

氏名・(本籍)	金井裕彦(福井県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博士 第130号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成5年3月23日
学位論文題目	An analogue of spider toxin selectively suppresses hippocampal epileptic discharges induced by quisqualate (キスカル酸投与による海馬発作性放電に対するジョロウグモ毒素アナログの選択的抑制効果)

審査委員	主査 教授	横田 敏 勝
	副査 教授	半田 謙 二
	副査 教授	高橋 三 郎

論 文 内 容 要 旨

[目 的]

中枢神経系のグルタミン酸受容体は薬理的にNMDA型(N-methyl-D-aspartate)、キスカル酸(QUIS)型(またはAMPA型; α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-propionic acid)、カイニン酸(KA)型の3つのイオンチャンネル型と代謝型グルタミン酸受容体に分けられる。ジョロウグモ毒腺中より発見されたジョロウグモ毒素(JSTX)は、*in vitro*でラット海馬推体細胞のnon-NMDA型受容体に対して選択的で非競合的拮抗作用を持つといわれる。ところで、てんかんに関して重要な部位である海馬は脳内でグルタミン酸受容体が最も豊富な部位でもあることが知られている。グルタミン酸受容体作動薬はラットなどに投与すると、海馬を始め辺縁系にてんかん性異常放電が誘発され、けいれんが発現することから、側頭葉てんかんの動物モデル作製に用いられる。

本研究ではラットにグルタミン酸受容体の各サブタイプに特異的な作動薬を投与し、行動観察と海馬深部脳波記録により、*in vivo*におけるJSTXの抗けいれん効果とその選択性を検討することを目的とした。

[方 法]

Wistar系雄性ラット18匹にペントバルビタール麻酔下で、深部電極を右背側海馬に脳定位的に刺入し、右側脳室に留置した薬物注入用カテーテルとともに固定した。回復期間として2~4週間経たラットを実験に用いた。グルタミン酸受容体作動薬は、NMDA型アゴニストのキノリン酸(QUIN30 μ g)、QUIS/AMPA型のキスカル酸(QUIS30 μ g)を用いた。JSTXの誘導体は東京大学薬学部の中嶋暉躬教授より分与された1-naphthyl acetyl spermine(1-NA-spm)を用いた。薬物は生食加リン酸緩衝液(PBS)に溶解して投与した。

実験ではPBSまたは1-NA-spm(5または20 μ g/2.5 μ l/rat)を1分間で注入し、その5分後に各作動薬を同様に右側脳室に注入した。そして無麻酔無拘束下で最低2時間の行動観察と脳波の同時記録を行った。

[結果]

QUISを投与すると、薬物投与直後から海馬 θ 波が消失し不整な脳波となり、1分前後で棘波が出現し、約5分で棘波の群発が連続的に見られる。そして約15分で全般性けいれんに至る。けいれんは重積状態となり、死亡する場合もある。発作性放電は数時間続いたのち、徐々に θ 波が回復して発作は終了する。行動的にはラットは円周を描いて回ったり、無動を示したりし、chewingやwet dog shakeが出現し、全身けいれん(GTCS)に移行する。QUINでは注入直後に一過性にけいれんや跳躍があり、速やかに脳波の平坦化が見られる。そして疾走発作、GTCSの出現が見られ、その直後より多棘波が約1分間程出現し、再び平坦な脳波に移行するという発作パターンが繰り返される。発作と発作の間にはrooting、sniffingといった活動の増加が見られる。

1-NA-Spm $20\mu\text{g}$ のみを投与すると海馬 θ 波の出現量は減少し、時には散発的に鋭波が見られたが、けいれんは起こさず、軽度の鎮静を見るにとどまった。1-NA-Spmの前投与は、QUISの発作性放電を強力に抑制した。投与後30分間の海馬発作性放電の出現量(%時間)では、1-NA-Spm $20\mu\text{g}$ を前投与するとvehicle投与に対しては $80\rightarrow 11\%$ ($p < 0.001$)、 $5\mu\text{g}$ では $80\rightarrow 69\%$ と、用量依存的な抑制効果が得られた。一方QUINの発作波に対しては1-NA-Spm $20\mu\text{g}$ の前投与は効果がなかった($19\rightarrow 20\%$)。また、行動観察では1-NA-Spm $20\mu\text{g}$ の前投与により、QUISではGTCS出現潜時は有意に延長し、GTCS出現率は $100\rightarrow 33\%$ に、死亡率は $67\%\rightarrow 0\%$ に減少した。一方QUINでは、GTCS出現潜時、発作出現率、死亡率のいずれについても1-NA-Spm $20\mu\text{g}$ の抑制効果は見られなかった。

