

multiplex PCR による modified MPEX 法の最適化

分担研究者：古閑 比佐志

研究協力者：柳川 俊英

（財団法人 かずさDNA研究所 ヒトゲノム研究部 ゲノム医学研究室）

【研究要旨】

平成 18 年度においては、MPEX(Multiple Primer Extension)法を改良することでコストパフォーマンスの高いハイスループットな遺伝子多型検出法を確立し、 μ オピオイド受容体 1 (μ OR1) の複数の多型領域に適応してその検証を行った。この手法により、卓上の家庭用スキャナーがあれば、誰でもどこでも SNPs を検出可能な系が構築された。

MPEX 法は住友ベークライト株式会社の plastic 基盤である S-BIO に SNPs 特異的オリゴを固相化し、基板上で伸長反応を行わせるというものである。本来は基板上で増幅反応も行なえるよう開発されたが、我々の方法では基盤上にサンプルをアプライする前に、別プレートで PCR により増幅反応を行なっている(modified MPEX 法)。この手法では、96 well plate の 1 well に μ OR1 の LD block を代表すると考えられる 4 つの SNPs (A118G, G691C, G5953A, A2109G) に対応するオリゴ全てを固相化し解析を行なっているが、増幅反応はそれぞれの SNPs に対して別々に行なっていた。このことは操作を煩雑にさせ、またコストパフォーマンスの面からも、改善の余地があった。そこで本年度は、 μ OR1 の 5 つの SNPs を multiplex PCR を用いて一度に前処理する系での解析が可能かどうか検討した。最終的に、SNPs 判定が正しかったかは前年度までにダイレクトシーケンシングや一分子蛍光法、MPEX 法で判定した結果と照合し、その検証を行なった。

その結果、精度において改良の余地はあるが、multiplex PCR の適応はほぼ成功した。このことに加え、昨年度は各 PCR 反応を 50 μ l の系で行なっており計 200 μ l の PCR 産物が必要であったが、本最適化により全量 20 μ l で足りるようになった。このことはコストパフォーマンスの観点からも強調できる成果である。

A. 研究目的

最終目標であるテーラーメイド疼痛治療を可能とする遺伝子検査キットの開発に先立ち、コストパフォーマンスの高いハイス

ループットな遺伝子多型検出法を開発することを目的とする。

B. 研究方法

平成 18 年度においては、MPEX(Multiple Primer Extension)法を改良することでコストパフォーマンスの高いハイスループットな遺伝子多型検出法を確立し、 μ オピオイド受容体 1 (μ OR1) の複数の多型領域に適応してその検証を行った。この手法により、卓上の家庭用スキャナーがあれば、誰でもどこでも SNPs を検出可能な系が構築された。

MPEX 法は住友ベークライト株式会社の plastic 基盤である S-BIO に SNPs 特異的オリゴを固相化し、基板上で伸長反応を行わせるというものである。本来は基板上で増幅反応も行なえるよう開発されたが、我々の方法では基盤上にサンプルをアプライする前に、別プレートで PCR により増幅反応を行なっている (modified MPEX 法)。この手法では、96 well plate の 1 well に μ OR1 の LD block を代表すると考えられる 4 つの SNPs (A118G, G691C, G5953A, A2109G) に対応するオリゴ全てを固相化し解析を行なっているが、増幅反応はそれぞれの SNPs に対して別々に行なっていた。このことは操作を煩雑にさせ、またコストパフォーマンスの面からも、改善の余地があった。そこで本年度は、 μ OR1 の 4 つの SNPs を multiplex PCR を用いて一度に前処理する系での解析が可能かどうか検討した。最終的に、SNPs 判定が正しかったかは前年度までにダイレクトシーケンスや一分子蛍光法、MPEX 法で判定した結果と照合し、その検証を行なった。

C. 研究結果

multiplex PCR における検討条件としては 1)

1) 鋳型の濃度、2) polymerase の種類、3) Primer 濃度、4) PCR 条件 (温度、サイクル数等)、5) PCR 後の処理(残存 primer の除去条件等)などの各条件に関して最適な組み合わせを選択できるよう実験を計画した。MPEX 反応後の操作は、昨年度確立した方法に準拠して、7 X 7 mm grid area 中に forward 及び reverse の両鎖を固相化したモジュール (96 well フォーマット) で行なった。

multiplex PCR のための上記 1-5)の検討課題では最終的に次のような条件が適切であるとの結果を得た。1) 鋳型の濃度:0.5-19.75 ng の範囲においては濃度に依存しない系を確立、2) polymerase : Multiplex PCR Mix (タカラバイオ株式会社)が最適、3) Primer 濃度 : 最終濃度が G5953A, A2109G(1.0 μ M)、C691G, A118G (0.2 μ M)、4) PCR 条件 (温度、サイクル数等) : サーマルサイクラー (TaKaRa PCR Thermal Cycle Dice Model TP600)で行い、反応ステップは Step1: 94°C 60秒, Step 2 : 94°C 30秒 ,54.0°C 90秒, 72°C 90秒 Step 2 は 40 サイクル Step 3 : 72°C 10分 で PCR 反応を行う。5) PCR 後の処理(残存 primer の除去条件等): 昨年度と同様、PCR 産物精製キット (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System) を使用して精製を行なうが、80%エタノールでの洗浄操作を加えることで primer の除去をより効果的にした。実際の PCR 産物のアガロースゲル上での泳動像を図 1 に示すが、均等な増幅が multiplex に行なわれているのがわかる。SNPs 判定結果に関しては、図 2、表 1 に示すごとく個別増幅に比較して、残念ながらその精度はやや落ちるようである。最も大きな原因は増幅不良で、サンプル名 TIM039 や TIM059 の一部では判定が困難であった。

これらのものは図1のPCR産物も他と比較して量が少ない。これらのものに関して個別には十分増幅できることから、最終的な

キット化においてはPrimerのデザインの時点まで立ち返って、multiplex PCRの条件を詰める必要があることも明らかとなった。

図1. multiplex PCRの産物の2% agarose gel上での泳動像：PCR反応が終わった産物を2 μ l (1/10 vol.)使いアガロースゲル電気泳動で確認を行なった。アガロースゲルは2%のゲルを使用し、100Vで30-40分泳動後、エチジウムブロマイドで30分染色をして、トランスイルミネーター上で検出した。

