

日 ポスター

- 56 Ichikawa H, Ozeki Y, Murakami M, Koga H, KeyMolnet for InCeP (IntraCellular Pathway based on mKIAA protein-protein interactions) ~ The implementation of bidirectional communication system in the pathway database ~, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, 京都, 2006年6月18日-23日 ポスター
- 57 薄井(青木)一恵, 島田希代, 長野美穂子, 川井誠, 古閑比佐志, 2005, 抗体アレイを用いたマウスKIAAタンパク質の発現プロファイリング~新しい疾患マーカーの発見を目指して~, 第28回日本分子生物学会年会, 福岡, 2005年12月7日-10日 ワークショップ
- 58 古閑比佐志, cDNAプロジェクトからプロテオーム領域への挑戦~かずさDNA研究所の取り組み~, 第2回 プロテオミクスシンポジウム, 熊本, 2005年4月1日, 招待講演
- 59 Koga H, InGaP and InCeP databases: A paradigm for identifying functions of mKIAA/KIAA proteins, 9th International Congress on Amino Acids and Proteins, Vienna, 2005年8月8日-12日 口演
- 60 Koga H, 2005, InGaP and InCeP databases: A paradigm for identifying novel pathways and theories, VIth European Symposium of the Protein Society, Barcelona, Spain, 2005年5月1日-4日 ポスター
- 61 長野美穂子, 島田希代, 村上雅利, 岡崎規理子, 古閑比佐志, 抗マウスKIAA抗体の網羅的作製とその評価, 第28回日本分子生物学会年会, 福岡, 2005年12月7日-10日 ポスター
- 62 島田希代, 小原令子, Achim Knappik, Christian Frisch, Francisco Ylera, 長野美穂子, 古閑比佐志, 同一抗原で作製したポリクローナル抗体とファージ抗体との比較, 第28回日本分子生物学会年会, 福岡, 2005年12月7日-10日 ポスター
- 63 長瀬隆弘, 中島大輔, 岡崎規理子, 古閑比佐志, 小原收, 培養細胞を用いたKIAA遺伝子産物過剰発現によるレポーター遺伝子解析, 第28回日本分子生物学会年会, 福岡, 2005年12月7日-10日 ポスター
- 64 中島大輔, 村上雅利, 菊野玲子, 岡崎規理子, 古閑比佐志, 小原 收, 長瀬 隆弘, 培養細胞を用いたKIAAタンパク質の細胞内局在および生化学的解析, 第28回日本分子生物学会年会, 福岡, 2005年12月7日-10日 ポスター
- 65 長野美穂子, 島田希代, 村上雅利, 岡崎規理子, 古閑比佐志, 網羅的に作製した抗体を用いた内在性mKIAA蛋白質の検出, 第28回日本分子生物学会年会, 福岡, 2005年12月7日-10日 ポスター
- 66 稲本進, 渡部綾子, 尾崎照遵, 渡辺眞理, 南雲利之, 島田希代, 長野美穂子, 古閑比佐志, 中島大輔, 長瀬隆弘, 小原收, 瀧景子, 馬替純二, 川上泰, 抗マウスKIAA抗体の網羅的作製とその評価, 第28回日本分子生物学会年会, 福岡, 2005年12月7日-10日 ポスター
- 67 村上 雅利, 島田希代, 長野美穂子, 岡崎規理子, 今井一英, 川井誠, 中島 大輔, 小原令子, 三木 双葉, 稲本進, 馬替純二, 湯浅茂樹, 長瀬隆弘, 小原收, 古閑比佐志, InCeP database~タンパク-タンパク相互作用に基づくパスウェイデータベース~, 第28回日本分子生物学会年会, 福岡, 2005年12月7日-10日 ポスター

(3) 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

1. 古閑比佐志, 村上雅利: 名称 「情報処理装

置、情報処理方法及びそのプログラム」, 出願番号 2005-203404 (公開番号 2006-185412), 国際出願番号なし(国際公開番号なし), 出願人 財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所、新日鉄ソリューションズ株式会社, 出願日 2005年7月12日

2. 川井誠、古閑比佐志、村上雅利: 名称 「パスウェイ表示方法、情報処理装置及びパスウェイ表示プログラム」, 出願番号 2006-111916 (公開番号2007-52766), 国際出願番号なし(国際公開番号なし), 出願人 株式会社数理システム、財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所、新日鉄ソリューションズ株式会社, 出願日 2006年4月14日

3. 中山俊憲、山下政克、小原收、古閑比佐志: 名称 「ヒトTh1/Th2分化誘導系及びその用途」, 出願番号 2006-93086 (公開番号2007-259835), 国際出願番号なし(国際公開番号なし), 出願人 国立大学法人 千葉大学、財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所、新日鉄ソリューションズ株式会社, 出願日 2006年3月30日

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

「遺伝子多型検査によるテーラーメイド疼痛治療法の開発」3年間のまとめ

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)

A. 研究目的

テーラーメイド疼痛治療法の開発のためには、疼痛発生や制御にかかわる分子機構における個人差の原因となる遺伝的多型を同定することが重要であることは言うまでもないが、実際にテーラーメイド疼痛治療を強力に推進するためには、医薬品の各標的分子に対する薬理作用に関する情報が、これまで以上に詳細に明らかにされ、医療現場に提供される必要がある。すなわち、現在用いられているオピオイド性鎮痛薬の作用機序、特に、鎮痛作用や副作用におけるオピオイド受容体各サブタイプの寄与を、定量的に解析し数値化することが重要である。

従来のオピオイド性鎮痛薬のオピオイド受容体各タイプ、すなわち、 μ 、 δ 、 κ 各タイプにおける作用に関する知見は、報告によって相違が見られることも多く、必ずしも正確な知見が得られているとは言い難い。その最も大きな原因は、受容体各タイプに対するオピオイド類の作用を解析するために用いられてきた評価系にある。オピオイド類の結合親和性やアゴニスト活性の評価は、脳膜標品を用いた結合実験やモルモット回腸縦走筋標本あるいはマウス輸精管標本などを用いた生物活性測定実験などにより行われてきたが、これら組織由来の標本では必ずしも純粋に1種類の受容体タイプのみが存在しているわけではなく、また、オピオイド受容体との相互作用によりその親和性やアゴニスト活性に影響を与え

るタンパク質（GTP結合タンパク質やリン酸化酵素など）の種類や量が組織ごとに異なっているため、異なった組織由来の膜標品や摘出組織標品を用いた評価系より得られた結果をそのまま、 μ 、 δ 、 κ 各受容体における当該薬物固有の薬理学的性質と捉らえて、それらを直接比較することには少なからず問題があった。薬物固有の薬理学的性質である結合親和性とアゴニスト活性をオピオイド受容体の μ 、 δ 、 κ 各タイプについて評価し、それらを比較するためには、受容体との相互作用によりその親和性やアゴニスト活性に影響を与えるタンパク質、さらにはアゴニスト活性の指標となる生物活性の発現に必要なタンパク質が同一である細胞上に、オピオイド受容体の各タイプが単独に発現している標本を評価系に用いることが望ましい。

