

平成 21 年 5 月 11 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19603021  
 研究課題名（和文）  $\mu$  オピオイド受容体遺伝子欠損マウスを用いたオピオイド拮抗性鎮痛薬の作用解析  
 研究課題名（英文） Mechanisms of effects of opioid partial agonists in  $\mu$ -opioid receptor knockout mice.  
 研究代表者  
 佐藤 公道（SATO MASAMICHI）  
 安田女子大学・薬学部・教授  
 80025709

研究成果の概要：“痛み”の治療において非常に重要な役割を果たしているオピオイド拮抗性鎮痛薬の作用機序を明らかにすることを目的として研究を行った。本邦で臨床使用されているオピオイド拮抗性鎮痛薬のうち、ブトルファノール、ペントゾシンを中心として鎮痛作用機序を解析し、熱ならびに機械刺激による痛みに対する鎮痛効果の発現には  $\mu$  オピオイド受容体が主要な役割を果たしているが、化学（内臓）刺激に対しては  $\mu$  および  $\delta$  オピオイド受容体とその効果の発現に重要であることを明らかとした。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：疼痛学

キーワード：オピオイド、痛み、依存、麻薬拮抗性鎮痛薬、 $\mu$  オピオイド受容体、遺伝子欠損マウス

## 1. 研究開始当初の背景

がんをはじめとした多くの疾患に付随する痛みや術後痛は、それ自体が生体の様々な因子に影響を及ぼし、種々の疾患・症状の悪化、術後の回復の遅延、薬物処置時における作用減弱や副作用増強を引き起こし、臨床において大きな問題となる。痛み自体は、生体防御警告系として重要な役割を果たしているのに対し、過剰な痛みや慢性的疼痛は、患者の生活の質（QOL: Quality of life）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る。1986年に世界保健機構（WHO）が、特にがん患者におけるがん性疼痛を緩和し、患者のQOLを向上することを目的として公表したWHO方式がん疼痛治療法は、現在では標準的な治療法として世界各国で活用されつつある。モルヒネをはじめとした各種オピオイド鎮痛薬は、治療法で示されるWHO方式3段階除痛ラダーにおいて、第2段階から第3段階である軽度から中程度並びに中程度から強度の痛みに対して用いられている。さらに近年では、が

ん性疼痛のみならず他の激しい痛みを伴う疾患や術後の疼痛管理においても、オピオイド鎮痛薬が用いられるようになってきている。一方で、本邦ではWHO方式がん疼痛治療法の導入から20年が経過しているが、オピオイド鎮痛薬の使用量に関しては未だ先進諸国の中でも最低ランクに留まっている。この原因の一つには、患者のみならず医療従事者においてもオピオイドに関する正しい知識が欠如していることが挙げられる。正しい知識のもと、痛みの種類・程度に合わせた適切なオピオイド鎮痛薬の使用による疼痛治療が、広く普及していくことが強く望まれる。

