

AMCoR

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

てんかんをめぐって (1992) 12巻:55～63.

周生期hypoxiaがラットのけいれん準備性に及ぼす影響
—実験てんかんの臨床への応用—

千葉茂、松本三樹、佐藤譲、吉田幸宏、福嶋隆一、宗岡幸
広、武藤福保、武井明、直江裕之、稲葉央子、鎌田隼輔、
宮岸勉

周生期 hypoxia がラットのけいれん準備性に及ぼす影響 — 実験てんかんの臨床への応用 —

旭川医科大学精神科神経科

千葉 茂 松本 三樹 佐藤 譲
吉田 幸宏 福嶋 隆一 宗岡 幸広
武藤 福保 武井 明 直江 裕之
稲葉 央子 鎌田 隼輔 宮岸 勉

Effects of Postnatal Hypoxia on Seizure Susceptibility in Rats.

Shigeru Chiba, Miki Matsumoto, Yuzuru Sato, Yukihiro Yoshida, Ryuichi Fukushima, Yukihiro Muneoka, Fukuyasu Mutoh, Akira Takei, Hiroyuki Naoe, Hiroko Inada, Shunsuke Kamata, Tsutomu Miyagishi

Department of Psychiatry and Neurology, Asahikawa Medical College, Nishikagura 4-5-3-11, Asahikawa 078.

I. はじめに

周生期 hypoxia はてんかん発症における重要な危険因子の1つと考えているが、この点に関する実験的研究は少ない¹⁻⁹⁾。我々は、ラットを用いて周生期低酸素がけいれん準備性に及ぼす影響について検討を重ねてきたので、その概要を報告する。

II. 実験の方法および結果

実験には Sprague-Dawley 系雄性ラットを使用した。実験群（以下、hypoxia 群）には、正常無処置の親ラットから生れたラットで、生後10日目に次に述べるような方法で低酸素に暴露したものを使用した。なお、対照群としては正常無処置の同系雄性ラットを使用した。

1) 低酸素暴露方法

あらかじめ100%の窒素ガスで満たされた容量10Lのデシケーターに、生後10日目の1組の同腹子すべてを同時に入れ、さらに窒素ガスを毎分5Lの流量で送り込んだ。窒素暴露中は1匹のラットの心電図をモニターし、心拍数が毎分60回に減少した時点ですべてのラットを大気中に戻した (Fig. 1)。平均暴露時間は4.70 - 5.57分であった^{1,3,7,9)}。なお、一部の実験⁵⁾では、心拍数が毎分45回に減少した時点でラットを大気中に戻した (平気暴露時間は5.31分)。

このような方法で作製した hypoxia 群について、i) 扁桃核キンドリング形成過程、ii) pentylenetetrazol (PTZ) に対するけいれん反応、iii) 脳の病理学的所見、およびiv) 生化学的所見の検討を行った。なお、両群の個々のラットは1つの実験にのみ使用した。

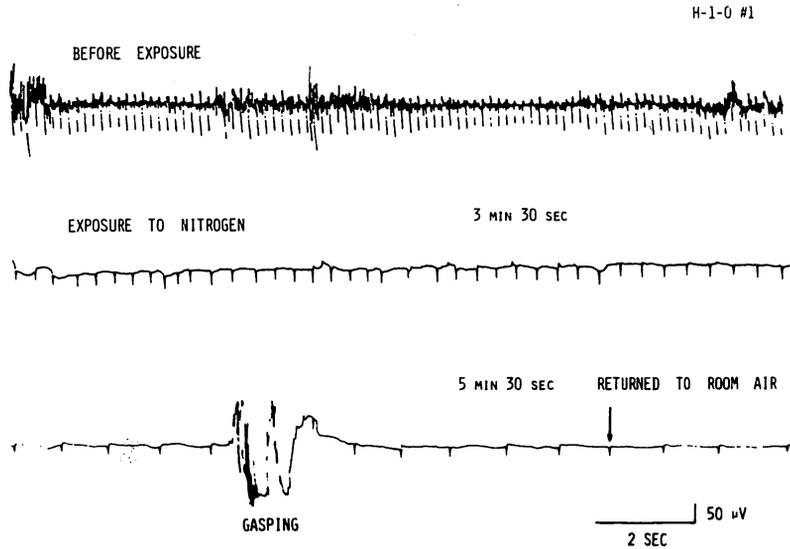


Fig.1 Electrocardiogram during exposure to nitrogen gas (Chiba, 1985).

