

カナビノイド研究における実施計画

平成21
-22年度

細胞を用いた研究

- カナビノイド発現細胞を用いた研究(受容体脱感作・耐性研究)

疼痛・悪液質モデル動物を用いた研究

- 担がん動物(悪液質モデル動物)に対するマリノール剤の効果判定
- マリノール製剤の食欲増進作用、制吐作用の効果についての研究

本邦におけるカナビノイド製剤を用いた疼痛・悪液質における治療

- マリノール製剤による制吐作用、食思増進効果の臨床研究

分担研究報告書

疼痛下におけるドロノビロールの精神依存と耐性形成抑制の解明、
がん性腹膜炎疼痛モデルの作製とリドカインの鎮痛メカニズムの
解明についての研究

鈴木 勉 星薬科大学 薬品毒性学教室 教授

研究要旨：痛みはがん患者にとって依然として大きな問題であり、治療法が確立していない難治性疼痛や、その他の苦痛度の高い症状に対して早急に取り組む必要がある。本研究では、緩和ケア領域における新たな治療法の開発を目指し、動物モデルにおける各種候補薬の疼痛制御メカニズムの包括的な検討を行った。まず、ケタミンの疼痛抑制機構の解明のため、痛覚伝達において重要な役割を果たすことが知られる TRPA1 感冷チャネル (TRPA1) の安定発現細胞株を用いた電気生理学的な検討を行った。しかしながら、TRPA1 の安定発現細胞にケタミンを処置しても、活動電位は認められず、ケタミンが TRPA1 に作用して、疼痛伝達の制御をする可能性がないことが明らかとなった。次に、難治性がん性疼痛、並びに悪液質（嘔気・嘔吐や食欲低下）に対してのカンナビノイド製剤の有効性を検討する一手として、カンナビノイドの依存形成能およびその機構について検討を行った。その結果、選択的 CB1 受容体作動薬 CP-55,940 を連続投与することにより、報酬効果の発現が認められ、さらに CP-55,940 の前投与は、側坐核領域における、methamphetamine 誘発 dopamine 遊離促進作用を有意に増強した。これらのことから、CB1 受容体の作動薬は依存性を有する可能性が示唆された。また、methamphetamine などの他の依存性薬物の報酬効果を増強する可能性が示唆された。

A. 研究目的

(1)ケタミンの有するがん性疼痛抑制
作用の機構解明に関する検討

非競合的 NMDA 受容体拮抗薬であるケタ
ミンは、がん性疼痛成分の多くを占める
神経障害性疼痛の治療に有効であると考え

られ、実際に臨床的にもその有用性は実証されている。しかし、ケタミンの神経障害性疼痛抑制機構は未だ不明な点が多い。

ケタミンを用いて各状況に応じたきめ細かながん性疼痛治療を実現させるためには、ケタミンの神経障害性疼痛抑制機構について詳細な検討を行い、それらの情報を臨床に還元することが急務であると考えられる。その一手として、我々は痛覚伝達において重要な役割を果たすことが知られる TRPA1 感冷チャネル (TRPA1) に着目し、TRPA1 に対するケタミンの反応性について検討することで、ケタミンの疼痛制御機構の解明を目指した。

(2) 慢性疼痛下におけるカンナビノイドの依存形成に関する検討

カンナビノイドは、モルヒネと同等の鎮痛効果を持ちながら、嘔気・嘔吐、食欲不振などの悪液質症状を改善する結果が得られており、本邦においても、難治性がん性疼痛を伴うがん性悪液質（嘔気・嘔吐や食欲不振）の改善に有用であると期待されている。一方で、カンナビノイドの乱用は社会的な問題になりつつある。臨床におけるカンナビノイド製剤の適切な疼痛治療アルゴリズムを確立するためには、慢性疼痛下におけるカンナビノイドの精神依存形成能ならびにそのメカニズムについて検証することが必要である。そこで、我々は坐骨神経結紮による神経障害性疼痛モデル動物を用いて、カンナビノイド投与による脳内ドパミン放出量ならびに報酬効果の

変化について検討を行った。

B. 研究方法

(1) ケタミンの有するがん性疼痛抑制作用の機構解明に関する検討

実験には、TRPA1 の安定発現細胞株を使用した。

ホールセルパッチクランプ法

視床由来初代培養神経/グリア共培養細胞を、人工脳脊髄液（イオン組成 (mM): NaCl 140, KCl 4, CaCl₂ 1.2, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) 10, MgCl₂ 1, D-glucose 10; pH 7.30) にて灌流している小水槽内で保持した。パッチ電極（イオン組成 (mM): NaCl 140, HEPES 10, ethylene glycol bis (·-aminoethyl ether)-N, N, N', N'-tetraacetic acid (EGTA) 5; pH 7.30) を用い、顕微鏡直視下、室温にて TRPA1 安定化発現 HEK 293 細胞にホールセル記録を行い、電位固定下のもと薬液を処置することにより誘導される電流を測定した。また、ホールセル記録には borosilicate 製で抵抗が 5-10 MΩ のガラス管 (Sutter Instrument Co., Ca., USA) を使用した。ホールセル電流は Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments, CA., USA) を使用して採取し、データ解析には pCLAMP 8 (Axon Instruments) を用いた。刺激回数に依存した Na⁺ チャネル抑制作用の検討を除き、P/4 刺激によって leak currents の補正を行った。薬物は 3 mL/min で灌流している人工脳脊髄液に添加する

ことにより細胞へ処置した。

(2) 慢性疼痛下におけるカンナビノイドの依存形成に関する検討

実験には ICR 系雄性マウスを使用した。

マイクロダイアリシス法

Sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) (東京化成 (株)、東京) 麻酔下、ラットを動物脳定位固定装置に固定し、lidocaine hydrochloride により頭部に局所麻酔を行い、ステレオ用ガイド (SAG-4 または SAG-9: (株) Eicom、京都) に接続したガイドカニューレ (AG-4 または AG-9: (株) Eicom) の先端を脳アトラス¹²⁾ に基づいて腹側被蓋野領域 (bregma より前方 -6.8 mm、左方向 -0.9 mm、深さ -7.8 mm、角度 10°) に挿入固定した。その後、ダミーカニューレ (AD-4 または AD-9: (株) Eicom) を挿入してキャップナット (AC-1: (株) Eicom) を締め、実験を開始するまで 3-5 日間隔離して飼育した。

Conditioned place preference (CPP) 法

選択的 CB1 受容体作動薬 CP-55,940 による報酬効果は CPP 法を用いて評価した。実験装置は幅 30 cm、長さ 60 cm、高さ 30 cm の白および黒色からなる 2-compartment box を使用した。Box は仕切り板によって 2 つの区間に分けられており、それぞれ白側の区間は凸凹のある床で、黒側の区間は平面の床で構成されている。条件づけはブレ方式に従い行った。すなわち、条件づけを行う前日に、薬物あるいは溶媒のいずれも処置せずに box 中央に設置した

