5. 自然発症性てんかんラット (SER) の脳内局所代謝

佐 治 英 郎 飯 田 靖 彦 横 山 陽

京都大学薬学部 放射性薬品化学講座

Local Cerebral Glucose Utilization and Blood Flow in the Spontaneously Epileptic Rats (SER)

Hideo SAJI, Yasuhiko IIDA and Akira YOKOYAMA

*Department of Radiopharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Kyoto University, Kyoto*

Summary

The spontaneously epileptic rat (SER) is a recently bred epileptic animal model which has seizures resembling absence and tonic seizures in humans from two months of age onwards, with similar electroencephalographic characteristics and responses to various antiepileptic drugs.

In this study, local cerebral glucose utilization (LCGU) in SERs and their parent strains, zitter (ZI) and Kyoto/wistar (KW) rats were investigated by the autoradiographic [^{14}C]-2-deoxyglucose method. LCGU of the 8-week-old SERs which had never exhibited the epileptic seizures was decreased in all brain regions examined, but there were no significant differences in the extent of decrement among those regions, in comparison with KW rats. Moreover, there were no differences in LCGU in all regions examined among both SERs and ZI rats. To the contrary, at 13 weeks of age, the interictal LCGU of SERs which exhibited the epileptic seizures was, on the whole, lower than in the other two strains, and in particular, significantly lower LCGU being found in the hippocampus and amygdala.

In local cerebral blood flow (LCBF) measured using I-125-N-isopropyl-iodoamphetamine, although significantly lower LCBF was found in the amygdala of ZI and SER and in temporal cortex of SER when compared with those of KW, there was no difference in other regions tested among these three strains.

These results suggest that the hippocampus and amygdala are the key structures related to the epileptogenic focus of SERs.

緒 言

自然発症てんかんラット (SER) は, Kyoto/wistar (KW) コロニーより見いだされた突然変異体の tremor ラットのヘテロ (*tm/+*) と Rehm らによって SD 系ラットに見いだされた突然変異体の zitter ラット (*zi/zi*) (ZI) を交配してえられた二重突然変異体である¹⁾. このラットは, 2 カ月前後から, 大脳皮質および海馬に 5~7 Hz の spike & wave 複合が出現する欠伸様発作と外的刺激なしにまたは軽い刺激により強直性けいれん発作とを起こす^{2,3)}.

今回, この SER のてんかん発作の機序を探るとともに, このモデル動物のてんかん研究への有用性を評価するために, 脳局所代謝をオートラジオグラフィにて調べた. この方法は, 生きているヒトの脳機能を

非侵襲的かつ直接的に調べることのできる核医学的手法と直結するものであり, 今後臨床, すなわちヒトでの結果と比較することが容易である利点を有する. そこで, その対応を考慮して, 放射性標識化合物としては, 現在核医学臨床に用いられている化合物と同等な動態を示すもの, すなわちグルコース代謝には臨床での 18-fluorodeoxyglucose (FDG) に対応して 14-C-deoxyglucose (DG) を⁴⁾, また血流量の測定には 123-I-iodo-N-isopropyl-amphetamine (IMP) の 125-I 標識体⁵⁾を用いた. また, 動物としては発作発現前の 8 週齢とてんかん発作を発現した 13 週齢の SER を用い, 少なくとも強直性けいれん発作は起こしていない覚醒状態で調べ, 同年齢の KW および ZI の結果と比較検討した.

Table 1 Local cerebral glucose utilization (LCGU) in Kyoto/wistar rats (KW), zitter rats (ZI) and spontaneously epileptic rats (SER)

