

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	石 丸 雄 二
学 位 論 文 題 目			
<p>Effects of levetiracetam on hippocampal kindling in Noda epileptic rats. (ノダてんかんラットの海馬キンドリングにおける レベチラセタムの効果について)</p>			
共 著 者 名			
<p>千葉茂、芹川忠夫、笹征史、稲葉央子、田村義之、 石本隆広、高崎英気、阪本一剛、山口一豪と共著</p>			
<p>Brain Research 1309巻104頁～109頁 平成22年1月</p>			
研 究 目 的			
<p>新規抗てんかん薬レベチラセタム (levetiracetam, LEV) は従来の抗てんかん薬の作用機序を有さず、シナプス小胞の膜上に存在するsynaptic vesicle protein, SV2Aとの結合能を有することが特徴とされている。</p> <p>本研究は、自然発症てんかんモデル動物であるノダてんかんラット (Noda epileptic rat, NER) を用いて、NERの発作過敏性と、LEVの効果を明らかにすることを目的として海馬電気キンドリングを行った。</p>			
材 料 ・ 方 法			
<p><実験1></p> <p>生後4-6ヶ月、体重350-560 gの雄性NER (n=5) およびWistar系雄性ラット(n=5) を使用した。ペントバルビタール麻酔下に直径200 μ mのステンレススチール線2本をより合わせた双極電極を右側背側海馬 (プレグマより後方3.3mm、右側2.0mm、頭蓋骨表面より下方3.6mm) に装置した。また、両側運動野および小脳皮質に相当する頭蓋骨にネジ電極を装置し、後者の基準電極として用いた。電極装置1週間後より、1日1回の海馬電気刺激を行った。初回の刺激は60Hz、2相性矩形波を1秒間、25 μ Aで行い、これによって後発射が誘発されない場合には10分おきに25 μ Aずつ刺激強度を上げて刺激閾値を決定した。</p> <p>誘発された発作はRacine (1972) のstage分類を改変し、以下のように分類した。すなわち、stage 1, behavioral arrest or mouth/ facial movements; stage 2, head nodding; stage 3,</p>			

forelimb clonus; stage 4, rearing; stage 5, falling; stage 6, jumping/running, subsequent seizure)。stage 5 または stage 6 が3回連続して出現する時点をキンドリング完成とみなし、電気刺激はこのキンドリング完成まで行なった。

行動および脳波変化は、それぞれビデオ撮影およびデジタル脳波形にて同時に電気刺激から20分間記録した。統計解析にはMann-Whitney U test および Fisher's exact testを用いた。

<実験2>

生後4-6ヶ月、体重350-560 gの雄性NER20匹を無作為に、LEV投与群 (n=10) と生理食塩水投与群 (n=10) とに分けて使用した。電極装置1週間後より、前者には生理食塩水 (2.4 ml/kg) に溶解したLEV 240 mg/kgを、後者には生理食塩水 (2.4 ml/kg) を1日1回、連日、腹腔内に投与した。海馬への電気刺激は、腹腔内投与5日目より、投与1時間後に1日1回の電気刺激を行った。なお、電極の装置法、電気刺激強度の決定、発作の分類、キンドリング完成の定義、脳波の記録法、統計手法は実験1と同様に行った。

成 績

<実験1>

初回のstage 5 または stage 6 に至るまでに要した電気刺激回数、およびキンドリング完成に要した刺激回数は、NER群で有意に少なかった。また、stage 6 を呈したラットの数は、NER群で有意に多かった。

<実験2>

初回のstage 5 または stage 6に至るまでに要した電気刺激回数は、およびキンドリング完成に要した刺激回数は、LEV投与群で有意に多かった。また、stage 6 を呈したラットの数は、LEV投与群で有意に少なかった。さらに、初回のAD出現時の電気刺激強度、すなわちAD閾値は、レベチラセタム投与群で有意に高値を示した。また、初回のstage 5 または stage 6 の発作のAD持続時間は、レベチラセタム投与群で有意に延長していた。その際、発作が全般化するまでの時間には有意差は認められなかったものの、LEV投与群でより長い傾向が認められた (p=0.082)。

考 案

実験1において、NER群では海馬キンドリングが極めて速やかに完成したことから、NERでは辺縁系発作に対する感受性が高いこと、さらにNERの海馬キンドリングモデルが抗てんかん薬の評価に有用であることが示唆された。また、NERでは running や強直発作をも示したことから、NERは脳幹における発作過敏性も亢進していることが示唆された。

実験2において、LEVは海馬キンドリングの進展を抑制し、海馬の閾値を上昇させたことから、海馬での異常発射を抑制する効果を有している可能性が示唆された。また、LEVはGTCSを

含むstage 6 の発作を抑制した。NER におけるGTCSは主にNaチャンネルの遮断作用によって抑制されると考えられている。しかしLEVはNaチャンネルの遮断作用を有していないため、現時点ではLEVによるNERにおける発作抑制機序は不明である。

電気刺激から全般化に至る時間がLEV投与群において延長している傾向が認められたことから、LEVは二次性全般化を抑制する可能性が示唆された。

結 論

NERは大脳辺縁系発作のみならず、脳幹発作に対しても発作感受性が亢進していた。また、LEVは辺縁系発作を抑制するのみならず、二次性全般化を抑制する効果を有する可能性が示唆された。




引 用 文 献

1. Noda A, Hashizume R, Maihara T, Tomizawa Y, Ito Y, Inoue M, Kobayashi K, Asano Y, Sasa M, Serikawa T. 1998. NER rat strain: a new type of genetic model in epilepsy research. *Epilepsia* 39, 99-107.
2. Klitgaard H, Matagne A, Gobert J, Wölfert E. 1998. Evidence for a unique profile of levetiracetam in rodent models of seizures and epilepsy. *Eur. J. Pharmacol.* 353, 191-206.

