

- 【オーラルセッション 1】 9:50-11:30 座長 長瀬 博(東レ) 野崎正勝(生産開発科学研)**
- 09:50 **Bisphenol A の妊娠期および授乳期曝露による morphine 誘発数種薬理作用に及ぼす影響**  
 O1 **水尾圭祐、成田 年、坂田 守、鈴木 勉**  
**星薬科大学薬品毒性学教室**  
 Effects of prenatal and neonatal exposure to bisphenol A on the morphine-induced several pharmacological effect, Keisuke Mizuo, et al, Department of Toxicology, Hoshi University School of Pharmacy and Pharmaceutical Science 1-3
- 10:10 **ストレスおよび CRH による鎮痛と内在性オピオイドペプチドとの関係**  
 O2 **岡 哲雄、小林広幸、小坂賢也、新野康弘、岩尾佳代子、金井昌之、赤堀一仁、高橋 滋、中林 大、金 幸禄、荒井美治**  
**東海大学医学部薬理学教室**  
 Relation between stress- and CRH-induced analgesia and endogenous opioid peptides, Tetsuo Oka, et al, Department of Pharmacology, School of Medicine, Tokai University 4-6
- 10:30 **慢性疼痛下におけるモルヒネによる呼吸抑制作用の変化**  
 O3 **亀井淳三、松縄保宏、圃子田康**  
**星薬科大学薬物治療学教室**  
 Modulation of morphine-induced respiratory depression by painful neuropathy Junzo Kamei, et al, Department of Pathophysiology & Therapeutics, Hoshi University School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 7-9
- 10:50 **オピオイド 受容体作動薬による抗うつ作用**  
 O4 **齋藤顕宣、木村祐治、桑谷ひふみ、鈴木知比古、河合孝治、田中利明、成田 年\*、溝口広一\*\*、亀井淳三\*\*\*、長瀬 博**  
**東レ(株)医薬研究所、星薬科大学薬品毒性学教室\*、ウイスコンシン医科大学麻醉科\*\*、星薬科大学薬物治療学教室\*\*\***  
 Antidepressant effects of the opioid  $\delta$  agonist, Akiyoshi Saitoh, et al Toray industries, Inc. Pharmaceutical Research Laboratories 10-13
- 11:10 **Prepulse inhibition 障害に対する endomorphin-1 の影響**  
 O5 **鵜飼 良、奥田亜美、間宮隆吉**  
**名城大学薬学部薬品作用学教室**  
 Effects of endomorphin-1 on impairments of prepulse inhibition in mice, Makoto Ukai, et al, Department of Chemical Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Meijo University 14-17

# Bisphenol A の妊娠期および授乳期曝露による morphine 誘発数種薬理作用に及ぼす影響

水尾 圭祐, 成田 年, 坂田 守, 鈴木 勉  
星薬科大学薬品毒性学教室

## Effects of prenatal and neonatal exposure to bisphenol A on the morphine-induced several pharmacological effect

Keisuke Mizuo, Minoru Narita, Mamoru Sakata and Tsutomu Suzuki  
Department of Toxicology, Hoshi University School of Pharmacy and  
Pharmaceutical Science

Summary: Recently, the general public has received alarming reports regarding the reproductive and health hazards of endocrine-disrupting chemicals in the environment. Bisphenol-A (BPA) is now used as the monomer for the production of polycarbonate plastics. Although recent studies warn that the administration of BPA to pregnant female mice on gestation days produces significant changes in the postnatal growth rate, little is known about the neuronal toxicity induced by BPA in the CNS. The present study was then designed to ascertain whether prenatal treatment with BPA could cause any changes in the mouse CNS system. All experiments were performed using male ddY mice prenatally exposed to BPA. The parents were chronically treated with BPA-admixed food from mating days. The mice prenatally and neonatally exposed to BPA were used for all experiments as B0, B0.002, B0.5 and B2. In the present study, we found for the first time that prenatal and neonatal exposure to BPA leads to the up-regulation of mesolimbic dopaminergic neurotransmission to enhance the rewarding effect and hyperlocomotion by morphine in mice.

### 緒言

近年、環境中に存在するいくつかの化学物質は、生体内に取り込まれることにより、内分泌系に影響を及ぼすことが明らかにされている。このような物質は内分泌かく乱化学物質 (endocrine disruptor) と呼ばれ、生殖器

系ならびに免疫系に対して影響を及ぼすことが数多く報告されている<sup>1,2</sup>。さらに最近では、内分泌かく乱化学物質の中枢神経系に及ぼす影響も懸念されており、我が国のみならず世界中で深刻な社会問題を引き起こしている。

Bisphenol A は、主にプラスチック製の食品容器や歯科用医療品などに使用されているが、

加熱により容易に溶出することが知られている。近年、環境中に存在するような低濃度の bisphenol A に曝露されたマウスにおいて、その仔の性的成長に影響を与えることが報告されている<sup>3</sup>。しかし、中枢神経系に対する影響についての検討ははまだほとんど行われていない。

そこで、本研究では bisphenol A を妊娠期および授乳期に曝露したマウスにおける行動影響について、morphine 誘発数種薬理作用を中心に検討した。

## 方法

実験には ddY 系マウスを使用した。Bisphenol A 慢性曝露は薬物混入飼料法に従って行った。Bisphenol A をそれぞれ 0.002、0.5、2 mg/g of food の用量で、雄は交配 2 日前、雌は交配日より処置を開始し、分娩後仔供を離乳させるまで処置を行った。Bisphenol A を各用量で処置した親から生まれたマウスをそれぞれ B0.002 群、B0.5 群、B2 群とし、bisphenol A を曝露しない control 群を B0 群とした。

自発運動量の測定は tilting-cage 法に従い、morphine (10 mg/kg, s.c.) を処置して自発運動量を 10 分間隔で計 180 分間測定した。報酬効果は conditioned place preference 法に従って測定した。条件づけはカウンターバランス方式を採用し、1 日 60 分間、計 6 日間行った。また、dopamine あるいは morphine による G-protein 活性化作用を検討するために [<sup>35</sup>S]GTP S を用いて結合実験を行った。また、RT-PCR 法に従い whole brain における D<sub>1</sub> 受容体の mRNA の発現量の変化を測定した。

## 結果および考察

まず、morphine 誘発自発運動促進作用における bisphenol A 慢性曝露による影響について検討を行った結果、B2 群において、B0 群と比較して morphine 誘発自発運動促進作用の有意な増強が認められた。次に、morphine 誘発報酬効果を検討した結果、B0 群において報酬効果の認められない用量で全ての bisphenol A 曝露群において有意な報酬効果の発現が認められた。Morphine は主に中脳辺縁 dopamine 神経の起始部である腹側被蓋野に存在する  $\mu$ -opioid 受容体に作用し、GABA の遊離を抑制することにより dopamine 遊離量を増大させ、報酬効果ならびに自発運動促進作用を発現させることが知られている<sup>4</sup>。これらの背景と本研究の結果より、bisphenol A 胎児期慢性曝露マウスは  $\mu$ -opioid 受容体、あるいは中脳辺縁 dopamine 神経系の機能亢進が生じている可能性が考えられる。そこで、腹側被蓋野を含む領域である lower midbrain より得られた膜標本を用いて morphine 誘発 G-protein 活性化作用について検討を行った。しかしながら、B2 群における morphine 誘発 G-protein 活性化作用は B0 群と比較して有意な差は認められなかった。そこで limbic forebrain における dopamine 誘発 G-protein 活性化作用について検討した結果、B2 群において、dopamine 誘発 G-protein 活性化作用の有意な増強が認められた。この dopamine 誘発 G-protein 活性化作用の増強は選択的 dopamine D<sub>1</sub> 受容体拮抗薬 SCH23390 の併用によって有意に抑制されたが、選択的 dopamine D<sub>2</sub> 受容体拮抗薬 sulpiride の併用によっては影響を受けな

