

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861363

研究課題名(和文) QX-314の脊髄後角ニューロンに対する作用と毒性に関する解析

研究課題名(英文) Effects of QX-314 on the spinal dorsal horn neurons

研究代表者

古谷 健太 (Furutani, Kenta)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：40535176

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：リドカイン誘導体であるQX-314の、ラット脊髄後角ニューロンに対する作用を電気生理学的に調べた。脊髄横断スライスからのホールセル・パッチクランプ記録では、QX-314はNMDA起因性電流の振幅を減少させた。また神経根刺激によって生じる興奮性電流の振幅を減少させた。しかし、自発性興奮性シナプス後電流の頻度や振幅には影響を与えなかった。in vivo脊髄標本からの細胞外記録では、ラット脊髄表面へのQX-314の灌流投与は、痛み刺激によって誘発される活動電位の発生頻度を減少させた。以上のことから、QX-314は脊髄後角ニューロンの興奮性を低下させることで、鎮痛作用を発揮している可能性がある。

研究成果の概要(英文)：I examined the effects of QX-314 on rat dorsal horn neurons, where primary afferents terminate. First, I used whole-cell patch clamp recording from the dorsal horn neurons of transverse spinal cord slices. QX-314 decreased the amplitude of N-methyl-D-aspartate induced currents and of the excitatory postsynaptic currents evoked by the dorsal root stimulation. QX-314, however, affected neither the frequency nor the amplitude of spontaneous excitatory postsynaptic current. Then, I used in vivo extracellular recording from the rat spinal cord. QX-314 decreased the frequency of action potentials induced by noxious stimulation to the rat hindpaw, especially in nociception specific neurons. These results suggest that QX-314 may act as an analgesic drug by inhibition of excitatory responses in dorsal horn neurons.

研究分野：麻酔科学

キーワード：局所麻酔薬 脊髄 パッチクランプ QX-314

1. 研究開始当初の背景

QX-314 (N-[2,6-dimethylphenyl carbamoylmethyl]-triethylammonium) は局所麻酔薬 lidocaine の誘導体であるが、常にイオン化しているため細胞膜を通過できず、細胞内に存在する局所麻酔薬の作用部位には到達できない。よって、細胞内投与しなければナトリウムチャンネル阻害薬として機能しない。しかし、2007年にBinstokら¹はQX-314が運動神経や触覚に影響を与えず、痛覚のみを遮断できる「夢の局所麻酔薬」となりうる可能性を示した。つまり、capsaicin (Cap) などのアゴニストが TRP (transient receptor potential) チャンネルを開くと、そのチャンネルポアから QX-314 が細胞内へ導かれることによって、鎮痛作用を発揮できることがわかった。TRPV1 は侵害受容線維にのみ発現しているため、触覚や運動機能に影響を与えずに鎮痛作用を発揮できる。このような作用は局所投与、神経周囲投与、くも膜下投与で確認されており、臨床応用への期待は大きい。

その反面、QX-314 のくも膜下投与に関しては安全性や鎮痛作用を疑問視する報告もある。例えば、5~10 mM の QX-314 をくも膜下投与されたラットのほぼ全例で不穏、ジャンプ、発声などの異常行動が起こり²、マウスの 17-33% が死亡したという報告もある。また、神経障害性疼痛モデルラットを用いた研究では、Cap + QX-314 の神経周囲投与で鎮痛作用が発揮されるものの、くも膜下投与では鎮痛作用は明らかではなかった²。このように、QX-314 は脊髄において、他の局所麻酔薬とは異なった薬理作用を有しており、それがくも膜下投与における異常行動や鎮痛作用の違いとして現れている可能性がある。

局所麻酔薬は単なるナトリウムチャンネル阻害薬ではないことがわかっている。研究代表者は局所麻酔薬が脊髄後角ニューロンの NMDA 起因性電流を抑制することを報告した³。また lidocaine は、脊髄において TRP チャンネルを介して興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の放出を促進するという報告⁴がある。QX-314 も、他の局所麻酔薬と同様に多彩な作用を有している可能性がある。

2. 研究の目的

QX-314 が脊髄後角ニューロンのシナプス伝達機構に与える影響を電気生理学的なアプローチから明らかにする。それによって、QX-314 の臨床応用に向けた基礎を固めることができる。

