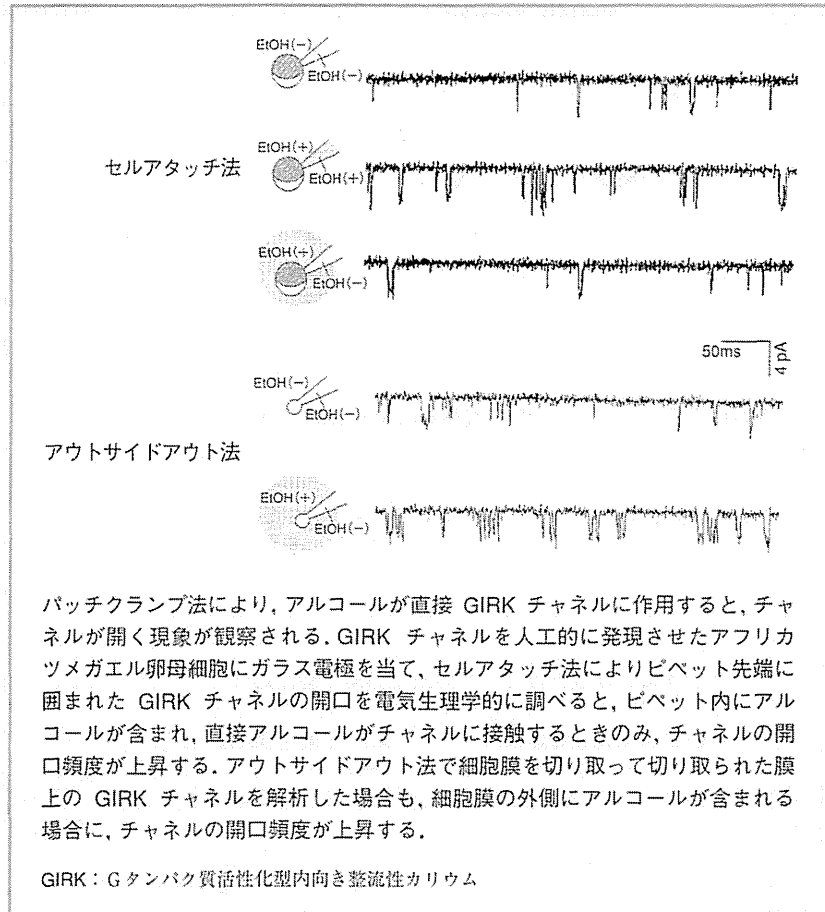


図3 アルコールによる GIRK チャンネルの開口 (文献<sup>8)</sup>より引用)

一方、アルコールを慢性的に摂取すると、GABA 受容体チャンネルが低活性型になって神経細胞の抑制が弱まり、NMDA 受容体チャンネルの量は増加して神経細胞が興奮しやすくなると考えられている。

一方、そのほかのイオンチャンネルにアルコールが直接作用することも明らかになっている。筆者らは、モルヒネなどのオピオイドや大麻の成分であるカナビノイドなど依存性薬物の多くのシグナル伝達を担う Gタンパク質活性化型内向き整流性カリウム (GIRK) チャンネルが<sup>7)</sup>、Gタンパク質を介さずに直接アルコールによって開口することを見いだした (図3)<sup>8)</sup>。GIRK チャンネルの遺伝子配列に変異を有するウィーバーミュータントマウスでは、アルコールによる鎮痛効果が特異的に減弱していることから、アルコールによる GIRK チャンネルの活性化はアルコールの鎮痛効果を担うと考えられ、アルコール依存症の発症と

も関連する可能性がある。

### 神経系のアルコール作用関連分子

遺伝子配列の差異とアルコール作用の個人差との関連解析や、遺伝子変異動物におけるアルコール作用の解析、各種のオミックス解析などから、さまざまな分子が脳神経系におけるアルコール作用機序にかかわっていることが明らかになってきた。Harrisらは、プロテインキナーゼCの $\gamma$ アイソフォームを持たないマウスでは、アルコール作用が減弱し、GABA受容体チャネルの機能が変化することを見いだした<sup>9)</sup>。Miyakawaらは、チロシンキナーゼの一種であるFynを持たないマウスでは、NMDA受容体チャネルの機能が変化し、アルコールに対する感受性が変化することを見いだした<sup>10)</sup>。ミューオピオイド受容体欠損マウスでは、アルコール嗜好性が減弱していることが示されており<sup>11)</sup>、オピオイド拮抗薬のナルトレキソンがアルコール依存治療薬として海外で広く用いられていることと整合性のある結果である。そのほか、多くの遺伝子欠損マウスがアルコール感受性の異常を示しており、アルコール作用には多くの分子が関与している。最近では、アルコールを好むラットと好まないラットの遺伝子配列の違いから代謝型グルタミン酸受容体2 (mGluR2) の遺伝子配列変異が見いだされ、mGluR2がなくなると、アルコール嗜好性が上昇することが示された<sup>12)</sup>。mGluR2作動薬によるアルコール依存治療の可能性が注目されている。

アルコール依存症患者と健常者の間での遺伝子配列の違いを調べる研究からも、多くのアルコール作用関連分子が同定されている。筆者らも、サイクリックAMP応答配列結合タンパク質 (CREB1) の遺伝子多型が脳におけるCREB1の遺伝子発現量、アルコール依存、オピオイド感受性などと関連することを見いだした<sup>13)</sup>。最近では、技術の進歩が著しく、網羅的な解析が可能となっており、ゲノムワイドに遺伝子多型を判定して関連を解析する方法や、遺伝子発現量を網羅的に調べるトランスクリプトーム解析、タンパク質発現量を網羅的に調べるプロテオーム解析などが、アルコールの脳神経作用の機序解明にも用いられている<sup>14)15)</sup>。

## アルコールの神経細胞への作用

アルコールは上記の標的分子に作用するとともに多くの分子の機能に影響して、さまざまな脳神経機能に影響を及ぼす。この分子レベルでのメカニズムと脳神経機能変化との間を結ぶ現象として、アルコールの神経細胞への作用が挙げられる。アルコールはシナプスや樹状突起の形態に影響することが知られており<sup>16-18)</sup>、外傷後ストレス障害とアルコール作用との関連が注目されている。また、アルコールは海馬における神経新生に影響することが報告されており<sup>19)</sup>、神経幹細胞によるアルコール関連障害の治療が試みられている<sup>20)</sup>。

## おわりに

アルコールは脳神経系において多岐にわたる作用を示す。そして、研究が進めば進むほど、そのそれぞれのアルコール作用に多くの分子が関与していることが明らかになってきており、まだまだ全容解明にはほど遠いと言える。しかし、網羅的な解析手法などの技術革新も起っており、先端的手法がアルコール依存症の神経科学的な解明に、続々と応用されている。アルコール依存症の生物学的な解明とその応用が、いっそう期待される。

池田 和隆

## 文献

- 1) 橋本恵理, 他: アルコール依存の基礎. 脳とこころのプライマリケア 8 依存 (福居顯二編) シナジー, 東京, 2011.
- 2) Wafford K A, et al: Genetic differences in the ethanol sensitivity of GABAA receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science* 249 (4966): 291-293, 1990.
- 3) Anstee Q M, et al: Mutations in the *Gabrb1* gene promote alcohol consumption through increased tonic inhibition. *Nat Commun* 4: 2816, 2013.
- 4) Lovinger D M, et al: Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. *Science* 243 (4899): 1721-1724, 1989.
- 5) Hagino Y, et al: Essential role of NMDA receptor channel  $\epsilon 4$  subunit (GluN2D) in the effects of phencyclidine, but not methamphetamine. *PLoS One* 5 (10): e13722, 2010.
- 6) Yamamoto H, et al: Involvement of the N-

- methyl-D-aspartate receptor GluN2D subunit in phencyclidine-induced motor impairment, gene expression, and increased Fos immunoreactivity. *Mol Brain* 6: 56, 2013.
- 7) Sugaya N, et al: Role of GIRK channels in addictive substance effects. *J Drug Alcohol Res* 2: ID 235823, 2013.
  - 8) Kobayashi T, et al: Ethanol opens G-protein-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels. *Nat Neurosci* 2 (12): 1091-1097, 1999.
  - 9) Harris R A, et al: Mutant mice lacking the gamma isoform of protein kinase C show decreased behavioral actions of ethanol and altered function of gamma-aminobutyrate type A receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 (9): 3658-3662, 1995.
  - 10) Miyakawa T, et al: Fyn-kinase as a determinant of ethanol sensitivity: relation to NMDA-receptor function. *Science* 278 (5338): 698-701, 1997.
  - 11) Hall F S, et al: Ethanol consumption and reward are decreased in mu-opiate receptor knockout mice. *Psychopharmacology (Berl)* 154 (1): 43-49, 2001.
  - 12) Zhou Z, et al: Loss of metabotropic glutamate receptor 2 escalates alcohol consumption. *Proc Natl Acad Sci USA* 110 (42): 16963-16968, 2013.
  - 13) Nishizawa D, et al: Genome-wide association study identifies a potent locus associated with human opioid sensitivity. *Mol Psychiatry* 19 (1): 55-62, 2014.
  - 14) Mulligan M K, et al: Toward understanding the genetics of alcohol drinking through transcriptome meta-analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 (16): 6368-6373, 2006.
  - 15) Gorini G, et al: Proteomic approaches and identification of novel therapeutic targets for alcoholism. *Neuropsychopharmacology* 39 (1): 104-130, 2014.
  - 16) Holmes A, et al: Chronic alcohol remodels prefrontal neurons and disrupts NMDAR-mediated fear extinction encoding. *Nat Neurosci* 15 (10): 1359-1361, 2012.
  - 17) Offenhäuser N, et al: Increased ethanol resistance and consumption in Eps8 knockout mice correlates with altered actin dynamics. *Cell* 127 (1): 213-226, 2006.
  - 18) Brady M L, et al: Moderate prenatal alcohol exposure reduces plasticity and alters NMDA receptor subunit composition in the dentate gyrus. *J Neurosci* 33 (3): 1062-1067, 2013.
  - 19) Nixon K, et al: Roles of neural stem cells and adult neurogenesis in adolescent alcohol use disorders. *Alcohol* 44 (1): 39-56, 2010.
  - 20) Shirasaka T, et al: Stem cell therapy: social recognition recovery in a FASD model. *Transl Psychiatry* 2: e188, 2012.

