

冷水強制水泳誘発抗侵害作用の発現における脳内 β -endorphin ならびに ϵ オピオイド受容体の関与

溝口 広一, 成田 年, 澤井 敏樹, 渡辺千寿子, 長瀬 博,
Leon F. Tseng, 櫻田 忍

Involvement of endogenous β -endorphin and ϵ -opioid receptors in supraspinal site on the cold water swimming-induced antinociception in mice

Hirokazu MIZOGUCHI, Minoru NARITA, Toshiki SAWAI, Chizuko WATANABE, Hiroshi NAGASE,
Leon F. TSENG, and Shinobu SAKURADA

(Received November 22, 2005)

The involvement of endogenous opioid peptides and opioid receptors in supraspinal site on the antinociception induced by cold water swimming was determined using the mouse tail-flick test. The mice forced to swim in cold water for 3 min, showed the marked antinociception. The antinociception induced by cold water swimming was significantly attenuated by intracerebroventricularly (i.c.v.) pretreatment with antiserum against β -endorphin, but not against dynorphin A or [Leu⁵]enkephalin. On the other hand, the antinociception was not affected by i.c.v. pretreatment with μ -opioid receptor antagonists β -funaltrexamine and D-Phe-cyclo-(Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen)-Thr-NH₂, δ -opioid receptor antagonists naltrindole, 7-benzylidene naltrexone and naltriben, or κ -opioid receptor antagonist nor-binaltorphimine. The present results suggest that the antinociception induced by cold water swimming may be mainly mediated through the release of β -endorphin in the supraspinal site, which act on β -endorphin-sensitive non- μ -, non- δ -, and non- κ -opioid receptor, so called putative ϵ -opioid receptor.

Key words — Antinociception, cold water swimming, environmental stress, supraspinal, β -endorphin, ϵ -opioid receptor

生体は気温, 湿度, 気圧の変化など様々な環境的ストレスにさらされており, それら環境的ストレスに対応して生体の機能を変化させる事により恒常性を維持している. ストレス負荷, 特に生命の危機を引き起こす程の激しい環境変化に対抗する生体の機能変化の一つに, 内因性オピオイドペプチドの遊離が考えられる. 脳内における内因性オピオイドペプチドの遊離は, 脳内オピオイド受容体を刺激することにより陶酔感と共に抗侵害作用を発現し, ストレス負荷による苦痛や疼痛を緩和すると推察されている¹⁾.

実際に, 種々の環境的ストレスにより抗侵害作用が発現する事が, マウスやラットを用いた動物実験において確認されている^{1,2)}. また, 環境的ストレスの中でも特に冷水強制水泳ストレスは, マウスにおいて強力な抗侵害作用を誘導し, その抗侵害作用の発現には脳内オピオイド受容体刺激が関与していることが報告されている^{3,4)}. 脳内には μ , δ , κ など各種オピオイド受容体が存在し, その内因性リガンドとして種々の内因性オピオイドペプチドが存在しているが, そのいずれが冷水強制水泳誘発抗侵害作用の発現に

関与しているかは未だ明らかにされていない。

そこで本研究においては, マウスの冷水強制水泳により誘発される抗侵害作用の発現に対する, 脳内内因性オピオイドペプチドならびにオピオイド受容体の関与を, tail-flick法において検討した。

実験材料および方法

1. 使用動物

実験には23-25gのICR系雄性マウス(Sasco, Omaha, NE, USA)を使用した。実験に供するまで, 明暗サイクル12時間, 室温 $22 \pm 0.5^\circ\text{C}$ の一定環境下で, 固形飼料および水道水を自由摂取させ飼育した。

2. 使用薬物

β -Funaltrexamine (東レ株式会社医薬研究所, 鎌倉), D-Phe-cyclo-(Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen)-Thr-NH₂ (CTOP: Peninsula Laboratory Inc., Belmont, CA, USA), naltrindole (東レ株式会社医薬研究所, 鎌倉), 7-benzylidene naltrexone (BNTX: 東レ株式会社医薬研究所, 鎌倉), naltriben (東レ株式会社医薬研究所, 鎌倉), nor-binaltorphimine (東レ株式会社医薬研究所, 鎌倉)を使用した。内因性オピオイドペプチド, β -endorphin, [Leu⁵]enkephalin, dynorphin Aの各抗体血清は, 定法に従いNew Zealand系雄性ウサギを用いて作製し, 十分な抗体価ならびに選択性を持つ事を確認した⁵⁾。全ての薬物ならびに抗体は, 滅菌生理食塩液に溶解した。

