ペプチド性オピオイド並びにモルヒネ関連化合物の 末梢性鎮痛作用について

柴田 学, 大久保つや子, 高橋 宏

福岡歯科大学薬理学教室*

工藤 照夫, 猪木 令三

大阪大学歯学部薬理学教室**

(昭和61年4月26日〔特〕)

要約: モルヒネ誘導体及びペプチド性オピオイドの末梢における鎮痛効果を検討する目的で, morphine, ethylketocyclazocine (EKC), dynorphin, [D-Ala², Met⁵]-enkephalinamide, [Met⁵]-enkephalin について, われわれが考案した formalin による足趾疼痛モデル (性質の異なる第1相, 第2相の2つの疼痛が得られるのが特徴) を用いて, 被検薬 10^{-9} ~ 10^{-6} の微量を炎症局所に投与して, 疼痛抑制効果を検討した. その結果オピオイドペプチドでは $20 \sim 500$ pmol の用量で dynorphin > [D-Ala², Met⁵]-enkephalinamide > [Met⁵]-enkephalin の順で用量に依存した抑制効果を確認した. これに対し EKC, morphine では $0.4 \sim 2.2$ nmol の用量で, 疼痛モデル第1相は用量依存的に抑制するものの, 疼痛第2相では却って過敏が用量に依存して出現した. これらの疼痛抑制は lidocaine hydrochloride が示す抑制用量の約 $1/10,000 \sim 1/500$ 用量であり, 局所麻酔作用とは異なった機序によるものと考えられた. また, これらの拮抗を見るために naloxone と, 末梢側にのみ作用を示す N-methyl levallorphan を用いて, 作用消失の有無を検討した. その結果第1相疼痛においては, 被検薬すべての疼痛抑制は, 両拮抗薬によって有意に拮抗されたが, 第2相では N-methyl levallorphan のみに拮抗が認められた. また EKC, morphine による疼痛過敏も N-methyl levallorphan で有意に拮抗された. 以上の事実より末梢においても, オピオイドによる疼痛制御機構が存在し, そのなかには naloxone によって拮抗されず, N-methyl levallorphan によってのみ拮抗される, 中枢と異なった受容体の存在が考えられた. また EKC, morphine によって, むしろ疼痛過敏が生ずる機構の存在も示唆された.

緒 言

morphine 様物質の鎮痛作用に関しては, 従来から中枢における作用機序を中心に, さまざまな追求がなされてきた. しかし近年, 内因性オピオイドに関する研究の進展にともなう, 体内オピオイドペプチドが中枢外の末梢組織神経内に多く含有されることが知られる^{1,2)}, なんらかの神経伝達の役割を担っていることが推測されるようになった. 加えて, kappa, mu, delta など諸タイプの受容体が末梢諸組織に広く分布すること³⁻⁶⁾ から, 体内オピオイドの末梢側での役割が注目されている.

Inoki ら⁷⁾ は歯髄電気刺激によって遊離する bradykinin (BK) 様物質の研究において, morphine が kinin 様物質の遊離を抑制し, この効果は naloxone

によって拮抗されることから, morphine には末梢性に働く鎮痛作用機作のある可能性を示唆した. また, Brodin ら⁸⁾ も歯髄組織から遊離する substance P (SP) の研究において morphine が末梢性に SP の遊離抑制に働くことを見出し, 知覚神経末端にオピオイド受容体のあることを想定した. 一方, Ferreira ら^{9,10)} は PGE₂ による疼痛過敏を実験モデルとして, 局所投与の morphine, pentazocine, [Leu⁵]-enkephalin などに鎮痛作用のあることを認め, 中枢ではなく末梢側にも鎮痛作用点のあることを示唆している.

本報告は, 当教室において開発し種々検討してきた formalin 起炎による足趾疼痛モデルを用いて¹¹⁾, dynorphin, [Met⁵]-enkephalin などの体内ペプチド性オピオイドと morphine, ethylketocyclazocine などの morphine 誘導体の局所投与による鎮痛作用を検討し, 疼痛抑制効果を確認すると同時に, 関連する2~3の知見について報告するものである.

