

論文要旨

Effect of Acetaminophen, a Cyclooxygenase Inhibitor, on Morris Water Maze Task Performance in Mice

アセトアミノフェン（シクロオキシゲナーゼ阻害薬）の
マウスにおけるモーリス水迷路課題成績に及ぼす効果について

石田 喬之

【序論および目的】非ステロイド性抗炎症薬（Non-steroidal anti-inflammatory drugs ; NSAIDs）を投薬されている患者はアルツハイマー病の出現が少ないと報告されてから、アスピリンに代表される NSAIDs がアルツハイマー病発症予防に対して有効であるとする論文が多く見られるようになった。また、NSAIDs それ自身が抗認知障害効果をもち、抗認知障害薬になる可能性が報告されている。しかし、シクロオキシゲナーゼ（Cyclooxygenase; COX）の産生物であるプロスタグランジン（Prostaglandin; PG）がグルタミン酸作動性神経活動によって生じる 長期増強（Long term potentiation ; LTP : 記憶に関与するとされている）に関与するとの報告を考えた場合、NSAIDs の抗認知障害薬としての使用は、学習・記憶の形成効果に対し、負の要因になるように思える。アセトアミノフェン（acetaminophen; AAP）は、広義には NSAIDs に分類され、古くから使用されている解熱性鎮痛薬で、安全性が高いとされているため、小児から高齢者にいたるまで、広く使用され、歯科臨床においても汎用されている薬物である。しかしながら、AAP の作用発現機序には諸説があり、その作用機序については、COX-3 type が関与している可能性を示唆する報告もあるが、詳細は不明である。一方、学習・記憶形成と AAP との関連についての報告はない。そこで申請者らは、実験動物としてマウスを用い、モーリス水迷路課題に対する、AAP を投与した動物の学習・記憶に対する影響を検討し、併せてインドメタシン（Indomethacin; IND）をはじめとする他の NSAIDs を投与した動物に対する影響についても検討した。

【材料および方法】 [1. 材料] 動物は、九州動物より購入した ddY 雄性マウス（5 週齢）を使用した。薬物は、Sigma-Aldrich 社より購入した AAP、フェナセチン（Phenacetin; PHE）、IND、NS-398、ピロキシカム（Piroxicam; PIX）、FR122047、45% (2-Hydroxypropyl)- β -cyclodextrin solution (HBC) と Tocris Cookson 社から購入したマレイン酸メチセルギド（Maleate methyserigide; MSM）を使用した。動物の行動は、PanLab 社製のソフトウェアである SMART2.0 を用い解析した。

[2. 方法] ①モーリス水迷路：通法である 2 つの課題、すなわち、Hidden Platform task (HP ; 空間記憶を反映) と Visible Platform task (VP ; 視覚認知を反映) を用いて評価した。HP はマウスのスタート地点はフリーに移動させ、ゴールであるプラットフォームを水面下に固定し、プラットフォームにランドマーク提示を行わなかった（視覚認知を不可能にした）。マウスがスタート地点からゴールするまでを 1 trial とした。また、VP はマウスのスタートおよびゴール地点をフリーとするが、ゴール地点のプラットフォームの位置を水面上に固定し、プラットフォームにランドマーク提示を行った（視覚認知を可能とした）。trial の定義は HP と同様である。両課題において、マウスに、1 日 8 回の trial からなる training session (8 trials = 1 training session) を連続 3

日間試行し、続く4日目に2回の trail からなる post-training session (2 trails = 1 post-training session) を試行した。行動評価項目は、スタートからゴールまで到達する潜時時間 (Latency)、プール壁側のエリア内に存在している時間 (Time in wall)、と水泳のスピード (Swimming speed) の3項目とした。なお、両課題において、プールにスキムミルクを溶解させ、水面下の景色が見えないようにした。

②薬物投与：一群8~14匹のマウスを使用し、45% HBC に AAP、PHE、IND、NS-398、PIX、FR122047 を溶解したものを、各 training session 終了直後に各グループ群に、腹腔内に適用した。