3. 抗侵害作用の測定

抗侵害作用は, D'Amour and Smithの方法⁶⁾に従い, tail-flick法により測定した。Tail-flick装置(model TF6: EMDIE Instrument Co., Maiden, VA, USA)を用い, マウス尾背部に放射熱を加え, tail-flick反応(尾を振る事により放射熱から逃れる反応)の反応潜時を測定した。放射熱の強度は, 無処置マウスにおいてtail-flick反応の反応潜時が3~5秒になるよう調節した。抗侵害作用は, 以下の式から算出した最大有効

反応率(percent of the maximum possible effect: % MPE)で表した。最大有効反応率(%) $= [(T_1 - T_0) / (10 - T_0)] \times 100$ 。なお T_0 および T_1 は, それぞれ冷水強制水泳前および水泳後のtail-flick反応潜時とした。尾背部組織の損傷を防ぐ為, 最長熱放射時間を10秒に設定した。

4. 冷水強制水泳誘発抗侵害作用

冷水強制水泳には, 4°C の冷水を張った水槽(30cm \times 20cm, 高さ15cm, 水深7.5cm)を用いた。冷水強制水泳前のtail-flick反応潜時を測定した後, マウスを水槽内に入れ3分間泳がせた。冷水強制水泳後, 乾いたタオルを用い, 速やかにマウスの体毛を乾かした。予試験において, 冷水強制水泳誘発抗侵害作用は水泳後速やかに形成され, 水泳7分後に最大抗侵害作用を示し水泳20分後に消失した事から, 以下の実験においては水泳7分後の抗侵害作用を測定した。

5. マウス脳室内投与

マウス脳室内(i.c.v.)投与は, Haley and McCormickの方法⁷⁾に準じ, $10\mu\text{l}$ のハミルトンマイクロシリンジを用いて行った。また投与容量は $4\mu\text{l}$ とした。

6. 統計処理

実験は一群10~24匹で行い, 抗侵害作用は平均 \pm 標準誤差で表した。統計学的検定は, 一元配置分散分析にて行い, Bonferroni's testにより後検定を行った。

実験結果

1. 冷水強制水泳誘発抗侵害作用に対する脳内内因性オピオイドペプチドの関与

冷水強制水泳1時間前に, 内因性オピオイドペプチドである[Leu⁵]enkephalin, dynorphin Aおよび β -endorphinの各抗体ウサギ血清をマウスに脳室内投与し, 冷水強制水泳誘発抗侵害作用に与える影響を検討した。対照群にはノーマルウサギ血清を前処置した。ノーマルウサギ血清を前処置した群においては, 冷水強制水泳