った。そこで、whole brain における  $D_1$  受容体の mRNA の発現量の変化を検討した結果、B2 群において  $D_1$  受容体 mRNA の有意な増加が認められた。これらのことより、本研究で得られた bisphenol A 群における morphine 誘発薬理作用の増強に  $D_1$  受容体の up-regulation が一部関与していると考えられる。以上、本研究において bisphenol A を胎児期に慢性的に曝露することにより morphine の依存形成が増強されることが明らかとなり、bisphenol A は精神依存形成に重要な役割を担う中脳辺縁 dopamine 神経系の発達に著明な影響を与える可能性が示唆された。

## 引用文献

1. Kloas, W., Lutz, I., Einspanier, R., 1999. Amphibians as a model to study endocrine disruptors: II. Estrogenic activity of environmental chemicals in vitro and in vivo. *Sci. Total Environ.* 225, 59-68
2. Lutz, I., Kloas, W., 1999. Amphibians as a model to study endocrine disruptors: I. Environmental pollution and estrogen receptor binding. *Sci. Total Environ.* 225, 49-57
3. Howdeshell, K. L., Hotchkiss, A. K., Thayer, K. A., Vandenberg, J. G., vom Saal, F. S., 1999. Exposure to bisphenol A advances puberty. *Nature* 401, 763-764
4. Narita, M, Funada, M., Suzuki, T., 2001. Regulation of opioid dependence by opioid receptor types. *Pharmacol. Ther.* 89, 1-15

# ストレスおよび CRH による鎮痛と内在大オピオイドペプチドとの関係

岡 哲雄、小林広幸、小坂賢也、新野康弘、岩尾佳代子、金井昌之、  
赤堀一仁、高橋 滋、中林 大、金 幸禄、荒井美治  
東海大学医学部薬理学教室

## Relation between stress- and CRH-induced analgesia and endogenous opioid peptides

Tetsuo Oka, Hiroyuki Kobayashi, Kenya Kosaka, Yasuhiro Niino, Kayoko Iwao, Masayuki Kanai, Kazuhito Akahori, Shigeru Takahashi, Masaru Nakabayashi, Xing Lu Jin, Yoshiharu Arai

Department of Pharmacology, School of Medicine, Tokai University

Summary: Previous in vitro studies showed that the hydrolysis of five endogenous opioid peptides, [Met<sup>5</sup>]-enkephalin (met-enk), [Leu<sup>5</sup>]-enkephalin, met-enk-Arg<sup>6</sup>-Phe<sup>7</sup>, met-enk-Arg<sup>6</sup>-Gly<sup>7</sup>-Leu<sup>8</sup> and dynorphin A-(1-8), by cerebral membrane preparations is almost completely prevented by a mixture of three peptidase inhibitors (PIs), amastatin, captopril and phosphoramidon. In order to elucidate the role of the five opioid peptides in the stress-induced anti-nociception, effects of the three PIs on the stress-induced anti-nociception in rats were examined in the present investigation. Anti-nociceptive effects induced by either the stress or the intra-third ventricular (i.t.v.) administration of corticotropin releasing hormone (CRH) were significantly augmented by the i.t.v. pretreatment of rats with three PIs. Additionally, the anti-nociceptive effects in rats pretreated with three PIs were antagonized by either the s.c. injection of naloxone or the i.t.v. administration of CRH antagonist. Thus, the results in the present investigation indicate the involvement of five opioid peptides in both the stress- and the CRH-induced anti-nociception.

## 緒言

内在大オピオイドペプチドには、プロオピオメラノコルチン (POMC) に由来する - エンドルフィン、プロエンケファリン A に由来するメチオニンエンケファリン (met-enk) ロイシンエンケファリン (leu-enk)、met-enk-Arg<sup>6</sup>-Phe<sup>7</sup> (met-enk-RF) ,

met-enk-Arg<sup>6</sup>-Gly<sup>7</sup>-Leu<sup>8</sup> (met-enk-RGL) 、およびプロエンケファリン B に由来するダイノルフィン A-(1-8) [Dyn A-(1-8)]、ダイノルフィン A-(1-17)、ダイノルフィン B (リモルフィン) 、および - ネオエンドルフィンなどがあることが知られている<sup>1-3)</sup>。

これらのペプチドのなかで、met-enk、leu-enk、met-enk-RF、met-enk-RGL、Dyn A-(1-8)

など5～8のアミノ酸残基のものは、脳の膜標本と37で60分間インキュベーションするとほぼ完全に加水分解される。しかし、3種のペプチダーゼ阻害剤(PIs)(アマスタチン、ホスホラミドン、カプトプリル)の1 $\mu$ Mを共存させると、これら5種の内在性オピオイドペプチドの加水分解はほぼ完全に阻止されることが、私達の研究で明らかにされた<sup>4-7)</sup>。

また、3種のPIsをラット脳の第3脳室に投与後に、これら5種のオピオイドペプチドを第3脳室に投与すると、PIs非投与群に比べ、鎮痛効果は数百～数千倍程度増強された<sup>8-9)</sup>。

そこで今回は、ストレスおよびCRH(corticotropin releasing hormone)による抗侵害効果に及ぼすPIsの影響を検討することにより、ストレスおよびCRHによる抗侵害効果に対する内在性オピオイドペプチドの関与を明らかにすることを研究の目的とした。

## 実験方法

体重180～220gのWistar系雄性ラットの第3脳室に、カニューレを介して薬液を10 $\mu$ l/minの速度で投与後、15分毎に120分目まで、55の温水を用いtail-flick response(TFR)を測定した。なお、TFRのcut off timeは5秒とした。そして、%MPE(maximal possible effect)を求めるとともに、必要に応じてAUC(area under the curve)値も求めた。

また、ラットの四肢を金網に縛り、頭部を上にして金網を垂直に立ててラットの剣状突起まで室温の水に15分間入れることによりストレスを与えた。

## 実験結果

(1)ストレスを与えることによりTFRは有意に抑制された。また、ストレスによるTFRの抑制は、3種のPIsを第3脳室内に前投与することにより有意に増強された。

(2)3種のPIsで前処置したラットのストレスによるTFRの抑制は、オピオイド受容体拮抗薬のnaloxoneの皮下投与およびcorticotropin releasing factor antagonistの第3脳室内投与により拮抗された。

(3)第3脳室にCRHを投与すると、TFRはわずかに抑制された。しかし、第3脳室に3種のPIsを投与後にCRHを投与すると著しい有意なTFRの抑制が認められた。

(4)3種のPIsで前処置したラットにCRHを投与した後にみられるTFRの抑制は、naloxoneの皮下投与、およびcorticotropin releasing factor antagonistの第3脳室内投与により拮抗された。

