

臨床利用部門

教授	倉石 泰	(薬学博士)
助手	長澤 哲郎	(薬学博士)
助手	東田 千尋	(薬学博士)
技官	林 和子	

研究目的

本部門では、和漢薬の作用機序の解明と新たな活性物質の探求を行い、それらの臨床利用のための基礎的知識を得ることを目的に、主に生化学、分子生物学あるいは内分泌学的手法を用いて和漢薬と関連薬物の薬効の解明をすすめている。また、和漢薬の研究に有用な病態モデル動物の作製、応用とその病態の解明を目指した研究も進めている。本年度の主な研究課題と成果は下記の通りである。

研究概要

I. 痛覚のメカニズムに関する研究

最近、痛覚の伝達や、痛み刺激に対する反応が増大する痛覚過敏および正常では痛みを起こさない刺激で痛みを生じるアロディニアなどの発症における、侵害受容性一次求心線維から遊離する glutamate の役割が注目を集めている。末梢組織の炎症状態下では、脊髄後角ニューロンの侵害受容野が変化することが知られており、この現象に、侵害刺激による一次求心線維からの glutamate の遊離の分布変化の関与も推

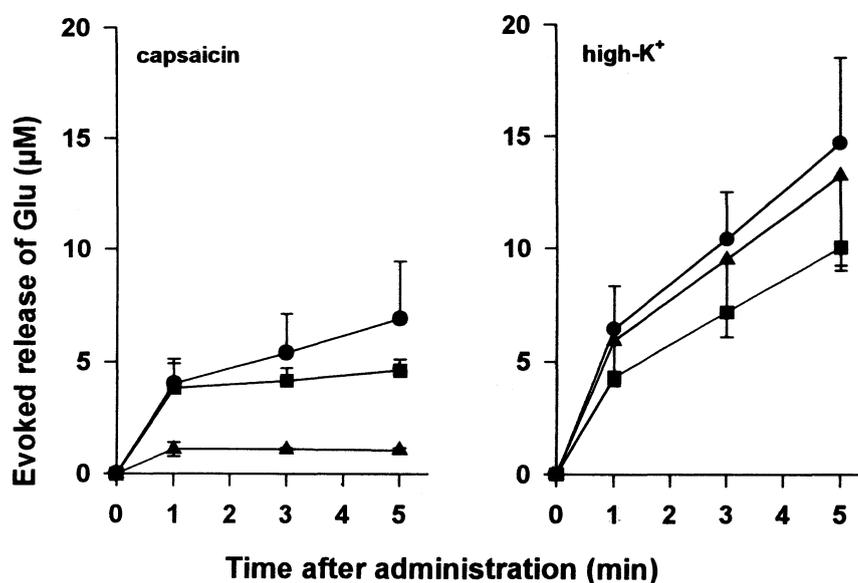


Fig. 1 Time-course of glutamate (Glu) release increased by capsaicin or high K⁺. The increase in fluorescence 1, 3 and 5 min after stimulation with 10 mM capsaicin or 80 mM KCl was quantified as Glu concentration in superficial laminae (●), lamina X (■) and ventral horn (▲), respectively. Data are expressed as mean ± S.E. (bars) values of three slices from three animals.

測される。遊離量だけでなく遊離部位の変化をも調べるためには、脊髄からの glutamate の遊離とその変化を高精度に画像として捉える、いわゆる glutamate 遊離の可視化法の確立が必要である。そこで、ラット脊髄腰膨大部の切片を glutamate dehydrogenase と NAD^+ を含む栄養液を満した培養皿に固定し、脊髄に終止する一次求心線維の終末から薬物刺激により遊離される glutamate を、増加する NADH の蛍光として共焦点UVレーザー走査顕微鏡を用いて検出することで、glutamate 遊離の量と部位の可視化を初めて示した[原著2]。Capsaicin 刺激による glutamate 遊離は主として脊髄後角 I, II 層および X 層で認められたのに対し、高濃度 K^+ イオン刺激による遊離は脊髄前角を含む灰白質全体で見られることを明らかにした (Fig. 1)。これらの結果から、正常時に、glutamate を遊離する capsaicin 感受性の一次求心線維は、主として脊髄後角 I, II および X 層に終止していることが示唆された。

II. 天然薬物の抗侵害受容作用に関する研究

骨粗鬆症患者に対し全身性反復投与で疼痛改善効果が認められているポリペプチドホルモンの calcitonin (CT) は、動物での鎮痛試験において中枢内投与の場合を除けば抗侵害受容作用がほとんどみられていない。本研究では、formalin 刺激による痛覚過敏モデルをもちいて CT として合成ウナギカルシトニン誘導体 (eCT) を背部皮下に投与したときの抗侵害受容作用を調べた[原著3]。eCT を皮下に 1 回投与しても formalin 誘発痛覚過敏は抑制されなかった。しかし、eCT を皮下に 1 日 1 回 7 日間反復投与することにより、formalin 誘発痛覚過敏は完全に抑制された (Fig. 2)。全身性投与による eCT の抗侵害受容作用が反復投与で発現したことは、本痛覚過敏モデルにおける eCT の作用がヒトにおける疼痛改善作用に類似する可能性を示唆した。

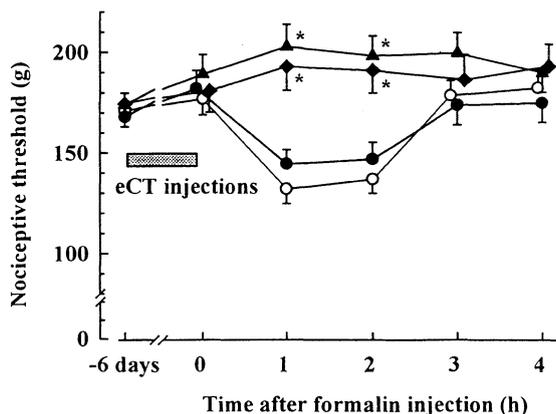


Fig. 2 Effects of repeated systemic injections of [Asu¹⁻⁷]eel calcitonin (eCT) on formalin-induced hyperalgesia. Vehicle or eCT was administered daily for 7 days and dilute formalin was administered 15 min after the last injection of eCT. ○: vehicle ($n=13$), ●: eCT ($0.4 \text{ Ukg}^{-1} \text{ day}^{-1}$, $n=12$), ◆: eCT ($4 \text{ Ukg}^{-1} \text{ day}^{-1}$, $n=14$), and ▲: eCT ($40 \text{ Ukg}^{-1} \text{ day}^{-1}$, $n=12$). Each point represents means and S.E. * $p < 0.05$ when compared with vehicle.

