

Title	4-アミノ酪酸およびアセチルコリンの薬物受容体に関する濃度作用曲線的解析
Author(s)	神谷, 大雄
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/29384
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	神谷大雄 <small>かみ や ひろ お</small>
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第 1041 号
学位授与の日付	昭和 41 年 11 月 16 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	4-アミノ酪酸およびアセチルコリンの薬物受容体に関する濃度作用曲線の解析
論文審査委員	(主査) 教授 青沼 繁 (副査) 教授 川崎近太郎 教授 青木 大 教授 岩田平八郎

論 文 内 容 の 要 旨

4-アミノ酪酸 (γ -aminobutyric acid: GABA) は動物界に存在するアミノ酸としては稀有な ω -アミノ酸に属し、しかもほとんど例外なく脊椎動物の中樞神経系組織に選択的、かつ高濃度に存在している。このため中樞神経系の代謝並びに機能における GABA の役割については広範な研究が行なわれてきた。

喜多らも中枢抑制剤の薬理学的研究の一環として神経機能の改善やテンカンの治療剤に応用されている GABA, およびその関連化合物である 4-amino-3-hydroxybutyric acid (GABOB), 更にこれの各種置換物質などについて薬理学的検索を行ってきた。

一方ここ数年来すでに神経-筋の興奮と抑制、並びに作用物質の細胞膜通過に無機イオンが大きく関与していることは知られている。従って私たちが種々の薬物の薬理作用を検討する場合にも、このイオンとの関連性を重要視しなければならない。

私の実験もこの考え方から出発したものである。まず GABA の中枢作用と無機イオンとの関係を直接的に確かめるためにマウスの脳室内注入実験を行ない、次いでアメリカザリガニ (*Cambarus clarkii* GIRARD) の後部摘出腸管を利用する実験法を試みた。この腸管は特に GABA-sensitive な実験標本であることから、GABA 作用をこれと拮抗関係にあるアセチルコリン (ACh) 作用と共に薬物受容体との関係において濃度作用曲線の解析を行ない、これら薬物の作用機構を解明し、無機イオンによる影響を比較検討することにした。

第 1 章 4-アミノ酪酸関連物質の中枢作用と無機イオン類との関係——マウス脳室内注入による実験

本実験は痙攣の発現を脳の興奮現象の指標として考察している。すなわち動物の興奮および痙攣の様相を変える極限的なものはイオンの濃度分布的变化であるとの想定から、まず過剰量のイオンをマ

ウス脳室内注入することにより生理的イオン濃度分布の動的平衡を変えるような影響を痙攣現象としてあらわした。

一方、マウスに対する 200mM GABA による誘発痙攣についてイオンとの濃度関係を比較検討した。

〔I〕 代表的な数種の無機イオンによる誘発痙攣について

(1) 無機イオン； Na^+ 、 K^+ または Ca^{2+} の各単独注入による影響を検討するために、それぞれの确实痙攣致死濃度を求めた。この結果、 Na^+ 、 K^+ 、または Ca^{2+} が、それぞれ固有の注入量—痙攣症状—一致死時間を示すことがわかった。なお各イオンの确实痙攣致死濃度は、 Na^+ ；2464, K^+ ；448, Ca^{2+} ；600 各 mM で、痙攣致死症状としては Na^+ 誘発痙攣は多くが伸展性痙攣、 K^+ では間代性痙攣、また Ca^{2+} では agony を経てそれぞれ死亡した。

(2) Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 3者の相互関係を検討するために、(1)の実験成績から得られた3種のイオン、それぞれの确实痙攣致死濃度に対して、第2のイオンを添加した場合について比較検討した。第2のイオン添加量は正常リンゲル液中に含有するそのイオンの塩化物のモル濃度であった。

実験結果から、最初のイオンによって確実に誘発された痙攣には他のイオンが存在しても何らの変化影響も現われなかった。このことから各イオンによる痙攣誘発作用は互いに独立しているものと思われる。

(3) pH の影響について(1)による誘発痙攣の成績をもとにして検索したが、 Na^+ 、または K^+ による痙攣相には著変が認められなかった。

(4) MgCl_2 を用いて Mg^{2+} の影響を調べた。まず 10~80 mM の MgCl_2 では致死は起らなかったが、160mM になると agony から死亡した。

