

氏 名（本籍）	にし 西	だ 田	のぶ 信	ゆき 之
学位の種類	薬	学	博	士
学位記番号	薬	第	318	号
学位授与年月日	平成3年11月27日			
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当			

学位論文題目      Enkephalin 誘導体の依存性に関する行動薬理学的研究

論文審査委員      (主 査)  
教授 佐 藤      進      教授 鈴 木 康 男  
教授 大 泉      康

## 論文内容要旨

アヘンアルカロイドは他の感覚を麻痺させずに痛覚のみを軽減する優れた鎮痛薬である。しかし、身体依存性、呼吸抑制、便秘などの副作用があり、これらが臨床での使用を制限している。中でも最も大きな問題は薬物依存性であり、それによる薬物乱用が個人に対する害にとどまらず、大きな社会問題を引き起こしている事は衆知の事実である。

人類はアヘンアルカロイドないし内因性鎮痛 peptide である enkephalin を化学的に修飾する事により、依存形成能が弱く、かつ鎮痛作用の強い薬物を創製しようと試みてきたが、今日まで成功に至っていない。藤野らは enkephalin analog を数多く合成し、それらは強力な鎮痛活性をもつことを発見した。その内、Tyr-D-Ala-Gly-MePhe-NHNHCOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>・AcOH (EK-209) 及び Tyr-D-Met (O)-Gly-EtPhe-NHNHCOCH<sub>3</sub>・AcOH (EK-399) は、マウス鎮痛試験でそれぞれ morphine の1.6~3.53倍及び5.73~773倍の鎮痛活性を示した。これらの enkephalin 誘導体は薬理的に morphine 等の麻薬性鎮痛薬と類似の特性をもつため、鎮痛薬として開発するためには依存形成能を評価し、ヒトでの乱用可能性を予測する必要がある。

ところで薬物依存には精神依存と身体依存があり、精神依存が薬物を摂取したいという強迫的欲求を伴う精神状態であるのに対し、身体依存とは、生体が薬物の影響下にあることに適応した結果、その薬理効果が消失すると精神的及び身体的な病的症候(退薬症候)を発現する状態である。精神依存形成能は薬物乱用を起こす主たる原因とされており、その検索はヒトでの乱用可能性を予測する上で最も重要である。精神依存形成能は、薬理的には薬物摂取行動に対する強化効果として検索することができる。この強化効果を動物実験で評価する方法として、動物のオペラント行動を利用した自己投与試験法は信頼度が高く、広く用いられている。中でも、依存形成能をもつ既知の薬物(標準薬)の自己投与を経験した動物を用いる交差自己投与試験法は、試験期間が短くて済み、検出感度も高い。そこで本研究ではまず、同法を用いて EK-209 及び EK-399 の強化効果を検討した。

頸静脈内にカニューレを留置したラットを、1個のレバーと薬液注入装置を備えたオペラント実験箱に入れ、動物がレバーを押せば所定量の morphine (標準薬) をカニューレを介して注入する条件下で訓練した。この訓練を1日約24時間、1~6週間行うことによりラットは安定した morphine 自己投与を示す様になった。そこで morphine を麻薬性鎮痛薬 codeine または fentanyl, 麻薬拮抗性鎮痛薬 pentazocine, 麻薬拮抗薬 levallorphan, EK-209 または EK-399 に置換し、自己投与回数を測定した。その結果、codeine, fentanyl, pentazocine 及び EK-209 では morphine 投与時の自己投与回数が維持され、しかも一回当たりの注入量(単位用量)を減量するとそれを補うように自己投与回数が増加した。一方、levallorphan 及び EK-399 では単位用量

を減量してもほとんどの動物で自己投与回数は増加しなかった。以上の事から、EK-209は強化効果が強いのに対し、EK-399は強化効果がないか、あったとしても極めて弱いことがわかった。

上記の交差自己投与試験法では、標準薬と被験薬がそれぞれ agonist と antagonist との関係にある時には退薬症候が誘発されるため、被験薬の自己投与が抑制される可能性がある。EK-399は低用量で morphine の鎮痛作用を抑制する事から antagonist の性質があると考えられ、その性質が morphine を標準薬とした上記の試験において自己投与を抑制したおそれがある。この点を解明するため、次に薬物未経験のラットを用いて EK-399 の長期連続自己投与試験を行った。

