

東北薬科大学

審査学位論文（博士）

氏名（本籍）	タカギ ヒロカズ 高木 宏和（新潟県）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	甲第 137 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	脊髄疼痛制御における μ 受容体サブタイプの多樣的関与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 野 勲
	副査 教授 丹 野 孝 一

脊髄疼痛制御における μ 受容体サブタイプの
多樣的関与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

高木 宏和

目次

緒言	1
実験材料及び方法	7
実験成績	
1 NMDA 誘発性疼痛関連行動に対する Endomorphins の抗侵害作用発現機序の検討	9
2 Substance P 誘発性疼痛関連行動に対する Endomorphins の抗侵害作用機序の検討	14
3 Capsaicin 誘発性疼痛関連行動に対する Endomorphins の抗侵害作用機序の検討	21
4 Naloxonazine 前処置群における Endomorphins の抗侵害作用発現機序の検討	26
考察	30
謝辞	37
引用文献	38

緒言

痛みとは外界からの刺激を脳に伝える重要な感覚である。外界からの刺激を脳に伝えると言う意味では皮膚感覚の一種とも捉えられるが、痛みがただの皮膚感覚と大きく異なる点は、痛みには不快感と言う情動を伴う事である。例えば熱傷による痛みには、皮膚組織を熱による損傷を防ぐ役割と、損傷を受けた組織の保護の役割を果たし生命を守る重要なシグナルと言う役割がある。それゆえ痛みを受けると言う事は生命を脅かすと言う意味となり、痛みは不快感をもたらす禁忌とされる。日常的な臨床診療の場において多くの人々は、腹痛、咽頭痛、頭痛等による不快感を主訴として訴え、痛みの原因を取り除き不快感を取り除くことが治療とされる事が多い。近年、痛みを除くこと自体が **Quality of Life (QOL)** を向上させるとされ重要度が増して来ている。

痛みは侵害受容器により感知され、A δ 線維やC線維などの一次知覚神経を伝導し、脊髄後角・脳へと伝達される。痛みの伝達のメカニズムは非常にシンプルであるが、伝わる痛みは①**侵害受容性疼痛**（i 化学的侵害刺激 ii 熱侵害刺激 iii 機械的侵害刺激 等による炎症や組織損傷による疼痛）②**神経因性疼痛**（末梢あるいは中枢神経の変異により、刺激なしで興奮・伝導を生じる疼痛）③**心因性疼痛**（解剖学的・神経学的に説明がつかない疼痛で、おそらく情動により生じている）の三種類に分類され、痛みを理解するのが困難でかつ複雑となる要因である。さらに動物を用いた実験系では与えた刺激に対し回避行動を生じるものの痛みにより生じた回避行動なのか、どの程度の痛みなのかなど客観的に評価しにくい点があり、痛みへの研究が遅れているのが現状である。

痛みの中で临床上大きな問題となっているのが帯状疱疹痛や癌性疼痛などの慢性痛であり、これらの慢性痛は患者の **QOL** を大きく低下させる。世界保健機構（WHO）により発行された三段階疼痛除去ラダー（75）によれば、慢性痛には①**NSAIDs** のような非オピオイド製剤、②**codeine** のような弱オピオイド製剤、③**morphine** を代表とする強オピオイド製剤の三種類を用いて患者毎の痛みに合わせて使用するべきとされ、癌性疼痛のような非常に強い痛みには強オピオイド製剤が非常に有用であるとされている。

人類とオピオイドとの歴史は古く、紀元前 3000 年頃にシュメール人によりケシの栽培方が確立され、紀元前 1500 年頃にはエジプトで鎮痛薬として阿片が用いられた。阿片からの **morphine** の単離は 1805 年に **Sertürner** により行われて（64,65）以来 200 年以上経過した現在でも臨床の現場では **morphine** が使用されている。しかし **morphine** の作用メカニズムは 1900 年後半まで不明点が多く

存在し、特に鎮痛作用については中枢系に **morphine** が特異的に作用する部位があるのではないかと推測される程度であった。

1971年 Goldstein らにより、マウス脳内において **levorphanol** とその光学異性体を用いることにより、後に **opioid** 受容体と呼ばれる特異的結合部位を見出した(13)。その後、1973年には Snyder らが^[3H]-naloxone を、Simon らが^[3H]-etorphine を、Ternius らは^[3H]-dihydromorphine をそれぞれ用いる事により **opioid** 受容体の存在を裏付けた(54,67,72)。1976年 Martin らは、**morphine** および同属種の薬物である **ketocyclazocine**、**SKF-10,047** の3種類の薬物をイヌ脊髄内に投与した際に生じる身体依存の特徴的違いを指標に **opioid** 受容体作動薬を分類し、その作動薬に対する **opioid** 受容体を作動薬物の頭文字より μ (**morphine**) 受容体、 κ (**ketocyclazocine**) 受容体、 σ (**SKF-10,047**) 受容体の3種類に分類命名した(38)。一方、中枢神経系とは別に、末梢平滑筋標本を用いたアプローチも試みられ、Kosterlitz らは放射性標識をした **enkephalin** を用いてモルモット回腸とマウス輸精管それぞれの平滑筋収縮が抑制される事と、**enkephalin** に対するモルモット回腸とマウス輸精管の反応性が大きく異なる事を発見した(24)。これらより Kosterlitz らはマウス輸精管に存在する **enkephalin** 高感受性受容体を δ 受容体とした。

オピオイド受容体の細分化が進む一方で、 σ 受容体は **naloxone**、**naltrexone** により拮抗しない事や、 μ 、 δ 、 κ 受容体とは薬理活性が大きく異なる事より現在ではオピオイド受容体ではないと評価されている(57,74)。現在オピオイド受容体として考えられているのは μ 受容体、 δ 受容体、 κ 受容体の3つで Pasternak の報告を基に各オピオイド受容体の生理活性を Table 1 に記しておく(52)。

現在オピオイド受容体にはサブタイプが存在すると考えられ、薬理的に各種受容体作動薬と拮抗薬をもちいて分類が行われている。すなわち μ 受容体は受容体拮抗薬である **naloxonazine** を用いて分類を行い、**naloxonazine** 感受性

Table 1: Opioid receptor subtypes

μ 受容体	鎮痛 プロラクチン遊離 アセチルコリン代謝回転減少 カタレプシー 体温低下 呼吸抑制 除脈 モルモット回腸の収縮抑制 身体的依存の形成 ドパミン代謝回転減少 成長ホルモン遊離
δ 受容体	鎮痛 ドパミン代謝回転減少 成長ホルモン遊離 マウス輸精管の収縮抑制 身体的依存の形成
κ 受容体	鎮痛 沈静 モルモット回腸の収縮抑制 μ 受容体作動薬による依存性形成の抑制

受容体を μ_1 受容体、naloxonazine 非感受性受容体を μ_2 受容体とし (30,53)、 δ 受容体も受容体拮抗薬を用い、BNTX 感受性受容体を δ_1 受容体、NTB 感受性受容体を δ_2 受容体と分類した (70)。一方 κ 受容体は作動薬を用い、U-69,593 と U-50-488H の両結合部位を κ_1 受容体とし、非 μ 非 δ 非 κ_1 bremazocine 結合部位を κ_2 受容体、naloxone benzoylhydrazone 感受性の非 κ_1 非 κ_2 受容体を κ_3 受容体とした (45)。

本研究テーマにそって μ 受容体にスポットをあてれば、 μ_1 受容体は鎮痛作用発現、 μ_2 受容体は呼吸抑制発現に関与すると考えられてきたが (51)、1993 年に Chen らは、遺伝子学的解析において μ 受容体は MOR-1 にエンコードされている事を発表された (6)。この報告は薬理的には μ 受容体はサブタイプが存在する事を示唆し、遺伝子学的には μ 受容体にはサブタイプが存在しない事を示唆し、矛盾をもたらした。しかし MOR-1 より mRNA にスプライシングを受ける過程で、exon の組み合わせによりスプライスバリエントと呼ばれる、mRNA の多様性が生じる事が解ってきた (49,50)。現在マウス、ラット、ヒトの 3 種において計 19 個の exon の存在が確認され、exon の組み合わせにより計 33 種のスプライスバリエントが確認されているが (9,10,25,46,47,48)、これら 33 種のスプライスバリエントより翻訳された各 μ 受容体の生理活性の詳細な検討は行われていない。

オピオイド受容体についての研究が始まると同時に内因性リガンドの模索が始まり、1975 年 Hughes らによりブタの脳より [Met⁵]enkephalin と、[Leu⁵]enkephalin が単離同定された (29)。1976 年には Li らにより β -endorphin が (14,28)、1979 年には Goldstein らのグループにより dynorphin A と dynorphin B が (22)、また同年 Matsuo らのグループにより α -neo-endorphin と、 β -neo-endorphin が哺乳類の脳から単離同定された (21)。これらの内因性オピオイドは全て 5 個以上のアミノ酸からなるペプチド鎖であり、ペプチド構造の N 端側は必ず Tyr-Gly-Gly-Phe である為に、この構造は内因性オピオイドペプチドの N 端基本構造とされた。しかし、1997 年 Zadina らにより、従来の概念を覆す新しいオピオイドペプチドである endomorphin 類が、ウシ脳 (17) 及び人間の脳 (58) より単離同定された。Endomorphin 類は、従来のオピオイドペプチドとは異なり、テトラペプチドと短く、Tyr-Gly-Gly-Phe の N 端基本構造を持たない。また従来の内因性オピオイドペプチドは、複数の受容体に結合能を有するいわゆる非選択的リガンドであったのに対し (39)、endomorphin 類の μ 受容体に対する親和性は、 δ 受容体、 κ 受容体に比して 4,000 倍、15,000 倍も高く、 μ 受容体に選択的なりガンドであった。Endomorphin-1 (Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂ : EM1) 及び endomorphin-2 (Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂ : EM2) を、脳室内 (i.c.v) 及び脊髄くも膜下腔内 (i.t.) に投与すると、熱刺激や機械刺激に対し強力な抗侵害作用を発

Table 2 Amino acid sequences of endogenous opioid peptides

Opioid peptides	Structures (Amino acid sequences)
Endomorphin-1	• Tyr-Pro-Trp-Phe-NH ₂
[D-Pro ²]Endomorphin-1	• Tyr-DPro-Trp-Phe-NH ₂
Endomorphin-2	• Tyr-Pro-Phe-Phe-NH ₂
[D-Pro ²]Endomorphin-2	• Tyr-DPro-Phe-Phe-NH ₂
Dermorphin	• Tyr-DAla-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-NH ₂
Tyr-W-MIF-1	• Tyr-Pro-Typ-Gly-NH ₂
[D-Pro ²]Tyr-W-MIF-1	• Tyr-DPro-Typ-Gly-NH ₂
Kyotorphin	• Tyr-Arg

現することが明らかとなり (56,61,77)、また炎症性慢性疼痛や神経障害性疼痛にも有効である事が実証されている (3,20)。心血管系に対しては、血圧下降や心拍数減少を誘発し、これらの作用はいずれも μ 受容体拮抗薬である naloxone により消失する (51,56,61)。これ等の事より、EM1 及び EM2 は、種々の生理作用を持つ μ 受容体の内因性リガンドであると考えられている。興味深い事に EM1、EM2 と morphine との交差耐性についての試験において、EM2 により生じた鎮痛耐性は EM1 と morphine に交差耐性が認められなかったが、EM1 により生じた鎮痛耐性は morphine に交差耐性を認め、EM2 では交差耐性を認められなかった (26)。この事よりアミノ酸配列の 3 位しか違いが無いにもかかわらず、EM1 と EM2 では異なる受容体に作用し抗侵害作用を発現し、EM1 と morphine は同じ受容体に作用し抗侵害作用を発現していると考えられる。一方、Naloxonazine を用いた実験にでも同様に、EM1 は μ_2 受容体に EM2 は μ_1 受容体に、それぞれ異なる受容体に作用すると報告されている (60)。

ここで EM 類以外の μ 受容体作用性の内因性ペプチドを 2 種類紹介する。Dermorphin (Tyr-DAla-Phe-Gly-Tyr-Pro-Ser-NH₂) は南アメリカ原産のカエルの皮膚から単離されたオピオイドペプチドである。Dermorphin は μ 受容体に強力に作用し強力な抗侵害作用を示す (1,12,14)。Tyr-W-MIF-1 (Tyr-Pro-Typ-Gly-NH₂) はメラトニン細胞刺激ホルモン放出抑制ホルモン (Melanocyte-stimulating hormone-release Inhibiting Factor-1(MIF-1)) に分類されるペプチドであるが、その立体構造が EM1 (Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂) に類似することから μ 受容体に作用するのではないかと推測され、実際に μ 受容体に親和性を有し (11,16)、naloxonazine 非感受性の μ 受容体に作用し抗侵害作用を発現する事が報告された (78)。

生理活性の有無はそのリガンドの立体構造に大きく左右される。Dermorphin は立体構造という意味では非常にユニークで、2 位の D-Alanine は当時自然界

に一部の真核生物しか持たないと考えられた D 体のアミノ酸を持つ。Dermorphin の立体構造活性に関する研究では、Dermorphin の 2 位の D-Ala を L-Ala に置換すると μ 受容体の結合能が約 4000 倍近く低下し、ほぼ結合能が無い状態となり、2 位に D-Ala が存在することが活性を持つ意味で重要である (40)。逆に takagi らはジペプチドである kyotorphin(Tyr-Arg)の 2 位の L-Arg を D-Arg に置換することにより kyotorphin の μ 受容体を介した抗侵害作用が増強する事を見出した (68,69)。これらの研究よりオピオイドペプチドの 2 位のアミノ酸の立体構造がオピオイド活性の強弱に影響すると考えられ、当教室ではこれらの発表を基に EM 類と Tyr-W-MIF-1 の 2 位の L-Pro を D-Pro に変換することにより抗侵害作用が増強するのではないかと考え、[D-Pro²]EM 類、[D-Pro²]Tyr-W-MIF-1 を開発合成した。しかし残念ながら [D-Pro²]EM1 及び [D-Pro²]EM2 は、i.c.v.投与ならびに i.t.投与のいずれにおいても抗侵害作用を示さなかった。しかし [D-Pro²]EM 類は、i.c.v.投与及び i.t.投与において痛覚過敏反応を発現せず、お互いにジアステレオマーの関係にある EM 類の抗侵害作用を拮抗し (44,62)、同様に [D-Pro²]Tyr-W-MIF-1 も Tyr-W-MIF-1 の抗侵害作用を拮抗した (19)。従来まで naloxonazine 非感受性の μ 受容体を μ_2 受容体と分類してきたが、[D-Pro²]EM1、[D-Pro²]Tyr-W-MIF-1 により選択的 μ_2 受容体拮抗薬が登場し、 μ 受容体の詳細な機能解析の可能性が示唆された。Table2 に紹介した μ オピオイドペプチドのアミノ酸配列を記しておく。

μ 受容体は痛みの伝導伝達に関した部位に分布している場合が多い。通常痛みは、侵害受容器から一次知覚神経を介し、二次知覚神経に伝達され、反対側の前側索を上行して視床へ伝わり、大脳皮質に存在する体性感覚野へと伝播する事で痛みとして認知される。疼痛伝達に携わる一次知覚神経-二次知覚神経間の主な神経伝達物質として、glutamate 及び substance P (SP)が挙げられる。Glutamate の受容体は、代謝型、イオンチャンネル型の 2 種類に大別されるが、脊髄における疼痛伝達には後者に分類される N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体が主に関与している (44,62)。免疫組織学的研究により、NMDA 受容体は脊髄後角の I 層から III 層に分布しており、二次知覚神経に多く存在することが明らかとなっている (7)。一次知覚神経終末にも NMDA 受容体はわずかに存在し、従来までこの NMDA 受容体は、glutamate の放出に関与しているとされて来たが、vanilloid receptor subtype 1 (VR1) の活性化に基づく、SP 等の神経伝達物質の放出に関与している事が明らかとなっている (27)。VR1 遺伝子は、northern blot hybridization 法、in situ hybridization 法による解析によって、一次知覚神経(後根神経節細胞および三叉神経節細胞)に発現しているが、二次知覚神経には発現していない事が明らかにされている (2)。近年 VR1 受容体は、カルシウムイオンチャンネルである事、6 回膜貫通型受容体である事、終末のアミノ酸配列が

