アジュバント関節炎ラットにおける疼痛閾値と副腎髄質および プラズマ met-enkephalin 様ペプチド含量との相関関係

魏 尔清・工藤照夫・猪木令三^{*1)}、寺沢道夫・中尾 達^{*2)}

Correlations between pain threshold and met-enkephalin-like peptide levels in adrenal medulla and plasma of adjuvant-induced arthritic rats Changes of endogenous opioid peptide system by pain stimuli were examined using adjuvant-induced arthritic rats. Following the 5th day after adjuvant inoculation, the met-enkephalin-like peptide content in plasma was significantly decreased while after the 12th day, the peptide content was markedly increased in adrenal medulla. Significant correlations were found between pain threshold and met-enkephalin-like peptide contents in adrenal medulla and plasma. It was suggested that a long term of lowering of plasma opioid peptide level was necessary to lower the pain threshold, and was followed by compensatory promotion of the opioid peptide processing in adrenal medulla. Y-20003, a new nonsteroidal antiinflammatory agent without inhibition of prostaglandin biosynthesis, showed an analgesic effect which was significantly antagonized by naloxone or Win 44,441-3, suggesting that the endogenous opioid peptide system may be involved in the analgesic mechanism of Y-20003.

Er-Qin Wei・Teruo Kudo・Reizo Inoki^{*1)}

Michio Terasawa・Tohru Nakao^{*2)}

^{*1)} Department of Pharmacology, Osaka University Faculty of Dentistry

^{*2)} Research Laboratories, Yoshitomi Pharmaceutical Industries, Ltd.

key word: chronic pain, met-enkephalin-like peptides, adjuvant-induced arthritis, Y-20003, opiate antagonists

急性侵害刺激時に、プラズマにおける β -endorphin 含量が増加することはよく知られている¹⁻⁴⁾。また、leu-enkephalin の含量が著明に増大することも報告されている⁵⁾。しかし、一方では、慢性疼痛患者では逆に、プラズマおよび脳脊髄液の β -endorphin 含量が健常者と比較して著明に減少し⁶⁾、また、脳脊髄液中の met-enkephalin 含量も減少することが報告されている⁷⁾。このような疼痛刺激による生体内オピオイドペプチド系の変動が、いかなる生理的意義をもつかについては、現在、なお明らかではない。

最近、Martiniら⁸⁾は、ヒトプラズマ中の β -endorphin 含量が非ステロイド系酸性抗炎症薬の diclofenac によって増大されること、また、Sacerdote ら⁹⁾は、ラットにおいてこの薬物が脳下垂体の β -endorphin 含量を低下させ、視床下部のそれを増大させることを報告し、解熱性鎮痛薬の作用機序の一つとして、プロスタグランジン合成阻害作用以外に、内因性オピオイドペプチドの関与を示唆した。

さらに、Knepel ら¹⁰⁾は、ラット脳下垂体中葉を用いての *in vitro* での実験で、 β -endorphin 様ペプチドの遊離が indomethacin によって増強されることを認めてい

る。

本研究では、慢性炎症疼痛疾患モデルとして、アジュバント関節炎ラットを用い、関節炎発症前後における生体内オピオイドペプチド系の変動を検討し、併せて、最近合成されたプロスタグランジン合成阻害作用を有しない非ステロイド系塩基性抗炎症薬 Y-20003(10-amino-6-methyl-1,2,3,4,7,8,9,10-tetrahydrobenzo[f]quinolin-3-one)(図1)の鎮痛作用との関連を考察した。

方 法

実験には Lewis 系雄性ラットを用いた。尾根部にアジュバントとして流動パラフィンに懸濁した結核死菌(R35H5型)0.5 mg/0.1 ml を接種した。接種後、5, 12, 20日目に水置換法で足蹠浮腫率、天秤式加圧装置で圧痛閾値(Randall & Selitto 法)を測定した。Y-20003 投薬群は、アジュバント接種後15日目から1日1回、5日間治療的に連続、50 mg/kg/day を経口投与し、また、実験によっては、オピエート拮抗薬として naloxone(2mg/kg/day, s.c)あるいは Win 44,441-3(1 mg/kg/day, s.c)をそれぞれ Y-20003 投与10分前に投与した。同時に、毎日投薬前に足容積と圧痛閾値を測定した。これらの測定終了後、動物を頸動脈切斷採血し、両側副腎髄質および上下4本の切歯歯髄を摘出した。これらの臓器はそれぞれの湿重量を測定した。血液は heparin および actino-