オピオイド鎮痛薬に関する研究においては、オピオイド受容体各サブタイプがクローニングされて以降、培養細胞への単一受容体サブタイプ強制発現系を用いた *in vitro* 解析が可能となり、さらに最近では、遺伝子組み換え技術により作製された遺伝子改変マウスを用いることで、*in vivo* でのより詳細な解析が可能となってきた (Sora et al., (1997) Opiate receptor knockout mice define mu receptor roles in endogenous nociceptive responses and morphine-induced analgesia. Proc Natl Acad Sci USA. 94(4):1544-9.)。研究代表者並びに研究分担者はこれまでに、WHO方式3段階除痛ラダーの第3段階で用いられるブプレノルフィンに関して *in vitro* 並びに  $\mu$  オピオイド受容体遺伝子欠損 (MOR-KO) マウスを用いた *in vivo* での詳細な解析を行い、ブプレノルフィンは  $\mu$ 、およびオピオイド受容体に対して部分作動薬として作用するが、その抗熱的侵害受容作用は主に  $\mu$  オピオイド受容体を介して発現していること、並びに依存性の指標となる報酬効果は  $\mu$  だけでなく、およびオピオイド受容体もそれぞれ関与していることを明らかとした。また、第2段階で用いられる塩酸トラマドールに関して解析を行い、その抗熱的侵害受容作用は主に  $\mu$  オピオイド受容体と  $\alpha$ 2アドレナリン受容体を介して発現していること、並びにその報酬効果は著しく弱いものであることを明らかとした。しかしながら、モルヒネやフェンタニルなどの  $\mu$  オピオイド受容体完全作動薬に関する研究が多く為されている一方で、本邦で臨床使用されている他のオピオイド鎮痛薬の大半、特に  $\mu$  オピオイド受容体部分作動薬であるオピオイド拮抗性鎮痛薬に関しては、オピオイド受容体各サブタイプに対する結合特性や最大アゴニスト活性などの分子的機構、並びに痛みの種類やその程度に対する鎮痛作用や種々の副作用に関し、未だ不明瞭な点が多く残されているまま使用されているのが現状であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、種々のオピオイド鎮痛薬の抗侵害受容作用特性と分子機構を解明することを目的とし、本邦で臨床使用されているオピオイド鎮痛薬のうち、特にオピオイド拮抗性鎮痛薬に焦点を絞り、以下の検討を行った。

- (1) MOR-KO マウスを用いた「熱的」、「機械的」、「化学的」な種々の異なる痛みに対する抗侵害受容作用の評価とオピオイド受容体各サブタイプの関与の検討
- (2) MOR-KO マウスを用いた報酬効果を指標とした依存性の評価とオピオイド受容体各サブタイプの関与
- (3) ヒトオピオイド受容体各サブタイプに対する選択性、並びにアゴニスト活性の評価

## 3. 研究の方法

### (1) 実験動物の準備

研究に用いる野生型、ヘテロ型、並びにホモ型 MOR-KO マウスは、遺伝背景を C57BL/6J としたヘテロ型 MOR-KO マウス同士の交配により作製した。また実験に際しては、全ての抗侵害受容作用の検討において、マウスに対し必要以上の負荷がかからないよう留意し、疼痛刺激負荷時間に上限、ならびに負荷刺激強度に閾値を設けた。また、関連研究機関の動物実験委員会の審査・承認を得た後に研究を行った。

### (2) 抗侵害受容作用の評価

「熱的」、「機械的」および「化学的」な侵害刺激は、それぞれ異なる経路で伝達され、各侵害刺激を抑制する機構もそれぞれ異なると考えられる。本研究では、これら各種の侵害刺激に対するオピオイド拮抗性鎮痛薬の抗侵害受容作用をより多角的に評価するために、野生型並びに MOR-KO マウスを用いて、同一薬物に対して下に示す複数の鎮痛検定を行った。

抗熱的侵害受容作用の検討

Hot-plate 法、Tail-flick 法

抗機械的侵害受容作用の検討

Paw-pressure 法 (Randall Selitto 法)

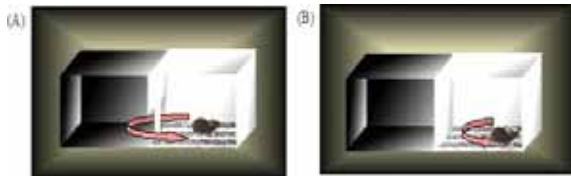
抗化学的侵害受容作用の検討

酢酸ライジング法

### (3) 報酬効果の評価

“麻薬には依存性がある”という負のイメージは、オピオイドの臨床使用が広く普及する上で、障害の一つとなっている。一方、オピオイド拮抗性鎮痛薬は、 $\mu$  オピオイド受容体完全アゴニストであるモルヒネやフェンタニルと比較しその依存性は弱いと考えられ、その結果を明確に示すことはオピオイドの適切な使用の普及に貢献すると考えられる。本研究においては、薬物の依存性の指標の一つとされる報酬効果の解析を、野生型並