アンキリン反復配列を有する等の類似点より、TRPファミリーに属すると考えられ、TRPV1受容体と呼ばれる(34)。一方、一次知覚神経終末より放出されたSPは二次知覚神経に存在するNK₁受容体に結合し、痛みを伝達することが明らかとなっている(4,8,31)。これ等の報告より、TRPV1受容体は一次知覚神経の痛みのout putに、NMDA及びNK₁受容体は二次知覚神経の痛みのin putに重要であると考えられる。一方、痛みを制御する μ 受容体のin situ hybridization法による解析も行われ、一次知覚神経及び二次知覚神経のどちらにも μ 受容体が発現している事が報告されている(32,33,36,37,41,42,43)。しかし、一次知覚神経及び二次知覚神経における μ 受容体を介した疼痛制御機構は等しくなく、二次知覚神経においてはカリウムチャンネル開口による神経脱分極による抑制が、一次知覚神経終末ではカルシウム流入抑制による神経伝達物質の放出制御が関わっている(15,63,76)。興味深い事に、高用量morphineによる熱侵害刺激に対する抗侵害作用には、一次知覚神経終末からの神経伝達物質の放出抑制が関与しているが、低用量morphineによる抗侵害作用には、一次知覚神経からの神経伝達物質の放出抑制は関与していない(23)と報告され、電気生理学研究においてもmorphineとEM2は一次知覚神経上に存在する μ 受容体に作用し、EM1は脊髄二次知覚神経上に存在する μ 受容体に作用すると報告されている(71)。

本研究では、これらの報告を基に一次知覚神経-二次知覚神経間に存在する μ 受容体には薬理学的特徴の異なる受容体が存在し分布しているとし、一次知覚神経には μ_1 受容体が、二次知覚神経上では μ_2 受容体が大きく疼痛コントロールに寄与していると仮説をたて、一次知覚神経-二次知覚神経間の μ 受容体の分布と μ 受容体の薬理学的特徴について行動薬理的に検討を行う。

実験材料及び方法

実験動物

実験には体重 22～26 g の d d Y 系雄性マウスを使用した。マウスは恒温 (22±2°C)、恒湿 (55±5%)、明暗 12 時間サイクル (明期：7:00～19:00、暗期 19:00～7:00) の一定の環境の室内にて飼育し、固型飼料 (F2、船橋農場、千葉) 及び水道水を自由に摂取させた。なお実験は東北薬科大学動物実験指針に従った。

使用薬物

Capsaicin (Sigma Chemical Co. St.Louis USA)

CTOP: D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH₂

(Sigma Chemical Co. St.Louis USA)

Endomorphine-1 : Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂ (ペプチド研究所 大阪)

Endomorphine-2 : Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂ (ペプチド研究所 大阪)

[D-Pro]²Endomorphine-1: Tyr-D-Pro-Trp-Phe-NH₂ (当教室で合成)

[D-Pro]²Endomorphine-2: Tyr-D-Pro-Phe-Phe-NH₂ (当教室で合成)

[D-Pro]²Tyr-W-MIF-1: Tyr- D-Pro-Typ-Gly-NH₂ (当教室で合成)

Naloxonazine (Sigma Chemical Co. St.Louis USA)

NMDA (Nacalai Tesque Inc. 京都)

Substance P (ペプチド研究所 大阪)

投与方法

脊髄くも膜下腔内投与

マウスの腰椎を指でしっかり固定して動かないようにした後、Hylden and Wilcox (18) 等の方法に準じて、無麻酔科で腰椎の 5 番と 6 番の間の髄腔内へ、50 μl マイクロシリンジ (Hamilton) を取り付けた 1/5 皮下針 (M.Y&CO.,LTD、東京) を素早く挿入し、薬物を 5 μl 注入した。尚、マイクロシリンジならびに皮下針は、ペプチドの吸着を防ぐ目的で 5%シリコナイズ溶液 (Pierce、Rocford、USA) を用いてシリコン化した。

皮下投与

マウス頸背部皮下に、27 番ゲージ注射針（TERUMO）を用い 0.1ml/10g 体重の割合で投与した。

行動観察方法

疼痛関連行動測定方法

疼痛関連行動は、マウスの後肢尾部への引っ掻き（**Scratching**）、噛み付き（**Biting**）、舐め回し（**Licking**）行動（SBL 行動）を指標として測定した。マウスを測定用のプラスチックケージ（22×15×12.5cm、日本クレア）に一匹ずつ入れ、約一時間後に自発運動が消失したのを確認した後に、薬物を i.t.投与した。行動観察は投与直後より開始し、5 分間隔で 15 分間測定し、その持続時間を累積時間として表示した。また対照群として、CSF もしくは 0.57%DMSO/CSF 溶液を i.t.投与し、上記と同じ条件下で行動観察した。

統計処理

実験は 1 群 10 匹で行い、実験結果は平均値（Mean）と標準誤差（S.E.M.）で示した。統計学的検定は、一元配置分散分析（one-way ANOVA）で行った後、Dunnett test または Bonferroni test にて後検定を行った。危険率 5%以下を有意差ありと判定した。

実験成績

1 NMDA 誘発性疼痛関連行動に対する Endomorphins の抗侵害作用発現機序の検討

1-1 NMDA 誘発性疼痛関連行動

NMDA (150-300pmol) を i.t. 投与し、疼痛関連行動の発現持続時間を測定した。NMDA の i.t. 投与により、用量依存的な疼痛関連行動の発現が確認され、300pmol では、投与後 5 分間に約 80 秒といった強力な疼痛関連行動の発現が認められた (Fig. 1A)。また、NMDA 誘発性疼痛関連行動は投与直後より発現し、0-5 分をピークとし、その後速やかに消失した (Fig. 1B)。

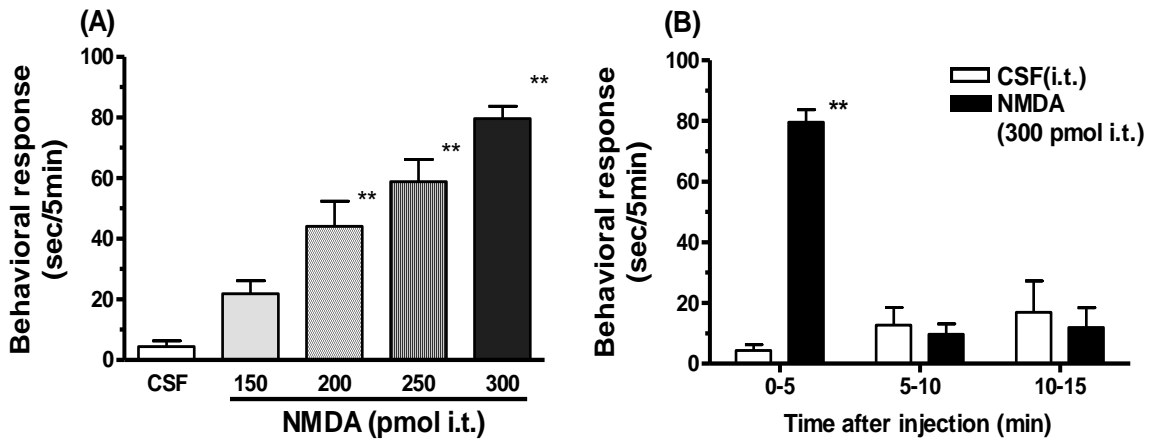


Fig. 1 The nociceptive behavioral responses induced by NMDA given i.t. in mice. (A) Groups of mice were treated i.t. with various doses (150-300pmol) of NMDA, and the duration of nociceptive behaviors induced by NMDA was measured for 5min. (B) Groups of mice were treated i.t. with NMDA (300pmol), and the duration of nociceptive behaviors was measured for 15min in 5min interval. Each column represents the mean \pm S.E.M. for 10 mice. **, $P < 0.01$ vs. CSF-treated control group.

1-2 NMDA 誘発性疼痛関連行動に対する Endomorphin-1 の効果

NMDA 300pmol の i.t.投与により、約 80 秒の疼痛関連行動が発現した。この NMDA 誘発性疼痛関連行動は、endomorphin-1 (75-600pmol) の i.t.同時併用投与により用量依存的かつ有意に抑制された (Fig. 2A)。Endomorphin-1 の 50%有効用量 (ED_{50}) ならびにその 95%信頼限界は、128.3pmol (103.7-158.8) であった (Fig.2B)。

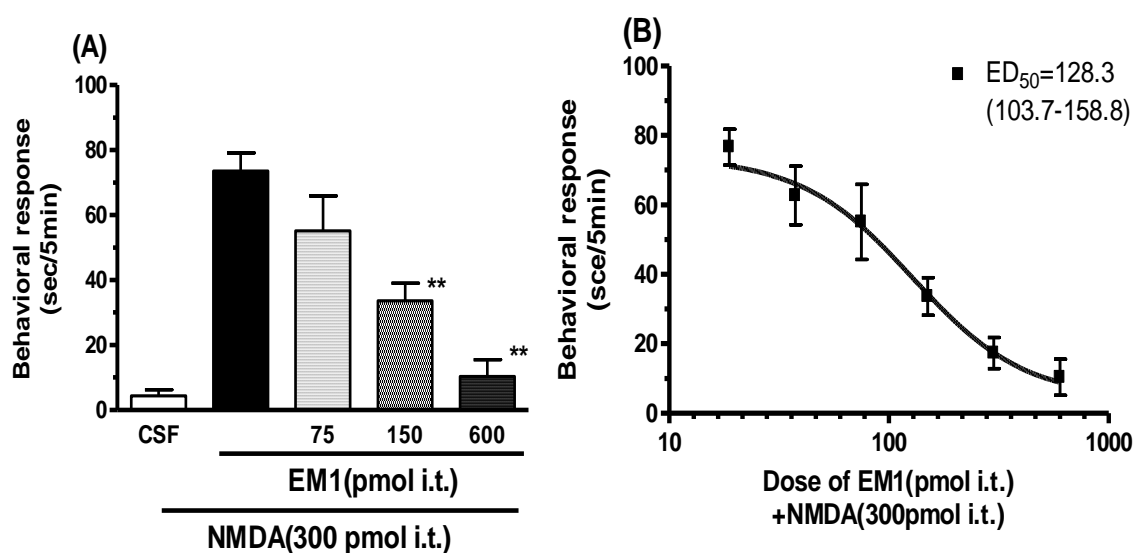


Fig. 2 Effects of endomorphin-1(EM1) on the nociceptive behaviors induced by NMDA in mice. (A) Effect of EM1 on the nociception does-response curve of NMDA. (B) Groups of mice were co-administered i.t. various doses of EM1 (75-600 pmol) with NMDA(300pmol), and nociceptive behaviors induced by NMDA were observed for 5min. Each column represents the mean \pm S.E.M. for 10 mice.**, $P < 0.01$ vs. NMDA alone.

1-3 Endomorphin-1 の効果に対する各種受容体拮抗薬の効果

MNDA(300pmol i.t.)誘発性疼痛関連行動に対する Endomorphin-1 (600pmol i.t.) の抗侵害作用は、 μ 受容体拮抗薬である CTOP (20pmol i.t.) の同時併用投与により消失した。[D-Pro²]endomorphin-1(70-200fmol i.t.)の同時併用投与では、120fmol をピークとした bell-shape の用量反応性を示したが、[D-Pro²]endomorphin-2(50-200fmol)の同時併用投与では、endomorphin-1 の抗侵害作用には影響を及ぼさなかった (Fig. 3)。[D-Pro²]endomorphin-1 の 50%抑制用量 (ID₅₀) ならびにその 95%信頼限界は、95.66fmol(82.75-110.6fmol)であった。

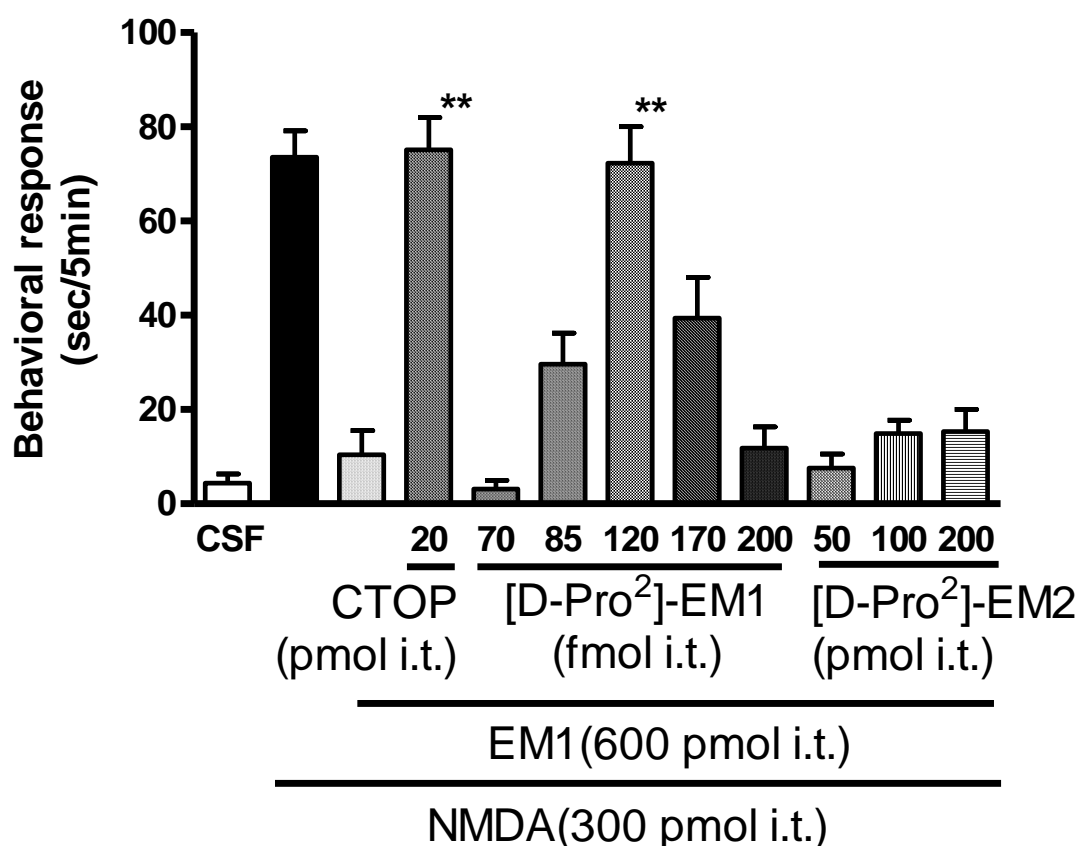


Fig. 3 Effects of μ opioid receptor antagonists on the antinociception induced by endomorphin-1(EM1) against NMDA-induced nociceptive behaviors in mice. Groups of mice were administered i.t. concomitant solution of NMDA (300pmol) and EM1 (A: 600pmol) in combination with μ opioid receptor antagonists, CTOP (20pmol), [D-Pro²] endomorphin-1 ([D-Pro²]-EM1: 70-200fmol) or [D-Pro²] endomorphin-2 ([D-Pro²]-EM2: 50-200pmol), and the nociceptive behaviors induced by NMDA were observed for 5 min. Each column represents the mean \pm S.E.M. for 10 mice. **,P<0.01 vs. groups administered EM1 with NMDA.

