

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592099

研究課題名(和文)水溶性ビタミンE誘導体による外傷性てんかん発症予防の実証的研究

研究課題名(英文)Empirical studies on preventive measures of post-traumatic epilepsy using water-soluble vitamin E derivatives

研究代表者

横井 功(YOKOI, Isao)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：80150366

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：研究成果の概要(和文)：電子スピン共鳴法を使用し、 α -リポ酸誘導体(DHL)やビタミンE誘導体(ETS-GS)はヒドロキシルラジカルなどの活性酸素種やフリーラジカルを消去し、過酸化による脂質の分解を抑制することを示した。また、 ^{31}P -核磁気共鳴法を使用しETS-GSは脳虚血後の再灌流で発生する活性酸素種によるエネルギー代謝への障害を軽減することを見いだした。さらに、ヘモグロビンを使用して、より臨床病態に近い外傷性てんかんモデルラットを作成し、DHLのてんかん焦点形成予防効果を検討したが、DHLでは予防困難なことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)： This is a study of the effects of α -lipoic acid derivative (DHL) or vitamin E derivative (ETS-GS) on the peroxidation of neural membranes by hydroxyl radical, on the radical scavenging activities, on the brain energy metabolism, and on the occurrence of epileptic discharges in the hemoglobin (Hb) injected post-traumatic epilepsy model rats.

DHL or ETS-GS scavenged active oxygen species and radicals using electron spin resonance spectrometry with a spin trap, and inhibited the production of TBARS which is an index of membrane peroxidation. Therefore, DHL and ETS-GS would have a protective effect in brain from radical stress has been suggested. In the group 0.1mM administration of the ETS-GS, recovery rate of phosphocreatine 2 hours after post-ischemic reperfusion is significantly better using ^{31}P -nuclear magnetic resonance spectrometry. However, supplemented DHL (100mg/kg/day) into the diet for 7 months did not lower the percent induction of epileptic discharges.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：外傷性てんかん てんかん焦点形成予防法 ヘモグロビン 活性酸素消去剤 α -リポ酸誘導体 ビタミンE誘導体 核磁気共鳴(NMR)法 電子スピン共鳴(ESR)法

1. 研究開始当初の背景

頭部外傷の後などに起こるけいれんは、受傷後1週間以内に発生する早発けいれんとそれ以後に発生する晩発性てんかんとに大別され、早発けいれんを起こした者は晩発性てんかんを起こしやすいことが知られている。しかし、その発症機序は明らかではなく、予防対策も遅れていた。近年、動物モデルを使用した研究が進み、頭部外傷後に発症するけいれん発作や頭部外傷後遺症としてのてんかんの成因や発現機序についてしだいに明らかになりつつある。ネコやラットの脳に鉄塩を注入するとてんかん焦点が形成され、この部では活性酸素種や過酸化脂質の生成量が増加する。しかし、ビタミンEを投与しておくとも過酸化脂質の生成は抑制され、鉄塩誘導てんかん焦点は形成されないため、外傷性てんかんの成因には活性酸素種が深く関与していることが明らかになった。すなわち、頭部外傷の際に脳内に出血した赤血球より遊離したヘモグロビン(Hb)中に含まれる鉄イオンにより発生した活性酸素種は神経細胞膜を損傷して早発けいれんを起こして外傷性てんかんの焦点を形成すると考えられている。

つまり、発生した活性酸素種を消去すれば外傷性てんかんの発症は予防されることが示唆される。このため、我々は鉄イオンをラット大脳皮質に投与した外傷性てんかんモデルを使用し、ビタミンE・Cエステル、茶葉タンニンであるエピガロカテキンなどの活性酸素消去剤が細胞膜の脂質過酸化を防止し、早発けいれんの発症を抑制することを示した。さらに鉄イオン投与後活性酸素消去剤を投与し続けると6ヶ月後のけいれん発作発現頻度が抑制されることを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

