

シンポジウム 1

オピオイド研究の進歩と展望

○岡 哲雄¹、竹山 和秀²、岩尾 佳代子¹、
北村 憲¹、小林 広幸¹、滝口 守²

¹東海大学医学部薬理学教室、²麻酔科学教室

[諸言]

私達は先に、[D-Ala², N-Me-Phe⁴, Gly⁵-ol]-enkephalin (DAMGO) を、生後 10、15、および 20 日目のラットに 2 μmol/kg 皮下注射し、tail-flick response (TFR) および正向反射を観察した¹⁾。その結果、TFR の抑制の程度は、10 日目のラットで最も大きく、次いで 15 日目のラットで、20 日目のラットでは抑制は認められなかった。また、正向反射の消失の程度も同様で、10 日日のラットで最も大きく、20 日目のラットでは消失は認められなかった。つまり、皮下投与された DAMGO は生後 10 日目のラットでは、血液-脳関門を通り中枢神経に入るが、15 日目では入り難くなり、20 日日のラットでは極めて入り難くなっていることが示唆された。そこで今回は、モルヒネ、モルヒネ-6-グルクロナイト (M-6-G)、およびロペラミドなどを皮下投与した時の効果の大きさの発達に伴う変化を観察した。また、脳の毛細血管の内皮細胞に存在することが報告されている P-糖タンパク質 (P-gp) の阻害剤の効果についても検討したので報告する。

[実験方法]

生後 10、15、20、および 25 日目の Wistar 系ラットを用いた。モルヒネ、M-6-G、あるいはロペラミドを皮下投与後 15 分毎に 120 分目まで TFR および正向反射を観察した。また、P-gp 阻害剤は、オピオイド投与の 5 分前に腹腔内に投与した。

[実験結果および考察]

(1) TFR を抑制する効力の大きさは、3つのオピオイド（モルヒネ、M-6-G、ロペラミド）とも生後15日目のラットにおいて最も大きく、25日目のラットでは20日目のラットより有意に小さかった。また、生後10日目のラットでは、20日目と25日目との中間ぐらいであった。なお、生後15日目のラットではM-6-Gとロペラミドの効力はほぼ同じで、 $1 \mu\text{mol/kg}$, sc で大きな抑制効果が認められたが、同じ投与量のモルヒネでは抑制は認められなかった。一方、(2) 正向反射を消失させる効力の大きさは、3つのオピオイドとも生後10日目のラットで最も大きく、15, 20, 25日目と発達に伴って効力は小さくなつた。なお、生後10日目のラットでの効力の大きさは M-6-G > ロペラミド > モルヒネの順で、M-6-Gとロペラミドでは $0.3 \mu\text{mol/kg}$, sc で大きな効果が認められたが、同じ投与量のモルヒネでは効果は認められなかつた。また、生後10日目と25日目のラットでの3つのオピオイドによる正向反射消失効果の大きさを比較すると、モルヒネでは10日目のラットの投与量の5-10倍を25日目のラットに投与すると、ほぼ同じ消失効果が得られた。M-6-Gでは10日目のラットの投与量の10-20倍を投与すると、ほぼ同じ効果が得られた。また、ロペラミドでは10日目のラットの投与量の約30倍を25日目のラットに投与すると、ほぼ同じ効果が得られた。つまり、正向反射消失効果から推測すると、3つのオピオイドとも発達に伴つて中枢神経に入り難くなるが、その程度はロペラミドで最も大きく、次いでM-6-Gで、モルヒネが最も小さいことが示唆された。(3) 生後20日目のラットに種々のP-gp阻害剤を腹腔内に投与後、モルヒネ $3 \mu\text{mol/kg}$ 、M-6-G $3 \mu\text{mol/kg}$ 、あるいはロペラミド $1 \mu\text{mol/kg}$ を皮下に投与し、TFR の抑制の大きさを P-gp 阻害剤非投与群と比較した。その結果、モルヒネおよびM-6-Gでは、P-gp 阻害剤投与群と非投与群との間に

有意の差は認められなかった。一方、ロペラミドでは、P-gp 阻害剤前投与により、有意に TFR の抑制効果が大きくなつた。

以上の実験結果より、3つのオピオイドに対して、発達に伴つて血液-脳関門が形成されることが示唆されたが、ロペラミドに対する関門の形成に P-gp が関与していることが示唆された。また、生後 25 日目のラットの皮下にモルヒネ 10 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ を投与した場合と、M-6-G 10 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ を投与した場合を比べると、TFR 抑制効果も正向反射消失効果もともに M-6-G の方が大きいことから、M-6-G の血中濃度がモルヒネと同じになるような状態では、モルヒネのみならず M-6-G の中枢神経に対する効果（鎮痛、呼吸抑制など）も考慮する必要があることが示唆された。

[文献]

- 1) Oka, T., Liu, X.F., Kajita, T., Ohgiya, N., Ghoda, K., Taniguchi, T., Arai, Y. and Matsumiya, T.: Effects of the subcutaneous administration of enkephalins on tail-flick response and righting reflex of developing rats, *Dev. Brain Res.*, 69 (1992) 271-276.

S-2

新規オピオイド δ 拮抗薬 TRK-851 の合理的設計とその鎮咳作用

○上野新也¹、齊藤顯宜¹、河合孝治¹、夏目和人¹、坂見敏¹、前田至幸¹、伊藤剛¹、大瀧芽久美²、森田佳代³、亀井淳三³、遠藤孝¹、長瀬博¹

¹東レ（株）・医薬研究所、²三菱東京製薬（株）・かずさ研究所、
³星葉科大学・薬物治療学教室

【緒言】

咳は様々な呼吸器系の疾患に伴う症状の一つであり、重篤な咳嗽の場合には咳 자체で呼吸器系、循環器系、中枢神経系などに様々な障害をもたらし、さらに咳による患者の体力消耗によりそれらを助長されることになる。

麻薬性鎮咳薬であるリン酸コデインは強力な鎮咳薬として広く受け入れられているが、中枢抑制、消化管運動抑制、呼吸抑制、依存性などの副作用のため使用が制限されている。この麻薬性鎮咳薬の欠点を克服すべく、多くの鎮咳薬が幅広く開発されてきた。しかしながら、効果の面で麻薬性鎮咳薬に匹敵する薬物が見い出されていないのが現状である。それ故、激しい咳を抑え、治療上で問題となっている副作用の軽減された、新しい薬剤が望まれている。さらに、麻薬性鎮咳薬であるリン酸コデインでも有効性が認められない、あるいは使用できない病態も知られており、そのような病態においても使用できる強力な鎮咳薬が切望されている。

一方 1990 年代になって、オピオイド δ 受容体（ δ 受容体）を介する内因性オピオイド神経系による鎮咳作用修飾機構の存在が示唆され^{1, 2)}、さらに δ 拮抗薬がラット、マウスにおいて強力な鎮咳作用を有することが報告されている³⁾。

我々は、この新知見をもとに新規メカニズムの鎮咳薬を探索し、既存鎮咳薬の持つ問題点を克服する可能性を備えた新規オピオイド δ 拮抗作用 TRK-851 を発見したので報告する。

【合理的設計】

代表的な δ 受容体拮抗薬である Naltrindole (NTI) は演者の一人である長瀬らにより、ミネソタ大学においてメッセージ・アドレスの概念に基づき合成された化合物である。しかし NTI は経口吸収性に難があり、脳関門通過性も不充分である。そこで、活性の向上とオリジナルの骨格を目指し、種々の化合物を合成してスクリーニングを行った。具体的には、NTI のアドレス部位（インドール環部位）に脂溶性基（C3 炭素ユニット）を付与し、さらに代謝の抑制のためにインドールのベンゼン環にフッ素原子を導入することにより TRK-851 に到達した。