1-4 NMDA 誘発性疼痛関連行動に対する Endomorphin-2 の効果

NMDA 300pmol の i.t.投与により、約 80 秒の疼痛関連行動が発現した。この NMDA 誘発性疼痛関連行動は、endomorphin-2 (37.5-300pmol) の i.t.同時併用投与により、用量依存的かつ有意に抑制され(Fig. 4A)、endomorphin-2 の 50%有効用量 (ED_{50}) ならびに 95%信頼限界は、96.41pmol (67.89-136.9)であった(Fig. 4B)。

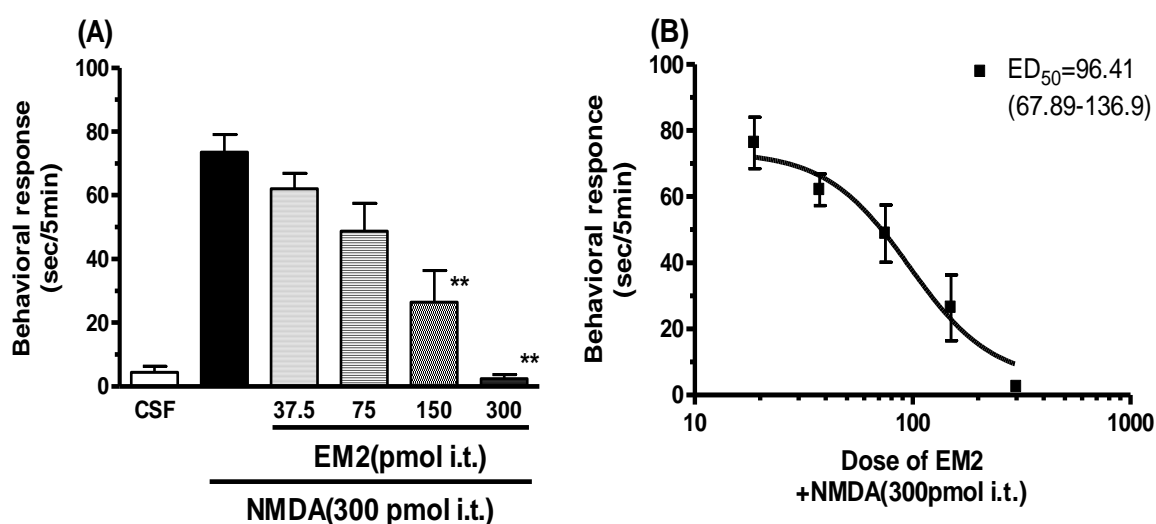


Fig. 4 Effects of endomorphin-2 (EM2) on the nociceptive behaviors induced by NMDA in mice.(A) Effect of EM1 on the nociception does-response curve of NMDA. (B) Groups of mice were co-administered i.t. various doses of EM2 (37.5-300 pmol) with NMDA(300pmol), and nociceptive behaviors induced by NMDA were observed for 5min. Each column represents the mean \pm S.E.M. for 10 mice. **,P<0.01 vs. NMDA alone.

1-5 Endomorphin-2 の効果に対する各種受容体拮抗薬の効果

NMDA(300pmol i.t.)誘発性疼痛関連行動に対する Endomorphin-2 (300pmol i.t.) の抗侵害作用は、 μ 受容体拮抗薬である CTOP (20pmol i.t.) の同時併用投与により消失した。[D-Pro²]endomorphin-1(70-170fmol i.t.)の同時併用投与では endomorphin-2 の抗侵害作用に何ら影響を与えなかったが、[D-Pro²]endomorphin-2 (50-200pmol i.t.) の同時併用投与では用量依存的に反応を示した(Fig. 5)。[D-Pro²]endomorphin-2 の 50%抑制曲線 (ID₅₀) その 95% 信頼限度は、86.89pmol(74.24-101.7)であった。

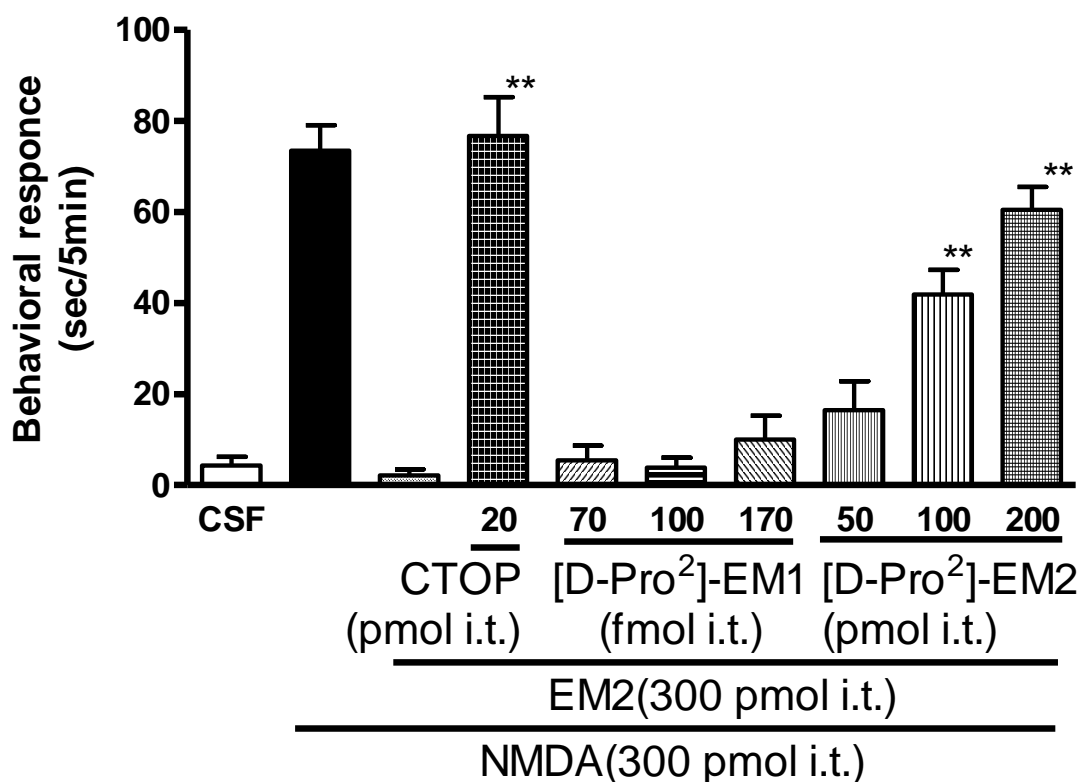


Fig. 5 Effects of μ opioid receptor antagonists on the antinociception induced by endomorphin-2 against NMDA-induced nociceptive behaviors in mice. Groups of mice were administered i.t. concomitant solution of NMDA (300pmol) and EM2 (300pmol) in combination with μ opioid receptor antagonists, CTOP (20pmol), [D-Pro²] endomorphin-1 ([D-Pro²]-EM1 70-170fmol) or [D-Pro²] endomorphin-2 ([D-Pro²]-EM2 50-200pmol), and the nociceptive behaviors induced by NMDA were observed for 5 min. Each column represents the mean \pm S.E.M. for 10 mice. **,P<0.01 vs. groups administered EM2 with NMDA.

2 Substance P 誘発性疼痛関連行動に対する Endomorphins の抗侵害作用発現機序の検討

2-1 Substance P 誘発性疼痛関連行動

Substance P (50-100pmol) を i.t. 投与し、疼痛関連行動の発現持続時間を測定した。Substance P の i.t. 投与により、用量依存的な疼痛関連行動の発現が確認され、100pmol では、投与後 5 分間に約 60 秒といった強力な疼痛関連行動の発現が認められた (Fig.6A)。また、Substance P 誘発性疼痛関連行動は投与直後より発現し、0-5 分をピークとし、その後速やかに消失した (Fig.6B)。

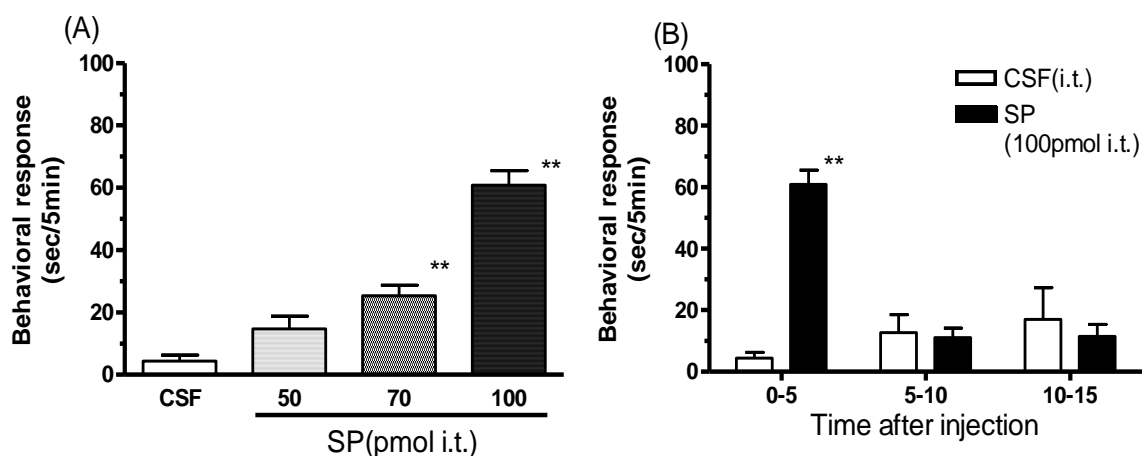


Fig. 6 The nociceptive behavioral responses induced by Substance P (SP) given i.t. in mice. (A) Groups of mice were treated i.t. with various doses (50-100pmol) of SP, and the duration of nociceptive behaviors induced by SP was measured for 5min. (B) Groups of mice were treated i.t. with SP(100pmol), and the duration of nociceptive behaviors was measured for 15min in 5min interval. Each column represents the mean \pm S.E.M. for 10 mice. **, $P < 0.01$ vs. CSF-treated control group

2-2 Substance P 誘発性疼痛関連行動に対する Endomorphin-1 の効果

Substance P 100pmol の i.t.投与により、約 60 秒の疼痛関連行動が発現した。この Substance P 誘発性疼痛関連行動は、endomorphin-1 (300pmol) の i.t.同時併用投与により用量依存的かつ有意に抑制された(Fig. 7)。Endomorphin-1 の 50% 有効用量 (ED₅₀) ならびにその 95%信頼限界は、141.1pmol (75.36-264.2) であった。

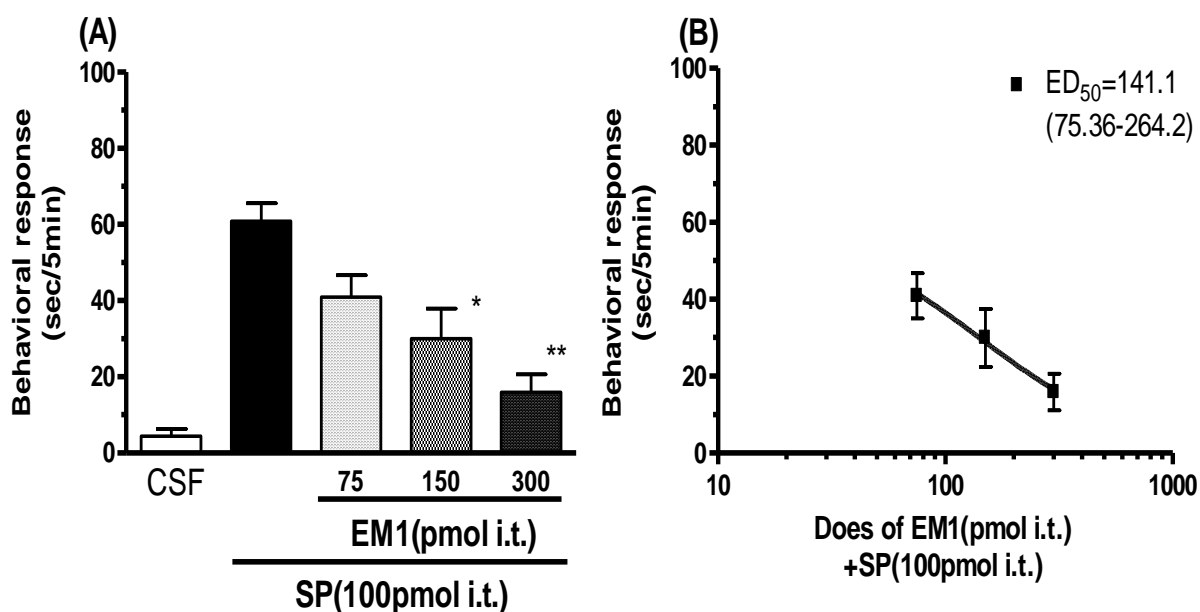


Fig. 7 Effects of endomorphin-1(EM1) on the nociceptive behaviors induced by substance P(SP) in mice. (A) Effect of EM1 on the nociception does response curve of SP. (B) Groups of mice were co-administered i.t. various doses of EM1 (75-300 pmol) with SP(100pmol), and nociceptive behaviors induced by SP were observed for 5min. Each column represents the mean \pm S.E.M. for 10 mice. **,P<0.01 vs. SP alone.

2-3 Endomorphin-1 の効果に対する各種受容体拮抗薬の効果

Substance P (100pmol i.t.)誘発性疼痛関連行動に対する Endomorphin-1 (300pmol i.t.) の抗侵害作用は、 μ 受容体拮抗薬である CTOP (20pmol i.t.) の同時併用投与により消失した(Fig. 8)。[D-Pro²]endomorphin-1(70-170fmol i.t.) 及び[D-Pro²]endomorphin-2(50-200fmol)の同時併用投与では何ら拮抗作用は認められなかった。

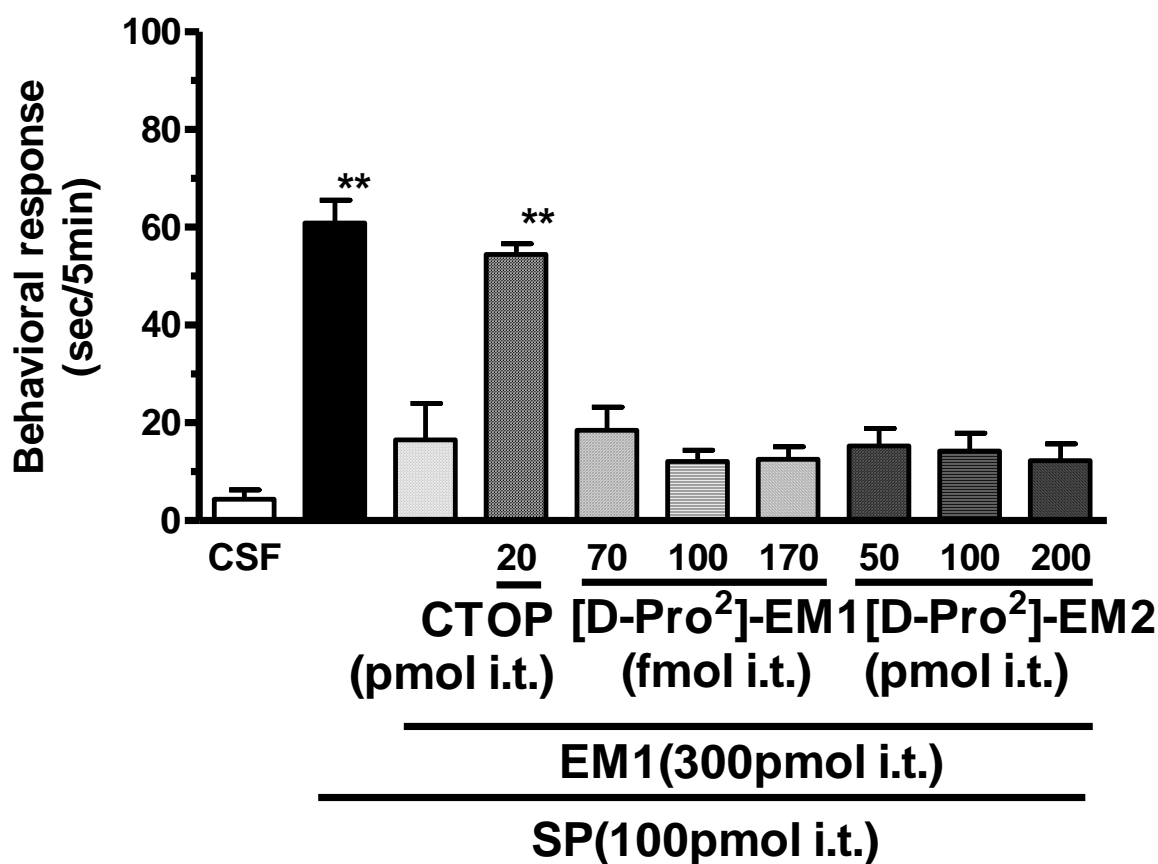


Fig. 8 Effects of μ opioid receptor antagonists on the antinociception induced by endomorphin-1 (EM1) against substance P (SP)-induced nociceptive behaviors in mice. Groups of mice were administered i.t. concomitant solution of SP (100pmol) and EM1 (300pmol) in combination with μ opioid receptor antagonists, CTOP (20pmol), [D-Pro²] endomorphin-1 ([D-Pro²]-EM1: 70-170fmol) or [D-Pro²] endomorphin-2 ([D-Pro²]-EM2: 50-200pmol), and the nociceptive behaviors induced by SP were observed for 5 min. Each column represents the mean \pm S.E.M. for 10 mice. **,P<0.01 vs. groups administered EMs with SP.

