原 著

「鍼鎮痛」の神経生理学的研究

Opioid receptor subtype の同定の試み

永 井 英 一* 影 山 照 雄 白 石 武 昌

要旨 鍼鎮痛に関与する中枢神経系内の opioid の作用を解明する目的で、視床下部の電気刺激で表出する摂食行動(LHA-ESIF)を指標として、 μ 、 δ 、 κ のそれぞれの opioid receptor subtype の agonist をラットの中脳腹側被蓋(VTA)と水道灰白質(PAG)に微量投与することにより、opioid receptor subtype の決定を試みた。

VTA は、 δ -agonist である DADLE や κ -agonist の U-50, 488H が μ -agonist の morphine よりも弱いものの、同用量ではほぼ同程度、ESIF に対する促進作用が認められ、naloxon は morphine に最も奏効した。PAG に対しては、 δ -agonist や κ -agonist は作用しなく、 μ -agonist のみが ESIF を抑制した。得られた成績などから、鍼鎮痛に関与する部位としての PAG に於ける opioid receptor の subtype は、 δ -receptor や κ -receptor でなく μ -receptor を介するものと示唆された。

I はじめに

刺鍼による鎮痛発現は良く知られているが、その作用機序は神経説、体液説などあるが、未だ不明な点が多々あるのも事実である。その鍼鎮痛発現と morphine によって得られる鎮痛が、同一のあるいは共通の求心路を経て、鎮痛が発現される¹⁻³⁾。これらの鎮痛発現に、視床下部や中脳水道灰白質 periaqueductal gray (PAG) が関与することも知られている^{3,4)}。また腹側被蓋 ventral tegmental area (VTA) や PAG には免疫組織学的検索により、高濃度に opioid receptor が存在し、且つ両者の作用は相反する⁵⁾。即ち、VTA に opioid μ -receptor

agonist である morphine を微量投与すると、視床下部外側野の摂食中枢 lateral hypothalamic area (LHA) の電気刺激による摂食 electrical stimulation induced feeding (LHA-ESIF) を強化させ⁶⁾、PAG への投与ではそれを抑制する⁵⁾という。

従って、この VTA PAG に対する opioid の作用、特にこの morphine の作用から、少なくとも一個以上の receptor に作用すると思われるが、明らかでないのが現状である。

一方、Shiraishi, et al は LHA の特定の部位の特定のニューロン(群)が直接摂食行動やそれに伴う自律機能に直接関与していること等を報告している^{7,8)}。

本研究の目的は、鍼鎮痛や morphine により発現する鎮痛に関与する opioid receptor の決定を行うことにあったので、従って、従来の研究の一環として、feeding、特に LHA-ESIF を指標として、VTA や PAG にある opioid receptor の subtype を決定するため、現在まで知られている opioid

* Eiichi NAGAI 日本鍼灸理療専門学校

共同研究者：Teruo KAGEYAMA 勸東洋医学研究所
Takemasa SHIRAISHI 東海大学医学部第一生理学教室

Key Words : opioid receptor, acupuncture analgesia, hypothalamus, electrical-stimulation induce feeding

receptor subtypeのうち、 μ 、 δ 、そして κ のそれぞれの選択的作用薬 selective agonist⁹⁻¹¹⁾を用い、opioidの中脳神経内での作用を解明することにし、二三の興味ある知見が得られたので報告する。

II 実験方法

実験はすべて Wistar-SPF 雄性ラット、実験時の体重350~480g, を供試した。体重250~280gのラットの一侧の視床下部外側野(LHA)に、刺激用単極電極(直径約250 μ m, 先端2mmを除きカニューレーティングしたステンレススチール)を, feedingに直接関与する neuron 分布の最も高い部位である^{7,8)} bregma から後方(p)3.5mm, 側方(l)2.0mm, 深さ(v)頭頂骨から8.0~8.5mmに、また、微量投与用カニューレ(ステンレススチール皮下針, 外径0.35mm, 内径0.20mm)をPAG(p5.6mm, 10.3mm, v4.6~5.6mm), VTA(p3.4mm, l0.5mm, v8.5~9.0mm)に Nembutal (50mg/kg, i.p.) 麻酔下で植込んだ。