プラットホーム上にラットを乗せ、プラットホームに降りた時点より 15 分間、白および黒の区間を自由に行き来させ、それぞれの区間における滞在時間を測定し、これを pre-test 値とした。1 日目に薬物を投与したラットは pre-test 値の低い方の区間へ、溶媒を投与したラットは pre-test 値の高い方の区間にそれぞれ 60 分間閉じ込め、2 日目にはそれぞれ逆の操作を行った。この一連の操作を 1 セッションとし、合計 3 セッション行った。6 日目の条件づけが終了した翌日に post-test を行い、pre-test 同様にそれぞれの box における滞在時間を測定し、薬物を処置した区間における post-test 値と pre-test 値の差を CPP スコア (sec) として算出し、報酬効果の指標とした。

Western-blot 法

Western blot は、sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 法に従い、5-20% の濃度勾配のゲル (アトー (株) 東京) 中の各レーンに loading buffer (アトー (株)) と全細胞溶解液の混合液を注入し、抗原タンパク質を電気泳動法を用いて分子量の差によって分離した。分離完了後、速やかにゲルを取り出し、電気泳動した抗原蛋白を 5% methanol を含む 25 mM Tris-HCl buffer に浸したニトロセルロースメンブランにホライズブロット (アトー (株)) を用い電氣的に移行させた。ニトロセルロースメンブランに移行後、メンブランをブロッキングし、さらに、phosphory-

lated-CB1 (Ser316) 受容体 (p-CB1R) 抗体、および glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 抗体にそれぞれ別々に抗原タンパクをメンブラン上で反応させるため、一晚 4 °C にてインキュベーションを行った。その後、0.05 % Tween 20 (Research Biochemicals, Inc.) を含む TBS (TTBS) で洗浄し、た horseradish peroxidase (HRP) 標識の二次抗体 (Southern Biotechnology Associates, Inc., AL, USA) と室温にて 2 時間インキュベーションを行い、反応させた。インキュベーション後、TTBS で洗浄し、ケミルミノエッセンス法に従い蛍光発色性の基質 (SuperSignal, PIERCE, IL, USA) を用いて、目的とするタンパク質を検出した。蛍光発色させたメンブランはケミルミノエッセンス用フィルム (GE Healthcare Biosciences co., Little Chalfont, USA) に転写し、フィルムの画像はスキャナ (RICOH imagio MP C5000; リコー (株)) によってコンピューターに取り込み、バンドは NIH imaging software を用いて画像解析を行なった。

なお、p-CB1R (Ser316) タンパク質量は GAPDH を陽性対照とし、それぞれのバンドを補正した後に有意差検定を行った。

(倫理面への配慮)

本研究を遂行するにあたり、科学的にはもとより、動物福祉の観点からも適正な動物実験の実施を促すことを目的として制定された星薬科大学動物実験指針に従い、

本学の動物実験委員会で承認を得たうえで、動物に対する倫理面を十分に考慮し、使用動物数を最小限にして、すべての実験を行った。

C. 研究結果

(1) ケタミンの有するがん性疼痛抑制作用の機構解明に関する検討

まず、TRPA1 チャンネルの安定発現細胞に TRPA1 チャンネルの活性化薬である allyl isothiocyanate (AITC) を処置したところ、著明な活動電位が観察された。このような条件下、ケタミン (100 μ M) を処置しても活動電位は観察されなかった。一方、AITC 誘発活動電位に対するケタミンの影響について検討したところ、AITC および ケタミンを共処置しても、AITC による活動電位には影響が認められなかった。

(2) カンナビノイドの精神依存形成に関する検討

CP-55,940 (0.0025、0.05 および 0.1 mg/kg) を投与することにより、用量依存的に報酬効果の発現が認められた。この効果は dopamine D₁ 受容体拮抗薬である SCH23390 (0.75 mg/kg) を前投与することにより有意に抑制された。さらに CP-55,940 (1mg/kg) 慢性処置後の limbic および線条体領域におけるリン酸化型 CB1 受容体タンパク質量の変化を western blot 法に従い検討した。その結果、リン酸化 CB1 受容体タンパク質量の有意な増加が認められた。また、CP-55,940 腹側被

蓋野領域における dopamine 遊離量の変化について検討した。その結果、腹側被蓋野領域において dopamine の細胞外濃度の有意な増加が認められた。

D. 考察

(1) ケタミンの有するがん性疼痛抑制作用の機構解明に関する検討

ケタミンの神経障害性疼痛抑制機構について解明する一手として、我々は痛覚伝達において重要な役割を果たすことが知られる TRPA1 感冷チャンネルに着目し、TRPA1 に対するケタミンの反応性について電気生理学的に検討した。TRPA1 の安定発現細胞にケタミンを処置したが、活動電位は認められなかった。さらに、TRPA1 チャンネルの活性化薬である AITC 誘発活動電位に対して、増強作用も抑制作用も示さなかった。これらのことから、ケタミンは TRPA1 に作用して、疼痛伝達の制御を行う可能性がないことが明らかとなった。

(2) カンナビノイドの精神依存形成に関する検討

CP-55,940 を連続投与することにより、用量依存的に報酬効果の発現が認められ、その効果は dopamine D₁ 受容体拮抗薬である SCH23390 (0.75 mg/kg) を前投与することにより有意に抑制された。さらに、CP-55,940 の前投与は、側坐核領域における、methamphetamine 誘発 dopamine 遊離促進作用を有意に増強した。これらのことから、CB1 受容体の作動薬は依存性を

有することが明らかとなった。また、methamphetamine などの他の依存性薬物の報酬効果を増強する可能性が示唆された。現時点では、さらなるメカニズムの検討が必要と思われるが、脳内において、CB1 受容体の一部が中脳辺縁 dopamine 神経上に発現しているといった報告も散見されることから、CB1 受容体作動薬は dopamine 神経上に発現する受容体を介して、その活性および dopamine 遊離を促進させ、報酬効果を発現している可能性が想定される。今後は、慢性疼痛モデル動物を用いて、同様の検討を行い、CB 受容体作動薬が疼痛下においても依存性を有するかについて検討を行う予定である。

E. 結論

本研究のような、がん性疼痛という病態を意識した研究およびその成果は疼痛制御機構に関する研究領域に新たな視点を与えることができるばかりでなく、優れた疼痛治療アルゴリズムの確立のために有用であると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

HASHIMOTO, K., AMANO, T., SAKAI, N., SUZUKI, T., NARITA, M.: Cell-dependent physiological synaptic action of morphine in the rat habenular nucleus:

morphine both inhibits and facilitates excitatory synaptic transmission. *Neurosci. Lett.*, (2009), 451, 270-273

HASHIMOTO, K., AMANO, T., KASAKURA, A., UHL, GR., SORA, I., SAKAI, N., KUZUMAKI, N., SUZUKI, T., NARITA, M.: μ -Opioid receptor-independent fashion of the suppression of sodium currents by μ -opioid analgesics in thalamic neurons. *Neurosci Lett.*, (2009), 453, 62-67