1992年から1993年にかけて、オピオイド受容体 μ 、 δ 、 κ 各タイプのcDNAが相次いでクローニングされたことにより、そのような理想的な評価系の構築が可能となった。すなわち、遺伝子工学的手法を用いて、オピオイド受容体のクローンを、本来オピオイド受容体のいずれのタイプも有していない株化細胞に発現させることにより、単一タイプのオピオイド受容体を発現し、かつ、オピオイド受容体以外のバックグラウンドとなるタンパク質の種類や量が同一である細胞標本を得ることが可能となった。そこで本研究では、ヒト型クローン化オピオイド受容体各サブタイプ発現

細胞株を活用し、各オピオイド性鎮痛薬のオピオイド受容体 μ 、 δ 、 κ 各タイプにおける結合親和性とアゴニスト活性を検討することにより各オピオイド性鎮痛薬の薬理的性質を評価した（平成17年度および18年度）。また、トラマドールは、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が示唆されている。そこで、トラマドールおよび現在本邦で使用可能な3種の麻薬性鎮痛薬、モルヒネ、フェンタニル、オキシコドンに関しては、先のオピオイド受容体発現細胞株を用いた検討に加え、ヒトノルアドレナリン (NE) トランスポーター (hNET) 発現細胞株を用いて、細胞外 NE 取り込みに対する効果についても定量的に解析した（平成19年度）。

B. 実験方法

1. ヒトオピオイド μ 、 δ 、 κ 受容体を安定的に発現する CHO 細胞の樹立

CHO 細胞は 10% ウシ胎仔血清、50 U/ml ペニシリン、50 μ g/ml 硫酸ストレプトマイシンを含むハム F12 培地で、37°C、5% CO₂ 条件下で培養・維持した。各ヒトオピオイド受容体 cDNA を組み込んだプラスミドを、リポフェクチン法により CHO 細胞にトランスフェクションした。500 μ g/ml の G418 存在下で培養し、生存するコロニーのうち、³H]オピオイドリガンドを用いた結合実験により各受容体を高レベルに発現しているクローン細胞 (CHO/hMOPR、CHO/hDOPR、CHO/hKOPR) を選別した。それぞれの受容体の発現はノーザンブロット法にて確認した。

2. 受容体結合実験

CHO/hMOPR、CHO/hDOPR、CHO/hKOPR を Tris 緩衝液 (50 mM Tris (pH 7.4)、10 mM MgCl₂、1 mM EDTA) 中で、ホモジナイズした。ホモジネートを 4°C、30,000×g で 20 分間遠心した後、沈殿を Tris 緩衝液に再懸濁したものを粗膜標品として実

験に用いた。オピオイド μ 、 δ 、 κ 受容体は、それぞれの受容体に選択的なりガンドである [³H]DAMGO、³H]DPDPE、³H]U69,593 を用いて標識した。標識リガンド 10 μ l、非標識リガンド 10 μ l、膜標品 80 μ l を混合し、25°C、1 時間インキュベートした後、氷冷した Tris 緩衝液 1 ml で反応を停止した。これを 0.1% ポリエチレンイミンにあらかじめ浸した Whatman GF/C フィルターで濾過し、Tris 緩衝液で 3 回洗浄した後、フィルターを 3-5 ml のクリアゾル I (ナカライテスク) に入れ、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。競合実験には一定濃度の [³H]DAMGO、³H]DPDPE、³H]U69,593 と、種々の濃度の非標識オピオイドリガンドを用い、非特異的結合は 10 μ M あるいは 100 μ M の DAMGO、DPDPE、U69,593 いずれかの存在下で求めた。

3. cAMP アッセイ

24 穴マルチウェルプレートで培養した CHO/hMOPR、CHO/hDOPR、CHO/hKOPR (1×10⁵ cells/well) を 0.5 ml の HBS (140 mM NaCl、4.7 mM KCl、2.2 mM CaCl₂、1.2 mM KH₂PO₄、11 mM glucose、15 mM HEPES、pH 7.4) で 1 回洗浄後、0.45 ml の 1 mM IBMX を含む HBS 中で 37°C、10 分間プレインキュベートした。反応は種々の濃度のオピオイドリガンド、フォルスコリン (最終濃度 10 μ M)、1 mM IBMX を含む HBS 50 μ l を加えて開始した。37°C で、10 分間インキュベートした後、氷冷した 0.5 ml の 10% TCA 添加して反応を停止した。cAMP を抽出後、含有する cAMP 量を cAMP assay kit (Amersham Pharmacia Biotech) を用い、ラジオイムノアッセイで定量した。

4. データ解析

受容体結合実験における各オピオイドリガンドの阻害定数 (K_i) は、標識リガンドの結合を 50% 置換するために必要な濃度 (IC₅₀ 値) から Cheng & Prusoff の式により計算した。

また cAMP アッセイによる各薬物のアゴニスト

活性は、フォルスコリン刺激による細胞内 cAMP 濃度上昇に対する抑制効果を指標とし、平成 17 年度に行った拮抗性鎮痛薬に関しては、完全アゴニストの抑制効果を 100% とした最大抑制率 (I_{max} (%)) を算出し、平成 18 年度に行った麻薬性鎮痛薬およびトラマドールに関しては、フォルスコリン単独による cAMP 蓄積量をそのまま 100% とした最大抑制率 (I_{max} (%)) ならびに I_{max} の 50% を発現するのに必要な濃度 (IC_{50} 値) を算出することで検討した。

5. 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°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。

6. 統計解析

cAMP アッセイにおける I_{max} 値の検定は Student's *t*-test により行い、NE 取り込み実験における統計処理は、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. 実験結果および考察

1. 平成 17 年度

【結果】

Table 1 では、各薬物の受容体に対する結合親和性の高さを解離定数 K_i で表している。 K_i 値は、その値が小さいほど親和性が高いことを示す。モルヒネが μ 受容体に対して比較的結合選択性が高いのに対し、拮抗性鎮痛薬のうちブトルファノールとペンタゾシンは μ 受容体と κ 受容体に同程度の親和性で結合し、 δ 受容体に対する親和性はそれらの 4-20 分の 1 程度であったことから、ブトルファノールとペンタゾシンの薬理作用は μ および κ 受容体を介するものであると考えられる。一方、ブプレノルフィンもモルヒネと同程度の μ 受容体選択性を示した。また、従来より μ 、 δ 、 κ 各タイプに選択的なアゴニストとして用いられてきた、DAMGO、DPDPE および U69,593 は、クローン化受容体を用いた本評価系においても、各タイプに選択的に結合することが確認された (データは示さない)。

次に、cAMP 産生抑制作用を指標として各薬物のアゴニスト活性を検討した。すなわち、CHO 細胞をフォルスコリンで刺激した際に観察される細胞内 cAMP 濃度上昇に対する抑制効果を指標として各薬物のアゴニスト活性を評価した。Fig. 1 には、 μ 受容体を介した DAMGO とブトルファノールの cAMP 産生抑制効果を示している。完全ア

