原 著

猫の脳内葉酸注入によるてんかん 重積発作——臨床, 脳波, 病理所見

**Status Epilepticus Induced by Intracerebral Folic Acid Injection
in Cats—Clinical, Electroencephalographic, Pathological Study**

関

健*,** Juhn A. Wada*

要旨：けいれんを惹起する物質の1つである葉酸を猫の一侧扁桃核 (Am) もしくは無名質 (SI) に微量投与したところ、激しい自律神経症状を伴った、扁桃核キンドリング stage 1～6に相当するてんかん発作の重積状態 (SE) が4～8時間にわたってみられ、その後5日以内に臨床・脳波上完全な回復を示した。SE 中尿中ノルアドレナリンの放出増加およびミオグロビン尿が認められたが、これらも改善を示した。注入2週間後の病理所見は注入部の変化はなく、同側海馬、梨状葉皮質のわずかな虚血性変化を認めたにすぎなかった。心臓、肺、腎を含む諸臓器には全く異常病理所見を認めなかった。このように Am, SI 起源のてんかん発作全汎化には共通の機序の存在が示唆された。

てんかん研究 1985 ; 3 : 73-79

Key Words: folic acid, amygdala, substantia innominata, status epilepticus, GABA.

緒 言

カナダ、ブリティッシュコロンビア大学キンズメン脳神経研究所では扁桃核キンドリング (Am K) におけるけいれん全汎化に無名質 (SI) が主要な役割を担う可能性を示唆してきたが^{3,13)}、その役割をさらに明らかにするため、Am あるいは SI に注入した neurotoxin の1つである葉酸 (FA)^{8, 14)}により惹起されるてんかん発作様式の異同を検討し、またその回復後に行う Am K に対する影響を調べるための基礎実験として、FA 局所注入による急性症状と脳波の観察および病理所見を検討した。

I. 対象および方法

成猫4匹に、当研究所で常用されている方法¹⁷⁾により、脳定位的に刺激および記録用双極電極 (先端距離 0.5 mm) を左右の Am, SI, 海馬、淡蒼球、中脳網様体、S字状前または後回および梨状葉皮質に植え込んだ。右 Am および SI には、記録、刺激、FA 注入の目的を兼ねて、外側絶縁注射針 (23 G 1 1/2 inch; canurode) を植え込み、頭蓋外部に出た部分は手術用骨ロウおよび歯科用セメントで被った。心電図記録は27号エナメル線の先端を約 1 cm 露出し、左前胸部と右頸部皮下に導入固定、頭部ソケットに接続した。術後10日

* カナダ、ブリティッシュコロンビア大学キンズメン脳神経研究所

** 現 順天堂大学医学部精神神経科
[〒113 東京都文京区本郷 2-1-1]

Ken Seki**, Juhn A. Wada*

* Kinsmen Laboratory of Neurological Research, HSCH. University of British Columbia, Vancouver, B.C., Canada

** Present address: Department of Neuro-psychiatry, Juntendo University School of Medicine
1985年2月27日受理

Fig. 1 Localization of canurode tips

目より猫を採尿用ケージ (46×46×46 cm) に移し、採尿を行うとともに脳波、心電図の対照記録を行った。尿検査には、試験紙法 (Rapignost® basic screen, Hoechst 社製) によるブドウ糖、アスコルビン酸、蛋白質 (アルブミン)、潜血反応 (ヘモグロビンまたはミオグロビン)、pH の定性・半定量検査を行ったのち、1 規定 HCl を 1~2 滴滴下し、-20°C の冷凍庫内に保存、後日ノルアドレナリン (NA) の測定を行った⁹⁾。

FA (Sigma 社製) は滅菌水に溶解し、4 規定 NaOH で pH を 7.0 とし 110 mg/ml に調製した。注入装置はステンレス針 (26G) をポリエチレンチューブで Hamilton microsyringe® に接続したもので、canurode に挿入した際、針先が約 0.5 mm 突出する長さに作られた。

術後14日目に無麻酔、無拘束の下で FA, 1,000 nmol/4 μ l を 3 分間かけて Am または SI に注入、行動、脳波、心電図変化を 2 週間にわたって観察した。尿は SE 中排尿のつど集め、2 日目以降は 2 週間に 3 回以上の採尿を行い、前述の諸検査を行った。FA 注入後 2 週間目に sodium pentobarbital (ネンブタール®) 深麻酔下で、生理食塩水-10% ホルマリン液による脳灌流固定後、氷結切片の Cresyl-Violet 染色を行い、心臓、肺および腎の切片は Hematoxyline-Eosine 染色および Masson-Trichrome 染色の後、組織学的に検討した。なお、電極先端はすべて意図した部位に局在することが確かめられた。同様に canurode の局在は Fig. 1 のごとくであった。

