

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590738

研究課題名(和文)うつ病・不安モデル動物におけるオピオイド鎮痛薬の作用機序解析

研究課題名(英文)Antinociceptive effects of opioid analgesics in the chronic stress-induced depression model mice

研究代表者

佐藤 公道 (Sato, Masamichi)

京都大学・薬学研究科(研究院)・名誉教授

研究者番号：80025709

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、抑うつ・不安状態における種々のオピオイド鎮痛薬の抗侵害受容作用特性と、その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に関して解析を行った。慢性緩和ストレス負荷により作成したモデルマウスにおいて、モルヒネを処置した際の鎮痛効果に減弱がみられたが、トラマドールの鎮痛効果への影響は見られなかった。さらに、ストレス負荷によるモルヒネの鎮痛効果減弱は、ノルアドレナリントランスポーター阻害薬前処置により回復したが、セロトニントランスポーター阻害薬の前処置による影響は見られなかった。

研究成果の概要(英文)：The influence of unpredictable chronic mild stress (UCMS) on the antinociceptive effects of opioid analgesics remains to be fully investigated. The present study examined the influence of UCMS on the thermal pain sensitivity and antinociceptive effects of opioid analgesics. We also examined the effects of pretreatment with maprotiline (a noradrenaline reuptake inhibitor) and escitalopram (a serotonin reuptake inhibitor) on the antinociceptive action of morphine in mice under an UCMS condition. We demonstrated that the antinociceptive effect of morphine but not tramadol was reduced in mice that had experienced UCMS. The reduced antinociceptive effect of morphine under the UCMS condition was ameliorated by pretreatment with maprotiline but not escitalopram. These results suggest that the reduced antinociceptive effects of morphine under conditions of chronic stress may be ameliorated by activation of the noradrenergic but not the serotonergic system.

研究分野：薬理学

キーワード：疼痛 鎮痛薬 ストレス オピオイド トラマドール モルヒネ SSRI SNRI

1. 研究開始当初の背景

ストレスや痛みにより惹起される不安、抑うつなどの負情動は、生体警告系にとって非常に重要である。しかしながら、これら負情動は、患者の QOL を著しく低下させるだけでなく、特に慢性疼痛下では精神疾患・情動障害の引き金ともなり、また、そのような精神状態が痛みをさらに悪化させるという悪循環を生じさせる。このことは、感覚的側面だけでなく情動的側面をも考慮した疼痛治療の必要性を示唆している。

オピオイド鎮痛薬に関する研究は、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。我々はこれまでに、 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により、 μ オピオイド受容体が、痛みの感覚的側面の制御において主要な役割を担っていることを明らかにすると共に、外因性ストレス負荷に対する生体応答 (HPA-axis 活性化) や、高架式十字迷路試験法における不安様行動ならびに強制水泳試験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としてきた。このため、オピオイド神経系が痛みの感覚的側面だけではなく、情動的側面にも密接に関わっていると考えられ、さらにはオピオイド鎮痛薬の鎮痛作用が情動的側面によって影響を受けることが考えられた。

疫学的調査などから、うつ病患者の 60% 以上が慢性疼痛を併発していることなどが報告されており、抑うつ状態においては疼痛感受性が変化することも知られている。しかしながら、抑うつや不安などの負情動存在下におけるオピオイド鎮痛薬の鎮痛作用や、それら作用へのオピオイドならびにモノアミン神経伝達の関与については、未だ不明瞭な点が多く残されており、特にうつ病や不安障害の患者における疼痛制御において、その機構解明が希求されている。

2. 研究の目的

本研究では、抑うつ・不安状態における種々のオピオイド鎮痛薬の抗侵害受容作用特性と、その分子機構を解明することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 使用動物