Region	Local cerebral glucose utilization ($\mu\text{mol}/100\text{ g}/\text{min}$)					
	8 weeks			13 weeks		
	KW	ZI	SER	KW	ZI	SER
Frontal cortex	100 $\pm$ 10	60 $\pm$ 7 ^b	59 $\pm$ 6 ^a	88 $\pm$ 6	87 $\pm$ 5	59 $\pm$ 9 ^b
Temporal cortex	100 $\pm$ 8	57 $\pm$ 8 ^a	56 $\pm$ 5 ^a	125 $\pm$ 14	82 $\pm$ 9	59 $\pm$ 11 ^b
Parietal cortex	107 $\pm$ 10	62 $\pm$ 10 ^b	58 $\pm$ 6 ^a	112 $\pm$ 10	92 $\pm$ 3	62 $\pm$ 10 ^{b, d}
Caudate-putamen	87 $\pm$ 11	56 $\pm$ 7	54 $\pm$ 5 ^b	74 $\pm$ 7	94 $\pm$ 5	64 $\pm$ 7 ^d
Hippocampus	76 $\pm$ 6	41 $\pm$ 8 ^b	42 $\pm$ 5 ^a	71 $\pm$ 9	73 $\pm$ 8	34 $\pm$ 4 ^{b, d}
Thalamus	95 $\pm$ 10	59 $\pm$ 9 ^b	53 $\pm$ 6 ^a	83 $\pm$ 14	90 $\pm$ 4	50 $\pm$ 8 ^d
Hypothalamus	48 $\pm$ 6	22 $\pm$ 7 ^b	23 $\pm$ 4 ^b	41 $\pm$ 3	49 $\pm$ 7	32 $\pm$ 4
Amygdala	62 $\pm$ 8	27 $\pm$ 6 ^b	27 $\pm$ 6 ^a	38 $\pm$ 5	38 $\pm$ 2	20 $\pm$ 1 ^{b, c}
Cerebellum	66 $\pm$ 11	42 $\pm$ 6	39 $\pm$ 5 ^b	52 $\pm$ 18	59 $\pm$ 4	40 $\pm$ 4 ^d

The values are means $\pm$ S.E.M. for 4-5 animals. ^a $p<0.01$ and ^b $p<0.05$ as compared with KW; ^c $p<0.01$ and ^d $p<0.05$ as compared with ZI (Student's t test).

実験材料

14-C-DG は Dupont-NEN より購入した. 125-I-IMP は日本メジフィジックス社より供給された. その他の試薬は特級試薬を用いた.

雄性 SER および同腹の ZI は京都大学医学部附属実験動物施設より供給された. また, 雄性 KW は日本エス・エル・シーより購入した.

方 法

[局所グルコース利用(代謝)率 (LCGU) の測定]

LCGU の測定は Sokoloff の方法にしたがって行った⁶⁾.

動物をハロタンで麻酔し, ポリエチレンチューブを大腿動脈および静脈に挿管した. 麻酔から覚醒した後, 14-C-DG を 3.7 MBq/kg の割合で静脈内投与し, 以後 45 分間経時的に動脈血を採取した. 動脈血は採取後, ただちに遠心分離し, 血漿中の 14-C 濃度およびグルコース濃度を測定した. 45 分後断頭し, 脳を摘出, クリオスタットにて 20 μm の厚さの切片を作成した. この脳の切片を市販の 14-C 標準線源 (Amersham) とともに X 線フィルムに 2 週間露光し, 脳の各部位での 14-C 放射能濃度をビデオデンストメータにて測定した. LCGU は上記の測定値を Sokoloff の式に代入して算出した. なお, 速度定数および lumped constant は Sokoloff の値⁹⁾を用いた. データの有意差検定は Student's t test 法にて行った.

[局所脳血流量 (LCBF) の測定]

動物をハロタンで麻酔し, ポリエチレンチューブを大腿動脈および静脈に挿管した. 麻酔から覚醒した後, 125-I-IMP を 2.59 MBq/rat の割合で静脈内投与し, 以後 5 分間経時的に動脈血を採取した. 動脈血は採取後, ただちにオクタノールを用いて脂溶性分画を抽出し, 脂溶性分画の 125-I 放射能濃度を測定した. 5 分後断頭し, 脳を摘出, クリオスタットにて 20 μm の厚さの切片を作成した. この脳の切片を市販の 125-I 標準線源 (Amersham) とともにオートラジオグラフ用フィルム (Konica, MARG H-3 type) に 1 週間露光し, 脳の各部位での 125-I 放射能濃度をビデオデンストメータにて測定した. LCBF は Kuhl らの方法に従い⁷⁾, 下記の式によって算出した. なお, 拡散係数 m , 分配係数 λ はそれぞれ Lear らの値, すなわち 25, 1 を用いた⁸⁾.

$$F = Cb(T) / e^{-kt} \int_0^T Ca(t) e^{kt} dt$$

$$k = mF / \lambda$$

ここで Cb , Ca はそれぞれ脳の各部位および血中での放射能濃度を示す. なお, データの有意差検定は Student's t test 法にて行った.

