

第3回滋賀医大てんかん研究会記録

(平成9年10月29日：滋賀医科大学大学院講義室にて)

遺伝性てんかんラット(IGER)の自然発症発作に 対する抗てんかん薬の効果

安田 新¹⁾, 天野 殖²⁾, 伊原 信夫³⁾, 森田 邦彦⁴⁾,
石田 展弥¹⁾, 加藤 進昌¹⁾

1) 滋賀医科大学精神科, 2) 同病理, 3) ICR 基礎研究所, 4) 滋賀医科大学薬剤部

Effects of Anticonvulsants on Spontaneous Seizure in the Novel Genetic Model of Epilepsy

Shin YASUDA¹⁾, Shigeru AMANO²⁾, Nobuo IHARA³⁾, Kunihiro MORITA⁴⁾,
Nobuya ISHIDA¹⁾, Nobumasa KATO¹⁾

1) Department of Psychiatry, Shiga University of Medical Science

2) Department of Pathology, Shiga University of Medical Science

3) Institute of ICR Research

4) Department of Hospital Pharmacy, Shiga University of Medical Science

Ihara's genetically epileptic rat (IGER) は、白内障の遺伝性モデル動物である inherited cataract rat を起源とする遺伝性てんかんモデル動物である。IGER の発作は、顔面および頭部のミオクローヌスに始まり、後ろ足での直立に続いて全般性強直間代けいれん発作 (GTCS) に至るものであり、症候学的には辺縁系発作に属するものである。殆ど全ての雄 IGER で、GTCS は、生後5ヵ月に始まり、加齢と共に発作頻度が増加することが確認されている。これまでの IGER に対する抗てんかん薬の効果は不明であった。そこで、今回我々は IGER の GTCS に対する各種抗てんかん薬の効果について検討したので報告する。

方 法

生後5ヵ月以上経過し、GTCS が起きることが確認された雄 IGER に対して、carbamazepine (50, 100, 150mg/kg, 経口), phenobarbital (2, 5, 20mg/Kg, 皮下), phenytoin (10, 20mg/Kg, 皮下) をそれぞれ5日間連続で一日一回投与した。投与前、投与中5日間の発作回数を比較した。また、投与中に血中濃度測定を行い、血中濃度と発作回数の相関を各薬剤ごとに評価した。

Received September 30, 1998

Correspondence: 滋賀医科大学病理学第二講座 天野 殖 〒520 2192 大津市瀬田月輪町

結 果

carbamazepine, phenobarbital 投与により, IGER の GTCS が有意に抑制された。一方, phenytoin では抑制されなかった。また, carbamazepine 血中濃度と発作回数の間には有意の負の相関関係が見られた。

Ihara's genetically epileptic rat (IGER) is the genetically epileptic model, derived from an inherited cataract rat. The seizure of the rat begins with face and head myoclonus, followed by rearing and generalized tonic clonic seizures (GTCS), all of which are symptomatologically the same as limbic seizure. Almost all male animals had GTCS, starting from 5 months of age, and the frequency of the seizures increased with aging (Amano et al, Am. J. Pathol 1996, 149: 329-336).

In the present study, the effect of anticonvulsants on GTCS and aggression of IGER were investigated.

Carbamazepine (50, 100, 150mg/kg, p.o.), pheno-

考 察

IGER に対する抗てんかん薬の効果は, spontaneously epileptic rat (SER) 等の他のてんかんモデル動物でみられたものとは異なるものであった。今後, 開発される新しい抗てんかん薬の効果の評価に際しては IGER は有用なモデル動物となりうることが示唆された。

barbital (2, 5, 20mg/kg, i.p.) and phenytoin (20mg/kg, p.o.) were administered for serial 5 days, and plasma concentration of anticonvulsants were measured. Behavior was assessed 5 days before treatment, 5 days under treatment and 5 days after treatment.

Phenobarbital and carbamazepine dose-dependently suppressed GTCS, while phenytoin failed to inhibit GTCS. The antiepileptic profile of 3 drugs was different from that in other epileptic model rats, such as spontaneously epileptic rat. It is expected that IGER becomes a useful model for studying limbic seizures, and evaluating the antiepileptic effects of novel drugs.

Enhancement of granule cell division in the rat dentate gyrus in the early development of epilepsy

Eiji NAKAGAWA^{1,2}, Yoshinari AIMI¹, Osamu YASUHARA¹, Ikuo TOOYAMA¹,
Morimi SHIMADA² and Hiroshi KIMURA¹

1) Institute of Molecular Neurobiology, Shiga University of Medical Science

2) Department of Pediatrics, Shiga University of Medical Science

Abstract: Mitogenic effects of epileptic seizures on granule cells in the dentate gyrus were studied using bromodeoxyuridine (BrdU) labeling in two rat models of epilepsy induced either by kainic acid (KA) or by kindling. Following the injection of KA, the number of BrdU-positive granule cells began to increase from 3 days after the treatment to reach a peak at 5 days. In the kindling model, daily electrical stimulation was given to the perforant path. The number of BrdU-positive granule cells markedly increased from the fifth subtle partial seizure before the complete development of generalized seizures. However, repeated general-

ized seizures did not facilitate cell division of granule cells. These results indicate that a mechanism underlying development of epilepsy boosts the ability of dentate granule cells to divide. The division of dentate granule cells early in the course of epilepsy may be associated in the reorganization of the hippocampal formation.

