



Effects of excitatory amino acids on the oxygen consumption of hippocampal slices from the guinea pig

西崎, 知之

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1988-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0748

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000748>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	にし ぎき とも ゆき (兵 庫 県)
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	医博い第588号
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
学位授与の日付	昭和63年3月31日
学位論文題目	Effects of excitatory amino acids on the oxygen consumption of hippocampal slices from the guinea pig (興奮性アミノ酸のモルモット海馬切片の酸素消費量に及ぼす効果)
審 査 委 員	主査 教授 松 本 悟 教授 岡 田 安 弘 教授 埜 功

論 文 内 容 の 要 旨

(緒 言)

グルタミン酸、アスパラギン酸が神経系で興奮性神経伝達物質の候補として有力であることは古くより報告されており、そのアゴニストであるカイニン酸, N-methyl-D-aspartate(NMDA), キスカル酸などの物質も同様に強い興奮作用があることはよく知られている, また, 一方これらの興奮性アミノ酸が神経毒としての作用をもつこと, 例えば脳虚血時にグルタミン酸が細胞外腔に顕著に蓄積され, ニューロンの障害をより増強するという報告や, 脳切片レベルでこれらの物質を高濃度に作用させると不可逆的に神経活動を消失させるという報告がある。その理由の1つとして, これらの物質がニューロンの興奮性を高めることによってエネルギー代謝を上昇させるためと考えられている。しかし, これらの物質が実際の程度ニューロンのエネルギー代謝を上昇させるのかという直接的研究はなされていない。本研究は興奮性アミノ酸 (グルタミン酸, アスパラギン酸, カイニン酸, NMDA, キスカル酸)が神経活動を高めるとともに, エネルギー消費を上昇させることを明らかにしたものである。

(方 法)

本実験ではモルモット海馬切片 (厚さ300~400 μ m) が使用された。実験前に各切片は95%O₂, 5%CO₂で飽和した37°C標準液 (10mMグルコースを含むKrebs-Ringer) の中で20分間 incubationされた。神経活動は海馬歯状回の顆粒細胞層を電氣的に刺激し, 錐体細胞層 (CA₃-野) より得られたシナプス後電位 (PSP) を指標として調べられた。興奮性アミノ酸の神経活動に対する

効果をみるために、各切片を種々の濃度の興奮性アミノ酸を含む標準液の中で10分間 incubation した。その切片からPSPを記録し、さらに機能的な回復をみるために、正常標準液に戻して20分後にPSPを記録した。また、興奮性アミノ酸のアンタゴニストである glutamic acid diethylester (GDEE), DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid (APV) の興奮性アミノ酸によって誘発される神経活動に対する効果も調べた。

興奮性アミノ酸のエネルギー代謝に対する効果を調べるために酸素消費量が計測された。酸素消費量は筆者の考案した微小酸素測定装置を用い、電極はClark型微小酸素電極を使用した。海馬切片は95%O₂, 5%CO₂で飽和した標準液に満たされたchamber内へ移され、chamberは直ちに閉鎖された後37°C恒温水の中に置かれた。chamber内の切片及び溶液はマグネチック・スタラーにてゆっくりと攪拌された。興奮性アミノ酸は注入口よりchamber内へ投与され、その時の酸素消費に対する効果が調べられた。酸素消費量は最初の6分間の酸素分圧の変化より計算された。また、興奮性アミノ酸アンタゴニストであるGDEE, APV, 及び女郎グモ毒(JSTX)の興奮性アミノ酸によって誘発される酸素消費量に対する効果も調べられた。

(結 果)

