



Title	アドレナリン 2A受容体サブタイプに対する 2作動薬の作用に関する研究 [全文の要約]
Author(s)	小林, 武志
Citation	北海道大学. 博士(獣医学) 甲第12616号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/68633
Type	theses (doctoral - abstract of entire text)
Note	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。
Note(URL)	https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
File Information	Takeshi_Kobayashi_summary.pdf



[Instructions for use](#)

アドレナリン α_{2A} 受容体サブタイプに
対する α_2 作動薬の作用に関する研究
(要約)

小林 武志

Takeshi KOBAYASHI

目次

I 緒論	1
II 実験方法	4
A. 実験動物	4
B. ジェノタイピング	4
C. 脊髄反射電位測定法	6
1. 摘出脊髄標本作製法	6
2. 電位変化の記録方法および刺激法	7
D. 複合活動電位測定法	10
F. 試薬	12
G. 統計処理	12
III 実験成績	13
A. WT マウス脊髄反射電位に対する α_2 受容体作動薬の効果	13
1. キシラジン	13
2. デクスメデトミジン	13
B. α_{2A} 受容体変異マウス (B6.129S2- <i>Adra2a</i> ^{tm1Lel/J}) における α_2 受容体作動薬の効果	16
1. α_2 受容体作動薬の効果	16
a) キシラジン	16
b) デクスメデトミジン	19
2. α_2 受容体およびイミダゾリン受容体拮抗薬の効果	21
a) デクスメデトミジンの反射電位抑制に対する効果	21
b) キシラジンの反射電位抑制に対する効果	22
C. マウス脊髄神経の複合活動電位に対する α_2 受容体作動薬の効果	26
IV 考察	29
総括および結論	34
謝辞	36
参考文献	37
英文抄録	42

略語表

ACSF : artificial cerebrospinal fluid (人工脳脊髄液)

AR : adrenaline receptor (アドレナリン受容体)

ATI : atipamezole (アチパメゾール)

CAP : compound action potential (複合活動電位)

DEX : dexmedetomidine (デクスメデトミジン)

EFA : efaroxan (エファロキサン)

GPCR : G protein-coupled receptor (G タンパク質共役型受容体)

IDA : idazoxan (イダゾキサン)

MSR : monosynaptic reflex potential (単シナプス反射電位)

NA : noradrenaline (ノルアドレナリン)

sVRP : slow ventral root potential (遅発性前根電位)

WT : wild type (野生型)

XYL : xylazine (キシラジン)

I 緒論

α_2 -AR 作動薬の鎮痛効果には、脊髄の侵害受容経路に発現する α_2 -AR の活性化が重要な役割を果たしていると考えられている (Pertovaara, 2006; 2013)。脊髄の α_2 -AR は、脳幹の A5、A6、A7 神経核より伸びた下行性神経の終末から放出されるノルアドレナリンの作用点であり、脊髄で痛覚伝達の調整を行っている (Millan, 2002)。脊髄侵害受容経路において、 α_2 -AR の活性化により Gi/o タンパク質が活性化され、cAMP 減少や K^+ チャネル活性化、 Ca^{2+} チャネル抑制などを介して主にシナプス前膜からの神経伝達物質の放出が減少することによって痛覚シグナルの伝達が抑制されることが考えられている (Pertovaara, 2013)。

遺伝子改変マウスを用いた行動解析実験から、 α_2 -AR 作動薬による鎮痛作用には α_{2A} -AR サブタイプが必要だと報告されている (Hunter *et al.*, 1997; Stone *et al.*, 1997)。また、 α_2 -AR 作動薬の効果には上位中枢での作用も重要で、ラットの青斑核の α_{2A} -AR 発現をアンチセンス DNA で阻害すると、デクスメデトミジンの鎮痛効果が減弱すると報告されている (Mizobe *et al.*, 1996)。一方で α_{2C} -AR (Philipp *et al.*, 2002) やイミダゾリン I_1 および I_2 受容体 (Pineda *et al.*, 1993) なども α_2 -AR 作動薬の脊髄での鎮痛作用に関わっているという報告がある。イミダゾリン骨格を持つデクスメデトミジンはイミダゾリン受容体に作用することが知られている (Dahmani *et al.*, 2008)。イミダゾリン受容体は α_2 -AR 作動薬による降圧や鎮痛に関与していると考えられているが、その分子実態やシグナル経路は分かっ

ていない (Li & Zhang, 2011)。 α_2C -AR も α_2A -AR と同様にマウス脊髄に発現しており (Tamagaki *et al.*, 2010)、Gi/o タンパク質を活性化し、シナプス前膜からの神経伝達物質の放出を減少させる。これらのことから、 α_2 -AR 作動薬の脊髄における正確な作用機序は分かっておらず、より詳細で定量的な解析が求められる。

薬物の鎮痛作用を定量的に調べる手法として、摘出脊髄標本における反射電位測定法がある (Otsuka & Konishi, 1974)。摘出脊髄標本の腰髄後根を電気刺激すると、対応する前根より数ミリ秒以内に単シナプス反射電位 (monosynaptic reflex potential; MSR) が記録され、続いて 20~30 秒間持続する遅発性前根電位 (slow ventral root potential; sVRP) が記録される。MSR は脊髄前角において一次求心性 A δ 線維終末から放出されたグルタミン酸が、運動ニューロンの non-NMDA 受容体を活性化することで生じる興奮性の電位であり、運動や姿勢の制御に関与すると考えられている (Jahr & Yoshioka, 1986)。一方、sVRP は脊髄後角において一次求心性 A δ および C 線維終末から放出されたグルタミン酸や substance P が NMDA 受容体や NK₁ 受容体にそれぞれ作用して複数の介在ニューロンのシナプスを介して最終的に前根の運動ニューロンが興奮して起こる電位と考えられている (Akagi *et al.*, 1985; Brugger *et al.*, 1990)。sVRP は以下に述べる実験的根拠から侵害受容の神経伝達を反映していると考えられている (Faber *et al.*, 1997)。1) 末梢に侵害刺激を与えると sVRP と同様の持続性の脱分極が記録される (Yanagisawa *et al.*, 1985)。2) モルヒネ (Yanagisawa *et al.*, 1985) や α_2 -AR 作動薬 (Kendig *et al.*, 1991) などの鎮痛薬で選択

的に抑制される。3) sVRP の記録される閾値が、痛みを伝達する一次求心性 C 線維が活性化する閾値と一致する (Akagi *et al.*, 1985)。この脊髄反射電位測定法は新生ラットを用いて行われていたが、本研究室でマウスを用いた実験手法を確立し (Kobayashi *et al.*, 2015)、これにより遺伝子改変マウスでの痛覚伝達の解析が可能となった。

α_2A -AR の遺伝子改変マウスに、第二膜貫通領域にある 79 番目のアスパラギン酸がアスパラギンに変異 (D79N) しているマウスがある (Surprenant *et al.*, 1992)。第二膜貫通領域のこの位置のアスパラギン酸残基はクラス A の GPCR で広く保存されており (Kolakowski, 1994)、D79N マウスは α_2A -AR の機能的ノックアウトマウスとして用いられる (Shafaroudi *et al.*, 2005)。D79N マウスでは α_2 -AR 作動薬の鎮痛効果が有意に減弱することが報告されている (Hunter *et al.*, 1997; Stone *et al.*, 1997)。また、マウス下垂体癌由来細胞株 AtT-20 に D79N 変異した α_2A -AR を発現させて膜電流を測定した実験では、 α_2 -AR 作動薬による K^+ チャネル活性化は消失するが Ca^{2+} チャネル抑制効果および cAMP 減少効果には影響を与えないことが報告されている (Surprenant *et al.*, 1992, Lakhiani *et al.*, 1996)。

本研究では、D79N マウスを用いて脊髄反射電位測定を中心に実験を行い、マウスにおける α_2 -AR 作動薬の作用における α_2A -AR サブタイプの役割について検討した。本研究の成果の一部は誌上公開されている (Kobayashi *et al.*, 2015)

II 実験方法

A. 実験動物

本研究は、北海道大学大学院獣医学研究科獣医学科・獣医学部において行う動物実験に関するガイドラインに従って行った。実験に必要な新生マウスを得るため、C57BL/6J マウスと B6.129S2-*Adra2a^{tm1Le/J}* (The Jackson laboratory) マウスをそれぞれ自家繁殖した (動物実験計画書承認番号：第 13-0038 号)。得られた新生マウスの 1~6 日齢のものを雌雄の区別なく脊髄標本摘出実験に用いた。

B6.129S2-*Adra2a^{tm1Le/J}* マウスは 79 番目のアスパラギン酸がアスパラギンに一塩基置換 (D79N) することにより活性が大きく損なわれている α_2A -AR を持つ系統である (MacMillan *et al.*, 1996; Hunter *et al.*, 1997; Stone *et al.*, 1997)。これ以降、この D79N 変異した α_2A -AR 遺伝子をホモで持つマウスを D79N-homo、ヘテロで持つマウスを D79N-hetero、野生型の α_2A -AR をホモで持つマウスを WT と表記する。

B. ジェノタイピング

α_2A -AR 変異マウス (B6.129S2-*Adra2a^{tm1Le/J}*) の遺伝子型を調べるために α_2A -AR の

DNA に対するプライマーを用いて PCR を行った。自家繁殖に用いるマウスのイヤープ
チ断片もしくは実験に用いた新生マウスの尾を材料として、Lysis buffer (100 mM NaCl,
50 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 0.1% SDS) 500 μ l とともにエッペンチューブに入れ、
proteinase K を 50 μ g 加えて 50°C で 5 時間以上振盪して組織を融解させた。その後 95°C
で 10 分間処理することで proteinase K を失活させた。

PCR 反応は市販のキット(KAPA 2G Robust HotStart ReadyMix, 日本ジェネティクス株
式会社) を用い、上述の組織溶解液 1 μ l をテンプレートとした。サーマルサイクラー
(PC320, ANTEC) を用いて 95°C (15 秒)、55°C (15 秒)、72°C (15 秒)を 1 サイクルとし、
35 サイクル行った。得られた PCR 産物をエチジウムブロマイド (10 μ g/100 ml) を含む
5%アガロースゲルで電気泳動した後、トランスイルミネーター (Mupid Scope WD,
ADVANCE) によりバンドを確認した。156 bp 付近に増幅されたバンドの検出を確認した
後、PCR 産物 5 μ l に M buffer ($\times 10$) 2 μ l と制限酵素 Nhe 1 (TaKaRa bio Inc.) を 3 units
加え、超純水で 20 μ l にメスアップした。これを 37°C で 4 時間反応させた後、エチジウム
ブロマイド含の 5%アガロースゲルで電気泳動し、トランスイルミネーターで PCR 産物の
制限酵素による切断の有無を確認した。

C. 脊髄反射電位測定法

1. 摘出脊髄標本作製法

新生マウスを断頭して安楽殺を行った。腹位にして背側の皮膚を切開し、肋骨を脊椎からやや腹側に離れた部位で吻側から尾側に向かって切断した。胸腔内と腹腔内の諸臓器を除去した後、上部胸椎から尾椎までの脊柱を摘出した。これを人工脳脊髄液 (ACSF: artificial cerebrospinal fluid) で満たした標本作製用シャーレにピンで背位に固定した。

標本作製は、双眼実体顕微鏡 (SZ61, OLYMPUS) 下で以下の方法で行った。なお、標本作製は室温で行い、標本作製用シャーレ内の ACSF は 5 分毎に交換した。ACSF の組成 (mM) は NaCl 138; KCl 3.5; CaCl₂ 1.25; MgCl₂ 1.5; NaHCO₃ 21; NaH₂PO₄ 0.6; グルコース 10 とし、95% O₂ + 5% CO₂ 混合ガスを通気し、pH を 7.3 に調節した。

角膜尖刀を用いて胸椎、腰椎および仙椎の腹側部分を切除し、脊髄腹側部を露出させた。次に、椎弓の左側部をピンセットでつまみ、胸椎から尾椎に切り開いて脊髄左側部および後根神経節を露出した。この時、最後肋骨 (第十三胸椎) を指標にして胸髄、腰髄および仙髄を確認し、腰髄の前根と後根を後根神経節とともに脊髄に付着させた状態に保った。次に、胸髄の左側先端をピンセットで持ち上げ、角膜尖刀を用いて脊髄を正中線に沿って半裁し、左半分の脊髄を摘出した。第三から第五腰髄の前根と後根を識別し、それ以外の神経根や神経節を除去した後、第三から第五腰髄の神経根から後根神経節を切除した。