[考察]

QUIS型受容体拮抗薬としてこれまで知られている拮抗薬(GDEE、キノキサリン誘導体)はin vivoにおいて抗けいれん作用が弱く、あるいはNMDA型にも拮抗作用を持つといった問題があり、優秀な拮抗薬は見いだされていない。この実験に用いたJSTXの誘導体(1-NA-Spm)はロブスターの神経筋シナプスのキスカル酸型受容体に対して、比較的高力価で可逆的な作用を示し、ジョロウグモ毒素の主成分であるJSTX-3よりも単純な構造のため合成しやすいという特徴を持つ。この実験で脳波上、1-NA-SpmはQUISによる海馬発作性放電に対し用量依存的な抑制効果を持ち、高用量ではほぼ完全にそれを抑制でき、行動上のけいれんの出現も抑制した。一方QUINによる海馬発作性放電には無効であり、かつけいれんおよび異常行動に対しても効果は見られなかった。すなわち、1-NA-SpmはQUIS/AMPA型受容体作動薬に選択的で強力な抗けいれん作用を持つことが初めて直接的に示された。

[結論]

JSTX誘導体は選択的で強力な抗けいれん作用を示し、更にその用量では薬物自体による明らかな行動上の変化をひき起こさなかった。

このような性質から、JSTX誘導体はてんかんの病態の研究や治療薬開発において、新しいnon-NMDA型受容体拮抗薬として有用であると思われる。

学位論文審査の結果の要旨

脳のイオンチャンネル型グルタミン酸受容体には、NMDA型(N-methyl-D-aspartate)、キスカル酸(QUIS)型、カイニン酸型があり、後の2つはnon-NMDA型と一括されている。最

近海馬のてんかん原性に関連したnon-NMDA型受容体の変化が注目されている。ジョロウグモ毒素 (JSTX) はQUIS型受容体にin vitroで選択的拮抗作用を示し、non-NMDA型受容体拮抗薬の候補とされている。この毒素はポリアミンを含んだ新奇なもので、non-NMDA型受容体に対する作用機序は未だ明らかにされていない。JSTXはin vivoでも抗けいれん作用を有すると期待される。また、脳室内投与すると海馬ニューロンのnon-NMDA型受容体に働き、けいれんに伴う海馬の異常放電を抑制すると予想される。本研究は、in vivoでのnon-NMDA型受容体選択性と抗けいれん作用を、海馬の発作性放電を指標として検討した。ラットを用いて、無麻酔無拘束の状態で海馬深部脳波と行動を記録した。グルタミン酸受容体の各サブタイプの特異的作動薬を脳室内投与してけいれんを誘発した。すなわち、前者の投与後、辺縁系発作によるさまざまな異常行動と運動性けいれんが現れ、海馬に発作性放電の群発が重延して見られたのに対し、後者の投与後には疾走発作や全般性けいれんが反復性に起こり、それに伴って発作性放電が反復性に見られた。1-NA-Spmを前投与すると、QUISによる海馬に発作性放電は用量依存的に抑制され、運動性けいれんへの発展を完全に抑制することができた。それに対しQUINの作用には全く変化が見られなかった。1-NA-Spmがnon-NMDA型のQUIS受容体に作用して海馬発作性放電を抑制し、抗けいれん作用を発揮することが明らかにされた。また有効量の1-NA-Spmを単独に投与しても行動や海馬脳波が変化しないことも確認された。

本論文は、non-NMDA型受容体拮抗薬JSTXの誘導體 (1-NA-Spm) の抗けいれん作用を証明した基礎的研究の報告で、博士 (医学) の授与に値する。