

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09043

研究課題名(和文) 一次求心性A神経線維をターゲットとした疼痛治療の基礎研究

研究課題名(英文) Basic research on a treatment for pain targeting primary afferent A nerve fibers

研究代表者

坪井 美行 (TSUBOI, Yoshiyuki)

日本大学・歯学部・講師

研究者番号：50246906

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)：QX-314(Q)はリドカインの誘導体であり、Na⁺チャンネルに結合して神経伝導をブロックする。Flagellin(F)は、Toll-like受容体5のリガンドである。近年、マウスにおいてQ/F溶液がA_δ神経線維を選択的に遮断することが報告されている。本研究の目的は、ラットにおいてQ/F溶液が伝導に及ぼす影響を詳細に調べることとした。

麻酔下で、大腿レベルで坐骨神経を電気刺激し、後根神経から複合活動電位を記録した。最初に、A_δ線維が投与量および注入速度依存的に遮断された。しかし、最終的に他の神経もブロックされた。これらの結果は、Q/F溶液の使用法に対してさらなる工夫を必要とすることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経、特に末梢神経が障害されたときに疼痛が発症する(神経障害性疼痛)。その疼痛は、正常時には無害な(低閾値)機械刺激により激しい痛みが生じるアロディニアを主症状とする。低閾値機械刺激情報はA_δ神経により伝導される。QX-314(Q)はリドカインの誘導体であり、Na⁺チャンネルに結合して神経伝導をブロックする。Flagellin(F)は、Toll-like受容体5のリガンドである。Q/F溶液投与は、最初にA_δ神経を容量依存的にブロックすること、神経障害モデル動物の閾値の上昇(痛くなる刺激の強さが大きくなる)が示唆され、その投与法の工夫をすればアロディニアに対する治療となることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：QX-314(Q) is a derivative of lidocaine and block the conduction by binding Na⁺ channel. Flagellin (F) is a ligand of the Toll-like receptor 5. Recently, it has been reported that Q/F solution selectively blocked A_δ fibers in mice. The purpose of this study clarifies the effects of Q/F on the conduction of the sciatic nerve and thresholds for mechanical stimulation to foot in rats.

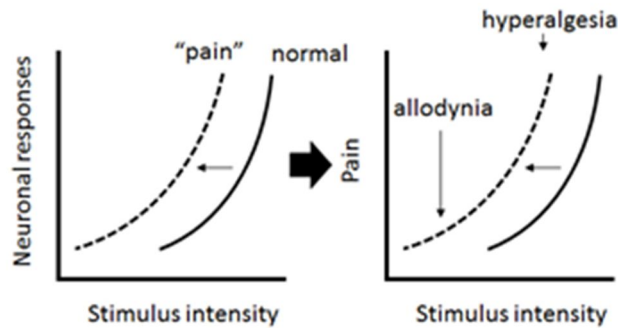
Compound action potentials were recorded from the dorsal roots of lumber 4 or 5 following the electrical stimulation of sciatic nerve (SN) at the level of the distal of the mid-thigh under gas anesthesia. A_δ fibers were first blocked by the application of Q/F solution in dose and infusion-velocity dependent manner. But the solution also finally blocked other types of fiber. Thresholds for mechanical stimulation to foot were increased in rats with SN injury at 40 min to 3 h after Q/F solution injection to foot skin. These results suggest that Q/F solution may be required any contrivance for the application.

