

大脳皮質ペニシリン焦点における カテコールアミンの変動に関する研究

岡山大学医学部脳代謝研究施設機能生化学部門（主任：森昭胤教授）

白 壁 武 博

（昭和50年11月27日受稿）

第1章 緒 言

てんかん発作発現の生化学的機序を追究する試みは、従来多方面からなされてきた。そのうち、アセチルコリンや γ -アミノ酪酸（GABA）などのごとく中枢神経系における神経伝達物質と想定されている物質の代謝に関係するものや、脳のエネルギー代謝に関係するものについては、かなりのデータが集積されてきた¹⁾。一方、モノアミンは脳内における有力な神経伝達物質として、種々の脳固有の機能と密接に関係しているものと考えられており、最近特に注目されている。てんかん発作と脳内モノアミンとの関係についても、ここ約20年間に数多くの動物実験成績が発表され、両者間に密接な相関関係のあることが指摘されてきた²⁾。しかしながら、これらの研究によってもなお、てんかん発作発現の根底にあると思われる生化学的機序については明らかでないことが多く、解決されねばならない多くの問題が残されている。

てんかんの臨床生化学的研究は、従来外科的治療として行れた皮質焦点切除術の際にえられた脳組織を用いて行れており、アミノ酸やアセチルコリンなどについてそれらの代謝が検討された³⁾。しかしながら、その研究が脳それ自体を対象とする以上、実験遂行の上で自ら限界があり、これまでの研究の多くは、実験動物にいろいろな方法でヒトに見られるてんかん発作と類似の状態を作製することによってなされてきた。実験てんかんモデルとしては、種々のものが知られているが、急性実験では脳局所に物理的的刺激（電気刺激、凍結、無酸素など）や種々の催癲性薬物による化学的的刺激（ペニシリン、ストリキニン、ピクロトキシン、ウワバイン、メトラゾールなど）を加える方法があり、慢性実験ではアルミナクリームやコバルトを脳内に投与する方法などがある。これらの方法によって作製されたてんかんモデ

ルは、ヒトのてんかん発作と同一ではないけれども、発作現象の背景にある神経細胞の基本的活動様式はかなりの類似を示している⁴⁾。

さて、当研究施設の岸川は⁵⁾、ネコ脳にペニシリン皮質焦点を作製し、これに対するカテコールアミンの作用を検討した結果、ドーパミンあるいはその前駆物質であるL-3,4-ジハイドロキシフェニルアラニン（L-DOPA）を焦点上に局所投与するか、あるいは静脈内投与すると、いずれもペニシリン棘波の出現が抑えられること、およびノルエピネフリンの局所投与では、この抑制作用は認められないことを明らかにした。したがって、彼は、ドーパミンがペニシリン棘波の出現を抑制すると結論しているが、この成績はカテコールアミンがペニシリン焦点の形成あるいはその伝播過程に関与している可能性を示唆するものとして興味深い。本研究はそれに引続き、岸川と同様の方法でペニシリン皮質焦点を作製して、棘波の出現およびその伝播の各段階における大脳皮質カテコールアミン値の変動を検討し、その役割をさらに詳細に解明しようとするものである。

第2章 実験方法

第1節 ペニシリン皮質焦点の作製法

実験には体重約3kgの成熟ネコ41匹を雌雄を問わずに用いた。ペントバルビタール（50mg/kg）腹腔内注射による全身麻酔下に、ネコ頭部を東大脳研式脳定位固定装置に固定したのち、以下の操作を行った。すなわち、1%プロカインで局所麻酔後、頭皮を正中線上で縦切開して骨膜とともに左右に圧排したのち、両側頭頂部を中心に頭蓋骨を広く開放し、両側硬膜をそれぞれI字型に切開して大脳皮質を露出した。この操作中に脳表に肉眼的損傷の加わった3例を、実験例から除外したため、実際の実験例数は計38匹であった。

脳波記録用電極には、馬蹄型の電極保持器に装着した皮質脳波記録用電極（単極針電極）の先端に、生理食塩水に浸した綿片をつけたものを用い、一側脳に2本ずつ、それぞれ中シルビウス上回（middle suprasylvian gyrus）の前方部と後外側回（posterior lateral gyrus）の前方部の脳表に接するように置いた（図1）。不関電極として、鼻根部に針電極

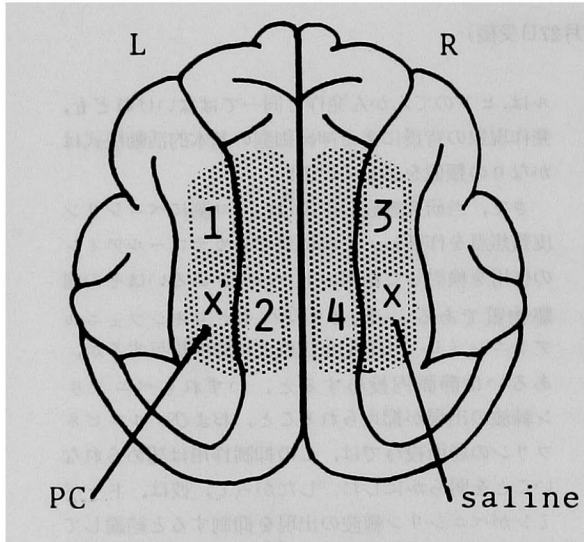


図1 ペニシリン焦点作製および電極装着部位
PCおよび saline：ペニシリンおよび生理食塩水を皮質内に注入した部位
1-4：皮質電極装着部位
陰影部は切除部位を示す

を装着した。皮質脳波の記録には、日本光電製8素子万能型脳波計を使用し、時定数0.1、紙送り速度1.5~3 cm/secで、単極および双極誘導により記録した。

ペニシリン焦点の作製は、市販のベンジルペニシリンGを生理食塩水に溶解して40,000 I.U./mlとしたものを、10 μ l (400 I.U.) マイクロシュリンジで左側中シルビウス上回の脳表から1-1.5mmの皮質内に注入して行った。なお、本実験では、ペニシリンの皮質内投与法を用いたため、それによる機械的損傷という影響を除外するために、右側皮質の対称部位に同量の生理食塩水を注入して sham-operation とした（図1）。さらに、対照として両側大脳皮質内に生理食塩水のみを注入する実験例を作製した。麻酔開始よりペニシリン焦点作製までに要した時間は約30分であった。

以上の操作の後、皮質脳波を指標として、焦点作製側でのペニシリン棘波の出現と対側大脳皮質への棘波伝播の状態を観察しながら、表1に示す各段階（Stage）で電極をすばやくとり除き、図1に点状陰

表1 ペニシリン棘波出現の各段階

第0段階 (Stage 0)	ペニシリンを大脳皮質内注入後、いまだ棘波の出現しない時期
第1段階 (Stage 1)	ペニシリン棘波が焦点作製（左）側皮質にのみ限局して出現する時期
第2段階 (Stage 2)	ペニシリン棘波が対（右）側皮質にわずかに伝播して出現する時期
第3段階 (Stage 3)	ペニシリン棘波が対（右）側皮質に十分に伝播し、両側同期性に出現する時期

影で示した両側大脳皮質を鋭匙を用いて同時に切除した。切除した脳組織は、直ちに液体窒素中に投入して凍結した。電極除去より切除開始までに要した時間および切除開始より凍結までに要した時間は、それぞれ5秒以内である。切除皮質は、注射部位と電極装着部を含むおよそ10 \times 20mmの大きさで、厚さ2-3mmであり、主として大脳灰白質からなる約300mg重のものである。

第2節 脳組織のカテコールアミン定量法

カテコールアミンの定量には電子捕獲検出器（electron capture detector）によるガスクロマトグラフィ法を用い、Kawaiらの原法⁸⁾と岸川の方法⁹⁾を一部改変して行った。

