(様式 甲 5)

氏 野 村 昇 平 名 ふりがな) (のむら しょうへい) 位 \mathcal{O} 博士 (医学) 学位授与番 甲第 묽 学位審查年月日 平成 27年 1月 28 日 学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one or 学 位 論 文 題 名 N-acetylcysteine prevents hippocampal mossy fiber rectifies sprouting and subsequent convulsive susceptibility in a rat model of kainic acid-induced seizure ceased by pentobarbital (3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オンあるい は N-アセチルシステインは、カイニン酸けいれん後 の海馬組織における苔状繊維の異常発芽を抑制し、 のちのけいれん閾値を改善させる) (主) 博 教授 米 田 論文審查委員 教授 木 村 文 治 教授 梶 本 官. 永

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《研究目的》

乳幼児期に、発熱に伴い 15 分以上持続する痙攣を熱性痙攣重積症という。熱性痙攣重積症後、数か月から数年後に、内側側頭葉てんかんを発症する症例が存在する。内側側頭葉てんかんは治療抵抗性の難治てんかんであり、病理組織像は「海馬硬化像」と呼ばれ、その特徴は海馬神経細胞死と海馬組織の神経ネットワークを構築する苔状線維の異常な伸長(発芽)である。

カイニン酸 (kainic acid: KA) は、グルタミン酸レセプターに作用し痙攣発作を誘発させる化学物質である。げっ歯類に KA を単回投与すると、直ちに痙攣重積に至り、その数カ月後てんかんを発症する。脳組織には海馬硬化像がみられ、症状、経過、病理像の一致からヒトの内側側頭葉てんかんモデルとされている。

一方で、酸化ストレスが神経細胞死やてんかん発症に関与することは知られている。KA 痙攣モデルにおいて、抗酸化剤が痙攣発症前に投与されると、神経細胞死を抑制し、後に 発症するてんかん発作が抑制されることが知られている。臨床においては痙攣重積発症前 の抗酸化剤投与は非現実的で、抗酸化剤には、「痙攣重積後投与によって後のてんかん発症 を予防する効果」が望まれる。

本研究ではヒトに用いることが可能な抗酸化剤 N-Acetylcystein(NAC)と 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one(Edaravone; Ed)の2種類を痙攣重積後に単回静脈内投与し、病理像の変化や後のてんかん発症時期の痙攣閾値を上昇させる効果があるか否かを検討した。

《方 法》

6週令雄性 SD ラットに KA 12mg/kg 腹腔内投与して痙攣重積を誘発し、KA 投与 3 時間 30 分後にペントバルビタールで痙攣を頓挫させて、KA 痙攣モデルを作成した。痙攣後ペントバルビタールと同時に Ed 30mg/kg あるいは NAC 30mg/kg を単回静脈内投与した群を Ed 群、NAC 群とし、ペントバルビタールのみ投与する群を KA 群とした。 KA のかわりに生理食塩水を投与し痙攣を誘発させない群をコントロール群とした。そして以下の実験を行い群間で結果を比較した。

①KA 投与 1 週間後の海馬神経細胞死抑制効果を NeuN 免疫染色で評価した。海馬のそれぞれの領域(hilus, CA3, CA2/CA1)で、コントロール群の神経細胞の割合を neuronal viability 100%として、各群の海馬各領域における生存細胞の割合を算出し、比較検討した。 ②KA 投与 12 週後に揮発性の痙攣誘発剤である flurothyl を用い、各群の痙攣閾値を flurothyl 吸入から痙攣に至るまでの時間の長さで比較した。

- ③KA 投与 12 週後に苔状線維の発芽様式を Timm 染色を用いて評価し、各群の Timm's score を比較した。
- ④KA 投与 1 週後に脂質過酸化物である 4-hydroxy-2-nonenal(HNE)の海馬における発現を免疫染色法で評価した。海馬のそれぞれの領域(hilus, CA3, CA1)の神経細胞数に対する HNE 陽性細胞数の割合を群間で比較した。