2) 扁桃核キンドリング

最初に、成熟期（生後3-4ヵ月）における扁桃核キンドリングの形成過程を両群で比較した¹⁾。電極の装着には脳定位固定装置を使用し、両側扁桃核に双極深部電極を刺入したのち、1週間の回復期において右扁桃核を100 μ A、60Hzの2相性矩形波で、1秒間、1日1回刺激した。発作症状の分類はRacine¹⁰⁾に従った。両群における各発作段階の出現に要した刺激回数をFig. 2に示す。対照群では最終発作段階であるstage 5に至るまでに平均 17.6 ± 5.1 （平均 \pm SD）回の刺激を必要としたのに対して、hypoxia群では平均 8.8 ± 3.9 （平均 \pm SD）回で有意に少なく、また、stage 1-4についてもhypoxia群は有意に少ない刺激回数を示した。

さらに、20、30、および60日齢において、両群の扁桃核キンドリング形成過程を日齢別に検討した⁷⁾。刺激は、左扁桃核に対して400 μ A、60Hzの2相性矩形波を1秒間、1時間の間隔で1日10回行った。Fig. 3は、それぞれの日齢におけるstage 5の出現に要した刺激回数を表している。20および30日齢では、両群のキンドリング形成速度に差はみられなかった。しかし、60日齢の成熟期では、対照群が 16.1 ± 1.6 （平均 \pm SE）回であったのに対してhypoxia群は 9.8 ± 1.3 （平均 \pm SE）回であり、hypoxia群ではキンドリング形成の著しい促進が認められた。

以上の結果から、ラットにおける周生期hypoxiaはキンドリング形成の促進をもたらすこと、およびこの促進は幼若期では認められず、60日齢以降の成熟期に至ってからはじめて現れることが

明らかとなった。

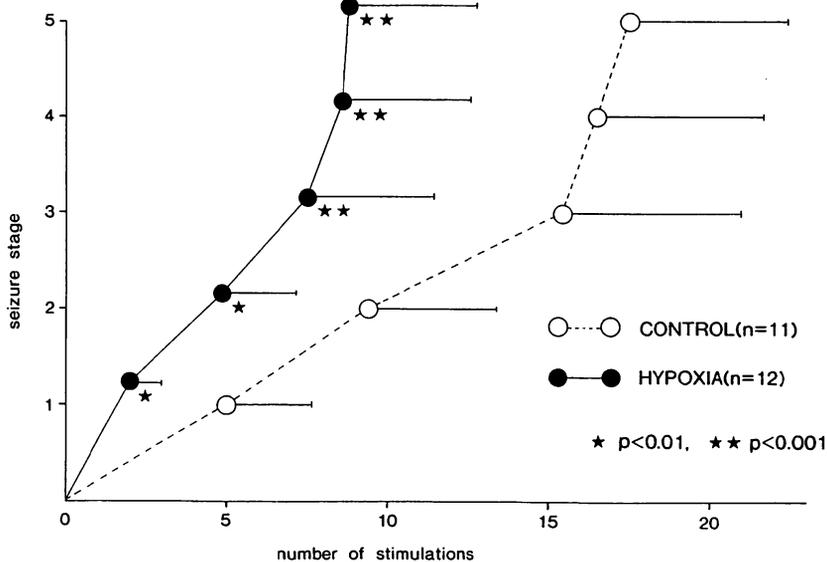


Fig.2 Number of stimulations (mean + SD) required to produce each stage of motor seizures. Statistical analysis : Student's t-test (modified from Chiba, 1985).