次に(1)で求めた Na^+ 、 K^+ または Ca^{2+} の各イオン誘発痙攣に対する 10~80 mM の MgCl_2 (Mg^{2+} 単独では無作用濃度)の影響を調べた結果、224 mM KCl による誘発痙攣には Mg^{2+} によるかなりの抑制効果を認めた。

(5) 無機イオン (Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+}) の确实痙攣致死量に対する諸種薬物の影響を調べた。使用薬物は GABA, 4-amino-3-hydroxybutyric acid (GABOB), taurine, arginine, ornithine, procaine, dl-noradrenaline, hexobarbital, および chlorpromazine などであったが、いずれの誘発痙攣にもほとんど無影響であったが、NaCl による痙攣に対して taurine, procaine, dl-noradrenaline などにわずかながら致死時間の延長効果があった。

以上の実験成績から高濃度イオンの脳室内注入による誘発痙攣がいずれも痙攣の最終過程を意味するものと思われた。

〔II〕 4-アミノ酪酸の誘発痙攣に対するナトリウムイオンの影響

200 mM GABA をマウス脳室内に注入して誘発した痙攣には、特に GABA を溶存する medium 中の Na^+ 濃度が重要な意義をもつものと思われる成績を得た。すなわち、この GABA による誘発痙攣は Na^+ 濃度が 154 mM (0.9%NaCl) で最も強く現われた。一方、 K^+ 濃度についての同様の実験では無影響であった。

第2章 4-アミノ酪酸、およびアセチルコリン作用と薬物受容体との関係

前章で述べたマウス脳室内注入の実験と前後して、私はすでに Florey によって紹介されたアメリ

カザリガニの後部摘出腸管を利用して GABA とその関連物質について諸種の関係を検討した。

本章で述べる実験の目的は、前章の脳室内注入による痙攣実験から得られた成績との比較考察により、GABA 作用と無機イオンとの関係、並びにその間の種々の問題点を実験的に明らかにすることである。

〔I〕 4-アミノ酪酸およびアセチルコリン作用と栄養液中イオンとの関係

動物の生理的栄養液中に含まれる無機イオン濃度のうちでは、いずれも Na^+ がその大部分を占めていることから、 Na^+ の濃度的変化によっては薬物作用がいろいろと変り得ることは容易に想像される。私は第1章で述べたマウス脳室内注入実験にひき続き、 Na^+ をはじめ、栄養液中に含まれている他の無機イオンの濃度変化と薬物作用との関係を検索した。

ザリガニ腸管は GABA により弛緩、ACh によって収縮的に作用するが、浸透圧を等しくした ion free medium 中では GABA が、本来の弛緩傾向とは逆に、収縮作用に逆転し、ACh は本来の収縮作用を減弱した。更にこれら GABA、または ACh の本来の作用は等張の 1.2% NaCl 液でも正常栄養液（ザリガニ用リンゲル液；n.R. と略記）の場合と同程度に発現すること、並びに K、Ca または Mg の各 free medium 中でもその傾向が失われていないことなどから、GABA が弛緩、ACh が収縮の本来の作用を現わすためには medium 中に Na^+ の存在が他の K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} にも増して最も重要であることを明らかにした。

〔II〕 4-アミノ酪酸およびアセチルコリン作用の変化とナトリウムイオン濃度との関係

(1) 前実験において特に GABA が弛緩作用を現わすためには Na^+ が一定濃度（約 0.7% NaCl）以上を必要とした。すなわち n.R. 中 Na^+ 濃度の 60% (0.72% NaCl) 以下で GABA 作用は弛緩から収縮に逆転し、更に Na^+ 減量とともに収縮高は大きく現われた。

(2) これに対し ACh の収縮高は Na^+ の減量に伴って低下した。

〔III〕 4-アミノ酪酸およびアセチルコリン作用におよぼす1価の陽イオン類または陰イオン類の影響

(1) 〔I〕、〔II〕の実験から Na^+ の重要性を認めたが、 Na^+ 以外の1価の陽イオンについて K^+ 、 NH_4^+ 、および第4級アンモニウムイオンの各塩化物を 1.2% NaCl と等張の medium として溶存せしめ、それぞれの medium 中における GABA、または ACh 作用を検索した。