びに MOR-KO マウスを用いた、条件付け場所嗜好性試験 (CPP 法) により行った。また、CPP 法においてはカウンターバランス法 (下図 (A)) の自由探索期間に、より長く滞在した側 (preference compartment) を判定し、下図 (B) の条件付け期間において、preference compartment 並びに逆側の compartment で判定薬物を投与するマウスをそれぞれ同数とする方法} を用い、さらに自発運動量の測定を同時に行うことで、より厳密に報酬効果の判定を行った。



#### (4) in vitro 解析

本研究においては、研究代表者並びに研究分担者が以前に作成した、ヒトオピオイド受容体各サブタイプを安定的に発現する CHO 細胞株を用いて、オピオイド拮抗性鎮痛薬の受容体各サブタイプに対する結合親和性を、細胞膜標本を用いた Binding assay により解析した。また、各オピオイド拮抗性鎮痛薬のアゴニスト活性に関しては、フォルスコリン誘発の cAMP 蓄積に対する最大阻害効果を指標とした cAMP assay により解析した。

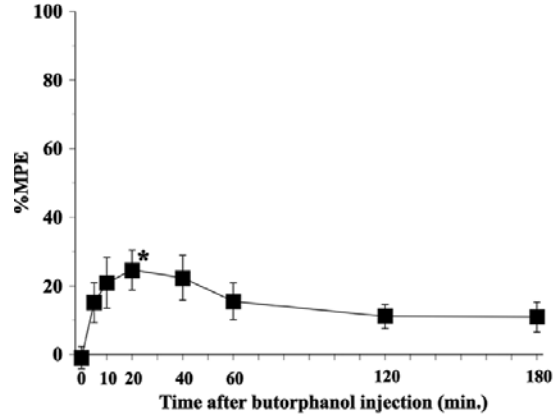
### 4. 研究成果

#### (1) ブトルファノールの鎮痛作用機序

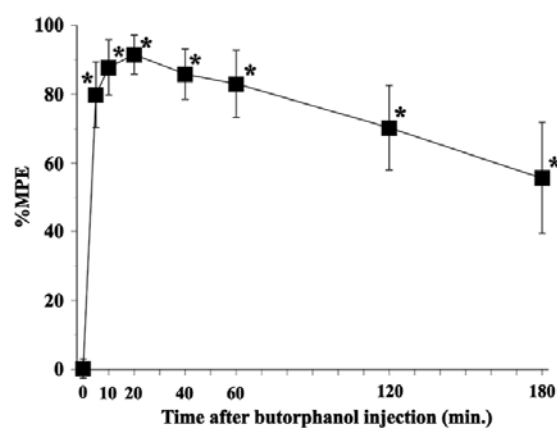
酒石酸ブトルファノール (以下、ブトルファノール。商品名: スタドール) は、サブタイプ非選択的なオピオイド受容体部分アゴニストであり、WHO 方式 3 段階除痛ラダーにおいて第 2 段階の疼痛治療に用いられる。また、ブトルファノールは国内では麻薬指定を受けておらず、向精神薬として扱われている。これまで、ブトルファノールの鎮痛効果は、様々な選択的アンタゴニストを用いた薬理学的実験より、 $\mu$  及び  $\delta$  オピオイド受容体のそれぞれを介して発現していると報告されていたが、各サブタイプの関与に関しては、矛盾する結果も報告されており、詳細は明らかとされていなかった。本研究において、ブトルファノールによる鎮痛効果を、熱的侵害刺激に対する作用を検定する Tail-flick 法ならびに Hot-plate 法、および機械的侵害刺激に対する作用を検定する Hind-paw pressure 法を用いて検討したところ、野生型マウス (C57BL/6J マウス) に皮下投与後、20 分程度で作用のピークに達し、その鎮痛効果は 3 時間以上持続していた (図 1)。また、抗熱的侵害受容作用において、脊髄レベルでの鎮痛を反映すると考えられている Tail-flick 法においては、ブトルファノールは強い鎮痛作用を示したが、より上位中枢で

