Dual Actions of DPDPE on DAMGO Induced Antinociceptive Activity

Satoshi Takeda¹, Shinobu Sakurada¹, Tsukasa Sakurada¹,
Taisuke Otsuki² and Kensuke Kisara¹

¹*Department of Pharmacology, Tohoku College of Pharmacy and*

²*Neurological Research Center, Miyagi National Hospital, Sendai, Japan*

(Received 1 April 1993)

Abstract

The present study was to investigate an interaction between supraspinal δ -receptors and antinociceptive effect induced by intracerebroventricular (i. c. v.) administration of [D-Ala², N-Me-Phe⁴, Gly⁵-ol] enkephalin (DAMGO), a μ -receptor agonist. I. c. v. administration of DAMGO (2.0~0.125 pmol) produced a dose-dependent antinociceptive effect in the mouse formalin test. The ED₅₀ dose of DAMGO was approximately 0.5 pmol, which was used for co-administration of [D-Pen², D-Pen⁵] enkephalin (DPDPE). When co-administered with 1.0 pmol DPDPE, DAMGO induced antinociception was reduced significantly. Inversely, the antinociceptive effect of DAMGO was enhanced significantly by co-administration of 125 pmol DPDPE. The antagonistic effect of DPDPE was also observed when 10 pmol DPDPE was co-administered with 2.0 pmol DAMGO, which had 80 % of antinociceptive effect alone. The results that DPDPE had dual effects on DAMGO-induced antinociception suggest a possible interaction between supraspinal δ -receptors and μ -receptors.

Key Words : formalin test, DAMGO, DPDPE, dual actions

DAMGO の侵害刺激抑制作用に対する DPDPE の二相性効果について

武田 聡¹ 桜田 忍¹ 桜田 司¹ 大槻 泰介² 木皿 憲佐¹

¹東北薬科大学 薬理学教室

²国療宮城病院

緒 言

疼痛制御機構におけるオピオイド受容体の重要性については、すでに広く認められている。とくにモルヒネの疼痛制御機構は、 μ 受容体を介しているこ

とが明らかである。しかしオピオイド受容体である δ 受容体については、選択性に富んだアゴニスト、アンタゴニストが少ないこともあって、疼痛制御機構における生理的、機能的役割りについて不明な点が多い。そこで今回我々は、 μ 受容体誘発性抗侵害受容

効果に対する δ アゴニストの調節作用 (μ 受容体誘発性抗侵害受容効果を δ アゴニストが増強あるいは減弱させる作用) に焦点を当て、マウスホルマリントテスト法第一相において δ 受容体がどのように μ 受容体に影響を及ぼすか、 μ 受容体アゴニストである [D-Ala², N-Me-Phe⁴, Gly⁵-ol] enkephalin : DAMGO, および δ 受容体アゴニストである [D-Pen², D-Pen⁵] enkephalin : DPDPE を用いて検討した。その結果, DPDPE が DAMGO 誘発性抗侵害受容効果に対して, 抑制作用および増強作用の二相性の効果を示すという興味ある知見を得たので報告する。

実験方法

1. 実験動物

実験には体重 22~27 g の ddY 系雄性マウス (静岡県実験動物農業共同組合) を使用し, 実験に供するまで室温 22±2 °C, 湿度 55±10 %, 12 時間照明 (AM9 : 00~PM9 : 00) の一定環境下で飼育した。なお, 飼料および飲料水は自由摂取とした。

2. 使用薬物

薬物は [D-Pen², D-Pen⁵] enkephalin および [D-Ala², N-Me-Phe⁴, Gly⁵-ol] enkephalin (sigma) を使用し, それぞれの薬物は滅菌人工脳脊髄液 (artificial cerebrospinal fluid : (A-CSF) : NaCl 7.4 g, KCl 0.19 g, MgCl₂ 0.19 g, CaCl₂ 0.14 g/1000ml) に溶解した。

3. 使用器具のシリコン化

今回使用したペプチド (DAMGO, DPDPE) の吸着を抑えるため, 投与用マイクロシリンジ (Hamilton), 投与針を SurfaSil (PIERCE) 5 % 溶液を用いてシリコン化した。

4. マウス側脳室内投与

薬物は滅菌 A-CSF に溶解し, McCormick と Haley の方法⁸⁾ に準じた Brittain と Handley の方法³⁾ に従いマウスを固定し脳内へ投与針を直接挿入し, 5 μ l/mouse の割合で薬液を投与した。薬液の投与時期はホルマリン投与 5 分前とした。また複数の薬物を同時に用いる場合は, すべて混合溶液による