液体窒素中で凍結した大脳皮質は、秤量後水冷した0.4N過塩素酸7mlを加えてホモゲナイズした。ついで、10,000回転、10分間の遠沈による上清に同容量の水冷エーテルベンゼン（5：2）を加えて脱脂を行った。これを、6,000回転で6分間遠沈した水層に0.2Nエチレンジアミン四酢酸・二ナトリウム（EDTA \cdot 2Na）1mlを加え、氷冷下に4Nアンモニア水でpH5-6に調整した。ついで、精製アルミナ0.2gを加え、さらに1Nアンモニア水でpH8.4-8.5に調整して5分間攪拌後、5分間静置した。これを冷凍室内にて0.9 \times 25cmのカラムに流しこみ蒸留水20mlで洗滌した後、0.2N酢酸メタノール4mlで20mlナス型フラスコ中に溶出した。溶出液は凍結乾燥装置（ATMO-VAC, Refrigeration for Science, Inc., N. Y.）を用いて乾固し、アセトニトリル0.1ml、ついで無水トリフルオロ酢酸2滴を加えて50-60 $^{\circ}$ Cにて15分間トリフルオロアセチル化した。これに100ng/mlの内標準物質（ヘプタクロ

ル・エポキシド)を含むベンゼン 3 ml を加えて希釈し、その 1—2 μ l をガスクロマトグラフに注入した。

ガスクロマトグラフィーには、柳本製作所製 Yanco G80-EC (Ni) を使用した。充填剤は 2% XF-1105, Gaschrom P (60—80mesh), カラムは内径 4 mm, 長さ 2.25m のものを用いた。測定条件は、カラム温度 180°C, 注入および検出温度 225°C とし、キャリアガスとして高純度窒素 (99.999% 以上) を用い、キャリアガス圧を 1.4 kg/cm² とした。

第 3 章 実験成績

以下に、各実験群の大脳皮質ドーパミン (DA) およびノルエピネフリン (NE) の分析結果について述べ、一部の試験で検出されたオクトパミンについても言及する。なお、本実験で用いたガスクロマトグラフィー法による脳組織 DA および NE の回収率は、それぞれ約 70—80% と約 80—90% であり、オクトパミンのそれは約 50% であった。

実験成績の有意差検定は、Mann-Whitney の U 検定⁹⁾ (両側検定) で行い、オクトパミンについてはレンジの検定⁸⁾ を用いた。

第 1 節 対照ネコ大脳皮質のカテコールアミン値
まず、測定成績の対照値とするために、6 匹のネコを用いて、上記の実験方法により大脳皮質を露出し、両側に生理食塩水のみを注入した 3 分後に、両側大脳皮質を切除してカテコールアミンを測定した。その成績を表 2 に示したが、DA, NE とともに両側大脳皮質間に測定値の差は認められなかった。したがって、以後対照値として、表 2 の右端に示した数値である 12 検体の DA, NE 値、すなわち、 47 ± 7 ng/g、
表 2 対照ネコ大脳皮質のカテコールアミン値 (ng/g)

	Left	Right	Bilateral
DA	47 ± 8 (6)	47 ± 11 (6)	47 ± 7 (12)
NE	26 ± 3 (6)	27 ± 3 (6)	26 ± 2 (12)

Mean ± S. E. () 内は検体数

表 3 ペニシリン棘波出現の各段階における大脳皮質カテコールアミン値 (ng/g)

	DA		NE	
	Focus	Non-focus	Focus	Non-focus
Control (n=12)	47 ± 7		26 ± 2	
Stage 0 (n=6)	22 ± 5 *	33 ± 8	17 ± 4 *	24 ± 6
Stage 1 (n=8)	56 ± 7	100 ± 18 **	38 ± 6	72 ± 13 ***
Stage 2 (n=7)	44 ± 4	92 ± 23 *	21 ± 2	59 ± 19 *
Stage 3 (n=11)	114 ± 10 ***	123 ± 21 ***	51 ± 8 **	53 ± 10 *

Mean ± S. E.

*p ≤ 0.1 **p < 0.05 ***p < 0.005

26 ± 2 ng/g を用いることにした。

第 2 節 ペニシリン棘波出現の各段階における大脳皮質カテコールアミン値の変化

ペニシリンを左側大脳皮質内に投与すると、多くの例では 3—4 分間の潜時 (Stage 0) の後にまず脳波上左側誘導から不規則な頻度で単発性ペニシリン棘波が出現しはじめ (Stage 1), 次第に頻度と規則性を増しながら、右側にも波及していき (Stage 2), 約 15—20 分後には、両側同期性の高振幅棘波が 1 分間に約 20 回の頻度でかなり規則的に出現するようになる (Stage 3) (表 1)。これらの各段階における脳波の各 1 例を図 2 に示した。

本節では、表 2 に示した対照群の大脳皮質カテコールアミン値と、ペニシリン棘波出現の各段階における両側大脳皮質のカテコールアミン値を比較した成績について述べる (表 3)。表 3 の有意差検定は、対照値と各段階における値との間で行った。

まず、焦点側皮質の DA 値は、棘波のいまだ出現しない第 0 段階で減少傾向を示す (U = 15, p < 0.1)。第 1 段階 (U = 35, p > 0.1) および第 2 段階 (U = 37.5, p > 0.1) では、対照値との間に差を認めないが、第 3 段階では逆に明らかな増加がみられた (U = 9, p < 0.002)。非焦点側皮質の DA 値は、第 0 段階では差がないが (U = 20.5, p > 0.1)、第 1 段階 (U = 12.5, p < 0.02) および第 3 段階 (U = 7.5, p < 0.002) では明らかな増加がみられ、第 2 段階でも増加傾向が認められた (U = 21, p = 0.1)。

一方、焦点側皮質の NE 値は、やはり第 0 段階で減少傾向 (U = 16.5, p < 0.1) がみられるが、第 1 段階 (U = 27, p > 0.1) および第 2 段階 (U = 28, p > 0.1) では変化がない。第 3 段階では逆に明らかに増加している (U = 27, p < 0.02)。非焦点側皮質の NE 値は、第 0 段階では差がないが (U = 35, p > 0.1) 第 1 段階では明らかな増加 (U = 4, p < 0.002)、第 2 段階 (U = 20.5, p < 0.1) と第 3 段階 (U = 37, p < 0.1) では増加傾向がみられた。

