

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	澤村 淳
-------	----	----	------

学位論文題目

カイニン酸誘発ラット黒質てんかんモデルにおける
発作行動、脳波、脳代謝の変化に関する研究

共著者名：橋詰清隆、吉田克成、田中達也

Brain Research 911 巻 89 頁～95 頁
平成 13 年

研究目的

黒質網様体は γ -アミノ酪酸 (GABA) 系のメカニズムにおいて重要な構造体であり、脳内のてんかん現象に対して抑制系の中心として重要な役割を果たしている。てんかんに対する黒質網様体の役割を明確にするために一側黒質網様体にカイニン酸を注入した。黒質網様体原発によるてんかん発作が誘発された後、発作行動、脳波所見、局所脳糖代謝所見を検討した。

材料・方法

実験 1：カイニン酸誘発黒質てんかん

体重 250-350g の雄性 Wistar 系ラット (N=8) を用いた。腹腔内へのネブプタール麻酔下 (45 mg/kg) で外径 0.6 mm で内側に径 0.3mm のステンレス針が入るカイニン酸注入用のステンレススチールカニューラを定位脳手術装置を用いて Pellegrino のアトラスに従って左黒質網様体 (A=+2.8mm, L=+2.5mm, D=-3.5mm) に挿入した。また、脳波記録用の深部電極をステンレススチールカニューラの先端から僅かに後方になるようにステンレススチールカニューラに予め接着して挿入した。また、深部単極電極を左淡蒼球・左海馬・左黒質に、ビス電極を左の感覚運動野に各々設置した。電極は 6 チャンネルのソケットに接続して、ステンレススチールカニューラと共に歯科用レジセメントで頭蓋に固定した。手術の 7 日後に左黒質に、燐酸緩衝液 (0.2 M, pH 7.4) 1ml あたりカイニン酸を 1 mg 溶解し (1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)、その溶解液 1.0 μl

を注入した。カイニン酸注入後、約 30 時間持続的にビデオモニタリング装置を用いて発作行動、脳波所見を観察した。さらに、その後約 1 ヶ月間に亘り、間歇的に脳波・行動を観察・記録した。脳波計の設定は high cut filter: 50Hz, low cut filter: 1.5Hz, TC: 0.1, A.C. filter: 50Hz on である。カイニン酸注入後、約 1 ヶ月で病理組織学的検討を行った。

実験 2：黒質てんかん重積状態時の脳糖代謝

カイニン酸注入後、約 2 時間でラット (N=7) がてんかん重積状態であることを確認した。その後、100 μ Ci/kg の 14 C-デオキシグルコース (2DG) を経静脈的に注入し、オートラジオグラムの準備を行った。ラットは最後の採血が終了した後すぐに断頭し、脳組織をすばやく冷凍し、クライオスタットで冠状断に 20 μ m 厚の連続切片としてスライスを作成した。60°C で乾燥し、カセットの中で 7 日間曝写し 14 C-メチルメタクリレート・スタンダードを連続的に設置した。血液サンプルは遠沈し、血漿グルコース濃度を測定した。局所脳糖代謝は Sokoloff らによって得られた方程式によって算出した。脳組織の局所脳糖代謝は 7 匹のてんかんラットと 7 匹のコントロールラットで算出した。Mann-Whitney U-test を用いて両者を比較分析した。

成 績

(1) 発作行動、脳波所見の変化

カイニン酸注入約 10 分後より、脳波上、左黒質・左淡蒼球に連続性の低振幅棘波が認められた。ビデオでは発作行動の初発行動として流涎などの辺縁系発作様式が認められた。カイニン酸注入約 30 分後には、脳波上は左黒質から左淡蒼球・左海馬まで波及する間欠的な多発性棘徐波複合が認められた。ビデオでは辺縁系発作の際に見られるような wet dog shake と standing・jumping 発作が確認できた。カイニン酸注入約 50 分後には、脳波上は連続性棘徐波複合が左感覚運動野まで波及し始めた。ビデオでは注入反体側への頭部回旋・注入反体側の前肢のクローヌスが認められた。カイニン酸注入約 70 分後には、脳波上は二次性全般化を呈していた。ビデオでは rolling (体軸に対して回旋する運動) と全身性強直運動を認めた。黒質てんかん発作は 5-7 分毎に繰り返され、3-4 時間持続した。しかし、けいれん発作は徐々に消退していき 12 時間後に正常に戻った。30 日間の観察で自発てんかん発作は検出されなかった。てんかんの型式としては辺縁系発作の二次性全般化発作であった。しかし、全般

