

# がん性疼痛患者におけるモルヒネの至適投与量設計 に関する研究

櫻田 大也<sup>1)</sup>, 川口 啓之<sup>1)</sup>, 江口 久恵<sup>1)</sup>, 遠藤 一司<sup>1)</sup>, 田中 克彦<sup>2)</sup>  
国立札幌病院 薬剤科<sup>1)</sup>、臨床研究部<sup>2)</sup>

## Evaluation of the optimal dose of morphine in cancer pain

Tomoya Sakurada<sup>1)</sup>, Hiroyuki Kawaguchi<sup>1)</sup>, Hisae Eguchi<sup>1)</sup>, Kazushi Endo<sup>1)</sup>, Katuhiko Tanaka<sup>2)</sup>  
Department of pharmacy, National Sapporo Hospital<sup>1)</sup>  
Department of clinical research, National Sapporo Hospital<sup>2)</sup>

Summary : We now present such a method for the simultaneous analysis of morphine, morphine-3-glucuronide (M-3-G) and morphine-6-glucuronide (M-6-G) by high-performance liquid chromatography (HPLC). Morphine is a potent opioid analgesic used traditionally for the long-term treatment of moderate to severe cancer pain. In human, morphine is metabolized primarily to two glucuronide metabolites, M-3-G and M-6-G to be pharmacologically active. Thus, it is important to measure the plasma concentrations of M3G, M6G, and morphine in order to more fully interpret pharmacodynamic / pharmacokinetic data obtained from patients treated with morphine. Before any analgesic can be selected one must determine the analgesic requirement. An accurate analgesic history will be helpful in determining the analgesic dose. The needs of the patient will dictate the route or desired interval. As always, therapy should be individualized to specific patient requirements. Drug selection should be based on established evidence.

## はじめに

1986年に「WHO方式がん疼痛治療法」が公表されて以来、モルヒネはがん疼痛治療薬の主軸として頻用されているが、体内動態と薬理作用の関係については不明な点が多く、また個体差が大きいことなどからモルヒネ投与量の設定が難しいとされている。その一つの要因として、肝・腎機能の変化や、サードスペース（腹水・胸水等）による血中濃度低下および鎮痛有効濃度の上昇が、患者個々の癌の進行に伴う病態の変化によって大きく異なるためと考えられる。したがって、モルヒネによるがん疼痛治療は、患者個々の状況・状態の的確な把握が必要であり、痛みの感じ方は個体差があるため、それを患者の主観と客観の側面から確認し総合的に評価する必要がある。

患者の主観は、昨年報告した薬剤管理指導業務の標準化と効率化を図るために作成したアセスメントツールを使用することで評価が可能である。

患者の客観的指標は、モルヒネの血中濃度を測定することにより科学的根拠として評価することが可能であるが、血中モルヒネ濃度の簡易測定がないため臨床の現場では治療的薬物モニタリング（TDM）が困難である。

そこで本研究ではモルヒネの体内動態及び鎮痛効果について評価を行うために、がん性疼痛治療の最適化、至適投与法における科学的方法論の

確立について検討したので報告する。

## 痛みの評価方法

治療方法の選択や治療効果を確認するためには、痛みの部位、性質や強さを判定し、患者ごとに異なる複雑な痛みを正確に評価することが必要となる。

当薬剤科では、薬剤管理指導業務を行う際に下記のアセスメントツールを活用することにより痛みや副作用状況の評価を行っている。また、服薬指導を通して患者が抱えている不安軽減に努めている。

### アセスメントツール

痛みに関する問診票：

患者の疑問や不安を把握する。

疼痛記録用紙：

医師・看護師へ、服薬指導で得られた除痛効果や副作用の初期症状の確認などの情報を提供する。

服薬日誌：

フェイススケールを用いて痛みの程度や副作用症状について患者自身が記入するものであり、痛みの部位、性質や強さを判定する。

## 血中濃度測定法

がん性疼痛治療は、時間の経過とともに疼痛の性質や程度が大きく変化するため、患者の痛みの

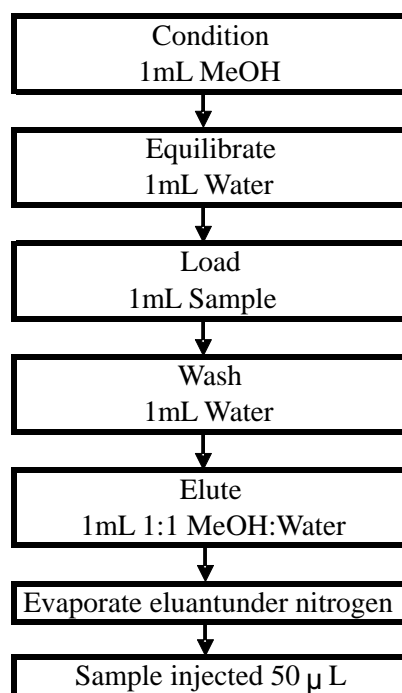
訴えや症状によりモルヒネの処方設計を行うのが基本となる。しかし、処方内容を変更する場合の判断基準や増量・減量等の程度については、医師の経験や勘によるところが大きく、科学的根拠に基づいているとは言い難い。また、モルヒネの主代謝物であるmorphine-3-glucuronide (M-3-G)及び活性代謝物である morphine-6-glucuronide (M-6-G)は、腎機能障害により蓄積することが認められおり、意識障害やせん妄などの副作用が生じるといわれている。(1)

そこで我々は、モルヒネおよびその代謝物 (M-3-G、M-6-G) の体内動態を把握するために臨床で利用可能な簡便かつ精度の高い測定法を高速クロマトグラフィー (HPLC) を用いて検討した。

### (1) 前処理方法

試料血清 1mL に 0.5N 過塩素酸 0.3mL を加え攪拌後、あらかじめメタノール 1mL および水 1mL でコンディショニング及び平衡化した Waters ,Oasis HLB に、試料血清の上清 1mL を流す。その後、水 1mL で洗浄後、メタノール：水 = 1 : 1 の溶液 1mL で抽出し、50 の恒温槽中で窒素ガスにて蒸発乾固し、得られた残渣に HPLC の移動相 100μL で溶解後 50 μL を試料溶液とした。(Fig1)

#### Oasis HLB Extraction Method (Fig1)



### (2) 検出条件

カラム：

CAPCELL PAK SCX UG 80  
2.0 mm × 150 mm

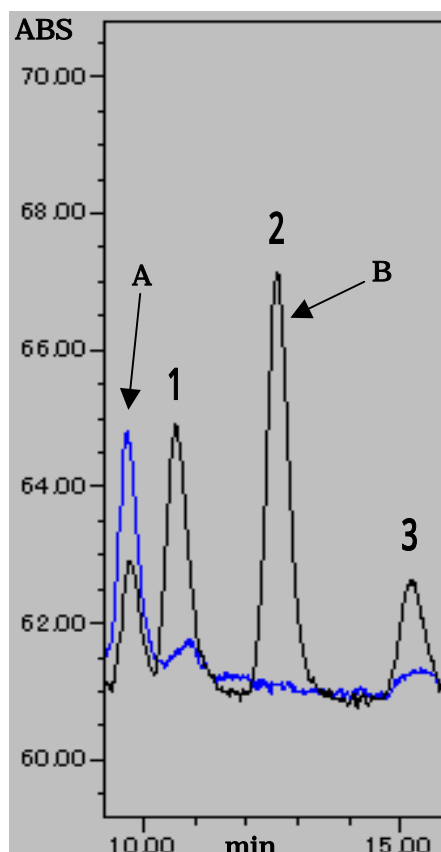
移動相：

50mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ( H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> を加え pH 3.0 に調整 ) : acetonitrile = (40:60)

流速:0.2 mL / min

注入量:50 μL

検出波長:210 nm



Peaks: 1 Morphine-6-glucuronide  
2 Morphine-3-glucuronide  
3 Morphine

Chromatogram of plasma extracts :

A) Blank B) Spiked Sample

## モルヒネとその代謝物の 体内動態

モルヒネは、主としてM-6-G、M-3-Gに代謝され、血中濃度の各濃度比は約1：4：8の割合で出現することが知られている。鎮痛効果は、M-3-Gで認められないが、M-6-Gでは強い鎮痛効果を有することが認められている<sup>(2)</sup>。

モルヒネは生理的pHにおいてイオン化しているため血液脳関門(BBB)通過性が悪く脳内にはごく少量しか移行しない。また、M-6-G、M-3-Gは水溶性に代謝されているため、BBBの通過はモルヒネより低いと考えられ、ラットを用いたBBB透過性の実験ではM-6-Gの脳内取り込みはモルヒネの1/32であると報告されている<sup>(3)</sup>。

M-6-Gは脳内において、中枢移行したモルヒネの代謝により産生されることが報告されており<sup>(4)</sup>、モルヒネ中枢鎮痛に大きく関与していることが示唆される。しかし、M-6-GはBBB透過性が悪いため、血中濃度と中枢鎮痛効果の関係が低いことが予想される。

一方、高脂溶性の薬物にもかかわらずBBB透過性の低い化合物がある。例えば抗癌剤のビンクリスチンや免疫抑制剤のシクロスポリンがあり、これらの薬物はP-糖蛋白質の基質となる。P-糖蛋白質は多剤耐性化した腫瘍細胞から発見された薬物排出ポンプであり、細胞内から能動的な汲み出し機構により抗癌剤の蓄積量を減少させ、最終的に腫瘍細胞を耐性化させる。重要な特徴は、化学構造も作用機序もまったく異なる様々な抗癌剤に対して働くことである。近年、脳毛細血管内皮細胞管腔側細胞膜にP-糖蛋白質が特異的に発現していることが明らかにされ、脳内あるいは血管内皮細胞内から種々の薬物を血管内腔側に汲み出すことにより、高脂溶性の細胞毒性物質の脳内侵入を積極的に制御していることが示唆されている。

モルヒネ及びその代謝物のM-6-GもP-糖蛋白質の基質となる。

Patrickらは、モルヒネのラット腹腔内持続投与により、遊離型モルヒネの血中濃度は3日目以降定常状態になるが、脳内モルヒネ濃度は3日目以降徐々に低下し、それに伴って鎮痛効果も減弱することを報告した<sup>(5)</sup>。そこで、Aquilanteらは、ラットにモルヒネを反復投与し、Western blot法に従い脳内P-糖蛋白質発現量を測定したところ、モルヒネ反復投与群は対象群に比しP-糖蛋白質が約2倍強く発現することを明らかにした<sup>(6)</sup>。すなわち、モルヒネ反復投与によりP-糖蛋白質が誘導され、それがモルヒネの耐性形成に関与する可能

性が考えられる。しかし、臨床上モルヒネは、1日あたりの投与量として10mgからg単位におよぶほど広範囲に投与され、鎮痛効果を有することから、モルヒネはP-糖蛋白質の基質になるが、親和性は低いことが考えられる。しかし、癌患者の多くは抗癌剤による化学療法を受けている場合が多く、これら薬剤によるP-糖蛋白質の活性の変化が考えられることや、難治性疼痛患者のようにモルヒネの大量投与においては、その投与量、血中のモルヒネ代謝物量及び併用薬を考慮に入れた、作用部位である中枢移行量を予測することが重要である。今後、M-6-G及びP-糖蛋白質を含めた評価が検討課題である。

## 有害事象と代謝物

M-6-G、M-3-Gは腎排泄されるため、腎機能が低下すると蓄積傾向が認められる。

特にM-6-Gはモルヒネと同様、P-糖蛋白質の基質となることから両薬物間の相互作用による薬物動態変化が予測される。

実際、腎機能障害によるモルヒネ代謝物の蓄積から、意識障害や、せん妄等の副作用が生じやすいことが報告されている<sup>(1)</sup>。

したがって、モルヒネ服用患者の有害事象においてはM-6-Gの薬物動態を評価し、その因果関係についても検討を行わなければならない。また、最近、がん性疼痛の鎮痛剤としてフェンタニルパッチ及びオキシコドンの徐放製剤が承認され本邦においてもオピオイドローテーションが可能となった。そこで、モルヒネ不耐性対策にオピオイドローテーションを組み込むため、当薬剤科ではモルヒネの血中濃度解析を基に処方設計への支援につなげていきたいと考えている。

## 結果・考察

がん性疼痛患者におけるモルヒネの至適投与量の設定を目指し、患者の主観的および客観的な病態を把握するために、アセスメントツールの作成およびモルヒネの血中動態の測定法を確立した。臨床現場において、リアルタイムに測定しなければならないことから以下の点を工夫した。

1. Waters, Oasis HLBは、従来のC18カートリッジに比べ再現性・回収率が高く、また減圧吸引装置による影響が無いため、抽出時間の短縮が可能となり、前処理に要する時間は約20分となった。
2. イオン交換カラム使用により、生体成分の夾雑物の影響がなく、モルヒネとその代謝物の分離が可能となった。また、カラム内

径が 2.0 mm×150 mm であるため溶媒消費量が低減でき、高感度に測定が出来るようになった。

また、本研究は院内での倫理委員会にも承認されており、患者への同意書中の説明者欄に担当医師の他、担当薬剤師の署名欄を設け、薬剤師からも疼痛治療の説明を行うこととなった。このことは、服薬指導による疼痛管理から、さらに科学的根拠に基づいた疼痛管理へと、その質的向上に対する期待が大きいことを意味していると考えられる。

現在、これらの得られた知見から臨床症状及びモルヒネの体内動態の個体内変動を考慮した処方の個別化について検討中である。

## 引用文献

- 1 ) Osborne RJ, Joel SP, Slevin ML.:Morphine intoxication in renal failure: the role of morphine-6-glucuronide.Br Med J (Clin Res Ed). 1986 Jun 14;292(6535):1548-9.
- 2 ) Paul D, Standifer KM, Inturrisi CE, Pasternak GW.: Pharmacological characterization of morphine-6 beta-glucuronide, a very potent morphine metabolite. J Pharmacol Exp Ther. 1989 Nov;251(2):477-83.
- 3 ) Wu D, Kang YS, Bickel U, Pardridge WM.: Blood-brain barrier permeability to morphine-6-glucuronide is markedly reduced compared with morphine. Drug Metab Dispos. 1997 Jun;25(6):768-71.
- 4 ) Samuelsson H, Hedner T, Venn R, Michalkiewicz A.: CSF and plasma concentrations of morphine and morphine glucuronides in cancer patients receiving epidural morphine. Pain. 1993 Feb;52(2): 179-85.
- 5 ) Patrick GA, Dewey WL, Huger FP, Daves ED, Harris LS.: Disposition of morphine in chronically infused rats: relationship to antinociception and tolerance. J Pharmacol Exp Ther. 1978 Jun;205(3):556-62.
- 6 ) Aquilante CL, Letrent SP, Pollack GM, Brouwer KL.: Increased brain P-glycoprotein in morphine tolerant rats. Life Sci. 2000;66(4): PL47-51.

