生体内在性オピオイドの性質と機能的役割

尾崎 昌 宣

Characteristics and Functional Roles of Opioids Originally Present *in Vivo*

Masanobu Ozaki

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Niigata University of Pharmacy and Applied
Life Sciences; 265-1 Higashijima, Akiha-ku, Niigata 956-8603, Japan.

(Received September 28, 2015)

The characteristics and functional roles of opioids originally present *in vivo* (endogenous opioids) in guinea-pig ileum were investigated. The release of endogenous opioids was determined by the inhibitory twitch response evoked by 0.1 Hz stimulation after 10 Hz stimulation (post-tetanic twitch inhibition). The effects of peptidase inhibitors increased the post-tetanic twitch inhibition, prevented by β -funaltrexamine and nor-binaltorphimine, which are selective μ - and κ -opioid receptor subtype antagonists, respectively. Dopamine receptor antagonists (haloperidol, sultopride and domperidone) increased the post-tetanic twitch inhibition. These results suggest that dopamine receptors are involved in modulation of the ileal opioid system, so as to diminish endogenous opioid release by tetanic stimulation, and dopamine antagonists increase the opioid action, that might depend more on the increased release of endogenous opioids. The post-tetanic twitch inhibition was inhibited by adrenalectomy, and showed the supersensitivity of the opioid receptors, resulting from a decrease of endogenous opioids by adrenalectomy. These findings suggest that the increase in morphine-analgesia by adrenalectomy was due to this process. In the presence of naloxone, an opioid antagonist, an increase in basal tension after tetanic stimulation (10 Hz stimulation) (post-tetanic contraction) was observed, and was blocked by spantide, a substance P antagonist, and indomethacin, a prostaglandins-biosynthesis inhibitor. This contraction increased with morphine or peptidase inhibitor exposure, depending on the length of time the ileum was exposed to the morphine or peptidase inhibitor. Post-tetanic contraction might be a useful indicator of the formation of physical dependence to morphine or endogenous opioids in the ileum.

Key words—endogenous opioid; post-tetanic twitch inhibition; peptidase; opioid receptor subtype; dopamine antagonist; dependence

1. はじめに

本誌から薬学での研究を振り返る総説執筆の機会を頂いた。約 40 年間を通し研究生活を通じて多くの方々との出会いと経験を交えて振り返る。

私の研究生活は、大阪薬科大学の学生時代から始まったと言える。「薬理学」を選んだ理由は特にないが、当時から薬学＝化学の概念があり、優秀な学生は化学系の研究室に興味をしめしていた。しかし、化学があまり好きでなかったのも、2 年生になり、「薬理学」の授業がカリキュラム上始まっていなかったが、よくわからぬままに羽野 壽教授、金

戸 洋助教授、大阪大学から出向されていた仮家公夫先生の薬理学教室に出入りし、先輩方の研究や実習のお手伝いをしていた。このとき出会ったのがマグヌス法で、薬物作用が目ではっきりと見ることができることに驚きと興味を持った。諸先輩方が生薬「またたび」成分である β -フェニルエチルアミンの摘出腸管に対する作用を調べられておりそのお手伝いをした。それらの結果をまとめ（助手の先生がまとめたものを）、岐阜薬科大学で開催された関西薬学生連盟で、無我夢中で発表した（させられた？）。4 年生になり、当然のように卒業論文をこの研究室で作成した。教室のテーマであった麻薬性鎮痛薬研究に興味を持ち、卒業研究のテーマは、メーカーが新規開発した薬物が「モルヒネ鎮痛作用の耐性、依存性を抑制するか」という課題で、マウスを用い Tail-pinch 法により検討した。ここで初めて、*in*

新潟薬科大学薬学部（〒956-8603 新潟市秋葉区東島 265-1）

e-mail: ozakimfm@alles.or.jp

本総説は、平成 26 年度退職にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

vivoでの動物を扱う実験と出会うことになった。詳細な実験結果は忘れてしまったが、「モルヒネ耐性や依存性が鎮痛効果だけではなく他の臓器・器官においても形成される」ことが話題になったことを覚えている。また当時、学内の動物施設の設置に係わっておられた羽野教授からは、動物の取り扱いや倫理等の指導を受けた。このように、学生時代は実験結果やその考察よりも規則正しく研究室に足を運び、体を動かしたことの記憶が多く残っている。卒業後の進路は、迷わず大学院進学に決めた。当時多くの私立大学には、大学院が設置されておらず、研究室の先輩方は、全国各地の大学院へ進学していた。これが幸いして、卒業後に先輩方を訪ねることで、多くの大学研究室の様子や研究室の方々を知る機会となった。大学院修士課程、博士課程は、大阪府立大学農学部獣医学科薬理学教室で一貫して神経伝達物質である「脳組織におけるアセチルコリン合成に関与するコリンに関する研究」を続け学位論文となった。¹⁾「なぜ、薬学部出身者が農学部へ来たのか」という質問を度々受け、日頃研究室内では全く意識していないなかった「領域、分野、経歴など」について考える機会になった。当時、神経伝達物質の研究が盛んな時代であったが、アセチルコリンを研究している研究室は日本では限られており、大阪府立大学農学部と東京大学脳研究所であった。以前から考えていた「ヒトの活動は脳内神経活動」であることに興味を持ち進学した。大学院生時代、柳谷岩雄教授、矢ヶ崎 修助教授から学んだことは、論文を発表しまとめることであり、他の研究室と違い、通常カリキュラムよりも多い数の総説講演が義務づけられていた。また、神経伝達物質やその他の研究においても「生物、物質が起こす現象は、臓器、器官、物質を問わず、その考え方や現象は、今の研究テーマに置き換えて考える」ということであった。研究課題は、「ラット脳組織におけるアセチルコリン合成に関与するコリン」であったが、脳以外の材料や研究分野に目を向けるきっかけになった。研究結果は、コリンが細胞外や神経終末外に多量に放出されることを見出した¹⁾が、生理的意義について明らかにするに至らなかった。当時パーキンソン病に対するドパを用いた基質療法が言われ始めていたが、コリンの役割は、栄養素や神経伝達物質の基質としての役割が論じられているのみ

