総説

脳から単離された活性ジペプチド Kyotorphin
およびその前駆物質 L-Arginine の生理・薬理
作用と慢性疼痛への臨床応用

—Kyotorphin 発見10年のあゆみ—

高 木 博 司

I. はじめに

1979年 kyotorphin (KTP) が私たち^{1,2)}によりウシ脳から単離、同定されて以来約10年が経過し、その間、人の脳脊髄液内にも KTP の存在が明らかにされ、また他の神経ペプチドには見られないジペプチド独特の生合成機構が明らかにされ、それを臨床の現場で痛みの治療に応用する試みも行われ成果を挙げつつある。私は KTP の発見から生理薬理作用の解明、さらに前駆物質 L-arginine の臨床応用 (間接的 KTP 投与) にいたるまでの研究の推進に終始責任者として携わってきたので、この10年間の進歩についてまとめると共に KTP の病態生理学的意義などについてもふれてみたい。

II. KTP の単離と化学

1. KTP の単離・構造決定・合成

1975年 Hughes, Kosteritz らにより Met-enkephalin と Leu-enkephalin が最初のオピオイドペプチドとしてブタ脳から単離同定されたことに刺激をうけ、私たちも未知のオピオイド様抗侵害受容活性ペプチドをウシ脳から単離することを試みた。ウシ脳のエキス成分をマウスの大槽内に注射し tail pinch 法で抗侵害受容活性と naloxone による拮抗性の有無をチェックしながら活性成分の精製を繰り返し2年あまりの試行錯誤の後、オピオイド様抗侵害受容活性をもつ新規ペプチドの単離に成功しその化学構造を決めることが出来た。化学構造は L-tyrosine と L-arginine から成る dipeptide (L-tyrosyl-L-arginine; Tyr-Arg) で、化学合成したも

の³⁾と脳から単離したものとの物理化学的性状および、薬理学的活性が完全に一致した。当時筆者は京都大学に在職中であったので京都で見いだされたモルヒネ様ペプチドという意味をこめて kyotorphin (キョートルフィン; KTP) と命名した¹⁾。その後 KTP はオピオイド受容体に結合しないで、Met-enkephalin 遊離を介して作用する「間接作用型のオピオイドペプチド」であることが明らかにされた²⁾。

KTP (Tyr-Arg) およびその異性体 (Tyr-D-Arg) の化学合成は1980年共同研究者 Yajima ら³⁾により、後に Balaspiri ら⁴⁾により行われ、その後酵素 (tyrosyl-tRNA synthetase または α -chymotrypsin) を用いる合成法^{5,6)}も確立され、すでに KTP およびその異性体が Sigma, Aldrich, Peninsula, Bachem, Vega の5社から試薬として市販されている。私たちは研究の初期には矢島教授の合成品を用いていたが、現在は Sigma 社のものを選んで用いている。なお Vaught and Chipkin⁷⁾ が筆者の HPLC のデータを参照しながら鎮痛効力試験で純度を総合的に判定したところ他社の市販品の純度は必ずしも高くない結果 (40~60%) をえていることに注意する必要がある。

2. KTP 定量法

ボルタンメトリーをつけた HPLC 法¹⁾、KTP 特異抗体を用いるラジオイムノアッセイ^{8,9)}、アミノ酸分析計を用いる方法¹⁰⁾などがある。

3. KTP 関連化合物の合成と活性

KTP 異性体 Tyr-D-Arg の抗侵害受容活性が元の KTP の約5倍強いことに注目し、Tyr-D-Arg 分子を持った enkephalin 誘導体 (KTP と enkephalin のハイブリッド化合物) が矢島グループと私たちの共同研究^{11~14)}により合成されその中には皮下投与で強力な抗侵害受容活性を示す tetrapeptide (Tyr-D-Arg-Gly-

Phe) が見いだされた。また Sato ら¹⁵⁾も Tyr-D-Arg 分子をもつ dermorphin 誘導体について研究し皮下注射で強力な抗侵害効果を示し tetrapeptide (Tyr-D-Arg-Phe-Gly など) について報告している。これらの誘導体の抗侵害受容作用はいずれも naloxone により拮抗され、ミュー受容体に結合する^{13,15)}ので、オピオイドアゴニストとしての性質をもつに至り、原型の KTP がもっていた enkephalin 遊離作用という特徴は失われている。

III. KTP の脳脊髄内分布と細胞下局在

KTP はウシ脳から単離されたが、その後ラット、マウス、モルモット、ウサギの脳組織にも存在すること、またヒトの脳脊髄液中にも存在することが明らかにされた(後述)。ラットの脳・脊髄内分布を HPLC ボルタンメトリー法で調べたところ、含有濃度は均一ではなく最も高い中脳では 719.5 ng/g 組織、最も低い線条体で 45.5 ng/g 組織であった¹⁶⁾。KTP の濃度の高い組織は中脳の他に橋・延髄、脊髄背側部、視床下部などであ

り、いずれも痛みの制御に関係が深い部位である¹⁶⁾のが興味深い。なお末梢組織における分布はまだよく調べられていない。

最近 Shiomi ら¹⁷⁾は KTP のモノクローナル抗体の作成に成功し、これを用いてラット脳で kytorphin 含有神経の存在部位を免疫組織化学的に検索した。KTP は視床下部弓状部 (ARH)、中脳水道周囲灰白質 (PAG)、延髄傍巨大細胞網様核 (NRPG) の神経細胞内に存在することが形態学上確認され、長年の懸案事項が解明の方向に向かった。KTP の脳内分布はまだ研究中であるが、現在までにえられた知見にもとづき KTP 含有神経の分布を模式的に示したのが図 1 である^{17,18)}。

さらに KTP の細胞下分布について調べたところシナプトゾームを主に含む P₂B 画分に多いことも明らかにされた¹⁹⁾。

なおヒトの脳脊髄液(順天堂大学麻酔科学教室茅グループの協力による)中の KTP をラジオイムノアッセイ法と HPLC を組み合わせることにより測定した。ヒトの脳脊髄液中の KTP 含有量はバラツキがあるが、1～

Fig. 1 1: Regional distribution of the kytorphin-containing neurons in the rat brain with the immunofluorescence-histochemical technique. Location of perikaria is shown. 2-4: Regional distribution of opioid peptides.

