

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：32690

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2013

課題番号：25893266

研究課題名(和文) 実験モデルにおけるてんかん性反応の経時的なイメージング

研究課題名(英文) Temporal imaging of epileptic activity in animal models

研究代表者

土屋 孔明 (TSUCHIYA, KOMEI)

創価大学・工学部・助教

研究者番号：80708462

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 600,000円、(間接経費) 180,000円

研究成果の概要(和文)：

本研究では、マウス及びラットの海馬を標的とし、電気刺激や薬物注入によって誘発されるてんかん様発作波の伝播経路を明らかにすることを目的に、脳血流イメージングを行った。その結果、海馬でのてんかん様発作波が帯状回を経由し、皮質運動野に到達することが示唆された。また、てんかん性の反応が、これまで確認されていた様な脳波変化だけでなく、血流量の変化としても、両側の生じることが確認され、てんかん病の進展・伝播に起因する神経代謝が神経活動に付随して起きる事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

In this study, we measured the alteration of cerebral blood flow (CBF) during epileptiform seizure induced by acute kindling and drug injection of the mouse and rat hippocampus to reveal the progression of epileptic activity. In consequence, we found cingulate gyrus might mediate propagation of epileptiform seizure for motor cortex. Additionally, it was confirmed alteration of CBF during epileptiform seizure occurred bilaterally. It was suggested that metabolic change caused by epileptiform seizure might occur bilaterally and accompany change of local field potentials.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：実験病理学

キーワード：てんかんモデル 内因性信号 キンドリング 脳血流画像

## 1. 研究開始当初の背景

てんかん病は世界で最も一般的な神経疾患であり、全世界で少なくとも 5000 万人以上の患者が存在する (WHO, Epilepsy Atlas, 2005)。抗てんかん薬によりその約 60% の患者をコントロール出来るものの難治性のもも少なくない。とりわけ、海馬周辺を発作の焦点とする側頭葉てんかんは成人のヒトにおいて最も難治に成り易く、抗てんかん薬による治療が効果を示し辛いてんかんである。側頭葉てんかんの動物モデル及び脳スライスを用いて、電気生理学的な観点から海馬周辺でのてんかん様発作が増強されていく過程について検討した研究により、*in vivo* 及び *in vitro* の双方において局所的な神経回路の増強や弱体化が確認されているが (Dugladze et al., P.N.A.S., 2007; Musto et al., Epilepsy Res., 2009; Fujiwara-Tsukamoto et al., J. Neurosci., 2010)、その全体像は解明されていない。てんかん病の進展・伝播に関連する特異的な神経回路の存在は十分に示唆されてきたが、海馬等、側頭葉において発生したてんかん様発作が大脳など他の脳部位へ進展・伝播していく過程を捉える事が課題であった。てんかん様発作の伝播を検討する電気生理学的な解析方法として、多極電極を用いた階層解析が用いられてきたが (Bragin et al., Neurosci., 1997; Kogure, Epilepsy Res., 1997)、電極刺入による組織損傷が発生する点と解析可能な範囲に制限があることが問題となっている。

近年、カメラの撮影技術の向上によりイメージングの可能性が大きくなる中で、ヘモグロビンやフラビンなどの生体由来の内因性信号 (IOS: intrinsic optical signal) イメージングが注目を集めてきている。このイメージングでは神経活動を可視的に、かつより自然に近い状態で観察することができる。特に、酸素化ヘモグロビンと脱酸素化ヘモグロビンの吸収特性がほぼ等しくなる 586 nm の等吸収点波長の光を用いることで、組織に含まれる血液ヘモグロビン量の変化 (血液量、血流量変化と高い相関があり、血行動態の良い指標となる) を、酸素化ヘモグロビンの吸収がほとんどない 610nm の波長の光を使うことで脱酸素化ヘモグロビンの動態、つまり、生体における酸素代謝をイメージングすることが可能である。神経活動 (電気生理的な変化) と神経代謝 (局所脳血流の変化) のカップリングは、絶対とは言い切れないものの (Nemoto et al., NeuroImage, 2012)、このように血行動態と酸素代謝の変化を可視化することで、その背後にある神経活動を推測することが可能となり、様々な脳疾患研究への応用が期待されている。