# 末梢性神経因性疼痛における薬物の効果

## - 薬理的疼痛機序判別試験の結果から

林田真和\*, 有田英子, 関山裕詩, 斎藤雄一郎, 碓井久子

目野亜希, 澤村成史, 折居亮, 矢島直, 花岡一雄

東京大学医学部附属病院麻酔科・痛みセンター

\*現・東京大学医科学研究所附属病院手術部

### Drug challenge tests in neuropathic pain

Masakazu Hayashida, Hideko Arita, Hiroshi Sekiyama, Yuichiro Saito, Hisako Usui

Aki Meno, Shigehito Sawamura, Ryo Orii, Choku Yajima, Kazuo Hanaoka

Department of Anesthesiology and Pain Relief Center, The University of Tokyo Hospital

\*Surgical Center Research Hospital, Institute of Medical Science, The University of Tokyo

Summary: Neuropathic pain is frequently refractory to a variety of therapies. We performed drug challenge tests (DCT) with various drugs including morphine, ketamine, lidocaine, thiopental, phentolamine, and ATP in 37 patients with peripheral neuropathic pain to differentiate mechanisms underlying the neuralgia and hopefully, to identify potentially effective therapeutics. Pain scale was significantly decreased with 5 drugs other than phentolamine. The reduction in pain scale appeared to be greater with ketamine, ATP and morphine than with other 3 drugs, and responders to ketamine were greater in number than those to other drugs. These results indicate that in patients with peripheral neuropathic pain ketamine can be the first drug of choice, and that ATP and morphine may be also effective albeit in a more limited number of patients.

## 緒言

ペインクリニックで扱う慢性疼痛の多くは神経因性疼痛であるが、これらの中には通常の薬物や神経ブロックによる治療に抵抗性を示すものが少なくない。このような難治性疼痛の発生機序を判別し、適切な治療法を見出すために薬理的な疼痛機序判別試験 (Drug challenge test : DCT) が施行されている<sup>1)2)</sup>。今回は、種々の末梢性神経損傷に続発して発生した神経因性疼痛の患者において6種類の薬物によるDrug challenge test (DCT) を施行し、各薬物の鎮痛効果を検討した。

## 対象と方法

1997年から2001年までの最近5年間に、帯状疱疹、手術や外傷などによる末梢性神経損傷に続発して発生した神経因性疼痛に対して少なくとも1種類の薬物によるDCTを施行された37症例(年齢24-86歳、平均54.9±19.1歳、男性19症例)を対象とした。神経因性疼痛の内訳は、帯状疱疹後神経痛(n=14)、腕神経叢引き抜き損傷後の慢性痛(n=5)、四肢の手術/外傷後の慢性痛/カウザルギア(n=10)、頭部や胸部の手術後の慢性痛(n=4)、および膠原病に伴ういずれかの四肢のカウザルギア(n=4)であった。同じ慢性痛でも椎間板ヘルニアや

脊柱管狭窄症などに伴う、あるいはその術後の慢性腰下肢痛は、脊柱管内に神経の炎症性癒着など痛みの原因となる何らかの形態学的/病理学的変化の認められることが多いため、今回の検討対象に含めなかった。

複数の薬物によるDCTを受ける場合、少なくとも一日以上の間隔を空けて別の日に各薬物のテストを行った。各テスト薬の投与プロトコルを表1に示す<sup>2)</sup>。概ね偽薬(生理的食塩水: NS)を5分間隔で2回投与した後、実薬を何回かにわたって5分間隔で分割投与した。その間、Visual analogue scale (VAS: 0mm=無痛, 100mm=想像できる最強の痛み)による疼痛スコアを、最初のNS投与前(PreNS)、偽薬または実薬各回投与1分後と5分後、さらに最終実薬投与後30分後と1時間後、および鎮痛作用の持続が見られた場合は、その後も適宜測定した。

最後の偽薬投与の5分後、すなわち最初の実薬投与直前のVAS( PostNS VAS )を Control とし、実薬投与後のVAS 最低値を実薬投与後VAS (PostD VAS) として、これのControl に対する割合(%Control)を算出した。

各薬物の有効性は、PostD VAS が Control に比べ有意に減少したかどうかで判定するとともに、個々の症例においては実薬投与後にVAS が半分以下に減少した症例 (%Control≤50%) を有効と判定し、さらに有効例の中でもVAS が20%以下にまで減少した症例 (%Control≤20%) を著効と判定した。

データは Mean±SD で表示した。全体におけるVAS の変化は、繰り返し測定におけるANOVA および要すれば Bonferroni-Dunn 検定を追加して検討し、有効例あるいは著効例の数はカイ二乗検定で比較検討した。P<0.05 を統計学的有意と判定した。

表1 薬理的疼痛機序判別試験(DCT)の薬物投与プロトコル  
ATP 以外の各ステップは5分間隔で施行。NS=生理的食塩水。

テスト薬	薬物投与プロトコル
Morphine (M)	(1)NS (2)NS (3) M:3mg (4) M:3mg (5)M:3mg (6)M:3mg (7)M:3mg
Ketamine (K)	(1)NS (2)NS (3) K:5mg (4)K:5mg (5)K:5mg
Lidocaine (L)	(1)NS (2)NS (3) L:1mg/kg (4)L:1mg/kg/30min 持続静注
Thiopental (T)	(1)NS (2)NS (3) T:50mg (4)T:50mg (5)T:50mg
Phentolamine (P)	(1)NS (2)NS (3) P:5mg (4)P:5mg (5)P:5mg
ATP	(1)NS を1時間持続点滴 (2) ATP を 50-100μg/kg/min の投与速度で3時間

## 結果

37 症例のうち 28、33、26、25、22、7 症例がそれぞれモルヒネ、ケタミン、リドカイン、チオペンタール、フェントラミン、および ATP の DCT を受けていた。各 DCT を施行した際の VAS の変化を表2に示す。偽薬の生食投与後には、モルヒネテストを受けた 28 症例中 1 症例、およびフェントラミンテストを受けた 22 症例中 2 例のみにおいて 50%以

上(80%未満)の VAS 低下を認めたが、全体の VAS 平均値はいずれの DCT においても偽薬投与によっては変化しなかった。Control の VAS 値に比べて、フェントラミンの投与後には有意な VAS 変化は生じなかったが、モルヒネ、ケタミン、リドカイン、チオペンタール、および ATP 投与後には VAS が有意に減少した。ケタミンは、フェントラミン、リドカイン

ンやチオペンタールなど他の薬物よりもVASを大きく減少させ、有効例および著効例の数が多かった。すなわちケタミンは約 2/3 の症例において有効で、約 1/3 の症例においてほとんど痛みが消失するほどの著効を示

した。ケタミンに次いでモルヒネと ATP のVAS減少が大きい傾向が見られ、モルヒネとATPはそれぞれ約 1/3 および約半数の症例で有効と判定された。その他の薬物ではVAS減少も小さく、有効症例数も少なかった。

表 2 偽薬および実薬による Visual analogue scale (VAS)の変化

PreNS VAS =VAS before normal saline (NS) injections. PostNS VAS=VAS after the last NS injection and immediately before test drug injections. PostD VAS=the minimal VAS after test drug injections. %Control=PostD VAS/PostNS VAS\*100. 有効例数=Number of patients in whom VAS decreased by 50% or more (%Control≤50%). 著効例数= Number of patients in whom VAS decreased by 80% or more (%Control≤20%). \*p<0.05 vs. Control (Post NS) VAS or 100±0%, #p<0.05 vs. Placebo NS, and <sup>L, T, P</sup>p<0.05 vs. lidocaine, thiopental and phentolamine, respectively.

薬物	PreNS VAS	PostNS VAS (Control)	PostD VAS	%Control (PostD/PostNS)	有効例数	著効例数
Morphine (n=28)	60.1±20.3	56.2±19.7	33.1±22.4*	58.1±32.0*	10/28 <sup>#P</sup>	4/28 <sup>#</sup>
Ketamine (n=33)	64.4±16.9	61.5±16.8	31.8±23.3*	50.8±37.4* <sup>LP</sup>	20/33 <sup>#LTP</sup>	10/33 <sup>#TP</sup>
Lidocaine (n=26)	57.6±19.8	55.1±19.4	44.0±23.9*	90.3±74.7	5/26 <sup>#</sup>	3/26
Thiopental (n=25)	63.9±20.0	61.6±19.5	43.5±26.2*	70.6±35.0*	8/25 <sup>#</sup>	2/25
Phentolamine (n=22)	61.1±23.1	55.2±21.8	50.0±24.7	91.1±31.1	2/22	1/21
ATP (n=7)	63.3±12.5	63.3±12.5	37.4±27.6*	54.2±34.0*	4/7 <sup>#</sup>	1/6

## 考察

今回の結果から、末梢性の神経因性疼痛においては、ケタミンが最も有効性が高いことが示された。神経因性疼痛の成立には、脊髄レベルでの中枢性感作の成立が関与しており、これにはNMDA受容体刺激が大きく寄与している<sup>3)</sup>。このため神経因性疼痛においてNMDA受容体アンタゴニストのケタミンが奏功する可能性は高いと考えられる<sup>3)</sup>。テストでケタミンの有効性が示唆された症例のうち疼痛強度の症例にはケタミン静脈内投与による治療を行うこともあるが、これは外来では行いにくい。当施設では院内製剤であるケタミン舌下錠、あるいは内服のケタミンカプセルを処方している<sup>4)</sup>。ケタミン治療の難点としては、不快感などの精神症状が強く投与に耐えない症例が少なからずいること、

および初期には著効を奏しても、繰り返し投与するうちに効果が減弱し、次第に必要量が増加する症例が見られることである。

ケタミンに次いで、モルヒネも症例によっては神経因性疼痛に奏功することが示された。神経因性疼痛の成因は複数のメカニズムが関与しており、特に帯状疱疹後神経痛においては中枢性感作のみならずirritable nociceptorの存在も疼痛の発生に関与するとされる<sup>5)</sup>。このような例ではnociceptorからの侵害刺激の伝達を遮断する、モルヒネなどのオピオイド受容体アゴニストが奏功する可能性がある。動物実験の結果からは神経因性疼痛にオピオイドが効きにくいとされているが、臨床上の神経因性疼痛にはオピオイドが有効な場合も多い<sup>6)</sup>。そのような症例に対しては、ブプレノルフィン舌下錠/坐薬、モルヒネ錠/坐薬、ペンタゾシン錠などによる治療を

行っている<sup>6)</sup>。辛い疼痛の強い症例では、嘔気嘔吐や呼吸抑制などのオピオイドの副作用が出現しにくい印象がある。モルヒネなど $\mu$ -オピオイド受容体アゴニストでは耐性を生じる可能性があるが、最近フェンタニルパッチなど他の $\mu$ -アゴニストも利用できるようになり、オピオイドローテーションがより行いやすくなった。

今回の結果からはATPが神経因性疼痛に有用である可能性も示唆された。アデノシンが、脊髄のA1受容体を介する神経調節作用を通して鎮痛効果を発揮し、臨床的な神経因性疼痛にも奏功しうるとの報告はいくつか見られる<sup>7)8)</sup>。しかし、本邦ではアデノシンの製剤は市販されていないため、代わりに市販されているATPの製剤を利用している。ATPはどちらかといえば発痛物質として作用するとされるが、静脈内投与された場合、血中で急激に分解されアデノシンとして鎮痛効果を発揮すると考えられる<sup>9)</sup>。ATPは、アデノシンと同様<sup>7)8)</sup>、副作用も少なく症例によっては1回の治療で数ヶ月以上持続する長時間の鎮痛効果を発揮することもあるので、神経因性疼痛患者において一度は試みるべき治療法と考えられる<sup>9)</sup>。

リドカイン、チオペンタール、フェントラミンは有効性が低いものの、テスト時の副作用も少なく、時に著効を示す症例も見られるので時間が許せば施行したほうがよいであろう。

## 結語

末梢性の神経因性疼痛においては、他の薬物に比べケタミン、モルヒネ、ATPが、特にケタミンが奏功する可能性が高いことが示された。

## 引用文献

1) 小川節郎．薬理的疼痛機序判別試験(ドラッグ・チャレンジ・テスト, DCT)の意義と

臨床応用． The 23rd JNRC Proceedings, 155-8, 2002

- 2) 有田英子, 林田真和, 花岡一雄．痛みの治療 - 薬物療法．Pharma Medica 21:41-7, 2003
- 3) Dickenson AH, Chapman V, Green M. The pharmacology of excitatory and inhibitory amino acid-mediated events in the transmission and modulation of pain in the spinal cord. Gen Pharmac 28: 633-8, 1997
- 4) Arita H, Hayashida M, Hanaoka K, et al. The use of ketamine capsules and sublingual ketamine in the treatment of intractable chronic pain, Recent Views on Clinical Pain, Edited by Varrassi G, Monduzzi Editore, Bologna, 2002, 323-326
- 5) Pappagallo M, Oaklander AL, Quatrano-Piacentini AL, et al. Heterogenous patterns of sensory dysfunction in postherpetic neuralgia suggest multiple pathophysiologic mechanisms. Anesthesiology 92: 691-8, 2000
- 6) 有田英子, 林田真和, 矢島直, ほか．各種慢性疼痛に対するモルヒネの効果 - DCTの結果から．The 23rd JNRC Proceedings, 148-54, 2002
- 7) Sjolund KF, Belfrage M, Karlsten R, et al. Systemic adenosine infusion reduces the area of tactile allodynia in neuropathic pain following peripheral nerve injury: a multi-centre, placebo-controlled study. Eur J Pain. 5: 199-207, 2001
- 8) Lynch ME, Clark AJ, Sawynok J. Intravenous adenosine alleviates neuropathic pain: a double blind placebo controlled crossover trial using an enriched enrolment design. Pain 103: 111-7, 2003
- 9) 林田真和, 花岡一雄, 福永篤翁．ATP とアデノシン．ペインクリニック 23: 1715-8, 2002



# 脊髄侵害伝達機構におけるビッグダイノルフィンの二相性効果

丹野孝一、江刺晶央、中川西 修、新島富紀枝、只野 武  
東北薬科大学薬理学教室

## Dual actions of big dynorphin on nociceptive transmission in the mouse spinal cord

Koichi Tan-No, Akihisa Esashi, Osamu Nakagawasai, Fukie Niijima, Takeshi Tadano  
Department of Pharmacology, Tohoku Pharmaceutical University, Sendai Japan

Summary: The effect of big dynorphin (BD), a prodynorphin-derived peptide consisting of dynorphin A and dynorphin B, on nociceptive transmission in the mouse spinal cord was examined. BD at an extremely low dose (3 fmol) produced nociceptive behaviour which might be mediated through the activation of the NMDA receptor ion-channel complex by acting on the polyamine modulation site. Inversely, BD at higher doses (30-300 pmol) produced a dose-dependent antinociceptive effect which might be through a close connection between  $\kappa$ -opioid receptors and polyamine modulation site. The data on dual actions of BD will be presented in detail.