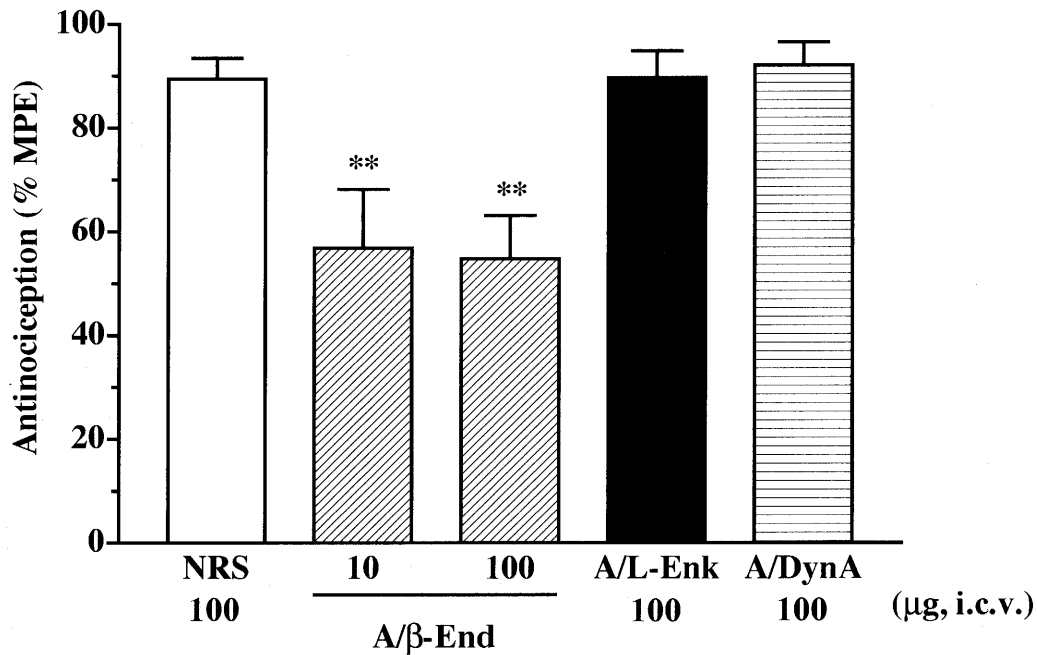


Fig. 1. The effects of i.c.v. pretreatment with antisera against endogenous opioid peptides on the antinociception induced by cold water swimming in mice. Groups of mice were injected i.c.v. with normal rabbit serum (NRS: 100 μ g) or antisera against β -endorphin (A/ β -End: 10 and 100 μ g), [Leu⁵]enkephalin (A/L-Enk: 100 μ g) or dynorphin A (A/DynA: 100 μ g), 1 hr prior the cold water swimming (4°C, 3 min). The antinociception induced by cold water swimming was measured 7 min after the cold water swimming. The data represent the mean \pm S.E.M. The statistical significance of differences between groups was assessed with one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test. The F value of ANOVA is F [4,55]=7.675 (P<0.001). **P<0.01 vs. NRS.

により約90%の抗侵害作用が発現した(図1)。この抗侵害作用は、抗 β -endorphinウサギ血清の脳室内前処置により有意に抑制された。一方、抗[Leu⁵]enkephalinウサギ血清ならびに抗dynorphin Aウサギ血清の脳室内前処置によっては、冷水強制水泳誘発抗侵害作用は全く影響を受けなかった。

2. 冷水強制水泳誘発抗侵害作用に対する脳内オピオイド受容体の関与

冷水強制水泳誘発抗侵害作用の発現に対する脳内オピオイド受容体の関与を、各種オピオイド受容体拮抗薬を脳室内前投与する事により検討した。使用する各種オピオイド受容体拮抗薬の用量は、対応するオピオイド受容体作動薬の脳室内投与により誘発される抗侵害作用を、選択的かつ完全に抑制する用量とした⁸⁾。図2に示す通り、

冷水強制水泳誘発抗侵害作用は、 μ オピオイド受容体拮抗薬CTOPおよび β -funaltrexamine、 δ オピオイド受容体拮抗薬naltrindole、BNTXおよびnaltriben、 κ オピオイド受容体拮抗薬norbinaltorphimineの、いずれの脳室内前投与によっても全く影響を受けなかった。

考 察

本研究において、冷水強制水泳誘発抗侵害作用が、内因性オピオイドペプチドである β -endorphinの抗体を脳室内前投与することにより有意に抑制されたことから、この抗侵害作用は、冷水強制水泳ストレスに対する生体の防御反応として、脳内で β -endorphinが遊離されることにより発現することが明らかとなった。オピオイド受容体拮抗薬を用いた動物実験の結果から、環境的