5 pmol/ml の KTP が含まれていることが明らかになった (Takagi and Ueda²⁰⁾, Nishimura et al. 投稿準備中). 脳脊髄液中の KTP はおそらく脳組織で生成貯蔵されていた KTP が放出されたものと推定される.

IV. KTP の生理・薬理作用

現在までに調べられた生理・薬理作用を大別すると中枢作用と末梢作用に分けられ, また naloxone で拮抗される作用とされない作用とに分けられる.

1. 中枢作用

1) 抗侵害受容作用 (仮性鎮痛作用)

痛みのような主観的な感覚に対する薬物効果を動物で判定するのは極めて困難である. 通常, 動物実験で用いられる“鎮痛作用”は侵害受容反応の抑制を指標にしているの, 厳密に言えば抗侵害受容作用あるいは仮性鎮痛作用というべきものである. 基礎薬理学の論文では以上の点を承知のうえで, 簡略に鎮痛作用と表現するのが通例であるが, 本稿では後にヒトでの真の鎮痛作用が出てくるので両者を区別するため動物の場合は抗侵害受容作用という用語を用いている.

KTP の抗侵害受容作用はマウスやラットの脳内注射 (側脳室, 第三脳室, 中脳灰白質, 延髄傍巨大細胞網様核, 大槽など) あるいは腰髄くも膜下腔投与で発現する. たとえばマウス大槽内注射で, tail-pinch 法で ED₅₀ は 34.7 nmol/マウスであり, その効果は少量の naloxone (1~100 µg/kg 皮下注) で拮抗される^{1,2,21,22)}. 抗侵害受容作用の持続は投与量と投与部位により異なるが, 大槽内投与の場合 15~60 分である. また酵素により分解され難い KTP 異性体 Tyr-D-Arg (D-kyotorphin: D-KTP) の抗侵害受容効力は ED₅₀ 値での比較で元の KTP の約 5 倍で, 作用持続もより長かった^{1,3)} (表 1). 筆者らにより得られたこれらの知見は Rackham ら²³⁾, Vaught and Chipkin⁷⁾ によりマウスおよびラットで確認された. なお KTP あるいは Tyr-D-Arg (D-kyotorphin) を単独で末梢投与した場

合は抗侵害受容作用が見られない. これは KTP が血液脳関門を透過し難いためと考えられた. そこで D-kyotorphin (D-KTP) の脳内への移行を促進する工夫がなされた. すなわち Sakane, Sezaki らは筆者との共同研究²⁴⁾の結果, 非イオン性界面活性剤 polysorbate 80 投与後に D-KTP を末梢に投与すると明らかに抗侵害受容効果を発現することを確認した. これは polysorbate 80 前処置が血液脳関門に影響を与え, D-KTP の一部が脳内に透過できたためと解釈される.

上述のように KTP を大槽内投与した場合その作用持続は比較的短い. これは KTP が脳組織や血清中に存在する酵素 aminopeptidase により容易に分解されるためである¹⁰⁾. aminopeptidase 阻害剤である bestatin (50 µg) を KTP と併用 (大槽内投与) すると抗侵害受容効果は約 5 倍強くなり (ED₅₀ 値比較), 作用持続も長くなる¹⁰⁾ (表 1).

また Vaught ら⁷⁾は morphine 耐性マウスで KTP 脳内注射時の抗侵害受容効果が著しく減弱している事実から, KTP と morphine の間に交叉耐性が成立すると報告している.

reserpine をマウスに 24 時間前に投与しておくとも KTP の抗侵害受容作用は抑えられる. またアルファ遮断薬を脊髄くも膜下腔に 5 分前に投与しておくとも KTP の抗侵害受容作用が抑えられる (Takagi & Ueda²⁰⁾). これらの知見は KTP が morphine や enkephalin と同様に脳幹から脊髄への下行性抑制系 (とくに nor-adrenaline 系) を介して抗侵害受容作用を発現することを示唆している. 事実, 大槽内または脊髄くも膜下腔への微量注射で抗侵害受容作用を発現するところから, KTP の作用部位は enkephalin と同様脳幹および脊髄後角にあると判断される. これを支持する電気生理学的知見として, α-chloralose で麻酔したラットにおいて NRPG の単一ニューロンから自発活動を記録しながら, 同じニューロンに微小電気泳導法で KTP を適用すると自発単位発射数の増加をきたし, この作用は

Table 1 The analgesic effects of kyotorphin and its analog, and combined effect with bestatin

	ED ₅₀ (µg, i.cis/mouse)	References
L-Tyr-L-Arg (kyotorphin)	11.7	Takagi et al. ¹⁾
L-Tyr-D-Arg (D-kyotorphin)	2.1	
Kyotorphin	14.3	Matsubayashi et al. ¹⁰⁾
Bestatin (50 µg) + kyotorphin	3.0	

naloxone で拮抗された²⁵⁾。この知見は enkephalin を NRPG に微小電気泳導的に適用した場合と類似しており、KTP は NRPG において enkephalin を遊離させ(後述)、この enkephalin が NRPG ニューロンを興奮させ、その結果 NRPG から脊髄後角への下降性抑制系が刺激され抗侵害受容作用発現の一因となると解釈される。一方、無麻酔脊髄ウサギにおいて痛みの伝達に関与している腰髄後角第5層型ニューロンの単位発射を記録しながら、痛み刺激(bradykinin の大腿動脈内注射)を与えると単位発射数の増加反応を示すが、同じニューロンに微小電気泳導法で KTP を適用すると調べたニューロン31個中10個において enkephalin と類似の抑制作用を示し、その効果は naloxone により遮断された²⁵⁾。この効果もおそらく KTP の enkephalin 遊離作用によるもので、やはり抗侵害受容効果発現に寄与している可能性を示唆している。

