

Title	実験的痙攣動物モデルを用いた脂肪族ケトン体の抗痙攣作用及び神経保護作用に対する検討
Author(s)	長谷部, 伸嘉
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/58104">https://hdl.handle.net/11094/58104</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【4】

氏名	はせべ のぶ よし 長谷部 伸 嘉
博士の専攻分野の名称	博士 (保健学)
学位記番号	第 24263 号
学位授与年月日	平成22年12月20日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科保健学専攻
学位論文名	実験的痙攣動物モデルを用いた脂肪酸ケトン体の抗痙攣作用及び神経保護作用に対する検討
論文審査委員	(主査) 教授 井上 修 (副査) 教授 永井利三郎 教授 大和谷 厚

論文内容の要旨

・研究背景

本研究では脂肪酸ケトン体の抗痙攣作用について検討するために、種々の実験的痙攣動物モデルに対するmethyl ethyl ketone (MEK) 及びdiethyl ketone (DEK) の影響について調べた。

その背景として、てんかんに対する食事療法にはケトン食療法が古くから実施されており、ミオクロヌス発作、非定型失神発作や小児の難知性てんかんの症状を改善する事が知られている。ケトン食療法は、一般的に高脂肪、低タンパク質、低炭水化物の食事を継続的に摂取し、脂肪酸から産生されるacetone、acetoacetate、 $\beta$ -hydroxybutyrateといったケトン体を体内で発生させることを目的としている。ケトン食によるてんかん治療の際には、炭水化物の摂取が制限されるためglucoseから解糖系を介したATPの産生が行われないことから、代替経路としてacetone、acetoacetate、 $\beta$ -hydroxybutyrateがケトン体の形で筋肉や脳等の各組織に運ばれ、ミトコンドリアにおいてATP産生のための基質として利用される。

このように、ケトン体の上昇により起こるエネルギー代謝の変容は、ケトン食療法が抗痙攣作用を示すための有力なメカニズムの1つとして報告されている。しかし、ケトン食摂取により生体内でケトン体が上昇した際において、必ずしもATPとの関連が認められない場合があることや、acetoneそのものがin vivoにおける各種痙攣動物モデルに対して抗痙攣作用を有することが報告されていること、また、当研究室において実施された先行研究において、MEKがLithium-pilocarpineてんかんモデルラットにおいて、強い抗痙攣作用を有することが見出された。MEKは生体内では産生されないためエネルギー代謝の基質にはなり得ないことから、従来想定されていたエネルギー代謝の変容以外の作用機序があるものと想定される。

・研究目的

そこで本研究では、脂肪酸ケトン体について更に詳細に検討するために、acetoneの類似体でありかつ炭素数の異なる脂肪酸ケトン体であるMEK及びDEKを用いて以下の2点を主な目的とした検討を行った。①痙

攣発現メカニズムの異なる代表的な4種類の実験的痙攣モデルマウスを用いて、MEK及びDEKの抗痙攣作用スペクトルを明らかにすること。② 次に、てんかん重積モデルラットにおいて、MEKのてんかん進展に対する抑制作用の有無、及び海馬等における神経細胞に対する保護作用の有無について明らかにすることを目的とし、lithium-pilocarpine induced status epilepticus ラット (Li-pilo SEラット) に対するMEKの影響について、電気生理学的手法及び病理学的手法により検討した。

・結果

①脂肪酸ケトン体 (MEK及びDEK) の抗痙攣作用スペクトルに関する検討

実験には、薬物誘発性痙攣モデルとして、pentylenetetrazol (PTZ:GABA<sub>A</sub>受容体拮抗薬)、methyl-6,7-dimethoxy-4-ethyl- $\beta$ -carboline-3-carboxylate (DMCM:GABA<sub>A</sub>受容逆作用薬) 及びkainic acid(グルタミン酸受容体作用薬)をマウスの腹腔内に投与し、強直性痙攣及び間代性痙攣を誘発させ、痙攣の発現率を評価した。また、電撃痙攣モデルとして、マウスの角膜に刺激電極から電流を与えることにより痙攣を誘発させ、痙攣が発現した際の電流値を閾値として評価した。MEK及びDEKは各痙攣誘発薬投与の10分前に腹腔内に投与し、抗痙攣作用評価のために比較対照として用いた抗痙攣薬のclonazepam (CZP:ベンゾジアゼピン受容体作用薬)は30分前に腹腔内投与した。MEK及びDEKの抗痙攣作用の評価には、各痙攣モデルに対する50%有効薬効用量 (ED<sub>50</sub>) を算出し、CZPのED<sub>50</sub>と比較した。

その結果、MEK、DEK及びCZPはいずれもPTZ及びDMCM誘発痙攣を完全に抑制した。Kainic acid誘発痙攣に対してもMEK及びDEKの方がCZPと比較して強力な抗痙攣作用を示した。一方、電撃痙攣に対してはMEK及びDEKは痙攣閾値を有意に上昇させ、痙攣の発現をほぼ完全に抑制した。しかし、CZPは痙攣閾値を有意に上昇させたが、かなりの高用量を投与しても、痙攣発現を完全には抑制できなかった。即ち、電撃痙攣に対してMEK及びDEKはCZPよりも強力な抗痙攣作用を有することが示された。更に、MEK及びDEKは、痙攣誘発メカニズムが異なる全ての痙攣モデルに対して同程度のED<sub>50</sub>を示したが、CZPの各種痙攣モデルに対するED<sub>50</sub>は、それぞれのモデル間で大きく異なり約60~100倍以上の乖離が認められた。

