

AMCoR

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

てんかんをめぐって (1998.02) 18(XVIII)巻:113~121.

ラット橋網様体カイニン酸注入による全般性強直発作モデル

前田高宏、橋詰清隆、國本雅之、佐古和廣、田中達也

ラット橋網様体カイニン酸注入による 全般性強直発作モデル

旭川医科大学脳神経外科

前田 高宏、橋詰 清隆、國本 雅之
佐古 和廣、田中 達也

PenfieldとJasper¹²⁾が、定型欠神発作の両側棘徐波複合の神経機序を説明する仮説として、中心脳系の概念を提唱して以来、脳幹網様体が全般発作の発現、部分発作の全般化に関与していると考えられるようになった。

また動物実験でも、一側性に中脳網様体への電気刺激^{1, 5, 11)}、ピククリン⁶⁾、カイニン酸(KA)¹⁴⁾の局所投与にて全身性強直発作が出現し、中脳網様体と両側大脳皮質に同期する発作波が認められることが報告されている。さらに中脳網様体以外の橋および延髄網様体刺激でも全身性強直発作が誘発されることが報告されている^{6, 9)}。この様に全般てんかんの発現メカニズムに脳幹網様体に関与していることが考えられているが、その真のメカニズムは未だ明らかになっていない。本研究では、興奮性アミノ酸のグルタミン酸アナログであるカイニン酸をラットの一側橋網様体 (PRF = pontine reticular formation) に微量注入することにより、てんかん発作を誘発し、発作時脳波の特徴および行動上の観察を行った。この観察より、これらのモデルが全般発作のモデルとして有用であることを報告する。また、発作急性期の [¹⁴C] 2-deoxyglucose (¹⁴C-DG) によるオートラジオグラフィーを行い、local cerebral glucose

utilization (LCGU) を測定し、この発作がどのような経路で全脳に波及するのかを検討した。

〈方 法〉

1) 行動および脳波の観察: 体重280-320gのWistarラット10匹を用いた。Pentobarbital 50mg/kgの腹腔内投与にて全身麻酔導入後、定位脳手術装置に固定した。KA注入用のカニューラ (外径0.6mm) をPaxinosとWatson¹¹⁾のアトラスにしたがって、定位的にPRF (reticularis pontis oralis) に挿入した。また、脳波記録用のモノポーラー電極を両側の感覚運動野と視床CM核に置いた。電極は、プラグに接続し、プラグは、カニューラとともに歯科用レジセメントにて頭蓋に固定した。手術の7日後、ラットをrecording chamberに入れ、カニューラよりリン酸緩衝液にて1.0 μ g/ μ lに溶解したKAを0.8から1.0 μ gを無菌的に注入した。注入後、脳波、臨床所見を12~24時間連続して観察し、その後は、一日に3~6時間観察した。注入7日後、ラットに、pentobarbital腹腔内投与による深麻酔をかけ、10%ホルマリン溶液にて灌流し、脳を摘出し、固定後、冠状断切片を作製し、

ヘマトキシリン-エオジン染色標本を作成した。

- 2) The LCGU study : LCGU測定には、橋網様体にカニューラをいれた雄のWistarラットを14匹用いた。ハロセンにて全身麻酔をかけ、大腿動静脈にカニューレーションし、下半身をギプス固定した。麻酔からの覚醒を最低2時間待った後、7匹にはカイニン酸0.8 μ g注入し、対照として7匹にはリン酸緩衝液を注入した。注入1時間15分後に¹⁴Cデオキシグルコースを100 μ Ci/kg 静注し、その後45分まで採血し、断頭した。素速く脳を取り出し、凍結し、クライオスタットにて厚さ20 μ mの切片を作製し、ホットプレートにて乾燥後、X線フィルムに7日間曝写し、オートラジオグラムを作製した。以下、ソコロフの方法¹⁰⁾ にしがって、局所脳糖代謝率を算出した。