## 考察

ストレスおよびCRHによる抗侵害効果は、ストレスCRHの遊離 - エンドルフィンの遊離 抗侵害効果の順に生じると考えられる。

しかし、 - エンドルフィンの摘出モルモット回腸標本における電気刺激に応じた収縮抑制効果は、3種のPIsにより大きくなる。一方、5～8のアミノ酸残基から成る5種のオピオイドペプチドの抑制効果は、3種のPIsにより有意に大きくなる。つまり、5～8種のアミノ酸残基から成る5種のオピオイドペプチドは、この標本に存在する3種のペプチダーゼにより不活化されるが、31のアミノ酸残基から成る - エンドルフィン是不活性化されないと考えられる。また、脳の膜標本に存在する3種のペプチダーゼでも - エンドルフィンが加水分解されないことが示唆されている。

それでは今回の実験結果をどのように説明すればいいのだろうか。以下の3つが考えられる。(1) - エンドルフィンはin vivoでは3種のペプチダーゼで加水分解不活性化される、(2)CRHは、 - エンドルフィンとともに、5～8のアミノ酸残基から成るオピ

オイドペプチドも遊離させる、(3) - エンドルフィンが、5 ~ 8のアミノ酸残基から成るオピオイドペプチドを遊離させる。このなかのどれが正しいかは、今後の実験で明らかにされることが期待される。

## 引用文献

- 1) Nakanishi S, Inoue A, Kita T, Nakamura M, Chang ACY, Cohen SN, Numa S. Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin- $\beta$ -lipotropin precursor. *Nature*. 278:423-7, 1979
- 2) Noda M, Furutani Y, Takahashi H, Toyosato M, Hirose T, Inayama S, Nakanishi S, Numa S. Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin. *Nature*. 295:202-6, 1982
- 3) Kakidani H, Furutani Y, Takahashi H, Noda M, Morimoto Y, Hirose T, Asai M, Inayama S, Nakanishi S, Numa S. Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine  $\beta$ -neo-endorphin/dynorphin precursor. *Nature*. 298:245-9, 1982
- 4) Hiranuma T, Oka T. Effects of peptidase inhibitors on the [Met<sup>5</sup>]-enkephalin hydrolysis in ileal and striatal preparations of guinea-pig: almost complete protection of degradation by the combination of amastatin, captopril and thiorphan. *Jpn J Pharmacol*. 41(4):437-46, 1986
- 5) Hiranuma T, Iwao K, Kitamura K, Matsumiya T, Oka T. Almost complete protection from [Met<sup>5</sup>]-enkephalin-Arg<sup>6</sup>-Gly<sup>7</sup>-Leu<sup>8</sup> (Met-enk-RGL) hydrolysis in membrane preparations by the combination of amastatin, captopril and phosphoramidon. *J Pharmacol Exp Ther*. 281(2):769-74, 1997
- 6) Hiranuma T, Kitamura K, Taniguchi T, Kanai M, Arai Y, Iwao K, Oka T. Protection against dynorphin-(1-8) hydrolysis in membrane preparations by the combination of amastatin, captopril and phosphoramidon. *J Pharmacol Exp Ther*. 286(2):863-9, 1998
- 7) Hiranuma T, Kitamura K, Taniguchi T, Kobayashi T, Tamaki R, Kanai M, Akahori K, Iwao K, Oka T. Effects of three peptidase inhibitors, amastatin, captopril and phosphoramidon, on the hydrolysis of [Met<sup>5</sup>]-enkephalin-Arg<sup>6</sup>-Phe<sup>7</sup> and other opioid peptides. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 357(3):276-82, 1998
- 8) Taniguchi T, Fan XT, Kitamura K, Oka T. Effects of peptidase inhibitors on the enkephalin-induced anti-nociception in rats. *Jpn J Pharmacol*. 78(4):487-92, 1998
- 9) Kitamura K, Akahori K, Yano H, Iwao K, Oka T. Effects of peptidase inhibitors on anti-nociceptive action of dynorphin-(1-8) in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 361(3):273-8, 2000

# 慢性疼痛下におけるモルヒネによる呼吸抑制作用の変化

亀井淳三、松縄保宏、園子田康  
星薬科大学薬物治療学教室

## Modulation of morphine-induced respiratory depression by painful neuropathy

Junzo Kamei, Yasuhiro Matsunawa, Ko Zushida  
Department of Pathophysiology & Therapeutics, Hoshi University  
School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tokyo Japan.

Summary: Naive rats treated with morphine (20 mg/kg, s.c.) once a day for 4 days reveals the development of antinociceptive tolerance and respiratory depression. However, same treatment with morphine (20 mg/kg, s.c.) did not reveal the development of antinociceptive tolerance in sciatic nerve ligation-induced neuropathic rats. Furthermore, morphine-induced respiratory depression was not observed in neuropathic rats. The present data indicate the possibility that presence of neuropathic pain prevent the respiratory depression and the development of antinociceptive tolerance of morphine.

## 緒言

WHO方式がん疼痛治療法に沿った、モルヒネ等の鎮痛薬を使用したがん疼痛緩和治療法が普及しつつある。モルヒネの持つ副作用の一つである依存性の問題に関しては、身体的依存も精神的依存も疼痛治療における必要量の使用ではほとんど問題の無いことが、臨床的にも動物を用いた基礎研究からも明らかになりつつある。さらに、鎮痛耐性もほとんど問題ないとされている。一方、呼吸抑制作用に関しては、鎮痛に用いる適切な量のモルヒネでは呼吸抑制の発現はまれであると報告されているが、それを証明する基礎的な研究は行われていない。また、疼痛下におけるモルヒネの呼吸抑制作用に対する耐性形成能の変化に関する詳細な検討もない。そこで本研究では、慢性疼痛下におけるモルヒネによる呼吸抑制作用の変化を鎮痛作用の変化と比較検討するとともに、慢性疼痛下におけるモルヒ

ネの呼吸抑制に対する耐性形成の変化を鎮痛効果に対する耐性形成と比較検討した。

## 実験方法

### 実験動物

実験には 8 週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラットを用いた。

### 慢性疼痛モデル

慢性疼痛モデルは seltzer らの神経因性疼痛モデル作成方法を応用し<sup>1)</sup>、左足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。これらの動物は手術後 7 日目に痛覚過敏の有無を確認した後、モルヒネ (20 mg/kg, s.c.) を 1 日 1 回 7 日間反復投与し、その間の 1, 4, 7 日目において、モルヒネによる抗侵害効果および呼吸抑制作用の測定を行った。

## 侵害受容閾値の測定

侵害受容閾値の測定には神経因性疼痛様症状をより客観的に評価できる足底熱刺激装置を用いた。侵害受容閾値の測定はモルヒネ投与 30、60、90、120 分後に測定した。抗侵害効果は、縦軸に %MPE を横軸に時間をプロットした時間反応曲線における下側の面積すなわち、area under the curve (AUC) を算出することにより評価した。

## 呼吸抑制の測定

測定には自動呼吸機能測定装置(Oxymax : Columbus Instruments 製)を用いて、無拘束下に呼吸回数、酸素消費量、二酸化炭素排出量を経時的に計測し、解析した。呼吸抑制は薬物投与直後の呼吸回数と、投与後 30 分、60 分、90 分それぞれの呼吸回数から呼吸抑制率を算出することにより評価した。