Key words: hippocampus; kainic acid; kindling; neurogenesis; mossy fiber sprouting

INTRODUCTION

Recent immunocytochemical studies have suggested that the reorganization of dentate granule cell axons, the mossy fibers, occurs in the epileptic human hippocampus and in the animal models of epilepsy. Mossy fiber collaterals have been proposed to subservise recurrent excitation by forming granule cell-granule cell synapses¹. However, the basis on the structural reorganization of the event remains uncertain. The granule cells of the dentate gyrus represent one of a few neuronal populations that continues to produce neurons postnatally in the rodent brain. In most mammalian species, neurons in the dentate granule cell layer continue to migrate, differentiate, and form axonal connections in the postnatal period². Thus, we hypothesize that newly-generated granule cells may also contribute to the reorganization of the hippocampal formation in the course of epileptic seizures, constituting a possible substrate of epileptogenicity. To evaluate this hypothesis, we examined whether the division of dentate granule cells increases in the rats pretreated with KA or submitted to perforant path kindling.

days after the treatment. *Electrical kindling*: Adult male SD rats were stereotaxically implanted with a bipolar electrode into the left perforant pathway near the angular bundle. Two weeks after the implantation, the rats, in an unrestrained awake state, received twice-a day (6 days per week) kindling stimulation with a 2 sec train of 60 Hz biphasic constant current with 1.0 msec square wave pulses. Evoked behavioral seizures were classified according to the standard criterion³. These rats were sacrificed twenty-four hours after each behavioral seizure stage. Sham-operated rats were served as the control. *BrdU labeling procedure*: Three hours before the sacrifice, the rats of both models of epilepsy received a single intraperitoneal injection of BrdU at a dose of 100 mg/kg to label mitotically active cell. The BrdU positive cells were examined by immunocytochemistry using antibody to BrdU and an avidin-biotinylated peroxidase complex method. Double immunostaining for BrdU antigen and one of cell markers, including glial fibrillary acidic protein (GFAP; an astrocytic marker), a complement receptor CR3 (OX-42; a microglial marker) and calbindin D28K (CaBP; a granule cell marker), was performed.

MATERIALS AND METHODS

KA treatment: Adult male Sprague-Dawley (SD) rats received a single intraperitoneal injection of KA (12 mg/kg). Rats showing generalized limbic seizures were examined in this study. Rats injected with saline vehicle were used as control. The animals were sacrificed at 1, 3, 5, 7, 10 and 13

RESULTS

Following the injection of kainic acid, the number of BrdU-labeled granule cells began to increase from 3 days after the treatment to reach a peak at 5 days. A progressive dispersion of labeled cells was observed throughout the granule cell layer of kainate-treated rats. The distribution was

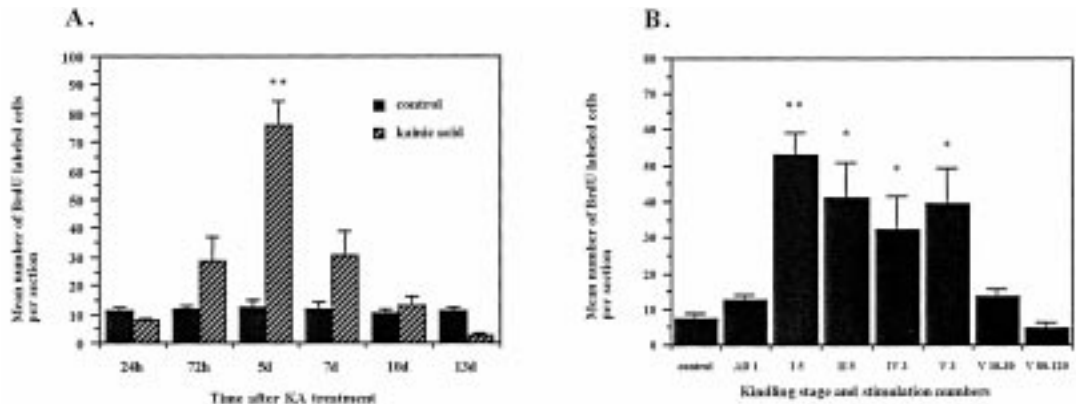


Fig. 1

1. BrdU labeled cells after KA treatment (A) or electrical kindling (B). Single ($p < 0.01$) and double asterisks ($p < 0.001$) indicate statistical significance (t-test).

substantially wider than that seen in controls (Fig. 1A). In the kindling model, daily electrical stimulations were given to the perforant path. After the fifth facial twitching (Stage I) seizures, BrdU-positive granule cells markedly increased in number. However, repeated generalized seizures did not facilitate division of dentate granule cells (Fig. 1B). The identity of BrdU-positive cells with the dentate granule cells was confirmed by double immunohistochemical staining. CaBP, typically observed in dentate gyrus granule cells⁴, was expressed by some BrdU-positive cells in the granule cell layer. Neither BrdU-labeled GFAP-nor CR3 receptor (OX-42)-immunoreactive cells were observed in the subgranular layer.

DISCUSSION

The present study showed that the mitogenic activity of granule cells reached a maximal level at 5 days following KA-induced status epilepticus. In accordance, a recent study has reported that pilocarpine-induced status epilepticus causes dentate granule cell division⁵. It has also been shown that the dentate granule cell division is regulated by afferent input via N-methyl-D-aspartate receptor activation⁶. Although it is likely that an in-

crease in cell proliferation is triggered by epileptic seizures, it is still uncertain which developmental stage of epilepsy elicits dentate granule cell division in KA or pilocarpine models. In the kindling model, the dentate granule cell division was not induced at the stage of after discharges without any seizures, but was triggered only at Stage I seizure. Furthermore, the repeated generalized seizures did not stimulate cell proliferation. These results indicate that subtle epileptic seizures in the early epileptic stage appear to boost the capability of dentate granule cells for neuronal cell division. Recent studies have revealed that mossy fiber axons of granule cells in the dentate gyrus undergo reorganization of their terminal projections in both animal models of epilepsy and human epilepsy. Neurogenesis in the dentate granule layer seems to precede sprouting of mossy fibers in the KA model of epilepsy⁷, and correlate temporally with that in the kindling model⁸. Furthermore, aberrant mossy fiber sprouting has been reported in early stages of seizures in the immature, structurally intact, human hippocampus in a very early postnatal period⁹. Therefore, it is probable that neurogenesis of dentate granule cells may be closely related to the occurrence of mossy fiber sprouting in epilepsy. The causal relationship of both remains to be elucidated. It is also suggested

that newly-born granule cells could play a role in the network reorganization in some forms of human temporal lobe epilepsy.

