

〔別紙2〕

審査の結果の要旨

氏名 河合 信宏

不眠症は罹患頻度の高い代表的な睡眠障害の一つであり、入眠困難・中途覚醒・早朝覚醒・熟眠困難のいずれかの症状を呈する。不眠症は、当人の QOL だけではなく、長期欠勤や医療費の増加、生産性の低下、産業事故の増加など、様々な人的および社会経済的損失をもたらすことが明らかとなっており、公衆衛生上の大きな課題の一つとなっている。薬物治療として睡眠導入剤があるが、その主流は抑制性神経伝達物質であるγアミノ酪酸（GABA）のイオンチャネル型受容体の一つである GABA_A 受容体の活性化である。しかし、徐波睡眠量を減少させ、運動障害・記憶障害・依存性などの副作用を有し、鎮静の持越し効果や反跳性不眠等が問題となっている。これらの有害作用を持たない新たな作用機序の睡眠導入剤、もしくは、不眠症状が重症化する前に摂取できる、安全で効果的な食品成分が求められている。

グリシンは最も簡単な構造を持つアミノ酸であり、脳内にて抑制性神経伝達物質としてグリシン受容体（GlyR）に、興奮性神経伝達調節物質として NMDA 受容体（NMDAR）に作用することが知られている。近年、我々はグリシン経口摂取によって睡眠に不満を持つヒトの睡眠が改善されることを発見した。しかし、なぜグリシン摂取により睡眠が改善するか、更には、経口摂取したグリシンがどのような体内動態を示すかも不明であった。本研究は、グリシンの睡眠改善効果をラット睡眠妨害モデルで検証すること、経口摂取したグリシンの体内動態を明らかにすること、更に睡眠改善効果の作用機序を解明することを目的とした。

ラット睡眠妨害モデルの構築とグリシン経口投与によるラットノンレム睡眠増加作用の検証

自由行動条件下でラット脳波及び深部体温を測定するための手技を施し、通常ラットが休息している明期に通常の睡眠を妨害する新奇環境下に置くことで、睡眠妨害モデルを構築した。この条件下で水またはグリシン 2 g/kg を経口投与したところ、投与 0-90 分間でグリシン投与群は水投与群に比べ有意に覚醒時間が減少し、ノンレム睡眠時間が増加した。更に、投与後 90 分間でノンレム睡眠に移行する回数、一エピソードあたりのノンレム睡眠時間は有意に増加し、ノンレム睡眠潜時は有意に短縮した。興味深いことに、睡眠妨害条件下でラットの深部体温は上昇するが、この深部体温上昇はグリシン投与群で投与 20-90 分後に有意に抑制された。深部体温の低下は睡眠に先立ちみられる自然睡眠のプロセスとされている。以上の結果から、ラットはグリシンの睡眠改善効果の作用機序を解明するモデル動物として有用であることが示唆された。

経口投与グリシンの体内動態

グリシンの体内動態を明らかにするため、オートラジオグラフィーを用いて放射性同位体標識

¹⁴C グリシンをラットに尾静脈投与した際の体内および脳内分布を調べた。尾静脈投与 6 分後、¹⁴C グリシンは速やかに肝臓及び脾臓に分布した。脳組織中では、¹⁴C グリシンは松果体・脳下垂体・脳室周囲器官・脳室部位に速やかに集積した。血中に分布したグリシンは末梢組織のみならず血液脳関門を通過した上で脳脊髄液及び一部脳実質にも移行することが示された。