実験には 6 週齢の雄性 BALB/c マウス (日本 SLC, 浜松) を使用した。3-4 匹のマウスを 17×35 cm のプラスチックケージで飼育した。室温が 22±1、明暗周期が 12 時間 (明期: 7:00-19:00, 暗期: 19:00-7:00)、さらに摂食・飲水が自由に行える室内環境を維持した。なお、実験は全て「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定 (平成 19 年 4 月 1 日)」および「動物実験に関する日本薬理学会指針」を遵守して行った。

(2) 慢性ストレス負荷

慢性ストレスには、慢性緩和ストレス

(chronic mild stress: CMS) を用いた。CMS には Table.1 で示した 9 種類のストレス、すなわち、飼育ケージを 45° の角度に傾ける、床敷きを濡らす (1 ケージあたり 200 mL の水)、絶食状態、絶水食状態、暗期に明るい環境で飼育する、通常より小さいケージで飼育する (ケージサイズ: 12.5×20 cm)、同居しているペアマウスを入れ替える、明期に暗い環境で飼育する、他のマウスのケージで飼育する、を用いた。これらのストレスの内、1 日 1 種類のストレス負荷を 5 週間継続し、この期間中にストレス負荷を行わない日も設けた。なお、全てのストレス負荷は暗期に切り替わる時刻である 19 時より開始し、動物が予測できないスケジュールで行った (Table.2)。また、対照群としてストレス負荷を行わないマウス (非ストレス負荷群: NS) を同一環境で飼育し、実験に用いた。

Table.1 CMS に用いたストレスの種類

1	ケージを傾ける	14時間
2	濡れた床敷	24時間
3	絶食	24時間
4	絶水食	14時間
5	暗期を明期に変更	24時間
6	過密飼育	24時間
7	同居ペア入れ替え	24時間
8	明期を暗期に変更	24時間
9	ケージ入れ替え	24時間
10	ストレス負荷を行わない	

Table.2 CMS のスケジュール

	1st	2nd	3rd	4th	5th	6th	7th
week 1	1	2	3	5	8	4	7
week 2	9	1	10	11	4	8	2
week 3	3	9	1	7	5	3	2
week 4	9	10	4	5	11	1	3
week 5	7	2	8	5	3	2	7

表内の番号は Table.1 に対応

(3) 鎮痛効果の評価

薬物の鎮痛効果を評価するために熱的侵害刺激を与える試験系である、hot plate 試験を行った。本試験ではマウスを 52±0.5 のプレート上に乗せ、後肢の licking、あるいは jumping といった、熱的侵害刺激からの逃避行動を行うまでの反応潜時を測定した。なお、マウスの組織の損傷を防ぐため、カットオフタイムを 60 秒に設定して実験を行った。CMS 負荷後、morphine (1-10 mg/kg) あるいは tramadol (10-100 mg/kg) を累積投与方法 (cumulative dose) で腹腔内に投与し、hot plate 試験を用いて鎮痛効果を評価した。すなわち、同一のマウスに対して morphine 1, 2, 7 mg/kg を順に投与することで累積用量と

して 1, 3, 10 mg/kg とし、同様に tramadol についても同一のマウスに対して tramadol 10, 20, 70 mg/kg を順に投与することで累積用量として 10, 30, 100 mg/kg とし、それぞれの用量における鎮痛効果を評価した。鎮痛試験は各投与の 30 分後に行い、また、各投与は試験の直後に行った。ノルアドレナリントランスポーター (NET) 阻害薬である maprotiline およびセロトニントランスポーター (SERT) 阻害薬である escitalopram を用いた実験では、morphine 3 mg/kg を投与する 30 分前に maprotiline 3, 10 mg/kg あるいは escitalopram 1, 3 mg/kg のいずれかを腹腔内に投与し、鎮痛検定を行った。

(4) in vitro 解析

研究代表者並びに研究分担者が以前に作成した、ヒトノルエピネフリントランスポーター (NET) を安定的に発現する CHO 細胞株を樹立し、各種オピオイド鎮痛薬のノルエピネフリントランスポーターに対する取り込み阻害活性を評価した。