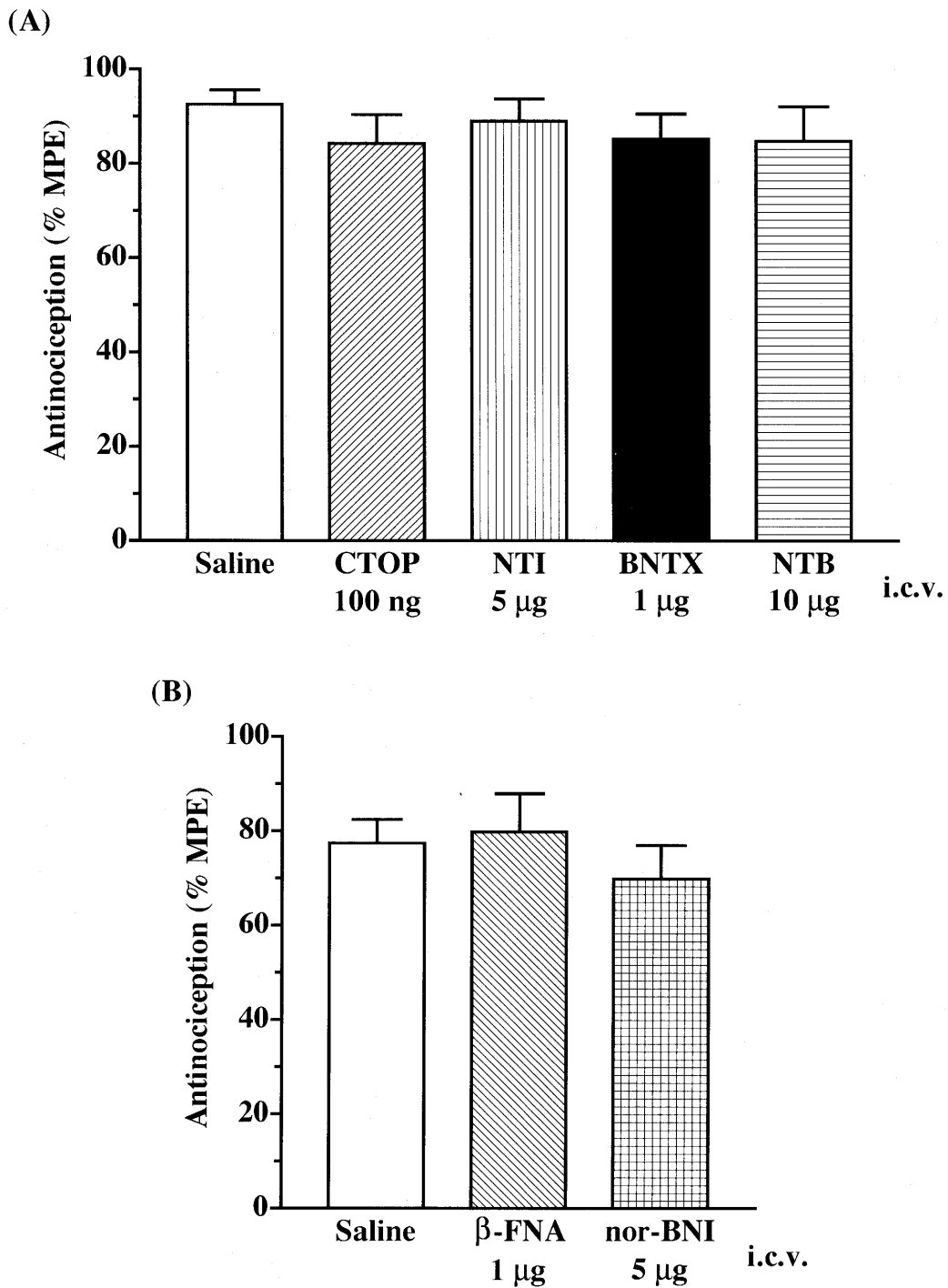


Fig. 2. The effects of i.c.v. pretreatment with opioid receptor antagonists on the antinociception induced by cold water swimming in mice. Groups of mice were injected i.c.v. with saline, CTOP (100 ng), naltrindole (NTI: 5µg), BNTX (1µg) or naltriben (NTB: 10µg) 10 min before (A), or saline, β-funaltrexamine (β-FNA: 1µg) or nor-binaltorphimine (nor-BNI: 5µg) 24 hr before (B) the cold water swimming (4 °C, 3 min). The antinociception induced by cold water swimming was measured 7 min after the cold water swimming. The data represent the mean ± S.E.M. The statistical significance of differences between groups was assessed with one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test.