2) Met-enkephalin 遊離促進作用と抗侵害受容

KTP は上述のように naloxone で拮抗される抗侵害受容効果を示すが、ミュー、デルタ、カップなどオピオイド受容体に対し親和性を示さない²⁾。モルモット線状体切片に KTP を適用して調べてみると、KTP は 10^{-6} M 添加で Met-enkephalin 遊離を促進することが証明された。なおこの実験は bestatin, captopril などの酵素阻害剤存在下で行ったものである。脊髄切片でも同様な作用が認められた。KTP による enkephalin 遊離促進作用は Ca イオン依存性であり、tetrodotoxin で遮断された。同様な知見は D-kyotorphin (D-KTP) でも認められた。以上の筆者らの知見は Janicki and Lipkowski²⁶⁾ によっても確認されている。したがって、KTP の抗侵害受容作用は大部分その Met-enkephalin 遊離促進作用により発現し、さらに次に述べる enke-

phalin 分解酵素阻害作用も一部協力的に関与すると考えられる。

なお私たちによる KTP の enkephalin 遊離促進作用の報告後、enkephalin 遊離を促進する物質として black widow spider venom²⁷⁾ および睡眠誘発ペプチド (DSIP)²⁸⁾ が報告されており、とくに後者が抗侵害受容作用を示すことは興味深い。

さきに述べた KTP 含有ニューロンの存在、KTP による enkephalin 遊離の増大、侵害刺激による脳室 CSF 中の KTP 量の増加²⁹⁾などの一連の事実を合理的に説明するために、KTP 含有ニューロンと enkephalin 含有ニューロンの結合を仮想的に描いたのが図2である。しかし KTP ニューロン終末が enkephalin ニューロン終末とシナプスを形成している可能性もあり、今後の組織化学的証明が待たれる。

痛みの制御系における KTP-enkephalin 系の活動は次のような連鎖の一環と考えられる。

侵害刺激→脳幹での KTP 遊離促進→enkephalin 遊離促進→下降性抑制系の活性化→脊髄後角での侵害情報伝達の抑制→抗侵害受容効果発現

3) enkephalin 分解酵素阻害作用

enkephalin 分解酵素として aminopeptidase (AP), dipeptidylaminopeptidase (DAP), enkephalinase-A (ENK-A), angiotensin-converting enzyme (ACE) の4種の酵素が知られている。Lee and Snyder²⁹⁾ はラット脳の細胞質から精製した DAP III を KTP が阻害することを報告し、Hazato ら³⁰⁾はサル脳膜から精製したこれら4種の酵素に対する KTP の効果をしらべた結果、やはり DAP のみが阻害されること (IC₅₀: 18 μ M) そしてこの効果が KTP により遊離された enkephalin の分解を阻止するのに役だっていることを

Fig. 2 A possible connection of the kyotorphin-containing neuron to the enkephalin-containing neuron.

指摘している。なお Fournie-Zaluski ら³¹⁾も KTP がマウス線状体からの ENK-A に対して阻害作用を示さないことを報告している。したがって KTP は弱いながらも比較的選択的な DAP 阻害作用をもつペプチドと言える。

4) KTP に対する特異的受容体の存在

KTP は naloxone で拮抗される鎮痛作用をもって、オピオイド受容体のミュー、デルタ、カッパいずれの受容体にも結合しない。そこで Ueda らはラット脳膜標品について ³H-KTP を用いてしらべた結果、KTP の特異的結合の存在を示すことができた³²⁾。高親和性結合の K_d 値は 0.34 nM, B_{max} 値は 36 fmol/mg protein, 低親和性結合の K_d 値は 9.07 nM, B_{max} 値は 1.93 pmol/mg protein であった。この結合は既知の神経ペプチド、神経伝達物質などの添加では阻害されなかった。

しかし KTP と構造類似の dipeptide は ³H-KTP 結合に対し、かなり強い置換作用を示した。特に, Leu-Arg (IC₅₀ 値: 11.2 nM), Phe-Arg (IC₅₀ 値: 12.7 nM) は KTP (IC₅₀ 値: 20.8 nM) よりも親和性が高かった。Phe-Arg は KTP より弱い抗侵害受容作用を示し、一方 Leu-Arg はそれ自体抗侵害受容活性は極めて弱く、KTP に対比較的特異的な拮抗薬として働くことが明らかにされた。

また ³H-KTP の高親和性結合は GTPγ S 存在下で消失した。この事実から高親和性結合は KTP 受容体と GTP 結合タンパクとの連関が示唆された。事実、KTP は GTP 結合タンパク由来の Low Km GTPase 活性を濃度依存性に促進した。この作用は Leu-Arg により拮抗された。また KTP による Low Km GTPase 活性の促進効果は、膜標品を IAP (pertussis toxin) で前処置することにより消失し、精製 Gi タンパクを再構成することによってのみ回復したことから、KTP 受容体と Gi タンパクとの選択的な連関が示唆された³²⁾。

また KTP は脳膜標品における phospholipase C 活性を濃度依存的に促進し^{32,33)}、この作用もまた Leu-Arg により拮抗され、IAP 前処置により消失し、さらに精製 Gi タンパクとの再構成によってのみ回復した。

さらに KTP はその受容体刺激により IP₃ 生成を促進し³²⁾、細胞内 Ca²⁺ 濃度を上昇させること³⁴⁾も明らかにされた。

KTP 受容体が enkephalin 含有ニューロンの神経終末または細胞体に存在すると仮定すると KTP が受容体を刺激し、IP₃ 生成を介し細胞内 Ca²⁺ 濃度を高め、

