

# AMCoR

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

てんかんをめぐって (1999.02) 19巻:86～93.

ラットカイニン酸誘発てんかんモデルにおける海馬顆粒細胞層破壊の影響についての検討

前田高宏, 橋詰清隆, 佐古和廣, 田中達也

# ラットカイニン酸誘発てんかんモデルにおける 海馬顆粒細胞層破壊の影響についての検討

旭川医科大学脳神経外科

前田 高宏、橋詰 清隆、佐古 和廣  
田中 達也

## 1. はじめに

ラット一側扁桃核内にカイニン酸 (kainic acid、以下KA) を微量注入することで、ヒトにおける側頭葉てんかんと似た発作を誘発できることが報告されている。またその病理学的所見でも、ヒトと同様に海馬CA3を中心とした錐体細胞の脱落が見られることが報告されている<sup>1)</sup>。このため、このモデルを用いた側頭葉てんかんの基礎的研究が数多く行われてきた<sup>2,3,4)</sup>。このモデルにおいて、海馬顆粒細胞層は、海馬CA3への重要な興奮の入力経路となっている<sup>5,6)</sup>。

今回我々は、海馬顆粒細胞層をコルヒチンにて破壊したラットを用いて、扁桃核内KA注入によるてんかん発作を誘発し、その行動、脳波、局所脳糖代謝の検討を行った。

## 2. 方 法

### 実験1：脳波、行動の観察

雄Wistarラット7匹を用いた。全身麻酔導入後、定位脳手術装置に固定し、Nadlerら<sup>7)</sup>の方法に従って、コルヒチンを左背側海馬顆粒細胞層 (nose barを0に合わせ、正中より1.8mm外側、Bregmaより3.3mm後方、硬膜より3.3mm下方)、及び腹側海馬顆粒細胞層 (同様に各々4.6mm、5.1mm、5.2mmのところ) に各々2.5  $\mu$ g

ずつ注入した。また7匹は対照として生理食塩水を注入した。両群ともKA注入用及び脳波記録用のchemitorodeを左扁桃核に刺入した。左海馬CA3、左感覚運動野に脳波記録用単極電極を置き、ソケットに接続し、頭蓋冠に固定した。7~10日後に、無麻酔、無拘束下にてchemitorodeよりKAを1  $\mu$ g注入し、脳波、行動の観察を6時間行った。

KA注入後の発作は、Racineのstage分類<sup>8)</sup> (1: mouth and facial movements, 2: head nodding, 3: forelimb clonus, 4: rearing, 5: rearing and falling) に従って、5段階に分類し、KA注入からの各stageの出現時間、海馬、扁桃核からのspike初発までの時間、二次性全般化の初発時間と回数及び最高到達stageを観察した。統計処理には、Mann-WhitneyのU検定を用いた。

### 実験2：発作時の局所脳糖代謝の観察

実験1と同様の方法で左海馬顆粒細胞層にコルヒチンまたは生理食塩水を注入し、左扁桃核にKA注入用のカニューラを置いたラットを作製した。7~10日後にハロセン麻酔下に大腿動脈にカニューレーションし、下半身をギプスにて固定した。麻酔より十分覚醒した後、KAを1

$\mu$ g 扁桃核へ注入し、その2時間後に $^{14}\text{C}$ -deoxyglucose ( $^{14}\text{C}$ -DG) を100  $\mu\text{Ci}/\text{kg}$  静脈内投与し、静注45分後に断頭、凍結切片とし、オートラジオグラムを作製し<sup>9)</sup>、局所脳糖代謝亢進部位の検討をした。

### 3. 結 果

#### 1) 海馬顆粒細胞層に対するコルヒチンの効果

コルヒチン注入7日後のH-E染色標本にて、海馬顆粒細胞層は、腹側、背側海馬ともに、脱落していた。KA注入後6時間経っているが錐体細胞層には明らかな変化は認めなかった (Fig. 1)。

#### 2) 発作時の行動、脳波所見

扁桃核焦点部位でのKA注入から spike 初発までの平均時間は、コルヒチン群で10.8分、コントロール群で2.96分だった ( $p=0.0017$ )。また海馬では、コルヒチン群で37.25分、コントロール群で6.01分であり ( $p=0.006$ )、扁桃核、海馬のいずれでも spike 初発が、コルヒチン群で有意に遅延した (Fig. 2-1)。

KA注入から、二次性全般化の初発までは、コントロール群で33.31分であったのに対し、コルヒチン群では、184.39分とこれも有意に遅延した ( $p=0.0045$ , Fig. 2-2)。

