

オピオイド受容体遺伝子多型と神経精神疾患

曾良 一郎^{1),2)}、畑 春実¹⁾、渡邊 秀和¹⁾、井手 聡一郎^{2),3)}

¹⁾ 東北大学大学院医学系研究科 神経科学講座精神神経生物学分野

²⁾ (財)東京都医学研究機構 東京都精神医学総合研究所 分子精神医学研究部門

³⁾ 京都大学大学院薬学研究科 生体機能解析学分野

μ Opioid receptor gene polymorphisms and neuropsychiatric disorders

Ichiro Sora^{1),2)}, Harumi Hata¹⁾, Hidekazu Watanabe¹⁾, Soichiro Ide^{2),3)}

¹⁾ Division of Psychobiology, Department of Neuroscience,

Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, JAPAN

²⁾ Department of Molecular Psychiatry, Tokyo Institute of Psychiatry,

Tokyo Metropolitan Organization for Medical Research, Tokyo, JAPAN

³⁾ Department of Molecular Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences,

Kyoto University, Kyoto, Japan

Summary: The opioid system is thought to play a major role in several neuropsychiatric disorders including analgesia and substance abuse. Pharmacologic approaches have suggested that μ -opioid receptor (μ OR) serves as a principal site for morphine actions in inducing behavioral reward. The transgenic knockout mice provided data that the gene expression of opioid receptor modulate the rewarding effects of opiates and non-opiate drug like alcohol. Heterozygous μ OR-KO mice with half expression of wild-type μ OR which display reduced morphine and ethanol self-administration would be a good animal model of human disorders. Recently, we have identified several novel polymorphisms of human and murine μ OR gene. Analysis of μ OR gene polymorphisms would be important to find new strategy of the treatment for neuropsychiatric disorders.

緒言

オピオイドの作用メカニズムの解明は、遺伝子クローニングを用いてオピオイド受容体を自

在に発現させることにより、受容体作動薬・拮抗薬のみを用いた従来の薬理学的手法から長足の進歩を遂げた。さらに個体レベルでの遺伝子組み換えが可能となり、培養細胞上では困難であった

生体内でのオピオイド受容体の役割が一層明らかとなった。我々は、組換え DNA 技術によりオピオイド受容体遺伝子が欠損したノックアウト・トランスジェニックマウスを用いて、オピオイドの作用メカニズムの解明を行っている¹⁾²⁾。μオピオイド受容体ノックアウトマウスの中でも、μ受容体発現が完全欠損ではなく半減しているヘテロ接合体マウスをヒトのモデルとして解析することにより、モルヒネの報酬・鎮痛効果や依存・耐性などの副作用出現には個人差があることの基礎的な知見を得ることが期待される³⁾。

さらに、ヒトオピオイド受容体の遺伝子配列の個人差、つまり遺伝子多型はμ受容体発現などに関与している可能性があることから、この遺伝的個人差をオピオイド受容体の遺伝子多型から説明できれば、臨床上、モルヒネの効果とその副作用の予測が可能となり、効果的なオピオイド治療の開発に貢献すると考えられる。そこで、我々は、オピオイド受容体遺伝子多型を検討し、テーラーメイドのオピオイド治療への道を拓くことを目的として、健常人およびマウスにおけるオピオイド受容体のゲノム解析を開始した。

実験方法

μオピオイド受容体ノックアウトマウスの行動解析： 自発運動量の測定は移所運動量測定装置を用いて薬物無処置の馴化期間 1hr、並びにオピオイド受容体作動薬のモルヒネ処置 (10 mg/kg, s.c.) 後、3hr まで計測した。条件付け場所嗜好性試験は、一方は wire mesh floor、もう一方は corncob bedding floor で両コンパートメント間は自由に移動できる Plexiglas chamber 内にてマウスの各コンパートメントにおける滞在時間を

測定した。条件付けとして嗜好性を示した側に 30 min 置いた後 saline を投与するか、嗜好性を示さなかった側に 30 min 置いた後モルヒネ (s.c.) ないしエタノール (i.p.) を投与する試技を行った。最後の投与から 24hr 後における場所嗜好性の変化を見ることで、各薬物の報酬効果を検討した。静脈内自己投与試験は、マウス静脈内にカニューレを埋め込む手術を行い、マウスがレバー押し行動を 4 回行う毎に、刺激光を照射すると同時にモルヒネを 5-8 μl/15 sec. で静脈内投与する方法で検討を行った。各モルヒネ投与量でのレバー押し回数を測定し、3 日間の試技の回数の平均を指標として、モルヒネの報酬効果を評価した。

μオピオイド受容体ゲノム解析： マウス μオピオイド受容体は転写調節領域およびエクソンおよびその隣接のイントロンの塩基配列を含む約 20kb の解析を行った。ヒトゲノムサンプルは日本人の健常人より採取した血液よりフェノール抽出法を用いて精製した。血液を採取する際に、全ての対象者に文書による同意を得て、関連施設の倫理指針に沿って実験を行った。健常人サンプルを用いて全エクソン領域 (exon 1-4)、開始コドンより 5' 上流側 5.5 kbp、終止コドンより 3' 下流側 14 kbp、及び intron 2 全領域と intron 1, 3 の繰り返し配列を含む一部の領域に関して PCR-sequence 法を用いて解析を行った。見いだした遺伝子多型の中から、頻度の高い遺伝子多型に関して、さらに例数を増やし解析を行った。

結果

μオピオイド受容体ノックアウトマウスの行動解析： 馴化期間 1hr の自発運動量を測定したと

ころ、マウスの各遺伝子型間で有意な差はみられなかった。モルヒネ処置により、野生型においては運動量が増加したが、 μ 受容体部分欠損マウスでは運動量増加は野生型と比較して半減し、完全欠損マウスでは消失していた⁴⁾。

