

博士学位論文

新規 μ オピオイド受容体部分作動薬
TRK-130 (Naltalimide) の過活動膀胱治療薬としての
薬理学的特性に関する検討

2018 年 6 月

藤村 森広

目次

略語表	1
第1章 緒言	2
第2章 ヒト μ 、 δ 及び κ オピオイド受容体に対する結合親和性評価	6
2.1. 目的	6
2.2. 実験方法	6
2.2.1. 試薬	6
2.2.2. オピオイド受容体結合試験	6
2.2.3. データ処理及びデータ解析に使用した統計学的手法	7
2.3. 結果	8
2.4. 考察	9
第3章 ヒト μ 、 δ 及び κ オピオイド受容体に対する作動活性評価	10
3.1. 目的	10
3.2. 実験方法	10
3.2.1. 試薬	10
3.2.2. 細胞	10
3.2.3. オピオイド受容体作動活性評価	11
3.2.4. データ処理及びデータ解析に使用した統計学的手法	12
3.3. 結果	12
3.4. 考察	17
第4章 麻酔下モルモットの律動性膀胱収縮に対する作用	18
4.1. 目的	18
4.2. 実験方法	18
4.2.1. 試薬	18
4.2.2. 動物	18
4.2.3. 尿道結紮法	18
4.2.4. データ処理及びデータ解析に使用した統計学的手法	19
4.3. 結果	20
4.4. 考察	22
第5章 麻酔下モルモットの尿流動態に対する作用	23
5.1. 目的	23
5.2. 実験方法	23
5.2.1. 試薬	23
5.2.2. 動物	23
5.2.3. 尿流動態測定法	23
5.2.4. データ処理及びデータ解析に使用した統計学的手法	24

5.3.	結果	24
5.4.	考察	26
第 6 章	覚醒下モルモット化学物質誘発頻尿モデルに対する作用	28
6.1.	目的	28
6.2.	実験方法	28
6.2.1.	試薬	28
6.2.2.	動物	28
6.2.3.	Formalin 誘発膀胱炎モデルの作製法	28
6.2.4.	排尿動態測定法	28
6.2.5.	データ処理及びデータ解析に使用した統計学的手法	29
6.3.	結果	30
6.4.	考察	32
第 7 章	麻酔下脊髄切断モルモットの律動性膀胱収縮に対する作用	34
7.1.	目的	34
7.2.	実験方法	34
7.2.1.	試薬	34
7.2.2.	動物	34
7.2.3.	脊髄切断処置法	34
7.2.4.	尿道結紮法	35
7.2.5.	データ処理及びデータ解析に使用した統計学的手法	35
7.3.	結果	36
7.4.	考察	37
第 8 章	麻酔下ラット骨盤神経末梢端電気刺激誘発膀胱収縮反応に対する作用	39
8.1.	目的	39
8.2.	実験方法	39
8.2.1.	試薬	39
8.2.2.	動物	39
8.2.3.	骨盤神経末梢端電気刺激法	39
8.2.4.	データ処理及びデータ解析に使用した統計学的手法	40
8.3.	結果	40
8.4.	考察	42
第 9 章	麻酔下モルモットにおける TRK-130 の律動性膀胱収縮抑制作用に対する naloxone の作用	44
9.1.	目的	44
9.2.	実験方法	44
9.2.1.	試薬	44

9.2.2.	動物	44
9.2.3.	尿道結紮法	44
9.2.4.	データ処理及びデータ解析に使用した統計学的手法	44
9.3.	結果	45
9.4.	考察	47
第 10 章	マウス腸管輸送能に対する作用	48
10.1.	目的	48
10.2.	実験方法	48
10.2.1.	試薬	48
10.2.2.	動物	48
10.2.3.	腸管輸送能評価法	48
10.2.4.	データ処理及びデータ解析に使用した統計学的手法	48
10.3.	結果	49
10.4.	考察	51
第 11 章	結論	53
第 12 章	謝辞	55
第 13 章	参考文献	56

略語表

略語	省略していない表現／定義
AD ₅₀	作動薬の作用を 50%に拮抗する拮抗薬の用量
ATP	Adenosine triphosphate
BSA	ウシ血清アルブミン
cAMP	3',5'-cyclic adenosine monophosphate
CHL 細胞	チャイニーズ・ハムスター肺由来細胞
CHO 細胞	チャイニーズ・ハムスター卵巣由来細胞
CI	信頼区間
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EC ₅₀	50%有効濃度
ED ₃₀	30%有効用量
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
E _{max}	評価化合物の最高濃度での cAMP 産生に対する抑制率（各受容体サブタイプの標準的完全作動薬の最高濃度での抑制率を 100%として算出）
FBS	ウシ胎児血清
HBSS	ハンクス平衡塩類溶液
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl] ethanesulfonic acid
HEK-293 細胞	ヒト胎児腎細胞
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthine
IC ₅₀	50%抑制濃度
ID ₅₀	50%抑制用量
K _d	解離定数
K _i	結合阻害定数
MEM	最小必須培地
MPE	最大可能効力
OAB	過活動膀胱
QOL	生活の質
SEM	標準誤差
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane

第1章 緒言

過活動膀胱 (Overactive Bladder: OAB) は蓄尿障害である。国際禁制学会の用語標準化報告によると、OAB とは「切迫性尿失禁の有無に係わらず尿意切迫感を有する状態であり、通常、頻尿及び夜間頻尿を伴い、かつ炎症・感染又は他の明らかな病理変化が認められないもの」を指す^{1,2}。より具体的には、OAB とは尿意切迫感（突然起こる、我慢できないような強い尿意であり通常の尿意との相違の説明が困難なもの³）を必須症状とし、多くの場合は、これに頻尿（排尿回数が多過ぎるという患者の愁訴³）や夜間頻尿（夜間就寝中に排尿のために少なくとも1回は睡眠が中断されること³）を伴うものである。また OAB 患者の約半数では、切迫性尿失禁（尿意切迫感と同時または尿意切迫感の直後に、不随意に尿が漏れるという愁訴³）が見られる⁴。OAB は病因に基づいて、脳血管障害、パーキンソン病や脊髄障害などに由来する神経因性型と、特発性及び前立腺肥大症のような下部尿路閉塞疾患、加齢や骨盤底の脆弱化などに由来する非神経因性型とに大別される⁵。

OAB の頻度は、欧米諸国の報告では地域住民の 10-20%とされる^{6,7}。国内でも、日本排尿機能学会が 2002 年に実施した全国 40 歳以上の男女を対象とした調査⁴では、12.4%（2013 年に実施された吉田ら⁸の疫学調査では 20.0%）と報告されており、推定実数は 810 万人に及ぶ。OAB は加齢にともない罹患率が高まるとともに、長時間の移動を伴う旅行ができない、十分な睡眠が取れないなどの日常生活の質（Quality of Life: QOL）を著しく低下させることも知られ^{9,10}、OAB を有する者の中で何らかの排尿症状で生活に影響があったとする者は 53.0%に達する⁴。このような背景から、近年 OAB は一般的で、治療対象として重要な疾患と捉えられている。

臨床における OAB 治療として、行動療法、薬物療法や神経変調療法（ニューロモデュレーション）などが行われる^{11,12,13}が、その主体は薬物療法である。現在の薬物療法では主に抗コリン系薬剤が用いられており、国内では oxybutynin, propiverine, tolterodine, solifenacin, imidafenacin 及び fesoterodine が使用可能である。抗コリン薬は膀胱に直接作用し、排尿筋の収縮を司るムスカリン受容体を遮断することで OAB 患者に頻発する過度な膀胱収縮を抑制する。しかし、全身投与した抗コリン薬は膀胱だけでなく、唾液腺、腸管、毛様体や心臓などにも作用し、口渇、便秘、視覚障害、頻脈などの副作用を伴うことが知られており^{14,15,16}、患者によっては効果発現用量まで投与量を上げられない例、副作用を嫌い脱落する例もいる。また膀胱には一部 atropine 抵抗性収縮のあることが知られており、抗コリン薬治療抵抗性患者が存在する^{15,17,18}。この様に、副作用ならびに治療効果の面から、抗コリン薬の治療継続率は低く^{19,20}（6 ヶ月: 50%、1 年: 25%²¹）、医療現場での治療満足度は必ずしも高くない。こうした背景から、抗コリン薬とは異なる作用機序を有する OAB 治療薬が待ち望まれており、多くの研究、開発が行われてきた。こうした中で、末梢性に作用して膀胱を弛緩させる β_3 アドレナリン受容体刺激薬では、臨床において OAB に対する有用性が示され^{22,23}、2011 年 9 月にはアステラ

ス製薬株式会社から新規作用機序の OAB 治療薬として mirabegron (ベタニス®錠) が上市された²⁴。しかし、mirabegron には生殖器への影響や、循環器系や肝機能に対する副作用も懸念されることから、医療現場へさらなる治療選択肢を提供することは依然として重要な課題である。

膀胱と尿道からなる下部尿路は蓄尿と尿排出の相反する機能を司り、その機能は末梢及び中枢の神経路を介して複雑に制御されている (図 1)。これまでの基礎的な検討から、脊髄から大脳皮質までの多くの部位が排尿に関連していることが示されており、種々の伝達物質が脊髄とその上位中枢で排尿をコントロールしている²⁵。こうした知見を踏まえ、OAB による膀胱から中枢への信号伝達過敏状態を脊髄、上位中枢レベルで抑制することを作用機序とする新規 OAB 治療薬創出の試みが数多く行われ、ドパミン²⁶、セロトニン²⁷、GABA²⁸やオピオイド^{29,30,31,32,33}などが有望な調節因子候補として挙げられている。このような中枢仲介性の機序を有する OAB 治療薬は、中枢性の副作用は懸念されるものの、膀胱に直接作用する既存の抗コリン薬や β_3 刺激薬とは作用、副作用ともに全く異なる治療薬になり得るものとして期待できるが、臨床においてその有用性はまだ十分に示されていない。

オピオイド受容体は、主に μ 、 δ 及び κ のサブタイプに分類され、鎮痛作用を始めとした様々な生体反応に関与している (表 1)。排尿機能においては、 μ 及び δ オピオイド受容体作動薬が橋排尿中枢³⁴や脊髄の仙髄副交感神経核³⁵や尿道括約筋の運動核³⁶などの種々の場所で排尿反射の制御に関与することが報告されている。また、オピオイド受容体拮抗薬 naloxone の投与により排尿が促進されることが動物及びヒトで報告されており、中枢のオピオイドが排尿反射に対して恒常的な抑制をかけていると考えられる²⁵。これより、オピオイド受容体作動薬は OAB 治療に有効と考えられるが、QOL 改善薬として高い安全性が求められる OAB 治療薬において、オピオイドで懸念される便秘や薬物依存などは大きな問題であった。しかし、近年いくつかのオピオイド受容体作動薬で、排尿反射抑制作用を有しつつオピオイド由来の副作用は少ないものが報告されてきており^{29,33}、オピオイド受容体作動薬は新規機序の有望な OAB 治療薬になり得ると考えられる。

TRK-130 (化学名 : *N*-[(5*R*,6*R*,9*R*,13*S*,14*S*)-17-(Cyclopropylmethyl)-4,5-epoxy-3,14-dihydroxymorphinan-6-yl]phthalimide、一般名 : naltalimide、図 2) は東レ株式会社のオピオイド探索研究において見出された経口投与可能な新規 μ オピオイド受容体部分作動薬である。本研究では、TRK-130 の OAB 治療薬としての薬理学的特性を明らかにすることを目的として、TRK-130 のヒトオピオイド受容体サブタイプに対する *in vitro* 選択性評価、作動活性評価から始まり、麻酔処置または覚醒下のラットやモルモットを用いた各種 *in vivo* 評価系により、TRK-130 の排尿反射抑制作用について、既存の μ オピオイド受容体作動薬 (morphine/buprenorphine、図 3) や抗コリン薬 (oxybutynin、図 3) との作用比較を取り入れながら評価を行い、当該化合物の排尿機能に対する薬理学的特

性やその作用機序について詳細な検討を行った。また、併せて、TRK-130 の安全性を確認するため、 μ オピオイド由来の代表的な副作用の一つである便秘について、マウス腸管輸送能に対する TRK-130 の作用を評価することにより検討した。

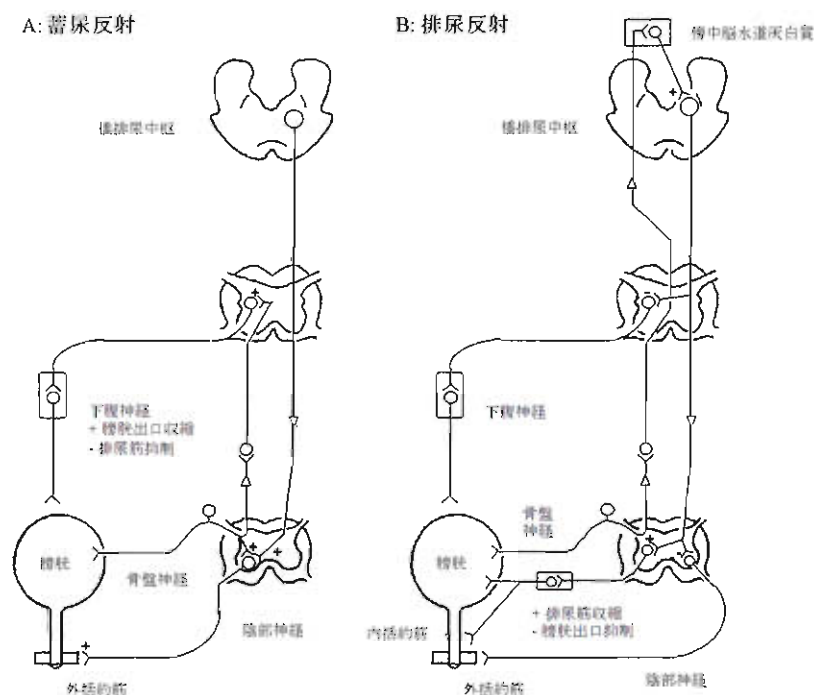


図 1. 下部尿路の神経機構^{25*}

*：一部改變

表 1. オピオイド受容体サブタイプ^{37*}

	μ 受容体	δ 受容体	κ 受容体
内因性リガンド	β -endorphin, endomorphin-1, endomorphin-2	Met-enkephalin, Leu-enkephalin	dynorphin
主な作動薬	morphine, codeine, pethidine, fentanyl, oxycodone	Met-enkephalin, Leu-enkephalin	ketocyclazocine, nalfurafine
選択的作動薬	DAMGO	SNC-80, DPDPE	U50448H, U69593
選択的拮抗薬	β -funaltrexamine (β -FNA)	naltrindole (NTI)	nor-binaltorphimine (Nor-BNI)
生理機能	鎮痛、鎮咳、多幸福感、身体精神依存、徐脈、排尿反射抑制、神経伝達物質の遊離抑制など	鎮痛、情動、身体精神依存、排尿反射抑制、神経伝達物質の制御	鎮痛、鎮咳、鎮静、縮瞳、徐脈、利尿、止痒、嫌悪感
脳内分布	大脳皮質、視床、扁桃核、青斑核、孤束核、黒質など	大脳皮質、側坐核など	脊髄、線条体、側坐核、孤束核、視床下部など

*：一部改變

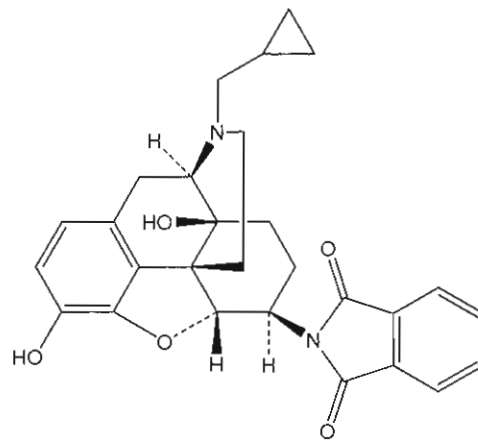
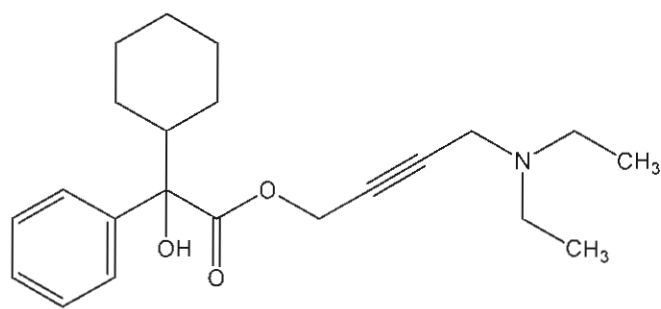
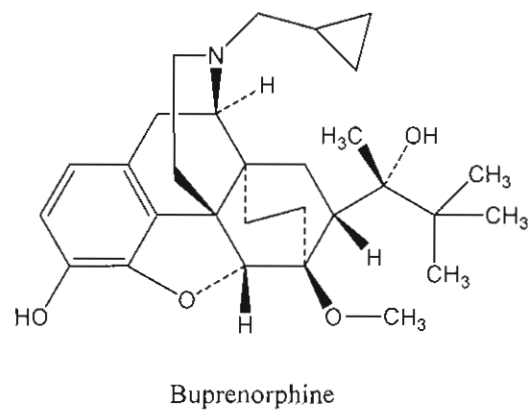
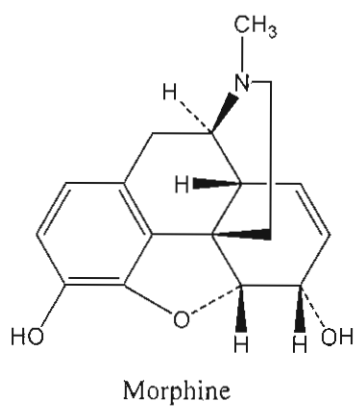


図 2. TRK-130 構造式



Oxybutynin

図 3. Morphine、buprenorphine 及び oxybutynin の構造式

第2章 ヒト μ 、 δ 及び κ オピオイド受容体に対する結合親和性評価

2.1. 目的

本試験は、TRK-130 のオピオイド化合物としての薬理学的特性を検討する一環として、ヒト μ 、 δ オピオイド受容体サブタイプをそれぞれ安定発現させた CHO 細胞、ヒト κ オピオイド受容体サブタイプを安定発現させた HEK-293 細胞由来の細胞膜を用いた受容体結合試験により、TRK-130 の各オピオイド受容体サブタイプに対する親和性を評価することを目的として実施した。代表的な μ オピオイド受容体リガンドである morphine も同時に評価し TRK-130 と比較検討した。

2.2. 実験方法

本試験は Eurofins Panlabs Taiwan (Taipei, Taiwan) (Catalogue #260110, 260210, 260410) に委託して実施した。

2.2.1. 試薬

被験化合物として TRK-130 (東レ医薬研究所にて合成) を、対照化合物として morphine hydrochloride (Eurofins Panlabs Taiwan 提供) (以下、morphine と表記) を用いた。TRK-130 は 10 mmol/L のストック溶液を調製するため 1.1 mol 当量 methanesulfonic acid 含有 10% DMSO 溶液に溶解し、反応溶液に添加時には、目的の濃度となるよう 10% DMSO 溶液を用いて適宜希釈した溶液を調製した (methanesulfonic acid 及び DMSO の最終濃度はそれぞれ 110 μ mol/L 以下、0.1% になるよう調製)。なお、methanesulfonic acid のアッセイ系への影響について、110 μ mol/L methanesulfonic acid 含有 0.1% DMSO 溶液の 3 つの受容体結合試験に対する影響を事前に検討し、問題ないことを確認した。

Morphine は 10 mmol/L のストック溶液を調製するため 100% DMSO 溶液に溶解し、反応溶液に添加時には、目的の濃度となるよう 100% DMSO 溶液を用いて適宜希釈した溶液を調製した (DMSO の最終濃度は 1% になるよう調製)。

放射性標識化合物として [3 H] diprenorphine (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) 及び [3 H] naltrindole (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) を用いた。

2.2.2. オピオイド受容体結合試験

2.2.2.1. μ オピオイド受容体

ヒト μ オピオイド受容体結合試験では、ヒト μ オピオイド受容体を強制発現させた CHO 細胞由来の膜標本を用いた。

各チューブに膜標本懸濁液 (インキュベーション用バッファー [50 mmol/L Tris-HCl バッファー、pH7.4] に懸濁) を 200 μ L (膜最終濃度: 35 μ g protein/mL)、目的の濃度になるよう調製した評価化合物溶液を 2.2 μ L、[3 H] diprenorphine 溶液 (インキュベーション用バッファーで希釈) を 20 μ L (最終濃度: 0.6 nmol/L) ずつ加え、反応を開始した。

