

令和 6 年 5 月 11 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06702

研究課題名（和文）周産期の抗てんかん薬による児脳発達リスク軽減に対するDHA摂取補完療法の基礎研究

研究課題名（英文）Basic research on complementary DHA intake therapy to reduce the risk of infant brain development

研究代表者

伊藤 康一（Itoh, Kouichi）

徳島文理大学・薬学部・特別研究員

研究者番号：30291149

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：複雑性熱性けいれん（CFS）後てんかん発症の可能性とDHAの効果を検討するため、生後10日のマウスをヒートチャンバー法による熱性けいれん誘発に対するDHAの効果、さらにCFSから離乳時までDHA投与マウスの成獣期の、低用量ペンチレンテトラゾール（PTZ）誘発発作感受性をビデオ脳波測定により観察した。CFSマウスは熱性けいれん後てんかんモデルマウスの可能性が示された。DHAの母乳経路摂取により、PTZ誘発発作感受性が抑制された。DHAはCFS発作1週間のミクログリア活性化を抑制することにより脳内炎症等から脳を保護し、その後のてんかん発症を予防することに貢献する可能性が示唆されました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

熱性けいれんは、生後6か月から5歳までの小児に頻繁に起こる。多くの場合熱性けいれん発症後、特に問題がない単純性熱性けいれん（SFS）と、その後に側頭葉てんかん発症のリスクが2～7倍高くなる複雑性熱性けいれん（CFS）に分類される。そのためCFS後てんかん発症を予防するには、CFS後の適切な対応が重要となる。CFS後（てんかん原性期）の脳内で何が起きているかを理解することがCFS後てんかん発症の予防治療の可能性の足がかりとなる。本研究では、DHAはCFS発作後1週間の脳内ミクログリア活性化を抑制することが、DHAがCFS発作直後から脳を保護し、その後のてんかん発症を予防することに貢献する。

研究成果の概要（英文）：We investigated the possibility of epilepsy onset after complex febrile seizures (CFS) and the effect of DHA in infant. In order to study with the effect of DHA, we used the heat chamber method in mice 10 days after birth on febrile seizure induction, and observed susceptibility to low-dose pentylentetrazol (PTZ)-induced seizures in adulthood using video electroencephalography. In this study, CFS mice have been shown to have potential as a model mouse for post-CFS epilepsy. Ingestion of DHA via breast milk suppressed CFS in infant and PTZ-induced seizure susceptibility in adult. This research project has been suggested that DHA protects the brain from intracerebral inflammation by suppressing microglial activation during the first week of a CFS attack, and may contribute to preventing the post-CFS epilepsy.