研究分野：神経科学

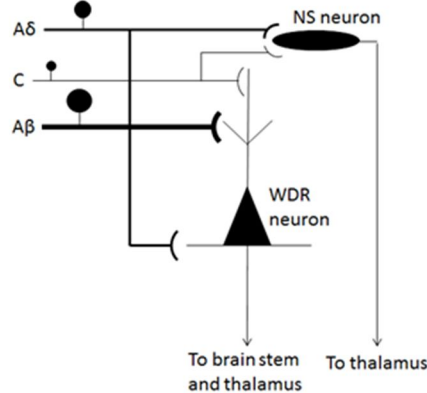
キーワード：A神経線維 QX-314 フラジェリン

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛は、正常時には無害な(低閾値)機械刺激により激しい痛みが生じるアロディニアや持続的な自発痛を主症状とする。アロディニアは、低閾値機械刺激情報が2次ニューロン以降の侵害受容性中枢神経系を駆動し疼痛が発現するとされる。その機構は、中枢ニューロンのシナプス伝達効率の変化やニューロン以外のマイクログリア細胞などの活性化によることが報告されている[1、2、3]。侵害受容性ニューロンの刺激に対する閾値が低下することによって、疼痛の感覚閾値が低下することによって発症するとされている(左図参照)。このことは、2次ニューロンが正常でも侵害情報のみを受ける Nociceptive specific (NS; 特異的侵害受容)ニューロンのみに当てはまるものである。しかし、中枢神経系で記録される侵害受容ニュー



ロンは、非侵害から侵害刺激に応答する Wide dynamic range (WDR; 広作動域)ニューロンも存在する(下図参照)。このタイプのニューロンに関して、神経障害後の変化についてはいまだ不明な点が多い。我々は、三叉神経領域の神経障害性疼痛モデル動物を使って、中枢神経系の神経応答の変化、グリア細胞の影響について研究を行ってきた[4、5]。自発放電の増加や機械刺激による誘発神経応答の増加などが記録され、グリア細胞の一部の酵素(グルタミン酸合成酵素)を不活性化すると誘発神経応答の増加が抑制された。これらの WDR ニューロンの活動上昇が疼痛発現に関与していることが示唆された。しかし、どのような入力割合の変化、A神経で伝導される入力、WDRニューロンの応答性の変化にどのように反映されているかは明らかには出来なかった。



近年、Jiらのグループが Toll 様受容体 5 (TLR5) を介した選択的 A 神経線維伝導ブロックの可能性を報告した[6]。それによると、TLR5 をそのリガンドである Flagellin (フラジェリン、F) で活性化すると、膜不透過性のリドカイン誘導体 QX-314 (Q) がニューロン

内へと移動し、後根神経節 (DRG) の主として A 線維で、ナトリウム電流が遮断されることを示している。さらに、Juliusらのグループは、電位依存性ナトリウムチャンネル 1.1 (Nav1.1) が高閾値機械受容器でもある A 神経終末に発現することが免疫組織学的検索で明らかにし、これが機械刺激に対する痛覚に関与することが報告された[7]。これらのことは、中枢神経に投射されてくる入力、特に A 神経線維の入力を選択的に遮断することが出来ることを示唆している。

2. 研究の目的

神経障害性疼痛は、正常時には無害な(低閾値)機械刺激により激しい痛みが生じるアロディニアや持続的な自発痛を主症状とする。アロディニアは、低閾値機械刺激情報が A 神経により伝導され、その情報が2次ニューロン以降の侵害受容性中枢神経系を駆動し疼痛が発現するとされる。本研究では、Q/F 溶液を用いて A 神経を選択的に伝導遮断にするツールとして使用し、末梢神経から中枢神経系への入力のうち A 神経が中枢のニューロンの反応にどのように反映されているかを調べることを目的とした。