以上に述べた如く、外傷性てんかんの発症機序をHb中に含まれる鉄イオンを媒介として発生した活性酸素種による神経細胞膜の酸化傷害ととらえると、発生した活性酸素種を消去すれば外傷性てんかん発症は予防できる。このため、本研究では、Hbをラット大脳皮質に注入した外傷性てんかんモデルラットを作成し、神経細胞のエネルギー代謝や細胞膜の過酸化傷害過程を、また、新規の合成したビタミンE、グルタチオン、タウリンをマレイン酸で結合した化合物であるETS-GSなどの活性酸素消去作用とけいれん発作発症抑制効果を検討する。ヘモグロビンを注入したより臨床病態に近いモデルを使用して、活性酸素消去剤によ

る外傷性てんかん焦点形成の予防対策を探ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 活性酸素種やラジカル種消去能の確認

活性酸素種やラジカル種はETS-GSや α -リポ酸誘導体のジヒドロリポイル-ヒスチジン亜鉛キレート化合物(DHL)とインキュベイトしDMPOや*g*-CYPMPPOによりトラップして電子スピン共鳴装置(ESR装置:日本電子社製JES-RE1X)で定量した。測定条件はマイクロウェーブ周波数:9.45GHz、中心磁場:335.8mT、変調幅:0.079mTとした。ヒドロキシルラジカル($\cdot\text{OH}$)はFenton反応(化学法)または希 H_2O_2 +UV照射(物理法)(ラジカルリサーチ社製RUVF-203SR UV illuminatorを使用)で、スーパーオキシドアニオン($\text{O}_2^{\cdot-}$)は濃 H_2O_2 +UV照射法で、アスコルビン酸ラジカル($\cdot\text{VC}$)はDMSOを用いた松本法で、ブタノールラジカル($\text{BuOO}^{\cdot-}$)は*t*-ブタノール+UV照射法で、メチルラジカル($\cdot\text{MEt}$)は希 H_2O_2 +DMSO+UV照射法で発生させて使用した。また窒素ラジカルとしてはDPPH安定ラジカル、NOC7法で発生させた一酸化窒素($\cdot\text{NO}$)を使用した。

脂質過酸化抑制効果の評価にはラット脳組織ホモジェネイトにDHLあるいはETS-GSを加え、ラジカル発生系と共にインキュベイトして脳組織中の脂質を過酸化した。脂質過酸化の最終産物のひとつであるマロンジアルデヒドとチオバルビツール酸(TBA)との付加物を535nmでの吸光度を測定するTBA反応物質法(TBARS法)を使用した。脂質の酸化物質としては化学法で発生させた $\cdot\text{OH}$ または Fe^{3+} +アスコルビン酸法で発生させたカーボンセンタードラジカル($\cdot\text{C}$)を使用した。ことにより定量して脂質過酸化抑制効果を評価した。

(2) 脳エネルギー代謝に対する影響

エーテル麻酔下にWistarラットを断頭し、摘出した大脳を厚さ400 μm のスライスにし、酸素化した灌流液(10mMブドウ糖+人工髄液、95% O_2 +5% CO_2 で飽和)中で十分に回復させた。リン核磁気共鳴分析装置(^{31}P -NMR装置:AMX-300、Bruker社)にセットし、アデノシン三リン酸(ATP)、クレアチンリン酸(PCr)、糖リン酸、無機リンは ^{31}P -NMRスペクトル曲線(加算回数64回、時間分解能4分)下の面積から、細胞内pHは無機リンのケミカルシフトから定量した。128分間の灌流後に灌流ポンプを64分間停止して脳スライスを虚血条件下に置いた。この後、再び灌流を行うと活性酸素種が発