モルヒネの報酬試験としての条件付け場所嗜好性試験において、野生型では、モルヒネによる条件付けにより、モルヒネ投与側のコンパートメントへの滞在時間が約2倍にまで増加したが、 μ 受容体完全欠損マウスでは野生型と比較して有意に報酬効果が減弱し、部分欠損マウスでもその傾向がみられた⁴⁾。

さらに、別のモルヒネ報酬試験として静脈内自己投与試験を行ったところ、レバー押し行動回数は、ヘテロ及びホモ体のKOマウスにおいて、0.1ないし0.3 mg/kg/injectionの際に野生型と比較し有意に少なかった。モルヒネ総摂取量は、いずれの試技においても野生型マウスの摂取量が最も大きな値を示した⁴⁾。

μ オピオイド受容体ゲノム解析：マウス μ ORの転写調節領域の解析により、 μ オピオイド受容体転写調節候補領域に単純反復配列多型を見出し、BXD(DBAxC57)組み替え純系マウス系統種を含むマウス系統種において μ OR発現量とモルヒネ鎮痛効果との間に相関を認めた⁵⁾。ヒト μ ORの転写調節領域およびエクソンおよびその隣接のイントロンの塩基配列を決定し、転写調節候補領域の塩基配列がマウスのそれと極めて高い相似性を示すことを見出し、これらの高い相似性を示した領域がヒト、マウスを通じて μ ORの発現調節に重要な役割を果たすことを示唆した⁵⁾。

ヒト μ OR遺伝子塩基配列は、最初にライブラリーより得られたクローンから50kb以上と推

定される八つのフラグメント(各2kb~12kb)の合計約40kbの解析を行った。データベース上のラフドラフト配列を参考にしながら日本人健常対照群より得られたゲノムDNA標本におけるヒト μ OR遺伝子の塩基配列を解析し、欧米人において現在、報告されている反復配列多型、単塩基多型を日本人でも確認するとともに、新規の遺伝子多型も同定した。日本人においては、翻訳領域の存在する多型はA118G(Asn40Asp)のみであり、これまで欧米人で報告されていた他の翻訳領域に存在する多型(e.g. C17T)は見られなかった。また、さらに高頻度の多型に関しサンプル数を増やして検討したところ、日本人でも見られた多型の頻度も欧米人と比較して有意に異なるものであった(日本人の多型頻度、A118G 45.6%、IVS2+G691C 81.9%。欧米人の多型頻度、A118G 7.5 - 25.8%、IVS2+G691C 42.5 - 53.3%)。また、intron 3内の一部多型と3'非翻訳領域内に存在する一部多型で、ほぼその発生が一致するSNP群が見いだされ、約55kbpにわたって存在する32の多型が完全に同時に見られた。さらに、それらSNP群と他の多型に関しても、ハプロタイプ解析、並びに連鎖不平衡解析を行った結果、一部の多型を除き、 μ オピオイド受容体遺伝子の全域にわたり広範囲で有意な連鎖不平衡が存在することが明らかとなった。

考察

モルヒネの鎮痛効果や副作用には個人差があることはよく知られている。報酬試験としての静脈内自己投与試験、場所条件付け試験では、モルヒネの報酬効果が μ 欠損マウスでは消失していた。エタノールの報酬効果にオピオイド系の関与

が示唆されているが、 μ 欠損マウスではエタノールの報酬効果が減少していた⁶⁾。これらの μ OR欠損マウスモデルの解析により、 μ OR発現はモルヒネ鎮痛のみならずアルコールをはじめ薬物依存の病態にも関与することが明らかとなった。

我々のヒト μ ORゲノム解析により、これまで報告されてきた欧米人の μ OR内に存在する遺伝子多型頻度と比較し、日本人の多型頻度は大きく異なっており、あらためてそれぞれの人種を用いた多型解析の重要性を示唆する結果となった。また、 μ OR内には強い連鎖不平衡が存在することが新たに明らかとなり、今後、神経精神疾患との関与を検討する上での基礎を提供すると考えられる。オピオイドの鎮痛効果・副作用の個人差、薬物依存の発症脆弱性が、 μ OR遺伝子多型により説明することが可能なら、疼痛、薬物依存などの神経精神疾患の新しい治療戦略が期待できると考えられる。

オピオイド治療 課題と新潮流. 東京:エルゼビア・サイエンス株式会社ミクス, 2001; 77~84.

- 4) Sora I, Elmer G, Funada M, et al. Mu opiate receptor gene dose effects on different morphine actions: evidence for differential in vivo mu receptor reserve. *Neuropsychopharmacol.* 2001; 25(1): 41 ~ 54.
- 5) Uhl G R, Sora I, Wang Z. The mu opiate receptor as a candidate gene for pain: polymorphisms, variations in expression, nociception, and opiate responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96: 7752~5.
- 6) Hall S, Sora I, Uhl GR (2001) Ethanol consumption and reward are decreased in mu-opiate receptor knockout mice. *Psychopharmacol* 154:43-49

引用文献

- 1) 曾良一郎(1999)特集:精神神経薬理学的領域におけるノックアウトマウスの応用,オピオイド受容体ノックアウトマウス. *日本神経精神薬理学雑誌* 19: 239-249
- 2) Sora I, Takahashi N, Funada M, et al. Opiate receptor knockout mice define mu receptor roles in endogenous nociceptive responses and morphine-induced analgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94: 1544 ~ 1549.
- 3) 曾良一郎, 池田和隆. 遺伝子欠損マウスを含む動物個体レベルでのオピオイドの作用機序. 鎮痛薬・オピオイドペプチド研究会編.

快情動発現におけるオピオイドシステムの役割： ドーパミンシステムとの比較

池田和隆、高松幸雄、高橋雄大

財団法人東京都医学研究機構・東京都精神医学総合研究所・分子精神医学研究部門

A role of the opioid system in pleasant emotion: comparison with the dopamine system

Kazutaka Ikeda, Yukio Takamatsu, Takehiro Takahashi

Department of Molecular Psychiatry, Tokyo Institute of Psychiatry, Tokyo Japan.