2. 電位変化の記録方法および刺激法

前述のようにして作製した脊髄半裁標本を、ACSF で満たした容量 1.5 ml の実験槽に移し、頭側を手前、半裁面を下にして、脊髄が実験槽の底に沈むように両端をピンで固定した。ACSF を 2.5 ml/min の流速で灌流し、実験槽はヒーターで加熱して $27 \pm 2^\circ\text{C}$ に保った。

反射電位は Otsuka & Konishi (1974) の方法を改良した Saito (1979) の方法に準じ、吸引電極を用いて前根から細胞外性に記録した。記録吸引電極は、銀-塩化銀線の入ったガラス管の先端にガラス細管を連結して作成し、内径の異なるガラス細管を準備して前根の太さにあったガラス細管を用いた。記録電極内を ACSF で満たした後に前根を吸引し、電極内の銀-塩化銀線と実験槽内の不関電極との間に生じる電位差を微小電極用増幅装置 (MEZ-8300, 日本光電) で増幅後サーマルアレイコーダー (WR7900, GRAPHTEC) 上にサンプリング時間 40 μs で記録した。さらにデータは AD 変換器 (Power Lab 2/26, AD Instruments) を介してサンプリング時間 25 ms でコンピューター (Windows XP, Microsoft Inc.) 上に保存して解析した (Chart V, AD Instruments)。電極はマニピレーターに取り付けて操作した。電気刺激は電気刺激装置 (SEN-7103, 日本光電) とアイソレーター (SS-403J, 日本光電) を用い、刺激用吸引電極を介して後根に与えた。刺激電極の内外にはそれぞれ銀-塩化銀線を装着した。記録電極を装着した腰髄前根に対応する後根を刺激電極内に吸引し、電圧 40 V、持続時間 200 μs の単一矩形波を与えた。図 1A に電極の配置と電位変化の記録法を示している。

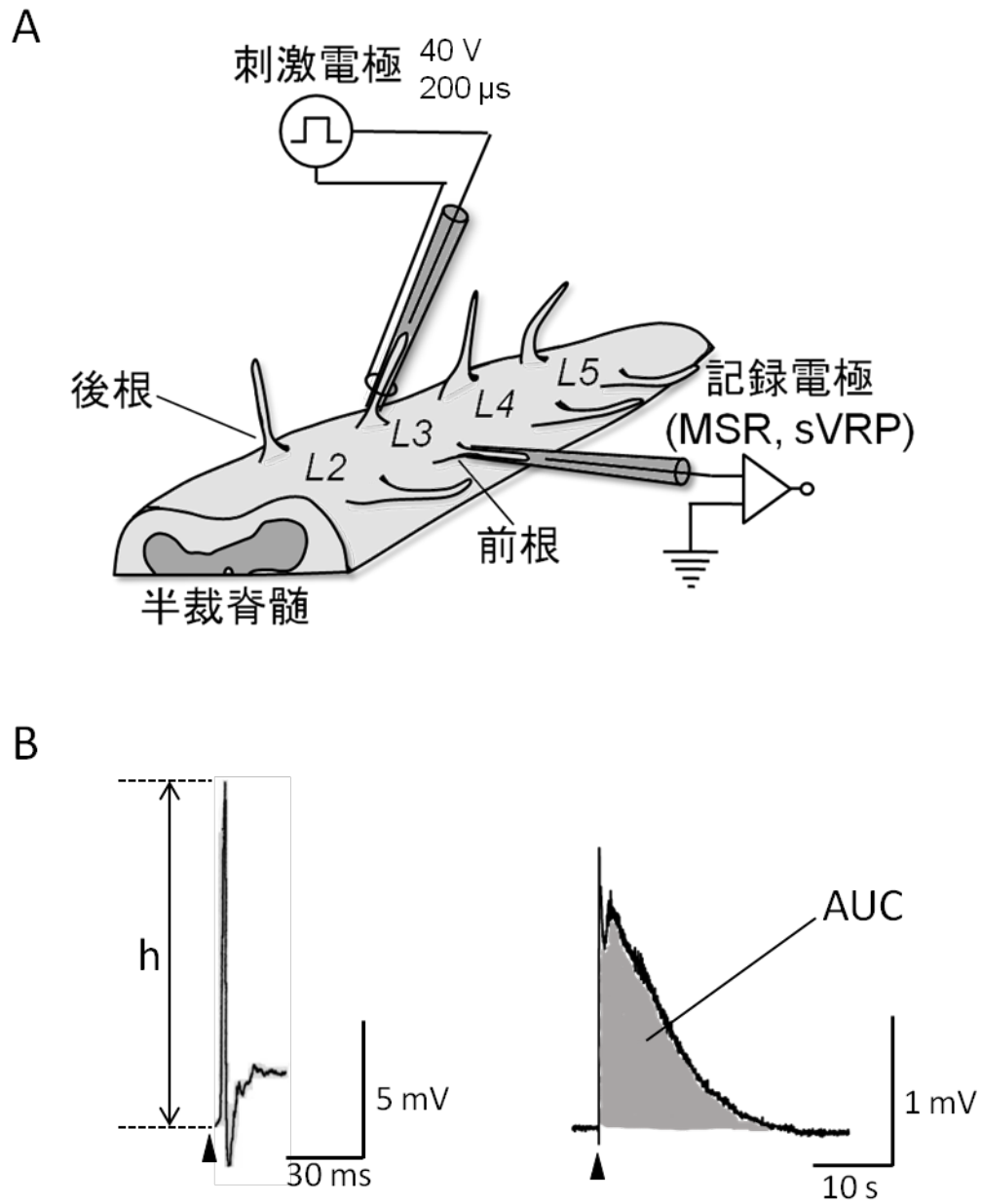


図 1. 新生マウス摘出脊髓標本と脊髓反射電位

A : 脊髓標本の模式図。第三から第五腰髄 (L3~L5) 後根のいずれかに刺激電極を、対応する前根に記録電極をそれぞれ装着した。図は第三腰髄 (L3) に電極を装着した場合を表している。

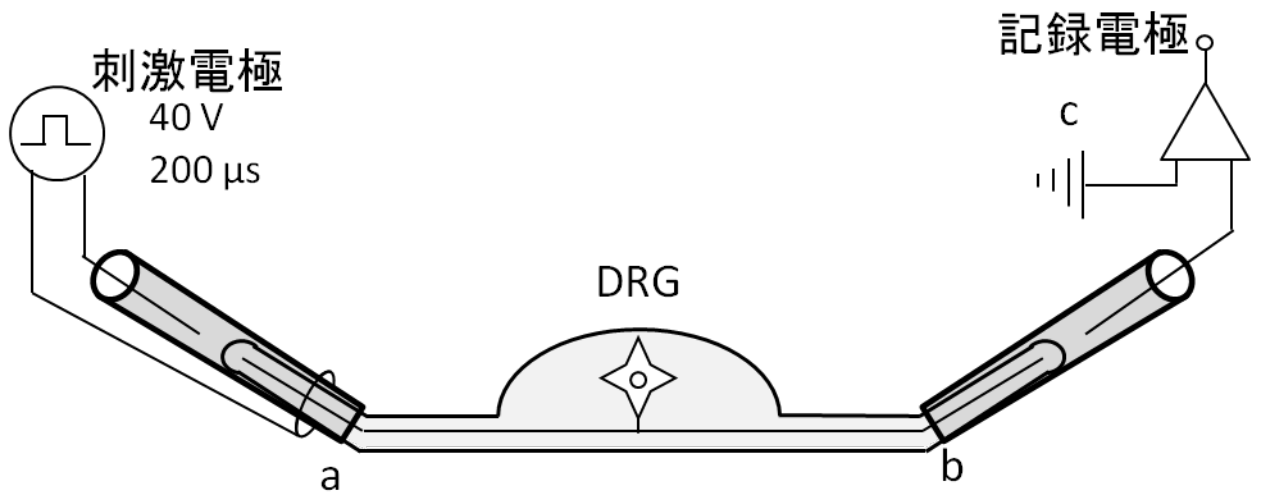
B : 後根の電気刺激 (▲) により記録される単シナプス反射電位 (MSR ; 左) と遅発性前根電位 (sVRP ; 右) の典型的な波形。MSR は最大振幅 (h) を、sVRP は反応の曲線下面積 (AUC) を測定した。

第三から第五腰髄後根のいずれかを電気刺激すると、対応する前根から数ミリ秒以内に単シナプス反射電位 (MSR) が記録され、続いて 20~30 秒間持続する遅発性前根電位 (sVRP) が記録された (図 1B)。2 分間隔で電気刺激すると、各標本より記録された反射電位は時間とともに徐々に増大したが、1 時間後にほぼ一定になり、波形に著しい変化は見られなくなった。この反射電位の増大は、脊髄が標本作製中に受けた傷害から回復したためと、前根と記録電極先端のガラス細管との接触が密になり、両者間の電気抵抗が増大したためであると考えられる。それゆえ、電気刺激開始から 1 時間以上経過して、安定した反応が得られるようになってから実験を開始した。MSR は最大振幅を、sVRP は反応の曲線下面積 (area under the curve) をそれぞれ測定し、経時変化を薬物投与直前に得られた 3 点の反応の平均値に対する割合 (%) で表した。

D. 複合活動電位測定法

脊髄反射電位測定法と同様に、新生マウスを断頭して脊髄左側部および第四腰髄後根神経節を露出した。露出した神経根を神経節より近位端で切断し、ACSF で灌流しながら遠位端に刺激用、近位端に記録用のガラス吸引電極を装着した (図 2A)。腰髄神経の遠位端を 40 V、200 μ s で刺激することで近位端で二相の複合活動電位の波形を記録した (図 2B)。2 分間隔で電気刺激を続けながら ACSF に溶解した薬物を腰髄神経に適用した。第一相およ

A



B

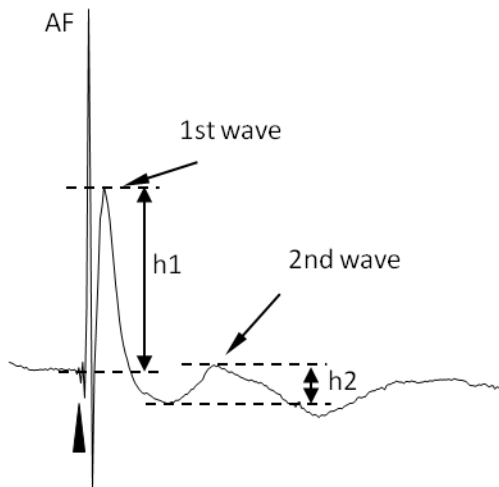


図 2. 新生マウス摘出脊髄神経における複合活動電位の記録法

A : 複合活動電位の記録法の模式図。a は刺激電極、b は記録電極、c は接地した不関電極である。DRG は第四腰髄の後根神経節を表し、神経の細胞体が存在する。

B : 遠位端の神経に電気刺激 (▲) を与えて記録した複合活動電位の波形。AF は刺激によって生じたアーティファクトを表している。第一相および第二相の活動電位それぞれの最大振幅 (h1, h2) を測定した。

び第二相のそれぞれの最大振幅 (mV) を測定し、薬物投与直前に得られた 3 点の反応の平均値に対する割合 (%) で表した。

F. 試薬

実験では以下の試薬を使用した。

Idazoxan hydrochloride, efaroxan hydrochloride, JP1302 dihydrochloride (TOCRIS), xylazine hydrochloride (SIGMA), dexmedetomidine hydrochloride (ORION PHARMA), atipamezole hydrochloride (SIGMA, ORION PHARMA)

G. 統計処理

各実験で得られた値は、平均値±標準誤差 (S.E.M.; n=例数) で表した。有意差検定は二標本 *t* 検定もしくは Dunnett 検定で行い (JMP Pro 12, SAS Institute Inc.)、有意水準を $P < 0.05$ とした。