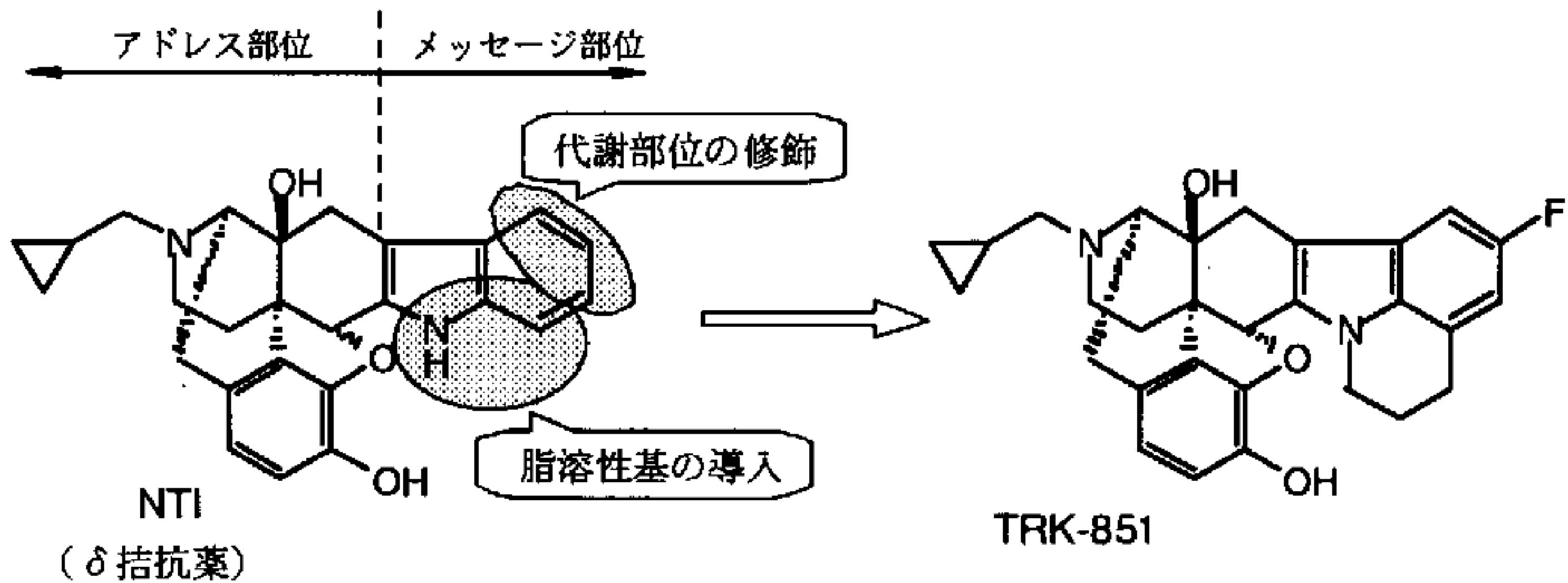


図 1 メディシナルケミストリーに基づく合成デザイン

【薬理作用】

1. オピオイド受容体選択性

TRK-851 は、これまでの評価において、オピオイド受容体以外にはほとんど親和性を示さず、しかもオピオイド受容体の中でも δ 受容体への選択性が μ 、 κ 受容体に比べ高いことが確認された。

2. ラット・カプサイシン誘発咳嗽モデルにおける薬効

ラットに、超音波ネブライザーにより噴霧質としたカプサイシン ($60 \mu\text{M}$) を刺激物質として吸入させ、咳嗽を誘発し、同一個体で薬物投与前、投与後の呼吸数および咳嗽数の測定を行った。その結果 TRK-851 は用量依存的にカプサイシン誘発咳嗽を抑制し、鎮咳効果を有することが確認された。咳嗽抑制作用の経口投与による ED_{50} 値は $35.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ であり、同時に試験したリン酸コデイン ($9.59\text{mg}/\text{kg}$) に比し 250 倍低用量であった。

3. コデイン難治性咳嗽モデルに対する作用

2. と同様な手法でラットを用い、ニュートラルエンドペプチダーゼ (NEP) 阻害薬 (フォスフォラミドン) で誘発される咳嗽に対する TRK-851 の鎮咳効果を検討した。NEP は気道上皮で産生され、正常時には神経末端から遊離するサブスタンス P 等の刺激物質を速やかに分解する。気道が何らかの障害を受けた際には NEP の産生も障害されることから刺激物質が増加し咳が誘発されると考えられる。すなわち NEP 阻害薬により誘発される咳は気道障害を受けた状態を反映するモデルであると考えられる。

その結果、TRK-851 はラット・カプサイシン誘発咳嗽モデルで示されたものと同様に用量依存的な鎮咳作用を有していることが確認された。一方、リン酸コデインは本モデルに対して有意な鎮咳作用は示さなかった。

