

自発てんかん発作を有した皮質異形成ラットモデル

鎌田 崇嗣¹⁾ 高瀬敬一郎²⁾ 重藤 寛史³⁾

要旨：局所皮質異形成は、難治性てんかんと強い関連が指摘されている。われわれは、胎児期に頭蓋へ多発性の凍結損傷を与え、大脳皮質に皮質異形成を作製したラットモデルを作製し、自発てんかん発作を発症するかどうかを観察した。胎児期に皮質異形成を両側の前頭頭頂葉に作製したラットにて、出生後海馬にて自発てんかん発作波が観察され、臨床的にもヒトの側頭葉てんかんに類似したものであった。皮質異形成部と海馬での免疫組織化学的検討にて、てんかん原性の獲得の過程でグルタミン酸受容体を介した興奮性の変化がみられた。このモデルは、ヒトのてんかん原性獲得の機序を明らかにする手がかりを有すると考えられる。

(臨床神経 2014;54:1132-1135)

Key words：皮質異形成、凍結損傷ラットモデル、側頭葉てんかん

はじめに

局所皮質形成異常は、難治性てんかんの外科的治療を受けた患者にてしばしばみとめられ、時には細胞レベルでの異常もみられるが、皮質の層構造異常を特徴としており、難治性てんかんと強い関連が推定されている¹⁾²⁾。ヒトの皮質異形成内に電極を挿入して記録された脳波では、発作期や発作間欠期のてんかん性放電もみとめられているが³⁾、皮質異形成のてんかん原性については未だよくわかっていない。実験的凍結損傷ラットモデルにおいて、皮質形成異常は新生児期に頭蓋に凍結損傷を与えることによって生じ、過剰脳溝や微小多脳回を示すが、このモデルでは臨床的および脳波上の自発てんかん発作はみられていない⁴⁾⁵⁾。齧歯類において、皮質に分布する神経細胞の遊走は出生時にはほぼ終了していると考えられている。それゆえ、われわれは以前胎児期のラットの頭蓋に凍結損傷を与えて一側の大脳半球に皮質異形成を生じさせる新たな皮質異形成ラットモデルを作製した⁶⁾。このモデルの皮質異形成では、顕著な皮質層構造の異常をともなっており、コントロールラットと比較して、皮質と海馬において有意に電気刺激後の後放電の持続時間の延長がみられ、さらにはキンドリングによる海馬のてんかん原性獲得も有意に早い段階で完成した。グルタミン酸受容体(N-methyl-D-aspartate受容体;NMDAR)サブユニット2Bの染色強度も凍結損傷を加えた皮質において有意に上昇していた。しかし、自発てんかん発作の発症はみられなかった。今回の研究において、われわれは両側の大脳半球に多発性の皮質異形成を有する新しいラットモデルを作製した。この目的は、皮質異形成を両側多

発性に作製することによって、皮質への電気刺激なしに自発てんかん発作を発症するかどうかを明らかにすることである。

方法

妊娠 Sprague-Dawley (SD) ラットにおいて、妊娠 18 日目に全身麻酔下に両側の子宮を部分的に腹腔内から取り出し、皮質異形成の作製のため、液体窒素で冷却された金属性のプローブを子宮壁の外側から 4 秒間、ラット胎児の頭蓋部に接触させた。

手術後出生した子ラットは、以下のように分類：A 群：大脳半球にそれぞれ 2 ヶ所の凍結損傷 (21 匹)、B 群：偽凍結損傷 (シャム手術, 11 匹)。生後 28 日目でラットの前頭葉皮質と海馬に脳波測定のための記録電極が設置された。自発てんかん性放電と臨床的な発作症状を検索するために、生後 35 日目から 77 日目までの間、3 日間毎に 12 時間脳波記録と行動の記録が実施された。組織学的および免疫組織化学的検討をおこなうために、一部 (A : 5 匹, B : 5 匹) は生後 28 日目でサクリファイスされ、それ以外 (A : 16 匹, B : 6 匹) は脳波記録終了後の生後 78 日目でサクリファイスされた。脳組織標本に対して、NMDAR1 (NR1), -2A (NR2A), -2B (NR2B), glutamate/aspartate transporter (GLAST), glial glutamate transporter 1 (GLT1) の免疫染色をおこなった。デンストメトリーによる半定量的解析をおこない、皮質異形成を作製した群とシャム手術群との間で海馬 C1 と C3 領域、皮質領域の各染色強度の比較がなされた。