4. 研究成果

(1) 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 (hNET/CHO) を用い、細胞外 NE 取り込みに対する各種オピオイド鎮痛薬の阻害効果を検討した (Table 3)。

Table.3 hNET による細胞外 NE 取り込みに対する各種オピオイド鎮痛薬の阻害効果

	hNET/CHO
IC ₅₀ (μM)	
Buprenorphine	>100
Butorphanol	32.3
Pentazocine	63.8
Tramadol	2.87
M1	6.48
Morphine	>100
Fentanyl	43.2
Oxycodone	>100

麻薬拮抗性鎮痛薬のうち、buprenorphine は NET 阻害作用を殆ど示さなかったものの、butorphanol ならびに pentazocine は、高濃度(数十 μM)で NET 阻害活性を示した。また、NET 阻害活性を有することが知られている tramadol 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、麻薬性鎮痛薬を用いた検討においては、

morphine ならびに oxycodone に関しては 100 μM の濃度では阻害活性を示さなかった。一方、fentanyl は高濃度(数十 μM)で NET 阻害活性を示した。

(2) 慢性緩和ストレス負荷時におけるオピオイド鎮痛薬の作用変化

NET 阻害活性の結果より、最も阻害活性の高かった tramadol と阻害活性の低い morphine に焦点をあて、CMS 負荷が鎮痛効果に与える影響に関して検討を行った。まず morphine の鎮痛効果に対する影響を検討したところ、hot plate 試験における morphine 投与前の反応潜時は、CMS 負荷群と非ストレス負荷群との間に有意な差は見られず、慢性ストレスを負荷することによる痛みの感受性への影響は確認されなかった (Fig.1A)。一方、CMS 負荷群および非ストレス負荷群の両群において、morphine を投与することで用量依存的な反応潜時の延長と %MPE の増加が見られたが、CMS 負荷群においては morphine 3 mg/kg を投与した際の %MPE が有意に減少しており、鎮痛効果が減弱していることが示された (Fig.1)。

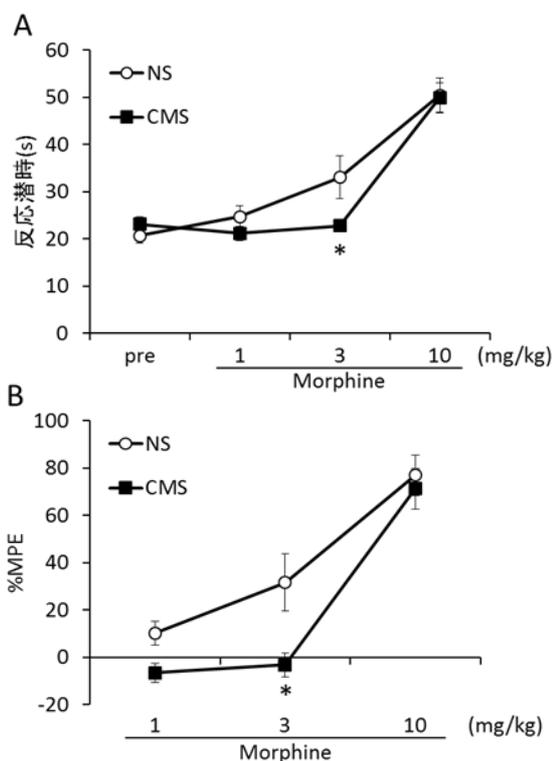


Fig.1 Hot plate 試験における morphine の鎮痛効果に対する慢性ストレスの影響

(A) 反応潜時, (B) %MPE, 白: NS, n = 13, 黒: CMS, n = 15, * P < 0.05 vs. NS

続いて、morphine とは異なる作用機序を有するオピオイド鎮痛薬である tramadol を用いて検討を行った。Hot plate 試験における tramadol 投与前の反応潜時には、CMS 負荷群と非ストレス負荷群との間で有意な変化が