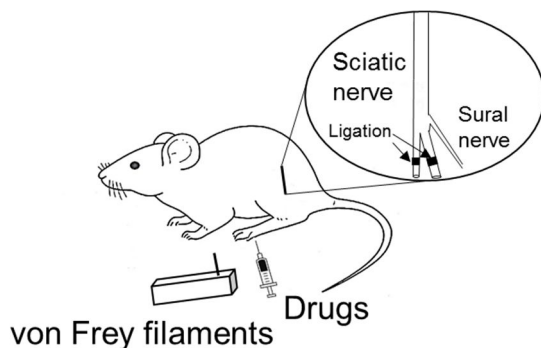
3. 研究の方法

中枢ニューロンへの末梢神経の入力のうち A 神経の比率を調べるためにことを目的に、以下のような行動学的検索、電気生理学的を中心に研究を行った。

(1) Q/F 溶液の神経障害モデルラットへの適用によって疼痛様行動を抑制できるかを行動学的観察した。

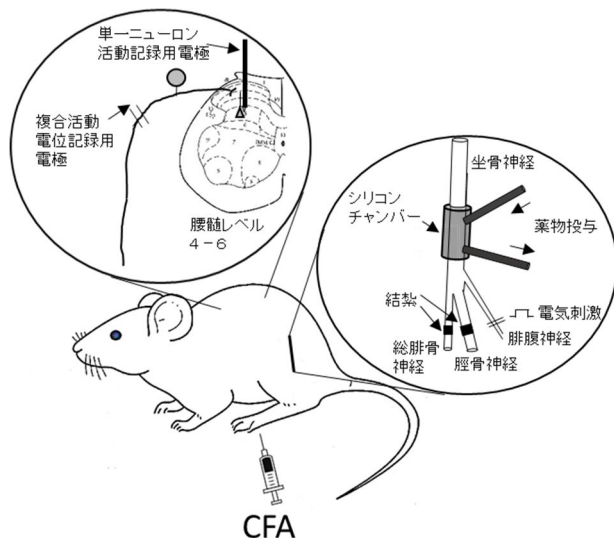
Decosterdらによって開発された SNI (Spared nerve injury) モデル動物を用いた[8]。モデル動物の作製は以下に行った。7 週齢 Sprague Dawley 系雄性ラット(体重 180 ~ 220 g)を使用した。イソフルラン麻酔(3 - 4%)下で、左側大腿皮膚を切開し、8.0 絹糸を用い総腓骨神経(common peroneal nerve)と神経と脛骨神経(tibial nerve)を結紮した。腓腹神経(sural nerve)は傷つけないように注意した。sham 群は神経露出のみで拘厄はしないものとした。定量的機械刺激は足底へ Touch-Test™ Sensory Evaluator (North Coast Medical Inc, CA) を用いて行った。5 回ずつ刺激して 3 回以上逃避行動を示した刺激強度を逃避閾値とした。神経障害性

疼痛モデル動物において術前 3 日間測定する。術後、1、3、5、7、9、11、13、15 日毎にそれぞれ



テストを行い、神経障害性と打つモデルの確立を確認した。神経障害後、7 - 15 日後において、逃避閾値を測定したのち、Q/F 溶液を左足の腓骨神経支配領域の皮下に注射した（左図参照）。注射後、20、40、60、120、180 分、24 時間後に逃避閾値を測定した。

(2) 電気生理学的検索：坐骨神経を電気刺激した時に、後根神経より複合活動電位を記録し、刺激部位と記録部位の間の坐骨神経に Q/F 溶液を適用し、選択的 A 神経成分（以後後根神経は求心性神経のみなので、II 神経群とする）の伝導ブロックが達成できているかを確認するために電気生理学的実験を行った（下図参照）。投与方法は、神経の周りに投与用の空間をカフおよびシリコンで作成し投与するカフ方式とガラスピペットで注入するピペット方式を用いた。投与前後の複合活動電位の変化を調べた。これによって、末梢神経の伝導ブロックが確実に行われているか、その時間経過を調べることができる。



イソフルラン吸入麻酔下(1.0%)、非動化(ロクロニウム臭化物質、2.5 mg/h、i.v.)で、大腿部の坐骨神経を、露出し、電気刺激用のワイヤー電極(双極、電極間距離、3 mm)を装着した。それよりも、中枢寄りの坐骨神経を露出し、薬物を灌流できるカフ、またはピペットによる注入ができるようなチャンバー(後に神経束にガラスピペットを挿入できるようにするために)を装着した。脊髄の胸椎 12 番から腰椎 4 番まで脊椎骨の背側を除去し、後根神経 4 - 5 を露出し、カフ電極(電極

間距離 4 mm) を装着し、電極間の後根神経を挫滅し、単極導出ができるようにして複合活動電極を記録した。神経活動の閾値を調べ、刺激強度(200 ~ 500 μ A、Duration 100 ~ 200 μ 秒)で 5 分毎に 16 または 64 回刺激した。1 時間後に、Q/F 溶液を投与し、投与後同様に 5 分ごとに 2 時間記録した。