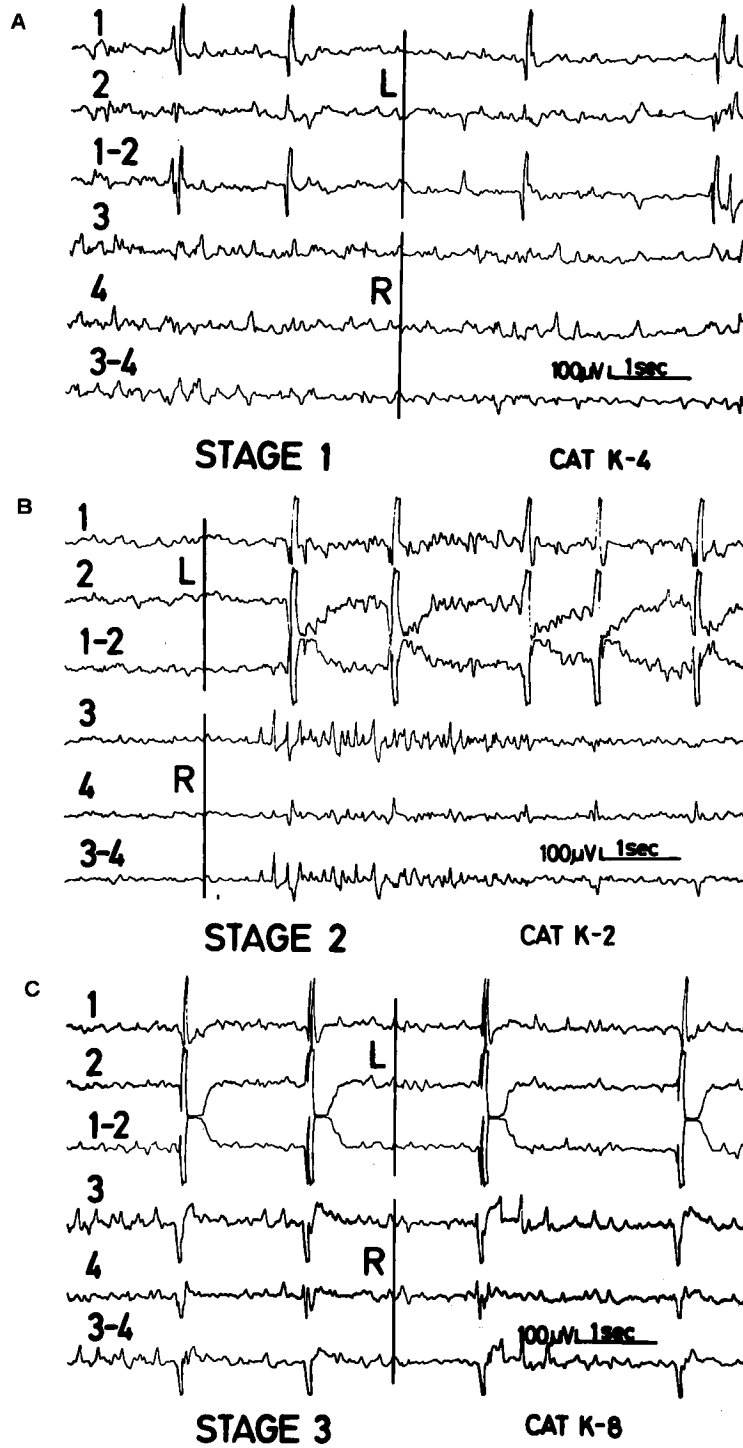


図2 ペニシリン棘波出現の各段階における皮質脳波
 A: 第1段階 (Stage 1) B: 第2段階 (Stage 2) C: 第3段階 (Stage 3)
 左端の数字は電極番号を示す. L: 左側誘導 R: 右側誘導

これら DA と NE 値の変動は、ほぼ同様の型をとっており、第 0 段階では焦点側皮質で減少し、第 1 段階と第 2 段階では非焦点側皮質で増加がみられる。第 2 段階では両側皮質で、第 1 段階より平均値はやや減少しているが、統計的には有意差は認められなかった。最後に、第 3 段階では両側皮質の DA、NE 値ともに増加が認められた。

第 3 節 ペニシリン棘波出現の各段階における両側大脳皮質カテコールアミン値の差異

本節では、ペニシリン投与後棘波のいまだ出現し

は 67% および 70% であった。しかし、統計的には DA 値 ($U=9.5, p=0.12$), NE 値 ($U=10.5, p=0.155$) ともに有意差を呈するまでにはいたっていない。

2) 第 1 段階 (Stage 1) における左右差

8 匹のネコで検討した。ペニシリン棘波が焦点作製側すなわち左側皮質にのみ限局して出現する段階での焦点側皮質の DA および NE 値を、非焦点側皮質の値に対する百分率で表わしたのが図 4 である。すなわち、DA は全 8 例の焦点側皮質で低値であり (35—95%), その平均は 61% であった。一方、NE も

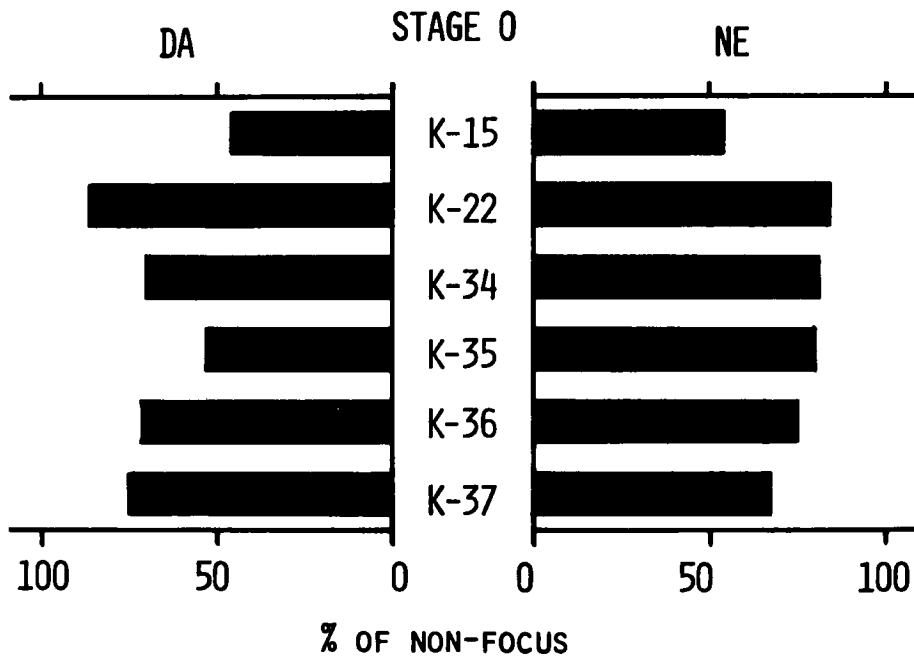


図 3 第 0 段階 (Stage 0) における両側大脳皮質ドーパミン (DA) およびノルエピネフリン (NE) 値の差
非焦点側皮質の値に対する焦点側皮質の値を百分率で示す
K: ネコ番号 (図 4—6 も同じ)

ない段階 (Stage 0) から、第 3 段階までの各段階における両側大脳皮質間のカテコールアミン値を比較した成績について述べる。

1) 第 0 段階 (Stage 0) における左右差

6 匹のネコで検討した。ペニシリン注入約 2 分後、いまだ棘波が出現しない段階での焦点作製側 (左側) 皮質の DA および NE 値について、対側 (右側) 皮質のそれらに対する百分率を求めたのが図 3 である。すなわち、全 6 例で左側の DA および NE 値は、それぞれ右側の 46—86%, 54—84% と低く、その平均

同様に焦点側皮質で全例低値を示し (23—83%), 平均 59% であった。いずれも第 0 段階での差より大きくなっているが、両アミンの低値の割合は、各個体でかなりのバラツキがみられる。左右皮質間の値の有意差検定では、DA ($U=11, p=0.014$), NE ($U=13, p=0.025$) とともに、5% 以下の危険率で有意に焦点側皮質で低値であった。

