

ダブルトレーサ法によるてんかん焦点の局所脳血流
と神経伝達物質レセプターの研究

(課題番号 04807079)

平成4年、5年度科学研究費補助金
一般研究(C)研究成果報告書

平成7年3月

研究代表者 米 増 祐 吉
(旭川医科大学医学部脳神経外科)

<はしがき>

近年てんかんの外科治療が盛んに行われるようになり、てんかん焦点の画像診断が重要となってきた。これまで、SPECT(single photon emission tomography) や PET (positron emission tomography) を用いた、てんかん焦点の脳血流・脳代謝測定が試みられてきたが、そのてんかん焦点診断率は必ずしも高くない。てんかんのメカニズムにより密接に関与すると考えられる神経伝達物質レセプター測定が近年試み始められているものの、未だ一定の見解は無い。そこで本研究では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と脳血流を同時に研究した。また当施設で行われているてんかん外科の臨床例も併せて検討した。

<研究組織>

研究代表者	米増祐吉（旭川医科大学	医学部	脳神経外科・教授）
研究分担者	田中達也（旭川医科大学	医学部	脳神経外科・助教授）
	川田佳克（旭川医科大学	医学部	脳神経外科・助手）

研究経費	平成4年度	600	千円
	平成5年度	600	千円
	計	1200	千円

<研究発表>

1、学会誌等

- (1) 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.
- (2) 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.
- (3) 福田博、田中達也、米増祐吉 (1993) 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 autography`` を用いた研究。てんかんをめぐって: 第35回北海道てんかん懇話会記念大会号 14, 80 - 85.
- (4) 福田博、田中達也、米増祐吉、Yamamoto, L.Y., Diksic M. : カイニン酸誘発てんかんモデルにおける脳内神経伝達物質の研究. -multiple tracer autography- を用いた研究。てんかん研究の最前線、田中達也編、ライフサイエンス、pp. 38 - 43

2、口頭発表

- (1) 福田博、田中達也、米増祐吉, Yamamoto, L.Y. : 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. 第30回北海道てんかん懇話会、札幌、1991年4月
- (2) 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内セロトニン・レセプターの研究. 第32回北海道てんかん懇話会、札幌、1992年2月
- (3) 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。第35回北海道てんかん懇話会、旭川、1993年9月
- (4) 福田博、田中達也、米増祐吉、Yamamoto, L.Y., Diksic M. : カイニン酸誘発てんかんモデルにおける脳内神経伝達物質の研究. -multiple tracer autoradiography- を用いた研究。第1回日本冬季神経科学会議 ((JWCBR)、富良野、1993年2月
- (5) Fukuda, H., Tanaka, T., Yonemasu, Y. Neurotransmitters and receptor changes in Kainic acid induced seizure, International Pathophysiology Conference, Kyoto 1994

< 研究目的 >

てんかん焦点では、発作間歇期には脳血流が低下し、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レセプター及び脳血流を研究した。

< 実験方法 >

(1) カイニン酸誘発てんかんモデルを用いた動物実験

I. カイニン酸てんかんモデルの作成；

カイニン酸($2 \mu\text{g}/1 \mu\text{l}$)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。発作重責はカイニン酸注入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 ^{14}C -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。 ^{14}C -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 ^{14}C -IAP を除去後、 ^3H -MK801, ^3H -QNB, ^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。

(2) 臨床研究

当院に入院した難治性てんかん患者のてんかん焦点を、long-term EEG / video monitoring, CT, MRI, SPECTによる発作間欠期の脳血流測定、臨床症状、神経心理学的検査などで総合的にてんかん焦点の局在診断を行なった。手術後、切除したてんかん焦点の神経伝達物質レセプターの autoradiography を行なった。

< 結果 >

- (1) 脳血流： ^{14}C -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) NMDA receptor： ^3H -MK801 の autoradiogram で興奮性神経伝達物質の Glutamate の NMDA 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側海馬全体で 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) Acetylcholine receptor： ^3H -QNB の autoradiogram で興奮性神経伝達物質の Acetylcholine 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側海馬全体で receptor binding が低下していた(図4)。
- (4) 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5)。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6）。

- (5) 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7）。
- (6) 5-HT receptor : ^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8）。

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全てにおいて低下していた。すべての神経伝達物質レセプターが、扁桃核、海馬錐体細胞層で低下していたが、抑制系神経伝達物質である GABA, Benzodiazepine, 5-HT receptor は海馬歯状回で逆に上昇していた。

臨床研究

側頭葉てんかん患者で術前発作間欠期に脳血流をSPECTで測定し、術後手術切除標本の神経伝達物質 autoradiography を行なった。症例数はまだ少ないが、動物実験と同様の傾向の結果が得られた。

< 考察 >

SPECT や PET scan 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割程度と言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(6)、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 PET scan 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 Mu-opiate 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(8)。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 PET scan 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(15)。

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。又臨床研究でも動物実験と同様の傾向の結果が得られた。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ため、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・局在診断に有望と考えられた。

< 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., Rondouin, 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., Brown, 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-Natoli, M., Rondouin, 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 [14C] 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 intra-amygdaloid 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.

