

側頭葉てんかんに対するレベチラセタムの予防的治療効果の検討

The Prophylactic Effect of Levetiracetam on the Brain Edema in Epileptogenesis of Pilocarpine TLE Model

○稲嶺盛佳、大島航、渡邊正知、伊藤康一（徳島文理大学・香川薬学部・薬物治療学）



要旨

症候性局在関連てんかんの予防的治療のターゲットとして、てんかん原性を理解することは重要である。既存の抗てんかん薬では抗てんかん原性効果は乏しい。本研究では、広域治療マウスモデルを有する新規てんかん薬であるレベチラセタム(LEV)の抗てんかん原性効果を検討した。

本実験は、症候性局在関連てんかんモデルとしてピロカルピン誘発重積けいれん(PILO-SE)モデルマウスを用いた。PILO-SE3時間後には変化が認められなかったが、PILO-SE2日目の海馬、扁桃核(梨状皮質含む)で有意な増加が認められた。つまり、PILO-SE後の海馬、扁桃核領域で細胞障害性浮腫から血管原性浮腫に移行することが示唆された。その脳浮腫に対してLEV(500 mg/kg)連続投与群で、PILO-SE後の脳浮腫のMRI所見と脳内水分含量は、非投与群と同程度であったことから、LEVはてんかん原性初期に発症する脳浮腫に対して抑制効果を示していることが示唆された。次に、PILO-SE後の脳組織学的検討をニッスル染色法で行った。PILO-SE後2日目において、脳浮腫が確認された海馬、扁桃核(梨状皮質含む)で顕著な神経細胞脱落の所見が得られたが、LEV(500 mg/kg)投与群では顕著な神経細胞脱落は観察されなかった。

以上の結果は、LEVをPILO-SE直後(てんかん原性過程)から投与開始することがPILO-SE後の脳浮腫、神経細胞脱落を抑制し、結果としてSRS出現を抑制する可能性を示した。つまり、症候性局在関連てんかんの予防的治療にLEVが有用である可能性を示唆している。

Q ガドリニウム(Gd)増強MRIを用いたBBB透過性の評価

MRI造影効果を示す高陽性体のGdは、陽性造影剤でありT1WIで高信号となる。GdはBBBを透過出来ないため、通常Gdを静脈内投与しても脳血管から脳実質内へ移行しない。しかし、BBBが損傷すると脳実質内にGdが漏出し、損傷部位周辺でT1高信号を示す。本研究では、非イオン性MRI造影剤Gd-HP-DO3A(ガドリドール：プロハンスリ)を用いた。Gd-HP-DO3A投与(0.2 mmol/kg)は、尾静脈より急速静注し、Gd増強効果が最も強く認められる投与10~30分後にT1WI撮像した。

Q 脳水分含量測定法

MRI撮像後、脳を海馬、扁桃核(梨状皮質含む)、大脳皮質に分画しそれぞれ秤量瓶に入れ、各湿重量を測定(W1)した。それを100°Cで2時間乾燥させ、再び乾燥重量を測定(W2)した。脳水分含量率は、下記の式に従って算出した。

$$\text{Brain water content (\%)} = ((W1-W2)/W1) \times 100$$

Q ニッスル染色法による組織学的検討法

MRI撮像後、4%パラホルムアルデヒド(PFA)液で遠流固定した脳を摘出し、さらに4%PFA液で一晩浸漬した。その後凍結保護のため、10%Sucrose溶液に1日間、さらに30%Sucrose溶液に1日間浸漬置換後、マウス用アクリル製プレインスライス(室柯機)を用い、マウス脳図譜(Paxinos and Franklin, (2001) The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Academic Press)に従い4切片した(図3)。本研究では分割脳を、O.T.C. Compound (サフラインテックジャパン)を用いて液体窒素で凍結処理し、切片作成まで-80°Cで保存した。切片作成は、クリオスタット(Leica, CM3050 S)を用い、厚さ10 μmの凍結切片を作成し、Cryesyl violetを用いたニッスル染色を行った。神経細胞の脱落の有無を検討するため、海馬の3領域(CA1, CA3, DG)と扁桃核(AG)、梨状皮質(PC)のニッスル染色陽性細胞数を計測した(各領域4切片からCA1, CA3, DG, AGは5 mm²区域、PCは20 mm²区域)。