同時投与とし, 薬物の相互作用を避けるために薬液は用時調整とした。

5. マウスホルマリントテスト法

マウスを測定用のプラスチックケージ内に, ケージ 1 個につき 1 匹ずつ入れて約 1 時間環境に順応させた。その後, マウスの自発運動量の消失を確認してからマウスをケージから取り出し保定して, 2.0 % ホルマリン溶液を右後肢足蹠皮下に 20 μ l/mouse の割合ですばやく投与した。測定は右後肢に対する licking, biting を指標として, ホルマリン投与直後から 10 分間に認められる反応 (第一相) を 5 分間隔で測定し, 第一相の反応が消失するまでの 10 分間観察した。

6. 統計処理

実験結果は 10 分間の合計値を図中に平均値と標準誤差で示した。また有意差検定は分散分析により処理した後, Litchfield と Wilcoxon¹⁹⁾ および Dunnett の方法⁶⁾ により行った。

実験結果

1. DAMGO および DPDPE マウス側脳室内投与による影響

DAMGO をマウス側脳室内に投与して検討したところ, 0.125 pmol から 2.0 pmol の範囲で用量依存的な抗侵害受容効果を発現し, ED₅₀ 値 (信頼限界値) は 0.43 pmol (0.20~0.94) であった (Fig. 1)。DPDPE との同時投与による併用実験は, 約 50 % の抗侵害受容効果を示す DAMGO 0.5 pmol と, 顕著な抑制作用に対する影響を確認するための DAMGO 2.0 pmol の二用量を用いて行った。

また, DPDPE は 0.125 nmol から 2.0 nmol の範囲で用量依存的な抗侵害受容効果を発現し, ED₅₀ 値は 0.56 nmol (0.26~1.20) であった (Fig. 1)。同時投与による併用実験では, 有意な作用を示さない DPDPE 0.125 nmol を上限にして行った。

2. DAMGO 0.5 pmol に対する DPDPE 同時投与時の影響

DAMGO 0.5 pmol と DPDPE の各種用量を同時投与して影響を検討した (Fig. 2)。その結果, DPDPE

Fig. 1 Effects of intracerebroventricularly administered DAMGO and DPDPE on the licking response in the first phase (0~10 min) of the formalin test. Each column represents the amount of time (sec) the animals spent licking the injected hindpaw. Data is expressed as mean $\pm$ S. E. M. ($n=10$ in each group). Significant different ($\star P<0.01$) when compared to artificial CSF-control alone.

Fig. 2 Effects of different doses of DPDPE on DAMGO (0.5 pmol) induced antinociception in the first phase of the formalin test. Each column represents the amount of time (sec) the animals spent licking the injected hindpaw. Data is expressed as mean $\pm$ S. E. M. ($n=10$ in each group). Significant different ($\# P<0.01$) when compared to DAMGO alone.

0.125 nmol を同時投与すると有意な抗侵害受容効果の増強が、また DPDPE 1 pmol を同時投与すると逆に抗侵害受容効果に対する有意な拮抗現象が認められた。しかしこれらの中間用量である DPDPE 5.0~75 pmol を同時投与した際には、有意な影響が認

Fig. 3 Effects of different doses of DPDPE on DAMGO (2.0 pmol) induced antinociception in the first phase of the formalin test. Each column represents the amount of time (sec) the animals spent licking the injected hindpaw. Data is expressed as mean $\pm$ S. E. M. ($n=10$ in each group). Significant different ($\# P<0.01$) when compared to DAMGO alone.

められなかった。

3. DAMGO 2.0 pmol に対する DPDPE 同時投与時の影響

DAMGO 2.0 pmol と DPDPE の各種用量を同時投与して影響を検討した (Fig. 3)。約 85% の抗侵害受容効果を示す DAMGO 2.0 pmol は DPDPE 10 pmol 同時投与時を最大として、0.1~10 pmol の範囲で抗侵害受容効果に対する拮抗作用を示した。しかし 100 pmol 同時投与時には抗侵害受容効果に対する有意な影響が認められなかった。

考 察

疼痛制御における μ 受容体の重要性は、モルヒネの主な作用が μ 受容体を介して発現していることから広く認められている。しかし同じオピオイド受容体に分類されている δ 受容体の生理的、機能的役割については、いまだに不明な点が多い。例えば、中枢に存在する δ 受容体を刺激すると抗侵害受容効果が発現することは知られているが^{17,25,29}、実際にどの程度疼痛制御に関わっているのか、また μ 受容体との関係など、いまだに明確になっていない。

