

主 題 3

オピオイド研究の進歩と展望

3-1

癌細胞移植マウスにおける疼痛反応と癌細胞の増殖・転移に対する morphine の効果

○笹村 崇¹、中村恵暢¹、飯田優子¹、藤猪英樹²、村田 純²、
濟木育夫²、倉石 泰¹

¹富山医薬大・薬品作用、²同・病態生化

【緒言】

癌患者の80%は痛みを訴え、その多くは耐え難い痛みであるとされる。癌性疼痛の薬物治療は morphine が主軸である。ところが morphine には嘔気や便秘等の副作用があり、その投与を中止せざるを得ない場合もある。また、morphine は免疫機能の抑制作用の結果として癌細胞の増殖を促進するとの報告がある¹。Morphine に代わる副作用の少ない強力な鎮痛薬もない。これは、癌性疼痛の動物モデルがなかったことが原因の一つである。一方、最近、高用量の morphine 投与が末期癌患者に対して延命効果を引き起こすとの報告もある。この効果は癌細胞からの tumor necrosis factor- α 遊離の抑制が一因であるといわれる²。そこで、マウスの癌性疼痛モデルを確立し、疼痛反応を抑制する用量の morphine が癌細胞の増殖と転移に影響を及ぼすか検討した。

【実験方法】

実験には、雄性 C57BL/6 マウス (移植時 6 週齢) を使用した。メラノーマは同系マウス由来で肺への転移能の高い B16-BL6 細胞を使用した。この細胞をマウスの片側の後肢足蹠に 2×10^5 cells/mouse で皮下移植した。疼痛反応は、後肢輻射熱刺激法により測定した。すなわちマウスの後肢足蹠に一定強度の輻射熱を照射することで起こる逃避行動を疼痛反応の指標とし、その反応潜時を測定した。後肢の無毛部分の体積を plethysmography により測定し、移植した癌細胞の増殖能の指標とした。転移は肺転移結節数を指標とした。B16-BL6 細胞移植後 27 日目にマウスの後肢をエーテル麻酔下に大腿部から切除した。このとき、股関節付近のリンパ節に転移があれば、同様に切除した。その 14 日後、肺組織を摘出し Bouin's solution で固定し、転移結節数を実体顕微鏡下で計測した。

【結果】

1. B16-BL6 細胞移植による疼痛反応と細胞増殖

B16-BL6 細胞移植後、6 日目頃から疼痛反応の潜時が短縮し始め、7 日目にはそ

の短縮が反対側と比較して有意となり、その後 5-6 日間は比較的一定の反応潜時を示した。14 日目になると反応潜時がさらに短縮し始め、14 日目から再び一定の潜時を示した (図 1a)。後足の体積は、B16-BL6 細胞移植後、8 日目頃から緩やかに増加し始め、11 日目には反対側と比較して有意となり、その後は指数関数的に増加した (図 1b)。反対側および無処置の後足の潜時および体積は変化しなかった。

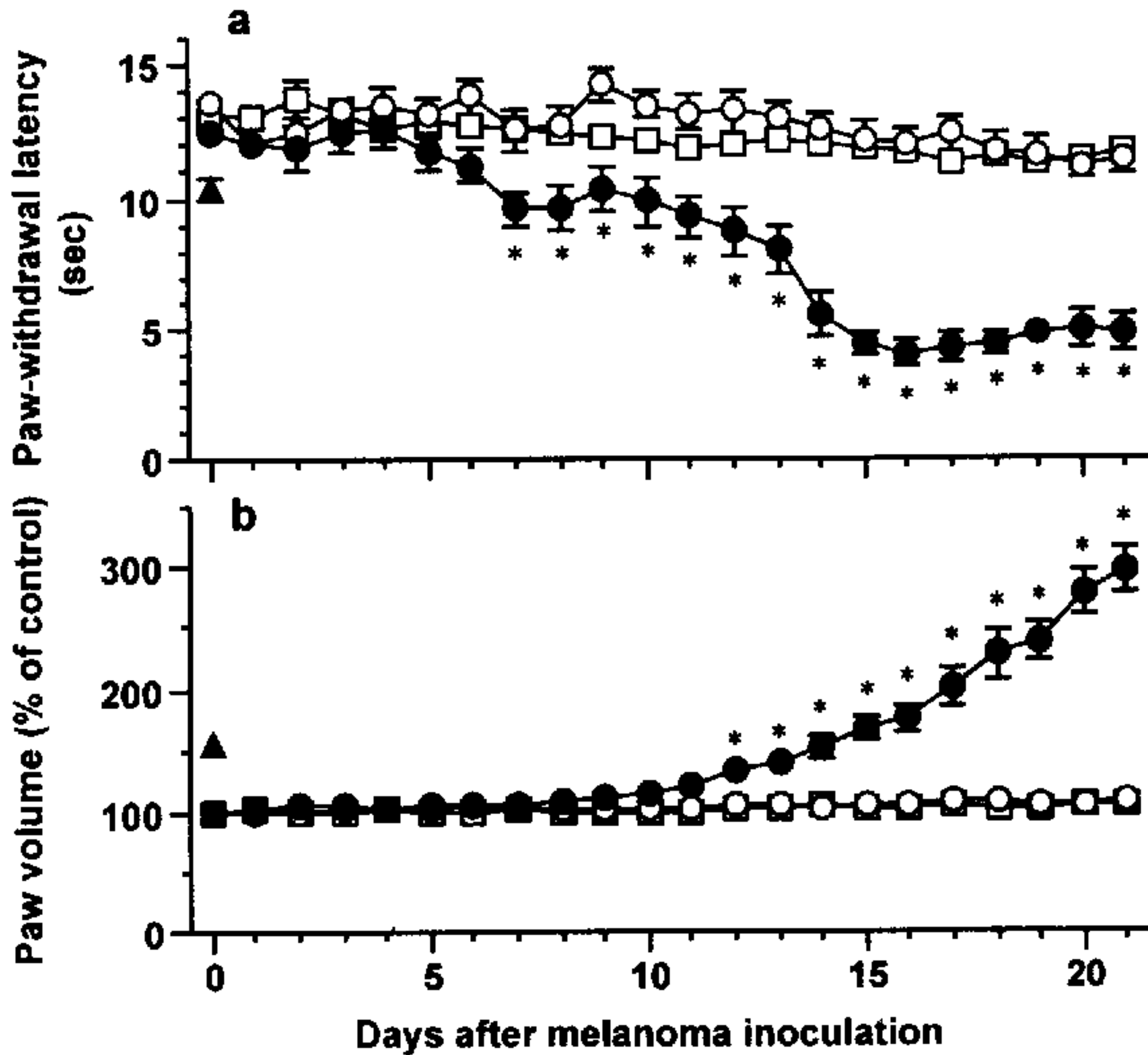


図 1 マウスの熱刺激に対する疼痛反応潜時 (a) と後肢の体積 (b) の B16-BL6 細胞移植による変化。

B16-BL6 細胞 (●) は、右足裏の皮下に移植した (days 0-18、 $n=8$; days 19-21、 $n=7$)。反対側には PBS (○) を投与した。無処置のマウスは □ ($n=5$) で示し、▲ は carrageenan 投与後 5 時間目の潜時を示す ($n=13$)。

結果は平均値と標準誤差で表した。* $p<0.05$ vs. ○ (Dunnett's test)

2. B16-BL6 細胞移植マウスの疼痛反応に対する morphine 単回投与の効果

B16-BL6 細胞移植マウスにおいて、疼痛反応の潜時が比較的軽度に短縮した移植後 8 日目と顕著に短縮した移植後 16 日目に、morphine の鎮痛効果を検討した。

Morphine は、短縮した潜時に対して用量依存的な鎮痛効果を示し、8 日目では 1mg/kg (図 2a)、16 日目では 5mg/kg (図 2b) の用量で健常値にまで回復させた。

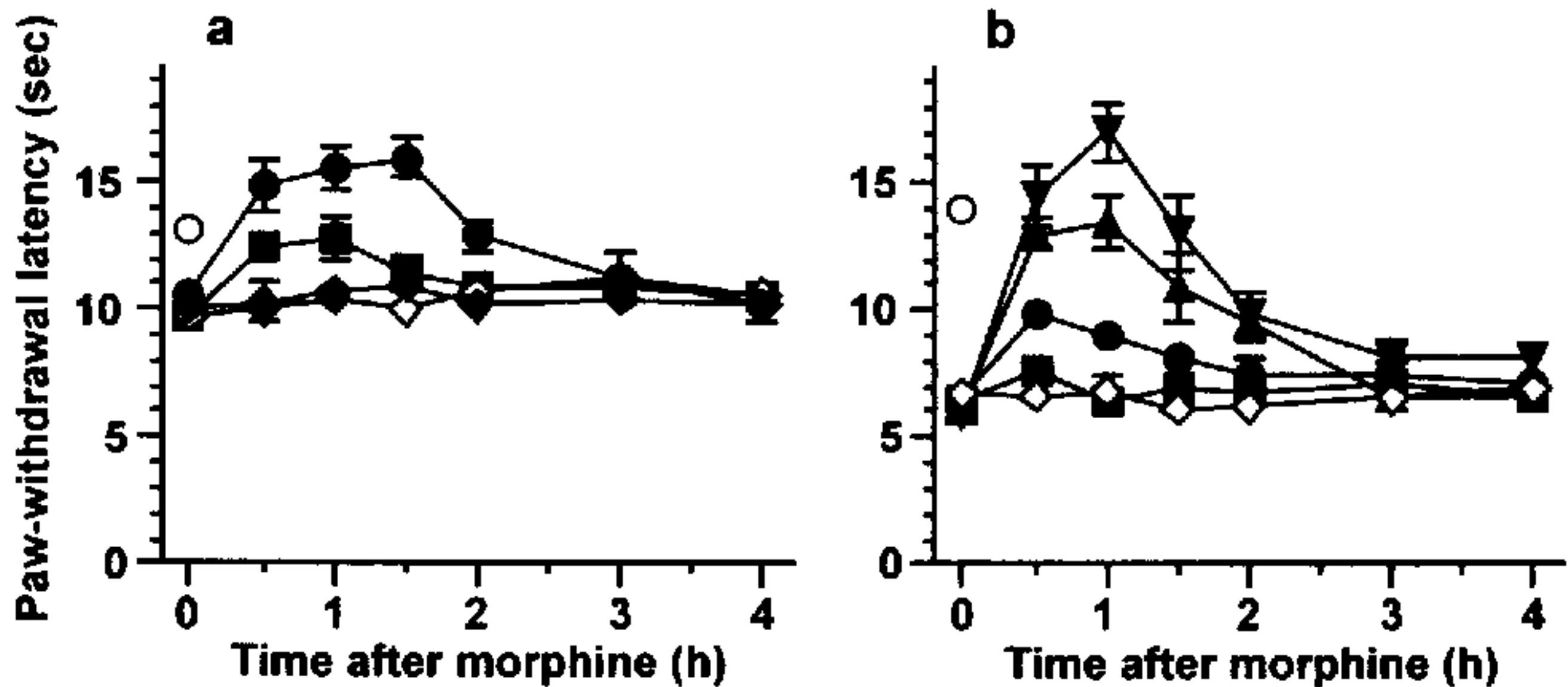


図 2 B16-BL6細胞移植マウスの疼痛反応に対する morphine 単回投与の効果。

a, 移植後 8 日目 ($n=7-8$); b, 移植後 16 日目 ($n=6$)。Morphine は 0.3 (◆)、1 (■)、3 (●)、5 (▲)、10 (▼) mg/kg の用量で皮下投与した。対照群 (◇) には生理食塩水を投与した。○は健常足の潜時を示す。結果は平均値と標準誤差で表した。有意差検定は、two-way RM-ANOVA により行った。 a, morphine の主効果, $F(3,26) = 9.75, p = 0.0002$; morphine と時間の交互作用, $F(18,156) = 6.22, p < 0.0001$ 。 b, morphine の主効果, $F(4,25) = 18.2, p < 0.0001$; morphine と時間の交互作用, $F(24,150) = 11.9, p < 0.0001$ 。

3. B16-BL6細胞移植マウスの疼痛反応に対する morphine 反復投与の効果

B16-BL6細胞移植後 16 日目から 21 日目まで morphine を反復投与し、その鎮痛効果を検討した。Morphine の効果は、単回投与時に反応潜時を健常値まで回復した 5mg/kg を 1 日に 1 回投与、5mg/kg を 1 日に 2 回投与、さらに健常値以上に延長した 10mg/kg を 1 日に 1 回投与した 3 群で比較した。5mg/kg、10mg/kg を 1 日に 1 回投与すると、5 日間鎮痛効果が持続したが、6 日目にはほとんど無効であった。一方、5mg/kg を 1 日に 2 回投与すると、3 日目から鎮痛効果が消失した。

4. Morphine の反復投与による癌細胞増殖と転移に対する効果

Morphine を反復投与し、後足の体積と肺転移に対する効果を検討した (図 3a)。どの morphine 投与群でも生理食塩水投与群と比較して有意に体積の増加が減少した。ただし、5 mg/kg を 1 日に 2 回投与した時の効果は最も軽度であった。肺転移

に対しても morphine 投与群は抑制効果を示し、やはり 5mg/kg を 1 日に 2 回投与した時の効果は比較的軽度であった (図 3b)。

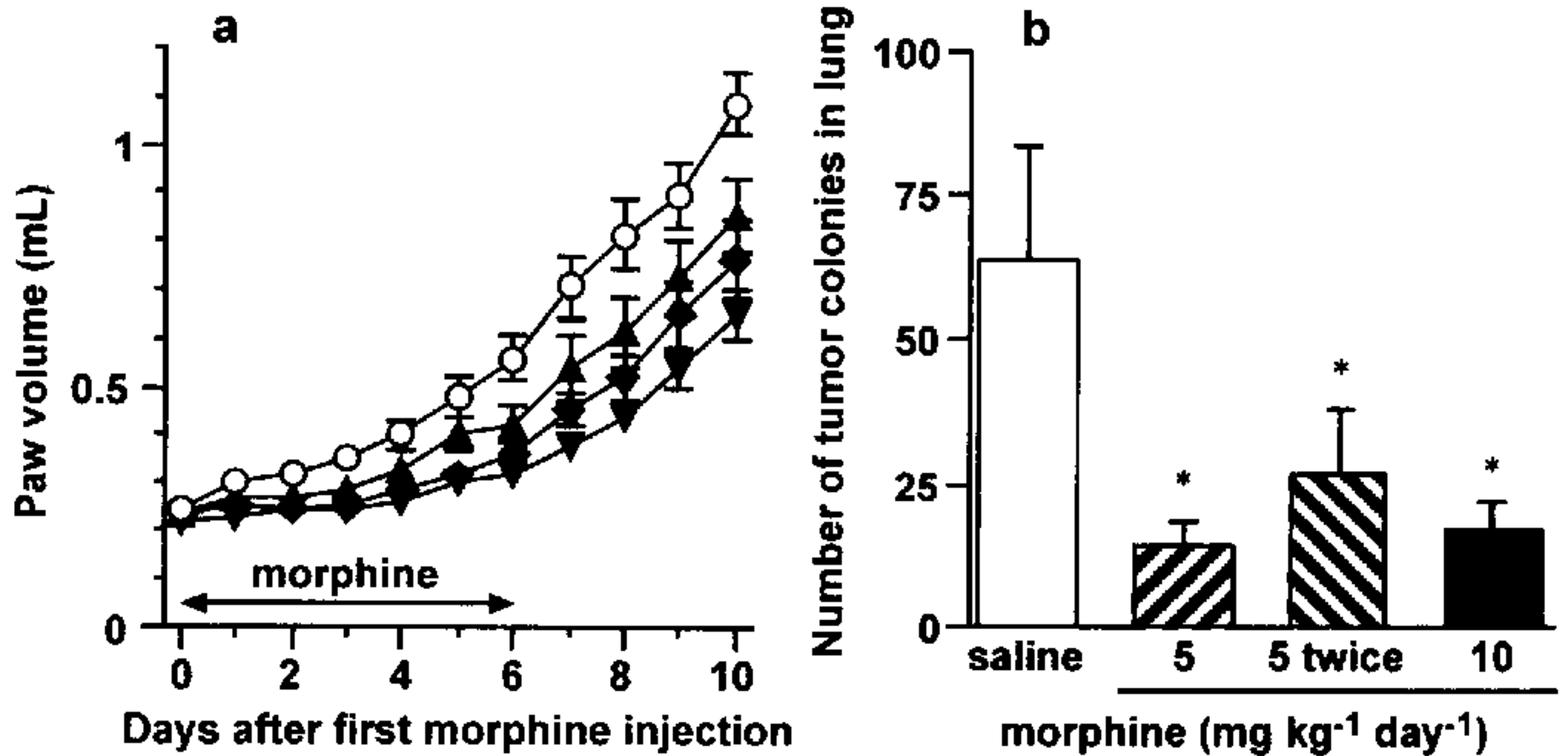


図3 B16-BL6 細胞移植マウスの細胞増殖と転移に対する morphine 反復投与の効果。

Morphine は移植後 16 日目から 6 日間皮下投与した。a は後肢の体積を示す。◆は 10mg/kg を 1 日 1 回、▼は 5mg/kg を 1 日 1 回、▲は 5mg/kg を 1 日 2 回投与した。対照群 (○) には生理食塩水を投与した。結果は平均値と標準誤差で表した。有意差検定は、two-way RM-ANOVA により行った。Morphine の主効果, $F(3,42) = 7.95, p = 0.0003$; morphine と時間の交互作用, $F(30,420) = 4.75, p < 0.0001$ 。b は肺における転移結節数を示す。結果は平均値と標準誤差で表した。* $p < 0.05$ vs. saline (Dunnett's test)。

