

## 細胞レベルにおけるけいれん発現機序と柴胡桂枝湯加芍薬の作用

菅谷 愛子

城西大学薬学部生薬材科学研究室, 〒350-0295 坂戸市けやき台 1-1

## Cellular Mechanism of Seizure Discharge and Its Normalization by a Herbal Mixture Prescription “Saikokeishito-ka-Shakuyaku” (SK)

Aiko SUGAYA

Laboratory of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, 1-1, Keyakidai, Sakado 350-0295, Japan

(Received January 23, 2001)

Epilepsy is one of the most frequently occurring nervous diseases. However, the fundamental cause of epilepsy is still unclear. We tried to elucidate the cellular mechanism of seizure discharge. During this research we unexpectedly found that a herbal mixture prescription shows very good effects on epileptics. Therefore, we also performed experiments on the anticonvulsant mechanism of this herbal mixture prescription, “Saikokeishito-ka-Shakuyaku” (SK). SK showed normalizing effects on intracellular calcium-related and protein-related pathological changes induced by pentylenetetrazol (PTZ) application in snail neurons and cultured neurons from the cerebral cortex of mice. In addition, SK showed marked protective effects against neuron damage induced by the cobalt focus epilepsy model, cytochalasin B and severe stress. SK also showed normalizing effects on developmental defects of cultured neurons from the cerebral cortex of an epilepsy animal model, EL mice. Moreover, SK showed complete preventive effects on the abnormal expression of one of the seizure-related (SEZ) genes, PTZ-17, induced by PTZ in *Xenopus* oocytes injected with PTZ-17 RNA. We also determined mouse chromosomal loci of the SEZ gene group and PTZ sensitive trait loci by linkage analysis for comparison with human synteny of epileptic families. The above-mentioned findings suggest that some herbal prescriptions will become promising drugs for the therapy against intractable nervous diseases which can not be ameliorated by pure chemical drugs in the future.

**Key words**—seizure; pentylenetetrazol; bursting activity; intracellular calcium; SEZ genes; Saikokeishito-ka-Shakuyaku

## はじめに

てんかんは世界人口のうち約3%という頻度で発症する非常に高い発症率を持つ神経疾患である。<sup>1)</sup>しかし、この疾患の根本的な発症原因が明らかになっていないために、いまだに根本的な治療法はなく、phenytoin, barbiturate, valproateなどの抗けいれん剤によって、主な症状であるけいれん発作を抑えているうちに自然に治癒することを期待することで治療しているにすぎない。

てんかんはILAE (International League Against Epilepsy) の国際分類によれば、全般発作を持つ全般てんかんと、部分あるいは焦点を持つ焦点てんかんとに二分され、それぞれがさらに器質的病変がなく特発性であるものと、なんらかの器質的病変から二次的にてんかん原焦点が形成されて発症する続発

性てんかんに分類される。<sup>2)</sup>特発性てんかんについては、家系研究や双生児研究の結果から、特に遺伝要因が大きい疾患と考えられてきた。近年、分子遺伝学、分子生物学の進歩により、ごく一部ではあるが遺伝性特発性てんかんの病因遺伝子の同定が進行しているものもある。<sup>3)</sup>

一方、てんかに伴うけいれん発現のメカニズム解明にはまず単一神経細胞レベルでの研究が必要であると考えられる。神経細胞レベルでけいれん発作波を考えると、けいれんが単なる神経細胞の過剰興奮とは考えにくい。いろいろな実験手段、例えばpentylenetetrazol (PTZ) などのけいれん剤を温血動物に注射したり、penicillinを大脳皮質上に載せたり、又は電撃刺激を行った時、脳の大脳皮質にけいれん波といわれる spike discharge が発生し EEG

で記録される。そのときこの直下の神経細胞には bursting activity (BA) 又は paroxysmal depolarization shift とよばれる正常のときとは異なる特有な膜電位変化が例外なく起ることが認められている (Fig. 1A).<sup>4)</sup> すなわち正常な神経細胞の発火の頻度が単純に多くなるのではなく、特有な異常な発火状態を伴う細胞内の病的変化が作り出され、てんかんの場合には、自発的、周期的にこのような状態が発生しているのである。てんかんけいれんの解明のために、正常な神経細胞がどのような過程を経て特有な膜電位変化を示すようになるのか、正常神経細胞とそのような異常な神経細胞とでは何が異なるのか、このことをはっきりさせればてんかんの根本的原因が明らかにできると考えてこれから述べる一連の実験が始まった。

まず、単純な神経系であるカタツムリの巨大神経細胞を材料にした実験で、1つの神経細胞で PTZ により発現するけいれんの準備及び細胞膜電位変化、細胞内のけいれん関連現象をかなりのレベルまで捕らえることができた。<sup>5-21)</sup> 次に温血動物の脳皮質初代培養神経細胞に材料を替えて継続した実験から、カタツムリで認められた BA に伴う細胞内カルシウム関連の諸現象をすべて再現することができ、<sup>22-25)</sup> またけいれんモデル動物の EL マウスのけ

いれん発現に伴う特有の性質、<sup>26,27)</sup> さらにけいれん発現に関与するイオンチャネルの決定、<sup>28)</sup> けいれん原性遺伝子の発見、<sup>29-31)</sup> マウス染色体上の座の決定<sup>32)</sup>にまで発展した。

けいれん発現機構の実験を始めた極めて初期に、難病の1つであるてんかんの治療に漢方処方が用いられていることを知った。東洋医学会の会長も務められた故相見三郎先生が用いられた「柴胡桂枝湯加芍薬」である。<sup>33)</sup> 相見先生は傷寒論の小柴胡湯の条文中「往来寒熱、休作有時」という記述をてんかんけいれんに見立てるという独創的な解釈をされていた。そして、てんかんの腹症として「胸脇苦満」と「腹直筋拘攣」が認められることが多いので、小柴胡湯と桂枝加芍薬湯の合法の意味で、柴胡桂枝湯加芍薬を用いたと述べられている。漢方的には条文のなかの一証があれば足りるという解釈から必ずしも胸脇苦満の腹証がなくても、てんかん発作を往来寒熱の証とみなし、すでに433例中125例が軽快、79例が完全治癒という治療成績を持っておられた。<sup>33)</sup> また「西洋薬は発作を抑えるだけであるが、漢方は発作を抑えるよりは病気そのものを治すものである」という説明も興味をそそった。この漢方薬を近代科学的に抗てんかん薬としてのメスを入れ、明確な作用が裏付けられれば、発作を抑えるだけで根

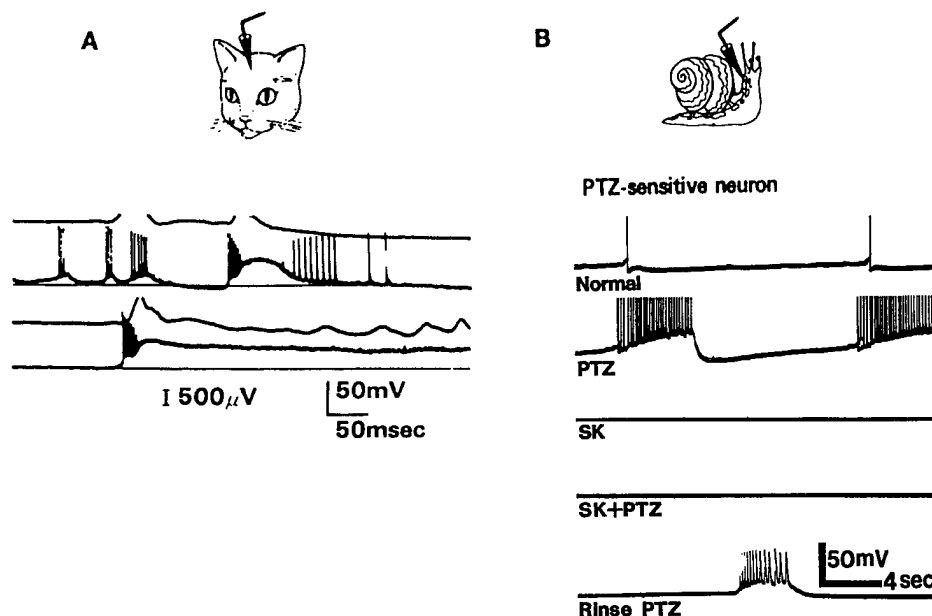


Fig. 1. Bursting Activity Induced by PTZ Application in Mammalia and Snail Neurons

A) PTZ-induced intracellular potential of the cerebral cortical neuron of a cat. B) Effect of extracellularly applied PTZ on the PTZ-sensitive neuron of the snail, *Euhadra*, and effect of SK on PTZ-induced bursting activity.<sup>4,5,44)</sup>

本的な治療方法のないてんかんの患者への福音になるであろうと考えた。

そこで、細胞レベルでのけいれん発現機構についてかなり成果のでていた実験系、またその後も進展させたけいれん発現機構に関する実験のほとんどすべてについて柴胡桂枝湯加芍薬の実験を平行して実施することにした。<sup>34-38)</sup>

実験を始めるにあたって新たに臨床データも集めた結果、国立東京第二病院の精神科では22例中13例に非常に効果が認められ、原発性全汎てんかんと二次的全汎てんかんに有効であった。<sup>39)</sup> 朝霞厚生病院脳神経外科では投与後4週で著明改善が最も多く、軽度改善以上の症例でみると発作抑制率はほぼ70%であった。<sup>40)</sup> またいわゆる抗けいれん作用の一般薬理学的スクリーニングも実施した。<sup>41,42)</sup> 使用した薬方は相見処方で作成した柴胡桂枝湯エキス(SK)又は株式会社ツムラで作成提供していただいた小柴胡湯合桂枝加芍薬湯エキス(TJ-960)を用いた(Table 1)。この2つの処方構成生薬は全く同じで配合量が少し異なるが、いずれも芍薬がかなり増量してあること、甘草を減量してあることが特色である。SKとTJ-960は臨床上也同じように用い、実験でも同じ結果が得られたので本総説ではすべてSKとして記述した。

てんかんけいれんに関する基礎、臨床に関する報告は、すでに総説<sup>43-45)</sup>や原著論文が出版され、種々の国内外の学会やシンポジウムでも発表している。

本総説ではけいれん発現に関する実験結果を述べたのち、それぞれについてSKの作用を記載することとしたが、枚数に制限があるので紹介できなかった部分は、それぞれの参考論文又は総説をご覧いただければ幸いである。

Table 1. Crude Drug Components of SK and TJ-960

	SK (g/day)	TJ-960 (g/day)
Bupleuri Radix	5.0	7.0
Paeoniae Radix	6.0	6.0
Pinelliae Tuber	5.0	5.0
Cinnamomi Cortex	2.0	4.0
Zizyphi Fructus	4.0	4.0
Scutellariae Radix	3.0	3.0
Ginseng Radix	3.0	3.0
Glycyrrhizae Radix	1.5	2.0
Zingiberis Rhizoma	2.0	1.0

## I. 一般薬理学的スクリーニング及びけいれんモデル動物による検討<sup>41,42)</sup>

相見処方のSK 1日分から減圧乾燥エキス(SK)は7.1gの収量で得られ、それぞれ次のような実験を行った。

### 1. 一般薬理学的スクリーニング

ddYマウスのbarbiturate睡眠作用に対して4g/kg投与群のみにわずかな睡眠延長作用を認めた(Fig. 2A)が、体温、自発脳波に何ら効果を認めなかった。一般薬理試験での抗けいれん作用は、最大電撃けいれんではSK 4g/kg投与で強直性けいれん発現数に変化はないが、死亡数は有意に減少した(Fig. 2B)。Strychnineけいれん及びPTZけいれんについては、SKの一回投与及び4週間連続のいずれにおいても対照群に比べてけいれん抑制作用は認められず、むしろけいれんの増強作用が観察された。

### 2. けいれんモデル動物に対する作用

1) 聴原性けいれんに及ぼす影響：DBA系マウスは先天的に音刺激(12 KHz, 100 dB)によってけいれん発作を示すことが知られている。ただし、この系統のマウスは発作を誘発する週令が5週令までに限られる。

SK 1回経口投与では著しい影響はないが、SK 4g/kgの連続投与群では11日目では5%の危険率で有意なけいれん抑制を認めた。2g/kg連続経口投与群でも、音刺激による“なれ”の要素を除くため、投与11日目に1回だけの音刺激を与えるようにすると、対照群に比べて有意に抑制作用を示した(Fig. 2C)。

2) Kindling現象に及ぼす影響：脳のある部位を毎日わずかな通電量で刺激すると、次第にてんかん様の反応が増強し、やがて全身けいれんを起こすようになる。この現象はkindling現象としててんかんのモデルに使用されている。<sup>46)</sup> Wistar系雄性ラットに新皮質運動野及び扁桃核に双極電極を植え込み、1週間後1日1回、25  $\mu$ A, 3秒間の刺激をによって作成したkindling preparationについてSKの作用を検討した。全身けいれんが完全に形成されたラットにSK 4g/kg 2週間連続投与によって、咀嚼運動、點頭、前肢のclonus及び立ち上がり反応、また脳波上見られる発作発射に関しても全く変化が認められなかった。

以上のように、臨床的には驚くほどの効果がある

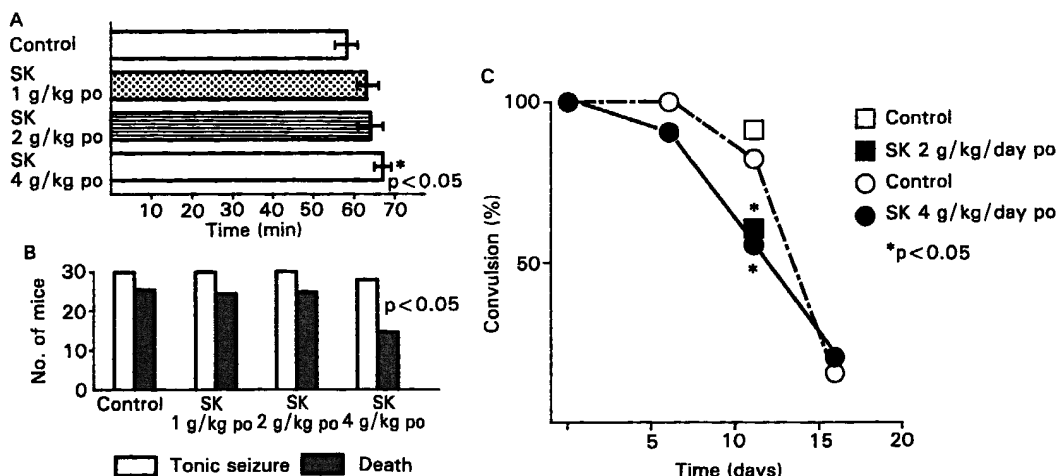


Fig. 2. Effect of SK on General Pharmacologic Screening Tests for Antiepileptic Agents