III 実験成績

A. WT マウス脊髄反射電位に対する α_2 受容体作動薬の効果

1. キシラジン

キシラジン (1-300 μM) を WT マウスの摘出脊髄標本に累積適用すると、sVRP は 10 μM から濃度依存性に抑制され、100 μM でほぼ消失した (図 4)。一方、MSR は 100 μM から濃度依存性に抑制された。キシラジン (300 μM) による MSR および sVRP 抑制は、 α_2 -AR 拮抗薬アチパメゾール (10 μM) を適用しても回復しなかった。キシラジンによる MSR および sVRP 抑制作用の EC_{50} 値は、それぞれ $239 \pm 23 \mu\text{M}$ (n=6) および $24 \pm 4 \mu\text{M}$ (n=6) であり、sVRP のほうが MSR よりもキシラジンに対する感受性が約 10 倍高かった。

2. デクスメデトミジン

デクスメデトミジン (0.1-300 nM) を累積適用すると sVRP は 10 nM から、MSR は 30 nM から濃度依存性に抑制された (図 5)。デクスメデトミジン (300 nM) によって抑制された sVRP はアチパメゾール (10 μM) によって薬物投与前の $86 \pm 15\%$ (n=4) まで回復したが、MSR の抑制は回復しなかった。デクスメデトミジンによる MSR および sVRP 抑制作用の EC_{50} 値は、それぞれ $182 \pm 16 \text{ nM}$ (n=4) および $15 \pm 4 \text{ nM}$ (n=4) であり、sVRP の

ほ

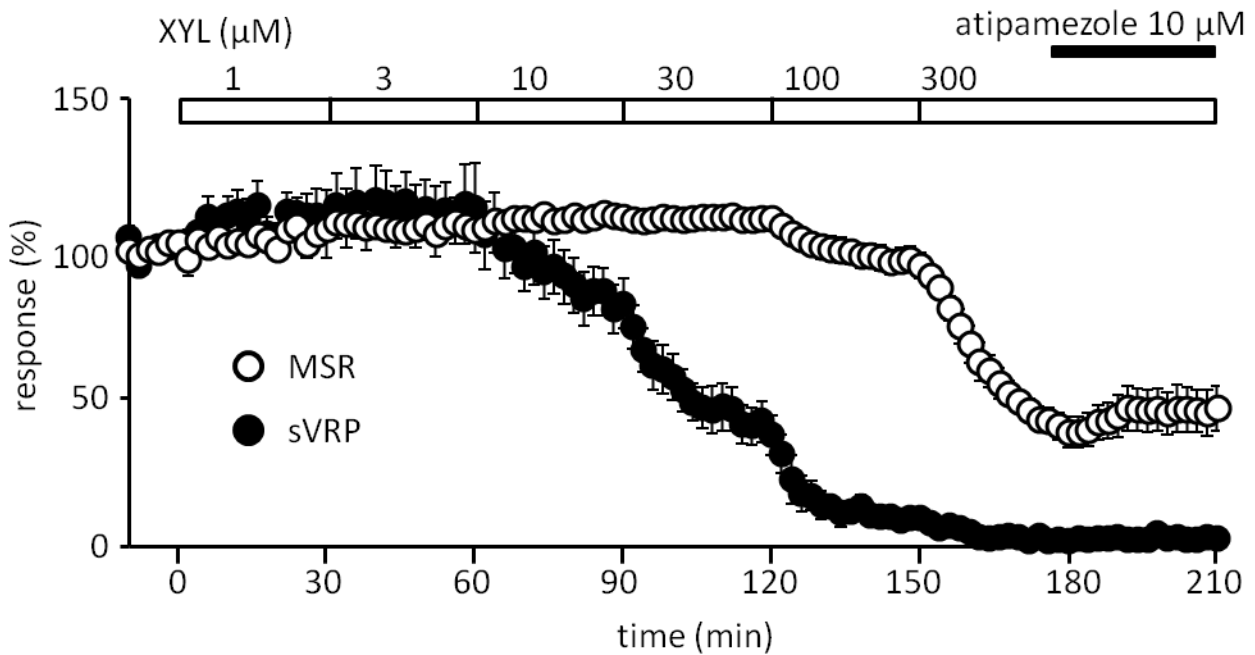
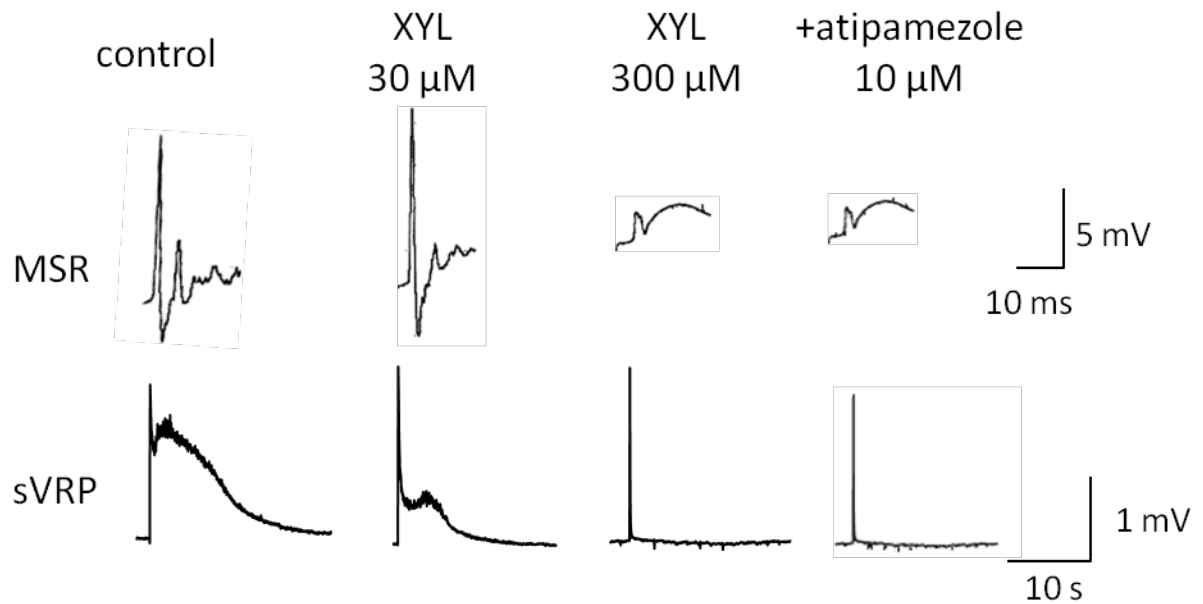


図 4. WT マウスにおけるキシラジンの脊髄反射電位に対する効果

キシラジン (XYL: 1-300 μM) の各濃度を 30 分間累積適用した時に得られた MSR と sVRP の典型的な波形 (上段) と経時変化 (下段)。MSR および sVRP はキシラジン適用前の 3 回の反応の平均値に対する割合で示している (平均値 \pm S.E.M., $n=6$)。

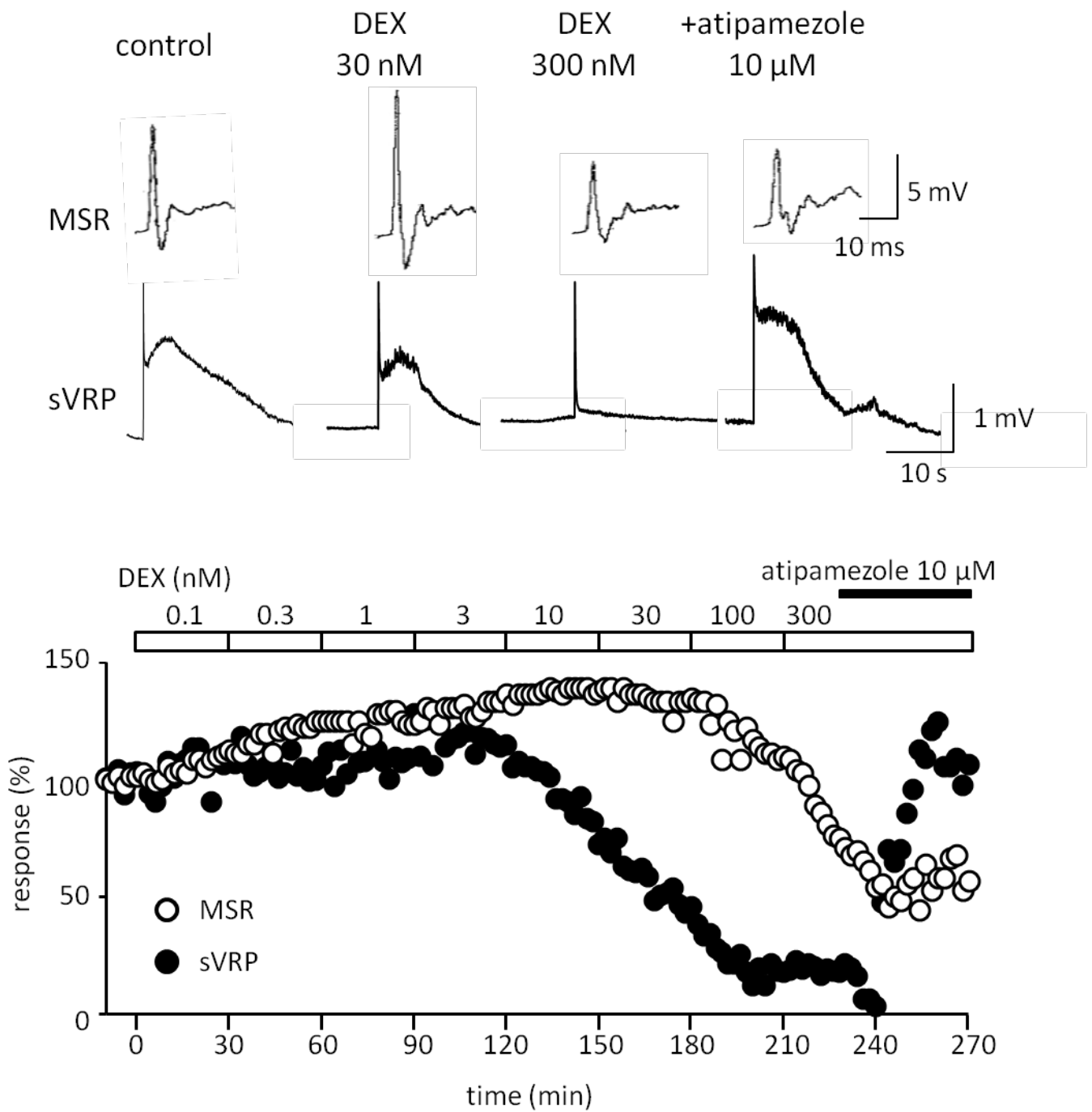


図 5. WT マウスにおけるデクスメドトミジンの脊髄反射電位に対する効果

デクスメドトミジン (DEX: 0.1-300 nM) の各濃度を 30 分間累積適用した時に得られた MSR と sVRP の典型的な波形 (上段) と経時変化 の典型的な一例 (下段)。MSR および sVRP はデクスメドトミジン適用前の 3 回の反応の平均値に対する割合で示している。

うが MSR よりもデクスメデトミジンに対する感受性が約 10 倍高かった。

また、デクスメデトミジンによる MSR および sVRP 抑制効果は、キシラジンと比較して約 1,300 倍および 1,600 倍それぞれ高い力価を示した (図 6)。

B. α_2A 受容体変異マウス (B6.129S2-*Adra2a*^{tm1Lel/J}) における α_2 受容体作動薬の効果

WT マウスの脊髄反射電位は α_2 -AR 作動薬によって抑制されることが示された。そこで次に α_2A -AR 変異マウス (D79N-homo および hetero) を用いて、 α_2 -AR 作動薬の脊髄反射電位に対する効果を WT マウスと比較検討した。

1. α_2 受容体作動薬の効果

a) キシラジン

D79N-hetero マウスにおいて、WT マウスと同様にキシラジン (1-300 μ M) の累積適用は sVRP を 10 μ M から、MSR を 100 μ M から濃度依存性に抑制した (図 7A, B)。この抑制作用の EC₅₀ 値は、MSR では 239 \pm 23 μ M (n=6, WT) および 216 \pm 21 μ M (n=5, D79N-hetero)、sVRP に対しては 24 \pm 4 μ M (n=6, WT) および 24 \pm 8 μ M (n=5, D79N-hetero) であり、両マウス群の間で有意な差はなかった。また、WT マウスと同様に、D79N-hetero マウスにおいてキシラジン (300 μ M) による MSR および sVRP の抑制はア