5. 感覚神経の切除による癌細胞増殖と転移に対する効果

B16-BL6 細胞移植後 16 日目に同側の坐骨神経を切除し、癌による痛みが除去されたことを確認した上で、癌細胞の増殖と転移に変化が生じるか検討した。坐骨神経の切除によって癌細胞の増殖、転移ともに抑制された。

【考察】

B16-BL6細胞をマウス後肢足趾に皮下移植すると熱刺激に対する疼痛反応の潜時が短縮した。その時間変化は 2 相性の様相を呈し、特に潜時の短縮の程度が著しい第 2 相では carrageenan 誘発炎症による反応潜時の低下と比較して非常に大きい反応であった。また、このような疼痛反応の増大は morphine によって抑制されたこ

とから、このマウスが癌性疼痛のモデルになりうる可能性がある。B16-BL6 細胞移植後の後肢の体積は指数関数的に一樣に増加したことから、この変化は主に癌細胞の増殖に起因すると考えられる。しかしこの変化は熱刺激に対する疼痛反応の潜時の変化とは対応していなかった。増殖した癌細胞による周辺組織および一次求心線維終末の圧迫の疼痛反応増大への関与を否定するものではないが、これらが疼痛反応増大の主要な原因ではないと考えられる。第1相と第2相の疼痛反応増大は、現時点ではその発症機序が不明であるが、変化が一樣でなくその程度にも大きな相違があることから、主たる発症機序は互いに異なるものと推測される。

Morphine の 10mg/kg の 1日1回反復投与は、次第にその鎮痛効力を減弱し、6日目(第6回)投与では効果がほとんど消失した。5mg/kg の 1日1回反復投与も 10mg/kg と比較して若干効果が弱いものの効力減弱の時間変化は類似していた。一方、5mg/kg を 1日2回反復投与すると、1日1回反復投与と比較して鎮痛効果の減弱が急速であり、3日目の第6回投与でほとんど鎮痛効果が消失した。

Morphine は免疫機能を抑制することで癌細胞増殖を促進する報告がある。一方で、高用量の morphine の投与を受ける末期癌患者に延命効果があるとする報告がある。そこで本モデル系において鎮痛効果を示す適量の morphine を反復投与したときの移植側足の体積と転移を検討すると、morphine 投与群は体積、転移ともに抑制された。しかも、5mg/kg を 1日に2回投与した時の効果は、最も軽度であった。この結果は morphine の制癌効果の主な要因が癌細胞に対する直接作用ではないことを示唆する。ところで、この群は鎮痛効果の耐性が最も早く発現したことから、痛みの軽減が間接的に制癌効果を示す可能性があると考えた。そこで、B16-BL6 細胞移植部位を神経支配する一次求心線維を切除して、痛覚信号の脊髄への持続的な入力への遮断が足の体積と転移に影響するか検討した。坐骨神経を切除したマウスでは morphine 投与と同様に体積の増加と転移が抑制された。これらの結果を勘案すると、morphine の制癌作用の主要因が癌性疼痛の抑制である可能性がある。

このように、癌性疼痛モデルを作製することで痛みを抑制する用量の morphine が癌細胞増殖と転移を抑制することを明らかにした。また、この効果は morphine の癌細胞に対する直接作用ではなく、痛みを抑制することで現れる間接的な効果である可能性がある。本モデルは癌性疼痛の機序の検討やそれに対する鎮痛薬のスクリーニングに使用できるだけでなく、神経-免疫連関を探る研究への応用が期待できる。

【参考文献】

¹ Ishikawa M et al., *Biol. Pharm. Bull.* **16**, 762-766 (1993)

² Sueoka N et al., *Carcinogenesis* **17**, 2337-2341 (1996)

3-2

TRK-820の鎮痛作用におけるモルヒネとの相乗効果

○田中利明、泉本直樹、鈴木知比古、齊藤顕宣、
松浦博敏、川村邦明、遠藤孝、長瀬博

東レ株式会社 医薬研究所

【緒言】

オピオイド受容体は3つのタイプ μ 、 δ 、 κ に分類され、それぞれの受容体を介する薬理作用が精力的に研究されている。鎮痛作用を示す化合物として μ 受容体に作用するモルヒネやフェンタニルは臨床重要であるが、呼吸抑制、便秘、依存性といった好ましくない副作用も合わせ持っていることが知られている。一方、 κ 受容体に作用する化合物、例えばU-50488H、ICI-199441、CI-977などは動物試験において鎮痛作用を示し、 μ 受容体作動薬に見られる上記の副作用を持たないことが示されていた。しかし、これらの化合物は動物において嫌悪効果を発現させることや、ヒトにおいて、幻覚・妄想などの精神症状を発現させることが報告されている。

すでに我々は、メッセージアドレスの概念に基づきこれまでの化合物とは異なる構造を持つ κ 受容体作動薬 TRK-820 を設計／合成し、この化合物が動物試験において鎮痛作用を示す一方、薬物嫌悪性も選択性も示さない特徴を持つ化合物であることを報告してきた^{1, 2)}。

本報告においては、TRK-820の鎮痛作用についてさらに検討を加え、*in vivo*での受容体選択性およびモルヒネとの相互作用を検討したので報告する。

【結果および考察】

1. *in vivo*での受容体選択性

TRK-820の鎮痛作用に関わる受容体を明らかにするために、マウス

酢酸ライジング試験における種々の拮抗薬の効果を検討した（図1）。TRK-820（0.001～0.01mg/kg, s.c.）により用量依存的な鎮痛効果が得られ、その用量反応曲線はnor-BNI（20mg/kg, s.c.）前処置により右方向にシフトしたが、naloxone（0.3mg/kg, s.c.）では影響がなかった。また、NTI（3mg/kg, s.c.）でも影響がないことを確認した。従って、この試験系におけるTRK-820の作用は κ 受容体のみを介して発現していることが示唆された。また、モルヒネの場合にはnaloxoneのみで用量反応曲線がシフトし、 μ 受容体のみを介してその作用が発現していることが示唆された。

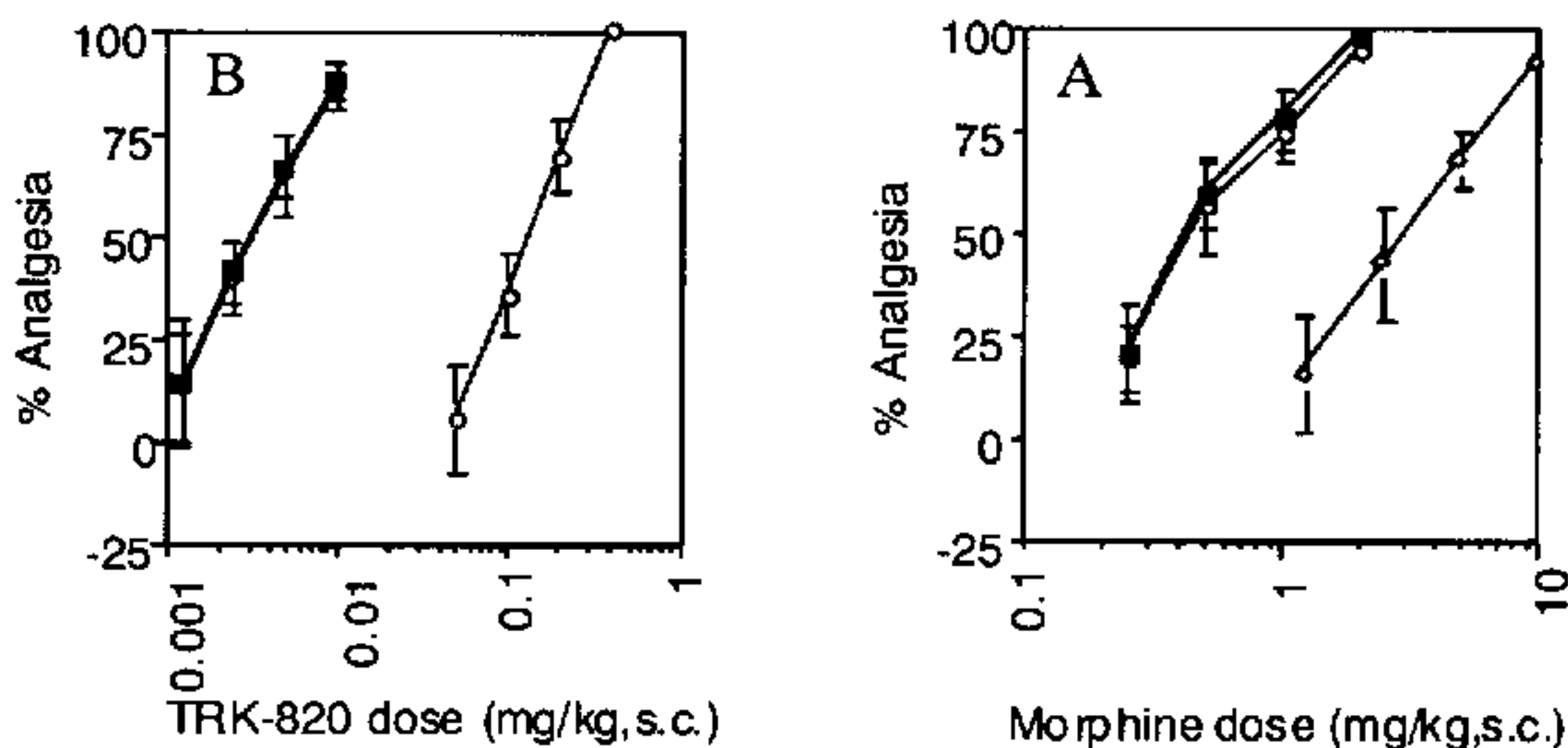


図1 A: TRK-820、B: モルヒネの鎮痛作用（酢酸ライジング試験）に対するNor-BNI、naloxoneの影響。■；作動薬のみ、○；nor-BNI処置、◇；naloxone処置を示す。

2. モルヒネの併用効果

TRK-820とモルヒネの併用効果について、酢酸ライジング試験で検討した。マウスにモルヒネを皮下投与、直後に単独で40%程度の鎮痛作用を示す用量のTRK-820（0.0025mg/kg, s.c.）または溶媒を皮下投与し酢酸ライジング試験を行った。その結果モルヒネの用量反応曲線は左上方向にシフトし、TRK-820とモルヒネが相加作用あるいは相乗作用を持つことが示唆された。

さらにこの作用が κ 受容体のみを介して発現していることを確認するためnor-BNI (20mg/kg, s.c.) 前処置した後、上記と同様の実験を行った。ただし、TRK-820の用量として0.03または0.003mg/kgを用いた。その結果、モルヒネの用量反応曲線は全くシフトしなかった。この結果は、前記の併用効果がTRK-820の κ 受容体を介する作用により発現していること、およびTRK-820が μ 受容体に対する拮抗作用を持たないことを示している。最近、in vitro のGTP- γ S 結合実験ではTRK-820が μ 受容体拮抗性を持つこと³⁾、cAMP産生抑制試験では μ 受容体部分作動性を持つこと⁴⁾が報告されているが、in vivo ではそのような作用は見られなかった。

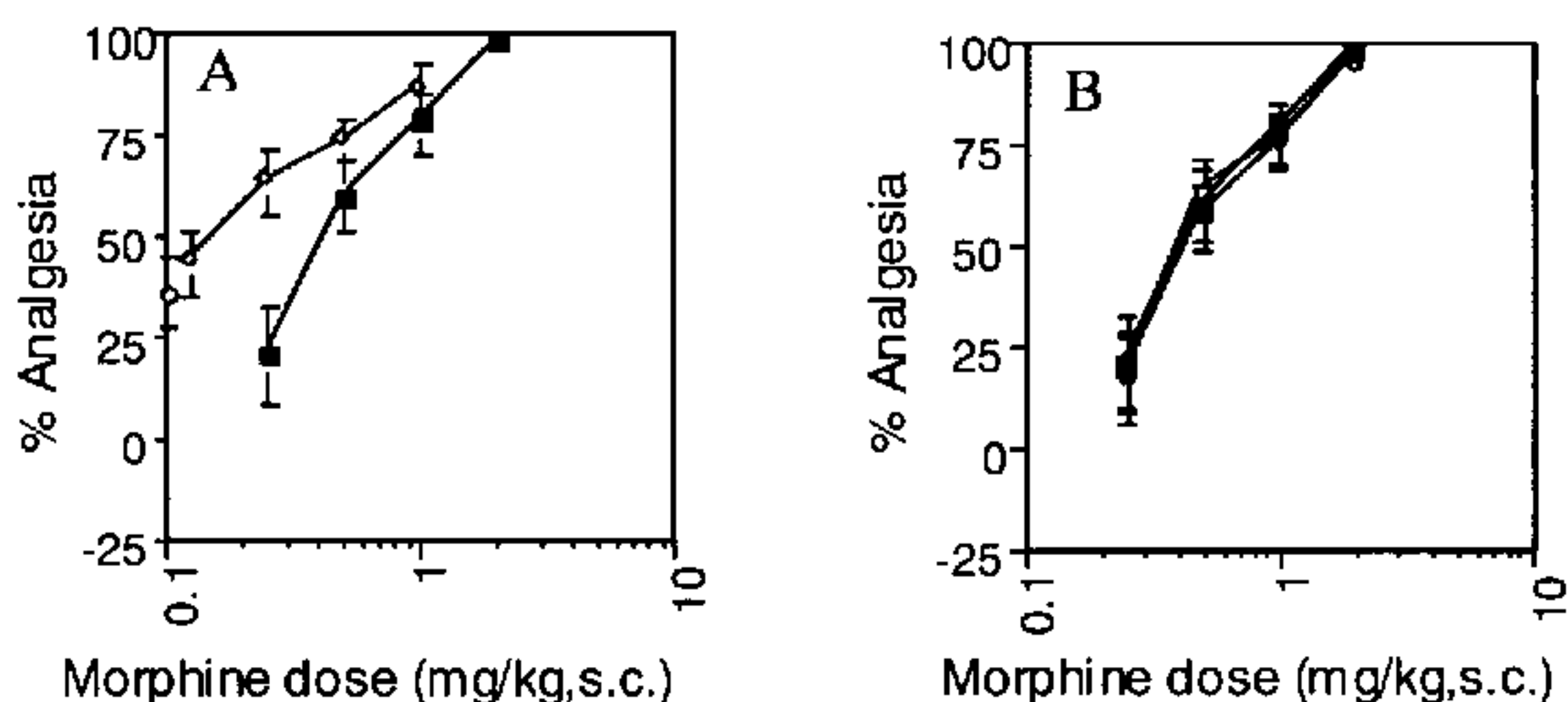


図2 A: 無処置マウスにおけるTRK-820とモルヒネとの併用効果。■; モルヒネのみ、◇; モルヒネ+TRK-820、○; 併用試験に用いたTRK-820のみ B: nor-BNI前処置マウスにおけるTRK-820とモルヒネとの併用効果。■; モルヒネのみ、◇; モルヒネ+TRK-820 (0.003mg/kg)、○; モルヒネ+TRK-820 (0.03mg/kg)