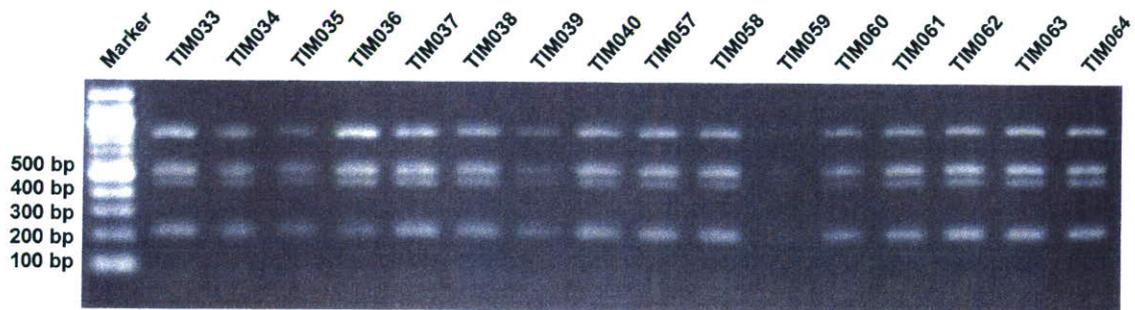
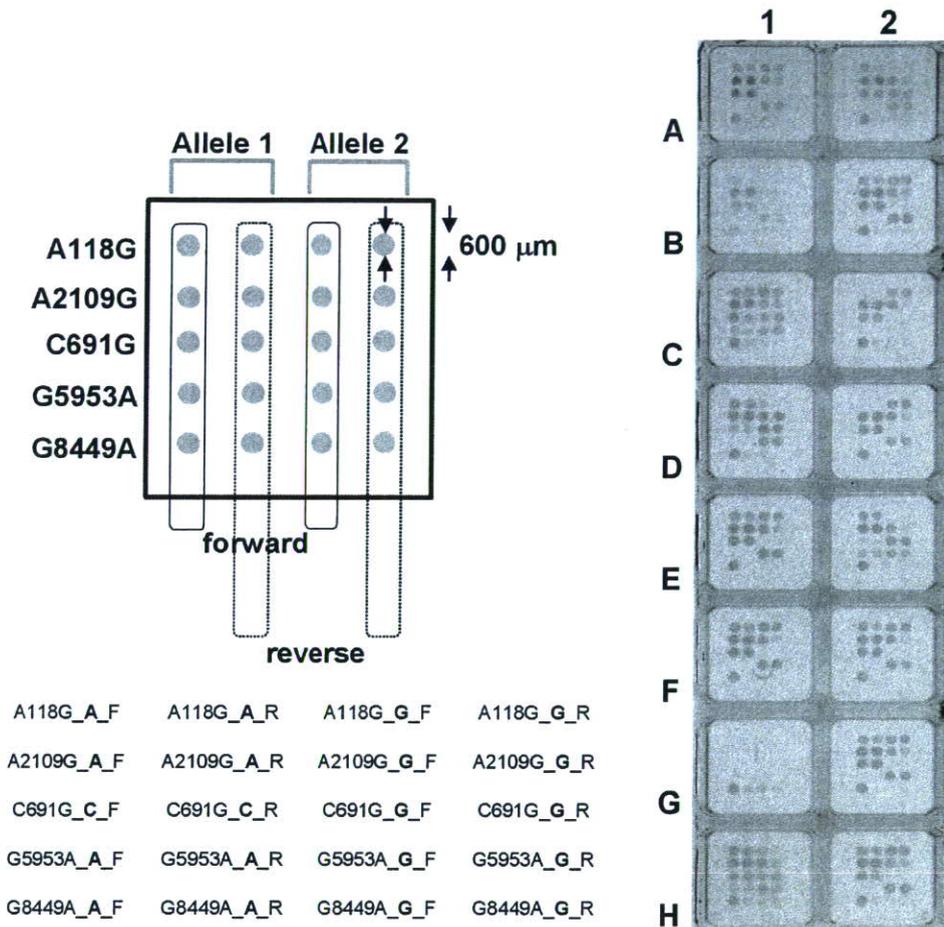


表1. 96 well formatで行なったMPEX反応の結果：一つのモジュールの判定結果を示しているが、図2の実際の画像に対応している。赤字で示しているのは従来法に対して判定が異なっているか、判定できなかったSNPs。

		A118G	A2109G	C691G	G5953A	A118G	A2109G	C691G	G5953A
1-A	TIM033	AG	A	C	G	AG	A	C	G
B	TIM034	A	A	C	G	A	A	C	G
C	TIM035	AG	A	CG	GA	AG	A	CG	GA
D	TIM036	A	G	G	G	A	AG	G	G
E	TIM037	AG	A	C	G	AG	A	C	G
F	TIM038	AG	A	C	G	AG	A	C	G
G	TIM039	AG	A	C	G	-	-	-	-
H	TIM040	A	A	GG	GA	A	A	CG	GA
2-A	TIM057	A	A	CG	G	A	A	CG	G
B	TIM058	AG	A	G	G	AG	A	C	G
C	TIM059	G	A	C	G	G	A	C	-
D	TIM060	G	A	C	G	G	A	C	G
E	TIM061	A	A	G	GA	A	A	G	GA
F	TIM062	AG	A	C	G	AG	A	C	G
G	TIM063	AG	A	C	G	AG	A	C	G
H	TIM064	AG	A	C	G	AG	A	C	G

図3. 96 well format で行なった MPEX 反応の結果 (生データ) : 表1 の判定結果を生じた元データ。SNPs 特異的オリゴは、左図に示すようにスポットしてある。



D. 考察

精度において改良の余地はあるが、multiplex PCR の適応はほぼ成功した。このことに加え、昨年度は各 PCR 反応を 50 μ l の系で行なっており計 200 μ l の PCR 産物が必要であったが、本最適化により全量 20 μ l で足りるようになった。このことはコストパフォーマンスの観点からも強調したい。また今回の解析からそれぞれの SNPs に適切な固相化用 primer が決定できたので (A118G : F, G691C : F, G5953A : F/R, A2109G : R)、今後は GIRK チャネル、CYP2D6 などの他の疼痛関連遺伝子も、同

一の well 内で解析できるよう、アッセイ系の更なる最適化を行なって行きたい。

E. 結論

本年度で本研究事業は終了するが、これまでの成果を活かし、最終目標である遺伝子検査キットの開発をぜひ達成したい。そのためには企業との連携が必須であるが、今年に入り MPEX(Multiple Primer Extension) 法による SNPs の判定には特許の縛りがあることが判明した。今後これをどのようにクリアーするか、あるいは他の手法に乗り

換えてキット化を達成するか、検討が必要である。かずさ DNA 研究所が凸版印刷との連携を深めたこともあり、今後凸版印刷の技術活用も視野に入れて更なる努力を重ねて行きたい。

