学位論文題名

The functional role of opioid receptors
in acetylcholine release in the rat adrenal medulla(ラット副腎髄質アセチルコリン遊離機構における
オピオイド受容体の役割に関する研究)

学位論文内容の要旨

副腎髄質におけるクロム親和性細胞からのカテコールアミン(CA)分泌は、主として副腎交感神経終末から分泌されるアセチルコリン(ACh)の刺激によることが知られている。最近、副腎交感神経終末において、オピオイドペプチドがAChと共に存在することが証明され、副腎髄質機能調節において重要な役割を担っていると推測されている。

本研究では、ラット副腎髄質での交感神経節前線維終末からのACh遊離調節機構におけるオピオイド受容体の役割を *in vivo* において解明することを目的として、新たに副腎マイクロダイアリシス法を考案し、基礎的検討を行なうと共に、オピオイド作動薬と拮抗薬の影響を検討した。

方 法

動物は12-18週齢の雄性ウイスター系ラットを用いた。今回、新たに考案した2.5mmの透析膜を持つ副腎マイクロダイアリシス用プローブを、ハロセン麻酔下に背腰部アプローチにて副腎髄質に挿入し、physostigmineを含むRinger液で持続的に灌流した。プローブ挿入後180分よりサンプリングを開始し、内部標準物質としてethylhomocholineを加えたサンプリングチューブに、20分毎に灌流液を回収した。サンプルはHPLC-ECDに注入し、AChを定量した。サンプリング開始後60分と120分に10分間ずつ、高濃度カリウム (K^+) を含む灌流液で灌流した。2度の K^+ 刺激に対するACh遊離反応をそれぞれS1、S2とし、S1に対するS2の反応比 (S2/S1 ratio) を求めて反応を標準化し評価した。オピオイド作動薬である morphine (μ 受容体作動薬)、[D-Pen², D-Pen⁵]enkephalin (DPDPE, δ 受容体作動薬)ならびにU69593 (κ 受容体作動薬)は、2回目の K^+ 刺激の際に灌流液に加えた。また、オピオイド拮抗薬であるnaltrexone (μ 受容体拮抗薬)ならびにnaltrindole (δ 受容体拮抗薬)は、各オピオイド作動薬を灌流する20分前に腹腔内投与した。

結 果

1. 基礎的検討

(1) 回収率：副腎髄質の細胞外液から回収される物質の回収率は灌流速度に依存した。単位時間（20分）あたり灌流液中に回収されるACh量は $2\mu\text{l}/\text{min}$ の灌流速度で最大となった。

(2) アセチルコリンエステラーゼ阻害薬：灌流液中の可逆的アセチルコリンエステラーゼ阻害薬(physostigmine)濃度と回収された副腎ACh遊離量の間には有意な正の相関関係が認められた。灌流液中のACh量を安定した状態で定量するために、以下の実験では $100\mu\text{M}$ physostigmine を使用した。

(3) K^+ 刺激によるACh遊離反応：ACh遊離量は、灌流する K^+ の濃度に依存して増加した。 50mM と 100mM のKClを10分間灌流するとACh遊離量はそれぞれ前値の1.85倍と3.21倍に増加した。対照群での2度の 100mM K^+ 刺激によるACh遊離反応比(S2/S1 ratio)は0.961であった。

2. K^+ 刺激によるACh遊離に対するオピオイド作動薬ならびに拮抗薬の効果

(1) μ 受容体作動薬と拮抗薬の効果： $1\mu\text{M}$ morphineを投与した場合のS2/S1 ratioは0.843、 $10\mu\text{M}$ morphineを投与した場合のS2/S1 ratioは0.712と対照群に比べて有意に低値となった。すなわち、 K^+ 刺激によるACh遊離反応はmorphineにより用量依存的に抑制された。さらに、naltrexoneを前投与してmorphineのACh遊離抑制効果を検討した。Naltrexone $3\text{mg}/\text{kg}$ を前投与した場合にはS2/S1 ratioは0.764とmorphineの効果に影響はないが、naltrexone $9\text{mg}/\text{kg}$ を前投与した場合にはS2/S1 ratioは0.946と、morphineの K^+ 刺激によるACh遊離抑制効果は消失し、ほぼ対照群のレベルまで回復した。