LHA-ESIFは、刺激電圧0.1~10v, パルス幅0.5ms, 頻度20~80Hz, 20秒のパラメーターで行い、刺激終了後25秒間、即ち開始から45秒間観察し45mgのペレットを3個摂取することを「正試行」とすることにした。

実験は、動物が手術から回復した7~10日後、約30×30cmの前述のペレットをおいたケージ内にいれ、20分間自由に摂食させた。これにより実験環境への慣れと満腹状態を維持した。ESIFは、先の条件を種々変え、個々のパラメーターを確立するための予備実験を行った。ESIFの刺激頻度に対する応答性は、20~80Hzの間で明らかに、VTA, PAG共にsaline投与の対照実験(いずれもn=4)において、頻度依存性が認められた。本実験ではその内、中等度頻度である50Hzで得られた成績について報告する。

各opioid receptor agonistの微量投与は、VTA投与は1nmolと10nmol, PAGには2nmolと20nmolのそれぞれの用量を、0.05 μ l/minの速度で5分間、即ち0.25 μ lで投与した。この微量投与は、先のガイドカニューレに、注入用カニューレ(ステンレススチール, 外径約0.3mm, 内径0.18mm)にポリエチレンチューブで、1 μ l用Hamilton micro-

syringe (Hamilton Co. Reno, Nevada, USA)よりESIFの約30分前に注入した。

本実験に用いたopioid receptorのselective agonistsは、一般に μ -receptorはmorphine, β -endorphine, δ -receptorはmet-, leu-, enkephalinそして κ -receptorはdynorphineである¹¹⁾といわれているので、 μ -agonistとしてmorphine(塩酸モルヒネ, 三共)¹¹⁾, δ -agonistとしてはDADLE ([D-Ala², D-Leu⁵]-Enkephalin, Sigma)¹¹⁾, κ -agonistは, dynorphine-Bよりも κ -receptor選択性が高いというU-50,488H(trans-3, 4-dichloro-N-methyl-N-(2-(1-pyrrolidinyl) cyclohexyl)-benzeneacetamin)¹¹⁾を用いた。

実験は先の予備実験等の結果から、それぞれ三種のagonistsをVTAにはそれぞれsterile salineに溶解した1nmolと10nmolを、PAGには2nmolと20nmol及びsalineのそれぞれ三種、計14通りを、個々の動物に繰返しat randomに1日10回を越えないように投与し、3日の間隔を置き次の残りの実験を再開した。

またNaloxone (NLX) 2mg/kg. i. p. 1時間前処置に対するそれぞれの三種のopioid agonistsのVTA, PAG投与による影響も観察した。

すべての実験終了後、従来¹²⁾に従って刺激部位であるLHA, 微量投与部であるVTA, PAGでの刺激電極並びにカニューレの位置の組織学的検索を行い、標的部位より0.5mm以上ずれている例、及び得られた数値がKolmogorov-Smirnovの棄却検定で有意であったものについては、その後の統計学的処理より除いた。

実験結果は、各群の平均値とその標準偏差と誤差を算出し、分散をBartlettの検定を行い、平均値の検定は一元分散分析(ANOVA)でF検定を、各群間の検定はDunnet¹³⁾, 又はDuncan¹⁴⁾の方法により群間多重比較を行った。有意水準は危険率5%以下とした。

III 実験成績

1. LHA-ESIFに対するopioidのVTA内微量投与の影響

刺激のパラメーター、0.1ms, 50Hz, 0.1~10v, 20secで極めて再現性の高い、LHA-ESIFが得

られた。この刺激終了後25秒間のLHA-ESIFに対するVTA内への各opioid subtype receptor agonistの影響は、図1に示した。Saline投与の対照群(n=5)が 16.6 ± 1.3 (mean $\pm$ S.D)秒であった。

これに対し、 μ -, δ -, κ -のそれぞれのagonistの低用量群(1 nmol)はmorphine(n=4) 15.8 ± 1.7 秒, DADLE 16.2 ± 1.5 , U-50,488H 16.8 ± 1.5 秒といずれも対照群に比し、有意の変化が認められなかった。