反応はインキュベーション用バッファー中で、25°C で 60min 行なった。

反応液を GF/B フィルターで濾過することで反応を終了させ、フィルター上に捕えられた [³H] diprenorphine の放射エネルギーを液体シンチレーションカウンター (LKB Wallac Betaplate Liquid Scintillation Counter) で測定し、結合量を求めた。 [³H] diprenorphine の非特異的結合量は 10 μmol/L の naloxone 存在下における [³H] diprenorphine の結合量から求めた³⁸。

2.2.2.2. δ オピオイド受容体

ヒト δ オピオイド受容体結合試験では、ヒト δ オピオイド受容体を強制発現させた CHO 細胞由来の膜標本を用いた。

各チューブに膜標本懸濁液 (インキュベーション用バッファー [5 mmol/L MgCl₂ を含む 50 mmol/L Tris-HCl バッファー、pH7.4] に懸濁) を 200 μL (膜最終濃度: 119 μg protein/mL)、目的の濃度になるよう調製した評価化合物溶液を 2.2 μL、 [³H] naltrindole 溶液 (インキュベーション用バッファーで希釈) を 20 μL (最終濃度: 0.9 nmol/L) ずつ加え、反応を開始した。反応はインキュベーション用バッファー中で、25°C で 120min 行なった。

以下、2.2.2.1 と同様にして [³H] naltrindole の結合量を求めた。 [³H] naltrindole の非特異的結合量は 10 μmol/L の naloxone 存在下における [³H] naltrindole の結合量から求めた³⁹。

2.2.2.3. κ オピオイド受容体

ヒト κ オピオイド受容体結合試験では、ヒト κ オピオイド受容体を強制発現させた HEK-293 細胞由来の膜標本を用いた。

各チューブに膜標本懸濁液 (インキュベーション用バッファー [50 mmol/L Tris-HCl バッファー、pH7.4] に懸濁) を 200 μL (膜最終濃度: 105 μg protein/mL)、目的の濃度になるよう調製した評価化合物溶液を 2.2 μL、 [³H] diprenorphine 溶液 (インキュベーション用バッファーで希釈) を 20 μL (最終濃度: 0.6 nmol/L) ずつ加え、反応を開始した。反応はインキュベーション用バッファー中で、25°C で 60min 行なった。

以下、2.2.2.1 と同様にして [³H] diprenorphine の結合量を求めた。 [³H] diprenorphine の非特異的結合量は 10 μmol/L の naloxone 存在下における [³H] diprenorphine の結合量から求めた^{40,41}。

2.2.3. データ処理及びデータ解析に使用した統計学的手法

Ki 値を算出するため、評価化合物の 5~7 濃度 (各濃度は 2 回測定) で実施した結合阻害試験 (3 回実施) から得られた結合阻害曲線を基に IC₅₀ 値を算出した。

評価化合物の各濃度での結合阻害率 (%) は以下の計算式に従い算出した。

$$\text{結合阻害率 (\%)} = 100 - \frac{\text{評価化合物存在下での放射性標識化合物結合量} - \text{非特異的結合量}}{\text{放射性標識化合物総結合量} - \text{非特異的結合量}} \times 100$$

各結合阻害曲線の非線形回帰分析により評価化合物の IC₅₀ 値を算出した。また Ki 値は以下の計算式に従い算出し、平均値±SEM で表示した。

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \text{Ligand}/K_d} \times 100$$

Ligand: アッセイに用いた放射性標識化合物濃度

K_d: μ=0.41 nmol/L、δ=0.49 nmol/L、κ=0.4 nmol/L（委託先で取得済みの各放射性標識化合物の K_d 値を使用）

2.3. 結果

始めに予備検討として、各受容体サブタイプに対する 10 μmol/L での結合阻害率を評価した。TRK-130 は 10 μmol/L にて、³H] diprenorphine の μ 及び κ オピオイド受容体に対する結合をいずれも 100%阻害し、³H] naltrindole の δ オピオイド受容体に対する結合を 101%阻害した。Morphine は 10 μmol/L にて、³H] diprenorphine の μ 及び κ オピオイド受容体に対する結合をそれぞれ 100%及び 85%阻害し、³H] naltrindole の δ オピオイド受容体に対する結合を 62%阻害した。そこで、TRK-130 及び morphine の μ、δ、κ オピオイド受容体それぞれに対する結合親和性を調べるため、これら化合物の濃度を 5～7 点とって、結合親和性を表す K_i 値を求めた。その結果、TRK-130 の K_i 値は、μ オピオイド受容体で 0.268±0.012 nmol/L、δ オピオイド受容体で 121±6 nmol/L、κ オピオイド受容体で 8.97±1.05 nmol/L であり、morphine の K_i 値は、μ オピオイド受容体で 11.5±0.4 nmol/L、δ オピオイド受容体で 1517±150 nmol/L、κ オピオイド受容体で 445±11 nmol/L であった（表 2）。TRK-130 は δ、κ オピオイド受容体に比べ、μ オピオイド受容体に対して高い親和性（δ の 451 倍、κ の 33.5 倍）を有しており、また morphine は μ オピオイド受容体に対して δ 受容体の 132 倍、κ 受容体の 38.7 倍高親和性であった。TRK-130 は morphine との比較において、いずれのオピオイド受容体に対しても高親和性を示し、μ オピオイド受容体に対する TRK-130 の K_i 値は morphine の 1/43 であり、TRK-130 は morphine よりもヒト μ オピオイド受容体に対してより高い親和性を有していることが示された。

表 2. ヒト μ 、 δ 及び κ オピオイド受容体に対する TRK-130、morphine の親和性

Compound	K _i (nmol/L)			Selectivity ratio	
	μ Opioid receptor	δ opioid receptor	κ opioid receptor	δ/μ	κ/μ
TRK-130	0.268 \pm 0.012	121 \pm 6	8.97 \pm 1.05	451	33.5
Morphine	11.5 \pm 0.4	1517 \pm 150	445 \pm 11	132	38.7

K_i 値は 3 回の実験から得られた結果の平均値 \pm SEM で表示

2.4. 考察

ヒト μ 、 δ オピオイド受容体サブタイプをそれぞれ安定発現させた CHO 細胞、ヒト κ オピオイド受容体サブタイプを安定発現させた HEK-293 細胞由来の細胞膜を用いた受容体結合試験により、TRK-130 の各ヒトオピオイド受容体サブタイプに対する親和性を評価した。その結果、TRK-130 は morphine に比べ、いずれのオピオイド受容体サブタイプに対しても高い親和性を有していることが示された。また TRK-130 は 3 種のオピオイド受容体サブタイプのうち μ 受容体に対して最も高い結合親和性を有することが明らかとなった。

第3章 ヒト μ 、 δ 及び κ オピオイド受容体に対する作動活性評価

3.1. 目的

本試験は、TRK-130 のオピオイド化合物としての薬理学的特性を解析する一環として、ヒト μ 、 δ 及び κ オピオイド受容体サブタイプをそれぞれ単独に安定発現させた CHO 細胞にて、50 $\mu\text{mol/L}$ forskolin 誘発細胞内 cAMP 産生に対する抑制作用を指標に TRK-130 の作動活性を評価することを目的として実施した。臨床上利用可能な μ オピオイド受容体作動薬である morphine、buprenorphine についても同様に評価し TRK-130 と比較検討した。なお、これらの試験では標準的完全作動薬として、DAMGO (μ オピオイド受容体)、DPDPE (δ オピオイド受容体) 及び U-69593 (κ オピオイド受容体) を使用した。

3.2. 実験方法

3.2.1. 試薬

被験化合物として TRK-130 (東レ医薬研究所にて合成) を、対照化合物として DAMGO (SIGMA-ALDRICH、St. Louis、MO、USA)、DPDPE (SIGMA-ALDRICH、St. Louis、MO、USA)、U-69593 (SIGMA-ALDRICH、St. Louis、MO、USA)、morphine hydrochloride (武田薬品工業、大阪) (以下、morphine と表記)、buprenorphine hydrochloride (レパテン注 [0.3 mg/1.5 mL]、大塚製薬、東京) (以下、buprenorphine と表記) を用いた。また cAMP 産生のための細胞刺激試薬として forskolin (SIGMA-ALDRICH、St. Louis、MO、USA) を用いた。

TRK-130 は 10 mmol/L のストック溶液を調製するため 1.1 mol 当量 methanesulfonic acid 含有 10% DMSO 溶液に溶解した。DAMGO、DPDPE 及び morphine は蒸留水に、U-69593 は ethanol に溶解して用時調製で 10 mmol/L とした。実験当日は、各 10 mmol/L 溶液をバッファーを用いて段階希釈し、目的とする濃度の 4 倍濃い溶液を調製して、刺激用バッファーにて 200 $\mu\text{mol/L}$ とした forskolin 溶液の等量と使用直前に混合した。

AlphaScreen™ cAMP アッセイキットは PerkinElmer (Waltham、MA、USA) より購入し、以下の手順に従って forskolin 刺激した CHO 細胞中の cAMP 量を測定した。アッセイキットの取扱説明書に従いキット付属の凍結乾燥試薬を用いて 50 $\mu\text{mol/L}$ cAMP 溶液を調製し、刺激用バッファーを用いて段階希釈により cAMP スタANDARD溶液を用意した。同様に streptavidin donor beads を含むビオチン化 cAMP 検出溶液を lysis/detection バッファー (0.1% BSA、0.3% Tween-20、5 mM HEPES、pH 7.4) で希釈し、使用直前に暗所にて 25°C で 30min インキュベーションした。

3.2.2. 細胞

ヒト μ オピオイド受容体 cDNA は pEF/myc/cyto ベクターに、ヒト κ オピオイド受容体 cDNA は pCR3 ベクターに組み込み CHO-K1 細胞 (宿主細胞) に導入し、ヒト δ オピ

オピオイド受容体 cDNA は pCR3 ベクターに組み込み CHO-dhfr(-) (宿主細胞) に導入した後、安定的に導入されたクローンのみを選択した (μ 受容体発現 μ /CHO-K1/20-25 細胞、 κ 受容体発現 κ /CHO-K1/26-19 細胞及び δ 受容体発現 δ /CHO-dhfr(-)/13 細胞)。これらのヒトオピオイド受容体発現 CHO-dhfr(-) 細胞及び CHO-K1 細胞は、それぞれ ribonucleosides 及び deoxyribonucleosides を添加または非添加の 10% FBS、100 units/mL penicillin、100 μ g/mL streptomycin 及び 0.6 mg/mL G418 disulfate 含有 α -MEM 培地中で 5% CO₂ 下 37°C にて培養した。なお、宿主細胞の培養には、G418 disulfate を除いた培地を用いた。

実験に用いる前に、CHO-dhfr(-) または CHO-K1 細胞の培養フラスコから培地を取り除き、細胞表面を PBS(-) で 2 回洗浄し、0.53 mmol/L EDTA/PBS を加えて培養フラスコから剥離するまで室温下でインキュベーションした。剥離した細胞は遠心して集め、最終濃度が 10,000 cells/ μ L となるよう 0.5 mmol/L IBMX、5 mmol/L HEPES 及び 0.1% BSA 含有 HBSS (pH 7.4) (下記刺激用バッファー) に再懸濁した。

3.2.3. オピオイド受容体作動活性評価

Forskolin 誘発細胞内 cAMP 産生に対する抑制作用を指標としたヒトオピオイド受容体作動活性評価法の概略を図 4 に示した。

CHO 細胞における forskolin 刺激 cAMP 産生に対する被験化合物、対照化合物の影響は、384 well のマイクロプレート (OptiPlate-384 NEW, PerkinElmer, Waltham, MA, USA) を用いて検討した。

CHO 細胞 (7,500-10,000 cells) と anti-cAMP acceptor beads (1 Unit) を含む 5 μ L の刺激バッファーに 100 μ mol/L forskolin と被験化合物または対照化合物を含む 5 μ L の刺激用バッファーを加え、暗所にて 25°C で 60min 反応させた。その後、streptavidin donor beads を含む biotinylated-cAMP 検出用溶液 (1 Unit/well each) を 15 μ L 添加し、暗所にてさらに 25°C で 120min 反応させた後、Fusion α universal microplate reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) を用いて蛍光シグナル強度 (AlphaScreen signals: cps) を測定した。

cAMP 検量線作成用に、cAMP スタンダード溶液 (最終濃度範囲: 1~100 nmol/L) に anti-cAMP acceptor beads のみを含む溶液を加え、以降は上記と同様の手順で cps を測定した。

cAMP スタンダード溶液から得られた cps を cAMP 濃度に対してプロットし、線形回帰分析により検量線を作成し、評価化合物を添加して得られた cps から cAMP 濃度を定量した。Forskolin 刺激処置しない細胞での cAMP 濃度は検出下限 (<1 nmol/L) 以下であったため、測定値の補正は行わなかった。なお、各オピオイド受容体の標準的完全作動薬の作用は、それぞれの宿主細胞では検出されないことを事前に確認した。

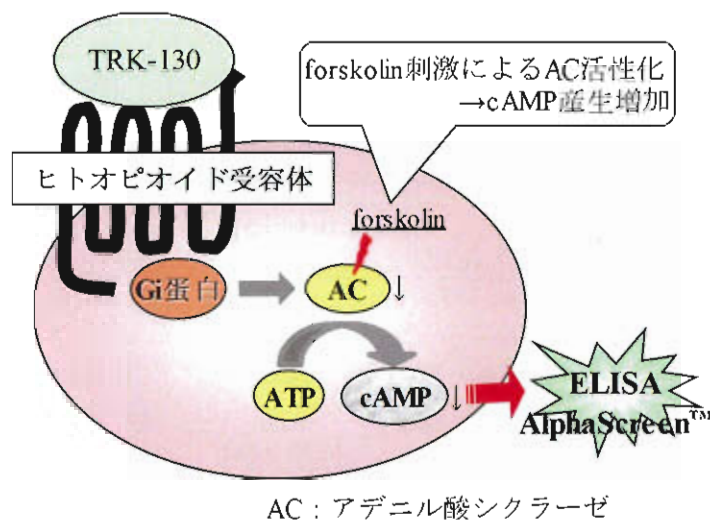


図 4. オピオイド受容体作動活性評価法の概略

3.2.4. データ処理及びデータ解析に使用した統計学的手法

被験化合物または対照化合物を添加して得られた cAMP 量は、forskolin 単独刺激時の細胞内 cAMP 量を 100%とした時の変化率(%)で表示した。各サブタイプ受容体の発現細胞における、被験化合物または対照化合物の最大抑制率(3,000 nmol/L での抑制率)は、各受容体サブタイプの標準的完全作動薬の最高濃度で得られた cAMP 産生に対する抑制率を 100%とした時の各対象化合物の最高濃度での抑制率(% of full inhibition: Emax)として求め、平均値±SEM で表示した。また、非線形回帰分析により各対象化合物の最高濃度での抑制率を 100%とした時の 50%有効濃度(EC₅₀)及び 95% CI をそれぞれ算出した。なお、最高濃度に隣接する 2 濃度レベルの cAMP 量が±5%の範囲内であった場合、cAMP 産生阻害はプラトーに達していると判断し、Emax 値及び EC₅₀ 値を算出したが、最高濃度でプラトーに達しなかった場合は、いずれも算出しなかった。

Emax 値における群間の有意差検定では、Bartlett 検定により分散の均一性を検証し(有意水準は 0.05)、分散が均一な場合は Tukey 法により全ての二群同士を比較する多重比較検定を行った。分散が不均一な場合には Steel-Dwass 法により全ての二群同士を比較する多重比較検定を行った。いずれも検定方向は両側とし、有意水準は 0.05 とした。

3.3. 結果

ヒト μ 、 δ 及び κ オピオイド受容体サブタイプをそれぞれ単独に安定発現させた CHO 細胞にて、50 μ mol/L forskolin 誘発の細胞内 cAMP 産生に対する抑制作用を指標に TRK-

130 の作動活性を評価した。Morphine、buprenorphine についても同様に評価し TRK-130 と比較検討した。各評価化合物の EC₅₀ 値及び Emax 値を表 3 に示した。

表 3. TRK-130、morphine 及び buprenorphine のヒトオピオイド受容体サブタイプ安定発現細胞における作動活性 (forskolin 誘発細胞内 cAMP 産生の抑制) 評価

Compound	μ opioid receptor		δ opioid receptor		κ opioid receptor	
	EC ₅₀ [95% CI] (nmol/L)	Emax (%)	EC ₅₀ [95% CI] (nmol/L)	Emax (%)	EC ₅₀ [95% CI] (nmol/L)	Emax (%)
TRK-130	2.39 [1.85-3.09]	66.1±3.9 a,b,c	26.1 [22.4-30.5]	71.0±1.9 d,e	9.51 [8.40-10.8]	62.6±1.3 d,e
Morphine	19.9 [18.4-21.5]	100.0±1.0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Buprenorphine	4.49 [4.11-4.91]	90.8±1.4 a,b	8.00 [6.59-9.68]	62.2±2.4 d	2.08 [1.53-2.68]	20.5±0.7 d
DAMGO	2.07 [1.92-2.23]	100.0±0.9	-	-	-	-
DPDPE	-	-	0.527 [0.456-0.608]	100.0±0.7	-	-
U-69593	-	-	-	-	1.64 [1.55-1.73]	100.0±0.4

N.D.: 算出せず、-: 未実施

EC₅₀ 値は平均値と 95% CI で表示

Emax 値は平均値±SEM で表示

a P<0.05 vs. 対応する受容体の標準的完全作動薬 (両側 Steel-Dwass test)

b P<0.05 vs. morphine (両側 Steel-Dwass test)

c P<0.05 vs. buprenorphine (両側 Steel-Dwass test)

d P<0.05 vs. 対応する受容体の標準的完全作動薬 (両側 Tukey test)

e P<0.05 vs. buprenorphine (両側 Tukey test)

ヒト μ オピオイド受容体発現細胞において、TRK-130 は 50 $\mu\text{mol/L}$ forskolin 刺激による細胞内 cAMP 産生に対し濃度依存的な阻害を示した (図 5)。TRK-130 の E_{max} 値は $66.1 \pm 3.9\%$ であり、標準的完全作動薬 DAMGO の値に比べ有意に低かった。この結果は TRK-130 が μ オピオイド受容体の部分作動薬であることを示唆するものと考えられる。Morphine 及び buprenorphine も濃度依存的な阻害を示した。 E_{max} 値はそれぞれ $100.0 \pm 1.0\%$ と $90.8 \pm 1.4\%$ であり、buprenorphine の E_{max} 値は DAMGO に比べ有意に低かった。TRK-130 の E_{max} 値は morphine と buprenorphine に比べても有意に低かった。 μ オピオイド受容体に対する EC_{50} 値は、TRK-130、morphine、buprenorphine 及び DAMGO でそれぞれ、2.39 nmol/L [95% CI: 1.85-3.09]、19.9 nmol/L [95% CI: 18.4-21.5]、4.49 nmol/L [95% CI: 4.11-4.91] 及び 2.07 nmol/L [95% CI: 1.92-2.23] であり、 $\text{DAMGO} < \text{TRK-130} < \text{buprenorphine} < \text{morphine}$ の順であった。

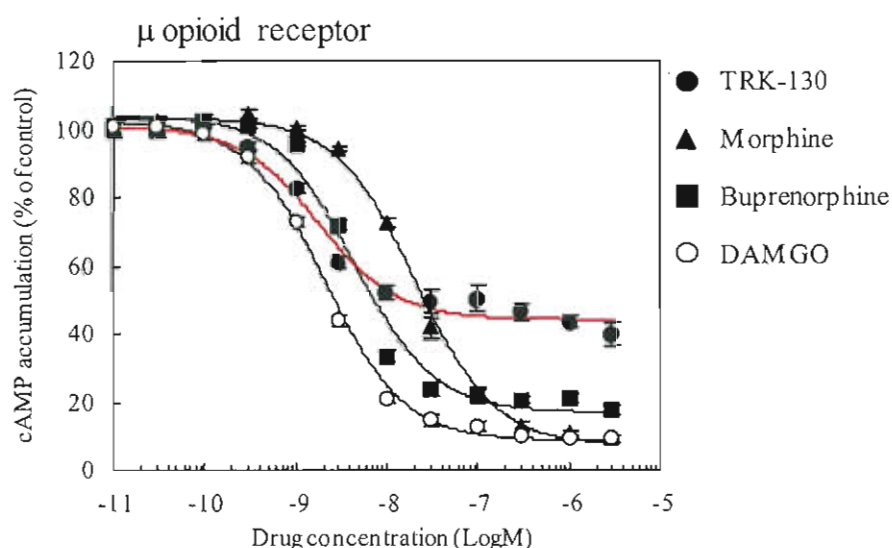


図 5. TRK-130 のヒト μ オピオイド受容体安定発現細胞における作動活性 (forskolin 誘発細胞内 cAMP 産生の抑制) 評価

細胞内 cAMP 産生は 50 $\mu\text{mol/L}$ forskolin 単独刺激時の細胞内 cAMP 産生量を 100%としたときの変化率 (%) で表示