* 814-01 福岡市早良区田700

** 565 吹田市山田丘1-8

実験材料および実験方法

1. 動物

体重 18~20 g の ddY 系雄性マウスを室温 25°C ± 1°C, オリエンタル飼料「MF」で飼育したものを、一群 7 匹として使用した。

2. 使用薬物

morphine hydrochloride (田辺製薬), ethylketocyclazocine methanesulfonate (Sterling-Winthrop Research Institute), naloxone hydrochloride (和光純薬), N-methyl levallorphan (Midy S.P.A.), dynorphin (Protain Research Foundation), [Met⁵]-enkephalin (Protain Research Foundation), [D-Ala², Met⁵]-enkephalinamide (Protain Research Foundation), formalin (半井化学), lidocaine hydrochloride (藤沢薬工)

3. 鎮痛作用測定

既報¹⁾の如く、マウス後肢右足趾に 0.5% formalin, 25 μ l を皮下投与し、直後より起る licking (舐める) biting (噛みつき) を疼痛の指標として、ストップウォッチで持続時間を計測し、5 分毎の総計を記録した。被検薬物は formalin 投与 2 分前に 2.5 μ l の容量で足趾皮下に注入した。

4. 有意差検定

成績はすべて、平均値 ± 標準誤差 (mean ± S.E., n = 7) で示し、群間の有意差検定は Student's *t* 検定によ

った。

実験結果

1. formalin 起炎による仮性疼痛反応と dynorphin 局所投与による抑制効果

実験法に記載したように 0.5% formalin 25 μ l をマウス後肢右足趾注入によって、直後より起炎足に対する激しい licking (舐める), biting (噛みつき) が出現し、まず 0~5 分をピークとする即時反応 (疼痛第 1 相) が出現し、一旦この反応が完全に消失したのち、約 10 分後より、15~20 分をピークとする第 2 の遅延反応 (疼痛第 2 相) が出現した (図 1 の control)。この 2 相性仮性疼痛反応に対して、dynorphin (84 pmol/2.5 μ l) を formalin 投与 2 分前に右足趾 (formalin 注入足) 皮下に投与した際の疼痛経過を観察した (図 1)。

その結果 dynorphin の局所投与は、有意に formalin による疼痛反応 (duration of pain response) を短縮することが観察された。また特に疼痛第 1 相より第 2 相における抑制効果が顕著であった。

2. formalin 起炎による疼痛反応に対する各種オピオイド局所投与による鎮痛効果と用量作用曲線

dynorphin (21~84 pmol), [D-Ala², Met⁵]-enkephalinamide (56~235 pmol), [Met⁵]-enkephalin (125~500 pmol), ethylketocyclazocine (EKC) (400~1,650 pmol), morphine (550~2,200 pmol), lidocaine hydrochloride (250~1,000 nmol) の各用量を formalin

Fig. 1 Time course of pain response induced by intraplantar (i. pl.) injection of formalin (0.5%, 25 μ l/paw) and effect of dynorphin (1-13) on the pain response in mice. Pain response (Ordinate): The times spent in paw licking or biting response during each 5 min block. Each point is the mean ± S.E. (n = 7). *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$.

Fig. 2 Dose-response curves of peripheral analgesic action of dynorphin (1-13), [D-Ala², Met⁵]-enkephalinamide, [Met⁵]-enkephalin, EKC, morphine and lidocaine hydrochloride. S and F indicate the first phase and the second phase of pain response, respectively. Ordinate: Inhibition percent of formalin-induced pain at the first phase (0~5 min) and the second phase (15~20 min). All drugs were administered intraplantarly 2 min before formalin injection in a volume of 2.5 μ l. Each point is the mean value (n=7).

起炎 2 分前に起炎予定足趾に皮下投与した際の licking, biting 抑制効果を疼痛第 1 相と第 2 相に分けて, おのおの用量作用曲線を求めた (図 2). dynorphin, [D-Ala², Met⁵]-enkephalinamide, [Met⁵]-enkephalin のようなペプチド性オピオイドにおいては 20~500 pmol の微量で用量依存的に formalin 疼痛反応の抑制が認められた。しかし morphine や EKC のような外因性オピオイドにおいては 0.4~2.2 nmol の高い用量で, 用量依存的に疼痛第 1 相の抑制が認められた。しかし第 2 相疼痛においては, 逆に疼痛過敏が用量依存的に出現することが認められた。一方, lidocaine hydrochloride (250~1,000 nmol) も用量依存的に疼痛反応を抑制した。しかしこれは morphine 用量の約 500 倍に相当した。