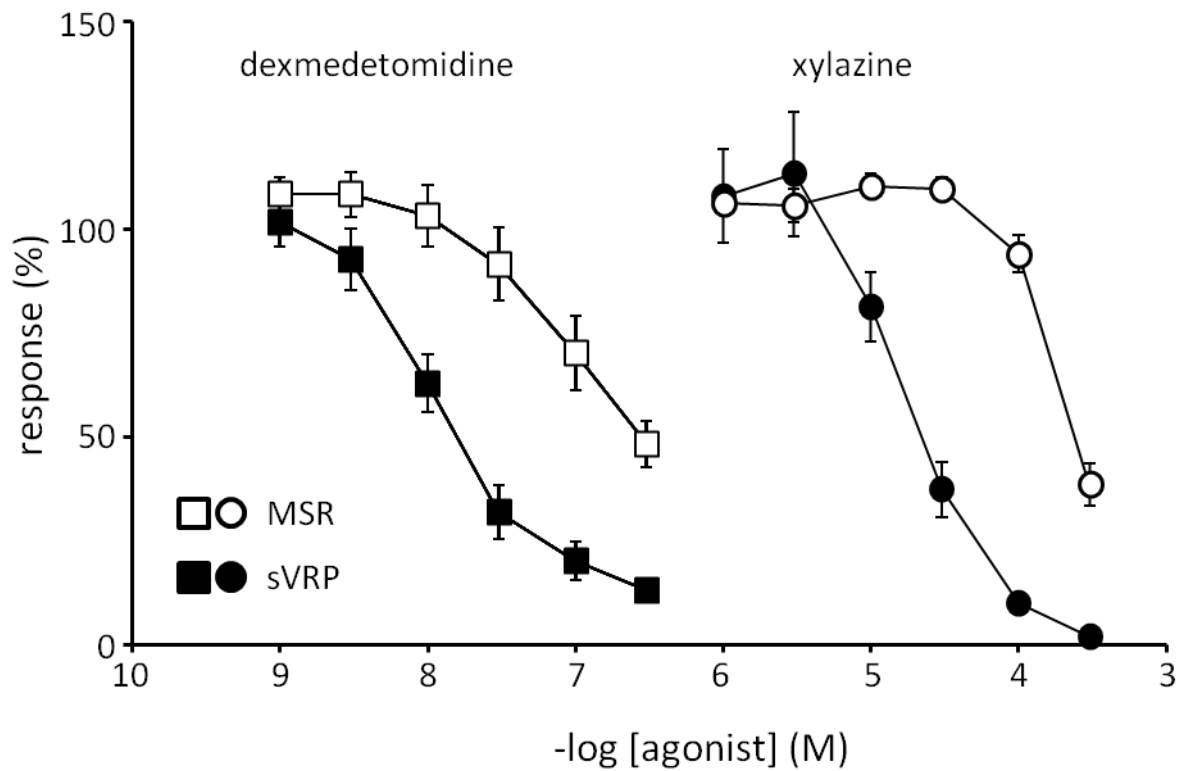


図 6. WT マウスにおけるキシラジンとデクスメドトミジンの脊髄反射電位抑制効果の濃度反応関係

キシラジンとデクスメドトミジンの MSR および sVRP 抑制効果の濃度反応曲線。縦軸は各薬物適用直前の 3 回の反応の平均値に対する、各濃度における最大抑制が見られた 3 点の平均値の割合を示している (平均値 ± S.E.M., n=4)。

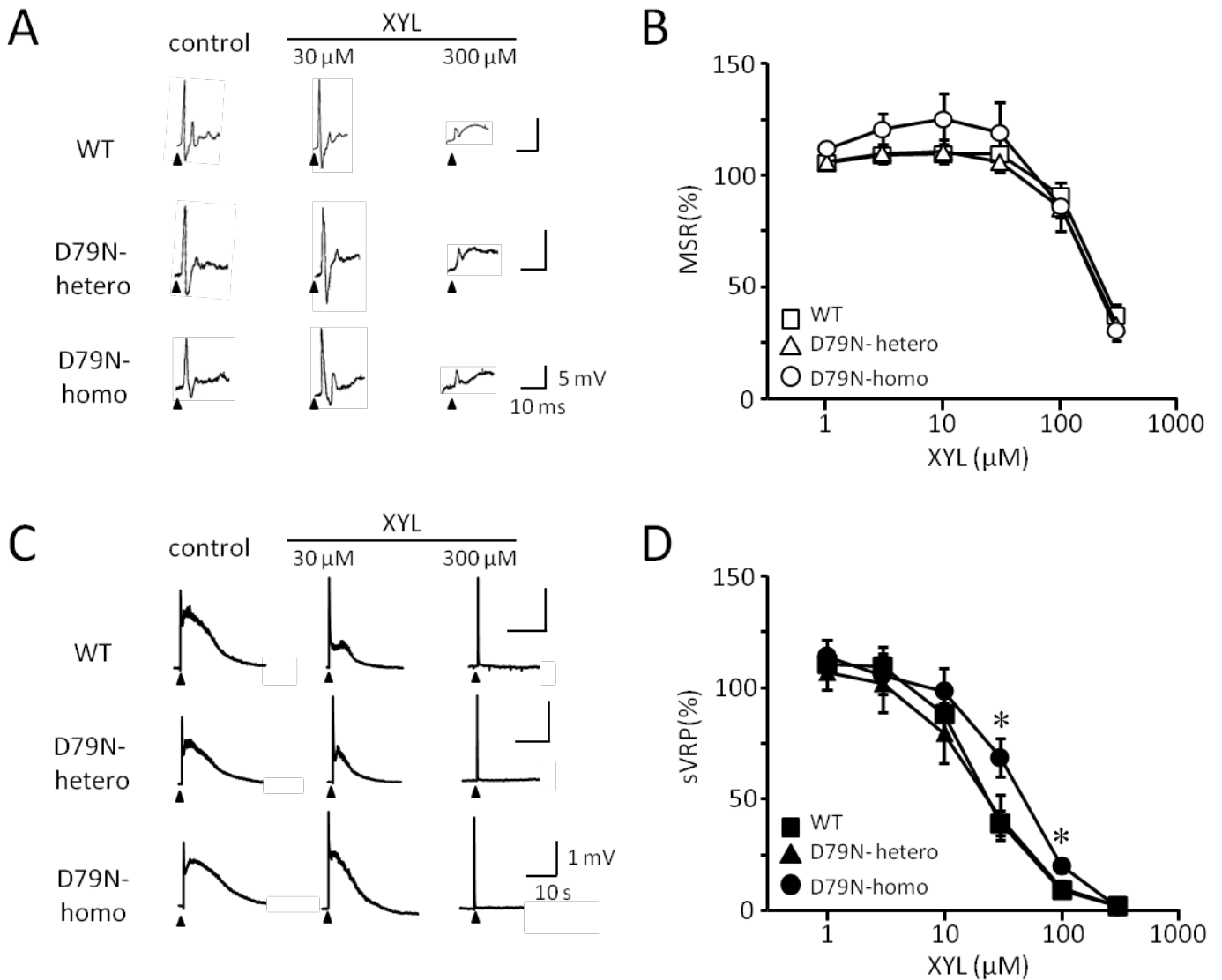


図 7. α_2A -AR 遺伝子変異マウスにおけるキシラジンの脊髄反射電位に対する効果

(A, B) キシラジン適用時の MSR の波形の変化 (A) および濃度反応曲線 (B)。

(C, D) キシラジン適用時の sVRP の波形の変化 (C) および濃度反応曲線 (D)。濃度反応曲線の縦軸はキシラジン適用前の 3 回の反応の平均値に対する、各濃度の最大抑制が見られた 3 点の平均値の割合で示している (平均値 \pm S.E.M., $n=5-6$)。* $P < 0.05$ vs. WT (paired Student's t -test)

チパメゾール (10 μM) では回復しなかった。

D79N-homo マウスにおいても、キシラジン (1-300 μM) の累積適用は MSR を 100 μM から濃度依存性に抑制した (図 7C, D)。一方、キシラジンの sVRP 抑制は WT マウスや D79N-hetero マウスと比較して高濃度 (30 μM) から生じ、キシラジン (30 および 100 μM) による抑制効果も有意に小さかった。D79N-homo マウスにおける sVRP 抑制の EC_{50} 値は $45 \pm 8 \mu\text{M}$ (n=6) で、WT ($24 \pm 4 \mu\text{M}$, n=6) および D79N-hetero ($24 \pm 8 \mu\text{M}$, n=5) マウスに比べて有意に大きかった。

また、キシラジン (300 μM) による MSR および sVRP の抑制はアチパメゾール (10 μM) の適用で回復しなかった (データは示さない)。

b) デクスメデトミジン

D79N-hetero マウスにおいて、デクスメデトミジン (1-300 nM) の累積適用は WT マウスにおいてと同様に MSR を 30 nM から濃度依存性に抑制した (図 8A, B)。 EC_{50} 値は $158 \pm 68 \text{ nM}$ (n=5) で、WT マウス群の値 ($182 \pm 16 \text{ nM}$, n=4) と有意差はなかった。また、D79N-homo マウスにおいても、デクスメデトミジン (3 nM-10 μM) は MSR を 30 nM から濃度依存性に抑制した。WT および D79N-hetero マウスと比較して、D79N-homo マウスにおけるデクスメデトミジンの濃度反応曲線は右方にシフトする傾向があったが、 EC_{50} 値 ($688 \pm 354 \text{ nM}$, n=4) に有意差はなかった。

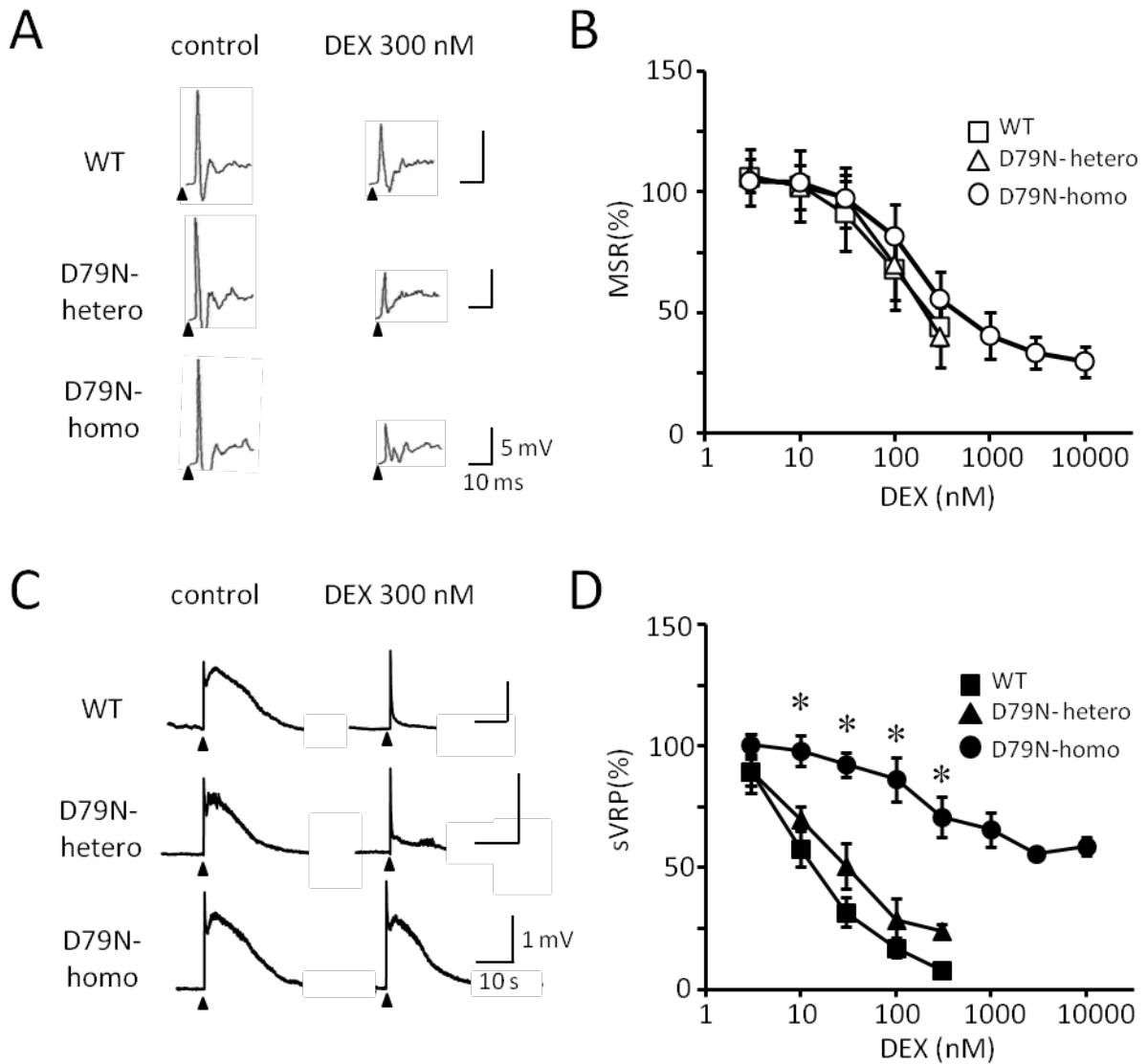


図 8. α_{2A} -AR 遺伝子変異マウスにおけるデクスメデトミジンの脊髄反射電位に対する効果

(A, B) デクスメデトミジン適用時の MSR の波形の変化 (A) および濃度反応曲線 (B)。
 (C, D) デクスメデトミジン適用時の sVRP の波形の変化 (C) および濃度反応曲線 (D)。濃度反応曲線の縦軸はデクスメデトミジン適用前の 3 回の反応の平均値に対する、各濃度の最大抑制が見られた 3 点の平均値の割合で示している (平均値 \pm S.E.M., $n=4-5$)。* $P < 0.05$ vs. WT (paired Student's t test)

