

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 8日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790239

研究課題名（和文） 痛みによる不快情動に対する分界条床核内オピオイドによる調節機構の薬理学的研究

研究課題名（英文） The role of opioid neurotransmission in pain-induced aversion

研究代表者

井手 聡一郎（IDE SOICHIRO）

北海道大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：30389118

研究成果の概要（和文）：本研究では、痛みにより生じる不快情動に対する調節機構を明らかにすることを目的とし、分界条床核（BNST）におけるオピオイド神経系の役割に関して研究を進め、背外側BNST内へのCRF処置誘発不快情動に対するオピオイド受容体作用薬の効果を検討し、不快情動抑制作用を示すと同時に、疼痛関連行動にも変化を引き起こすことを明らかとした。また、腹側BNST内ノルアドレナリン神経情報伝達亢進により不安様行動が惹起され、さらに食欲を減退させることを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we examined the role of the opioid within the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) in pain-induced aversion. The conditioned place aversion (CPA) induced by intra-dorsolateral part of BNST (dlBNST) injection of CRF was reversed by the co-injection of an opioid agonist. On the other hand, nociceptive behaviors induced by pain stimulus were also changed by intra-dlBNST injection of opioid agonist. Further, we revealed that noradrenergic transmission within the ventral part of BNST regulates food intake and anxiety-like behaviors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：痛み、嫌悪、不安、食欲、分界条床核、オピオイド、ノルアドレナリン

1. 研究開始当初の背景

がんをはじめとする多くの疾患に付随する過剰な痛みや慢性疼痛は、身体的・精神的に患者のQOLを著しく低下させるため、現在では治療すべき疾患の一つとして認識されはじめています。これまでに、侵害刺激が加わった場所や強さの認知に関与する痛みの身体的・感覚的側面に関しては、精力的な研究

がなされ、その分子機構も明らかにされてきている。一方、痛みに伴う嫌悪、不安、抑うつなどの精神的・情動的側面に関しては、未だ不明瞭な点が多いのが現状である。これら痛みの情動的側面の分子機構を明らかにすることは、QOLの向上に不可欠であると考えられる。

分界条床核（BNST）は、扁桃体中心核や無

名質とともに extended amygdala と呼ばれる脳領域を構成し、不快情動の生成に重要な役割を果たしていることが知られている。これまでに、当研究室では、BNST の腹側領域 (vBNST) において、末梢への侵害刺激時にノルアドレナリンの遊離が亢進しており、vBNST における β アドレナリン受容体を介した神経情報伝達が嫌悪の生成に関与することを、in vivo microdialysis 法や条件付け場所嫌悪性試験 (Conditioned place aversion (CPA) 試験) を用いて明らかにしている (Deyama et al. (2008) J. Neurosci. 28:7728-7736)。さらに、BNST 背外側領域 (d1BNST) においては、グルタミン酸、ならびにコルチコトロピン放出因子 (CRF) による神経情報伝達も、不快情動生成に重要な役割を示すことを見出している。

一方、モルヒネは鎮痛に必要な用量より低用量で痛みに伴う不快情動を抑制することが知られており、当研究室においても、扁桃体へのモルヒネ投与により痛みによる不快情動生成が抑制されることを明らかにしている (Deyama et al. (2007) Neurosci. Res. 28: 7728-7736)。また、申請者はこれまでに、モルヒネなど麻薬性鎮痛薬の主たる作用部位である μ オピオイド受容体の遺伝子欠損マウス (MOR-KO マウス) を用いた行動薬理的解析により、 μ オピオイド受容体が、外因性ストレス負荷による生体内応答 (HPA-axis 機能の活性化)、さらに、高架式十字迷路における不安様行動や強制水泳法におけるうつ様行動に対して影響を与えていることを明らかにしている (Ide et al. (2010) Neuropharmacology 58: 241-247)。

