

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10555

研究課題名(和文) リドカイン代謝産物の鎮痛機序の解明と鎮痛薬としての可能性

研究課題名(英文) Analgesic mechanism of lidocaine metabolite, and the potential as an analgesic drug

研究代表者

古谷 健太 (Furutani, Kenta)

新潟大学・医歯学総合病院・特任講師

研究者番号：40535176

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：リドカイン代謝産物monoethylglycinexylidide(MEGX)の作用を電気生理学的および行動学的アプローチによって調べた。MEGXの灌流投与は、ラット脊髄後角ニューロンにおいて興奮性神経伝達物質の放出を減少させ、抑制性神経伝達物質の放出を増加させた。この反応は同濃度のリドカインでは見られなかった。しかし後根刺激によって誘発された興奮性電流の振幅は抑制しなかった。またマウス足底切開モデルに対しMEGXをくも膜下投与したところ、疼痛反応への反応が少なくなった。以上のことから、MEGXは脊髄において、抑制性伝達物質の放出を促進することによって、鎮痛作用を発揮していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Analgesic mechanisms of systemic administration of lidocaine have not fully elucidated. We hypothesized that the one of the lidocaine metabolites, monoethylglycinexylidide (MEGX), had the analgesic action on spinal dorsal horn. First, we used whole-cell patch clamp recording from rat dorsal horn neurons. MEGX inhibited the excitatory synaptic transmission. In contrast, MEGX facilitated the inhibitory synaptic transmission in half of recording cells. However, MEGX did not affect the amplitudes of evoked-excitatory postsynaptic currents induced by the dorsal root electrical stimuli.

Then, we tested analgesic efficacy of MEGX using plantar incision model mice by behavioral analysis. Response rate to von Frey stimuli for a hindpaw was decreased by intrathecal injection of MEGX.

These results suggest that MEGX affects synaptic transmission in spinal dorsal horn neurons and exerts an analgesic action.

研究分野：神経科学

キーワード：リドカイン 脊髄後角 パッチクランプ 痛み

### 1. 研究開始当初の背景

リドカインの静脈内投与は、様々な痛みを緩和する目的で、日常診療において頻用されている。リドカインの鎮痛作用は、これまで電位依存性ナトリウムチャンネルの阻害作用によりもたらされると信じられてきた。しかし、リドカインの全身投与で鎮痛作用が発揮される血中濃度(数  $\mu\text{g/ml}$ )は、末梢神経や脊髄後角ニューロンに発現しているナトリウムチャンネルを抑制する濃度(数十~数百  $\mu\text{g/ml}$ )と比べて著しく低いため、それらのナトリウムチャンネルを阻害できない。よって、リドカイン静脈内投与によって生じる鎮痛の機序に、電位依存性ナトリウムチャンネルの関与は小さいと考えられる。

近年、リドカイン代謝産物 monoethylglycinexylidide (MEGX) にグリシントランスポーター(GlyT)-1 の阻害作用があることが報告された。さらに、GlyT 阻害薬は動物実験において、経口投与、静脈内投与、くも膜下投与などによって、骨がん性痛、神経障害性痛、急性痛など、様々な種類の痛みに対して鎮痛作用を発揮することが知られている。以上から、MEGX は、GlyT 阻害作用を介して鎮痛作用を発揮する可能性があるが、これまでに MEGX の鎮痛作用を検討した報告はない。

GlyT は GlyT-1 と GlyT-2 に分けられ、中枢神経系に広く分布する。GlyT-1 は主にアストロサイトに、GlyT-2 はグリシン作動性ニューロンのシナプス前終末に存在する。それぞれシナプス間隙からグリシンを取り込むことにより、シナプス間隙に存在するグリシン量の調節を担うと考えられている。GlyT 阻害薬のくも膜下投与によって鎮痛作用が発揮されることなどから、GlyT 阻害薬によってもたらされる鎮痛作用には、脊髄が関与していると考えられる。

GlyT 阻害薬はシナプス間隙のグリシン量を増加させ、シナプス後細胞における抑制性入力を増加させることで鎮痛作用を発揮すると考えられる。しかし、シナプス間隙にグリシンが増加すると、spill-over したグリシンが co-agonist として N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体を刺激し、痛みを惹起する可能性もあるが、これについても一定の見解はない。

リドカイン静脈内投与がもたらす鎮痛機序を検討した研究は数多く存在するものの、その代謝産物に鎮痛作用があることに着目した研究はほとんどない。我々は、MEGX は GlyT 阻害作用を介して、シナプス間隙に存在するグリシンを増加させ、抑制性入力を増加させ、鎮痛作用を発揮すると考えた。

