

学位論文題名

Consequences of Nitric oxide Generation  
in Epileptic-Seizure Rodent Models as studied by  
In vivo EPR

(生体内電子常磁性共鳴法によるてんかん発作げっ歯類モデルにおける  
一酸化窒素生成に関する研究)

学位論文内容の要旨

「はじめに」一酸化窒素(NO)は脳内細胞間情報伝達物質として約 10 年前に初めて確認された。NO は NO synthase(NOS)により L-arginine から生成され、周囲に速やかに拡散し、近傍の細胞を様々な経路で活性化する。NOS は特に N-methyl-D-aspartate(NMDA)レセプター刺激により活性化され、産生された NO は guanyl cyclase を誘導し細胞内の cyclic GMP を増加させる。NO のてんかんへの関与が推察され多くの報告がされているが、未だ統一した見解は認められていない。本研究では生体内および生体外電子常磁性共鳴法(electron paramagnetic resonance:EPR)スペクトロスコピーにより、pentylentetrazole(PTZ)を投与したマウスおよびラットの発作時の脳内 NO レベルを計測し、脳内の様々な部位での NO 産生量の定量化を行った。

「対象と方法」Wister 種の雄ラット(120-150g、8 週)および ICR 雄マウス(15-20g、4 週)を用いた。PTZ は 10-100mg/kg を腹腔内投与した。投与後の様子は Ito らの論文に倣い 1:痙攣無し、2:頭部のひくつき、3:間代性痙攣、4:カンガルー肢位、5:転倒 (4 と 5 を強直性痙攣と判定) のようにスコアリングした。Diazepam(5mg/kg)と phenytoin(60mg/kg)は PTZ 投与の 30 分前に投与した。NO-trapping 剤として DETC(Sodium diethyldithiocarbamate)500mg/kg を腹腔内に、および鉄クエン酸複合体(50 mg/kg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  + 250 mg/kg sodium citrate)を皮下に、両者を PTZ 投与の 30 分前に投与した。NOS 阻害剤の実験に際しては、L-NNA ( $\text{N}^G$ -nitro-L-arginine) 50-100mg/kg、あるいは L-NMMA ( $\text{N}^G$ -monomethyl-L-arginine) 50-250mg/kg、あるいは 3Br-7NI (3-bromo-7-nitroindazole) 1-20mg/kg を PTZ 投与の 30 分前に腹腔内投与した。L-band による生体内 EPR においては、PTZ 投与後の発作を観察した後、pentobarbital(35mg/kg)を投与して鎮静し測定した。X-band による生体外 EPR での脳組織内の NO 濃度の測定に際しては、PTZ 投与後に発作を観察し、その後すみやかに脳を摘出し大脳皮質、小脳、嗅球、海馬、及び視床下部の一部を凍結保存した。定量化は標準試料のスペクトルのピークとの比較により行った。

「結果」 NO 産生量の検討に際して、PTZ を投与した 26 例全てに間代あるいは強直性痙攣を認めた。PTZ60mg/kg を投与した例では 18 例中 16 例で強直性痙攣を認めた。PTZ40mg/kg を投与した例では 8 例全例に間代性痙攣を認めた。強直性痙攣を起こした例においては、X-band 生体外 EPR で 3 峰性のスペクトルが明瞭に認められた。このスペクトルは NOS 阻害剤を前投与することにより抑制された。この結果は、NO が脳内で NOS により生成されていることを示唆する。間代性痙攣を起こした例でも同様のスペクトルを認めたが、時間当たりの NO 産生量は強直性痙攣の例に較べ明らかに少なかった。

生体内 EPR は、PTZ80mg/kg を投与し 3 分観察した後に L-band EPR により行った。X-band 生体外 EPR と同様のスペクトルが観察された。間代性痙攣例においては強直性痙攣例に比べて信号が低かった。NOS 阻害剤を前投与した例ではこれらは認められなかった。

NOS 阻害剤による NO 産生量および発作の変化についても検討した。L-NNA により NO 産生量は 30%以下に減少した。3Br-7NI ではさらに著明で、98%以上の減少を認めた。発作の抑制は L-NNA と 3Br-7NI の両方で認め、強直性痙攣から間代性痙攣への抑制を認めた(L-NNA と 3Br-7NI との間での有意差は認めなかった)。抗痙攣剤、diazepam あるいは phenytoin を前投与することによる NO 産生量の変化についても検討した。これらの前投与により PTZ80mg/kg の投与にもかかわらず強直性痙攣は抑制された。間代性痙攣は認められた。また NO 産生量も完全にではないが減少した。

「考察」 てんかんにおける NO の役割は未だ不明である。動物実験においては、NO は痙攣を抑制するとともに促進するとともにその両方が推察されていたが、それらは NO 産生を実際に測定したものでなかった。今回我々は(DETC)<sub>2</sub>-Fe-NO complex を L-band EPR で測定することにより、マウスの生体内での NO 産生を直接検討することが可能であった。痙攣を誘発した例において NO レベルが上昇していることが確認できた。