Summary: Opioid and dopamine systems play crucial roles in reward. Similarities and differences in neural mechanisms of reward mediated by these two systems have remained largely unknown. We now show significant differences between opioid and dopamine systems' reward functions. Mice lacking mu-opioid receptors (MOR), the main target of morphine, showed enhanced lateral hypothalamic intracranial self-stimulation (ICSS) which induces dopamine release. They also displayed increased movement in despairing conditions. Both of these results are consistent with MOR involvement in drive-reducing reward functions such as satisfaction and relaxation. In contrast, mice lacking dopamine transporters (DAT), a main target of cocaine, maintained lateral hypothalamic ICSS responding under continuous, partial and delayed reinforcement schedules. These results are consistent with dopamine systems' involvement in drive-inducing reward functions such as excitation and volition. ICSS differences in MOR and DAT knockout mice underscore the multidimensional nature of reward.

緒言

オピオイドは、強力な鎮痛薬であると同時に快感を引き起こす依存性薬物である。オピオイドの鎮痛作用機序に関する研究が進んでいるのに対して、その報酬効果のメカニズムは不明な点が多い。依存性薬物は全て、側坐核におけるドーパミン放出を亢進させることにより報酬効果を発揮するという仮説がある¹⁾。この仮説によると、オピオイドの場合は腹側被蓋野のドーパミン細胞

を抑制している神経細胞を抑制するために、脱抑制によって側坐核でのドーパミン放出が亢進し、報酬効果が生まれるとされている。一方、依存性薬物により引き起こされる快情動にはそれぞれ特徴があることから、報酬効果およびそのメカニズムも多様であるとする考え方もある²⁾。オピオイドシステムとドーパミンシステムによる快情動の異同はいまだに解明されていない³⁾。

一方、オルズらにより脳内自己刺激反応が発見⁴⁾されて以来、脳内自己刺激試験は報酬系の解明

に大きく貢献してきた³⁾。特に外側視床下部刺激では、強い報酬効果が現れることと、側坐核におけるドーパミンの放出が亢進することが知られている。また、ミューオピオイド受容体が、モルヒネの鎮痛効果や報酬効果において決定的な役割を担うことは、ミューオピオイド受容体欠損マウスの行動解析から明らかになった^{5),6)}。従って、ミューオピオイド受容体欠損マウスの脳内自己刺激反応の解析は、オピオイドシステムによる報酬効果とドーパミンシステムとの関係を検討する上で、極めて有用なアプローチであると考えられる。

本研究では、ミューオピオイド受容体欠損マウスに対して、脳内自己刺激試験を中心に行動解析を行った。さらに、コカインや覚醒剤の標的分子であるドーパミントランスポーターの遺伝子欠損マウスについても脳内自己刺激試験を行い、オピオイドシステムとドーパミンシステムによる快情動発現メカニズムを比較した。

実験方法

実験動物

ミューオピオイド受容体欠損マウス⁵⁾、ドーパミントランスポーター欠損マウス⁷⁾は、研究協力者の菅良一郎東北大学医学部教授より提供を受けた。それぞれ、野生型、ヘテロ接合体、ホモ欠損型を、実験に十分なだけ準備した。遺伝子型の判定は、尻尾より精製したゲノム DNA の PCR 解析によって行った。

脳内自己刺激試験

十分に麻酔を施した各遺伝子型マウス(ミューオピオイド受容体欠損マウスおよびドーパミン

トランスポーター欠損マウス)を脳定位固定装置に固定し、刺激電極を内側前脳束(外側視床下部)に刺入して歯科用セメントで固定した。手術後の回復期間は1週間以上とした。能動的行動を指標とするヘッドディッピング式(図1)と受動的行動を指標とする場所滞在式の2種の脳内自己刺激試験装置を用いた⁸⁾。実験が終了したマウスは灌流固定し脳を採取し、切片を作製して電極刺入位置を確認した。



Fig. 1: Mouse showing head-dipping ICSS

逃避意欲に関する試験

テールサスペンション法⁹⁾では、10分間マウスを尻尾でつり下げ、最後の5分間に動いた時間を測定した(ニューロサイエンス社製)。

水車法¹⁰⁾では、6分間マウスを25度の水を入れた水車のついた水槽に入れ、最後の5分間に水車を回した回数を測定した(小原医科産業社製)。

結果

脳内自己刺激反応の獲得と消去

刺激電流値を10分ごとに0, 100, 0マイクロアンペアとすると、ヘッドディッピング法、場所滞在法の何れにおいても、遺伝子型によらず脳内自己刺激反応が速やかに獲得され、速やかに

消去した。ただし、ミューオピオイド受容体欠損マウスでは自己刺激反応頻度の上昇が見られた。

脳内自己刺激反応の刺激電流閾値

ミューオピオイド受容体欠損マウスでは遺伝子型による電流閾値の違いは認められなかったが、ドーパミントランスポーター欠損マウスでは閾値の低下が認められた。

プログレッシブレイショ-過程での反応消去

電気刺激を得るために必要な穴のぞき行動の回数を徐々に増やし、反応の消去過程を観察した。ミューオピオイド受容体欠損マウス、ドーパミントランスポーター欠損マウスの何れにおいても、反応が消失しにくかった。特にドーパミントランスポーター欠損マウスでは、反応消失抵抗性が顕著であった。

モルヒネの影響

ミューオピオイド受容体欠損マウスに関して、脳内自己刺激反応頻度に与えるモルヒネの効果を検討した。モルヒネは野生型、ヘテロマウスの反応頻度を濃度依存的に低下させたが、欠損型マウスには影響しなかった。

逃避意欲試験

ミューオピオイド受容体欠損マウスに関して、テールサスペンション法、水車法を用いて逃避意欲を試験した。何れの試験においても、ミューオピオイド受容体欠損マウスでは、絶望的な状況下による運動が亢進していた。