3. formalin 起炎による疼痛反応に対する dynorphin, [Met⁵]-enkephalin, [D-Ala², Met⁵]-enkephalinamide 局所投与の影響と N-methyl levallorphan, naloxone の拮抗作用

dynorphin (84 pmol/2.5 μ l), [Met⁵]-enkephalin (500 pmol/2.5 μ l), [D-Ala², Met⁵]-enkephalinamide (235 pmol/2.5 μ l) を右足趾皮下に投与し, 2 分後に formalin (0.5% 25 μ l) を同一足趾皮下に投与して疼

痛反応を観察し, 更に拮抗薬 N-methyl levallorphan (30 mg/kg), naloxone (1 mg/kg) を各アゴニスト投与 30 分前に皮下注射した場合の拮抗の状態を, 第 1 相と第 2 相に分けて観察した (図 3)。

第 1 相疼痛では dynorphin, [Met⁵]-enkephalin, [D-Ala², Met⁵]-enkephalinamide 共に有意に formalin 疼痛を抑制し, この抑制は N-methyl levallorphan, naloxone によってはほぼ完全に拮抗されることを観察した。一方第 2 相疼痛では, 用いた 3 薬物はより一層強力に疼痛を抑制したが, しかし拮抗薬による作用消失は N-methyl levallorphan では有意に出現したが, naloxone では有意な拮抗を観察しなかった。

4. formalin 起炎による疼痛反応に対する EKC, morphine 局所投与の影響と N-methyl levallorphan, naloxone による拮抗作用

EKC (1,690 nmol/2.5 μ l), morphine (2,200 pmol/25 μ l) を足趾皮下に投与, 2 分後同一足趾で formalin (0.5%, 25 μ l) 投与による疼痛反応を観察した (図 4)。EKC, morphine とともに第 1 相では有意な抑制を観察したが, 第 2 相疼痛では逆に疼痛過敏を生じた。この効果に対する拮抗薬投与の影響は, 第 1 相では N-methyl levallorphan, naloxone とともに有意な拮抗を観察する

Fig. 3 Antagonism of N-methyl levallorphan and naloxone on peripheral analgesic actions of dynorphin (1-13), [Met⁵]-enkephalin and [D-Ala², Met⁵]-enkephalinamide. Antagonists and agonists were administered subcutaneously 30 min and intraplantarly 2 min before formalin injection, respectively (see Fig. 2 for details). Ordinate: Pain response (See Fig. 1 for details). C: control; DY: dynorphin (1-13), 84 pmol/paw; ME: [Met⁵]-enkephalin, 500 pmol/paw; DALA: [D-Ala², Met⁵]-enkephalinamide, 235 pmol/paw; NML: N-methyl levallorphan, 30 mg/kg, s.c.; N: naloxone, 1 mg/kg, s.c. N.S.: Not significant, *: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001.

ものの、第2相での疼痛過敏に対しては N-methyl levallorphan は有意に拮抗したが、naloxone では有意拮抗は見られなかった。

考 察

すでに緒言において述べたように morphine あるいは各種オピオイドの末梢性鎮痛効果については、間接的に示唆する報告⁷⁻⁸⁾は2~3あるものの、直接的にこれを証明する研究としては Ferreira らの一連の報告^{9,10)}と Bently ら¹²⁾の研究があるのみである。前者はラットの carrageenin 炎症足に PGE₂ を与えて疼痛過敏とした実験モデルに Randall-Selitto 変法を用いて疼痛閾値を計測したもので morphine, pentazocine, [Met⁵]-enkephalin, [Leu⁵]-enkephalin の微量の局所投与によって疼痛抑制効果を確認している⁹⁾。また Bently ら¹²⁾は酢酸 writhing 法によって pentazocine, morphine,

ketazocin, Met and Leu-enkephalin などの微量を酢酸投与6分後に腹腔内に与えて疼痛抑制に有効であることを認めている。われわれが今回用いた方法は、教室において考案された formalin による足趾疼痛モデルであり Ferreira ら、Bently らの方法とは異っているものの、ともに化学物質による炎症性の疼痛モデルという点では共通している。われわれの疼痛モデルについては、種々の報告^{11,13,14)}を重ねてきたが、図1のように formalin 注射後、即時的に出現する第1相疼痛と遅延性に出現し、やや持続型の第2相疼痛の特徴ある2相のパターンを示す反応である。すでに第1相では substance P と kinin が、第2相では kinin, histamine, serotonin, PG など、従来疼痛または炎症のケミカルメディエーターとされてきた内因性物質が関与していることを立証している^{11,14)}。このように本実験モデルにおいては、性質の異なる2つの疼痛反応が抱含されているのである。

Fig. 4 Antagonism of N-methyl levallorphan and naloxone on peripheral analgesic actions of morphine and EKC. See Fig. 3 for details. M: morphine, 2.2 nmol/paw; EKC: ethylketocyclazocine, 1.65 nmol/paw; NML: N-methyl levallorphan, 30 mg/kg, s.c.; N: naloxone, 1 mg/kg, s.c. N.S.: Not significant, *: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001.