# 結果

## モルヒネの抗侵害効果

モルヒネ (20 mg/kg) の反復投与によって、投与初日において sham 群および結紮群ともに有意な抗侵害効果が認められた。しかし、sham 群においては投与開始 4 日目において有意な抗侵害効果の減弱が認められ、さらに 7 日目において抗侵害効果はほぼ消失した。一方、結紮群におけるモルヒネによる抗侵害効果は投与開始 4 日目においてなんら変化は認められず、sham 群に対し有意な抗侵害効果の発現が認められた。しかしながら、投与開始 7 日目におけるモルヒネの抗侵害効果は sham 群のそれと同程度にまで減弱した (Fig. 1)。

## モルヒネの呼吸抑制作用

モルヒネ (20 mg/kg) の反復投与によって、sham 群においては投与初日にだけ、著明な呼吸回数の抑制が認められた。また、この呼

吸回数の抑制は 90 分以上持続した。しかし、4 日目、7 日目にモルヒネによる呼吸回数の抑制は認められなかった。一方、結紮群においてはモルヒネを反復投与しても、1、4、7 日目のいずれにおいても、モルヒネによる呼吸回数の抑制は認められなかった (Fig. 2)。

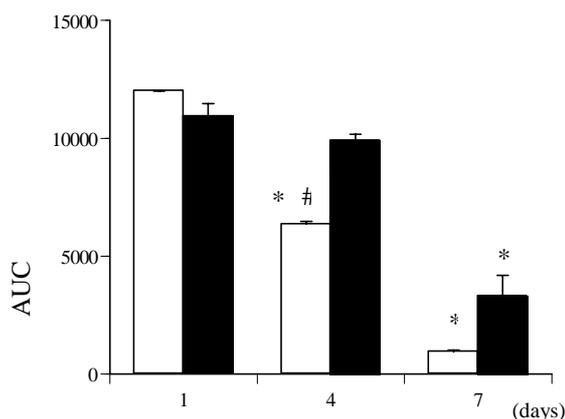


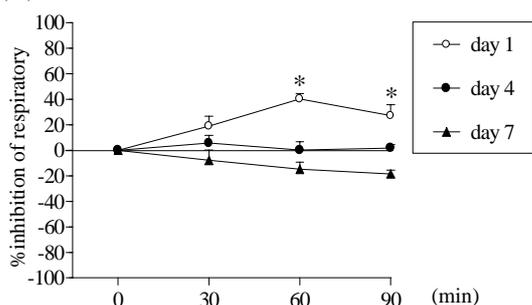
Figure 1. Development of antinociceptive tolerance to repeated administration of morphine in sham-operated (open column) and sciatic nerve ligation-induced neuropathic rats (closed column). Rats were treated with morphine (20 mg/kg, s.c.) once a day for 7 days. The antinociceptive effect of morphine was examined 30, 60, 90 and 120 min after the injection of morphine at days of 1, 4 and 7. Area under the antinociceptive latency-time curve (AUC) obtained by joining the mean values of the antinociceptive latency obtained between 0 and 120 min. Each column represents the mean with S.E. (n=5). \*P<0.05 vs respective 1st day group. #P<0.05 vs respective neuropathic rats.

# 考察

高用量のモルヒネ (20 mg/kg) の投与により、結紮群、sham 群ともに有意な抗侵害効果が認められた。従来、今回用いた坐骨神経結紮ラットの様な神経因性疼痛に対して、モルヒネの末梢投与は殆ど無効であるとされてきた。しかし、近年、神経因性疼痛動物実験モデルに対する高用量のオピオイド類による鎮痛効果が報告されており<sup>2)</sup>、今回の結果はそれに

沿うものであった。一方、モルヒネ (20 mg/kg) の投与による鎮痛効果に対して、結紮群においては 7 日目に、sham 群においては 4 日目から明らかな鎮痛耐性が生じた。これらのことより、坐骨神経結紮ラットの様な慢性疼痛下においては、高用量のモルヒネによる鎮痛耐性の形成能も減弱していることが明らか

(A)



(B)

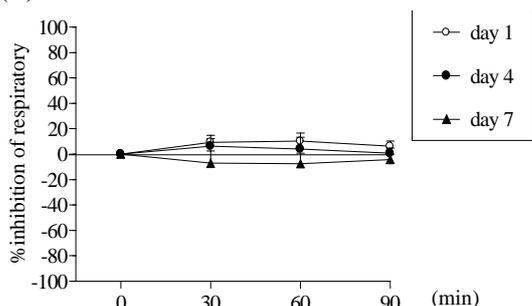


Figure 2. Effect of repeated administration of morphine on the respiratory frequency in sham-operated (A) and sciatic nerve ligation-induced neuropathic rats (B). Rats were treated with morphine (20 mg/kg, s.c.) once a day for 7 days. The effect of morphine on the respiratory frequency was examined 30, 60 and 90 min after the injection of morphine at days of 1, 4 and 7. Each point represents the mean with S.E. for 5 rats. \*P<0.05 vs baseline response.

となった。また、sham 群に対するモルヒネの投与によって、投与初日に有意な呼吸回数の抑制が認められたが、4 日目、7 日目には認められなかったことから、高用量のモルヒネによって認められる呼吸抑制は鎮痛耐性同様に耐性の形成が早いことも明らかとなった。一方、結紮群のような慢性疼痛下においては、高用量のモルヒネによっても呼吸抑制は認められないことが明らかとなった。

今回の結果より鎮痛耐性と同様に、呼吸抑制作用も慢性疼痛下においては起きにくい可能性が示唆された。

## 引用文献

- Selzer Z, Dubner R, Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain*. 43(2):205-218,1990
- Bachonja M, Miletic G, Miletic V. The effect of continuous morphine analgesia on chronic thermal hyperalgesia due to sciatic constriction injury in rats. *Neurosci Lett*. 196:61-65,1995

# オピオイド 受容体作動薬の抗うつ作用

齋藤顕宜、木村祐治、桑谷ひふみ、鈴木知比古、河合孝治、田中利明、  
成田 年\*、溝口広一\*\*、亀井淳三\*\*\*、長瀬 博

東レ(株)医薬研究所、星薬科大学薬品毒性学教室\*、  
ウイスコンシン医科大学麻酔科\*\*、星薬科大学薬物治療学教室\*\*\*

## Antidepressant effects of the opioid $\delta$ agonist

Akiyoshi Saitoh, Yuji Kimura, Hifumi Kumeya, Tomohiko Suzuki, Kouji Kawai, Toshiaki Tanaka,  
Minoru Narita\*, Hirokazu Mizoguchi\*\*, Junzo Kamei\*\*\*, Hiroshi Nagase  
Toray industries, Inc. Pharmaceutical Research Laboratories  
Hoshi University Dept. of Toxicology\*  
Medical College of Wisconsin Dept. of Anesthesiology\*\*  
Hoshi University Dept. of Pathophysiology & Therapeutics\*\*\*

Summary: Recently it has been reported that opioid  $\delta$  receptors were associated with the regulation of the emotional responses. In the present study, we investigated the antidepressant and the anxiolytic effects of the opioid  $\delta$  agonist in various animal models in rodents. SNC80 (0.3~3 mg/kg, s.c.) and TAN-670 (1~10 mg/kg, s.c.) significantly reduced the immobility time in the forced swim test (an animal model of depression). Furthermore, in the elevated plus-maze test (an animal model of anxiety), SNC80 (1~10 mg/kg, s.c.) and TAN-670 (1~10 mg/kg, s.c.) dose-dependently and significantly increased the time-spent on the open arm of the plus maze, compared with control. These effects were completely antagonized by the opioid  $\delta$  receptor antagonist, naltrindole (1, 3 mg/kg, s.c.). In the conditioned fear stress test, defined as the psychological stress-induced motor suppression, desipramine (a tricyclic antidepressant) and fluvoxamine (a selective serotonin reuptake inhibitor) partially reduced the conditioned suppression in motility, while SNC80 exhibited the significant attenuation of the motility suppression in a dose-dependent manner. From these results, it was demonstrated that the opioid  $\delta$  receptors might play an important role in the regulation of the emotional responses. Thus, we suggested that the opioid  $\delta$  receptor agonist might be a novel antidepressant, which also possessed together with the anxiolytic effects.