一方、それぞれの高用量(10 nmol)群の成績はmorphine, DADLE, U-50,488Hともそれぞれ有意($p < 0.01$)に短縮、即ちLHA-ESIFを促進した。特にmorphineのそれは対照群 16.6 ± 1.3 秒に対し、 8.5 ± 1.7 秒と概ね半減させた。この各agonistsの高用量群の統計学的結果については表1にまとめた。分散分析(一元取置分散分析ANOVA)F検定では $0.01 < P < 0.006$ と極めて有意であった。

各群間の平均値の差も前述のごとくSaline投与の対照群に比し、Duncanの多重比較検定の結果いずれも明らか($p < 0.01$)な有意性を示した。しかしながら、morphineはDADLE及びU-50,488Hに対し、DADLEはU-50,488Hに対しては有意差は認められなかったが、三者の間ではmorphineがもっともESIFに対する促進作用は強かった。

2. LHA-ESIFに対するopioidのPAG内微量投与の影響

VTAの場合と同様の刺激パラメーターでのPAG内への各opioid subtype receptor agonistsのLHA-ESIFに対する作用は、VTA投与の場合と全く異なっていた。それぞれの低用量、高用量の成績を図1に示した。

PAGへのsaline投与の対照群(n=4) 14.8 ± 2.1 秒に比し、agonistsの作用は三者とも低用量(2 nmol)では指摘すべき差を認めることは出来なかつ

Fig. 1 Effects of three types of opioid receptor agonists on the LHA-ESIF(lateral hypothalamus electrical stimulation induced feeding) in rats.

VTA: ventral tegmental area PAG: periaqueductal gray

Table. 1 Statical analysis of effects of three types of opioid-agonists of high-dose (into VTA, 10nmol ; into PAG, 20nmol) microinjection on the LHA-ESIF in rats.

Effects of OPIOID subtypes agonists(high-dose) on LHA-ESIF

VTA:10 nmol

	saline	morphine(μ-)	DADLE(-)	U50,488H(κ-)	
n	5	4	5	5	
mean	16.6	8.5	10.6	10.6	
variance	1.79991	3	5.8	11.3	
s d	1.34164	1.73205	2.40832	3.36155	
s e	.5999	.806025	1.07703	1.50333	
ANOVA					
source	SS	DF	MS	Vr	Fv.(1%)
between	173.084	3	57.6948	10.2296**	5.41682
within	84.599	15	5.6399		
total	257.684	18			
F(df 3/15) 0.00643<5.41682(1%)					
Duncan's test					
T		8.1	6	6	
t		4.56515	4.7841	4.92642	
significance		**	**	**	

PAG:20 nmol

n	4	5	4	5	
mcan	14.75	21	16.25	16.4	
variance	4.91667	8.5	2.91667	7.2999	
s d	2.21736	2.91548	1.70783	2.701856155	
s e	1.68687	1.30384	.85391	1.208550333	
ANOVA					
source	SS	DF	MS	Vr	Fv.(5%)
between	102.912	3	34.3039	5.53928*	3.34389
within	86.6997	14	6.19284		
total	189.611	17			
F(df 3/14) 1.01617<3.34389(5%)					
Duncan's test					
T		6.25	1.5	1.65	
t	①	4.96954	3.75375	3.85997	
significance		**			
		②	4.75	4.6	
			3.57667	3.75373	
			*	*	

* p<0.05 ** p<0.01
(further detail information see TEXT)

た。しかし、PAGへの各薬物の高用量(20 nmol)の影響は興味深かった。即ち、この実験の各群の平均値の分散分析(ANOVA F検定)は5%以下($0.010 < p < 0.01016$)の危険率で有意であった。個々の実験群での成績は、対照群に比し μ -receptor agonistのmorphineは 21.0 ± 2.9 ($n = 5$)秒と明らか($p < 0.01$)にESIFを延長した。しかし、同じ高用量群でも δ や κ -receptor agonistsに対しては、いずれも対照群に比してはそれぞれ 16.3 ± 1.7 ($n = 4$), 16.4 ± 2.7 ($n = 6$)と有意差は認められなかった。一方、agonist群間での比較では、morphineが他の二者のopioid agonistsに対して、それぞれ5%以下の危険率で有意($t = 3.754$, $3.860 < 4.970$)な抑制効果を示した。このことは、PAGには先のVTAと異なりopioid receptorのsubtypeとしては δ -receptorや κ -receptorでなく μ -receptorのみ、あるいは μ -receptor優位であることを示唆するものであった。