A) Effect of SK on hexobarbital-induced sleep in mice. Each dose of SK was administered p.o. 1h before hexobarbital (100 mg/kg i.p.) injection. B) Effect of SK on maximal electroshock convulsions. Each dose SK was administered p.o. 1h before maximal electroshock (90 V, 200 m sec). 30 mice were used in each group. C) Effect of SK on audiogenic seizure in DBA strain mice. 30 mice were used in each group.<sup>42)</sup>

のにもかかわらず、確率されている抗けいれん剤に対する一般薬理学的スクリーニングの方法ではすべて無効という結果が出た。しかし、先天的にけいれん素質を持つ病態モデル動物にのみ、それも長期投与を行った場合だけに有効性が認められたことは、和漢薬の作用機序解明には特別な工夫が必要であること、また最も自然の疾病に近い病態モデル動物の必要性を示唆するものである。この実験結果から、単一神経細胞レベルの実験によるSKの作用検討を計画することになり、それによってSKの抗けいれん作用を明らかにすることができた。さらにてんかん発生の細胞内機序の解明に多大の示唆を与えてくれることになった。

## II. 神経細胞レベルでのけいれん発現機構：軟体動物神経細胞による実験

### 1. PTZで誘発されるBAに対する作用<sup>5,6,8,9,35)</sup>

BAは温血動物の神経細胞でなくても、軟体動物の神経細胞でもPTZを神経細胞外から与えることによって、全く同じように引き起こすことができる(Fig. 1A, B)。また、*Aplysia*, *Helix*, *Otala*などの軟体動物の神経細胞でもPTZで似たようなBAが特定の細胞に見られる<sup>47-49)</sup>し、なかには自発放電がBA状を示す細胞もみられる。

このようなPTZによる温血動物の脳皮質や海馬及び軟体動物の神経細胞で見られるBAは、けいれんの細胞レベルのモデルとして広く実験に用いられている。なかでも細胞が大きく、神経連絡が少な

いという軟体動物の神経細胞は、電気生理学的実験、生化学的実験など、単一神経細胞で発現するけいれんのメカニズム解明のためには極めて好都合な実験材料である。私たちはまず関東地方に生息するカタツムリのミスジマイマイ *Euhadra peliomphala* の食道下神経節の特定の神経細胞を実験材料とした。ミスジマイマイの食道下神経節には、その神経節内の位置、色、電気生理学的応答から大きさ100-200  $\mu\text{m}$ の巨大神経細胞の多くを同定することが可能である。<sup>5)</sup> これらの神経細胞はPTZに対して高い感受性のある細胞と比較的低いが感受性を示す細胞があり、これらの細胞は外からPTZを作用させることにより、温血動物の脳皮質神経細胞と全く同じBAを発現させることができる(Fig. 1B)。一方、このようなPTZ感受性の神経細胞と混在してPTZの濃度を高めても、また長時間投与してもBAを発現しないPTZ非感受性の細胞があり、その同定も可能である。<sup>5)</sup> 実験には、このPTZに対して異なる応答を示す2種類の細胞を対比して検討した。

PTZ 50 mMを細胞外から投与すると、5分前後でBAが発現する。このBAを指標にSKの作用を検討した結果、SK 4%溶液でBAは完全に抑制され(Fig. 1B)、SKの構成生薬の中で、シャクヤク、ケイヒ、サイコ、ショウキョウの4生薬にも同様なBA抑制作用を認めた。<sup>9)</sup> また、抗けいれん剤phenytoinでも $10^{-5}$  MでBAをきれいに抑制した。<sup>21)</sup>

BAの発現機構に関しては、isolateした細胞でも

完全に同じBAが見られることから、endogeneousなものであると考えられる。そのイオン機構としては電気生理学的実験でカルシウムの重要性が指摘されていたが、細胞内諸器官との関連においてBAとカルシウムの関連を捕らえた研究はほとんどなかった。私たちの研究グループはBA発現時の細胞内カルシウムの変化に注目し、ミスジマイマイのPTZ-sensitive neuronとnon sensitive neuronを用いていくつもの新しい技法、すなわちX線マイクロアナライザー、イオンシャワーミリング装置、凍結超薄

切片の作成、細胞5個によるマイクロディスク電気泳動などの手段を用いて実験を重ねた結果、BAの発現時に次のような細胞内変化が起こっていることをつきとめた。<sup>10-19)</sup>

1) BAが単一の神経細胞に起こっている時には、細胞内に貯えられていたカルシウムが細胞膜付近に移動する。この現象はコバルトやランタン又はカルシウムキレート剤などを外液に加えて細胞外からのカルシウム流入を阻止しておいても全く同じように見られる (Fig. 3B).<sup>10,11)</sup>

2) BA時には、lysosome-like granule (LLG)の形態的变化を伴ってカルシウムが放出されている。ミスジマイマイのPTZ sensitive neuronでは、直径約0.5  $\mu\text{m}$ の電子密度の非常に高い顆粒(LLG)が存在する。PTZを作用させた時にこのLLGの構造がラメラ状に変化し、PTZを洗浄した後は元の構造にもどることが観察される。超薄凍結切片を使って無染色凍結ステージで電子顕微鏡でみるとこの顆粒が識別でき、その中のカルシウム量をエネルギー分散型のXMAで測定すると顆粒の中に大量のカルシウムが検出された。PTZ作用後の顆粒では全く検出することができない。またPTZ非感受性細胞ではラメラ様に変化する顆粒はほとんどない (Fig. 4).<sup>12)</sup>

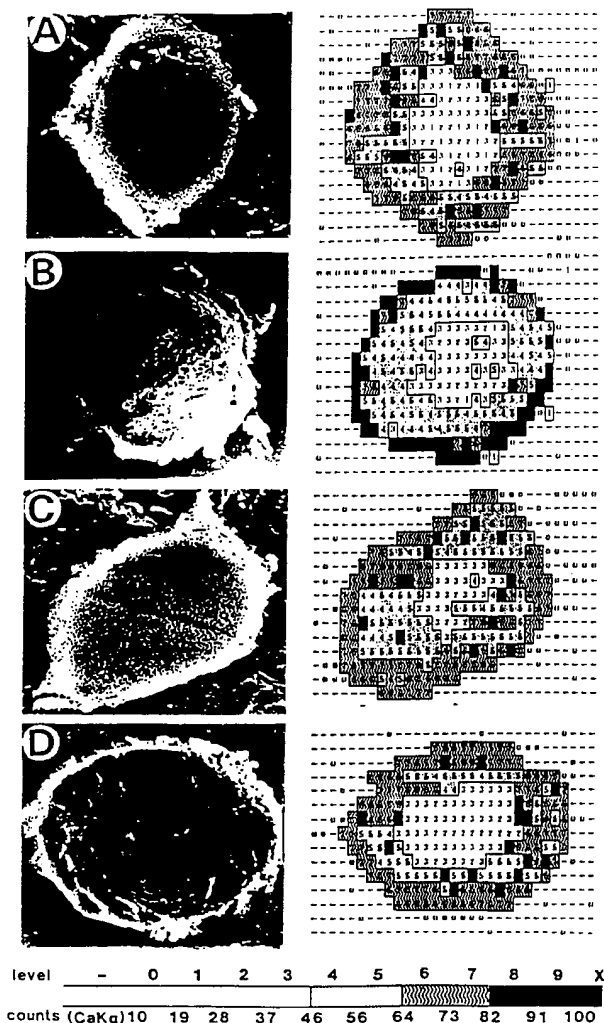


Fig. 3. SK Effect on PTZ Induced Intracellular Calcium Shift on PTZ-Sensitive Neuron of *Euhadra* Using the Mapping Technique of Single Neuron by a Computer Controlled X-Ray Microanalyser

A) Intracellular calcium distribution of normal neuron. B) Calcium shift toward the cell membrane area after PTZ application. C) After application of SK. D) After application of SK and PTZ, showing complete inhibition of intracellular calcium shift. Left photographs are secondary electron images of each examined neuron. Measured counts of CaK $\alpha$  X-ray were classified in twelve steps as shown at the bottom; the numbers in the maps correspond to these levels. Densely shaded spots show the most dense calcium distribution.<sup>22,34)</sup>

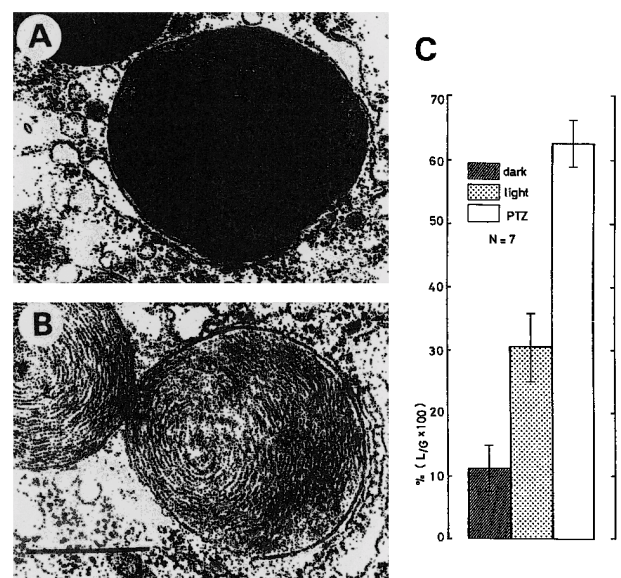


Fig. 4. Electron Micrograph of Intracellular Granules in the *Euhadra* Neuron

A) Normal neuron. B) Neuron after 15 min incubation in PTZ-containing Ringer (bar, 0.5  $\mu\text{m}$ ). C) Percentage of lamella type granules (L) in dark normal, light normal, and dark PTZ-incubated neurons. Values are the mean  $\pm$  standard deviation of seven experiments on each type of neuron.<sup>12)</sup>

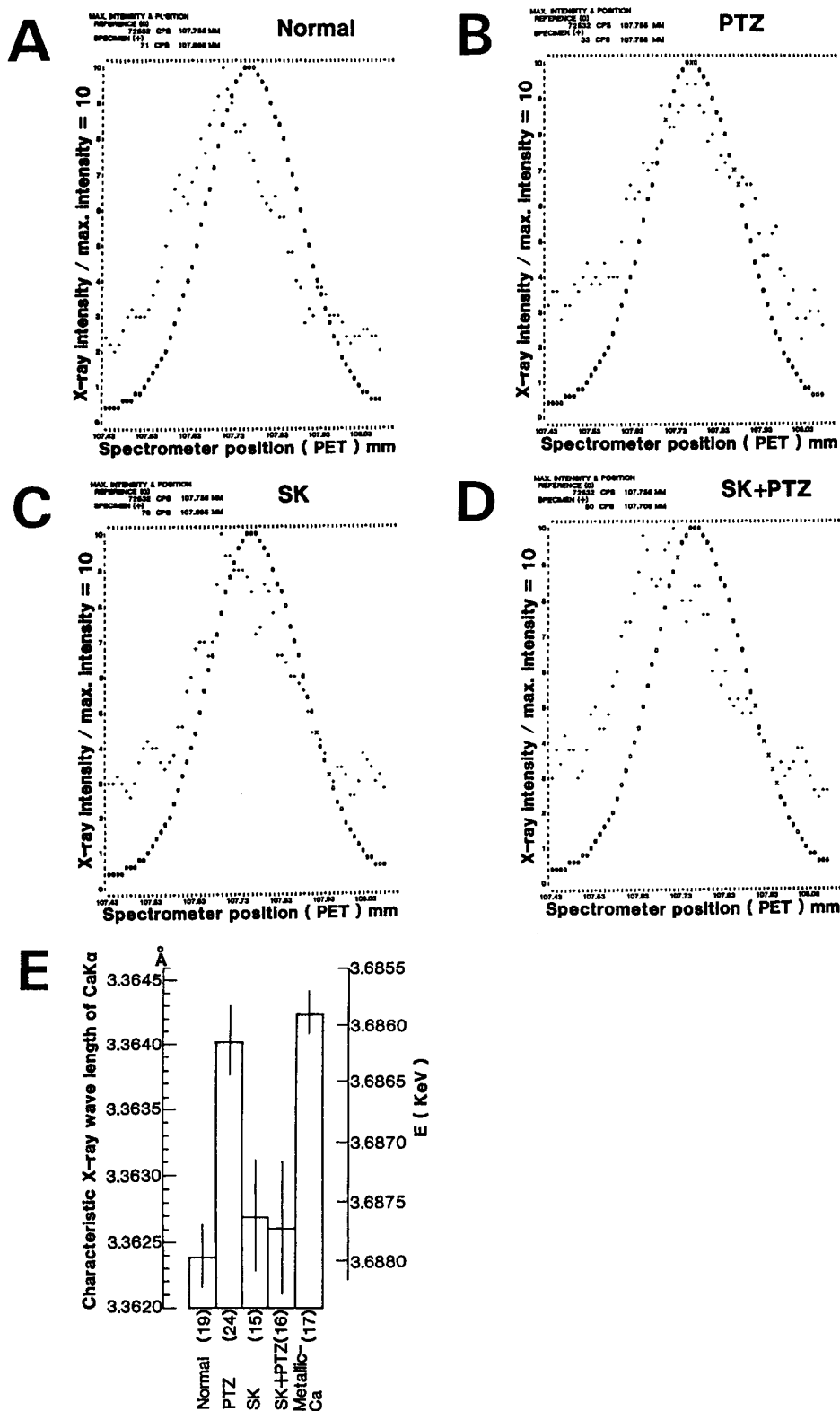


Fig. 5. SK Effect on Calcium Binding State Change during PTZ-Induced Bursting Activity near the Cell Membrane of a Freeze-Dried PTZ-Sensitive Neuron of *Euhadra* Examined by a Computer-Controlled Electron Probe X-Ray Microanalyzer

A) An example of CaK $\alpha$  X-ray intensity drawing by stepwise (10  $\mu$ m) analyzing crystal position movement (total of 67 steps) of metallic calcium (○) and normal neuron (+). The symbol × indicates the superimposed position of the symbols ○ and +. B) Same graph but with metallic calcium (○) and PTZ-treated neuron (+). C) Same graph but with metallic calcium (○) and SK (+). D) Same graph but with metallic calcium (○) and combined treatment with SK and PTZ (+). Abscissa, CaK $\alpha$  X-ray detector position. Ordinate, relative X-ray intensity when the peak strength is 10.<sup>34)</sup> E) Summary of calcium binding state changes of normal, PTZ-treated, SK-treated and SK-PTZ-treated neurons. Values are mean  $\pm$  SD. Numbers of experimental specimens are in parentheses.<sup>34)</sup>