1. 興奮性アミノ酸の神経活動に及ぼす効果

切片から記録されるPSPを指標としてその振幅に対するグルタミン酸、アスパラギン酸、カイニン酸、NMDA、及びキスカル酸の効果が様々な濃度下に検討された。それぞれ作用濃度範囲は異なったが、すべての興奮性アミノ酸の効果に同様の傾向が認められた。すなわち、低濃度ではPSP振幅は増大し、高濃度になるとPSPは減少し、消失した。カイニン酸においては 1×10^{-9} Mから 1×10^{-8} Mの濃度範囲でPSP振幅はコントロールレベルの120%まで増大し、 1×10^{-6} MでPSPは消失し、さらに 1×10^{-4} Mより高濃度になると不可逆的な神経活動の消失が認められた。NMDAでは 1×10^{-9} Mと 1×10^{-7} Mの濃度範囲で、キスカル酸では 1×10^{-8} Mと 1×10^{-7} Mの濃度範囲で、グルタミン酸では 1×10^{-6} Mと 1×10^{-5} Mの濃度範囲で、アスパラギン酸では 1×10^{-6} Mと 1×10^{-4} Mの濃度範囲で、PSP振幅がそれぞれコントロールレベルの127%, 117%, 124%, 118%まで増大した。NMDAは 1×10^{-4} Mの濃度でPSPの不可逆的消失が認められた。キスカル酸は 1×10^{-4} Mで、グルタミン酸は 5×10^{-4} Mで、アスパラギン酸は 5×10^{-3} Mで、PSPが可逆的に消失しそれぞれ 1×10^{-3} M, 1×10^{-2} M, 1×10^{-2} Mより高濃度になるとPSPは不可逆的に消失した。

GDEE (1×10^{-3} M) を前処理しておけば、グルタミン酸、アスパラギン酸、キスカル酸によって誘発される神経活動の用量作用曲線は、GDEE投与時と比較し右へ偏位した。すなわち、GDEEはグルタミン酸、アスパラギン酸、キスカル酸に対して拮抗作用を示した。またAPV (1×10^{-4} M)はNMDA, アスパラギン酸によって誘発される神経活動に対して特異的に抑制作用を示した。

2. 興奮性アミノ酸の酸素消費量に及ぼす効果

静止時(興奮性アミノ酸非投与時)における海馬切片の酸素消費量は $8.43 \pm 0.21 \mu\text{mol/g pro-}$

tein/minであった。カイニン酸では 1×10^{-8} M から 1×10^{-6} M の濃度範囲で酸素消費量は濃度依存性に増加し、 1×10^{-6} M より高濃度になると静止時の142%の増加で最大値となり一定した。他の興奮性物質でも同様の傾向をもち、NMDAでは 1×10^{-8} M と 1×10^{-4} M の濃度範囲で、キスカル酸では 1×10^{-7} M と 1×10^{-4} M の濃度範囲で、グルタミン酸では 1×10^{-5} M と 5×10^{-4} M の濃度範囲で、アスパラギン酸では 1×10^{-5} M と 1×10^{-3} M の濃度範囲で酸素消費量は増大した。酸素消費量の最大はNMDAでは 1×10^{-4} M、キスカル酸では 1×10^{-4} M、グルタミン酸では 5×10^{-4} M、アスパラギン酸では 5×10^{-3} M の濃度でそれぞれ静止時の136%、127%、146%、120%となり、グルタミン酸以外はそれ以上濃度を上げてても一定値を示した。グルタミン酸は 2×10^{-3} M と 1×10^{-2} M の濃度範囲で再び静止時の200%まで酸素消費量の増加が認められた。興奮性アミノ酸投与にて酸素消費量が増大し始める濃度は神経活動の興奮が誘発される濃度と一致しており、また酸素消費量が最大値をとる濃度と神経活動の消失が認められる濃度とは一致していた。

GDEE (1×10^{-3} M) はグルタミン酸、アスパラギン酸、キスカル酸に対して、APV (1×10^{-4} M) はNMDA、アスパラギン酸に対して酸素消費量の増大を抑制した。JSTX (2 U/ml) はグルタミン酸受容体に対する特異的アンタゴニストであり、 5×10^{-4} M グルタミン酸による酸素消費量の増大を完全に抑制した。これらのアンタゴニストの興奮性アミノ酸による酸素消費量の増大に対する効果は、興奮性アミノ酸によって誘発される神経活動に対する効果とよく一致していた。

(討 論)

