

②

脊髄後角内一次感覚神経からのグルタミン酸遊離と
その制御に関する薬理学的研究

1995

上田 睦明

目次

緒言	1
第一章 オンライン測定法によるカプサイシン感受性一次感覚神経からの グルタミン酸遊離の証明	3
実験方法	3
実験結果	
第1節 グルタミン酸のオンライン測定法の確立	7
第2節 カプサイシン感受性一次感覚神経からのグルタミン酸遊離	9
考察	17
第二章 カプサイシン誘発グルタミン酸遊離に対する 抗侵害受容物質の抑制効果	19
実験方法	19
実験結果	
第1節 オピオイドアゴニストの抑制効果	21
第2節 α アドレノセプターアゴニストの抑制効果	26
考察	30
第3章 脊髄後角内プロスタグランジン類のグルタミン酸遊離促進作用 および痛覚過敏発現への関与	33
実験方法	33
実験結果	
第1節 痛覚過敏発現に対する脊髄後角内NMDAレセプターおよび シクロオキシゲナーゼの関与	35
第2節 侵害受容閾値に対する脊髄くも膜下腔内投与した プロスタグランジン類の効果	38
第3節 プロスタグランジン類のグルタミン酸遊離促進作用	42
考察	45
総括および結論	48
謝辞	49
発表論文	50
引用文献	51

緒言

痛みは、組織を損傷するような侵害性の刺激により起こり、生体を種々の危害から逃れさせるための警告信号として重要な役割を果たしている。しかし、痛みには器質的な原因のはっきりしないものや癌末期のように原因は分かっているにもかかわらずそれを除去することが難しいものがあり、これらの場合には痛み自体が治療の主な対象となる。脊髄後角は、A δ およびC線維からなる侵害受容性一次感覚神経から痛覚情報を受け取る最初の中枢神経系であり、鎮痛薬を開発する上でこの部位を作用点とする薬物が有効な場合があると考えられる。しかし、鎮痛機構の研究と痛覚伝達機構の研究は表裏の関係をなすものであり、鎮痛機構の更なる解明には痛みの成立の物質的基礎の解明が不可欠である。脊髄後角内での痛覚情報の伝達機構については比較的よく調べられており、一次感覚神経の中枢側終末から遊離されるサブスタンスP等の神経ペプチドが、痛覚情報を伝達する神経伝達物質の有力な候補あることが以前から知られていた。しかし、その後の研究により、中枢神経系での主要な興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸が、脊髄後角内において痛覚情報の伝達に関与していることが行動薬理的、電気生理学的研究によって明らかとなってきた。さらに、グルタミン酸が一次感覚神経終末のシナプス小胞内に存在することが明らかとなっている。これらの知見は、グルタミン酸が一次感覚神経における主要な痛みの伝達物質である可能性を示唆している。したがって、侵害受容性一次感覚神経線維からのグルタミン酸遊離の調節機構を調べることは、脊髄後角内における痛覚情報伝達の機序の物質的解明に有用であり、また、鎮痛薬を開発するという点においても重要であると思われる。しかし、グルタミン酸が侵害受容性一次感覚神経から遊離されることを直接的に示した知見は報告されていなかった。

そこで、本研究において著者は、グルタミン酸のオンラインモニタリング法を確立し、C線維あるいはA δ 線維を選択的に興奮させることが知られているカプサイシンのグルタミン酸遊離に対する影響を検討した。その結果、カプサイシン刺激により脊髄後角内一次感覚神経終末からグルタミン酸が遊離されることを初めて明示した。また、このグルタミン酸の遊離が、オピオイドなどの鎮痛物質によって抑制的に、また、プロスタグランジン類によって促進的に調節されていることを明らかにした。これらの研究成果について以下に三章に分けて論述する。

なお本文中あるいは図表中で使用した略号および薬物の化学名は以下の通りである。

aCSF	Artificial cerebrospinal fluid
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
DAMGO	[D-Ala ² , MePhe ⁴ , Gly(ol) ⁵]Enkephalin
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DPDPE	[D-Pen ² , D-Pen ⁵]Enkephalin
EGTA	Ethylene glycol bis (β-aminoethyl-ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
GABA	γ-Aminobutylic acid
GDH	Glutamate dehydrogenase
ir-	Immunoreactive
i.t.	Intrathecal
(+)-MK-801	(5R,10S)-(+)-5-Methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d] cyclohepten-5,10-imine (dizocilpine)
β-NAD	β-Nicotinamide adenine dinucleotide
NMDA	N-methyl D-aspartate
NSAIDs	Non-steroidal anti-inflammatory drugs
PBS	Phosphate-buffered saline
PG	Prostaglandin
RIA	Radioimmunoassay
ST-91	2,6-Diethyl-N-2-imidazolidinyliden-benzenamine
U50,488H	(±)- <i>trans</i> -3,4-Dichloro-N-methyl-N-[2-(1-pyrrolidinyl)cyclohexyl]benzeneacetamide
U69,593	(+)-(5α,7α,8β)-N-Methyl-N-[7-(1-pyrrolidinyl)-1-oxaspiro[4,5]dec-8-yl]benzeneacetamide

第一章

オンライン測定法によるカプサイシン感受性一次感覚神経からのグルタミン酸遊離の証明

グルタミン酸は、中枢神経系における主要な興奮性神経伝達物質の一つであり、脊髄において痛覚の情報伝達に重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。侵害情報の伝達に関与していると考えられている細径一次感覚神経の終末部には、シナプス小胞内に貯蔵されたグルタミン酸が存在し、サブスタンスPなどの神経ペプチドと一部共存することが免疫組織化学的に示されている [5, 13, 45]。しかし、このような神経終末からグルタミン酸が遊離されるという物質的な証拠は明確には示されていない。とうがらしの辛味成分であるカプサイシンは、細径一次求心性線維であるCあるいはAδ線維を選択的に興奮させ [25, 72]、脊髄後角切片に適用するとサブスタンスPなどの神経ペプチドの遊離が誘発されることは古くから知られていた [20, 35, 49, 75]。グルタミン酸が一次感覚神経に存在し、侵害受容伝達に関与しているならば、カプサイシンを脊髄後角部に投与すると、グルタミン酸の遊離が惹起されると考えられる。しかし、以前の研究では惹起されないという結果しか報告されていなかった [2, 16, 66, 68]。この原因として、グルタミン酸遊離の場合、基礎遊離量が誘発遊離量に比べ極めて多いため、数分間毎にフラクションを採取して測定する従来の方法では測定誤差や時間分解能の低さのため誘発遊離が検出できなかったと考えられる。したがって、著者は、精度と再現性が良く時間分解能が高い測定法としての *in vitro* 実験に応用可能なグルタミン酸遊離のオンライン測定法の確立を試みた。

実験方法

(1) 使用動物

実験には、体重 200 - 300 g の Sprague-Dawley 系ラット (6 - 8 週齢) を使用した。

(2) 薬物の調製法

テトロドトキシンは、0.3 mM の濃度で 50 mM クエン酸緩衝液 (pH 4.5) に溶解し 4°C で保存した。3-ヒドロキシアスパラギン酸 (Sigma) は、10 mM の濃度で 40 mM 水

酸化ナトリウム水溶液に用時溶解した。NAD (Sigma)、カプトプリル、ロイペプチン、ベスタチンはそれぞれ H₂O に溶解し -20°C で保存した。カプサイシン (Sigma) は、DMSO に溶解し 4°C で保存した。カプサゼピン (Sandoz) は、DMSO に溶解し -20°C で保存した。

(3) グルタミン酸脱水素酵素の固定化

グルタミン酸の定量法として、グルタミン酸脱水素酵素 (GDH) と NAD を用いた測定法が知られている [21]。すなわち、グルタミン酸は NAD の存在下 GDH によって α -ケトグルタル酸に変換され、この際生成する NADH の蛍光度を測定する定量法である。著者らはこの定量法を応用して、固定化 GDH カラムを作製し、これを *in vitro* 灌流実験系に組み込むことによって、灌流液中のグルタミン酸を連続的に測定する実験系の確立を試みた。

GDH を固定化する担体として、トレスル活性化ゲル (Tosoh) を用いた。1 ml のトレスル活性化ゲルと 15 - 20 mg protein の GDH を、通常、0.5 M NaCl を含む 0.1 M の炭酸緩衝液 (pH 8.5) 中で 4°C の条件下 15 時間攪拌した。0.5 M NaCl で洗浄した後、0.5 M NaCl を含む 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で 4 時間攪拌することで残った活性基をブロックした。固定化 GDH は、0.5 M NaCl を含む 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) 中で 4°C で保存した。GDH のカップリングは 15 時間攪拌直前および直後の炭酸緩衝液中のタンパク量を Bradford 法 [9] で定量することにより評価した。

(4) 脊髄後角切片の調製および灌流実験

ラットを断頭し腰膨大を含む脊髄組織をすばやく取り出し、95% O₂ + 5% CO₂ 混合ガスを飽和し氷冷した人工脳脊髄液 (aCSF) 中に移した。軟膜、前根および後根をすべて取り除いた後、後角あるいは一部の実験では前角から切片 (0.5 - 1.0 mm) を作製した。後角切片には、カプサイシン感受性一次感覚神経が主に投射している膠様質 (substantia gelatinosa) を切り出し、白質は可能なかぎり取り除いた標本を使用した。前角切片には、カプサイシン感受性一次感覚神経がほとんど投射していないと考えられる脊髄腹側部表層を使用した。切片は、37°C の aCSF で 30 - 45 分間インキュベーションした後、灌流実験に用いた。使用した aCSF の組成 (mM) を以下に示す。塩化ナトリウム 127、塩化カリウム 2、リン酸二水素カリウム 1.24、硫酸マグネシウム 5、炭酸水素ナトリウム 25、グルコース 10、塩化カルシウム 2 (pH 7.4)。また、灌流液は、通

常、aCSF に 1 mM NAD、グルタミン酸取り込み阻害薬である 10 μ M 3-ヒドロキシアスパラギン酸、三種類のペプチダーゼ阻害薬 (1 μ M ロイペプチン、5 μ M カプトプリル、10 μ M ベスタチン)、脊髄内存在ニューロンからのグルタミン酸遊離を阻害するため 0.3 μ M テトロドトキシンを加えたものを使用した。

灌流実験に用いた装置の模式図を図 1-1 に示す。タンパク量 1.0 - 2.0 mg の切片をチャンバーに移し、37°C の水浴中で流速 0.5 ml/min で灌流した。切片から遊離されたグルタミン酸は NAD の存在下、固定化 GDH カラムにおいて α -ケトグルタル酸と NADH に変換されるので、NADH を蛍光ディテクター (EX. 340 nm, EM. 460 nm) で連続的に測定した。細胞外 Ca²⁺ 依存性を検討する実験では、aCSF 中の 2 mM Ca²⁺ を等モルの EGTA に置換し、Ca²⁺ を含まない灌流液を用いた。

20 pmol から 200 pmol のグルタミン酸標準液を 2 分間適用したときのピーク面積から検量線を作成し、カプサイシン誘発遊離量を定量化した。誘発遊離量は pmol/mg protein として表した。基礎遊離量は、カプサイシン刺激前である灌流開始 25 分後から 30 分後の 5 分間の遊離量を 1 秒間当たりの平均値 (pmol/sec/mg protein) として表した。組織中のタンパク量は、Bradford 法により定量した。

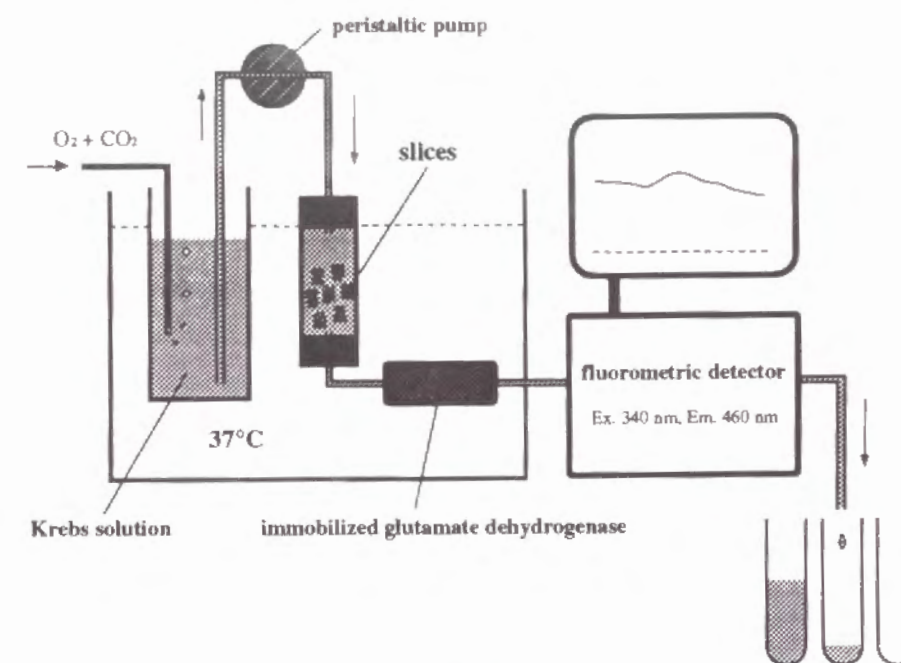


図 1-1 *in vitro* 灌流装置の模式図

表1-1 C8カラムのコンディショニング、サンプルの脱塩、抽出の手順

メタノール	2 ml
蒸留水	2 ml
サンプル (pH 3.0)	3 ml
0.1 M トリフルオロ酢酸 (pH 3.0)	6 ml
60% アセトニトリル / 0.1 M トリフルオロ酢酸	2 ml

(5) サブスタンスPの定量

一部の実験において、グルタミン酸を定量した後の灌流液を6分間隔で回収し、それぞれのフラクションに含まれるサブスタンスPを定量した。サンプルは2N HClでpH 3.0に調整した後、アンプレップC8カラム (Amersham) を用いて脱塩、抽出した。表1-1で示した順に溶媒を通すことによって、カラムのコンディショニング、サンプルの脱塩および抽出を行った。さらにサンプルを凍結乾燥した後、RIAで免疫活性(ir-)サブスタンスPとして定量した。RIAの手順は、Kuraishi et al. [33]の方法に従って行った。

(6) 後根神経切断

後根神経切断の手順については、Nanayama et al. [49]の方法に従った。ペントバルビタール麻酔下 (50 mg/kg, i.p.)、L₄-L₆レベルの椎弓切除を行った後、両側の後根神経節の中核側軸索を切断した。また、対照群として、椎弓切除のみを行った。灌流実験には、術後7-11日経過したラットを用いた。後角切片には、L₄-L₆の後根が入力している部位から取り出した。

第1節 グルタミン酸のオンライン測定法の確立

(1) 固定化のpH至適条件

膨潤化したトレシル活性化ゲル1 mlに対し、約17 mgのGDHのカップリング条件を検討した。反応中のGDHの失活を防ぐため、反応時間は15時間、温度は4°Cで行った。pH 7.5のリン酸緩衝液中ではトレシル活性化ゲルへのカップリングがほとんどみられなかったのに対し、pH 8.5の炭酸緩衝液ではタンパク量で約85%のGDHがカップリングした。

(2) 固定化GDH

固定化GDHカラムを用い、グルタミン酸に対する定量性と特性に関して検討した。図1-2に示す典型例のように、GABA、L-アスパラギン酸、L-グルタミンはそれぞれ1 μMの濃度で蛍光値の変化に対しほとんど影響を及ぼさなかったが、0.1 μMおよび0.2 μMのL-グルタミン酸を2分間灌流適用 (絶対量で0.1, 0.2 pmol) すると、濃度に応じた蛍光値の上昇がみられた。少なくとも20-200 pmolのグルタミン酸において、ピーク面積およびピークの高さの両方に関して定量性がみられた。

第2節 カプサイシン感受性一次感覚神経からのグルタミン酸遊離

(1) 後角切片からのカプサイシン誘発グルタミン酸遊離

図1-3に示すように、脊髄後角切片あるいは前角切片からのグルタミン酸の基礎遊離量は大きく変動することなく、徐々に減少していく傾向を示した。脊髄後角切片に1 μ Mカプサイシンを適用することによって、基礎遊離量の14%程度ではあるが明らかなグルタミン酸の誘発遊離がみられた。カプサイシン誘発遊離は、高K⁺刺激誘発遊離に比べ持続的であった。一方、脊髄前角から得た切片では、高K⁺誘発グルタミン酸遊離はみられたが、カプサイシン誘発遊離はほとんどみられなかった(図1-3)。

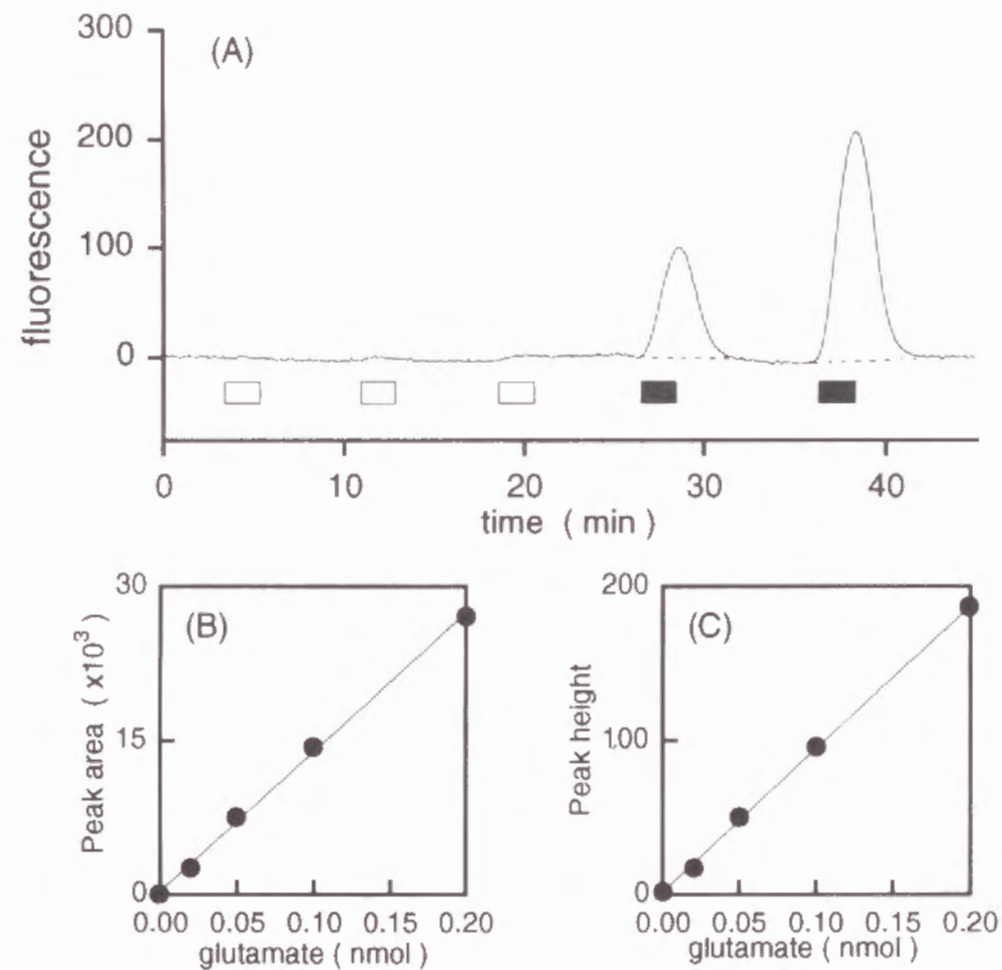


図1-2 固定化GDHカラムのグルタミン酸に対する特異性および定量性。
 典型例(A)において左から順に1 μ M GABA、1 μ M L-アスパラギン酸、1 μ M L-グルタミン(open bar)、0.1 μ Mおよび0.2 μ M L-グルタミン酸(solid bar)を2分間適用した。ピーク面積(B)およびピークの高さ(C)に関するグルタミン酸の定量性を表す。