各点は個別に実施した 3 回の実験から得られた 6well 分の結果の平均値 \pm SEM で表示

ヒト δ オピオイド受容体発現細胞においても、TRK-130 は forskolin 刺激による細胞内 cAMP 産生を濃度依存的に阻害した (図 6)。TRK-130 の E_{max} 値は $71.0 \pm 1.9\%$ であり、標準的完全作動薬 DPDPE の値に比べ有意に低かった。この結果は TRK-130 が δ オピオイド受容体の部分作動薬であることを示唆するものと考えられる。Morphine 及び buprenorphine も濃度依存的な阻害を示した。Buprenorphine の E_{max} 値は $62.2 \pm 2.4\%$ であり、DPDPE の値に比べ有意に低かった。一方、morphine は検討した濃度範囲で抑制作用が頭打ちにならなかったため、 E_{max} 値及び EC_{50} 値は算出しなかった。 δ オピオイド受容体に対する EC_{50} 値は、TRK-130、buprenorphine 及び DPDPE でそれぞれ、 26.1 nmol/L [95% CI: 22.4-30.5]、 8.00 nmol/L [95% CI: 6.59-9.68] 及び 0.527 nmol/L [95% CI: 0.456-0.608] であり、 $DPDPE < buprenorphine < TRK-130$ の順であった。

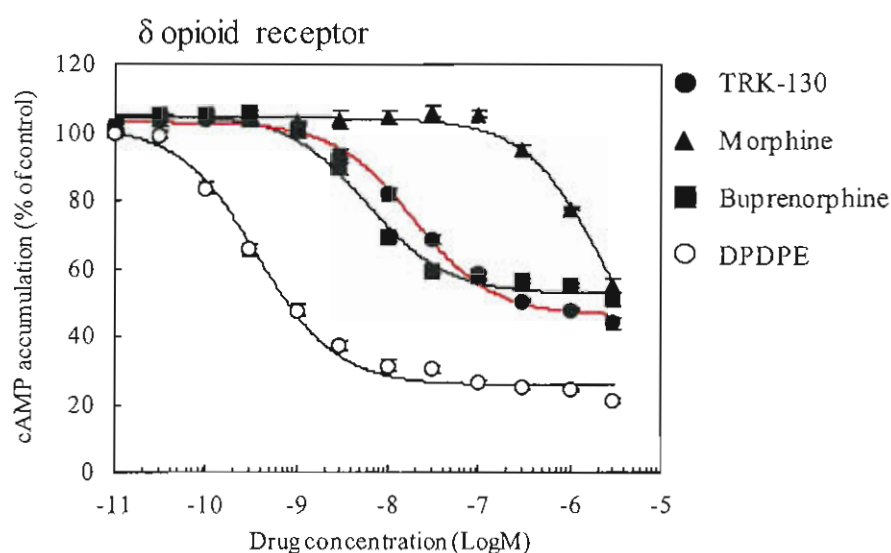


図 6. TRK-130 のヒト δ オピオイド受容体安定発現細胞における作動活性 (forskolin 誘発細胞内 cAMP 産生の抑制) 評価

細胞内 cAMP 産生は $50 \mu\text{mol/L}$ forskolin 単独刺激時の細胞内 cAMP 産生量を 100%としたときの变化率 (%) で表示

各点は個別に実施した 3 回の実験から得られた 6 well 分の結果の平均値 \pm SEM で表示

ヒト κ オピオイド受容体発現細胞においても、TRK-130 は forskolin 刺激による細胞内 cAMP 産生を濃度依存的に阻害した (図 7)。Emax 値は $62.6 \pm 1.3\%$ であり、標準的完全作動薬である U-69593 の値に比べ有意に低かった。この結果は TRK-130 が κ オピオイド受容体の部分作動薬であることを示唆するものと考えられる。Morphine 及び buprenorphine も濃度依存的な阻害を示した。Buprenorphine は、Emax 値が $20.5 \pm 0.7\%$ と κ オピオイド受容体に対してわずかであるが検出可能な作動活性を示し、U-69593 の値に比べて有意に低かった。Morphine は検討した濃度範囲で抑制作用が頭打ちにならなかったため、Emax 値及び EC_{50} 値は算出しなかった。 κ オピオイド受容体に対する EC_{50} 値は、TRK-130、buprenorphine 及び U-69593 でそれぞれ、 9.51 nmol/L [95% CI: $8.40\text{--}10.8$]、 2.08 nmol/L [95% CI: $1.53\text{--}2.68$] 及び 1.64 nmol/L [95% CI: $1.55\text{--}1.73$] であり、 $U\text{-}69593 < \text{buprenorphine} < \text{TRK-130}$ の順であった。

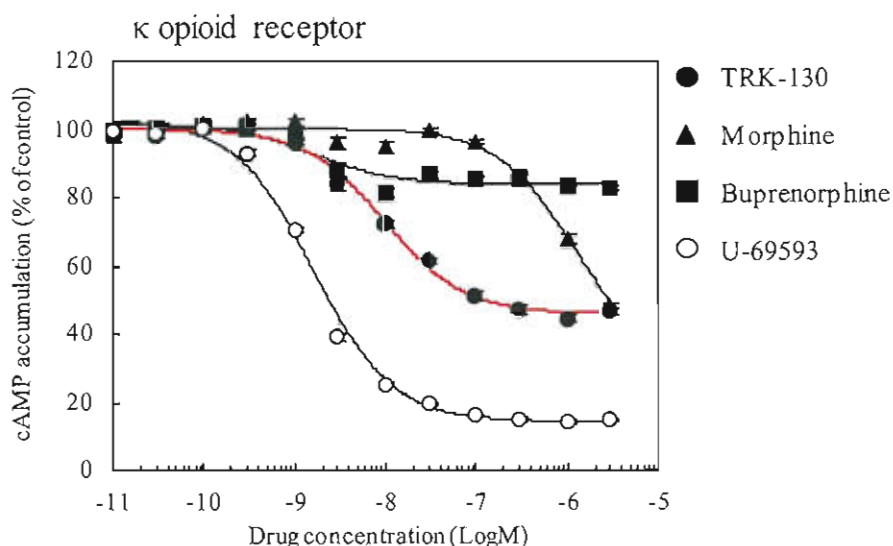


図 7. TRK-130 のヒト κ オピオイド受容体安定発現細胞における作動活性 (forskolin 誘発細胞内 cAMP 産生の抑制) 評価

細胞内 cAMP 産生は $50 \mu\text{mol/L}$ forskolin 単独刺激時の細胞内 cAMP 産生量を 100%としたときの変化率 (%) で表示

各点は個別に実施した 3 回の実験から得られた 6 well 分の結果の平均値 \pm SEM で表示

3.4. 考察

ヒト μ 、 δ 及び κ オピオイド受容体サブタイプをそれぞれ単独に安定発現させた CHO 細胞にて、50 $\mu\text{mol/L}$ forskolin 誘発の細胞内 cAMP 産生に対する抑制作用を指標に TRK-130 の作動活性を評価し、morphine 及び buprenorphine と比較した。その結果、TRK-130 はヒト μ 、 δ 及び κ オピオイド受容体いずれに対しても部分作動性を示し、 EC_{50} 値はそれぞれ 2.39、26.1 及び 9.51 nmol/L であることが示された。対照として評価した morphine はヒト μ オピオイド受容体完全作動性を示し、 EC_{50} 値は 19.9 nmol/L であった。また部分作動薬として知られている buprenorphine^{42,43}は、TRK-130 と同様にヒト μ 、 δ 及び κ オピオイド受容体いずれに対しても部分作動性を示し、 EC_{50} 値はそれぞれ 4.49、8.00 及び 2.08 nmol/L であった。TRK-130 は μ 受容体に対して buprenorphine よりも顕著な部分作動性を示し、一方、 δ 及び κ 受容体に対しては buprenorphine がより顕著な部分作動性を示すことが明らかとなった。

in vitro オピオイド受容体結合試験及び作動活性評価試験の結果より、TRK-130 は μ オピオイド受容体に選択的な部分作動薬であることが示された。

第4章 麻酔下モルモットの律動性膀胱収縮に対する作用

4.1. 目的

本試験は、TRK-130 の排尿反射抑制作用の確認及びその作用機序を検討する一環として、尿道結紮法を用いて麻酔下モルモットの律動性膀胱収縮に対する TRK-130 の抑制作用を評価することを目的として実施した。Morphine 及び代表的な抗コリン薬である oxybutynin も同時に評価し TRK-130 と比較検討した。

4.2. 実験方法

4.2.1. 試薬

被験化合物として TRK-130(東レ医薬研究所にて合成)を、対照化合物として morphine hydrochloride (武田薬品工業、大阪) (以下、morphine と表記) 及び oxybutynin chloride (SIGMA-ALDRICH、St. Louis、MO、USA) (以下、oxybutynin と表記) を用いた。溶媒には 0.02% citric acid 含有 5% キシリトール溶液 (キリット®注 5%、大塚製薬工場、徳島) を用い、目的の投与量になるよう適宜調製して使用した。

4.2.2. 動物

5 週齢の雌性 Hartley 系モルモット (日本エスエルシー、静岡) を用いた (体重 265～320 g)。

本試験は武田薬品工業の動物倫理委員会の承認を受けて実施した。

4.2.3. 尿道結紮法

尿道結紮法の概略を図 8 に示した。

本試験は土居ら⁴⁴の方法を参考にして行った。モルモットにウレタン (ethyl carbamate) を 1.2 g/kg の用量で腹腔内投与し麻酔した。腹部切開して膀胱を露出し、圧トランスデューサーと多チャンネルデータ取得システム (MP-100A-CE、Biopac Systems、Santa Barbara、CA、USA) により膀胱内圧を測定するため、20G 注射針の先端部分を取り付けたポリエチレンチューブを膀胱頂部に刺入して固定し、尿道は結紮した。律動的な膀胱収縮を発生させるため、ポリエチレンチューブを介して生理食塩水を膀胱内に適宜注入した。安定した律動性膀胱収縮が得られた個体に、各化合物を 0.5 mL/kg の投与容量で静脈内投与した。TRK-130 の投与量は 0.00125、0.0025、0.005 及び 0.01 mg/kg、morphine は 0.25、0.5 及び 1 mg/kg、oxybutynin は 1 mg/kg とした。化合物投与後、再び律動性膀胱収縮が発現するまで膀胱内圧を測定した (cut-off 時間: 60min)。測定パラメータは膀胱収縮の消失時間及び膀胱収縮時最高膀胱内圧とした。

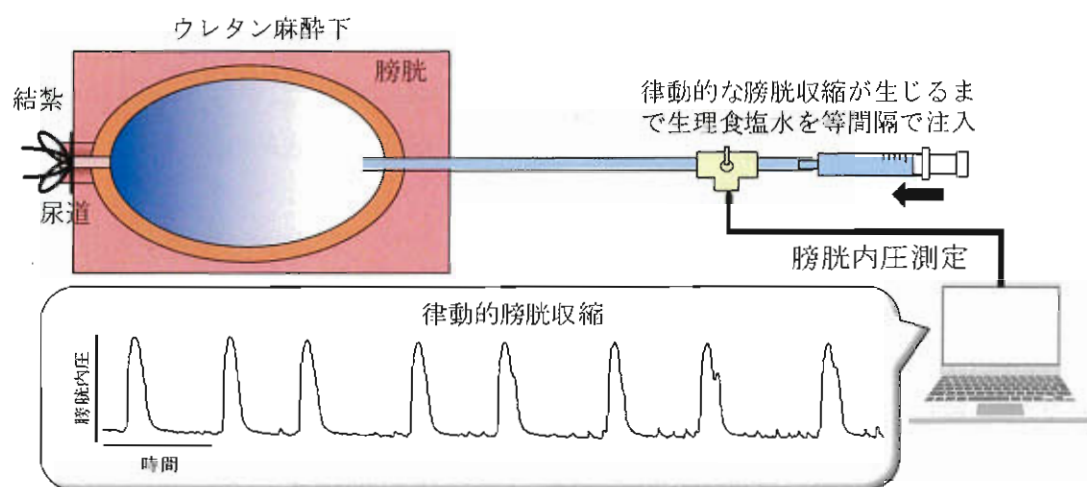


図 8. 尿道結紮法の概略

4.2.4. データ処理及びデータ解析に使用した統計学的手法

評価化合物の膀胱収縮消失時間から%MPE を以下の計算式により算出し、%MPE を基に非線形回帰分析により ED₃₀ 及び 95% CI をそれぞれ算出した。なお、本試験にて cut-off 時間とした 60min を越えて膀胱収縮が消失していた場合は、その個体の消失時間は 60min とした。各群のデータは平均値±SEM で表示した。

$$\%MPE = \frac{\text{化合物投与群の膀胱収縮消失時間(min)} - \text{溶媒投与群の膀胱収縮消失時間(min)}}{60\text{min} - \text{溶媒投与群の膀胱収縮消失時間(min)}} \times 100$$

評価化合物投与後の膀胱収縮時最高膀胱内圧は、投与前に対する変化率(%)に変換し解析に用いた。各群の結果は平均値±SEM で表示した。

群間の有意差検定では、oxybutynin (1 mg/kg) 投与群と対応する溶媒投与群の二群間の比較においては、F 検定により分散の均一性を検証し(有意水準は 0.05)、分散が均一な場合は Student's t 検定を行い、分散が不均一な場合には Aspin-Welch 検定を行った(有意水準は 0.05)。TRK-130 投与群または morphine 投与群と対応する溶媒投与群との多群間比較においては、評価化合物ごとに Bartlett 検定により分散の均一性を検証し(有意水準は 0.05)、分散が均一な場合は Williams 法により溶媒投与群に対する多重比較検定を行った。分散が不均一な場合には Shirley-Williams 法により溶媒投与群に対する多重比較検定を行った。いずれも検定方向は片側とし、有意水準は 0.025 とした。

4.3. 結果

尿道結紮法における麻酔モルモットの律動性膀胱収縮とそれに対する TRK-130 (0.01 mg/kg) 投与及び oxybutynin (1 mg/kg) 投与の代表的チャートを図 9 に示した。

静脈内投与した TRK-130 (0.00125、0.0025、0.005 及び 0.01 mg/kg) は用量依存的に膀胱収縮の消失時間を延長し、ED₃₀ 値は 0.0034 mg/kg [95% CI: 0.0014-0.0048] と算出された (表 4)。TRK-130 は最高膀胱内圧には影響を及ぼさなかった (表 5)。静脈内投与した morphine (0.25、0.5 及び 1 mg/kg) も TRK-130 と同様に用量依存的に膀胱収縮の消失時間を延長し、ED₃₀ 値は 0.62 mg/kg [95% CI: 0.35-0.77] と算出された。Morphine も最高膀胱内圧には影響を与えなかった。Morphine の結果は、以前の他報告⁴⁵と同様であった。

TRK-130 及び morphine とは対照的に、静脈内投与した oxybutynin (1 mg/kg) は、最高膀胱内圧を投与前値の 72.7±3.7%までに低下させ、溶媒投与群との比較において有意の低下を示したが、膀胱収縮の消失時間には影響を与えなかった。今回の oxybutynin の結果は、以前の他報告^{44,46}と同様であった。

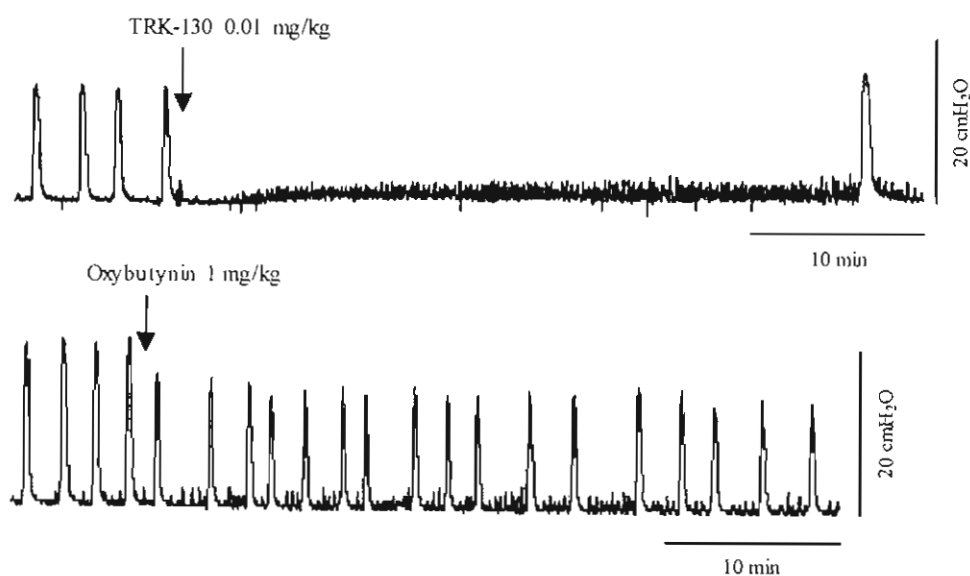


図 9. 麻酔下モルモットにおける律動性膀胱収縮の代表的チャート

表 4. 麻酔下モルモットにおける律動性膀胱収縮の消失時間に対する TRK-130、morphine 及び oxybutynin の作用

Group	Dose (mg/kg)	n	Shutdown time of bladder contractions (min)		%MPE	ED ₃₀ [95% CI] (mg/kg)
			Predrug	Postdrug		
Vehicle	-	6	3.3±0.4	3.9±0.6	0.0±1.0	0.0034 [0.0014-0.0048]
TRK-130	0.00125	6	3.3±0.4	4.7±0.9	1.4±1.6	
	0.0025	6	3.2±0.5	18.0±8.5*	25.2±15.2	
	0.005	6	3.1±0.4	28.0±7.8*	43.0±13.9	
	0.01	6	3.3±0.2	45.9±5.5*	74.8±9.8	
Vehicle	-	11	3.3±0.2	3.5±0.3	0.0±0.5	0.62 [0.35-0.77]
Morphine	0.25	10	3.3±0.2	5.5±0.7*	3.5±1.2	
	0.5	10	3.4±0.2	12.4±5.3*	15.7±9.5	
	1	10	3.4±0.2	44.1±8.1*	71.9±14.3	
Vehicle	-	6	2.8±0.2	4.3±0.7	0.0±1.3	-
Oxybutynin	1	6	2.8±0.5	5.0±1.5	1.2±2.7	

平均値±SEM で表示

* P<0.025 vs. 対応する溶媒投与群 (片側 Shirley-Williams' test)

表 5. 麻酔下モルモットにおける律動性膀胱収縮の最高膀胱内圧に対する TRK-130、morphine 及び oxybutynin の作用

Group	Dose (mg/kg)	n	Maximum intravesical pressure(cmH ₂ O)		% of predrug value
			Predrug	Postdrug	
Vehicle	-	6	18.4 ± 1.3	18.3 ± 1.1	99.7 ± 2.2
TRK-130	0.00125	6	18.8 ± 1.7	18.7 ± 1.8	99.9 ± 4.0
	0.0025	5	25.0 ± 3.6	24.3 ± 3.1	98.3 ± 2.1
	0.005	5	22.0 ± 1.5	22.6 ± 2.5	102.2 ± 7.7
	0.01	5	24.2 ± 1.5	26.9 ± 3.3	109.6 ± 7.9
Vehicle	-	11	24.7 ± 1.4	23.6 ± 1.4	95.7 ± 2.7
Morphine	0.25	10	27.2 ± 2.8	27.0 ± 2.9	99.0 ± 1.6
	0.5	9	25.5 ± 1.2	25.8 ± 1.3	101.1 ± 1.7
	1	3	24.1 ± 4.5	23.6 ± 3.7	99.5 ± 6.3
Vehicle	-	6	18.7 ± 2.0	19.4 ± 2.0	103.9 ± 1.6
Oxybutynin	1	6	22.7 ± 1.6	16.6 ± 1.6	72.7 ± 3.7*

平均値±SEM で表示

* P<0.05 vs. 対応する溶媒投与群 (Aspin-Welch test)

4.4. 考察

TRK-130 の排尿反射に対する抑制作用の確認及びその作用機序を検討する一環として、尿道結紮法を用いて麻酔下モルモットの律動性膀胱収縮に対する TRK-130 の抑制作用を評価した。併せて morphine 及び oxybutynin も同時に評価し TRK-130 と比較検討した。その結果、TRK-130 及び morphine は排尿筋の収縮力には影響を及ぼすことなく排尿反射の発生を抑制することが示された。一方、oxybutynin は排尿筋収縮力を減弱させるが、排尿反射の発生には影響を及ぼさないことが示された。なお、TRK-130 は morphine よりも低用量にて排尿反射抑制作用を示すことが明らかとなった。