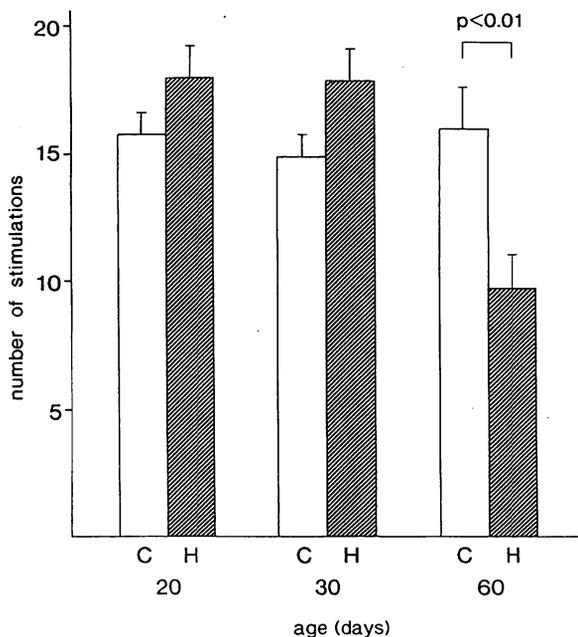


Fig.3 Number of stimulations (mean + SE) required to produce stage 5 at different ages. C, control group (20 days, n = 9; 30 days, n = 10; 60 days, n = 7); H, hypoxia group (20 days, n = 10; 30 days, n = 9; 60 days, n = 8). Statistical analysis : Mann-Whitney U test.

3) PTZけいれん反応

ラットの15、20、30、60、および90-120日齢の各時期について、PTZ55mg/kg (i. p.) 投与後30分間に観察されたけいれん反応の重症度を両群の間で比較検討した (Fig. 4)⁹⁾。けいれん反応は両側感覚運動野からの表面脳波を記録しながら観察し、また、その重症度はseverity scoreによって検討した。severity scoreは、Fig. 4に示した点数表に従って、1分間に認められたもっとも高いscoreを記録し、30分間の合計得点として算出した。その結果、hypoxia群はいずれの日齢においても対照群と比較して高いscoreを示し、とくに15、20および90-120日齢では統計学的な有意差が認められた。

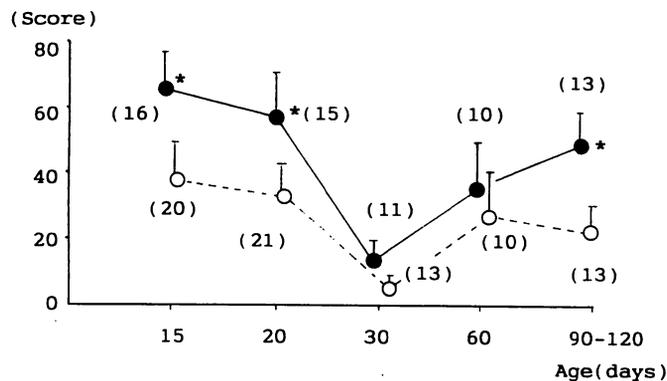


Fig.4 The severity score (mean + SE) in the control and hypoxia groups (from Matsumoto, 1990). Closed circles with solid line, hypoxia group; open circles with dotted line, control group. Number in parentheses indicate number of rats in each group. ★P < 0.05 by Mann-Whitney U test.

