた。

## 考察

これまで正常状態での動物やヒトを対象とした研究では EA 終了後、徐々に鍼鎮痛効果は消失することが分かっている<sup>1)</sup>。本研究において、カラゲニン炎症性痛覚過敏に対する EA の影響を検討したところ、鎮痛効果が長時間にわたり持続することが明らかとなった。すなわち、炎症性の疼痛の緩和に EA が有効である可能性が考えられた。また、本研究において鍼鎮痛は オピオイド受容体拮抗薬の炎症部位への足底内投与で EA 終了直後から完全に拮抗されたが、

オピオイド受容体拮抗薬では EA 終了 1 時間後から、 $\mu$  オピオイド受容体拮抗薬では EA 終了 3 時間後から拮抗されることが分かった。近年、多くの研究において一次感覚神経終末にオピオイド受容体が存在し、末梢のオピオイド受容体の内因性リガンドであるオピオイドペプチド(エンドルフィン、エンケファリン、ダイノルフィン)が Tリンパ球、Bリンパ球、単球、マクロファージ

を含む免疫細胞によって産生、放出され、それぞれのオピオイドペプチドが末梢のオピオイド受容体に作用して、末梢性の鎮痛を引き起こすことが報告されている<sup>2,3)</sup>。これらの報告と今回の結果を併せて考えると、EA が異なる時間のタイミングでオピオイドの放出を促進し、末梢神経に存在する 3 つのオピオイド受容体を活性化させ、鎮痛作用を出現させている可能性が考えられた。しかし、どのような経路を介してオピオイド受容体を活性化させたのか現段階では不明であり、今後詳細な検討が必要である。

## 引用文献

- 1) Han J S, Trenius L : Neurochemical basis acupuncture analgesia. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 22 : 193-220, 1982.
- 2) Stein C : The control of pain in peripheral tissue by opioids. *N Engl J Med*, 332 : 1685-1690, 1995.
- 3) Stein C, Yassouridis A : Peripheral morphine analgesia. *Pain*, 71 ; 119-121, 1997