本試験において、膀胱内に一定量注入された生理食塩水によって誘発される律動性膀胱収縮は、中枢に存在する排尿中枢によって調節されたものである⁴⁷。本検討で oxybutynin によって示された通り、末梢性に作用する抗コリン薬は、本評価系において排尿筋収縮力は減弱させるが、排尿反射の発生には影響を及ぼさないことが知られている^{44,46}。また、抗コリン薬と同様に末梢性に作用する β_3 刺激薬の mirabegron は、排尿筋収縮力にも排尿反射の発生にも影響を及ぼさないことが報告されている²⁴。TRK-130 は morphine と同様に律動性膀胱収縮の発生を完全に抑制したことから、その作用点は末梢（膀胱）への直接作用ではなく、中枢に作用して排尿反射を抑制していることが考えられた。また、TRK-130 は morphine よりも低用量で律動性膀胱収縮を抑制したことから、morphine よりも強力な排尿反射抑制作用を有するものと考えられ、これは TRK-130 が *in vitro* 評価において μ オピオイド受容体に対して、morphine よりも高い親和性を有していることを反映したものと推察される。

第5章 麻酔下モルモットの尿流動態に対する作用

5.1. 目的

本試験は、TRK-130 の排尿反射抑制作用の薬理学的特性及びその作用機序を検討する一環として、麻酔下モルモットを用いた尿流動態測定法により、TRK-130 の尿流動態パラメータに対する作用を評価することを目的として実施した。Oxybutynin も同時に評価し TRK-130 と比較検討した。

5.2. 実験方法

5.2.1. 試薬

被験化合物として TRK-130（東レ医薬研究所にて合成）を、対照化合物として oxybutynin chloride（SIGMA-ALDRICH、St. Louis、MO、USA）（以下、oxybutynin と表記）を用いた。溶媒には 0.02% citric acid 含有 5% キシリトール溶液（キリット®注 5%、大塚製薬工場、徳島）を用い、目的の投与量になるよう適宜調製して使用した。

5.2.2. 動物

4～5 週齢の雄性 Hartley 系モルモット（日本エスエルシー、静岡）を用いた（体重 290～350 g）。

本試験は武田薬品工業の動物倫理委員会の承認を受けて実施した。

5.2.3. 尿流動態測定法

尿流動態測定法の概略を図 10 に示した。なお、モルモットは尿流動態測定法において排尿機能を測定するのに最も適した動物種とされている^{48,49}。

本試験は長袋ら⁴⁸の方法を参考にして行った。モルモットにウレタン (ethyl carbamate) を 1.2 g/kg の用量で腹腔内投与し麻酔した。腹部切開して膀胱を露出し、圧トランスデューサーにより膀胱内圧を測定するため、ポリエチレンチューブを膀胱頂部に刺入して固定した。排尿反射が生じるまで、ポリエチレンチューブを介して 18 mL/hour の速度で生理食塩水を膀胱内に注入した。本試験では尿流動態パラメータとして、膀胱容量 (Bc) (mL)、排尿量 (Vv) (mL)、最大尿流率 (Qmax) (mL/s)、最大尿流時膀胱内圧 (Pves(Qmax)) (cmH₂O) 及び排尿効率 (Ve) (%) を多チャンネルデータ取得システム (MP-100、Biopac Systems、Santa Barbara、CA、USA) を用いて測定した。化合物投与前に少なくとも 2 回の安定した排尿反射を発生させ、化合物投与直前 1 回の排尿反射から得られた尿流動態パラメータを化合物投与前値として扱った。評価化合物を 0.5 mL/kg の投与容量にて静脈内投与し、その 10min 後に再度膀胱内への生理食塩水の注入を開始して排尿反射を誘発し、得られた尿流動態パラメータを化合物投与後値として扱った。TRK-130 の投与量は 0.0025 mg/kg、oxybutynin は 1 mg/kg とした。

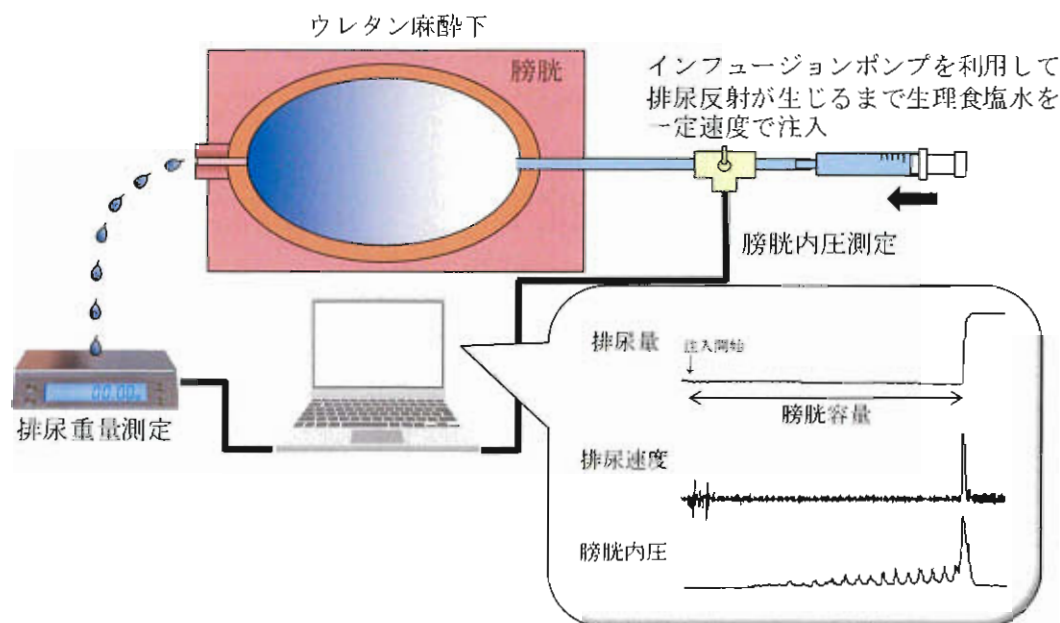


図 10. 尿流動態測定法の概略

5.2.4. データ処理及びデータ解析に使用した統計学的手法

尿流動態パラメータのうち、 B_c は排尿反射が生じるまでに注入した生理食塩水量、 V_e は B_c に対する V_v の比として算出した。評価化合物投与後の各尿流動態パラメータは投与前値に対する変化率 (%) に変換して解析に用いた。なお、各群 10 個体で評価を行ったが、oxybutynin 投与群の 1 個体は尿閉を生じたため解析から除外した。

群間の有意差検定では、Bartlett 検定により分散の均一性を検証し (有意水準は 0.05)、分散が均一な場合は Tukey 法により全ての二群同士を比較する多重比較検定を行った。分散が不均一な場合には Steel-Dwass 法により全ての二群同士を比較する多重比較検定を行った。いずれも検定方向は両側とし、有意水準は 0.05 とした。

5.3. 結果

麻酔下モルモットの尿流動態とそれに対する溶媒投与、TRK-130 (0.0025 mg/kg) 投与及び oxybutynin (1 mg/kg) 投与の代表的チャートを図 11 に示した。

B_c 、 V_e 、 Q_{max} 及び $P_{ves}(Q_{max})$ の各尿流動態パラメータについて、溶媒及び各評価化合物の投与前値に群間差は認められなかった (表 6)。なお、ウレタン麻酔下では V_e は約 80% に低下していた。

静脈内投与した TRK-130 (0.0025 mg/kg) 及び oxybutynin (1 mg/kg) はいずれも溶媒と比較して同程度 (それぞれ 34 及び 35%) にまで有意に B_c を増加させた。この条件下で、TRK-130 投与群は溶媒投与群と比較して他のパラメータ (V_e 、 Q_{max} 及び $P_{ves}(Q_{max})$)

には影響を与えなかった。一方、oxybutynin 投与群では V_e 、 Q_{\max} 及び $P_{\text{ves}}(Q_{\max})$ の各パラメータが溶媒処置群に比べ有意に低下しており、さらに、これらパラメータは TRK-130 投与群との比較においても有意な差が認められた (図 12)。

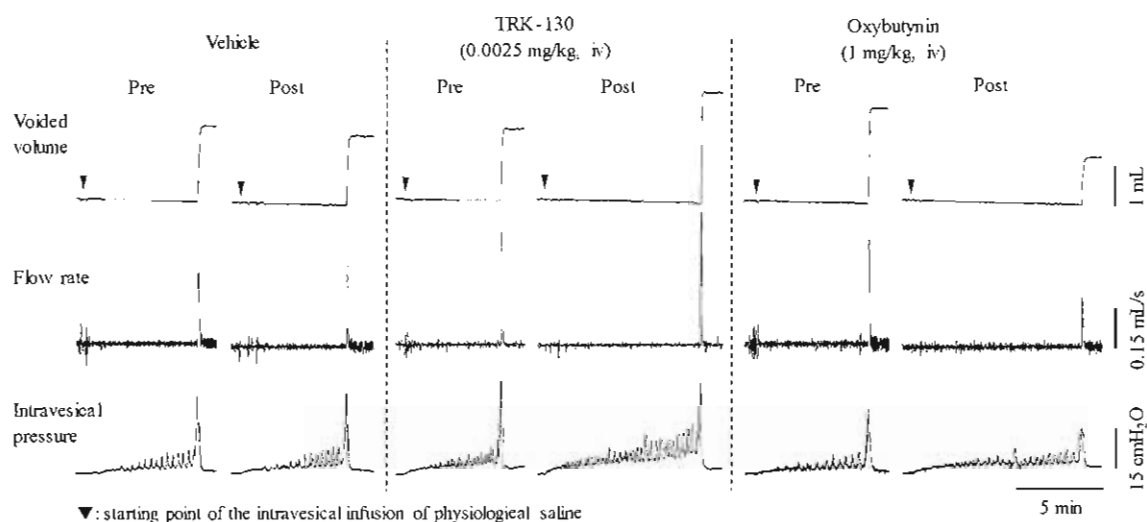


図 11. 尿流動態測定法における代表的チャート

表 6. 尿流動態パラメータの投与前値の比較

Group	n	Bc (mL)	V_e (%)	Q_{\max} (mL/s)	$P_{\text{ves}}(Q_{\max})$ (cmH ₂ O)
Vehicle	10	2.16 ± 0.18	72.6 ± 7.9	0.240 ± 0.022	22.9 ± 2.4
TRK-130	10	1.75 ± 0.10	79.8 ± 6.1	0.282 ± 0.036	23.5 ± 1.5
Oxybutynin	9	2.02 ± 0.21	84.4 ± 5.4	0.282 ± 0.030	23.2 ± 1.6

平均値±SEM で表示

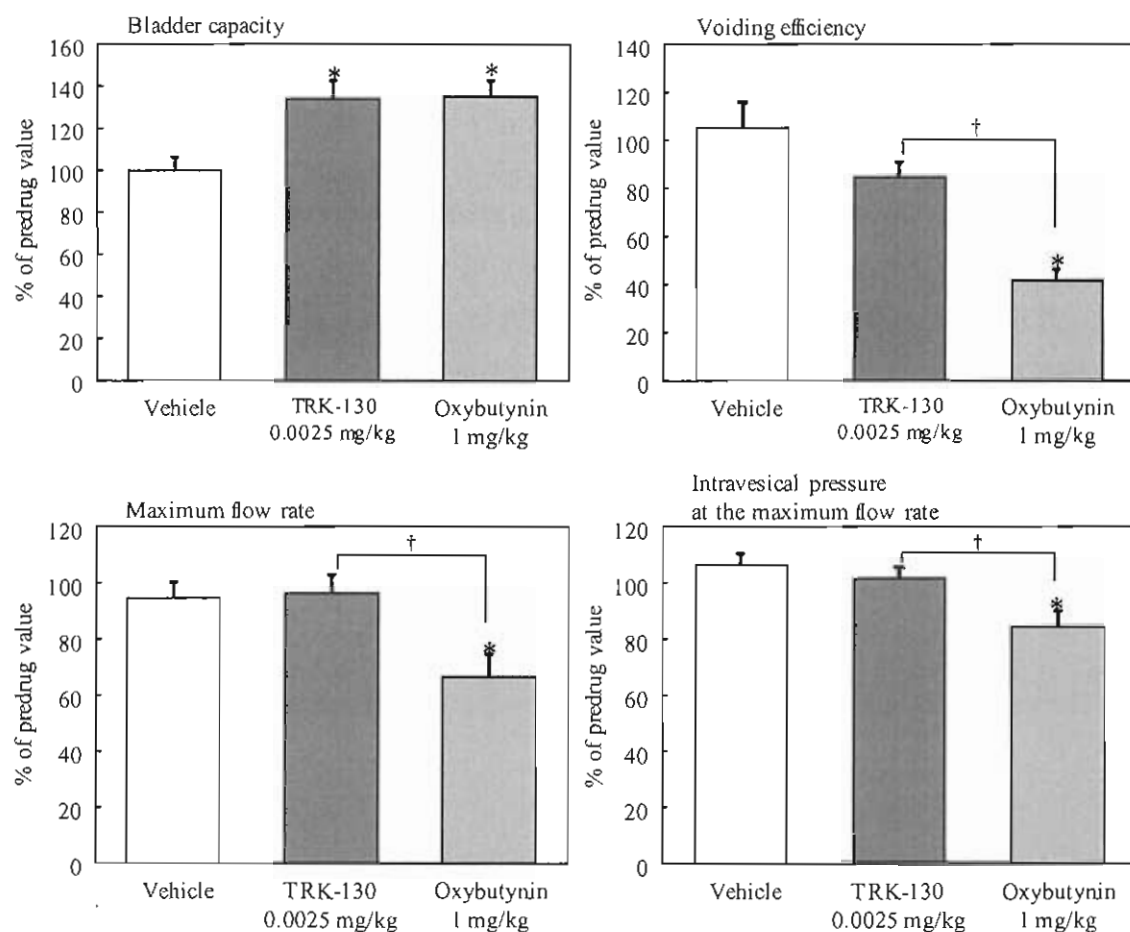


図 12. 麻酔下モルモットの尿流動態パラメータに対する TRK-130 及び oxybutynin の作用

溶媒投与群及び TRK-130 投与 (0.0025 mg/kg) 群は 10 例、oxybutynin 投与 (1 mg/kg) 群は 9 例の結果を平均値±SEM で表示

* P<0.05 vs. 溶媒投与群 (両側 Tukey test)

† P<0.05 vs. TRK-130 投与群 (両側 Tukey test)

5.4. 考察

尿流動態測定法は、尿を貯める機能 (蓄尿機能) と尿を排出する機能 (排尿機能) に対する化合物の作用を同時に評価可能な系である。尿道結紮法において認められた TRK-130 の排尿反射に対する抑制作用の薬理学的特性及びその作用機序を検討する一環として、麻酔下モルモットを用いた尿流動態測定法により、TRK-130 の尿流動態パラメータに対する作用を評価した。その結果、TRK-130 (0.0025 mg/kg) は Ve をわずかに (15.8%) に低下させたが (Ve は投与前値においても 20%程度低下しており、麻酔の影響を受けた可能性がある)、いずれのパラメータに対しても統計学的に有意の影響は与

えず、Bcのみを増加させることが明らかとなった。一方、oxybutynin (1 mg/kg) は TRK-130 と同程度 Bc を増加させるものの、他のパラメータにも有意な影響を与えることが示され、尿流動態パラメータに対する TRK-130 と oxybutynin の作用特性は顕著に異なることが明らかとなった。具体的には、oxybutynin の作用点は排尿機構の遠心路側にあり、膀胱に直接作用して骨盤神経終末から放出されるアセチルコリンによって引き起こされる膀胱平滑筋の収縮を抑制することで Bc を増加させるものの、同時に排尿機能にも影響を与えるため、 V_e 、 Q_{max} や $P_{ves}(Q_{max})$ が低下したと考えられる。一方、TRK-130 の作用点は排尿機構の求心路側にあり、膀胱からの尿意伝達を制御して Bc を増加させるが、膀胱収縮自体には影響を与えないため、他のパラメータはほとんど変化しなかったと考えられる。これより、TRK-130 は蓄尿機能を高める作用がある一方で、排尿機能には影響を与えず尿排泄時にはスムーズな排尿が可能であるのに対し、oxybutynin は膀胱容量を増加させるものの、同時に排尿機能に影響を与えてしまうため、臨床で知られているように残尿や尿閉を引き起こす懸念の高いことが本検討にて示された。

第6章 覚醒下モルモット化学物質誘発頻尿モデルに対する作用

6.1. 目的

本試験は、TRK-130 の排尿反射抑制作用の薬理学的特性を検討する一環として、覚醒下での抑制作用の有無を確認するとともに、頻尿モデルでの経口投与による薬効を確認するため、化学物質（formalin）により膀胱炎を誘発させたモルモットの頻尿状態に対する TRK-130 経口投与の作用について排尿動態測定法を用いて評価した。

6.2. 実験方法

6.2.1. 試薬

被験化合物として TRK-130（東レ医薬研究所にて合成）を用いた。溶媒には 0.1% citric acid 含有 5% キシリトール溶液（キシリット®注 5%、大塚製薬工場、徳島）を用い、目的の投与量になるよう適宜調製して使用した。

6.2.2. 動物

6 週齢の雌性 Hartley 系モルモット（日本エスエルシー、静岡）を用いた（体重 280～353 g）。

本試験は武田薬品工業の動物倫理委員会の承認を受けて実施した。

6.2.3. Formalin 誘発膀胱炎モデルの作製法

Formalin 誘発膀胱炎モデルは Dupont ら⁵⁰の方法を参考にして作製した。

実験 2 日前にエーテル麻酔した個体に外尿道口から 4F Groshong®カテーテル（Bard Access Systems、Salt Lake City、UT、USA）を刺入し、カテーテル先端が膀胱内にくるよう設置（外尿道口から 3 cm）した。膀胱内の尿を排出した後、当該カテーテルを介して 1 mL の 2.5% formalin 含有生理食塩水を膀胱内注入して 1 min 保持し排出することで頻尿状態を惹起した。同様の手順で 2.5% formalin 含有生理食塩水の代わりに生理食塩水を膀胱内注入した個体を作製し、コントロール群として用いた。

6.2.4. 排尿動態測定法

排尿動態測定法の概略を図 13 に示した。

自発的な排尿を測定するため、下部に電子天秤を設置した代謝ケージを使用した。ケージと電子天秤の間に金網を設置し、糞と尿が分離出来るようにした。Multiplexer（データリンク、埼玉）を介して電子天秤と PC を繋ぎ、電子天秤上に落ちた尿量データを PC に取り込み、実験終了後に電子天秤から得られたデータを解析した。実験当日は、個体をケージに移して 30min 順化させた後、40 mL/kg の水を経口負荷し、その直後から 3hr の排尿頻度、1 回あたりの排尿量及び総排尿量を排尿パラメータとして測定した（投与前セッション）。その後、TRK-130 溶液を 2 mL/kg の投与容量にて経口投与した。

投与量は 0.003、0.01 及び 0.03 mg/kg とした。さらに 40 mL/kg の水を経口負荷し、その直後から 3hr の排尿頻度、1 回あたりの排尿量及び総排尿量を再度測定した（投与後セッション）。

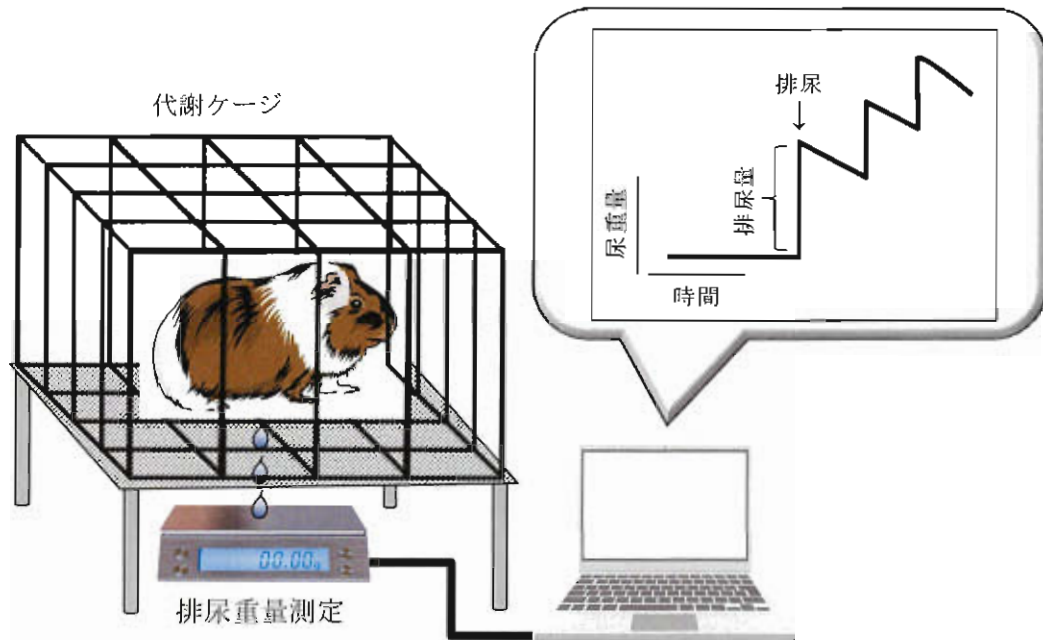


図 13. 排尿動態測定法の概略

6.2.5. データ処理及びデータ解析に使用した統計学的手法

投与後セッションで得られた排尿パラメータ（排尿頻度、1 回あたりの排尿量及び総排尿量）は投与前セッションに対する変化率（％）に変換し解析に用いた。各群の結果は平均値±SEM で表示した。