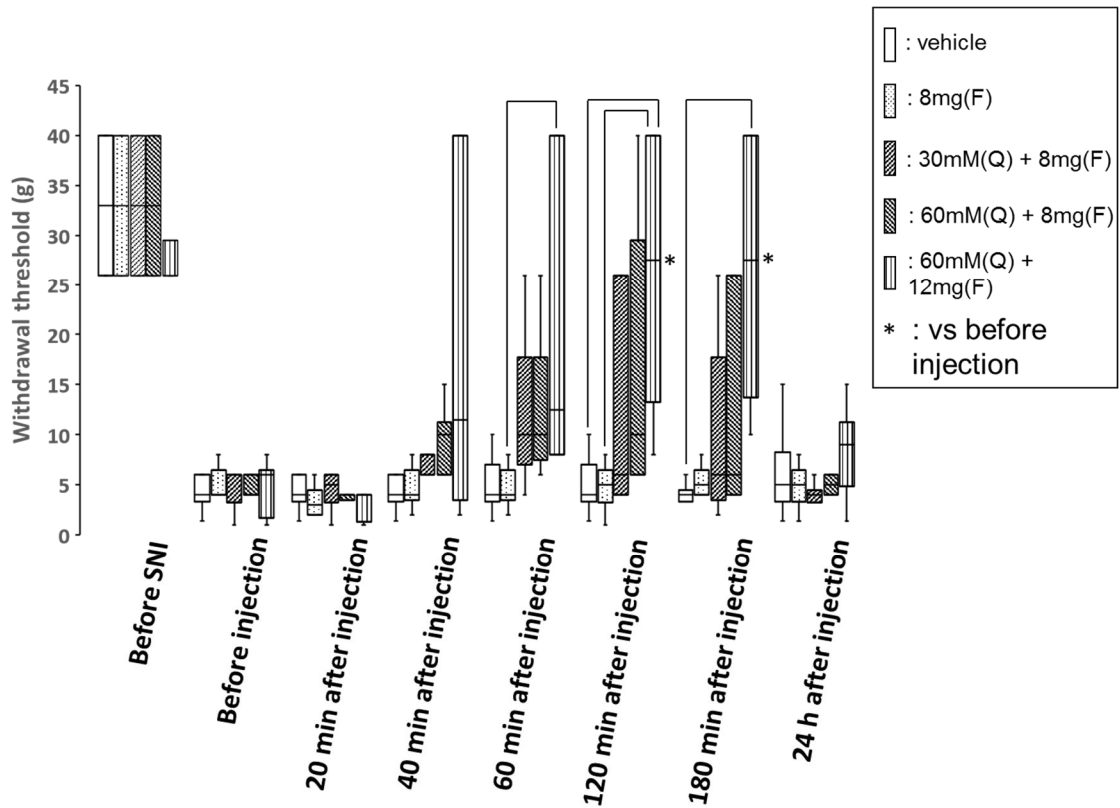
(3) 後索核ニューロン活動に対する II 神経の成分の伝導遮断の効果を電気生理学的に調べた。坐骨神経と後根神経の露出は(2)の方法と同様に行った。その後、延髄を露出し、後索核にアプローチできるようにした。後索核の一部は足からの入力を受けており、坐骨神経障害モデル動物では、自発活動の上昇や刺激に対する反応の増加が記録されている[9]。足の皮膚からの入力を受ける後索核侵害受容性ニューロンの応答特性(2 分間の自発放電、自発放電、受容野のブラシによる 1 Hz の触刺激、定量的機械刺激ができるクランプによる 30、50 g、およびピンチ刺激に対する刺激誘発反応)を単一細胞外記録した。それぞれの侵害受容性ニューロンにおいて、Q/F 溶液による伝導ブロックを行い、II 神経で伝導される入力の遮断により応答特性(自発放電と誘発反応)がどのように変化するかを調べた。

4. 研究成果

(1) Q/F 溶液の皮下投与による神経障害性疼痛閾値に対する影響

神経障害モデル動物の左足の腓骨神経支配領域への機械刺激に対する逃避閾値は、神経障害後 3 日目に手術前の逃避閾値に比べて有意に低下していた。シャム群では手術前後で有意な差はなかった。神経障害モデル動物で機械刺激に対して有意に逃避閾値が低下していた術後 7 ~ 15 日間の間で、左足の腓骨神経支配領域に Q/F 溶液を注射した後の逃避閾値を観察し次ページの図のような結果を得た。