### 2. 研究の目的

リドカイン代謝産物である MEGX がラット脊髄後角ニューロンにおいてシナプス伝達を修飾することを電気生理学的手法によって調べ、また MEGX によって鎮痛作用が発

揮されることを行動学的手法によって調べ、そのことを目的とした。

### 3. 研究の方法

・ラット脊髄後角ニューロンからのホールセル・パッチクランプ記録

Wistar 系成熟雄性ラットにウレタン麻醉した後、椎弓切除を行った。腰仙部脊髄を摘出し、冷却クレブス液中でマイクロスライサーを用いて厚さ約 600  $\mu\text{m}$  の脊髄横断スライス標本を作成した。このスライス標本を記録用チャンバーに移して、人工脳脊髄液で灌流した。電極抵抗約 10 M $\Omega$  のガラス微小電極を作成し、顕微鏡下に目的とする細胞に誘導する。軽い陰圧によってギガオームシールを形成させた後、強い陰圧をかけ細胞膜を破り脊髄後角ニューロンよりホールセル・パッチクランプ記録を行った。

・ラット炎症モデルを用いた行動学的研究

Wistar 系成熟雄性ラットの左後肢足底に CFA 100  $\mu\text{l}$  を皮下注射した。投与 24 時間後に von Frey filament による逃避閾値の低下を確認した後、イソフルランで全身麻酔を行い、MEGX もしくは Vehicle をくも膜下投与した。15, 30, 60, 120, 180 分後に von Frey filament による刺激に対する逃避反応を観察した。

・マウス足底切開モデルを用いた行動学的研究

C57BL/6 マウスにイソフルランで全身麻酔を行った。その後、足底を筋膜に至るまで切開し、Brennan らの足底切開モデルマウスを作成した。疼痛閾値の低下を確認した後、MEGX もしくは Vehicle をくも膜下投与し、von Frey filament を用いた刺激に対する逃避行動の変化を 5, 10, 15, 30, 60, 120 分後に観察した。

### 4. 研究成果

・ラット脊髄後角ニューロンからのホールセル・パッチクランプ記録

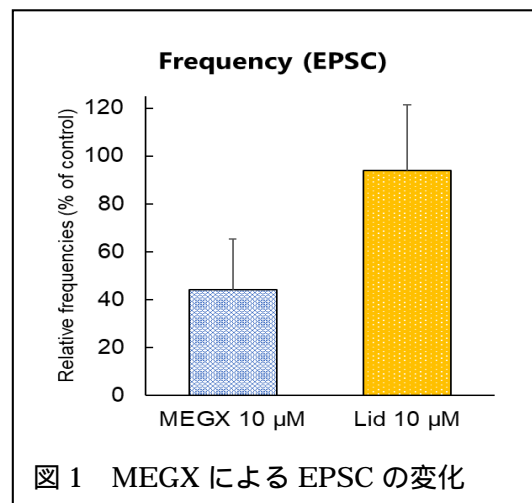


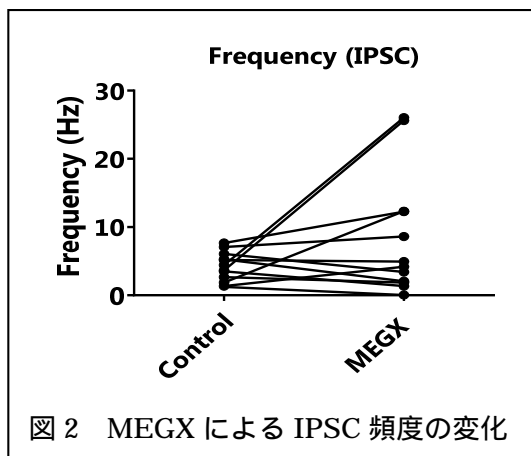
図1 MEGX による EPSC の変化

MEGX (10  $\mu\text{M}$ ) を灌流投与し、自発性興奮性シナプス後電流 (EPSC) および抑制性シ

ナプス後電流 (IPSC) に対する作用を観察した。

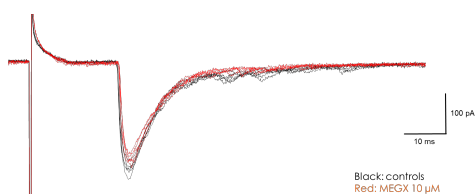
MEGX (10  $\mu$ M) の灌流投与によって、EPSC の頻度が減少した (図 1) が、その振幅は変化しなかった。また IPSC の頻度は 12 細胞中 6 細胞で増加しており (図 2) また 12 細胞中 6 細胞で外向き電流が観察された。IPSC の振幅に変化はなかった。

