

記憶喪失性貝毒成分ドウモイ酸によるマウスの自発的交替行動障害に及ぼす代謝調節型グルタミン酸受容体作動薬の効果

Effects of Metabotropic Glutamate Receptor Agonists on Impairment of Spontaneous Alternation Behavior Induced by Domoic Acid, an Amnesic Shellfish Poison, in Mice

上野 健一

Ken-ichi UENO

1987年、カナダのプリンスエドワード島で養殖ムラサキイガイの摂食により発生した食中毒事例を契機に認知された記憶喪失性貝毒ドウモイ酸^{1,2)}は、カイニン酸と同様、中枢神経細胞に対してグルタミン酸様の神経細胞興奮作用及び神経細胞死すなわち興奮毒性を発現する。このカイニン酸やドウモイ酸は興奮毒性アミノ酸と呼ばれている³⁾。

グルタミン酸受容体は、中枢神経における興奮性シナプス伝達の中心的な役割を果たしており、学習・記憶などのシナプス可塑性に関与するばかりでなく、種々の神経変性疾患の発症メカニズムに深い関連性を持つ⁴⁻¹¹⁾。これら興奮性神経伝達に携わるグルタミン酸受容体はイオンチャンネル型グルタミン酸受容体 (iGluR) と代謝調節型グルタミン酸受容体 (mGluR) に大別される。さらに、iGluRは、*N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 型と non-NMDA (AMPA 型及びカイニン酸型) 型のサブタイプに分類され、また mGluR は Group I (mGluR 1, 5), Group II (mGluR 2, 3), Group III (mGluR 4, 6, 7, 8) のサブグループに分類される¹²⁾。

ラットやマウスなどの哺乳動物にドウモイ酸を投与すると、空間記憶障害が認められることが報告されている¹³⁻¹⁵⁾。これらの記憶障害は少なくとも1日以上記憶の保持時間を必要とする長期記憶に関するものであり、記憶の保持時間が極めて短い短期記憶については検討されていない。

これまでに、我々はマウスのドウモイ酸誘発性自発的交替行動障害に及ぼす iGluR 拮抗薬の影響を明らかにしてきた¹⁶⁾。そこで本研究は、短期記憶機能を指標として、マウスのドウモイ酸誘発性自発的交替行動障害に及ぼす mGluR 作動薬の影響を検討した。

方 法

1. 実験動物

実験には、6～7週齢の ddY 系雄性マウス (日本

SLC) を使用した。動物は、入荷後約1週間、室温 22±2°C で、12時間ごとの明暗サイクル環境下で飼育し、餌及び水は自由に摂取させた。

2. 実験装置

自発的交替行動の測定にはアームの全長が 40 cm、壁の高さが 12 cm、床の幅が 3 cm、上部の幅が 10 cm で、3本のアームがそれぞれ 120 度の角度で接続された Y 字迷路を使用した。

3. 実験手順

自発的交替行動の測定は、Sarter *et al.* の方法に準じて行った¹⁷⁾。マウスを Y 字迷路のいずれかのアームの先端に置き、8分間にわたって迷路内を自由に探索させ、マウスが選択したアームを選択した順に記録した。マウスが測定時間内に各アームを選択した回数を記録し、これを総アーム選択数 (total arm entries) とした。次に、この中から連続して異なる 3 本のアームを選択した組み合わせを調べ、この数を交替行動数とした。交替行動数を総アーム選択数から 2 を引いた数で割り、その値に 100 を掛けて求めた数値を交替行動率 (alternation behavior (%)) とし、これを自発的交替行動の指標とした。

4. 使用薬物と投与方法

ドウモイ酸 (Domoic acid, Sigma 社製), *trans*-Azetidine-2,4-dicarboxylic acid (*t*-ADA, Sigma-RBI 社製), [2*S*,1'*S*,2'*S*]-2-[Carboxycyclopropyl] glycine (L-CCG-1, Sigma-RBI 社製) 及び L-(+)-2-Amino-4-phosphono butyric acid (L-AP-4, Sigma 社製) は生理食塩水に溶解し、各濃度の投与用溶液を調製した。*t*-ADA, L-CCG-1 及び L-AP-4 は, Haley and McCormick の方法¹⁸⁾に従い、エーテル麻酔下でドウモイ酸投与の 5 分前に、それぞれマウスの側脳室内に投与 (中枢投与) した。側脳室内への投与容量は 3 µL/mouse とした。ドウモイ酸は 3 mg/10 mL/kg の投与条件で、自発的交替行動測定の前 24 時間前に単回腹腔内投与 (末梢投与) した。

