

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

神経精神薬理 (1995.03) 17巻3号:177~183.

Zonisamide(ZNS)の抗てんかん作用についての基礎的研究

田中達也、高野勝信、橋詰清隆、牧原真治、吉田克成、國本雅之、米増祐吉

Zonisamideの抗てんかん作用についての基礎的研究*

田中達也**, 高野勝信**, 橋詰清隆**, 牧原真治**,
吉田克成**, 国本雅之**, 米増祐吉**

抄録 Zonisamide(ZNS)の抗てんかん作用の機序を明らかにする目的で、脳波に及ぼす影響と局所脳循環および局所脳糖代謝について、カイニン酸誘発てんかんモデルを用いて基礎的な検討をおこなった。実験Iでは、ネコの急性実験で、脳波によるZNSの抗てんかん作用を検討するとともに、海馬の血流変化を熱勾配式組織血流計および電解式水素クリアランス法にて測定し、抗てんかん薬の基礎的な薬理作用について検討した。カイニン酸の扁桃核内注入により辺縁系発作重積を誘発し、ZNSを投与しその効果を検討した。ZNSの脳波上での抗てんかん作用は、辺縁系発作の皮質への伝播を抑制することを明らかにした。また、投与直後より背側海馬の局所脳血流量を2時間以上にわたって増加させた。実験IIでは、ラットの辺縁系発作に及ぼすZNSの影響について発作時脳波および行動の検討をおこない、辺縁系発作の抑制が認められたことよりZNSの発作抑制の有効性を確認した。実験IIIでは、てんかんラットを用いてZNS投与後の局所脳糖代謝の変化を¹⁴C-deoxyglucoseを用いたオートラジオグラフィにて検討した。対照群では、カイニン酸の扁桃核内注入により扁桃核を焦点とする辺縁系発作が誘発され、オートラジオグラムでも発作波は辺縁系のみならず大脳皮質まで伝播していた。ZNS投与により、発作の範囲は縮小し、発作は焦点部の扁桃核に限局して認められ、同側海馬に軽度伝播しているのが認められた。以上の結果より、ZNSは、てんかん焦点から周囲組織および大脳皮質への伝播を抑制する事を、明らかにした。

神経精神薬理, 17: 177-183, 1995.

key words: zonisamide, kainic acid, limbic seizure status, autoradiography, hippocampal damage

はじめに

Zonisamide(ZNS)は、わが国で開発された新しい抗てんかん薬で、薬理作用に関する基礎的研究によると、化学構造はindoleに類似しており、carbonic anhydraseにわずかに拮抗する作用のあることが報告されている⁴⁾。kindlingを用いた

研究^{5,7)}や、カイニン酸誘発てんかんモデル¹¹⁾の研究では、バルプロ酸の場合²⁾と同様に、二次性全般化発作を抑制することが報告されている。臨床においては焦点発作に有効⁴⁾と考えられているが、その作用機序についてはよく解明されていない。本研究では、カイニン酸誘発てんかんモデル^{9,10,12)}を用いて、ZNSの基礎的な抗てんかん作用について、臨床、脳波、糖代謝および病理学的検討を行った。

I. 実験 I

12匹の成猫を用いた。Nembutal麻酔下に(35 mg/kg, i. p.), 気管切開を行い、大腿動脈および

1995年1月10日受理

*Zonisamide: Basic mechanism of anti-convulsant action.

**旭川医科大学脳神経外科

[〒078 旭川市西神楽4-5-3-11]

Tatsuya Tanaka, Katsunobu Takano, Kiyotaka Hashizume, Shinji Makihara, Katsunari Yoshida, Masayuki Kunimoto and Yukichi Yoneyasu: Department of Neurosurgery, Asahikawa Medical College. 4-5-3-11, Nishikagura, Asahikawa, 078 Japan.