## 緒言

DSM-IVの診断基準によると感情障害は気分障害と不安障害に大別される<sup>1)</sup>。一般的にうつ病と言われている気分障害は、活力の喪失、希死念慮といった抑うつ気分が長期に渡ることを特徴とし、治療しない場合は自殺に至る場合が多い。一方、神経症・心身症とも言われている不安障害は明らかな理由がないのにストレスに対して持続的で過剰な恐怖・不安反応(発作)を示す精神疾患である。従来から感情障害は、1)三・四環系抗うつ薬反応症候群を気分障害として、2)ベンゾジアゼピン系抗不安薬反応症候群を不安障害として分類されてきた。これら薬物はその副作用の強さ・重篤さから使用が制限されてきたが、より安全性の高い治療薬としてここ20年余りで欧米を中心に選択的セロトニン再取り込み阻害薬(selective serotonin reuptake inhibitor: SSRI)が使用されるようになってきた。

このSSRIはその安全性の高さから気分障害(うつ病)だけでなく強迫性神経障害やパニック障害といったうつ病周辺領域の疾患や不安障害などへの適応が拡大されつつある。しかし、SSRIには依然として性機能障害や消化器障害といった副作用や、治療効果発現までのタイムラグ、重症うつ病患者への低い治療効果といった問題が指摘されており、治療効果が確実で安全性の高い新規抗うつ薬の開発が望まれている。

最近、オピオイド受容体がうつ・不安などの感情の調節に重要な役割を担っていることを示唆する報告がなされた。オピオイド受容体の内因性リガンドであるエンケファリンの欠損マウスに著明な攻撃行動の増加や0型迷路試験の壁なし走行路滞在時間の短縮など、強い不安様行動が認められることが報告され<sup>2,3)</sup>、さらにFilliolら<sup>4)</sup>によって、オピオイド受容体欠損マウスが強制水泳試験の

無動時間の延長や、高架式十時迷路試験の壁なし走行路滞在時間の短縮などうつ／不安様行動を示すことが報告された。ところでオピオイド 受容体選択的作動薬である TAN-670 や SNC80 の薬理作用として鎮痛作用などが報告されているが、抗うつ作用や抗不安作用についてはまだ明らかにされていない。そこで本検討ではオピオイド 受容体作動薬の感情障害治療薬としての可能性を評価するために、各種情動モデルを用いて TAN-670 および SNC80 の抗うつ作用および抗不安作用について検討した。

## 実験方法

### 強制水泳試験

実験には ICR 系雄性マウス（日本 CRJ）4 週齢を使用した。強制水泳試験は、Porsolt 等<sup>5)</sup>の報告を参考にして行った。水中における強制的な水泳行動の測定にはスーパーメックス（室町機械社製）を用い、強制水泳は円筒形強制水泳プール（内径 10 cm、高さ 25 cm）を用いた。試験に使用する水は水温 23-24 に設定し、実験毎に新しい水に交換した。また、強制水泳試験（テストセッション）の前にトレーニングセッションとして、1セッション 10 分間の強制水泳を 4 セッション行い、テストセッションとして 4 分間の強制水泳を行った。なお、トレーニングセッションにより、一定時間以上無動化を示す動物を選別した。

### 高架式十時迷路試験

実験には Wistar 系雄性ラット（日本 SLC）8 週齢を使用した。高架式十時迷路にはラット用高架式十字迷路装置（ニューロサイエンス社製）を用いた。プラットホーム上（中心部）にラットの頭が壁有り走行路へ向くように置き、別室よりビデオモニター（室町機械社製：Comp ACT）を介して目視にてそれぞれの走行路への侵入回数および滞在時間について 3 分間観察した。ラットの四肢が壁無し走行路上に入ったときを侵入回数としてカウントし、またラットの胴体の 1/2 以上が壁無し走行路へまたいだときを滞在時間とみなした。

### 恐怖条件付けストレス試験

実験には 9 週齢以上の雄性 ICR マウス（日本クレア）を使用した。マウス恐怖条件付け試験は、Kameyama 等<sup>6-7)</sup>の報告を参考にして

行った。実験一日目、防音箱中にてマウスに電流刺激を与え（1.3 mA，0.3 sec/10 sec, for 4 min）home cage に戻した。実験二日目、再度防音箱中にマウスを投入し自発運動量を赤外線装置により 4 分間測定した。自発運動量は赤外線フォットセンサーを備えた行動量測定装置（ニューロサイエンス社製）を用いた。

## 結果および考察

強制水泳試験における TAN-670 および SNC80 の抗うつ効果 (Fig. 1)

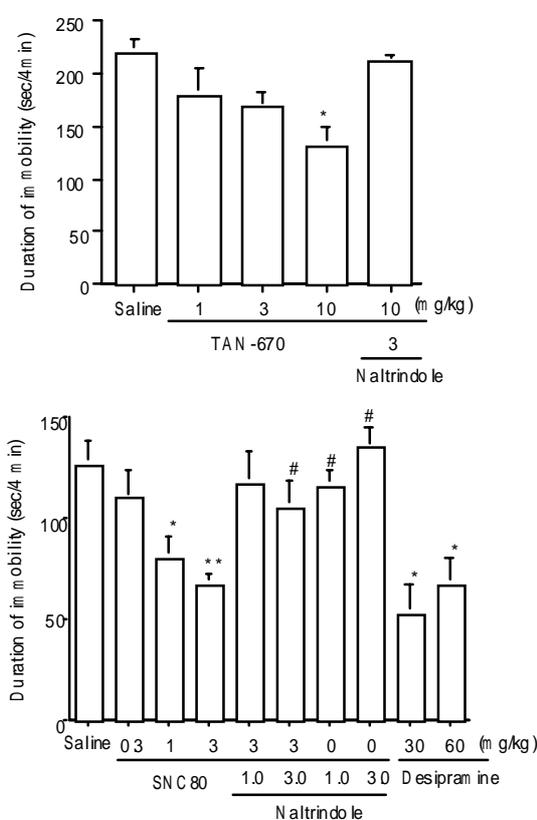


Fig. 1 Effects of TAN-670 and SNC-80 in the forced swim stress test in mice. \*P<0.05 vs. saline-treated group. \*\*P<0.01 vs. saline-treated group. #P<0.05 vs. SNC-80 3 mg/kg treated group.