(2) この結果、 NH_4^+ のみに Na^+ の代償性が認められた。すなわち 205 mM NH_4Cl 液中の GABA、ACh 作用は 205 mM NaCl 液中でも、或いは n.R. 中の NaCl を NH_4Cl で置換した medium 中でも、ほとんど n.R. と同様の態度を示した。

(3) その他の K^+ 、tetramethylammonium ion では腸管の蠕動運動が停止した。

(4) Cl^- と数種の陰イオンとの比較を同様に試みた結果、陰イオンには陽イオンで見られたような GABA、または ACh の作用に対する本質的な差異は認められなかった。

〔IV〕 4-アミノ酪酸の抗アセチルコリン作用とカルシウムイオンとの関係

n.R. 中では GABA の抗 ACh 作用（ACh による収縮作用に対し GABA は拮抗抑制する）が認められるが、n.R. から Ca を除去した medium 中ではこの GABA の抗 ACh 作用が減弱ないしは消失した。これは Florey の報告している picrotoxin 前処置後（5~10 min. の前処置による）における GABA

の抗 ACh 作用の消失現象と酷似していた。

第 3 章 ザリガニ摘出腸管に対する4-アミノ酪酸関連化合物の作用態度

第 2 章-[I]で GABA の n.R. 中における本来の弛緩作用が、等張の ion free medium 中では収縮作用に逆転することを述べた。

本章では GABA を中心とした近縁の関連化合物について、n.R. 中と ion free medium (8.5% anhydrous glucose) 中での各薬物作用を比較検討した。

この結果、n.R. 中と ion free medium 中とにおいて GABA と同じような逆転作用を示す化合物が数種あり、これら GABA と同様の傾向を現わす物質はその化学構造でも類似していた。すなわち塩基性基と酸性基の距離間隔は直鎖炭素数で 2~3 のものに限られていた。

第 4 章 4-アミノ酪酸およびアセチルコリン作用と薬物受容体との関係、特にその濃度作用曲線的解析

第 2・3 章ではザリガニの摘出腸管を用いた Florey の実験法を適用して ACh および、GABA とその関連化合物の薬物作用につき、おもにイオンとの関係において論じてきた。

私は更このに問題を検討するために、ザリガニ摘出腸管に対する ACh や GABA の作用は腸管組織の薬物受容体の関与で有効な作用を現わすものと仮定し、これら薬物とその受容体との相互関係およびこの間の作用機構をあらためて濃度作用 (dose-response: 以下 D-R と略記) 曲線的解析の立場から明らかにした。

一方、GABA の受容体に関する本格的な研究は、Curtis らがネコの脊髄の運動ニューロンについて GABA またはグルタミン酸で代表される抑制性、または興奮性アミノ酸の構造と生理活性を論じている報告のみで、この問題を詳細に究明した例はまだ見あたらないようである。そこで私はザリガニの腸管標本を用いて、特に ACh 作用と GABA 作用からその受容体との結合態度に関する諸問題の検討にとりかかった。

なお、本実験を実施するにあたっては、Florey と Jones によって別々に行なっている実験成績から、使用するザリガニの種が異なることにより、結果は必ずしも一致しないことがあるので、私は Florey の用いたものと同種のアメリカザリガニ (*Cambarus clarkii* GIRARD) を用いた。従ってその成績は多くの点で、Florey のそれと一致した。

[I] ザリガニ腸管に対する4-アミノ酪酸およびアセチルコリンの作用と受容体との関係

薬物作用の濃度作用曲線的解析法は Clark (1933) の「薬物作用機序の質量作用律的仮説」から誘導される Langmuir 吸着式と同型の $Kx^n = \frac{y}{y_{\max} - y}$ (1 式) に基づいて論及されている。