¹⁾ 福岡山王病院てんかんセンター [〒 814-0001 福岡県福岡市早良区百道浜 3 丁目 6 番 45 号]

²⁾ 飯塚病院神経内科

³⁾ 九州大学大学院神経内科学

(受付日：2014 年 5 月 24 日)

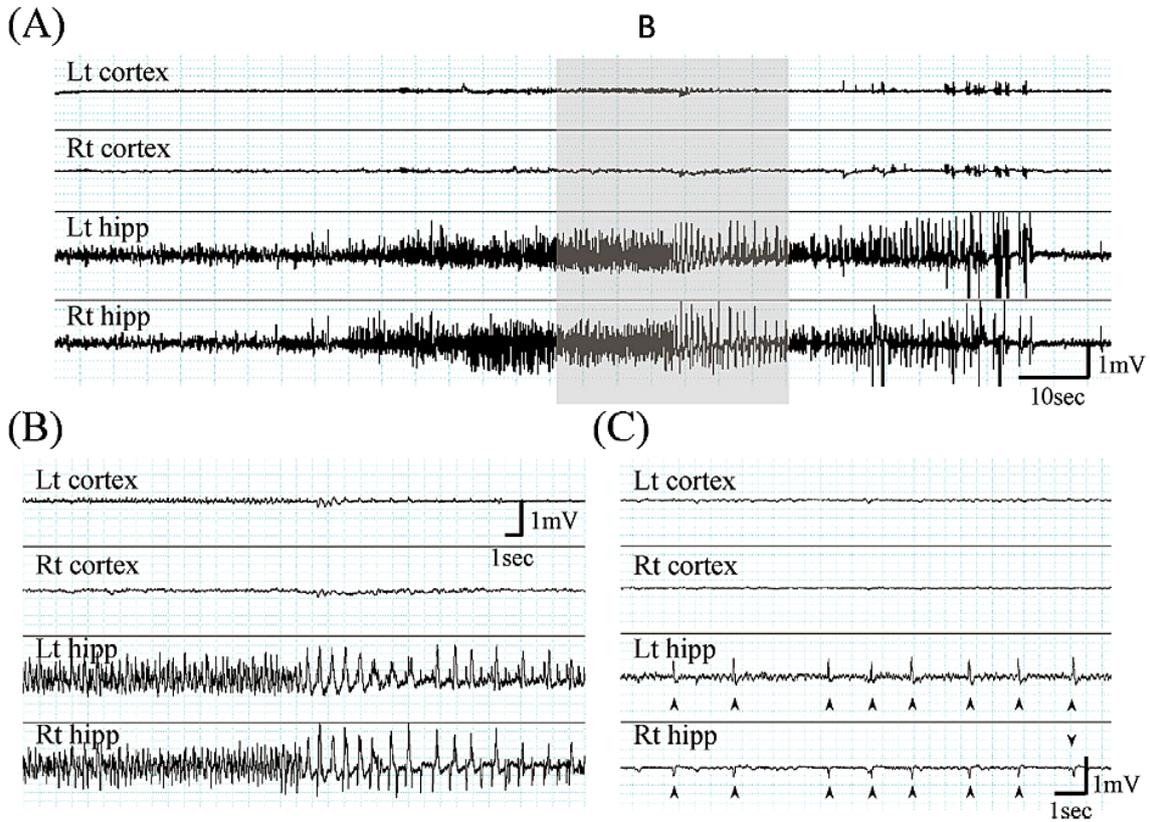


Fig. 1 脳波上の発作時および発作間欠期てんかん性放電.

(A) 脳波上の自発てんかん発作. 自発てんかん性放電が両側の海馬より出現し、発作終了まで徐々に振幅が増大している. 両側の皮質では volume conduction はみられているが、てんかん性放電はみられていない. この海馬でのてんかん性放電の持続時間は 102 秒である. 四角で覆われた部分の拡大図を (B) で示している. (B) 海馬でのバースト状の発作波. (C) 発作間欠期の海馬での棘波. 矢印が自発的な棘波の出現を示している. 単発の棘波が間欠的に、同期して両側の海馬より出現している. Lt cortex : 左皮質, Rt cortex : 右皮質, Lt hipp : 左海馬, Rt hipp : 右海馬.