しかしながら、endomorphin-1 (300pmol) の抗侵害作用は、新規 μ_2 受容体拮抗薬である[D-Pro²] Tyr-W-MIF-1 (350-1400pmol) により用量依存的にほぼ完全に抑制された(Fig.9)。[D-Pro²] Tyr-W-MIF-1 の 50%抑制量 (ID₅₀) ならびにその 95% 信頼限界は、509.9pmol(441.0-589.7)であった。

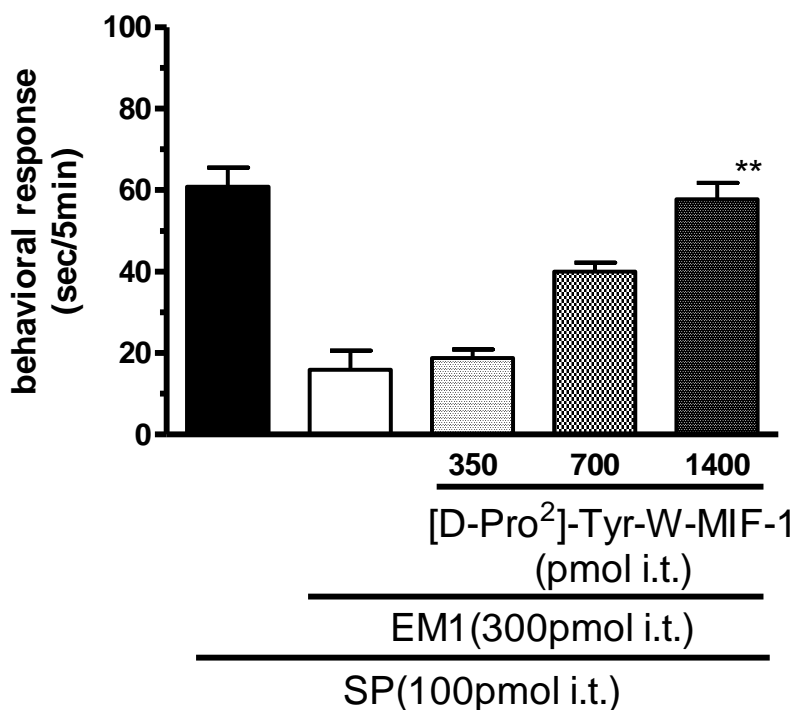


Fig. 9 Effect of [D-Pro²]-Tyr-W-MIF-1 on the antinociception induced by endomorphin-1(EM1) against substance P(SP)-induced nociceptive behaviors in mice. Groups of mice were administered i.t. concomitant solution of SP (100pmol) and EM1 (300pmol) in combination with [D-Pro²]-Tyr-W-MIF-1 (350-1400pmol), and the nociceptive behaviors induced by SP were measured for 5min. Each column represents the mean \pm S.E.M. for 10 mice. **,P<0.01 vs. groups administered EMs with SP.

2-4 Substance P 誘発性疼痛関連行動に対する Endomorphin-2 の効果

Substance P 100pmol の i.t.投与により、約 60 秒の疼痛関連行動が発現した。この Substance P 誘発性疼痛関連行動は、endomorphin-2 (pmol) の i.t.同時併用投与により用量依存的かつ有意に抑制された(Fig. 10)。Endomorphin-2 の 50%有効用量 (ED₅₀) ならびにその 95%信頼限界は、108.2pmol (98.66-118.7) であった。

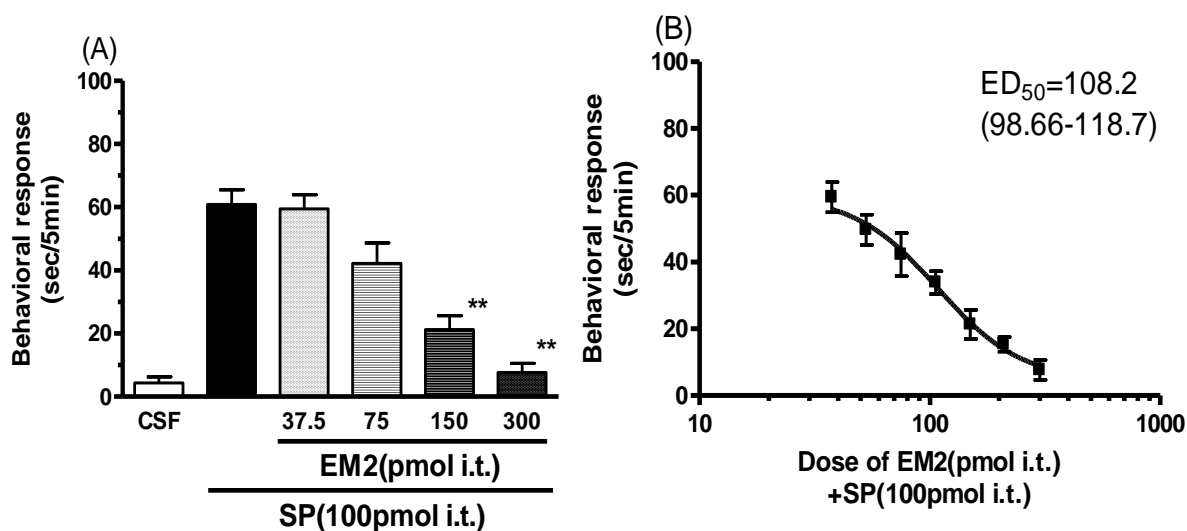


Fig. 10 Effects of endomorphin-2(EM2) on the nociceptive behaviors induced by substance P(SP) in mice. (A) Effect of EM2 on the nociception dose-response curve of SP(B). Groups of mice were co-administered i.t. various doses of EM2 (37.5-300 pmol) with SP(100pmol), and nociceptive behaviors induced by SP were observed for 5min. Each column represents the mean \pm S.E.M. for 10 mice. **,P<0.01 vs. NMDA alone.

2-5 Endomorphine-2 の効果に対する各種受容体拮抗薬の効果

Substance P (100pmol i.t.)誘発性疼痛関連行動に対する Endomorphin-2 (300pmol i.t.) の抗侵害作用は、 μ 受容体拮抗薬である CTOP (20pmol i.t.) の同時併用投与により消失した。[D-Pro²]endomorphin-1(fmol i.t.)の同時併用投与では endomorphine-2 の抗侵害作用に何ら影響を与えなかったが、[D-Pro²]endomorphin-2(fmol i.t.) 同時併用投与では用量依存的に反応を示した (Fig. 11)。[D-Pro²]endomorphine-2(fmol i.t.) の 50% 抑制量 (ID₅₀) は 119.9pmol(103.6-138.8)であった。

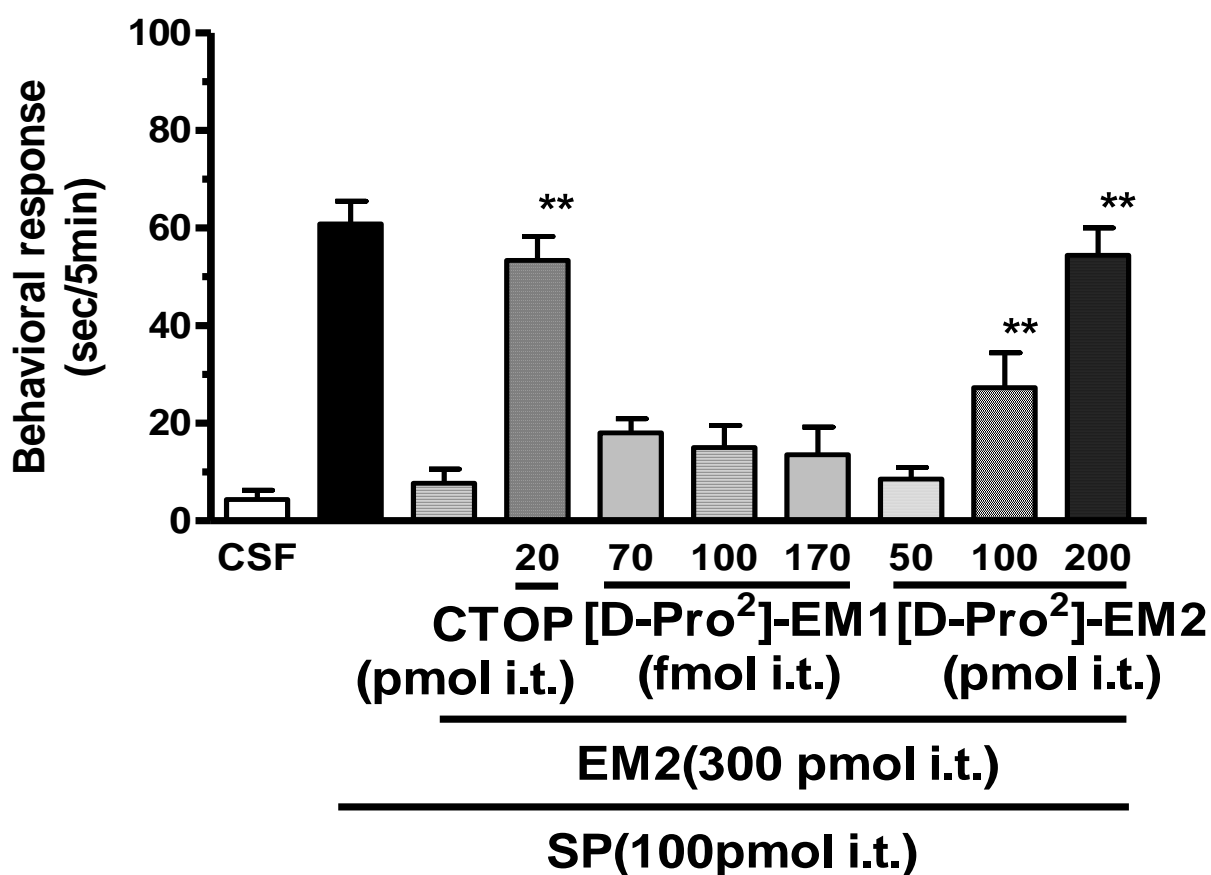


Fig. 11 Effects of μ opioid receptor antagonists on the antinociception induced by endomorphin-2 (EM2) against substance P (SP)-induced nociceptive behaviors in mice. Groups of mice were administered i.t. concomitant solution of SP (100pmol) and EM2 (300pmol) in combination with μ opioid receptor antagonists, CTOP (20pmol), [D-Pro²] endomorphin-1 ([D-Pro²]-EM1: 70-170fmol) or [D-Pro²] endomorphin-2 ([D-Pro²]-EM2: 50-200pmol), and the nociceptive behaviors induced by SP were observed for 5 min. Each column represents the mean \pm S.E.M. for 10 mice. **, P<0.01 vs. groups administered EMs with SP

一方 Substance P (100pmol) 誘発性疼痛関連行動に対する endomorphin-2 (300pmol) の抗侵害作用は、新規 μ_2 受容体拮抗薬である [D-Pro²] Tyr-W-MIF-1 (350-1400pmol) の同時併用投与では何ら影響を及ぼさなかった(Fig. 12)。

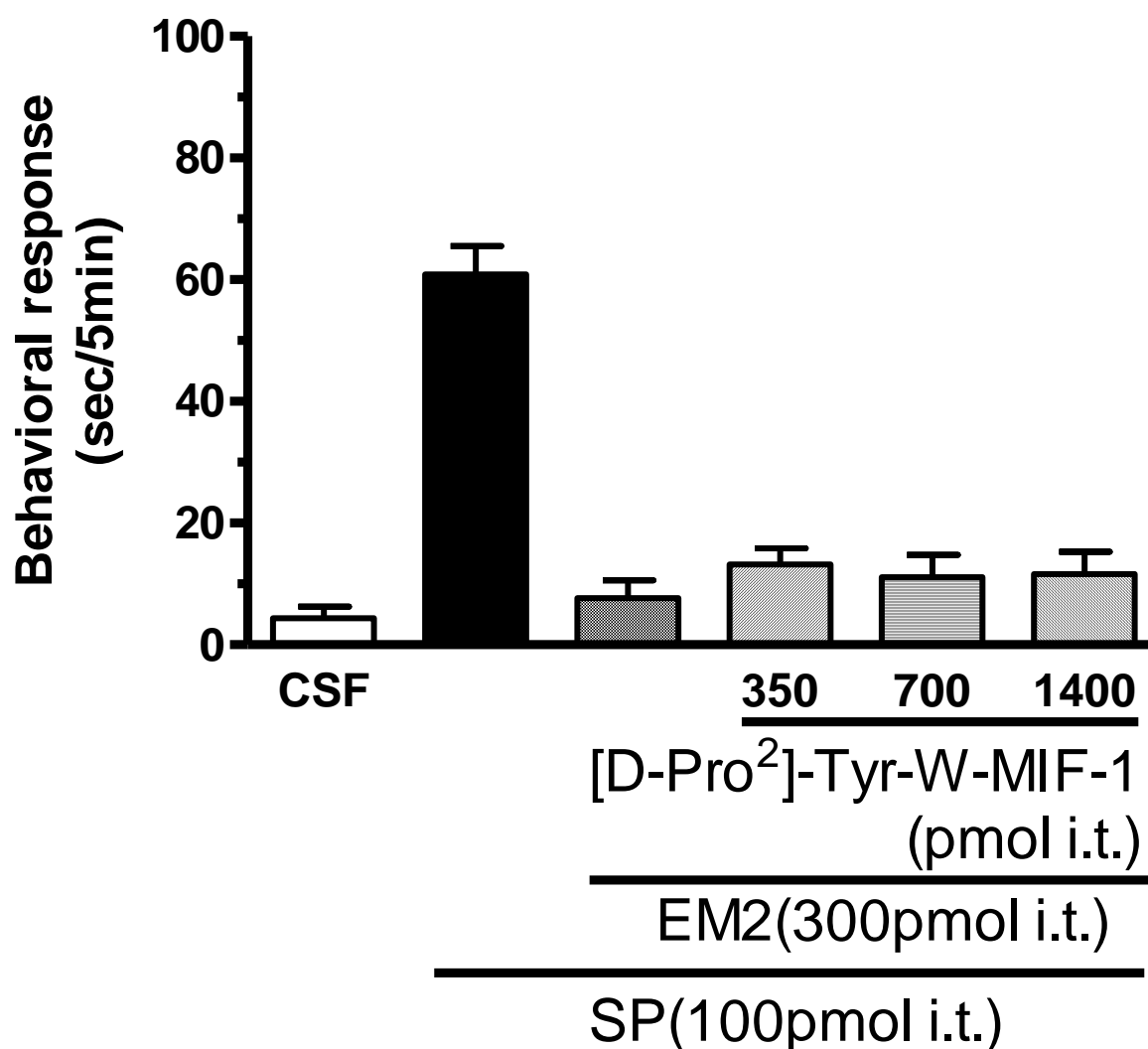


Fig. 12 Effect of [D-Pro²]-Tyr-W-MIF-1 on the antinociception induced by endomorphin-2(EM2) against substance P(SP)-induced nociceptive behaviors in mice. Groups of mice were administered i.t. concomitant solution of SP (100pmol) and EM2(300pmol) in combination with [D-Pro²]-Tyr-W-MIF-1 (350-1400pmol), and the nociceptive behaviors induced by SP were measured for 5min. Each column represents the mean \pm S.E.M. for 10 mice. **,P<0.01 vs. groups administered EMs with SP.