その結果 enkephalin 遊離を引き起こすと推定できる。

5) その他の中枢作用

a) 脳波に及ぼす作用: Janicki ら³⁵⁾はラット側脳室内投与で KTP または D-KTP を 100 μg 与えると大脳皮質脳波の徐波成分が減少し速波成分が増加するとし、Sato ら³⁶⁾は KTP 296-593 nmol を与え、新皮質および古皮質海馬からてんかん様発作波を記録した。この効果は naloxone 10 mg/kg, i.v. 前処置により影響を受けなかった^{36,37)}ので、enkephalin 遊離を介する作用ではなく、別の作用と解釈される。

b) 大脳皮質単一ニューロン活動に対する作用: ラット新皮質ニューロンの単位発射活動は調べた 112 個の 86 % で著しく増加した。この作用は naloxone 10 mg/kg, i.v. でも抑えられなかった^{36,38)}。この効果の機序として KTP のニューロンに対する直接の興奮作用と脱抑制による間接作用が考えられるが、naloxone が効かなかったことから前者の可能性が高い。また Stone³⁹⁾は淡蒼球ニューロンへの KTP 適用は発火活動を抑制し、この作用も naloxone で拮抗されにくいと報じている。

c) 条件回避反応に対する作用: ラットを用い、pole-climbing 法で条件回避反応の消去（すなわち学習効果の減退）を指標に、KTP 15~30 μg/kg 皮下注あるいは 1 μg/ラット側脳室内投与したところ消去が有意に遅延し、この効果も naloxone で影響されなかった⁴⁰⁾。また step and down 法でも同様の効果を得た。

d) 海馬長期増強に対する作用: モルモット海馬 CA3 野で苔状線維刺激により誘発した長期増強 (LTP) に対し KTP は bestatin 存在下で 0.1 μM で有意の増大作用を示し、この効果は naloxone では拮抗されず、KTP 拮抗薬 Leu-Arg で拮抗された⁴¹⁾。

e) dopamine 代謝回転促進作用: Rackham ら²³⁾はラット脳で認めており、この効果は naloxone で拮抗された。

f) acetylcholine 代謝回転抑制作用: Rackham ら²³⁾によりラット脳で認められ、naloxone で拮抗された。

g) その他の神経伝達物質に対する作用: 脳切片では ³H-noradrenaline, 3H-GABA, 3H-D-aspartate, beta-endorphin の遊離には影響を与えなかった²⁶⁾。

h) 迷走神経核 (延髄疑核) に対する作用: Laubie and Schmitt⁴²⁾は KTP の安定な異性体 D-KTP を延髄疑核に適用すると naloxone で拮抗される徐脈が生じることを報告している。延髄は KTP 含有量が比較的に多いので、KTP は迷走神経核で enkephalin と

共に心機能の中樞性調節に一役買っている可能性が示唆される。

i) 下垂体の分泌機能に対する作用：ラットで KTP 投与により血漿中の TRH 値には変動が見られなかったが、TSH 値は用量依存性に減少した⁴³⁾。この効果は L-DOPA または 5-HTP の前処置により消失した。

j) 運動系に対する作用：Bean and Vaught⁴⁴⁾ は D-KTP を一側の黒質内に注射すると同側性の回転行動を示し、naloxone で拮抗されることを報告した。これに対し Met-enkephalin の黒質内投与は反対側への回転行動を示した。彼らは KTP のこの効果は Met-enkephalin 遊離を介さない別個の作用によるとした。

k) 一般行動に対する作用：Kastin ら⁴⁵⁾は生後1日のひよこ (chick) への KTP 腹腔内投与で行動に影響を与えると報告した。KTP は幼若ひよこでは血液脳関門を通ることが示されたわけである。これは血液脳関門が未完成なためと考えられる。

2. 末梢作用

1) 交感神経節：ガマの摘出交感神経節標本における電気生理学的研究から KTP および D-KTP が acetylcholin の遊離を促進し、この効果は naloxone で拮抗されるという知見が Hirai and Katayama⁴⁶⁾ により得られている。

2) 腸管：筆者らは KTP を発見した当時、KTP のモルモット回腸縦走筋標本に対する作用を調べ、ほとんど作用が見られないと報告²⁾したが、ごく最近、KTP 分解で阻害する bestatin または amastatin 存在下で再検討したところ、KTP の比較的高濃度で抑制作用があることが明らかになった (著者ら：未発表)。この作用は acetylcholine 遊離の抑制にもとづくものであるが、naloxone または Leu-Arg により拮抗されなかったため、未知の新しい作用によるものと考えられる。

3) 血管：Thomas ら⁴⁷⁾は arginine 分子をもつ諸種ペプチドの血管に対する効果を調べたが、KTP は 10^{-3} M でも弛緩作用を示さなかったと報告している。

上に述べた KTP の諸作用のうち naloxone で拮抗されない作用は Met-enkephalin 遊離を介さない作用であるが、その作用機序はまだよくわかっていない。

V. KTP の生合成, 取り込み, 遊離, 分解

1. 生合成

diptide である KTP の生成は他の多くの神経ペプチドの場合と異なり複数のルートで行われることが明らかにになった。

1) kyotorphin synthetase による生合成：脳シナプトゾームを kyotorphin の構成アミノ酸である L-tyrosine と L-arginine とインキュベートすると KTP 含量が時間依存的に増加した。これは両アミノ酸が結合し KTP が生成されたことを示唆するものである。そこで私たちは、ラット全脳のシナプトゾーム画分を Sephacryl S-300 のゲル濾過クロマトグラフィーにかけ、この合成酵素の部分精製を行ない、その性質を調べた。その結果、KTP は図3のような反応式により生成されることが明らかにされた。この酵素を私たちは kyotorphin synthetase と命名した⁹⁾。この酵素は L-tyrosine, L-arginine, ATP に対し高い基質特異性を示した。親和性を示す K_m 値は L-tyrosine, L-arginine, ATP, $MgCl_2$ に対して、それぞれ 25.6, 926, 294, 442 μM であった。脳内におけるそれぞれのおよその生理的濃度 100, 100, 1000, 1000 μM と比較すると、L-arginine の K_m 値のみが生理的濃度の約9倍高く、脳内の L-arginine 含量が KTP の合成の調節に重要な役割を演じていることが示唆された。

事実、ラット脳スライスを L-arginine とインキュベートすると KTP の含量増加が認められるが、L-tyrosine ではそのような増加は認められず、また in vivo でマウス皮下に L-arginine を投与すると投与30時間後から KTP 含量が増加し、24時間で最高値に達することが証明された (図4)。

2) 前駆体タンパク質からの生成：多くの神経ペプチドは前駆体タンパク質として神経細胞内のリボソームで合成され、これが神経終末に移動する過程においてプロセッシング酵素により切断され最終産物である神経ペプチドになると考えられている。KTP の場合は、前述の KTP 合成酵素による生合成の他に、前駆体タンパク質からのプロセッシングによる生合成の可能性が指摘されている⁸⁾。最近、Yoshihara ら⁴⁸⁾はこのプロセッシング酵素

Fig. 3 Biosynthesis of kyotorphin with "kyotorphin synthetase".

