

平成30年6月7日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20081

研究課題名(和文) アセトアミノフェンの脊髄後角における鎮痛機序解明と新規投与経路の開発

研究課題名(英文) Acetaminophen Metabolite N-Acylphenolamine Induces Analgesia via Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Receptors Expressed on the Primary Afferent Terminals of C-fibers in the Spinal Dorsal Horn.

研究代表者

大橋 宣子 (Ohashi, Nobuko)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：70706712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：アセトアミノフェンの作用機序はN-アシルフェノールアミン(AM404)が脳に移行し、TRPV1やCB1受容体を活性化することで鎮痛作用を発揮するとされている。一方、このTRPV1やCB1受容体は脳だけでなく痛覚伝導路である脊髄後角にも多く存在するが、これまでにアセトアミノフェンの脊髄後角における鎮痛作用を検討した報告はない。そこで我々は、行動学実験およびin vivo、in vitroパッチクランプ記録を用いた電気生理学実験を行い、アセトアミノフェンはAM404へ代謝された後、脊髄後角ニューロンのC線維終末のTRPV1受容体に作用し脊髄レベルで鎮痛作用を発揮することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Acetaminophen is metabolized to N-acylphenolamine (AM404), which induces analgesia in the brain, but no previous studies have reported analgesic effects of acetaminophen mediated by the spinal cord dorsal horn.

First, we assessed in a rat using behavioral measures and revealed that systemic administration of acetaminophen and intrathecal injections of AM404 induces analgesia to thermal stimulation. Second, we used whole-cell patch-clamp recordings in the dorsal horn, and revealed that intravenous acetaminophen decreased peripheral pinch-induced excitatory responses, while direct application of acetaminophen did not reduce these responses. Direct application of AM404 decreased the amplitudes of monosynaptic EPSCs evoked by C-fibers stimulation. These phenomena were mediated by TRPV1, but not CB1, receptors. These results suggest that the acetaminophen metabolite AM404 induces analgesia directly via TRPV1 receptors expressed on central terminals of C-fibers in the spinal dorsal horn.

研究分野：麻酔科学分野

キーワード：アセトアミノフェン N-アシルフェノールアミン パッチクランプ記録 脊髄後角 TRPV1受容体

### 1. 研究開始当初の背景

アセトアミノフェンと NSAIDs は臨床で鎮痛薬としていずれもよく使用されている。特に、アセトアミノフェンは用量拡大や静脈薬が認可されたためその使用頻度は急速に増加している。NSAIDs が COX 阻害作用による消炎鎮痛薬である一方、アセトアミノフェンは COX 阻害作用を有さないため抗炎症作用はないとされているが、胃腸、腎障害などの副作用が少なく高齢者にも安全に使用できることが知られている。アセトアミノフェンの作用機序は長年不明であったが、近年、アセトアミノフェンの代謝産物である p-aminophenol が肝臓で産生された後、アラキドン酸と結合することで N-acylphenolamine (AM404) へと代謝され、この AM404 が強力な鎮痛作用を示すことが示された。この鎮痛機序として、AM404 がカプサイシン受容体 (TRPV1) を強力に活性化させることやカンナビノイドの再取り込みを阻害して、シナプス間隙のカンナビノイドを増加させることにより間接的にカンナビノイド受容体 (CB1) を活性化させる可能性が報告されている。しかし、これらの作用の多くが中脳における *in vitro* の組織での結果である。一方、脊髄後角は末梢からの痛みの情報を受け取り、修飾、統合した後、上位中枢に伝える痛覚伝導路として重要な部位である。さらに、脊髄には TRPV1 や CB1 などの受容体が密に存在するが、これまでアセトアミノフェンの脊髄後角における作用機序の報告はない。

### 2. 研究の目的

脊髄後角におけるアセトアミノフェンの鎮痛作用を行動学実験や *in vivo* および *in vitro* パッチクランプ法による電気生理学的実験を用いて明らかにする。

また、これまでアセトアミノフェンの抗炎症作用は非常に弱いと考えられてきたが、炎症性疼痛モデルラットを用いて同様の実験を行い、脊髄後角における鎮痛効果を検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) Radiant heat test による行動学実験

