

論文要旨

論文題目「Increase in antinociceptive effect of [Leu⁵]enkephalin after intrathecal administration of mixture of three peptidase inhibitors」

(ラット髄腔内に投与したペプチド分解酵素阻害剤によるロイシンエンケファリンの鎮痛効果の増強)

学位申請者 三浦正明

キーワード: [Leu⁵]enkephalin, antinociception, amastatin, captopril, phosphoramidon

背景

末梢の皮膚から入力された痛み刺激により侵害受容器で活動電位が発生し、これが一次知覚神経のA δ またはC線維を伝わり脊髄後角に伝えられる。脊髄後角でシナプス伝達が行われる過程で、この情報は修飾、統合され上位中枢へ伝えられ、痛みとして認識される。痛みは重要な生体警告系であり、下垂体からACTHを分泌するなどの抗ストレス機構を駆動させるが、末梢から脳に至るまでの過程でこの痛み警告情報を消去するものとして、この経路を抑制するシステムが存在する。一つは脳幹より脊髄へ投射する線維が存在し脊髄で選択的に痛みを抑制する下行性抑制系と呼ばれる系で、この系で脳から脊髄へ放出される神経伝達物質は主にノルアドレナリンとセロトニンである。もう一つは、脊髄内鎮痛であり、抑制性介在ニューロンからGABA、グリシンを放出し、脊髄後角ニューロンを抑制する。脊髄においてはオピオイド受容体、NMDA受容体、GABA受容体が密に存在し一次求心線維末端からのサブスタンスPなどの神経伝達物質の遊離を抑制すること、カリウムチャネルの活性化による過分極状態を介してシナプス後抑制を引き起こすこと、グルタミン酸などによる脊髄後角細胞の興奮を抑制することなどが知られている。これらのことから、オピオイド受容体は脊髄における疼痛伝達を前シナプス性および後シナプス性に修飾し、鎮痛効果を発揮する内因性疼痛制御機構の一つであると考えられる。

1970年代、オピオイド受容体(μ , δ , κ)の発見とほぼ同時期にオピオイドペプチドとしてエンケファリンが発見された。エンケファリンの中でロイシンエンケファリン(以下、LE)とメチオニンエンケファリン(以下、ME)が一番短い基本骨格を持ちオピオイド受容体に作用する内因性活性物質と考えられる。その後約20種類もの関連オピオイドペプチドが発見されたが、これらは何れも3つの異なる前駆蛋白質(プロエンケファリン、プロダイノルフィン、プレプロオピオメラノコルチン)からプロセシング酵素による限定分解を受けて生じる生理活性ペプチドであることが判明した。ペプチドの主要な不活化機構として酵素による代謝と再取り込みがあるが、オピオイドペプチドは前者が主役である。オピオイドペプチドの中で、LEはMEに比べて鎮痛作用は無い、かなり弱く、またペプチド分解酵素により容易に加水分解されるため持続時間も短いといわれていた。しかしME、LE、ダイノルフィンA (1-8)などの分解をアマスタチン(A)、カプトプリル(C)、フォスフォラミドン(P)のペプチド分解酵素阻害剤3種混合液がほぼ100%抑制すると、マウス脳膜標本や輸精管を用いた*in vitro*実験で報告されている。以前に3種ペプチド分解酵素阻害剤をラット脳室内に前投与することによりLEの鎮痛効果が増強されることが報告されているが、髄腔内におけるLEに対するペプチド分解酵素阻害剤の効果については報告がない。

目的

本研究では、ラット髄腔内に3種ペプチド分解酵素阻害剤によるLEの鎮痛効果への影響を明らかにすることを目的とした。

方法

7週齢Wistar系雄性ラット(体重180~220 g)を用いた。脊髄腔内カテーテル留置：笑気・酸素・イソフルレン吸入麻酔下においてYakshらの方法に従い、環椎後頭間膜より腰椎髄腔内にPE10(外径0.61mm)を8.5cm挿入し数日以内に運動麻痺がおきなかったものを実験に供試した。3種のペプチド分解酵素阻害剤(以下、PIs)を髄腔内に投与し10分後にLEを髄腔内投与した。LEを投与後5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120分目に55℃恒温槽にラットの尾を浸し、tail-flick responseまでの潜時を測定した。尚、cut off timeは5秒とした。Tail flick法による鎮痛効果は%MPE (percentage of maximum possible effects)=[(test-latency - baseline latency)/(5 - baseline latency))x100 および AUC(縦軸に%MPE、横軸に時間をとった場合のarea under the curve)を用いて評価した。 μ , δ , κ オピオイド受容体の各拮抗薬:D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH₂ (CTOP: 10 nmol 髄腔内)、naltrindole(NTI: 66 nmol 髄腔内)、norbinaltorphimine(nor-BNI: 10 mg/kg 皮下)をそれぞれPIs投与の5分, 20分, 24時間前に投与した。

結果

ラット髄腔内へLE投与前に3種PIsを投与した場合、PIsの用量依存的にLEの鎮痛作用が増強された。3種PIs各10nmol投与群は、PIs非投与群に比べLEの鎮痛効果が約100倍程度有意に増強した。3種PIs混合液(各10nmol)の前投与によりLEは用量依存的(0.1, 1.0, 10, 100 nmol)に鎮痛作用持続時間が延長され、効力が増強した。すなわち、鎮痛作用が増強した。1種および2種PIs混合液(各10nmol)においても、PIs非投与群に比べ、LEの鎮痛作用は増強した。しかし、PIs3種混合液による鎮痛効果は1種および2種PIs混合液に比べて有意に大きかった。

CTOPおよび NTIにより3種PIs混合液(各10nmol)前投与したLE(10 nmol)の鎮痛効果が有意に減弱した。nor-BNIにおいても鎮痛効果が減弱したが有意差はなかった。脳室内投与よりも脊髄腔内投与の方が3種PIs混合液(各10nmol)前投与したLEの鎮痛効果は有意に増強された。3種PIs混合液(各10nmol)前投与したLEの鎮痛効果はモルヒネと比較して作用持続時間が短かった。

考察

以上の実験結果から、ラット脊髄腔内にPIsを3種類前投与することによりLEの加水分解が有意に抑制され鎮痛作用の効力が増強され持続時間も延びたと考えられた。また、ラット髄腔内に投与されたLEの加水分解を有意に抑制するにはPIs 3種類が必要であると考えられた。これは以前の37℃ 60分のマウス輸精管での膜標本を使った実験でのA, C, Pの 3種PIsを加えるとLEの分解が98%抑えられたという *in vitro*での結果と一致した。

Tail-flick法は一部脳によるものであるが主に脊髄反射を見ていることから、脳室内投与に比べて髄腔内投与の方がPIs+LE投与による鎮痛効果の増強程度は大きくなったと考えられた。

結論

3種PIsの髄腔内前投与によって、LEの鎮痛効果は有意に約100倍程度増強された。PIsは内因性オピオイドペプチドの鎮痛効果を利用した鎮痛補助薬としての可能性が示唆された。またラット髄腔内へのPIs+LE投与による鎮痛効果は、脳室内投与よりもより低用量で有意に増強された。髄腔内に3種PIs混合液(各10nmol)前投与したLEによる鎮痛効果は、 μ および δ 受容体を介することが示された。

これらから脊髄へのオピオイド投与は脳室内投与よりも、低用量投与でより優れた鎮痛法となる可能性があり、より現実的で臨床の術後鎮痛にも応用された呼吸抑制の少ない硬膜外オピオイドが普及しているのに合致するものと考えられる。