反応消去過程の検討

ドーパミントランスポーター欠損マウスに関

して、脳内自己刺激反応の消去過程をさらに2つの方法で検討した。穴のぞき行動から電気刺激が与えられるまでの時間を徐々に長くした場合、欠損型マウスでは有意に反応が消去しにくかった。しかし、刺激電流値を徐々に低下させた場合の消去過程は、遺伝子型によらなかった。

考察

ミューオピオイド受容体が無くても外側視床下部刺激による脳内自己刺激反応が現れたことは、外側視床下部刺激による報酬効果にはミューオピオイド受容体は必要ないことを示唆している。また、欠損マウスではむしろ自己刺激反応が亢進していたことより、ミューオピオイド受容体は、外側視床下部刺激による報酬効果を抑制的に制御していると考えられた。このことは、モルヒネによりミューオピオイド受容体を活性化させた場合、自己刺激反応が低下したことによっても裏付けられた。さらに、欠損マウスでは報酬を求める行動が亢進していただけではなく、絶望的な状況下からの逃避行動も亢進していたことより、意欲全般が亢進している可能性が考えられた。

一方、ドーパミントランスポーター欠損マウスでは、刺激電流閾値の低下と反応消去抵抗性が特徴であると考えられる。刺激電流値の低下は、このマウスで遊離ドーパミンの回収が行われなため、弱い刺激によって放出されたドーパミン量でも神経伝達が十分に起こるからであると考えられる。電気刺激が容易には得られない条件下でも脳内自己刺激反応が維持しており、ドーパミントランスポーターが渴望感と関連することが示唆される。

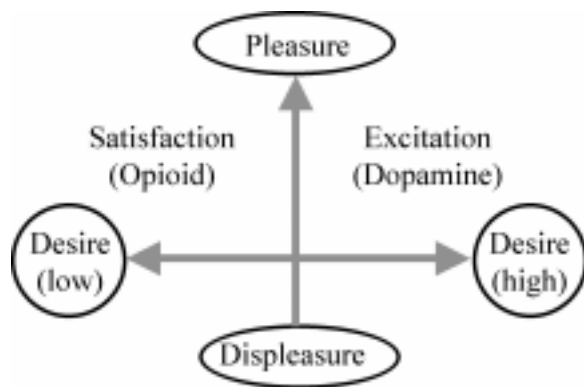


Fig.2: Scheme of the hypothesis showing multidimensional pleasant emotion

これらの結果は、オピオイドとドーパミンシステムが、欲求を抑える方向の報酬機能と欲求を高める方向の報酬機能とにそれぞれ関係しているという仮説²⁾を支持するものである(図2)。快情動に多様性があり、オピオイドシステムは、ドーパミンシステムによって発現される快情動とは異なる快情動を、異なるメカニズムで発現させる可能性が考えられる。

引用文献

- 1) Wise, R. A. : Addictive drugs and brain stimulation reward. *Annu. Rev. Neurosci.*, 19 : 319-340, 1996.
- 2) Belluzzi, J. D., Stein, L. : Enkephaline may mediate euphoria and drive-reduction reward. *Nature*, 266 : 556-558, 1977.
- 3) 池田和隆 : 快と不快の脳内メカニズムに関する仮説、*脳の科学* 25 : 287-290, 2003.
- 4) Olds, J., Milner, P. : Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 47 : 419-427, 1954.
- 5) Sora, I., Takahashi, N., Funada, M., Ujike, H., Revay, R. S., Donovan, D. M., Miner, L. L., Uhl, G. R. : Opiate receptor knockout mice define mu

receptor roles in endogenous nociceptive responses and morphine-induced analgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 94 : 1544-1549, 1997.

6) Kieffer, B. L. : Opioids: first lessons from knockout mice. *Trends Pharmacol. Sci.*, 20 : 19-26, 1999.

7) Sora, I., Wichems, C., Takahashi, N., Li, X. F., Zeng, Z., Revay, R., Lesch, K. P., Murphy, D. L., Uhl, G. R. : Cocaine reward models: conditioned place preference can be established in dopamine- and in serotonin-transporter knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 95 : 7699-704, 1998.

8) Ikeda, K., Moss, S. J., Fowler, S. C., Niki, H. : Comparison of two intracranial self-stimulation (ICSS) paradigms in C57BL/6 mice: head-dipping and place-learning. *Behav. Brain Res.*, 126 : 49-56, 2001.

9) Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., Simon, P. : The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*, 85 : 367-370, 1985.

10) Nomura, S., Shimizu, J., Kinjo, M., Kametani, H., Nakazawa, T. : A new behavioral test for antidepressant drugs. *Eur. J. Pharmacol.*, 83 : 171-175, 1982.

痛覚感受性の個体差に関わる遺伝学的解析

小出剛、古瀬民生

国立遺伝学研究所マウス開発研究室

Genetic analysis of different pain sensitivity among mouse strains

Tsuyoshi Koide, Tamio Furuse

Mouse Genomics Resource Laboratory, National Institute of Genetics,

Mishima Japan.

Summary: Pain sensation is an essential alert for avoiding environmental danger and feeling tissue damage or illness. In spite of the essential role of pain sensation, surplus pain is stressful or unpleasant for animals. Heat evoked pain and capsaicin sensation activate the multi functional pain receptor, VR1. Capsaicin is the main chemical component of hot chili peppers providing its hot taste and causes sensation in physiological pain system. We found diversity of sensitivity for capsaicin and pain in the stock of wild-derived mouse strains, Mishima battery. In order to clarify genetic basis of diversity of pain sensitivity, we conducted QTL analyses using two mouse strains, C57BL/6 and KJR. In the study, 470 F2 mice were generated from a cross of F1 mice obtained from a cross of C57BL/6 and KJR. We applied fluid intake test of capsaicin solution and 52 hot plate test for the F2 progeny. In the mapping study, four significant QTLs for capsaicin sensitivity were detected on chr2, chr7, chr8 and two significant QTLs for heat sensitivity were detected on chr2 and 18.

