

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 1日現在

機関番号：35408

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21600018

研究課題名（和文） 麻薬拮抗性鎮痛薬の作用機序の網羅的解析

研究課題名（英文） Pharmacological mechanisms in effects of opioid partial agonists

研究代表者

佐藤 公道（SATO MASAMICHI）

安田女子大学・薬学部・教授

研究者番号：80025709

研究成果の概要（和文）：“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である、ブトルファン、ブプレノルフィン、ペンタゾシンならびにトラマドールに関して薬理作用機序を解析し、いずれの薬物の鎮痛効果の発現においても μ オピオイド受容体が主要な役割を果たしていることを明らかとした。

研究成果の概要（英文）： Although opioid partial agonists are widely used for the management of mild to moderate pain in humans and animals, the pharmacological mechanisms of their effects remain unclear. In the present research, we examined the pharmacological effects of butorphanol, buprenorphine, pentazocine and tramadol. We revealed that these opioid partial agonists exert their analgesic and rewarding effects by mainly acting on the μ -opioid receptor.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
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、 μ 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

がんをはじめとする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 段階の疼痛治療に用いられている。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に関しては未だ先進諸国の中でも最低ランクに位置し続けている。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考えられる。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らはこれまでに、ブプレノルフィンに関して *in vitro* ならびに μ オピオイド受容体遺伝子欠損 (MOR-KO) マウスを用いた解析を行い、ブプレノルフィンは μ 、 δ および κ 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 μ オピオイド受容体を介して発現していること、ならびに依存性の指標となる報酬効果は μ だけでなく δ および κ 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、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 μ 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、なら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。さらに、ブトルファノールに関して解析を行い、その抗熱・抗機械的侵害受容作用は μ オピオイド受容体を介して発現しているが、化学的内臓痛に対しては μ だけでなく κ オピオイド受容体も関与してい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 μ 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 μ 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薬理学的特性、ならびに痛みの種類やその強度に応じた鎮痛効果や種々の副作用に関し、未だ不明瞭な点が多く残されたまま使用されているのが現状である。

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、オピオイド拮抗性鎮痛薬であるペンタゾシン、ブトルファノール、ブプレノルフィン、塩酸トラマドールの 4 種の薬物に焦点を絞り、以下の検討を行った。

- ・「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・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
- ・ヒトオピオイド受容体各サブタイプに対する選択性、ならびにアゴニスト活性の評価
- ・ヒトノルエピネフリントランスポーターに対する阻害活性の評価系構築

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。

① 抗熱的侵害受容作用の検討

Hot-plate 法、Tail-flick 法

② 抗機械的侵害受容作用の検討

Paw-pressure 法 (Randall Selitto 法)

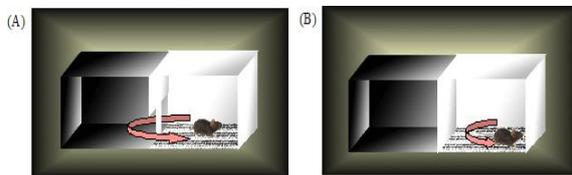
③ 抗化学的侵害受容作用の検討

酢酸ライジング法、ホルマリンテスト

(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、 μ 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。

また、新たにヒトノルエピネフリントランスポート (NET) を安定的に発現する CHO 細胞株を樹立し、ノルエピネフリントランスポートに対する取り込み阻害活性を評価する実験系の構築を行った。

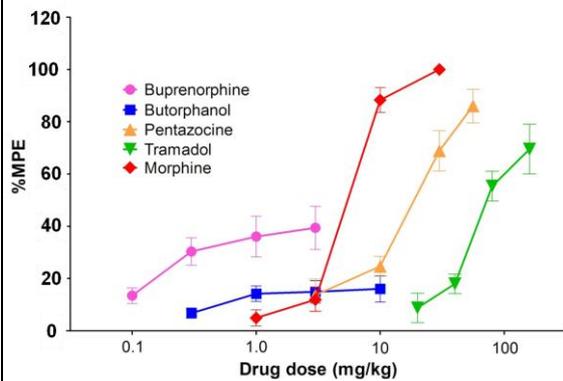
4. 研究成果

(1) 野生型マウスにおける鎮痛効果

まず、野生型マウスにおける麻薬拮抗性鎮痛薬の鎮痛効果を、脊髄レベルでの鎮痛効果を反映すると考えられる tail-flick 法と、より上位中枢レベルでの鎮痛効果を反映すると考えられる hot-plate 法を用いて検討した。その結果、全ての薬物が用量依存的に熱的侵害刺激に対する有意な鎮痛効果を示したが、両鎮痛検定において μ 受容体に対して完全アゴニストとして作用すると考えられるモルヒネが最大で 100% の %MPE 値を示すのに対し、麻薬拮抗性鎮痛薬の効果には薬物間で差が見られ、いずれの %MPE 値も 100% に