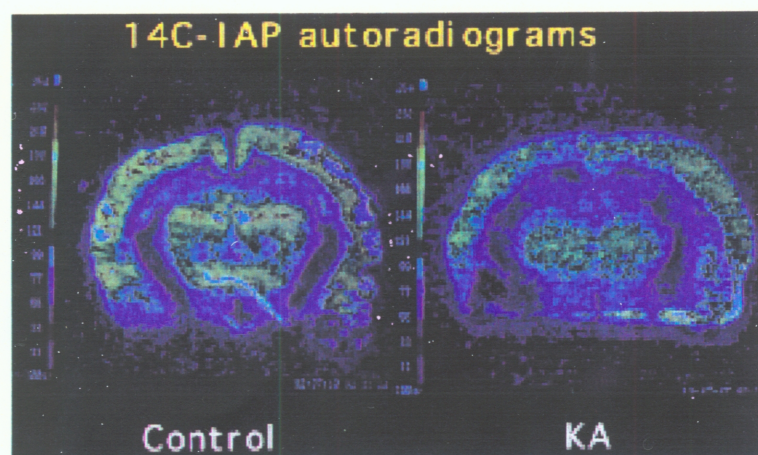
< 表 1 > Results of the multiple tracer autoradiography
in Kainic acid induced seizure

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

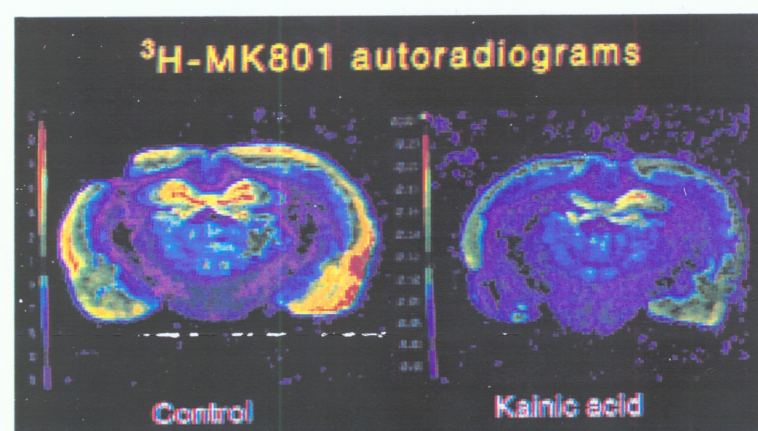
< Summary >

Cerebral blood flow (CBF) and neurotransmitters (NMDA, Acetylcholine, 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 -QNB, ^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. All the receptor bindings were decreased in the left amygdala and pyramidal cell layer of the left hippocampus. However, the GABA, Benzodiazepine, 5-HT receptors were inversely increased in the fascia dentata of the hippocampus bilaterally.

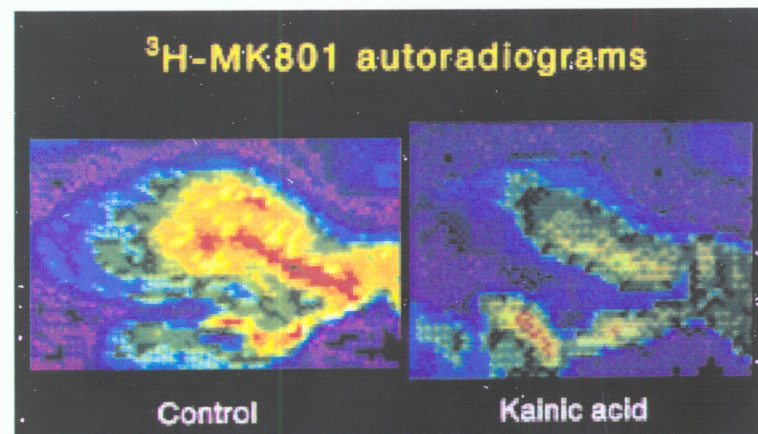
(图 1)



