

博士論文

アトピー性皮膚炎モデルマウスの搔破行動における
ヒスタミンならびにオピオイド受容体の関与

平成30年3月

仲宗根 佑

安田女子大学大学院
薬学研究科博士課程薬学専攻

目次

序論	1
第1章 自然発症アトピー性皮膚炎マウス (ADJM マウス) の搔破行動の特徴	
緒言	4
実験材料ならびに実験方法	5
実験成績	8
考察	17
第2章 ICR 系マウスの搔破行動におけるヒスタミン H₁ 受容体とオピオイド μ 受容体の関与	
緒言	20
実験材料ならびに実験方法	22
実験成績	26
考察	35
第3章 ICR 系マウスの搔破行動におけるヒスタミン H₁ 受容体とオピオイド κ 受容体の関与	
緒言	37
実験材料ならびに実験方法	39
実験成績	42
考察	51
第4章 ノルビナルトルフィミン誘発搔破行動における末梢性オピオイド μ および κ 受容体の関与	
緒言	53
実験材料ならびに実験方法	54
実験成績	58

考察	63
総括	68
参考文献	70
発表論文	79
謝辞	80

【序論】

アトピー性皮膚炎とは「憎悪・寛解を繰り返す，掻痒のある湿疹を主病変とする疾患であり，患者の多くはアトピー性素因を持つ」と規定されている(1)(2)(3)。アトピー性皮膚炎で見られる強い痒みは，非常に不快で掻かずにいられないという感覚であるとされている(4)。痒みの生理学的メカニズムは以下のように理解されている。すなわち，痒みは皮膚の表皮と真皮との結合部に存在する一次求心性C線維の自由神経終末がヒスタミンをはじめとするケミカルメディエーターにより刺激され，脊髄後角から視床を経由して，大脳皮質で痒みとして知覚される(5)。Fig. 1 に痒みの伝達経路を示した。

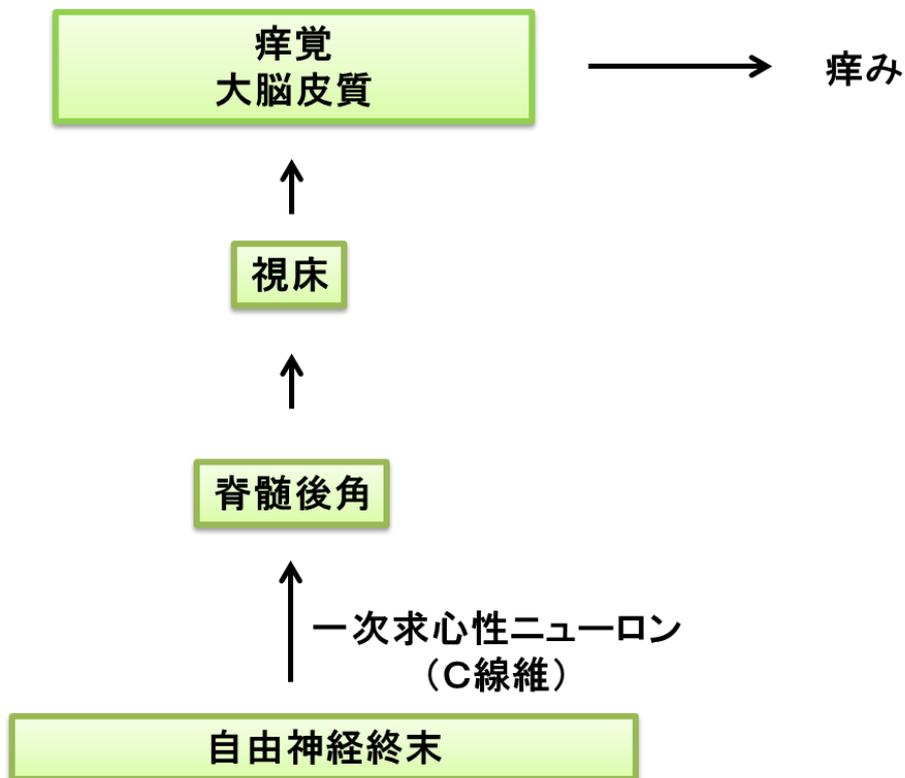


Fig. 1 The pathway of itching

実験動物における痒みに関する研究は，Kuraishi ら(6) (7)，Sugimoto ら(8) および Inagaki ら(9) (10) の日本人研究者により精力的に行なわれてきた。動物に痒みを誘発する物質としては，ヒスタミン，セロトニンおよびコンパウンド 48/80 が報告されてきたが(6) (8) (9)，最近麻薬性鎮痛薬であるモルヒネも動物に強い

痒みを誘発することが見出された(11) (12)。

さて、自然発症アトピー性皮膚炎モデルとして NC/Nga マウスが知られている。本マウスは、飼育環境に依存して、アトピー性皮膚炎と類似した掻痒性皮膚炎が発症されることが Matsuda らのグループによって報告された(13) (14) (15)。現在では、アトピー性皮膚炎の病態解明および新規抗掻痒薬の開発研究に汎用されている(16)。最近、Matsushima ら(17) (18) は、日本産野生由来の近交系マウス(KOR1)の突然変異により自発的な掻破行動を示し、アトピー性皮膚炎様の症状を自然発症するマウスを発見した。その後、このマウスは、Traf3ip2/Act1 遺伝子が欠損していることが判明した(18)。Matsushima ら(18) は本マウスを ADJM (atopic dermatitis from Japanese mice)マウスと命名し、アトピー性皮膚炎モデル動物として有用であると報告しているが、その詳細、特にその掻破行動の特徴については不明である。

そこで、著者は、第1章で ADJM マウスの皮膚炎、特に掻破行動の基礎知見について検討するとともに、臨床ならびに動物実験を行い、痒みと関連する化学伝達物質の拮抗薬およびオピオイド関連薬物の効果を検討し、ADJM マウスの掻破行動の特徴を解析した。

アトピー性皮膚炎をはじめとする各種の痒みには、従来からヒスタミンが関与することが知られている。動物の皮内にヒスタミンやマスト細胞からヒスタミンを遊離するコンパウンド 48/80 を投与すると掻破行動が認められ、ヒスタミン H₁ 受容体拮抗薬であるジフェンヒドラミンやクロルフェニラミンの投与によりこの掻破行動が抑制されることが報告されている(8)。臨床でも、アトピー性皮膚炎の痒みにヒスタミン H₁ 受容体拮抗薬の内服や塗布が行われていることは周知の事実である。一方、痒みがオピオイド受容体を介して発現するという知見が得られ、動物の髄腔内のみならず皮内にモルヒネやフェンタニルを投与すると掻破行動が認められること、およびこの掻破行動がモルヒネ μ 受容体拮抗薬であるナロキソンで抑制されることも見出されている(11) (12)。現在、痒みの発現は、オピオイド μ 受容体が関与し、オピオイド κ 受容体は、これを制御・調節していると考えられている。また、腎透析患者で見られる全身の強い痒みは、ヒスタミン H₁ 受容体拮抗薬では十分に抑制されず、オピオイド

κ 受容体作用薬であるナルフラフィンが有効であるとされている(19)。このように、オピオイドが原因で生じる痒みは中枢性の痒みと考えられている。そこで、著者は第2章で、ヒスタミンおよびモルヒネを皮内投与することによりアトピー性皮膚炎モデルを作製し、これらの痒みにおけるヒスタミン H_1 受容体およびオピオイド μ 受容体との関連を検討した。第3章では、痒みに対するヒスタミン H_1 受容体とオピオイド κ 受容体の関連を明らかにする目的で、ヒスタミン誘発搔破行動に対するオピオイド κ 受容体作用薬であるナルフラフィンの効果を検討した。また、オピオイド κ 受容体拮抗薬であるノルビナルトルフィミン誘発搔破行動に対するクロルフェニラミンの効果も検討した。

オピオイド κ 受容体の作用薬であるナルフラフィンは日本で開発された薬物で、腎透析患者で見られる全身の強い痒みを抑制することが証明され、臨床で汎用されている(19)。オピオイド κ 受容体作用薬による痒みの抑制は中枢性であるとされている。しかし、著者は第2章および第3章でヒスタミン H_1 受容体とオピオイド μ および κ 受容体が密接に関連することを見出した。つまり、ヒスタミンおよびノルビナルトルフィミンによって誘発した搔破行動は、主に末梢で作用するクロルフェニラミンによって有意に抑制された。この事実はオピオイド κ 受容体には中枢神経系のみならず、末梢神経系にも作用点があることを示唆している。そこで第4章では、中枢神経系に移行しないオピオイド κ 受容体作用薬、ICI 204,448(20) およびオピオイド μ 受容体拮抗薬であるナロキソンメチオジド(21) を用いてオピオイド κ 受容体の末梢神経系の関与について検討した。

第 1 章 自然発症アトピー性皮膚炎マウス (ADJM マウス) の搔破行動の特徴

〔緒言〕

ADJM マウス (atopic dermatitis from Japanese mice) は, Matsushima (17) により, 日本産野生マウス KOR1 近交系のコロニーから発見された自然発症突然変異マウスで, 自発的に搔破行動を誘発する。その後, Matsushima ら(18) は原因遺伝子を BALB/c マウスに導入したマウスを作製し, C.KOR/StmSlc-Traf3ip2^{adjm} (以下 ADJM マウスと記す) と命名した。本マウスは Traf3ip2/Act1 遺伝子が欠損しており, 高い血中 IgE レベルを示し, 皮膚の肥厚や好酸球をはじめとする炎症細胞の浸潤が観察されることが報告されている。Traf3ip2 および Act1 は, ともに BAFF 受容体[BAFF とは B 細胞活性化因子のことであり(22), B 細胞の分化, 生存および増殖に重要な役割を果たしているサイトカインである]のシグナル伝達に対し抑制的に機能する。従って, この遺伝子の欠損は B 細胞の異常な活性化を引き起こす。このことから B 細胞の異常な活性化が, 血清 IgE の著明な増加を示すことは容易に理解できる。従って, Traf3ip2 遺伝子はアトピー性皮膚炎の治療標的分子として重要な役割を有し, かつ ADJM マウスが, アトピー性皮膚炎の新規動物モデルになりうると考えられている。

一方, ADJM マウスは, 後肢で, 耳部を含む顔面, 腹部および背部を引っ掻く行動 (搔破行動) が見られることが報告されているが, 詳細な検討はなされていない。そこで, 著者は ADJM マウスの搔破行動の特徴を見出す目的で, 痒みの抑制作用を有するとされているヒスタミン H₁ 受容体拮抗薬, ニューロキニン NK₁ 受容体拮抗薬, オピオイド μ 受容体拮抗薬およびオピオイド κ 受容体作用薬を用いて, ADJM マウスの搔破行動の特徴を薬理的に検討した。

[実験材料ならびに実験方法]

1. 実験動物

実験には、雌性ならびに雄性の ADJM マウスおよび BALB/c マウス (8 - 10 週齢, 埼玉がんセンターから供給された) を用いた。動物は $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 湿度 $50 \pm 10\%$ の動物飼育室で飼育し, 飼料 (フナコシ, 千葉) および飲料水は自由に摂取させた。すべての実験手順は, 日本薬科大学動物実験指針に従って行った。

2. 使用薬物

使用薬物は, d-クロルフェニラミンマレイン酸塩 (和光純薬, 大阪), シプロヘプタジン塩酸塩 (日医工, 富山), ナロキソン塩酸塩 (シグマーアルドリッチ, 東京), アプレピタント (小野薬品, 大阪) およびナルフラフィン塩酸塩 (東レ一鳥居, 東京) である。ナロキソン以外の薬物は 5%アラビアゴム溶液で懸濁し, 経口ゾンデを用いて投与した。ナロキソンは生理食塩液に溶解し, 皮下投与した。投与計画は Fig.2 に示した如く, 経口投与した場合は 60 分前に, 皮下投与した場合は 15 分前に薬物を投与した後, その後 60 分間搔破行動を観察した。使用薬物の化学構造は Fig.3 に示した (塩類は省略した)。

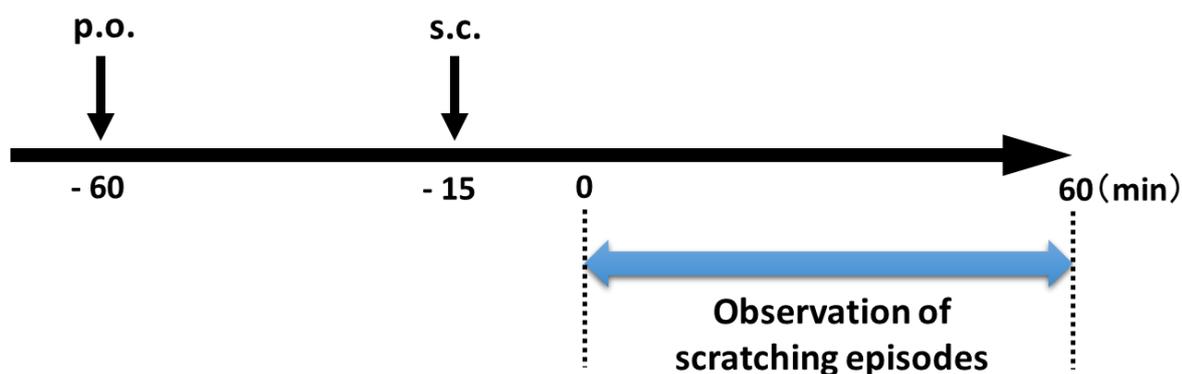


Fig. 2 Experimental schedule

経口投与 (p.o.) : クロルフェニラミン, シプロヘプタジン,
アプレピタント, ナルフラフィン

皮下投与 (s.c.) : ナロキソン

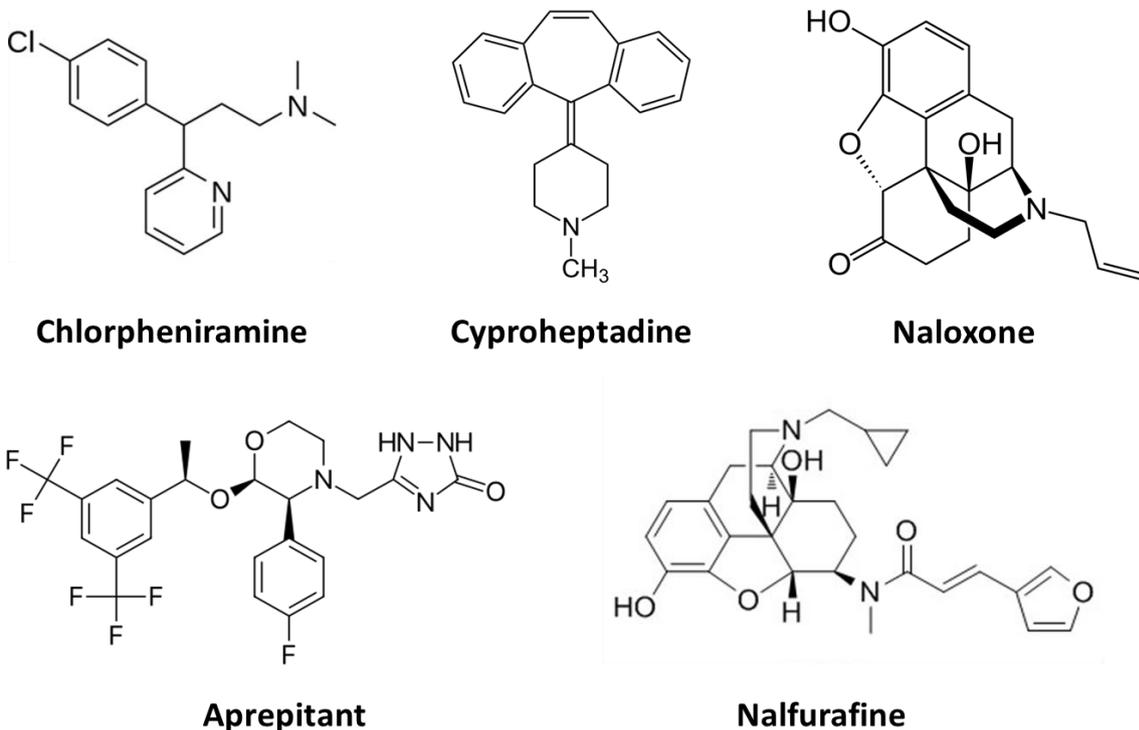


Fig. 3 Chemical structures of drugs used in this chapter

3. 搔破行動の観察

搔破行動は, Kuraishi ら(6) の方法に準じて行った。すなわち環境に順応させるため, 試験開始 10 分前にマウスを観察用ケージに入れた。搔破行動の観察は, 目視で, 二重盲検法 (薬物投与を担当する者および搔破行動を観察する者は実験の内容を知らされていない) で行った。

4. 皮膚のヒスタミン含量の測定

マウスをエーテルにより致死させ, 皮膚を 1 cm 四方に切り取った。氷冷した生理食塩液で洗浄した後, 皮膚組織湿重量を測定し, 9 倍量の 0.4 M 過塩素酸を加え, ポリトロンでホモジナイズした。次に皮膚組織ホモジネートを 4°C, 400 ×g で 10 分間遠心分離した。上清中のヒスタミンは, 蛍光誘導化 HPLC 法 (エイコム, OPA ポストカラム蛍光誘導化システム) を用いて測定し, 皮膚組織中のヒスタミン含量を算出した(23) (24)。

5. 統計処理

統計学的有意差は、一元配置分散分析および Dunnett's 法を用いて検定し、危険率 5%以下の場合を有意差ありと判定した(25)。実験成績はすべて平均値±標準誤差で示した。ED₅₀ 値（薬物を投与した動物の半数が薬理効果を示す用量）は Probit 法を用いて算出した。

〔実験成績〕

1. ADJM マウスの搔破行動の雌雄差

Fig. 4 は、ADJM マウスおよび対照群である BALB/c マウスの代表例を示したものである（動物の症状をわかり易くする為に、マウスを直径 4.8 cm、高さ 2.5 cm のプラスチック台の上に置いた）。黒枠は ADJM マウスが搔破行動を示した顔面、腹部および背部である。ADJM マウスは顔面（Face）、腹部（Abdomen）および背部（Back）を後肢で引っ掻き、従って、皮膚に糜爛が生じている。一方、BALB/c マウスでは、搔破行動は全く認められず、糜爛も観察されなかった。

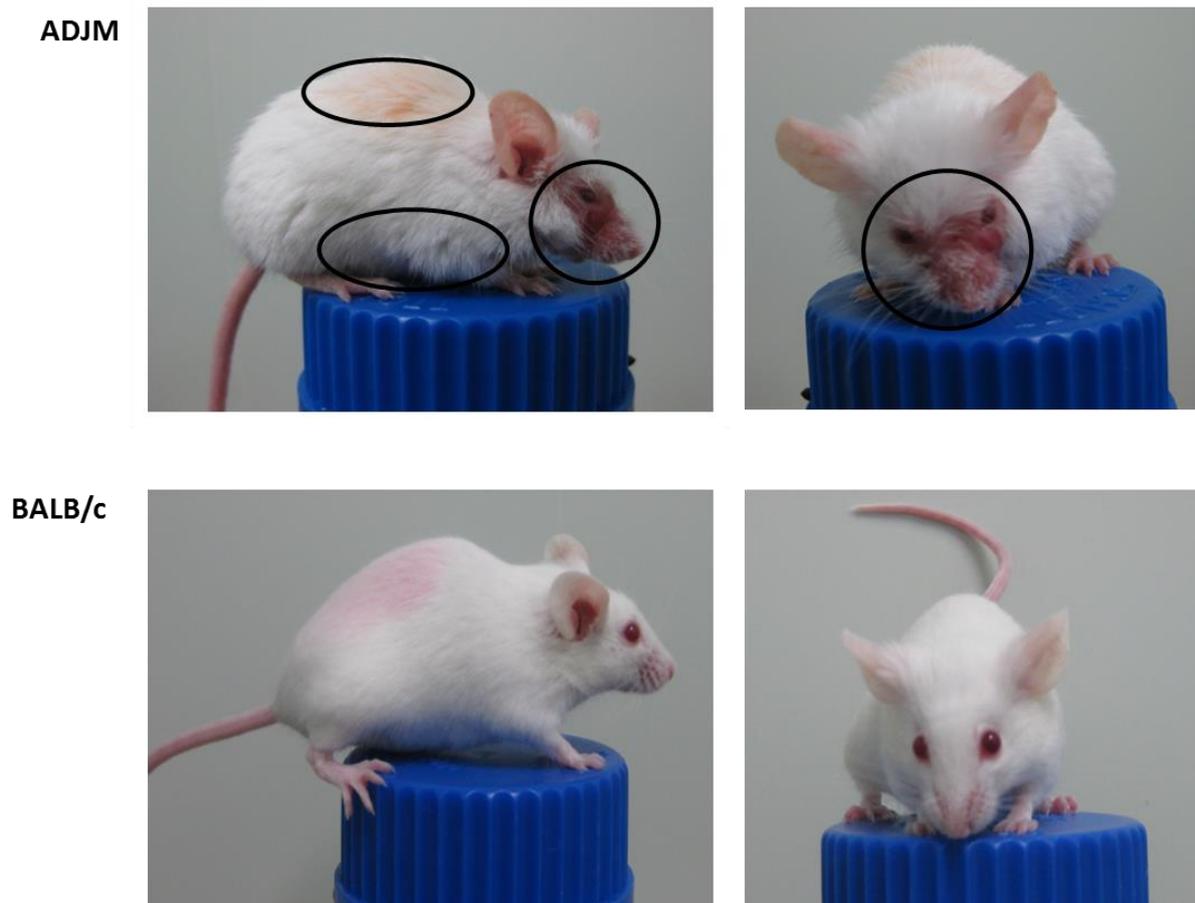


Fig. 4 Representative examples of ADJM mice and BALB/c mice

Fig. 5 は、顔面、腹部および背部の搔破行動を 60 分間測定した成績である。縦軸の搔破行動 (scratching episodes) は、後肢で各部を引っかき、後肢を床におろすまでを 1 回としてカウントしたものである。顔面の搔破行動は、雄性マウスで 45 ± 15 回 (7 例)、雌性マウスで 70 ± 18 回 (7 例) であった。腹部および背部の搔破行動も雄性、雌性とも見られたが、顔面の搔破行動よりも少なかったため、以下の実験では顔面の搔破行動のみに限定して測定した。また、雌性マウスの搔破行動の方が雄性マウスより多かったため本実験では雌性マウスを用いた。

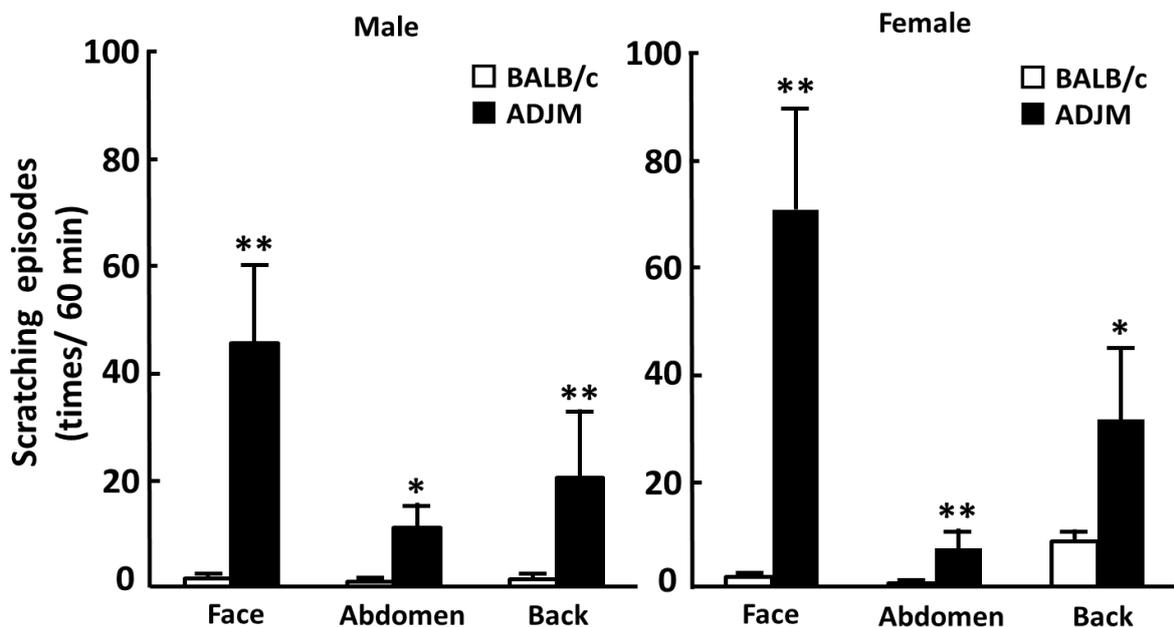


Fig. 5 Scratching episodes in male and female ADJM mice

Each column and vertical bar represents the mean \pm S.E.M.