# 痛みと遺伝子多型

Genetic polymorphisms and pain

西澤大輔, 池田和隆

Daisuke Nishizawa, Kazutaka Ikeda

## 痛み感受性に関連する 主な遺伝子多型

痛みの受容, 伝達および上位中枢における認知に至る過程では, さまざまな神経伝達物質やその受容体, イオンチャネル, 炎症性メディエータなどが関与している. 本稿では, それらのさまざまな分子の中でもこれまで遺伝子多型, 主にはSNP (single nucleotide polymorphism; 一塩基多型) により機能や疼痛感受性が変化するという報告のあるものに絞り, 一部を具体的に紹介する.

### 1. COMT

(catechol-O-methyl transferase)

COMTはアドレナリン, ノルアドレナリン, ドパミンなどのカテコラミンの代謝酵素であり, これらの作動性神経伝達において鍵となる調節因子である. ラットではCOMTの阻害により疼痛感受性が増加する. ヒトのCOMT遺伝子における翻訳領域のrs4680 G>A多型はVal>Metのアミノ酸置換を伴い, これにより熱安定性が3~4倍低下し, 酵素活性が低下することが知られている. またこの多型は, オピオイド系の痛み刺激に対する反応性にも影響を及ぼすことがZubietaら (Science, 2003) により報告されている. とくに, Diatchenkoら (Human Mol Genet, 2005) の研究により, COMT遺伝子の座位における2つめのハプロブロック上のrs4680 G>Aを含む4つのSNPによって構成されるハプロタイプ, すなわち染色体上のアリル (allele: 対立遺伝子) の組み合わせが疼痛感受性と強い関連を示すことが明らかになった.

### 2. $\mu$ オピオイド受容体遺伝子 (OPRM1)

オピオイド受容体は, 上行性疼痛伝導路お

よび下行性疼痛抑制系の両方に関与し, 鎮痛作用発現に重要な分子である.  $\mu$ オピオイド受容体遺伝子 (OPRM1) の翻訳領域におけるA118G (rs1799971) 多型はAsn40 Aspのアミノ酸置換を伴う非同義多型である. Bondら (PNAS, 1998) が *in vitro* の実験により, この多型がヒトの内因性リガンドである $\beta$ -エンドルフィンの受容体に対する親和性を増加させることを示して以来, オピオイド系やドパミン系が関わりとえられる多くの疾患や表現型とA118G多型との関連解析が行われるに至った. Fillingimら (J Pain, 2005) は圧刺激による痛覚テストにおいて, A/Aの遺伝子型の被験者はA/Gの被験者に比べ有意に痛覚閾値が低いことを見出し, またLötschら (2006) は, CO<sub>2</sub>パルス刺激により誘発される事象関連脳電位 (event-related potential; ERP) は, 遺伝子型がA/Aの被験者においてはA/GまたはG/Gの被験者に比べ有意に高い電気生理学的応答を認めた.

### 3. GCH1 (GTPシクロヒドロラーゼ)

GCH1はカテコラミン, セロトニンおよび一酸化窒素の産生に不可欠な補助因子であるテトラヒドロビオプテリン (BH4) 合成の律速酵素である. この分子はTegeederら (Nat Med, 2006) の研究により, 末梢神経障害性疼痛および炎症性疼痛の重要な調節因子であることが示された. 同グループの報告によると, ラットでBH4の新規合成を阻害すると, 神経障害性および炎症性の疼痛が軽減され, 脊髄後根神経節 (dorsal root ganglion; DRG) での神経損傷に起因する過剰な一酸化窒素産生が妨げられた. 一方, BH4をくも膜下腔内に投与すると疼痛は悪化した. ヒトでは, GCH1遺伝子の座位の15 SNPによって構成

遺伝子	関連が報告された多型	疼痛の種類	対象者 (関連疾患または表現型)	関連が報告された疼痛の種類 (尺度)	参考文献
BCL11A	3 SNPs from BCL11A	Non-Cancer Pain	Sickle cell anemia patients	Pain crisis rate	Lettre, et al: PNAS(2008)
COMT	158 and haplotypes(APS, HPS)	Experimentally Induced Pain	Heat stimuli, cold stimuli, pressure stimuli	Pain score	Diatchenko, et al: Human Mol Genet(2005)
COMT	Haplotypes(APS, HPS, LPS)	Experimentally Induced Pain	Pressure stimuli, heat stimuli, ischemic stimuli	Pain score	Diatchenko, et al: Pain(2006)
COMT	Haplotypes(APS, HPS, LPS)	Experimentally Induced Pain	Muscle soreness	Self-report ratings	George, et al: Clin J Pain(2008)
COMT	rs4646312, rs6269	Experimentally Induced Pain	Heat stimuli, cold stimuli	Cold withdrawal time	Kim, et al: J Med Genet(2006)
COMT	158Val>Met	Experimentally Induced Pain	Saline injection	McGill pain questionnaire, VAS	Zubieta, et al: Science(2003)
COMT	rs6269A>G/rs4633C>T/rs4818C>G/rs4680G>A haplotypes	Non-Cancer Pain	Fibromyalgia	Fibromyalgia	Vargas-Alarcon, et al: Arthr Res Ther(2007)
DRD4	48 bp tandem repeat in exon III	Non-Cancer Pain	Headache	Migraine	Cevoli, et al: Eur J Neuro(2006)
ESR1	Haplotype based on RFLP (-397T>C and -351A>G)	Non-Cancer Pain	TMJ, OA	Pain intensity	Kang, et al: Int J Oral Maxillofac Surg(2007)
FAAH	7 SNPs from FAAH	Experimentally Induced Pain	Heat stimuli, cold stimuli	VAS, cold withdrawal time	Kim, et al: J Med Genet(2006)
GCH1	Haplotype	Experimentally Induced Pain	Pressure stimuli, thermal stimuli, electrical stimuli	VAS, von Frey hair before and after sensitization	Tegeder, et al: Eur J Pain(2008)
GCH1	Haplotype based on 15 GCH1 SNPs	Non-Cancer Pain	Surgical diskectomy, normal healthy	Leg pain, mechanical pain	Tegeder, et al: Nat Med(2006)
HBC1L-MYB	5 SNPs from HBS1L -MYB loci	Non-Cancer Pain	Sickle cell anemia patients	Pain crisis rate	Lettre, et al: PNAS(2008)
HBG2	1 SNP from upstream of HBG2	Non-Cancer Pain	Sickle cell anemia patients	Pain crisis rate	Lettre, et al: PNAS(2008)
HFE	C282Y, H63D	Non-Cancer Pain	Arthralgia	Disease status	Alizadeh, et al: Ann Rheum Dis(2007)
HLA-A	HLA-A*3303-B*4403-DRB1*1302 haplotype	Non-Cancer Pain	Postherpetic neuralgia	Disease status	Sato-Takeda, et al: Pain(2004)
IL1A	889C>T	Non-Cancer Pain	Back pain	VAS pain intensity	Solovieva, et al: Pain(2004)
IL1B	3954T>A	Non-Cancer Pain	Back pain	VAS pain intensity	Solovieva, et al: Pain(2004)
IL1RN	1812G>A	Non-Cancer Pain	Back pain	VAS pain intensity	Solovieva, et al: Pain(2004)
IL6	15T>A	Non-Cancer Pain	IDD-related sciatica	Disease status	Noponen-Hietala, et al: Pain(2005)
IL6	-174G>C	Non-Cancer Pain	Idiopathic arthritis patients	VAS pain intensity	Oen, et al: Rheumatology(2005)
IL8	-251T>A	Cancer Pain	Lung cancer	Pain intensity	Reyes-Gibby, et al: Cancer Epidemiol Biomarkers(2007)
MAOB	Intron 13 A>G	Surgically Induced Acute Clinical Pain	Tonsillectomy patients	Postoperative pain up to 5 hours	Sery, et al: Neuro Endocrinol Lett(2006)
OPRM1	118A>G	Experimentally Induced Pain	Pressure pain, heat pain	Pressure pain threshold, heat pain rating	Fillingim, et al: J Pain(2005)
OPRM1	118A>G	Experimentally Induced Pain	Pain related cortical potential	ERPs	Lötsch, et al: Behav Neurosci(2006)
OPRM1	118A>G	Non-Cancer Pain	Noncancer chronic patients	VAS pain intensity	Janicki, et al: Anesth Analg(2006)
OPRM1	118A>G	Surgically Induced Acute Clinical Pain	Noncancer chronic patients	VAS pain intensity	Janicki, et al: Anesth Analg(2006)
OPRM1	118A>G	Surgically Induced Acute Clinical Pain	Cesarean surgery	VAS pain intensity	Sia, et al: Anesthesiol(2008)
SCL6A4	STin2	Non-Cancer Pain	Migraine	Disease status	Szilagyi, et al: Headache(2006)
SOD2	47Ala>Val	Non-Cancer Pain	Chronic pelvic pain syndrome	Disease status	Arisan, et al: Prostate Cancer Prostatic Dis(2006)
TRPA1	rs1198795	Experimentally Induced Pain	VAS, cold withdrawal time	Cold withdrawal time	Kim, et al: J Med Genet(2006)

APS : average pain sensitivity, HPS : high pain sensitivity, LPS : low pain sensitivity, RFLP : restriction fragment length polymorphism, TMJ : temporomandibular joint, OA : osteoarthritis, IDD : intervertebral disc disease, VAS : visual analogue scale, ERPs : event-related potentials.

表1 これまで疼痛感受性との関連が報告された遺伝子多型

される特定のハプロタイプと、椎間板ヘルニア形成によって引き起こされた持続的な神経根性腰痛の処置としての椎間板切除後の疼痛程度の低さととの間に有意な関連が認められた。このハプロタイプをホモ接合でもつ健康な被験者では、実験的疼痛の感受性低下がみられ、またこのハプロタイプ保有者からの不死化白血球をフォルスコリンで刺激したところ、GCH1の発現増加の程度は対照よりも低かった。

## 痛み感受性に関連する その他の遺伝子多型

本稿では誌面の都合により紹介できなかったが、その他の痛みの感受性に関連する遺伝子多型を、さまざまな痛みの種類ごとに表1に示す。より詳細には、Lötschら、Kim

らおよびMaxらの総説など他稿を参照されたい<sup>1~3)</sup>。また、研究デザインの多様性、サンプルの異質性、不十分なサンプルサイズ、表現型の複雑さおよび統計学的アプローチの差異等の原因により、これまで報告された多くの痛み感受性の候補遺伝子多型においては、結果の再現性が得られていないなどの問題があり<sup>2)</sup>、今後のさらなる研究が必要とされよう。

### 文献

- 1) Lötsch J, Stuck B, Hummel T : The human mu-opioid receptor gene polymorphism 118A>G decreases cortical activation in response to specific nociceptive stimulation. *Behav Neurosci* 2006 ; 120 : 1218-1224.
- 2) Kim H, Clark D, Dionne RA : Genetic contributions to clinical pain and analgesia: avoiding pitfalls in genetic research. *J Pain* 2009 ; 7 : 663-693.
- 3) Max MB, Stewart WF : The molecular epidemiology of pain : a new discipline for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2008 ; 7 : 647-658.