III. 痒みのメカニズムに関する研究

痒みは、皮膚疾患の主要で不快な症状の一つであり、内臓疾患にも耐え難い痒みを生ずるものがあるが、痒みの発生機序に関して解明されていることは多くはない。ヒトに投与すると痒みを生じさせる substance P (SP) をマウスの背部に皮内注射すると、痒み関連行動 (引っ掻き行動) が惹起される。SP の痒み惹起機序として、SP が皮膚の肥満細胞から histamine を遊離させ、この histamine により痒みが生ずると推察されている。ところが、SP は、肥満細胞欠損マウス (WBB6F1 W/W^v) においても肥満細胞欠損マウスの同系正常マウスと同様に痒み関連行動を惹起した。この結果は、SP の痒み関連行動惹起作用に肥満細胞が主要な役割をはたしていない可能性も示された。また、SP の痒み関連行動惹起が NK1 受容体遮断薬により抑制されたことより、SP の NK1 受容体への作用が少なくとも一部関与する可能性も示された。これらのことから、SP の作用点として、一次求心線維の NK1 受容体が作用点の一つである可能性が推察

された。本研究では、マウス後根神経節での NK1 受容体 mRNA の発現について分子生物学的手法を用い調べた [原著 5]。その結果 Fig. 3 に示されるようにマウス後根神経節に NK1 受容体 mRNA が検出された。このことは一次感覚神経上に NK1 受容体が発現しており、SP が直接一次求心線維の末梢側終末に作用し得る可能性を示唆する。

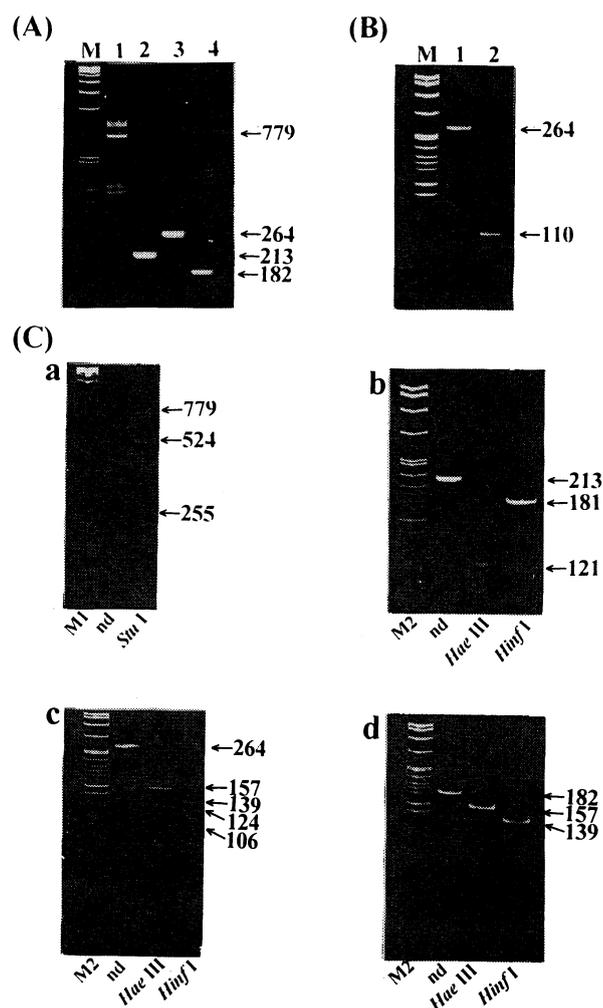


Fig. 3 RT-PCR for NK₁ receptor mRNA in the dorsal root ganglia of mice and the confirmation using nested PCR and digestion with restriction enzymes. A : RT-PCR of RNA from the dorsal root ganglia using four pairs of primers, NK₁-1 plus NK₁-6 (lane 1), NK₁-2 plus NK₁-5 (lane 2), NK₁-3 plus NK₁-7 (lane 3), and NK₁-4 plus NK₁-7 (lane 4). M : ϕ 174 digested with *HaeIII*. B : Identification of the 264 bp PCR product (lane 1) by nested PCR using internal primers, NK₁-4 and NK₁-6 (lane 2). M : pBR322 digested with *MspI*. C : Identification of the PCR products by digestion with restriction enzymes (*StuI*, *HaeIII* and *HinfI*). The restriction enzymes used are shown under the each lane. a. b. c. and d correspond with 1, 2, 3, and 4 in Fig. 3A, respectively. M1 : ϕ 174 digested with *HaeIII*; M2 : pBR322 digested with *MspI*; nd : not digested.

IV. 神経の分化, 成長, 再生のメカニズムに関する研究

脳はシナプスの可塑性を基盤にして、記憶や学習といった高次機能を形成していると考えられている。未成熟なニューロンがシナプス形成に至る過程や神経ネットワークの修正の機序を明らかにするには神経分化の研究が必要であることから、ニューロンモデル NG108-15 細胞を用いて、その神経突起伸展や細胞増殖抑制に関与する新規因子 TA20 を cDNA クローニングした。TA20 の機能を調べるために、発達中のラット脳内での TA20 mRNA 発現量の変化を検討した [原著 6]。TA20 mRNA は胎生 13 日から 16 日の間に脳内で増加し始めるが、大脳皮質では生後より生前の方が発現量が高く、小脳プルキンエ細胞での発現は生後も徐々に高まった。海馬の TA20 mRNA は生前、生後を通して高い発現量を保った (Fig. 4)。以上、TA20 は、神経可塑性の生じていると思われる部位と時期に対応してその発現量が増加していることが示されたことより、神経ネットワークの形成に関与している可能性が示唆された。

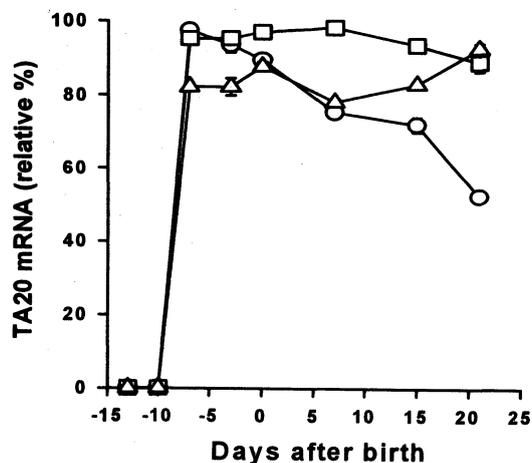


Fig. 4 The expression change of TA20 mRNA in developing rat brains. The relative expression levels of TA20 mRNA in the cerebral cortex (○), hippocampus (△) and cerebellum (□) are shown through the development. Quantified expression values of TA20 mRNA are shown as relative percentages to a maximum intensity. Data are expressed as means \pm S.E. (bars) values of six slices from three animals.

