

反復電気痙攣刺激が脳内ブドウ糖-アミノ酸代謝に与える影響について

分担研究者 湯浅龍彦 国立精神・神経センター国府台病院神経内科
共同研究者 金松知幸 創価大学生命科学研究所

研究要旨 一日一回の電気痙攣刺激を6日間続け、最後の刺激後24時間目に[1-13C]-ブドウ糖を尾静脈より投与し、7.5, 15, 30分後に経時的に脳内遊離アミノ酸への13Cの取り込み量を測定し、反復電気痙攣刺激(rECS)が脳内ブドウ糖-アミノ酸代謝に与える影響についてラットを用いて検討を行った。ブドウ糖投与後、15, 30分ではrECS群で脳内の13C-ブドウ糖量が増加(1.4, 1.3倍)していたが、乳酸への13Cの組込量は減少傾向を示した。このことは、rECSによりブドウ糖の取込が増加しているか、解糖系が抑制されていることを示している。また、各アミノ酸のそれぞれの位置の炭素への13Cの組込量を測定し、rECS群の対照群(sham)に対する比率(rECS/Sham; E/S値)を求め、rECSの影響を調べたところ、グルタミン酸の2位, 3位は経時変化のどの時点でもE/S=0.90であり、またGABAの3, 4位では7.5, 15分でE/S値がそれぞれ0.70, 0.78を示し、rECSによりグルタミン酸、GABAの合成が低下していることが認められた。グルタミンの2, 3, 4位のE/Sは経時変化のどの時点でも、0.83から0.87を示し、グルタミン合成が抑制されていることが認められた。

A. 研究目的

鬱病や鬱病を伴うパーキンソン病患者への反復電気痙攣処置(rECS)が治療上有効であることが知られている。しかしながら、rECSが治療効果を示す機序については、ほとんど明らかにされていない。動物、特にマウスやラットを用いた実験により、rECSがカテコールアミン作動性、セロトニン作動性シナプスに機能変化を生じること、オピオイドペプチド含量やその受容体量に変化が生じること、などが報告がされて来ている。近年、rECSにより、遺伝子転写因子複合体であるAP-1が長期発現してくること、グルタミン酸受容体のサブタイプである、NMDA受容体のNMDAR1が増加すること、カイン酸受容体であるKA1, KA2のmRNA量が海馬で部位特異的に変化すること、神経軸索のマーカー蛋白と言われているMAP-2やそのmRNAの発現が増加することなど、分子生物学的報告がされている。しかしながら、rECSの脳内代謝に対する影響についてはほとんど報告がないことから、我々は今回、rECSが脳内ブドウ糖、アミノ酸代謝に与える影響について[1-13C]-ブドウ糖投与により検討をおこなった。

B. 研究方法

ラット(Wistar, 雄, 150-200g)の両側耳にイヤークリップを装着し、35 mA, 0.5 secの通電を1日1回、6日間続けて行ったものをrECS群(12匹)とし、1日1回イヤークリップ装着のみをし通電を行わなかったものをSham群(12匹)とした。両群とも、最後(6日目)の処置後、24時間後に尾静脈より、1g/kgの[1-13C]-ブドウ糖を投与し、7.5, 15, 30分後(各4匹)にラット頭部のみマイクロプローブを照射し脳組織を瞬時(1.2 sec)に固定した後、脳よりアミノ酸画分を抽出し、分析用NMRで測定した。

C. 研究結果

脳内13C-ブドウ糖量及び乳酸量をSham群とrECS群で比較すると、rECS群では有意(15分後)にブドウ糖量が増加していたが、乳酸量には変化がないかむしろ減少傾向にあった。このことは、rECSによって脳組織の解糖系が抑制されていることを示しているものと思われる。脳内グルタミン酸の代謝に対するrECSの影響を見ると、グルタミン酸の4位への13Cの組込には変化が認められないものの、3位及び2位への組込は、rECS/Sham

(E/S) 値が 0.87~0.93 と経時変化の全時点で低下していた。抑制性伝達物質である GABA への ^{13}C の組込みでは、2 位の E/S 値は全時点で 0.94 でほぼ変化は認められなかったが、3 位、4 位の E/S 値は 7.5 分後で約 0.70、15 分後で 0.78 であり、GABA の合成経路速度が rECS によって遅くなっていることが示された。一方、アストログリアで主に合成されているグルタミンへの ^{13}C の組込みは、4 位、3 位、2 位ともに経時変化のどの時点でも rECS 群で低く (E/S 値は 0.83~0.86)、グリアでのグルタミン合成が抑制されていることが示された。