図3. 脳断面部位

Q LEVは海馬および扁桃核/梨状皮質の脳水分含量を低下させた

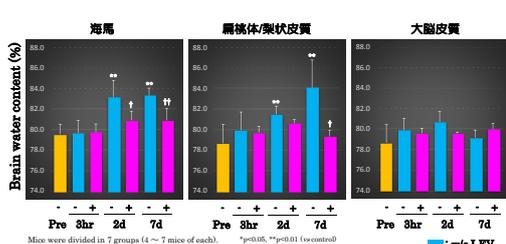


図8. 海馬(左)、扁桃核/梨状皮質(中央)、大脳皮質(右)の脳水分含量率に対するLEVの効果

Q LEVがSE後のBBB透過性亢進を抑制した

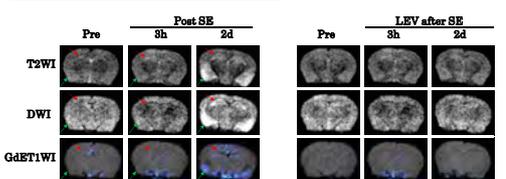


図9. LEV投与のGd増強MRI所見

PILO-SE2日後に、海馬、扁桃核/梨状皮質領域でGdによるT1高信号が認められたことから、BBB透過性亢進と血管原性浮腫の関与が示唆された。また、LEVはこの過程に作用している可能性がある。

Q PILO-SE後の神経細胞脱落はLEV投与により抑制された

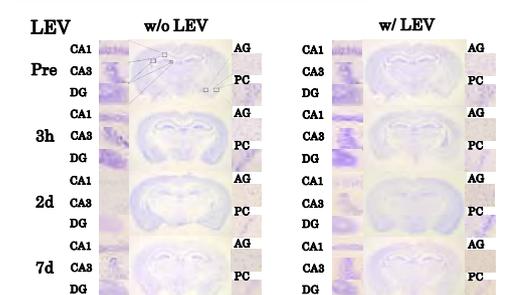


図10. 脳前断面のニッスル染色法の弱拡大(大)および強拡大画像(小)

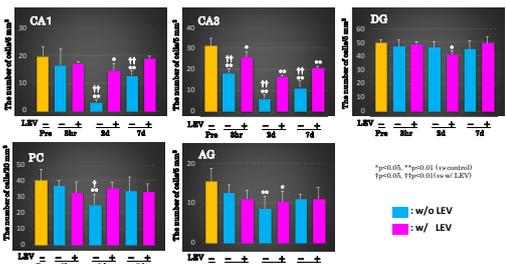
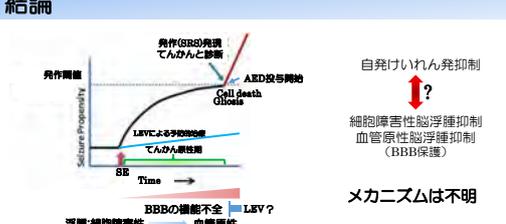


図11. PILO-SEモデルマウスのCA1, CA3, DG, PC, AG細胞数に対するLEVの影響

結論



- 1. LEV投与におけるSRS発症抑制効果の検討
PILO-SE後にLEV(500 mg/kg)を1日2回連続投与により、SRS及び、PILO-SE後の死亡率の抑制効果が認められた。
2. 脳内変化の検討
2-1. 脳浮腫
LEVは、PILO-SE後に発症する脳浮腫を抑制した。
2-2. BBBの透過性
LEVは、PILO-SE後に確認されたBBB透過性亢進を抑制した。
2-3. 細胞死
LEVは、PILO-SE後に海馬、扁桃核/梨状皮質で観察された細胞死を抑制した。
てんかん原性初期からのLEV適用は、症候性てんかん(側頭葉てんかん)の予防的薬物治療の可能性を示唆された。

Locher, W. et al., Antiepileptogenic Effects of the Novel Anticonvulsant Levetiracetam (uch 10109) in the Kindling Model of Temporal Lobe Epilepsy. J. Pharmacol. Exp. Ther., 284:474-479, 1998
Stratton, S.C. et al., Effects of Amgenoxone and Levetiracetam on seizure development in a rat amygdala kindling model. Epilepsy Res., 53:95-101, 2003
Kligman, H. and Pitkanen, A., Antiepileptogenesis, neuroprotection, and disease modification in the treatment of epilepsy: focus on levetiracetam. Epilepsy Res., 53:95-101, 2003
Blanchard, D. et al., Prophylactic treatment with levetiracetam after status epilepticus: Lack of effect on epileptogenesis, neuronal damage, and behavioral alterations in rats. Neuropharmacology, 33:207-217, 1997

