

# 東北薬科大学

## 審査学位論文（博士）

氏名（本籍）	ながおか こうし 長岡 高史（岩手県）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	甲第 138 号
学位授与の日付	平成 26 年 3 月 18 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条 1 項該当
学位論文題名	カンナビノイド受容体を介した疼痛制御機構に関する 行動薬理学的検討
論文審査委員	主査 特任教授 櫻田 忍
	副査 教授 大久保 恭 仁
	副査 教授 石川 正 明

# カンナビノイド受容体を介した疼痛制御機構に 関する行動薬理学的検討

東北薬科大学大学院薬学研究科薬学専攻博士課程後期課程  
機能形態学教室

長岡 高史

# 目次

序論	1
<u>第一章</u> カンナビノイド1受容体拮抗薬AM251はERKシグナル経路の活性化を介して侵害刺激行動を起こす	
緒言	5
材料及び方法	7
実験結果	10
考察	21
<u>第二章</u> $\beta$ -カリオフィレン誘発性抗侵害作用における末梢カンナビノイド受容体とオピオイド受容体の関与	
緒言	23
材料及び方法	25
実験結果	27
考察	37
結論	38
謝辞	39
引用文献	40

## 序論

現在、本邦では大麻取締法により大麻の所持は禁止されているが、その乱用が若年層にまで及んでいることは大きな問題となっている<sup>1)</sup>。一方、近年では大麻類似物質の変容が原因とされる疾患が明らかとなり、大麻及びその類縁物質を用いた治療や創薬活動もまた盛んとなっている<sup>2-9)</sup>。

大麻は1886年より印度大麻草として鎮痛、鎮静、喘息および催眠の目的で日本薬局方にも収載されていた歴史があるが、治療効果が不明確であることや思考および自我の変化、短期記憶障害をはじめとした副作用のほうが顕著に現れることから今日では日本薬局方から削除されている<sup>10)</sup>。当時はその作用機序は不明ではあったが、1964年にイスラエルのMechoulamが大麻の主成分である $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC)を単離することに成功し、初めて幻覚の原因物質であることを示した<sup>11)</sup>。また、大麻には $\Delta^9$ -THCやcannabinol、cannabidiolを始めとする水素と炭素および酸素からなる成分が60種類以上含有されていることが明らかにされており、これらは総称してカンナビノイドと呼ばれている<sup>10),12),13)</sup>。(Fig.1)

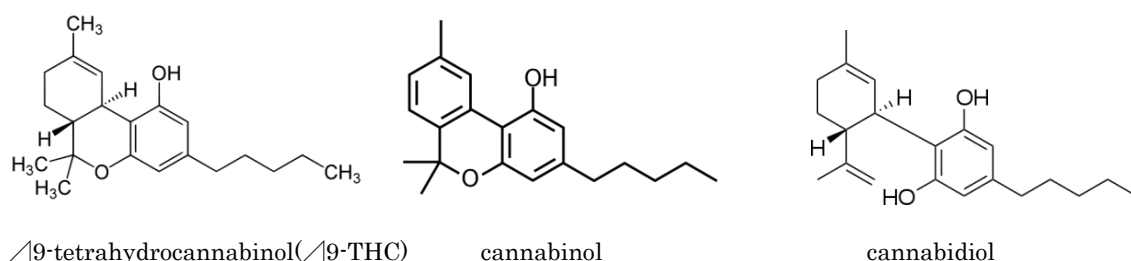


Fig.1. Structure of cannabinoids.

その後、1988年にはDevaneとHowlettらが放射標識した合成カンナビノイドを用いて生体内にカンナビノイドに対する受容体が存在することを初めて明らかにし<sup>14)</sup>、これら薬理作用の多くは受容体を介していることが示唆された。次いで、1990年にはMatsudaらによりラット脳cDNAライブラリーからCB<sub>1</sub>受容体がクローニングされ<sup>15)</sup>、1993年にはMunroらによってCB<sub>1</sub>受容体cDNAと68%の相同性をもつCB<sub>2</sub>受容体がクローニングされた<sup>16)</sup>。CB<sub>1</sub>およびCB<sub>2</sub>受容体はどちらも細胞膜7回貫通型のGタンパク質共役型受容体に属しており、そのアミノ酸の相同性は44%とされている。生体内に受容体が存在することが明らかとなったことから、それらに結合するリガンドの研究が行われた。1992

年に Devane らにより豚の脳から anandamide (N-arachidonylethanolamide) が発見された<sup>17)</sup>。anandamide は phosphatidylethanolamide (PE) のアミノ基にリン脂質の arachidonic acid が転位して N-arachidonoyl PE となり、さらに phosphodiesterase の作用によって anandamide が生成する。この anandamide を投与されたマウスは抗侵害作用を示すことが報告されており<sup>18)</sup>、anandamide は Fatty acid amide hydrolase によって arachidonic acid と ethanol amine へと分解する。しかしながら anandamide は、部分作動薬として作用し、CB<sub>1</sub> 受容体に対する親和性は高いものの CB<sub>2</sub> 受容体に対する親和性は低いとされている<sup>19)</sup>。また、transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1) 受容体にも作用することが知られていることから<sup>20),21)</sup>、別のリガンドの存在が推測されていた。その後、1995 年には Sugiura と Mechoulam らによってラット脳とイヌ小腸より 2-arachidonoylglycerol が発見されている<sup>22),23)</sup>。新たに発見された 2-arachidonoylglycerol は両受容体に高い結合性を持ち、完全作動薬として作用することが明らかにされている。他にもいくつかの分子が内因性カンナビノイドの候補として報告されていたが、現在ではその中でも anandamide と 2-arachidonoylglycerol が主要なリガンドであると考えられている。(Fig.2)

2-arachidonoylglycerol は phosphatidylinositolbisphosphate (PIP<sub>2</sub>) または phosphatidylinositol (PI) を基に数段階の酵素反応によって生成し、monoacylglycerol lipase によって arachidonic acid へと分解する<sup>24)</sup>。

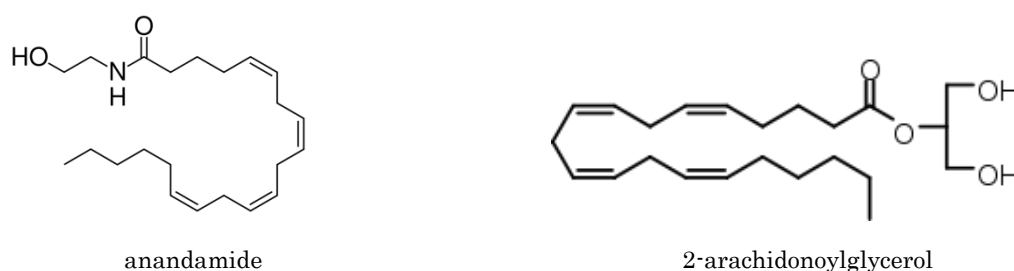


Fig.2. Structure of cannabinoid receptor ligands.

CB<sub>1</sub> 受容体は記憶を司る海馬や運動機能を担う小脳や大脳基底核、大脳皮質などの中枢神経系に豊富に存在している<sup>25)</sup>。細胞体や樹状突起には少なく、シナプス前膜側に豊富に発現しており、シナプス前膜終末より神経伝達物質の遊離を抑制的に制御していることが報告されている<sup>26),27)</sup>。また、CB<sub>1</sub> 受容体はシナプス後膜側にも発現しており、後膜側の興奮伝導を抑制的に制御していることも報告されている。しかしながらその発現量は前膜側と比較して極めて少ない。

さらに 2001 年には内因性カンナビノイドによる神経伝達物質の遊離抑制機構が明らかとなっている<sup>28),29)</sup>。内因性カンナビノイドはシナプス後膜の脱分極によって流入した一定量の  $\text{Ca}^{2+}$  に依存して産生され、逆行的にシナプス前膜に存在する  $\text{CB}_1$  受容体へと結合する。また、 $\text{CB}_1$  受容体は興奮性神経だけではなく GABA 神経系のような抑制性神経の終末部にも発現していることも報告され、過剰な抑制がかからないように制御していると考えられている<sup>30)</sup>。 $\text{CB}_1$  受容体はリガンドに暴露され続けると、脱感作を起こしたり受容体の発現量が低下することが示唆されている。また、海馬培養細胞を使った実験では、 $\text{CB}_1$  受容体の作動薬を長期間投与すると  $\text{CB}_1$  受容体の発現量が低下することが報告されている<sup>31)</sup>。さらに、作動薬の長期間投与によって、 $\text{CB}_1$  受容体が細胞膜上で神経終末のシナプス部からシナプス外へ移動することも報告されていることから<sup>32)</sup>、これらの機能は恒常性を保つためであると考えられている。

$\text{CB}_1$  受容体は中枢神経系において豊富に発現している一方、 $\text{CB}_2$  受容体は主に脾臓や肥満細胞などの免疫系細胞に発現し、主にサイトカインや免疫機能の調節を行っていると言われている<sup>33)</sup>。マウスやラットを対象とした炎症性疼痛モデルや神経因性疼痛モデルへ  $\text{CB}_2$  受容体作動薬を投与すると疼痛反応が抑制されることが報告されている<sup>33)-35)</sup>。Ibrahim らは、末梢  $\text{CB}_2$  受容体の活性化がケラチノサイトから内因性オピオイドペプチドである  $\beta$ -endorphin を遊離することを報告している<sup>36)</sup>。

さらに、近年では  $\text{CB}_2$  受容体が一部の中枢神経系やグリア細胞に発現していることが示唆されている<sup>37)-40)</sup>。グリア細胞はアストロサイト、ミクログリアおよびオリゴデンドロサイトに分類され、その量は神経細胞の約 10 倍とも言われている。これまでは神経細胞への栄養補給、伝達物質の除去などを行う支持細胞として認識されていたが、神経伝達物質やサイトカインの遊離を行うだけでなく、 $\text{CB}_2$  受容体を始めとして多くの受容体が発現していることが明らかにされ、痛みの発現にも重要な役割を示すことが示唆されている<sup>41),42)</sup>。

人間にとって痛みは生体に対する警告であると考えられるが、過剰で持続的な痛みは除去する必要がある。侵害刺激による疼痛は末梢で感知された刺激が有髄の  $\text{A}_\delta$  繊維および無髄の C 脊髄を通じて、脊髄後角表層部にてシナプスを介して二次神経へ伝達されたのちに大脳皮質知覚領へ到達して痛みとして認識される。

脊髄後角における代表的な疼痛伝達物質として興奮性アミノ酸のグルタミン酸やサブスタンス P がある<sup>43)-45)</sup>。これらはそれぞれ脊髄後角表層部（第 I 層および第 II 層）に存在する NMDA 受容体および  $\text{NK}_1$  受容体へ結合してその刺激をさらに上位中枢へと伝えている<sup>46)</sup>。NMDA 受容体は中枢神経系に豊富に存在し、基本的なサブユニットである NR1 サブユニット 2 個およびその受容体機能

を決定づける NR2A、NR2B、NR2C、NR2D サブユニットのうち 2 個から成る計 4 量体で構成され、中心部にイオンチャネルが存在する<sup>47)</sup>。NMDA 受容体には 4 つの結合部位（イオンチャネル部位、グルタミン酸結合部位、グリシン結合部位、ポリアミン結合部位）が存在し、中心部は  $Mg^{2+}$  によって蓋をされ、細胞内への  $Ca^{2+}$  流入は阻害されている<sup>48)</sup>。結合部位へグルタミン酸を始めとするリガンドが結合すると  $Mg^{2+}$  が外れ、高く速い  $Ca^{2+}$  透過性を示し、マウスにおいて NMDA を i.t. 投与すると投与直後より疼痛関連行動が起こることからも疼痛の伝達に重要な役割を担っている。

11 個のアミノ酸（Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met）から成るサブスタンス P は  $NK_1$  受容体へと結合してその刺激を上位中枢へと伝えている<sup>49)</sup>。 $NK_1$  受容体は  $G_q$  タンパクと共役しており、ホスホリパーゼ C (PLC) を介した  $Ca^{2+}$  動員系を担っている。マウスへサブスタンス P を i.t. 投与すると投与直後より疼痛関連行動を示す。

疼痛伝達を増強する成分の一つにセカンドメッセンジャーである一酸化窒素 (nitric oxide:NO) がある。NO は L-Arginine と分子状酸素および一酸化窒素合成酵素 (nitric oxide synthase:NOS)、NADPH、FAD/FM、ヘム、テトラヒドロピオプリテンおよびカルモジュリンを補酵素として産生する<sup>50)</sup>。NOS はその違いから神経型の nNOS、誘導型の iNOS および血管内皮型の eNOS に分類されている<sup>51), 52)</sup>。疼痛に関与するのは nNOS および iNOS であるが、産生された NO の寿命はほんの数秒と言われている。気体であるために細胞を自由に通過し周辺の細胞へと速やかに作用する。シナプス後膜側の NMDA 受容体の活性化によって NOS の活性化が引き起こされ、産生された NO がシナプス前膜へ作用することから、グルタミン酸のさらなる遊離を引き起こす NMDA-NO カスケードが報告されている<sup>53)</sup>。