【参考文献】

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Yamamoto H, Kamegaya E, Takamatsu Y, Imai K, Yamamoto T, Hagino Y, Koga H, Ikeda K, PROLONGED CHANGES IN EXPRESSION OF GENES UNDERLYING METHAMPHETAMINE ABUSE, New Research on Methamphetamine Abuse, NY: Nova Science Publishers, Inc., pp149-182, 2007.
- 2 古閑比佐志, 抗体マイクロアレイ、「マイクロアレイ・バイオチップの最新技術」、著書(分担、シーエムシー出版)、pp218-228, 2007.
- 3 古閑比佐志, タンパク質間相互作用をターゲットとした新薬開発の戦略、生体の科学 増大特集「タンパク-タンパク相互作用」58, pp494-495, 医学書院, 2007.
- 4 古閑比佐志, 抗体マイクロアレイ開発の現状と展望、実験医学増刊号「癌診断研究の最前線」25, pp149-156, 羊土社, 2007 Jan.
- 5 Usui-Aoki K, Shimada K, Koga H, A novel antibody microarray format using non-covalent antibody immobilization with chemiluminescent detection, *Molecular BioSystems* 3(1):36-42, 2007.

- 6 Imai K, Ogai Y, Nishizawa D, Kasai S, Ikeda K, Koga H. A novel SNP detection technique utilizing a multiple primer extension (MPEX) on a phospholipid polymer-coated surface. *Mol Biosyst* 3(8):547-53, 2007 Aug.
 - 7 Yamamoto H, Kamegaya E, Irago M, Hagino Y, Imai K, Fujikawa A, Tamura K, Enokiya T, Yamamoto T, Yakashima T, Koga H, Uhl GR, Ikeda K, Sora I. Genetic deletion of vascular monoamine transporter-2 (VMAT2) reduces dopamine transporter activity in mesencephalic neurons in primary culture. *Neurochemistry International* 237-244, 2007.
- ##### 2. 学会発表
- 8 H Koga, K Imai, K Fujimoto, A novel SNPs detection technique utilizing multiple primer extension (MPEX) on phospholipid polymer-coated surface, Lab-on-a-Chip World Congress, エジンバラ, 2007年5月15日-5月16日.
 - 9 T Nagase, H Koga, O Ohara, Kazusa Mammalian Genome Resources: From Contents to Platform. International Symposium on Advanced Functional Genomics, 木更津, 2007年10月11日-10月12日.
 - 10 R Oose, T Nagase, O Ohara, H Koga, Functional prediction of KIAA genes by combination of two-dimensional gel electrophoresis and pathway-analysis. International Symposium on Advanced Functional Genomics, 木更津, 2007年10

- 月11日－10月12日.
- 11 R Ohara, K Shimada, K Imai, S Yuasa, H Koga, The Precise Distribution of KIAA0445/Rootletin Protein in Mouse Brain-Possible Participation of Alternative Splicing in the Subcellular Localization-. International Symposium on Advanced Functional Genomics, 木更津, 2007年10月11日－10月12日.
 - 12 K Oh-hashii, T Araki, K Imai, K Shimada, S Ikeda, H Koga, Y Hirata, K Kiuchi, Down-regulation of Transmembrane protein 132A contributes to ER stress responses and serum starved-cell death in Neuro2a cells. International Symposium on Advanced Functional Genomics, 木更津, 2007年10月11日－10月12日.
 - 13 H Yamamoto, E Kamegaya, Y Takamatsu, Y Hagino, K Tatsumi, S Yasumoto, T Yamamoto, M Mishina, H Koga, K Ikeda, Phencyclidine-induced gene expression changes in the striatum of NMDA receptor $\epsilon 4$ subunit knockout mice. International Symposium on Advanced Functional Genomics, 木更津, 2007年10月11日－10月12日.
 - 14 K Shimada, R Ohara, N Okazaki, S Ikeda, T Yanagawa, T Nagase, H Koga, Establishment of the 'library' of antibodies to clarify transcriptional network. International Symposium on Advanced Functional Genomics, 木更津, 2007年10月11日－10月12日.
 - 15 N Okazaki, S Ikeda, R Ohara, K Shimada, T Yanagawa, H Koga, Genome-wide analysis of SMARCAD1 (KIAA1122) targets by ChIP-on-chip. International Symposium on Advanced Functional Genomics, 木更津, 2007年10月11日－10月12日.
 - 16 H Mamada, T Shibano, F Hakuno, S Takahashi, H Koga, M Taira, Analysis of a novel nuclear envelope protein, Nemp1, in early Xenopus eye development. International Symposium on Advanced Functional Genomics, 木更津, 2007年10月11日－10月12日.
 - 17 H Yamakawa, S Tadokoro, D Nakajima, S Inoue, R Kikuno, H Koga, T Nagase, O Ohara, Preparation of ORF Clones for Human Genes by a Restriction-Enzyme based High-Throughput Cloning Method, International Symposium on Advanced Functional Genomics, 木更津, 2007年10月11日－10月12日.
 - 18 古閑比佐志, 抗体マイクロアレイ、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会, 横浜, 2007年12月10日－12月15日.
 - 19 島田希代, 小原令子, 岡崎規理子, 池田俊, 柳川俊英, 長瀬隆弘, 古閑比佐志, 転写因子に対する抗体ライブラリーの構築、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会, 横浜, 2007年12月10日－12月15日.
 - 20 山川央, 井上慎一, 菊野玲子, 中島大輔, 古閑比佐志, 長瀬隆弘, 小原収, かずさORFeomeプロジェクト-FlexiクローニングシステムによるORF発現クローンの構築、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会, 横浜, 2007年12月10日－12月15日.

日.