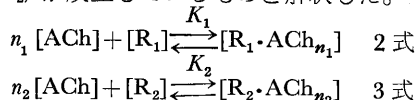
但し x : 収縮薬の (agonist, 例えば ACh) 濃度, y : 作用度 (こゝでは収縮度), y_{\max} : 収縮薬によって与えられる最大作用 (収縮) 度, K : 収縮薬の affinity, n : 薬物と受容体 (receptor: 以下 R と略記) との結合比率で D-R 曲線の slope を示す。

従って (1 式) の定数値 (K, n, y_{\max}) が薬物の作用機構の解明にあたって有力な手がかりとなる。

(1) ACh の単独作用 まず ACh についてその D-R 関係を求めた。ACh は $2.2 \times 10^{-9} \sim 1.12 \times 10^{-6} M$ の濃度について 10 用量 (濃度階級) を用いて D-R 曲線に表現し、各 D-R 関係から $\left(\log x, \log \frac{y}{y_{\max} - y} \right)$ プロットについて回帰直線を求め、最尤法、または図解法によって推計学的検討を試みた。

ACh の D-R 曲線について棄却検定を行なった結果、ACh の上記濃度範囲にわたって一定の n 値を持つ実験式を想定することは困難であるため、私は ACh の濃度範囲を $2.2 \times 10^{-9} \sim 7 \times 10^{-8} \text{M}$ (低濃度域) と、 $1.4 \times 10^{-7} \sim 10^{-6} \text{M}$ (高濃度域) に分けてそれぞれの回帰直線を求めた。すなわち低濃度域では $n=0.491$, 高濃度域では $n=1.76$ であった。

以上の成績から ACh の D-R 関係は薬物 (ACh) とその受容体との結合平衡過程に 2 種類が内在しており、その第 1 種は低濃度から高濃度域への広い濃度変域にわたって下記の (2 式) が成立し (1st receptor system: R_1), 他の第 2 種は高濃度作用域にあって (3 式) で示される平衡関係 (2nd receptor system: R_2) が成立しているものと解釈した。



(2) GABA の単独作用 GABA については、 $9.5 \times 10^{-9} \sim 9.7 \times 10^{-6} \text{M}$ の間を $\log 4$ の等比的用量差に分けた各濃度を用いて実験したが、腸管は $2.4 \times 10^{-6} \text{M}$ でわずかに弛緩し、 $9.7 \times 10^{-6} \text{M}$ で一般に弛緩したが、これらの濃度以下ではほとんど無作用であった。

(3) GABA の抗 ACh 作用 ACh の濃度変化と収縮作用に対し、GABA と ACh との拮抗関係を各濃度の GABA による前処置下における D-R 曲線上に表現した。すなわち、この間の変動様式を $(\log x, \log y)$ および $(\log x, \log \frac{y}{y_{\max} - y})$ の各プロットの D-R 曲線上に求め、GABA による ACh 収縮に対する拮抗作用を検討した。

その結果、GABA-ACh の拮抗関係は非競合的拮抗であったが、その非競合性は単調なものではなく、ACh の $1.4 \times 10^{-7} \text{M}$ を境界にした 2 種類の非競合的拮抗型式を含んでいるものと考えられるが、特に高濃度の ACh 作用域では弱いながら競合型拮抗の性質が認められた。

更に GABA の抗 ACh 作用の機構を調べるため、[i] 各濃度の GABA による前処置下における D-R 関係を $(\log x, \log y)$ プロットに現わし、[ii] GABA による抑制の D-R 曲線を求めた。

[i] ACh の作用濃度全域にわたって D-R 関係を $(\log x, \log y)$ プロットで作図すると低濃度域から高濃度域の一部 (ほゞ $2.8 \times 10^{-7} \text{M}$) までにおいて ACh 単独、GABA 前処置による ACh 収縮度は、いずれの場合も直線上に並び、各々の D-R 関係から Freundlich 吸着式と同型の実験式が得られた。

[ii] ACh の低濃度域と高濃度域からそれぞれ 1 例ずつ、 $1.75 \times 10^{-8} \text{M}$ と $5.6 \times 10^{-7} \text{M}$ の 2 種の濃度を選び、それぞれの GABA による抑制の D-R 曲線を求めた。