3. イソボログラフによる検討

TRK-820とモルヒネとの併用効果をさらに詳しく解析するため、イソボログラフによる検討を行った。モルヒネまたはTRK-820それぞれ単独投与時のED50値を1として1:1、3:1、1:3の比率で混合した様々な濃度の溶液を投与し、ED50値を与える各化合物の用量を求めた。得

られたED50値について、縦軸にTRK-820濃度、横軸にモルヒネ濃度を取ったグラフ上にプロットしたところ、TRK-820およびモルヒネのED50値を結ぶ直線上あるいは内側にプロットされた。この結果は、TRK-820とモルヒネの併用効果が相加あるいは相乗作用であることを示唆している。

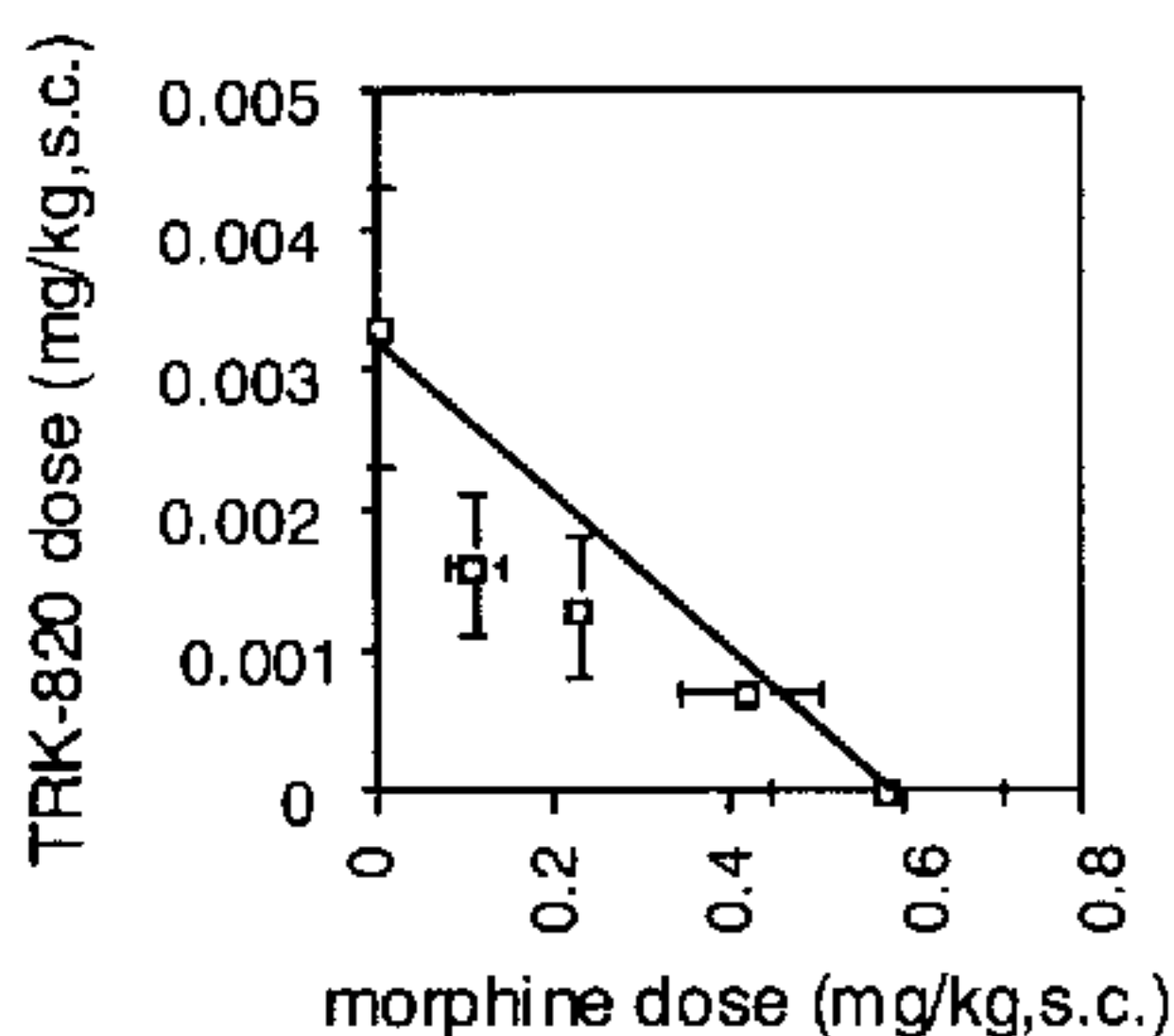


図3 TRK-820とモルヒネの併用効果について、イソボログラフによる解析

【結論】

TRK-820は *in vitro* での受容体選択性試験結果と同様、*in vivo* においても κ 受容体選択的に作用を発現していることが明らかとなった。さらに、モルヒネと併用した場合に、相加あるいは相乗作用を持つことが示され、GTP- γ S 結合実験で示唆されたような μ 拮抗性は認められなかった。これらの結果は、TRK-820が鎮痛薬として有用な化合物であることを示唆している。

引用文献

- 1) Nagase, H. et al. Chem. Pharm. Bull. 46, 366 (1998)
- 2) 鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム講演要旨、p80 1997年
- 3) DeHaven et al. 28th Annual Meeting, Soc. Neurosci. Abst. 24, 889 (1998)
- 4) Seki et al. Eur. J. Pharmacol. in press

3-3

アンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドのオピオイド受容体 mRNA 量に対する効果

○吉川正信、小林広幸、北村 憲、小林智美、
安藤英祐¹、矢野 広¹、牧山 恵²、竹山和秀³、
高谷哲夫³、岩尾佳代子、岡 哲雄
東海大学医学部薬理学教室、¹精神科学教室、
³麻酔科学教室、²開発工学部生物工学科

[緒言]

μ-オピオイド受容体 (MOR) mRNA に対するアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチド (AS ODN) 10 μg を、ラット脳のPAG (periaqueductal gray) に投与後、3、6、12、24、48、および72時間目に断頭し、RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) 法で PAG の MOR mRNA 量を測定すると、12時間目のみに有意な減少が認められた。また、MOR AS ODN 10 μg を48時間毎に3回 PAG に投与し、最終投与後上記と同じ時間目に断頭し、PAG の MOR mRNA 量を測定すると、6、12、および24時間目に有意な減少が認められた。なお、AS ODN 1回投与後12時間目の mRNA 量減少の程度に比べ、AS ODN を3回投与し、最終投与後の12時間目の mRNA 量の減少の程度の方が大きかった。すなわち、MOR AS ODN の MOR mRNA 量減少効果は、可逆的であること、および、反復投与により大きくなることなどが先回の私達の実験により明らかにされた。なお、MOR AS ODN 10 μg を48時間毎に3回投与し、最終投与後24時間目に PAG の κ-オピオイド受容体 (KOR) および δ-オピオイド受容体 (DOR) などの mRNA 量を測定したが、いずれも有意な変化は認められなかった。また、MOR sense ODN 10 μg を48時間毎に3回投与し、最終投与後24時間目に MOR mRNA 量を測定したが、有意な変化は認められなかった。

すなわち、MOR AS ODN の特異性は高いことが示唆された。なお、私達は先に、MOR AS ODN を PAG に投与することにより、PAG に投与したモルヒネの抗侵害効果が減弱されることも報告した¹⁾。

今回は、MOR AS ODN の MOR mRNA 量減少効果が、反復投与により大きくなる機序を明らかにする目的で実験を行った。

[実験方法]

MOR 遺伝子に対する AS ODN は CGC CCC AGC CTC TTC CTC T を、DOR 遺伝子に対する AS ODN は AGA GGG CAC CAG TCC AT を、KOR 遺伝子に対する AS ODN は AAT CTC GAT GGG GGA CTC を用いた。これらの配列の特異性は、BLAST algorithm を用い GenBank で検索し確認した。なお、各 ODN はホスホロチオエート型を用いた。

体重 200 - 250 g の Wistar 系雄性ラットを、ペントバルビタール Na (40 mg/kg, i.p.) で麻酔後、脳定位固定装置を用い、Paxinos and Watson の脳図譜²⁾に従い、ガイドカニューレ (外径 0.55 mm、長さ 13 mm) を periaqueductal gray (PAG) (A, -6.7 mm; V, +4.0 mm; L, -0.6 mm) の 3 mm 上に挿入固定した。ODN (10 µg/µl of saline) あるいは生理的食塩液 (1 µl) を 2.5 µl/min の速度で、注射用カニューレ (外径 0.30 mm) を用い投与した。ODN あるいは生理的食塩液投与後一定時間目に 0.1 % プロモフェノールブルー (1 µl) を投与し、20 分後に染色される組織を摘出した。この組織より total RNA を抽出し、RT-PCR 法により各遺伝子発現量を測定した。PCR 産物は電気泳動後、ゲルより抽出し、DNA シーケンサーにより各遺伝子の配列を確認した。また、各サンプル間の cDNA 量の均一性を確認するため、ハウスキーピング遺伝子の glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いた。

[実験結果および考察]

1. DOR AS ODN 10 µg を PAG に 48 時間毎に 3 回投与し、最終投与後 24 時間目に断頭し、PAG の DOR、KOR、および MOR な

どの mRNA 量を測定した。その結果、DOR mRNA 量は有意に減少したが、KOR および MOR などの mRNA 量に有意な変化は認められなかった。すなわち、DOR AS ODN は、標的 mRNA 量のみを減少させる特異性の高い AS ODN であることが示唆された。

2. KOR AS ODN 10 μ g を PAG に 48 時間毎に 3 回投与し、最終投与後 24 時間目に断頭し、PAG の DOR、KOR、および MOR などの mRNA 量を測定した。その結果、KOR mRNA 量は有意に減少したが、DOR および MOR などの mRNA 量に有意な変化は認められなかった。すなわち、KOR AS ODN も、標的 mRNA 量のみを減少させる特異性の高い AS ODN であることが示唆された。

なお、前回の実験で、MOR AS ODN も MOR mRNA 量を有意に減少させるが、KOR および DOR などの mRNA 量に有意な変化を生じさせないことが示されているので、前回および今回私達が用いたオピオイド受容体の 3 つのタイプに対する AS ODN は、いずれも特異性が高いことが示唆された。

3. PAG に DOR AS ODN 10 μ g を投与後 48 時間目に、DOR AS ODN 10 μ g を投与し、その後 48 時間目に MOR AS ODN 10 μ g を投与した。MOR AS ODN 投与後 24 時間目に断頭し、MOR、KOR、および DOR などの mRNA 量を測定した。その結果、MOR mRNA 量は有意に減少したが、KOR および DOR などの mRNA 量に有意な減少は認められなかった。MOR AS ODN 10 μ g を 1 回のみ投与した場合、投与後 24 時間目の PAG の MOR mRNA 量は有意に減少しないことから、MOR AS ODN の MOR mRNA 量減少効果は、DOR AS ODN の前投与により増強されることが示唆された。

4. PAG に KOR AS ODN 10 μ g を投与後 48 時間目に、KOR AS ODN 10 μ g を投与し、その後 48 時間目に MOR AS ODN 10 μ g を投与した。MOR AS ODN 投与後 24 時間目に断頭し、MOR、KOR、および DOR などの mRNA 量を測定した。その結果、MOR mRNA 量は有意に減少したが、KOR および DOR などの mRNA 量に有意な減少は認められなかった。つまり、MOR AS ODN の MOR mRNA 量減少効果は、KOR AS ODN の前投与でも増強されること

が示唆された。

以上の実験結果は、MOR AS ODN の MOR mRNA 量減少効果の反復投与による増強は、MOR AS ODN → MOR AS ODN → MOR AS ODN の順に投与した場合にのみ認められるのではなく、DOR AS ODN → DOR AS ODN → MOR AS ODN の順に投与した場合、および KOR AS ODN → KOR AS ODN → MOR AS ODN の順に投与した場合でも認められることが明らかにされた。

この興味ある現象が現れる機序として、ODN による AS ODN の輸送に関連したタンパク質、あるいは RNase H などの誘導が考えられるが、現在のところ明らかでない。核酸を薬として投与する試みが今後増えることが予想されるが、核酸には、相補的結合に基づく主作用の発現以外に、種々の効果(副作用)が現れる可能性があることを今回の実験は示している。

[文献]

- 1) K. Kiatamura, M. Yoshikawa, T. Taniguchi, M. Kanai, K. Iwao, A. Hashimoto, and T. Oka : Duration of decrease in morphine-induced effects by an antisense oligodeoxynucleotides to the μ -opioid receptor mRNA. Japan. J. Pharmacol., 71, Suppl I 82P, 1996.
- 2) G. Paxinos and C. Watson : The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 2nd ed. Academic Press, New York, NY, USA, 1986.