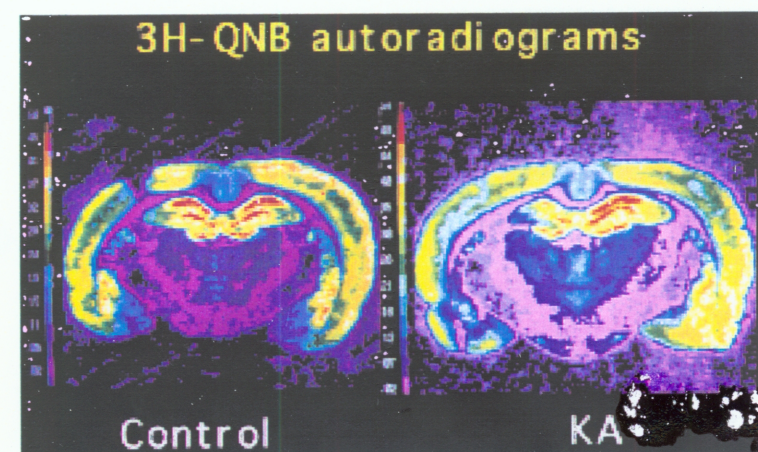
(图 2)



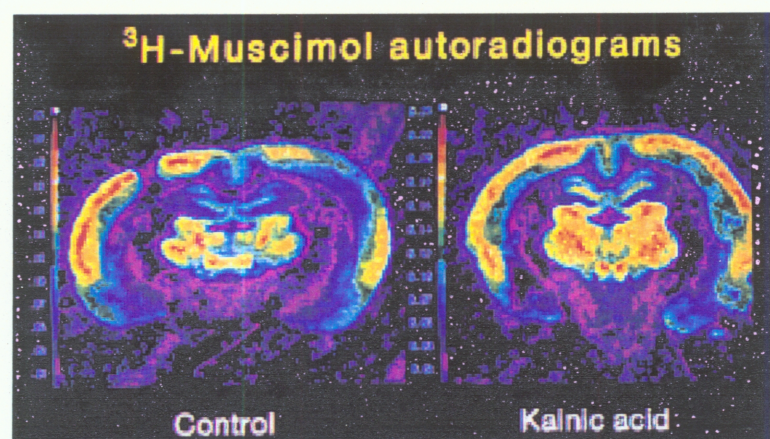
(图 3)



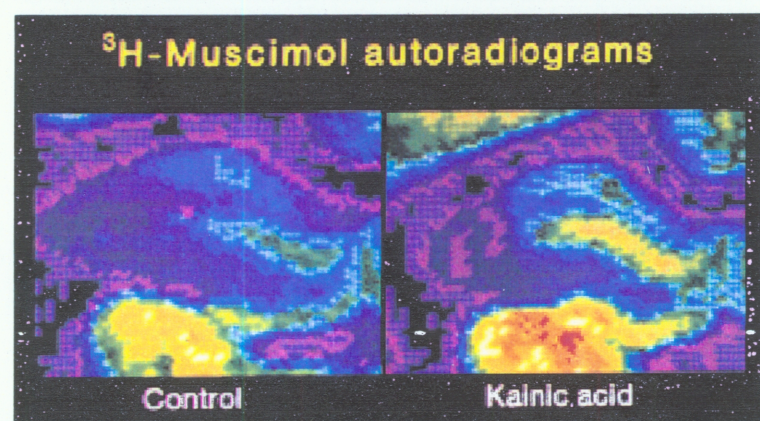
(图 4)



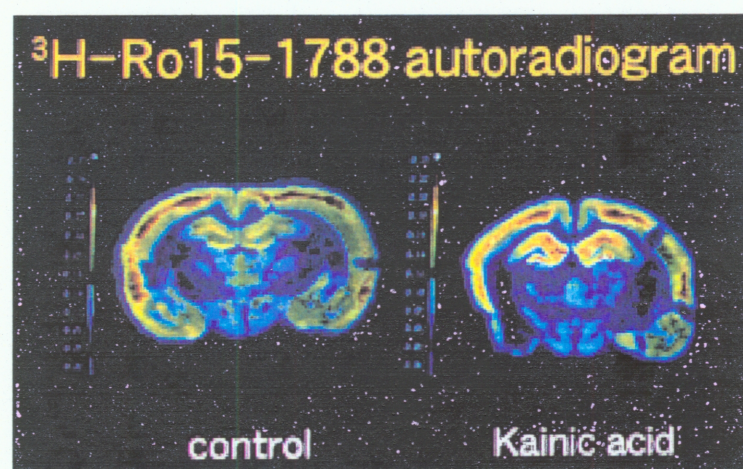
(圖 5)



(圖 6)



(圖 7)



(圖 8)