TAN-670 (1, 3, 10 mg/kg, s.c.) および SNC80 (0.3, 1, 3 mg/kg, s.c.) の処置により用量依存的かつ有意な無動時間の短縮作用が認められた (Fig. 1)。SNC80 (3 mg/kg) および TAN-670 (10 mg/kg) において認められたその作用はオピオイド 受容体拮抗薬である naltrindole (NTI: 3 mg/kg s.c.) の 30 分

前処置により共に有意に拮抗された。なお、TAN-670 および SNC80 において認められた無動時間の短縮作用は既存抗うつ薬であるデシプラミン (30, 60 mg/kg, i.p.) と同程度であった。また、NTI (1, 3 mg/kg s.c.) を単独処置しても、マウス無動時間に何ら影響を与えなかった。

したがって、オピオイド 受容体作動薬が抗うつ効果を示すこと、さらにその効果が既存抗うつ薬 (デシプラミン) と同程度である可能性が示唆された。

### 高架式十時迷路試験における TAN-670 および SNC80 の抗不安作用 (Fig. 2)

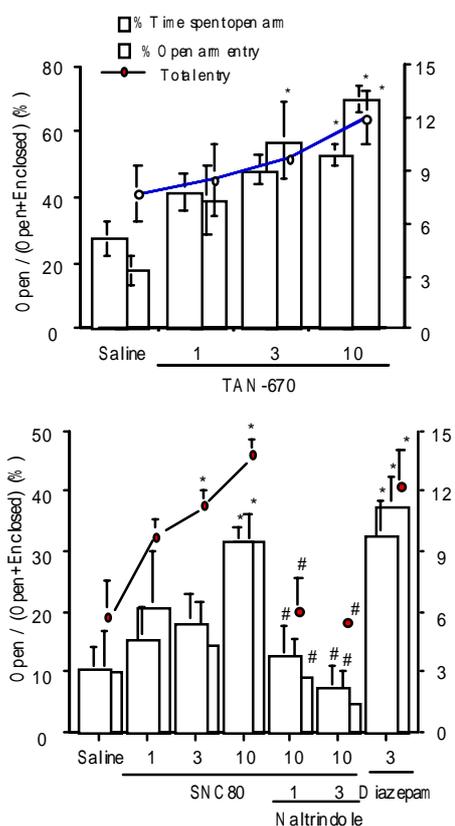


Fig. 2 Effects of TAN-670 and SNC80 in the elevated plus maze test in rat. \*P<0.05 vs. saline-treated group. #P<0.05 vs. SNC80 10 mg/kg treated group

TAN-670 (1, 3, 10 mg/kg, s.c.) および SNC80 (1, 3, 10 mg/kg, s.c.) の処置により用量

依存的かつ有意な壁無し走行路への滞在時間の延長および侵入回数の増加が認められ、既存抗不安薬であるジアゼパム (3 mg/kg, s.c.) と同程度の作用を示した。総侵入回数についても SNC80 は有意な増加を示し、その作用はジアゼパム (3 mg/kg) とほぼ同数であった。また、TAN-670 および SNC80 において認められたそれらの作用は 受容体拮抗薬である NTI の 30 分前処置によりそれぞれ有意に拮抗した。次に、既存抗うつ薬であるデシプラミンやフルボキサミンのについても同様の検討を行った。しかしながら、既存抗うつ薬はオピオイド 受容体作動薬と異なり壁なし走行路の滞在時間を延長させなかった。

以上のことから、オピオイド 受容体作動薬が既存抗うつ薬とは異なり、ジアゼパムと同一な抗不安作用も有することが示唆された。

### 恐怖条件付けモデルマウスにおける SNC80 の効果 (Fig. 3)

Fig. 3 に示される様に、電撃負荷により恐怖条件付けしたマウスは対照群マウス (電撃非負荷マウス) に比べて有意な自発運動量の低下 (すくみ行動) を示した。Kameyama 等<sup>6-7)</sup> は本モデルの特徴として、既存抗うつ薬が効きにくいストレス疾患モデルマウスであると報告している。本検討においても、イミプラミン (三環系抗うつ薬)、フルボキサミン (SSRI) およびミルナシプラン (セロトニン / ノルアドレナリン再取り込み阻害薬) について検討した結果、既存抗うつ薬はすくみ行動に対し抑制傾向を示すものの有意な改善効果は認められなかった。一方、SNC80 (1, 3 mg/kg, s.c.) は用量依存的かつ有意なすくみ行動に対する抑制作用を示し、さらにその作用は NTI により拮抗された。なお、SNC-80 は電撃非負荷マウスの自発運動量に何ら影響を及ぼさなかった。

したがって、SNC-80 がオピオイド 受容体を介して恐怖条件付けモデルマウスのすくみ行動を改善することが、さらにオピオイド 受容体作動薬が既存薬と異なる抗ストレス作用を有する可能性が示された。

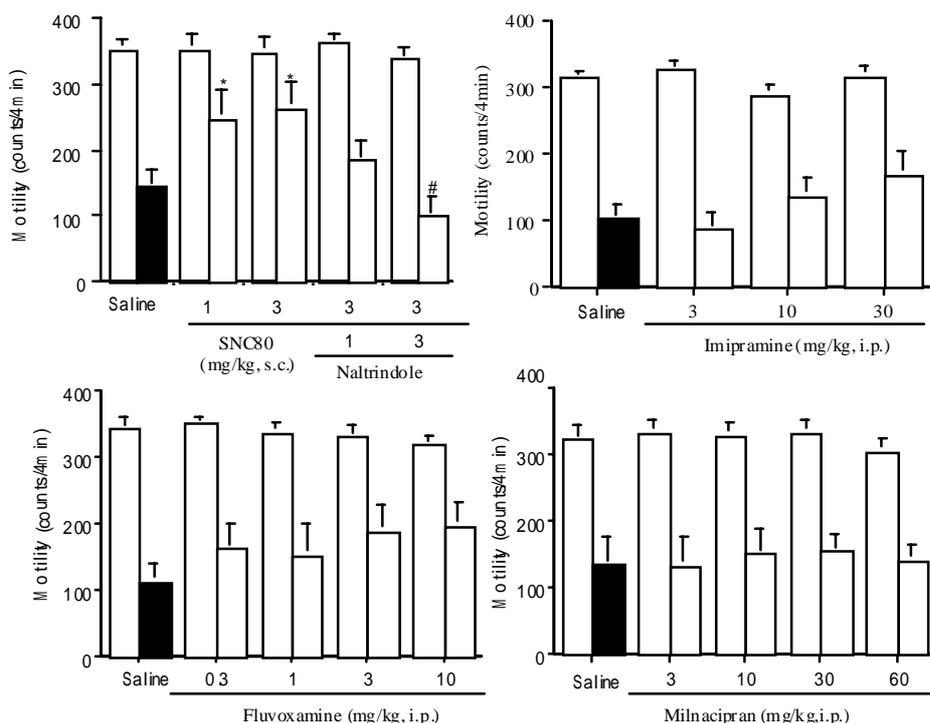


Fig. 3 Effects of SNC80, imipramine, fluvoxamine, milnacipran on conditioned fear stress test in mice. Open column: non-stimulated group, Closed column: electric footshock (1.3 mA) stimulated group. \* $P < 0.05$  vs. vehicle treated group, # $P < 0.05$  vs. SNC80 treated value

## 結論

以上のことから、TAN-670 および SNC80 がオピオイド受容体作動薬を介して、抗うつ作用だけでなく抗不安薬作用も示すことが、さらにこれらの作用が既存抗うつ薬（デシプラミン）や既存抗不安薬（ジアゼパム）と同程度であることが明らかになった。また、既存薬抵抗性のストレス疾患モデルマウスを用いた検討により、オピオイド受容体作動薬が既存薬にない新しいタイプのストレス疾患治療薬に成り得る可能性が示された。