3-4

内在性オピオイドペプチドの抗侵害効果に及ぼすペプチダーゼ阻害剤の効果

北村 憲、○金井昌之、赤堀一仁、中林 大、高橋
滋、矢野 広*、安藤英祐*、荒井美治、岩尾佳代子、
小林広幸、岡 哲雄
東海大学医学部薬理学教室、*精神科学教室

[緒言]

モルモットの脳の線条体、およびアウエルバッハ神経叢付き縦走筋などから調製した膜標本と、5種の内在性オピオイドペプチド—[Met⁵]-enkephalin (met-enk)、[Leu⁵]-enkephalin (leu-enk)、met-enk-Arg⁶-Phe⁷、met-enk-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸、および dynorphin A-(1-8) [dyn-(1-8)]—を、37 °Cで 60 分間 incubation 後、5種の親ペプチド、Tyr 含有ペプチドフラグメント (Tyr-Gly, Tyr-Gly-Gly など)、および Tyr などを HPLC-ECD (high-performance liquid chromatography combined with electrochemical detection) で分離、定量すると、5種の親ペプチドはいずれもほぼ完全に加水分解され消失した。しかし、3種のペプチダーゼ阻害剤—アマスタチン、ホスホラミドン、およびカプトプリル—各 1μM を共存させると、5種の内在性オピオイドペプチドの加水分解はいずれもほぼ完全に阻止された¹⁾⁻⁴⁾。また、5種のペプチドの加水分解は、どの2種のペプチダーゼ阻害剤の共存でも完全に阻止することはできなかつた。すなわち、5種の内在性オピオイドペプチドの加水分解に、3種のペプチダーゼ—アマスタチン感受性アミノペプチダーゼ (AsA)、ホスホラミドン感受性エンドペプチダーゼ-24.11 (EC3.4.24.11) (PsE)、およびカプトプリル感受性ジペプチジルカルボキシペプチダーゼ I (EC3.4.15.1) (CsD)—が重要な役割を演じていることが明らかにされた。なお、これら3種の膜結合性ペプチダーゼは、摘出標本を用いた実験で、オピオイド受容体の極めて近くと、その他の部位との間に、投与された met-enk の濃度勾配を作っていて、ペプチダーゼ阻害剤の投与によりその勾配が減少することが明らかにされた⁵⁾⁻⁷⁾。つまり、受容体の極めて近くと、そのほかの部位との間に濃度勾配が作れるほど3

種のペプチダーゼはいずれもオピオイド受容体の極めて近くに存在することが示唆された。このことから、3種のペプチダーゼはいずれも、5種の内在性オピオイドペプチドが、シナプス間隙に遊離されたのちの不活性化に、重要な役割を演じていることが示唆された。

私達はこれまでに、摘出標本における内在性オピオイドペプチドの効力が、3種のペプチダーゼ阻害剤により有意に大きくなることを報告した^{1)~9)}。そこで今回は、ラットの第3脳室に内在性オピオイドペプチドおよびペプチダーゼ阻害剤を投与し、抗侵害効果を検討したので報告する。

【実験方法】

体重 180 - 220 g の Wistar 系雄性ラットを用いた。ラットの第3脳室にステレンススチール製注射針（外径 0.30 mm）を挿入し固定後 5 - 7 日目に、注射針とインフュージョンポンプに装着した 50 μ l のマイクロシリンジをポリエチレンチューブでつなぎ、10 μ l/min の速度で薬を投与した。オピオイドペプチドを第3脳室に投与後 5、10、15、30、45、および 60 分目に、ラットの尾を 55 $^{\circ}$ C の温水に入れ、尾を振るまでの時間を測定した。また、cut-off time は 5 秒とした。なお、各ラットの tail-flick response は、薬を投与する前にも測定し、実験結果は %MPE (maximal possible effect) = [(test latency - baseline latency) / (5 - baseline latency)] \times 100 で表現した。また、必要に応じて実験結果は AUC (area under the curve) でも現わした。なお、前回の実験結果から、3種のペプチダーゼ阻害剤（アマスタチン、ホスホラミドン、およびカプトプリル）の投与量は各 10 nmol とし、オピオイドペプチドの投与 5 分前に投与した。

【実験結果及び考察】

1. ペプチダーゼ阻害剤非存在下では、100 nmol の dyn-(1-8) で tail-flick response はわずかに抑制された。また、3種のペプチダーゼ阻害剤のうちどの1種も、1種だけでは 100 nmol の dyn-(1-8) の効果を有意に大きくすることはできなかった。しかし、3種のペプチダーゼ阻害剤各 10 nmol を投与後に、1 nmol の dyn-(1-8) を投与した時の tail-flick response の抑制の程度は、阻害剤非存在下での 100 nmol の dyn-(1-8) による抑制の程度より、有意に大きかった。つまり、dyn-(1-8) の抗侵害効果は、3種のペプチダーゼ阻害剤が共存

すると、非存在時に比べ、100 倍以上大きくなることが明らかにされた。

2. 10 nmol の dyn-(1-8) による tail-flick response の抑制の程度は、3 種のペプチダーゼ阻害剤のうちどの 2 種の阻害剤共存下に比べ、3 種の阻害剤共存下の方が有意に大きかった。つまり、3 種のペプチダーゼのうち阻害されていないどの 1 つのペプチダーゼも dyn-(1-8) を不活性化し、その抗侵害効果を有意に減弱させることが明らかにされた。なお、10 nmol の dyn-(1-8) による tail-flick response の抑制の程度は、アマスタチンとホスホラミドン、あるいはホスホラミドンとカプトプリルの共存下に比べ、アマスタチンとカプトプリルの共存下の方が有意に大きかった。つまり、dyn-(1-8) の不活性化には、PsE に比べ、AsA および CsD などの方が大きく関与していることが示唆された。

3. 代表的 κ -アゴニストのケトサイクラゾシン、および代表的 δ -アゴニストの DPDPE ([D-Pen^{2,5}]-enkephalin) などでは、今回の方法による tail-flick response は抑制されなかった。つまり、今回の方法は、 μ -アゴニストの活性を検出していると思われた。また、naloxone による拮抗の程度も、dyn-(1-8) の tail-flick response の抑制は、 μ オピオイド受容体を介して現われていることを示唆した。なお、3 種のペプチダーゼ阻害剤共存下において tail-flick response の抑制の程度は、met-enk に比べ、dyn-(1-8) の方が有意に大きかった。つまり、内在性オピオイドペプチドのなかで、dyn-(1-8) は、 κ 受容体に対するアゴニスト活性が大きいものとしてよく知られているが、 μ 受容体に対するアゴニスト活性も大きいことが今回の実験で明らかにされた。

4. 3 種のペプチダーゼ阻害剤共存下での tail-flick response の抑制の程度の大きさは、met-enk-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸ > dyn-(1-8) > met-enk = met-enk-Arg⁶-Phe⁷ > leu-enk の順であることが示された。なお、これらの内在性オピオイドペプチドの効力はいずれも、3 種のペプチダーゼ阻害剤の共存により著しく大きくなることが示された。

以上の実験結果より、3 種のペプチダーゼ (AsA、PsE、および CsD) は、摘出標本と同様に脳においても、内在性オピオイドペプチドの不活性化に重要な役割を演じていることが明らかにされた。

文献

- 1) Hiranuma, T. and Oka, T.: Effects of peptidase inhibitors on the [Met⁵]-enkephalin hydrolysis in ileal and striatal preparations of guinea-pig: Almost complete protection of degradation by the combination of amastatin, captopril and thiorphan. *Jpn. J. Pharmacol.* 41: 437-446, 1986
- 2) Hiranuma, T., Iwao, K., Kitamura, K., Matsumiya, T. and Oka, T.: Almost complete protection from [Met⁵]-enkephalin-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸ (met-enk-RGL) hydrolysis in membrane preparations by the combination of amastatin, captopril and phosphoramidon. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 281: 769-774, 1997
- 3) Hiranuma, T., Kitamura, K., Taniguchi, T., Kanai, M., Arai, Y., Iwao, K. and Oka, T.: Protection against dynorphin-(1-8) hydrolysis in membrane preparations by the combination of amastatin, captopril and phosphoramidon. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 286: 863-869, 1998
- 4) Hiranuma, T., Kitamura, K., Taniguchi, T., Kobayashi, T., Tamaki, R., Kanai, M., Akahori, K., Iwao, K. and Oka, T.: Effects of three peptidase inhibitors, amastatin, captopril and phosphoramidon, on the hydrolysis of [Met⁵]-enkephalin-Arg⁶-Phe⁷ and other opioid peptides. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 357: 276-282, 1998
- 5) Aoki, K., Kajiwara, M. and Oka, T.: The role of bestatin-sensitive aminopeptidase, angiotensin converting enzyme and thiorphan-sensitive "enkephalinase" in the potency of enkephalins in the guinea-pig ileum. *Jpn. J. Pharmacol.* 36: 59-65, 1984
- 6) Aoki, K., Kajiwara, M. and Oka, T.: The inactivation of [Met⁵]-enkephalin by bestatin-sensitive aminopeptidase, captopril-sensitive peptidyl dipeptidase A and thiorphan-sensitive endopeptidase-24.11 in mouse vas deferens. *Jpn. J. Pharmacol.* 40 : 297-302, 1986
- 7) Cui, S., Kajiwara, M., Ishii, K., Aoki, K., Sakamoto, J., Matsumiya, T. and Oka, T.: The enhancing effects of amastatin, phosphoramidon and captopril on the potency of [Met⁵]-enkephalin in rat vas deferens. *Jpn. J. Pharmacol.* 42: 43-49, 1986
- 8) Numata, H., Hiranuma, T. and Oka, T.: Inactivation of dynorphin-(1-8) in isolated preparations by three peptidases. *Jpn. J. Pharmacol.* 47:

417-423, 1988

- 9) Oka, T., Aoki, K., Kajiwara, M., Ishii, K., Kuno, Y., Hiranuma, T. and Matsumiya, T.: Inactivation of [Leu⁵]-enkephalin in three isolated preparations: relative importance of aminopeptidase, endopeptidase-24.11 and peptidyl dipeptidase A. In: Holaday, J.W., Law, P.Y. and Herz, A. (eds) NIDA Research Monograph 75: Progress in Opioid Research. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C., pp 259-262, 1986
- 10) Taniguchi, T., Fan, X.-T., Kitamura, K. and Oka, T.: Effects of peptidase inhibitors on the enkephalin-induced anti-nociception in rats. Jpn. J. Pharmacol. 78: 487-492, 1998

3-5

モルヒネ禁断時のラット尾側中脳水道周囲灰白質プレプロエンケファリンmRNA増加における転写調節因子の役割

○福永優子、岸岡史郎、清水典史、深澤洋滋、宮本昌彦、
前田武彦、山本博之
和歌山県立医科大学 薬理学教室

緒言

転写調節因子であるcAMP response element binding protein (CREB)のノックアウトマウスでは、その野生型に比べモルヒネ慢性処置後に誘発される禁断症状が軽度であると報告されている(1)。また、それとは異なる転写調節因子AP-1を構成する蛋白c-Fosまたは c-fos mRNA が、モルヒネ禁断時に種々脳部位において増加することが報告されている(2、3)。このことから、モルヒネの依存形成または禁断発現に、これら転写調節因子が何らかの役割を果たしていると考えられる。一方我々は、モルヒネ禁断時に、ラット尾側中脳水道周囲灰白質 (PAG) の外側部から腹外側部にかけて、プレプロエンケファリンmRNA量が増加し(4、5)、この増加がCREB mRNAまたはc-Fos mRNAに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド処置(側脳室内投与)により抑制されることを明らかにした(6)。そこで本研究では、モルヒネ依存形成時および禁断発現時の尾側PAGにおけるCREB、リン酸化CREBおよびc-Fos陽性細胞数の変化を、免疫組織化学法を用いて検討した。

実験方法

実験にはSD系雄性ラットを使用した。実験1および2日目にモルヒネ

20mg/kg/dayを、3および4日目に30mg/kg/dayをそれぞれ1日2回に分割皮下投与し、5日目にモルヒネ30mg/kgを1回皮下投与した。モルヒネ最終投与24時間後、ナロキソン5mg/kg皮下投与により禁断を誘発した。ナロキソン投与4時間後に、ラットをペントバルビタールで麻酔し、4%パラホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝液にて灌流固定した。脳を摘出後、尾側PAGを含む凍結切片を作製の上、CREB、リン酸化CREBおよびc-Fosを免疫染色（streptavidin-biotin複合体法）し、腹外側部の陽性細胞数を計測した。免疫染色には、リン酸化CREBおよび非リン酸化CREBを認識する抗CREB抗体、リン酸化CREBを認識する抗リン酸化CREB抗体ならびにc-Fosを認識する抗c-Fos血清を用いた。

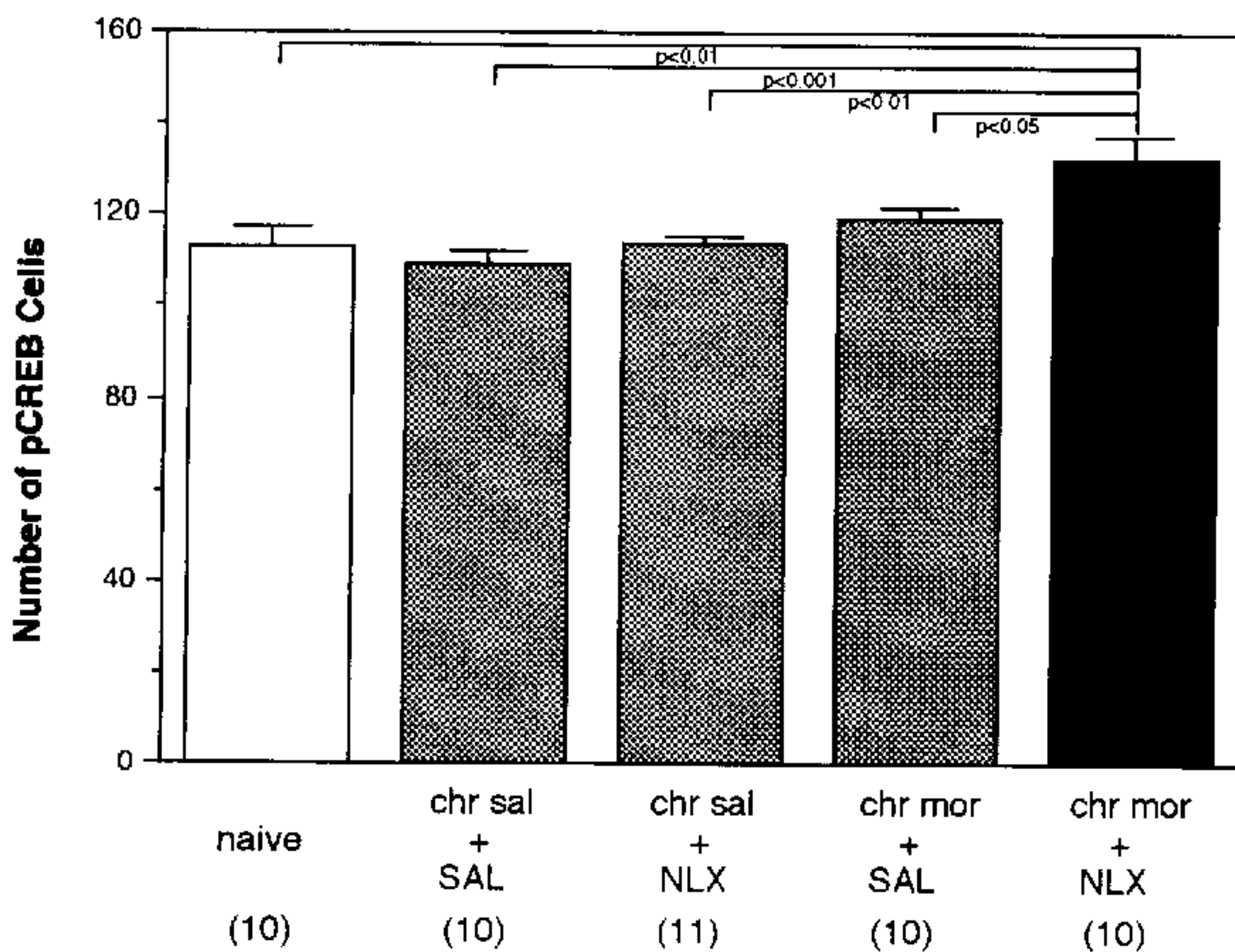


図1 モルヒネ禁断時の尾側中脳水道周囲灰白質腹外側部におけるリン酸化CREB(pCREB)陽性細胞数 ()内の数字は例数を示す。chr sal : chronic saline, chr mor : chronic morphine, SAL : saline, NLX : naloxone

結果および考察

免疫組織化学法により、CREB、リン酸化CREBおよびc-Fosは、いずれも核内に存在することを確認した。尾側PAGにおけるCREBおよびリン酸化CREB陽性細胞の分布は、背側部、外側部および腹外側部の区別なく均一であった。一方、c-Fos陽性細胞は、背側部および外側部では少なく、腹外側部に多く認められた。

CREBはリン酸化されると、CREB binding proteinと複合体を形成し、標的遺伝子の転写を促進することから、CREBのリン酸化レベルはCREBによる転写促進作用の指標になると考えられる。本実験では、尾側PAG腹外側部におけるリン酸化CREB陽性細胞数は、ナロキソン単独およびモルヒネ連投の影響を受けなかったが、モルヒネ連投後のナロキソン処置によるモルヒネ禁断により、無処置群と比べ有意に増加した(図1)。

