

令和 2 年 4 月 26 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09036

研究課題名(和文) アセトアミノフェンの鎮痛機序の検討

研究課題名(英文) Mechanism of acetaminophen to produce an analgesic effect

研究代表者

山本 達郎 (YAMAMOTO, TATSUO)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授

研究者番号：20200818

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：アセトアミノフェンの鎮痛効果の発現メカニズムとして最も有望と考えられているのが、AM404を介した効果である。アセトアミノフェンは肝臓にて脱アセチル化され、さらにFAAHを介して中枢神経にてアラキドン酸と結合しAM404となる。AM404はTRPV1の強力な活性物質であるとともに、CB1受容体作動作用もある。AM404を、脳室内投与にて300～3000µg;で投与量依存性の鎮痛効果を示した。AM404 500µg;を中脳水道周辺灰白質・吻側延髄腹内側部へ局所投与することにより、鎮痛効果を示した。アセトアミノフェンの鎮痛効果は、下行性疼痛抑制系を介する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究にて、アセトアミノフェンの鎮痛メカニズムの一つに下行性疼痛抑制系の活性化が関与していることが示された。今後の鎮痛薬開発に当たり、CB1受容体・TRPV1と下行性疼痛抑制系との関連に注目する必要があると考えられた。

研究成果の概要(英文)： The mechanism of acetaminophen to produce an analgesic effect is still unclear. AM404, a metabolite of acetaminophen, is a promising candidate to produce an analgesic effect. Acetaminophen was deacetylated at a liver to p-aminophenol. P-aminophenol is conjugated with arachidonic acid by FAAH in the CNS. AM404 act as an CB1 receptor and TRPV1 agonist. In the present study, we injected AM404 intracerebroventricularly (ICV) and examined the analgesic effect using rat formalin test model. We also microinjected into periaqueductal gray (PAG), rostral ventromedial medulla (RVM) and locus coeruleus (LC).

ICV injected AM404 produced an analgesic effect dose-dependently at a dose between 300 and 3000 µg; 500 µg; of AM404 microinjected into PAG, RVM and LC also produced an analgesic effect. These data suggested that an analgesic effect of acetaminophen was, at least partly, mediated by the action of AM404 at PAG, RVM and LC.

研究分野：麻酔科学

キーワード：AM404 CB-1受容体 FAAH TRPV1

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

アセトアミノフェンは、1877年に発見され米国・欧州で頻用されている解熱鎮痛薬である。非ステロイド系消炎鎮痛薬を比べ副作用が少なく、使いやすい。そのため特に、小児・高齢者に対しては好んで使用されることが多い薬物である。

このように長い歴史があるにも関わらず、アセトアミノフェンの鎮痛機序は十分には理解されていないのが現状である。最近では、アセトアミノフェンが肝臓にて代謝され *p*-Aminophenol となり中枢神経系に運ばれ、Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH) を介してアラキドン酸抱合されて出来る *N*-Acylphenolamine (AM404) が鎮痛効果を発揮する本体であることが示唆されてきているが、その作用部位などは未だわかっていない。AM404 は、カンナビノイドの受容体である CB-1 受容体の作動作用があり、さらには TRPV1 の強力な活性化を引き起こすことが知られている。さらに CB-1 受容体と TRPV1 は、同一細胞に発現している場合はクロストークを起こすことが知られており、中脳水道周辺灰白質 (periaqueductal gray; PAG) にも多く発現していることが報告されている (Cristino et al, Neuroscience 2006;139:145-15)。PAG は下行性疼痛抑制系の中心的な核である。従ってアセトアミノフェンの鎮痛効果は、AM404 が下行性疼痛抑制系を活性化させることによる可能性が示唆される。

さらに、アセトアミノフェンの鎮痛効果は脊髄でのセロトニン放出が関係しており、5-HT<sub>3</sub> 受容体拮抗薬の髄腔内投与により鎮痛効果が拮抗されることが報告されている。脊髄におけるセロトニンによる鎮痛効果もまた、下行性疼痛抑制系を介するものと考えられている。このこともまた、アセトアミノフェンの鎮痛効果が下行性疼痛抑制系を介する可能性があることを示唆している。