3 Capsaicin 誘発性疼痛関連行動に対する Endomorphins の抗侵害作用発現機序の検討

3-1 Capsaicin 誘発性疼痛関連行動

Capsaicin (50-200pmol) を i.t.投与し、疼痛関連行動の発現持続時間を測定した。Capsaicin の i.t.投与により、用量依存的な疼痛関連行動の発現が確認され、200pmol では、投与後 10 分間に約 100 秒といった強力な疼痛関連行動の発現が認められた (Fig. 13)。また、capsaicin 誘発性疼痛関連行動は投与直後より発現し、0-5 分をピークとし 10 分間持続した後急速に消失した。

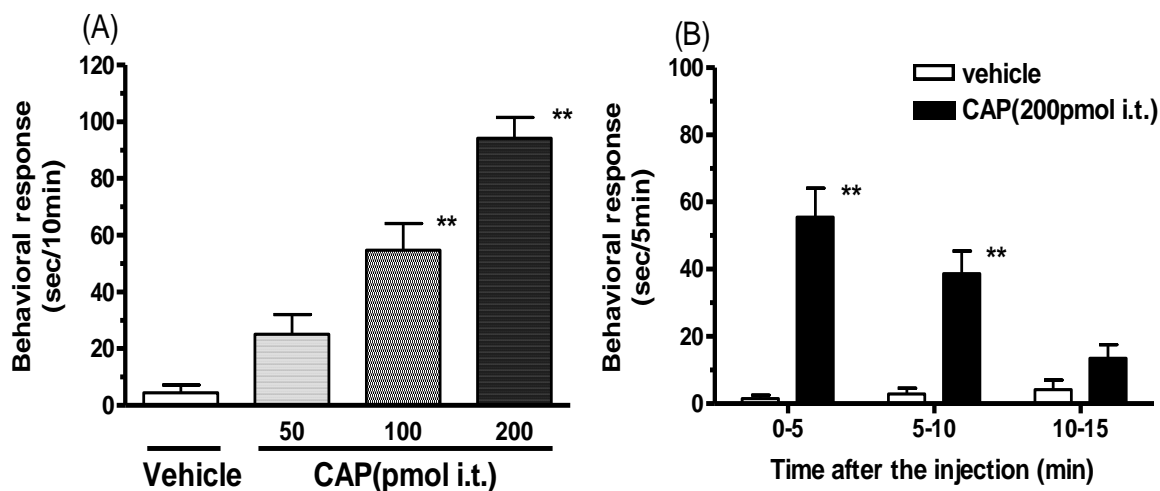


Fig. 13 The nociceptive behavioral responses induced by capsaicin (CAP) given i.t. in mice. (A) Groups of mice were treated i.t. with various doses (50-200pmol) of CAP and the duration of nociceptive behaviors induced by CAP was measured for 5 min. (B) Groups of mice were treated i.t. with CAP (200pmol), and the duration of nociceptive behaviors was measured for 15min in 5min interval. Each column represents the mean \pm S.E.M. for 10 mice. **, $P < 0.01$ vs. CSF-treated control group.

3-2 Capsaicin 誘発性疼痛関連行動に対する Endomorphin-1 の効果

Capsaicin 200pmol の i.t.投与により、約 100 秒の疼痛関連行動が発現した。この capsaicin 誘発性疼痛関連行動は、endomorphin-1 (9-35pmol) の i.t.同時併用投与により用量依存的かつ有意に抑制された (Fig. 14A)。Endomorphin-1 の 50%有効用量 (ED_{50}) ならびにその 95%信頼限界は、17.1pmol (15.82-18.49) であった (Fig. 14B)。

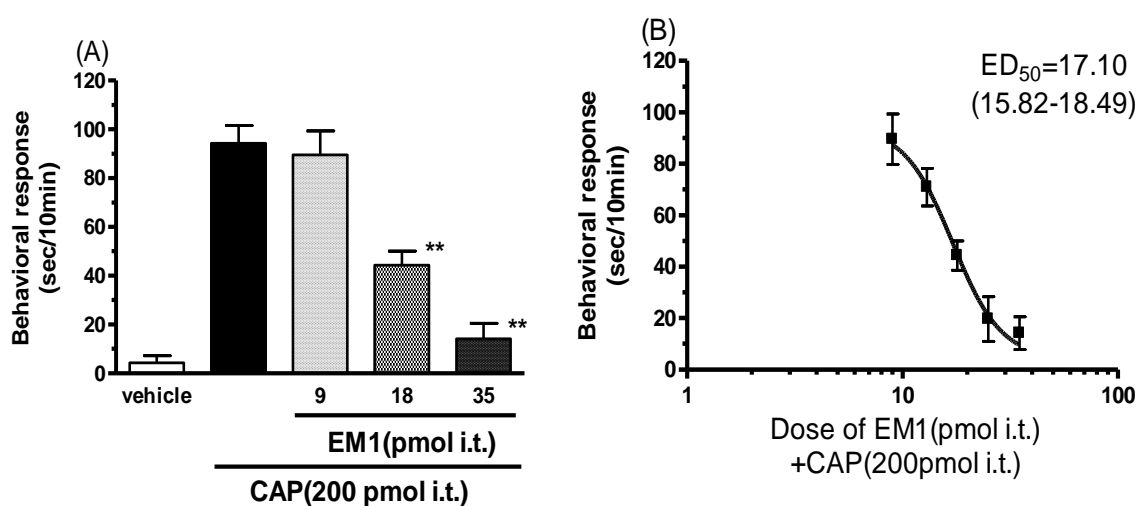


Fig. 14 Effects of endomorphin-1(EM1) on the nociceptive behaviors induced by capsaicin(CAP) in mice.(A) Effect of EM1 on the nociception dose-response curve of CAP.(B) Groups of mice were co-administered i.t. various doses of EM1 (9-35 pmol) with CAP(200pmol), and nociceptive behaviors induced by CAP were observed for 10min. Each column represents the mean \pm S.E.M. for 10 mice. **,P<0.01 vs. CAP alone.

3-3 Endomorphin-1 の効果に対する各種受容体拮抗薬の効果

Capsaicin(200pmol i.t.) 誘発性疼痛関連行動に対する Endomorphin-1 (35pmol i.t.) の抗侵害作用は、 μ 受容体拮抗薬である CTOP (20pmol i.t.) の同時併用投与により消失した。[D-Pro²]endomorphin-1(70-140fmol i.t.)の同時併用投与では、100fmol をピークとした bell-shape の用量反応性を示したが、[D-Pro²]endomorphin-2(3-50fmol)の同時併用投与では、endomorphin-1 の抗侵害作用には影響を及ぼさなかった (Fig. 15)。[D-Pro²]endomorphin-1 の 50%抑制用量 (ID₅₀) ならびにその 95%信頼限界は、87.06fmol(41.16-184.1)であった。

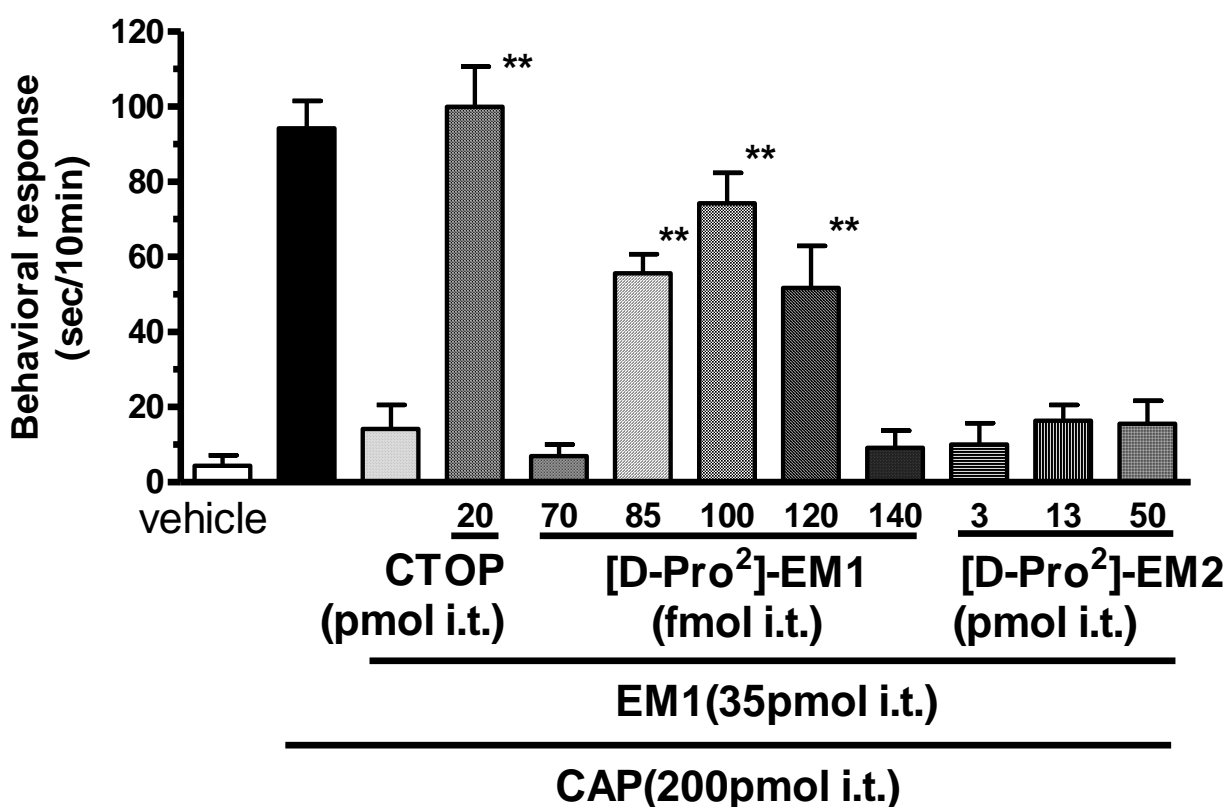


Fig. 15 Effects of μ opioid receptor antagonists on the antinociception induced by endomorphin-1(EM1) against capsaicin (CAP)-induced nociceptive behaviors in mice. Groups of mice were administered i.t. concomitant solution of CAP (200pmol) and EM1 (35pmol) in combination with μ opioid receptor antagonists, CTOP (20pmol), [D-Pro²] endomorphin-1 ([D-Pro²]-EM1: 70-140fmol) or [D-Pro²] endomorphin-2 ([D-Pro²]-EM2: 3-50pmol), and the nociceptive behaviors induced by CAP were observed for 10 min. Each column represents the mean \pm S.E.M. for 10 mice. **,P<0.01 vs. groups administered EM1 with CAP

3-4 Capsaicin 誘発性疼痛関連行動に対する Endomorphin-2 の効果

Capsaicin 200pmol の i.t.投与により、約 100 秒の疼痛関連行動が発現した。この capsaicin 誘発性疼痛関連行動は、endomorphin-2 (18-70pmol) の i.t.同時併用投与により用量依存的かつ有意に抑制された (Fig. 16A)。Endomorphin-2 の 50% 有効用量 (ED_{50}) ならびにその 95%信頼限界は、32.95pmol (28.53-38.06) であった (Fig. 16B)。

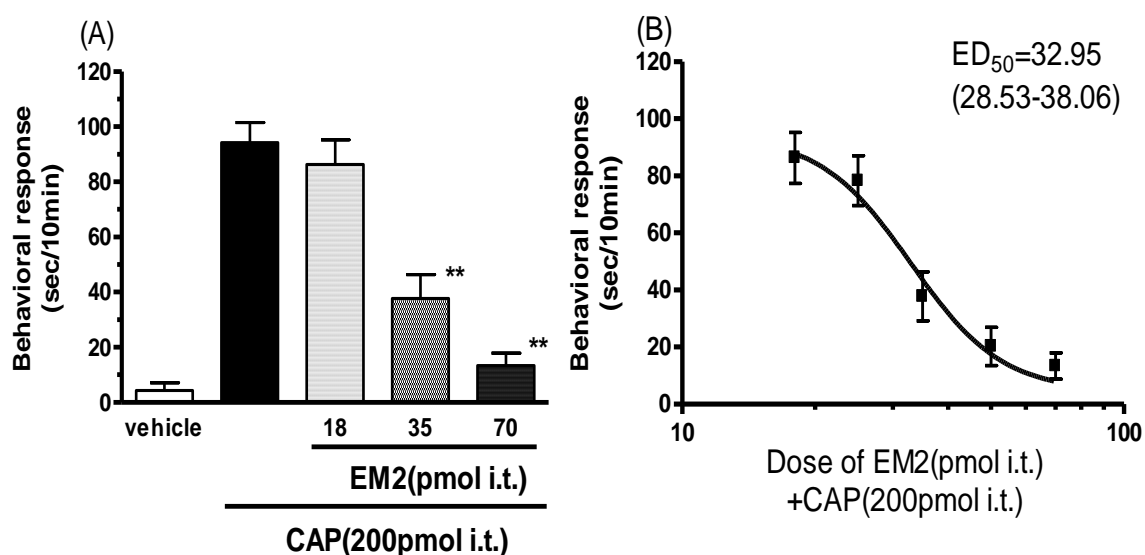


Fig. 16 Effects of endomorphin-2(EM2) on the nociceptive behaviors induced by capsaicin (CAP) in mice.(A) Effect of EM2 on the nociception dose-response curve of CAP.(B) Groups of mice were co-administered i.t. various doses of EM2 (18-70 pmol) with CAP(200pmol), and nociceptive behaviors induced by CAP were observed for 10min. Each column represents the mean \pm S.E.M. for 10 mice. **,P<0.01 vs. CAP alone.

3-5 Endomorphin-2 の効果に対する各種受容体拮抗薬の効果

Capsaicin(200pmol i.t.)誘発性疼痛関連行動に対する Endomorphin-2 (70pmol i.t.) の抗侵害作用は、 μ 受容体拮抗薬である CTOP (20pmol i.t.) の同時併用投与により消失した。[D-Pro²]endomorphin-1(58-170fmol i.t.)の同時併用投与では endomorphin-2 の抗侵害作用に何ら影響を与えなかったが、[D-Pro²]endomorphin-2(3-50fmol)の同時併用投与では用量依存的に反応を示した (Fig. 17)。[D-Pro²]endomorphin-2 の 50%抑制用量 (ID₅₀) ならびにその 95%信頼限界は、11.83fmol(8.847-15.82)であった。

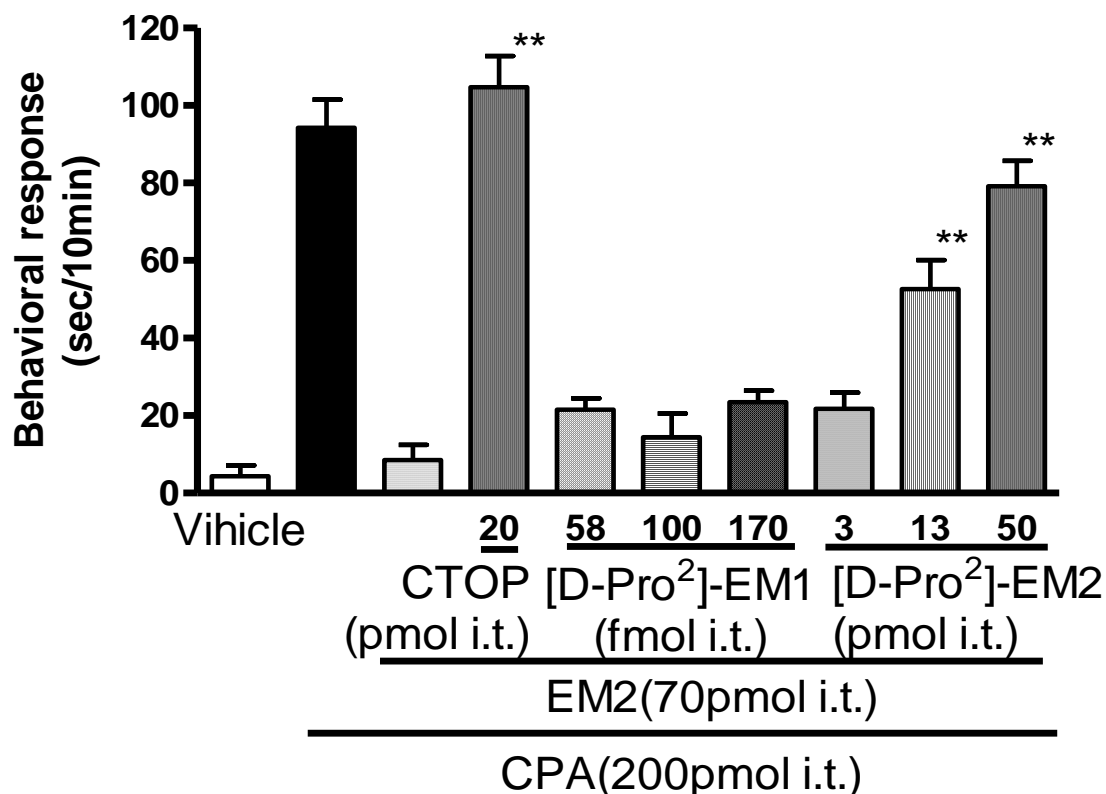
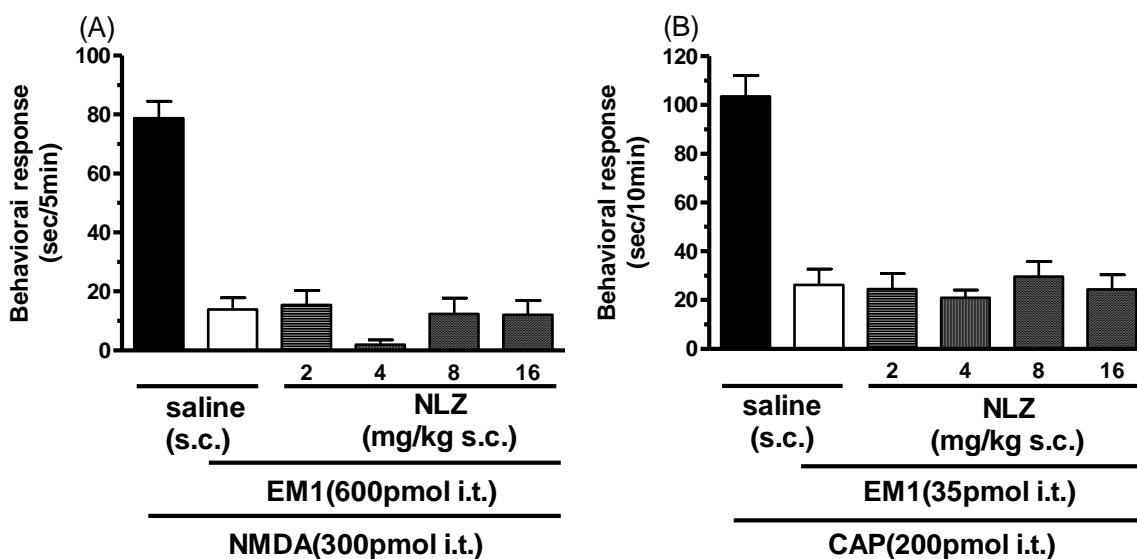