REFERENCES

- 1) Sutula T, He XX, Cavazos J, Scott G (1988) Synaptic reorganization in the hippocampus induced by abnormal functional activity. *Science* 239: 1147 1150.
- 2) Kaplan MS, Hinds JW (1977) Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197: 1092 1094.
- 3) Racine RJ (1972) Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 32: 281 294.
- 4) Sloviter RS (1989) Calcium-binding protein (calbindin-D28K) and parvalbumin immunocytochemistry: localization in the rat hippocampus with specific reference to the selective vulnerability of hippocampal neurons to seizure activity. *J Comp Neurol* 287: 183 196.
- 5) Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH (1997) Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 17: 3727 3738.
- 6) Cameron HA, McEwen BS, Gould E (1995) Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus. *J Neurosci* 15: 4687 4692.
- 7) Yang Q, Wang S, Hamberger A, Haglid KG (1996) Plasticity of granule cell-mossy fiber system following kainic acid induced seizures: an immunocytochemical study on neurofilament proteins. *Neurosci Res* 26: 57 64.
- 8) Cavazos JE, Golarai G, Sutula TP (1991) Mossy fiber synaptic reorganization induced by kindling: time course of development, progression, and permanence. *J Neurosci* 11: 2795 2803.
- 9) Mathern GW, Babb TL, Mischel PS, Vinters HV, Pretorius JK, Leite JP, Peacock WJ (1996) Childhood generalized and mesial temporal epilepsies demonstrate different amounts and patterns of hippocampal neuron loss and mossy fiber synaptic reorganization. *Brain* 119: 965 987.

てんかん発作獲得過程におけるラット 歯状回顆粒細胞の分裂について

中川 栄二^{1,2)}, 相見 良成¹⁾, 安原 治¹⁾, 遠山 育夫¹⁾,
島田 司巳²⁾, 木村 宏¹⁾

1) 滋賀医科大学分子神経生物学研究センター

2) 滋賀医科大学小児科

てんかんけいれん発作が歯状回顆粒細胞の細胞分裂に与える影響について、カイニン酸と貫通路電気キンドリングてんかんモデルラットを用い、臭化デ

オキシウリジン (BrdU) 標識法により検討した。BrdU 標識顆粒細胞数は、カイニン酸投与による全身けいれん後 3 日目から増加し 5 日目に最高に達し

た。貫通路の電気キンドリングモデルでは、5回の早期部分けいれんの時期から BrdU 標識顆粒細胞数の増加が認められ、顆粒細胞の分裂は全身けいれん

で促進されることはなかった。てんかん発作の獲得過程における何らかの機構が顆粒細胞の分裂増殖を促進することが示された。

海馬歯状回顆粒細胞の進行性肥大化の際に 発現する mRNA の検討

平井 久雄¹⁾, 井上 卓郎¹⁾, 黒川 清²⁾, 鈴木 文夫¹⁾

1) 滋賀医科大学脳神経外科, 2) 滋賀医科大学第二解剖学講座

Analysis of mRNA Expressions in Progressive Enlargement of Granule Cells of Mouse Hippocampus.

Hisao HIRAI¹⁾, Takuro INOUE¹⁾, Kiyoshi KUROKAWA²⁾, Fumio SUZUKI¹⁾

1) Department of Neurosurgery, Shiga University of Medical Science

2) Second Department of Anatomy, Shiga University of Medical Science

Abstract: Injection of small volume of kainate into the dorsal hippocampus induced a progressive enlargement of dentate granule cells with a long-lasting significant overexpression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). The enlargement and the overexpression continued for more than 16 weeks, and their chronological correlations suggested the causal relationship between them. However, the treatment with BDNF anti-sense oligonucleotide prevented the enlargement only when it was started less than 24 hours and had no effect after then. These results indicated that BDNF gene can trigger the enlargement, but not related to the ongoing process of the enlargement. Therefore, some other factors, which promoted the granule cell enlargement, were thought to exist. To find them, mRNAs expressed specifically in the enlarged granule cells were examined by a newly employed method, suppression subtractive PCR of mRNA. Although we cloned several cDNAs with this method, they did not have any significant homology to the reported gene sequences. And these cDNA were not expressed specifically in the kainate-injected hippocampus in *in situ* hybridization and Northern blotting. Non-specific gene amplification thought to occur due to the multiple steps of this complicated technique. Recently, we changed the methods to mRNA differential display. Preliminarily, we found different length of bands in electrophoresis between normal and enlarged granule cells in differential display method, but, until now, we have not specified the mRNA related to this phenomenon yet.

Key words: granule cell, enlargement, mRNA, suppression subtractive PCR, differential display

海馬歯状回顆粒細胞は脳の中で最も高度な神経可塑性を有する組織である。これまで私たちは成獣マウスを用い、この海馬に微量のカイニン酸を投与することにより惹起される進行性の海馬顆粒細胞の肥大化について報告してきた^{3,4,6,7)}。形態学的にはカイニン酸投与後 2 - 3 週目まで急速に顆粒細胞層の幅が拡大し、8 週目には顆粒細胞は核、細胞質とも数倍の大きさとなり、顆粒細胞層が海馬全体を占める程度にまで拡大した(図 1 A, B⁷⁾)。また、神経突起については軸索のみならず、樹状突起にも強い萌芽が認められた⁷⁾。この際発現する神経栄養因子について調べたところ、Nerve growth factor や Neurotrophin-3 の増加はなく、Brain derived neurotrophic factor (BDNF) が長期にわたり mRNA、蛋白とも顆粒細胞で増加していた^{4,6)}。この BDNF の増加は形態変化と空間的・時間的な一致を示しており、BDNF が肥大化の惹起、維持に重要な因子であると推測された。次に、それを証明するため、BDNF の mRNA に対する anti-sense oligonucleotide (AS-ODN) を作成し、カイニン酸投与後経時的に投与を行った。AS-ODN を 48 時間内に投与した場合

には肥大化は抑制されたが、それ以後の投与では肥大化の抑制は認められなかった³⁾。以上よりカイニン酸投与後の顆粒細胞肥大化において、その初期過程には BDNF は強く関与しているが、その維持には他に何らかの因子が関与しているものと考えられた。この未知の因子の同定は神経可塑性に重要な因子を発見することに繋がるものと考え、今回の研究を開始した。