3) BA時に遊離したカルシウムは、細胞膜の内側に移動している。Ion shower milling machineという機械を始めて神経細胞に応用して、凍結乾燥した1個の細胞をお椀状に割り、アルゴンの気体中で電子ビームをあててÅ単位で削りとってゆき、その時の残っている部分のカルシウムの量を測定する方法で調べると、75Åを削った所でカルシウム量が急激に減ることが分かった。細胞膜の内側にカルシウムが移動して集まっていると考えられた。<sup>13,19)</sup>

4) BA時には細胞膜付近のカルシウムの結合状態が正常の時と異なる。金属カルシウムをstandardにおいてchemical shiftを測定すると、正常の神経細胞でのズレと、PTZを与えた後のズレが異なる(Fig. 5B)。<sup>15,34)</sup>すなわちけいれん波を起こしている時の神経細胞のカルシウムの結合相手の物質と、正常の時の結合相手の物質とは異なっていることが分かる。その後の実験でこの結合相手はタンパク質であることが明らかになった。<sup>11,19)</sup>

5) BA時には約15 kDaと約5 kDaの細胞内タンパク質に質的・量的変化が起こり、しかもこれらのタンパク質にカルシウムが多く取り込まれている。ミスジマイマイの全く同じ種類の細胞を5個取り出して、直径0.4 mmのガラス管を使ってマイクロディスク電気泳動を行うと、PTZ sensitive neuronでは15 kDaと約5 kDaのタンパク質の増加が見られる(Fig. 6B)。しかしPTZ non-sensitive neuronではそのような変化は全く見られない。また<sup>45</sup>Caを細胞内に取り込ませた後PTZの影響をみると、PTZ処理による細胞のradioactivityは2個の明瞭なピークを示し、そのピークは約15 kDaと約5 kDaのタンパク質の位置に一致した(Fig. 6B)。このことから細胞膜内側に移動したカルシウムは質的・量的に変化したタンパク質に結合するのであると考えられた。<sup>19)</sup>

6) BAが細胞で起こっている時、細胞内の遊離カルシウム濃度は正常時よりは高く、Meech効果を引き起こす濃度よりは低く、長い間保たれている。細胞内の遊離カルシウムをcalcium-sensitive microelectrodeで細胞内を測定すると、PTZ投与と共にカルシウム濃度が徐々に上昇し、ある点まで達するとBAが起こってくる。さらにカルシウム濃度が高くなると、いわゆるMeech effectと称する cal-

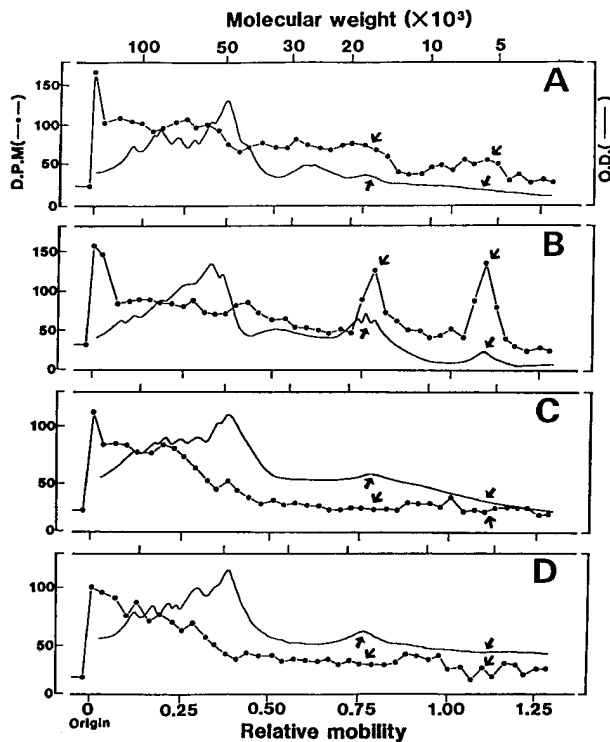


Fig. 6. SK Effects on Intracellular Protein Changes and Calcium Incorporation into Ca. 15 k and Ca. 5 k Dalton Proteins (—●—) with Densitometry Patterns (Thin Lines) during PTZ-Induced Bursting Activity

A) Normal neurons. B) PTZ-treated neurons. C) Neurons treated with SK without PTZ. D) Neurons with combined treatment of SK and PTZ. Arrows indicate ca. 15 K and 5 K dalton proteins.<sup>34)</sup>

cium activated potassium channelの活性化が起こり、 $K^+$ が細胞内に入り過分極を引き起こすが、BAが起こっている時はそこまでカルシウム濃度は上がらずに正常より高い所で長い間細胞内カルシウムが保持されている。<sup>20)</sup>

BAに伴う細胞内の変化、特にカルシウム関連の変化がここまで明らかになった時、SKについて上記の結果を指標に実験を行った。またてんかん治療に用いられる薬剤としてphenytoinについても検討した。

その結果、カルシウムシフトはSKを加えてPTZを投与すると、細胞内貯蔵器管から遊離されたカルシウムの細胞膜付近への移動は見事に抑制され(Figs. 4C, D), chemical shiftの変化も正常化した(Figs. 5C, D)。また、タンパク質の質的・量的変化も全く抑制され正常化される(Figs. 6C, D)。さらにカルシウムとこのタンパク質の結合も見られず(Figs. 6C, D), SKは明らかにBAに伴うカルシウム関連の細胞内変化のすべてを抑制することが判

明した.<sup>34)</sup> また phenytoin も細胞外から作用させることによって、これらの一連の変化を抑制した.<sup>21)</sup>

### III. 温血動物の脳皮質初代培養神経細胞による実験

カタツムリの神経細胞は実験には大変便利な材料で、私たちに多くの貴重なデータを与えてくれたが、できれば温血動物のそれも BA を確実に示す脳皮質で行うことが望ましいと考えた。ちょうどその頃に神経細胞の初代培養方法が確率されたので、早速それを実験に用いることにした。

マウス又はラットの初代培養細胞は、妊娠 17 日目の胎児を Asou ら<sup>50)</sup>の方法で培養し、培養 3 日から 7 日目までの細胞を使用した。

#### 1. Patch Clamp 法による検討

温血動物の神経細胞は大きさが約  $10\ \mu\text{m}$  ほどなので、カタツムリの細胞のように単純にガラス電極を挿入して電位変化を測定するのは極めて難しい。そこで用いられるのが patch clamp 法<sup>51)</sup>である (Figs. 7, 8)。

硬質ガラス管で作成したキャピラリーの先端を内径が約  $1.5\text{--}2.0\ \mu\text{m}$  に熱処理で丸めたパッチ電極を用い、これを神経細胞に軽く押し当てて吸引すると giga ohm seal という高い絶縁状態が作り出せる。このとき電極の中に入った単一チャンネルの開閉が記録できる (cell-attached patch clamp 法) (Figs. 7A-C, 8B)，さらに瞬間的に吸引を強くすると吸着し

た細胞膜が破れて細部内と電極内を通じ、細胞膜全体を流れるイオン電流を記録することができる (whole cell patch current clamp 法) (Fig. 8A)，whole cell patch current clamp 法では、カタツムリの細胞に電極を挿入して得られたと同様な膜電位変化が記録できる。また giga ohm seal した後、吸着した細胞の断片のみを細胞全体から引き離して記録する方法 (inside-out patch 法) (Figs. 7D, E) などがあり、必要に応じて使い分けた。<sup>24,25,28)</sup>

Cell-attached patch clamp で、単一の potassium channel の開閉をみると、正常では比較的 open time が短くて close time が長いランダムな開閉状態を示している。これに PTZ を外から与えると開閉頻度が増加すると同時に open time が長くなり、ついには burst 状に open-close を繰り返すようになる (Fig. 7B)。<sup>25)</sup> Cell-attached patch clamp で burst 状になった時に PTZ を洗浄し、同じ細胞を inside-out patch にすると、更に PTZ を投与しても burst 状の開閉は起こらない (Figs. 7D, E)。つまり、このことは BA が起こるためには、これに先立つ細胞の中で起こる一連の変化が絶対に必要であることを示す結果である。

Whole cell patch current clamp で記録すると、正常な状態で regular spike が見られ、PTZ を外から与えると BA が出現する (Figs. 8Aa-b)。この状態に SK を与えると BA は次第に減少し、regular

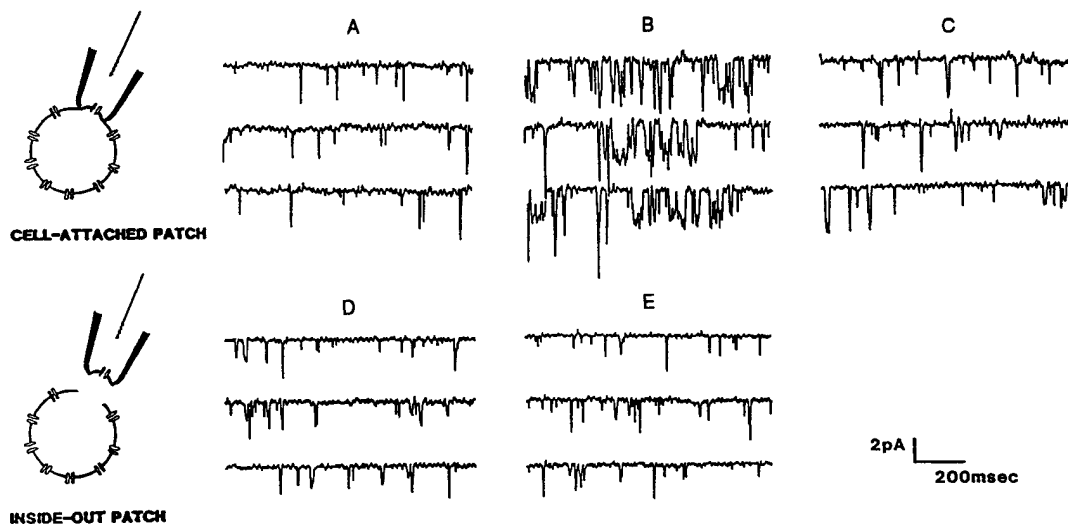


Fig. 7. PTZ-Induced Changes of the Single Potassium Channel

A) Cell-attached configuration. B) PTZ-induced frequent and burst-type open-close state. C) After rinsing. D) After switching to the inside-out configuration. E) PTZ application from inside the cell membrane. No change was observed. Primary cultured neuron from the cerebral cortex of the mouse. 3-day-old culture.<sup>45)</sup>



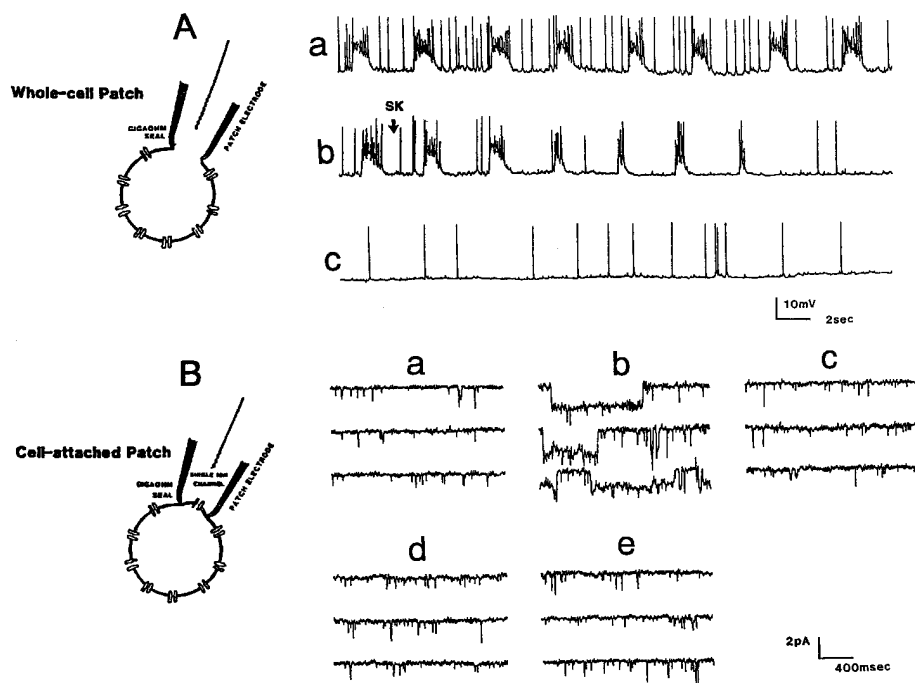


Fig. 8. Normalizing Effects of SK on PTZ-Induced BA and Burst-Type Open-Close State in Primary Cultured Neuron

A) Whole-cell patch recording. a) PTZ-induced BA. b, c) Normalization of BA by extracellular application of SK (75 μg/ml). B) Cell-attached patch configuration. a) Random open-close state in a normal neuron. b) PTZ-induced frequent burst type open-close state. c) After rinsing with normal medium. d) SK (75 μg/ml) added medium. e) PTZ and SK added medium. No PTZ effect was observed. Primary cultured neuron from the cerebral cortex of the mouse.<sup>45)</sup>

spikeになる (Figs. 8Ab-c). また cell-attached patch で PTZ で誘発した burst 状の open-close も SK により正常化された (Fig. 8Bc). 以上のようにマウス大脳皮質初代培養神経細胞を用いて patch clamp 法で記録した BA 及び burst 状のチャネルの開閉についても, SK によって正常な状態になり抑制効果を示した.