Fig. 4 The time course of L-arginine-induced increase in the kyotorphin content in the mouse brain. Abscissa: time (hours) after administration of L-arginine (1 g/kg, s.c.). Ordinate: kyotorphin content in the brain-stem (pmol).

を精製し、47 kDa のタンパク質であることをつきとめ、その性質を明らかにした。本酵素はカルシウムにより活性化されるチオールプロテアーゼであり、既知の calpain I および II とは異なることも明らかにされた。しかし KTP 分子を含有する前駆体の構造はまだ解明されていない。

二つの生合成経路のうち、どちらが重要であるかについて結論をだすのはまだ早い。少なくとも慢性痛の臨床治療の観点からは L-arginine を材料にする生合成が重要と考えられる(後述)。

2. 取り込みと遊離

ラット脳粗シナプトゾーム画分 (P₂) への KTP の取り込みは温度依存性で、Km および Vmax は 1.31×10^{-4} M および 5.9 pmol/mg であった。dinitrophenol, iodoacetate, ouabain のような代謝阻害剤はこの取り込みを阻害した。シナプトゾーム画分を予め合成 KTP とインキュベートし KTP を取り込ませた後、高濃度の K 液で脱分極させると KTP が遊離してくることが証明されている⁴⁹⁾。in vivo でラットの第 IV 脳室を灌流しながら後肢に formalin で痛み刺激を与えたところ、一過性に灌流液中の KTP 含量の増加が観察された²⁰⁾。

3. 酵素による分解

前述したように KTP は脳ホモジネートや血清により分解され tyrosine と arginine になる¹⁰⁾。これは aminopeptidase によるもので、この酵素は bestatin 及び amastatin で阻害される⁵⁰⁾。KTP は aminopeptidase の他に、human dipeptidase により分解され

ることが Ito ら⁵¹⁾により示されている。この酵素は Gly-Leu, Ala-Ala, leukotrien D₄ などを分解し、その活性は captopril により競合的に阻害される。

KTP の生合成、遊離、分解、受容体への結合およびセカンドメッセンジャーとの関係をまとめたのが図 5 である。

VI. KTP 前駆物質 L-arginine の抗侵害受容作用およびその他の作用

上述のようにマウスに L-arginine を投与すると kyotorphin synthetase の活性が増加し、脳内の KTP 含量が増加する。そのような状態の時に、acetic acid writhing 法、formalin 法で用量依存性の抗侵害受容効果が認められ、その効果は naloxone で拮抗された。しかし意外なことに tail pinch 法や hot plate 法では抗侵害受容効果は検出できなかった(吉原：学位論文)。

L-arginine の他の作用として、下垂体刺激による成長ホルモン遊離促進作用、インスリンおよびグルカゴン遊離促進作用、血管弛緩作用(血管内皮依存性弛緩因子(EDRF)の前駆物質としての作用)^{47,52)}、guanylate cyclase 活性化作用⁵³⁾などがあげられているが、紙数の関係で詳細は省略する。

VII. L-arginine の難治性慢性疼痛患者に対する有効性

すでに述べたように動物実験では侵害刺激の種類により L-arginine の抗侵害受容作用が出たり出なかったり相反する成績がえられた。この結果から直ちに臨床での

Fig. 5 Biosynthesis and release of kyotorphin at the presynaptic terminal of the kyotorphin-containing neuron and the kyotorphin-receptor mediated Ca^{2+} increase in the postsynaptic enkephalin-containing neuron via the G_i protein phospholipase C- IP_3 link.

鎮痛効果を予測することはきわめて困難である。動物での抗侵害受容効果と臨床上の鎮痛効果との間にはしばしば乖離現象が認められるので、実際にヒトで用いてみなければわからないというのが実状である。

私は生体内で L-arginine-KTP 系および enkephalin 系が連動して慢性痛の制御に重要な役割を演じているという仮説を立て、上記動物実験での知見を参考に、L-arginine の臨床効果を慎重に調べることにした。京都大学付属病院ペインクリニックの播磨および京都南西病院慢性痛研究所清水の協力を得て、まず難治性（他の治療に反応しにくい）慢性疼痛（持続痛）患者を選び、有効かどうかを調べてみた。

L-arginine は生理的なアミノ酸であり、幸いに、10% L-arginine 液がすでに臨床検査試薬として市販されており、下垂体の機能検査に用いられている。したがって臨床検査の場合と同様の用い方をすれば安全性の問題はクリア出来ると判断した。そこでこの市販品を用い、投与方法も下垂体機能検査の場合と同様に、一人あたり 300 ml を 30～50 分間かけて静脈内に点滴注入した。用

量は体重 60 kg の場合 0.5 g/kg となるわけである。

痛みの測定法はペインクリニックで常用される Visual Analogue Scale (VAS) を用いた。すなわち 10 cm の紙製の scale を提示し、現時点の痛みの強さを 10 とした場合、L-arginine 投与後痛みの強さがいくつに変化したかを患者自身で scale 上で指示してもらい、その変化を経時的に記録する方法である。

患者は 6 カ月以上持続性疼痛を訴えているもので他の治療法に反応しにくいものを選び、L-arginine 投与の前に患者によく説明し、承諾が得られたケースにのみ投与を実施した。L-arginine 点滴静注中は血圧、呼吸、脈拍を随時測定すると共に、患者の顔色、気分などの一般状態も注意深く観察した。