新たな鎮痛薬のターゲットとして注目されているカンナビノイド受容体の活性化が抗侵害作用を起こす研究はすでに報告されている<sup>54), 55)</sup>。しかしながら  $CB_1$  受容体拮抗薬である SR141716A をマウスの脊髄くも膜下腔内へ投与すると痛覚過敏を発現したということも報告されており<sup>56)</sup>、 $CB_1$  受容体が疼痛を制御していることを示唆している。

第一章では選択的な  $CB_1$  受容体拮抗薬を用いて  $CB_1$  受容体の疼痛制御機構について検討した。第二章では大麻含有成分を用いてその抗侵害作用を発現するメカニズムを検討した。

## 第1章

# カンナビノイド1受容体拮抗薬 AM251は ERK シグナル経路の活性化を介して侵害刺激行動を起こす

### 1.1.緒言

1990年に Matsuda らにより CB<sub>1</sub>受容体が同定されて以来<sup>15)</sup>、CB<sub>1</sub>受容体に関する研究が進展し、カンナビノイド受容体の研究分野は多方面に渡っている。CB<sub>1</sub>受容体の活性化によりアデニル酸シクラーゼの抑制、電位依存型カルシウムチャンネルの抑制、電位依存型カリウムチャンネルおよび mitogen-activated protein kinase (MAPキナーゼ)カスケードの活性化を引き起こすことが明らかとなっている<sup>57)</sup>。MAPキナーゼは真核生物に保存されたセリン/スレオニンキナーゼであり、活性化にともなって核内へと移行することから、細胞外のシグナルを核内へと伝える鍵分子として機能しているものと考えられている。MAPキナーゼは細胞外からの様々な刺激による活性化に伴って核内へと移行する。これらは全身の細胞に広く発現していることが知られており、細胞の増殖や分化などの機能発現において重要な役割を担っていると言われている。

哺乳類においては、古典的 MAPK とも呼ばれる ERK1・ERK2 サブファミリー、JNK1・JNK2・JNK3 サブファミリー、p38 $\alpha$ ・p38 $\beta$ ・p38 $\gamma$ ・p38 $\delta$  サブファミリー、さらに ERK5 サブファミリーの4つの主要な MAPK サブファミリーの存在が知られている。細胞外からの刺激により MAPキナーゼキナーゼキナーゼ (MAPKKK) がリン酸化を受けると、MAPキナーゼキナーゼ (MAPKK) がリン酸化し、続いて MAPキナーゼ (MAPK) がリン酸化を受けて細胞応答を引き起こされる。近年ではこの MAPキナーゼをはじめとする細胞内情報伝達経路の活性化が痛みの発生にも重要な役割を担っていることが示唆されており、痛みのメカニズムを解明するための指標となっている<sup>58)</sup>。

これまでの研究において CB<sub>1</sub>受容体の活性化によって抗侵害作用が示されたという報告は多数あり、疼痛制御に深く関与していることが明らかとなっている。

その一方で CB<sub>1</sub>受容体拮抗薬である SR141716A をマウスの脊髄くも膜下腔内へ投与すると痛覚過敏を発現することが報告されている<sup>56)</sup>。本研究ではカンナビノイド受容体と疼痛発現に関する報告が少ないことから SR141716A よりもさらに CB<sub>1</sub>受容体に選択性の高い CB<sub>1</sub>受容体拮抗薬である AM251 を用いて、



疼痛関連行動が発現するかどうかをまず検討した。さらにその疼痛制御メカニズムを探るため、疼痛関連行動がどのような機構で発現しているのかを行動薬理的に検討し、細胞内情報伝達系である MAP キナーゼとの関与についても検討を行った。

## 1.2. 材料及び方法

### 1.2.1 実験動物

全ての実験には体重 22-23g の雄性 ddY マウスを用いた。マウスは実験に供するまで水とエサを自由に摂取させ、12 時間の明暗サイクルで調節して維持した。室温と湿度は 22-24°C と 50-60% にそれぞれ維持した。

### 1.2.2. 脊髄くも膜下腔内投与 (intrathecal (i.t.) injection)

マウスの腰椎を指でしっかりと固定し動かないようにした後、無麻酔下で腰椎の 5 番と 6 番の間にマイクロシリンジ (50  $\mu$  L) (Hamilton) に取り付けられた 1/5 皮下針を挿入し薬液を 5  $\mu$  L/マウスの割合でゆっくりと投与した<sup>59)</sup>。マイクロシリンジおよび注射針はペプチドの吸着を防ぐ目的で、あらかじめシリコン化を施したものを使用した。薬物を同時投与する際には全量が 5  $\mu$  L になるように調製し投与した。capsaicin は i.t. 前処理を行った<sup>60), 61)</sup>。

### 1.2.3. 行動観察法

i.t. 投与の約 1 時間前に観察容器として透明プラスチックケージ (22.0  $\times$  10.0  $\times$  12.5 cm) にて馴化した。薬物の i.t. 投与後すぐに、それぞれのマウスを透明なケージ内に戻して観察を始めた。

マウスは AM251 の投与後からすぐに 30 分間観察し、AM251 投与後 30 分まで 5 分間隔で疼痛関連行動を測定した。疼痛関連行動は後肢による腹部への引っ掻き (Scratching) 行動、尻尾および後肢への噛みつき (Biting) 行動、そして腹部、尾部および後肢への舐め (Licking) 行動である SBL 行動を指標とした。対照群には CSF および dimethylsulfoxide (DMSO) を CSF で希釈したものを i.t. 投与し同様に行動観察を行った。

### 1.2.4. 薬物

AM251, ACEA, JWH-133, 7-Nitroindazole (7-NI) , 1400W (Tocris) , [Tyr<sup>6</sup>, D-Phe<sup>7</sup>, D-His<sup>9</sup>] Substance P (6-11) (sendide) (Bachem AG) , MK-801, ifenprodil, CPP, D-APV, capsaicin (Sigma) , L-NAME (Nakalai tesq) , CP-99,994 (Pfizer Pharmaceuticals) , U0126 (Calbiochem) , Monoclonal anti-phospho-p44/42 MAP kinase antibody, anti-p44/42 MAP kinase antibody

(Cell Signaling Technolog) を使用した。これらの薬物は滅菌人口脳脊髄液 (CSF (126.6 mM NaCl, 10.0 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2.5 mM KCl, 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.0 mM glucose)) で溶解し、希釈して使用した。

Capsaicin は 15%DMSO に溶解後、CSF で希釈し AM251 投与 4 日前に i.t.前処理した。U0126 は DMSO に溶解後、CSF で希釈して使用した。

### 1.2.5. サンプル調製

i.t.投与から 15 分後、無麻酔下でマウスを断頭した後に生理食塩水で駆血して脊髄を取り出した。ウェスタンブロット法に用いるため、さらに腰髄の後角部分を氷で冷やしたガラスシャーレ上で手早く解体した。

### 1.2.6. ウェスタンブロット法

組織サンプルは 0.1mL の lysis buffer reagent (150nM NaCl,1.0% NP-40, 50mM Tris-HCl pH8.0, 1mM phenylmethylsulfonylfluodide, 1mg/ml aprotin, 1mM sodium vanadate および 1mM EDTA pH 8.0) で均一化し、4°C、16000 ×g、30 分間で遠心分離した。上澄み部分をサンプルとし、Protein assay (BIO-RAD, Hercules, CA) を用いて全タンパク量を測定した。

サンプル (30 μg protein) に sodium dodecyl sulfate (SDS) -ポリアクリルアミドゲル電気泳動サンプルバッファー (100mM Tris-HCl, pH=6.8, 2.5% SDS, 20%glycerol, 0.006% bromophenol blue, 10% β-mercaptoethanol) を加え、100 °C で 3 分間加熱した後に 10 % SDS-polyacrylamide gel (BIO-RAD,Hercules,CA) に電気泳動した。電気泳動後、ゲルを Hybond-P 膜 (Amersham Biosciences) に転写した。

転写終了後の膜を 5%スキムミルク (和光純薬・大阪・日本) / T-PBS (0.1% (v/v) Tween 20 を含む PBS) にて一晩インキュベートした。

T-PBS で洗浄後、一次抗体 (1:1000, monoclonal phospho-p44/42 MAP kinase および 1:1000 anti-p-44/42 MAPK antibody) で 2 時間室温にてインキュベートした。再度 T-PBS で洗浄後、二次抗体 (1:5000 anti-rabbit or anti-mouse IgG peroxidase-conjugated antibody (Amersham Biosciences)) で 2 時間インキュベートを行った。標準タンパク質は ECL-Plus Western blotting detection system (Amersham Biosciences) を用いて化学蛍光法により検出し、Dolrhine-Chemi Image System (Wealtec) により可視化した後、MagicMark western protein standard (Invirogen) を用いてタンパク質の分子量 (kDa)

を確認した。

### 1.2.7. 統計処理

実験は 1 群 10 匹で行った。結果は平均値と標準誤差 (S.E.M) で表示した。統計学的検定は、一元配置分散分析 (one-way ANOVA) 後 Dunnett test、または二元配置分散分析 (two-way ANOVA) 後 Bonferroni test を行った。また、capsaicin を前処理した実験においては student's t-test を行った。いずれも危険率 5%未満を有意差ありとして判定した。

### 1.3 実験結果

#### 1.3.1 AM251 i.t.投与後の SBL 行動及び経時変化

AM251 (0.000625-0.01 fmol) を i.t.投与し、SBL 行動の累積時間を投与直後より 30 分間計測した結果、用量依存的かつ有意な SBL 行動を示した。Biting および Licking が多く Scratching はあまり見られなかった。ピークは 10-15 分に見られ、25-30 分にはほぼ消失した。対照として用いた CSF は動物に影響を与えなかった。0.01fmol による反応が最も特徴的であったことから、以降の実験では 0.01fmol の AM251 を用いた。

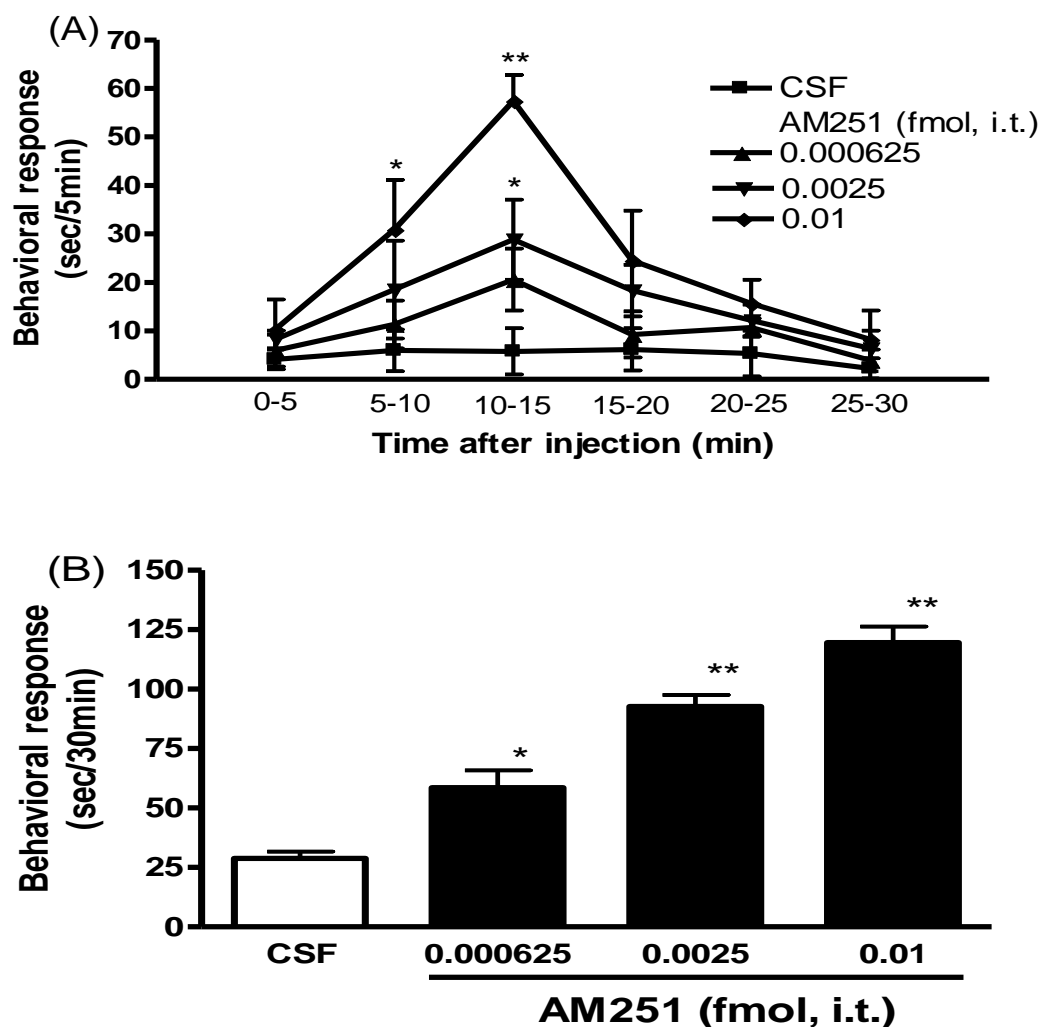


Fig.3. The time course of AM251-induced scratching, biting and licking response (A), and effect of varying doses of AM251 in mouse (B). Groups of mice were injected i.t. various dose of AM251 (0.000625-0.01 fmol) or CSF. The duration of scratching, biting and licking induced by AM251 (0.000625-0.01 fmol) was determined over a 30 min

period starting immediately after injection. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. of ten mice in each group.