(n=7).

*, **: Significantly different from the control group (BALB/c mice) at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively (Dunnett's test).

2. ADJM マウスの搔破行動に対するクロルフェニラミンの効果

Fig. 6 は, ADJM マウスの搔破行動に対するヒスタミン H₁ 受容体拮抗薬であるクロルフェニラミンの効果を検討したものである。クロルフェニラミンは, 搔破行動測定の 60 分前に経口投与した。クロルフェニラミンは 1, 3 および 10 mg/kg の用量で用量依存性の抑制作用を示した。1 mg/kg の用量では有意差は認められなかったが, 3 および 10 mg/kg の用量では対照群 (未処理の ADJM マウス) と比較し有意差が観察された。ED₅₀ 値は 4.11 (1.77 - 7.81 mg/kg)であった。

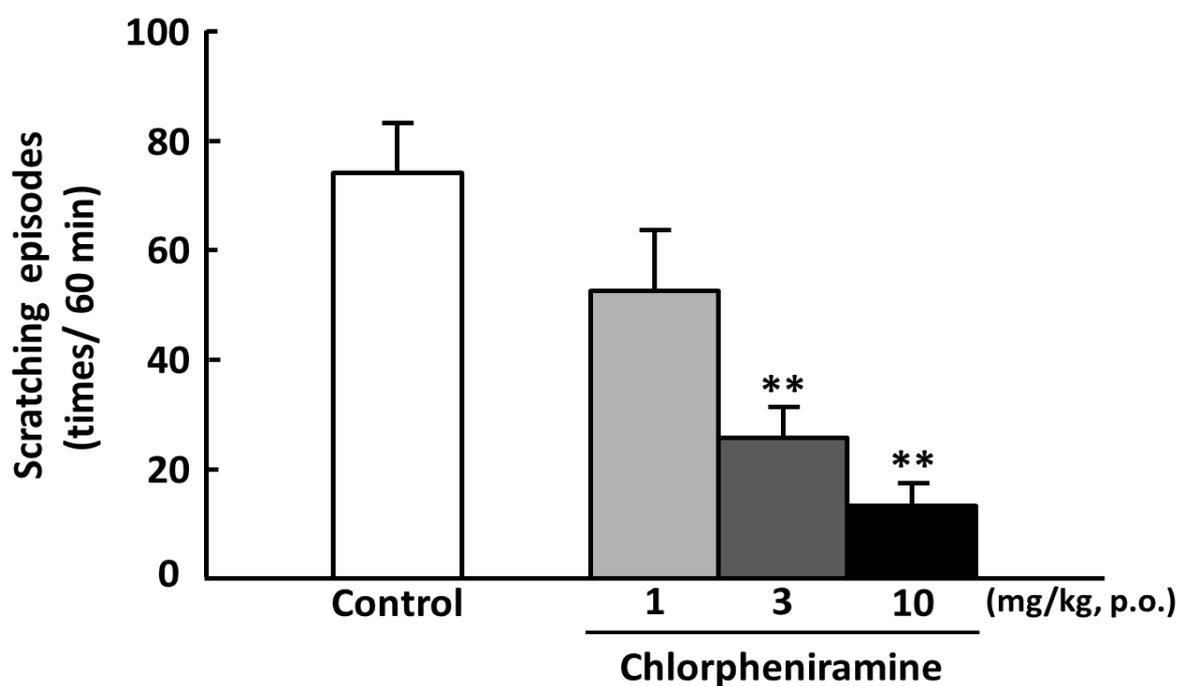


Fig. 6 Effect of chlorpheniramine on scratching episodes in ADJM mice

Chlorpheniramine was administered orally 60 min before testing.

Each column and vertical bar represents the mean \pm S.E.M. (n=8-9).

** : Significantly different from the control group at $p < 0.01$ (Dunnett's test).

3. ADJM マウスの搔破行動に対するシプロヘプタジンの効果

Fig. 7 は, ADJM マウスの搔破行動に対するヒスタミン H₁ 受容体拮抗薬であるシプロヘプタジンの効果を検討した成績である。シプロヘプタジンは搔破行動の測定 60 分前に経口投与した。シプロヘプタジンも用量依存性の抑制作用を示した。1 mg/kg の用量では有意差は見られなかったが, 3 および 10 mg/kg の用量では対照群 (未処理の ADJM マウス) と比較し有意差が観察された。ED₅₀ 値は 4.45 (2.30 - 8.01 mg/kg) であった。

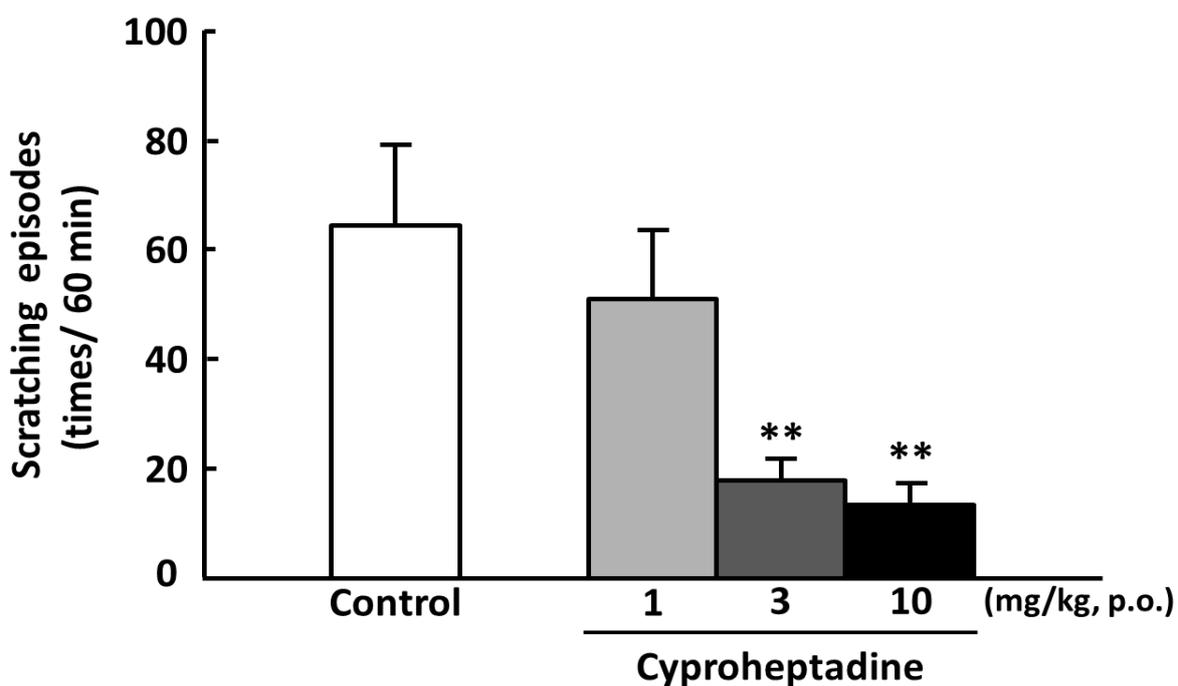


Fig. 7 Effect of cyproheptadine on scratching episodes in ADJM mice

Cyproheptadine was administered orally 60 min before testing.

Each column and vertical bar represents the mean \pm S.E.M. (n=7-9).

** : Significantly different from the control group at $p < 0.01$ (Dunnett's test).

4. ADJM マウスの搔破行動に対するアプレピタントの効果

Fig. 8 は、ニューロキニン NK₁ 受容体拮抗薬であるアプレピタントの効果を検討したものである。アプレピタントは、搔破行動測定の 60 分前に経口投与した。アプレピタントは 10, 30 および 100 mg/kg のいずれの用量でも有意な抑制作用を示さなかった。

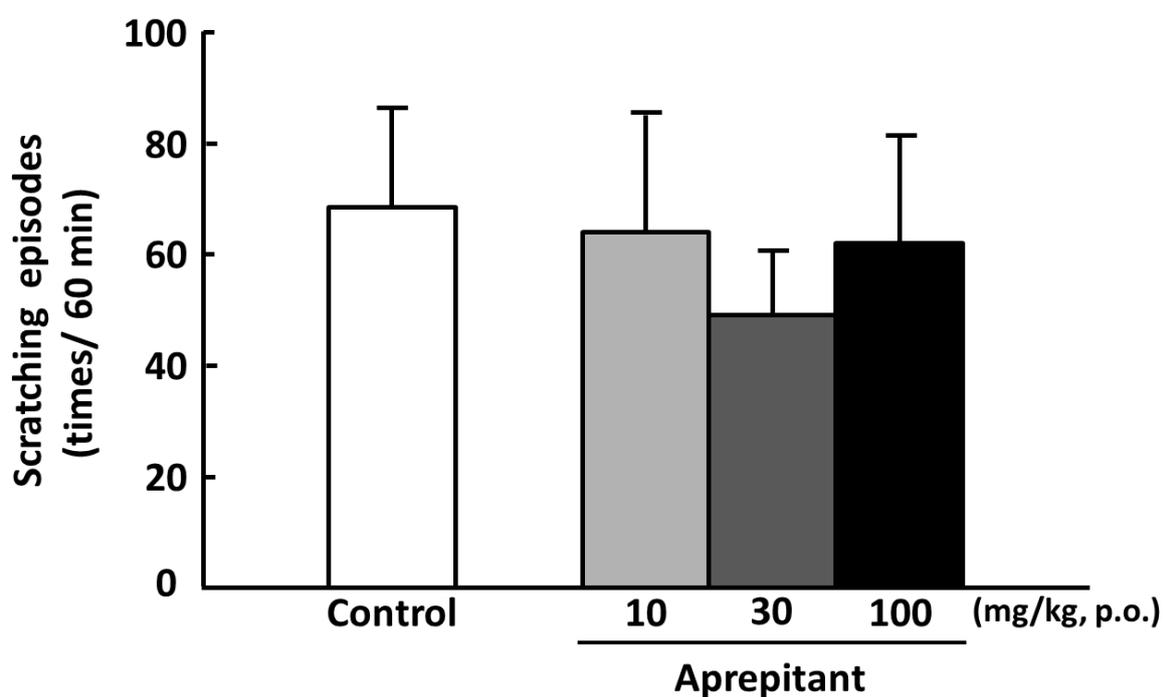


Fig. 8 Effect of Aprepitant on scratching episodes in ADJM mice
Aprepitant was administered orally 60 min before testing.
Each column and vertical bar represents the mean \pm S.E.M. (n=7-10).

5. ADJM マウスの搔破行動に対するナロキシソンの効果

Fig. 9 は、ADJM マウスの搔破行動に対するオピオイド μ 受容体拮抗薬であるナロキシソンの効果を検討したものである。ナロキシソンは、搔破行動測定の 15 分前に皮下投与した。ナロキシソンは、0.1 mg/kg の用量では有意の抑制作用は示さなかったが、0.3 および 1 mg/kg の用量では対照群（未処理の ADJM マウス）と比較して有意な抑制作用を示した。ED₅₀ 値は 0.52 mg/kg (0.26 – 1.04 mg/kg) であった。

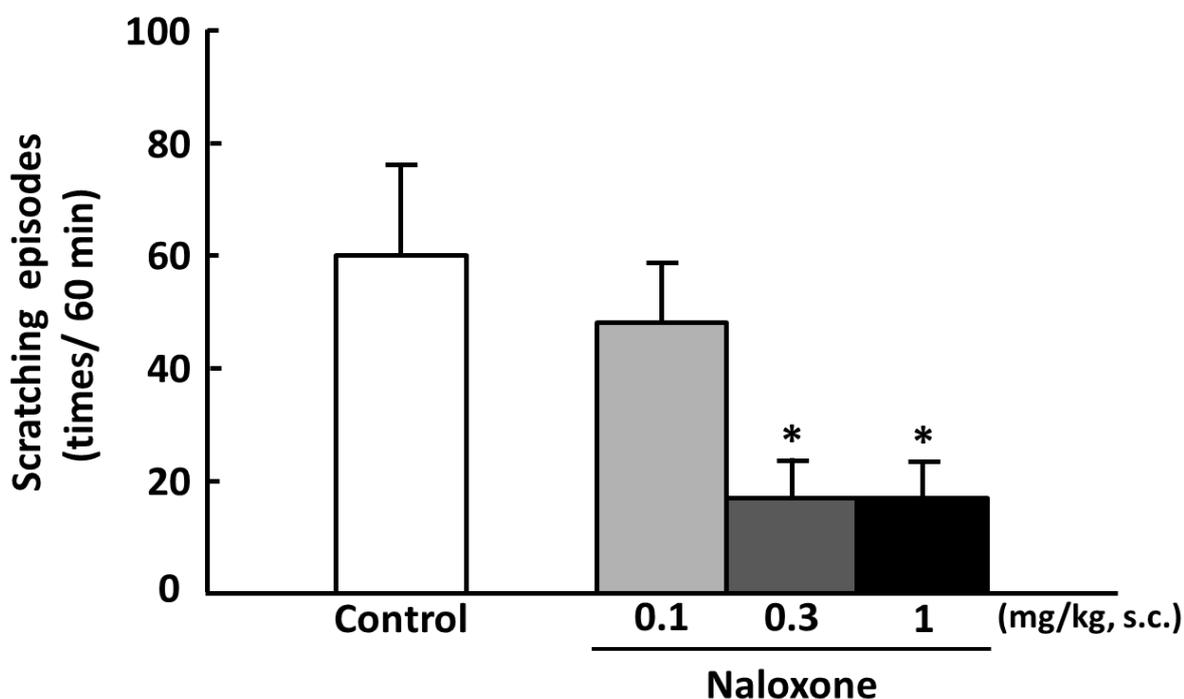


Fig. 9 Effect of naloxone on scratching episodes in ADJM mice

Naloxone was administered subcutaneously 15 min before testing. Each column and vertical bar represents the mean \pm S.E.M. (n=8-9).

*: Significantly different from the control group at $p < 0.05$

(Dunnett's test).

6. ADJM マウスの搔破行動に対するナルフラフィンの効果

Fig. 10 は, ADJM マウスの搔破行動に対するオピオイド κ 受容体作用薬であるナルフラフィンの効果を検討したものである。ナルフラフィンは搔破行動測定の前60分に経口投与した。ナルフラフィンは 0.005 mg/kg では有意な抑制作用を示さなかったが, 0.01 および 0.05 mg/kg の用量では対照群 (未処理の ADJM マウス) と比較して有意な抑制作用を示した。ED₅₀ 値は 0.02 (0.01 – 0.04 mg/kg) であった。

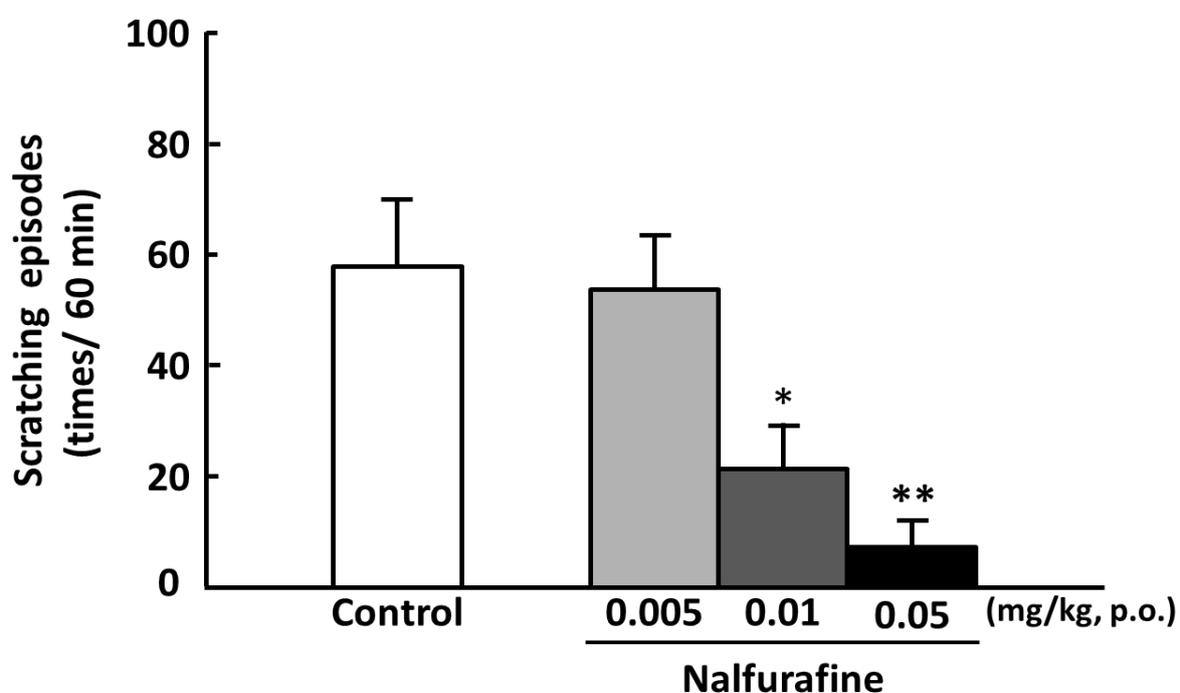


Fig. 10 Effect of nalfurafine on scratching episodes in ADJM mice

Nalfurafine was administered orally 60 min before testing.

Each column and vertical bar represents the mean \pm S.E.M. (n=10).

*, **: Significantly different from the control group at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively (Dunnett's test).

7. ADJM マウスの搔破行動に対するクロルフェニラミン、シプロヘプタジン、アプレピタント、ナロキソンおよびナルフラフィンの効果の比較

ADJM マウスの搔破行動に対するクロルフェニラミン、シプロヘプタジン、アプレピタント、ナロキソンおよびナルフラフィンの ED₅₀ 値を Table 1 にまとめたとめた。

Table 1 ED₅₀ values for chlorpheniramine, cyproheptadine, aprepitant, naloxone and nalfurafine on scratching episodes in ADJM mice

Drugs	ED₅₀ values, mg/kg (95% confidence limits)
Chlorpheniramine (H₁ antagonist)	4.11 (1.77 – 7.81)
Cyproheptadine (H₁ antagonist)	4.45 (2.30 – 8.01)
Aprepitant (NK₁ antagonist)	>100
Naloxone (μ antagonist)	0.52 (0.26 – 1.04)
Nalfurafine (κ agonist)	0.02 (0.01 – 0.04)

8. ADJM マウスの皮膚ヒスタミン含量

Fig. 11 は,ADJM マウスの皮膚ヒスタミン含量を測定した成績である。ADJM マウスの皮膚ヒスタミン含量は $59 \pm 5 \mu\text{g/g}$ (5 例) であり, 対照群である BALB/c マウスの皮膚ヒスタミン含量と比べて有意に高かった。

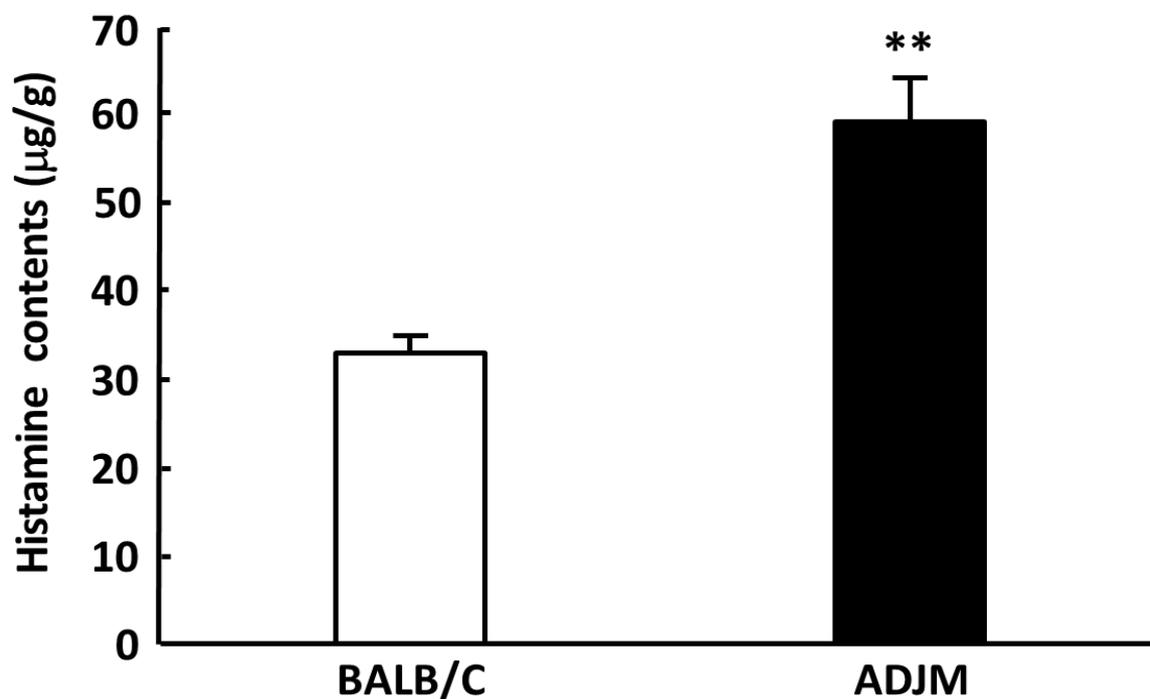


Fig. 11 Histamine contents in the skin of ADJM mice

Each column and vertical bar represents the mean \pm S.E.M.(n=5).