## 2. 細胞内カルシウム濃度変化<sup>44,45,52)</sup>

初代培養神経細胞についてもカタツムリの神経細胞と同様の XMA による細胞内カルシウム測定を行ってみると, PTZ によってカルシウムが局所的にたまり, 洗浄で元にもどる現象が観察された.<sup>44)</sup> 遊離カルシウムイオンのみの細胞内濃度測定方法として用いられるようになった calcium sensitive 蛍光色素 fura 2AM を細胞内に incubate して画像解析で PTZ の作用をみると, PTZ によって細胞内カルシウムが明らかに増加し洗浄によって元にもどる (Fig. 9E).<sup>45,52)</sup> SK はこのような PTZ による細胞内カルシウムの上昇を抑制した (Figs. 9B, C). また, BA 及び細胞内カルシウムの上昇は, PTZ でなくとも細胞内カルシウム貯蔵器官からカルシウムを遊離させる IP<sub>3</sub> の細胞内への適用や caffeine の細胞外か

らの適用及び電極内液を高濃度のカルシウムイオン溶液として細胞内に挿入すると, PTZ と同じような BA が観測され,<sup>52)</sup> 画像解析でも細胞内カルシウムの上昇が観察される.<sup>52)</sup> このような PTZ 以外の方法で生じた BA 及び細胞内カルシウムの上昇については, SK の構成生薬シャクヤクエキスでも抑制した.<sup>52)</sup>

## IV. けいれんモデル動物 EL マウスによる実験

### 1. けいれん誘発の PTZ 感受性<sup>26)</sup>

EL マウスは Imaizumi ら<sup>53)</sup> により ddY マウスの突然変異として見つけられたけいれんモデルマウスである. 手の上に載せて 10 cm ほどの高さに 20 回ほど放り上げるにより tonic clonic のけいれんが必ず起こってくる. 普通のマウス, 例えば ddY や C57B1 などのマウスでは, 抗けいれん作用を見る薬理のスクリーニングでは, i.v. で 70 mg/kg と非常に大量の PTZ を投与する必要がある. しかし EL マウスでは 18 mg/kg で 100% けいれんが起こる. つまり PTZ のけいれん閾値が非常に低いマウスである. このマウスに SK を 2 g/kg 経口投与した後, 30 分後に PTZ を投与すると, けいれんが起こらなくなる. SK はこのようなけいれんモデルマ

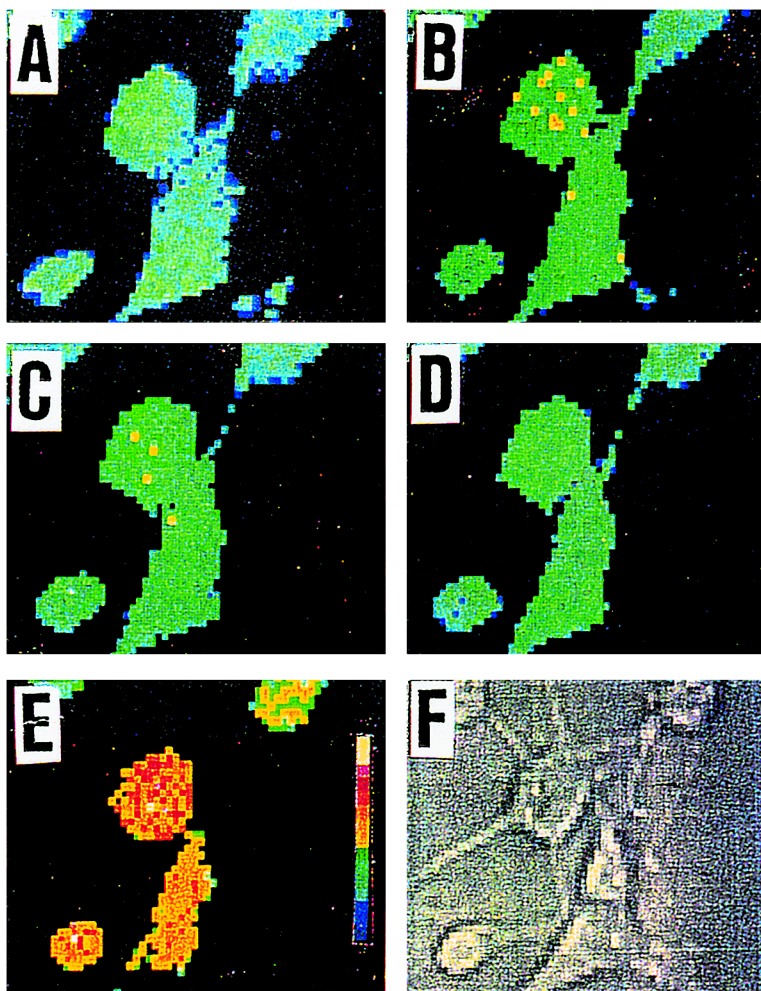


Fig. 9. Normalizing Effect of SK on the PTZ-Induced Intracellular Calcium Increase

A) Normal state. B) Treatment of SK and PTZ (10 mM). C) 10 min after rinsing with normal medium. D) 20 min after rinsing with normal medium. E) PTZ without SK, intracellular calcium increased markedly. F) Phase contrast photograph of the observed neuron. Observation using ARGUS-50 (Hamamats Photonics) with calcium sensitive dye fura 2. Primary cultured neuron from the cerebral cortex of the mouse.<sup>45)</sup>

ウスに対しても有効であることが分かった。

## 2. EL マウスの自発運動<sup>37)</sup>

EL マウスは行動に特色があり、自発運動を調べると ddY のような普通のネズミは夜間に動き昼間はほとんど動かないというサーカディアンリズムがあるが、EL マウスは昼夜の区別がなく動き運動量が非常に多い。このように異常な行動を持つ EL マウスに SK 2 g/kg を 1 日 1 回連続経口投与すると、次第に ddY と同じような行動を示すようになり異常な行動も正常化される。<sup>37)</sup>

## 3. EL マウスの培養神経細胞

1) 神経細胞の成長・発達障害<sup>38)</sup>: EL マウスは PTZ 閾値が低かったり、行動が異常であるばかりでなく、ddY マウスと同じように大脳皮質神経細胞を培養して比較すると、ddY では培養 3 日目ぐ

らいまでは約 0.5% の細胞に分裂像が見られるが、EL マウスでは全く分裂像を見ることができない。つまり、胎生期のかなり前の段階で細胞の発達が停止してしまうと思われる。また、7 日ぐらい培養した ddY の神経細胞ではきれいな neuron の network を作るが、EL マウスの場合には束状に神経細胞の neurite が延びてきて、neurite の認識に何らかの欠陥があるらしいことが示唆される (Fig. 10)<sup>27)</sup>。培養 10 日目の ddY の神経細胞は neurite を伸ばしているのに対して EL マウスでは neurite の伸展が停止してしまい、細胞はほとんど死滅してしまう。EL マウスの大脳皮質神経細胞を medium 中に SK 75  $\mu\text{g/ml}$  を添加して培養すると、対照に対して約 2 倍に増加する。また 100  $\mu\text{m}$  以上に伸展した neurite を数えると、同様に約 2 倍に増加しており ddY に

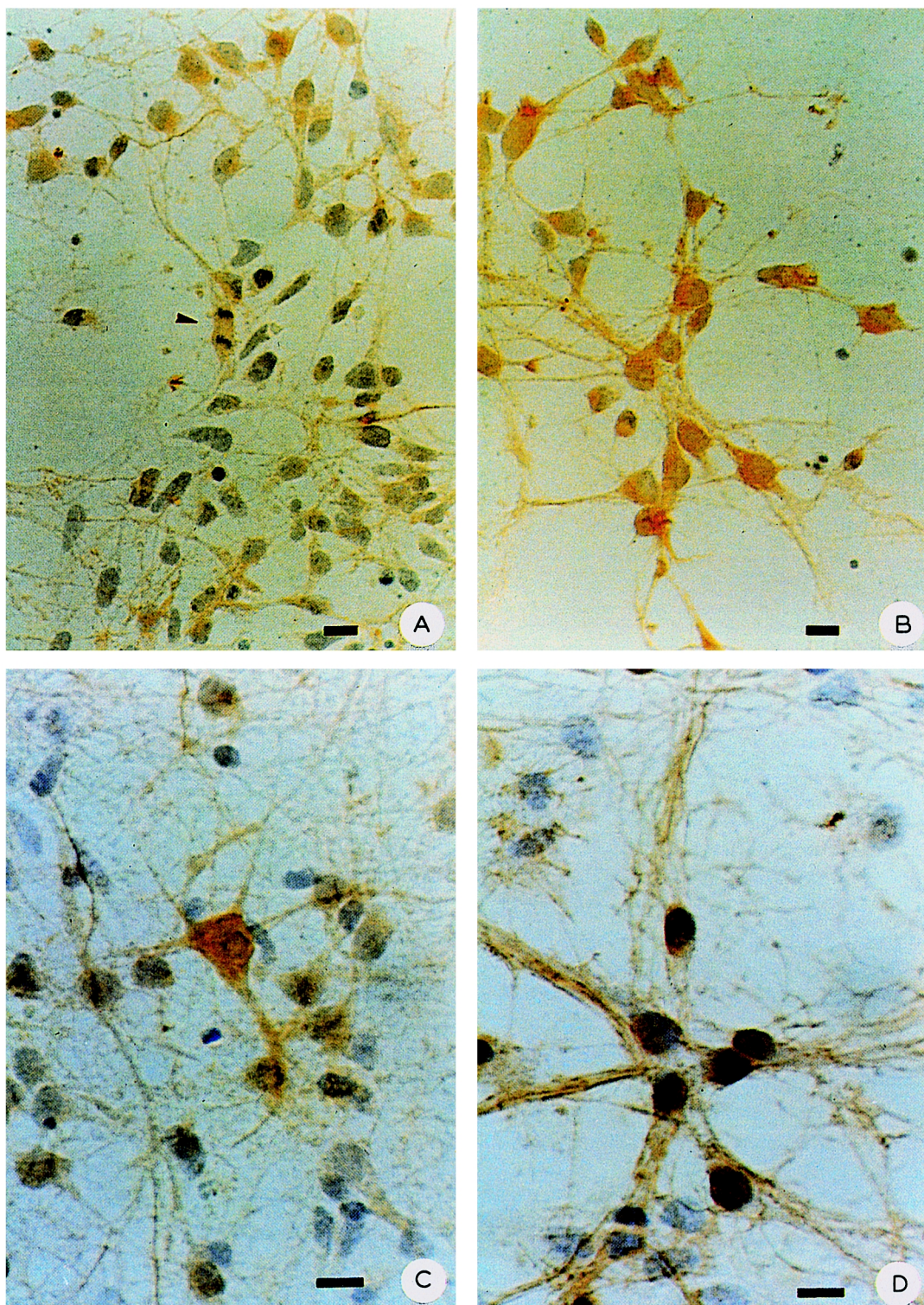


Fig. 10. Immunoperoxidase Staining for Neurofilaments in 3-Day-Old (A and B) and 7-Day-Old (C and D) Primary Cultures of Embryonic Control ddY (A and C) and Mutant EL Mouse (B and D) Brain

Note NF-positive cell divide *in vitro* at the early telophase (arrowhead) in the ddY mouse brain. Bars=10  $\mu$ m.<sup>27,44)</sup>

近い状態になる。<sup>38)</sup>

EL マウス培養細胞の状態から、神経突起の伸展や神経細胞の成長に重要な役割を持つ ganglioside

の量を測定してみると、GD<sub>1b</sub>、GD<sub>3</sub>、GT<sub>1b</sub> 及び GQ<sub>1b</sub> 量が EL マウスの神経細胞で明らかに低いことが分かった。EL マウスの培養神経細胞を SK を

添加した medium で培養すると、正常とまではいえないが無添加の場合の約2倍まで ganglioside が増加する結果が得られた (Fig. 11).<sup>37,38)</sup>

このような結果から先天的に発達障害のある神経細胞の medium に SK を添加して培養すると、ほぼ正常と同じ発達を示すようになるということが言える。

2) EL マウス神経細胞の電位変化と細胞内カルシウム変化<sup>38)</sup>: EL マウスの培養細胞で、ddY の場合と同様に patch clamp 法で電位変化を記録すると、多くの神経細胞が PTZ を与えなくても自発的に BA を示している。このとき、細胞内カルシウム濃度を測定してみると、何もしなくても oscillation 状の濃度変化がみられ、画像でも同様に自発的なカルシウムの増減がみられる。このような先天的に現れる EL マウスの BA も細胞の外から SK を与えることにより正常化される。また cell attached patch で記録すると、自発的に頻度の高い open-close 状態を示し、burst 状の開閉が見られ、同じように SK を与えることによって正常化され、きれいな channel の開閉状態になる。<sup>38)</sup> EL マウスの先天的な異常な BA に対して抗けいれん剤 phenytoin を投与してみると、EL マウスの BA はやや不完全に抑えられ、single channel では EL マウス神経細胞の異常な channel 開閉が phenytoin ではかえって悪化するものさえあった。<sup>38)</sup>

3) EL マウスのグリア細胞<sup>38)</sup>: Astrocyte を継代培養すると休止状態のいわゆる I 型 glia と称する

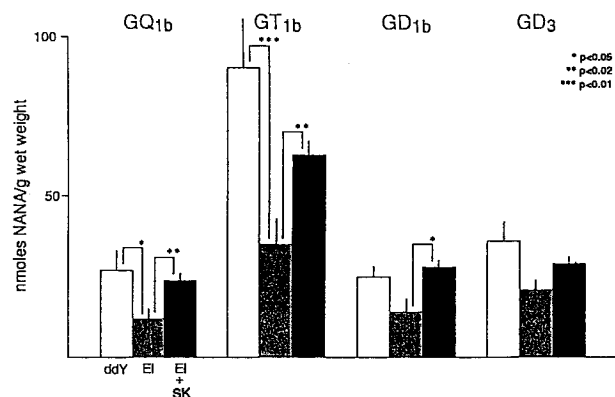


Fig. 11. Lower Contents of Gangliosides in the EL mouse cultured neurons and their Amelioration by SK

White column: normal mice. Shaded column: EL mice. Black column: EL mice with SK containing medium. 3-day-old culture neurons from 18 day-old embryo.<sup>38)</sup>

石垣状の形態を示す。このような astrocyte の medium に 75  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の SK を添加して 48 時間培養すると、すべてのグリア細胞が同活動状態を示す II 型の glia になる。EL マウスのグリア細胞を継代培養して、I 型 glia の状態のものを SK 添加 medium で 48 時間だけ培養し、その SK は洗ってしまった astrocyte の上に EL マウスの neuron をまいて培養すると、SK はすでに洗って除去してしまったにもかかわらず、SK 処理した glia の上に neuron がぎっしりと生えてくる (Fig. 12).<sup>38)</sup>

この結果は、成長・発達・分化に先天的に障害がある EL マウスの glia に対しても neuron に対しても、SK はそれぞれを正常化する作用があると言える。一方 phenytoin を培地に添加して培養すると、ddY の神経細胞でも培養 7 日目ぐらい経過すると neurite の伸展が停止し、ほとんどの細胞は死滅してしまう。したがって phenytoin には培養に関して毒性があると考えられる。

