

氏名	呉 軍
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博(医)第253号
学位授与の日付	平成20年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	Taurine activates glycine and $\gamma$ -aminobutyric acid A receptors in rat substantia gelatinosa neurons (タウリンは脊髄膠様質細胞においてグリシンとGABAA 受容体を活性化する)
論文審査委員	主査 教授 澁木 克 栄 副査 教授 馬 場 洋 副査 教授 那 波 宏 之

#### 博士論文の要旨

##### 【はじめに】

タウリン(taurine)は中枢神経系に多く含まれる内在性アミノ酸の一つで、神経細胞の機能に重要な役割を担っていると考えられている。タウリンは脊髄にも存在し、末梢組織に対する痛み刺激によって脊髄後角内で放出される。グリシンや GABA に加えて、タウリンも脊髄後角で抑制性神経伝達物質または神経調節物質として作用する可能性があるが、脊髄後角での痛覚伝達に対するタウリンの作用はほとんど知られていない。脊髄後角の中でも特に第 II 層(膠様質)は痛みの伝達や修飾に重要な役割を果たし、タウリンも豊富に存在することが知られている。我々は成熟ラット脊髄スライス標本を用いてホールセルパッチクランプ記録を行い、膠様質細胞に対するタウリンの作用を解析した。

##### 【方法】

週齢 5~7 週の Wistar 系雄性ラットから、ウレタン麻醉下 (1.5 g/kg 腹腔内投与) に腰仙部脊髄を摘出し、厚さ約 600  $\mu$  m の脊髄スライス標本を作製し、酸素化したクレブス液 (NaCl 117, KCl 3.6, CaCl<sub>2</sub> 2.5, MgCl<sub>2</sub> 1.2, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 25, and D-glucose 11(mM)) を 36°C に加温して灌流した (15 ml/min)。膠様質細胞からのパッチクランプ記録は先端電極抵抗約 10 M $\Omega$  のパッチガラス電極を用いて行った。ガラス電極内液の組成は Cs-sulfate 110, CaCl<sub>2</sub>

0.5, MgCl<sub>2</sub> 1.2, EGTA 5, HEPES 5, TEA 5, ATP 5, GDP-β-S 1 (mM)とした。膜電位を 0mV に固定し、タウリンによって膠様質細胞に誘起される膜電流を記録した。また、薬剤は Krebs 液中で既知の濃度に調整し、速度、温度を変えずに灌流投与した。得られた電流は、パッチクランプ用増幅器により増幅し、データ解析用ソフトウェアを用いて解析した。すべてのデータは mean ± S.E.M で表した。統計処理は対応のある T 検定を用いて行った。p < 0.05 を有意とした。

### 【結果】

GABA<sub>A</sub>受容体拮抗薬 (bicuculline 20 μM) 存在下にタウリン (0.01mM ~ 30mM) を灌流投与すると膠様質細胞に外向き電流が誘起され、濃度依存性に振幅は増大した。同様にグリシン (0.01mM ~ 30mM) を投与すると外向き電流が誘起された。タウリンやグリシンで誘発される電流は共に 10mM 付近で最大振幅に達し、最大振幅はグリシン ( $I_{Gly}$  96.7 ± 8.1 pA) よりタウリン ( $I_{Tau}$  151.1 ± 4.9 pA) の方が有意に大きかった (p < 0.05)。タウリンによって得られた最大振幅はプロポフォールによってさらに増大することはなかった。さらに strychnine (2 ~ 10 μM) を加えるとタウリンによって誘発される電流は消失した。 $I_{Tau}$  の逆転電位は -70mV 付近であり、これは塩素イオンの平衡電位に一致していた。

次にタウリンが GABA<sub>A</sub> 受容体に作用するかどうか調べた。低濃度 (0.3 mM) のタウリンで誘起される電流は GABA<sub>A</sub> 受容体拮抗薬 (bicuculline 20 μM) でまったく抑制されなかったが、比較的高濃度 (3 mM) のタウリンで誘起される電流は bicuculline (20 μM) でコントロール値の 76.5% に有意に抑制された (p < 0.05)。

タウリンとグリシンは脊髄後角で同時に放出されるため、その相互作用を調べた。タウリンとグリシンの同時投与によって誘起された電流の平均振幅はタウリンとグリシン別々に投与した場合と比べて振幅は減少し、 $I_{Tau}$  と  $I_{Gly}$  の交差抑制作用 (cross inhibition) が示された。

### 【考察】

本研究の結果より脊髄膠様質細胞においてタウリンは主にグリシン受容体を活性化し、高濃度では GABA<sub>A</sub> 受容体も活性化することが明らかとなった。また、プロポフォールの効果から、膠様質細胞ではグリシンはグリシン受容体に対して部分作動薬であり、むしろタウリンの方が完全作動薬である可能性が高いと考えられる。タウリンが脊髄後角で放出された場合、主にグリシン受容体の活性化を介して塩素イオンチャンネルが開き細胞を過分極させる、あるいは膜抵

抗を減少させることによって膜の興奮性を低下させる。従って、タウリンは脊髄後角の痛覚伝達には抑制的に作用すると考えられ、タウリンを脊髄に投与すると有効な鎮痛作用が得られる可能性もある。 $I_{Taur}$  と  $I_{Gly}$  間の交差抑制の機能的意味は不明であるが、それらが同時に放出された場所での過剰な抑制を制限するという意味を持つかもしれない。

(論文審査の要旨)

タウリンは脊髄に存在するアミノ酸で、痛み刺激によって後角内に放出されるため、グリシンやGABAなどと同様の抑制性伝達物質として機能する可能性がある。申請者はラット脊髄スライス標本を作製し、脊髄後角の膠様質細胞からパッチクランプ記録を行い、タウリンの作用を解析した。GABA<sub>A</sub>受容体拮抗薬の bicuculline 存在下にタウリンを灌流投与すると、濃度依存的に外向き電流が誘起された。グリシン受容体阻害薬の strychnine を加えると、タウリンによって誘発される電流は消失した。グリシン投与でも同様の外向き電流が観察されたが、タウリン誘発電流の最大振幅はグリシン誘発電流より有意に大きかった。タウリン誘発電流の逆転電位は -70 mV 付近であり、これは塩素イオンの平衡電位と一致した。低濃度のタウリンはGABA<sub>A</sub>受容体には殆ど作用しなかったが、高濃度になると bicuculline で阻害される外向き電流を生じさせた。タウリンとグリシンを同時投与すると、それぞれ別々に作用させたときより反応が小さくなる交差抑制作用が見られた。以上の結果から、タウリンは脊髄後角膠様質細胞においてグリシン受容体に作用する内在性の抑制性伝達物質として鎮痛に関与している可能性が示唆される。

本論文は脊髄後角の膠様質細胞におけるタウリンの作用を初めて明らかにしたものであり、この点に学位論文としての価値を認める。