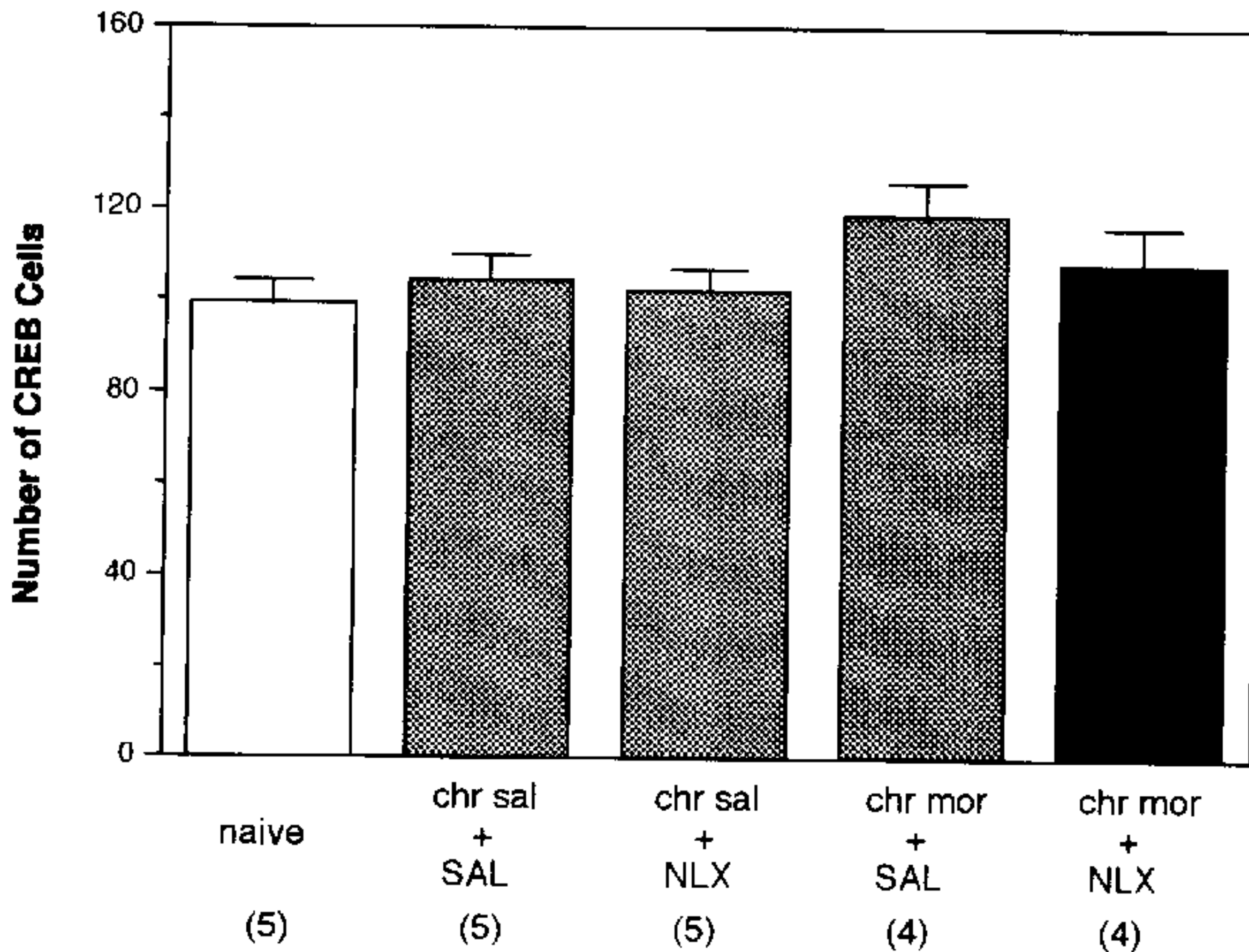


図2 モルヒネ禁断時の尾側中脳水道周囲灰白質腹外側部におけるCREB陽性細胞数 () 内の数字は例数を示す。chr sal : chronic saline, chr mor : chronic morphine, SAL : saline, NLX : naloxone

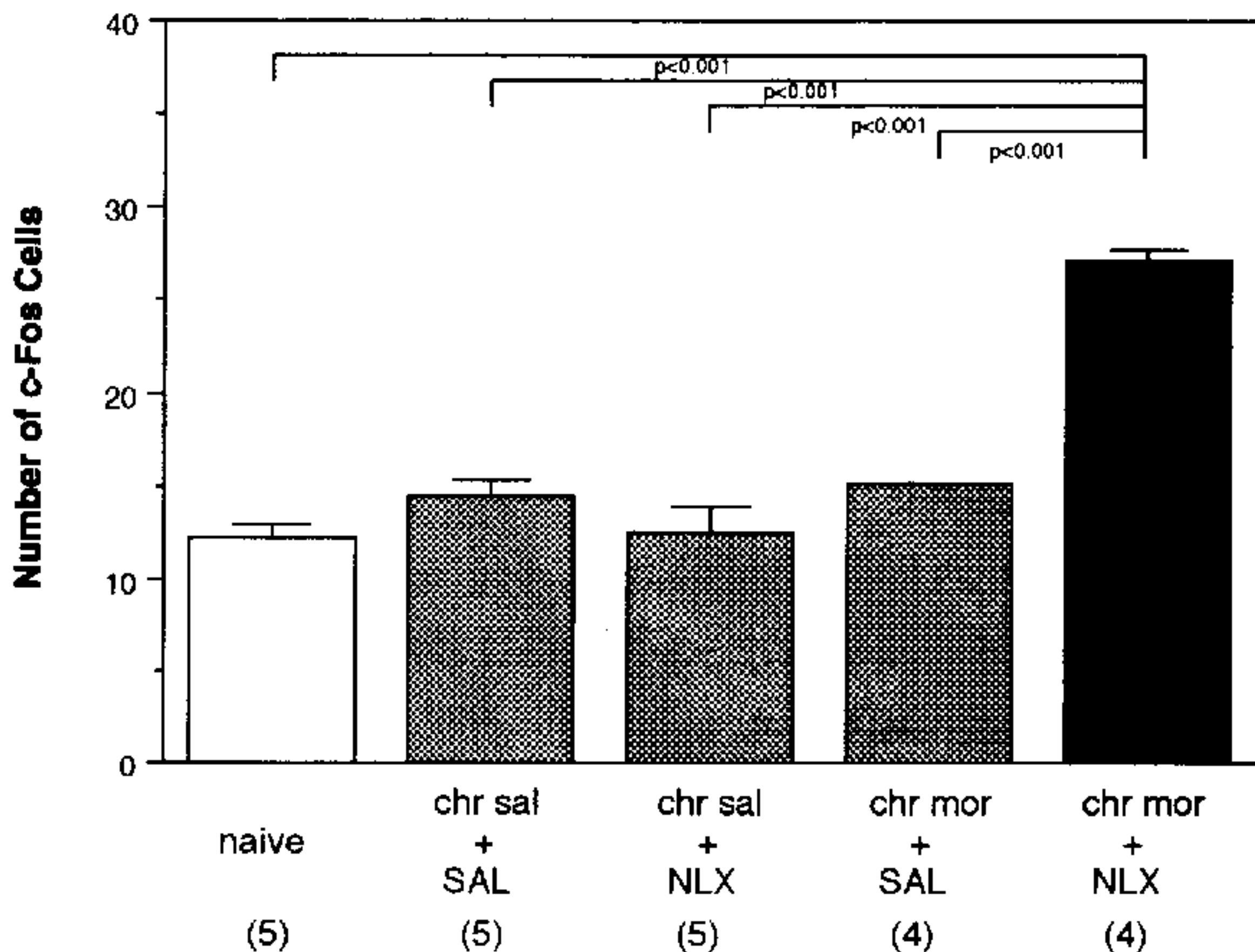


図3 モルヒネ禁断時の尾側中脳水道周囲灰白質腹外側部におけるc-Fos陽性細胞数 () 内の数字は例数を示す。chr sal : chronic saline, chr mor : chronic morphine, SAL : saline, NLX : naloxone

リン酸化CREBの増加がCREBの増加に起因するか否かを検討するため、尾側PAG腹外側部におけるCREB陽性細胞数を計測した(図2)。しかしCREB陽性細胞数は、ナロキソン単独、モルヒネ連投およびナロキソン誘発モルヒネ禁断の影響を受けなかった。我々は以前、ナロキソン誘発モルヒネ禁断時の尾側PAGプレプロエンケファリンmRNAの増加が、プロテインキナーゼA阻害薬の側脳室内投与により抑制されることを報告した(6)。プロテインキナーゼAがCREBのリン酸化に寄与することから、モルヒネ禁断時のプレプロエンケファリンmRNAの増加に、プロテインキナーゼAの活性化によるCREBのリン酸化の促進が関与する可能性が考えられる。

尾側PAG腹外側部におけるc-Fos陽性細胞数は、ナロキソン単独および

モルヒネ連投の影響を受けなかったが、ナロキソン誘発モルヒネ禁断により有意に増加した(図3)。しかし、ナロキソン誘発モルヒネ禁断によるPAG外側部でのc-Fos陽性細胞数の増加は明らかではなかった。モルヒネ禁断時のプレプロエンケファリンmRNAの増加は、PAG外側部から腹外側部にかけて認められることから(4、5)、PAG外側部ではなく腹外側部のプレプロエンケファリンmRNA発現にc-Fosが関与しているのかもしれない。

尾側PAGのリン酸化CREB陽性細胞数およびc-Fos陽性細胞数が、ナロキソン単独およびモルヒネ連投の影響を受けなかった本実験の結果は、尾側PAGプレプロエンケファリンmRNA量が、ナロキソン単独およびモルヒネ連投により増加しない(未発表データ)ことと一致した。

以上の結果より、モルヒネ禁断時の尾側PAGにおけるプレプロエンケファリンmRNA増加に、リン酸化CREBおよびc-Fosの増加が関与する可能性が示唆された。

参考文献

- 1 Maldonado, R., et al., *Science*, 273 (1996) 657-659
- 2 Beckman, A.M., et al., *Neuropharmacology*, 35 (1995) 1183-1189
- 3 Chieng, B., et al., *Neurosci. Lett.*, 183 (1995) 79-82
- 4 Fukunaga, Y., et al., *Mol. Brain Res.*, 42 (1996) 128-130
- 5 Fukunaga, Y., et al., *Mol. Brain Res.*, 55 (1998) 221-231
- 6 福永ら, 第19回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム講演要旨集(1998)12-16

3-6

(+)TAN-67 誘発侵害反応における各種 opioid 受容体作動薬の影響

○矢島義識¹、長瀬 博²、鈴木 勉¹

¹ 星薬大・薬品毒性、² 東レ・基礎研

【緒言】

近年、Nagase らにより高選択的非ペプチド性 δ -opioid 受容体作動薬 TAN-67 (2-methyl-4 α -(3-hydroxyphenyl)-1,2,3,4,4a,5,12,12 α -octahydro-quinolino [2,3,3-g] isoquinoline) が合成された (1)。この TAN-67 は、 δ -opioid 受容体に対して μ - および κ -opioid 受容体と比較して、それぞれ約 2000 倍および約 1600 倍以上の選択性を有しており、*in vitro* の実験においてもペプチド性 δ -opioid 受容体作動薬の DPDPE と同等かそれ以上の強いアゴニスト活性と選択性を有している (1)。しかしながら、*in vivo* では逆に TAN-67 の抗侵害作用は非常に弱く、その原因の一つに TAN-67 の光学活性が関与していることが最近報告されている (2)。すなわち、TAN-67 はラセミ体であり (-) 体をマウスに髄腔内投与すると δ_1 -opioid 受容体を介した抗侵害作用を発現するが、(+) 体では (-) 体とは逆に用量依存的に侵害反応が誘発される (2)。しかしながら、(+) TAN-67 の髄腔内投与により誘発される侵害反応と opioid 受容体との関係については検討されていない。そこで本研究では、(+)TAN-67 誘発侵害反応における各種 opioid 受容体作動薬の影響について検討した。

【実験方法】

実験には体重 22–25 g の ddY 系雄性マウスを使用し、髄腔内投与は Hylden と Wilcox の方法に準じ (3)、30 gauge の注射針と 25 μ L 用の Hamilton syringe を用いて行った。(+)TAN-67 を髄腔内投与して誘発される scratching、biting および licking 行動を仮性疼痛反応の指標とし、そのいずれかの行動を発現している持続時間を (+)TAN-67 の髄腔内投与 5 分後から 5 分間、透明アクリル製ケージ (20×13×10 cm) 内で single-blind 法に従って測定した。使用薬物は、 μ -opioid 受容体作動薬として morphine、 δ -opioid 受容体作動薬として (-)TAN-67、DPDPE および deltorphin II、 κ -opioid 受容体作動薬として U50,488H を用い、すべての薬物は (+)TAN-67 と同時に髄腔内投与した。なお、薬液の投与容量は 4 μ L/mouse とした。

【実験結果および考察】

(+)TAN-67 (3.75, 7.5 および 15.0 μ g/mouse) を髄腔内投与することにより、用量依存的で著明な侵害反応が誘発された。この侵害反応は、投与直後には認められず投与 4 分後ぐらいから約 1 時間ほど続く持続的な反応であった。(+)TAN-67 (15 μ g/mouse) 誘発侵害反応は、 δ_1 -opioid 受容体作動薬であり (+)TAN-67 の光学活性体である (-)TAN-67 (15 および 30 μ g/mouse) の同時投与により有意に抑制され、さらに他の δ_1 -opioid 受容体作動薬である DPDPE (3 および 10 nmol/mouse) および δ_2 -opioid 受容体作動薬 deltorphin II (3 および 6 nmol/mouse) の同時投与によっても用量依存的に抑制された。(+)TAN-67 は受容体結合実験により、 δ -opioid 受容体に対して非常に高い親和性を示し、GABA_A 受容体に対しては中程度の親和性を有することが確認されている (未発表データ)。最近、我々は (+)TAN-67 が δ -opioid 受容体の直接型逆作動薬として G 蛋白質活性を抑制することを見いだしている (未発表データ)。さらには第 72

回日本薬理学会年会で報告したように、(+)TAN-67 誘発侵害反応が GABA_A 受容体作動薬で抑制され、 GABA_A 受容体拮抗薬の髄腔内投与で (+)TAN-67 と類似した侵害反応が誘発される結果を得ている (4)。このことから、(+)TAN-67 が脊髄の GABA_A 受容体に対して、少なくとも部分的に拮抗して侵害反応を引き起こしている可能性が考えられる。以上の結果を加味すると、(+)TAN-67 で誘発される一連の侵害反応の発現には、脊髄の GABA_A 受容体に対する拮抗作用および δ -opioid 受容体に対する逆作動性が関与している可能性が考えられるが、この点についてはさらなる検討が必要であると思われる。

一方、(+)TAN-67 誘発侵害反応における脊髄の κ -opioid 受容体の関与を検討したところ、 κ -opioid 受容体作動薬 U50,488H (30 および 100 nmol/mouse) の同時投与により有意に抑制された。しかしながら、(+)TAN-67 誘発侵害反応は μ -opioid 受容体作動薬の morphine (0.3, 1.0 および 3.0 nmol/mouse) の同時投与では全く影響を受けなかった。本研究で用いた morphine (3.0 nmol/mouse) は、tail-flick 法において著明な抗侵害反応が観察された用量である。慢性疼痛モデルにおいて、 κ -opioid 受容体作動薬は疼痛を抑制するが、morphine は抑制しにくいことが報告されていることから (5)、本研究における結果は、(+)TAN-67 で誘発される侵害反応が、慢性疼痛時の状態に非常に類似した機構を有している可能性を示唆している。これは大変興味深い結果であり、今後多角的に (+)TAN-67 誘発侵害反応の機序を追求していくことにより、複雑な慢性疼痛機構を解明する手掛りになる可能性を十分に有していると考えられる。また今回の結果は従来の報告を強く支持するように、 κ -opioid 受容体作動薬の慢性疼痛治療薬としての有用性を間接的に示唆するものであると考えられる。