化発作の際中に standing・jumping・rolling（体軸に対して回旋する運動）が特徴的であり、脳幹けいれん発作と二次性全般化発作の特徴を合わせ持っていた。

（2）病理組織学的検討

冠状断にてヘマトキシリン・エオジン、クレシル・バイオレットで染色を行った。カイニン酸浸透が原因と思われる神経細胞の消失を伴うグリオシスが黒質網様体のカニューラ先端周囲にわずかに認められた。左海馬の CA3 で錐体細胞の消失が観察された。

（3）局所脳糖代謝所見（ ^{14}C -オートラジオグラム）

^{14}C -オートラジオグラムでは以下の部位で局所脳糖代謝が亢進していた。内側・外側中隔野、黒質、海馬、頭頂葉、梨状葉、内側・外側膝状体核、視床前背側・外側腹側核、扁桃核、中脳網様体等である。今回の実験では誘発されたてんかん発作は主に一側半球に限局していた。しかし、反体側の半球にも高代謝領域が認められ、特に、中脳下丘、視床前背側核、前頭葉、頭頂葉、内嗅領皮質、梨状葉が高代謝領域となっていた。

考 案

黒質は運動機能の制御について大きな役割を担っていると考えられている。黒質の主な出力系はドーパミン作動性黒質線条体路である。今回の我々の実験では黒質網様体にカイニン酸を微量注入し、特徴的な全身けいれん発作重積を誘発した。黒質網様体の過剰興奮がてんかん発作を引き起こす機序を説明することは非常に難しいが、けいれん重積状態での局所脳糖代謝は重要な情報を示している。

局所脳糖代謝の過剰亢進は黒質網様体だけでなく、中脳網様体、視床、大脳皮質にも認められた。このような異常な状況では黒質網様体からの抗てんかん性の GABA 系の出力が、中脳網様体、視床、大脳皮質に対して不活性となり全脳に及ぶ過剰なてんかん性興奮を引き起したものと考えられる。

もう 1 つの説明としては黒質網様体の過剰興奮のため、黒質緻密体から出力される黒質線条体路の興奮性ドーパミン作動性回路の増強である。

黒質網様体での GABA 容量のほとんどは線条体の細胞体に起始する GABA 作動性神経終末に関連する。黒質網様体の GABA は黒質線条体、中辺縁系ドーパミン作動性神経を制御している。扁桃核中心は黒質からの直接繊維連絡を

受けている。Le Gal La Salle らは黒質付近での GABA 上昇物質 (γ ビニル GABA) の両側投与が運動性けいれんは変化させず、扁桃核キンドリングてんかんの期間のみをかなり短縮したと報告している。ところが、Tanaka らはイボテン酸の注入により黒質網様体の両側破壊を行った結果、扁桃核へのカイニン酸注入により誘発された辺縁系発作を明らかに増悪させたと報告している。Iadarola らはラット腹側中脳被蓋・黒質の限局した部位内での GABA の上昇か GABA レセプターの直接刺激の結果として、最大電気刺激あるいはけいれん誘発薬によって誘発されるけいれん発作の進展を抑制したと報告している。

Vitek らによると、大脳皮質・線条体・淡蒼球・黒質・視床・視床下核の間には相互に興奮・抑制系の回路が形成されている。淡蒼球外節からの抑制が減少することに加えて大脳皮質・視床・中脳錐体外路領域から視床下核への興奮性投射活性が増加することにより視床下核の活性が増加する可能性がある。淡蒼球外節の投射率が減少すれば、淡蒼球内節への直接投射を介して淡蒼球内節での投射率が増加することが期待される。我々の結果では、黒質網様体は代謝が過剰に亢進していたが、淡蒼球では変化が少なかったことより、淡蒼球の抑制系の作動が少なく、全身けいれん発作が誘発された可能性も考えられる。

今回の研究では黒質網様体と淡蒼球内節の抑制系の役割は、過剰なてんかん性興奮により不活性化され、脳幹てんかんと二次性全般化発作が誘発されたことが推測される。このように、異常な脳の興奮が起こると黒質は焦点発作の二次性全般化のための中継核として作用することが明らかとなった。