## 緒言

ダイノルフィン A (Dyn A) やダイノルフィン B (Dyn B) に代表されるダイノルフィン類をマウスの脊髄クモ膜下腔内 (i.t.)<sup>1)</sup>あるいは脳室内<sup>2)</sup>へ投与した際、抗侵害作用を示すことは周知の事実である。一方、ダイノルフィン類の抗侵害作用とは対照的に、痛覚過敏やアロディニアなどの痛覚異常<sup>3)</sup>および神経因性疼痛の維持<sup>4)</sup>に脊髄ダイノルフィン系が促進的に関与していることが明らかにされている。しかしながら、いかなる機序でダイノルフィン系が脊髄侵害伝達機構において促進的に関与しているのかは十分には解明されていない。本研究では、この点を明らかにする

目的でプロダイノルフィン由来ペプチドのDyn A、Dyn B およびDyn AとDyn BとがLys-Argで連結されたビッグダイノルフィン (BD) をマウスのi.t. へ投与し行動薬理的に検討を行った。また、Dyn AやDyn Bとは異なり、BDの抗侵害作用についての検討はなされていない。そこで、BD i.t. 投与時の抗侵害作用についてマウス・カプサイシン法<sup>5)</sup>を用い検討した。

## 実験方法

体重 22-24 gのddY系雄性マウスを使用した。各ペプチドはリンゲル液に溶解し、5  $\mu$ L/mouseの割合で腰椎の5番と6番の間に無麻酔下で直接投与した。侵害行動の測定項目は両後肢による下腹部

への scratching、後肢や尾部への biting および licking 行動で、これらの行動の持続時間を i.t. 投与直後からダイノルフィン類に関しては 15 分間、ポリ L-リジンに関しては 50 分間測定した。また、抗侵害作用は i.t. 投与 5 分後にカプサイシン法<sup>5)</sup>により検討を行った。すなわち、カプサイシン (1.6  $\mu\text{g}/20\mu\text{L}$ ) を右後肢足蹠内へ投与した際に誘発される licking 行動の持続時間をカプサイシン投与直後から 5 分間測定した。

## 結果

### 1. ダイノルフィン類<sup>6)</sup>およびポリ L-リジンの侵害行動

BD (3 fmol)、Dyn A (300 fmol) およびポリ L-リジン (12 および 36 pg) は対照のリングル液投与群と比較し有意な侵害行動を誘発した。しかしながら、Dyn B は 1000 pmol の用量においても有意な侵害行動を誘発しなかった。BD (3 fmol) およびポリ L-リジン (12 pg) によって誘発される侵害行動は NMDA 受容体イオンチャネル複合体のポリアミン調節部位の拮抗薬であるイフェンプロジル、NMDA イオンチャネル遮断薬である MK-801 および NMDA 受容体の競合的拮抗薬である D-APV の i.t. 同時投与によっていずれも有意に抑制された。一方、NMDA 受容体イオンチャネル複合体グリシン調節部位の拮抗薬である 7-クロロキヌレニン酸および非 NMDA 受容体拮抗薬である CNQX は BD およびポリ L-リジン誘発性侵害行動に対して無影響であった。

### 2. BD および Dyn A の抗侵害作用

BD (30-300 pmol) および Dyn A (0.5-2 nmol) はいずれも用量-依存的な抗侵害作用を示した。

Dyn A (2 nmol) の抗侵害作用は選択的 $\kappa$ 受容体拮抗薬である ノルビナルトルフィミン (nor-BNI) (10 mg/kg, s.c.) の 24 時間前処理によってほぼ完全に抑制された。一方、BD (300 pmol) の抗侵害作用は nor-BNI およびイフェンプロジルのいずれによっても抑制されなかったが、これら二種の拮抗薬の併用によって有意に抑制された。

## 考察

本研究で BD および Dyn A は、それぞれ 3 fmol および 300 fmol の極めて低用量において有意かつ顕著な侵害行動を発現することを見出した。しかしながら、同じプロダイノルフィン由来ペプチドの Dyn B は 1000 pmol の用量においても侵害行動を発現しなかった。最近、我々は HeLa 細胞に各種プロダイノルフィン由来ペプチドをトランスフェクションし、細胞毒性に及ぼす影響について検討を行った結果、BD および Dyn A のみが細胞毒性を示し、その効力は BD の方が強力であること、また BD の細胞毒性はアポトーシスの誘導に起因することを明らかにしている<sup>7)</sup>。脊髄ダイノルフィン系が神経因性疼痛の維持に促進的に関与している<sup>4)</sup>ことを考えると、HeLa 細胞は神経細胞ではないが、BD の細胞毒性が侵害行動の発現の場合と同様に Dyn A よりも強力であることから、神経因性疼痛において BD は Dyn A よりも重要な役割を担っている可能性が示唆される。

BD 誘発性侵害行動はイフェンプロジル、MK-801 および D-APV によって有意に抑制された。一方、<sup>3</sup>H-イフェンプロジルとラット大脳皮質膜標本との結合はスペルミン、スペルミジンやポリ L-リジンなどのカチオニック化合物によって阻害される<sup>8)</sup>。BD および Dyn A は構造中にそれ

それ 10 個および 5 個の塩基性アミノ酸を含むカチオニックペプチドである。また、我々は極めて低用量のスペルミン (0.1 fmol-10 pmol) の i.t. 投与がイフェンプロジル拮抗性の侵害行動を発現することを明らかにしている<sup>9)</sup>。本研究において、典型的なカチオニックペプチドであるポリ-L-リジンもイフェンプロジル拮抗性の侵害行動を発現した。これらの結果から、BD は侵害行動を発現した他のスペルミンやポリ-L-リジンと同様にカチオニック化合物であることから、BD はこのペプチドが有している陽性電荷のため NMDA 受容体イオンチャネル複合体上のポリアミン調節部位に作用し、その結果この複合体の機能が亢進して侵害行動を発現することが示唆された。また、BD 誘発性侵害行動の発現にはグリシン調節部位および非 NMDA 受容体機構の関与はないことが判明した。

種々の実験系でポリアミンはポリアミン調節部位を介して低用量で促進的に、高用量では抑制的に NMDA 応答を二相性に調節している。脊髄侵害伝達機構においても、侵害行動を発現するよりも高用量のスペルミン (2.5-10 nmol) が抗侵害作用を示し、この作用はイフェンプロジルによって抑制されることを見出している<sup>10)</sup>。このことから、高用量の BD もイフェンプロジル拮抗性の抗侵害作用を示す可能性が推測されたが、BD の抗侵害作用はイフェンプロジルによって全く抑制されなかった。それどころか、BD の抗侵害作用は Dyn A のそれとは異なり nor-BNI によっても抑制されなかった。しかしながら、イフェンプロジルと nor-BNI の二種の併用によって BD の抗侵害作用は有意に抑制された。これらの結果から、BD の抗侵害作用は  $\kappa$  受容体およびポリアミン調節部位

が密接に関連して発現されることが示唆された。

## 引用文献

1. Tan-No K. et al., *Eur. J. Pharmacol.*, **314**, 61-67 (1996)
2. Tan-No K. et al., *Brain Res.*, **891**, 274-280 (2001)
3. Vanderah T.W. et al., *J. Neurosci.*, **20**, 7074-7079 (2000)
4. Wang Z. et al., *J. Neurosci.*, **21**, 1779-1786 (2001)
5. Sakurada T. et al., *Neuropharmacology*, **31**, 1279-1285 (1992)
6. Tan-No K. et al., *Brain Res.*, **952**, 7-14 (2002)
7. Tan-No K. et al., *Exp. Cell Res.*, **269**, 54-63 (2001)
8. Hashimoto K. et al., *Eur. J. Pharmacol.*, **266**, 67-77 (1994)
9. Tan-No K. et al., *Pain*, **86**, 55-61 (2000)
10. Tan-No K. et al., *Biogenic Amines* "in press"

# モルヒネの耐性および身体的依存形成に及ぼす ホルマリン疼痛負荷の影響 —マウス血清コルチコステロンを指標とした検討—

清水典史、岸岡史郎  
和歌山県立医科大学薬理学教室

Effects of formalin-induced pain on the development of tolerance to and physical dependence on morphine in mice – Studies by serum corticosterone –

Norifumi Shimizu, Shiroh Kishioka  
Department of Pharmacology, Wakayama Medical University, Wakayama Japan

Summary: The present study was designed to investigate the effect of formalin-induced pain on the development of tolerance to and physical dependence on morphine in mice. A single injection of morphine elicited serum corticosterone (CS) increase, dose-dependently. The morphine-induced increase in serum CS was attenuated after chronic morphine treatment, indicating that tolerance was developed. Intraplantar injection of formalin diminished the attenuation of morphine-induced serum CS increase due to chronic morphine treatment. Serum CS was increased by naloxone-precipitated morphine withdrawal. The increase in serum CS was dependent on both injection period and dose of morphine, and on dose of naloxone, indicating that the naloxone-induced serum CS increase may be a useful index of the intensity of morphine withdrawal in mice. Intraplantar injection of formalin inhibited the naloxone-induced increase in serum CS level. These results suggest that formalin-induced pain suppresses the development of tolerance to and physical dependence on morphine.

## 緒言

モルヒネの投与により血漿コルチコステロン (CS) 値が上昇し、この作用に耐性が形成される<sup>1)</sup>。また、モルヒネ禁断により血漿CS値が上昇し、その上昇度がモルヒネ禁断の強さ、すなわち、身体的依存形成の強さに相関することが報告されている<sup>2)</sup>。一方、モルヒネの鎮痛作用に対する耐性形成および精神的依存形成 (報酬効果) は疼痛存在下で抑制されることが明らかにされている<sup>3, 4)</sup>。しかし、それ以外の作用に対する耐性および

身体的依存形成に及ぼす疼痛の影響は不明である。そこで本研究では、モルヒネの血清CS上昇に対する耐性形成および血清CS上昇を指標としたナロキソン誘発禁断に及ぼすホルマリン疼痛負荷の影響をマウスを用いて検討した。

## 実験方法

### 実験動物

実験には ICR 系雄性マウス (25-35 g) を使用した。

## 耐性形成

モルヒネを1日1回または2回5-6日間反復皮下投与した。反復投与最終日の翌日にモルヒネ10mg/kgを皮下投与し、その60分後の血清CS値を測定した。

## 身体的依存性形成

モルヒネを1日2回4-6日間反復皮下投与した。反復投与最終日の翌日にナロキソン(5mg/kg)を皮下投与し、その30分後の血清CS値を測定した。体重減少は、ナロキソン投与1時間前から1時間後までの体重の変化率として求めた。

## 疼痛負荷

2%ホルマリン溶液20 $\mu$ lを足蹠皮下に処置し、疼痛を負荷した。対照群には生理食塩液20 $\mu$ lを処置した。

## 血清CS値の測定

ZenkerとBernsteinの方法<sup>5)</sup>に従い蛍光法に従って定量した。

# 結果

## ホルマリン足蹠皮下処置

ホルマリンの足蹠皮下処置により血清CS値は上昇したが、120分後には無処置群と同程度まで回復した。従って、本実験系において、血清CSの影響を除外するため、モルヒネの投与はホルマリン処置の120分後とした。ホルマリン処置による浮腫は処置後4日目においても認められた。

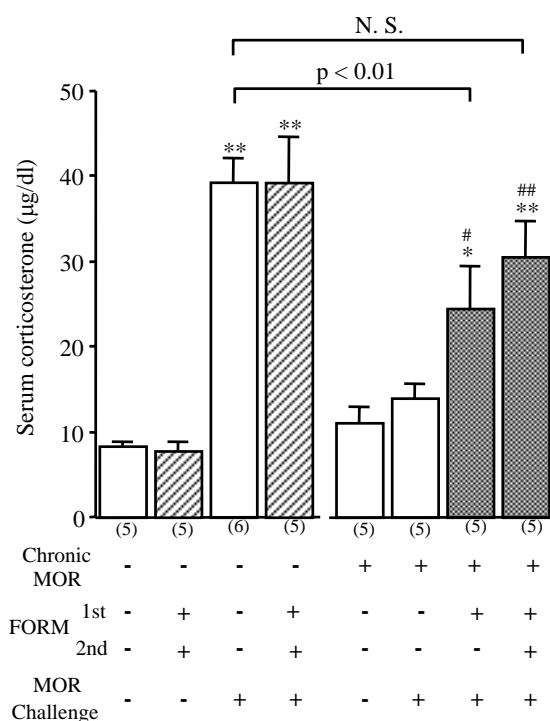
## モルヒネの血清CS値上昇に対する耐性形成に及ぼすホルマリン疼痛負荷の影響

モルヒネの単回投与(2.5-40mg/kg)により血清CS値は上昇し、その上昇度はモルヒネの投与量に依存した。モルヒネ(10mg/kg)を1日2回5日間反復投与すると、モルヒネによる血清CS値の上昇は有意に抑制され、耐性形成が認め

られた。また、モルヒネの反復投与量が多い程、強い耐性が形成された。

モルヒネ反復投与(10mg/kg、1日2回、6日間)の1日目にホルマリンを1回処置することにより、モルヒネの血清CS値上昇に対する耐性形成は抑制された。また、ホルマリンをモルヒネ反復投与(10mg/kg、1日2回、6日間)の1日目と4日目の2回処置した群では、1日目に1回のみ処置した群に比し、耐性形成は強く抑制された(Fig. 1)。

Fig. 1. Effect of intraplantar injection of formalin on the development of tolerance to



morphine-induced increase in serum corticosterone level in mice. Morphine (10mg/kg) was injected twice a day for 6 days. Formalin was treated on day 1 (1st), or day 1 (1st) and day 4 (2nd). On day 7, blood was collected 60 min after morphine (10mg/kg) challenge. Each column represents the mean and vertical bar indicates the S.E.M. of 5-6 mice. Vs. chronic saline + intraplantar saline + saline challenge, \*P<0.05, \*\*P<0.01. Vs. chronic morphine + intraplantar saline + saline challenge, #P<0.05, ##P<0.01. MOR: morphine. FORM: formalin.

## モルヒネ身体的依存形成に及ぼすホルマリン疼痛負荷の影響

モルヒネ反復投与後、ナロキソン投与により血清CS値は有意に上昇し、その上昇度は反復投与するモルヒネの投与量(10-40 mg/kg、1日2回、4日間)、投与期間(40 mg/kg、1日2回、3-7日間)およびナロキシソンの投与量(0.01-10 mg/kg)に依存していた。

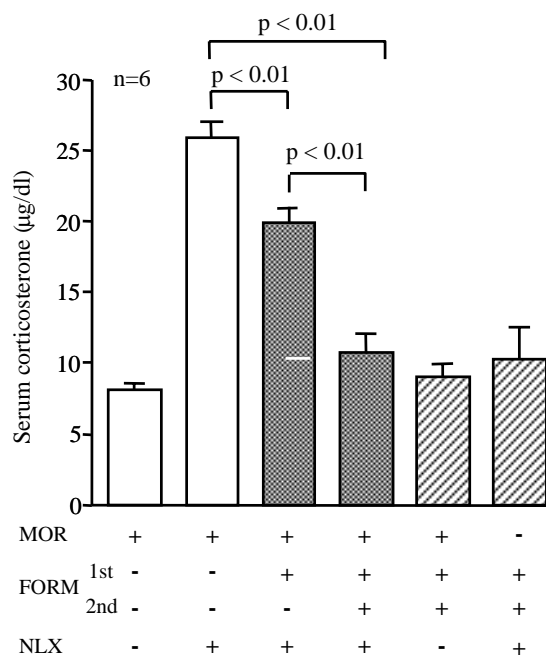


Fig. 2. Effect of intraplantar injection of formalin on naloxone-induced increase in serum CS level in mice. Morphine (10 mg/kg) was injected twice a day for 6 days. Formalin was treated on day 1 (1st), or day 1 (1st) and day 4 (2nd). On day 7, naloxone (5 mg/kg) was injected, and blood was collected 30 min after naloxone. Each column represents the mean and vertical bar indicates the S.E.M. of 6 mice. MOR: chronic morphine. FORM: formalin. NLX: naloxone.