慢性疼痛患者 10 名の内訳は、ヘルペス後神経痛 3、群発性頭痛 1、頸肩腕症候群 1、脊椎捻挫（頸胸椎）1、変形性脊椎症（腰痛）1、リウマチ性関節炎 1、肩関節周囲炎 1、脳梗塞後中枢痛 1 であった。これらの症例に用いたところ、いずれも投与前の痛みの強さを 10 とした場合、投与後は 0～5（平均 3.0）に減少した⁵⁴⁾。鎮

痛効果の発現は投与開始後15～30分で認められ、その効果は6～20時間、時には70時間持続した。3例において患者の要望により arginine を週1回ないし隔週に1回の割合で5～19回の反復投与を行ったが、いずれも鎮痛効果が再現し、耐性は観察されなかった。また L-arginine 投与で発現した鎮痛効果は naloxone 静脈内投与により拮抗された。したがって L-arginine の慢性痛患者に対する鎮痛作用は脳内での kyotorphin 量増加に起因すると考えられる。なお L-arginine の点滴中に手足および全身の温感が感じられ、快適であると述べる患者が大部分であった。血管内皮細胞において L-arginine から nitric acid (NO) が生成されることはすでに指摘されている⁵²⁾ので、上記の温感生成した NO による組織血流増加にもとづく可能性が高いと考えられる。なお L-arginine 投与により血圧は10～15 mmHg 低下したが、脈拍、呼吸などには有意の変化を認めなかった。

脳において NO が痛みの伝達に関与しているとの説 (Moncada, 個人情報) もあり、L-arginine の作用機序は複雑であるが、上述のように L-arginine による鎮痛効果が naloxone で拮抗された事実から KTP 生成による機序が主役であり、補助的に nitric acid による血流増加作用が発痛物質の除去に役立つとみなすのが現時点での妥当な解釈であろう。

L-arginine の慢性痛患者における鎮痛効果が予想以上に速やかに出現し、しかも高い有効性を示したことから、これらの患者の脳は“Arginine-Kyotorphin 欠乏状態”にあることが推定される。

今後さらに症例に加えていく必要があるが、現時点でははっきり言えることは、従来の治療法が効かなくなっていた慢性痛(持続痛)に対し、L-arginine 療法(間接的 KTP 療法)という一つの新しい治療法を開発できたということである。

以上に述べた難治性の慢性痛に対する L-arginine の優れた有効性についての新知見は1990年7月 Amsterdam での第11回国際薬理学会において発表し⁵⁴⁾、原著は投稿中である。なお予備的な知見として L-arginine の投与量はもっと少なくてすむというデータを得ており、さらに別の持続痛患者に対する効果についても検討中である。なお L-arginine は遅効性のため急性痛に対しての効果は期待できない。

VIII. ま と め

kyotorphin (KTP) が脳から単離され、化学構造の決定から生理・薬理作用の追究、生成機構、前駆物質

L-arginine の慢性痛への臨床応用へとたどってきた私たちの研究成果を中心に他の研究者の知見をも加えてまとめた。

まだ説明すべきところは残っているが、慢性痛(持続痛)における制御機構としての「Arginine-Kyotorphin 系と Enkephalin 系の連関」の重要性がヒトで明らかになってきたといえよう。

謝辞：京都大学在職中先鞭をつけた KTP の基礎研究を、定年後協力者を得て臨床へ応用し、確認することが出来たのは発見者の一人として大きな喜びである。この間協力してくださった大勢の方々に心から感謝致します。

文 献

- 1) Takagi, H., Shiomi, H., Ueda, H. and Amano, H.: Morphine-like analgesia by a new dipeptide, L-tyrosyl-L-arginine (kyotorphin) and its analogue. *Eur. J. Pharmacol.* **55**, 109～111 (1979)
- 2) Takagi, H., Shiomi, H., Ueda, H. and Amano, H.: A novel analgesic dipeptide from bovine brain is a possible Met-enkephalin releaser. *Nature* **282**, 410～412 (1979)
- 3) Yajima, H., Ogawa, H., Ueda, H. and Takagi, H.: Studies on peptides XCIV, Synthesis and activity of kyotorphin and its analogs. *Chem. Pharm. Bull.* **28**, 1935～1938 (1980)
- 4) Balaspiri, L., Kovacs, K., Gecse, A., Telegdy, G. and Neubert, K.: Synthesis and activity of kyotorphin and its analogs. *Peptides 1982*, Edited by Blaha, K. & Malon, P., p. 487～493, Walter de Gruyter & Co., Berlin (1983)
- 5) Kitabatake, S., Tsurutani, R., Nakajima, H., Tomita, K., Yoshihara, Y., Ueda, H., Takagi, H. and Imahori, K.: A novel method for the synthesis of kyotorphin, Tyr-Arg and 3H-Tyr-Arg, catalysed by tyrosyl-tRNA synthetase from *Bacillus stearothermophilus*. *Pharmaceut. Res.* **4**, 154～157 (1987)
- 6) Floersheimer, A., Kula, M.-R., Schultz, H.-J. and Wandrey, C.: Continuous production of kyotorphin. *Biotech. & Bioengin.* **33**, 1400～1405 (1989)
- 7) Vaught, J.L. and Chipkin, R.E.: A characterization of kyotorphin (Tyr-Arg)-induced antinociception. *Eur. J. Pharmacol.* **79**, 167～173 (1982)
- 8) Ueda, H., Yoshihara, Y., Nakamura, A., Shiomi, H., Satoh, M. and Takagi, H.: How is kyotorphin (Tyr-Arg) generated in the brain? *Neuropeptides*, **5**, 525～528 (1985)