この GABA による抑制の D-R 曲線より、GABA と R_1, R_2 の receptor systems との結合関係はほゞ同一の結合比を有するものと考えられた。

〔II〕 ザリガニ腸管に対する 4-アミノ酪酸関連化合物、並びにアセチルコリン作用と薬物受容体との関係

本章〔I〕に引き続き GABA の抗 ACh 作用と受容体との関係を検討するために GABA と類似構造を有する関連化合物である GABOB およびグルタミン酸ナトリウム (monosodium DL-glutamate: NaGL) などのアミノ酸類を用いて D-R 曲線的解析を試みた。GABA に関連したアミノ酸のうち、グルタミン酸のみはそのナトリウム塩を、GABA および GABOB についてはアミノ酸そのものの結晶を使用

したが、ザリガニ用リンゲル液で希釈した各薬液の pH は 6.4~7.1 で、ほぼ中性ないし微酸性であった。

(1) GABOB, NaGL の単独作用 GABOB, あるいは NaGL の 2.4×10^{-6} M で腸管はわずかに弛緩し、 9.7×10^{-6} M ではかなり弛緩したが、これらの濃度以下ではいずれも、ほとんど無作用であった。

特に NaGL については、[i] D-型, L-型により収縮度に現われる相違, [ii] glutamic decarboxylase による影響などを一応検討したが、本法による実験の範囲内ではいずれも無影響であると考えられた。

(2) GABOB, NaGL の抗 ACh 作用 本章-[I]の(3) GABA の抗 ACh 作用で述べたと同様の実験を行なったが、GABOB, NaGL の抗 ACh 作用はほぼ GABA と同型式であった。

(3) GABA, GABOB および NaGL の抗 ACh 作用の比較 ACh の低濃度における収縮作用に対してこれら 3 化合物の抗 ACh 作用度は $GABA > NaGL > GABOB$

であったが、高濃度の ACh による収縮作用に対しては



であった。なお、この高濃度 (5.6×10^{-7} M) の ACh に対する GABA: GABOB: NaGL の抗 ACh 作用度の比率は大体 1:0.3:1 (GABA の抗 ACh 作用度を 1 とした) であった。

[III] 4-アミノ酪酸, およびアセチルコリン作用とナトリウム, カルシウムイオンとの関係

本来の GABA および ACh 作用に対して、例えば栄養液中のイオン組成を変えることにより作用態度が影響を受けることは、すでに述べたが、本節ではこれら諸現象を D-R 曲線的に解析し、更に薬物と受容体との関係から作用機構を明確にする目的で実験を行なった。

(1) picrotoxin, γ -guanidinobutyric acid (γ -GBA) の単独作用 picrotoxin は 1.65×10^{-8} M を、 γ -GBA·HCl は $3.9 \times 10^{-10} \sim 10^{-7}$ M を用いたが、ザリガニ腸管にはいずれも無作用であった。

(2) picrotoxin, γ -GBA の ACh または GABA 作用におよぼす影響 picrotoxin, γ -GBA·HCl は上記(1)の濃度条件では、いずれも ACh や GABA の各作用に対してはほとんど無影響であった。

(3) picrotoxin, または γ -GBA による GABA の抗 ACh 作用におよぼす影響 1.65×10^{-8} M picrotoxin の前処置で 6.1×10^{-7} M GABA の抗 ACh 作用は消失したが、その成績は picrotoxin が競合的に GABA の抗 ACh 作用を消失させることを示唆した。一方、 γ -GBA·HCl は $6.25 \times 10^{-9} \sim 10^{-7}$ M の範囲で、 6.1×10^{-7} M GABA の抗 ACh 作用を競合兼非競合型拮抗の型式で減弱させた。

(4) 栄養液中 Na 濃度と ACh および GABA との関係 [i] ACh 作用におよぼす Na 減量の影響を D-R 曲線上に表現して薬物作用と Na との関係を検討した。その結果、先に(2式)と(3式)で想定した 2 種類の receptor systems のうち、1st receptor system (R_1) は Na 依存性が少ない receptor system であり、2nd receptor system (R_2) は Na 依存性の大きい receptor system であることが認められた。