## mTOR

公益財団法人東京都医学  
総合研究所

佐藤敦志 (SATO Atsushi)

池田和隆 (IKEDA Kazutaka)

### mTORとrapamycin<sup>1)</sup>

mTOR (mammalian target of rapamycin) は、rapamycin の標的として発見された蛋白質である。mTOR は細胞内で複合体 mTORC1, mTORC2 (mTORC1 は Raptor, mTORC2 は Rictor をサブユニットとする点が異なる) を形成し、セリン・スレオニンキナーゼとして作用する。mTORC1 (以下、mTOR) は成長因子、飢餓などのシグナル入力を受けて活性化し、下流でさまざまな蛋白質をリン酸化して細胞の成長や増殖を調節する。なかでも重要な標的は S6K と 4EBP1 である。S6K は mTOR によって活性化されると、S6 を通じて蛋白質の合成を促進する。また、mTOR は 4EBP1 を抑制することにより eIF4E を活性化し、CAP 依存性の遺伝子発現を亢進させる (図 1)。

Rapamycin は *Streptomyces hygroscopicus* が産生するマクロライド系化合物で、その構造をもとにエベロリムスなどの誘導體 (ラバログ) が合成されている。rapamycin およびその誘導體は mTORC1 を阻害するが、mTORC2 の阻害作用はほとんどないとされる。

当初、mTOR シグナル系は腫瘍および免疫領域での研究が盛んで、臨床においても免疫抑制剤、抗腫瘍薬として使用されてきた。近年は中枢神経系における mTOR の機能が明らかになり、精神神経領域の新たな創薬ターゲットとして注目されている。本稿では、mTOR との関連での研究が進んでいる自閉症スペクトラム障害 (以下、自閉症)、うつ病、てんかんについて述べる。

### mTOR と精神疾患

#### 1) 自閉症<sup>1)2)</sup>

自閉症は遺伝性が強く、原因遺伝子は報告があるだけでも数十を超える。その一部は、機能が共通するいくつ

かのサブグループに分けられる。TSC1 および TSC2 (結節性硬化症)、PTEN (PTEN 過誤腫症候群)、FMRP (脆弱 X 症候群、FXS)、NF1 (神経線維腫症 I 型) などの遺伝子異常による疾患は自閉症を高率に合併し、いずれも、mTORC1 機能の亢進という共通の分子病態を有する (図 1)。

これらの遺伝子異常によって、細胞レベルでは樹状突起の分枝の亢進、未熟なスパインの増加、蛋白質合成の全体的な増加などが共通してみられる。行動レベルでは、遺伝子異常をもつマウスが自閉症様の行動異常を示すことが明らかとなっている。さらに、rapamycin によって mTOR シグナル系を抑制すると、細胞レベルの異常が改善するとともに自閉症様行動も正常化する<sup>3)</sup>。特に、rapamycin が成獣に対するわずか数日の投与でも有効である点は興味深い。

mTOR シグナル系の亢進が自閉症に至る機序は、いまだに不明な点が多い。FXS においては mGluR5 の機能亢進が以前から知られている<sup>4)</sup>。TSC では逆に、mGluR5 の機能低下がみられ、rapamycin によって回復する。興味深いことに、FXS と TSC のダブルノックアウトマウスでは mGluR5 の異常がキャンセルされ、それぞれ単独のノックアウトマウスが示す記憶障害が改善した<sup>5)</sup>。自閉症における mGluR5 の関与についても、今後の研究の進展が待たれる。

#### 2) うつ病<sup>6)7)</sup>

うつ病患者の死後脳研究によると、うつ病患者の前頭前野などにおいて神経細胞の萎縮および mTOR シグナル系の抑制が報告されている。うつ病モデル動物においても、樹状突起の退縮、スパイン密度の減少とともに mTOR 活性の低下がみられる。

フェンサイクリジン系麻酔薬であるケタミンは、その強力な抗うつ効果が注目されている。ケタミンは非競合

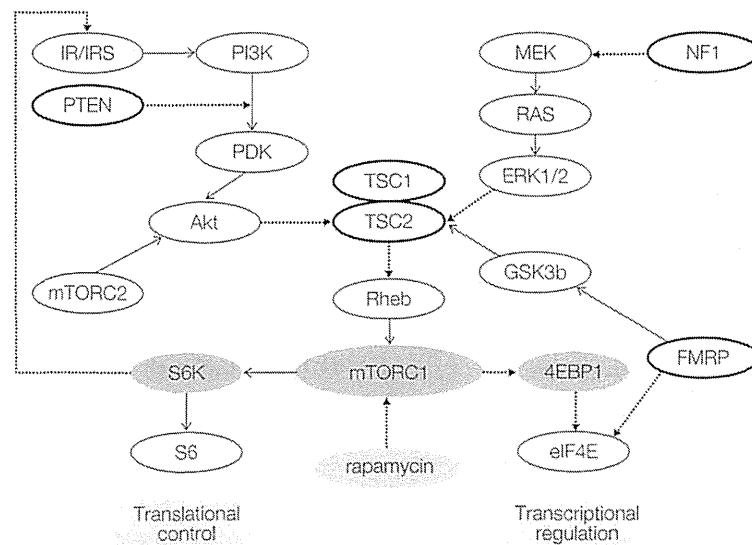


図 1. mTOR シグナル系

実線は活性化, 点線は抑制を示す. 太線で囲んだ遺伝子の異常は, mTORC1 機能亢進を伴う遺伝性疾患の原因である (本文参照). mTORC1 の機能亢進によって, 下流の S6K および 4EBP1 のリン酸化が亢進し, 遺伝子の転写・翻訳に異常をきたす.

性 NMDA 受容体阻害薬として知られ, 従来の抗うつ薬の主な作用機序であるモノアミン系には作用しない, とところが, ケタミンは動物モデルのみならず, 難治性うつ病患者に対しても, 非常に速やかに治療効果をもたらすことが明らかとなった. ケタミンの投与によって mTOR 活性が速やかに上昇し, 同時に前頭前野においてスパイン密度の増加と成熟がみられる. 同様の効果は AMPA 受容体作動薬の投与後にもみられ, AMPA 受容体拮抗薬によって消失する. また, ケタミンの抗うつ効果は BDNF ノックアウトマウスでは観察されない. グルタミン酸によるシグナル伝達や BDNF が, mTOR の活性低下によるうつ病の病態に関与し, うつ病の新たな治療標的になりうると考えられる.

### 3) てんかん<sup>26)</sup>

自閉症患者は一般人口にくらべててんかんを合併しやすく, 両者の発症機序には共通部分がある可能性がある. その代表例として, TSC および PTEN 過誤腫症候群の患者はてんかんの合併率が高い. 両疾患の分子病態である mTOR シグナル系の亢進は, てんかんの発症にも関与すると考えられる. TSC および PTEN 異常症の

モデル動物において, ヒトと同じヘテロ変異ではてんかんを発症しないが, 脳特異的ノックアウトマウスは重篤なてんかんを合併し, 神経細胞および樹状突起の巨大化, 軸索の肥大などの病理学的異常を伴う. てんかんと mTOR の関連はノックアウト動物にとどまらず, 重積を含むいれん発作, 低酸素, 脳損傷などによる後天性てんかんモデルマウスの脳組織, 難治性てんかんを合併する脳病変 (限局性皮質異形成, 片側巨脳症, 神経節腫など) においても, mTOR 活性の亢進が見出されている.

mTOR 阻害薬の抗てんかん作用は, 上記のノックアウトマウスにおいては示されているが, 後天性てんかんモデルマウスについては有効, 無効それぞれの報告がある. モデルマウスおよび脳病変を用いた研究によると, mTOR シグナル系の亢進に伴って興奮性アミノ酸受容体および GABA 受容体の発現が変化しており, てんかんの発症にかかわると考えられる. 臨床においては, エベロリムスが TSC 患者の難治性てんかんに有効であったとの報告がある<sup>27)</sup>. mTOR 阻害薬の適応となる患者背景の解明が期待される.



## おわりに

mTOR の機能異常はさまざまな精神神経疾患の病態に関与しており, 従来の治療薬とは異なる治療標的になりうる. 幸いにも rapamycin, エベロリムス, ケタミンなど既存の薬剤によるエビデンスが, 基礎臨床の両面において蓄積されつつある. これら既存の薬剤の臨床応用とともに, mTOR を標的とした精神神経疾患の新規治療薬の開発が進むことが期待される.

\*\*\*\*\*

## 文献

- 1) Hoeffler CA, Klann E : mTOR signaling : at the crossroads of plasticity, memory and disease. *Trends Neurosci* 33 : 67-75, 2010
- 2) Moavero R, Coniglio A, Garaci F *et al* : Is mTOR inhibition a systemic treatment for tuberous sclerosis? *Ital J Pediatr* 39 : 57, 2013
- 3) Zhou J, Blundell J, Ogawa S *et al* : Pharmacological inhibition of mTORC1 suppresses anatomical, cellular, and behavioral abnormalities in neural-specific Pten knock-out mice. *J Neurosci* 29 : 1773-1783, 2009
- 4) Dölen G, Osterweil E, Rao BS *et al* : Correction of fragile X syndrome in mice. *Neuron* 56 : 955-962, 2007
- 5) Auerbach BD, Osterweil EK, Bear MF : Mutations causing syndromic autism define an axis of synaptic pathophysiology. *Nature* 480 : 63-68, 2011
- 6) Duman RS, Li N, Liu RJ *et al* : Signaling pathways underlying the rapid antidepressant actions of ketamine. *Neuropharmacology* 62 : 35-41, 2012
- 7) Caddy C, Giaroli G, White TP *et al* : Ketamine as the prototype glutamatergic antidepressant : pharmacodynamic actions, and a systematic review and meta-analysis of efficacy. *Ther Adv Psychopharmacol* 4 : 75-99, 2014
- 8) Lasarge CL, Danzer SC : Mechanisms regulating neuronal excitability and seizure development following mTOR pathway hyperactivation. *Front Mol Neurosci* 7 : 18, 2014
- 9) Krueger DA, Wilfong AA, Holland-Bouley K *et al* : Everolimus treatment of refractory epilepsy in tuberous sclerosis complex. *Ann Neurol* 74 : 679-687, 2013

