



Title	一酸化窒素による細胞死に対するモルヒネの作用に関する研究
Author(s)	金崎, 朋彦
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40817">https://hdl.handle.net/11094/40817</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	かね さき とも ひこ 金 崎 朋 彦
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	第 1 3 7 8 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平成10年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科歯学臨床専攻
学 位 論 文 名	一酸化窒素による細胞死に対するモルヒネの作用に関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 作 田 正義  (副査) 教 授 米 田 俊之    講 師 前 田 定秋    講 師 丹 羽 均

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目的】

一酸化窒素 (NO) は生体内で3種類の NO 合成酵素 (NOS) から産生され、発癌や炎症など様々な生体反応に関与していることが知られている。虚血に伴う神経細胞障害の機序として、細胞間隙に多量に遊離されたグルタミン酸が NMDA 受容体と結合し、細胞内にカルシウムイオンが流入して NOS 活性が上昇することにより NO あるいは peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ) が産生され神経細胞障害を引き起こすことが考えられている。一方、モルヒネをはじめとするオピオイドは種々の薬理作用を有しており、主として癌性疼痛の制御を目的に臨床的に用いられているが、近年、虚血性脳障害患者への臨床応用も試みられている。実験的脳虚血動物における神経細胞死に対してオピオイド受容体アゴニストが保護作用を示すことや、アンタゴニストであるナロキソンも抑制作用を示すことが報告されているが、NOによる神経細胞死に対するオピオイドの作用については報告されていない。

本研究は、NO、 $\text{ONOO}^-$  およびそれらに関連する活性酸素により誘導された細胞死に対するモルヒネの作用について薬理学的、生化学的に実験を行ったものである。

#### 【方法】

##### (1) NO、 $\text{ONOO}^-$ および活性酸素種により誘導される細胞死とそれらに対するモルヒネの作用

実験にはオピオイド受容体を豊富に発現しているヒト神経芽細胞種 SH-SY5Y 細胞を用いた。 $\text{ONOO}^-$  ( $10\mu\text{M}$ )、 $\text{ONOO}^-$  発生剤である SIN-1 ( $500\mu\text{M}$ ) または NO 発生剤である NOC12 ( $500\mu\text{M}$ ) を各々培地に投与し、24時間後トリパンブルーによる色素排除試験あるいは MTT 法により細胞死を判定し、またアガロースゲル電気泳動法により DNA の断片化について調べた。 $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $30\mu\text{M}$ )、superoxide ( $\text{O}_2^-$ ) と  $\text{H}_2\text{O}_2$  の発生系である hypoxanthine ( $30\mu\text{M}$ ) + xanthine oxidase ( $5\text{mU/ml}$ )、または hydroxyl radical ( $\text{OH}^\bullet$ ) の発生系である  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $30\mu\text{M}$ ) + Fe-EDTA ( $5\mu\text{M}$ ) による細胞死についても同様に検討した。以上の系で誘導された細胞死に対するモルヒネの作用およびオピオイド受容体サブタイプの選択的アゴニストである DAMGO ( $\mu$ )、DPDPE ( $\delta$ )、U-50488 ( $\kappa$ ) の作用について調べた。 $\text{ONOO}^-$  とモルヒネのリン酸緩衝液中での相互作用について吸光度計を用いて吸収スペクトルの変化を指標に検討した。

##### (2) lipopolysaccharide と interferon- $\gamma$ の刺激により産生された NO および $\text{ONOO}^-$ による細胞死に対するモルヒネの作用

実験には誘導型 NOS を有するマウス由来マクロファージ様細胞 RAW264細胞を用いた。RAW264細胞に lipopolysaccharide (LPS)  $1 \mu\text{g/ml}$  と interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )  $10\text{U/ml}$  を作用させ、産生された  $\text{NO}_2^-$  と  $\text{NO}_3^-$  の濃度を Griess 法により測定した。また(1)と同様の方法により細胞死を判定した。この細胞死へのモルヒネおよびオピオイド受容体アゴニストの作用について検討した。さらに SH-SY 5 Y 細胞に RAW264細胞を共存させ、LPS と IFN- $\gamma$  刺激による細胞死に対するモルヒネの作用についても検討した。

### (3) $\text{ONOO}^-$ による血管透過性亢進に対するモルヒネの作用

雄性マウス (ddy 系, 体重25-30 g) を用い、尾静脈にエバンスブルー ( $50 \mu\text{g/g}$ ) を注入し、5 分後に  $10\text{mM}$  SIN-1 を後肢足蹠に  $20 \mu\text{l}$  投与した。1 時間後、血管外に漏出した色素量を測定し血管透過性亢進の指標とした。モルヒネを後肢足蹠に投与し、SIN-1 投与による色素漏出に対する作用について検討した。