モルヒネ反復投与(50、100および200 mg/kg、1日2回、それぞれ2日間)の1日目にホルマリンを1回処置することにより、ナロキソン誘発体重減少および血清CS上昇は有意に抑制された。ホルマリンをモルヒネ反復投与(10 mg/kg、1日2回、6日間)の1日目と4日目の2回処置した

群では、1日目のみ処置した群に比し、ナロキソン誘発血清CS上昇は強く抑制された(Fig. 2)。

## 考察

ホルマリン(2.5%、50µl)を足蹠皮下に処置すると、9日間持続する痛覚閾値の低下が報告されている<sup>4)</sup>。本研究において、ホルマリン(2%、20µl)処置により浮腫は少なくとも4日間持続した。一方、ホルマリン処置により血清CS値は上昇したが、ホルマリン処置120分後には消失し、痛覚閾値の低下および浮腫の持続時間と比較すると、血清CS値の上昇は極めて短時間に消失した。

ホルマリンの足蹠内処置はモルヒネの血清CS上昇に対する耐性形成を有意に抑制し、この抑制はホルマリンの1回処置(1日目)よりも2回処置(1日目および4日目)の方が強力であったことから、ホルマリン疼痛負荷はモルヒネの血清CS上昇作用に対する耐性形成を抑制すると考えられた。一方、血清CS自身がモルヒネの鎮痛作用に対する耐性形成を抑制することが報告されている<sup>6)</sup>。本研究では、モルヒネの反復投与開始時には、すでにホルマリン処置による血清CS上昇が消失していたことから、ホルマリン疼痛負荷によるモルヒネの耐性形成の抑制には、血清CS以外の機序が関与していると考えられる。

ラットでは、モルヒネ禁断時の血漿CS上昇度はモルヒネの身体的依存強度の定量的指標となる可能性が報告されている<sup>2)</sup>。今回、マウスにおいてもナロキソン誘発禁断時の血清CS上昇度は、モルヒネの投与期間および投与量、ならびにナロキシソンの投与量に依存していた。従って、マウスにおいても血清CS上昇はモルヒネ身体依存の強さの定量的指標となると考えられる。

モルヒネ反復投与開始1日目のホルマリンの足蹠内1回処置は、ナロキソン誘発禁断により惹起される血清CS上昇および体重減少を有意に抑制した。さらに、この血清CS上昇はホルマリン1回処置(1日目)よりも2回処置(1日目および4日目)の方が強く抑制した。従って、本実験モデルにおいても、疼痛負荷がモルヒネの身体的

依存形成を抑制すると考えられた。

以上の結果は、疼痛を有する患者にモルヒネを投与しても、耐性および身体的依存が形成されないとする臨床報告に一致する。

本研究は、財団法人和歌山県医学振興会の研究助成（第共 11-15）を得て行われた。

## 引用文献

- 1) George R. Way EL. Studies on the mechanism of pituitary-adrenal-activation by morphine. *Br J Pharmacol.* 10: 260-264, 1955
- 2) Kishioka S. Nishida S. Fukunaga Y. Yamamoto H. Quantitative properties of plasma corticosterone elevation induced by naloxone-precipitated withdrawal in morphine-dependent rats. *Jpn J Pharmacol.* 66: 257-263, 1994
- 3) Vaccarino AL. Marek P. Kest B. Ben-Eliyahu S. Couret Jr LC. Kao B. Liebeskind JC. Morphine fails to produce tolerance when administered in the presence of formalin pain in rats. *Brain Res.* 627: 287-290, 1993
- 4) Suzuki T. Kishimoto Y. Misawa M. Formalin- and carrageenan-induced inflammation attenuates place preferences produced by morphine, methamphetamine and cocaine. *Life Sci.* 59: 1667-1674, 1996
- 5) Zenker N. Bernstein DE. The estimation of small amount of corticosterone in rat plasma. *J Biol Chem.* 231: 695-701, 1958
- 6) Vaccarino AL. Nores WL. Soignier RD. Olson RD. The role of corticosterone in the blockade of tolerance to morphine analgesia by formalin-induced pain in rat. *Neurosci Lett.* 232: 139-142, 1997

# 抗悪性腫瘍薬 vincristine 誘発痛覚過敏発現に おける脊髄 NO-cGMP 経路の関与

齋藤 顕宜、田村 直也、亀井 淳三  
星薬科大学薬物治療学教室

## The possible involvement of spinal nitric oxide-cGMP pathway in vincristine-induced painful neuropathy in mice

A. Saitoh, N. Tamura, J. Kamei

Department of Pathophysiology and Therapeutics, School of Pharmacy  
and Pharmaceutical Sciences, Hoshi University

**Summary:** Several lines of evidence indicated that the vinca alkaloid vincristine, a widely used chemotherapeutic agent, produces painful peripheral neuropathy in humans. However, the mechanisms underlying the development of vincristine-induced painful neuropathy are poorly understood. Nitric oxide (NO)-guanosine 3',5'-cyclic mono phosphate (cGMP) pathway has been reported to be involved in spinal transmission of nociceptive information. Thus, in the present study, we examined whether alterations in spinal nociceptive processing via NO-cGMP pathway contribute to vincristine-induced painful neuropathy in mice. Vincristine (0.125 mg/kg) was intraperitoneally administered twice a week for six weeks. In vincristine-treated mice, a significant decrease in tail-flick latencies developed at four weeks after treatment. Subcutaneous pretreatment with L-arginine (30 - 300 mg/kg), a substrate of NO synthase, dose-dependently increase the tail-flick latencies in vincristine-treated mice to the level that observed in naïve mice. The increase in tail-flick latencies induced by s.c. pretreatment with L-arginine in vincristine-treated mice was reversed by i.t. pretreatment with N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 3 - 30 nmol), a non-specific NO synthase inhibitor. Furthermore, intrathecal pretreatment with 8-bromoguanosine 3', 5'-cyclic monophosphate (8-Br cGMP, 0.3 - 3.0 nmol), a cell-permeable cGMP analog, dose-dependently increase the tail-flick latencies in vincristine-treated mice, but not in naïve mice. These results suggest that the dysfunction of L-arginine/NO/cGMP cascade may trigger the vincristine-induced thermal hyperalgesia in mice.

## 緒 言

急性白血病や悪性リンパ腫などに対して、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。しかしながら、これらに対する治療法は確立さ

れておらず、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ている。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。

脊髄において nitric oxide (NO)-cyclic guanosine mono-



phosphate (cGMP) 経路は痛覚情報伝達に重要な役割を演じていることが報告されている<sup>(1-2)</sup>。マウス坐骨神経損傷モデルにおいて、痛覚過敏を誘発する用量よりも低用量の NO の供与体あるいは生体内の NO 合成酵素 (NOS) の基質である L-arginine の髄腔内投与などにより、侵害受容閾値の低下の改善が認められる<sup>(1)</sup>。

ラットに vincristine を反復投与することにより熱刺激あるいは機械刺激に対する感受性の亢進、すなわち痛覚過敏が認められることが報告されている<sup>(3)</sup>。しかしながら、vincristine 誘発痛覚過敏の発現における、脊髄 NO-cGMP 経路の役割についての詳細な検討はなされていない。そこで本研究では、マウスにおいて認められる vincristine 誘発痛覚過敏における脊髄 NO-cGMP 経路の関与について検討した。

## 実験方法

### 1. 使用動物

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

### 2. 侵害受容閾値の測定

侵害受容閾値の測定は tail-flick 法に従い測定した。L-arginine (30 - 300 mg/kg or 30 - 300 pmol) は侵害受容閾値測定の 60 分前、10 分前にそれぞれ

皮下投与あるいは髄腔内投与した。L-NAME (3 - 30 nmol) および 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3a]quinoxalin-1-one (ODQ, 30 - 300 pmol) は L-arginine の皮下投与 10 分前に髄腔内投与した。8-Br-cGMP (0.3 - 3.0 nmol) は、侵害受容閾値測定の 10 分前に髄腔内投与した。

### 3. マウス脊髄内 NO 代謝物および cGMP の定量

脊髄内一酸化窒素代謝物 ( $\text{NO}_2$  /  $\text{NO}_3$ ) は、氷冷下にてマウス脊髄を摘出後、6 倍量のメタノール中にてホモジナイズし、遠心分離 ( $10000\text{g} \times 10\text{min}$ ) 後、上清を酸化窒素分析システム (エイコム社製、ENO-20) にて測定した。また、脊髄内 cGMP 量は、氷冷下にてマウス脊髄を摘出後、2 倍量のトリクロロ酢酸中にてホモジナイズし、遠心分離 ( $700\text{g} \times 15\text{min}$ ) 後、上清をラジオイムノアッセイキット (Yamasa, YSI-7720) を用い測定した。

## 結果

### 1. マウス侵害受容閾値に及ぼす vincristine の反復投与による影響

Vincristine 処置群において、投与開始 4 週目に侵害受容閾値の有意な低下が認められた。なお、この熱刺激に対する痛覚過敏は、投与開始後 6 週目まで認められた (Fig. 1)。

### 2. Vincristine 誘発侵害受容閾値の低下に及ぼす L-arginine の影響

Vincristine 処置群における侵害受容閾値の低下は、NOS の基

質である L-arginine の皮下投与あるいは髄腔内投与により、対照群マウスと同程度にまで改善された。また、L-arginine の皮下投与による侵害受容閾値の上昇は、非選択的 NOS 阻害薬である L-NAME の髄腔内投与により有意に抑制された ( Fig. 2 )。また、グアニル酸シクラーゼ阻害薬である ODQ の髄腔内処置によっても同様に L-arginine の効果は抑制された。また、cGMP の誘導体である 8-bromo-cGMP の髄腔内投与により、vincristine 処置群における侵害受容閾値の低下は用量依存的かつ有意に改善された。一方、溶媒処置した対照群では、8-bromo-cGMP を処置しても何ら影響が認められなかった ( Fig. 3 )。

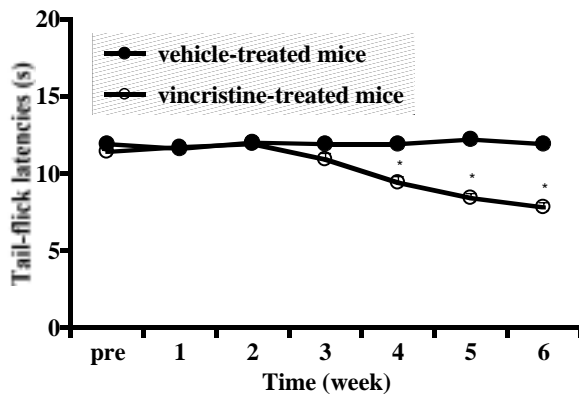


Fig. 1: Time course of the effect of vincristine on tail-flick latency in mice. Mice were i.p. treated with vincristine at a dose of 0.05 mg/kg a day after the measurement of pre-drug latency, and treated with a dose of 0.125 mg/kg twice a week until the final week of the six-weeks study period. The control group received an equal volume of saline. Each point represents the mean with S.E. for 10 mice in each group. \*P<0.05 compared with the vehicle-treated group.

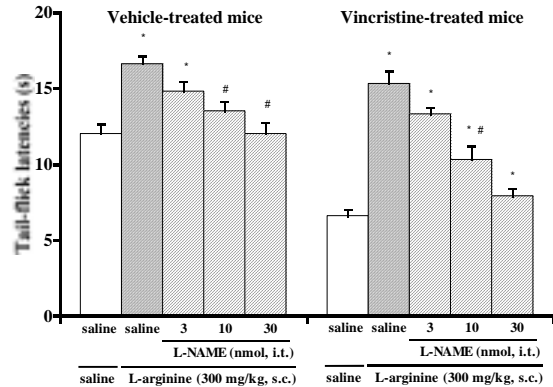


Fig. 2: Effects of L-NAME, a non-specific NO synthase inhibitor, on the effect of L-arginine on tail-flick latency in vincristine- or vehicle-treated mice. L-NAME was intrathecally administered 10 min before the s.c. injection of L-arginine. The experiments were conducted 6 weeks after vincristine or vehicle treatment. Each column represents the mean with S.E. for 10 - 11 mice in each group. \*P<0.05 compared with the respective saline-saline-treated group. #P<0.05 compared with the respective saline-L-arginine-treated group.

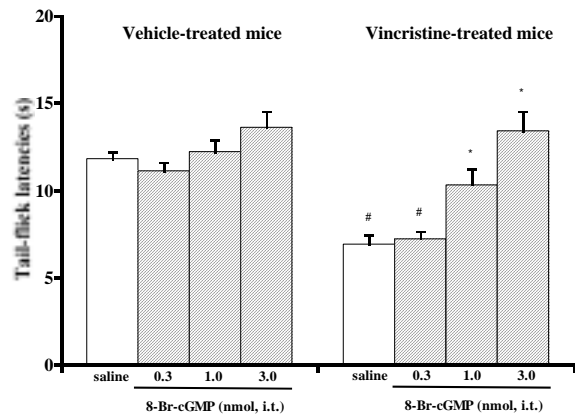


Fig. 3: Effects of 8-Br-cGMP, a cell permeable cGMP analog, on tail-flick latency in vincristine- or vehicle-treated mice. 8-Br-cGMP was intrathecally administered 10 min before testing. The experiments were conducted 6 weeks after vincristine or vehicle treatment. Each column represents the mean with S.E. for 10 mice in each group. \*P<0.05 compared with the respective saline-treated group. #P<0.05 compared with the respective vehicle-treated group.

### 3 .マウス脊髄内 NO 代謝物および cGMP に及ぼす vincristine 反復投与の影響

Vincristine 処置群の脊髄内 NO 代謝物について検討したところ、対照群マウスに比べ、脊髄組織中の NO の代謝物 ( $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$ ) の有意な減少が認められた (Fig. 4)。さらに、Vincristine 処置マウスの脊髄組織中の cGMP の濃度についても検討したところ、溶媒処置群に比べ vincristine 処置群において有意な減少が認められた (Fig. 4)。

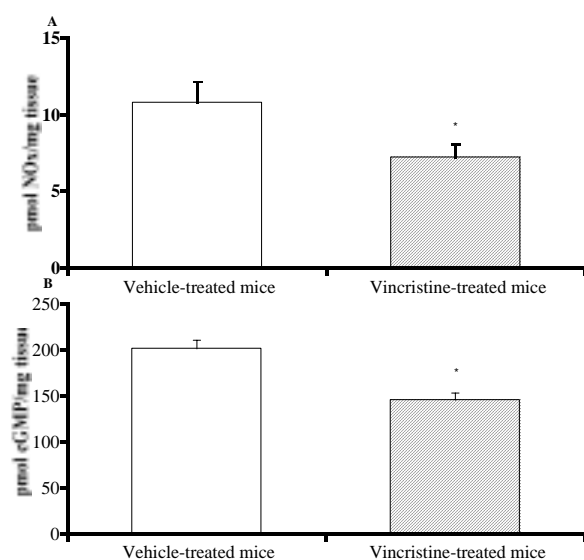


Fig. 4. The levels of NO metabolite production ( $\text{NO}_x$ :  $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$ ) (A) and cGMP (B) in the spinal cord in vincristine- or vehicle-treated mice. Each column represents the mean with S.E. for 14 mice (A) and 10 mice (B) in each group, respectively. The results were expressed as pmol  $\text{NO}_x$  and cGMP/mg tissue, respectively. \* $P < 0.05$  compared with the respective vehicle-treated group.

