

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850206

研究課題名(和文)オピオイド受容体の分布と構造が犬と猫における作用の種差におよぼす影響

研究課題名(英文)Influence of the distribution and the structure of opioid receptor on species difference in opioid effect between dogs and cats

研究代表者

鎌田 正利(KAMATA, Masatoshi)

東京大学・農学生命科学研究科・特任助教

研究者番号：50646411

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：犬と猫でオピオイドの鎮痛作用や副作用に種差が生じる要因を明らかにするため、中枢神経系におけるオピオイド受容体の分布に着目し、受容体の分布領域や受容体のmRNA発現量を比較した。脳や脊髄において犬と猫ではオピオイド受容体の分布領域に大きな違いは認められないものの、視床、中脳水道周囲灰白質、脊髄背根神経節などの領域でオピオイド受容体のmRNA発現量に違いが認められた。これらの領域は鎮痛作用に重要な役割を果たすため、犬と猫で中枢神経におけるオピオイド受容体の発現量が異なることが作用の種差に関連することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the distribution pattern and mRNA expression level of opioid receptor (μ and κ) in the central nervous system in dogs and cats to study the mechanism that causes the species difference in opioid effects between dogs and cats. We found that the distribution pattern of opioid receptor (μ and κ) in the central nervous system is not different between dogs and cats. But relative mRNA expression level of opioid receptor (μ and κ) is much different in some areas such as thalamus, periaqueductal gray matter (PAG) and dorsal root ganglion (DRG). Since PAG and DRG play very important roles in pain perception and analgesia, the difference in mRNA expression level of opioid receptor in these area may have a relation to the species difference of opioid effects between dogs and cats.

研究分野：小動物麻酔学

キーワード：オピオイド受容体 中枢神経 mRNA発現量 分布 種差

1. 研究開始当初の背景

(1) オピオイドはオピオイド受容体に作用して強力な鎮痛作用を発揮し、医学領域では様々な疼痛管理の中心薬として広く使用されている。オピオイド受容体のサブタイプの一つであるμオピオイド受容体に作用するモルヒネやフェンタニルは、鎮痛薬として獣医学療域においても犬猫の疼痛管理に使用されている。しかしながら、オピオイドの作用および副作用には犬と猫で種差があるため、有効な鎮痛薬であるもののほかの鎮痛薬と比較して使用されることは多くない。研究者らは猫では犬よりもフェンタニルの鎮痛作用が弱く、大量投与すると活動性の上昇などの副作用が生じやすくなることを明らかにしている。犬と猫で種差の生じる機構を解明することでオピオイドをより適切に使用することが可能となれば、犬猫の疼痛管理の向上につながることを期待できる。

(2) 犬と猫ではオピオイドの薬物動態が異なることが明らかとなっているが、鎮痛作用や副作用に種差が生じる機構は十分に解明されていなかった。

(3) オピオイドの作用に種差がある動物には犬と猫以外にも様々な動物種が存在するが、中枢神経系におけるオピオイド受容体の分布や受容体のサブタイプの発現量が異なることが知られている。

2. 研究の目的

オピオイドの作用部位である中枢神経系（能および脊髄）におけるオピオイド受容体の分布や受容体の構造の特徴を調べ、オピオイドの作用に犬と猫で種差が生じる機序との関連を検討する。

3. 研究の方法

犬と猫における中枢神経系におけるオピオイド受容体の分布の特徴を以下の方法により調べて比較した。

(1) 免疫組織化学染色法を用い、μオピオイド受容体およびオピオイド受容体の局在の比較を行った。免疫組織化学染色法は以下の方法で行った。

使用した一次抗体

μオピオイド受容体: AB5511 (Chemicon Int. USA)、ラットμ受容体 C 末端)

オピオイド受容体 : ab113533 (abcam plc, UK、ヒト 受容体 C 末端)

