

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

てんかんをめぐって (1994.02) 14巻:80～86.

カイニン酸誘発てんかんモデルにおける脳血流量及び神経伝達物質の研究
"multiple tracer autoradiography"を用いた研究

福田博、田中達也、米増祐吉

カイニン酸誘発てんかんモデルにおける 脳血流量及び神経伝達物質の研究 “multiple tracer autoradiography”を用いた研究

旭川医科大学脳神経外科

福田 博、田中 達也、米増 祐吉

〈はじめに〉

てんかん焦点では、発作間歇期には脳血流低下し、発作中は脳血流が増加する事が報告されている^{6,7)}。又てんかん焦点では神経伝達物質レセプターの変化が見られる事も報告されているが^{1, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 18)}、そのメカニズムは必ずしも充分解明されていない。そこで複数の神経伝達物質レセプターと脳血流を同時に測定することが可能となる multiple tracer autoradiography 方法を用いて、カイニン酸誘発てんかんモデルの神経伝達物質及び脳血流を同一動物で研究した。

〈実験方法〉

I. カイニン酸てんかんモデルの作成；

カイニン酸 (2 μ g/1 μ l) を予め植え込んだカニューラを介しウィスターラットの左扁桃核に、無麻酔、無拘束下に注入し、辺縁系てんかん重積発作を誘発した。発作重積はカイニン酸注入24時間後には、いったんおさまり、Inter Ictal Discharge が出現するのみとなるが、注入一ヶ月後頃より再び Spontaneous seizure が出現する様になった^{2, 17)}。

II. Autoradiography；

カイニン酸注入一ヶ月後、一旦おさまった

spontaneous seizure が再び起き始める時期に Autoradiography を行なった。ハロセン吸入麻酔下に大腿動静脈にカニューレーションし、麻酔覚醒後 ¹⁴C-IAP 静注し30秒間動脈血サンプリングを行なった後、ラットを断頭し凍結切片を作成。¹⁴C-IAP in vivo autoradiography により脳血流を測定¹⁶⁾。隣接した脳切片を buffer で洗浄し ¹⁴C-IAP を除去後、³H-MK801、³H-Muscimol、³H-Ro15-1788、³H-5-HT を用いて in vitro, multiple tracer autoradiography を行なった^{4, 5, 12, 13, 14)}。この方法により、同一動物で脳血流と複数の Neurotransmitter の receptor binding 測定を同時に行うことが可能となった。

〈結 果〉

- (1) 脳血流：¹⁴C-IAP の autoradiogram で脳血流を見ると、カイニン酸注入群では対照群に比べ、カイニン酸注入部の左扁桃核と両側海馬全体で脳血流が低下していた (図1)。
- (2) MK801 receptor：³H-MK801 の autoradiogram で興奮性神経伝達物質の Glutamate の MK801 receptor binding を見ると、カイニン酸注入群では対照群に比べ、カイニン酸中入部の左扁桃核と左側海馬全体

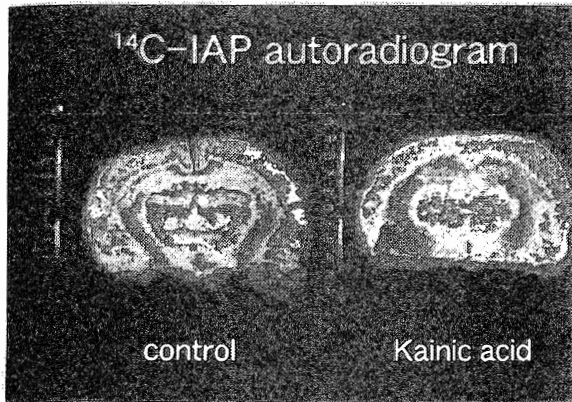


図1 ^{14}C -IAPのautoradiogram (脳血流) : Kainic acid注入ラットで注入部左扁桃核と両側海馬全体で脳血流低下を認める。

でreceptor bindingが低下していた (図2)。海馬を拡大してみると (図3)、カイニン酸注入ラットでは海馬錐体細胞層及び海馬歯状回でreceptor bindingが低下していた。