研究分野：神経薬理学

キーワード：熱性けいれん ドコサヘキサエン酸 小児 ペンチレンテトラゾール 脳波

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

てんかんは、有病率約1%という一般的な脳神経疾患の一つである。その中で妊婦への AED の使用は、全妊婦の 2%にも及んでいる。女性が周産期(妊娠期、授乳期)に一番不安に感じるのは、「健康な子どもが生まれるかどうか」と言うことであり、特にてんかん患者では服薬を継続することの児への影響(その内 50%以上が催奇形性)に対する懸念である。また、最近の研究では、妊娠期間中に子宮内で AED に暴露された児の 3 歳と 6 歳での IQ スコアが低下していること、自閉症スペクトラム障害(ASD)発症リスクが上昇していることが報告され、さらに不安が増えることとなった。このため妊娠自体を諦めたり、妊娠中の AED 服薬を自己中止したりすることがあるが、安易な退薬は症状の悪化につながるだけでなく、発作による児へのリスクを上昇させるなど、多くの悪影響をもたらす。単剤使用できる新規 AED(ラモトリギン、レベチラセタム(LEV))は、周産期であっても問題なく服用できるため、女性は発症初期から、または拳児希望者にはそれらの AED を使用することも推奨されている(てんかん診療ガイドライン 2018)。しかし、てんかん治療は個々の患者に対応した AED 選択が重要であるため、必ずしも児に影響が小さい AED が使用できるとは限らない。特に、VPA は AED 以外にも片頭痛予防薬、気分安定薬など様々な適応があり非常に優秀な薬剤である一方、妊婦への適用は、児への影響(先天奇形高発現、IQ・認知機能低下、ASD 発症リスク上昇)を考えると慎重でなければならない。現在、その対応策として VPA を低用量にすることが推奨されているが、発作抑制効果との兼ね合いもあり、難しい場合が多い。催奇形性に対しては、葉酸の補充療法が推奨されているが、IQ 低下や ASD 発症リスクに対する対処法はない。そこで本研究課題では、AED 服用中の女性が児に対し安心できる周産期の補充療法として、胎児・新生児脳神経回路形成における ω -3 PUFA である DHA 摂取の効果を検討する。 ω -3PUFA は、中枢神経系の発育や成熟に必要な不可欠な物質であり、小児の注意欠陥多動性障害(ADHD)や ASD における効果が既に数多く報告されている。特に DHA は、脳内の全脂肪酸の 26.7%、PUFA の 60%を占め、脳機能にとって必須の物質である。主に神経新生、シナプス形成、神経突起伸長・分岐に関与している。また、細胞膜構成成分として細胞膜の流動性を変化させることで、イオンチャネルや G タンパク質共役型受容体を介した情報伝達を調節する。さらに、アラキドン酸カスケードと拮抗することで抗炎症作用を発揮し、ミクログリアに作用して脳内炎症を抑える。また、酸化ストレスによる認知機能低下や、神経損傷(シナプス消失、神経細胞死)に対し、抗酸化作用により脳機能低下を軽減する可能性も示唆されている(Crit Rev Biotech. 2017,37:579)。一方、体内ではほとんど合成できず、脳内枯渇したときすぐに補充するのは難しいので、食事等から常に必要量摂取しておかなければならない。食事での脂肪は、エネルギー、脂溶性ビタミン、必須脂肪酸供給が基本であり、妊婦・幼児の栄養においては、特に DHA などの ω -3PUFA の重要性が着目されている。母親が食事等で摂取した DHA は、胎盤及び母乳を介して児に供給され、その量は母体の血中濃度に依存する。特に中枢神経系細胞膜への取り込みは、主に妊娠第三期(28 週~)と生後 1 年間におこる (Early Hum Dev. 1980,4:131)。DHA の脳内への取り込みは、血液脳関門(BBB)に存在する特異的トランスポーター(Mfsd2a)機構によることが報告された(Nature 2014,509:503)。DHA は、胎児・新生児脳の発達に重要な栄養素の一つであり、その不足が、脳神経発達障害をもたらす可能性がある (Am J Clin Nutr. 2001,73: 807)。つまり、周産期に DHA を適切に補充することで、AED による児の脳神経発達異常を抑えられる可能性がある。申請者は既に、DHA の新しい作用機序として、DHA 摂取による脳内エストロゲン(E2)合成酵素経路を介した脳内 E2 量の上昇が、神経の異常活動性を抑制することを明らかにした(Sci. Rep. 2017, 7:6268-6278)。脳内 E2 は、神経細胞保護作用などを持つことが報告されている。しかし、DHA の脳機能改善作用や神経保護効果を説明するには十分でなく、DHA の作用を媒介するメディエーターの存在が示唆される。

本研究課題では、乳幼児で頻発する熱性けいれんに着目し、熱性けいれん発症と熱性けいれん後てんかん発症に対する DHA の効果に着目した。熱性けいれんは、発熱を伴うけいれんで生後 6 か月から 5 歳までの小児に頻発に起こります。多くの場合熱性けいれん発症後、特に問題がない単純性熱性けいれんと、その後側頭葉てんかん発症のリスクが 2~7 倍高くなる複雑性熱性けいれんに分類されます。そのため複雑性熱性けいれん後のてんかん発症を予防するには、熱性けいれん後の適切な対応が重要となります。複雑性けいれんは全身のけいれん発作が 15 分以上続く、または 24 時間以内に発作が 2 回以上、さらに約 30 分以上持続するけいれん重積状態を誘発されることがある。このことから、複雑性けいれん発症後、つまりてんかん原性期に、適切な処置をすることが重要です。また、複雑性熱性けいれん発症後の脳内で何が起きているかを理解することが複雑性熱性けいれん発症後てんかん発症の予防治療の可能性の足がかりとなる。この複雑性熱性けいれん発症期は乳幼児期であり、薬学的介入よりは栄養学的介入が有用であると考えた。

2. 研究の目的

妊娠後期から若年期は児の脳神経発達に重要な時期であり、脳の成長に伴い大量の DHA が必要となることから、DHA は児の脳神経発達に重要な役割を担っていると考えられる。そこで、本研究では、乳幼児で頻発する熱性けいれんに着目し、熱性けいれん発症と熱性けいれん後てんかん発症に対する DHA の効果を明らかにすることで軽減補充療法への道に繋がる臨床応用を目指した基礎的研究を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