見られなかった (Fig.2A)。また、CMS 負荷群および非ストレス負荷群の両群において用量依存的な %MPE の増加が見られたが、morphine を投与した場合は異なり、tramadol の鎮痛効果に対する CMS 負荷の影響は見られなかった (Fig.2)。

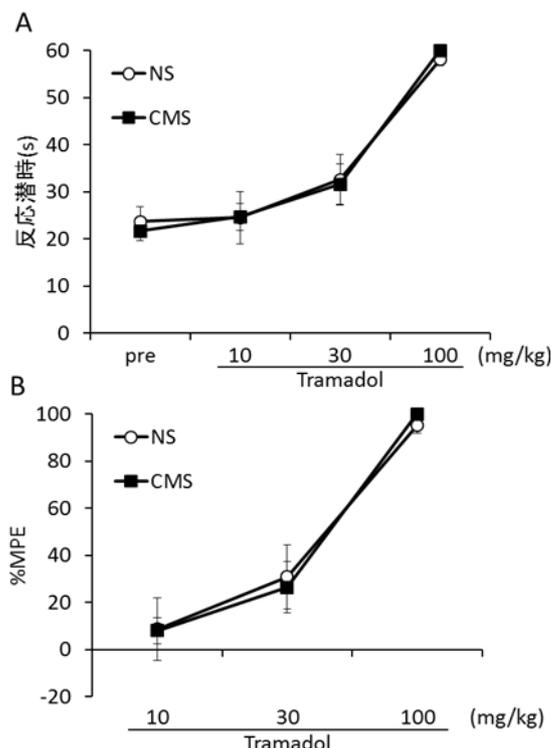


Fig.2 Hot plate 試験における Tramadol の鎮痛効果に対する慢性ストレスの影響 (A) 反応潜時, (B) %MPE, 白: NS, n = 8, 黒: CMS, n = 8

(3) Morphine の鎮痛効果減弱に対するノルアドレナリン (NET) 阻害薬、セロトニン (SERT) 阻害薬の影響

CMS 負荷群において morphine の鎮痛効果が減弱したことに對し、tramadol の鎮痛効果には影響が見られなかった原因として tramadol が有する NET 阻害作用あるいは SERT 阻害作用が関与している可能性が考えられた。そこで、NET 阻害薬である maprotiline あるいは SERT 阻害薬である escitalopram を morphine 3 mg/kg 投与の 30 分前に腹腔内に投与し、hot plate 試験における CMS 負荷時の morphine 鎮痛効果減弱に対する影響を検討した。

CMS 負荷群および非ストレス負荷群において、maprotiline (3, 10 mg/kg) の単独投与後に hot plate 試験を行った結果、どちらの群においても %MPE の値に変化は見られなかったことから、maprotiline 単独投与は本研究において検討した用量では鎮痛効果を示さないことが確認された (Fig.3A)。Vehicle 投与群においては先程の結果と同様に、CMS

を負荷することによって morphine 3 mg/kg の %MPE が減少した。一方、maprotiline 10 mg/kg を前処置することで CMS 負荷群における morphine 3 mg/kg の %MPE が有意に増加し、非ストレス負荷群のものと同程度の鎮痛効果を示した (Fig.3B)。Maprotiline 3 mg/kg の前処置によっては、vehicle 投与群と比較し変化は見られなかった。