ストレス誘発抗侵害作用の発現に内因性オピオイドペプチドが関与している可能性は従来より指摘されてきていたが¹⁻⁴⁾、本研究は、環境的ストレス誘発抗侵害作用の発現に関与する具体的内因性オピオイドペプチドの存在をはじめて示唆した。

β -Endorphinは、 μ オピオイド受容体に対する親和性が比較的高い事⁹⁾から、発見された当初より内因性 μ オピオイドペプチドであると考えられてきた。しかしながら、 β -endorphinの上位中枢における抗侵害作用など種々の薬理作用は μ オピオイド受容体を介して発現していない事¹⁰⁾、また近年極めて選択的な内因性 μ オピオイドペプチドとしてendomorphin-1およびendomorphin-2が発見された事¹¹⁾から、内因性 μ オピオイドペプチドとしての β -endorphinの存在は疑問視されるようになってきている。一方Nockら^{12, 13)}は、脳内には β -endorphin感受性の非 μ 非 δ 非 κ オピオイド受容体が存在する事を受容体結合実験において証明しており、その受容体を ϵ オピオイド受容体と命名している。この ϵ オピオイド受容体に選択的な作動薬あるいは拮抗薬は、現時点では存在せず、それゆえ ϵ オピオイド受容体自身も未だクローニングされていない。しかしながらTsengらは、in vivoならびにin vitroの種々の実験を行う事によって、 β -endorphinの薬理作用は主に脳内 ϵ オピオイド受容体を介して発現する事を示唆している^{10, 14)}。 β -Endorphinの脳室内投与によって誘導される特徴的生理反応として、脊髄における内因性 δ オピオイドペプチド [Met⁵]enkephalinの遊離が知られているが、選択的 μ オピオイド受容体作動薬、選択的 δ オピオイド受容体作動薬、選択的 κ オピオイド受容体作動薬のいずれの脳室内投与によっても、その様な生理反応は出現しないことから、脊髄における [Met⁵]enkephalinの遊離は、脳内 ϵ オピオイド受容体を介して発現すると考えられている¹⁰⁾。

本研究において、冷水強制水泳誘発抗侵害作用は、 μ 、 δ および κ オピオイド受容体の各種拮抗薬の脳室内前処置によっては全く影響を受けなかったことから、この抗侵害作用は、 β -

endorphinにより脳内 ϵ オピオイド受容体が刺激される事により発現する可能性が示唆された。我々は以前に、冷水強制水泳誘発抗侵害作用の発現には、脊髄における [Met⁵]enkephalinの遊離と、遊離された [Met⁵]enkephalinによる脊髄 δ オピオイド受容体刺激が関与している事を報告している^{15, 16)}。本研究結果は、我々の以前に報告したこの研究結果と極めて一致しており、冷水強制水泳ストレスにより、脳内 ϵ オピオイド受容体を介した下降性抑制鎮痛経路、特に [Met⁵]enkephalin含有神経の活性化が誘導される事が示唆された。

一方Killianら³⁾やVanderahら⁴⁾は、冷水強制水泳誘発抗侵害作用の発現には、脳内 δ オピオイド受容体刺激が関与していることを、選択的 δ オピオイド受容体拮抗薬を用いて報告しており、本研究の結果と相違が認められる。我々は以前に、冷水強制水泳誘発抗侵害作用は、百日咳毒素の脊髄クモ膜下腔内前処置により著しく抑制されるが、百日咳毒素の脳室内前処置によっては全く影響を受けない事を報告している¹⁷⁾。オピオイド受容体の三大主要受容体 μ 、 δ 、 κ オピオイド受容体は、百日咳毒素感受性Gi/Go蛋白と共役している受容体であり¹⁸⁾、その受容体刺激により発現する抗侵害作用は、脊髄・脳のいずれにおいても百日咳毒素の前処置により抑制される事が知られている¹⁹⁾。これに対し、脳内 ϵ オピオイド受容体は百日咳毒素非感受性Gi/Go蛋白と共役している受容体であり、その受容体刺激により発現する抗侵害作用は、百日咳毒素の前処置により全く影響を受けない事が報告されている¹⁹⁾。これらの報告は本研究の実験結果を支持するものであり、本研究の実験条件においては、脳内 μ 、 δ 、 κ オピオイド受容体は冷水強制水泳誘発抗侵害作用の発現には関与していないものと思われる。Killianら³⁾やVanderahら⁴⁾の報告との相違は、おそらく動物種、水温、水槽のサイズ、水泳時間を含む種々の実験条件の違いに基づくものと考えられる。また本研究において、冷水強制水泳誘発抗侵害作用は、 β -endorphin抗体の脳室内前投与により有意に抑制されたが、その抑制は完全なもの