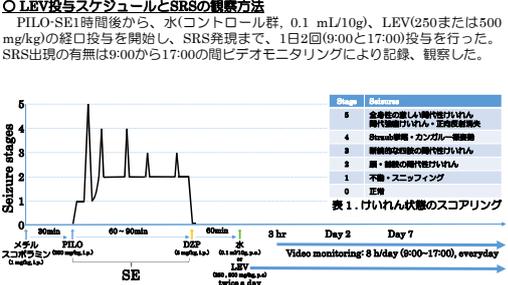
背景と目的

脳卒中、脳外傷、重積けいれんなどの基礎疾患を有し、その後発症するてんかんは症候性局在関連てんかんの約40%を占めている。しかし、脳基礎疾患発症後、どのようなメカニズムでてんかんが発症するかについては未だ明確な結論を得ていない。通常、脳疾患発症後にてんかん発症までには、けいれん発作などの病状が認められない。通常、これをてんかん発症と呼ぶ。を経て突然てんかん発作が出現する。現在発症したてんかんを診断され、初めててんかん薬(AED)を用いた治療を開始される。しかし、症候性局在関連てんかんの根本的治療を考えると、脳疾患発症後にてんかん原性に対して予防的治療を行うことができれば、てんかん発症を事前に防ぐことが可能となる。つまり、従来の抗発作薬(けいれん発作を抑えるAED)ではなく、本当の根本的AED(抗てんかん原性薬)の開発に繋がる(図1)。本研究は、他のAEDとは異なる作用機序を持つ、広域治療マウスモデルを有する新規AEDの一つであるレベチラセタム(LEV)の抗てんかん原性効果を検討した。LEVと抗てんかん原性効果に関する報告では(Lascher et al., 1998; Stratton et al., 2003; Kligman & Pitkanen, 2003), LEVがkindling獲得を抑制効果したことから、LEVの抗てんかん原性効果を示唆された。しかし、Brandtら(2007)は、LEVが扁桃核の持続電気刺激による重複モデル動物のSRS出現を抑制しないことを報告し、LEVの抗てんかん原性効果に対して相反する結果が報告されている。そこで、本研究では、LEVのてんかんの予防的治療効果を検討するため、症候性てんかんの一つである側頭葉てんかん(TLE)モデルとして広く使用されているPILO-SEマウスを用いて検討した。

方法

Q PILO-SEマウスの作成法
ICR10週齢雄性マウスに、PILOの末梢性ムスカリン効果を低減させるため、PILO投与30分前にメチルスココラミンを腹腔内投与(1 mg/kg, ip)した。けいれん発作誘発のためのPILO(90 mg/kg, ip)を投与し、その90分間けいれん発作の観察を行った(図2)。表1のけいれん状態の分類に従い、全身けいれん発作(Stage 3以上)が5回起きたマウスにゾセラム(DZP)(5 mg/kg, ip)を投与し、PILO-SE発症させ、てんかん原性のモデルマウスとした。

Q LEV投与スケジュールとSRSの観察方法
PILO-SE1時間後から、水コントロール群、0.1 mL/10g、LEV(250または500 mg/kg)の終日投与を開始し、SRS発現まで、1日2回(9:00-17:00)投与を行った。SRS出現の有無は9:00から17:00の間ビデオモニタリングにより記録、観察した。



Q MRI撮像条件

MRI装置は、永久磁石小動物用1.5 Tesla MRI(Mrmini-S, DS Pharma Biomedical Co., Ltd, Osaka, Japan)と直径30 mmのRF coilを使用し、重積けいれん発作終了後3時間、2日、7日後にマウス脳MRI撮像を行った。MRI撮像は、1.5~2.0%イソフルラン(160~180 mL/min, Escain*, MERCK, USA)麻酔下で行った。マウスの体温は、37.5±0.2°Cとなるように直温温熱電対で測定し、循環温温水フィードバック制御装置(Yamashita Tech System, Tokushima, Japan)を用いて維持した。MRI撮像は、2次元フラッシュスピンエコー法で行った。その撮像条件は、FOV (field of view) = 20x40 mm²、マトリックス (matrix) = 128x256、voxel size = 0.234 x 0.234 x 1.0 mm²でT1強調撮像(T1WI)、T2強調撮像(T2WI)、拡散強調撮像(DWI)を、スライス厚1 mmの連続前頭断面画像(11枚)とした。