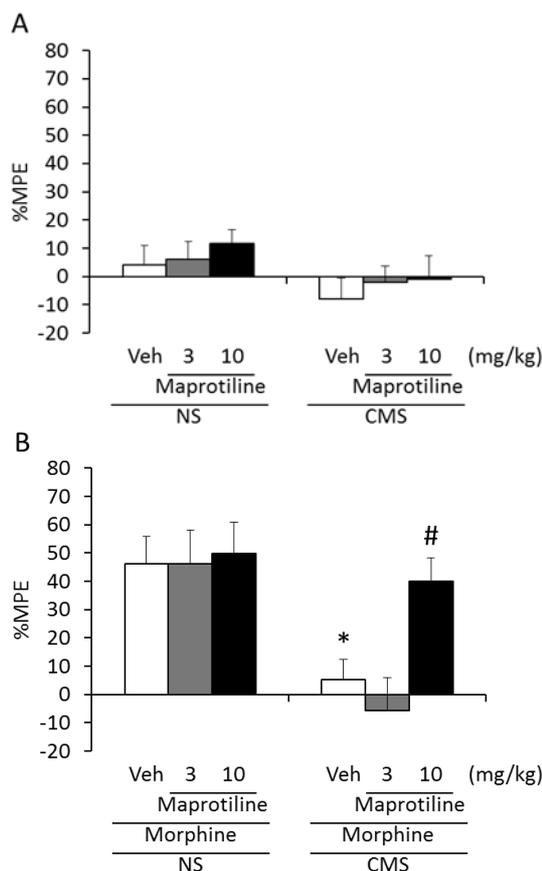


Fig.3 maprotiline が morphine の鎮痛効果に与える影響

(A) Maprotiline 単独投与時の鎮痛効果, (B) Maprotiline を前処置した際の morphine の鎮痛効果, NS (白: Vehicle 投与群 (Veh), n = 12, 灰: maprotiline 3 mg/kg 投与群, n = 12, 黒: maprotiline 10 mg/kg 投与群, n = 14), CMS (白: Veh, n = 14, 灰: maprotiline 3 mg/kg 投与群, n = 12, 黒: maprotiline 10 mg/kg 投与群, n = 14), * $P < 0.05$ vs. NS-Morphine-Veh, # $P < 0.05$ vs. CMS-Morphine-Veh

Escitalopram (1, 3 mg/kg) の単独投与は CMS 負荷群および非ストレス負荷群の両群において %MPE に影響を与えなかった (Fig.4A)。また、vehicle 投与群においては CMS を負荷することで morphine 3 mg/kg の %MPE が減少したが、escitalopram を前処置することによる影響は、1, 3 mg/kg のいずれの用量においても見られなかった (Fig.4B)。

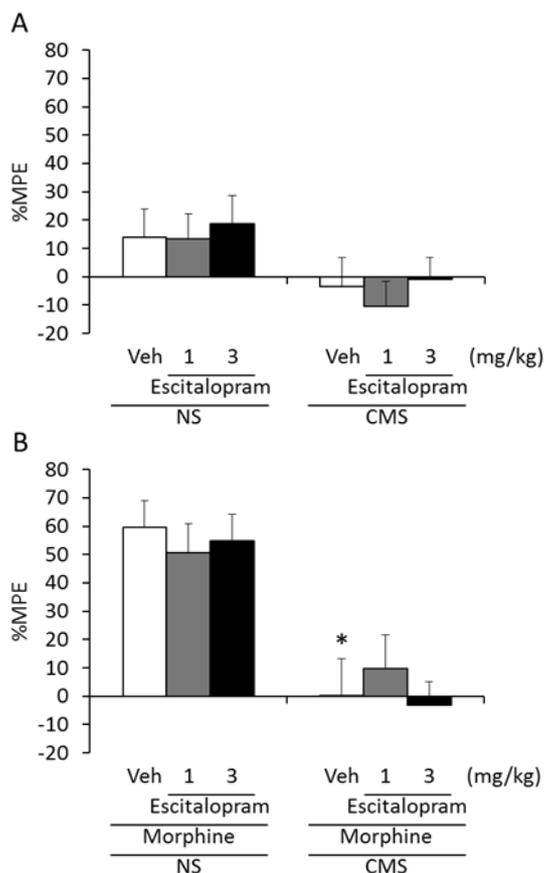


Fig.14 Hot plate 試験において escitalopram が morphine の鎮痛効果に与える影響 (A) Escitalopram 単独投与時の鎮痛効果, (B) Escitalopram を前処置した際の morphine の鎮痛効果, NS (白: Vehicle 投与群 (Veh), n = 11, 灰: escitalopram 1 mg/kg 投与群, n = 12, 黒: escitalopram 3 mg/kg 投与群, n = 10), CMS (白: Veh, n = 12, 灰: escitalopram 1 mg/kg 投与群, n = 11, 黒: escitalopram 3 mg/kg 投与群, n = 9), * $P < 0.05$ vs. NS-Morphine-Veh