の鎮痛を反映すると考えられている Hot-plate 法においては有意ではあるものの比較的弱い鎮痛効果しか示さなかった (図 1 a, b)。このことは、全身性に投与した際のブトルファノールの鎮痛作用は、主として脊髄レベルで作用している可能性を示している。

#### a) Hot-plate test (time course)



#### b) Tail-flick test (time course)



#### c) Hind-paw pressure test (time course)

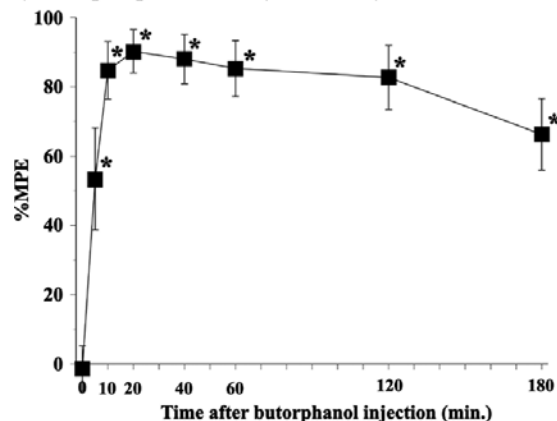


図 1 野生型マウスにおけるブトルファノール (3 mg/kg s.c.) の鎮痛効果の経時変化

a: Hot-plate 法

b: Tail-flick 法

c: Hind-paw pressure 法

\*  $P < 0.05$  vs 投与前 (0 min)

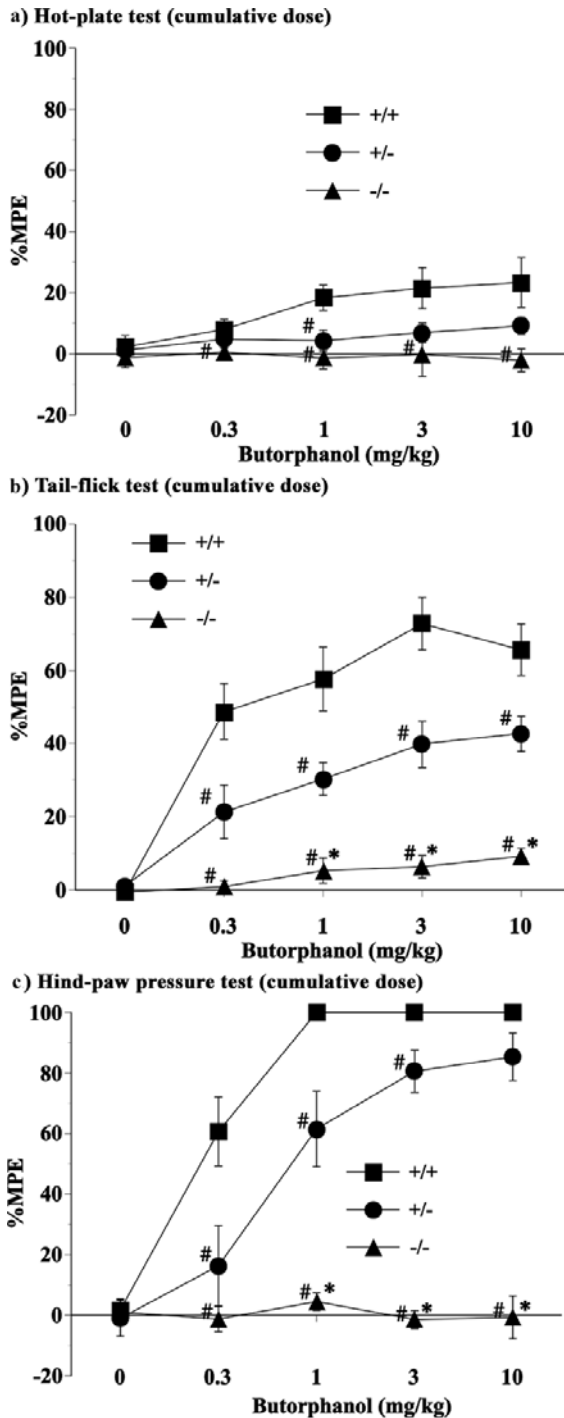


図2 野生型(+/+), ヘテロ型(+/-), ホモ型(-/-)MOR-KO マウスにおけるブトルファノール(s.c.)の鎮痛効果。薬物投与は相加蓄積投与法により投与した。