従って、本モデルはコデイン難治性のモデルであり、TRK-851 はこのような咳に対しても有効である可能性が示された。

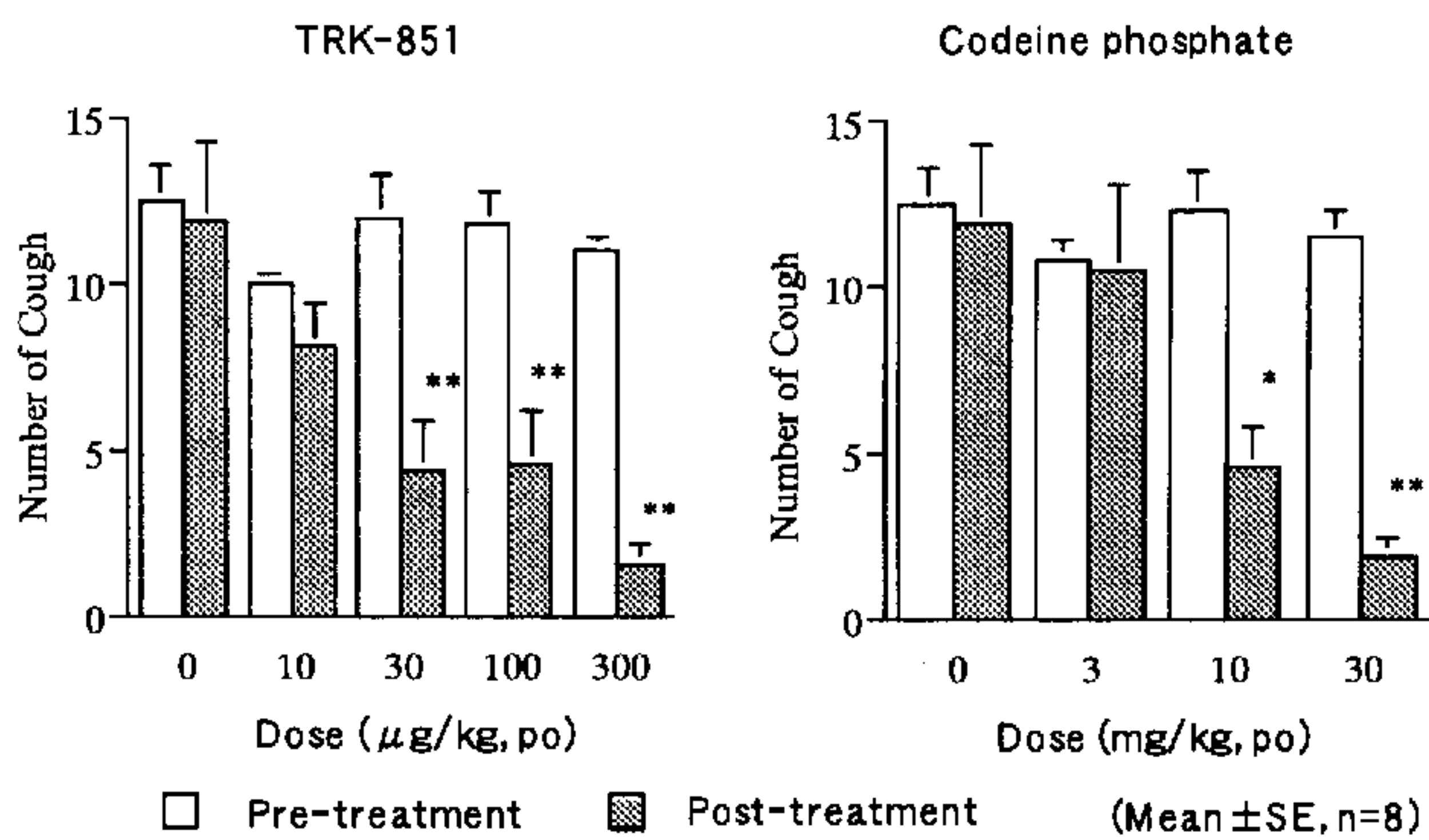


図2 ラット・カプサイシン誘発咳嗽におけるTRK-851の効果

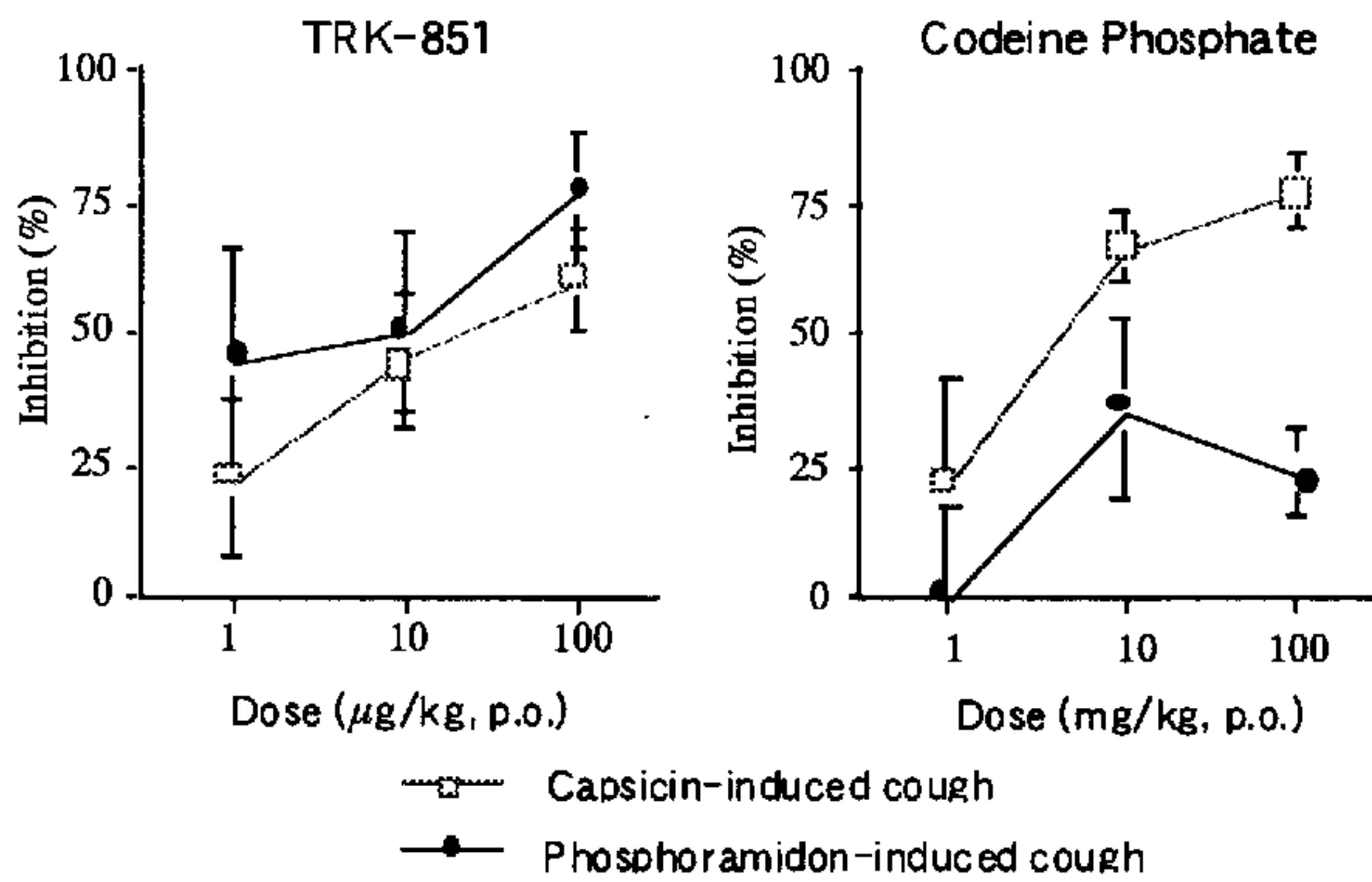


図3 コデイン難治性咳嗽モデルにおけるTRK-851の効果

4. 副作用

δ 拮抗薬であることから類推されるように、TRK-851 はラットにおいて薬物選好性および身体依存性を示さないこと、さらにアカゲザルの自己投与試験においても強化効果を示さないことを確認している。さらに、ラットにおいて一般症状および行動に及ぼす影響、中枢神経系に対する影響は認められず、腸管輸送能に対する作用も認められなかった。

【結論】

NTI の経口吸収性向上、代謝抑制等を目的としてオリジナルな δ 拮抗薬 TRK-851 のデザイン、合成に成功した。この TRK-851 は優れた鎮咳作用を示し、既存強力鎮咳薬のリン酸コデインの無効である咳にも有効である可能性が示された。また、 δ 受容体拮抗作用という新規鎮咳メカニズムの薬物であることから、リン酸コデインの持つ μ 作動性に起因すると考えられる依存性、呼吸抑制、便秘作用等の副作用を持たないことが動物実験で確認されている。

これらのことから、TRK-851 は、高い安全性を有し優れた鎮咳効果を示す新しい非麻薬性鎮咳薬として各種呼吸器疾患に伴う咳嗽治療に有用な薬となることが期待される。

引用文献

- 1) J. Kamei, H. Tanihara and Y. Kasuya, Eur. J. Pharmacol., 187, 281-286 (1990)
- 2) J. Kamei, H. Tanihara and Y. Kasuya, Res. Comm.in Chem.Pathol.Pharmacol., 76, 375-378 (1992)
- 3) J. Kamei, Y. Iwamoto, T. Suzuki, M. Misawa, H. Nagase and Y. Kasuya, Eur. J. Pharmacol., 249, 161-165 (1993)

S-3

モルヒネ耐性における臨床上の問題点

国立がんセンター中央病院、

千葉大学医学部第2生理学教室

下山直人、下山恵美

「はじめに」 WHO がん疼痛治療指針が発表されてから、モルヒネを中心としたがん疼痛治療法が普及してきている。それにより日本でもモルヒネに対する偏見が減少してきたためか、がん性疼痛患者に対するモルヒネ投与量は増加し、投与期間も延長する傾向がある。オピオイド系鎮痛薬の欠点としては、臨床的には嘔気、眠気、便秘などの副作用があるが、それに加え長期の投与による耐性と依存性の可能性も指摘されている。オピオイド系鎮痛薬への耐性が実際に起こった場合、患者の QOL を著しく低下させ、がん性疼痛治療における大きな障壁となる可能性がある。しかし、モルヒネなどの嘔気、眠気などの副作用に対しては、実は早期に耐性が形成された方がむしろ患者にとっては有利になるわけである。本稿では臨床におけるモルヒネ耐性形成に関する問題点とケタミンなどの N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) 受容体拮抗薬により臨床的に耐性形成が抑制されるか、予防できるかに関する言及する。

「オピオイドに対する耐性を恐れる理由」 がん性疼痛患者は、もともと麻薬に対する偏見を持っていることが多い。偏見とは、1) 中毒になってしまう（精神的依存）のではないか、2) 耐性ができるて投与量がどんどん増えててしまうのではないか、3) 止められなくなってしまうのではないか、ということである。そして、モルヒネを鎮痛薬として投与するにあたっては、それらの偏見、不安を取り除くための説明のために、いまだに多くの時間を費やすこともある。その説明の内容は、痛みに対して使用している限り精神的な依存を起こすことはない、痛みに対して使用している限りモルヒネに対する耐性はできない、痛みが減少してくればモルヒネ投与量は少しずつ減らしていくことである。そして、多くの場合、臨床的には、耐性によってモルヒネの投与に支障をきたすことはほとんどない。耐性形成が問題となるのは、多くの場合、基礎研究においてと特にアメリカ

では社会的な問題となっている麻薬中毒者（street addict）の場合である。共通点は痛みがない状態にオピオイドが投与されているということである。

「モルヒネ耐性の実態」 モルヒネの主作用は鎮痛であるが、副作用として便秘、嘔気、眠気、まれに呼吸抑制がある。通常、嘔気、眠気には耐性がつくため、初期の頃には嘔気止めの服用、リタリンなどの眠気止めの服用を予防的にすることが必要である。耐性によって副作用止めは次第に減量することができるとされている。しかし、モルヒネ不耐性の場合には副作用がなかなか改善しない場合がある。便秘に関しては通常は耐性はつかず、モルヒネを服用している限り下剤の服用を続ける必要がある。呼吸抑制に関しては、通常経口投与で行っている限りはほとんど問題とはならない。副作用に関してはむしろ耐性は好ましい結果をもたらし、患者の QOL をむしろ向上させる。ケタミンがモルヒネの耐性を抑制するという点では、副作用に対する耐性も抑制してしまうのではという疑問が起こるが、ケタミンとモルヒネを併用していて特にそのようなことは経験していない。この理由としては、モルヒネの耐性と NMDA 受容体とは脊髄の細胞レベルで関連があると考えられており、眠気、嘔気などは脊髄以外での作用であるため、耐性の抑制はないものと考えられる。

「痛みと副作用の関係」 副作用の眠気、嘔気は次第に耐性がついていくと述べたが、実際の臨床ではそれだけでは説明がつかないことがある。比較的大量のモルヒネによって疼痛コントロールがついている骨転移の患者に対して、放射線療法や神経ブロック療法を行い痛みが取れてくると、相対的なモルヒネの過量状態が起り、眠気が出現したり、嘔気が起らったりすることがある。中には意識がなくなってしまうこともある。このことから考えてみると、モルヒネにおける眠気、嘔気は痛みとまったく関係なく耐性がついているとは考えられない。今後、検討されるべき問題と思われる。

