

博士（薬 学） 大 滝 康 一

学 位 論 文 題 名

ブレインマイクロダイアリシス法による薬物  
(パラコート、セフォセリス) の血液脳関門透過性の  
評価とそれら薬物の神経毒性の機序

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【序論】薬毒物の血液脳関門 (BBB) 透過性を研究するには、様々な手法が用いられてきた。これらの方ははそれぞれ利点を持つが、一方では限界がある。ブレインマイクロダイアリシス法は、もし実験的な条件がうまくコントロールされていれば、薬毒物の BBB 透過性を検討する上で、極めて有効な *in vivo* の手法である。

本研究においては、従来は BBB の透過性はないと考えられてきた 2 つの薬毒物 (パラコートとセフォセリス) について、BBB の透過性を証明し、中枢神経内での毒性機序に関する研究を行った。

I. パラコートの血液脳関門透過性と神経毒性発現機序

【序論】除草剤であるパラコート (PQ) は、化学的パーキンソン病誘発物質である合成麻薬 MPTP の活性化体である MPP<sup>+</sup>と極めて構造が類似しているが、MPP<sup>+</sup>と同様に BBB を通過しないと考えられていた。そこで、我々は、PQ の BBB 透過性・脳細胞への取り込み・神経細胞毒性の発生機序に関して検討を行った。

【結果・考察】

1. PQ の BBB 透過性と中枢神経細胞への取り込み<sup>1)</sup>

PQ をラット頸部に皮下注射後、脳脊流液から投与量依存的に PQ を検出した。PQ の BBB 透過が、PQ による BBB の器質的障害に基づくものではないことを、PQ 投与後に投与した MPP<sup>+</sup>が、脳脊流液から検出されないことから証明した。PQ の化学構造から、アミノ酸輸送系の関与が考えられた。そこで、アミノ酸輸送系に高親和性を有するアミノ酸を、各輸送系飽和を目的に PQ 投与前に腹腔内投与し、PQ の BBB 透過性の変化を観察した。パリソニンによってのみ有意に PQ の BBB 透過が阻害されたため、PQ の BBB 透過には、中性アミノ酸輸送系の関与が示唆された。また、PQ の脳内取り込み機構について検討したところ、Na<sup>+</sup>依存性であり、阻害剤投与実験から、ドバミン (DA) トランスポーターの関与が示唆された。

2. DA 神経への毒性機構とその保護作用<sup>2,3)</sup>

PQ を 5 日間皮下投与することにより、皮質・線条体・中脳の DA とその代謝物の含量が著明に減少していた。従って、PQ は、DA 神経に選択性的毒性を示すことが推測された。ブレインマイクロダイアリシス法によって、PQ を透析膜から直接線条体内へ灌流したところ、一過性に細胞外液中のグルタミン酸 (Glu) 濃度が用量依存的に上昇した。この Glu 放出にやや遅れて、NO の放出が認められた。この NO の放出とほぼ同時に、DA 放出が認められた。この DA 放出の程度は軽微であったが、PQ 灌流終了後、24 時間後にも観察され、DA 神経への影響は極めて長時間持続した。この PQ による DA の長時間に及ぶ放出は、神経の持続的障害に基づくと考えられた。また、阻害剤投与による実験から DA 神経終末に

に対する PQ の毒性は、Glu を介した興奮性毒性を起点とすると考えられた。

ラット中脳切片培養による毒性を検討したところ、PQ は用量依存的に DA 神経の細胞死を生じさせた。50  $\mu$ M の PQ によって誘発される細胞毒性は、DA 取り込み阻害剤で完全に抑制され、MK-801 及び L-NAME によっても抑制された。蛋白合成阻害剤はこの細胞死を抑制せず、PQ 単独の細胞死にはアポトーシスの関与は小さいことが示唆された。一方、それぞれの単独投与では DA 細胞死を誘発しない量である、10  $\mu$ M の PQ と 1  $\mu$ M の MPP<sup>+</sup> の連続曝露により著明な DA 神経細胞死が誘発された。この結果は、低濃度の PQ 曝露によって DA 神経が脆弱化されることを示唆した。この細胞死は、caspase 3, 9 の阻害剤及び蛋白合成阻害剤によって強く抑制され、アポトーシスの関与が示唆された。また、この細胞死は、MK-801, DNQX, L-NAME 及び deprenyl によって抑制された。更に、ドパミン D2/3 アゴニストによって、細胞死はほぼ完全に抑制された。このことから、PQ 及び MPP<sup>+</sup>の誘発する細胞毒性の制御に、ドパミン D2/3 受容体が関与していることが示唆された。

## II. 新世代の $\beta$ ラクタム系抗生物質は血液脳関門を透過し痙攣を誘発する<sup>4)</sup>

【序論】セフェム系の抗生物質は、透析中の患者や腎不全患者において中枢神経障害の発症例が多く報告されている。一般に、 $\beta$  ラクタム系抗生物質の血液脳関門透過性は小さいと考えられてきたため、中枢神経障害は予想されがたいものであった。我々は、この重篤な副作用である痙攣を誘発する機序を明らかにすることを目的として研究を行った。

### 【結果と考察】

#### 1. セフォセリスの BBB 透過性の検討

セフォセリスの BBB 透過性は、ラット線条体にプローブを挿入しリングル液を灌流した。灌流開始 4 時間後に、セフォセリスまたはセファゾリンを静脈投与後、灌流液および尾静脈血を経時に採取した。セフォセリスは用量依存的に脳神経細胞外液から検出されたが、セファゾリンは検出されなかった。このことは、従来の  $\beta$  ラクタム系抗生物質は血液脳関門を通過し難いということを裏付けるものであるが、新しく開発されたセフォセリスなどは BBB を通過することを示した。この理由としてセフォセリスの有するベタイン骨格の部位が水溶性を打ち消し、その結果高脂溶性をもたらし受動拡散するとも考えられる。一方、脳内からの見かけの消失速度定数は、正常ラットにおいては、血液中からの消失速度定数よりも低かった。更に、腎不全ラットにおいては、セフォセリスの血中と脳細胞外液中濃度比が正常ラットに比べ有意に低かった。これらのこととは、BBB の構造内にセフォセリスの取り込みや排出に関与する担体の存在が示唆される。

高度の腎不全モデルのラットにおいては、セフォセリス濃度測定開始当初からみられる高濃度状態が、実験時間内において常時継続した。腎不全に起因する脳内での長時間・高濃度のセフォセリスの存在が、けいれん等の中枢性の障害を引き起こしていると考えられた。しかし、腎不全ラットにおいてもけいれんを誘発させるためには、極めて高用量のセフォセリスが必要とされる。従って、加齢に伴う何らかの脳の機能低下がけいれんに関与していると推測された。

#### 2. セフォセリスの痙攣誘発機構

セフォセリス投与による海馬の Glu 及び GABA をマイクロダイアリシス法により測定した。透析プローブを介して直接セフォセリスを海馬に投与すると、細胞外液中の GABA の変化は少なかったが、Glu 放出は用量依存的に増大した。しかし、セフォセリスを末梢静脈から腎不全モデルに投与した場合、痙攣誘発は認められるものの海馬での Glu の著明な放出は認められなかった。従って、セフォセリスの痙攣誘発機構は、直接興奮性アミノ酸の放出を促進して起こるのではなくて、恐らく GABA 受容体の拮抗作用によるものと考えられる。

### 【参考文献】

1. Shimizu K, et al. (2001) *Brain Res.* 906: 135-142.
2. Shimizu K, et al. (2003) *Brain Res.* 976: 243-252.
3. Shimizu K, et al. (2003) *Neurosci. Res.* 46: 523-532.
4. Ohtaki K, et al. *J. Neural Transm.* in press.

## 学位論文審査の要旨

主査教授 井関 健 (臨床薬剤学分野)  
副査教授 松原 和夫 (旭川医科大学)  
副査教授 宮崎 勝巳 (薬物動態解析学分野)  
副査助教授 宮内 正二 (生物物理化学分野)

### 学位論文題名

# ブレインマイクロダイアリシス法による薬物 (パラコート、セフォセリス) の血液脳関門透過性の 評価とそれら薬物の神経毒性の機序

本研究は、薬毒物の血液脳関門 (BBB) 透過性の検証にブレインマイクロダイアリシス法を用い、その後の中枢毒性機序を研究したものである。中枢神経系は血液脳関門によって保護されているため、一般的に脂溶性の低い薬物はこの関門を通過して脳せき髄中に到達することが困難であるとされている。しかしながら、脂溶性の低い薬物であるパラコートは急性中毒時に中枢神経症状を示すと共に、パーキンソン病発症との関連性が指摘され、セフォセリスは高齢者および腎機能障害者に於いてけいれん等の中枢神経障害が報告されるなど、薬物の脂溶性のみでは解釈できない臨床結果が多い。本研究では主としてこれらの中枢毒性が報告されている水溶性薬物を対象として、血液脳関門透過性の観点から本研究により、これまで BBB の透過性に対して疑問視あるいは確証がなかった除草剤であるブレインマイクロダイアリシス法を用いてパラコートおよび第4世代セフェム系のセフォセリスの BBB 透過性を実証した。その結果、

- 1) パラコートの BBB 透過性に比較して、その構造が類似している MPP+ はほとんど BBB を透過していないこと、パラコートの透過性に中性アミノ酸トランスポーターの関与を示唆する結果を得た。さらに、パラコートの線条体細胞内への取り込みにドパミントランスポーターの関与が示唆された。
- 2) パラコートを5日間連続投与後、脳各部位のモノアミン量を測定したところ、皮質・線条体・中脳でドパミンとその代謝物量が減少しており、ドパミン神経系への選択性 in vivo においても示唆された。また、これらの結果より、パーキンソン病発症要因の可能性を示唆した。
- 3) セフォセリスに関する研究では、パラコート同様に BBB を透過できることを本手法に

より明らかにし、腎機能の低下した患者でしばしば観察される中枢性の重篤の副作用の機序を、GABAに対する作用を介するものであると示唆した。

これらの研究成果は、臨床上極めて意義あることと認められ、今後の新たな研究への発展が期待される。

審査に当たっては、各審査担当者による持ち回り審査を実施し、申請者に対して主査より諮問並びに論文に対する加筆訂正を求めた。当論文提出者から本論文および関連領域に関する試間に適切な応答が得られ、充分な学力を有することが示された。

以上から、本論文は学位（薬学）に値するものと判断した。