【引用文献】

1. T. Suzuki et al.: Effect of a highly selective nonpeptide δ opioid receptor agonist, TAN-67, on morphine-induced antinociception in mice. *Life Sci.* **57**, 155-168 (1995)
2. L. F. Tseng et al.: Delta-1 opioid receptor-mediated antinociceptive properties of a nonpeptidic delta opioid receptor agonist, (-)TAN-67, in the mouse spinal cord. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **280**, 600-605 (1997)
3. J. L. K. Hylden and G. L. Wilcox: Intrathecal morphine in mice: a new technique. *Eur. J. Pharmacol.* **67**, 313-316 (1980)
4. Y. Yajima et al.: Studies on drug dependence (Rept. 318): Role of the spinal GABA system in the (+)TAN-67-induced nociception. *Jpn. J. Pharmacol.* **79**, 65P (1999)
5. E. Eliav et al.: The kappa opioid agonist GR89696 blocks hyperalgesia and allodynia in rat models of peripheral neuritis and neuropathy. *Pain* **79**, 255-264 (1999)

3-7

疼痛およびオピオイド鎮痛発現機構における IP_3 ならびに protein kinase C (PKC) の関与

○成田 年^{1, 2)}、溝口 広一¹⁾、鈴木 勉²⁾、
長瀬 博^{1), 3)}、Leon F. Tseng¹⁾

1)ウイスコンシン医大・麻酔科、2)星薬大・
薬品毒性 3)東レ・基礎研

[緒言]

近年、慢性疼痛モデルなどにおける侵害反応発現に、プロテインキナーゼC (PKC) の活性化が関与している可能性が報告されている¹⁾。また、オピオイド鎮痛耐性発現にも PKC の活性化が関与していることが明らかになっている²⁾。一方、オピオイド作用発現において PKC カスケードの上流にあたる効果器としてのホスホリパーゼC (PLC)、ならびにこの一連のカスケードによって産生されるイノシトール3リン酸 (IP_3) の役割についても注目されはじめている。そこで本研究では、脊髄内 δ オピオイド受容体作動薬投与によって誘発される鎮痛作用ならびに慢性疼痛モデルにおける PKC カスケード系の関与について多角的な検討を行った。

[実験方法]

実験には主として体重 20-30 g の ICR 系雄性マウスを用いて行った。神経損傷性疼痛モデルには坐骨神経を強度に結紮した

動物を、また炎症性疼痛モデルにはアジュバンドを一側下肢足底に投与した動物をそれぞれのモデル動物として使用した。一方、 δ オピオイド作動薬である deltorphin II (DELT II) や PKC 阻害薬については、無麻酔下にて腰椎部位髄腔内へ投与した。

侵害刺激反応ならびに仮性疼痛反応の測定は、慢性疼痛モデルを使用した検討では thermal paw-stimulation (TPS) 法を、 δ オピオイド作動薬誘発鎮痛効果発現の検討には tail-flick (TF) 法をそれぞれ用いて行った。TPS は術後 24 時間ごとに 1 日 1 度施行し、TF は DELT II 投与後 10 分ですべての実験を行った。

[実験結果および考察]

坐骨神経を強度に結紮することにより、術後 24 時間で処置側の TPS 潜時は無処置側に対して有意に短縮し、その後 2 日目、3 日目と潜時は著明な短縮を続け、その効果は 4-7 日でピークに達した。また、この効果は 2 週間以上維持された。これらの現象に伴って、脊髄内の PKC γ 様免疫活性が無処置側に対し有意に増加した。そこで術前 10 - 20 分および各測定日の測定 1 時間前に髄腔内に PKC 阻害薬を投与し、TPS 潜時の変化を観察したところ、PKC 阻害薬処置によって TPS 潜時の短縮は著しく抑制された。アジュバンド投与群においても PKC 阻害薬処置によってわずかながら潜時短縮の回復傾向が見られたが、その回復効果は、坐骨神経モデルに比べ大変弱いものであった。以上の結果より、坐骨神経損傷に伴う慢性疼痛の発現には、脊髄内 PKC、特に PKC γ の活性化が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、炎症性疼痛モデルにおいては、神経損傷性疼痛モデルに比べ疼痛発現時に脊髄内 PKC の関与が希薄だったことから、神経損傷性疼痛と炎症性疼痛の発現機序の違いが推察できる。

PKC γ は脊髄後角の laminae II に限局しており、これらのことから坐骨神経損傷に伴う慢性疼痛の発現には、主として laminae II への異常入力による後角ニューロンの感作が起因している可能性が考えられる。

一方、DELT II の髄腔内投与によって用量依存的な TF 潜時の延長が観察され、この効果は PLC 阻害薬である neomycin, U-73122 および D-609 の髄腔内併用適用によってそれぞれ用量依存的に抑制された。また、受容体-G 蛋白結合型 PLC の典型的サブタイプである PLC β に対して高い親和性を示す阻害薬である ET-18-OCH $_3$ の併用適用によっても、DELT II 誘発鎮痛効果の著明な抑制が観察された。これらの結果は、脊髄 δ オピオイド受容体を介した鎮痛効果の発現に PLC、特に PLC β が関与していることを強く示唆するものである。

次に脊髄 δ オピオイド受容体を介した鎮痛効果の発現における PLC β の下流にあたる PKC ならびに IP $_3$ の関与を検討した。DELT II 誘発鎮痛効果は、LiCl の前処置によって IP $_3$ を枯渇させることによって有意に抑制され、この抑制効果は IP $_3$ を髄腔内に併用適用することによって完全に消失した。また DELT II 誘発鎮痛効果は細胞内 Ca $^{2+}$ ストアーの枯渇薬である thapsigargin の前処置によっても有意に抑制された。以上の結果より脊髄 δ オピオイド受容体を介した鎮痛効果の発現には、IP $_3$ 感受性の Ca $^{2+}$ ストアーからの Ca $^{2+}$ 動員が重要な役割を担っていることが明らかになった。

一方、PKC の阻害薬である calphostin C の併用適用による効果を検討したところ、低用量の calphostin C では DELT II 誘発鎮痛効果に有意な影響を及ぼさなかったものの、併用用量を増加することにより、DELT II 誘発鎮痛効果は有意かつ著明に増強した。

これに対しプロテインキナーゼ A の選択的阻害薬である KT5720 は DELT II 誘発鎮痛効果に全く影響を与えなかった。

以上の結果より、脊髄 δ オピオイド受容体-PLC β を介した反応は、そのカスケードにより IP $_3$ を産生し、同時に PKC 活性を高めるが、活性化された PKC は negative feedback の因子として δ オピオイド受容体活性を調節していく可能性が示唆された。

引用文献

- 1) J. S. Mogil and J. E. Grisel, Pain 77 (1998) 107-128
- 2) Narita et al., Br. J. Pharmacol. 118 (1996), 1829-1835

3-8

内因性enkephalin分解酵素阻害物質spinorphinのラット海馬およびマウス輸精管における作用

○小野秀樹 1、山崎貴信 1、高山仁子 1、本多基子 1、
山本行男 2、羽里忠彦 2

1 東京理大・薬・薬理、 2 東京都臨床研・分子腫瘍

緒言

痛みを調節する内因性のモルヒネ様物質として、脳よりenkephalinをはじめとする多数のオピオイドペプチドが見いだされてきた。enkephalinはenkephalin分解酵素により分解され、活性が消失する。enkephalinの分解を阻害する物質として多数の合成化合物が見いだされている。一方、羽里らは、enkephalinの分解酵素に対する阻害活性を指標として、ウシの脊髄よりenkephalinの分解を阻害するペプチド(LVVYPWT)を見だし、spinorphinと命名した(Nishimura and Hazato, 1993)。spinorphinは鎮痛作用、モルモット回腸縦走筋標本・マウス輸精管収縮抑制作用(西村ら、1993)、抗炎症作用(羽里ら、1996; Yamamoto et al., 1997, 1998)を示し、生体内における役割が注目される。

本研究においては、enkephalinがシナプス反応を増強することが知られるラット海馬スライス(Haas and Ryall, 1980)を用いて、spinorphinの神経系に対する作用を調べた。また、摘出マウス輸精管における経壁刺激収縮に対するspinorphinの作用も研究した。

実験方法

ラット海馬

5週齢のWistar系雄性ラットを麻酔後、脳を取り出し、厚さ400 μ mのスライスを作製した。スライスをチャンバーに移し、シャーフアー側枝を4-15sec毎に刺激し、CA1領域錐体細胞層から誘発電位を記録した。長期増強(LTP)を誘発する標本での刺激間隔は15secとし、LTP誘発のためのテタヌス刺激は100Hz、1秒間とした。EPSPから発生する活

動電位の振幅を測定した。

マウス輸精管

4-5週齢のddY系マウスの輸精管を摘出し、Krebs-Henseleit栄養液中に懸垂し、電気刺激により輸精管を収縮させた。電気刺激は0.5 msec duration, 20Hz, 10発とし、これを30sec毎に与えた。

結果および考察

ラット海馬

spinorphinは5secおよび4sec間隔の刺激において、活動電位に対して抑制作用を示した(図1)。この抑制はspinorphinの洗浄後も回復しなかった。

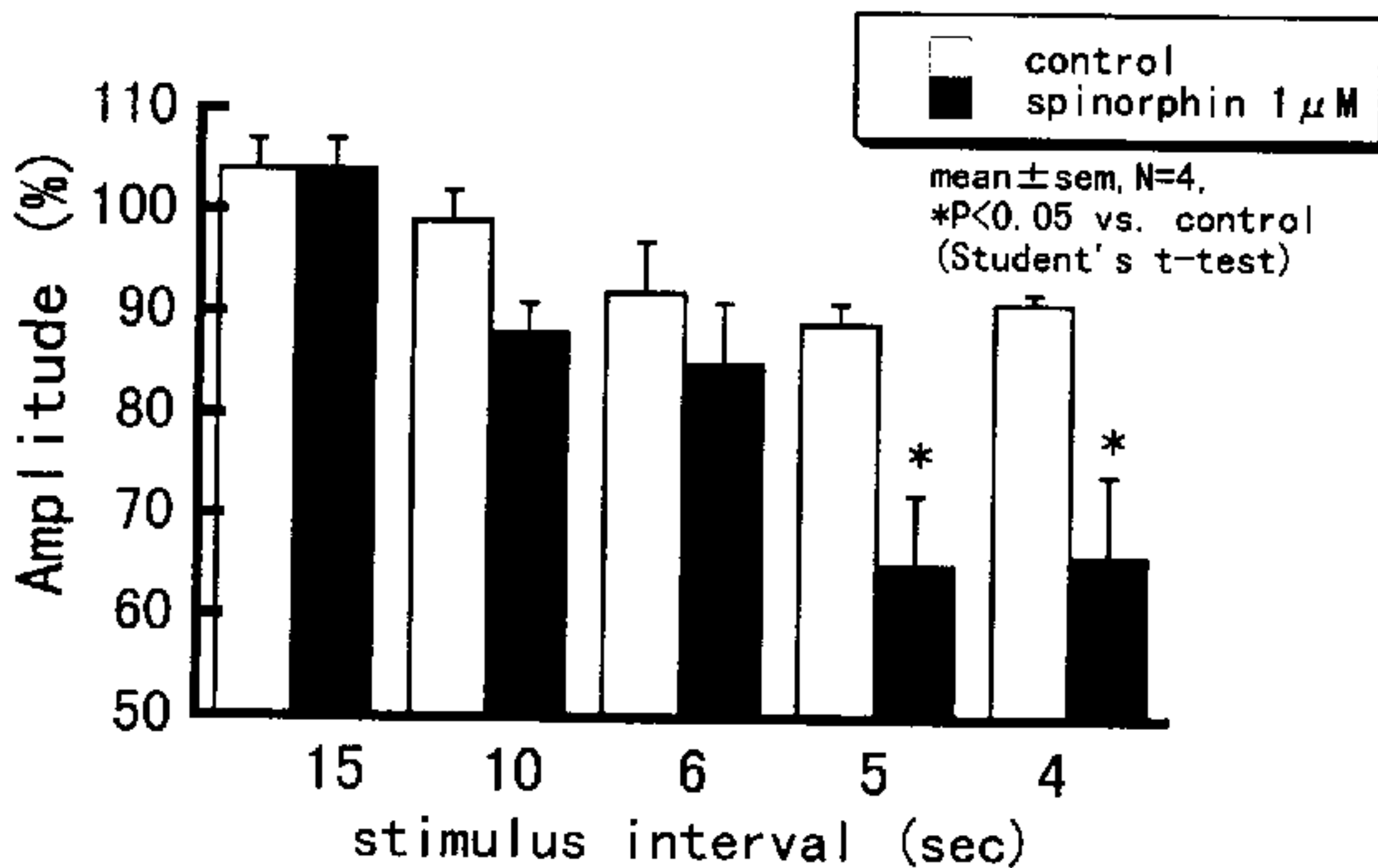


図1 活動電位に対するspinorphinの刺激頻度依存性の抑制作用

刺激間隔が15secの時は、spinorphin 1μM単独は活動電位に影響しなかった。この条件で、lue-enkephalin 1μMは活動電位をわずかに増強した。spinorphin 1μMを併用すると、enkephalinの活動電位増強作用は有意に増強され、この作用は naloxone 1μMにより拮抗された(図2)。すなわち、spinorphinはenkephalinの分解を阻害することにより、enkephalinの活動電位増強作用を増強すると考えられた。

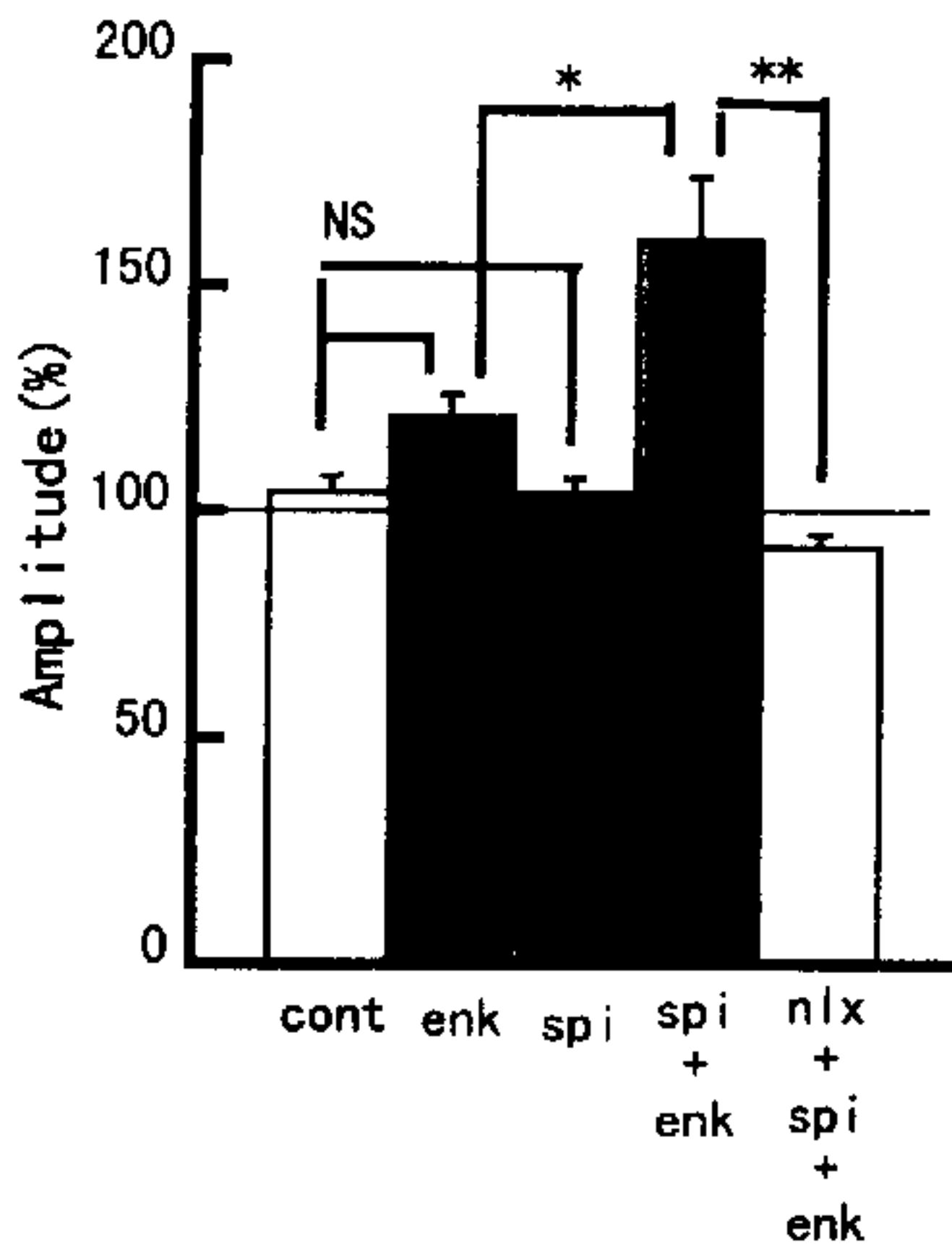


図2 低頻度(15sec)刺激における spinorphin の enkephalin に対する増強作用(10分後) 各 $1\mu\text{M}$. mean \pm sem (n=4), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ Bonferroni's multiple t-test.