頸静脈内にカニューレを留置したラットを上記と同様にオペラント実験箱に入れ、動物のレバー押しに対して生理食塩液を注入し、自己投与回数のコントロールレベルを測定した。その後、生理食塩液を EK-399 または陽性対照薬 morphine または cocaine に置換し、自己投与回数を測定した。その結果、EK-399 群では4週間、自己投与回数の増加はなかったのに対し、morphine 及び cocaine 群ではほとんどの動物が1～2週間以内に自己投与回数の増加を示した。更に、単用量を減量すると morphine 群では全例が自己投与回数の著しい増加を示したのに対して、EK-399 群では増加を示した例は少数であり、しかも増加の程度は弱かった。この事から、EK-399 の強化効果は弱いことが確認できた。

以上の如く、本研究では始めに自己投与試験を行い、EK-209 及び EK-399 の強化効果を調べた結果、前者はその効果が強く、後者は弱い事を見出した。ところで、自己投与試験法では動物が被験薬を好んで摂取するか否かは調べることができ、薬物摂取時にどのような自覚効果を及ぼしているのかは調べることができない。摂取時の自覚効果がどのような種類の薬物の自覚効果に類似しているかを調べることは、精神依存形成能の評価に大いに参考になる。動物実験では薬物摂取時の自覚効果を直接知ることができないが、オペラント行動を利用して薬物間の弁別刺激効果の類似性を調べる事により、自覚効果の類似性を類推する事ができる。以上の事から、本研究では次いで、EK-209 及び EK-399 と morphine との弁別刺激効果の類似性について検討した。

給水制限したラットを、2個のレバーと給水装置を備えたオペラント実験箱に入れ、標準薬 morphine を皮下投与した時には片方のレバー (morphine レバー) を押した時のみ給水し、溶媒である生理食塩液を皮下投与した時には反対側のレバー (saline レバー) を押した時のみ給水する条件下で動物を訓練した。この訓練を1日1回、1～2カ月間反復する事により、動物は morphine 投与の有無により90%以上の正解率で morphine 及び saline レバーを選択できるようになった。これらのラットに codeine, fentanyl, pentazocine, levallorphan, EK-209 または EK-399 を皮下投与し、morphine レバー選択率を調べた。その結果、ラットは codeine, fentanyl 及び EK-209 投与時には90%以上 morphine レバーを選択した。一方、pentazocine, levallorphan 及び EK-399 投与時にはいずれも73%以下の morphine レバー選択率しか示さなかった。即ち、

morphine の弁別刺激効果は codeine, fentanyl 及び EK-209 に完全に般化するが, pentazocine, levallorphan 及び EK-399 には不完全にしか般化しないことが見出された。この事から EK-209 は morphine 様の, EK-399 は morphine と異なる弁別刺激効果をもつと推察した。

以上の如く, EK-399 の自覚効果は morphine と異なる可能性が示唆された。一般に enkephalin 誘導体の鎮痛作用や依存性などの中枢作用は morphine と同じく opioid receptor を介して発現するとされている。Opioid receptor としては  $\mu$ ,  $\kappa$  及び  $\delta$  等のサブタイプが知られており, それぞれ morphine, ethylketocyclazocine (EKC) 及び enkephalin が代表的な agonist とされている。また一部の opioid (例えば N-allylnormetazocine (NANM)) は脳内の  $\alpha$ -receptor に結合し, 幻覚, 興奮等の異常精神作用を起こす事が知られている。EK-399 は in vitro で  $\mu$  及び  $\delta$ -opioid receptor に高親和性を示す事が報告されている。そこで EK-399 の弁別刺激効果の特徴を更に明らかにし, その発現に関与する receptor を推定する目的で EK-399, morphine, EKC 及び NANM のお互いの弁別刺激効果の類似性を検討した。