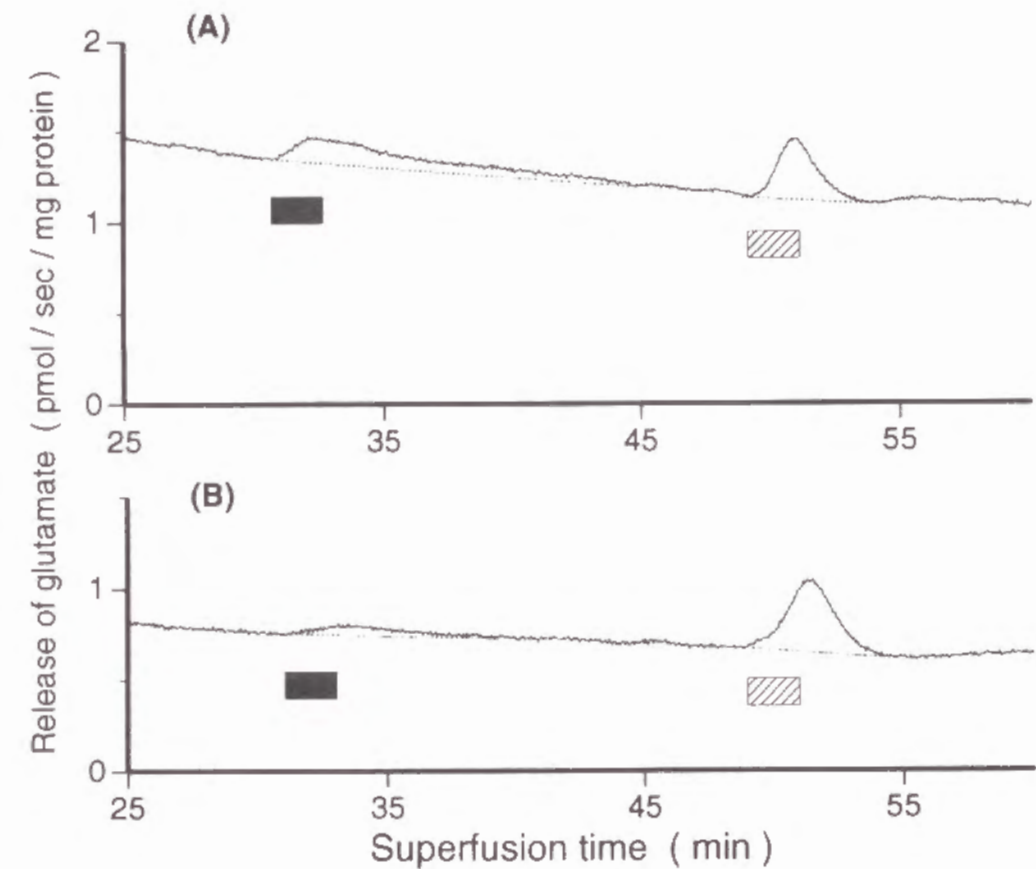


図1-3 ラット脊髄後角切片(A)および前角切片(B)からのグルタミン酸遊離のオンラインモニタリング。
 3 μ Mカプサイシン(solid column)および30 mM K⁺(hatched bar)をそれぞれ2分間適用した。

脊髄後角切片からのカプサイシン誘発グルタミン酸遊離が脊髄内介在ニューロンから遊離されたものではないことを証明するため、テトロドトキシンの影響を検討した。図1-4に示すように、0.3 μM テトロドトキシ存在下あるいは非存在下における1 μM カプサイシン誘発グルタミン酸遊離量はそれぞれ $24.9 \pm 3.6 \text{ pmol/mg protein}$ ($n=6$) および $28.7 \pm 6.2 \text{ pmol/mg protein}$ ($n=8$) であり、これらの群間に有意な影響はみられなかった。また、基礎遊離量に対してもテトロドトキシによる有意な影響はみられなかった。これらの結果から介在ニューロンの寄与はそれほど大きくないことが示唆されるが、以下の実験では介在ニューロンからの遊離の可能性をできる限り除くため、0.3 μM テトロドトキシ存在下で実験した。

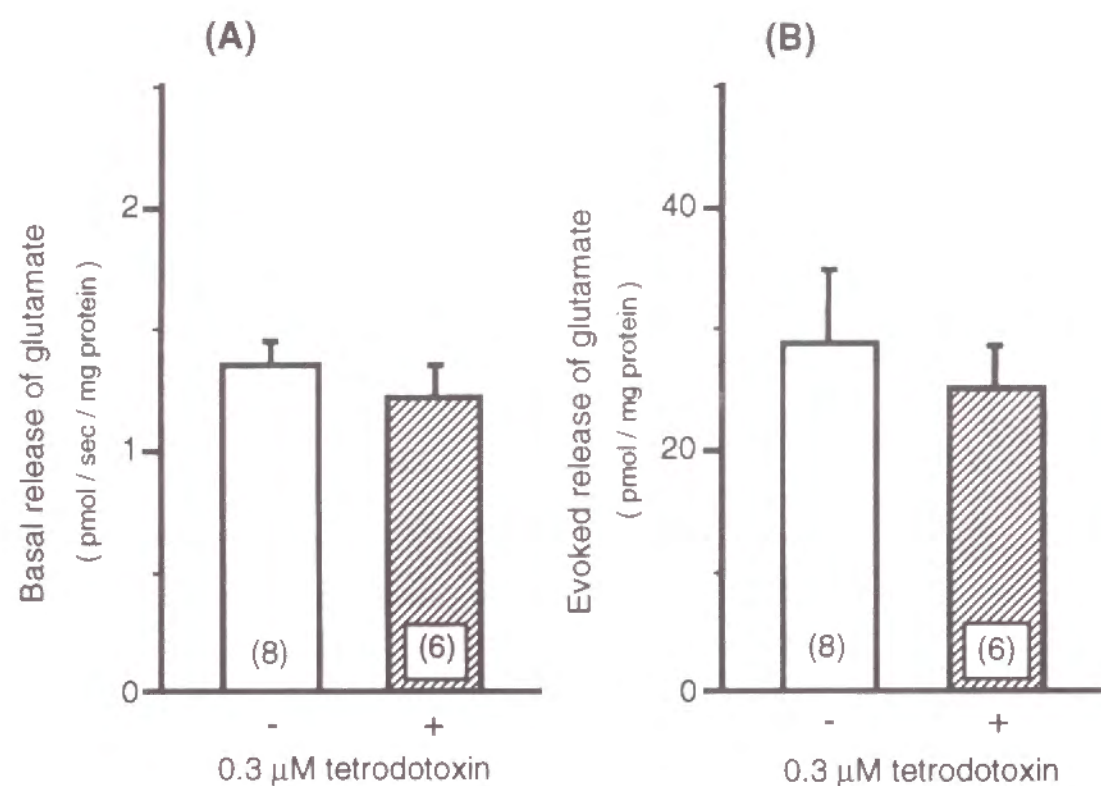


図1-4 ラット脊髄後角切片からのテトロドトキシンの存在下あるいは非存在下におけるグルタミン酸の基礎遊離量 (A) および1 μM カプサイシン誘発遊離量 (B)。0.3 μM テトロドトキシンはグルタミン酸遊離に対して有意な影響を及ぼさなかった。

脊髄後角切片からのカプサイシン誘発グルタミン酸遊離量は、0.1 - 10 μM の濃度においてほぼ濃度依存性がみられた。誘発遊離に対するカプサイシンの最大効果濃度は3 μM であり、この濃度のカプサイシン適用で、 $42.84 \pm 4.77 \text{ pmol/mg protein}$ ($n=8$) のグルタミン酸遊離が誘発された。一方、カプサイシン誘発ir-サブスタンスP遊離についても0.1 - 10 μM で濃度依存性がみられた。最大効果は10 μM の濃度においてみられ、10 μM カプサイシンの適用では $0.213 \pm 0.030 \text{ pmol/mg protein}$ ($n=5$) のir-サブスタンスP遊離が誘発された。(図1-5)

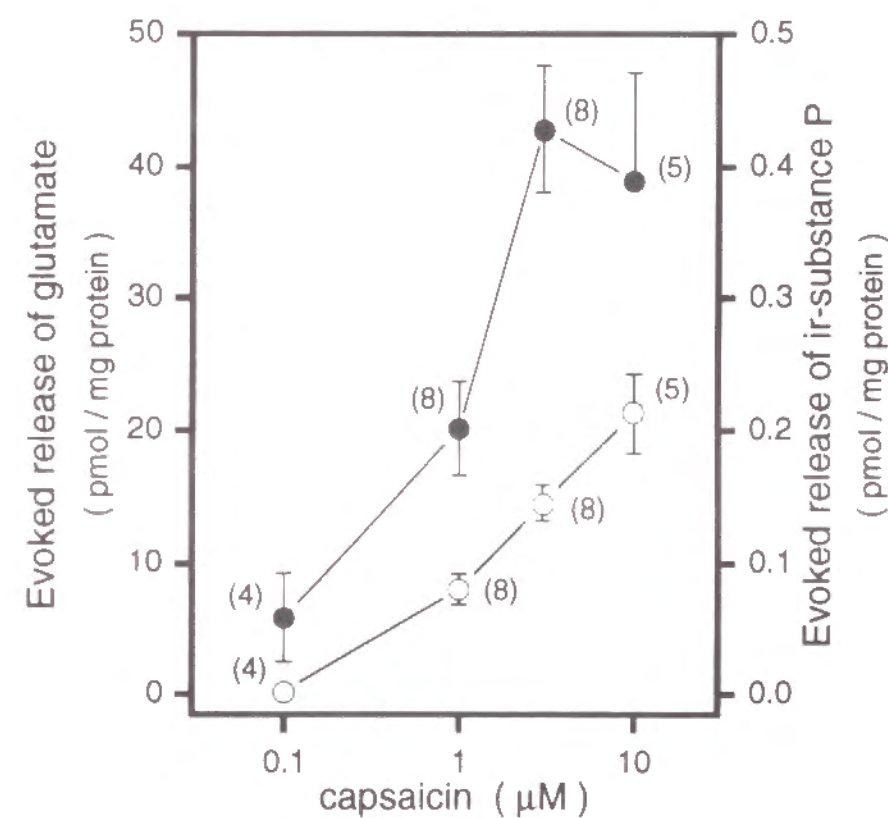


図1-5 グルタミン酸 (closed circle) およびir-サブスタンスP (open circle) のカプサイシン誘発遊離量の濃度依存性。

図1-6は、同一の脊髄後角切片にカプサイシン刺激を二回繰り返したときそれぞれにおいて遊離されるグルタミン酸の誘発遊離量を示している。二回目のカプサイシン適用は一回目の15-26分後に行った。1 μM および3 μM カプサイシンを同じ標本に二回繰り返し適用した場合、二回目の適用によって遊離されるグルタミン酸の誘発遊離量は、それぞれ一回目の $25.6 \pm 7.4\%$ ($n=8$) および $14.4 \pm 6.8\%$ ($n=5$) にまで著しく減少した (図1-6)。

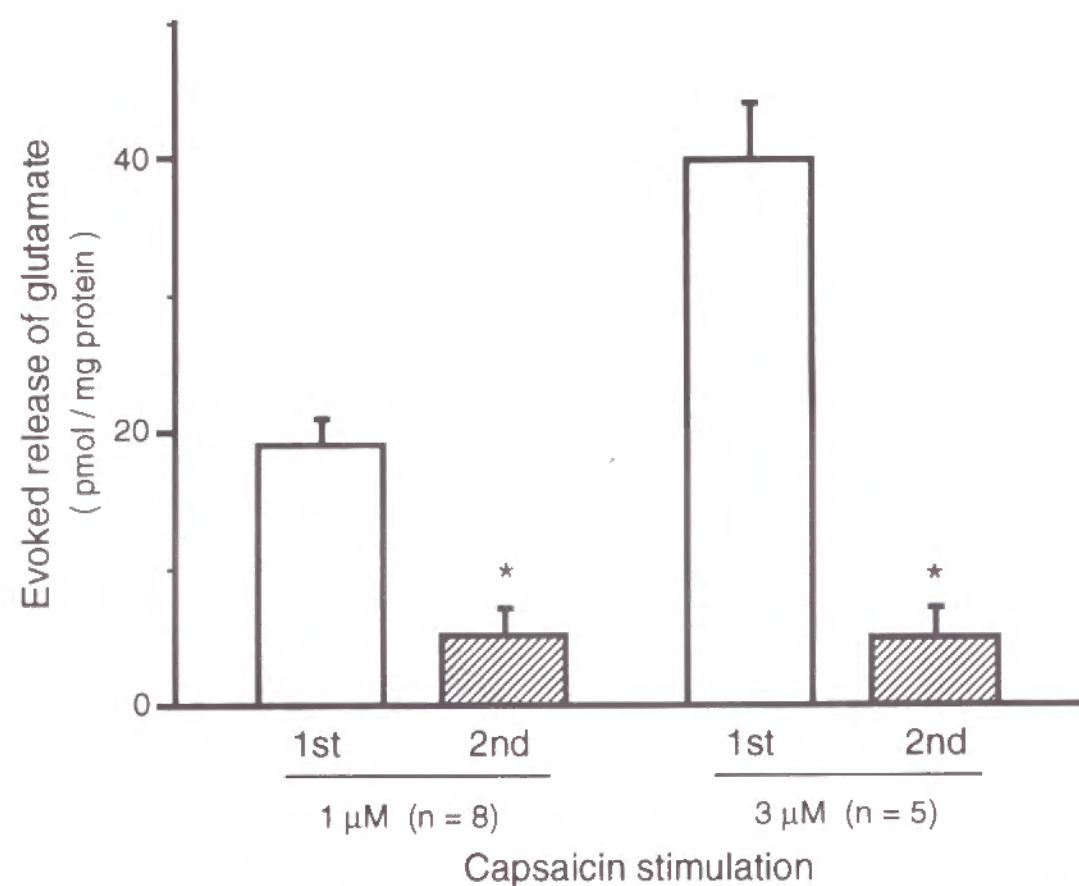


図1-6 ラット脊髄後角切片に二回カプサイシン刺激したときのグルタミン酸の誘発遊離量の変化。
1 μM および3 μM の濃度のカプサイシンでは、二回目の刺激ではほとんどグルタミン酸遊離は誘発されなかった。
* $P < 0.05$ vs. 1st (Student's paired t -test)

(2) カプサイシンアンタゴニスト

カプサイシンは、CあるいはA δ 線維に存在する特異的なレセプターに結合しその薬理作用を発揮すると考えられている。そこで、カプサイシン誘発グルタミン酸遊離がカプサイシンレセプターを介したものであるかどうかを、競合的アンタゴニストであるカプサゼピンを用いて検討した。カプサゼピンは、1-10 μM の範囲で濃度依存的に脊髄後角切片からの1 μM カプサイシン誘発グルタミン酸遊離を抑制した。また同一標本における、サブスタンスPの誘発遊離についても同様にカプサゼピンは濃度依存的に抑制した。グルタミン酸およびサブスタンスPのカプサイシン誘発遊離に対するカプサゼピンの IC_{50} 値はそれぞれ、2.74 μM , 2.67 μM であった (図1-7)。

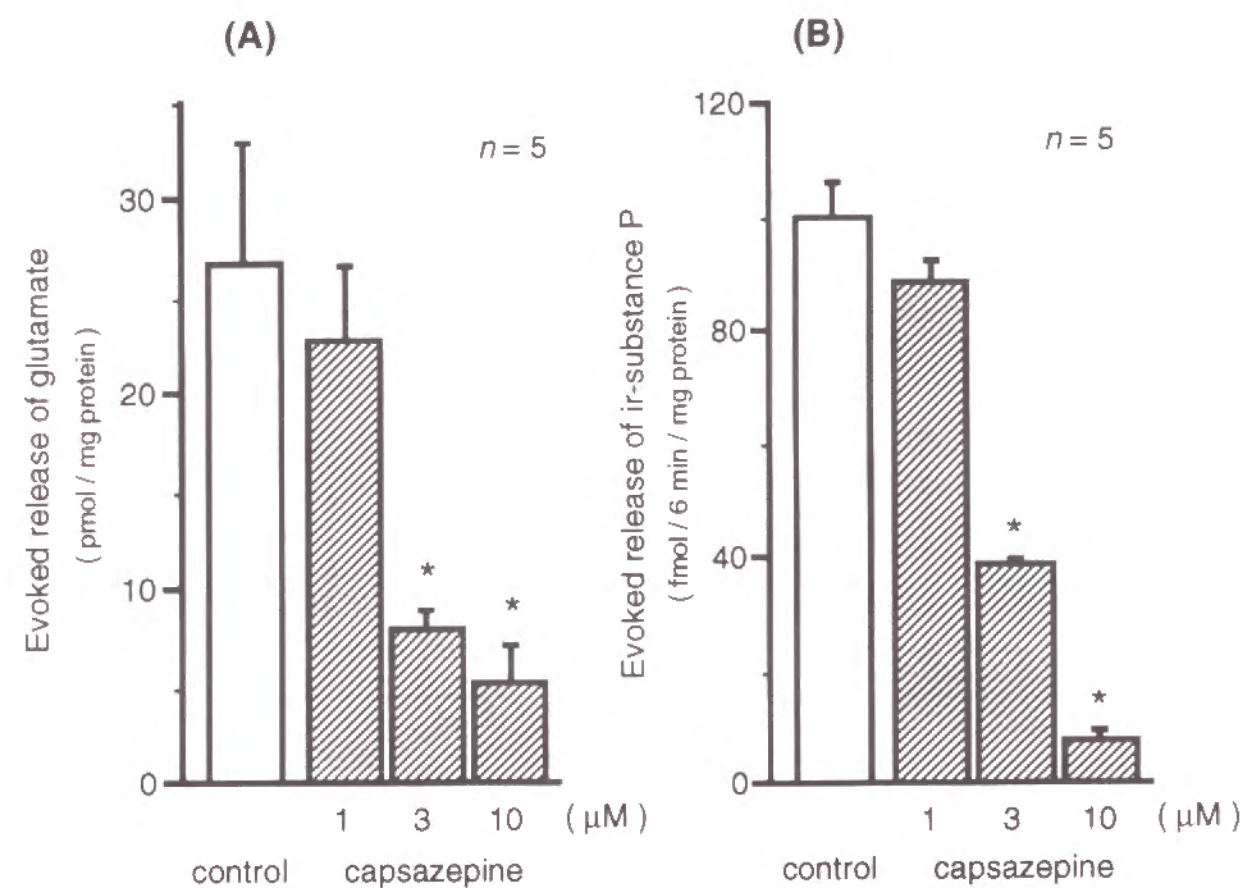


図1-7 ラット脊髄後角切片からの1 μM カプサイシン誘発グルタミン酸 (A) およびir-サブスタンスP (B) 遊離に対するカプサゼピンの濃度依存的抑制作用。
* $P < 0.05$ vs. control (Bonferroni's *post hoc*-test)

(3) 細胞外カルシウム依存性

脊髄後角切片からのカプサイシン誘発グルタミン酸遊離が、細胞外Ca²⁺依存性であるかどうかを検討した。図1-8に示すように、グルタミン酸の基礎遊離量は、灌流液中の2 mM Ca²⁺を等モルのEGTAに置換しても有意な変化はみられなかった。基礎遊離量の値は、Ca²⁺の存在、非存在下においてそれぞれ、1.14 ± 0.03 (n = 5), 1.24 ± 0.11 (n = 5) pmol/sec/mg proteinであった。それに対して、灌流液中のCa²⁺非存在下における3 μM カプサイシン誘発グルタミン酸遊離量は、5.7 ± 2.4 pmol/mg protein (n = 5)であり、存在下での遊離量の13%にまで有意に減少した(図1-8)。

