

論 文 要 旨

Differences in two mice strains on kainic acid-induced amygdalar seizures

2つのマウスストレインにおけるカイニン酸誘発辺縁系発作の相違

春日井 基文

【序論および目的】

カイニン酸全身（皮下および腹腔）投与に対するマウスストレイン間の相違を示したこれまでの研究報告において、FVB/N マウスは C57BL/6 マウスよりも海馬の神経細胞障害が強いことが示されている。しかし、てんかん発作焦点は明らかでなく、てんかん発作強度や持続時間は脳波検査による客観的な評価ではなく、行動観察のみの主観的な評価であり、各研究報告で評価が一定していない。我々はこれまでに側頭葉てんかんモデルとしてカイニン酸を扁桃核に微量注入することで、てんかん発作焦点を作り、自発性の複雑部分発作（辺縁系発作）が誘発されるカイニン酸誘発辺縁系発作動物実験モデルをラットで確立し、研究を行っていた。これを C57BL/6 マウスと FVB/N マウスの2つの異なるマウスストレインに行い、脳波、行動、組織学上において比較し、2つのマウスストレインにおけるカイニン酸誘発辺縁系発作の相違を明らかにすることを目的とした。

【材料および方法】

材料：10週齢雄性の C57BL/6 マウスと FVB/N マウスを用いた。方法：定位脳手術にて基準電極を左側前頭洞、ビス電極を左側皮質感覚運動領、深部電極とカイニン酸注入針を左側扁桃核に留置した。手術7日後、左側扁桃核にカイニン酸 $0.5 \mu\text{g}/0.25 \mu\text{l}$ を微量注入した。カイニン酸注入48時間、脳波測定および行動観察を行い比較検討した。また、カイニン酸注入2時間後および48時間後の海馬の神経細胞障害を比較検討した。

【結 果】

カイニン酸注入2時間後までは2つのストレインともに脳波測定、行動観察上、扁桃核をてんかん発作焦点とした辺縁系発作の発展を認めた。しかし、48時間後には C57BL/6 マウスのてんかん発作は消失したが、FVB/N マウスのてんかん発作は持続していた。また、FVB/N マウスは C57BL/6 マウスと比べ、カイニン酸注入2時間後および48時間後ともに、有意に海馬の神経細胞障害を認めた。

【結論及び考察】

カイニン酸誘発辺縁系発作における C57BL/6 マウスと FVB/N マウスのてんかん発作感受性および海馬の神経細胞障害の相違を明らかにした。これには遺伝的背景が関与していると考えられ、この知見は、てんかん発作感受性遺伝子あるいはてんかん原性の分子生物学的研究に貢献すると思われる。

(BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS Volume.357, Issue 4, Pages

1078-1083, 2007年 掲載)

論文審査の要旨

報告番号	総研第 23 号	学位申請者	春日井 基文
審査委員	主査	出雲 周二	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	河野 嘉文	副査 有田 和徳
	副査	岸田 昭世	副査 有村 公良

Differences in two mice strains on kainic acid-induced amygdalar seizures

2つのマウスストレインにおけるカイニン酸誘発辺縁系発作の相違

カイニン酸全身投与に対するマウスストレイン間の相違を示したこれまでの報告において、FVB/N マウスは C57BL/6 マウスよりも海馬の神経細胞傷害が強いことが示されている。しかし、てんかん発作焦点は明らかでなく、てんかん発作強度や持続時間は脳波検査による客観的な評価ではなく、行動観察のみの主観的な評価であり、各研究報告で評価が一定していない。筆者らはこれまでに側頭葉てんかんモデルとしてカイニン酸を扁桃核に微量注入することで、てんかん発作焦点を作り、自発性の複雑部分発作（辺縁系発作）が誘発されるカイニン酸誘発辺縁系発作動物実験モデルをラットで確立し、研究を行っていた。本研究では、これを C57BL/6 マウスと FVB/N マウスの2つの異なるマウスストレインに行い、行動観察、脳波測定、病理組織学上において比較している。その結果、以下の知見が明らかにされた。

1. 行動観察、脳波測定所見

カイニン酸注入2時間後までは2つのストレインともに脳波測定、行動観察上、扁桃核をてんかん発作焦点とした辺縁系発作の発展を認め、相違はなかった。しかし、48時間後には C57BL/6 マウスでのんかん発作は消失したが、FVB/N マウスでのんかん発作は持続していた。