満たない値となった (図 1)。また、50% 有効量は、ブプレノルフィンとブトルファノールはほぼ同じ用量で、続いてモルヒネ、ペンタゾシン、トラマドールの順に低用量で鎮痛効果を示した。

(A) Hot-plate test



(B) Tail-flick test

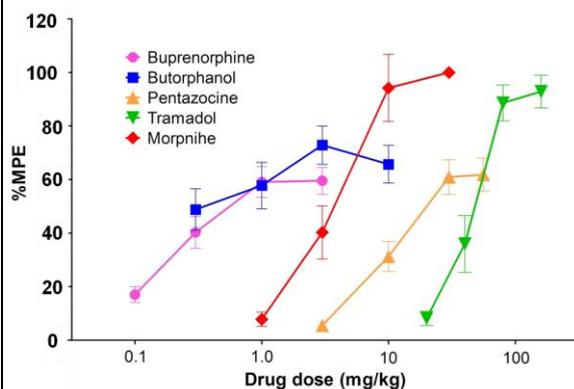


図 1 熱的侵害刺激に対する麻薬拮抗性鎮痛薬の鎮痛効果

薬物投与 (s.c.) 後 20 分の野生型マウスにおける鎮痛効果を %MPE 値によって評価した。

(2) 野生型マウスにおける報酬効果

次に、野生型マウスにおける麻薬拮抗性鎮痛薬の報酬効果を、CPP 法を用いて検討した。CPP score を指標とした解析の結果、薬物間で依存形成には差が見られ、用いた用量においてブプレノルフィンはモルヒネと同程度の有意な依存形成を示した (図 2)。一方、他の麻薬拮抗性鎮痛薬に関しては、ブトルファノールにおいて、若干の依存形成傾向は確認されたものの、有意な効果ではなく、特にトラマドールならびにペンタゾシンに関しては、報酬効果は少なく、依存を形成しにくい薬物であることが示唆された。

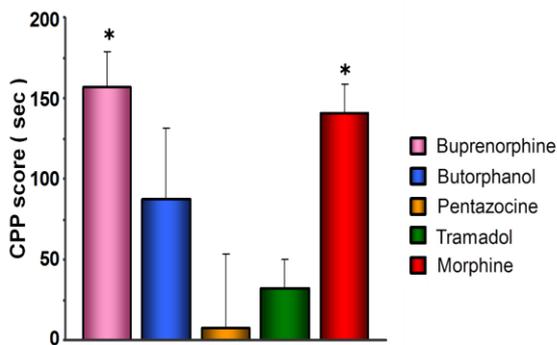


図2 麻薬拮抗性鎮痛薬の報酬効果
各薬物を3日間投与 (s.c.)することによって条件付けを行った条件付け場所嗜好性試験における CPP score。

*p < 0.05 vs. saline 処置群 (paired t-test)

(3) オピオイド受容体各サブタイプに対する活性評価

麻薬拮抗性鎮痛薬のオピオイド受容体各サブタイプにおける親和性を検討するために、ヒト μ 、 δ および κ オピオイド受容体を安定的に発現する細胞株 (MOR/CHO、DOR/CHO 及び KOR/CHO) を用いて binding assay により検討を行った (表1)。モルヒネの δ 、 κ 受容体に対する K_i 値は、 μ 受容体に対する K_i 値のそれぞれ約 25 分の 1 と約 12 分の 1 であり、モルヒネは μ 受容体に対して比較的高い選択性を有していた。また、ブプレノルフィンの δ 、 κ 受容体に対する K_i 値は、 μ 受容体に対する K_i 値のそれぞれ約 12 分の 1 と 9 分の 1 であり、ブプレノルフィンはモルヒネと同程度の μ 受容体結合選択性を示した。一方、ブトルファノールとペンタゾシンは μ 、 κ 受容体に同程度の親和性で結合し、 δ 受容体に対する結合親和性は比較的弱かった。また、トラマドールの μ 受容体に対する K_i 値は主な代謝物である M1 の約 241 分の 1 であり、M1 はトラマドールよりも μ 受容体に対して高い結合親和性を有していた。