** : Significantly different from the control group at $p < 0.01$ (Dunnett's test).

〔考察〕

本実験において、ADJM マウスは後肢による著明な顔面の搔破行動を示した。顔面の搔破行動の回数は雌性マウスでは 60 分間で 70 ± 18 回 (7 例) であった。腹部や背部の搔破行動も認められたが、顔面の搔破行動よりは少なかった。一方、アトピー性皮膚炎モデル動物としてよく知られている NC/Nga マウスも顔面、腹部および背部の搔破行動を誘発することが報告されている(13)。ADJM マウスの搔破行動は、NC/Nga マウスの搔破行動と類似していた。

ヒスタミン H_1 受容体拮抗薬であるクロルフェニラミンは、3 および 10 mg/kg の用量で ADJM マウスの搔破行動を有意に抑制し、その ED_{50} 値は 4.11 (1.77 - 7.81) mg/kg であった。Togashi ら(26) はヒスタミンにより誘発した搔破行動は、クロルフェニラミンおよびケトチフェンで用量依存的に抑制され、その ED_{50} 値は 8.5 (1.7 - 25.5) mg/kg および 3.4 (0.5 - 20.3) mg/kg であったと報告している。さらに Sugimoto ら(8) は、ヒスタミン遊離物質であるコンパウンド 48/80 の皮内投与により誘発した搔破行動をクロルフェニラミンおよびジフェンヒドラミンは、それぞれ 3 および 1 mg/kg の用量で有意に抑制し、それらの ED_{50} 値は 2.43 (1.37 - 4.47) mg/kg および 1.09 (0.58 - 3.06) mg/kg であったと報告している。本研究における ADJM マウスに対するクロルフェニラミンの抑制効果は、上記のヒスタミンもしくはコンパウンド 48/80 誘発搔破行動に対する効果とほとんど同程度か少し弱い程度の強さであった。従って、ADJM マウスの搔破行動はヒスタミンが主な原因であることが示唆された。そこで、著者は ADJM マウスの皮膚のヒスタミン含量の測定を試みた。その結果、ADJM マウスの皮膚のヒスタミン含量は対照群である BALB/c マウスより有意に高かった。これらの成績より ADJM マウスの搔破行動には、ヒスタミンが関与することが明らかとなった。シプロヘプタジンもこの搔破行動を抑制し、有意差は 3 および 10 mg/kg で得られた。シプロヘプタジンは、ヒスタミン H_1 受容体拮抗作用以外にセロトニン $5HT_2$ 受容体も遮断することが判明している(27)。従って、ADJM マウスの搔破行動にはセロトニンも関与している可能性は否定できない。また、げっ歯

類のマスト細胞にはヒスタミンとともにセロトニンの含有率が高く、刺激により両化学伝達物質が遊離されることは周知の事実である(28)。

一方,NC/Nga マウスの搔破行動は、クロルフェニラミン 10 mg/kg の用量でも有意に抑制されなかったと報告されている(29)。これらの知見より,ADJM マウスの搔破行動は NC/Nga マウスとは異なると考えられる。サブスタンス P も痒みの発生および維持に関与することが知られている物質であり,サブスタンス P が表皮ケラチノサイトから痒み物質を放出させて痒みを起こすことが報告されている(30)。一方,Stander ら(31) は,ニューロキニン NK₁ の受容体拮抗薬であるアプレピタントは,ヒトで痒みの軽減を示したと報告している。しかし,本実験ではアプレピタントは,100 mg/kg の用量でも ADJM マウスの搔破行動を抑制しなかった。従って,ADJM マウスの搔破行動にサブスタンス P は全く関与しないことが明らかとなった。

鎮痛薬であるモルヒネが臨床でしばしば痒みを引き起こすことは知られており(32),この痒みに対してオピオイド受容体拮抗薬が有効であるとされている(33)。また,He ら(34) や Monroe (35) は,アトピー性皮膚炎の痒みにナロキソンやナルメフェンが有効であることを報告している。本実験においてもナロキソンは,0.3 および 1 mg/kg の用量で ADJM マウスの搔破行動を有意に抑制した。ED₅₀ 値は 0.52 (0.26 - 1.04) mg/kg であった。Yamamoto ら(11) はモルヒネ 100 nmol/site の皮内投与による搔破行動は,ナロキソン 0.03 および 0.1 mg/kg の皮下投与で抑制されることを報告している。Yamamoto ら(11) は ED₅₀ を算出していないが,著者が算出したところ,約 0.2 mg/kg であることが判明した。従って,本 ADJM マウスの搔破行動に対するナロキシソンの効果は,モルヒネ誘発搔破行動に対するナロキシソンの効果と同等かもしくはやや弱いと考えられる。これらの知見より,ADJM マウスの搔破行動に対するナロキシソンの抑制効果はオピオイド μ 受容体に関与している可能性が高いことが示唆された。一方,モルヒネはマスト細胞からヒスタミンを遊離することが知られており(36)(37),モルヒネによる痒みはこのヒスタミンが関与するのではないかと考えられてきた。Yamamoto ら(11) はモルヒネ 100 nmol/site 誘発搔破行動は,ヒスタミン H₁ 受容体拮抗薬であるクロルフェニラミンおよびジフェンヒドラミンの 10 mg/kg

で抑制されることを見出している。これらの知見より、オピオイドにより誘発される搔破行動にヒスタミンが関与することは明白であるが、ADJM マウスの搔破行動に対するナロキソンの抑制効果はヒスタミンを介した作用か、もしくはオピオイド μ 受容体が直接関与しているかは現在のところ不明である。

本研究で、ADJM マウスの搔破行動に対してナルフラフィン[®]は、0.01 および 0.05 mg/kg という少量で有意な抑制作用を示した。ED₅₀ 値は 0.02 (0.01 - 0.04) mg/kg であった。この用量は Togashi ら(26) が報告しているようにヒスタミン誘発搔破行動に対する抑制効果と同程度であった。最近、オピオイド κ 受容体が痒みに関連するという研究が多く見受けられる。すなわち、痒みの発現にはオピオイド μ 受容体が関与し、オピオイド κ 受容体はこれを制御・調節していると考えられている。ナルフラフィン[®]は選択的なオピオイド κ 受容体作用薬であり、腎透析患者の痒みに有効であるとの報告が多い(38)(39)。Togashi ら(26) はヒスタミン誘発搔破行動に対して、ヒスタミン H₁ 受容体拮抗薬のみならず、ナルフラフィン[®]も有効であると報告している。これらの知見は、痒みに関してヒスタミン H₁ 受容体とオピオイド κ 受容体の間に何らかの関連があることを示唆している。

以上、ADJM マウスの搔破行動にはヒスタミン H₁ およびオピオイド μ 、 κ 受容体が関与していることが明らかとなった。

第2章 ICR系マウスの搔破行動におけるヒスタミン H₁受容体とオピオイド μ受容体の関与

〔緒言〕

ヒスタミンが H₁ 受容体を介して搔破行動，すなわち痒くて掻きたいという衝動を示すことは良く知られている(40)。ヒトの場合と同様，ヒスタミン，セロトニンおよびコンパウンド 48/80 などの搔痒物質をマウスやラットの背部皮内に投与した際，著明な搔破行動が認められる(6) (7) (8) (9) (41)。従って，実験動物における搔破行動は，抗搔痒薬の開発および痒みの作用機序を解明するための有用なモデルとして広く用いられている。ヒトでは，痒み物質として広く知られているヒスタミンは著明な痒みを誘発するが，ddY系マウスやBALB/c系マウスでは，搔破行動を誘発しないことが報告されている(9)。しかし，Inagaki ら(9) は，ICR系マウスではヒスタミンの皮内投与により著明な搔破行動を示すことを見出した。これらの実験成績から，Inagaki ら(9) は，ICR系マウスは，搔破行動の化学伝達物質や作用機序の解明に適切な系統であると結論づけている。Togashi ら(26) は，ICR系マウスにおいて，代表的なヒスタミン H₁ 受容体拮抗薬であるクロルフェニラミンが，ヒスタミンにより生じる搔破行動を抑制したことを報告している。

一方，麻薬性鎮痛薬であるモルヒネが，しばしばヒトや実験動物で痒みを誘発すること，およびオピオイドの拮抗薬が痒みを軽減することは良く知られている。Yamamoto ら(11) は，モルヒネをICR系マウスに皮内投与した際，搔破行動が誘発されること，さらに，モルヒネにより誘発される搔破行動が，ナロキソンのみならずクロルフェニラミンで抑制されることを見出している。しかし，Yamamoto ら(11) は，モルヒネによる搔破行動に対する拮抗に必要なクロルフェニラミンの用量は，ヒスタミン誘発搔破行動に対する拮抗用量より高いという理由から，モルヒネによる搔破行動は，ヒスタミン H₁ 受容体を介して生じるのではないと考察している。そこで，著者は痒みに対するヒスタミン H₁ 受容体

とオピオイド μ 受容体との関連を、ヒスタミン誘発搔破行動およびモルヒネ誘発搔破行動に対するクロルフェニラミンおよびナロキソンの効果を比較することにより検討した。

[実験材料ならびに実験方法]

1. 実験動物

実験には、雄性の ICR 系マウス（8 - 18 週齢, 30 - 35 g , 日本チャールズブリバ
ー, 静岡）を用いた。動物は $24 \pm 2^\circ\text{C}$, 湿度 $55 \pm 15\%$ の動物飼育室で飼育し, 飼
料（オリエンタル酵母, 東京）および飲料水は自由に摂取させた。すべての実
験手順は安田女子大学動物実験ガイドラインに従って行った。

2. 使用薬物

使用薬物は、ヒスタミン二塩酸塩（和光純薬, 大阪）, d-クロルフェニラミン
マレイン酸塩（和光純薬, 大阪）, モルヒネ塩酸塩（武田薬品, 大阪）およびナ
ロキソン塩酸塩（シグマアルドリッチ, 東京）である。ヒスタミンおよびモ
ルヒネは, 生理食塩液に溶解し, 0.02 ml の用量で背部皮内に投与した。ナロキ
ソンは生理食塩液に溶解し, マウスの体重 10 g につき 0.05 ml をヒスタミンお
よびモルヒネ投与の 15 分前に背部皮下投与した。クロルフェニラミンは, 5%
アラビアゴム溶液で溶解し, マウスの体重 10 g につき 0.1 ml の容量で経口ゾ
ンデを用いてヒスタミンおよびモルヒネ投与の 60 分前に投与した。投与計画と
投与方法は Fig.12 に示した如く, クロルフェニラミンは, ヒスタミンもしくは
モルヒネ投与の 60 分前に経口投与し, ナロキソンは 15 分前に皮下投与した。
10 分間観察用ケージ内で順化した後, ヒスタミンもしくはモルヒネを皮内注射
し, 60 分間搔破行動を観察した。Fig.13 に, 本章で用いた使用薬物の化学構造を
示した（塩類は省略した）。

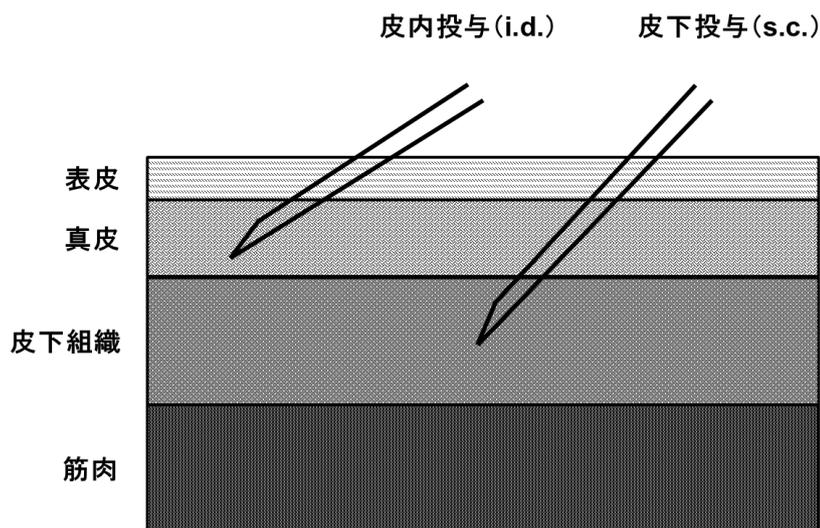
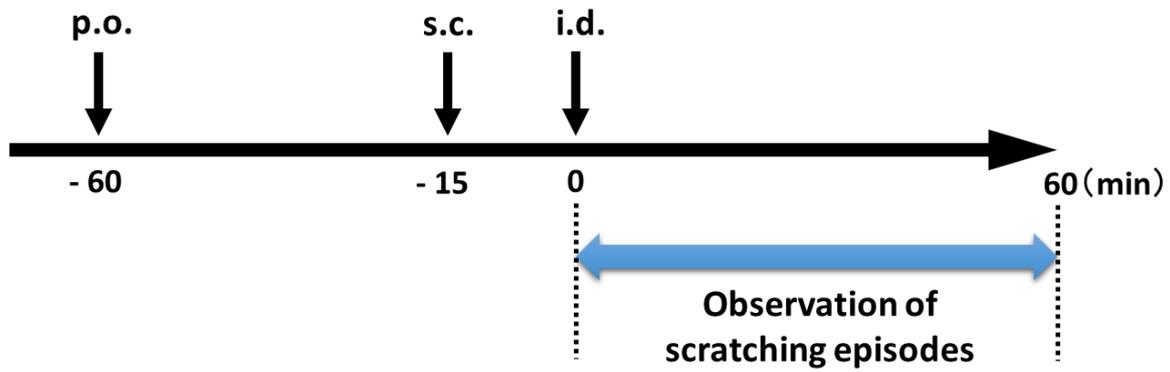
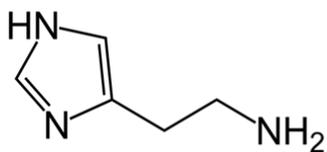


Fig. 12 Experimental schedule and injection method

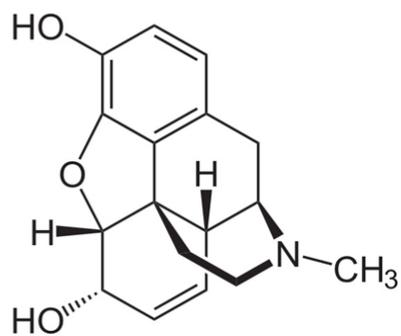
経口投与 (p.o.) : クロルフェニラミン

皮下投与 (s.c.) : ナロキソン

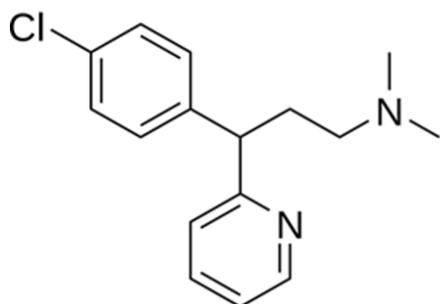
皮内投与 (i.d.) : ヒスタミン, モルヒネ



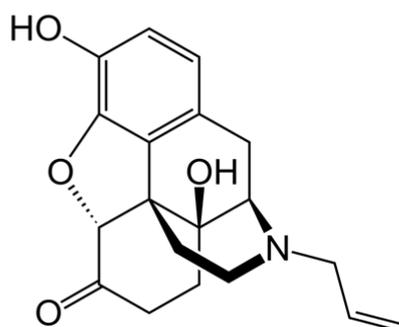
Histamine



Morphine



Chlorpheniramine



Naloxone

Fig. 13 Chemical structures of drugs used in this chapter

3. 搔破行動の観察

搔破行動の観察は, Kuraishi ら(6) の方法に準じて行った。すなわち環境に順応させるため, 薬物皮内投与開始 10 分前にマウスをアクリル製観察用ケージ (円筒形, 直径 12 cm, 高さ 18 cm) に入れた (Fig.14)。搔破行動の観察は目視で行った。搔破行動の観察は, 二重盲検法 (薬物投与を担当する者および搔破行動を観察する者は実験の内容を知らされていない) で行った。搔破行動は後肢で注射部位もしくはその付近を引っ掻き, 後肢を床におろすまで 1 回としてカウントした。

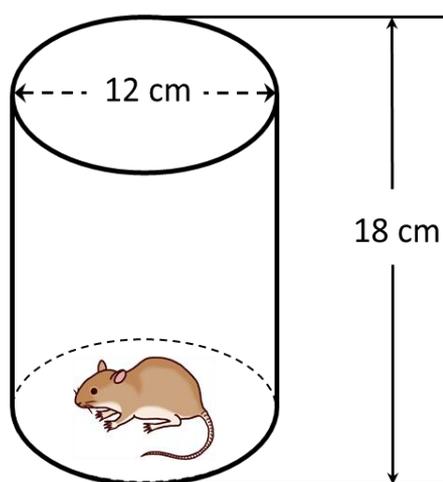


Fig. 14 Observation cage used in the experiments

The mouse was placed in an observation cage 10 min before testing (cylindrical diameter 12 cm, height 18 cm).

4. 統計処理

統計学的有意差は, 一元配置分散分析および Dunnett's 法を用いて検定し, 危険率 5%以下の場合を有意差ありと判定した(25)。実験成績はすべて平均値±標準誤差で示した。ED₅₀ 値 (薬物を投与した動物の半数が薬理効果を示す用量) および ID₅₀ 値 (ある薬物の最大効果に対して, 50%の抑制効果を引き起こす薬物の用量) は Probit 法を用いて算出した。

〔実験成績〕

1. ヒスタミン誘発搔破行動

ヒスタミンを背部皮内に投与した際に見られる搔破行動の結果を Fig. 15 に示した。ヒスタミンは、用量依存性に搔破行動の増加を示した。10 nmol/site の用量では有意差は見られなかったが、30 および 100 nmol/site の用量では有意な搔破行動の増加を示した。ヒスタミン 100 nmol/site の用量で 60 分間の観察で、 112 ± 13 回 ($n=10$) であった。

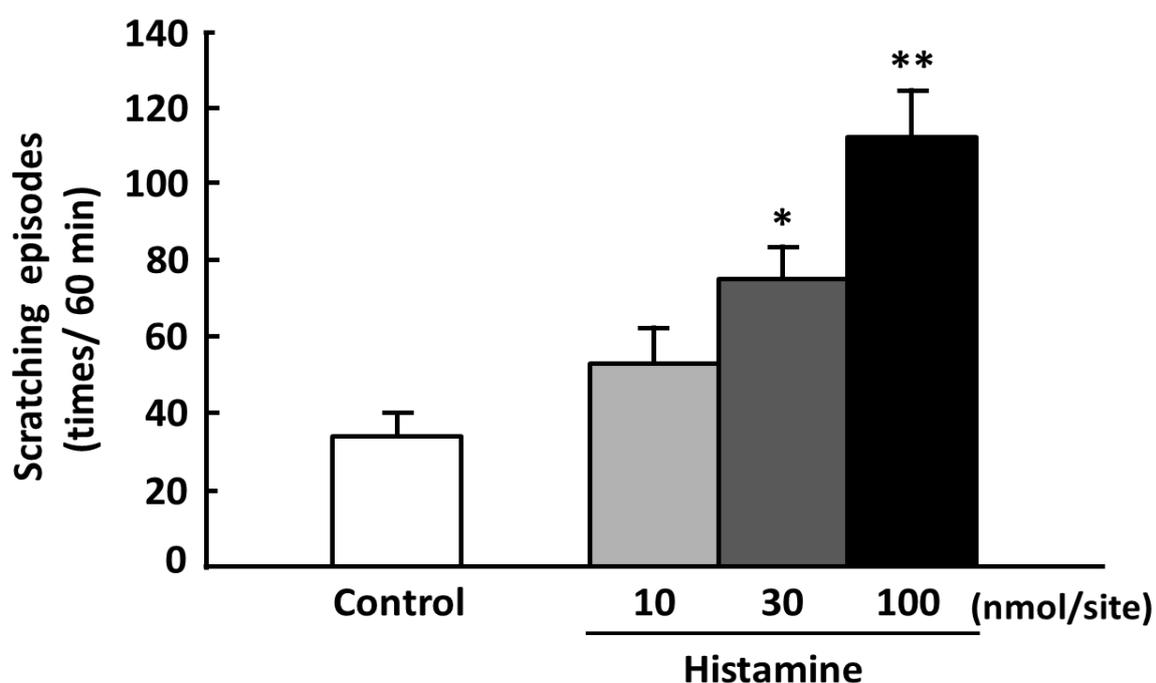


Fig. 15 Histamine - induced scratching episodes in ICR mice

Histamine was injected intradermally into the rostral back, and the number of scratching episodes was counted for 60 min.

Each column and vertical bar represents the mean \pm S.E.M. ($n=10$).

*, **: Significantly different from the control group at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively (Dunnett's test).

2. モルヒネ誘発搔破行動

Fig. 16 に、モルヒネを背部皮内に投与した際に観察される搔破行動を示した。モルヒネは、10, 30 および 100 nmol/site の用量で用量依存性の搔破行動の増加を示した。30 および 100 nmol/site の用量で対照群 (Control) と比べ有意差が観察された。

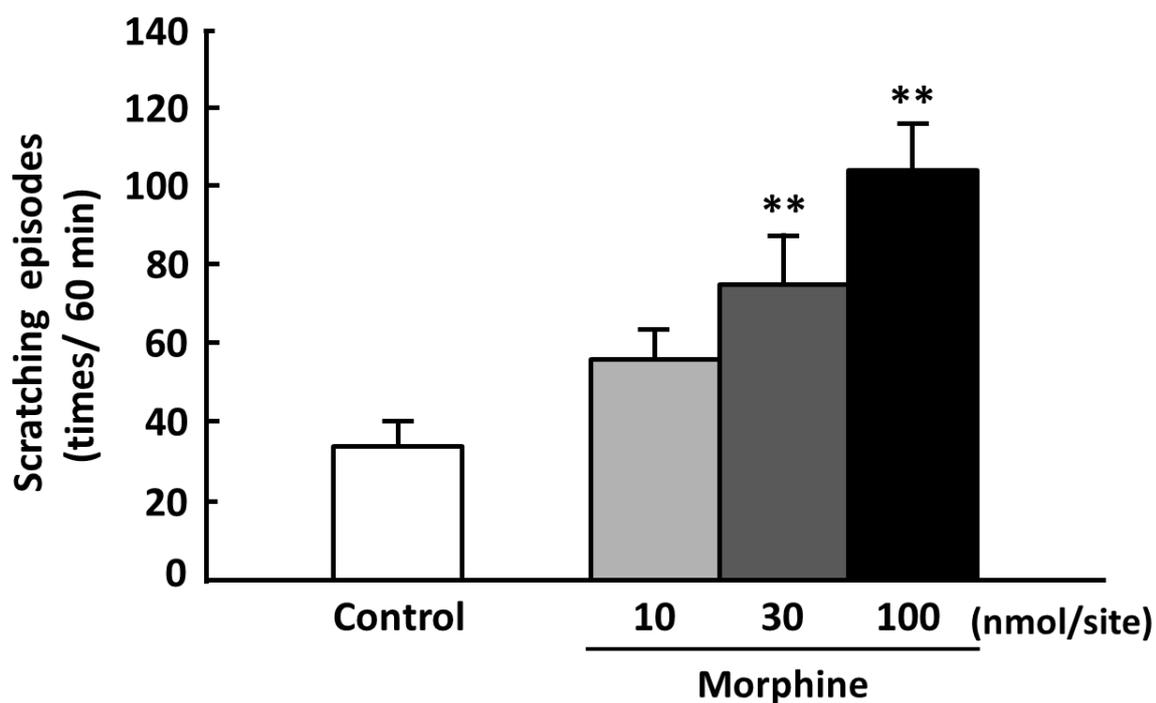


Fig. 16 Morphine - induced scratching episodes in ICR mice

Morphine was injected intradermally into the rostral back, and the number of scratching episodes was counted for 60 min.

Each column and vertical bar represents the mean \pm S.E.M. (n=10).

** : Significantly different from the control group at $p < 0.01$ (Dunnett's test).

3. ヒスタミン誘発搔破行動ならびにモルヒネ誘発搔破行動の比較

Table 2 に、ヒスタミンならびにモルヒネ誘発搔破行動誘発の ED₅₀ 値を示した。ヒスタミンの ED₅₀ 値は 25.0 (15.5 - 37.2) nmol/site であった。モルヒネの ED₅₀ 値は 27.3 (13.2 - 49.9) nmol/site であり、両者の ED₅₀ 値はほぼ同程度であった。

Table 2 ED₅₀ values for histamine - and morphine - induced scratching episodes

Agonists	ED₅₀ values, nmol/site, i.d. (95% confidence limits)
Histamine	25.0 (15.5 — 37.2)
Morphine	27.3 (13.2 — 49.9)

4. ヒスタミンならびにモルヒネの併用による効果

Fig.17 に、ヒスタミン[30 nmol/site, 5%の危険率で対照群 (Control) と比べ有意差を示す用量]およびモルヒネ[30 nmol/site, 5%の危険率で対照群 (Control) と比べ有意差を示す用量]の併用効果を示した。ヒスタミンおよびモルヒネを併用すると、それぞれ単独で投与した場合と比べて有意な搔破行動の増加を示した。

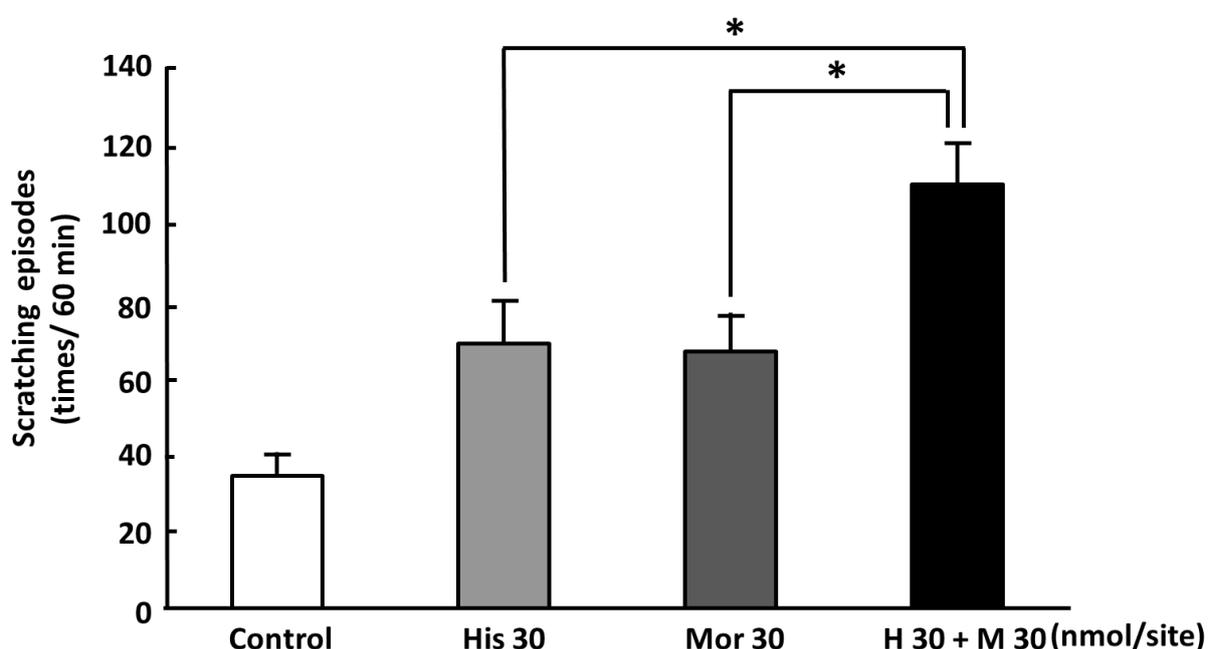


Fig. 17 Scratching episodes induced by simultaneous injection of histamine and morphine

His: histamine, Mor: morphine. H: histamine, M: morphine

Histamine and morphine were injected intradermally at 30 nmol/site each which showed a significant effect at $p < 0.05$ compared with the control group. Each column and vertical bar represents the mean \pm S.E.M. (n=10).