## 参考文献

- 1) 井上令一 / 四宮滋子監訳. カプラン 臨床精神医学テキスト DSM-IV 診断基準の臨床への展開. メディカル・サイエンス・インターナショナル. 273-375. 1999.
- 2) König M, Zimmer AM, Steiner H, Holmes PV, Crawley JN, Brownstein MJ, Zimmer A. Pain responses, anxiety and aggression in mice deficient in pre-proenkephalin. *Nature*. 383:535-538, 1996

- 3) Ragnauth A, Schuller A, Morgan M, Chan J, Ogawa S, Pinter J, Bodnar RJ, Pfaff DW. Female preproenkephalin-knockout mice display altered emotional responses. *Proc Natl Acad Sci*. 98:1958-1963, 2001
- 4) Filliol D, Ghazizadeh S, Chluba J, Martin M, Masthies H, Simonin F, Befort K, Gaveriaux-Ruff C, Dierich A, LeMeur M, Valverde O, Maldonado R, Kieffer BL. Mice deficient for  $\delta$ - and  $\mu$ -opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses. *Nature Genetics*. 25:195-200, 2000
- 5) Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioural despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn* 229: 327-336, 1977
- 6) Kameyama T, Nagasaka M, Yamada K. Effects of antidepressant drugs on a quickly-learned conditioned-suppression response in mice. *Neuropharmacology* 24:285-290, 1985
- 7) Kameyama T, Nagasaka M. Effects of apomorphine and diazepam on a quickly learned conditioned suppression in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 17:59-63, 1982

# Prepulse inhibition 障害に対する endomorphin-1 の影響

鷗飼 良, 奥田亜美, 間宮隆吉  
名城大学薬学部薬品作用学教室

## Effects of endomorphin-1 on impairments of prepulse inhibition in mice

Makoto Ukai, Ami Okuda, Takayoshi Mamiya  
Department of Chemical Pharmacology, Faculty of Pharmacy,  
Meijo University

Summary : The prior acoustic stimulation has been reported to subsequently inhibit the startle response to acoustic stimulation (prepulse inhibition, PPI). Since PPI is reduced in schizophrenic patients, the reduction of PPI is considered to be an index of schizophrenic symptom. The present study was designed to examine the effects of intracerebroventricular injection of the endogenous  $\mu$ -opioid receptor agonist endomorphin-1 (EM-1: Tyr-Pro-Trp-Phe-NH<sub>2</sub>) on the decrease in PPI by apomorphine and (+)-MK-801. Apomorphine (1 mg/kg) and (+)-MK-801 (0.1 mg/kg) produced a significant decrease in PPI. EM-1 (17.5  $\mu$ g) produced an inhibitory effect on the apomorphine (1 mg/kg)- but not (+)-MK-801 (0.1 mg/kg)-induced decrease in PPI. Although  $\beta$ -FNA (5  $\mu$ g/mouse) did not reverse the inhibitory effects of EM-1 (17.5  $\mu$ g/mouse) on the apomorphine (1 mg/kg)-induced decrease in PPI, naloxonazine (35 mg/kg) reversed the effects of EM-1 (17.5  $\mu$ g/mouse). DAMGO (5 ng/mouse) had no significant effects on the apomorphine (1 mg/kg)-induced decrease in PPI.

These results suggest that EM-1 attenuates the apomorphine-induced decrease in PPI via  $\mu_1$ -opioid receptors.

## 緒言

音刺激に対する驚愕反応は、その直前に音刺激を与えることにより抑制され (prepulse inhibition, PPI), PPI は精神分裂病患者で障害されることが知られている<sup>1)</sup>。さらに、ドパミン受容体作動薬 apomorphine や NMDA 受容体拮抗薬 (+)-MK-801 を実験動物に投与すると PPI が障害されることから、PPI 障害は抗精神病モデルの一つとして抗精神病薬のスクリーニングに利用さ

れている。

近年、単離・同定された内因性  $\mu$ -オピオイド受容体作動薬 endomorphin-1 (EM-1: Tyr-Pro-Trp-Phe-NH<sub>2</sub>) は種々の中枢作用を有することが報告<sup>2), 3)</sup>されているが、精神分裂病モデルに対する EM-1 の作用については明確でない。そこで今回、apomorphine および (+)-MK-801 による PPI 障害に対する EM-1 の脳室内投与による作用について検討した。

## 実験方法

実験には ddY 系雄性マウス 6 - 8 週齢 (体重 30-43 g, 日本 SLC, 静岡) を使用した。購入後, 動物は少なくとも 4 日以上に渡って温度  $24 \pm 1$ , 湿度  $55 \pm 5\%$ , 12h の明暗サイクル (8:00-20:00 明期) の恒温室で飼育し, 水および飼料は自由に摂取させた。

(+)-MK-801 hydrogen maleate, -funtrexamine hydrochloride (-FNA), naloxonazine dihydrochloride, [D-Ala<sup>2</sup>, NMePhe<sup>4</sup>, Gly-ol]enkephalin (DAMGO) (Sigma) および EM-1 (ペプチド研究所) はそれぞれ生理食塩液に溶かした。R(-)-apomorphine hydrochloride には抗酸化剤として, 0.1% アスコルビン酸を加えた。

SR-LAB システム (San Diego Instrument, USA) を使用して PPI を測定した。試行開始 5 分前にマウスを測定ケージに保持し 5 分間順応させた。その後, no stimulus (background white noise, 70 dB), prepulse (87 dB, 40 ms), pulse (118 dB, 40 ms), prepulse (80 dB, 40 ms) + pulse (118 dB, 40 ms), prepulse (83 dB, 40 ms) + pulse (118 dB, 40 ms) および prepulse (87 dB, 40 ms) + pulse (118 dB, 40 ms) の 6 種類の刺激を無作為に各 8 回 (合計 48 回), 試行間隔 30 秒でマウスに負荷し, 刺激直後の測定ケージの振動を 40 ms 間測定し, 次式により PPI を計算した。

$$\text{PPI (\%)} = \frac{\{\text{pulse alone} - (\text{prepulse} + \text{pulse})\}}{\text{pulse alone}} \times 100$$

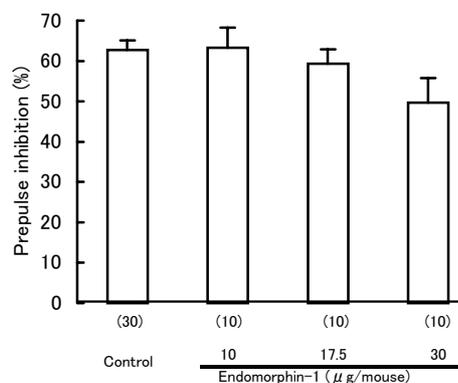
## 結果

### EM-1 の PPI に対する影響

EM-1 (10-30  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ , i.c.v.) は PPI にほとんど影響しなかった (Fig. 1)。

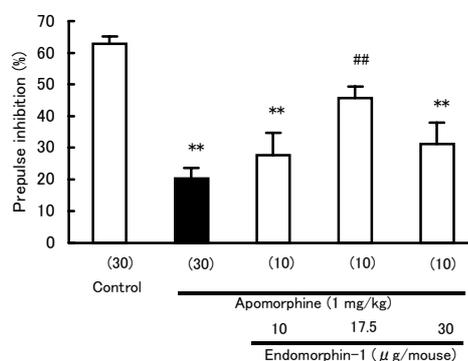
### Apomorphine による PPI 障害に対する EM-1 の影響

EM-1 (17.5  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ , i.c.v.) は apomorphine (1 mg/kg, s.c.) による PPI 障害を有意に改善した (Fig. 2)。



**Fig. 1** Effects of endomorphin-1 on prepulse inhibition in mice.

Each value represents the mean  $\pm$  S.E. Endomorphin-1 (i.c.v.) was given to mice 15 min before measurement. The number of mice used is shown in parentheses.