- 21 村上正晃, 守川英幸, 古閑比佐志, 長瀬隆弘, 小原収, 平野俊夫, 亜鉛シグナル分子の網羅的スクリーニング、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会, 横浜, 2007年12月10日-12月15日.
- 22 湯浅茂樹, 前川素子, 加藤怜子, 相馬美歩, 島田希代, 小原令子, 岡崎規理子, 古閑比佐志, マウスKIAA長鎖cDNAがコードする蛋白質に対して網羅的に作製された抗体の神経科学研究への応用、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会, 横浜, 2007年12月10日-12月15日.
- 23 大瀬壘, 長瀬隆弘, 小原収, 古閑比佐志, 二次元電気泳動をベースにしたKIAA遺伝子の機能予測システムの構築、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会, 横浜, 2007年12月10日-12月15日.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

デルタ及びカッパオピオイド受容体の役割に関する研究

分担研究者：南 雅文

（北海道大学大学院薬学研究院・薬理学研究室）

〔研究要旨〕

我々はこれまでに、ヒトオピオイド受容体発現細胞株を用いて、各種オピオイド性鎮痛薬のオピオイド受容体に対する受容体親和性およびアゴニスト活性を定量的に解析してきた。本研究では、細胞外ノルエピネフリン（NE）取り込みへのトラマドール、フェンタニル、オキシコドン、モルヒネの効果を、ヒトNEトランスポーターを安定的に発現させたCHO細胞を用いて検討した。トラマドールは、濃度依存的にNE取り込みを抑制し、 IC_{50} 値（1.96 μ M）は昨年度までの受容体結合実験で得られた μ 受容体における K_i 値（20.1 μ M）よりも低濃度であった。このことから、その鎮痛効果の一部には、NE神経情報伝達促進作用が関与することが示唆された。フェンタニルは、100 μ MにおいてNE取り込みを有意に抑制したが、その濃度は μ 受容体における K_i 値（9.2 nM）に比べて、著しく高濃度であった。一方、モルヒネおよびオキシコドンに関しては、検討した濃度範囲（100 nM～100 μ M）において、NE取り込みに対する抑制効果は認められなかった。

A. 研究目的

現在本邦において市販されているオピオイド性鎮痛薬のうち麻薬指定を受けていないものとしては、ブプレノルフィン、ブトルファノール、ペンタゾシン、エプタゾシンおよびトラマドールがあるが、これらの薬物の鎮痛作用機序については必ずしも明らかでない。我々はこれまでに、 μ オピオイド受容体ノックアウトマウスを用いた解析により、トラマドールの鎮痛作用機序として、 μ オピオイド受容体を介した機序に加え、モノアミン神経伝達促進による機序が存在することを示唆する結果を得てきた³⁾。現在市販されているトラマドールは、(+)および(-)エナンチオマーのラセミ混合体であるが、(+)エナンチオマーと(-)エナンチオマーで薬理作用が異なること、またその主要な代謝物である *O*-desmethyl-tramadol (M1) にも薬理活性があることが報告されている。これらの薬物が、各々、オピオイド受容体を介する

鎮痛作用とモノアミン神経情報伝達促進を介する鎮痛作用にどの程度関与しているかを明らかにし、加えて、モノアミン神経情報伝達促進作用のメカニズムを分子レベルで解明することは、トラマドールの鎮痛作用機序の理解とそれに基づく適正使用に貢献するものと考えられる。

クローン化ヒトオピオイド受容体発現系を用いた昨年度までの研究において、(+)トラマドール（以下、単にトラマドールを記す）の薬理的活性、すなわち受容体親和性およびアゴニスト活性を検討した。受容体結合実験から、トラマドールは、その結合親和性は低いものの δ および κ 受容体に比べて μ 受容体に対して高い親和性を示すこと（ K_i 値は20.1 μ Mであり、モルヒネの約1600分の1）、また、cAMPアッセイから、トラマドールが μ 受容体に対して部分アゴニストとして作用することを明らかにしてきた（最大抑制効果 I_{max} 値は76.4%）。

一方、トラマドールのモノアミン神経伝達への関与については、これまでにラット大脳皮質スライス²⁾やウシ副腎髄質細胞⁵⁾などを用いた研究から、トラマドールが細胞外 NE の取り込みを抑制することが報告されている。しかしながら、それらの細胞では、ドパミントランスポーターのような他のモノアミントランスポーターも存在し、その影響を完全に排除することはできない。そこで、本年度は、トラマドールのモノアミン神経伝達への関与を明らかにするため、他のトランスポーターや内因性の阻害物質の影響を受けにくい評価系として、ヒトノルアドレナリン (NE) トランスポーター (hNET) を安定的に発現した CHO 細胞 (CHO/hNET) を用いて、細胞外 NE 取り込みに対するトラマドールの効果を検討した。さらに、現在本邦で使用されている3種の麻薬性鎮痛薬であるフェンタニル、オキシコドン、モルヒネについても、それらの鎮痛作用へのモノアミン神経伝達の関与を明らかにするため、同様に CHO/hNET を用いて細胞外 NE 取り込みに対する効果を検討した。

B. 実験方法

1. 細胞外 NE 取り込み実験

5×10^4 cells/well の細胞密度で 24 穴プレートに播種した CHO/hNET を 2 日間培養した後、実験に用いた。50 μ M pargyline および 100 μ M アスコルビン酸を含有する Krebs-Ringer-HEPES (KRH) 緩衝液 (125 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.3 mM CaCl_2 , 1.2 mM MgSO_4 , 1.2 mM KH_2PO_4 , 5.6 mM glucose, 25 mM HEPES, pH 7.4) に 500 nM NE (30 nM [^3H]NE + 470 nM NE) を添加し、さらに各濃度のトラマドール、フェンタニル、オキシコドン、モルヒネを加えることで測定液を調製した。37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下、培地を 400 μ l の測定液で置換することによってアッセイを開始し、一定時間後に測定液を吸引除去し、氷冷した PBS で 3 回 wash することにより反応を停止した。300 μ l の 0.3% Triton X-100 で細胞を溶解させ、このライセート中の

[^3H]NE 量を液体シンチレーションカウンターで測定し、定量した。非特異的な取り込みは desipramine (1 μ M) 存在下での取り込み量を測定することで求めた。

2. 統計解析

データは、平均値 \pm 標準誤差で表した。統計処理は、一元配置分散分析に続く Student-Newmann-Keuls の多重比較を使用した。危険率 5%未満の場合に統計学的に有意であると判定した。

C. 実験結果

初めに、細胞外 NE 取り込み量の経時変化を検討した。その結果、少なくともアッセイ開始 20 分後までは NE 取り込み量はほぼ直線的に増加することを確認した (図 1)。よって、以後の検討では 15 分間での NE 取り込み量を測定した。細胞外 NE 取り込みに対して、トラマドールは 10^6 M (1 μ M) より高濃度において、有意に NE 取り込みを抑制し (図 2 A)、その IC_{50} 値は 1.96 μ M であった (表 1)。また、フェンタニルは 10^4 M (100 μ M) においてのみ、有意に NE 取り込みを抑制した ($\text{IC}_{50} = 43.2$ μ M ; 図 2 B および表 1)。一方で、オキシコドンおよびモルヒネに関しては、検討した濃度範囲 (100 nM ~ 100 μ M) において NE 取り込みに影響を与えなかった (図 2 C および 2 D)。