## 物質関連障害および嗜癮性障害群

宮田久嗣<sup>1)</sup>, 樋口 進<sup>2)</sup>, 廣中直行<sup>3)</sup>, 池田和隆<sup>4)</sup>, 伊豫雅臣<sup>5)</sup>, 小宮山徳太郎<sup>6)</sup>,  
松本俊彦<sup>7)</sup>, 鈴木 勉<sup>8)</sup>, 高田孝二<sup>9)</sup>, 和田 清<sup>10)</sup>, 齋藤利和<sup>11)</sup>

日本アルコール・薬物医学会/日本依存神経精神科学会

### はじめに

DSM-IV-TR の物質関連障害 (Substance-Related Disorders) の章は, DSM-5<sup>1)</sup> では物質関連障害および嗜癮性障害群 (Substance-Related and Addictive Disorders) に変更となった。DSM-5 の最大の変更点は, この領域の中心概念であった依存 (dependence) に代わり, 物質使用障害 (Substance Use Disorder) を採用したことである。第 2 の変更点は, 非物質関連障害群 (Non-Substance-Related Disorders) としてギャンブル障害 (Gambling Disorder) を新たに加えたことである。以上の 2 点は, 歴史的な変更といえる。しかし, 後述するように DSM-5 ではやや理念が先行し, 矛盾のない理論構築や精密な診断基準の作成が不十分である (あるいは間に合わなかった) 印象を受ける。その意味では, 今後も変更を加える中で完成度を高めていくものと考えられる。本稿では, 物質関連障害および嗜癮性障害群に含まれる各疾患を紹介しながら DSM-5 の理念や方向性を考えてみたい。

### DSM-5 の変更点

#### —DSM-IV-TR と比較して—

#### 1. 物質使用障害という概念の導入

DSM-5 の物質使用障害の診断基準は, DSM-IV-TR の物質依存と物質乱用の診断基準を合わせて作られている (表 1)。ただし, 物質乱用の中で「法律上の問題」は削除され, 新たに「物質に対する渴望」が追加されている。この結果, DSM-5 では物質乱用に相当する社会障害がより重視された診断構造になっている。また, 診断が成立するための条件として, DSM-IV-TR では, 物質依存が 7 項目中 3 項目以上, 物質乱用が 4 項目中 1 項目以上必要であったのに対して, DSM-5 では 11 項目中 (幻覚薬と吸入剤では離脱の項目がないため 10 項目) の 2 項目以上で診断が成立することから, DSM-5 では診断の閾値が低下している。これらのことから, DSM-5 の物質使用障害の診断概念の意義を挙げるならば, 乱用と依存という 2 つの異なる概念を統一することで, これまで医学的治療の対象とみなされなかった段階から, 連続

著者所属: 1) 東京慈恵会医科大学精神医学講座 2) 独立行政法人国立病院機構久里浜医療センター 3) 株式会社 LSI メディエンス薬理部門 4) 公益財団法人東京都医学総合研究所依存性薬物プロジェクト 5) 千葉大学大学院医学研究院精神医学教室 6) 社会医療法人栗山会飯田病院 7) 国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所自殺予防総合対策センター 8) 星薬科大学薬品毒性学研究室 9) 帝京大学文学部心理学科 10) 国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所薬物依存研究部 11) 医療法人北仁会幹メンタルクリニック院長, 精神医学研究所所長

注) DSM-5 病名の訳語は日本精神神経学会・精神科病名検討連絡会のガイドラインに従った。

表1 DSM-5の物質使用障害

11項目中2項目以上、同じ12ヵ月以内のどこかで起こる

項目	意味	DSM-IV-TRとの対比	内 容
1	制御障害	物質依存	当初の思惑よりも、摂取量が増えたり、長期間使用する
2	制御障害	物質依存	やめようとしたり、制限しようとする努力や、その失敗がある
3	制御障害	物質依存	物質に関係した事象（入手、使用、影響からの回復）に多くの時間を費やす
4	制御障害	新規項目	物質使用への渴望や強い欲求がある
5	社会障害	物質乱用	物質使用の結果、社会的役割を果たせない
6	社会障害	物質乱用	社会・対人関係の問題が生じたり、悪化しているにもかかわらず、使用を続ける
7	社会障害	物質依存	物質使用のために、重要な社会的、娯楽活動を放棄または縮小する
8	危険な使用	物質乱用	身体的に危険な状況下で反復使用する
9	危険な使用	物質依存	心身に問題が生じたり悪化することを知っていながら、使用を続ける
10	耐 性	物質依存	反復使用による効果の減弱、または、使用量の増加
11	離 脱	物質依存	中止や減量による離脱症状の出現、または、その回避のために再使用

的に医学的問題として把握し、医療的支援の対象に結びつける可能性が高まることである。その他、DSM-IV-TRの物質依存では、物質の種類にかかわらず共通の診断基準を用いていたのに対して、DSM-5では物質の特性に応じて診断項目の内容が変えられている点で改良されたといえる。

## 2. その他の変更点

多物質関連障害 (Polysubstance-Related Disorders) のカテゴリーが削除された。その他、診断項目の附記として、DSM-5では物質ごとに重症度分類 (2~3項目が軽症, 4~5項目が中等症, 6項目以上が重症) を特定 (specify) することが求められている。

### それぞれの障害群における変更点

#### 1. アルコール関連障害群 (Alcohol-Related Disorders)

アルコールに関しては、DSM-5における診断基準の変更、すなわち、DSM-IV-TRの依存と乱用の診断基準が、DSM-5では使用障害として統合された影響は比較的少ないといえる。なぜならば、アルコールは社会生活障害を強く起こすことから、社会生活障害が重視された診断構造になっ

ても該当する項目数はそれほど変わらないからである。しかし、治療の観点から考えた場合、DSM-5では診断基準の閾値が低下している点は考慮しなければならない。なぜならば、アルコールの使用障害の場合、重症度によって治療方針が異なるからである。特に、近年、“harm reduction”として節酒の治療的意義が見直されている中で、節酒と断酒を使い分ける場合、DSM-5の診断範囲は広すぎるため、その重症度も考慮した見方が必要になる。この他、DSM-IV-TRではアルコール誘発性障害 (Alcohol-Induced Disorders) の中に分類されていたアルコール中毒 (Alcohol Intoxication)、アルコール離脱 (Alcohol Withdrawal)、特定不能のアルコール関連障害 (Unspecified Alcohol-Related Disorder) がDSM-5では独立したカテゴリーになっている。

#### 2. カフェイン関連障害群 (Caffeine-Related Disorders)

DSM-5のカフェイン関連障害群では、DSM-IV-TRと同様にカフェイン使用障害は採用されなかったが (今後の研究のための病態に記載)、DSM-IV-TRでは検討課題であったカフェイン離脱は正式に採用された。カフェイン離脱は、カフェインを長期間摂取していた者が、中止もしくは

は減量した場合に 24 時間以内に、①頭痛、②著しい倦怠感や眠気、③不快または抑うつ気分、いらいら、④集中困難、⑤インフルエンザ様の症状(吐き気、嘔吐、筋肉の痛みやこわばり)の中で3項目以上が該当する場合に診断される。この中で特に頭痛が特徴的で、時間経過とともに頭全体に広がり、ズキズキする痛みが強くなる。

### 3. 大麻関連障害群 (Cannabis-Related Disorders)

大麻離脱は DSM-IV-TR までは検討課題にも挙がっていなかったが、DSM-5 で新たに採用された。この背景には、従来、大麻では離脱症状は出現しにくいとされていたのに対して、近年、大麻の離脱症状のエビデンスが集積されてきたことが関係している。大麻離脱は、使用中止後 1~3 日以内に出現し、ピークは 1 週間以内で、1~2 週間持続する。症状は、いらいら、神経過敏、食欲減退、睡眠障害、抑うつ気分、各種の不快感(振戦、発汗、頭痛など)などである。大麻離脱の存在は、大麻使用障害の重症度や予後不良に関係する点で重要である。

### 4. 幻覚薬関連障害群 (Hallucinogen-Related Disorders)

フェンシクリジンは、解離性麻酔薬に分類されることから DSM-IV-TR では幻覚薬とは別のカテゴリーに分類されていたが、幻覚薬類似の症状を惹起することから、DSM-5 では幻覚薬と同じカテゴリーに分類された。この結果、DSM-5 では、使用障害、中毒、誘発性障害のいずれにおいても、フェンシクリジンと他の幻覚薬の二種類の診断基準が存在する。一方、幻覚薬持続性知覚障害は、幻覚薬においてのみ用いられる診断基準であり、幻覚薬を使用していない状態でも、幻覚薬使用時に体験した知覚症状(幻覚など)を追体験するものであり、フラッシュバックに相当するものである。

### 5. 吸入剤関連障害群 (Inhalant-Related Disorders)

DSM-5 の吸入剤関連障害群では、依存と乱用の診断分類が使用障害に統合された点を除いては DSM-IV-TR から大きな変更はない。DSM-IV-TR の吸入剤依存の診断基準と同様に、吸入剤使用障害の診断基準に離脱の項目は含まれていない。

### 6. オピオイド関連障害群 (Opioid-Related Disorders)

診断基準とは直接関係ないが、DSM-IV-TR までは opioid の日本語訳としてアヘン類が用いられてきた。アヘンとはケシ未熟果から採取された成分の総称でモルヒネやコデインを含む。これに対して、オピオイドとはオピオイド受容体に結合してモルヒネ様作用を発揮する物質の総称であることから、オピオイドが正確な訳語といえる。DSM-IV-TR と DSM-5 の診断基準の違いに関しては、他の物質と同様に使用障害となった点を除けば大きな変更はない。

### 7. 鎮静薬、睡眠薬または抗不安薬関連障害群 (Sedative-, Hypnotic-, or Anxiolytic-Related Disorders)

DSM-IV-TR から DSM-5 への変更に関しては、他の物質と同様に使用障害となった点を除けば大きな違いはない。

### 8. 精神刺激薬関連障害群 (Stimulant-Related Disorders)

DSM-IV-TR では別々のカテゴリーに分類されていたアンフェタミン類とコカインは、臨床的な類似性から DSM-5 では精神刺激薬関連障害群に統合された。DSM-5 の精神刺激薬はアンフェタミン類とコカインにとどまらず、類似の薬理学的な特性をもち、乱用リスクのあるメチルフェニデートや植物由来のカートも含む。以上の変更は、精神薬理学的観点からは合理的なものといえる。精神刺激薬の使用障害の診断基準は、これまで紹介してきた物質と同様の構造となっている。