この研究においては無作為に発現の増加している物質を同定することが必要である。その方法として、mRNA の suppression subtractive PCR 法や differential display 法 (DD 法) がある^{1,2,5)}。

suppression subtractive PCR 法の原理は以下のごとくである。まずは、実験群と対照群より mRNA を抽出し、それぞれ cDNA に複製する。実験群の cDNA を 2 群に分けて 2 種類の異なったアダプターを各々結合させる。この 2 群の実験群を対照群の cDNA とそれぞれ hybridization させ、アダプターのついた cDNA のうち、対照とは配列の異なった cDNA が一本鎖として残る。さらにその hybridization 産物どうしを再度 hybridization させることにより、対照群と異なった cDNA のみが両端に違ったアダプターを持つこととなる。この cDNA を鋳型とし、各々のアダプターの一部と相補的な塩基配列を持った 2 種類のプライマーを使って PCR で増幅させることにより、実験群に特異的な mRNA 由来の cDNA が得られるという方法である²⁾。この方法は DD 法に比べ操作は煩雑となるが、DD 法で問題となる false positive が少ないと報告されている。このため、先ず suppression subtractive PCR 法を行った。

マウスの一側海馬に KA を投与し、投与側を実験群、対側を対照群とした。投与後 4 週で両側海馬を摘出して mRNA を抽出し、suppression subtractive PCR 法を行った。この cDNA を cloning し、1) sequencing を行い、Gene bank で照合した。2) この cDNA をもとに Digoxigenin(DIG)-labeled RNA probe を作成し、KA 投与後 4 週目の脳切片にて *in situ* hybridization を行った。3) DIG-labeled RNA probe を用い、正常マウスの海馬より抽出した mRNA との間で Northern blot を行った。

結果：subtraction PCR にて得られた PCR 産物を電気泳動したところ、数本のバンドが見られた。

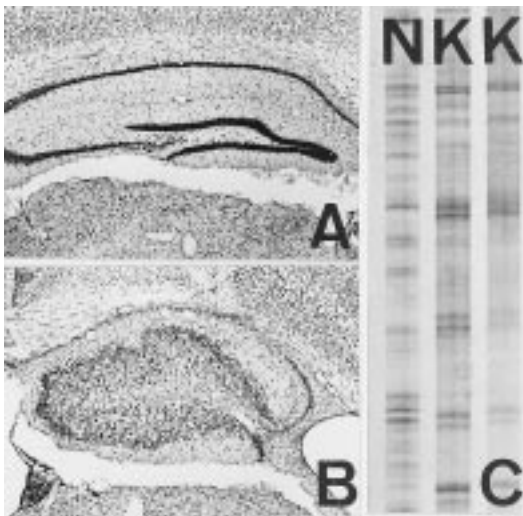


図 1 A : マウス正常海馬。顆粒細胞は層を形成し密に分布している (X15)
 図 1 B : カイニン酸投与後 8 週目肥大化海馬 : アンモン角の錐体細胞は消失し、歯状回が海馬全体を占めるように拡大している (X15)
 図 1 C : Differential display による電気泳動の違い。カイニン酸投与後肥大化海馬には正常とは異なるバンドが多数認められる。正常 (N)、カイニン酸投与後 (K)

それらのバンドをゲルより切り出し, cDNA を再抽出した。cloning の後, sequencing し, 農林水産省の Gene bank で検索したところ, 既知の物質で homology の高いものは見られなかった。

抽出された cDNA は肥大側のみで増加しているもので, *In situ* hybridization では, 本来なら肥大側のみ染まってくるはずである。しかし, いずれの RNA probe でも特異的な染色は得られなかった。Northern blot でも同様に有意な結果は得られなかった。これらの結果より抽出された cDNA は実際に発現が増加しているものとは考えられず, 何らかの原因により, 非特異的に増幅された可能性が高いと考えられた。何回か試みたが手技上の問題も含め再現性も不良であった。明らかな原因は不明であるが, PCR, hybridization のステップが多いため, 非特異的な増幅が生じやすいのではないかと推測された。

次の方法として挙げられるのが differential display 法であるが, この方法は false positive が多いという問題点があるとされる。しかし, 上流プライマー (任意プライマー) を長く設定することにより false positive をすくなくできることが証明されており, この方法で行うこととした^{1,5)}。KA 投与後 1 週, 4 週, 8 週および正常マウスの歯状回を取り出し total RNA を抽出した。2 種類のアンカープライマーを使って cDNA に複製, 3 種類の上流プライマーを用いて PCR を行い, band pattern を比較し, 相違のある band を切り出した。まだ実験法を変更したばかりであり, cloning にまでは至っていない。泳動では海馬肥大化側と対照間にいくつかの異なったバンドが認められている (図 1 C)。今後これらのバンドをもとに cloning を行い, sequencing, *in situ* hybridization 等を施行していく予定である。

REFERENCES

1) Bauer D, Muller H, Reich J, Riedel H, Ahren-

kiel V, Warthoe P, Strauss M: Identification of differential expressed mRNA species by an improved display technique. *Nucleic Acids Res.* 21: 4272-4280, 1993

2) Diatchenko L, Lau Y-FC, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD: Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 6025-6030, 1996

3) Guilhem D, Dreyfus P, Makiura Y, Suzuki F, Onteniente B: Short increase of BDNF messenger RNA triggers kainic acid-induced neuronal hypertrophy in adult mice. *Neuroscience* 72: 923-931, 1996

4) Inoue T, Hirai H, Onteniente B, Suzuki F: Correlated long-term increase of BDNF and TrkB proteins in enlarged granule cells of mouse hippocampus after KA injection. *Neuroscience* (submitted)

5) Pazman C, Bengzon J, McKay RDG, Somogyi R: Novel Differentially expressed genes induced by kainic acid in hippocampus. *Exp. Neurol.* 146: 502-512, 1997

6) Suzuki F, Junier MP, Guilhem D, Sorensen J-C, Onteniente B: Morphogenic effect of kainate on adult hippocampal neurons associated with a prolonged expression of brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience* 64: 665-674, 1995

Neuroscience 64: 665-674, 1995

7) Suzuki F, Makiura Y, Guilhem D, Sorensen J-C, Onteniente B: Correlated axonal sprouting and dendritic spine formation during kainate-induced neuronal morphogenesis in the dentate gyrus of adult mice. *Exp. Neurol.* 145: 203-213, 1997