大腿静脈にカニューレーションを行った。次いで、pancronium bromide (0.25 mg/kg/h) にて無動化し、人工呼吸下においた。動脈圧、心電図、呼吸パターンは脳波とともに、ポリグラフ上に連続記録した。双極電極を定位的に背側海馬および扁桃核の外側核に刺入し、感覚運動領野の硬膜外にビス電極を置いた。熱勾配式組織血流計 (Biomedical Science 社製) の電極を深部測定用に改良したものを定位的に背側海馬に刺入した。同様に、電解式水素クリアランス組織血流計 (Biomedical Science 社製) 用の双極電極 (Pt/Pt-Ir 双極電極, Pt: 水素ガス発生用電極, Pt-Ir: rCBF 測定用電極) も背側海馬に刺入し固定した。この実験は急性実験のため、猫に疼痛が加わらないように細心の注意を行った。定位的に21G のステンレスカニューラを扁桃核内に刺入し、デンタルセメントにて固定した。はじめに、電解式水素クリアランス法を用いて、背側海馬の局所脳血流量 (rCBF) の絶対値を測定した。次に、熱勾配式組織血流計のキャリブレーションを行ってから、背側海馬の連続的な rCBF を測定しポリグラフ上に記録した。rCBF の測定法についてはすでに詳細に報告^{5,10)} しているのでここでは省略する。扁桃核に phosphate buffer solution (PBS) に溶解したカイン酸 (KA) をカニューラの内筒を介して 2 μ g 注入してから30-60分後になると、注入部の扁桃核

に連続した棘波が誘発され、20秒前後の扁桃核発作を繰り返すようになる。この発作は同側の辺縁系および側頭葉、特に同側の海馬にただちに伝播し、約5分間隔で繰り返す辺縁系発作重積となった。辺縁系発作重積が出現するようになって1時間以上経過してから、9匹のネコには ZNS の静脈内投与を行った。ZNS は、3匹ずつ10,50または100 mg/kg を蒸留水で希釈して、総量が2 ml になるようにした。残りの3匹のコントロールには、生理食塩水 PHS を 2 ml 静注した。

病理組織学的検査

実験は KA 注入後約14時間連続して行われた。実験終了時、塩化カリウム静注による心停止確認後、電解式水素クリアランス法のための拡散係数¹⁰⁾ を算出してから、ただちに PHS および10%ホルマリン溶液にて灌流固定した。パラフィン切片を作製してから H. E. または cresyl violet で染色し鏡検した。

結 果

1. ZNS の辺縁系発作重積時脳波に及ぼす影響

ZNS (10および50 mg/kg) には、脳波上発作発射の抑制効果は認められなかった。ZNS (100 mg/kg) の静脈内に投与では、扁桃核発作の皮質への伝播が抑制されたため、皮質誘導の脳波では発作

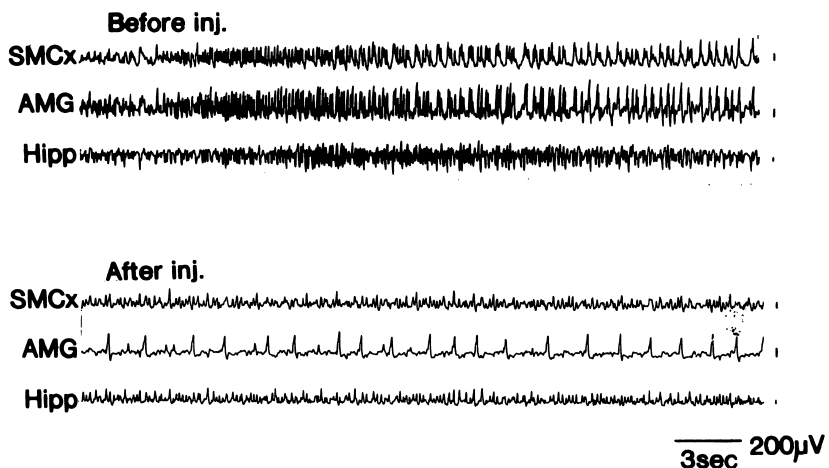


図1 辺縁系発作重積時に、ZNS (100 mg/kg, i. v.) 投与前後の脳波。ZNS 投与により、扁桃核に周期性の棘波が残存しているが、海馬および感覚運動領の発作波はほとんど消失している。