であった。しかし、後年になりコリンが認知症の治療薬に関連して脚光を浴びることになった。

大学院終了後、和歌山県立医科大学薬理学教室に助手として赴任した。この研究室のテーマは、学部学生時代に共通する麻薬性鎮痛薬に関するものであった。入室当時は、多くの薬物の一般薬理作用について検討した。²⁻¹³⁾一般薬理作用は、「古典的」実験を実施するヒトや機会が少なくなりつつあるが、後日、高校生対象の基礎実験講座を実施する上で貴重な知識・体験となった。大学院生時代に学んだ神経伝達物質と学部学生時代に学んだオピオイド類の研究とを合わせ、研究テーマを「内在性オピオイドの神経機能的ネットワーク」と設定し、後日移籍した新潟薬科大学毒物学教室、薬効安全性学教室でもこれを継続した。当時、神経伝達物質を始め多くの内在性物質の機能を知るために、器官・組織から抽出・定量し、それらの動態の検討が行われていた。種々のオピオイドペプチド類もまた同様に抽出され作用が検討されていたが、器官・組織から抽出・定量しその動態が解析されることはなかった。これは、後述するように、抽出操作・定量過程が複雑なため、抽出されたペプチド類が生体内の状況を反映しているか否かという問題があった。そこで本研究では、脳では検出し難いオピオイド類の遊離効果を機械的反応として捉え、定量を容易にするために摘出回腸を実験材料として選択し、末梢器官の現象を脳機能の概念・解釈を適用することとした。

2. オピオイド作用の検出

マグヌス管に懸垂し、摘出回腸を電界刺激することによって起こる攣縮は、腸の壁内神経叢を刺激し、刺激に対応したアセチルコリンがこの神経叢から遊離され攣縮が起こる。この攣縮は、モルヒネや種々の組織より単離された内因性オピオイド類を適用することによって抑制される。この攣縮抑制作用は、オピオイド類のアセチルコリンの遊離抑制作用

尾崎昌宣

大阪府出身。1969年大阪薬科大学薬学部卒業。75年大阪府立大学大学院農学研究科修士・博士課程修了、農学博士、和歌山県立医科大学助手。81-83年米国ミネソタ大学医学部研究員として出張。92年新潟薬科大学薬学部講師、助教授。2006年同大学薬学部薬効安全性学教授。15年同大学定年退職、名誉教授。専門は薬理学・毒性学。

に起因し、モルヒネ鎮痛効果と相関するため *in vitro* でオピオイド類の作用を知る上で極めて有用な手法であった。¹⁴⁻¹⁷⁾ また、内因性オピオイド類を分解する酵素類の存在や、外部からマグヌス管に加えられた合成の内因性オピオイド類（外因性オピオイド類）の作用とそれらの分解阻害薬の効果についても多数の報告がなされていた。⁸⁻²⁸⁾ しかし、これらの結果は、すべて外因性オピオイド類、すなわち外部からオピオイドペプチド類を適用した場合の作用であり、元来その組織中に存在するオピオイド（内在性オピオイド）の作用を検出したものではない。

本組織において、外部からマグヌス管にオピオイド類を適用しなくても、高頻度刺激（10 Hz）後に低頻度刺激（0.1 Hz）で起こる攣縮の抑制（テタヌス後攣縮抑制）が、オピオイド拮抗薬のナロキソンによって減弱することが報告された（Fig. 1）。^{29,30)} このことは、高頻度刺激の方法として電界刺激法が用いられていることから、この刺激によりオピオイド作動性神経から遊離されたオピオイド類の遊離が促進され、低頻度刺激によるアセチルコリンの遊離を抑制することによってこのテタヌス後攣縮抑制が生じると考えられた。

このような研究に着手し始めたとき、当時の和歌山県立医科大学学長・村野 匡先生、同薬理学教授・山本博之先生から米国ミネソタ大学医学部薬理研究室 Takemori, A. E. 教授のもとへの出張研究の機会を与えて頂いた。その間、このテタヌス後攣縮抑制に関する研究は中断した。ミネソタ大学では、初めての海外生活ということもあって、周囲の人々の様々な日常生活を見聞・経験し、その中で暮らす多くの日本人達や同時期に米国留学していた友人達とも出会うことができ、現在でも交流が続いている。研究室は、Portoghese P. S. 教授の化学研究室と共同研究を行っており、新規合成のオピオイド拮抗薬が次々と持ち込まれ、受容体の「化学構造と薬理作用」について知る機会となった。

研究は、モルヒネ耐性、依存性下におけるオピオイド受容体の性質について研究した。しかし、その米国在任中に出会った研究において、元来組織（特に脳内）にある内在性オピオイド類の動態や、内在性オピオイド類の役割等は全く考慮されていなかった。海外では言葉の問題、研究システム、物流機構

Fig. 1. Inhibitory Response (IR) of the Myenteric Plexus Longitudinal Muscle Preparation Elicited by Stimulation at 10 Hz (top) and Reversal by Naloxone (bottom)

The area of the recorded contractions generated during 5 min by stimulation at 0.1 Hz was measured before (base response, BR) and immediately after stimulation at 10 Hz (post-stimulation response, PSR). The inhibitory response was calculated by subtracting the PSR from the BR. Naloxone (Nx), at the concentration indicated, was added 5 min before the stimulation at 10 Hz in order to measure the BR in the presence of the drug (horizontal calibration is 1 min per division). Cited from Puig M. M. *et al.*, *Science*, **195**, 419-420 (1977).²⁹⁾

Fig. 2. Met-enkephalin Degrading Enzymes and Their Inhibitors

Arrows indicate the decomposed position of met-enkephalin by the respective degrading-enzyme and X(s) show their inhibition of enzymes by the peptidase inhibitors.