## 9. タバコ関連障害群 (Tobacco-Related Disorders)

DSM-5での変更点は2点ある。第1に、ニコチン関連障害からタバコ関連障害に名称が変更になったことである。ニコチンかタバコかの議論は古くからある。ニコチンを含まないタバコは摂取されないことからニコチンに依存性があることは明白であるが<sup>2)</sup>、一方、喫煙という行動が社会的意味をもち、ニコチンの報酬効果を増強させる、あるいは、燃焼によって生じた多くの化学物質がニコチンの報酬効果を増強させるなどの理由からタバコを重視する立場がある<sup>6)</sup>。DSM-5は後者の立場をとったといえる。

第2に、DSM-IV-TRのニコチンでは依存の診断基準はあったものの、乱用(社会生活障害)の診断基準は存在しなかった。しかし、DSM-5の使用障害は、DSM-IV-TRの依存と乱用の診断項目を合わせて作られていることから、乱用に相当する社会生活障害が自動的に含まれている。具体的には、「タバコ使用の結果、重要な社会的役割を果たせなくなる」「身体的に危険な状況でタバコを使用する」「社会的問題がタバコにより生じているにもかかわらず、使用を継続する」の3項目である。これに対して、DSM-5のテキストブックでは、タバコによって社会的役割を果たせなくなることはほとんどないものの、喫煙を嫌う者との間で議論になる、あるいは、喫煙を制限される社会的状況を回避するなどの問題は生じるとしている。さらに、ベッドや可燃性物質の近くで喫煙するなどの危険な行為も生じるとしている。しかし、このような状況はDSM-IV-TRでも同じであったことから、DSM-5の改訂でタバコによる社会生活障害を新たに組み入れた経緯をもう少しはっきりと説明するべきではないだろうか。

## 10. ギャンブル障害 (Gambling Disorder)

DSM-5においてギャンブル障害が組み入れられた背景には、ギャンブル障害などの行動嗜癖と

物質使用障害には症候学的な類似性がある<sup>3)</sup>、あるいは、ギャンブルのような行為でも、物質と同様に脳内報酬系が活性化される<sup>4)</sup>などの知見が集積されたことによる。ギャンブル障害の診断項目は、耐性(興奮を得るために掛け金が増える)、離脱(やめると落ち着かず、いらいらする)、制御障害(中止や制限の失敗がある)、制御障害(ギャンブルに心を奪われている)、制御障害(つらいときにギャンブルをする)、社会障害(損失を取り戻そうとする)、社会障害(ギャンブルへの没頭を隠すために嘘をつく)、社会障害(社会生活を犠牲にする)、社会障害(ギャンブルによる経済的な破綻を回避するために他人の金を頼る)の9項目からなる。ギャンブル障害では、ギャンブルによる経済的破綻などの社会生活障害を重視した立場で、物質使用障害とは共通項の少ない診断基準であり、むしろ、後述するインターネット・ゲーム障害のほうが物質関連障害と類似した診断基準になっている。

### 「今後の研究のための病態」における変更点

#### 1. カフェイン使用障害

DSM-5ではカフェイン使用障害の疾病概念としての問題点を以下のように指摘している。すなわち、臨床的に問題のないカフェイン使用者と、臨床的に問題となるカフェイン使用障害を明確に区別することが困難である。その理由として、①カフェインでは社会生活障害を起こしにくいこと、②社会・行動・心理学的な問題が生じているとしても、そのすべての原因をカフェインに求めることが困難なことを挙げている。このため、カフェイン使用障害の診断基準案では、他の物質よりも診断の閾値を高くしている。同時に、カフェイン使用障害という疾病概念の信頼性や妥当性、および、罹病状況の研究を今後推進する必要性を強調している。

## 2. インターネット・ゲーム障害

インターネット・ゲーム障害では、インターネットを使用したギャンブル性の高い(賭金の発生する)ゲーム、職業としてのインターネット使用、フェイスブックなどの社会的交流のための使用、ポルノグラフィーなどの性的なサイトの利用などを除外したものを対象としている。DSM-5の作業部会では、240編以上の論文を検討してインターネット・ゲーム障害と物質使用障害やギャンブル障害との間に、耐性、離脱、使用制御の試みの失敗、社会生活障害における共通点を見出している<sup>5)</sup>。一方で、検討課題として、新しいゲームが次々に作られている中で、ゲームごとに障害のパターンが変化するのか、あるいは、ゲームの種類によって障害のパターンが異なるのかが今後明らかにされるべきとしている。

## 3. 出生前のアルコール暴露に関連した神経行動障害

本疾病の概念は、出生前のアルコール暴露に関連した神経認知、自己制御、適応的機能の障害である。神経認知機能とは、知的機能全般 (IQ)、実行機能、学習機能、記憶、視空間推論を含む。自己制御とは、気分や行動の制御、注意力、衝動制御の能力を、また、適応的機能とは、言語によるコミュニケーション、社会的交流、日常生活技能、運動機能を意味する。これらの障害が幼少時期に出現し、臨床的に重大な障害や苦痛を引き起こす。出生前のアルコール暴露がどの程度であれば神経発達障害を起こすかについては、まだ、はっきりとしていないが、おおよその目安として軽度の飲酒習慣(1ヵ月に1~13回の飲酒機会、1回の飲酒で2杯まで)を超えた飲酒を想定している。

## まとめ

以上、DSM-5の物質関連と嗜癖性障害について、その変更点を中心に概説した。DSM-5は、科学的なエビデンスをベースにした診断基準の作成を目指している。その目的は明確であるし、従来とは異なった新たな診断概念が生まれてくる可能性がある。今回の改訂ではディメンジョン診断は採用されなかったが、今後導入される可能性が高い。このような中で、改めてDSMは、研究や統計のための診断ツールに特化していく可能性が示唆される。この診断基準を臨床の場面でどのように取り入れていくのかが今後の課題と考えられる。しかし、DSMは改訂の途中であることから、早急な結論は避けて今後の改訂を見守っていきいたい。

本稿は日本アルコール・薬物医学会および日本依存神経精神学会の用語検討委員会の活動としてまとめられた。

なお、本論文に関連して、開示すべき利益相反はない。

## 文 献

- 1) American Psychiatric Association : Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th ed, DSM-5. American Psychiatric Publishing, Washington, D. C., 2013
- 2) Benowitz, N. L., Henningfield, J. E. : Establishing a nicotine threshold for addiction : The implications for tobacco regulation. *N Engl J Med*, 331 ; 123-125, 1994
- 3) Denis, C., Fatseas, M., Auriacombe, M. : Analyses related to the development of DSM-5 criteria for substance use related disorders : 3. An assessment of Pathological Gambling criteria. *Drug Alcohol Depend*, 122 ; 22-27, 2012
- 4) Linnet, J., Mouridsen, K., Peterson, E., et al. : Striatal dopamine release codes uncertainty in pathological gambling. *Psychiatry Res*, 204 ; 55-60, 2012
- 5) Petry, N. M., O'Brien, C. P. : Internet gaming disorder and the DSM-5. *Addiction*, 108 ; 1186-1187, 2013
- 6) Robinson, J. H., Pritchard, W. S. : The role of nicotine in tobacco use. *Psychopharmacol*, 108 ; 397-407, 1992

# Peripheral Nerve Injury Reduces Analgesic Effects of Systemic Morphine *via* Spinal 5-Hydroxytryptamine 3 Receptors

Masafumi Kimura, M.D., Ph.D., Hideaki Obata, M.D., Ph.D., Shigeru Saito, M.D., Ph.D.

## ABSTRACT

**Background:** Morphine produces powerful analgesic effects against acute pain, but it is not effective against neuropathic pain, and the mechanisms underlying this reduced efficacy remain unclear. Here, the authors compared the efficacy of systemic morphine between normal rats and rats with peripheral nerve injury, with a specific focus on descending serotonergic mechanisms.

**Methods:** After L5 spinal nerve ligation injury, male Sprague–Dawley rats were subjected to behavioral testing, *in vivo* microdialysis of the spinal dorsal horn to determine serotonin (5-hydroxytryptamine [5-HT]) and noradrenaline release, and immunohistochemistry (n = 6 in each group).

**Results:** Intraperitoneal administration of morphine (1, 3, or 10 mg/kg) produced analgesic effects in normal and spinal nerve ligation rats, but the effects were greater in normal rats ( $P < 0.001$ ). Morphine increased 5-HT release (450 to 500% of the baseline), but not noradrenaline release, in the spinal dorsal horn *via* activation of serotonergic neurons in the rostral ventromedial medulla. Intrathecal pretreatment with ondansetron (3  $\mu$ g), a 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist, or 5,7-dihydroxytryptamine creatinine sulfate (100  $\mu$ g), a selective neurotoxin for serotonergic terminals, attenuated the analgesic effect of morphine (10 mg/kg) in normal rats but increased the analgesic effect of morphine in spinal nerve ligation rats (both  $P < 0.05$ ).

**Conclusions:** Systemic administration of morphine increases 5-HT levels in the spinal cord, and the increase in 5-HT contributes to morphine-induced analgesia in the normal state but attenuates that in neuropathic pain through spinal 5-HT<sub>3</sub> receptors. The plasticity of the descending serotonergic system may contribute to the reduced efficacy of systemic morphine in neuropathic pain. (**ANESTHESIOLOGY 2014; 121:362-71**)

THE analgesic effects of opioids such as morphine are thought to arise from activation of  $\mu$ -opioid receptors in neurons in the brain, medulla, spinal cord dorsal horn, and peripheral terminals of primary afferents.<sup>1,2</sup> The analgesic actions of systemic morphine are in part mediated by periaqueductal gray (PAG) and the rostral ventromedial medulla (RVM) that exert a net inhibitory effect on nociceptive processing in the spinal dorsal horn.<sup>1</sup> The role of the RVM in the modulation of nociceptive inputs has been extensively studied, and this region has been characterized as an important source of descending modulatory inputs that both inhibit and enhance the perception of pain at the level of the spinal cord.<sup>1,3,4</sup> When administered into the RVM, opioids directly inhibit on-cells and indirectly stimulate off-cells, thus inhibiting spinal nociceptive neurons and behavioral responses to noxious stimuli.<sup>5</sup> The RVM also includes the raphe magna, which contains serotonergic neurons that project to the spinal cord.<sup>6</sup> Systemic administration of morphine may increase serotonin (5-hydroxytryptamine [5-HT]) levels in the spinal cord,<sup>7-9</sup> thus inhibiting the transmission of nociceptive information.<sup>10,11</sup> However, it has been suggested that descending facilitation from the RVM, including its serotonergic neurons, may play an essential role in maintaining neuropathic pain.<sup>12-15</sup> Although the exact

### What We Already Know about This Topic

- Opioids are a mainstay of treatment for many types of pain but may be less effective against neuropathic pain

### What This Article Tells Us That Is New

- Using a rat spinal nerve ligation model, the authors observed that neuropathic rats were less sensitive to morphine than normal animals
- The enhanced spinal release of serotonin acting through 5-hydroxytryptamine 3 receptors may be responsible for the reduced effects of morphine

mechanism underlying the descending facilitation remains unclear, activation of spinal 5-HT<sub>3</sub> receptors is considered critical.<sup>4,13,16</sup>

Neuropathic pain is a chronic and persistent pain that is difficult to treat with conventional analgesics, and it is characterized by altered pain perception including enhanced sensitivity to noxious stimuli (hyperalgesia) and abnormal sensitivity to previously nonpainful stimuli (allodynia). Morphine produces powerful analgesic effects in acute pain, but its efficacy is reduced in neuropathic pain.<sup>17-19</sup> We hypothesized that increased 5-HT levels in the spinal cord contribute to the reduced efficacy of systemically administered morphine in neuropathic pain *via* spinal 5-HT<sub>3</sub> receptors. The current

Corresponding article on p. 217.