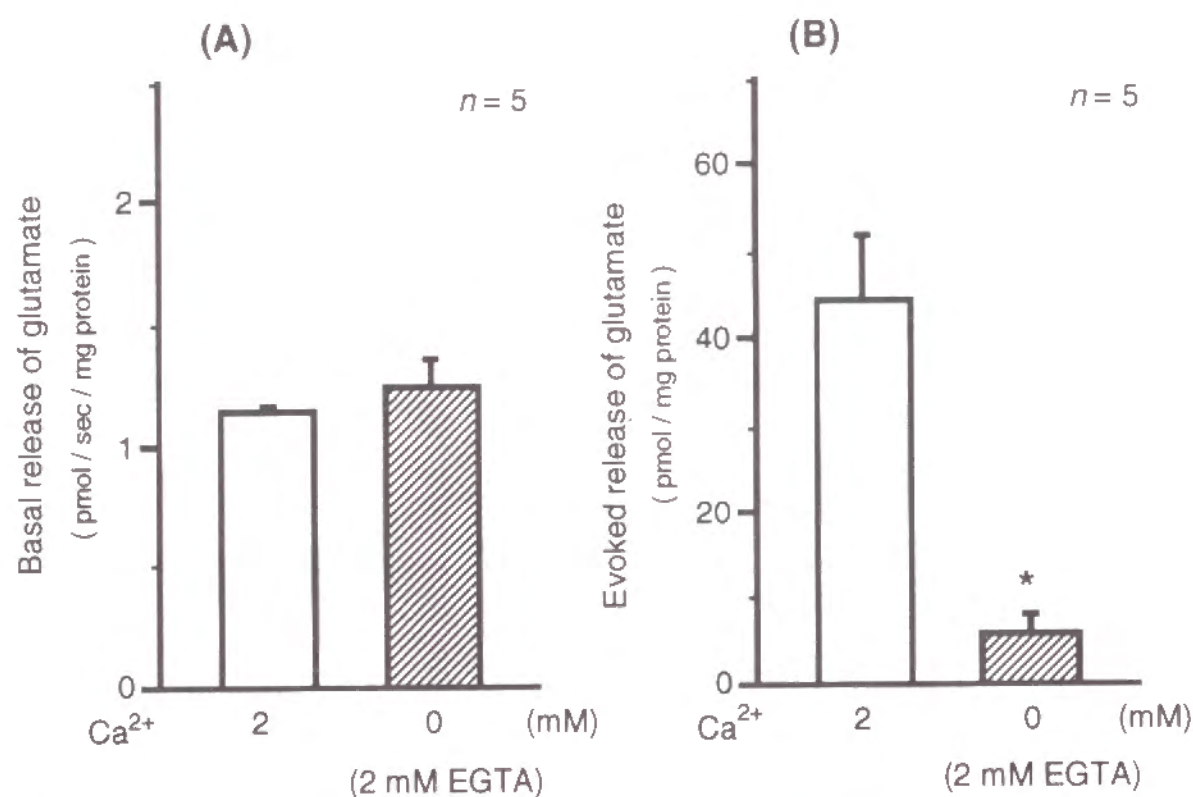


図1-8 ラット脊髄後角切片からのグルタミン酸の基礎遊離量(A)および3 μM カプサイシン誘発遊離量(B)に対する細胞外Ca²⁺除去の影響。
aCSF中のCa²⁺をEGTAに置換すると、グルタミン酸の基礎遊離量に対しては有意な影響はみられなかったが、3 μM カプサイシン誘発遊離は有意に抑制された。
* P < 0.05 vs. 2 mM Ca²⁺ (Student's *t*-test)

図1-9は、サブスタンスP遊離に対する細胞外Ca²⁺依存性について図1-8で用いた同一の標本で検討した結果を示している。細胞外Ca²⁺存在下において、脊髄後角切片への3 μMカプサイシンの適用はir-サブスタンスP遊離を基礎遊離量に比べ約15倍増加させた。しかし、2 mM EGTAに置換した細胞外Ca²⁺非存在下では、カプサイシンの適用はir-サブスタンスP遊離を全く増加させなかった。(図1-9)

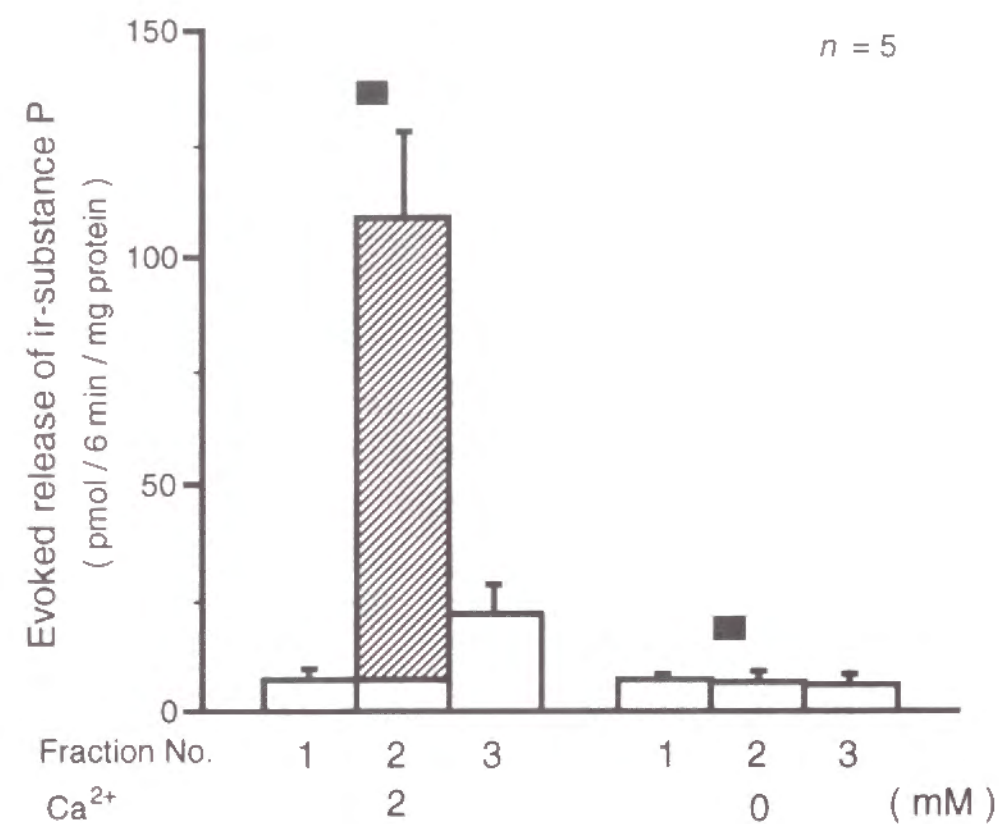


図1-9 ラット脊髄後角切片からのir-サブスタンスP遊離に対する細胞外Ca²⁺除去の影響。
それぞれのcolumnは、6分フラクション中に遊離されたir-サブスタンスP量の変化を示す。Hatched columnは誘発遊離量を示す。Closed barで示す2分間3 μM カプサイシンを適用した。

(4) 脊髄後根切断

カプサイシン誘発グルタミン酸遊離におけるカプサイシンの作用部位が、実際に一次感覚神経終末であるかどうかを証明するために、両側性の後根神経切断を施したラットを用いて検討した。後根神経切断したラットの腰髄後角切片からの3 μM カプサイシン誘発グルタミン酸遊離量は 7.6 ± 6.1 pmol/mg protein ($n = 4$) であり、対照である椎弓切除のみ施したラットでの遊離量の12%にまで有意に減少した。グルタミン酸の基礎遊離量は、後根神経切断によって減少する傾向がみられたが、有意差はなかった (図1-10)。

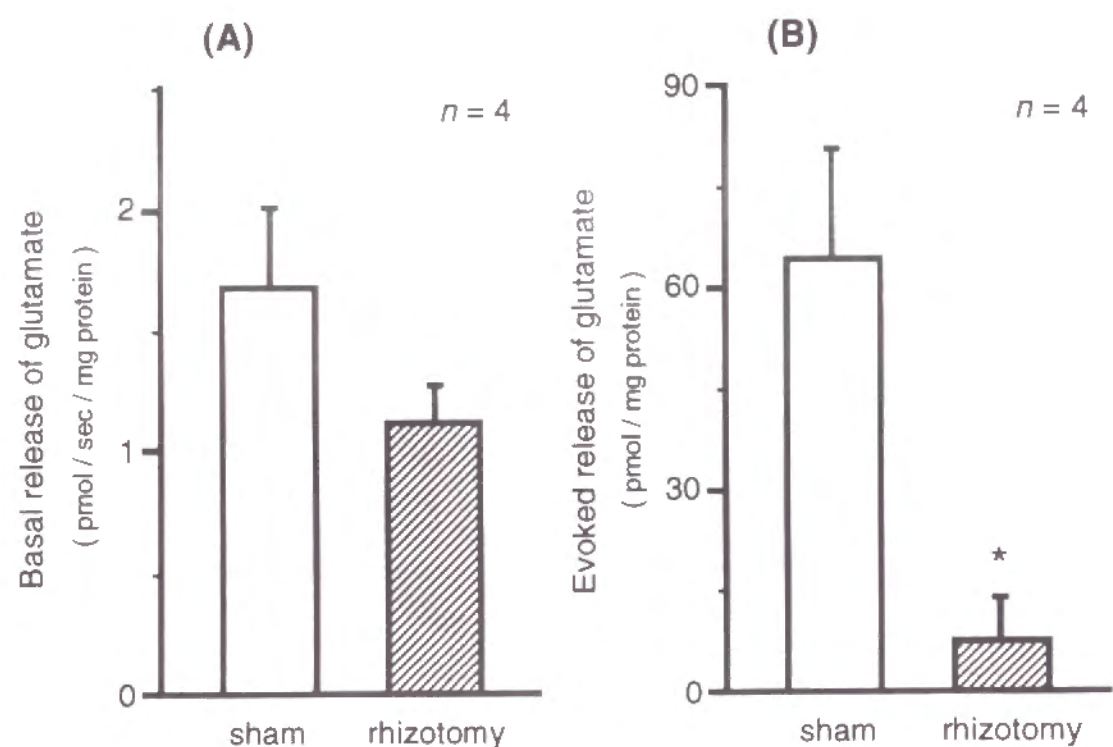


図1-10 ラット脊髄後角切片からのグルタミン酸の基礎遊離量 (A) および3 μM カプサイシン誘発遊離 (B) に対する後根神経切断の影響。後根神経切断を施したラットでは、対照群に比べ基礎遊離量は変化しなかったが、誘発遊離量は有意に減少した。
* $P < 0.05$ vs. sham (Student's *t*-test)

考察

グルタミン酸のオンライン測定法を用いることにより、カプサイシンが脊髄後角切片からグルタミン酸遊離を誘発することが初めて示された。以前の研究では、カプサイシンは、グルタミン酸を含むアミノ酸の遊離を全く変化させないという報告しかなかった [2, 16, 66, 68]。これらの知見は、数分毎に灌流液を採取しそれらに含まれるグルタミン酸を定量しているため、おそらく精度および時間分解能が低いためカプサイシンによるグルタミン酸の遊離量の増加が検出できなかったものと思われる。実際に本研究で、カプサイシンは、サブスタンスPの遊離に対して、基礎遊離量の約15倍増大させたのに対し、グルタミン酸遊離では、最大で基礎遊離量の約20%程度しか増大させなかった。このことは、サブスタンスPに比べ、カプサイシンによるグルタミン酸遊離量の変化を検出するためには、より高い精度が必要であることを示している。

カプサイシンは、一次感覚神経のC線維あるいはA δ 線維に特異的に存在するレセプターに結合し、非選択的カチオンチャネルを開口させて、その薬理作用を発揮すると考えられている。このカプサイシンレセプターの競合的アンタゴニストであるカプサイゼピン [7, 78] は、カプサイシン誘発グルタミン酸遊離を濃度依存的に抑制したので、カプサイシンレセプターを介した抑制作用であることが示唆される。また、本研究において、脊髄後角切片からのグルタミン酸遊離に対するカプサイシンの作用の脱感作が観察された。誘発遊離に対して準最大効果を示した1 μM カプサイシンでも脱感作が起こること、および、培養後根神経節細胞において、カプサイシンにより誘発される内向き電流も同様の脱感作が起きること [8] から、単なるグルタミン酸の枯渇ではないと考えられる。この現象は、カプサイシンの薬理作用全般に共通することであり、この点からもカプサイシン誘発グルタミン酸遊離は、カプサイシンの非特異的な作用を反映したものではないことを示唆している。

図1-9にも示したように、カプサイシンによって誘発されるサブスタンスPなどの神経ペプチドの遊離は、細胞外Ca²⁺依存性であることが知られている [3, 63]。今回の研究により、カプサイシン誘発グルタミン酸遊離も、細胞外Ca²⁺依存性であることが明らかとなった。カプサイシンによる神経ペプチドの遊離は、N型あるいはL型Ca²⁺チャネル阻害薬で抑制されなかったことから、電位依存性Ca²⁺チャネルよりもカプサイシンレセプター-カチオンチャネル複合体から流入したCa²⁺に依存していることを示唆する報告がなされてる [8, 40]。カプサイシン誘発グルタミン酸遊離に関しても、

カプサイシンレセプター-カチオンチャネル複合体から流入したCa²⁺に依存している可能性が高いと考えられる。しかし、グルタミン酸の遊離に関しては、N型Ca²⁺チャネルではなく、P型Ca²⁺チャネルが関与しているという知見 [76] が近年報告されたので、カプサイシン誘発グルタミン酸遊離に関しても、部分的であるにしてもP型Ca²⁺チャネルが関与している可能性は否定できない。

後根神経切断したラットでは、サブスタンスPを含む様々な神経ペプチドのカプサイシン誘発遊離が消失することが報告されている [35, 49, 59]。カプサイシン誘発グルタミン酸遊離もまた、後根神経切断によってその遊離量が著しく減少したので、一次感覚神経が誘発遊離に関与していることを示唆している。カプサイシンで遊離される様々な神経ペプチドの中で、特にサブスタンスPは、脊髄においてグルタミン酸の遊離を増大させることが報告されている [29, 67]。この知見から、本研究で得られたカプサイシン誘発グルタミン酸遊離は、カプサイシンによって一次感覚神経から遊離されたサブスタンスPによって脊髄後角内介在ニューロンから遊離されたものである可能性が考えられる。しかし、テトロドトキシンの存在下でも、グルタミン酸はカプサイシンの適用により遊離されたので、サブスタンスPなどの神経ペプチドが、介在ニューロンからグルタミン酸を遊離させるという可能性は低いと思われる。従って、グルタミン酸は、主としてカプサイシン感受性一次感覚神経から遊離されたものであると考えられる。

以上の結果は、グルタミン酸のオンライン測定法を用いることにより、カプサイシン感受性一次感覚神経からグルタミン酸が遊離されることを示したものであり、グルタミン酸が一次感覚神経の痛覚情報伝達物質であるという考えを裏付けるものである。

第二章

カプサイシン誘発グルタミン酸遊離に対する抗 侵害受容物質の抑制効果

オピオイドあるいは下行性抑制系であるノルアドレナリン神経系は、脊髄における内在性痛覚抑制系として機能していることが知られている。これらのレセプターに対するアゴニストあるいはアンタゴニストを用いた行動薬理学実験により、オピオイドに関しては、 μ 、 δ および κ レセプターが、ノルアドレナリンに関しては、 α レセプターが抗侵害受容作用を媒介していることが示されている [31, 60, 74, 81, 82]。この鎮痛作用機序に関しては、侵害受容性一次感覚神経と脊髄後角内二次ニューロンにおけるシナプス前抑制とシナプス後抑制による二つのメカニズムが考えられている。シナプス前抑制に関しては、一次感覚神経に存在することが知られているサブスタンスPやソマトスタチンなどの神経ペプチドの遊離を抑制することが報告されている [24, 27, 32, 79, 80]。それに対して、グルタミン酸遊離を抑制するという報告も近年になってなされているが [28, 30]、どの神経からの遊離であるかについてははっきりとは示されていない。そこで著者は、カプサイシン誘発グルタミン酸遊離に対するオピオイド及び α アドレノセプターアゴニストの効果について検討した。

実験方法

(1) 実験動物

体重 180 - 250 g の雄性 Sprague-Dawley 系ラット (6 - 8 週齢) を使用した。

(2) 薬物の調整法

モルヒネ HCl (Takeda Chemical Industries Ltd.)、ナロキソン HCl (Sigma)、DAMGO AcOH (Bachem Feichemikalien AG)、DPDPE (Peninsula Lab.)、ナルトリンドール (Toray Industries Inc.)、U50,488H (Upjohn)、クロニジン HCl、オキシメタゾリン HCl (以上 RBI)、ST-91 HCl (Boehringer Ingelheim) は H₂O に溶解し -20°C に保存した。ヨヒンビン HCl およびフェニレフリン HCl (RBI) は、H₂O に用時溶解し実験に使用した。また、U69,593 (Upjohn) は、DMSO に溶解し -20°C で保存した。

実験結果

(3) 脊髄後角切片の調整および灌流実験

脊髄後角切片の調製法および灌流実験の条件は、第一章と同じである。カプサイシンは、グルタミン酸遊離に対して最大効果を発揮した濃度である $3\mu\text{M}$ を2分間適用した。薬物は、 $3\mu\text{M}$ カプサイシンの適用の6分前から灌流実験の最後まで灌流適用した。第一章での実験結果から、カプサイシン誘発グルタミン酸遊離は脱感作が起こるので、同一標本にカプサイシンを2回以上適用することができなかった。したがって、異なる標本でコントロールをとり、薬物の作用を検討した。

第1節 オピオイドアゴニストの抑制効果

(1) DAMGO およびモルヒネの効果

図2-1にコントロール (A) および選択的 μ アゴニストの $10\mu\text{M}$ DAMGOを適用したとき (B) のグルタミン酸遊離の典型例を示す。 $10\mu\text{M}$ DAMGOの適用によって、基礎遊離量に対してほとんど影響はみられなかった。それに対して $3\mu\text{M}$ カプサイシン誘発遊離量はDAMGOの適用によって明らかな減少がみられた。