表1 麻薬拮抗性鎮痛薬のオピオイド受容体各サブタイプに対する結合親和性

K_i (nM)	μ	δ	κ
Buprenorphine	12.4 ± 3.5	154 ± 27	108 ± 27
Butorphanol	5.4 ± 1.6	28.6 ± 8.1	7.3 ± 3.5
Pentazocine	85.6 ± 13.3	641 ± 88	35.2 ± 2.6
Tramadol	41,424 ± 10,527	>100,000	>100,000
M1	171.8 ± 85.5	20,489 ± 2,968	7,524 ± 353.0
Morphine	21.0 ± 3.7	524 ± 83	247 ± 13

次に、MOR/CHO、DOR/CHO 及び KOR/CHO におけるフォルスコリン誘発 cAMP 蓄積に対する各麻薬拮抗性鎮痛薬の効果を検討した (表2)。

モルヒネはオピオイド受容体の3サブタイプ全てにおいて80%以上の最大抑制効果 (I_{max}) を示し、 μ 受容体に対して完全アゴニストとして、 μ 受容体と比べると比較的結合親和性の低い δ 、 κ 受容体に対しても高い濃度であれば完全アゴニストとして作用していると考えられた。ペンタゾシンは δ 、 κ 受容体に対してモルヒネと同程度の最大抑制効果を示したことからほぼ完全アゴニストとして作用しており、また、 μ 受容体に対しては最大抑制効果がモルヒネよりも弱いことから部分アゴニストとして作用していると考えられた。ブプレノルフィン、ブトルファノールは全ての受容体に対して部分アゴニストとして作用していた。トラマドールに関しては δ 、 κ 受容体にはほとんど作用せず、 μ 受容体に対してのみ部分アゴニスト活性を有していた。

表2 麻薬拮抗性鎮痛薬のオピオイド受容体各サブタイプに対するアゴニスト活性

	μ	δ	κ
IC_{50} (nM)			
Buprenorphine	3.7 ± 0.5	5.5 ± 1.3	20.6 ± 6.4
Butorphanol	7.5 ± 3.9	61.9 ± 38.0	4.2 ± 2.8
Pentazocine	42.8 ± 12.9	255 ± 46	39.6 ± 14.8
Tramadol	11,200 ± 3,900	ND	ND
Morphine	25.0 ± 9.0	610 ± 220	340 ± 160
I_{max} (%)			
Buprenorphine	66.0 ± 4.7	75.7 ± 2.8	57.3 ± 4.1
Butorphanol	61.0 ± 9.8	77.3 ± 1.8	70.0 ± 6.5
Pentazocine	52.8 ± 3.0	89.3 ± 4.3	82.1 ± 3.7
Tramadol	76.4 ± 3.7	ND	ND
Morphine	88.0 ± 3.1	83.7 ± 2.7	84.3 ± 3.3

(4) ノルエピネフリントランスポーター阻害活性の評価

ヒト型 NET を安定的に発現する細胞株 (NET/CHO) を用い、細胞外 NE 取り込みに対する各麻薬拮抗性鎮痛薬の阻害効果を検討するための実験系を構築した。

NET 阻害活性を有することが知られているトラマドールに関して検討を行ったところ、 μ 受容体に対する K_i 値 (41, 424 ± 10, 527 nM) よりも低濃度で NET 阻害作用を示した。一方、モルヒネに関しては 100 μ M の濃度では阻害活性を示さなかった。現在、他の麻薬拮抗性鎮痛薬の NET 阻害活性の解析を進めている。

(5) 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、 κ 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、 μ 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、特に μ オピオイド受容体の関与を検討するために、MOR-KOマウスを用いて、(-)-ペンタゾシンによる鎮痛作用機序の検討を行った。昨年度の研究において、熱的侵害刺激に対する作用を検定するTail-flick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法を用いた検討の結果、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を明らかとしている。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 κ オピオイド受容体を介した機構ではなく、 μ 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。

本年度は、昨年度より開始していた化学的侵害刺激(体性痛・内臓痛)に対する鎮痛効果に関する検討を行った。ホルマリンテストを用いた、化学的侵害刺激(体性痛)に対する抗侵害受容作用の検討では、熱ならびに機械的侵害刺激に対する効果と同様に、その効果は μ オピオイド受容体の発現量に依存しており、ホモ型MOR-KOマウスでは完全に消失していた(図3)。一方、酢酸ライジン