このように δ 受容体についての研究が進展していない理由の1つに、選択性・安定性に優れたアゴニスト、アンタゴニストが存在しなかったことがあげられる。

近年選択性に優れたアゴニストである DPDPE^{22,24)}あるいは [D-Ala²] deltorphin II^{7,17,18,21)}、また同様に選択性に優れたアンタゴニストである [D-Ala², Leu⁵, Cys⁶] enkephalin: DALCE^{2,14,15,23)}, naltrindole 5'-isothiocyanate: 5'-NTII^{14,23,26)}などが利用できるようになり、さまざまな事実が明らかになってきた。例えば1983年 Holaday ら¹⁰⁾はラットのエンドトキシンショックモデルを用いた研究から、また Rothman ら²⁷⁾は放射性リガンドを用いた一連の結合実験から、それぞれ δ 受容体と μ 受容体が複合体を形成している可能性を示唆した。同様の可能性がモルヒネ誘発性抗侵害受容効果に対するロイシンエンケファリンおよびそのアナログ、あるいはメチオニンエンケファリンおよびそのアナログによる調節作用（モルヒネによる抗侵害受容効果に対する増強あるいは抑制）^{1,9,16,24,30,31)}からも示唆された。

また Mattia ら²⁰⁾は DPDPE と [D-Ala²] deltorphin II を用いた交差耐性の研究から、これらの薬物がそれぞれ異なるサブタイプの δ 受容体に直接作用して抗侵害受容効果を発現している可能性を示し、さらに Jiang ら¹⁴⁾は δ 受容体に高い選択性を持つアンタゴニストである DALCE, 5'-NTII などを用いた研究から、DPDPE と [D-Ala²] deltorphin II の直接作用が異なるサブタイプの受容体を介して発現していることを明確にした。これらの報告から現在 δ 受容体は、

- 1) DPDPE, DALCE 感受性である δ_1 受容体、
- 2) [D-Ala²] deltorphin II, 5'-NTII 感受性で μ 受容体と複合体を形成している δ_2 受容体のふたつに分類されている。

今回我々は、脊髄上位脳での DAMGO 誘発性抗侵害受容効果に対する δ アゴニスト: DPDPE の影響について報告した。これと類似の報告例に、モルヒネ誘発性抗侵害受容効果に対するロイシンエンケ

ファリン類やメチオニンエンケファリン類の影響についての報告がある。これらエンケファリン類は単独では作用を及ぼさない用量で有意にモルヒネの抗侵害受容効果に影響し、ロイシンエンケファリン類はモルヒネの効果に対する増強を逆にメチオニンエンケファリン類は拮抗を示すことが知られている。今回報告した DPDPE の調節作用とこれらの報告例とで大きく異なるのは、DPDPE の場合その投与用量を変化させるだけで拮抗と増強の両作用: 二相性の効果を示すという点である。ロイシンエンケファリン類やメチオニンエンケファリン類は、抗侵害受容効果に対する増強あるいは拮抗のどちらかの作用しか示さず、DPDPE の μ アゴニストに対するような二相性の作用はこれらアゴニストでは報告されていない。

侵害閾値の測定方法には熱刺激、圧刺激などを用いたさまざまな方法が知られているが、ほとんどの報告では急性痛のモデルを使用しており、なかでも簡便で再現性の良好な tail-flick 法^{4,13)}を用いた報告例が多い。今回我々が用いたのは、化学刺激を利用したホルマリンテスト法^{5,11,28)}である。この方法は持続痛のモデルとされており、第一相（ホルマリン投与後0分から10分に現れる）と、第二相（ホルマリン投与後10分から30分に現れる）の異なる2つの反応を示すのが特徴である。とくに解熱性鎮痛薬は第二相に対して感受性が強く、第一相に対してはほとんど影響を与えないのに対し、麻薬性鎮痛薬は両相に対して抑制作用を示す^{11,12)}。このように第一相はオピオイドに対して特異的な感受性を示すことが報告されている。今回の結果では、ホルマリンテスト法第一相における DAMGO の ED₅₀ 値が 0.45 pmol, DPDPE の ED₅₀ 値が 0.6 nmol であった。

これは tail-flick 法で報告されている ED₅₀ 値よりもかなり低い値である。このように低用量の薬物の作用に対し鋭敏に反応するため、急性痛モデルで用いた場合にはなんら作用を示さない低用量でも、その作用を容易に検出できると考えられる。さらに本モデルを用いることによって、きわめて低用量の DPDPE が DAMGO の抗侵害受容効果に対する拮

