

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K18478

研究課題名（和文）新生児ラット脳幹脊髄標本を用いたマルチモーダル鎮痛の神経機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the neural mechanism of multimodal analgesia in brainstem spinal cord preparations isolated from neonatal rats

研究代表者

津澤 佳代（Tsuzawa, Kayo）

昭和大学・医学部・兼任講師

研究者番号：70796367

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,500,000円

研究成果の概要（和文）：アセトアミノフェンの鎮痛効果について、ラット脊髄の摘出標本を用いて、脊髄背側神経根を刺激した際に得られる腹側神経根の反射電位の大きさを侵害受容反応として評価した。カンナビノイド受容体アンタゴニストAM251は、反射電位の増強を引き起こした。アナンドアミドトランスポーター阻害剤AM404単独投与では、反射電位の顕著な変化は認められなかった。カンナビノイド受容体アゴニストであるノラジンエーテル、あるいはWIN55,212-2の投与でも有意な変化は認められなかった。内因性カンナビノイド受容体が脊髄背側神経根を刺激した際に引き起こされる侵害受容反応の減弱に関与してい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

本研究では、ラットの（脳幹-）脊髄標本というin vitro実験系を用いて、下行性疼痛抑制系を含めたアセトアミノフェンの作用機構における、特にカンナビノイド受容体の役割に注目してその役割を明らかにする。この実験系は主に延髄呼吸中枢の研究に使用されてきたが、複雑な機能的神経回路の神経生理学的・神経薬理的な研究に極めて有用であり、これまで多くの重要な知見が得られている。鎮痛制御の神経機構の解明においても優れた実験モデルとして考えられており、本研究の成果は新しい鎮痛制御系の開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：We investigated about the analgesic effect of acetaminophen by evaluating the ventral root reflex response induced by stimulation of the dorsal root in in vitro preparations of rat spinal cord. We analyzed the effects of AM404 and cannabinoid receptor antagonist AM251 on reflex responses in lumbar spinal cord preparations from newborn rats and found that the amplitude of the slow ventral root potential after administration of AM404 was not significantly changed, whereas AM251 significantly increased the amplitude. Administration of the cannabinoid receptor 1 agonist WIN55,212-2 did not significantly affect the reflex response. We suggest that endogenous cannabinoids in the spinal cord are involved in the antinociceptive mechanism through suppressive effects.

研究分野：神経生理学

キーワード：アセトアミノフェン カンナビノイド受容体 新生児ラット

1. 研究開始当初の背景

整形外科周術期の疼痛コントロールに関しては、非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs) や局所麻酔薬の使用が主流であったが、2011年にアセトアミノフェンの成人容量の拡大や変形性関節症に対する効能・効果が追加されてから、アセトアミノフェンの定時投与を用いたマルチモーダル鎮痛が注目されている(Chidambaran et al., 2018; Fukumori et al., 2019; Liang et al., 2017; Naito et al., 2017; Yin et al., 2022)。

アセトアミノフェンは肝臓で p-アミノフェノールとなり、脳脊髄で脂肪酸アミドヒドロラーゼ (fatty acid amide hydrolase : FAAH) 依存性にアラキドン酸と結合することで、AM404 (アナンダミドトランスポーター阻害剤) へと代謝されて鎮痛効果を示す(Mallet et al., 2023)。AM404 に関してはシクロオキシゲナーゼ (COX) の阻害やカンナビノイド (CB) 受容体、トランジェントレセプターポテンシャルチャネル (TRPV1) の活性化を行う他、セロトニン神経系を含む下降性疼痛抑制系を賦活する可能性が示唆されている (Anderson, 2008; Barriere et al., 2020; Ohashi et al., 2017; Pickering et al., 2006; Sharma et al., 2017; Zygmunt et al., 2000)。臨床的には、アセトアミノフェンの定時点滴投与を行うことにより、併用する薬剤の投与量や入院コスト・期間の削減が得られる可能性が示唆されている(Chidambaran et al., 2018; Yin et al., 2022)が、その作用機序に関しては、明らかになっていない点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、痛み研究の実験モデルとして確立されている新生児ラットの摘出脊髄標本を用いて、マルチモーダル鎮痛における CB 受容体の役割を明らかにし、さらにアセトアミノフェンの作用機構の解明を目指すことを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、新生児ラット摘出脊髄標本を用いて(Otsuguro et al., 2005; Tsuzawa et al., 2015) 解析を行った。