2. 病理組織学的所見

FVB/N マウスは C57BL/6 マウスと比べ、カイニン酸注入2時間後および48時間後ともに、有意に海馬の神経細胞傷害を認めた。

本研究によって、マウスのカイニン酸誘発辺縁系発作モデルを初めて開発し、カイニン酸誘発辺縁系発作における C57BL/6 マウスと FVB/N マウスでのんかん発作感受性および海馬の神経細胞傷害の相違を明らかにした。これから遺伝的基盤の相違が示唆された。この知見は、てんかん発作感受性遺伝子あるいはてんかん原性の分子生物学的研究に貢献すると思われる。以上より、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 23 号	学位申請者	春日井 基文
審査委員	主査	出雲 周二	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	河野 嘉文	副査 有田 和徳
	副査	岸田 昭世	副査 有村 公良

主査および副査の5名は、平成19年10月25日、学位申請者 春日井 基文 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 側頭葉てんかんモデルとしてカイニン酸誘発辺縁系発作モデルを使用する理由は？

(回答) これまでに多くの研究者により、ヒトの側頭葉てんかんの実験モデルが開発され、研究されてきたが、ヒトの側頭葉てんかんモデルの条件として、①辺縁系の組織の中にてんかん焦点が存在すること。②自発性の複雑部分発作が継続して繰り返し出現すること。③ヒトの側頭葉てんかん症例で認められている海馬硬化と同等の病理組織変化を有すること。以上の3点が必要であると考えられている。カイニン酸誘発辺縁系発作モデルはカイニン酸を扁桃核に微量注入することによって①～③の3点がラットやネコ、イヌ、サルで認められており、これまでにヒトの側頭葉てんかんモデルとして用いられ、研究が行われている。

質問2) カイニン酸誘発辺縁系発作モデルにマウスを用いる理由は？

(回答) これまでにラットやネコ、イヌ、サルにおいてカイニン酸誘発辺縁系発作モデルが開発され、研究されているが、マウスのカイニン酸誘発辺縁系発作モデルは本実験で初めて開発された。カイニン酸誘発辺縁系発作モデルにマウスを用いる利点として、マウスはストレインごとに遺伝的に均一であり、てんかんの分子遺伝学的研究に有用であると思われる。

質問3) 左側にカイニン酸を注入する理由は？

(回答) とくに左側でなければならない特別な理由はない。

質問4) カイニン酸注入48時間後のFVB/Nマウスの脳波所見では皮質感覚運動領にスパイクの出現を認めているが、行動観察上、ステージ1～2にとどまっている理由は？

(回答) 行動観察上、明らかに認められたステージ1～2との評価をしたが、ステージ3～5までの発作が出現していた可能性は推察される。

質問5) カイニン酸注入48時間後のC57BL/6マウスとFVB/Nマウスの発作間歇時には行動上では相違はなかったのか？

(回答) 発作間歇時においては、C57BL/6マウスとFVB/Nマウスに行動観察上の相違はなかった。

質問6) カイニン酸注入48時間後以降、すなわち、慢性期での比較は？

(回答) 今回は急性期モデルとしてのカイニン酸誘発辺縁系発作モデルでの実験であったが、今後、慢性期モデルを行い、検討する必要があると思われる。

質問7) 海馬CA1に比べてCA3の神経細胞傷害が強かった理由は？

(回答) カイニン酸誘発辺縁系発作での海馬の神経細胞傷害は相対的な脳虚血が原因であると考えられている。ラットのカイニン酸誘発辺縁系発作モデルにおける辺縁系発作重積時の局所糖代謝と局所脳血流測定の研究で、海馬CA1に比べてCA3の方が辺縁系発作時の糖代謝と脳血流のuncoupling、すなわち相対的虚血が大きいと報告されている。本実験ではマウスを用いたが、同様の機序で海馬CA1に比べてCA3の神経細胞傷害が強かったと推察される。

質問8) 発作時の脳波所見の形はマウスの特徴なのか？種による違いがあるのか？

(回答) ラットやネコ、イヌ、サルにおけるカイニン酸誘発辺縁系発作モデルでの発作時の脳波所見と比較して形での相違はない。

最終試験の結果の要旨

質問9)扁桃核に注入後のカイニン酸濃度の時間的経過の変動はどうか?どのくらいの間カイニン酸は残存しているのか?