◇ 原 著

I. 痛覚のメカニズムに関する研究

1) Dual effect of serotonin on formalin-induced nociception in the rat spinal cord.

T. Oyama, M. Ueda, Y. Kuraishi and M. Satoh. *Neurosci. Res.*, 25, 129-135, 1996.

Summary: To examine the role of the descending serotonergic system in the regulation of spinal nociceptive processing, the effects of serotonin (5-HT) and selective ligands for 5-HT receptor subtypes on persistent nociception were investigated. Formalin (5% formaldehyde) injected into the plantar region of the rat hindpaw induced two phases of aversive responses such as licking and biting. Intrathecal administration of selective 5-HT3 receptor antagonists, granisetron (0.1-100 pmol/rat) and ondansetron (1-1000 pmol/rat), reduced the second phase of the formalin-induced aversive responses without affecting the first one. The antinociceptive effect of granisetron (100 pmol/rat) was abolished when 5-HT was depleted from the lumbar cord by pretreatment with 5,7-dihydroxytryptamine (5,7-DHT). In the 5,7-DHT-treated

rats, intrathecal administration of 1-(m-chlorophenyl)-biguanide, a selective 5-HT3 receptor agonist, facilitated the aversive responses in the second phase whereas that of 8-OH-DPAT, a selective 5-HT1A receptor agonist, suppressed them. Intrathecal administration of 5-HT showed a dual effect on the second phase of the aversive responses in the 5,7-DHT-treated rats; 5-HT inhibited the aversive responses when administered at a low dose (0.1 nmol/rat) but facilitated them at a high dose (1 nmol/rat). In addition, the inhibitory and facilitatory effects of intrathecal 5-HT were blocked by its co-administration with NAN190, a 5-HT1A receptor antagonist, and granisetron, respectively. These results suggest that 5-HT suppresses formalin-induced nociception in the spinal cord via the 5-HT1A receptor and facilitates it via the 5-HT3 receptor.

2) Visualization of glutamate release from rat spinal cord with a confocal laser scanning microscope.

C. Tohda and Y. Kuraishi. *Neurosci. Res.*, 24, 183-187, 1996.

Summary: Visualization of the release of an excitatory neurotransmitter, glutamate (Glu), from a slice preparation of the brain and spinal cord may be of great advantage in studying the release of Glu from a small population of neurons. When capsaicin (10 mM) was applied to a slice of the rat spinal cord immersed in a medium containing glutamate dehydrogenase (GDH), an oxidized form of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+), and tetrodotoxin, we observed an apparent increase of fluorescence in superficial laminae and lamina X, using a confocal laser scanning microscope. Such an increase was not observed in the absence of either NAD^+ or GDH, inhibited by removal of extracellular Ca^{2+} , and abolished by capsazepine (100 mM). In contrast with capsaicin, Glu release evoked by high- K^+ was observed in all laminae throughout the grey matter. The present results suggest that this system enables us to see the site of the release of Glu as an image and that capsaicin releases this amino acid mainly in superficial laminae and lamina X in the spinal cord.

II. 天然薬物の抗侵害受容作用に関する研究

3) Antinociceptive effects of repeated systemic injections of calcitonin in formalin-induced hyperalgesic rats.

H. Umeno, T. Nagasawa, N. Yamazaki and Y. Kuraishi. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **55**, 151-156, 1996.

Summary: Calcitonin (CT) produces a long-lasting analgesia in patients suffering from painful diseases following repeated systemic injections, but there have been few reports on the antinociceptive action of systemic injections of CTs in animal experiments. This study was conducted to elucidate an antinociceptive action of systemic CT in rats. An injection of dilute formalin induced hyperalgesia for about 2 h. Single topical injections of 0.12 and 1.2 u, but not 0.012 u, of [Asu¹⁻⁷]eel CT (eCT) into the same site of formalin injection inhibited the hyperalgesia. Repeated systemic injections of eCT (4 and 40, but not 0.4, u kg⁻¹ day⁻¹) for 7 days inhibited the hyperalgesia, while the single injection was without effects at doses tested. Although the highest dose of eCT (40 u kg⁻¹ day⁻¹) inhibited an increase in body weight following repeated injections, lower doses (0.4 and 4 u kg⁻¹ day⁻¹) were without effects. The antinociception following repeated systemic injections of eCT (4 u kg⁻¹ day⁻¹) lasted for at least 24 h, and subsided by 3 days following the last eCT injection. These results indicate that the repeated systemic injections of eCT produce a long-lasting inhibition of formalin-induced hyperalgesia in rats. This inhibitory effect is similar to CT analgesia in human subjects in terms of a necessity for repeated administration, effective dose and long-lasting effects.

4) Processing of nux vomica. VII. Antinociceptive effects of crude alkaloids from the unprocessed and processed seeds of *Strychnos nux-vomica* in mice.

B. Cai, T. Nagasawa, S. Kadota, M. Hattori, T. Namba and Y. Kuraishi. *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 127-131, 1996.