5. 統計学的処理

交替行動率及び総アーム選択数は平均値±標準誤差で表した。2群間の比較には *t* 検定を用い、3群以上の比較には、一元配置分散分析を行い、有意差が認められたものについては、Dunnett の多重比較検定を行った。なお、これらの統計処理では、原則として危険率を5%とした。

結果及び考察

1. マウスの自発的交替行動に及ぼすドウモイ酸の影響

ドウモイ酸をマウスへ末梢投与したときの自発的交替行動の結果を Fig. 1 に示す。投与量 3 mg/kg でのドウモイ酸はマウス交替行動率を有意に低下させた。しかしながら、総アーム選択数には影響を及ぼさなかった。

2. ドウモイ酸誘発自発的交替行動障害に及ぼす *t*-ADA の影響

ドウモイ酸 3 mg/kg 末梢投与により誘発されるマウス

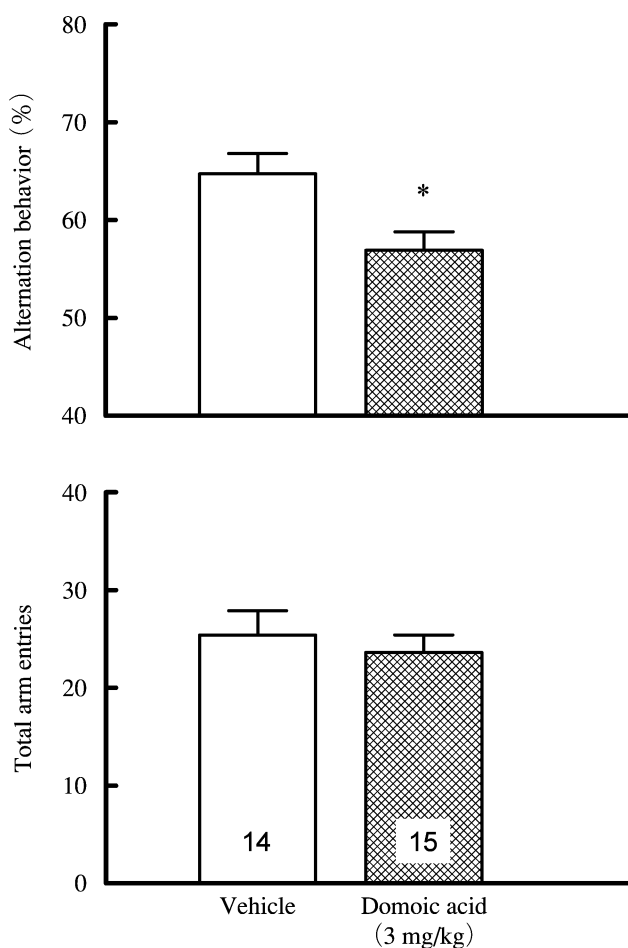


Fig. 1 Effects of Domoic Acid on Spontaneous Alternation and Total Arm Entries in Mice

Data are expressed as the mean±S.E.M. (vertical bars). The number of mice used is in the columns. **p*<0.05 vs. vehicle-group.

の自発的交替行動の障害に対し、Group I mGluR 作動薬の *t*-ADA を中枢投与したときの結果を Fig. 2 に示す。ドウモイ酸による交替行動率の減少に対して、*t*-ADA の 1、3 及び 10 μ g の投与による影響は認められなかった。また、総アーム選択数にも影響は認められなかった。

3. ドウモイ酸誘発自発的交替行動障害に及ぼす L-CCG-1 の影響

ドウモイ酸 3 mg/kg 末梢投与により誘発される自発的交替行動の障害に対し、Group II mGluR 作動薬の L-CCG-1 を中枢投与したときの結果を Fig. 3 に示す。ドウモイ酸による交替行動率の減少に対して、L-CCG-1 の 1、3 及び 10 μ g の投与は用量依存的な交替行動率の増加を示し、L-CCG-1 10 μ g 投与群ではドウモイ酸単独投与群との間に有意な差が認められた (Fig. 3 上段)。しかしながら、L-CCG-1 投与群では総アーム選択数に影響は認められなかった (Fig. 3 下段)。

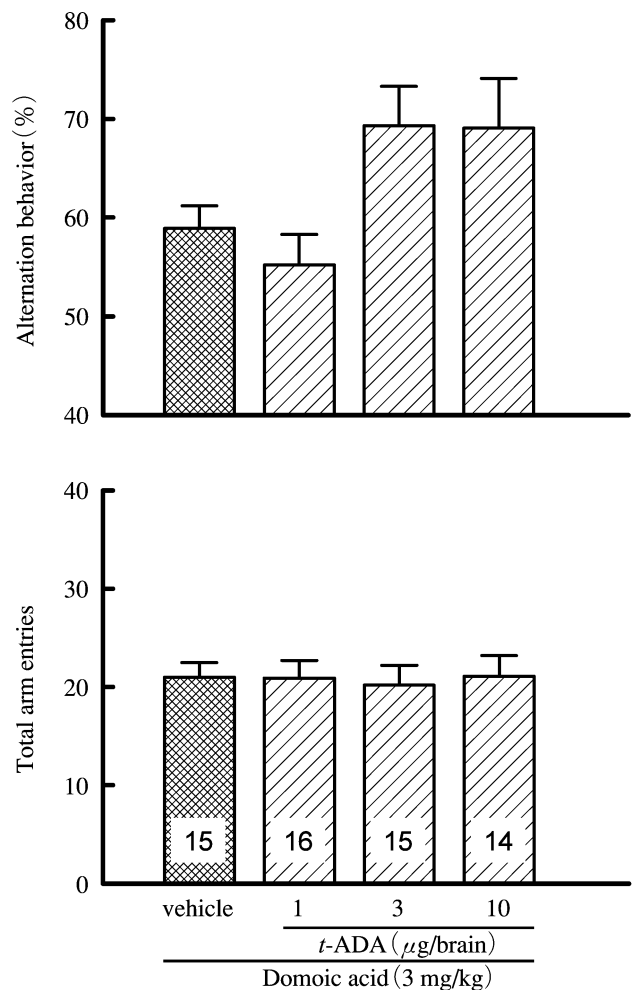


Fig. 2 Effects of *t*-ADA on Domoic Acid-induced Impairment of Spontaneous Alternation and Total Arm Entries in Mice

Data are expressed as the mean±S.E.M. (vertical bars). The number of mice used is in the columns.

4. ドウモイ酸誘発自発的交替行動障害に及ぼすL-AP-4の影響

ドウモイ酸 3 mg/kg 末梢投与により誘発される自発的交替行動の障害に対し、Group III mGluR 作動薬のL-AP-4を中枢投与したときの結果を Fig. 4 に示す。ドウモイ酸による交替行動率の減少に対して、L-AP-4の1, 3及び10 μg の投与は用量依存的な交替行動率の増加を示し、L-AP-4 10 μg 投与群ではドウモイ酸単独投与群との間に有意な差が認められた (Fig. 4 上段)。しかしながら、L-AP-4 投与群では総アーム選択数に影響は認められなかった (Fig. 4 下段)。

5. 考察

Y字迷路を用いてドウモイ酸によるマウスの自発的交替行動障害に及ぼすmGluR作動薬の影響を検討した。

ドウモイ酸 3 mg/kg の腹腔内投与は、マウスの交替行動率が有意に減少したことから、マウスの自発的交替行動

に障害を与えることが明らかとなった。マウスの自発運動量の指標となる総アーム選択数については、ドウモイ酸による影響は認められず、ドウモイ酸により誘発される交替行動率の減少すなわち自発的交替行動障害は、運動量の変化に伴う二次的な影響によるものではないことが示唆された。また、mGluR作動薬を用いて、ドウモイ酸誘発性自発的交替行動障害に及ぼす効果を検討したところ、Group I mGluR作動薬 *t*-ADAでは改善されず、Group II mGluR作動薬L-CCG-1ならびにGroup III mGluR作動薬L-AP-4により用量依存的かつ有意に拮抗されたことから、Group IIならびにGroup III mGluRの活性化はドウモイ酸誘発性自発的交替行動障害に対して改善作用を有することが示唆された。

細胞内におけるmGluR作動薬の作用機序は次のように説明されている¹⁹⁾。すなわちmGluRに作動薬が結合すると、その受容体は三量体型GTP結合タンパク質(Gタン

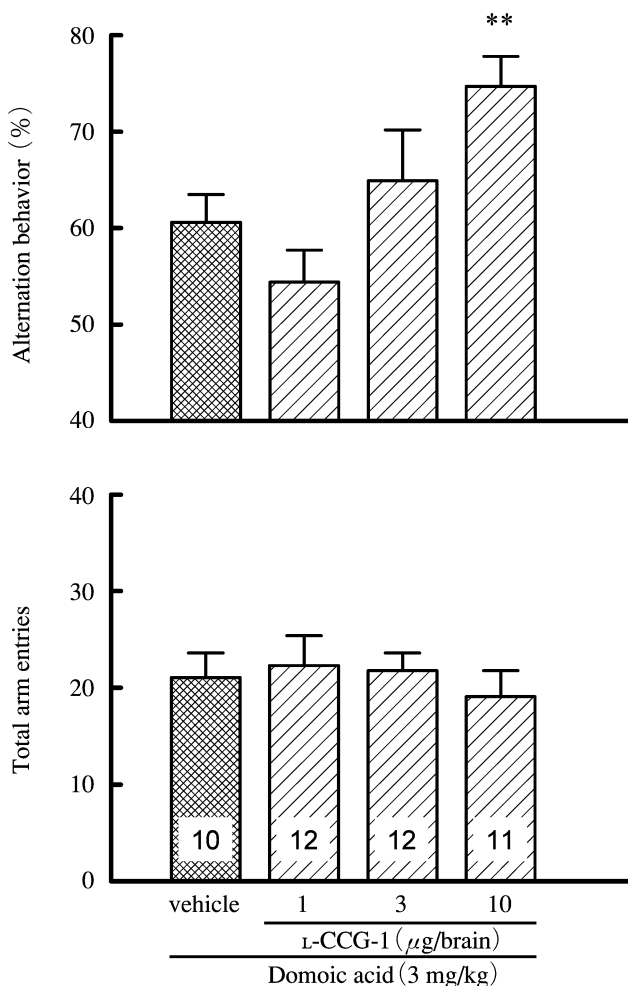


Fig. 3 Effects of L-CCG-1 on Domoic Acid-induced Impairment of Spontaneous Alternation and Total Arm Entries in Mice

Data are expressed as the mean \pm S.E.M. (vertical bars). The number of mice used is in the columns. ** $p < 0.01$ vs. domoic acid alone.

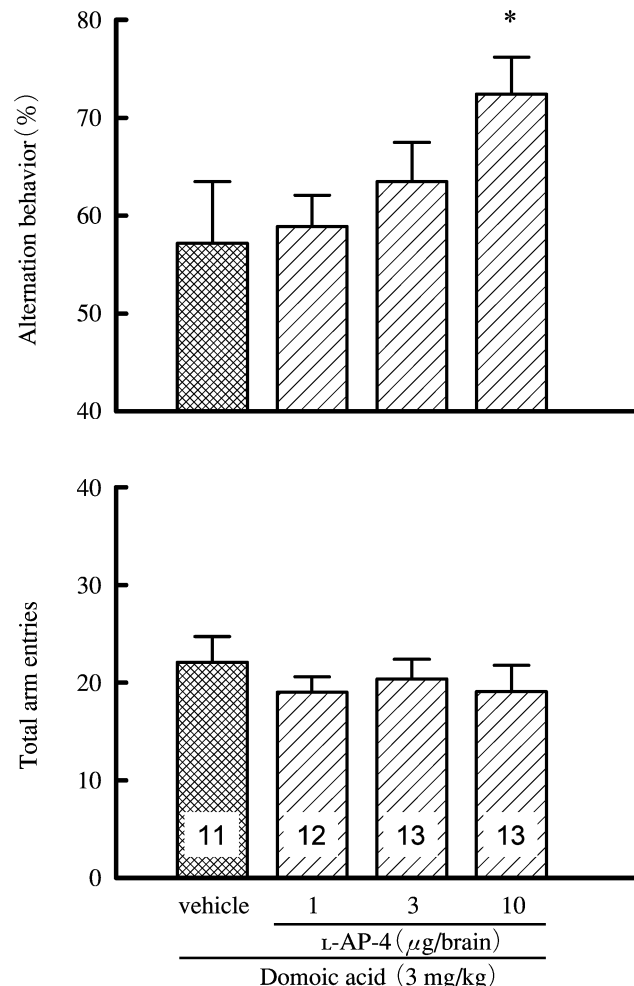


Fig. 4 Effects of L-AP-4 on Domoic Acid-induced Impairment of Spontaneous Alternation and Total Arm Entries in Mice

Data are expressed as the mean \pm S.E.M. (vertical bars). The number of mice used is in the columns. * $p < 0.05$ vs. domoic acid alone.

パク質, $\alpha_{\text{GDP}}\beta\gamma$) に作用し, GDP/GTP 交換反応を促進する。その結果, Gタンパク質を α_{GDP} と $\beta\gamma$ に解離させ, 酵素やイオンチャネルなどの効果器に作用する。Group I mGluR は, Gタンパク質を介したホスホリパーゼC刺激に続くリン脂質代謝回転によって, イノシトール三リン酸 (IP 3) とジアシルグリセロール (DG) の生成を引き起こす。IP 3 は細胞内 Ca^{2+} ストアを刺激し, DG はプロテインキナーゼCを活性化する。Group II mGluR はアデニル酸シクラーゼを抑制し, 細胞内 cAMP 量を減少させる。Group II mGluR はシナプス前終末に存在し, 神経伝達物質の遊離を抑制する。Group III mGluR は, cAMP 系の抑制, cGMP ホスホジエステラーゼの活性化を生じる。

興奮性アミノ酸により神経細胞が過剰に興奮した結果生じる神経細胞死ないしは興奮毒性と mGluR 作動薬との関係が報告されている。すなわち, Group I mGluR の活性化により興奮毒性は増強されるが, Group II ならびに Group III mGluR 作動薬は神経毒作用を抑制する。このように, ある種の mGluR 作動薬は iGluR 作動薬の活性化によって生じる神経細胞死ないしは興奮毒性を減弱させる^{20,21)}。

本研究において, Group I mGluR 作動薬の *t*-ADA はドウモイ酸誘発性自発的交替行動障害を改善しなかったが, Group II mGluR 作動薬の L-CCG-1 ならびに Group III mGluR 作動薬の L-AP-4 がドウモイ酸誘発性自発的交替行動障害を用量依存的かつ有意に改善させたという結果は, 上記の報告と一致する。これは, L-CCG-1 による Group II mGluR 刺激ならびに L-AP-4 による Group III mGluR 刺激によりシナプス前終末からのグルタミン酸遊離が抑制され, 神経細胞の過剰興奮が抑制された結果, ドウモイ酸誘発性自発的交替行動障害が改善されたものと考えられる。

以上より, マウスにおけるドウモイ酸誘発性自発的交替行動障害に及ぼす mGluR 作動薬の作用を明らかにした。ドウモイ酸誘発性自発的交替行動障害は Group II mGluR 作動薬ならびに Group III mGluR 作動薬によって改善されたことから, Group II ならびに Group III mGluR 活性化がドウモイ酸誘発性自発的交替行動障害に対して有効であることが示唆された。

文 献

- 1) Perl TM, Bédard L, Kosatsky T, Hockin JC, Todd ECD, Remis RS : N. Engl. J. Med., 322, 1775 (1990)
- 2) Teitelbaum JS, Zatorre RJ, Carpenter S, Gendron D, Evans AC, Gjedde A, Cashman NR : N. Engl. J. Med., 322, 1781 (1990)
- 3) Olney JW, Rhee V, Ho Q : Brain Res., 77, 507 (1974)
- 4) Greenamyre JT, Penny JB, Young AB, D'Amato CJ, Hicks SP, Shoulson I : Science, 227, 1496 (1985)
- 5) Young AB, Greenamyre JT, Hollingsworth Z, Albin R, D'Amato CJ, Shoulson I, Penny JB : Science, 241, 981 (1988)
- 6) Monaghan DT, Bridges RJ, Cotman CW : Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 29, 365 (1989)
- 7) Wroblewski JT, Danysz W : Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 29, 441 (1989)
- 8) Palmer AM, Gershon S : FASEB J., 4, 2745 (1990)
- 9) Greenamyre JT, O'Brien CF : Arch. Neurol., 48, 977 (1991)
- 10) 秋山一文, 甲平一郎 : 神経進歩, 37, 484 (1993)
- 11) Danysz W, Parsons CG, Bresink I, Quack G : DN&P, 8, 261 (1995)
- 12) 篠崎温彦 : 臨床神経科学, 17, 6 (1999)
- 13) Sutherland RJ, Hoising JM, Whishaw IQ : Neurosci. Lett., 120, 221 (1990)
- 14) Kuhlmann AC, Guilarte TR : Brain Res., 751, 281 (1997)
- 15) Clayton EC, Peng Y-G, Means LW, Ramsdell JS : Toxicol., 37, 1025 (1999)
- 16) 上野健一, 田沢悌二郎, 石下真通, 堀 義宏 : 道衛研所報, 51, 87 (2001)
- 17) Sarter M, Bodewitz G, Stephens DN : Psychopharmacology, 94, 491 (1988)
- 18) Haley TJ, McCormick WG : Br. J. Pharmacol., 12, 12 (1957)
- 19) 篠崎温彦 : 臨床神経科学, 17, 362 (1999)
- 20) Ishida M, Saitoh T, Shimamoto K, Ohfuné Y, Shinozaki H : Br. J. Pharmacol., 109, 1169 (1990)
- 21) Miyamoto M, Ishida M, Shinozaki H : Neuroscience, 77, 131 (1997)