等の社会環境の相違等の様々な困難があり、この内在性オピオイド類の研究に着手する機会がなかったが充実した2年間であった。

2年後に帰国したが、依然内在性オピオイド類の機能的役割等については全く研究されていないことを確信し、再び本課題に取り組むこととした。

米国出張前に進めていた内在性オピオイド類の作用としてのテタヌス後攣縮抑制に関する報告はなかった。このテタヌス後攣縮抑制作用は、内在性オ

ピオイド類の機能的作用を知る上で極めて有益な指標であると考え、この検出法の確立と、それらの性質を検討することとした。

3. ペプチダーゼ阻害薬の影響

多くの単離されたオピオイド類がペプチドであることから、組織内在性オピオイド類はペプチドであると考え、ペプチダーゼ阻害薬（ベスタチン：アミノペプチダーゼ阻害薬,³¹⁻³⁴ ホスホラミドン、チオルファン、カプトプリル：エンケファリンアーゼ阻害薬³⁵⁻³⁸）の影響を調べた。内因性オピオイドペプチドの1つであるメチオニンエンケファリンに対する分解酵素とそれらの阻害薬は、Fig. 2の通りである。

その結果、テタヌス後攣縮抑制は、ベスタチン又はホスホラミドンで増強され、ナロキソンで拮抗された。³⁹ そして、アマスタチン、ホスホラミドン及びカプトプリルを併用した場合も同様にテタヌス後攣縮抑制は、増強された (Fig. 3).⁴⁰ これらの結果から、テタヌス後攣縮抑制はオピオイドペプチド類によって生じている抑制であることが示唆された。

4. オピオイド受容体サブタイプの関与

テタヌス後攣縮抑制が内在性オピオイドペプチド類によって引き起こされると考え、この抑制に関与しているオピオイド受容体サブタイプの種類を検討

した。

オピオイド μ 受容体作動薬であるモルヒネの低頻度刺激による攣縮抑制、 κ 受容体作動薬であるダイノルフィン 1-13 の低頻度刺激による攣縮抑制、 δ 作動薬であるロイシン-エンケファリンの低頻度刺激による攣縮抑制を十分に発現する濃度の選択的 μ 受容体阻害薬 β -フナルトレキサミン (β -FNA),^{41,42} 選択的 κ 受容体阻害薬ノルビナルトルフィミン (nor-BNI),^{43,44} 当時の選択的 δ 受容体阻害薬 ICI-174864⁴⁵ の各影響を検討した。その結果、テタヌス後攣縮抑制は、 β -FNA 及び nor-BNI によって抑制され、残存する抑制はナロキソンによってすべて同程度にまで拮抗されたことから、テタヌス後攣縮抑制には、 μ 、 κ 受容体サブタイプが関与し、この器官においてオピオイドペプチド類が μ 及び κ 受容体を介していることがわかった。そして、両受容体作動ペプチド類が高頻度刺激により放出されている可能性が考えられた (Fig. 4).⁴⁶

高頻度刺激により放出されるオピオイドペプチド類の同定を試みた報告によると、各物質の同定過程でかなりのペプチドフラグメントが生成され、それらの生理活性は調べられていない。⁴⁷ したがって、本研究で用いた方法は、オピオイド物質の構造や名

Fig. 3. Representative Dynograph Tracing of the Effect of Peptidase Inhibitors on Post-tetanic Twitch Inhibition in Guinea-pig Ileal Myenteric Plexus-Longitudinal Muscle

Tetanic-stimulation (10 Hz, 0.5 ms pulse width, maximum intensity) was applied for 1, 1.5 and 2 min as indicated by the underlines. Brackets in the tracing indicate post-tetanic twitch inhibition for 1 min. Each preparation was treated with a mixture of peptidase inhibitors, consisting of 100 nM each of amastatin, phosphoramidon, and captopril. This mixture was added to the bath 10 min before the tetanic stimulation. Cited from Ozaki *et al.*, *J. Auton. Nerv. Syst.*, **58**, 147-152 (1996).⁴⁰

Fig. 4. Summarized Representative Dynograph Tracing of the Effect of Various Opioid Receptor Antagonists on Post-tetanic Twitch Inhibition in Guinea-pig Ileal Longitudinal Muscle

Tetanic stimulation (10 Hz, 0.5 ms duration, maximum intensity, 1 min) was applied as indicated by the arrow. Brackets indicate post-tetanic twitch inhibition for 1 min, and each preparation was previously treated with β -FNA (1 μ M), nor-BNI (10 nM) and ICI 174864 (10 μ M). Cited and modified from Ozaki M. *et al.*, *Neuropharmacology*, 33, 671–679 (1994).⁴⁶⁾

称は明らかではないが、機能的に遊離・作用する内在性オピオイド類をより直接的に測定しており、物質を定量するよりもより生理的・機能的定量法として有用であると考えた。

5. ドパミン神経系とオピオイド神経系の相互作用

この内在性オピオイド類反応の機能的役割を知るために、テタヌス後攣縮抑制作用を指標として、ドパミン神経系との相互作用を検討した。

従来、腸において、ドパミン神経から遊離されるドパミンは、副交感神経終末からのアセチルコリン遊離を阻害するため、その結果、低頻度刺激によるアセチルコリン遊離を介した攣縮が抑制されることが知られていた。⁴⁸⁾

そこで、ドパミン D_2 受容体阻害薬であるハロペリドール、スルトプリド (Fig. 5)、ドンペリドン (Fig. 6) の高頻度刺激後抑制への影響を調べた。これらの阻害薬存在下の高頻度刺激後抑制は、非存在下に比べ増強され、オピオイド類の遊離が増加することが示された。^{49,50)}

また、高頻度刺激後抑制に関与するオピオイド μ , κ 受容体に対する影響を、 μ 受容体作動薬のモルヒネ及び κ 受容体作動薬のダイノルフィン 1–13 の低頻度刺激攣縮の抑制効果を調べたが、ハロペリドールは影響がなく、ドンペリドン存在下において μ 受容体作動薬のモルヒネに対する感受性が増大したことから、ドパミン拮抗薬のオピオイド作用の増強機構に相違があることがわかった (Fig. 7)。