波が消失し、海馬に伝播した発作波も著明な発作波の減少とスパイク波の振幅の減少が認められた(図1)。コントロールのPHS投与群では、発作の抑制はまったく認められなかった。

2. ZNSの海馬rCBFに及ぼす影響

辺縁系発作誘発前の背側海馬の平均のrCBFは21.7 cc/100g/min(18.3-24.9 cc/100g/min)であり、これまでの報告とほぼ同じ値を示した。しかし、辺縁系発作重積状態ではrCBFは常に平均30.4 cc/100g/min(25.1-34.8 cc/100g/min)と持続的な上昇を示していた。

静脈内投与量は、10, 50および100 mg/kgで、rCBFの比較を行った。10および50 mg/kgでは、

発作は抑制されず、rCBFの変化も認められなかった。100 mg/kgのZNSを静脈内投与するとただちに辺縁系発作は抑制され、rCBFが29-36 cc/100g/min(8-20.1%:平均10.7%)と増加し、しかもこの増加はplateau状態で2時間以上持続した(図2)。PHS投与群では、rCBFおよび動脈圧の変化はなく、発作の抑制も認められなかった。抗てんかん薬投与前後で、海馬の局所脳血流量をt-検定を用いた統計学的検討で比較してみると、100 mg/kgの投与量の場合は5%の危険率をもって、背側海馬のrCBFの増加は有意であった。

3. 病理組織学的検査

すべての深部電極およびカニューラは目的の位

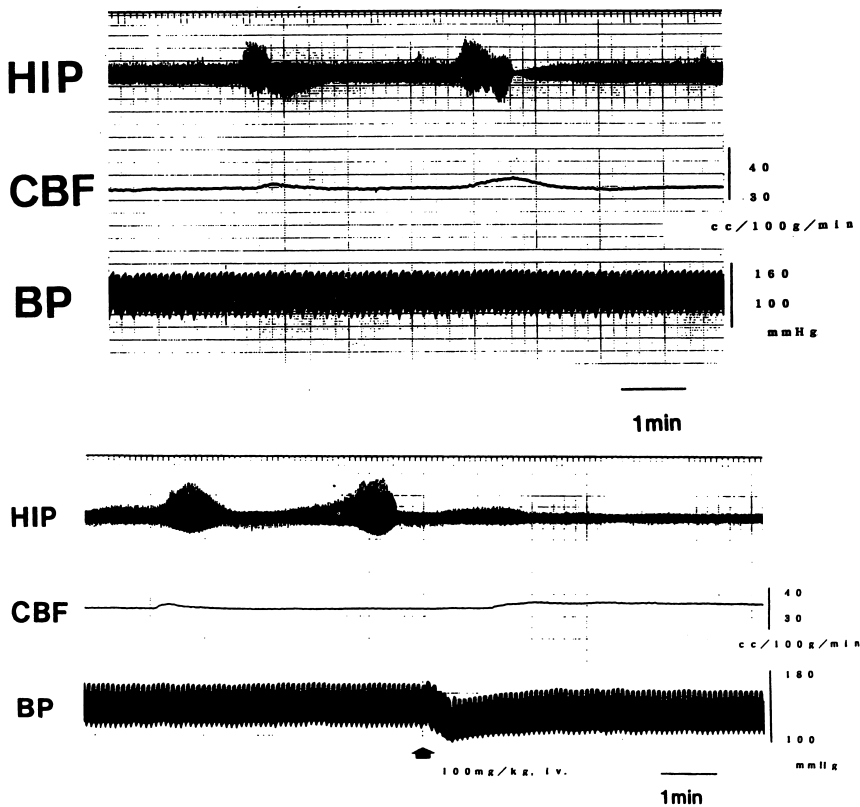


図2 熱勾配式組織血流計による、ZNS投与前後での背側海馬の持続的な血流測定と脳波の変化

上段はZNS投与前のポリグラフで、発作時にはrCBFが軽度増加し、発作終了とともに、baselineに復帰する傾向が認められる。ZNS(100 mg/kg, i. v.)により、投与後の発作が抑制されるとともに、rCBFは緩やかに上昇し、plateau状態となる。