抗作用を引き出すことがみいだされ、本実験においても以前の報告と同様に、ホルマリンテスト第一相がオピオイドに対して高感受性であることが認められた。

他の報告によると、 δ アゴニストによる調節作用を研究するための δ アゴニストの用量は、単独投与で作用を示さない最大用量に設定してあるのが普通である。しかしDPDPEの拮抗作用の場合は、単独投与で作用を示さない最大用量よりもかなり低い用量一本実験では、増強作用を示す用量の1/10～1/100の用量一で拮抗現象が発現する。そのため、他の実験モデルではこの現象が見過ごされてきたかあるいは持続痛においてのみこのような現象が認められるなどから、今までこの現象が報告されなかったことが考えられる。最近モルヒネ誘発性抗侵害受容効果に対する各種 δ アゴニストの調節作用が、いずれも δ_2 受容体を介して発現しているという報告がPorrecaら²³⁾によってなされた。今回のDPDPEの調節作用もあるいはこの報告のように δ 受容体サブタイプを介して発現していると推測することも可能であるが、はっきりした結論をだすためにはさらに研究を進める必要がある。また今回の拮抗現象がきわめて低用量—おそらく内因性の δ 受容体リガンドが、生体内で作用している用量にきわめて近いと予想される一で発現することから、今後、生体内での δ 受容体の機能を研究する上でたいへん興味深い知見であると思われる。

文 献

- 1) Barrett, R. W. and Vaught, J. L., The effects of receptor selective opioid peptides on morphine-induced analgesia, *Eur. J. Pharmacol.*, **80** (1982) 427-430.
- 2) Bowen, W. D., Hellewell, S. B., Kelemen, M., Huey, R. and Stewart, D., Affinity labeling of δ -opiate receptors using [D-Ala², Leu⁵, Cys⁶] enkephalin, *J. Biol. Chem.*, **262** (1987) 13434-13439.
- 3) Brittain, R. T. and Handley, S. L., Temperature changes produced by the injection of catecholamines and 5-hydroxytryptamine into the cerebral ventricles of the conscious mouse, *J. Physiol.*, **192** (1967) 805-813.
- 4) D'Amour, F. E. and Smith, D. L., A method for determining loss of pain sensation, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **72** (1941) 74-79.
- 5) Dubuisson, D. and Dennis, S. G., The formalin test: quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats, *Pain*, **4** (1977) 161-174.
- 6) Dunnett, C. W., New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, **20** (1964) 482-491.
- 7) Erspamer, V., Melchiorri, P., Erspamer, G. F., Negri, L., Corsi, R., Severini, C., Barra, D., Simmaco, M. and Kreil, G., Deltorphins: a family of naturally occurring peptides with high affinity and selectivity for δ -opioid binding sites, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **86** (1989) 5188-5192.
- 8) Haley, T. J. and McCormick, W. G., Pharmacological effects produced by intracerebral injection of drugs in the conscious mouse, *Brit. J. Pharmacol.*, **12** (1957) 12-15.
- 9) Heyman, J. S., Jiang, Q., Rothman, R. B., Mosberg, H. I. and Porreca, F., Modulation of μ -mediated antinociception by δ -agonists: characterization with antagonists, *Eur. J. Pharmacol.*, **169** (1989) 43-52.
- 10) Holaday, J. W. and D'Amato, R. J., Multiple opioid receptors: evidence for μ - δ binding site interactions in endotoxic shock, *Life. Sci.*, **33** (1983) 703-706.
- 11) Hunskaar, S. and Kjell, H., The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain, *Pain*, **30** (1987) 103-114.
- 12) Hunskaar, S., Berge, Odd-Geir. and Hole, K., Dissociation between antinociceptive and anti-inflammatory effects of acetylsalicylic acid and indomethacin in the formalin test, *Pain*, **25** (1986) 125-132.
- 13) Janssen, P. A. J., Niemegeers, C. J. E. and Dony, J. G. H., The inhibitory effects of fentanyl and other morphine-like analgesics on the warm water-induced tail-withdrawal reflex in rats, *Arzneim. Forsch.*, **13** (1963) 502-505.
- 14) Jiang, Q., Takemori, A. E., Sultana, M., Protoghesi, P. S., Bowen, W. D., Mosberg, H. I. and Porreca, F., Differential antagonism of opioid delta antinociception by [D-Ala², Leu⁵,

