

Title	Diazepam enhances production of diazepam binding inhibitor (DBI), a negative saliva secretion regulator, localized in rat salivary gland
Author(s)	塚越, 絵里
Journal	歯科学報, 111(6): 652-653
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10130/2673">http://hdl.handle.net/10130/2673</a>
Right	

氏名(本籍)	塚越絵里 (群馬県)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	第1924号(甲第1176号)
学位授与の日付	平成23年3月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Diazepam enhances production of diazepam binding inhibitor (DBI), a negative saliva secretion regulator, localized in rat salivary gland
掲載雑誌名	Journal of Pharmacological Sciences 第115巻 221~229頁 2011年
論文審査委員	(主査) 川口 充教授 (副査) 下野 正基教授 田崎 雅和教授 山根 源之教授 一戸 達也教授

### 論文内容の要旨

#### 1. 研究目的

ベンゾジアゼピン(BDZ)受容体は、1)細胞膜上のGABA(A)受容体に内在する中枢型(CBR)と、2)ミトコンドリア外膜に存在する末梢型(PBR)に分類される。脳ではこれら受容体の内因性リガンドとして diazepam binding inhibitor(DBI)が存在し、1)では inverse agonistとして作用し、Cl<sup>-</sup>チャンネルを閉鎖して不安作用を現すこと、2)では agonistとして作用し、GABA(A)受容体のポジティブな修飾因子であるニューロステロイドの産生と分泌に関与することが提示されている。これまでに我々は、ジアゼパムの唾液分泌抑制の機構を調べ、一回投与ではラットの唾液分泌抑制が生じない用量(ヒト治療量の最大量:0.4mg/kg)で、7日間に亘って継続投与すると、ジアゼパムに対する感受性の亢進(CBRのKd値の低下、Bmax値の増加、ピロカルピン刺激唾液分泌に対する抑制効果の発現閾値の低下)が生じることを報告した。今回は、ジアゼパムの感受性亢進に関与する因子としてDBIに着目し、唾液腺細胞におけるDBIの存在と役割、および大脳皮質細胞との相違について調べた。

#### 2. 研究方法

Wistar系雄性ラット(7週齢)を使用した。ジアゼパムの投与に関して、唾液分泌抑制効果を現す10mg/kgは単回投与を行ったが、唾液分泌抑制効果を示さない0.4mg/kgは、単回投与と14日間の継続投与を行った。唾液分泌測定は、10および0.4mg/kgの単回投与では薬物投与から2時間後に、0.4mg/kgの継続投与では最終投与から2時間および16時間後に行った。DBIおよび関連するPACAP、PBRのmRNA量とタンパク質量の変化を測定するために、薬物の投与から2時間後と16時間後に大脳皮質、耳下腺、顎下腺、舌下腺を摘出した。抽出したRNAの品質は、Agilent 2100 Bioanalyzerを用いて純度をそろえ、同時にクロマトグラフィーのピーク面積からRNA濃度を算出した。mRNA量の定量には、使用するすべての正常臓器から抽出した内部標準( $\beta$ アクチン)と目的タンパク質のmRNAからcDNAを合成した後PCRを行い、PCR産物を一連の実験に共通の標準品として使用した。標準品を用いて実験ごとに検量線を作成し、試料タンパク質mRNAの定量値の普遍性と精度を高めた。DBIのタンパク質量は、ウェスタンブロット法とイメージJを用いて濃度解析を行った。

### 3. 研究成績および結論

ジアゼパムの大量投与(10 mg/kg)により、唾液分泌の有意な減少が見られたが、唾液腺組織中の遺伝子量に関してはDBIが増加したのを除いて、PACAP、PBRに顕著な変化は見られなかった。一方、ジアゼパムの少量投与(0.4mg/kg)について行った実験では、単回投与では、唾液分泌量に変化は見られなかったが、14日間の継続投与では、すべての唾液腺で唾液分泌の抑制が見られた。また、DBI、PACAP、PBRのmRNAの発現を調べると、単回投与では、変化が見られなかったが、継続投与では最終投与の2時間後に、全ての臓器でDBI、PACAP、PBRのmRNA量が有意に増加し、DBIのタンパク質量も増加することが示された。

以上の結果から、ジアゼパムの長期投与により感受性が亢進するのは、ジアゼパムによる刺激が続くことで、DBIの産生が促進され、BDZ受容体の感受性および機能が修飾されるためであることが示された。

### 論文審査の要旨

本研究は、唾液腺におけるジアゼパムの感受性亢進に関与する因子として、BDZ受容体に対する内因性リガンドのDBIに着目し、唾液腺細胞におけるDBIの存在と役割について検索するために、唾液量の測定、および大脳皮質細胞をポジティブコントロールとして、DBI、PACAP、PBRのmRNA量およびタンパク質量を調べた。その結果、ジアゼパムの長期投与により感受性が亢進するのは、ジアゼパムによる刺激が続くことでDBIの産生が促進され、BDZ受容体の感受性および機能が修飾されるためであることが示された。

本審査会では以上の発表について、1)細胞膜上、細胞内の受容体における反応性の違い、2)大量投与の意義、3)唾液腺の種類による違い、4)DBIが末梢臓器にも存在することの合理性、5)ジアゼパムの作用機序に血流量低下が関与する可能性、6)2時間値と16時間値の根拠、7)mRNA量とタンパク量の変動についての平行性、8)ANOVAとMann-Whitneyの使い分け、の各質問に対して、1)ジアゼパムの膜透過性の高さにより細胞内に早く作用すること、2)受容体への作用を明確にするために大量投与したこと、3)DBI量の変化は耳下腺が一番大きかったこと、4)PBRはDBIと共に脳よりも唾液腺に多いこと、5)血流量は今後の検討課題とすること、6)1、2、4、8、16時間のタイムポイントにおける基礎データに基づいて決めたこと、7)タンパク質の代謝回転速度の違いにより発現が遅延すること、8)正規性のある場合とない場合を調べ、それぞれに使い分けたことが回答され、その適切性・妥当性が評価された。

本研究で得られた結果は、今後の歯学の研究の進歩、発展に寄与するところ大であり、学位授与に値するものと判定した。