## 考 察

Vincristine の慢性処置により、侵害受容閾値の低下すなわち痛覚過敏が形成された。その侵害受容閾値の低下に対して、NOS の基質である L-arginine は改善効果を示した。Vincristine 処置群の侵害受容閾値の低下に対する L-arginine による改善効果は、NOS 阻害薬である L-NAME およ

びグアニル酸シクラーゼ阻害薬である ODQ の髄腔内への前処置により有意に抑制された。したがって、vincristine 誘発痛覚過敏に対する L-arginine の改善効果は、脊髄において増加した NO によって活性化を受けたグアニル酸シクラーゼが関与している可能性が示唆された。また、cGMP の誘導体である 8-Br-cGMP の髄腔内投与により、侵害受容閾値の低下は有意に改善された。さらに、脊髄組織中における NO 代謝物および cGMP の濃度が vincristine 処置群において有意に減少していたことから、脊髄 NO-cGMP 経路の機能低下が明らかとなった。

以上、本研究の結果より、vincristine により誘発される痛覚過敏の発現に対して、脊髄 NO-cGMP 経路の機能低下が関与していることが示唆された。

## 引用文献

- (1) Sousa AM. and Prado WA. (2001) The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. *Brain Res.*, 897, 9-19
- (2) Tegeder I. et al. (2002) Dual effects of spinally delivered 8-bromo-cyclic guanosine mono-phosphate (8-bromo-cGMP) in formalin-induced nociception in rats. *Neurosci. Lett.*, 332, 146-150
- (3) Aley K. et al. (1996) Vincristine hyperalgesia in the rat: a model of painful vincristine neuropathy in humans. *Neuroscience*, 73, 259-265

# マウスの帯状疱疹痛と一酸化窒素

佐々木淳、高崎一朗、植田陽子、安東嗣修、野島浩史、倉石泰  
富山医科薬科大・薬・薬品作用

## Acute herpetic pain and nitric oxide in mice

Atsushi Sasaki, Ichiro Takasaki, Yoko Ueda, Tsugunobu Andoh,  
Hiroshi Nojima, Yasushi Kuraishi

Department of Applied Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toyama Medical  
and Pharmaceutical University, Toyama Japan.

Summary: Percutaneous inoculation with herpes simplex virus type-1 (HSV-1) brought about herpes zoster-like skin lesions. These mice showed mechanical pain-related responses (tactile allodynia and mechanical hyperalgesia), but not thermal pain-related response (thermal hyperalgesia) although partial ligation of sciatic nerve showed mechanical and thermal pain-related responses in mice. The adrenergic neuron blocker guanethidine and the non-selective  $\alpha$ -adrenoceptor antagonist phentolamine did not affect the mechanical pain-related responses although these agents suppressed the mechanical pain-related responses induced by partial ligation of sciatic nerve. These results suggest the sympathetic nervous system may not be involved in the mechanical pain-related responses of HSV-1 inoculated mice and the mechanism of pain-related responses is different between HSV-1 inoculation and surgical injury of sensory neurons. NO production was increased in the spinal dorsal horn of HSV-1-inoculated mice. Intrathecal injections of the non-selective NO synthase (NOS) inhibitor NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) and the selective NOS2 inhibitor S-methylisothiourea (SMT) inhibited the NO production and mechanical pain-related responses. The selective NOS1 inhibitor 7-nitro indazole (7-NI) was without effect on mechanical pain-related responses. Immunoreactivity of NOS2, but not NOS1, was increased in the spinal dorsal horn. NOS2-immunoreactive cells were widely located in the spinal dorsal horn. These results suggest that the NOS2-NO pathway in the dorsal horn is involved in acute herpetic pain.

## 緒言

帯状疱疹は水痘・帯状疱疹ウイルスの回帰感染によって発症する有痛性の疾患である。その痛みは激しい自発痛とともにアロディニア(触刺激などの非侵害刺激により誘発される痛み)を特徴とする。帯状疱疹痛のモデル動物の作製は困難とされていたが、当研究室では単純ヘルペスウイルスI型(herpes simplex virus type-1, HSV-1)をマウス後肢へ経皮接種することにより、

ヒトの帯状疱疹に類似した皮膚病変を生じたマウスが機械的アロディニアと機械的痛覚過敏を生じることを見出し、帯状疱疹痛のモデルマウスの作製に成功した<sup>1)</sup>。帯状疱疹痛のメカニズムの詳細は明らかではないが、炎症性疼痛と神経因性疼痛の両者が複雑にからみあっている疼痛と考えられている。生体内において痛みに関与すると報告されている物質は多くあるが、炎症性疼痛と神経因性疼痛に共通して関与が示唆されている因子として一酸化窒素

素 (nitric oxide, NO) があげられる。そこで本実験では、このモデルマウスの疼痛関連反応の特徴をマウスの坐骨神経部分結紮モデルと比較するとともに、帯状疱疹痛モデルマウスの疼痛関連反応における脊髄内一酸化窒素の関与について検討した。

## 実験方法

### 実験動物

雌性 BALB/c マウス、C57BL/6J マウス( 実験開始時 6 週齢 ) を用いた。

### 神経因性疼痛モデル

神経因性疼痛モデルは Malmberg and Basbaumの方法に従い<sup>2)</sup>、坐骨神経の 1/2 - 1/3 をきつく結紮することにより作製した。反対側は坐骨神経を露出しただけで結紮は行わない sham 処置とした。

### 帯状疱疹痛モデル

除毛したマウスの右後肢膝関節下部の角質層を乱切し、その部位に HSV-1 (  $1 \times 10^6$  PFU ) を経皮接種した。

### 疼痛関連反応の測定

熱的刺激 ( paw radiant heat 法 )

後肢の熱的痛覚過敏は、tail-flick test 装置を用いた paw radiant heat 法により測定した。拘束下マウスの後肢足蹠に一定強度の輻射熱を照射し、後肢の逃避反応を指標として、その反応潜時を測定した。輻射熱の強度は、無処置下での平均潜時が約 10 秒となるように設定した。反応潜時は 3 回測定し、その平均値を疼痛反応潜時とした。

機械的刺激

後肢の触覚アロディニア、痛覚過敏の測定には 0.17g と 1.0g の強さの von Frey filament ( VFF ) を用いて行った。マウスを測定用ケージに入れた後、VFF を後肢足蹠

に垂直に曲がるまで適用し、その時のマウスの反応を以下のように 3 段階にスコア化した。スコア 0 : 反応なし、1 : 後肢の引き上げ行動、2 : 後肢のすばやい逃避反応、後肢の振り動作、および刺激部位への舐め行動。これを 6 回繰り返し、その平均値を疼痛関連スコアとした。

### 薬物

Guanethidine( 交感神経遮断薬 ) 30, 60 mg/kg の用量で腹腔内投与

Phentolamine( 非選択的  $\alpha$  アドレナリン受容体遮断薬 ) 3, 10, 30 mg/kg の用量で腹腔内投与

$N^G$ -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 非選択的 NOS 阻害薬) 11, 37 nmol を脊髄くも膜下腔内投与

S-methylisothiourrea (SMT, 選択的 iNOS 阻害薬) 11, 37 nmol を脊髄くも膜下腔内投与

7-nitroindazole (7-NI, 選択的 nNOS 阻害薬) 11, 37 nmol を脊髄くも膜下腔内投与  
なお、坐骨神経部分結紮モデルは結紮後 7 - 14 日目、帯状疱疹痛モデルはウイルス接種後 6 日目に薬物効果を検討した。

### 脊髄後角での NO 産生

エーテル麻酔下でマウスを断頭した後、脊髄腰膨大部を摘出し、HSV-1 接種側と非接種側に分けた後、脊髄組織はさらに前角と後角に分けた。後角における NO 産生量は、NO 代謝物  $NO_2^-$  産生量を Griess 法により測定することで検討した。HSV-1 接種前、接種後 4, 6, 8, 10 日における  $NO_2^-$  産生量を経日的に測定し、また接種後 6 日目において  $NO_2^-$  産生に対する NOS 阻害剤の効果を検討した。

### 脊髄後角での NOS1, NOS2 タンパク発現

エーテル麻酔下でマウスを断頭した後、脊

髄腰膨大部を摘出し、HSV-1 接種側と非接種側に分けた後、脊髄組織はさらに前角と後角に分けた。HSV-1 接種前、接種後 4, 6, 8, 10 日における脊髄後角での NOS1, NOS2 タンパク発現をウエスタンブロッティング法により経日的に検討した。また、免疫染色法を用いて、脊髄後角における NOS2 発現部位を観察した。

## 結果

### 1、帯状疱疹痛モデルマウスの疼痛関連反応の特徴

HSV-1 の経皮接種により、マウスの背部に帯状疱疹様の皮疹が出現した。これらのマウスは機械的刺激に対して疼痛関連反応（触覚アロディニア、機械的痛覚過敏）を示したが、熱的刺激に対しては疼痛関連反応（熱的痛覚過敏）を示さなかった。一方、坐骨神経部分結紮モデルでは機械的刺激および熱的刺激に対して疼痛関連反応が観察された。また、交感神経遮断薬 guanethidine、非選択的 $\alpha$ アドレナリン受容体遮断薬 phentolamine は、坐骨神経部分結紮モデルでみられる機械的刺激に対する疼痛関連反応を有意に抑制したが、帯状疱疹痛モデルの疼痛関連反応は抑制しなかった。

### 2、帯状疱疹痛への NO の関与

HSV-1 接種側の脊髄後角での  $\text{NO}_2^-$  産生量が、疼痛関連反応の発現に一致して増加がみられた。非選択的 NOS 阻害剤 L-NAME と選択的 NOS2 阻害剤 SMT は疼痛関連反応を抑制し、HSV-1 接種後 6 日目における  $\text{NO}_2^-$  産生も正常レベルまで抑制した。しかし、選択的 NOS1 阻害剤 7-NI は疼痛関連反応を抑制しなかった。脊髄後角における NOS1、NOS2 タンパク発現をウエスタンブロッティング法で検討したところ、NOS1 発現に変化がみられなかったのに対し、NOS2 は疼痛関連反応がみられる接種後 6, 8 日目

において顕著な発現誘導がみられた。また、免疫染色法を用いた結果、NOS2 免疫陽性細胞が脊髄後角の広範囲で観察された。

## 考察

本研究より、帯状疱疹痛モデルでは坐骨神経部分結紮モデルでみられるような熱的刺激に対する疼痛関連反応はみられないこと、また、坐骨神経部分結紮モデルの疼痛関連反応には交感神経が関与しているが、帯状疱疹痛モデルには関与していないという特徴があること、帯状疱疹痛に脊髄内 NOS2 - NO 系が関与していることが明らかとなった。

## 引用文献

1. Takasaki I, Andoh T, Shiraki K and Kuraishi Y: Allodynia and hyperalgesia induced by herpes simplex virus type-1 infection in mice. Pain 86, 95–101 (2000)
2. Malmberg AB and Basbaum AI: Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. Pain 76, 215–222 (1998)

# 脊髄内 P2 プリン受容体による痛みの調節

中川貴之、張 楠楠、岡田麻衣子、福井真人、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

## Pain modulation by spinal P2 purinoceptors

Takayuki Nakagawa, Nannan Zhang, Maiko Okada, Makoto Fukui, Masabumi Minami and  
Masamichi Satoh

Department of Molecular Pharmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,  
Kyoto University, Kyoto, Japan

Summary: Recent studies revealed that ATP plays a role in facilitating peripheral pain transmission via ionotropic P2X-purinoceptors, although little is known about the roles of spinal P2 purinoceptors. In the present study, we examined the roles of spinal P2X- and metabotropic P2Y-purinoceptors in pain transmission in rats. We found that i.t. administration of P2Y-purinoceptor agonists UTP and UDP produced rapid and short-lasting analgesic effects in normal and neuropathic pain model rats. On the other hand, i.t. administration of ATP and  $\alpha,\beta$ -methylene-ATP, a P2X-purinoceptor agonist, caused rapid and short-lasting hyperalgesic and long-lasting tactile allodynic effects. The ATP-induced allodynia gradually developed, remained even 7 days after the administration, and was inhibited by co-administration of P2X-purinoceptor antagonists and morphine. These results suggest that spinal P2X- and P2Y-purinoceptors play opposite roles in pain transmission, and the ATP-induced allodynia was likely to be due to P2X-purinoceptor-triggered neuronal plasticity.

## 緒言

Adenosine 5'-triphosphate (ATP) は、生体におけるエネルギー伝達体として数多くのエネルギー代謝に関与しているだけでなく、近年では細胞間における情報伝達を担っていることが広く認知されるようになった。ATP 受容体、すなわち P2 プリン受容体は、チャンネル内蔵型の P2X 受容体と G タンパク質共役型の P2Y 受容体に大別されるが<sup>1)</sup>、特に 1995 年にクローニングされた P2X<sub>3</sub> 受容体は、三叉神経節および脊髄後根神経節において比較的選択的に発現していることから、ATP の痛みへの関与が一躍注目されるようになった<sup>2)</sup>。これまでも痛みに対する P2 プリン受容体の関与については、特に末梢において数多

くの報告がなされ、ATP や P2X 受容体アゴニストをラットあるいはマウスの後肢足底内へ投与すると、自発痛様行動、痛覚過敏反応、アロディニアなどの行動が惹起されることが報告されている<sup>3,4)</sup>。これらの知見から、ATP は末梢において、おそらく一次感覚神経に発現する P2X<sub>3</sub> あるいは P2X<sub>2/3</sub> 受容体を介して痛みの発生に寄与していると考えられている。一方、脊髄における P2 プリン受容体の痛みに対する役割に関しては、末梢のそれと比較すると不明瞭な点が多く、特に P2Y 受容体の関与を検討した報告はこれまでになかった。

本研究では、脊髄における P2 プリン受容体の痛みに対する役割を明らかにするために、まず、痛みへの関与がほとんど明らかにされていない P2Y 受容体に関して、そのアゴニストである UTP

および UDP を脊髄くも膜下腔内 (i.t.) 投与し、侵害受容反応および神経因性疼痛に対する影響を検討した。さらに、ATP や P2X 受容体アゴニストを i.t.投与することにより惹起される疼痛関連行動のうち、特に未だそのメカニズムが明らかにされていないアロディニアに着目した検討を行った。

## 実験方法

### 実験動物

Sprague-Dawley 系雄性ラット (体重 180・250 g)

### 脊髄くも膜下腔内 (i.t.) 投与

エーテル麻酔下でラットの背部皮膚を L2-L5 level の部位の棘突起に沿って剥離後、切開口を閉じた。翌日、傷口を切開し、薬物または vehicle を 10  $\mu$ l の用量で L3-L4 あるいは L4-L5 間の脊髄くも膜下腔内に 25 G のステンレス製注射針を用いて投与した。

### 検定方法

#### 1. Paw pressure テスト

機械的侵害受容閾値の測定は、Randall-Sellitto 式圧刺激鎮痛効果測定装置を用いた paw pressure テストにより行った。すなわち、ラット右後肢の背側表面に対し 32 g/s の速度で加圧し、後肢の撤去反応を発現させる閾値を測定した。

#### 2. von Frey フィラメントテスト

アロディニアは von Frey フィラメントへの刺激による反応をスコア化することにより評価した。0.6 g (3.84 mN) のフィラメントをわずかに曲がる程度の強さで 2・4 秒間、右後肢の足底にあてた。そのときの動物の反応を、0 = 無反応、1 = 足をあげる、2 = 跳びはねる、足を震わせる、フィラメントや足を噛む、の 3 段階に点数化した。1 回の検定につきフィラメントを 10 回あて、その 10 回の施行の合計点 (0・20) をスコアとして表した。