Table with 4 columns: 信号強度, 組織, 組織, 組織. Rows: T1WI, T2WI, DWI. Includes acquisition parameters like TR, TE, etc.

Q MRI所見による脳浮腫の評価

脳浮腫の詳細は、表3に従って行った。

Table with 4 columns: 細胞障害性浮腫, 血管原性浮腫, T2WI, T2値, DWI, ADC値. Rows: 細胞障害性浮腫, 血管原性浮腫. Includes T2WI: 2領域平均値 (mm²) and ADC: 後方平均値 (mm²) (x10^-6mm²/s)

結果

Q LEVはSRS発症率とPILO-SE後の死亡率を低減させる

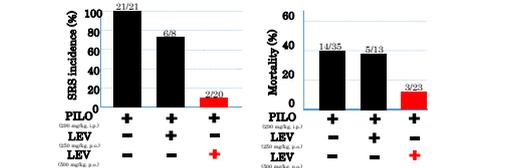


図4. SRS発症率(左)、PILO-SE後の死亡率(右)に対するLEVの影響

Q PILO-SE後に海馬、扁桃核/梨状皮質でT2WIとDWIの信号強度が上昇した

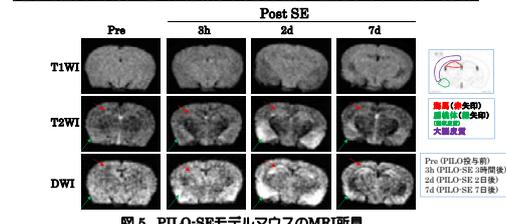


図5. PILO-SEモデルマウスのMRI所見

Q LEV投与により海馬、扁桃核/梨状皮質でT2WIとDWIの信号強度が低下した

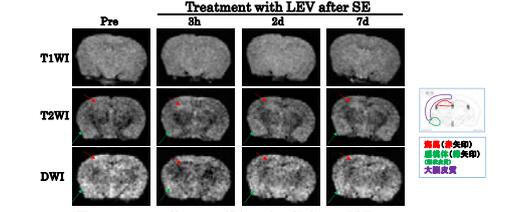


図6. PILO-SE後のLEV投与でマウス脳内MRI所見

Q LEV投与によりT2WI, T2値, DWI, ADC値が正常マウスと同等であった

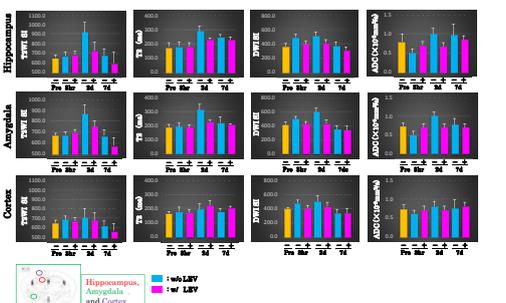


図7. LEVのT2WI, T2値, DWI, ADC値に対する影響

表4. MRIを用いた脳浮腫の評価

Table with 6 columns: After PILO-SE, LEV, T2WI, T2値, DWI, ADC値, Pathophysiology. Rows: 3 hours, 2 days. Shows signal intensity and ADC changes for cytotoxic and vasogenic edema.

PILO投与前のマウス(Pre)と比べ、PILO-SE3時間後のマウス(w/o)では、DWIで高信号、ADC値が低値を示し、PILO-SE2日後(w/o)ではT2WI, DWI, T2値, ADC値の全パラメーターで高信号および高値を示した。この結果は、3時間後の海馬、扁桃核(梨状皮質)において細胞障害性浮腫、2日後には血管原性浮腫が発症していることを示した。LEV投与(w/)マウスにおいては、正常マウスと同等な信号強度および値を示したことから、LEVの脳浮腫抑制効果が認められた。