3) 第 2 段階 (Stage 2) における左右差

7 匹のネコで検討した。ペニシリン棘波が非焦点側皮質にわずかに伝播した段階での焦点側皮質の DA

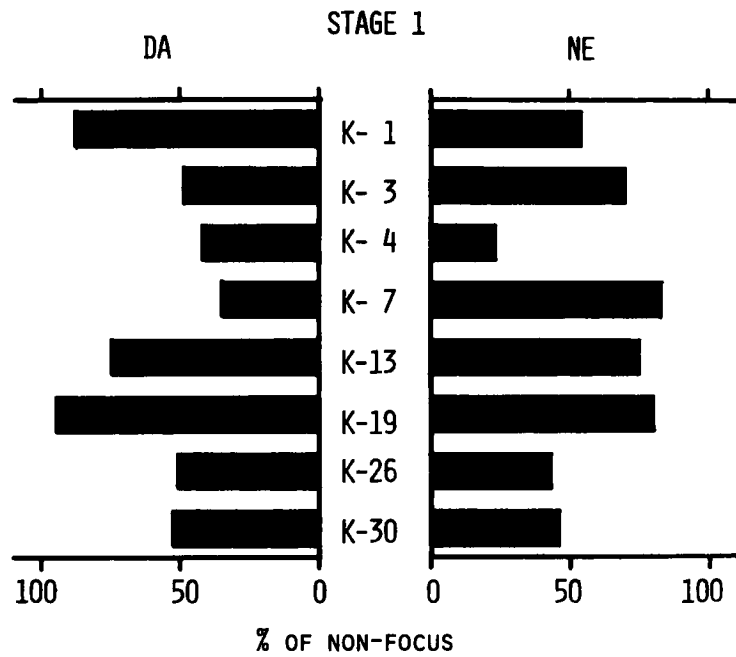


図4 第1段階(Stage 1)における両側大脳皮質ドーパミン(DA)およびノルエピネフリン(NE)値の差 図説明は図3参照

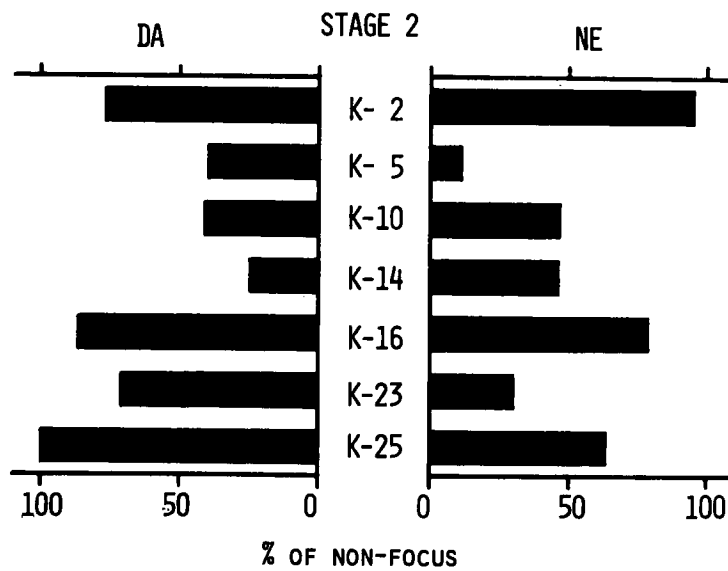


図5 第2段階(Stage 2)における両側大脳皮質ドーパミン(DA)およびノルエピネフリン(NE)値の差 図説明は図3参照

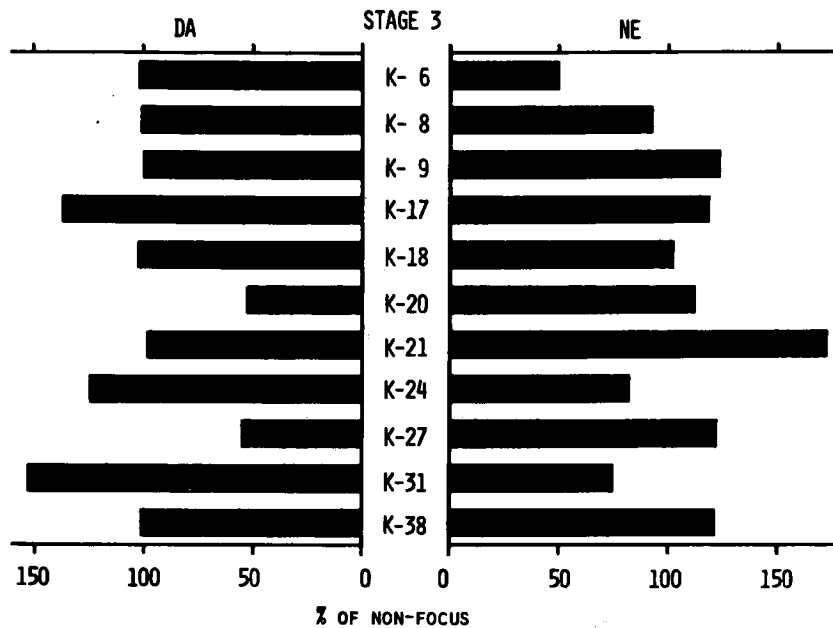


図6 第3段階(Stage 3)における両側大脳皮質ドーパミン(DA)およびノルエピネフリン(NE)値の差 図説明は図3参照

およびNE値を、非焦点側皮質の値に対する百分率で表わしたのが図5である。DAは1例(K-25, 左右皮質間の値に差がない)を除く6例で焦点側において低値であり(25-87%),その平均は63%であった。統計的にも5%以下の危険率($U=11, p=0.049$)で有意に低い。一方,NEは7例全例で焦点側皮質において低値であり(11-95%),その平均は53%であった。統計的にも1%以下の危険率($U=5, p=0.006$)で有意に低い。しかし各個体間におけるバラツキは、前2段階に比べてさらに大きくなっている。このバラツキの原因は脳波を指標としての皮質切除時期の決定が厳密には全く同条件では行れにくいことによるものであろう。

4) 第3段階(Stage 3)における左右差

11匹のネコで検討した。ペニシリン棘波が非焦点側皮質に十分伝播し、両側同期性に出現する段階での焦点側皮質のDAおよびNE値を、非焦点側皮質の値と比較して百分率で示したのが図6である。DAでは左右差のないもの6例,焦点側皮質で高値であるもの3例,逆に低値であるもの2例であった。一方

NEでは各個体間のバラツキが大きく、左右差のないもの2例,焦点側皮質で高値であるもの6例,逆に低値であるもの3例であった。全体としてはDA 103%,NE 107%とやや焦点側皮質で高値を示す傾向がみられた。しかしながら、有意差検定では,DA値($U=52.5, p>0.1$),NE値($U=54.5, p>0.1$)ともに左右差は認められなかった。

5) 成績の小括

対照群および第0~3段階における、焦点側(左側)皮質および非焦点側(右側)皮質のDAおよびNE値の比較を図7にまとめた。すなわち、ペニシリン投与後いまだ棘波の出現していない第0段階では統計的には有意ではないが,DA,NE値ともに焦点側皮質で低い傾向がみられる。そして、棘波が焦点側皮質のみに局限して出現する第1段階では,DA,NE値ともに対側に比べて有意に低値である。さらに、棘波が対側皮質にわずかに出現しはじめる第2段階でも、やはり焦点側皮質のDAおよびNE値は対側に比べて有意に低い。しかしながら、棘波が両側同期性に出現する第3段階にいたると,DA,NE

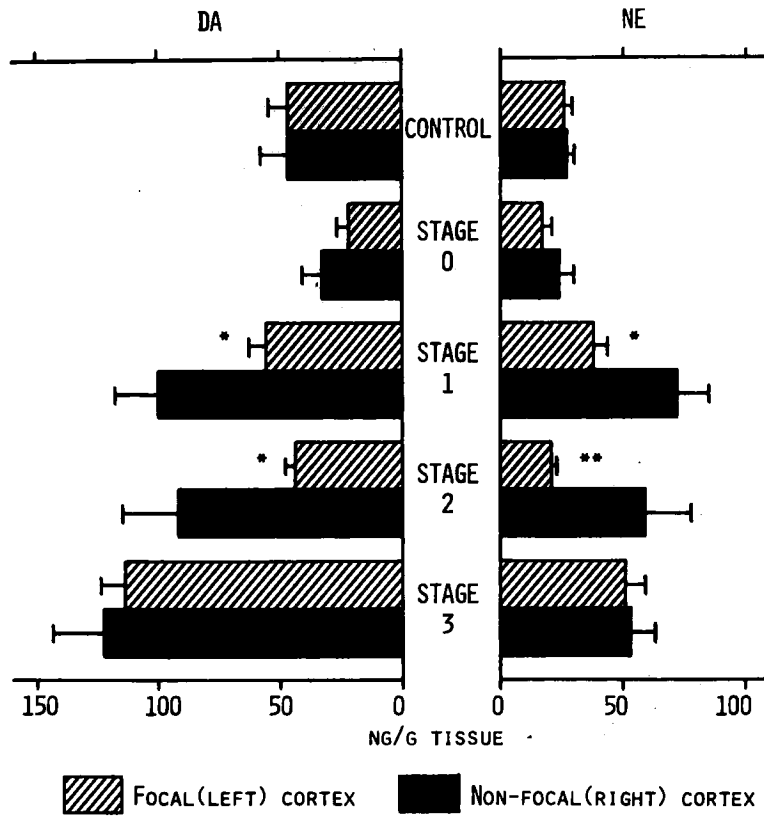


図7 対照群および各段階(Stage 0-3)における両側大脳皮質ドーパミン(DA)およびノルエピネフリン(NE)値の比較
 棒グラフは平均値, 横線は標準誤差を示す
 *p<0.05, **p<0.01 (Mann-Whitney's U-test)