#### V. PTZ 誘発 BA に対するカルシウム依存性 $\text{BK}_{\text{Ca}}$ Channel の関与<sup>28)</sup>

BA の発現時に細胞内カルシウムの上昇、タンパク質の質的・量的変化が現れることが判明しているが、この時の ion channel の詳細については報告がない。BA 発現に細胞内カルシウム濃度上昇が不可欠であることから  $\text{Ca}^{2+}$  activated  $\text{K}^{+}$  channel の関与を想定した。カルシウムにより活性化される  $\text{K}^{+}$  channel については、その conductance の違いにより  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  channel と  $\text{SK}_{\text{Ca}}$  channel に大別されている (Table 2).<sup>54)</sup>  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  channel は 100—400 pS の大きい conductance を有し、voltage sensitive で、早い after-hyperpolarization (AHP) の発生に関与し、1 mM 以下の TEA、サソリ毒の iberiotoxin (IbTX) 及び charybdotoxin (ChTX) などにより阻害される。ChTX と IbTX は 68% の構造相同性を持つが、ChTX は純粋に  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  channel のみでなく、電位依存性の  $\text{K}^{+}$  channel の一部も抑制することが知られている。一方、 $\text{SK}_{\text{Ca}}$  channel は 5—20 pS 程度の小さい conductance を有し、voltage insensitive で、slow after-hyperpolarization の発生に関与すること、20 mM 以上の高い濃度の TEA、ハチ毒の apamin 及び *d*-tubocurarine により阻害される。また、この中間の conductance を有する  $\text{SK}_{\text{Ca}}$  channel の存在も報告されているが、この channel は細胞外にカル

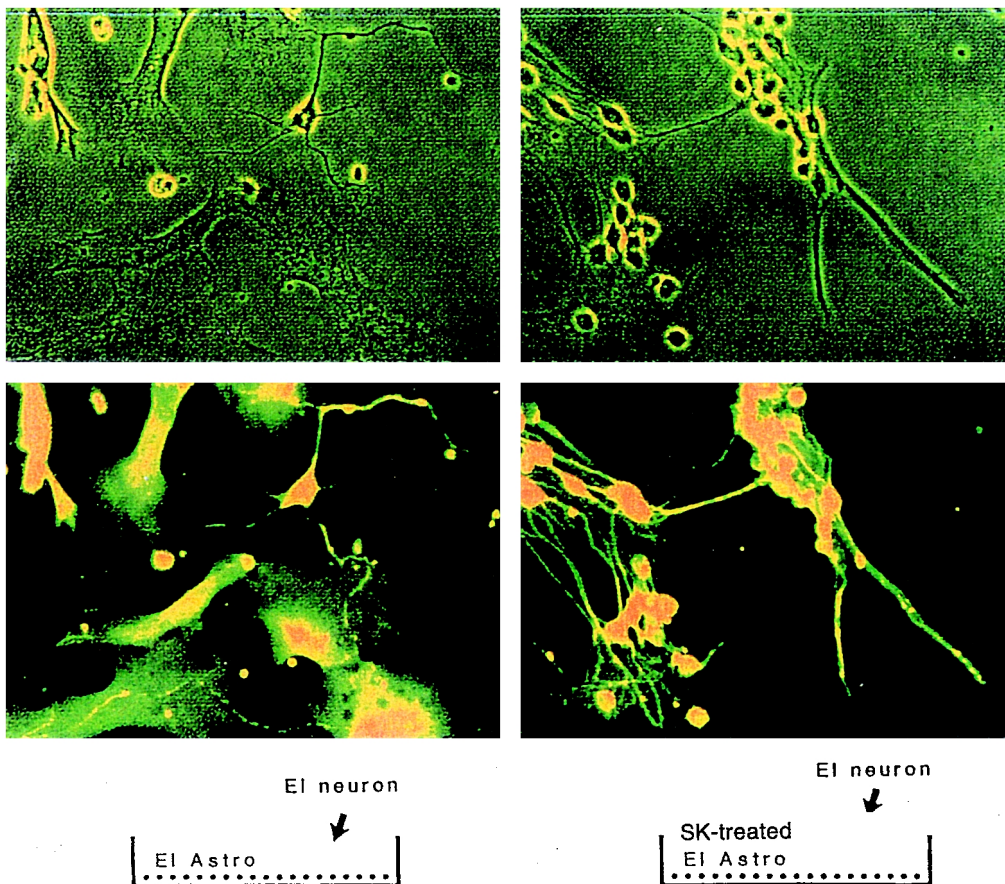


Fig. 12. Increased Proliferation of the EL Mouse Neurons on the SK Pretreated EL Astrocytes  
 The EL mouse neurons were placed on the subcultured astrocytes pretreated with SK for 48 hr and then washed out with normal medium.<sup>38)</sup>

Table 2. Properties of Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Channels in Neurons<sup>54)</sup>

Property	Channel type		
	BK <sub>Ca</sub>	SK <sub>Ca</sub>	Other
Single-channel Conductance (pS)	100~400	5~20	3~7
Voltage sensitivity	Yes	No	No
Blockers	TEA (<1 mM) Charybdotoxin Iberiotoxin	TEA (>20 mM) Apamin <i>d</i> -Tubocurarine	TEA (>20 mM) Ryanodine
Macroscopic current	<i>I<sub>C</sub></i>	<i>I<sub>AHP</sub></i>	<i>sI<sub>AHP</sub></i>
Proposed role	Action-potential repolarization	AHP	AHP

シウムブロッカーを適用したときのみ阻害される。PTZでBA-likeの開閉を示すsingle K<sup>+</sup> channelのconductanceが約150 pSの大きさであることからBK<sub>Ca</sub> channelであることを推定した。

**1. BK<sub>Ca</sub> Channel Blocker, IbTXのBAに対する作用<sup>28)</sup>**

実験はIbTXによる阻害を指標として、PTZで誘発するBAとBK<sub>Ca</sub> channelの関係を検討した。

その結果、PTZによるBA及びPTZ以外の手段、caffeineの細胞外からの適用、IP<sub>3</sub>や高濃度カルシウムの細胞内注入などの手段で細胞内カルシウムを上昇させて誘発したBAのいずれも、膜電位を上昇することなしにIbTXで完全に抑制された (Fig. 13A).<sup>28)</sup> また、cell-attached patch clampで記録されるPTZによるsingle potassium channelのburst状の開閉もIbTXで消失し (Fig. 13B), BA発現に

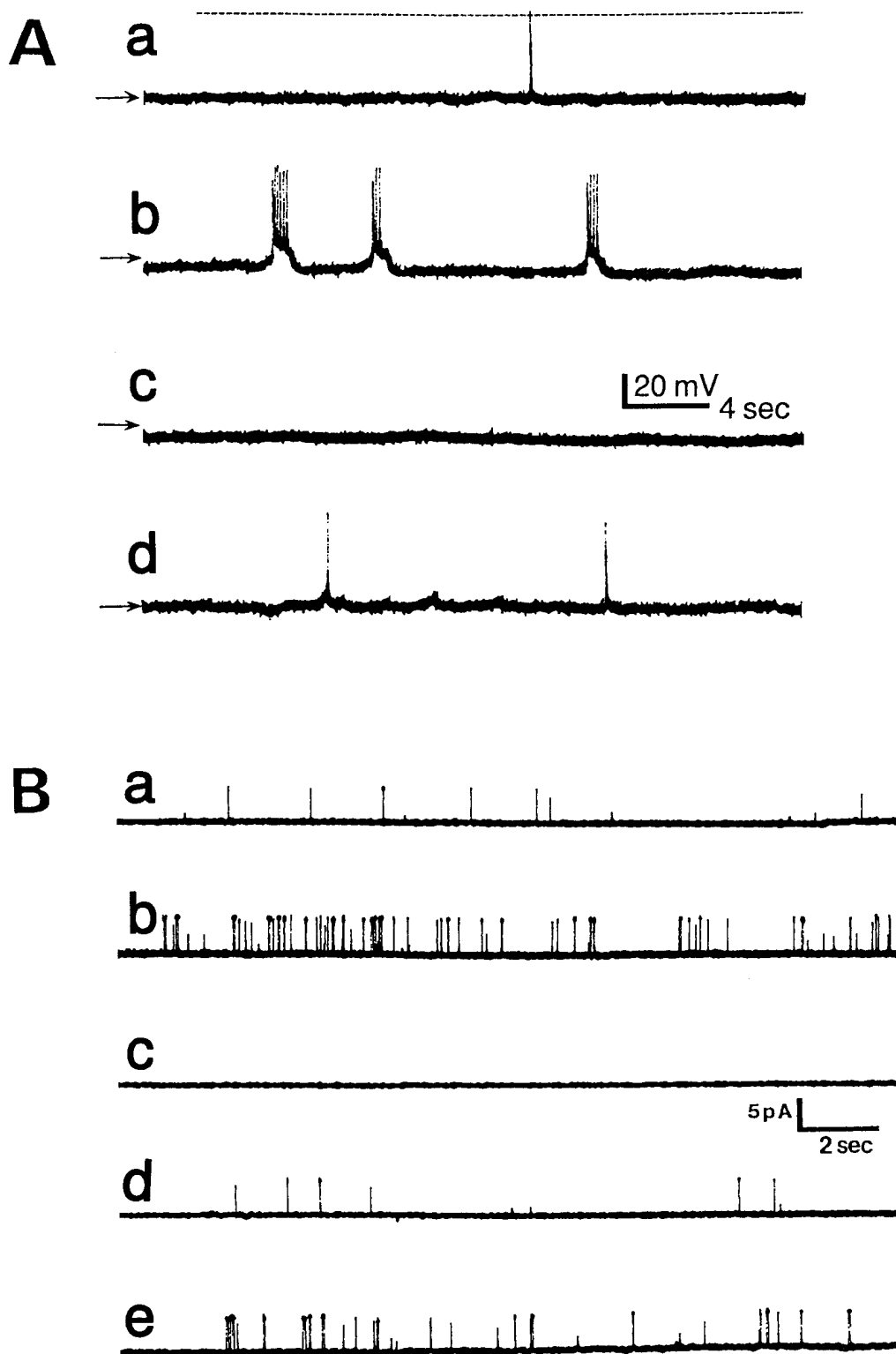


Fig. 13. Inhibition of PTZ-Induced Bursting Activity by IbTX

A. Whole-cell patch recording. a) Spontaneous spike discharge. b) 5 min after application of PTZ (10 mM). c) 1 min after IbTX (50 nM) and PTZ application. d) 1 min after rinsing with external solution. The broken line indicates zero level and horizontal arrows indicate initial normal level of the membrane potential.<sup>28)</sup> B. Cell-attached patch configuration. a) Spontaneous open-close state of potassium channel (150 pS conductance). b) 4 min after extracellular application of PTZ (10 mM). c) 5 min after IbTX (50 nM) and PTZ (10 mM) application. d) After rinsing with external solution. e) PTZ application 10 min after rinsing with external solution.<sup>28)</sup>

BK<sub>Ca</sub> channel が直接関与することを明らかにした。ちなみに apamin は BA を全く抑制しなかった。BK<sub>Ca</sub> channel はエーテルにより足を震わせる形質を持つショウジョウバエで発見された電位依存性 K<sup>+</sup> channel の mutant であり、その欠損、変異などに視点をいた研究が極めて多いが、てんかんけいれんに伴う BA への関与を明らかにしたのは私たちが初めてである。

さらに PTZ 感受性閾値が低く、自発的・周期的な細胞内カルシウムの遊離異常が誘因とされる EL マウスの先天的な BA も IbTX によって抑制され、PTZ 誘因以外の先天的な BA も BK<sub>Ca</sub> channel が深く関わることを明らかにした。<sup>28)</sup> この結果から BK<sub>Ca</sub> channel を止めれば BA が抑制できるということになり、投与量、方法など今後検討すべき課題はあるが、IbTX は抗けいれん剤としての可能性も期待できる。

## 2. BK<sub>Ca</sub> Channel に対する SK の作用<sup>28)</sup>

毒性の強い IbTX に対して BK<sub>Ca</sub> を抑える薬物として考えられるのが SK である。SK は大きい conductance のカリウムチャンネルを抑制するし、その構成生薬のシャクヤクについても同様な作用があった。SK 及びシャクヤクとその成分は、いずれも単に BK<sub>Ca</sub> channel の抑制だけでなく、BA の誘因とされる細胞内カルシウム上昇も抑制する。また whole-cell voltage clamp 法で測定すると早い AHP

のみならず apamin で抑制される遅い AHP も抑制することが分かった。<sup>28)</sup> したがって、IbTX に比べて SK やシャクヤクの抗けいれん作用は優れていると考えられる。BK<sub>Ca</sub> channel 阻害による BA の抑制は、K<sup>+</sup> current による早い hyperpolarization を抑制するためと考えられ、電位依存性 K<sup>+</sup> channel などすべての K<sup>+</sup> channel を止めてしまう TEA などとは異なって、脱分極を示すことなく BA を止めることもその利点と言える。以上の結果は、催奇形性などが指摘されている抗てんかん薬に替わって、新たな薬剤開発のきっかけを提供するものとする。

## VI. 神経細胞の保護作用<sup>55,56,59-62,63,64)</sup>

### 1. サイトカラシン B による細胞発達・成長・分化障害<sup>55-57)</sup>

ddY マウス的大脑皮質神経細胞の medium に actin の重合阻害剤である cytochalasin B を 5 μg/ml 添加して培養すると、neurite の伸展に looping phenomenon という現象が見られる (Fig. 14B)。また正常な神経細胞では neurite が伸展するとき、行く先を認識し接着の場所を定める機能を持つと考えられる growth cone という構造がその先端に現れるが、cytochalasin B を添加した medium で培養した神経細胞はこの構造が見られなくなる。Looping phenomenon はその結果として現れるのであろう。さらに cytochalasin B を添加した medium で培養した細胞は、培養 10 日目には neurite の伸展が止ま