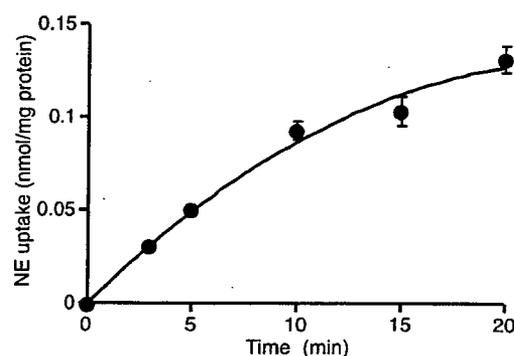


図1 CHO/hNETにおける細胞外NE取り込みの経時変化

500 nM NE を緩衝液中に添加し、0 (pre)、3、5、10、15、20 分間における取り込み量を測定した。n = 3

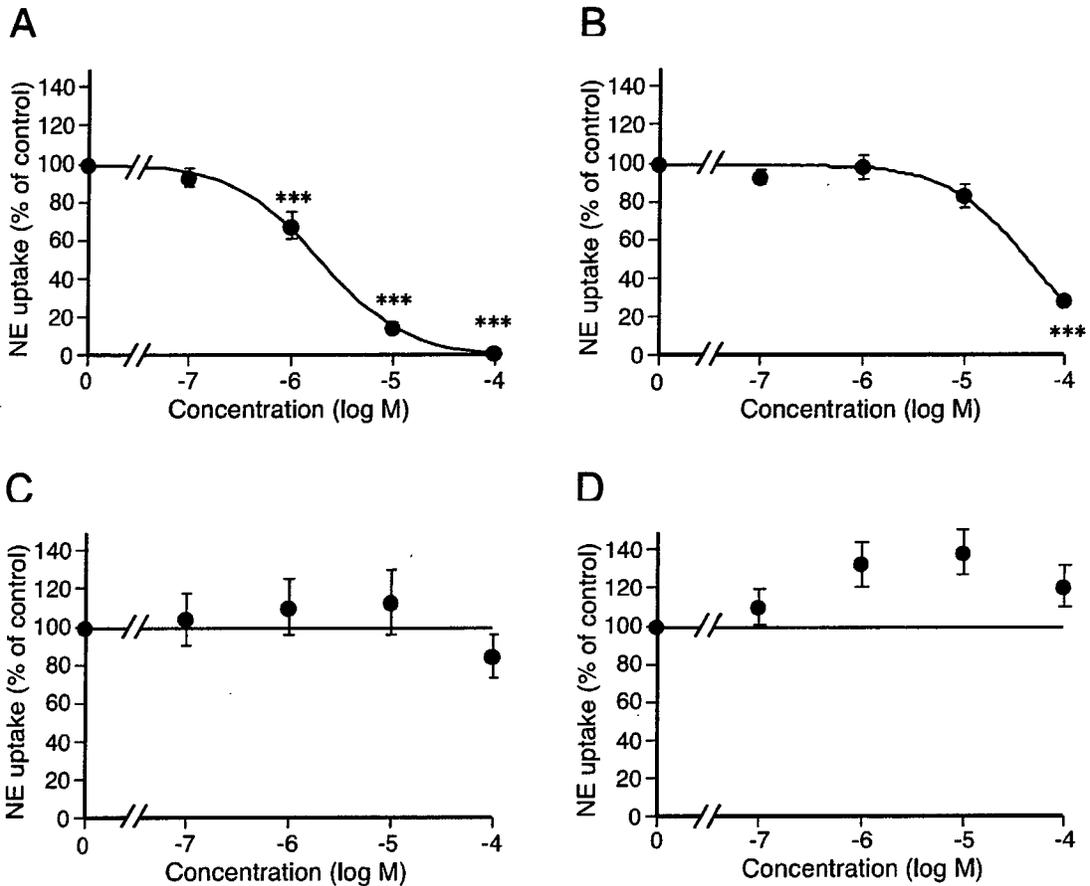


図2 CHO/hNET での細胞外 NE 取り込みに対するトラマドール(A)、フェンタニル(B)、オキシコドン(C)、モルヒネ(D)の効果

500 nM NE を緩衝液中に添加し、15 分間における取り込み量を測定した。データはコントロール (オピオイドリガンド非存在下) における値を 100%として表した。

*** $P < 0.001$ vs control; $n = 4$

	NE 取り込み IC ₅₀ (μM)
トラマドール	1.96
フェンタニル	43.2
オキシコドン	> 100
モルヒネ	> 100

表1 CHO/hNET における細胞外 NE 取り込み量に対する各種オピオイドリガンドの効果

各薬物の NE 取り込み阻害効果を IC₅₀ 値で示した。

D. 考察

これまでのラット大脳皮質スライスやウシ副腎髄質細胞などでの報告と一致して、CHO/hNET を用いた本研究において、トラマドールは濃度依存的に細胞外 NE 取り込みを阻害し、その IC₅₀ 値 (1.96 μM) は、昨年度までの受容体結合実験で得られた μ 受容体における K_i 値 (20.1 μM) よりも低濃度であった。これらのことから、トラマドールの鎮痛効果の一部には、NE 神経伝達促進作用が関与することが示唆される。また、トラマドールの抗侵害受容効果が α₂ 受容体アンタゴニスト yohimbine によって減弱す

るという我々を含めた複数のグループからのこれまでの知見と考え合わせると^{3, 4)}、トラマドールの鎮痛効果は、NET を介した細胞外 NE 取り込み阻害により細胞外 NE 濃度が上昇し、 $\alpha 2$ 受容体を介した神経伝達が亢進することによって発揮されているものと考えられる。

また、麻薬性鎮痛薬の1つであるフェンタニルに関しても、これまでに、神経芽細胞腫 SY5Y 細胞や褐色細胞腫 PC12 細胞において、細胞外 NE の取り込みを抑制することが報告されている¹⁾。そこで、フェンタニルを含めた3種の麻薬性鎮痛薬に関しても、CHO/hNET を用いて同様の検討を行った。その結果、フェンタニルのみが 100 μM という濃度において、細胞外 NE の取り込みを有意に抑制したものの、その IC_{50} 値 (43.2 μM) が、受容体結合実験で得られた μ 受容体における K_i 値 (9.2 nM) より 1,000 倍以上の高濃度であったことから、フェンタニルの鎮痛作用には、NE 神経伝達促進作用はほとんど寄与していないことが示唆される。しかしながら、終末期医療などにおいては大量の麻薬性鎮痛薬が使用されることから、そのような使用条件下で得られるフェンタニルの鎮痛作用に関しては、一部、NE 神経伝達促進作用が関与する可能性を完全には否定できないと思われる。

E. 結論

本研究結果より、トラマドールの鎮痛作用の一部には、NE 神経伝達促進作用が関与していることが示唆された。また、フェンタニルも、 μM オーダーで NE 取り込みを抑制したが、 μ 受容体への結合親和性を考えると、フェンタニルの鎮痛作用への NE 神経伝達促進作用の関与は極めて小さいものと考えられる。さらに、オキシコドンおよびモルヒネは、細胞外 NE 取り込みを阻害しないことが示された。

[参考文献]

1) Atcheson, R., Rowbotham, D.J., Lambert, D.G.:

Fentanyl inhibits the uptake of [³H]noradrenaline in cultured neuronal cells. *Br. J. Anaesth.*, 71: 540-543, 1993.