この方法によって 20~500 pmol の dynorphin, [D-Ala², Met⁵]-enkephalinamide, [Met⁵]-enkephalin などのオピオイドペプチドを炎症足趾に局所投与して、疼痛反応抑制の有無を第1相, 第2相に分けて観察したところ, dynorphin, [D-Ala², Met⁵]-enkephalinamide, [Met⁵]-enkephalin の順で抑制効果を確認することが出来た (図2)。これらの作用は局所麻酔薬である lidocaine hydrochloride の示す抑制より約 1/500 以下の低用量で認められることから, 局所麻酔作用とは異なった機序によるものであることが推察された。他方, EKC, morphine では 0.4~2.2 nmol とペプチドグループより高用量で第1相疼痛を抑制することを認めたが, 第2相疼痛では逆に疼痛過敏が用量依存的に出現した。この過敏現象は N-methyl levallorphan によって拮抗される (図4) ことから morphine の局所での直接作用であると考えられる。水村ら¹⁵⁾はイヌ精巣神経の侵害受容器から発する複数ユニット放電の実験から BK, PG によって誘発される侵害受容器の興奮は morphine (1~

40 μmol) 添加によって増強すること, また morphine 単独でも受容器放電は増加するなどから, morphine が末梢侵害受容器の興奮を抑制することによって鎮痛作用を示すとする Ferreira⁹⁾ の主張と異なる結果を報告している。これは第2相疼痛に対して抑制ではなく過敏に現われたわれわれの結果とも符合する事実と言えよう。また, morphine には compound 48/80 による histamine 遊離や血管透過性亢進を増強する作用¹⁶⁾があり, 本報告の第2相疼痛は血管透過性亢進や histamine 遊離と密接に関係している事実から^{11,14)}, morphine の疼痛過敏を, これらの現象と対応させて考えることが妥当と思われる。

次に, これらオピオイド作用の拮抗を naloxone と N-methyl levallorphan によって観察した。N-methyl levallorphan は morphine 構造の4級アミン化によって脳一血液関門を通過しない化合物として合成されたもので¹⁷⁾, その拮抗は末梢性と考えられることから, 特に本実験に使用した。その結果は図3, 4のように第1相

疼痛に対する各オピオイドの抑制作用は naloxone, N-methyl levallorphan によって拮抗されたが, 第2相疼痛においては N-methyl levallorphan のみに拮抗が認められ naloxone では全例において有意な拮抗は認められなかった。

一方 Ferreira⁹⁾ は naloxone の局所投与は拮抗薬としてよりもむしろ morphine 様アゴニストとして鎮痛に働くとしている。また Bently ら¹²⁾ の報告では naloxone (s.c.) 投与は morphine, [Met⁵]-enkephalin の末梢作用に拮抗するものの ketazocine, pentazocine に対しては, むしろ鎮痛増強的に働くとしている。このように naloxone の末梢作用は複雑であり, 鎮痛以外の morphine 末梢諸効果においても naloxone で拮抗されない作用のあることから^{3,8,18,19)}, 末梢での morphine 受容器は中枢のそれとは性質を異にする内容であることが示唆された。いずれにせよ中枢作用をもたない N-methyl levallorphan によって, 用いたすべてのオピオイドが拮抗されたことは, 末梢側に疼痛制御に働く受容器の存在を示唆するものである。

以上, 数種のオピオイドの末梢性鎮痛作用を, われわれが考案した formalin による疼痛反応を用いて確認した。同時に末梢性疼痛には morphine, EKC によって助長される疼痛が存在すること, naloxone によって拮抗されず N-methyl levallorphan のみに拮抗される, オピオイドによる疼痛制御機構の存在することが明らかとなった。

謝辞: 本研究に使用された N-methyl levallorphan は Dr. Marco, Dragonetti 氏の提供であることを付記し, 感謝の意を表します。