置にあることを確認した。同側の背側海馬および腹側海馬のCA 3には散在性にpyramidal cellのpyknosisを認めた。

II. 実験 II

実験には、Wistar系のラット12匹を用いた。Pentobarbital麻酔下(40 mg/kg)に定位脳手術を行い、扁桃核にKA注入用のカニューラを、扁桃核および背側海馬には双極電極を、また両側の感覚運動領部の頭蓋骨の中にビス電極を固定し、硬膜外電極とした。電極は7チャンネルのソケットに接着した。手術後8日以上経過してからハロセン軽麻酔下に、大腿動脈と大腿静脈にカニューレーションしたのちに、腰部以下をギプスによって固定して、麻酔より覚醒させた。完全に覚醒したことを、脳波で確認したのちに、PBSに溶解したKA(0.8 μ g/0.4 μ l)を、扁桃核に刺入したカニューラの内筒を介してマイクロインジェクターにて注入し、注入後約30分で辺縁系発作重積を誘発した。KA注入後80分経過した、辺縁系発作重積中に、ZNSを大腿静脈に注入し、行動上の変化および脳波の変化を検討した。ZNSは生理食塩水に溶解し、50 mg/mlの溶液を作成した。ラットは3群に分けた(A群:50 mg/kg, i.v., B群:100 mg/kg, i.v., C群:生理食塩水, 2 ml)。KA溶液は、生理食塩水を加えて、総量が2 mlになるように、調節した。行動および脳波の観察は、6時間継続して行った。実験終了時、深いpentobarbital麻酔下に、10%ホルマリン溶液で経心的に灌流し、脳は固定後パラフィン包埋し、病理組織学的検査を行った。

結 果

すべてのラットに、辺縁系発作重積が誘発された。腰部以下を、ギプスで固定された状態での観察ではあったが、発作時の行動上の特徴はこれまでに報告^{9,11)}されているように、探索様の行動、流涎、咀嚼運動、顔面揺溺が脳波上の辺縁系発作の時に認められた。ZNS(50 mg/kg)の静脈内投与では、行動および脳波上の辺縁系発作の抑制は認

められなかった。ZNS(100 mg/kg)では、ネコの場合と同様に、感覚運動領野および背側海馬の発作が消失した。しかし、てんかん焦点部の扁桃核には、発作が残存し、発作中の行動としては、流涎、咀嚼運動、顔面揺溺等の扁桃核発作が認められた。しかし、発作は明らかに軽減しZNSの抗てんかん作用による発作の退行が認められた。病理学的検査では、カニューラおよび電極は、目的の場所にあることを確認した。

III. 実験 III

実験には、Wistar系のラット10匹を用いた。Pentobarbital麻酔下に定位脳手術を行い、一側扁桃核に内筒付きのカニューラを刺入し、デンタルセメントで固定した。術後8日目にハロセン麻酔下に大腿動脈と大腿静脈にカニューレーションを行った。腰部以下を、ギプスで固定してから、完全に覚醒させた。実験IIと同様に、KA(0.8 μ g)を扁桃核内に注入し、辺縁系発作重積を誘発させた。KA注入後80分目の、辺縁系発作重積中に、実験IIで効果の認められたZNS(100 mg/kg)を発作中の5匹のラットに、または生理食塩水2 mlを残りの5匹に静脈内投与した。さらに5分後に、¹⁴C-deoxyglucose(100 μ g/kg)の静脈内投与を行い、KA注入後130分目に断頭しオートラジオグラムを作成した。動脈血の採血は、¹⁴C-deoxyglucose投与後、30秒、1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30および45分後に行って、血中のアイソトープの測定を行った。

結 果

コントロール群のオートラジオグラムは、すでに報告しているように⁹⁾、注入側の扁桃核および辺縁系を中心に、同側の側頭部の大脳皮質および視床、大脳基底核に糖利用率の著明な増加が認められた(図3左)。辺縁系発作重積時にZNSを投与した群では、糖利用率の増加は、注入部の扁桃核にのみ認められ、同側海馬のCA 3には軽度の糖利用率の上昇が認められるものの、発作範囲の明らかな縮小が認められた(図3右)。さらに、

