

機関番号：37104
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2008～2010
課題番号：20591698
研究課題名(和文) 頭部外傷実験モデルラットを使った急性期脳損傷における新しい神経保護薬の探求
研究課題名(英文) Exploring a novel neuroprotectant for the treatment of acute traumatic brain injury using experimental model rats
研究代表者 蓮尾 博 (HASUO HIROSHI)
久留米大学・医学部・准教授
研究者番号：90172882

研究成果の概要(和文)：頭部外傷性脳損傷(TBI)の治療薬でその臨床効果が確認されたものはない。我々は新しい神経保護作用の期待できる薬物として大黄の有効成分の一つであるエモジンの生体内投与による効果をTBIモデル動物を用いて検討した。記憶・学習に関係深いと考えられている海馬シナプス伝達の長期増強(LTP)がTBIのみの群で障害されて、TBI後にエモジンを投与した群ではLTPの障害が認められなかった。エモジンがTBI後の脳保護薬として有効であることを示唆する結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Deficient learning and memory are frequently reported as a consequence of traumatic brain injury (TBI). Since long-term potentiation (LTP) is a leading cellular model underlying learning, we investigated the effects of emodin, an active compound of rhubarb extract, on the impairment of LTP observed in the experimental TBI-model rats. As a result, the LTP of emodin-treated group was improved dramatically. Our results in the present study suggest that emodin may be effective therapeutic agents for TBI.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
平成 21 年度	700,000	210,000	910,000
平成 22 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：頭部外傷学、神経保護薬、脳・神経、薬理学、生理学、神経科学

1. 研究開始当初の背景

(1)頭部外傷性脳損傷(TBI)は交通事故などで発生し、たとえ救命されても、記憶障害やてんかんなどの難治性後遺症で悩まされることが多い。TBI後の障害には直接外力による神経障害(1次性傷害)とその後の生体内の反応により徐々に進行する神経障害(2次

性傷害)に分けられる。その内、2次性傷害が治療対象と考えられている。治療薬としてグルタミン酸興奮毒性に作用する数多くの薬物等が研究されているが、臨床治験においてTBIの治療効果のエビデンスが得られたものはまだない。

(2)我々は、今まで TBI モデル動物を使った研究で TBI 後に神経活動の異常（過興奮）が起こることを見出した。また、細胞内電極法を用いて、過興奮の機序を単一細胞レベルで検討した。さらに抗不安薬であるベンゾジアゼピンやフリーラジカル除去剤のエダラボンの TBI 後早期投与により、過興奮が軽減されるという結果が得られている。

2. 研究の目的

(1)我々が見出した新しい神経保護作用の期待できる薬物（大黄の主有効成分であるエモジン）が本当に TBI による中枢神経機能異常を改善し、新しい神経保護薬として効果が期待できるのかを、TBI 実験モデル動物を用いて検討することが目的である。

(2)細胞レベルでの記憶・学習に関連するモデルと考えられている海馬神経核におけるシナプス伝達の長期増強（LTP）を指標として、TBI 後の LTP の異常をエモジン投与により改善するのかを調べるのが目的である。

3. 研究の方法

(1)TBI モデルラットの作製は成熟雄性ラットに液体打撃法（FPI 法）により中等度の衝撃を 1 回だけ左側脳の頭頂部に与えて作製した。脳スライス標本は外傷後 7 日目に脳を摘出し、海馬核を含む水平断スライスを作製した。

(2)Schaffer 側枝を電気刺激して海馬 CA1 領域の放線状層より電気生理学的な応答を細胞外記録法により記録した。LTP の誘発には高頻度刺激（HFS）を用いた。