緒言

痛覚では個体間で大きな感受性の違いがみられる。このような違いをもたらす遺伝的機構を理解することは、鎮痛薬を用いた効果的な治療には不可欠であると考えられる。また、モルヒネをはじめとした鎮痛薬の作用についても、個体間で大きな違いがみられ、副作用の少ない使用を行うためには、その個体差をもたらす機構を解明する必要がある。

マウスにおいてみられる各近交系統間の表現型の

差は、ヒトの個人差のモデルになると考えられ、系統間での表現型比較に基づく遺伝的解析が進んでいる。しかし、一般的に利用されている実験用近交系統は、そのほとんどが世界に広く分布する野生マウス亜種の一つ *Mus musculus domesticus* からつくられた比較的小さな飼育コロニーに由来しており、それらの間で多様な表現型は期待できない。一方で、国立遺伝学研究所では世界各地から捕獲した

マウスを基に、数多くの野生マウス由来近交系統を樹立し維持している。これらの一連の系統は多くが当研究所で独自に樹立されたものなので、Mishima Battery of Strains と呼ばれている。我々はこれらの系統の遺伝的多様性に着目し、行動遺伝学的研究を進めている。

Table 1. Mishima battery

起源	系統名	亜種名	捕獲地
Wild mice	BFM/2	<i>Domesticus</i>	France
	NJL	<i>Musculus</i>	Denmark
	BLG2	<i>Musculus</i>	Bulgaria
	HMI	<i>Castaneus</i>	Taiwan
	CAST/Ei	<i>Castaneus</i>	Thailand
	KJR	<i>Musculus</i>	Korea
	SWN	<i>Musculus</i>	Korea
	MSM	<i>Musculus</i>	Japan
Fancy mice	JF1	<i>Musculus</i>	Japan
Fancy mice	C57BL/6	Laboratory strain	
	DBA/1	Laboratory strain	

A list of inbred strains used in this study

これまでに自発運動性、情動性、学習記憶能力、痛覚感受性などの行動解析を行った結果、行動には野生由来系統間で大きな多様性があることが分かった (1, 2, 4)。現在、このような行動形質のなかで、痛覚感受性に関して更に遺伝的解析を進めている。

辛味物質 (Capsaicin) に対する受容体である Vanilloid Receptor-1 は、マウスにおいては侵害性の熱および痛覚刺激の伝達に必須であることが知られており、辛味と熱感覚が共通の伝達経路を持つと考えられている。このような辛味や熱感覚にはしばしば個体差が観察されるが、これには遺伝的要因も関与していると考えられている。その遺伝的要因として、オピオイド及び非オピオイド系の修飾経路に関わる遺伝子の存在が予想される。これらの遺伝的要因を

明らかにする目的で、Mishima battery を用いて、各マウス系統の Capsaicin 及び熱に対する感受性を解析した。また、痛覚に違いを示すマウス系統から、遺伝学的マッピングによりその原因となる遺伝子座を絞り込み、遺伝的機構を解析した。更に、モルヒネの痛覚抑制に関して各系統で検討した。

実験方法

実験動物

実験には 8 ~ 12 週齢のマウスを用いた。マウスは明期暗期各 12 時間の周期で飼育し、餌と水は自由に摂取とした。

カプサイシン感受性テスト

辛味嗜好性の試験として、最初に Capsaicin 水溶液を用いた 12 時間の 1-bottle test を行った。1-bottle test とは、まず、試験用給水瓶にて 2 日間予備飼育を行った後、暗期 12 時間の飲水量を測定し、その三日間の平均をマウス個体毎の飲水量のコントロールとした。その後、明期の終了直前に給水瓶を Capsaicin 水溶液の入った物に交換し、暗期中の水溶液摂取量を測定した。この Capsaicin 水溶液の濃度を日毎に 1.0、4.0、7.0、10.0 μ M の順に上昇させ、摂取量をコントロールとの比率で表した。

熱痛覚感受性テスト

マウスを 52 $^{\circ}$ C に保温したアルミニウムプレートの上に移し、後肢を舐める行動までの潜時を測定し、熱に対する感受性の指標とする。

結果

Capsaicin 感受性の試験として、Capsaicin 水溶液を用いた 12 時間の 1-bottle test を行った。その結果、全ての系統で Capsaicin 濃度の上昇と共に摂取量が減少し、その減少量にはマウス系統間で顕著な差がみ

られた。特に、KJRとMSMの野生由来マウス2系統は高濃度 Capsaicin 水溶液を他の系統より有意に多く摂取し、C57BL/6、DBA/1、PGN2の3系統は他の系統より摂取量が少なかった3)。この中で特に、KJR系統が Capsaicin 水溶液に対する感受性が鈍く、C57BL/6系統は感受性が高いため以下の実験に用いた(Figure1)。KJR系統とC57BL/6系統を交配して得られたF1個体、F2個体に対して Capsaicin 感受性試験と52 hot plate testを行った。その結果、F1個体は Capsaicin 感受性試験ではKJRと同様の傾向を示したのに対し、hot plate testでは逆にC57BL/6と近似な値を示した。以上の結果より、Capsaicinと熱に対する感受性は、同一のレセプターを持ち、親系統では類似した感受性を示しながら、これらの表現型が別々の遺伝的因子によって影響されている可能性が示唆された。更にF2個体群を用いて Capsaicin 感受性試験と共に hot plate testを行った後、多型解析を行い関連遺伝子座のマッピングを行った。その結果、Capsaicin 感受性の系統差に関わる遺伝子は染色体2番、7番、8番上に存在することが明らかになった5)。また、熱感受性に関わる遺伝子は染色体2番と18番上に存在し、2番上の遺伝子は Capsaicinと熱感受性で共通しているものの、他は異なった遺伝子が関与していることが示唆された(論文準備中)。

また、モルヒネ投与による痛覚抑制を検討したところ、痛覚の鈍いKJR系統においても鎮痛効果は確認され、非オピオイド系の修飾機構が痛覚の系統差に関与している可能性が示唆された。更に、モルヒネ投与後も痛覚感受性に系統差が確認され、個体差にあわせた適切な鎮痛薬の使用の必要性が改めて確認された。

1) Koide, T., Moriwaki, K., Uchida, K., Mita, A., Sagai, T., Yonekawa, H., Katoh, H., Miyashita, N., Tsuchiya, K., Nielsen, T. J. and Shiroishi, T.: A new inbred strain JF1 established from Japanese fancy mouse carrying the classic piebald allele. *Mammalian Genome*, 9, 15-19, 1998.