〈結 果〉

KAのPRF内への微量注入直後から数分で、hyperventilationが現われた。その後平均4.5分後より頭部及び上体を右又は左へ屈曲する姿勢をとり始め、平均16.9分より間歇的にrecording chamber内を走り、時に飛び回るようになる(wild running)。その後、平均22.5分後より上体を強く左へねじる、もしくは強く後屈させ、四肢を強く進展させる強直肢位をとるようになる(Fig.1-A)。しばしばラットは尾までトーンスの増強が見られ、尾を立てるようになる(serpentine tail: Fig1-B)。強直肢位はwild runningと交互に見られるが、その

後次第に強直肢位をとることが多くなり注入後約2時間後には、wild runningは見られなくなり、強直肢位が持続するようになる。この時期にはしばしば顔面、四肢の間代性痙攣および、ごく稀に辺縁系の発作で見られるようなfallingやrearingがごく短時間見られることもあった。この強直肢位は注入後3~4時間をピークに、以後次第に回復し、24時間以内に完全に消失した。

脳波所見は、はじめは左PRFに限局する低振幅のスパイクが見られるのみであった。wild runningの時には、両側感覚運動野に速波成分の増加を認めた(Fig2-A)。平均50.9分後より左PRFから起始し、同時に両側感覚運動野に波及する高振幅の発作波が出現した(Fig2-C)。これは、脳波記録を行ったすべての部位に同時に起った。発作のピーク時には脳波上の発作波は、5~10分間隔で出現した。持続性の強直肢位をとり続ける時のラットの姿勢は、発作波の有無に関係なく同じであった。

serpentine tailをとるときも脳波上に明らかな変化は見られなかった(Fig2-B)。24時間後の脳波は、脳波記録を行ったすべての部位で、同期するinter-ictal discharge (IID) が認められ(Fig2-D)、このIIDも3日後にはほぼ消失し(Fig2-E)、脳波上、行動上も完全に正常に戻った。

病理所見: PRFへのKA注入後7日目のH-E染色標本にて、カニューレ周囲のグリオーシス、および、注入側にreticularis pontis oralisの神経細胞のピクノーシスを認めたが、注入反対側のreticularis pontis oralisの変性は軽度であった(Fig3-A,B)。また海馬の錐体細胞の変

性はほとんど認められなかった (Fig3-C, D)。

LCGU所見: KA注入後2時間の14C-DGによるオートラジオグラムをFig-4に、これより測定したLCGUをTable-1に示す。両側の中脳および、橋網様体、periaqueductal gray、上丘、縫線核、青斑核、不確帯、内側前頭束、海馬 CA1,3、扁桃核は、Mann-Whitney U-testにてcontrolに比べて、 $p < 0.05$ で優位に

LCGUが亢進していた。また、注入側の外、内側膝状体、外側中隔野、視床VM核、lateral preoptic areaのLCGUが優位に亢進していた。嗅内野、梨状葉は有意差がないものの、LCGUが亢進しているものと、していないものばらつきが大きかった。また視床CM核では優位差がなかったが、注入側のp-valueが0.064であり、LCGUが亢進している傾向があった。