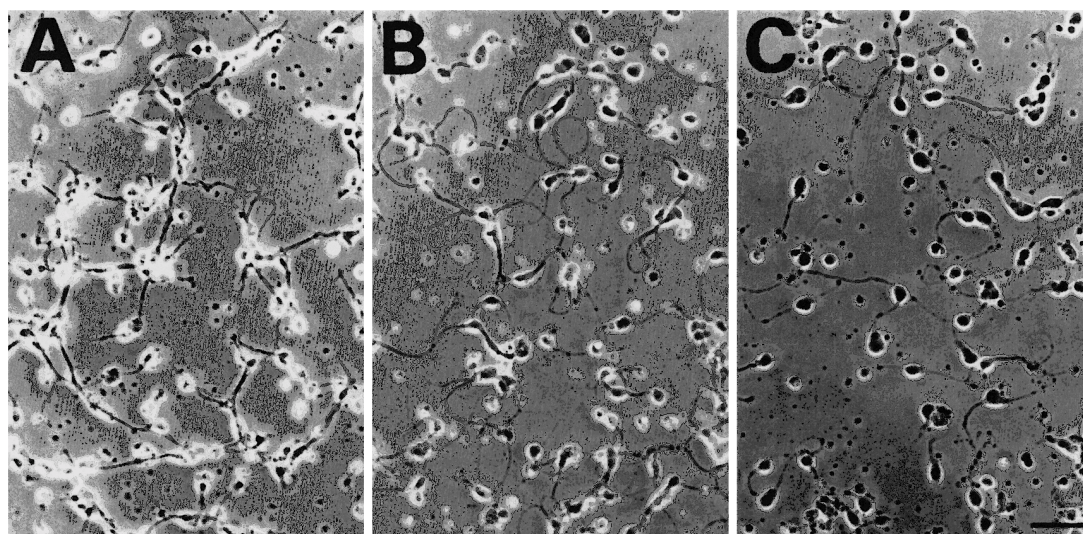


Fig. 14. Effect of SK on Cytochalasin B Distorted Neurites of Cultured Neurons from 17-Day-Old Embryonic Rat Cerebral Cortex  
A) 24 hr cultured neurons of rat cerebral cortex in normal medium. B) 24 hr culture of cerebral cortical neurons in medium containing cytochalasin B (5 mg/ml). The looping phenomenon of neurites is seen. C) 48 hr cultured neurons in SK and cytochalasin B containing medium when SK was added after 24 hr culture in cytochalasin B containing medium. Note the recovery of distorted neurites.<sup>55)</sup>

り死滅してしまう。Cytochalasin と共に SK を添加した medium で培養すると、まず looping phenomenon は見られなくなり (Fig. 14C),<sup>57,58)</sup> neurite 先端の growth cone も現れてくる。<sup>56,57)</sup> さらに培養 10 日目でも神経細胞は neurite を伸展して生存している。このように actin 重合阻害剤 cytochalasin B による培養神経細胞の障害はすべて SK によって抑制される。<sup>55)</sup> Cytochalasin を添加して培養した神経細胞の ganglioside を測定してみると、全体に減少し中でも myelination に影響があると考えられている GM<sub>1</sub> が全く消失してしまう。このような ganglioside に対する損傷も SK を添加して培養することによって阻止される。<sup>55-57)</sup>

## 2. コバルトフォーカステんかんモデル<sup>59-61)</sup>

てんかんのモデル動物としてよく用いられる方法に、focal epilepsy のモデルとして使うコバルトフ

ォーカスモデル<sup>58)</sup>がある。ラットの頭蓋骨をとり dura の上に金属コバルト 0.5 mg ほどの粉末を載せると、その皮質はもちろん反対側の皮質あるいは海馬などに非常にはげしいけいれん波が起こってくる (Fig. 15A)。しかし、処置前 1 ヶ月から SK 2 g/kg/day 連続経口投与を続け、1 ヶ月後にコバルトフォーカスを作成すると全くけいれん波が起こらない (Fig. 15B)。<sup>59)</sup> 一方 phenytoin は、コバルトフォーカスについては全く抑制作用を示さないし、かえってけいれん波がひどくなることが多い。<sup>59)</sup>

コバルトフォーカステんかんモデルのラットでは、海馬 CA<sub>1</sub> の神経細胞がほとんど脱落してしまう (Figs. 16D-F)。<sup>59-61)</sup> しかし、上述のように処置 1 ヶ月前から SK を連続投与した後コバルトフォーカスを作成した場合は、海馬 CA<sub>1</sub> の神経細胞の脱落はほぼ完全に予防できる (Fig. 16G)。<sup>59)</sup> SK 構成

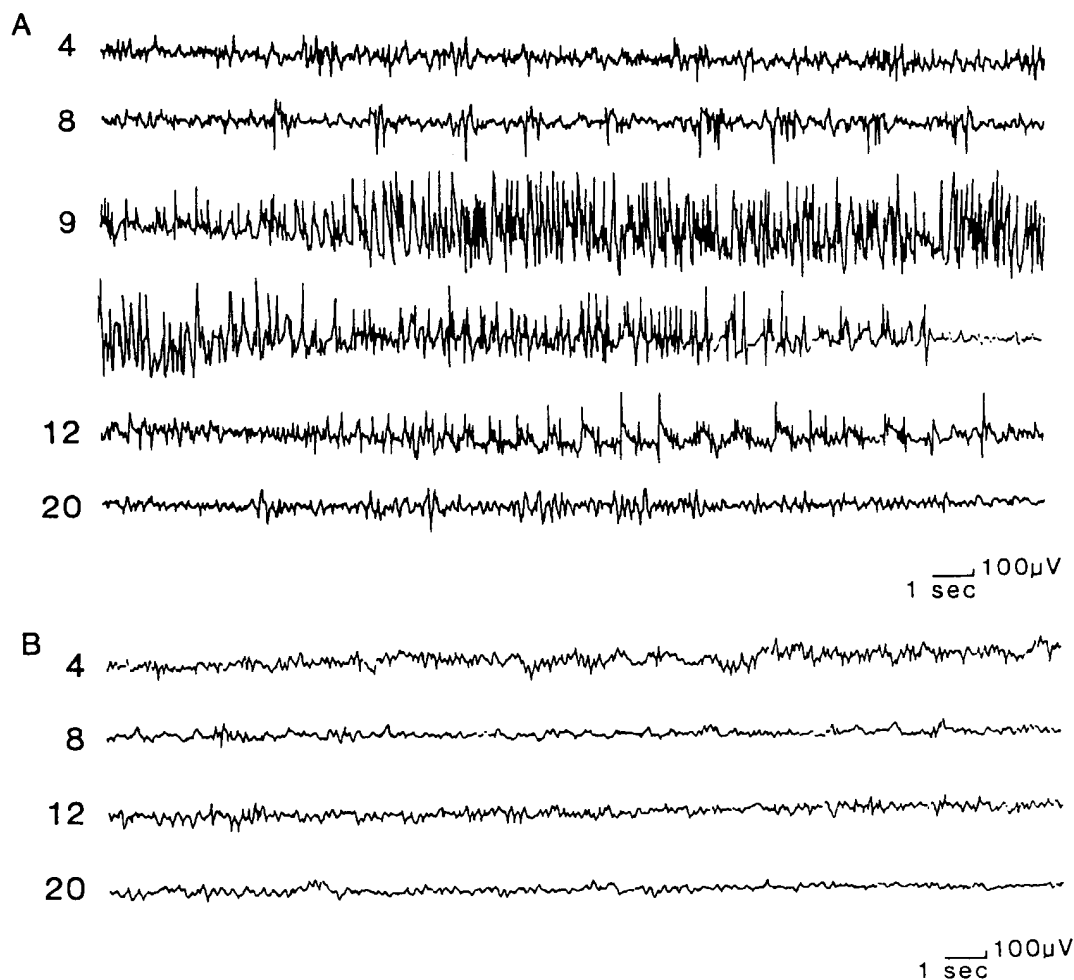


Fig. 15. Typical EEG Changes Induced by Cobalt Application to the Cerebral Cortex and Their Normalization by SK

A) EEG changes in the contralateral cortex with cobalt application. B) Normalization of EEG by one month prior to administration of SK. Numbers on the left indicate days after cobalt application.<sup>58)</sup>



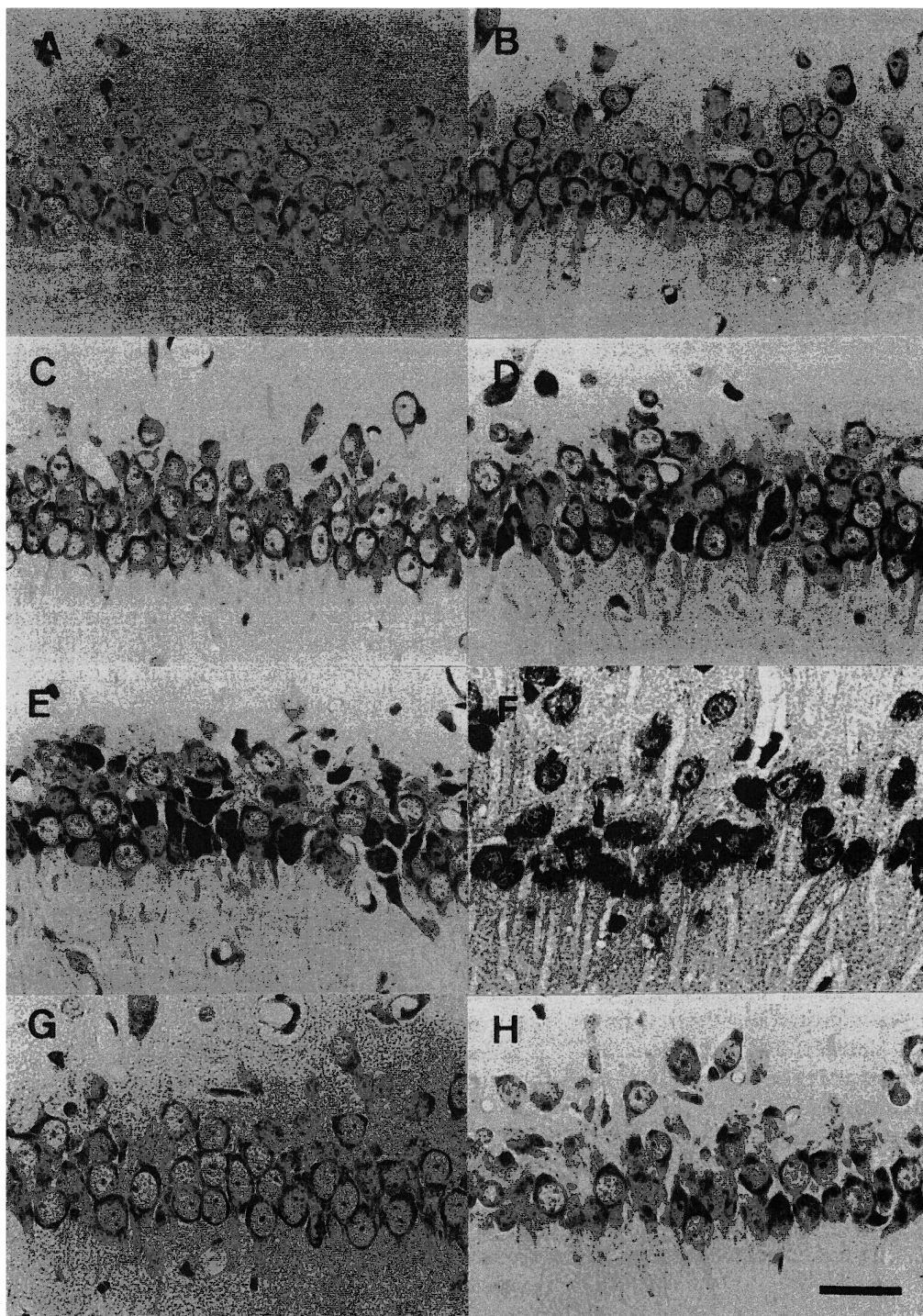


Fig. 16. Hippocampal Neuron Damage Induced by Cobalt Application to the Cerebral Cortex and Protective Effect of SK on Neuron Damage

A) Intact pyramidal cell layer in the CA<sub>1</sub> area of the hippocampus. B-D) 2 days after, 4 days after and 8 days after application of cobalt to the cerebral cortex. E) 20 days after application of cobalt to the cerebral cortex. Pyramidal cells are mostly degenerated. F) 60 days after application of cobalt to the cerebral cortex. Pyramidal cells are scarce and degenerated cell have partly disappeared. G) Administration of SK (2.0 g/kg/day p.o.) one month prior to cobalt application: 20 days after cobalt application to the cerebral cortex; pyramidal cells are well preserved. H) Administration of phenytoin (100 mg/kg/day, p.o.) one month prior to cobalt application: 20 days after cobalt application to the cerebral cortex. Marked scale: 10  $\mu$ m for all photographs.<sup>59,60</sup>

生薬のシャクヤクによっても同様に海馬神経細胞の変性・脱落が予防できる。<sup>61)</sup> また脳虚血による海馬CA<sub>1</sub>の神経細胞脱落もSKによって完全に防止でき

る。処置1ヵ月前からphenytoinを100 mg/kg投与したラットではこの神経細胞の変性・脱落に対し全く変化が見られないばかりか、細胞変性が悪化する

傾向さえ見られた。<sup>59)</sup>

### 3. レイリー現象<sup>62-64)</sup>

レイリー現象は1934年にReillyが提案した自律神経過剰症候群で、自律神経の末端又は中枢に非常に強い刺激あるいは弱くても持続的な刺激を与えると、微小循環に変化が起こり、全身の出血性変化が起こる。自律神経でなくても三叉神経のような体性神経に刺激が加わっても同様の病変が起こる。<sup>63)</sup> 抜歯をして、その抜歯窩にクロトン油0.3—0.5 mlを注入すると、全身の出血性変化が100%出現する。すなわち肺の梗塞、胃潰瘍、腸の出血、膀胱の充血、血尿が見られ、これは三叉神経起源レイリー現象である。ラットはレイリー現象の起こりにくい動物であるが、三叉神経起源のレイリー現象は非常に容易に起こすことができる。ラットに2週間前からSK 2 g/kgを連続経口投与しておくるとレイリー現象はほとんど起こらない。<sup>63)</sup> また、レイリー現象発現時には延髄で*c-fos*, HSPの強い発現がみられるが、これもSKによって完全に抑制される。<sup>64)</sup> このようにSKには、異常なストレスが加わったときに発現する何らかの機構に対して防御作用が明らかにあるということが判明した。

## VII. けいれん原性遺伝子とPTZ感受性遺伝子

### 1. けいれん原性遺伝子<sup>29-32)</sup>

先に述べたようにBA発現に先立って、細胞内カルシウムの貯蔵器官からの遊離と細胞膜付近への移動、細胞膜内側のタンパク質が質的・量的に変化し、そのカルシウムと結合することが知られている。<sup>9-19)</sup> このようなタンパク質の変化は、けいれん関連遺伝子の存在と、これらの遺伝子がカルシウムと何らかの関わりをもつに違いはないと考えられる。この考えに基づいてKajiwaraら<sup>30)</sup>はC57BL/6マウス的大脑皮質初代培養神経細胞を用いて、PTZ投与群と非投与群のdifferential hybridization法によってこのようなけいれん関連遺伝子を得ようと試みた。その結果PTZ投与によって20クローンの遺伝子発現が、増加又は減少することを認めこれらけいれん関連遺伝子をSEZ group genesと名付けた。マウスにPTZを投与した後、RNA blottingによって20クローン中の9クローンにマウス脳での明らかな発現変化が確認された。この9クローンのうちPTZ適用後に6クローンのmRNAは増加し、3クローンのRNAレベルは減少する。その中の4つは

カルシウム関連遺伝子であることが明らかにされた。<sup>30)</sup> このうちSEZ-17は*Xenopus* oocyteに注入するとPTZ感受性が発現し、PTZ投与によりカルシウムの流入がみられた (Figs. 17, 18).<sup>63-66)</sup> またSKを添加したmedium中で15分incubateしたoocyteはPTZによるカルシウムの流入がみられない (Fig. 18).