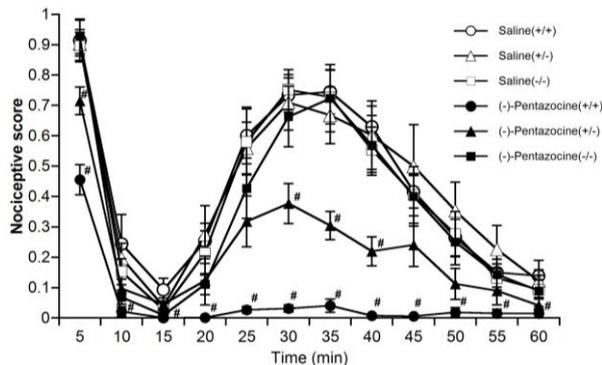


図3 ペンタゾシンの抗化学的侵害受容作用(体性痛)

野生型(+/+),ヘテロ型(+/-),ホモ型(-/-)MOR-KOマウスにおけるペンタゾシン(10 mg/kg, s.c.)の鎮痛効果(ホルマリン試験)。

$p < 0.05$ vs. saline 処置群 (ANOVA with Bonferroni *post hoc* test)

グ試験法による、化学的侵害刺激(内臓痛)に対する抗侵害受容作用の検討では、ブトルファノールにおける検討結果と同様に、MOR-KOマウスにおいては、 μ 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4)。さらに、このホモ型MOR-KOマウスにおいて見られるペンタゾシンの残存鎮痛効果は、選択的 κ 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、 μ および κ 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関与していることが明らかとなった。

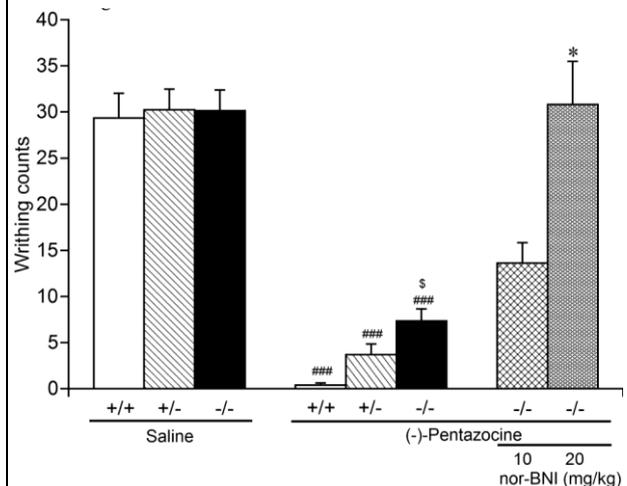


図4 ペンタゾシンの抗化学的侵害受容作用(内臓痛)

野生型(+/+),ヘテロ型(+/-),ホモ型(-/-)MOR-KOマウスにおけるペンタゾシン(10 mg/kg, s.c.)の鎮痛効果(酢酸ライジン試験)。

$p < 0.05$ vs. saline 処置群 (ANOVA with Bonferroni *post hoc* test)

(6) まとめ

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、および抗化学的侵害受容作用は主に μ 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に関しては、特に麻薬拮抗性鎮痛薬においては、 μ だけでなく κ 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。また、熱的抗侵害受容作用の詳細な解析より、麻薬拮抗性鎮痛薬の50%有効量と μ オピオイド受容体に対する結合親和性は有意に相関するが、最大鎮痛効果や他のサブタイプへの結合親和性とは相関性を示さないことを明らかとした。今後、下行性痛覚抑制系路に深く関与するモ

ノアミン神経伝達に対する麻薬拮抗性鎮痛薬の作用を検討すると共に、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

〔雑誌論文〕(計1件)

Ide S., Minami M., Uhl G.R., Satoh M., Sora I., Ikeda K.

(-)-Pentazocine induces visceral chemical antinociception, but not thermal, mechanical, or somatic chemical antinociception, in μ -opioid receptor knockout mice.

Mol. Pain, 7: 23 (2011) (査読有)

doi:10.1186/1744-8069-7-23

〔学会発表〕(計1件)

松川遥、井手聡一郎、片山貴博、南雅文
麻薬拮抗性鎮痛薬の薬理作用機序の検討
医療薬学フォーラム 2011

2011年7月9日、旭川

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 公道 (SATO MASAMICHI)

安田女子大学・薬学部・教授

研究者番号：80025709

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

池田 和隆 (IKEDA KAZUTAKA)

(財)東京都医学総合研究所・参事研究員

研究者番号：60281656