	μ K_i (nM)	δ K_i (nM)	κ K_i (nM)
モルヒネ	21	520	250
ブプレノルフィン	13	120	180
ペンタゾシン	80	670	34
ブトルファノール	5.4	31	7.3

Table 1 ヒト型オピオイド受容体に対するモルヒネおよび拮抗性鎮痛薬の親和性

μ 、 δ および κ 受容体に対する各薬物の結合親和性の高さを解離定数 K_i で示した。 K_i 値はその値が小さいほど親和性が高い。

ゴニストであるとされている DAMGO が cAMP 濃度を最大約 91% 抑制する (図中 A の矢印で示す) のに対し、ブトルファノールは最大約 61% までしか抑制せず (図中 B の矢印で示す)、ブトルファノールの μ 受容体における最大抑制率 (I_{max} (%)) は DAMGO の 67% ($= B/A \times 100$ (%)) であった。ブトルファノールは最大抑制効果が完全アゴニストである DAMGO のそれよりも弱いことから、部分アゴニストであると言える。同様の方法により各薬物の μ 、 δ 、 κ 各受容体タイプ

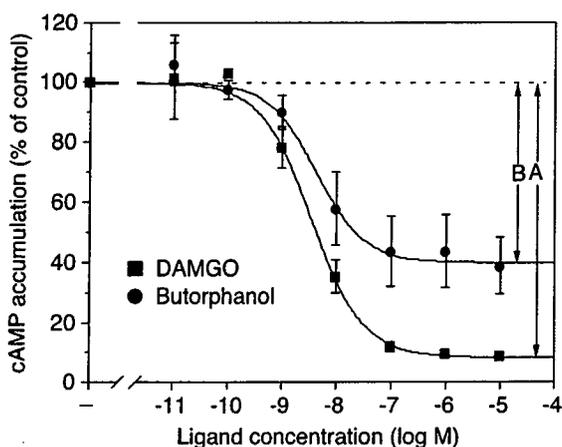


Fig. 1 μ オピオイド受容体を介した DAMGO と拮抗性鎮痛薬ブトルファノールのアゴニスト活性

	μ I_{max} (%)	δ I_{max} (%)	κ I_{max} (%)
モルヒネ	96	91	92
ブプレノルフィン	72	82	63
ペンタゾシン	65	94	90
ブトルファノール	67	83	77

Table 2 ヒト型オピオイド受容体におけるモルヒネおよび拮抗性鎮痛薬のアゴニスト活性 μ 、 δ および κ 受容体における各薬物のアゴニスト活性の強さを最大抑制率 (I_{max}) で示した。

におけるアゴニスト活性を検討した (Table 2)。

μ 受容体においてブプレノルフィン、ブトルファノール、ペンタゾシンの I_{max} は、各々、72%、67%、65% であり、完全アゴニストと考えられる DAMGO よりもその最大抑制効果が弱いことから、これらの拮抗性鎮痛薬は μ 受容体に対して部分アゴニストとして作用すると考えられる。これら拮抗性鎮痛薬は、 κ 受容体においても U69,593 と比較した最大抑制率が 63~90% であり、部分アゴニストとして作用すると考えられるが、ペンタゾシンに関しては、他の 2 つの拮抗性鎮痛薬に比し κ アゴニスト性が強い。一方、モルヒネの最大抑制効果は DAMGO のそれとほぼ同程度であることからモルヒネは μ 受容体の完全アゴニストとして作用する。モルヒネが μ 受容体に比較的高い結合選択性を有していることを考え併せると、モルヒネの鎮痛作用の大部分は μ 受容体を介したものであると考えられる。これは μ 受容体ノックアウトマウスにおいてモルヒネの鎮痛効果が消失したとする報告とも一致する。

「拮抗性鎮痛薬」の名称は、これらの薬物が、モルヒネなどの麻薬性鎮痛薬の作用には拮抗するが、単独投与により鎮痛作用を発現することに由来している。モルヒネが μ 受容体に比較的高い結合選択性を有しており、その薬理作用が主として μ 受容体を介したものであると考えられることより、拮抗性鎮痛薬のモルヒネに対する拮抗作用は μ 受容体における競合により起こるものと考えられる。そこで、拮抗性鎮痛薬が実際にモルヒネの効果に拮抗しうるかどうかをクローン化 μ オピオイド受容体発現細胞を用いて検討し、代表的な麻薬拮抗薬であるナロキソンの拮抗作用と比較した。理想的なアンタゴニストはアゴニストの濃度作用曲線を高濃度側すなわち右方へ平行移動させる。本研究でも、ナロキソンは μ 受容体におけるモルヒネの濃度作用曲線を右方へほぼ平行に移動させた (Fig. 2A)。一方、部分アゴ

ニストが完全アゴニストと共存する場合には、部分アゴニストの二面性、すなわち、アゴニスト性とアンタゴニスト性の両方が発揮される。Fig. 2B

では拮抗性鎮痛薬としてブトルファノールを用いているが、モルヒネの濃度が低い場合には、ブトルファノールのアゴニスト作用がモルヒネのアゴニスト作用と相加的に働き、濃度作用曲線を下方に移動させるが、モルヒネの濃度が高くなり、ブトルファノールとモルヒネが受容体を競合するようになるとブトルファノールのアンタゴニスト性が発揮され、完全アゴニストの濃度作用曲線を右方に移動させる。これら2つの効果の合計として、ブトルファノールはモルヒネの濃度作用曲線を右下方向へ移動させた。ブトルファノール存在下の濃度作用曲線がブトルファノール非存在下の濃度作用曲線よりも上方にあるところ (Fig. 2B 中、アステリスク (*) で示した部分) では、ブトルファノールがモルヒネの効果に拮抗していた。同様に、ブプレノルフィンやペンタゾシンもモルヒネの濃度作用曲線を右下方向へ移動させ、モルヒネ濃度の高いところではモルヒネに対する拮抗作用を示した。