*: Significantly different from histamine- or morphine- treated

group at $p < 0.05$ (Dunnett's test).

5. ヒスタミン誘発搔破行動に対するクロルフェニラミンならびにナロキシソンの効果

Fig.18 に、ヒスタミン誘発搔破行動に対するクロルフェニラミンならびにナロキシソンの効果の結果を示した。その結果、クロルフェニラミンおよびナロキシソンは用量依存性の抑制作用を示した。クロルフェニラミンは、0.3 mg/kg では有意差は認められなかったが、1 および 3 mg/kg の用量では対照群 (His 100) と比べ有意な抑制作用を示した。ナロキシソンは 0.3 および 1 mg/kg の用量で対照群 (His 100) と比べ有意差が認められた。

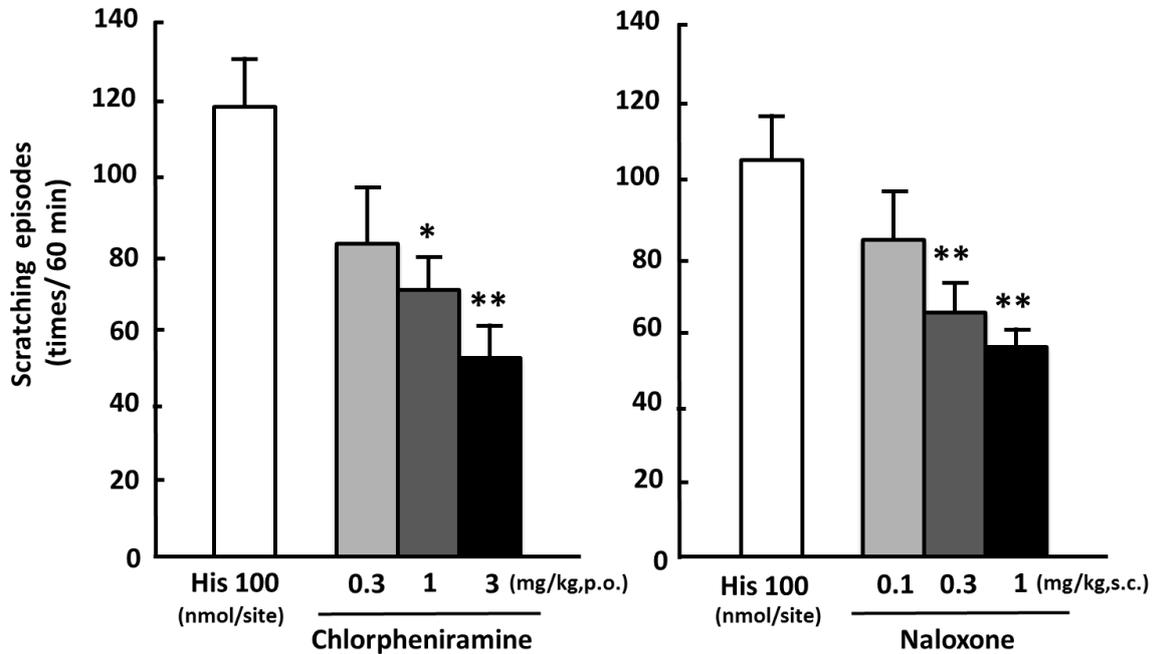


Fig. 18 Effects of chlorpheniramine and naloxone on histamine - induced scratching episodes

Chlorpheniramine was injected orally 60 min before histamine injection. Naloxone was injected subcutaneously 15 min before histamine injection.

His: histamine

Each column and vertical bar represents the mean \pm S.E.M.(n=10).

***: Significantly different from the histamine - treated group at p

< 0.05 and $p < 0.01$, respectively (Dunnett's test).

6. モルヒネ誘発搔破行動に対するナロキソンならびにクロルフェニラミンの効果

Fig.19 に、モルヒネ誘発搔破行動に対するナロキソンならびにクロルフェニラミンの効果に関する結果を示した。ナロキソンならびにクロルフェニラミンは、モルヒネ誘発搔破行動を用量依存性に抑制した。ナロキソンは 0.01 mg/kg では有意差は観察されなかったが、0.03 および 0.1 mg/kg では有意な抑制作用を示した。クロルフェニラミンは、0.3 mg/kg では有意な差は観察されなかったが、1 および 3 mg/kg では有意差が観察された。

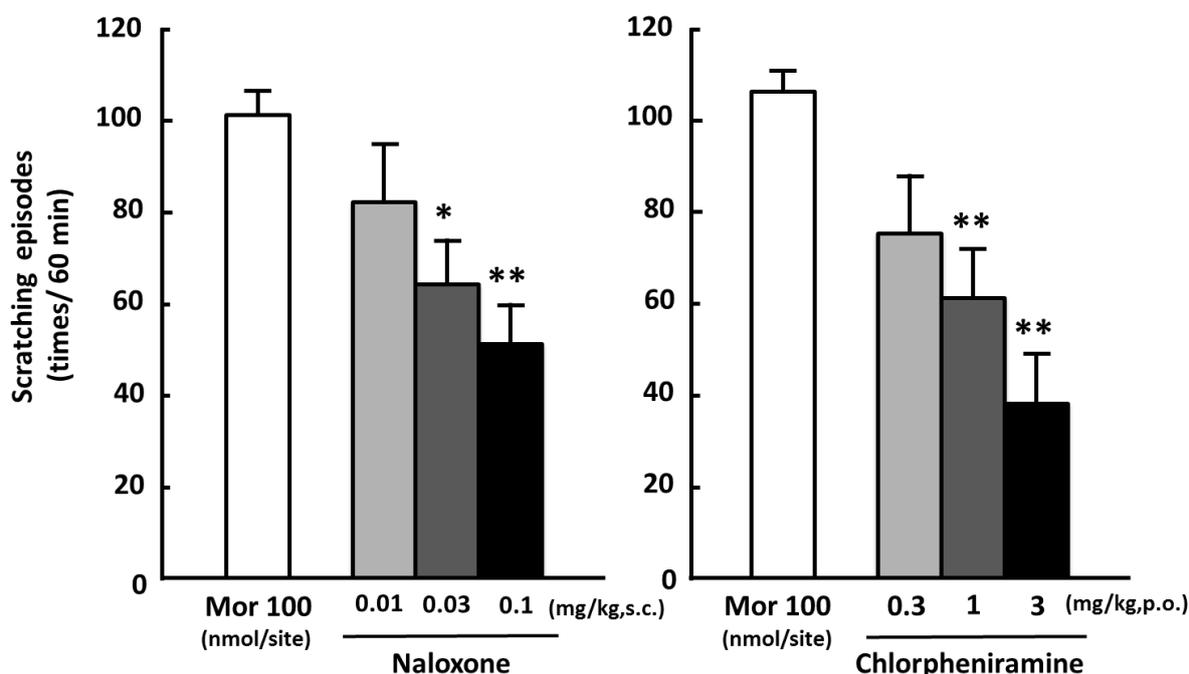


Fig. 19 Effects of naloxone and chlorpheniramine on morphine - induced scratching episodes

Naloxone was injected subcutaneously 15 min before morphine injection. Chlorpheniramine was injected orally 60 min before morphine injection.

Mor: morphine

Each column and vertical bar represents the mean \pm S.E.M.(n=10).

***: Significantly different from the morphine - treated group at p

< 0.05 and $p < 0.01$, respectively. (Dunnett's test).

7. ヒスタミンおよびモルヒネ誘発搔破行動に対するクロルフェニラミンおよびナロキソンの比較

Table 3 に、ヒスタミンならびにモルヒネ誘発搔破行動に対するクロルフェニラミンおよびナロキソンの拮抗作用の ID₅₀ 値を示した。ヒスタミン誘発搔破行動に対するクロルフェニラミンの ID₅₀ は 2.08 (1.34 - 4.67) mg/kg であり、モルヒネ誘発搔破行動に対するクロルフェニラミンの ID₅₀ は 1.36 (0.94 - 2.20) mg/kg であった。ヒスタミン誘発搔破行動に対するナロキソンの ID₅₀ は 1.70 (0.86 - 10.7) mg/kg であり、モルヒネ誘発搔破行動に対するナロキソンの ID₅₀ は 0.18 (0.12 - 0.33) mg/kg であった。

Table 3 ID₅₀ values for chlorpheniramine and naloxone on histamine - or morphine - induced scratching episodes

Agonists	Antagonists	ID₅₀ values, mg/kg (95% confidence limits)
Histamine (i.d.)	Chlorpheniramine (p.o.)	2.08 (1.34 – 4.67)
Histamine (i.d.)	Naloxone (s.c.)	1.70 (0.86 – 10.7)
Morphine (i.d.)	Chlorpheniramine (p.o.)	1.36 (0.94 – 2.20)
Morphine (i.d.)	Naloxone (s.c.)	0.18 (0.12 – 0.33)

8. ヒスタミン誘発搔破行動に対するクロルフェニラミンおよびナロキシソンの併用効果

Fig. 20 に、ヒスタミン誘発搔破行動に対するクロルフェニラミン (1 mg/kg, ヒスタミン誘発搔破行動に対して 5%の危険率で有意差を示す用量) およびナロキシソン (1 mg/kg, ヒスタミン誘発搔破行動に対して 5%の危険率で有意差を示す用量) の併用効果に関する結果を示した。クロルフェニラミンとナロキシソンの併用により、クロルフェニラミンおよびナロキシソン単独の抑制作用と比べて有意な差が観察された。

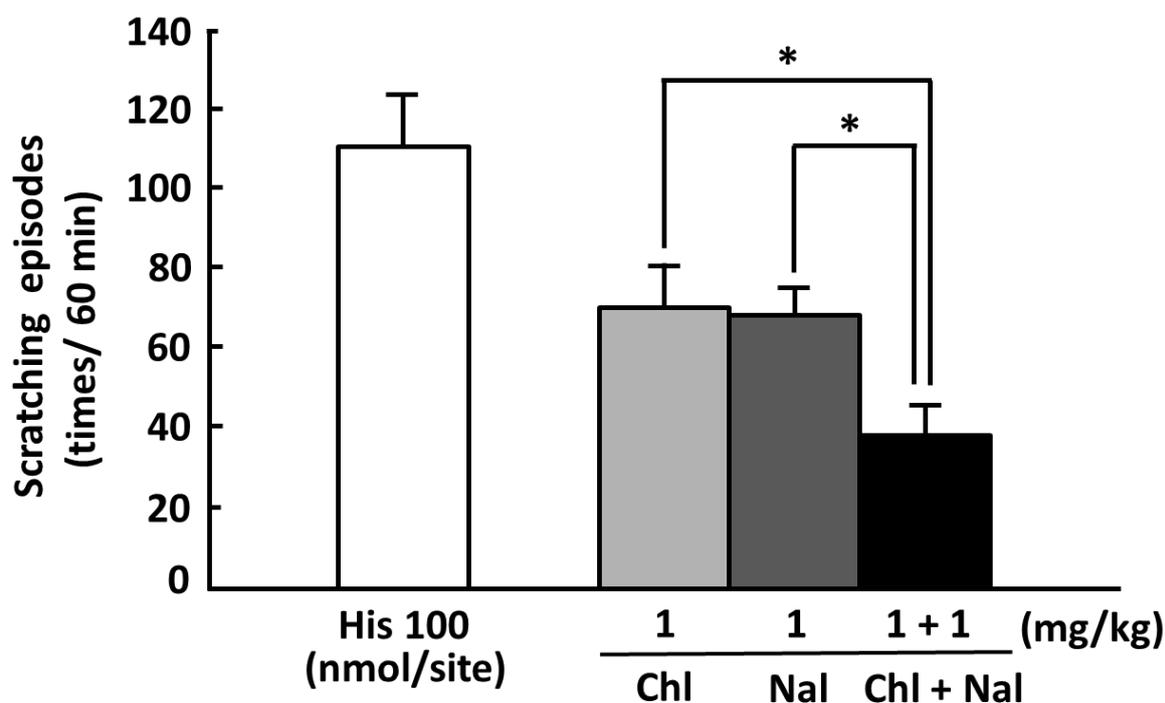


Fig. 20 Effects of simultaneous injection of chlorpheniramine and naloxone on histamine - induced scratching episodes

His: histamine, Chl: chlorpheniramine, Nal: naloxone.

Chlorpheniramine was injected orally 60 min before histamine injection.

Naloxone was injected subcutaneously 15 min before histamine injection.

Each column and vertical bar represents the mean \pm S.E.M.(n=10).

*: Significantly different from the control group at $p < 0.05$ (Dunnett's test).

9. モルヒネ誘発搔破行動に対するナロキソンおよびクロルフェニラミンの併用効果

Fig.21 に、モルヒネ誘発搔破行動に対するナロキソン (0.03 mg/kg, モルヒネ誘発搔破行動に対して 5%の危険率で有意差を示す用量) およびクロルフェニラミン (1 mg/kg, モルヒネ誘発搔破行動に対して 5%の危険率で有意差を示す用量) の併用効果に関する結果を示した。クロルフェニラミンとナロキソンの併用の場合は、クロルフェニラミンおよびナロキソン単独の場合と比べて有意に低い搔破行動の値を示した。

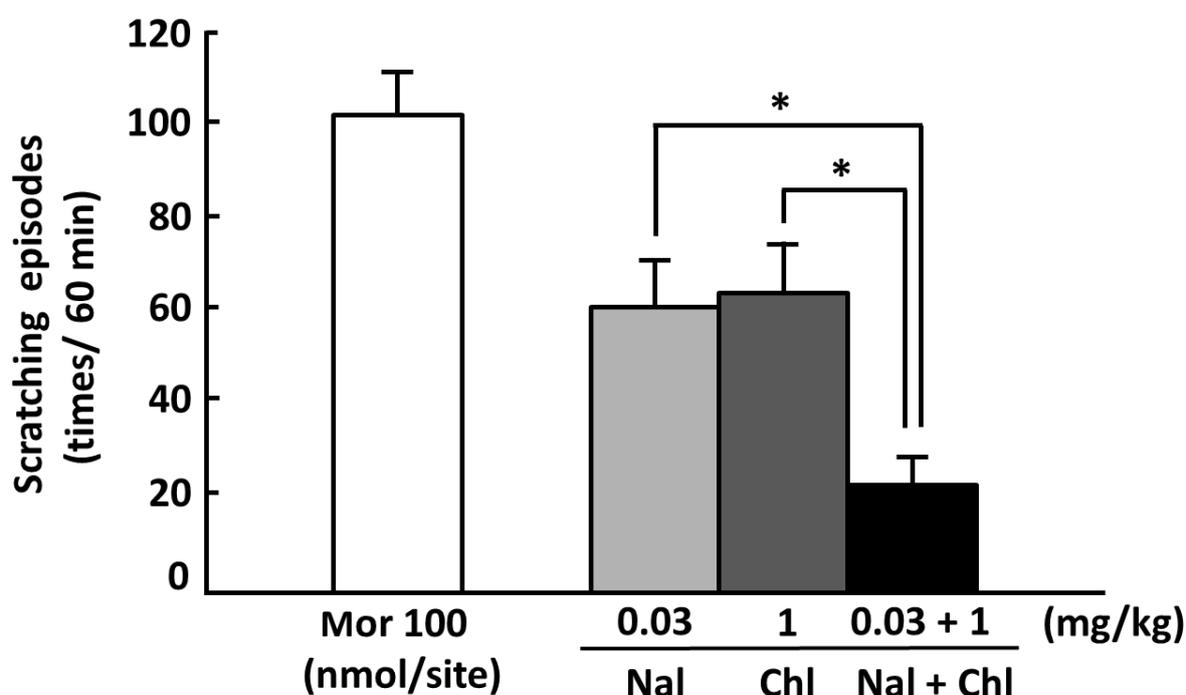


Fig. 21 Effects of simultaneous injection of chlorpheniramine and naloxone on morphine - induced scratching episodes

Mor: morphine, Chl: chlorpheniramine, Nal: naloxone.

Chlorpheniramine was injected orally 60 min before histamine injection.

Naloxone was injected subcutaneously 15 min before histamine injection.

Each column and vertical bar represents the mean \pm S.E.M.(n=10).

*: Significantly different from the control group at $p < 0.05$ (Dunnett's

test).

〔考察〕

本実験で、著者はヒスタミンを ICR 系マウスの背部皮内に投与した結果、用量依存性の搔破行動を示すことを見出した。搔破行動の回数は、100 nmol/site の用量で 60 分間の観察で、 112 ± 13 回 ($n=10$) であった。ほぼ同様の知見が、Maekawa ら(42) および Inagaki ら(9) により、報告されている。モルヒネの皮内投与でも搔破行動が観察された。その回数は、100 nmol/site の用量で 104 ± 12 回 ($n=10$) であった。Yamamoto ら(11) もほぼ同様の結果を報告している、すなわち、ヒスタミン 100 nmol/site で生じる搔破行動は、モルヒネ 100 nmol/site で誘発される搔破行動とほぼ同程度であることが判明した。さらに ED₅₀ 値で比較してみても両薬物の効果は、ほぼ同程度であった。すなわち、ヒスタミンの ED₅₀ 値は 25.0 (15.5 - 37.2) nmol/site であり、モルヒネのそれは 27.3 (13.2 - 49.9) nmol/site であった。本実験条件で、ヒスタミンとモルヒネの同時投与により相加効果が観察された。相加作用とは、2 種類の薬物の作用が加え算的に現れることであり、2 種類の薬物の効果の作用機序は同様であると考えられている。

一方、モルヒネによって誘発される搔破行動は中枢神経系由来であるという報告が、2,3 見受けられる [Kuraishi ら(12) や Ko ら(43)]。この点に関して Yamamoto ら(11) は中枢神経系のオピオイド神経を刺激すれば、顔面の搔破行動が、そして末梢神経系のオピオイド刺激では体部の搔破行動が認められると述べている。さらに、Yamamoto ら(11) はモルヒネにより生ずる搔破行動は、中枢神経系に移行しないナロキソンメチオジドで拮抗されることから末梢神経系由来であると報告している。これらの知見から、著者も本実験で得られたモルヒネ誘発搔破行動は末梢神経系由来であると考えている。

本研究で、ヒスタミン誘発搔破行動がクロルフェニラミンだけでなく、ナロキソンでも抑制されることを見出した。Inagaki ら(44) もヒスタミンにより誘発された搔破行動がナロキソンにより拮抗されることを報告している。また、モルヒネ誘発搔破行動がナロキソンだけでなく、クロルフェニラミンでも抑制さ

れることが判明した。Yamamoto ら(11) も、クロルフェニラミンは、モルヒネ誘発搔破行動を抑制したことを報告している。この知見に加えて、臨床で、ナロキソン等のオピオイド拮抗薬が、アトピー性皮膚炎患者の痒みを軽減するという成績が報告されている(35) (45) 。また、動物実験でもアトピー性皮膚炎モデルである NC/Nga マウスの搔破行動をオピオイド μ 受容体拮抗薬が抑制するとの報告がある(29) 。これらの知見は、オピオイド μ 受容体がヒスタミン誘発の痒みに密接に関与することを裏付けている。モルヒネはヒトの皮膚組織のマスト細胞(46) (47) およびラットの腹腔単離マスト細胞から、ヒスタミンを遊離することが知られている(48) 。一方、ヒスタミン誘発搔破行動に対するナロキシソンの効果は、モルヒネ誘発搔破行動に比較するとやや弱い、0.3mg/kg 用量で有意な拮抗作用を示した。さらに、著者はヒスタミン誘発搔破行動もモルヒネ誘発搔破行動もクロルフェニラミンとナロキシソンを併用すると、それぞれ単独と比べて、有意な抑制効果を示すことを見出した。これらの知見は、 μ オピオイド受容体がヒスタミン H_1 受容体と相互に関連して、痒みの誘発に関与しているということを強く示唆している (Fig. 22)。しかし、この段階では、ナロキシソンが末梢神経系に作用しているかどうかは不明である。

以上の知見から、ICR 系マウスの搔破行動においてヒスタミン H_1 受容体とオピオイド μ 受容体は、密接に関連する事が結論された。

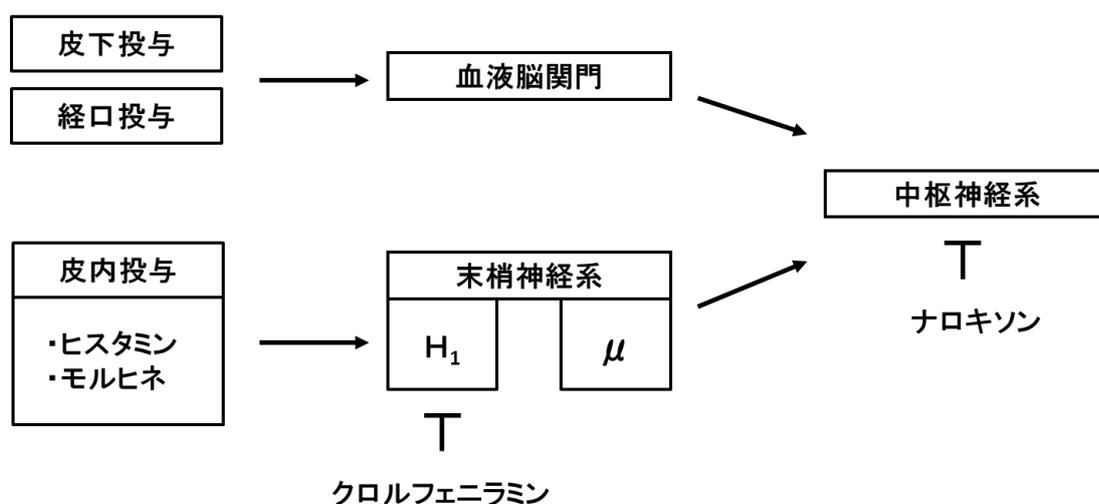


Fig. 22 Relationship between histamine H₁ receptor and opioid μ receptor of itching

第3章 ICR系マウスの搔破行動におけるヒスタミン H₁ 受容体とオピオイド κ 受容体の関連

〔緒言〕

第2章において著者は、ICR系マウスの搔破行動にヒスタミン H₁ 受容体とオピオイド μ 受容体が密接に関与することを見出した。Togashi ら(26) は、オピオイド κ 作用薬であるナルフラフィンが、サブスタンス P およびヒスタミン誘発搔破行動を抑制することを報告している。また、サブスタンス P 誘発搔破行動に対するナルフラフィンの抑制作用がオピオイド κ 拮抗薬であるノルビナルトルフィミンにより拮抗されることも見出している。また、中尾(49) は、NC/Nga マウスの搔破行動に対してナルフラフィンが有効であると報告している。アトピー性皮膚炎のかゆみにヒスタミンが密接な関連があることは周知の事実である。すなわち、アトピー性皮膚炎患者の血中ヒスタミン濃度は健常人と比べて有意に高いことが報告されており(50)、抗ヒスタミン薬（ヒスタミン H₁ 受容体拮抗薬）がアトピー性皮膚炎に有効であることは良く知られている(51)。