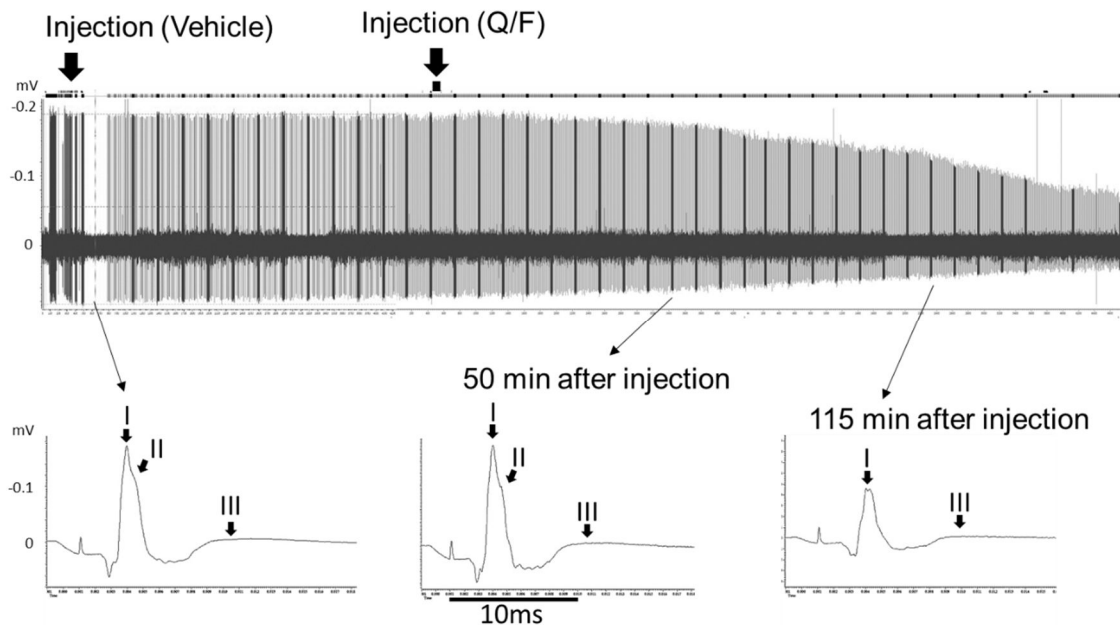
Q/F 溶液投与後 60 分から 180 分まで生理食塩水(vehicle)投与群と比較して有意な逃避閾値の上昇が容量依存性に認められた。24 時間後はそのような閾値の上昇は認められなかった。これらのことで、ラットでも Q/F 溶液の効果が確認できた。



(2) 坐骨神経へ Q/F 溶液投与による複合活動電位の変化

後根神経より複合活動電位を記録し、Vehicle 投与、Q/F 溶液投与（カフ内への灌流投与とピペット挿入による投与）の効果を記録した。

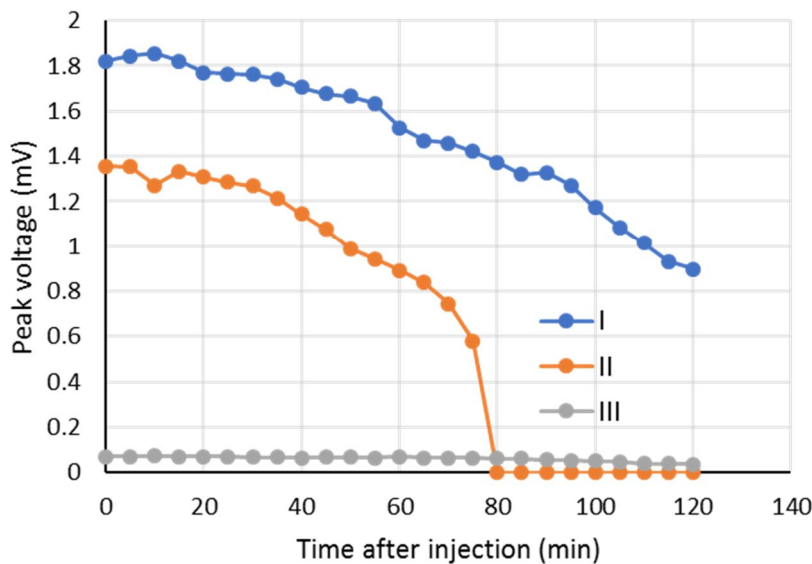
Vehicle 投与では1時間の間、複合活動電位のそれぞれの成分（I~VI 神経群）には著名な変化は認められなかった（下図参照）。