結 果

Table 1 は 8 および 13 週齢の KW, ZI, SER のさまざまな脳の部位における LCGU を示す. また, Fig. 1 は KW あるいは ZI と SER との LCGU の

Fig.1. Ratio of local cerebral glucose utilization (LCGU) in spontaneously epileptic rats (SER) to those in their parent strains, Kyoto/wistar rats (KW) and zitter rats (ZI). FCX : frontal cortex, TCX : temporal cortex, PCX : parietal cortex, CP : caudate/putamen, HIP : hippocampus, TH : thalamus, HTH : hypothalamus, AMY : amygdala, CEL : cerebellum. * $p < 0.05$ as compared with the LCGU ratio in the caudate/putamen (Student's t test).

比を各週齢について計算したものを示している。なお、8週齢のSERはてんかん発作をまったく示していなかった。一方、13週齢のSERは実験当日の朝に息を吹きかける刺激により、強直性けいれんを、その直後に欠神様発作を起こしたが、実験中は少なくとも強直性けいれんは起こしていなかった。

KWのLCGUは8週齢と13週齢との間には統計的な有意差はなく、それらの値は他の報告と同じであった⁶⁾。

8週齢において、SERのLCGUはKWのそれに比べ、すべての脳の領域において有意に低下していた。しかし、最も減少率の高かった扁桃核と最も低かった線条体との間では減少率に有意の差はなく、LCGUの減少率には部位による差はないことが示された。また、SERとZIの間ではLCGUの差はまったくなかった。

対症的に、13週齢においては、SERのLCGUは

KW、ZIのどちらとも全般的に低い傾向にあり、その低下率には部位による差が認められた。すなわち、KWとの比較では、海馬、側頭葉において最も低下率が高く（-54%）、ついで扁桃核（-51%）、頭頂葉（-47%）の順に低下率は減少したが、これら4部位では線条体にくらべ減少率が有意に大きかった。また、ZIとの比較では、海馬（-55%）、扁桃核（-51%）、視床（-49%）、小脳（-36%）、頭頂葉（-35%）、線条体（-35%）において有意にSERは低下しており、最も減少率の大きかった海馬での減少率は線条体のそれに比べ有意に大きかった。これらの結果から、てんかん発作の起こる13週齢のSERにおいて、このようなてんかん発作を起こさない親種のKW、ZIとの比較において、海馬、扁桃核での著しいLCGUの低下が共通の現象として認められた。

一方、血流量LCBFの測定には、核医学臨床への応用性を考えて今回¹²⁵I-IMPを用いたが、正常な

Table 2 Local cerebral blood flow (LCBF) in Kyoto/wistar rats (KW), zitter rats (ZI) and spontaneously epileptic rats (SER) (13 weeks)

Region	LCBF (ml/100 g/min)		
	KW	ZI	SER
Frontal cortex	140±12	87±31	111±15
Temporal cortex	112±8	85±22	75±15 ^a
Parietal cortex	140±18	86±23	115±28
Caudate-putamen	99±8	59±30	72±10
Hippocampus	100±15	56±16	68±14
Thalamus	93±13	63±18	68±15
Hypothalamus	68±11	35±13	45±9
Amygdala	74±8	35±13 ^b	43±8 ^b
Substantia nigra	57±7	45±14	40±7
Cerebellum	74±16	41±17	58±10

The values are means±S.E.M. for 4-8 animals. ^a $p<0.01$ as compared with KW; ^b $p<0.05$ as compared with KW (Student's *t* test).

KW に対して得られた値は他の放射性化合物を用いて得られた文献値とよく一致していた⁹⁻¹¹⁾。このようにして測定された LCBF においては、KW に対する ZI, SER での扁桃核および SER の側頭葉以外は3者の間に有意の差は認められなかった (Table 2)。

考 察

臨床的に、18-FDG の取込みは発作間欠期にはてんかんの焦点の部位で低下していることが報告されている^{12,13)}。

一方、SER は脳波や抗てんかん薬の薬理的検討から、ヒトのてんかん発作とよく似た症状を示すことが報告されている^{2,3)}。

今回の検討において、てんかん発作を示さない8週齢の SER は KW や ZI に比べて LCGU が変わらないか、あるいは低下してもその割合は部位による差はないことが示された。一方、てんかん発作を示した13週齢の SER では他の2種に比べて全体的な LCGU の低下とともに、海馬と扁桃核での低下が著しいことが認められた。

これらのことから、海馬や扁桃核がてんかんの焦点に関係した重要な部位であることが示唆された。これらの部位がてんかん発作に重要な役割を演じていることは、他の動物実験や複雑部分発作の患者でもいわれていることであり¹⁴⁻¹⁹⁾、今回の結果もこれと一致している。発作間欠期でのグルコース代謝率の低下の原因