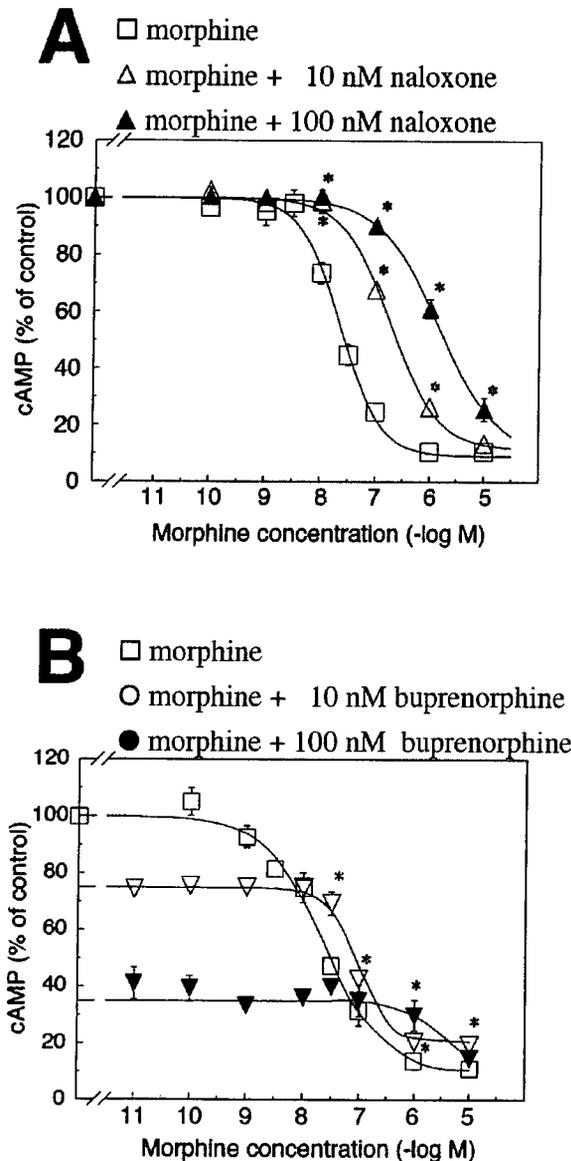


Fig. 2 クローン化 μ オピオイド受容体におけるモルヒネの作用に対するナロキソンおよびブプレノルフィンの拮抗作用

μ 受容体におけるモルヒネのcAMP産生抑制効果に対するナロキソン(A)およびブプレノルフィン(B)の拮抗作用を検討した。モルヒネの作用がナロキソンやブプレノルフィンにより拮抗され、cAMP産生抑制効果が有意に減弱している部分を*で示している。

【考察】

オピオイド受容体の3つのタイプ、 μ 、 δ 、 κ はすべてオピオイド類の鎮痛作用に関与していることが知られているが、拮抗性鎮痛薬の各タイプに対する親和性と固有活性を考慮すると、ブプレノルフィンが μ 受容体を、ブトルファノールとペンタゾシンが μ および κ 受容体を介してその鎮痛作用を発揮しているものと考えられる。拮抗性鎮痛薬の「鎮痛薬」としての作用は μ および κ 受容体に対する部分アゴニストとしての作用による。一方、その「拮抗性」は μ 受容体においてモルヒネが完全アゴニストであるのに対し拮抗性鎮痛薬が部分アゴニストであるという2種の薬物間の相対的な関係にもとづくものであり、ナロキソンなどの麻薬拮抗薬とは異なり、拮抗性鎮

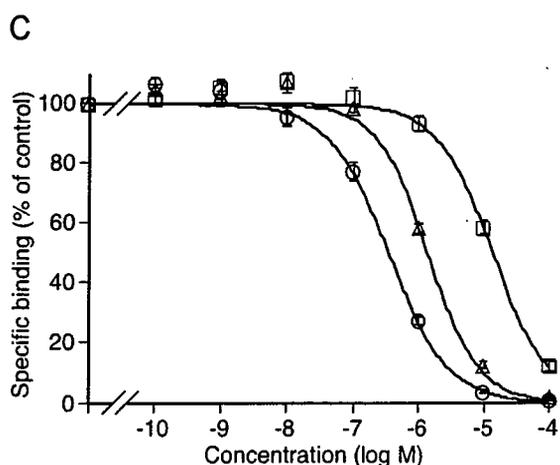
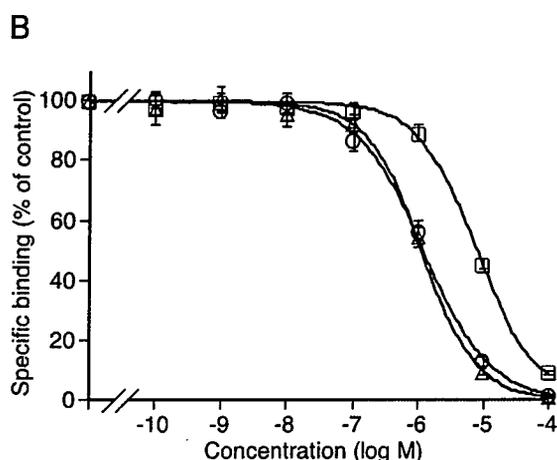
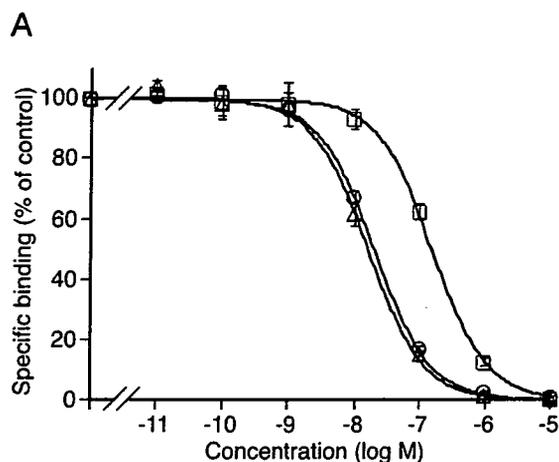


Fig. 3 CHO/hMOPR (A), CHO/hDOPR (B), CHO/hKOPR (C)から得た膜標品における、 ^3H 標識各受容体選択的リガンド結合のモルヒネ (○)、フェンタニル (△)、オキシコドン (□)による阻害

	μ K_i (nM)	δ K_i (nM)	κ K_i (nM)
モルヒネ	12.7	1250	281
フェンタニル	9.2	1080	1040
オキシコドン	91.6	7490	9060

Table 3 ヒト型オピオイド受容体に対するモルヒネ、フェンタニル、オキシコドンの親和性 μ 、 δ および κ 受容体に対する各薬物の結合親和性を解離定数 K_i で示した。

痛薬は μ 受容体アンタゴニスト (μ 受容体拮抗薬) ではないという点には注意する必要がある。

2. 平成 18 年度

【結果】

2-1. フェンタニルおよびオキシコドン

麻薬性鎮痛薬の μ 、 δ 、 κ 各受容体に対する結合親和性を検討するために、ヒトオピオイド受容体各サブタイプ発現細胞株から調整した細胞膜標品に対する ^3H 標識リガンド (^3H DAMGO、 ^3H DPDPE、 ^3H U69593) と各薬物との競合実験を行い (Fig. 3)、そこから K_i 値を算出した (Table 3)。その結果、フェンタニル、オキシコドンともに、 μ 受容体に対する選択性が高く、 δ あるいは κ 受容体に対する親和性に比較して 82-117 倍の高親和性を示した。一方、モルヒネの δ 受容体に対する選択性は、 μ 受容体に対するそれと比較し 98 分の 1 であったが、 κ 受容体に対する親和性は比較的高く、 μ 受容体に対する親和性の 22 分の 1 であった。

次に、 μ 受容体に着目し、cAMP 産生抑制作用を指標として各薬物のアゴニスト活性を検討した。Fig. 4 は、 μ 受容体を介したモルヒネ、フェンタニル、オキシコドンの cAMP 産生抑制効果を示している。これから、 $I_{\text{max}}(\%)$ および IC_{50} 値を算出した (Table 4)。フェンタニル、オキシコドンはモルヒネとほぼ同等の I_{max} を示し、 μ 受容