FUJII, H., WATANABE, A., NEMOTO, T., NARITA, M., MIYOSHI, K., NAKAMURA, A., SUZUKI, T. AND NAGASE, H.: Synthesis of novel twin drug consisting of 8-oxaendoethanotetrahydromorphides with a 1,4-dioxane spacer and its pharmacological activities: μ , κ , and putative epsilon opioid receptor antagonists. *Bioorg Med Chem Lett.*, 19, 438-441 (2009)

MINAMI, K., HASEGAWA, M., ITO, H., NAKAMURA, A., TOMII, T., MATSUMOTO, M., ORITA, S., MATSUSHIMA, S., MIYOSHI, T., MASUNO, K., TORII, M., KOIKE, K., SHIMADA, S., KANEMASA, T., KIHARA, T., NARITA, M., SUZUKI, T., KATO, A.: Morphine, oxycodone, and fentanyl exhibit different analgesic profiles in mouse pain models. *J. Pharmacol. Sci.*, (2009), 111, 60-72

2. 学会発表

松島勇紀, 成田 年, 新倉慶一, 成田道子, 朝戸めぐみ, 高木茂実, 葛巻直子, 鈴木 勉: 薬物依存の研究 (第 435 報): オピオイドによる報酬効果の発現に対する腹側被蓋野-前帯状回 dopamine 神経の関与, 第 82 回日本薬理学会年会, 2009 年 3 月, 横浜

池上大悟, 成田 年, 朝戸めぐみ, 鶴川百合, 新倉慶一, 成田道子, 浅沼幹人, 喜多大三, 葛巻直子, 鈴木 勉: 薬物依存の研究 (第 436 報): Methamphetamine ならびに methylphenidate 誘発神経毒性発現機序の相違, 第 82 回日本薬理学会年会, 2009 年 3 月, 横浜

中原加恵, 成田 年, 松島勇紀, 成田道子, 高木茂実, 新倉慶一, 今井哲司, 葛巻直子, 鈴木 勉: 薬物依存の研究 (第 437 報): μ オピオイド受容体作動薬による報酬効果発現および維持における腹側被蓋野-前帯状回 dopamine 神経系の関与, 第 44 回日本アルコール・薬物医学会総会, 2009 年 9 月, 横浜

中原加恵, 成田 年, 松島勇紀, 成田道子, 高木茂実, 新倉慶一, 今井哲司, 葛巻直子, 鈴木 勉: 薬物依存の研究 (第 437 報): μ オピオイド受容体作動薬による報酬効果発現および維持における腹側被蓋野-前帯状回 dopamine 神経系の関与, 第 44 回日本アルコール・薬物医学会総会, 2009 年 9 月,

横浜

Tsutomu Suzuki, Daigo Ikegami, Megumi Asato, Michiko Narita, Mai Saeki, Naoko Kuzumaki and Minoru Narita : Distinct mechanism of methamphetamine- and methylphenidate-induced dopamine related-neurotoxicity, The College on Problems of Drug Dependence 71th Annual Scientific meeting, 2009 年 6 月, Reno/Sparks, USA.

今井哲司, 成田 年, 新倉慶一, 古谷雅治, 成田道子, 葛巻直子, 鈴木 勉 : 薬物依存の研究 (第 439 報) 慢性疼痛下における micro RNA の発現変動を伴った脳内報酬系の可塑的变化とオピオイド精神依存不形成に関する検討, 第 19 回日本臨床精神神経薬理学会・第 39 回日本神経精神薬理学会合同年会, 2009 年 11 月, 京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特記事項なし。

平成21年度 第3次対がん総合戦略研究事業
的場班班会議

2010年1月30日

星薬科大学 薬品毒性学教室

鈴木 勉、成田 年、今井哲司、葛巻直子

分担研究課題

- ①がん細胞を用いた骨転移の動作時痛モデルとがん性腹膜炎の腹痛モデルの開発（上園班員と共同）
- ②骨転移の動作時痛とがん性腹膜炎に伴う腹痛に対するケタミンとリドカインの疼痛抑制機構（上園班員と共同）
- ③カンナビノイドの疼痛下での依存や耐性形成の抑制（上園班員と共同）

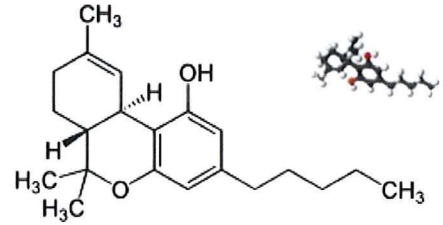
大麻： marijuana



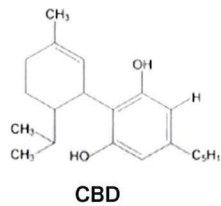
大麻： marijuana
学名： *Cannabis sativa L*

3大主成分

Tetrahydrocannabinol; **THC**, Δ^9 -THC



Cannabidiol

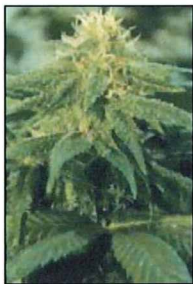


Cannabinol

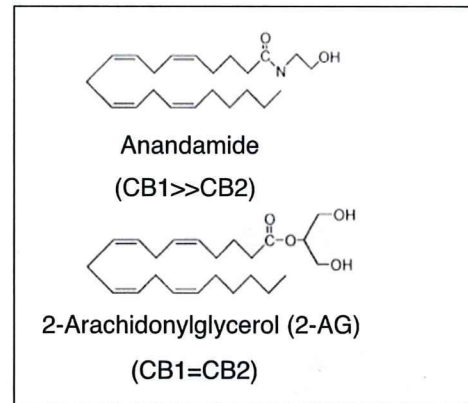
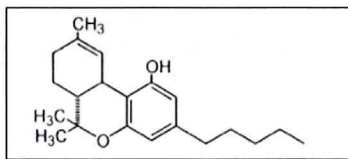


内因性カンナビノイドシステム

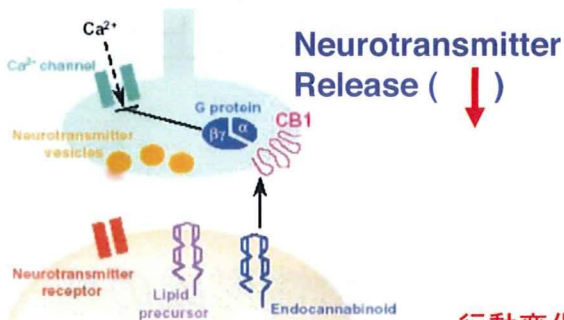
大麻の主な精神活性成分



Δ^9 -THC
(CB1=CB2)