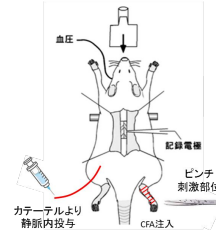
Wistar 系成熟ラットを用い、25G 針を用いてアセトアミノフェン (10, 20, 40 mg/kg) の腹腔内投与およびくも膜下にカテーテル留置し、そのカテーテルより AM404 (0.1, 0.3, 1 nmol/10  $\mu$ L) を投与する。熱刺激を用い逃避行動が発現するまでの潜時を測定する。

#### (2) 脊髄後角の *in vivo* パッチクランプ記録

Wistar 系成熟ラットを用い、薬物の静脈投与のため大腿静脈にカテーテルを挿入する。椎弓切除後、呼吸性動揺を最小限にするために脊柱をフレームに固定する。ガラス微小記録電極を顕微鏡下にマニピュレーターを用いて脊髄後角に誘導し、パッチクランプ記録により興奮性シナプス後電流 (Excitatory

postsynaptic current: EPSC) の記録を行う。痛み刺激として受容野に侵害刺激 (ピンチ刺激) を与える。アセトアミノフェンの静脈内投与を行い、侵害刺激に対する EPSC の変化を記録する。

図 1: *in vivo* パッチクランプ記録



#### (3) 脊髄後角の *in vitro* パッチクランプ記録

##### 脊髄横断スライス標本の作製

ウレタン (1.2 ~ 1.5 g/kg, 腹腔内投与) 麻酔下に椎弓切除を行い、腰仙部脊髄を摘出する。その後、氷冷 Krebs 液中でマイクロスライサーを用い、L5 後根を付した厚さ約 650  $\mu$ m の脊髄横断スライスを作成する。スライスを記録用チェンバーに移したのち、95%酸素、5%二酸化炭素の混合ガスで飽和された Krebs 液を 36 度に加温して灌流する。

##### パッチクランプ記録

脊髄後角第 2 層 (膠様質) 細胞 (SG ニューロン) より、先端抵抗が約 10 M $\Omega$  のガラス電極を用いてホールセルパッチクランプ記録を行う。保持膜電位を -70 mV に固定した EPSCs を記録し、アセトアミノフェンおよび AM404 の灌流投与に対する反応を検討する。

##### 後根刺激方法

吸引電極を用い脊髄横断スライスに付した L5 後根の電気刺激を行った (A $\delta$  線維; 100  $\mu$ A, 0.05 ms, C 線維; 1000  $\mu$ A, 0.5 ms)。

で観察されたアセトアミノフェンおよび AM404 の効果が TRPV1 受容体拮抗薬 (カプサゼピン) または CB1 受容体拮抗薬 (AM251) で消失するかを観察する。

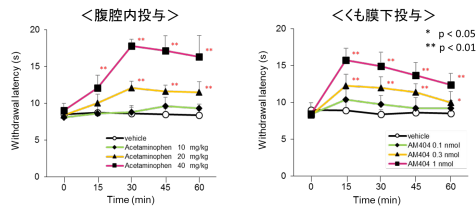
#### (4) 炎症性疼痛モデルラット

左足底に CFA (Complete Freund's adjuvant) を 100  $\mu$ l 注入し、炎症性疼痛モデルラットを作製し、(1)(2)(3)の実験を行う。

#### 4. 研究成果

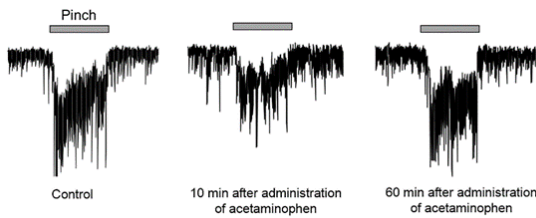
(1) アセトアミノフェンおよび AM404 は熱刺激による逃避行動までの潜時を濃度依存的に延長させた。