(3)薬物投与の方法は、適当な溶媒に溶かした薬液を、腹腔内（IP）投与した。

(4)エモジンを腹腔内投与した後、血清中および海馬組織内のエモジンの濃度について高速液体クロマトグラフ法（HPLC 法）を用いて測定した。

(5)実験動物のグループ分けは、コントロール群（正常群と sham 群）、FPI 群（FPI のみ、FPI+溶媒のみ投与、FPI+薬物投与）として比較した。

4. 研究成果

(1)TBI モデルラットの作製が安定するまで FPI 装置のトラブルもあり、当初の予定より時間がかかったが、死亡率も低く安定して作製ができるようになった。

(2)FPI 群における LTP の減弱：コントロール群（正常群と sham 群）においては、Schaffer

側枝の電気刺激による fEPSP を 20 分以上安定して記録した後、HFS を行うとその後長時間続く fEPSP の促進（LTP）がみられた（図 1 A）。LTP の強度を HFS 後 50-60 分で評価するとテスト刺激による fEPSP の約 150%であった。一方 FPI 群における LTP は図 1 に示すように HFS 後の fEPSP の促進は起こるもののその程度が減弱していた（約 115%）。この値には統計的に有意差がみられた（ $p < 0.05$ 、図 1 B）。

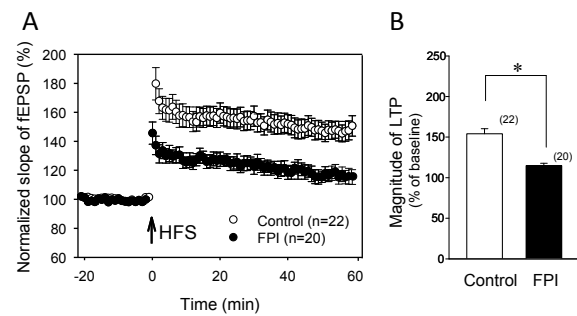


図 1 海馬 CA1 領域における高頻度刺激により誘発した LTP（コントロール群に対して外傷群（FPI）で減弱）

(3) TBI 後のエモジン腹腔内投与による LTP の改善効果：TBI 後 10 分にエモジン（10 mg/kg）を腹腔内投与した。この群から得られた標本における LTP は FPI のみの群のそれに対して LTP 強度が有意に改善されていた（ $p < 0.05$ 、図 2）。また TBI 後 4-5 時間にエモジンを投与した群でも FPI のみの群より有意に LTP の強度が改善された。また低濃度のエモジン（1 mg/kg）を腹腔内投与した群でも FPI のみの群より LTP が改善した。しかし、FPI 後溶媒のみを腹腔内投与した群の LTP は FPI のみの群の LTP 強度と差がなかった。

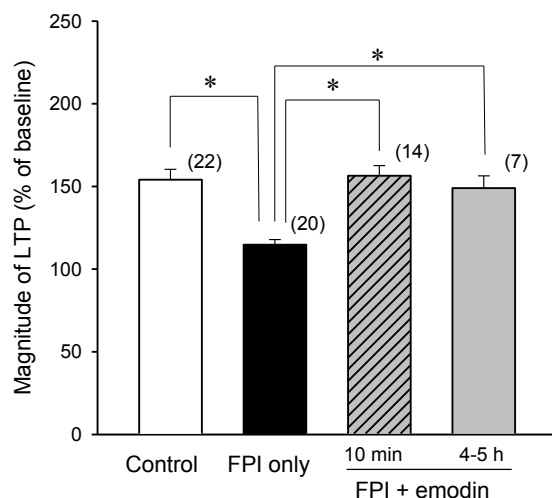


図 2 TBI による LTP 強度の低下とエモジン投与による改善効果

(4)HPLC 法による脳組織内のエモジンの濃度測定：正常群のラットにエモジンを腹腔内投与して 30 分後と 1 時間後に摘出した海馬組織のホモジネートを用いて海馬組織内のエモジンの濃度を測定した。エモジンは血清中のタンパクとよく結合するらしく、遊離のエモジンの濃度は比較的 low、投与後 30 分では海馬組織内に有意に増大しているものの 1 時間後には測定限界近くに減少した (図 3)。しかしながら、この結果は腹腔内に投与したエモジンは血液中に取り込まれ、脳血液関門 (BBB) を通過して実際に脳組織に運ばれていることを示している。