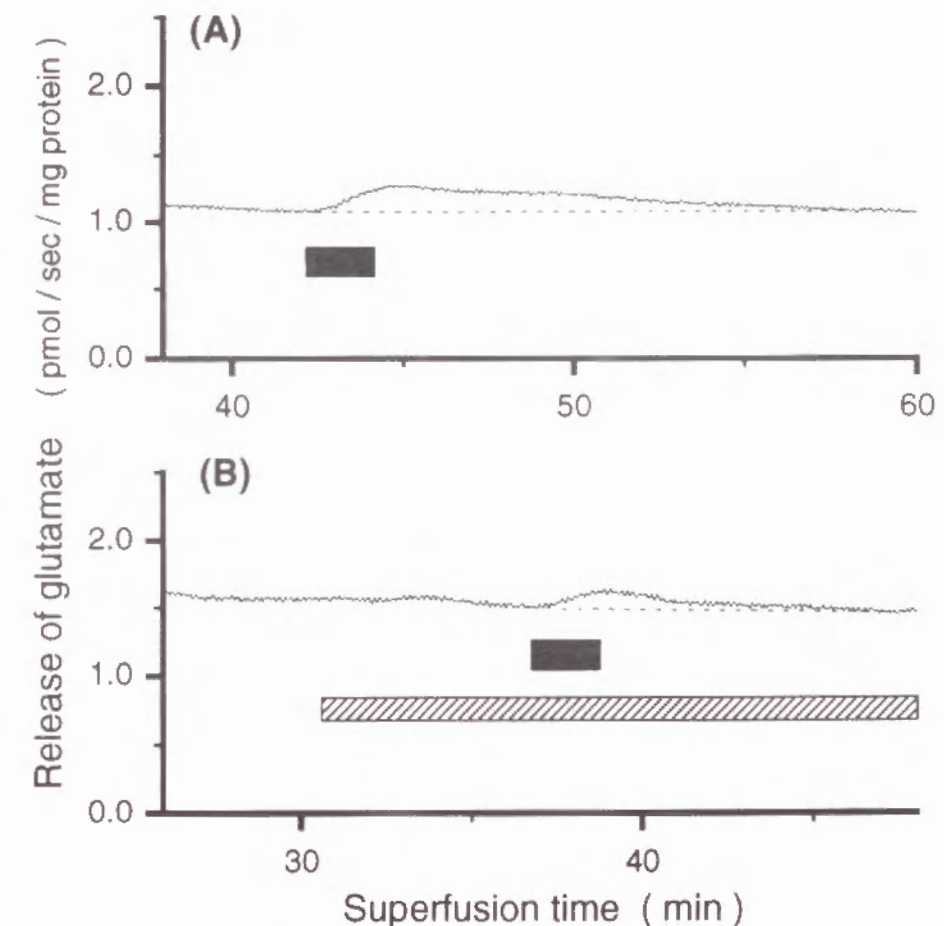


図2-1 10 μM DAMGO 非存在下 (A) あるいは非存在下 (B) におけるラット脊髄後角切片からのグルタミン酸遊離の典型例。
カプサイシン ($3\mu\text{M}$, solid bar) は2分間灌流液中に適用し、また、DAMGO ($10\mu\text{M}$, hatched bar) は、カプサイシン刺激の開始6分前から灌流実験終了まで脊髄後角切片に処置した。

DAMGOは、0.3 - 10 μM の範囲で濃度依存的に3 μM カプサイシン誘発グルタミン酸遊離量を抑制した。10 μM DAMGOの適用では、コントロールの15%にまで有意に抑制された。誘発遊離抑制作用に対するDAMGOの EC_{50} 値は0.77 μM であった。また、3 μM DAMGOによるグルタミン酸の誘発遊離の抑制は、麻薬拮抗薬である1 μM ナロキソンによってほぼ完全に拮抗された(図2-2)。

次に、 μ 選択的アゴニストであり代表的な麻薬性鎮痛薬であるモルヒネのカプサイシン誘発グルタミン酸遊離に対する効果について検討した。モルヒネの灌流適用によって、ラット脊髄後角切片からの3 μM カプサイシン誘発グルタミン酸遊離は1 - 30 μM の範囲で濃度依存的に抑制された。30 μM モルヒネの場合では、コントロールの23%にまで有意に抑制された。モルヒネの EC_{50} 値は2.21 μM であった。また、10 μM モルヒネによるグルタミン酸の誘発遊離の抑制は、1 μM ナロキソンによって有意に拮抗された(図2-3)。10 μM 以上の濃度のモルヒネではモルヒネ自体が蛍光を示したので、基礎遊離量に対する効果は検討できなかった。

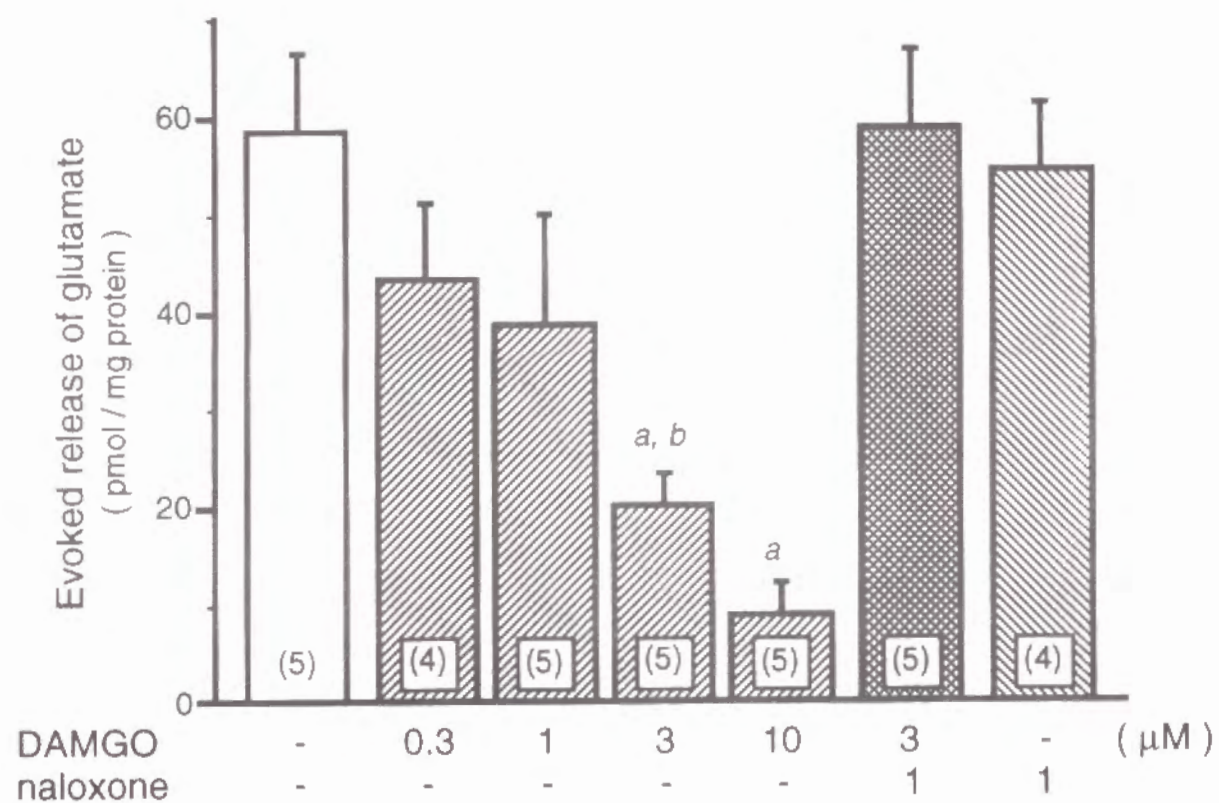


図2-2 ラット脊髄後角切片からの3 μM カプサイシン誘発グルタミン酸遊離に対するDAMGOの抑制効果。
DAMGOは、濃度依存的に抑制効果を発揮し、さらにこの効果はナロキソン(1 μM)によって有意に拮抗された。a; $P < 0.05$ vs. control (open column), b; $P < 0.05$ vs. DAMGO + naloxone (double hatched column).

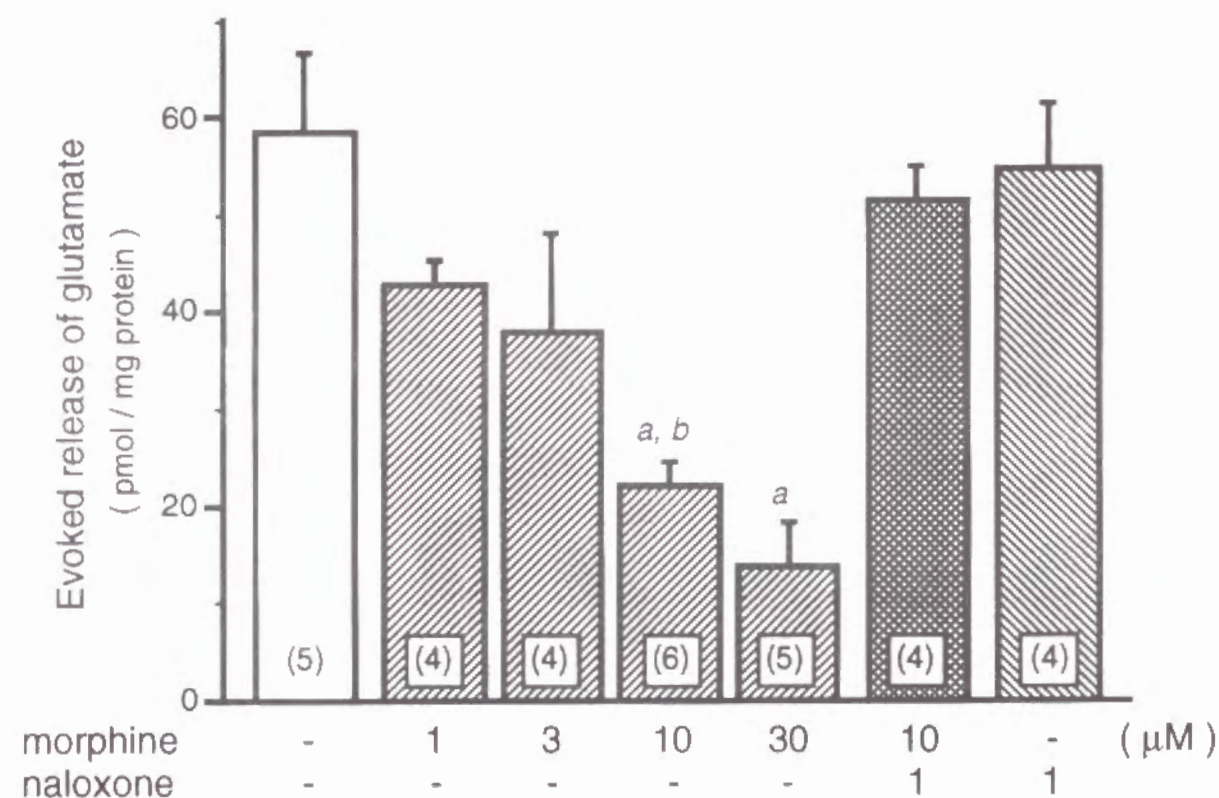


図2-3 ラット脊髄後角切片からの3 μM カプサイシン誘発グルタミン酸遊離に対するモルヒネの抑制効果。
モルヒネは、濃度依存的に抑制効果を発揮し、さらにこの効果はナロキソン(1 μM)によって有意に拮抗された。a; $P < 0.05$ vs. control (open column), b; $P < 0.05$ vs. morphine + naloxone (double hatched column).

(2) DPDPE の効果

選択的 δ アゴニストである DPDPE は、ラット脊髄後角切片からの 3 μ M カプサイシン誘発グルタミン酸遊離を 1 - 10 μ M の範囲で濃度依存的に抑制した。10 μ M DPDPE の場合では、コントロールの 50% にまで有意に抑制した。DPDPE の EC₅₀ 値は 1.21 μ M であった。また、3 μ M DPDPE によるグルタミン酸の誘発遊離の抑制は、1 μ M ナルトリンドールとの同時適用によってほぼ完全に拮抗された (図 2-4)。1 - 10 μ M DPDPE および 1 μ M ナルトリンドールは、グルタミン酸の基礎遊離に対して有意な影響を及ぼさなかった。

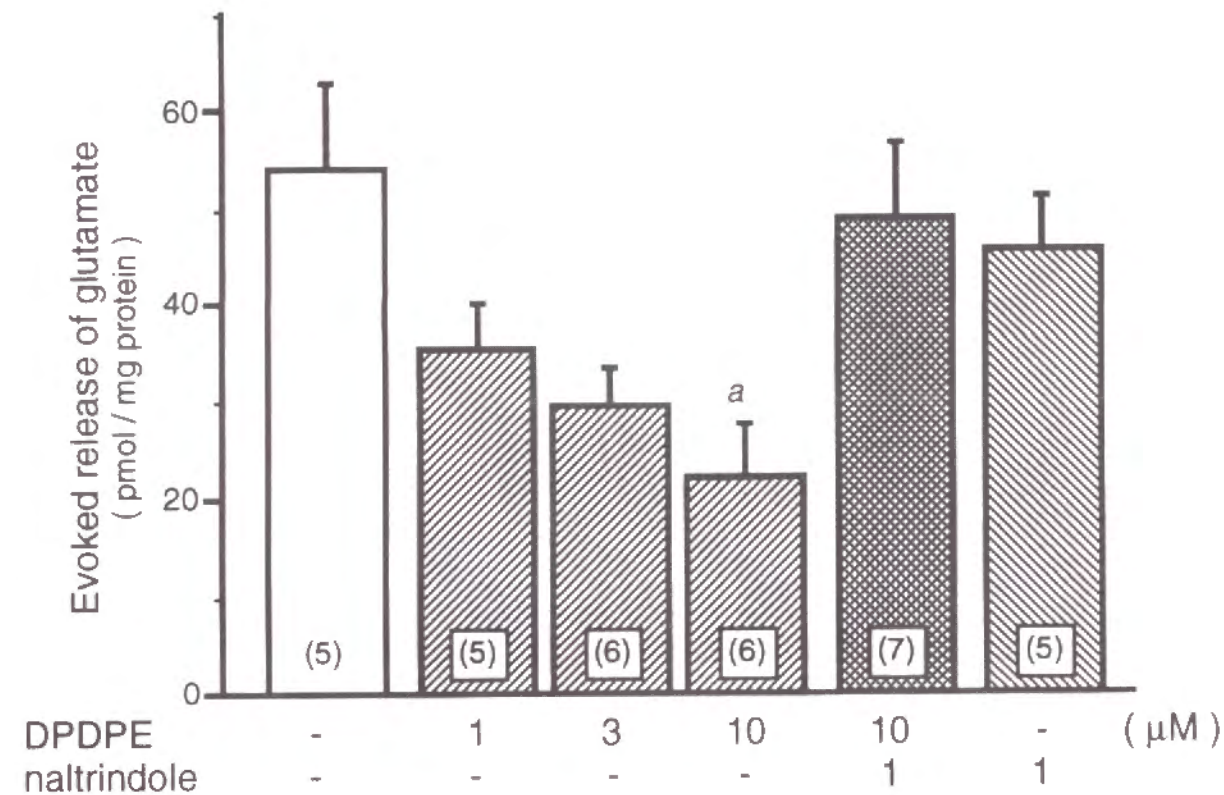


図 2-4 ラット脊髄後角切片からの 3 μ M カプサイシン誘発グルタミン酸遊離に対する DPDPE の抑制効果。DPDPE は、濃度依存的に抑制効果を発揮し、さらにこの効果はナルトリンドール (1 μ M) によって有意に拮抗された。a; $P < 0.05$ vs. control (open column) or DPDPE + naltrindole (double hatched column).

(3) U50,488H および U69,593 の効果

選択的 κ アゴニストである U50,488H 及び U69,593 のラット脊髄後角切片からのカプサイシン誘発グルタミン酸遊離に対する効果について検討した。しかし、1, 10 μ M U50,488H 及び 10 μ M U69,593 は 3 μ M カプサイシン誘発グルタミン酸遊離に対して有意な影響を示さなかった (図 2-5)。また、グルタミン酸の基礎遊離に関してもこれらの薬物は有意な効果を発揮しなかった。

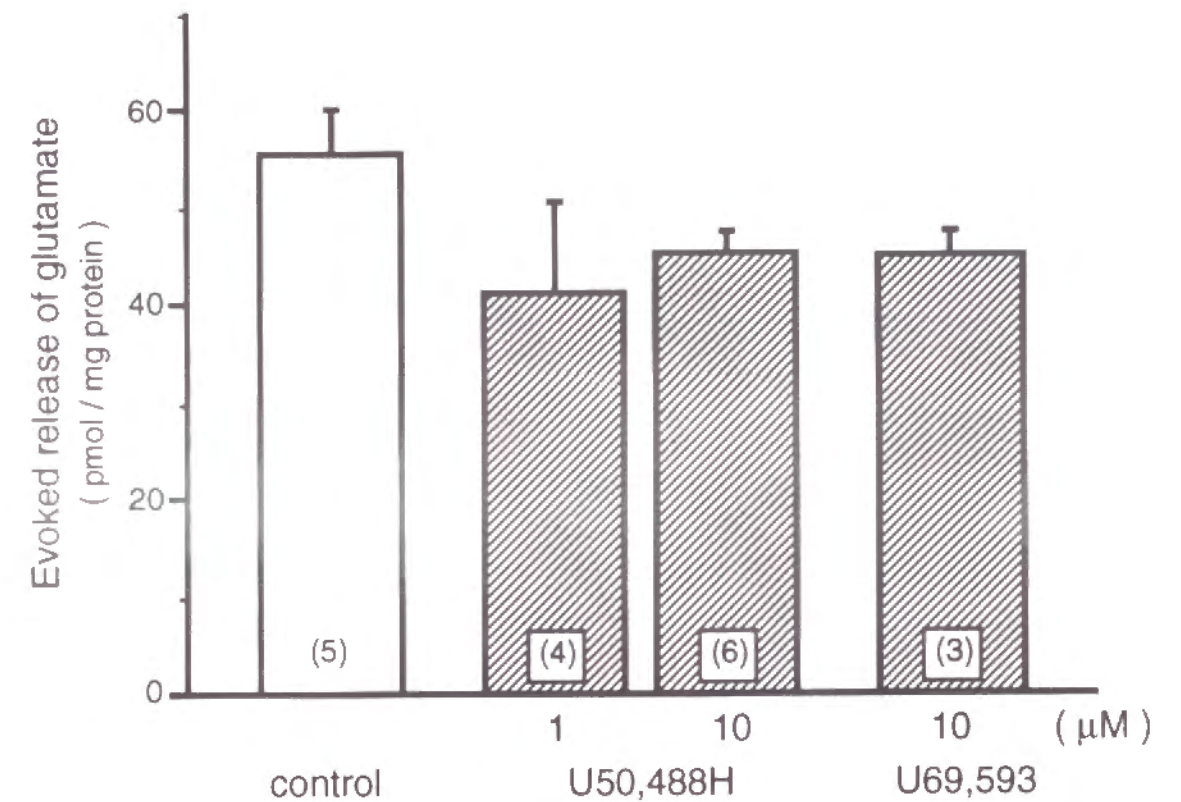


図 2-5 ラット脊髄後角切片からの 3 μ M カプサイシン誘発グルタミン酸遊離に対する U50,488H および U69,593 の抑制効果。U50,488H および U69,593 は、グルタミン酸の誘発遊離に対して有意な影響を示さなかった。

第2節 α アドレノセプターアゴニストの抑制効果

(1) α アドレノセプターアゴニストの効果

図2-6 (A) に示すように、コントロールでは3 μ M カプサイシンを脊髄後角切片に2分間適用すると、基礎遊離量に対して最大で約17%のグルタミン酸遊離の持続的な増大がみられた。一方、図2-6 (B) に示すように、選択的 α_2 アゴニストである10 μ M クロニジンをカプサイシン刺激の開始6分前から灌流液中に適用すると、3 μ M カプサイシンによって誘発されるグルタミン酸遊離が明らかに減少した。しかし、この濃度のクロニジンは、グルタミン酸の基礎遊離量には有意な影響を及ぼさなかった。