[ii] GABA 作用におよぼす Na 減量の影響を検討した結果、低 Na 液から無 Na 液において GABA は収縮作用に逆転したが、その際栄養液中 Na の増量は GABA による収縮を非競合的に拮抗阻害した。

(5) 栄養液中 Ca 濃度と ACh および GABA との関係 [i] ACh 作用におよぼす Ca 減量の影

響を検討した所、栄養液中 Ca 量が減量すると ACh による収縮反応性が増大した。この成績から Ca は R_1 , R_2 の受容体の特定部分（結合部位）の表面膜構造に対し、何らかの影響をおよぼしている最も有力な因子の一つであると考えられる。

・ [ii] 各濃度の GABA による弛緩傾向はいずれの低 Ca 液についても正常栄養液中における場合と比較して著変は認められなかった。

[iii] Ca 減量により GABA の抗 ACh 作用が減弱する傾向を D-R 曲線上で検討した結果、特に ACh の高濃度作用域における GABA の抗 ACh 作用が強く減弱された。

第 5 章 結 論

GABA および ACh 作用を薬物受容体との関係において検討して、以下の結論を得た。

1) マウス脳室内に 200 mM GABA を注入して誘発した痙攣に対しては Na^+ 濃度が 77~154 mM (0.45~0.9% NaCl) で最も痙攣誘発能が強く、 Na^+ 濃度がこの範囲以下、または 462 mM (2.7% NaCl) あたりで弱く現われた。

ザリガニの摘出腸管を使用して GABA および ACh 作用を検討した実験。

2) 本来の ACh による収縮、GABA による弛緩の各作用発現のためには栄養液中の Na^+ が最も重要であり、特に GABA が弛緩作用を現わすためには Na^+ の一定濃度（約 0.7% NaCl）以上を必要とした。

3) GABA の抗 ACh 作用発現には栄養液中 Ca^{2+} の存在が必要であった。

4) ACh の D-R 曲線を求めた結果、ザリガニ腸管には ACh の受容体が 2 種類、広範囲の作用濃度域に対して反応する 1st receptor system (R_1) と高濃度の ACh に対して反応する 2nd receptor system (R_2) の存在をほぼ確定し得た。

5) GABA が抗 ACh 作用を示すとき、競合兼非競合型の拮抗型式で現われた。

6) 4) で述べた R_1 と R_2 のうち、 R_1 は Na 依存性の少ない receptor system であり、 R_2 は Na 依存性の receptor system である。

7) GABA と構造類似する一部の化合物は、GABA と同様に正常栄養液中で弛緩的に、非イオン性の等張液中で収縮的に作用した。この場合、化学構造において塩基性基と酸性基の距離は、GABA と同様に直鎖状炭素数で 2~3 の化合物に限られた。

8) GABA 関連化合物のうち GABOB および NaGL について、それぞれの薬物作用、並びに ACh 作用との関係を検討した結果、この 2 物質は多くの点で GABA と類似した。3 化合物の抗 ACh 作用の機構は、ほとんど同じ型式と考えられ、その拮抗度は $GABA \geq NaGL > GABOB$ であった。

9) GABA と構造類似した別の化合物である γ -GABA は、picrotoxin と類似して GABA の抗 ACh 作用を減弱する性質があった。

論文の審査結果の要旨

神経機能の改善やテンカン治療剤に応用されている 4-アミノ酪酸 (GABA) およびアセチルコリン (ACh) 作用を薬物受容体 (receptor) との関係において研究し、

(1) GABA および ACh 作用はザリガニ摘出腸管に対して Na^+ Ca^{2+} との関係で重要であることを認め、

(2) ACh 収縮作用には R_1 (ACh 低濃度域), R_2 (高濃度域) の receptor systems が存在すること特に R_2 は Na 依存性の receptor system であることを認めた。また、

(3) GABA 作用は R_1 - R_2 に対する選択性は少ないこと。

(4) 2, 3 の GABA 近縁化合物, たとえば γ -amino- β -hydroxy butyric acid, sodium glutamate などでも GABA 様作用を有することを認めた。

よって、本研究者は薬学博士の学位を得る資格があると認める。