(回答)カイニン酸を扁桃核に注入後、どのくらい扁桃核に残存するかは明らかではない。

質問10)カイニン酸注入2時間後はカイニン酸のアゴニストとしての作用があるとしても、カイニン酸注入48時間後はカイニン酸のアゴニストとしての作用は無いと思われるが、カイニン酸注入48時間後にストレインに相違が生じた原因はどのように考えられるか?

(回答)カイニン酸注入48時間後のC57BL/6マウスとFVB/Nマウスに相違が認められた原因は明らかではない。カイニン酸誘発のてんかん発作であるが、グルタミン酸受容体を介するてんかん発作興奮系の影響だけでなく、GABA受容体を介するてんかん発作抑制系の関与も考えられる。また、この相違がてんかん原性のメカニズムの解明にもつながると考えられる。

質問11)カイニン酸を扁桃核に注入した後の次の経路の神経伝達物質は?

(回答)カイニン酸を扁桃核に微量注入すると、扁桃核から嗅内皮質に投射する興奮性グルタミン酸作動性神経が興奮し、嗅内野皮質にグルタミン酸が放出されます。

質問12)カイニン酸を扁桃核に注入して、海馬CA1とCA3では神経細胞障害を認めたが、扁桃核や嗅内野皮質は同じように障害されないのか?

(回答)カイニン酸を扁桃核に微量注入することで扁桃核の一部は神経細胞傷害を受けるが、全てが傷害されることはない。ラットにおけるカイニン酸誘発辺縁系発作モデルにおける辺縁系発作重積時の局所糖代謝と局所脳血流測定の研究では辺縁系発作の糖代謝と脳血流のuncouplingが生じていることが報告されている。すなわち、発作時に相対的な虚血が生じていることで海馬CA1およびCA3の神経細胞傷害が生じると報告されており、扁桃核や嗅内野皮質が海馬CA1とCA3と同程度に傷害されることはない。

質問13)今回の結果で、C57BL/6マウスとFVB/Nマウスの海馬の神経細胞障害に差が生じた原因についてはどのように考えているのか?

(回答)C57BL/6マウスとFVB/Nマウスの海馬のイオンチャネル型グルタミン酸受容体の比較実験では、2つのストレインに相違はなかったと報告されている。このことから、グルタミン酸受容体にグルタミン酸が結合した後の細胞内伝達の相違の可能性およびてんかん発作に対して抑制系にかかわるGABA受容体の相違の可能性が考えられる。

質問14) intact neuron はどのように判定したか?

(回答)核小体を有する細胞核と細胞質を認めている神経細胞を intact neuron と判定した。

質問15) pyknosis は灌流固定がうまくいかなかった場合にも生じるが、本実験での pyknosis がカイニン酸誘発辺縁系発作によるものか灌流固定の失敗によるかはどのように判別したか?

(回答)これまでのラットやネコ、イヌ、サルのカイニン酸誘発辺縁系発作モデルを用いた実験の知見を基に、海馬のCA1やCA3に特徴的に生じている pyknosis はカイニン酸誘発辺縁系発作によるものと判断した。海馬全体や脳実質に pyknosis がある場合は手技的なものと判断した。

質問16)海馬の神経細胞障害に左右差はあったか?

(回答)カイニン酸注入側の方が神経細胞障害は強く、左右差を認めた。

質問17)脳虚血により海馬の神経細胞障害が生じるとすると、海馬の神経細胞障害に左右差が生じる理由は何?

(回答)カイニン酸注入側の方が、海馬への興奮伝達が強いことが示唆されると考えられる。

質問18)C57BL/6マウスとFVB/Nマウスを用いた理由は?

(回答)C57BL/6マウスはマウスゲノムプロジェクトとして最初に遺伝配列が明らかになっており、分子生物学的研究に最も用いられている。FVB/Nマウスは、これまでにてんかん研究に用いられることが多い。また、これまでのカイニン酸全身投与によるマウスストレインの比較実験において、C57BL/6マウスとFVB/Nマウスが発作強度および海馬の神経細胞障害に相違があるとの報告されている。これらの理由からC57BL/6マウスとFVB/Nマウスを用いた。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。