各々の興奮性アミノ酸によって作用濃度範囲は異なったが、神経活動において興奮を示す濃度と酸素消費量が増大する濃度範囲とは一致していた。また、これらの興奮作用及び酸素消費量増大はともに興奮性アミノ酸アンタゴニストによって抑制された。以上の結果から、興奮性アミノ酸による酸素消費量の増大はこれらの物質によって誘発される神経活動の上昇を反映していることが強く示唆された。

一方、高濃度に興奮性アミノ酸を投与すると神経活動の消失が認められたが、この濃度と酸素消費量が最大値を示す濃度と非常によく一致していた。このような状態下では興奮性アミノ酸によってニューロンが強い脱分極を引き起こされているために、スパイク発射が起これないと考えられる。また、ニューロンの脱分極にともなう細胞膜を通してのイオンの移動とそれに続くエネルギー依存性のイオン能動輸送を行うために、エネルギーが最大限に使用されていることが想定できる。

最近、興奮性アミノ酸の神経毒としての作用が注目されているが、その機序は未だ不明である。本実験において、興奮性アミノ酸をより高濃度に作用させると不可逆的な神経活動の消失が認められた。このような不可逆的なニューロン障害の1つの要因として、過度の酸素消費量（エネルギー消費量）増大が関与している可能性が示唆されている。すなわち、エネルギー代謝における需要と供給の不均衡にともなうイオンの能動輸送不全が細胞内カルシウム蓄積を招き、不可逆的細胞障害の原因になっているのかもしれない。グルタミン酸作動性神経線維の切断が脳虚血時、

あるいは低血糖時におけるニューロンの障害に対して保護作用があり、虚血時の生存時間を延長させるという報告がある。この結果はグルタミン酸が脳虚血時にニューロンのエネルギー代謝を上昇させ、よりニューロンの障害を増強させている可能性を示している。本研究は上記の可能性を支持する直接的証拠を提供していると考えられ、将来の脳虚血時の治療に大きく貢献するものであると考えられる。

論文審査の結果の要旨

緒 言

一般にグルタミン酸、アスパラギン酸は、興奮性神経伝達物質であるらしいとの考えは、よく知られているが、一方ではこれら興奮性アミノ酸は、脳虚血時神経毒として作用もあることが認められている。或は脳切片レベルでは、これらアミノ酸を加えることにより、神経活動が消失してしまうことも知られている。この様に、特定物質が神経興奮性をたかめたり、逆に低下してしまったり、一方ではエネルギー代謝を変化するような異った現象をどの様に解釈するか、その機構に関しては何も報告されていない。本申請者はこの点に注目し、かかるアミノ酸添加による神経活動変化、エネルギー代謝の推移を検討し、この機構につき解明を試みた。

方 法

本実験においては以下の2点につき検討した。

- ①興奮性アミノ酸（グルタミン酸・アスパラギン酸・カイニン酸、N-methyl-D-Aspartate (NMDA)、キスカル酸）付加によって神経活動はどの様に变化したか。

まずモルモット200~300g/体重を用い厚さ300~400 μ mの脳海馬切片を用い、これを95%O₂ 5%CO₂-37°Cの標準液に20分間incubateしたのち、observation chamber内に入れた上で、海馬歯状回顆粒細胞層を電気刺激し、錐体細胞層(CA₃-P)よりpostsynaptic potential (PSP)をとり、これを指標とした。以上の基礎実験後、海馬切片を各種濃度の異なる興奮性アミノ酸を含む標準液中に、10分間incubateし、それぞれの濃度におけるPSPを記録した。その後この変化の(可逆性)回復をみる度切片を正常標準液に浸し20分間後再めてPSPを測定した。次に上記興奮性アミノ酸のantagonist (glutamic acid diethylester GDEE, DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid APV)を灌流液に加えることにより、興奮性アミノ酸によって変化亢進した神経活動の修飾をあわせて検討した。

- ②興奮性アミノ酸付加によって酸素消費量(エネルギー代謝)はどの様に变化したか。

この測定の為に、申請者が考案した微小酸素測定装置を用い、Clark型微小酸素電極を用いた。海馬切片は95%酸素、5%炭酸ガス飽和標準液中に(37°C)浸し、それぞれの濃度の興奮性アミノ酸を付加し、酸素消費量がどの様に変わるかを検討した。さらに①同様、興奮性アミノ酸antagonist (GDEE, APVなど)を加えることによって上記酸素消費量の変化が、どの様に修飾さ