Summary: We examined the antinociceptive effects of the crude alkaloid fractions (CAF) of nux vomica (the dried seeds of *Strychnos nux-vomica* L.) and the influences of various processing

methods upon their antinociception in three analgesic tests in mice. In the tail-pressure test, the CAF (0.01-1 μg/kg, i.p.) of nux vomica that was unprocessed or treated with sand-, licorice-, or vinegar and sand-processing showed clear antinociception. The CAF (1 μg/kg, i.p.) of vinegar-processed nux vomica showed antinociception, without effects at lower doses of 0.01 and 0.1 mg/kg and those treated with urine- or urine and sand-processing were without effects at doses of 0.01 - 1 μg / kg. Morphine (2 mg / kg, s.c.) showed short - lasting antinociception, without effects at a dose of 1 μg / kg. In the hot-plate test, the CAF (100 μg/kg, i.p.) of nux vomica having undergone sand processing produced a significant antinociception, without effects at lower doses of 0.01 and 1 μg/kg. The CAF (0.01-100 μg/kg, i.p.) of nux vomica that was unprocessed or treated with oil- or vinegar and sand-processing and morphine (1 and 100 μg/kg, s.c.) were without effects. In the acetic acid-induced writhing test, the CAF (1 μg/kg, i.p.) of nux vomica that was treated with sand-processing significantly inhibited the writhing behavior, while those of nux vomica that was unprocessed or treated with oil- or vinegar and sand-processing and morphine were without effects at a dose of 1 μg/kg. The present results demonstrate the antinociceptive effects of the CAF of nux vomica and suggest that sand-processing is good for the analgesic potency of nux vomica. It is also suggested that the CAF of nux vomica has distinct antinociceptive potency, even after treatment with licorice-, oil-, vinegar and sand-processing.

III. 痒みのメカニズムに関する研究

5) Expression of tachykinin receptor mRNA in dorsal root ganglia of the mouse.

T. Andoh, T. Nagasawa and Y. Kuraishi. *Mol. Brain Res.*, **35**, 329-332, 1996.

Summary: We examined whether mRNA coding for tachykinin NK1 receptor is expressed in the dorsal root ganglion (DRG) of the mouse, using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Both the RT-PCR of the total RNA from the DRGs using four pairs of primers and the digestion of these products with the restriction

enzymes gave the bands with predicted length. Further amplification (nested PCR) of the part of one PCR product also gave the band with predicted length. Southern blot hybridization of RT-PCR products of total RNA from the DRG and several CNS regions revealed that the expression level of NK1 receptor mRNA in the DRG was similar to the cerebellum and less than the olfactory bulb, cerebral cortex, medulla oblongata and spinal cord. The present results suggest that NK1 receptor mRNA is expressed in the mouse DRG, although the level is relatively low.

IV. 神経の分化, 成長, 再生のメカニズムに関する研究

6) Expression of mRNA for a neuronal differentiation factor, TA20, in developing rat brain. C. Tohda, S. Nagai, Y. Kuraishi and Y. Nomura. *Neurosci. Res.*, 25, 129-135, 1996.

Summary: In our previous study, a novel factor, TA20, was isolated from NG108-15 cells. The TA20 mRNA was increased by stimulation which also induced neuronal differentiation. Neuronal cells overexpressed with TA20 extended long neurites and stopped cell growth (Tohda et al., 1995, *Neurosci. Res.*, 23:21-27). We investigated the expression pattern of TA20 mRNA in developing rat brains to predict physiological roles of TA20. TA20 mRNA began to increase between embryonic days 13 and 16. TA20 mRNA was observed mainly in neocortical, hippocampal and precerebellar neuroepithelium on embryonic day 16. Although the level of TA20 mRNA in the cerebral cortex was higher before birth than after birth, the level in cerebellar Purkinje cells increased gradually even after birth. The high expression level of TA20 mRNA in the hippocampus was maintained before and after birth. Thus, TA20 was expressed highly in brain regions in which neurons were changing morphologically and qualitatively, suggesting that TA20 may be involved in neuronal formation in vivo.

◇ 著 書

- 1) 倉石 泰: オピオイドペプチド. 「痛みの概念の整理」花岡一雄, 田上 恵編, 16-17, 真興交易, 東

京, 1996.

- 2) 倉石 泰: 下行性疼痛抑制系. 「痛みの概念の整理」花岡一雄, 田上 恵編, 20-21, 真興交易, 東京, 1996.
- 3) 倉石 泰: エンケファリンとその前駆体. 「廣川タンパク質化学」第11巻, ホルモン系タンパク質およびポリアミンII, 北川幸己, 五十嵐一衛編, 237-241, 廣川書店, 東京, 1996.
- 4) 倉石 泰: エンドルフィンとその前駆体. 「廣川タンパク質化学」第11巻, ホルモン系タンパク質およびポリアミンII, 北川幸己, 五十嵐一衛編, 242-245, 廣川書店, 東京, 1996.
- 5) 倉石 泰: ダイノルフィンとその前駆体. 「廣川タンパク質化学」第11巻, ホルモン系タンパク質およびポリアミンII, 北川幸己, 五十嵐一衛編, 246-250, 廣川書店, 東京, 1996.

◇ 総 説

- 1) 倉石 泰: 痛覚伝達物質の遊離と鎮痛のメカニズム. 痛みと漢方 6: 3-8, 1996.

◇ 講演記録集等

- 1) 倉石 泰, 長澤哲郎, 安東嗣修, 林 和子: サブスタンスPの痒みは肥満細胞からのヒスタミン遊離によるのか? 第5回痒みシンポジウム, 103-111, 1996.

◇ 学会報告

- 1) 倉石 泰: マウスの行動を指標にした痒みの研究は可能か. 北陸実験動物研究会設立総会, 1996, 9, 金沢.
- 2) 安東嗣修, 長澤哲郎, 済木育夫, 林 和子, 倉石 泰: マウスのサブスタンスP誘発引掻き行動に及ぼす2-chloroadenosineとcarrageenanの影響. 第69回日本薬理学会年会, 1996, 3, 長崎. T. Andoh, T. Nagasawa, I. Saiki, K. Hayashi and Y. Kuraishi, Effect of 2-chloroadenosine and carrageenan on substance P-induced scratching in mice. *Jpn. J. Pharmacol.*, 71, Suppl. I, 302P(1996).

