



Alteration in regional brain neuropeptides following intracerebroventricular infusion of excitotoxins in rats

金田, 弘幸

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1994-11-02

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1882

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001882>

※ 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）	かね だ ひろ ゆき 金 田 弘 幸	（兵庫県）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）	
学位記番号	博ろ第1425号	
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当	
学位授与の日付	平成6年11月2日	
学位論文題目	Alteration in regional brain neuropeptides following intracerebroventricular infusion of excitotoxins in rats （興奮性アミノ酸の脳室内持続投与によるラット脳内神経ペプチドの変化）	
審査委員	主査 教授 中 井 久 夫 教授 千 原 和 夫 教授 前 田 盛	

論文内容の要旨

緒言

近年、神経変性疾患の神経化学的および神経病理学的異常に関する多くの研究が報告されている。例えば、アルツハイマー病患者において、神経ペプチドの一つであるソマトスタチンが、死後脳や髄液中で低下していることは広く知られている。また、神経変性疾患に認められる神経病理学的な変化を実験動物で再現しようとするモデル動物開発の研究もさかんである。そして、最近ではこれらの疾患の病因と神経毒性を持つ興奮性アミノ酸との関連が注目されている。したがって、神経変性疾患の動物モデルの研究において興奮性アミノ酸が脳内神経ペプチドにどのような影響を及ぼすかを調べることは興味深いところである。これまでの報告は、毒性を示す相当量の興奮性アミノ酸を急性組織内投与したものがほとんどである。しかしこのたびの実験では、浸透圧ポンプを用いて、より少ない用量の興奮性アミノ酸をラット脳室内へ持続慢性投与し、部位別に脳内神経ペプチドの変化を検討した。

対象と方法

<実験1>

ウイスター系雄ラット（月齢3カ月、体重300-350g）に興奮性アミノ酸のうち、イボテン酸（IA）、カイニン酸（KA）、キノリン酸（QA）を浸透圧ポンプ（Alzet2002）を用い右側脳室へ二週間持続的に投与した。右側脳室に、脳室内カニューレを脳定位装置によりペントバルビタール麻酔下で固定し、ポンプと接続した。二週間持続慢性投与された興奮性アミノ酸の総投与量は、0.5 μmol IA, 5 nmol KA, 5 μmol QAである。対照群には、同じ方法でリン酸緩衝液を脳室内へ投与した。

<実験2>

月齢3カ月（体重300-350g）と月齢13カ月（体重500-620g）のウイスター系雄ラットにリン酸緩衝液を実験1と同じ手技で脳室内投与し正常加齢における脳内神経ペプチドの変化を調べた。

＜実験3＞

実験1の結果、IA投与群のみ神経ペプチドの減少が認められたので、月齢13カ月（体重500-620g）のウイスター系雄ラットを用いて、0.25, 0.5 μ molのIA、および対照群としてリン酸緩衝液を同様に脳室内投与し、用量との関係を検討した。

持続投与開始後、15日目に断頭し脳を取り出した。取り出した脳は、パルコヴィッツの打ち抜き法に準じて7部位（前頭葉、側頭葉、後頭葉、海馬、扁桃核、視床下部、中隔核）に分割し、それぞれの蛋白量をLowry法により測定した。脳組織は2規定酢酸によりホモジナイズし、5分間煮沸して蛋白分解酵素を不活化した後、遠心後上清を濃縮乾燥してアッセイ用緩衝液で再溶解した。ソマトスタチン（SS）、ニューロペプチドY（NPY）、バゾプレッシン（AVP）のペプチド免疫活性はラジオイムノアッセイで測定した。アッセイ内のばらつきの変動係数は、SS-LIが8.1%，NPY-LIが5.2%，AVP-LIが12.0%で、アッセイ間のばらつきは対照群と実験群を同一のアッセイで測定することにより排除した。

結果と考察

＜実験1＞

(1) 月齢3カ月の場合、0.5 μ molのIAで、SS-LIは前頭葉、後頭葉、海馬、扁桃核、中隔核で有意に減少し、NPY-LIは扁桃核、AVP-LIは海馬で有意に減少した。

