

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
宮本良平	主査 教授 玉井 浩
	副査 教授 黒岩 敏彦
	副査 教授 大槻 勝紀
	副査 教授 朝日 通雄
	副査 教授 米田 博
主論文題名 Edaravone prevents kainic acid-induced neuronal death (エダラボンはカイニン酸による神経細胞死を抑制する)	
学位論文内容の要旨	
<p>《背景》</p> <p>海馬硬化病変をともなう側頭葉てんかんは難治性の経過をたどるてんかんとして知られているが、その患者には、乳幼児期の熱性けいれん重積症が先行してみられることがあり、側頭葉てんかん発症の1つのメカニズムとして考えられている。</p> <p>海馬硬化病変をともなう側頭葉てんかん患者は側頭葉切除によっててんかん発作が抑制されるため、この形態異常を研究することは、てんかんの原因究明や治療および予防法開発においても重要であると考えられる。</p> <p>ところで、この海馬硬化の組織では、海馬 CA3 野および歯状回門に投射する歯状回顆粒細胞の無髄軸索である苔状線維の異常発芽と海馬神経細胞死がみられる。乳幼児期のけいれん重積症により、側頭葉に海馬硬化病変をきたし、てんかんを発症するのであれば、けいれん重積症による海馬神経細胞死を抑制することは、のちの経過を変えうる可能性がある。</p> <p>近年、けいれん重積後の神経細胞死に活性酸素種の関与を示唆する報告がみられ、さらにラジカル捕捉剤がこの細胞死を抑制することが知られてきた。しかし、現在までの報告では、けいれん重積症発症前に、十分なラジカル捕捉剤が投与されていなければ、神経細胞死は抑制されていない。しかしながら、臨床の間では必ずしもけいれん重積発症前にすべての患者が十分なラジカル捕捉剤を投与されているとは限らない。したがって、けいれん発症後に投与しても細胞死抑制効果を発揮するラジカル捕捉剤が必要とされるが、そのような薬剤は現在までに報告がない。しかし、最近ヒト脳梗塞治療薬として開発された、ラジカル捕捉剤 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one(エダラボン(Ed))は、脳梗塞発症後に投与され、脳梗塞の予後を改善する。われわれは Ed であれば、けいれん重積後に投与することで、神経細胞死を抑制できるのではないかと考えた。</p> <p>腹腔内カイニン酸(KA)投与は、けいれん重積後、海馬硬化病変をきたし自発けいれんを発症することから側頭葉てんかんの動物モデルと考えられている。今回われわれは、この側頭葉てんかん動物モデルを用いて、Ed をけいれん重積後に投与し、細胞死抑制効果の有無について検討した。</p>	

《方 法》

6週齢雄性のSD系ラットにKAを腹腔内投与して、けいれんを誘発させた。KA投与後3時間半でペントバルビタールNaを腹腔内投与して、けいれんを停止させた。ラットはラジカル捕捉剤の投与法の違いによって、以下の4つのグループに分けた。①《KAのみ群》KA投与のみを行なう群。②《後のみ投与群》KA投与前には抗酸化剤を投与せず、KAでけいれんを誘発し、そのけいれんを停止させた直後のみ、Edを10mg/kg静注する群。③《前後投与群》KA投与60分前にEd30mg/kgを腹腔内投与し、KAでけいれんを誘発。けいれんを停止させた直後に再度Edを10mg/kg静注する群。④《コントロール群》Ed前投与と同じ時間に生食を腹腔内投与し、KAを投与せず、Edの後投与と同じ時間に再度生食を静注する群。

Edが抗けいれん作用をもてば、けいれんの程度に差が生じ、このために細胞死の程度に差が生じる可能性がある。このため、まずKAのみ群、後のみ投与群、前後投与群でけいれんの程度について全身けいれんにいたるラットの割合とけいれん重積の持続時間について評価した。

これ以下の実験にはコントロール群以外のグループのラットではそれぞれの群のけいれん重積を発症したラットを使用した。けいれん誘発1週間後に4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し、脳を摘出後、海馬切片で細胞死の程度をNissl染色およびFluoro-Jade B染色で評価した。Edの細胞死抑制機序の一つとして、Edの脂質過酸化抑制効果を評価した。マーカーとして、脂質過酸化物である4-ヒドロキシ-2-ノネナル(以下HNE)を測定した。けいれん誘発1週間後にリンゲル液で灌流し、海馬を摘出後、ホモジナイズし、ガススペクトログラフィー・マススペクトロスコーピーでHNE量を測定した。また、海馬組織中の抗酸化剤の量について評価をおこなう目的でグルタチオン(GSH)を測定した。けいれん誘発1週間後にリンゲル液で灌流し、海馬を摘出後、ホモジナイズしたサンプルは高速液体クロマトグラフィーを使用し、electrochemical detection(ECD)でGSH量を測定した。