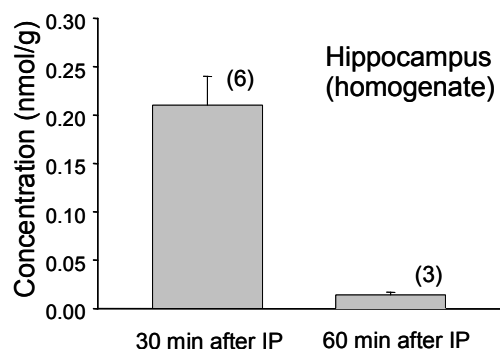


図 3 海馬組織内の遊離エモジン濃度

(5)エモジンの LTP 改善効果は内因性アデノシンを介するか? : 以前の我々の研究で、海馬スライス標本に灌流投与したエモジンは内因性アデノシンによる A1 受容体活性化による機序が含まれていることを報告していたので、今回の in vivo での投与にもこの機序が関与しているかを、BBB を通過することが分かっている A1 受容体の選択的阻害剤を FPI+エモジン群に投与して検討した。その結果、A1 受容体阻害剤を投与してもエモジンによる LTP 改善効果は変化がなかった。

(6)研究成果の意義

今回の実験結果から FPI 後 (10 分および 4-5 時間) 投与したエモジンは FPI 後 1 週目に見られた海馬 CA1 領域における LTP の誘発の障害を軽減することが示唆された。頭部外傷の数時間後に投与しても効果がみられるということは、臨床応用の可能性を高める結果である。エモジンの作用機序については、内因性アデノシンを介する可能性は低いという結果からまだ詳細は不明である。可能性としては抗炎症作用や抗癌作用に関連する細胞内シグナル伝達系が海馬 LTP の誘発・維持の機序に抑制的に作用して TBI 後 7 日に見られる海馬 LTP の障害を改善しているのではないかと推察される。

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 12 件)

- ①Yamashita S, Hasuo H, Tokutomi T, Shigemori M, Akasu T: Emodin attenuates impairment of synaptic plasticity in granule cell layer of the dentate gyrus following traumatic brain injury. *Kurume Med J*; 58: 2011(印刷中). 査読有.
- ②Takeya M, Hayashi T, Ishimatsu M, Nakamura K, Hasuo H: Isolated guinea pig seminal vesicle contracts in response to mechanical stimuli without the activities of neurons and Kit-positive interstitial cells. *J Physiol Sci*; 61: S275, 2011. 査読無.
- ③林 篤正, 武谷三恵, 中村桂一郎, 松岡啓: モルモットの自律精嚢収縮運動. *日泌会誌*; 101:485, 2010. 査読無.
- ④Hasuo H, Takeya M: Emodin, an active compound of Chinese medicine, attenuates the impairment of LTP after moderate traumatic brain injury (TBI) in rats. *Neurosci Res*; 68:e426, 2010. 査読無.
- ⑤武谷三恵, 林 篤正, 石松 秀, 蓮尾 博, 赤須 崇: 医学生が階層的に活用できる腸管運動の動画教材の作成. *医教育*; 40:89, 2009. 査読無.
- ⑥Hasuo H, Takeya M, Ooba S, Yamashita S, Akasu T: Impairment of LTP in hippocampal neurons of the traumatic brain injury model rats and its attenuation by neuroprotective drugs. *J Physiol Sci*; 59:366, 2009. 査読無.
- ⑦大場さとみ, 山下 伸, 蓮尾 博, 徳富孝志, 赤須 崇, 重森 稔: ラット海馬 CA1 ニューロンにおける脳外傷後過興奮とジアゼパムの効果. *神経外傷*; 32:61-67, 2009. 査読無.
- ⑧Takeya M, Hasuo H, Akasu T: Emodin attenuates the impairment of LTP after traumatic brain injury in rat hippocampus. *Neurosci Res*; 65:S125, 2009. 査読無.