**\*\***P<0.01, **\***P<0.05 when compared with artificial CSF-controls.

### 1.3.2 AM251 誘発性 SBL 行動に対する CB<sub>1</sub> 及び CB<sub>2</sub> 受容体作動薬の効果

AM251 と CB<sub>1</sub> 受容体作動薬である ACEA (0.683-683 fmol) を同時に投与して 30 分間計測した。AM251 誘発性 SBL 行動は ACEA により用量依存的かつ有意な抑制を示した。一方、CB<sub>2</sub> 受容体作動薬である JWH-133 (0.3125-2.5 nmol) を AM251 と同時に投与しても AM251 誘発性 SBL 行動に有意な影響を与えなかった。また、ACEA (683fmol) および JWH-133 (2.5nmol) は単独では CSF 投与群に比較して有意な反応を示さなかった。

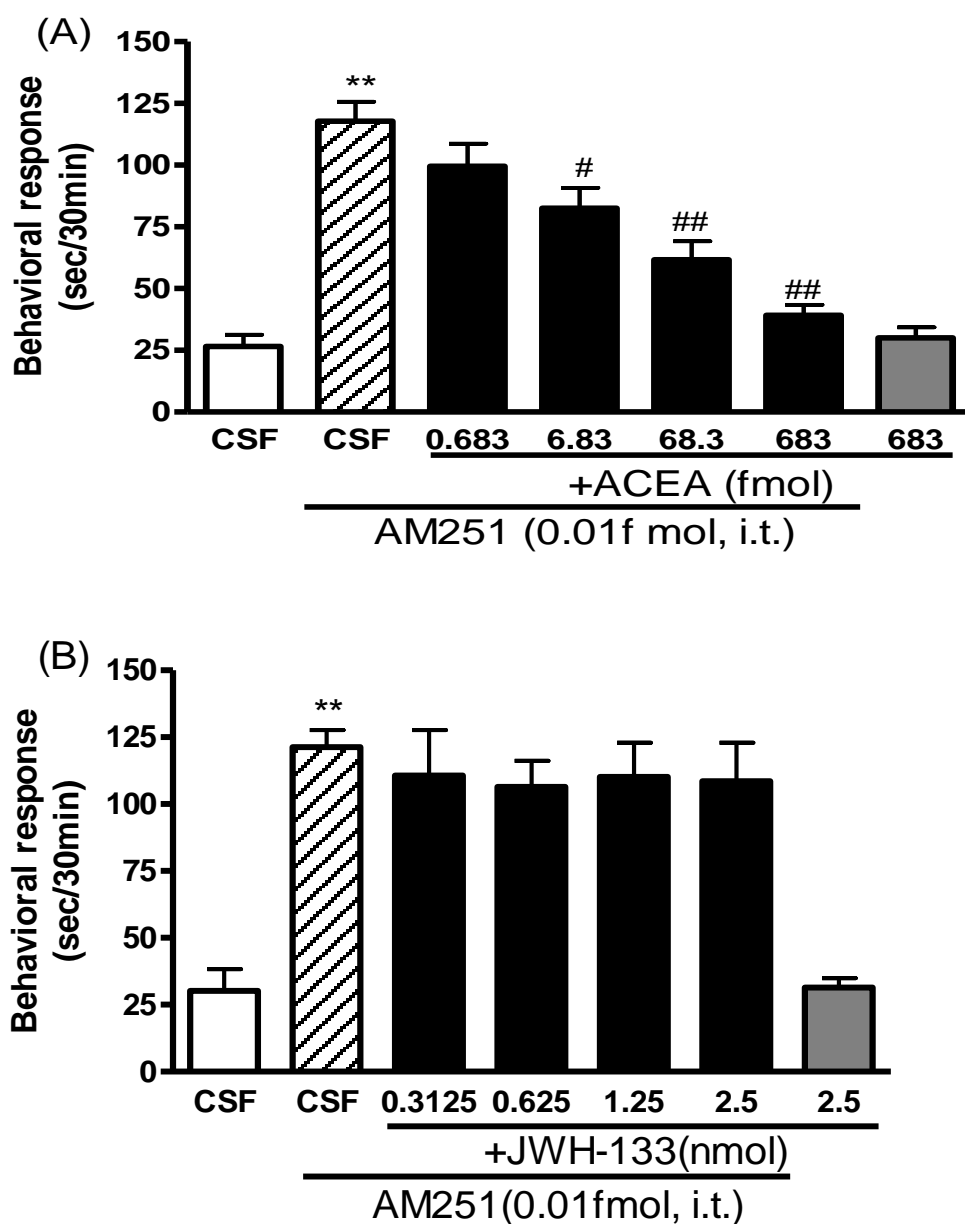


Fig.4. Effect of the CB<sub>1</sub> receptor agonist ACEA (A) and the CB<sub>2</sub> receptor agonist JWH-133 (B) on AM251-induced

scratching, biting and licking response in mice. Each agonist was co-administrated i.t. with AM251 (0.01 fmol) in a total volume of 5  $\mu$ L. The duration of scratching, biting and licking induced by AM251 was determined over a 30 min period starting immediately after injection. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. of ten mice in each group. \*\*P<0.01 when compared with artificial CSF-controls.##P<0.01, #P<0.05 when compared with AM251 (0.01 fmol) alone.



### 1.3.3. AM251 誘発性 SBL 行動に対する NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬の効果

AM251 と NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬である CP-99,994 (125-2000 pmol) および sendide (0.5-2.0 pmol) を同時に投与して 30 分間計測した。AM251 誘発性 SBL 行動は CP-99,994 および sendide により用量依存的かつ有意に抑制した。また、一次知覚神経終末に含有される神経伝達物質を放出することにより枯渇する capsaicin (15 nmol) を AM251 の i.t. 投与 4 日前に i.t. 投与すると AM251 誘発性 SBL 行動は 15% DMSO 投与群に比較して有意に減少した。NK<sub>1</sub> 受容体拮抗薬を単独で投与しても CSF 投与群と比較して有意な反応は見られなかった。

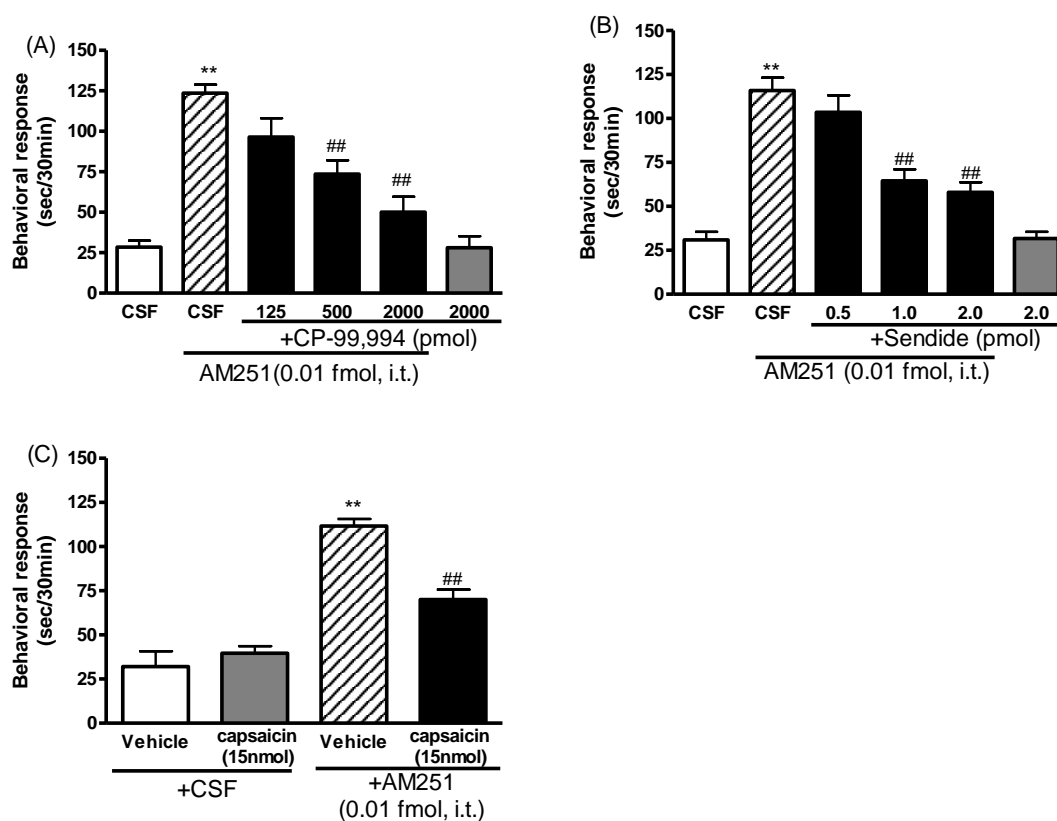


Fig.5. Effects of CP-99,994 (A), Sendide (B), and capsaicin (C) on AM251-induced scratching, biting and licking response in mice. CP-99,994 or Sendide was co-administrated i.t. with AM251 (0.01 fmol) in a total volume of 5 $\mu$ L. Capsaicin (15 nmol) was pretreated i.t. 4 days prior to i.t. injection of AM251 (0.01 fmol). The duration of scratching, biting and licking induced by AM251 was determined over a 30 min period starting immediately after injection. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. of ten mice in each group. \*\*P<0.01 when compared with artificial CSF- or vehicle (15% DMSO) -controls. ##P<0.01 when compared with AM251 (0.01 fmol) alone.

### 1.3.4. AM251 誘発性 SBL 行動に対する NMDA 受容体拮抗薬の効果

AM251 と NMDA 受容体イオンチャネル部位阻害薬である MK-801 (62.5-16000 pmol)、ポリアミン結合部位の競合的拮抗薬である Ifenprodil (2.0-8.0 pmol)、さらに競合的拮抗薬の CPP (1.25-20 pmol) と D-APV (250-1000 pmol) を同時に投与して 30 分計測した。AM251 誘発性 SBL 行動は MK-801、Ifenprodil、CPP と D-APV により用量依存的かつ有意に抑制した。NMDA 受容体拮抗薬を単独で投与しても CSF 投与群と比較して有意な反応は見られなかった。

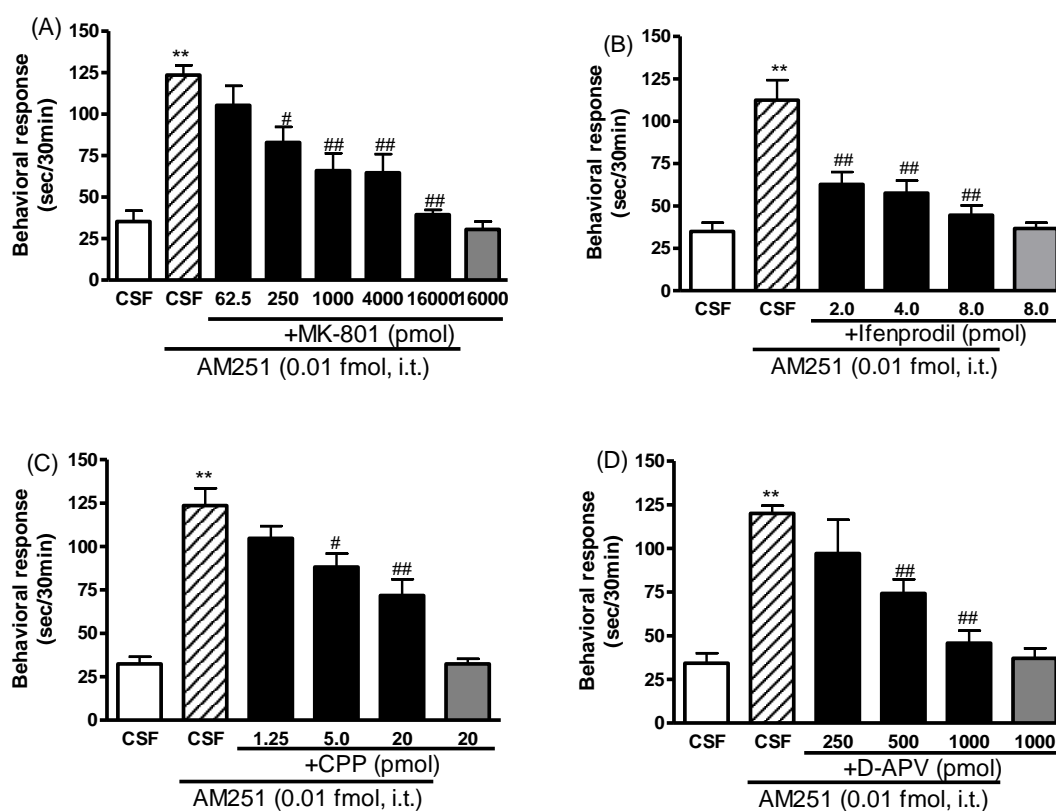


Fig.6. Effect of MK-801 (A), Ifenprodil (B), CPP (C), and D-APV (D) on AM251-induced scratching, biting and licking response in mice. Each antagonist was co-administrated i.t. with AM251 (0.01 fmol) in a total volume of 5  $\mu$ L. The duration of scratching, biting and licking induced by AM251 was determined over a 30 min period starting immediately after injection. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. of ten mice in each group. \*\* $P$ <0.01 when compared with artificial CSF-controls. ## $P$ <0.01, # $P$ <0.05 when compared with AM251 (0.01 fmol) alone.