Q/F 溶液の投与では、投与の仕方、投与濃度と投与速度にその効果が大きく影響されることが解った。まず、投与方法はピペットによる注入の方が、その効果の再現性が高かった。さらに、濃度依存性が認められた（次ページの図参照）。ピペットによる投与では投与速度にも依存し、投与速度が、1.25 $\mu\text{l}/\text{min}$ の投与速度では20分ですべての成分の消失が認められることもあったので、1.0 $\mu\text{l}/\text{min}$ の速度で、投与することとした。再現性が良いピペット挿入による投与での、典型的な複合活動電位の振幅の変化のグラフを次ページに示した。Q/F 溶液投与後、I および II 神経群の振幅は両者とも減少傾向が認められたが、80分後には II 神経群の成分はほとんど記録できなくなった。120分後には III 神経成分もほとんど記録できなくなった。この傾向は、Q または F の濃度が上昇するとすべての神経群の成分の消失が間隔をあげずに生じた。Q の濃度

の上昇によるそのような現象が起こる条件の一つが、刺激強度が強いとことが認められた。

Change of peak voltage of averaged compound action potentials



カフ内灌流投与では、QおよびFの濃度を上昇させないと伝導ブロックの効果は認められなかった。しかし、その効果は、すべての神経群の成分が一度にブロックされるというものだった。

(3) 後索核ニューロンに対するQ/F溶液の投与の効果について

上記に(2)に示したように、ピペットによる投与が効果的であるが、その効果の発現を末梢神経

の電位をモニターしておく必要があることが示唆された。そのため、まず、峰分れを観察するための後根神経に3本のカフ電極を装着し、中枢側の2本の電極間を挫滅した。末梢側の電極間では挫滅はしないことにして、2種類の複合活動電位を記録し、Q/F溶液を投与し、II神経群に相当する波形の変化が、電極間を挫滅しない電極で記録した波形のどの部分の変化に相当するかを調べた。

後索核ニューロンを記録し、自発放電、一連の機械刺激に対する反応を記録した。その後Q/F溶液を投与し、20分おきに自発放電、一連の機械刺激に対する反応を記録した。II神経群成分が消失すると触刺激に対する反応がなくなった。低閾値機械受容ニューロンでは、自発放電には変化が無いが、一連の反応は消失した。このことからこのタイプの後索核ニューロンは、II神経群の入力により、その反応が成り立っていることが解った。