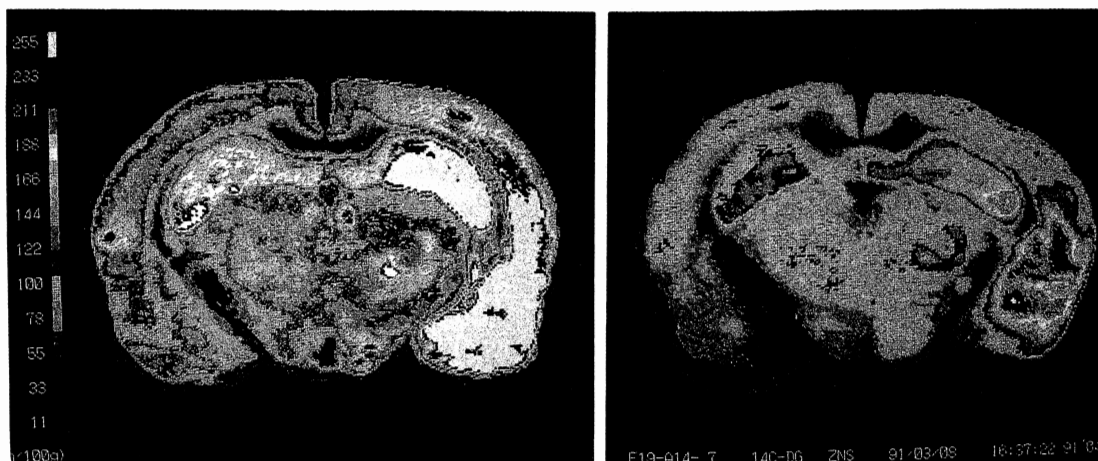


図3 左図;コントロールラットの、辺縁系発作重積時の局所脳糖代謝のオートラジオグラム。扁桃核に生じた発作が、背側海馬と大脳皮質に伝播している。右図;辺縁系発作重積ラットにZNS(100 mg/kg, i. v.)を投与した後の局所脳糖代謝のオートラジオグラム。大脳皮質の糖代謝は抑制され、残存している発作は、焦点の扁桃核および海馬CA3に局限している。

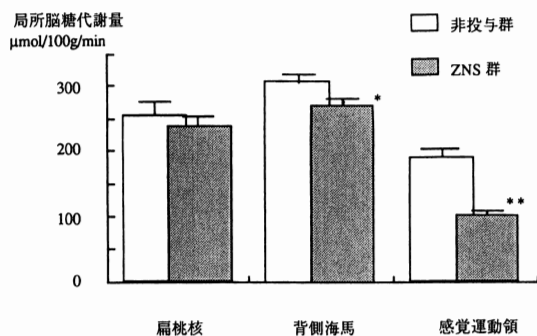


図4 コントロール群と、ZNS(100 mg/kg, i. p.)投与群の、てんかん焦点の扁桃核、背側海馬、感覚運動領での糖利用率の実測値での比較

Sokoloff⁸⁾の方程式を用いて、糖利用率の実測値を求めると、ZNS投与群では、糖代謝の低下が海馬を中心とした辺縁系で認められ、ZNSの発作抑制効果が認められた。特に、大脳皮質での糖代謝が最も抑制されたことより、辺縁系から大脳皮質への発作伝播が抑制されたと考えられる(図4)。

IV. 考 察

本研究では、ラットおよびネコの辺縁系発作重積モデルを用いて、ZNSの抗てんかん作用を検討した。

実験Iでは、pentobarbital軽麻酔下で猫の扁桃核にカイニン酸を微量注入した。この条件下でも、辺縁系発作重積が誘発されることはすでに報告しているが、この実験の利点は、扁桃核焦点からのてんかん性興奮により海馬に発作が誘発されることである。海馬にはカイニン酸による、直接の破壊が認められず、Ben-Ari¹⁾も指摘しているように、中隔野や視床下部を介する経路よりも扁桃核から過剰な発作の入力が貫通路を介して海馬のCA3に伝達されて海馬を巻き込んだ辺縁系発作重積に発展する。このため、辺縁系発作時の海馬の血流変化を長時間にわたって観察するモデルとしては最適である。さらに、熱勾配式組織血流計による、連続的なrCBFの測定により、ZNS投与後の急性期の薬理作用を検討することが可能となった。本研究によって得られた結果を分析すると、ZNS(100 mg/kg)の静脈内投与は、脳波上では皮