- 9) Ueda, H., Yoshihara, Y., Fukushima, N., Shiomi, H., Nakamura, A. and Takagi, H.: Kyotorphin (tyrosine- arginine) synthetase in rat brain synaptosomes. *J. Biol. Chem.* **262**, 8165~8173 (1987)
- 10) Matsubayashi, K., Kojima, C., Kawajiri, S., Ono, K., Takegoshi, T., Ueda, H. and Takagi, H.: Hydrolytic deactivation of kyotorphin by the rodent brain homogenates and sera. *J. Pharm. Dyn.* **7**, 479~484 (1984)
- 11) Kubota, M., Nagase, O., Amano, H., Takagi, H. and Yajima, H.: Enkephalin analogs containing the dipeptide unit Tyr-Arg (kyotorphin). *Chem. Pharm. Bull.* **28**, 1935~1938 (1980)
- 12) Kubota, M., Kojima, H., Nagase, O., Amano, H., Takagi, H. and Yajima, H.: Further synthesis of enkephalin analogs containing the dipeptide unit Tyr-Arg (kyotorphin). *Chem. Pharm. Bull.* **30**, 2447~2451 (1982)
- 13) Takagi, H., Amano, H., Nakamura, A., Kubota, M., Nagase, O. and Yajima, H.: Morphine-like analgesic actions of enkephalin-like peptides containing the Tyr-Arg unit. *Life Sci.* **31**, 2245~2248 (1982)
- 14) Amano, H., Morimoto, Y., Kaneko, S. and Takagi, H.: Opioid activity of enkephalin analogues containing the kyotorphin-related structure in the N-terminus. *Neuropharmacol.* **23**, 395~400 (1984)
- 15) Sato, T., Sakurada, S., Sakurada, T., Furuta, S., Chaki, K., Kisara, K., Sasaki, Y. and Suzuki, K.: Opioid activities of D-Arg-substituted tetrapeptides. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **242**, 654~659 (1987)
- 16) Ueda, H., Shiomi, H. and Takagi, H.: Regional distribution of a novel analgesic dipeptide kyotorphin (Tyr-Arg) in the rat brain and spinal cord. *Brain Res.* **198**, 460~464 (1980)
- 17) Shiomi, H., Tamura, Y., Horiuchi, S., Nakamura, A. and Takagi, H.: Monoclonal antibody directed against formaldehyde conjugated kyotorphin and immunocytochemical application in the rat brain. *Brain Res.* (in press)
- 18) 田村 豊, 尾高宏治, 堀内聖子, 中村明弘, 塩見浩人, 高木博司: ラット脳における Kyotorphin 含有神経存在部位の免疫組織化学的検索. *日薬理誌* **94**, 34 P (1989)
- 19) Ueda, H., Tatsumi, K., Shiomi, H. and Takagi, H.: Analgesic dipeptide, kyotorphin (Tyr-Arg), is highly concentrated in the synaptosomal fraction of the rat brain. *Brain Res.* **231**, 222~224 (1982)
- 20) Takagi, H. and Ueda, H.: Kyotorphin in the brain may function as an endogenous pain modulator. *Biowarning System in the Brain*, Edited by Takagi, H. et al., p. 139~153, University of Tokyo Press, Tokyo (1988)
- 21) Takagi, H., Shiomi, H., Ueda, H., Akaike, A., Ueda, H., Kawajiri, S., Yamamoto, M. and Amano, H.: Identification of a new opioid peptide from the bovine brain and its mechanism of action. *Endogenous and Exogenous Opiate Agonists and Antagonists*, Edited by Way, E.L., p. 201~204, Pergamon Press, New York (1980)
- 22) Shiomi, H., Ueda, H. and Takagi, H.: Isolation and identification of an analgesic opioid dipeptide kyotorphin (Tyr-Arg) from bovine brain. *Neuropharmacol.* **20**, 633~638 (1981)
- 23) Rackham, A., Wood, P.L. and Hudgin, R.L.: Kyotorphin (Tyrosine-Arginine): Further evidence for indirect opiate activation. *Life Sci.* **30**, 1337~1342 (1982)
- 24) Sakane, T., Tanaka, C., Yamamoto, A., Hashida, M., Sezaki, H., Ueda, H. and Takagi, H.: The effect of polysorbate 80 on brain uptake and analgesic effect of D-kyotorphin. *Int. J. Pharmaceut.* **57**, 77~83 (1989)
- 25) Satoh, M., Kawajiri, S., Yamamoto, M., Akaike, A., Ukai, Y. and Takagi, H.: Effects of tyrosyl-arginine (kyotorphin), a new opioid dipeptide, on single neuron in the spinal dorsal horn of rabbits and the nucleus reticularis paraventricularis of rat. *Neurosci. Lett.* **16**, 319~322 (1980)
- 26) Janicki, P.K. and Lipkowski, A.W.: Kyotorphin and D-kyotorphin stimulate Met-enkephalin release from rat striatum in vitro. *Neurosci. Lett.* **43**, 73~77 (1983)
- 27) Janicki, P.K. and Habermann, E.: Tetanus and botulinus toxins inhibit, and black widow spider venom stimulates the release of methionine-enkephalin-like material in vitro. *J. Neurochem.* **41**, 395~402 (1983)
- 28) Nakamura, A., Nakashima, M., Sakai, K., Niwa, M., Nozaki, M. and Shiomi, H.: Delta-sleep-inducing peptide (DSIP) stimulates the release of immuno-reactive Met-enkephalin from rat lower brainstem slices in vitro. *Brain Res.* **481**, 165~168 (1989)
- 29) Lee, C.-M. and Snyder, S.: Dipeptidyl-amino-peptidase III of rat brain. *J. Biol. Chem.* **257**, 12043~12050 (1982)
- 30) Hazato, T., Kase, R., Ueda, H., Takagi, H. and Katayama, T.: Inhibitory effects of the analgesic neuropeptides kyotorphin and neo-kyotorphin on enkephalin-degrading enzymes from monkey brain. *Biochem. Int.* **12**, 379~383 (1986)