表4 ペニシリン棘波出現の各段階における大脳皮質オクトパミン値 (ng/g)

Stage 1			Stage 2			Stage 3		
Cat No.	Focus	Non-focus	Cat No.	Focus	Non-focus	Cat No.	Focus	Non-focus
K-1	T	T	K-2	8	T	K-6	10	11
K-3	T	T	K-5	6	T	K-8	T	10
K-4	9	T	K-10	T	T	K-9	17	14
K-7	3	5	K-14	20	3	K-17	12	9
K-13	27	14	K-16	13	23	K-18	T	T
K-19	18	16	K-23	T	T	K-20	16	27
K-26	31	17	K-25	T	T	K-21	32	32
K-30	T	T				K-24	T	T
						K-27	7	18
						K-31	T	T
						K-38	T	T

T : trace

値とともに左右差は認められなくなる。

第4節 ペニシリン皮質焦点におけるオクトパミンについて

38実験例のうち、16例においてオクトパミンを検出した。これら検出例はすべて、第1段階以降のものであり、対照群および第0段階では検出されていない(表4)。ペニシリン棘波が焦点作製側にのみ局限して出現する第1段階では、焦点側皮質にのみオクトパミンが検出されたり、焦点側に明らかに多量のオクトパミンが検出されたものが8例中3例に認められた。この成績の有意差検定はtraceを0.0とすると、同順位のものが多いことからU検定を用いえないため、レンジの検定で行った。その結果、焦点側皮質では対側に比べてオクトパミンが多量に検出されることは、10%以下の危険率で有意という傾向がえられた。しかし、第2および第3段階では、有意差はえられなかった。

第4章 考 按

ペニシリンの epileptogenicity を最初に指摘したのは、Walker ら⁹⁾である。その後、ペニシリンは広く実験でかんモデルの作製のために用いられているが、これは操作が容易でコントロールしやすく、長時間にわたって安定した発作波型がえられることのほかに、発作間歇期棘波および発作期痙攣波が同一実験で検討できるという利点をもっているからである⁴⁾

ペニシリンの痙攣作用に関しては数多くの生理学的研究がなされてきたが、^{4,10,11)}神経細胞レベルにおける最も明らかな電気生理学的所見は、発作焦点における表面棘波に一致した発作性脱分極性変位 (paroxysmal depolarization shift) の出現である¹²⁾。しかしながら、この現象の出現機構については、いまだ明確にされておらずペニシリンの作用機序についてもいくつかの説明がなされている。すなわち、1)ペニシリンが反回性興奮神経回路を増強する、^{13,14)}2)シナプス前終末の変化によって伝達物質放出の増加が起る、¹⁵⁾3)ペニシリンがGABAにより仲介される抑制性過程を抑制する^{16,17)}などである。いずれにしても、これらの現象に関しては、脳内神経伝達物質が重要な役割を担っていることが想定されるが、ペニシリン焦点形成における伝達物質を含めた生化学的研究は、ほとんど行われていない。その中で、GABA系物質に注目したものとして、Pintillie らは¹⁸⁾ネコの一側大脳皮質にペニシリン焦点を作製し、1)新

皮質全体でアンモニアが大量に増加していること、2)焦点と対側の皮質では、グルタミン酸が有意に低下していること、および3)グルタミン量には、変化がないことを報告している。また、Gottesfeld ら¹⁹⁾は、ネコ脳のパニシリン焦点では発作間歇期および発作期にGABAおよびグルタミン酸が有意に減少しており、後者は発作期により一層減少していることを示した。一方、ニューロンレベルの研究では、Wilson ら²⁰⁾がアメフラシの腹部神経節ニューロンのシナプス電流に対するペニシリンの効果を観察し、抑制性シナプス電流の約90%が消失することから、この効果はアセチルコリンによって仲介される抑制性シナプス後電位 (IPSP) をブロックすることにより生ずるものと推定している。このように、著者の調べた範囲では神経伝達物質としてのカテコールアミンを取上げた報告は現在まで皆無である。

さて、本研究では、ネコ大脳皮質に作製したペニシリン焦点の形成とその脳内伝播過程において、大脳皮質DA、NE値に変動がみられたのであるが、その意義を分析するにあたっては、大脳皮質にカテコールアミン性ニューロンあるいはカテコールアミン感受性ニューロンが存在するかどうか重要な問題となる。従来、新皮質にはカテコールアミン性神経終末が存在することは証明されていたが^{21,22)}それらはすべて橋の青斑核より上行するノルアドレナリン性のものであると考えられてきた。したがって、大脳皮質でもNEが神経伝達物質としての機能を有することが想定されていた。一方、DAに関しては、新皮質における含有量が線状体などに比べると非常に少なく、DA性ニューロンの存在も組織化学的に証明されていなかったことから、単にNEの代謝性前駆物質にすぎないという考えが強く、この部におけるDAの生理的機能については、ほとんど考慮されていなかった。しかしながら、すでに1963年にKrnjević ら²³⁾は、ネコ大脳皮質ニューロンの自発発火およびL-グルタミン酸投与によって誘発される細胞発火 (evoked spike discharges) が iontophoretic に投与されたDAによって抑制されることから、この部に“DA感受性”ニューロンが存在することを指摘している。ただし、その抑制作用はGABAほど強くなく、皮質のDA含量が少ないことから、皮質内神経伝達には重要な役割を果しているとは思われなかった²⁴⁾

最近になって、まずThierry ら²⁵⁾が、ラット大脳皮質にDA性ニューロンが存在することを示唆した

が、これに続いて、ラットの前頭葉皮質および辺縁系皮質に中脳より上行するDA性神経終末が存在することが報告されている。^{25,27} さらに、ネコのシルビウス上回にもDA性神経終末の存在が指摘されたが、同時にこの部にはDA性ニューロン体は存在しておらず、また、このニューロンが脳内いずれの部位に起始しているのかは明らかにされていない。²⁸ しかし、大脳皮質にDA性神経終末の存在することが証明されたことは、この部においてもDAが何らかの生理的機能を有するという間接的な証拠となりうるものと思われる。

ネコ大脳皮質のカテコールアミンについては、従来NE量がDA量より多いとされているが、本研究でえられた値は、シルビウス上回を含む大脳皮質ではDAの方がNEより高値を示した。岸川⁹が冷却生理食塩水で脳を急速に灌流した後にとり出す方法で行なった定量では、DAの17ng/gに対してNEは21ng/gとやや高値である。一方、Thierryら²⁹がシルビウス上回のカテコールアミンを蛍光法で測定したものでは、DA 112ng/gに対してNE 242ng/gと、後者が約2倍の値となっている。後2者の測定値には大きな差があり、またヒト大脳皮質ではその全領域にわたって、DAの方が高値を示すという報告³⁰もあり、DAとNE量の相関関係についてはさらに局所解剖学的な検討が必要であると思われる。

さて、本研究でペニシリン焦点を作製し、その後切除してカテコールアミン定量に用いた大脳皮質組織は、主としてこのシルビウス上回であり、上述のごとくこの部にNE性のものに加えてDA性神経終末も存在するという事は、ペニシリン焦点形成にともなうカテコールアミン値変動の意義づけに妥当性を与えるものであろう。しかし、このカテコールアミン値変動がペニシリン棘波の出現に直接関与しているものか、あるいはいったん形成された焦点における発作放電が脳内他部位に伝播していく過程に関与しているのかは、いまだ情報不足であり、慎重な解釈を必要とするものと思われる。本研究でえられたペニシリン棘波の発生およびその伝播にともなうカテコールアミンの変動は、かなり複雑であるが、以下にその意義について考察してみたい。