Figure 1A

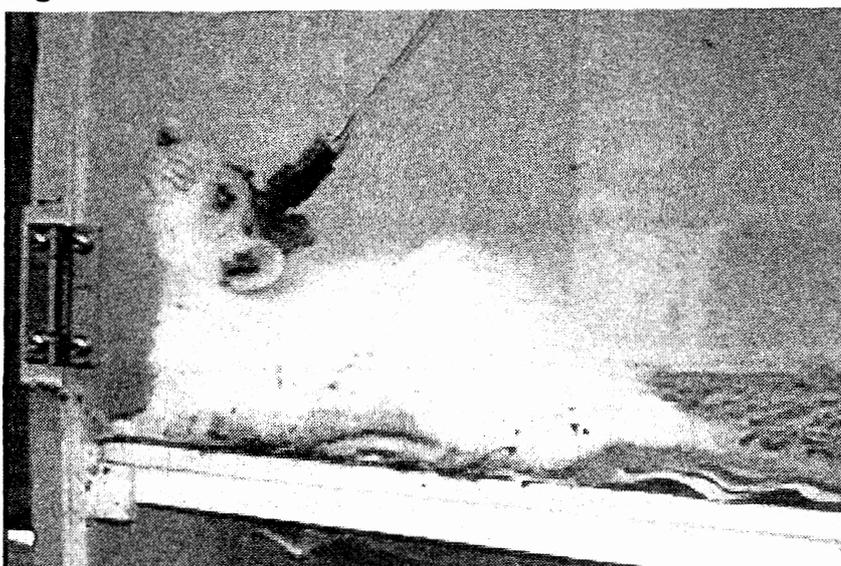


Figure 1B

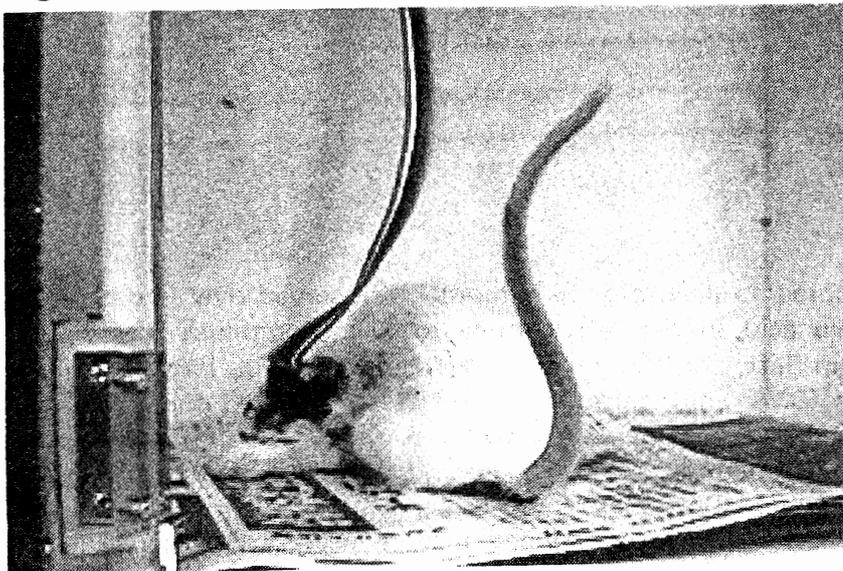


Fig-1. Photographs demonstrated the behaviors of the No.5 rat after the KA injection into left pontine reticular formation.
(A) Generalized tonic seizure at 90 min. after the KA injection.
(B) Serpentine tail at 30 min. after the KA injection.