犬および猫の献体から脳を採取し、ホルマリン固定した後、視交叉を起点として 4mm 幅で冠状断に切片を作成。パラフィン包埋処理し、連続切片を作成。

脱パラフィン後、120、10 分のオートクレーブ処理により抗原賦活化。

0.3%過酸化水素に 10 分間浸漬してブロッキングを行い、goat serum を添加し室温にて 1 時間静置。

一次抗体反応は 4 にて over night。二次抗体反応は anti-rabbit 抗体を室温にて 30

分添加。

) 発色は DAB で行い、対比染色としてヘマトキシリンにて核を染色。

(2) RT-PCR 法を用い、μオピオイド受容体およびオピオイド受容体の mRNA 発現レベルの比較を行った。

) RT-PCR に用いるプライマーは公開されているオピオイド受容体の予測遺伝子配列を基に作成した。

動物	mRNA	プライマー	Sequence (5'-3')
犬	μ 受容体	forward	CGGAAACTTCCTGGTC ATGTATG
		reverse	GCCAGGGTACTGGTTG CTAA
	受容体	forward	AACTCCCTGGTCATGT TCGTG
		reverse	GGAAGGGCATGGTTGT AGTAAC
猫	μ 受容体	forward	ATGTTTCATGGCAACAA CGAAG
		reverse	TTTTCCCAGTACCAGG TTGG
	受容体	forward	AGTCAGGGAAGACGTG GATGTCATC
		reverse	AATGAGGACAGGGATC ACGAAGG

) 犬および猫の献体から大脳皮質、尾状核、視床、海馬、中脳、橋、延髄、脊髄、脊髄、背側神経節を採取し、RNA later を加え -80 にて保存。

) Trizol に加えた各組織 10~30 mg を用手にてホモジェナイズし、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA の抽出。抽出した RNA は Nanodrop を用いて濃度を測定し、-80 にて保存。

) 抽出した RNA から ReverTra Ace (東洋紡) を用いて cDNA を作成。作成した cDNA は -20 にて保存。

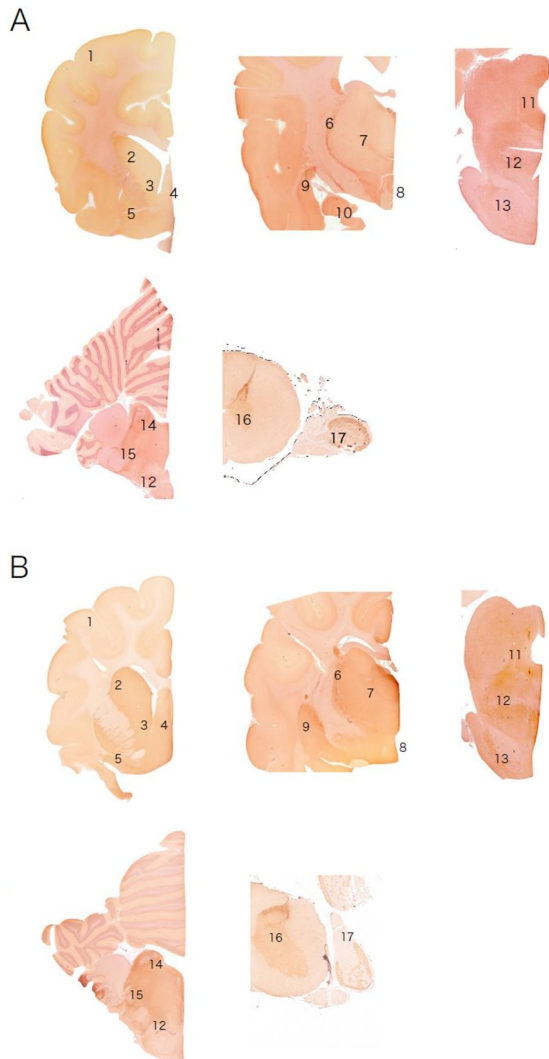
) THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix および作成した特異的プライマーを用いて cDNA を調整し、Applied Biosystem StepOnePlus にて測定。