- a: Hot-plate 法
- b: Tail-flick 法
- c: Hind-paw pressure 法
- # P<0.05 vs 野生型マウス
- \* P<0.05 vs ヘテロ型 MOR-KO マウス

一方、熱的および機械的な侵害刺激に対するブトルファノール鎮痛作用は $\mu$ オピオイド受容体遺伝子量に有意に依存しており、ヘテロ型の MOR-KO マウスでは野生型の約半分程度の鎮痛効果しか示さず、ホモ型 MOR-KO マウスにおいてはほぼ完全に消失していた(図2)。この結果は、同じ麻薬拮抗性鎮痛薬であるブプレノルフィンの、MOR-KO マウスにおける抗熱的侵害受容作用消失を示した以前の報告(Ide et al., (2004) Buprenorphine antinociception is abolished, but naloxone-sensitive reward is retained, in mu-opioid receptor knockout mice. *Neuropsychopharmacology* 29(9): 1656-63)と一致する。これらの結果から、ブトルファノールによる抗熱・抗機械的侵害受容作用では、 $\mu$ オピオイド受容体が中心的な役割を果たしていることが示唆される。また、ブトルファノールやブプレノルフィンと同様の結合特性を示すペンタゾシンなどの他の麻薬拮抗性鎮痛薬も、その鎮痛作用の発現に $\mu$ オピオイド受容体が中心的な役割を果たしている可能性が考えられる。

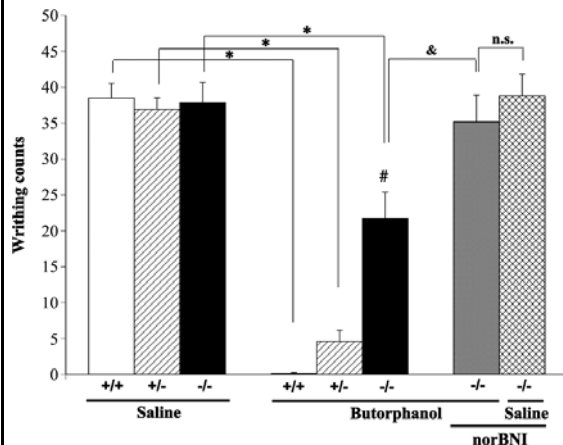


図3 野生型(+/+), ヘテロ型(+/-), ホモ型(-/-)MOR-KO マウスにおけるブトルファノール(s.c.)の化学刺激(内臓痛)に対する鎮痛効果(酢酸ライジング法)

- # P<0.05 vs 野生型マウス
- \* P<0.05 vs コントロール群(生理食塩水処置群)
- & P<0.05 vs ブトルファノール単独処置

次に、ブトルファノールの化学的侵害刺激(内臓痛)に対する鎮痛効果に関して、酢酸ライジング法を用いて検討したところ、MOR-KO マウスにおいては、 $\mu$ オピオイド受容体の遺伝子量に依存した鎮痛効果の有意な減弱は確認されたが、ホモ型 MOR-KO マウスにおいても、依然として有意な鎮痛効果が残存していた(図3)。さらに、このホモ型 MOR-KO マウスにおいて見られるブトルファ

