

学 位 論 文 題 名

ムスカリン様M₁受容体作動薬のラット交感神経活動に
およぼす影響に関する研究

学位論文内容の要旨

1. 目 的

ムスカリン様アセチルコリン受容体は、ラジオリガンドの受容体への結合および選択的拮抗薬に対する反応の違いによって薬理学的にM₁、M₂およびM₃の3種類に分類されている。このうち、M₁受容体は交感神経節、大脳皮質および海馬に多く存在することが知られている。本研究では、新しいM₁受容体作動薬、AF102B, (±)-cis-2-methyl-spiro(1,3-oxathiolane-5,3') quinuclidine hydrochloride hemihydrate の交感神経節伝達におよぼす影響について交感神経活動および副腎髄質機能を指標として麻酔ラットを対象に検討した。

2. 方 法

動物：13週齢前後の Wistar 系雄ラットを用いた。実験には、神経無傷ラットに加えて、両側頸部迷走神経、頸動脈洞神経および大動脈減圧神経を切断した調圧神経切断ラットならびに脊髄破壊ラットを用いた。urethane と α -chloralose の腹腔内投与により麻酔し、gallamine triethiodide で不動化した後、人工呼吸下にて実験をおこなった。血圧と心拍数は、股動脈カニューレに接続した圧トランスデューサーにより、連続的にモニターした。薬物は、股静脈に留置したカニューレより投与した。

交感神経活動記録：交感神経節前線維である副腎交感神経および節後線維である下心臓交感神経は、それぞれ手術用顕微鏡下で分離した。神経の中枢側断端を白金-イリジウム双極電極に載せ、遠心性放電活動を増幅し、出力をオシロスコープでモニターした。神経活動は、累積積分器で積分すると同時に、データ処理コンピューターでノイズレベルを越えた生体信号を計測し、サーマルアレイ・レコーダーにて連続記録した後、解析した。

副腎静脈血中カテコールアミン分泌速度測定：副腎静脈血採取は、左副腎静脈に直接カニューレを挿入しておこなった。採血時間と採血量より副腎静脈血流量を算出した。分離した血漿をア

ルミナ吸着法にて処理し、HPLC-ECD 法によりエピネフリン(Ep), ノルエピネフリン(NE) およびドーパミン (DA) 濃度を測定した。

薬物：AF102B, atropine sulfate および pirenzepine dihydrochloride を用いた。これらの薬物は、生理食塩水に溶解し、投与液量が常に0.5ml/kgとなるように調整した。対照群には等量の生理食塩水を投与した。

3. 結 果

1. 交感神経活動に対する AF102B の影響：神経無傷ラットでは AF102B 1 mg/kg および 10 mg/kg 投与により、交感神経節後線維である下心臓交感神経活動 (ICNA) は用量依存的かつ有意に増加した。この反応は、アトロピン (1 mg/kg) の前投与により拮抗された。ICNA 増加反応は調圧神経切断ラットでも観察された。脊髄破壊ラットでは、AF102B による ICNA 増加反応は顕著となった。この反応は、ピレンゼピン (50 μ g/kg) の前投与により拮抗された。交感神経節前線維である副腎交感神経活動 (ANA) は AF102B 1 mg/kg および 10 mg/kg のいずれの用量においても、対照群と比較して有意な増加反応を示さなかった。

2. 副腎静脈血中カテコールアミン分泌に対する AF102B の影響：AF102B 1 mg/kg および 10 mg/kg 投与により、副腎静脈血中への Ep 分泌速度は、副腎静脈血流量の変化を伴うことなく、用量依存的かつ有意に増加した。AF102B による Ep 分泌の亢進は、ピレンゼピン (50 μ g/kg) の前投与により有意に抑制された。

3. 血圧に対する AF102B の影響：神経無傷ラットの血圧は、AF102B の投与により、1 mg/kg 投与群では一過性の降圧反応の後軽度上昇した。しかし、10 mg/kg 投与群では一過性の降圧後も、血圧は投与前値を上回ることにはなかった。AF102B 投与による一過性の血圧低下はアトロピン (1 mg/kg) の前投与で抑制された。調圧神経切断ラットでも一過性の血圧低下が認められた。脊髄破壊ラットでは薬物投与前の血圧は神経無傷ラットと比較して有意に低値であり、AF102B 10 mg/kg 投与で一過性に軽度低下した後、有意に上昇した。この二相性の反応は、ピレンゼピン (50 μ g/kg) の前投与により有意に抑制された。

4. 心拍数に対する AF102B の影響：神経無傷ラットの心拍数は AF102B 1 mg/kg および 10 mg/kg 投与により、血圧と同様に一過性の徐脈の後増加する、用量依存的な二相性の反応を示した。徐脈に対しアトロピン (1 mg/kg) は拮抗作用を示さなかったが、頻脈を有意に抑制した。脊髄破壊ラットの心拍数も同じく二相性の反応を示した。心拍数増加反応はピレンゼピン (50 μ g/kg) の前投与により有意に抑制された。