## 2. 研究の目的

本研究では、電気刺激 (キンドリング刺激) および薬物投与 (カイニン酸、4-AP) により構築されたてんかんモデル動物を用い、海馬周辺で発生したてんかん様発作が大脳などの他の脳部位へ進展・伝播する過程を、脳血流量の変化を観察することにより非侵襲的に可視化し、発作の全般化の抑制に有効な神経回路を検討し、難治性てんかんである側頭葉てんかんに効力を持つ治療法や抗てんかん薬の開発につなげることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) てんかんモデルの作成

動物種は、C57bl マウス及び、SD ラットを用いた。ウレタン、キシラジンで麻酔後、脳定位固定装置に頭部を固定した。画像撮影のため頭部を広く露出させ、電気刺激用及び薬物注入用の同心円電極を脳図譜に基づいて角度をもたせて海馬 CA1 野へ刺入した。電極刺入後 1 時間の回復期間の後、キンドリング刺激を加えた。キンドリング刺激は、後発射 (AD: Afterdischarge) を誘発するのに十分な刺激強度に設定し、20 分間隔で投入した。薬物を使用する実験では、同様に 1 時間の回復期間の後、4-AP (10nmol, 10  $\mu$ l) とカイニン酸 (1nmol, 10  $\mu$ l) をそれぞれ 1 分間かけて投入した。

### (2) 脳血流イメージング及び脳波記録

イメージングにはタングステン - ハロゲン光源に酸素化ヘモグロビンと脱酸素化ヘモグロビンの吸光度の等吸収点である 586nm の波長にフィルタリングした光を皮質に照射した。マウスを用いた実験においては、準備実験としてマウスの後肢を電気刺激 (1 ms 二相性パルス・5 Hz で、顕微鏡下で後肢が動くのを確認できる刺激強度に設定) した場合の体性感覚野での血流量変化をイメージングし、血流量変化が明確に確認できることを確認してから実験を行った。

電気刺激実験ではキンドリング刺激を加える 10 秒前から撮影を開始し、最低でも刺激後 50 秒後まで撮影を続けた。薬物投与実験では投与前 30 秒前から投与後 10 分後まで撮影後、その後発生した自発性の発作に対して発作の開始から終了まで撮影を行った。すべての画像は 250  $\times$  250 ピクセルで撮影した。外部ソフトウェアを用いて電気刺激と撮影のタイミングを制御し、撮影画像は MATLAB を用いて刺激直前をベースラインとして差分を算出した。実験中の脳波は記録用の電極から A/D コンバータ - (The CED Power1401 mk II) を介して 1000 サンプリングでデジタル化し、コンピュータを用いて連続記録した。

#### 4. 研究成果

##### (1) マウス海馬急性キンドリングによる大脳皮質における血流量変化

麻酔下でのキンドリング刺激によって後発射(AD: Afterdischarge)の誘発は確認されたが、慢性キンドリングで確認されるような後発射持続時間の延長や増強は確認できなかった。しかしながら、キンドリング刺激投入による血流量変化は確認され、刺激投入より1秒程遅れて刺激側頭頂葉後部、続いて刺激側の帯状回に対応する正中、対側の頭頂葉後部、さらに対側の帯状回に対応する正中での血流量が増加し、刺激後10秒ほど持続した(図1)。帯状回に対応する正中での血流量の増加が確認されたことにより、海馬でのてんかん様発作波が帯状回を經由し、皮質運動野に到達することが示唆された。

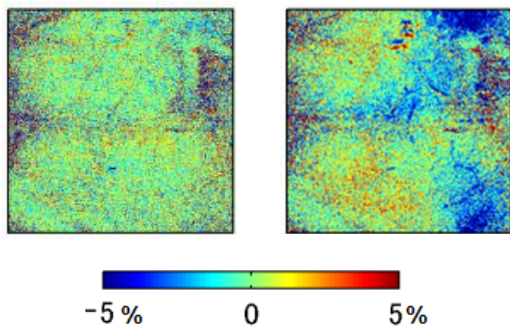


図1 キンドリング刺激による血流量の変化(左:刺激投入前、右:刺激投入10秒後)

##### (2) マウス海馬カイニン酸投与による大脳皮質における血流量変化

カイニン酸投入モデルではカイニン酸注入直後から全身けいれんが発生した。脳血流変化は一樣ではなく、特定の部位や回路の増強を示唆する変化を捉えることはできなかったが、カイニン酸投入直後から皮質全体での血流量の減少を確認した。

##### (3) マウス海馬 4-AP 投入による大脳皮質における血流量変化

4-AP注入モデルでは、注入後数分で全身けいれんを起こすものが多く、その後反復性の自発性発作波を誘発させるものが多かった。この場合では、持続的に自発性の発作波と皮質血流画像を観測できた。