【結果】高濃度の AAP (302.3 mg/kg) において HP 課題の成績低下 (Latency の延長)、つまり、記憶獲得・保持障害が認められた。また、AAP の前駆物質とされている PHE の高濃度 (179.2 mg/kg) で HP 課題の獲得・保持の成績低下が認められた。AAP の中濃度 (69.5 mg/kg) では、HP、VP 両課題の獲得・記憶保持の成績には影響が認められなかった。一方、AAP の低濃度である 15.1 mg/kg の場合は HP、VP 両課題において、獲得・保持成績の向上傾向が認められた。この低濃度 AAP の成績向上は、セロトニンアンタゴニストである MSM (15.1 mg/kg) を AAP と同時に投与することによって阻害された。PHE は中濃度 (82.4 mg/kg) と低濃度 (17.9 mg/kg) では、HP、VP 両課題の成績に影響は認められなかった。COX の non-specific inhibitor である IND (20 mg/kg) と COX-2 specific inhibitor である NS-398 (10 mg/kg) の投与は、HP 課題の獲得・保持に障害が認められたが、VP 課題においては障害が認められなかった。また、COX-1 の specific inhibitor である PIX および FR122047 (10-20 mg/kg) 投与では HP、VP 両課題に対して効果が認められなかった。

【結論及び考察】AAP は幾つかのグループにより specific COX-3 type inhibitor であると報告されている。我々の実験では、それは、中濃度 (69.5 mg/kg) に該当する。高濃度 (302.3 mg/kg) の AAP は、我々の実験において、COX-2 type の酵素を抑制すると考えられるので、今回の結果により、COX-3 type の酵素を抑制するのではなく、COX-2 type を抑制することにより、空間学習・記憶に障害を与える可能性が示唆された。併せて、COX-1 type の阻害薬である PIX や FR122047 が空間学習・記憶課題に効果を示さず、COX-2 type を阻害する IND や NS-398 が空間学習・記憶課題の成績を低下させたことから、COX-2 type の酵素抑制が、空間学習・記憶に障害を与える可能性を示した。なお、AAP の鎮痛効果の作用機序は現在においても諸説があり、意見の一致を見ないが、本研究によって使用した低濃度 (15.1 mg/kg) は一般に臨床で使用されている濃度に近いことから、中枢のセロトニン作動性神経が鎮痛効果に影響を与えている可能性を示唆した。

AAP は比較的安全な解熱性鎮痛薬として多用されているが、用量が多くなると、薬物代謝機能が低い高齢者や小児では、記憶障害等の中枢障害が惹起される可能性があり、注意が必要であるとする結果を示した。

論文審査の要旨

報告番号	総研第 10 号	学位申請者	石田 喬之
審査委員	主査	植村 正憲	学位 博士 (医学・ <u>歯学</u> ・学術)
	副査	宮田 篤郎	副査 杉原 一正
	副査	原田 秀逸	副査 小椋 幹記

Effect of acetaminophen, a cyclooxygenase inhibitor, on Morris water maze task performance in mice

(アセトアミノフェン(シクロオキシゲナーゼ阻害薬)のマウスにおけるモーリス水迷路課題成績に及ぼす効果について)

Journal of Psychopharmacology 2007 掲載予定

Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) はアルツハイマー型痴呆の予防や進行の抑制に有効であるとする論文が多くみられる。一方、NSAIDs の cyclooxygenase (COX) 阻害作用が海馬における long-term potentiation (LTP: 記憶形成の基とされている) 形成を阻害するとの報告もあり、近年、NSAIDs 等の COX 阻害薬の中枢神経系に及ぼす影響が注目されている。一般的に NSAIDs に分類されている acetaminophen (AAP) は COX-3 を選択的に阻害するとの報告があるが、その詳細な作用機序は不明である。また、AAP 投与が高次神経機能である学習・記憶に及ぼす影響についての報告はない。そこで学位申請者らは、AAP 投与が記憶形成に影響を及ぼすかどうかを調べるため、マウスの学習・記憶課題遂行における行動解析実験を行った。学習・記憶課題の測定にはモーリス水迷路課題を用い、training 終了後直ちに AAP をはじめとする各種 NSAIDs を腹腔内に投与し、どの COX の subtype が記憶形成に重要であるかを検討した。

