

## 審査の結果の要旨

熱性けいれんフェノタイプに対する GABA<sub>A</sub> 受容体賦活薬の影響に関する検討

氏名 笠原 由佳

笠原由佳は、熱性けいれんモデルマウスを用いて行動学的解析及び電気生理学的解析を行い、GABA<sub>A</sub> 受容体賦活薬の影響について評価した。

熱性けいれんは乳幼児にとって最も一般的なけいれんである。多くの場合 38 °C以上の発熱を伴い、特に 6 ヶ月-5 歳の時期に多く発症する。その罹患率は全世界で 2-14 %に上り、将来的な脳機能に対する影響が懸念されている。

熱性けいれんは単純型と複雑型に分類される。単純型は、一般的に予後が良好である。一方、複雑型は、その後のてんかん発症に関与する可能性が示されている。このため、複雑型熱性けいれん発症時の迅速かつ適切な治療が期待される。

熱性けいれんは成人のけいれんと同様、主に、抑制性神経伝達物質である  $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) の作用を増強する GABA<sub>A</sub> 受容体賦活薬によって治療される。この理由は、GABA の抑制性作用の増強により、熱性けいれん発症時の神経回路の過剰な興奮が緩和され、症状が改善されると考えられているためである。しかしながら、複雑型熱性けいれんにおいて GABA<sub>A</sub> 受容体賦活薬による十分な治療効果が得られない場合があること、及び、副作用が生じ得ることが臨床研究により報告されている。この一因として、GABA の作用が発達に伴って変化することが考えられる。すなわち、GABA は成熟した神経細胞を過分極させるが (GABA の抑制性作用)、未熟な神経細胞を脱分極させる (GABA の興奮性作用)。このため、乳幼児期に生じる熱性けいれんに対して GABA<sub>A</sub> 受容体賦活薬を用いた場合、神経回路の興奮をさらに亢進し、熱性けいれんを悪化させる可能性が考えられる。しかし、GABA<sub>A</sub> 受容体賦活薬が熱性けいれんに与える影響の詳細は不明である。この理由として、影響の評価指標が多様であること、及び、評価するための測定技術の適応が熱性けいれん発症時において困難であることが挙げられる。そこで、本研究では熱性けいれんモデルマウスを用い、多様な評価指標によりまず、GABA<sub>A</sub> 受容体賦活薬によるけいれんフェノタイプへの影響を評価し、次に新規局所場電位記録法を確立し、GABA<sub>A</sub> 受容体賦活薬による神経活動への影響を評価した。

本研究では、各種熱性けいれんモデルの中でも再現性の高いヘアドライヤーモデルを採用し、長時間持続、反復する発作を生じさせることで複雑型熱性けいれんを模倣した。生後 11、14 日齢のマウスをヘアドライヤーにより誘導した高温条件に暴露した。直腸温を 39.5 °C以上に 30 分間維持し、複雑型熱性けいれん様の発作を誘導した。GABA<sub>A</sub> 受容体賦活薬として、ベンゾジアゼピン系であるジアゼパム (0.1 mg/kg, 1.0 mg/kg) 及びバルビツール酸系であるペントバルビタール (0.37 mg/kg, 37 mg/kg) を用いた。さらに、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>共輸送体アイソフォーム 1 (NKCC1) 阻害薬であるブメタニド (10 mg/kg) を使用した。熱性けいれん誘導 15 分前に薬剤を投与し、間代性発作の発生率、生じるまでの潜時及び体温閾値、持続時間を測定した。

3D プリンターにより印刷、設計した記録電極及び基盤を組み立て、生後 10 日齢のマウスの大脳皮質 (AP: -1.9 mm, LM: 0.9 mm, DV: 1.0 mm) に埋め込んだ。翌日、薬剤投与 15 分後に複雑型熱性けいれん誘導条件下における局所場電位記録を行った。薬剤は、GABA<sub>A</sub> 受容体賦活薬であるジアゼパム (1 mg/kg) 及びペントバルビタール (37 mg/kg)、NKCC1 阻害薬であるブメタニド (10 mg/kg) を使用した。GABA<sub>A</sub> 受容体賦活薬の投与により、最も大きな変化が生じた熱性けいれん誘導開始 10 分間について解析を行った。

発作行動の中でも視覚的に明らかである間代性発作 (四肢の屈伸、伸長を繰り返し、ガタガタとふるえる発作) に着目し、その発症率、潜時、体温閾値、持続時間を評価指標とした。

まず、熱性けいれんに対する感受性を評価するため、間代性発作の発症率、潜時、体温閾値を測

定した。生後 11 日齢のマウスにおいて、間代性発作の発生率はコントロール群で 100%であった。0.1 mg/kg ジアゼパムを投与した場合、発生率は 0%となった。一方、1.0 mg/kg ジアゼパム、0.37 mg/kg、37 mg/kg ペントバルビタールを投与した場合、コントロールに比べて発生率は減少しなかった。さらに、1.0 mg/kg ジアゼパム及び 37 mg/kg ペントバルビタールは潜時を短縮し、体温閾値を低下させた。