### 2. 研究の目的

今回の研究では、AM404 による鎮痛効果発現が特に下行性疼痛抑制系を介するものである可能性を確認することを目的としている。下行性疼痛抑制系には、セロトニンを介するシステムとノルアドレナリンを介するシステムが存在することが知られている。セロトニンを介するシステムに関しては、すでに報告があるが、ノルアドレナリンを介するシステムに関しては報告がない。従って、今回の研究の目的は、セロトニンを介するシステムはもちろん、ノルアドレナリンを介するシステムと AM404 の関係を明らかにすることにある。この目的を達成するために、痛みモデルとしてホルマリンモデルを用い、鎮痛効果を検討するとともに、マイクロダイアリシス法を用いて脊髄におけるセロトニンとノルアドレナリンの放出を検討する。

### 3. 研究の方法

熊本大学の倫理委員会の承認のもとに実験を行った。

今回の研究は、すべて 250 ~ 300g の雄性 SD ラットを用いて行っている。痛みのモデルとしては、すべてホルマリンモデルを用いている。

#### ホルマリンテスト

ホルマリンモデルは、ラット後肢に 5%ホルマリンを 50  $\mu$ l 皮下注することにより作成する。ホルマリンにより後肢を振り回すような行動 (flinching behavior) を惹起することができる。この行動の回数を数えることにより痛みの程度を評価した。この痛み行動は 2 相性を示し、第 1 相はホルマリン皮下注後 10 分、第 2 相は皮下注後 10 ~ 60 分に起こることが知られている。第 1 相はホルマリンによる直接的な神経刺激作用、第 2 相はホルマリンにより惹起される炎症反応による痛みであると考えられている。従って薬物の効果は、第 1 相と第 2 相を分けて解析することとした。

#### マイクロダイアリシス法

脊髄でのノルアドレナリン・ドーパミン・セロトニンの放出は、マイクロダイアリシス法を用いて、自由行動が可能なラットで検討した。イソフルラン麻酔下に、環椎後頭膜から腰膨大部へマイクロダイアリシス用のプローブ (exposed tip, 10 mm, Cut-off of 50 kDa; EICOM, Japan) を挿入した。一晩、人口脳脊髄液にて透析プローブを 1  $\mu$ l/min 灌流した後に、実験を行った。

実験中は、2  $\mu$ l/min にて透析プローブを灌流した。灌流液は、15 分ごとに回収した。薬物投与の 45 分前から 3 回分を回収し、その平均値をコントロールとした。

透析液内のノルアドレナリン・ドーパミン・セロトニンは高速液体クロマトグラフィー法用い、電気化学検出 (ECD-300, EICOM, Japan) を用いて測定した。逆相カラム (EICOMPAK CAX, 2.0 x 200 mm, EICOM) を用い、移動相として 0.1M 酢酸アンモニウム緩衝液と 50 mg/mL EDTA-2Na, 0.05 mol/L 硫酸ナトリウムとメタノール(7:3, v/v) で pH を 6.0 に調整した。

#### 研究プロトコル

アセトアミノフェンの全身投与による鎮痛効果とノルアドレナリンとの関連

アセトアミノフェンの経口投与では、T-max は 30 分程度であり、血中半減期が 2 時間 45 分程度であることが示されている。また予備実験により、最大効果が得られるのが経口投与後 45 分

であった。これらのことから、今回の研究ではアセトアミノフェンをホルマリン皮下注の45分前に経口投与した。アセトアミノフェンの経口投与は、ゾンデを用いて300 mgを2mlの0.5%カルボキシメチルセルロース(0.5% CMC)溶液に浮遊させて投与した。

アセトアミノフェンの鎮痛効果が脊髄におけるノルアドレナリン放出が関与している可能性を検証するために、アセトアミノフェン経口投与の35分後(ホルマリン皮下注10分前)に2受容体拮抗薬であるイダゾキサンを髄腔内投与した。