^{*1)} 大阪大学歯学部薬理学教室

^{*2)} 吉富製薬株式会社中央研究所

(10-amino-6-methyl-1,2,3,4,7,8,9,10-tetrahydrobenzo [f] quinolin-3-one)

図1 Y-20003の化学構造式

図2 アジュバント接種による疼痛閾値と足容積の経時変化
(接種前と比較して, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

nin(20 μM)を添加して遠心分離し, プラズマを得, これを塩酸性アルコールにて除蛋白し, 遠心分離してその上清を凍結乾燥した。

met-enkephalin 様ペプチド含量の測定は, met-enkephalin 抗血清を用いる2抗体法によるラジオイムノアッセイで行った¹¹⁾。用いた met-enkephalin 抗体の交叉反応性は, leu-enkephalin とは0.4%, met-enkephalin-Arg-Phe とは44%, substance P とは $5 \times 10^{-5}\%$, bradykinin とは $10^{-5}\%$ 以下であった。

結果

(1) アジュバント接種前後における疼痛閾値と足容積の変化

アジュバント接種前のコントロールと比較して, 接種後5日目には疼痛閾値および足容積のいずれにおいても有意な変動は認められなかったが, 接種後12日目から20日目において, 疼痛閾値は著明に低下し, 一方, 足容積は著明に増大した(図2)。足容積の増大と疼痛閾値の低下とはよく相関した。

(2) アジュバント関節炎発症前後における生体内met-enkephalin 様ペプチド含量の変化

プラズマの met-enkephalin 様ペプチド含量は, アジュバント接種後5日目以降, 著明に減少したが, 一方, 副腎髄質のそれは, 5日目においては有意に変動せず, 12日目からは著明に増大した。歯髄の met-enkephalin 様ペプチド含量は, 全期間を通じて変動しなかった(図3)。(1)と(2)の結果を解析すると, 実験の全期間を通じて副腎

図3 アジュバント接種による副腎髄質, 歯髄およびプラズマの met-enkephalin 様ペプチド含量の経時変化
(接種前と比較して, ** $P < 0.01$)

図4 アジュバント関節炎ラットにおける疼痛閾値と副腎髄質 met-enkephalin 様ペプチド含量との相関関係

髄質のペプチド含量と疼痛閾値との間には, 有意の負の相関関係が認められた($r = -0.5348$, $P < 0.01$)のに対して, プラズマのペプチド含量と疼痛閾値の間には相関関係は認められなかった($r = 0.3157$, $P > 0.05$)。しかしながら, 5日目のデータを除外して, 同様に検討すると, 副腎髄質のペプチド含量と疼痛閾値の間には, さらに有意性の高い負の相関関係が認められた($r = -0.5939$, $P < 0.01$)(図4)ばかりでなく, プラズマのペプチド含量と疼痛閾値の間にも有意の正の相関関係が存在することが認められた($r = 0.6588$, $P < 0.01$)(図5)。

また, 副腎髄質の湿重量(mg/100g 体重)は, アジュバント接種後5日目には有意な変動は認められなかったが, 接種後12日目と20日目には, それぞれ $59.8 \pm 9.6\%$ ($n=7$, $P < 0.01$), $53.0 \pm 3.9\%$ ($n=7$, $P < 0.01$)と著明

図5 アジュバント関節炎ラットにおける疼痛閾値とプラズマ met-enkephalin 様ペプチド含量との相関関係¹²⁾

図7 アジュバント関節炎ラットにおける Y-20003 の鎮痛作用のオピエート拮抗薬による拮抗 (対照群と比較して, ** $P<0.01$. Y-20003 群と比較して * $P<0.05$. ** $P<0.01$)

図6 アジュバント関節炎ラットにおける疼痛閾値に対する Y-20003 作用 (対照群と比較して, * $P<0.05$)

に増大した。

(3) Y-20003 の鎮痛作用およびそのオピエート拮抗薬による拮抗

アジュバント接種後15日目から、1日1回、Y-20003を5日間経口投与すると、アジュバント接種による疼痛閾値の低下は正常レベルに回復した。すなわち、著明な鎮痛作用が認められた(図6)。しかし、足容積の増大に対しては、Y-20003 は抗浮腫作用をまったく示さなかった。接種後18日目(投薬後3日目)、オピエート μ -拮抗薬である naloxone およびオピエート κ -拮抗薬である