### 1.3.5. AM251 誘発性 SBL 行動に対する NOS 阻害剤の効果

AM251 と非選択的 NOS 阻害剤である L-NAME (5.0-320 nmol)、nNOS 阻害剤である 7-NI (2.5-10 nmol)、N<sup>ω</sup>-propyl-L-arginine (3.75-15 nmol) および iNOS 阻害剤である 1400W (7.5-30 nmol) を同時に投与して 30 分間計測した。L-NAME、7-NI、N<sup>ω</sup>-propyl-L-arginine は AM251 誘発性 SBL 行動を用量依存的かつ有意に抑制を示した。しかしながら iNOS 阻害剤である 1400W は AM251 誘発性 SBL 行動に対して有意ではあるが用量依存的ではなく弱い抑制を示した。NOS 阻害剤を単独で投与しても CSF 投与群と比較して有意な反応は見られなかった。

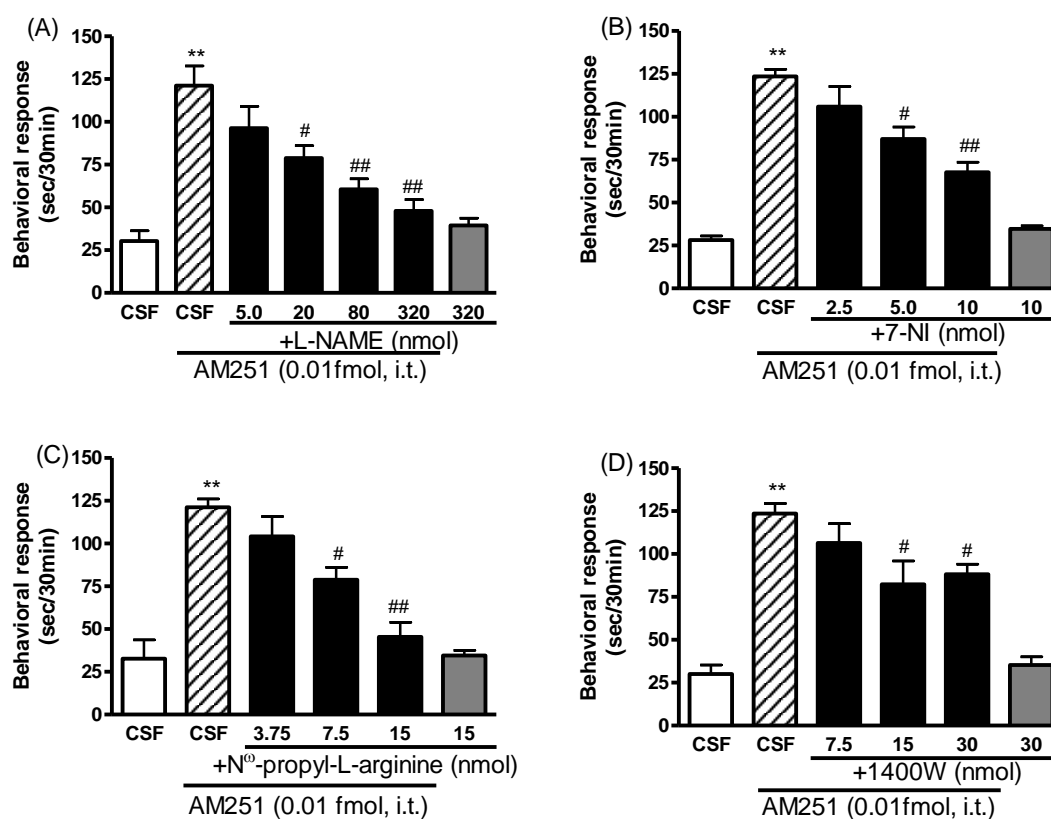
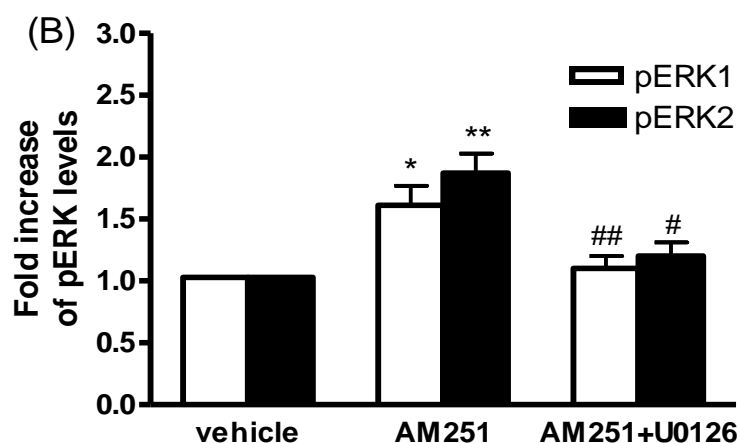
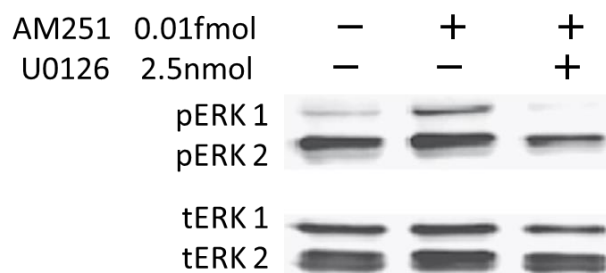


Fig.7. Effect of L-NAME (A), 7-NI (B), N<sup>ω</sup>-propyl-L-arginine (C), and 1400W (D) on AM251-induced scratching, biting and licking response in mice. Each NOS inhibitor was co-administrated i.t. with AM251 (0.01 fmol) in a total volume of 5  $\mu$ L. The duration of scratching, biting and licking induced by AM251 was determined over a 30 min period starting immediately after injection. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. of ten mice in each group. \*\*P<0.01 when compared with artificial CSF-controls. ##P<0.01, #P<0.05 when compared with AM251 (0.01 fmol) alone.

### 1.3.6 脊髄後角における AM251 誘発性 ERK 活性(リン酸化)と MEK 阻害剤 U0126 の効果

i.t.投与した 0.01fmol の AM251 により、脊髄の ERK の活性が観察されたかどうかを検討するために i.t.投与 15 分後に腰髄を摘出して vehicle 群と比較した。i.t.投与した AM251 により、腰髄で pERK1 および pERK2 (pERK1/2) の著明な増加が認められた。MEK 阻害剤である U0126 (2.5nmol) を AM251 と同時に投与すると、15 分後には pERK1/2 の活性は抑制した。i.t.投与した AM251 は total ERK の発現に影響がなかった。U0126 (0.625-2.5 nmol) は 0.01fmol の AM251 誘発性の SBL 行動を vehicle 処置群に比べて用量依存的かつ有意に抑制した。U0126 (2.5nmol) は vehicle (6.71%DMSO) 処置群と比べて有意な反応を起こさなかった。

(A)



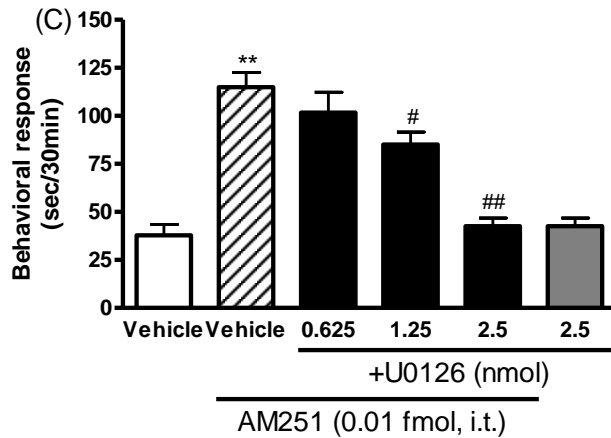
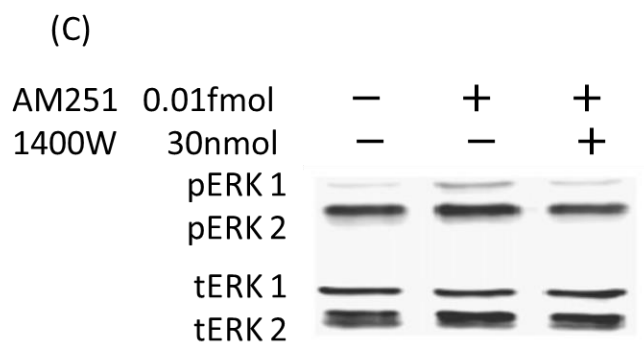
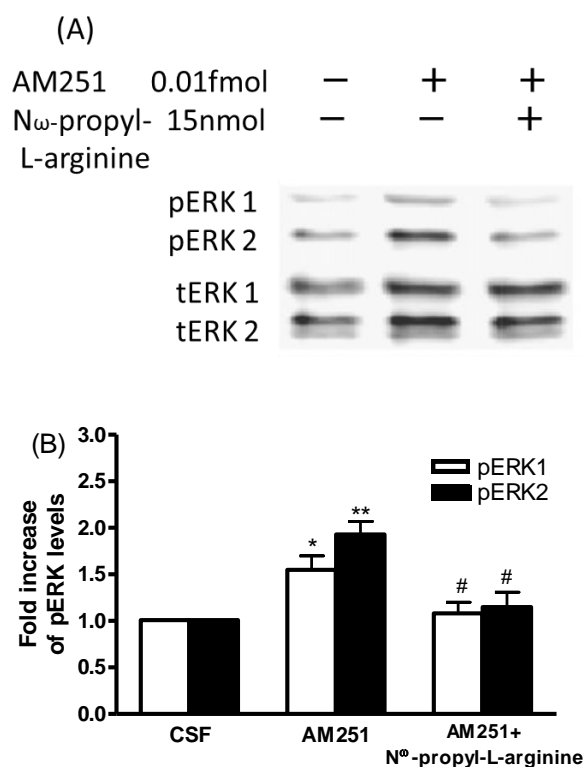


Fig8. Alterations in spinal ERK phosphorylation (pERK) after i.t. injection of AM251 and the effect of the MEK inhibitor U0126. (A) Western blots of the dorsal spinal homogenates for pERK1/2 and total ERK (tERK). Dorsal spinal cord samples were taken 15 min after i.t. injection of AM251 (0.01 fmol). U0126 (2.5 nmol) was co-administrated i.t. with AM251 (0.01 fmol). This Western blot is representative of seven independent experiments. Densitometric quantification from (A) is shown (B). (C) Inhibition of AM251-induced behavioral response by U0126 (0.625-2.5 nmol). The total time of scratching, biting and licking response are indicated. Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. of ten mice in each group. \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$  when compared with vehicle (6.71% DMSO) -controls. # $P < 0.05$  when compared with AM251 (0.01 fmol) alone.

### 1.3.7. AM251 による ERK 活性と N<sup>ω</sup>-propyl-L-arginine、1400W の効果

nNOS および iNOS が pERK1/2 の活性化を起こすかどうか、N<sup>ω</sup>-propyl-L-arginine および 1400W を AM251 (0.01fmol) と共に投与して検討した。N<sup>ω</sup>-propyl-L-arginine (15nmol) は pERK1 および pERK2 を有意に抑制した。しかしながら、1400W (30nmol) は pERK1 を有意に抑制したが、pERK2 には有意な変化がなかった。



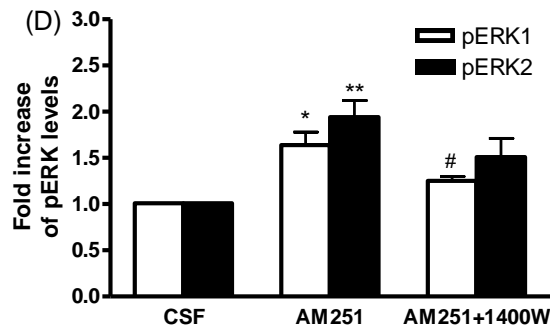


Fig9. Effect of the selective nNOS inhibitor N<sup>ω</sup>-propyl-L-arginine (A, B) and the selective iNOS inhibitor 1400W (C, D) on spinal ERK phosphorylation (pERK) after i.t. injection of AM251 (0.01 fmol). Western blots of the dorsal spinal homogenates for pERK1/2 and total ERK (tERK). Dorsal spinal cord samples were taken 15 min after i.t. injection of AM251 (0.01 fmol). N<sup>ω</sup>-propyl-L-arginine and 1400W were co-administrated i.t. with AM251 (0.01 fmol). Densitometric quantification from (A) and (C) is shown (B) and (D). Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. of seven mice in each group. \*\*P<0.01, \*P<0.05 when compared with artificial CSF-controls. #P<0.05 when compared with AM251 (0.01 fmol) alone.