2) Driessen, B., Reimann, W., Giertz, H.: Effects of the central analgesic tramadol on the uptake and release of noradrenaline and dopamine in vitro. *Br. J. Pharmacol.*, 108: 806-811, 1993

3) Ide, S., Minami, M., Ishihara, K., et al.: Mu opioid receptor-dependent and independent components in effects of tramadol. *Neuropharmacology*, 51: 651-658, 2006.

4) Kayser, V., Besson, J.M., Guilbaud, G.: Evidence for a noradrenergic component in the antinociceptive effect of the analgesic agent tramadol in an animal model of clinical pain, the arthritic rat. *Eur. J. Pharmacol.*, 224: 83-88, 1992.

5) Sagata, K., Minami, K., Yanagihara, N., et al.: Tramadol inhibits norepinephrine transporter function at desipramine-binding sites in cultured bovine adrenal medullary cells. *Anesth. Analg.*, 94: 901-906, 2002.

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
大谷保和、 池田和隆	麻薬	二木鋭雄編	ストレスの科学と健康	共立出版	東京	2008	237-241
池田和隆	薬物依存における再使用抑制薬の探索	坂口正道、 岡崎祐士、 池田和彦、 天野直二、 五味潤隆志、 斎藤正彦編	精神医学の方位：松下正明先生古稀記念論文集	中山書店	東京	2007	135-141
Yamamoto H, Kamegaya E, Takamatsu Y, Imai K, Yamamoto T, Hagino Y, Koga H, Ikeda K.	Prolonged changes in expression of genes underlying methamphetamine abuse.	Toolaney GH, ed	New research on methamphetamine abuse	Nova Science Publishers, Inc	New York	2007	149-182
林田眞和	麻薬および類似薬	水島裕編著	今日の治療薬(2008年版)	南江堂	東京	2008	939-952
林田眞和	麻酔薬	水島裕編著	今日の治療薬(2008年版)	南江堂	東京	2008	953-967
曾良一郎	オピオイド受容体 Opioid receptor	樋口輝彦、 神庭重信、 染矢俊幸、 宮岡等編	KEY WORD 精神,第4版,	先端医学社	東京	2007	150-151
甲田賢一郎、 田上恵	輸液管理とケアQ&A こんなとき、どうしたらよいの？ 末梢静脈ルートとケア 点滴が皮下に大量に漏れたら、どうするの？	岡元和子(編)	ナーシングケアQ&A	総合医学社		2007	78-79
下山直人、 鈴木正寛、 下山恵美	疼痛のメカニズム	東原正明編著	癌緩和ケア	振興医学出版社		2008	6-9
片山博文、 下山直人	緩和療法の実際	がん看護実践シリーズ 3 肺がん	田村友秀編	メヂカルフレンド社		2007	146-154
大澤美佳、 土岐なみ、 戸谷美紀、 下山直人	ターミナル期にある患者の支援	がん看護実践シリーズ 8 乳がん	藤原康弘編	メヂカルフレンド社		2007	197-212

下山直人	緩和医療における インフォームド・コ ンセント	医をめぐる 自己決定ー 倫理・看 護・医療・ 法の視座ー	五十子敬子編	イウス出 版		2007	147-161
下山恵美、 下山直人	緩和医療1. オピオ イドの使い方は？	EBM 呼吸器 疾患の治療	永井厚志、吉澤 靖之、大田健、 江口研二編集	中外医学 社		2007	405-408
下山直人	医療用麻薬(オピオ イド鎮痛薬)の種類 と特徴	インフォ ムドコンセ ントのため の図説シリ ーズ がん 性疼痛	下山直人編	医薬ジャー ナル社		2007	34-39
高橋秀徳、 下山直人	II. 緩和ケアにおけ るコンサルテーシ ョン活動の専門性 2. 緩和ケアチーム で活躍する医師の 役割と実際ー1) 緩 和ケア担当医の立 場から	ホスピス緩 和ケア白書 2007	(財)日本ホス ピス・緩和ケア 研究振興財団 「ホスピス緩 和ケア白書」編 集委員会編集	(財)日 本ホスピ ス・緩和 ケア研究 振興財団		2007	24-27
下山直人	がん患者の苦痛に 対する鍼灸の効果	統合医療 基礎と臨床	日本統合医療 学会、渥美和彦 編集	株式会社 ゾディア ック		2007	66-73
古閑比佐 志	抗体マイクロアレ イ	「マイクロ アレイ・バ イオチップ の最新技 術」	古閑比佐志著 書分担	シーエム シー出版		2007	218-228
古閑比佐 志	タンパク質間相互 作用をターゲット とした新薬開発の 戦略	生体の科学 増大特集 「タンパク タンパク相 互作用」58		医学書院		2007	494-495
古閑比佐 志	抗体マイクロアレ イ開発の現状と展 望	実験医学増 刊号「癌診 断研究の最 前線」25		羊土社		2007	149-156

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kobayashi T, Nish izawa D, Iwamura T, Ikeda K.	Inhibition by cocaine of G protein-activated inwardly rectifying K ⁺ channels expressed in Xenopus oocytes.	Toxicol In Vitro	21	656-664	2007