一つの可能性としては、ネコ大脳皮質ニューロンの自発発火あるいはL-グルタミン酸投与による細胞発火に対して抑制作用を有するとされるDAやNEの機能^{31,32}すなわち、大脳皮質ニューロンの電気活動に対して抑制作用を示すこれら神経伝達物質の放

出あるいはシナプス後膜への作用をペニシリンが抑制することによって、シナプス後ニューロンの異常興奮が起り、棘波が出現することである。ストリキニンの脊髄レベルにおける作用には、抑制性シナプスの遮断という機序が証明されている。³⁰ 本実験の結果のうち、第3段階におけるDA、NEの著明な増加は、これら伝達物質の放出および分解の低下による蓄積として説明可能ではありそうだが、一方、他の段階における焦点側カテコールアミンの非焦点側のそれらに対する低値からは、このような機序を想定することが困難である。

他方、ペニシリン投与により他の何らかの機序に基づいて起った大脳皮質ニューロンの異常興奮に対応するために、これらのニューロンに対して抑制的な影響を及ぼしているカテコールアミン性ニューロン末端からの、DAやNEの放出増加とそれともなう代謝的分解過程の促進が生じて、焦点を含む脳組織中でのDAやNEが減少することが考えられる。これは、脳波上いまだ棘波が出現していない第0段階で、すでにDAとNE両者の減少傾向がみられることから首肯される。焦点側に棘波が出現する第1段階では、DAおよびNE値は両側大脳皮質とも正常対照値よりは高くなる傾向があるが、焦点側の値は対側に比べると有意に低い。これは、DAやNEの神経末端からの放出増加がある一方、これに対応するためにニューロン体における伝達物質合成の増加が起っていることを示すものと思われる。非焦点側におけるカテコールアミンの増加は、カテコールアミン性神経系の相対的な合成系の促進として捉えねばならないが、もちろんこれら推論の確認には、今後大脳皮質に投射するニューロン体の存在する脳部位を同定し、その部におけるカテコールアミン代謝全般、ことにその律速酵素であるチロジン水酸化酵素活性の検討など、合成系の調節機構に対する広汎な研究が必要であらう。

以上の考察からは、カテコールアミンが、ペニシリンによって誘発される大脳皮質ニューロンの異常興奮に対して抑制的な影響を及ぼしていること、すなわち、ペニシリン棘波出現の機序に関与していることが示唆される。これはさらに、大脳皮質にカテコールアミン感受性ニューロンが存在することや³³ ペニシリン棘波の出現がDAやL-DOPAの外部からの投与によって抑制されること³⁴からも支持されうる。一方、ペニシリン棘波の脳内伝播に対するカテコールアミンの関与については、大脳皮質にはカテ

コルアミン性ニューロン体の存在が証明されていない²⁸⁾ ことなどから、現時点では否定しようと考えられる。

ペニシリン皮質焦点におけるオクトパミンについては、いまだ一定の変化として捉えることができず、今後の研究課題として保留せざるをえなかった。しかし、第1段階では、DAが低値を示す焦点側でのみオクトパミンが検出されたり、あるいは、対側に比べて高値を示す傾向のあったことは、対照群および第0段階においては、オクトパミン検出例がなかったこととともに注目したい。オクトパミンは、軟体動物の神経系には存在することが証明されており、^{31, 32, 33)} さらにこれらのニューロン電気活動に対して影響を及ぼすという^{31, 30)} 哺乳動物にオクトパミンを投与するとNEに代って、偽性伝達物質 (false transmitter) として働くことも報告されているが^{35, 36)} 岸川³⁾ はペニシリン焦点作製後オクトパミンを大槽内に投与すると、棘波数の増加が起ることを観察している。哺乳動物脳におけるオクトパミン存在の有無とその役割はまだ明らかではないが、興味ある物質と思われる。

さて、てんかん発作発現の生化学的機序に脳内モノアミンが重要な役割を果していることは、1954年にChenら³⁷⁾ が、脳内モノアミンの放出を促進し、枯渇させる作用を有するレセルピンを動物に投与すると、ベンチレンテトラゾールやカフェイン静注による痙攣あるいは電気刺激痙攣の閾値低下が起ることを報告して以来、多くの研究者によって確認されている。これまでの業績に関しては、小林らの総説²⁾ にくわしく述べられているが、脳内モノアミンのうち何が最も重要な働きをしているのかは未解決である。すなわち、DAの役割を重視するもの^{38, 39)} NEの役割を重視するもの⁴⁰⁾ セロトニン(5-HT)が重要であるとするもの⁴¹⁾ さらにこれら2者以上が関与しているとするもの^{42, 43)} まである。

本研究でえられた成績からは、DAとNEがほぼ同じ変動を示しており、いずれの役割が重要であるのかは結論するにいたらなかったが、ペニシリン棘液に対してDAは抑制作用を示すが、NEにはその作用がない³⁾ ことから考えると、DAの役割を注目したい。脳内発作活動に対してDAが抑制作用を示すことは、上記の論文^{38, 39)} のほかに、最近実験てんかんモデルとして注目されている燃えあがり効果(kindling effect)⁴⁴⁾ の脳内発展に対しても、DAが重要な役割を果すことが報告されている⁴⁵⁾ これまでの研

究では、発作閾値の上昇、下降が脳内モノアミン量の増減と対応すると一般に考えられてはいるけれども、必ずしもモノアミンの総量では説明がつかない点がある²⁾ ことも明らかである。この問題の解決には、発作過程にともなうモノアミンの神経細胞下での存在様式や、これらの放出の様式にまで関与する研究が必要であろう。本研究の成績からも、発作放電の発現からその伝播にいたる諸段階でのカテコールアミンの変動は複雑であり、簡単には説明しえない。さらに、これまでの諸家の成績の多くは、発作に関係するモノアミンの変化を全脳を対象として測定している。脳全体としてのこれらモノアミンの変動が、必ずしも発作発現に関して重要な働きを示す脳内各部位のそれに対応しているとはいえない。この意味で今回用いたペニシリンやその他の化学的焦点作製物質を用いて、発作の発展過程における個々の脳部位の化学過程の変化を連続的に捉えていくことが重要であろう。岡田⁴⁶⁾ は、タンゲステン酸ゲルを用いてラット大脳皮質に焦点を作製し、痙攣の発展過程における脳各部位のモノアミンを測定している。それによると、痙攣過程でことに海馬や下部脳幹内側部の5-HTと5-ヒドロキシインドール酢酸(5-HIAA)含量が大きく変動するが、NEには変化がないことや、大脳皮質では痙攣初期に焦点側の5-HIAA含量が増加していることが示されている。一方、佐藤ら⁴⁷⁾ は、海馬に一次焦点を作製し、いったん燃えあがり効果を起こさせた脳標本では、脳各部位のDAとNEが減少しているとともに、ことに焦点側の運動領皮質、海馬および両側レンズ核のDAが著しく減少していると述べた。さらに、Billietら⁴⁸⁾ は、電激痙攣閾値の低下と尾状核DA量の低下との間に相関関係のあることを報告している。

DAが脳内発作活動に対して抑制作用をもち、本研究での結果から考察したように、ペニシリン焦点でもDAが抑制作用を有するとすれば、DA性神経終末と連結する神経細胞での神経伝達物質との相関関係が問題となろう。線状体では、DA性神経細胞の活動(DAの放出や受容器との作用)を修飾する処置を行うと、シナプス後細胞のアセチルコリン量が変化することが証明されており⁴⁹⁾ また、線状体でのアセチルコリンドーパミンのバランスがてんかん発作の制御に関与しているという報告もみられる⁵⁰⁾ アセチルコリンは発作活動に対して促進的に働くことが良く知られており、ペニシリン焦点においてもこのアセチルコリンとの関係を解明することは重要な