統計処理はすべて Mann-Whitney U test を用いて評価した。

《結果》

- ①NAC 群, Ed 群ともに、KA 群と比較して有意に neuronal viability が高く、痙攣重積後の NAC、Ed 投与は神経細胞死を抑制した。
- ②KA群はコントロール群, Ed群, NAC群それぞれと比較して、痙攣閾値が低下していた。 また、Ed群, NAC群の痙攣閾値はコントロール群と同等まで改善した。
- ③KA 群は、コントロール群、Ed 群、NAC 群それぞれと比較して有意に Timm's score が高く、異常発芽を認めた。また NAC 群では、コントロール群と同等まで異常発芽が抑制されていた。
- ④KA 群は、コントロール群と比較して海馬のすべての領域で有意に HNE 陽性細胞の割合が高かった。また Ed 群, NAC 群ともに、KA 群と比較して海馬のすべての領域で有意に HNE 陽性細胞の割合が低かった。

《考案》

KA 痙攣モデルにおいて、痙攣重積後、抗酸化剤(Ed, NAC)の単回静脈内投与は①海 馬神経細胞死を抑制し、②後のてんかん発症時期の痙攣閾値を上昇させ、③苔状線維の発 芽を抑制した。また HNE 免疫染色の結果から、神経細胞死の抑制に Ed あるいは NAC の 抗酸化作用が関与したことが推察された。

Ed あるいは NAC 投与後神経細胞死が抑制されたことにより、重積後に発生する脳内 ネットワークの再構築がなされず、てんかん原性の獲得や苔状線維の異常発芽が抑制され たものと推察した。

ヒトにおいて、内側側頭葉てんかんは難治なてんかんである。Ed や NAC はヒトへの投与が可能であり、熱性痙攣重積後 Ed や NAC が単回静脈内投与されることにより内側側頭葉てんかんの発症が予防できる可能性が示唆された。本研究はてんかん発症の予防的治療戦略に関する基礎的事実であり、価値あるものと考えられる。

論 文 審 査 結 果 の 要 旨

乳幼児期に熱性痙攣重積発症し、その数か月から数年後に、海馬硬化とよばれる病理像を有する内側側頭葉でんかんを発症する症例が存在し、これらは治療抵抗性で難治である。

本研究は、内側側頭葉てんかんモデルとして、カイニン酸(kainic acid: KA)投与ラットを使用し、KA 誘発痙攣重積後、抗酸化剤である N-Acetylcystein(NAC)と 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one(Edaravone; Ed)を単回静脈内投与し、病理像の変化や後のてんかん発症時期の痙攣閾値を上昇させる効果があるか否かを検討したものである。

KA 投与ラットを用いて、Ed、NAC をそれぞれ痙攣重積後に単回静脈内投与した群(Ed群、NAC群)、対照として抗酸化剤を投与しなかった群(KA群)、KAの代わりに生理食塩水を投与して痙攣重積を発症しない群(コントロール群)を作成した。各群において、海馬神経細胞死の程度、後のてんかん発症時期の痙攣閾値、苔状線維の発芽様式、4-hydroxy-2-nonenal(HNE)の発現レベルを群間で比較した結果、申請者らは以下の結果を得た。

いずれの抗酸化剤を投与しても KA 群と比較し、海馬神経細胞死は抑制された。また後のてんかん発症時期のけいれん閾値は上昇しその程度はコントロール群と同程度であった。 苔状線維の発芽は、いずれの抗酸化剤を投与しても、KA 群と比較して抑制され、NAC 群の苔状線維の異常発芽はコントロール群と同等程度であった。HNE 陽性細胞の割合は、いずれの抗酸化剤を投与しても、KA 群と比較して低かった。

以上の結果より、痙攣重積後の Ed, NAC 投与は、病理像を改善させ、後のてんかん発症 時期の痙攣閾値を上昇させることから、後のてんかん発症を予防する効果が期待できるこ とが示された。申請者らの研究は、てんかん発症の予防的治療戦略に関する基礎的知見を 与えるものであり、Ed, NAC はヒトへの投与が可能で臨床応用が今後期待できるものと考 えられる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 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。

(主論文公表誌)

Brain research 1590: 65-74, 2014