Ogai Y, Haraguchi A, Kondo A, Ishibashi Y, Umeno M, Kikumoto H, Horii T, Komiyama T, Kato R, Aso K, Asukai N, Senoo E, Ikeda K.	Development and validation of the stimulant relapse risk scale for drug abusers in Japan.	Drug Alcohol Depend	88	174-181	2007
笠井慎也, 池田和隆	オピオイド受容体～ミューオピオイド受容体の機能を中心に～.	日本薬理学雑誌	130	235-237	2007
Mizuno J, Akune T, Tsuda T, Fukui Y, Otsuji M, Kin N, Saito Y, Orii R, Hayashida M, Arita H, Hanaoka K.	Time course of systolic and diastolic blood pressure decreases during the preintubation period of anesthesia Induction: Modelling with a logistic function.	Journal of Clinical Anesthesia	19(7)	497-505	2007
Li C, Sekiyama H, Hayashida M, Takeda K, Sumida T, Sawamura S, Yamada Y, Arita H, Hanaoka K.	Effects of Topical application of clonidine cream on pain behaviors and spinal Fos protein expression in rat models of neuropathic pain, postoperative pain, and inflammatory pain.	Anesthesiology	107(3)	486-494	2007
Ohshima N, Chinzei M, Mizuno K, Hayashida M, Kitamura T, Shibuya H, Hanaoka K.	Transient decreases in Bispectral Index without associated changes in the level of consciousness during photic stimulation in an epileptic patient.	British Journal of Anaesthesia	98 (1)	100-104	2007
Hayashida M, Sekiyama H, Orii R, Chinzei M, Ogawa M, Arita H, Hanaoka K, Takamoto S.	Effects of deep hypothermic circulatory arrest with retrograde cerebral perfusion on EEG bispectral index and suppression ratio.	Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia	21(1)	61-67	2007
Mizuno J, Gauss T, Suzuki M, Hayashida M, Arita H, Hanaoka K.	Encephalopathy and rhabdomyolysis induced by iotrolan during epiduroscopy.	Canadian Journal of Anesthesia	54(1)	49-53	2007
Shu H, Hayashida M, Chiba S, Sekiyama H, Kitamura T, Hanaoka K, Yamada Y, Arita H.	Inhibitory effect of processed Aconiti tuber on the development of antinociceptive tolerance to morphine: evaluation with a thermal assay.	Journal of Ethnopharmacology	113(3)	560-3	2007
林田真和	Not a Drop of Blood.	臨床麻酔	32(1)	3	2008

水野樹, 林田眞和	エピドロスコピーによる腰痛治療.	総合臨床	56(4)	773-774	2007
有田英子, 林田眞和, Haihua Shu H, Hongmeng Xu, 関山裕詩, 花岡一雄	ペインクリニックにおける漢方薬の応用ーブシ剤の基礎研究を中心としてー	麻酔	56(増刊)	S199-S211	2007
林田眞和, 花岡一雄	レミフェンタニル使用上の注意点	Anesthesia 21 Century	9(2)	1658-1665	2007
林田眞和, 福田謙一, 福永敦翁, 花岡一雄	アデノシンと痛み	Anesthesia 21 Century	9(2)	1694-1699	2007
林田眞和, 福田謙一, 池田和隆	ゲノムペインクリニック時代へ向けてーその2ー	ペインクリニック	28(11)	1451-1452	2007
井出康雄, 北村亨之, 関山裕詩, 鎮西美栄子, 矢島直, 林田眞和, 田上恵, 花岡一雄	腰部交感神経節領域の直線偏近赤外線照射の下肢皮膚温への影響	麻酔	56(6)	706-707	2007
Kishimoto M, Ujike H, Motohashi Y, Tanaka Y, Okahisa Y, Kotaka T, Harano M, Inada T, Yamada M, Komiyama T, Hori T, Sekine Y, Iwata N, Sora I, Iyo M, Ozaki N, Kuroda S.	The dysbindin gene (<i>DTNBP1</i>) is associated with methamphetamine psychosis.	Biol Psychiatry	63(2)	191-196	2008
Morita Y, Ujike H, Tanaka Y, Kishimoto M, Okahisa Y, Kotaka T, Harano M, Inada T, Komiyama T, Hori T, Yamada M, Sekine Y, Iwata N, Iyo M, Sora I, Ozaki N, Kuroda S.	The glycine transporter 1 gene (<i>GLYT1</i>) is associated with methamphetamine-use disorder.	Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.	147(1)	54-58	2008
Doi N, Itokawa M, Hoshi Y, Arai M, Furukawa A, Ujike H, Sora I, Yoshikawa T.	A resistance gene in disguise for schizophrenia?	Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet	144(2)	165-173	2007

Okuyama K, Ohwada K, Sakurada S, Sato N, Sora I, Tamura G, Takayanagi M, Ohno I.	The distinctive effects of acute and chronic psychological stress on airway inflammation in a murine model of allergic asthma.	Allergology International	56(1)	29-35	2007
Harburg GC, Hall FS, Harrist AV, Sora I, Uhl GR, Eisch AJ.	Knockout of the mu opioid receptor enhances the survival of adult-generated hippocampal granule cell neurons.	Neuroscience	144(1)	77-87	2007
Numachi Y, Shen H, Yoshida S, Fujiyama K, Toda S, Matsuoka H, Sora I, Sato M.	Methamphetamine alters expression of DNA methyltransferase 1 mRNA in rat brain.	Neuroscience Letters	414	213-217	2007
Fukushima S, Shen H, Hata H, Ohara A, Ohmi K, Ikeda K, Numachi Y, Kobayashi H, Hall FS, Uhl GR, Sora I.	Methamphetamine-induced locomotor activity and sensitization in dopamine transporter and vesicular monoamine transporter 2 double mutant mice.	Psychopharmacology	193(1)	55-62	2007
Ikeda M, Ozaki N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Kishi T, Sekine Y, Iyo M, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Ujike H, Inada T, Iwata N.	Possible association of beta-arrestin 2 gene with methamphetamine use disorder, but not schizophrenia.	Genes Brain Behavior	6 (1)	107-112	2007
Yamamoto H, Kamagaya E, Hagino Y, Imai K, Fujikawa A, Tamura K, Enokiya T, Yamamoto T, Takeshima T, Koga H, Uhl GR, Ikeda K, Sora I.	Genetic deletion of vesicular monoamine transporter-2 (VMAT2) reduces dopamine transporter activity in mesencephalic neurons in primary culture.	Neurochemistry International	51	237-244	2007
Numachi Y, Ohara A, Yamashita M, Fukushima S, Kobayashi H, Hata H, Watanabe H, Hall FS, Lesch KP, Murphy DL, Uhl GR, Sora I.	Methamphetamine-induced hyperthermia and lethal toxicity: role of the dopamine and serotonin transporters.	Eur J Pharmacol	572	120-128	2007