図 2: 熱刺激による逃避行動までの潜時



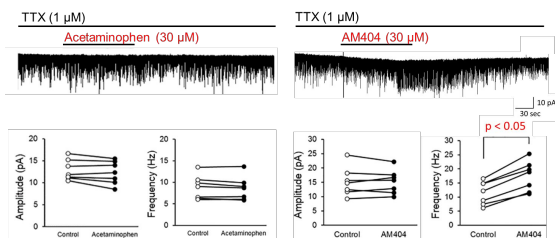
(2) *In vivo* パッチクランプ記録により得られた EPSC の波形から基線により囲まれた面積を比較した。アセトアミノフェンの投与により徐々に痛み刺激に対する反応は減弱し、投与 10 分後の反応をコントロールと比較すると有意に痛みを抑制していた (図 3)。この結果より、アセトアミノフェンの全身投与は痛み刺激による脊髄後角の興奮性伝達を抑制し、鎮痛効果を発揮すると考えられた。

図 3: *in vivo* パッチクランプ記録による痛み刺激の変化



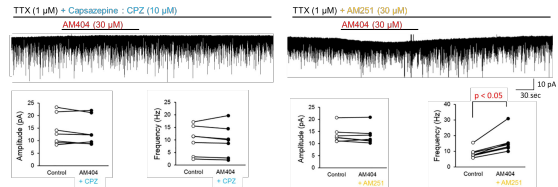
(3) アセトアミノフェンの脊髄後角における鎮痛作用の機序を *in vitro* パッチクランプ記録により検討した。まず、興奮性シナプス前終末に対する作用として、テトロドトキシン (TTX: 1  $\mu$ M) 存在下の miniature EPSCs (mEPSCs) を記録したところ、アセトアミノフェンの投与では振幅、頻度に変化はみられなかったが、AM404 の投与により頻度が有意に増加した。この結果から、アセトアミノフェンの代謝物である AM404 が脊髄後角における興奮性シナプス前終末に直接作用し、グルタミン酸の放出を増強させることが明らかになった (図 4)。

図 4: *in vitro* パッチクランプ記録による mEPSCs



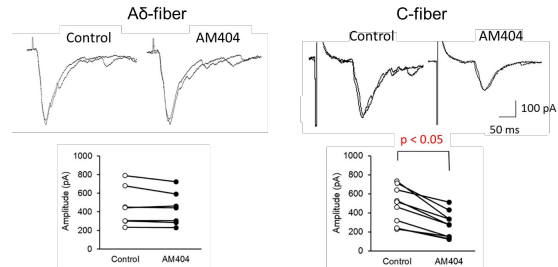
これらの反応をカプサゼピンおよび AM251 存在下で記録したところ、AM404 による頻度の増加作用はカプサゼピンでは拮抗されたが、AM251 では拮抗されなかった。この結果から、AM404 の作用は TRPV1 受容体が関与することが明らかになった (図 5)。

図 5: TRPV1 および CB1 受容体アンタゴニスト存在下の mEPSCs



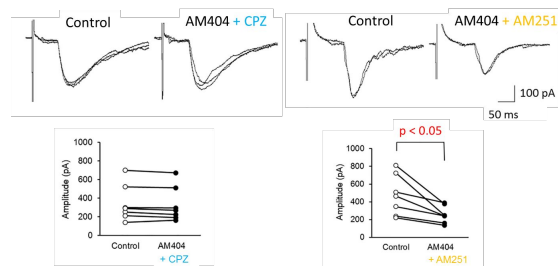
(4) 一次求心性線維に対する反応として、A $\delta$ , C 線維の後根刺激による単シナプス性 EPSC を記録したところ、AM404 の投与により、A $\delta$  線維では振幅に変化はみられなかったが、C 線維では振幅が有意に抑制された。この結果から AM404 は C 線維終末に作用し、末梢からの痛み刺激の伝導を抑制することが明らかになった (図 6)。

図 6: A $\delta$ , C 線維の後根刺激による単シナプス性 EPSC



これらの反応をカプサゼピンおよび AM251 存在下で記録したところ、AM404 による振幅の抑制作用はカプサゼピンでは拮抗されたが、AM251 では拮抗されなかった。この結果から、AM404 の作用は C 線維終末の TRPV1 受容体が関与することが明らかになった (図 7)。