KA注入6時間までの最高到達gradeはコント

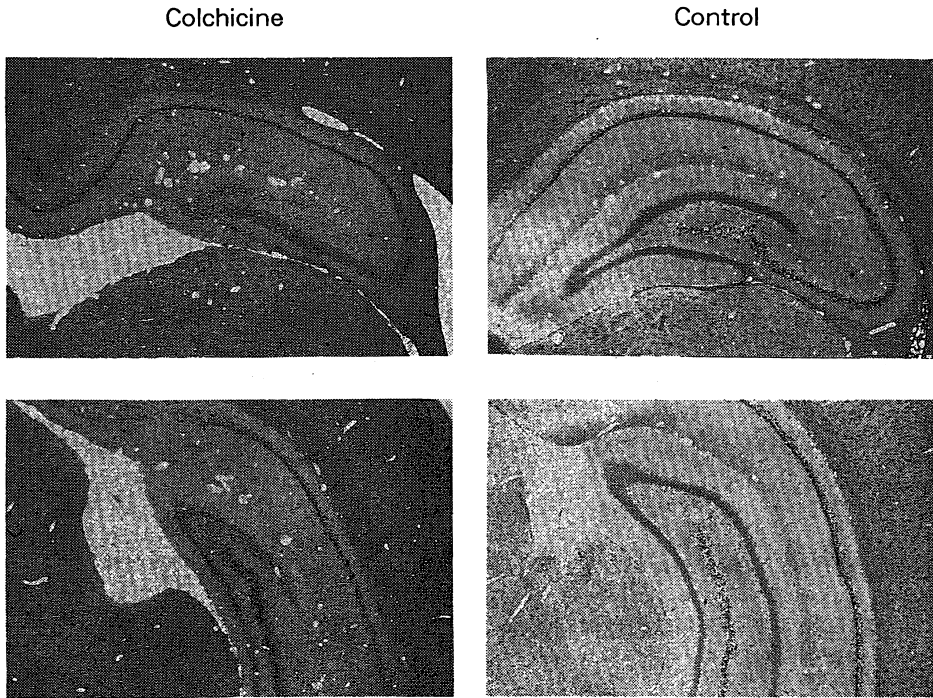


Fig. 1 Histopathological study revealed selective loss of left hippocampal granular cell 7 days after the colchicine injection. Hematoxylin-eosin.  
Upper : dorsal hippocampus  $\times 10$   
Lower : ventral hippocampus  $\times 10$

ロール群で4.43であったが、コルヒチン群では、3.14であり、有意に抑制された ( $p = 0.0088$ , Fig. 2-3)。二次性全般化の回数はKA注入6時間までのいずれの時間帯でも、コルヒチン群が少なく、特に4時間までは統計学的に有意であった (0-1時間;  $p = 0.0073$ , 1-2時間;  $p = 0.0033$ , 2-3時間;  $p = 0.0027$ , 3-4時間;  $p = 0.0152$ , Fig. 2-4)。

各stageの到達時間もstage1~3では有意にコルヒチン群での遅延を認めた (stage 1;  $p = 0.0017$ , stage 2;  $p = 0.0253$ , stage 3;  $p = 0.0321$ )。なおコルヒチン群でstage 4に達したのは2例、stage 5に達したものはなく、コントロール群でもstage 5に達したのは、3例のみであり、stage 4, 5については、両群の比較ができなかった (Fig. 2-5)。

### 3) 局所脳糖代謝所見

今回は局所脳糖代謝率の定量を行っていないため、確実な事は言えないが、定量的に検討するにすぎない<sup>14</sup>C-DGオートラジオグラム (Fig. 3) では、コントロールに比べ、コルヒチン群における両側海馬の糖代謝亢進が抑制され、また、KA注入部である左扁桃核の代謝亢進も抑制されているように思われる。

## 4. 考 察

Goldschmidtら<sup>10</sup>は、海馬顆粒細胞層にコルヒチンを2.5~3.5  $\mu$ g注入するか、10  $\mu$ g脳室内に投与することで、7日間ではほぼ完全に顆粒細胞層を選択的に破壊でき、その効果は注入120日後も持続していることを報告している。

コルヒチンはデンドライトに豊富に存在するマイクロチューブの構成要素であるチューブリンの $\alpha$ サブユニットに結合する<sup>11</sup> ことによってaxonal transportを抑制する<sup>12</sup>。一方、海馬顆粒細胞は、短期および長期のneuroplasticityに富むところであり、新たなシナプスの維持のために活発な細胞内輸送系が必要である。顆粒細胞は、このような特殊性を持つためにコルヒチンにより、選択的に破壊されるものと考えられている<sup>10</sup>。