詳細な時間経過を明らかにするため、ラットにグリシン投与後 5 分から 24 時間までの血中・脳脊髄液中・脳実質中のグリシン濃度及び関連アミノ酸濃度の推移を観察した。グリシンは経口投与後速やかに血中濃度が上昇し、30 分後に最大濃度を示した。脳脊髄液中のグリシン濃度は血中と同様のタイムコースで最大濃度を示した。脳実質内グリシン濃度は血中・脳脊髄液中に比べ緩やかな濃度推移を示し、投与 4 時間後に最大濃度を示した。一方、グリシンから一段階の酵素変換で生成されるアミノ酸セリンの濃度は、血中では投与 2 時間後に最大、脳脊髄液中で 8 時間後に最大、脳実質中で 8 時間後に最大、といずれの値を見てもグリシンに比べ緩やかに上昇した。グリシンおよびセリンの脳内濃度はいずれも投与 24 時間後にはベースラインに戻った。また、グリシン経口投与後の脳脊髄液中グリシン濃度は、NMDAR の ED₅₀ より高く、GlyR の ED₅₀ より低い値で推移した。これらの結果から、グリシンの睡眠改善作用の主成分はグリシンそのものであり、その作用は脳脊髄液中もしくは脳中へのグリシンの分布を介すること、その作用点は GlyR よりも NMDAR の可能性が高いことが示された。

グリシンは脳内の NMDA 受容体を介し表面血流量増加作用を示す

深部体温低下の原因は熱放散増加と考え、ラットの主な熱放散部位である足底部の表面血流量をレーザードップラー法により測定した結果、グリシン 2 g/kg 経口投与 30-45 分後の表面血流量は水投与群に比べ有意に増加した。更に、グリシンを脳室内投与したところ、経口投与時と同等の表面血流量の増加が認められた。NMDAR グリシン結合部位アゴニストの単独脳室内投与で、グリシン投与時と同等の表面血流量増加作用が見られた。さらに、グリシンの表面血流量増加作用は GlyR アンタゴニストでは抑制されず、NMDAR アンタゴニスト、NMDAR グリシン結合部位アンタゴニストにより抑制された。以上の結果から、ラットに対するグリシンの睡眠改善作用は表面血流量増加による熱放散の増加が主たる原因であり、その作用が脳内の NMDA 受容体を介することが示唆された。

免疫組織化学染色および脳内直接投与法によるグリシン作用部位の同定

中枢の睡眠関連部位は主に視床下部に集中している。これまでの結果から、主に体内時計を司る部位とされる視交叉上核、体温調節を司る部位とされる内側視索前野、脳室周囲器官を対象を絞り、暗期活動中のラットから脳組織を摘出し、神経活動の指標として c-Fos に対する免疫組織化学染色を行った。その結果、グリシン経口投与により視交叉上核と内側視索前野中の c-Fos 発現細胞数が増加した。

グリシンの直接の作用部位は視交叉上核または内側視索前野にグリシンを微量投与したところ、視交叉上核にグリシンを投与した場合にのみ表面血流増加作用が認められた。更に、NMDAR グリシン結合部位特異的アンタゴニストを共に投与したところ、この表面血流増加作用は消失した。これらの結果から、グリシンは視交叉上核の NMDAR を直接の作用点とし、内側視索前野への投

射を介して表面血流量を増加させ、その結果深部体温が速やかに低下し、睡眠改善作用が発現することが示唆された。

視交叉上核破壊によりグリシンのノンレム睡眠増加作用・深部体温低下作用は消失する

グリシンによる表面血流量増加には視交叉上核の NMDAR を介することが示唆されたので、視交叉上核を熱破壊した。その結果、グリシン経口投与によるノンレム睡眠量の増加、ノンレム睡眠のエピソード数増加、一エピソードあたりのノンレム睡眠時間の増加、ノンレム睡眠潜時の短縮および深部体温の低下はいずれも消失した。この結果から、グリシンは視交叉上核を介して深部体温低下作用・睡眠改善作用を示すことが強く示唆された。

本研究において、グリシンが中枢神経系に及ぼす生理作用を初めて示すと共に、自然な眠りのプロセスとされる表面血流増加、深部体温低下、ノンレム睡眠量増加を初めて包括して確認した。これまでの睡眠導入剤の主作用部位である GABA_A 受容体を介した抑制性神経伝達の増強ではなく、NMDAR を介した興奮性神経伝達を調節することでラット睡眠妨害モデルの睡眠を改善させることを示した。以上、本研究は、睡眠の生理的メカニズムや不眠症の成因に新たな知見を与えたのみならず、不眠症治療薬開発に新たなストラテジーを提示するものであり、博士(薬学)の学位に値すると判断した。