Scores :

- 0 = no PTZ-induced phenomena
- 1 = single myoclonic jerk
- 2 = a series of myoclonic jerks
- 3 = generalized convulsion (GC), or GC with long-lasting loss of control
- 4 = death

4) 病理学的所見

生後3-4ヵ月のhypoxia群9匹の脳をformalinで灌流固定後paraffinに包埋し、hematoxylin-eosinで染色して、大脳皮質、海馬、扁桃核、青斑核、黒質、および小脳皮質における光顕所見を、対照群ラット脳 (n = 3) と比較した。その結果、hypoxia群では大脳皮質を含めたいずれの脳部位においても、神経細胞の脱落や虚血性変化のような異常所見は認められなかった^{1, 3, 5, 9)}。

5) 生化学的所見

hypoxia群ラットの脳内 monoamine および amino 酸含量を小脳、橋・延髄、視床下部、線条

体、中脳、海馬、前頭葉皮質、および黒質において検討した³⁾。monoamineは電気化学検出器付高速液体クロマトグラフィにより、また、amino酸は自動amino酸分析計により測定した。Fig. 5は、hypoxia群における各脳部位のnorepinephrine (NE) 含量の平均値を、対照群の平均値に対する百分率で示したものである。hypoxia群のNEは、海馬を除くすべての部位で低下しており、また、橋・延髄および視床下部では、対照群と比較して有意に低下していた。

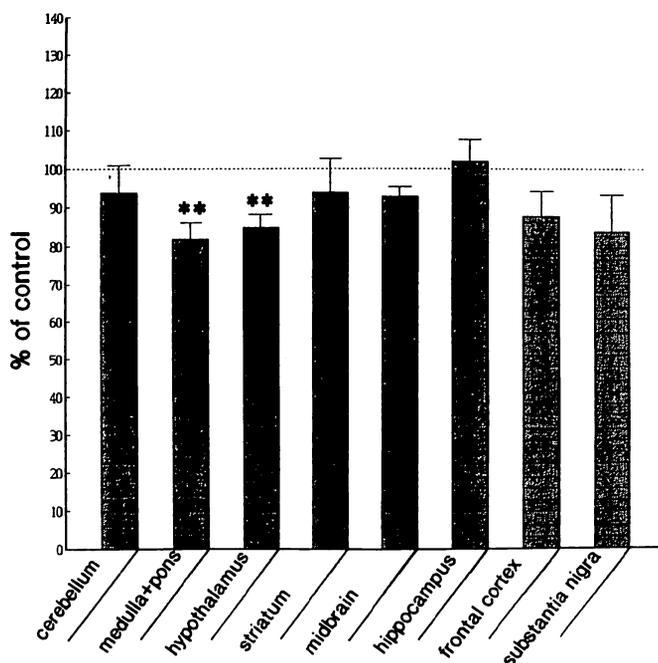


Fig.5 Effects of postnatal hypoxia on NE levels in the rat brain. Results are means with SE of the data obtained from eight hypoxia-treated rats and are expressed as the percentage of the respective control values (NE in ng/mg protein, mean ± SE, n = 9 : the cerebellum, 2.62 ± 0.11 ; pons + medulla, 5.21 ± 0.19 ; hypothalamus, 15.3 ± 0.4 ; striatum, 1.22 ± 0.11 ; midbrain, 5.65 ± 0.33 ; hippocampus, 3.78 ± 0.33 ; frontal cortex, 4.80 ± 0.20 ; substantia nigra, 3.73 ± 0.41). ** p < 0.01 compared with the control values using Student's t-test (福嶋ら, 1990)

次に、dopamine (DA)、3, 4-dihydroxy-phenylacetic acid (DOPAC)、およびhomovanillic acid (HVA) の含量を両群の間で比較検討した (Fig. 6)。hypoxia群では、橋・延髄におけるDAの有意な低下、黒質におけるDOPACの有意な低下、および海馬におけるHVAの有意な低下が認められた。また、海馬ではDAとDOPACの含量も低下していた (有意差なし)。なお、hypoxia群では線条体のGABA含量が対照群の平均値 (14.6 nmol/mg) と比較して121%を示し、有意に増加していた (p < 0.05 by Student's t-test)。