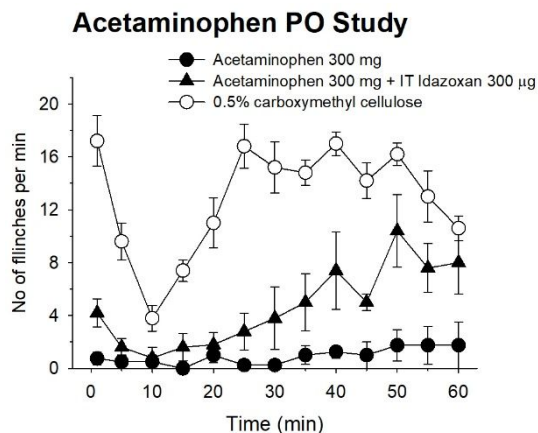
またアセトアミノフェン経口投与により脊髄でのノルアドレナリン・ドーパミン・セロトニンの放出を確認するために、マイクロダイアリシス法を用いてホルマリン皮下注後75分まで検診を行った。

PAG・RVM・LCを介するAM404の鎮痛効果の検証と、脊髄でのノルアドレナリン・ドーパミン・セロトニンの放出

AM404を脳室内・PAG・RVM・LCに投与するために、投与用のカニュラをそれぞれの部位に、ステレオ手術の技術を用いて挿入した。AM404は0.5  $\mu$ lのDMSOに溶解し、マイクロシリンジポンプ(EP-60, EICOM, Japan)を用いて60秒かけて投与した。コントロールとして、DMSOを同様に投与した。

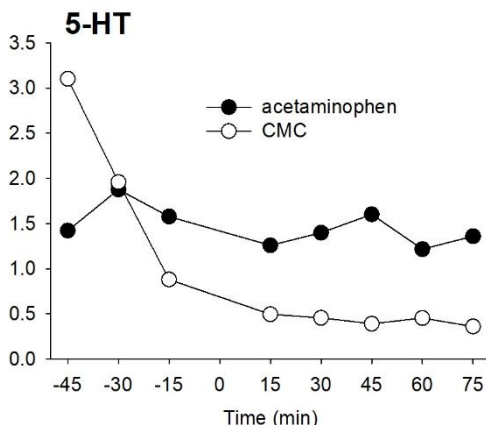
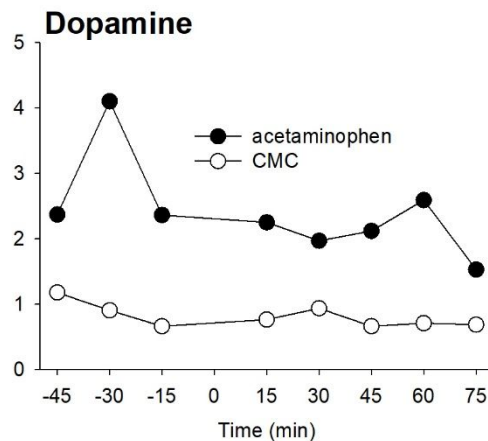
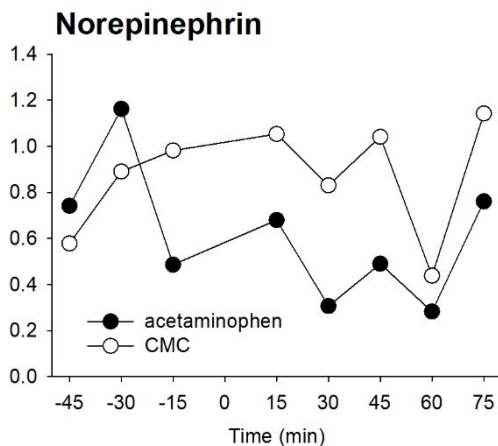
#### 4. 研究成果

アセトアミノフェンの全身投与による鎮痛効果とノルアドレナリンとの関連



アセトアミノフェン300 mg(1000mg/kg)経口投与により第1相・第2相ともに痛みの程度は抑制され、良好な鎮痛効果が確認できた。この鎮痛効果はイダゾキサンの300  $\mu$ gの髄腔内投与により拮抗できた。通常ノルアドレナリンの効果を拮抗するには、この投与量の1/10(30  $\mu$ g)で十分である。このことから、ノルアドレナリンではなくドーパミンなどの他の神経伝達物質の影響が考えられた。