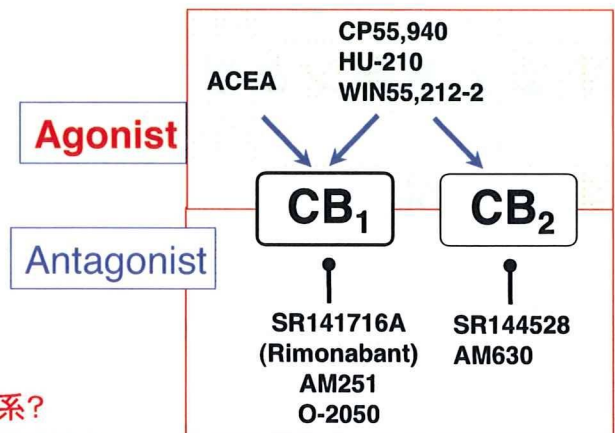


逆行性シナプス伝達



CP慢性処置による
覚せい剤の作用変化

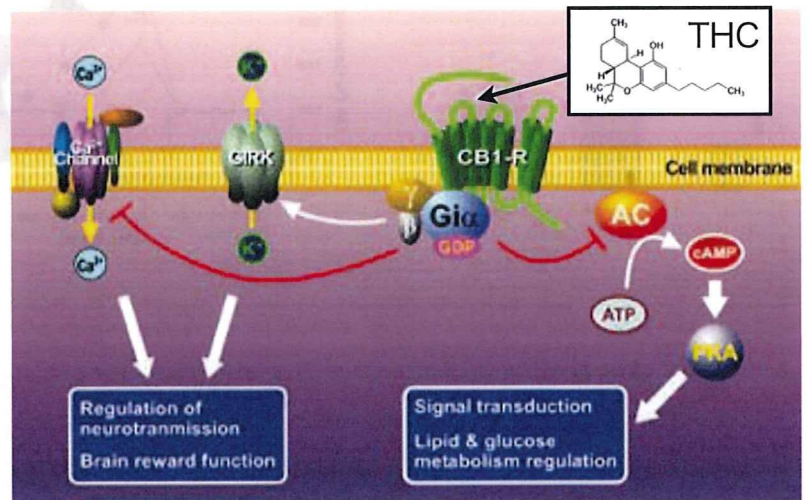
行動変化?
モノアミン神経系?
CB1 agonist作用変化?
細胞内情報伝達系の変化?



カンナビノイドの生理活性

大麻の主成分として知られている Δ -9テトラヒドロカンナビノール (Δ -9 tetrahydrocannabinol) : Δ -9-THC は、多幸感、時間・空間感覚の混乱、記憶障害、疼痛閾値の上昇、といった多彩な精神神経反応をもたらす、鎮痛薬として使用している国も存在する。エイズや癌による多発性硬化症による痛みに対して有効という報告もある。

カンナビノイド受容体である CB1 は、7回膜貫通型の G タンパク共役型 (G_i/G_o) 受容体であり、アデニル酸シクラーゼの活性低下を伴わない ATP の産生が抑制される。



脳内報酬系におけるカンナビノイドによる dopamine 遊離の変化

Cannabinoid and Heroin Activation of Mesolimbic Dopamine Transmission by a Common μ 1 Opioid Receptor Mechanism
Gianluigi Tanda, *et al.*
Science **276**, 2048 (1997);

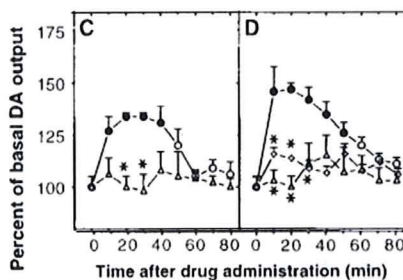


Fig. 1 Effect of intravenous WIN55212-2 on dialysate DA in the shell. WIN55212-2 doses of 0.15 and 0.30 mg/kg.

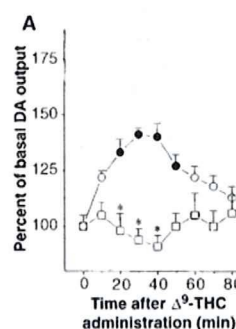


Fig. 2. (A) Effect of naloxonazine (squares) or vehicle (circles), bilaterally infused in the VTA, on dialysate DA in the NAC stimulated by Δ^9 -THC and by heroin. Results are means \pm SEM of the amount of DA found in 10-min dialysate samples expressed as percent of basal values uncorrected for probe recovery. Solid symbols: $P < 0.05$ compared with basal values. Asterisks: $P < 0.05$ compared with the corresponding value of saline-pretreated controls.

CB1 受容体作動薬である WIN55212-2 を i.v. 投与することにより側坐核の shell における dopamine 遊離量の増加が認められる。

また、腹側被蓋野に μ オピオイド受容体拮抗薬である naloxonazine を前処置することにより側坐核において i.v. Δ^9 -THC 誘発 dopamine 遊離量の抑制が認められる。



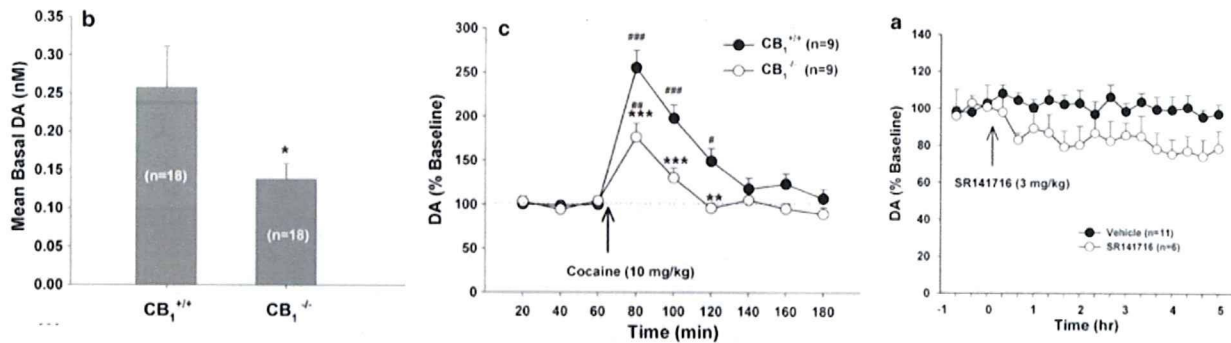
カンナビノイド誘発 dopamine 遊離量の増加には腹側被蓋野における μ オピオイド受容体が一部関与している可能性が考えられる。

コカインによるドパミン遊離におけるCB1受容体の関与

Attenuation of basal and cocaine-enhanced locomotion and nucleus accumbens dopamine in cannabinoid CB1-receptor-knockout mice

Xia Li · Alexander F. Hoffman · Xiao-Qing Peng · Carl R. Lupica · Eliot L. Gardner · Zheng-Xiong Xi