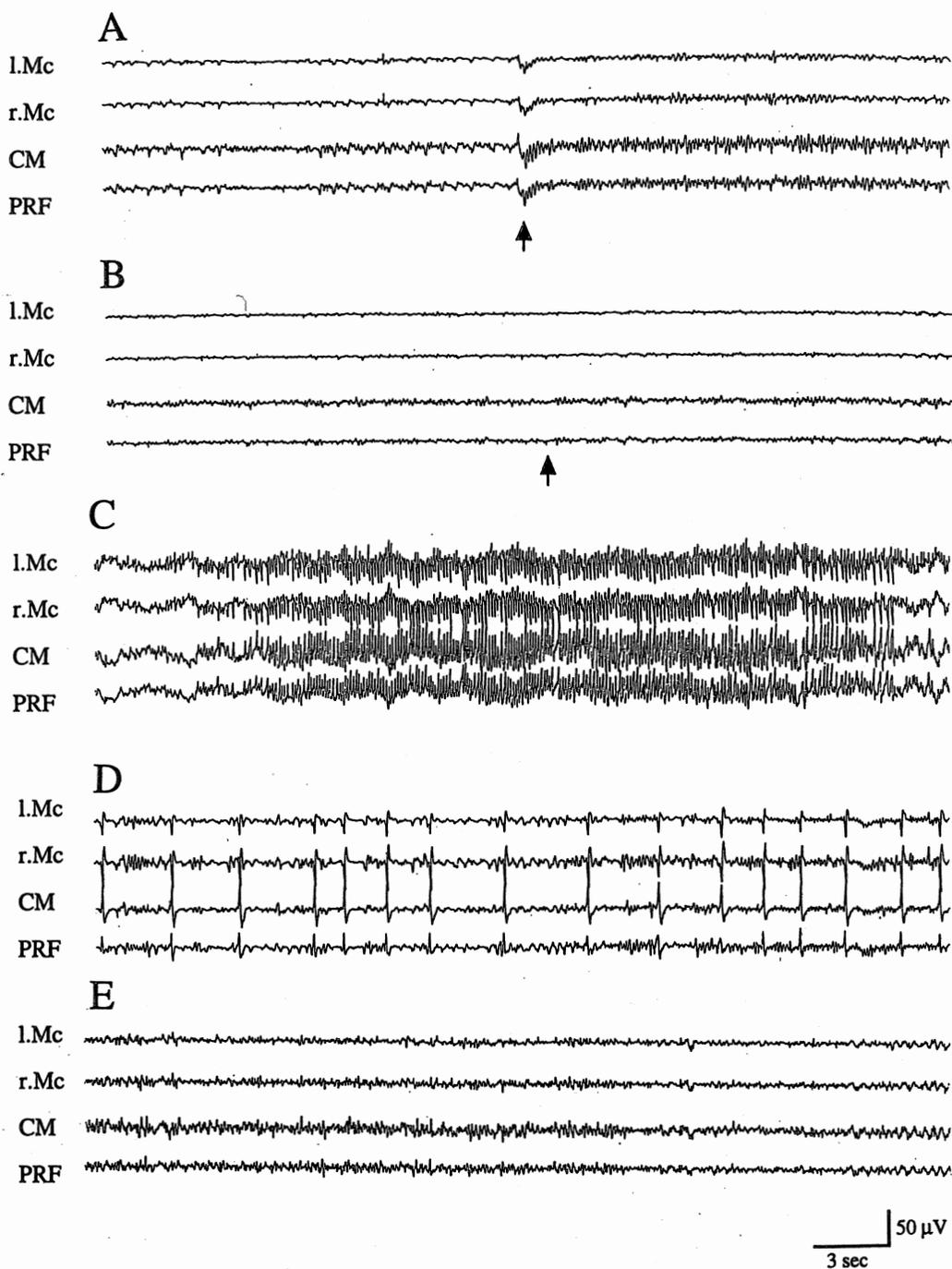


Fig-2. EEG records to illustrate the alterations observed over 3 days after the injection of kainic acid in the left pontine reticular formation of No.9 rat. EEG records are from left pontine reticular formation (RPF), left central medial thalamic nucleus (CM), right sensorimotor cortex (rMc), left sensorimotor cortex (lMc). (A) EEG when the rat began wildly running at 52 min. after the KA injection. The arrow indicate the beginning of wild running. (B) EEG when the rat appeared serpentine tail at 55 min. after the KA injection. EEG pattern is not changed after appearance of serpentine tail. The arrow indicate the beginning of serpentine tail. (C) EEG demonstrate the generalized seizure at 90 min. after the KA injection. Ictal activity of PRF rapidly propagated to bilateral sensorimotor cortex. (D) EEG demonstrate the inter-ictal discharge at 1 days after the KA injection. (E) EEG demonstrate almost normal pattern at 3 days after the KA injection.

