

キノホルムによる脊髄後角における疼痛増強作用について

谷口 亘 (和歌山県立医科大学整形外科学講座)
泉 尚史 (関西医療大学保健医療学部神経病研究センター)
西尾 尚子 (和歌山県立医科大学整形外科学講座)
山中 学 (和歌山県立医科大学整形外科学講座)
曽根勝真弓 (和歌山県立医科大学整形外科学講座)
太地 良 (和歌山県立医科大学整形外科学講座)
筒井 俊二 (和歌山県立医科大学整形外科学講座)
中塚 映政 (関西医療大学保健医療学部疼痛医学分野)
山田 宏 (和歌山県立医科大学整形外科学講座)
吉田 宗平 (関西医療大学保健医療学部神経病研究センター)

研究要旨

我々はこれまで Clioquinol が脊髄前角細胞における興奮性シナプス伝達に対し、どのような作用を与えるか whole-cell patch-clamp 法を用いて電気生理学的な解析を行った。その結果 Clioquinol は脊髄前角細胞に投射するシナプス前終末部の膜上に存在する電位依存性 N 型カルシウムチャンネルに作用し、カルシウムを流入させることによってグルタミン酸の放出を増強させることを明らかにした。そこで今年度は脊髄後角細胞における興奮性シナプス伝達に対する Clioquinol の作用を検討した。Clioquinol の単独灌流投与は脊髄後角細胞の興奮性シナプス後電流の発生頻度を増強させ、振幅には影響を与えなかった。またグルタミン酸受容体拮抗薬である CNQX 存在下に Clioquinol を投与したところ、興奮性シナプス後電流は消失したままで変化は見られなかった。さらに Na チャンネル拮抗薬であるテトロドトキシン存在下に Clioquinol を投与したところ、微小興奮性シナプス後電流の発生頻度を増強させ、振幅に影響を与えなかった。最後に ZnCl₂ 存在下で Clioquinol を投与したところ、興奮性シナプス後電流の発生頻度が単独投与時と同様に増強したが、その程度は単独投与時と比較してより強い増強を示した。以上のことから Clioquinol は、脊髄後角細胞に入力する神経線維終末部に作用し、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の放出を増強させ、その作用はキレート化によりさらに増強することが示唆された。

A. 研究目的

亜急性脊髄視神経症 (Subacute-Myelo-Optico-Neuropathy : SMON) の原因物質はキノホルムと判明している。しかし下肢痛などの知覚異常といった SMON の症状に関する発生機序は未だ不明な点が多い。本研究は Clioquinol が脊髄後角細胞の興奮性シナプス伝達に対しどのような作用を及ぼすかを明らかに

することを目的に、ラット脊髄横断スライスに whole-cell patch-clamp 法を適用し、電気生理学的検討を行った。

B. 研究方法

1. 脊髄横断スライス標本の作製

幼弱 Sprague-Dawley ラット (9 日 ~ 11 日齢) にウ

レタンを腹腔内投与し、腰仙部の椎弓切除を行い、1.0~1.5 cmの長さで脊髄を摘出し、酸素付加した2~4の人工脳脊髄液に浸した。実態顕微鏡視下に脊髄から硬膜、前根、後根、くも膜、軟膜を除去した後、脊髄を寒天ブロックに作った溝に設置し、マイクロスライサーを用いて、厚さ約500 μMの脊髄横断スライス標本作製した。切片化した脊髄スライスを記録用のチャンバーに移し、グリッドで固定後、酸素付加した人工脳脊髄液で5~10 ml/分の速度で灌流した。

2. 脊髄後角細胞からのパッチクランプ記録

赤外線システム含有の顕微鏡を用いて、脊髄後角層の細胞をモニターで観察しながら、微小ガラス電極を刺入、whole-cell patch-clamp法を適用し、単一細胞からデータ記録を行った。記録用電極には電極内液を充填した先端抵抗5~12 Mの微小ガラス電極を用いた。得られた記録電流はパッチクランプ用アンプ、A/D変換器、データ記録・解析用ソフトを用いて、記録・解析した。膜電位は-70 mVに電圧固定した。実験結果は平均±標準誤差で表し、検定はpaired student's t-testおよびunpaired student's t-testを用いた。危険率5% (P<0.05)をもって有意と判定した。