ナルフラフィンは、現在、臨床で血液透析患者における全身の強い痒みの治療に用いられている(52)。血液透析患者に見られる搔痒症は、炎症を伴わない全身性の強い痒みであるが、はっきりした原因は判明していない。しかし、この痒みは中枢性であると理解されている。一方、Inui (19) は、ナルフラフィンが血液透析患者の搔痒のみならずアトピー性皮膚炎患者に有用であることを報告している。

そこで、著者は、ICR系マウスを用いて、ヒスタミンならびにオピオイド κ 受容体拮抗薬であるノルビナルトルフィミン誘発搔破行動に対する、クロルフェニラミンならびにナルフラフィンの効果を検討するとともに、クロルフェニ

ラミンとナルフラフィンとの併用効果を検討し、ICR 系マウスの搔破行動に対するヒスタミン H₁ 受容体ならびにオピオイド κ 受容体の関与について検討した。また、オピオイド μ 受容体およびオピオイド κ 受容体の関連についても検討した。

〔実験材料ならびに実験方法〕

1. 実験動物

実験には、雄性の ICR 系マウス（8 - 18 週齢, 30 - 35 g, 日本チャールズリバー, 静岡）を用いた。動物は $24 \pm 2^\circ\text{C}$, 湿度 $55 \pm 15\%$ の動物飼育室で飼育し, 飼料（オリエンタル酵母, 東京）および飲料水は自由に摂取させた。すべての実験手順は, 安田女子大学動物実験ガイドラインに従って行った。

2. 使用薬物

使用薬物は, ヒスタミン二塩酸塩（和光純薬, 大阪）, d-クロルフェニラミンマレイン酸塩（和光純薬, 大阪）, モルヒネ塩酸塩（武田薬品, 大阪）, ナロキソン塩酸塩（シグマーアルドリッチ, 東京）, ノルビナルトルフィミン二塩酸塩（和光純薬, 大阪）およびナルフラフィン（東レー鳥居, 東京）である。ヒスタミン, モルヒネおよびノルビナルトルフィミンは, 生理食塩液に溶解し, 0.02 ml の用量で背部皮内に投与した。クロルフェニラミン, ナロキソンおよびナルフラフィンは, 蒸留水に溶解し, 10 g につき 0.1 ml の用量で経口ゾンデを用いて, ヒスタミンおよびノルビナルトルフィミン投与の 60 分前に投与した。投与計画と投与方法は Fig. 23 に示した如く, クロルフェニラミン, ナロキソンおよびナルフラフィンは, ヒスタミン, モルヒネもしくはノルビナルトルフィミン皮内投与の 60 分前に経口投与した。その後, 10 分間観察用ケージ内で順化した後, ヒスタミン, モルヒネもしくはノルビナルトルフィミンを皮内注射し, 60 分間搔破行動を観察した。使用薬物の化学構造は Fig. 24 を示した（塩類は省略した）。

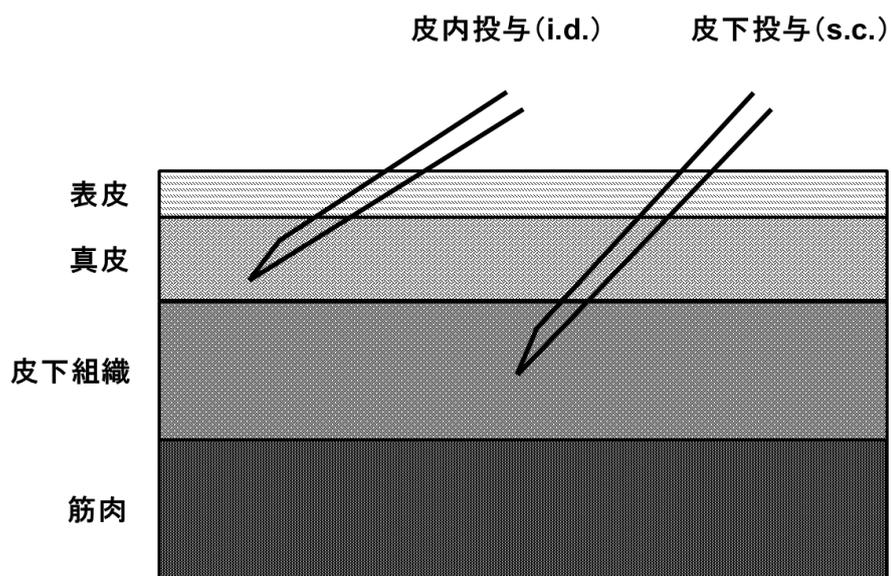
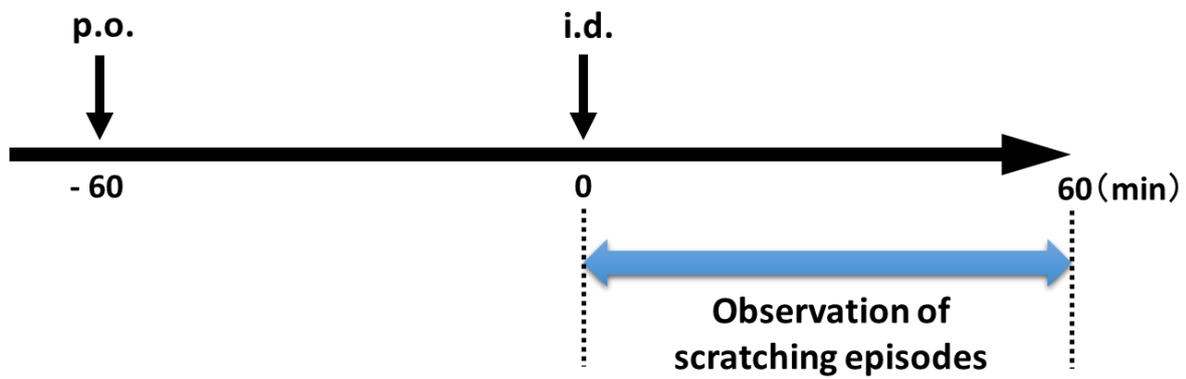


Fig. 23 Experimental schedule and injection method

経口投与 (p.o.) : クロルフェニラミン, ナロキソン, ナルフラフィン

皮内投与 (i.d.) : ヒスタミン, モルヒネ, ノルビナルトルフィミン

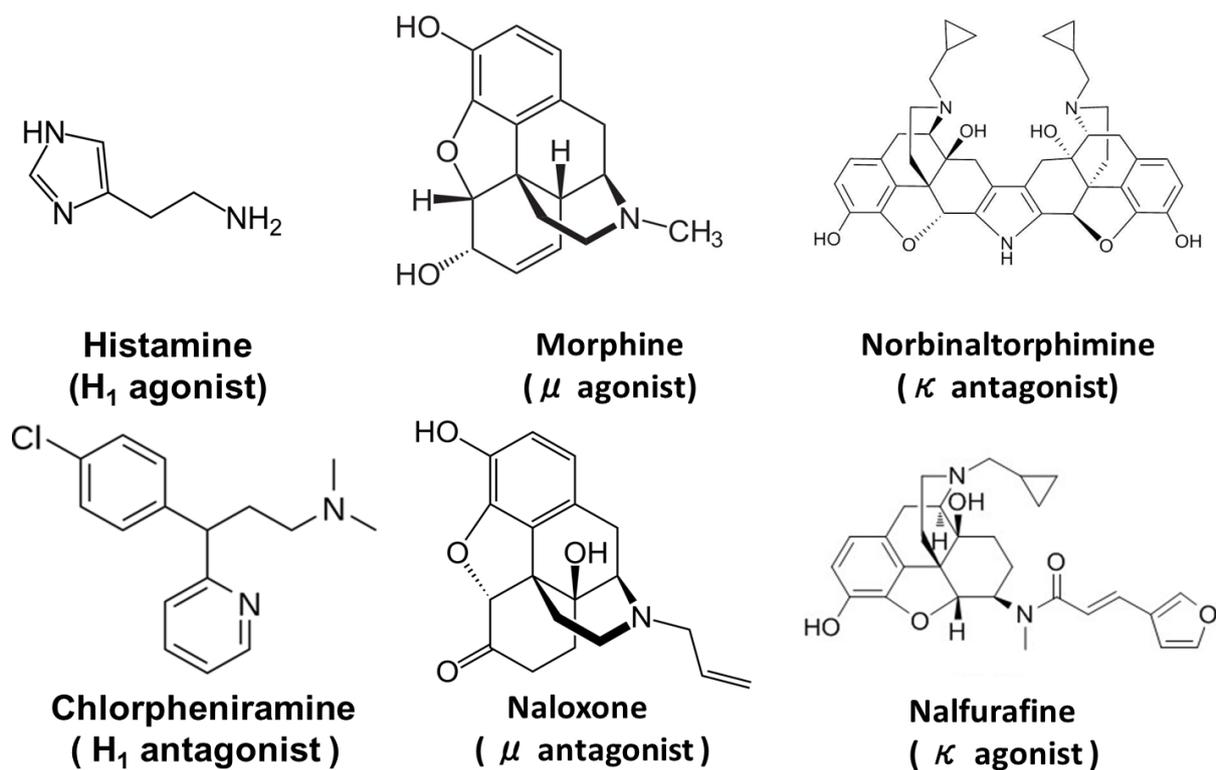


Fig. 24 Chemical structures of drugs used in this chapter

4. 搔破行動の観察

搔破行動の観察は、Kuraishi ら(6) の方法に準じて行った。すなわち環境に順応させるため、薬物投与開始 10 分前に、マウスをアクリル製観察用ケージ（円筒形、直径 12 cm、高さ 18 cm）に入れた（Fig. 14）。搔破行動の観察は目視で行った。搔破行動の観察は、二重盲検法（薬物投与を担当する者および搔破行動を観察する者は実験の内容を知らされていない）で行った。搔破行動は後肢で注射部位もしくはその付近を引っ掻き、後肢を床におろすまでを 1 回としてカウントした。

5. 統計処理

統計学的有意差は、一元配置分散分析および Dunnett's 法を用いて検定し、危険率 5%以下の場合を有意差ありと判定した。実験成績はすべて平均値±標準誤差で示した(25)。ED₅₀ 値および ID₅₀ 値は Probit 法を用いて算出した。

〔実験成績〕

1. ヒスタミンならびにノルビナルトルフィミン誘発搔破行動

Fig. 25 に示したように、ヒスタミンは、30 および 100 nmol/site の用量で対照群 (Control) に比べ有意な搔破行動の増加を示した。ED₅₀ 値は 25.0 (15.5 - 37.2) nmol/site であった。ノルビナルトルフィミンも 30 および 100 nmol/site の用量で有意な搔破行動の増加を示した。ED₅₀ 値は 13.0 (7.1 - 18.7) nmol/site であり、搔破行動誘発作用はモルヒネより強力であった。

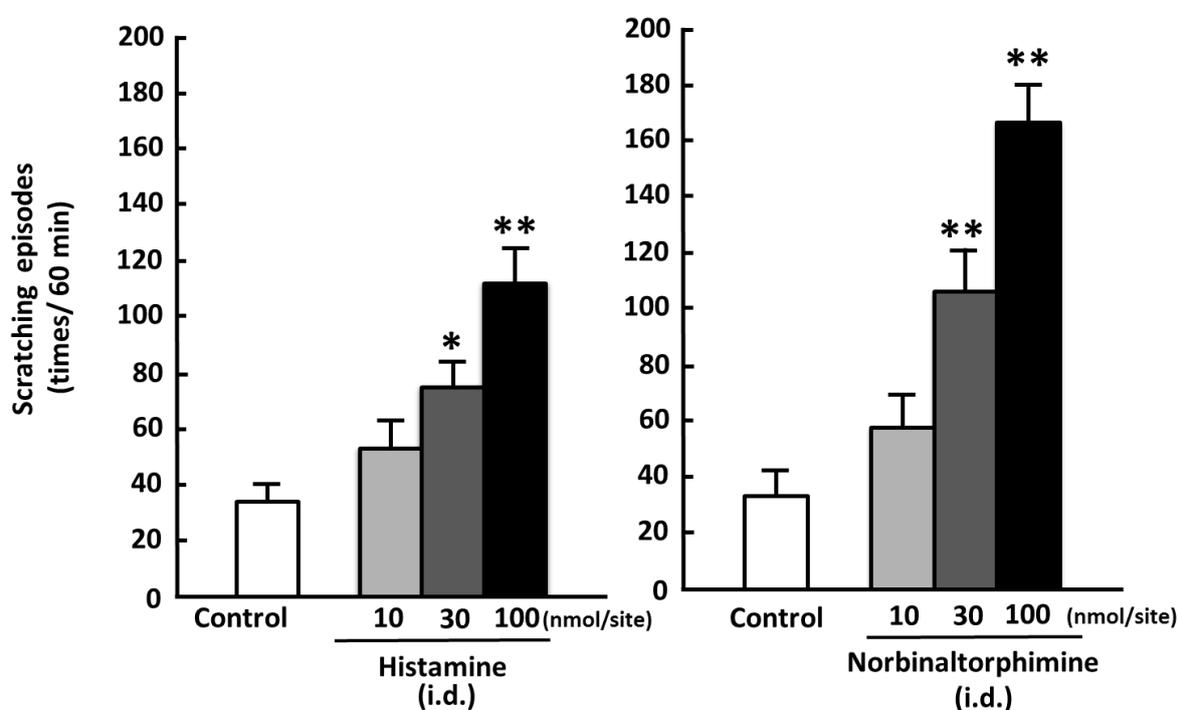


Fig. 25 Histamine- and norbinaltorphimine- induced scratching episodes in ICR mice

Histamine and norbinaltorphimine were injected intradermally into the rostral back and the number of scratching episodes was counted for 60 min. Each column and vertical bar represents the mean \pm S.E.M. (n=10). *, **: Significantly different from the control group at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively (Dunnett's test).

2. ヒスタミン誘発搔破行動に対するクロルフェニラミンおよびナルフラフ

インの効果

Fig. 26 に示したようにクロルフェニラミンは、ヒスタミン誘発搔破行動を用量依存性に抑制した。1 および 3 mg/kg の用量で有意差が観察された。ID₅₀ 値は 2.08 (1.34 - 4.67) mg/kg であった。ナルフラフィンも、ヒスタミン誘発搔破行動を用量依存性に抑制した。有意差は 0.01 および 0.03 mg/kg の用量で観察された。ID₅₀ 値は 0.010 (0.007 - 0.014) mg/kg であった (Table 4)。

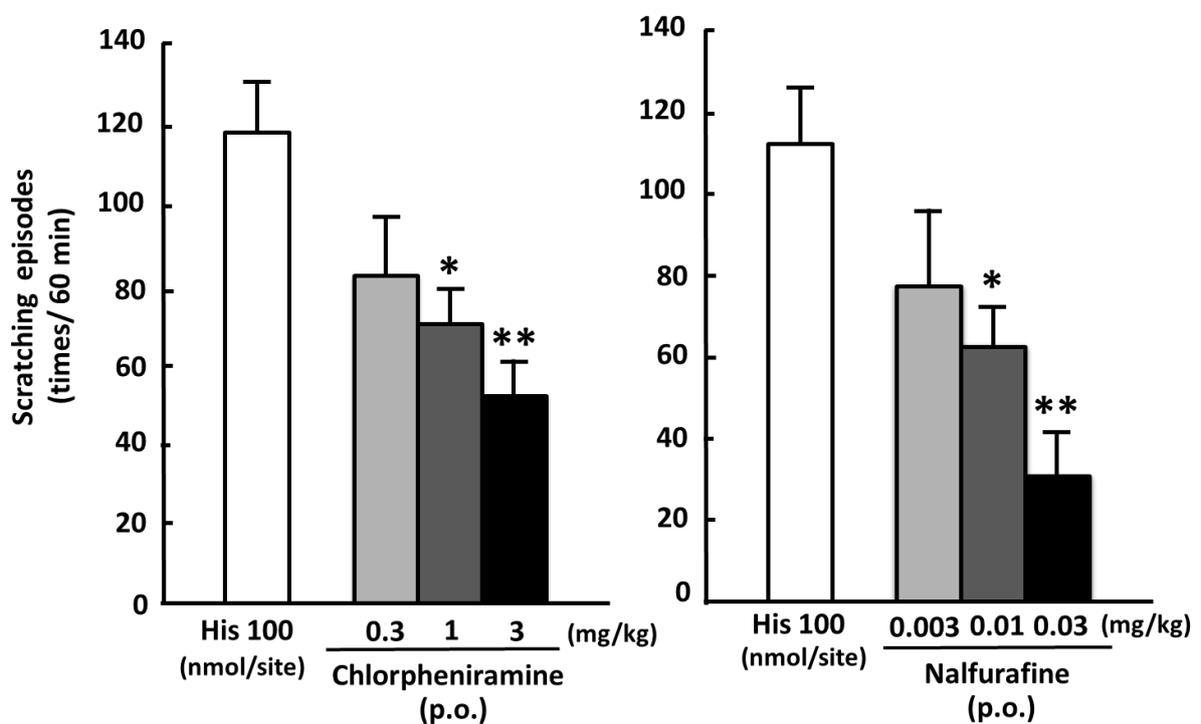


Fig. 26 Effects of chlorpheniramine and nalfurafine on histamine - induced scratching episodes

Chlorpheniramine and nalfurafine were injected orally 60 min before histamine injection.

Each column and vertical bar represents the mean \pm S.E.M.(n=10).

*,** : Significantly different from the histamine-treated group at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively (Dunnett's test).

3. ノルビナルトルフィミン誘発搔破行動に対するクロルフェニラミンおよび

ナルフラフィンの効果

Fig. 27 に示したように、クロルフェニラミンは 3 および 10 mg/kg の用量でノルビナルトルフィミン誘発搔破行動を有意に抑制した。ID₅₀ 値は 4.19 (2.87 - 6.85) mg/kg であった。ナルフラフィンも、ノルビナルトルフィミン誘発搔破行動を用量依存的に抑制した。有意差は 0.01 および 0.03 mg/kg の用量で観察された。ID₅₀ 値は 0.012 (0.008 - 0.018) mg/kg であった (Table 4)。

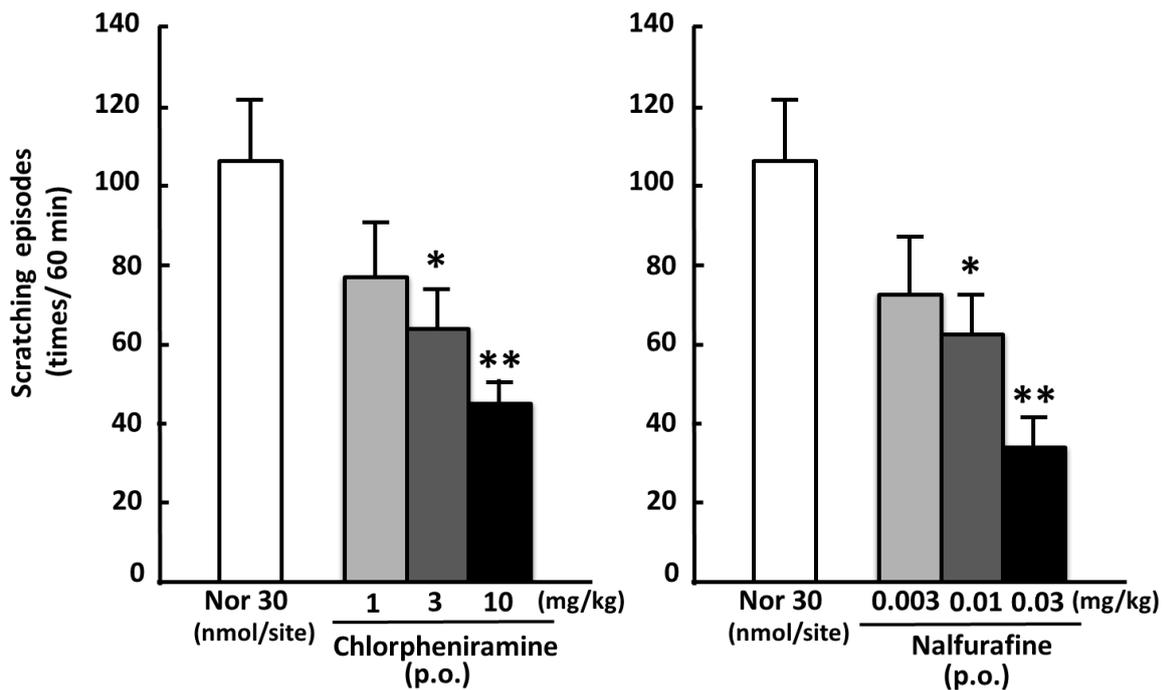


Fig. 27 Effects of chlorpheniramine and nalfurafine on norbinaltorphimine - induced scratching episodes

Chlorpheniramine and nalfurafine were injected orally 60 min before histamine injection.

Each column and vertical bar represents the mean \pm S.E.M.(n=10).

*, **: Significantly different from the norbinaltorphimine - treated group at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively (Dunnett's test).

4. ヒスタミンおよびノルビナルトルフィミン誘発搔破行動に対するクロルフ

ェニラミンおよびナルフラフィンの効果の比較

Table 4 に、ヒスタミンならびにノルビナルトルフィミン誘発搔破行動に対するクロルフェニラミンおよびナルフラフィンの拮抗作用の ID₅₀ 値を示した。

Table 4 ID₅₀ values for chlorpheniramine and nalfurafine on scratching episodes induced by histamine and norbinaltorphimine

Pruritic agents	Anti-pruritic agents	ID₅₀ values, mg/kg (95% confidence limits)
Histamine (i.d.)	Chlorpheniramine (p.o.)	2.08 (1.34 – 4.67)
Histamine (i.d.)	Nalfurafine (p.o.)	0.010 (0.007 – 0.014)
*nor-BNI (i.d.)	Chlorpheniramine (p.o.)	4.19 (2.87 – 6.85)
nor-BNI (i.d.)	Nalfurafine (p.o.)	0.012 (0.008 – 0.018)

*** nor-BNI: norbinaltorphimine**

5. ヒスタミン誘発搔破行動に対するクロルフェニラミンならびにナルフラフ

インの併用効果

結果は Fig. 28 に示したように、単独でヒスタミン誘発搔破行動に対して有意差が認められたクロルフェニラミン 1 mg/kg およびナルフラフィン 0.01 mg/kg の併用により、各々単独の抑制効果と比較して、有意に強い効果が認められた。

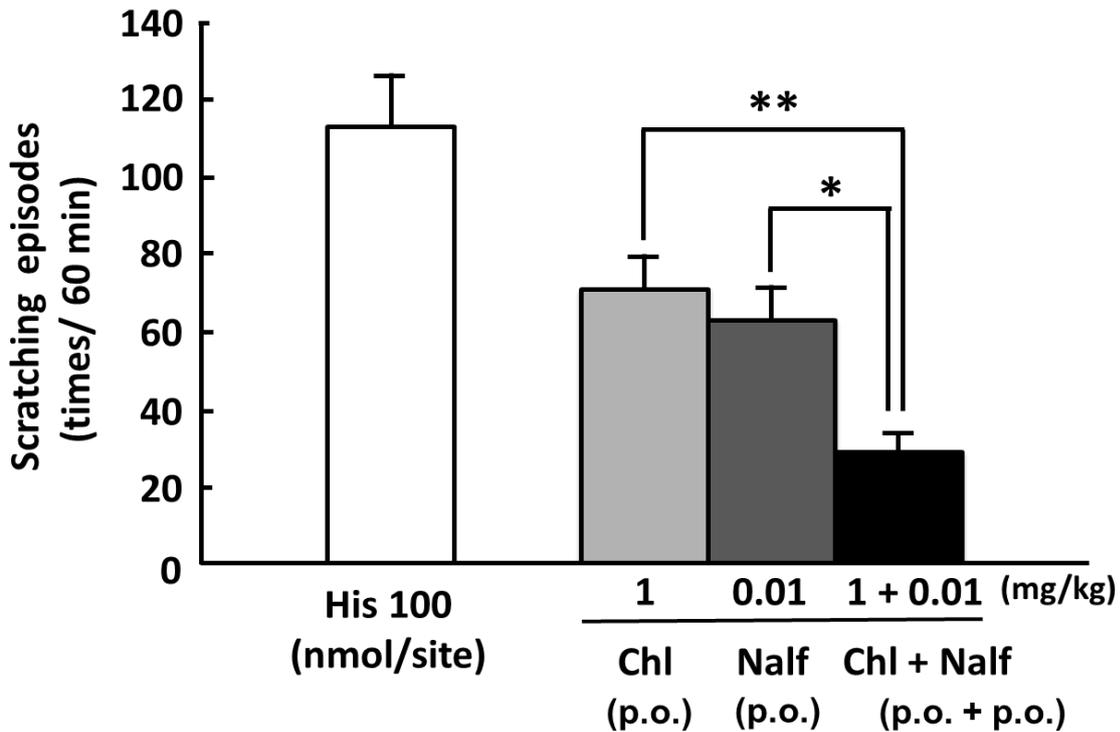


Fig. 28 Effects of simultaneous injection of chlorpheniramine and nalfurafine on histamine - induced scratching episodes

Chl: chlorpheniramine, Nalf: nalfurafine.