3-1 妊娠期特別飼料投与マウスの飼育方法：確定妊娠 (~胎生 9.5 日) ICR マウス (日本クレア) を購入した。確定妊娠 ICR マウスは、大豆油含有飼料 (コントロール)、綿実油含有飼料、綿実油含有飼料に DHA を添加した飼料で飼育した。大豆油含有飼料、および綿実油含有飼料は AIN-93G [オリエンタル酵母工業株式会社] にそれぞれの油 (日清) を 7% (w/w) の含量で添加された特別飼料であり、綿実油+DHA 群には脂質全量の 4% (w/w) の Docosahexaenoic Acid (DHA、備前化成) を添加して調整した特別飼料である。これらの餌をマウスに与えて、12 時間明/暗サイクル環境下で飼育した。

3-2 熱性けいれん発症後 DHA 投与マウスの飼育方法：仔 (~生後 8.5 日) ICR マウス (日本クレア) を購入した。生後 10 日齢時の熱性けいれん誘導後から生後 20 日齢まで母親マウスと一緒に大豆油含有飼料(コントロール)、7% (w/w) 含量大豆油含有飼料 (AIN-93G) に 4% (w/w) DHA を添加した飼料で飼育した。

3-3 熱性けいれん誘導法：常温でのマウス直腸温を測定後、マウスを入れたガラスチャンパーを33°C設定で照射し、3分ごとに直腸温度を測定し38.5°Cを超えて42°Cになるまでにけいれん強度のスコアリング化を行い、けいれん非発症=高熱コントロール群 (HT)、けいれん1回発症=単純性熱性けいれん群 (SFS) とけいれん2回以上発症=複雑性熱性けいれん群 (CFS) に分類した。

3-4 熱性けいれん強度のスコアリング方法：

| STAGE | 症状 | 行動 |
|-------|-----------------------------|--------------------------|
| 0 | Normal | 正常 |
| 1 | Face wash | 前肢で顔(目や口)を洗う仕草 |
| 2 | Tail Shaiking | 尾に力が入っている(緊張している),尾が反り返る |
| 3 | Forelimb clonus | 前肢を擦り合わせる |
| 4 | Forelimb clonus and rearing | 立ち上がって前肢を擦り合わせる |
| 5 | Clonic convulsion | ひっくり返って四肢の収縮と弛緩の繰り返し |
| 6 | Tonic and clonic convulsion | ひっくり返って四肢の突っ張りの後、収縮と弛緩 |
| 7 | Unconsciousness | ひっくり返って無動 |

3-5 脳波 (EEG) 測定法：仔(-生後9日) ICR マウスの頭蓋骨に、ポリウレタンコーティングされたステンレス鋼ワイヤー(直径0.3 mm, UNIQUE MEDICAL, 東京, 日本)を右前頭皮質 (RF) 上と左前頭皮質 (LF) に電極を留置し、参照電極 (R) は LF 電極から 1 mm 前方に埋め込んだ。この電極をヘッドマウント (8235-SM, Pinnacle Tech., Inc. Lawrence, KS, USA) に接続し、歯科用セメントで固定した。

離乳後6週齢のマウスに、ステンレスビス電極をプレグマから3mm後方2mm左右側方にRF、LF、プレグマ左前方1mmにRに頭蓋骨に装着し、さらに頸部の筋電測定用電極をヘッドマウント(8235-SM)に接続し、歯科用セメントで固定した。ヘッドマウントを高ゲインブリアンプ(3チャンネル標準構成システム、8202-SE, Pinnacle Tech.)に接続して、2つの電極間の10個の差動ポイント(R-LF対R-RF)のEEG信号をPAL-8200 EEGソフトウェア(Pinnacle Tech.)で記録した。EEGデータは、1.0Hzのハイパスフィルタリングと100Hzのローパスフィルタリングを使用して400Hzでサンプリングした。同時にけいれん行動は、IPカラーカメラ(Vcam01, JSEED Inc. Japan)とPnPスーパークライアントの無料ソフトウェアを使用して30フレーム/秒で録画記録した。