- Cys⁶] enkephalin and naltrindole 5'-isothiocyanate: evidence for delta receptor subtypes, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **257** (1991) 1069-1075.
- 15) Jiang, Q., Bowen, W. D., Mosberg, H. I., Rothman, R. B. and Porreca, F., Opioid agonist and antagonist antinociceptive properties of [D-Ala², Leu⁵, Cys⁶] enkephalin: selective actions at the delta noncomplexed site, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **255** (1990) 636-641.
 - 16) Jiang, Q., Mosberg, H. I. and Porreca, F., Modulation of the potency and efficacy of mu-mediated antinociception by delta agonists in the mouse, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **254** (1990) 683-689.
 - 17) Jiang, Q., Mosberg, H. I. and Porreca, F., Antinociceptive effects of [D-Ala²] deltorphin II, a highly selective δ agonist in vivo, *Life. Sci.*, **47** (1990) 43-47.
 - 18) Kreil, G., Barra, D., Simmaco, M., Erspamer, V., Erspamer, G. F., Melchiorri, P., Negri, L., Severini, C. and Corsi, R., Deltorphin, a novel peptide from amphibian skin with high selectivity and affinity for δ opioid receptors, *Eur. J. Pharmacol.*, **162** (1989) 123-128.
 - 19) Litchfield, J. T. Jr. and Wilcoxon, F., A simplified method of evaluating dose effect experiments, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **96** (1949) 99-113.
 - 20) Mattia, A., Vanderah, T., Mosberg, H. I. and Porreca, F., Lack of antinociceptive cross-tolerance between [D-Pen², D-Pen⁵] enkephalin and [D-Ala²] deltorphin II in mice: evidence for delta receptor subtypes, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **258** (1991) 583-587.
 - 21) Melchiorri, P., Negri, L., Severini, C., Corsi, R., Erspamer, G. F., Soaje, M., Erspamer, V. and Barra, D., Structure-activity relationships of the δ -opioid-selective agonists, deltorphins, *Eur. J. Pharmacol.*, **195** (1991) 201-207.
 - 22) Mosberg, H. I., Hurst, R., Hruby, V. J., Gee, K., Yamamura, H. I., Galligan, J. and Burks, T. F., Bis-penicillamine enkephalins possess highly improved specificity toward δ -opioid receptors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **80** (1983) 5871-5874.
 - 23) Porreca, F., Takemori, A. E., Sultana, M., Portoghese, P. S., Bowen, W. D. and Mosberg, H. I., Modulation of mu-mediated antinociception in the mouse involves opioid delta-2 receptors, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **263** (1992) 147-152.
 - 24) Porreca, F., Heyman, J. S., Mosberg, H. I., Omnaas, J. R. and Vaught, J. L., Role of mu and delta receptors in the supraspinal and spinal analgesic effects of [D-Pen², D-Pen⁵] enkephalin in the mouse, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **241** (1987) 393-400.
 - 25) Porreca, F., Mosberg, H. I., Hurst, R., Hruby, V. J. and Burks, T. F., Roles of μ , δ , and κ opioid receptors in spinal and supraspinal mediation of gastrointestinal transit effects and hot-plate analgesia in the mouse, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **230** (1984) 341-348.
 - 26) Portoghese, P. S., Sultana, M. and Takemori, A. E., Naltrindole 5'-isothiocyanate: a nonequilibrium, highly selective δ opioid receptor antagonist, *J. Med. Chem.*, **33** (1990) 1547-1548.
 - 27) Rothman, R. B., Long, J. B., Bykov, V., Jacobson, A. E., Rice, K. C. and Holaday, J. W., β -FNA binds irreversibly to the opiate receptor complex: in vivo and in vitro evidence, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **247** (1988) 405-416.
 - 28) Shibata, M., Ohkubo, T., Takahashi, H. and Inoki, R., Modified formalin test: characteristic biphasic pain response, *Pain*, **38** (1989) 347-352.
 - 29) Sullivan, A. F., Dickenson, A. H. and Roques, B. P., δ -opioid mediated inhibitions of acute and prolonged noxious-evoked responses in rat dorsal horn neurones, *Brit. J. Pharmacol.*, **98** (1989) 1039-1049.
 - 30) Vaught, J. L., Rothman, R. B. and Westfall, T. C., mu and delta receptors: their role in analgesia and in the differential effects of opioid peptides on analgesia, *Life. Sci.*, **30** (1982) 1443-1455.
 - 31) Vaught, J. L. and Takemori, A. E., Differential effects of leucine and methionine enkephalin on morphine-induced analgesia, acute tolerance and dependence, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **208** (1979) 86-90.

Address for correspondence: Shinobu Sakurada, Ph. D., Department of Pharmacology, Tohoku College of Pharmacy, 4-4-1 Komatsushima, Aoba-ku, Sendai 981, Japan.
Telephone: 022-234-4181