(3) GABA-typeA receptor : ^3H -Muscimolのautoradiogramで抑制系神経伝達物質GABA-typeA receptor bindingを見ると、カイニン酸注入群では対照群に比べ、カイニン酸注入部の左扁桃核でreceptor bindingが低下していた (図4)。左海馬を拡大してみるとカイニン酸注入群では、海馬錐体細胞層でreceptor bindingが低下していたが、海馬歯状回では逆にreceptor bindingが上昇していた (図5)。

(4) Benzodiazepine receptor : ^3H -Ro15-1788のautoradiogramでCentral type benzodiazepine receptor bindingを見ると、カイニン酸注入群では対照群に比べ、カイニン酸注入部の左扁桃核と左海馬錐体細胞層でreceptor bindingが低下していたが、海馬歯状回では逆にreceptor bindingが上昇していた (図6)。

(5) 5-HTreceptor : ^3H -5-HTのautoradiogramで5-HT receptor bindingを見ると、カ

イニン酸注入群では対照群に比べ、カイニン酸注入部の左扁桃核と左海馬錐体細胞層でreceptor bindingが低下していたが、海馬歯状回では逆にreceptor bindingが上昇していた (図7)。以上の実験結果をまとめると (表1)、カイニン酸てんかんラットでは、脳血流は扁桃核、海馬錐体細胞層及び海馬歯状回総において低下していた。ところが、神経伝達物質レセプターは、扁桃核、海馬錐体細胞層では低下していたが、海馬歯状回では逆に上昇していた。

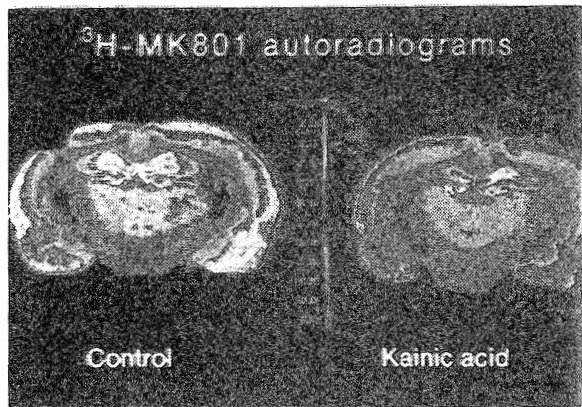


図2 ^3H -MK801 autoradiogram (Glutamate receptor) : Kainic acid注入ラットで注入部左扁桃核と左側海馬全体でreceptor binding低下を認める。

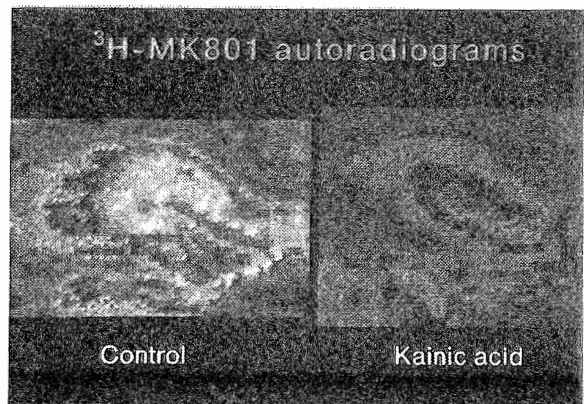


図3 ^3H -MK801 autoradiogram (海馬拡大) : Kainic acid注入ラットで海馬錐体細胞層及び海馬歯状回でreceptor binding低下を認める。

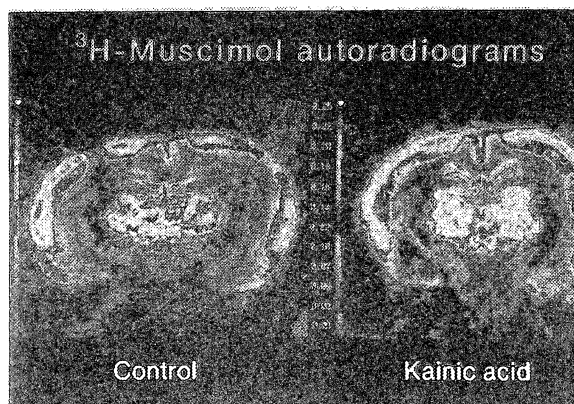


図4 ^3H -Muscimol autoradiogram (GABA-A receptor) : Kainic acid 注入ラットで注入部左扁桃核で receptor binding 低下を認める。海馬にも変化を認める。海馬拡大図5参照