- A: FA injection (SI)
 B: FA injection (Am)
 0: no signs
 I: restless searching behaviour
 II: facial twitching
 III: licking, chewing, head nodding
 IV: contralateral head turning and circling and/or contralateral forepaw or hindpaw clonus
 V: jumping or contralateral hemi-convulsion
 VI: generalized tonic-clonic convulsion

Fig. 2 Proportion of the symptoms during SE

II. 結 果

1. 行 動

Am, SI 注入いずれの場合も激しい自律神経症状 (特に交感神経系) を伴った Am K stage I~VI に相当する発作症状¹⁷⁾ (Fig. 2 参照) が段階的に出現、反復した。ただし SI 注入の場合初発症状として探索行動が目立って出現した。両者に共通していたのは Am K stage IV にあたる運動症状、すなわち対側への頭部回旋と回転歩行もしくは疾走が最も時間的に長く続き、1~4 時間経過ののち頂点症状として全身けいれん発作に到り、けいれん性 SE が 30 分間ほど続いたのち軽減し、4~8 時間で消退した。これに対して両者で最も異なっていたのは顔面抽搐出現の時期で、Am の場合には運動症状出現の前に、SI の場合にはそのの

Abbreviation R: right, L: left, Am: amygdala, SI: substantia innominata, MRF: midbrain reticular formation, GP: globus pallidus, HIPP: hippocampus, MC: motor cortex (anterior sigmoid gyrus), PyC: pyriform cortex, ft: facial twitching, ht: head turning, fp cl: forepaw clonus, hp cl: hindpaw clonus, bft: bilateral facial twitching, t-cl-conv: tonic-clonic-convulsion, m: mastication

Fig. 3 EEG

ちに発現した。Fig. 2 は SE 中に出現した症状を 0～Ⅶの stage に分類し、それぞれの出現時間の合計を図示したものであるが、SI 注入 (A) では探索行動 (stage I) が比較的長時間続いたため、stage IV 以降の運動症状出現が遅れ、全身けいれん発作出現までの潜時が長くなり、SE 持続時間も長かった。しかしながらけいれん性 SE については、Am 注入 (B) と較べて、その強度および持続時間に差はなかった。こうした特徴をまとめると、両者における質的な差はなかったが、Am 注入の SE は症状が急速に発展し、集中的に続き、短時間で終了するのに対し、SI 注入の SE は徐々に発展し、比較的長時間続いた。SE 中恒常的に頻脈、ヒッシング・呼吸促迫、bushy tail、流涎、排尿、散瞳などの自律神経症状がみられた。SE 終了後わずかに残存した局在性筋搐搦を含めた行動・脳波上のでんかん性異常も 5 日以内には完全に消退した。対側後肢に不全麻痺を残した #818 以外はすべて神経学的異常を認めなかった。

2. 脳波 (Fig. 3)

Am 注入の場合、数分以内に生じた単発性棘波

Table 1 Urinary noradrenaline

Cat	During SE	non-SE	Ratio
# 814	9.58	2.72	3.52
# 816	9.43	2.88	3.27
# 817	6.79	2.04	3.33
# 818	8.66	2.00	4.33

(unit: ng/mg creatinine)

の頻度が増し、同側 SI、海馬、淡蒼球、梨状葉、運動領皮質、次いで対側半球に波及した。また海馬、運動領皮質に同期する独自の速波帯域の反応性後発射も出現した (Fig. 3-A)。脳幹網様体への波及は初期にはみられなかったが、症状が stage Ⅲ～Ⅶに到る頃には独自の反応性後発射も出現し、臨床・脳波上の全汎上はこの波の出現にひきつづいて起こった (Fig. 3-B)。SI 注入の場合、注入部局所の棘波出現潜時が Am の場合よりも長かったが、出現後は速やかに同側 Am、次いで淡蒼球、梨状葉皮質に波及、さらに海馬、運動領皮質、対側脳部位にも及んだ。脳幹網様体に波及後、運動領皮質には海馬に同期する 28 Hz では

じまり 16 Hz で終わる紡錘状棘波群発が出現し、遂にはこの放射に伴う独立焦点性けいれん現象が現出するに至った (Fig. 3-C)

3. 心電図

注入前から洞房性不整脈を示した #814 を含め全例に SE 中一過性洞性頻脈 (1.5~2 倍) が認められた。SE 終了後は #817 が5日目に一過性の洞性徐脈を示したが、全例とも全観察期間を通じて QRS, ST, T の異常は認めなかった。