生し脳のエネルギー代謝が障害されるが、虚血からの回復過程時に 192 分間高エネルギー燐酸の動態を観察した。

(3) 外傷性てんかんモデルラットでの検討

実験には 24 匹の雄 Sprague-Dawley ラット (SD: 体重 250 ~ 300g) を使用した。エチルエーテル麻酔下でラットを脳定位固定装置に固定し、ブレグマより尾側 1mm、左側方 1mm の大脳皮質内 (脳表より 1.7mm) に 15g/dl に溶解した Hb 溶液を $1 \mu\text{l}/\text{min}$ の速度で $5 \mu\text{l}$ (Fe 量 46nmol) 注入することにより、外傷性てんかんモデルラットを作成した。また、対照群のラットには生理食塩水を $5 \mu\text{l}$ 大脳皮質内に注入した。さらに、ブレグマより後方 4mm で左右側方 3mm の 2 部位に硬膜外ビス電極を固定し脳波記録用とし、さらに前頭洞正中部にビス電極を固定して不閉電極とした (図 1)。各電極は頭蓋骨に歯科用レジンで固定したコネクタに接続した。モデルラットは 4 群に分け、生理食塩水を注入し対照飼料 (MF) で飼育する対照群、DHL を 0.25% 含む飼料で飼育 (DHL 摂取量約 100mg/kg/day) する HDL 群、及び、Hb を注入して MF で飼育する Hb 群、DHL 飼料で飼育する Hb+DHL 群、の 4 群を作成した。この間、水は自由に摂取させた。

ヘモグロビン溶液注入の 3 日、7 日、1 月、3 月、7 月後に各群のラット脳波と行動を無麻酔無拘束でそれぞれ 45 分間観察した。脳波記録には日本光電社製脳波記録装置 (EEG-5200) を使用した。脳波は左後頭部電極 - 不閉電極、右後頭部電極 - 不閉電極の単極導出法で記録した。

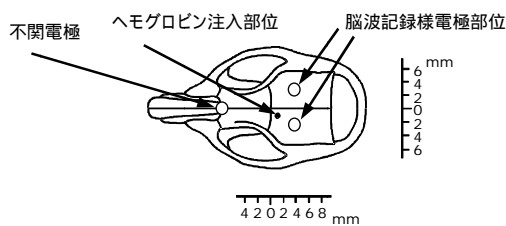


図 1 . Hb 溶液注入部位と電極位置

4 . 研究成果

(1) 活性酸素種やラジカル種消去能の確認

DHL は TBARS 法により $\cdot\text{OH}$ 酸化に対する抗酸化能が認められた (EC_{50} : 0.69mM)。しかし、 $\cdot\text{C}$ 酸化に対する抗酸化能は弱かった (EC_{50} : 21mM)。また、DHL は ESR 法で DPPH (EC_{50} : 0.14mM)、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ (EC_{50} : 2.1mM)、 $\text{BuOO}^{\cdot-}$ (EC_{50} : 9mM)、 $\cdot\text{VC}$ (EC_{50} : 2.1mM)、 $\cdot\text{NO}$ (EC_{50} : 0.09mM) を消去したが $\cdot\text{Met}$ は消去しないことが明らかとなった。しかし、化学

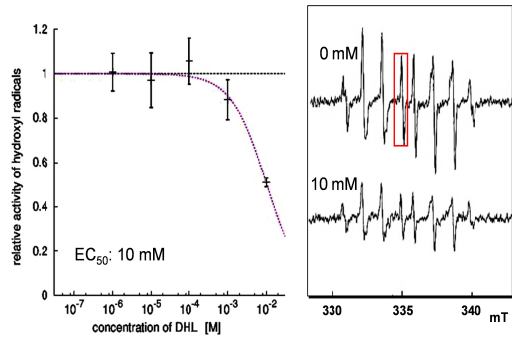


図 2 . DHL による $\cdot\text{OH}$ 消去能。 $\cdot\text{OH}$ は化学法で発生させ *g*-CYPMPPO によりトラップして測定した。右: ESR では 8 本ピークの波として観測された。赤枠で囲った 4 本目の波高から $\cdot\text{OH}$ 量を比較した。左: DHL は用量依存性に $\cdot\text{OH}$ を消去し、その EC_{50} は 10mM であった。

法で発生させた $\cdot\text{OH}$ に対しては弱い消去活性が認められたが (EC_{50} : 10mM、図 2) 物理法では 1mM 以上の濃度で $\cdot\text{OH}$ 量を *g*-CYPMPPO トラップ法でも DMPPO トラップ法でも増加させた。