(倫理面への配慮)

本実験計画は和歌山県立医科大学動物実験委員会の審査を受けて承認された。

C. 研究結果

膜電位固定下(-70 mV)では、記録した全ての細胞において自発性興奮性シナプス後電流(spontaneous excitatory postsynaptic current: sEPSC)が観察された。このsEPSCはグルタミン酸受容体拮抗薬である6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX)存在下で完全に消失されることから、神経終末内のシナプス小胞から放出された興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸を介した反応であることが示された。

最初にClioquinol (100 μM)を5分間単独灌流投与しsEPSCの発生頻度と振幅に対する影響を調べたところ、ClioquinolはsEPSCの発生頻度を有意に増強させ、振幅に影響を与えなかった(n=20) (Fig. 1A)。Clioquinol投与後のsEPSCの発生頻度並びに振幅は、

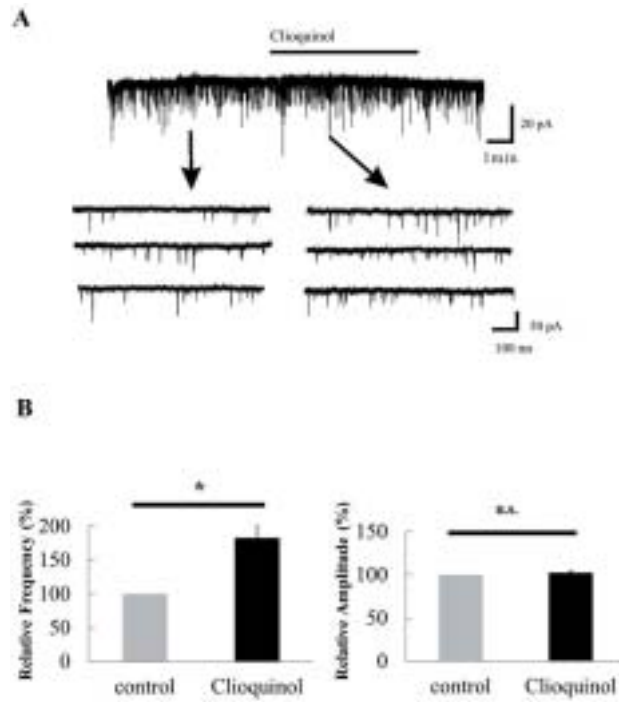


Fig. 1

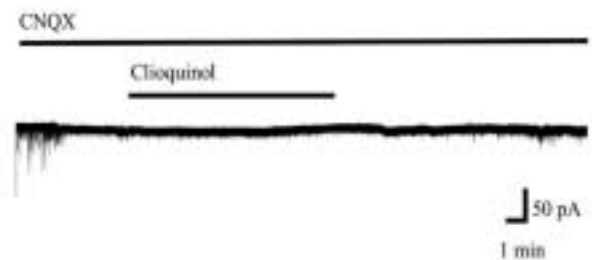


Fig. 2

それぞれコントロールの $183.2 \pm 13.3\%$ ($p < 0.05$)、 $102.6 \pm 1.67\%$ ($p > 0.05$)であった (Fig. 1B)。

一方、グルタミン酸受容体拮抗薬であるCNQX (20 μM)存在下では、sEPSCは完全にブロックされ、Clioquinolを投与しても変化はみられなかった(n=4) (Fig. 2)。次にClioquinolのシナプス前作用を解析するためにNaチャンネル拮抗薬であるテトロドトキシン(tetrodotoxin: TTX)存在下(1 μM)でClioquinolを投与したところ、微小興奮性シナプス後電流(miniature excitatory postsynaptic current: mEPSC)の発生頻度を有意に増強させ、振幅に影響を与えなかった(n=12) (Fig. 3A)。Clioquinol投与後のmEPSCの発生頻度並びに振幅は、それぞれコントロールの $142.2 \pm 16.0\%$ ($p < 0.05$)、 $99.61 \pm 3.09\%$ ($p > 0.05$)であった (Fig. 3B)。さらにClioquinolは銅や亜鉛に選