4-APにより発作を誘発したモデルでは10分おきに脳波に発作波が生じ、平均して2分

ほどで発作は終息した。4-AP注入直後での血流量変化では、注入部位から血流量の変化が空間的に皮質の注入側に進展し、それに対して上矢状洞が目立つ部位を中心に血流量の減少が確認された。自発性発作直前の脳血流量を基準にその変化を確認したところ、発作が始まると両側の頭頂葉の血流量の減少が確認された。また血流の減少は発作が終わるとほぼ同時になくなった(図2)。皮質のイメージングにおいては血流量の減少が両側頭頂葉の皮質部位において確認されるが、発作の焦点となっている海馬では血流量の増加が生じていると考えられる。今回の結果としては、海馬焦点の自発性の発作を抑制しようとする働きが皮質でイメージングされたと考えられる。しかし血流量の減少については586nm波長を用いたイメージングだけではなく、多波長でのイメージングや、レーザードップラー血流測定法などを用いて正確に検討する必要がある。

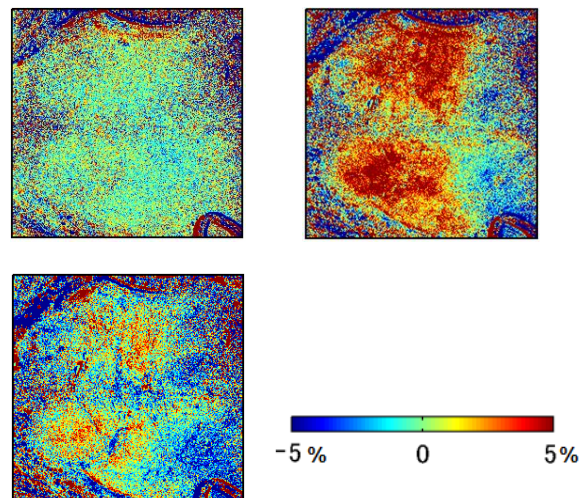


図2 4-AP注入により誘発された自発性てんかん様発作中の血流量変化(左上:発作開始直前、右上:発作中、左下:発作終了20秒後)

##### (4) ラット海馬急性キンドリングによる大脳皮質における血流量変化

ラット海馬急性キンドリングにおいては、マウス海馬急性キンドリングで得られた結果以上に、より慢性のキンドリングに近い結果を確認した。キンドリング刺激を繰り返し投入することにより、慢性実験で報告されている、後発射の延長と増強、後発射における高周波数成分の出現が確認された。マウス海馬急性キンドリング同様、刺激投入より2秒

程遅れて、刺激側頭頂葉及び対側の頭頂葉にて血流量の増加が確認された。後発射発生に起因する血流量変化は、誘発された後発射によって違いを見せた。誘発された後発射が、持続時間が短く、高周波数成分の出現が少ない場合においては、皮質血流量は、両側共に若干の増加傾向にあった。その一方で、誘発された後発射が、持続時間が長く、高周波数成分の出現が多い場合には、血流量は一度増加傾いた後、減少に転じる傾向が確認された（図3）。この場合は、マウスにおける4-AP投入と同様、発作の焦点となっている海馬では血流量の増加が生じていると考えられるが、今後より正確に検討する必要がある。

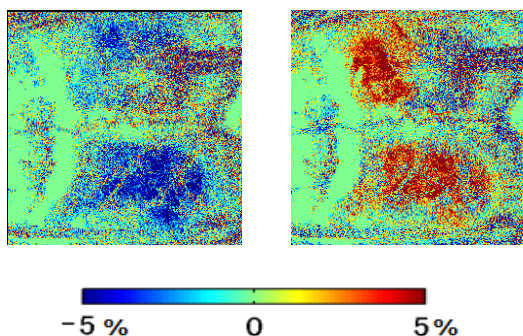


図3 ラット海馬キンドリング刺激による血流量の変化（左：刺激終了6秒後における後発射中の血流量の増加、右：後発射終了10秒後における血流量の減少）

以上4種のでんかんモデルにおける研究により、てんかん性の反応が、これまで確認されていた様な脳波変化だけでなく、血流量の変化としても、両側的に生じることが確認され、てんかん病の進展・伝播における神経活動と神経代謝のカップリングが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

#### 〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

#### 〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

土屋 孔明 (TSUCHIYA, Komei)

創価大学・工学部・助教

研究者番号：80708462