







学位論文審査の結果の要旨

審査区分 ① 課 ・ 論	第 701 号	氏 名	大 西 晃 平
審 査 委 員 会 委 員	主査氏名	伊 東 弘 樹 	
	副査氏名	手 嶋 泰 之 	
	副査氏名	正 木 孝 幸 	
<p>論文題目 Anticonvulsant and antioxidant effects of lamotrigine on pilocarpine-induced status epilepticus in mice (マウスのけいれん重積モデルにおけるラモトリギンの抗けいれん作用と抗酸化作用)</p> <p>論文掲載雑誌名 NeuroReport</p> <p>論文要旨 ・【目的】酸化ストレスは、生体内でのフリーラジカルの生成と消去の不均衡から惹起され、てんかんなど種々の病態に関連しているが、ラモトリギン (LTG) の抗けいれん作用と抗酸化作用については十分に解明されていない。そこで申請者は、マウスのピロカルピン (Pilo) 誘発けいれん重積 (SE) モデルにおいて、LTG のこれら作用への影響を評価した。【方法】雄マウスに Pilo 400mg/kg を皮下投与し SE を誘発させ、LTG 20mg/kg を Pilo 投与 30 分前に腹腔内投与し、①対照②生食+Pilo ③LTG+Pilo の 3 群に分け、Pilo 投与後 SE までの潜時、SE の持続時間、Pilo 投与後 2 時間以内の死亡率を測定した。なお、重積死したものは直ちに、生存したものは Pilo 投与 2 時間後に断頭して海馬を取り出し、一酸化窒素 (NO)、マロンジアルデヒド (MDA) ならびにグルタチオン (GSH) 濃度を測定した。また、NMDA 受容体を介さない LTG の作用経路を調査するため、Pilo、Pilo+LTG (Pilo/LTG) および Pilo/LTG+NMDA 受容体アンタゴニスト (MK-801 及びイフェンプロジル) で処理した培養ラット海馬神経細胞にて、NO 濃度を測定した。【結果】LTG は、SE までの潜時及び SE の持続時間を延長し、Pilo 誘発 SE マウスの死亡率を低下させた。さらに、LTG は海馬の NO および MDA 濃度を低下させ、GSH 濃度を上昇させた。加えて、Pilo と Pilo/LTG 及び Pilo/LTG と Pilo/LTG+MK-801 で処理した培養ラット海馬神経細胞のグループ間で、NO 濃度に有意差があった。 【考察】Pilo 誘発けいれん発作は、NMDA 受容体を活性化させ、発作の維持にアストロサイトにおける Ca²⁺依存性グルタミン酸の放出と GABA 作動性シナプス抑制の低下により起こると考えられている。そのため、今回の LTG 投与は、Na⁺チャネルを抑制することで神経細胞膜を安定化させ Ca²⁺ の流入を遮断し、興奮性神経伝達物質の過剰な放出を抑制、さらに GABA_A 受容体を介したシナプス伝達も減少させることで、Pilo 誘発 SE に対して抗けいれん作用をもたらすと考えられた。また、LTG は Pilo 誘発 SE 後の海馬において NO および MDA 濃度を減少させ、GSH 濃度を増加させることにより、抗酸化効果も示した。NMDA 受容体が過剰に活性化されると、過度の Ca²⁺が流入し NO などのフリーラジカルが過剰に産生されるため、Pilo 誘発 SE に対する LTG の抗けいれん作用および抗酸化作用は、NMDA 受容体を介して働く可能性があるが、本研究の結果から、LTG の抗酸化作用は NMDA 受容体以外の関与も示唆された。</p> <p>本研究は、SE の誘発方法と LTG の投与タイミングを従来の方法から変更することで、SE に対する LTG の抗けいれん作用を初めて示すことが出来た。よって、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

最終試験
の結果の要旨
~~学力の確認~~

審査区分 ①・論	第701号	氏名	大西晃平
審査委員会委員	主査氏名	伊東 弘樹 	
	副査氏名	手嶋 泰之 	
	副査氏名	正木 孝幸 	
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 今回の研究を行う上で、ラモトリギンを選択した理由は何か。 2. てんかん患者では酸化ストレスが慢性的に増えているのか、あるいは発作前に増えるのか。 3. ピロカルピンのけいれん誘発機序と他の誘発モデルとは、機序がどのように異なるのか。 4. カルバマゼピンなど他の抗けいれん薬には、抗酸化作用は無いのか。 5. ピロカルピンとラモトリギンを両者投与しているが、薬物同士の相互作用は無いのか。 6. ラモトリギンは内服薬であるが、今回の実験で腹腔内投与とした理由は何か。 7. 今回使用したラモトリギンは、どのように用量設定したか。 8. ラモトリギンの投与量を決定するために、他の用量で検討したか。 9. 今回使用したピロカルピンは、どのように用量設定したか。 10. けいれん発作前にラモトリギンを投与することは難しいが、臨床的にどのような方法で使用することを想定しているか。 11. ピロカルピン投与2時間後の時間設定での解析になっているが、時間設定の根拠と、それ以降の解析はしなくても良いのか。 12. 今回海馬を取り出しているが、他の脳内領域の解析はどのようにになっているのか。 13. Fig2, 3 でラモトリギン単独投与群は必要ないか。ラモトリギン単独群での酸化ストレスマーカーの変化はないと考えて良いか。 14. Fig2 でコントロール群とピロカルピン/ラモトリギン群の間に有意差がないという事は、ラモトリギンの抗酸化作用はコントロールレベルまで完全に改善すると考えて良いか。 15. Fig3 でラモトリギンはNMDA受容体を抑制することで酸化ストレスを減少させている。MK801 と Ifenprodil もラモトリギンと同様にNMDA受容体を抑制するため、この結果ラモトリギンの効果がNMDA受容体を抑えているためか直接確認することができない。この結果をどう解釈すればよいか。 16. 酸化ストレスにはいろんな種類があるが、スーパーオキシド、ヒドロキシラジカル、過酸化水素などその中から今回の測定に一酸化窒素を選んだ理由は何か。 17. Fig2 が <i>in vivo</i> で、Fig3 が <i>in vitro</i> の解析だが、Fig3 でのMDAやGSHの動きも <i>in vivo</i> と同様な動きをしているのか。 18. 今回の研究結果を、今後の研究にどのような発展させていく予定であるか。 <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