DHL は 7 種中 6 種の活性酸素種やフリーラジカルに対して、濃度依存的な除去能を示した。一方 $\cdot\text{OH}$ にたいしては、その発生系や捕捉系によって、結果が異なる場合が認められた。以上の結果は DHL が自動酸化を促進するプロオキシダントの側面も有していることを示唆する。

ETS-GS も TBARS 法により $\cdot\text{OH}$ 酸化に対し抗酸化能を示す (EC_{50} : 7.5mM) が、 $\cdot\text{C}$ の酸化能には影響を与えなかった。また、ESR 法で ETS-GS には DPPH (EC_{50} : 0.77mM)、 $\cdot\text{OH}$ (EC_{50} : 17mM、図 3)、 $\cdot\text{VC}$ (EC_{50} : 16mM)、 $\text{BuOO}^{\cdot-}$ (EC_{50} : 1.8mM)、 $\cdot\text{NO}$ (EC_{50} : 2.7mM) に対する消去能が認められた。しかし、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ に対する消去能は弱かった (EC_{50} : 63mM)。

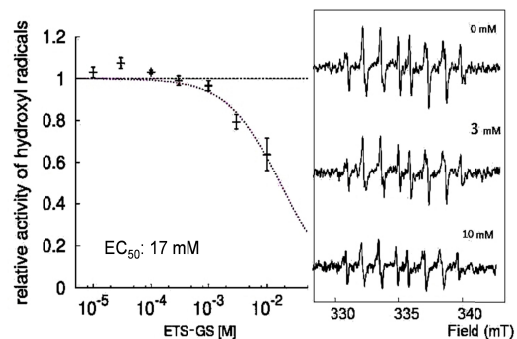


図 3 . ETS-GS による $\cdot\text{OH}$ 消去能。 $\cdot\text{OH}$ は化学法で発生させ *g*-CYPMPPO によりトラップして測定した。左: DHL は用量依存性に $\cdot\text{OH}$ を消去した。

(2) 脳エネルギー代謝に対する影響

脳内 PCr 量は虚血にすると減少し 96 分後にはほとんど 0 となった。灌流を再開すると 16 分後には虚血開始前の約 30% に回復し 2 時間後には虚血前の 90% に回復した。ETS-GS を 0.1mM 含む灌流液を使用すると脳組織中 PCr 量の回復は早く、再開直後で約 60%、2 時間後にはほぼ虚血前にもどった (図 4)。また、細胞内 pH は虚血により酸性に傾き (pH 6.9 → 6.2) 再灌流により回復するが、pH の回復も ETS-GS は促進した。しかし、0.01mM の ETS-GS にはこれらの効果は認められなかった (図 4)。以上の結果は虚血再還流で発生する活性酸素種が障害する PCr 合成系を ETS-GS が保護したことを示唆する。

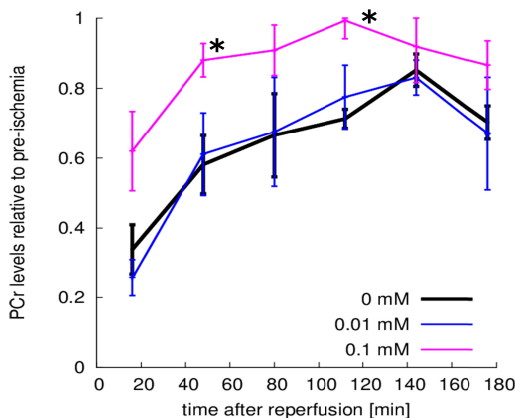


図 4 . 虚血後の脳内 PCr 量回復に対する ETS-GS の効果。横軸は再灌流開始時を 0 分とし、縦軸は灌流停止前の値との比。* : $p < 0.05$ vs. 0 mM .