これらの成果から、痛みの感覚的側面ならびに情動的側面それぞれに対するオピオイドの作用には、密接に関係しつつも、異なった脳領域あるいは神経回路が関与しているものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、痛みにより誘発される不快情動の生成・制御メカニズムを明らかにすることを目的として、不快情動の生起に深く関与することが考えられる BNST に着目し、不快情動の生起におけるオピオイド神経情報伝達の役割を検討すると共に、ノルアドレナリン神経情報伝達経路による不快情動生成機構に関する解析を行った。

3. 研究の方法

BNST 内薬物投与には、事前にガイドカニューレ埋込手術を行ったラットを用いた。ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg) 麻酔下、d1BNST 内薬物投与用 25G ガイドカニューレを両側に挿入し、歯科用セメントにて固定した。ガイドカニューレ挿入位置は d1BNST

もしくは vBNST の 1.5 mm 上方とした。ラットは手術後 5 日目以降に実験に使用した。BNST 内薬物投与は、侵害刺激を与える 10 分前に 33G インジェクションカニューレをガイドカニューレに刺入し、マイクロインジェクションポンプを用いて、頭蓋表面から深さ 6.5 mm の位置に 0.5 μ l の容量を流速 0.5 μ l/min で投与した。実験終了後、投与部位の確認を行い、両側 BNST 内への薬物投与が確認された個体のみデータ解析に用いた。

条件付け場所嫌悪性試験 (CPA test) では、大きさの等しい 2 つのボックス (一方が白く床面に凹凸のあるボックス、もう一方が黒く床面が滑らかなボックス) からなるシャトルボックスを使用し、BNST 内薬物投与により条件付けを行う 6 日間の実験プロトコルで行った (図 1)。1 日目 (habituation session) および 2 日目 (preconditioning session) は、ラットを 15 分間 (900 秒間) 装置内で自由に行動させ、各ボックスにおける滞在時間を計測し、2 日目により長く滞在したボックスを drug-paired compartment とした。3 日目から 5 日目を conditioning session では、ラットを group 1 と 2 の 2 つのグループに分けた。午前のセッションでは、group 1 のラットには d1BNST 内薬物投与を行い投与直後から 30 分間 drug-paired compartment に閉じ込めた。一方、group 2 のラットには何も処置を施さずに 30 分間 drug-paired compartment とは反対側のボックスに閉じ込めた。4 時間後、午後のセッションでは、group 1 のラットは無処置で drug-paired compartment とは反対側のボックスに 30 分間閉じ込め、group 2 のラットには d1BNST 内薬物投与を行い 30 分間 drug-paired compartment に閉じ込めた。group 1、2 ともに同様の条件付けを 3 日間繰り返した。Test session を 6 日目とし、再びラットを 15 分間装置内で自由に行動させ、各ボックスにおける滞在時間を計測した。2 日目の drug-paired compartment 滞在時間から 6 日目の drug-paired compartment 滞在時間を引いた値を CPA score と定義し、この値が正に大きいほど痛みによる不快情動が強く惹起されたものとして評価した。

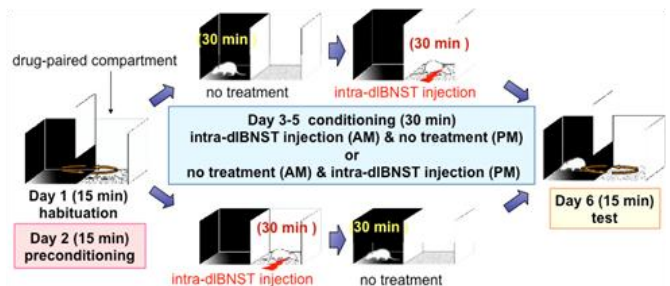


図 1 条件付け場所嫌悪性試験

BNST 内薬物投与による条件付けの実験手順。

ホルマリンテストでは、アクリル製の透明な観察筒（直径 30 cm、高さ 30 cm）にラットを入れ、30 分以上環境に馴化させた後、2%ホルマリン 100 μ l を右後肢足底内に投与し、速やかに観察筒に戻した。ラットが lifting、licking、biting、shaking を行った秒数を 5 分毎（300 秒毎）に 60 分間計測し、以下の式により、Nociceptive score を算出した。

$$\text{Nociceptive score} = \{[\text{time (sec) spent with lifting}] \times 1 + [\text{time (sec) spent with licking, biting or shaking}] \times 2\} / 300 \text{ (sec)}$$