When injected into the human skin, substance P (SP) produced an itch sensation, which is believed to be mediated by histamine liberated from mast cells. However, we have recently found in mice that SP elicits itch-related behavior, which is inhibited by NK1 receptor antagonist, and that SP induced

such behavior even in mast cell-deficient mice. As NK1 receptors are expressed in macrophages ($M\phi$), we examined whether $M\phi$ would be involved in SP-induced itching in mice. In the present experiments, SP (100 nmol) was intradermally injected into the rostral back of the male ICR (28-32 g) mice and in one experiment mast cell-deficient mice (WBB6F1 W/W^v, 33-40 g). For itch-related response, scratching of the injected site by either hind-paw was counted. Pretreatment with carrageenan (0.1-1.2 mg, i.p., -24 h) produced the dose-dependent inhibition of SP-induced scratching. Pretreatment for 24 h with 2-chloroadenosine (ChA, 5-50 mg, i.v., -24 h), but not adenosine (50 mg, i.v., -24 h), also produced the dose-dependent inhibition of the SP action. ChA (50 mg) inhibited the SP action in mast cell-deficient mice. As carrageenan and ChA are toxic to $M\phi$, the present results suggest that $M\phi$ are at least in part involved in scratch- probably itch-inducing action of SP in mice.

3) 長澤哲郎, Yaakob H.B., 安東嗣修, 倉石 泰: **Papain の皮内注射はマウスに引っ掻き行動を惹起する.** 第69回日本薬理学会年会, 1996, 3, 長崎. H.B.Yaakob, T. Nagasawa, T. Andoh and Y. Kuraishi, **Intradermal injection of papain elicits scratching behaviors in mice.** *Jpn. J. Pharmacol.*, 71, Suppl. I, 302P(1996).

Although pruritus is the common symptom of cutaneous diseases, the mechanisms are unclear. Papain, a protease, causes an itch sensations in human subjects when applied to the skin. In the present experiments, we examined whether papain would elicit itch-related behaviors, that is, scratching in mice. Papain was intradermally injected into the rostral back of the male ICR mice (5 weeks old) and their behaviors were recorded using a video camera, which served for behavioral observation. Papain (1-100 μ g) dose-dependently elicited the scratching of the injected skin by the hind paws; the number of scratching at papain dose of 100 μ g was 205.9 ± 42.7 per 60 min ($n=8$). Papain (100 μ g) denatured by heat at 100°C for 10 min was without effect. When coadministered with papain (100 μ g), the protease inhibitor antipain (100 μ g) significantly suppressed the papain-induced scratching.

Pretreatment with capsaicin (50, 50, 100, 150 and 200 mg/kg⁻¹day⁻¹, s.c., daily for 5 days) significantly inhibited papain (100 μ g)-induced scratching. These results demonstrated that papain induces scratching, which may be due to the sensory, probably itch, stimulation of the skin. It is suggested that the proteolytic activity is responsible for the action of papain.

4) 安東嗣修, 山口朋美, 長澤哲郎, 倉石 泰, 佐藤 公道: **ヒスタミンの引っ掻き行動惹起作用はマウスの系統により異なる.** 日本薬学会第116年会, 1996, 3, 金沢. 講演要旨集 3, p.29.

【目的】我々は, compound 48/80 や serotonin (5-HT) を ddY 系マウスの皮膚に投与すると痒み関連行動(引っ掻き行動)を惹起するが, 古典的な痒みのメディエーターである histamine (HST) はほとんど惹起しないことを報告した。今回, ICR 系マウスでは, HST が明らかな引っ掻き行動惹起作用を示すことを見出したので, ddY 系と ICR 系マウスにおける HST の引っ掻き行動惹起作用を 5-HT と比較検討した。

【方法】ICR 系あるいは ddY 系の雄性マウス (5-6 週令) を 1 群 8 匹として用いた。HST と 5-HT は, 生理食塩水に溶解し, 前日に除毛しておいた吻側背部に 0.05 ml の容量で皮内注射した。Chlorpheniramine maleate (CPR, H1 遮断薬) は, 水道水に溶解し, HST の皮内注射の 30 分前に経口投与した。皮内注射後直ちに, マウスを行動観察用ケージに入れ, その行動を無人環境下にビデオカメラで撮影した。ビデオの再生により, マウスの引っ掻き行動を観察した。

【結果・考察】生理食塩水及び HST (1, 10, 100 μ g) の注射後 1 時間の引っ掻き行動の平均回数は, ICR 系マウスで各々 7, 47, 70, 120 回と用量依存的に増加したが, ddY 系マウスでは各々 3, 7, 10, 20 回と少なかった。一方, 5-HT (3, 10, 30 μ g) のそれは, ICR 系マウスで各々 22, 78, 112 回, ddY 系マウスで各々 14, 47, 146 回と, 何れも用量依存的に増加した。ICR 系マウスにおける HST (100 μ g) 誘発引っ掻き行動は, CPR (1, 10, 100 mg/kg) で用量依存的に抑制された。CPR の調べたいずれの用量も明らかな鎮静作用を生じなかった。以上の結果から, ICR 系マウスで皮膚の HST-H1 受容体系が痒みを起す可能性が示唆される。ddY 系マウスで HST が引っ掻き行動を惹起し難い理由は, 現在のところ不明である。

5) 長井忍布, 伊藤昭博, 上原孝, 野村靖幸, 東田千尋: **NG108-15 細胞の突起伸展, 増殖, 細胞死に及ぼす新規神経分化因子 TA20 の影響.** 日本薬学会

第116年会, 1996, 3, 金沢. 講演要旨集 3, p.7.

【目的】 NG108-15 細胞は cAMP アナログ処理によってニューロンへ分化するが, TPA を同時処理すると分化が促進されることを我々は見出ししている。さらに, 両薬物処理によって特異的に強く発現する遺伝子として TA20 を単離した。そこで, TA20 の機能を明らかにするためにこの遺伝子をトランスフェクトし, 増殖, 分化, 生存に対する影響を検討し, 以下の知見を得た。

【方法】 デキサメサゾン (DEX) 誘導型発現ベクター (pMAM-neo) に TA20 遺伝子を組み込み (pMAM-TA20), NG108-15 細胞にトランスフェクトした。その後, ネオマイシン処理することで stable clone を得た。TA20 mRNA の発現は DEX を培地中に添加することによって誘導した。2~4 日後に total RNA, 細胞質および細胞膜画分を調製し, 特異的蛋白質, 遺伝子の発現を調べた。さらに突起伸展, 増殖, NO による細胞死への影響を検討した。

【結果】 1) DEX は発現ベクター pMAM-neo を移入した細胞には影響せず, pMAM-TA20 を移入した細胞にのみ作用し TA20 mRNA を発現させ, それと同時に細胞増殖を抑制した。2) さらに, DEX は pMAM-TA20 移入細胞においてニューロフィラメント (NF-H) 量を増加させ, 突起伸展を促進した。3) 神経細胞に大量に存在している GTP 結合蛋白質である Goa 量も突起伸展とともに増加した。

【考察】 以上のことより, TA20 は突起伸展と増殖抑制活性を有することが示唆された。また, Goa および NF-H 量の増加を促進させたことから細胞骨格系の変化をもたらす事が予想された。さらに, 神経細胞に特異的な蛋白質の発現など, その機能面についても解析中である。最近, 神経栄養因子は分化のみならず, 細胞死抑制因子としても働くことが知られており, NO などの誘発による細胞死に対する TA20 の機能についても併せて報告する予定である。

6) Kuraishi Y., Umeno H., Nagasawa T., and Yamazaki N.: Antinociceptive effects of repeated systemic injections of calcitonin, involving ascending serotonergic systems. 1996 World Congress on Osteoporosis, 1996, 5, Amsterdam, The Netherlands.