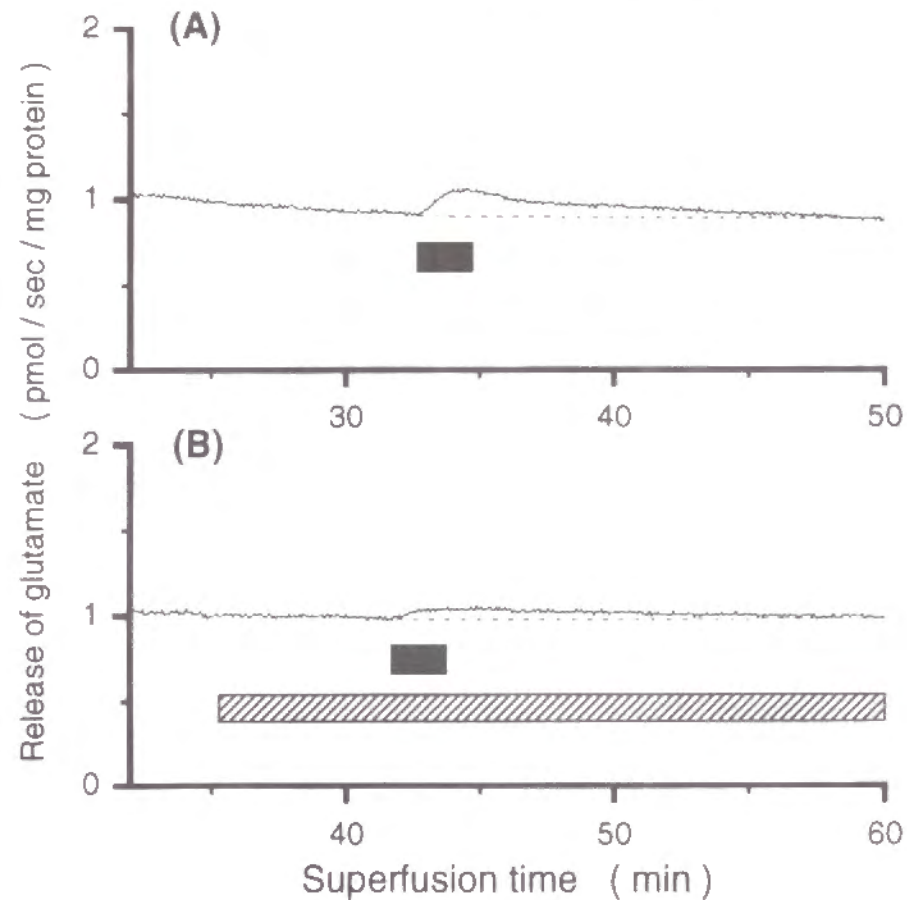


図2-6 10 μ M クロニジン非存在下(A)あるいは非存在下(B)におけるラット脊髄後角切片からのグルタミン酸遊離の典型例。カプサイシン (3 μ M, solid bar) は2分間灌流液中に適用し、また、クロニジン (10 μ M, hatched bar) は、カプサイシン刺激の開始6分前から灌流実験終了まで脊髄後角切片に処置した。

図2-7にクロニジンおよび選択的 α_1 アゴニストのフェニレフリンの効果を示す。コントロールでは、 42.83 ± 4.69 pmol/mg protein ($n=5$) の3 μ M カプサイシン誘発遊離量がみられた。クロニジンは、0.1-10 μ M の範囲で濃度依存的に脊髄後角切片からのカプサイシン誘発遊離量を抑制した。10 μ M の濃度において誘発遊離量は 21.38 ± 4.39 pmol/mg protein ($n=7$) であり、コントロールに対して50%にまで抑制された(図2-7)。クロニジンのカプサイシン誘発グルタミン酸遊離の抑制に対する EC_{50} は、0.92 μ M だった。それに対して、選択的 α_1 アゴニストであるフェニレフリンは、1および10 μ M の濃度において、カプサイシン誘発グルタミン酸遊離に対して、有意な影響を及ぼさなかった(図2-7)。またこれらの薬物のグルタミン酸の基礎遊離量に対する有意な効果は認められなかった。

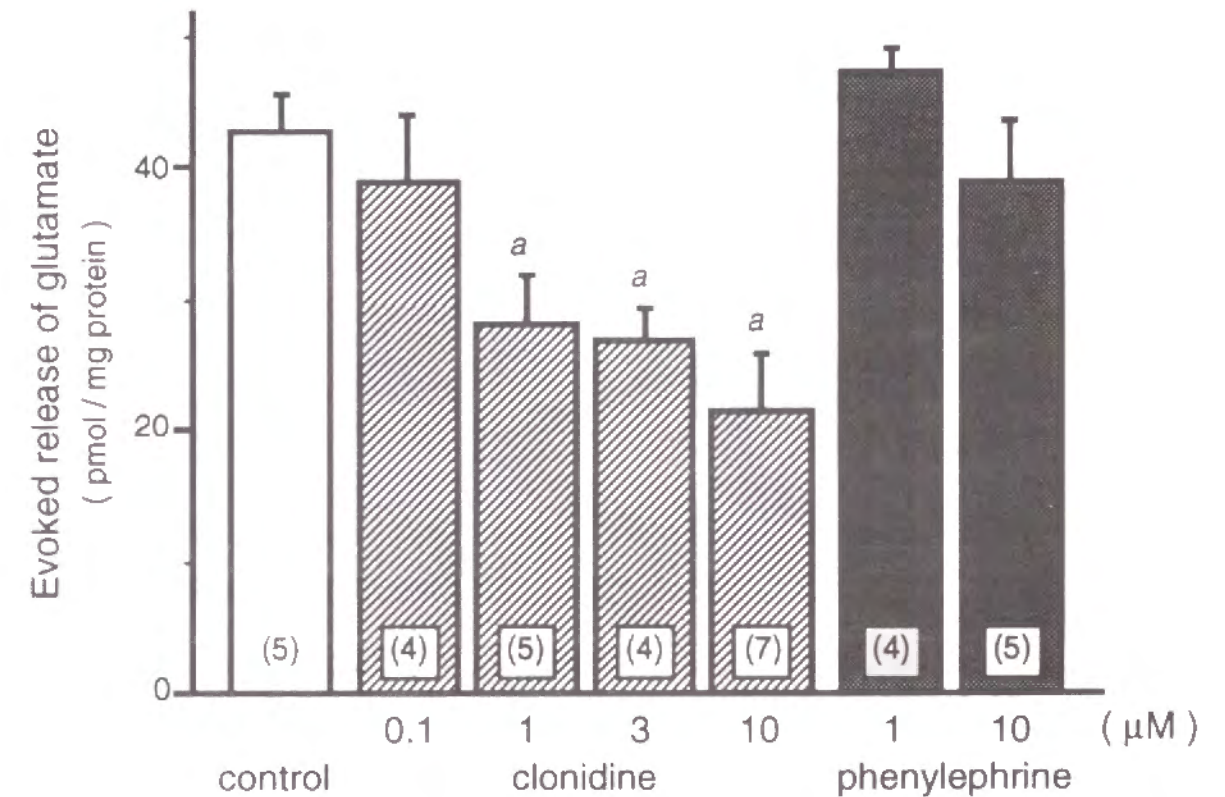


図2-7 ラット脊髄後角切片からの3 μ Mカプサイシン誘発グルタミン酸遊離に対するクロニジンおよびフェニレフリンの効果。クロニジンは濃度依存的に誘発遊離を抑制したのに対し、フェニレフリンは、有意な影響を示さなかった。
a; $P < 0.05$ vs. control (post hoc Dunnet's test)

クロニジンが α_2 レセプターを介してカプサイシン誘発グルタミン酸遊離を抑制することを確認するため、選択的 α_2 アンタゴニストであるヨヒンビンの効果について検討した。10 μ Mクロニジンと1 μ Mヨヒンビンの同時適用によって、クロニジンの抑制効果は有意に抑制された(図2-8)。 α_2 レセプターの活性化によってラット脊髄後角切片からのカプサイシン誘発グルタミン酸遊離が抑制されることが明らかとなったので、次に、この抑制作用が、オピオイド系を介したものであるかどうか調べるため、ナロキソンとの同時適用について検討した。しかし、10 μ Mのナロキソンは、10 μ Mクロニジンによるカプサイシン誘発グルタミン酸遊離の抑制作用に対して、全く影響を及ぼさなかった(図2-8)。

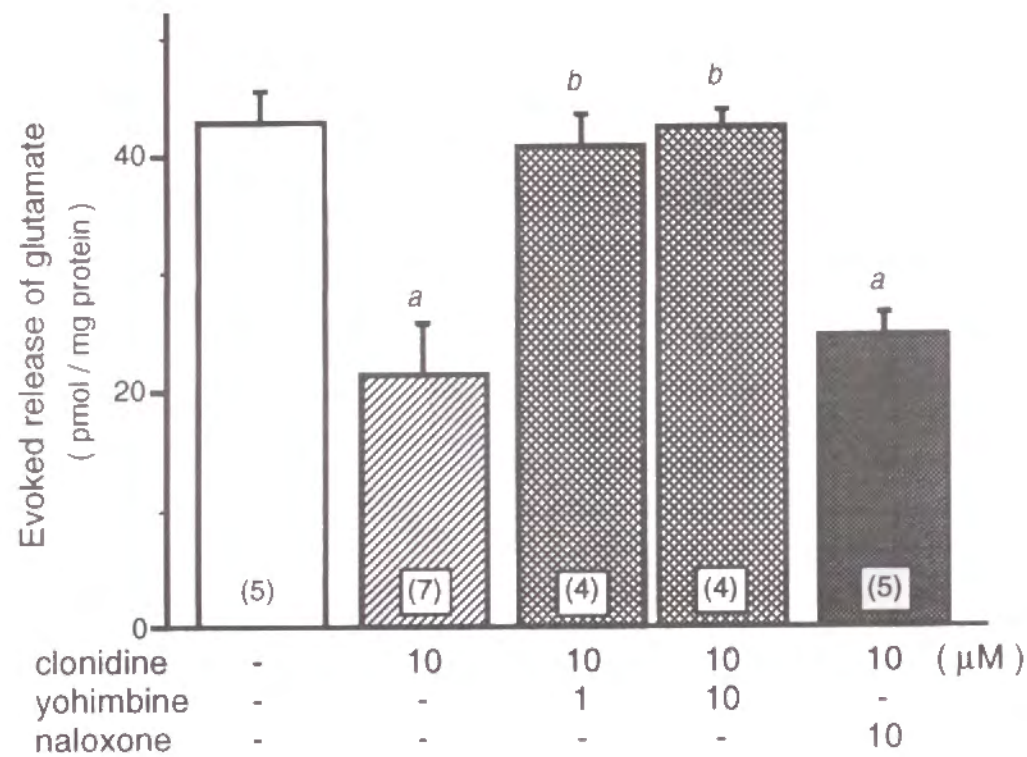


図2-8 クロニジンの3 μ Mカプサイシン誘発グルタミン酸遊離抑制作用に対するヨヒンビンおよびナロキシンの効果。クロニジンの効果はヨヒンビンによって拮抗されたが、ナロキソンに対しては全く影響を受けなかった。
a; $P < 0.05$ vs. control, b; $P < 0.05$ vs. 10 μ M clonidine (post hoc Dunnet's test)

(2) α_2 レセプターサブタイプに関する検討

α_2 レセプターには、 α_{2A} 、 α_{2B} および α_{2C} レセプターの三種類のサブタイプの存在が知られている[10]。鎮痛検定実験において、アンタゴニストとの同時投与により α_{2B} および α_{2C} レセプターにより親和性が高いと報告されているST-91 [73]は、1-10 μ Mの範囲で濃度依存的に脊髄後角切片からの3 μ Mカプサイシン誘発グルタミン酸遊離を抑制し、10 μ Mの濃度では、クロニジンとほぼ同程度であるコントロールの約50%にまで抑制した。それに対して、 α_{2A} レセプターに高親和性を示すが部分アゴニストとして作用するオキシメタゾリンは誘発遊離を抑制する傾向を示したが、統計上有意な変化ではなかった(図2-9)。

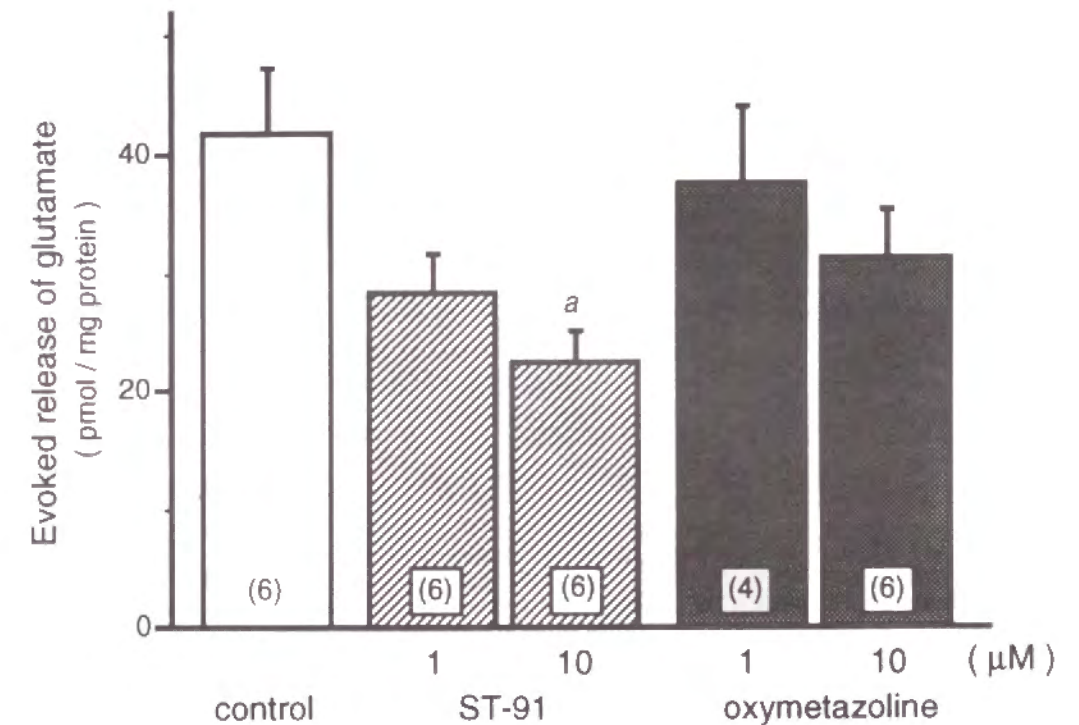


図2-9 ラット脊髄後角切片からの3 μ Mカプサイシン誘発グルタミン酸遊離に対するST-91およびオキシメタゾリンの効果。ST-91は、グルタミン酸の誘発遊離に対して有意な抑制効果を示したが、オキシメタゾリンは誘発遊離に対し有意な抑制効果を示さなかった。
a; $P < 0.05$ vs. control (post hoc Dunnet's test)

考察

オピオイド μ 、 δ 、 κ レセプターアゴニストおよびノルアドレナリン α レセプターアゴニストは、脊髄内において鎮痛作用を発揮することが知られており、これら結合部位が脊髄後角内に比較的多く存在することも知られている [6, 23, 71]。これらの知見から、オピオイドおよび下行性ノルアドレナリン神経系は、内在性痛覚抑制系として機能していると考えられている。今回の実験において、オピオイド μ 、 δ レセプターおよびアドレナリン α_2 レセプターの活性化によってカプサイシン誘発グルタミン酸遊離が抑制されることが明らかとなった。これらのレセプターはすべて、アデニル酸シクラーゼ抑制系に関連しており、細胞内cAMP産生を抑制することが知られている [17, 19, 36, 46, 85]。また、これらのレセプターの活性化は、 Ca^{2+} コンダクタンスおよび K^{+} コンダクタンスをそれぞれ抑制、増強することが報告されている [38, 84]。したがって、グルタミン酸遊離抑制の作用機序の一つとして、これらのレセプターの活性化が、直接 Ca^{2+} チャネルを抑制するか、あるいは、 K^{+} チャネルの活性化を介した間接的な Ca^{2+} チャネルの抑制による細胞内 Ca^{2+} 流入の抑制を引き起こすことによって、グルタミン酸遊離を抑制する可能性が考えられる。

本研究において、オピオイド μ アゴニストは、オピオイドの中では最も強く脊髄後角切片からカプサイシン誘発グルタミン酸遊離を抑制した。10 μM DAMGOでは、誘発遊離をコントロールの15%程度にまで抑制した。カプサイシン誘発グルタミン酸遊離の約90%は、細胞外 Ca^{2+} 依存性なので、 Ca^{2+} 依存性遊離の成分がほとんど完全に抑制された可能性が考えられる。Kangrga and Randic [30] は、ラットの後根神経節-脊髄後角切片を用いて、DAMGOが、後根のhigh intensity刺激によって誘発されるグルタミン酸遊離をほぼ完全に抑制することを示している。したがって、これらの知見は、 μ オピオイドが、脊髄後角における侵害受容伝達をシナプス前性に抑制し、鎮痛作用を発揮するという仮説を支持している [26]。

選択的 δ アゴニストであるDPDPEもまた、濃度依存的にカプサイシン誘発グルタミン酸遊離を抑制し、選択的 δ アンタゴニストであるナルトリンドールによって有意に拮抗された。これは、 μ レセプターだけでなく、 δ レセプターによっても、グルタミン酸による侵害受容伝達がシナプス前性に抑制されていることを示している。しかし、有意な差ではないが、DPDPEの最大効果は、DAMGOのそれよりも弱かった。この結果は、オピオイドによるサブスタンスP遊離の抑制作用は、主に δ レセプターを介し

たものであるとの報告と異なっている [11, 43, 70]。しかし、この違いについては現在のところ不明である。

選択的オピオイド κ アゴニストであるU50,488HやU69,593は、カプサイシン誘発グルタミン酸遊離に対して有意な効果を示さなかった。この結果は、サブスタンスP遊離に対して κ アゴニストの効果がなかったという以前の報告と一致している [1, 24]。In situ ハイブリダイゼーション法により、 μ および κ レセプターmRNAが、脊髄後角、後根神経節細胞に存在し、後根神経節では、 κ レセプターmRNAが発現している細胞数は、 μ レセプターmRNAの発現細胞数よりも少ないことが示されている [39]。さらに、放射性標識したリガンドを用いたオートラジオグラフィ実験において、脊髄後角表層部における結合部位が、 μ 、 δ 、 κ の順に多く存在すると報告されている [6]。したがって脊髄後角内一次感覚神経終末におけるレセプターの量的な差が、本実験の結果を反映している可能性が考えられる。

また、 α_2 アドレノセプターアゴニストであるクロニジンやST-91も、カプサイシン誘発グルタミン酸遊離を濃度依存的に抑制した。また、 α_2 アンタゴニストのヨヒンビンで完全に拮抗されたことから、この作用は、 α_2 アドレノセプターを介したものであることを示している。また、クロニジンの抑制作用は、高濃度のナロキソンによってもほとんど影響されなかったため、オピオイド系は関与していないことが明らかとなった。以上の結果は、カプサイシン感受性一次感覚神経終末に存在する α_2 アドレノセプターの活性化によって、グルタミン酸の遊離が抑制されることを強く示唆している。これは、ノルアドレナリンが脊髄後角における侵害受容伝達をシナプス前性に抑制しているという仮説を支持している [34]。

α_2 レセプターには、 α_{2A} 、 α_{2B} および α_{2C} レセプターの三種類のサブタイプに分類されている。 α_{2A} サブタイプは、オキシメタゾリンに高親和性を示しプラゾシンに対して低親和性を示す。対照的に、 α_{2B} および α_{2C} レセプターは、プラゾシンに対して高親和性を示しオキシメタゾリンに対して低親和性を示すことが知られている [10]。本研究では、ST-91は、カプサイシン誘発グルタミン酸遊離をクロニジンとほぼ同程度抑制した。Takano et al. [73] は、ST-91の鎮痛作用が α_{2A} アンタゴニストよりもプラゾシンなどの α_{2B} および α_{2C} レセプターアンタゴニストで拮抗されることを報告していることから、ST-91はnon- α_{2A} レセプターを介して抗侵害受容作用を発揮することが示唆される。さらに、後根神経節細胞には α_{2C} レセプターmRNAを強く発現している細胞が非常に多く、 α_{2A} レセプターmRNAはほとんど発現していないという

in situ ハイブリダイゼーション法による報告がある [52]。したがって、本研究においてオキシメタゾリンがカプサイシン誘発グルタミン酸遊離に対して有意な抑制作用を發揮しなかったという結果は矛盾しない。今後、より選択的なリガンドを用いた検討が必要ではあるが、これらの知見と考えあわせると、 α_2 アゴニストは、 α_{2c} レセプターを介してカプサイシン誘発グルタミン酸遊離を抑制する可能性が考えられる。