Win 44,441-3 をそれぞれ Y-20003 に併用処置すると、Y-20003 の鎮痛作用が拮抗され、疼痛閾値は逆転した(図7)。

考 察

1975年の Hughes ら¹³⁾による内因性鎮痛物質である met-enkephalin および leu-enkephalin の発見以来、これまでに数多くのオピオイドペプチドが見出されてきて、それらと疼痛、あるいは鎮痛との間の関係が多くの研究者の興味の対象となっている。冒頭で述べたように、急性侵害刺激時に生体内オピオイドペプチド系、特にプラズマにおけるオピオイドペプチド含量が増大することはよく知られているが^{1,5)}、一方では、慢性疼痛刺激時には逆に、プラズマおよび脳脊髄液中のオピオイドペプチドは減少することが報告されていて^{6,7)}、これらのオピオイドペプチドの生理的役割については、なお不明な点が多い。

本研究では、慢性炎症性疼痛疾患モデルとしてアジュバント関節炎ラットを用い、慢性多関節炎炎症の症状である浮腫と疼痛、ならびにそれらに対応する生体内オピオイドペプチド系、特に副腎髄質およびプラズマにおける met-enkephalin 様ペプチド含量を指標として、それらの発症前後における変動を詳細に検討した。

まず、足容積と疼痛閾値との変動を検討すると、図2に示したように、アジュバント接種後5日目においては足容積と疼痛閾値とは著明な変動が認められなかった。これは5日目までは関節炎の潜伏期であることを示すものと考えられた。接種後12日目から20日目においては、足容積は増大し、疼痛閾値は低下して、発症は明

らからであった。一方、プラズマおよび副腎髄質の met-enkephalin 様ペプチド含量について検討すると、アジュバント接種後5日目以降プラズマの met-enkephalin 様ペプチド含量は著明に持続的に減少したが、副腎髄質のそれは5日目には有意に変動せず、12日目から疼痛閾値の低下に対応して、副腎髄質の met-enkephalin 様ペプチド含量は著しく増大した(図3)。また、副腎髄質の100g 体重当たりの湿重量も著明に増加した。

これらの結果は、疼痛閾値の低下に至るまでに、プラズマのオピオイドペプチドレベルの持続的な低下が必要であることを示唆するとともに、また、そのことが副腎髄質において代償的に、あるいは生体自己防衛的に組織を増生させ、オピオイドペプチド含量を増大させたことを示唆するものかもしれない。また、結果の(2)において述べたように、実験の全期間を通じてみた場合、疼痛閾値がプラズマの met-enkephalin 様ペプチド含量よりも副腎髄質のそれとよく対応したことは、疼痛刺激があつてはじめて、副腎髄質においてオピオイドペプチドの産生が促進されることを示唆するものとも考えられる。

しかしながら、先に述べたように、アジュバント接種後5日目までは潜伏期と考えられ、関節炎症状の発現は認められず、また、ヒトの慢性炎症性疼痛疾患においては、プラズマ中のオピオイドペプチドレベルが有意に低下する^{6,7)}ことが知られているので、発症と生体内オピオイドペプチドレベルとの関係をより明確にするため、結果の(2)において述べたごとく、潜伏期のデータを除外して疼痛閾値と副腎髄質およびプラズマの met-enkephalin 様ペプチド含量との関係を検討した。

図4および図5に示したように、疼痛閾値と副腎髄質およびプラズマの met-enkephalin 様ペプチド含量との間には、それぞれ有意な負および正の相関関係が存在することが認められた。Panerai ら⁶⁾および Simonnet ら⁷⁾は、慢性疼痛疾患患者では、プラズマおよび脳脊髄液におけるオピオイドペプチドの含量の低下と慢性疼痛との間に密接な関係が存在することを示したが、本研究における上記の結果は、彼らの臨床的事実を実験的にアジュバント関節炎ラットにおいて確かめたものである。

他方、本研究において歯髄の met-enkephalin 様ペプチド含量が実験の全期間を通じて変動しなかった(図3)ことは、歯髄のオピオイドペプチドが局所的な役割しか演じていないことを示唆するものかもしれない。

一方、はじめに述べたように、プロスタグランジン生合成阻害作用を有する非ステロイド系酸性抗炎症薬が、生体内オピオイドペプチド系の変動をもたらし、その鎮痛作用が一部このオピオイドペプチド系を介している可能性があることが、最近報告されている^{8~10)}。本研究では、プロスタグランジン生合成阻害作用を示さず、持続性の鎮痛作用を有することが知られている新規化合物

Y-20003 を用いて上記の点についてさらに詳細に検討した。

図6において示したように、本薬物をアジュバント接種後15日目から治療的に投与すると、疼痛閾値の著明な回復が認められたが、しかし、データは示していないが、抗浮腫作用はまったく認められなかった。この結果は、Y-20003 の作用機序を考察するうえにおいてきわめて重要であると考えられた。先に述べたように、アジュバント関節炎ラットにおいては、疼痛閾値とプラズマの met-enkephalin 様ペプチドレベルとの間に密接な関係が存在したことから、Y-20003 の疼痛閾値回復作用がオピオイドペプチド系を介するものであるかどうか知するため、本研究ではオピエート拮抗薬である naloxone (μ -拮抗薬)および Win 44,441-3 (κ -拮抗薬)をそれぞれY-20003 と併用した。