3-6 CFS 発症後ペンテトラゾール誘発けいれん感受性：

GABA_A受容体遮断薬ペンテトラゾール (PTZ) 40 mg/kg 腹腔内投与後、下表のけいれん強度評価表に従いスコアリング化した。PTZ投与量では、正常動物においてけいれん発作(スコア3以上)を発症することはない。本投与量でけいれん発作が発症シユルことはPTZ誘発けいれん感受性が上昇(PTZけいれん発作閾値の低下)を示す。

| STAGE | 症状 |
|-------|-----------------------------------|
| 1 | 無動 |
| 2 | Twitch |
| 3 | 前肢間代性けいれん(まれに後肢) |
| 4 | 拳尾反応、前肢・後肢間代性けいれん発作、カンガルー様姿勢、後ずさり |
| 5 | 前肢・後肢間代性けいれん発作で倒れこみ、飛び跳ねる |
| 6 | 死亡 |

3-7 ビデオ EEG 測定：20分間ビデオ EEG 測定後、PTZを投与し20分間 EEG を測定し、同時にけいれんをビデオに録画しけいれん出現(強度)を観察した。

3-8 脳内DHA濃度の測定：大脳皮質のDHA含量は、Takemotoら (Brain Dev 2003;25:481-7) の方法に従って、Sgilrny 7890GC/5975MSD GC-MS system (Agilent, Santa Clara, CA, USA) - HP-INNOWAX capillary column (Agilent, 19091N-133I, Length: 30 m, Diam: 0.250 mm, Film: 0.25 lm)で測定した。

3-9 脳内エストロジオールの測定：大脳皮質17β-Estradiol含量は、Ishiharaら (Sci. Rep., 2017, 7:6268) の方法に従って測定した。

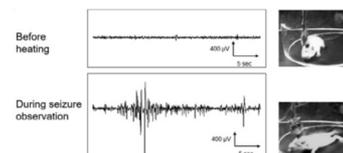
3-10 レトロゾール投与方法：けいれん感受性とエストロゲンとの関係性について検証するためにエストロゲン合成阻害薬であるレトロゾール (Let) をマウスへ投与した。投与する直前に、Letをメチルセルロース溶液 (20 mg/mL) に懸濁調整した。この溶液を10 mg/kgで腹腔内投与した。

3-11 フローサイトメトリーによる脳内ミクログリアの評価：大脳皮質を摘出後コラゲナーゼ (Sigma-Aldrich)で細胞分散し、氷上でCD11b FITC (1/50 dilution, Biolegend, San Diego, CA, USA, RRID:AB_312789)、CD45 PE (1/50 dilution, Biolegend, RRID:AB_312970)、CD68 PE/Cyanine7 (1/50 dilution, Biolegend, RRID:AB_2562948) で染色後、CytoFLEX S flow cytometer (Beckman Coulter,

Indianapolis, IN, U.S.A.)でミクログリアは CD11b⁺/CD45^{low}、とミエロイド(好中球、マクロファージ)は CD11b⁺/CD45^{high}、活性型ミクログリアはCD68⁺としてその発現を計測した。

4. 研究成果

4-1 熱性けいれん発作と脳波：体温38.5°C-42°Cで発症した熱性けいれんステージ5の状態時に EEGではslow and wave discharge (SWD) が出現した。

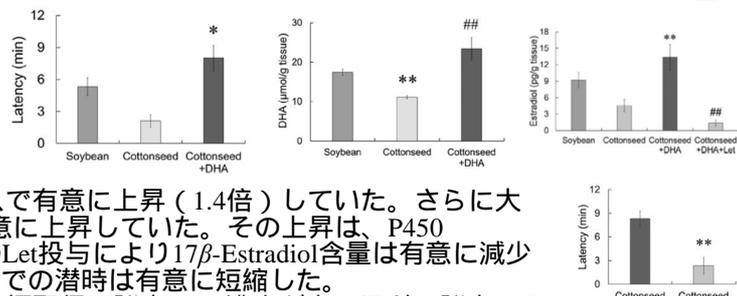


4-2 熱性けいれん発作とDHAとエストロジオール： DHA含有餌を摂取している母親から産まれた仔たちは、体温

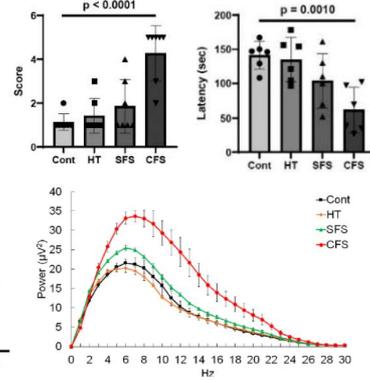
38.5°C~42°Cでけいれんが発症するまでの潜時は有意に延長した。さらに、けいれん発症する体温閾値は他の群に比べて有意に高くなった。そのマウスの大脳皮質でのDHA含量

