Responses of Polymodal Receptors to Bradykinin Analogs Studied In Vitro Using Testis-Superior Spermatic Nerve Preparations

Kazue Mizumura^{*1}, Munenori Minagawa^{*1},
Yoichiro Tsujii^{*2} and Takao Kumazawa^{*1}

^{*1} *Department of Nervous & Sensory Functions, Research Institute of
Environmental Medicine, Nagoya University, Aichi and*

^{*2} *Department of Physical Therapy, Nagoya University College of
Medical Technology, Aichi, Japan*

(Received 16 March 1990, accepted 23 March 1990)

Abstract

The polymodal receptor, which respond to noxious mechanical, heat stimulations and algesic substances such as bradykinin (BK), is considered to play an important role in transmitting inflammatory pain. In order to know which type of BK receptors is concerned in the BK response of this receptor, effects of three analogs of BK, namely des Arg⁹-BK, des Arg⁹-[Leu⁸]-BK and [Thi^{5,8}, D-Phe⁷]-BK, were studied using in vitro testis spermatic nerve preparations excised from anesthetized dogs. Neither des Arg⁹-BK nor des Arg⁹-[Leu⁸]-BK (up to 9.4×10^{-6} M) induced discharges or suppressed ongoing activities of polymodal receptors, and the BK response (9.4×10^{-9} M) was not significantly influenced by either of them, though a small insignificant facilitation was observed. [Thi^{5,8}, D-Phe⁷]-BK (up to 9.4×10^{-6} M) induced discharges in none of preparations except for one, but it suppressed the BK response concentration-dependently and reversibly. It had no influence on responses to heat and high K⁺ solution. From these results it is concluded that the BK receptor mediating the BK response of nociceptor might be B₂ type, and a possible agonistic action of these three analogs is discussed.

Key Words : bradykinin, bradykinin receptor, bradykinin analog, polymodal receptor, pain

in vitro 睪丸一上精巢神経標本で調べたブラジキニン同族体に対するポリモーダル受容器の反応

水村 和枝^{*1} 皆川 宗徳^{*1} 辻井洋一郎^{*2} 熊澤 孝朗^{*1}

^{*1}名古屋大学環境医学研究所 神経・感覚部門

^{*2}名古屋大学医療技術短期大学部 理学療法学科

はじめに

痛みは外的に与えられた強い熱刺激や機械刺激によって引き起こされるばかりでなく、外的な刺激なしでも炎症部位では自発的に痛みが生じる。そのような痛みを引き起こす内因性の物質としては、ブラジキニン (BK) がもっとも広く知られている。ヒトでカンタリジンでつくった水疱底に滴下すると疼痛を起こし¹⁾、動物では疼痛による反応と考えられている pseudoaffective response を起こすこと¹⁵⁾ がその基盤となっている。

ところで、痛み情報を末梢から中枢神経系へと伝える受容器として、はっきりしているものに2種類ある。針で刺すなどの侵害レベルの機械刺激に特異的に反応し、熱刺激や発痛物質には通常反応しない高閾値機械受容器⁶⁾と、侵害レベルに及ぶ機械的刺激、熱刺激および発痛物質のいずれにも反応し、炎症痛などの伝達に関与していると考えられているポリモーダル受容器である⁴⁾。前者は現在までのところ皮膚以外のところでは記録されていないが、ポリモーダル受容器は皮膚ばかりでなく筋^{7,9)}、および腸管⁸⁾、睪丸^{11,14)}、心臓²⁰⁾などの内臓に広く分布していることが知られている。

我々は睪丸のポリモーダル受容器をポリモーダル受容器のモデルとして、その反応特性について研究を続けてきたが、この受容器にBKは放電を引き起こす^{3,10,14)}。他の発痛物質や熱刺激に対する侵害受容器の反応と比較して、BKに対する反応は潜時が10秒以上に及ぶという特徴があり、反応に時間のかかる中間段階の介在が示唆されている。その1つがプロスタグランジンであり¹⁸⁾、その合成阻害が現在までの末梢性鎮痛薬の主たる作用であると考えられている。しかし、BKに対する直接的な特異的 antagonist があれば、痛みを伴うような多くの炎症状態や病的状態のどんな段階でBKが関与しているかを知らうえて大きな力を発揮すると考えられるし、また新しい鎮痛薬ともなりうるだろう。