⑨Ooba S, Hasuo H, Shigemori M, Yamashita S, Akasu T: Mild hypothermia prevents post-traumatic hyperactivity of excitatory synapses in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Kurume Med J*; 56:49-59, 2009. 査読有.

⑩蓮尾 博, 赤須 崇: 中隔核における 5-HT_{1B} 受容体の役割. *生体の科学*; 60:430-431, 2009. 査読無.

⑪Ooba S, Hasuo H, Shigemori M, Akasu T: Diazepam attenuates the post-traumatic hyperactivity of excitatory synapses in rat hippocampal CA1 neurons. *Neurosci Res*; 62:195-205, 2008. 査読有.

⑫Hasuo H, Yamashita S, Shigemori M, Akasu T: The radical scavenger edaravone suppresses the exogenous nitric oxide [NO]-induced potentiation of perforant path synapse of the dentate gyrus *in vitro*. *Neurosci Res*; 61:S275, 2008. 査読無.

[学会発表] (計 11 件)

①武谷三恵: モルモット摘出精囊はニューロンおよびKit 陽性間質細胞活動に依存せず機械刺激に応じて収縮する. 第 88 回日本生理学会大会、第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会合同大会, 2011 年 3 月 30 日, 横浜.

②Yue H-Y: Spinal cord nociceptive processing: pharmacology. Society for Neuroscience, 40th Annual Meeting (Neuroscience 2010), 2010 年 11 月 14 日, San Diego.

③Hasuo H: Emodin, an active compound of Chinese medicine, attenuates the impairment of LTP after moderate traumatic brain injury (TBI) in rats. The 33rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Neuro 2010), 2010 年 9 月 4 日, 神戸.

④林 篤正: モルモットの自律精囊収縮運動. 第 98 回日本泌尿器科学会総会, 2010 年 4 月 29 日, 盛岡.

⑤Hayashi T: The contractile function and morphological characteristics of the guinea pig seminal vesicle. The 6th International Symposium on ICC "Smooth Muscle Rhythms" 2010 年 2 月 10 日, 宮崎.

⑥Takeya M: Emodin attenuates the impairment of LTP after traumatic brain injury in rat hippocampus. The 32nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Neuroscience 2009), 2009 年 9 月 16 日, 名古屋.

⑦Hasuo H: Impairment of LTP in hippocampal neurons of the traumatic brain injury model rats and its attenuation by neuroprotective drugs. The XXXVI International Congress of Physiological Sciences (IUPS2009)・The 86th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, 2009 年 7 月 30 日, 京都.

⑧武谷三恵: 医学生が階層的に活用できる腸管運動の動画教材の作成. 第 41 回日本医学教育学会大会, 2009 年, 大阪.

⑨Mizuta K: Relationship of the chemical structures of opioids to their inhibitory actions on compound action potentials in frog sciatic nerves. Society for Neuroscience, 38th Annual Meeting (Neuroscience 2008), 2008 年 11 月 17 日 Washington DC.

⑩蓮尾 博: 頭部外傷後のシナプス可塑性障害に対するエダラボンの効果. 平成 20 年度生理学研究所研究会『新たなコンセプトでシナプス伝達機構を考える』, 2008 年 9 月 20 日, 岡崎.

⑪Hasuo H: The radical scavenger edaravone suppresses the exogenous nitric oxide [NO]-induced potentiation of perforant path synapse of the dentate gyrus *in vitro*. The 31st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Neuro2008), 2008 年 7 月 11 日, 東京.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

蓮尾 博 (HASUO HIROSHI)
久留米大学・医学部・准教授
研究者番号: 90172882

(2) 研究分担者

武谷 三恵 (TAKEYA MITSUE)
久留米大学・医学部・助教
研究者番号: 30289433