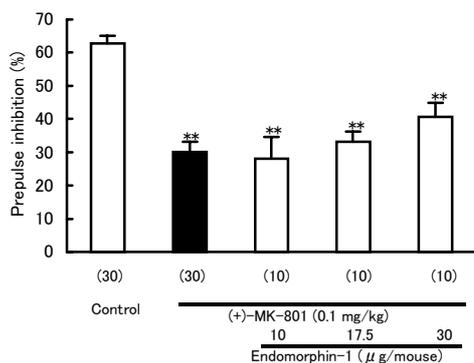


**Fig. 2** Effects of apomorphine and its combination with endomorphin-1 on prepulse inhibition in mice.

Each value represents the mean  $\pm$  S.E. Apomorphine (s.c.) and endomorphin-1 (i.c.v.) were given to mice 5 and 15 min before measurement, respectively. The number of mice used is shown in parentheses. \*\* $P < 0.01$  vs. control, ## $P < 0.01$  vs. apomorphine alone.

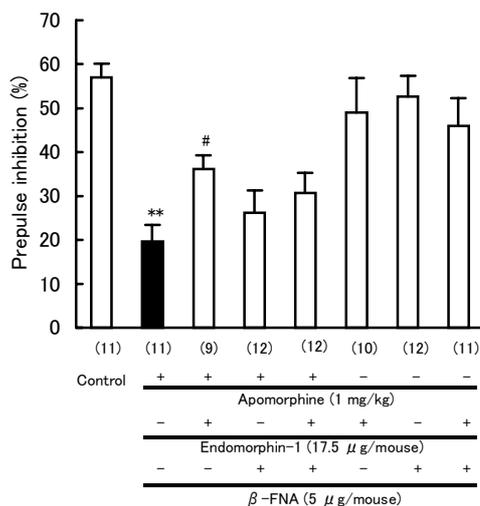
### (+)-MK-801 による PPI 障害に対する EM-1 の影響

EM-1 (10-30  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ , i.c.v.) は (+)-MK-801 (0.1 mg/kg, s.c.) による PPI 障害にほとんど影響しなかった (Fig. 3)。



**Fig. 3** Effects of (+)-MK-801 and its combination with endomorphin-1 on prepulse inhibition in mice.

Each value represents the mean  $\pm$  S.E. (+)-MK-801 (s.c.) and endomorphin-1 (i.c.v.) were given to mice 15 min before measurement. The number of mice used is shown in parentheses. \*\* $P < 0.01$  vs. control.



**Fig. 4** Effects of apomorphine, endomorphin-1 and their combinations with  $\beta$ -funaltrexamine ( $\beta$ -FNA) on prepulse inhibition in mice.

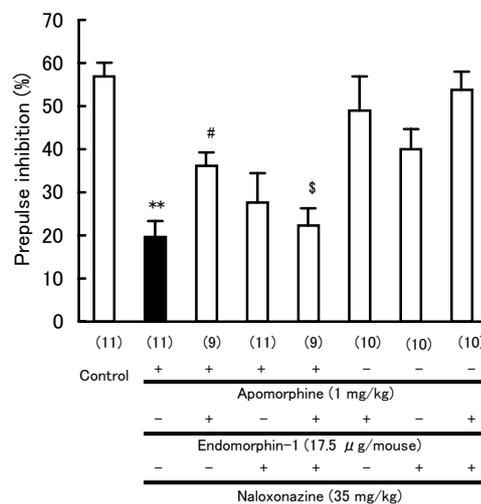
Each value represents the mean  $\pm$  S.E. Apomorphine (s.c.), endomorphin-1 (i.c.v.) and  $\beta$ -FNA (i.c.v.) were given to mice 5 min, 15 min and 24 h before measurement, respectively. The number of mice used is shown in parentheses. \*\* $P < 0.01$  vs. control, \* $P < 0.05$  vs. apomorphine alone.

#### EM-1 による PPI 障害改善作用に対する $\beta$ -FNA の影響

$\beta$ -FNA (5  $\mu$ g/mouse, i.c.v.) は, EM-1 (17.5  $\mu$ g/mouse, i.c.v.) による PPI 障害改善作用に対して有意な影響を及ぼさなかった (Fig. 4). EM-1 による PPI 障害改善作用に対する

#### naloxonazine の影響

Naloxonazine (35 mg/kg, s.c.) は, EM-1 (17.5  $\mu$ g/mouse, i.c.v.) による PPI 障害改善作用に対して有意な拮抗作用を示した (Fig. 5).



**Fig. 5** Effects of apomorphine, endomorphin-1 and their combinations with naloxonazine on prepulse inhibition in mice.

Each value represents the mean  $\pm$  S.E. Apomorphine (s.c.), endomorphin-1 (i.c.v.) and naloxonazine (s.c.) were given to mice 5 min, 15 min and 24 h before measurement, respectively. The number of mice used is shown in parentheses. \*\* $P < 0.01$  vs. control, # $P < 0.01$  vs. apomorphine alone, \$ $P < 0.01$  vs. apomorphine plus endomorphin-1.

#### Apomorphine による PPI 障害に対する DAMGO の影響

Apomorphine (1 mg/kg, s.c.) による PPI 障害に対して, DAMGO (5 ng/mouse, i.c.v.) は有意な拮抗作用を示さなかった.

## 考察

PPI の発現機構には, ドパミン神経系, グルタミン酸神経系およびコリン神経系が関与していることが知られている<sup>4)</sup>. (+)-MK-801 による PPI 障害は EM-1 による影響を受けなかったが, apomorphine による PPI 障害は EM-1 によって改善され, その改善作用は naloxonazine によって拮抗された. した

がって, EM-1 はドパミン神経系の機能亢進による PPI 障害を  $\mu_1$ -オピオイド受容体を介して改善することが示唆された。一方, NMDA 受容体を介するグルタミン酸神経系の機能亢進による PPI 障害は  $\mu$  オピオイド受容体作動薬による影響を受けないものと思われる。なお, apomorphine による PPI 障害は DAMGO による有意な影響を受けなかったが, 今後さらに詳細な検討が必要であると思われる。

## 引用文献

- 1) Blaff D, Stone C, Callaway E, Geyer M, Glick I, Bail L. Prestimulus effects on human startle reflex in normals and schizophrenics. *Psychophysiology*. 15 : 339-343, 1978
- 2) Zadina, JE, Hackler L, Ge LJ, Kastin AJ. A potent and selective endogenous agonist for the mu-opioid receptor. *Nature* 386 : 499-502, 1997
- 3) Ukai M, Watanabe Y, Kameyama T. Effects of endomorphin-1 and -2, endogenous mu-opioid receptor agonists, on spontaneous alternation performance in mice. *Eur J Pharmacol*, 395 : 211-215, 2000
- 4) Jones CK and Shannon HE . Effects of scopolamine in comparison with apomorphine and phencyclidine on prepulse inhibition in rats. *Eur J Pharmacol*. 391 : 105-112, 2000