新生児ラット (0-3 日齢) から脊髄を摘出し実験槽に置き、95% O₂、5% CO₂ で飽和した人工脳脊髄液 (ACSF) (25-27°C) で灌流した(Suzue, 1984)。侵害受容反応はガラス吸引電極を用いて、第4または第5腰髄神経根背側神経根を60秒毎に刺激 (200μs square pulse) した際に得られる腹側神経根の反射電位 (sVRP) を侵害受容反応として記録した。ACSF の灌流を継続し、反射電位が安定した後に、AM404、AM251 (CB1 受容体アンタゴニスト)、WIN55,212-2 (CB1 受容体アゴニスト) を各々15分間灌流し、その反射電位も記録した。ACSF 灌流中のコントロール、薬剤投与終了時、再度 ACSF を灌流して washout した際の平均の peak amplitude を計測し、比較することによりその効果を判定した。

4. 研究成果と考察

【AM404 の投与】

10μM の AM404 を 15 分間投与した際に得られる反射電位に有意な差は認められなかった(n=10)。一部の標本では、AM404 投与直後に一時的な反射電位の減衰を認め、washout 後に増加するという現象が認められた。(図 1)

【AM251 の投与】

10μM の AM251 を 15 分間投与した際の反射電位は、徐々に増強を認めた(n=7)。その効果は AM251 を washout した後も 30 分以上にわたって継続した。(図 2)

【WIN55,212-2 の投与】

10μM の WIN55,212-2 を 15 分間投与した際に得られる反射電位に有意な差は認められなかった(n=5)。

また、コントロールとして、ACSF の灌流を 45 分以上継続した際の反射電位も記録したが、有意な差は認められなかった(n=5)。

【考察】

カンナビノイド受容体アンタゴニストである AM251 が脊髄反射電位の増強を引き起こしたことから、脊髄においては内因性カンナビノイドが抑制的に働いており、AM251 はその抑制効果を減弱させたと説明される(Jennings et al., 2003)。アナンダミドトランス

ポーター阻害剤である AM404 の投与効果が明確には引き起こされなかった点は、内因性カンナビノイドがすでに抑制的に働いている状況下では、AM404 による内因性カンナビノイドのさらなる増加が起こっても、反射電位の抑制には結びつかなかったと考えられる。また、カンナビノイド受容体アゴニストである WIN55,212-2 についても同様のメカニズムにより、反射電位の抑制が起こらなかったと推察される。この結果より、AM404 による鎮痛効果にはバニロイド (TRPV1) 受容体だけでなく、カンナビノイド受容体活性化も関与している可能性が示唆された (Morisset et al., 2001; Morisset and Urban, 2001)。これらの結果を論文として発表した (Tsuzawa et al., 2023)。