(3) 外傷性てんかんモデルラットでの検討

餌の摂取量は約 35 ~ 65g/kg/day (DHL 摂取量 : 約 90 ~ 160mg/kg/day) と 4 実験群間

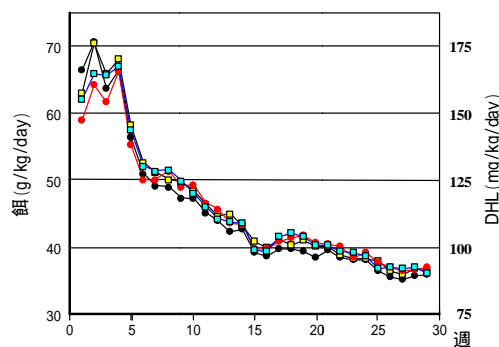


図 5 . 実験期間中のラットの餌摂取量と DHL 摂取量。餌の摂取量を左縦軸に、DHL 摂取量を右縦軸に示す。
; 対照群、■ ; DHL 群、■ ; Hb 群、■ ; Hb+DHL 群。各群 6 匹のラットの平均値として示す。

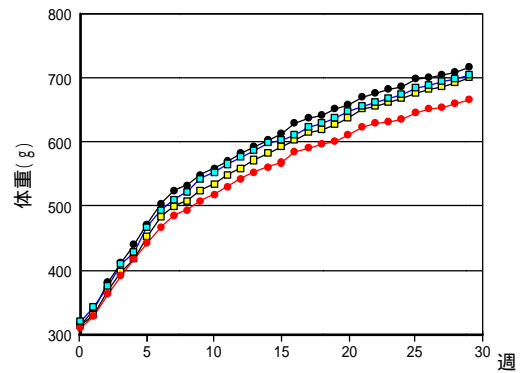


図 6 . 各群ラットの体重変化。体重を 6 匹のラットの平均値として示す。各群のシンボルは図 4 と同じ。

に有意な差は認められなかった。DHL 摂取量は実験期間を通じてラット一匹あたり約 60mg/day と一定であった。また、平均摂水量 (60 ~ 130ml/kg/day) や体重増加変化にも 4 群群の間に差は認められなかった (図 6)。以上の結果から DHL の長期投与はラットの摂餌量、飲水量、体重増加に大きな影響を与えないことが示された。

対照群ラットの脳波や行動は 7 ヶ月後にも何ら異常所見は認められなかった。一方 DHL 群のラット脳波には 3 ヶ月後から速波の混入が認められるようになり、7 ヶ月後にも半数のラットには高振幅速波の混入が認められた。しかし行動に特別な変化は認められなかった。

Hb を 750 μ g 投与し通常餌で飼育した Hb 群ラットの脳波には、投与 3 日後までの脳波にはスパイク活動などの異常脳波活動は認められなかった。しかし、7 日後よりは 7Hz の紡錘波様脳波活動にスパイク活動が混在し始め、1 ヶ月後より紡錘波状の群発する発作波が約 67% のラットに認められた (図 7)。歩行中のラットに発作波が出現するとラットは歩行を止め鼻先を少し挙上

Rat 5-2

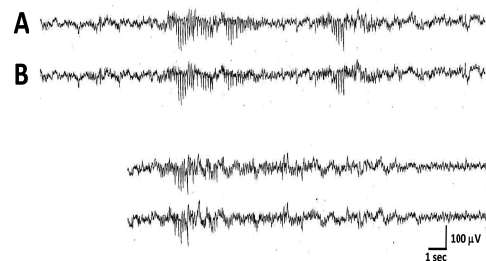


図 7 . Hb 群ラットの Hb 投与 3 ヶ月後の脳波。A : 左大脳皮質 (Hb 投与側) 電極 - 不関電極、B : 右大脳皮質硬膜外電極 - 不関電極の双極導出法による連続記録。

Rat 9-2

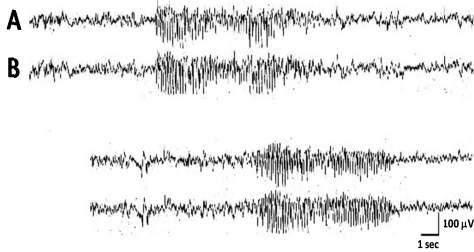


図8 .Hb + DHL 群ラットの Hb 投与 7 ヶ月後の脳波。A、B の記録法は図 7 に同じ。

して、洞毛を脳波に同期させてトゥイッチング様に震わせた。この時の発作波の前後は約 7 Hz の波であった。この脳波変化は 7 ヶ月後にも継続していた。一方、睡眠中のラットから記録された睡眠時紡錘波の前後の脳波は振幅が大きな除波で構成され、覚醒時の脳波とは明らかに異なっていた。また、紡錘波の記録中にはラットは頭部を動かさず、洞毛を震わせることも無く、発作発現時とは異なった脳波と行動が観測された。

