

学術交流・研究推進プロジェクト 成果報告書

研究代表者 所属 薬品作用解析学研究室
職・氏名 教授・大野 行弘

研究テーマ：

広域周波数脳波（Wide-band EEG）記録法によるてんかん脳波解析とグリア機序の探索

研究期間：

2019 年 4 月 1 日 ～ 2021 年 3 月 31 日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 大野 行弘（大阪薬科大学・薬学部・教授）
研究分担者 國澤 直史（大阪薬科大学・薬学部・助教）
研究分担者 清水 佐紀（大阪薬科大学・薬学部・助教）

<共同研究機関>

研究代表者 池田 昭夫（京都大学大学院医学研究科・てんかん/運動異常生理学講座・教授）
研究分担者 佐藤 和明（武田病院・脳神経内科）
研究分担者 金星 匡人（京都医療センター・脳神経内科）

研究目的：

ニューロン・グリア間の相互作用に基づく 3 者間シナプスの概念が定着し、神経疾患の発症過程と病態におけるグリア細胞の機能が世界的に注目されている。本研究では、アストロサイトの空間的 K⁺緩衝機構とこれを仲介する内向き整流性 Kir4.1 チャネルに着目し、広域周波数脳波（Wide-band EEG）記録法を用いたてんかん発作脳波の成分解析を行うとともに、発作性異常脳波の発生過程におけるアストロサイトの役割を探索する。

研究内容および研究成果：

本研究では、ピロカルピン投与による急性重積発作時（急性モデル）および遅発性自発発作時（慢性モデル）の広域周波数脳波（Wide-band EEG）解析を行った。特に、グリア活動や細胞外 K⁺濃度の上昇の指標とされる DC shift、神経細胞の異常な同期発火を反映していると考えられている高周波数成分（High frequency oscillations: HFOs）の発現特性について評価、比較した。

ピロカルピンはムスカリン性アセチルコリン受容体を刺激することにより、30 分以内に大脳辺縁系由来の急性重積発作を誘発し、その 7-8 週間後には遅発性自発発作を生じるようになる。また、ピロカルピン投与後 8-12 週のラット側頭葉てんかんモデルの海馬では、Kir4.1 チャネルを介する空間的 K⁺緩衝機構が障害されていることが報告されている。

① 急性モデル

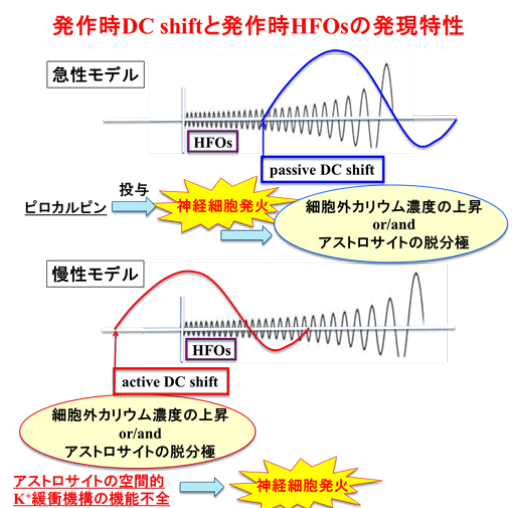
実験には、SD 系雄性ラットを使用した。各動物の脳皮質および海馬に白金記録電極を慢性的に留置し、約 1 週間の回復期間を設けた。実験当日、まず末梢性ムスカリン受容体拮抗薬であるメチルスコポラミン (3 mg/kg, i.p.) を前投与し、30 分後にピロカルピン (400 mg/kg, i.p.) を投与することでけいれん発作を誘発、wide-band EEG 記録を行った。その結果、7 匹のラットで計 20 回以上の急性発作が出現し、全ての発作で DC shift を認めた。また、これら急性モデルにおける DC shift は、一貫して通常 EEG の発作波や HFOs に続いて発現していた (Passive DC shift)。