BKはまた、平滑筋を収縮、弛緩させるが、特異的 antagonist の研究はそれらの標本で進められてき

た。Regoli たちはウサギ大動脈がBKよりも des-Arg⁹-BK に対して感受性が高く、その作用は des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK で拮抗されるのに対し²³⁾、ネコ回腸、ラット子宮では des-Arg⁹-BK は非常に弱い agonist 作用しかもたず、des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK は無効であることから²⁾、前者のような反応特性をもつ B₁ タイプと、後者の反応タイプをもつ B₂ の2つの受容体タイプを提唱している²²⁾。また B₁ 受容体は in vitro での incubation 中、または実験的に triton X などで炎症を起こすと新生されてくると報告されている^{16,24)}。この B₁、B₂ という Regoli たちのタイプ分けが完全に承認されているわけではないが、BK 受容体のタイプ分けの出発点となっている。

侵害受容器のBK反応も受容体を介する反応であろうと考えられるが、どのような受容体を介するものであるかまだ明らかではない。受容体タイプを明らかにするうえで必須な特異的な antagonist は、B₁ 受容体に対しては des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK が当初からあったが²³⁾、B₂ 受容体に対する良いものはなかった。多くのBK同族体がつくられた結果、そのなかでも [Thi^{5,8}, D-Phe⁷]-BK は比較的親和性の高い antagonist であることが報告された²⁵⁾。そこで本実験では、侵害受容器であるポリモーダル受容器の反応にかかわる受容体のタイプを、bradykinin とその同族体である des-Arg⁹-BK, des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK, [Thi^{5,8}, D-Phe⁷]-BK を用いて調べた。

実験方法

実験にはネブタール (30 mg/kg) で麻酔したイヌより取りだした睪丸—上精巣神経標本を用いた。方法の詳細はすでに報告したので¹⁴⁾、ここでは簡単に述べるにとどめる。上精巣神経よりポリモーダル受容器からの単一または複数ユニット放電を in vitro で記録し、計数した。我々の現在までの研究より上精巣神経に含まれる求心神経の90%以上がBKに反応するポリモーダル受容器であり、それに対し約5%を占める速順応型機械受容器はBKなど発痛物質にはほとんど反応しないことがわかっている¹⁴⁾。複数ユニット放電記録も用いた。その場

Fig. 1 Des Arg⁹-BK did not suppress the BK response of testicular polymodal receptors.

A : Peristimulus time-histograms recorded from a fine fascicle containing 5 fibers are shown according to the order of testing. 1 bin being 4 s and the scale on the right. BK (9.4×10^{-9} M) was applied during the underlined time period, and des Arg⁹-BK was applied during the shadowed time period. First three responses show the time course of tachyphylaxis.

B : Averaged response $\pm$ SE ($n=9$). Ordinate: net increase of mean discharge rate during 1 min application period of BK. abscissa: order of application. Concentrations of drugs are the same as in A.

n. s.: non significant difference (paired t test).

The way of presentation is the same in fig. 2 and 3 unless otherwise stated.

合には、高張食塩水に対する反応に基づいて含まれるユニット数を推定し¹²⁾、この推定ユニット数を用いて放電頻度を1ユニットあたりに標準化し、統計処理を行った。BKなどの試験液は受容野を浸すKrebs液と置換する方法で投与した。BKは約10分間隔で1分間投与した後、Krebs液で洗い流した。このような時間間隔で投与した場合、BKの反応は次第に減弱する(tachyphylaxis)が、3、4回目以後はほぼ一定になるので¹⁸⁾、BK同族体のBK反応への影響は3、4回目以後の反応について調べた。使用したBKおよびその同族体(des-Arg⁹-BK, des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK, [Thi^{5,8}, D-Phe⁷]-BK)はいずれもペプチド研究所より購入した。

結 果

1. des-Arg⁹-BKに対する反応

B₁受容体は標本を摘出してから長時間すると新生されてくるという報告があるので、摘出後70分から350分まで種々の時点でdes-Arg⁹-BK (9.4×10^{-8} M $\sim$ 9.4×10^{-6} M, 2~5分間)を投与してみた。

しかし、des-Arg⁹-BKは16例中いずれの時点で調べた例にも放電を引き起こさなかった。また、自発放電を抑制することもなかった。

BK反応への影響は、方法の項で述べかつ、Fig. 1-AのI, II, IIIの反応に明らかなように、tachyphylaxisがあるが、3、4回目以後の変化は少なくなるため、3、4回目以後のBK反応について調べた。BKの濃度はわずかな抑制も検出できるように、 9.4×10^{-9} Mの低い濃度を用いた。des-Arg⁹-BKは 9.4×10^{-6} Mを用い、BK投与3~5分前からBKに対する反応が終了するまで投与した。反応の1例をFig. 1-Aに示す。des-Arg⁹-BKそのものは放電を引き起こしていないが、その存在下でBKに対する反応はわずかに増大した。9例の平均をFig. 1-Bに示す。des-Arg⁹-BK投与時の反応は統計的には有意ではないものの、やや大きい傾向がある。10倍の濃度のBKに対しても調べてみたところ、des-Arg⁹-BKの投与により平均放電頻度は0.81 imp/sから0.89 imp/sと多少大きくなったが、やはりその差は有意ではなかった。

Fig. 2 Effect of des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK on the activities of testicular polymodal receptors.