《結 果》

[Edの抗けいれん作用]

KAのみ群、後のみ投与群、前後投与群でけいれんの程度について全身けいれんにいたるラットの割合とけいれん重積の持続時間について評価したが有意差はみられず、Edの抗けいれん作用は認められなかった。

[細胞死]

Nissl染色で評価したところ、海馬の歯状回、CA3、CA1/CA2の全ての領域にて後のみ投与群で有意に細胞死が抑制された。前後投与群では、後のみ投与群よりもさらに細胞死が抑制された。Fluoro-Jade B染色で変性した神経細胞を染色したが、Ed投与された2つの群では変性神経細胞が減少している傾向がみられた。

[HNE]

HNEはコントロール群と比較してKAのみ群で有意に上昇した。前後投与群ではKAのみ群に比較して優位にHNEの産生がコントロールレベルまで抑制されたが、後のみ投与群では、KAのみ群に比較して有意な減少が認められなかった。

[GSH]

GSHはKA投与により顕著に消費され、有意な減少がみられた。前後投与群ではKAのみ群に比較して優位にGSHの消費が抑制されたが、コントロール群の程度までは消費が抑制されなかった。また後のみ投与群では、KAのみ群に比較してGSH消費に有意差が認められなかった。

《考 察》

本研究により、ヒト脳梗塞治療薬である Ed が KA 投与けいれんモデルラットにおいて海馬細胞死抑制効果を有することを発見した。さらに、後のみ投与群でも抑制効果が得られることがわかった。

実際の臨床の場合においては、けいれん重積を発症する個々の症例が抗酸化剤を十分投与されているわけではないので、けいれん重積を発症した後に抗酸化剤が細胞死を抑制できるという抗酸化剤の存在を発見したことは意義があると思われた。その薬剤がすでに脳梗塞の治療として臨床で使用されていることは、ヒトの投与においても安全性が高いと思われた。しかし、前後投与群の方が細胞死抑制効果は高かった。

Ed の細胞死抑制機序についてであるが、HNE の産生が前後投与群で KA のみ群と比較して有意に抑制されていること、GSH 消費が前後投与群で KA のみ群と比較して有意に抑制されていることから細胞死抑制機序は脂質過酸化の関与が示唆されるが、けいれん後投与群で有意な細胞死抑制が得られているにも関わらず、HNE の産生の程度や GSH の消費抑制の程度には有意差を認めていない。したがって、Ed の細胞死抑制には脂質過酸化抑制以外の機序が関与し、過去の報告などからはサイトカイン抑制効果などが関与する可能性が示唆された。

短期的な効果として Ed 投与により KA けいれんモデルラットの海馬神経細胞死が抑制されることが証明されたが、Ed による海馬神経細胞死抑制が長期的にてんかんの発症や行動の問題などにどのような作用するかについて、今後十分に検討していく必要があると考える。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	乙 第 号	氏 名	宮本良平
論文審査担当者		主査 教授 玉 井 浩	
		副査 教授 黒 岩 敏彦	
		副査 教授 大 槻 勝紀	
		副査 教授 朝 日 通雄	
		副査 教授 米 田 博	
主論文題名			
<p>Edaravone prevents kainic acid-induced neuronal death (エダラボンはカイニン酸による神経細胞死を抑制する)</p>			
論文審査結果の要旨			
<p>乳幼児期にけいれん重積を発症した児が、のちに内側側頭葉てんかんを発症することが知られている。けいれん重積により海馬にみられた海馬神経細胞死がこのてんかんの発症に関与すると考えられているため、海馬神経細胞死を抑制することは、のちの経過を変えうる可能性がある。</p> <p>そこで申請者はラットカイニン酸投与けいれんモデルを用いて、抗酸化剤による神経細胞死抑制作用について検討した。</p> <p>その結果、抗酸化剤であるエダラボロンが神経細胞死を抑制することを明らかにした。さらにこれまでに報告されているようにけいれん誘発前に抗酸化剤を投与するだけでなく、けいれん誘発後に投与することでも神経細胞死が抑制されることを明らかにした。</p> <p>実際の臨床の場合においては、けいれん重積発症前に児に十分な抗酸化剤が投与されていることはない。しかし、本研究から、けいれん後の投与であっても神経細胞死を抑制する可能性を見出した。</p> <p>今後、神経細胞死を抑制した動物の長期的な経過を評価するなど、けいれん時に抗酸化剤を投与することの有効性についてさらに検討することは、内側側頭葉てんかんの発症予防につながると考えられる。</p> <p>以上により、本論文は本学学位規程第3条第2項に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>(主論文公表誌) Brain Research 1209: 85-91, 2008</p>			