摂食量の測定では、まずラットの 24 時間の基礎摂食量を測定した後に 20 時間の絶食を行った。その後 BNST 内に薬物処置を行い、30 分間の摂食量を測定した。

高架式十字迷路試験では、床面より高い位置に壁に囲まれた走路（クローズドアーム：50×10 cm）と壁のない走路（オープンアーム 50×10 cm）とで構成される高架式の十字迷路を用いた。BNST 内に薬物処置を行い、ラットを迷路の中心のプラットフォーム（10×10 cm）に置いた後、10 分間の行動を観察し、オープンアーム滞在時間、オープンアーム侵入回数を自動計測した。オープンアーム滞在時間の短縮、侵入回数の減少を、不安水準の亢進として評価した。

4. 研究成果

(1) 嫌悪に対する d1BNST 内 μ オピオイド受容体アゴニスト投与の効果

当研究室のこれまでの研究成果において、侵害刺激により惹起される CPA が、d1BNST 内 CRF 受容体アンタゴニスト投与により抑制されることや、侵害刺激の代わりに d1BNST 内 CRF 投与することで、直接的に CRF 受容体を活性化させることにより、CPA が惹起することを見いだしている。そこで、本研究では、d1BNST 内 CRF 処置誘発の CPA に対する、 μ オピオイド受容体選択的アゴニスト DAMGO の効果を検討した（図 2）。その結果、d1BNST 内 CRF 処置により惹起される CPA は、DAMGO を共処置することにより用量依存的に抑制されることを明らかとした。

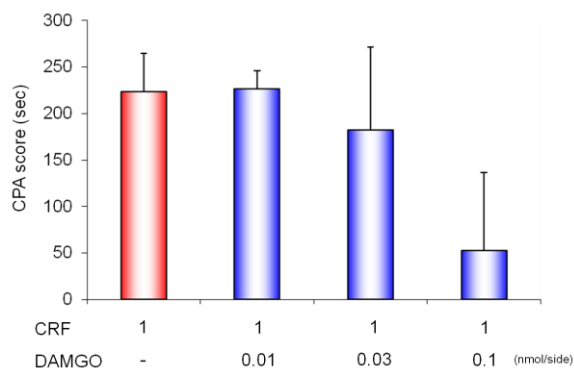


図 2 d1BNST 内 CRF 投与による CPA に対する DAMGO 共処置の効果（CPA 試験）

(2) 痛みの感覚的側面に対する d1BNST 内 μ オピオイド受容体アゴニスト投与の効果

当研究室のこれまでの研究成果において、d1BNST 内 CRF 受容体アンタゴニストの処置は、痛みの感覚的側面に影響を与えることなく、不快情動を抑制することを見いだしている。そこで、次に d1BNST 内 DAMGO 処置が痛みの感覚的側面に与える影響をホルマリンテストにより検討した（図 3）。その結果、d1BNST 内 DAMGO 処置は、ホルマリン後肢足底内投与による疼痛反応を減弱もしくは遅延させる傾向が確認された。このため、痛みによる不快情動生成に対する d1BNST 内 μ オピオイド受容体活性化による抑制機構は、CRF 受容体アンタゴニストによる抑制機構とは異なり、不快情動生成を直接的に抑制するだけでなく、痛みの感覚的側面を抑制することにより、効果が発現している可能性が考えられた。