反応条件は初期変性 95 60 秒、PCR (40 サイクル) 変性 95 15 秒、アニーリング 62 15 秒、伸長 72 30 秒、融解曲線分析の順で行った。

mRNA 濃度は GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) に対する相対定量にて評価。

4. 研究成果

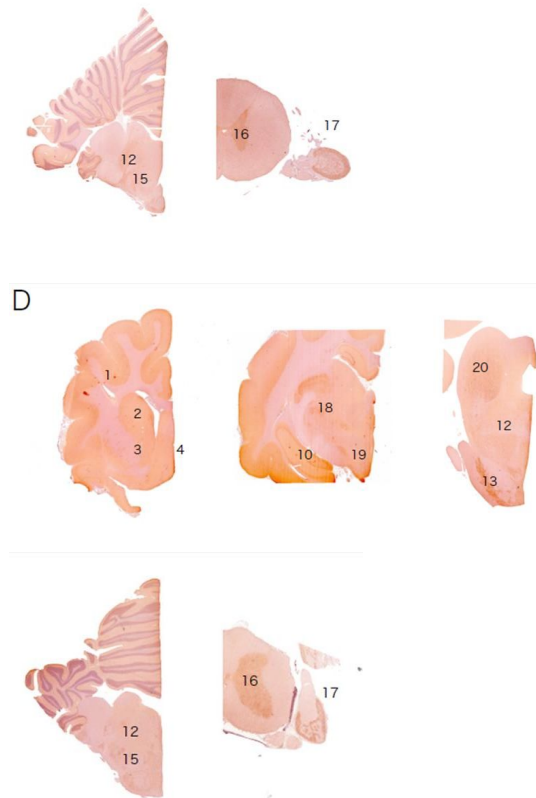
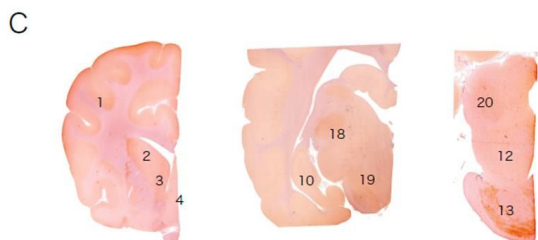
(1) 犬と猫の中枢神経系においてオピオイド受容体の局在を調べたところ、μオピオイド受容体は大脳皮質、尾状核、視床核、海馬、視床下部、中脳周囲水道灰白質、橋、青斑核、脊髄背根神経節など中枢神経系の広範な領域において陽性像が得られ、その分布領域に犬と猫で大きな違いは認められなかった (図 1)。



1. 大脳皮質 2. 尾状核 3. 側坐核 4. 中隔核
 5. 淡蒼球 6. 網様核 7. 視床核 8. 視床下部
 9. 扁桃核 10. 海馬 11. 中脳水道周囲灰白質
 12. 網様体 13. 橋 14. 青斑核 15. 三叉神経核
 16. 脊髄灰白質 17. 脊髄背根神経節

図 1. 免疫組織化学染色法を用いた中枢神経系における μ オピオイド受容体の局在の比較。犬 (A) と猫 (B) ではオピオイド受容体の分布に差は認められなかった。

(2) オピオイド受容体は大脳皮質、尾状核、黒質、橋核、脊髄背根神経節など広範な領域で陽性像が得られ、 μ オピオイド受容体と同様に分布領域に犬と猫で大きな違いは認められなかった (図 2)。



1. 大脳皮質 2. 尾状核 3. 側坐核 4. 中隔核
 5. 淡蒼球 6. 網様核 7. 視床核 8. 視床下部
 9. 扁桃核 10. 海馬 11. 中脳水道周囲灰白質
 12. 網様体 13. 橋 14. 青斑核 15. 三叉神経核
 16. 脊髄灰白質 17. 脊髄背根神経節
 18. 膝状核 19. 黒質 20. 下丘核

図 2. 免疫組織化学染色法を用いた中枢神経系における オピオイド受容体の局在の比較。犬 (C) と猫 (D) ではオピオイド受容体の分布に差は認められなかった。

(3) 犬と猫の中枢神経系におけるオピオイド受容体 (μ , δ) の mRNA 発現量を調べたところ、犬と猫で mRNA 発現量に有意な差がある領域が認められた。 μ 受容体の mRNA 発現レベルは、視床において猫の方が多く、視床下部、延髄および脊髄背根神経節では犬の方が有意に多かった (図 3)。