「モルヒネ耐性が起こっている考え方の症例」 この 1 年間（1999.6-2000.5）で当科を紹介されたがん性疼痛患者総数は 385 例であった。その中で

経口モルヒネ投与が 800mg/日を超えていた症例は 2 例 (1200mg、960mg) であり、いずれも直腸がん症例であった。仙骨神経叢の浸潤も考え鎮痛補助薬を併用していたが、モルヒネに対する反応が保たれている症例で、一回のレスキューそれぞれ 200mg と 160mg であった。レスキューのモルヒネは痛みに対して有効であった。モルヒネに反応している痛みの場合では、大量になってしまい、嘔気などの副作用はあまりみられず、モルヒネ投与量が大量になってしまいそのまま経過を見ていく方がよいと考えている。このように頻度は少ないが、直腸がんなど予後の長い症例においてはモルヒネ耐性が起こる可能性がある。モルヒネが経口で投与され、痛みがコントロールされている自宅療養患者に対して、NMDA 受容体拮抗薬の経口投与が日常化していない現在、NMDA 受容体拮抗薬によって耐性の予防をする必要性はあまりないであろう。むしろ、NMDA 受容体拮抗薬の長期投与によって、それ自体の耐性が問題となる可能性もある。しかし、投与量の増加によって痛みがとれても、患者の服用量、服用回数が多くなることによって患者に負担がかかっていく場合がある。臨床使用可能な経口ケタミンが発売されれば、臨床的にモルヒネが効かない場合、モルヒネが効果があるが投与量が増加する場合（耐性）には、NMDA 受容体拮抗薬の併用も必要となってくると考えられる。

「まとめ」

- 1) がん性疼痛治療を WHO 方式に基づいて行っている限り、臨床ではモルヒネ耐性によって患者の QOL が障害されることはほとんどない。
- 2) 痛みに対する耐性と嘔気、眠気などの副作用に関しては何らかの関係がある可能性がある。
- 3) 臨床的には、モルヒネの耐性を考える前に鑑別すべき状態を検討すべきである。

セカンドメッセンジャーであるcAMPやCa⁺⁺のシグナルの一部は、CRE (cAMP response element) に伝えられ遺伝子発現を調節している。CRE (TGACGTCA) に CREB が結合し、1) 本蛋白のリン酸化が、2) リン酸化CREBとCBPとの結合が、3) これに種々の蛋白質が結合・複合体を作り転写活性を促進する。モルヒネがcAMPを介し、このCRE/CREB/CBPシグナルを調節している。また、CREBノックアウトマウスの解析からも、モルヒネ耐性・依存形成との関係が報告されている。

これまで私達は、CRE などの DNAをプローブとし、NG-108 細胞や マウス小脳から調整した核抽出物との反応をゲルシフトアッセイ法などで解析を行ってきた。モルヒネ耐性・依存形成に伴い、A) NG-108 細胞やマウス小脳核抽出物の一本鎖CRE (ssCRE) との結合活性が減少すること(1,2)、B) 核抽出物からssCRE との結合蛋白質 (ssCRE-Binding protein ; ssCRE-BP) を精製し、アミノ酸配列の決定を、続いて、マウス脳 cDNA ライブラリーからcDNAのクローニングを行った。塩基配列の決定から、ssCRE-BPが321 アミノ酸残基よりなる Purα 蛋白と同一であることを明らかにした(3)。

Purα は、ヒトc-myc 遺伝子上流の複製開始点に存在するPurine に富んだ塩基配列 (PUR エレメント) を認識する一本鎖結合蛋白質として見い出され、そのコンセンサスは(GGN)_n とされている。最近、ミエリン塩基性蛋白、ニコチン様アセチルコリンレセプター-β4サブユニット、神経特異的蛋白質FE65などの遺伝子上流にある(GGN)_n 配列の一本鎖にPurα が結合し、複製・転写の調節に関与すると報告されている。他方、私達は脳のPurα 含量が他の組織に比べ約10倍も多量に発現していることを見いただした(3)。

Purα の増強因子とCRE/CREB/CBPシグナルとの相互作用

DNAアフィニティカラムクロマトグラフィーを用いたssCRE-BP (Purα) の精製過程で、A) 溶出されるPurα のDNA 結合活性が著しく減少すること、B) 素通り分画との共存ではDNA 結合が顕著に増強されること、C) 分画中の因子が熱安定性を示すことなどから、Purα の内在性増強因子の存在が考えられた。増強因子をマウス全脳から精製し、本因子をカルモデュリン(CaM)と同定した(4)。CaM自身にはDNAへの結合能