2) Koide, T., Moriwaki, K., Ikeda, K., Niki, H. and Shiroishi, T.: Multi-phenotype behavioral characterization of inbred strains derived from wild stocks of *Mus musculus*. *Mammalian Genome* 11, 664-670, 2000

3) Furuse, T., Blizard, D. A., Moriwaki, K., Miura, Y., Yagasaki, K., Shiroishi, T., Koide, T.: Genetic diversity underlying capsaicin intake in the Mishima battery of mouse strains. *Brain Research Bulletin* 57, 49-55, 2002a.

4) Furuse, T., Takano-Shimizu, T., Moriwaki, K., Shiroishi, T., Koide, T.: QTL analyses of spontaneous locomotor activity using mouse strains from Mishima battery. *Mammalian Genome* 13, 411-415, 2002b.

5) Furuse, T., Miura, Y., Yagasaki, K., Shiroishi, T., Koide, T.: Identification of QTLs for differential capsaicin sensitivity between mouse strains KJR and C57BL/6. *Pain*, in press.

引用文献

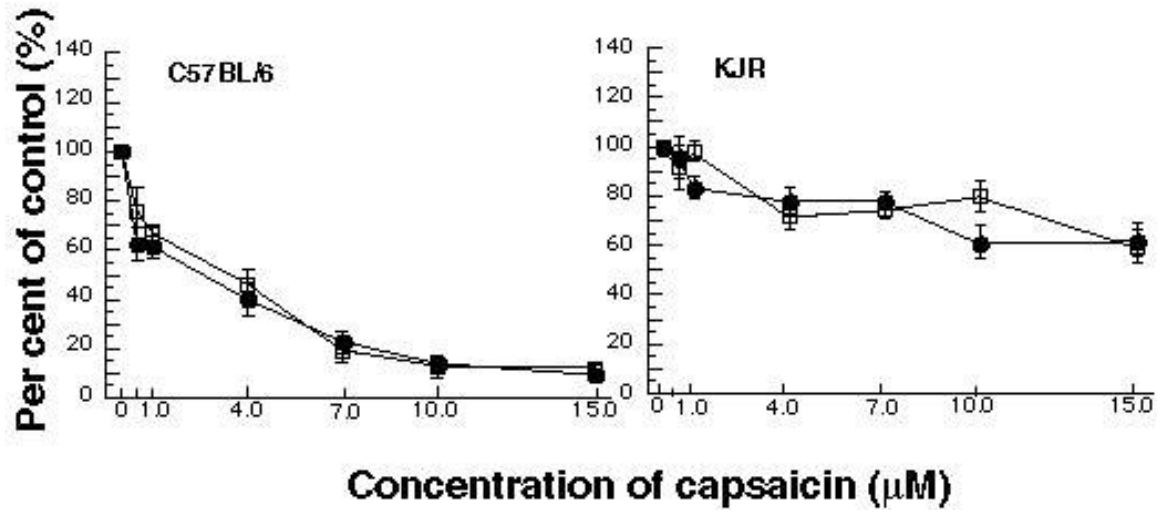


Figure1. Measurement of capsaicin intake at different concentration by the 12-h 1-bottle test. Relative percent volume of capsaicin fluid intake to control water was presented in each strain

オピオイドとグリア細胞の新展開

成田 年, 鈴木 勉

星薬科大学薬品毒性学教室

A new turn of research for opioid and glial cell

Minoru Narita, Tsutomu Suzuki

Department of Toxicology,

Hoshi University School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tokyo Japan

Summary: A recent new insight into the physiology of astrocytes has emerged, leading to a different view of its role in the CNS, i.e., “Active regulation of neuronal function”. Here we show that morphine induced a significant increase in intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in cortical neuron/glia cocultures using a Ca^{2+} imaging technique, whereas morphine had no such effect in purified astrocytes. Three days treatment of cortical neuron/glia cocultures with morphine caused the activation of astrocytes, as detected by a stellate morphology and an increase in glial fibrillary acid protein (GFAP). These effects were reversed by coculture with a specific protein kinase C (PKC) inhibitor, suggesting that PKC may be implicated in these events. Furthermore, the level of GFAP immunoreactivity in the cingulate gyrus and the dorsal horn of the spinal cord were clearly increased by repeated *in vivo* treatment with morphine. A deletion of a neuronal PKC isoform, $\text{PKC}\gamma$, gene revealed a dramatic suppression of these changes. These results constitute the direct evidence that morphine-induced astrocytic activation results from the stimulation of the neuronal PKC in the central nervous system. This communication between neuron and glia may be implicated in the morphine-induced synaptic plasticity.