結果

脳波記録の期間において、A 群の 16 匹中 11 匹のラットにて生後 47~77 日目の間に計 30 回の海馬の自発てんかん発作がみられた. 発作をおこしたラット一匹当たりの発作平均回数は 2.7 回であった. すべての脳波上の自発てんかん性放電は海馬より発生し、両側の海馬に限局されていた (Fig. 1A, B). 平均持続時間は 58 ± 38.9 秒 (mean \pm standard deviation) であった. 臨床症状として持続する静止状態がみられ、時に口周囲の動き、強く体幹全体を振るわせる動きも続けてみられた. また、発作間欠期の棘波も時にみられた (Fig. 1C). 脳波記録の期間において、シャム手術群では自発てんかん発作はみられなかった. 皮質異形成は両側の前頭頭頂葉にみられ、著明な層構造の異常がみられた (Fig. 2). 免疫組織化学的検討では、シャム手術群と比較して生後 28 日目と 78 日目に皮質異形成部において NR1A, -2A, -2B と GLAST, GLT1 の染色強度の上昇がみられた. 海馬では形態的に顕著な変化はみられなかったが、NR2A, -2B の染色強度は生後 28 日目で上昇しており、78 日目には NR1A, -2A, -2B と GLAST, GLT1 の染色強度の上昇がみられた.

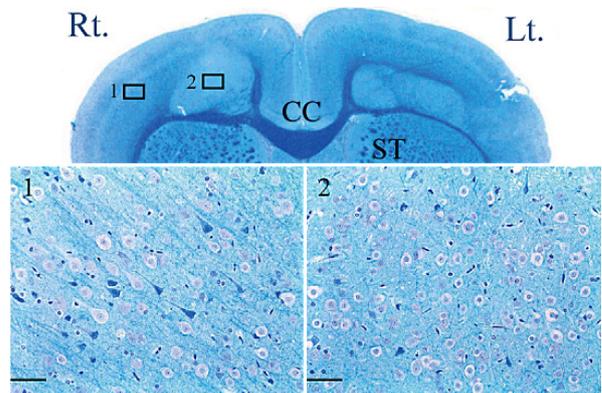


Fig. 2 凍結損傷を与えた大脳半球のミクロ的所見. 両側凍結損傷を与えたラットの冠状断での脳標本のミクロ的所見 (KB 染色). 局所皮質異形成や異所性灰白質が両側の大脳半球にみられている. 顕著な皮質層構造の異常が、大脳半球の表層と皮質下白質の間でみられている. 異常な皮質層構造内のニューロンは極性を失っているが、形態的には正常な状態を保っている (右下に拡大図). また、層構造異常の皮質に隣接した皮質領域では、正常な層構造が保たれている (左下に拡大図). Scale bars : 50 μ m, Lt : 左, Rt : 右, CC : 脳梁, St : 線条体.

結論

今回の凍結損傷ラットモデルでは、皮質異形成部において顕著な層構造異常がみられたが、明らかな細胞構築異常はみられなかった。脳波記録では、皮質でのてんかん性放電の出現はみられなかった。しかし、免疫染色による半定量的デンシトメトリーによる解析では、生後 28 日目、78 日目で皮質異形成部において NR1, -2A, -2B, GLAST, GLT1 の発現の上昇がみられ、興奮性の増大が示唆された。皮質異形成から海馬へ伝播するてんかん性放電活動はみられなかったが、皮質異形成から海馬への興奮性の間欠的な刺激が、二次的に海馬での変化をひきおこし、その結果、キンドリングの動物モデルと同じように海馬のてんかん原性を獲得したと考えられる。実際、皮質異形成での GLAST, GLT1 の発現の変化は早期 (生後 28 日目) の段階でみられているが、同時期に海馬では変化はみられていない。

われわれのモデルは、胎児期に放射線暴露⁷⁾⁸⁾あるいは MAM に暴露させる⁹⁾皮質異形成の動物モデルと比較して、海馬での形態的な異常が微小なものであった。免疫染色による解析では、生後 28 日目から海馬にて NR2A, 2B 発現の上昇をみとめ、この時点で海馬にてんかん原性獲得に繋がる変化が生じていたと考えられた。さらに、生後 78 日目には NR1, -2A, -2B の発現の上昇がみられ、さらに GLAST, GLT1 の上昇もともなっていた。主要なアストロサイトのグルタミン酸トランスポーターである GLAST と GLT1 の発現の継時的な変化は、てんかん原性獲得のプロセスが存在することを示唆している。細胞外グルタミン酸濃度の上昇は、ヒトではてんかん発作中の海馬内でみられている¹⁰⁾。自発海馬てんかん発作そのものが GLAST と GLT1 の発現の変化に寄与しているのだろう。