A : Peristimulus time-histograms. No. of fibers included is 5. 1 bin is 5 s. BK-AL : des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK. Note that des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK induced an increase of discharges but it was much smaller than that induced by BK of three orders lower concentration.

B : Averaged response (n=10).

Fig. 3 [Thi^{5,8}, D-Phe⁷]-BK suppressed the BK response of testicular afferents.

A : Peristimulus time-histograms. 1 bin is 5 s. No. of fibers included is 11. BK : bradykinin 9.4×10^{-8} M, TPBK 10 : [Thi^{5,8}, D-Phe⁷]-BK 9.4×10^{-6} M.

B : Averaged response (n=9).

2. des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK に対する反応

des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK (9.4×10^{-6} M) は BK を投与したことの無い 10 標本で、放電を生じなかった。しかし、10 分間隔の BK 投与の間に投与した場合には、11 例中 1 例で低頻度の放電を生じた (Fig. 2-A)。BK (9.4×10^{-9} M) に対する反応は、des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK (9.4×10^{-6} M) によって抑制されず、む

しろ弱いながらも増強される傾向を示した (Fig. 2-A)。しかし増強を示さない例もあるために、統計的には有意な変化ではなかった (Fig. 2-B)。しかし、des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK 洗い流し後にはその投与前の反応より小さくなった。 9.4×10^{-6} M のような高い濃度では考察の項で述べるように agonist 作用がでて抑制作用が不明瞭になる可能性が考えられるの

Fig. 4 [Thi^{5,8}, D-Phe⁷]-BK had no influence on responses to high K⁺ solution and heat stimulation.

White column: response before [Thi^{5,8}, D-Phe⁷]-BK (9.4×10^{-6} M, abbreviated as TPBK), shadowed column: response after [Thi^{5,8}, D-Phe⁷]-BK. heat: 48°C, 30 sec, high K⁺: 30 mM K⁺ solution. Difference between responses before and after [Thi^{5,8}, D-Phe⁷]-BK was not statistically significant (paired t-test).

で、 9.4×10^{-7} M の des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK の作用も 1 例で調べたが、抑制はみられなかった。

3. [Thi^{5,8}, D-Phe⁷]-BK に対する反応

9.4×10^{-6} M までの濃度の [Thi^{5,8}, D-Phe⁷]-BK は、調べた 19 例のうち 1 例の例外を除いた全例になんらの放電も引き起こさず、また自発放電を抑制することもなかった。例外的な 1 例においては 10 から 40 秒の潜時の後に低頻度の放電を引き起こした。

BK 反応に対する効果を調べるには、BK の濃度を最大反応のおおよそ 1/2 の大きさの反応を生じる 9.4×10^{-8} M に選んだ¹³⁾。Fig. 3-A に 1 例を示したように、[Thi^{5,8}, D-Phe⁷]-BK は BK 反応を抑制した。抑制は 2.8×10^{-7} M からみられ、用いた濃度の範囲 ($\sim 9.4 \times 10^{-6}$ M) 内では、抑制の度合いは濃度とともに強くなる傾向を示した。しかしその抑制効果の持続は短く、[Thi^{5,8}, D-Phe⁷]-BK を洗い流した後に通常の間隔で投与した BK に対する反応は、ほぼ [Thi^{5,8}, D-Phe⁷]-BK 投与前のレベルに復し

た。

[Thi^{5,8}, D-Phe⁷]-BK の BK 反応への抑制効果が BK 反応に特異的なものであるかどうかを調べるため、高 K⁺ 液と熱刺激に対する影響を調べた。Fig. 4 にその平均値を示してあるが、いずれの反応も [Thi^{5,8}, D-Phe⁷]-BK (9.4×10^{-6} M, 2 または 5 分間) の投与によって影響を受けなかった。

