

学 位 論 文 題 名

Effects of clobazam and its active metabolite  
on GABA-activated currents in rat  
cerebral neurons in culture

(ラット培養大脳神経細胞の GABA 活性化電流に  
対する cl obazam とその活性代謝産物の作用)

学位論文内容の要旨

従来の benzodiazepine 系薬物が diazepine 環の第 1 位と第 4 位に N 原子を有する 1,4-benzodiazepine であるのに対し、clobazam (CLB) は第 1 位と第 5 位に N 原子を有する 1,5-benzodiazepine に属する。1979 年、Gastaut らが難治性てんかんの付加薬として効果があったと報告して以来、動物実験と臨床試験で抗てんかん作用が調べられてきた。最大電撃けいれん、薬剤誘発性けいれん、キンドリング、遺伝性てんかん動物などの動物実験のいずれでも CLB は効果を示し、各種抗てんかん薬と比べても効果が明らかで、1,4-benzodiazepine よりも優れているとされる。22 の研究における 850 症例で CLB の効果をまとめた報告では、全体で 65% の発作頻度の減少をもたらした。CLB の代謝産物である N-desmethyloclobazam (DMCLB) にも活性があり、半減期が長いので長期投与中の患者では血漿濃度が CLB の 10~20 倍と高く、DMCLB の血漿濃度と抗けいれん作用の間に明らかな相関が認められたとする報告がある。このため、CLB の経口長期投与における抗てんかん薬としての効果は、主に DMCLB によるものと考えられたが、詳細な分析は行われてこなかった。CLB の抗てんかん効果の作用機序は 1,4-benzodiazepine と同じく  $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) 受容体の benzodiazepine 結合部位に働き、Cl<sup>-</sup> チャネルの開閉頻度を増加させて GABA 作動性電流を増強するためと考えられる。本研究はラット培養神経細胞において、GABA が活性化するイオン電流に対する CLB と DMCLB の作用を明らかにした。

実験には胎生 15 日目の Wister 系ラットの初代培養の神経細胞を用いた。胎児脳の大脳半球を分離して髄膜を除去後、リン酸緩衝液中に混和し細胞レベルまで破碎した。濾過して得られた神経細胞を 10% ウシ胎児血清を含む Ham-MEM 培養液中に懸濁させ、 $5 \times 10^4$  cell/cm<sup>2</sup> になるように調整し、35mm ペトリディッシュ内で 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-air 中で培養した。実験には培養後 4~7 日目の細胞を用いた。whole cell voltage clamp 法を適用し、パッチ電極を用いて細胞を任意の電位に固定した状態で細胞膜を横切る電流

を記録した。細胞内液には陰イオンとして acetate イオンを用いた。また、GABA<sub>B</sub> 受容体による K<sup>+</sup> 電流の混入を防ぐために、K<sup>+</sup> に代えて Cs<sup>+</sup> を用いた。GABA 作動性電流の run-down を防ぐために、MgCl<sub>2</sub> の代わりに実験の直前に MgATP を加えた。GABA を種々の濃度の CLB や DMCLB あるいは flumazenil と混和し、細胞表面から 70~100 μm の距離に置かれたマイクロピペットから圧力によって 2秒間投与し、同濃度の GABA のみの投与によって得られる電流量と比較した。

Cl<sup>-</sup> イオン濃度が細胞外 159mM 細胞内 10.2mM、-60~60mV の静止膜電位において CLB 単剤投与でイオン電流は見られなかった。同様のイオン状況下で 3 μM CLB を 10 μM GABA と共に投与すると、外向き電流が増強した。この増強効果が認められた直後に benzodiazepine 受容体の拮抗薬である flumazenil を CLB と GABA と同時に投与したところ、10 μM の flumazenil は CLB の GABA に対する増強効果を完全に抑制した。-20, 0, 20mV の静止膜電位で 0.01~100 μM の様々な濃度の CLB を 10 μM GABA に加えて投与し、GABA 活性化電流に対する CLB の増強効果の程度を、GABA 単剤の活性化電流に対する比率として計算した。この CLB の増強比は 3 μM まで濃度依存性に増加し、3 μM CLB に対して最高値 2.28 倍に至ったが、10 μM 以上になると減少した。これら CLB の増強比は -20, 0, 20mV の静止膜電位の各 CLB 濃度でほぼ同様であった。DMCLB についても CLB と同様に flumazenil によって GABA に対する増強効果が完全に抑制された。-20, 0, 20mV の静止膜電位で 0.01~100 μM の様々な濃度の DMCLB を 10 μM GABA に加えて投与したところ、DMCLB の増強比は 3 μM まで濃度依存性に増加し、3 μM DMCLB に対して最高値 2.22 倍に至ったが、10 μM 以上になると減少した。DMCLB の濃度依存性の反応は CLB の場合と同様であった。10 μM CLB の 1, 10, 100 μM の GABA に対する GABA 活性化電流の増強効果の違いを調べたところ、CLB による増強効果は 1 μM GABA で有意に大きく、100 μM GABA で有意に小さかった。CLB の GABA 活性化電流の増強効果はより低濃度の GABA で大きかった。

benzodiazepine 受容体の選択的阻害剤である flumazenil が CLB と DMCLB の GABA 活性化電流を増強する作用を阻害したことから、CLB と DMCLB は benzodiazepine 受容体に結合して作用することが明らかとなった。CLB と DMCLB の各 3 μM における最大 2.28 倍、2.22 倍の増強作用は diazepam, clonazepam, nitrazepam などの 1,4-benzodiazepine に関する研究で得られた値とほぼ同じであることから同様の作用機序と考えられた。発作が抑制された患者の血漿 CLB, DMCLB 濃度が報告されており、CLB と DMCLB 全体の蛋白結合率はヒトで 85% である。蛋白非結合の薬物が脳内に移行するとして、これから推定される CLB と DMCLB の髄液中の濃度はそれぞれ 0.02~0.17 μM, 0.3~1.5 μM となる。この値は本研究で GABA 作動性電流が増強された濃度範囲内であるが、DMCLB は CLB と同様の用量依存性の増強作用を示したことから、CLB の抗てんかん作用の基となるのは、より多く血漿中に存在する代謝産物の DMCLB であると考えられた。CLB は GABA の高濃度におけるより低濃度において活性化電流をより強く増強した。このことは GABA の放出が減少した組織においてより効果的に働くことを意味する。ヒトのてんかん原性組織における GABA 濃度を調べた

研究の結論は一致していないが、てんかん原性組織では神経細胞興奮時の GABA 放出が減少しているとの報告がある。本研究の結果は、発作活動によって本来放出される GABA が枯渇したてんかん原性組織において、CLB は GABA 作動性の抑制をより選択的に増強することで効果的に作用することを示唆している。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 山 司  
副 査 教 授 菅 野 盛 夫  
副 査 教 授 田 代 邦 雄

## 学 位 論 文 題 名

### Effects of clobazam and its active metabolite on GABA-activated currents in rat cerebral neurons in culture

(ラット培養大脳神経細胞の GABA 活性化電流に  
対する cl obazam とその活性代謝産物の作用)

Clobazam (CLB) は第1位と第5位にN原子を有する 1,5-benzodiazepine に属する。1979年、Gastaut らが難治性てんかんの付加薬として効果があったと報告して以来、動物実験と臨床試験で抗てんかん作用が調べられてきた。22の研究における 850 症例で CLB の効果をまとめた報告では、全体で 65%の発作頻度の減少をもたらした。CLB の代謝産物である N-desmethyloclobazam (DMCLB) にも活性があり、CLB の経口長期投与における効果は主に DMCLB によるものと考えられたが、詳細な分析は行われてこなかった。本研究はラット培養神経細胞において、GABA が活性化するイオン電流に対する CLB と DMCLB の作用を明らかにした。実験には胎生 15日目の Wister 系ラットの初代培養神経細胞を用いた。whole cell voltage clamp 法を適用し、細胞を任意の電位に固定し、細胞膜を横切るイオン電流を記録した。GABA を種々の濃度の CLB, DMCLB あるいは flumazenil と混和し、細胞近傍に置いたマイクロピペットより投与した。CLB あるいは DMCLB の単剤投与ではイオン電流は見られなかった。3  $\mu$ M CLB、あるいは DMCLB を 10  $\mu$ M GABA と共に投与すると外向き電流が増強した。この直後に benzodiazepine 受容体の拮抗薬である flumazenil 10  $\mu$ M を同時に投与したところ、GABA に対する増強効果は完全に抑制された。-20, 0, 20mVの静止膜電位で 0.01~100  $\mu$ M の様々な濃度の CLB あるいは DMCLB を 10  $\mu$ M GABA に加えて投与し、GABA 単剤の活性化電流に対する比率を計算した。この増強比は CLB と DMCLB のいずれでも 3  $\mu$ M まで濃度依存性に増加し、3  $\mu$ M CLB で最高値 2.28倍、3  $\mu$ M DMCLB で最高値 2.22倍に至ったが、10  $\mu$ M 以上になると減少した。CLB と DMCLB 全体の蛋白結合率はヒトで 85%であり、発作が抑制された患者の血漿濃度から推定される CLB と DMCLB の髄液濃度はそれぞれ 0.02~0.17  $\mu$ M, 0.3~1.5  $\mu$ M と計算される。この値は

GABA 作動性電流が増強された濃度の範囲であるが、DMCLB は CLB と同様の用量依存性の増強作用を示したことから、CLB の抗てんかん作用の基となるのは DMCLB であると考えられた。10  $\mu$ M CLB の 1, 10, 100  $\mu$ M の GABA に対する GABA 活性化電流の増強効果の違いを調べたところ、CLB の GABA 活性化電流の増強効果はより低濃度の GABA で有意に大きかった。このことは、発作活動によって本来放出される GABA が枯渇したてんかん原性組織においてより効果的に働くことを意味すると考えられた。

以上の発表に際し、質問を受け回答した。菅野盛夫教授。(1) CLB, DMCLB 10  $\mu$ M 以上の濃度で増強効果が落ちてくるのはなぜか。1,4-benzodiazepine に関しても同様の報告があり、Cl<sup>-</sup>チャンネルを直接抑制する、あるいは非特異的な細胞膜に対する作用であると推論されている。(2) 直接作用であるとする根拠は何か。機序は明らかでないが、100  $\mu$ M 以上の濃度では本来の GABA 作用の増強はおろか抑制してしまうことと、この濃度では flumazenil によって反応が抑制できないことから、benzodiazepine 受容体を介する反応ではないと判断される。(3) 薬剤の washout の影響は検討したか。1分間隔で薬剤投与を繰り返したが、投与直後は速やかに反応が終了し、周囲の細胞外液によって投与薬剤が希釈されることを確認している。(4) 薬剤投与するマイクロピペットの設置部位による反応の差はなかったか。GABA と CLB, DMCLB, flumazenil をあらかじめ混合して投与したので差は出なかった。田代邦雄教授。(1) ヒトのてんかん原性組織に関する GABA の減少とは何か。てんかん患者のてんかん原生焦点の組織で、発作時の GABA 放出が減少しているとの報告に基づく。(2) 日本での CLB の臨床使用はどうなっているか。現在、前臨床段階にある。(3) 間欠投与の可能性は。生物学的半減期が長く、間欠投与では薬剤耐性を引き起こしにくいとして勧める臨床報告がある。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、方法論、論旨が明確で一貫しており、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。