これらの結果から、オピオイド類が低頻度攣縮を抑制することが知られているため、^{14–17)} ドパミン受容体阻害薬によりドパミンのアセチルコリンの遊離抑制が解除されるが、オピオイド類の遊離が増加し低頻度刺激によるアセチルコリン遊離が抑制されたと考えられた。そして、従来、副交感神経 (コリン作動性神経) に対するドパミン受容体とオピオイド受容体の存在が個別に考えられていたが、ドパミン作動性神経とコリン作動性神経との相互関係にオピオイド作動性神経を組み入れた神経機能相互作用ネットワークを提唱した (Fig. 8)。⁴⁹⁾

すなわち、従来オピオイド受容体、ドパミン受容体は、それぞれ個別に副交感神経に存在し機能すると考えられ、消化管運動に対する機能が説明されてきた。⁴⁸⁾ しかし、これらの神経系を組み合わせた相互作用は、全く想定されてこなかった。本結果から得られたオピオイド類の遊離作用の増減を考慮に入れて以下のように考えた。すなわち、副交感神経に対してオピオイド神経はドパミン神経よりも下流にあると考え、通常一定の緊張下ではドパミン神経がオピオイドの神経活性を抑制することにより一定のアセチルコリンの遊離を保持している。しかし、ドパミン阻害薬を適用すると、ドパミン神経からのオピオイド神経活性抑制が解除され、オピオイドの遊離促進が起こり、アセチルコリンの遊離抑制が増強されることが考えられた。⁴⁹⁾ この結果は、生化学的手法による定量や解析が複雑である⁴⁷⁾ ことから検討されていないオピオイド類の遊離を機能的に検出することにより、これらの神経系の相互機能ネットワー

Fig. 5. Representative Dynograph Tracing of the Effects of (upper) Haloperidol or (lower) Sultopride, and Naloxone (NLX) on Post-tetanic Twitch Inhibition in Guinea-pig Ileal Myenteric Plexus-Longitudinal Muscle

Haloperidol 10^{-6} M or sultopride 2×10^{-5} M (▲) and NLX 10^{-7} M (●) were added to the bath 10 and 5 min, respectively, before tetanic stimulation (10 Hz, 0.5 ms pulse width, maximum voltage) was applied for 2 min, as indicated by the lines. Cited from Ozaki M. *et al.*, *Neuropharmacology*, **34**, 473–480 (1995).⁴⁹⁾

Fig. 6. Effect of Domperidone on Post-tetanic Twitch Inhibition and Its Antagonism by Naloxone (NLX)

Domperidone, 1 μ M, was added to the bath 10 min before the first tetanic stimulation (10 Hz, 0.5 ms pulse width, maximum voltage for 1 min) and kept continuously in contact with the preparation. NLX 0.1 and 1 μ M were also added to the bath 5 min before tetanic stimulation, as indicated by the arrow. Data points and vertical bars represent mean and S.E.M. of the number of experiments shown in parentheses. ** $p < 0.01$ indicates a difference from non-treated control at the respective stimulation number. Cited from Ozaki M., *et al.*, *Autonomic & Autacoid Pharmacol.*, **23**, 57–62 (2003).⁵⁰⁾

クの存在が窺えた。

6. 副腎摘出とオピオイド神経系の性質

副腎摘出によってモルヒネの鎮痛作用が増強されることが、共同研究者の宮本ら⁵¹⁾によって報告されていた。この増強作用機序を知るために、モルヒネをあらかじめ *in vivo* で投与し、鎮痛作用増強発現

下に摘出された回腸を用い、上記の方法を用い高頻度刺激後攣縮抑制に対する影響を調べた。その結果、高頻度刺激後攣縮抑制は非摘出群に比べ減弱し、オピオイド類の遊離は減少していることがわかった (Fig. 9).⁵²⁾

しかし、このときの、 κ 受容体作動薬であるダイノルフィン 1–13 による低頻度刺激攣縮に対する抑制作用は変化していなかったが、 μ 受容体作動薬であるモルヒネを高濃度適用すると増強がみられ、 μ 受容体の感受性が増大していた (Fig. 10).⁵²⁾

これらの結果から、オピオイド類の遊離減少に起因したオピオイド μ 受容体の感受性増大機構が、副腎摘出時に生ずるモルヒネ鎮痛効果上昇の一機序と考えた。

ドパミン阻害薬及び副腎摘出に関する内在性オピオイド遊離と受容体サブタイプへの作用の要約を Table 1 に示した。

このように、ドパミン阻害薬や副腎を摘出した動物から得られた標本でも、内在性オピオイド類の作用の相違が認められることから、本方法が内在性オピオイド類の定量法 (生物学的定量法の 1 つ)、及び機能的動態を検討する方法として有用であると考えられた。

Fig. 7. Effects of Haloperidol (upper panel) and Domperidone (lower panel) on Actions of Morphine (A) and Dynorphin 1-13 (B) on Electrically Evoked Twitch Response in Guinea-pig Ileal Myenteric Plexus-Longitudinal Muscle

Haloperidol, 1 μ M and domperidone, 1 μ M were added to the bath 10 min before agonists, respectively. Haloperidol did not show any effect on the concentration-response curve for morphine and dynorphin 1-13. Domperidone produced an upward shift in the concentration-response curve for morphine (A) but not in that of dynorphin 1-13 (B). Data points and vertical bars represent mean and S.E.M. of the number of experiments shown in parentheses. * $p < 0.05$ indicates a difference from the non-treated control at the respective concentration of agonist. Upper panel: Cited and modified from Ozaki M. *et al.*, *Neuropharmacology*, **34**, 473-480 (1995).⁴⁹⁾ Lower panel: Cited and modified from Ozaki M. *et al.*, *Autonomic & Autacoid Pharmacol.*, **23**, 57-62 (2003).⁵⁰⁾

7. 耐性, 依存性

7-1. 中枢神経系におけるオピオイド受容体の性質 オピオイド耐性, 依存性下における中枢神経系のオピオイド受容体変化に関する研究では, オピオイド受容体への親和性, 受容体数の変化がこれらの作用発現機序として検討されていた.^{53,54)} これらの多くは, *in vitro* でオピオイド受容体作用薬の結合実験によるもので, 耐性, 依存性動物から得られた膜標本調製は, 定量までいくつかの操作過程 (ホモジネート, 希釈, インキュベートなど) を経るため耐性や依存性下の受容体の状態を直接反映してい