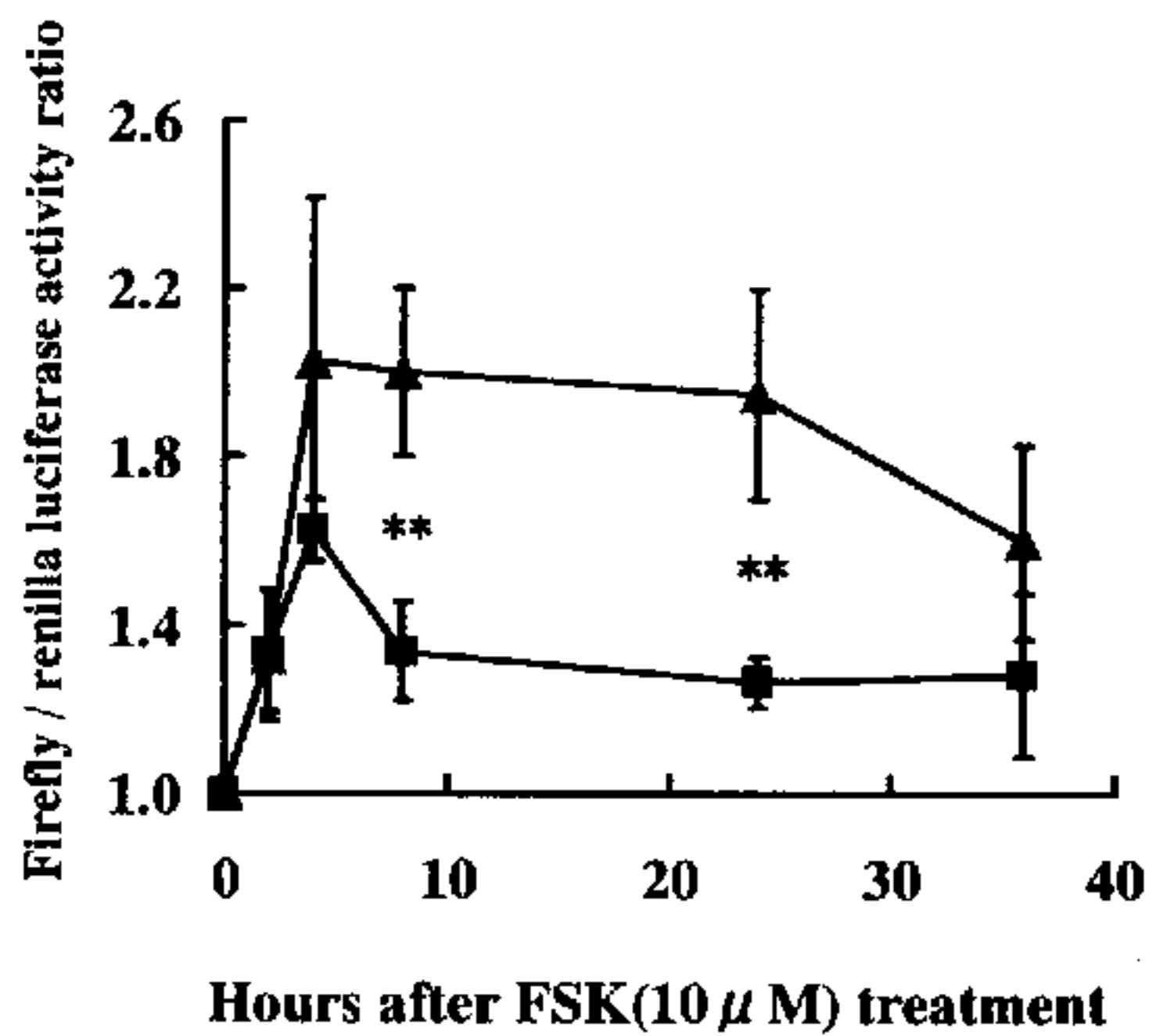


図1、フォルスコリンによるCRE-luciferase活性化に対するPurαの影響

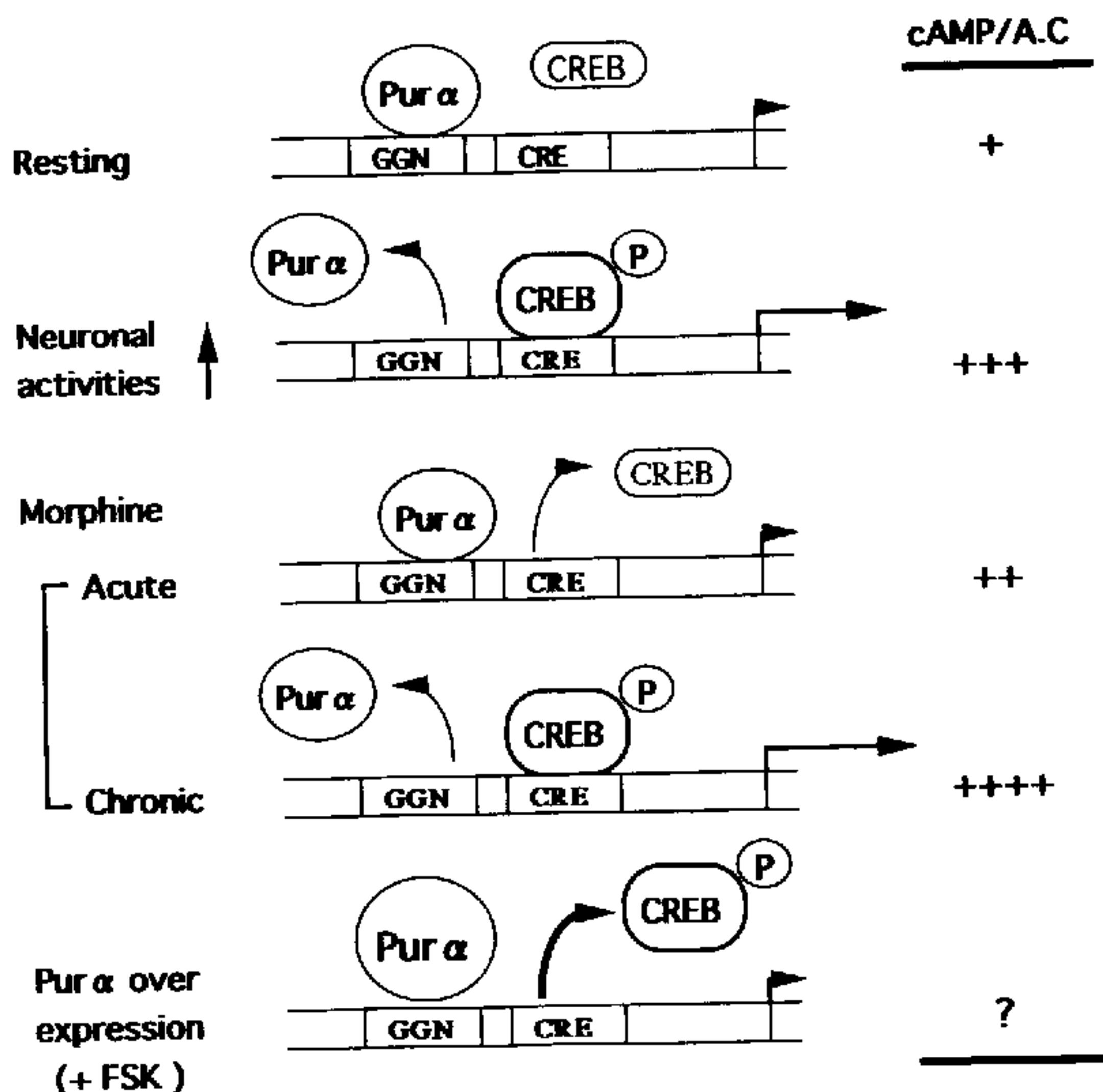


図2、GGNが隣接するCRE上でのCREBとPurαとの相互作用

はないが、GST-Pur α のPURエレメントへの結合を約10倍増強する。私達が使っている36merのssCREプローブは、ラットソマトスタチン遺伝子で、その配列は、-67 5'-CTGGGGCGCCTCCTGGCTGACGTAGAGAGAG-3' -32である。5'側のTGGGGを除き、(GGN)を2カ所から1カ所にしたプローブをゲルシフトアッセイに用いると、Pur α との結合能もCaMによる増強作用も認められなくなることから、(GGN) n の配列が重要であることがわかる。Pur α は、二本鎖CREプローブにも結合すること、結合には(GGN) n の配列が必要であった。他方、CREBのCREへの結合は、(GGN) n 配列に依存しなかった。これらの結果から、CREとこれに隣接する(GGN) n 配列を持った遺伝子(Somatostatin, Proenkephalin, Tyrosine hydroxylaseなど)上では、CREBとPur α が相互作用している可能性が考えられる。二本鎖CREへのPur α の結合は、CREBの添加で阻害されることをゲルシフトアッセイ法で確認した。

Pur α の生理機能を確かめるために、PC12細胞にPur α 蛋白を強制発現させ、フォルスコリンによるレポーター遺伝子(CRE-ルシフェラーゼ)の活性化を検討した。Pur α は、フォルスコリンによるルシフェラーゼの活性化(図1)と神経突起進展を阻害した(5)。また、EGFP-Pur α 蛋白を神經細胞で発現させるため、調製したプラスミッドをZebra fishの受精卵に注入すると、Pur α を発現した神經細胞は、軸索の伸展が阻害されることなどを見出している。

モルヒネの薬理作用の一部には、cAMPを介したCRE/CREB/CBPシグナルに作用し遺伝子発現に影響を与えることは、広く認められている。私達が同定したPur α 蛋白が神經系に多量に存在すること、本蛋白の機能の一つには、CREに隣接する(GGN) n 配列に結合しCRE/CREBシグナルを抑制すると考えられる。図2に転写活性の作業仮説を示した。

現在、CaM遺伝子は3種類存在することが知られているが、 μ -アゴニストがCaM III遺伝子のみをup regulationさせ、ナロキソンがこれを阻害する事などを見出している。今後、Pur α のターゲット遺伝子の同定、モルヒネ耐性・依存形成とCa/CaMなどの関係を明らかにする必要がある。

文献

- 1) Osugi et al., : Biochem. Biophys. Res. Commun., 174, 25-31 (1991)
- 2) Osugi et al., : Mol. Brain Res., 21, 256-262 (1994)
- 3) Osugi et al., : FEBS lett., 391, 11-16 (1996)
- 4) Kuo et al., : Biochem. Biophys. Res. Commun., 255, 406-411 (1999)
- 5) Sadakata et al., Mol. Brain Res., 77, 47-54 (2000)

麻薬依存形成・禁断症状発現に対する脳内グリア型 グルタミン酸トランスポーターの関与

○中川貴之、小澤 徹、重 歌織、山本梨絵、南 雅文、
佐藤公道

京都大学薬学研究科生体機能解析学分野

緒 言

モルヒネなどの麻薬性鎮痛薬は、その連続的使用により容易に耐性および精神的・身体的依存を生じることが知られているが、そのメカニズムに関しては未だ不明な点が多く残されている。これまでに、麻薬の連続的処置による依存形成あるいは禁断症状の発現は、各種グルタミン酸受容体拮抗薬により抑制されること、さらに禁断症状発現時には青斑核などの脳部位において細胞外グルタミン酸濃度が上昇することなどが報告されており、脳内におけるグルタミン酸が重要な役割を果たしていることが示唆されている。一方、シナプス間隙に遊離されたグルタミン酸を取り込むことによりグルタミン酸神経伝達を調節することが知られているグルタミン酸トランスポーターは、これまでに4種類のサブタイプの存在が確認され、そのうちGLT-1およびGLASTは脳内では主にアストロサイトに発現していることが報告されている。麻薬依存の形成過程における神経機能の可塑的変化に、脳内のグリア細胞が何らかの役割を果たしている可能性が考えられることから、本研究ではまず、麻薬依存形成・禁断症状発現に対する脳内グリア型グルタミン酸トランスポーターの関与を行動薬理学的および分子薬理学的に検討した。

実験方法

モルヒネ依存動物を用いた行動薬理学的検討

モルヒネ依存マウスは、雄性ddYマウス(20-25 g)の頸背部皮下に塩酸モルヒネ 11.5 ± 0.3 mgを含有するペレットを1日目に1個埋め込み、3日目に実験に用いた。ペレット除去後、vehicleあるいはグルタミン酸トランスポーター阻害薬DL-threo-β-benzyloxyaspartate(TBOA)を大槽内に投与した。10分後にナロキソン(1 mg/kg)を腹腔内投与し、誘発される典型的な禁断症状の一つである跳躍行動の回数を40分間計数した。

またモルヒネ依存ラットは、雄性SD系ラット(200-250 g)の頸背部皮下にモルヒネ75 mgを含有するペレットを、1日目に1個、2日目に1個、合計2個を埋め込み、

5日目に実験に用いた。VehicleあるいはTBOAを側脳室内に投与し、10分後にナロキソン(0.3 mg/kg)を腹腔内投与し、誘発される様々な禁断症状を1時間観察した。
ラット脳内におけるGLT-1およびGLAST mRNA発現量の解析

モルヒネ依存ラットおよびモルヒネ依存ラットにナロキソン(3 mg/kg)を腹腔内投与し、2時間経過したラットから全脳を摘出し、大脳皮質、海馬、線条体、視床、視床下部、中脳、小脳および橋・延髄におけるGLT-1およびGLASTのmRNAの発現量をnorthern blot法により解析した。また、モルヒネを含まないプラセボペレットを同様の処置により埋め込んだラットをコントロールとして用いた。