群間の有意差検定では、生理食塩水膀胱注入処置群（コントロール群）と 2.5% formalin 含有生理食塩水膀胱注入処置群との二群間の比較においては、F 検定により分散の均一性を検証し（有意水準は 0.05）、分散が均一な場合は Student's t 検定を行い、分散が不均一な場合には Aspin-Welch 検定を行った（有意水準は 0.05）。2.5% formalin 含有生理食塩水膀胱注入処置＋TRK-130 投与群と 2.5% formalin 含有生理食塩水膀胱注入処置＋溶媒投与群との多群間比較では、Bartlett 検定により分散の均一性を検証し（有意水準は 0.05）、分散が均一な場合は Williams 法により溶媒投与群に対する多重比較検定を実施した。分散が不均一な場合には Shirley-Williams 法により溶媒投与群に対する多重比較検定を実施した。いずれも検定方向は片側とし、有意水準は 0.025 とした。

6.3. 結果

覚醒下、無拘束下における生理食塩水膀胱注入（コントロール）と formalin 含有生理食塩水膀胱注入モルモットの代表的な排尿動態パターンと、formalin 含有生理食塩水膀胱注入モルモットに対する TRK-130 (0.03 mg/kg) 経口投与後の代表的な排尿動態パターンを図 14 に示した。

2.5% formalin 膀胱内注入処置により、生理食塩水注入処置と比較して有意に排尿頻度が増加し、1 回あたりの排尿量は有意に減少した（図 15 A）。これらの変化は膀胱炎患者の頻尿状態で観察される変化に類似したものであった。覚醒下、無拘束下の条件において、経口投与した TRK-130 (0.003、0.01 及び 0.03 mg/kg) は用量依存的に formalin 注入により誘発されたモルモットの頻尿状態を改善し、排尿頻度は溶媒投与群の $80.8 \pm 6.5\%$ に対し、0.003 mg/kg 投与群で $72.6 \pm 5.2\%$ 、0.01 mg/kg 投与群で $54.4 \pm 4.7\%$ 、0.03 mg/kg 投与群で $48.6 \pm 3.9\%$ となり、一回あたりの排尿量は溶媒投与群の $115.4 \pm 7.7\%$ に対し、0.003 mg/kg 投与群で $135.8 \pm 13.9\%$ 、0.01 mg/kg 投与群で $159.2 \pm 6.9\%$ 、0.03 mg/kg 投与群で $168.0 \pm 11.7\%$ となり、0.01、0.03 mg/kg では溶媒と比較して、formalin 膀胱注入動物の排尿頻度を有意に減少させ、1 回あたりの排尿量は有意に増加させた（図 15 B）。なお、この時、TRK-130 は総排尿量には影響を与えなかった。

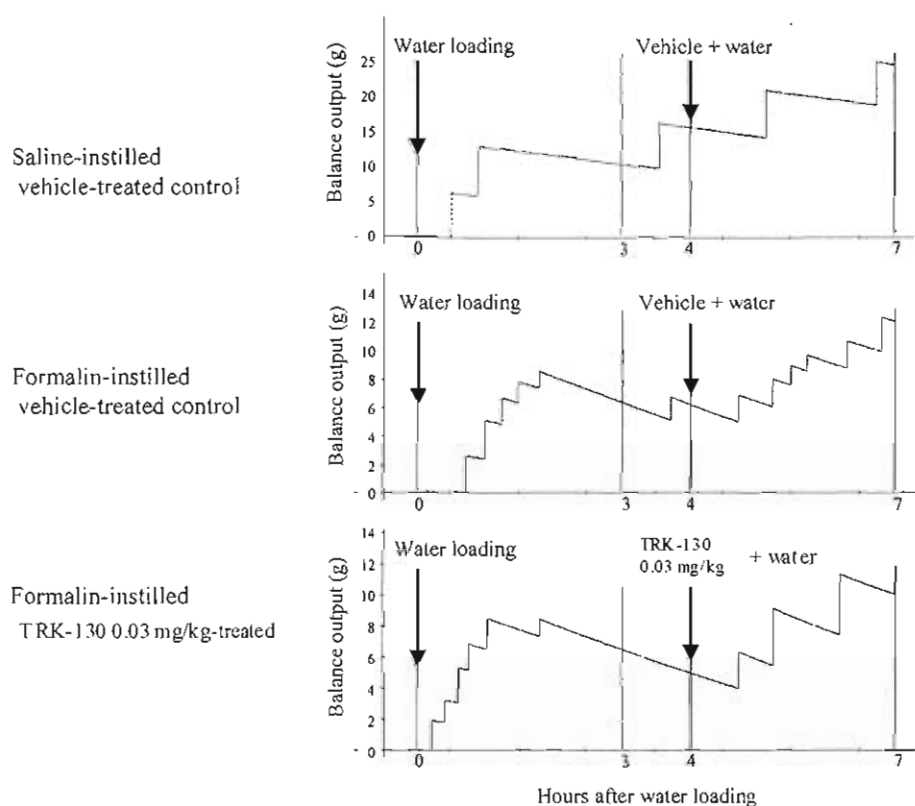


図 14. 化学物質（formalin）膀胱注入モルモットの代表的排尿動態パターン

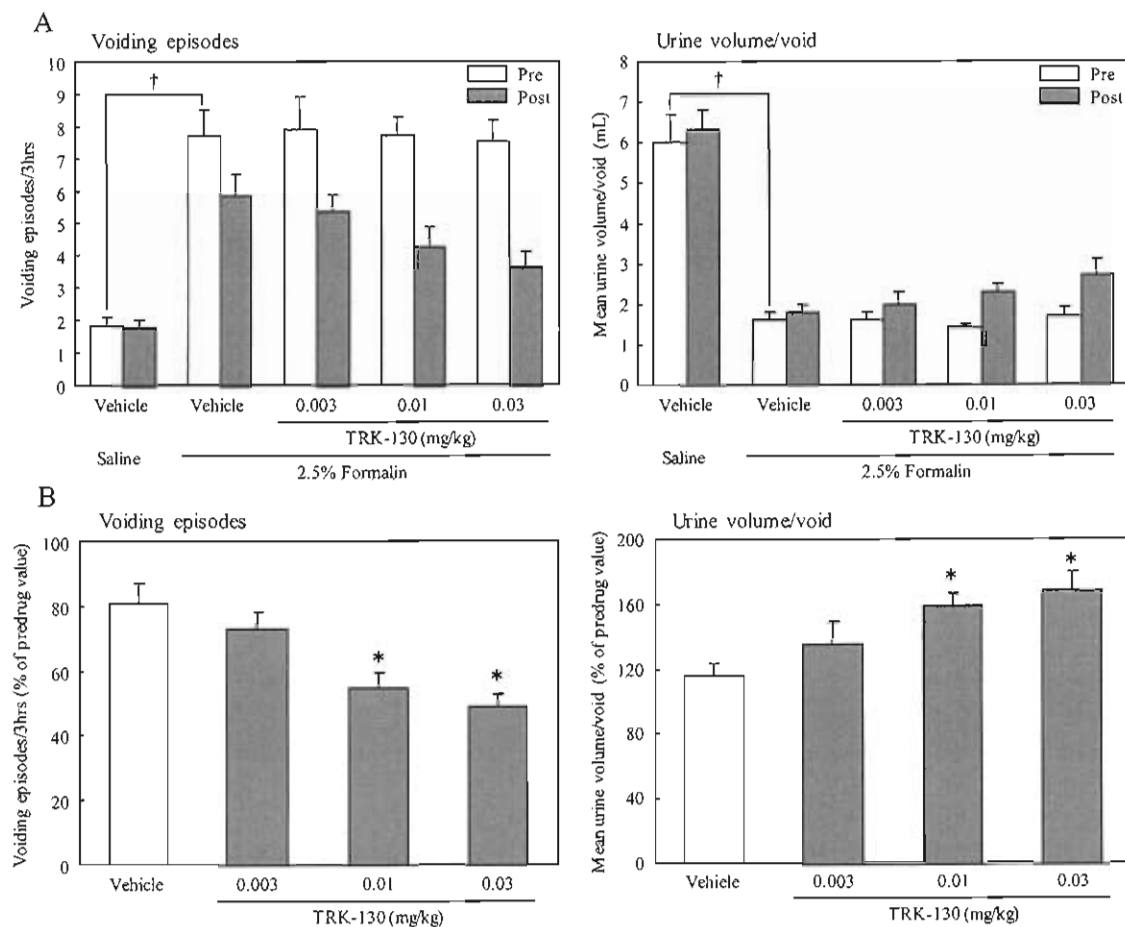


図 15. 化学物質 (formalin) 誘発モルモット頻尿モデルの頻尿状態に対する TRK-130 の作用

A: TRK-130 投与後 3hr の排尿頻度と 1 回あたりの排尿量

B: 排尿頻度と 1 回あたりの排尿量における投与前セッションの値に対する投与後セッションの変化率 (%)

1 群あたり 8-12 例の結果を平均値 \pm SEM で表示

† $P < 0.05$ vs. 生理食塩水膀胱注入-溶媒投与群 (Aspin-Welch test)

* $P < 0.025$ vs. formalin 膀胱注入-溶媒投与群 (片側 Williams' test)

6.4. 考察

TRK-130 の排尿反射抑制作用の薬理学的特性を検討する一環として、覚醒下での抑制作用の有無を確認するとともに、頻尿モデルでの経口投与による薬効を確認するため、formalin により膀胱炎を誘発させたモルモットを用いて、この頻尿状態に対する TRK-130 経口投与の作用について排尿動態測定法を用いて評価した。その結果、TRK-130 は総排尿量には影響を与えず、排尿頻度を減少させる一方で、1 回あたりの排尿量は増加させたことから、残尿量を増やしたりすることなく膀胱炎動物モデルの頻尿状態のみを改善するという理想的な特性を有していることが示された。

実験に用いる麻酔によっては、排尿反射機能に影響を与えることが知られており⁵¹、化合物の排尿反射に対する作用を検討する際には、麻酔下のみならず覚醒下での作用を確認しておくことが必須である⁵²。本検討により、覚醒下の頻尿モデル動物において TRK-130 の抗頻尿作用が認められたことから、TRK-130 は麻酔下／覚醒下に関係なく排尿反射抑制作用を有することが示された。

μ オピオイド受容体作動活性と 5-HT/NA 再取り込み阻害作用を併せ持ち、鎮痛薬として臨床で広く用いられている tramadol について、覚醒下の正常及び頻尿モデルラットを用いて作用を検討した報告^{30,31,32}がある。Tramadol は主に μ 受容体を介して、TRK-130 と同様に膀胱内圧には影響を与えずに排尿反射を抑制することが示されているが、同時に活性代謝物が κ 受容体親和性を有し、 κ 受容体を介して利尿作用（視床下部にある κ 受容体を刺激することで vasopressin の遊離を抑制^{53,54}）を示すことが報告されている。利尿作用による尿量増加は排尿回数を増加させる懸念があり、頻尿治療に対しては好ましくない作用である。本検討において TRK-130 には利尿作用が認められていないことから、TRK-130 は臨床において tramadol よりも優れた頻尿治療効果をもたらすことが期待できる。

なお、tramadol は化学物質誘発膀胱炎マウスにおいて、膀胱痛関連行動を抑制したとの報告⁵⁵がある。本検討では、TRK-130 の膀胱炎に伴う痛みに対する作用評価は実施していないため、TRK-130 の鎮痛作用の有無は不明である。今後 TRK-130 の膀胱痛に対する作用についても検討する必要があると考える。

TRK-130 は律動性膀胱収縮に対して膀胱内圧には全く影響を与えず、また尿流動態測定法において、既存の抗コリン薬とは異なり、排尿機能に対する影響は少ないことが示されており、これらの結果は TRK-130 が中枢神経系の排尿反射機構において求心路側に作用して蓄尿機能を亢進することにより排尿反射抑制作用を示していることを示唆するものと考えられる。さらに本検討により、覚醒下の頻尿モデル動物において、経口投与した TRK-130 が総排尿量には影響を与えず、排尿頻度を減少させる一方で、1 回あたりの排尿量は増加させることも示されたことなどから、TRK-130 は OAB 患者の蓄尿機能を向上させ、主訴である尿意切迫感を抑え、頻尿や切迫性尿失禁を抑制するとともに、排尿時には排尿機能に影響を与えず残尿や尿閉などの懸念が少ないスムーズな尿排

泄を可能とする理想的な薬理特性を有する治療薬と考えられ、臨床にて OAB の有用な治療選択肢の一つになり得るものと思われた。

第7章 麻酔下脊髄切断モルモットの律動性膀胱収縮に対する作用

7.1. 目的

本試験は、TRK-130 の排尿反射抑制作用の機序を検討する一環として、脊髄以下で排尿反射が調節されるように脊髄切断処置したモルモットを用いて、TRK-130 の律動性膀胱収縮に対する作用を評価し、TRK-130 の排尿反射抑制作用に脊髄以下の部位が関与しているか否かを確認することを目的として実施した。

7.2. 実験方法

7.2.1. 試薬

被験化合物として TRK-130（東レ医薬研究所にて合成）を用いた。溶媒には 0.02% citric acid 含有 5% キシリトール溶液（キリット®注 5%、大塚製薬工場、徳島）を用い、目的の投与量になるよう適宜調製して使用した。

7.2.2. 動物

4 週齢の雄性 Hartley 系モルモット（日本エスエルシー、静岡）を用いた（体重 230～335 g）。

本試験は東レの研究本部動物実験指針に基づき、基礎研（鎌倉）動物実験倫理委員会の承認を得て実施した。

7.2.3. 脊髄切断処置法

脊髄切断処置の概略を図 16 に示した。

本試験は土居ら⁴⁴の方法を参考にして行った。モルモットにイソフルラン（フォーレン®、大日本製薬、大阪）を吸入させ、全身麻酔を施した。背部正中線に沿って皮膚を切開した後、Th12（12th thoracic vertebra）から L2（2nd lumbar vertebra）の間で脊椎を一カ所切開し、切開部付近の脊髄を一カ所完全に切断した。切断部に止血剤（ゼルフォーム®、ファルマシア、東京）を挿入し、縫合した。術後の感染予防のため、処置日とその翌日に抗生剤（アミカシン®、萬有製薬、東京）を 1 日 1 回、1.4 mg/body の用量で筋肉内投与した。処置後は 1 匹ずつ飼育し、実験に使用するまで自由摂餌、摂水とした。処置 2 日後に両後肢に麻痺が認められる個体のみを選んで実験に使用した。

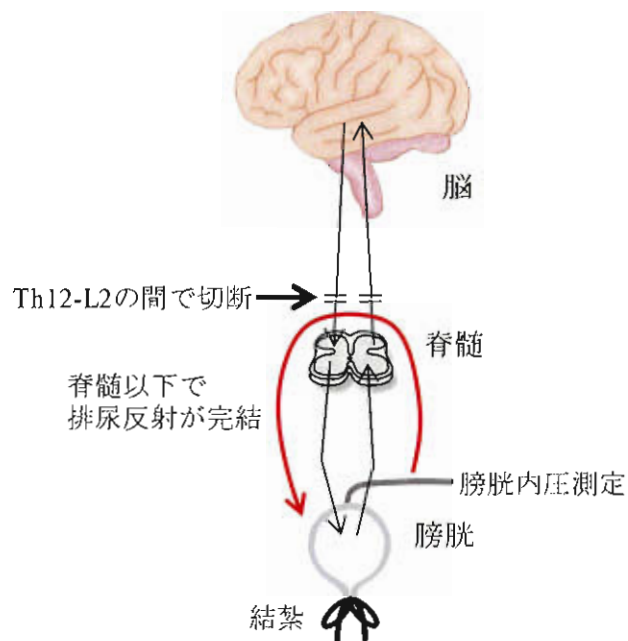


図 16. 脊髓切断実験の概略

7.2.4. 尿道結紮法

4.2.3 に準じて律動性膀胱収縮を発現させた。膀胱内圧はポリエチレンチューブに接続した圧トランスデューサーと血圧測定用アンプ（AP-641G、日本光電、東京）を介してミニポリグラフ（CP-642G、日本光電、東京）を用いて記録した。安定した律動性膀胱収縮が得られた個体に、TRK-130 を 1 mL/kg の投与容量で静脈内投与した。TRK-130 の投与量は脊髓切断処置群では 0.003、0.01 及び 0.03 mg/kg、無処置群では 0.001、0.003 及び 0.01 mg/kg とした。TRK-130 投与後、再び律動性膀胱収縮が発現するまで膀胱内圧を測定した（cut-off 時間: 30min）。測定パラメータは膀胱収縮の消失時間及び膀胱収縮時最高膀胱内圧とした。

7.2.5. データ処理及びデータ解析に使用した統計学的手法

TRK-130 の各投与量投与後の膀胱収縮消失時間を測定し解析に用いた。なお、本試験にて cut-off 時間とした 30min を越えて膀胱収縮が消失していた場合は、その個体の消失時間は 30min とした。各群の結果は平均値±SEM で表示した。

膀胱収縮時最高膀胱内圧は投与前に対する変化率（%）に変換し解析に用いた。各群の結果は平均値±SEM で表示した。

群間の有意差検定では、TRK-130 投与群と溶媒投与群との多群間比較において、脊髓切断処置の有無別に Bartlett 法により分散の均一性を検証し（有意水準は 0.05）、分散が均一な場合は Williams 法により溶媒投与群に対する多重比較検定を行った。分散が不均一な場合には Shirley-Williams 法により溶媒投与群に対する多重比較検定を行った。

いずれも検定方向は両側とし、有意水準は 0.05 とした。なお、膀胱内圧の統計解析においては、無処置モルモットでは 0.01 mg/kg 投与群にて 8 例中 7 例で、脊髓切断モルモットでは 0.03 mg/kg 投与群にて 8 例中 6 例にて、TRK-130 投与後に cut-off 時間の 30min が経過しても排尿反射が戻らず膀胱収縮時最高膀胱内圧が測定出来なかったため、当該群は除外して統計解析を実施した。

7.3. 結果

脊髓切断処置したモルモットにおいても、無処置モルモットと同様に律動的な膀胱収縮が確認された (図 17 A)。無処置モルモットでは、溶媒の平均膀胱収縮消失時間は 3.5 ± 0.6 min であった。静脈内投与した TRK-130 (0.001、0.003 及び 0.01 mg/kg) は用量依存的に膀胱収縮の消失時間を延長し、0.001 mg/kg 投与群で 7.1 ± 2.5 min、0.003 mg/kg 投与群で 20.4 ± 2.7 min、0.01 mg/kg 投与群で 29.7 ± 0.3 min であり、0.003 及び 0.01 mg/kg 投与群では溶媒投与群と比較し有意な延長を示した。脊髓切断処置モルモットでは、溶媒投与群の平均膀胱収縮消失時間は 3.6 ± 0.5 min であった。脊髓切断処置によっても静脈内投与した TRK-130 (0.003、0.01 及び 0.03 mg/kg) は用量依存的に膀胱収縮消失時間を延長し、0.003 mg/kg 投与群で 6.3 ± 1.2 min、0.01 mg/kg 投与群で 16.7 ± 3.7 min、0.03 mg/kg 投与群で 24.7 ± 3.6 min であり、検討したいずれの用量においても溶媒投与群と比較し有意な延長が認められた。一方、膀胱収縮時最高膀胱内圧においては、無処置及び脊髓切断モルモットとも TRK-130 のいずれの用量においても溶媒と比較し有意な変化は認められなかった (図 17 B)。