図7に示したように、Y-20003 の鎮痛作用はこれらの拮抗薬によってそれぞれ有意に拮抗された。これらの事実に加うるに、正常ラットでの予備的な実験で、Y-20003 は副腎髄質の met-enkephalin 様ペプチド含量を著明低下させること、また、プラズマのそれを増大させる傾向があることを、筆者らは先に認めている。

以上、これらの事実、Y-20003 の鎮痛作用が met-enkephalin などの内因性オピオイドペプチド系を介するものであることを強く示唆している。

文 献

- 1) Guillemin, R., Vargo, T., Rossier, J., Minick, S., Ling, N., Rivier, C., Vale, W., Bloom, F.: β -Endorphin and adrenocorticotropin are secreted concomitantly by the pituitary gland. *Science* 197: 1367-1369, 1977.
- 2) Rossier, J., French, E.D., Rivier, C., Ling, N., Guillemin, R., Bloom, F. E.: Foot-shock induced stress increases β -endorphin levels in blood but not brain. *Nature* 270: 618-620, 1977.
- 3) Höllt, V., Przewlocki, R., Herz, A.: Radioimmunoassay of β -endorphin basal and stimulated levels in extracted rat plasma. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 303: 171-174, 1978.
- 4) Millan, M.J., Przewlocki, R., Jerlicz, M., Gramsch, Ch., Höllt, V., Herz, A.: Stress-induced release of brain and pituitary β -endorphin: major role of endorphins in generation of hyperthermia, not analgesia. *Brain Res.* 208: 325-338, 1981.
- 5) Machi, T., Hazato, T., Katayama, T.: Enkephalin metabolism in human serum: serum leu-enkephalin concentration in patients with acute and chronic pain. *Masui* 35: 605-609, 1986.
- 6) Panerai, A.E., Martini, A., De Rosa, A., Salerno, F., Di Giulio, A.M., Mantegazza, P.: *Regulatory Peptides: From Molecular Biology to Function.* (eds. Costa, E., Trabucchi, M.) Raven Press, New York, 1982, p 139-149.

- 7) Simonnet, G., Taquet, H., Floras, P., Caille, J.M., Legrand, J.C., Vincent, J.D., Cesselin, F.: Simultaneous determination of radio-immunoassay able methionine-enkephalin and radioreceptor-active opiate peptides in CSF of chronic pain suffering and non suffering patients. *Neuropeptides* 7: 229-240, 1986.
- 8) Martini, A., Bondiolotti, G.P., Sacerdote, P., Pierro, L., Picotti, G.B., Panerai, A.E., Restelli, L., Zancaner, F.: Diclofenac increases beta-endorphin plasma concentrations. *J. Int. Med. Res.* 12: 92-95, 1984.
- 9) Sacerdote, P., Monza, G., Mantegazza, P., Panerai, A.E.: Diclofenac and piroprofen modify pituitary and hypothalamic beta-endorphin concentrations. *Pharmacol. Res. Commun.* 17: 679-684, 1985.
- 10) Knepel, W., Nutto, D., Vlaskovska, M., Kittel, Ch.: Inhibition by prostaglandin E2 of the release of vasopressin and β -endorphin from rat pituitary neurointermediate lobe or medial basal hypothalamus *in vitro*. *J. Endocr.* 106: 189-195, 1985.
- 11) Kudo, T., Chang, H.-L., Maeda, S., Uchida, Y., Nakamae, J., Inoki, R.: Changes of the met-enkephalin-like peptide content induced by noxious stimuli in the rat incisor pulp. *Life Sci.* 33(sup. 1): 677-680, 1983.
- 12) Kudo, T., Wei, E.-Q., Inoki, R., Terasawa, M., Nakao, T.: Influence of Y-20003, an analgesic agent, on the endogenous opioid peptide system in rats. *Progress in Opioid Research (Proceedings of the 1986 International Narcotics Research Conference)*. (eds. Holaday, J.W., Law, P.-Y. and Herz, A.) National Institute on Drug Abuse, Rockville, 1986, p 236-239.
- 13) Hughes, J., Smith, T.W., Kosterlitz, H.W., Fothergill, L.A., Morgan, B.A. and Morris, H.R.: Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 258: 577-579, 1975.