緒言

中枢神経系は、神経細胞とグリア細胞で構成されている。長らくグリア細胞は神経系の構築、細胞外液の恒常性維持、血液脳関門の形成など、神経細胞の円滑な働きを保持するための環境を整えていると考えられていた。しかしながら近年、グリア細胞の積極的な神経機能制御に関する

報告が相次ぎ、グリア細胞の脳、脊髄内での生理的意義が注目されるようになってきている。特にアストロサイトは、ほぼすべてのシナプスを取り囲み、多種の神経伝達物質に応答し、様々な生理活性物質を放出することにより脳機能の発現、さらにはシナプス可塑性に関与することが報告されている¹⁾。そこで本研究では、morphine の情報伝達におけるアスト

ロサイトの生理的役割を解明する目的で、morphine による神経およびアストロサイトの細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を Ca^{2+} イメージング法によって解析した。また、morphine 精神依存および鎮痛耐性形成時の脳、脊髄内におけるアストロサイトの変化を免疫組織学的に検討した。

実験方法

本研究では、ラット新生仔ラット大脳皮質由来神経・グリア共培養細胞および初代培養アストロサイトに morphine を処置することにより引き起こされる細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の変化を fluo-3 AM を用いた共焦点レーザー顕微鏡法に従い測定することで、morphine によるアストロサイトへの情報伝達の有無を検討した。また、morphine 精神依存および鎮痛耐性形成時の脳、脊髄内におけるアストロサイトの変化をアストロサイトのマーカーである glia fibrillary acidic protein (GFAP) の特異的抗体を使用し、免疫組織化学染色法より機能形態学的に検討した。

結果および考察

Fluo-3 AM を取り込ませた神経・グリア共培養細胞においては morphine 刺激により一過性の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が惹起された。しかしながら、アストロサイト単独の初代培養細胞においては、morphine 刺激による Ca^{2+} 応答は認められなかった。また、大脳皮質由来神経・グリア共培養細胞および初代培養アストロサイトに morphine を 3 日間処置し、control と比較したところ、ア

ストロサイト単独の培養細胞には形態変化が認められないものの、神経・グリア共培養細胞においては、アストロサイトの著明な活性化が認められた。また、この反応は選択的 PKC 阻害薬により抑制された。以上のことから morphine はアストロサイトに直接的に作用せず、神経細胞膜上の opioid 受容体を刺激することにより、PKC 依存的にアストロサイトを活性化する可能性が考えられる。

次に morphine 精神依存の形成に脳内アストロサイトが関与しているか否かを検討するために、conditioned place preference (CPP) 法を用いて morphine 報酬効果が獲得されたことを確認したマウスの脳凍結切片を用いて、帯状回におけるアストロサイトの変化を検討した。その結果、control 群と比較し、morphine 群において著しい GFAP 陽性細胞の増加が認められた。これらのことから、morphine 精神依存の形成に脳内アストロサイトの活性化が関与している可能性が示唆された。また、当教室において脊髄内の疼痛発現に関与する laminae II の内層に高濃度に局在する PKC γ isoform が、opioid 受容体の脱感作現象や鎮痛耐性を制御している重要な要因である可能性を示唆している^{2,3)}。そこで、PKC γ knockout マウスおよびその wild-type マウスに morphine を慢性処置し、GFAP 抗体を用いてアストロサイトの変化を検討した。その結果、wild-type マウスでは、morphine 慢性処置によるアストロサイトの著明な形態変化およびその増殖が認められたのに対し、PKC γ knockout マウスでは morphine 慢性処置によるアストロサイトの形態変化は認められなかった。これらの結果から morphine 鎮痛耐性形成に、脊髄後角の神経細胞

に由来する PKC γ の活性に依存したアストロサイトの著しい形態変化が一部関与している可能性が示唆された。

以上、本研究の結果より、morphine 慢性暴露によりアストロサイトの星状化が誘導されるが、こうした反応は神経細胞に由来する PKC γ の活性化に依存していることが明らかとなった。また、このようなアストロサイトの形態変化や増殖が、morphine による神経可塑の発現に一部関与している可能性が示唆された。

引用文献

- 1) Fields RD, Stevens-Graham B. (2002) New insights into neuron-glia communication. *Science* 298:556-562.
- 2) Narita M, Mizoguchi H, Narita M., Suzuki T, Narita M, Dun N J, Imai S, Yajima Y, Nagase H, Suzuki T, Tseng LF (2001) Enhanced μ -opioid responses in the spinal cord of mice lacking protein kinase C γ isoform. *J Biol Chem* 27:15409-15414.
- 3) Narita M, Mizoguchi H, Narita M, Nagase H, Suzuki T, Tseng LF (2001) Involvement of spinal protein kinase C γ in the attenuation of opioid μ -receptor mediated G-protein activation after chronic intrathecal administration of [D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol⁵] enkephalin (DAMGO). *J Neurosci* 11:3715-3721.

オピオイドへの医療薬学的アプローチ

平井みどり¹⁾, 沼田千賀子¹⁾, 山上友子¹⁾, 八木敬子¹⁾, 寺岡麗子²⁾, 松田芳久²⁾, 安保博文³⁾
神戸薬科大学臨床薬学研究室¹⁾, 製剤学研究室²⁾, 国家公務員共済六甲病院³⁾

Pharmaceutical approach to opioids

Midori Hirai¹⁾, Chikako Numata¹⁾, Tomoko Yamakami¹⁾, Keiko Yagi¹⁾, Reiko Teraoka²⁾,
Yoshihisa Matsuda²⁾, Hirofumi Abo³⁾
Department of Clinical Pharmacy¹⁾ and Department of Pharmaceutical Technology²⁾,
Kobe Pharmaceutical University, Rokko Hospital³⁾

Summary: We investigated the use of opioids and their blood concentration in cancer patients and the genotype of P-glycoprotein and investigated the relationship between these factors. It has been suggested that P-glycoprotein is involved in the appearance of side-effects in morphine and the transport of morphine across the blood-brain barrier. Our findings indicated a possible correlation between mutation in P-glycoprotein and the appearance of side effects. We also measured the amount of residual drug remaining in discarded units of a newly released opioid preparation in patch form (product name Durotep patch) and explored the relationship between drug absorption efficiency and analgesic effect. We found that the average percentage of drug remaining was 41 ~ 58%; in study of nine patients who applied the patch product frequently, standard deviation was 6.8 ~ 13.1%. This demonstrated that the release of the drug was relatively stable and that fluctuations in the analgesic effect depended on factors other than absorption rate. Additionally, we used a questionnaire on the use of opioid patch preparations completed by medical professionals to consider the potential role of pharmacists in the appropriate use of opioids.