Chlorpheniramine was injected orally 60 min before histamine injection. Nalfurafine was injected orally 60 min before histamine injection.

Each column and vertical bar represents the mean \pm S.E.M.(n=10).

*, **: Significantly different from the histamine-treated group at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively (Dunnett's test).

6. ノルビナルトルフィミン誘発搔破行動に対するクロルフェニラミンならび

にナルフラフィンの併用効果

結果は Fig. 29 に示した通り、単独でノルビナルトルフィミン誘発搔破行動に対して有意差が認められたクロルフェニラミン 3 mg/kg およびナルフラフィン 0.01 mg/kg の併用により、各々単独の抑制効果を比較して、有意な効果が認められた。

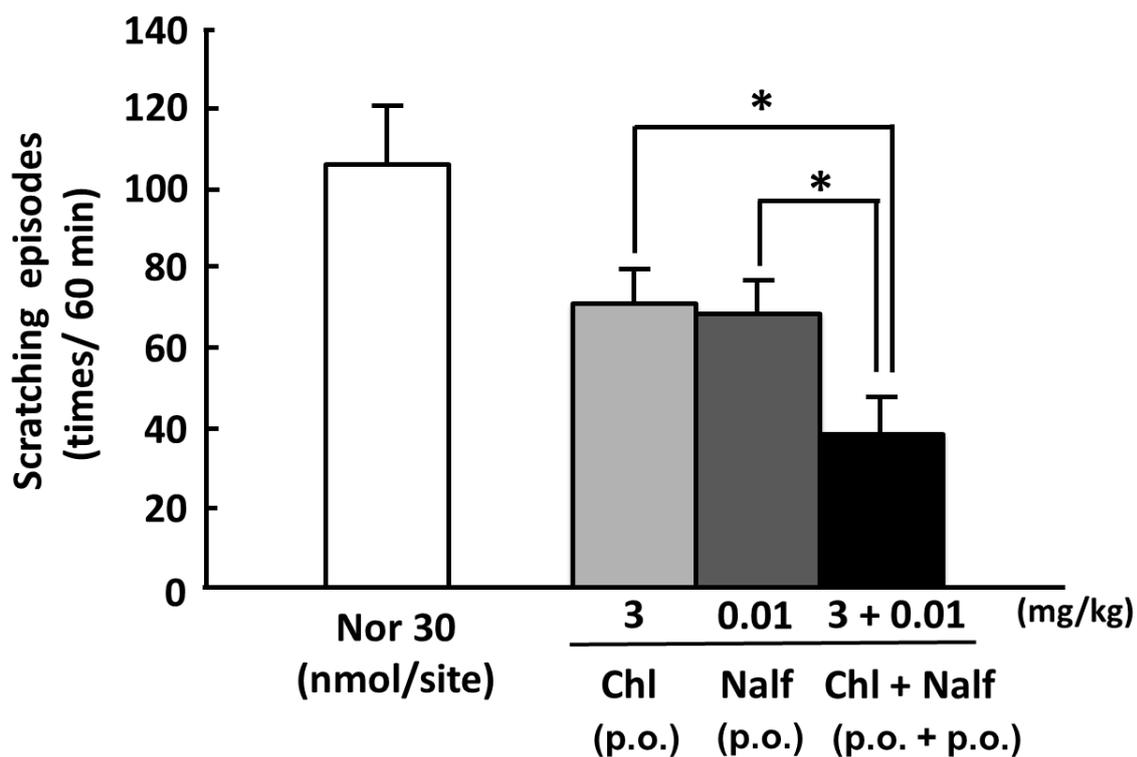


Fig. 29 Effects of simultaneous injection of chlorpheniramine and nalfurafine on norbinaltorphimine - induced scratching episodes

Chl: chlorpheniramine, Nalf: nalfurafine.

Chlorpheniramine was injected orally 60 min before histamine injection.

Nalfurafine was injected orally 60 min before histamine injection.

Each column and vertical bar represents the mean \pm S.E.M.(n=10).

*: Significantly different from the norbinaltorphimine-treated group at $p < 0.05$ (Dunnett's test).

7. モルヒネ誘発搔破行動に対するナルフラフィンの効果

結果は Fig. 30 に示したようにナルフラフィンは、モルヒネ誘発搔破行動を用量依存性に抑制した。0.003 および 0.01 mg/kg の用量で有意差が観察された。

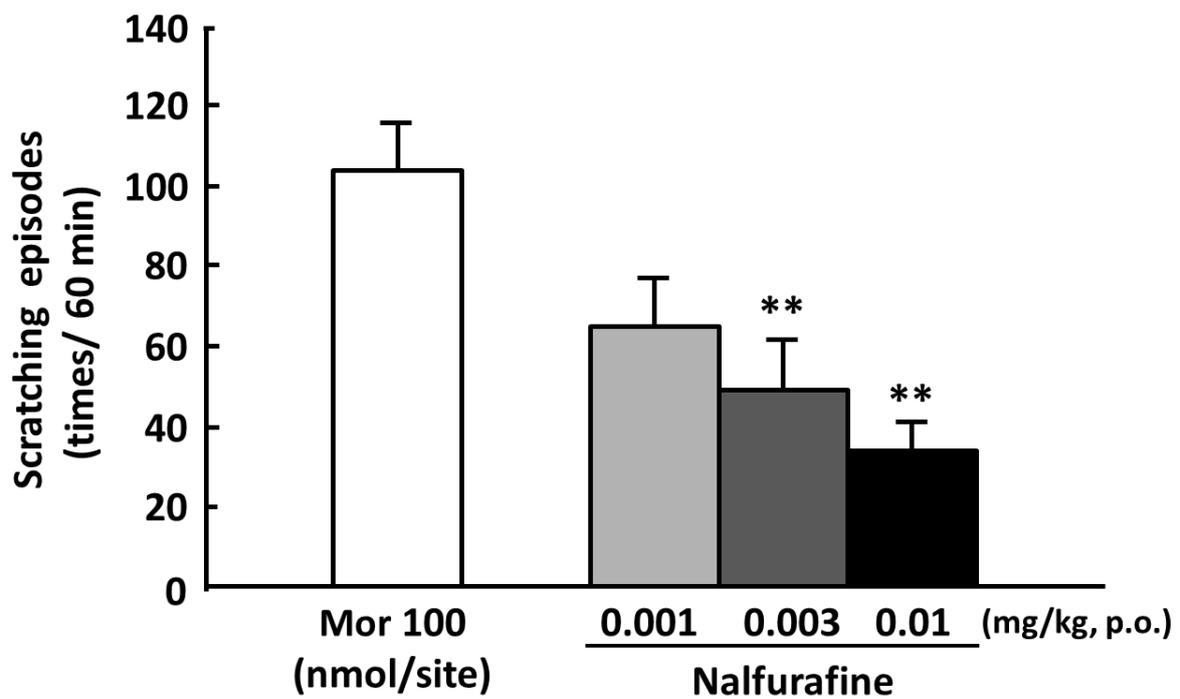


Fig 30. Effect of nalufurafine on morphine-induced scratching episodes
Nalufurafine was injected orally 60 min before morphine injection. Each column and vertical bar represents the mean \pm S.E.M.(n=10). **: Significantly different from the morphine-treated group at $p < 0.01$, respectively (Dunnett's test).

8. ノルビナルトルフィミン誘発搔破行動に対するナロキソンの効果

結果は Fig. 31 に示したように、ナロキソンは 1 および 3 mg/kg の用量でノルビナルトルフィミン誘発搔破行動を有意に抑制した。

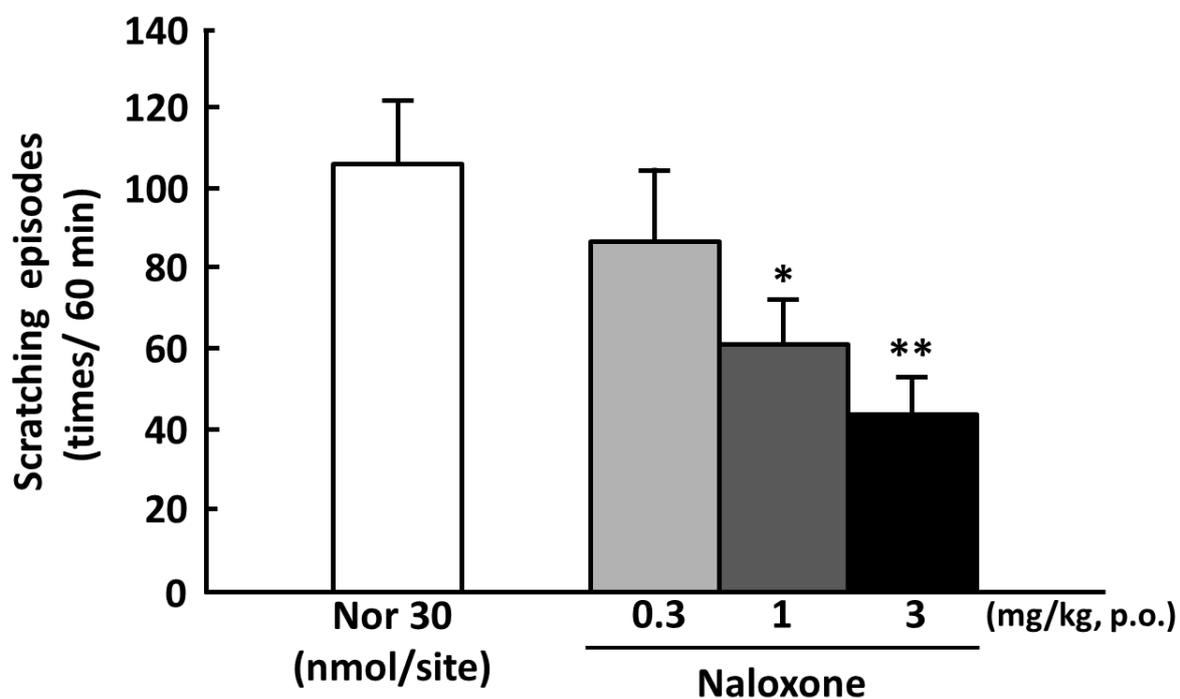


Fig. 31 Effect of naloxone on norbinaltorphimine-induced scratching episodes

Naloxone was injected orally 60 min before naloxone injection.

Each column and vertical bar represents the mean \pm S.E.M.(n=10).

*, **: Significantly different from the norbinaltorphimine-treated group at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively (Dunnett's test).

9. モルヒネおよびノルビナルトルフィミン誘発搔破行動に対するナロキソン
およびナルフラフィンの効果の比較

Table 5 に、モルヒネ誘発搔破行動に対するナルフラフィンの拮抗作用およびノルビナルトルフィミン誘発搔破行動に対するナロキシソンの ID₅₀ 値を示した。モルヒネ誘発搔破行動に対するナルフラフィンの ID₅₀ 値は 0.003 (0.002 - 0.004) mg/kg であった。ノルビナルトルフィミン誘発搔破行動に対するナロキシソンの ID₅₀ 値は 1.75 (1.28 - 2.70) mg/kg であった。

Table 5 ID₅₀ values for naloxone and nalfurafine on scratch episodes induced by morphine and norbinaltorphimine

Agonists	Antagonists	ID₅₀ values, mg/kg (95% confidence limits)
Morphine (i.d.)	Nalfurafine (p.o.)	0.003 (0.002 - 0.004)
*nor-BNI (i.d.)	Naloxone (s.c.)	1.75 (1.28 - 2.70)

*** nor-BNI: norbinaltorphimine**

〔考察〕

ノルビナルトルフィミンにより搔破行動が誘発されるか否かに関して、Kamei ら(53) は 3 - 30 mg/kg の皮内投与ではなく皮下投与を行い、搔破行動が観察されることを報告している。彼らはヒスタミン遊離物質であるコンパウンド 48/80 の効果も調べて比較しているが、コンパウンド 48/80 は皮内投与を行っており、皮下投与したノルビナルトルフィミンの作用の強さに関しては比較できないと記載している。皮下投与の場合には中枢神経系に対する影響も考えなければならない。本実験で、オピオイド κ 受容体拮抗薬であるノルビナルトルフィミンは皮内投与により用量依存性の搔破行動を示すことが判明した。

著者の検討では、ノルビナルトルフィミンの搔破行動は、ヒスタミンやモルヒネによる搔破行動より強力であったので、オピオイド κ 受容体の方がヒスタミン H_1 受容体やオピオイド μ 受容体より、痒みと関連がより強いのかもかもしれない。ヒスタミン誘発搔破行動はナルフラフィンで用量依存性に拮抗され、またノルビナルトルフィミン誘発搔破行動は、クロルフェニラミンでも拮抗された。ヒスタミン誘発搔破行動が、ナルフラフィンで抑制されるという成績は Togashi ら(26) により既に報告されている。彼らが算出した ID_{50} 値は 0.0073 (0.0042 - 0.0126) mg/kg であり、著者の成績とほぼ同様である。Kamei ら(53) は、ノルビナルトルフィミン皮下投与による搔破行動は、クロルフェニラミンの 0.3 mg/kg で有意に抑制されることを報告している。彼らは ID_{50} 値を算出していないが、著者の本データとほぼ同様であると思われる。

本研究で明らかのように、ヒスタミン誘発搔破行動に対するクロルフェニラミンの拮抗作用はナルフラフィンにより増強された。また、ノルビナルトルフィミン誘発搔破行動に対するナルフラフィンの拮抗作用は、クロルフェニラミンで増強された。いずれの増強作用も相乗作用というよりは相加作用と考えられる。相加効果というのは、その作用点が同じであるとされている。従って、ヒスタミン誘発搔破行動には末梢神経系が関与していることは間違いない。オピオイド μ 受容体と κ オピオイド受容体の関連を検討する目的で研究を行い、オピオイド μ 受容体作用薬のモルヒネにより誘発される搔破行動に対して、

オピオイド κ 受容体作用薬により強力な拮抗作用を示すことが明らかとなった。また、オピオイド κ 受容体拮抗薬により誘発される搔破行動に対して オピオイド μ 受容体拮抗薬のナロキソンは強力な抑制作用を示した。従って、オピオイド μ 受容体とオピオイド κ 受容体は密接に関連し、痒みの誘発に関与していることが判明した。一方、ナルフラフィンの抗搔痒効果は中枢神経系が関与するといわれている(54)。しかし、この段階で、ナロキソンおよびナルフラフィンが末梢神経系へ作用しているかどうかは不明である。

以上、第3章の成績から ICR 系マウスの搔破行動において、ヒスタミン H_1 受容体とオピオイド κ 受容体が密接に関連し、作用していることが判明した。

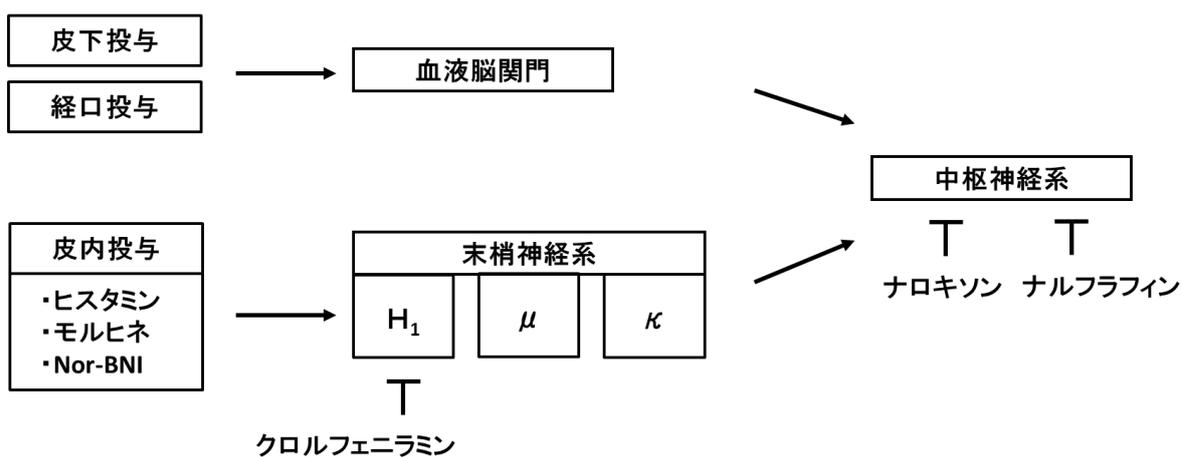


Fig. 32 Relationship between histamine H_1 receptor opioid κ receptor for itching

第4章 ノルビナルトルフィミン誘発搔破行動における末梢性 μ オピオイド および κ 受容体の関与

〔緒言〕

強力なオピオイド κ 受容体作用薬であるナルフラフィン¹⁾は、2002 年 Togashi ら(26) により開発された。彼らは、ナルフラフィンはマウスでサブスタンス P 誘発による搔破行動を抑制すること、およびサブスタンス P 誘発搔破行動に対するナルフラフィンの抑制効果は、特異的なオピオイド κ 受容体拮抗薬であるノルビナルトルフィミンにより抑制されることを見出した。現在では、ナルフラフィンはヒスタミン H_1 受容体拮抗薬に抵抗性の血液透析・慢性肝疾患における掻痒症に汎用されている(55)。Umeuchi ら(54) は、中枢神経系のオピオイド μ 受容体が痒みの発生に重要な役割を演じており、中枢神経系のオピオイド κ 受容体の活性化がオピオイド μ 受容体を抑制し、この作用機序により痒みが抑制されると報告している。一方、Kamei ら(53) は、ノルビナルトルフィミンの皮下投与により搔破行動が誘発され、代表的なヒスタミン遊離物質であるコンパウンド 48/80 の場合と同様クロルフェニラミンで抑制されることを見出している。これらの知見より、オピオイド関連化合物による痒みには中枢神経系のみならず末梢神経系も関与すると考えられる。Ikoma (55) も痒みに関するオピオイド受容体は中枢神経系のみならず末梢神経系にも存在するとしている。

本章では、ノルビナルトルフィミンにより誘発される搔破行動における末梢神経系の関与について、中枢神経系に移行しないオピオイド κ 受容体作用薬である ICI 204,448 (20)、オピオイド μ 受容体拮抗薬であるナロキソンメチオジド(21) およびヒスタミン H_1 受容体拮抗薬であるレボセチリジン(56) を用いて検討した。

[実験材料ならびに実験方法]

1. 実験動物

実験には、雄性の ICR 系マウス（8 - 18 週齢, 30 - 35 g, 日本チャールズリバー, 静岡）を用いた。動物は $24 \pm 2^\circ\text{C}$, 湿度 $55 \pm 15\%$ の動物飼育室で飼育し, 飼料（オリエンタル酵母, 東京）および飲料水は自由に摂取させた。すべての実験手順は, 安田女子大学動物実験ガイドラインに従って行った。

2. 使用薬物

使用薬物は, ノルビナルトルフィミン二塩酸塩（和光純薬, 大阪）, ICI 204,448 塩酸塩（シグマーアルドリッチ, 東京）, ナロキソンメチオジド（シグマーアルドリッチ, 東京）およびレボセチリジン二塩酸塩（LKT 社, MO, USA）である。ノルビナルトルフィミンは, 生理食塩液に溶解し, 0.02 ml の用量で背部皮内に投与した。ICI 204,448 およびナロキソンメチオジドは生理食塩液に溶解し, 10 g につき 0.05 ml をノルビナルトルフィミン皮内投与の 15 分前に皮下投与した。レボセチリジンは, 蒸留水に溶解し, 10 g につき 0.1 ml の用量で経口ゾンデを用いてノルビナルトルフィミン皮内投与の 60 分前に投与した。その後, 10 分間観察用ケージ内で順化した後, ノルビナルトルフィミンを皮内注射し, 60 分間搔破行動を観察した。投与計画と投与方法は, Fig. 33 に示した。Fig. 34 に, 本実験で用いた使用薬物の化学構造式を示した（塩類は省略した）。

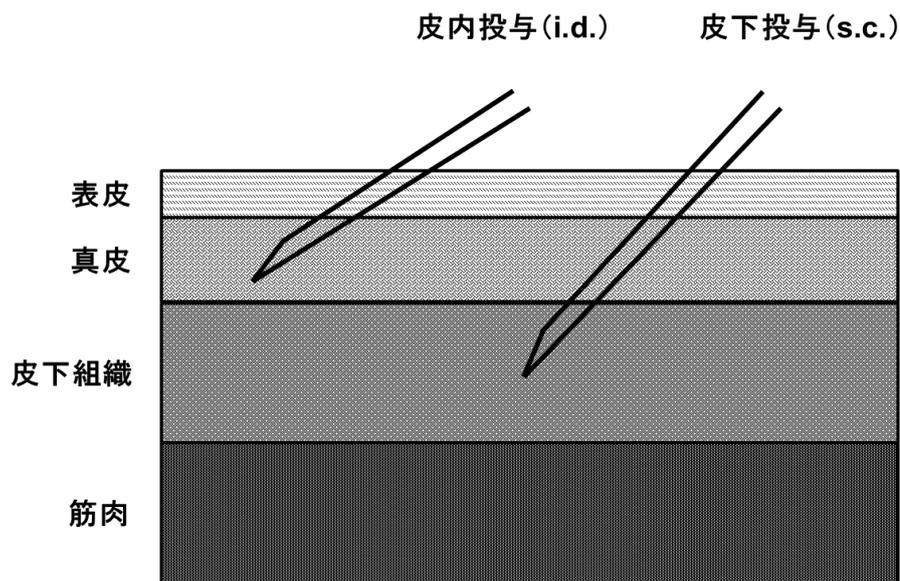
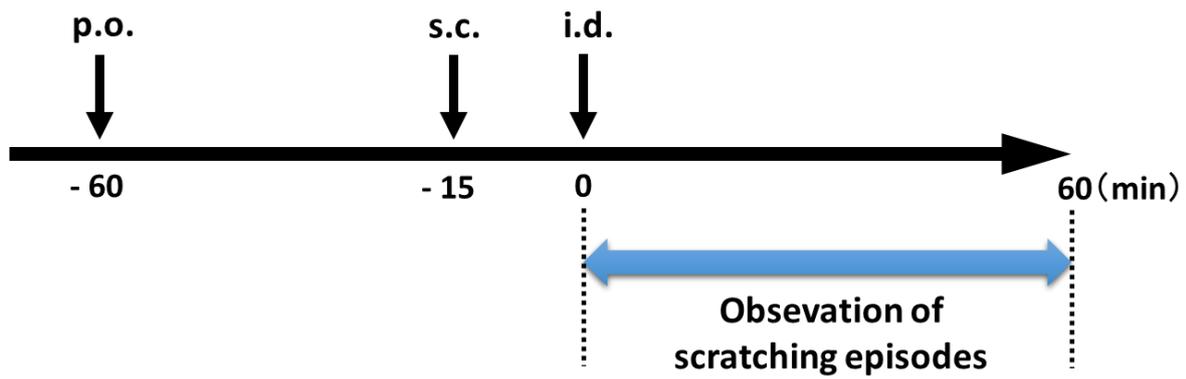
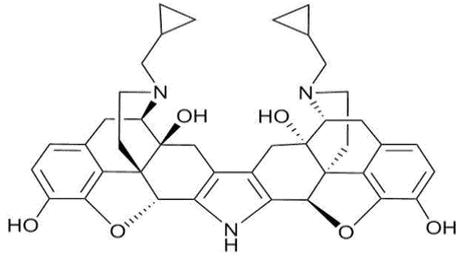