## 1.4 考察

これまでの動物実験で、CB<sub>1</sub>受容体拮抗薬である SR141716A を i.t.投与すると NMDA 受容体に依存した熱性の痛覚過敏反応やホルマリンによる疼痛行動が増大するという報告がなされている<sup>62), 63)</sup>。

AM251 誘発性疼痛関連行動は CB<sub>1</sub>受容体作動薬である ACEA によって有意に抑制され、CB<sub>2</sub>受容体作動薬である JWH-133 では変化がなかった。さらにデータには示していないが、当研究室においても CB<sub>1</sub>受容体アンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドを連投した後に AM251 を投与した場合、対照群に比べて疼痛関連行動が有意に低下することを確認している。したがって、AM251 は CB<sub>1</sub>受容体を介して疼痛関連行動を発生していることが考えられる。

i.t.投与した AM251 は投与直後から疼痛関連行動を示すサブスタンス P とは異なり、投与後 10-15 分後に特徴的なピークを描くタイムコースとなったことから神経伝達物質を介した間接的な反応であることが考えられた。さらに、サブスタンス P を i.t.投与した時に比べて **Scratching** 行動の回数は非常に少なかった。

データには示していないが、AM251 誘発性疼痛関連行動は抗侵害作用を示す morphine (0.25-1.0 mg/kg i.p.) の前処理や、AM251 と同時に i.t.投与することによって用量依存的かつ有意な抑制を示している。

AM251 誘発性疼痛関連行動は NK<sub>1</sub>受容体拮抗薬 (CP-99,994 および Sendide) および非競合的 NMDA 受容体拮抗薬 (MK-801)、NMDA 受容体ポリアミン部位拮抗薬 (Ifenprodil)、競合的 NMDA 受容体拮抗薬 (CPP,D-APV) の同時投与により、用量依存的かつ有意に抑制された。

capsaicin は一次知覚神経上に存在する TRPV1 受容体に作用し、サブスタンス P およびグルタミン酸を遊離することはよく知られている。さらに一次知覚神経上のサブスタンス P を枯渇させる目的で用いた capsaicin (15nmol) を AM251 投与 4 日前に i.t.投与で前処理した際も有意な減少を示したことから、AM251 誘発性疼痛関連行動の発現には脊髄後角のサブスタンス P およびグルタミン酸の遊離を介した NK<sub>1</sub> および NMDA 受容体の活性化が関与していることが示唆される。

一次知覚神経終末から放出されるサブスタンス P およびグルタミン酸は脊髄後角の NK<sub>1</sub> 受容体および NMDA 受容体の活性化を起こし、Ca<sup>2+</sup>に依存する NOS の活性化を促進する。また、NO は痛覚過敏のメカニズムにも関与している。formalin や capsaicin は一次知覚神経を刺激して脊髄後角の NO を介して侵害反応を起こし、L-NAME によって拮抗することが知られている。NO は一次知覚神経と脊髄後角部の疼痛関連過程におけるシナプス伝達にセカンドメッ



センサーとして深く関与している。本研究では非選択的な NOS 阻害剤である L-NAME および 7-NI、さらに nNOS 阻害剤である N<sup>ω</sup>-propyl-L-arginine が AM251 誘発性疼痛関連行動を用量依存的かつ有意に抑制することを示した。しかしながら、iNOS 阻害剤である 1400W は有意な抑制を示したが用量依存的ではなかった。AM251 誘発性疼痛関連行動には NOS の活性化を介した NO の産生が関与していること、iNOS の関与は小さく、nNOS が主に関与していることが示唆された。

i.t.投与した AM251 誘発性疼痛関連行動は MEK 阻害剤である U0126 により有意に抑制され、脊髄後角の pERK の減少を伴った。この結果は、脊髄後角において MEK と pERK によるシグナル伝達経路を介していることを示している。pERK の変化は疼痛反応の結果に影響を与える可能性がある。また、N<sup>ω</sup>-propyl-L-arginine において pERK1/2 が有意に抑制されたが、1400W では pERK1 を有意に減少して pERK2 には変化が見られなかった。AM251 誘発性疼痛関連行動には脊髄後角における nNOS-ERK 経路が重要な役割を担っている。

AM251 誘発性疼痛関連行動は一次知覚神経終末に存在する CB<sub>1</sub> 受容体を介してサブスタンス P およびグルタミン酸の遊離を引き起こすことが示唆された。さらに遊離されたサブスタンス P およびグルタミン酸は、脊髄後角の NK<sub>1</sub> および NMDA 受容体の活性化を引き起こし、主に nNOS による NO の産生を介して ERK をリン酸化する nNOS-ERK 経路を介して発現していることが明らかとなった。

## 第2章

### $\beta$ -カリオフィレン誘発性抗侵害作用における末梢カンナビノイド

#### 受容体とオピオイド受容体の関与

##### 2.1. 緒言

近年、我が国ではストレスの緩和や美容を目的としたアロマセラピーが普及している。アロマセラピーは花や木、種子などの植物を由来とする精油を用いた自然療法であり、その歴史は長い。動物および人間において嗅覚による刺激や皮膚粘膜を介した方法で体内へ吸収されて作用を示す<sup>64), 65)</sup>。

ミカン科ベルガモットの果実に含まれる bergamot essential oil (BEO) は主要な揮発成分として l-linalool および linalyl acetate を含み、最も一般的な精油成分の一つとされている。ベルガモットの果実は食用、飲用にはあまり使用されず、殆どがアロマセラピーを目的とした精油の採取や香料を目的としている。

capsaicin はトウガラシの辛味成分であり、一次知覚神経上に存在する TRPV1 受容体に作用することが知られている。TRPV1 受容体はイオンチャンネル型受容体であり、Na<sup>+</sup>や Ca<sup>2+</sup>の流入を引き起こして細胞の興奮を起こす。capsaicin (1.6 $\mu$ g/paw) をマウスの足底内へ投与すると、投与した足への biting および licking 行動を主とした 0-5 分をピークとする疼痛関連行動を示すことが知られている<sup>66)</sup>。この capsaicin test は疼痛モデルとして広く用いられているが、morphine の i.t.投与により用量依存的に抑制されることが知られている。Sakurada らは、この capsaicin test に対してマウス足底内へ BEO および linalool を投与すると末梢のオピオイドを介して抗侵害作用を示すことを明らかにしている<sup>67)</sup>。また、Katsuyama らは linalool が抗がん剤である paclitaxel 誘発性の急性痛に対して抗アロディニア、抗痛覚過敏効果を示すことを証明し<sup>68)</sup>、BEO や linalool は新たな鎮痛薬となる可能性が示唆されている。

一方、大麻の精油成分である  $\beta$ -caryophyllene (BCP) は、丁子や黒胡椒のような食用植物および香辛料に広く含まれているセスキテルペン類の精油として知られている。現在、アロマセラピーの分野では不安や更年期症状の改善などを目的として広く用いられている。BCP には動物実験において抗炎症効果が認められており、ラットにおいては carrageenan およびプロスタグランジン E<sub>1</sub> 誘発性の浮腫を抑制することが示されている<sup>69), 70)</sup>。さらにデキストラン硫酸ナ

トリウムによって大腸炎を誘発したマウスに経口投与した場合にも抗炎症効果が認められている<sup>71)</sup>。また、抗菌作用を示す持つことも示唆されており<sup>72)</sup>、同じ大麻を由来とする成分である $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinolと比較しても精神的な副作用が見られずに様々な薬理効果を示すことが示唆されている。

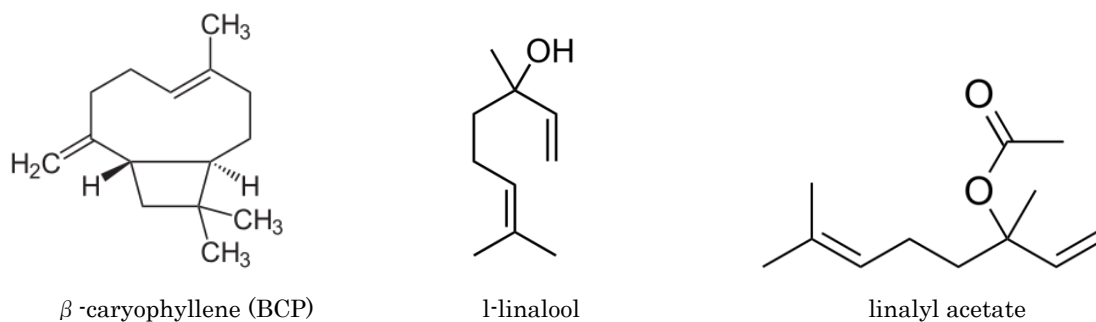


Fig.10. Structure of  $\beta$ -caryophyllene (BCP), l-linalool and linalyl acetate.

しかしながら BCP の抗侵害作用発現機序は詳しく検討されていない。そこで本研究では、capsaicin 誘発性の急性疼痛モデルに対する BCP の抗侵害作用発現機序を検討し、さらに morphine との併用についても検討した。

## 2.2 材料及び方法

### 2.2.1 実験動物

全ての実験には体重 22-25g の雄性 ddY マウスを用いた。マウスは実験に供するまで水とエサを自由に摂取させ、12 時間の明暗サイクルで調節して維持した。室温と湿度は 22-24°C と 50-60% にそれぞれ維持した。

### 2.2.2. カプサイシンテスト

capsaicin 投与の約 1 時間前に観察容器として透明プラスチックケージ (22.0 × 15.0 × 12.5cm) にてマウスを馴化した。マイクロシリンジ (50  $\mu$  L) (Hamilton) および 26 ゲージの注射針を用いて 20  $\mu$  L の capsaicin (1.6  $\mu$  g/paw) 液を右後肢表面へマウスの抵抗がないようにできるだけ早く投与した。対照として用いたマウスには 20  $\mu$  L の jojoba wax のみを同様に投与した。capsaicin を投与した後肢への Licking および Biting 行動を疼痛反応として秒数で測定し集積した。測定は capsaicin 投与後から 5 分で終了した。

### 2.2.3 脊髄くも膜下腔内投与 (intrathecal (i.t.) injection)

マウスの腰椎を指でしっかりと固定し動かないようにした後、無麻酔下で腰椎の 5 番と 6 番の間にマイクロシリンジ (50  $\mu$  L) (Hamilton) に取り付けた 1/5 皮下針を挿入し薬液を 5  $\mu$  L/マウスの割合でゆっくりと投与した。マイクロシリンジおよび注射針はペプチドの吸着を防ぐ目的で、あらかじめシリコン化を施したものを使用した。

### 2.2.4 実験薬物

capsaicin, BCP, naloxone hydrochloride, naloxone methiodide,  $\beta$ -funaltrexamine ( $\beta$ -FNA), nor-binaltorphimine (nor-BNI), naltrindole hydrochloride (NTI), antisera against  $\beta$ -endorphin (Sigma), AM251, AM630 (Tocris), morphine hydrochloride (Sankyo), を使用した。各薬物は生理食塩水にて希釈した。

capsaicin は dimethylsulfoxide (DMSO) に溶解後、生理食塩水にて希釈した。BCP は jojoba wax に溶解した。jojoba wax 単独ではカプサイシンテストに影響を与えなかった。タイムコースを測定した実験を除き、BCP を capsaicin

投与 10 分前に同側、反対側の後肢足底部に投与した。morphine hydrochloride の i.t. 投与は滅菌人口脳脊髄液 (CSF (126.6 mM NaCl, 10.0 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2.5 mM KCl, 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.0 mM glucose)) で溶解し、希釈してから使用した。

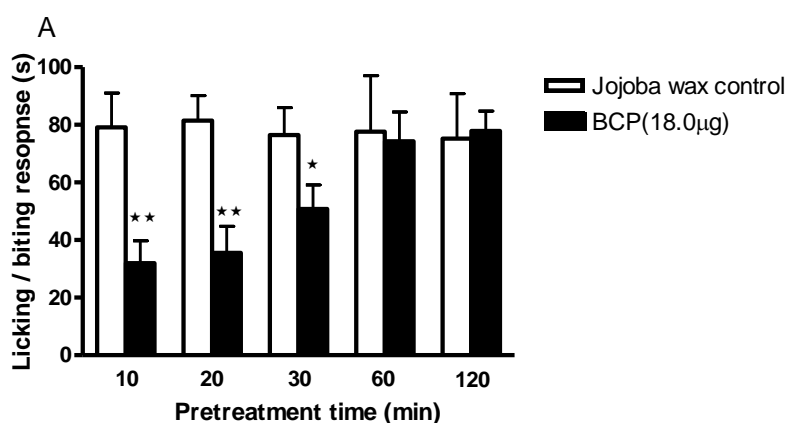
### 2.2.5 統計分析

実験は 1 群 10 匹で行った。結果は平均値と標準誤差 (S.E.M) で表示した。グループ間の統計学的検定は、分散分析 (ANOVA) 後に多重比較 (Dunnnett test) を行った。いずれも危険率 5% 未満 ( $p < 0.05$ ) を有意差ありとして判定した。