Fig. 17 Effects of μ opioid receptor antagonists on the antinociception induced by endomorphin-2(EM2) against capsaicin (CAP)-induced nociceptive behaviors in mice. Groups of mice were administered i.t. concomitant solution of CAP (200pmol) and EM2 (70pmol) in combination with μ opioid receptor antagonists, CTOP (20pmol), [D-Pro²] endomorphin-1 (D-Pro²-EM1: 58-170fmol) or [D-Pro²] endomorphin-2 (D-Pro²-EM2: 3-50pmol), and the nociceptive behaviors induced by CAP were observed for 10 min. Each column represents the mean \pm S.E.M. for 10 mice. **,P<0.01 vs. groups administered EM2 with CAP

4 Naloxonazine 前処置群における Endomorphins の抗侵害作用の発現メカニズムの検討

4-1 Endomorphins の抗侵害作用に対する naloxonazine の効果

NMDA 及び capsaicin 誘発性疼痛関連行動における、endomorphins の抗侵害作用に対する μ_1 受容体拮抗薬である naloxonazine の影響について検討した。Naloxonazine の 24 時間前処置 (2-16mg/kg s.c.) により endomorphin-1 誘発性抗侵害作用は抑制されず、NMDA および capsaicin 誘発性疼痛関連行動に何ら影響を与えなかった。(Fig 18A,B)しかし naloxonazine の 24 時間前処置 (2-16mg/kg s.c.) により endomorphin-2 誘発性抗侵害作用は用量依存的に抑制され、NMDA および capsaicin 誘発性疼痛関連行動は用量依存的に回復した。(Fig18C,D)尚 naloxonazine の 50%抑制量 (ID_{50}) 及び 95%信用限界は、NMDA (300pmol i.t.) に対する endomorphin-2(300pmol i.t.) では 6.147mg/kg(4.154-9.097) 、 capsaicin(200pmol i.t.) に対する endomorphin-2(70pmol i.t.)では 5.844mg/kg(4.223-8.088)であった。



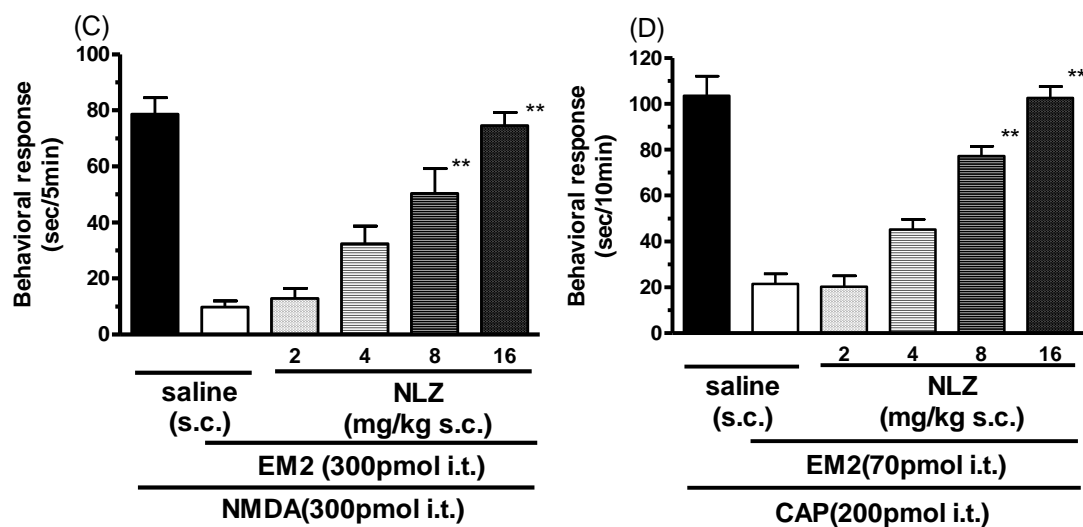
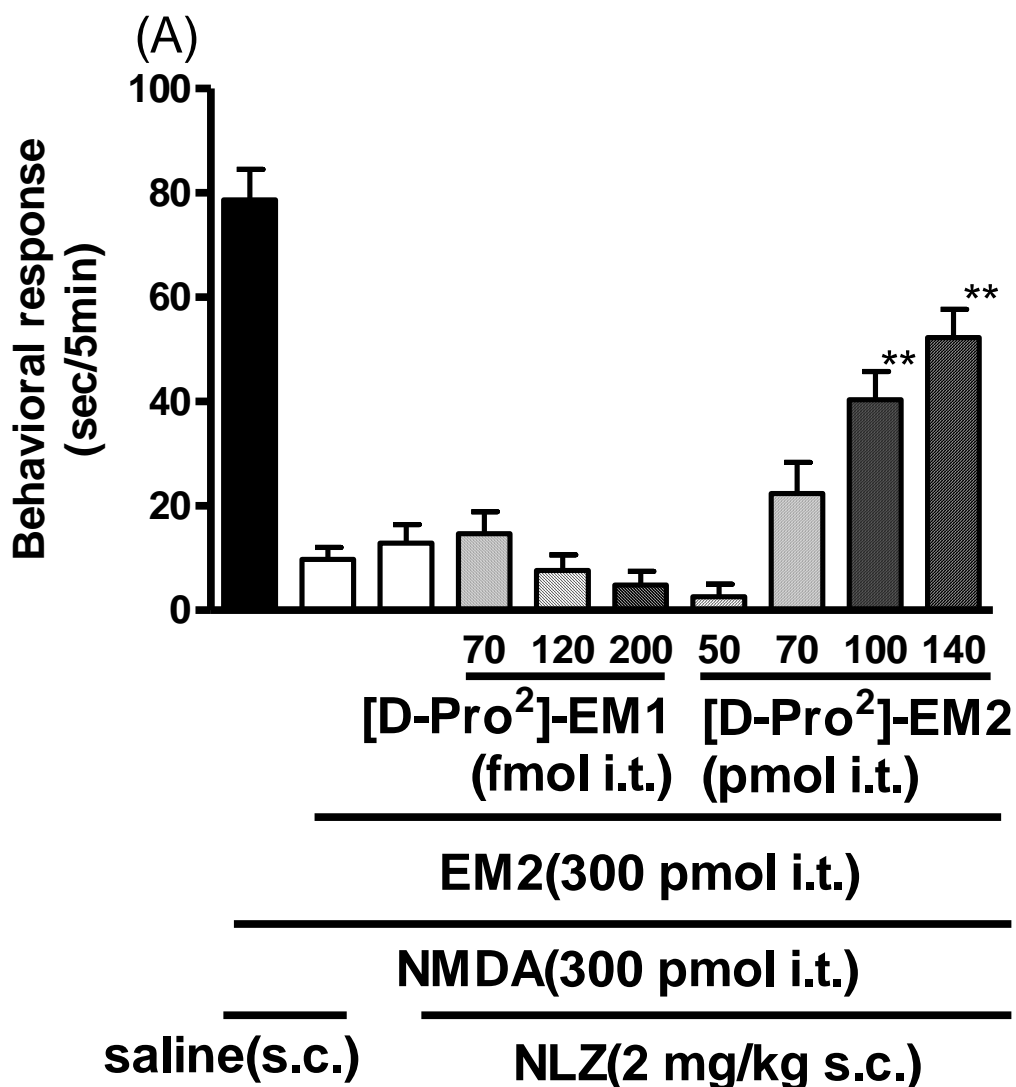


Fig.18 Effect of naloxonazine (NLZ) on the antinociceptive effect induced by endomorphin-1(EM1) against NMDA or capsaicin (CAP)-induced nociceptive behaviors in mice.(A,B) Effect of NLZ on the antinociceptive effect induced by endomorphin-2 (EM2) against NMDA or capsaicin (CAP)-induced nociceptive behaviors in mice.(C,D) Groups of mice, pretreated s.c. with various doses of NLZ (2-16mg/kg 24hr prior), were co-administered i.t. EM1 (600pmol or 35pmol) or EM2 (300pmol or 70pmol) with NMDA (300pmol) or CAP (200pmol), and nociceptive behaviors induced by NMDA or CAP were observed for 5min or 10min respectively. Each column represents the mean \pm S.E.M. for 10 mice **,P<0.01 vs . groups administered EM2 with NMDA or CAP.

4-2 Naloxonazine (2mg/kg)前処置下における endomorphin-2 の抗侵害作用に対する[D-Pro²]endomorphins の拮抗作用の検討

Endomorphin-2 の抗侵害作用に何ら拮抗作用を示さない naloxonazine(2mg/kg s.c.)を前処置した状態での endomorphin-2 の抗侵害作用の発現のメカニズムを [D-Pro²]endomorphins を用いて検討した。Naloxonazine(2mg/kg)を前処置した状態では、NMDA 誘発性疼痛関連行動に対する endomorphin-2 の抗侵害作用は[D-Pro²]endomorphin-2 で抑制され、[D-Pro²] endomorphin- 1 では抑制されなかった。(Fig. 19A) しかし naloxonazine (2mg/kg)を前処置した状態では、capsaicin 誘発性疼痛関連行動に対する endomorphin-2 の抗侵害作用は[D-Pro²]endomorphin-2 では抑制されず、[D-Pro²]endomorphin-1 で抑制された。(Fig. 19B) 尚この拮抗薬が変わる現象は同条件下での endomorphin-1 の抗侵害作用では観察できなかった。(data not shown)



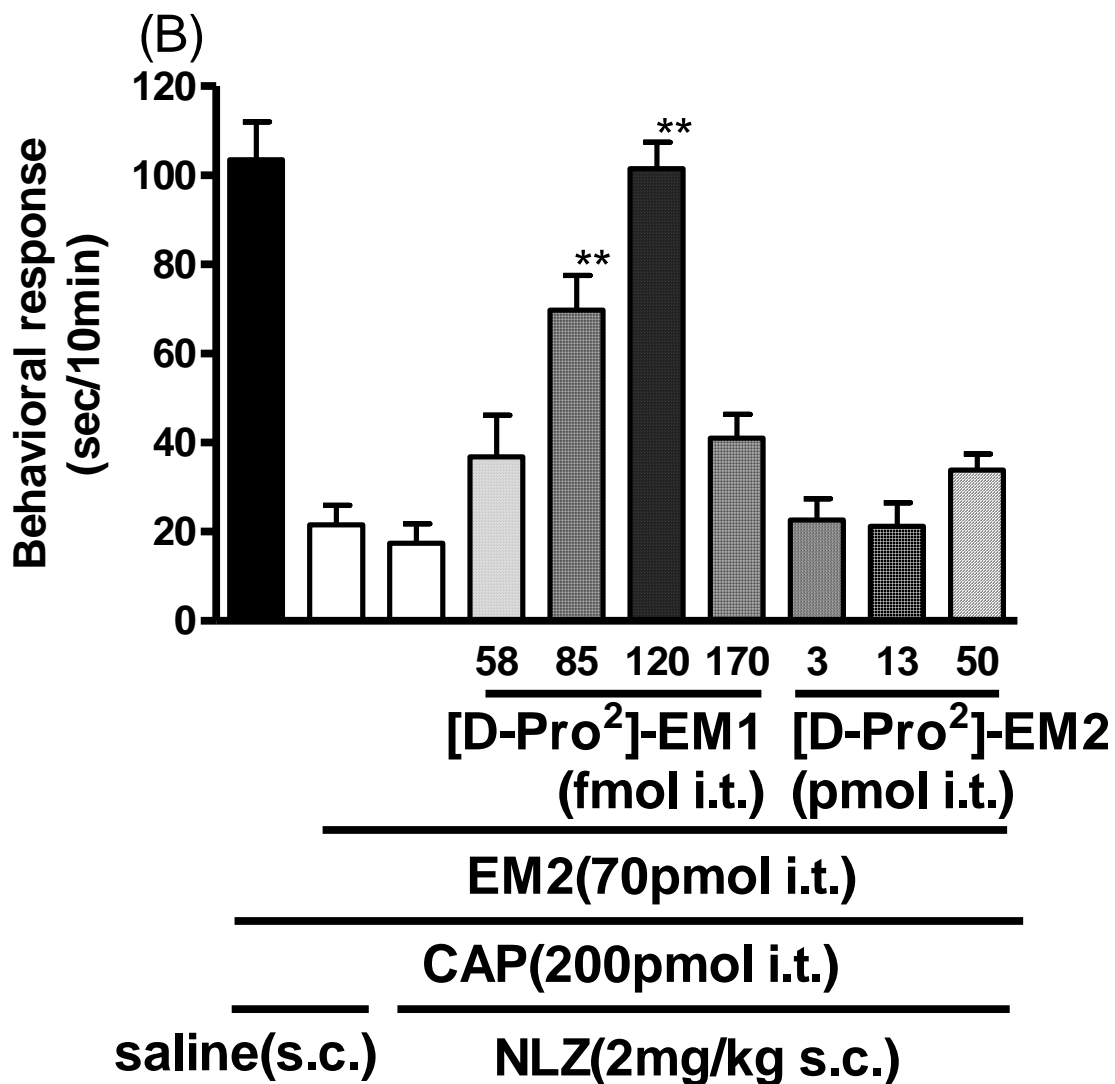


Fig. 19 Effects of [D-Pro²]endomorphins ([D-Pro²]-EMs) on the antinociception induced by endomorphin-2 (EM2) against NMDA(A) -and capsaicin (CAP)(B)-induced nociceptive behaviors in mice pretreated s.c. with naloxonazine (NLZ). Groups of mice, pretreated s.c. with NLZ (2mg/kg) 24hr prior, were co-administered i.t. concomitant solution of NMDA (300pmol) or CAP (200pmol) and EM2 (300pmol or 70pmol) in combination with various doses of [D-Pro²]-EM1 (58-200fmol) or [D-Pro²]-EM2 (3-140pmol), and the nociceptive behaviors induced by NMDA or CAP were observed for 5 min or 10min, respectively. Each column represents the mean \pm S.E.M. for 10 mice. **,P<0.01 vs. groups administered EMs with NMDA or CAP.