るのかという疑問を持っていた. そこで, *in vivo* の結合実験系を用いた. すなわち, 全脳のうちオピオイド受容体の少ない部位である小脳を非特異的結合とし, その他の部位の特異的結合部位を算出した. その結果, モルヒネ耐性, 依存性下のオピオイド受容体の特異的拮抗薬であるナロキソンの結合は, 高親和性部分ではなく低親和性部分の解離定数がともに減少し, オピオイド受容体の低親和性部分の親和性が増しているが, 受容体数は変化していないことが明らかになった (Table 2).⁵⁵⁾ また, これらの結果から, 耐性, 依存性下の動物から得られた

Fig. 8. Model of Neural Interaction of Dopaminergic, Opioidergic and Cholinergic Systems in the Ileum

Dopaminergic neuron activity inhibits opioidergic neuron activity. This inhibition is blocked by dopamine antagonists, so that the release of endogenous opioid(s) was increased. This increased release of opioid(s) inhibits ACh-release from cholinergic neurons, thereby reducing the twitch contraction. Cited from Ozaki M. *et al.*, *Neuropharmacology*, 34, 473–480 (1995).⁴⁹⁾

膜標本を用いて論議されてきた高親和性部位よりも低親和性部位の関与が明らかになった。

7-2. 摘出回腸における耐性、依存性と内在性収縮物質の検出 耐性、依存性下における末梢器官での内在性オピオイドの動態を知ろうとした。

当時、モルヒネ依存性動物から摘出した回腸や *in vitro* で長時間モルヒネを作用させた後、オピオイド拮抗薬であるナロキソンを適用すると、サブスタンス P が遊離され、収縮を引き起こすことが依存性発現下の現象として報告されていた (Fig. 11).⁵⁶⁻⁶³⁾

耐性、依存性下では、外因性オピオイド類が組織内に集積していると考え、高頻度刺激後抑制を阻害するよりも高濃度のオピオイド受容体拮抗薬ナロキシソンの存在下に高頻度刺激を適用した。その結果、アセチルコリン遊離を介した高頻度刺激後抑制（テタヌス刺激後攣縮抑制）が完全に阻害されるととも

に、高頻度刺激後にナロキソン存在下では濃度依存的に (5×10^{-7} – 5×10^{-5} M)、静止張力の増大（テタヌス刺激後収縮）を見出した (Fig. 12, 矢印)。⁶²⁾

そこで、このテタヌス刺激後収縮に関与する物質を知るために、腸の収縮を引き起こすと考えられているいくつかの神経伝達物質拮抗薬の効果を調べた。その結果、テトロドトキシン存在下ではほぼ完全に抑制され、この収縮が神経由来であることがわかった。また、この収縮は、アセチルコリン拮抗薬アトロピン又はセロトニン拮抗薬メチセルギド存在下ではほとんど影響がみられなかった。しかし、サブスタンス P の拮抗薬スパンタイド、及びプロスタグランジン生合成阻害薬であるインドメタシン前適用によって抑制された (Fig. 13)。⁶⁴⁾ これらの結果から、テタヌス刺激後収縮にはサブスタンス P 及びプロスタグランジン類が関与していることが明らかとなった。

Fig. 9. Effects of Adrenalectomy on Post-tetanic Twitch Inhibition in Guinea-pig Ileal Longitudinal Muscle Preparations

Each preparation was continuously stimulated at a frequency of 0.1 Hz and tetanic stimulation (10 Hz, 0.5 ms pulse width, maximum voltage for 1 min) was applied every 30 min, as indicated by the stimulation number according to the protocol. Symbols represent (○) sham operation and (●) adrenalectomy. Post-tetanic twitch inhibition showed a significant decrease in parallel with the number of stimulations in the adrenalectomized group. The values and vertical bars represent the means and S.E.M. for the number of different animals shown in parentheses. * $p < 0.05$ indicates a difference from sham-operated controls at each stimulation number. Cited from Ozaki M. *et al.*, *J. Auton. Pharmacol.*, **21**, 63–69 (2001).⁵²⁾

Fig. 10. Effects of Adrenalectomy on Concentration-response Curves of Twitch Inhibition for Morphine in Guinea-pig Ileal Longitudinal Muscle

Symbols represent (○) sham operation and (●) adrenalectomy. The curves for morphine in the adrenalectomized group shifted upward at a high concentration of morphine. The values and vertical bars represent the means and S.E.M. for the number of animals shown in parentheses. * $p < 0.05$ indicates a difference from sham-operated group. Cited from Ozaki M. *et al.*, *J. Auton. Pharmacol.*, **21**, 63–69 (2001).⁵²⁾

Table 1. Summary of the Effect of Dopamine Antagonists and Adrenalectomy on Endogenous Opioid Release and Opioid Receptors

	Haloperidol Sultopride	Domperidone	Adrenalectomy
Opioid release	□	□	↓
μ -Receptor (Morphine)	→	↑*	↑*
κ -Receptor (Dynorphin 1–13)	→	→	→

□: increase, ↑: potentiation, ↓: decrease, →: not affected, * high concentration of morphine.