## 2.3. 実験結果

### 2.3.1 カプサイシンテストにおいて局所投与した BCP の抗侵害作用

まず、後肢表面への BCP 単独投与が有意な licking/biting 行動を起こさないことを確認した。BCP は  $9.0 \mu\text{g}$  および  $18.0 \mu\text{g}$  の用量において、それぞれ  $15.9 \pm 3.9\text{s}/5\text{min}$  と  $16.8 \pm 3.2\text{s}/5\text{min}$  の licking/biting 行動を起こした。これらの値は対照として用いた jojoba wax 群 ( $16.4 \pm 3.0\text{s}/5\text{min}$ ) および saline 群 ( $16.2 \pm 4.9\text{s}/5\text{min}$ ) と比較して有意差はなかった。続いて、BCP の抗侵害作用を i.pl. 投与してから効果発現が最大となる時間および用量依存性について検討した。BCP ( $18.0 \mu\text{g}$ ) は capsaicin 投与の 10-20 分前に i.pl. 投与しておくことで有意な抗侵害作用を示し、30 分前投与においても有意な抗侵害作用を示した。以降の実験では capsaicin 投与 10 分前に BCP を前処理し、capsaicin 投与後 5 分間の licking/biting 行動を測定した。BCP ( $2.25\text{-}18.0 \mu\text{g}$ ) および jojoba wax は抗侵害作用を観察するために capsaicin の投与 10 分前に同じ部位へ i.pl. 投与した。コントロールとして jojoba wax を投与した群は無処置群と比較して変化はなかった。BCP ( $9.0$  および  $18.0 \mu\text{g}$ ) の同側部への後肢足底内投与は jojoba wax 群と比較して capsaicin による侵害受容反応を有意に抑制した。また、BCP の i.pl. 投与による抗侵害作用が局所性であり、全身性ではないことを明らかにするために BCP ( $18.0 \mu\text{g}$ ) を capsaicin 投与とは反対側の肢へ投与した。反対側の肢へ投与した BCP は capsaicin による侵害受容反応を抑制せず、jojoba wax 投与群と比較して影響を与えなかった。



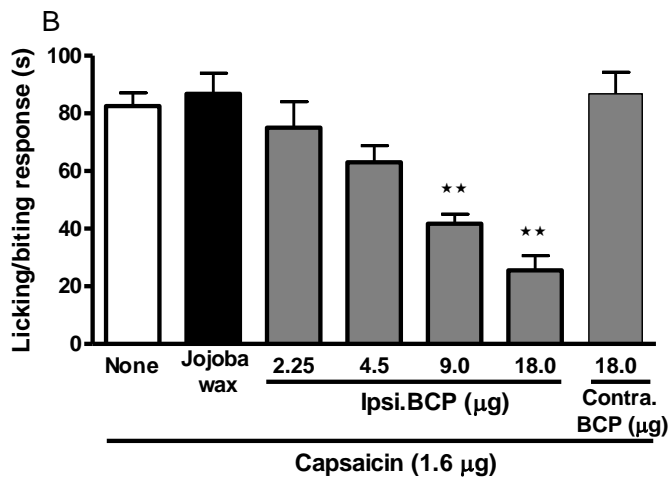


Fig.11. Antinociceptive effect of intraplantar (i.pl.) injection of  $\beta$ -caryophyllene (BCP) in the capsaicin test. (A) The time course of the antinociceptive effect of BCP (18.0  $\mu$ g) injected into the plantar surface of hindpaw. The jojoba wax control value of the effect of capsaicin was compared with the effect of capsaicin at the designated times after i.pl. injection of BCP (18.0  $\mu$ g). Mice received two separate i.pl. injections. The duration of licking/biting induced by capsaicin was determined using the 5-min period, starting immediately after i.pl. injection of capsaicin. Jojoba wax was used as control and this failed to affect capsaicin-induced nociceptive response. (B) BCP was injected into the hindpaw ipsilateral or contralateral i.pl. 10 min prior to capsaicin (1.6  $\mu$ g/paw) injection. Values represent the mean  $\pm$  SEM for 10 mice per group. \*\*P<0.01, \*P<0.05 when compared with jojoba wax-treated control. Ipsi., Ipsilateral ; Contra., Contralateral.

### 2.3.2. BCP 後肢足底内投与誘発性抗侵害作用に対する CB<sub>1</sub> および CB<sub>2</sub> 受容体拮抗薬の効果

BCP の抗侵害作用がカンナビノイド受容体を介しているかどうかを確認する目的で、CB<sub>1</sub> 受容体拮抗薬である AM251 および CB<sub>2</sub> 受容体拮抗薬である AM630 を BCP の投与 30 分前に s.c.投与した。AM630 (0.25-1.0 mg/kg) は用量依存的かつ有意に BCP の抗侵害作用を抑制したが、AM251 は影響がなかった。また、BCP 投与 30 分前に AM251 および AM630 を i.pl.投与した場合においても、AM630 は用量依存的かつ有意に BCP 誘発性抗侵害作用を拮抗したが AM251 は影響を与えなかった。AM251 および AM630 は単独での s.c.投与および i.pl.投与において capsaicin 誘発性侵害受容反応に何も変化を示さなかった。

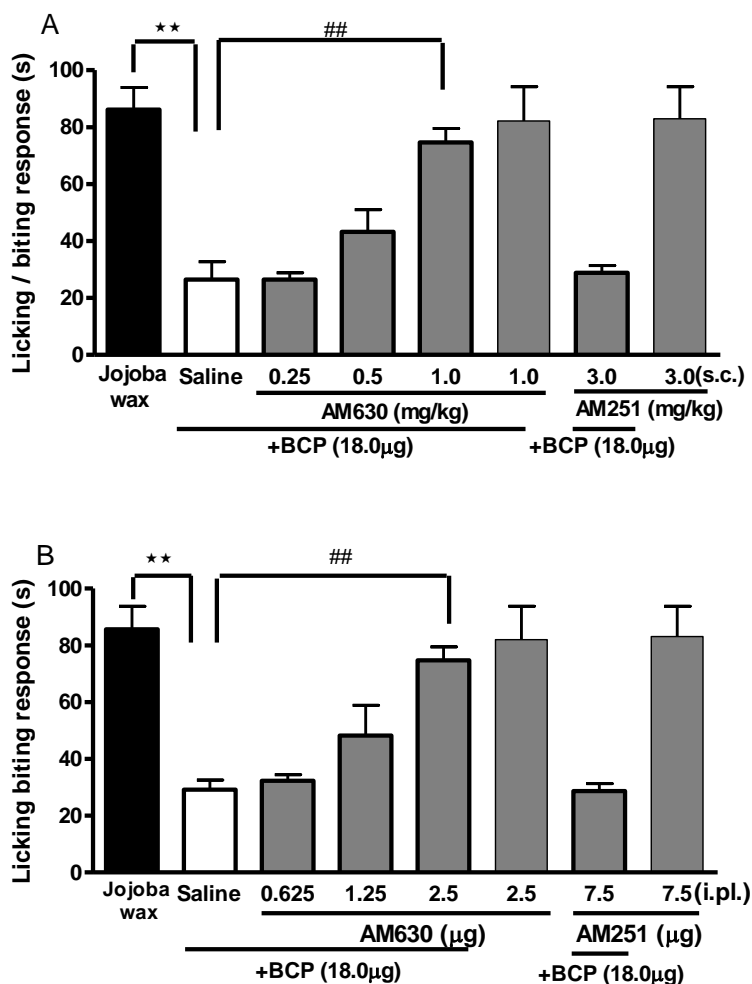


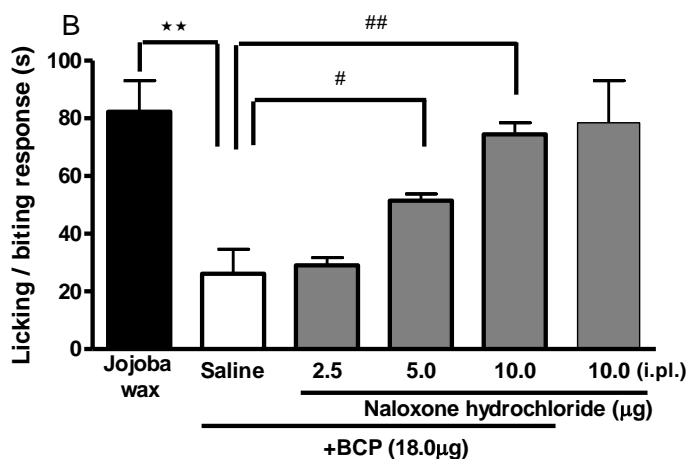
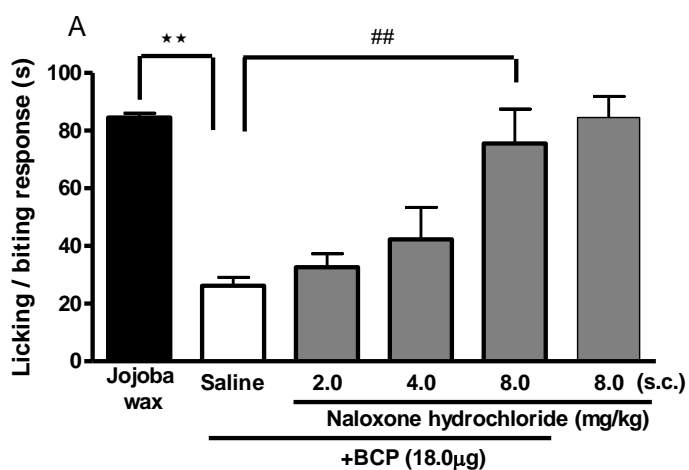
Fig.12. Antagonistic action of AM630 or AM251 on antinociception produced by intraplantar (i.pl.) injection of  $\beta$ -caryophyllene (BCP) in the capsaicin test. AM630 or AM251 was injected subcutaneous (s.c.) (A) and i.pl. (B) 30



min prior to i.pl. injection BCP. Capsaicin (1.6  $\mu$  g/paw) was injected s.c. into the plantar surface of hindpaw 10 min after BCP injection. Values represent the mean  $\pm$  SEM for 10 mice per group. **\*\***P<0.01 when compared with jojoba wax-treated control. **##**P<0.01 when compared with saline plus BCP (18.0  $\mu$  g/paw).

### 2.3.3. BCP 後肢足底内投与誘発性抗侵害作用に対する naloxone hydrochloride および naloxone methiodide の効果

BCP の抗侵害作用がオピオイドを介している可能性を確認するため、BCP (18.0  $\mu$ g) の投与 15 分前にオピオイド受容体拮抗薬である naloxone hydrochloride および naloxone methiodide を s.c. 投与した。naloxone hydrochloride および naloxone methiodide は有意に BCP の抗侵害作用を抑制した。また、BCP 投与 15 分前に naloxone hydrochloride を i.pl. 投与した場合においても用量依存的かつ有意に BCP 誘発性抗侵害作用を拮抗した。naloxone hydrochloride および naloxone methiodide は単独での s.c. 投与および i.pl. 投与において capsaicin 誘発性侵害受容反応に何も変化を示さなかった。



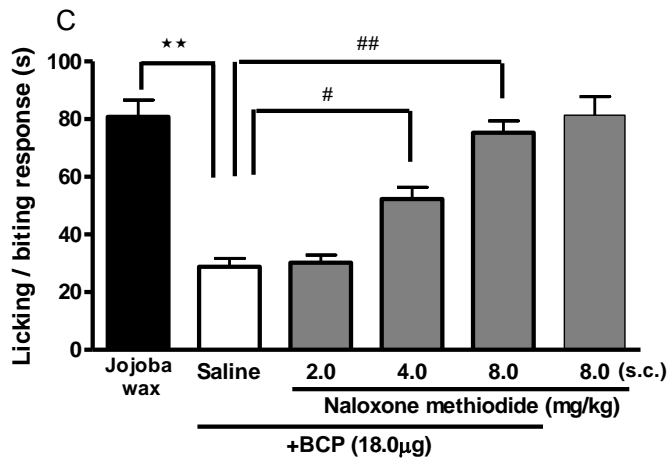


Fig.13. Antagonistic action of naloxone hydrochloride or naloxone methiodide on antinociception produced by intraplantar (i.pl.) injection of  $\beta$ -caryophyllene (BCP) in the capsaicin test. Naloxone hydrochloride (A,B) or naloxone methiodide (C) was injected s.c. and i.pl. 15 min prior to i.pl. injection of BCP. Capsaicin ( $1.6 \mu\text{g/paw}$ ) was injected subcutaneous (s.c.) into the plantar surface of hindpaw 10 min after BCP injection. Values represent the mean  $\pm$  SEM for 10 mice per group. **\*\*** $P < 0.01$  when compared with jojoba wax-treated control. **##** $P < 0.01$ , **#** $P < 0.05$  when compared with saline plus BCP ( $18.0 \mu\text{g/paw}$ ).

