

氏 名（本籍）	お 小 原 健
学 位 の 種 類	博 士（医 学）
学 位 記 番 号	医 博 第 2 0 6 1 号
学位授与年月日	平 成 16 年 3 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）医科学専攻
学 位 論 文 題 目	モルヒネのヒト末梢血リンパ球アポトーシスに及 ぼす影響

（主 査）

論文審査委員 教授 山 室 誠 教授 曾 良 一 郎

教授 伊 藤 恒 敏

論文内容要旨

モルヒネは急性痛やがん疼痛の治療において極めて重要な臨床的位置を占めるが、一方で、オピオイド受容体を介した生体免疫系に対する陰性作用も報告されている。ただし、こうした報告の多くがモルヒネによる免疫修飾が、中枢神経系や内分泌系などを介する間接的な *in vivo* 作用である可能性を示唆しており、免疫担当細胞に対する直接作用に関しては未だ一定の結論が得られていなかった。しかし最近になり、培養ヒト末梢血リンパ球 (PBL) におけるモルヒネの直接アポトーシス誘導を示し、モルヒネによる直接的な免疫抑制の可能性を指摘する研究が相次いで報告された。もし、モルヒネが直接免疫担当細胞のアポトーシスを誘導し、それが臨床的に免疫抑制へつながるとすれば、がん疼痛治療を含めた疼痛治療戦略の見直しが必要となる可能性も否定できない。

本研究ではモルヒネが *in vitro* において直接ヒト PBL アポトーシスを誘導するか否かについて、細胞レベルでの客観定量が可能な flow cytometry 法 (FCM) を用いて測定し、検証した。

はじめに、臨床使用濃度を基準とした培養濃度を決定する目的で、がん疼痛治療にモルヒネを使用している患者のモルヒネ血中濃度を電気化学検出高速液体クロマトグラフィー法にて測定した。その結果、鎮痛状態および投与量の安定している患者におけるモルヒネ血中濃度は、ほぼ $10^{-8} \sim 10^{-6}$ M の範囲で投与量とよく相関していた。そこで $10^{-8} \sim 10^{-4}$ M を今回の PBL 培養モルヒネ濃度とした。

次に培養環境におけるアポトーシス発現の経時的自然経過を見るため、健康成人末梢血より分離した PBL を 3~48 時間培養し、アポトーシス早期の現象のひとつである細胞表面への phosphatidylserine (PS) 表出を FCM にて測定した。単純培養 PBL 中の annexin V 陽性/7-AAD 陰性細胞率は 24 時間後において $4.9 \pm 1.5\%$ であった。アポトーシス陽性対照の作成には、dexamethasone (Dm) と etoposide (Ep) を用いた。両薬剤は 24 時間培養後の annexin V 陽性/7-AAD 陰性細胞率を上昇 (Dm ; $13.4 \pm 4.4\%$, Ep ; $41.5 \pm 8.0\%$) させ、アポトーシスを誘導することが確認できた。しかし、モルヒネ ($10^{-8} \sim 10^{-4}$ M) 存在下で培養した PBL では、単純培養と比較して細胞表面への PS 表出に変化を認めなかった。

この結果を確認するため、さらに細胞表面 CD95、細胞内 bcl-2 および caspase-3 活性を測定した。その結果、単純培養では約 31% の PBL の細胞表面 CD95 が陽性であり、それはモルヒネ添加でも有意な変化を生じなかった。また、bcl-2 陽性率も単純培養では 90% 以上であったが、モルヒネ添加により有意な変化は認められなかった。Caspase-3 を活性化している PBL は単純培養において 2% 未満であり、それもモルヒネを添加によっても有意な変化は生じなかった。これらの結果は、モルヒネが細胞表面 PS 表出を増加させないという annexin V による結果を支

持するものと考えられる。

結論として、今回、臨床使用濃度のモルヒネが培養ヒト PBL において細胞表面への PS 表出、細胞表面 CD95、細胞内 bcl-2 および caspase-3 活性に影響を及ぼす証拠は得られず、少なくとも健康成人においては、モルヒネが直接的に PBL アポトーシスを誘導しない可能性が示唆された。モルヒネが疼痛患者 PBL に対してアポトーシスを *in vivo* 誘導するかは非常に興味深い問題であり、今後の課題としたい。

審査結果の要旨

モルヒネは急性痛やがん疼痛の治療において極めて重要な薬剤であるが、一方でオピオイド受容体を介した生体免疫系に対する陰性作用も報告されている。ただし、こうした報告の多くはモルヒネによる免疫修飾が間接的な *in vivo* 作用の可能性を示唆しており、免疫担当細胞に対する直接作用に関しては未だ一定の結論が得られていなかった。しかし最近、ヒト末梢血リンパ球 (PBL) におけるモルヒネの直接アポトーシス誘導を示し、それによる直接的な免疫抑制の可能性を指摘する研究が相次いで報告された。もし、モルヒネが免疫担当細胞のアポトーシスを直接誘導し、臨床的に免疫抑制へつながるとすれば、がん疼痛治療を含めた疼痛治療戦略の見直しが必要となる可能性も否定できない。

本研究ではモルヒネが *in vitro* において直接ヒト PBL アポトーシスを誘導するのか否かについて、細胞レベルでの客観的定量が可能な flow cytometry 法 (FCM) を用いて測定検証した。

はじめに、臨床使用濃度を基準とした培養濃度を決定する目的で、がん疼痛治療にモルヒネを使用している患者のモルヒネ血中濃度を電気化学検出高速液体クロマトグラフィー法にて測定した。その結果、鎮痛状態および投与量の安定している患者におけるモルヒネ血中濃度は、 10^{-8} ~ 10^{-6} M の範囲で投与量とよく相関していた。そこで 10^{-8} ~ 10^{-4} M を今回の PBL 培養モルヒネ濃度とした。

次に培養環境におけるアポトーシス発現の経時的自然経過を見るため、健康成人末梢血分離 PBL を 3~48 時間培養し、アポトーシス早期の現象の一つである細胞表面への phosphatidylserine (PS) 表出を FCM にて測定した。陽性対照の作成には、dexamethasone と etoposide を用いた。両薬剤は 24 時間培養後の annexin V 陽性/7-AAD 陰性細胞率を上昇させ、アポトーシスを誘導することが確認できた。しかし、モルヒネ添加溶液で培養した PBL では、単純培養と比較して細胞表面への PS 表出に変化は認められなかった。

この結果を確認するため、さらに細胞表面 CD95、細胞内 bcl-2 および caspase-3 活性を測定したが、それらの分子の陽性率もモルヒネ添加により有意な変化は認められなかった。このことはモルヒネが細胞表面 PS 表出を増加させないという annexin V による結果を支持するものと考えられる。

結論として、今回臨床使用濃度のモルヒネが培養ヒト PBL において細胞表面への PS 表出、細胞表面 CD95、細胞内 bcl-2 および caspase-3 活性に影響を及ぼす証拠は得られず、少なくとも健康成人においては、モルヒネが直接的に PBL アポトーシスを誘導しない可能性が示唆された。

最終審査の結果、本論文の内容は学位に十分値することが確認された。