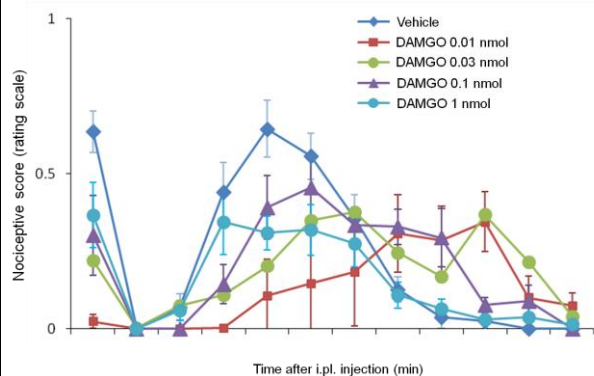


図 3 d1BNST 内 DAMGO 投与による痛みの感覚的側面に対する影響（ホルマリンテスト）

(3) 摂食量に対する vBNST 内 β アドレナリン受容体アゴニスト投与の効果

当研究室ではこれまでに、vBNST 内 β アドレナリン受容体を介したノルアドレナリン神経情報伝達亢進が、痛みによる不快情動生成に重要な役割を担っていることを明らかとしてきたが、嫌悪以外の不快情動に対する影響は未検討であった。そこで、vBNST 内 β アドレナリン受容体が摂食量調節に関与しているか否かを検討するために、vBNST 内 isoproterenol (β アドレナリン受容体選択的アゴニスト) 投与による vBNST 内 β アドレナリン受容体刺激が、摂食量に及ぼす影響について検討した。その結果、vBNST 内 isoproterenol 投与により、用量依存的に摂食量が低下した（図 4 A）。また、isoproterenol 投与による摂食量の低下は、 β アドレナリン拮抗薬である timolol の同時投与により有意に抑制された（図 4 B）。

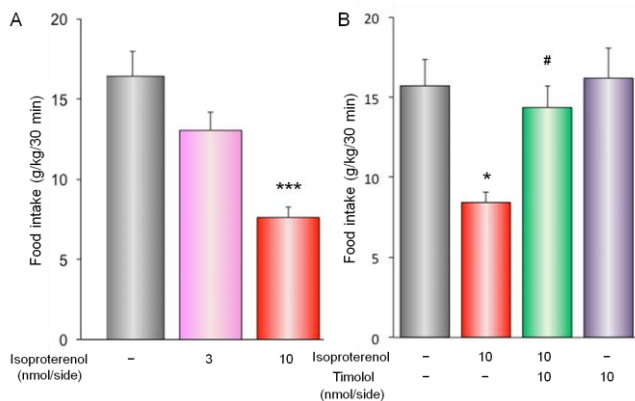


図4 vBNST内 isoproterenol 投与による摂食量への影響 (A) と timolol 同時処置の影響 (B)

(4) 不安様行動に対する vBNST 内 β アドレナリン受容体アゴニスト投与の効果

vBNST 内 isoproterenol 投与による vBNST 内 β アドレナリン受容体刺激が、不安様行動に及ぼす影響について高架式十字迷路試験により検討した。その結果、vBNST 内 isoproterenol 投与により、用量依存的にオープンアーム滞在時間が減少し、不安様症状が惹起されることが示された (図 5 A)。また、isoproterenol 投与によるオープンアーム滞在時間の減少は、timolol 同時投与により有意に抑制された (図 5 B)。

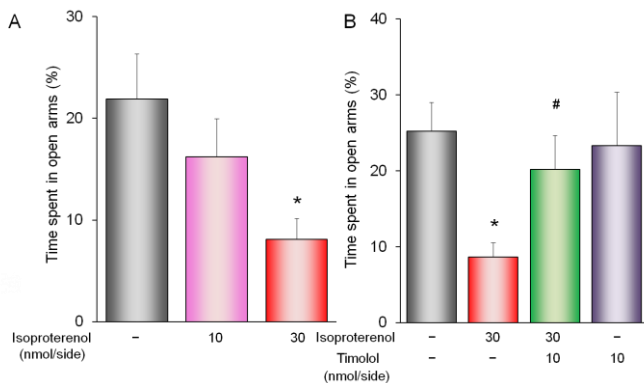


図4 vBNST内 isoproterenol 投与による不安様行動に対する影響 (A) と timolol 同時処置の影響 (B) (高架式十字迷路試験)