緒言

がん末期の疼痛をコントロールするために、様々なオピオイド製剤が市販されている。その中でもモルヒネは古くから臨床使用されており、また安価で手に入りやすいことから、使用頻度が最も高い。しかし、モルヒネの効果や副作用は極めて個人差が大きく、その理由に関する十分な説明

は未だなされていない。血液脳関門で発現している P-糖蛋白質は、モルヒネを輸送することが示されており¹⁾、一方で P-糖蛋白質に遺伝多型が存在することが明らかになった²⁾。このように個人差の指標となるなんらかの予測方法があれば、投与計画が容易になり、オピオイドの使用経験が少ない場合でも、適正使用が推進できると考えられる。また、昨年我が国では初めての貼付型オピオ

イド製剤が発売されたが、使用経験の浅い薬剤については、様々な問題点が予想されるため、情報収集が必要である。以上のことから、我々は緩和ケア病棟におけるモルヒネの使用状況を調査し、同意の得られた患者について、モルヒネの血中濃度と P-糖蛋白質の遺伝多型を検討した。また、貼付型オピオイド製剤(フェンタニル貼付薬：商品名デュロテップパッチ)の使用に関する医療従事者へのアンケートと、使用している患者の使用状況及び薬剤の放出効率を検討した。

方 法

カルテ調査：六甲病院緩和ケア病棟および協和病院において、モルヒネ投与により疼痛緩和治療を実施している患者 18 名に関し、カルテ調査により患者情報、診断名、主訴、患者状態、および投薬スケジュールを調査した。また十分な説明を行い同意を得た上で、採血を行った血液の一部をモルヒネ血中濃度測定および P-糖蛋白質遺伝多型の決定に用いた。

アンケート：フェンタニル貼付薬使用経験があり、同意の得られた医療施設に、アンケート用紙を送付し、フェンタニル貼付薬の使用印象等に関して医師、看護師、薬剤師による回答を得た。

実験方法：患者血液サンプルの血清を用いて、HPLC によるモルヒネ及び代謝物(M-3-G, M-6-G)の測定を行った。また全血より白血球を分離し、DNA を抽出後、PCR-RFLP 法により P-糖蛋白質遺伝子の変異(C3435T)を検出した。使用済みパッチよりフェンタニルを抽出し、HPLC にて定量した。

結 果

カルテ調査による効果・副作用状況把握と、血中濃度および P-糖蛋白質遺伝多型

モルヒネの投与量は、患者の訴えに従って変更が激しい。また、モルヒネ及び代謝物の血中濃度は個人差が大きく、検出限界以下の症例もあり、一定の傾向は見出せなかった。P-糖蛋白質の遺伝子変異を検討したところ、健常者の比率とほぼ等しい分布が認められた。P-糖蛋白質のホモ型変異を持つ患者において、副作用が強度に出現する傾向が認められた。

フェンタニル貼付薬使用に関するアンケート

関西の 6 施設から、75 名の回答を得、うち有効回答 62 名に関して分析を行った。2002 年 9 月の時点では処方数の最も多い製剤は MS コンチンであり、次いでデュロテップパッチが用いられていた。フェンタニル貼付薬は使用に際し、効果の判断が難しく中止例も多いとの指摘があった。また 3 日ごとの交換を忘れる恐れも指摘された。しかし、全体としての印象は良く、適宜使って行きたいとの感想が得られた。一方、薬剤師の関与が少ないことも示された。

パッチからのフェンタニル放出効率と効果の相関

上記の結果にも示すように、貼付薬の効果判定が難しい理由は、パッチからの薬剤放出が変動するからではないかと考え、パッチ内の残存フェンタニルを測定した。結果的にはほぼ安定した放出が起こっており、増量に従って吸収量も増加することが明らかになった。また効果の個

人差は放出量の差を示すものではないことが示された。ただし、貼付する場所や手技によって放出量に変化し、効果の変動につながるものが予想された。

考 察

P-糖蛋白質の遺伝多型とモルヒネの副作用の関連性を検討したところ、ワイルド型7例およびヘテロ型9例は傾眠や便秘等の副作用は強く現れなかったが、ホモ型変異2例は両者とも嘔気・嘔吐や便秘といった、消化管副作用が強く現れた。P-糖蛋白質 exon 26 の 3435 位における変異は、P-糖蛋白質の低発現をもたらし、その結果腸管中や BBB でのモルヒネ及び代謝物の排泄が低下、副作用が増強したのではないかと推測された。但し症例数が少ないため、結論は今後の検討を待つ必要がある。

フェンタニル貼付薬発売後約半年の時点では、投与量の調節や効果判定に問題があるものの、パッチを使いたいと考える医療従事者が多かった。現在は貼付面をテープで隠すなどの方法で、投与量の微調整が可能になり、使いやすさと副作用の少なさを利点としてあげる医療従事者が増加している。がん末期の疼痛緩和にオピオイドの使用は一般的になりつつあるが、その際薬剤師の積極的な関与を推進する必要があると考える。

パッチからのフェンタニル放出は、残存量の平均が 41～58%と、ほぼ添付文書に添った結果が得られ、標準偏差も 10%程度とさほど変動は認められなかった。但し、在宅での貼付と入院中の貼付で、放出量に差が認められる例があった。また、胸部に貼付するよりも、脇や背中の方が安定して

放出されることが示された。がん末期の患者では、体重減少が甚だしく、従って肋骨の部分に貼付すると、密着性が低下するものと考えられる。これらの情報は、今後オピオイドを使用するにあたり、有用な知見となり得るものと考えられる。

引用文献

1. King M, Su W, Chang A, Zuckerman A, Pasternak GW. Transport of opioids from the brain to the periphery by P-glycoprotein: peripheral actions of central drugs. *Nat Neurosci.* 4:268-274, 2001
2. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, Johnen A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, Brinkmann U. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97: 3473-3478, 2000