は明らかではないが、神経活動の抑制または不活性化や神経細胞の消失が関係しているのかもしれない^{14,17,20)}。実際、SER においては、海馬でのベンゾジアゼピンレセプター数の有意な低下が報告されている²¹⁾。一方、血流はほとんど低下していない。したがって、SER でのてんかん発作には神経細胞そのものの機能低下が関与しているものと考えられる。ただし、LCGU は抑制系も興奮系もどちらの神経細胞の活動もまとめた総括的な値であり、ある特定の神経細胞の活動を表すことはできない。また、発作発現期では神経細胞の興奮活動が全般におよぶ可能性があり焦点に関する情報が得られにくいと考え、今回はそのようなことがない発作間欠期を選んだが、それでも焦点からの神経活動の伝播が起こっている可能性はある。したがって、海馬や扁桃核が焦点のものなのか、焦点からの神経が伝播している二次的な部位なのかは今回の結果からだけでは判断できないが、これらの部位がてんかん発作に関係していることは明らかであろう。なお、8, 13 週齢ともに SER が低い LCGU を示したのは発育不全が関係しているかもしれない²²⁾。

以上の結果から、海馬や扁桃核の機能低下が認められたが、今後これらの部位を中心に、さらに生化学、電気化学的な検討をしていくことが発作発現のメカニズムのよりいっそうの解明につながるものと考えられる。

本研究は一部、てんかん治療研究振興財団研究助成金による。

文 献

- 1) Serikawa, T. and Yamada, J.: *J. Hered.*, **77**, 441 (1986)
- 2) Serikawa, T., Yamada, J., Ohno, Y. *et al.*: *Transplant Proc.*, **19**, 3205 (1987)
- 3) Sasa, M., Ohno, Y., Ujihara, H. *et al.*: *Epilepsia*, **29**, 505 (1988)
- 4) Gallagher, B.M., Fowler, J.S., Guttererson, N.I. *et al.*: *J. Nucl. Med.*, **19**, 1154 (1978)
- 5) Hill, T., Holman, L., Lovett, R. *et al.*: *J. Nucl. Med.*, **23**, 191 (1982)
- 6) Sokoloff, L., Reivich, M., Kennedy, C. *et al.*: *J. Neurochem.*, **28**, 897 (1977)
- 7) Kuhl, D., Barrio, J., Huang, S-C. *et al.*: *J. Nucl. Med.*, **23**, 196 (1982)
- 8) Lear, J., Ackermann, R., Kameyama, M. *et al.*: *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **2**, 179 (1982)
- 9) Sakurada, O., Kennedy, C., Jehle, J. *et al.*: *Am. J. Physiol.*, **234**, H59 (1978)
- 10) Rapin, J., Poncin-Lafitte, M., Duterte, D.

- et al.* : *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **4**, 270 (1984)
- 11) Takagi, S., Ehara, S., Kenny, P. *et al.* : *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **4**, 275 (1984)
 - 12) Fisher, R.S. and Frost, J.J. : *J. Nucl. Med.*, **32**, 651 (1991)
 - 13) Gresh, D., Goldstein, S., Sperling, M.R. *et al.* : *J. Nucl. Med.*, **31**, 1839 (1990)
 - 14) Ackermann, R., Moshe, S., Albala, B. *et al.* : *Epilepsia*, **23**, 434 (1982)
 - 15) Engel, J., Kuhl, D., Phelps, M. *et al.* : *Ann. Neurol.*, **12**, 518 (1982)
 - 16) Suzuki, J., Nakamoto, Y. and Shinkawa, Y. : *Brain Res.*, **266**, 359 (1983)
 - 17) Mazziotta, J. and Phelps, M. : *Positron Emission Tomography and Autoradiography: Principles and Applications for the Brain and Heart*, Raven Press, New York, pp. 493-579 (1986)
 - 18) Nakamoto, Y., Nakayama, S. and Suzuki, J. : *Epilepsy Res.*, **5**, 43 (1990)
 - 19) Namba, H., Iwasa, H., Kubota, M. *et al.* : *Epilepsia*, **32**, 27 (1991)
 - 20) Meldrum, B. : *Neurotransmitters, Drugs, and Disease*, Blackwell Scientific Pub., Oxford, pp. 301-335 (1989)
 - 21) Shirasaka, Y., Ito, M., Mitsuyoshi, I. *et al.* : *Exp. Neurol.*, **113**, 255 (1991)
 - 22) Serikawa, T., Yamada, J., Ujihara, H. *et al.* : *Lab. Anim.*, **25**, 216 (1991)