学 位 論 文 要 旨

氏名 大西 晃平

論 文 題 目

Anticonvulsant and antioxidant effects of lamotrigine on pilocarpine-induced status epilepticus in mice

(マウスのけいれん重積モデルにおけるラモトリギンの抗けいれん作用と抗酸化作用)

要 旨

目的: 酸化ストレスは生体内でのフリーラジカルの生成と消去の不均衡から惹起され、てんかんなど種々の病態に関連している。新規抗てんかん薬でけいれん重積 (SE) に対する抗酸化作用が報告されるも、ラモトリギン (LTG) の抗けいれん作用と抗酸化作用については十分に解明されていない。本研究では、マウスのピロカルピン (Pilo) 誘発 SE モデルにおいて、LTG のこれらの効果を評価した。**方法:** 体重 20-25g の雄マウスに Pilo 400mg/kg を皮下投与し SE を誘発した。SE は Racine 分類の stage3 以上とした。LTG 20mg/kg を Pilo 投与 30 分前に腹腔内投与し、①対照 ②生食+Pilo ③LTG+Pilo の 3 群に分けた。Pilo 投与後 SE までの潜時、SE の持続時間、Pilo 投与後 2 時間以内の死亡率を測定した。重積死したものは直ちに、生存したものは Pilo 投与 2 時間後に断頭して海馬を取り出し、酸化ストレスバイオマーカーである一酸化窒素 (NO)、マロンジアルデヒド (MDA) とグルタチオン (GSH) を測定した。NMDA 受容体を介さない LTG の作用経路を調べるため、

4 μ M Pilo、Pilo+100 μ M LTG (Pilo/LTG)および Pilo/LTG+ NMDA 受容体アンタゴニスト (10 μ M MK-801、3 μ M イフェンプロジル) で処理した培養ラット海馬神経細胞で NO を測定した。結果: LTG は SE までの潜時、SE の持続時間を延長し、Pilo 誘発 SE マウスの死亡率を低下させた。LTG は海馬の NO および MDA 濃度を低下させ、GSH 濃度を上昇させた。さらに Pilo と Pilo/LTG、および Pilo/LTG と Pilo/LTG+MK-801 で処理した培養ラット海馬神経細胞のグループ間で NO 濃度に有意差があった。考察: 本研究は、SE の誘発方法と LTG の投与タイミングが従来の研究とは異なり、SE に対する LTG の抗けいれん作用を初めて示すことが出来た。Pilo 誘発けいれん発作は NMDA 受容体を活性化させ、発作の維持にアストロサイトにおける Ca^{2+} 依存性グルタミン酸の放出と GABA 作動性シナプス抑制の低下が考えられている。LTG は Na^{+} チャネルを抑制することで神経細胞膜を安定化させ Ca^{2+} の流入を遮断し、グルタミン酸などの興奮性神経伝達物質の過剰な放出を抑制する。またシナプス前 Ca^{2+} 流入に作用して GABA_A 受容体を介したシナプス伝達を減少させる働きがある。以上の理由により、Pilo 誘発 SE に対して LTG が抗けいれん作用を示したのかもしれない。本研究では、LTG は Pilo 誘発 SE 後の海馬において NO および MDA 濃度を減少させ、GSH 濃度を増加させることにより、従来の報告通りの抗酸化効果を示した。NMDA 受容体が過剰に活性化されると、過度の Ca^{2+} が流入し NO などのフリーラジカルが過剰に産生される。Pilo 誘発 SE に対する LTG の抗けいれん作用および抗酸化作用は、NMDA 受容体を介して働く可能性があるが、本研究の in vitro の結果から、LTG の抗酸化作用は NMDA 受容体を介して完全には発揮されない可能性が示唆された。LTG が NMDA 受容体とは別の経路で抗酸化作用を示す報告が散見されることから、本研究でそれを明らかにするために、コントロール群として Pilo+MK-801 を追加する必要があった。