Figure3A

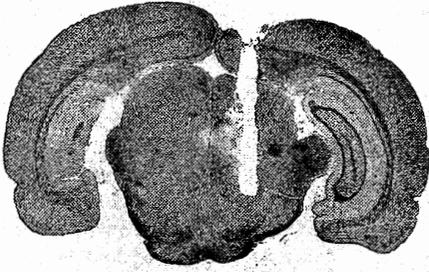


Figure3B

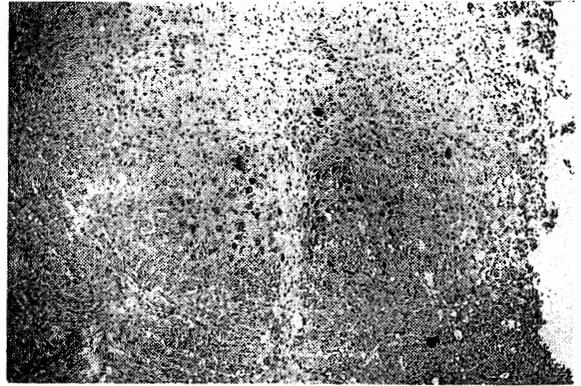


Figure3C

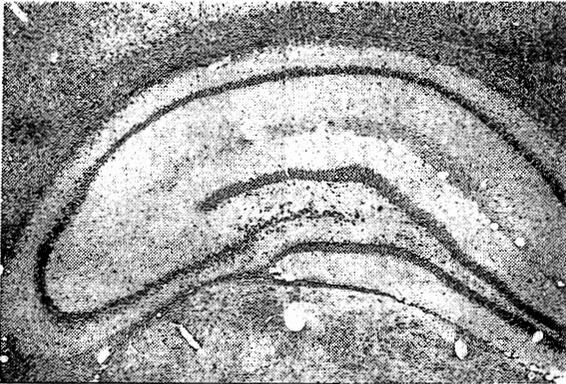


Figure3D

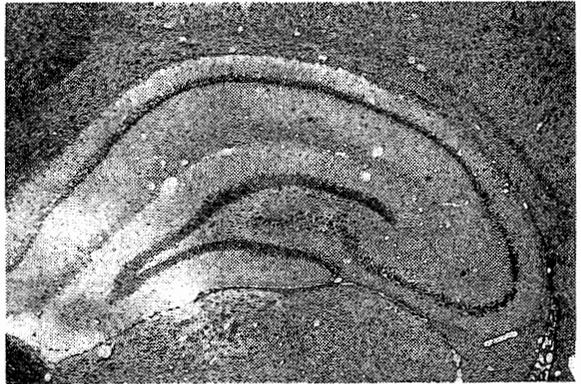


Fig-3. Photomicrogram of reticularis pontis oralis and bilateral hippocampus of the No.9 rat 7 days after the KA injection into left reticularis pontis oralis.
 (A) (B) Histopathological study revealed damage of bilateral reticularis pontis oralis, especially on the left.
 (C) (D) Bilateral hippocampus remains almost intact.



Fig-4. [14C] 2-Deoxyglucose autoradiograms 2 h after KA injection.

Table 1. Local cerebral glucose utilization of the control and kainic acid groups