熱性けいれんの重篤度を評価するため、間代性発作の持続時間を測定した。ジアゼパムは持続時間を減少させなかった。また、37 mg/kg ペントバルビタールは持続時間を延長させた。

次に、GABA<sub>A</sub> 受容体賦活薬によるけいれんフェノタイプへの作用が GABA の興奮性作用に起因するものか検討した。GABA の作用は、細胞内の Cl<sup>-</sup>濃度により厳密に制御される。乳幼児期に多い未成熟な神経細胞では、Cl<sup>-</sup>を細胞内に流入させる NKCC1 の発現率が高く、GABA が興奮性に作用する一因となっている。そこで、NKCC1 阻害薬であるブメタニドを用い、GABA の作用について検討した。この結果、ブメタニドの単独投与、または 1 mg/kg ジアゼパムもしくは 37 mg/kg ペントバルビタールと共投与した場合、間代性発作の発生率が低下した。さらに、37 mg/kg ペントバルビタールにより延長した間代性発作の持続時間はブメタニドの共投与により短縮した。

最後に、高濃度の GABA<sub>A</sub> 受容体賦活薬によるけいれんフェノタイプへの影響が、発達の問題に関与するか検討した。生後 11 日齢よりさらに発達した生後 14 日齢のマウスを用い、複雑型熱性けいれんを誘導した。間代性発作の発生率はコントロール群で 60%であり、1.0 mg/kg ジアゼパムもしくは 37 mg/kg ペントバルビタールを投与した場合、ブメタニドの共投与の有無に関わらず、発症率は 0%となった。

次に、GABA<sub>A</sub> 受容体賦活薬が神経活動に与える影響について検討した。このために、まず、熱性けいれんモデルマウスにおいて *in vivo* 局所場電位記録法により、大脳皮質における神経活動を記録する系を確立した。この理由は、乳幼児期のマウスは従来の記録電極に比べて小さく、頭蓋骨も脆弱であるため、既存の記録系の適応が困難であるからである。3D プリンターを用いてより小型かつ軽量化した記録電極や基盤を新たに設計・印刷することで、乳幼児期マウスにおける局所場電位記録を可能にした。さらに、高温条件誘導装置と組み合わせ、熱性けいれん誘導下における局所場電位記録システムを確立した。また、記録データを解析するにあたって、神経活動を抽出するための新たな指標を確立した。自由行動下における局所場電位記録時には、神経活動由来ではなく身体の動きに由来した電位の変動（ノイズ）が生じる。間代性発作などの激しい発作行動を伴う際、顕著な神経活動の上昇がみられるため、従来の研究ではこの特徴的な電位変化についてのみ着目し、行動によるノイズを除去していないものが多い。本研究では、生じた電位変化の立ち上がり時間 ( $200 \text{ ms} \leq \Delta t \leq 10 \text{ ms}$ ) や傾きの程度 (正のピークの数 / 負のピークの数  $> 2$ ) によって行動由来のノイズを分離・除去することで、熱性けいれん誘導中におけるより正確な神経活動の観察及び評価を可能にした。

確立した新規局所場電位記録システムを用い、GABA<sub>A</sub> 受容体賦活薬が熱性けいれん誘導中の神経活動に与える影響について検討した。高濃度の GABA<sub>A</sub> 受容体賦活薬の投与により、熱性けいれん誘導初期において振幅の大きな神経活動の発生が認められた。実際に振幅の大きさを定量すると、ジアゼパム群で振幅の増加傾向がみられ、ペントバルビタール群で優位に増加した。こうした増加傾向及び増加は、ブメタニドの共投与により抑制された。3 mV 超の特に大きな振幅を持つ神経活動をてんかん様脳波と定義した。てんかん様脳波の生じやすさを評価するため、最初にてんかん様脳波が生じるまでの潜時を測定した。この結果、ジアゼパム及びペントバルビタールは潜時を短縮することが明らかとなった。次に、てんかん様脳波の発生回数を測定した。発生回数はジアゼパム及びペントバルビタールにより増加した。これらの増加はブメタニドの共投与により抑制された。今回用いた評価指標においてブメタニド単独による影響は認められなかった。