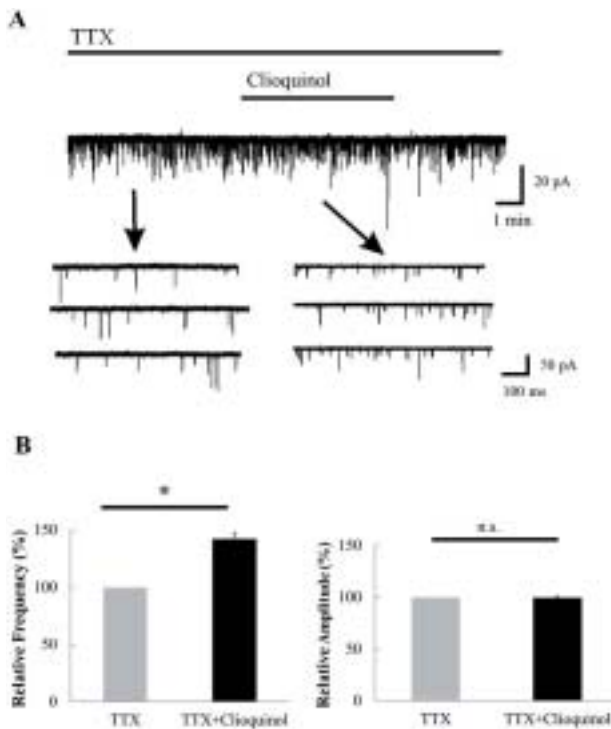


Fig. 3

拮抗的キレート作用を有することから、 $ZnCl_2$ 存在下で Clioquinol をキレート化しての投与実験をおこなった。 $ZnCl_2$ 存在下 ($10 \mu M$)での Clioquinol 投与時の sEPSC は単独投与時と同様に発生頻度の増強を示し、振幅に影響を与えなかった ($n=17$) (Fig. 4A)。Clioquinol 投与後の sEPSC の発生頻度並びに振幅は、それぞれコントロールの $291.26 \pm 32.3\%$ ($p < 0.05$)、 $104.5 \pm 2.49\%$ ($p > 0.05$)であった (Fig. 4B)。これは Clioquinol 単独投与と比較した場合、より強く増加していた。

D. 考察

本研究は脊髄後角細胞に whole-cell patch-clamp 法を適用し、Clioquinol の興奮性シナプス伝達に対する作用を検討した。我々は以前、Clioquinol が脊髄前角細胞に投射するシナプス前終末部に作用し、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の放出を増強させることを明らかにし報告した¹⁾。前角細胞における作用同様、後角細胞においても Clioquinol の単独投与は sEPSC の発生頻度を増強させ、振幅には影響を与えなかった。また CNQX 存在下では sEPSC は完全に消失し、Clioquinol 投与による変化は見られなかった。