Table 2. Apparent Dissociation Constant (K_B) and Maximal Binding Values (B_{max}) of Naloxone *in Vivo*

Group	High affinity site		Low affinity site	
	K_B (pmol/g)	B_{max} (pmol/g)	K_B (pmol/g)	B_{max} (pmol/g)
Control	3.6 ± 0.5	13.4 ± 0.8	407.8 ± 54.9	219.3 ± 20.1
Withdrawn	3.3 ± 0.9	10.2 ± 1.2	$191.5 \pm 22.0^*$	203.2 ± 11.6
Acute morphine	5.4 ± 1.7	15.0 ± 0.7	353.5 ± 23.5	185.9 ± 5.3
Tolerance	3.7 ± 1.0	12.7 ± 0.8	$199.0 \pm 11.7^*$	194.9 ± 5.3

* Values significantly different ($p < 0.05$) from those of either the control or acute morphine groups. Cited from Oishi R. *et al.*, *Neuropharmacology*, **22**, 1015–1019 (1983).⁵⁵⁾

Fig. 11. Naloxone Induced Contraction of Electrically Stimulated Ileal Longitudinal Muscle of Guinea-pig

Ratio (S_0/S_1): Calculated by measuring the area of the contraction before and after of naloxone ($Nx 1 \mu M$). S (mm^2): Area under the contraction evoked by naloxone. Cited from Kaneto H. *et al.*, *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **76**, 347–354 (1980).⁵⁸⁾

Fig. 12. Naloxone(NLX) Induced Contraction after Tetanic Stimulation

Low-frequency electrical field stimulation (0.1 Hz, 0.5 ms pulse width, maximum intensity) was continued throughout the experiment. Each concentration of naloxone (5×10^{-5} , 10^{-5} , 10^{-6} and 5×10^{-7} M), indicated by the closed circles, was added to the bath 5 min before tetanic stimulation (10 Hz, 0.5 ms pulse width, maximum intensity, for 1 min), indicated by the solid line. The increase in basal tension, which was dependent on the concentration of naloxone, was observed after the tetanic stimulation was stopped, indicated by the arrow. Cited from Ozaki M. *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 17–22 (2000).⁶⁴⁾

このように、テタヌス刺激後収縮がサブスタンス P やプロスタグランジン類によって起こり、内在性オピオイドの遊離を指標であるテタヌス刺激後収縮抑制はナロキソンで完全に阻害されていることから、テタヌス刺激後収縮は、内在性オピオイド遊離とは異なって発現していると考えられた。また、耐性、依存性下でのサブスタンス P やプロスタグランジン類の動態を知る上で、このテタヌス刺激後収縮が指標になるのではないかと考えた。

7-3. オピオイド耐性、依存性検出法としての有用性 オピオイド耐性、依存性検出法としての有用性を調べるために、外因性オピオイドとしてモルヒネ及び内在性オピオイド類の作用を強めるペプチダーゼ阻害薬ベスタチンのテタヌス刺激後収縮に対する効果を調べた。

モルヒネ又はベスタチン単独ではテタヌス刺激後収縮を生じなかったが [Figs. 14(A) and (C)], ナロキソンを適用すると、モルヒネ作用下でテタヌス後収縮抑制の阻害がみられた [Fig. 14(B)]. そして、生体内在性のサブスタンス P やプロスタグランジン類に起因するテタヌス刺激後収縮は、モルヒネ適用時間の長さ（刺激回数：第2回目と6回目）に応じて増強された [Fig. 14(B)]. モルヒネと同様に、テタヌス刺激後収縮は、ペプチダーゼ阻害薬ベスタチンの適用時間の長さ（刺激回数：第2回目と6回目）に応じて増強された [Fig. 14(D)].⁶⁵⁾

これらの結果より、モルヒネ耐性あるいは依存性形成時に遊離される内在性サブスタンス P やプロスタグランジン類の作用の検出にテタヌス刺激後収縮が有効な指標になるのではないかと考えた。⁶⁵⁾ また、本方法は、オピオイド耐性、依存性下で起こる内在性オピオイド類、サブスタンス P、プロスタグランジン類の動態を機能的に検出する指標や依存性下の内在性オピオイド類の動態を知る指標として有用であるとおもわれる。

8. おわりに

大学の薬理学分野で研究を続ける上で留意していたことは、1) 薬物作用を新しく簡便な薬理学的検出法で解析する方法の開発、2) 新しい生体反応現象の検出と解析、3) 薬物による新しい作用や作用点の検出と解析を念頭に、薬物毒性の1つである耐性、依存性発現・防止機構と医薬品の係わりを解明、及び医薬品の安全な使用に寄与することを目的・目標としたが、大学人として特に基礎研究を重視して研究を進めてきた。大学時代に会った薬物耐性や依存性は、化学的・物理的には創り出すことができず生物が創り出すものであり、その機序解明に生物標本を用いて研究することが不可欠であった。薬理学研究は、薬物の作用とその機構を扱う分野と解し、「内在性オピオイド類の薬理学」研究を進めてきた。特に、耐性、依存性は生体内で起こる現象であるとの考えから、本研究では生体内在性物

Fig. 13. Representative Dynograph Tracing (upper) and the Data Column (lower) of the Effect of Antagonists of Muscle Contractile Substances on the Post-tetanic Contraction in the Presence of Naloxone

The drug was added to the bath 10 min before tetanic stimulation, and naloxone was added 5 min before tetanic stimulation (10 Hz, 0.5 ms pulse width, maximum intensity, for 1 min.). The post-tetanic contraction is indicated by an arrow. Cited from Ozaki M. *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.*, 23, 17–22 (2000).⁶⁴⁾

Fig. 14. Representative Dynograph Tracing of the Effects of Naloxone and Tetanic Stimulation in Morphine- and Bestatin-exposed Ileal Preparations

Morphine (10^{-6} M), bestatin (10^{-4} M), naloxone (10^{-6} M) and tetanic stimulation (10 Hz, 0.5 ms duration, maximum voltage for 1 min) were applied. Each drug was added to the bath at the dot and was present throughout the experiments, except naloxone at the 2nd and 6th stimulations, as indicated by the solid lines. Arrows indicate the naloxone-induced contraction and post-tetanic contraction, respectively. Cited from Ozaki M., *J. Toxicol. Sci.*, **27**, 173–182 (2002).⁶⁵⁾

質の機能的役割を検討するために、内因性オピオイドといわれる物質を外部から生体に適用する研究ではなく、元来組織が含有するオピオイド類（内在性オピオイド）の性質や機能について、検出法、性質、神経機能ネットワーク、耐性、依存性における物質の動きと検出法についての知見を提供した。振り返ると、これらの知見は、医療分野における基礎研究の1つに位置づけられるが、医療における基礎研究として確立され繁用されるまでには至らなかった。