文 献

- 1) Watson, S.J., Akil, H., Ghazarossin, V.E. and Goldstein, A.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **78**, 1260 (1981)
- 2) Kudo, T., Nishimoto, T., Inoki, R., Akai, M. and Yonehara, N.: Acta Histochem. Cytochem. **15**, 449 (1982)
- 3) Lord, J.A.H., Waterfield, A.A., Hughes, J. and Kosterlitz, H.W.: Nature **267**, 495 (1977)
- 4) Lemaire, S., Magnan, J. and Regoli, D.: Br. J. Pharmacol. **64**, 327 (1978)
- 5) Wüster, M., Schulz, R. and Herz, A.: Eur. J. Pharmacol. **62**, 235 (1980)
- 6) Oka, T., Negishi, K., Suda, M., Matsumiya, T., Inazu, T. and Ueki, M.: Eur. J. Pharmacol. **73**, 235 (1981)
- 7) Inoki, R., Toyoda, T. and Yamamoto, I.: Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. **279**, 387 (1973)
- 8) Brodin, E., Gazelius, B., Panopouls, P. and Olgart, L.: Acta Physiol. Scand. **117**, 567 (1983)
- 9) Ferreira, S.H.: Mechanisms of Pain and Analgesic Compound, Edited by Beers, R.F.Jr. and Bassett, E.G., p. 390, Raven Press, New York (1979)
- 10) Ferreira, S.H., Lorenzetti, B.B. and Rae, G.A.: Eur. J. Pharmacol. **99**, 23 (1984)
- 11) 柴田 学: 歯基礎誌 **27**, 890 (1985)
- 12) Bently, G.A., Newton, S.H. and Starr, J.: Br. J. Pharmacol. **73**, 332 (1981)
- 13) Takahashi, H., Ohkubo, T., Shibata, M. and Naruse, S.: Japan. J. Oral Biol. **26**, 543 (1984)
- 14) 柴田 学, 大久保つや子, 高橋 宏, 工藤照夫, 猪木令三: 日薬理誌 **87**, 405 (1986)
- 15) 水村和枝, 佐藤 純, 熊沢孝朗: 第7回日本疼痛学会, 東京, 口演要旨集 p.53 (1985)
- 16) Barthó, L. and Szolcsányi, J.: Eur. J. Pharmacol. **73**, 101 (1981)
- 17) Dragonetti, M., Bianchetti, A., Sacilotto, R., Giudice, A., Ferrarrese, N., Cattaneo, C. and Manara, C.: Life Sci. **33**, 477 (1983)
- 18) Kosterlitz, H.W. and Hughes, J.: Life Sci. **17**, 91 (1975)
- 19) Chavkin, C., James, I.F. and Goldstein, A.: Science **251**, 413 (1982)

Abstract—Peripheral analgesic actions of opioid peptides and morphine analogues. Manabu SHIBATA, Tsuyako OHKUBO, Hiroshi TAKAHASHI, Teruo KUDO* and Reizo INOKI* (Department of Pharmacology, Fukuoka Dental College, 700 Ta, Sawara-ku, Fukuoka 814-01, Japan. *Department of Pharmacology, Osaka University Faculty of Dentistry, 1-8 Yamadaoka, Suita, Osaka 565, Japan). *Folia pharmacol. japon.* **88**, 101~107 (1986)

Opiates and opioid peptides were administered in the order of 10^{-9} ~ 10^{-6} mol peripherally, and their action on pain sensitivity was investigated by the modified formalin test which has two characteristic pain responses (the first and the second phase) in the mouse hind-paw. Opioid peptides (20~500 pmol) had dose-dependent analgesia against both first and second phases, and their action ranked dynorphin>[D-Ala², Met⁵]-enkephalinamide>[Met⁵]-enkephalin. EKC and morphine (0.4~2.5 nmol) inhibited pain response of the first phase, but produced hyperalgesia in the second phase dose-dependently. Lidocaine hydrochloride had peripheral analgesic action, but was about 500~10000 times weaker than these substances. So, these peripheral analgesic actions have a different mechanism from that of local anesthetic action. N-methyl levallorphan which is thought to be a peripherally selective narcotic antagonist reversed these peripheral analgesic actions at the first and second phases and also prevented the hyperalgesic effects of EKC and morphine at the second phase. Naloxone reversed analgesia at only the first phase. These results suggest that an analgesic mechanism by opioids may exist at the peripheral site as well. Furthermore, it is estimated that a receptor exists which is antagonized by N-methyl levallorphan but not by naloxone and that there is a system of hyperalgesia by EKC and morphine in pain modulation.