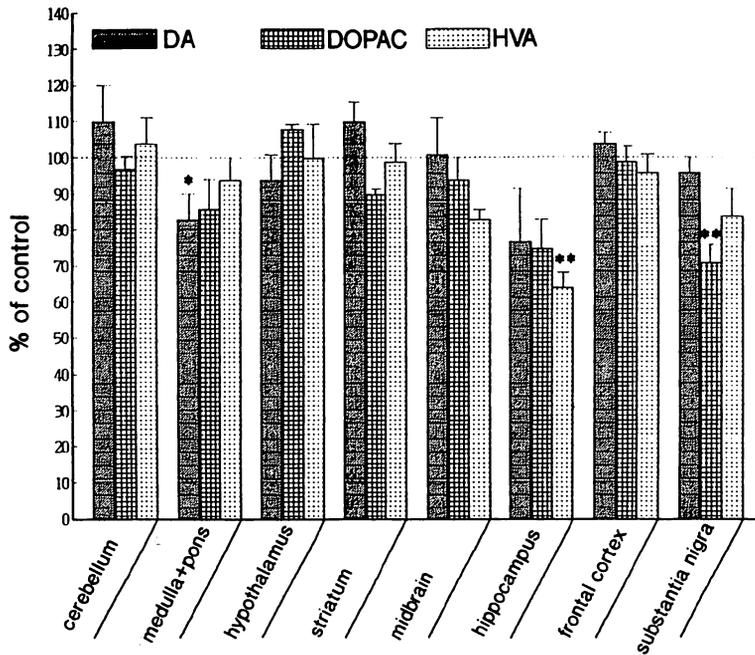


Fig.6 Effects of postnatal hypoxia on DA, DOPAC, and HVA levels in the rat brain. Results are means with SE of the data obtained from eight hypoxia-treated rats and are expressed as the percentage of the respective control values (DA, DOPAC, and HVA in ng/mg protein, mean \pm SE, n = 9: the cerebellum, 0.09 ± 0.01 , 0.07 ± 0.01 and 0.10 ± 0.01 ; pons + medulla, 0.58 ± 0.03 , 0.28 ± 0.02 and 0.18 ± 0.01 ; hypothalamus, 2.86 ± 0.14 , 0.73 ± 0.05 and 0.22 ± 0.03 ; striatum, 47.6 ± 1.3 , 19.9 ± 1.0 and 7.53 ± 0.36 ; midbrain, 1.86 ± 0.20 , 0.52 ± 0.05 and 0.30 ± 0.04 ; hippocampus, 0.35 ± 0.07 , 0.12 ± 0.01 and 0.10 ± 0.01 ; frontal cortex, 15.4 ± 1.0 , 3.86 ± 0.21 and 1.84 ± 0.11 ; substantia nigra, 10.9 ± 0.8 , 10.2 ± 0.7 and 2.44 ± 0.18 , respectively). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the control values using Student's t-test. (福嶋ら, 1990)

そこで、このような脳内 monoamine 系の変化が hypoxia 群のけいれん準備性に対して関与しているか否かを調べる目的で、GABA 受容体の選択的な agonist で monoamine 系とは異なる系に作用する bicuculline (BIC) を用いて、この BIC に対するけいれん反応、および monoamine oxydase 阻害剤である iproniazid (IPR) で前処置した際の BIC けいれん反応を両群間で比較検討した (Table 1)⁹⁾

まず、生後 3-4 ヶ月齢の両群のラットに BIC を 2.0mg/kg 腹腔内に投与し、その後 30 分間に出現した myoclonus (MC)、全身けいれん (GC)、および 4 分以上 GC が持続する重積状態 (SE) の出現頻度を、表面脳波 (両側感覚運動野) を記録しながら検討した。また、両群の BIC けいれん反応を severity score を用いて検討した。すなわち、発作波のみは 1 点、MC は 2 点、GC は 3 点、SE は 4 点とし、観察時間内に認められた最高得点を severity score として記録した。その