一方、sVRP に対して、デクスメデトミジンは WT マウスにおいてと同様に D79N-hetero マウスにおいて 3 nM から濃度依存性に抑制した。EC₅₀ 値は 40±20 nM (n=4) で、WT マウス群 (15±4 nM, n=5) と有意差はなかった (図 8C, D)。一方、D79N-homo マウスにおいては、デクスメデトミジン (3 nM-10 μM) は WT や D79N-hetero マウスよりも高濃度 (100 nM) から sVRP を濃度依存性に抑制し、WT マウスでは sVRP が消失した濃度 (300 nM) でも抑制率は 29.0±8.4% (n=4) で、さらに高濃度 (10 μM) まで適用しても抑制率は 41.1±3.8% (n=4) だった (図 8D)。

2. α₂受容体およびイミダゾリン受容体拮抗薬の効果

これまでの実験で、α₂-AR 作動薬の sVRP 抑制効果に α_{2A} サブタイプが関与していることが示唆された。一方、D79N-homo マウスにおいても α₂-AR 作動薬による sVRP 抑制効果は消失せず、MSR 抑制効果は WT マウスと比較して変化しなかった。そこで、α_{2C}-AR サブタイプやイミダゾリン受容体に対する特異性の高い拮抗薬の作用を検討することでこれら α_{2A}-AR 以外の受容体が脊髄反射電位抑制効果に関与しているかどうかを調べた。

a) デクスメデトミジンの反射電位抑制に対する効果

D79N-homo マウスにおいて、デクスメデトミジン (1 μM) による sVRP 抑制はアチパメゾール (10 μM) でほぼ完全に回復した (図 9A) が、α_{2C}-AR サブタイプに選択性のある拮

抗薬の JP1302 (10 μM) では回復しなかった (図 9B)。同様の実験をそれぞれイミダゾリン I₁ および I₂ 受容体拮抗薬であるエファロキサン (10 μM) とイダズキサン (10 μM) を用いて行ったが、デクスメトミジンによる sVRP 抑制は回復しなかった (図 9C)。また、アチパメゾールを含む全ての拮抗薬でデクスメトミジン (1 μM) による MSR 抑制は影響を受けなかった。

b) キシラジンの反射電位抑制に対する効果

高濃度 (300 μM) キシラジンの反射電位抑制効果はアチパメゾール (10 μM) で全く回復しなかった。以前の卒業論文 (Kobayashi, 2013) の検討でも、C57BL/6J マウスの反射電位に対する高濃度キシラジンの効果はアチパメゾールで回復しなかった。そこでまず低濃度 (30 μM) キシラジンの効果に対するアチパメゾールの作用を、C57BL/6J マウスを用いて検討した。

C57BL/6J マウスにおいて、キシラジン (30 μM) を適用すると sVRP は顕著に抑制されたが MSR は影響を受けなかった。アチパメゾール (1 μM) はこの sVRP 抑制効果の大部分を回復させた (図 10B)。

D79N-homo マウスの脊髄標本にキシラジン (30 μM) を適用すると sVRP はわずかに抑制されたが、アチパメゾール (10 μM) を適用してもこの抑制は回復しなかった (図 11A)。JP1302 (10 μM)、エファロキサン (10 μM)、イダズキサン (10 μM) を用いて同様の実験を

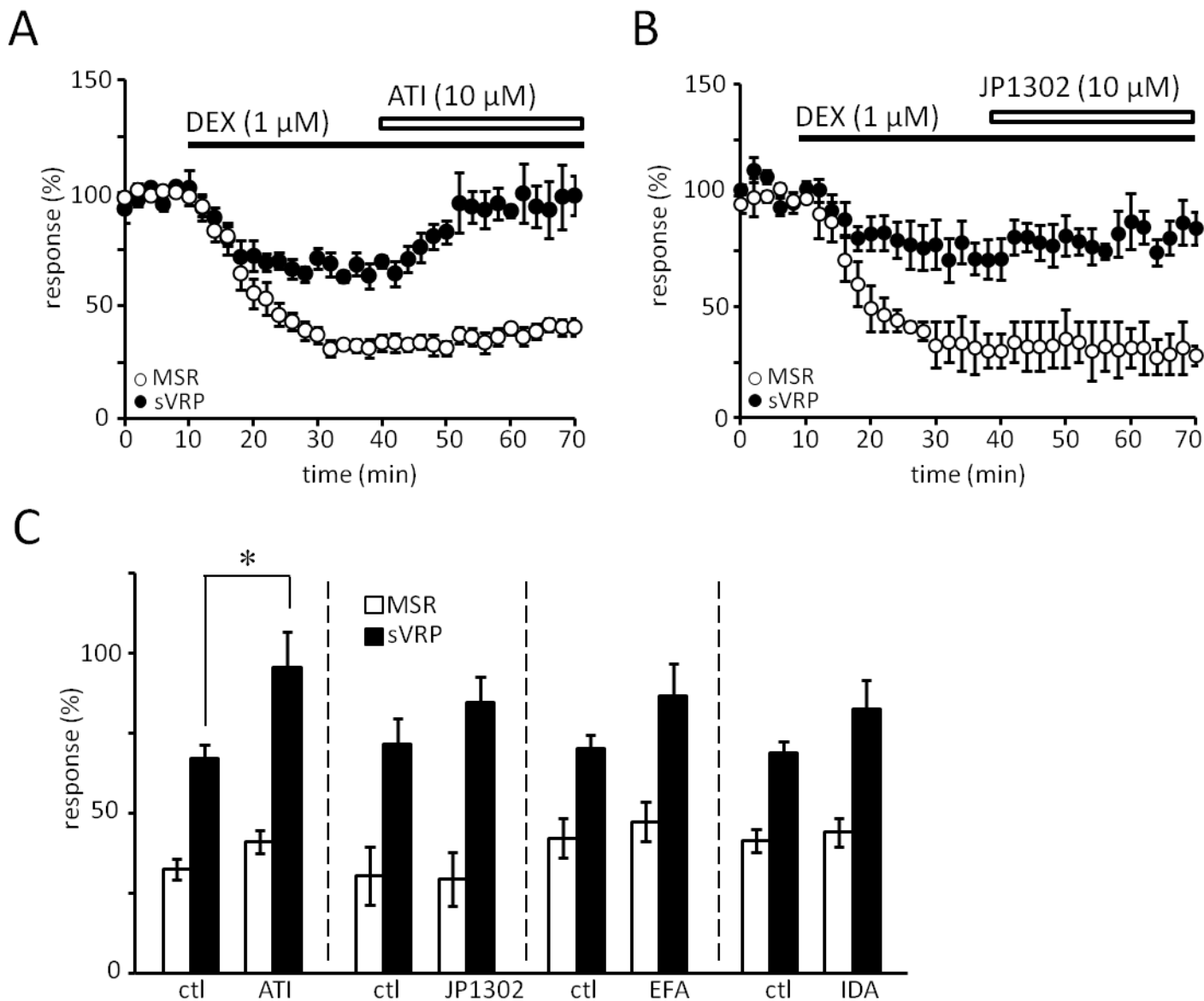


図 9. $\alpha_2\text{A-AR}$ 変異マウスにおけるデクスメドトミジンの脊髓反射電位抑制効果に対する拮抗薬の作用

(A, B) D79N-homo マウスにデクスメドトミジン (1 μM) を 30 分間適用した後にアチパメゾール (A) および JP1302 (B) を 10 μM 適用した際の MSR および sVRP の経時変化。

(C) アチパメゾール (ATI, 10 μM)、JP1302 (10 μM)、エファロキサシ (EFA, 10 μM)、イダゾキサシ (IDA, 10 μM) を 30 分間適用する前後の MSR と sVRP の大きさ。デクスメドトミジン適用前の 3 回の反応の平均値に対する、拮抗薬適用 30 分後の 3 点の平均値の割合で示している (平均値 \pm S.E.M., $n=5-6$)。* $P < 0.05$ (paired Student's t -test)

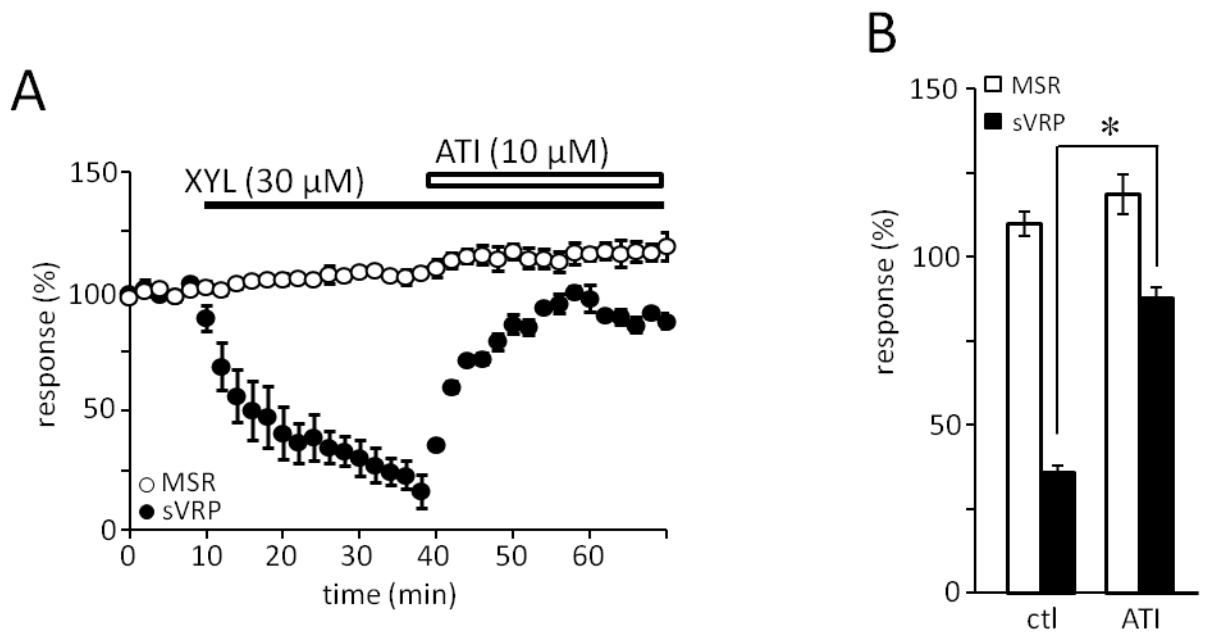


図 10. C57BL/6J マウスにおけるキシラジンの脊髄反射電位抑制効果に対するアチパメゾールの作用

(A) C57BL/6J マウスにキシラジン (30 μM) を 30 分間適用した後にアチパメゾール (ATI, 10 μM) を適用した際の MSR および sVRP の経時変化。