GABA<sub>A</sub> 受容体賦活薬は熱性けいれんの主な治療薬であり、数々の臨床研究でその有効性が報

告されている。しかし、いくつかの研究では、複雑型熱性けいれんに対する有効性について疑問が呈されている。このように議論が分かれる要因として、調査を行った標本の年齢や性別、遺伝系統などの背景、評価指標の差異が挙げられる。そこで、本研究ではモデルマウスを用いることでこれらの背景を均一化し、多様な指標に基づき、GABA<sub>A</sub> 受容体賦活薬が複雑型熱性けいれんに与える影響について詳細に評価した。まず初めに、けいれんフェノタイプへの影響について検討した。本研究では、高濃度のジアゼパム及びペントバルビタールにより間代性発作の発生率が減少しないこと、潜時が短縮し、体温閾値が低下することを明らかにした。これらの結果から、高濃度のジアゼパム及びペントバルビタールは複雑型熱性けいれんへの感受性を増加させることが示唆される。さらに、ジアゼパムによる間代性発作の持続時間の短縮は認められず、高濃度のペントバルビタールによる持続時間の延長が認められた。これらの結果から、高濃度のジアゼパムは複雑型熱性けいれんの重篤度を改善しないこと、高濃度のペントバルビタールはより悪化させることが示唆される。以上から、高濃度のジアゼパム及びペントバルビタールが複雑型熱性けいれんのけいれんフェノタイプを増悪させることを明らかにした。一方、低濃度のジアゼパムにより間代性発作の発生率が減少したことから、高濃度の GABA<sub>A</sub> 受容体賦活薬では鎮静作用が過剰となり、熱の発散が抑制され、けいれんフェノタイプが悪化した可能性も考えられる。GABA<sub>A</sub> 受容体賦活薬がけいれんフェノタイプを悪化させる原因として、GABA が興奮性に作用することが考えられる。ジアゼパムもしくはペントバルビタールと NKCC1 阻害薬であるブメタニドを共投与することにより、間代性発作の発生率が減少した。さらに、ブメタニドの投与により、ペントバルビタールによって延長した間代性発作の持続時間が短縮した。これらの結果は、ジアゼパム及びペントバルビタールによるけいれんフェノタイプの増悪が NKCC1 の阻害によって抑制されることを示唆する。本研究により、GABA<sub>A</sub> 受容体賦活薬が GABA の興奮性作用を増強し、複雑型熱性けいれんのフェノタイプを悪化させる可能性が示された。

高濃度の GABA<sub>A</sub> 受容体賦活薬は生後 14 日齢において、複雑型熱性けいれんの発生を阻害した。また、生後 11 日齢で認められた高濃度のペントバルビタールによる間代性発作の持続時間の増加は、生後 14 日齢において認められなかった。以上の結果から、GABA<sub>A</sub> 受容体賦活薬の作用が発達に伴って変化することが示唆される。高濃度 GABA<sub>A</sub> 受容体賦活薬による複雑型熱性けいれんへの感受性の増加、及び、熱性けいれんの重篤化には発達に伴う GABA の作用変化が関与することが考えられる。

熱性けいれんの発作時に過剰な神経活動が生じ、てんかん様の脳波が発生することが報告されている。しかし、熱性けいれん発症時に脳波記録を行った臨床研究は極端に少なく、GABA<sub>A</sub> 受容体賦活薬が発作時の神経活動に対して与える影響は不明である。この原因として、ヒトにおける熱性けいれん発症時期の予測が不可能であることが挙げられる。このため、薬理的検討を十分に行うためにはモデル動物の利用が不可欠である。しかしながら、熱性けいれんモデルマウスにおいても神経活動に関連する知見は非常に少ない。なぜなら、乳幼児期のマウスは従来の記録電極に比べて小さく、頭蓋骨も脆弱であるため、電極や基盤の設置や固定が困難であるからである。本研究では、まず、熱性けいれんモデルマウスにおける *in vivo* 局所場電位記録法を確立した。さらに、確立した新規局所場電位記録法を用い、GABA<sub>A</sub> 受容体賦活薬が神経活動に与える影響について検討した。これにより、熱性けいれん誘導初期において、神経活動の振幅の大きさがジアゼパムの投与により増加する傾向があること、ペントバルビタールの投与により増加することを明らかにした。以上の結果は、GABA<sub>A</sub> 受容体賦活薬が複雑型熱性けいれん発症時の神経活動を亢進することを示唆する。また、ジアゼパム及びペントバルビタールがてんかん様脳波の潜時を短縮したこと及び、発生回数を増加させたことから、GABA<sub>A</sub> 受容体賦活薬によりてんかん様脳波が生じやすくなることが示唆される。ジアゼパム及びペントバルビタールの影響がブメタニドの共投与により抑制されたことにより、GABA<sub>A</sub> 受容体賦活薬は GABA の興奮性作用を増強し、複雑型熱性けいれん発症時の神経活動を亢進すると推測される。

本研究ではまず、GABA<sub>A</sub> 受容体賦活薬がけいれんフェノタイプに与える影響について検討し、

次に、熱性けいれんモデルマウスにおける電気生理学的計測法を確立し、GABA<sub>A</sub>受容体賦活薬が神経活動に与える影響について解析した。本研究から、GABA<sub>A</sub>受容体賦活薬が熱性けいれんのフェノタイプを増悪させることが示唆された。これらの作用がNKCC1阻害薬により抑制されたことから、GABA<sub>A</sub>受容体賦活薬の影響はGABAの興奮性作用の増強に起因すると考えられる。本研究により得られた知見は、熱性けいれんの新規治療ガイドラインの確立に繋がることが期待される。

よって本論文は博士（薬学）の学位請求論文として合格と認められる。