(2) δ 受容体作動薬と拮抗薬の効果： $1\mu\text{M}$ DPDPEを投与した場合のS2/S1 ratioは0.714、 $10\mu\text{M}$ DPDPEを投与した場合のS2/S1 ratioは0.687と共に K^+ 刺激によるACh遊離反応は、対照群に比較して有意に抑制された。さらに、naltrindole $3\text{mg}/\text{kg}$ を前投与した場合にはS2/S1 ratioは0.606とDPDPEの効果に影響はないが、naltrindole $9\text{mg}/\text{kg}$ を前投与した場合にはS2/S1 ratioは0.968とDPDPEの K^+ 刺激によるACh遊離抑制効果は消失し、対照群のレベルまで回復した。

(3) κ 受容体作動薬の効果： $10\mu\text{M}$ U69593を投与した場合のS2/S1 ratioは1.028と K^+ 刺激によるACh遊離反応に影響はなかった。

考 案

本研究では、*in vivo*に於て、ラット副腎交感神経終末からのACh遊離調節機構に関与するオピオイド受容体のサブタイプおよびその役割を解明するために、新たに副腎マイクロダイアリシズ法を考案して、 μ 、 δ ならびに κ オピオイド作動薬と拮抗薬による影響を検討した。

K^+ 刺激による副腎ACh遊離増加反応は、 μ 受容体作動薬であるmorphineにより有意に抑制され、 μ 受容体拮抗薬であるnaltrexoneを前投与すると、このmorphineの抑制効果は消失した。また、 δ 受容体作動薬であるDPDPEにより、 K^+ 刺激による副腎ACh遊離増加

反応は有意に抑制され、 δ 受容体拮抗薬である naltrindole を前投与すると、このDPDPEの抑制効果は消失した。このことから、副腎髄質での K^+ 刺激によるACh遊離増加反応には μ 受容体と δ 受容体を介する抑制機構が関与していることが示された。

副腎髄質には μ 、 δ および κ 型オピオイド受容体が存在し、クロム親和性細胞中に存在するオピオイドペプチドは、 μ および δ 受容体に親和性が高いことが報告されている(Castanasら)。また、Jarryらは、ラット副腎髄質における内因性のオピオイドペプチドがクロム親和性細胞からのCA分泌を抑制することを報告している。しかし、副腎交感神経終末から分泌されるAChに対するオピオイド受容体の機能的役割に関しては、これまで報告がなかった。本研究の結果は、副腎交感神経終末にはクロム親和性細胞と同じく μ および δ 受容体が存在して、ACh遊離調節において抑制的に関与している可能性を示すものである。一方、 κ 受容体作動薬であるU69593はACh遊離増加反応に影響を与えなかった。Castanasらによると牛副腎髄質には3種類の κ 受容体(κ_1 、 κ_2 、 κ_3)の存在が証明されている。また、 κ 受容体作動薬によって副腎髄質由来の利尿因子の分泌が刺激されると報告されている(Borkowski K. R.)。したがって、ラット副腎髄質に存在している κ 受容体は、副腎交感神経終末からのACh遊離とクロム親和性細胞からのCA分泌における μ および δ 受容体を介する抑制機構とは異なった役割を担っている可能性がある。

本研究では、ラット副腎髄質の細胞外ACh量を測定するため新たに副腎マイクロダイアリシス法を考案した。Ungerstedtらによって開発されたマイクロダイアリシス法は、*in vivo*で細胞外液中の神経伝達物質を測定する方法とされている。副腎髄質機能は、神経性および体液性因子によって生理的条件下で様々な影響を受けており、従来から用いられている副腎髄質の細胞培養や*in vitro/in situ*の灌流モデルでは、種々の調節因子に変化が生じる可能性がある。今回新たに考案した副腎マイクロダイアリシス法は*in vivo*の条件下で細胞外ACh量を測定できると同時に、副腎髄質に種々の薬物を局所的に投与できるため、副腎髄質機能の生理的ならびに薬理学的研究を行う上で非常に有用な方法と考えられる。

結 語

新たに考案した副腎マイクロダイアリシス法を用いることにより、ラット副腎髄質における交感神経終末からのACh遊離調節にオピオイド μ 受容体と δ 受容体の両方が機能的役割を担っている可能性が示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 斎 藤 秀 哉
副 査 教 授 本 間 研 一
副 査 教 授 小 山 司

学 位 論 文 題 名

The functional role of opioid receptors in acetylcholine release in the rat adrenal medulla

(ラット副腎髄質アセチルコリン遊離機構における
オピオイド受容体の役割に関する研究)

副腎髄質での交感神経節前線維終末において、オピオイドペプチドがアセチルコリン(ACh)と共に存在することが証明され、副腎髄質機能調節において重要な役割を担っていると推測されている。本研究では、ラット副腎交感神経節前線維終末からのACh遊離調節機構におけるオピオイド受容体の役割を*in vivo*において解明することを目的として、新たに副腎マイクロダイアリシス法を考案し、基礎的検討を行うと共に、オピオイド受容体作動薬と拮抗薬の影響を検討した。