考 察

本実験は、睾丸のポリモーダル受容器は B₁ agonist といわれる des-Arg⁹-BK に対して放電を生じず、B₁ antagonist といわれる des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK によっては、その BK 反応が抑えられないことを明らかにした。一方、B₂ antagonist といわれる [Thi^{5,8}, D-Phe⁷]-BK によって BK 反応が抑えられること、その抑制効果は BK 反応に特異的であることも明らかにされた。また、BK に対する濃度反応関係は、[Thi^{5,8}, D-Phe⁷]-BK の存在下ではほぼ平行に右方にシフトすることから、競合阻害であることが示唆されている¹⁷⁾。これらの結果を総合すると、ポリモーダル受容器の BK 反応にかかわる受容器は B₂ タイプであろうと考えられる。ヒトで水疱底を使った痛覚実験から皮膚痛覚にかかわる BK 受容体は B₂ であろうと報告されているが²⁰⁾、本実験の結果はそれを支持する。

ところで、des-Arg⁹-BK も des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK も統計的には有意でなかったが BK 反応を多少促進する傾向を示し、des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK と [Thi^{5,8}, D-Phe⁷]-BK はそれぞれ 1 例で低頻度の放電を誘起した。des-Arg⁹-BK は B₂ 受容体をもつとされる平滑筋標本で、mM の濃度では多少効果があると報告されている²⁾。またごく最近ラットの空腸を使った実験で、des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK の agonist 作用が示された²¹⁾。したがって、上記の BK 反応の弱い促進効果は、これらの物質が B₂ 受容体に対する subliminal な agonist 作用をもっていることを示唆するものと考えられる。des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK と [Thi^{5,8}, D-Phe⁷]-BK によって放電を生じた例は、 9.4×10^{-6} M という高濃度を用いた場合であり、

これらの同族体の B_2 agosist 作用に感受性が高かったと推定される。予備的な段階の実験であるが、強度熱刺激で感作した状態では, des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK も [Thi^{5,8}, D-Phe⁷]-BK もより高頻度にポリモーダル受容器に放電を引き起こした (未発表データ)。強度熱刺激後には BK 反応は増強されるので¹⁹⁾, なんらかの感作物質が生じていると考えられる。この感作物質によって, 上記2つの同族体の弱い agonist 作用も強められて, その結果放電を生じたと考えることが可能である。この結果も des-Arg⁹-[Leu⁸]-BK および [Thi^{5,8}, D-Phe⁷]-BK に agonist 作用がある可能性を支持する。

現在までの報告では B_1 受容体をもつ標本は限られており, B_2 受容体をもつものが多い。しかし, 多くの BK 同族体に対する反応を比較すると, B_2 受容体が単一でないことが示唆される。たとえば, ラット子宮では [D-Phe⁷]-BK は弱いながらも agosist であるのに対し, モルモット回腸では antagonist である²⁵⁾, また neuroblastoma 細胞のイノシトール燐酸代謝では [D-Phe⁷]-BK も [Thi^{5,8}, D-Phe⁷]-BK も agonist である⁵⁾, 等等。ポリモーダル受容器の BK 反応にかかわる受容体が B_2 のどのような subtype に属するか, 今後の検討課題である。

B_1 受容体は長時間 *in vitro* で incubation したり, 炎症を起こすと新生されてくると報告されている^{16,24)}。しかし本実験では, 6時間までの incubation 時間にかかわりなく, des-Arg⁹-BK に対する放電反応はみられなかった。また, 予備的な段階であるが, 強度熱刺激によって炎症に近い状態をつくっても des-Arg⁹-BK に対する反応はみられなかった (未発表データ)。したがって, この実験系では, B_1 受容体が放電反応に関与していることは考えにくい, 今後さらにカラゲニンなどによる炎症状態で検討する必要がある。