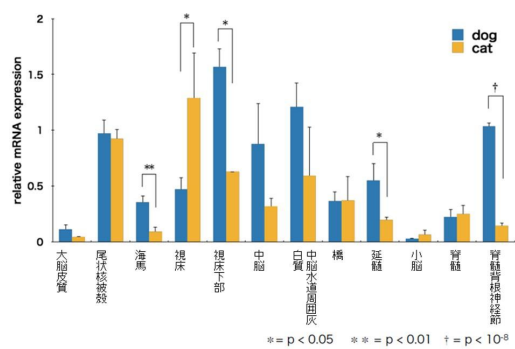


図3.中枢神経における μ 受容体の mRNA 発現レベルの比較(青:犬、橙:猫)。視床、視床下部、延髄、脊髄背根神経節において犬と猫で有意な差が認められた。

(4) 受容体の mRNA 発現レベルは、尾状核、視床、視床下部、中脳、中脳水道周囲灰白質、橋、延髄、小脳、脊髄、脊髄背根神経節において猫の方が多かった(図4)。

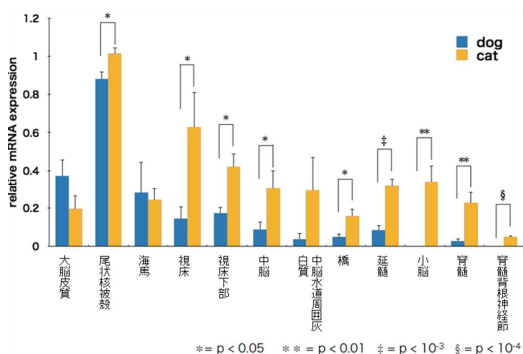


図4.中枢神経における μ 受容体の mRNA 発現レベルの比較(青:犬、橙:猫)。尾状核、視床、視床下部、中脳、中脳水道周囲灰白質、橋、延髄、小脳、脊髄、脊髄背根神経節において犬と猫で有意な差が認められた。

(4) オピオイドの鎮痛作用や副作用に犬と猫では種差があることは明らかにされているが、作用に種差が生じる要因は不明であった。作用の種差は、小動物臨床においてオピオイドの適切な使用ならびに良好な疼痛管理の妨げとなっていた。本研究により、犬と猫ではオピオイドの作用部位である中枢神経系におけるオピオイド受容体の分布に大きな違い認められないものの、脊髄背根神経節や中脳水道周囲灰白質などいくつかの領域においてオピオイド受容体の mRNA 発現レベルが大きく異なることが明らかとなった。脊髄背根神経節は疼痛刺激の伝達経路として重要な領域であり、中脳水道周囲灰白質は内因性の鎮痛機構の発現に重要な領域である。これらの領域における μ オピオイド受容体の mRNA 発現量が猫では犬よりも少ないことは、犬と猫において μ オピオイド受容体作動性のフェンタニルやモルヒネの鎮痛作用が猫では犬よりも弱いことと関連している可能性を示唆するものであると考えられる。一方、中枢神経系におけるオピオイド受容体の mRNA 発現量は猫の方が犬よりも多い領域が存在し、これらの領域には脊髄背根神経節、中脳水道周囲灰白質など鎮痛作用に関与する領域が含まれているため、猫ではオピオイド受容体に作用するオピオイドが鎮痛薬としてフェンタニルやモルヒネなどの μ 受容体に作用するオピオイドよりも効果的である可能性も示唆される。オピオイドの作用機序や動物間の種差を詳細に知ること、副作用の少ないより適切な鎮痛方法を選択

し、小動物臨床における疼痛管理を向上させることが期待できる。今後、mRNA 発現量の違いが生じている部位における機能的な解析を行うことにより、オピオイドの作用に種差が生じる要因をより詳細に検討することが可能になると考えられる。

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 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 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 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
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

鎌田 正利 (KAMATA, Masatoshi)
東京大学・農学生命科学研究科・特任助教
研究者番号: 50646411

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: