

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23592675

研究課題名(和文)有機リン中毒性痙攣に対するアトロピンおよびプラリドキシムの治療的効果の実験的検証

研究課題名(英文)Influence of atropine and pralidoxime on organophosphorus cholinesterase inhibitors-induced epileptic activity

研究代表者

成松 英智(NARIMATSU, EICHI)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：70295343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、有機リン系コリンエステラーゼ阻害薬であるパラオキソンはグルタミン酸シナプス伝達を抑制し、細胞の興奮性を高めること、またカリウム濃度の上昇もまた細胞興奮性を高めることが示された。カリウム濃度の上昇がパラオキソン誘発性てんかんの発生を誘発する要因の一つであることが示唆された。アトロピンがてんかんの発生を抑制したのに対し、PAMは前投与でのみパラオキシソンのPSおよびfEPSPに対する抑制作用を防止したが、てんかんの発生は防ぐことができなかった。これは高カリウム濃度におけるパラオキソン誘発性けいれんが、わずかなムスカリン受容体刺激でも起こりうる可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：We investigated the epilepsy-inducing actions of paraoxon with elevated $[K^+]_e$ and the effects of atropine, pralidoxime, and selective muscarinic acetylcholine receptor (mAChR) antagonists on the actions of paraoxon. paraoxon-induced cholinesterase inhibition elicited epileptic activity in elevated $[K^+]_e$ but not normal $[K^+]_e$. Treatment for hyperkalemia likely prevents the development of epilepsy in organophosphate intoxication. Paraoxon-induced epileptic activity was inhibited by atropine but not by pralidoxime. Relatively weak mAChR activation likely elicited epileptic activity in 7.5 mM $[K^+]_e$. Atropine, rather than pralidoxime, may be effective at inhibiting organophosphate-induced epileptic activity.

研究分野：救急医学

キーワード：有機リン 毒 コリンエステラーゼ阻害薬 てんかん 海馬 アトロピン プラリドキシム 抗痙攣薬 中

1. 研究開始当初の背景

有機リン系コリンエステラーゼ (OP-ChE) 阻害薬中毒は、全身組織のアセチルコリン (ACh) 作動性異常亢進から意識障害、痙攣重積、徐脈、縮瞳、分泌亢進、気管支喘息、呼吸停止、等の致死的な全身症状を引き起こす。実際に国内におけるオウムサリン事件・農薬混入餃子事件・自殺者の増加、また国外紛争地域における神経剤使用、等が後を絶たない現在、その治療法確立は重要な研究・対策課題である。

OP-ChE 阻害薬中毒の死因には意識障害、痙攣重積、呼吸停止、等の中枢神経系機能失調が深く関与している。中枢神経系機能の評価には電気生理学的手法が有用である。中毒機序の一部であるムスカリン型 ACh 受容体 (mACh 受容体) を介した中枢神経系シナプス伝達修飾に関する研究が生理学的観点から進められてきた。しかし OP-ChE 阻害薬の中枢神経作用を直接評価した電気生理学的研究は、興奮性シナプス伝達抑制、GABAA 抑制性伝達抑制、痙攣誘発作用等、少数であった。また OP-ChE 阻害薬中毒治療薬であるペラドンナ剤、オキシム剤、等の治療的作用機序に言及した電気生理学的研究も少数であった。

2. 研究の目的

それまで解明が遅れていた上記問題に対し我々は、今年度までの基盤研究 (C, 19592093, 平成 19-22 年度) において、1) OP-ChE 阻害薬であるパラオキシソンのより蓄積した ACh が mACh 受容体を介してグルタミン酸シナプス伝達を抑制すると同時に神経細胞体興奮性を増強すること、2) アトロピン (mACh 受容体遮断薬、ペラドンナ剤) はパラオキシソンの影響を抑制すること、3) プラリドキシム (PAM, オキシム剤) は早期投与に限りパラオキシソンの影響を抑制すること、等を海馬スライスで解明し、論文発表した (Neurosci Res. 2010 Dec;68(4):276-84.)。

この研究経過および予備実験の中で我々は、海馬スライスにおいてパラオキシソンによる痙攣波誘発を確認した。この実験的痙攣波は OP-ChE 阻害薬中毒時に発生する臨床的痙攣のモデルの一つである。しかし、この実験的痙攣波に対するオキシム剤、ペラドンナ剤および各種抗痙攣薬の抑制作用は十分には解明されていない。臨床的 OP-ChE 阻害薬中毒に伴う痙攣の治療にはアトロピン、PAM に加えて各種抗痙攣薬が使用されるが、これらの作用機序や有効性の解析も不十分である。

以上から本研究代表者はこれまでの研究成果を直接発展させ、OP-ChE 阻害薬の痙攣誘発作用とそれに対するオキシム剤、ペラドンナ剤および各種抗痙攣薬の抑制作用についての実証的かつ詳細な検証を中枢神経系組織の多部位で行うことが不可欠と考え、本研究を計画した。

3. 研究の方法

4-5 週齢の Wistar 系ラットをイソフルラン麻酔下に断頭し、速やかに脳組織を摘出した。ピプラトームを使用し厚さ 400 μm の海馬スライス標本を作製した。標本は 1 時間以上の回復期間をおいた後、標準酸素化人工髄液 [組成 (mM): NaCl; 123.0, KCl; 4.5, CaCl_2 ; 2.5, MgSO_4 ; 1.2, NaHCO_3 ; 25.0, Na_2HPO_4 ; 1.2, glucose; 10] を灌流した実験用チャンパーに移し、電気生理学的記録を行った。記録は多点同時記録が可能な MEA system を用いて行った。海馬スライスの CA3 領域のシャッフアー側枝を刺激し、CA1 領域の錐体細胞層におかれた電極から Population spikes (PSs) を、放線状層におかれた電極から field excitatory postsynaptic potentials (fEPSP) を同時に細胞外記録した。細胞体の活動電位を反映する PS amplitude と、グルタミン酸興奮性シナプス伝達を反映する fEPSP slope を計測した。またてんかんの活動性は単発の電気刺激で発生する多発性スパイクの発生率とスパイク数で評価した。各薬剤は灌流液に目的濃度に溶解して 20 分灌流投与することとした。検討項目は、1) 標準カリウム濃度 (4.5 mM) でのパラオキシソンの影響、2) 高カリウム濃度 (6.0、7.5、9.0 mM) でのパラオキシソンの影響、3) PAM の影響、4) アトロピンの影響、5) 選択的ムスカリン受容体拮抗薬 (M1, M2, M3, M4) の影響とした。PAM およびアトロピンはパラオキシソンに対する前、同時、後投与を評価した。

4. 研究成果

1) パラオキシソンの影響

4.5 mM $[\text{K}^+]_e$ ではパラオキシソンは fEPSP slope を低下させたが、PS amplitude には影響を与えなかった。また、パラオキシソンは多発性スパイクを誘発しなかった。

2) 細胞外カリウム濃度変化による影響

6.0 mM $[\text{K}^+]_e$ への上昇は、PS amplitude と fEPSP を変化させなかった。パラオキシソンは、PS amplitude と fEPSP を低下させたが、多発性スパイクは認めなかった。7.5 mM $[\text{K}^+]_e$ への上昇は、PS amplitude を有意に上昇させたが、fEPSP slope を変化させなかった。パラオキシソンは PS amplitude と fEPSP をともに低下させた。7.5 mM $[\text{K}^+]_e$ への上昇により多発性スパイクの誘発を認めたが、パラオキシソンはその発生率とスパイク数を有意に増加させた。9.0 mM $[\text{K}^+]_e$ への上昇は、多発性スパイクの誘発とともに PS amplitude と fEPSP slope をともに低下させた。パラオキシソンは PS amplitude と fEPSP slope、および多発性スパイクの発生率とスパイク数に影響を与えなかった。7.5 mM $[\text{K}^+]_e$ への上昇が、もっともパラオキシソン誘発性てんかんに惹起したため、以降の研究の灌流液として使用した。

3) PAM の影響

PAM の前投与は、パラオキシソンによる PS

amplitude と fEPSP slope の低下を防止した。PAM とパラオキシソンの同時投与は、PS amplitude と fEPSP slope を低下させた。PAM の後投与は、パラオキシソンによる PS amplitude と fEPSP slope の低下を防ぐことができなかったが、Wash out により PS amplitude の回復を認めた。また、すべての投与手段において、PAM は多発性スパイクの発生率とスパイク数を減少させなかった。

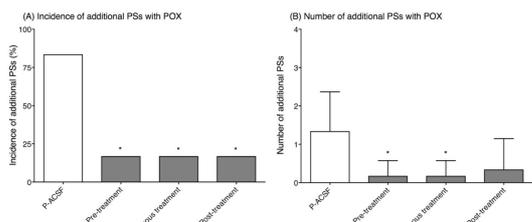


図2. POX誘発性てんかんの発生率および発生数に対するアトロピンの影響 (n=6, mean ± SD, *: p<0.05 vs. P-ACSF)

4) アトロピンの影響

アトロピンの前投与は、パラオキシソンによる PS amplitude と fEPSP slope の低下を防止した。アトロピンとパラオキシソンの同時投与は、PS amplitude と fEPSP slope に影響を与えなかった。アトロピンの後投与は、パラオキシソンによる PS amplitude と fEPSP slope の低下を回復させた。また、すべての投与手段において、アトロピンは多発性スパイクの発生率を減少させた。前投与および同時投与ではスパイク数を減少させた。

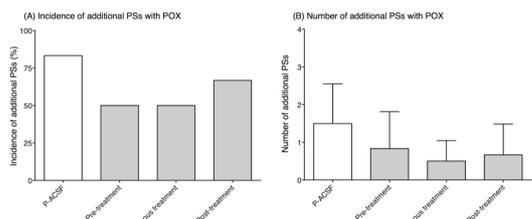


図3. POX誘発性てんかんの発生率および発生数に対するPAMの影響 (n=6, mean ± SD, *: p<0.05 vs. P-ACSF)

5) 選択的ムスカリン受容体拮抗薬の影響

ピレンゼピン (M1-mAChR 拮抗薬) は、パラオキシソンによる PS amplitude と fEPSP slope の低下を防止した。p-fluorohexahydro-sila-difenidol hydrochloride (p-HHSiD: M3-mAChR 拮抗薬) は、パラオキシソンによる PS amplitude の低下を防止したが、fEPSP slope の低下は防止できなかった。メトクロピラミド (M2-mAChR 拮抗薬) およびトロピカミド (M4-mAChR 拮抗薬) は、パラオキシソンによる PS amplitude と fEPSP slope の低下を防止できなかった。ピレンゼピンおよび p-HHSiD は多発性スパイクの発生率とスパイク数を減少させたが、メトクロピラミドおよびトロピカミドは減少させなかった。

上記の結果から、パラオキシソンはグルタミン酸シナプス伝達を抑制し、細胞の興奮性を高めること、またカリウム濃度の上昇もまた細

胞興奮性を高めることが示された。カリウム濃度の上昇がパラオキシソン誘発性てんかんの発生を誘発する要因の一つであることが示唆された。アトロピンがてんかんの発生を抑制したのに対し、PAM は前投与でのみパラオキシソンの PS および fEPSP に対する抑制作用を防止したが、てんかんの発生は防ぐことができなかった。これは高カリウム濃度におけるパラオキシソン誘発性けいれんが、わずかなムスカリン受容体刺激でも起こりうる可能性を示唆している。また、パラオキシソン誘発性てんかんは M1 および M3 mAChR 拮抗薬により抑制された。M1 および M3 mAChR は Gq/11 タンパク質共役型受容体であり、この受容体の活性化はシナプス伝達を促進する。有機リン誘発性てんかんは過剰なアセチルコリンの蓄積による Gq/11 タンパク質共役型受容体刺激によって誘発される可能性が示唆された。

また、上記実験と平行して、ChE 阻害薬であるエドホロニウムが、過剰グルタミン酸による神経細胞損傷(グルタミン酸興奮性細胞毒性)に与える影響を検証した。

過剰グルタミン酸は PS amplitude および fEPSP slope を不可逆的かつ部分的に抑制した。ChE 阻害薬であるエドホロニウムは、過剰グルタミン酸による抑制効果を強調した。また、この抑制効果はアトロピン、メトクロピラミド、トロピカミドによって阻害された。多くの急性中枢神経系病態においてアセチルコリンおよびグルタミン酸の中枢神経系組織内への放出は増加する。この研究結果は、今後の OP-ChE 阻害薬誘発性けいれん波の発生機序解析に有用だと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計2件)

Narimatsu E, Niiya T, Takahashi K, Yamauchi M, Yamakage M.

Pralidoxime inhibits paraoxon-induced depression of rocuronium-neuromuscular block in a time-dependent fashion.

Am J Emerg Med. 2012 Jul;30(6):901-7.

DOI: 10.1016/j.ajem.2011.06.013.

査読有

Narimatsu E, Niiya T, Takada Y, Takahashi K, Yamauchi M, Yamakage M.

Blockers of adenosine A1, but not muscarinic acetylcholine receptors improve excessive extracellular glutamate-induced synaptic depression.

Neurosci Res. 2013 Feb;75(2):103-11.

DOI: 10.1016/j.neures.2012.11.002.

査読有

[学会発表](計2件)

Eichi Narimatsu

Influence of cholinesterase inhibition on glutamate-induced neuronal damage in rat hippocampal slices

American Society of Anesthesiologists annual meeting 2011. 2011.10.15-19, Chicago, USA

Eichi Narimatsu

Influence of adenosine on glutamate-induced neuronal damage in rat hippocampal slices

American Society of Anesthesiologists annual meeting 2012. 2012.10.13-17. Washington, D.C., USA

Yukimasa Takada

Elevation and suppression of paraoxon-induced epileptic activity in the rat hippocampus

American Society of Anesthesiologists Annual Meeting 2015 2015.10.24-28. San Diego, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

成松 英智 (NARIMATSU, Eichi)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：70295343

(2) 研究分担者

新谷 知久 (NIIYA, Tomohisa)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：90315523

川真田 樹人 (KAWAMATA, Mikito)

信州大学・医学部・教授

研究者番号：90315523

山内 正憲 (YAMAUCHI, Masanori)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・

教授

研究者番号：00404723