ノールの残存鎮痛効果は、選択的 オピオイド受容体拮抗薬ノルビナルトルフィミン (norBNI) の前処置により、完全に消失した。これらの結果より、 $\mu$ および  $\delta$  の両オピオイド受容体サブタイプがブトルファノールの化学的侵害刺激 (内臓痛) に対する鎮痛効果に關与していることが明らかとなった。今後、異なる化学的侵害刺激であるホルマリンの足底内投与 (体性痛) に対する抗侵害受容作用などを検討することにより、オピオイド受容体を介した化学的侵害刺激に対する鎮痛機構が、その刺激の種類や部位により異なるか否かを明らかにしたい。

### (2) ブトルファノールのオピオイド受容体サブタイプ選択性

ヒトオピオイド受容体各サブタイプを安定的に発現する培養細胞系を用いて、ブトルファノールの受容体各サブタイプに対する結合親和性を、Binding assay により解析したところ、ブトルファノールはいずれの受容体サブタイプに対してもモルヒネより高い結合親和性を示し、特に  $\mu$  ならびに オピオイド受容体に対して高い結合親和性を示した (表 1)。また、フォルスコリン誘発 cAMP 蓄積に対する抑制効果を指標とした cAMP assay によりアゴニスト活性を解析したところ、いずれの受容体サブタイプに対しても部分アゴニストとして作用することが明らかとなった (表 1)。これら in vitro 解析の結果は、ブトルファノールの鎮痛作用が、主として  $\mu$  オピオイド受容体を介しており、一部痛みの種類もしくは部位の違いにより オピオイド受容体も介していることと一致している。

表 1 ブトルファノールのオピオイド受容体サブタイプ選択性とアゴニスト活性

	$\mu$	$\delta$	$\kappa$
<b>Competitive binding assay</b>			
$K_i$ value (nM)			
Butorphanol	5.4 ± 1.6	28.6 ± 8.1	7.3 ± 3.5
Morphine	21.0 ± 3.7	524 ± 83	247 ± 13
<b>cAMP assay</b>			
$IC_{50}$ (nM)			
Butorphanol	7.5 ± 3.9	61.9 ± 38.0	4.2 ± 2.8
Morphine	25.0 ± 9.0	610 ± 220	340 ± 160
$I_{max}$ (%)			
Butorphanol	61.0 ± 9.8	77.3 ± 1.8	70.0 ± 6.5
Morphine	88.0 ± 3.1	83.7 ± 2.7	84.3 ± 3.3

### (3) ペンタゾシンの鎮痛作用機序

塩酸ペンタゾシン (以下、ペンタゾシン。商品名: ソセゴン、ペンタジン) は、ブトルファノールと同様に、WHO 方式 3 段階除痛ラダーにおいて第 2 段階の疼痛治療に用いられ、

国内では麻酔前投与と術後疼痛管理にも用いられ、麻薬指定を受けておらず、向精神薬として扱われている。また、その作用機序は当初、オピオイド受容体に対する作用により鎮痛がもたらされ、 $\mu$  オピオイド受容体に対しては拮抗作用、もしくは弱い作用しか示さないと考えられていた。また、臨床使用されているペンタゾシンはラセミ体であり、(-)-ペンタゾシンがオピオイド受容体に対する活性を有していると考えられているが、その鎮痛作用の詳細なメカニズムに関しては未だ不明瞭な点が多い。そこで、本研究において、(-)-ペンタゾシンによる鎮痛効果を、熱的侵害刺激に対する作用を測定する Tail-flick 法、および機械的侵害刺激に対する作用を測定する Hind-paw pressure 法を用いて検討したところ、これまでに検討した他の麻薬拮抗性鎮痛薬と同様に、ヘテロ型の MOR-KO マウスでは野生型の約半分程度の鎮痛効果しか示さず、ホモ型 MOR-KO マウスにおいてはほぼ完全に消失することが明らかとなった。これらの結果は、ペンタゾシンの鎮痛効果はこれまでに言われてきた オピオイド受容体を介した機構ではなく、 $\mu$  オピオイド受容体を介した機構が主要な役割を担っている場合があることを示唆している。一方、現在解析を進めている化学的侵害刺激 (内臓痛) に対する鎮痛効果に關しても、ペンタゾシンの鎮痛効果はブトルファノールと同様に、一部 オピオイド受容体の関与が考えられるが、 $\mu$  オピオイド受容体の発現量に依存していることを明らかとしつつある。