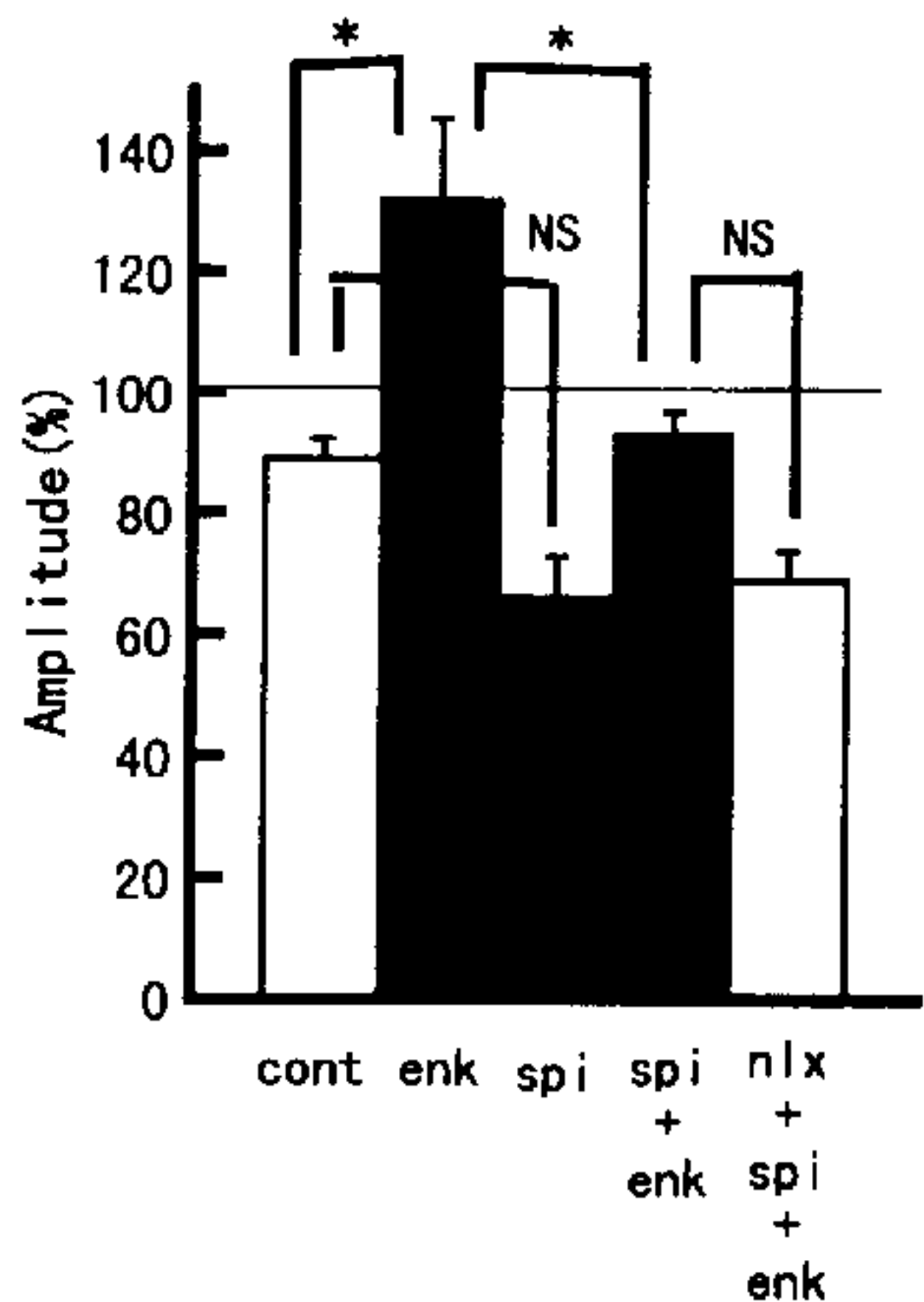


図3 高頻度(5sec)刺激における spinorphin の抑制作用と enkephalin の増強作用(10分後)

刺激間隔を5secにすると、spinorphin $1\mu\text{M}$ は活動電位を抑制した(図3)。この刺激条件でも、enkephalinは活動電位を増強した。spinorphinとenkephalinの併用は、活動電位に対してそれぞれの作用の中間の作用を生じた。さらにnaloxoneを併用すると、enkephalinの増強作用を抑制したが、spinorphinの抑制作用は拮抗されなかった。すなわち、spinorphinには刺激頻度が高いときには、抑制作用を生じ、この作用にはenkephalinは関与しないことが示された。

LTPに対してはnaloxoneは抑制作用を示した。内因性のenkephalinがLTPの発生に関与し、naloxoneはenkephalinの作用を抑制することにより、LTPを抑制すると考えられる。spinorphinもLTPを抑制した。enkephalinの分解阻害ではLTPの増強が期待されるので、spinorphinは他の機序でLTPを抑制すると考えられた。

マウス輸精管

enkephalinは濃度に依存してマウス輸精管の収縮反応を抑制した。spinorphinの併用はenkephalinの作用を増強し、濃度-抑制曲線を左方へ移動した(図4)。しかし、その作用は $3\mu\text{M}$ で最大に達し、その移動はせいぜい10倍であった。一方、enkephalin分解酵素を完全に阻害するamastatin、captopril、phosphoramidon 各 $1\mu\text{M}$ の混合物(Hiranuma and Oka, 1996)では、spinorphinの濃度-抑制曲線は左方へ100倍程度移動した。

naloxone $10\mu\text{M}$ はenkephalin $0.3\mu\text{M}$ の輸精管収縮抑制作用には拮抗作用を示したが、spinorphin $30\mu\text{M}$ で見られる収縮抑制に対してはほとんど拮抗を示さなかった(図5)。

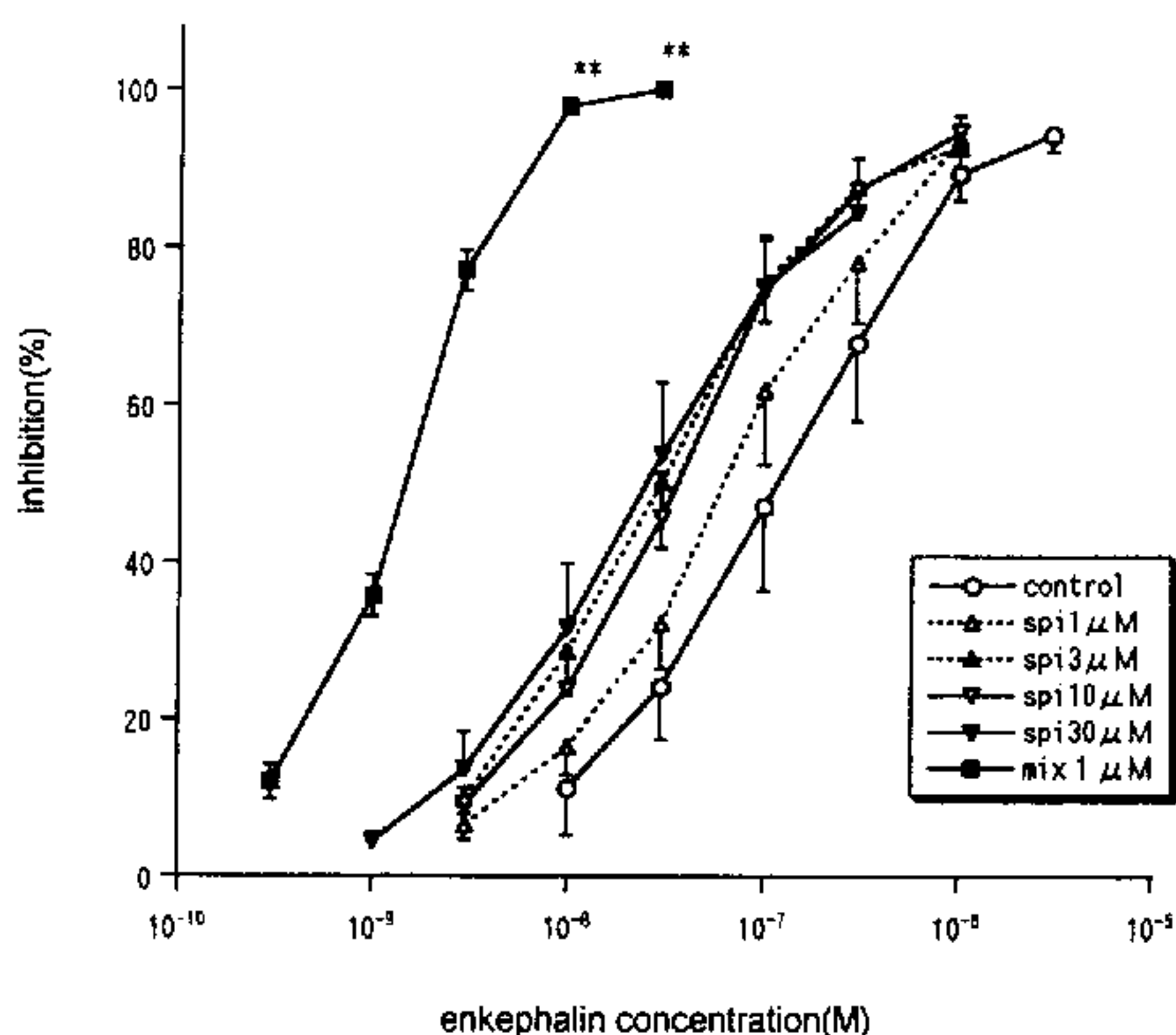


図4 spinorphinおよびenkephalin分解酵素阻害薬(mix)によるenkephalin増強作用
mean \pm sem (n=5)

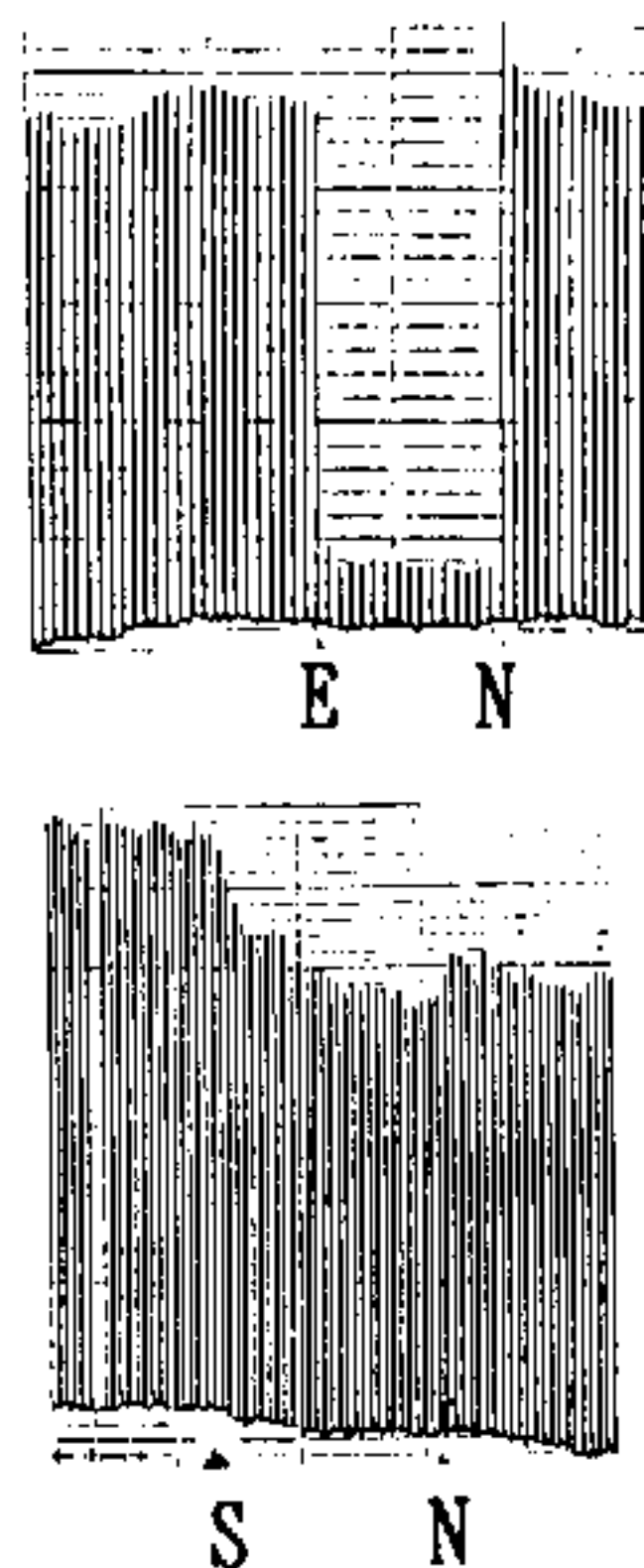


図5 enkephalinおよびspinorphinの収縮抑制作用に対するnaloxoneの拮抗

以上、enkephalin分解阻害活性を指標に見出されたspinorphinには神経系において、enkephalin分解阻害により活性を示す一方で、enkephalinとは関連しないと思われる機序により、シナプス伝達を抑制することが示された。

文献

Nishimura K. and Hazato T (1993) Isolation and identification of an endogenous inhibitor of enkephalin-degrading enzymes from bovine spinal cord, *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 30, 713-719.

西村欣也、植木正彬、金戸洋、羽里忠彦(1993) 新しい内因性エンケファリン分解酵素阻害物質の研究 - 第2報: 新物質Spinorphinの薬理活性と作用機構の解析 -, *麻酔*, 42, 1663-1670.

羽里忠彦、金澤忠博、植木正彬、山本行男 (1996) 内因性痛覚制御物質・Spinorphinの抗炎症効果, *日薬理誌*, 108, 155P-160P.