結果、hypoxia群では対照群と比較してGCとSEの出現率、および、severity scoreが有意に高値を示し、hypoxia群ではBICけいれん反応の増強がみられた (Table 1、破線より上のデータ)。次に、生後3-4ヵ月齢の両群の別のラットに15、30、または100mg/kgのいずれかの投与量のIPRを腹腔内に1回投与し、その22-24時間後にさらに2.0mg/kgのBICを腹腔内投与して、BIC投与後30分間における発作症状および発作波を観察した。その結果、IPR前処置によって両群のBICけいれんはともに抑制され、しかも、hypoxia群と対照群との間でBICけいれんには質的にも量的にも差は認められなかった (Table 1、破線より下のデータ)。15および30mg/kgの低投与量のIPRによる前処置では、対照群におけるBICけいれんの抑制は、IPRで前処置を行っていない対照群と比較して軽度であったのに対して、hypoxia群におけるBICけいれんの抑制は、IPRで前処置を行っていないhypoxia群と比較して高度であった。これらの結果は、IPRで前処置を行っていない場合のhypoxia群におけるBICけいれん反応の増強に、NEおよびDA系の機能低下が重要な役割を果たしていることを示唆している。

Table 1 Incidence of motor seizures and severity scores of seizures induced by 2.0 mg/kg of BIC following pretreat-ment with IPR

IPR (mg/kg)	Group	Incidence (%)			Severity score (points, mean±SD)
		MC	GC	SE	
-	C (n=20)	35	25	20	1.5±1.5
-	H (n=20)	65	60]*	50]*	2.7±1.6]**

15	C (n=10)	20	20	10	1.2±1.3
15	H (n=10)	20	10	10	1.1±1.2
30	C (n=10)	20	10	10	1.4±1.0
30	H (n=10)	30	20	20	1.5±1.4
100	C (n=10)	0	0	0	0.8±0.4
100	H (n=10)	0	0	0	0.8±0.4

*p<0.05 by χ^2 -test, **p < 0.05 by Mann-Whitney U test

BIC, bicuculline; IPR, iproniazid; C, control group; H, hypoxia group, MC, myoclonus; GC, generalized convulsion; SE, status epilepticus

(modified from Mutoh, 1991).

Ⅲ. 考 察

生後10日目に100%窒素ガスに暴露された成ラットは、対照群と比較して扁桃核キンドリング形成の促進¹⁾、およびPTZとBICに対するけいれん反応の増強^{5, 6)}を示すことが明らかとなった。これらの所見は、周生期hypoxiaが、その後けいれん準備性の亢進をもたらすことを示している。

hypoxia群の成ラット脳では、橋・延髄および視床下部のNE含量の低下、橋・延髄におけるDAの低下、海馬におけるHVAの低下など、けいれんに対して抑制的に作用すると考えられているNEおよびDA系の障害が見いだされた³⁾。さらに、IPR前処置によるBICけいれんの検討により、hypoxia群のBICけいれん反応の増強にはmonoamine系の機能低下が関与していることが示された⁶⁾。したがって、周生期hypoxiaによってもたらされるけいれん準備性の亢進にはNEやDA系の機能低下が関与していると考えられる。なお、GABA系の関与については今後の検討が必要である。

ところで、hypoxia群では、一次全般化けいれんのモデルであるPTZけいれんの増強が幼若期(15-30日齢)のみならず成熟期(60日齢以降)においても認められたのに対して、二次全般化けいれんのモデルである扁桃核キンドリング形成の促進は成熟期においてのみ認められた^{1, 7)}。これらの結果は、脳が幼若な時期と成熟した時期とでは、けいれん準備性亢進の現れ方が異なることを示しており、興味深い所見である。