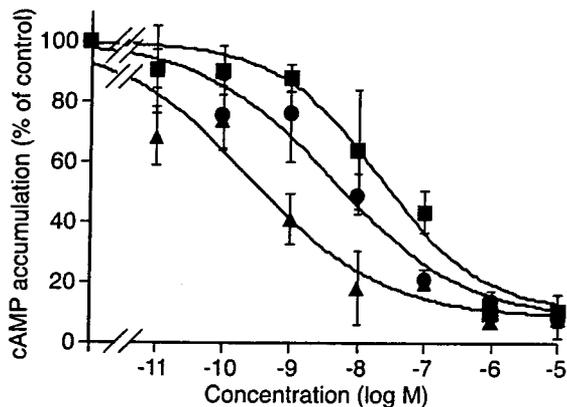


Fig. 4 CHO/hMOPR におけるフォルスコリン誘発 cAMP 蓄積のモルヒネ(●)、フェンタニル(▲)、オキシコドン (■) による抑制

	IC ₅₀ (nM)	I _{max} (%)
モルヒネ	6.57 ± 3.62	91.3 ± 2.9
フェンタニル	0.32 ± 0.13	91.0 ± 6.2
オキシコドン	37.6 ± 22.2	89.2 ± 2.1

Table 4 CHO/hMOPR におけるモルヒネ、フェンタニル、オキシコドンのアゴニスト活性 μ 受容体における各薬物のアゴニスト活性の強さを IC₅₀ 値ならびに最大抑制効果 (I_{max}) で示した。

体に対して完全アゴニストとして作用することが示された。

2-2. トラマドール

続いて、トラマドールについても同様に検討した。Fig. 5 は μ 、 δ 、 κ 各受容体の発現細胞株における受容体結合実験の結果を示しており、Table 5 はそこから算出した K_i 値を示している。トラマドールはモルヒネと比較して約 1,600 倍という非常に低親和性ながらも、 μ 受容体に対して親和性を有することが明らかとなった。 δ 、 κ 受容体に関しては、1 mM においても、標識リガンド結合を十分に置換しなかった。

次に、 μ 受容体に着目し、cAMP 産生抑制作用を指標としてトラマドールのアゴニスト活性を

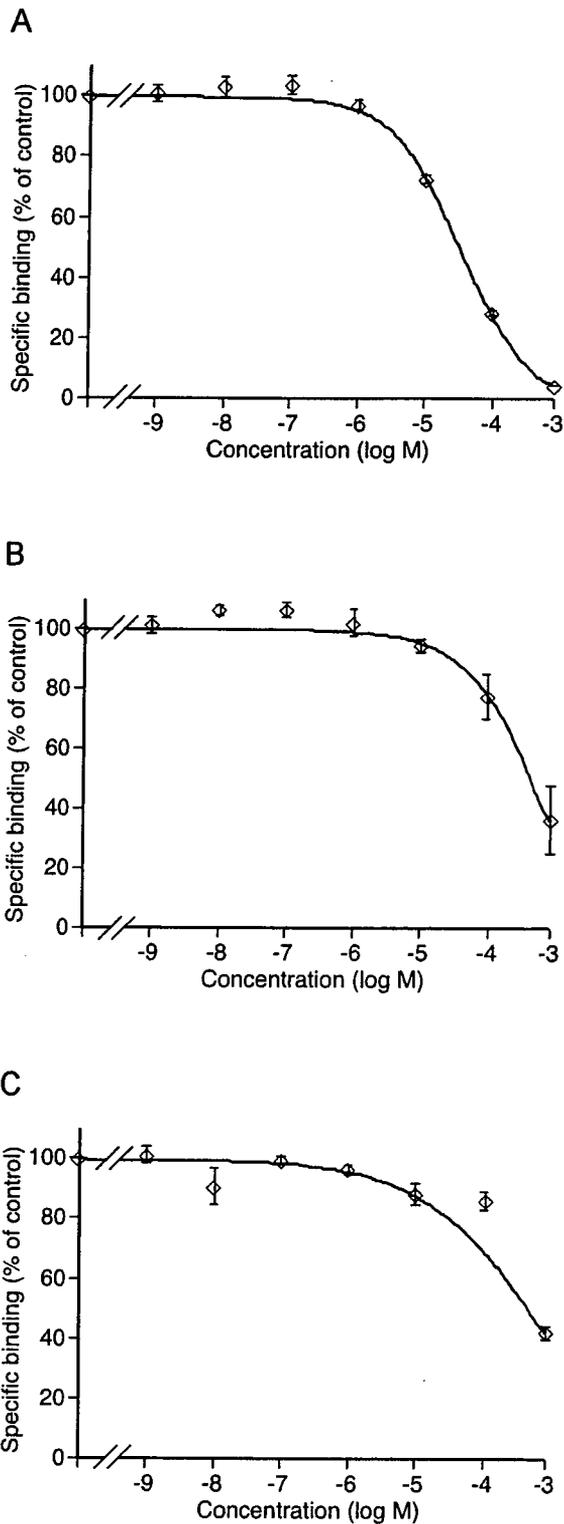


Fig. 5 CHO/hMOPR (A)、CHO/hDOPR (B)、CHO/hKOPR (C) から得た膜標品における、³H 標識各受容体選択的リガンド結合のトラマドール (◇) による阻害

	μ K_i (μM)	δ K_i (μM)	κ K_i (μM)
トラマドール	20.1	>100	>100

Table 5 ヒト型オピオイド受容体に対するトラマドールの親和性
 μ 、 δ および κ 受容体に対する各薬物の結合親和性を解離定数 K_i で示した。

検討した。Fig. 6 は、 μ 受容体を介したトラマドールの cAMP 産生抑制効果を示している。これから、 $I_{\text{max}}(\%)$ および IC_{50} 値を算出した (Table 6)。トラマドールの I_{max} はモルヒネに比べ有意に低く、トラマドールは μ 受容体に対して部分アゴニストとして作用していることが明らかとなった。

【考察】

今回検討したフェンタニルおよびオキシコドンの受容体各サブタイプに対する親和性とアゴニスト活性から、両者ともに主として μ 受容体を介してその鎮痛作用を発揮しているものと考えられる。オキシコドンは、 μ 受容体だけでなく κ 受容体にもアゴニスト作用があるとの報告があるが、本結果では、むしろモルヒネの方が κ 受容体に対する親和性が相対的に強く、オキシコドンはフェンタニルに類似し、 μ 受容体に対する選択性が高いことが示された。

一方、トラマドールに関しても、主として μ 受容体に親和性を有することが明らかとなった。また、cAMP アッセイより、トラマドールは μ 受容体に対して部分アゴニストとして作用することが示された。トラマドールに関しては、その代謝物 M1 ならびに M5 が μ 受容体に対して、より高親和性を有することが報告されており、これらの代謝物の作用に関しても同様に検討すれば、トラマドールの鎮痛作用機序の詳細がより明らかになるものと期待される。