### (4) ペンタゾシンの報酬効果

ペンタゾシンは、モルヒネと比較し依存性を含めた副作用の発現が弱いとされているが、他の麻薬拮抗性鎮痛薬と比較すると依存性を起こしやすいとも言われている。本研究においては、(-)-ペンタゾシンに關して、精神依存性の指標となる報酬効果の検討を、CPP 法を用いておこなった。その結果、野生型マウスにおいて、(-)-ペンタゾシン (10 mg/kg s.c.) 5 日間の条件付けにより、報酬効果を示す傾向が確認された。一方で、ホモ型の MOR-KO マウスにおいては、ペンタゾシンによる報酬効果は全く観察されなかった。このことは、ペンタゾシンによる報酬効果は、 $\mu$  オピオイド受容体を介して発現しているが、その効果は比較的弱いことを示唆している。

### (5) ペンタゾシンのオピオイド受容体サブタイプ選択性

ヒトオピオイド受容体各サブタイプに対する選択性、並びにアゴニスト活性の検討を行ったところ、ペンタゾシンは  $\mu$  及び オピオイド受容体に対して比較的高い結合親和性を有し、 $\mu$  オピオイド受容体に対しては部

分作動薬として作動しているが、並びにオピオイド受容体に対しては比較的強いアゴニスト作用（モルヒネと同程度の作用）をもつ部分作動薬として作用することが明らかとなった。これら *in vitro* の結果は、ペンタゾシンの鎮痛作用機序は、主として $\mu$ オピオイド受容体を介しており、一部痛みの種類もしくは部位の違いによりオピオイド受容体の関与が考えられるこれまでの *in vivo* の結果と矛盾しないものであった。

#### (6)まとめ

著者らの今回の実験結果とこれまでの知見は、オピオイドによる抗熱・抗機械的侵害受容作用は主に $\mu$ オピオイド受容体を介して発現しているが、内臓痛に対する鎮痛効果は、特にブトルファノールなどの麻薬拮抗性鎮痛薬においては、 $\mu$ だけでなくオピオイド受容体も関与していることを示しており、オピオイドによる鎮痛機序が痛みの種類により一部異なることを示唆している。今後、異なる種類・部位の痛みに対する作用の詳細な解析が行われることで、複雑な様相を呈する臨床での痛みに関する疼痛治療戦略に有用な知見を提供し、より良い疼痛治療に発展していくことが期待される。

#### 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 2 件)

- 1). Ide S., Minami M., Ishihara K., Uhl G.R., Satoh M., Sora I., Ikeda K.  
Abolished thermal and mechanical antinociception but retained visceral chemical antinociception induced by butorphanol in  $\mu$ -opioid receptor knockout mice.  
*Neuropharmacology*, 54: 1182-1188 (2008) (査読有)
- 2). 井手聡一郎, 笠井 慎也, 池田和隆  
医療用麻薬の鎮痛効果の個人差.  
*日本神経精神薬理学雑誌*, 28(1): 43-48 (2008) (被依頼分; 査読無)

[学会発表](計 1 件)

- 1). 井手聡一郎  
 $\mu$ オピオイド受容体遺伝子欠損マウスを用いた麻薬拮抗性鎮痛薬の抗侵害受容作用の評価  
第28回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム  
2007年8月31日、札幌

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

佐藤 公道 (SATOH MASAMICHI)

安田女子大学・薬学部・教授

研究者番号: 80025709

##### (2)研究分担者

池田 和隆 (IKEDA KAZUTAKA)

(財)東京都医学研究機構・東京都精神医学総合研究所・副参事研究員

研究者番号: 60281656

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

研究者番号: 30389118

##### (3)連携研究者

なし