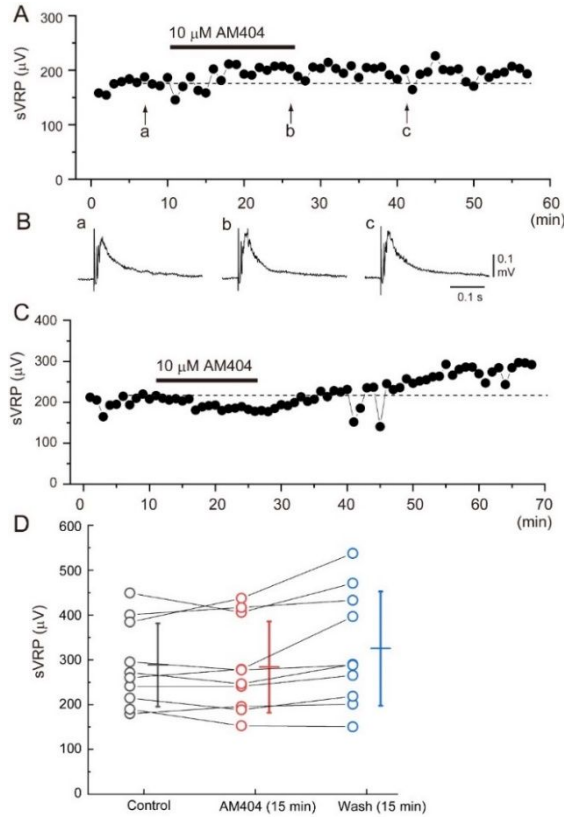


図 1

A、B:AM404 を投与した際の反射電位の推移

C:AM404 投与直後に一時的な減衰と投与終了後の反射電位の増強を認めた例

D:各標本の反射電位の推移

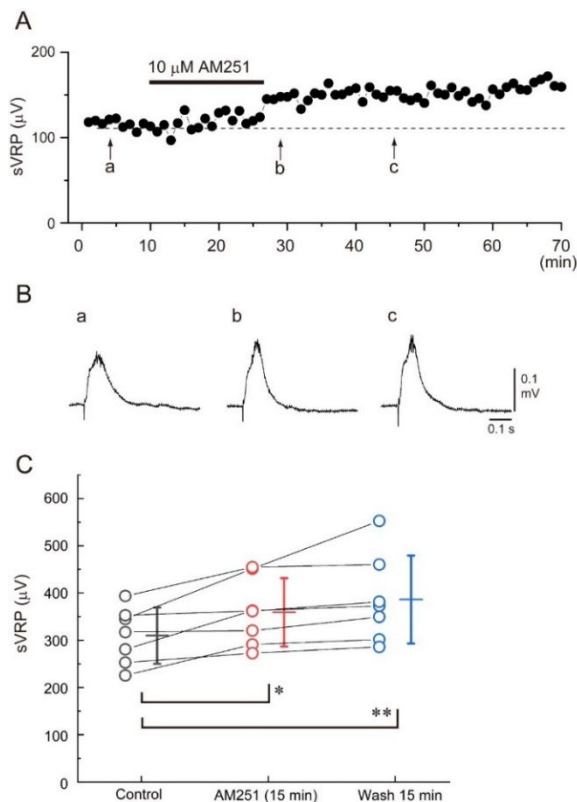


図 2

A、B:AM251 を投与した際の反射電位の推移

C:各標本の反射電位の推移

References

- Anderson BJ (2008) Paracetamol (Acetaminophen): mechanisms of action. *Paediatr Anaesth* 18:915-921.
- Barriere DA, Boumezbeur F, Dalmann R, Cadeddu R, Richard D, Pinguet J, Daulhac L, Sarret P, et al. (2020) Paracetamol is a centrally acting analgesic using mechanisms located in the periaqueductal grey. *Br J Pharmacol* 177:1773-1792.
- Chidambaran V, Subramanyam R, Ding L, Sadhasivam S, Geisler K, Stubbeman B, Sturm P, Jain V, et al. (2018) Cost-effectiveness of intravenous acetaminophen and ketorolac in adolescents undergoing idiopathic scoliosis surgery. *Paediatr Anaesth* 28:237-248.
- Fukumori N, Sonohata M, Kitajima M, Kawano S, Kurata T, Sakanishi Y, Sugioka T, Mawatari M (2019) Reduction of Postoperative Pain by Addition of Intravenous Acetaminophen after Total Hip Arthroplasty: A Retrospective Cohort Study. *Acta Med Okayama* 73:7-14.
- Jennings EA, Vaughan CW, Roberts LA, Christie MJ (2003) The actions of anandamide on rat superficial medullary dorsal horn neurons in vitro. *J Physiol* 548:121-129.
- Liang L, Cai Y, Li A, Ma C (2017) The efficiency of intravenous acetaminophen for pain control following total knee and hip arthroplasty: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 96:e8586.
- Mallet C, Desmeules J, Pegahi R, Eschalier A (2023) An Updated Review on the Metabolite (AM404)-Mediated Central Mechanism of Action of Paracetamol (Acetaminophen): Experimental Evidence and Potential Clinical Impact. *J Pain Res* 16:1081-1094.
- Morisset V, Ahluwalia J, Nagy I, Urban L (2001) Possible mechanisms of cannabinoid-induced antinociception in the spinal cord. *Eur J Pharmacol* 429:93-100.
- Morisset V, Urban L (2001) Cannabinoid-induced presynaptic inhibition of glutamatergic EPSCs in substantia gelatinosa neurons of the rat spinal cord. *J Neurophysiol* 86:40-48.
- Naito M, Sato T, Nakamura T, Yamanashi T, Miura H, Tsutsui A, Watanabe M (2017) Pain management using acetaminophen throughout postoperative course of laparoscopic colorectal surgery: A case-matched control study. *Ann Med Surg (Lond)* 17:38-42.
- Ohashi N, Uta D, Sasaki M, Ohashi M, Kamiya Y, Kohno T (2017) 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* 127:355-371.
