

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 9 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21791441

研究課題名（和文）モルヒネ耐性形成後の $\alpha 2$ 受容体作動薬による鎮痛作用機序の解明研究課題名（英文）Analgesic effects of $\alpha 2$ -adrenoceptor agonist in morphine-tolerant rats.

研究代表者

石井 秀明 (Ishii Hideaki)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：60529775

研究成果の概要（和文）：オピオイドによる耐性の機序は、NMDA 受容体の増強、 μ 受容体の内在化など諸説があるものの未だ解明されていない。本研究では、電気生理学的実験によって、脊髄後角の第 II 層細胞には $\alpha 2A$ 、 $\alpha 2C$ 受容体が存在し鎮痛作用に関与していることが明らかとなった。行動実験において、フェンタニルおよびモルヒネの腹腔内単回投与、および長時間のフェンタニル腹腔内持続投与は、ホットプレートテストによる逃避行動の潜時に影響を及ぼさなかった。さらに、高用量レミフェンタニルの腹腔内持続投与でも逃避行動の潜時の短縮は認められなかった。オピオイドの極端な高用量投与はオピオイド耐性を減弱させる可能性を有することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：It was revealed using whole-cell patch-clamp technique that a selective $\alpha 2$ -adrenoceptor agonist contributed to its antinociceptive action through $\alpha 2A$ - and $\alpha 2C$ -adrenoceptors in the spinal cord. In behavioral experiments, fentanyl was injected 4 times at 15-min intervals. Subsequently, morphine was injected at the end of the fentanyl effects. Withdrawal latencies did not decrease below baseline values in the hot plate test. Withdrawal latencies also remained steadily elevated during continuous high-dose remifentanyl administration. These findings suggest that acute high-dose opioid treatment might prevent the development of opioid tolerance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：疼痛管理学、オピオイド、モルヒネ、耐性、 $\alpha 2$ 受容体作動薬

1. 研究開始当初の背景

痛みは本来、生体を傷害する危険から身を守る為の警告として重要な意味がある。しかしながら、耐え難い疼痛が続くことは決して好ましいことではない。癌は我が国の死因ワ

ースト 3 に入り、終末期癌患者の約 70% が癌性疼痛に苦しんでいる。癌性疼痛は侵襲に対する生体警告系の役割を全く果たしておらず、有害無益であり quality of life を著しく低下させる。1986 年に世界保健機構 (WHO)

は Cancer Pain Relief という癌性疼痛緩和ガイドラインをまとめ、3段階除痛ラダーを提唱し、臨床で広く普及している。その中で第3段階の強オピオイドとしてモルヒネの使用が掲げられており、癌性疼痛の軽減消失に大きく貢献している。しかしながら、モルヒネの慢性投与によって強度のモルヒネ耐性が形成されることが知られている。この著しい耐性形成は癌性疼痛治療における患者、さらには医療従事者がモルヒネの使用を躊躇する原因となりうる。

2. 研究の目的

オピオイド耐性形成後の痛覚伝達機構について、詳細は解明されていない。オピオイド耐性は長期におよぶ癌性疼痛治療の障害になる為、その機序の解明および予防と治療の確立が求められる。

さらに、周術期にも術中および術後鎮痛のためにオピオイドは頻用され、臨床で多大な効果を上げているが、近年、周術期にもオピオイドの鎮痛効果が減弱する可能性があることが報告された。周術期の耐性は、比較的短時間のオピオイド投与によって形成されると報告されているが、それを否定する研究もあり、未だに結論は出ていない。

また、 $\alpha 2$ 受容体作動薬は鎮静薬として臨床使用されているが、耐性を予防または減弱させる効果を有する可能性がある。

本研究では、オピオイドの投与量および投与時間と耐性形成の関係を解明し、 $\alpha 2$ 受容体作動薬の耐性に対する薬理効果について考察する。

3. 研究の方法

動物実験等の実施に関する基本指針を遵守し、動物愛護の観点から麻酔等による苦痛の軽減に努めながら、最少のラットおよびマウスを用いて、人の健康増進のために研究をした。

(1) 電気生理学的実験

① 脊髄スライス標本の作成

週齢5から8週の雄性ラットをウレタン麻酔下に腰仙部脊髄を切りだし、冷却クレブス液中で厚さ約500 μ mの脊髄横断スライス標本を作成した。このスライスをチェンバーに移して、37°Cに加温したクレブス液で灌流した(13~15 ml/min)。

② ホールセルパッチクランプ記録

顕微鏡下にマニピレーターを用いて電極抵抗5~12M Ω のガラス微小電極を目的とする脊髄後角第II層の膠様質細胞に誘導した。

ホールセルパッチクランプ記録にて得られた応答は、Axopatch 200B (Axon

Instruments)により増幅し、コンピューターに記録後、データ解析用ソフトウェア pCLAMP 9 (Axon Instruments)にて解析した。

(2) オピオイド投与による行動実験

週齢8~14週の雄性マウス(C57BL/6)を使用した。マウスは昼夜を12時間サイクルで保ち、室温は24 \pm 2°Cに保ち、水と飼料は自由に摂取できるような環境におかれた。実験は9時から18時に施行した。