(B) アチパメゾールを 30 分間適用する前後の MSR と sVRP の大きさ。キシラジン適用前の 3 回の反応の平均値に対する、アチパメゾール適用 30 分後の 3 点の平均値の割合で示している (平均値 \pm S.E.M., $n=4$)。* $P < 0.05$ (paired Student's t -test)

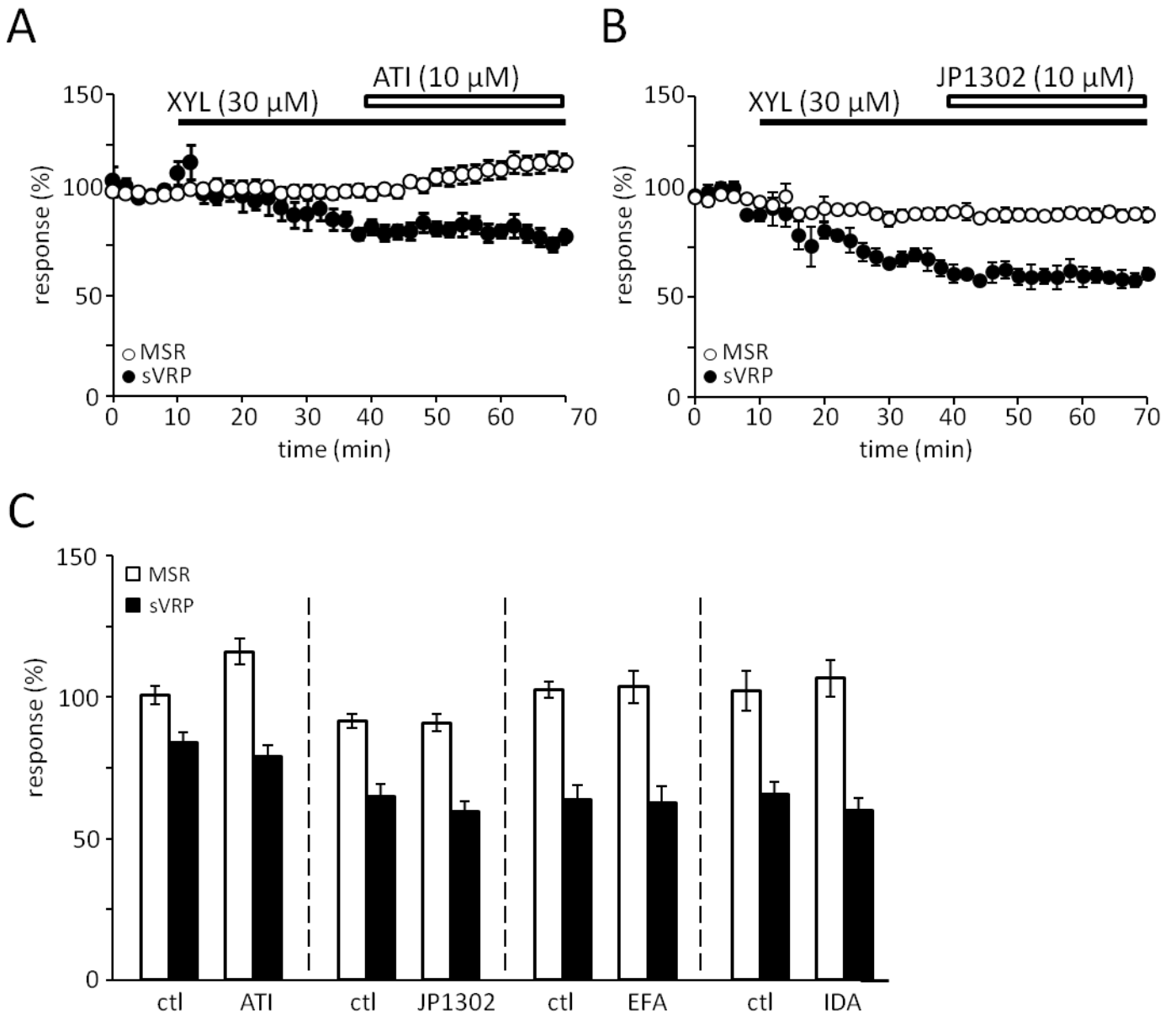


図 11. α_2A -AR 変異マウスにおけるキシラジンの脊髄反射電位抑制効果に対する拮抗薬の作用

(A, B) D79N-homo マウスにキシラジン (30 μ M) を 30 分間適用した後にアチパメゾール (A) および JP1302 (B) を 10 μ M 適用した際の MSR および sVRP の経時変化。

(C) アチパメゾール (ATI, 10 μ M)、JP1302 (10 μ M)、エファロキサン (EFA, 10 μ M)、イダゾキサン (IDA, 10 μ M) を 30 分間適用する前後の MSR と sVRP の大きさ。キシラジン適用前の 3 回の反応の平均値に対する、拮抗薬適用 30 分後の 3 点の平均値の割合で示している (平均値 \pm S.E.M., $n=4-7$)。

行ったが、いずれの拮抗薬もキシラジンの sVRP 抑制効果を回復させなかった (図 11B, C)。

また、キシラジン (30 μM) は D79N-homo マウスの MSR に影響を与えなかった。

C. マウス脊髄神経の複合活動電位に対する α_2 受容体作動薬の効果

高濃度のキシラジンによる反射電位の抑制は、D79N-homo マウスでも見られた。この抑制は α_2 -AR やイミダズリン受容体の拮抗薬でも回復しなかったことから、受容体を介さない非特異的な作用である可能性が考えられた。そこで高濃度 α_2 -AR 作動薬の活動電位伝導に対する効果を検討した。

C57BL/6J マウスから摘出した L4 背根脊髄神経の遠位端を電気刺激すると、近位端から二相性の複合活動電位が記録された (図 12A)。デクスメデトミジン (1 μM) の適用は、第一相および第二相のどちらの活動電位にも影響を与えなかった (図 12A, C)。一方、キシラジン (300 μM) は第一相および第二相電位を有意に抑制した (図 12B, C)。また D79N-homo マウスでも同様の結果が得られ、デクスメデトミジン (1 μM) は第一相および第二相のどちらの活動電位にも影響を与えなかった (図 13A, C) のに対して、キシラジン (300 μM) は第一相および二相電位を有意に抑制した (図 13B, C)。

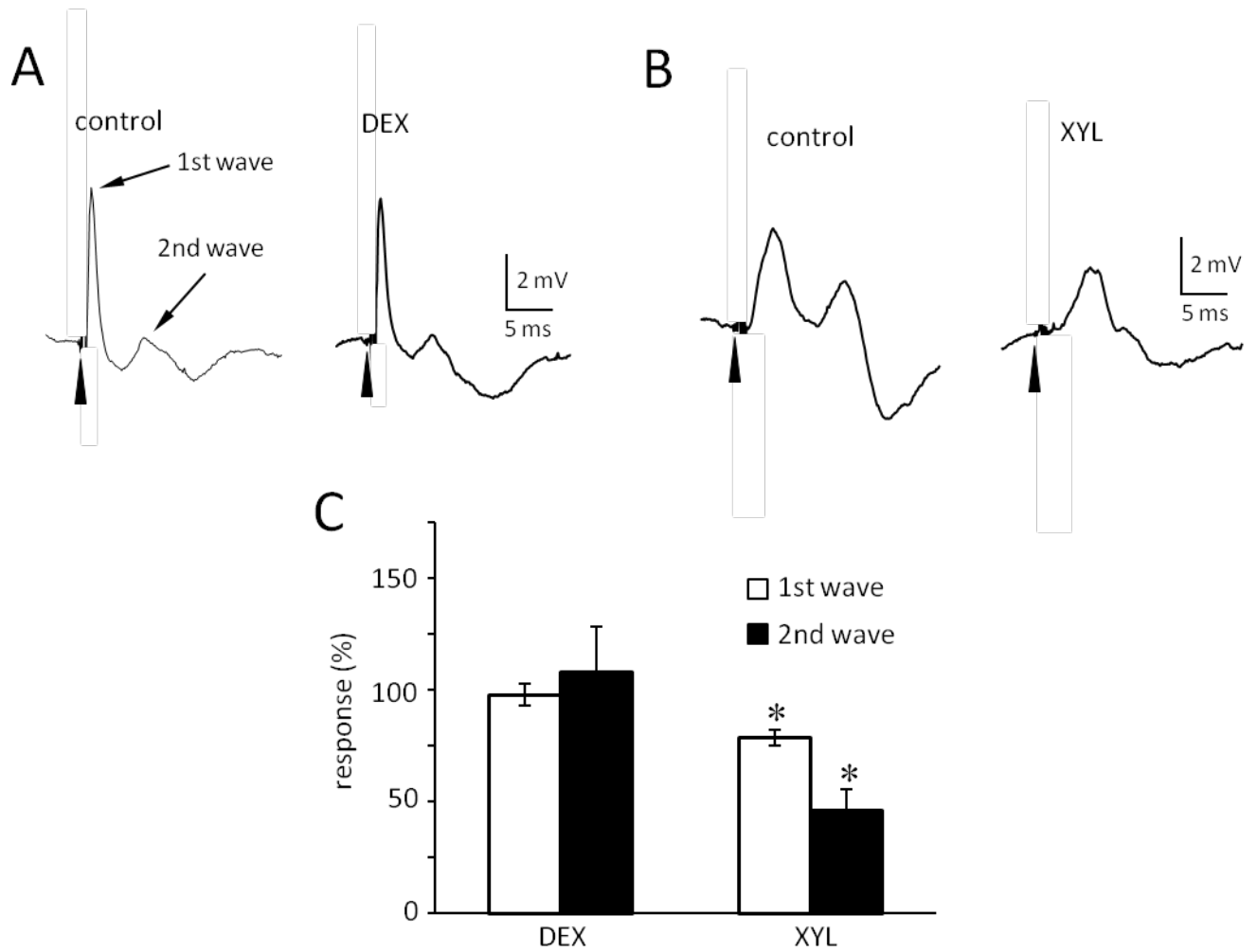


図 12. C57BL/6J マウスの複合活動電位に対するデクスメドトミジンおよびキシラジンの効果

C57BL/6J マウスの L4 後根脊髄神経の遠位を電気刺激した際に近位から得られる二相性の複合活動電位のデクスメドトミジン (1 μM , A) およびキシラジン (300 μM , B) の 30 分間適用前後の波形。それぞれの反応の大きさを薬物適用前の 3 回の反応の平均値に対する割合で示している (C, 平均値 \pm S.E.M., $n=3-5$)。* $P < 0.05$ vs. control (paired Student's t -test)