れるかについても検討した。

結 果

①興奮性アミノ酸付加による神経活動の変化

海馬回切片から得られるPSPの振幅が、上記各種興奮性アミノ酸付加によって同一傾向の変化として認められた。すなわち、濃度の作用範囲はそれぞれ異ったが、まず低濃度ではPSP振幅は増大し、高濃度になるとPSPが減少し、ついには消失した。PSPは振幅の変化は、基礎レベルの117~127%まで亢進→低下→消失→非可逆性消失と変化した。さらにGDEEを前処理しておけば、グルタミン酸、アスパラギン酸、キスカル酸に対し拮抗、APVではNMDA、アスパラギン酸に拮抗した。

②興奮性アミノ酸付加で海馬回片の酸素消費量（エネルギー代謝）はどの様に変ったか。

興奮性アミノ酸非投与時（静止時）における酸素消費量は $8.43 \pm 0.21 \mu\text{mol/g protein/min}$ であった。次で各種アミノ酸付加によって、その作用濃度範囲は異ったが濃度依存性に酸素消費量が亢進し、つづいて一定最大値がつづいた。即ちその変化は静止時に比し120~200%まで亢進した。さらに明確になったことは、興奮性アミノ酸投与で酸素消費量が増大し始める濃度は、神経活動の興奮が誘発される濃度と一致しており、さらに、前者が最大値をとる濃度と、神経活動消失を認める濃度が一致した。ついで興奮性アミノ酸AntagonistのGDEE, APVは、①これらアミノ酸投与で誘発される神経活動に対する効果同様、酸素消費量に対しても拮抗した。

討 論

上記実験結果から、以下3点が結論され強調された。

④海馬切片のPSP振幅は興奮性アミノ酸付加によってまず濃度が比較的低いと神経活動は亢進すると共に、酸素消費量もまた増大し両者の増大・亢進の濃度範囲が一致した。これとは逆に、上記アミノ酸antagonistであるGDEE, APVなどを処理することにより、亢進していた神経活動、酸素消費量は、何れも抑制された、以上の所見から、興奮性アミノ酸による酸素消費量の増大は、上記神経活動上昇と相関していることがわかった。⑤興奮性アミノ酸を更に高濃度に添加すると、それまで亢進していたPSP振幅は逆に低下し、ついに消失する。一方、酸素消費量はこのアミノ酸濃度では最大値を維持していた。この機序としては、興奮性アミノ酸添加でニューロンの強い脱分極が生じ、スパイク発射が生じない一方で、脱分極に伴うイオン移動、エネルギー依存のイオン能動移送に必要なエネルギーを最大限用いていることが考えられる。⑥興奮性アミノ酸を更に高濃度に添加すると、神経活動消失が不可逆的になって了う、この様な永久的神経活動消失機序は、ニューロンの脱分極作用、過度の酸素消費増大も関係していると思われる。すなわちエネルギー代謝における需要・供給の不均衡に伴い、イオン能動移送が不完全となり細胞内カルシウム蓄積→不可逆性細胞障害へと推移することが推例される。以上の所見やそれを補強するものとしての興奮性アミノ酸の神経毒として作用、脳虚血時グルタミン酸作動性神経線維切断がニュー

ロン障害に対し保護作用を見する事実などから、興奮性アミノ酸であるグルタミン酸によるニューロン障害の機序が実験的裏付けを以て解明されたのである。この解明により、上記アミノ酸antagonist投与により、神経障害の軽減、治療効果も期待される。

以上本研究は、海馬切片を用いて、神経活動、エネルギー代謝を観察し、興奮性アミノ酸の作用機序を解明したもので従来殆ど行われなかった脳組織における神経活動・酸素消費量の相互関係を明確にし、あわせて興奮性アミノ酸antagonistの虚血脳治療の応用に対する理論的根拠を与えたものである。よって本研究者は医学博士の学位を得る資格があると認める。