4. 考 察

AF102B は神経無傷ラットにおいて、ICNA を用量依存的に増加させた。この ICNA 増加反応が、AF102B 投与直後の一過性の血圧低下に対する反射性の反応である可能性は、調圧神経切断ラットにおいても ICNA 増加がみられたことから否定される。また、脊髄破壊ラットでも ICNA 増加反応がみられたことから、中枢を介した交感神経興奮作用による反応ではないと考えられた。この AF102B による ICNA 増加反応は選択的 M_1 受容体拮抗薬であるピレンゼピンで拮抗された。以上の結果は、AF102B が星状神経節において M_1 受容体を介した交感神経刺激作用を有することを示すものと考えられた。また、AF102B は副腎髄質において、ANA の増加を伴うことなく Ep 分泌を亢進させ、この反応はピレンゼピンで有意に拮抗された。したがって、AF102B は副腎髄質クロマフィン細胞に存在する M_1 受容体を直接刺激することにより、Ep 分泌を亢進させたものと考えられる。

AF102B 投与により神経無傷ラットおよび脊髄破壊ラットのいずれでも一過性の降圧が見られ、この反応は、アトロピンあるいはピレンゼピンで拮抗された。血管内皮のムスカリン様 M_1 あるいは M_2 受容体を介する刺激はいずれも血管を弛緩させることが知られているが、AF102B 投与直後にみられる一過性の降圧反応には血管平滑筋の M_1 受容体の関与が推測された。AF102B 10mg/kg 投与による神経無傷ラットの血圧は、一過性の降圧から回復した後も投与前値を上回ることにはなかった。一方、脊髄破壊ラットでは著明な昇圧反応がみられ、これはピレンゼピンで拮抗された。このような神経無傷ラットと脊髄破壊ラットにおける血圧の反応の相違について二つの可能性が考えられた。第一は、血管の緊張性 (tonus) の違いによるもので、緊張性が低い時にはアセチルコリンはムスカリン様 M_1 受容体を介して血管の収縮を起こし、緊張性が高い時には弛緩させることが報告されている。脊髄破壊ラットでは AF102B 投与前にすでに血管の緊張性が著しく低下しているため、 M_1 受容体を介した血管収縮作用のみがみられた可能性が考えられた。第二は脊髄破壊による交感神経節伝達機構の変化の可能性である。すなわち、神経無傷ラットでは交感神経節前線維から放出されるアセチルコリンによるニコチン様受容体への緊張性刺激が交感神経節伝達の主体をなし、これが血圧の維持に主要な役割を果たしている。これに対して、脊髄からの緊張性入力消失している脊髄破壊ラットでは、この交感神経節におけるニコチン様受容体を介した機構が作動せず、ムスカリン様受容体を介した交感神経興奮作用が節伝達の主体となり、その結果、AF102B の交感神経興奮作用による昇圧反応が顕著に現れたという可能性がある。

心拍数は、AF102B 投与後一過性に減少した後増加する二相性の反応を呈した。一過性の徐

脈については、ピレンゼピンでもアトロピンでも拮抗できず、 M_1 、 M_2 以外の受容体を介した反応と考えられた。心拍数増加反応は、神経無傷ラットおよび脊髄破壊ラットのいずれにおいても認められた。この反応は ICNA と平行した時間的経過を示し、ICNA 同様ピレンゼピンで拮抗された。このことから AF102B による心拍数増加は、星状神経節における M_1 受容体を介した心臓交感神経興奮によるものと考えられた。

5. 結 語

- 1) AF102B は神経無傷ラットにおいて用量依存的に心臓交感神経活動および心拍数を増加させた。
- 2) AF102B は脊髄破壊ラットにおいても心臓交感神経活動および心拍数を増加させた。これらの反応はムスカリン様 M_1 受容体の選択的遮断薬であるピレンゼピンの前投与によって抑制された。
- 3) 交感神経節前線維である副腎交感神経活動は、AF102B 投与によって増加しなかった。
- 4) AF102B は副腎の血流量の増加を伴うことなく、エピネフリンの分泌を有意に増加させた。この反応はピレンゼピンの前投与により抑制された。

以上より、AF102B は交感神経節刺激作用を有し、これはムスカリン様 M_1 受容体を介したものであることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 齋 藤 秀 哉

副 査 教 授 本 間 研 一

副 査 教 授 菅 野 盛 夫

新しい M_1 受容体作動薬 AF102B, (±)-cis-2-methyl-spiro (1, 3-oxathiolane-5, 3') quinuclidine hydrochloride hemihydrate の交感神経節伝達におよぼす影響について交感神経活動および副腎髄質機能を指標として麻酔ラットを対象に検討した。

I. 実験方法: 13週齢前後の Wistar 系雄ラットを用いた。実験には、神経無傷ラット、調圧神経切断ラットならびに脊髄破壊ラットを用いた。urethane と α -chloralose の腹腔内投与によ

り麻酔し、gallamine triethiodide で不動化した後、人工呼吸下にて実験をおこなった。

副腎交感神経および下心臓交感神経は、それぞれ顕微鏡下で分離した。神経の中樞側断端を白金-イリジウム双極電極に載せ、遠心性放電活動を増幅し、出力をオシロスコープでモニターした。神経活動は、累積積分器で積分すると同時に、データ処理コンピュータでノイズレベルを越えた生体信号を計測し、サーマルアレイ・レコーダーにて連続記録したのち解析した。

HPLC-ECD 法により副腎静脈血中エピネフリン(Ep)、ノルエピネフリン (NE) およびドーパミン (DA) 濃度を測定した。

II. 結果：1) 神経無傷ラットでは AF102B 1 mg/kg および 10 mg/kg 投与により、交感神経節後線維である下心臓交感神経活動 (ICNA) は用量依存的かつ有意に増加した。この反応は、アトロピン (1 mg/kg) の前投与により拮抗された。ICNA 増加反応は調圧神経切断ラットでも観察された。脊髄破壊ラットでは、AF102B による ICNA 増加反応は顕著となった。この反応は、ピレンゼピン (50 μ g/kg) の前投与により拮抗された。交感神経節前線維である副腎交感神経活動 (ANA) は AF102B 1 mg/kg および 10 mg/kg のいずれの用量においても、対照群と比較して有意な増加反応を示さなかった。2) AF102B 1 mg/kg および 10 mg/kg 投与により、副腎静脈血中への Ep 分泌速度は、副腎静脈血流量の変化を伴うことなく、用量依存的かつ有意に増加した。AF102B による Ep 分泌の亢進は、ピレンゼピン (50 μ g/kg) の前投与により有意に抑制された。3) 神経無傷ラットの血圧は、AF102B 投与により、1 mg/kg 投与群では一過性の降圧反応ののち軽度上昇した。しかし、10 mg/kg 投与群では一過性の降圧後も、血圧は投与前値を上回ることにはなかった。AF102B 投与による一過性の血圧低下はアトロピン (1 mg/kg) の前投与で抑制された。調圧神経切断ラットでも一過性の血圧低下が認められた。脊髄破壊ラットでは薬物投与前の血圧は神経無傷ラットと比較して有意に低値であり、AF102B 10 mg/kg 投与で一過性に軽度低下したのち有意に上昇した。この二相性の反応は、ピレンゼピン (50 μ g/kg) の前投与により有意に抑制された。4) 神経無傷ラットの心拍数は AF102B 1 mg/kg および 10 mg/kg 投与により、血圧と同様に一過性の徐脈ののち増加する用量依存的な二相性の反応を示した。徐脈に対しアトロピン (1 mg/kg) は拮抗作用を示さなかったが、頻脈を有意に抑制した。脊髄破壊ラットの心拍数も同じく二相性の反応を示した。心拍数増加反応は、ピレンゼピン (50 μ g/kg) の前投与により有意に抑制された。

III. 考察ならびに結語：AF102B は神経無傷ラットにおいて、ICNA を用量依存的に増加させた。この ICNA 増加反応が、AF102B 投与直後の一過性の血圧低下に対する反射性の反応である可能性は、調圧神経切断ラットにおいても ICNA 増加がみられたことから否定される。また、

脊髄破壊ラットでも ICNA 増加反応がみられたことから、中枢を介した交感神経興奮作用による反応ではないと考えられた。この AF102B による ICNA 増加反応は選択的 M_1 受容体拮抗薬であるピレンゼピンで拮抗された。以上の結果は、AF102B が星状神経節において M_1 受容体を介した交感神経刺激作用を有することを示すものと考えられた。また、AF102B は副腎髄質において、ANA の増加を伴うことなく Ep 分泌を亢進させ、この反応は、ピレンゼピンで有意に拮抗された。したがって、AF102B は副腎髄質クロマフィン細胞に存在する M_1 受容体を直接刺激することにより、Ep 分泌を亢進させたものと考えられる。

口頭発表に際して、菅野教授から、神経節 M_1 受容体刺激による slow EPSP の発現機序、AF102B の M_1 受容体に対する親和性など、本間教授からは脊髄破壊ラットの作成法、「脊髄破壊をどのようにして確認したのか」について質問があったが、申請者はおおむね適切な解答をなし得たと考える。また、副査の菅野および本間両教授からは、詳細なる論文審査ならびに面接の試験が課せられた。

本論文は、新しい M_1 受容体作動薬 AF102B が *in vivo* において交感神経節刺激作用を有し、これはムスカリン様 M_1 受容体を介したものであることを解明した研究であり学位に値すると判定された。