Yamamoto, Y., Kanazawa, T., Shimamura, M., Ueki, M. and Hazato, T. (1997) Inhibitory effects of spinorphin, a novel endogenous regulator, on chemotaxis, O_2^- generation, and exocytosis by N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP)-stimulated neutrophils, *Biochem. Pharmacol.*, 54, 695-701.

Ymamamoto, Y., Kanazawa, H., Shimamura, M., Ueki, M. and Hazato, T. (1998) Inhibitory action of spinorphin, an endogenous regulator of enkephalin-degrading enzymes, on carrageenan-induced polymorphonuclear neutrophil accumulation in mouse air-pouches, *Life Sci.*, 19, 1767-1773.

Hass, H.L. and Ryall, R.W. (1980) Is excitation by enkephalins of hippocampal neurones in the rat due to presynaptic facilitation or to disinhibition? *J. Physiol.*, 308, 315-330.

Hiramuma, T. and Oka, T. (1996) Effects of peptidase inhibitors on the [Met⁵]-enkephalin hydrolysis in ileal and striatal preparations of guinea-pig: almost complete protection of degradation by the combination of amastatin, captopril and thiorphan, *Jpn. J. Pharmacol.*, 41, 437-446.

3-9

システインプロテアーゼ阻害剤の脊髄ダイノルフィン系を介する侵害刺激抑制作用

○丹野孝一¹⁾、平 亜希¹⁾、大島清史¹⁾、Lars Terenius²⁾、木皿憲佐¹⁾

¹⁾ 東北薬大・薬理学、²⁾ カロリンスカ研・臨床神経科学

【緒言】

ダイノルフィン A およびダイノルフィン B の分解に関わるプロテアーゼとしてLeu⁵-Arg⁶ およびArg⁶-Arg⁷ 間のペプチド結合を加水分解し、ロイシンエンケファリン (Leu-Enk) およびLeu-Enk-Arg⁶ を生成するダイノルフィン変換酵素 (DCE) がヒト¹⁾ およびウシ²⁾ の脊髄より抽出・精製され、この酵素の本質はシステインプロテアーゼであることが明らかにされている。また、我々はマウス・ホルマリン法を用いてダイノルフィン A およびダイノルフィン B を脊髄クモ膜下腔内 (i.t.) へ投与した際の侵害刺激抑制作用がシステインプロテアーゼ阻害剤の*p*-ヒドロキシメルクリ安息香酸 (PHMB) によって有意に遅延される³⁾ ことを見出し報告している。一方、マウスの熱板法およびフェニルベンゾキノロンライジング法においてエンケファリンの分解に関して極めて重要な役割を担っているエンドペプチダーゼ 24.11 の阻害剤であるチオルファンの脳室内投与は侵害刺激抑制作用を示し、この作用はアミノペプチダーゼ阻害剤のベスタチンとの併用によって増強される⁴⁾ ことが報告されている。これらのことから、システインプロテアーゼであるDCEの阻害によって内因性ダイノルフィン類の分解阻害に起因する侵害刺激抑制作用が発現する可能性が推測される。

本研究ではシステインプロテアーゼ阻害剤のPHMBおよび*N*-エチルマレイミド (NEM) i.t. 投与時の侵害刺激に対する効果についてマウス・カプサイシン法^{5,6)} を用い、ホスホラミドン (エンドペプチダーゼ24.11阻害剤) とベスタチンとの併用によるそれと比較検討した。

【方法】

体重22-24 gのddY系雄性マウスを使用し、以下の実験を行なった。

①カプサイシン法^{5,6)}：カプサイシン溶液 (800 ng/20 μ l) を右後肢足蹠内へ投与した際に誘発される投与部位へのlicking行動の持続時間を投与直後から5分間測定した。i.t.投与時の薬物は人工脳脊髄液 (CSF) に溶解し、HyldenとWilcoxの方法⁷⁾ に準じ5 μ 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。また、ナルトリンドールは生理食塩液に溶解し腹腔内に投与した。

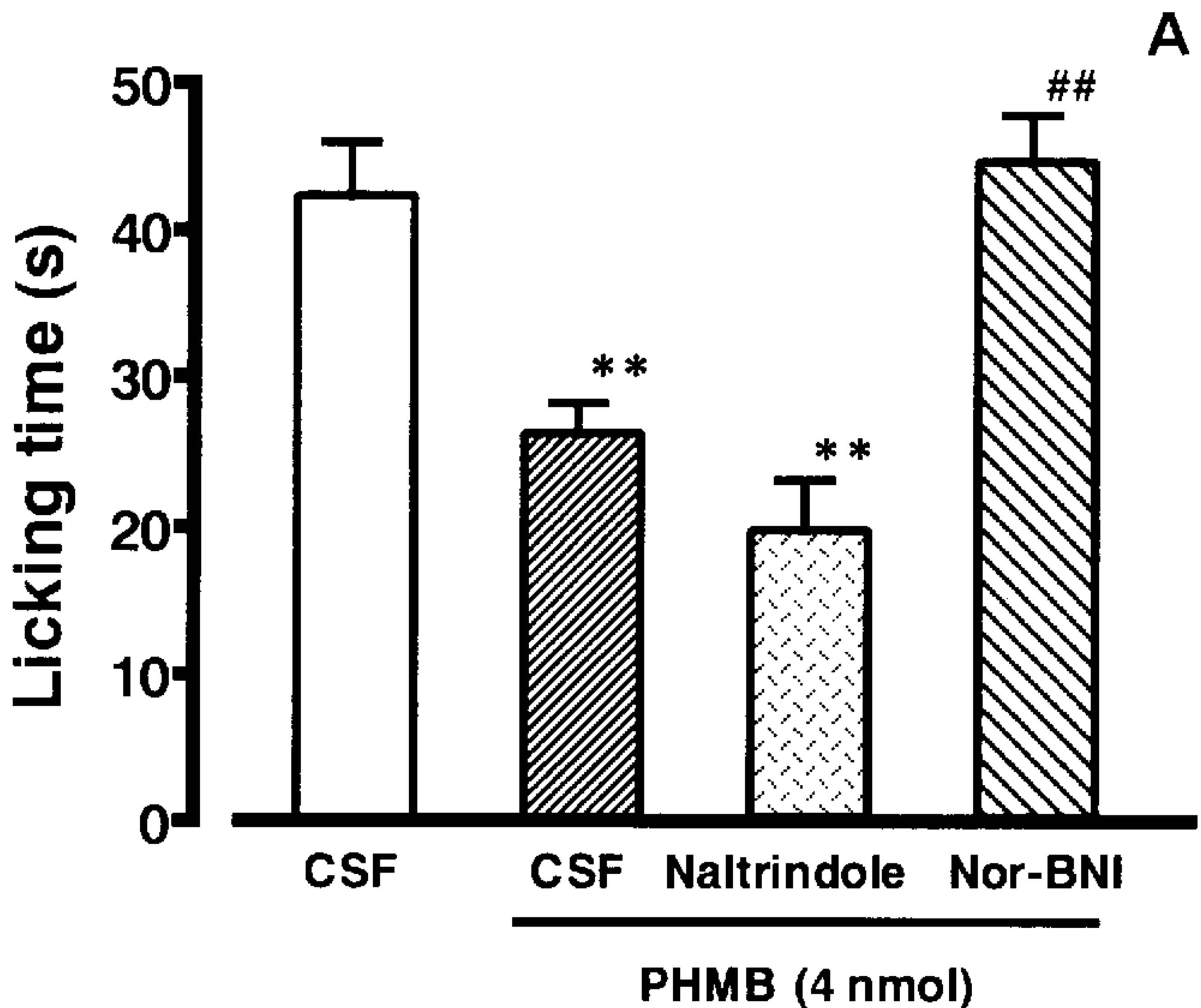
②マウス脊髄抽出液によるダイノルフィン Aの分解：マウス脊髄抽出液 (タンパク量として30 μ g) とダイノルフィン A (1 nmol) を37°Cで経時的にインキュベーションを行なった後、ダイノルフィン Aの残存量を高速液体クロマトグラフィーによって分離・定量した。

【結果・考察】

カプサイシン法において、対照のCSF i.t.投与60分後にカプサイシン溶液をマウスの右後肢足蹠内に投与した際、投与直後からの5分間で約42秒のlicking行動が観察された。一方、PHMBおよびNEM (それぞれ4および8 nmol) ならびにベスタチン (0.25 nmol) 存在下におけるホスホラミドン (2および4 nmol) のi.t.投与はカプサイシンによるlicking行動を有意に抑制し、侵害刺激抑制作用を有することが判明した。PHMBの侵害刺激抑制作用はK-オピオイド受容体拮抗薬のノルビナルトルフィミン (nor-BNI) によって完全に拮抗されたが、 δ -オピオイド受容体拮抗薬のナルトリンドールでは拮抗されなかった (Fig. 1A)⁸⁾。それに対し、ベスタチン存在下におけるホスホラミドンの侵害刺激抑制作用はnor-BNIではなくナルトリンドールによって完全に拮抗された (Fig. 1B)⁸⁾。ダイノルフィン Aおよびダイノルフィン Bは腰髄の背側部に高濃度に分布⁹⁾ しており、疼痛制御物質としてよく知られている。これらのペプチドはヒト¹⁾ およびウシ²⁾ の脊髄より抽出・精製されたシステインプロテアーゼのDCEによって主としてLeu-Enk-Arg⁶⁾ と少量のLeu-Enkに分解される。また、ラット線条体抽出液中においてもDCE活性が認められており、この酵素活性は低濃度のPHMBによって抑制される¹⁰⁾。ダイノルフィン Aおよびダイノルフィン Bのi.t.投与による侵害刺激抑制作用を指標とした実験において、PHMBはこれらペプチドの作用を有意に遅延する³⁾。さ

らに、本研究の*in vitro*における実験でダイノルフィン Aは脊髄抽出液とのインキュベーション90分後にはほぼ完全に分解されたが、PHMBおよびNEM (0.25 mM) はその分解を有意に抑制した。

以上の結果から、ホスホラミドン/ベスタチンの侵害刺激抑制作用は内因性エンケファリン類の分解阻害に起因するのに対し、PHMBやNEM等のシステインプロテアーゼ阻害剤は内因性ダイノルフィン類の分解を阻害し侵害刺激抑制作用を発現することが判明した。



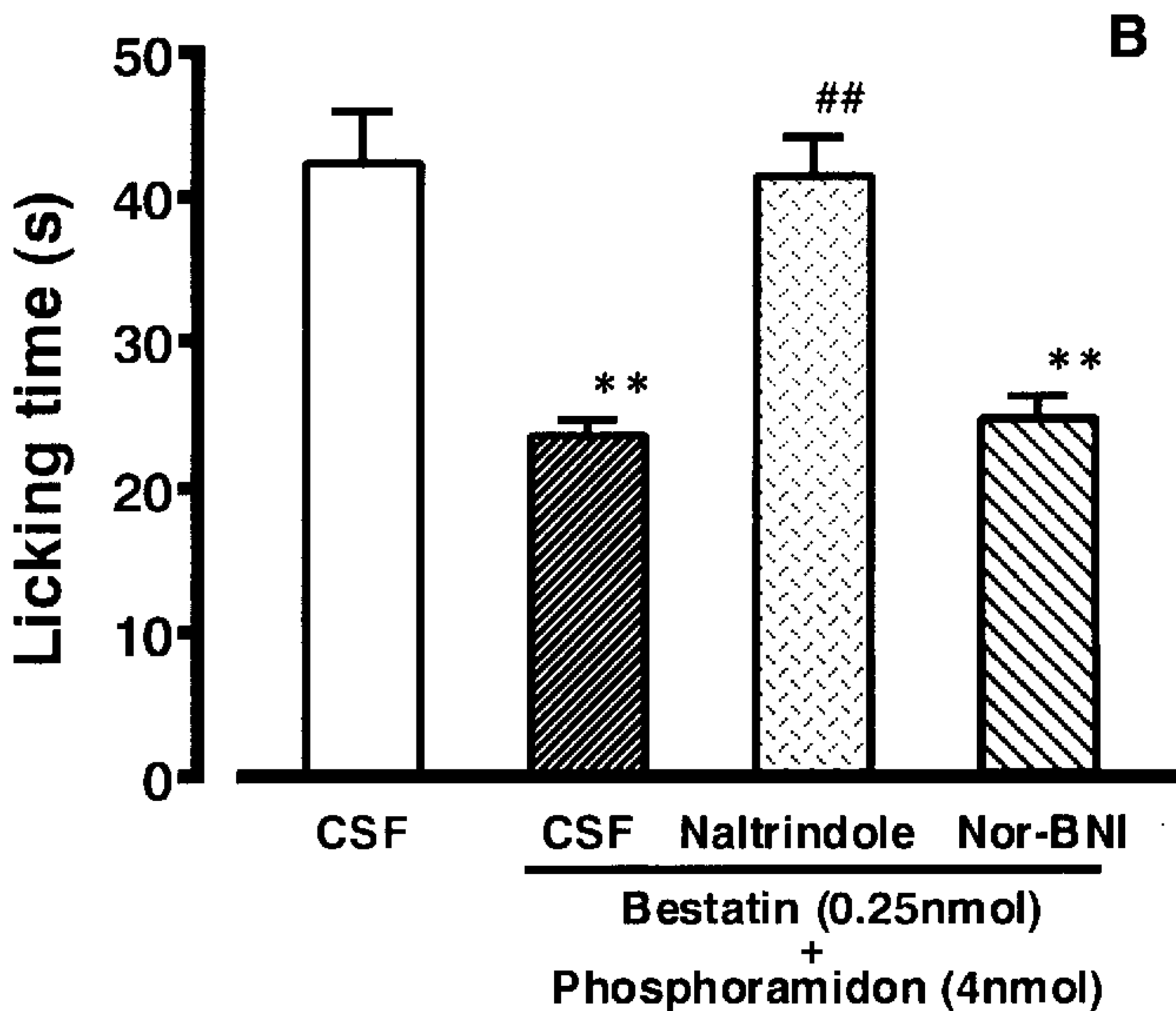


Fig. 1 Effect of naltrindole and nor-binaltorphimine (nor-BNI) on the antinociceptive action of *p*-hydroxymercuribenzoate (PHMB) (A) and, phosphoramidon in the presence of bestatin (B). PHMB or, phosphoramidon in the presence of bestatin was administered i.t. 60 min before injection of capsaicin. Naltrindole was administered i.p. at a dose of 0.1 mg/kg 15 min before injection of capsaicin. Nor-BNI was administered i.t. at a dose of 0.2 μ g/mouse 24 h before the experiment. The data are given as the means and S.E.M. for groups of 10 mice. ** $P < 0.01$ when compared to CSF-treated controls. ## $P < 0.01$ when compared to protease inhibitors alone.

【引用文献】

1. Silberring J. et al. *J. Biol. Chem.* **267**, 21324-21328 (1992)
2. Silberring J. and Nyberg F. *J. Biol. Chem.* **264**, 11082-11086 (1989)

3. Tan-No K. et al. *Eur. J. Pharmacol.* **314**, 61-67 (1996)
4. Chaillet P. et al. *Eur. J. Pharmacol.* **86**, 329-336 (1983)
5. Sakurada T. et al. *Neuropharmacology* **31**, 1279-1285 (1992)
6. Tan-No K. et al. *Pain Res.* **12**, 59-64 (1997)
7. Hylden J.L.K. and Wilcox G.L. *Eur. J. Pharmacol.* **67**, 313-316 (1980)
8. Tan-No K. et al. *Neuropeptides* **32**, 411-415 (1998)
9. Tan-No K. et al. *Neurochem. Int.* **31**, 27-32 (1997)
10. Nylander I. et al. *Life Sci.* **57**, 123-129 (1995)