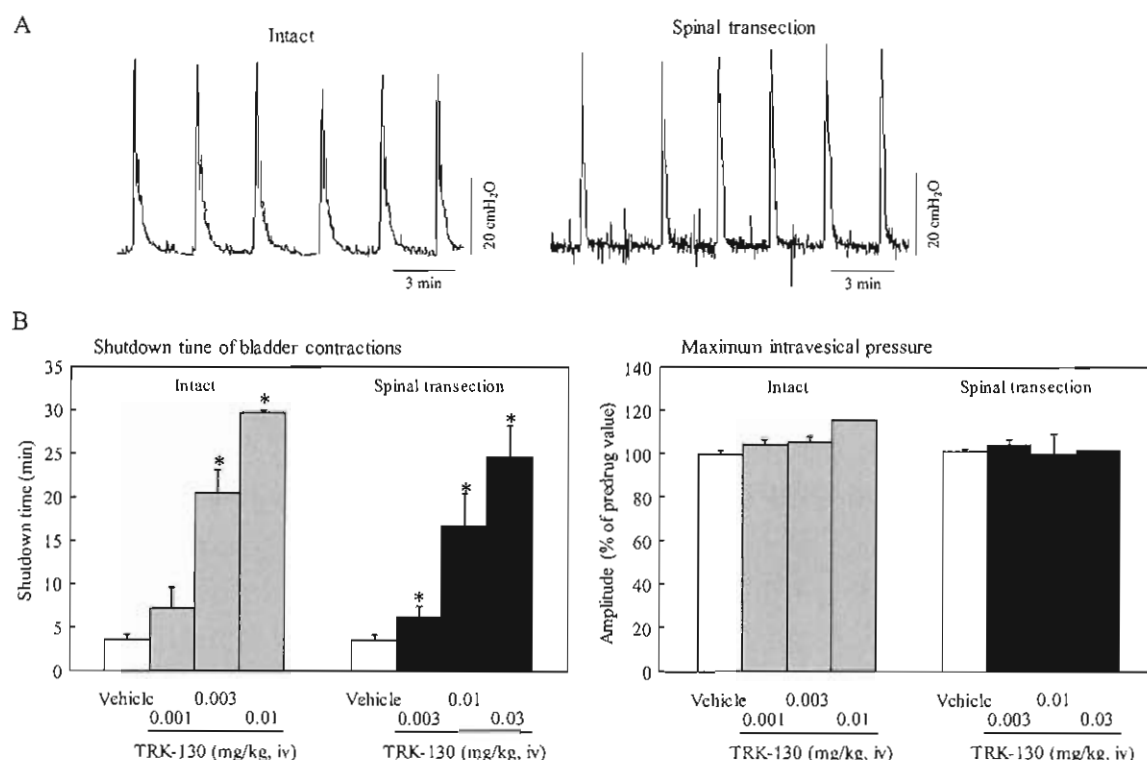


図 17. 脊髄切断モルモットでの TRK-130 の律動性膀胱収縮に対する作用

A: 無処置及び脊髄切断処置したモルモットの代表的な律動性膀胱収縮チャート

B: 無処置及び脊髄切断処置したモルモットの律動性膀胱収縮における TRK-130 の消失時間及び膀胱内圧に対する作用

1 群あたり 8 例の結果を平均値±SEM で表示 (ただし、最高膀胱内圧においては、無処置の 0.003 mg/kg 投与群及び 0.01 mg/kg 投与群、脊髄切断処置の 0.01 mg/kg 投与群及び 0.03 mg/kg 投与群にて、cut-off 時間 (30min) を過ぎてても膀胱収縮が発現しなかったため、それぞれ 7 例、1 例、6 例、2 例の結果)

* P<0.05 vs. 溶媒対照群 (両側 Shirley-Williams' test)

7.4. 考察

TRK-130 の排尿反射抑制作用の機序を検討する一環として、脊髄以下で排尿反射が調節されるように、腰仙髄に存在する脊髄排尿中枢よりも上部 (Th12-L2) で脊髄切断処置したモルモットを用いて、TRK-130 の律動性膀胱収縮に対する作用を評価し、脊髄以下が TRK-130 の排尿反射抑制作用に関与しているか否かを確認した。その結果、TRK-130 は脊髄切断処置の有無によらず、いずれにおいても膀胱内圧に影響を与えずに 0.003 mg/kg から膀胱収縮消失時間を有意に延長した。本結果から TRK-130 の排尿反射抑制作用は上位中枢の影響がない状態でも保持されていることが示され、TRK-130 の作用点は腰仙髄に存在する脊髄排尿中枢及びそれ以下の部位にあることが示唆された。

Morphine などの μ 受容体作動薬の全身投与によって示される排尿反射抑制作用は、脊髄及び上位中枢に存在する μ 受容体に作用することで発現すると考えられており

^{45,56,57}、オートラジオグラフや免疫学的組織染色法による検討ではラットやモルモットの腰仙髄には μ 受容体が存在することが報告^{58,59}されている。TRK-130 の作用点も脊髄にあると考えられるが、TRK-130 が同程度の排尿反射抑制作用を示すには、脊髄切断モルモットでは無処置モルモットに比べて多少高用量投与が必要であったことから、morphine と同様に上位中枢の関与も考えられた。

第8章 麻酔下ラット骨盤神経末梢端電気刺激誘発膀胱収縮反応に対する作用

8.1. 目的

本試験は、TRK-130 の排尿反射抑制作用の機序を検討する一環として、排尿反射に関与する両側の骨盤神経を切断したラットを用いて、その一方の末梢端を直接電気刺激して誘発した膀胱収縮に対する TRK-130 の作用を評価し、TRK-130 の排尿反射抑制作用に末梢への直接作用が関与しているか否かを確認することを目的として実施した。Oxybutynin も同時に評価し TRK-130 と比較検討した。

8.2. 実験方法

8.2.1. 試薬

被験化合物として TRK-130（東レ医薬研究所にて合成）を、対照化合物として oxybutynin chloride（SIGMA-ALDRICH、St. Louis、MO、USA）（以下、oxybutynin と表記）を用いた。TRK-130 の溶媒には 10% DMSO 溶液を、oxybutynin の溶媒には生理食塩水（大塚生食注、大塚製薬工場、徳島）を用い、目的の投与量になるよう適宜調製して使用した。

8.2.2. 動物

5～6 週齢の Wistar 系雄性ラット（日本チャールスリバー、神奈川）を用いた（体重 200～300 g）。

本試験は東レの研究本部動物実験指針に基づき、基礎研（鎌倉）動物実験倫理委員会の承認を得て実施した。

8.2.3. 骨盤神経末梢端電気刺激法

骨盤神経末梢端電気刺激法の概略を図 18 に示した。なお、本検討は技術的手法が報告²⁸されているラットを用いて実施した。

ラットにウレタン（ethyl carbamate）を 1.0 g/kg の用量で腹腔内投与し麻酔した。腹部切開して膀胱及びその周辺領域を露出し、尿道は結紮した。両側の骨盤神経を膀胱の近傍にて筋肉、脂肪組織から慎重に剥離、切断し、一方の神経の末梢端側に双極性白金電極（MT 技研、東京）を装着した。この時、両側の下腹神経及び尿管を膀胱から 10 mm 以上離れた場所で剥離、切断した。神経刺激は、電気刺激装置（SEN-1101、日本光電、東京）を用いて、矩形波刺激（条件: 10 Hz、5 V、1 msec）を 5 min 毎に 5 sec 与えることによって行った。神経刺激による膀胱収縮の記録は、膀胱頂部に刺入して固定したポリエチレンチューブに接続した圧トランスデューサーと血圧測定用アンプ（AP-641G、日本光電、東京）を介して MacLab Chart（ADInstruments、Dunedin、New Zealand）により膀胱内圧変化として記録した。実験中は腹腔内に加温した流動パラフィンを滴下し神経及び臓器の乾燥を防いだ。双極性白金電極を装着後、30～45 min 放置し安定化させた後、

膀胱内に生理食塩水を適量注入（静止膀胱内圧が2～3 mmHg になるように注入）し、電気刺激による膀胱収縮反応が3回以上安定して得られた後、評価化合物を1 mL/kg の投与容量で静脈内投与した。TRK-130 の投与量は0.005 mg/kg、oxybutynin は1 mg/kg とした。

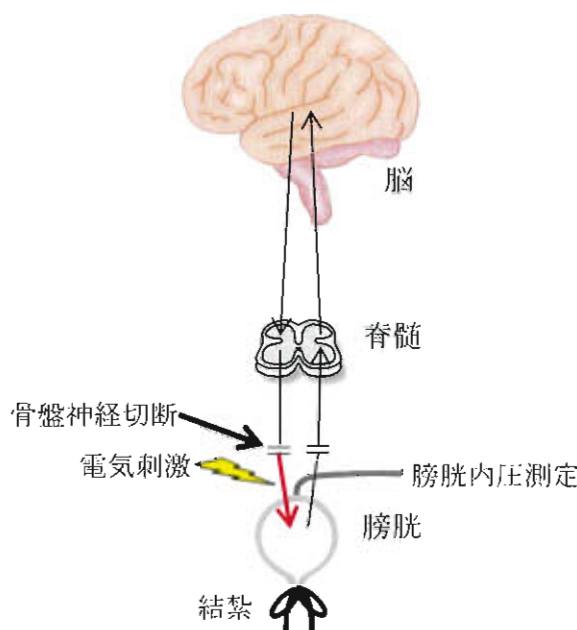


図 18. 骨盤神経末梢端電気刺激法の概略

8.2.4. データ処理及びデータ解析に使用した統計学的手法

評価化合物投与後の電気刺激誘発膀胱収縮を以下の計算式に従い投与前値に対する変化率（％）に変換し解析に用いた。各群の結果は平均値±SEM で表示した。

膀胱収縮の変化率（％）

$$= \frac{\text{化合物投与後の電気刺激誘発収縮高 (mmHg)}}{\text{化合物投与前の電気刺激誘発収縮高 (3 回分の平均) (mmHg)}} \times 100$$

群間の有意差検定では、まず刺激時間ごとに Bartlett 検定にて分散の均一性を検証し（有意水準は 0.05）、分散が均一な場合は対応する溶媒投与群に対する Student's t 検定を実施し、分散が不均一な場合には Aspin-Welch 検定を実施した。有意水準は 0.05 とした。

8.3. 結果

図 18 に示した様に、骨盤神経を切断し、その末梢端側を電気刺激することで、末梢

レベルのみで生ずる膀胱収縮を誘発することが可能である。骨盤神経末梢端電気刺激法における、TRK-130 (0.005 mg/kg) 投与及び oxybutynin (1 mg/kg) 投与時の代表的チャートを図 19 A に示した。TRK-130 の溶媒として用いた 10% DMSO 投与群では、投与直後で投与前の $89.0 \pm 7.7\%$ 、5min で $92.8 \pm 6.6\%$ 、10min で $89.4 \pm 8.3\%$ 、15min で $87.8 \pm 9.0\%$ 、30min で $86.8 \pm 8.7\%$ を示した。これに対し、静脈内投与した TRK-130 (0.005 mg/kg) は、投与直後で投与前の $99.4 \pm 2.6\%$ 、5min で $103.7 \pm 1.8\%$ 、10min で $101.5 \pm 3.5\%$ 、15min で $100.6 \pm 2.6\%$ 、30min で $97.5 \pm 1.3\%$ を示した。Oxybutynin の溶媒として用いた生理食塩水投与後の膀胱収縮圧は投与直後で投与前の $86.8 \pm 3.5\%$ 、5min で $91.3 \pm 4.6\%$ 、10min で $85.7 \pm 4.9\%$ 、15min で $85.7 \pm 5.9\%$ 、30min で $78.7 \pm 8.4\%$ を示した。これに対し、静脈内投与した Oxybutynin (1 mg/kg) では、投与直後で投与前の $37.4 \pm 2.1\%$ 、5min で $41.9 \pm 5.2\%$ 、10min で $43.0 \pm 5.1\%$ 、15min で $39.6 \pm 3.6\%$ 、30min で $39.4 \pm 5.8\%$ を示した。TRK-130 投与群では、投与後 30min まで対応する溶媒投与群と比較して統計学的に有意の変化は認められなかった。一方、oxybutynin 投与群では、投与直後から 30min まで有意の抑制作用が認められた (図 19 B)。

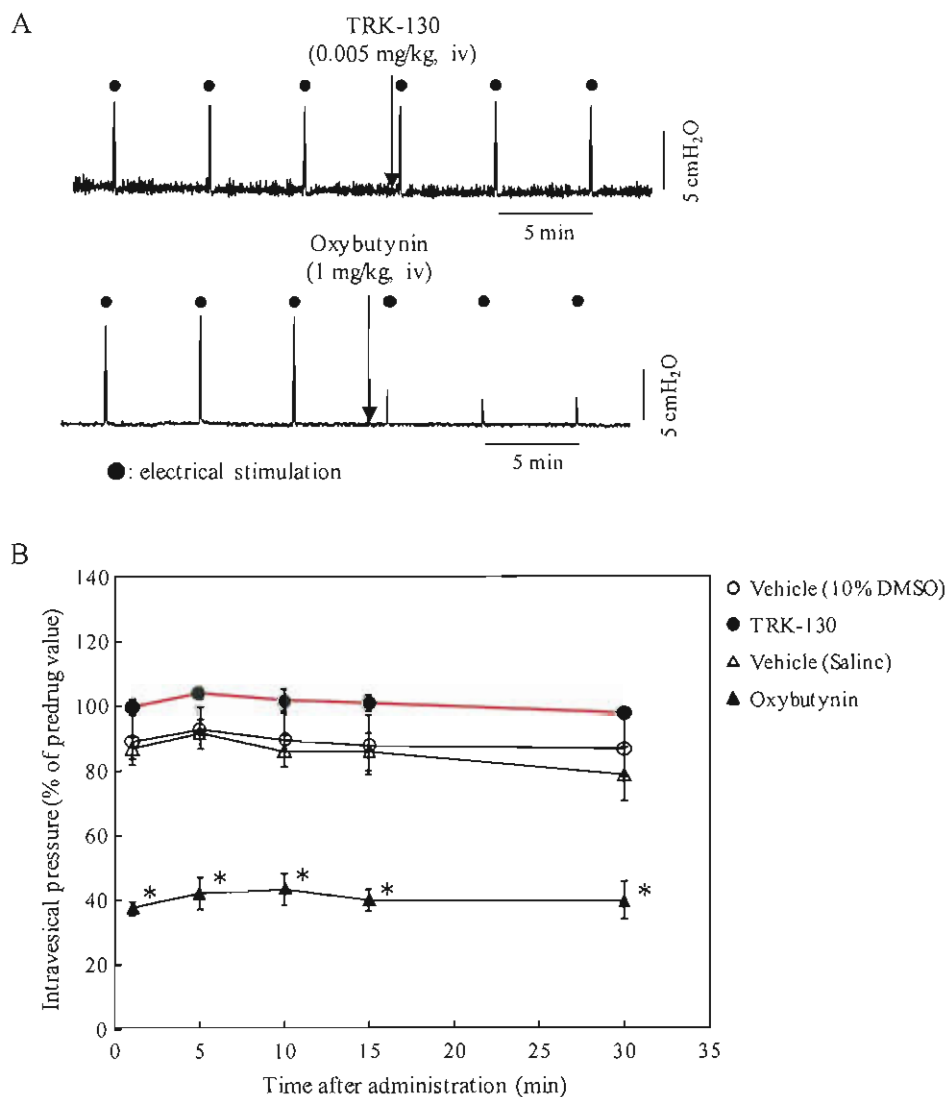


図 19. 骨盤神経末梢端電気刺激法による TRK-130 及び oxybutynin の作用評価

A: 骨盤神経末梢端電気刺激法の代表的なチャート

B: TRK-130 及び oxybutynin の骨盤神経末梢端電気刺激誘発膀胱収縮に対する作用

1 群あたり 5 例の結果を平均値±SEM で表示

*P<0.05 vs. 対応する溶媒投与群 (Student's T-test)

8.4. 考察

TRK-130 の排尿反射抑制作用の機序を検討する一環として、ラット骨盤神経末梢端電気刺激法を用いて、骨盤神経末梢端の電気刺激により誘発した膀胱収縮に対する TRK-130 及び oxybutynin の作用を評価した。その結果、TRK-130 (0.005 mg/kg) は末梢端電気刺激誘発膀胱収縮には全く影響を与えず、一方、oxybutynin (1 mg/kg) は顕著な抑制作用を示したことから、TRK-130 が示す排尿反射抑制作用の作用点は末梢側 (膀胱) に

はないことが明らかとなった。なお、別途実施したラット摘出排尿筋の電場刺激誘発収縮に対する作用評価において、*in vivo* 試験での血中濃度に比べ高濃度である 1 $\mu\text{mol/L}$ （ラットへの 0.1 mg/kg 静脈内投与における $C_{5\text{min}}=25\text{ nmol/L}$ であり、本試験の検討用量 0.005 mg/kg の約 800 倍）の TRK-130 添加によっても収縮抑制作用は認められていない（詳細データは示さず）ことから、TRK-130 は *in vivo* にて薬効が認められている用量レベルでは末梢（膀胱）への直接的作用を有さないものと考えられる。

脊髄切断モルモットでの検討結果と併せ、TRK-130 の作用点として脊髄が重要であることが強く示唆されたが、これらの結果だけでは上位中枢や末梢神経の関与を完全に除外することは出来ない。今後引き続き追加の検討が必要と考える。

第9章 麻酔下モルモットにおける TRK-130 の律動性膀胱収縮抑制作用に対する naloxone の作用

9.1. 目的

本試験は、TRK-130 の排尿反射抑制作用の機序を検討する一環として、TRK-130 による律動性膀胱収縮抑制作用に対する代表的な μ オピオイド受容体拮抗薬 naloxone の拮抗作用を評価することを目的として実施した。Morphine も同時に評価し TRK-130 と比較検討した。

9.2. 実験方法

9.2.1. 試薬

被験化合物として TRK-130(東レ医薬研究所にて合成)を、対照化合物として morphine hydrochloride (武田薬品工業) (以下、morphine と表記) を用いた。 μ オピオイド受容体拮抗薬として naloxone hydrochloride (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA) (以下、naloxone と表記) を用いた。TRK-130 及び morphine の溶媒には 0.02% citric acid 含有 5% キシリトール溶液 (キリット注[®]5%、大塚製薬工場、徳島) を用い、目的の投与量になるよう適宜調製して使用した。また、naloxone は TRK-130 溶液 (0.02 mg/mL) または morphine 溶液 (2 mg/mL) に溶解して用いた。

9.2.2. 動物

5 週齢の雌性 Hartley 系モルモット (日本エスエルシー、静岡) を用いた (体重 260～330 g)。

本試験は武田薬品工業の動物倫理委員会の承認を受けて実施した。

9.2.3. 尿道結紮法

4.2.3 と同様の手順で律動性膀胱収縮を発現させた。安定した律動性膀胱収縮の発現を確認後、各化合物 (溶媒、naloxone 添加／無添加の TRK-130 溶液または naloxone 添加／無添加の morphine 溶液) を 0.5 mL/kg の投与容量にて静脈内投与した。TRK-130 と morphine の投与量は、4.3 で示した結果を基に、両化合物が同程度の排尿反射抑制作用を示し、かつ拮抗実験が可能な抑制時間が十分に得られる投与量として、TRK-130 は 0.01 mg/kg、morphine は 1 mg/kg とした。Naloxone の投与量は TRK-130 では 0.005、0.01、0.02、0.04 及び 0.08 mg/kg、morphine では 0.0005、0.001、0.002、0.004 及び 0.008 mg/kg とした。化合物投与後、再び律動性膀胱収縮が発現するまで膀胱内圧を測定した (cut-off 時間: 60min)。測定パラメータは律動性膀胱収縮の消失時間とした。

9.2.4. データ処理及びデータ解析に使用した統計学的手法

評価化合物の膀胱収縮消失時間から 4.2.4 と同様の手順により %MPE を算出した。ま

た、TRK-130 または morphine 単独の作用に対する naloxone 処置時の変化率 (%) を以下の計算式に従い算出し、当該変化率を基に非線形回帰分析により AD_{50} 及び 95% CI をそれぞれ算出した。

作動薬単独の作用に対する Naloxone 処置時の変化率(%) =

$$\frac{\text{TRK-130 または morphine+naloxone 処置時の\%MPE}}{\text{TRK-130 または morphine 単独投与時の\%MPE}} \times 100$$

群間の有意差検定では、TRK-130 (0.01 mg/kg) 単独投与群または morphine (1 mg/kg) 単独投与群と溶媒投与群の二群間の比較において、F 検定により分散の均一性を検証し (有意水準は 0.05)、分散が均一な場合は Student's t 検定を行い、分散が不均一な場合には Aspin-Welch 検定を行った。有意水準は 0.05 とした。

また、naloxone による拮抗性の感受性を評価するため、TRK-130 (0.01 mg/kg) 及び morphine (1 mg/kg) に対する naloxone 拮抗作用の用量反応曲線の差を平行線検定により比較した。

9.3. 結果

麻酔下モルモットの律動性膀胱収縮における TRK-130 (0.01 mg/kg) 及び morphine (1 mg/kg) の静脈内投与後の抑制作用に対する naloxone 拮抗の代表的チャートと用量依存的な拮抗作用を図 20 に示した。

溶媒静脈内投与後の平均膀胱収縮消失時間は 4.1 ± 0.5 min であった。一方、TRK-130 0.01 mg/kg または morphine の 1 mg/kg を単独静脈内投与後の消失時間はそれぞれ 36.9 ± 7.2 及び 46.9 ± 8.6 min であり、溶媒投与群と比較して有意に延長した。TRK-130 の 0.01 mg/kg での律動性膀胱収縮抑制作用は、naloxone (0.005、0.01、0.02、0.04 及び 0.08 mg/kg) 同時投与により用量依存的に拮抗された。 AD_{50} 値は 0.012 mg/kg [95% CI: 0.0056-0.027] と算出された。同様に morphine の 1 mg/kg での膀胱収縮抑制作用も、naloxone (0.0005、0.001、0.002、0.004 及び 0.008 mg/kg) 同時投与により用量依存的に拮抗され、 AD_{50} 値は 0.0012 mg/kg [95% CI: 0.00040-0.031] と算出された (表 7)。両化合物の抑制作用に対する naloxone 拮抗性は、平行線検定にて統計学的に有意の差が認められた (naloxone による拮抗性感受性比は 8.9 [95% CI: 4.6-17] と算出)。