考察

Labuz らは endomorphin (EM)1 と morphine の交差耐性を生じるが、EM2 と morphine では交差耐性を生じないと報告した (26)。Kondo らは脊髄における低用量 morphine の i.t.投与では脊髄内の NK1 受容体のインターナリゼーションの抑制は生じないが、高用量の morphine の i.t.投与では NK1 受容体のインターナリゼーションの抑制が生じると報告した (23)。これらの報告より、低用量 morphine は二次知覚神経上に存在する μ_2 受容体を介し抗侵害作用を発現し、高用量の morphine はその μ_2 受容体選択性が消失し一次知覚神経上の μ_1 受容体を介し抗侵害作用が発現していると考えられる。本研究では一次知覚神経-二次知覚神経間において、一次知覚神経上では μ_1 受容体、二次知覚神経では μ_2 受容体が抗侵害作用に大きく寄与していると仮説をたて μ 受容体の分布と薬理学的特徴について検討を行った。

NMDA の i.t.投与により用量依存的な疼痛関連行動が観察された。この NMDA 誘発性疼痛関連行動は EM1 及び EM2 の併用により用量依存的に抑制され、EMs の抗侵害作用は μ 受容体拮抗薬である CTOP により抑制された事より、 μ 受容体を介し発現していると考えられる。次に [D-Pro²]EMs を用いて抗侵害作用発現に関する μ 受容体サブタイプを検討した。NMDA 誘発性疼痛関連行動に対する EM1 の抗侵害作用は [D-Pro²]EM1 により抑制され、EM2 の抗侵害作用は [D-Pro²]EM2 により抑制された。しかし EM1 の抗侵害作用は [D-Pro²]EM2、EM2 の抗侵害作用は [D-Pro²]EM1 では何等影響を受けなかった。EMs と [D-Pro²]EMs の拮抗関係は熱刺激において報告されており (59)、NMDA 誘発性の疼痛関連行動でも同様の結果が得られた。NMDA 受容体は一次知覚神経と二次知覚神経上に存在する事が報告されており (55,66,73)、一次知覚神経上の NMDA 受容体は glutamate や substance P(SP)の遊離に関与していると報告されている (29,35)。しかしこれ等報告は本研究よりも高用量の NMDA を投与した実験結果であり、本研究と近い用量の NMDA (400 pmol) を使用した報告では NMDA 誘発性疼痛には NK₁ 受容体の関与を否定しており (62)、Chen らも特殊な条件下を除外すれば一次知覚神経上の NMDA 受容体は glutamate や SP の遊離に関与しない可能性を指摘している (5)。前述の報告より本研究で使用した NMDA (300 pmol) 誘発性の疼痛関連行動は二次知覚神経上の NMDA 受容体に作用し生じると考えられ、EM1 は二次知覚神経上に存在する μ_2 受容体、EM2 は二次知覚神経上に存在する μ_1 受容体にそれぞれ作用し抗侵害作用を発現する事が考えられる。

SP の i.t.投与により用量依存的な疼痛関連行動が観察された。この SP 誘発性

疼痛関連行動は、EM1 及び EM2 の併用により用量依存的に抑制された。この EMs の抗侵害作用は μ 受容体拮抗薬である CTOP の併用により抑制された事より、 μ 受容体を介し発現していると考えられる。次に [D-Pro²]EMs を用いて抗侵害作用発現に関する μ 受容体サブタイプを検討した。SP 誘発性疼痛関連行動に対する EM2 の抗侵害作用は、[D-Pro²]EM2 により抑制されたが、[D-Pro²]EM1 ではなんら影響を受けなかった。SP 誘発性疼痛関連行動に対する EM1 の抗侵害作用は、[D-Pro²]EM2 や [D-Pro²]EM1 では何ら影響を受けなかった。しかし近年新たに μ_2 受容体拮抗薬と報告された (19) [D-Pro²] Tyr-W-MIF-1 を用いた検討では、EM1 の抗侵害作用は [D-Pro²] Tyr-W-MIF-1 により用量依存的に抑制された。一方 EM2 の抗侵害作用は [D-Pro²] Tyr-W-MIF-1 ではなんら影響を受けなかった。SP は二次知覚神経上に発現している NK₁ 受容体に直接作用し疼痛と伝達することより (4,8,31)、SP 誘発性疼痛関連行動に対する EM1 の抗侵害作用は二次知覚神経上の μ_2 受容体に、EM2 の抗侵害作用は二次知覚神経上の μ_1 受容体に作用していると考えられるが、 μ_2 受容体に関しては NMDA 誘発性疼痛関連行動に対する EM1 の作用する [D-Pro²]EM1 感受性 μ_2 受容体とは薬理学的特性が異なり、[D-Pro²]EM1 非感受性 [D-Pro²]Tyr-W-MIF1 感受性 μ_2 受容体である事が明らかとなった。この μ_2 受容体の薬理学的特徴の差は、イオンチャンネル型である NMDA 受容体と、G 蛋白共役型受容体である NK₁ 受容体では疼痛伝導のメカニズムが異なっている事に起因しているのかもしれない。尚、SP 誘発性疼痛関連行動に対する EM2 の抗侵害作用が [D-Pro²] Tyr-W-MIF-1 の併用では拮抗されない事より、[D-Pro²] Tyr-W-MIF-1 は従来の報告通り μ_1 受容体には作用していない。

Capsaicin (CAP) の i.t. 投与により用量依存的な疼痛関連行動が観察された。この CAP 誘発性疼痛関連行動は EM1 及び EM2 の併用により用量依存的に消失した。EMs の抗侵害作用は μ 受容体拮抗薬である CTOP により抑制された事より、 μ 受容体を介し発現していると考えられる。次に [D-Pro²]EMs を用いて抗侵害作用発現に関する μ 受容体サブタイプを検討した。CAP 誘発性疼痛関連行動に対する EM1 の抗侵害作用は [D-Pro²]EM1 により抑制され、EM2 の抗侵害作用は [D-Pro²]EM2 により抑制された。しかし EM1 の抗侵害作用は [D-Pro²]EM2 および EM2 の抗侵害作用は [D-Pro²]EM1 では何等影響を受けなかった。CAP の疼痛関連行動は一次知覚神経終末に存在する TRPV1 受容体の活性による、glutamate や SP 等の神経伝達物質放出により生じる事が解明されている (27)。CAP 誘発性疼痛関連行動に対する EM1 は [D-Pro²]EM1 に抑制された事より μ_2 受容体に、EM2 は [D-Pro²]EM2 に抑制された事より μ_1 受容体に作用し抗侵害作用を発現していると考えられるが、これら作用する μ 受容体が一次知覚神経終末に存在し神経伝達物質の遊離を抑制するのか、二次知覚神経上に存在し脱分

Table 3

The ED₅₀ of EM1 and EM2's antinociceptive effect against CAP, NMDA, and SP induce nociceptive behavior.

	CAP	NMDA	SP
× EM1 ED ₅₀	17.1pmol (15.82-18.49)	128.3pmol (103.7-158.8)	141.1pmol (75.36-264.2)
× EM2 ED ₅₀	32.95pmol (28.53-38.06)	96.41pmol (67.89-136.9)	108.2pmol (98.66-118.7)

極の抑制をしているのかは受容体拮抗薬の感受性の有無だけでは言えない。そこで各種疼痛誘発物質に対する EMs の ED₅₀ を比較すると、CAP×EM1 では 17.1pmol(15.82-18.49)、NMDA×EM1 では 128.3pmol(103.7-158.8)、SP×EM1 では 141.1pmol(75.36-264.2)となる。一方 CAP×EM2 では 32.95pmol(28.53-38.06)、NMDA×EM2 では 96.41pmol(67.89-136.9)、SP×EM2 では 108.2pmol(98.66-118.7)となり、一次知覚神経に作用する CAP に対する EMs の ED₅₀ 値が、二次知覚神経上で作用する NMDA、SP に対する EMs の ED₅₀ 値よりも低い傾向にある (Table3)。これらの薬物力価の比較より CAP 誘発性疼痛関連行動に対する EMs の抗侵害作用が一次知覚神経に存在する μ 受容体を介し発現していると考えられる。また一次知覚神経からの SP 等の疼痛関連物質を放出に起因する CAP 誘発性の疼痛関連行動が EM1 により抑制され、その抗侵害作用が [D-Pro²]EM1 で拮抗されることより、CAP 誘発性疼痛関連行動に対する EM1 の抗侵害作用は、一次知覚神経上に存在する μ_2 受容体、EM2 の抗侵害作用は、一次知覚神経上に存在する μ_1 受容体を介し疼痛関連物質の遊離を阻害していると考えられる。

現在 μ 受容体サブタイプのカテゴリは naloxonazine (NLZ) の 35mg/kg(s.c.)への感受性の有無により分類されている (30)。前述の通り NLZ 35mg/kg(s.c.)非感受性受容体と一括りにされてきた μ_2 受容体の中に、薬理学的特徴の異なる受容体が存在する事を示唆した。そこで本研究では NLZ 35mg/kg(s.c.)感受性受容体と一括りにされてきた μ_1 受容体の中にも異なる薬理学的特徴の受容体が存在するのではないかと考えた。そこで非可逆的受容体阻害薬である NLZ と、可逆的受容体阻害薬である [D-Pro²]EM2 の阻害形式の違いを利用し μ_1 受容体の細分化の可能性を検討した。NLZ (2~16mg/kg s.c.)の 24 時間前の処置により NMDA、CAP 誘発性疼痛関連行動に対する EM2 の抗侵害作用は用量依存的に抑制されたが、EM1 の抗侵害作用(i.t.)は何ら影響を与えなかった。次に EM2 の抗侵害作用に何等影響を与えない NLZ (2mg/kg s.c.)に注目し、NLZ (2mg/kg s.c.)前処置下における EM2 の抗侵害作用発現メカニズムを検討した。NLZ(2mg/kg)を前処置した状態での NMDA 誘発性疼痛関連行動に対する EM2 の抗侵害作用は

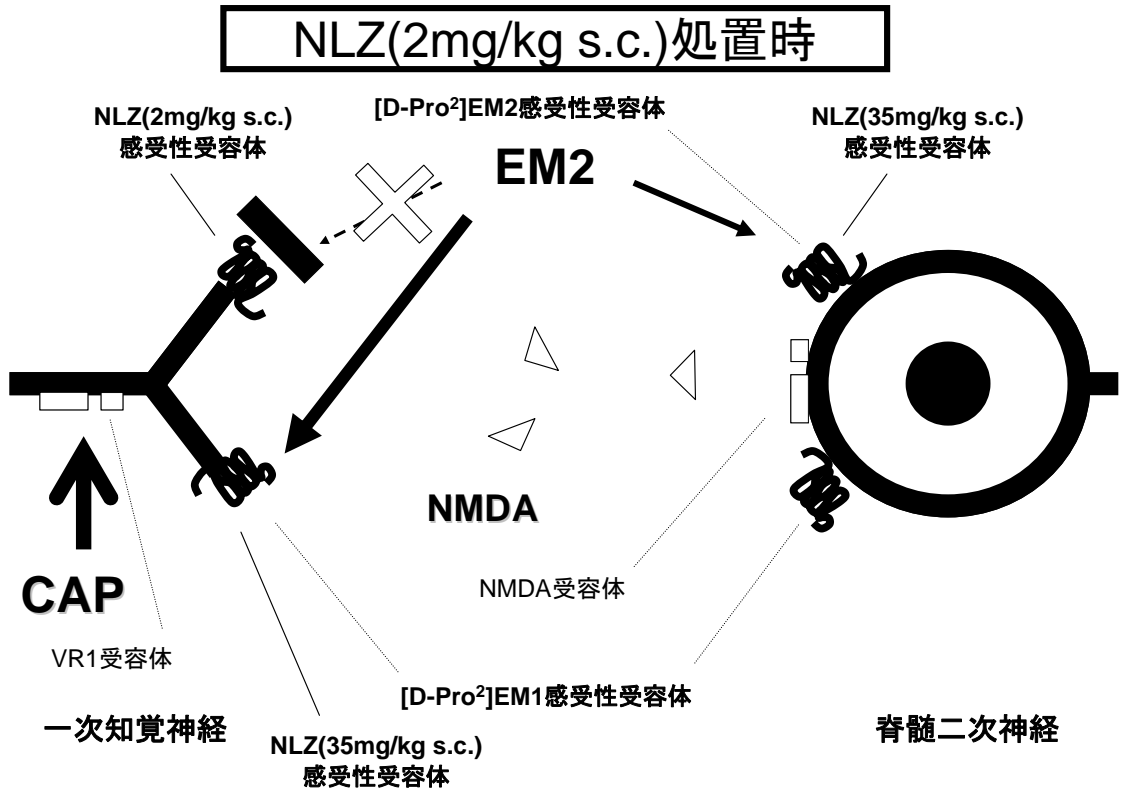
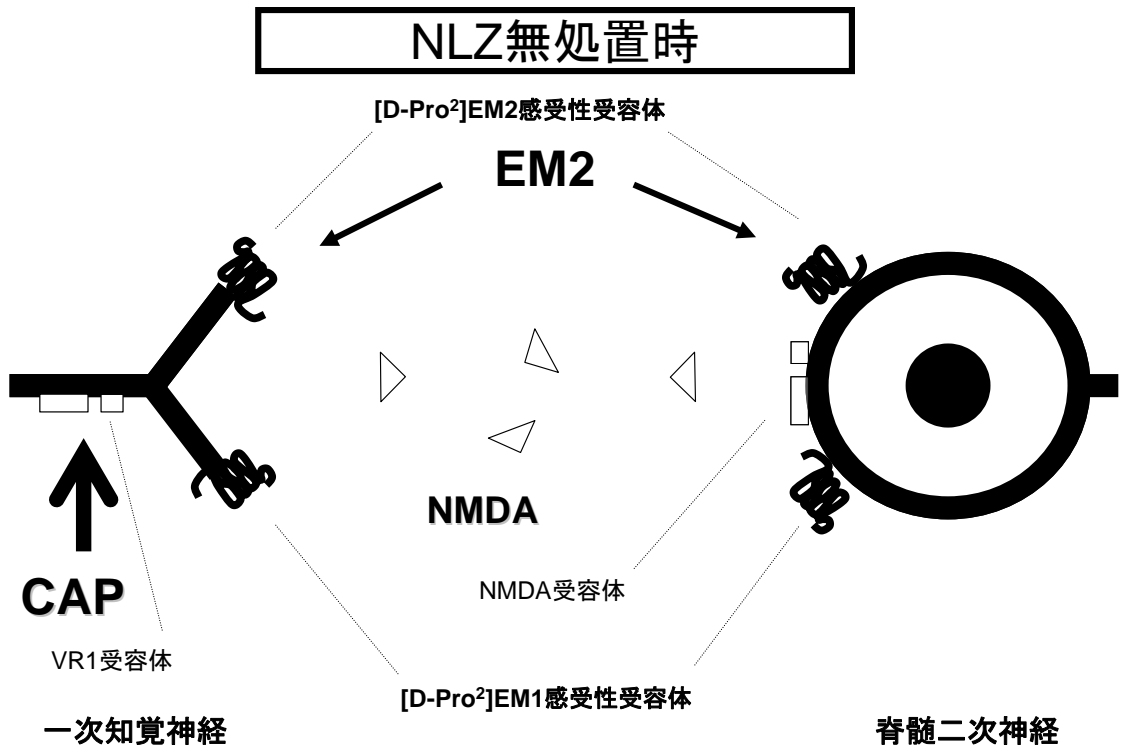


Fig. 20 Schematic illustration of the mechanism of antinociception induced by endomorphin-2 (EM2) against capsaicin in induced nociceptive behaviors in mice pretreated s.c. with naloxonazine (NLZ) (2mg/kg)

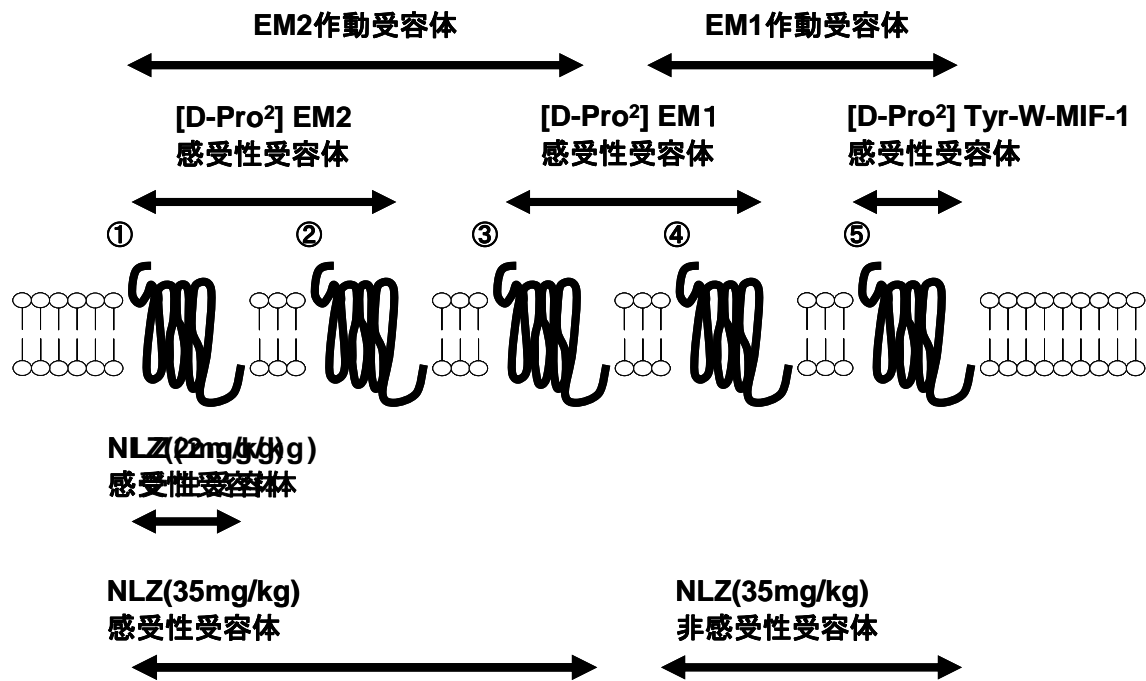


Fig. 21 Illustration of classification of mu opioid receptor

NLZ 無処置下と同様に [D-Pro²]EM2 で拮抗されたが、NLZ 前処置下の CAP 誘発性疼痛関連行動に対する EM2 の抗侵害作用は、[D-Pro²]EM2 では拮抗されず [D-Pro²]EM1 で拮抗された。この結果は NLZ (2mg/kg s.c.) 感受性受容体の存在を示唆し、CAP 誘発性疼痛関連行動に対する EM2 の抗侵害作用のみ受容体拮抗薬のスイッチング現象が見られた。この事より NLZ(2mg/kg s.c.) 感受性受容体は一次知覚神経上に存在し、疼痛伝達物質の遊離抑制に関与していると考えられる。