文 献

- 1) Armstrong, D., Jepson, J. B., Keel, C. A. and Stewart, J. W., Pain-producing substance in human inflammatory exudate and plasma, *J. Physiol. (Lond.)*, **135** (1957) 350-370.
- 2) Barab, J., Drouin, J.-N., Regoli, D. and Park, W. K., Receptors for bradykinin in intestinal and uterine smooth muscle, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **55** (1977) 1270-1285.
- 3) Beck, P. W. and Handwerker, H. O., Bradykinin and serotonin effects on various types of cutaneous nerve fibres, *Pflgers Arch.*, **347** (1974) 209-222.
- 4) Bessou, P. and Perl, E. R., Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli, *J. Neurophysiol.*, **32** (1969) 1025-1043.
- 5) Braas, K. M., Manning, D. C., Perry, D. C. and Snyder, S. H., Bradykinin analogues: differential agonist and antagonist activities suggesting multiple receptors, *Br. J. Pharmacol.*, **94** (1988) 3-5.
- 6) Burgess, P. R. and Perl, E. R., Myelinated afferent fibers responding specifically to noxious stimulation of the skin, *J. Physiol. (Lond.)*, **190** (1967) 541-562.
- 7) Franz, M. and Mense, S., Muscle receptors with group IV afferent fibres responding to application of bradykinin, *Brain Res.*, **92** (1975) 369-383.
- 8) Haupt, P., Jnig, W. and Kohler, W., Response pattern of visceral afferent fibres, supplying the colon, upon chemical and mechanical stimuli, *Pflgers Arch.*, **398** (1983) 41-47.
- 9) Kumazawa, T. and Mizumura, K., Thin fibre receptors responding to mechanical, chemical, and thermal stimulation in the skeletal muscle of the dog, *J. Physiol. (Lond.)*, **273** (1977) 179-194.
- 10) Kumazawa, T. and Mizumura, K., Chemical responses of polymodal receptors of the scrotal contents in dogs, *J. Physiol. (Lond.)*, **299** (1980) 219-231.
- 11) Kumazawa, T. and Mizumura, K., Mechanical and thermal responses of polymodal receptors recorded from the superior spermatic nerve of dogs, *J. Physiol. (Lond.)*, **299** (1980) 233-245.
- 12) Kumazawa, T. and Mizumura, K., Abnormal activity of polymodal receptors induced by clioquinol [5-chloro-7-iodo-8-hydroxyquinoline], *Brain Res.*, **310** (1984) 185-188.
- 13) Kumazawa, T., Mizumura, K. and Sato, J., Thermally potentiated responses to algescic substances of visceral nociceptors, *Pain*, **28** (1987)
- 1) Armstrong, D., Jepson, J. B., Keel, C. A. and Stewart, J. W., Pain-producing substance in human inflammatory exudate and plasma, *J.*

- 255-264.
- 14) Kumazawa, T., Mizumura, K. and Sato, J., Response properties of polymodal receptors studied using in vitro testis superior spermatic nerve preparations in dogs, *J. Neurophysiol.*, **57** (1987) 702-711.
 - 15) Lim, R. K. S., Guzman, D. W., Rodgers, F., Goto, K., Braun, C., Dickenson, G. D. and Engle, R. J., Site of action of narcotic and non-narcotic analgesics determined by blocking bradykinin-evoked visceral pain, *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **152** (1964) 25-58.
 - 16) Marceau, F., Barab, J., St-Pierre, S. and Regoli, D., Kinin receptors in experimental inflammation, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **58** (1980) 536-542.
 - 17) Mizumura, K., Minagawa, M., Tsujii, Y. and Kumazawa, T., The effects of bradykinin agonists and antagonists on visceral polymodal receptor activities, *Pain*, **40** (1990) 221-227.
 - 18) Mizumura, K., Sato, J. and Kumazawa, T., Effects of prostaglandins and other putative chemical intermediaries on the activity of canine testicular polymodal receptors studied in vitro, *Pflgers Arch.*, **408** (1987) 565-572.
 - 19) Mizumura, K., Sato, J. and Kumazawa, T., Comparison of sensitizing effects of noxious heat and prostaglandin-E₂ on visceral polymodal receptor activities studied in vitro, *Pain, Suppl.* **4** (1987) S282.
 - 20) Nishi, K., Sakanashi, M. and Takenaka, F., Activation of afferent cardiac sympathetic nerve fibers of cats by pain producing substances and by noxious heat, *Pflgers Arch.*, **372** (1977) 53-61.
 - 21) Paiva, A. C. M., Paiva, T. B., Pereira, C. C. and Shimuta, S. I., Selectivity of bradykinin analogues for receptors mediating contraction and relaxation of the rat duodenum. *Br. J. Pharmacol.*, **98** (1989) 206-210.
 - 22) Regoli, D. and Barab, J., Pharmacology of bradykinin and related kinins, *Pharmac. Rev.*, **32** (1980) 1-46.
 - 23) Regoli, D., Barab, J. and Park, W. K., Receptors for bradykinin in rabbit aortae, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **55** (1977) 855-867.
 - 24) Regoli, D., Marceau, F. and Barab, J., De novo formation of vascular receptors for bradykinin, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **56** (1978) 674-677.
 - 25) Vavrek, R. J. and Stewart, J. M., Competitive antagonists of bradykinin, *Peptides*, **6** (1985) 161-164.
 - 26) Whalley, E. T., Clegg, S., Stewart, J. M. and Vavrek, R. J., The effect of kinin agonists and antagonists on the pain response of the human blister base, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **336** (1987) 652-655.