この報告以来、てんかん発作における海馬顆粒細胞層の役割を解明する目的で、このモデルを用いた報告が行われてきた。OkazakiとNadler<sup>13</sup>は、背側、腹側海馬顆粒細胞層を破壊した後、KAを脳室内投与したところ、有意に発作を抑制し、病理学的にも、海馬CA3, 4の脱落が抑制されたと報告した。よって、KA誘発辺縁系発作の進展に顆粒細胞が重要であると結論している。同様に、Dasheiffら<sup>14</sup>は、コルヒチンで海馬顆粒細胞層を破壊し、扁桃核をキンドリングし、また、Tanakaら<sup>15</sup>は、イボテン酸でラット海馬を破壊後に扁桃核をキンドリングし、いずれも発作の形成が遅れたと報告している。

一方、Greckschら<sup>16</sup>は、ラットの両側海馬顆粒細胞層を破壊した後、ペンチレンテトラゾールを腹腔内投与したところ、けいれん発作の若干の増強が見られたと報告している。

この様に、けいれん発作における、海馬顆粒細胞層の役割は、報告により促進するというものと、抑制するというものの相反する報告がなされている。KAは主に海馬、扁桃核などの辺

縁系に作用するのに対し、ペンチレンテトラゾールは脳幹、大脳皮質に作用し大脳皮質の興奮が先行する。このように、刺激薬物の作用部位の違いが、てんかん発作に対する海馬顆粒細胞

胞層破壊による影響の違いに関与しているのかもしれない。

また今回の実験では、海馬からのスパイク初発が遅れたのみならず、KA注入部である扁桃

Figure 2 - 1

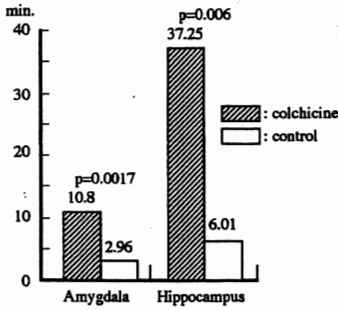


Figure 2 - 2

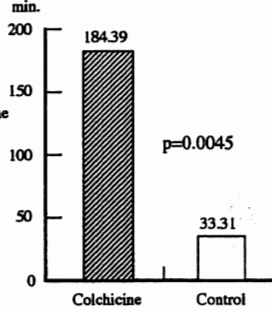


Figure 2 - 3

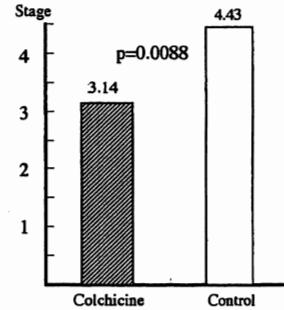


Figure 2 - 4

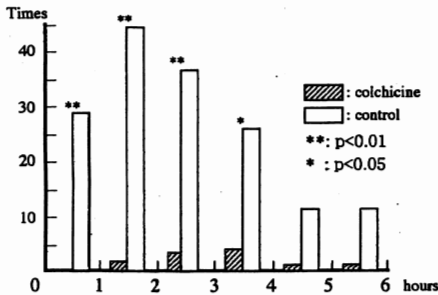


Figure 2 - 5

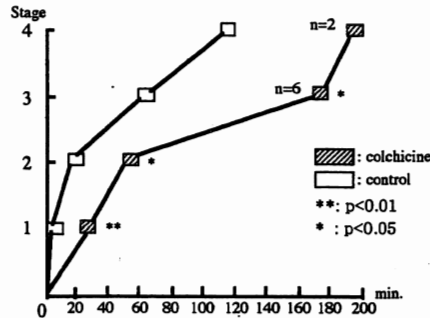


Fig. 2

Figure 2 - 1: Bar graphs displaying the time of the first spike from amygdala and hippocampus since kainic acid injection in the left amygdala.

Figure 2 - 2: Bar graphs displaying the time of the first generalized seizure from kainic acid injection in the left amygdala.

Figure 2 - 3: Bar graphs displaying the maximum Racine's stage for 6 hours after the kainic acid injection in the left amygdala.

Figure 2 - 4: Bar graphs displaying times of seizure for 6 hours from kainic acid injection in the left amygdala.