SEZ group genesについては、Herbst, Nicklinら<sup>67)</sup>による実験でも生体機能に関わる重要な遺伝子として注目されている。私たちは、上記9つのSEZ group genesのマウス染色体上の座を決定することを計画した。近年、多くの研究者が特異的なヒトてんかん家系の詳細な連鎖解析を行い、てんかん関連遺伝子の染色体上の位置が明らかにされつつある。SEZ group genesの座を決定することは、ヒト

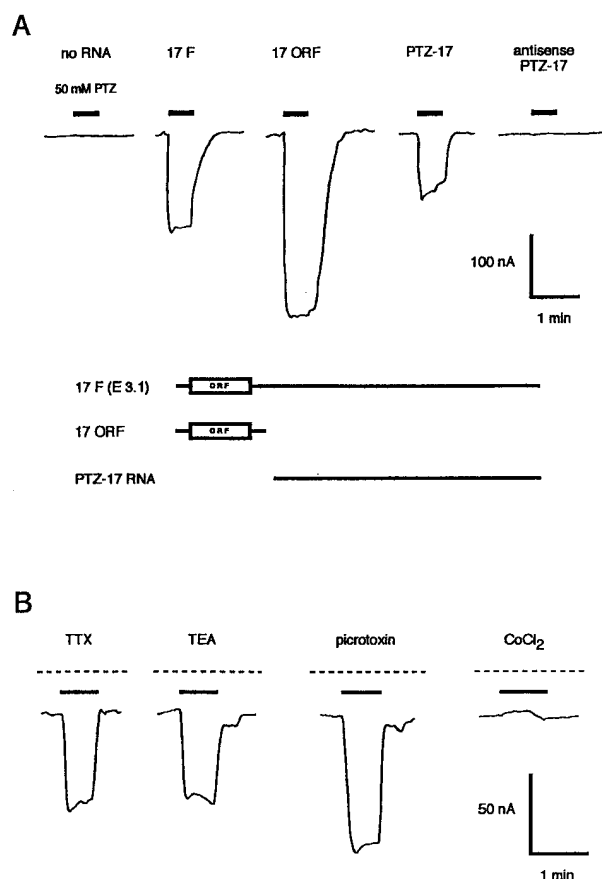


Fig. 17. PTZ Responses of *Xenopus* Oocytes Injected with Various Length of PTZ-17 RNA

A) PTZ responses of *Xenopus* oocytes injected with various lengths of E 3.1 RNA. Lower diagram indicates length of injected RNA fragments. 17F: full length E 3.1 RNA. 17 ORF: RNA containing open reading frame. PTZ-17: RNA containing 3'UTR of E. 3.1. Horizontal thick bars indicate period of PTZ (50 mM) application. B) PTZ responses of *Xenopus* oocyte injected with PTZ-17 RNA in the medium containing TTX (10  $\mu$ M), TEA (10 mM), picrotoxin (1  $\mu$ M) and  $\text{CoCl}_2$  (10 mM).<sup>65)</sup>

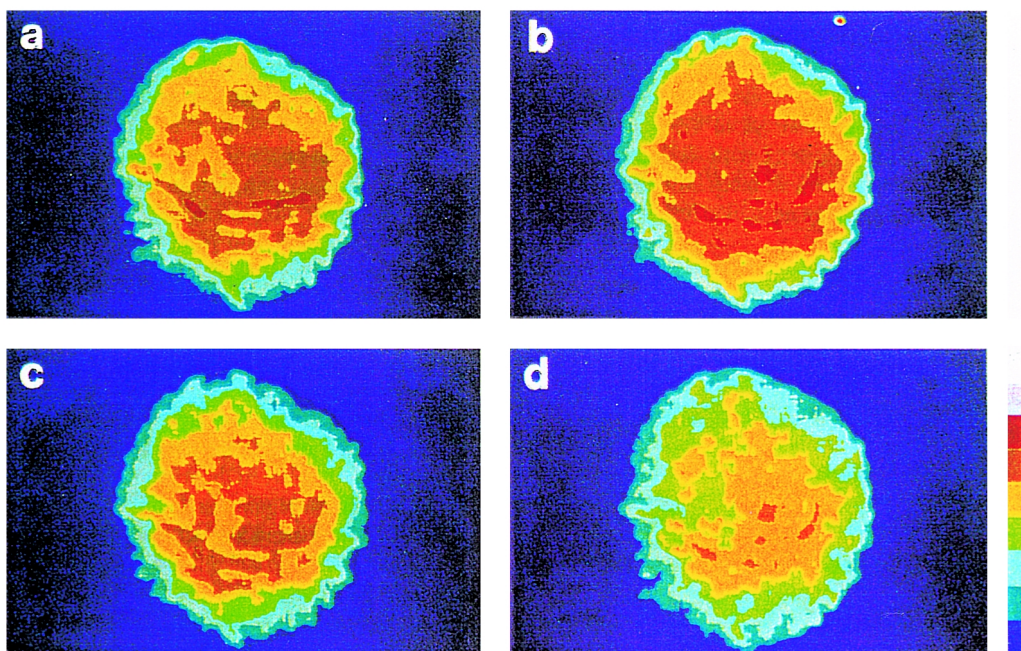


Fig. 18. Intracellular Calcium Concentration Changes during PTZ Application and SK Application in a *Xenopus* oocyte Injected with PTZ-17 RNA

Control state oocyte (a), 5 min after PTZ application (b), 5 min after PTZ but incubation with SK containing medium for 15 min (c) and 10 min after rinsing with normal medium (d). Observation near the vegetal pole by a confocal laser microscope with a 488 nm laser source and Fluo 3.<sup>64)</sup>

でのてんかん関連遺伝子との相互関係を究明する糸口になると考えた。

SEZ group genes のマウス染色体上での mapping では、backcross panel (BC) と radiation hybrid panel (RH) を用いて linkage analysis を行った。その結果、BC により 3 遺伝子の座を決定し (SEZ 6: Chr.11, SEZ 12: Chr.16, SEZ17: Chr.18), RH により 6 遺伝子の座を決定した (SEZ 2: Chr.15, SEZ 4: Chr.10, SEZ 7: Chr.2, SEZ 9 and 15: Chr.3, SEZ 10: Chr.17) (Fig. 19, Table 3).<sup>32)</sup> SEZ group 9 genes すべてが決定できたことによって、human synteny 領域からヒトてんかん関連遺伝子との関係の考察が可能になった。その結果 SEZ 4, 9, 10 及び 15 の genes が、ヒトで解明されたてんかん関連遺伝子に近い領域に位置することが分かった (Table 3)。ヒトのてんかん関連遺伝子は特殊な家系を主とした検索であり普遍的なものではなく、今後の広範な研究解析によって SEZ group genes とのさらに明確な相同性が得られることが期待される。

SEZ group genes のうち、SEZ17 は *Xenopus* oocyte に発現させると  $Ca^{2+}$  current を引き起こすし、SEZ15 はイオンチャネルの変調に関与することなどが知られておりけいれん発現との関連が深い。

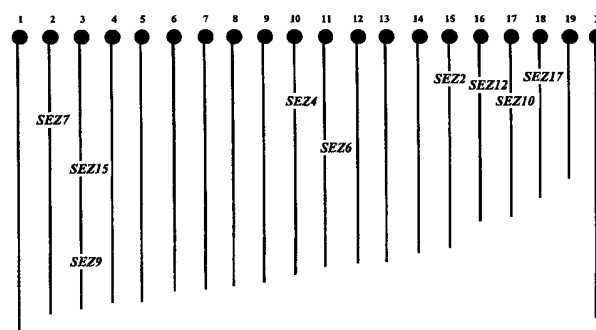


Fig. 19. Chromosomal Location of SEZ Group Genes<sup>32)</sup>

## 2. PTZ 感受性遺伝子の Mapping<sup>32)</sup>

PTZ によるけいれん発現の閾値は、近交系のマウス C57BL/6J と DBA/2J の系統間でも明らかに異なる。さらにこれらの交配種 BDF<sub>1</sub>, BDF<sub>2</sub>, BXD を用いて PTZ けいれん発現の閾値を検討し、Map Manager QTb 17 により linkage analysis を行った。BXD RI 系で高い linkage を示した BDF<sub>2</sub> に対して QTL 解析を行った結果、Chr.2 上に 2 つの非常にはっきりした PTZ 感受性遺伝子座が認められ (Fig. 20)、この位置は電圧依存性の  $Ca^{2+}$  channel の  $\beta 2$  subunit 領域 (*Cacn b2*) と  $\beta 4$  subunit (*Cacn b4*) に極めて近い位置であることを認めた。<sup>32)</sup> PTZ

Table 3. Summary of SEZ Genes and Their Chromosomal Location, Human Synteny and Mapping Method<sup>32)</sup>

	Clone	mRNA level After PTZ	Product	Chr. location	Human synteny	Mapping method
☆	SEZ 2	increase	30 kDa cytosolic phospholipase A <sub>2</sub>	Chr. 15	8pter	RH
	SEZ 4	increase	nonessential DNA polymerase REV3	Chr. 10	6q21	RH
○	SEZ 6	increase	brain-specific membrane protein	Chr. 11	17p13	BC
☆	SEZ 7	increase	78 kDa glucose related protein	Chr. 2	9q34	RH
	SEZ 9	decrease	ζ-crystalline/quinone reductase	Chr. 3	1p31	RH
	SEZ10	increase	CCAAT-box binding protein NF-YA	Chr. 17	6p21	RH
○	SEZ12	decrease	membrane-bound adhesion protein	Chr. 16	22q11	BC
☆○	SEZ15	increase	cellular polyamine antizyme	Chr. 3	1p31	RH
☆○	SEZ17	decrease	unknown	Chr. 18	5q21-23	BC

☆ : genes related to calcium, ○ : newly discovered genes, BC: backcross panel, RH: radiation hybrid panel.

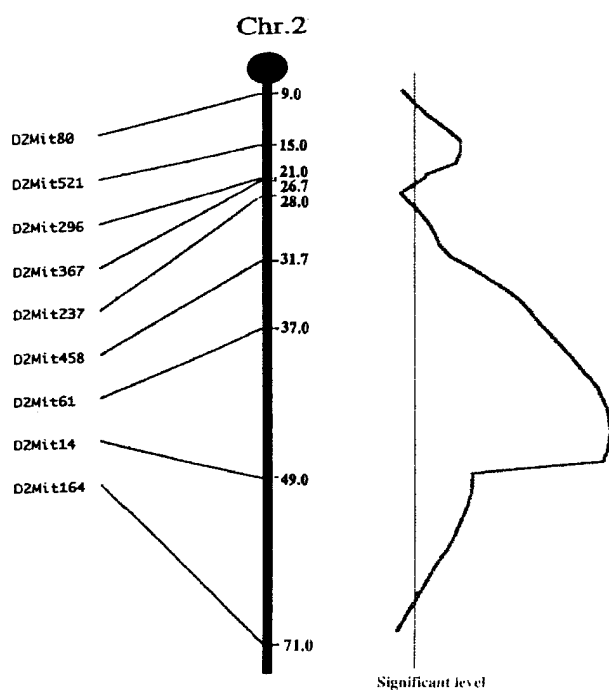


Fig. 20. Likelihood Curve of PTZ Susceptible QTL in Chromosome 2

Values in the center indicate centimorgans from the centomere.<sup>32)</sup>

による BA 発現にはカルシウムが深く関与することからも興味深い結果である。

#### おわりに

1973年に東邦大学薬学部生薬学教室から新設の城西大学薬学部へ転出した時、研究の方向を全く変えてみようと思った。生薬関連の研究室なので少し前から本格的に学び始めた漢方方剤の薬理研究を実験テーマに選ぶことにした。

その中でまず手がけたのが、柴胡桂枝湯加芍薬の薬理研究であった。この薬方は、すでに漢方医の間で臨床的にてんかんに用いられてかなりの治療成績

を出しているにもかかわらず、薬理実験書に記載されているような方法ではほとんど効果を示さなかった。そこで、脳神経生理学が専門分野で以前からてんかんの発現機序を研究テーマとしていた夫菅谷英一との共同研究が始まった。新たな実験方法で人に説得できるデータを得るときには、すでにある程度薬理機構が分かっているような化学医薬品でまずデータを出し、次いで和漢薬の実験をしなければならなかった。そのために、てんかんけいれん発現に関する純粋に神経生理学的な実験の方が和漢薬実験よりも多くなるという傾向になった。2000年のノーベル医学生理学賞を受賞した Kandel が、記憶の形成の実験に単純な神経系としてまず *Aplysia* を実験材料としたように、私たちが温血動物神経系のモデルとして単純なカタツムリの神経細胞を用いたことが、けいれんメカニズムの研究進展につながったと思う。種々工夫した新たな方法で、柴胡桂枝湯加芍薬以外にも神経系に作用すると考えられる方剤、甘麦大棗湯、<sup>68,69)</sup> 苓桂朮甘湯、<sup>70)</sup> 半夏厚朴湯、<sup>71)</sup> 柴胡加竜骨牡蠣湯<sup>72)</sup> 及びその構成生薬について実験してきた。単味の生薬としては特に芍薬に関する実験が多く総説も記している。<sup>50,73-75)</sup> これらの和漢薬薬理実験の中で一番時間と労力を費やしたのが柴胡桂枝湯加芍薬であったので本総説で記述することにした。研究が進むにつれて実に興味ある奥の深い処方である。細胞レベルでのけいれん波を止める作用は phenytoin なみであるが、先天的なけいれん素質をも改善し神経細胞の保護作用までである。この実験を始めるきっかけを頂いた故相見三郎先生が、「単にけいれんを止めるのではなく、病気を治す漢方である」、また「小児てんかんの子供が良い子になる