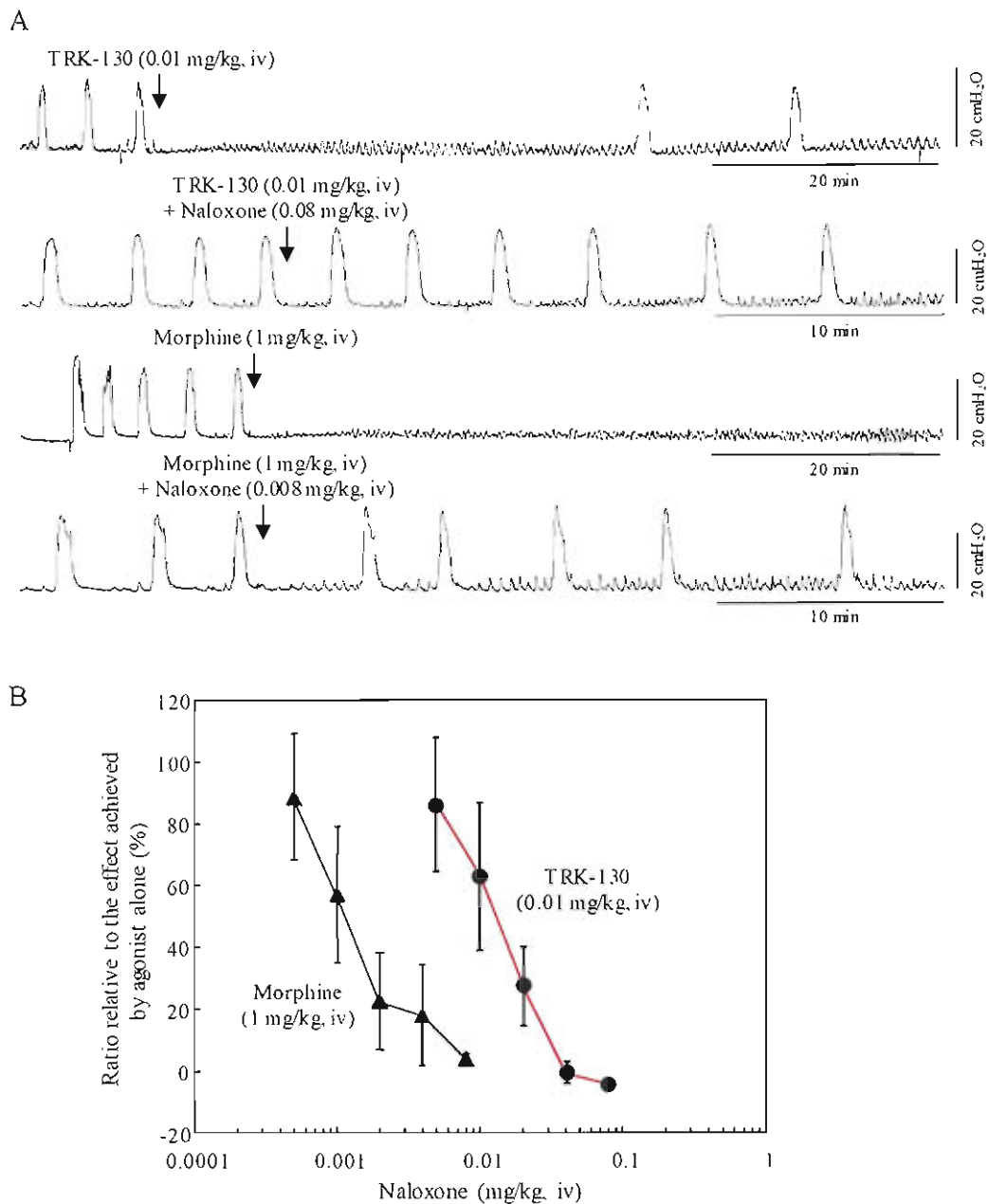


図 20. 麻酔下モルモットにおける TRK-130 及び morphine の律動性膀胱収縮抑制作用に対する naloxone の拮抗作用

A: Naloxone 処置したモルモットの代表的な律動性膀胱収縮チャート

B: TRK-130 (0.01 mg/kg) または morphine (1 mg/kg) 単独投与時の作用に対する naloxone の用量依存的な拮抗作用

1 群あたり 8 例の結果を平均値 \pm SEM で表示

表 7. 麻酔下モルモットにおける TRK-130 及び morphine の律動性膀胱収縮抑制作用に対する naloxone の拮抗作用

Group	n	Shutdown time of bladder contractions (min)		%MPE	Ratio relative to the effect achieved by agonist alone (%)	AD ₅₀ [95% CI] (mg/kg)
		Predrug	Postdrug			
Vehicle	8	3.3±0.4	4.1±0.5	0.0±0.9	-	-
TRK-130 0.01 mg/kg alone	8	3.3±0.3	36.9±7.2*	58.8±12.9	100±22.0	0.012
+ naloxone 0.005 mg/kg	8	3.1±0.3	32.4±7.1	50.7±12.7	86.2±21.6	[0.0056-0.027]
+ naloxone 0.01 mg/kg	8	3.3±0.2	24.7±7.9	36.9±14.0	62.9±23.9	
+ naloxone 0.02 mg/kg	8	3.3±0.4	13.1±4.1	16.2±7.3	27.6±12.5	
+ naloxone 0.04 mg/kg	8	3.0±0.4	3.9±1.1	-0.3±2.0	-0.5±3.4	
+ naloxone 0.08 mg/kg	8	3.2±0.4	2.8±0.3	-2.3±0.5	-3.9±0.9	
Morphine 1 mg/kg alone	8	3.3±0.4	46.9±8.6*	76.6±15.3	100.0±20.0	0.0012
+ naloxone 0.0005 mg/kg	8	3.2±0.3	42.1±8.8	68.1±15.8	88.8±20.6	[0.00040-0.0031]
+ naloxone 0.001 mg/kg	8	3.0±0.4	28.6±9.3	43.9±16.7	57.3±21.8	
+ naloxone 0.002 mg/kg	8	3.2±0.3	13.8±6.6	17.4±11.9	22.7±15.5	
+ naloxone 0.004 mg/kg	8	3.1±0.3	11.9±6.9	14.0±12.3	18.3±16.1	
+ naloxone 0.008 mg/kg	8	3.2±0.3	5.8±0.7	3.1±1.2	4.1±1.6	

平均値±SEM で表示

* P≤0.05 vs. 溶媒投与群 (Aspin-Welch test)

9.4. 考察

TRK-130 の排尿反射抑制作用の機序を検討する一環として、TRK-130 による排尿反射抑制作用に対する μ オピオイド受容体拮抗薬 naloxone の拮抗作用を評価することを目的として実施した。Morphine も同時に評価し TRK-130 と比較検討した。その結果、両化合物の律動性膀胱収縮抑制作用に対して、naloxone は完全な拮抗作用を示した。これより TRK-130 及び morphine の排尿反射抑制作用は μ オピオイド受容体を介して発現しているものと考えられた。

これまでに示した、TRK-130 の①律動性膀胱収縮に対する作用、②尿流動態試験における各種パラメータへの作用、③脊髓切断処置下での作用、④骨盤神経末梢端電気刺激誘発収縮に対する作用、⑤排尿筋の電場刺激誘発収縮に対する作用、⑥naloxone による拮抗性、を総合的に考え合わせ、TRK-130 の作用点は、既存薬の抗コリン薬とは異なり、末梢（膀胱）ではなく、 μ オピオイド受容体を介して、腰仙髄及び上位中枢に存在する排尿反射中枢に作用して、蓄尿機能を亢進することにより排尿反射抑制作用を示すものと考えられた。

なお、naloxone 拮抗性の感受性について、TRK-130 と morphine とで有意に異なり、morphine にて naloxone 感受性が高いことが示された。本知見から、TRK-130 の示す排尿反射抑制作用が morphine とは異なる μ オピオイド受容体 (μ 受容体サブタイプの存在を示唆する報告^{60,61,62}がある) を介して発現している可能性も考えられた。

第10章 マウス腸管輸送能に対する作用

10.1. 目的

本試験は、TRK-130の安全性を確認する一環として、マウスに経口投与した charcoal mealの小腸内の移動率を指標とした腸管輸送能に対し、TRK-130の影響を評価することを目的とした。また、対照として morphine 及び buprenorphine の腸管輸送能抑制への影響を同時に評価し、TRK-130と比較検討した。

10.2. 実験方法

10.2.1. 試薬

被験化合物として TRK-130(東レ医薬研究所にて合成)を、対照化合物として morphine hydrochloride (武田薬品工業、大阪) (以下、morphine と表記) と buprenorphine (レパタン注 [0.3 mg/1.5 mL]、大塚製薬、東京) (以下、buprenorphine と表記) を用いた。TRK-130の溶媒には、0.1% citric acid 含有 5% キシリトール溶液 (キリット®注 5%、大塚製薬工場、徳島) を、morphine 及び buprenorphine の溶媒には生理食塩水 (大塚生食注、大塚製薬工場、徳島) を用い、目的の投与量になるよう適宜調製して使用した。

10.2.2. 動物

5週齢の雄性 ddY 系マウス (日本エスエルシー、静岡) を用いた (体重 22.8~27.8 g)。

本試験は東レの研究本部動物実験指針に基づき、基礎研 (鎌倉) 動物実験倫理委員会の承認を得て実施した。

10.2.3. 腸管輸送能評価法

投与前日夕方に餌を全て取り除き、それ以降は絶食としたマウスに、被験化合物または対照化合物を 10 mL/kg の投与容量で皮下投与した。投与量は、TRK-130 は 0.01、0.1、1 及び 10 mg/kg、morphine は 0.3、1、3 及び 10 mg/kg、buprenorphine は 0.03、0.1、0.3 及び 1 mg/kg とした。投与後飼育ケージ内で 15min 放置してから、10% 活性炭粉末含有 5% アラビアゴム (charcoal meal) 溶液を 0.25 mL/body の投与容量で経口投与した。20min 放置後、マウスを頸椎脱臼により安楽死させ、幽門部から盲腸までの小腸を摘出した。摘出した小腸を直線状に延ばし、全長と十二指腸起始部から charcoal meal の輸送到達先端までの距離 (cm) を測定した⁶³。

10.2.4. データ処理及びデータ解析に使用した統計学的手法

各評価化合物の腸管輸送率 (%) を以下に示す計算式に従い算出し、これを基に線形回帰分析により ID₅₀ 及び 95% CI をそれぞれ算出した。各群の結果は平均値 ± SEM で表示した。

$$\text{腸管輸送率 (\%)} = \frac{\text{小腸内 charcoal meal の移動距離 (cm)}}{\text{小腸の全長 (cm)}} \times 100$$

群間の有意差検定では、各評価化合物投与群と対応する溶媒投与群との多群間比較において、Bartlett 検定により分散の均一性を検証し（有意水準は 0.05）、分散が均一な場合は Williams 法により溶媒投与群に対する多重比較検定を行った。分散が不均一な場合には Shirley-Williams 法により溶媒投与群に対する多重比較検定を行った。いずれも検定方向は両側とし、有意水準は 0.05 とした。

10.3. 結果

皮下投与した TRK-130（0.01、0.1、1 及び 10 mg/kg）は最高用量の 10 mg/kg においても charcoal meal の腸管輸送に影響を及ぼさなかった。一方、皮下投与した morphine（0.3、1、3 及び 10 mg/kg）及び buprenorphine（0.03、0.1、0.3 及び 1 mg/kg）は、用量依存的に charcoal meal 腸管輸送を阻害し、morphine は最高用量の 10 mg/kg にて最大約 90%、buprenorphine は最高用量の 1 mg/kg にて最大約 55%の腸管輸送能抑制作用を示した（図 21）。また、その ID₅₀ は、それぞれ 1.01 mg/kg [95% CI: 0.695-1.39] 及び 0.326 mg/kg [95% CI: 0.120-4.17] と算出された（表 8）。

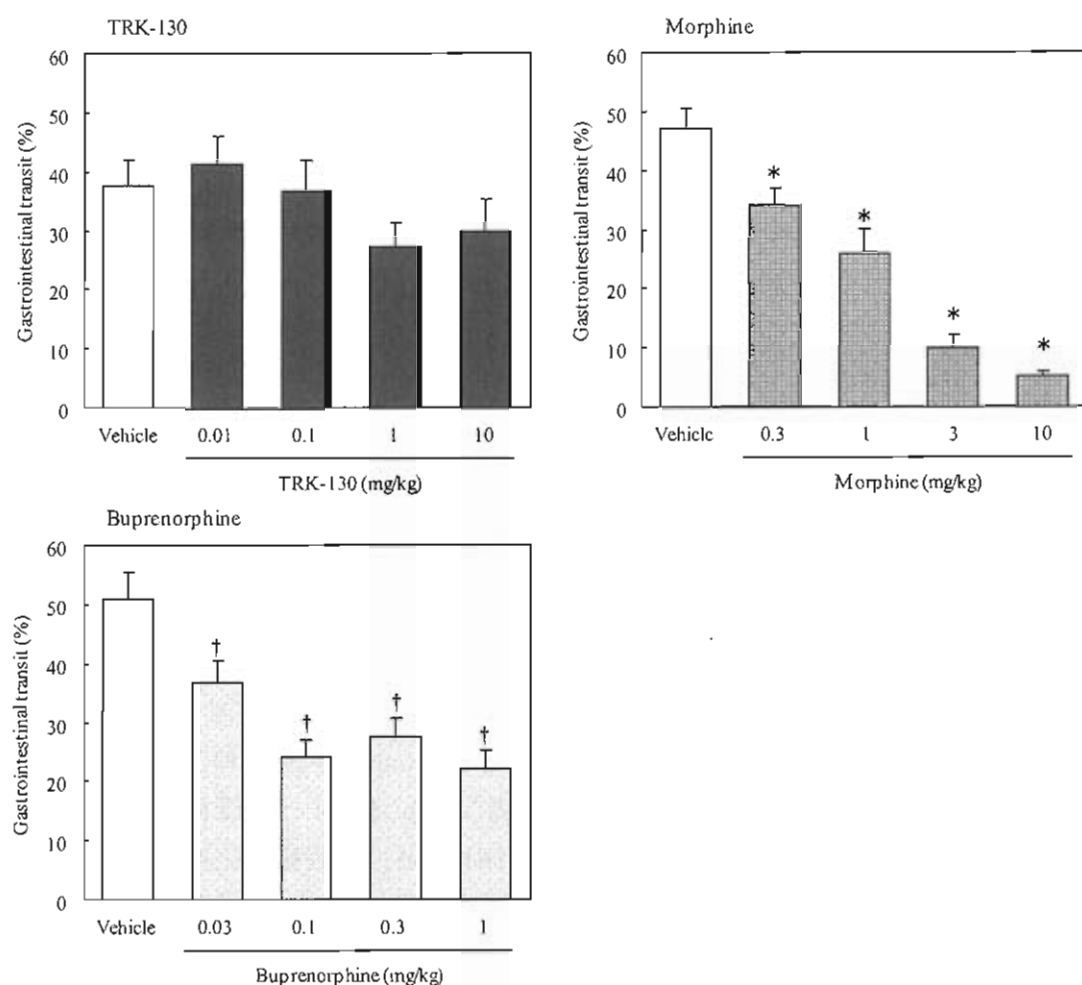


図 21. 腸管輸送能に対する TRK-130、morphine 及び buprenorphine の作用

1 群あたり 10 例の結果を平均値±SEM で表示

* $P \leq 0.05$ vs. 対応する溶媒投与群 (両側 Shirley-Williams test)

† $P \leq 0.05$ vs. 対応する溶媒投与群 (両側 Williams test)

表 8. 腸管輸送能に対する TRK-130、morphine 及び buprenorphine の ID_{50}

Compound	ID_{50} (mg/kg)	95% CI
TRK-130	N.D.	N.D.
Morphine	1.01	0.695-1.39
Buprenorphine	0.326	0.120-4.17

N.D.: 算出せず

10.4. 考察

TRK-130 の安全性を確認する一環として、 μ オピオイド受容体由来の代表的な副作用である便秘の有無について、マウスに経口投与した charcoal meal の小腸内の移動率を指標とした腸管輸送能に対する TRK-130 の影響を評価することにより検討した。その結果、TRK-130 は排尿反射抑制作用を示す用量に比べ高用量の 10 mg/kg 投与においても腸管輸送能に対して抑制作用を示さなかった。一方、morphine 及び *in vitro* 作動活性評価にて TRK-130 と同様に部分作動性を示した buprenorphine においても用量依存的に腸管輸送能抑制作用が認められ、TRK-130 は morphine 及び buprenorphine に比べ腸管輸送能に対する影響は少なく、便秘を誘発する懸念は少ないことが明らかとなった。

近年、 μ オピオイド受容体には少なくとも 2 種 (μ_1 及び μ_2) のサブタイプが存在することが示唆されている。 μ 受容体サブタイプの分類は、主に μ_1 受容体選択的な拮抗薬である naloxonazine が示す薬理学的特性の違いを基に提唱されており、naloxonazine が morphine の全身投与/上位中枢投与時の鎮痛作用は拮抗するものの、脊髓投与時の鎮痛作用や呼吸抑制作用、腸管輸送能抑制作用は拮抗しないことが報告されている^{60,61}。また、 μ 受容体遺伝子において複数のスプライスバリエントが同定⁶¹されており、これにより機能的にも異なる μ 受容体サブタイプが存在する可能性が報告⁶²されている。

第 9 章で示した TRK-130 と morphine に対する naloxone 拮抗性の検討において、TRK-130 の示す排尿反射抑制作用が morphine とは異なる μ オピオイド受容体を介して発現している可能性も考えられた。本検討により、TRK-130 は腸管輸送能抑制を有さないことが示され、さらにラットを用いた毒性試験において、600 mg/kg 経口投与でも呼吸抑制を示さないことを確認済み（詳細データは示さず）であり、TRK-130 は morphine など従来の μ 受容体作動薬とは異なる特性を有していることが分かっている。興味深いことに、末梢性の μ 受容体作動薬である loperamide はラット膀胱筋標本に対し弛緩作用を示し、この弛緩作用は naloxone により拮抗されるが、 μ_1 受容体を拮抗するのに十分な量の naloxonazine によっても拮抗されないとの報告⁶⁴がある。TRK-130 が骨盤神経末梢端電気刺激モデルを用いた検討（第 8 章）において、末梢（膀胱）に対して直接的な作用を示さなかったことは、作用する μ 受容体サブタイプの違いに起因している可能性も考えられる。さらに、naloxonazine によってその鎮痛作用が選択的に拮抗されることから μ_1 受容体作動薬であることが示唆されている内因性 μ 受容体作動薬の endomorphin-2^{65,66} が、排尿機能の恒常的な調整と情報伝達に参与している可能性も報告されており⁵⁹、今後、TRK-130 の薬理作用に対する naloxonazine 拮抗性を確認することなどにより、TRK-130 と μ 受容体サブタイプの関係について、明らかにしていく必要があると考える。

TRK-130 が従来の μ 受容体作動薬とは異なる薬理学的特性を有する別の可能性として、近年、提唱されているバイアスド μ 受容体リガンドと言う概念も考えられる。バイアスド μ 受容体リガンドは、 μ 受容体を介して G 蛋白経路の細胞内シグナル経路を活性化して鎮痛作用などを引き起こすとともに、もう一方の β -arrestin 経路の細胞内シグナ

ル経路は拮抗することで呼吸抑制や腸管輸送能抑制は引き起こさないとされる。最近、このバイアスド μ 受容体リガンドとされる TRV130 が、臨床試験において morphine よりも強力な鎮痛作用を示しつつ、かつ morphine に比べ広い安全域を示したとの報告がなされている⁶⁷ (図 22)。

TRK-130 が示す種々の薬理学的特性は、主に μ 受容体を介した部分作動性に由来するところが多いと考えられるが、これら μ 受容体サブタイプの関与やバイアスドリガンドの可能性などについても今後検討する必要があると思われる。