その結果、本研究では以下の知見が明らかにされた。

- 1) non-specific COX inhibitor である indomethacin (20 mg/kg) と COX-2 specific inhibitor である NS-398 投与は空間記憶依存課題の成績を低下させたが、COX-1 specific inhibitor である piroxicam (20 mg/kg) は空間記憶依存課題には影響を及ぼさなかった。
- 2) AAP や phenacetine (PHE) は COX-1/2 を阻害すると考えられる濃度 [AAP (302.3 mg/kg); PHE (179.2 mg/kg)] において、空間記憶依存課題の成績を低下させたが、COX-3 を阻害する濃度 [AAP (69.5 mg/kg)] では当課題に影響を及ぼさなかった。
- 3) AAP の 15.1mg/kg 投与では空間記憶依存課題成績の向上が認められたが、視覚認知課題においても、マウスの成績は向上した。これらの成績向上は serotonin (5-HT)₁₂ 阻害薬の同時投与によって抑制された。これらのことから、AAP 15.1mg/kg の成績向上は 5-HT 作動性神経を介した、運動・情動変化による課題の成績向上と考えられた。
- 4) AAP 15.1mg/kg は臨床で使用される濃度に近いことから AAP の臨床作用発現に中枢における 5-HT 作動性神経の関与の可能性が示唆された。

本研究は AAP が学習・記憶形成を COX-2 阻害を介して低下させる可能性を初めて報告したものであり、併せて、COX-2 が学習・記憶に関与することを支持するものである。また、臨床において AAP は比較的安全な解熱性鎮痛薬とされているが、用量が多くなると、薬物代謝機能が低い高齢者や幼小児(幼小児は血液・脳関門も未発達)は、記憶障害等の中枢障害が惹起される可能性があり、注意が必要であるとする結果を示した点で興味深く、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 10 号	学位申請者	石田 喬之
審査委員	主査	植村 正憲	学位 博士 (医学・ <u>歯学</u> ・学術)
	副査	宮田 篤郎	副査 杉原 一正
	副査	原田 秀逸	副査 小椋 幹記

主査および副査の5名は、平成 19 年 2 月 6 日、学位申請者 石田 喬之 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問 1) COX-3 は、機能的には COX-1/2 に比べてどのような違いがあるか。

(回答) COX-3 の生理的役割はよく分かっていませんが、中枢神経に分布していることが示唆されているので、何らかの中枢神経機能に関与していると考えられます。

質問 2) 薬物は腹腔内投与を行っているが、投与時期はどうしているのか。

(回答) 各 training session (8 trials) の終了直後に投与を行っています。training session は 3 日連続で行っているが、各日とも training session の終了直後に薬物を投与しました。

質問 3) 各日の training session 直後に投与しているのなら、薬物効果は 2 日目以降にあらわれると考えてよいか。

(回答) ご指摘のとおり、2 日目以降のデータに効果が反映されています。

質問 4) acetaminophen の投与量は、15.1 mg/kg, 69.5 mg/kg, 302.3 mg/kg, の 3 種類を使用しているが、臨床で使用する濃度は 15.1 mg/kg と考えてよいのか。

(回答) 前述された、3 つの濃度のなかで、最も臨床使用時に近い濃度が、15.1 mg/kg です。しかし、一般に臨床で使用する濃度より少し高いと考えています。

質問 5) acetaminophen 15.1 mg/kg よりも低濃度は検討していないのか。

(回答) 今回の実験では検討を行っておりません。今後、検討したいと考えています。

質問 6) acetaminophen を 3 つの濃度に分けて実験した根拠はなにか。

(回答) 過去の幾つかの文献を参考に濃度を決めました。15.1 mg/kg は過去の文献においてラット海馬切片上の LTP 誘発実験で LTP を抑制した濃度に相当し、69.5 mg/kg は COX-3 の IC₅₀ に相当すると考えます。302.3 mg/kg は COX-1/2 の IC₅₀ の 2 倍の濃度に相当すると考えています。