課題であると思われる。

第5章 結 語

ネコ大脳皮質にペニシリン焦点を作製し、皮質脳波を記録しながら、ペニシリン棘波の出現およびその対側大脳皮質への伝播の各段階において、両側皮質を切除し、カテコールアミンの定量を行った結果つぎの成績をえた。

1) 対照ネコ大脳皮質のDA, NE値は、それぞれ 47 ± 7 ng/gおよび 26 ± 2 ng/g (n=12)であった。

2) ペニシリン焦点作製側大脳皮質のDA値は、いまだ棘波が出現しない第0段階で減少を示し、両側同期性に棘波が出現する第3段階では逆に増加を示した。一方、非焦点側大脳皮質では、焦点側へのみ棘波がみられる第1段階から第3段階までの各段階でDA値の有意な増加が認められた。左右皮質の比較では、第1および第2段階で焦点皮質DAが有意に低値を示したが、第3段階では差を認めなかった。

3) 焦点側大脳皮質のNE値も、第0段階で減少したが、第3段階では逆に増加を示した。非焦点側皮質のNE値は、第1段階から第3段階のいずれでも、対照に比べて増加を認めた。左右皮質の比較で

は、第1段階および第2段階で焦点側皮質NEが有意に低値を示したが、第3段階では差を認めなかった。

4) 第1段階では焦点側皮質にのみオクトパミンが検出されたり、明らかに焦点側に多量のオクトパミンが検出された実験例があり、有意差を示した。しかし、第2段階および第3段階では一定の傾向が認められなかった。

これらの実験成績をもとにして、脳内発作活動とカテコールアミンとの関係について考察を加えた。ペニシリン皮質焦点における発作放電の出現過程でカテコールアミン、とくにDAは重要な抑制的役割を果しているものと考えられる。

本論文の要旨は、Symposium on Stereotactic Treatment of Epilepsy (1975年4月29日, Bratislava, Czechoslovakia) および第104回日仏生物学会 (1975年12月12日, 岡山) において発表した。

稿を終るに臨み、御指導、御校閲を賜った森昭胤教授、ならびに直接御指導いただいた病態生化学部門小林清史講師に深く感謝の意を表します。また、実験に御協力をいただいた平松緑、白石由起子嬢に深謝いたします。

文 献

- 1) Tower, D. B.: Neurochemistry of Epilepsy. Charles C Thomas, Springfield, Illinois, 1960. (森昭胤, 高坂睦年, 西本詮訳: てんかんの生化学. 永井書店, 大阪, 1964)
- 2) 小林清史, 森昭胤: てんかんと脳内モノアミン. 日本臨床, **33**: 3074—3084, 1975.
- 3) Jinnai, D. and Mori, A.: Biochemical studies on the epileptic cerebral cortex with a special reference to the results of our recent works. Acta Neurol. (Napoli), **15**: 491—504. 1960.
- 4) 松本秀夫: てんかん焦点の病態生理. てんかんの臨床と理論(原俊夫, 平井富雄, 福山幸夫編). 医学書院, 東京, 1974, 623—652頁
- 5) 岸川秀実: カテコールアミン代謝に関する基礎的ならびに臨床的研究. 岡山医誌, **87**: 451—496, 1975.
- 6) Kawai, S. and Tamura, Z.: Gas chromatography of catecholamines as their trifluoroacetates. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), **16**: 699—701, 1968.
- 7) Siegel, S.: Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences. McGraw-Hill Kogakusha, Tokyo, 1965, pp. 116—127.
- 8) 肥田野直, 瀬谷正敏, 大川信明: 心理教育統計学. 培風館, 東京, 1972.
- 9) Walker, A. E. and Johnson, H. C.: Convulsive factor in commercial penicillin. Arch. Surg., **50**: 69—73, 1945.
- 10) Ajmone Marsan, C.: Acute effects of topical epileptogenic agents. In Basic Mechanisms of the Epilepsies, ed. by Jasper, H. H., Ward, A. A., Jr. and Pope, A., Little, Brown and Co., Boston, 1969, pp. 299—319.

- 11) Prince, D. A. : Topical convulsant drugs and metabolic antagonists. In *Experimental Models of Epilepsy*, ed. by Purpura, D. P., Penry, J. K., Tower, D. B., Woodbury, D. M. and Walter, R., Raven Press, New York, 1972, pp. 51—83.
- 12) Matsumoto, H. and Ajmone Marsan, C. : Cortical cellular phenomena in experimental epilepsy. Interictal manifestations. *Exp. Neurol.*, **9** : 294—304, 1964.
- 13) Dichter, M. and Spencer, W. A. : Penicillin-induced interictal discharges from the cat hippocampus. II. Mechanisms underlying origin and restriction. *J. Neurophysiol.*, **32** : 663—687, 1969.
- 14) Ayala, G. F., Spencer, W. A. and Gurnit, R. J. : Penicillin as an epileptogenic agent : Effect on an isolated synapse. *Science*, **171** : 915—917, 1971.
- 15) Gutnick, M. J. and Prince, D. A. : Thalamocortical relay neurons : Antidromic invasion of spikes from a cortical epileptogenic focus. *Science*, **176** : 424—426, 1972.
- 16) Davidoff, R. A. : Penicillin and presynaptic inhibition in the amphibian spinal cord. *Brain Res.*, **36** : 218—222, 1972.
- 17) Curtis, D. R., Game, C. J. A., Johnston, G. A. R., McCulloch, R. M. and MacLachlan, R. M. : Convulsive action of penicillin. *Brain Res.*, **43** : 242—245, 1972.
- 18) Pintilie, C., Mison-Crighel, N. and Badiu, G. : Convulsive effect elicited by topical application of penicillin on glutamate-glutamine system of brain. *Nature (Lond.)*, **214** : 1131—1132, 1967.
- 19) Gottesfeld, Z. and Elazar, Z. : GABA and glutamate in different EEG stages of the penicillin focus. *Nature (Lond.)*, **240** : 478—479, 1972.
- 20) Wilson, W. A. and Escueta, A. V. : Effects of sodium penicillin-G on invertebrate identified synaptic connections. *Epilepsia*, **14** : 95, 1973.
- 21) Fuxe, K., Hamberger, B. and Hökfelt, T. : Distribution of noradrenalin nerve terminals in cortical areas of the rat. *Brain Res.*, **8** : 125—131, 1968.
- 22) Ungerstedt, U. : Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta physiol. scand., Suppl.*, **367** : 1—48, 1971.
- 23) Krnjević, K. and Phillis, J. W. : Actions of certain amines on cerebral cortical neurones. *Brit. J. Pharmacol.*, **20** : 471—490, 1963.
- 24) Krnjević, K. : Actions of drugs on single neurones in the cerebral cortex. *Brit. med. Bull.*, **21** : 10—14, 1965.
- 25) Thierry, A. M., Stinus, L., Blanc, G. and Glowinski, J. : Some evidence for the existence of dopaminergic neurons in the rat cortex. *Brain Res.*, **50** : 230—234, 1973.
- 26) Lindvall, O., Björklund, A., Moore, R. Y. and Stenevi, U. : Mesencephalic dopamine neurons projecting to neocortex. *Brain Res.*, **81** : 325—331, 1974.
- 27) Fuxe, K., Hökfelt, T., Johansson, O., Jonsson, G., Lidbrink, P. and Ljungdahl, Å. : The origin of the dopamine nerve terminals in limbic and frontal cortex. Evidence for meso-cortico dopamine neurons. *Brain Res.*, **82** : 349—355, 1974.
- 28) Thierry, A. M., Hirsch, J. C., Tassin, J. P., Blanc, G. and Glowinski, J. : Presence of dopaminergic terminals and absence of dopaminergic cell bodies in cerebral cortex of the cat. *Brain Res.*, **79** : 77—88, 1974.
- 29) Sano, I., Gamo, T., Kakimoto, Y., Taniguchi, K., Takesada, M. and Nishimura, K. : Distribution of catechol compounds in human brain. *Biochim. Biophys. Acta*, **32** : 586—587, 1959.
- 30) Eccles, J. C., Fatt, P. and Koketsu, K. : Cholinergic and inhibitory synapses in a pathway from motor axon collaterals to motoneurons. *J. Physiol.*, **126** : 524—562, 1954.