結 論

一側黒質網様体へのカイニン酸の微量注入は初発症状として辺縁系発作を誘発し、最終的には全般化発作重積に進展した。黒質線条体路の過剰興奮と GABA 作動性投射システムの機能減弱のため、黒質が二次性全般化に関して重要な役割を果たしている事が今回の実験結果より実証された。

引用文献

- [1] L. Sokoloff, M. Reivich, C. Kennedy, M.H. Des Rosiers, C.S. Patlak, K.D. Pettigrew, O. Sakurada and M. Shinohara, The [14C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat, **J. Neurochem.** **28** (1977) **897-916**.
- [2] T. Tanaka, S. Tanaka, M. Kaijima and Y. Yonemasu, Ibotenic acid-induced nigral lesion and limbic seizure, **Brain Res.** **498** (1989) **215-220**.
- [3] J.L. Vitek, J. Zhang, M. EVatt, K. Mewes, M.R. DeLong, T. Hashimoto, S. Triche and R.A.E. Bakay, GPi pallidotomy for dystonia : clinical outcome and neuronal activity, **Advances in Neurology** **78** (1998) **211-219**.

参考論文

参考論文 1

1. 題目 高解像度画像と脳波による新しいてんかん外科 (1)
橋詰清隆、田中達也と共著 (第3著者)
2. 印刷公表の
方法及び時期 臨床脳波 42 卷 (3) 188 頁～195 頁
平成 12 年

参考論文 2

1. 題目 非侵襲的検査による小児のてんかん外科治療
橋詰清隆、吉田克成、津田宏重、田中達也、
田中滋也と共著 (第2著者)
2. 印刷公表の
方法及び時期 小児の脳神経 26 卷 56 頁～59 頁
平成 13 年

参考論文 3

1. 題目 **Electrophysiological, behavioral and metabolic features of globus pallidus seizures induced by a microinjection of kainic acid in rats in collaboration with Kiyotaka Hashizume and Tatsuya Tanaka (First author)**
2. 印刷公表の
方法及び時期 **Brain Research** in Press
平成 14 年

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	澤 村 淳
<p>審査委員長 千葉 茂 ㊦</p> <p>審査委員 田中 達也 ㊦</p> <p>審査委員 吉田 成孝 ㊦</p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>カイン酸誘発ラット黒質てんかんモデルにおける 発作行動、脳波、脳代謝の変化に関する研究</p>			
<p>黒質網様部は、脳内のγ-アミノ酪酸 (GABA) 系の中心で、てんかん現象に対しては、抑制系として重要な役割を果たしている。本研究では、てんかん現象に対する黒質網様部の役割を明確にするために、ラット一側黒質網様部にカイン酸を注入し、その後の発作行動、脳波、脳代謝の変化を検討した。</p> <p>実験には、雄性 Wistar 系ラット 30 匹を用いた。ステンレスカニューーラを定位脳手術装置を用いて左黒質網様部に挿入し、手術の 7 日後に左黒質網様部にカイン酸 1μg を溶解液 1μL として注入した。その後、ビデオモニタリング装置を用いて発作行動、脳波所見を観察した。注入約 30 分後には、間欠的な多発性棘徐波複合が認められ、約 70 分後には、二次性全般化発作重積状態となった。発作型は、辺縁系発</p>			

作の二次性全般化発作と脳幹けいれん発作の要素を合わせ持っていた。

次に、カイニン酸注入後、約 2 時間でラットがてんかん重積状態であることを確認した後、 $100\mu\text{Ci/kg}$ の ^{14}C -デオキシグルコースを急速静注し、オートラジオグラムを作成した。局所脳糖代謝のマップの検討では、黒質網様部の異常な興奮によって GABA 系の出力が、中脳網様体、視床、大脳皮質に対して不活化され、全脳に及ぶ過剰なてんかん性興奮が引き起こされたものと考えられた。

以上の結果から、脳のてんかん性興奮に抑制的に作動している黒質網様部が、カイニン酸注入によって過剰に興奮すると、黒質網様部の抑制的な機能が破綻し、発作重積状態が生じたと考えられる。この事実は、てんかん発作の抑制機序を解明するために、重要な情報を提供している。本研究はてんかん発作の抑制機構の増強するためには、黒質網様部の機能を維持する必要があることを示した重要な知見である。

なお、各審査委員は論文提出者に試問を行い、本論文の内容および関連領域に関して十分な回答を得た。以上より、本審査委員会は、本論文が医学博士の学位論文に値すると判定した。