上記の検定において、1 日 3 回の馴化作業を 2

日間行い、薬物投与直前の 2 回の測定平均値をコントロールとした。コントロール値測定後、直ちに薬物または vehicle を i.t.投与し、所定の時間後に検定を行った。

### 神経因性疼痛モデルの作製

神経因性疼痛モデルは、Seltzer らの方法に従って作製した。すなわち、エーテル麻酔下、右側坐骨神経を露出させ、坐骨神経の約 1/2 を強固に結紮した。坐骨神経露出後、結紮を施さなかったものを sham 処置群とした。結紮前および結紮 7・9 日後、0.6 g (3.84 mN) の von Frey フィラメントを用いてアロディニアを測定し、結紮 7・9 日後の処置側後肢のスコアが 10 点以上を示した動物を、以後の実験に使用した。

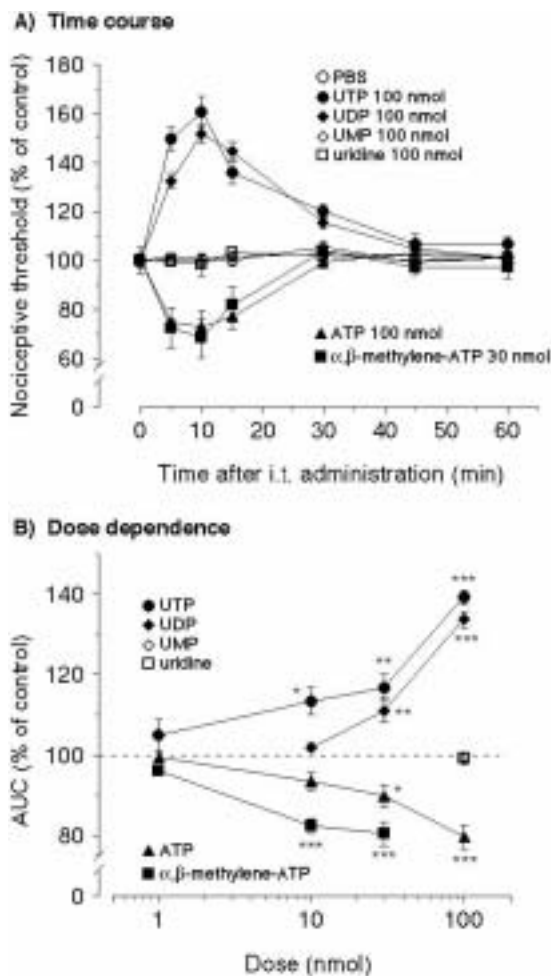
## 結果および考察

### 1) 脊髄内 P2 プリン受容体の侵害受容反応および神経因性疼痛に対する役割

まず、正常ラットの機械的侵害受容閾値に対して、ATP およびその関連物質の i.t.投与が及ぼす影響を、paw pressure テストにより検討した (Fig.1)。その結果、ATP (1-100 nmol) および P2X 受容体アゴニスト  $\alpha,\beta$ -methylene-ATP (1-30 nmol) の i.t.投与により、用量依存的に機械的侵害受容閾値の有意な低下が見られた。また、それらの作用は投与後 5-10 分で最大となり、30 分後には消失するという比較的短いものであった。これに対し、P2Y 受容体アゴニスト UTP (1-100 nmol) および UDP (10-100 nmol) の i.t. 投与によって、機械的侵害受容閾値は用量依存的に有意に上昇し、その作用はどちらも投与後 5-10 分で最大となり、30 分後には消失するという比較的短いものであった。しかしながら、それらの代謝産物である UMP (100 nmol) および uridine (100 nmol) を投与しても、侵害受容閾値に有意な変化は見られなかった。

なお、UTP および UDP の i.t. 投与による運動



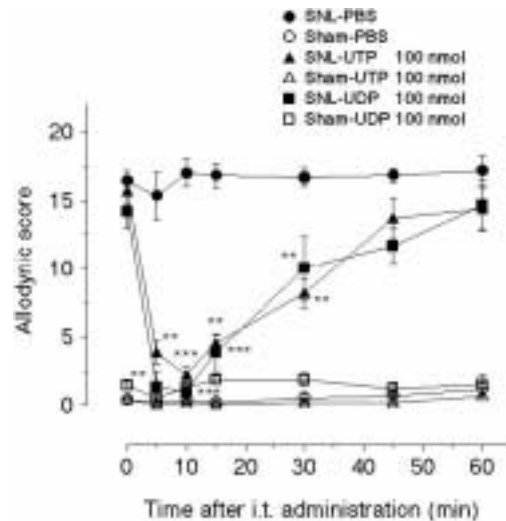


**Fig.1** Effects of i.t. administration of ATP, α,β-methylene-ATP, UTP, UDP, UMP and uridine on the mechanical nociceptive threshold of normal rats in the paw pressure test.

(A) Drugs were i.t. administered at time 0. The mechanical nociceptive threshold of each animal before the i.t. administration served as the control value (100%). (B) The magnitudes of the effects of ATP, α,β-methylene-ATP, UTP, UDP, UMP and uridine are presented as the AUC values from 0 to 30 min after i.t. administration. The AUC value of vehicle-treated group was assigned as a value of 100%. These values are presented as the mean ± S.E.M. ( $n=6$ ). \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  compared with the vehicle-treated group

機能に対する影響を inclined plane test により検討したが、どちらも有意な変化は見られなかった。このことから、UTP および UDP による抗侵害受容作用は運動機能の低下による二次的なものではなく、痛覚の抑制により誘発されたと推論できる。

UTP は P2Y 受容体のうち、P2Y<sub>2</sub> および P2Y<sub>4</sub> 受容体に、また UDP は P2Y<sub>6</sub> 受容体高い選択性



**Fig.2** Effects of i.t. administration of UTP and UDP on the tactile allodynia induced by sciatic nerve-ligation in the von Frey filament test in the neuropathic pain model.

Drugs or vehicle were i.t. administered to sham-operated (sham) and sciatic nerve-ligated rats (SNL), respectively, at time 0. Allodynic scores are the sum of the scores for ten applications, each of which was scored as 0, 1 or 2, as described in Methods. The values are presented as the mean ± S.E.M. ( $n=5-6$ ). \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  compared with the vehicle-treated group

を示すことが知られている。そこで、ラット脊髄後角および後根神経節における P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub> および P2Y<sub>6</sub> 受容体 mRNA の発現を RT-PCR 法により検討した。その結果、いずれの部位においても全ての P2Y 受容体サブタイプ mRNA の発現が確認された。これらの結果から、脊髄内 P2Y<sub>2/4/6</sub> 受容体の活性化が、P2X 受容体とは反対に、抗侵害受容作用を示すことを示唆される<sup>5)</sup>。

次に、神経因性疼痛モデルとして、坐骨神経部分結紮により生じるアロディニアに対して、UTP および UDP の i.t. 投与が与える影響を、von Frey フィラメントテストにより検討した (Fig.2)。手術前では、フィラメント刺激に対する反応は観察されなかった。坐骨神経部分結紮により、手術 7 日後には処置側後肢においてアロディニアの誘発が認められた。このアロディニアは UTP (30 および 100 nmol) および UDP (30 および 100 nmol) の i.t. 投与により抑制され、その作用はどちらも投与後 10 分をピークとし、投与後 45 分までには消失した。一方、sham 処置群では、手術

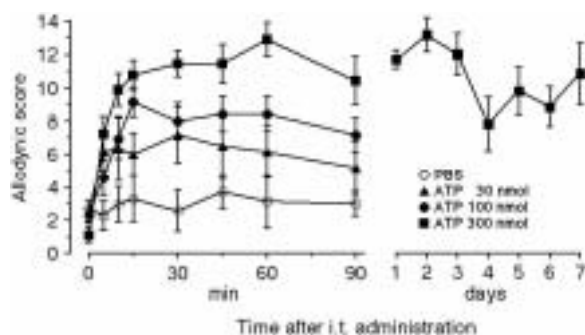
後7日目においてもアロディニアは認められず、薬物投与による影響も見られなかった。これらの結果は、脊髄内 P2Y<sub>2/4/6</sub> 受容体は神経因性疼痛モデルにおけるアロディニアの誘発に対しても緩和作用を有することを示している<sup>5)</sup>。

以上の結果から、脊髄における P2 受容体は痛みに対して、P2X 受容体を介した促進的作用と、P2Y 受容体を介した抑制的作用の相反的な役割を担っていることが示唆される。

## 2) ATP および P2X 受容体アゴニストの i. t. 投与により誘発されるアロディニア

正常ラットに、ATP および  $\alpha, \beta$ -methylene-ATP を i. t. 投与し、von Frey フィラメント刺激に対する反応を検討した (Fig.3)。その結果、ATP (30-300 nmol) および  $\alpha, \beta$ -methylene-ATP (10-100 nmol) を i. t. 投与することにより、投与 5-10 分後より顕著なアロディニアが誘発された。またその持続時間は非常に長く、投与 30-45 分後で最大となり、120 分後においても持続していた。さらに 300 nmol の ATP によるアロディニアは、投与後 7 日後においても確認された。一方、UTP (100 nmol) および UDP (100 nmol) の i. t. 投与によっては、そのようなアロディニア誘発作用は全く認められなかった。

また、ATP (100 nmol) により誘発されるア



**Fig.3** Effects of i.t. administration of ATP on the allodynia to the tactile stimuli in the von Frey filament test in normal rats. ATP (30-300 nmol) or vehicle were i. t. administered at time 0. Allodynic scores are the sum of the scores for ten filament applications, each of which was scored as 0, 1 or 2, as described in Materials and Methods. The values are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. ( $n=6-14$ ).

ロディニアは、ATP と同時に、P2 プリン受容体アンタゴニストである、suramin (30 nmol) および PPADS (30 nmol) により有意に拮抗された。これらの結果から、ATP により誘発される長期持続性のアロディニアは、脊髄内の P2X 受容体の活性化が寄与していることが示唆される。また、この ATP 誘発アロディニアは、モルヒネの同時投与によって有意に減弱されることを確認している。

しかしながら、細胞外 ATP は ecto-nucleotidase により速やかに分解されることが知られているため、ATP によるこのような長期持続性のアロディニアは、P2X 受容体の活性化により直接引き起こされているとは考えにくく、P2X 受容体の活性化がトリガーとなって、何らかの神経可塑性が誘導されたものと考えられる。今後、このメカニズムについてより詳細に検討していく必要があると考えられる。

## 引用文献

- 1) Ralevic, V and Burnstock, G. (1998) Receptors for Purines and Pyrimidines. *Pharmacol. Rev.*, 50, 413-492.
- 2) Chen, C.C., Akopian, A.N., Sivilotti, L., Colquhoun, D., Burnstock, G. and Wood, J.N. (1995) A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature*, 377, 428-431.
- 3) Hamilton, S.G. and McMahon, S.B. (2000) ATP as a peripheral mediators of pain. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 81, 187-194.
- 4) Tsuda, M., Koizumi, S., Kita, A., Shigemoto, Y., Ueno, S. and Inoue, K. (2000) Mechanical allodynia caused by intraplantar injection of P2X receptor agonist in rats: involvement of heteromeric P2X<sub>2/3</sub> receptor signaling in capsaicin-insensitive primary afferent neurons. *J. Neurosci.*, 20, 1-5.
- 5) Okada, M., Nakagawa, T., Minami, M. and Satoh, M. (2002) Analgesic effects of intrathecal administration of P2Y nucleotide receptor agonists UTP and UDP in normal and neuropathic pain model rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 303, 66-73.

# 末梢炎症に伴う慢性疼痛発現機序の解析 — 脊髄痛覚回路の可塑性と神経栄養因子 —

古江 秀昌、又吉 達、中塚 映政、吉村 恵

九州大学大学院 医学研究院 統合生理学

## Mechanism of chronic pain following peripheral inflammation: plastic change of nociceptive transmission in the spinal cord and neurotrophic factors

Hidemasa Furue, Matayoshi Satoru, Terumasa Nakatsuka, Megumu Yoshimura

Dept. of Integrative Physiol., Grad. Sch. of Med. Sci., Kyushu University, Fukuoka Japan.

Summary: Plastic changes of nociceptive transmission in the spinal cord after peripheral inflammation were analyzed by using patch-clamp recordings from substantia gelatinosa (SG, lamina II) neurons of *in vivo* animals and spinal cord slices. In rats 2-4 days after inflammation, spontaneous activities of SG neurons originating from the peripheral and increment of the innocuous and noxious mechanical excitatory synaptic responses were observed. Brain-derived neurotrophic factor facilitated the excitatory synaptic transmission during the period. Although SG neurons in naive rats received monosynaptic inputs mainly from A $\delta$  and C afferent fibers, the percentage of SG neurons receiving monosynaptic inputs from A $\beta$  fiber was increased from 7 % to more than 30 % following 7-10 days after inflammation. The enhancement of excitatory synaptic responses of SG neurons at early stages of peripheral inflammation may contribute to, at least in part, the induction of plastic changes in sensory circuits in the spinal cord.

### 緒言

脊髄後角表層は痛みを伝える一次求心性線維の A $\delta$ 線維や C 線維が密に終末するとともに、下部脳幹より下行性にセロトニンおよびノルアドレナリン神経の投射を受ける。さらに、オピオイドペプチド含有神経や GABA およびグリシンを含む介在神経が密に分布するなど、痛みの伝達や調節に重要な役割を果たす。近年、神経切断などの種々の末梢神経損傷モデルにおいて、末梢神経の感作のみならず、脊髄後角表層における痛覚伝

達に可塑的变化が生じることが見出され、慢性疼痛発現機序として注目されている。この可塑性には非侵害性情報を伝える A $\beta$ 線維（本来は後角深層の細胞に情報を伝える）の後角表層への軸索発芽による、触情報の痛覚回路への割り込み<sup>1)</sup>、下行性痛覚抑制系に關与する受容体数の減少<sup>2)</sup>や抑制性介在神経の脱落による痛覚抑制系の減弱<sup>3)</sup>などが報告されており、これらの脊髄痛覚系の可塑的变化によって行動実験で観察されるアロディニアや痛覚過敏が起こると推測されてい

る。

一方で、神経栄養因子は神経細胞の発生、分化、生存維持に関与するとともに、神経系の損傷に伴ってその発現が変化することが知られている。末梢炎症ではまず、炎症部から NGF が産生され、これを NGF の高親和性受容体、TrkA を発現した C 線維などが自由終末から取り込む。その結果、遺伝子発現に変化が起こり、特に BDNF の発現が一過性に増加し、それが脊髄終末部まで運ばれて後角表層に放出されると考えられている。しかしながら、これらの神経栄養因子が痛覚伝達に如何なる影響を与え、可塑性発現にどの様に寄与するか明らかにされていない。そこで、末梢炎症モデルを用いた電気生理学的研究を行い、炎症に伴う脊髄痛覚伝達の可塑的变化と神経栄養因子の作用を解析した。

## 実験方法

### 炎症モデル動物の作製と行動実験

ネブタール (40-50 mg/kg) 麻酔下に、雄性 Sprague-Dawley ラット (7 ~ 9 週齢) 一側の後肢足底皮下に Freund's のアジュバントを注入した。Von Frey フィラメントを用いて後肢に機械的刺激を加え、up-down 法により逃避行動を示す閾値を測定した。