他方、Hb 投与後に HDL 含有飼料で飼育した Hb + HDL 群では約 83% のラット脳波に 7Hz 陽性棘波で構成される発作性異常波が認められた(図 8)。以上の結果、HDL では外傷性てんかん発症を予防することは困難なことが明らかとなった。

(4) 研究結果のまとめ

頭部外傷の後などに起こる外傷性てんかんの成因には Hb に含まれる鉄イオンや酸素不足などが関与して発生する活性酸素種やラジカルが深く関与している。このため我々は活性酸素種やラジカルを除去することにより外傷性てんかん焦点の形成を阻止しようと各種化合物の活性酸素種やラジカルの除去活性やてんかん発作発現予防効果について調べてきた(図 9)。

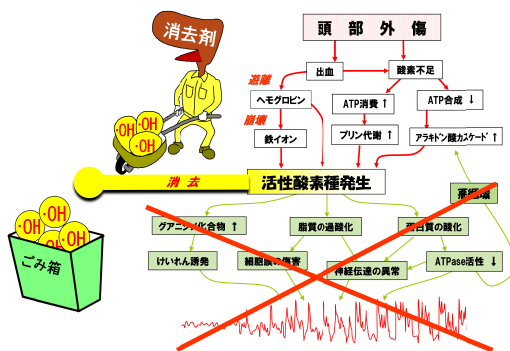


図 9 . 我々の取っている外傷性てんかん発症予防の戦略

今回我々が検討した DHL は各種の活性酸素種やラジカルに対し除去活性を示し、脂質が活性酸素種により過酸化され分解することを防止する効果も示した。しかし、脂質などに自動酸化を引き起こし酸化の悪循環を招く強い酸化物質である・OH 産生を増加させることが有ることも明らかとなった。また、DHL の慢性経口投与により脳波には高振幅速波の混入が認められた。しかしこの間にも行動に特別な変化は認められなかったが、脳波変化を起こす可能性は否定できない。さらに Hb 注入モデル動物に慢性経口投与しても発作波発現抑制効果は示さなかった。以上の結果より、DHL では外傷性てんかん発症を予防することは困難なことが明らかとなった。

一方、ETS-GS も各種の活性酸素種やラジカルに対し除去活性を示し、脂質過酸化を防止する効果も示した。さらに、再灌流モデルで ETS-GS は活性酸素種によるエネルギー産生機構の障害に対しても保護効果を示した。つまり、ETS-GS は DHL より活性酸素種による脳機能障害を軽減する作用を持つことを明らかとした。この結果は ETS-GS が外傷性てんかん発作発症予防薬となれる可能性を秘めている。しかし、現在、ETS-GS は薬品合成工場が福島原子力発電所の事故の影響を受け入手が困難となっている。早急の復旧が待たれる。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

Suezumi K, Yamada K, Tokumaru O, Ogata K, Kitano T, Yokoi I. Neuroprotective effect of water-soluble vitamin E derivatives as radical scavengers/antioxidants. J Physiol Sci. 査読無, 64, 2014, S256. 徳丸治、北野敬明、横井功。虚血 - 再灌流負荷に対するラットの脳エネルギー代謝の変化: ^{31}P -NMR による経時的検討。日本生理学会雑誌、査読有、75(5) Pt 2, 2013, 31-33.

Tandai-Hiruma M, Kato K, Kemuriyama T, Ohta H, Tashiro A, Hagiwara K, Nishida Y. High blood pressure enhances brain stem neuronal nitric oxide synthase activity in Dahl salt-sensitive rats. Clin Exp Pharmacol Physiol 査読有, 40, 2013, 197-204.