本研究の実験結果から、脊髄内でのオピオイド μ 、 δ レセプターおよび、アドレナリン α_2 レセプターの活性化による抗侵害受容作用発現には、少なくとも一部、脊髄後角内におけるカプサイシン感受性一次感覚神経からのグルタミン酸遊離の抑制が寄与していることが示唆される。

第三章

脊髄後角内プロスタグランジン類のグルタミン酸遊離促進作用および痛覚過敏発現への関与

痛覚情報伝達に対するプロスタグランジン類 (PGs) の作用として、末梢組織においてブラジキニンの発痛作用を増強することが広く知られており、非ステロイド性抗炎症鎮痛薬 (NSAIDs) は、シクロオキシゲナーゼ阻害により炎症部位における PGs 産生を抑制することによって、鎮痛作用を發揮すると考えられている [18, 22, 37]。しかし、実験的にラットあるいはマウスの脳室内あるいは脊髄くも膜下腔内に PGs 投与すると痛覚過敏あるいは allodynia を起こすこと [47, 54, 77] から、NSAIDs の鎮痛作用機序の一つとして、脊髄後角を含む中枢神経系に対する直接的な作用も存在する可能性が示唆されている。

本研究では、中枢神経系に対する NSAIDs の鎮痛作用機序の一部を明らかにするため、炎症性痛覚過敏発現における脊髄後角内 PGs の関与について、後肢圧刺激法による検討を行った。またその作用機序に関して、カプサイシン感受性一次求心性線維からのグルタミン酸遊離に対する効果について検討した。

実験方法

(1) 使用動物

体重 180g - 250 g の Sprague-Dawley 系雄性ラット (6-7 週齢) を使用した。

(2) 侵害受容閾値の測定

侵害受容実験には、あらかじめ環境に馴化させておいた Sprague-Dawley 系雄性ラット (180-250 g) を用いた。脊髄くも膜下腔内投与は、前日にあらかじめ背部皮下を切開しておいたラットの L₃, L₄間の脊椎骨間隙に針を刺入し、ポリエチレンチューブを介してマイクロシリンジにより薬液 10 μ l を注入して行った。非競合的 NMDA レセプターアンタゴニストである (+)-MK-801 は生理的食塩水に溶解した。ジクロフェナック及びプロスタグランジン類は、DMSO に溶解した後、それぞれ生理的食塩水あるいは

はPBSで希釈した。起炎性物質として2%カラゲニン+2%カオリンを100 μ lの容量で右側後肢に皮下投与した。

機械的侵害受容閾値の測定には、Randall-Sellitto後肢圧刺激法を用いた[56]。すなわち、毎秒32gの一定速度で増加する機械的侵害刺激を後肢腹側部に適用し、後肢の引っ込み反応が惹起された時点の値(g)を侵害受容閾値とみなした。結果は、薬物投与直前の侵害受容閾値を100%として表した。

(3) 脊髄後角切片の調整法

第一章と同様の方法で脊髄後角切片を調製した。炎症ラットを用いた実験では、両側後肢に2%カラゲニン+2%カオリンを皮下投与し、1、2および4時間後に脊髄腰膨大を取り出した。

(4) 灌流実験

灌流実験の方法は、基本的に第一章と同じである。本章で使用した人工脳脊髄液の組成を次に示す(mM)。塩化ナトリウム 124、塩化カリウム 5、リン酸二水素カリウム 1.24、硫酸マグネシウム 1.3、炭酸水素ナトリウム 25、グルコース 10、塩化カルシウム 2.4 (pH 7.4)

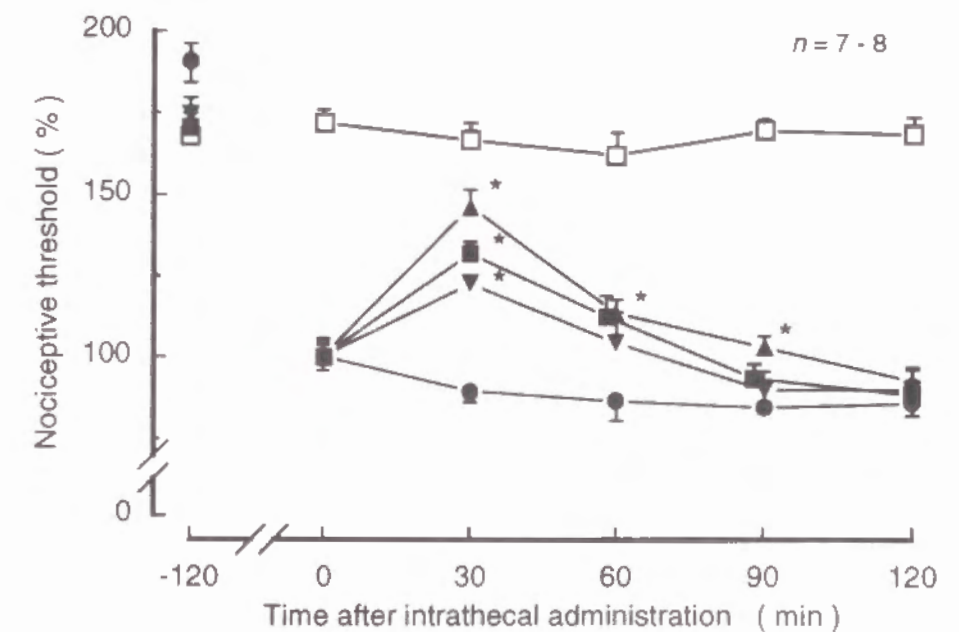
図3-1 カラゲニン+カオリン誘発炎症ラットの後肢における機械的侵害受容閾値に対するi.t.投与したMK-801の影響。
縦軸は、薬物投与直前の炎症側後肢の閾値を100%として表す。それぞれ、生理的食塩水(●)、MK-801 1 nmol/rat (▼)、3 nmol/rat (▲)、10 nmol/rat (■)の処置側、および10 nmol/rat (□)の非処置側の閾値の経時変化を示す。
* $P < 0.05$ vs. 生理的食塩水 (●) (Bonferroni's post-hoc test)

実験結果

第1節 痛覚過敏発現に対する脊髄後角内NMDAレセプターおよびシクロオキシゲナーゼの関与

(1) 炎症性痛覚過敏発現に対するNMDAアンタゴニストの効果

右側後肢への2%カラゲニン+2%カオリン皮下投与120分後の機械的侵害受容閾値は、処置前の約55%にまで低下した。この直後、非競合的NMDAレセプターアンタゴニストであるMK-801を1-10 nmol/ratの用量で脊髄くも膜下腔内(i.t.)投与すると、非処置側に影響することなく、処置側の機械的侵害受容閾値の低下を濃度依存的に回復させた。MK-801の抗侵害受容作用は、投与後30分で最大になり、3 nmol/ratでは投与前の $146.59 \pm 5.01\%$ にまで有意に侵害受容閾値を上昇させた。(図3-1)。



(2) 炎症性痛覚過敏発現に対するシクロオキシゲナーゼ阻害薬の効果

2% カラゲニン+2%カオリン処置によって、処置側後肢の機械的侵害受容閾値は処置前の 50.48 ± 2.74 ($n=8$) にまで低下した。シクロオキシゲナーゼ阻害薬であるジクロフェナック (1-30 nmol/rat) を i.t. 投与すると、処置側の侵害受容閾値の低下を用量依存的に回復させた。ジクロフェナックの抗侵害受容作用は、投与60分後で最大になり、投与120分後にはほぼ消失した。ほぼ最大効果を示した 10 nmol/rat の用量では、投与後60分において、投与前の $150.17 \pm 6.46\%$ にまで有意に侵害受容閾値を上昇させた (図3-2)。しかし、処置前の閾値まで完全に回復することはなかった。また、今回使用した用量において、ジクロフェナックは、非処置側の侵害受容閾値に対して有意な影響を及ぼさなかった。

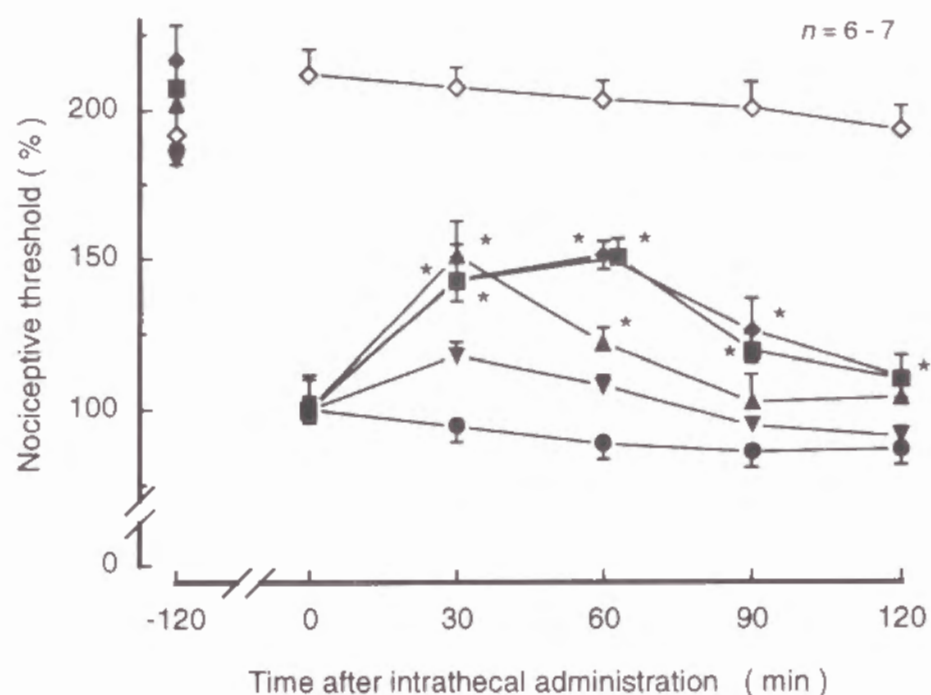


図3-2 カラゲニン+カオリン誘発炎症ラットの後肢における機械的侵害受容閾値に対する i.t. 投与したジクロフェナックの影響。

縦軸は、薬物投与直前の炎症側後肢の閾値を100%として表す。それぞれ、3% DMSO (●)、ジクロフェナック 1 nmol/rat (▼)、3 nmol/rat (▲)、10 nmol/rat (■)、30 nmol/rat (◇) の処置側および 10 nmol/rat (□) の非処置側の閾値の経時的変化を示す。

* $P < 0.05$ vs. 3% DMSO (●) (Bonferroni's *post-hoc* test)

i.t. 投与したジクロフェナックが、末梢組織へ移行し抗侵害受容作用を発揮している可能性が考えられる。実際に、10 mg/kg ジクロフェナックを背部皮下 (s.c.) に投与すると処置側においてのみ有意な抗侵害受容作用を発揮した。しかし、i.t. 投与で最大効果を示した用量よりもさらに多い 100 nmol/rat (約 0.15 mg/kg) のジクロフェナックを s.c. 投与しても、カラゲニン+カオリン炎症による機械的侵害受容閾値の低下に対して有意な影響はみられなかった (図3-3)。

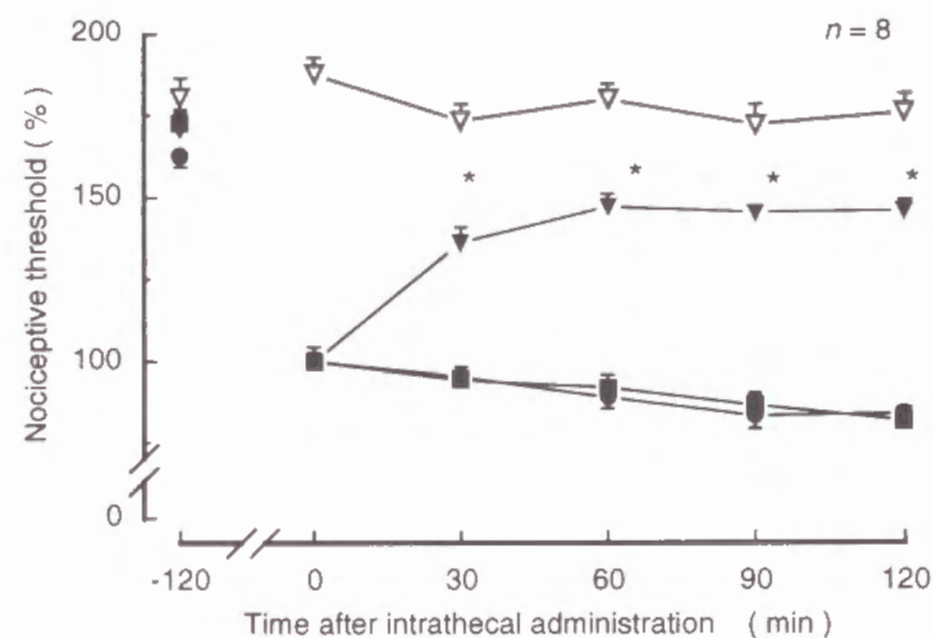


図3-3 カラゲニン+カオリン誘発炎症ラットの後肢における機械的侵害受容閾値に対する s.c. 投与したジクロフェナックの影響。

縦軸は、薬物投与直前の炎症側後肢の閾値を100%として表す。それぞれ、生理食塩水 (●)、ジクロフェナック 100 nmol/rat (■)、10 mg/kg (▼) の処置側および 10 mg/kg (▽) の非処置側の閾値の経時的変化を示す。

* $P < 0.05$ vs. 生理的食塩水 (●) (Bonferroni's *post-hoc* test)

第2節 侵害受容閾値に対する脊髄くも膜下腔内投与したプロスタグランジン類の効果

1) 機械的侵害受容閾値に対するプロスタグランジン類の関与

プロスタグランジンE₂ (PGE₂) をラットにi.t.投与すると、1 - 1000 pmol/ratの範囲で用量依存的に機械的侵害受容閾値が一過性に低下した。閾値低下のピークである投与20分後では、すべての用量で有意な侵害受容閾値の低下がみられ、最大効果を示した100 pmol/rat PGE₂では、投与前の79.14 ± 1.25% (n = 8) にまで有意に低下した。しかし、PGE₂による侵害受容閾値低下作用は投与60分後において消失した。(図3-4) 今回用いた用量のPGE₂では、嫌悪反応が現れなかった。

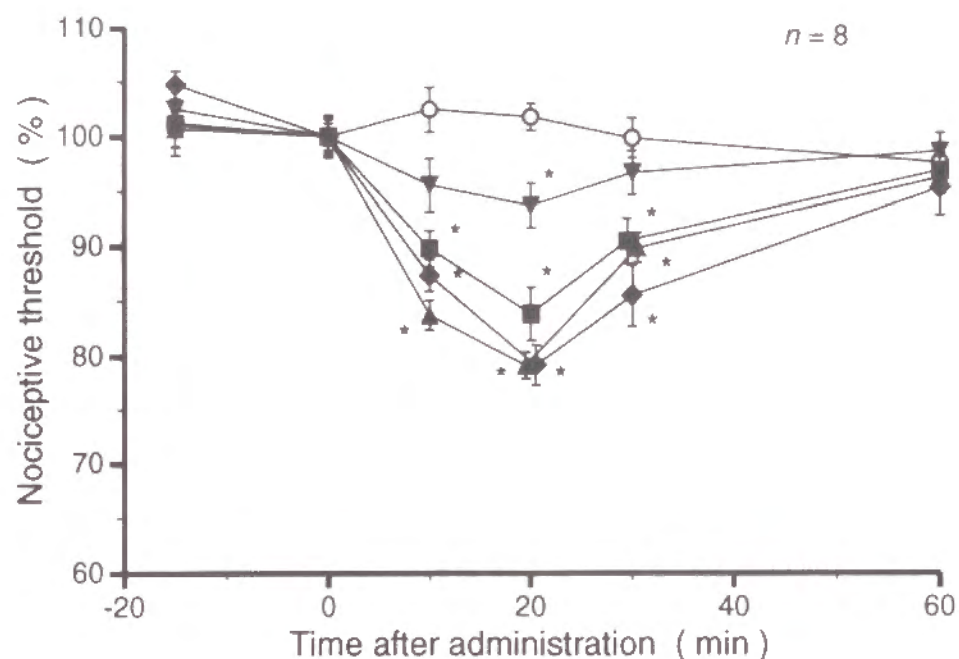


図3-4 ラット後肢の機械的侵害受容閾値に対するi.t.投与したPGE₂の効果。それぞれ、1%DMSO/PBS (O) およびPGE₂ 1pmol/rat (▼)、10 pmol/rat (■)、100 pmol/rat (▲)、1000 pmol/rat (◆) のi.t.投与による侵害受容閾値の経時的变化を示す。
* P < 0.05 vs. 1% DMSO/PBS (Bonferroni's post-hoc test)

プロスタグランジンI₂ (PGI₂) の安定誘導体であるPGI₂メチルエステルをi.t.投与したときの機械的侵害受容閾値に対する影響を図3-5に示す。PGI₂メチルエステルは、1 - 1000 pmol/ratの範囲で用量依存的に機械的侵害受容閾値を低下させた。最大効果を示した100 pmol/ratのi.t.投与では、投与20分後において、投与前の80.25 ± 2.17% (n = 8) にまで有意に侵害受容閾値を低下させ、この作用は投与60分後において完全に消失した。また、PGE₂と同様に、今回用いた用量のPGI₂メチルエステルのi.t.投与によって嫌悪反応は誘発されなかった。

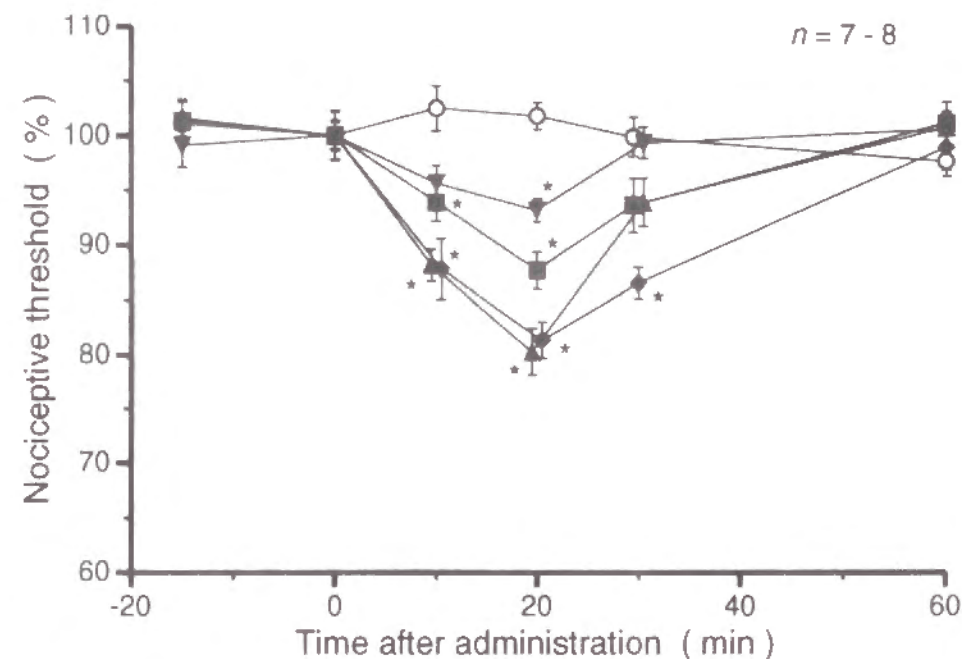


図3-5 ラット後肢の機械的侵害受容閾値に対するi.t.投与したPGI₂メチルエステルの効果。それぞれ、1%DMSO/PBS (O) およびPGI₂メチルエステル 1pmol/rat (▼)、10 pmol/rat (■)、100 pmol/rat (▲)、1000 pmol/rat (◆) のi.t.投与による侵害受容閾値の経時的变化を示す。
* P < 0.05 vs. 1% DMSO/PBS (Bonferroni's post-hoc test)