### 脊髄スライス標本を用いた痛覚伝達機序の解析

炎症モデルおよび正常ラットからウレタン麻酔下に、椎弓切除を行って腰部脊髄を露出した。脊髄を摘出し、スライサーを用いて L4-5 レベルの横断スライスを作製して記録用チャンバーにセットした。脊髄後角表層第 1 層、いわゆる膠様

質細胞からパッチクランプ記録を行い、正常および炎症ラットに誘起されるシナプス応答、興奮性シナプス後電流 (EPSC) を記録した。神経栄養因子を灌流投与して発生頻度および振幅の変化を解析した。また、後根を電気刺激し、A $\delta$ 線維や C 線維誘起の EPSC を記録・解析し、正常と炎症ラットで比較した。

### In vivo 標本を用いた痛覚伝達機序の解析

脊髄スライス標本を用いた解析では、観察されるシナプス応答がどのような感覚情報を運んでいるのかを知ることが出来ない。そこで、新規に開発した in vivo パッチクランプ法<sup>4)</sup>を用いて、皮膚への生理的感覚刺激によって誘起されるシナプス応答を記録・解析した。正常および炎症ラットをウレタン麻酔し、人工呼吸下に両側を気胸とし、低容量、高頻度の換気を行って呼吸に伴う胸郭の振動を最小限にした。腰部椎弓を切除し L4-L6 レベルの脊髄を露出した後、ラットを脳脊髄固定装置にセットした。硬膜を切開し、クモ膜と軟膜に微細欠みを用いて約 0.2 mm のパッチ電極刺入用の窓を開けた。露出した脊髄表面は 38 度 C の酸素負荷した Krebs 液で灌流した。L4-L6 レベルの脊髄膠様質細胞からパッチクランプ記録を行い、後肢皮膚への機械的痛み刺激や触刺激を加え、誘起される EPSC を記録・解析した。正常および炎症ラットから得られたものと比較した。薬物は Krebs 液に溶解したものを脊髄表面から投与した。

## 結果

### 炎症ラットの行動変化

炎症ラット患側への機械的刺激に対する逃避行動の閾値は、正常ラットに比べて有意に低下した。この閾値低下はアジュバント注入後一週間以上持続した。

### 炎症初期に見られた脊髄膠様質への興奮性入力 の増大

アジュバント注入後2～4日を経過したラット脊髄膠様質細胞から *in vivo* パッチクランプ記録を行い EPSC を記録すると、正常ラットに比して振幅の大きな自発性 EPSC が観察された。また、正常ラット後肢皮膚へ触刺激を加えると、刺激の最初に EPSC の振幅と発生頻度が一過性に増大した後、瞬時に応答が消失し刺激前の状態に戻る accommodation が観察されたが、炎症ラットでは、触刺激によって持続して EPSC の振幅と発生頻度が増大し、accommodation は観察されなかった。機械的痛み刺激を加えると、正常ラットでは刺激の間中持続して EPSC の振幅と発生頻度が増大した。一方、炎症ラットでは機械的痛み刺激に対する応答が大きくなった。一次求心性線維の後根および脊髄表面に 1 $\mu$ M TTX を投与すると、炎症ラットに観察された振幅の大きな自発性 EPSC や触刺激および機械的痛み刺激によって誘起された EPSC は可逆的に抑制された。

一方、脊髄スライス標本の膠様質細胞から EPSC を記録すると、正常ラットおよび炎症ラットで自発性 EPSC の発生頻度および振幅に差は得られなかった。また、炎症ラット *in vivo* 標本で見られた振幅の大きな自発性 EPSC は観察されず、1 $\mu$ M TTX を投与しても、自発性 EPSC の発生頻度および振幅に変化は見られなかった。

### 炎症初期における BDNF のシナプス伝達増強作用

正常ラット脊髄スライス標本に BDNF (200 ng/ml) を灌流投与しても、膠様質細胞に誘起された自発性 EPSC は何ら影響を受けなかった。一方、炎症後2～4日を経過したラットでは、BDNF を投与すると自発性 EPSC の振幅は変化せず、発生頻度が著明に増大した。しかし、炎症後7日を経過したラットでは、BDNF を投与しても発生頻度の増大は観察されなかった。また、NGF を投与しても、正常および炎症ラットとも自発性 EPSC に変化は見られなかった。炎症初期に見られた BDNF による自発性 EPSC の発生頻度の増大は、Trk チロシンキナーゼ inhibitor の K252a (200 nM) によって抑制された。また、1 $\mu$ M TTX 存在下では、自発性 EPSC の発生頻度の増大が同様に観察されたが、10 mM lidocaine 存在下では抑制された。また、PLC の inhibitor でも発生頻度の増大が見られた。

### 炎症一週間後に観察された A $\beta$ 線維入力の増加

正常ラット脊髄スライス標本に付した後根を電気刺激すると、膠様質細胞は主に A $\delta$ 線維と C 線維由来の単シナプス性 EPSC を発生した。一方、炎症後一週間を経過したラットでは、A $\delta$ 線維と C 線維の入力に加えて約 30% 以上の細胞で A $\beta$ 線維由来の単シナプス性 EPSC が観察された<sup>5)</sup>。

## 考察

末梢炎症に伴う脊髄後角膠様質における痛覚伝達機序の可塑的变化と神経栄養因子の作用を脊髄スライス標本および *in vivo* 標本を用いて解析した。

炎症初期のラットでは BDNF による自発性 EPSC の発生頻度の増大が観察された。振幅に影響を与えなかったことから、神経終末部に作用してグルタミン酸の放出を促したと考えられる。BDNF は TrkB 受容体を活性化し、PLC を介してカチオンチャネルである TRPC3 チャネルや TTX 非感受性 Na チャネル ( $Na_v1.9$ ) を活性化することが報告されている。BDNF による自発性 EPSC の発生頻度の増大が PLC の inhibitor では影響を受けず、Na チャネルのプロッカーである lidocaine によって抑制されたことから、BDNF は神経終末部に発現する TrkB 受容体を活性化し、次いで TTX 非感受性 Na チャネルを活性化することによってグルタミン酸の放出を促進させたと考えられる。

In vivo 標本を用いた解析から、炎症初期には、振幅の大きな自発性 EPSC や触刺激に対する accommodation の消失や機械的痛み応答の増大などが観察された。これらの EPSC は、TTX により抑制されること、振幅の大きな自発性 EPSC は炎症モデルから作製した in vitro の脊髄スライス標本では誘起されなかったことから、これらの EPSC は炎症によって一次求心性線維が感作して活動電位が発生し、末梢から脊髄膠様質に伝えられたものと考えられる。

以上のことから、炎症初期には A $\delta$ 線維や C 線維が感作して、末梢から脊髄へ情報が過剰に投射されるとともに、活動依存性に放出された BDNF がこれを助長して、膠様質の活動が亢進されるものと思われる。

一方、炎症後一週間を経過すると、A $\beta$ 線維の単シナプス性入力が増加して、膠様質における痛覚回路のシナプス結合に可塑的变化が生じた。

A $\beta$ 線維の入力増大による触情報の痛覚回路への割り込みは、触刺激に対する逃避行動の閾値低下を説明するものと考えられる。炎症初期に見られる膠様質細胞の活動亢進が、一週間後に観察された痛覚回路の可塑性発現に寄与している可能性が高い。今後、末梢からの過剰な興奮性入力をブロックする、あるいは神経栄養因子抗体などを用い、痛覚回路の可塑的变化が阻止できるか否かを調べる必要がある。

## 引用文献

- 1) Okamoto M, Baba H, Goldstein PA, Higashi H, Shimoji K, Yoshimura M. Functional reorganization of sensory pathways in the rat spinal dorsal horn following peripheral nerve injury. *J Physiol.* 532 Pt 1:241-50 (2001)
- 2) Ito A, Kumamoto E, Takeda M, Shibata K, Sagai H, Yoshimura M. Mechanisms for ovariectomy-induced hyperalgesia and its relief by calcitonin: participation of 5-HT1A-like receptor on C-afferent terminals in substantia gelatinosa of the rat spinal cord. *J Neurosci.* 20-16:6302-8 (2000)
- 3) Moore KA, Kohno T, Karchewski LA, Scholz J, Baba H, Woolf CJ. Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. *J Neurosci.* 22-15:6724-31(2002)
- 4) Furue H, Narikawa K, Kumamoto E, Yoshimura M. Responsiveness of rat substantia gelatinosa neurones to mechanical but not thermal stimuli revealed by *in vivo* patch-clamp recording. *J Physiol.* 521 Pt 2:529-35 (1999)
- 5) Nakatsuka T, Park JS, Kumamoto E, Tamaki T, Yoshimura M. Plastic changes in sensory inputs to rat substantia gelatinosa neurons following peripheral inflammation. *Pain.* 82-1:39-47(1999)

# 神経因性疼痛ならびに慢性炎症性疼痛発現における脊髄を介した疼痛伝達経路の相違

矢島義識、成田 年、鈴木 勉

星薬科大学薬品毒性学教室

## Distinct mechanisms involving pain processing between neuropathic and chronic inflammatory pain-like state in mice

Yoshinori Yajima, Minoru Narita and Tsutomu Suzuki

Department of Toxicology, Hoshi University School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences,  
Tokyo Japan

Abstract: Partial sciatic nerve ligation and intraplantar injection of complete Freund's adjuvant (CFA) in mice caused a marked and persistent decrease in latencies of the paw withdrawal from a thermal stimulus only on the ipsilateral side. Thermal hyperalgesia caused by nerve ligation was completely reversed by repeated intrathecal (i.t.) injection of a specific antibody to brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and a selective inhibitor for protein kinase C (PKC), whereas the same treatment failed to suppress the CFA-induced thermal hyperalgesia in mice. In addition, the decreased thermal threshold induced by nerve ligation was reduced in BDNF hetero-knockout mice. Sciatic nerve ligation caused a significant increase in the membrane-bound protein levels of TrkB, a receptor for BDNF, and PKC $\gamma$  in the mouse spinal cord. It should be noted that the immunoreactivities to BDNF and activated form of conventional PKC (cPKC) were clearly increased on the ipsilateral superficial layers of the dorsal horn of the spinal cord in nerve-ligated mice as compared to that in sham-operated mice. On the contrary, CFA-induced thermal hyperalgesia can be reversed by repeated i.t. injection of a selective PKA inhibitor, whereas the same treatment failed to reverse the thermal hyperalgesia induced by nerve ligation. Additionally, the immunoreactivity to activated form of PKA on the ipsilateral superficial dorsal horn of the spinal cord in CFA-injected mice was significantly increased as compared to that in saline-injected mice. These findings provide further evidence that nerve injury-induced thermal hyperalgesia may result from the activation of cPKC through the BDNF/TrkB-mediated signaling pathway in the spinal cord. In contrast, the activation of spinal PKA may contribute to the development of thermal hyperalgesia induced by inflammation in mice. Such findings raise the fascinating possibility that there are the distinct intracellular mechanisms involving pain processing between neuropathic and persistent inflammatory pain-like state in mice.

## 緒言

神経因性疼痛は、痛覚過敏反応やアロディニアを主症状とする神経の損傷や機能障害に起因した難治性疼痛である。炎症性疼痛とは異なり、神経因性疼痛は解熱鎮痛薬やモルヒネに代表される典型的な鎮痛薬に対して抵抗性を示すことが多く、適切な治療法もないことが臨床上問題となっている。このような神経因性疼痛と炎症性疼痛との間に見られる相違は、これらの疼痛が異なった機構を有することが原因であると想定されるが、その疼痛伝達機構の相違についてはいまだ明確にされていない。

Protein kinase は、基質となる標的タンパク質をリン酸化することにより様々な生理反応を引き起こすだけでなく、シナプス可塑性を誘導する主要因子の一つとしても重要な役割を担っている。中でも protein kinase C (PKC) は、その持続的な活性上昇により、wind up 現象や central sensitization といった脊髄後角の可塑的变化を引き起こすことが知られており、現在までのところ、脊髄におけるこのような可塑的变化が、痛覚過敏反応やアロディニアを惹起する主たる原因ではないかと想定されている。

一方、protein kinase A (PKA) も一次求心性神経の過感受性などに寄与していることが示唆されていることから、PKAも疼痛伝達に関与している可能性が考えられる。事実、起炎物質である formalin の足蹠投与によって引き起こされる即時性の疼痛関連行動が、PKA の調節サブユニットの一つである PKA RI $\beta$  の遺伝子ノックアウトマウスでは有意に抑制されることが報告されている<sup>1)</sup>。

神経栄養因子は、神経の分化・生存および機能

維持などに重要な役割を担っており、その受容体である Trk ファミリーは細胞内に tyrosine kinase ドメインを有し、様々な細胞内応答を引き起こすことが知られている。特に、脳由来神経栄養因子 (BDNF) は、海馬におけるシナプス可塑性を引き起こす主要因子の一つとして最近注目を集めている。

そこで本研究では、坐骨神経結紮による神経因性疼痛モデルならびに complete Freund's adjuvant (CFA) の足蹠投与による慢性炎症性疼痛モデルを作製し、これらのモデルの熱痛覚過敏反応における脊髄を介した細胞内情報伝達系の役割について検討した。

## 方法

実験には ICR 系雄性マウス、brain-derived neurotrophic factor (BDNF) 遺伝子ヘテロノックアウトマウスおよびその野生型マウスを使用した。

神経因性疼痛モデルは、Seltzerら<sup>2)</sup>の方法をマウスに応用し、ペントバルビタール麻酔下にて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。

また、慢性炎症性疼痛モデルは、ペントバルビタール麻酔下にて CFA を右側後肢足蹠皮下に投与することにより作製した。なお、対照群には同様の方法で生理食塩液を投与した。

坐骨神経結紮ならびに CFA 投与による熱刺激に対する痛覚過敏反応は、足底熱刺激法により評価した。疼痛閾値の指標は、マウスの両側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とし、坐骨神経結紮および



CFA 投与前後の変化を経日的に測定した。

また、坐骨神経結紮および CFA 投与後のマウスから得られた脊髄細胞膜分画標本を用いて、Western blot 法に従い、PKC アイソフォームの一つである PKC $\gamma$  ならびに BDNF 受容体である TrkB のタンパクレベルを検討した。

さらに、坐骨神経結紮および CFA 投与後のマウスから作製した脊髄切片に、リン酸化 cPKC、リン酸化 PKA ならびに BDNF に対する特異的な一次抗体を添加し、免疫蛍光染色法により脊髄後角におけるそれらの免疫活性の変化を検討した。

## 結果および考察

坐骨神経の結紮ならびに CFA の足蹠投与により、それぞれ処置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。そこで、BDNF の特異的抗体を一日一回マウスの髄腔内に繰り返し処置し、坐骨神経結紮ならびに CFA 投与による熱痛覚過敏反応に対する影響を検討した。その結果、BDNF 抗体を繰り返し髄腔内処置することにより、坐骨神経結紮による熱痛覚過敏反応は完全に回復した<sup>3)</sup>。それに対して、CFA 誘発熱痛覚過敏反応は、BDNF 抗体を繰り返し髄腔内処置しても全く抑制されなかった。さらに、坐骨神経を結紮したマウスから得られた脊髄細胞膜標本においては、TrkB タンパク量が有意に増加し、この TrkB タンパク量の増加は、BDNF 抗体の繰り返し髄腔内処置によりコントロールレベルにまで完全に抑制された<sup>3)</sup>。しかしながら、CFA を投与したマウスから得られた脊髄細胞膜標本ではこのような変化は認められなかった。また、BDNF 遺伝子のヘテロノックアウトマウス