一貫して薬理学・毒性学の分野から研究を進めて

きたが、研究を始めた当時の薬学研究手法は、生化学的手法を中心とした生体内物質の定量が主たる手法であり、神経研究においては電気生理学手法が用いられてはいたが、生理学的手法を用いる研究は比較的少なかった。このような観点からみると上記の一連の研究は、当時では異質であり創薬研究に直接役立てるところまでには至らなかった。最近では、生化学、生理学的手法はもとより、薬学の領域に含まれている化学、物理、生物、倫理、心理の基礎を始め医療等の多岐にわたる分野の手法が取り入れられ、それらの境界は見えなくなっている。また、最

近では、コンピュータ技術の発達に伴い、薬理作用を化学反応や作用によって薬物作用機序を可視的に説明する試みがなされている。これらは、創薬予測から作用機序、医療への応用までの一連の過程を説明・理解するのに有効な手段であると考え、このような状況下で、本研究はすぐに創薬研究に役立てることは難しい。しかし、大学人のみが遂行可能であると思われる“基礎の基礎”を研究することも必要であると考え、

大学時代から、各時代の学内関係者のみならず、学会等で多くの方々に出会い、様々な経験をさせて頂いた。退職にあたり、また人生の後半に近づき、「ヒトの評価」を考えると、「ヒトの評価は、人脈と経験」ともいわれるが、グローバルな時代になり、人脈・経験の範囲も多岐多様にわたり、研究・教育の場だけに限られたことではなく、それぞれの知識・経験の線引きは曖昧なものとなり線を引くことは難しく、不要なものとなっている。「ヒトの評価」も多種多様であることは言うまでもない。この多様な時代に小学校以来の学校生活、大学人生活を終わるにあたり「大学人としてのアイデンティティー」を考えてみるが、大学での成果を教育や社会貢献として反映することが不可欠であるが、すぐにかつ直接的に研究や教育を社会に貢献できない分野や、“基礎分野”あるいは“基礎分野の基礎”を扱うのも大学人の役割であり、それらの中から大学人としての評価も見えてくるのではないだろうか。

最後に、退職記念総説ということで、研究論文や研究総説とは異なったスタイルで記述したが、大学人としてのもう1つの責務であると考え教育についてはふれず、自己の研究経緯を含めて研究について記した。研究内容も古くなり、浅く、自己の経緯、感想、意見が多くなり、研究の引用文献も当時のものである。内容の詳細については引用文献を参照頂きたい。

謝辞 本稿で取り上げた研究は、和歌山県立医科大学薬理学教室と新潟薬科大学毒物学研究室、薬効安全性学研究室で行われたものであり、ご指導ご鞭撻を賜りました和歌山県立医科大学山本博之名誉教授、岸岡史郎教授、並びに新潟薬科大学増田康輔名誉教授、長友孝文名誉教授、神戸学院大学仮家公夫名誉教授を始め諸先輩方に衷心より謝意を表しま

す。また、学生時代に入会させて頂いた本学会、本誌関係の皆様を始め、ご指導、ご助力を頂いた皆様方に謹んで深く感謝申し上げます。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Ozaki M., “Available choline for acetylcholine biosynthesis in rat brain,” The Doctoral Dissertation (No. 122) in Osaka Prefecture University, 1978. Abstract of “Osaka Prefecture University Bulletin, 4, 30-35, 1978: (<http://hdl.handle.net/10466/9522>),” cited 1 March, 2016.
- 2) Yamamoto H., Kuki M., Ozaki M., *Oyo Yakuri*, **14**, 15-25 (1977).
- 3) Yamamoto H., Kuki M., Ozaki M., *Oyo Yakuri*, **14**, 97-108 (1977).
- 4) Yamamoto H., Kuki M., Ozaki M., *Oyo Yakuri*, **14**, 109-114 (1977).
- 5) Yamamoto H., Kuki M., Ozaki M., *Oyo Yakuri*, **14**, 115-120 (1977).
- 6) Yamamoto H., Kuki M., Ozaki M., *Oyo Yakuri*, **14**, 121-125 (1977).
- 7) Yamamoto H., Kuki M., Ozaki M., *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **73**, 703-715 (1977).
- 8) Yamamoto H., Ozaki M., Kuki M., Oyama H., Ogawa H., Enomoto K., Matsumoto C., *Oyo Yakuri*, **17**, 431-454 (1979).
- 9) Yamamoto H., Kuki M., Ozaki M., Kishioka S., *Oyo Yakuri*, **18**, 635-645 (1979).
- 10) Yamamoto H., Ozaki M., Kishioka S., Iguchi Y., Takeuchi K., Yanamoto C., Miyazaki K., *Oyo Yakuri*, **24**, 751-766 (1982).
- 11) Yamamoto H., Ozaki M., Kishioka S., Iguchi Y., Takeuchi K., Yanamoto C., Miyazaki K., *Oyo Yakuri*, **24**, 767-790 (1982).
- 12) Yamamoto H., Ozaki M., Kishioka S., Iguchi Y., Takeuchi K., Yanamoto C., Miyazaki K., *Oyo Yakuri*, **24**, 791-806 (1982).
- 13) Yamamoto H., Ozaki M., Kishioka S., Iguchi Y., Takeuchi K., Yanamoto C., Miyazaki K., *Oyo Yakuri*, **24**, 807-819 (1982).
- 14) Paton W. D. M., *Br. J. Pharmacol. Chemother.*, **12**, 119-127 (1957).
- 15) Paton W. D. M., Zar M. A., *J. Physiol.*, **194**, 13-33 (1968).
- 16) Kosterlitz H. W., Waterfield A. A., *Ann. Rev.*