① オピオイドの持続投与

オピオイドの鎮痛作用を経時的に測定するために、セボフルラン(1.5% vol/vol)による全身麻酔後にマウスの腹腔内に直径0.6mmカテーテルを2-3cm留置した。精密持続注入器を用いてオピオイドを0.2 ml/hの流速で腹腔内投与した。

セボフルランはマウスを入れたチェンバーに流入し、ガス分析装置によって濃度を測定しながら一定濃度を保つように維持した。自発呼吸を温存しながら呼吸管理した。恒温槽による温水灌流によってマウスの体温低下を防止しながら、直腸温を経時的に測定した。1回の実験で同時に4匹のマウスに全身麻酔を施行し、plantar test (Ugo Basile)を用いて接触型熱刺激に反応する潜時を測定した。

② オピオイドの単回投与

マウスを1週間前からhabituationし、環境に適応させた。オピオイドに鎮痛作用の用量効果を測定するために、腹腔内にオピオイドを単回投与した。1回の投与量は、2.5 ml/kgとした。hot plate test (IITCinc)を用いて52°Cの熱刺激に対する逃避行動の潜時を測定した。カットオフ値は60秒とした。

(3) 統計

鎮痛効果の判定には、percent maximum possible effect (%MPE)を用いた。

$$\%MPE = (\text{処置後測定値} - \text{処置前測定値}) / (\text{cutoff値} - \text{処置前測定値}) \times 100$$

統計学的処理には、GraphPad Prism software version 5.04を使用した。 $P < 0.05$ を有意とした。

4. 研究成果

(1) 電気生理学的応答

切り出したスライス標本を、膜電位-40mV固定下に後角第II層細胞からホールセルパッチ記録を行った。その結果、 $\alpha 2A$ 受容体作動薬オキシメタゾリンと $\alpha 2C$ 受容体作動薬ST-91の灌流投与によって、 $\alpha 2$ 受容体作動薬デクスメドミジンと同様に外向き電流が誘起された。

次に、 $\alpha 2$ 受容体作動薬による外向き電流

に対して $\alpha 2$ 受容体拮抗薬アチパメゾールの抑制効果を解析した。単回投与によるアチパメゾールの拮抗作用は5時間後の外向き電流も抑制した。 $\alpha 2C$ 受容体拮抗薬 JP-1302 および $\alpha 2A$ 受容体拮抗薬 BRL44408 によって同様な抑制が認められた。

後角第II層の細胞には $\alpha 2A$ 、 $\alpha 2C$ 受容体が存在することが明らかになった。デクスメデトミジンは $\alpha 2A$ 、 $\alpha 2C$ 受容体に作用し、カリウムイオンチャネルを介する過分極を引き起こすことで興奮の伝達を抑制し鎮痛効果を現すと考えられる。

(2) オピオイド投与による鎮痛効果

マウスの hot plate および plantar test による熱刺激に対する逃避反応までの潜時を測定した。

① フェンタニルの用量依存性

腹腔内にフェンタニルを単回投与し hot plate による逃避行動を測定したところ、用量依存性に潜時が延長した。カットオフ値 60 秒で、EC50 は 100 μ g/kg であった (n = 17)。

② モルヒネ単回投与による反応

フェンタニルを連続4回投与したフェンタニル群と生食を連続4回投与したコントロール群において、その後のモルヒネ 10 mg/kg を腹腔内投与した時に hot plate の熱刺激による逃避行動の潜時を比較検討した。

フェンタニル群では、フェンタニル 100 μ g/kg を1時間に4回腹腔内投与したところ、潜時は延長し鎮痛効果が認められたが、時間の経過とともに鎮痛効果は減少した。潜時が基準値に回復した後に、モルヒネ 10 mg/kg を腹腔内投与したところ、潜時は再び速やかに延長した。一方で、生食のコントロール群は潜時の延長は認められなかったが、その後のモルヒネ 10 mg/kg を腹腔内投与したところ、速やかに潜時は延長した。生食によるコントロール群とフェンタニル群の間にモルヒネ 10 mg/kg による潜時の延長において有意差を認めなかった。次に、モルヒネ 10 mg/kg の潜時の延長が基準値まで回復後に、フェンタニル 100 μ g/kg を投与したところ再び潜時は延長したが、コントロール群とフェンタニル群に有意差を認めなかった。

③ フェンタニル持続投与による反応

フェンタニル 200 μ g/kg/h を8時間投与した。セボフルラン投与中止後にオピオイドによる挙尾反応が認められた。

フェンタニル持続投与中止後から12時間後に、長時間投与による鎮痛効果への影響を観察した。フェンタニルを 20、40、80、160、320 μ g/kg 投与後の hot plate による熱刺激では、20 % (2/10) のマウスで潜時の延長が