質に伝播した発作は消失し、海馬の発作波もほとんど消失したが、焦点部の扁桃核発作は抑制されたわけではない。この結果より、ZNSには、脳波上は発作の伝播を抑制する作用を有することを明らかにした。さらに連続的なrCBFの測定により、海馬のrCBFはZNSの静脈内投与直後より軽度の上昇を示し、この増加はplateau状態で2時間以上持続することを明らかにした。Hayakawaら³⁾は、幼若ラットの、一側総頸動脈を結紮した後に一定期間低酸素状態を負荷したhypoxic-ischemic brain damageモデルにZNS(75 mg/kg, i. p.)を投与したところ、神経細胞の壊死の程度が改善されたことより、ZNSには脳虚血の病態にも脳保護作用があると報告している。我々の結果でも、ZNSには脳血流改善作用が認められ、慢性てんかん焦点部の虚血性の変化をZNSの投与により改善できる可能性が示された。

実験IIでは、ラットの kainin 酸モデルでもZNSの抗てんかん作用があるかどうか検討を行った。ハロセン麻酔から、完全に覚醒してからKAを扁桃核内に注入したため、すべてのラットに扁桃核発作および辺縁系発作が誘発された。ZNSを10または50 mg/kg 静脈内投与した場合は、行動上も脳波上も辺縁系発作重積はまったく変化せず、抗てんかん作用は認められなかった。しかし、B群の100 mg/kg 投与群は、実験Iのネコの場合と同様に、脳波上は発作波は焦点の扁桃核に限局し、行動上は発作が著明に軽減し、salivationやmasticationを認めるのみであった。これらの結果より、ZNSは、脳波上は、発作焦点から周囲組織への発作の伝播を抑制し、行動上もこれらの変化と一致していることを明らかにした。

実験IIIでは、辺縁系発作重積を誘発してからZNSを静脈内投与し、コントロール群とZNS群との間で局所糖代謝の変化部位を比較して、ZNSの抗てんかん薬としての局所の作用部位を検討した。辺縁系発作重積時の局所脳糖代謝の変化は、これまでに報告^{10,12)}しているので詳細は省略するが、本実験のコントロール群では、扁桃核と同側の辺縁系および視床、大脳皮質に発作が伝播して

いるのが認められた。ZNS(100 mg/kg)を静脈内投与した群では、発作の広がりには明らかに縮小し、糖代謝の著明な亢進部位は扁桃核のみで、海馬に軽度の代謝の増加が認められるのみであった。脳皮質の糖代謝は、感覚運動領野で、¹⁴C-deoxyglucoseのuptakeが減少し、発作の伝播が抑制されていることを示した。

おわりに

本研究で得られた結果より、側頭葉てんかんモデルでのZNSの抗てんかん作用は、てんかん焦点と連絡のある周辺組織と皮質への発作伝播の抑制であることが明らかにされた。さらに、ZNSに抗てんかん作用と同時に背側海馬の局所脳血流量が約10%程度持続的に増加することを明らかにした。難治性の焦点てんかん発作の症例では、発作間歇時には焦点部および周囲の脳組織は常にhypometabolismおよびhypoperfusionに陥っていることがSPECTまたはPETの検討で報告されているが、難治性の複雑部分発作の症例では虚血性の変化により海馬障害は常に進行性であることが推測される。抗てんかん薬に海馬の血流改善作用があれば海馬の保護作用を合わせ持つことになる。複雑部分発作が頻発している難治性てんかんの症例でも、ZNSを毎日服用することによりてんかん発作の抑制効果のみならずてんかん発作の加重による海馬の退行性変化をも予防する可能性を示した。