遺伝性てんかんラット(IGER)における てんかん原因遺伝子の染色体マッピング

横山 正男¹⁾, 天野 殖²⁾, 辻 篤司¹⁾, 伊原 信夫³⁾,
芹川 忠夫⁴⁾, 挟間 章忠²⁾

1) 滋賀医科大学脳神経外科, 2) 同第2病理, 3) ICR 基礎研究所

4) 京都大学医学部付属動物実験施設

Genetic analysis of epileptic genes in Ihara's genetically epileptic rat (IGER): chromosomal mapping for epileptic genes

Masao YOKOYAMA¹⁾, Shigeru AMANO²⁾, Atsushi TSUJI¹⁾, Nobuo IHARA³⁾,
Tadao SERIKAWA⁴⁾, Fumitada HAZAMA²⁾

1) Department of Neurosurgery, Shiga University of Medical Science

2) Second Department of Pathology, Shiga University of Medical Science

3) Institute of ICR Research

4) Institute of Laboratory Animals, Faculty of Medicine, Kyoto University

Abstract: Although epilepsy is one of the most common and significant disorders of the central nervous system, the mechanism of epileptic disorders is not fully understood. Recently, we developed an epileptic rat mutant, Ihara's genetically epileptic rat (IGER) from inherited cataract rats (ICR). Detection of epileptic genes in this mutant rat is expected to give a clue to the better understanding pathogenesis and pathophysiology of human epileptic diseases. Chromosomal mapping of epileptic genes in this mutant by linkage analysis was performed as a first step of the gene cloning.

The F1 and backcross progenies were produced by mating Izm substrain of Wistar Kyoto rat females to IGER males and backcrossing female F1 progeny to the IGER males. The phenotype of seizure in backcrosses was identified by using automated seizure monitoring system. High-molecular-weight DNA was extracted from the tails and used for typing of 45 microsatellite loci. The linkage analysis study was performed by computer soft-ware program GENE-LINK.

Out of 123 backcross progenies, 63 rats (51.2%) showed seizures and 60 rats showed no seizure. In 63 rats with seizures, significant linkage relationships was recognized in 3 microsatellite loci (D15Mgh2, D15Mgh3, ETB) on Chr. 15.

Further investigation is needed to map the epileptic genes in more detail.

Key words: IGER, epileptic mutant, chromosomal mapping, linkage analysis, microsatellite marker

目 的

てんかんは脳血管障害に次ぐ最も一般的且つ重要な中枢神経疾患の一つである。抗てんかん薬および外科的治療の進歩により、ある程度発作をコントロールできるようになったが、いまだ難治性のもも多く、またてんかんの病因、病態については不明なものが少なくない。なかでも側頭葉てんかんはてんかん性疾患の中で最も重要なものの一つであり、それらのあるものは遺伝的背景を持っている。

遺伝性てんかんラット (Ihara's genetically epileptic rat: IGER)¹⁻³⁾は、遺伝的に白内障を発症する Inherited cataract rat (ICR)^{4,5)}より共同研究者伊原により分離・開発されたてんかんミュータントである。この動物は白内障とともに辺縁系発作を自然発症し、ヒト側頭葉てんかんの良いモデル動物と考えられている^{6,7)}。この動物のてんかん遺伝子並びにそれに関連する異常遺伝子の同定はヒト側頭葉てんかんの原因並びにその病態生理の解明に重要な役割を果たすと期待され、てんかんの遺伝子診断や遺伝子治療に道を開くものである。我々は、白内障遺伝子が8番および15番染色体上にマッピングされることを発見したが(未発表)、同様に、遺伝子クローニングの第一段階として連鎖解析にて、てんかん原因遺伝子の染色体マッピングを行った。

方 法

IGERは滋賀医科大学動物実験施設で系統維持されているものを使用した。交配ラットとしては遺伝

的に安定であり IGER との間で遺伝的多型性に富むウイスターラット (Izm 亜系) を選択した。雄 IGER ラットと雌 Izm ラットを交配し雑種一代 (F1) を作成する。ついで雄 IGER と雌 F1 を戻し交配し戻し交雑仔 (backcross) を作成する。てんかんの表現型の観察には我々が開発した自動てんかん発作モニター装置⁸⁾を使用した。この装置は動物ケージの底にある振動センサーが発作を感知し、コントロールボックスを経由して振動波形記録装置、ビデオレコーダー、発光装置に信号が送られる仕組みとなっている (図1)。

この装置にて生後12か月以上のラットで連続3日間、3回以上発作をモニターし、てんかん表現型を決定した。遺伝子型の確認は、まず backcross よりゲノム DNA を抽出 (QIAampTM Kits, QIAGEN) し、芹川らの方法⁹⁾に準じて PCR 法にて増幅し、アガロースゲルを用いた電気泳動にてタイピングを行った。マイクロサテライトマーカーは Research Genetics 社から購入、ならびにインターネットより得たシーケンスより作成し、多型のある45個を使用した。マーカーの一部は京大動物実験施設および東大医科学研究所より分与をうけた。なお電気泳動でタイピングが不明瞭なマーカーは蛍光プライマーを作成し、シーケンサー (Pharmacia DNA Fragment Manager) を使用した。全ての backcross ラットの遺伝子型を決定し、てんかん表現型と遺伝子型のタイピングを基にコンピューターソフトウェア GENE-LINK¹⁰⁾を用い連鎖解析を行った。

