



Title	Thioperamide, a histamine H3 receptor antagonist, increased GABA release from the rat hypothalamus
Author(s)	山本, 由美子
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40031
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	山本由美子
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第12982号
学位授与年月日	平成9年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学位論文名	Thioperamide, a histamine H ₃ receptor antagonist, increased GABA release from the rat hypothalamus (ヒスタミンH ₃ 受容体遮断薬チオペラミドのラット視床下部GABA遊離増加作用)
論文審査委員	(主査) 教授 岡本光弘
	(副査) 教授 津本忠治 教授 遠山正彌

論文内容の要旨

【目的】

ヒスタミンH₃受容体はautoreceptorとしてヒスタミン神経終末に存在しヒスタミンの遊離ならびに合成を制御している。またこのH₃受容体はheteroreceptorとしてセロトニン、ノルアドレナリン、アセチルコリン、ドーパミン神経などの終末にも存在しこれらの神経伝達物質の遊離調節に関与していることも知られている。一方、ヒスタミン神経系には抑制性神経伝導物質であるγ-アミノ酪酸(GABA)が共存しているが、私達はこの共存するGABAがGABA_A受容体を介してヒスタミン遊離をシナプス前調節することを明らかにしている。このことはGABA_A受容体がcoreceptorとして、共存するヒスタミンの遊離調節を行っていることを示すもので、反対にヒスタミン神経終末に存在するH₃受容体がcoreceptorとして共存するGABAの遊離調節を行う可能性を示すものである。そこで私は新しいGABAの高感度定量法を開発し、ラット視床下部におけるGABA遊離に対する各種ヒスタミンH₃受容体作用薬の作用をin vivoマイクロダイアリシス法により検討した。

【方法ならびに成績】

体重約250gのWistar系雄性ラットをウレタン麻酔下(1.2g/kg, i.p.)に脳定位固定装置に固定し、前部視床下部(bregmaより前方1.5mm, 左右0.5mm, 硬膜下9.2mm)にダイアリシスプローブ(CMA10, 2mm)を刺入、毎分2μlで人工脳脊髄液を灌流した。灌流開始2時間後より20分ごとにサンプルを回収した。各種薬物は灌流液中に添加しプローブを通じて投与し、Ca²⁺除去灌流液は液中のCa²⁺を等モルのMg²⁺に置き換えて4mMのEGTAを添加したもの用いた。また、特異的ヒスチジン脱炭酸酵素阻害剤であるα-フルオロメチルヒスチジン(α-FMH, 100mg/kg, i.P.)の投与はサンプリング開始17.5時間および3.5時間前の2回行った。プローブの刺入位置は、サンプリング終了後、組織学的方法により確認した。

透析サンプル中のGABAの定量はKehrとUngerstedt(1988)のHPLC-ECD法を改良したHPLC蛍光法を用いて行った。サンプル中のGABAをt-ブチルメルカプタン存在下にo-フタルアルデヒドと反応させ蛍光誘導体に変換した後、逆相系カラム(ODS80TM)に注入し50%(v/v)アセトニトリルを含む0.15Mの酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.1)を用いて展開した。本法によるGABAの定量限界は0.1pmol/sampleであった。サンプル中のヒスタミンの定量は大和谷ら(1985)のHPLC蛍光法を用いて行った。今回用いたマイクロダイアリシス法で回収された

前部視床下部における GABA とヒスタミンの基礎遊離量の平均は、それぞれ 0.31 ± 0.02 , 0.034 ± 0.002 pmol/20min であり、サンプリング中の 5 時間にわたり安定であった。

H_3 受容体遮断薬チオペラミド ($1 \mu M$) の投与により視床下部 GABA 遊離は基礎遊離の約 140% に、 $10 \mu M$ では約 200% に増加した。このときヒスタミンの遊離は $1 \mu M$ で基礎遊離の約 140%， $10 \mu M$ で 170% に増加した。このことからラット視床下部 GABA 遊離はヒスタミン H_3 受容体により緊張性に抑制されていることが考えられた。そこで、 α -FMH 投与により神経性のヒスタミンを涸渇した状態で先と同様の実験を行ったところ、GABA の基礎遊離に変化はなく α -FMH を投与しなかったものと同様にチオペラミドによる GABA 遊離の増加が見られた。この結果はチオペラミドの GABA 遊離増加作用は H_3 受容体の遮断によるものではないことを示している。そこで、次に H_3 受容体作動薬イメピップ ($10 \mu M$) の作用を調べたところヒスタミン遊離は基礎遊離の約 50% に減少したが GABA 遊離には変化がみられなかった。またチオペラミド投与の後イメピップを同時投与してもチオペラミドによる GABA の遊離増加作用に影響が見られないが、チオペラミドによるヒスタミン遊離の増加は完全に抑えられた。さらに、より特異的は H_3 受容体遮断薬であるクロベンプロピット ($10 \mu M$) の作用を調べたところ、ヒスタミン遊離は基礎遊離の約 2 倍に増加したが GABA 遊離には変化がなかった。クロベンプロピットに GABA 遊離増加作用が見られず、また H_3 受容体遮断薬イメピップも GABA 遊離に影響しなかったことから、 H_3 受容体遮断薬チオペラミドによる GABA 遊離増加作用は H_3 受容体を介した作用ではないと結論した。