認められなかった。

④ レミフェンタニル持続投与による反応

第1に、レミフェンタニル 240 mg/kg/h を1時間持続投与したところ、投与中に plantar test による熱刺激に対する逃避反応の潜時が短縮することはなかった。さらに、投与中止後1時間経過しても、潜時の短縮は認められなかった。

第2に、レミフェンタニルを 240 mg/kg/h から 120 mg/kg/h に投与量を漸減し、3時間投与したところ、投与中および中止後に潜時が短縮することはなかった。

第3に、レミフェンタニルの投与量を 120 mg/kg/h にて4時間投与したところ、投与中に潜時が短縮することはなかった。投与中止後は、長時間投与したにもかかわらず、速やかにその鎮痛効果は消失し、潜時が短縮することはなかった。

第4に、180 mg/kg/h を3時間投与したところ呼吸循環抑制をきたしたことから、この用量が極量と判断した。

(3) 考察

オピオイドによる耐性の機序は、NMDA 受容体の増強、 μ 受容体の内在化など諸説があるものの未だ解明されていない。ここでは、 $\alpha 2$ 受容体作動薬の耐性治療の可能性およびオピオイド大量投与による反応について考察する。

① $\alpha 2$ 受容体作動薬について

鎮静薬である $\alpha 2$ 受容体作動薬は、脊髄において $\alpha 2$ 受容体のサブタイプである $\alpha 2A$ 、 $\alpha 2C$ 受容体に作用して鎮痛効果を表すことが明らかになった。耐性の形成は、受容体や神経回路レベルでの中枢および末梢性の機序が複雑に絡み合っており成り立つものと考えられるが、 $\alpha 2$ 受容体作動薬が有する鎮痛作用が、モルヒネをはじめとするオピオイドの鎮痛効果を再増強するのかもしれない。耐性機序のひとつに前述したように、 μ 受容体の内在化が提唱されているが、 μ 受容体の機能的減少に $\alpha 2$ 受容体作動薬の関与の可能性も考えられる。

② オピオイド大量投与について

過去の報告では、レミフェンタニルのマウスの投与量は120~240 μ g/kg/h が一般的である。我々の行動実験では、その1000倍である120~240 mg/kg/h の大量投与を施行した。経静脈投与と腹腔内投与という違いのためオピオイドの代謝による影響は否定できないが、その条件の違いを考慮しても、呼吸循環抑制

をきたす程の大量投与であった。

オピオイドを大量に長時間投与した場合、その曝露時間に比例してオピオイド耐性は生じるものと予想された。しかしながら、オピオイドの高用量投与中に鎮痛効果が減弱することはなかった。さらに、投与中止後において、痛覚過敏を生じることはなかった。鎮痛効果は投与時間依存性に減弱することなく、長時間投与でも維持された。すなわち、極端な高用量投与はオピオイド耐性をむしろ減弱させる可能性を有することが示唆された。

最近の電気生理学的研究で、高濃度のレミフェンタニルによって脊髄での長期増強 Long-term potentiation (LTP)が消失するという研究結果が報告された。LTPはオピオイドの痛覚過敏や耐性に関与していると考えられているが、高濃度のオピオイドは痛覚過敏や耐性を形成しにくいという結論に至り、本研究結果はこれを支持するものとなった。しかしながら、高用量投与は呼吸循環抑制などが生じる可能性があるため、その管理に留意する必要がある。

③結語

ヒトと薬剤感受性が異なる動物によって得られた本研究結果が、臨床における耐性の予防および治療に直ちに貢献できるとは限らない。しかしながら、新たな治療の実用化の足がかりとして、緩和医療に寄与できる可能性があると思われる。

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 1 件)

①石井秀明、河野達郎、オピオイドによる痛覚過敏と急性耐性、臨床麻酔、査読無、36 巻、6 号、2012 年

[学会発表] (計 4 件)

①石井秀明、マウスにおける大量レミフェンタニルによる痛覚過敏症の検討、2012 年 6 月 8 日、日本麻酔科学会 第 59 回学術集会、神戸

②石井秀明、マウスにおける熱刺激に対するレミフェンタニルの鎮痛効果、第 18 回日本静脈麻酔学会、2011 年 11 月 26 日、京都

③河野達郎、オピオイドの急性耐性と痛覚過敏 (石井秀明の実験結果を一部使用)、日本麻酔学会- 関東甲信越・東京支部第 51 回合同学術集会 - 教育講演、2011 年 9 月 10 日、千葉

④石井秀明、マウスにおける熱刺激に対する超短時間作用性オピオイドの鎮痛効果、第 73 回新潟麻酔懇話会、2011 年 6 月 4 日、新潟市

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計◇件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 秀明 (Ishii Hideaki)
新潟大学・医歯学総合病院・助教
研究者番号：60529775

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：