

財団法人日中医学協会
2007年度共同研究等助成金－在留中国人研究者－報告書

2008年 3月 12日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

中国人研究者名： 邵和 (印)
指導責任者名： 各内一彦 職名： 教授
所属機関名： 東北大学医学系研究科機能薬理学
〒980-8575
所在地： 仙台市青葉区星陵町2-1
電話： 022-717-8058 内線： 8057

1. 助成金額： 600,000 円

2. 研究テーマ

ヒスタミン神経系の神経変性重カ物の作成：ヒスタミン神経の変性疾患は存在するか？

3. 成果の概要 (100字程度)

ヒスタミン神経系は、多くの機能を持つ重要なアミン系神経系である。本研究でペンタレントラゾール(PTZ)キンドリングマウスを作成したところ、フルキンドリングマウスは認知機能の低下を引き起こした。

4. 研究業績

(1) 学会における発表

無 ・ 有 (学会名・演題)

(2) 発表した論文

無 ・ 有 (雑誌名・題名)

— 日中医学協会助成事業 —

ヒスタミン神経系の神経変性動物の作成：ヒスタミン神経の変性疾患は存在するか？

研究者氏名	邵 和
研究機関	東北大学大学院医学系研究科
指導責任者	教授 谷内 一彦
共同研究者	櫻井映子

要旨

ヒスタミン神経系は、睡眠/覚醒のリズム、自発運動量、摂食/飲水、学習・記憶、認知などに関する多くの機能を持ち重要なアミン系神経系である。ヒトにおいて、かぜ薬などに汎用されているヒスタミン H1 拮抗薬使用時に痙攣が誘発されたという多くの臨床報告がある。これは成熟小動物でも観察される知見なので、ヒスタミン神経変性疾患が存在するとすれば、ヒスタミン神経系の生体における役割が明らかになるばかりか、新たな治療薬が誕生する可能性がある。そこで、トランスジェニックマウスモデルを作成することを考えた。この実験に取り掛かる前に認知機能テストや疾患モデル動物の病態を把握する必要があったので、一次てんかんモデルと考えられている、ペンチレンテトラゾール(PTZ)キンドリングマウスを作成し、認知機能テストでどのような結果が出るか検討し、ヒスタミン神経系との関わりを明らかにした。PTZの連続投与による痙攣発作が Stage IVまたはVを3回繰り返したマウスをフルキンドリングとし、認知機能の実験にはフルキンドリングマウスについて、前頭前野関連課題、扁桃体関連課題、海馬関連課題を実行した。フルキンドリングマウスは認知機能の低下を引き起こした。ヒスタミンの含有量の低い餌を与えたマウスでは、ヒスタミンの含有量の高い餌を食べたマウスに比べ、有意に認知機能が低下していることが認められた。ヒスタミン神経系の保護のために食餌中のヒスタミンが役立つ可能性が考えられた。さらにアラキドン酸(ARA)含有食、ドコサヘキサエン酸(DHA)含有食は脳内神経保護に働くという説があり、PTZキンドリングモデルマウスのように神経系に異常をきたしたマウスにどのような作用があるか検討した。その結果は現在検討中である。

Key Words ヒスタミン神経系 てんかん ペンチレンテトラゾール(PTZ) 食餌

緒言：

ヒスタミンはアレルギーや炎症に関するメディエーターとして広く知られているが、末梢のみならず中枢に関与するヒスタミンの存在が1940年代から示唆されてきた。抗ヒスタミン薬を投与された小児やてんかん既往を持つ小児に痙攣を引き起こすケースがまれに臨床症例としてみられていたためである。1984年に渡邊らにより、中枢でヒスタミンを合成する酵素であるヒスチジン脱炭酸酵素の抗体が作られ、ヒスタミン神経系の存在が明らかになった¹⁾。

ヒスタミン神経系は、睡眠/覚醒のリズム、自発運動量、摂食/飲水、学習・記憶、認知などに関する多くの機能を持ち、重要なアミン系神経系であることが古典的薬理学手法により明らかにされてきている²⁾。これは成熟小動物でも観察される知見なので、ヒスタミン神経変性疾患が存在するとすれば、ヒスタミン神経系の生体における役割が明らかになるばかりか、新たな治療薬が誕生する可能性がある。そこで、トランスジェニックマウスモデルを作成することを考えた。この

実験に取り掛かる前に認知機能テストや疾患モデル動物の病態を把握する必要があったので、一次てんかんモデルと考えられている、ペンチレンテトラゾール(PTZ)キンドリングマウスを作成し、認知機能テストでどのような結果が出るか検討し、ヒスタミン神経系との関わりを明らかにした。

対象と方法：

PTZフルキンドリングマウスの作成：4周令の雄性ICRマウスを購入し、一週間飼育した後、35mg/kgのPTZを一日一回30日間腹腔内投与した。PTZフルキンドリングは、伊藤らの方法³⁾により、PTZの投与により痙攣スコアのステージ4または5を3回繰り返したマウスを選び出して実験に用いた。PTZフルキンドリングモデルを形成後、1ヶ月間アラキドン酸含有食、DHA含有食とその対照食を与え、2日に一回餌を交換しながら飼育した。対照には4周令で購入後一週間飼育した雄性ICRマウスに、30日間生食を腹腔内に連続投与し、引き続き1ヶ月間普通食を与えたものを用意した。マウスの飼育は室温24±1℃、12時間の明/暗サイクル条件下で行った。

行動薬理学実験：

1ヶ月特殊食または普通食摂取後のマウスについて、1週間に1課題につき行動薬理学的実験を行った。行動薬理学的試験としては、object recognition test, acoustical fear conditioning test, passive avoidance test, Morris water maze testなどを用い、ストレスのより少ないと思われる課題から実施した。

脳内モノアミンの測定：

行動薬理学的試験の後、一週間経過後、エーテル麻酔下で腹部大静脈から採血し、脳を取り出した。脳は大脳、間脳、小脳、脳幹の4部位に分け、モノアミン測定まで-80度で冷凍保存した。採取した血液は3000rpmで15分間遠心分離し、血漿を-80度に凍結保存した。脳内モノアミンは、脳の各部位を3%の過塩素酸を含む5mM EDTA溶液でホモジネーとし、上清を高速液体クロマトグラフィーにより分析した。

結果：

1. PTZ投与によるフルキンドリングマウス数と体重変化：

PTZ投与回数とフルキンドリングマウスの数を図1-aに、けいれん誘発に伴い体重の変化を図1-bに示した。

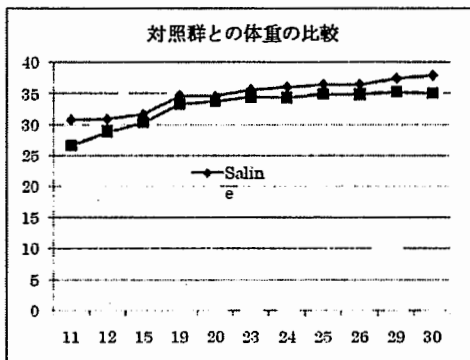
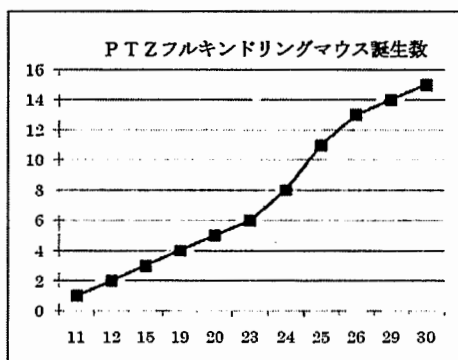


図1-a 横軸は投与回数

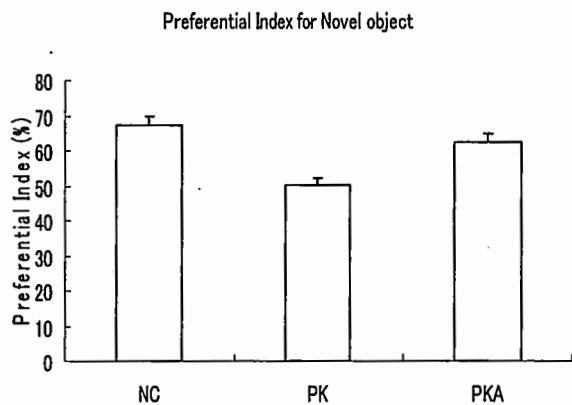
図1-b ■はPTZキンドリングマウス

投与開始後11日から23日までは直線的にフルキンドリングのマウスが増加したが、24日目からはその数が急増し、30日ではほぼ横ばいになった。この実験による大幅な体重の減少は認められな

かった。

2. PTZ 誘発フルキンドリングマウス⁴⁾の行動薬理学実験

行動薬理的試験としては、object recognition test(前頭前野関連課題), acoustical fear conditioning test(扁桃体関連課題), passive avoidance test(前頭前野・扁桃体・海馬関連課題), Morris water maze test(海馬関連課題)など、異なる脳部位を用いる課題を用い、ストレスのより少ないと思われる課題から実施した。現在結果は解析中である。その一例として新規物体の探索実験(object recognition test)の結果を図2に示した。NCはヒスタミンの多い通常食を与えたマウスの群の結果、PKはフルキンドリング形成後ヒスタミンの少ないアラキドン酸食の対照食を与えたマウス群の結果、PKAはアラキドン酸食を与えた群の結果である。図2に見られるように、ヒスタミンの少ない対照食を与えたフルキンドリング群では明らかに新規物体探索能力が低下していることが認められた。DHA食を与えた群はアラキドン酸食を与えた群とほぼ同じ結果だった。



3. PTZ 誘発フルキンドリングマウスの脳内モノアミンの変化

けいれん発作や認知機能の低下を起こしたマウスではモノアミンの変化が観察されることが多い。行動薬理学実験終了後に脳を取り出しモノアミンを測定した結果のうちドパミン(図3-a)とその代謝物(図3-b)の結果を図3に示した。

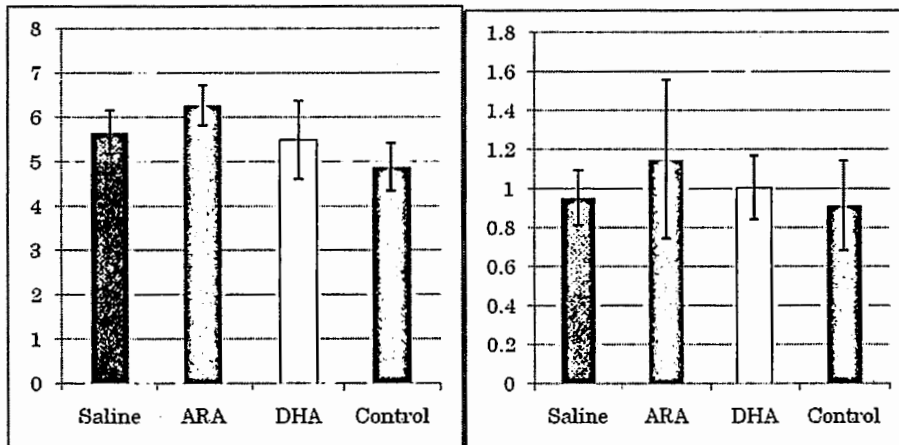


図3-a 各種食餌を2ヵ月摂取後の脳内
ドパミンレベル(nmol/g)

図3-b ドパミン代謝物である
DOPAC レベル(nmol/g)

フルキンドリングを起こしたマウスのうち、新規物体認識能が落ちていると認められたアラキド

ン酸対照食(Control)摂取群マウスの脳内ドパミンレベルはアラキドン酸摂取群に比べて有意に低下していた。代謝物の量には変わりがなかったが、けいれん発作時にドパミンが遊離されたものと考えられた。脳内ヒスタミンレベルに関しては個体差による変動が大きいため、再度検討する予定である。

考察：

PTZ 投与によるけいれん誘発は認知能力に影響を及ぼすが、本研究からヒスタミンの多い食餌を取ったマウスでは認知機能の低下を防ぐことが可能であることが示唆された。食事の取り方により認知機能障害の程度を減らすことが可能であるかもしれないことが示唆された。

謝辞：

本研究に対し助成金をいただいて研究を行えたことは、今後の発展につながると深く感謝申し上げます。日中友好に役立つことをしたいと考えております。

参考文献：

1. Watanabe T, Taguchi Y, Shiosaka S, Tanaka J, Kubota H, Terano Y, Tohyama M, Wada H. Distribution of the histaminergic neuron system in the central nervous system of rats; a fluorescent immunohistochemical analysis with histidine decarboxylase as a marker. *Brain Res.* 295(1):13-25 (1984).
2. Watanabe T & Yanai K. Studies on functional roles of the histaminergic neuron system by using pharmacological agents, knockout mice and positron emission tomography. *Tohoku J. Exp. Med.* 195: 197-217 (2001).
3. Ito T, Hori M, Yoshida K, Shimizu M. Effect of anticonvulsants on seizures developing in the course of daily administration of pentetrazol to rats. *Eur J Pharmacol.* 45(2):165-72 (1977).
4. Jia F, Kato M, Dai H, Xu A, Okuda T, Sakurai E, Okamura N, Lovenberg TW, Barbier A, Carruthers NI, Iinuma K, Yanai K, Effects of Histamine H3 antagonists and Donepezil on Learning and Mnemonic Deficits Induced by Pentylene tetrazol Kindling in Weanling Mice, *Neuropharmacology*, 50(4):404-411 (2006).

作成日：2008年3月24日