Region	Control(n=7)		KA(n=7)	
	right	left	right	left
frontal cortex	81.9±4.9	82.0±5.0	83.7±3.8	84.4±4.2
parietal cortex	78.5±4.8	78.5±4.7	79.6±6.9	80.5±6.9
visual cortex	78.8±5.3	79.2±5.7	79.6±2.3	86.0±7.1
auditory cortex	89.6±5.8	90.5±6.0	92.1±6.8	92.3±6.7
sensory-motor cortex	85.0±5.4	85.0±5.2	89.5±4.6	95.5±6.8
entorhinal cortex	54.8±3.5	55.6±3.8	73.2±16.6	80.6±16.5
cingulate cortex	82.7±4.5	82.2±4.3	64.0±4.8*	65.3±5.5*
corpus callosum	20.3±1.9	20.6±1.4	19.8±1.1	19.7±1.1
piriform cortex	58.9±8.2	69.8±7.5	87.6±13.7	93.0±12.0
frontal lobe medial	59.1±5.7	59.2±5.9	76.8±12.6	82.0±12.5
caudate-putamen	75.9±5.5	76.7±5.8	66.6±4.6	73.9±5.0
globus-pallidum	45.5±3.6	46.0±3.6	45.6±2.7	48.4±3.4
substantia nigra	44.8±1.1	44.8±1.0	49.6±3.2	49.9±2.9
thalamus				
antero-dorsal	78.4±6.3	79.0±6.1	69.1±4.8	78.9±6.3
ventral	74.5±5.5	74.1±5.6	80.9±4.4	91.3±5.3
lateral	77.2±5.8	78.6±5.1	75.1±4.8	92.9±7.5
CM	77.9±3.9	77.7±3.9	89.0±9.4	93.0±8.0
paraventricular	56.8±4.7	66.4±4.5	80.2±12.6	83.1±13.4
medial geniculate	76.6±4.5	76.9±4.5	91.3±8.2	109.8±6.7**
lateral geniculate	62.6±3.4	62.7±3.4	72.6±7.8	80.9±6.7*
hypothalamus				
dorsal	47.4±3.4	47.4±3.3	62.1±12.8	62.5±11.3
ventral	40.3±2.6	40.6±2.5	58.4±11.4	58.5±10.5*
paraventricular	48.5±5.5	48.5±5.5	56.8±12.5	59.1±12.1
limbic structure				
medial septal n.	54.4±5.8	53.7±5.9	64.0±9.7	70.8±9.8
lateral septal n.	43.3±4.5	43.5±4.4	74.0±15.3	88.7±14.5*
accumbens n.	49.3±4.9	49.6±4.9	68.7±8.8	70.7±7.2
hippocampus CA1	48.0±3.0	47.9±3.1	96.2±16.5**	101.1±16.9**
hippocampus CA3	49.0±4.4	48.9±4.5	94.1±16.5*	100.7±17.1*
dentate gyrus	53.7±2.9	53.6±2.8	78.9±13.9	81.5±14.0
amygdala	41.2±3.5	40.9±3.6	77.9±13.8**	83.0±13.8**
mammillary body	95.2±6.0	95.0±6.0	100.3±6.7	100.2±7.0
zona incerta	52.6±4.7	52.8±4.8	80.2±12.0*	88.2±10.2**
doagonal band of B.	60.2±5.6	60.8±5.9	74.4±6.8	81.4±6.4
lateral preoptic area	57.5±4.9	58.4±4.8	85.9±14.8	93.1±13.3*
med. forebrain bundle	55.3±3.1	54.8±3.1	82.9±13.0*	83.7±8.9*
brain stem				
MRF	49.0±3.5	48.6±3.4	90.1±8.8**	117.8±8.7**
periaqu. gray	43.3±2.8	43.0±3.0	79.2±10.3**	110.5±12.6**
sup.colliculus	64.0±4.0	63.6±3.9	77.9±6.4*	104.5±9.3**
inf.colliculus	76.0±5.6	75.3±5.5	77.6±8.5	89.7±8.1
raphe n.	46.8±4.7	46.0±4.5	79.3±4.2**	95.3±8.0**
locus ceruleus	58.5±4.3	58.5±4.5	93.8±4.2**	102.9±4.5**
PRF	43.4±3.5	46.1±3.9	91.0±3.6**	112.4±3.9**
cerebellum	46.9±2.7	47.2±2.7	47.1±1.4	46.9±1.4

Values are means S. E. expressed as $\mu\text{mol}/100\text{g}$ per min.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, for the comparison on between vehicle and KA administration (Mann-Whitney U-test)