- Otsuguro K, Yasutake S, Ohta T, Ito S (2005) Effects of opioid receptor and alpha2-adrenoceptor agonists on slow ventral root potentials and on capsaicin and formalin tests in neonatal rats. *Brain Res Dev Brain Res* 158:50-58.
- Pickering G, Loriot MA, Libert F, Eschalier A, Beaune P, Dubray C (2006) Analgesic effect of acetaminophen in humans: first evidence of a central serotonergic mechanism. *Clin Pharmacol Ther* 79:371-378.
- Sharma CV, Long JH, Shah S, Rahman J, Perrett D, Ayoub SS, Mehta V (2017) First evidence of the conversion of paracetamol to AM404 in human cerebrospinal fluid. *J Pain Res* 10:2703-2709.
- Suzue T (1984) Respiratory rhythm generation in the in vitro brain stem-spinal cord preparation

- of the neonatal rat. *J Physiol* 354:173-183.
- Tsuzawa K, Minoura Y, Takeda S, Inagaki K, Onimaru H (2015) Effects of alpha2-adrenoceptor agonist dexmedetomidine on respiratory rhythm generation of newborn rats. *Neurosci Lett* 597:117-120.
- Tsuzawa K, Onimaru H, Inagaki K, Izumizaki M (2023) Involvement of cannabinoid receptors in depression of the putative nociceptive response in spinal cord preparations isolated from neonatal rats. *J Physiol Sci* 73:23.
- Yin F, Ma W, Liu Q, Xiong LL, Wang TH, Li Q, Liu F (2022) Efficacy and safety of intravenous acetaminophen (2 g/day) for reducing opioid consumption in Chinese adults after elective orthopedic surgery: A multicenter randomized controlled trial. *Front Pharmacol* 13:909572.
- Zygmunt PM, Chuang H, Movahed P, Julius D, Hogestatt ED (2000) The anandamide transport inhibitor AM404 activates vanilloid receptors. *Eur J Pharmacol* 396:39-42.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tsuzawa Kayo, Onimaru Hiroshi, Inagaki Katsunori, Izumizaki Masahiko	4. 巻 73
2. 論文標題 Involvement of cannabinoid receptors in depression of the putative nociceptive response in spinal cord preparations isolated from neonatal rats	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12576-023-00881-5	査読の有無 無
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 -

〔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 Kayo Tsuzawa
2. 発表標題 Posteromedial dislocation of the elbow with lateral humeral condyle fracture in children; Arthrography is useful for distinguishing between dislocation or epiphyseal separation
3. 学会等名 14th FESSH 11th IFSHT TRIENNIAL CONGRESS（国際学会）
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------