3. LHA-ESIFに対する各種opioids-agonistsの影響におよぼすNaloxoneの効果

各種高用量(10 nmol)opioids agonistsのLHA-ESIFに対する作用に及ぼす、所謂opioids antagonistとして知られているNaloxon(以下NLX)の前処置(1時間前、2 mg/kg. i. p.投与)の影響を観察し、その結果の一部を図2に示した。

1) VTAに於けるNLXの検討

NLXの作用は、Saline投与の対照群においても認められた。Saline単独(16.6 ± 1.3 秒, $n = 5$)に対し、NLXの前投与後のSalineは 18.8 ± 1.9 秒と有意($p < 0.05$)にLHA-ESIFを延長するという結果であった。それぞれのopioids agonistsに対するNLXの影響は、 μ -receptor agonist morphineに対して、単独の 8.5 ± 1.7 秒が、NLXにより 17.8 ± 1.7 秒と、有意($p < 0.01$)に延長、即ちmorphineによるLHA-ESIFに対する促進作用をほとんど完全に抑制した。

Fig. 2 Effects of naloxone(NLX) on the LHA-ESIF with high-dose of three types of opioid-agonists in rats.

δ -receptor agonist である DADLE に対しては、単独が 10.6 ± 2.4 秒に対し、NLX により 16.2 ± 3.3 秒、 κ -receptor agonist の U-50,488H は単独が 10.6 ± 3.4 秒、NLX によって 16.8 ± 1.9 秒といずれも有意 ($p < 0.01$) にそれぞれの agonist の作用を NLX により抑制された。尚、Saline 投与の対照群を含め、それぞれの +NLX 群の四群間にはいずれも差は認められなく、従って VTA に対する NLX の作用は一元的なものと思われた。

2) PAG に於ける NLX の検討

NLX の PAG に於ける各 opioid agonist に対する作用は、VTA の場合とかなり様相が異なっていた。即ち、Saline 投与の対照群に対しては、Saline 単独の場合の LHA-ESIF が 14.8 ± 2.1 秒 ($n = 4$) であったが、+NLX の影響は 15.8 ± 1.7 秒であった。これは VTA の場合とは異なり有意差は認められなかった。一方、各 agonists の作用に対する +NLX の作用は、 δ 、 κ -の両者の agonist である DADLE、U-50,488H 共に Saline に対する場合と同様、何等の変化を指摘することはできなかった。

しかしながら、 μ -receptor agonist である morphine に対する +NLX の作用は、PAG の場合極めて特徴的であった。morphine 単独では前述の如く Saline 単独投与対照群 (14.8 ± 2.1 秒) に比し、 21.0 ± 2.9 秒 ($n = 5$) と明らかに PAG に於ける LHA-ESIF を抑制したが、+NLX により 15.2 ± 1.5 秒と有意 ($P < 0.01$) に morphine の作用を消滅せしめ、概ね Saline 単独投与の対照群のレベルに戻すという、NLX の明らかな morphine 即ち、 μ -receptor に対する拮抗作用を示した。

この成績は PAG に於ける opioid receptor は μ -receptor のみ存在する事を示唆するものであろうか。

IV 考 察

鍼による鎮痛発現機序を解明する事を目的に、摂食中枢として知られている視床下部外側野の電気刺激によって惹起される摂食行動 (LHA-ESIF) を指標として、中枢神経系内の opioids の関与、特にその receptor subtype を決定しようと試み二、三の興味ある所見を得た。