2) i.t. 投与した PGs による侵害受容閾値低下に対する MK-801 の影響

PGE₂ および PGI₂ メチルエステルは、それぞれ 100 pmol/rat を最大効果用量としてはほぼ同程度侵害受容閾値を低下させた。そこでこれらの用量の PGE₂ および PGI₂ メチルエステルを同時投与したときの機械的侵害受容閾値に対する影響を検討した。図 3-6 に示すように、100 pmol/rat ずつ同時投与すると、それぞれの単独投与に比べ、より強い閾値低下作用を示し、投与直前の閾値に比べ、投与 20 分後では $68.46 \pm 1.84\%$ 、投与 60 分後においても $87.78 \pm 1.53\%$ ($n = 8$) の有意な侵害受容閾値の低下がみられた。しかし、2 種類の PG の同時投与自体で嫌悪反応を引き起こすことはなかった。

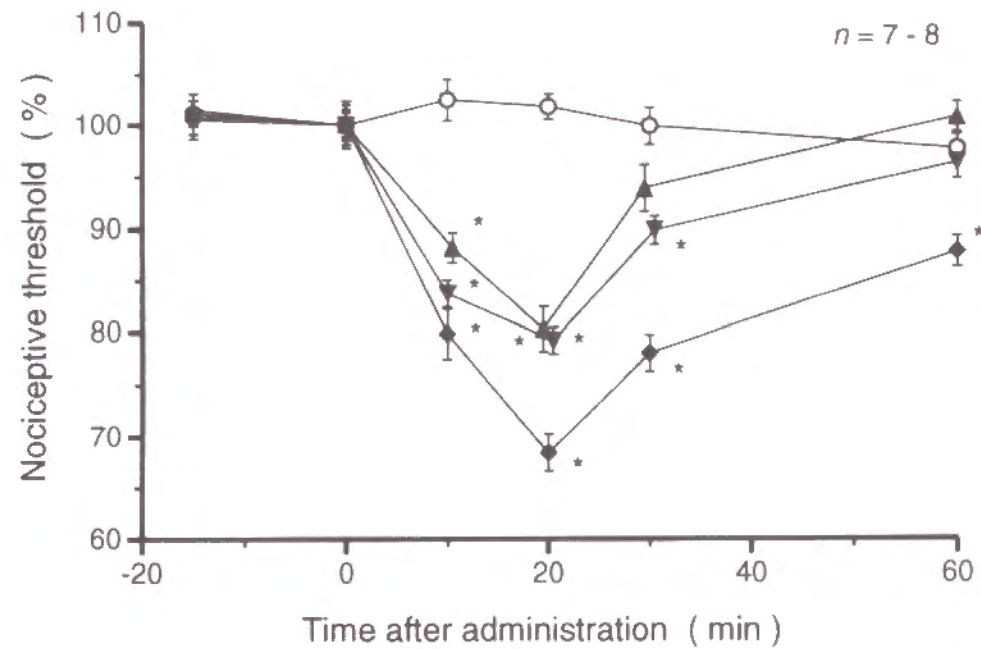


図 3-6 PGE₂ および PGI₂ メチルエステルの同時投与によるラット後肢の機械的侵害受容閾値に対する影響。

それぞれ、1% DMSO/PBS (O)、PGE₂ 100 pmol/rat (▼)、PGI₂ メチルエステル 100 pmol/rat (▲)、PGE₂ 100 pmol/rat + PGI₂ メチルエステル 100 pmol/rat (◆) の i.t. 投与による侵害受容閾値の経時的変化を示す。

* $P < 0.05$ vs. 1% DMSO/PBS (Bonferroni's *post-hoc* test)

PGE₂ および PGI₂ メチルエステルをそれぞれ 100 pmol/rat の用量で同時に i.t. 投与すると、機械的侵害受容閾値が投与前の約 70% にまで低下したので、この作用に NMDA レセプターの活性化が関与しているかどうかを検討した。カラゲニン誘発痛覚過敏に対して最も抑制作用の強かった用量である 3 nmol/rat の MK-801 を PGE₂ + PGI₂ メチルエステルと同時に投与すると、PGE₂ + PGI₂ メチルエステルによる機械的侵害受容閾値の低下を有意に抑制した (図 3-7)。

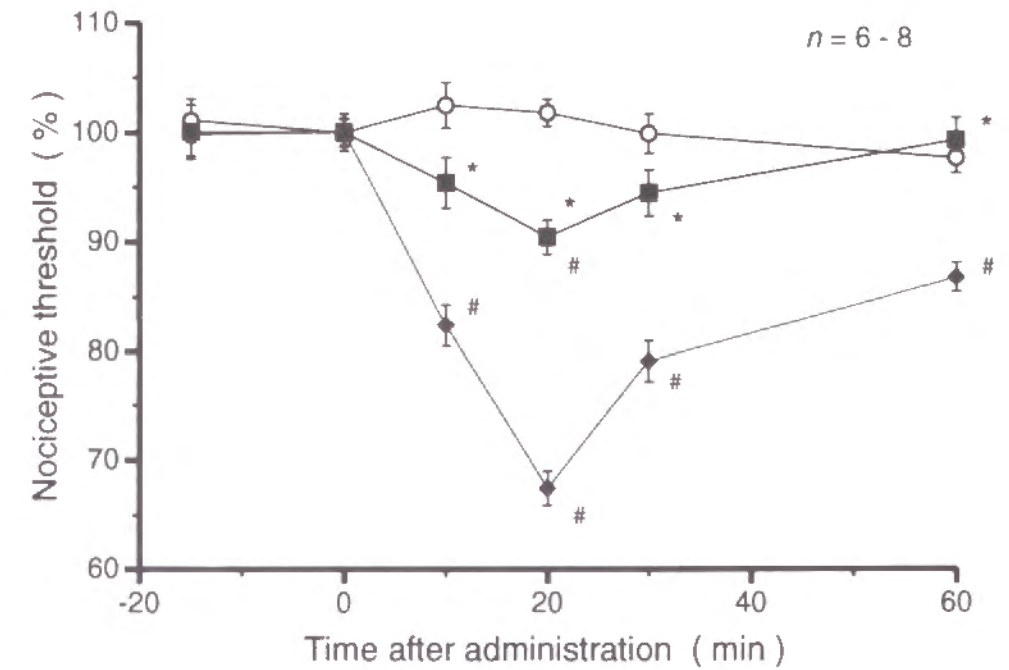


図 3-7 PGE₂ + PGI₂ メチルエステルの i.t. 投与により生じるラット後肢の機械的痛覚過敏に対する MK-801 i.t. 投与の影響。

それぞれ、1% DMSO/PBS (O)、PGE₂ 100 pmol/rat + PGI₂ メチルエステル 100 pmol/rat (◆)、PGE₂ 100 pmol/rat + PGI₂ メチルエステル 100 pmol/rat + MK-801 3 nmol/rat (■) の i.t. 投与による侵害受容閾値の経時的変化を示す。
$P < 0.05$ vs. 1% DMSO/PBS, * $P < 0.05$ vs. PGE₂ + PGI₂ メチルエステル (Bonferroni's *post-hoc* test)

第3節 プロスタグランジン類のグルタミン酸遊離促進作用

(1) グルタミン酸遊離に対する PGE₂ の効果

脊髄後角切片に 1 μM カプサイシンを 2 分間適用すると 26.6 ± 3.1 pmol/mg protein (n = 7) のグルタミン酸の誘発遊離がみられた。PGE₂ は、1 μM カプサイシン誘発グルタミン酸遊離を 0.1 - 3 μM の範囲で濃度依存的に増大させた。この増強作用は 1 μM の濃度において最大効果を示し、この濃度の PGE₂ は、コントロールに対して約 200% の有意な誘発遊離増大作用を示した (図3-8)。一方、グルタミン酸の基礎遊離量に対して PGE₂ は有意な影響を及ぼすことはなかった。

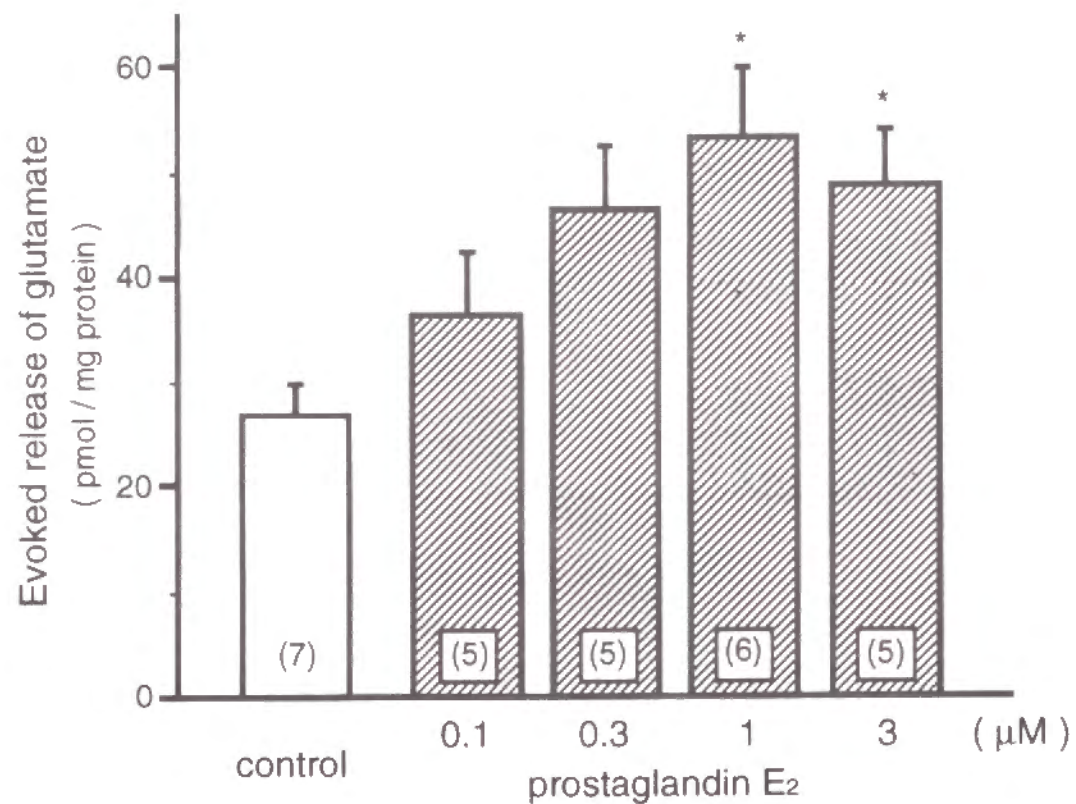


図3-8 ラット脊髄後角切片からの1 μMカプサイシン誘発グルタミン酸遊離に対する PGE₂ の効果。

* P < 0.05 vs. control (Bonferroni's post-hoc test)

(2) グルタミン酸遊離に対する PGI₂ メチルエステルの効果

PGI₂ メチルエステルは、0.1 - 3 μM の範囲で濃度依存的にラット脊髄後角切片からの 1 μM カプサイシン誘発グルタミン酸遊離を増大させた。この増強効果は、1 μM の濃度においては最大効果を発揮し、この濃度の PGI₂ メチルエステルは、コントロールに対して、約 180% の有意な誘発遊離増大作用を示した (図3-9)。しかし、今回使用した濃度において、PGI₂ メチルエステルはグルタミン酸の基礎遊離量に対して有意な影響を示さなかった。

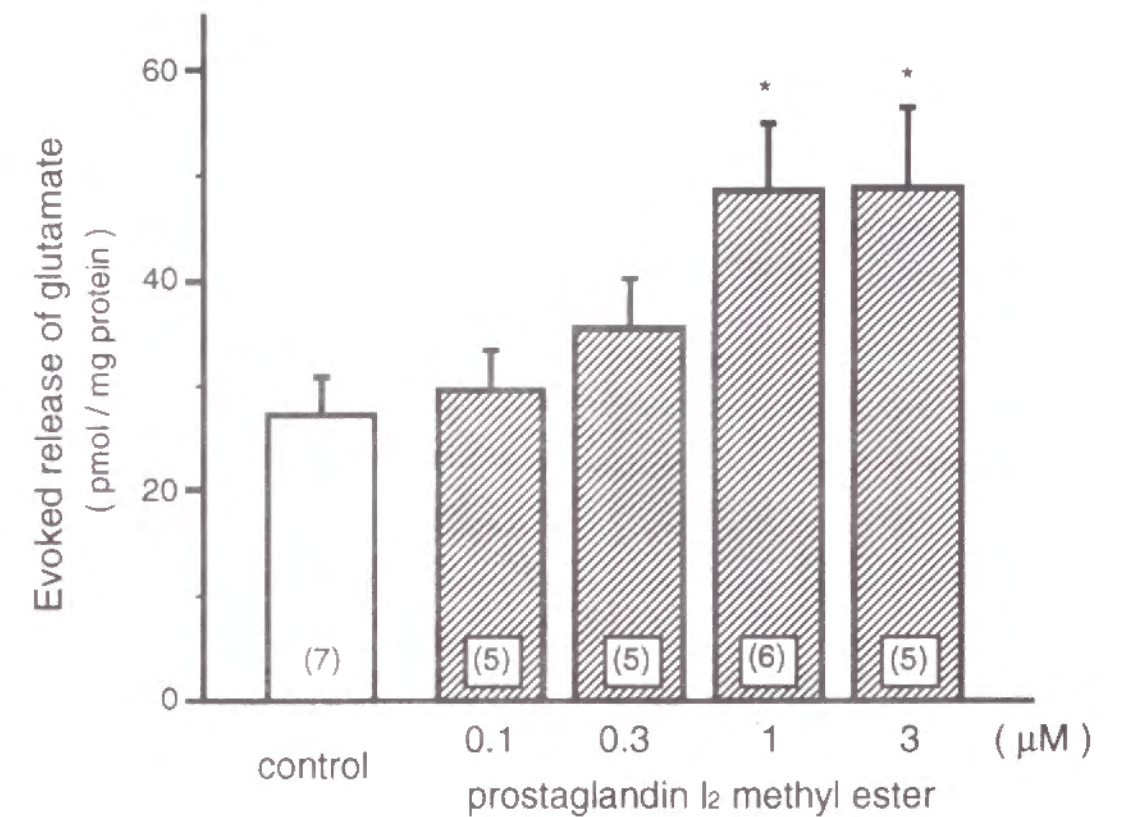


図3-9 ラット脊髄後角切片からの1 μMカプサイシン誘発グルタミン酸遊離に対する PGI₂ メチルエステルの効果。

* P < 0.05 vs. control (Bonferroni's post-hoc test)

(3) カラゲニン+カオリン誘発炎症におけるグルタミン酸遊離の促進

2%カラゲニン+2%カオリンを両側後肢に皮下投与したラットの脊髄後角切片からのグルタミン酸遊離について検討した。非処置ラットの脊髄後角切片からのグルタミン酸の基礎遊離量および1 μ M カプサイシン誘発遊離量はそれぞれ 0.824 ± 0.015 pmol/sec/mg protein および 28.59 ± 2.99 pmol/sec/mg protein であった。しかし、カラゲニン+カオリン処置によって、処置1時間から4時間後において基礎遊離量およびカプサイシン誘発遊離量の有意な増加がみられた。2時間後において、グルタミン酸の基礎遊離量およびカプサイシン誘発遊離量はそれぞれ 1.189 ± 0.046 pmol/sec/mg protein および 55.35 ± 6.10 pmol/mg protein であり、非処置群に対して約140%および190%の有意な増加が認められた(図3-10)。

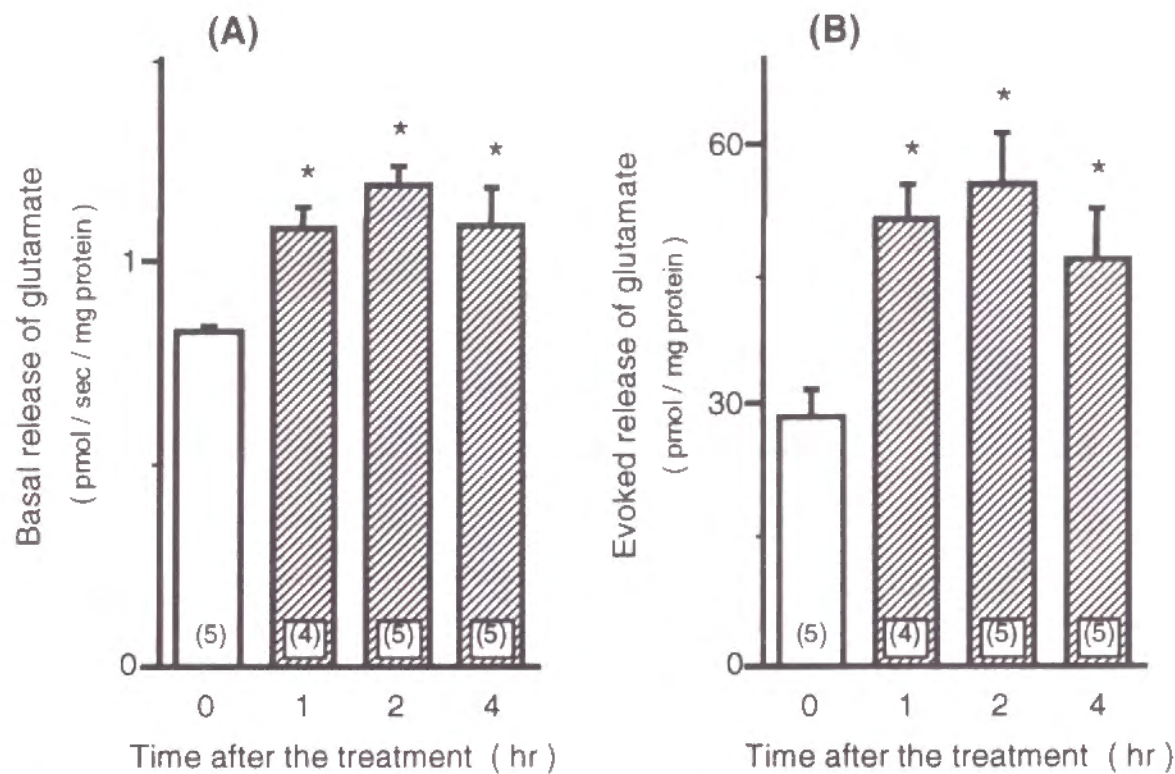


図3-10 ラット脊髄後角切片からのグルタミン酸の基礎遊離量および1 μ M カプサイシン誘発遊離量に対するカラゲニン+カオリン誘発炎症の影響。非処置ラット (0 hr, open column) をコントロールとした。
* $P < 0.05$ vs. 0 hr (Dunnet's post-hoc test)