7) 安東嗣修, 長澤哲郎, H.B. Yaakob, 倉石 泰: Papain の起痒作用と血管透過性亢進作用に及ぼす NK1 拮抗薬 L-668, 169 の影響. 第89回日本薬理学会近畿部会, 1996, 6, 宝塚. 日薬理誌, 108 (4), 82P (1996).

【目的】 Papain はヒトで強い起痒作用が知られているが, その機序の詳細は不明である。我々は, papain をマウスに皮内注射すると引っ掻き行動を惹起し, その行動が痒みに起因する反応 (痒み関連行動) である可能性を明らかにした。また, 一次求心線維に含有され神経原性血漿漏出に関与する substance P (SP) も痒み関連行動を惹起し, その作用が一部は NK1 受容体を介して発現する。そこで今回, papain の起痒作用と血管透過性亢進作用に及ぼす NK1 受容体遮断薬の影響を検討した。

【方法】 雄性 ICR 系マウス (5 週令) を, 行動実験には 1 群 8 匹, 血漿漏出実験には 1 群 4-6 匹として用いた。Papain 及び SP は, 単独あるいは L-668, 169 と共に生理食塩水に溶解し, 前日に除毛した吻側背部に 50 μ l の容量で皮内注射した。注射後 1 時間マウスの行動を無人環境下にビデオ録画し, ビデオ再生により注射部位への後肢による引っ掻き行動を観察した。血漿漏出量は, 予め Evans blue を静脈内注射したマウスに papain 等を皮内注射し, その 20 分後の皮膚中の Evans blue 量から算出した permeability ratio (PR) 値を指標とした。

【結果】 Papain (100 μ g) 注射後 1 時間の引っ掻き行動は, 206 \pm 43 回であった。L-668, 169 (5 nmol) を papain (100 μ g) と同時投与すると, 引っ掻き行動は 85 \pm 18 回と有意に抑制された。L-668, 169 (5 nmol) は, SP (100 nmol) の引っ掻き行動惹起作用も有意に抑制した。生理食塩水及び papain (30, 100 μ g) の単独注射後の PR 値がそれぞれ 2.3, 3.2, 4.7 と用量依存的に増加した。L-668, 169 (5 nmol) を同時投与すると, 生理食塩水及び papain (30, 100 μ g) 注射後の PR 値がそれぞれ 2.2, 4.6, 8.6 となり, papain の血管透過性亢進作用が L-668, 169 により増大した: 二元配置分散分析法による解析で papain と L-668, 169 の交互作用が $F(2,18)=10.1, p=0.0011$ であった。

【考察】 以上の結果から, papain による血管透過性の亢進は papain の起痒作用に重要な役割を果たしていないと考えられる。また, papain の起痒作用に少なくとも一部皮膚における SP-NK1 受容体系が関与する可能性が示唆される。

8) 東田千尋, 山口朋美, 倉石 泰, 佐藤公道: 反復低温ストレスによる脊髄後角 NMDA 受容体サブタイプ mRNA の発現の変化. 第19回日本神経科学大会, 1996, 7, 神戸. *Neurosci. Res. Suppl.*, 20: S213 (1996)

We have found that facilitation of glutamatergic transmission in the spinal dorsal horn is suggested

to be responsible for the repeated cold stress (RCS)-induced hyperalgesia. In the present experiments, to determine whether the facilitation of the function of NMDA receptors in the spinal dorsal horn would be involved in this hyperalgesia, we investigated expression changes of mRNAs for four NMDA receptor subtypes, NR2A-2D, in the lumbar cord of RCS rats, using *in situ* hybridization. Three-day exposure to RCS decreased the nociceptive threshold of the hind paw. It produced a significant increase in the expression of NR2C mRNA in the laminae I and II and tendency to increase in the laminae V and VI. Such increases were not apparent 11 days after cessation of RCS, when the nociceptive threshold recovered to normal. There was a tendency to increase in NR2B mRNA in the laminae I and II after 3-day exposure to RCS. There were no obvious alterations in the expression of mRNAs for NR2 NR2C and NR2B in other laminae of the lumbar cord and those of NR2A and NR2D in all the laminae. These results suggest that RCS-induced hyperalgesia is mediated at least in part by the increased expression of NMDA receptor subtypes, particularly NR2C subtype, in the dorsal horn.

9) 山口朋美, 東田千尋, 倉石 泰, 佐藤公道: セロトニン皮内注射の蚤痒関連行動誘発作用への5-HT₂受容体サブタイプの関与. 第19回日本神経科学大会, 1996, 7, 神戸. *Neurosci. Res. Supple.*, 20 : S208 (1996)

We have found that an intradermal (i.d.) injection of serotonin (5-HT) induces itch-related behavior, that is, scratching of the injection site by the hind paws in mice. This study was conducted to determine which subtypes of 5-HT receptors would be involved in the 5-HT action. An i.d. injection was given to male ddY mice (4-5 weeks old) in a volume of 50 μ l. The behaviors were videotaped, which served for behavioral observation. An i.d. injection of 5-HT (1.4-140 nmol) and the 5HT₂ agonist (methyl-5-HT (3-300 nmol)) produced the scratching in a dose-dependent manner, but the 5-HT_{1A} agonist R(+)-8-OH-DPAT (0.1-100 nmol) and the 5-HT₃ agonists 1-phenylbiguanide (30-300 nmol) and 2-methyl-5-HT (30-300 nmol) were almost without effects. The scratching induced by 5-HT (100 nmol) was significantly inhibited by peroral

pretreatment with the 5-HT₂ antagonists methysergide (0.1-1 mg/kg) and cyproheptadine (0.1-1 mg/kg), but not with the 5-HT₃ antagonists ondansetron (0.01-1 mg/kg) and MDL-72222 (0.01-1 mg/kg). The present results suggest that an i.d. injection of 5-HT elicits itch-related behavior mediated at least in part by 5-HT₂ receptors.