(6) まとめ

研究の結果、CMS を負荷することにより、morphine の鎮痛効果が減弱すること、ならびに、tramadol の鎮痛効果には影響が見られないことを示した。Morphine の主な作用点は μ オピオイド受容体である。一方、tramadol は μ オピオイド受容体への作用に加え、NET 阻害作用および SERT 阻害作用を併せ持つことが報告されている。そのため、tramadol が有する NET あるいは SERT 阻害作用が CMS 負荷による鎮痛効果減弱に対して有効であると考え、NET 阻害薬である maprotiline ならびに SERT 阻害薬である escitalopram を前処置した際の morphine の鎮痛効果について検討を行った。その結果、escitalopram の前処置は CMS 負荷による morphine の鎮痛効果減弱に影響を及ぼさなかったが、maprotiline を前処置することによって CMS 負荷群における morphine の鎮痛効果が非ストレス負荷群における効果と同程度にまで回復した。ノルア

ドレナリン神経の主要な起始核である青斑核はストレス応答や痛みの制御に関わる脳領域であることが知られており、CMS を負荷することにより青斑核内の神経細胞の活動が低下することや、青斑核の破壊により morphine の鎮痛効果が減弱することが報告されている。これらの報告から、慢性ストレスにより青斑核の機能が低下し、ノルアドレナリン神経伝達の機能が低下することにより morphine の鎮痛効果が減弱することが考えられる。

さらに、痛みはそれ自体がストレスであると考えられており、慢性疼痛の一つである神経障害性疼痛のモデル動物において、青斑核のノルアドレナリン伝達機能が低下していることが報告されている。また、臨床において神経障害性疼痛は morphine をはじめとするオピオイドによる治療が奏功しない痛みであることが知られており、これらの報告からも、青斑核ノルアドレナリン神経伝達機能の低下が morphine の鎮痛効果減弱に対して重要な役割を担っていると考えられる。そのため、神経障害性疼痛をはじめとするオピオイド抵抗性の慢性疼痛を発症している患者に対して、オピオイドと NET 阻害作用を有する鎮痛補助薬との併用、あるいは μ オピオイドアゴニスト活性と NET 阻害活性の両者を有する鎮痛薬を用いることで有効な治療効果を得ることができると考えられる。

5. 主な発表論文等

[学会発表](計4件)

1. 里吉寛、井手聡一郎、佐藤公道、南雅文
オピオイド鎮痛薬鎮痛効果への慢性ストレスの影響

第24回日本臨床精神神経薬理学会・第44回日本神経精神薬理学会 合同年会
2014/11/20-22, 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

2. 里吉寛、井手聡一郎、佐藤公道、南雅文
オピオイド鎮痛薬鎮痛効果への慢性ストレスの影響

JNRC2014

2014/9/4-6, 東京都医学総合研究所(東京都・世田谷区)

3. 井手聡一郎、佐藤公道、南雅文
麻薬拮抗性鎮痛薬の鎮痛作用機序

第87回日本薬理学会年会

2014/3/19-21, 仙台国際センター(宮城県・仙台市)

4. 里吉寛、井手聡一郎、佐藤公道、南雅文
抑うつ状態におけるオピオイド鎮痛薬の作用変化に関する検討

次世代を担う創薬・医療薬理 シンポジウム 2013

2013/8/31, 熊本大学(熊本県・熊本市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 公道 (SATOH MASAMICHI)

京都大学・名誉教授

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