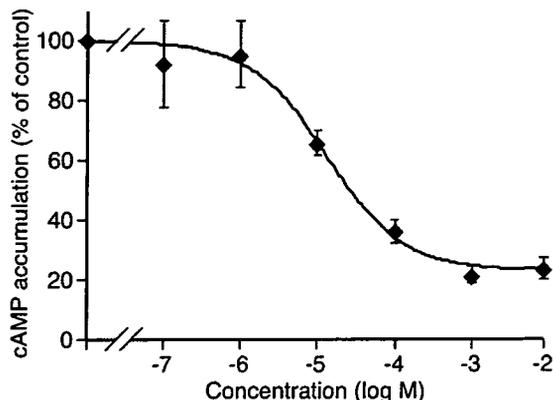


Fig. 6 CHO/hMOPR におけるフォルスコリン誘発 cAMP 蓄積のトラマドール (◆) による抑制

	IC_{50} (μM)	I_{max} (%)
トラマドール	11.2 ± 3.9	$76.4 \pm 3.7^*$

Table 6 CHO/hMOPR におけるトラマドールのアゴニスト活性

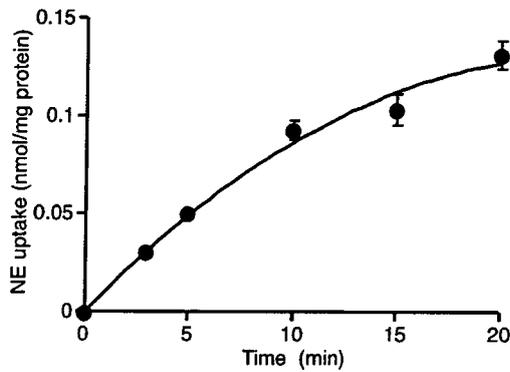
μ 受容体におけるトラマドールのアゴニスト活性の強さを IC_{50} 値ならびに最大抑制効果 I_{max} で示した。

* $P < 0.05$ vs モルヒネ (Student's *t*-test)

3. 平成 19 年度

【結果】

各オピオイドリガンドの細胞外 NE 取り込みへの効果について調べるため、初めに、細胞外 NE 取り込み量の経時変化を検討したところ、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 (Fig. 7)。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 $1 \mu\text{M}$ より高濃度において、有意に NE 取り込みを抑制し (Fig. 8A)、その IC_{50} 値は $1.96 \mu\text{M}$ であった (Table 7)。また、フェンタニルは $100 \mu\text{M}$ においてのみ、有意に NE 取り込みを



抑制した ($IC_{50} = 43.2 \mu M$; Fig. 8B および Table 7)。

Fig. 7 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

Ta

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 IC_{50} 値で示した。

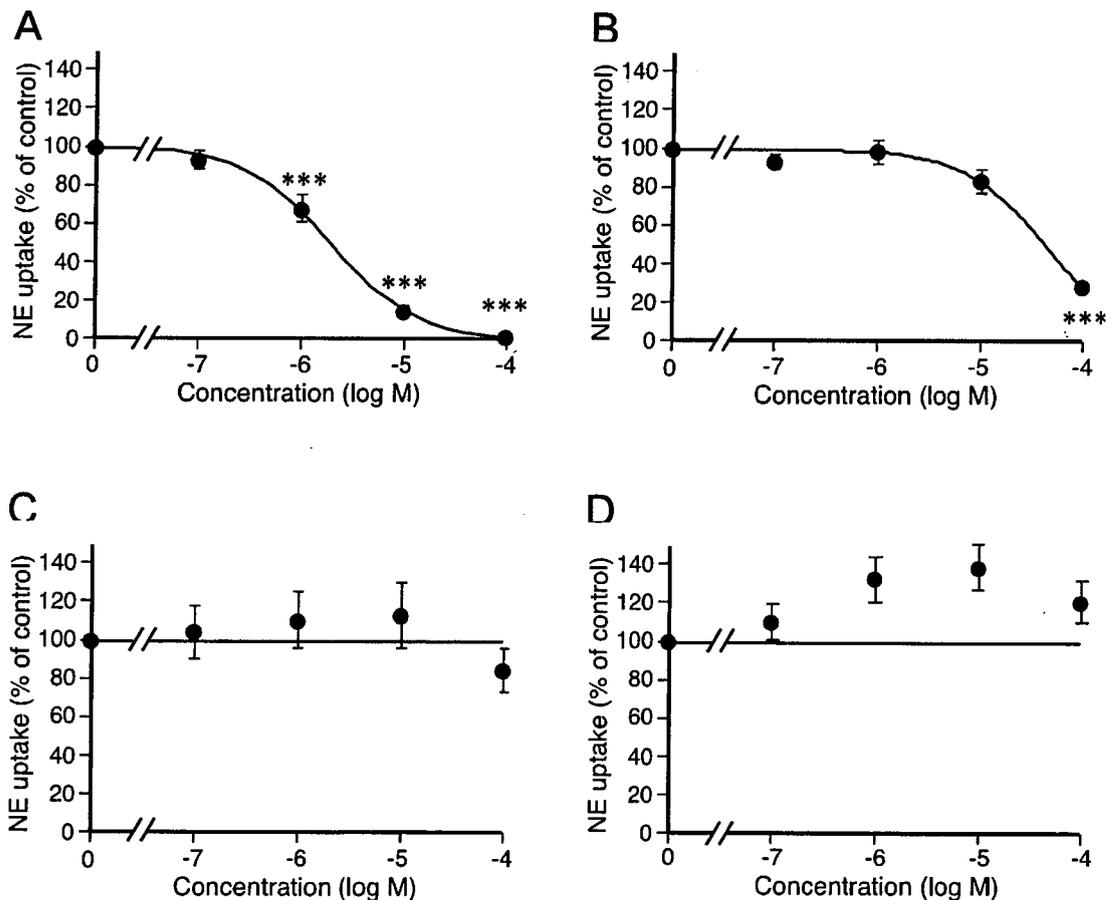


Fig. 8 CHO/hNETでの細胞外NE取り込みに対するトラマドール(A)、フェンタニル(B)、オキシコドン(C)、モルヒネ(D)の効果

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

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 μM) において NE 取り込みに影響を与えなかった (Fig. 8C および 8D)。

【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 ; Table 5 参照) 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、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、α₂ 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。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 IC₅₀ 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 ; Table 3 参照) 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。

D. 結論

拮抗性鎮痛薬の「鎮痛薬」としての作用は μ および κ 受容体、特に μ 受容体に対する部分アゴニストとしての作用によるものであり、一方、その「拮抗性」は μ 受容体においてモルヒネが完全アゴニストであるのに対し拮抗性鎮痛薬が部分アゴニストであるという 2 種の薬物間の相対的な関係にもとづくものであることが明らかとなった。