### 2.3.4. BCP 後肢足底内投与誘発性抗侵害作用に対する選択的 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\kappa$ オピオイド受容体拮抗薬および $\beta$ -endorphin 抗血清の効果

選択的 $\mu$ 受容体拮抗薬である $\beta$ -FNA (10.0 および 20.0 mg/kg, s.c.) を BCP 投与の 24 時間前に前処理すると、BCP の抗侵害作用は有意に抑制した。また、後肢足底内へ前処理した $\beta$ -FNA (25.0 および 50.0  $\mu$ g, i.pl.) は BCP の抗侵害作用を有意に抑制した。一方、 $\delta$ 受容体拮抗薬である NTI および $\kappa$ 受容体拮抗薬である nor-BNI は s.c.および i.pl.投与のどちらにおいても BCP の抗侵害作用に影響を与えなかった。

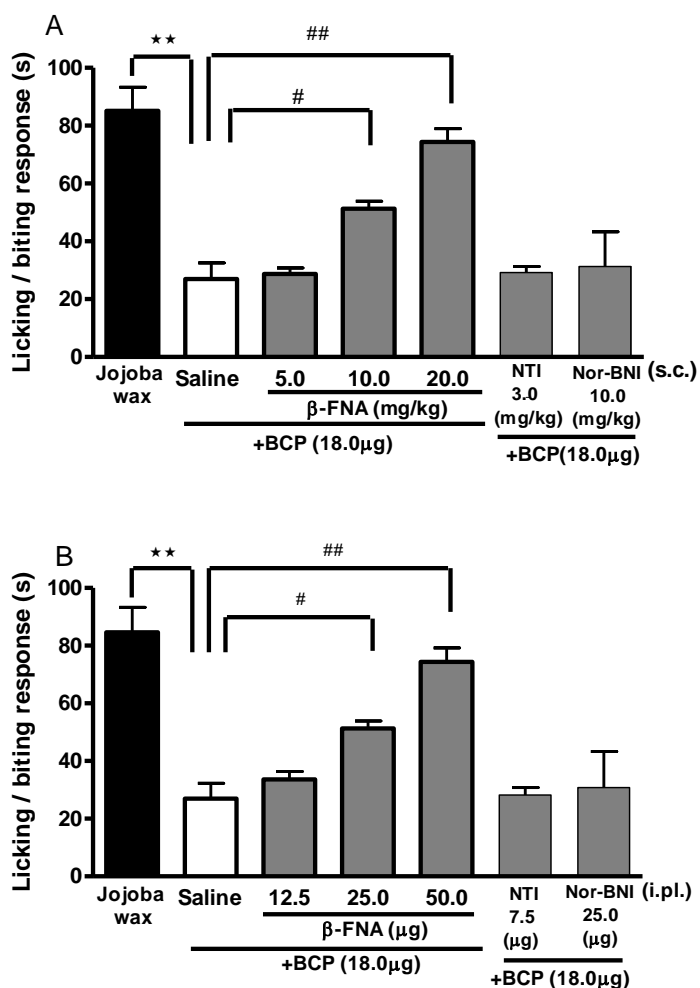


Fig.14. Antagonistic action of  $\beta$ -funaltrexamine ( $\beta$ -FNA), naltrindole hydrochloride (NTI) or nor-binaltorphimine (nor-BNI) on antinociception produced by intraplantar (i.pl.) injection of  $\beta$ -caryophyllene (BCP) in the capsaicin test.  $\beta$ -FNA or nor-BNI was injected subcutaneous (s.c.) (A) and i.pl.(B) 24h prior to i.pl. injection of BCP. NTI was injected s.c.(A) and i.pl.(B) 30 min prior to BCP injection. Capsaicin (1.6  $\mu$ g/paw) was injected s.c. into the plantar

surface of hindpaw 10 min after BCP injection. Values represent the mean  $\pm$  SEM for 10 mice per group. **\*\*** P<0.01 when compared with jojoba wax-treated control. **##**P<0.01, **#**P<0.05 when compared with saline plus BCP (18.0  $\mu$ g/paw).

内因性オピオイドペプチドである  $\beta$ -endorphin に対する抗血清を BCP 投与 5 分前に処理すると、BCP 誘発性抗侵害作用は希釈倍率依存的かつ有意に抑制した。 $\beta$ -endorphin 抗血清 (1/50) の単独投与は capsaicin 誘発性侵害受容反応に影響を与えなかった。

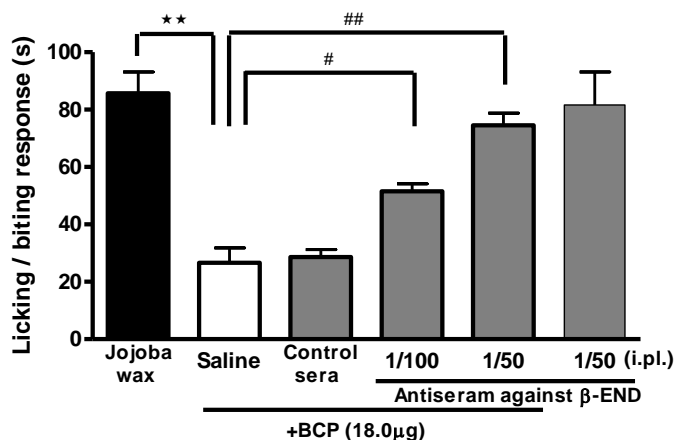


Fig.15. antagonistic action of local injection of antiseram against  $\beta$ -endorphin on antinociception produced by intraplantar (i.pl.) injection of  $\beta$ -caryophyllene (BCP) in the capsaicin test. Antiseram against  $\beta$ -endorphin were injected i.pl. 5 min prior to BCP injection. Capsaicin (1.6  $\mu$ g/paw) was injected subcutaneous into the plantar surface of hindpaw 10 min after BCP injection. Values represent the mean  $\pm$  SEM for 10 mice per group **\*\*** P<0.01 when compared with jojoba wax-treated control. **##**P<0.01, **#**P<0.05 when compared with saline plus BCP (18.0  $\mu$ g/paw).  $\beta$ -END.,  $\beta$ -endorphin.

### 2.3.5. モルヒネ誘発性抗侵害作用に対する BCP 後肢足底内投与の効果

BCP と morphine を併用投与すると、morphine 単独投与時に比べ、低用量で抗侵害作用を示すか検討した。2.25  $\mu$ g (i.pl.) の用量において morphine と組み合わせて投与することで morphine (s.c., i.t.) の対数用量反応曲線を左へシフトした。Saline+BCP (2.25  $\mu$ g, i.pl.) および CSF+BCP (2.25  $\mu$ g) の後肢足底内投与は capsaicin 誘発性侵害受容行動に有意な影響を与えなかったが、morphine (1.0 mg/kg, s.c. および 100pmol, i.t.) +BCP (2.25  $\mu$ g) は対照群である morphine+jojoba wax 群に比べて有意な抗侵害作用を示した。しかしながら BCP+morphine による抗侵害作用の増強は低用量の naloxone hydrochloride (1.0 mg/kg) によって有意に抑制した。一方、 $\beta$ -endorphin の抗血清を前処理しても BCP+morphine の抗侵害作用は有意な抑制を示さなかった。

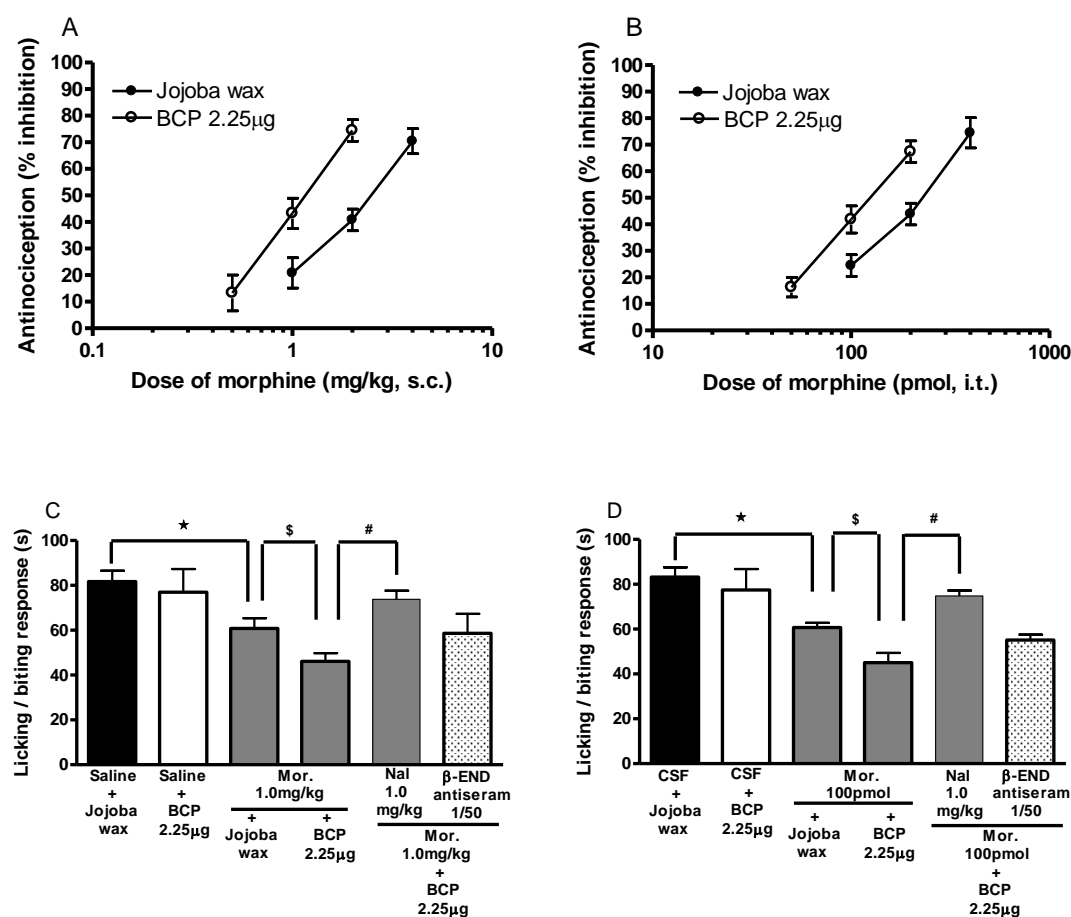


Fig.16. Enhancement of morphine-induced antinociception by intraplantar (i.pl.) injection of  $\beta$ -caryophyllene (BCP) in the capsaicin test and antagonism of naloxone hydrochloride on enhanced antinociception induced by BCP

combined injection of BCP and morphine (Mor.). (A,C) Morphine was injected subcutaneous (s.c.) 5 min prior to i.pl. injection BCP. (B,D) Morphine was injected intrathecal (i.t.) 1 min prior to i.pl. injection BCP. Naloxone hydrochloride (Nal) was pretreated s.c. 15 min prior to BCP injection. Antiseram against  $\beta$ -endorphin were injected into the hindpaw 5 min prior to BCP injection. Capsaicin (1.6  $\mu$ g/paw) was injected s.c. into the plantar surface of hindpaw 10 min after BCP injection. Values represent the mean  $\pm$  SEM for 10 mice per group. \*P<0.05 when compared with saline or cerebrospinal fluid (CSF) plus jojoba wax. <sup>s</sup>P<0.05 when compared with morphine 1.0mg/kg plus jojoba wax and morphine 100 pmol plus jojoba wax. <sup>#</sup>P<0.05 when compared with morphine 1.0 mg/kg plus BCP 2.25  $\mu$ g and morphine 100pmol plus BCP 2.25  $\mu$ g.  $\beta$ -END.,  $\beta$ -endorphin.

## 2.4. 考察

本実験では BCP の i.pl.投与が capsaicin 誘発性の疼痛反応を用量依存的に抑制することを示した。主に末梢に発現している CB<sub>2</sub> 受容体の活性化は抗侵害作用を示すことから、中枢系の副作用がなく術後疼痛や神経因性疼痛に対する効果が期待されている<sup>73)</sup>。BCP は CB<sub>2</sub> 受容体の活性化を介して神経保護作用や腎毒性を回復することも示唆されているが、CB<sub>2</sub> 受容体のノックアウトマウスではこれらの作用は発現しないことが報告されている<sup>74)</sup>。

本実験では BCP の抗侵害作用は CB<sub>2</sub> 受容体拮抗薬である AM630 の s.c.および i.pl.前処理投与により抑制したが、CB<sub>1</sub> 受容体拮抗薬である AM251 の s.c.および i.pl.前処理投与では変化がなかった。以上のことから、BCP の抗侵害作用発現には CB<sub>2</sub> 受容体の活性化が関与していることが示唆される。

BCP の抗侵害作用は、オピオイド受容体拮抗薬である naloxone hydrochloride の s.c.および i.pl.投与、末梢オピオイド受容体拮抗薬である naloxone methiodide の s.c.投与により用量依存的かつ有意に抑制したことから、末梢のオピオイド受容体を介していることが示唆された。さらに詳細に検討するため、β-endorphin の抗血清および μ 受容体拮抗薬である β-FNA を用いたところ BCP の抗侵害作用は有意に抑制した。β-endorphin は μ 受容体に作用して鎮痛、鎮静、多幸感を起こす内因性オピオイドペプチドであり、その鎮痛作用は morphine の数倍とされている<sup>75)</sup>。