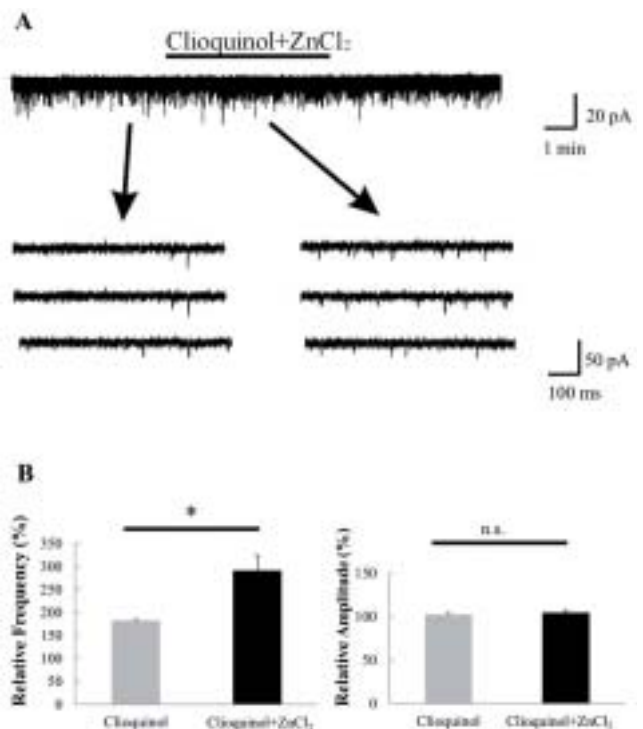


Fig. 4

さらに神経終末部における作用を検討するため Na チャネルブロッカーである TTX 存在下で Clioquinol の作用を解析した。TTX 存在下では活動電位が阻害されるため mEPSC が観察できるが、Clioquinol は TTX 存在下において mEPSC の頻度を増強させ、振幅を変化させることはなかった。以上のことより、Clioquinol は脊髄後角細胞に投射している神経終末部に作用し、グルタミン酸の放出を促進させることが判明した。SMON の主症状に疼痛、異常感覚障害といった下肢感覚障害があるが、Clioquinol により神経終末部からのグルタミン酸放出が促進した結果、脊髄後角細胞の sEPSC を増強することによって興奮が持続することにより、何らかの下肢感覚障害を呈していると考えられる。

また Clioquinol には銅、亜鉛に対して選択的キレート作用があり、神経細胞の傷害を増強させるということが報告されている²⁾。一方、このキレート作用がアルツハイマー病などの神経変性疾患に効果があると近年は注目されている。今回の実験では $ZnCl_2$ 存在下で Clioquinol のキレート作用による反応は、Clioquinol 単独投与時よりも有意に sEPSC の発生頻度を増強させた。このことから Clioquinol のキレート化は脊髄後

角において興奮性シナプスの伝達作用をより増強し、下肢感覚障害を強くするものではないかと考える。

E. 結論

キノホルムは脊髄後角細胞に入力する末梢神経線維の中枢端終末部に作用し、興奮性神経伝達物質のグルタミン酸の放出を促進することが判明した。加えて、キノホルムの持つキレート作用は脊髄後角におけるシナプス伝達をさらに増強することが示唆された。これらの脊髄後角における作用が下肢痛など異常感覚の発生機序に関連している可能性が考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 泉尚史, 谷口亘, 西尾尚子, 山中学, 曾根勝真弓, 太地良, 筒井俊二, 中塚映政, 山田宏, 吉田宗平: 脊髄後角における興奮性シナプス伝達に対するキノホルムの作用. 第41回脊髄機能診断研究会, 2020.2. 東京

2) Izumi N, Taniguchi W, Yamanaka M, Nishio N, Taiji R, Murata S, Tsutsui S, Nakatsuka T, Yamada H: Clioquinol enhances excitatory synaptic transmission in spinal dorsal horn neurons by activating TRPA1. International Symposium on TRP Ion Channel at Wakayama, 2020.1. Wakayama

3) 泉尚史, 谷口亘, 西尾尚子, 山中学, 曾根勝真弓, 筒井俊二, 中塚映政, 山田宏, 吉田宗平: 脊髄後角におけるキノホルムの興奮性シナプス伝達増強作用. 第41回日本疼痛学会, 2019.7. 名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 文献

1) 泉尚史, 谷口亘, 山中学, 曾根勝真弓, 西尾尚子, 中塚映政, 吉田宗平, 吉田宗人. 脊髄前角細胞におけるキノホルムの興奮性シナプス伝達増強作用. 脊髄機能診断学. 2015. 36: 40-46.

2) Arbiser JL, Kraeft SK, van Leeuwen R, Hurwitz SJ, Selig M, Dickersin GR, Flint A, Byers HR, Chen LB. Clioquinol-zinc chelate: a candidate causative agent of subacute myelo-optic neuropathy. Mol Med. 1998. 4 (10): 665-70.