Submitted for publication December 2, 2013. Accepted for publication April 4, 2014. From the Department of Anesthesiology, Gunma University Graduate School of Medicine, Maebashi, Japan.

Copyright © 2014, the American Society of Anesthesiologists, Inc. Lippincott Williams & Wilkins. Anesthesiology 2014; 121:362-71

study was undertaken to compare the efficacy of systemic morphine between normal rats and rats with peripheral nerve injury with particular regard to the function of descending inhibitory systems including serotonergic mechanisms.

## Materials and Methods

### Surgical Preparation

The study was approved by the Animal Care and Use Committee of the Gunma University School of Medicine (Maebashi, Japan 12-058). Male Sprague-Dawley rats (250 g, n = 156; SLC, Shizuoka, Japan) were used in all experiments. No data were lost to observation during the experiments. The animals were housed under a 12-h light-dark cycle, with food and water available *ad libitum*. Spinal nerve ligation (SNL) was performed as previously described.<sup>20</sup> The animals were anesthetized with inhaled isoflurane in oxygen, and the right L5 spinal nerve was tightly ligated with 5-0 silk and cut just distal to the ligature. Normal (unoperated) rats were used as a control group in all experiments; the normal rats did not undergo any aspect of the SNL procedure (*i.e.*, skin preparation, incision, tissue dissection, or nerve ligation) but were housed and handled similarly to the SNL rats. For SNL rats, experiments were performed 2 to 3 weeks after nerve injury to permit the full development of behavioral sensitivity and pathological changes reflective of neuropathic pain.

### Behavioral Testing

The withdrawal threshold to pressure applied to the hind paw, expressed in grams, was measured using an analgesimeter (37215, Ugo Basile, Comerio, Italy) as previously described.<sup>21</sup> The device applies increasing pressure to the hind paw. When the animal withdraws the paw, the pressure is immediately released, and the nociceptive threshold is measured in grams. A cutoff of 250 g was used to prevent potential tissue injury. All animals were trained for 3 days with the device before baseline values were recorded. Experiments with normal and SNL rats were performed separately. The experimenter was unaware of drug and dose.

### Drug Administration

Normal animals and SNL rats were intraperitoneally injected with morphine (1, 3, or 10 mg/kg). Antagonist studies were performed using the 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist, ondansetron (0.3 or 3 μg). Saline or the antagonist solution was administered intrathecally 15 min before morphine injection. The ondansetron doses were selected according to previous studies<sup>16</sup> and our preliminary studies. For intrathecal administration, ondansetron was dissolved in 5 μl of saline and injected into the L5 to L6 intervertebral space using a 30-gauge needle. For intraperitoneal administration, morphine was dissolved in 0.5 ml of saline.

\* Available at: [http://www.eicom.co.jp/ECD\\_application.html](http://www.eicom.co.jp/ECD_application.html). Accessed March 2, 2014.

To examine the role of 5-HT in the spinal cord on morphine-induced analgesia, 5,7-dihydroxytryptamine (5,7-DHT) creatinine sulfate (100 μg in 10 μl), a selective neurotoxin for serotonergic terminals, was administered intrathecally to normal rats and SNL rats 2 weeks after nerve ligation. To prevent damage to noradrenergic neurons, we pretreated the animals with desipramine (20 mg/kg, intraperitoneal), an inhibitor of neuronal noradrenaline reuptake<sup>22</sup> 30 min before 5,7-DHT (or saline) administration. Ten days later, behavioral experiments were performed. In preliminary experiments to confirm that treatment with 5,7-DHT and desipramine selectively ablated serotonergic terminals, we used our previously described homogenate preparation<sup>23</sup> to determine that the 5-HT concentration in the spinal cord was decreased (1.21 ± 0.12 pg/mg after saline and 0.23 ± 0.41 pg/mg after 5,7-DHT, respectively, n = 6 in each group) at 10 days after administration (the time point where behavioral effects were performed), whereas the noradrenaline concentration was not affected (0.49 ± 0.08 pg/mg after saline and 0.47 ± 0.62 pg/mg after 5,7-DHT, respectively, n = 6 in each group). Morphine, ondansetron, 5,7-DHT, and desipramine were purchased from Sigma Co. (St. Louis, MO).

### Microdialysis Studies

Microdialysis studies were performed to measure noradrenaline and 5-HT levels in the spinal dorsal horn of normal rats or SNL rats according to a previously described protocol.<sup>23-25</sup> Anesthesia was induced using urethane (1.2 to 1.5 g/kg, intraperitoneally) and maintained with 0.5% isoflurane in 100% oxygen through a nose cone. A 24-gauge indwelling catheter was placed in the peritoneal cavity for drug administration. The left femoral vein was cannulated for saline infusion (1 ml/h), rectal temperature was maintained at 37° to 38°C, and the L3 to L6 level of the spinal cord was exposed. The microdialysis probe (outer diameter = 0.22 mm, inner diameter = 0.20 mm, length = 1 mm; A-I-8-01; Eicom Co., Kyoto, Japan) was inserted from just lateral to the dorsal root and advanced at a 20° angle to a depth of 1 mm and perfused with Ringer's solution at a constant flow rate (1 μl/min). After 120 min of constant perfusion, two consecutive samples were collected to determine the basal noradrenaline and 5-HT concentrations in the dialysate. Saline (0.5 ml) or morphine (10 mg/kg) was administered intraperitoneally to the rat through an indwelling catheter, and 15-min perfusate fractions were collected into an autoinjector (EAS-20; Eicom Co.). Samples (15 μl) were automatically injected and analyzed for noradrenaline and 5-HT concentration using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection by an HTEC-500 analyzing system (Eicom Co.). The sample was then separated on the column (2.0 mm × 200 mm, EICOMPAC CAX; Eicom Co.) using the mobile phase that consisted of 0.1 M ammonium acetate buffer (pH 6.0) and methanol (7:3 v/v) containing 0.05 M sodium sulfonate and 50 mg/l EDTA-2Na. The detection limit of this assay is 0.1 pg per injection (information from Eicom Co.\*).



### Immunohistochemistry

To determine whether systemic administration of morphine activates serotonergic neurons in the RVM, we performed immunohistochemistry using antibodies for tryptophan hydroxylase (an enzyme responsible for 5-HT synthesis) and c-Fos (a marker for neuronal activation). Normal animals and SNL rats were deeply anesthetized with intraperitoneal pentobarbital (100 mg/kg) 2 h after intraperitoneal administration of morphine (10 mg/kg) or saline and perfused through the aorta with 4°C 0.01 M phosphate-buffered saline containing 1% sodium nitrite, followed by 500 ml of 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate-buffered saline. The brain was dissected out, postfixed in the same fixative for 3 h, and cryoprotected by immersion in 0.1 M phosphate buffer containing 30% sucrose at 4°C. Three days later, the brain containing the RVM was cut transversely into 30- $\mu$ m sections using a cryostat and the sections were mounted on glass slides.

The mounted sections were rinsed two times with 0.01 M phosphate-buffered saline containing 0.3% Triton X-100. After pretreatment with 1.5% normal goat serum (S-1000; Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA), the sections were incubated for 24 h at 4°C with a mouse monoclonal anti-tryptophan hydroxylase antibody (1:1,000, MAB5278; Chemicon International Inc., Temecula, CA) and a rabbit monoclonal anti-c-Fos antibody (1:1,000, sc-253; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) in 1.5% normal goat serum. The sections were then rinsed twice with 0.01 M phosphate-buffered saline containing 0.3% Triton X-100 and incubated for 1 h with an AlexaFluor 488-conjugated goat anti-mouse secondary antibody (1:100; Invitrogen, Cergy Pontoise, France) in 1.5% normal goat serum to label serotonergic neurons and an AlexaFluor 568-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (1:100; Invitrogen) in 1.5% normal goat serum to label c-Fos. Images were captured on an Olympus FSX100 microscope (Olympus Co., Tokyo, Japan). The number of c-Fos-positive serotonergic neurons in the RVM was compared between normal animals and SNL rats.

### Statistics

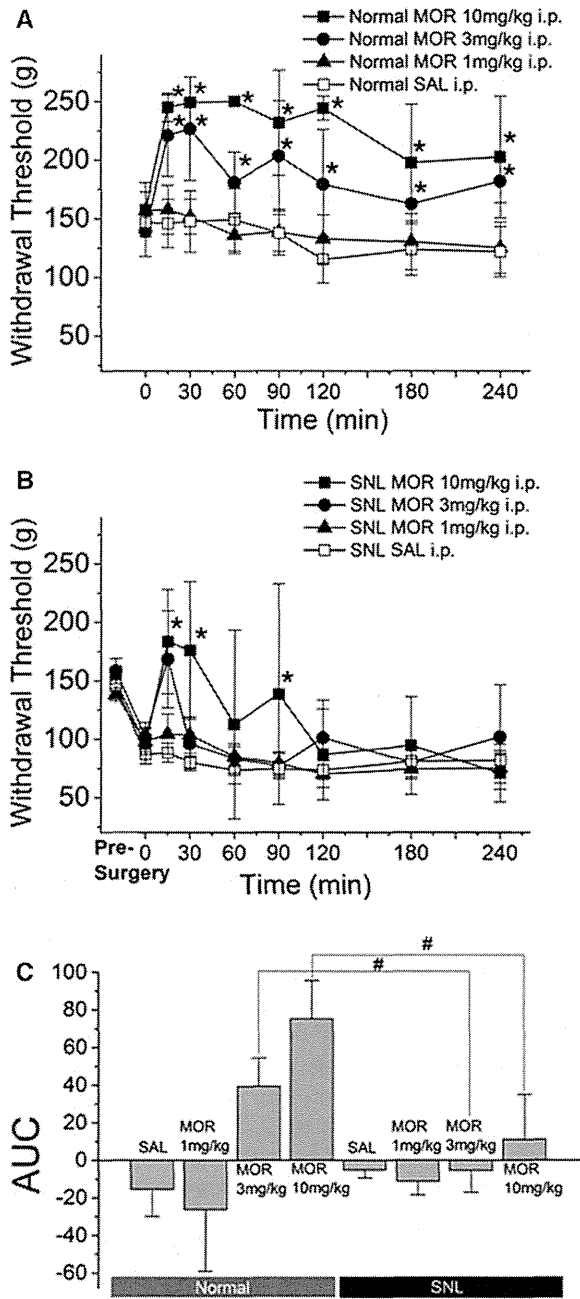
We selected a sample size of 6 based on a previous study.<sup>25</sup> The statistical analysis was conducted using SigmaPlot 12 (Systat Software Inc., San Jose, CA). Data were normally distributed (Shapiro–Wilk test) and are presented as the mean  $\pm$  SD. All statistical comparisons involved a two-tailed hypothesis of either an increase or a decrease in the measurement variable. Time-course data from the behavioral and microdialysis studies were analyzed using a two-way repeated-measures ANOVA. When significant differences were observed, Student–Newman–Keuls *post hoc* tests were performed for between-group comparisons and comparisons at each time point. The paired *t* test was also used for some analyses in behavioral studies. For comparisons of behavioral data between normal and SNL rats, the area under the time-course curve for the percentages of the maximum possible effect was calculated from individual scores