実験結果

モルヒネ依存動物におけるナロキソン誘発禁断症状に対するグルタミン酸トランスポーター阻害薬の脳室内投与による影響

モルヒネ依存マウスにおいて、グルタミン酸トランスポーターTBOA(0.01 - 10 nmol)を大槽内投与することにより、ナロキソン誘発跳躍行動は濃度依存的に増加し、0.1、1および10 nmolの用量でvehicle投与群と比較して有意な促進作用が見られた(図1)。同様に、モルヒネ依存ラットにおいても、TBOA(10 nmol)の側脳室内投与により、いくつかの禁断症状(wet-dog shake、跳躍行動、teeth chattering、流涎など)がvehicle投与群と比較して有意に増加した。

モルヒネ依存形成時および禁断症状発現時のラット脳内におけるGLT-1およびGLAST mRNA発現量の解析

モルヒネ依存ラットにおいては、大脳皮質、海馬、線条体、視床、視床下部、中脳および小脳においてGLT-1 mRNA発現量は20-50%減少し、線条体および視床においてはコントロールと比較して有意な減少が見られた。また、禁断症状を誘発したラットの線条体、視床下部および中脳においてはモルヒネ依存形成時と比較してGLT-1 mRNA発現量が増加し、線条体においてはコントロールおよびモルヒネ依存ラットと比較して有意な増加が見られた(図2)。

一方、モルヒネ依存ラットおよび禁断症状誘発ラットの脳内において、コントロール群と比較してGLAST mRNA発現量に有意な変化は見られなかった。

また、GLT-1 mRNAの発現量の変化が顕著であった線条体、およびその近傍に存在し、麻薬依存との関連性が指摘されている側坐核において、in vivoマイクロダイアリシス法により細胞外グルタミン酸濃度の測定を行い、ナロキソン(3 mg/kg)の腹腔内投与により、どちらの部位においても細胞外グルタミン酸濃度が著明に増加することを確認した。

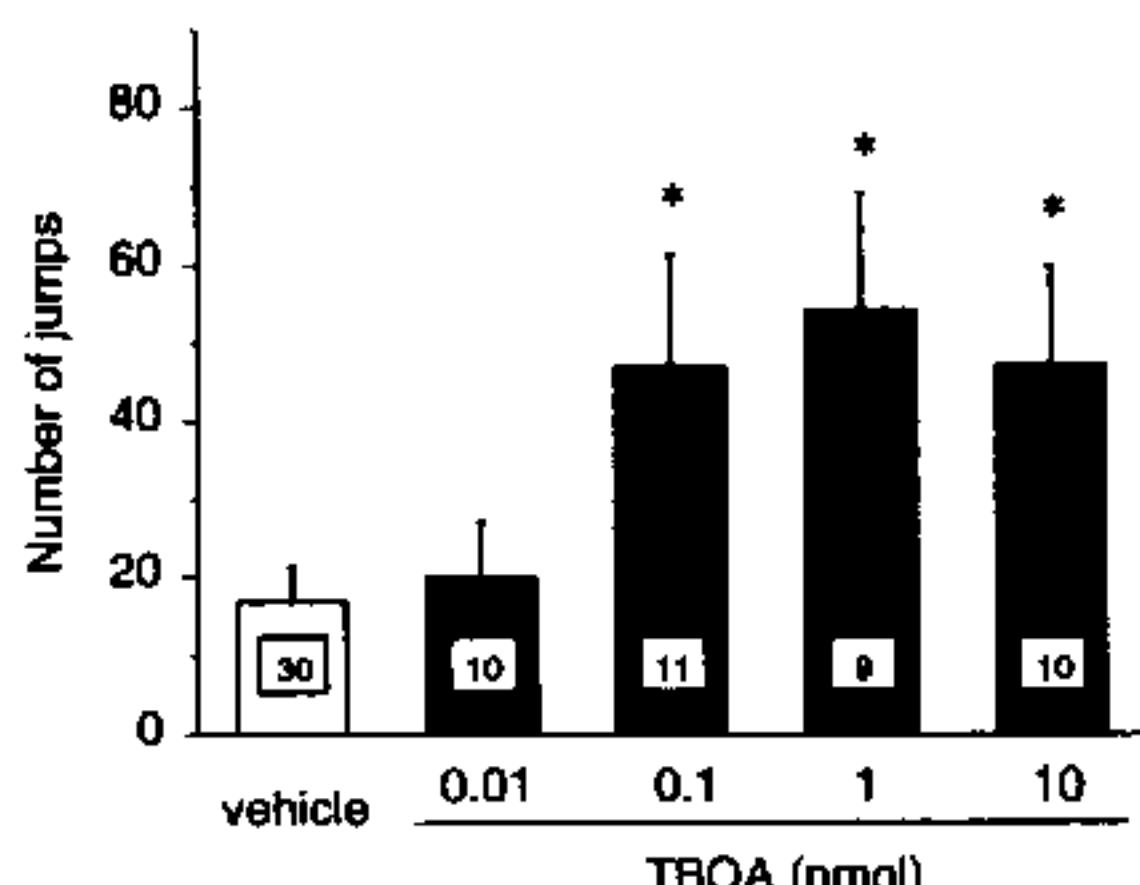


図1 モルヒネ依存マウスにおけるナロキソン誘発跳躍行動に対するグルタミン酸トランスポーター阻害薬TBOA大槽内投与の効果

*P<0.05 vs. vehicle (Mann Whitney U-test)

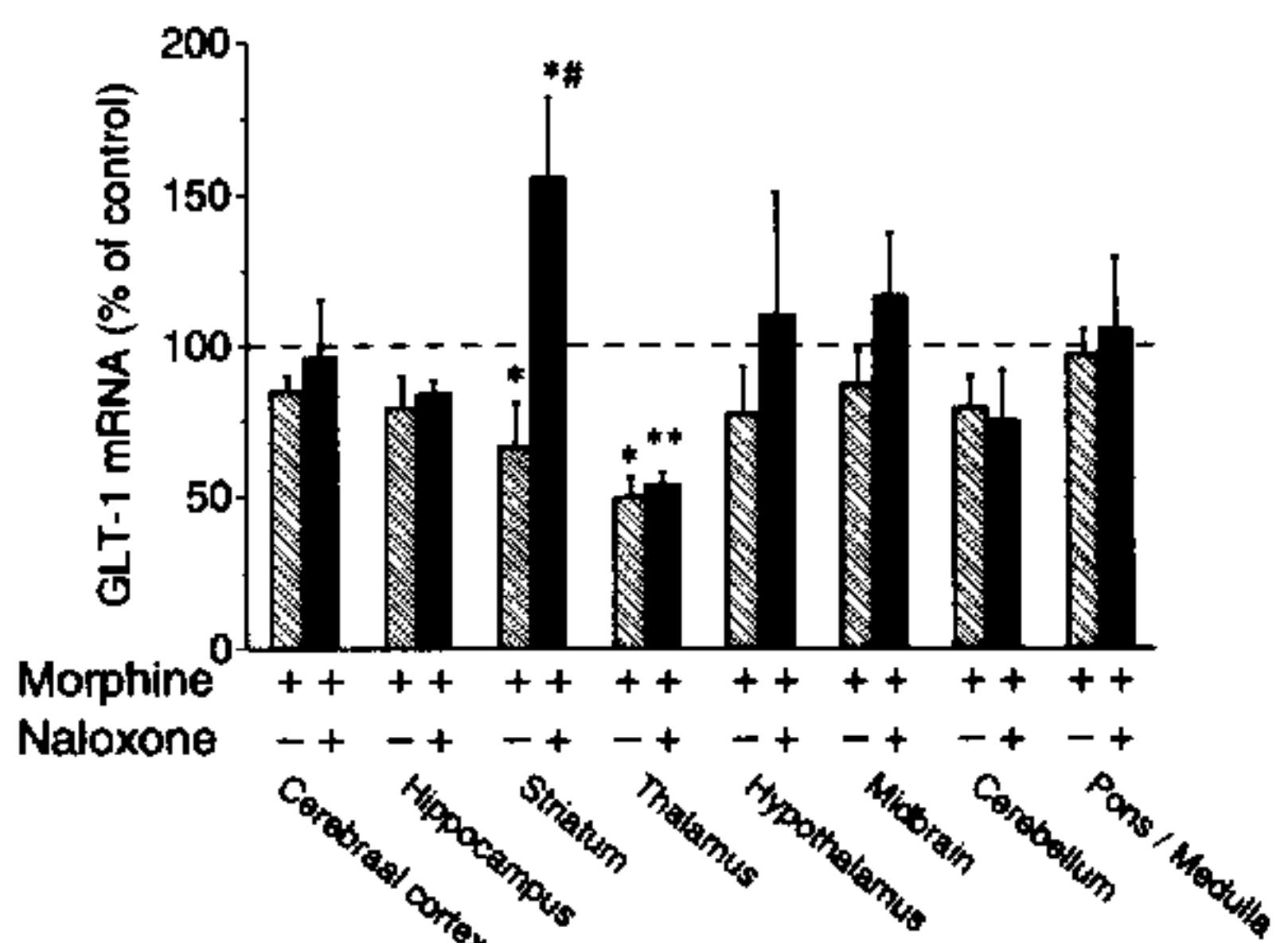


図2 モルヒネ依存および禁断症状誘発ラット脳内におけるGLT-1 mRNA発現量の変化

*P<0.05, **P<0.01 vs. control (placebo pellet treatment), *P<0.05 vs. dependent (morphine +, naloxone -) (Mann Whitney U-test), n=4-6