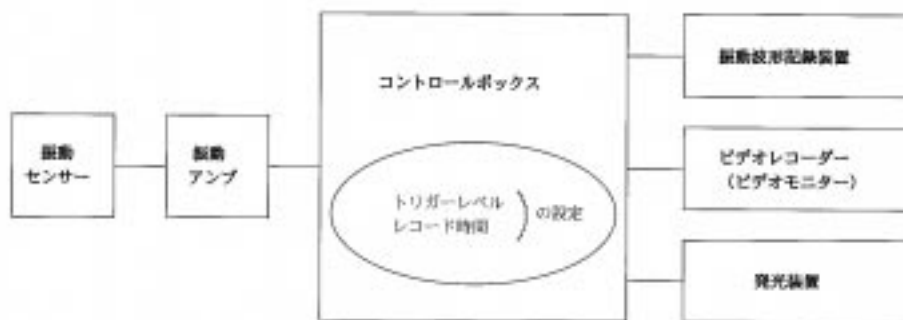


図1 自動てんかん発作モニター装置のブロック図

結 果 考 察

自動てんかん発作モニター装置にて、生後12か月以上で連続3日間、3回以上発作をモニターできた backcross は123匹であった。そのうち、何らかのてんかん発作を観察したのは63匹 (51.2%) で、てんかん発作を認めなかったのが60匹 (48.8%) であった。てんかん発作は大きく分けて強直間代痙攣、回転運動、疾走などの異常行動の3つに分類でき、単純に発症率を計算するとそれぞれ2.4%、12.2%、45.5%であった。しかし、複数のけいれん発作のパターンを示す動物が存在するため、発作の組み合わせによる発症率を計算すると表1の如くになった。これらのてんかん発作を発症した63匹にてマイクロサテライトマーカーを用いて連鎖解析したところ、15番染色体の3個のマーカー (D15Mgh2, D15Mgh3, ETB) との間に関連連鎖を認めた (表2)。また、てんかんと白内障の表現型の間にも有意な連鎖を認め、その遺伝学的距離は 36.51cM であった ($P < 0.05$)。

GENE-LINK による解析にて、てんかん原因遺伝子は、15番染色体上にあると考えられたが、単独でけいれん発症を説明できる程の強い連鎖ではなかった。第15番染色体以外にも未だ探索されていない領域に IGER のけいれん発症に関連する遺伝子が存在する可能性も示唆され、今後検討を続ける方針である。なお白内障遺伝子も15番染色体上にあるが、てんかん遺伝子と部位は異なっており、両者は、異なる遺伝子にて支配されていると考えられた¹¹⁾。今後は、更にマーカーを入手しポジショナルクローニングにむけて詳細なマッピングを行う予定である。

結 語

遺伝性てんかんラットの backcross を用い連鎖解析を行った。123匹の backcross のなかで63匹にてんかん発作を認めた。発作を認めた63匹について連鎖解析を行ったところ、15番染色体上のマーカー (D15Mgh2, D15Mgh3, ETB) と有意な連鎖を認めた。したがって、てんかん原因遺伝子の一つは15番染色体上に存在すると考えられた。

表1 てんかん発作モニター装置によるてんかんの種類と発現頻度

1) 強直間代痙攣	1 (0.8%)
2) 回転運動	6 (4.9%)
3) 異常行動	46 (37.4%)
4) 強直間代痙攣+回転運動	0 (0.0%)
5) 強直間代痙攣+異常行動	1 (0.8%)
6) 回転運動+異常行動	8 (6.5%)
7) 強直間代痙攣+回転運動+異常行動	1 (0.8%)
8) てんかん発作 (-)	60 (48.8%)
	123 (100%)

表2 てんかん発作モニター装置によるてんかん発作と連鎖を認めたマイクロサテライトマーカー

Chr.	locus name	Typed animals	Distance	Std-Dev	P
15	D15Mgh2	63	31.75 cM	5.88	< 0.01
15	D15Mgh3	63	30.16 cM	5.78	< 0.01
15	ETB	63	36.51 cM	6.07	< 0.05

文 献

- 1) Amano S, Ihara N, Uemura S, Yokoyama M, Ikeda M, Hazama F: Neuropathological study on a newly developed epileptic rat mutant with limbic-like seizures. *Psychiatr Clin Neurosci* 49: S284-286, 1995
- 2) Amano S, Ihara N, Uemura S, Ikeda M, Yokoyama M, Sasahara M, et al: Hippocampal lesions in a newly developed epileptic rat mutant with spontaneous limbic-like seizures. In *The Hippocampus: Functions and Clinical Relevance*, ed. N. Kato, Elsevier Science, Amsterdam: p161-164, 1996
- 3) Amano S, Ihara N, Uemura S, Yokoyama M, Ikeda M, Serikawa T, Sasahara M, Kataoka H, Hayase Y, Hazama F: Development of a novel rat mutant with spontaneous limbic-like seizures. *Am J Pathol* 149: 329-336, 1996
- 4) Ihara N: A new strain of rat with an inherited cataract. *Experimentia* 39: 909-911, 1983
- 5) Kato S, Ohno K, Ihara N: Breeding of cataract rat strain (IGER/Kmu/Yg). *Exp Animal* 39: 295-298, 1990
- 6) 天野 殖, 伊原信夫, 植村秀治, 横山正男: ヒト側頭葉てんかんのモデル動物の開発: 症候学的並びに病理形態学的に見た Ihra's genetically epileptic rat の側頭葉てんかんモデル動物としての適格性の検証. てんかん治療研究振興財団, 研究年報 8: 34-42, 1996
- 7) 天野 殖, 伊原信夫: 新しく開発された遺伝性てんかんラット (Ihra's genetically epileptic rat: IGER) - ミュータント動物はヒトてんかんにどこまで迫れるか - . *医学のあゆみ* 183: 38-42, 1997
- 8) Amano S, Ihara N, Yokoyama M, Torii R, Ikeda M, Uemura S, et al: Behavior analysis of genetically epileptic rats by a newly developed seizure-monitoring system employing a vibration sensor and videotape recording. *Lab Anim Sci* 47: 317-320, 1997
- 9) Serikawa T, Kuramoto T, Hilbert P, et al. : Rat gene mapping using PCR-analyzed microsatellites. *Genetics* 131: 701-721, 1992
- 10) Montagutelli X: A program in PASCAL for backcross genetic linkage analysis. *J Hered* 81: 490-491, 1990
- 11) 天野 殖, 横山正男, 伊原信夫, 鳥居隆三, 挟間章忠, 芹川忠夫: 平成8年度厚生省特定疾患調査研究班, 遺伝子解析プロジェクト研究報告書. 46, 1997

『遺伝性てんかんラット(Ihara's genetically epileptic rat : IGER)の 神経病理学的異常：原因遺伝子のクローニングにむけて』