Fig. 33 Experimental schedule and injection method

経口投与 (p.o.) : レボセチリジン

皮下投与 (s.c.) : ICI 204,448, ナロキソンメチオジド

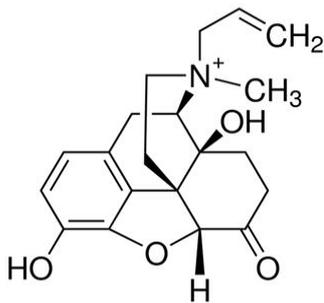
皮内投与 (i.d.) : ノルビナルトルフィミン



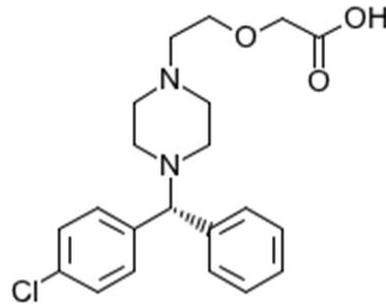
Norbinaltorphimine
(κ antagonist)



ICI 204,448
(κ agonist)



Naloxone methiodide
(μ antagonist)



Levocetirizine
(H_1 antagonist)

Fig. 34 Chemical structures of drugs used in this chapter

3. 実験方法

3-1. 搔破行動の観察

搔破行動の観察は、Kuraishi ら(6) の方法に準じて行った。すなわち環境に順応させるため、薬物投与開始 10 分前にマウスをアクリル製観察用ケージ（円筒形、直径 12 cm、高さ 18 cm）に入れた（Fig.14）。搔破行動の観察は、二重盲検法（薬物投与を担当する者および搔破行動を観察する者は実験の内容を知らされていない）で行った。搔破行動は、後肢で注射部位もしくはその付近を引っ掻き、後肢を床におろすまで 1 回としてカウントした。

3 - 2. 統計処理

統計学的有意差は、一元配置分散分析および Dunnett's 法を用いて検定し、危険率 5%以下の場合を有意差ありと判定した。実験成績はすべて平均値±標準誤差で示した(25)。ED₅₀ 値および ID₅₀ 値は Probit 法を用いて算出した。

〔実験成績〕

1. ノルビナルトルフィミン誘発搔破行動

Fig. 35 より明らかなように、ノルビナルトルフィミンは 10, 30 および 100 nmol/site に背部皮内投与で用量依存性の搔破行動を示した。10 nmol/site では有意差は認められなかったが、30 および 100 nmol/site では対照群 (Control) に比較し、有意な搔破行動を示した (第 3 章の Fig. 23 に同一のデータが示してある)。ED₅₀ 値は、13.0 (7.13 – 18.7) nmol/site であった。

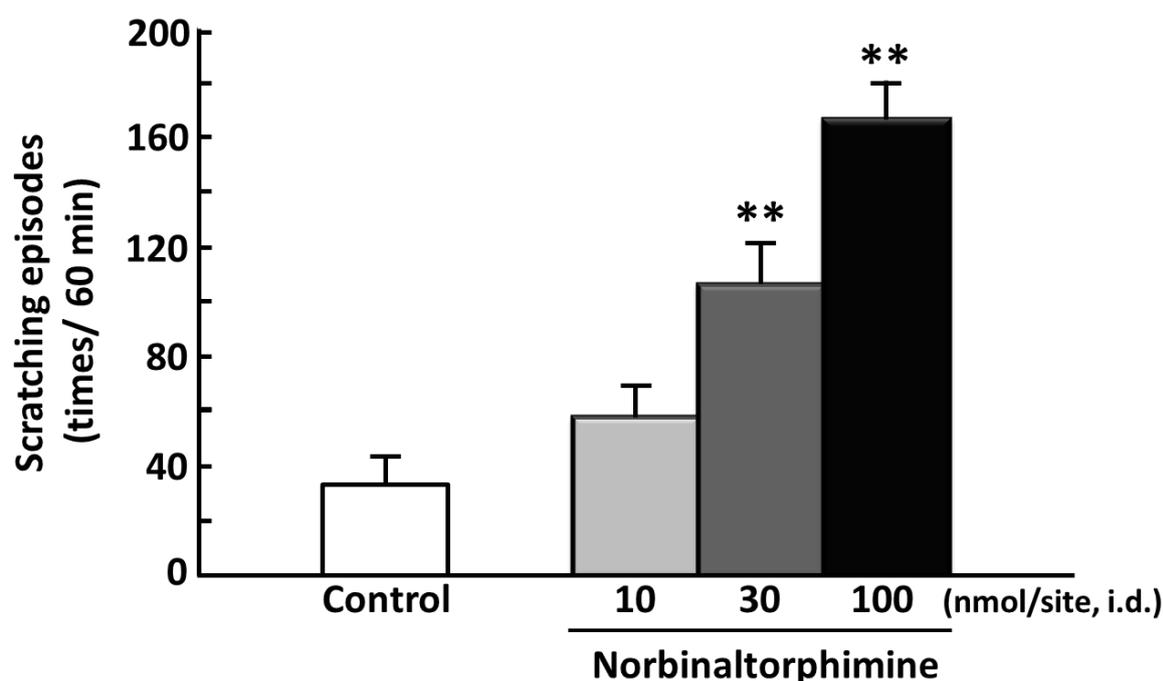


Fig. 35 Norbinaltorphimine - induced scratching episodes in ICR mice

Norbinaltorphimine was injected intradermally into the rostral back, and the number of scratching episodes was counted for 60 min. Each column and vertical bar represents the means \pm S.E.M. (n=10).

** : Significantly different from the control group at $p < 0.01$ (Dunnett's test).

2. ノルビナルトルフィミン誘発搔破行動に対する ICI 204,448 の効果

結果は、Fig.36 に示した。ノルビナルトルフィミン誘発搔破行動に対する薬物の効果を調べる実験においては、ノルビナルトルフィミン 30 nmo/site の用量を用いた。中枢神経系に移行しないとされている ICI 204,448 は、用量依存性の抑制作用を有し、1 および 3 mg/kg の用量で有意差が認められた。ID₅₀ 値は 1.00 (0.75 - 1.35) mg/kg であった (Table 6)。

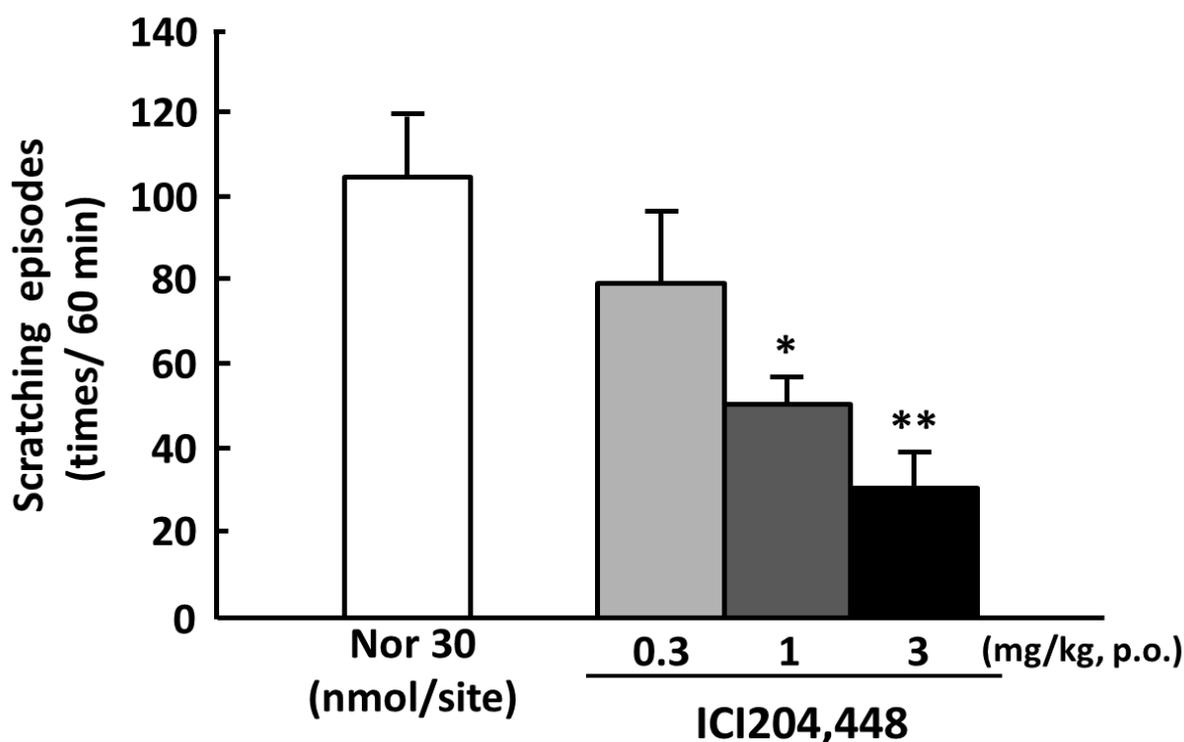


Fig. 36 Effect of ICI 204,448 on norbinaltorphimine - induced scratching episodes

ICI 204,448 was injected orally 60 min before norbinaltorphimine injection.

Nor: norbinaltorphimine

Each column and vertical bar represents the mean \pm S.E.M.(n=10).

*, **: Significantly different from the norbinaltorphimine - treated group at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively (Dunnett's test).

3. ノルビナルトルフィミン誘発搔破行動に対するナロキソンメチオジドの効果

結果は、Fig.37 に示した。中枢神経系に移行されないとされているナロキソンメチオジドは用量依存性の抑制作用を示した。0.3 および 1 mg/kg の用量では、有意差が観察されなかったが、3 mg/kg では有意差が認められた。ID₅₀ 値は 3.40 (2.25 - 7.25) mg/kg であった (Table 6)。

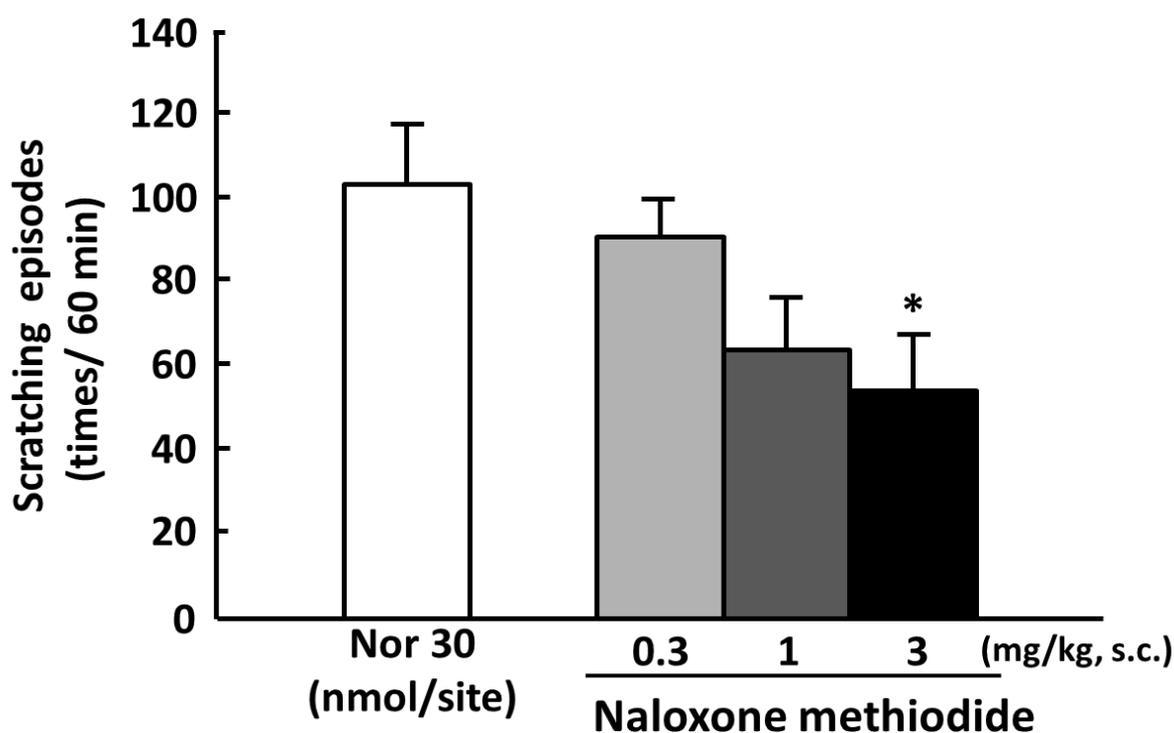


Fig. 37 Effect of naloxone methiodide on norbinaltorphimine - induced scratching episodes

Naloxone methiodide was injected subcutaneously 15 min before norbinaltorphimine injection.

Nor: norbinaltorphimine

Each column and vertical bar represents the mean \pm S.E.M.(n=10).

*: Significantly different from the norbinaltorphimine - treated group at $p < 0.05$ (Dunnett's test).

4. ノルビナルトルフィミン誘発搔破行動に対するレボセチリジンの効果

結果は Fig. 38 に示した。中枢神経系に移行しないレボセチリジンは用量依存性の抑制作用を示した。1 および 3 mg/kg の用量では、有意差は観察されなかったが、10 mg/kg では有意差が認められた。ID₅₀ 値は 6.31 (4.63 – 9.87) mg/kg であった (Table 6)。

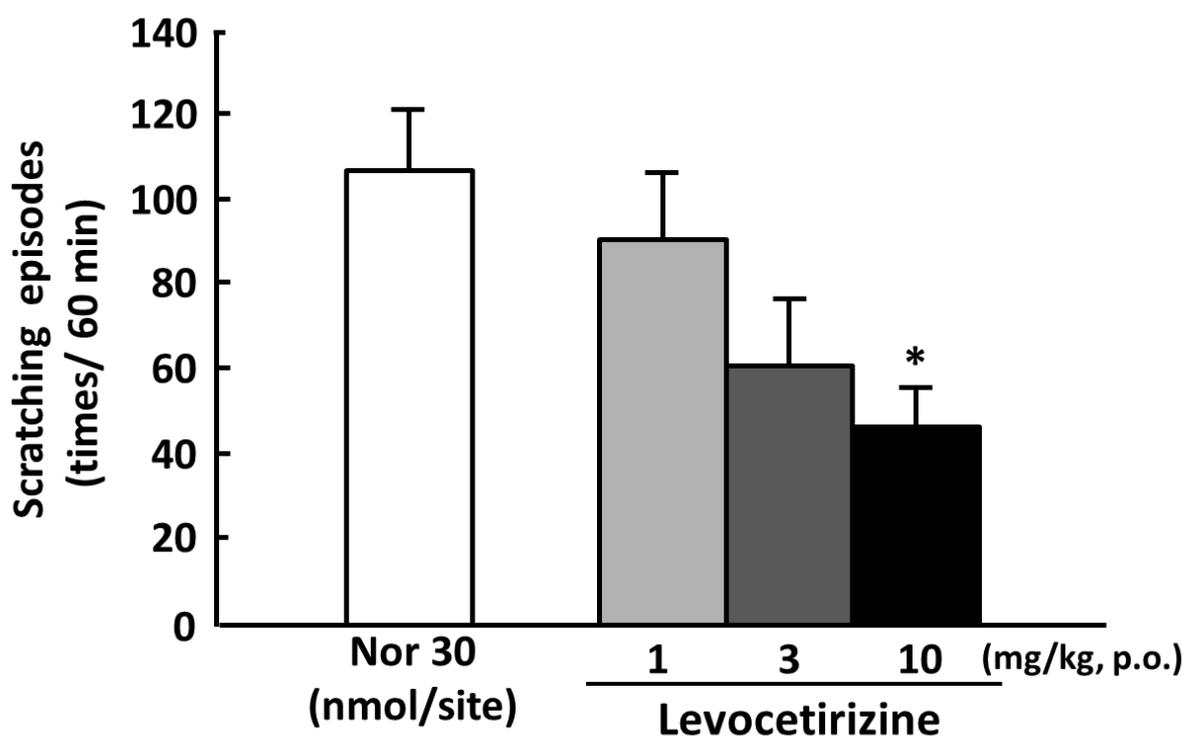


Fig. 38 Effect of levocetirizine on norbinaltorphimine - induced scratching episodes

Levocetirizine was injected orally 60 min before norbinaltorphimine injection.

Nor: norbinaltorphimine

Each column and vertical bar represents the mean \pm S.E.M.(n=10).

*: Significantly different from the norbinaltorphimine - treated group at $p < 0.05$ (Dunnett's test).

5. ノルビナルトルフィミン誘発搔破行動に対する ICI 204,448, ナロキソンメチオジドおよびレボセチリジンの ID₅₀ 値 (Table 6)

Table 6 ID₅₀ values for ICI 204,448, naloxone methiodide and levocetirizine on scratching episodes induced by norbinaltorphimine

Drugs	ID₅₀ values, mg/kg (95% confidence limits)
ICI 204,448 (κ agonist)	1.00 (0.75 – 1.35)
Naloxone methiodide (μ antagonist)	3.40 (2.25 – 7.25)
Levocetirizine (H₁ antagonist)	6.31 (4.63 – 9.87)

〔考察〕

オピオイド κ 受容体作用薬であるナルフラフィン⁽²⁶⁾は、マウスのヒスタミン⁽²⁶⁾、サブスタンス P⁽²⁶⁾ およびモルヒネ⁽⁵⁴⁾ の皮内投与によって生じる搔破行動を抑制することが報告されている。従って、オピオイド κ 受容体拮抗薬であるノルビナルトルフィミンをマウスの皮内に投与した際、強力な搔破行動が誘発されることは容易に想像される。しかしながら、これまでノルビナルトルフィミンをマウス皮内に投与した際、搔破行動が誘発されるという報告は見当たらない。Kamei ら⁽⁵³⁾ は、ノルビナルトルフィミンを ICR 系マウスの皮下に投与した際、高用量で(3 - 30 mg/kg)で搔破行動を誘発するという成績を報告している。高用量の皮下投与ではノルビナルトルフィミンの一部は中枢神経系に移行する可能性が考えられる。また、彼らを用いたノルビナルトルフィミンは遊離塩基であり、著者が用いたのは二塩酸塩である。遊離塩基と二塩酸塩とは溶解性や体内動態も異なると考えられるので、作用の強弱については正確には議論できない。本研究で、著者はノルビナルトルフィミンが 10-100 nmol/site (6.62 - 66.2 μ g/kg) の用量で搔破行動を誘発することを ICR マウスで見出した。ED₅₀ 値は 13.0 (7.13 - 18.7) nmol/site であった。ヒスタミンの ED₅₀ 値は 25.0 (15.5 - 37.2) nmol/site, そしてモルヒネの ED₅₀ 値は 27.3 (13.2 - 49.9) nmol/site であったので、ノルビナルトルフィミンの搔破行動誘発作用はヒスタミンやモルヒネよりやや強力であるといえる。

モルヒネを始めとするオピオイドの皮下投与により生ずる痒みは、中枢神経系由来であると考えられてきた。Umeuchi ら⁽⁵⁴⁾ は、中枢神経系のオピオイド μ 受容体は痒みの発生に大きな役割を演じ、中枢神経系のオピオイド κ 受容体の活性化はオピオイド μ 受容体に拮抗し、それによって痒みを抑制するのではないかと記載している。本研究で、著者は、ノルビナルトルフィミン皮内投与による搔破行動は ICI 204,448 で抑制されることを初めて見出した。ICI 204,448 はオピオイド κ 受容体に対して高親和性を示すが、中枢神経系には移行しないと報告されている⁽⁵⁷⁾。さらに、ノルビナルトルフィミン誘発搔破行動は、中枢神経系に作用しないナロキソンメチオジドでも抑制されることが判

明した。これらの知見はノルビナルトルフィミンを皮内投与することによって生ずる搔破行動は、中枢神経系のみならず末梢神経系も関与した新しい発見である。Bigliardi-Qi ら(58) は、オピオイド受容体は末梢の神経終末およびケラチノサイトに存在していることを報告している。Tivoli ら(59) は、オピオイド受容体は中枢ならびに末梢性の痒みの誘発に重要な役割を演じており、オピオイド μ 受容体と κ 受容体の不均衡により痒みが誘発されると報告している。著者は本章で、ノルビナルトルフィミン誘発搔破行動が非鎮静性の抗ヒスタミン薬（中枢神経系に移行しない）であるレボセチリジンで抑制されることを見出した。著者はさらにモルヒネ誘発搔破行動がクロルフェニラミンで抑制されることを見出している（第3章）。Kamei ら(53) もノルビナルトルフィミン誘発搔破行動がクロルフェニラミンで抑制されることを報告している。これらの知見はノルビナルトルフィミンがマスト細胞からのヒスタミン遊離を生ずる可能性を示唆している。モルヒネがマスト細胞からヒスタミン遊離を起こすという報告は既に見出されている(36) (37)。これらの知見を総合すると、ノルビナルトルフィミン誘発搔破行動は、マスト細胞からのヒスタミン遊離も一部関与していると考えられる。

最後にマウスの搔破行動に対するヒスタミン H_1 、オピオイド μ ならびに κ 受容体の作用点に関する考察を行った (Fig.39)。

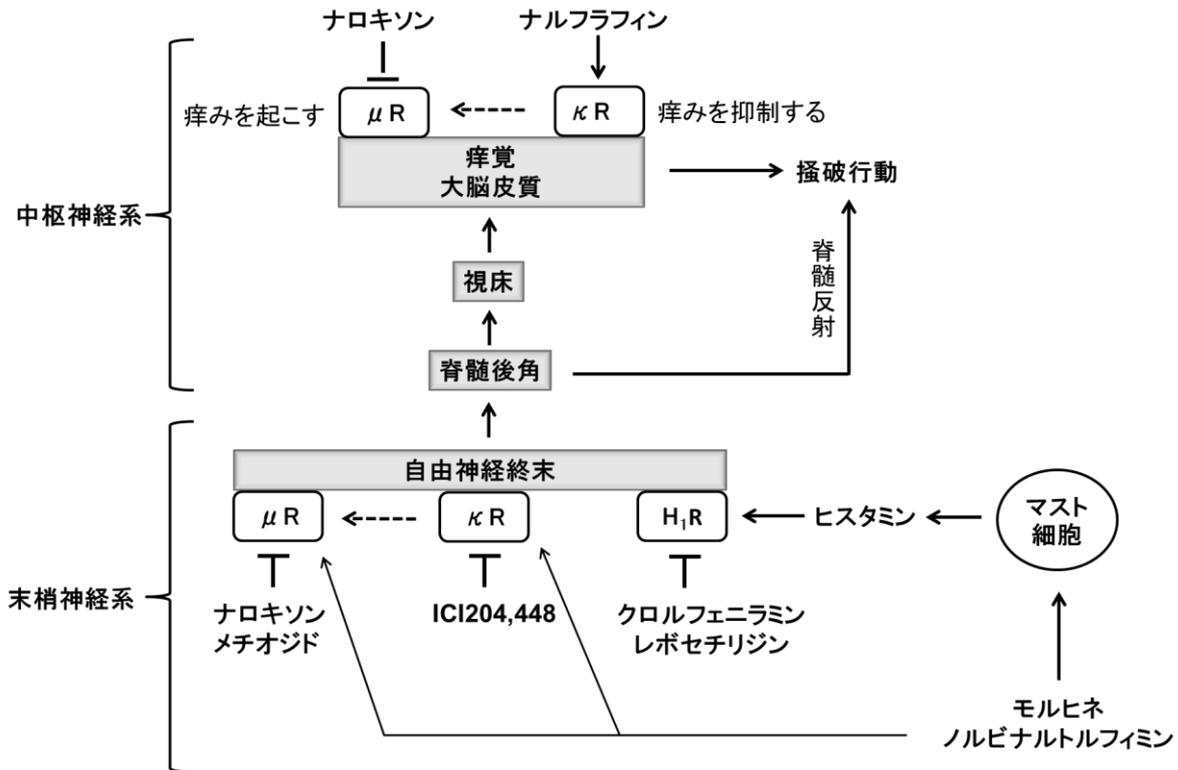


Fig. 39 Mechanism for itching of H₁ receptor and opioid receptors on the central and the peripheral systems