考 察

モルヒネ依存動物において、グルタミン酸トランスポーター阻害薬TBOAの脳室内投与によりナロキソン誘発禁断症状が有意に促進されたことから、脳内のグルタミン酸トランスポーターが禁断症状の発現あるいはその調節に関与していることが示唆される。そこで次に、モルヒネ依存形成時あるいは禁断症状発現後における脳内グリア型グルタミン酸トランスポーターの発現変化を検討した。その結果、モルヒネ依存形成時にはいくつかの脳部位においてGLT-1 mRNA発現量が減少することを見いだした。このことからモルヒネの連続的使用によりシナプス前終末から放出されたグルタミン酸のアストロサイトへの取り込みが減少し、グルタミン酸神経伝達の効率に変化が生じ、このことがモルヒネ依存形成に関与している可能性が考えられる。一方、ナロキソン投与2時間後には、いくつかの脳部位において依存形成時と比較してGLT-1 mRNAの発現量の増加が見られた。禁断症状発現時には、細胞内cAMP量が激増する、いわゆる "cAMP overshoot" 現象が起こることが知られているが、我々はラット新生仔由来初代培養アストロサイトにおいて種々のcAMP系の活性化薬(isoproterenol、IBMX、dibutyryl cAMP)の処置により、GLT-1 mRNA発現量が増加することを見いだしており、このことが禁断症状発現後のGLT-1 mRNA発現量の増加に関与しているのかもしれない。さらに、GLT-1 mRNA量の発現変化が顕著であった線条体およびその近傍に存在する側坐核においても、青斑核などの脳部位と同様に、禁断症状発現時に細胞外グルタミン酸濃度の増加が見られた。このような現象の一部にグリア型グルタミン酸トランスポーターの発現量の変化が関与している可能性も考えられる。

S-6

抗接着因子SPARCとモルヒネ移所運動活性増強効果

○池本光志¹、滝田正寿²、井上浩太郎¹

通産省・工業技術院・生命工学工業技術研究所

¹生体分子工学部、²生体情報部

【はじめに】

モルヒネの反復投与により形成される耐性・依存現象は、脳内における遺伝子発現変化を伴うことが行動薬理学的に示唆されている。しかしながら、モルヒネ反復投与に伴う遺伝子発現変化の分子機構は依然不明である。これまでに我々は、この分子機構を解明する目的で、モルヒネ反復投与時における脳内遺伝子発現変化について解析を行ってきた。既に我々は、cAMP系を介した遺伝子発現変化が、マウス扁桃体において長期間持続されること(1)、細胞外マトリクスの構成因子で分泌性抗接着性蛋白質である Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC) 蛋白質の発現量が扁桃体外側核においてモルヒネ反復投与時に特異的に増加することを示してきた。

今回我々は、リコンビナントSPARC蛋白質を扁桃体外側核に微量脳内投与を施したマウスに対してモルヒネの単回投与を行うと、モルヒネの反復投与時に観察されるモルヒネ移所運動活性の増強効果（逆耐性）が顕著に誘導されることを見い出したので詳細に報告する。

【方法】

薬物投与： モデルマウスは、金戸らの方法(2)に従い、ddYマウス（雄、6週齢）に1日2回ずつ7日間にわたり塩酸モルヒネを皮下投与することにより作製した。モルヒネ移所運動活性は、最終投与日からそれぞれ7、14、28日目に塩酸モルヒネ100 mg/kgを単回投与後3時間にわたり自動測定した。尚、測定装置は、赤外線自発運動量測定装置 (Scanet SV-10、東洋産業株式会社)を使用した。

SPARC mRNAの定量（定量的RT-PCR）： 凍結脳組織切片より扁桃体外側核をパンチアウトし、Quickprep MicroRNA purification kit (Pharmacia社)を用いてmRNAを抽出後に常法に従って一本鎖cDNAを作製した。SPARC mRNA量は、カイネティクスRT-PCR法(3)により測定した。尚、測定値はGAPDH mRNA量に対して補正を行った。

脳内微量投与： 塩化ペントバルビタールを用いてマウス（雄、7週齢）を麻酔し、マウスを脳固定装置（成茂）に装着後、扁桃体外側核 (Bregma -1.6 mm, Lateral ±3.0 mm, Ventral 3.0 mm) に24ゲージガイドカニューレを挿入した。術後7日目にカニューレを挿入してチオレドキシン-SPARC蛋白質(Trx-SPARC)を0.1 μl/minの速度で5分間微量注入した。術後9日目に塩酸モルヒネ100mg/kgを単回投与してモルヒネ移所運動活性を測定した。

チオレドキシンSPARC蛋白質の調製： SPARC蛋白質全長をコードするcDNA断片(90-1592)をpET32a(+)発現ベクターのBamHIとXholサイトに組み込み、NiキレートカラムおよびSuperdex75ゲル濾過カラムを用いてTrx-SPARC蛋白質ならびにチオレドキシン蛋白質(Trx-Tag)を単離精製した。最終調製試料の含有エンドトキシン量は、Limulus amebocyte lysate法で100 pg/ml未満であり、その純度はCBB染色95%以上であった。また、Trx-SPARC蛋白質が神経培養細胞 (NG108-15, N18TG-2)に対して抗接着活性($ED_{50} = 1.5 \mu M$)を有することを確認した。

【結果】

扁桃体外側核におけるSPARC mRNAの増加と逆耐性現象との相関

SPARC蛋白質ならびにSPARC mRNAは、モルヒネ反復投与により扁桃体外側核において統計的に有意な増加が認められた (mRNA : 181±11 %, n = 4, 蛋白質 : 148±25 %, n = 4)。この現象は、ナロキソンの同時投与により完全に抑制されたことから、オピオイド受容体を介していると考えられた。モルヒネ反復投与により作製したモデルマウスでは、扁桃体外側核におけるmRNA量は、モルヒネ最終投与から 16 時間後に最大(469±47%)になり、休薬 3 日目以降から少なくとも 14 日目までは約 2 倍量を維持したが、休薬 28 日目にはコントロールレベルに低下していた(図 1 A)。一方、逆耐性は、休薬 7 および 14 日目に観察されたが、休薬 28 日目には観察されなかった(図 1 B)。

Trx-SPARC蛋白質を脳内微量注入したマウスにおける逆耐性の惹起

10 pmole のTrx-SPARCを脳内微量注入したマウスでは、100 mg/kgのモルヒネ単回投与により逆耐性が顕著に誘導された。一方、Trx-Tag蛋白質および熱処理(100 °C, 30分間)したTrx-SPARCを各々10 pmole 脳内微量注入したマウスでは逆耐性は認められなかった(図 2 A)。また、10 pmoleのTrx-SPARCを脳内微量注入したマウスでは、逆耐性はモルヒネ皮下投与量依存的に顕著となり、少なくとも10 mg/kg のモルヒネ単回投与により誘導されることが判明した(図 2 B)。また、100 mg/kg のモルヒネ単回投与に対する逆耐性は、Trx-SPARC蛋白質の脳内微量注入量に依存的に明瞭になり、5 pmole以上で観察された。

【考察】

扁桃体外側核におけるSPARC mRNAの増加と逆耐性が強い相関性を示すこと、SPARC蛋白質を扁桃体外側核へ脳内投与処置したマウスがモルヒネ単回投与にもかかわらず逆耐性を示すことから、扁桃体外側核におけるSPARC蛋白質の増加は、逆耐性発現に重要な役割を果たしていると考えられる。SPARC蛋白質は、シナプス形成や神経突起伸展に関するSC1蛋白質と高い相同性を有すること、増殖因子や細胞外マトリクス因子間の相互作用を調節する作用や抗細胞接着作用を有することなどが報告されている。従って、SPARC蛋白質は、脳内ではシナプス結合などを調節する神経可塑性因子として機能している可能性が考えられる。

【参考文献】

- (1) Ikemoto, M. et al. *NeuroReport* 6, 262–264 (1995).
- (2) Kaneto, H. et al. *Jpn. J. Pharmacol.* 23, 701–707 (1973).
- (3) Nakayama, H. et al. *Nucleic Acids Res.* 20, 4939 (1992).