Figure 2 - 5: The graphs displaying the time of the seizure progression after the kainic acid injection in the left amygdala.

Values are given as the mean for seven colchicine injection rats and seven control rats. The p value was obtained using Mann-Whitney U-test.

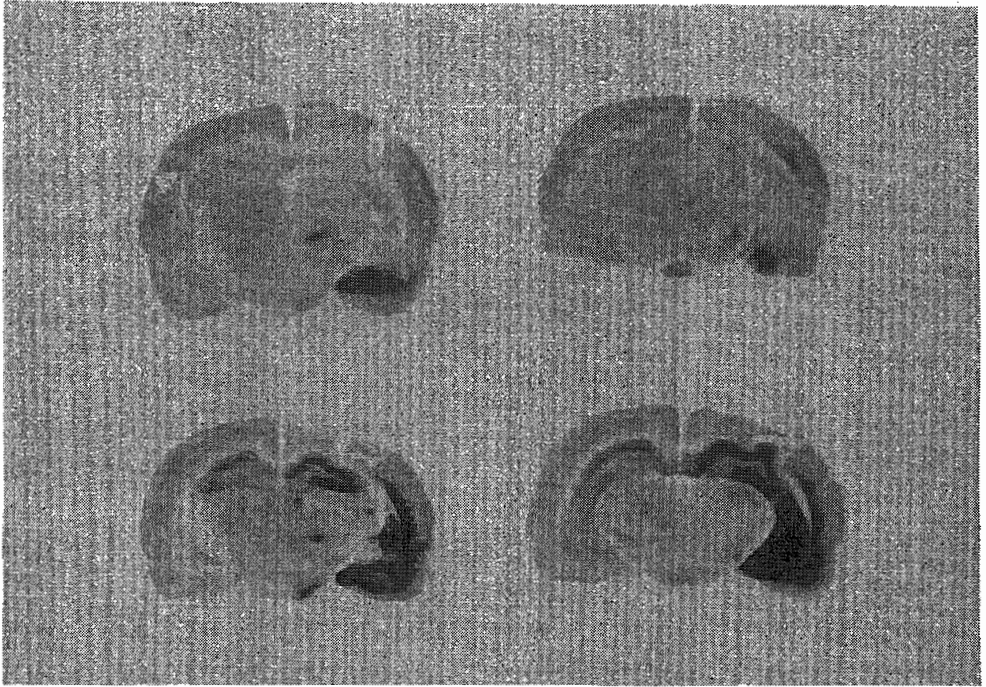


Fig. 3  $^{14}\text{C}$ -deoxyglucose autoradiography during limbic seizure status induced kainic acid injection in the left amygdala. Colchicine pretreatment rat seems lower uptake of  $^{14}\text{C}$  in the bilateral hippocampus and left amygdala where kainic acid injection site.  
Upper : Colchicine pretreatment rat  
Lower : Control rat

核からのスパイク初発も遅れた。さらに $^{14}\text{C}$ -デオキシグルコースオートラジオグラムにて、やはり、海馬のみならず、扁桃核の代謝亢進が抑制されていたことが示唆された。この事より、扁桃核へのKA注入モデルにおいて、扁桃核で形成されたてんかん性興奮は、海馬に興奮を引き起こし、さらにその興奮が扁桃核にはいり、さらに扁桃核を興奮させるといったてんかん性興奮の増幅機構が、扁桃核と海馬の間にあるものと思われる。実際にキンドリング実験では海馬のてんかん性興奮が扁桃核のてんかん閾値を低下させることが証明されている<sup>17, 18)</sup>。そして、KA注入後にその興奮が、扁桃核および海馬の

発作閾値を超えたときに辺縁系発作が起こり、さらに大脳皮質にその興奮が伝わったときに二次性全般化発作となるものと思われる。

## 文 献

- 1) Ben-Ari Y, Tremblay E, Ottersen OP: Injections of kainic acid into the amygdaloid complex of the rat: an electrographic, clinical and histological study in relation to the pathology of epilepsy. *Neuroscience* 5 : 515 - 528, 1980
- 2) Tanaka S, Kondo S, Tanaka T, Yonemasu