麻薬性鎮痛薬であるフェンタニルおよびオキシコドンの薬理作用は、ともに μ 受容体を介しており、δ および κ 受容体の寄与は小さいことが示唆された。また、トラマドールに関しても、オピオイド受容体を介したその薬理作用は主として μ 受容体を介したものであること、またその鎮痛作用の一部には、NET 活性抑制を介した NE 神経伝達促進作用が関与していることが示唆された。

本研究結果は、オピオイド性鎮痛薬の適正使用に大きく貢献する基礎的知見となることが期待される。

【研究業績】

(1) 論文発表

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

(2) 学会発表

井手聡一郎、南雅文、Uhl, George R.、石原熊寿、曾良一郎、池田和隆：μ オピオイド受容体遺伝子欠損マウスにおけるペンタゾシンの抗熱性・機械

性侵害受容効果の消失と抗化学性侵害受容効果
の維持、第79回日本薬理学会年会（横浜）、2006
年3月

(3) 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
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
藤本幸弘, 林田眞和	腎臓移植術の輸血・輸液療法	稲田英一編	周術期の輸液・輸血療法(麻酔科診療プラクティス第18巻)	文光堂	東京	2005	220-221
藤本幸弘, 林田眞和	モルヒネは痛みを抑える一方で免疫力を落とすのか?	下山直人編	患者の疑問に答えるオピオイドの要点	真興交易(株)医学出版部	東京	2005	48-52
林田眞和	手術患者の全身状態の評価ー術前検査各論ー酸塩基バランス機能評価.	弓削孟文編	麻酔科術前管理ハンドブック2005	真興交易(株)医学出版部	東京	2005	78-85
林田眞和	麻酔方法と周術期全身管理計画の立案ー周術期全身管理計画ー酸塩基バランス機能評価.	弓削孟文編	麻酔科術前管理ハンドブック2005	真興交易(株)医学出版部	東京	2005	179-182
曾良一郎, 渡邊秀和, 井手聡一郎, 池田和隆	モルヒネの効き, 副作用のでかたは個人で異なるか?	下山直人編	患者の疑問に答えるオピオイドの要点	真興交易(株)医学出版部	東京	2005	53-62
菅野敬之, 田上恵	合併症患者の麻酔の新しい流れー高血圧	後藤文夫、 並木昭義、 島田康弘	先端医療シリーズ33:麻酔科の新しい流れ	先端医療技術研究所	東京	2005	248-251
菅野敬之, 佐藤泰雄, 田上恵	術中のトラブルシューティングー導入時および神経ブロック施行時のトラブル	弓削孟文	麻酔科診療プラクティス:麻酔科トラブルシューティング	文光堂	東京	2005	202-205
田上恵	師弟交歓 医学界編		論座	朝日新聞社	東京	2005	169-172
下山直人, 下山恵美	モルヒネが効きにくい痛みとその対策	下山直人編	患者の疑問に答えるオピオイドの要点	真興交易(株)医学出版部	東京	2005	85-97
下山直人, 下山恵美	疼痛対策、緩和ケア	西條長宏編	癌治療の新たな試み	医薬ジャーナル社	東京	2005	664-679

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
Ikeda K, Ide S, Han W, Hayashida M, Uhl GR, Sora I.	How individual sensitivity to opiates can be predicted by gene analyses.	Trends Pharmacol Sci	26	311-317	2005

Takahashi T, Kobayashi T, Ozaki M, Takamatsu Y, Ogaia Y, Ohta M, Yamamoto H, Ikeda K.	G protein-activated inwardly rectifying K ⁺ channel inhibition and rescue of <i>weaver</i> mouse motor functions by antidepressants.	Neurosci Res	54	104-111	2006
Kobayashi T, Washiyama K, Ikeda K.	Inhibition of G protein-activated inwardly rectifying K ⁺ channels by ifenprodil.	Neuropsychopharmacology	31	516-524	2006
Yamamoto H, Imai K, Takamatsu Y, Kamegaya E, Shen HW, Hagino Y, Kobayashi H, Harayama Y, Shimada K, Yamamoto T, Sorai I, Koga H, Ikeda K.	Methamphetamine modulation of gene expression in the brain: analysis using customized cDNA microarray system with the mouse homologues of KIAA genes.	Mol Brain Res	137	40-46	2005
笠井慎也, 池田和隆	オピオイドと遺伝子解析.	緩和医療学	8(1)	98-99	2006
池田和隆, 大谷保和, 西澤大輔, 井手聡一郎, 曾良一郎	モルヒネ感受性の遺伝子解析.	日本臨牀	63	463-466	2005
池田和隆, 萩野洋子	覚醒剤依存症の分子機構研究とその応用.	ファルマシア	41	760-764	2005
池田和隆, 山本秀子	アルコールと麻薬と覚せい剤.	生体の科学	56(1)	45-50	2005
池田和隆, 高松幸雄, 萩野洋子, 中本百合江, 吉井光信, 福島攝, 曾良一郎	ADHDのモデル動物の解析.	脳と精神の医学	16	161-167	2005
大谷保和, 原口彩子, 近藤あゆみ, 高松幸雄, 山本秀子, 妹尾栄一, 池田和隆	覚せい剤依存治療における渴望感制御の重要性: 評価法の構築と候補治療薬の探索に向けて.	日本神経精神薬理学雑誌	25	227-233	2005
Hayashida M, Fukuda K, Fukunaga A.	Clinical application of adenosine and ATP for pain control.	Journal of Anesthesia	19(3)	225-235	2005
Hayashida M, Fukuda K, Fukunaga A, Meno A, Sato K, Tarui K, Arita H, Kaneko Y, Hanaoka K.	Analgesic effect of intravenous ATP on postherpetic neuralgia in comparison with responses to intravenous ketamine and lidocaine.	Journal of Anesthesia	19(1)	31-35	2005

Xu H, Arita H, Hayashida M, Zhang L, Sekiyama H, Hanaoka K.	Pain-relieving effects of processed Aconiti tuber in CCI-neuropathic rats.	Journal of Ethnopharmacology	103	392-397	2006
Shu H, Arita H, Hayashida M, Sekiyama H, Hanaoka K.	Effects of processed Aconiti tuber and its ingredient alkaloids on the development of antinociceptive tolerance to morphine.	Journal of Ethnopharmacology	103	398-405	2006
Bougaki M, Hayashida M, Kin N, Tomioka T, Chinzei M, Hanaoka K.	Bispectral Index Monitoring during pediatric cardiac surgery: effects of anesthetic doses, hypothermic cardiopulmonary bypass, and age.	Cardiovascular Anesthesia	9(1)	1-7	2005
Shu H., Arita H., Hayashida M., Chiba S., Sekiyama H., Hanaoka K.	Inhibition of morphine tolerance by processed Aconiti tuber is mediated by kappa-opioid receptors.	Journal of Ethnopharmacology	106(2)	263-271	2006
Hayashida M, Ikeda K, Fukuda K, Tagami M, Nagashima M, Sato Y, Ohgai Y, Arita H, Hanaoka K.	Acute Postoperative Pain Management: Past, Present, and Future.	8th Biennial Congress of the Asian & Oceanic Society of Regional Anesthesia and Pain Medicine		15-19	2005
林田眞和, 有田英子, 関山裕詩, 折井亮, 矢島直, 花岡一雄	CRPSの機序判別としてのDCTの役割.	ペインクリニック	26	950-956	2005
水野樹, 有田英子, 河村岳, 浅原美保, 辻原寛子, 芝間さやか, 林田眞和, 花岡一雄	慢性疼痛に対する薬理的疼痛機序判別試験(ドラッグチャレンジテスト): テスト薬物に陽性反応を示した4症例.	治療学	39	103-106	2005
花岡一雄, 小川真, 林田眞和	自己疼痛管理法(PCA).	臨床整形外科	40	184-186	2005
水野樹, 関山裕詩, 折井亮, 鎮西美栄子, 矢島直, 林田眞和, 有田英子, 花岡一雄	東京大学医学部附属病院における硬膜外内視鏡手術(エピドラスコピー)の説明書と同意書ーエピドラスコピーに伴う偶発症についてー.	日本ペインクリニック学会誌	12(4)	408-417	2005