Shimada M, Mizutani Y, Tokumaru O,

Ogata K, Kitano T, Yokoi I. Neuroprotective effects of acetyl-L-carnitine on rat brain after ischemia-reperfusion injury: spin resonance analyses study. J Physiol Sci. 査読無, 63, 2013, S151.

Mizutani Y, Shimada M, Tokumaru O, Ogata K, Kitano T, Yokoi I. Neuroprotective effects of a water-soluble α -lipoic acid derivative, DM-HisZn, on rat brain tissue after ischemia-reperfusion injury: spin resonance analyses study. J Physiol Sci. 査読無, 63, 2013, S151.

Tokumaru O, Kitano T, Yokoi I. Recovery of energy metabolism of rat brain after ischemia-reperfusion injury : a ^{31}P -NMR study. J Physiol Sci. 査読無, 63, 2013, S97.

Koga H, Hagiwara S, Kusaka J, Matsumoto S, Nishida T, Yokoi I, Noguchi T. Human atrial natriuretic peptide attenuates renal ischemia-reperfusion injury. J Surg Res. 査読有, 173, 2012, 348-353.

Koga H, Hagiwara S, Inomata M, Kusaka J, Asai N, Oyama M, Kita K, Kashima K, Yokoi I, Noguchi T. Vitamin E derivative ETS-GS reduces liver ischemia-reperfusion injury in rats. J Surg Res. 査読有, 175, 2012, 118-122.

〔学会発表〕(計8件)

居積晃希、山田訓也、徳丸治、尾方和枝、北野敬明、横井功. 水溶性ビタミンE誘導体の抗酸化能と脳保護作用. 第91回日本生理学会大会、平成26年3月16-18日、鹿児島市.

徳丸治、北野敬明、横井功. 水溶性リポ酸誘導体 DM-His.Zn のラジカル除去作用: ESR による検討. 第4回癌・炎症とリポ酸研究会、平成25年11月16日、大分県日出町.

Tokumaru O, Shimada M, Mizutani Y, Ogata K, Kitano T, Yokoi I. Neuroprotective effects of acetyl-L-carnitine agonist ischemia-reperfusion injury: a spin resonance study. IUPS2013 (第37回国際生理学会議) 平成25年7月20-26日、Birmingham, U.K.

Tokumaru O, Mizutani Y, Shimada M, Ogata K, Kitano T, Yokoi I. Water-

soluble α -lipoic acid derivative, DM-His.Zn, scavenges free radicals, inhibits peroxidation, and protects brain tissue from ischemia-reperfusion injury. 第36回日本神経科学大会、平成25年6月20-23日、京都市.

徳丸治、北野敬明、横井功. 虚血 - 再灌流負荷に対するラットの脳エネルギー代謝の変化: ^{31}P -NMR による経時的検討. 日本病態生理学連携シンポジウム、第90回日本生理学会大会、平成25年3月29日、東京.

水谷有輝、島田真樹、徳丸治、尾方和枝、北野敬明、横井功. 水溶性リポ酸による神経保護作用のスピ解析による検討. 第90回日本生理学会大会、平成25年3月27日、東京.

島田真樹、水谷有輝、徳丸治、尾方和枝、北野敬明、横井功. Acetyl-L-carnitine による神経保護作用のスピ解析による検討. 第90回日本生理学会大会、平成25年3月27日、東京.

杉本幸甫、丸山聡、徳丸治、横井功、西田育弘. 麻酔下ラットにおける脳組織酸素濃度の脳虚血からの遅い回復. 第89回日本生理学会大会、平成24年3月31日、松本市.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横井 功 (YOKOI, Isao)
大分大学・医学部・教授
研究者番号: 80150366

(2) 研究分担者

北野 敬明 (KITANO, Takaaki)
大分大学・医学部・教授
研究者番号: 20211196

徳丸 治 (TOKUMARU, Osamu)
大分大学・医学部・准教授
研究者番号: 40360151

西田 育弘 (NISHIDA, Yasuhiro)
防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同研究)・その他部局等・教授
研究者番号: 90172668