- Pharmacol.*, **15**, 29–47 (1975).
- 17) Waterfield A. A., Kosterlitz H. W., *Life Sci.*, **16**, 1787–1792 (1975).
- 18) Craviso G. L., Musacchio J. M., *Life Sci.*, **23**, 2019–2029 (1978).
- 19) Vogel Z., Altstein M., *FEBS Lett.*, **98**, 44–48 (1979).
- 20) Greenberg R., O’Keefe E. H., Antonaccio M. J., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **217**, 750–756 (1981).
- 21) Geary L. E., Wiley K. S., Scott W. L., Cohen M. L., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **221**, 104–111 (1982).
- 22) McKnight A. T., Corbett A. D., Kosterlitz H. W., *Eur. J. Pharmacol.*, **86**, 393–402 (1983).
- 23) Cohen M. L., Geary L. E., Wiley K. S., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **224**, 379–385 (1983).
- 24) Aoki K., Kajiwara M., Oka T., *Jpn. J. Pharmacol.*, **36**, 59–65 (1984).
- 25) Aoki K., Kajiwara M., Oka T., *Jpn. J. Pharmacol.*, **40**, 297–302 (1986).
- 26) Hiranuma T., Oka T., *Jpn. J. Pharmacol.*, **41**, 437–446 (1986).
- 27) Kuno Y., Aoki K., Kajiwara M., Ishii K., Oka T., *Jpn. J. Pharmacol.*, **41**, 273–281 (1986).
- 28) Kuno Y., Oka T., *Jpn. J. Pharmacol.*, **44**, 241–247 (1987).
- 29) Puig M. M., Gascon P., Craviso G. L., Musacchio J. M., *Science*, **195**, 419–420 (1977).
- 30) Puig M. M., Gascón P., Musacchio J. M., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **206**, 289–302 (1978).
- 31) Umezawa H., Aoyagi T., Suda H., Hamada M., Takeuchi T., *J. Antibiotics*, **29**, 97–99 (1976).
- 32) Hudgin R. L., Charleson S. E., Zimmerman M., Mumford R., Wood P. L., *Life Sci.*, **29**, 2593–2601 (1981).
- 33) Wagner G. W., Dixon J. E., *J. Neurochem.*, **37**, 709–713 (1981).
- 34) Palenker J., Lentzen H., Brandt U., *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **325**, 214–217 (1984).
- 35) Geary L. E., Wiley K. S., Scott W. L., Cohen M. L., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **221**, 104–111 (1982).
- 36) McKnight A. T., Corbett A. D., Kosterlitz H. W., *Eur. J. Pharmacol.*, **86**, 393–402 (1983).
- 37) Rubin B., Laffan R. J., Kotler D. G., O’Keefe E. H., Demaio D. A., Goldberg M. E., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **204**, 271–280 (1978).
- 38) Roques B. P., Fournié-Zaluski M. C., Soroca E., Lecomte J. M., Malfroy B., Llorens C., Schwartz J.-C., *Nature (London)*, **288**, 286–288 (1980).
- 39) Ozaki M., Miyamoto Y., Kishioka S., Masuda Y., Yamamoto H., *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 62–69 (1994).
- 40) Ozaki M., Masuda Y., Yamamoto H., *J. Auton. Nerv. Syst.*, **58**, 147–152 (1996).
- 41) Portoghesi P. S., Larson D. L., Sayre L. M., Fries D. S., Takemori A. E., *J. Med. Chem.*, **23**, 233–234 (1980).
- 42) Takemori A. E., Larson D. L., Portoghesi P. S., *Eur. J. Pharmacol.*, **70**, 445–451 (1981).
- 43) Portoghesi P. S., Lipkowski A. W., Takemori A. E., *Life Sci.*, **40**, 1287–1292 (1987).
- 44) Takemori A. E., Ho B. Y., Naeseth J. S., Portoghesi P. S., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **246**, 255–258 (1988).
- 45) Cotton R., Giles M. G., Miller L., Shaw J. S., Timms D., *Eur. J. Pharmacol.*, **97**, 331–332 (1984).
- 46) Ozaki M., Miyamoto Y., Kishioka S., Masuda Y., Yamamoto H., *Neuropharmacology*, **33**, 671–679 (1994).
- 47) Corbett A. D., Gillan M. G., Kosterlitz H. W., *J. Recept. Res.*, **11**, 665–673 (1991).
- 48) O’Brien C. P., “Goodman & Gilman’s The pharmacological basis of therapeutics,” 10th ed., ed. by Hardman J. G., Limbird L. E., Gilman A. G., McGraw-Hill Co., New York, 2001, pp. 631–634.
- 49) Ozaki M., Miyamoto Y., Kishioka S., Masuda Y., Yamamoto H., *Neuropharmacology*, **34**, 473–480 (1995).
- 50) Ozaki M., Masuda Y., Kishioka S., Yamamoto H., *Auton. Autacoid Pharmacol.*, **23**, 57–62 (2003).
- 51) Miyamoto Y., Ozaki M., Kishioka S., Yamanishi T., Kitabata Y., Morita N., Yamamoto H., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **37**, 703–706 (1990).
- 52) Ozaki M., Masuda Y., Kishioka S., Yamamoto H., *J. Auton. Pharmacol.*, **21**, 63–69 (2001).
- 53) Hitzemann R. J., Hitzemann B. A., Loh H.

- H., *Life Sci.*, **14**, 2393–2404 (1974).
- 54) Klee W. A., Streaty R. A., *Nature*, **248**, 61–63 (1974).
- 55) Oishi R., Ozaki M., Takemori A. E., *Neuropharmacology*, **22**, 1015–1019 (1983).
- 56) Ehrenpreis S., Greenberg J., Comaty J. E., *Life Sci.*, **17**, 49–54 (1975).
- 57) Schulz R., Herz A., *Life Sci.*, **19**, 1117–1127 (1976).
- 58) Kaneto H., Watanabe J., *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **76**, 347–354 (1980).
- 59) Collier H. O. J., Cuthbert N. J., Francis D. L., *Br. J. Pharmacol.*, **73**, 921–932 (1981).
- 60) Wang, F.-S., Tsou K., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **249**, 329–332 (1989).
- 61) Chahl L. A., *Br. J. Pharmacol.*, **80**, 741–749 (1983).
- 62) Chahl L. A., *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **333**, 387–392 (1986).
- 63) Munday M. K., Mason R., Wilson V. G., *Br. J. Pharmacol.*, **124**, 911–916 (1998).
- 64) Ozaki M., Masuda Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 17–22 (2000).
- 65) Ozaki M., *J. Toxicol. Sci.*, **27**, 173–182 (2002).