両側大脳半球に皮質異形成を有するわれわれの動物モデルでは、海馬より発生する自発てんかん発作を示し、同部位の興奮性の増大も免疫染色による解析で示された。臨床的な発作症状は、ヒトの内側側頭葉てんかんのそれに類似したものであった。今回のモデルは皮質異形成を有した内側側頭葉てんかんの動物モデルであり、皮質異形成を有する内側側頭葉てんかんにおけるてんかん原性獲得の解明に有用なものとなるだろう。

※本論文に関連し、開示すべき COI 状態にある企業、組織、団体はいずれも有りません。

文 献

- 1) Fauser S, Schulze-Bonhage A, Honnegger J, et al. Focal cortical dysplasias: Surgical outcome in 67 patients in relation to histological subtypes and dual pathology. *Brain* 2004;127: 2406-2418.
- 2) Blümcke I, Thom M, Aronica E, et al. The clinicopathologic spectrum of focal cortical dysplasias: A consensus classification proposed by an ad hoc Task Force of the ILAE Diagnostic Methods Commission. *Epilepsia* 2011;52:158-174.
- 3) Francione S, Nobili L, Cardinale F, et al. Intra-lesional stereo-EEG activity in Taylor's focal cortical dysplasia. *Epileptic Disord* 2003;5(suppl 2):S105-S114.
- 4) Scantlebury MH, Gibbs SA, Foadjo B, et al. Febrile seizures in the predisposed brain: A new model of temporal lobe epilepsy. *Ann. Neurol* 2005;58:41-49.
- 5) Kellinghaus C, Möddel G, Shigeto H, et al. Dissociation between in vitro and in vivo epileptogenicity in a rat model of cortical dysplasia. *Epileptic Disord* 2007;9:11-19.
- 6) Takase K, Shigeto H, Suzuki SO, et al. Prenatal freeze lesioning produces epileptogenic focal cortical dysplasia. *Epilepsia* 2008; 49:997-1010.
- 7) Kondo S, Najm I, Kunieda T, et al. Electroencephalographic characterization of an adult rat model of radiation-induced cortical dysplasia. *Epilepsia* 2001;42:1221-1227.
- 8) Kellinghaus C, Kunieda T, Ying Z, et al. Severity of histopathologic abnormalities and in vivo epileptogenicity in the in utero radiation model of rats is dose dependent. *Epilepsia* 2004;45:583-591.
- 9) Harrington EP, Möddel G, Najm IM, et al. Altered glutamate receptor-transporter expression and spontaneous seizures in rats exposed to Methylazoxymethanol in utero. *Epilepsia* 2008; 48:158-168.
- 10) Doring MJ, Spencer DD. Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain. *Lancet* 1993;341:1607-1610.

Abstract**Spontaneous seizures in a rat models of multiple prenatal lesioning**Takashi Kamada, M.D.¹⁾, Kei-ichiro Takase, M.D., Ph.D.²⁾ and Hiroshi Shigeto, M.D., Ph.D.³⁾¹⁾Epilepsy Center, Fukuoka Sanno Hospital²⁾Department of Neurology, Iizuka Hospital³⁾Department of Neurology, Neurological Institute, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

Focal cortical dysplasia (FCD) is an important cause of intractable epilepsy. Previous rat studies have utilized freeze lesioning of neonatal animals to model FCD; however, such models are unable to demonstrate spontaneous seizures without seizure-provoking events. Therefore, we created an animal model with multiple FCD, produced during embryonic development, and observed whether spontaneous seizures occurred. Furthermore, we examined the relationship between FCD and epileptogenesis using immunohistochemistry. At 18 days postconception, a frozen metal probe was placed bilaterally on the scalps of Sprague-Dawley rat embryos through the uterus wall to produce multiple FCD. Eleven of 16 rats showed spontaneous seizures arising in the hippocampus from postnatal day47. Movement cessation followed by sniffing and mastication, culminating in wet-dog shaking, was seen during the hippocampal EEG discharges. Alterations in the levels of glutamatergic and GABA-ergic receptors were investigated during growth. We created an animal model showing spontaneous seizures without a provoking event except for the existence of cortical dysplasia, and without a genetic or general systematic cause like MAM injection or irradiation. The seizures resembled human temporal lobe epilepsy both clinically and on EEG. This model should enable better clarification of the mechanisms underlying the development of human epilepsy.

(Clin Neurol 2014;54:1132-1135)

Key words: focal cortical dysplasia, freeze lesion rat model, temporal lobe epilepsy
