

氏 名	きく ち まさ し 菊 地 雅 史
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 1879 号
学位授与の日付	平 成 9 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 外 科 系 専 攻
学位論文題目	Protective effects of methylcobalamin, a vitamin B ₁₂ analog, against glutamate-induced neurotoxicity in retinal cell culture (網膜培養細胞におけるグルタミン酸毒性に対するビタミン B ₁₂ 類 縁体メチルコバラミンの保護作用)
論文調査委員	(主 査) 教 授 中 西 重 忠 教 授 清 野 裕 教 授 本 田 孔 士

論 文 内 容 の 要 旨

網膜においてグルタミン酸は興奮性神経伝達物質として機能しているだけでなく、虚血負荷において生じる遅発性神経細胞死において重要な役割を担っている。この細胞死は、グルタミン酸受容体サブタイプの1つである *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体刺激による Ca²⁺ の細胞内流入によってもたらされる。細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇が一酸化窒素合成酵素を活性化し一酸化窒素 (NO) を発生させる。生じた NO は、細胞外へ直ちに拡散し、少量の NO は NMDA 受容体を抑制して Ca²⁺ の細胞内流入を阻止するため網膜神経細胞に対し保護的に働く。しかし多量に生じた NO は superoxide と反応して peroxynitrite を生じ、周囲の網膜神経細胞を障害しグルタミン酸毒性を発現する。

ビタミン B₁₂ は水溶性ビタミンの一つで視神経炎の際に臨床的にも用いられている。ビタミン B₁₂ の活性型である methylcobalamin (MB₁₂) は homocysteine から methionine を生成する際に必要な補酵素で、この代謝経路により生成される S-adenosylmethionine (SAM) は生体内で最大のメチル基供与体として、種々のメチル基転移反応に関与している。本研究の目的はグルタミン酸毒性に対する MB₁₂ の保護作用及びそのメカニズムの *in vitro* での検討である。

実験には胎生16~19日齢の胎児ラットより単離した初代培養網膜神経細胞を10~12日間培養して用いた。培養6日目に cytosine arabinoside (10 μM) を添加して、非神経細胞を除去した。グルタミン酸毒性は培養細胞をグルタミン酸 (1 mM) に10分間暴露し、さらにグルタミン酸不含培地で1時間培養した後、トリパンブルー染色法にて定量的に判定した。MB₁₂ の投与方法は、培養初日からグルタミン酸投与と実験直前まで投与する慢性投与と、グルタミン酸暴露時及びその後の *post incubation* に投与する急性投与とでその効果を判定した。

慢性投与実験では、MB₁₂ (0.01~10 μM) は用量依存性に保護作用を示した。一方、急性投与実験では、グルタミン酸毒性は抑制されなかった。SAM (1 μM) を慢性投与した場合も MB₁₂ (1 μM) の慢

性投与と同様の保護作用を示したが、急性投与では MB₁₂ 同様、グルタミン酸誘発細胞死は抑制されなかった。また、一酸化窒素生成試薬 (sodium nitroprusside, 1 mM) でグルタミン酸と同様の処置を行うと著明な細胞死が誘発される。この細胞死に対しても、MB₁₂ (1 μM) あるいは SAM (1 μM) は慢性投与することで保護作用を示した。さらに、Ca²⁺ 蛍光指示薬である Fura-2 を用いて、グルタミン酸 (50 μM, 10秒) 刺激による細胞内 Ca²⁺ 濃度の最大値を測定したところ、MB₁₂ あるいは SAM を慢性投与した細胞群と無処置の細胞群との間に有意差は認められなかった。

以上の結果より、MB₁₂ はグルタミン酸受容体の発現及び機能に影響することなく SAM を介する代謝経路を賦活化することにより、NMDA 受容体を介するグルタミン酸誘発遅発性神経細胞死に対して保護作用を発揮するものと推定された。

論文審査の結果の要旨

網膜においてグルタミン酸は興奮性神経伝達物質としての生理的機能だけではなく、遅発性神経細胞死における神経毒としての作用がある。本研究はグルタミン酸誘発遅発性神経細胞死に対するメチルコバラミン (MB₁₂) の保護作用及びそのメカニズムの *in vitro* での検討である。

ビタミン B₁₂ の活性型である MB₁₂ はホモシステインからメチオニンを生成する際に必要な補酵素で、この代謝経路により生成される S-アデノシルメチオニン (SAM) は生体内でのメチル基供与体として、種々のメチル基転移反応に関与している。MB₁₂ はグルタミン酸毒性に対して、同時投与では無効であったが、培養初日からの前投与で用量依存性に保護作用を示した。さらに、一酸化窒素生成試薬で誘発される細胞毒性を前投与で抑制した。また、グルタミン酸毒性の最初のステップである細胞内への Ca²⁺ の流入に関しては前投与をしても対照群と有意差は認められなかった。SAM を MB₁₂ と同様にグルタミン酸毒性に対し検討したところ MB₁₂ と同様の保護作用を示した。従って、MB₁₂ のグルタミン酸毒性に保護作用を示した。従って、MB₁₂ のグルタミン酸毒性に対する保護作用は SAM のメチル基供与体としての作用を介して発現していると考えられた。

以上の研究はグルタミン酸神経毒性に対する MB₁₂ の保護作用及びそのメカニズムを解明したものであり、グルタミン酸神経毒性の関与する疾患に対する治療薬としての可能性を示したものである。

従って、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 9 年 2 月 12 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。