方法：動物は12-18週齢の雄性ウィスター系ラットを用いた。今回、新たに考案した2.5mmの透析膜を持つ副腎マイクロダイアリシス用プローブを、ハロセン麻酔下に背腰部アプローチにて左副腎髄質に挿入し、Ringer液で持続的に灌流した。プローブ挿入後180分よりサンプリングを開始し、内部標準物質としてethylhomocholineを加えたサンプリングチューブに20分毎に灌流液を回収した。得られたサンプルはHPLC-ECDに注入しAChを定量した。サンプリング開始後60分と120分に10分間ずつ、100mM K⁺を含む灌流液で灌流した。オピオイド受容体作動薬であるmorphine (μ 受容体作動薬)、[D-Pen², D-Pen⁵] enkephalin (DPDPE, δ 受容体作動薬)ならびにU69593 (κ 受容体作動薬)は、2回目のK⁺刺激の際に灌流液に加えた。また、オピオイド受容体拮抗薬であるnaltrexone (μ 受容体拮抗薬)ならびにnaltrindole (δ 受容体拮抗薬)は、各オピオイド受容体作動薬を灌流する20分前に腹腔内投与した。これらの反応は、2度のK⁺刺激によるACh遊離反応をそれぞれS1、S2とし、S1に対するS2の反応比 (S2/S1 ratio)を求めて標準化し評価した。

結果：1. 副腎マイクロダイアリシス法の基礎的検討 (1)プローブの回収率は灌流速度に依存していた。単位時間(20分)あたり灌流液中に回収されるACh量は2 μ l/minの灌

流速度で最大となった。(2)副腎マイクロダイアリスで回収されたACh量は、灌流液に加えたphysostigmine濃度に依存して増加した。灌流液中のACh量を安定した状態で定量するために、 10^{-4} M physostigmineを使用した。(3)対照群において2度の100mM K^+ 刺激に対するACh遊離反応比(S2/S1 ratio)は0.961であった。

2. K^+ 刺激によるACh遊離反応に対するオピオイド受容体作動薬ならびに拮抗薬の影響 (1) K^+ 刺激によるACh遊離反応は、morphine 1 μ M投与群ならびに10 μ M投与群において用量依存的に抑制された。また、naltrexone 9mg/kgを前投与してmorphine 10 μ Mを灌流すると、morphineのACh遊離抑制効果は消失した。(2)DPDPE 1 μ M投与群、10 μ M投与群共に、 K^+ 刺激によるACh遊離反応は対照群に対して有意に抑制された。さらに、naltrindole 9mg/kgを前投与してDPDPE 10 μ Mを灌流すると、DPDPEのACh遊離抑制効果は消失した。(3)U69593 10 μ Mを投与した場合、 K^+ 刺激によるACh遊離反応に影響はなかった。

考案および結語：今回新たに考案した副腎マイクロダイアリス法は、*in vivo*で副腎髄質における細胞外液中ACh量を測定できると同時に種々の薬物を局所的に投与できるため、副腎髄質機能の生理的および薬理学的研究を行ううえで非常に有用な方法であることが示された。この方法の応用により、ラット副腎交感神経節前線維終末からのACh遊離調節にオピオイド μ 受容体と δ 受容体の両方が機能的役割を担っている可能性が示された。

口頭発表に際して、本間教授より、副腎髄質に存在している内因性オピオイドペプチドの種類、オピオイド受容体拮抗薬の単独投与によってACh遊離に影響が出ない理由、小山(司)教授より、オピオイド受容体を介するAChの遊離抑制はtonicな状態でもおこりうるか否か、AChの遊離抑制に対してinterneuronの関与の可能性、菅野教授より、オピオイド受容体が刺激されてAChの遊離抑制がおきるまでの細胞内情報伝達系、AChと同時に測定されるコリンの存在意義について質問がなされたが、申請者はおおむね妥当な回答をなしたと考える。また、副査の本間および小山(司)両教授から、詳細なる論文審査ならびに面接試験が課せられた。

本研究は、ラット副腎交感神経節前線維終末からのACh遊離調節機構におけるオピオイド受容体の役割を*in vivo*において解明するために、副腎マイクロダイアリス法を考案し、オピオイド μ 受容体と δ 受容体の両方が機能的役割を担っている可能性を明らかにしたものであり、有意義な研究と考えられ、学位授与に値すると判定された。