Job MO, Tang A, Hall FS, Sora I, Uhl GR, Bergeson SE, Gonzales R A.	Mu opioid receptor regulation of ethanol-induced dopamine response in the ventral striatum: evidence of genotype specific sexual dimorphic epistasis.	Biol Psychiatry	62 (6)	627-634	2007
Arai M, Obata N, Kockelkorn TT, Yamada K, Toyota T, Haga S, Yoshida Y, Ujike H, Sora I, Ikeda K, Yoshikawa T, Itokawa M.	Lack of association between polymorphisms in the 5' upstream region of the <i>DISC1</i> gene and mood disorders.	Psychiatric Genetics	17(6)	357	2007
曾良一郎	薬物依存の分子病態.	実験医学	25(13)	179-184	2007
曾良一郎、猪狩もえ、山本秀子、池田和隆	依存性薬物の分子標的としてのモノアミントランスポーター.	日本薬理学雑誌	130(6)	450-454	2007
曾良一郎、福島攝、山本秀子、池田和隆	ADHD動物モデルとしてのドーパミントランスポーター欠損マウス. シンポジウム4 AD/HD研究の新機軸-基礎と臨床のクロストーク-	脳と精神の医学	18(4)	279-283	2007
Fukushima S, Shen H, Ikeda K, Hata H, Ohara A, Ohmi K, Kobayashi H, Numachi Y, Hall F, Uhl GR, Sora I.	Methamphetamine-induced locomotor activity and sensitization in dopamine transporter and vesicular monoamine transporter 2 double mutant mice.	Psychopharmacology	193(1)	55-62	2007
Yamamoto H, Kamagaya E, Hagino Y, Imai K, Fujikawa A, Tamura K, Enokiya T, Yamamoto T, Takeshima T, Koga H, Uhl GR, Ikeda K, Sora I.	Genetic deletion of vesicular monoamine transporter-2 (VMAT2) reduces dopamine transporter activity in mesencephalic neurons in primary culture.	Neurochem Int	51	237-244	2007

Sugishita Y, Nagashima M, Ooshiro M, Urita T, Moriyama A, Yoshida Y, Tanaka H, Nihon-Yanagi Y, Koide K, Wakabayashi M, Ueda T, Yamaguchi M, Katoh R.	Fournier's gangrene progressing from the buttocks to the scrotum following a perianal abscess: report of a case.	Journal of Infection and Chemotherapy	14	56-58	2008
Nagashima M, Katoh R, Sato Y, Tagami M, Kasai S, Ikeda K.	Is there genetic polymorphism evidence for individual human sensitivity to opiates?	Curr Pain Headache Rep	11	115-123	2007
花岡一雄、有田英子、長瀬真幸、井手康雄、田上恵	ワクシニアウイルス接種家兎炎症皮膚抽出液（ノイロトロピン [®] 錠、ノイロトロピン [®] 注射液1.2単位、3.6単位、ナブトピン [®] 注、ノルポート [®] 注、ローズモルゲン [®] 注3.6単位）	ペインクリニック	29(1)	125-126	2008
甲田賢一郎、菅野敬之、芝間さやか、原田雅樹、佐藤泰雄、井手康雄、田上恵	Brugada症候群様心電図を呈する患者の術前評価と麻酔管理	麻酔	56(12)	1398-1403	2007
花岡一雄、永村陽子、有田英子、長瀬真幸、井手康雄、田上恵	骨粗鬆症における疼痛管理	クリニカ	34(6)	345-348	2007
Fukuda K, Hayashida M, Fukunaga A, Kasahara M, Koukita Y, Ichinohe T, Kaneko Y.	Pain-relieving effects of intravenous ATP in chronic intractable orofacial Pain: an open-label study.	Journal of Anesthesia	21(1)	24-30	2007
宮尾真理子、高北義彦、笠原正貴、福田謙一、一戸達也、金子譲	下顎前突症患者における術前不安の検討—下顎枝矢状分割術と金属固定板除去術との比較—	日歯麻誌	35	38-41	2008
笠原正貴、福田謙一、一戸達也、高北義彦、金子譲	星状神経節ブロック施行後後頸部において著しい血腫をきたした1例	日歯麻誌	35	276-277	2007
齊田菜緒子、福田謙一、金子完子、高北義彦、一戸達也、金子譲	喘息重積発作を繰り返していた歯科恐怖症患者の日帰り全身麻酔経験	日歯麻誌	53(2)	276-277	2007

福田謙一、齊田菜緒子、谷田部純子、飯田和美、笠原正貴、高北義彦、一戸達也、金子讓	下顎孔伝達麻酔施行直後に局所麻酔中毒発症が疑われた1症例	日歯麻誌	35	699-700	2007
平山 明、福田謙一、齊田菜緒子、杉山あや子、金子完子、高北義彦、一戸達也、金子讓	認知症患者のプロポフォルによる反復全身麻酔経験	日歯麻誌	35	703-704	2007
笠原正貴、梅安理絵、高北義彦、福田謙一、一戸達也、金子讓	星状神経節ブロック施行期間中に発見された全身麻酔後喉頭肉芽腫の1例	日歯麻誌	35	709-710	2007
Waga C, Iwahashi K.	CYP2A6 gene polymorphism and personality traits for NEO-FFI on the smoking behavior of youths.	Drug and Chemical Toxicology	30	343-349	2007
Waga C, Ikeda K, Iwahashi K.	The relationship between alcoholism and DBI gene polymorphism in Japanese -genotyping of the +529A/T in DBI gene polymorphism based on PCR.	Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi	42(6)	629-634	2007
岩橋和彦、加賀央子、青木淳、吉原英児、村山洋、渡辺全朗、池田和隆、石郷岡純	オランザピンの副作用による体重増加・血糖上昇と俊約遺伝子やセロトニン系遺伝子との関連—統合失調症16例による予備的検討—	脳と精神の医学	18(2)	143-148	2007
Shimoyama M, Szeto H, Schiller P, Tagaito Y, Tokairin H, Ito H, Shimoyama N.	The mu-opioid peptide [Dmt1]DALDA acts predominantly in the spinal cord to produce analgesia in rats.	Submitted to Anesthesia & Analgesia			
Miyashita M, Sanjo M, Morita T, Hirai K, Kizawa Y, Shima Y, Shimoyama N, Tsuneto S, Hiraga K, Sano K, Uchitomi Y.	Barriers to Providing Palliative Care and Priorities for Future Actions to Advance Palliative Care in Japan: A Nationwide Expert Opinion Survey.	J Palliat Med	10(2)	390-399	2007
下山恵美、門田和氣、下山直人	経口オピオイド鎮痛薬の重要性和オキシコドンが果たす臨床的役割	がん患者と対症療法	18(2)	6-10	2007