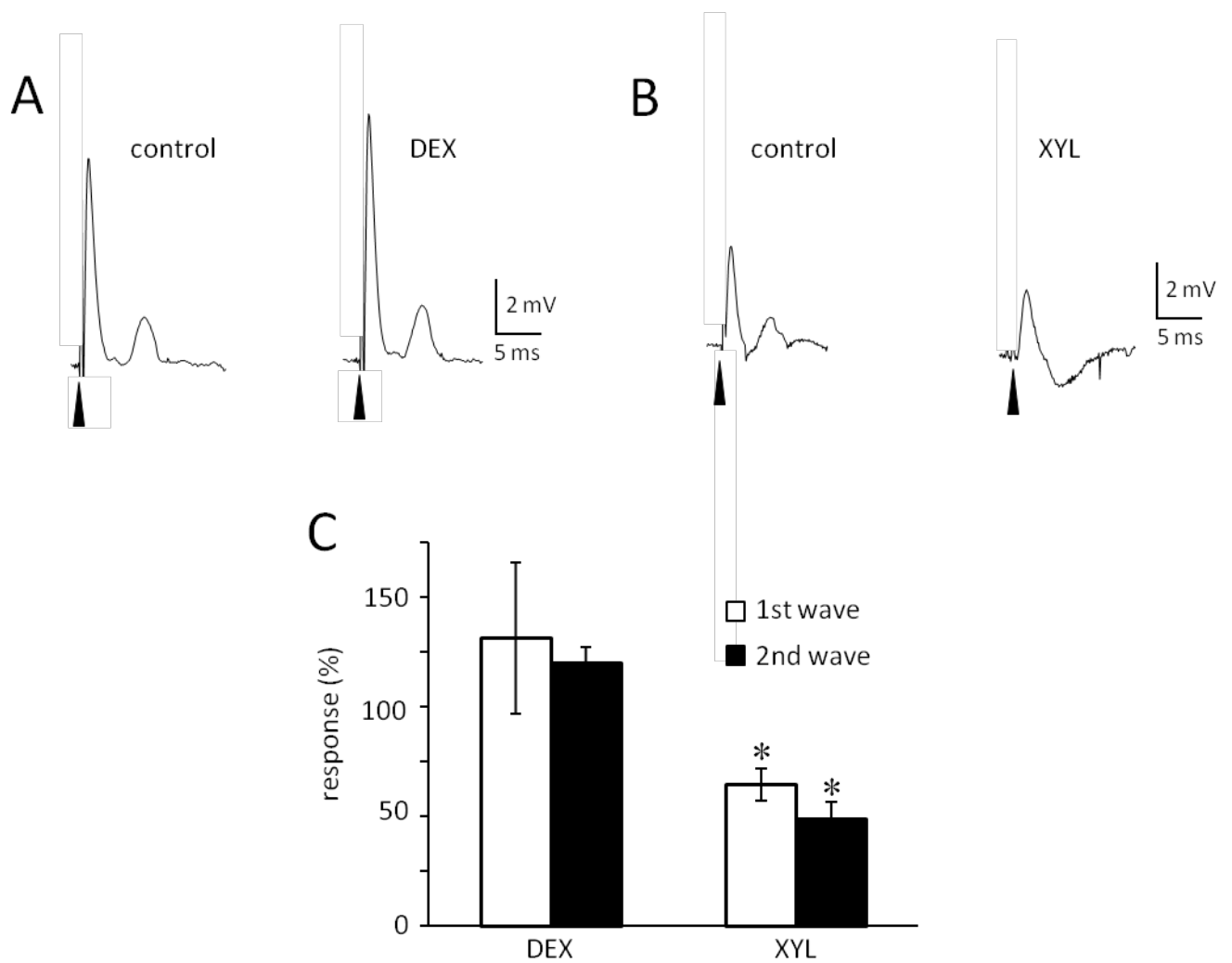


図 13. D79N-homo マウスの複合活動電位に対するデクスメドトミジンおよびキシラジンの効果

D79N-homo マウスの L4 後根脊髄神経の遠位を電気刺激した際に近位から得られる二相性の複合活動電位のデクスメドトミジン (1 μ M, A) およびキシラジン (300 μ M, B) の 30 分間適用前後の波形。それぞれの反応の大きさを薬物適用前の 3 回の反応の平均値に対する割合で示している (C, 平均値 \pm S.E.M., n=3-5)。* $P < 0.05$ vs. control (paired Student's *t*-test)

IV 考察

デクスメデトミジンの脊髄侵害受容電位抑制効果における α_{2A} -AR の役割

α_{2A} -AR 遺伝子改変マウス (D79N) の脊髄反射電位に対する α_2 -AR 作動薬の作用を調べたところ、D79N-homo マウスの sVRP に対する抑制効果がデクスメデトミジンとキシラジンのどちらにおいても減弱していることが示された。 α_{2A} -AR は脊髄の特に後角表層に発現しており、下行性抑制神経路から放出されるノルアドレナリンおよび α_2 作動性鎮痛薬の主な作用点である (Millan, 2002)。 α_{2A} -AR に共役している Gi/o タンパク質の活性化に伴う K^+ チャネルの開口や Ca^{2+} チャネルの阻害、cAMP 量の減少がシナプス前膜からの伝達物質放出を抑制し、シナプス伝達の抑制が引き起こされると考えられている (Baba *et al.*, 2000a, b; Millan, 2002; Pertovaara, 2006; Benarroch, 2008)。sVRP は痛みを伝える侵害受容経路の神経活動を反映しており (Faber *et al.*, 1997)、sVRP の抑制は脊髄レベルでの鎮痛効果の指標と考えられている。本実験においても、 α_2 -AR 作動薬が脊髄後角表層の α_{2A} -AR を介してシナプス伝達を抑制し、sVRP を抑制したと考えられる。

しかし、D79N-homo マウスにおいて、デクスメデトミジンを高濃度 (10 μ M) 適用すると sVRP は約 40%抑制された。このことから、デクスメデトミジンの効果が α_{2A} -AR 以外の受容体も介して生じている可能性が考えられた。マウス脊髄組織では α_{2A} -AR に加えて

$\alpha_2\text{C-AR}$ が発現しており (Stone *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2002)、 $\alpha_2\text{-AR}$ 作動薬の脊髄における鎮痛作用に $\alpha_2\text{C-AR}$ が関わっているという報告がある (Philipp *et al.*, 2002)。また、デクスメドミジンはイミダゾリン骨格を有しているため、イミダゾリン受容体に対して活性を持つことが報告されている (Wikberg *et al.*, 1991)。しかし本研究では、D79N-homo マウスで観察されたデクスメドミジンによる sVRP 抑制は、非選択的 $\alpha_2\text{-AR}$ 拮抗薬のアチパメゾールで回復したが、 $\alpha_2\text{C-AR}$ に選択性の高い拮抗薬である JP1302 やイミダゾリン I_1 受容体拮抗薬のエファロキサン、 I_2 受容体拮抗薬のイダゾキサランでは回復しなかったことから、これらの受容体の関与の可能性は低い。今回用いた遺伝子改変マウスは $\alpha_{2A}\text{-AR}$ に一塩基置換を起こしたものであり、この D79N 変異した $\alpha_{2A}\text{-AR}$ はマウス脳組織において Ga サブユニットとの親和性が約 80%低下するものの、受容体としての活性を完全に失っているわけではないと報告されている (MacMillan *et al.*, 1996)。また、D79N 変異した $\alpha_{2A}\text{-AR}$ を強制発現させた AtT-20 細胞では、 K^+ チャネル活性化が選択的に阻害されるが、 Ca^{2+} チャネル抑制など他の細胞内伝達系は機能している可能性も指摘されている (Surprenant *et al.*, 1992; Lakhiani *et al.*, 1996)。そのため、デクスメドミジンが D79N 変異 $\alpha_{2A}\text{-AR}$ を介して sVRP を抑制している可能性がある。以上のことを考慮すると、デクスメドミジンによる sVRP 抑制は、その大部分が $\alpha_{2A}\text{-AR}$ を介して引き起こされていると考えられる。

キシラジンの脊髄侵害受容電位抑制効果における $\alpha_{2A}\text{-AR}$ の役割

デクスメデトミジンと同様に、キシラジンによる sVRP 抑制効果も D79N-homo マウスでは減弱していることが示された。このことから、キシラジンの脊髄侵害受容経路の抑制効果にも α_2A -AR が関与していることが明らかになった。一方、デクスメデトミジンと異なり、D79N-homo マウスでもキシラジンによる顕著な sVRP 抑制効果が観察された。この効果はアチパメゾールや JP1302、エファロキサシ、イダゾキサシのいずれを適用しても回復しなかったことから、 α_2A -AR、 α_2C -AR、イミダゾリン受容体のいずれも介していない反応と考えられる。

高濃度 (約 3 mM) のキシラジンがカエルの坐骨神経で活動電位の伝導を抑制したという報告があり (Aziz & Martin, 1978)、キシラジンが局所麻酔作用を持っている可能性がある。そこで本研究では、後根脊髄神経線維を用い非シナプス性の活動電位伝導に対するキシラジンの作用を検討した。後根神経を電気刺激すると速い波と遅い波の二相性の複合活動電位が観察された。これは今回用いた後根神経が主に求心性の知覚神経で構成されており、有髄で伝導速度の速い A 線維や無髄で伝導速度の遅い C 線維など伝導速度の異なる神経線維が混在しているためである。A 線維は筋の伸展などの情報を伝達するのに対して、C 線維は痛みの伝達に寄与している。デクスメデトミジンはこの 2 つの相のどちらの活動電位に対しても抑制効果は示さなかった。それに対してキシラジンは、二相性の両波を抑制し、特に遅い相に対してより強い抑制効果を示した。また、このキシラジンによる複合活動電位伝導

の抑制効果は C57BL/6J マウスと D79N-homo マウスのどちらでも同様に観察された。このことから、デクスメデトミジンとは異なり、高濃度のキシラジンは α_2 -AR を介さずに活動電位伝導を抑制することが明らかとなった。また、遅い相に対してより強い抑制効果が得られたことから、伝導速度が遅く痛みの伝達に関わる C 線維を優先的に抑制している可能性が示唆された。この活動電位抑制効果のメカニズムとして、電位依存性ナトリウムチャネルの阻害や、カリウムチャネル開口による過分極などの可能性が考えられる。A 線維よりも C 線維に対して強い抑制効果を示した理由としては、局所麻酔薬の作用で見られるように C 線維のほうが軸索の径が小さく無髄であるため、活動電位の伝導が抑制されやすいためと考えられる。

以上の結果から、高濃度のキシラジンによる sVRP 抑制は活動電位伝導抑制効果によってもたらされた可能性が高く、活動電位伝導抑制効果のないデクスメデトミジンは高濃度でも sVRP を完全には抑制しなかったと考えられる。

α_2 -AR 作動薬による運動反射電位の抑制効果

一方キシラジンとデクスメデトミジンによる MSR 抑制はどちらも α_2 -AR およびイミダゾリン受容体拮抗薬で回復せず、また、D79N-homo マウスでも減弱しなかった。キシラジンの MSR 抑制には高濃度で観察された活動電位伝導抑制効果が関与している可能性がある

る。また、本研究室では以前の卒業研究 (Kobayashi, 2013) で、デクスメデトミジンの MSR 抑制がアチパメゾールでは抑制されないが、ヨヒンビンで減弱することを報告している。ヨヒンビンは α_2 -AR 拮抗薬であるが、 α_2 -AR に対する特異性 ($\alpha_1 : \alpha_2 = 40 : 1$) はアチパメゾール ($\alpha_1 : \alpha_2 = 8300 : 1$) より低く (Virtanen *et al.*, 1989; Pertovaara, 2006)、5-HT 受容体に対する拮抗作用も報告されている (Millan *et al.*, 2000)。本研究室では、ラットの MSR が外因性および内因性の 5-HT で抑制されることを以前に示している (Iwasaki *et al.*, 2013)。これらのことから、デクスメデトミジンの MSR 抑制に 5-HT 受容体などの AR 以外の受容体が関与しているかもしれない。 α_2 -AR 作動薬の MSR 抑制機構を明らかにするためには、今後さらなる検討が必要である。

総括および結論

鎮静鎮痛薬である α_2 -アドレナリン受容体 (AR) 作動薬の詳細な作用機序やキシラジンの薬効種差の原因は未だ不明である。本研究では α_2 -AR 作動薬の作用とキシラジンの薬効種差における α_{2A} -AR サブタイプの役割について検討した。 α_{2A} -AR の機能的ノックアウトマウスである D79N マウスを用いて、摘出脊髄標本における反射電位および複合活動電位に対する α_2 -AR 作動薬の影響を検討した。

1. 新生マウス摘出脊髄において、キシラジンとデクスメデトミジンは、侵害受容経路の神経伝達を反映している遅発性前根電位 (sVRP) および運動や姿勢の制御を反映する単シナプス反射電位 (MSR) を濃度依存性に抑制した。デクスメデトミジンはキシラジンより力価が高く、sVRP は MSR よりも α_2 -AR 作動薬に対する感受性が高かった。
2. D79N マウスの脊髄において、デクスメデトミジンとキシラジンの sVRP 抑制効果は野生型マウスと比べて有意に減弱したが消失はしなかった。 α_2 -AR 作動薬による MSR 抑制は D79N 変異の影響を受けなかった。
3. D79N マウスにおけるデクスメデトミジンの sVRP 抑制は、 α_2 -AR 拮抗薬のアチパメゾ

ールで回復したが、 $\alpha_2\text{C-AR}$ 拮抗薬の JP1302 やイミダゾリン I_1 受容体拮抗薬のエファロキサン、 I_2 受容体拮抗薬のイダゾキサンの回復しなかった。一方、D79N マウスにおけるキシラジンの sVRP 抑制はいずれの拮抗薬でも回復しなかった。