有田英子, 水野樹, 関山裕詩, 齋藤勇一郎, 小川真, 折井亮, 林田眞和, 花岡一雄	腰下肢痛の治療: 硬膜外内視鏡手術療法.	ペインクリニック	26	326-333	2005
福永敦翁, 林田眞和, 福田謙一, 櫻井学	麻酔領域におけるアデノシン化合物の応用.	日本麻酔・薬理学会誌	17	9-11	2005
林田眞和, 福永敦翁, 福田謙一	急性痛とアデノシン化合物.	日本麻酔・薬理学会誌	17	12-14	2005
水野樹, 鈴木正寛, 齋藤勇一郎, 関山裕詩, 矢島直, 林田眞和, 有田英子, 花岡一雄	東京大学医学部附属病院における硬膜外内視鏡手術 (エピドラスコピ) の高度先進医療の承認および説明と同意書の作成.	ペインクリニック	26(12)	1713-1718	2005
関山裕詩, 有田英子, 碓井久子, 林田眞和, 花岡一雄	代替医療としての光線療法.	ペインクリニック	26	775-781	2005
藤本幸弘, 林田眞和, 花岡一雄	術後痛の生体に及ぼす影響.	ペインクリニック	26	S9-S13	2005
林田眞和, 池田和隆	ゲノムペインクリニック時代へ向けて.	ペインクリニック	26	1465-1466	2005
水野樹, 浅原美保, 折井亮, 矢島直, 林田眞和, 有田英子, 花岡一雄	東京大学医学部附属病院におけるドラッグチャレンジテストの説明文書と同意文書—方法と偶発症について—.	日本ペインクリニック学会誌.	13(1)	13-17	2006
林田眞和, 今村佐知子, 花岡一雄	術後痛の成因と生体に及ぼす影響.	Anesthesia 21 Century 2006	8	1368-1376	2006
Wu HE, Sun HS, Terashivili M, Schwasinger E, Sora I, Scott Hall F, Uhl GR, Tseng LF.	dextro- and levo-morphine attenuate opioid delta and kappa receptor agonist produced analgesia in mu-opioid receptor knockout mice.	Eur J Pharmacol	531(1-3)	103-107	2006
Morita Y, Ujike H, Tanaka Y, Uchida N, Nomura A, Ohtani K, Kishimoto M, Morio A, Imamura T, Sakai A, Inada T, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sekine Y, Iwata N, Iyo M, Sora I, Ozaki N, Kuroda S.	A nonsynonymous polymorphism in the human fatty acid amide hydrolase gene did not associate with either methamphetamine dependence or schizophrenia.	Neurosci Lett	376(3)	182-187	2005

Nishiyama T, Ikeda M, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Sekine Y, Iyo M, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Ujike H, Inada T, Furukawa T, Ozaki N.	Haplotype association between GABA(A) receptor gamma2 subunit gene (GABRG2) and methamphetamine use disorder.	Pharmacogenomics J	5(2)	89-95	2005
Morita Y, Ujike H, Tanaka Y, Uchida N, Nomura A, Ohtani K, Kishimoto M, Morio A, Inada T, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sekine Y, Iwata N, Iyo M, Sora I, Ozaki N.	The X-box binding protein 1 (XBP1) gene is not associated with methamphetamine dependence.	Neurosci Lett	383(1-2)	194-198	2005
Ohgake S, Hashimoto K, Shimizu E, Koizumi H, Okamura N, Koike K, Matsuzawa D, Sekine Y, Inada T, Ozaki N, Iwata N, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Ujike H, Shirayama Y, Iyo M.	Functional polymorphism of the NQO2 gene is associated with methamphetamine psychosis.	Addiction Biology	10	145-148	2005
Ikeda M, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshiya Y, Sekine Y, Iyo M, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Ujike H, Inada T, Ozaki N.	Positive association of AKT1 haplotype to Japanese methamphetamine use disorder.	Int J Neuropsychopharmacol	8	1-5	2005

Itoh K, Hashimoto K, Shimizu E, Sekine Y, Ozaki N, Inada T, Harano M, Iwata N, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Nakata K, Ujike H, Iyo M.	Association study between brain-derived neurotrophic factor gene polymorphisms and methamphetamine abusers in Japan.	Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet	132(B)	70-73	2005
Hashimoto T, Hashimoto K, Matsuzawa D, Shimizu E, Sekine Y, Inada T, Ozaki N, Iwata N, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Ujike H, Iyo M.	A functional glutathione-S-transferase P1 polymorphism is associated with methamphetamine-induced psychosis in Japanese population.	Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet	135(B)	5-9	2005
Arai M, Yamada K, Toyota T, Obata N, Haga S, Yoshida Y, Nakamura K, Minabe Y, Ujike H, Sora I, Ikeda K, Mori N, Yoshikawa T, Itokawa M.	Association Between Polymorphisms in the Promoter Region of the Sialyltransferase 8B (SIAT8B) Gene and Schizophrenia.	Biol Psychiatry	59	652-659	2006
Yamashita M, Fukushima S, Shen H, Hall FS, Uhl GR, Numachi Y, Kobayashi H, Sora I.	Norepinephrine Transporter Blockade Can Normalize the Prepulse Inhibition Deficits Found in Dopamine Transporter Knockout Mice.	Neuropsychopharmacology	31	2132-2139	2006
曾良一郎, 小林秀昭, 沼知陽太郎	精神疾患モデルとしての遺伝子改変動物	精神神経学雑誌	107(3)	285-289	2005
小林秀昭, 曾良一郎	μオピオイド受容体(OPRM1)遺伝子多型.	分子精神医学	5(3)	64-74	2005
曾良一郎, 小林秀昭	モノアミン神経系と報酬. 特集: 行動を司る脳機能の分子メカニズム.	実験医学	23(8)	1159-1163	2005
曾良一郎, 福島攝	遺伝子ノックアウトマウスの行動実験を行う前に必要なこと.	日本薬理学雑誌	125	373-377	2005