#### 【結果および考察】

(1) SH-SY 5 Y 細胞において  $\text{ONOO}^-$ 、SIN-1 または NOC12 処置により細胞死が誘導され、アガロースゲル電気泳動により DNA の断片化が認められた。モルヒネは  $\text{ONOO}^-$  および SIN-1 による細胞死を  $30 \mu\text{M}$  以上の濃度で有意に抑制したが、NOC12 による細胞死に対しては抑制作用を示さなかった。また、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、 $\text{O}_2^-$ 、 $\text{OH}^-$  の 24 時間処置によっても DNA の断片化を伴う細胞死が誘導されたが、モルヒネはこれらの細胞死を抑制しなかった。 $\text{ONOO}^-$ 、SIN-1 による細胞死に対するモルヒネの抑制作用は同時投与において認められ、この作用はナロキソンにより拮抗されなかった。DAMGO、DPDPE、U-50488 は、これらの細胞死に抑制作用を示さなかった。モルヒネによる抑制作用がオピオイド受容体を介さないことが考えられたため、モルヒネと  $\text{ONOO}^-$  との相互作用について吸収スペクトルの変化を指標として調べた。 $\text{ONOO}^-$  溶液は pH11 で  $302\text{nm}$  に吸収極大を有したが、pH7.4 では消失した。しかしモルヒネを共存させると pH7.4 において新たな吸収極大がみられた。以上の結果により、モルヒネは  $\text{ONOO}^-$  をスカベンジすることにより、細胞死を抑制すると考えられた。

(2) RAW264細胞を LPS ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) と IFN- $\gamma$  ( $10\text{U/ml}$ ) で処置すると経時的に培地中に  $\text{NO}_2^-$  および  $\text{NO}_3^-$  が検出され、24 時間後において DNA の断片化を伴った細胞死がみられた。モルヒネはこの細胞死を有意に抑制したが、その作用はナロキソンにより拮抗されなかった。また、この細胞死に対して DAMGO、DPDPE、U-50488 は抑制作用を示さなかった。SH-SY 5 Y 細胞と RAW264細胞を共培養系に低濃度の LPS ( $0.1 \mu\text{g/ml}$ ) と IFN- $\gamma$  ( $10\text{U/ml}$ ) を作用させると、SH-SY 5 Y 細胞に細胞死が誘導され、モルヒネはこの細胞死を抑制した。以上の結果より、RAW264細胞は LPS と IFN- $\gamma$  の刺激により NO だけではなく  $\text{ONOO}^-$  も産生、放出し、モルヒネは  $\text{ONOO}^-$  をスカベンジすることにより細胞死を抑制したと考えられた。

(3) SIN-1 のマウス後肢足蹠への局所投与により血管透過性の著明な亢進がみられた。この SIN-1 による作用は、モルヒネの後肢足蹠への同時投与により阻害された。SIN-1 による血管透過性亢進作用へのモルヒネの全身投与による作用を調べるため、背部皮下へモルヒネを投与し SIN-1 を後肢足蹠へ投与したが、透過性亢進作用は阻害されなかった。モルヒネは  $\text{ONOO}^-$  による血管透過性亢進に対して局所投与でのみ阻害作用を示し、生体内においても  $\text{ONOO}^-$  をスカベンジすることが明らかになった。

#### 【結論】

NO、 $\text{ONOO}^-$  または種々の活性酸素種による細胞死に対するモルヒネの作用について検討した結果、モルヒネは  $\text{ONOO}^-$  により誘導された細胞死を抑制し、その機序はオピオイド受容体を介さず、 $\text{ONOO}^-$  のスカベンジによることが明らかとなった。本研究より、エンドトキシンショックや炎症などの  $\text{ONOO}^-$  が関与する組織細胞障害に対して、モルヒネが保護作用を有する可能性のあることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、種々の培養細胞とマウスを用い、NO、 $\text{ONOO}^-$  およびこれらに関連する活性酸素により誘導された細胞死に対するモルヒネの作用について検討したものである。

その結果、モルヒネは  $\text{ONOO}^-$  により誘導された細胞死を抑制し、その作用機序はオピオイド受容体を介さず、

ONOO<sup>-</sup> のスカベンジによることが明らかとなった。

以上のことより、本研究はモルヒネの作用機序に新たな一面を加えることであり、モルヒネが、ONOO<sup>-</sup> のスカベンジャーとして、エンドトキシンショックや炎症などの NO あるいは ONOO<sup>-</sup> の関与する組織障害に対する保護作用を有することを示唆する重要な新知見を提供するものであり、博士（歯学）の学位請求に値するものと認める。