得られた成績は、VTA の opioid が、この LHA-

ESIF を促進することを確認し、 δ - と κ -receptor が μ -receptor と同様に関与することを示唆するものであった。しかも、 δ -や κ -receptor agonist である DADLE 及び U-50,488H 共に μ -receptor agonist である morphine と同程度の濃度で奏効した。このことは三者それぞれの opioid receptor の分布が均一であることを意味するのであろうか。三者共に Saline 投与の対照に対しては有意差 ($p < 0.01$) があつたものの、三者間での推計学的検定では、差は認められなかった。しかし、morphine の作用が最強であつたことは、先の報告^{5,6)}を支持する成績であつた。このことは、 δ -や κ -receptor に対して、DADLE や U-50,488H は極めて選択的であるという⁹⁻¹¹⁾ことから、本研究で得られた成績は意義有るものかも知れない。

この三者間の作用の問題は、naloxone が有意差があるが DADLE や U-50,488H に対してよりも、morphine に対しての拮抗作用から考えても morphine が第一位であると肯定せざるを得ない成績であつた。このことから、morphine は primary に μ -receptor に効果を及ぼすことを確認すると同時に、換言すれば naloxone は μ -receptor に対して最も選択的に拮抗効果を及ぼす、という成績¹⁵⁾をも支持するものであつた。

一方、PAG に於いて、DADLE と U-50,488H が完全に効果を及ぼさなかった事は、あるいは前述の VTA に於ける効果度の低かった事を考慮に入れても、opioid の δ -や κ -receptor は PAG への morphine の microinjection によって示した LHA-ESIF の抑制には、ほとんど何等の関与をしていないことを意味する、と思われる。この事は、 δ -や κ -receptor が免疫組織学的検索により、この PAG 近旁では検出されないこと¹⁶⁻¹⁸⁾により支持されると思われる。

本研究での PAG への μ -receptor agonist である morphine の成績も、これを支持するものである。

いずれにせよ、本研究により LHA-ESIF を指標として、中枢神経系内の opioid receptor の関与を、その subtype 別に決定しようとした試みは完全とはいかないまでも、まず初期段階での目的は果たしたと思われる。

以上の成績等から、従来より鍼鎮痛等に関与する部位として問題となっている PAG に於ける opioid

receptor の subtype は、 δ -や κ -receptor でなく μ -receptor を介して行っていることを、間接的に示唆するものであった。今後は、直接鎮痛効果に及ぼすこれら opioid receptor の subtype との関連性についての解明が、残された課題となった。