4. 尿

#816 が SE 中一過性蛋白強陽性 (500 mg 以上/100 ml) を示した他、全例 SE 中アルカリ性尿 (pH 8~9) および軽度 (0.03 mg/100 ml; #817) ~強度 (1.0 mg 以上/100 ml; #814, #816, #818) 潜血反応がみられた。NA は全例 SE 中 3~4 倍の上昇を示した (Table 1)。

5. 組織病理学的所見

1) 脳: 注入部位には光顕組織学的変化は認められなかった。注入側海馬、梨状葉皮質に神経細胞の萎縮・濃染がみられたが、他の皮質、皮質下諸構造、脳幹、小脳に異常は認めなかった。例外的に SE 後対側後肢不全麻痺を示した #818 のみ注入側半球に、脳梗塞に由来すると思われる広範な洞形成、大食細胞・星状細胞の増生および出血がみられた。

2) その他の臓器: 気道、心臓、肺、肝臓、腎、副腎、膀胱、消化管は外観および剖面で異常所見を認めず、心、肺、腎の光顕組織学的病変はみられなかった。

III. 考 按

カイニン酸 (KA), FA などの neurotoxin の脳内投与は、けいれん発作重積状態とそれに伴う特有な脳病理変化を示すため、てんかん性脳損傷のモデルとして注目されるようになった¹⁴⁾。ことに FA は中枢神経系に自然に存在するため、てんかん発作の発生や抗けいれん剤の作用機制に関係しうる物質として注目されてきた⁷⁾。ところで FA は KA に比して注入局所よりも遠隔部での損傷がみられ Am 注入の際には神経壊死性変化が海馬、大脳辺縁系皮質、中隔野、視床などヒトの側頭葉てんかんでみられる部位に生じ¹⁴⁾、SI 注入の場

合には生化学および組織化学的に Am、梨状葉皮質、前頭葉皮質に損傷が大きく、それがこれらの部位の GABA 性神経細胞の選択的損傷によることが推察されている⁸⁾。このたびの猫を用いた実験では、ラットで記載されたような重篤な脳病理所見は全く認められず、Am, SI 注入の如何を問わず、注入部には組織学的変化はなく、海馬、梨状葉皮質に虚血性と思われる変化をわずかに認めたにすぎない。なお本実験に関連して2匹の猫について、FA 注入後14日目に、脳内各所の glutamic acid decarboxylase (GAD), および choline acetyltransferase (CAT) を測定したところ、対側半球を対照として、Am 注入では注入側梨状葉皮質 (38.5%), Am (49.1%), 海馬 (52.3%) で GAD の減少がみられたのに対し、CAT は前外側回転 (72.3%) でわずかな減少がみられた他、差がなく、SI 注入では注入側前頭葉皮質で GAD (75.0%), CAT (66.1%) とともに多少の低下がみられたにすぎなかった (関, Wada; 未発表データ)。このように猫ではラットと較べて脳病理学的、生化学的所見のいずれにも SE の影響が比較的軽度であったことから、neurotoxin を用いた SE とその神経生物学的影響の考察には動物の種差を考慮する必要性が示された。

Am 注入と SI 注入とで臨床症状がほぼ共通していたことは、両者の解剖学的、機能的な相関を示唆する⁴⁾。事実、SI から Am へは境界条を経るものと前頭底を横切って直接に到るものと2つの線維連絡があり¹⁶⁾、Am から SI へは基底核群からの線維連絡が知られている⁶⁾。特に最近の知見によれば Am に軸索を送っている choline 作動性神経細胞は前頭底に広く分布するが、中でも SI からのものが重要であることが知られてきた¹¹⁾。また、両者はともに視床下部との解剖学的連絡を持ち¹²⁾、機能的に SI は Am から視床下部への中継を行い、また Am へのフィードバックの節目ともなっている可能性がある¹⁹⁾。視床下部の後外側および前内側部がそれぞれ交感および副交感神経系の症状発現に関係しており⁵⁾、本実験でみられた SE 中の頻脈、ヒッシング・呼吸促迫、散瞳 (以上交感系)、流涎、尿失禁 (以上副交感系) などの自律神経症状は視床下部を介して生じたもの

と考えられる。

Am, SI ともに棘波が辺縁系諸領域, 前頭葉皮質, 脳幹網様体の順に波及したことは共通していた。特に全汎化の前に脳幹網様体に反応性後発射が認められたことは Am K でみとめられたと同様に, 同部のけいれん全汎化での役割を示唆するものである^{17,18)}。