〈考 察〉

今回の実験では、一側PRFへのKA注入にて wild running とそれに引き続く強直を主体とした全身発作が出現した。一側性に中脳網様体

への電気刺激^{1, 5, 6)}、ビククリン⁶⁾、カイニン酸¹⁴⁾の局所投与、さらに中脳網様体以外の橋および延髄網様体刺激でも今回の study と同様の全般性強直発作が誘発されることが報告されてい

る^{6, 9}。一方 maximal electroshock seizure や pentylenetetrazol seizure などにおける強直発作が中脳被蓋の破壊^{2, 3} 橋被蓋の破壊⁴ によって抑制され、間代発作は抑制されなかったとする報告がある。さらに Kreindler らはラットおよび猫を precollicular level にて離断し、脳幹網様体を電気刺激したところ、離断していないときと同様の全般性強直発作が観察されたと報告している⁸。以上のこれらの報告より、脳幹網様体は強直発作の発現および二次性全般化に重要な役割を果たしており、これは上位脳の関与なしでも起りうるものと考えられている。一方間代発作は上位脳の関与にて起るものと考えられている^{4, 8, 9, 10}。

Jones らは、³H] leucine の局所注入により、ラットにおける、PRF からの投射を見ている⁷。これによると、reticularis pontis oralis からの long descending fiber は主に同側の脊髄を仙髄レベルまで下行する。また、reticularis pontis oralis からの主たる上行路は同側を通り、間脳の尾側にて以下の3つの主要な経路に分かれる。1) 視床の intralaminar nuclei, midline nuclei に入るもの。2) 視床腹部から Forel's field、不確帯を通り、淡蒼球腹側に入るもの。3) 内側前頭側を通り、視床下部、basal forebrain に入るもの。

今回の実験での LCGU 測定結果では、主に同側の辺縁系、basal forebrain が上昇していたことにより、今回の発作波の波及は、Jones らの上げた3つの経路のうち、PRF より内側前頭側を通過して basal forebrain、視床下部に波及し、そこから辺縁系へ入力しているものと思われる。

さらに有意差はなかったが、嗅内野、梨状葉の LCGU のばらつきが大きいこと、行動の観察にて、まれに間代性痙攣が短時間見られたことより、これらの皮質を介して、辺縁系からの発作波の入力が大脳皮質に及んだときに、間代性痙攣が起るものと思われる。

一方視床では注入側の外、内側膝状体で優位な LCGU の亢進があったが、注入側 CM 核では亢進している傾向が見られたのみであり、視床に入力する経路は、発作の全般化に対し、先にならげた経路に比べて重要な役割はしていないと考えられる。不確帯より淡蒼球に入力する経路は、淡蒼球の LCGU が亢進していないことより、発作の全般化にはほとんど作用していないと思われる。

今回の実験により、PRF が強直発作の発現、全般化に関与していること、および、全般化の経路として、内側前頭側を介して basal forebrain に入力する経路が最も重要であることが示唆された。また、直接の証明はできていないが、PRF より発する発作波にて間代性痙攣が起るためには、辺縁系を介して嗅内野および梨状葉に入力し、さらに大脳皮質に興奮が及ぶことが重要であると考えられた。

今回の実験では、発作の全般化に対する視床の役割については、証明できなかったが、今後この点についても調べる必要があると思われる。

〈文 献〉

- 1) Bergmann, F., Costin, A. and Gutman, J. (1963) A low threshold convulsive area in the rabbit's mesencephalon.

- Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. 15, 683 – 690.
- 2) Browing, R. A., Turner, F. J., Simonton, R. L. and Bundman, M. C.(1981) Effect of midbrain and Pontine Tegmental lesions on the maximal electroshock seizure pattern in rats. *Epilepsia* 22, 583 – 594.
 - 3) Browing, R. A., Simonton, R. L. and Turner, F. J.(1981) Antagonism of experimentally induced tonic seizures following a lesion in the midbrain tegmentum. *Epilepsia* 22, 595 – 601.
 - 4) Browing, R. A.(1985) Role of the brainstem reticular formation in tonic-clonic seizures : lesion and pharmacological studies. *Fed. proc.* 44, 2425 – 2431
 - 5) Burnham, W. M., Albright, P., Schneidermann, J., Chiu, P. and Ninchoji, T.(1981) "Centrencephalic" mechanisms in the kindling model. In: *Kindling 2* (Wada, J. A., ed.). 161 – 178, Raven Press, New York
 - 6) Chiba, S., Kamata, S., Numomura, A., Mutoh, F., Mastumoto, M. and Miyagishi, T.(1994) Convulsive response induced by microinjections of bicuculline methiodide into the brainstem reticular formation in rats. *てんかんをめぐって* 15, 39 – 44
 - 7) Jones, E. B. and Yang, T.(1985) The effect projections from the reticular formation and the locus coeruleus studied by anterograde and retrograde axonal transport inn the rat. *J. Comp. Neurol.* 242, 56 – 92.
 - 8) Kreindler, A., Zuckerman, E., Steriade, M. and Chimion, D.(1958) Electroclinical features of convulsions induced by stimulation of brainstem. *J. Neurophysiol.* 21, 430 – 436.
 - 9) McCown, T. J., Greenwod, R. S. and Breese, G. R.(1987) Inferior collicular interactions with limbic seizure activity. *Epilepsia* 28, 234 – 241.
 - 10) McCown, T. J. and Breese, G. R.(1991) Seizure interactions between the inferior collicular cortex and the deep prepiriform cortex. *Epilepsy Res.* 8, 21 – 29.
 - 11) Paxinos, G. and Watson, C.(1986) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Academic Press, Sydney
 - 12) Penfield, W. and Jasper, H.(1954) *Epilepsy and functional anatomy of the human brain.* Little Brown, Boston
 - 13) Sokoloff, L., Revich, M., Kennedy, C. et al.(1977) 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. Neurochemistry.* 28, 897 – 916.
 - 14) 田中達也、橋詰清隆、藤田 力、田中滋也、

Summary

Generalized tonic seizure induced by a kainic acid microinjection into unilateral pontine reticular formation in rats

Takahiro Maeda, Kiyotaka Hashizume, Masayuki Kunimoto, Kazuhiro Sako, Tatsuya Tanaka

Department of Neurosurgery, Asahikawa medical college, Japan 4-5 Nishikagura, Asahikawa, Hokkaido, Japan

An experimental animal model of generalized tonic seizure is produced by microinfusion of kainic acid (KA) into pontine reticular formation (PRF) of Wistar rats. The rats appeared wild running and subsequent generalized tonic seizure. Occasionally, clonic seizure was detected in the face and limbs. An average of 50.9 minutes after KA injection, high amplitude spike discharge appeared in the PRF and the bilateral sensorimotor cortices.

Local cerebral glucose utilization (LCGU) was measured during the acute seizure status by autoradiography using [14 C] 2-deoxyglucose. The LCGU significantly accelerated in the bilateral mesencephalic reticular formation, PRF, periaqueductal gray, superior colliculus, raphe nucleus, locus ceruleus, zona incerta, medial forebrain bundle, hippocampus CA1, 3 and amygdala. Furthermore, in the side into which KA was injected, LCGU markedly accelerated in the lateral geniculate, medial geniculate, lateral septal nucleus, ventromedial nucleus of the hypothalamus and lateral preoptic area. The degree of LCGU in the entorhinal cortex and piriform cortex varied greatly.

These results suggest that PRF plays an important role in the primary and secondary generalization of tonic seizure. The spread of epileptic discharge mainly passed through the medial forebrain bundle from the PRF, entered the hypothalamus and basal forebrain and affected the limbic system. When the epileptic discharge reaches cerebral cortex from PRF, PRF, clonic seizure may appear.