本研究の要旨は、第39回全日本鍼灸学会学術大会(1989年6月3日・金沢)に於いて発表した。

尚、本研究の一部は、(財)東洋医学研究所の援助によった。ここに謝意を表する。

引用文献

- 1) Acupuncture anesthesia research coordinating group, Shanghai First Med. Coll. : The relationship between the human CSF levels of morphine like substance and acupuncture analgesia. 上海第一医学院学报, 1 ; 13-16, 1978.
- 2) Akil, H., D. J. Mayer & J. C. Liebeskind. : Antagonism of stimulation-produced analgesia by naloxone, a narcotic antagonist. Science, 188 ; 941-943, 1975
- 3) Takeshige, C. et al. : Relationship between midbrain neurons (periaqueduct central gray and midbrain reticular formation) and acupuncture analgesia, animal hypnosis. Adv. Pain Res. Therap., 3 ; 615-621, 1979.
- 4) Lewis, V. A. & G. F. Gebhart. : Evaluation of the periaqueductal central gray (PAG) as a morphine-specific locus of action and examination of morphine-induced and stimulation-produced analgesia at coincident PAG loci. Brain Res., 124 ; 283-303, 1977.
- 5) Jenck, F. et al. : Opioid receptor subtypes associated with ventral tegmental facilitation and periaqueductal gray inhibition of feeding. Brain Res. 423 ; 39-44, 1987.
- 6) Jenck, F. et al. : Opioid receptor subtypes associated with ventral tegmental facilitation of lateral hypothalamic brain stimulation reward. Brain Res. 423 ; 34-38, 1987.
- 7) Shiraishi, T. et al : 2-deoxy-D-glucose effects on hypothalamic neurons, and on short and long term feeding. In : Hoebel, B. G. and D. Novin., eds. The Neural Basis of Feeding and Reward. Brunswick : Haerlinstitutew for Electrophysiology Research ; 373-390, 1982.
- 8) Shiraishi, T. & A. D. Simpson. : Lateral hypothalamic neuron responses to electroosmotic 2-deoxy-D-glucose. Brain Res. Bull. 8 ; 645-651, 1982.
- 9) Martin, W. R. et al. : The effects of morphine and nalorphine-like drugs in the non-dependent and morphine-dependent chronic spinal dog. J. Pharmacol. Exp. Ther., 197 ; 517-532, 1978.
- 10) Mosberg, M. I. et al. : Bis-penicillamine enkephalins possess highly improved specificity toward delta opioid receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80 ; 5871-5874, 1987.
- 11) Von Voightlander, P. F. et al. : U-50, 488H : a selective and structurally novel non- μ (kappa) opioid agonist. J. Pharmacol. Exp. Ther. 224 ; 7-12, 1983.
- 12) Shiraishi, T. & M. Mager. : Hypothermia following injection of 2-deoxy-D-glucose into selected hypothalamic sites. Am. J. Physiol. 2 ; 239 ; R265-R276, 1980.
- 13) Dunnet, C. W. : A multiple comparison procedure for comparing several treatment with a control. J. Am. Statist. Assoc. 50 ; 1096-1121, 1955.
- 14) Duncan, D. B. : Multiple range and multiple F test, Biometrics. In : A. W. Hayers, Principle and Methods of Toxicology. Raven Press, pp281-283, 1982.
- 15) Goldstein, S. E. et al : Dynorphine-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 76 ; 6666-6670, 1979.
- 16) Goodman, R. R. et al. : Differentiation of delta and mu opiate receptor localization by light microscopic autoradiography. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 77 ; 6239-6243, 1980.
- 17) Goodman, R. R. & S. H. Snider. : K opiate receptors localized by autoradiography to deep layers of cerebral cortex : relation to

sedative effects. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 79; 5703-5707, 1982.

- 18) Quirion, R. et al. : Autoradiographic distribution of mu and delta opiate receptors in rat brain using highly selective ligands. Life Sci. 33; Suppl. 1, 227-230, 1983.

(〒150 東京都渋谷区桜が丘19-4

日本鍼灸理療専門学校)

Neurophysiological Study of The Acupuncture Analgesia : Role of Opioid Receptor Subtypes

Eiichi Nagai

Hanada Gakuen - Nippon School of Oriental Medicine

Teruo Kageyama

Research Institute of Oriental Medicine

Takemasa Shiraishi

Department of Physiology Tokai University School of Medicine

SUMMARY

It is well known that opioids cause analgesia and feeding elicitation by action in the either periaqueductal gray (PAG) or ventral tegmental area (VTA).

We have investigated that determination of opioids receptor subtype on the lateral hypothalamic area, as feeding center, electrical stimulation induced feeding (LHA-ESIF) followed microinjection of μ -(morphine), δ -(DADLE) and κ -(U50, 488H) receptor selective agonists and physiological saline into the VTA and PAG of chronic Wistar male rats, weighing between 350 and 480 g. with stimulation fixed at a modulate level, 50 Hz. time to eat three-45 mg pellets within 45 sec. were studied.

Dose of 10 (but not 1) nmol of three agonists microinjected into the VTA significantly ($p < 0.01$) reduced time of LHA-ESIF, these agonists were almost equally effective at this dose. Naloxone(NLX) reversed the effects of each agonists. NLX was slightly more effective agonist morphine than against DADLE or U50, 488H. This results suggest that all three receptor subtype may be contributed to the VTA facilitation of the LHA-ESIF, and NLX is a selective antagonist of μ -receptor.

In the microinjection of PAG, morphine (20, but not 2 nmol) showed increasing LHA-ESIF, while both δ - and κ - agonists were each without effects. These results indicated that the PAG inhibition of LHA-ESIF is mediated solely by μ -receptor.

It is, thus suggests that opioids receptor subtypes on the PAG, as site of the acupuncture analgesia, might be contributed, neither δ - nor κ - receptors, through only via μ -receptor.