NLZ(2mg/kg s.c.) 前処置時における CAP 誘発性疼痛関連行動に対する EM2 の抗侵害作用に対する受容体拮抗薬のスイッチング現象のメカニズムについて検討する。通常 CAP 誘発性疼痛関連行動に対する EM2 の抗侵害作用は、一次知覚神経上に存在する [D-Pro²]EM2 感受性受容体を介し神経伝達物質の遊離を抑制している。しかし NLZ(2mg/kg s.c.) 前処置によりこの受容体が非可逆的に阻害された場合 EM2 の受容体選択性が消失し、非可逆的に阻害されていない [D-Pro²]EM1 感受性受容体に作用したと考えられる。この受容体は、

NLZ(16mg/kg s.c.)前処置下ではCAP誘発性疼痛関連行動に対するEM2の抗侵害作用は完全に抑制されることより、従来まで μ_1 受容体と分類されてきた受容体である。この受容体拮抗薬のスイッチング現象は一次知覚神経上にNLZ(2mg/kg s.c.)感受性受容体が存在し、二次知覚神経上にNLZ(2mg/kg s.c.)感受性受容体が存在しない事を示唆しているわけではなく一次知覚神経上にNLZ(2mg/kg s.c.)非感受性+[D-Pro²]EM2 感受性受容体が存在せず、NLZ(2mg/kg s.c.)非感受性+[D-Pro²]EM1 感受性受容体が存在する事を示唆している (Fig. 20)。

総括として本研究テーマの μ 受容体の薬学的特徴付けでは、少なくとも5種類の μ 受容体細分化の可能性が考えられ (Fig. 21)、①NLZ(2mg/kg s.c.)感受性 μ 受容体②NLZ(35mg/kg s.c.)感受性+[D-Pro²]EM2 感受性 μ 受容体③NLZ(35mg/kg s.c.)感受性+[D-Pro²]EM1 感受性 μ 受容体④NLZ (35mg/kg s.c.)非感受性+[D-Pro²]EM1 感受性 μ 受容体⑤NLZ (35mg/kg s.c.)非感受性+[D-Pro²]EM1 非感受性[D-Pro²]Tyr-W-MIF1 感受性受容体の存在が示唆された。

μ 受容体の分布については一次知覚神経上には①NLZ(2mg/kg s.c.)感受性 μ 受容体、③NLZ(35mg/kg s.c.)感受性+[D-Pro²]EM1 感受性 μ 受容体と④NLZ (35mg/kg s.c.)非感受性+[D-Pro²]EM1 感受性 μ 受容体の4種の存在が示唆され、②NLZ(35mg/kg s.c.)感受性+[D-Pro²]EM2 感受性 μ 受容体は存在しないと考えられる。二次知覚神経上には②NLZ(35mg/kg s.c.)感受性+[D-Pro²]EM2 感受性 μ 受容体、④NLZ (35mg/kg s.c.)非感受性+[D-Pro²]EM1 感受性 μ 受容体、⑤NLZ (35mg/kg s.c.)非感受性+[D-Pro²]EM1 非感受性[D-Pro²]Tyr-W-MIF1 感受性受容体が存在していると考えられる。

謝辞

本稿を終えるに望み、本研究の遂行に際し終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました恩師 東北薬科大学機能形態学教室 櫻田 忍 教授に心より感謝の意を表します。

本論文の作成にあたり、御高閲ならびに御助言を賜りました東北薬科大学病態生理学 大野 勲 教授、薬理学教室 丹野 孝一 教授に心より感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、多大なる御助言、御協力を賜りました大崎市民病院 薬剤部長 千葉 英雄 先生、薬剤長 田村 淳 先生に深く感謝の意を表します。また、本研究の機会を快く与えてくださいました、大崎市民病院 院長 太田 耕造 先生に深く感謝の意を表します。

本研究を進めるにあたり、御助言と御協力を賜りました東北薬科大学機能形態学教室 溝口 広一 准教授、米澤 章彦 准教授、渡辺 千寿子 講師、機能形態学教室諸氏に心より感謝の意を表します。

更に、本学におきまして、本研究の機会を快く与えて頂き、終始御激励を賜りました本学 理事長・学長 高柳 元明 博士に深く感謝の意を表します。

引用文献

- 1 Broccado M., Erspamer V., Erspamer G.F., Improta G., Linari G., Mechiorri P., Montccucch P.C., Br.J.Pharmacol.73, 625(1981)
- 2 Caterina M.J., Schumacher M.A., Tominaga M. Nature 389 816-24 (1997)
- 3 Champion H.C., Bivalacqua T.J., Zadina J.E., Friedman D.E., Kastin A.J. Kadiwitz P.J. Peptides 19 1595-602 (1998)
- 4 Chard P.S., Bleakman D., Chard P.S., Randic M., Miller R.J. J Neurochem 60 952-60 (1993)
- 5 Chen W., Zhang G., Marvizóna J.C., Neurosci 166 3 924-934 (2010)
- 6 Chen Y., Mestek A., Liu J., Hurlev J.A., Yu L., Mol Pharmacol.44(1):8-12 (1993)
- 7 Coggeshall R.E., Carlton S.M. Brain Res Brain Res Rev 24 28-66 (1997)
- 8 Dougherty P.M., Willis W.D. Pain 47 85-93 (1991)
- 9 Doyle G.A., Rebecca Sheng X., Lin S.S., Press D.M., Grice D.E., Buono R.J., Ferraro T.N., Berrettini W.H., Gece 388(1-2):135-147(2007)
- 10 Doyle G.A., Sheng X.R., Lin S.S., Press D.M., Grice D.E., Buono R.J., Ferraro T.N., Berrettini W.H.,Gene 395(1-2):98-107(2007)
- 11 Erchevy J., Kastin A.J., Zadina J.E., Peptides. 13, 623 (1992)
- 12 Espamer V., Melchiorri P., "Growth Hormvone and other Biologically Active peptides,"ed. by A.pecile and E.E, Exerpta Medica,Amsterdam(1980)p.185
- 13 Goldstein A., Lowney L.I., Pal B.K., Proc. Natl. Acid Sci. 68, 1742(1971)
- 14 Goldstein A., Tachibana S., Lowney L.I., Hunkapiller M., Hood L. Proc Natl Acad Sci 76 6666 -70(1979)
- 15 Grudt T.J ., Williams J.T. Neurosci 14 1646-54 (1994)
- 16 Hackler L., Kastin A.J., Erchevy J., Zadina J.E., Neuropeptides.24, 159(1993)
- 17 Hackler L., Zadina J.E., Ge L.J. Kastin A.J. Peptides 18 1635-9 (1997)
- 18 Heyman J.S., Williams C.L., Burks T.F., Mosberg H.I. Porreca F. J Pharmacol Exp Ther 245 238 (1988)

- 19 Hiroyuki W., Daisuke N., Kanenori I., Chizuko W., Hirokazu M., Tsutomu F., Kimie M., shunsuke K., Takumi S., Chikai S., Sinobu S., J Pharmacol Ther 312(3) 1075-81 (2005)
- 20 Horvath G., Szikszay M., Tomboly C. Benedek G. Life Sci 24 2635-41 (1999)
- 21 Hughes J., Smith T. W., Kosterlitz H. W., Fothergill L. A., Morgan B. A., Morris H. R. Nature 258 577-80 (1975)
- 22 Kangawa K., Matsuo H. Biochem Biophys Res Commun 86 153-60 (1979)
- 23 Kondo I., Marvizon J.C., Song B., Salgado F., Codeluppi S., Hua X.Y., Yaksh T.L. Neuroscience 25 3651-60 (2005)
- 24 Kosterlitz H.W., Waterfield A.A., Hughes J., Nature.276, 495 (1975)
- 25 Kvam T.M., Baar C., Rakvag T.T., Kaasa S., Krokan H.E., Skorpen F.J., Mol Med 82 (4):250-255 (2004)
- 26 Labuz D., Przewlocki R., Przewlocka B., *Neurosci Lett* **334**:127–130.
- 27 Lao L.J., Song B., Marvizon J.C. Neur sci 121 667-80 (2003)
- 28 Li C.H., Chung D. Doneen B.A., Biochem Biophys Res Commun 72 1542-7 (1976)
- 29 Li C.H., Chung D., Proc Natl Acad Sci 73 1145-8 (1976)
- 30 Ling GSF., Simantov R., Clark JA., Pasternak GW., Eur j Pharmacol 29 33-38(1986)
- 31 Liu H., Mantyh P.W., Basbaum A.I., Nature 386 721-4 (1997)
- 32 Maekawa K., Minami M., Masuda T., Satoh M., Pain 64 365-71 (1996)
- 33 Maekawa K., Minami M., Yabuuchi K., Toya T., Katao Y., Hosoi Y., Onogi T., Satoh M., *Neurosci Lett* 168 97-100 (1994)
- 34 Makoto tominaga., David Julius., *Jpn. J. Pharmacol.* 83, 20-24(2000)
- 35 Malcangio M., Fernandes K., Tomlison D.R., Marvizon J.C.G., Maetinez Z., Grady E.F., Burnett N.W., *Br J Neurosci* 17 8129-8136 (1997)
- 36 Mansour A., Fox C.A., Burke S., Meng F., Thompson R.C., Akil H., Watson S.J. *J Comp Neurol* 350 412-38 (1994)
- 37 Mansour A., Fox C.A., Thompson R.C., Akil H., Watson S.J. *Brain Res* 643-65 245 (1994)
- 38 Martin W.R., Eades C.G., Thompson J.A., Hupperler R.E., Gilbert P.E., *J Pharmacol. Exp. Ther.* 197, 517 (1976)

- 39 Martin-Schild S., Zadina J.E., Gerall A.A., Vigh S., Kastin A.J. ,Peptides 18 1641-9 (1997)
- 40 Melchiorri P., Negri L., Gen pharmacol 27(7) (1996)
- 41 Minami M., Maekawa K., Yabuuchi K., Satoh M. Brain Res Mol Brain Res 30 203-10 (1995)
- 42 Minami M., Onogi T., Toya Y., Hosoi Y., Maekawa K., Katsumata S., Yabuuchi K., Satoh M., Neurosci Res 18 315 (1994)
- 43 Minami M., Satoh M., Neurosci Res 23 121-45 (1995)
- 44 Murryay C.W., Cowan A., Larson A.A., Pain 44 179-85 (1991)
- 45 Nock B: The Pharmacology od Opiate Peptides (Ed by L.F.,Tseng), 29, Hawood Academic publishers(1995)
- 46 Pan X.Y., Xu J., Bloan E., Moskowitiz HS., Xu M., Pasternak GW., Mol Pharmacol 68:866-875(2005)
- 47 Pan X.Y., Xu J., Mahurter L., Bolan E., Xu M., Pasternak GW., Proc. Natl.Acid.Sci.98(24):14084-14089(2001)
- 48 Pan Y.X., DNA cell Biol(11):337-340(2005)
- 49 Pan Y.X., Xu J., Bolan E., Abbadie C., Chang A., Zuckerman A., Rossi G., Pasternak GW., Mol Pharmacol (2):396-340(1999)
- 50 Pan Y.X., Xu J., Bolan E., Chang A., Mahurter L., Rossi G.,Pasternak GW., FEBS Lett 466 (2-3) : 337-340 (2000)
- 51 Pasternak G.W. Clin Neuropharmacol 16 1-18(1993)
- 52 Pasternak G.W.,Wood P.J., Life Sci. 38,1989(1986)
- 53 Pasternak G.W.,Wood P.J., Life Sci.68,2213(2001)
- 54 Pert C.B., Snyder S.H., Science. 179, 1011 (1973)
- 55 Petralia R.A., Yokotani N., Wenthold R.J., Neurosci 14 667-696 (1994)
- 56 Przewlocha B., Mika J., Labuz D. Toth G., Przewtocki. Eur J Pharmacol 367 189-96 (1999)
- 57 Qurion R., Chicheportiche R., Trends Neurosci. 10,444(1987)
- 58 Raynor K., Kong H., Chen Y., Yasuda K., Yu L., Bell G.I., Reisine T., Mol Pharmacol 45 330-4(1994)
- 59 Sakurada S, Watanabe H, Hayashi T, Yuhki M, Fujimura T, Murayama K, Sakurada C, Sakurada T , Br J Pharmacol. 137(8): 1143–1146. (2002)
- 60 Sakurada S., Hayashi T., Yuhki M., Fujimura T., Murayama K., Yonezawa A., Sakurada C., Takeshita M., Sato T., Zadina JE., Kastin AJ., Sakurada T. Peptides 23:895-901(2002)

- 61 Sakurada S., Zadina J.E., Kastin A., Katsuyama S., Fujimura T., Murayama K., Yuhki M., Ueda H., Sakurada T. *Eur J Pharmacol* 372 25-30 (1999)
- 62 Sakurada T., Manome Y., Tan-No K., Sakurada S., Kisara K. *Br J Pharmacol* 101 307-10 (1990)
- 63 Schroeder J.E., Fischbach P.S., Zheng D., McCleskey E.W. *Neuron* 6 13-20 (1991)
- 64 Serturmer F.A.W., Gilbert's *Ann. D. Physik.* 25,56(1817)
- 65 Serturmer F.A.W., *J Pharm. F. Arzte. Apoth Chem.* 14,47(1806)
- 66 Shigemoto R., Ohshi H., Nakanishi S., Mizuno N., *Neurosci Lett.* 144 229-232 (1992) Liu H., *Proc Natl Acad Sci USA* 92 8383-8387 (1994)
- 67 Simon E.J., Hiller J.M., Edelman I., *Proc. Natl. Acad. sci. USA.* 70,1947(1977)
- 68 Takagi H., Shiomi H., Ueda H., Amano H., *Eur. J.Pharmacol.* 55, 109(1978)
- 69 Takagi H., Shiomi H., Ueda H., Amano H., *Nature.* 282, 410(1979)
- 70 Takemori A.E., Portighese P.S., *Eur. J. Pharmacol.* 242, 145(1993)
- 71 Tao PL, Lai YS, Chow LH, Huang EY. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 371 72-80 (2005)
- 72 Terenius L., *Acta Pharmacol. Et Toxicol.* 33,377(1973)
- 73 Tölle T. R., Berthele A., Zieglgänsberger W., Seeburg P. H., Wisgen W., *Neurosci* 13 5009-5028 (1993)
- 74 Vaupel D.B., *Eur J Pharmacol.* 92,269,(1983) Qurion R., Chicheportiche R., *Trends Neurosci.* 10,444(1987)
- 75 World Health Organization, Translated by Takeda F, *Cancer Pain Relief. With method for relief of cancer pain*, Kanehara Publishing Co., Tokyo, 1987; 10-21
- 76 Yoshimura M., North R.A. *Nature* 305 529-30 (1983)
- 77 Zadina J.E., Hackler L., Ge L.J. *Nature* 386 499-502 (1997)
- 78 Zadine JE., Kastin AJ., Kwnige V., Bruno C., Hackler L., *Neurosci Lett* 155 220-222(1993)