at each time point using the trapezoidal rule over the 240-min observation period: percentage of the maximum possible effect = (postdrug threshold – predrug threshold)  $\times$  100/(250 g – predrug threshold). The area under the time-course curve and immunohistochemical data are presented as the mean  $\pm$  SD and were analyzed by one-way ANOVA, followed by Student–Newman–Keuls *post hoc* tests. *P* value less than 0.05 was considered statistically significant.

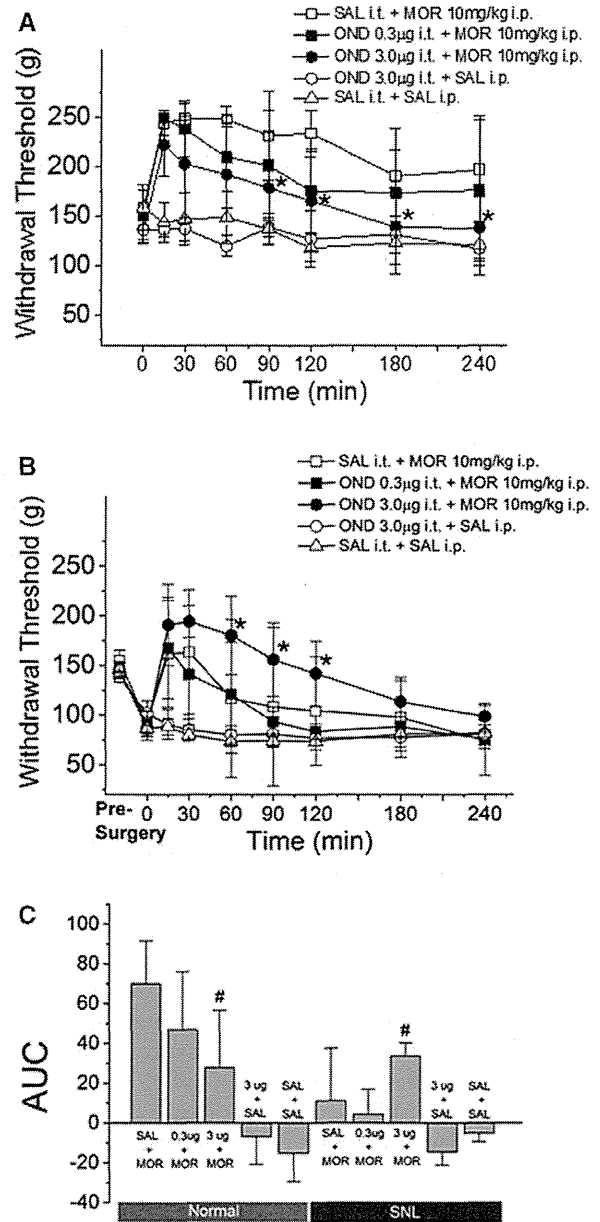
## Results

### Behavioral Studies

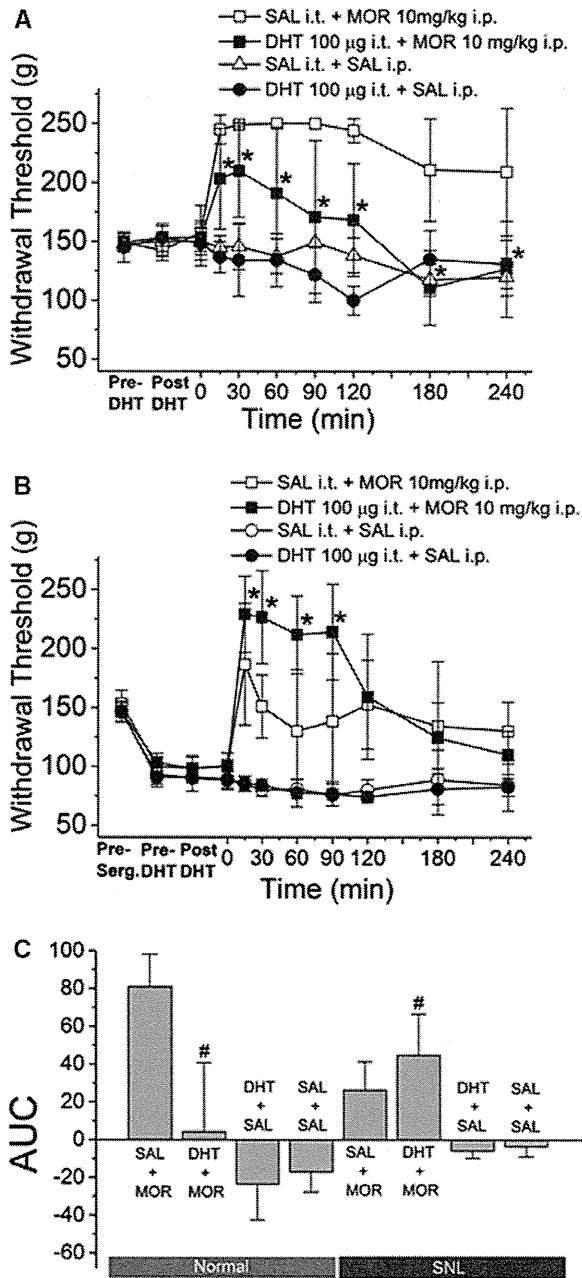
Intraperitoneal administration of morphine (1, 3, and 10 mg/kg) produced analgesic effects in normal and SNL rats ( $n = 6$  in each group,  $P < 0.001$  and  $P = 0.008$ , respectively; fig. 1, A and B). Withdrawal thresholds were higher in normal rats treated with 3 and 10 mg/kg morphine than in normal saline-treated rats ( $P < 0.001$  and  $P < 0.001$ , respectively; fig. 1A). In contrast, withdrawal thresholds were higher only in SNL rats treated with 10 mg/kg morphine when compared with saline-treated SNL rats ( $P = 0.01$ ; fig. 1B). Peak behavioral effects were observed 30 to 60 min and 15 min after morphine administration in the normal and SNL rats, respectively. The duration of the effect was longer in normal rats than in SNL rats (240 *vs.* 90 min). Based on the area under the time-course curve data, the effects of 3 and 10 mg/kg morphine were greater in normal rats than in SNL rats ( $n = 6$  in each group,  $P < 0.001$  and  $P < 0.001$ , respectively; fig. 1C). On the basis of these results, we selected the morphine dose of 10 mg/kg for subsequent experiments. The 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist ondansetron showed different effects on intraperitoneal morphine-induced analgesia in normal and SNL rats (fig. 2). Intrathecal pretreatment with ondansetron (3.0  $\mu$ g) attenuated the analgesic effect of morphine in the normal group ( $n = 6$  in each group,  $P = 0.008$ ; fig. 2, A and C). In contrast, ondansetron (3.0  $\mu$ g) increased the analgesic effect of morphine in the SNL group ( $n = 6$  in each group,  $P = 0.025$ ; fig. 2, B and C). Administration of ondansetron alone did not affect the withdrawal threshold when compared with saline administration in normal ( $n = 6$  in each group,  $P = 0.572$ ) and SNL rats ( $n = 6$  in each group,  $P = 0.747$ ). Similarly, ablation of serotonergic terminals by intrathecal administration of 5,7-DHT, a selective neurotoxin, produced different effects on intraperitoneal morphine-induced analgesia in normal and SNL rats (fig. 3). Intrathecal administration of 5,7-DHT attenuated the analgesic effect of morphine in normal rats ( $n = 6$  in each group,  $P < 0.001$ ; fig. 3, A and C) but increased the analgesic effect of morphine in SNL rats ( $n = 6$  in each group,  $P = 0.001$ ; fig. 3, B and C). Administration of 5,7-DHT alone did not affect the withdrawal threshold in both normal and SNL rats (the withdrawal thresholds before and 10 days after 5,7-DHT administration were  $147.1 \pm 10.3$  g and  $153.3 \pm 11.1$  g in normal rats and  $97.1 \pm 9.9$  g and  $94.6 \pm 8.9$  g in SNL rats,  $P = 0.063$  and  $P = 0.526$  by paired *t* test, respectively,  $n = 12$  in each group).