質問 7) acetaminophen 302.3 mg/kg は COX-1/2 を阻害すると考えて投与しているのか。

(回答) COX-1/2 を阻害する濃度と考えると投与しています。論文には示していませんが、COX-1/2 の IC₅₀ に相当すると考える濃度でも、latency の有意な増加を認めています。

質問 8) マレイン酸メチセルギド (MSM) を投与したのはなぜか。

(回答) 過去の文献報告で、ラット海馬切片上において AAP 投与によって生じる LTP 抑制を阻害したとの報告があり、15.1 mg/kg の acetaminophen との併用投与を行いました。

最終試験の結果の要旨

質問9) プロスタグランジン類が記憶に関係するという報告はあるのか。

(回答) プロスタグランジン類が記憶形成に関連があるとする報告は既に存在します。プロスタグランジン類の中でも、特に、プロスタグランジン E2 (PGE2) がグルタミン酸の放出を増加させるのではないかと、この報告がなされています。

質問10) PGE2 と 5-HT との関係はどのようになっているのか。

(回答) 過去の文献の一つにラット海馬切片における LTP の誘導に PGE2 が関与し、5-HT 作動性神経がその LTP 誘導を抑制したとの報告があります。我々はこの文献から、本実験においても、acetaminophen 15.1 mg/kg の作用がセロトニン作動性神経を介しているなら、水迷路の成績が低下するのではとの予想をしたが、反対に成績は向上しました。しかし、5-HT アンタゴニストの MSM がこの水迷路成績の向上を阻害したので、acetaminophen がセロトニン作動性神経を介して成績に影響すると考えています。それゆえ、これは LTP を介した記憶形成ではないと考えています。

質問11) figure 5 の MSM 群と Control 群は1日目では有意差があるように見えるが、これは結果には影響していないのか。

(回答) repeated measures ANOVA での解析(連続した3日での群間の有意差)ではありませんでしたが、しかし、各日毎に分離した要素で解析を行うと、ご指摘のように有意差があると思います。しかし、1日目の training を行うことによって2日目以降のデータは同じように収束しており、結果の解析に問題はないと考えています。

質問12) acetaminophen の使用濃度 (15.1 mg/kg) は、学習・記憶を向上させていると解釈できないだろうか。また、この濃度 (15.1 mg/kg) を用いて学習効果を上げる使い方はできないだろうか。

(回答) 今回の実験においては、acetaminophen 15.1 mg/kg は、視覚認知依存性の課題の成績向上に影響したため、空間記憶ではなく、情動や運動機能に作用して本水迷路実験の成績向上に作用したと考えています。また今述べた理由より、ご指摘のような学習効果を上げるような使い方は難しいと考えています。

質問13) acetaminophen が情動か記憶のどちらに効いているとはっきり言うことは可能か？

(回答) ご指摘のように、情動と記憶の interaction を無視して、明確に答えることは非常に難しいと考えています。しかし、acetaminophen が情動か記憶のどちらかにより多くの比重があるかを考えることは実験パラメータ(十字高架橋迷路や9ホール装置の実験)を増やすことで可能であると考えます。

質問14) phenacetin は acetaminophen の前駆物質とのことだが、phenacetin の低濃度ではなぜ、acetaminophen のような効果がでないのか。

(回答) phenacetin の低濃度で acetaminophen の効果がでない理由として、phenacetin の分解産物の一つである phenetididn が COX-2 作用にかなり影響するとの報告があることから、phenacetin と acetaminophen の作用の差はそこに起因しているのではないかと考えています。

質問15) 実験する季節や時間帯によって成績に影響があるのではないかと。

(回答) そのように考えています。我々は都合上、確かに季節を跨って実験を行っていますが、実験条件の差異の影響を最小にするため、室温、水温をどの季節でも一定になるよう配慮しています。また、実験の時間帯も一定にしています。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力と識見を有しているものと認め、博士(歯学)の学位を与えるに十分な資格を有するものと判断した。