図 7: TRPV1 および CB1 受容体アンタゴニスト存在下の単シナプス性 EPSC

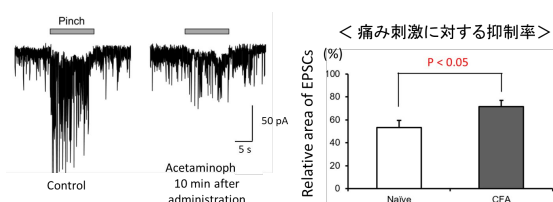


(5) 炎症性疼痛モデルラットを用いて脊髄後角にける鎮痛効果を検討した。

*In vivo* パッチクランプ記録では naïve ラッ

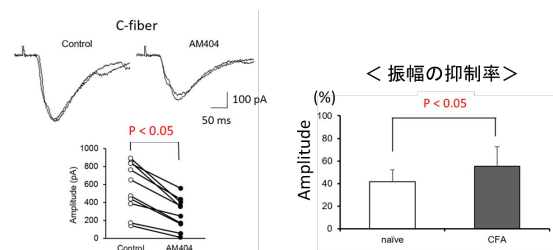
トと同様に、アセトアミノフェンの投与から 10 分後では痛み刺激に対する反応が减弱していた。また、アセトアミノフェンによる痛み刺激に対する反応の抑制率を naïve ラットと炎症モデルラットで比較したところ、炎症性疼痛モデルラットで有意により痛みを抑制していた (図 8)。

図 8 : 炎症性疼痛に対する *in vivo* パッチクランプ記録



*In vitro* パッチクランプでは、一次求心性線維に対する反応として、C 線維の後根刺激による単シナプス性 EPSC を記録したところ、naïve と同様に、A 線維では AM404 の投与を行っても振幅に変化はみられなかったが、C 線維では振幅を有意に抑制した。また、AM404 による C 線維の単シナプス性 EPSC の振幅抑制率を naïve ラットと炎症性疼痛モデルラットで比較したところ、炎症性疼痛モデルラットで有意により痛みを抑制していた (図 9)。

図 9 : 炎症性疼痛に対する *in vitro* パッチクランプ記録



これらの結果から、アセトアミノフェンは AM404 へ代謝され、脊髄後角ニューロンの C 線維終末の TRPV1 受容体に作用し鎮痛効果を示すことが明らかになった。また、炎症性疼痛に対し、アセトアミノフェンは末梢からの痛み刺激に対しより大きな鎮痛作用を発揮することが明らかになった。

## 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Nobuko Ohashi, Daisuke Uta, Mika Sasaki, Masayuki Ohashi, Yoshinori Kamiya, Tatsuro Kohno. Acetaminophen Metabolite N-Acylphenolamine Induces Analgesia via Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Receptors Expressed on the Primary Afferent

Terminals of C-fibers in the Spinal Dorsal Horn. *Anesthesiology* 2017; 127: 355-371.  
査読有  
doi: 10.1097/ALN.0000000000001700

[学会発表](計 4 件)

大橋宣子, 歌大介, 佐々木美佳, 大橋正幸, 紙谷義孝, 河野達郎 : アセトアミノフェンは炎症性疼痛に対しても脊髄レベルでより強い鎮痛効果を発揮する。脊髄後角ニューロンにおける *in vivo* および *in vitro* パッチクランプ記録を用いた検討 : 日本麻酔科学会 第 64 回学術集会, 2017 年 6 月

大橋宣子 : アセトアミノフェンの鎮痛機序 : 日本臨床麻酔学会 第 36 回大会 シンポジウム 神経炎症と組織炎症の観点から考える痛みのメカニズム, 2016 年 11 月

大橋宣子, 歌大介, 佐々木美佳, 大橋正幸, 紙谷義孝, 河野達郎 : アセトアミノフェンの脊髄後角ニューロンにおける鎮痛機序 : 日本麻酔科学会 第 63 回学術集会, 2016 年 5 月

Nobuko Ohashi, Daisuke Uta, Mika Sasaki, Masayuki Ohashi, Yoshinori Kamiya, Tatsuro Kohno : Underlying mechanisms of acetaminophen in the spinal dorsal horn neurons : Society for Neuroscience 46th Annual Meeting, November 2016, (San Diego, USA)

## 6 . 研究組織

(1) 研究代表者

大橋 宣子 (Nobuko, Ohashi)  
新潟大学・医歯学系・助教  
研究者番号 : 70706712