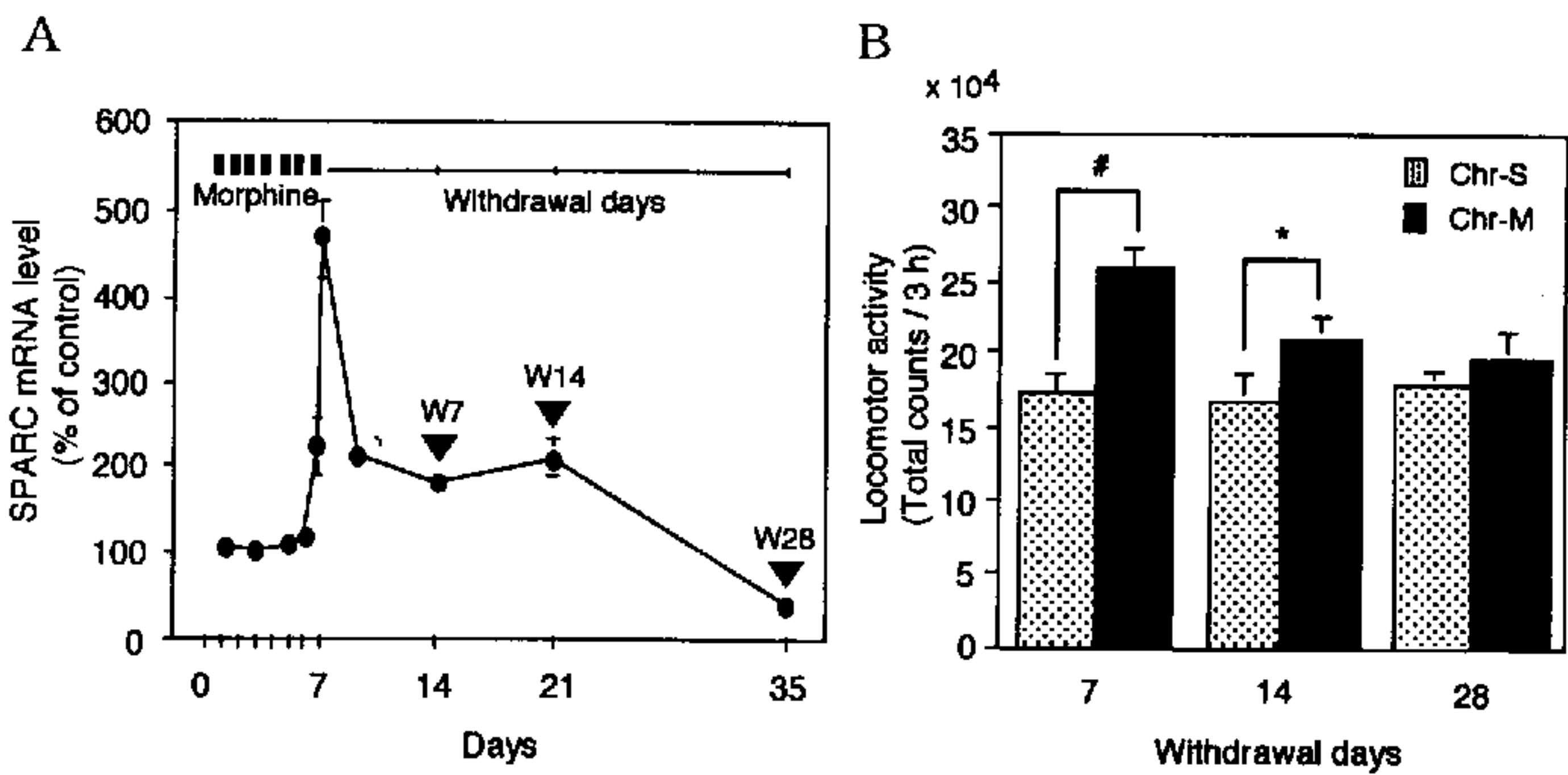


図1 扁桃体外側核におけるSPARC mRNA量の変動とモルヒネ移所運動活性との相関
A モルヒネ反復投与時の扁桃体外側核におけるSPARC mRNA量の経時変動 ($n = 4$)
B 各休薬期におけるモルヒネ単回投与(100 mg/kg, s.c.)により惹起される移所運動活性
Chr-S: 生理食塩水反復投与処置群 ($n = 14$)、Chr-M: モルヒネ反復投与処理群 ($n = 14$)
$P < 0.01$, * $P < 0.05$, unpaired *t*-test

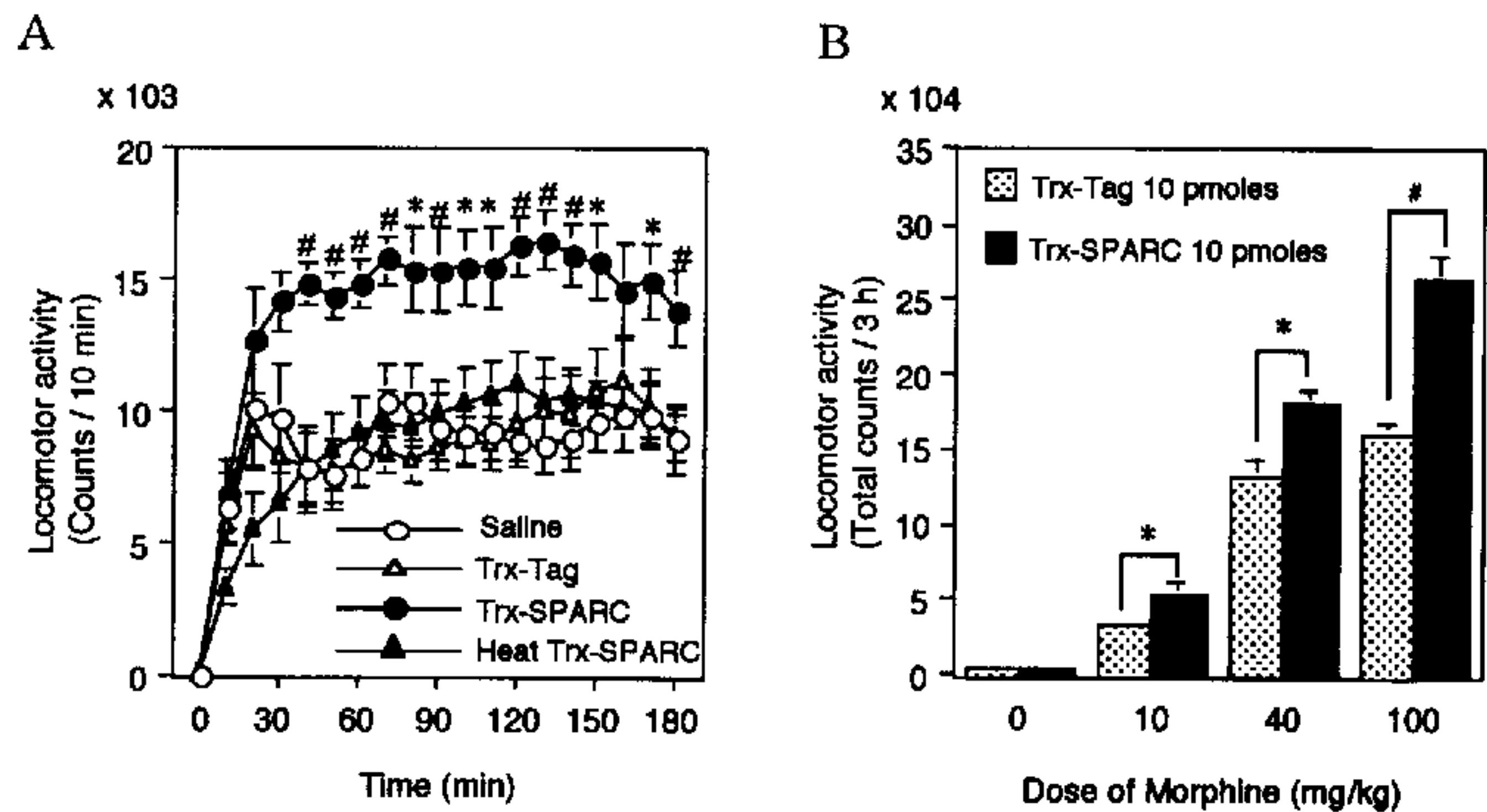


図2 モルヒネ単回投与がTrx-SPARC前処置マウスのモルヒネ移所運動活性に及ぼす影響
A モルヒネ単回投与(100 mg/kg, s.c.)による Trx-SPARC前処置マウスの移所運動活性の経時変化 ($n = 8$) 各試料とも10 pmolesを脳内微量投与した。# $P < 0.01$, * $P < 0.05$, One-way ANOVA.
B モルヒネの用量とモルヒネ移所運動活性の関係 ($n = 8$, 10mg/kg: $n = 11$) # $P < 0.001$, * $P < 0.05$, unpaired *t*-test