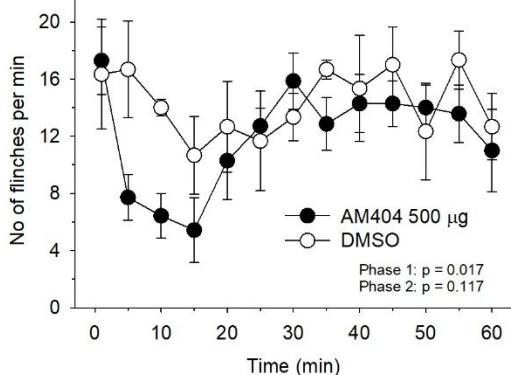
下の図には、アセトアミノフェン経口投与時のマイクロダイアリシスのデータを示すが、ノルエピネフリンはアセトアミノフェンにより減少しているが、ドーパミンは増加していた。



以前からの報告にあるように、アセトアミノフェンの全身投与によりセロトニンの増加は確認できた。

PAG・RVM・LC を介する AM404 の鎮痛効果の検証と、脊髄でのノルアドレナリン・ドーパミン・セロトニンの放出

**Contralateral PAG study**



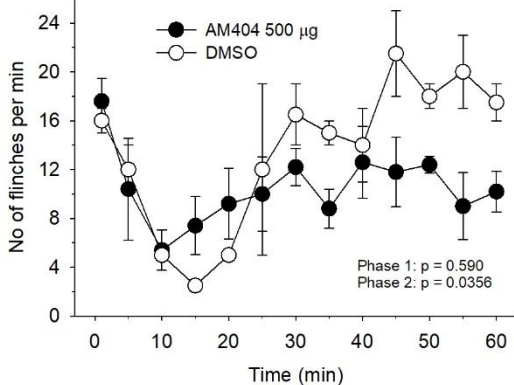
AM404 は、ホルマリン皮下注側と非皮下注側に分けて投与した。

ホルマリン皮下注と対側の PAG に投与すると第 1 相で有意な鎮痛効果が見られたが、同側の PAG 投与では鎮痛効果は見られなかった。

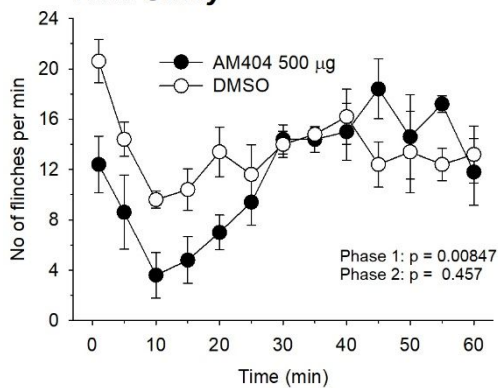
LC 投与では、同側への投与で第 2 相で鎮痛効果が見られたが、対側投与では鎮痛効果は見られなかった。

RVM では第 1 相で鎮痛効果が見られた。

**LC Ipsilateral Study**



**RVM Study**



**結論**

これらのことから、アセトアミノフェン全身投与では、AM404 が PAG・RVM・LC に作用して鎮痛効果がみられる可能性が示された。またドーパミンが鎮痛効果発現に関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshida K, Nonaka T, Nakamura S, Araki M, Yamamoto T	4. 巻 115
2. 論文標題 Microinjection of 26RFa, an endogenous ligand for the glutamate RF-amide peptide receptor (QRFP receptor), into the rostral ventromedial medulla (RVM), locus coeruleus (LC), and periaqueductal grey (PAG) produces an analgesic effect in rats.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PEPTIDES	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.peptides.2019.02.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nonaka T, Yamada T, Ishimura T, Zuo D, Moffett JR, Neale JH, Yamamoto T	4. 巻 13
2. 論文標題 A role for the locus coeruleus in the analgesic efficacy of N-acetylaspartylglutamate peptidase (GCP11) inhibitors ZJ43 and 2-PMPA.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecular Pain	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1744806917697008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yoshida K, Nakamura S, Araki M, Nonaka T, Yamamoto T
2. 発表標題 Microinjection of 26RFa, an endogenous ligand for GPR103, into RVM and LC is analgesic in rat.
3. 学会等名 American Society of Anesthesiology (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

## 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	生田 義浩  (IKUTA YOSHIHIRO)  (90264308)	熊本大学・病院・准教授     (17401)	