辻 篤司¹⁾, 天野 殖²⁾, 横山 正男¹⁾, 半田 譲二¹⁾, 挟間 章忠²⁾

1) 滋賀医科大学脳神経外科, 2) 滋賀医科大学第2病理

Microdysgenesis of Hippocampus of Ihara's Genetically Epileptic Rat (IGER): Differentiation of Hereditary Lesion from Acquired Lesion

Atsushi TSUJI¹⁾, Shigeru AMANO²⁾, Masao YOKOYAMA¹⁾, Jyoji HANDA¹⁾,
Fumitada HAZAMA²⁾

1) Department of neurosurgery, Shiga university of medical science

2) Department of pathology, Shiga university of medical science

Abstract: Ihara's genetically epileptic rat (IGER) was a mutant with genetically scheduled spontaneous convulsions, mimicking human limbic seizures. By the automatic seizure-monitoring system, the seizures were classified into three types as follows: abnormal behaviors, abnormal circling seizures and generalized tonic-clonic convulsions. Histopathological investigation of this epileptic mutant was performed in order to differentiate hereditary lesions from acquired ones in the hippocampal formation.

Two months-old IGERs which had experienced no apparent seizures yet, and 12 months-old IGERs with seizure activities, abnormal behaviors, abnormal circling seizures and generalized tonic-clonic convulsions, were subjected for the study. Five animals of both sexes in each group were used. The brains removed after perfusion fixation with 4% formaldehyde were serially sliced in 30 micrometer with freezing microtome. Then the hippocampal regions were investigated employing Nissl staining. For the control studies, age-matched Wistar rats were used. In IGERs, abnormal neuronal cluster formation and disarrangement of pyramidal cells were found in the region between st. radiatum and st. lacunosum moleculare, and in the CA1 and CA3 area, respectively. In addition to these two lesions, waving pattern of dentate gyrus and enlargement of hippocampus were also detected in 12 months-old IGERs of all three groups, but not in 2-months old rats. The degrees of the later two lesions seemed to be more remarkable in the rats with severer form of epileptic seizures. No such changes were found in the brains of control animals.

From these results, it was concluded that abnormal neuronal cluster formation and disarrangement of pyramidal cells were genetically programmed phenotype, neuronal microdysgenesis, on the other hand, waving pattern of dentate gyrus and enlargement of hippocampus were not hereditary, but acquired lesions after epileptic activities. Neuronal microdysgenesis seems to be a useful phenotype for chromosomal mapping and gene cloning searching for the epilepsy related-genes.

Key words: Ihara's genetically epileptic rat (IGER) hippocampus microdysgenesis heredity

遺伝性てんかんラット (IGER) は、外部からの刺激を加えることなく辺縁系てんかん発作を自然に発症するミュータントであり、症候学的・神経病理学的にヒト側頭葉てんかんのモデル動物と考えられている^{1,4)}。

我々は連鎖解析により、てんかん発作はラット15番染色体上のマイクロサテライトマーカールと有為な連鎖があることを認めたと、染色体マッピングには至っていない。一方、IGERには海馬体の微小神経形成異常 (neuronal microdysgenesis: MDG) を含む形態的变化が認められ、てんかん発作発症に関連していると考えられている^{1,4,7)}。MDGの染色体マッピングを目的とし、海馬体の病変が遺伝的に決定された異常 (遺伝的表現型) か、あるいはてんかん発作によって二次的に生じた異常 (偽遺伝的表現型) かを区別することを目的として以下の実験を行った。

IGERを、生後2カ月から12カ月まで2カ月毎に、自動てんかんモニター装置で観察する事により⁵⁾、そのてんかん発作のタイプを異常運動発作 (abnormal behavior: AB)、異常回転運動発作 (abnormal circling seizures: C) 並びに全身性間代性・強直性けいれん発作 (generalized tonic-clonic convulsion: GTC) の3群に分ける事が出来た⁶⁾。実験にはてんかん発作発症前の2カ月齢のIGERと、12カ月齢以上の上記3群の発作型を示したIGERを各群の雌雄各5匹ずつを使用した。対象には12カ月齢以上のウイスターラット (Izumo垂型) を用いた。ネブタール麻酔下に、10%ホルムアルデヒドで灌流固定し、海馬部分の連続凍結切片 (30 μ) を作成しニッスル染色をおこなった。海馬体におけるMDGの有無並びのその程度を中心に病理形態学的検索を行った。

IGERでは発作発症前の2カ月齢ラット並びに、12カ月齢ラットにおいて発作表現型にかかわらず、3群に共通して錐体細胞層CA1領域のSt.radiatumとSt.lacunosum moleculareの境界部分に、神経細胞の異常な集簇 (neuronal cluster) (図1) と、CA1からCA3 (主にCA1) の錐体細胞層の配列の異常 (disarrangement of pyramidal cell layer) (図2) が認められた。これらの変化には左右差ならびに雌雄差はなかった。12カ月を超えるラットでは、歯状回顆粒細胞の波状配列や海馬体全体

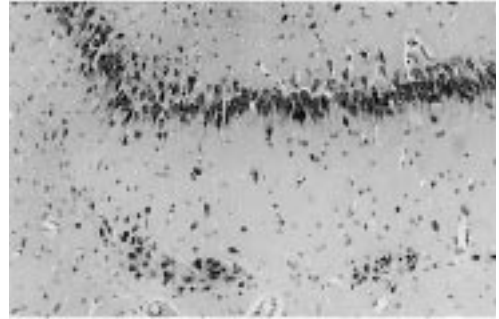


図1 Abnormal neuronal clusters in the region between stratum radiatum and stratum lacunosum moleculare of the hippocampus of IGER.

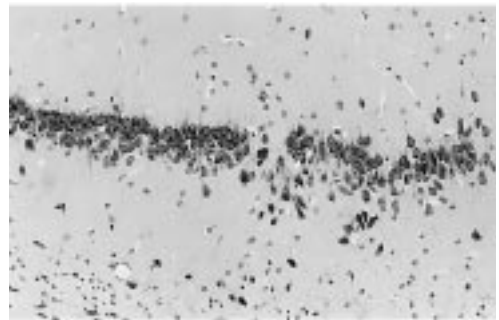


図2 Disarrangement of pyramidal cell of the hippocampus of IGER.