考察

末梢組織の炎症などによって生じる痛覚過敏発現には、脊髄後角内におけるグルタミン酸神経伝達の亢進が関与していることが、tail-flick test や hot plate test など様々なモデルを用いた行動薬理学実験から示されている [42, 50, 56, 61]。本研究においても、非競合的NMDAレセプターアンタゴニストであるMK-801が、カラゲニン+カオリンによる機械的侵害受容閾値の低下に対して、有意な抗侵害受容作用を示したことから、機械的痛覚過敏の発現には、NMDAレセプターの活性化を介したグルタミン酸神経伝達の亢進が関与していることが示唆された。中枢神経系において、NMDAレセプターの活性化とそれに続く細胞外 Ca^{2+} の流入は、神経伝達の可塑性に重要な役割を果たしていることが示されており [12]、脊髄においても一次求心性線維を高頻度刺激することによって生じる脊髄後角ニューロンのwind upの発現にNMDAレセプターの活性化が寄与していることも報告されている [15]。細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇はホスホリパーゼ A_2 を含む様々な Ca^{2+} 依存性の酵素を活性化させることが知られており、これらが痛覚過敏発現に関与している可能性が考えられる。この点に関して、シクロオキシゲナーゼ阻害薬の一つであるジクロフェナックをi.t.投与すると、非処置側に対して影響することなく、カラゲニン+カオリン処置側においてのみ有意な抗侵害受容作用を示した。このことは、末梢組織の炎症によって、脊髄内のシクロオキシゲナーゼが活性化し、それによって生成されるPG類が機械的痛覚過敏の発現に重要な役割を果たす可能性を示唆している。また、NMDAやサブスタンスPをi.t.投与して生じる温熱的痛覚過敏が同経路からのシクロオキシゲナーゼ阻害薬によって抑制されることが報告されている [41]。脊髄内におけるPG類の産生・遊離の機序に関する直接的な知見は示されていないが、これらの知見を考えあわせると、一次感覚神経から遊離されたグルタミン酸あるいはサブスタンスPがそれぞれのレセプターを介して、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇とそれに続くホスホリパーゼ A_2 の活性化を引き起こしPG類の前駆体であるアラキドン酸の産生を促進している可能性が考えられる。さらに、最近、NMDAレセプターの活性化により生成され痛覚過敏発現にも関与していることが報告されているNO [44]がシクロオキシゲナーゼを活性化するということが報告されており [62, 64]、脊髄内でのPG類の産生経路の一つの可能性として考えられる。今後、脊髄内での痛覚情報伝達に果たすNOおよびPG類の役割の相互関係を解明することは重要であると思われる。

シクロオキシゲナーゼには、非誘導型 (constitutive form) であるtype-1と誘導型

(inducible form) である type-2 の二種類のアイソザイムが存在し [14, 53]、脳内では、海馬および梨状葉皮質などの神経細胞に type-2 シクロオキシゲナーゼが発現していることが知られてる [83]。また、末梢組織の炎症には、type-2 シクロオキシゲナーゼが関与していることが報告されている [65]。本研究で使用したジクロフェナックはこれらのアイソザイムに対して非選択的阻害薬であるので [48]、どのアイソザイムが脊髄後角内で痛覚過敏発現に関与しているかは不明である。今後、選択的阻害薬の効果あるいは脊髄内での両型のシクロオキシゲナーゼの発現の分布などの検討が必要であると思われる。

PGE₂ あるいは、PGI₂ メチルエステルを i.t. 投与すると、それぞれ投与前の約 80% 程度にまで機械的侵害受容閾値を低下させた。さらに、これらを同時投与した場合、より強い侵害受容閾値の低下作用を示し、投与60分後においても有意な痛覚過敏状態を示した。このことは、脊髄後角内において生成された PGE₂ と PGI₂ は相加的に作用し、痛覚過敏発現に寄与する可能性を示唆している。今回の実験では、PGE₂ あるいは PGI₂ メチルエステルを i.t. 投与しても、興奮性アミノ酸アゴニストやサブスタンス P 投与後にみられるような嫌悪反応 [55] を惹起しなかった。同様に、CGRP も嫌悪反応を起こすことなく機械的痛覚過敏を誘発し、その作用機序として一次感覚神経終末からのサブスタンス P の遊離を増加させることが明らかとなっている [58]。PGE₂ と PGI₂ メチルエステルの同時投与による痛覚過敏が NMDA レセプターアンタゴニストの MK-801 で拮抗されたので、一次感覚神経終末からのグルタミン酸の遊離を促進することが示唆された。今回の実験において、PGE₂ および PGI₂ メチルエステルは、ともにカプサイシン誘発グルタミン酸遊離を有意に促進させることを明らかにした。神経ペプチドの遊離については、PG 類が一次感覚神経終末からのサブスタンス P および CGRP 遊離を促進させることが報告されている [4, 51]。これらの知見は、PG 類による侵害受容閾値低下の作用機序の一つとして、一次感覚神経からのグルタミン酸や神経ペプチドの侵害受容伝達物質遊離の促進作用も寄与していることが示唆される。

本研究で、カラゲニン誘発炎症ラットの脊髄後角切片からのグルタミン酸の基礎遊離量及びカプサイシン誘発遊離量が増加していることが明らかとなった。以前の研究においても、アジュバント関節炎あるいはカラゲニン誘発炎症ラット脊髄での、サブスタンス P あるいは CGRP 遊離が増大していることが明らかとなっている [49, 57]。これらの現象に対して、内因性 PG 類が促進的に寄与しているのかどうかは直接的には証明されていない。しかし、炎症性痛覚過敏時に脊髄内において PGE₂ の遊離が増大して

いるという実験結果 [69] もあり、以上の知見を考えあわせると、末梢組織の炎症によって、脊髄後角内一次感覚神経終末からのグルタミン酸や神経ペプチドの遊離が促進し、痛覚過敏発現に関与していることが示唆される。また、この遊離促進は、少なくとも部分的には脊髄内 PG 類によって媒介されている可能性が考えられる。

総括および結論

著者は、本研究においてグルタミン酸のオンライン測定法を確立し、侵害情報の伝達に重要と考えられる細径一次感覚神経に特異的に作用することが知られているカプサイシンによって誘発されるグルタミン酸遊離の調節に関する薬理学的研究を行った結果、以下の成果を得た。

1. カプサイシンが濃度依存的にラット脊髄後角切片からグルタミン酸遊離を増加させたことを初めて実証した。この誘発遊離は、テトロドトキシン非感受性、細胞外Ca²⁺依存性であり、後根神経切断により消失した。

2. ラット脊髄後角からのカプサイシン誘発グルタミン酸遊離は、オピオイド μ 、 δ レセプターおよび α_2 アドレノセプターアゴニストの適用によって抑制された。

3. MK-801 およびジクロフェナックのi.t.投与は炎症性痛覚過敏を軽減させ、また、PGE₂ およびPGI₂メチルエステルのi.t.投与は痛覚過敏を発現させた。一方、痛覚過敏状態では脊髄後角からのグルタミン酸遊離が促進していること、また、PGE₂ およびPGI₂メチルエステルはカプサイシン誘発グルタミン酸遊離を促進した。

以上の結果より、脊髄後角内カプサイシン感受性一次感覚神経からグルタミン酸が遊離されることを初めて示し、さらに、オピオイド μ 、 δ レセプターおよび α_2 アドレノセプターの活性化によって抑制的に調節されていることが明らかとなった。また、炎症性痛覚過敏状態では、脊髄後角内でのグルタミン酸性神経伝達の促進が生じ、内因性PG類がこの促進に寄与している可能性を示した。本研究の成果は、脊髄後角内での興奮性アミノ酸による痛覚情報の伝達とその制御のメカニズムに関する新しい知見を提供した。

謝辞

本研究に際しまして、テーマの選定から本論文の作成に至るまで終始懇切な御指導と御鞭撻を賜りました、京都大学薬学部 佐藤公道 教授に謹んで感謝の意を表します。また、直接ご指導を賜り、多くの有益なご助言をいただいた現富山医科薬科大学和漢薬研究所 倉石 泰 教授に心から感謝の意を表します。さらに、終始有益なご助言をいただきました京都大学薬学部 赤池昭紀 教授、金子周司 助教授、南 雅文 助手、並びに、前田武彦 助手に深く感謝いたします。

本研究にご協力いただきました中本泰充修士、尾山達哉修士、加川雅朗修士、杉本幹治学士、並びに、河村貴央学士に深く感謝いたします。

発表論文目録

本研究の内容の大部分は以下の論文に公表した。

- 1) Ueda, M., Kuraishi, Y. and Satoh, M.
Detection of capsaicin-evoked release of glutamate from spinal dorsal horn slices of rat with on-line monitoring system
Neuroscience Letters 155 (1993) 179-182
- 2) Ueda, M., Kuraishi, Y., Sugimoto, K. and Satoh, M.
Evidence that glutamate is released from capsaicin-sensitive primary afferent fibers in rats: study with on-line monitoring of glutamate
Neuroscience Research 20 (1994) 231-237
- 3) Ueda, M., Sugimoto, K., Oyama, T., Kuraishi, Y. and Satoh, M.
Opioidergic inhibition of capsaicin-evoked release of glutamate from rat spinal dorsal horn slices
Neuropharmacology (in press)
- 4) Ueda, M., Oyama, T., Kuraishi, Y., Akaike, A. and Satoh, M.
Alpha2-adrenoceptor-mediated inhibition of capsaicin-evoked release of glutamate from rat spinal dorsal horn slices
Neuroscience Letters (in press)

引用文献

1. Aimone, L.D. and Yaksh, T.L.
Peptide 10, 1127-1131 (1989)
2. Akagi, H., Otsuka, M. and Yanagisawa, M.
Neurosci. Lett. 20, 259-263 (1980)
3. Amann, R.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 342, 671-676 (1990)
4. Andreeva, L. and Rang, H.P.
Br. J. Pharmacol. 108, 185-190 (1993)
5. Battaglia, G. and Rustioni, A.
J. Comp. Neurol. 277, 302-312 (1988)
6. Besse, D., Lombard, M.C. and Besson, J.M.
Brain Res. 548, 287-291 (1991)
7. Bevan, S., Hothi, S., Hughes, G.A., James, I.F., Range, H.P. Shah, K., Walpole, C.S.J. and Yeats, J.C.
Br. J. Pharmacol. 107, 544-552 (1990)
8. Bleakman, D., Brorson, J.R. and Miller, R.J.
Br. J. Pharmacol. 101, 423-431 (1990)
9. Bradford, M.M.
Analyt. Biochem. 72, 248-254 (1976)
10. Bylund, D.B., Ray-Prenger, C. and Murphy, T.J.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 245, 600-607 (1988)
11. Collin, E., Mauborgne, A., Bourgoin, S., Mantelet, S., Ferhat, L., Hamon, M. and Cesselin, F.
Neuroscience 51, 347-355 (1992)
12. Collingridge, G.L. and Singer, W.
Trends Pharmacol. Sci. 11, 290-296 (1990)
13. De Biasi, S. and Rustioni, A.
Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 7820-7824 (1988)

14. De Witt, D.L. and Smith, W.L.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 1412-1416 (1988)
15. Dickenson, A.H. and Sullivan, A.F.
Neuropharmacology 26, 1235-1238 (1987)
16. Donnerer, J.
Brain Res. 555, 332-334 (1991)
17. Evans, C.J., Keith Jr, D.E., Morrison, H., Magendzo, K. and Edwards, R.H.
Science 258, 1952-1955 (1992)
18. Ferreira, S.H., Lorenzetti, B.B. and Correa, F.M.A.
Eur. J. Pharmacol. 53, 39-48 (1978)
19. Flordellis, C.S., Handy, D.E., Bresnahan, M.R., Zannis, V.I. and Gavras, H.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 1091-1023 (1990)
20. Gamse, R., Lackner, D., Gamse, G. and Leeman, S.E.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 316, 38-41 (1981)
21. Graham, L.T. and Aprison, M.H.
Anal. Biochem. 15, 487-497 (1966)
22. Guzman, F., Braun, C., Lim, R.K.S., Potter, G.D. and Rodgers, D.W.
Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 149, 571-588 (1964)
23. Herz, A.
J. Neural. Transmis. Suppl. 18, 227-233 (1983)
24. Hirota, N., Kuraishi, Y., Hino, Y., Sato, Y., Satoh, M. and Takagi, H.
Neuropharmacology 24, 567-570.
25. Holzer, P.
Pharmacol. Rev. 43, 143-201 (1991)
26. Hori, Y., Endo, K. and Takahashi, T.
J. Physiol. 450, 673-685 (1992)
27. Jessell, T.M. and Iversen, L.L.
Nature 268, 549-551 (1977)
28. Kamisaki, Y., Hamada, T., Maeda, K., Ishimura, M. and Itoh, T.
J. Neurochem. 60, 522-526 (1993)
29. Kangrga, I. and Randic, M.
J. Neurosci. 10, 2026-2038 (1990)
30. Kangrga, I. and Randic, M.
Brain Res. 553, 347-352 (1991)
31. Kuraishi, Y., Harada, Y. and Takagi, H.
Brain Res. 174, 333-336 (1979)
32. Kuraishi, Y., Hirota, N., Sugimoto M., Satoh, M. and Takagi, H.
Life Sci. 33, Suppl. I, 693-696 (1983)
33. Kuraishi, Y., Hirota, N., Sato, Y., Hino, Y., Satoh, M. and Takagi, H.
Brain Res. 325, 294-298 (1985)
34. Kuraishi, Y., Hirota, N., Sato, Y., Kaneko, S., Satoh, M. and Takagi, H.
Brain Res. 359, 177-182 (1985)
35. Kuraishi, Y., Minami, M. and Satoh, M.
Neurosci. Res. 9, 238-245 (1991)
36. Lanier, S.M., Downing, S., Duzic, E. and Homcy, C.J.
J. Biol. Chem. 266, 10470-10478 (1991)
37. Lim, R.K.S., Guzman, F., Rodgers, D.W., Goto, K., Braun, C., Dickerson, G.D. and Engle, R.J.
Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 152, 25-58 (1964)
38. MacDonald, R.L. and Werz, M.A.
J. Physiol. 377, 237-249 (1986)
39. Maekawa, K., Minami, M., Yabuuchi, K., Toya, T., Katao, Y., Hosoi, Y., Onogi, T. and Satoh, M.
Neurosci. Lett. 168, 97-100 (1994)
40. Maggi, C.A., Santicioli, P., Geppetti, P., Patacchini, R., Del Bianco, E. and Meli, A.
Regul. Pept. 22, 117 (1988)
41. Malmberg, A.B. and Yaksh, T.L.
Science 257, 1276-1279 (1992)
42. Mao, J., Price, D.D., Hayes, R.L., Lu, J. and Mayer, D.J.
Brain Res. 598, 271-278 (1992)
43. Mauborgne, A., Lutz, O., Legrand, J.C., Hamon, M. and Cesselin, F.
J. Neurochem. 48, 529-537 (1987)
44. Meller, S.T. and Gebhart, G.F.
Pain 52, 127-136 (1993)

45. Merighi, A., Polak, J.M. and Theodosis, D.T.
Neuroscience 40, 67-80 (1991)
46. Minami, M., Onogi T., Toya, T., Katao, Y., Hosoi, Y., Maekawa, K., Katsumata, S., Yabuuchi, K. and Satoh, M.
Neurosci. Res. 18, 315-322 (1994)
47. Minami, T., Nishihara, I., Uda, R., Ito, S., Hyodo, M. and Hayaishi, O.
Br. J. Pharmacol. 112, 735-740 (1994)
48. Mitchell, J.A., Akarasereent, P., Thiemermann, C., Flower, R.J. and Vane, J.R.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 11693-11697 (1993)
49. Nanayama, T., Kuraishi, Y., Ohno, H. and Satoh, M.
Neurosci. Res. 6, 569-572 (1989)
50. Näsström, J., Karlsson, U. and Post, C.
Eur. J. Pharmacol. 212, 21-29 (1992)
51. Nicol, G.D., Klingberg, D.K. and Vasko, M.R.
J. Neurosci. 12, 1917-1927 (1992)
52. Nicholas, A.P., Pieribone, V. and Hokfelt, T.
J. Comp. Neurol. 328, 575-594 (1993)
53. O'Banion, M.K., Winn, V.D. and Young, D.A.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4888-4892 (1992)
54. Oka, T., Aou, S. and Hori, T.
Brain Res. 663, 287-292 (1994)
55. Okano, K., Kuraishi, Y. and Satoh, M.
Biol. Pharm. Bull. 16, 861-865 (1993)
56. Okano, K., Kuraishi, Y. and Satoh, M.
Biol. Pharm. Bull. 18, 42-44 (1995)
57. Oku, R., Satoh, M. and Takagi, H.
Neurosci. Lett., 74, 315-319 (1987)
58. Oku, R., Satoh, M., Fujii, N., Otaka, A., Yajima, H. and Takagi, H.
Brain Res., 403, 350-354 (1987)
59. Onogi, T., Minami, M., Kuraishi, Y. and Satoh, M.
Neuropharmacology 31, 1165-1169 (1992)
60. Reddy, S.V.R., Maderdrut, J.L. and Yaksh, T.L.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 213, 525-533 (1980)
61. Ren, K., Williams, G.M., Hylden, J.L.K., Ruda, M.A. and Dubner, R.
Eur. J. Pharmacol. 219, 235-243 (1992)
62. Salvemini, D., Misko, T.P., Masferrer, J.L., Seibert, K., Currie, M.G. and Needleman, P.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7240-7244 (1993)
63. Santicioli, P., Patacchini, R., Maggi, C.A. and Meli, A.
Neurosci. Lett. 80, 167-172 (1987)
64. Sautebin, L., Ialenti, A., Ianaro, A. and Di Rosa, M.
Br. J. Pharmacol. 114, 323-328 (1995)
65. Seibert, K., Zhang, Y., Leahy, K., Hauser, S., Masferrer, J., Perkins, W., Lee, L. and Isakson, P.
Proc. Natl. Acad. USA, 91, 12013-12017 (1994)
66. Singer, E.A., Sperk, G. and Schmid, R.
J. Neurochem. 38, 1383-1386 (1982)
67. Skilling, S.R. and Larson, A.A.
Neurosci. Lett. 150, 107-111 (1993)
68. Solomon, R.E., Aimone, L.D., Yaksh, T.L. and Gebhart, G.F.
Pain Suppl. 5, S174 (1990)
69. Sorkin, L.S.
Soc. Neurosci. Abst., 18-II, 1023 (1992)
70. Suarez-Roca, H., Abdullah, L., Zuniga, J., Madison, S. and Maixner, W.
Brain Res. 579, 187-194 (1992)
71. Sullivan, A.F., Dashwood, M.R. and Dickenson, A.H.
Eur. J. Pharmacol. 138, 169-177 (1987)
72. Szolcsanyi, J. and Janco-Gabor, A.
Arzneim. Forsch. 25, 1877-1881 (1975)
73. Takano, Y., Takano, M. and Yaksh, T.L.
Eur. J. Pharmacol. 219, 465-468 (1992)
74. Tang, A.H. and Schoenfeld, M.J.
Eur. J. Pharmacol. 52, 215-223 (1978)

75. Theriault, E., Otsuka, M. and Jessell, T.
Brain Res. 170, 209-213 (1979)
76. Turner, T.J., Adams, M.E. and Dunlap, K.
Science 258, 310-313 (1992)
77. Uda, R., Horiguchi, S., Ito, S., Hyodo, M. and Hayaishi, O.
Brain Res. 510, 26-32 (1990)
78. Urban, L. and Dray, A.
Neurosci. Lett. 134, 9-11 (1991)
79. Yaksh, T.L.
The spinal actions of opioids. (in Opioids II. Handbook of Experimental Pharmacology; eds Herz, A.) Vol. 104/II, pp. 53-90. Springer-Verlag, Berlin (1993)
80. Yaksh, T.L., Jessell, T.M., Gamse, R., Mudge, A.W. and Leeman S.E.
Nature 286, 155-156 (1980)
81. Yaksh, T.L. and Rudy, T.A.
Science 192, 1357-1358 (1976)
82. Yaksh, T.L. and Wilson, P.R.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 208, 446-453 (1979)
83. Yamagata, K., Andreasson, K.I., Kaufmann, W.E., Barnes, C.A. and Worley, P.F.
Neuron, 11, 371-386 (1993)
84. Yoshimura, M. and North, R.A.
Nature 305, 529-530 (1983)
85. Zeng, D., Harrison, J.K., D'Angelo, D.D., Barber, C.M., Tucker, A.L., Lu, Z. and Lynch, K.R.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3102-3106 (1990)