以上、MEK及びDEKは4種の痙攣モデルにおいて強い抑制作用を示し、広範囲かつ強力な抗痙攣作用プロファイルを有することが明らかとなった。

②Li-pilo SEラットにおけるMEKの神経保護作用についての検討

ケトン食療法がてんかん症状を寛解させることから、てんかん重積症のモデルであるLi-pilo SEラットに対するMEKの抗痙攣作用について、電気生理学的手法及び病理学的手法を用いて評価を行った。実験には、Li-pilo SEラット群とLi-pilo SEラット+MEK投与群 (pilocarpine・HCl投与の15分前と2時間後に2回腹腔内投与)を用いて比較検討した。

その結果、Li-pilo SEラットは、てんかんを誘発するために用いたpilocarpine・HClの投与3時間後、1週間後及び4週間後において、持続的な痙攣波及びてんかん症状が認められたが、MEK投与群では、同様の期間においても異常脳波及び痙攣症状が完全に消失しており、てんかん形成がほぼ完全に抑制された。また、Li-pilo SEラットはpilocarpine・HCl投与の4週間後において、海馬CA1、CA3領域では著明な神経細胞死が認められ、更に、視床領域ではアストロサイトの増殖変化であるグリオーシス等の器質の変化が認められた。一方、MEK投与群ではいずれの領域においても病理学的な変化は認められなかった。また、髄鞘の形態についてもLi-pilo SEラット及びMEK投与群において病理学的な差は認められなかった。

以上、MEKはLi-pilo SEラットの急性期の痙攣発現を抑制するだけでなく、慢性的に進行するてんかんの形成を抑制することで、神経細胞に対して保護的に作用することが明らかとなった。

#### ・結論

本研究結果から、脂肪酸ケトン体のMEK及びDEKは幅広い抗痙攣プロファイルを示し、CZPと同等もしくはより強力な抗痙攣作用を有することが明らかとなった。また、MEKは急性期の痙攣症状を抑制するだけでなく、慢性的に進行するてんかんの形成過程を抑制することが明らかになった。脂肪酸ケトン体の抗痙攣作用メカニズムは未だ不明であるが、MEK及びDEKは本実験で用いた痙攣誘発メカニズムの異なる各種薬物誘発痙攣モデルや電撃痙攣モデルに対して幅広い抗痙攣スペクトルを示したことから、特定の神経系を介した作用だけではなく、イオンチャネルなどの神経伝達全般に共通して関与する因子に作用している可能性が考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は、脂肪酸ケトン体の抗痙攣プロファイルを明らかにすることを目的として、生体内では産生されない脂肪酸ケトン体であるmethyl ethyl ketone (MEK) 及びdiethyl ketone (DEK) の、各種痙攣モデル動物における抗痙攣作用を比較検討したものである。

その結果として、MEK及びDEKは3種類 (pentylene tetrazol、DMCM、kainic acid) の薬物誘発性痙攣マウス及び電撃痙攣マウスの全てのモデルに対して、強力な抗痙攣作用を示した。一方、比較対照薬として用いたclonazepamはGABA系の抑制により誘発される痙攣に対しては、低用量でも強い抗痙攣作用を示したが、kainic acidおよび電撃痙攣モデルマウスに対しては弱い抑制効果しか示さなかった。また、MEK及びDEKの抗痙攣作用に対する有効薬効用量 (ED<sub>50</sub>) は、いずれの痙攣モデルにおいても同等の値を示した。

次に、てんかん重積モデルラットであるlithium-pilocarpine induced status epilepticus ラット (Li-pilo SEラット) を用いて、MEKのてんかん進展に対する抑制作用の有無について、脳波測定及び病理学的評価により検討した。その結果、MEKはLi-pilo SEラットで認められる脳波上のrecurrent-seizureを完全に抑制しており、pilocarpine投与4週間後においては、てんかん重積によって発現する海馬の神経細胞死及び視床のグリオーシスをほぼ完全に抑制することが判明した。即ち、MEKはてんかんの進展をほぼ完全に抑制することが判明した。

結論として、脂肪酸ケトン体のMEK及びDEKは幅広い抗痙攣プロファイルを示し、非常に強力な抗痙攣作用を有することが明らかとなった。また、MEKは急性期の痙攣症状を抑制するだけでなく、慢性的に進行するてんかんの形成過程を抑制し、神経保護作用を有することが明らかになった。

本研究で用いたMEK及びDEKは①生体内で産生されないことや、②各実験的痙攣動物モデルに対する抗痙攣作用は投与直後から作用が認められていることから、脂肪酸ケトン体の抗痙攣作用はケトン食とは異なり、エネルギー代謝の変容作用以外の直接的な機序により強い抗痙攣作用を示すことが示唆された。

以上の研究成果は、ケトン食療法の作用機序を考える上でも、また、新しい抗てんかん薬の開発を進める上でも重要な知見であり、本論文は博士 (保健学) の学位授与に値するものと考えられる。