

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15566

研究課題名(和文) 脳、脊髄でのアセトアミノフェンの機序解明と最適な使用法の検討

研究課題名(英文) Elucidation of the underlying mechanism of acetaminophen in the brain and spinal cord

研究代表者

河野 達郎 (Tatsuro, Kohno)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：00313536

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：アセトアミノフェンは解熱鎮痛薬として臨床で使用されている薬物でありながら、作用機序は明らかでない。近年、代謝物のAM404が脳のTRPV1受容体やCB1受容体に作用することで鎮痛作用を発揮していることが報告された。しかし、脊髄後角での作用は明らかではない。アセトアミノフェンの全身投与はin vivo脊髄標本での末梢からの痛み刺激に対する反応を抑制した。さらに、in vitro脊髄標本でのAM404はC線維終末のTRPV1受容体に作用し、興奮性伝達を抑制した。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。

研究成果の概要(英文)：The widely used analgesic acetaminophen is metabolized to N-acylphenolamine (AM404), which induces analgesia by acting directly on TRPV1 or CB1 receptors in the brain. Although these receptors are also abundant in the spinal cord, no previous studies have reported analgesic effects of acetaminophen or AM404 mediated by the spinal cord dorsal horn. We used in vivo and in vitro whole-cell patch-clamp recordings of dorsal horn neurons to assess excitatory synaptic transmission. Intravenous acetaminophen decreased peripheral pinch-induced excitatory responses in the dorsal horn. Direct application of AM404 decreased glutamate release from C primary afferent terminals. We determined that these phenomena were mediated by TRPV1, but not CB1 receptors. Our results suggest that the acetaminophen metabolite AM404 induces analgesia directly via TRPV1 receptors expressed on C-fibers in the spinal dorsal horn and suggest a mechanism by which acetaminophen induces analgesia.

研究分野：麻酔科学

キーワード：アセトアミノフェン 脊髄後角

1. 研究開始当初の背景

アセトアミノフェンはすでに 100 年以上にもわたって臨床で使われてきている薬剤にも関わらず、作用機序は未だ解明されておらず、多くの機序が議論されている。アセトアミノフェンは代謝物である p-aminophenol が肝臓で産生された後、脳や脊髄に移行し、fatty acid amide hydrolase 依存的に N-acylphenolamine (AM404) が誘導される。AM404 はカプサイシン TRPV1 受容体の活性化や、カンナビノイド CB1 受容体のアゴニストとして間接的に CB1 受容体を活性化することにより、セロトニン下行性抑制系を賦活化するという報告がある。しかし、これらの AM404 による作用はほとんど中脳における *in vitro* での結果である。一方、痛みの伝導路として知られている脊髄後角でのアセトアミノフェンまたは AM404 が同様の作用機序によって鎮痛作用を有しているのか、また生体動物の *in vivo* 状態ではどうであるのかは明らかではない。

2. 研究の目的

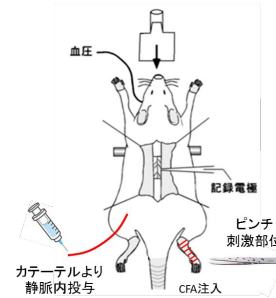
本研究では、生体動物の脊髄でのアセトアミノフェンの作用機序を *in vitro* 脊髄スライス標本および *in vivo* 状態での脊髄後角からパッチクランプ記録を行い、電気生理学的実験系を用いて明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 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 (EPSC) の記録を行う。

痛み刺激として受容野にピンチ刺激を与える。アセトアミノフェンの静脈投与を行い、侵害刺激に対する EPSC の変化を記録する (図 1)。得られた結果はパッチクランプ用増幅器により増幅し、データ解析用ソフトを用いて解析する。

図 1: *in vivo* 脊髄からのパッチクランプ記録



(2) 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、氷冷クレブス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 μm の脊髄横断スライスを作成する。スライス記録用チャ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クレブス液を 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 1 層 (膠様質) ニューロンより、先端抵抗が約 10 M Ω 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、EPSC を記録し、アセトアミノフェンおよびアセトアミノフェンの代謝物 AM404 の灌流投与に対する反応を検討する。

脊髄後根刺激

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 (A 線維; 100 μA , 0.05 ms, C 線維; 1000 μA , 0.5 ms) を行い、A 線維および C 線維によって誘起され

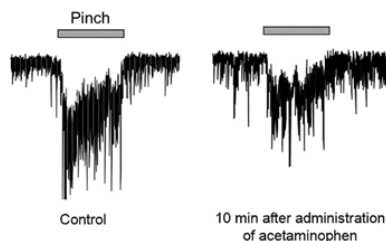
る EPSC を記録する。

または で観察された EPSC に対する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) で変化するかどうかを観察する。

4. 研究成果

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 2)。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。

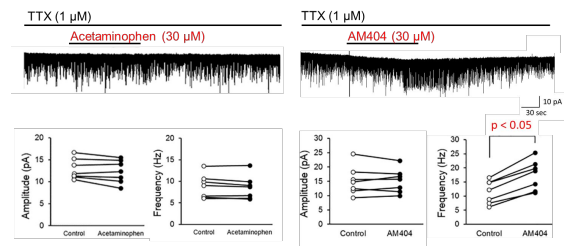
図 2: 痛み刺激に対するアセトアミノフェンの効果 (*in vivo* パッチクランプ記録)



次に、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* 脊髄スライス標本からの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 μ M) 存在下の miniature EPSC (mEPSC) 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

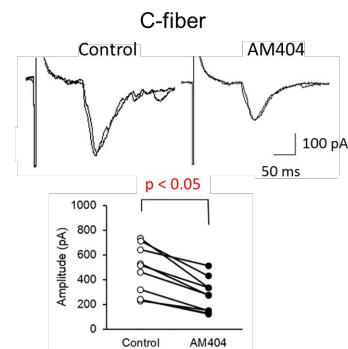
の放出を増強させることが明らかになった (図 3)。

図 3: mEPSC に対する作用



一次求心性線維の A , C 線維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 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 4)。

図 4: A , C 線維刺激による単シナプス性 EPSC



mEPSC の AM404 投与による頻度の増加および C 線維刺激による単シナプス性 EPSC の AM404 投与による振幅の抑制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。

5 . 主な発表論文等

〔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*. 査読有, in-press, 2017.

〔学会発表〕(計2件)

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 12-16, 2016 (San Diego, USA)

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26日～28日、福岡国際会議場（福岡県、福岡市）

6 . 研究組織

(1)研究代表者

河野 達郎 (KOHNO, Tatsuro)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号：00313536