D. 結論

これらの事実から、rECS によってグルタミン酸作動性、GABA 作動性ニューロンのブドウ糖-アミノ酸代謝の抑制、及びアストログリアでのグルタミン合成の抑制が生じていることが考えられた。また、アストログリアで合成されたグルタミンが神経細胞でのグルタミン酸、GABA 合成に利用されているとの報告があることから見ると、グルタミン合成量全体が減少していることがグルタミン酸、GABA 合成の抑制を生じている 1 次要因である可能性も考えられた。

「分担研究課題名 ^{13}C 標識神経伝達物質の作成」

分担研究者 梶原正宏 所属 明治薬科大学・薬品化学教室

研究要旨 脳研究に際し安全性が高く脳幹を通過する光学活性アミノ酸を同一方法で効率良く、安価に ^{13}C 標識合成出来る高立体選択的合成法を検討する。脳内の ^{13}C 標識神経伝達物質を効率よく、安価に生成することが、本研究課題達成に必須であり、 ^{13}C 標識アミノ酸の同一合成方法によるアスパラギン酸の位置選択的 ^{13}C 標識アミノ酸合成法の開発を行った。また、酵素法による ^{13}C 標識アミノ酸を開発し、立体選択的 ^{13}C 標識アミノ酸生成法を開発する。酵素的に短時間に立体選択的に ^{13}C 標識各種アミノ酸を生成する過程を ^{13}C -NMR で追跡し、生成過程を経時的に詳細に無侵襲的に検討する。中枢神経抑制薬として知られる ^{13}C 標識フェニトイン等、マイナートランキライザーとしてジアゼパム類の合成を行う。

A. 研究目的

比較的安価な ^{13}C 標識原料を用いて、短工程で収率よく、安価に脳内の ^{13}C 標識神経伝達物質や中枢神経抑制薬を ^{13}C 標識位置選択的に生成する。

B. 研究方法

^{13}C 標識アミノ酸合成は光学活性 *Dellaria's oxazinone* を塩基触媒でエノール化を行い、 ^{13}C 標識ハロゲン化アルキル、又は ^{13}C 標識ハロゲン化アリルを立体選択的にカップリングさせ、開環反応、脱保護反応を行って ^{13}C 標識アミノ酸合成を達成する。又、酵素反応を ^{13}C -NMR を活用して、芳香環水酸基を持つ基質とピルビン酸或いはその等価体より、芳香環を有する ^{13}C 標識アミノ酸を生成する。5-ヒドロキシインドールと[3- ^{13}C]-ピルビン酸を酵素反応でトリスバッファー中で変換反応を行った。

目的物の 5-ヒドロキシトリプトファンを得たが、目的物以外にも ^{13}C 標識化合物が得られた。本化合物はリン酸バッファー中では全く生成しなかった。[3- ^{13}C]-ピルビン酸とトリスバッファー間で生成していることが明らかになった。中枢神経抑制薬の代表医薬品である抗てんかん薬フェニトインを ^{13}C -尿素から合成を試み、マイナートランキライザーであるニトロゼパムを ^{13}C -グリシンから合成を行った。

C. 研究結果

^{13}C 標識セリン合成は光学活性 *Dellaria's oxazinone* から合成した。収率にばらつきが認められた。L-5-[3- ^{13}C]-ヒドロキシトリプトファンを酵素変換反応により生成した。抗てんかん薬 ^{13}C -フェニトイン、マイナートランキライザーである ^{13}C -ニトロゼパムを簡便に得た。

D. 結論

¹³C-セリンはバラホルムアルデヒドのクラッキングに問題があり収率が安定化させる必要がある。酵素反応では緩衝液とピルビン酸の反応に注意する必要があることを明確にした。中枢神経抑制薬の代表薬物である抗てんかん薬抗てんかん薬 ¹³C-フェニトイン、マイナートランキライザーである ¹³C-ニトロゼパムを簡便合成できた。

¹³C-MRS を用いた痴呆性疾患に対する新しい診断技術用 ¹³C-薬物合成が準備できた。次年度は治療薬の開発に関する基礎的研究を実施して行く計画である。

E. 研究発表

論文発表：

- 1) katsumi Iida and Masahiro kajiwara
“Evaluation of Biosynthetic pathways to δ-Amino-

levulinic Acid in *Propionibacterium shermanii* Based on Biosynthesis of Vitamin B₁₂ from D-[1-

¹³C]Glucose”, *Biochemistry*, **39**, 3666-3670 (2000).

2) W. Maruyama, M. Mori, R. Sato, M. kajiwara, k. Kimura, “Effect of Concomitant 18O in 13C-Urea on the Urea Breath Test”, *J. Labelled Cpd. And Radiopharm.* **43**, 1113-1118 (2000).

学会発表

- 1) 日本薬学会第 121 年会、高取和彦、梶原正宏「酵素反応による芳香族アミノ酸のいち選択的 ¹³C 標識合成」
- 2) 日本薬学会第 121 年会、飯田克巳、梶原正宏「*Propionibacterium shermanii* におけるδ-アミノレブリン酸生合成経路の評価」

研究成果の刊行に関する一覧表

| 発表者氏名 | 論文タイトル | 発表誌名 | 巻数・ページ数 |
|---|--|--|-----------------------|
| Otsuki T, Kanamatsu T, Tsukada Y, Okamoto K, Watanabe H, Umeda M | Measurement of cerebral glutamate metabolism by oral administration of 1-13C-glucose using a newly developed 13C-MRS system | Proc 30 th Annual Meeting of Society for Neuroscience | 645.12, 2000 |
| Otsuki T, Matsumoto A, Kanamatsu T, Tsukada Y, Okamoto K, Watanabe H, Umeda M | Umeda M: In vivo non-invasive investigation of human cerebral glutamate metabolism by oral administration of [1-13C]-glucose using a newly developed localized 13C-MRS. | Neuroscience Research | suppl 24:S52, 2000 |
| Kanamatsu T, Otsuki T, Tsukada Y, Watanabe H, Okamoto K, Umeda M | Non-invasive measurement of the turnover rate of glutamate in the monkey brain by in vivo 13C-MRS under a condition of continuous [1-13C] glucose. | Neuroscience Research | suppl 24:S145, 2000 |
| Watanabe H, Umeda M, Ishihara Y, Okamoto K, Kanamatsu T, Tsukada Y | Human brain glucose metabolism mapping using multislice 2D 1H-13C correlation HSQC spectroscopy. | Mag. Reson. Med. | 43, 525-533, 2000 |
| Watanabe H, Ishihara Y, Okamoto K, Oshio K, Kanamatsu T, Tsukada Y | 3D localized 1H-13C heteronuclear single-quantum coherence correlation spectroscopy in vivo. | Mag. Reson. Med. | 43, 200-210, 2000 |
| 大槻泰介、松本暁子、金松知幸、塚田裕三、岡本和也、渡邊英宏、梅田匡朗 | 13C-MRS による成人ヒト後頭葉グルタミン酸代謝動態の検討 | 第 16 回 13C 医学応用研究会抄録集 | 8, 2000 |
| 金松知幸、南部篤、大槻泰介、渡邊英宏、岡本和也、梅田匡朗、塚田裕三 | 片側性内頸動脈 MTPT 投与によるサル脳 Vtca の変化—非侵襲的マルチボクセル法による研究— | 第 16 回 13C 医学応用研究会抄録集 | 8, 2000 |
| 渡邊英宏、梅田匡朗、岡本和也、小田正記、金松知幸、塚田裕三、松本暁子、大槻泰介 | 1H MRS による GABA 観測法の開発 | 第 16 回 13C 医学応用研究会抄録集 | 9, 2000 |
| 金松知幸, A.B. Patel, J. Wall, D.L. Rothman, K.B. Behar, R.G. Shulman | Bicuculline によって誘発されたてんかん発作中のブドウ糖-アミノ酸代謝の変化 | 13C 医学 | 10, 34-35, 2000 |
| 渡邊英宏、梅田匡朗、石原康利、岡本和也、小田正記、金松知幸、塚田裕三 | 13C 代謝物イメージング法の高感度化 第二報 | 13C 医学 | 10, 36-37, 2000 |
| Y. Ishihara, H. Watanabe, K. Okamoto, T. Kanamatsu, and T. Tsukada | Temperature monitoring of internal body heating induced by decoupling pulses in animal 13C-MRS experiment | Magn Reson. Med. J Nucl Med | 43, 796-803, 2000 |
| Nakano S, Asada T, Matsuda H, Uno M, Takasaki M. | Donepezil hydrochloride preserves regional cerebral blood flow in patients with Alzheimer's disease. | Biochemistry | in press |
| Katsumi Iida and Masahiro Kajiwara | Evaluation of Biosynthetic pathways to Amino-levulinic Acid in <i>Propionibacterium shermani</i> Based on Biosynthesis of Vitamin B ₁₂ from D-[1- ¹³ C]Glucose | J. Labelled Cpd. And Radiopharm | 39, 3666-3670 (2000). |
| W. Maruyama, M. Mori, R. Sato, M. Kajiwara, k. Kimura | Effect of Concomitant 18O in 13C-Urea on the Urea Breath Test | J. Labelled Cpd. And Radiopharm | 43, 1113-1118 (2000). |

20000463

以降のページは雑誌／図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。