- 31) Fournie-Zaluski, M.-C., Perdrisot, R., Gacel, G., Swerts, J.-P., Roques, B.P. and Schwartz, J.-C.: Inhibitory potency of various peptides on enkephalinase activity from mouse striatum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **91**, 130~135 (1979)
- 32) Ueda, H., Yoshihara, Y., Misawa, H., Fukushima, N., Katada, T., Ui, M., Takagi, H. and Satoh, M.: The kyotorphin (Tyrosine-Arginine) receptor and a selective reconstitution with purified Gi, measured with GTPase and phospholipase C assays. *J. Biol. Chem.* **264**, 3732~3741 (1989)
- 33) Satoh, M., Ueda, H., Yoshihara, Y., Misawa, H., Fukushima, N., Katada, T., Ui, M. and Takagi, H.: Kyotorphin receptors mediate phospholipase C stimulation via Gi-protein. *Advances in the Biosciences* **75**, Progress in Opioid Research, 173~176, Pergamon Press, New York (1989)
- 34) Ueda, H., Fukushima, N., Yoshihara, Y. and Takagi, H.: A Met-enkephalin releaser, kyotorphin-induced release of plasma membrane-bound Ca^{2+} from rat brain synaptosomes. *Brain Res.* **419**, 197~200 (1987)
- 35) Janicki, P.K., Lipkowski, A.W. and Szreniawski, Z.: Effects of new kyotorphin analogs on ECoG pattern in the rat. *Activ. nerv. sup. (Praha)*, **28**, 146~147 (1986)
- 36) Satoh, M., Yamamoto, M., Kawamuki, K. and Takagi, H.: Excitatory effects of kyotorphin (Tyr-Arg) on EEG and unit discharge of cortical neuron in the rat. *Neurosci. Lett. Supp.* **9**, S100 (1982)
- 37) 佐藤公道, 高木博司: Kyotorphin について. *神経研究の進歩* **27**, 509~516 (1983)
- 38) Yamamoto, M., Kawamuki, K., Satoh, M. and Takagi, H.: Excitatory action of microelectrophoretically applied kyotorphin (Tyr-Arg) on unitary activity in the rat cerebral cortex. *Advances in Endogenous and Exogenous Opioids*, Edited by Takagi, H. and Simon, E., p. 220~222, Kodansya/Elsevier, Tokyo/Amsterdam (1981)
- 39) Stone, T.W.: A comparison of the effects of morphin, enkephalin, kyotorphin, and D-phenylalanine on rat central neurones. *Br. J. Pharmacol.* **79**, 305~312 (1983)
- 40) Yamamoto, M., Kawamuki, K., Satoh, M. and Takagi, H.: Kyotorphin (L-Tyr-L-Arg) inhibits extinction of pole-jumping avoidance response in the rat. *Neurosci. Lett.* **31**, 175~179 (1982)
- 41) Ishihara, K., Katsuki, H. and Satoh, M.: The effects of opioids and kyotorphin on long-term potentiation in the guinea-pig hippocampal CA3 in vitro. *Neurosci. Res. Supp.* **7**, S149 (1988)
- 42) Laubie, M. and Schmitt, H.: Indication for central vagal endorphinergic control of heart rate in dogs. *Eur. J. Pharmacol.* **71**, 401~409 (1981)
- 43) Mitsuma, T. and Nogimori, T.: Effects of various drugs on thyrotropin secretion in rats. *Horm. Metab. Res.* **17**, 337~341 (1985)
- 44) Bean, A.J. and Vaught, J.L.: [D-Arg]kyotorphin-induced ipsilateral rotation: evidence for vivo effects independent of Met-enkephalin release. *Brain Res.* **321**, 327~331 (1984)
- 45) Kastin, A.J., Honour, L.C. and Coy, D.H.: Kyotorphin affect aversive pecking in chicks. *Physiol. Behav.* **27**, 1073~1076 (1981)
- 46) Hirai, K. and Katayama, Y.: Effect of the endogenous analgesic dipeptide, kyotorphin, on transmitter release in sympathetic ganglia. *Br. J. Pharmacol.* **85**, 629~634 (1985)
- 47) Thomas, G., Mostaghim, R. and Ramwell, P.W.: Endothelium dependent vascular relaxation by arginine containing polypeptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **141**, 446~451 (1986)
- 48) Yoshihara, Y., Ueda, H., Fujii, N., Shide, A., Yajima, H. and Satoh, M.: Purification of a novel type of calcium-activated neuronal protease from rat brain. Possible involvement in production of the neuropeptide kyotorphin from calpastatin fragments. *J. Biol. Chem.* **265**, 5809~5815 (1990)
- 49) Ueda, H., Matsumoto, S., Yoshihara, Y., Fukushima, N. and Takagi, H.: Uptake and release of kyotorphin in rat brain synaptosomes. *Life Sci.* **38**, 2405~2411 (1986)
- 50) Ueda, H., Ge Ming, Hazato, T., Katayama, T. and Takagi, H.: Degradation of kyotorphin by a purified membrane-bound aminopeptidase from monkey brain.: potentiation of kyotorphin-induced analgesia by a highly effective inhibitor bestatin. *Life Sci.* **31**, 1865~1871 (1985)
- 51) Ito, Y., Iwaki, M., Ogiso, T., Nakamura, S., Kato, K. and Sawaki, S.: Inhibition of hydrolytic activities of human dipeptidases toward leucotrien D4 and kyotorphin by captopril. *Clin. Exp. Hypertens. [A]* **9**, 681~695 (1987)
- 52) Palmer, R.M.J., Ashton, D.S. and Moncada, S.: Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* **333**, 664~666 (1988)
- 53) Deguchi, T. and Yoshioka, M.: L-arginine

identified as an endogenous activator for soluble guanylate cyclase from neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* **257**, 10147~10151 (1982)

54) Takagi, H., Harima, A. and Shimizu, H.: A novel clinical treatment of persistent pain with L-arginine. *Eur. J. Pharmacol.* **183**, 1443 (1990)

Abstract—Physiological and pharmacological actions of a neuroactive dipeptide, kyotorphin, and its precursor, L-arginine, and clinical application. Hiroshi TAKAGI (Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University, Higashi-Osaka 577, Japan). *Folia pharmacol. japon.* **96**, 85~96 (1990)

This review describes: 1. Recent findings about the physiological and pharmacological actions of kyotorphin that was isolated from the brain. 2. Biosynthesis, distribution, release, uptake, enzymatic destruction of this peptide in the body. 3. L-Arginine was found to be a precursor of kyotorphin. 4. Clinical application of the precursor to the treatment of chronic pain.