Olsonら⁸⁾は、生後2日目のラットを、一側の脳虚血後に100%窒素ガスに20分間暴露すると、生後10日から20日目までの時期にhyperthermiaに対するけいれん閾値が有意に低下することを報告している。一方、Mshéら⁹⁾は、生後1日目あるいは10日目のラットを6%の低酸素に数時間暴露して、生後28日目に扁桃核キンドリング形成過程およびflurothylけいれん閾値を検討しているが、対照群との間に有意な差は認められなかった。また、周生期に100%窒素ガスに暴露されたrabbitの生後2ヵ月目に行った扁桃核キンドリングにおいても、その形成速度は対照群と比較して差がなかったことが報告されている²⁾。そのほか、Holmesら⁴⁾は、13日目と28日目に、一側頸動脈結紮後に6%の低酸素に数時間暴露するというLevine procedureでhypoxia-ischemiaに暴露したラットに対して、その2日後に頸動脈結紮側と同側の扁桃核キンドリング形成を検討した結果、対照群と比較してキンドリング形成の著しい抑制がみられたと報告している。

このように、周生期hypoxiaとけいれん準備性との関連性については必ずしも一致した実験結果が得られていない。その理由としては、研究者によってhypoxia暴露方法やけいれん誘発法、あるいはけいれん誘発を行う時期が異なることなどが考えられる。

我々が行ってきた一連の研究は、周生期hypoxiaがてんかんの病因の1つとして重要であることを示唆するものであり、今後さらに実験的検討を加える予定である。

IV. 結 論

生後10日目に100%窒素ガスに暴露したラット(H群)では、対照群と比較して、60日齢以降の成熟期におけるキンドリング形成の促進、成熟期におけるbicuculline(BIC)けいれん反応の増強、および幼若期(15-30日齢)から成熟期にかけてのPTZけいれん反応の増強が認められた。H群の成熟期における脳内monoamine・amino酸含量の検討、およびmonoamine oxydase阻害剤であるipromiazid前処置によるBICけいれん反応の検討により、H群の成熟期におけるけいれん準備性の亢進にはNE系およびDA系の障害が関与していることが示唆された。

V. 文 献

- 1) Chiba S : Long-term effect of postnatal hypoxia on the seizure susceptibility in rats. *Life Sci* 37 ; 1597 - 1604, 1985.
- 2) DeLeo JA, Applegate CD, Burchfiel JL, et al : Perinatal exposure to anoxia alone does not alter the susceptibility to amygdaloid-kindled seizures in the adult rabbit. *Brain Res* 522 ; 168 - 171, 1990.
- 3) 福嶋隆一、吉田幸宏、千葉 茂 : 幼若期hypoxiaが成熟ラットの脳内モノアミン・アミノ酸含量に及ぼす影響—けいれん準備性との関連から—。 *薬物・精神・行動* 10 ; 335 - 342, 1990.
- 4) Holmes GL, Weber DA : Effects of hypoxic-ischemic encephalopathies on kindling in the immature brain. *Exp Neural* 90 ; 194 - 203, 1985.
- 5) Matsumoto M : The effects of perinatal hypoxia on pentylenetetrazol-induced seizures in developing rats. *Life Sci* 46 ; 1787 - 1792, 1990.
- 6) Moshé SL, Albaka BJ : Perinatal hypoxia and subsequent development of seizures. *Physiol Behav* 35 ; 819 - 823, 1985.
- 7) 宗岡幸広、千葉 茂、宮岸 勉 : 周生期hypoxiaがけいれん準備性に及ぼす影響—幼若ラット扁桃核キンドリングによる検討。 *北海道医誌* 66 ; 591 - 592, 1991.
- 8) Mutoh F : Effect of postnatal anoxia on seizure susceptibility in rats : bicuculline-induced seizures and pretreatment with iproniazid. *Life Sci* 48 ; 2563 - 2569, 1991.
- 9) Olson JE, Horne DS, Holtzman D, et al : Hyperthermia-induced seizures in rat pups with preexisting ischemic brain injury. *Epilepsia* 26 ; 360 - 364, 1985.
- 10) Racine RJ : Modification of seizure activity by electrical stimulation : II. motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 32 ; 281 - 294, 1972.