次に、リドカイン (10  $\mu$ M) を灌流投与し、EPSC および IPSC に対する反応を観察したが、この濃度のリドカインは EPSC (図 1) および IPSC の頻度、振幅に有意な変化をもたらさなかった。



侵害刺激に対する MEGX の作用を解析するために、神経根付スライスを作成し、誘発性興奮性シナプス後電流 (eEPSC) に対する MEGX の作用を観察した。MEGX (10  $\mu$ M) の灌流投与では、A 線維、C 線維刺激によって起こる単シナプス性 eEPSC の振幅に有意な変化は見られなかった (図 3)

図 3  
C 線維刺激によって誘発された EPSC の変化



これら電気生理学的解析では、

1. MEGX が興奮性神経伝達物質の放出を抑制すること
2. MEGX は抑制性神経伝達物質の放出を促進すること
3. 一次知覚神経から後角ニューロンへの侵害刺激の入力は抑制しないことが判明した。

・ラット炎症モデルを用いた行動学的研究

前述のように、MEGX が eEPSC の振幅を抑制しないことから、MEGX に鎮痛作用があることが確認できなかった。よって行動学的に MEGX の鎮痛作用を調べることにした。

ラット後肢に CFA を投与し、炎症モデルを

作成した。疼痛閾値の低下を確認した後、MEGX (1 もしくは 3  $\mu$ g) をくも膜下投与した。しかし予想に反し、Vehicle と比較した逃避閾値の上昇は認められなかった。

この結果を研究グループ内で検討した結果、ラットへのくも膜下投与は手技的に難しく、MEGX が正確に投与されていない可能性があること、またこれまでの報告において、炎症モデルではリドカイン自体の鎮痛作用が明らかでないことから、動物種および疼痛モデルを変更し、追加実験を行うこととなった。

・マウス足底切開モデルを用いた行動学的研究

足底切開モデルマウスの疼痛閾値の低下を確認した後、MEGX (1  $\mu$ g, 3  $\mu$ g) のくも膜下投与を行った。MEGX は Vehicle に比べ機械的刺激に対する反応性の低下をもたらした。つまり MEGX は臨床使用濃度で脊髄における鎮痛作用を有している可能性が確認された。

本研究の成果を以下にまとめる。

- ・MEGX のくも膜下投与は、術後痛モデルにおいて鎮痛作用を発揮する。
- ・MEGX は脊髄後角ニューロンにおいて、興奮性神経伝達物質の放出を減少させる。
- ・MEGX は脊髄後角ニューロンにおいて、抑制性神経伝達物質の放出を促進させる。
- ・同濃度のリドカインは、興奮性および抑制性神経伝達に影響を与えない。

以上のことから、MEGX は脊髄において神経伝達物質の放出を修飾することによって、鎮痛作用を発揮していると考えられる。同濃度のリドカインには同様の作用がなかったことから、リドカイン静脈内投与によって生じる鎮痛作用は、MEGX の脊髄への作用が担っていることが示唆された。これまでに MEGX の鎮痛作用について掘り下げた研究は存在せず、本研究が初めてである。

リドカインの鎮痛作用は現時点でも不明な点が多い。前述の通り、MEGX には GlyT の阻害作用がある可能性があり、本研究から得られたデータは、MEGX が GlyT 阻害作用を発揮することによってもたらされている可能性がある。そこで GlyT 阻害薬を用いた実験を計画したが、そもそも GlyT 阻害薬を脊髄に灌流投与した際に生じる作用に関する研究が存在しないため、その基礎データ集めから始めなくてはならなかった。それには大きな時間を費やす可能性があったため、MEGX と GlyT 阻害作用との関連を検証するには至らず、行動実験を優先した。GlyT 阻害薬を用いた実験は、今後、行っていく予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Kenta Furutani, Yoshinori Kamiya, Tatsuro Kohno, Hiroshi Baba

Lidocaine metabolite, monoethylglycinexylidide, affects synaptic transmission in rat spinal dorsal horn

Society for Neuroscience annual meeting 2016 (2016.11, San Diego)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

古谷健太 (FURUTANI, Kenta)

新潟大学・医歯学総合病院・その他

研究者番号：40535176

### (2)研究分担者

河野達郎 (KOHNO, Tatsuro)

東北医科薬科大学・医学部・教授

研究者番号：00313536

### (3)連携研究者

なし

### (4)研究協力者

なし