ではなかった。冷水強制水泳誘発抗侵害作用が百日咳毒素に非感受性であることから、冷水強制水泳誘発抗侵害作用の発現には、脳内 ϵ オピオイド受容体以外に、Gi/Go 蛋白非共役型の何らかの機構も一部関与している可能性が考えられる。

結論として、本研究の結果から、冷水強制水泳ストレスによって誘発される抗侵害作用の発現には、脳内における内因性オピオイドペプチド β -endorphin の遊離と、遊離された β -endorphin による脳内 ϵ オピオイド受容体刺激が主に関与している事が明らかとなった。

REFERENCES

- 1) Mayer D.J., Manning B.H., "The Pharmacology of Opioid Peptides" Chap. 18, ed. by Tseng L.F., Hardwood Academic Publishers, Switzerland, 1995, pp. 345-395.
- 2) Tierney G., Carmody J., Jamieson D., *Pain*, **46**, 89-95 (1991).
- 3) Killian P., Holmes B.B., Takemori A.E., Portoghese P.S., Fujimoto J.M., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **274**, 730-734 (1995).
- 4) Vanderah T.W., Wild K.D., Takemori A.E., Sultana M., Portoghese P.S., Bowen W.D., Hruby V.J., Mosberg H.I., Porreca F., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **262**, 190-197 (1992).
- 5) Tseng L.F., Collins K.A., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **266**, 1430-1438 (1992).
- 6) D'Amour F.E., Smith D.L., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **72**, 74-79 (1941).
- 7) Haley M.J., McCormick W.G., *Br. J. Pharmacol.*, **12**, 12-15 (1957).
- 8) Tseng L.F., Narita M., Suganuma C., Mizoguchi H., Ohsawa M., Nagase H., Kampine J.P., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **292**, 576-583 (2000).
- 9) Raynor K., Kong H., Chen Y., Yasuda K., Yu L., Bell G.I., Reisine T., *Mol. Pharmacol.*, **45**, 330-334 (1994).
- 10) Tseng L.F., "The Pharmacology of Opioid Peptides" Chap. 13, ed. by Tseng L.F., Hardwood Academic Publishers, Switzerland, 1995, pp. 249-269.
- 11) Zadina J.E., Hackler L., Ge L.-J., Kastin A.J., *Nature*, **386**, 499-502 (1997).
- 12) Nock B., Giordano A.L., Cicero T.J., O'Connor L.H., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **254**, 412-419 (1990).
- 13) Nock B., Giordano A.L., Moore B.W., Cicero T.J., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **264**, 349-359 (1993).
- 14) Mizoguchi H., Narita M., Nagase H., Tseng L.F., *Life Sci.*, **67**, 2733-2743 (2000).
- 15) Mizoguchi H., Narita M., Nagase H., Tseng L.F., *Regul. Pept.*, **59**, 255-259 (1995).
- 16) Mizoguchi H., Narita M., Kampine J.P., Tseng L.F., *Life Sci.*, **61**, PL81-86 (1997).
- 17) Mizoguchi H., Narita M., Kampine J.P., Tseng L.F., *Eur. J. Pharmacol.*, **309**, 37-40 (1996).
- 18) Law P.Y., "The Pharmacology of Opioid Peptides" Chap. 6, ed. by Tseng L.F., Hardwood Academic Publishers, Switzerland, 1995, pp. 109-130.
- 19) Tseng L.F., Collins K.A., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **279**, 39-46 (1996).