給水制限したラットを 4 群に分け, 上記と同様のオペラント実験箱に入れ, それぞれ EK-399, morphine, EKC または NANM を皮下投与したときには片方のレバー (drug レバー) を押した時のみ給水し, 生理食塩液を皮下投与した時には反対側のレバーを押した時のみ給水する条件下で訓練した。この訓練を 1 日 1 回, 1~2 カ月間反復する事により, 各群の動物はそれぞれ EK-399, morphine, EKC または NANM の有無により 90% 以上の正解率でレバーを選択できる様になった。EK-399, morphine 及び EKC 投与時の drug レバー選択は, 麻薬拮抗薬 naloxone によって完全に拮抗する事ができ, これらの薬物の弁別刺激効果が opioid receptor を介した効果であることが確認できた。これらの動物に各種 opioid 系薬物を皮下投与し, drug レバー選択率を調べた。その結果, EK-399 訓練動物は morphine 投与時に 90% 以上の選択率を示したのに対し, morphine 訓練動物は EK-399 投与時には 74% の選択率しか示さなかった。また, EK-399 訓練動物の EKC 及び NANM 投与時の選択率は 60 及び 65% であり, EKC 及び NANM 訓練動物の EK-399 投与時の選択率は 46 及び 12% にしか過ぎなかった。即ち, EK-399 の弁別刺激効果は  $\mu$ -agonist である morphine に完全に般化するのに対し, morphine の弁別刺激効果は EK-399 に不完全にしか般化しないことが見出された。また, EK-399 と  $\kappa$  及び  $\sigma$ -agonist である EKC 及び NANM の弁別刺激効果とは相互に不完全にしか般化しないことを認めた。これらの成績から, EK-399 の弁別刺激効果の発現には主として  $\mu$ -opioid receptor を介した作用が関与しているが, morphine と EK-399 との間に非対称的な般化がみられる事から  $\delta$ -opioid receptor を介した作用も関与している可能性が示唆された。

以上の如く, EK-399 は薬物摂取行動に対する強化効果が弱く, しかも morphine と異なる弁別刺激効果を有する事が見出され, これらの事から, EK-399 の精神依存形成能はないか, あっ

たとしても極めて弱いと予測できた。ところで薬物の依存形成能のもう一つの側面である身体依存形成能は、薬物乱用を引き起こすことには関与しないが、休薬時に退薬症候を発現させる事によってそれを増強するといわれている。そこで、本研究では最後にラットを用いて EK-399 の身体依存形成能について検討した。

身体依存の形成は、動物に薬物を反復投与あるいは持続注入することによって試みる事ができる。身体依存が形成されたか否かは、上記の処置後、特異的拮抗薬を投与するか、または休薬した場合に体重減少などの退薬症候が発現するか否かによって判定する。小動物の身体依存の形成法として数多くの方法が開発されてきたが、留置カニューレを利用した薬液の頻回注入法は、opioid 系薬物の身体依存形成法として、試験期間が短くて済むこと及び pethidine 等の身体依存形成能の弱い薬物でも身体依存を形成可能な点で優れている。そこで先ず、頻回注入法を用いて EK-399 の身体依存の形成を試みた。

頸静脈内にカニューレを留置したラットを薬液注入装置を備えたケージに入れ、1時間に1回、1分間、所定量の EK-399, morphine, pethidine または pentazocine をカニューレを介して注入した。3日間の反復注入後、naloxone を皮下投与したところ、EK-399 処置動物は体重減少などの退薬症候を示したが、その程度は pethidine 及び pentazocine 処置動物と同程度であり、morphine 処置動物より軽度であった。更に、4日間薬液を反復注入後、休薬したところ、morphine, pethidine 及び pentazocine 処置動物は明らかな体重減少を示したが、EK-399 処置動物は僅かな体重減少しか示さなかった。以上の成績から、EK-399 の身体依存形成能は morphine, pethidine 及び pentazocine のいずれよりも弱い事を見出した。

次に、EK-399 の身体依存形成能が morphine 型であるか否かを検討するため、上記と同様の方法を用いて EK-399 と morphine との交差身体依存性を調べた。