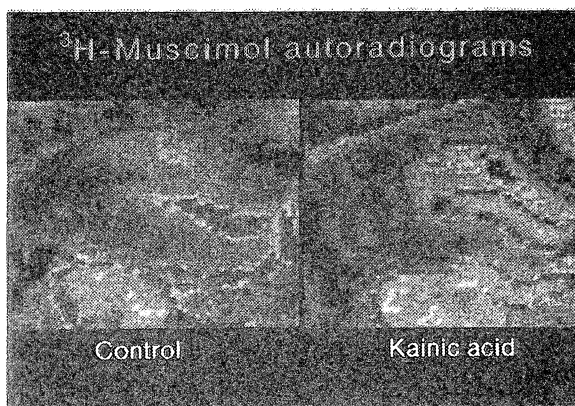


図5 ^3H -Muscimol autoradiogram (海馬拡大) : Kainic acid 注入ラットで海馬錐体細胞層の receptor binding 低下、海馬歯状回の receptor binding 上昇を認める。

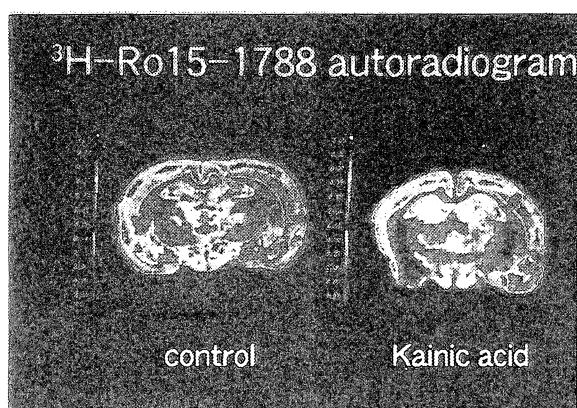


図6 ^3H -Ro15-1788 autoradiogram (Central type benzodiazepine receptor) : Kainic acid 注入ラットで注入部左扁桃核と左海馬錐体細胞層の receptor binding 低下、海馬歯状回で receptor binding 上昇を認める。

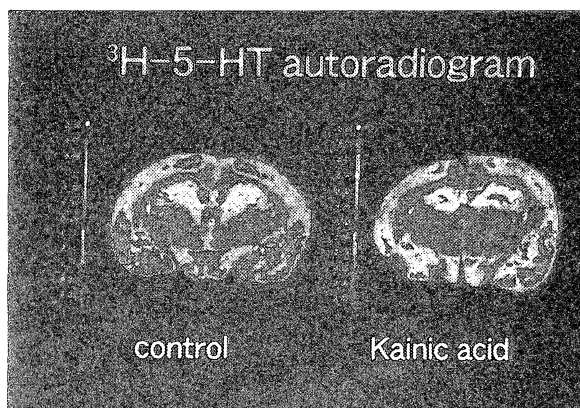


図7 ^3H -5-HT autoradiogram (Serotonin receptor binding) : Kainic acid 注入ラットで注入部左扁桃核と左海馬錐体細胞層の receptor binding 低下、海馬歯状回で receptor binding 上昇を認める。

< 表 1 > Results of the multiple tracer autoradiography in Kainic acid induced seizure

Ligand	(Receptors)	Hippocampus CA1,3,4	Hippocampus Fascia dentata	Amygdala
^{14}C - IAP	(CBF)	↓	↓	↓
^3H -MK801	(NMDA)	↓	↔	↓
^3H -Muscimol	(GABA)	↓	↑	↓
^3H -Ro15-1788 (Benzodiazepine)		↓	↑	↓
^3H -5-HT	(Serotonin)	↓	↑	↓

表1 実験結果のまとめ：カイニン酸てんかんラットにおいて、脳血流（CBF）は扁桃核・海馬錐体細胞層・海馬歯状回で低下、神経伝達物質レセプターは扁桃核・海馬錐体細胞層で低下、海馬歯状回で上昇していた。