を用いて同様の検討を行なったところ、野生型マウスと比較して、坐骨神経結紮による熱痛覚過敏反応の抑制が認められた。BDNF は通常、脊髄後根神経節において合成され、一次求心性神経の末梢端ならびに中枢端へ順向性に輸送されるが<sup>4)</sup>、特に中枢端においては内因性神経伝達物質あるいは神経調節物質として、脊髄後角神経の興奮性を調節すると考えられている<sup>5)</sup>。これらのことから、神経損傷により脊髄において遊離された BDNF が、細胞膜における TrkB の増加ならびに活性化を引き起こし、熱刺激に対する痛覚過敏反応を引き起こしている可能性が示唆された。

一方、TrkB の下流には phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) が存在しており、この PLC $\gamma$  を介して PKC が活性化されることが知られている<sup>6)</sup>。そこで次に、坐骨神経結紮による熱痛覚過敏反応の発現における脊髄の PKC の役割について検討した。その結果、PKC の選択的阻害薬の繰り返し髄腔内処置により、坐骨神経結紮による熱痛覚過敏反応は用量依存的に抑制された。このような条件下で、坐骨神経結紮マウスの脊髄細胞膜標本を用いて、神経特異的かつ脳および脊髄に高濃度存在している PKC $\gamma$  アイソフォームのタンパク量を検討したところ、坐骨神経を結紮することにより脊髄における PKC $\gamma$  のタンパク量は有意に増加した。それに対し、CFA 投与による熱痛覚過敏反応は選択的 PKC 阻害薬の繰り返し髄腔内処置では全く抑制されず、PKC $\gamma$  のタンパク量にも何ら有意な変化は認められなかった。また、坐骨神経を結紮した側の脊髄後角表層部では、sham 群と比較して BDNF ならびに cPKC の活性化の指標となるリン酸化 cPKC の免疫活性が著しく増大した。これらのことから、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BDNF/TrkB経路を介したcPKCの活性化が、非常に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。それに対し、CFA投与による熱痛覚過敏反応の発現には、これらの因子はほとんど関与していない可能性が考えられる。

一方、CFA投与による熱痛覚過敏反応は、選択的PKA阻害薬を繰り返し髄腔内処置することにより、用量依存性的かつコントロールレベルにまで回復した。さらに、CFAを投与した側の脊髄後角表層部では、生理食塩液処置群と比較して、PKAの活性化の指標となるリン酸化PKA (p-PKA)の免疫活性が有意に増大した。このような条件下で、坐骨神経結紮による熱痛覚過敏反応における脊髄のPKAの関与について検討したが、坐骨神経結紮による熱痛覚過敏反応は選択的PKA阻害薬を繰り返し髄腔内処置しても全く抑制されなかった。また、坐骨神経を結紮した側の脊髄後角表層部においても、p-PKAの免疫活性に何ら有意な変化は認められなかった。これらの結果から、CFA投与による熱痛覚過敏反応には坐骨神経結紮時とは異なり、PKC非依存的で脊髄におけるPKAに関連した疼痛発現機構が存在している可能性が示唆された。

以上、本研究の結果より、坐骨神経結紮による熱痛覚過敏反応の発現には、脊髄のBDNF/TrkB経路を介したcPKCの持続的な活性化が、一方、CFA投与による熱痛覚過敏反応の発現には脊髄のPKAに関連した疼痛伝達機構が存在することが明らかとなり、神経因性疼痛と慢性炎症性疼痛の脊髄を介した疼痛伝達機構には、異なる細胞内情報伝達系が関与する可能性が示唆された。

## 引用文献

- 1) A.B. Malmberg et al., J. Neurosci. 17 (1997) 7462-7470.
- 2) Z. Seltzer et al., Pain 43 (1990) 205-218.
- 3) Y. Yajima et al., Brain Res. 958 (2002) 338-346.
- 4) G.J. Michael et al., J. Neurosci. 17 (1997) 8476-8490.
- 5) I.J. Lever et al., J. Neurosci. 21 (2001) 4469-4477.
- 6) Zirrgiebel U et al., J. Neurochem. 65 (1995) 2241-2250.

# 神経因性疼痛における可塑的変調と治療戦略

井上誠、植田弘師

長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 分子薬理学研究室

## The plasticity in neuropathic pain.

Makoto Inoue, Hiroshi Ueda

Division of Molecular Pharmacology and Neuroscience, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, 1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki 852-8521, Japan

Summary: Neuropathic pain is resistance to morphine and NSAIDs. To clarify the molecular mechanism of such pain, we measured the gene expression in DRG of mice, which were given partial sciatic nerve ligation or treated with streptozotocin. Immunohistochemical study demonstrated that TRPV1 (VR1) signal was newly observed on myelinated A-fibers in DRG of nerve-injured mice and streptozotocin-induced diabetic model mice. Furthermore, the application of capsaicin cream in such neuropathic pain models blocked the responses upon prostaglandin I<sub>2</sub> (i.pl.), which are not affected by the cream in naïve mice. Altogether our results suggest that novel expression of TRPV1 on myelinated fibers might contribute to the analgesic affect of topical capsaicin in both neuropathic pain.

## 緒言

がん性疼痛の終末期にけるモルヒネ増量を余儀なくする理由として、モルヒネ耐性形成<sup>1-3)</sup>が関与するものと考えられる。また、その一方で、痛みそのものの性質が侵害性疼痛から神経因性疼痛へと変化することもその要因であろうとも考えられている。神経因性疼痛(ニューロパシクペイン)は神経系の一時的な損傷やその機能異常が原因となる、もしくはそれによって惹起される疼痛と定義されている。その代表的疾患としてはがん性疼痛、帯状疱疹後神経痛、三叉神経痛、幻

肢痛、カウザルギー並びに糖尿病性神経因性疼痛などであり、これらは消炎鎮痛薬や麻薬性鎮痛薬に対し抵抗性を示す疼痛疾患である。この神経因性疼痛に対する治療戦略を打ち出すために、その発生機構の解明が必須であろうと考えられる。そこで、本研究では、坐骨神経結紮モデルあるいはストレプトゾトシン誘発性糖尿病性モデルを用い、これらの神経因性疼痛における可塑的変調を解析し、その分子基盤の解明を試みた。

## 実験方法

## 実験動物

実験には4週齢の Std-ddY 系雄性マウスを用いた。

## 神経因性疼痛モデル

神経結紮モデルとしては Malmberg and Basbaum<sup>4)</sup>の方法に従い、坐骨神経の1/2を完全に結紮にすることにより作製した。また、糖尿病性モデルとしてはストレプトゾトシン(STZ, 200 mg/kg)を尾静注投与し、血中グルコース濃度が正常時の約2倍以上である300 mg/dl以上を示したマウスを糖尿病モデルマウスとした<sup>5)</sup>。実験には神経傷害あるいはストレプトゾトシン投与一週間後のマウスを使用した。

## 行動試験法

行動試験としては、高感度 Algogenic-induced nociceptive flexion (ANF)試験<sup>6,7)</sup>、Hargreaves thermal 試験、paw pressure mechanical 試験を用いた。

## 組織化学的解析

特異的 TRPV1/VR1 受容体抗体 (Santa Cruz)を用いて、免疫染色した<sup>5,8)</sup>。

# 結果・考察

## 1. モルヒネ非感受性神経因性疼痛機構

単一知覚神経を介した痛み刺激を評価できる ANF 試験を用い、様々な侵害物質の薬理学的作用を評価したところ、一次知覚神経は薬理学的に少なくとも3つのタイプに分類されることを見出している<sup>8-10)</sup>。坐骨神経を部分結紮した神経因性

疼痛モデルマウスにおいて、サブスタンスP、ヒスタミンあるいはノシセプチンによるI型線維を介する侵害性応答は完全に消失し、II型を介するATPの応答は全く影響を受けなかった<sup>8)</sup>。一方、III型線維を介するプロスタグランジン I<sub>2</sub> アゴニスト(PGI<sub>2</sub>)応答は1000倍低い用量で侵害性応答を示した<sup>8)</sup>。また、坐骨神経を部分結紮した神経因性疼痛モデルマウスにおいて、I型線維を介し、機能消失するはずのブラジキニン応答は逆にPGI<sub>2</sub>反応と同様1000倍近くの過敏応答を示した。このブラジキニン過敏反応に関与する受容体を解析したところ、正常マウスにおけるブラジキニン反応はB2受容体拮抗薬で抑制され、傷害後における反応はB1受容体拮抗薬によって抑制された。また、組織化学的解析から、正常時にはほとんど発現していないB1受容体が、神経傷害時にA線維に新規に発現してくることも観察している。更に、正常時のブラジキニン反応はサブスタンスP受容体拮抗薬の脊髄クモ膜下腔内投与によって抑制され、傷害時の反応はNMDA受容体拮抗薬によって抑制された。また、正常時反応は新生仔カプサイシン処置によって消失するのに対し、傷害時反応は全く影響されなかった。従って、受容体のサブタイプスイッチ同様、応答する侵害神経の線維もいわゆるI型からIII型に変換したものと思われ、III型線維はやはり神経因性疼痛に重要な役割を担う線維であることが示唆された。また、末梢適用したモルヒネは神経傷害時に認められるブラジキニン誘発性過敏応答を全く抑制しなかった。これは、モルヒネ受容体はI型線維には存在するものの、III型線維には存在しないためであろうと思われる。坐骨神経傷害後にモルヒネ非感受性になるブラジキニン誘発性過敏反応のメカニズムにはこうした神経タ

イプスイッチが関与している可能性が考えられる(図1)。

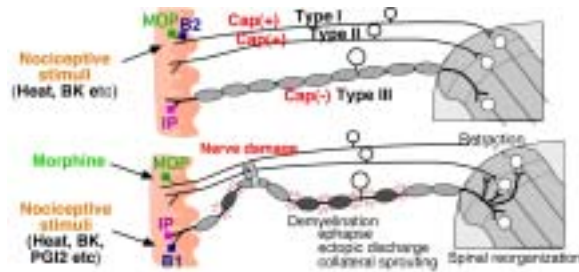


Figure 1. 神経因性疼痛における可塑的変調とモノヒネン感受性機構

## 2. カプサイシンクリームによる神経因性疼痛抑制機構

カプサイシンクリームは臨床において神経因性疼痛に有効であることが報告されているが、そのメカニズムは不明である。我々は ANF 試験を用いて、その作用機構の解明を試みた。正常マウスにおいて新生仔カプサイシン感受性の I (サブスタンス P)、II 型(ATP)の侵害性知覚神経線維を介する侵害応答に対し、カプサイシンクリーム (1%) の塗布により完全に消失した<sup>8)</sup>。一方、新生仔カプサイシン非感受性の III 型線維を介する PGI2 反応には全く影響しなかった<sup>8)</sup>。ところが、坐骨神経の部分結紮を受けた神経因性疼痛モデルマウスにおける III 型線維を介する過敏反応はカプサイシンクリームの塗布により完全に抑制された<sup>8)</sup>。このことから、神経傷害に伴い III 型 A 線維へのカプサイシンクリームの感受性の増大が推測されたが、実際に、組織化学的解析から、カプサイシン TRPV1/VR1 受容体の発現は正常マウスにおいて小型の C 線維細胞に特異的に存在するが、神経傷害後には有髄 A 線維細胞に発

現上昇してくることを確認している<sup>8)</sup>。更に、カプサイシンクリームは神経傷害時における熱刺激による過敏応答のみならず、III 型線維を介する機械刺激をも抑制した<sup>8)</sup>。同様の III 型線維を介する過敏応答と TRPV1/VR1 遺伝子発現はストレプトゾトシン誘発性糖尿病モデルマウスにおいても観察された<sup>5)</sup>。これらのことと、TRPV1/VR1 遺伝子欠損マウスにおいて、神経因性疼痛の程度は変わらないとの報告<sup>11)</sup>、を考え合わせると、カプサイシンクリームはこの新規発現性 TRPV1/VR1 受容体を刺激、脱感作することを通じて神経因性疼痛を抑制するものと推測される(図2)。

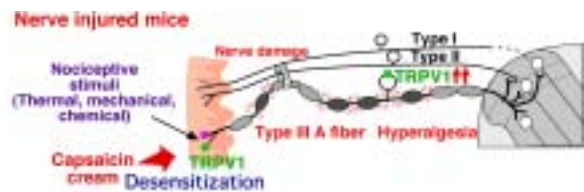


Figure 2. カプサイシンクリームの神経因性疼痛に対する鎮痛活性機構

また、今回用いた新規性カプサイシンクリームの塗布によって、塗布部位に対する biting や licking といった侵害行動は観察されなかった。上述したように、欧米ではカプサイシンクリームが帯状疱疹後神経痛や糖尿病性神経症などの神経因性疼痛モデルに対して有効利用されているが、それらのクリームはそれ自身で灼熱痛などの副作用を有するため、途中で治療を断念せざるを得ない患者も多いようである。我々が用いた新規カプサイシンクリームはそれ自身で発痛作用を示さず、熱刺激に対する閾値を変化しないものであったことから、副作用を伴わずに神経因性疼痛を抑制できる点で大いに期待が持てる。

## 引用文献

1. Inoue M, Mishina M, Ueda H. Locus-specific rescue of GluRε1 NMDA receptors in mutant mice identifies the brain regions important for morphine tolerance and dependence. *J Neurosci* 23,6529-36 (2003).
2. Ueda H, Inoue M, Matsumoto T. Protein kinase C-mediated inhibition of mu-opioid receptor internalization and its involvement in the development of acute tolerance to peripheral mu-agonist analgesia. *J Neurosci*. 21, 2967-73 (2001).
3. Ueda H, Inoue M, Takeshima H, Iwasawa Y. Enhanced spinal nociceptin receptor expression develops morphine tolerance and dependence. *J Neurosci*. 20, 7640-7 (2000).
4. Malmberg, A.B., & Basbaum, A.I. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. *Pain* 76, 215-222 (1998).
5. Rashid MH, Inoue M, Bakoshi S & Ueda H. Novel expression of vanilloid receptor 1 (VR1) on myelinated primary afferent neurons contributes to the antihyperalgesic effects of capsaicin cream in diabetic neuropathic pain in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 306, 709-717 (2003).
6. Inoue M, Kobayashi M, Kozaki S, Zimmer A & Ueda H. Nociceptin/orphanin FQ-induced nociceptive responses through substance P release from peripheral nerve endings in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 10949-53 (1998).
7. Inoue M et al. The algogenic-induced nociceptive flexion test in mice: studies on sensitivity of the test and stress on animals. *Brain Res Bull.* 60, 275-81 (2003).
8. Rashid MH, Inoue M, Kondo S, Kawashima T, Bakoshi S, Ueda H. Novel expression of vanilloid receptor 1 (VR1) on capsaicin-insensitive fibers accounts for the analgesic effect of capsaicin cream in neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther* 304, 940-948 (2003).
9. Inoue M et al. *In vivo* pain-inhibitory role of nociceptin/orphanin FQ in spinal cord. *J Pharmacol Exp Ther*, 305, 495-501 (2003).
10. Ueda H, Matsunaga S, Inoue M, Yamamoto Y & Hazato T. Complete inhibition of purinoceptor agonist-induced nociception by spinorphin, but not by morphine. *Peptides* 21, 1215-1221 (2000).
11. Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*. 288, 306-13 (2000).