ヒスタミンをマウス皮内に投与した際に誘発される搔破行動は、自由神経終末からC線維を介して脊髄後角に伝わり、視床から大脳皮質に達して痒みを認知し（痒覚）、搔破行動を引き起こす。クロルフェニラミンがヒスタミン投与により生ずる搔破行動を抑制する作用点は自由神経終末、すなわち末梢神経系であると考えられる。クロルフェニラミンは、ヒトで鎮静作用を示すことが知られているが(60)、げっ歯類で中枢作用を示すクロルフェニラミンの用量は比較的大量であり、本実験で用いた用量すなわち、搔破行動を抑制する用量では中枢作用は無視できると考えられる(61)。中枢に移行しないことが報告されているレボセチリジンを用いた成績からもヒスタミン H₁ 受容体拮抗薬の作用点は末梢神経系であることが判明した。

一方、モルヒネの皮内投与により、ヒスタミンを投与した際と同程度の搔破行動が皮内投与部位ならびに近隣部位で観察された。モルヒネを皮内投与する

と皮膚のマスト細胞からヒスタミンが遊離されるということが良く知られている(36)(37)。モルヒネにより生ずる搔破行動がクロルフェニラミンで抑制されることから考えてみると、モルヒネ皮内投与による搔破行動はヒスタミンを介して誘発されることを意味している。マウス大槽内および髄腔内にモルヒネ投与した場合も搔破行動を示すが、これは中枢性の痒みであると考えられている(62)。

本研究で明らかのように、ヒスタミン誘発搔破行動がオピオイド μ 受容体拮抗薬であるナロキソンで拮抗された。この事実は、ヒスタミンがC線維を介して大脳皮質のオピオイド μ 受容体を刺激して痒みを起こし、そして、搔破行動を起こしたのではないかと考えられる。ナロキソンは、大脳皮質のオピオイド μ 受容体を抑制し、搔破行動を抑制したと考えている。

ヒスタミン誘発搔破行動は、オピオイド κ 受容体作用薬であるナルフラフィンでも抑制された。オピオイド μ 受容体およびオピオイド κ 受容体は、大脳皮質の痒覚に存在し、オピオイド μ 受容体の活性化は痒みを生じ、オピオイド κ 受容体の活性化は止痒効果をもたらすと考えられている(51)(63)。すなわち、ヒスタミンによる刺激で大脳皮質のオピオイド μ 受容体が活性化され、引き続いてオピオイド κ 受容体がオピオイド μ 受容体に拮抗する。

κ 受容体拮抗薬であるノルビナルトルフィミンにより誘発された搔破行動は、ナロキシンのみならず、中枢に移行しないナロキソンメチオジドでも拮抗された。これらの知見は μ 受容体が中枢神経系のみならず末梢神経系にも存在する可能性を示唆している。Bigliardi-Qi は、ヒトの真皮ならびに表皮の無髄神経に μ 受容体が存在することを報告している(58)。Tivoli ら(59) は、オピオイド受容体は中枢ならびに末梢性の痒みの誘発に重要な役割を演じており、 μ オピオイド受容体と κ 受容体の不均衡により痒みが誘発されると報告している。また、加茂ら(64) は、アトピー性皮膚炎患者では、表皮における痒み抑制系のバランスが破綻し、 μ オピオイド系が、 κ オピオイド系より有意に機能することにより痒みが発現すると報告している。ノルビナルトルフィミン誘発搔破行動はナルフラフィンのみならず中枢に移行しない ICI 204,448 でも抑制された。これらの実験成績より、末梢神経系にも中枢神経系同様に κ 受容体が存

在し、 μ 受容体と κ 受容体との拮抗関係が成立するのではないかと考えている。

ノルビナルトルフィミンにより誘発された搔破行動は、クロルフェニラミンのみならず、レボセチリジンでも抑制された。レボセチリジンは中枢に移行しないことが判明している、従って、ノルビナルトルフィミン誘発搔破行動は、中枢神経系のみならず末梢神経系も関与することが明らかとなった。

〔総括〕

第1章で、著者は ADJM マウスが、野生型マウスである BALB/c マウスと比較して有意な搔破行動を示す事を明らかにした。第一世代のヒスタミン H₁ 受容体拮抗薬であるクロルフェニラミンおよびシプロヘプタジンは本搔破行動を著明に抑制した。オピオイド μ 受容体拮抗薬であるナロキソンおよびオピオイド κ 作用薬であるナルフラフィンも、ADJM マウスの搔破行動を抑制した。ADJM マウスの皮膚のヒスタミン含量は、野生型マウスである BALB/c マウスと比較して有意に高いことが見出された。従って、ADJM マウスの搔破行動にはヒスタミン H₁ 受容体、オピオイド μ 受容体ならびに κ 受容体が関与していることが判明した。

第2章では、ヒスタミンならびにモルヒネは、モル濃度で比較してみるとほぼ同程度の搔破行動を示すことを見出した。また、ヒスタミンおよびモルヒネの併用により、相加効果を思わせるような結果が観察された。ヒスタミン誘発搔破行動は、ヒスタミン H₁ 受容体拮抗薬であるクロルフェニラミンのみならずオピオイド μ 受容体拮抗薬であるナロキソンでも拮抗された。ヒスタミン誘発行動に対するクロルフェニラミンの拮抗作用は、ナロキソンにより増強された。また、モルヒネ誘発搔破行動は、ナロキソンのみならずクロルフェニラミンでも拮抗された。モルヒネ誘発搔破行動に対するナロキソンの拮抗作用は、クロルフェニラミンで増強された。従って、マウスの搔破行動において、ヒスタミン H₁ 受容体とオピオイド μ 受容体は密接に関連していることが明らかとなった。

第3章では、ヒスタミン誘発搔破行動は、クロルフェニラミンのみならず κ 受容体作用薬であるナルフラフィンでも用量依存性に拮抗されることを示した。モルヒネ誘発搔破行動は、ナロキソンのみならずナルフラフィンでも用量依存性に拮抗された。オピオイド κ 受容体拮抗薬であるノルビナルトルフィンは用量依存性の搔破行動を示し、その効果は、ヒスタミンおよびモルヒネ

より強力であった。ノルビナルトルフィミン誘発搔破行動は、ナルフラフィンのみならずナロキソンおよびクロルフェニラミンでも抑制された。ヒスタミン誘発搔破行動に対するクロルフェニラミンの拮抗作用は、ナルフラフィンにより増強された。また、モルヒネ誘発搔破行動に対するナロキシンの拮抗作用は、ナルフラフィンにより増強された。以上、マウスの搔破行動において、ヒスタミン H₁ 受容体とオピオイド κ 受容体は密接に関連している事が判明した。

第4章では、オピオイド κ 受容体拮抗薬である、ノルビナルトルフィミンにより誘発される搔破行動における末梢神経の関与について検討する目的で、中枢神経に移行しない ICI 204,448、ナロキソンメチオジドおよびレボセチリジンを用いて実験した。ノルビナルトルフィミンは用量依存的に搔破行動を誘発した。ノルビナルトルフィミン誘発搔破行動は、末梢神経に選択的に作用する ICI 204,448 で抑制された。ノルビナルトルフィミン誘発搔破行動は、末梢のオピオイド μ 受容体のみを抑制するナロキソンメチオジドで抑制された。ノルビナルトルフィミン誘発搔破行動は、中枢神経に移行せず鎮静作用のない第三世代の H₁ 拮抗薬であるレボセチリジンで抑制された。これらの結果はオピオイド κ 受容体拮抗薬であるノルビナルトルフィミンの誘発搔破行動は、中枢神経系だけでなく末梢神経系のオピオイド κ 受容体にも関連があることを強く示唆している。

〔参考文献〕

- (1) Ellis C, Luger T, Abeck D, Allen R, Graham-Brown RAC, De Prost Y, Eichenfield LF, Ferrandiz C, Giannetti A, Hanifin J, Koo JYM, Leung D, Lynde C, Ring J, Ruiz-Maldonado R, Saurat JH: International Consensus Conference on Atopic Dermatitis II (ICCAD II): clinical update and current treatment strategies. *Br. J. Dermatol.*, 2003; 148(Suppl. 63): 3-10.
- (2) 古江増隆, 佐伯秀久, 古川福美, 秀道広, 大槻マミ太郎, 中村敏明, 佐々木りか子, 須藤一, 竹原和彦: 日本皮膚科学会アトピー性皮膚炎診療ガイドライン. *日皮会誌*, 2008; 118: 325-342.
- (3) 加藤則人, 佐伯秀久, 中原剛士, 田中暁生, 椛島健治, 菅谷誠, 室田浩之, 海老原全, 片岡葉子, 相原道子, 江藤隆史: アトピー性皮膚炎診療ガイドライン 2016年版. *日皮会誌*, 2016; 126: 121-155.
- (4) Rothman S: Physiology of itching. *Physiol. Rev.*, 1941; 21: 357-381.
- (5) 関山裕詩: かゆみの基礎知識. *Anesthesia 21 Century*, 2008; 10: 1983-1987.
- (6) Kuraishi Y, Nagasawa T, Hayashi K, Satoh M: Scratching behavior induced by pruritogenic but not algesciogenic agents in mice. *European J. Pharmacol.*, 1995; 275: 229-233.
- (7) 安東嗣修, 倉石泰: かゆみの動物実験法. *日薬理誌.*, 2007; 130: 386-392.
- (8) Sugimoto Y, Umakoshi K, Nojiri N, Kamei C: Effects of histamine H₁ receptor antagonists on compound 48/80-induced scratching behavior in mice. *European J. Pharmacol.*, 1998; 351: 1-5.

- (9) Inagaki N, Nagao M, Igeta K, Kawasaki H, Kim JF, Nagai H: Scratching behavior in various strains of mice. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, 2001; 14: 87-96.
- (10) Inagaki N, Nakamura N, Nagao M, Musoh K, Kawasaki H, Nagai H: Participation of histamine H₁ and H₂ receptors in passive cutaneous anaphylaxis-induced scratching behavior in ICR mice. *European J. Pharmacol.*, 1999; 367: 361-371.
- (11) Yamamoto A, Kuyama S, Kamei C, Sugimoto Y: Characterization of scratching behavior induced by intradermal administration of morphine and fentanyl in mice. *European J. Pharmacol.*, 2010; 627: 162-166.
- (12) Kuraishi Y, Yamaguchi T, Miyamoto T: Itch-scratch responses induced by opioids through central mu opioid receptors in mice. *J. Biomed. Sci.*, 2000; 7: 248-252.
- (13) Matsuda H, Watanabe N, Geba GP, Sperl J, Tsudzuki M, Hiroi J, Matsumoto M, Ushio H, Saito S, Askenase PW, Ra C: Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *Int. Immunol.*, 1997; 9: 461-466.
- (14) Matsumoto M, Ra C, Kawamoto K, Sato H, Itakura A, Sawada J, Ushio H, Suto H, Mitsuishi K, Hikasa Y, Matsuda H: IgE hyperproduction through enhanced tyrosine phosphorylation of Janus kinase 3 in NC/Nga mice, a model for human atopic dermatitis. *J. Immunol.*, 1999; 162: 1056-1063.
- (15) Hiroi J, Sengoku T, Morita K, Kishi S, Sato S, Ogawa T, Tsudzuki M, Matsuda H, Wada A, Esaki K: Effect of tacrolimus hydrate (FK506) ointment on spontaneous dermatitis in NC/Nga mice. *Jpn. J. Pharmacol.*, 1998; 76: 175-183.

- (16) Suto H, Matsuda H, Mitsuishi K, Hira K, Uchida T, Unno T, Ogawa H, Ra C: NC/Nga mice: a mouse model for atopic dermatitis. *Int. Arch. Allergy, Immunol.*, 1999; 120(Suppl 1): 70-75.
- (17) Matsushima Y: Japanese wild mice: A rich resource of new disease models. *Exp. Anim.*, 2012; 61: 25-33.
- (18) Matsushima Y, Kikkawa Y, Takada T, Matsuoka K, Seki Y, Yoshida H, Minegishi Y, Karasuyama H, Yonekawa H: An atopic dermatitis-like skin disease with hyper-IgE-emia develops in mice carrying a spontaneous recessive point mutation in the *Traf3ip 2 (Act1/CIKS)* gene. *J. Immunol.*, 2010; 185: 2340-2349.
- (19) Inui S: Nalfurafine hydrochloride to treat prurits: a review. *Clin. Cosmet. Invest. Dermatol.*, 2015; 8: 249-255.
- (20) Keita H, Kayser V, Guilbaud G: Antinociceptive effect of a κ -opioid receptor agonist that minimally crosses the blood-brain barrier (ICI 204448) in a rat model of mononeuropathy. *European J. Pharmacol.*, 1995; 277: 275-280.
- (21) Lewanowitsch T, Irvine RJ: Naloxone and its quaternary derivative, naloxone methiodide, have differing affinities for μ , δ , and κ opioid receptors in mouse brain homogenates. *Brain Res.*, 2003; 964: 302-305.
- (22) Giltiay NV, Lu Y, Allman D, Jørgensen TN, Li X: The adaptor molecule Act1 regulates BAFF responsiveness and self-reactive B cell selection during transitional B cell maturation. *J. Immunol.*, 2010; 185: 99-109.
- (23) Shore PA, Burkhalter A, Cohn VH Jr: A method for the fluorometric assay of histamine in tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1959; 127: 182-186.

- (24) Shinmei Y, Yano H, Kagawa Y, Izawa K, Akagi M, Inoue T, Kamei C: Effect of Brazilian propolis on sneezing and nasal rubbing in experimental allergic rhinitis of mice. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 2009; 31: 688-693.
- (25) Kanda Y: Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant.* 2013; 48: 452-458.
- (26) Togashi Y, Umeuchi H, Okano K, Ando N, Yoshizawa Y, Honda T, Kawamura K, Endoh T, Utsumi J, Kamei J, Tanaka T, Nagase H: Antipruritic activity of the κ -opioid receptor agonist, TRK-820: *European J. Pharmacol.*, 2002; 435: 259-264.
- (27) Kim DK, Kim HJ, Kim H, Koh JY, Kim KM, Noh MS, Kim JJ, Lee CH: Involvement of serotonin receptors 5-HT₁ and 5-HT₂ in 12(S)-HPETE-induced scratching in mice. *European J. Pharmacol.*, 2008; 579: 390-394.
- (28) Weitzman G, Galli SJ, Dvorak AM, Hammel I: Cloned mouse mast cells and normal mouse peritoneal mast cells. Determination of serotonin content and ability to synthesize serotonin in vitro. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 1985; 77: 189-191.
- (29) Takano N, Arai I, Hashimoto Y, Kurachi M: Evaluation of antipruritic effects of several agents on scratching behavior by NC/Nga mice. *European J. Pharmacol.*, 2004; 495: 159-165.
- (30) Kuraishi Y: Methods for preclinical assessment of antipruritic agents and itch mechanisms independent of mast-cell histamine. *Biol. Pharm. Bull.*, 2015; 38: 635-644.
- (31) Stander S, Siepmann D, Herrgott I, Sunderkotter C, Luger TA: Targeting the

- neurokinin receptor 1 with aprepitant: a novel antipruritic strategy. *PLoS one.*, 2010; 5: e10968.
- (32) Ballantyne JC, Loach AB, Carr DB: Itching after epidural and spinal opiates. *Pain.*, 1988; 33: 149-160.
- (33) Metzger D, Reimann S, Luger TA: Effective treatment of pruritus with naltrexone, an orally active opiate antagonist. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 1999; 885: 430-432.
- (34) He F, Jiang Y, Li L: The effect of naloxone treatment on opioid-induced side effects: A meta-analysis of randomized and controlled trials. *Medicine (Baltimore)*, 2016; 95: e4729.
- (35) Monroe EW: Efficacy and safety of nalmefene in patients with severe pruritus caused by chronic urticaria and atopic dermatitis. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 1989; 21: 135-136.
- (36) Barke KE, Hough LB: Opiates, mast cell and histamine release. *Life Sci.*, 1993; 53: 1391-1399.
- (37) Blunk JA, Schmeltz M, Zeck S, Skov P, Likar R, Koppert W: Opioid-induced mast cell activation and vascular responses is not mediated by mu-opioid receptors: an in vivo microdialysis study in human skin. *Anesth. Analg.*, 2004; 98: 364-370.
- (38) Narita I, Iguchi S, Omori K, Geijyo F: Uremic pruritus in chronic hemodialysis patients. *J. Nephrol.*, 2008; 21: 161-165.
- (39) Nakao K, Mochizuki H: Nalfurafin hydrochloride: a new drug for the treatment

- of uremic pruritus in hemodialysis patients. *Drugs Today* , 2009; 45: 323-329.
- (40) Hagermark O, Hokfelt T, Pernow B: Flare and itch induced by substance P in human skin. *J. Invest. Dermatol.*, 1978; 71: 233-235.
- (41) Inagaki N, Nagao M, Nakamura N, Kawasaki H, Igeta K, Musoh K, Nagai H: Evaluation of anti-scratch properties of oxatomide and epinastine in mice. *European J. Pharmacol.*, 2000; 400: 73-79.
- (42) Maekawa T, Nojima H, Kuraishi Y: Itch-associated responses of afferent nerve innervating the murine skin: different effects of histamine and serotonin in ICR and ddY mice. *Jpn. J. Pharmacol.*, 2000; 84: 462-466.
- (43) Ko MCH, Song MS, Edwards T, Lee H, Naughton NN: The role of central μ opioid receptors in opioid-induced itch in primates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2004; 310: 169-176.
- (44) Inagaki N, Nakamura N, Nagao M, Kawasaki H, Nagai H: Inhibition of passive cutaneous anaphylaxis-associated scratching behavior by μ -opioid receptor antagonists in ICR mice. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2000; 123: 365-368.
- (45) Metze D, Reimann S, Beissert S, Luger T: Efficacy and safety of naltrexone, an oral opiate receptor antagonist, in the treatment of pruritus in internal and dermatological diseases. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 1999; 41: 533-539.
- (46) Casale TB, Bowman S, Kaliner M: Induction of human cutaneous mast cell degranulation by opiates and endogenous opioid peptides: evidence for opiate and nonopiate receptor participation. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1984; 73: 775-781.

- (47) Ebertz JM, Hermens JM, McMillan JC, Uno H, Hirshman C, Hanifin JM:
Functional differences between human cutaneous mast cells and basophils: a comparison of morphine-induced histamine release. *Agents Actions*, 1986; 18: 455-462.
- (48) Grosman N: Histamine release from isolated rat mast cells: effect of morphine and related drugs and their interaction with compound 48/80. *Agents Actions*, 1981; 11: 196-203.
- (49) 中尾 薫, 池田 顕, 黒川敬弘, 富樫裕子, 梅内秀郎, 本田敏行, 岡野 清, 望月英典: アトピー性皮膚炎モデルの引っ掻き行動に対するオピオイド κ 受容体作動薬 TRK-820 の効果. *日神精薬理誌*, 2008; 28: 75-83.
- (50) Imaizumi A, Kawakami T, Murakami F, Soma Y, Mizoguchi M: Effective treatment of pruritus in atopic dermatitis using H1 antihistamines (second-generation antihistamines) : changes in blood histamine and tryptase levels. *J. Dermatol. Sci.*, 2003; 33: 23-29.
- (51) Graves MW: Antihistamines in dermatology. *Skin Pharmacol. Physiol.*, 2005; 18: 220-229.
- (52) Wikstrom B, Gellert R, Ladefoged SD, Danda Y, Akai M, Ide K, Ogasawara M, Kawashima Y, Ueno K, Mori A, Ueno Y: κ -opioid system in uremic pruritus: multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical studies. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2005; 16: 3742-3747.
- (53) Kamei J, Nagase H: Norbinaltorphimine, a selective κ -opioid receptor antagonist, induces an itch-associated response in mice. *European J. Pharmacol.*, 2001; 418: 141-145.

- (54) Umeuchi H, Togashi Y, Honda T, Nakao K, Okano K, Tanaka T, Nagase H:
Involvement of central μ -opioid system in the scratching behavior in mice, and
the suppression of it by the activation of κ -opioid system. *European J.
Pharmacol.*, 2003; 477: 29-35.
- (55) Ikoma A: Recent advances in the study of itching: Updated neurophysiology of
itch. *Biol. Pharm. Bull.*, 2013; 36: 1235-1240.
- (56) 亀井千晃, 香川陽人, 伊澤可奈, 矢野春奈, 渡部祐介, 尾原義人, 岡田晶子,
加藤 茜: ヒスタミン誘発アレルギーモデルに対するレボセチリジンの効
果. *薬理と治療*, 2010; 38: 409-417.
- (57) Shaw JS, Carroll JA, Alcock P, Main BG: ICI 204448: a κ -opioid agonist with
limited access to the CNS. *Br. J. Pharmacol.*, 1989; 96: 986-992.
- (58) Bigliardi-Qi M, Sumanovski LT, Buchner S, Rufli T, Bigliardi PL: Mu-opiate
receptor and Beta-endorphin expression in nerve endings and keratinocytes in
human skin. *Dermatology*, 2004; 209: 183-189.
- (59) Tivoli YA, Rubenstein RM: Pruritus: An Updated look at an old problem. *J. Clin.
Aesthetic Dermatol.*, 2009; 2: 30-36.
- (60) Nicholson AN, Pascoe PA, Turner C, Ganellin CR, Greengrass PM, Casy AF,
Mercer AD: Sedation and histamine H₁-receptor antagonism: studies in man with
the enantiomers of chlorpheniramine and dimethindene. *Br. J. Pharmacol.*, 1991;
104: 270-276.
- (61) Kamei C, Chung YH, Tasaka K: Influence of certain H₁-blockers on the step-
through active avoidance response in rats. *Psychopharmacology*, 1990; 102: 312-

318.

(62) 倉石 泰 : 痒みの発生機序と鎮痒薬の薬理. 日薬理誌, 2012; 139: 160-164.

(63) Szarvas S, Harmon D, Murphy D: Neuraxial opioid-induced pruritus: A review.
J. Clin. Anesth., 2003; 15: 234-239.

(64) 加茂敦子, 富永光俊, 高森建二: アトピー性皮膚炎と皮膚感覚受容器. 顕
微鏡, 2011; 46: 233-237.

〔発表論文〕

- (1) Nakasone T, Sato T, Matsushima Y, Inoue T, Kamei C: Characteristics of scratching behavior in ADJM mice (atopic dermatitis from Japanese mice). *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 2015; 37: 202-206.
- (2) Nakasone T, Sugimoto Y, Kamei C: The interaction between histamine H₁ receptor and μ -opioid receptor in scratching behavior in ICR mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 2016; 777: 124-128.
- (3) Nakasone T, Sugimoto Y, Kamei C: Effects of ICI204,448, naloxone methiodide and levocetirizine on the scratching behavior induced by a κ -opioid antagonist, nor-BNI in ICR mice. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 2017; 39: 292-295.

〔謝辞〕

本研究に際し、終始御懇篤なご指導と御鞭撻を頂きました指導教授である安田女子大学亀井千晃教授ならびに副指導教授である大塚英昭教授に深謝申し上げます。また、主査の徳村 彰教授ならびに副査の森本金次郎教授、近藤慎一准教授に謹んで感謝の意を表します。本研究を進めるにあたり、ご協力を賜りました安田女子大学薬学部薬理学分野の諸氏に心より感謝申し上げます。さらに、安田女子大学大学院薬学研究科への進学を熱心に勧めて下さいました日本薬科大学井上俊夫准教授に感謝いたします。最後に安田女子大学大学院薬学研究科への入学を許可していただき、本研究の推進ならびに論文作成を暖かく見守って下さいました瀬山敏雄学長に深甚なる謝意を表します