〈考 察〉

SPECTやPETscanによる研究で、てんかん焦点では発作間歇期には脳血流・糖代謝が低下し、発作時には逆に脳血流・糖代謝が上昇していると報告されている^{6,7)}。しかし、そのてんかん焦点診断率は6-8割程度といわれ必ずしも正確ではない。又発作間歇期に見られる、てんかん焦点の脳血流・糖代謝低下部位は病理組織学的異常部位より広くなる傾向があると言われ⁸⁾、そのメカニズムも充分解明されていない。

最近脳血流・糖代謝よりも密接にてんかん焦点に関与すると考えられる、神経伝達物質を用いたPETscanによる研究が試みられている。Frost等は側頭葉てんかん患者の Muopiate receptor をPETで測定し、側頭葉皮質で receptor bindingの上昇、側頭葉内側部でその低下を報告している⁹⁾。Savic等は発作間歇期の側頭葉てんかん患者の benzodiazepine receptor binding及び糖代謝をPETscanで測定し、てんかん焦点で両者の低下を認めた。又てんかん焦点の benzodiazepine receptor binding低下部位は糖代謝低下部位より狭い部位に局限していたと報告している¹⁰⁾。

本研究のカイニン扁桃核内注入モデルでは、脳血流の低下は注入側扁桃核・両側海馬全体に認められたが、神経伝達物質レセプターの変化は注入側扁桃核・注入側海馬内錐体細胞層で低下し、歯状回では逆に上昇していた。このように神経伝達物質レセプターの変化は部位依存性であり、より狭い範囲に局限して認められた。神経伝達物質レセプター及び脳血流の低下が神経細胞が脱落している扁桃核・海馬に見られた

が、明らかな病理組織学的変化の見られない海馬歯状回でも神経伝達物質レセプターの上昇が見られた。てんかん焦点では形態的变化のみならず、機能的変化も生じている事が示唆され興味深い。

〈結 語〉

本研究はカイニン酸てんかんモデルにおける各種神経伝達物質、脳血流を同時に研究した最初の報告であり、興味深い結果が得られた。てんかん焦点では従来言われている様に、脳血流の低下が見られたが、神経伝達物質レセプターの変化は、脳血流低下部位より狭い範囲に局限し、かつ部位依存性で、上昇している所と低下している所がみられた。神経伝達物質レセプターの変化は脳血流の変化よりも密接にてんかん源性に関与すると思われる為、神経伝達物質 ligandを用いたPET、SPECTによる画像診断はてんかんのメカニズム解明・局在診断に有用と考えられた。

〈文 献〉

- 1) Ashton, D., Leysn, J. E. and Wauquier, A. (1980) Neurotransmitters and receptor binding in amygdaloid-kindling : serotonergic and noradrenergic modulatory effects. *Life Sci.* 27, 1547-1556.
- 2) Ben-Ari, Y., Lagowska, J., Tremblay, E. and Le Gal La Salle, G. (1979) A new model of focal status epilepticus: intra-amygdaloid application of kainic