3. 研究の方法

(1) 脊髄横断スライス標本からのホールセル・パッチクランプ記録

Wistar系成熟ラットにウレタン麻酔した後、椎弓切除を行った。腰仙部脊髄を摘出し、冷却 Krebs 液中でマイクロスライ

スライスを作成した。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 10MΩ 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した。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³。

(2) *in vivo* 脊髄標本からの細胞外記録

当初は *in vivo* パッチクランプ記録を予定したが、*in vivo* パッチクランプ記録には技術的困難が伴うとともに解析に長期間を要する懸念があったため、まずは細胞外記録を行い、QX-314 に対する応答の変化を確認することにした。Wistar系成熟ラットにウレタン麻酔した後、椎弓切除を行った。腰仙部脊髄を露出し、脊柱固定器に固定した。硬膜を切開し、脊髄表面を人工脳脊髄液で灌流した。電極刺入部の軟膜を剥離し、細胞外記録用の電極を刺入した。ラット後肢に加えた刺激に対して電位が記録できる部位まで電極を進めた。

4. 研究成果

(1) 脊髄横断スライス標本からのホールセル・パッチクランプ記録

NMDA 起因性電流に対する QX-314 の作用

研究代表者は、局所麻酔薬が NMDA 起因性電流を抑制する作用があることを報告している³。QX-314 も局所麻酔薬の誘導体であるため、NMDA 起因性電流を抑制するのではないかと考え、NMDA 起因性電流に対する QX-314 の作用を調べた。

QX-314 (2 mM) は NMDA 起因性電流の振幅を投与前の 80% まで抑制することが分かった (図 1)。その反応は、数分の経過で投与前の水準まで戻った。

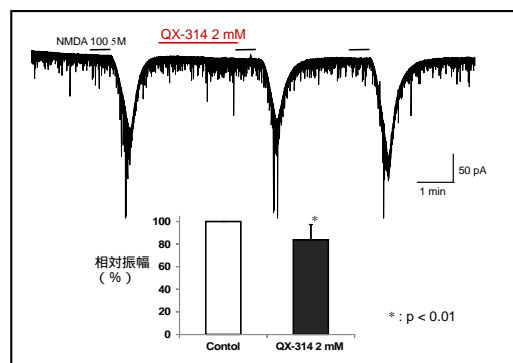


図 1: NMDA 起因性電流と QX-314

自発性興奮性シナプス後電流に対する QX-314 の作用

次に、自発性興奮性シナプス後電流 (excitatory postsynaptic current; EPSC) に対する QX-314 の作用を調べた。lidocaine は EPSC の頻度が増加することが知られてい

る⁴が、QX-314 (2 mM)の灌流投与によって、EPSCの頻度・振幅に有意な変化は見られなかった(それぞれ投与前の105%、98%)。しかし、17細胞中12細胞で、振幅が数pAの内向き電流を生じた。

神経根刺激により誘発したEPSC (evoked-EPSC) に対するQX-314の作用

神経根付きスライス標本を用いて解析を行った。QX-314が局所麻酔薬として作用した場合、evoked-EPSCの振幅が低下すると予想していた。Cap (0.5 μ M) + QX-314 (1 mM)を灌流すると、evoked-EPSCの振幅は低下し、その後しばらくevoked-EPSCが観察できなくなった。またQX-314 (1 mM)の単独投与では、evoked-EPSCの振幅が低下する傾向が見られたが、現時点では標本数が不足しており、A、C線維それぞれに対するQX-314の作用を論ずることは難しい。

lidocaineの灌流投与によって、脊髄後角ニューロンでは、EPSCの頻度が増加することが知られている⁴。研究開始当初は、QX-314によってlidocaineと同様の反応が起こり、そのことがQX-314の毒性に繋がっているのではないかと考えていた。しかし、本研究の結果は、QX-314は興奮性入力を変化させないか、やや減少させるという結果になり、毒性との直接的な関連を見いだせなかった。