Psychopharmacology (2009) 204:1–11



CB1 受容体を欠損することにより側坐核における dopamine 基礎遊離量ならびにコカイン誘発 dopamine 遊離量の減少が認められ、さらに、CB1 受容体を阻害することにより、側坐核において dopamine 遊離量の減少が認められる。

CPの行動薬理学的特性

使用動物: ICRマウス(4週齢)

選択的 CB₁受容体作用薬: CP-55,940

大麻精神活性成分: Δ^9 -THC

- 精神依存性: 条件付け場所嗜好性試験 (Conditioned place preference法)
- 自覚効果: 薬物弁別試験 (Drug discrimination procedure)

Evaluation of the rewarding effects of drug

報酬効果

Animals: Male ICR mice

Conditioned place preference (CPP) procedure:

- 1) Conditioning sessions: (3 for Drug, 3 for Vehicle)
 - Once daily for 6 days using a shuttlebox (15x30x15 cm: wlxhx)
 - The treatment compartment of the shuttlebox and the order of administration of Drug and Vehicle were counterbalanced (Table). All conditioning sessions were 40 min in duration
- 2) Test sessions: drug-free state
 - The total time spent in each compartment during a 15 min session

	1	2	... Test
White	Drug	Veh	
	Veh	Drug	
Black	Drug	Veh	
	Veh	Drug	

Day	1 ~6	7
	Conditioning	Test

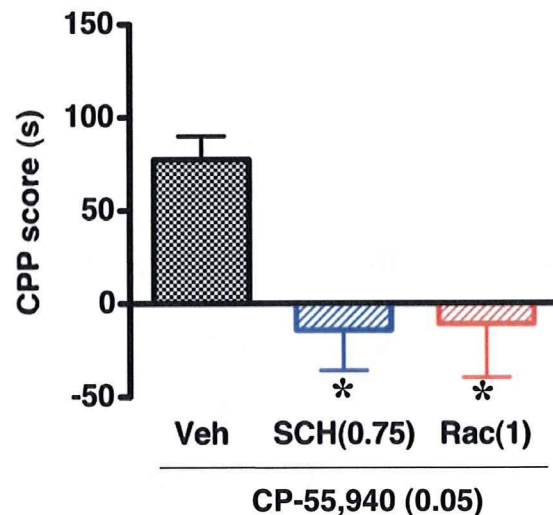
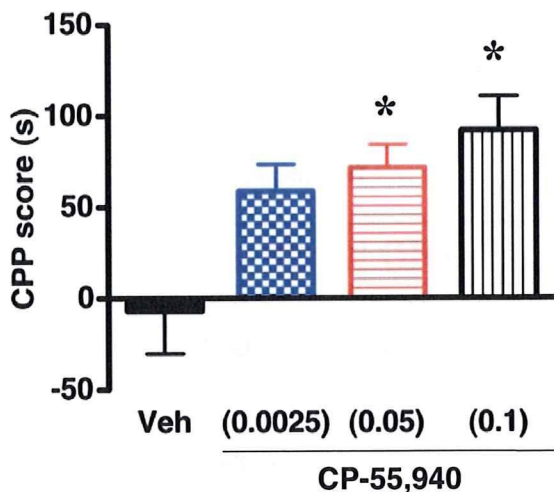


Effect of CP-55,940 on place conditioning in mice

Conditioned place preference

Drug conditioning (Day 1- Day 6)

Test

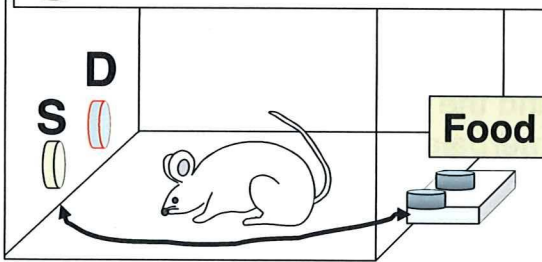


CP条件づけにより、報酬効果が発現した。
この効果はドパミン受容体が関与する可能性が示唆された。

薬物弁別試験

Drug Drug投与: Drug holeを押すと餌

Saline Saline投与: Saline holeを押すと餌

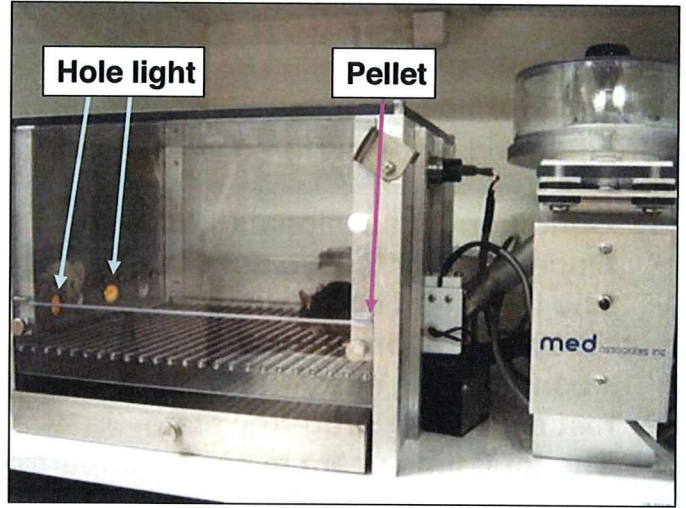


評価薬物ではどちらか？

薬物弁別: 薬物中枢効果の類似性

使用動物: C57/BL6J (正常発育体重の80%になるように摂餌制限)
 マウス用 Five Hole Nose Poke operant chamber (MED-NP5M-D1)
 FR10 scheduleで discrimination-training 及び generalization-test を行った。

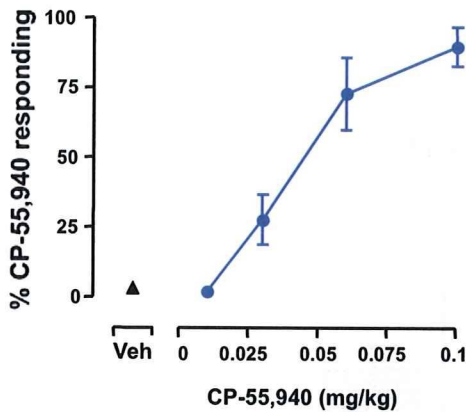
Discrimination-training の薬物は CP-55,940 (0.1 mg/kg) 及び vehicle を training の15分前に腹腔内投与した。Discrimination-training の実験デザインは 1回/日を5日/週 (i.e., VDVVDDVVD etc., D=CP-55,940; V=vehicle) のカウンターバランスのとし、連続5日間、正反応が 80% 以上になるまで training を行った。



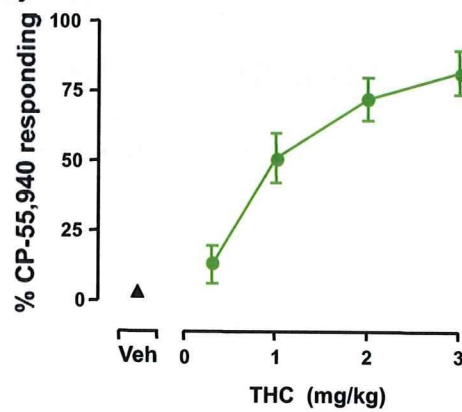
Training
 D: CP-55,940 Δ^9 -THCとの類似性?
 V: Vehicle

Dose response curves for CP-55,940 and Δ^9 -THC

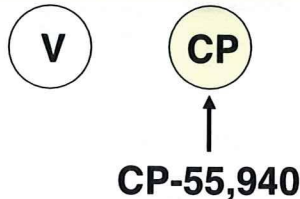
A) CP-55,940



B) Δ^9 -THC

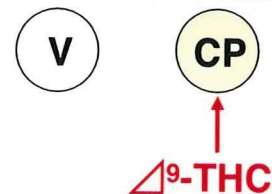


CPと vehicle の hole を区別



CP-55,940訓練動物:
 CP投与=CPのholeを選択

Δ^9 -THCは CP と類似作用



CP-55,940訓練動物:
 Δ^9 -THC投与=CPのholeを選択

自覚効果: 薬物弁別試験(DD試験)
 Δ^9 -THCと般化=類似の自覚効果(感覚効果)を有する。

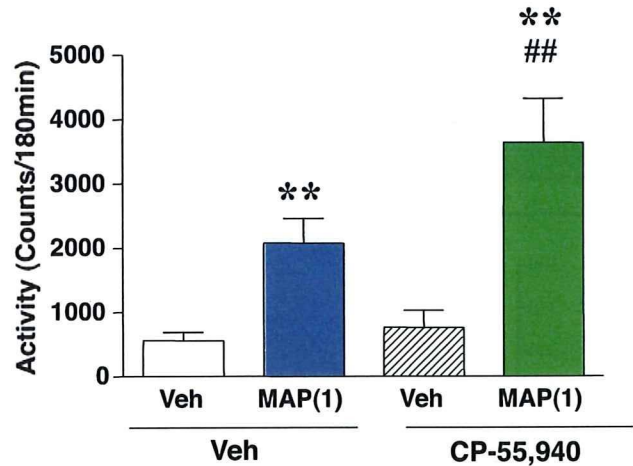
Effect of chronic treatment with CP on methamphetamine-induced hyperlocomotion in mice

CB1受容体作用薬: CP-55,940

CP-55,940(1) (AM, PM) 3 days	METH(1) Locomotion
---------------------------------	-----------------------

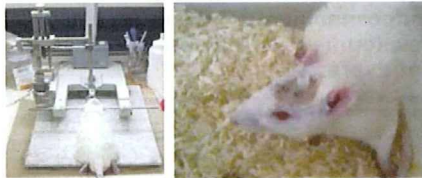
CP-55,940処置
=MAP作用増強

運動活性の測定



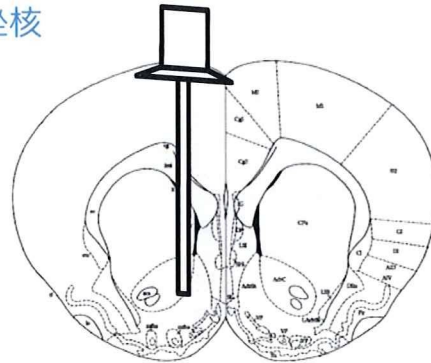
**P<0.01 vs Veh-group
##P<0.01 vs. Veh-MAP(1) group
Bonferroni's Multiple Comparison Test

側坐核領域における dopamine ならびにその代謝物の遊離量測定



N.Acc : AP +4.0 mm, L -0.8 mm, V -6.8 mm
angle 16° from bregma, 透析膜長 2 mm

側坐核



WIN 55,212-2 : CB 受容体 agonist

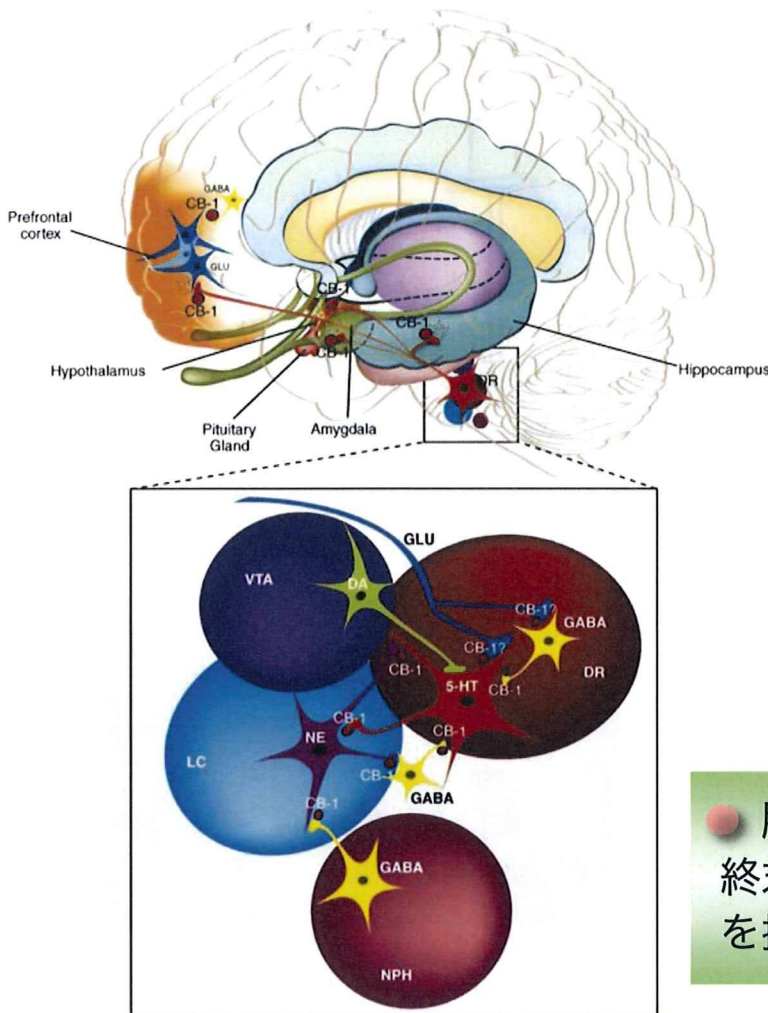
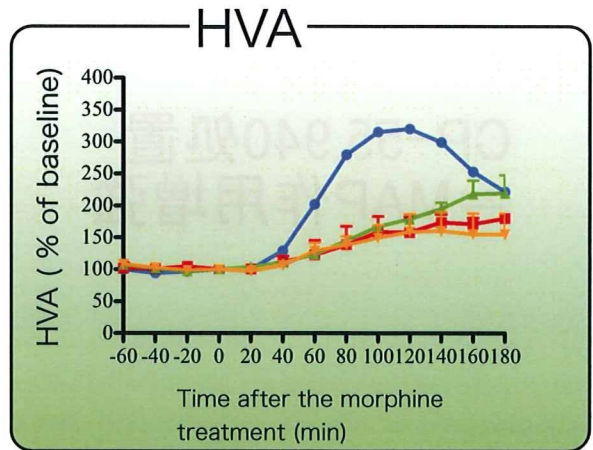
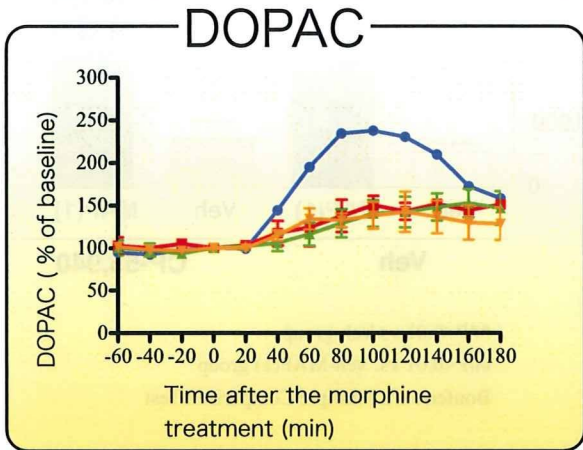
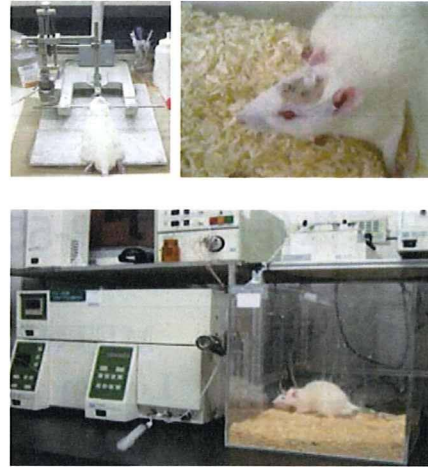
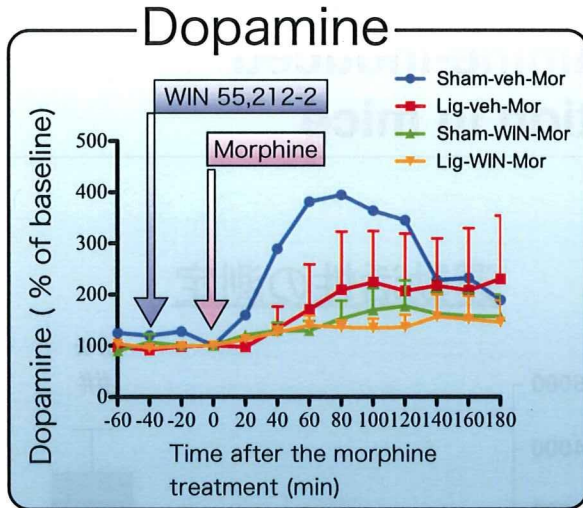
Schedule



実験方法 : In vivo microdialysis 法
動物 : SD 系雄性ラット



神経障害性疼痛下における CB1 受容体ならびに μ 受容体の相互作用



The Therapeutic Potential of the Endocannabinoid System for the Development of a Novel Class of Antidepressants

Matthew N. Hill^{1,2}, Cecilia J. Hillard³, Francis R. Bambico⁴, Sachin Patel⁵, Boris B. Gorzalka⁶ and Gabriella Gobbi¹

¹Laboratory of Neuroendocrinology, The Rockefeller University, New York, NY, USA
²Department of Psychology, University of British Columbia, Vancouver, B.C., Canada
³Department of Pharmacology and Toxicology, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, WI, USA
⁴Neurobiological Psychiatry Unit, Department of Psychiatry and McGill University Health Center, McGill University, Montreal, QC, Canada
⁵Department of Psychiatry, Vanderbilt University, Nashville, TN, USA

The endocannabinoid system is a neuromodulatory system which is known to regulate emotional, cognitive, neurovegetative and motivational processes. Substantial evidence has accumulated implicating a deficit in endocannabinoid in the etiology of depression, accordingly, pharmacological augmentation of endocannabinoid signaling could be a novel target for the pharmacotherapy of depression. Within preclinical models, facilitation of endocannabinoid neurotransmission evokes both antidepressant and anxiolytic effects. Similar to the actions of conventional antidepressants, enhancement of endocannabinoid signaling can enhance serotonergic and noradrenergic transmission, increase cellular plasticity and neurotrophin expression within the hippocampus, and dampen activity within the neuroendocrine stress axis. Furthermore, endocannabinoid activity is increased by both pharmacological and somatic treatments for depression, and in turn, appears to contribute to some of the neuroadaptive alterations elicited by these treatments. These preclinical findings support the rationale for the clinical development of agents which inhibit the cellular uptake and/or metabolism of endocannabinoids in the treatment of mood disorders.

The Endocannabinoid System
 The endocannabinoid system is a modulatory system present in both the brain and the periphery. At the signaling level, two cannabinoid receptors have been characterized to date (1). The canonical CB₁ receptor is expressed at high density throughout the brain (2,3) and is also present at lower density in peripheral tissues, including the liver, adipocytes, the ovarian processes, the GI tract, skeletal muscle and circulating immune cells (4). The CB₁ receptor is located predominantly in peripheral immune cells and organs in physiological conditions (5), but it is also expressed by microglial cells in injured, infected or inflamed CNS tissue (6). There is recent evidence that cannabinoid CB₁ receptors exhibit limited neuronal expression (7,8). Both CB₁ and CB₂ are G-protein coupled receptors. The CB₁ receptor couples to both G_i, protein which functions to inhibit adenylyl cyclase activity, activate potassium channels and inhibit voltage-gated calcium channels, while the CB₂ receptor is only known to couple to G_i protein (9). The CB₁ receptor is located predominantly on presynaptic axon terminals, and is capable of regulating calcium influx and hence neurotransmitter release (9).

The endogenous ligands for cannabinoid receptors are the arachidonic acid-derived molecules N-arachidonyl ethanolamine, anandamide, AEA and 2-arachidonyl glycerol, 2-AG (9,11). It is believed that both AEA and 2-AG are formed from phospholipid precursors post-synaptically through activity-dependent activation of specific phospholipase enzymes (10). Termination of endocannabinoid signaling occurs through a multiple mechanism and includes hydrolysis, fatty acid amide hydrolase (FAAH) is the primary catabolic enzyme of AEA, and monoamine oxidase (MAO) spans to the primary catabolic enzyme for 2-AG (11).

While it is not known why there are two endogenous ligands for one receptor, these molecules do exhibit slight pharmacokinetic differences which could result in differential signaling patterns. Specifically, AEA exhibits a high affinity for the CB₁ receptor (approximately 50-100 nM), but has poor efficacy as an agonist of inducing intracellular signal transduction (11). By contrast, 2-AG has a lower affinity for the CB₁ receptor (approximately 1-10 μ M), but is very potent, inducing a robust intracellular response as assessed by CB₁ receptor-mediated gamma-aminobutyric acid (GABA) release (11). Thus, it is possible that 2-AG induces a rapid and robust CB₁ receptor response, while AEA evokes more of a tonic, but still, stimulation of the CB₁ receptor as we have previously suggested (12). The pharmacology

● 脳内の CB1 受容体は、主に神経終末に局在し、神経伝達物質の放出を抑制的に制御している。

結 論

- ▷ 腹側被蓋野領域のサンプルを用いて、CB1 受容体の局在について検討した結果、CB1 受容体の免疫活性を確認した。また、同領域における、CB1 受容体と TH の共局在を認めた。
- ▷ 非疼痛性モデル動物においては、CB1作用薬である CP-55,940の慢性投与により、報酬効果が引き起こされた。また、非疼痛性モデル動物にCP-55,940を慢性投与により、methamphetamine 誘発 dopamine 遊離作用ならびに報酬効果が増強された。これらのことから、痛みの非存在下においては、CB1 受容体作用薬は、精神依存形成能を有する可能性が示唆された。
- ▷ 一方、現時点で詳細な機序は不明であるが、CB1作用薬である WIN 55,212-2 は morphine 誘発 dopamine 遊離促進作用をほぼ完全に抑制した。

今後は、非疼痛下および疼痛下におけるCB1 受容体を介した中脳辺縁 dopamine 神経系における制御機構の相違を比較検討し、疼痛下におけるカンナビノイドの依存不形成の可能性についてさらに詳細に検討を行って行く予定である。

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

分担研究報告書

呼吸困難に対するラシックスの吸入療法の臨床試験および
トロメタモール静注による呼吸困難治療の臨床試験についての研究

西野 卓 千葉大学大学院医学研究院 教授

研究要旨：フロセミド吸入および THAM 静注の呼吸困難に対する効果検討のための研究プロトコールを作成した。両治療法は呼吸困難に有効となる可能性があるが、十分なエビデンスは得られておらず、早急に臨床研究を進める必要がある。

A. 研究目的

本年度はフロセミド（ラシックス）吸入およびトロメタモール（THAM）静注によるがん性呼吸困難改善効果を明らかにするための研究のプロトコール作成に着手した。

B. 研究方法

プロトコール作成においては、先ずフロセミド吸入および THAM 静注による呼吸困難緩和に関する過去の研究を調査した。

（倫理面への配慮）

本研究では全般にわたり、世界医師会による 1964 年採択（2002 年修正）の「ヘルシンキ宣言」および厚生労働省による平成 15 年 7 月 30 日施行（平成 16 年 12 月 28 日

改定）の「臨床研究に関する倫理指針を遵守する。

C. 研究結果

がん性呼吸困難に対する吸入フロセミドの有効性については、これを支持する報告と支持しない報告があり、十分な結論が得られていない現状が明らかとなった。また、THAM 静注に関しては、がん患者に投与された報告は皆無であった。

D. 考察

吸入フロセミド臨床試験のプロトコールはフロセミドの主な作用部位が迷走神経受容器と想定して作成した。すなわち、患者選択基準を明確にし、吸入フロセミド

が迷走神経末端受容器に到達しないと考えられる症例やがんに関連しない病態に付随する呼吸困難を有する患者は除外規準に含めることにした。THAM 静注に関しては、がん患者への投与は安全性を確かめる必要があることが明らかとなった。

E. 結論

吸入フロセミド臨床試験は生食ネブライザー吸入をコントロールとしたランダム化比較第Ⅱ相試験を計画し、症例数は60例の予定である。THAM 静注臨床試験は第Ⅰ相試験であり、THAM(溶液：0.3mol/L；投与速度：0.2ml/kg/分)を10分間および20分間静脈点滴投与する。各群の症例数は3例を予定している。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) NISHINO T, et al. THAM improves an experimentally-induced severe dyspnea. J Pain Symptom Managet 37:212-219, 2009

2) NISHINO T. Aggravation of dyspnea by coughing-Vagal mechanisms Pulm Pharmacol Ther 22: 102-107, 2009

3) NISHINO T. Pathophysiology of dyspnea evaluated by breath-holding test: studies of furosemide treatment Respir Physiol & Neurobiol 167:20-25, 2009

4) Nishino T, et al. Comparison of painn and perceptual responses in healthy subjects. Pain 148: 426-430, 2010

5) 西野 卓. 呼吸困難の生理. 日本臨床麻酔学会誌 29:341-350, 2009

6) 西野 卓. 呼吸管理と呼吸中枢。人工呼吸 26: 150-156, 2009

2. 学会発表

1) 西野 卓. 教育講演：呼吸困難の病態生理と疼痛の関係、天童市、平成21年7月11日

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特記すべきことなし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

脊椎転移に伴う突出痛に対するケタミンの疼痛改善効果の
検討についての研究

山口重樹 獨協医科大学 准教授

研究要旨：文献的考察を行い、 $A\delta$ 神経線維を介した脊髄後角のシナプスにおけるグルタミン酸の放出が脊椎転移に伴う突出痛の病態であることを推測し、さらにNMDA受容体遮断薬であるケタミンの突出痛の予防投与の医学的意義について考察し、「脊椎転移に伴う突出痛に対するケタミンの疼痛改善効果の検討」の臨床研究のプロトコールを作成した

A. 研究目的

世界保健機関（WHO）のがん疼痛治療法の普及に伴い、本邦においてもモルヒネを中心としたオピオイド製剤が広く使用され、多くのがん患者が痛みから解放されるようになった。しかし、脊椎などの骨転移を有する患者では、鎮痛薬の規則正しい服用によってかなり良好な除痛が得られていても、体動時に出現する、「突然、短い時間、間歇的に出現または増強する強い痛み」と表現される突出痛に悩まされていることが多い。この痛みは睡眠中の無意識の寝返りの際にも発生し、しばしば睡眠断片化、睡眠時間の減少を引き起こし、不安やうつなどの精神症状の原因となり、患者のQOLが著しく低下することもある。この骨転移由来の痛みは鋭く速く伝わる痛みであり、

神経障害性疼痛と同様、 $A\delta$ 神経線維を介した痛みと考えられている。 $A\delta$ 神経線維は髄後角のシナプスにおいてグルタミン酸を放出して侵害受容伝達を行う。そのため、グルタミン酸受容体の一つであるNMDA受容体拮抗薬が脊椎転移における突出痛を軽減する可能性が考えられる。

本研究は、「強オピオイドの投与にもかかわらず出現する脊椎転移による突出痛に対するケタミンの予防効果」について、文献的考察による医学的意義の検討し、その効果および安全性を検討するための臨床研究の要綱作成、臨床研究の実施を行うものである。