- acid elicits repetitive secondarily generalized convulsive seizures. *Brain Res.* 163, 176-179.
- 3) Camu, W., Marlier, L., Lerner-Natori, M., Rondoin, G. and Privat, A. (1990) transplantation of serotonergic neurons into the 5, 7-DHT-lesioned rat olfactory bulb restores the parameters of kindling, *Brain Res.* 518, 23-30.
- 4) 福田博、田中達也、米増祐吉、Yamamoto, L. Y. (1991) カイニン酸誘発てんかんモデルにおける中枢性及び末梢性ベンゾジアゼピンレセプターの研究. てんかんをめぐって: 第30回北海道てんかん懇話会記念大会号 12, 47-54.
- 5) 福田博、田中達也、米増祐吉 (1992) カイニン酸誘発てんかんモデルにおける脳内セロトニンレセプターの研究. てんかんをめぐって 13, 125-130.
- 6) Engel, J., Bown, W. J., Kuhl, D. E et al (1982) Pathological findings underlying focal temporal lobe hypometabolism in partial epilepsy. *Ann. Neurol.* 12, 518-528.
- 7) Engel, J., Kuhl, D. E., Phelps, M. E. (1982) Patterns of human local cerebral glucose metabolism during epileptic seizures. *Science*, 218, 64-66.
- 8) Frost, J. J., Mayberg, H. S., Fisher, R. S. et al (1988) Mu-opiate receptors measured by positron emission tomography are increased in temporal lobe epilepsy. *Ann. Neurol.* 23, 231-237.
- 9) Kokaia, M., Kalen, P., Bengzon, J. and Lindvall, O. (1989) Noradrenaline and 5-Hydroxytryptamine release in the hippocampus during seizures induced by hippocampal kindling stimulation: an in vivo microdialysis study. *Neurosci.* 32, 647-656.
- 10) Lerner-Natori, M., Rondoin, G., Malafosse, A., Sandillon, F., Privat, A. and Baldy-Moulinier, M. (1986) Facilitation of olfactory bulb kindling after specific destruction of serotonergic terminals in the olfactory bulb of the rat. *Neurosci. Lett.* 66, 299-304.
- 11) Munkenbeck, K. E. and Schwark, W. S. (1982) Serotonergic mechanisms in amygdaloid-kindled seizures in the rat. *Exp. Neurol.* 76, 246-253.
- 12) Nobrega, J. N., Kish, S. J. and Burnham, W. M. (1990) Regional brain [³H] muscimol binding in kindled rat brain: a quantitative autoradiographic examination, *Epilepsy Res.* 6, 102-109.
- 13) Pazos, A. and Palacios, J. M. (1985) Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. serotonin-I receptors, *Brain Res.* 346, 205-239.
- 14) Sakurai, S. Y., Cha, J. H. J., Penney, J. B. and Young, A. B. (1991) Regional

- distribution and properties of [^3H] MK801 binding sites determined by quantitative autoradiography in rat brain. 40 (2) 533-543.
- 15) Savic, I., Roland, P., Sedvall, G. et al (1988) In vivo demonstration of reduced benzodiazepine receptor binding in human epileptic foci. *Lancet*, 2, 863-866.
- 16) Sakurada, O., Kennedy, C., Jehle, J. et al (1978) Measurement of local cerebral blood flow with iodo [^{14}C] antipyrine. *Am. J. Physiol.*, 234 : H59-H66.
- 17) Tanaka, S., Kondo, S., Tanaka, T. and Yonemasu, Y.(1988) Long-term observation of rats after unilateral intramygdaloid injection of kainic acid., *Brain Res.* 463, 163-167.
- 18) Wada, Y., Hasegawa, H., Nakamura, M. and Yamaguchi, N.(1991) suppressive effects of L-5-hydroxytryptophan in a feline model of photosensitive epilepsy, *Brain Res.* 552, 8-12.

Summary

Autoradiographic Study of the Neurotransmitters and Cerebral Blood Flow in Kainic Acid Induced Epilepsy Rats

Hiroshi Fukuda, Tatsuya Tanaka, Yuukichi Yonemasu

Department of Neurosurgery, Asahikawa Medical College, 4-5-3-11, Nishikagura, Asahikawa 078 Japan

Cerebral blood flow (CBF) and neurotransmitters (NMDA, GABA, Benzodiazepine, 5-HT) in kainic acid induced epilepsy models were studied by multiple tracer autoradiography. The kainic acid (KA), $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, was injected into the left amygdala of Wistar rats through previously implanted cannula in awake and unrestrained condition. All rats with the KA injection developed limbic seizure as reported earlier. One month after the KA injection, femoral artery and vein of the rats were cannulated under Halothane anesthesia. After recovery from the anesthesia, the rats were injected with ^{14}C -IAP. Serial arterial blood samplings were performed and the rats were decapitated 30 seconds after the ^{14}C -IAP injection. The brain was quickly removed and frozen. Serial coronal sections were made with a cryostat. The CBF was measured by ^{14}C -IAP in vivo autoradiography. The adjacent slices were washed with Tris buffer to remove the ^{14}C -IAP. In vitro multiple tracer autoradiography on these adjacent sections was performed using the ^3H -MK801, ^3H -Muscimol, ^3H -Ro15-1788, ^3H -5-HT. The receptor bindings were measured with image analyzer. The CBF was decreased in the left amygdala and all regions of the hippocampus. The receptor bindings were decreased in the left amygdala and pyramidal cell layer of the left hippocampus and they were inversely increased in the fascia dentata of the hippocampus bilaterally.