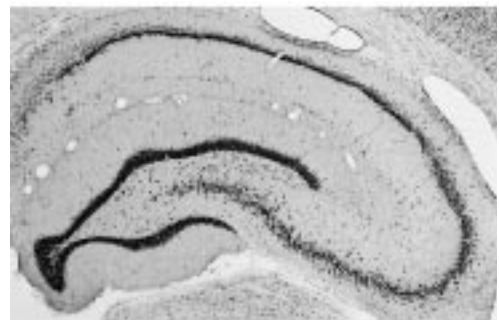


図3 Waving formation of dentate gyrus and hypertrophy of hippocampus of IGER



図4 The hippocampus of Wistar rat.

の肥大も認められた(図3)。しかしながらその程度には各群間で差があり、発作の程度が強い動物ほど変化の程度も強い傾向を示した。対照動物には、上記のような異常所見は全く認められなかった(図4)。各群の病理形態学的変化とその程度は表1に示した(表1)。

以上のように神経細胞の異常な集簇と配列の異常は、月齢並びに発作型、更には雌雄に関わらず、全てのIGERで等しく認められた。従って、この二つの病変は遺伝的にプログラムされたMDGであり、神経形成過程における神経細胞の増殖・移動の障害によって引き起こされたものと考えられた。一方、歯状回顆粒細胞の波状配列や海馬体全体の肥大は発作を発症する前の2ヵ月齢ラットにはほとんど見られず、また発作の強さが増すに連れてその程度が強くなる傾向を示した。電気キンドリングによるてんかん誘導ラットにおいても同様の、波状配列や肥大が認められていた¹³⁾。従って、歯状回顆粒細胞の波状配列や海馬体全体の肥大は、てんかん発作活動により二次的に生じた変化であると考えられた。以上のように海馬体における形態異常を遺伝的に決定された表現型と、発作による2次的変化に区別する事が出来た。

ヒトのある種のてんかん、特に難治性てんかんの原因の一つに、脳の形成障害が考えられている^{11,12)}。その中でもheterotopiaは神経細胞の移動障害であるとされ、遺伝性の病態も知られている^{7,9,10)}。IGERにおいても同様に、そのてんかん原性と海馬体の遺伝的に決定された変化であるMDGが、密接に関連しているであろう事は疑う余地はない。MDGの発生機序としては、中枢神経系の発生

段階における神経細胞の増殖/移動/分化を調節している遺伝子の異常に基づくことが予測された。

今後はMDGを表現型として、てんかん関連遺伝子のマッピング、クローニングを進めていく予定である。

文 献

- 1) Amano S, Ihara N, Uemura S, Morikawa S, Imamoto K, Hazama F: A new mutant rat with limbic - like epilepsy. *Brain Pathol* 4: 404, 1994
- 2) Amano S, Ihara N, Uemura S, Yokoyama M, Ikeda M, Serikawa T, Sasahara M, Kataoka H, Hayase Y, Hazama F: Development of a novel rat mutant with spontaneous limbic - like seizures. *Am. J. Pathol.* 149: 329-336, 1996
- 3) Amano S, Ihara N, Uemura S, Ikeda M, Yokoyama M, Sasahara M, Kataoka H, Hazama F: Hippocampal lesions on a newly developed epileptic rat mutant with spontaneous limbic-like seizures. *The hippocampus: Function and Clinical Relevance.* in Kato N(ed), 161-164, Amsterdam, Elsevier, 1996
- 4) Amano S, Ihara N, Uemura S, Yokoyama M, Ikeda M, Hazama F: Neuropathological study on a newly developed epileptic rat mutant with limbic-like seizures. *Psychiatr. Clin. Neurosci.* 49: S284-S286, 1997
- 5) Amano S, Yokoyama M, Torii R, Fukuoka J,

表 1

		異常集簇	異常配列	波状形成	海馬肥大	
IGER(12mo)	AB	♂	+	+	+	
		♀	+	+	+	
	C	♂	+	+	++	+
		♀	+	+	++	+
	GTC	♂	+	+	+++	+
		♀	+	+	+++	+
IGER(2mo)	♂	+	+	-	-	
	♀	+	+	-	-	
Wister(12mo)	♂	-	-	-	-	
	♀	-	-	-	-	

- Tanaka K, Ihara N, Hazama F: High performance seizure-monitoring system using a vibration sensor and videotape recording: behavioral analysis of genetically epileptic rats. *Laboratory Animal Science* 47: 317-320, 1997
- 6) 天野 殖, 横山正男, 伊原信夫, 鳥居隆三, 狭間章忠: 遺伝性てんかんラット (Ihara's genetically epileptic rat: IGER) における発作パターンとその加齢に伴う変化: 連鎖解析による発作関連遺伝子マッピングのための表現型の分析. 厚生省特定疾患 神経・筋疾患調査研究班 運動失調調査研究分科会 平成8年度研究報告書: 62-63, 1997
- 7) Andermann F, Guerrini R: The cortical dysplasias and epilepsy: an overview. *Dysplasias of cerebral cortex and epilepsy*, in Guerrini R (ed): 441-450, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996
- 8) Imamoto K, Amano S, Ihara N: Immunohistochemical and electron microscopical studies of the hippocampus on Ihara's genetically epileptic rat (IGER). *The Hippocampus*, N Kato(ed): 165-169, 1996
- 9) Kaufmann WE, Galaburda AM: Cerebrocortical microdysgenesis in neurologically normal subjects: a histopathologic study. *Neurology* 39: 238-244, 1989
- 10) McBride MC, Kemper TL: Pathogenesis of four-layered microgyric cortex in man. *Acta Neuropathol (Berl)* 57: 93-98, 1982
- 11) Meencke HJ: The density of dystrophic neurons in the white matter of the gyrus frontalis inferior of epilepsies. *J Neurol* 230: 171-181, 1983
- 12) Meencke HJ: Neuropathological findings in primary generalized epilepsy: a study of eight cases. *Epilepsia* 25: 8-21, 1984
- 13) Tønder N, Kragh J, Finsen BR, Bolwing TG, Zimmer J: Kindling induces transient changes in neuronal expression of somatostatin, neuropeptide Y, and calbindin in adult rat hippocampus and fascia dentata. *Epilepsia* 35: 1299-1308, 1994