細胞外液中に存在する GABA は細胞外 Ca^{2+} 依存性のエクソサイトーシスにより神経終末から遊離され、GABA トランスポーターにより神経やグリア細胞に再取り込まれる。一方 GABA の遊離がエクソサイトーシス以外に細胞外 Ca^{2+} 非依存性の GABA トランスポーターの逆転により起こることも知られている。そこでチオペラミドがこの GABA トランスポーターに作用した結果、細胞外 GABA 濃度の増加が起こったのではないかと考え、次にチオペラミドによるヒスタミンと GABA の遊離増加の Ca^{2+} 依存性を調べた。灌流液から Ca^{2+} を除去するとヒスタミン遊離は基礎遊離の約 45% に減少するが GABA 遊離には有意な変化は見られなかった。続いてチオペラミドを投与すると、ヒスタミン遊離には変化が見られなかったのに対し GABA 遊離は有意に増加した。つまり、チオペラミドによる GABA 遊離の増加は細胞外 Ca^{2+} 依存性を示さないことから、チオペラミドは H_3 受容体を介して神経終末からの GABA 遊離を増加させるものではなく、GABA トランスポーターの作用の抑制または逆転を引き起こして細胞外液中の GABA 濃度の増加を引き起こしていると考えられた。

【総括】

新たな HPLC 蛍光法による高感度 GABA 定量法を開発し、in vivo マイクロダイアリシス法を用いてラット視床下部における GABA 遊離を調べた。その結果、チオペラミドにこれまで知られていなかったヒスタミン H_3 受容体を介さない GABA 遊離増加作用があることを明らかにした。この作用は細胞外 Ca^{2+} 依存性を示さない点から GABA トランスポーターを介した作用であることが示唆された。これまでヒスタミン H_3 受容体遮断薬の様々な薬理作用を調べる多くの研究がチオペラミドを用いて行われてきたが、本研究の結果よりこれまでに報告されているチオペラミドの薬理作用について細胞外 GABA 濃度が増加した結果である可能性を含めて再検討する必要があると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は、新たに γ -アミノ酪酸 (GABA) の高感度定量法を開発し、この方法を応用して、ヒスタミン H_3 受容体遮断薬チオペラミドのこれまで知られていなかった脳内での GABA 遊離増加作用を明らかにしたものである。GABA 定量法は、自動化したプレカラム誘導体化反応により生成した GABA の蛍光誘導体を、逆相系カラムにより分離し、溶離液の蛍光強度を連続測定して行い、従来用いられていた電気化学的検出 (HPLC-ECD) 法に比べ、特異性および再現性を大幅に改善した。この定量法とマイクロダイアリシス法を用い、ラット視床下部における GABA 遊離に対するチオペラミドの作用を in vivo で調べた結果、チオペラミドは H_3 受容体を介さず、恐らく

GABA トランスポーターに作用して細胞外 GABA 濃度の増加を引き起こしていることを示した。

ヒスタミン H_3 受容体の生理的役割については未だ確定されてはいないが、これまでに H_3 受容体遮断薬の覚醒効果や学習記憶改善効果、過食症治療薬や抗てんかん薬としての可能性を示す報告がある。しかし、これらの研究においては、チオペラミドが H_3 受容体遮断薬として用いられており、本研究で明らかになった GABA 遊離増加作用については考慮されておらず、結果については再検討を要すると考えられる。一方、ヒスタミンが H_1 受容体に作用して抗てんかん作用を示すことが知られているが、GABA トランスポーター阻害薬も抗てんかん薬として有効であることが示されており、ヒスタミンと GABA の遊離増加をもたらすチオペラミドが、新しい抗てんかん薬のリーディングコンパウンドとして創薬に結びつく可能性が期待できる。

以上のように、本研究によって明らかになったチオペラミドの作用は、脳内ヒスタミン研究における新たな展開をもたらし、また、ヒスタミンと GABA の相互作用を狙った新たな治療薬開発の可能性を示すもので、学位授与に値するものと認める。