ラットに morphine または EK-399 を頸静脈内留置カニューレを介して7日間反復注入した後、morphine 処置動物では morphine を EK-399 に、EK-399 処置動物では EK-399 を morphine に置換し、退薬症候の有無を調べた。その結果、いずれの薬液置換においても退薬症候は発現しなかった。一方、morphine または EK-399 を生理食塩液に置換すると体重減少等の退薬症候がみられた。以上の如く、EK-399 は morphine との間に交差性を示し、morphine 型の身体依存形成能を有する事を見出した。

以上の知見より、2つの enkephalin 誘導体のうち、EK-209 は依存形成能が強いのに対して、EK-399 は依存形成能が弱いとの結論に達した。また、EK-399 の精神依存形成能が弱い事の理由として、薬物摂取時の自覚効果の発現に関与する receptor が、麻薬性鎮痛薬 morphine と一部異なることが推察された。EK-399 は鎮痛作用が極めて強く、しかも依存形成能が弱いことから癌性疼痛等の強い痛みに対する鎮痛薬として期待される。

## 審査結果の要旨

Morphine は疼痛以外の他の感覚を麻痺させることなく、選択的に疼痛のみを軽減する優れた鎮痛薬であるが、その依存性は臨床での使用を制限している最大の副作用である。内因性モルヒネ様物質として enkephalin が発見され、その誘導体のなかに鎮痛薬を見いだすべく多くの開発研究が行なわれている。本論文内容は、強力な鎮痛作用を有する enkephalin 誘導体 EK-209 及び EK-399 について、臨床応用のうえで問題となる薬物依存性について検討を加え、ヒトでの乱用可能性を予測する目的でおこなったものである。

まず、精神依存形成能を調べるため、自己投与試験を行なった。麻薬性鎮痛薬 morphine の静脈内自己投与を経験したラットに対し、morphine の代わりに被験薬を与えてその自己投与回数を調べた。その結果、①各種麻薬性鎮痛薬や EK-209 では高頻度の自己投与がみられたのに対し、麻薬拮抗薬や EK-399 では低頻度の自己投与しかみられない。②薬物未経験のラットを用いて長期間連続自己投与試験を行なった結果、morphine や cocaine では高頻度の自己投与がみられたのに対し、EK-399 では低頻度の自己投与しかみられないことを明らかにした。以上の成績から、EK-209 は自己投与頻度を増加させる性質、即ち強化効果を有するのに対し、EK-399 は強化効果が殆どないことを見出した。

次にこれらの化合物の摂取時の自覚効果を推測するため、薬物弁別試験を行なった。標準薬投与時には二つのレバーのうち一方を、溶媒投与時には他方を選択すれば報酬を与える条件でラットを訓練した。訓練後、被験薬を投与し、動物が80%以上標準薬側のレバーを選択すれば、標準薬の弁別刺激は被験薬のそれに完全に般化したと判定し、被験薬の自覚効果は標準薬のそれに類似していると推測されるわけである。① morphine ( $\mu$ -opioid 受容体 agonist) を標準薬として試験を行ない morphine の弁別刺激は各種麻薬性鎮痛薬や EK-209 に完全に般化したのに対し、麻薬拮抗薬や EK-399 には不完全にしか般化しない。また② EK-399 を標準薬とした場合、EK-399 の弁別刺激は麻薬拮抗薬 naloxone によって完全に拮抗され、また morphine に完全に般化することを明らかにした。これらの成績から、EK-209 は morphine と同様の、EK-399 は morphine と異なる自覚効果を有すること、および EK-399 の自覚効果の発現には主として  $\mu$  受容体が関与していることを示唆した。

さらに、EK-399 の身体依存形成能について検討した。EK-399 の静脈内反復投与後 naloxone の投与か或いは休業によって誘発される退薬症状を調べたところ、その強さは各種麻薬性鎮痛薬より弱く、身体依存形成能は極めて弱いことを明らかにした。以上の成績から EK-209 は依存性が強く、乱用される恐れがあるのに対し、EK-399 は依存性が弱く、乱用される可能性はないとの結論を得た。

本研究で見いだされた EK-399 は、morphine に代替し得る鎮痛薬としての開発が期待されるものである。本研究内容は、麻薬性鎮痛薬の依存性の実験動物における評価の上でも有用な新発見を加えたものであり、学位を授与するに十分値すると判断する。