一方、δ 受容体の拮抗薬である NTI および κ 受容体拮抗薬である nor-BNI の前処理においては変化がなかった。この結果から、BCP の抗侵害作用には CB<sub>2</sub> 受容体の活性化に続く末梢の β-endorphin および μ 受容体の活性化が深く関与していることが示唆される。

capsaicin 誘発性疼痛関連行動に対し morphine と単独投与では抗侵害作用を示さなかった用量の BCP を併用投与すると、抗侵害作用の相乗効果が認められた。しかしながら、この相乗効果は s.c.投与した naloxone hydrochloride の前処理によって有意に抑制した。一方、この相乗効果は i.pl.投与した β-endorphin 抗血清の前処理では変化が見られなかったことから、末梢の β-endorphin 遊離を介さずに別のメカニズムによって相乗作用を示している可能性がある。BCP の i.pl.投与と morphine による相乗作用のメカニズムに関しては現時点では明らかとなっていない。しかしながら、少なくとも BCP は末梢の CB<sub>2</sub> 受容体の活性化を介して末梢の鎮痛レベルを引き上げている可能性がある。

本実験では、BCP は CB<sub>2</sub> 受容体の活性化を介してケラチノサイトから β-endorphin を遊離して末梢の μ 受容体に作用して局所的な抗侵害作用を発現していることが示唆された。



## 結論

AM251 誘発性疼痛関連行動は、CB<sub>1</sub> 受容体遮断により脊髄後角の NK<sub>1</sub> 受容体および NMDA 受容体を活性化し、nNOS の活性化による NO の産生から NO-ERK 系の情報伝達を介して発現する事が明らかになった。一方、大麻由来の精油成分である BCP は、末梢において CB<sub>2</sub> 受容体の活性化を介して  $\beta$ -endorphin を遊離して抗侵害作用を示すことが明らかとなった。BCP との併用投与により中枢性の副作用を起こさずに morphine を減量しながら疼痛の管理ができる可能性がある。

本研究の結論として、内因性カンナビノイドは、脊髄において CB<sub>1</sub> 受容体を介して脊髄疼痛伝達物質の遊離を抑制する事により、また足蹠においては CB<sub>2</sub> 受容体を介して  $\beta$ -endorphin を遊離する事により、疼痛制御を行っている事が明らかとなった。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始御懇篤な御指導、御鞭撻を賜りました、東北薬科大学・機能形態学教室教授・櫻田 忍 先生に心より感謝いたします。

本論文の作成に対し御高閲を賜りました東北薬科大学・薬物治療学教室教授・石川 正明 先生、放射薬品学教室教授・大久保 恭仁 先生に心より御礼申し上げます。

有益なる御指導・御助言・御協力を賜りました、第一薬科大学薬品作用学教室教授・櫻田 司 先生、同准教授・小松 生明 先生、東北薬科大学・機能形態学教室准教授、米澤 章彦 先生、同准教授・溝口 広一 先生、同講師・渡辺 千寿子 先生、東北薬科大学・臨床薬剤学教室講師・勝山 壮 先生、機能形態学教室諸氏に感謝申し上げます。

また東北薬科大学大学院博士後期課程への入学と本研究の遂行を許可してくださった新潟県厚生農業協同組合連合会 柏崎総合医療センター薬剤部長・鈴木 和吉 先生、村上総合病院薬剤部長・山下 正秀 先生、新潟県厚生農業協同組合連合会薬剤師会の皆様に心より厚く御礼申し上げます。

最後に、本学におきまして研究を行う機会を与えてくださった東北薬科大学理事長・学長・高柳 元明 先生に感謝の意を表します。

## 引用文献

- 1) 山本郁男. 大麻の文化と科学(廣川書店), 151, 53-56(2001)
- 2) Ameri A. *Prog Neurobiol*, 58, 315-48(1999)
- 3) Williamson EM, Evans FJ. *Drugs*, 60, 1303-14 (2000)
- 4) Porter AC, Feder CC. *Pharmacolo Ther*, 90, 45-60(2001)
- 5) Kumar RN, Chambers WA, Pertwee RG. *Anaesthesia*, 56, 1059-68(2001)
- 6) Mechoulam R, Hanus L. *Pain Res Manag*, 6, 67-73(2001)
- 7) Robson P. *Br J Psychiatry*, 178, 107-15(2001)
- 8) Glass M. *Prog Neuro Psychopharmacol Biol Psychiatry*, 25, 743-65(2001)
- 9) Pertwee RG, Ross RA. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 66, 101-21(2002)
- 10) 藤原道弘, 三島健一, 江頭伸昭. 鎮痛・オピオイド研究最前線, 89-101(2002)
- 11) Gaoni Y, Mechoulam R. *J. Am.Chem.Soc*, 86, 1646-7(1964)
- 12) J. T. Pickens. *Br J Pharmacol*, 72, 649-56(1981)
- 13) Yamamoto I. *Yakugaku Zasshi*, 106, 7, 537-61(1986)
- 14) Devane WA, Dysarz FA 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. *Mol Pharmacol*, 34, 605-13(1988)
- 15) Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. *Nature*, 346, 561-4(1990)
- 16) Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. *Nature*, 365, 61-5(1993)
- 17) Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. *Science*, 258, 1946-9(1992)
- 18) Reis GM, Ramos MA, Pacheco Dda F, Klein A, Perez AC, Duarte ID. *Life Sciences*, 88, 653-7(2011)
- 19) Sugiura T. *Biofactors*, 35, 1, 88-97(2009)
- 20) Van Der Stelt M, Di Marzo V. *Eur J Biochem*, 271, 1827-34(2004)
- 21) Di Marzo V, Bisogno T, De Petrocellis L. *Trends Pharmacol Sci*, 22, 346-9(2001)
- 22) Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K. *Biochem Biophys Res Commun*, 215, 89-97(1995)
- 23) Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR. *Biochem Pharmacol*, 50, 83-90(1995)

- 24) 上田夏生. オレオサイエンス, 5, 11-19(2005)
- 25) Kano.M, Ohnosyo-saku T, Hashimotodani Y, Uchigashima,M, Watanabe M. *physiol Rev*, 89, 309-80(2009)
- 26) 橋本谷祐輝, 狩野方伸. 医学のあゆみ, 233, 9, 912-7(2010)
- 27) 橋本谷祐輝, 谷村あさみ, 狩野方伸. *Cognition and Dementia*, 8, 3, 189-95(2009)
- 28) Ohno-Shosaku T, Maejima T, Kano M. *Neuron*, 29, 729-38(2001)
- 29) Wilson RI, Nicoll RA. *Nature*, 410, 588-92(2001)
- 30) Llano I, Leresche N, Marty A. *Neuron*, 6, 565-74(1991)
- 31) Coutts AA, Anavi-Goffer S, Ross R A, MacEwan, D J, Mackie, K, Pertwee RG, Irving A J. *J. Neurosci*,21, 2425-33(2001)
- 32) Mikasova L, Groc L, Choquet D, Manzoni O. *J Proc Natl Acad Sci USA*, 105, 18596-601(2008)
- 33) Malan TP Jr, Ibrahim MM, Deng H, Liu Q, Mata HP, Vanderah T, Porreca F, Makriyannis A. *Pain*, 93, 239-45(2001)
- 34) Sagar DR, Kelly S, Millns PJ, O'Shaughnessey CT, Kendall DA, Chapman V. *Eur J Neurosci*, 22, 22371-9(2005)
- 35) Malan TP Jr, Ibrahim MM, Vanderah TW, Makriyannis A, Porreca F. *Chem Phys Lipids*, 121, 191-200(2002)
- 36) Ibrahim MM, Porreca F, Lai J, Albrecht PJ, Rice FL, Khodorova A, Davar G, Makriyannis A, Vanderah TW, Mata HP, Malan TP Jr. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 3093-8(2005)
- 37) Onaivi ES. *Curr Neuropharmacol*, 9, 205-8(2011)
- 38) Onaivi ES, Ishiguro H, Gong JP, Patel S, Meozzi PA, Myers L, Perchuk A, Mora Z, Tagliaferro PA, Gardner E, Brusco A, Akinshola BE, Hope B, Lujilde J, Inada T, Iwasaki S, Macharia D, Teasenfitz L, Arinami T, Uhl GR. *PLoS One*, vol.3, 2, e1640(2008)
- 39) Brusco A, Tagliaferro PA, Saez T, Onaivi ES. *Ann N Y Acad Sci*, 1139, 450-7(2008)
- 40) Stella N. *Glia*, 58, 9, 1017-30(2010)
- 41) Moonhee Lee. *Curr Protein Pept Sci*, 14, 1, 21-32(2013)
- 42) Ren K, Dubner R. *Curr Opin Anaesthesiol*, 21, 5, 570-9(2008)
- 43) Kuroda R, Kawabata A. *YAKUGAKU ZASSHI*, 123, 7, 533-46(2003)
- 44) Ueda M, Kuraishi Y, Sugimoto K, Satoh M. *Neurosci Res*, 20, 3, 231-7(1994)
- 45) Battaglia G, Rustioni A. *J Comp Neurol*, 277, 2, 302-12(1988)

- 46) Neugebauer V, Schaible HG, Weiretter F, Freudenberger U. *Brain Res*, 666, 2, 207-15(1994)
- 47) Ishii T, Moriyoshi K, Sugihara H, Sakurada K, Kadotani H, Yokoi M, Akazawa C, Shigemoto R, Mizuno N, Masu M, Nakanishi S. *J Biol Chem*, 268, 4, 2836-43(1993)
- 48) Chatterton JE, Awobuluyi M, Premkumar LS, Takahashi H, Talantova M, Shin Y, Cui J, Tu S, Sevarino KA, Nakanishi N, Tong G, Lipton SA, Zhang D. *Nature*, 415, 793-8(2002)
- 49) Regoli D, Boudon A, Fauchère JL. *Pharmacol Rev*, 46, 4, 551-99(1994)
- 50) Freire MA, Guimarães JS, Leal WG, Pereira A. *Front Neurosci*, 3, 2, 175-81(2009)
- 51) Paakkari I, Lindsberg P. *Ann Med*. 27, 3, 369-77(1995)
- 52) Infante C, Díaz M, Hernández A, Constandil L, Pelissier T. *Arthritis Res Ther*. 9, 3, R53(2007)
- 53) Sakurada T, Komatsu T, Kuwahata H, Watanabe C, Orito T, Sakurada C, Tsuzuki M, Sakurada S. *Biochem Pharmacol*, 74, 5, 758-67(2007)
- 54) Scott DA, Wright CE, Angus JA. *Pain*, 109,1-2, 124-31(2004)
- 55) Pertwee RG. *Prog Neurobiol*, 63, 5, 569-611(2001)
- 56) Richardson JD, Aanonsen L, Hargreaves KM. *Eur J Pharmacol*, 319(2-3), R3-4(1997)
- 57) Waku K. *Yakugaku Zasshi*, 126, 2, 67-81(2006)
- 58) 小畑浩一, 野口光一. *医学のあゆみ*, 223, 9, 668-73(2007)
- 59) Hylden JL, Wilcox GL. *Eur J Pharmacol*, 67, 313-6(1980)
- 60) Sakurada T, Wako K, Sakurada C, Manome Y, Tan-no K, Sakurada S, Kisara K. *Brain Res*, 724, 213-21(1996)
- 61) Goettl VM, Larson DL, Portoghese PS, Larson AA. *Pain*, 71, 271-8(1997)
- 62) Richardson JD, Aanonsen L, Hargreaves KM. *J Neurosci*, 18, 451-7(1998)
- 63) Strangman NM, Patrick SL, Hohmann AG, Tsou K, Walker JM. *Brain Res*, 813, 323-8(1998)
- 64) Lynne Graham, Deborah L Wells, Peter G Hepper. *Applied animal behaviour science*, 91, 143-53(2005)
- 65) 横山三男. *心身医学*, 32, 28-35(1992)
- 66) Sakurada T, Katsumata K, Tan-No K, Sakurada S, Kisara K. *Neuropharmacology*, 31, 1279-85(1992)
- 67) Sakurada T, Mizoguchi H, Kuwahata H, Katsuyama S, Komatsu T, Morrone LA, Corasaniti MT, Bagetta G, Sakurada S. *Pharmacol*

- Biochem Behav, 97, 436-43(2011)
- 68) Katsuyama S, Kuwahata H, Yagi T, Kishikawa Y, Komatsu T, Sakurada T, Nakamura H. Biomed Res, 33, 175-81(2012)
- 69) Martin S, Padilla E, Ocete MA, Galvez J, Jiménez J, Zarzuelo A. Planta Med, 59, 533-6(1993)
- 70) Agarwal RB, Rangari VD. Indian J Exp Biol, 41, 890-4(2003)
- 71) Beltramo M. Mini Rev Med Chem, 9, 11-25(2009)
- 72) Medina AL, Lucero ME, Holguin FO, Estell RE, Posakony JJ, Simon J, O'Connell MA. J Agric Food Chem, 53, 8694-8(2005)
- 73) Jhaveri MD, Sagar DR, Elmes SJ, Kendall DA, Chapman V. Mol Neurobiol, 36, 26-35(2007)
- 74) Béla Horváth, Partha Mukhopadhyay, Malek Kechrid, Vivek Patel, Galin Tanchian, David A Wink, Jürg Gertsch, Pál Pacher. Free Radic Biol Med, 52, 1325-33(2012)
- 75) 池上大悟, 伊達明利, 鈴木 勉, 成田 年. 基礎から学ぶ麻酔科学ノート, 17, 28-32(2013)