10) 倉石 泰: 痛みと鎮痛の機序. 第39回北陸臨床麻酔懇話会, 1996, 7, 金沢.

11) 倉石 泰: 痛みと鎮痛のメカニズムの物質的基礎. 整形外科立山セミナー, 1996, 7, 富山.

12) 倉石 泰: サブスタンス P の起痒機序-マウスの引っ掻き行動を指標にして. 第2回行動薬理研究会ならびに神経行動薬理若手研究者の集い5周年記念シンポジウム, 1996, 8. 作並.

13) Kuraishi Y., Umeno H., Yamazaki N., and Nagasawa T.: Evidence for the involvement of ascending serotonergic systems in antinociception of repeated systemic injection of calcitonin in rats. 8th World Congress on Pain, 1996, 8, Vancouver, Canada.

14) 山崎奈穂子, 佐藤一哉, 長澤哲郎, 倉石 泰: 麻黄附子細辛湯の痛覚過敏抑制作用とモノアミン神経毒の脊髄クモ膜下腔内投与による影響. 第13回和漢医薬学会大会, 1996, 8, 富山. 要旨集, p.49.

【目的】麻黄附子細辛湯は少陰病で表証のある場合に用いるが、頭痛、腰痛、関節痛、三叉神経痛などの疼痛性疾患に應用されている方剤である。そこで本実験では麻黄附子細辛湯の痛みに対する効果をみるために、正常動物と反復低温ストレス(RCS)負荷動物における麻黄附子細辛湯の抗侵害受容作用を調べた。また、その作用機序に内在性痛覚抑制系である下行性セロトニン(5-HT)神経系と下行性ノルアドレナリン(NA)神経系が関与するか検討した。

【方法】実験には ddY 系雄性マウス (6 週令) および SD 系雄性ラット (7 週令) を用いた。麻黄附子細辛湯として TJ-127 を用いた。RCS の負荷は、10 : 00-16 : 30 の間は 30 分毎に飼育環境温度を 24°C と 4°C に交互に変化させ、16 : 30-10 : 00 の間は 4°C とし、これを 3 日間繰返して行なった。TJ-127 は、5% アラビアゴムに懸濁して経口投与した。セロトニン神経毒 5,7-dihydroxytryptamine (5,7-DHT, 0.06 mg) あるいはカテコラミン神経毒 6-hydroxydopamine (6-OHDA, 0.06 mg) は、無麻酔下ラットに L3-L4 椎骨間の腰椎穿刺により 0.01 ml の容量で脊髄クモ膜下腔内 (i.t.) 注射した。侵害受容閾値は、マウスでは尾部圧刺刺激法、

ラットでは後肢圧刺激法により測定した。

【結果】RCSを負荷していないマウスおよびラットにTJ-127 (30, 100, 300 mg/kg)を投与しても侵害受容閾値に有意な影響は及ぼさなかった。一方、RCS負荷により痛覚過敏が発現したマウス、ラットにおいて、用量30 mg/kgのTJ-127では効果が認められなかったが、100及び300 mg/kgでは用量依存性の侵害受容閾値の上昇が観察された。この効果は経口投与15分後に発現し、30分後にピークに達した後約120分後まで持続した。また、5,7-DHTのラットへの4日前処置により腰髄の5-HTを減少させておくと、TJ-127 (300 mg/kg)の抗侵害受容作用は有意に減弱した。しかし6-OHDAの4日前処置により腰髄のNAを減少させておくと、TJ-127 (300 mg/kg)の抗侵害受容作用は作用のピークである30分値のみ軽度で減弱した。

【考察】RCS性痛覚過敏を発現しているマウスおよびラットでは、TJ-127が100及び300 mg/kgで抗侵害受容作用を示した。ヒトにおけるTJ-127の1日量は7.5 gで、体重50 kgとした場合500 mg/kgとなり、今回抗侵害受容作用を示した用量とほぼ一致することから、本実験において観察されたTJ-127の作用はヒトにおける鎮痛作用に対応する作用である可能性が高い。またラットにおいて5,7-DHT前処置によりTJ-127の抗侵害受容作用はほとんど消失したが、6-OHDA前処置では作用ピーク時でのみ抑制されたことから、その作用に下行性セロトニン神経系が少なくとも一部関与し、下行性ノルアドレナリン神経系の関与は少ないことが示唆される。

15) 倉石 泰, 山口朋美, 東田千尋: モルヒネの大槽内注射はマウスに痒みを惹起するか. 第6回痒みシンポジウム, 1996, 9, 東京.

16) 山口朋美, 東田千尋, 長澤哲郎, 倉石 泰: Serotonin誘発痒み関連行動への5-HT₂受容体サブタイプの関与. 第47回日本薬理学会北部会, 1996, 10, 山形. 日薬理誌, 109(1), 13P (1997).

【目的】我々はこれまでにserotonin (5-HT)のマウスへの皮内注射により後肢による注射部位への引っ掻き行動(人での痒みに対する反応と思われる)が惹起されることを見出した。今回、この5-HT誘発痒み関連行動に関与する5-HT受容体サブタイプを検討した。

【方法】雄性ddY系マウス(4-5週令)を用い、前日に除毛した吻側背部に5-HTあるいは5-HT受容体サブタイプの作動薬を50 µlの容量で皮内注射した。注射後60分間における注射部位へのマウス後肢による引っ掻き行動をビデオにて記録し、カウントした。

【結果, 考察】5-HT₂受容体作動薬α-Me-5-HT (1-500 nmol)をマウスの吻側背部に皮内注射すると、5-HTと同様に用量依存的に痒み関連行動(後肢による注射部位への引っ掻き行動)を惹起した。5-HT_{1A}受容体作動薬R(+)-8-OH-DPAT (0.1-300 nmol)及び5-HT₃受容体作動薬2-Me-5-HT (3-300 nmol)と1-phenylbiguanide (3-300 nmol)は無効であった。5-HT (100 nmol)およびα-Me-5-HT (50 nmol)の痒み関連行動惹起作用を5-HT₂受容体拮抗薬methysergide (0.1-1 mg/kg p.o.)が抑制したが、5-HT₃受容体拮抗薬ondansetron (0.01-1 mg/kg p.o.)は抑制しなかった。以上の結果から5-HTの起痒作用への5-HT₂受容体の関与が示唆される。

17) 山崎奈穂子, 佐藤一哉, 長澤哲郎, 倉石 泰: 麻黄附子細辛湯の痛覚過敏抑制作用における下行性モノアミン作動神経系の関与. 第90回日本薬理学会近畿部会, 1996, 10, 三重. 日薬理誌, 109(2), 48P (1997).