文 献

- 1) Ben-Ari, Y.: Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanism and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neurosci.*, 14: 375-403, 1985.
- 2) Buni, J. and Wilder, B.J.: Valproic acid. *Arch. Neurol.*, 36: 393-398, 1979.
- 3) Hayakawa, T., Higuchi, Y., Nigami, H. et al.: Zonisamide reduces hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats irrespective of its anticonvulsive effect. *Eur. J. Pharmacol.*, 257: 131-136, 1994.
- 4) Ito, T., Hori, M., Masuda, Y. et al.: 3-Sulfamoyl methyl-1, 2-benzisoxazole, a new type of anti-convulsant drug. *Electroencephalographic profile: Arzneim. -Forsch. /Drug Res.*, 30, (4): 603-609,

- 1990.
- 5) Kamei, C., Oka, M., Masuda Y. et al. : Effect of 3-Sulfamoylmethyl -1, 2- benzoxazole (AD -810) and some antiepileptics on the kindled seizure in the neo-cortex, hippocampus and amygdala in rats. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther., 249 : 164-176, 1981.
 - 6) Makino, K., Tanaka, T. and Yonemasu, Y. : Regional cerebral blood flow and kainic acid-induced focal limbic seizures in cats. Epilepsy Res., 2 : 260-268, 1988.
 - 7) 三辺義雄, 和田有司, 山口成良 : 3-sulfamoylmethyl-1, 2-benzisoxazole (AD-810) の扁桃核発作に対する抗けいれん効果. 神経精神薬理, 3 : 363-365, 1981.
 - 8) Sokoloff, L. : Localization of functional activity in the central nervous system by measurement of glucose utilization with radioactive deoxyglucose J. Cerebr. Blood. Flow. Metab., 1 : 7-36, 1981.
 - 9) Tanaka, S., Kondo, S., Tanaka, T. et al. : Long term observation of rats after unilateral intra-amygdaloid injection of kainic acid. Brain Res., 463 : 163-167, 1988.
 - 10) Tanaka, S., Sako, K., Tanaka, T. et al. : Uncoupling of local blood flow and metabolism in the hippocampal CA 3 in kainic acid-induced limbic seizure status. Neurosci., 36 : 339-348, 1990.
 - 11) 田中達也, 藤田力, 田中滋也他 : 抗てんかん薬の辺縁系発作重積に対する効果と局所脳血流量への影響について. 脳神経, 44 : 234-240, 1992.
 - 12) Tanaka, T., Tanaka, S., Fujita, T. et al. : Experimental complex partial seizures induced by a microinjection of kainic acid into limbic structures. Prog. Neurobiol., 38 : 317-334, 1992.

abstract**Zonisamide : Basic mechanism of anti-convulsant action**

Tatsuya Tanaka, Katsunobu Takano, Kiyotaka Hashizume,
Shinji Makihara, Katsunari Yoshida, Masayuki Kunimoto
and Yukichi Yonemasu

Basic anti-convulsant action of Zonisamide (ZNS) was studied by means of electroencephalography, regional cerebral blood flow (rCBF) study and autoradiography in cats or in rats.

In Experiment I, changes of electroencephalogram and rCBF in the dorsal hippocampus were continuously monitored before and after administration of ZNS in cats with limbic seizure status, elicited by an intra-amygdaloid injection of the kainic acid. ZNS not only suppressed the seizure activities of cerebral cortex and hippocampus but also slightly increased hippocampal rCBF.

In Experiment II, administration of ZNS also suppressed the seizure activities of cortex and amygdala in non-anesthetized rats, with seizures elicited by intra-amygdaloid injection of kainic acid.

In Experiment III, ¹⁴C-deoxyglucose study was performed in seizure rats with placebo and in seizure rats treated by ZNS. Autoradiograms clearly demonstrated that seizure propagation from the amygdala was suppressed not only to the hippocampus but also to the cerebral cortex in the group treated with ZNS.

The result of the present study demonstrates that ZNS is effective in the treatment of focal seizure and ZNS can suppress the seizure propagation from the epileptogenic focus to related area.

Jpn. J. Neuropsychopharmacol., 17 : 177-183, 1995.

* Department of Neurosurgery, Asahikawa Medical College. 4-5-3-11, Nishikagura, Asahikawa, 078 Japan.