探索行動と顔面搐搦とはいずれも Am 刺激で認められる症状であるが, SI 注入に際して顔面搐搦発現の前に運動症状がみられ, それが前頭葉皮質に形成された独立焦点発射と関連していたことは注目値する。現在 SI から新皮質への choline 作動性投射が明らかにされており¹⁰⁾, SI 起源の運動発作がこの投射回路を介して発現した可能性を示唆するものである。さらに Am K での SI の役割に関する私達の仮説¹³⁾にみるように, Am 注入の場合にも SI を介してこの投射系により運動症状が発現したことが考えられる。両者で運動症状発現潜時が異なった点は, FA 感受性細胞の密度が Am と SI とでは異なることなどを考慮する必要がある。

Boyko らはラットの視床内に KA を注入すると SE に伴って膀胱内出血に由来する血尿および SE 前の 10 倍に達する尿中 NA 上昇を示したのち, 広範な心筋壊死を伴って急死する事実を報告したが¹⁾, 今回の猫の実験においては, 1) 膀胱出血を認めず, 2) NA 上昇は 2~3 倍とわずかであり, 3) 心病理変化を認めなかった。また, 心電図上の変化も頻脈以外の異常を認めなかったことでもあり, NA 放出の程度と心筋壊死の因果関係を強く示唆するものである。

Boyko らが示したところでは, 血尿の原因は膀胱出血であったが, 本実験では腎および膀胱ともに病理組織学的異常を欠き, かつ SE 中一過性に尿蛋白強陽性を示した #816 の回復状態から推しても腎性の要因によるヘモグロビン尿は否定される。むしろ尿潜血反応陽性所見についてはミオグロビン尿であった可能性が高い。けいれん発作に伴うミオグロビン尿はいくつかの報告があり^{2,15)}, SE 後に生じた予後不良なミオグロビン尿性急性腎不全がみられたとの報告もある¹⁵⁾。けいれんが惹起するミオグロビン尿の成因の機序として,

Singhal らは, 1) 激しい運動, 2) 発作中の外傷, 3) 発作に伴う昏睡による局所性の血流遮断または体重による直接的な筋圧搾の 3 つを挙げている¹⁵⁾。

結 語

FA を直接 Am, SI 内に投与すると, ほぼ同様の行動, 脳波上の SE, 尿所見異常 (NA 上昇, ミオグロビン尿) を一過性にひきおこし, またほぼ同様な脳組織病理学的な変化, すなわち, 注入同側海馬, 梨状葉皮質に限局する神経細胞萎縮・濃染をもたらした。このことは SI 起源の発作と Am に起始する発作の発展全汎化に共通の機序があることを示唆する。

N.F. Quenville, K. Berry 両博士 (組織病理) および E.G. McGeer 博士 (NA 測定) の御助言を深謝する。

Canadian Medical Research Council の援助によるこの実験結果の一部は, 第15回国際てんかんシンポジウム (ワシントン D.C., 1983年) および第18回日本てんかん学会 (宇都宮, 1984年) において発表した。

文 献

- 1) Boyko WJ, Galabru CK, McGeer EG, McGeer PL. Thalamic injections of kainic acid produce myocardial necrosis. *Life Sci* **1979**; 25: 87-98.
- 2) Farmer TW. Glycogenosis due to deficiency of muscle phosphorylase, recurrent myoglobinuria precipitated by grand mal convulsions. In: Kakulus BA, ed. *Clinical studies in myology*; Part 2, N.Y.: Excerpta Medica Amsterdam, American Elsevier Company Inc, **1973**; 70-74.
- 3) Kimura H, Kaneko Y, Wada JA. Catecholamine and cholinergic systems and amygdaloid kindling. In: Wada JA, ed. *Kindling 2*, N.Y.: Raven Press, **1981**; 265-287.
- 4) Kimura H, Kastti BA, Maeda T, Kaneko Y, Wada JA. Cholinergic systems in the substantia innominata and amygdaloid kindling. In: Aki-moto H, Kazamatsuri H, Seino M, Ward A, ed. *Advances in Epileptology*; N.Y.: Raven Press, **1982**; 509-512.
- 5) Korteweg GCJ, Boeles JThF, Cate JTen. Influence of stimulation of some subcortical areas on electrocardiogram. *J Neurophysiol* **1957**; 20:

- 100-107.
- 6) Krettek JE, Price JL. Amygdaloid projections to subcortical structures within the basal forebrain and brainstem in the rat and cat. *J Comp Neurol* **1978**; 178: 225-254.
 - 7) Mauguiere F, Quoex C, Bello S. Epileptogenic properties of folic acid and N⁵ methyltetrahydrofolate in cat. *Epilepsia* **1975**; 16: 535-541.
 - 8) McGeer PL, McGeer EG, Nagai T. GABA-ergic and cholinergic indices in various regions of rat brain after intracerebral injections of folic acid. *Brain Res* **1983**; 260: 107-116.
 - 9) McGeer PL, McGeer EG, Wada JA. Central aromatic amine levels and behavior. *Arch Neurol* **1963**; 9: 91-99.
 - 10) McKinney M, Struble RG, Price DL, Coyle JT. Monkey nucleus basalis is enriched with choline acetyltransferase. *Neuroscience* **1982**; 7: 2363-2368.
 - 11) Nagai T, Kimura H, Maeda T, McGeer PL, Peng F, McGeer EG. Cholinergic projections from the basal forebrain of rat to the amygdala. *J Neurosci* **1982**; 2: 513-520.
 - 12) Nauta WJH, Haymaker W. Hypothalamic nuclei and fiber connections. In: Haymaker W, Anderson E, Nauta WJH, ed. *The hypothalamus*; III: C C Thomas, **1969**; 136-209.
 - 13) Okamoto M, Wada JA. Reversible suppression of amygdaloid kindled convulsion following unilateral gabaculine injection into the substantia innominata. *Brain Res* **1984**; 305: 389-392.
 - 14) Olney JW, Fuller TA, DeGubareff T, Labruyere J. Intrastratial folic acid mimics the distant but local brain damaging properties of kainic acid. *Neurosci Lett* **1981**; 25: 185-191.
 - 15) Singhal PC, Chugh KS, Gulati DR. Myoglobinuria and renal failure after status epilepticus. *Neurology* **1978**; 28: 200-201.
 - 16) Troiano R, Siegel A. Efferent connections of the basal forebrain in the cat, the substantia innominata. *Exp Neurol* **1978**; 61: 198-213.
 - 17) Wada JA, Sato M. Generalized convulsive seizures induced by daily electrical stimulation of the amygdala in cats, correlative electrographic and behavioral features. *Neurology* **1974**; 24: 565-574.
 - 18) Wada JA, Sato M. Effects of unilateral lesion in the midbrain reticular formation upon kindled amygdaloid convulsion in cats. *Epilepsia* **1975**; 16: 693-697.
 - 19) Watson RE Jr, Troiano R, Poulakos J, Weiner S, Block CH, Siegel A. A ¹⁴C-2 deoxyglucose analysis of the functional-neuronal pathways of the limbic forebrain in the rat, 1 the amygdala. *Brain Res Rev* **1983**; 11: 354-361.

Summary

Status Epilepticus Induced by Intracerebral Folic Acid Injection in Cats—Clinical, Electroencephalographic, Pathological Study

Ken Seki, Juhn A. Wada

Recently, intracerebral folic acid (FA) injection was reported to produce status epilepticus (SE) associated with extensive neuronal damage considered to reflect primarily lesion of GABA-ergic neurons in rats. Since earlier studies in our laboratory suggested the possibility that substantia innominata (SI) plays an important role in amygdaloid kindling (Am K), we planned to examine (1) the effect of SE, induced by FA injection into the Am upon subsequent seizure development at the same Am site by kindling, and (2) the possible role of GABA-ergic neurons, reported to be selectively vulnerable to FA when injected into SI, play in Am K in cats. The present study was undertaken to investigate acute effects of SE induced by microinjection of FA into Am or SI through chronic canula. EEG, EKG, and urinary samples were obtained continuously before, during, and after SE.

Regardless of where FA was injected, all the animals developed SE with recurrent stage 1~6 Am K seizure manifestations reaching a peak in about 3 hrs, gradually subsiding within 5 days. Motor seizure symptom appeared relating with reactive after-

discharge in motor cortex and hippocampus. Generalization followed appearance of reactive afterdischarge in midbrain reticular formation as reported in Am K.

There was no significant change in EKG except for a marked increase of cardiac rate during SE. Similarly transient myoglobulinuria and significant increase of urinary output of noradrenaline were observed at the time of SE. At the 14th day after FA injection all animals were sacrificed and examined histopathologically. There was a little evidence characterized by shrinkage and pyknosis of nerve cells with some macrophage proliferations localizing in the pyriform cortex and hippocampus. Other organs including the heart were normal. Thus no evidence of severe neuronal damage reported in rats was found, suggesting a significant species difference.

J. Jpn. Epil. Soc. 1985 ; 3 : 73-79