文献

- 1 .Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, et al. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature*. 2003;424(6950):778 783.
- 2 .Lee YW, Yaksh TL. Analysis of drug interaction between intrathecal clonidine and MK-801 in peripheral neuropathic pain rat model. *Anesthesiology*. 1995;82(3):741 748.
- 3 .Old EA, Clark AK, Malcangio M. The role of glia in the spinal cord in neuropathic and inflammatory pain. *Handb Exp Pharmacol*. 2015;227:145 170.
- 4 .Kitagawa J, Takeda M, Suzuki I, et al. Mechanisms involved in modulation of trigeminal primary afferent activity in rats with peripheral mononeuropathy. *Eur J Neurosci*. 2006;24(7):1976 1986.
- 5 .Miyamoto M, Tsuboi Y, Honda K, et al. Involvement of AMPA receptor GluR2 and GluR3 trafficking in trigeminal spinal subnucleus caudalis and C1/C2 neurons in acute-facial inflammatory pain. *PLoS One*. 2012;7(8):e44055.
- 6 .Xu ZZ, Kim YH, Bang S, et al. Inhibition of mechanical allodynia in neuropathic pain by TLR5-mediated A-fiber blockade. *Nat Med*. 2015;21(11):1326 1331.
- 7 .Cox JJ, Reimann F, Nicholas AK, et al. An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature*. 2006;444(7121):894 898.
- 8 .Decosterd I, Allchorne A, Woolf CJ. Progressive tactile hypersensitivity after a peripheral nerve crush: non-noxious mechanical stimulus-induced neuropathic pain. *Pain*. 2002;100(1-2):155 162.
- 9 .Miki K, Iwata K, Tsuboi Y, et al. Responses of dorsal column nuclei neurons in rats with experimental mononeuropathy. *Pain*. 1998;76(3):407 415.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Komiya H, Shimizu K, Noma N, Tsuboi Y, Honda K, Kanno K, Ohara K, Shinoda M, Ogiso B, Iwata K	4. 巻 97
2. 論文標題 Role of Neuron-Glial Interaction Mediated by IL-1 in Ectopic Tooth Pain	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Dent Res	6. 最初と最後の頁 467-475
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0022034517741253	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 Watase T, Shimizu K, Ohara K, Komiya H, Kanno K, Hatori K, Noma N, Honda K, Tsuboi Y, Katagiri A, Shinoda M, Ogiso B, Iwata K	4. 巻 14
2. 論文標題 Role of medullary astroglial glutamine synthesis in tooth pulp hypersensitivity associated with frequent masseter muscle contraction	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol Pain	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1744806918763270	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 -
1. 著者名 Ozawa Y, Gojoubori T, Ota H, Takemoto T, Suguro H, Nishida T, Satou S, Asano M	4. 巻 108
2. 論文標題 Bone regeneration is enhanced by the combined use of acid-electrolyzed functional water with hydroxyapatite/collagen composite	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Biomed Mater Res B Appl Biomater.	6. 最初と最後の頁 1679-1686
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbm.b.34513	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 -
1. 著者名 Okamoto N, Okumura M, Tadokoro O, Sogawa N, Tomida M, Kondo E.	4. 巻 14
2. 論文標題 Effect of single-nucleotide polymorphisms in TRPV1 on burning pain and capsaicin sensitivity in Japanese adults	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol Pain	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1744806918804439	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 -

1. 著者名 Masami Yamaguchi, Manabu Ishikawa, Yuri Aono, Tadashi Saigusa	4. 巻 40
2. 論文標題 OX2 receptors mediate the inhibitory effects of orexin-A on potassium chloride-induced increases in intracellular calcium ion levels in neurons derived from rat dorsal root ganglion in a chronic pain model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuropsychopharmacol Rep	6. 最初と最後の頁 30-38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/npr2.12094	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 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 坪井 美行、海津 彰弘
2. 発表標題 Effects of QX314 / Flagellin (Q+F) on the conduction of the peripheral nerve in rats
3. 学会等名 第9回アジア・オセアニア生理学会連合大会 & 第96回日本生理学会合同大会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshiyuki Tsuboi
2. 発表標題 Involvement of the HCN channel of GN neurons in abnormal behavior after peripheral nerve injury in rats
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshiyuki Tsuboi
2. 発表標題 Effects on compound action potentials at dorsal root after injection of QX314 / Flagellin (Q/F) solution to the sciatic nerve in rats
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上田 敬介、奥村 雅代、田所 治、金銅 英二
2. 発表標題 歯槽神経損傷に伴うアロディニア発症と延髄マイクログリア活性化の関連性
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石川 学、青野 悠里、三枝 禎
2. 発表標題 神経因性疼痛モデル動物のC線維様の神経細胞においてKClが誘発した細胞内Ca ²⁺ 量の増加に対するorexin-Aの抑制効果
3. 学会等名 第3回下総薬理学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tadashi Saigusa, Yuri Aono, Manabu Ishikawa, Masataka Kimura
2. 発表標題 OX2 receptors mediate orexin-A-induced inhibition of KCl-induced increase in intracellular calcium ion levels in neurons derived from dorsal root ganglion of rats with sciatic nerve ligation
3. 学会等名 6th Asian College of Neuropsychopharmacology (AsCNP) Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

日本大学歯学部生理学講座 坪井 美行の研究紹介ページ
<https://sites.google.com/a/nihon-u.ac.jp/tsuboiyoshiyuki/>

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	浅野 正岳 (ASANO Masatake) (10231896)	日本大学・歯学部・教授 (32665)	
研究分担者	奥村 雅代 (OKUMURA Masayo) (10362849)	松本歯科大学・歯学部・講師 (33602)	
研究分担者	三枝 禎 (SAIGUSA Tadashi) (50277456)	日本大学・松戸歯学部・教授 (32665)	