② 慢性モデル

実験には、SD 系雄性ラットを使用した。動物にメチルスコポラミン (3 mg/kg, i.p.) を前投与し、30 分後にピロカルピン (450 mg/kg, i.p.) を投与することで重積発作を誘発させた。12 週間後、各動物の脳皮質および海馬に白金記録電極を慢性的に留置し、約 1 週間の回復期間の後、自発発作時の wide-band EEG 記録を行った。慢性モデルでは、4 匹のラットで、計 84 回の自発発作が出現し、DC shift を伴っている発作、DC shift を伴わない発作の 2 種類を認めた。また、自発発作時脳波では、上記急性モデルの脳波所見に加えて、DC shift が先行して出現し、これに続いて発作性けいれん脳波、HFOs が誘発されるパターン (Active DC shift) が散見された。

近年のデジタル脳波技術の改良により、wide-band EEG 記録が可能となり、従来の脳波記録の測定域 (0.5~60 Hz) に加えて、より低周波数成分から高周波数成分の新たな情報が得られるようになった。特に、低周波成分である DC shift は、アストロサイトの空間的 K⁺緩衝機能の破綻を反映していることが知られており、また、高周波成分の HFOs は臨床においててんかん原性領域の代理マーカーとして注目されている。一方で、実験動物を用いた wide-band EEG 記録は稀であり、DC shift や HFOs の詳細な発現メカニズムの解明には至っていない。したがって、本研究において、てんかんモデル動物における wide-band EEG 記録法を確立することが出来たことは、てんかんの新たな病態メカニズムの解明や新規治療法の創出において大いに役立つと期待される。

本研究では、ピロカルピンによる急性重積発作と慢性側頭葉てんかんモデルの自発発作の発現メカニズムが異なることを明らかにした。急性モデルで認められた passive DC shift は、ピロカルピンによる神経発火に伴う細胞外 K⁺濃度の上昇を反映していると推察される。一方、慢性モデルにおける active DC shift は、大脳辺縁系でのアストロサイトの空間的 K⁺緩衝機構の機能不全を反映していると考えられ、それらが発作性脳波の惹起 (てんかん原性) に関与していることが示唆された。



成果発表:

<原著論文>

<学会発表>

・ Kazuaki Sato, Masato Kinboshi, Higor A. Iha, Saki Shimizu, Masao Matsushashi, Yukihiro

- Ohno, Akio Ikeda: Wide-band EEG analysis of epileptic seizures in pilocarpine-induced chronic epilepsy model in rats., 第 53 回日本てんかん学会学術集会, 2019/10/31-11/2 (神戸)
- ・ 佐藤和明、金星匡人、伊波イゴール、清水佐紀、松橋眞生、大野行弘、池田昭夫：ピロカルピン側頭葉てんかんモデル、ピロカルピン誘発性重積モデルにおける発作時 active、passive DC shift の解析., 第 53 回日本てんかん学会学術集会 シンポジウム, 2019/10/31-11/2 (神戸)
 - ・ 金星匡人、池田昭夫、大野行弘：てんかん病態におけるアストロサイトの役割：最近の薬理学的知見から., 第 53 回日本てんかん学会学術集会 シンポジウム, 2019/10/31-11/2 (神戸)
 - ・ 大野行弘：抗てんかん薬の薬理作用－第 1 世代薬から次世代薬の探索に向けて－., 第 53 回日本てんかん学会学術集会 シンポジウム, 2019/10/31-11/2 (神戸)
 - ・ 國澤直史、久積博明、加藤将貴、清水佐紀、佐藤和明、金星匡人、松橋眞生、池田昭夫、芹川忠夫、大野行弘：Phf24 欠損ラットのけいれん感受性亢進に関する薬理および脳波研究、第 16 回日本てんかん学会近畿地方会 2021/1/17 (オンライン)

<その他>

- ・ M. E. Frizzo, Y. Ohno: Perisynaptic astrocytes as a potential target for novel antidepressant drugs, J. Pharmacol. Sci., 145, 60-68 (2021)
- ・ M. Kinboshi, A. Ikeda, Y. Ohno: Role of astrocytic inwardly rectifying potassium (Kir) 4.1 channels in epileptogenesis., Front. Neurol., 11, 626658 (2020)
- ・ 大野行弘、國澤直史、清水佐紀：てんかんモデルを用いたてんかん原性研究., Medical Science Digest, 46, 79-83 (2020)
- ・ 大野行弘：「てんかんの薬物治療と新たな創薬展開」薬事日報 第 12359 号, 4-5 面, 2020 年 9 月 23 日