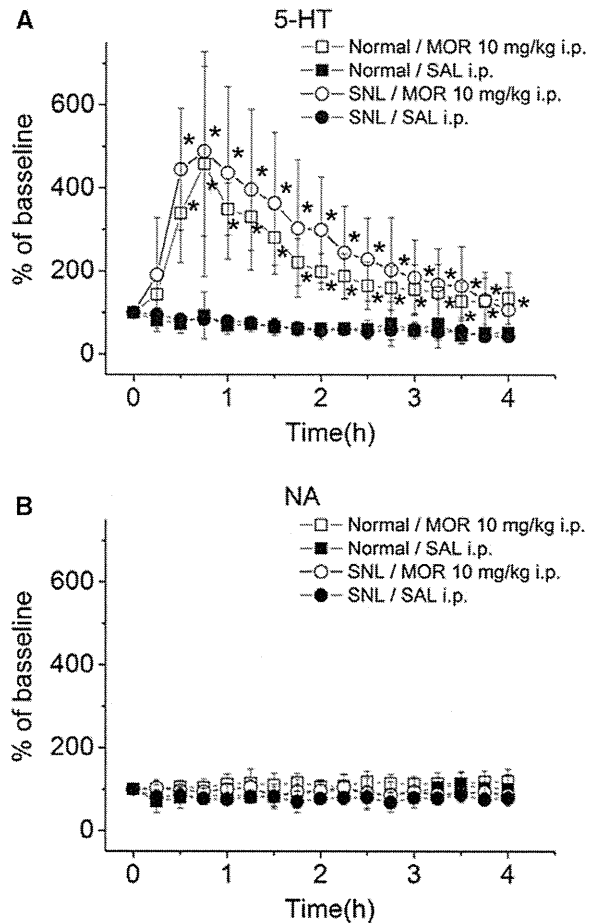
**Fig. 1.** Effect of intraperitoneal (i.p.) administration of morphine (MOR) or saline (SAL) on withdrawal threshold to pressure applied to the hind paw in normal (A) and spinal nerve ligation (SNL) rats (B). Time-course effects (A, B) and area under the time-course curve (AUC) (C) are shown. Withdrawal thresholds are expressed as the mean  $\pm$  SD for six rats in each group. \* $P < 0.05$  compared with saline-treated rats at each time point (two-way repeated-measures ANOVA followed by Student–Newman–Keuls *post hoc* tests). # $P < 0.05$  compared between the groups (one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls *post hoc* tests).



**Fig. 2.** Effects of intrathecal (i.t.) pretreatment of ondansetron (OND), a 5-hydroxytryptamine 3 receptor antagonist (0.3 or 3  $\mu$ g), on intraperitoneal (i.p.) morphine (MOR)-induced analgesia (10mg/kg) in normal (A) and spinal nerve ligation (SNL) rats (B). Time-course effects (A, B) and area under the time-course curve (AUC) (C) are shown. Withdrawal thresholds are expressed as the mean  $\pm$  SD for six rats in each group. \* $P < 0.05$  compared with the saline (SAL) plus morphine-treated group at each time point (two-way repeated-measures ANOVA followed by Student–Newman–Keuls *post hoc* tests). # $P < 0.05$  compared with the saline plus morphine-treated group (one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls *post hoc* tests).



**Fig. 3.** Effects of intrathecal (i.t.) pretreatment of 5,7-dihydroxytryptamine (DHT) creatinine sulfate (100 µg), a selective neurotoxin for serotonergic terminals, on intraperitoneal (i.p.) morphine (MOR)-induced analgesia (10 mg/kg) in normal (A) and spinal nerve ligation (SNL) rats (B). Time-course effects (A, B) and area under the time-course curve (AUC) (C) are shown. Withdrawal thresholds are expressed as the mean ± SD for six rats in each group. \**P* < 0.05 compared with saline (SAL) plus morphine-treated group at each time point (two-way repeated-measures ANOVA followed by Student–Newman–Keuls *post hoc* tests). #*P* < 0.05 compared with the saline plus morphine-treated group (one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls *post hoc* tests).



**Fig. 4.** Microdialysis from the dorsal horn of the lumbar spinal cord to measure levels of 5-hydroxytryptamine (5-HT) (A) and noradrenaline (NA) (B) after morphine (MOR) injection. Normal rats (*n* = 6) or spinal nerve ligation (SNL) rats (*n* = 6) received intraperitoneal (i.p.) saline (SAL) or morphine (10 mg/kg). Data are presented over time as a percentage of the baseline. \**P* < 0.05 compared with the saline-treated group at each time point (two-way repeated-measures ANOVA followed by Student–Newman–Keuls *post hoc* tests).

**Microdialysis Studies**

The baseline 5-HT concentration in spinal cord dorsal horn microdialysates before drug injection did not differ between normal rats (*n* = 6, 0.36 ± 0.22 pg/15 µl) and SNL rats (*n* = 6, 0.23 ± 0.13 pg/15 µl). The baseline noradrenaline concentration before drug injection was also similar in both groups (*n* = 6 in each group, 0.41 ± 0.30 pg/15 µl, normal; 0.45 ± 0.23 pg/15 µl, SNL). The 5-HT and noradrenaline concentrations in the dialysates did not change after saline injection in normal and SNL rats (fig. 4, A and B). In the morphine-treated normal and SNL rats, the 5-HT concentration in the dialysates increased within 30 min, peaked at 1 h with approximately 450 to 500% of the baseline value, and remained increased for 4 h after injection relative to the saline-treated controls (*n* = 6 in each group,

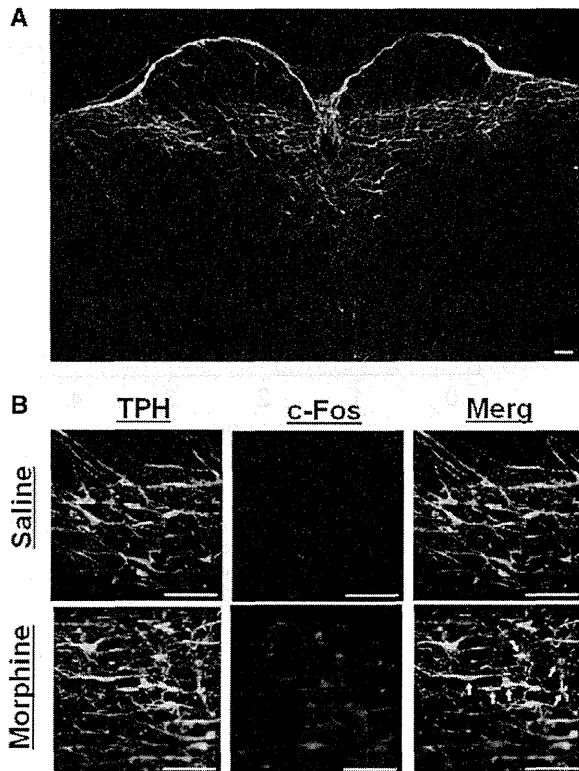


Fig. 5. The rostral ventromedial medulla has been defined as an isosceles triangle, the base of which is the width of the pyramidal tracts (A). Images showing tryptophan hydroxylase (TPH) immunoreactivity and c-Fos immunoreactivity in the rostral ventromedial medulla of spinal nerve ligation rats treated with saline and morphine (B). Arrows indicate serotonergic neurons that would be counted as c-Fos-positive neurons. Scale bar = 100  $\mu$ m.

$P < 0.001$ , respectively; fig. 4A). The morphine-induced 5-HT increase did not differ between normal and SNL rats. In the morphine-treated normal and SNL rats, the noradrenaline concentration in the dialysates did not change over time ( $n = 6$  in each group,  $P = 0.134$  and  $P = 0.305$ , respectively; fig. 4B).

#### Immunohistochemical Studies

The RVM has been defined anatomically as an isosceles triangle that lies at the level of the facial nucleus, with a base having a width equal to that of the combined pyramidal tracts and a height equal to half the width of the base (fig. 5A).<sup>26</sup> c-Fos-positive serotonergic neurons were observed after morphine administration (fig. 5B). SNL resulted in a significant decrease in the number of serotonergic neurons in the RVM ( $55.6 \pm 10.9$  vs.  $46.4 \pm 9.5$  for normal and SNL, respectively,  $n = 12$  in each group; fig. 6A;  $P = 0.039$ ). Systemic administration of morphine increased the percentage of c-Fos-positive serotonergic neurons compared with administration of saline in both normal rats ( $n = 6$  in each group,  $15.8 \pm 13.2\%$  vs.  $0.3 \pm 0.7\%$ ,  $P = 0.016$ ) and SNL rats ( $n = 6$  in each group,  $16.8 \pm 5.9\%$  vs.  $2.9 \pm 3.3\%$ ,  $P < 0.01$ ;

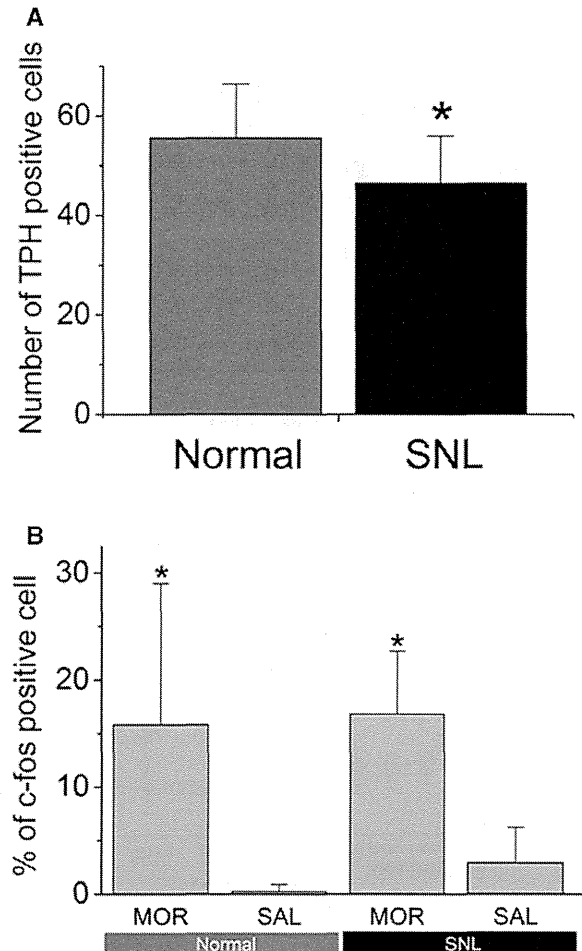


Fig. 6. Spinal nerve ligation (SNL)-induced loss of tryptophan hydroxylase (TPH)-positive neurons in the rostral ventromedial medulla (A). Data are expressed as the mean  $\pm$  SD for 12 rats in each group. \* $P < 0.05$  compared with normal rats (one-way ANOVA). Systemic administration of morphine (MOR, 10 mg/kg) increased the percentage of c-Fos-positive serotonergic neurons compared with saline (SAL) treatment in both normal and SNL rats (B). Data are expressed as the mean  $\pm$  SD for six rats in each group. \* $P < 0.05$  compared with saline-treated rats (one-way ANOVA).

fig. 6B). There were no significant differences in the percentage of c-Fos-positive serotonergic neurons between normal and SNL rats.

#### Discussion

Clinical studies have reported relatively poor efficacy for morphine in neuropathic pain compared with nociceptive pain,<sup>17–19</sup> and opioids are not used as first-line medications for the management of neuropathic pain.<sup>27</sup> Similarly, laboratory studies have reported a lack of efficacy for intrathecal administration of morphine in a neuropathic pain model in rats,<sup>28,29</sup> although such findings are controversial.<sup>30,31</sup> Few laboratory studies, however, have directly compared the