4. 野生型および D79N マウスのどちらにおいても、デクスメデトミジンは脊髄神経線維の複合活動電位伝導に影響を与えなかった。一方で高濃度のキシラジンは複合活動電位を抑制した。

以上の結果から、デクスメデトミジンとキシラジンの脊髄反射電位抑制効果および鎮痛効果に $\alpha_2\text{A-AR}$ が重要な役割を果たしていることが示された。また、高濃度のキシラジンが活動電位の伝導を抑制することが示され、この作用が D79N マウスにおける sVRP 抑制を引き起こした可能性が考えられる。

謝辞

稿の終わりに臨み、終始ご指導とご高配を賜り本論文をご校閲頂きました北海道大学獣医学研究科比較形態機能学講座薬理学教室、乙黒兼一准教授に深く感謝申し上げます。

本研究のご指導およびご校閲頂きました北海道大学獣医学研究科比較形態機能学講座薬理学教室、伊藤茂雄名誉教授、本論文をご校閲頂きました北海道大学獣医学研究科比較形態機能学講座生化学教室、木村和弘教授、同環境獣医学講座毒性学教室、石塚真由美教授に厚く御礼申し上げます。

新海秀史氏をはじめとする技官の方々には、実験動物や実験機器を安全かつ適正に管理して頂き、より良い研究環境を提供して頂きました。北海道大学獣医学研究科の教員の方々には、公私に渡り多くの有益なご指導を賜りました。研究生活を送るにあたり、北海道大学獣医学部の事務、特にリーディング担当の方々にもひとかたならぬご協力を頂きました。皆様にこの場を借りて御礼申し上げます。

また、本研究のために尊い命を提供してくれた数多の実験動物の御霊に心より感謝の念を捧げ、安らかな眠りにつくことを願って慰霊の言葉とさせていただきます。

最後に、山口総一郎助教をはじめとする薬理学教室の教室員の方々や友人、先輩、後輩の皆様のおかげで充実した博士課程を過ごさせて頂きました。皆様に深く感謝いたします。

参考文献

Akagi H, Konishi S, Otsuka M, Yanagisawa M (1985). The role of substance P as a neurotransmitter in the reflexes of slow time courses in the neonatal rat spinal cord. *Br J Pharmacol* **84**: 663-673.

Aziz MA, Martin RJ (1978). α agonist and local anaesthetic properties of xylazine. *Zentralbl Veterinarmed A* **25**: 181-188.

Baba H, Shimoji K, Yoshimura M (2000a). Norepinephrine facilitates inhibitory transmission in substantia gelatinosa of adult rat spinal cord (part 1): effects on axon terminals of GABAergic and glycinergic neurons. *Anesthesiology* **92**: 473-484.

Baba H, Goldstein PA, Okamoto M, Kohno T, Ataka T, Yoshimura M, Shimoji K (2000b). Norepinephrine facilitates inhibitory transmission in substantia gelatinosa of adult rat spinal cord (part 2): effects on somatodendritic sites of GABAergic neurons. *Anesthesiology* **92**: 485-492.

Benarroch EE (2008). Descending monoaminergic pain modulation: bidirectional control and clinical relevance. *Neurology* **71**:217-221.

Brugger F, Evans RH, Hawkins NS (1990). Effects of N-methyl-D-aspartate antagonists and spantide on spinal reflexes and responses to substance P and capsaicin in isolated spinal cord preparations from mouse and rat. *Neuroscience* **36**: 611-622.

Dahmani S, Paris A, Jannier V, Hein L, Rouelle D, Scholz J, Gressens P, Mantz J (2008). Dexmedetomidine increases hippocampal phosphorylated extracellular signal-regulated protein kinase 1 and 2 content by an α 2-adrenoceptor-independent mechanism: evidence for the involvement of imidazoline I1 receptors. *Anesthesiology* **108**: 457-466.

Faber ES, Chambers JP, Brugger F, Evans RH (1997). Depression of A and C fibre-evoked

segmental reflexes by morphine and clonidine in the *in vitro* spinal cord of the neonatal rat. *Br J Pharmacol* **120**: 1390-1396.

Huang Y, Stamer WD, Anthony TL, Kumar DV, St John PA, Regan JW (2002). Expression of α_2 -adrenergic receptor subtypes in prenatal rat spinal cord. *Brain Res Dev Brain Res* **133**: 93-104.

Hunter JC, Fontana DJ, Hedley LR, Jasper JR, Lewis R, Link RE, Secchi R, Sutton J, Eglén RM (1997). Assessment of the role of α_2 -adrenoceptor subtypes in the antinociceptive, sedative and hypothermic action of dexmedetomidine in transgenic mice. *Br J Pharmacol* **122**: 1339-1344.

Iwasaki T, Otsuguro K, Kobayashi T, Ohta T, Ito S (2013). Endogenously released 5-HT inhibits A and C fiber-evoked synaptic transmission in the rat spinal cord by the facilitation of GABA/glycine and 5-HT release via 5-HT_{2A} and 5-HT₃ receptors. *Eur J Pharmacol* **702**: 149-157.

Jahr CE, Yoshioka K (1986). Ia afferent excitation of motoneurons in the *in vitro* newborn rat spinal cord is selectively antagonized by kynurenic acid. *J Physiol* **370**: 515-530.

Kendig JJ, Savola MK, Woodley SJ, Maze M (1991). α_2 -adrenoceptors inhibit a nociceptive response in neonatal rat spinal cord. *Eur J Pharmacol* **192**: 293-300.

Kobayashi T (2013). Inhibitory effect of adrenaline α_2 receptor agonists on reflex potentials in mouse spinal cord. *Japanese Journal of Veterinary Research* **61**: 45-46.

Kobayashi T, Otsuguro K, Yamaguchi S, Ito S (2015). Contribution of α_{2A} -adrenoceptor subtype to effect of dexmedetomidine and xylazine on spinal synaptic transmission of mice. *Eur J Pharmacol* **761**: 321-329.

Kolakowski LF Jr (1994). GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors*

Channels **2**:1-7.

Lakhlani PP, Lovinger DM, Limbird LE (1996). Genetic evidence for involvement of multiple effector systems in α_{2A} -adrenergic receptor inhibition of stimulus-secretion coupling. *Mol Pharmacol* **50**: 96-103.

Li JX, Zhang Y (2011). Imidazoline I₂ receptors: target for new analgesics? *Eur J Pharmacol* **658**: 49-56.

MacMillan LB, Hein L, Smith MS, Piascik MT, Limbird LE (1996). Central hypotensive effects of the α_{2a} -adrenergic receptor subtype. *Science* **273**: 801-803.

Millan MJ, Newman-Tancredi A, Audinot V, Cussac D, Lejeune F, Nicolas JP, Cogé F, Galizzi JP, Boutin JA, Rivet JM, Dekeyne A, Gobert A (2000). Agonist and antagonist actions of yohimbine as compared to fluparoxan at α_2 -adrenergic receptors (AR)s, serotonin (5-HT)_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D} and dopamine D₂ and D₃ receptors. Significance for the modulation of frontocortical monoaminergic transmission and depressive states. *Synapse* **35**: 79-95.

Millan MJ (2002). Descending control of pain. *Prog Neurobiol* **66**: 355-474.

Mizobe T, Maghsoudi K, Sitwala K, Tianzhi G, Ou J, Maze M (1996). Antisense technology reveals the α_{2A} adrenoceptor to be the subtype mediating the hypnotic response to the highly selective agonist, dexmedetomidine, in the locus coeruleus of the rat. *J Clin Invest* **98**: 1076-1080.

Otsuka M, Konishi S (1974). Electrophysiology of mammalian spinal cord *in vitro*. *Nature* **252**: 733-734.

Pertovaara A (2006). Noradrenergic pain modulation. *Prog Neurobiol* **80**: 53-83.

Pertovaara A (2013). The noradrenergic pain regulation system: a potential target for pain therapy. *Eur J Pharmacol* **716**: 2-7.

Philipp M, Brede M, Hein L (2002). Physiological significance of α_2 -adrenergic receptor subtype diversity: one receptor is not enough. *Am J Physiol* **283**: R287-R295.

Pineda J, Ugedo L, García-Sevilla JA (1993). Stimulatory effects of clonidine, cirazoline and rilmenidine on locus coeruleus noradrenergic neurones: possible involvement of imidazoline-preferring receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **348**: 134-140.

Saito K (1979). Development of spinal reflexes in the rat fetus studied *in vitro*. *J Physiol* **294**: 581-594.

Shafaroudi MM, McBride M, Deighan C, Wokoma A, Macmillan J, Daly CJ, McGrath JC (2005). Two "knockout" mouse models demonstrate that aortic vasodilatation is mediated via α_{2A} -adrenoceptors located on the endothelium. *J Pharmacol Exp Ther* **314**: 804-810.

Stone LS, MacMillan LB, Kitto KF, Limbird LE, Wilcox GL (1997). The α_{2a} adrenergic receptor subtype mediates spinal analgesia evoked by α_2 agonists and is necessary for spinal adrenergic–opioid synergy. *J neurosci* **17**: 7157-7165.

Stone LS, Broberger C, Vulchanova L, Wilcox GL, Hökfelt T, Riedl MS, Elde R (1998). Differential distribution of α_{2A} and α_{2C} adrenergic receptor immunoreactivity in the rat spinal cord. *J Neurosci* **18**: 5928-5937.

Surprenant A, Horstman DA, Akbarali H, Limbird LE (1992). A point mutation of the α_2 -adrenoceptor that blocks coupling to potassium but not calcium currents. *Science* **257**: 977-980.

Tamagaki S, Suzuki T, Hagihira S, Hayashi Y, Mashimo T (2010). Systemic daily morphine enhances the analgesic effect of intrathecal dexmedetomidine via up-

regulation of alpha 2 adrenergic receptor subtypes A, B and C in dorsal root ganglion and dorsal horn. *J Pharm Pharmacol* **62**: 1760-1767.

Virtanen R, Savola JM, Saano V (1989). Highly selective and specific antagonism of central and peripheral α_2 -adrenoceptors by atipamezole. *Arch Int Pharmacodyn Ther* **297**: 190-204.

Wikberg JE, Uhlén S, Chhajlani V (1991). Medetomidine stereoisomers delineate two closely related subtypes of idazoxan (imidazoline) I-receptors in the guinea pig. *Eur J Pharmacol* **193**: 335-340.

Yanagisawa M, Murakoshi T, Tamai S, Otsuka M (1985). Tail-pinch method *in vitro* and the effects of some antinociceptive compounds. *Eur J Pharmacol* **106**: 231-239.

Potential actions of α_2 adrenoceptor agonists
on α_{2A} adrenoceptor subtype.

Takeshi Kobayashi
Laboratory of Pharmacology
Department of Biochemical Sciences
Graduate School of Veterinary Medicine
Hokkaido University, Sapporo 060-0818, Japan

α_2 -Adrenoceptor (AR) agonists, dexmedetomidine (DEX) and xylazine (XYL), are clinically used for sedation and analgesia in humans and animals. The effect of xylazine shows marked species difference. α_{2A} -AR subtype is reported to be important for the effect of α_2 -AR agonist, but precise mechanism of action of α_2 -AR agonists is still unclear.

The effect of DEX and XYL by using functional α_{2A} -AR KO mice (D79N) was estimated. In the isolated spinal cord preparation of mice, DEX and XYL inhibited both slow ventral root potential (sVRP), which is thought to reflect a nociceptive pathway, and monosynaptic reflex potential (MSR). sVRP was more sensitive to these agonists than MSR. sVRP inhibitions by DEX and XYL were attenuated in D79N mice. sVRP inhibition by DEX in D79N mice was reversed by atipamezole (α_2 -AR antagonist), but not by JP1302 (α_{2C} -AR antagonist), efaroxan (imidazoline I₁ receptor antagonist) nor idazoxan

(I₂ antagonist). sVRP inhibition by XYL in D79N mice was not reversed by atipamezole, JP1302, efaroxan nor idazoxan. XYL but not DEX suppressed the conduction of compound action potential in the spinal nerves.

These results indicate that α_{2A} -AR plays an important role in sVRP inhibition by DEX and XYL. XYL also inhibits conduction of action potential at its high concentrations, which is not mediated by α_{2A} -AR.