(2) 月齢3カ月の場合、5 nmolのKAで、SS-LIは前頭葉、後頭葉、海馬、扁桃核、視床下部で有意に増加し、NPY-LIは後頭葉、海馬、AVP-LIは側頭葉、線条体、中隔核で有意に増加した。

(3) 月齢3カ月の場合、5 μ molのQAで、SS-LIは側頭葉、海馬、扁桃核で有意に増加した。NPY-LIは後頭葉、海馬、視床下部、AVP-LIは扁桃核、線条体で有意に増加した。

＜実験2＞

(4) 加齢により（月齢3カ月と月齢13カ月）、SS-LIは前頭葉で、NPY-LIは前頭葉、後頭葉、扁桃核、視床下部で有意に減少し、その他の部位においても減少傾向が認められた。

＜実験3＞

(5) 月齢13カ月のラットに0.25, 0.5 μ molのIAを投与した場合、それぞれのペプチドに用量依存性の変化が認められなかっただけでなく、一定した傾向の変化もみられなかった。

(6) 月齢13カ月のラットに0.5 μ molのIAを投与した場合、有意な減少はSS-LIで線条体のみ認められた。

神経変性疾患の病因の一つとして神経毒性を示す興奮性アミノ酸が注目されている中、神経変性疾患のモデル動物を検討するために、内因性あるいは外因性興奮性アミノ酸を用いて実験動物に及ぼす神経病理学的、または神経化学的影響を調べることは重要である。これまでも多くの研究者が報告している。例えば、IAによるラットにおけるマイネルト核を破壊することによりアルツハイマー病患者のマイネルト核にみられるコリン系の障害が反映される。しかしその場合、脳内神経ペプチドに対する影響は一致しておらず、大脳皮質SS-LIやNPY-LIが増加した報告もあれば、大脳皮質SS-LIは変化しなかったという報告もある。また、IAやKAの線条体への組織内投与では、SS-LIやNPY-LIが皮質や海馬では変化せずに線条体で減少したという報告がある。QAの大脳皮質内投与で、皮質SSやNPY神経細胞を破壊しないという報告がある一方で、QAの大脳皮質内投与で線条体SSやNPY神経細胞を破壊するという報告もある。

このようにこれまでの報告では、神経毒性を現わすのに十分な用量の興奮性アミノ酸を組織内へ一回投与したものが多く、今回の実験のように低用量の興奮性アミノ酸を、側脳室内へ、二週間にわたって持続慢性投与したものはない。その結果、IAによってSS-LI, NPY-LI, AVP-LIが一致した部位ではないにしても、辺縁系に多く減少をしたことは、アルツハイマー病におけるSS-LIの低下が側頭葉や辺縁系で強いことを考えると興味深い結果である。しかし、同じ興奮性アミノ酸でもKAやQAでは、これらの神経ペプチドが増加したという反対の結果は、興奮性アミノ酸受容体のサブタイプに対するIA, KA, QAの親和性の違いが推測される。しかし、興奮性アミノ酸受容体と神経ペプチドの関連について詳しいことはわかっていない。

また、月齢3カ月と月齢13カ月のラットを比べた場合、加齢により生理的にSS-LI, NPY-LIが有意に減少あるいは減少傾向を示したことは以前の報告にも認められる。しかし、月齢13カ月のラットにIAを同じ用量で投与した場合、有意な減少を示した部位はSS-LIで線条体のみであり、IAの他の用量と比較した場合、それぞれのペプチドに用量依存的な変化や一定した傾向も認められなかった。これは、IAのラット神経ペプチドに及ぼす影響がラットの加齢により異なってくることを示唆しているのかもしれない。

このたびの実験では、ラットにおいて、IAの持続慢性投与によりKAやQAよりも、神経変性疾患の一つであるアルツハイマー病の神経生化学的な変化により類似した結果が得られた。

そして、このような神経変性疾患の動物モデルの開発のために脳内神経ペプチドと興奮性アミノ酸の関係を考える場合、

- 1) どのような用量でどのような種類の興奮性アミノ酸を用いるのか？
- 2) 脳内のどの部位に、どれくらいの期間どのように投与するのか？
- 3) どのような年齢の実験動物を用いるのか？

を注意深く検討することが重要性である。

論文審査の結果の要旨

アルツハイマー病では、死後脳における老人斑や神経原線維変化などの共通した病理学的変化が示唆されている。そこでアルツハイマー病の病態究明の手掛かりとなるモデル動物を作るために、これらの病理学的変化を生じさせるさまざまな試みがされてきたが、いまだ成功していない。その方法としては、脳の特定位点を神経毒や電気により破壊することが多く、神経毒としては、神経変性疾患との関連が注目されている興奮性アミノ酸がしばしば利用されている。また、アルツハイマー病の生化学的变化として、コリン系の機能障害と神経ペプチドのひとつであるソマトスタチンの減少が共通して報告されている。そのため、これらの生化学的变化を示すようなモデル動物も研究されている。例えばラットのマイネルト核に相当する部位を破壊し、脳の各部位の神経ペプチドが測定されているが、ソマトスタチンが減少したという報告はほとんどない。

これまでは、強い毒性を示す用量の興奮性アミノ酸を急性組織内投与したものがほとんどである。そこでこのたびの実験では、浸透圧ポンプを利用し、低用量の興奮性アミノ酸をラット脳室内へ二週間にわたって持続慢性投与し、部位別に脳内神経ペプチドの変化を検討した。

実験は、月齢3カ月のウイスター系雄ラットを用い、イボテン酸、カイニン酸、キノリン酸の三種類の興奮性アミノ酸について検討した。またラットの加齢による脳内神経ペプチドの変化を検討したうえ、月齢13カ月のラットを用いてイボテン酸に関して同じように検討した。神経ペプチドはソマト

スタチンに加え、ニューロペプチドY、バゾプレッシンを測定した。

月齢3カ月の場合、イボテン酸によりソマトスタチンは前頭葉、後頭葉、海馬、扁桃核、中隔核で有意に減少し、ニューロペプチドYは扁桃核、バゾプレッシンは海馬で有意に減少した。しかしカイニン酸やキノリン酸ではいくつかの部位で、いずれのペプチドも有意に増加していた。また、加齢により（月齢3カ月と月齢13カ月）、ソマトスタチンは前頭葉で、ニューロペプチドYは前頭葉、後頭葉、扁桃核、視床下部で有意に減少し、その他の部位においても減少傾向が認められた。

月齢13カ月の場合、イボテン酸によりそれぞれのペプチドに用量依存性の変化は認められなかっただけでなく、特定の傾向も認められなかった。

これらの結果から、イボテン酸によってソマトスタチン、ニューロペプチドY、バゾプレッシンが、一致した部位ではないにしても、辺縁系で多く減少したことは、アルツハイマー病におけるソマトスタチンの低下が側頭葉や辺縁系で強いことを考えると興味深い結果である。しかし、同じ興奮性アミノ酸でもカイニン酸やキノリン酸では、これらの神経ペプチドが増加したという反対の結果は、興奮性アミノ酸受容体のサブタイプに対するイボテン酸、カイニン酸、キノリン酸の親和性の違いが推測される。

また、月齢3カ月と月齢13カ月のラットを比べた場合、加齢により生理的にソマトスタチン、ニューロペプチドYが有意に減少あるいは減少傾向を示したことは以前の報告にも認められる。しかし、月齢13カ月のラットにイボテン酸を同じ用量で投与した場合、有意な減少を示した部位はソマトスタチンで線条体のみであり、イボテン酸の他の用量と比較した場合、それぞれのペプチドに用量依存的な変化や特定の傾向も認められなかった。これは、イボテン酸のラット神経ペプチドに及ぼす影響がラットの加齢により異なってくることを示唆しているのかもしれない。

したがって、実験計画の際には、

- 1) どのような用量でどのような種類の興奮性アミノ酸を用いるのか？
- 2) 脳内のどの部位に、どれくらいの期間どのように投与するのか？
- 3) どのような年齢の実験動物を用いるのか？

を注意深く検討することは重要性である。

このたびの実験では、ラットにおいて、イボテン酸の持続慢性投与によりカイニン酸やキノリン酸よりも、アルツハイマー病の脳内生化学的变化に類似した結果が得られた。

本研究は、アルツハイマー病の脳内生化学的变化について、その動物モデルを研究したものであるが、従来ほとんど行われなかったイボテン酸の脳室内持続慢性投与によるラット脳内ソマトスタチン含有量について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。