- 31) Walker, R. J., Ramage, A. G. and Woodruff, G. N.: The presence of octopamine in the brain of *Helix aspersa* and its action on specific snail neurones. *Experientia*, **28** : 1173—1174, 1972.
- 32) Saavedra, J. M., Brownstein, M. J., Carpenter, D. O. and Axelrod, J.: Octopamine: Presence in single neurons of *Aplysia* suggests neurotransmitter function. *Science*, **185** : 364—365, 1974.
- 33) Juorio, A. V. and Molinoff, P. B.: The normal occurrence of octopamine in neural tissues of the octopus and other cephalopods. *J. Neurochem.*, **22** : 271—280, 1974.
- 34) 竹内宏: 神経細胞の化学受容—軟体動物巨大神経細胞による—. *臨床生理*, **4** : 516—532, 1974.
- 35) Fischer, J. E., Horst, W. D. and Kopin, I. J.: β -hydroxylated sympathomimetic amines as false neurotransmitters. *Brit. J. Pharmacol.*, **24** : 477—484, 1965.
- 36) Musacchio, J. M., Kopin, I. J. and Weise, V. K.: Subcellular distribution of some sympathomimetic amines and their β -hydroxylated derivatives in the rat heart. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, **148** : 22—28, 1965.
- 37) Chen, G., Ensor, C. R. and Bohner, B.: A facilitation action of reserpine on the central nervous system. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **86** : 507—510, 1954.
- 38) De Schaeppdryver, A. F., Piette, Y. and Delaunois, A. L.: Brain amines and electroshock threshold. *Arch. int. Pharmacodyn.*, **140** : 358—367, 1962.
- 39) Boggan, W. O. and Seiden, L. S.: Dopa reversal of reserpine enhancement of audiogenic seizure susceptibility in mice. *Physiol. Behav.*, **6** : 215—217, 1971.
- 40) Pfeifer, A. K. and Galambos, E.: The effect of reserpine, α -methyl-m-tyrosine, prenylamine, and guanethidine on metrazol-convulsions and the brain monoamine level in mice. *Arch. int. Pharmacodyn.*, **165** : 201—211, 1967.
- 41) Jones, B. J. and Roberts, D. J.: The effect of intracerebroventricularly administered noradrenaline and other sympathomimetic amines upon leptazol convulsions in mice. *Brit. J. Pharmacol.*, **34** : 27—31, 1968.
- 42) Jobe, P. C., Picchioni, A. L. and Chin, L.: Role of brain norepinephrine in audiogenic seizure in the rat. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, **184** : 1—10, 1973.
- 43) Kobinger, W.: Beeinflussung der Cardiazolkrampfschwelle durch veränderten 5-Hydroxytryptamingehalt des Zentralnervensystems. *Arch. exp. Path. Pharmak.*, **233** : 559—566, 1958.
- 44) Lessin, A. W. and Parkes, M. W.: The effects of reserpine and other agents upon leptazol convulsions in mice. *Brit. J. Pharmacol.*, **14** : 108—111, 1959.
- 45) Azzaro, A. J., Wenger, G. R., Craig, C. R. and Stitzel, R. E.: Reserpine induced alterations in brain amines and their relationship to changes in the incidence of minimal electroshock seizures in mice. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, **180** : 558—568, 1972.
- 46) Wenger, G. R., Stitzel, R. E. and Craig, C. R.: The role of biogenic amines in the reserpine-induced alteration of minimal electroshock seizure thresholds in the mouse. *Neuropharmacology*, **12** : 693—703, 1973.
- 47) 佐藤光源, Wada, J. A.: 新しい実験てんかんモデルとしての“kindling” preparation: 展望. *脳神経*, **27** : 257—273, 1975.
- 48) Corcoran, M. E., Fibiger, H. C., McCaughran, J. A., Jr. and Wada, J. A.: Potentiation of amygdaloid kindling and metrazol-induced seizures by 6-hydroxydopamine in rats. *Exp. Neurol.*, **45** : 118—133, 1974.
- 49) 岡田文彦: けいれん過程におけるラット脳内モノアミンの部位的変動. *精神誌*, **75** : 397—408, 1973.
- 50) 佐藤光源, 中島豊爾, 大月三郎, 岸川秀実, 小林清史: 実験てんかん動物(kindling preparation)における脳内カテコラミンの変化. *医学のあゆみ*, **94** : 15—17, 1975.
- 51) Billiet, M., Bernard, P., Delaunois, A. and De Schaeppdryver, A.: Induced changes in cau-

- date nucleus dopamine and electroshock threshold. Arch. int. Pharmacodyn., **188**: 396—400, 1970.
- 52) McGeer, P. L., Grewaal, D. S. and McGeer, E. G.: Influence of noncholinergic drugs on rat striatal acetylcholine levels. Brain Res., **80**: 211—217, 1974.
- 53) Cools, A. R., Hendriks, G. and Korten, J.: The acetylcholine-dopamine balance in the basal ganglia of rhesus monkeys and its role in dynamic, dystonic, dyskinetic, and epileptoid motor activities. J. Neural Transmission, **36**: 91—105, 1975.

**Study on the changes of catecholamine contents in
penicillin-induced epileptogenic focus of the cat cerebral cortex**

Takehiro SHIRAKABE

Section of Neurochemistry Institute for Neurobiology,

Okayama University Medical School

(Director: Prof. Akitane Mori)

Recent investigations in a variety of experimental animal models suggest a close relationship between brain catecholamine and epileptic seizures. The aim of this study was to clarify the role of catecholamines in the epileptogenic focus. Thirty-eight adult cats were used for the experiments. After anesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital, cats were placed in stereotaxic apparatus and the bilateral parietal cortices were exposed. The electrocorticogram was recorded with two pairs of cotton-tipped electrodes applied on the pia. An epileptogenic focus was produced by intracortical injection of penicillin G in left middle suprasylvian gyrus. The sham-operation was done in the right cortex. At four different stages of development and propagation of penicillin spikes, bilateral cerebral cortices were excised and rapidly frozen in liquid nitrogen. Four stages of penicillin spikes were classified as follows:

Stage 0: Spikes do not yet appear after penicillin injection.

Stage 1: Spikes localize only in focal cortex.

Stage 2: Spikes slightly propagate to non-focal cortex.

Stage 3: Spikes fully propagate to non-focal cortex.

Catecholamine analysed by gas chromatography with electron capture detector.

In control cats, injected saline solution in bilateral cerebral cortices, the levels of dopamine and norepinephrine were 47 ± 7 ng/g and 26 ± 2 ng/g, respectively. Dopamine contents in focal cortex were significantly reduced in Stage 0 and increased conversely in Stage 3 compared with the control values. In non-focal cortex, dopamine contents significantly increased in Stages 1 to 3. Norepinephrine contents in both focal and non-focal cortex showed the same changes as dopamine. On the other hand, the contents of dopamine and norepinephrine showed the significantly lower levels in focal cortex compared with those in non-focal cortex in Stages 1 and 2. In Stage 3, however, there was no difference of catecholamine levels between focal and non-focal cortex. Octopamine, which is recently supposed as neurotransmitter substance in central nervous system, was detected in significantly high levels in focal cortex of Stage 1.

From the results of this experiment and our previous studies, it is suggested that catecholamine, especially dopamine, play an important role in development of penicillin-induced epileptic focus in the cerebral cortex. Based on the results of this study, a relationship between epilepsy and brain catecholamines was discussed.