生体内および生体外 EPR により、強直性痙攣例において間代性痙攣例より NO が多量に産生されていることが確かめられた。NOS 阻害剤の投与により NO 産生量の減少が認められ、また間代性痙攣から強直性痙攣への移行が抑制された。Diazepam 及び phenytoin も痙攣を抑制したが、NO の産生は完全には抑制しなかった。NO 産生量が著明に減少している例でも間代性痙攣が見られており、少なくとも PTZ 投与例においての間代性痙攣の発生には NO の直接の関与が必要ではないことが示唆される。また 3Br-7NI は血管脳関門を通過しやすく、L-NNA より効力が強いと考えられる。また抗痙攣剤の投与により NO 産生量が減少したことからも、NO が痙攣発作の結果、脳内の NOS により産生されているということが推察される。また NOS 抑制剤の投与により強直性痙攣発作が抑制されたということから、産生された多量の NO が強直性痙攣の誘発に重要な役割を示していることも推察される。

今回我々が強直性痙攣で認めた NO の量は、敗血症性ショックの際に認められるものと同レベルであった。将来的には NO の産生部位を視覚化するために EPR imaging が行われることも可能と考えられる。

「結論」 NO は間代性痙攣を直接的に誘発しないが、痙攣発作の結果として生成される。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 山 司

副 査 教 授 宮 坂 和 男

副 査 教 授 吉 岡 充 弘

学 位 論 文 題 名

## Consequences of Nitric oxide Generation in Epileptic-Seizure Rodent Models as studied by In vivo EPR

(生体内電子常磁性共鳴法によるてんかん発作げっ歯類モデルにおける  
一酸化窒素生成に関する研究)

一酸化窒素(NO)は脳内細胞間情報伝達物質として約10年前に初めて確認された。NOはNO synthase(NOS)によりL-arginineから生成され、周囲に拡散する。NOSは特にN-methyl-D-aspartate(NMDA)レセプター刺激により活性化され、産生されたNOはguanyl cyclaseを誘導し細胞内のcyclic GMPを増加させる。NOのてんかんへの関与について未だ統一した見解は認められていない。本研究では、生体内および生体外電子常磁性共鳴法(electron paramagnetic resonance:EPR)により、pentylentetrazole(PTZ)を投与したマウスおよびラットの発作時の脳内でのNO産生の計測を行った。対象として、Wister種の雄ラット(120-150g、8週)およびICR雄マウス(15-20g、4週)を用いた。NO-trapping剤としてdiethyldithiocarbamate(DETC)および鉄クエン酸複合体をPTZ投与の30分前に投与した。NOS阻害剤前投与の実験に際してはL-NNA( $N^G$ -nitro-L-arginine)またはL-NMMA( $N^G$ -monomethyl-L-arginine)または3Br-7NI(3-bromo-7-nitroindazole)を、抗痙攣剤の実験に際してはdiazepamまたはphenytoinをPTZ投与の30分前に投与した。L-band生体内EPRにおいては、PTZ投与後の発作を観察した後pentobarbitalを投与して鎮静し測定した。X-band生体外EPRでの脳組織内のNO濃度の測定に際しては、PTZ投与後に発作を観察した後、大脳皮質、小脳、嗅球、海馬、及び視床下部の一部を摘出した。結果として、強直性痙攣を起こした例においてはX-band生体外EPRで3峰性のスペクトルが明瞭に認められ、このスペクトルはNOS阻害剤の前投与により抑制された。間代性痙攣を起こした例でも同様のスペクトルを認めたがNO産生量は強直性痙攣の例に較べ明らかに少なかった。L-band生体内EPRでもX-band生体外EPRと同様のスペクトルが観察された。間代性痙攣例においては強直性痙攣例に比べて信号が低かった。NOS阻害剤の前投与によりこれらは抑制された。NOS阻害剤によるNO産生量および発作の変化についてX-band生体外EPRにより検討した。L-NNAにより

NO 産生量は 30%以下に、3Br-7NI では 98%以上の減少を認めた。発作については L-NNA と 3Br-7NI の両方で強直性痙攣から間代性痙攣への抑制を認めた。抗痙攣剤の前投与についても検討した。これらにより強直性痙攣は抑制され、間代性痙攣は認められた。NO 産生量は減少した。このように今回の実験では(ETC)<sub>1</sub>-Fe-NO complex を EPR で測定することにより、生体内での NO 産生を直接検討することが可能であった。痙攣を誘発した例において NO レベルが上昇し、強直性痙攣例において間代性痙攣例より NO が多量に産生されていることが確かめられた。NOS 阻害剤の投与により NO 産生量の減少が認められ、また強直性痙攣が抑制されたことから、産生された NO が強直性痙攣の誘発に重要な役割を示していることが推察される。また NO 産生量が著明に減少している例でも間代性痙攣が見られており、間代性痙攣の発生には NO の直接の関与が必要ではないことが示唆される。また抗痙攣剤の投与により NO 産生量が減少したことから、NO が痙攣発作の結果として産生されていると推察される。結論として、NO は間代性痙攣を直接的に誘発しないが、痙攣発作の結果として生成されることが考えられる。

口頭発表に際し、副査の吉岡充弘教授から、EPR の定量測定やスペクトルが NO に由来するものと考えた根拠、PTZ の機序および選択した理由、他の痙攣モデルでの予測、NO による生体への影響、NOS 阻害薬の臨床応用についての質問があった。副査の宮坂和男教授から、NO 産生量の部位における差異、低磁場 MRI 装置を用いて EPR の画像化について、次いで主査の小山司教授から、スピントラップ剤による NO の捕捉率、pentobarbital の影響、今後の課題について質問があった。申請者は実験結果や他の研究報告などを引用し概ね妥当な回答を行った。

この論文は、直接計測することが困難であった脳内の NO 産生量を EPR スペクトロスコピーにより検出して定量化し痙攣発作との関連を考察している点で高く評価され、今後のてんかんに対する研究への応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。