反面、QX-314には神経細胞の興奮を抑制する可能性が示唆され、脊髄での鎮痛作用機序の1つと考えることができる。

(2) *in vivo*脊髄標本からの細胞外記録

触刺激、圧刺激、侵害刺激 (pinch 刺激) の3種類の刺激に対する反応様式から、細胞を分類した。

主として侵害刺激に反応するニューロンでは、Cap (0.5 μ M) + QX-314 (1 mM)の灌流投与によって、ラット後肢pinch刺激に対する活動電位の発生頻度が投与前の39%に減少した(図2)。

低閾値作動性ニューロン、広域作動性ニューロンにおいても、pinch刺激に対する活動電位の頻度は投与前の70%程度まで減少した。

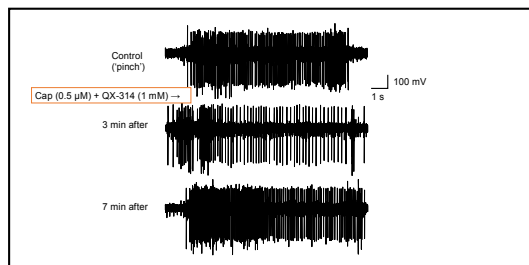


図2: pinch刺激によって発生した活動電位に対するcapsaicin+QX-314の作用

QX-314は細胞膜を通過できないため、局所麻酔薬としての薬理作用をほとんど持たな

いが、Capと共投与すると、Capによって活性化したTRPV1受容体のチャネルポアを介して細胞内に入り、局所麻酔薬の作用部位に到達することで、QX-314は局所麻酔作用を発揮できる¹。Pinch刺激はA線維、C線維によって伝達されること、TRPV1受容体がC線維に発現していることを踏まえると、Cap+QX-314がC線維をブロックした結果、活動電位の発生頻度を減少させたのではないかと推察している。

細胞外記録の結果からも、QX-314は脊髄において鎮痛作用を有している可能性が示唆される。

(1)、(2)を総合すると、QX-314は脊髄後角ニューロンでの興奮性シナプス伝達の一部を抑制すること、侵害刺激によって発生する神経細胞の興奮を抑制することが示された。それらの機序がQX-314の脊髄における鎮痛作用に寄与しているものと考えられる。なお、QX-314の脊髄後角ニューロンに対する作用と鎮痛機序との関連を調べた研究は本研究が初めてである。

しかしながら、QX-314のくも膜下投与によって生じる毒性につながるデータを得ることはできなかった。少なくとも*in vivo*標本にQX-314を灌流投与した限りにおいては、そのラットが死亡するなどの異常は生じなかった。QX-314に限らず、他の局所麻酔薬にも神経毒性があることが分かっているが、これらの機序も不明のままである。lidocaineのように興奮性伝達物質の放出が過剰となる⁴ことがその一つの機序と推定したが、QX-314では同様の作用を認めなかった。本研究の結果からは、毒性に関して明確な結論を導くことはできない。

現時点では、QX-314のC線維とA線維に対する作用を解析するには標本数が不足している。また疼痛モデル動物での解析が終了していない。今後、これらのデータを追加し、QX-314の脊髄における作用機序をさらに掘り下げ、臨床応用への橋渡し研究にしたいと考えている。

<引用文献>

1. Binshtok AM, et al. Inhibition of nociceptors by TRPV1-mediated entry of impermeant sodium channel blockers. *Nature* 2007; 449: 607-10
2. Shen J, et al. Differential effects of peripheral versus central coadministration of QX-314 and capsaicin on neuropathic pain in rats. *Anesthesiology* 2012; 117: 365-80
3. Furutani K, et al. Bupivacaine inhibits glutamatergic transmission in spinal dorsal horn neurons. *Anesthesiology* 2010; 112: 138-43
4. Piao LH et al. TRPA1 activation by

lidocaine in nerve terminals results in glutamate release increase. Biochem Biophys Res Commun 2009; 379: 980-4

研究者番号：

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)

古谷健太、紙谷義孝、馬場洋、河野達郎
リドカイン代謝産物
monoethylglycinexylidide の脊髄に対する
作用の解析
日本麻酔科学会第 61 回学術集会
2014 年 5 月 17 日
パシフィコ横浜 (神奈川県、横浜市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古谷 健太 (FURUTANI, Kenta)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号：40535176

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()