(5) まとめ

本研究結果から、痛み刺激負荷時に d1BNST 内 CRF 受容体を介した CRF 神経情報伝達の亢進により生じる嫌悪は、d1BNST 内 μ オピオイド受容体を介したオピオイド神経情報伝達亢進により抑制されることが示唆された。一方、その機序は、不快情動生成機構に対する直接的な作用ではなく、痛みの感覚的側面を抑制することによる 2 次的な作用である可能

性が考えられた。

また、本研究結果から、vBNST 内 β アドレナリン受容体を介したノルアドレナリン神経情報伝達の亢進により、摂食量が低下し、不安が惹起されることが示唆された。我々はこれまでに、侵害刺激により vBNST 内でノルアドレナリン遊離量が増加し、そのノルアドレナリンが vBNST 内 β アドレナリン受容体を介して痛みに対する嫌悪反応に関与していることを明らかにしている。それらの研究結果を併せて考えると、痛みにより vBNST 内で遊離が亢進されたノルアドレナリンは β アドレナリン受容体を介して、痛みによる嫌悪および不安情動の生成に関与するだけでなく、痛みによる食欲抑制にも寄与している可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 7 件)

- ① 眞嶋悠幾, 中誠則, 仲子友和, 平田美紀枝, 井手聡一郎, 吉岡充弘, 南雅文: 摂食行動および不安様行動における分界条床核内ノルアドレナリン神経情報伝達の役割、日本薬学会 第 132 年会、2012 年 3 月 29-31 日、北海道大学 (札幌)
- ② 小関加奈, 中誠則, 仲子友和, 平田美紀枝, 井手聡一郎, 吉岡充弘, 南雅文: Noradrenergic transmission within the bed nucleus of the stria terminalis regulates food intake and anxiety-like behaviors、第 85 回日本薬理学会、2012 年 3 月 14-16 日、国立京都国際会館 (京都)
- ③ Soichiro Ide, Atsushi Ohno, Ryuta Tamano, Tomonori Naka, Satoshi Deyama, Mitsuhiro Yoshioka, Masabumi Minami: Involvement of corticotropin-releasing factor within the dorsolateral part of the bed nucleus of the stria terminalis in pain-induced aversion、2nd Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology、2011 年 9 月 23-24 日、Grand Hilton Seoul Hotel (韓国)
- ④ 中誠則, 井手聡一郎, 南雅文: 痛みによる不快情動生成における分界条床核内 CRF 神経情報伝達系の役割、第 33 回日本疼痛学会、2011 年 7 月 22-23 日、愛媛県民文化会館 (愛媛)
- ⑤ 山本隆太, 原大樹, 中誠則, 玉野竜太, 井手聡一郎, 金田勝幸, 南雅文: 痛みによる

よる分界条床核内 AMPA 受容体 GluR1 サブ
ユニットのリン酸化、第 84 回日本薬理学
会年会、2011 年 3 月 22 日、誌上開催

- ⑥ 井手聡一郎：痛み・情動における μ オピ
オイド受容体の役割、第 20 回日本臨床精
神神経薬理学会・第 40 回日本神経精神薬
理学会合同年会、2010 年 9 月 15 日、仙
台国際センター（宮城）
- ⑦ 中誠則、玉野竜太、近藤直人、大野篤志、
井手聡一郎、山口拓、吉岡充弘、南雅文：
痛みによる不快情動生成における分界条
床核内 CRF 神経情報伝達の役割、日本薬
学会北海道支部第 134 回例会、2010 年 5
月 8 日、札幌コンベンションセンター（北
海道）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

- 出願状況（計 0 件）
○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井手 聡一郎（IDE SOICHIRO）
北海道大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号：30389118

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし