

40. Hashimoto H, Azuma Y, Kawasaki M, Fujihara H, Onuma E, et al.: Parathyroid hormone-related protein induces cachectic syndromes without directly modulating the expression of hypothalamic feeding-regulating peptides. *Clin Cancer Res* **13**, 292–298, 2007.
41. Hilakivi-Clarke L, Andrade JE., and Helferich W: Is soy consumption good or bad for the breast? *J Nutr* **140**, 2326S–2334S, 2010.
42. Banerjee S, Li Y, Wang Z, and Sarkar FH: Multi-targeted therapy of cancer by genistein. *Cancer Lett* **269**, 226–242, 2008.
43. Yanagihara K, Numoto M, Tauchi H, Akama Y, Yokozaki H, et al.: Genetic status of p53 and induction of apoptosis by radiation or isoflavones in human gastric carcinoma cell lines. *Int J Oncol* **9**, 95–102, 1996.
44. Matsukawa Y, Marui N, Sakai T, Satomi Y, Yoshida M, et al.: Genistein arrests cell cycle progression at G2-M. *Cancer Res* **53**, 1328–1331, 1993.
45. Camargo CA, da Silva ME, da Silva RA, Justo GZ, Gomes-Marcondes MC, and Aoyama H: Inhibition of tumor growth by quercetin with increase of survival and prevention of cachexia in Walker 256 tumor-bearing rats. *Biochem Biophys Res Commun* **406**, 638–642, 2011.
46. Gadgeel SM, Ali S, Philip PA, Wozniak A, and Sarkar FH: Genistein enhances the effect of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors and inhibits nuclear factor kappa B in nonsmall cell lung cancer cell lines. *Cancer* **115**, 2165–2176, 2009.
47. Raffoul JJ, Wang Y, Kucuk O, Forman JD, Sarkar FH, and Hillman GG: Genistein inhibits radiation-induced activation of NF- κ B in prostate cancer cells promoting apoptosis and G2/M cell cycle arrest. *BMC Cancer* **6**, 107, 2006.
48. Singh AV, Franke AA, Blackburn GL, and Zhou J-R: Soy phytochemicals prevent orthotopic growth and metastasis of bladder cancer in mice by alterations of cancer cell proliferation and apoptosis and tumor angiogenesis. *Cancer Res* **66**, 1851–1858, 2006.
49. Valsecchi AE, Franchi S, Panerai AE, Rossi A, Sacerdote P, and Colleoni M: The soy isoflavone genistein reverses oxidative and inflammatory state, neuropathic pain, neurotrophic and vasculature deficits in diabetes mouse model. *Eur J Pharmacol* **650**, 694–702, 2011.

Possible involvement of prolonging spinal μ -opioid receptor desensitization in the development of antihyperalgesic tolerance to μ -opioids under a neuropathic pain-like state

Minoru Narita¹, Satoshi Imai¹, Atsushi Nakamura¹, Ayumi Ozeki¹, Megumi Asato¹, Mahardian Rahmadi¹, Yuka Sudo², Minoru Hojo³, Yasuhito Uezono^{2,4}, Lakshmi A. Devi⁵, Naoko Kuzumaki¹ & Tsutomu Suzuki¹

Department of Toxicology, Hoshi University School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Japan¹, Department of Cellular and Molecular Biology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Japan², Department of Anesthesiology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Japan³, Cancer Pathophysiology Division, National Cancer Center Research Institute, Japan⁴ and Department of Pharmacology and Systems Therapeutics, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY, USA⁵

ABSTRACT

In the present study, we investigated the possible development of tolerance to the antihyperalgesic effect of μ -opioid receptor (MOR) agonists under a neuropathic pain-like state. Repeated treatment with fentanyl, but not morphine or oxycodone, produced a rapid development of tolerance to its antihyperalgesic effect in mice with sciatic nerve ligation. Like the behavioral study, G-protein activation induced by fentanyl was significantly reduced in membranes obtained from the spinal cord of nerve-ligated mice with *in vivo* repeated injection of fentanyl. In β -endorphin-knockout mice with nerve ligation, developed tolerance to the antihyperalgesic effect of fentanyl was abolished, and reduced G-protein activation by fentanyl after nerve ligation with fentanyl was reversed to the normal level. The present findings indicate that released β -endorphin within the spinal cord may be implicated in the rapid development of tolerance to fentanyl under a neuropathic pain-like state.

Keywords Fentanyl, mouse, neuropathic pain, opioid tolerance, μ -opioid receptor, spinal cord.

Correspondence to: Minoru Narita and Tsutomu Suzuki, Department of Toxicology, Hoshi University School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2-4-41 Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501, Japan. E-mail: narita@hoshi.ac.jp and suzuki@hoshi.ac.jp

INTRODUCTION

Although drugs that act on μ -opioid receptor (MOR), such as morphine, fentanyl and oxycodone, have been used clinically as analgesics, these MOR agonists also have undesirable effects, such as tolerance, and physical and psychological dependence (Ventafriidda and De Conno, 1981; Raynor *et al.* 1994). It has been considered that opioid tolerance is, in part, the end result of a coordinated balance between processes that govern the desensitization, internalization and resensitization of MORs (Claing *et al.* 2002; Gainetdinov *et al.* 2004). The initial process in these events is the phosphorylation of intracellular domains of MORs. Phosphorylated MORs are mostly internalized via clathrin-coated pits into early endosomes and subsequently dephosphorylated by

intracellular protein phosphatases. The dephosphorylated MORs may either be recycled to the plasma membrane or transported to lysosomes for degradation. Previous biochemical studies on cultured enteric neurons have indicated that fentanyl induces either the functional desensitization or internalization of MORs (Minnis *et al.* 2003). In contrast, under the same condition, morphine does not promote the detectable internalization of MORs in cultured cells after prolonged or acute treatment in healthy animals, although it has been well-established that morphine causes the development of tolerance to its pharmacological actions (Minnis *et al.* 2003). On the other hand, recent studies have demonstrated that morphine activates MORs with promoting internalization of MORs via β -arrestin-2-dependent mechanisms in striatal neurons (Haberstock-Debic *et al.* 2005).

Thus, the mechanisms that underlie the development of analgesic tolerance to MOR agonists are very much complicated. To further understand properties of analgesic tolerance to MOR agonists, it has been necessary to investigate possible changes in analgesic efficacy following repeated treatment with MOR agonists at optimum doses just for the relief of chronic pain associated with physiological changes in the endogenous MOR system.

In a previous study, we demonstrated that repeated treatment with fentanyl caused a rapid desensitization to its ability to block hyperalgesia under an inflammatory pain state, whereas morphine did not have a similar effect (Imai *et al.* 2006). In addition, repeated treatment with fentanyl, but not morphine, resulted in the attenuation of MOR resensitization, and a subsequent increase in the levels of phosphorylated-MOR in the spinal cord of mice with inflammatory pain. These findings raise the possibility that chronic treatment with fentanyl may cause a different modulation of either the desensitization, internalization or resensitization of MORs in the spinal cord under a pain-like state compared with chronic treatment with morphine.

One mechanism for the MOR desensitization or attenuation of MOR resensitization by fentanyl in the spinal cord under chronic pain could be a sustained increase in release of the endogenous μ -opioid neuropeptide β -endorphin after sciatic nerve ligation. In fact, it has been reported that β -endorphin is released within some brain regions during pain state (Zangen *et al.* 1998; Zubieta *et al.* 2001). In their reports, they mentioned that the extracellular levels of β -endorphin in the arcuate nucleus increased by 88% under pain-like state. Based on these findings, we assumed that β -endorphin might be released within the spinal cord, as well as brain regions, under pain-like state, as compensatory mechanism for the inhibition of pain transmission. As sustained exposure to β -endorphin could result in receptor phosphorylation and uncoupling of receptors from effector systems, and thus desensitization, neuropathic pain associated with release of β -endorphin may interfere MOR resensitization by fentanyl.

To further understand the mechanisms that underlie the development of tolerance to this opioid analgesic-induced antihyperalgesic effect under chronic pain, we evaluated the effect of repeated administration of morphine, fentanyl or oxycodone on neuropathic pain-like hyperalgesia and the possible development of tolerance following sciatic nerve ligation. As in the mouse model of inflammatory pain, we demonstrated that repeated treatment with fentanyl, but not morphine or oxycodone, caused a rapid desensitization to its antihyperalgesic effect in nerve-ligated mice. Furthermore, we found that β -endorphin could be a key modulator for the high

degree of antinociceptive tolerance to fentanyl caused by sciatic nerve injury. Based on this phenomenon, the present study was performed to investigate the effects of fentanyl on antihyperalgesic effect in β -endorphin knockout (KO) mice.

MATERIALS AND METHODS

The present study was conducted in accordance with the Guiding Principles for the Care and Use of Laboratory Animals of Hoshi University, as adopted by the Committee on Animal Research of Hoshi University. Every effort was made to minimize the numbers and any suffering of animals used in the following experiments.

Animals

Male and female β -endorphin derived from *proopiomelanocortin* (POMC) gene-KO mice (8–13 weeks old, 22–30 g) (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA), which had a C57BL/6J and 129S2/SvPas mixed genetic background as described previously (Niikura *et al.* 2008), their wild-type (WT) male and female C57BL/6J mice (8–13 weeks old, 22–30 g) (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) and male ICR mice (7–9 weeks old, 20–25 g) (Tokyo Laboratory Animals Science Co., Ltd., Tokyo, Japan) were used in the present study. Animals were housed in a room maintained at $23 \pm 1^\circ\text{C}$ with a 12-hour light–dark cycle. Food and water were available *ad libitum*. Each animal was used only once.

Drugs

The drugs used in the present study were fentanyl citrate (Hisamitsu Pharmaceutical Co., Inc., Tokyo, Japan), morphine hydrochloride (Daiichi-Sankyo Co., Tokyo, Japan), oxycodone hydrochloride (a kind gift from Shionogi Pharmaceutical Co. Inc., Osaka, Japan) and β -endorphin (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), which were dissolved in 0.9% physiological saline (Otsuka Pharmaceutical Co. Inc., Tokyo, Japan) for *in vivo* experiments or assay buffer for *in vitro* experiments.

Neuropathic pain model

Mice were anesthetized with 3% isoflurane. We produced a partial sciatic nerve injury by tying a tight ligature with a 8-0 silk suture around approximately one-third to one-half the diameter of the sciatic nerve on the right side (ipsilateral side) under a light microscope (SD30, Olympus, Tokyo, Japan), as described previously (Seltzer *et al.* 1990; Malmberg and Basbaum 1998). In sham-operated mice, the nerve was exposed without ligation.

Guanosine-5'-o-(3-thio) triphosphate ($[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$) binding assay

For membrane preparation, the mouse spinal cord was quickly removed after decapitation and rapidly transferred to a tube filled with ice-cold buffer. The membrane homogenate (3–8 μg protein/assay) was prepared as described previously (Narita *et al.* 2001) and incubated at 25°C for 2 hours in 1 ml of assay buffer with various concentrations of each agonist, 30 μM guanosine-5'-diphosphate and 50 pM $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ (specific activity, 1000 Ci/mmol; Amersham, Arlington Heights, IL, USA). The reaction was terminated by filtration using Whatman GF/B glass filters (Brandel, Gaithersburg, MD, USA) that had been presoaked in 50 μM Tris-HCl, pH 7.4, and 5 μM MgCl_2 at 4°C for 2 hours. The filters were washed three times with 5 ml of ice-cold Tris-HCl buffer, pH 7.4, and then transferred to scintillation-counting vials. Next, 4 ml of clear-sol 2 (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) was added to the vials and equilibrated for 12 hours. The radioactivity in the samples was determined with a liquid scintillation analyzer. Nonspecific binding was measured in the presence of 10 μM unlabeled GTP γS .

Measurement of thermal hyperalgesia and tactile stimulus

To assess the sensitivity to thermal stimulation, each of the hind paws of mice was tested individually using a thermal stimulus apparatus (UGO-BASILE, Biological Research Apparatus, Varese, Italy). The intensity of the thermal stimulus was adjusted to achieve an average baseline paw-withdrawal latency of approximately 9 to 12 seconds in naive mice. Only quick hind-paw movements (with or without licking of the hind paws) away from the stimulus were considered to be a withdrawal response. Paw movements associated with locomotion or weight-shifting were not counted as a response. The paws were measured alternating between the left and right with an interval of more than 3 minutes between measurements. The latency of paw withdrawal after the thermal stimulus was determined as the average of three measurements per paw.

Statistical analysis

The data from the $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ binding assay are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM) of % Stimulation. The data regarding hyperalgesic responses are shown as the mean \pm SEM of the paw-withdrawal latency. Receptor binding curves were fitted using GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). The statistical significance of differences between

groups was assessed by two-way analysis of variance followed by the Bonferroni/Dunn multiple comparison test or Student's *t*-test.

RESULTS

Effect of single or repeated subcutaneous (s.c.) injections of morphine, fentanyl or oxycodone on the neuropathic pain-like state induced by nerve injury in mice

In the present study, mice with partial sciatic nerve ligation exhibited marked neuropathic pain-like behavior only for the ipsilateral side at 7 days after nerve ligation ($***P < 0.001$ versus sham-saline group, Fig. 1). The persistent painful state caused by sciatic nerve ligation lasted for more than 21 days after surgery in mice (Fig. 2). A single s.c. injection of either morphine (1–10 mg/kg), fentanyl (0.003–0.01 mg/kg) or oxycodone (0.1–1 mg/kg) at 7 days after sciatic nerve ligation recovered the decreased thermal threshold observed on the ipsilateral side in sciatic nerve-ligated mice in a dose-dependent manner, and maximal antihyperalgesic responses were seen at 30, 15 or 15 minutes after the injection of morphine, fentanyl or oxycodone, respectively ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$ or $***P < 0.001$ versus sham-saline group, Fig. 1). At a dose of 5.0 mg/kg, 0.03 mg/kg or 0.5 mg/kg, s.c. administration of morphine, fentanyl or oxycodone almost completely reversed the decrease in the thermal threshold without excessive effects in sciatic nerve-ligated mice. Therefore, we proposed that the optimal doses for the morphine-, fentanyl- or oxycodone-induced antihyperalgesic effect in nerve-ligated mice were 5.0, 0.03 or 0.5 mg/kg, respectively. As shown in Fig. 2a and c, the thermal hyperalgesia observed on the ipsilateral side after nerve ligation was clearly reversed by each repeated s.c. injection of morphine (5 mg/kg) or oxycodone (0.5 mg/kg) once a day for 14 consecutive days from 7 days after nerve ligation. In contrast, the antihyperalgesic effect following repeated treatment with fentanyl (0.03 mg/kg) was gradually tolerated ($**P < 0.01$ or $***P < 0.001$ versus sham-saline group; Fig. 2b).

Changes in G-protein activation induced by repeated subcutaneous (s.c.) injection of morphine, fentanyl or oxycodone in the spinal cord of mice with nerve ligation

We investigated the ability of morphine, fentanyl or oxycodone to activate G-proteins through the stimulation of MOR in membranes of the ipsilateral side of the spinal cord obtained from mice treated with saline, morphine, fentanyl or oxycodone once a day for 14 consecutive days from 7 days after sham operation or nerve ligation (Fig. 3). The activation of G-proteins induced by morphine (0.001–10 μM), fentanyl (0.001–100 μM) or

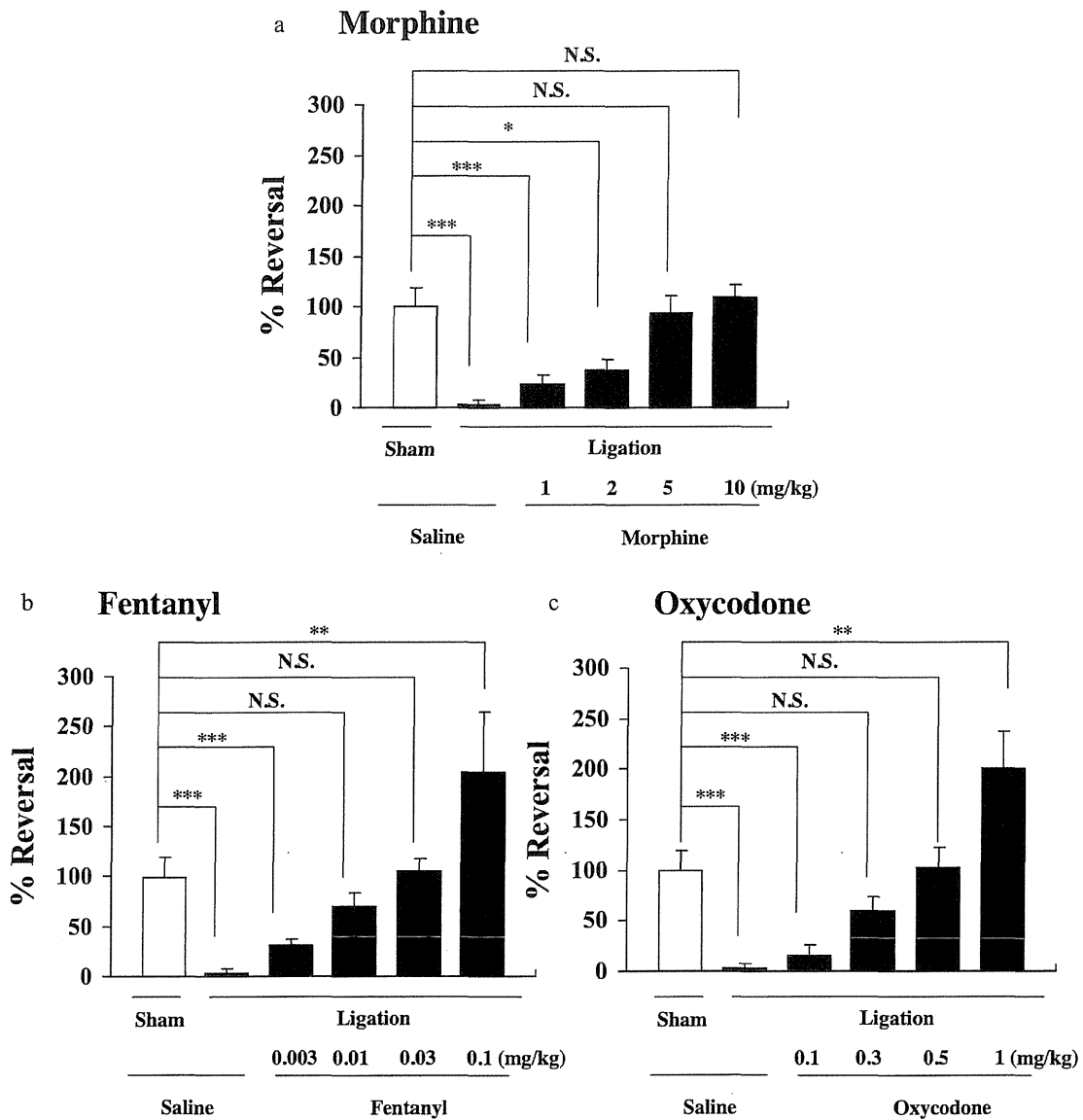


Figure 1 Effect of s.c. injection of morphine, fentanyl or oxycodone on the latency of paw withdrawal in response to a thermal stimulus on the ipsilateral side in sham-operated or sciatic nerve-ligated ICR mice. The thermal threshold was measured just before and 30, 15 or 15 minutes after s.c. injection of morphine, fentanyl or oxycodone, respectively. Groups of mice were treated s.c. with morphine (1–10 mg/kg) (a), oxycodone (0.003–0.1 mg/kg) (b) or fentanyl (0.003–0.01 mg/kg) (c) 7 days after the operation. Each column represents the mean \pm standard error of the mean of 8–10 mice. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ versus sham-saline group. N.S. = not significant

oxycodone (0.001–10 μ M) on the ipsilateral side of the spinal cord was examined by monitoring the binding of [35 S]GTP γ S to membranes. Morphine, fentanyl and oxycodone each produced a concentration-dependent increase in the binding of [35 S]GTP γ S to spinal cord membranes obtained from sham-operated mice (Fig. 3). In sciatic nerve-ligated mice following repeated injection of saline, the levels of [35 S]GTP γ S binding stimulated by fentanyl, morphine or oxycodone were similar to that found in sham-operated mice (Fig. 3a-c). The binding of [35 S]GTP γ S stimulated by fentanyl was significantly

decreased in nerve-ligated mice by the repeated s.c. injection of an optimal dose of fentanyl compared with the findings in sham-operated mice [$F(2,81) = 141.7$; $P < 0.001$ versus sham-saline group, Fig. 3c]. In contrast, there was no difference in G-protein activation in the spinal cord between sham-operated and nerve-ligated mice with the repeated s.c. injection of an optimal dose of morphine or oxycodone (Fig. 3a or c). Furthermore, the maximal G-protein stimulation by fentanyl was significantly decreased in nerve-ligated mice with the repeated s.c. injection of an optimal dose of fentanyl

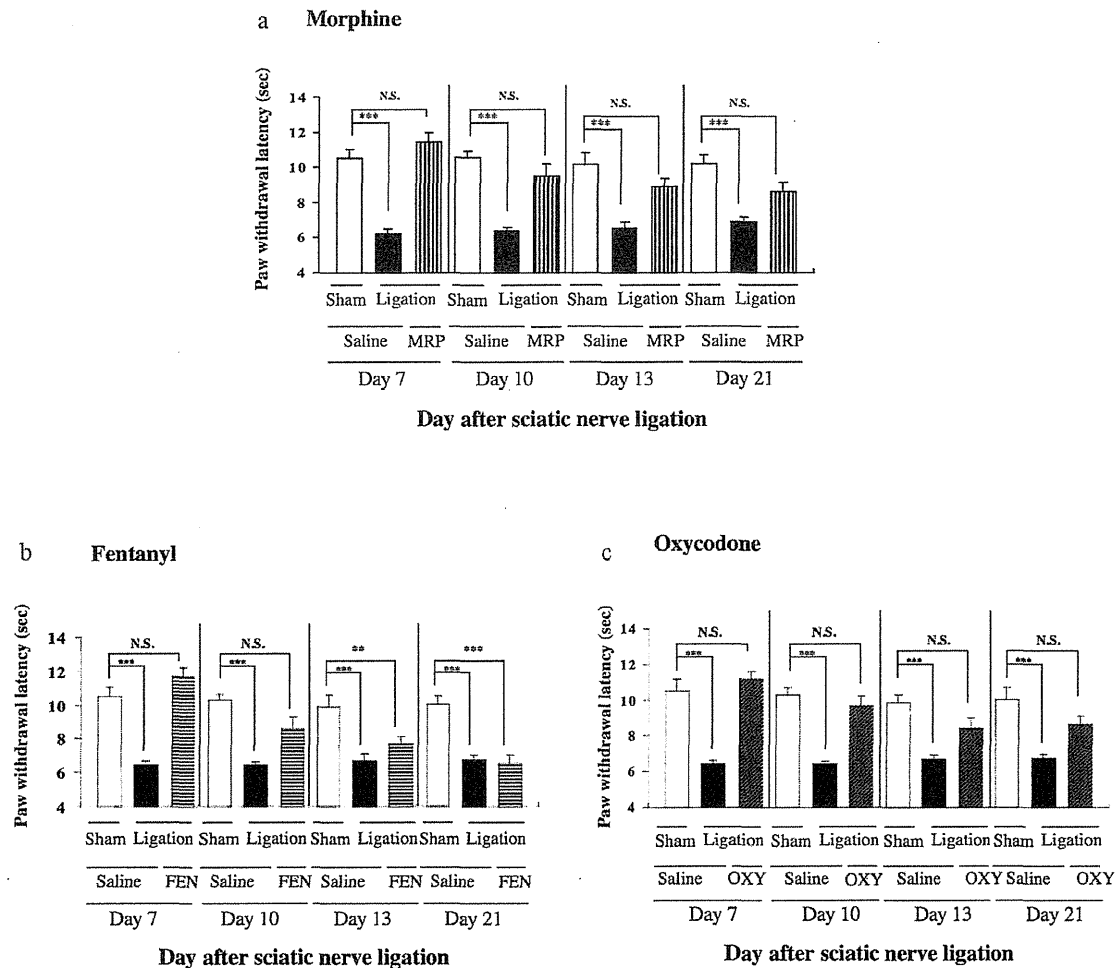


Figure 2 Effect of repeated s.c. injection of morphine (MRP) (a), fentanyl (FEN) (b) or oxycodone (OXY) (c) on the latency of paw withdrawal in response to a thermal stimulus on the ipsilateral side in sciatic nerve-ligated ICR mice. Repeated s.c. injection of saline, morphine (5 mg/kg), fentanyl (0.03 mg/kg) or oxycodone (0.5 mg/kg) was started 7 days after sciatic nerve ligation. ICR mice were repeatedly injected with saline, morphine, fentanyl or oxycodone once a day for 14 consecutive days. During the first 6 days after surgery, mice were not treated with saline, morphine, fentanyl or oxycodone. The thermal threshold was measured 7, 10, 13 and 20 days after ligation. Each column represents the mean \pm standard error of the mean of 8–10 mice. *** $P < 0.001$ and **** $P < 0.0001$ versus Sham-saline group on day 1. N.S. = not significant

(*** $P < 0.001$ versus sham-saline group, Fig. 3b). This reduction was not observed in the nerve-ligated β -endorphin KO mice treated with the optimum dose of fentanyl for 14 days (Fig. 4).

We further examined whether a single s.c. injection of fentanyl at relatively higher doses (0.03–0.17 mg/kg) could produce an antihyperalgesic effect in mice by using repeated treatment with an optimal dose of fentanyl under a neuropathic pain-like state (Fig. 5). Mice were repeatedly injected with saline or an optimal dose of fentanyl (0.03 mg/kg) for 14 consecutive days beginning at 7 days after nerve ligation. One day after the last injection of fentanyl, mice were challenged with fentanyl (0.03–0.17 mg/kg, Fig. 5). Fentanyl (0.056–0.17 mg/kg) failed to recover the decreased thermal threshold in nerve-

ligated mice following the repeated injection of an optimal dose of fentanyl (* $P < 0.05$ versus sham-saline group, Fig. 5).

Involvement of β -endorphin in the tolerance to fentanyl-induced antihyperalgesia under a pain-like state

We compared the potency of the antihyperalgesic effect induced by the repeated injection of fentanyl between nerve-ligated WT and β -endorphin KO mice (Fig. 6). In the present study, both WT and β -endorphin KO mice with partial sciatic nerve ligation exhibited a marked neuropathic pain-like behavior to almost the same degree (*** $P < 0.001$ versus sham-saline group Fig. 6). Under

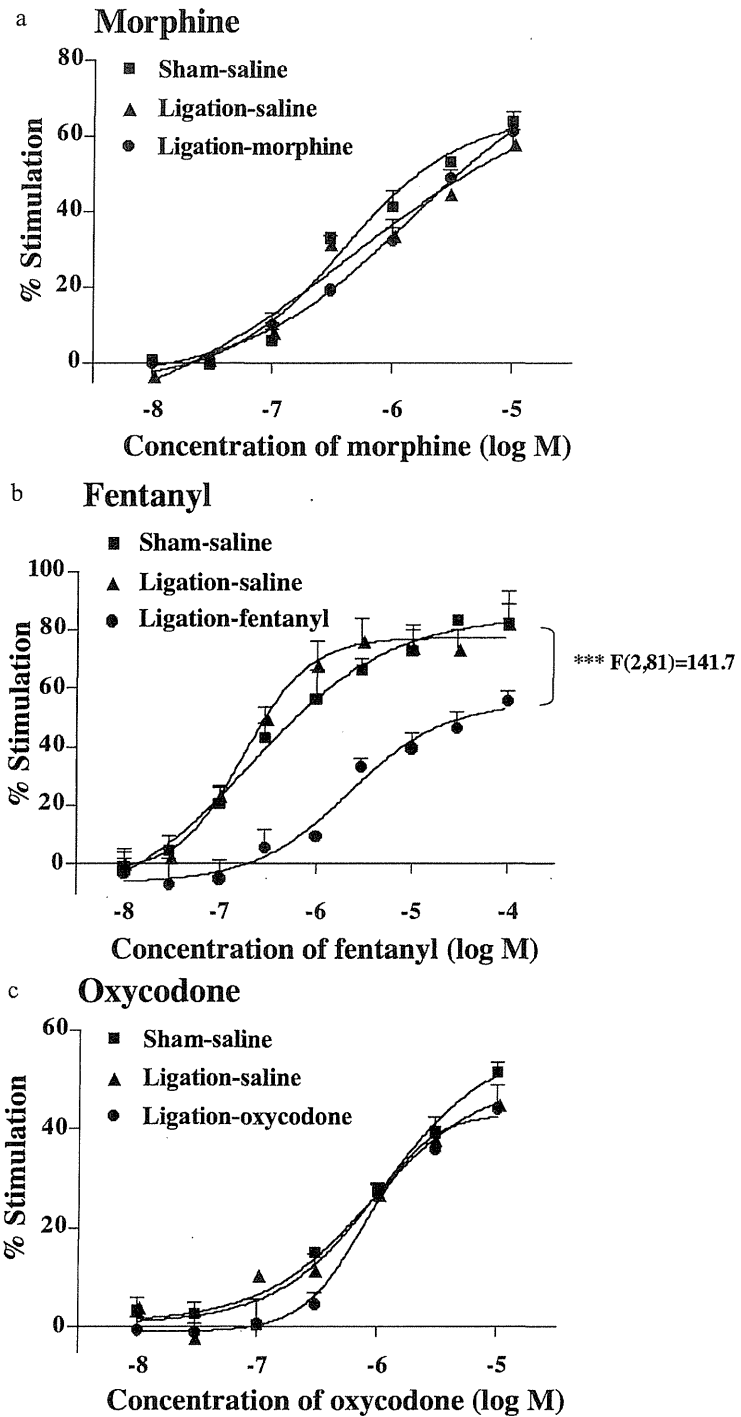


Figure 3 Effect of repeated injection of morphine (a), fentanyl (b) or oxycodone (c) on the morphine-, fentanyl- or oxycodone-induced increase in [³⁵S] GTPγS binding to membranes of the ipsilateral side of the spinal cord obtained from sham-operated and sciatic nerve-ligated ICR mice. Repeated s.c. injection of saline, morphine, fentanyl or oxycodone was started 7 days after sciatic nerve ligation. ICR mice were repeatedly injected with saline, morphine, fentanyl or oxycodone once a day for 14 consecutive days. During the first 6 days after surgery, mice were not treated with saline, morphine, fentanyl or oxycodone. Membranes were prepared at 21 days after nerve ligation. Each value represents the mean ± standard error of the mean of four samples

these conditions, the single s.c. injection of fentanyl (0.1 mg/kg) 7 days after nerve ligation almost completely reversed the decrease in the thermal threshold without excessive effects in sciatic nerve-ligated WT and β-endorphin KO mice, and maximal antihyperalgesic responses were seen at 15 minutes after fentanyl injection (Fig. 6). The antihyperalgesic effect following

repeated treatment with fentanyl (0.1 mg/kg) was gradually tolerated from 14 days after sciatic nerve ligation in WT mice. In contrast, the potency of the antihyperalgesic effect of fentanyl was preserved in nerve-ligated β-endorphin KO mice under repeated s.c. treatment with fentanyl (###P < 0.01 versus knockout-ligation-fentanyl group; Fig. 6).

DISCUSSION

In the present study, a neuropathic pain-like state induced by partial sciatic nerve ligation was suppressed by the single s.c. injection of morphine, fentanyl or oxycodone in a dose-dependent manner. At doses of 5.0, 0.5 and 0.03 mg/kg, s.c. administration of morphine, oxycodone

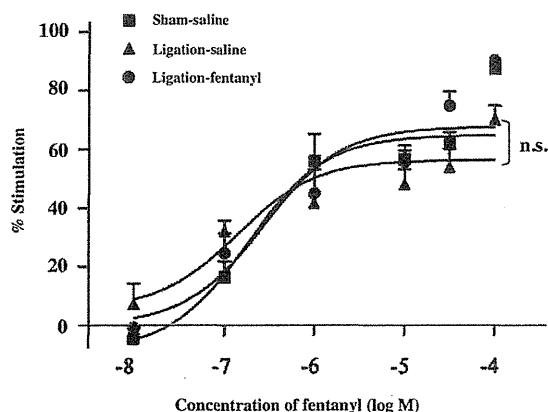


Figure 4 Effect of repeated injection of fentanyl on the fentanyl-induced increase in [^{35}S] GTP γ S binding to membranes of the ipsilateral side of the spinal cord obtained from sham-operated and sciatic nerve-ligated β -endorphin knockout (KO) mice. Repeated s.c. injection of fentanyl was started 7 days after sciatic nerve ligation. Mice were repeatedly injected fentanyl once a day for 14 consecutive days. During the first 6 days after surgery, mice were not treated with fentanyl. Membranes were prepared at 21 days after nerve ligation. Each value represents the mean \pm standard error of the mean of six samples. Each group was consisted of four males and two females. n.s. = not significant

and fentanyl, respectively, completely reversed the decreased thermal threshold without excessive effects in nerve-ligated mice. Based on the present findings, we proposed that the optimal doses for the morphine-, oxycodone- and fentanyl-induced antihyperalgesic effects in sciatic nerve-ligated mice were 5 mg/kg, 0.5 mg/kg and 0.03 mg/kg, respectively. If we combine this result with our previous findings, the optimal dose for a morphine-induced antihyperalgesic effect in sciatic

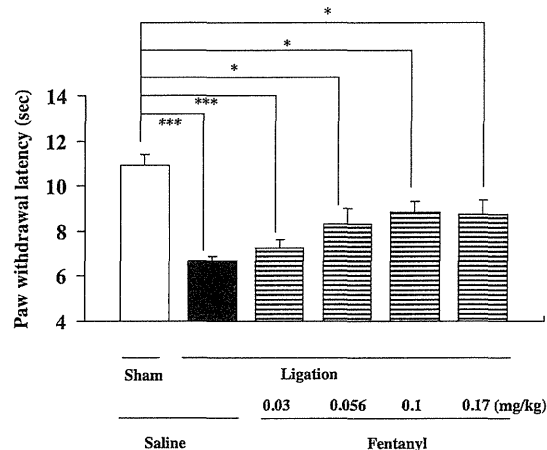


Figure 5 Effect of s.c. injection of fentanyl (0.03–0.17 mg/kg) on the latency of paw withdrawal in response to a thermal stimulus on the ipsilateral side in sciatic nerve-ligated ICR mice with the administration of fentanyl (0.03 mg/kg) for 14 consecutive days. The thermal threshold was measured 15 minutes after the s.c. injection of fentanyl. Each column represents the mean \pm standard error of the mean of eight mice. * $P < 0.05$, and *** $P < 0.001$ versus Sham-saline group

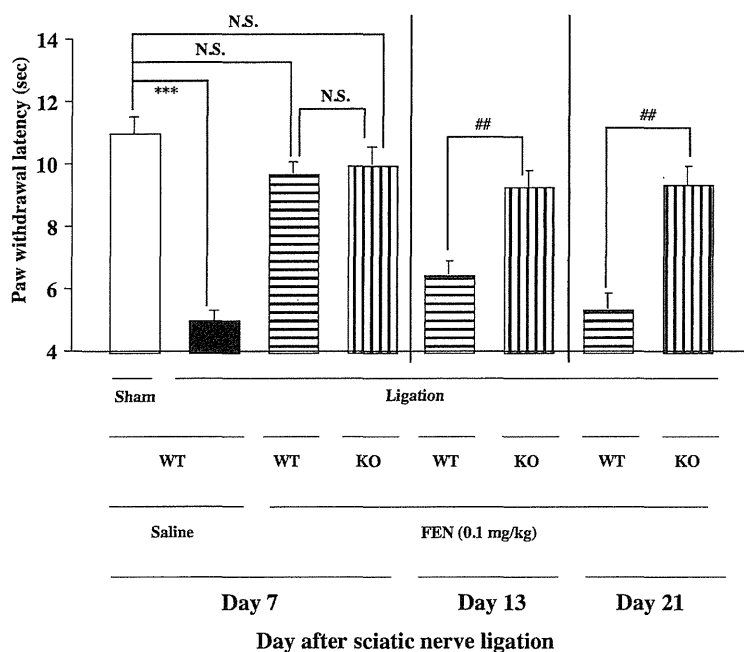


Figure 6 Effect of the repeated s.c. injection of fentanyl (0.1 mg/kg) on the latency of paw withdrawal in response to a thermal stimulus on the ipsilateral side in sciatic nerve-ligated, wild-type (WT) or β -endorphin knockout (KO) mice. Repeated s.c. injection of fentanyl was started 7 days after sciatic nerve ligation. Mice were repeatedly injected with fentanyl once a day for 14 consecutive days. During the first 6 days after surgery, mice were not treated with fentanyl. The thermal threshold was measured 7, 13 or 20 days after nerve ligation at 15 minutes after s.c. injection of fentanyl. Each column represents the mean \pm standard error of the mean of five to six mice (consisting of two to three males and three females). *** $P < 0.001$ versus WT-sham-saline group. ## $P < 0.01$ versus β -endorphin KO-ligation-fentanyl group. N.S. = not significant

nerve-ligated mice was higher than that under inflammatory pain, whereas the optimal doses for fentanyl and oxycodone under a neuropathic pain-like state and an inflammatory pain-like state were similar. Under these conditions, the antihyperalgesic effect induced by fentanyl in mice with sciatic nerve ligation rapidly disappeared during the consecutive administration of fentanyl (0.03 mg/kg), whereas the potencies of morphine (3 mg/kg) and oxycodone (0.5 mg/kg) with regard to their antihyperalgesic effects were preserved in nerve-ligated mice even after repeated s.c. treatment with morphine or oxycodone. Furthermore, even relatively higher doses of fentanyl (0.056–0.17 mg/kg) failed to reverse the hyperalgesia in sciatic nerve-ligated mice under the consecutive administration of fentanyl (0.03 mg/kg). Consistent with these results, the dose-response curve for G-protein activation induced by fentanyl was significantly shifted to the right and its maximal response was dramatically decreased in membranes of the spinal cord of nerve-ligated mice following the repeated injection of fentanyl (ligation-fentanyl group) compared with those in the sham-fentanyl and ligation-saline group. In contrast, these phenomena were not observed in nerve-ligated mice with the repeated administration of morphine or oxycodone. These findings provide evidence that the consecutive injection of fentanyl, unlike morphine and oxycodone, may extensively induce the development of tolerance to its antihyperalgesic effect under a persistent pain state. This event could be associated with the repeated administration of fentanyl-induced functional desensitization of MORs under a neuropathic pain-like state.

Several lines of evidence indicated that, in response to a pain stimulus, endogenous β -endorphin is released within some brain regions (Zubieta *et al.* 2001). We previously reported that β -endorphin released in the ventral tegmental area is a key factor in regulating the dysfunction of MOR to negatively modulate opioid reward under a neuropathic pain-like state (Niikura *et al.* 2008). Therefore, we next examined using β -endorphin KO mice whether a lack of β -endorphin expression could affect fentanyl-induced tolerance to antinociception under a neuropathic pain-like state. These β -endorphin KO mice showed no changes in the expression of other peptide products (e.g. ACTH and MSH) from the *POMC* gene (Rubinstein *et al.* 1996). With β -endorphin KO mice, we began by investigating whether a deletion of the β -endorphin gene could influence the development of a neuropathic pain-like state induced by sciatic nerve ligation in mice. As a result, there were no differences in decreased thermal hyperalgesia or increased tactile allodynia between β -endorphin KO and WT mice. Under these conditions, the fentanyl-induced antihyperalgesic tolerance under sciatic nerve ligation was abolished in β -endorphin KO mice. In addition, the reduced activation

of G-proteins by fentanyl observed in the spinal cord of nerve-ligated mice after the repeated s.c. injection of fentanyl was dramatically suppressed in the spinal cord of nerve-ligated β -endorphin KO mice treated with the optimum dose of fentanyl for 14 days. These results suggest that released endogenous β -endorphin, in response to long-lasting pain, may play a critical role in the fentanyl-induced antihyperalgesic tolerance under a neuropathic pain-like state.

It has been widely accepted that receptor desensitization appear to play a key role in the development of opioid tolerance (Bohn *et al.* 2000; Gainetdinov *et al.* 2004; Walwyn *et al.* 2004). Furthermore, it has been considered that opioid tolerance is, in part, the end result of internalized MORs (Whistler & von Zastrow, 1998, 1999; Claing *et al.* 2002; Kieffer & Evans 2002; Koch *et al.* 2005; Zollner *et al.* 2008). The initial process in these events is the phosphorylation of intracellular domains of MOR. Phosphorylated MORs are mostly internalized via clathrin-coated pits into early endosomes and subsequently dephosphorylated by intracellular protein phosphatases. The dephosphorylated MORs might either be recycled to the plasma membrane or transported to lysosomes for degradation. A growing body of evidence suggests that among diverse serine (Ser)/threonine (Thr) residues of the intracellular domain of MOR, the phosphorylation of Ser 375 in the mouse MOR is essential for the internalization of MORs (Schulz *et al.* 2004). In a previous study, we found that repeated treatment with fentanyl, but not morphine, resulted in an increase in the levels of phosphorylated-MOR (Ser 375) associated with the enhanced inactivation of protein phosphatase 2A and a reduction in Rab4-dependent MOR resensitization in the spinal cord of mice that showed inflammatory pain (Imai *et al.* 2006). Although further studies are still needed, the present study raise the possibility that released β -endorphin within the spinal cord may result in a loss of the coordinated balance between processes that govern the desensitization, internalization and resensitization of MORs. This phenomenon could be associated with the mechanism that underlies the rapid development of tolerance to fentanyl under a neuropathic pain-like state.

CONCLUSION

We have demonstrated that repeated treatment with fentanyl at an excessive dose causes a rapid antihyperalgesic tolerance in sciatic nerve-ligated mice, whereas morphine and oxycodone do not produce this phenomenon. This condition may reflect the clinical observation that tolerance to morphine analgesia is not a major concern when patients suffer from severe pain. In addition, the discrepancy between the present findings and classical basic understanding that chronic morphine treatment is

believed to lead to severe analgesic tolerance may result from the fact that most previous studies concerning molecular events in opioid tolerance have been performed using an excessive dose of MOR agonists in naive rodents. Furthermore, the present findings strongly indicate that β -endorphin within the spinal cord may be involved in the prolongation of the fentanyl-induced desensitization of MORs. This phenomenon may explain the high degree of tolerance to fentanyl-induced antihyperalgesia under a neuropathic pain-like state in rodents.

Authors Contribution

NM, HM, UY, DLA, ST designed the study. NM, IS wrote the manuscript. IS, NA, OA, AM, RM, SY, KN performed the experiments. IS, NA, OA, AM, RM, SY, KN performed the data analysis. All authors have critically reviewed content and approved final version submitted for publication.

References

- Bohn LM, Gainetdinov RR, Lin FT, Lefkowitz RJ, Caron MG (2000) Mu-opioid receptor desensitization by beta-arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence. *Nature* 408:720–723.
- Claing A, Laporte SA, Caron MG, Lefkowitz RJ (2002) Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. *Prog Neurobiol* 66:61–79.
- Gainetdinov RR, Premont RT, Bohn LM, Lefkowitz RJ, Caron MG (2004) Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Annu Rev Neurosci* 27:107–144.
- Haberstock-Debic H, Kim KA, Yu YJ, von Zastrow M (2005) Morphine promotes rapid, arrestin-dependent endocytosis of mu-opioid receptors in striatal neurons. *J Neurosci* 25:7847–7857.
- Imai S, Narita M, Hashimoto S, Nakamura A, Miyoshi K, Nozaki H, Hareyama N, Takagi T, Suzuki M, Suzuki T (2006) Differences in tolerance to anti-hyperalgesic effects between chronic treatment with morphine and fentanyl under a state of pain. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi* 26:183–192.
- Kieffer BL, Evans CJ (2002) Opioid tolerance-in search of the holy grail. *Cell* 108:587–590.
- Koch T, Wüdera A, Bartsch K, Schulz S, Brandenburg LO, Wundrack N, Beyer A, Grecksch G, Holtt V (2005) Receptor endocytosis counteracts the development of opioid tolerance. *Mol Pharmacol* 67:280–287.
- Malmberg AB, Basbaum AI (1998) Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. *Pain* 76:215–222.
- Minnis JG, Patierno S, Kohlmeier SE, Brecha NC, Tonini M, Sternini C (2003) Ligand-induced mu opioid receptor endocytosis and recycling in enteric neurons. *Neuroscience* 119:33–42.
- Narita M, Mizoguchi H, Suzuki T, Dun NJ, Imai S, Yajima Y, Nagase H, Tseng LF (2001) Enhanced mu-opioid responses in the spinal cord of mice lacking protein kinase Cgamma isoform. *J Biol Chem* 276:15409–15414.
- Niikura K, Narita M, Nakamura A, Okutsu D, Ozeki A, Kura-hashi K, Kobayashi Y, Suzuki M, Suzuki T (2008) Direct evidence for the involvement of endogenous beta-endorphin in the suppression of the morphine-induced rewarding effect under a neuropathic pain-like state. *Neurosci Lett* 435:257–262.
- Raynor K, Kong H, Chen Y, Yasuda K, Yu L, Bell GI, Reisine T (1994) Pharmacological characterization of the cloned kappa-, delta-, and mu-opioid receptors. *Mol Pharmacol* 45:330–334.
- Rubinstein M, Mogil JS, Japon M, Chan EC, Allen RG, Low MJ (1996) Absence of opioid stress-induced analgesia in mice lacking beta-endorphin by site-directed mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:3995–4000.
- Schulz S, Mayer D, Pfeiffer M, Stumm R, Koch T, Holtt V (2004) Morphine induces terminal micro-opioid receptor desensitization by sustained phosphorylation of serine-375. *EMBO J* 23:3282–3289.
- Seltzer Z, Dubner R, Shir Y (1990) A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 43:205–218.
- Ventafredda V, De Conno F (1981) Organizing pain control and rehabilitation service in a cancer centre. *Int Rehabil Med* 3:149–154.
- Walwyn WM, Keith DE, Jr, Wei W, Tan AM, Xie CW, Evans CJ, Kieffer BL, Maidment NT (2004) Functional coupling, desensitization and internalization of virally expressed mu opioid receptors in cultured dorsal root ganglion neurons from mu opioid receptor knockout mice. *Neuroscience* 123:111–121.
- Whistler JL, von Zastrow M (1998) Morphine-activated opioid receptors elude desensitization by beta-arrestin. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:9914–9919.
- Whistler JL, von Zastrow M (1999) Dissociation of functional roles of dynamin in receptor-mediated endocytosis and mitogenic signal transduction. *J Biol Chem* 274:24575–24578.
- Zangen A, Herzberg U, Vogel Z, Yadid G (1998) Nociceptive stimulus induces release of endogenous beta-endorphin in the rat brain. *Neuroscience* 85:659–662.
- Zollner C, Mousa SA, Fischer O, Rittner HL, Shaqura M, Brack A, Shakibaei M, Binder W, Urban F, Stein C, Schafer M (2008) Chronic morphine use does not induce peripheral tolerance in a rat model of inflammatory pain. *J Clin Invest* 118:1065–1073.
- Zubieta JK, Smith YR, Bueller JA, Xu Y, Kilbourn MR, Jewett DM, Meyer CR, Koeppe RA, Stohler CS (2001) Regional mu opioid receptor regulation of sensory and affective dimensions of pain. *Science* 293:311–315.

日本の「統合医療」のゆくえ

—『厚生労働省「統合医療」のあり方に関する検討会』による今後の指針は？—

独立行政法人国立がん研究センター研究所がん患者病態生理研究分野分野長
上園 保仁

はじめに

本誌『基礎医学セミナー』を連載で担当させていただいており、2009年12月発行の20巻2号より第1回が始まり、計7回、2012年23巻2号まで、緩和医療に関する基礎医学がどのように臨床医学につながっているのかについて、またがん患者の生活の質(quality of life; QOL)の向上に貢献する漢方薬についても2回にわたりお話をさせていただきました^{1)~7)}。第1回は「がん対策基本法」における緩和医療関連の基礎医学の立ち位置について、第2回はがんの痛みをなくすための基礎研究について、その一端を紹介いたしました。第3回は「第一次がん対策推進基本計画」(2007~2011年)がちょうど見直しの時期に来ており、今後の緩和ケアの推進、緩和ケア研究の今後について取り上げ、それに関連して第6回は2012年6月8日に閣議決定された「第二次がん対策推進基本計画」についてその内容を詳細に紹介させていただきました。第4回は進行がん患者の8割が陥る「がん悪液質」の説明ならびにその予防・治療に対する基礎から臨床に至る橋渡し研究の現状を、第5回ならびに第7回はがん患者のQOLを高める薬剤としての漢方薬の「なぜ効くの?」「本当に効くの?」について科学的エビデンスに基づいた最新の研究を紹介いたしました。

皆さんは「統合医療」ってご存知ですか? 漢方薬や鍼、灸、ヨガ、サプリメントや健康食品、

アロマセラピーなどが当てはまるとされています。2010年1月29日、当時の鳩山由紀夫内閣総理大臣が施政方針演説において、国民の健康寿命を延ばす観点から「統合医療」の積極的な推進について政府として検討を進めることを掲げました。総理の思い・方針を受けて、厚生労働省では省内にプロジェクトチームを発足させるとともに、厚生労働科学研究事業の研究費を用いて「統合医療」に関する知見の集積を図ってきました。2010年2月、4月に、民主党政権でつくられた統合医療プロジェクトチームの第1回、第2回会合が開かれました⁸⁾⁹⁾。

「統合医療」という名称については、おそらく一度は聞いたことのある言葉だと思います。しかし患者や国民、また医療界においてははまだ共通認識が確立していない状況にある言葉なのです。また「統合医療」に当てはまるとされる療法は数が大変多いこと、またそれらのなかには安全性・有効性に関する科学的根拠に乏しいものも多数あり、総理の方針どおりに「統合医療」を推進しようとする、まずこれらの科学的根拠などの課題に適切に対処する必要があるということになりました。統合医療プロジェクトチームの第1回、第2回の会合を受け、厚生労働省では「統合医療」のあり方に関する検討会を立ち上げ、そこで全5回にわたって「統合医療」のあり方に関する検討が行われました(表1)。検討項目としては、表1にあるように、

- ・「統合医療」とは何か? その定義
- ・「統合医療」の評価方法および国際的動向

表1. 厚生労働省「統合医療」のあり方に関する検討会の開催状況

第1回 平成24年3月26日(月)	<ul style="list-style-type: none"> 「統合医療」について 【ヒアリング】 渥美 和彦(一般社団法人日本統合医療学会理事長) 寺澤 捷年(社団法人日本東洋医学会前会長)
第2回 平成24年4月25日(水)	<ul style="list-style-type: none"> 「統合医療」の評価方法について 「統合医療」をめぐる国際的な動向について 【ヒアリング】 福井 次矢(財団法人聖路加国際病院院長)
第3回 平成24年8月6日(月)	<ul style="list-style-type: none"> 「統合医療」に関するエビデンスについて 論点整理 【ヒアリング】 高崎 隆次(株式会社ツムラ医薬営業本部副本部長 ／学術戦略統括室室長)
第4回 平成24年10月5日(金)	<ul style="list-style-type: none"> 「統合医療」に関する情報発信のあり方について 論点整理 【ヒアリング】 大野 智(早稲田大学先端科学・健康医療融合研究機構 客員准教授)
第5回 平成25年2月8日(金)	<ul style="list-style-type: none"> これまでの議論の整理

職位などはその当時のもの

(文献10)より引用)

・「統合医療」のエビデンスの現状
 ・「統合医療」の情報発信のあり方
 などです。2013年2月22日には、これまでの議論をまとめた「これまでの議論の整理」が厚生労働省のホームページに掲載されました¹⁰⁾。

「統合医療」について

まず統合医療について、今なぜ「統合医療」を厚生労働省がプロジェクトとして立ち上げを検討するのか、それを説明する必要があります。その背景についてお話しします。

われわれが現在恩恵を受けている近代西洋医学は、その発達・発展に伴い特に感染症などの疾患

の予防・治療に多大な貢献を行ってきました。その一方で、がん、生活習慣病、アレルギー疾患、精神疾患のように、食生活の乱れや悪習慣、現代における大きなストレスなどのさまざまな要因によって引き起こされる疾患については、人をトータルにみて「人」を治していくというアプローチが有用であろうという意見も出されてきました。すなわち、臓器別などの個別療法では容易に克服できない状況もあるということです。幸い日本では、西洋医学だけでなく漢方薬、健康食品、サプリメント、ヨガや鍼灸などの多くの民間療法が昔から広く用いられているという現状がありました。

このような状況のなか、今のところ近代西洋医

学的手法では科学的に説明できないけれども、そのようなさまざまな療法を西洋医学と相反するものとして対極に置くのではなく、両者を組み合わせることによってこれまでにない相加・相乗的な効果をもたらすことを期待し、それらを統合する医療、すなわち「統合医療」の考え方が注目されてきました。厚生労働省での検討会では、これまでしっかりと定義できていない、あるいは定義が甘く漠然と捉えられてきた「統合医療」の定義をまず確固たるものにしようという議論が行われました。

日本統合医療学会によると、「統合医療とは、さまざまな医療を融合し患者中心の医療を行うものです。科学的な近代西洋医学のみならず、伝統医学と相補・代替医療、さらに経験的な伝統・民族医学や民間医療なども広く検討しています」と定義されています。さらにその特長として、「①患者中心の医療、②身体のみならず、精神、社会(家族、環境など)、さらに最近では、スピリチュアルな面を含めた全人的医療、③個人の自然治癒力の促進により、治療のみならず、むしろ増進を目標とする病気の予防や健康」が挙げられるとされています。この「統合医療」は実は米国ではかなり科学的に捉えられ、政府機関である米国国立衛生研究所相補代替医療センター(National Center for Complementary and Alternative Medicine : NCCAM)において、「統合医療」を「従来の医学と、安全性と有効性について質の高いエビデンスが得られている相補・代替医療とを統合した療法」と定義し、さらに相補・代替医療については、①天然物(natural products : 生薬、ビタミン類、無機物などの利用)の投与、②心身療法(mind and body medicine : 脳、精神、身体および動作の相互作用に着目した、健康増進を目的とする行為(瞑想、ヨガ、鍼灸、太極拳など))、③手技的な行為(manipulative and body-based practices : 骨、関節、循環系、リンパ系などの身体構造・組織に着目した行為(カイロプラク

ティック、マッサージなど))、に分類し、科学的な研究が大きな予算をバックに進められているところです。

米国でのこのような「統合医療」の研究の進展については、1990年代より国民が「生体の有する防御機能や治癒力を支持する自然療法」に注目はじめ、その需要が高まってきたこと、また米国では急激な医療費の高騰が起こったことを契機に比較的安価な「統合医療」を実臨床に導入しようとする動きがあり、前述のようなNCCAMが設立されたという経緯がありました。

相補・代替療法や伝統医学などは必ずしも医師が主導して行うものではなく、医師や医療従事者以外が提供するものもたくさんあります。すなわち、わが国における「統合医療」は実は「医療」ではないものも数多く含まれていることとなります。このような状況をふまえ、検討会においては「統合医療」を「近代西洋医学を前提として、これに相補・代替療法や伝統医学等を組み合わせて更にQOLを向上させる医療であり、医師主導で行うものであって、場合により多職種が協働して行うもの」と位置づけました。また「統合医療」に含まれるであろうさまざまな分野は、科学的エビデンスのかなり高いもの、すなわち「西洋の上俵」でしっかりと勝負できるものから、エビデンスのかけらもない噂や迷信の類に近いものも含まれています。そこでこの検討会においては、今後それらの療法の有効性だけでなく、特に安全性に関する知見の集積状況もふまえながら(集まらない療法もあるものと考えられますが)療法の範囲についてはきちんと整理していく必要があると議論されました。

図1は、日本における「近代西洋医学」と組み合わせることのできる療法およびその大まかな分類を示しています。このように、療法の例として国家資格や制度がすでに確立されているものと、そうでないものに大きく分けられます。もちろん今後の科学の発展によっては、この分類がさまざま

療法の分類	療法の例	
	国家資格など、国の制度に組み込まれているもの	その他
食や経口摂取に関するもの	食事療法・サプリメントの一部 (特用途食品(特定保健用食品含む), 栄養機能食品)	左記以外の食事療法・サプリメント, 断食療法, ホメオパシー*
身体への物理的刺激を伴うもの	鍼・灸(鍼師, 灸師)	温熱療法, 磁気療法
手技的行為を伴うもの	マッサージの一部 (あん摩マッサージ指圧師), 骨つぎ・接骨(柔道整復師)	左記以外のマッサージ, 整体, カイロプラクティック
感覚を通じて行うもの	—	アロマセラピー, 音楽療法
環境を利用するもの	—	温泉療法, 森林セラピー
身体の動作を伴うもの	—	ヨガ, 気功
動物や植物との関わりを利用するもの	—	アニマルセラピー, 園芸療法
伝統医学, 民族療法	漢方医学の一部 (薬事承認されている漢方薬)	左記以外の漢方医学, 中国伝統医学, アーユルベダ

図1. 近代西洋医学と組み合わせる療法の分類について

図1の構成要素: 近代西洋医学 (左側の縦長ボックス) から矢印が「組み合わせ(補完・一部代替)」というラベルと共に表の「療法の分類」欄に指す。また、表の下部には「総合医療」というボックスがあり、矢印が表の下部から指す。

図1. 近代西洋医学と組み合わせる療法の分類について

表は、平成22年度厚生労働科学特別研究事業「統合医療の情報発信等の在り方に関する調査研究」で採り上げられた療法について、効果の有無を問わず整理したものである。

*：日本学術会議(2010年8月24日)において、「ホメオパシーの治療効果は科学的に明確に否定されている」との会長談話が出されている。

(文献10)より改変・引用)

まな変貌を遂げていくことも予想されます。

わが国における「統合医療」の現状

統合医療の現状については、平成22年度厚生労働科学特別研究事業「統合医療の情報発信等の在り方に関する調査研究」(研究代表者：福井次矢(聖路加国際病院院長))において、2008～2011年の4年間、コクランライブラリー(Cochrane Library：1992年に英国で設立されたコクラン共同計画に基づき、保健医療に関して、医療提供者や患者などが十分な情報に基づいた判断をするために役立つ情報を提供することをめざし、世界中の臨床研究について科学的な論文を網羅的に収集

し、そこに批判的評価を加え要約する「システマティックレビュー」を行った結果を報告したものを解析することにより、主な統合医療の数と有効性についての分析が行われました。

同分析によると、鍼療法などは「効果あり」とされているものの、大多数については効果は「未確定」「効果なし」と結論されています。つまり、科学的エビデンスは少ないか、あるいはないものが多いということです。

このように大多数の療法について科学的エビデンスがほとんど得られていない理由としては、相補・代替療法そのものが個人がそれぞれ異なる反応を示すものであり、いわゆる西洋の土俵として有効か無効かを見極めるランダム化比較臨床試験

(randomized controlled trial ; RCT)を行ってもなかなか結果が出ない、あるいはそもそも実施できない分野が多いということが挙げられます。

しかしこの数年、相補・代替療法に関するRCTの論文数は増加傾向をみせています。特に、医療用漢方薬のように国内外で大規模臨床試験が進められ、また基礎研究に基づいて作用機序が明らかになりつつあるなど一定の成果を挙げている分野もあります⁵⁾⁷⁾。

また、近年では個人の感情や心の動きを可視化できるfMRI(functional magnetic resonance imaging)や、個人を蛋白や遺伝子レベルで解析できるプロテオーム解析、メカゲノム解析法といった新しい技術開発により、これまでの技術ではわからなかったさまざまな療法の作用機序および効果が客観的に解明される可能性もあります。

以上より、現時点では「統合医療」に関する科学的知見は必ずしも十分でないものがあるものの、これからのさまざまな取り組みによって明らか

かにされていく可能性があります。

世の中にはさまざまな「統合医療」に含まれる療法がありますが、一般人がそれらの療法を選ぶ際、何を目安にするかという研究があります。一般人を対象に、医療機関以外で提供されている相補・代替療法などを利用する際の参考とする情報内容について調査を行ったところ(回答数3,227人)、各種療法の選択には科学的エビデンスに関する情報が最重要というわけではなく、「価格」を優先する人(58.9%)が最も多く、「一般の人々の体験談」(38.5%)、「研究結果(データ)の提示」(37.7%)、「効果を示す文句」(37.0%)が続く結果となっていました(表2)。これは、さまざまな療法の発信をどのように行っていくべきかという課題点を含んだ結果でもあると思われます。

各国における「統合医療」の実態

検討会では「統合医療」における諸外国の取り

表2. 医療機関以外で提供されている各種療法の利用に際して参考にする情報

	実数	%
全体	3,227	100.0
価格	1,901	58.9
一般の人々の体験談	1,241	38.5
研究結果(データ)の提示	1,217	37.7
効果を示す文句	1,195	37.0
医師や研究者など権威者による推薦	713	22.1
リスクに関する記述	695	21.5
発売・製造元	672	20.8
施術者の免許や資格の取得の記述	665	20.6
お得感・キャンペーン・割引の記述	485	15.0
個人差に関する記述	283	8.8
販売・利用実績の記述	282	8.7
有名・著名人の利用と推薦	152	4.7
受賞に関する記述	69	2.1
その他	111	3.4

(文献10)より引用)

組みについても述べられています。平成22年度厚生労働科学特別研究事業「統合医療の情報発信等の在り方に関する調査研究」、WHO西太平洋地域事務局による伝統医療の地域戦略に関する会議資料(2012年5月)をもとにした報告で、下記のようになされています。

①米国については前述のNCCAMがあり、相補・代替医療に関しては安全性を最も重視しています。安全性や有効性について比較的多額の研究費を外部の大学や研究機関に配分し、エビデンスの構築に努めています。また、相補・代替医療についてはウェブサイトを中心に、A.患者／一般向け、B.医療従事者向け、の2種類の情報配信を行っています。

1995年にはハーバード大学に代替医学研究センターが設立され、当センターではハーブ、鍼灸、太極拳、ヨガ、アーユルベータ、瞑想(meditation)などに関する研究を実施し、プラセボ(偽薬)効果に関する研究も実施しています。また、相補・代替医療に関する研究者の育成も併せて行い、関連診療所では相補・代替医療を提供しています。

②中国では、国の医療政策として近代西洋医学と伝統中医学とを並列に捉え、個別の教育・医療が行われています。2011年には第十二次伝統中医学五ヵ年計画(2011～2015年)が公表され、伝統中医学が積極的に保護・支援されるべきという方針で政策を行っています。

③インドでは中国と同様、医療体系は近代西洋医学と伝統医学の2本立てとなっており、医療施設も医師もそれぞれ別立てとなっています。近年では、近代西洋医学医師とインドの伝統医学、アーユルベータ医師とが協力することにより、近代西洋医学の最先端の技術と伝統的医療資源の知見を用いた統合的臨床研究プロジェクト(Medicity)が進められています。

④韓国においては、中国・インドと同じく、医療体系は近代西洋医学と伝統医学の2本立てと

なっています。医療施設も医療従事者(医師、薬剤師)もそれぞれ別立てとなっており、伝統医学の拠点病院(慶熙大学校医療院東西新医学病院)においては、近代西洋医学と伝統医学(韓医学)による統合医療の研究が行われています。

今後の厚生労働省ならびに関連する組織の取り組み

検討会は2012年3月26日～2013年2月8日まで5回にわたり議論を深めてきました(表1)。その結果、「統合医療」は多種多様であり、かつエビデンスの高いものからきわめて低いものまで玉石混濁であると結論されました。現時点において「統合医療」については①全体として科学的知見が十分に得られているとはいえ、②また患者・国民に十分浸透しているとはいえない、という結論に至りました。

このような状況下で、日本において(今後ますます重要となってくるであろう)「統合医療」を確実に推進するためには、第1にこのような療法に対して患者・国民の信頼を得ることが最も重要であり、そのためには安全性・有効性などが適切なかたちで確立され、また伝えられなければならないことや、何といても安全性の確保ができない「統合医療」を何のチェックもなく患者・国民に提供することは避けなければならないことが挙げられました。確かにこの部分はお金と時間をかけてでも、しっかりとした対応を行っていくべきだと思います。

さまざまな疾患、特に治療法に限界のある疾患をもつ患者は、藁にもすがる思いであらゆる可能性のある療法にすがろうとすると思われます。しかし、ここで一番重要なことは、現在のようにさまざまな情報が氾濫しているなかで、患者がより確実な内容の情報に辿り着けることです。

以上のことから、国としての今後の取り組みとしては、「統合医療」の各療法について安全性・



有効性などに関する科学的知見を収集するとともに、これらをもとにして必要な情報を広く発信していくことによって、患者・国民および医師が療法を適切に選択できるようにすることが重要であると結んでいます。

具体的な取り組み

具体的な取り組みとしては、まず国内外の「統合医療」および近代西洋医学と組み合わせる各種の療法に関するエビデンスレベルの高い学術論文などを収集できる体制を整備し、できれば国内に研究・資料収集のための代表的拠点を設定して、さまざまな「統合医療」の一つひとつについて研究・資料収集を行い、得られた結果を国民に還元するという実践的アプローチを推進することで「統合医療」に関する科学的知見の集積を図り、発信することが求められると考えます。

各種の公的機関と連携し、インターネットなどを介して提供する仕組みづくりを構築することもまた重要であると考えられます。その際、情報が氾濫する現代において最も重要なことは、いかに正確な情報を届けるかということだと思います。

さらに、統合医療に関する正確な情報は患者・国民のみならず患者・国民から相談を受ける医師などの医療従事者や研究者にもしっかりと伝えていく必要があることから、医療従事者や研究者にも情報がしっかりと伝わる発信の仕組みを構築す

ることが必要です。その取り組みに際しての留意点として、以下のものが挙げられます。

- ①「統合医療」のエビデンスについては、RCTのようによりレベルの高いエビデンスがより多く集積されることが望ましいこと。一方で、RCTが難しいものについては別途方法を考えることも必要と考えます。さまざまなガイドラインでも用いられているように、各医療についてエビデンスの段階(表3)をしっかりと明示するかたちで行うべきであると考えられます。これについては、日本緩和医療学会『がん補完代替医療ガイドライン』などのまとめ方が参考になると思われます¹¹⁾。
- ②また各種医療法の有効性評価については、通常の有意差(証拠があると考えられる規準)である有意水準5%以下で作用機序が明確な場合だけを捉えるのではなく、たとえば有意水準10%以下でも科学的解析の結果、作用機序が明確な場合は一定の評価を行ってもよいという新規準を設けることなど。
- ③たとえば食事療法でも個別に食物アレルギーがあるように、何をどのような場面で摂取したかによって有効性が変わるので、誰が、どのような属性をもった患者・国民に、どの療法をどのように用いて、結果どうなったのかといった正確なデータを整理していくことが必要です。したがって、療法を提供する側においてはどんな対象者にどんなことをしたのかという記録を

表3. 治療のエビデンスのレベル(段階)の例

I a	複数のランダム化比較試験のメタ分析による。
I b	少なくとも1つのランダム化比較試験による。
II a	少なくとも1つの非ランダム化比較試験による。
II b	少なくとも1つの他の準実験的研究による。
III	コホート研究や症例対照研究、横断研究などの分析疫学的研究による。
IV	症例報告やケース・シリーズなどの記述研究による。
V	患者データに基づかない、専門委員会の報告や権威者の意見による。

(文献10)より引用)

しっかりと残すこと、そしてそれを対外的に明らかにしていく必要性が求められること。

- ④患者・国民や医師などによる療法の選択を支援する観点からは、有効性の有無だけでなく、「現時点では有効性が認められていない（役に立たない、無意味である）」ということをしかりと伝えることも大切であること。
- ⑤特に健康被害状況など安全性に関する情報はきわめて重要であること。このため、これらの科学的知見も収集し、情報発信すべきであること。
- ⑥くわえて各国の統合医療に対する政策の状況や、社会経済的側面、国民のニーズの動きなど、いわゆる社会科学的な知見の収集も重要であること。
- ⑦上記のような解析を行うべき療法の範囲については検討会内でも相当の議論があったようですが、今のところ一定の整理を行ってしまうことは不可能であること、また適切な医療を行ううえで有効性だけでなく安全性についても必要な情報を提供していくことが重要であることから、できれば国内において現状行われている「療法」を幅広く調べていく必要があると考えられること。

以上のような留意点をもって、今後具体的にわが国における「統合医療」の発展のために行うべき課題が挙げられました。

おわりに

現在WHOでは国際疾病分類(ICD)の第10版から第11版への2015年改訂作業が進められており、そこに、「伝統医学」を盛り込むことが検討されています。そのなかで中国は、同国の伝統医学である「中医学」の用語、治療法、免許、生薬の製造方法などの国際標準化を積極的に申請しているそうです。日本においても、このような動きに置いていかれないようにしっかりと運動していく必

要があるでしょう。この点については、慶応義塾大学医学部漢方医学センター副センター長である渡辺賢治先生の手記である『日本人が知らない漢方の力』¹²⁾の第5章「漢方」存続の危機」に詳しく述べられています。参考にしてください。

厚生労働省では2010年に統合医療プロジェクトチームが結成され、それに基づいて2012年より「統合医療」のあり方に関する検討会が2013年2月まで計5回にわたり行われてきましたが、当検討会では今後の「統合医療」のあり方に関し、これまでの近代西洋医学が国民の健康の向上に大きな成果を挙げてきた一方で、さまざまな病態が解明されていくにしがたい医師などの専門性が臓器別などに細分化されてきたこと、そういったなかで患者全体を診る全人的医療の重要性が話題に上ることがあったと伺っています。また、各種の医療従事者などが連携して関わっていくチーム医療が今後の医療に重要であることも論じられました。「統合医療」の定義からその規程、質の担保、今後の方針などについて、科学的エビデンスを着実に集積し、その結果を国民に正確に伝えることの重要性を改めて確認したのが当検討会で話し合われた一定の成果でありました。

「統合医療」が今後どのように進んでいくのかについては、予想できないところもありますが、少なくともしっかりと科学的エビデンスのあるもの、明らかに国民のために役立つものについてはその推進を行ってほしいし、エビデンスが得られないとわかったものはその結果をさまざまな関連する業界におもねることなく、正確に真実を伝えてほしいと考えます。玉石混淆といわれる「統合医療」なのであれば、そのなかから「玉」のみを残す努力を行ってほしいし、医療に携わる者として私もしっかりとそのお手伝いをさせていただきます。と思っています。

モデル動物からみたcachexia (悪液質)

Study of cancer cachexia with cachexia model rats

上園保仁

SUMMARY

ヒト胃がん細胞株85As2を接種し、ヒトがん悪液質 (cachexia) 診断基準を満たす動物モデルを作製した。同モデルは血中グレリン濃度が有意に高く、悪液質に伴うグレリン抵抗性が考えられた。漢方薬の六君子湯が有意な摂食改善効果を示したのは、生薬成分の蒼朮がグレリン受容体 (GHS-R) シグナルを増強したことからであり、六君子湯は悪液質患者のGHS-Rシグナルを増強し摂食を改善することが考えられた。

KEY WORDS

- がん悪液質
- 食思改善ペプチドグレリン
- 六君子湯
- 漢方薬
- グレリン抵抗性

I

はじめに

2007年より「がん対策基本法」が施行されたことに伴い「第一期がん対策推進基本計画」が策定され、2012年にはさらにきめ細かい「第二期がん対策推進基本計画」が策定された¹⁾。本基本計画のもと、がん患者のQOLの維持向上のための緩和ケアならびにその進展に向けた研究が行われている。しかし、遅れているのが倦怠感、食思不振、やせなど多くの終末期がん患者にみられる「がん悪液質 (cancer cachexia)」の症状改善への対応である。がん悪液質の克服は患者のQOLを改善する重要課題であるが、ヒトがん悪液質を研究するためのモデル動物の作製が困難なこともあり、研究は進んでいない。

われわれは低分化型ヒト胃がん細胞株 (MKN-45) から腹膜播種株として樹立させた85As2細胞をヌードラットに皮下

移植することにより、体重減少、摂食量低下などのがん悪液質に特徴的な症状を示すがん悪液質モデルラットを確立することができた。また近年、漢方薬の1つ「六君子湯」が抗がん剤による食思不振改善効果を有することや、末梢で唯一の食思改善ペプチドであるグレリンの分泌を促進することが報告され、がん領域における六君子湯の消化器症状改善効果が注目されている²⁾³⁾。そこでわれわれは、作製したがん悪液質モデルラットががん悪液質研究に有用か、また六君子湯は悪液質改善に有効かを検証する研究を行い、さらに六君子湯の悪液質への作用メカニズムの解析を行ったので、本稿にてその内容を報告する。

II

実験方法

①新たに作製した悪液質モデルラットの「悪液質病態生理研究モデル」としての有用性を明らかにするための研究とし

て、以下の項目について検討を行った。

- (1) 85As2細胞における悪液質誘発能増強メカニズム解明のため、細胞培養上清中に存在するサイトカインの測定。
 - (2) 85As2細胞による腫瘍の摘出が悪液質症状に及ぼす影響の解析。
 - (3) 悪液質モデルラットの腓腹筋を用い、Antrogin-1/MAFbx, MuRF1など、悪液質の病態に関連すると思われる筋肉分解因子の発現レベルの解析。
 - (4) グレリン投与による摂食亢進作用について、悪液質を発症したラットモデルにグレリンを投与し、投与後1時間の摂食量の測定。
 - (5) 悪液質モデルラットの血中グレリン濃度の測定。
- ②さらに六君子湯の悪液質改善効果について、同モデルを用いて検討を行った。
- (1) 悪液質モデルラットに対する六君子湯の予防的および治療的効果の検討のため、85As2細胞を皮下移植後の体重、摂食量を毎週測定し、0、2および3週後に、除脂肪量・脂肪量・体水分量を測定した。そのなかで、悪液質を発症したラットに六君子湯 1 g/kg/日を1日2回に分けて7日間経口投与し、同量の蒸留水を与えた対照群と比較した。実験終了後、血中グレリン濃度を測定し、大胸筋、腓腹筋、前脛骨筋、ヒラメ筋および精巣上体・腎臓・腸間膜周辺の脂肪重量を測定した。
 - (2) ヒトグレリン受容体 (GHS-R) 発現HEK293T細胞およびラット