は、DHAの母乳経路摂取マウスで有意に上昇（1.4倍）していた。さらに大脳皮質の17β-Estradiol含量も有意に上昇していた。その上昇は、P450 aromatase アロマターゼ阻害剤のLet投与により17β-Estradiol含量は有意に減少し、熱性けいれんが発症するまでの潜時は有意に短縮した。

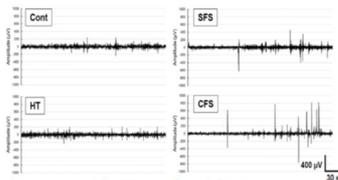
以上のことは、DHAの母乳経路摂取仔の脳内DHA濃度が高いほど、脳内エストロゲン依存的に熱性けいれん発症感受性・強度が顕著に低くなること示した。



4-3 CFS後のPTZけいれん閾値低下：熱性けいれん発症後8週齢時にPTZ（40 mg/kg）投与によるけいれん感受性及び強度の評価で、PTZ誘発けいれん強度はCFS罹患マウスで有意に上昇し、けいれん発症までの潜時は有意に短縮された。



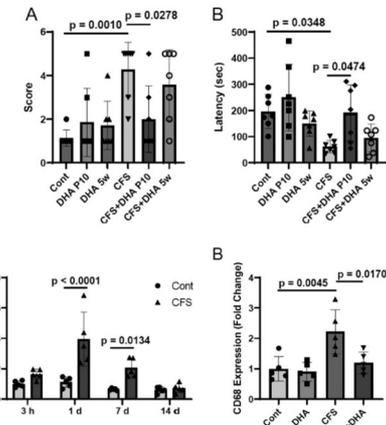
4-4 CFS後のPTZ誘発EEG： Spike数および、Amplitudeを計



測した結果、各群間でSpike数は有意な変化がないが、CFS後マウスのspike Amplitudeのみで有意の上昇を示した。さらにEEGの周波数帯域解析結果からCFS群で5Hzから16HzのPowerが高いことが示された。

4-5 DHA摂取でCFS後のPTZけいれん閾値上昇：CFS後から離乳時までのDHA母乳経路摂取した仔が8週齢まで成長した時に、PTZけいれん閾値の上昇（けいれん強度の低下、けいれん発作出現潜時の延長）を示した。つまり、CFS直後（離乳時までの約10日間）にけいれん準備性が形成されることが示唆された。

4-6 DHA摂取でCFS直後の脳内ミクログリア活性化：CFS直後1週間に仔マウス脳内ミクログリアが活性化し、その活性化はDHAの母乳経路摂取によりDHA群では無処置群レベルまでその活性化が制御された。DHAはCFS直後約10日間のミクログリア活性化を抑制することでCFSによる脳内炎症等から脳を保護し、その後のてんかん発症を予防することに貢献する可能性が示唆された。つまり、CFS後てんかん発症にいたらないためには、FS発症後早急な適切な対処を行いCFSにならないようになることが重要である。本研究から、CFSが発症した場合はCFS直後からDHAの栄養学的介入を考慮することが示唆された。しかし、本研究は動物モデルをベースにした研究であり、直接ヒトへの適用は投与量などの詳細な検討が必要であるが、AED等薬学的介入よりはるその検討へのハードルは低いと考えている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Kawano Shinji, Itoh Kouichi, Ishihara Yasuhiro | 4. 巻 46 |
| 2. 論文標題 Recent Advances in Understanding Nervous System Responses against Physical, Chemical, and Biological Stresses | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Biol. Pharm. Bull. | 6. 最初と最後の頁 1184-1193 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 川野真慈、石原康宏、伊藤康一 |
| 2. 発表標題 熱性けいれん後てんかんマウスの作製と ドコサヘキサエン酸(DHA)によるてんかん発症の予防 |
| 3. 学会等名 てんかん学会・第17回中四国支部会 |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|-------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 富永 貴志 (Tominaga Takashi) (20344046) | 徳島文理大学・神経科学研究所・教授 (36102) | |
| 研究分担者 | 石原 康宏 (Ishihara yasuhiko) (80435073) | 広島大学・統合生命科学研究所(総)・教授 (15401) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|