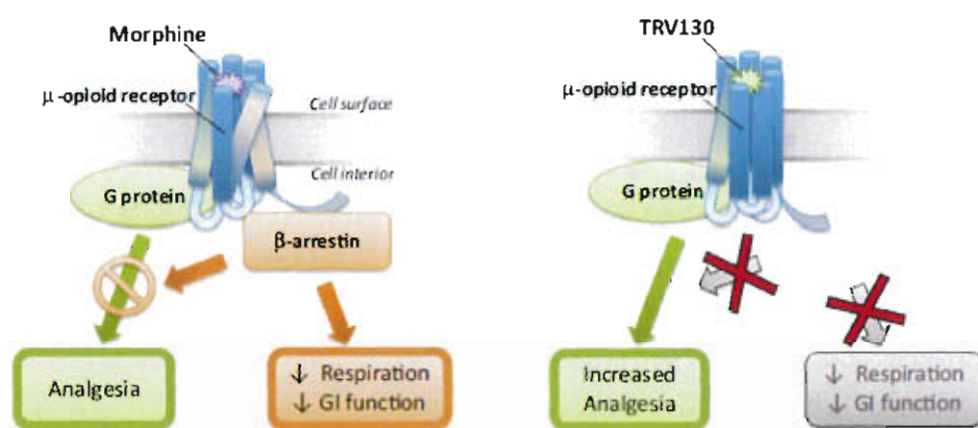


図 22. バイアスド μ 受容体リガンド TRV130 の作用概念図⁶⁸

第11章 結論

本研究により、以下のことが明らかとなった。

- (1) TRK-130 は μ 受容体に選択的に高い親和性を示した。 μ 受容体に対する TRK-130 の K_i は morphine の 1/43 であり、morphine より高い μ 受容体親和性を示した。
- (2) μ 受容体発現細胞にて、TRK-130 は forskolin 刺激による細胞内 cAMP 蓄積を濃度依存的に阻害し、 E_{max} は 66.1%と部分作動性を示し、 EC_{50} は 2.39 nmol/L であった。既存 μ 受容体作動薬である morphine と buprenorphine の E_{max} はそれぞれ 100.0%と 90.8%、 EC_{50} は 19.9 nmol/L と 4.49 nmol/L であり、TRK-130 の E_{max} はこれらに比べ有意に低かった。TRK-130 は δ 、 κ 受容体に対しても部分作動性を示した。
- (3) 静脈内投与した TRK-130 は用量依存的に膀胱収縮の消失時間を延長 (ED_{30} =0.0034 mg/kg) し、最高膀胱内圧には影響を及ぼさなかった。Morphine も消失時間を延長 (ED_{30} =0.62 mg/kg) し、最高膀胱内圧には影響を与えなかった。一方、抗コリン薬の oxybutynin (1 mg/kg) は、最高膀胱内圧を投与前値の 72.7%までに有意に低下させたが、消失時間には影響を与えなかった。TRK-130、morphine は排尿筋の収縮力に影響を及ぼさずに排尿反射の発生を抑制し、oxybutynin は排尿筋収縮力を減弱させるものの、排尿反射の発生には影響を及ぼさないことが示された。
- (4) TRK-130 (0.0025 mg/kg)、oxybutynin (1 mg/kg) の静脈内投与は同程度にまで有意に膀胱容量を増加 (それぞれ 34%、35%) させ、oxybutynin では V_e 、 Q_{max} 及び $P_{ves}(Q_{max})$ が溶媒群に比べ有意に低下したが、TRK-130 では影響は認められなかった。これより、TRK-130 は oxybutynin と異なり、中枢にて排尿反射を調節することにより蓄尿機能を向上させ、排尿圧や排尿効率に影響を及ぼさないものと考えられた。
- (5) 覚醒下 formalin 誘発頻尿モデルにて、経口投与した TRK-130 は 0.01 mg/kg 以上で排尿頻度を有意に減少させ、1 回あたりの排尿量は有意に増加させた。総排尿量には影響を与えなかった。TRK-130 は経口投与にて抗頻尿作用を有することが示された。
- (6) TRK-130 は脊髓切断の有無によらず用量依存的に膀胱収縮の消失時間を延長し、最高膀胱内圧には影響を及ぼさなかった。TRK-130 の排尿反射抑制作用は上位中枢の影響がない状態でも保持されていることが示された。
- (7) TRK-130 (0.005 mg/kg) の静脈内投与は骨盤神経末梢端刺激誘発膀胱収縮には影響を与えなかったが、oxybutynin (1 mg/kg) は有意な抑制作用を示した。TRK-130 は oxybutynin と異なり、末梢側に作用点を有さないことが示された。
- (8) 静脈内投与した TRK-130 (0.01 mg/kg)、morphine (1 mg/kg) の排尿反射抑制作用は、代表的 μ 受容体拮抗薬 naloxone の同時投与により用量依存的に拮抗された。

AD₅₀ はそれぞれ 0.012 mg/kg、0.0012 mg/kg であり、naloxone 拮抗性の感受性は morphine でより高いことが示された。

- (9) TRK-130 は 10 mg/kg の皮下投与においても腸管輸送能に影響を及ぼさなかった。一方、morphine、buprenorphine は用量依存的に輸送能を阻害し、ID₅₀ はそれぞれ 1.01 mg/kg、0.326 mg/kg であった。

TRK-130 は μ 受容体選択的な部分作動薬であり、経口投与にて中枢において排尿反射を調節することにより蓄尿機能を向上させ、排尿圧や排尿効率など排尿機能に影響を及ぼすことなく抗頻尿作用を示すことが明らかとなった。これは既存の抗コリン薬とは異なるものであった。一方、TRK-130 は従来のオピオイド化合物に比べ μ 受容体作動活性由来の便秘の懸念は少ないことが明らかとなった。

以上より、TRK-130 は OAB 治療薬として望ましい薬理特性を有し、臨床にて OAB の有用な治療選択肢の一つになり得るものと考えられた。

第12章 謝辞

本論文の作成にあたり、多大なるご指導、ご鞭撻を賜りました北里大学薬学部 薬理学教室 田辺 光男 教授に深く感謝申し上げます。また、有益なご助言を頂きました同大学薬学部 生命薬化学教室 藤井 秀明 教授、同大学薬学部 衛生化学教室 今井 浩孝 教授、同大学薬学部 分子薬理学教室 中原 努 教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、有益なご助言並びにご指導を賜りました Departments of Urology and Pharmacology and Chemical Biology, University of Pittsburgh 吉村 直樹 教授に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり、有益なご助言、ご指導並びに実験にご協力いただきました共同研究先の武田薬品工業株式会社 土居 孝行 氏、橋本 忠俊 氏、岡西 聡 氏、岩田 雅史 氏を始めとする多くの皆さまに心より感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、有益なご助言、ご指導並びに実験にご協力いただきました東レ株式会社医薬研究所 河合 孝治 氏、泉本 直樹 氏、駒形 俊和 氏、吉川 悟 氏、小林 良輔 氏、蟹江 小葉子 氏、平形 美樹人 氏、木綿 しのぶ 氏を始めとする多くの皆さまに心より感謝申し上げます。

最後に、本論文の作成にあたり、陰ながら支えていただきました家族に心より感謝申し上げます。

第13章 参考文献

- 1 Abram P, Cardozo L, Fall M, et al.: The standardization of terminology of lower urinary tract function: report from the standardization Sub-committee of the International Continence Society. *Neuroulog Urodyn.* 21(2): 167-178, 2002.
- 2 Abram P, Wein AJ: Introduction: overactive bladder and its treatments. *Urology.* 55(Suppl 5A): 1-2, 2000.
- 3 日本排尿機能学会 過活動膀胱診療ガイドライン作成委員会, 編: 過活動膀胱診療ガイドライン. 第2版: 7-8, 2015.
- 4 本間之夫, 柿崎秀宏, 後藤百万, 他: 排尿に関する疫学的研究. *日本排尿機能学会誌.* 14: 266-277, 2003.
- 5 柿崎秀宏, 田中博, 守屋仁彦, 他: 過活動膀胱の病態と診断. *排尿障害プラクティス.* 12(3): 193-198, 2004.
- 6 Stewart WF, Van Rooyen JB, Cundiff GW, et al.: Prevalence and burden of overactive bladder in the United States. *World J Urol.* 20: 327-336, 2003.
- 7 Milsom I, Abrams P, Cardozo L, et al.: How widespread are the symptoms of an overactive bladder and how are they managed? A population-based prevalence study. *BJU Int.* 87: 760-766, 2001.
- 8 吉田正貴, 大菅陽子, 野尻佳克, 他: 過活動膀胱に関する疫学調査. *泌尿器外科.* 27(3): 339-403, 2014.
- 9 本間之夫: 過活動膀胱と QOL. *Urology View.* 2: 51-56, 2004.
- 10 Liberman JN, Hunt TL, Stewart WF, et al.: Health-related quality of life among adults with symptoms of overactive bladder: results from a U.S. community-based survey. *Urology.* 57: 1044-1050, 2001.
- 11 Wein AJ: Diagnosis and treatment of the overactive bladder. *Urology.* 62(Suppl2): 20-27, 2003.
- 12 Wein AJ and Rackley RR: Overactive bladder: a better understanding of pathophysiology, diagnosis and management. *J Urol.* 175: S5-S10, 2006.
- 13 Cipullo LMA, Cosimato C, Filippelli A, et al.: Pharmacological approach to overactive bladder and urge urinary incontinence in women: an overview. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 174: 27-34, 2014.
- 14 Yarker YE, Goa KL, and Fitton A: Oxybutynin: a review of its pharmacodynamics and pharmacokinetic properties, and its therapeutic use in detrusor instability. *Drugs Aging.* 6: 243-262, 1995.
- 15 Kelleher CJ, Cardozo LD, Khullar V, et al.: A medium-term analysis of the subjective efficacy of treatment for women with detrusor instability and low bladder compliance. *Br J Obstet*

- Gynaecol. 104: 988-993, 1997.
- 16 Andersson KE: Antimuscarinics for treatment of overactive bladder. *Lancet Neurol.* 3: 46-53, 2004.
 - 17 Sahai A, Khan M, Fowler CJ, et al.: Botulinum toxin for the treatment of lower urinary tract symptoms: a review. *Neurourol Urodyn.* 24: 2-12, 2005.
 - 18 Sakakibara F, Kiniwa M, and Nanri M: Are antimuscarinic drugs effective against urinary frequency mediated by atropine-resistant contractions? *J Pharmacol Sci.* 115:364-373, 2011.
 - 19 Sexton CC, Notte SM, Maroulis C, et al.: Persistence and adherence in the treatment of overactive bladder syndrome with anticholinergic therapy: a systematic review of the literature. *Int J Clin Pract.* 65: 567-585, 2011.
 - 20 Chancellor MB, Migliaccio-Walle K, Bramley TJ, et al.: Long-term patterns of use and treatment failure with anticholinergic agents for overactive bladder. *Clin Ther.* 35: 1744-1751, 2013.
 - 21 Broström S and Hallas J: Persistence of antimuscarinic drug use. *Eur J Clin Pharmacol.* 65: 309-314, 2009.
 - 22 Ohlstein EH, von Keitz A, and Michel MC: A multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled trial of the β_3 -adrenoceptor agonist solabegron for overactive bladder. *Eur Urol.* 62: 834-840, 2012.
 - 23 Nitti VW, Khullar V, van Kerrebroeck P, et al.: Mirabegron for the treatment of overactive bladder: a prespecified pooled efficacy analysis and pooled safety analysis of three randomised, double-blind, placebo-controlled, phase III studies. *Int J Clin Pract.* 67: 619-632, 2013.
 - 24 鈴木雅徳, 鶴飼政志, 関信男, 他: 新規過活動膀胱治療薬ミラベグロン (ベタニス®錠) の薬理学的特性及び臨床試験成績. *日本薬理学雑誌.* 139(5): 219-225, 2012.
 - 25 吉村直樹. 排尿反射機構に関する新しい考え. *日薬理誌.* 121: 290-298, 2003.
 - 26 Seki S, Igawa Y, Kaidoh K, et al.: Role of dopamine D1 and D2 receptors in the micturition reflex in conscious rats. *Neurourol Urodyn.* 20: 105-113, 2001.
 - 27 Kakizaki H, Yoshiyama M, Koyanagi T, et al.: Effects of WAY100635, a selective 5-HT1A-receptor antagonist on the micturition-reflex pathway in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 280: R1407-R1413, 2001.
 - 28 Morikawa K, Hashimoto S, Yamauchi T, et al.: Inhibitory effect of inaperisone hydrochloride (inaperisone), a new centrally acting muscle relaxant, on the micturition reflex. *Eur J Pharmacol.* 213: 409-415, 1992.
 - 29 Soulard C, Pascaud X, Roman FJ, et al.: Pharmacological evaluation of JO 1870: relation to the potential treatment of urinary bladder incontinence. *J Pharmacol Exp Ther.* 260: 1152-

- 1158, 1992.
- 30 Pandita RK, Pehrson R, Christoph T, et al.: Actions of tramadol on micturition in awake, freely moving rats. *Br J Pharmacol.* 139: 741-748, 2003.
 - 31 Pehrson R and Andersson KE: Tramadol inhibits rat detrusor overactivity caused by dopamine receptor stimulation. *J Urol.* 170: 272-275, 2003.
 - 32 Pehrson R, Stenman E, and Andersson KE: Effects of tramadol on rat detrusor overactivity induced by experimental cerebral infarction. *Eur Urol.* 44: 495-499, 2003.
 - 33 Holt JDS, WatsonMJ, Chang JP, et al.: DPI-221 [4-((a-s)-a-((2s,5r)-2,5-dimethyl-4-(3-fluorobenzyl)-1-piperazinyl)benzyl)-N,N-diethylbenzamide]: a novel nonpeptide δ receptor agonist producing increased micturition interval in normal rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 315: 601-608, 2005.
 - 34 Noto H, Roppolo JR, de Groat WC, et al.: Opioid modulation of the micturition reflex at the level of the pontine micturition center. *Urol Int.* 47 (Suppl 1): 19-22, 1991.
 - 35 deGroat WC, Kawatani M, Hisamitsu T, et al.: The role of neuropeptides in the sacral autonomic reflex pathways of the cat. *J Auton Nerv Syst.* 7: 339-350, 1983.
 - 36 Thor KB, Hisamitsu T, Roppolo JR, et al.: Selective inhibitory effects of ethylketocyclazocine on reflex pathways to the external urethral sphincter of the cat. *J Pharmacol Exp Ther.* 248: 1018-1025, 1989.
 - 37 垣花学, 成田年, 編集.: オピオイド 基礎を知って臨床で使いこなす. 5, 2012.
 - 38 Wang JB, Johnson PS, Persico AM, et al.: Human mu opiate receptor: cDNA and genomic clones, pharmacologic characterization and chromosomal assignment. *FEBS Lett.* 338: 217-222, 1994.
 - 39 Simonin F, Befort K, Gaveriaux-Ruff C, et al.: The human delta-opioid receptor: Genomic organization, cDNA cloning, functional expression, and distribution in human brain. *Mol Pharmacol.* 46: 1015-1021, 1994.
 - 40 Maguire P, Tsai N, Damal J, et al.: Pharmacological profiles of fentanyl analogs at μ , δ , and κ opiate receptors. *Eur J Pharmacol.* 213: 219-225, 1992.
 - 41 Simonin F, Gaveriaux-Ruff C, Befort K, et al.: Kappa-opioid receptor in humans: cDNA and genomic cloning, chromosomal assignment, functional expression, pharmacology and expression pattern in the central nervous system. *PNAS USA.* 92: 7006-7010, 1995.
 - 42 Selley DE, Liu Q, and Childers SR: Signal transduction correlates of mu opioid agonist intrinsic efficacy: receptor-stimulated [35 S]GTP γ S binding in mMOR-CHO cells and rat thalamus. *J Pharmacol Exp Ther.* 285: 496-505, 1998.
 - 43 Huang P, Kehner GB, Cowan A, et al.: Comparison of pharmacological activities of buprenorphine and norbuprenorphine: norbuprenorphine is a potent opioid agonist. *J*

- Pharmacol Exp Ther. 297: 688-695, 2001.
- 44 Doi T, Kamo I, Imai S, et al.: Effects of TAK-637, a tachykinin receptor antagonist, on the micturition reflex in guinea pigs. *Eur J Pharmacol.* 395: 241-246, 2000.
 - 45 Dray A, and Metsch R: Inhibition of urinary bladder contractions by a spinal action of morphine and other opioids. *J Pharmacol Exp Ther.* 231: 254-260, 1984.
 - 46 Shimizu I, Kawashima K, Ishii D, et al.: Pharmacological actions of AH-9700 on micturition reflex in anesthetized rats. *Eur J Pharmacol.* 412: 171-179, 2001.
 - 47 Maggi CA, Santicioli P, and Meli A: Somatovesical and vesicovesical excitatory reflexes in urethane-anaesthetized rats. *Brain Res.* 380: 83-93, 1986.
 - 48 Nagabukuro H, Okanishi S, and Doi T: Effects of TAK-802, a novel acetylcholinesterase inhibitor, and various cholinomimetics on the urodynamic characteristics in anesthetized guinea pigs. *Eur J Pharmacol.* 494: 225-232, 2004.
 - 49 Van Asselt E, Groen J, and Van Mastrigt R: A comparative study of voiding in rat and guinea pig: simultaneous measurement of flow rate and pressure. *Am J Physiol.* 269: R98-R103, 1995.
 - 50 Dupont MC, Spitsbergen JM, Kim KB, et al.: Histological and neurotrophic changes triggered by varying models of bladder inflammation. *J Urol.* 166: 1111-1118, 2001.
 - 51 Yaksh TL, Durant PAC, and Brent CR: Micturition in rats: a chronic model for study of bladder function and effect of anesthetics. *Am J Physiol.* 251: R1177-R1185, 1986.
 - 52 Kontani H, Nakagawa M, and Sakai T: Effects of central nervous system-acting drugs on urinary bladder contraction in unanesthetized rats. *Japan J Pharmacol.* 50: 327-332, 1989.
 - 53 Leander JD, Hart JC, and Zerbe RL: Kappa agonist-induced diuresis: evidence for stereoselectivity, strain differences, independence of hydration variables and a result of decreased plasma vasopressin levels. *J Pharmacol Exp Ther.* 242: 33-39, 1987.
 - 54 Brooks DP, Giardina G, Gellai M, et al.: Opiate receptors within the blood-brain barrier mediate kappa agonist-induced water diuresis. *J Pharmacol Exp Ther.* 266: 164-171, 1993.
 - 55 Oyama T, Homan T, Kyotani J, et al.: Effect of tramadol on pain-related behaviors and bladder overactivity in rodent cystitis models. *Eur J Pharmacol.* 676: 75-80, 2012.
 - 56 Dray A, and Metsch R: Morphine and the centrally-mediated inhibition of urinary bladder motility in the rat. *Brain Res.* 297: 191-195, 1984.
 - 57 Dray A, and Metsch R: Opioid receptor subtypes involved in the central inhibition of urinary bladder motility. *Eur J Pharmacol.* 104: 47-53, 1984.
 - 58 Gouarderes C, Cros J, and Quirion R: Autoradiographic localization of mu, delta and kappa opioid receptor binding sites in rat and guinea pig spinal cord. *Neuropeptides.* 6: 331-342, 1985.

- 59 Dou XL, Qin RL, Qu J, et al.: Synaptic connections between endomorphin 2-immunoreactive terminals and μ -opioid receptor-expressing neurons in the sacral parasympathetic nucleus of the rat. *PLoS ONE* 8: e62028, 2013.
- 60 Pasternak GW, and Wood PJ: Multiple mu opiate receptors. *Life Sci.* 38: 1889-1898. 1986.
- 61 Pasternak GW: Incomplete cross tolerance and multiple mu opioid peptide receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 22: 67-70, 2001.
- 62 Bolan EA, Pan YX, and Pasternak GW: Functional analysis of MOR-1 splice variants of the mouse mu opioid receptor gene Oprm. *Synapse.* 51: 11-18, 2004.
- 63 Pol O, and Puig MM: Reversal of tolerance to the antitranst effects of morphine during acute intestinal inflammation in mice. *Br J Pharmacol.* 122: 1216-1222, 1997.
- 64 Lee LM, Lin CS, Chung HH, et al.: Urinary bladder relaxation through activation of opioid μ -receptors induced by loperamide is increased in diabetic rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 120: 323-328, 2012.
- 65 Sakurada S, Hayashi T, Yuhki M, et al.: Differential antagonism of endomorphin-1 and endomorphin-2 spinal antinociception by naloxonazine and 3-methoxynaltrexone. *Brain Res.* 881: 1-8, 2000.
- 66 Sakurada S, Hayashi T, Yuhki M, et al.: Differential antagonism of endomorphin-1 and endomorphin-2 supraspinal antinociception by naloxonazine and 3-methoxynaltrexone. *Peptides.* 23: 895-901, 2002.
- 67 Singla N, Minkowitz HS, Soergel DG, et al.: A randomized, Phase IIb study investigating oliceridine (TRV130), a novel μ -receptor G-protein pathway selective (μ -GPS) modulator, for the management of moderate to severe acute pain following abdominoplasty. *J Pain Res.* 10: 2413-2424, 2017.
- 68 Soergel DG, Subach RA, Burnham N, et al.: Biased agonism of the μ -opioid receptor by TRV130 increases analgesia and reduces on-target adverse effects versus morphine: A randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study in healthy volunteers. *Pain.* 155: 1829-1835, 2014.