んですよ」と言われたことが納得できるようなSKの実験結果である。

けいれんは止めるけれども phenytoin には学習・記憶障害が現れるし、valproate には催奇形性が報告されている。作用があっても病気の根本的な治療にはならない。使用方法によっては毒性の現れる化学医薬品よりも、生体に備わる自然治癒力を生かし、生体のホメオスタシスを制御することが漢方の特色であるという考えをさらに新たにした実験成果であった。21世紀の医療にはこのような基本概念が重要であると考え。柴胡桂枝湯加芍薬に対する遺伝子レベルの実験はまだ継続中で、このような実験によって「未病を治す」という漢方の最も重要な概念が間もなく証明できると考えている。

**謝辞** てんかんけいれんに対する和漢薬の作用について、研究のきっかけを与えて下さいました故相見三郎先生に心から感謝申しあげます。また城西大学に招いて頂き生薬材料学教室という実験の場を与えて頂いた、城西大学小松曼者名誉教授に感謝申し上げます。本研究は終始、城西大学生薬材料学教室（現、臨床薬理学教室）、神奈川歯科大学生理学教室を始め、それぞれの研究の方向に応じて実験動物中央研究所、東海大学医学部東京病院、東海大学総合医学研究所・分子発達部門、(株)日本電子、慶応義塾大学医学部ツムラ東洋医学基礎研究施設、株式会社ツムラ薬理研究所、中外製薬株式会社研究所、東邦大学医学部生理学教室、埼玉医科大学生理学教室、慶応義塾大学医学部生理学教室との共同研究で遂行されたものであります。これらの機関に所属された多くの方々に有益な御助言と多大の御協力をいただきましたことを深く感謝申し上げます。

## REFERENCES

- Ueno S., Sano A., *Molecular Medicine*, **37**, 8–156 (2000).
- Kuzumi I., Koyama T., Nishikawa T., *Molecular Medicine*, **35**, 1452–1461 (1998).
- Wada K., *Experimental Medicine*, **17**, 161–167 (1998).
- Sugaya E., Goldring S., O’Leary J. L., *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, **17**, 661–669 (1964).
- Sugaya A., Sugaya E., Tsujitani M., *Jpn. J. Physiol.*, **23**, 261–274 (1964).
- Sugaya A., Sugaya E., Onozuka M., *IRCS Med. Sci.*, **2**, 1107 (1974).
- Sugaya A., Sugaya E., Onozuka M., *IRCS Med. Sci.*, **2**, 1204 (1974).
- Sugaya E., Onozuka M., Usami M., Sugaya A., “Abnormal Neuronal Discharges,” ed. by Chalazonitis N., Boisson M., Raven Press., 1978, pp. 407–418.
- Sugaya A., Tsuda T., Sugaya E., Takato M., Takamura K., *Planta Medica*, **34**, 294–298 (1978).
- Onozuka M., Sugaya E., Usami M., Sugaya A., Abstracts of papers, 9th International Congress on Electron Microscopy, Toronto. Vol. II, August, 1978, pp. 126–127.
- Sugaya E., Onozuka M., *Science*, **200**, 797–799 (1978).
- Sugaya E., Onozuka M., *Science*, **202**, 1195–1197 (1978).
- Sugaya E., Onozuka M., *Science*, **202**, 1197–1198 (1978).
- Sugaya E., Onozuka M., *Experientia*, **34**, 1229–1330 (1978).
- Sugaya E., Onozuka M., Furuichi H., Sugaya A., *Experientia*, **37**, 1080–1081 (1981).
- Sugaya E., Onozuka M., Furuichi H., Sugaya A., *Experientia*, **37**, 1081–1082 (1981).
- Sugaya E., Onozuka M., Furuichi H., Sugaya A., Tsuda T., “Physiology and Pharmacology of Epileptogenic Phenomena,” ed. by Klee M., Lux H.D., Speckman E.J., Raven Press, New York, 1982, pp. 335–341.
- Sugaya E., Onozuka M., Kishii K., Furuichi H., Sugaya A., Tsuda T., “Advances in Epileptology,” ed. by Akimoto H., Kazamatsuri H., Seino M., Ward A., Raven Press, New York, 1982, pp. 335–341.
- Sugaya E., Onozuka M., Kishii K., Sugaya A., Tsuda T., *Brain Res.*, **253**, 271–279 (1982).
- Sugaya E., Furuichi H., Takagi T., Kajiwara K., Komatsubara J., *Brain Res.*, **416**, 183–186 (1987).
- Sugaya E., Onozuka M., Furuichi H., Kishii K., Imai S., Sugaya A., *Brain Res.*, **327**, 161–168 (1985).
- Sugaya E., Onozuka M., Furuichi H., Kishii K., Imai S., Sugaya A., *Advances in Epileptol-*

- ogy, **16**, 507–510 (1987).
- 23) Sugaya E., Takagi T., Kajiwara K., Komatsubara J., Sugaya A., Tsuda T., Yasuda K., Yuzurihara M., “Recent Advances in the Pharmacology of Kampo (Japanese Herbal) Medicine,” ed. by Hosoya E., Yamamura Y., Excerpta Medica, 1988, pp. 82–86.
  - 24) Sugaya E., Takagi T., Kajiwara K., Komatsubara J., Sugaya A., Tsuda T., Yasuda K., Sekiguchi K., Ishige A., Iizuka S., “Recent Advances in the Pharmacology of Kampo (Japanese Herbal) Medicine,” ed. by Hosoya E., Yamamura Y., Excerpta Medica, 1988, pp. 87–96.
  - 25) Sugaya E., Sugaya A., Takagi T., Tsuda T., Kajiwara K., Yasuda K., Komatsubara J., *Brain Res.*, **497**, 239–244 (1989).
  - 26) Sugaya E., Ishige A., Sekiguchi K., Iizuka S., Ito M., Sugimoto A., Aburada M., Hosoya E., *Epilepsia*, **27**, 354–358 (1986).
  - 27) Sugaya E., Asou H., Itoh K., Ishige A., Sekiguchi K., Iizuka S., Sugimoto A., Abrada M., Hosoya E., Takagi T., *Brain Res.*, **406**, 270–274 (1987).
  - 28) Wen J., Sugaya A., Tsuda T., Ohguchi H., Sugaya E., *Brain Res.*, **860**, 21–28 (2000).
  - 29) Shimizu-Nishikawa K., Kajiwara K., Kimura M., Katsuki M., Sugaya E., *Molecular Brain Res.*, **28**, 201–210 (1995).
  - 30) Kajiwara K., Sugaya E., Kimura M., Katsuki M., Nagasawa H., Yuyama N., Tsuda T., Sugaya A., Motoki M., Ookura T., Shimizu-Nishikawa K., *Brain Res.*, **671**, 170–174 (1995).
  - 31) Kajiwara K., Nagasawa H., Shimizu-Nishikawa K., Ookura T., Kimura M., Sugaya E., *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **219**, 795–799 (1996).
  - 32) Wakana S., Sugaya E., Naramoto F., Yokote N., Maruyama C., Jin W., Ohguchi H., Tsuda T., Sugaya A., Kajiwara K., *Brain Res.*, **857**, 286–290 (2000).
  - 33) Aimi S., Saito T., Matsuda K., *Toyoigaku Zasshi*, **27**, 99–116 (1976).
  - 34) Sugaya A., Tsuda T., Yasuda K., Sugaya E., Onozuka M., *Planta Medica*, **49**, 2–6 (1985).
  - 35) Sugaya A., Tsuda T., Yasuda K., Sugaya E., *Planta Medica*, **49**, 60–61 (1985).
  - 36) Sugaya E., Ishige A., Sekiguchi K., Iizuka S., Sugimoto A., Yuzurihara M., Hosoya E., *Epilepsy Res.*, **2**, 337–339 (1988).
  - 37) Sugaya E., Sugaya A., Takagi T., Tsuda T., Kajiwara K., Yasuda K., Komatsubara J., *Neurosciences*, **16**, 95–104 (1990).
  - 38) Sugaya E., Sugaya A., Yuyama N., Tsuda T., Kajiwara K., Kubota K., Katoh K., Hosoya S., Takagi T., Motoki M., *Neurosciences*, **18** (Supple. 2), 111–127 (1992).
  - 39) Narita Y., Satowa H., Kokubu T., Sugaya E., *IRCS Med. Sci.*, **10**, 8889 (1982).
  - 40) Uemura T., *Rinsho-Seishin-Igaku*, **10**, 1249–1260 (1988).
  - 41) Takato M., Takano N., Takamura K., Sugaya A., Tsuda T., Sugaya E., *Shoyakugaku Zasshi*, **32**, 273–275 (1978).
  - 42) Takato M., Takamura K., Sugaya A., Tsuda T., Sugaya E., *IRCS Med. Sci.*, **10**, 86–87 (1982).
  - 43) Sugaya E., *Drugs of the Future*, **12**, 362–363 (1987).
  - 44) Sugaya E., Sugaya A., *Comp. Biochem. Physiol.*, **98C**, 249–270 (1991).
  - 45) Sugaya E., Sugaya A., Kajiwara K., Tsuda T., Kubota K., Yuyama N., Motoki M., Takagi T., Takagi H., Ookura T., Nagasawa H., “Neurochemistry in Clinical Application,” ed. by Tang L., Tang S., Plenum Press, New York, 1994, pp. 165–179.
  - 46) Goddard G. V., McIntyre D. C., Leech C. K., *Exp. Neurol.*, **25**, 295–330 (1969).
  - 47) Ducreux C., Gola M., *Pflugers Arch.*, **361**, 43–53 (1975).
  - 48) Klee M. R., Faber D. S., Heiss W. D., *Science*, **179**, 1133–1135 (1973).
  - 49) Klamer G., Chaplain R., *Brain Res.*, **106**, 321–331 (1976).
  - 50) Asou H., Brunnegraber F.G., Jeug. I., *J. Histochem., Cytochem.*, **31**, 1375–1379 (1983).
  - 51) Hamil O. P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F. J., *Pfluers Arch.*, **391**, 85–100 (1981).
  - 52) Sugaya A., Tsuda T., Kubota K., Motoki M., Sugaya E., *Bioimages*, **1**, 115–123 (1993).
  - 53) Imaizumi K., Nakano T., *Mouse News Letter*, **31**, 57 (1964).
  - 54) Sah P., *TINS.*, **19**, 150–154 (1996).
  - 55) Sugaya A., Yuzurihara M., Tsuda T., Yasuda

- K., Sugaya E., Kajiwara K., Takagi T., Komatsubara J., *J. Ethnopharmacol.*, **21**, 193–199 (1987).
- 56) Sugaya A., Yuzurihara M., Tsuda T., Yasuda K., Sugaya E., Kajiwara K., Takagi T., Komatsubara J., “Recent Advances in the Pharmacology of Kampo (Japanese Herbal) Medicines,” ed. by Hosoya E., Yamamura Y., Excerpta Medica, 1988, pp.105–111.
- 57) Sugaya E., Sugaya A., Asou H., Yuzurihara M., Tsuda T., Yasuda K., Nishikawa S., Takagi T., Kajiwara K., Komatsubara J., Ishige A., Ito K., Hirano S., Abstract of papers, III World Conference on Clinical Pharmacology and Therapeutics, Stockholm, July, 1986, p. 1341.
- 58) Dow R.S., Fernandy-Guarkiola A., Manne E., *Electroencephalogr. and Clin. Neurophysiol.*, **14**, 399–407 (1962).
- 59) Sugaya E., Ishige A., Sekiguchi K., Yuzurihara T., Iizuka S., Sugimoto A., Takeda S., Wakui Y., Ishihara K., Aburada M., *J. Ethnopharmacol.*, **34**, 13–19 (1991).
- 60) Sugaya E., Ishige A., Sekiguchi K., Yuzurihara T., Iizuka S., Sugimoto A., Hosoya E., *Brain Res.*, **459**, 196–199 (1988).
- 61) Tsuda T., Sugaya A., Ohguchi H., Kishida N., Sugaya E., *Exp. Neurol.*, **146**, 518–525 (1997).
- 62) Reilly J., Rivalier E., Compagnon A., Laplane R., *C. R. Soc. Biol.*, **116**, 24–26 (1934).
- 63) Sugaya E., Sugaya A., Yuyama N., Tsuda T., Kajiwara K., *Progress in Medicine*, **17**, 788–794 (1997).
- 64) Sugaya E., Sugaya A., Kajiwara K., Yuyama N., Tsuda T., Motoki M., Shimizu-Nishikawa K., Kimura M., *Brain & Development*, **19**, 93–103 (1997).
- 65) Kajiwara K., Sugaya E., Kimura M., Katsuki M., Nagasawa H., Yuyama N., Tsuda T., Sugaya A., Motoki M., Ookura T., Shimizu-Nishikawa K., *Brain Res.*, **671**, 170–174 (1995).
- 66) Kajiwara K., Sugaya E., Yuyama N., Nagasawa H., Tsuda T., Sugaya A., Motoki M., Shimizu-Nishikawa K., Kimura M., *Molecular Brain Res.*, **47**, 49–58 (1997).
- 67) Herbst R., Nicklin M. J., *Mol. Brain Res.*, **44**, 309–322 (1997).
- 68) Tsuda T., Kubota K., Yasuda K., Nishikawa S., Sugaya A., Sugaya E., *J. Ethnopharmacol.*, **17**, 257–261 (1986).
- 69) Tsuda T., Kubota K., Yasuda K., Sugaya A., Sugaya E., *J. Ethnopharmacol.*, **15**, 289–296 (1986).
- 70) Yasuda K., Tsuda T., Sugaya A., *J. Medical and Pharmaceutical Society for WAKAN-YAKU*, **5**, 104–110 (1988).
- 71) Sugaya A., Tsuda T., Obuchi T., Sugaya E., *Planta Medica*, **47**, 59–62 (1983).
- 72) Tsuda T., Sugaya A., Kaneko E., Ohoguchi H., Katho K., Jin W., *Natural Medicine*, **52**, 300–309 (1998).
- 73) Sugaya A., Suzuki T., Sugaya E., Yuyama N., Yasuda K., Tsuda T., *J. Ethnopharmacol.*, **33**, 159–167 (1991).
- 74) Sugaya A., *J. Traditional Sino-Japanese Medicine*, **12**, 93–102 (1991).
- 75) Sugaya A., Sugaya E., *P & M Kampo*, **4**, 10–15 (1999).