- Y: Long-term observation of rats after unilateral intra-amygdaloid injection of kainic acid. *Brain Res* 463 : 163 - 167, 1988
- 3) Tanaka S, Sako K, Tanaka T, Yonemasu Y: Regional calcium accumulation and kainic acid(KA)-induced limbic seizure status in rats. *Brain Res* 478 : 385 - 390, 1989
- 4) Tanaka S, Sako K, Tanaka T, Nishihara I, Yonemasu Y: Uncoupling of local blood flow and metabolism in the hippocampal CA3 in kainic acid-induced limbic seizure status. *Neuroscience* 36 : 339 - 348, 1990
- 5) 後藤 昇: 海馬の解剖学. *臨床神経* 12 : 33 - 36, 1994
- 6) 平田 洋, 小川紀雄: 海馬の神経伝達物質とレセプター. *臨床神経* 12 : 42 - 46, 1994
- 7) Nadler JV, Cuthbertson GJ: Kainic acid neurotoxicity toward hippocampal formation: Dependence on specific excitatory pathways. *Brain Res* 195 : 47 - 56, 1980
- 8) Racine RJ: Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 32 : 281 - 294, 1972
- 9) Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, Des Rosiers MH, Patlak CS, Pettigrew KD, Sakurada O, Shinohara M: The <sup>14</sup>C-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 : 897 - 916, 1977
- 10) Goldschmidt RB, Steward O: Preferential neurotoxicity of colchicine for granule cells of the dentate gyrus of the adult rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 77 : 3047 - 3051, 1980
- 11) Williams RF, Mumford CL, Williams GA, Floyd LJ, Aivaliotis MJ, Martinez RA, Robinson AK, Barnes LD: A photo affinity derivative of colchicine: 6'-(4'-azido-2'-nitrophenylamino)hexanoyldeacetylcolchicine. Photolabeling and location of the colchicine-binding site on the  $\alpha$  subunit of tubulin. *J Biol Chem* 260 : 794 - 802, 1985
- 12) Steward O, Goldschmidt RB, Sutula T: Neurotoxicity of colchicine and other tubulin-binding agents: a selective vulnerability of certain neurons to the disruption of microtubules. *Life Sci* 35 : 43 - 51, 1984
- 13) Okazaki MM, Nadler JV: Protective effects of mossy fiber lesions against kainic acid-induced seizures and neuronal degeneration. *Neuroscience* 26 : 763 - 781, 1988

- 14) Dasheiff RM, McNamara JO: Intradentate colchicine retards the development of amygdala kindling. *Ann Neurol* 11: 347 - 352, 1982
- 15) Tanaka T, Kondo S, Hori T, Tanaka S, Yonemasu Y: Various hippocampal lesions induced by multi-fractional ibotenic acid injections and amygdala kindling in rats. *Brain Res* 559: 154 - 158, 1991
- 16) Grecksch G, Ruethrich H, Bernstein H G, Becker A: PTZ-kindling after colchicine lesion in the dentate gyrus of the rat hippocampus. *Physiology & Behavior* 58: 695 - 698, 1995
- 17) 佐藤光源: Kindling — 今日的意義について — II. 側頭葉てんかんとその精神症状の発現機序. *臨床脳波* 24: 140 - 147, 1982
- 18) Burhnam MW: Primary and "transfer" seizure development in the kindled rat. In: Kindling, de Wada JA, Raven Press, New York, pp61 - 83, 1976



## Summary

The effect of hippocampal dentate granule cell lesions upon the limbic seizure model of rats

Takahiro Maeda, Kiyotaka Hashizume, Kazuhiro Sako, Tatsuya Tanaka

Department of Neurosurgery, Asahikawa Medical College, Japan

The purpose of this study was to determine the role of dentate granule cells in limbic seizure caused by unilateral intra-amygdaloid administration of kainic acid (KA).

Stereotactic surgery was performed in Wistar rats to insert stainless steel injection chemitorode in the left amygdala. Left dentate granule cells lesion was made by destroying with colchicine. After recovery period for 7 days, the rats were divided into two groups, one for observation of symptoms and electroencephalographic findings for 6 hours after the KA injection in the left amygdala, and another for  $^{14}\text{C}$ -deoxyglucose autoradiography.

The histological study demonstrated selective loss of the left hippocampal dentate granule cells 7 days after the colchicine injection. After kainic acid injection, initiation of the spike discharge was significantly retarded in the hippocampus and the amygdala in comparison with control group. Progression, frequency and intensity of the KA induced seizures were also inhibited by dentate granule cells lesion. During limbic seizure status, the density of the  $^{14}\text{C}$ -deoxyglucose autoradiography seemed to be decreased in the hippocampus and the amygdala where the KA was injected.

These data suggest that hippocampal dentate granule cells play an important role of initiation and progression of the KA induced limbic seizure.