【目的】反復低温ストレス(RCS)負荷動物において麻黄附子細辛湯は抗侵害受容効果を示す。この作用に下行性モノアミン作動神経系が関与するかどうか検討した。

【方法】実験には雄性SD系ラット(7週令)を用いた。麻黄附子細辛湯としてTJ-127を用いた。RCSの負荷は、10:00-16:30の間は30分毎に飼育環境温度を24°Cと4°Cに交互に変化させ、16:30-10:00の間は4°Cとし、これを3日間繰返した。TJ-127は5%アラビアゴムに懸濁して300 mg/kgの用量で経口投与した。神経毒と受容体拮抗薬は、無麻醉下にL3-L4椎骨間の腰椎穿刺により10 mlの容量で脊髄クモ膜下腔内(i.t.)投与した。侵害受容閾値は後肢圧刺激法により測定した。

【結果】TJ-127によるRCS性痛覚過敏抑制作用はセロトニン神経毒5,7-dihydroxytryptamine (5,7-DHT, 60 mg)の4日間前処置により有意に減弱した。また、5-HT_{1/2}受容体拮抗薬のmethysergide (30 nmol, 5分前処置), cyproheptadine (3 nmol, 30分前処置), methiothepine (3 nmol, 30分前処置)もTJ-127の抗侵害受容作用を有意に抑制した。一方、カテコラミン神経毒6-hydroxydopamine (6-OHDA, 60 mg)の4日前処置によりTJ-127の抗侵害受容作用は作用のピークである30分値のみ軽度で減弱した。α受容体拮抗薬phentolamine (100 nmol, 5分前処置)は、TJ-127の抗侵害受容作用を抑制しなかった。

【考察】以上のことからTJ-127の抗侵害受容作用には少なくとも一部下行性セロトニン神経系が関与する

が、下行性ノルアドレナリン神経系の関与は少ないものと示唆される。

18) 倉石 泰：カルシトニンの鎮痛作用機序。第5回日本骨粗鬆症研究会，1996，10，大阪。

19) Andoh T., Nagasawa T., Hayashi K., and Kuraishi Y.: **Endogenous nitric oxide modulates substance P-induced itch-related behavior.** 26th Annual Meeting, Society of Neuroscience, 1996, 11, Washington D.C., USA.

Substance P (SP) causes an itch sensation in human subjects when applied to the skin. Recently we have shown that SP injected into the rostral part of the mouse back elicits scratching of the injection site by the hind paws, behaviors related to an itch sensation. Incidentally, it has been reported that nitric oxide (NO) modulates several peripheral perception. Stimulation of NK1 receptors activates nitric oxide synthase (NOS) and NO is synthesized from L-arginine. The present experiments were conducted to determine whether the NO-cyclic GMP pathway was involved in SP-induced scratching. Male ICR mice (5-6 weeks old) were used and SP was intradermally injected (50 μ l) into the rostral back. Pretreatment with N⁶-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, i.v. for 5 min), an agent that inhibits NOS, significantly suppressed SP (100 nmol)-induced scratching in a dose dependent manner, but not D-NAME. The second inhibitor of NO formation, 1-ethyl-2-thiourea had a similar inhibitory effect on SP-induced scratching. Com-mitant intradermal injection of SP (100 nmol) with haemoglobin (0.01-10 nmol), a scavenger of NO, or methylene blue (0.001-0.1 nmol), a guanylate cyclase inhibitor, significantly suppressed SP-induced scartching.

20) Tohda C., Yamaguchi T., and Kuraishi Y.: **Intracisternal injection of morphine induces facial scratching in mice.** 26th Annual Meeting, Society of Neuroscience, 1996. 11. Washington D.C., USA.

Epidural and intrathecal administrations of morphine result in pruritus in humans, and the microinjection of opioid μ -agonists into the medullary dorsal horn produces facial scratching in monkeys and rats. The present experiments were conducted to determine whether morphine and μ -agonist, [D-Ala², N-Me-Phe⁴, Gly⁵-ol] enkephalin (DAMGO) induced centrally itch-related behavior, that is, scratching in mice. Male ddY mice (4-6 weeks old) were used. When intracisternally injected (5 μ L), morphine (0.1-3 nmol) and DAMGO (0.03, 0.1 nmol) dose-dependently elicited scratching of face, but not ear and body trunk, by the hind paws for about 30 min after injection. The morphine (0.3 nmol)-induced face scratching was inhibited by pretreatment with naloxone (1 mg/kg, s.c., 15 min before). When injected intradermally, morphine (3, 30 nmol, 50 mL) into the rostral back didn't significantly elicit scratching of any areas of the body. These results suggest that opioids produce an itch sensation at least in part through opioid μ -receptors in the central nervous system in mice. The present experimental model is easy to use and seems to be available to clarify central mechanisms of itch.

◇ 講演，社会活動，その他

- 1) Kuraishi Y., Onogi T., and Satoh M.: A mechanism of antinociceptive action of (6)-shogaol, a pungent component of ginger. *Advances in Research on Pharmacologically Active substances from Natural Sources*, 83-89, 1996.
- 2) 倉石 泰：鎮痛薬の新しい作用機序をめぐって。薬事日報 27, 1996.
- 3) 長澤哲郎, 植田知子, 倉石 泰：桂姜棗草黄辛附湯の痛覚過敏抑制作用への下行性セロトニン神経系の関与。和漢医薬学雑誌, 12 (4), 368-369, 1995.
- 4) 長澤哲郎：痒みとその治療薬。平成8年度富山県リカレント教育学習コース講義テキスト 和漢薬に未来はあるか, 56-60, 1996.