参 考 論 文

1. Tamura Y, Chiba S, Takasaki H, Tabata K, Ishimaru Y, Ishimoto T. 2006. Biperiden-induced delirium model in rats: A behavioral and electroencephalographic study. *Brain Research.* 1115, 194-199.
2. 田村義之、千葉 茂、石丸雄二、武藤福保、鎌田隼輔、澤谷令児：血液透析患者における定量脳波．*臨床脳波* 43巻369頁～373頁、平成13年6月．

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏名	石丸 雄二
<p>審査委員長 鎌田 恭輔 </p> <p>審査委員 高草木 薫 </p> <p>審査委員 松原 和夫 </p>			
<p>学位論文題目</p> <p>Effects of levetiracetam on hippocampal kindling in Noda epileptic rats</p> <p>(ノダてんかんラットの海馬キンドリングにおける レベチラセタムの効果について)</p>			
<p>2. 学位論文の審査結果の要旨</p> <p>石丸雄二氏は自然発症てんかんモデル動物であるノダてんかんラット (Noda epileptic rat,NER) を用いて、NER の発作過敏性と、新規抗てんかん薬レベチラセタム (levetiracetam,LEV) の効果を明らかにすることを目的として海馬電気キンドリング実験を行った。今回用いた LEV は従来の抗てんかん薬の作用機序を有さず、シナプス小胞の膜上に存在する synaptic vesicle protein,SV2A との結合能を有することが特徴とされ、本年より本邦で発売予定が決定している注目を集めている抗てんかん薬である。石丸氏は本検討を2段階に分けて実施した。実験1ではキンドリングモデル作成を目的とした。生後4-6カ月、体重350-560gの雄性NER(N=5)およびWistar系雄性ラット(N=5)を使用した。てんかんモデルの作成にはペントバルビタール麻酔下に直径200μmのステンレススチール線2本をより合わせた双曲電極を右側背側海馬(ブレグマより後方3.3mm、右側2.0mm、頭蓋骨表面より下方3.6mm)に装置した。また、両側運動野および小脳皮質に相当する頭蓋骨にネジ電極を装置し、後者の</p>			

基準電極として用いた。電位変化の安定した電極装置 1 週間後より、1 日 1 回海馬電極刺激を行った。初回の刺激は 60Hz、2 相性矩形波を 1 秒間、 $25\mu\text{A}$ で行い、これによって後発射が誘発されない場合には 10 分おきに $25\mu\text{A}$ ずつ刺激強度を上げて刺激閾値を決定していった。誘発された発作はキンドリングモデル分類である Racine(1972)の stage 分類を参考にし、電気刺激はキンドリング完成まで行った。統計解析には Mann-Whitney U test および Fisher's exact test を用いた。

モデル完成後に実験 2 として LEV の効果判定を行った。LEV 投与群 (n=20) と生理食塩水投与群 (n=10) とに分けて使用した。電極装置 1 週間後より、前者には生理食塩水 (2.4ml/kg) に溶解した LEV240mg/kg を、後者には生理食塩水 (2.4ml/kg) を 1 日 1 回、連日腹腔内に投与した。海馬への電気刺激は、腹腔内投与 5 日目より、投与 1 時間後に 1 日 1 回の電気刺激を行った。

その結果初回のキンドリング完成に要した刺激回数は、NER 群で有意に少なかった。完全キンドリングモデルとなったラットの数は NER 群で有意に多かった。次に LEV 投与下で電気刺激を行いキンドリングに達する要した刺激回数を検討した。その結果、LEV 投与群で必要な電気刺激回数は有意に多かった。また、完全キンドリングモデルを呈したラットの数は LEV 群で有意に少なかった。さらに、初回の後発射出現時の電気刺激強度、すなわち後発射閾値は、LEV 投与群有意に高値を示した。また初回のキンドリングモデルの発作の後発射持続時間は、LEV 投与群で有意に延長していた。その際、発作が全般化するまでの時間には有意差は認められなかったものの、LEV 投与群でより長い傾向が認められた ($p=0.082$)。

石丸氏は今回の検討結果より NER は大脳辺縁系発作のみならず、脳幹発作に対しても発作感受性が亢進していると推察した。また、LEV は辺縁系発作を抑制するのみならず、二次性全般化を抑制する効果を有する可能性を示唆している。

3. 学力確認の結果

申請者は新薬である levetiracetam の機序を理解し、その有効性を証明する実験を行った。この証明のために、適切な実験モデルを作成し、十分な個体数を用いて検討している。本薬剤は本邦において発売を目前に控え、臨床においてはその有効性は極めて重要な意味をもつ研究である。また本論文は英文雑誌(Brain Research)に掲載されており、その研究は国際的に認められている。正確かつ、客観的な検討と注意深い考察、さらに国際的な競争力を有している申請者は学位取得に十分な資格があるものと判断した。