

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591132

研究課題名（和文） 熱性痙攣重積後の内側側頭葉てんかん発症の病態解明と新たな予防戦略の開発

研究課題名（英文） Mechanism and prevention strategy for mesial temporal lobe epilepsy following febrile status convulsion.

研究代表者

福田 光成 (Fukuda Mitsumasa)

愛媛大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：80274330

研究成果の概要（和文）：遷延性温熱誘発痙攣（pHS）モデルを用いて、熱性痙攣重積が海馬硬化症を伴う内側側頭葉てんかん（TLE-HS）の原因となるか、炎症性サイトカインはTLE-HS発症に影響を及ぼすかを検討した。結果として、日齢10と12にpHSを誘発し発作後と翌日にIL-1 $\beta$ を投与した群のみで有意に成熟期（日齢70）の痙攣準備性が亢進し、海馬CA3領域での有意な細胞障害が認められた。日齢10に単回のpHSを誘発する群では変化は認められなかった。今回の結果は、IL-1 $\beta$ を過剰に産生する素因を持つ乳幼児での熱性痙攣重積の反復は、成人期での痙攣準備性を亢進させTLE-HS発症に関与する可能性を示唆する。

研究成果の概要（英文）：Febrile seizures (FS) are recognized as an antecedent to the development of temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis (TLE-HS). In this study, we used a rat model of FS to study the effects of inflammatory cytokines on seizure susceptibility and neuronal death in adulthood. Prolonged hyperthermia-induced seizures (pHS) were induced in male Lewis rats on P10 and 12, and IL-1 $\beta$  were administered twice intranasally at the seizures. Adulthood seizure susceptibility (P70) was significantly enhanced in rats receiving IL-1 $\beta$  together with repeated pHS, whereas no significant effects were seen in rats receiving IL-1 $\beta$  after a single pHS episode (P10). Significant hippocampal neuronal cell loss was observed in the CA3 region of rats receiving IL-1 $\beta$  together with repeated pHS. Our results are consistent with the hypothesis that excessive production of IL-1 $\beta$  after repeated prolonged FS could enhance adulthood seizure susceptibility and neuronal cell death, and might contribute to the development of TLE-HS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：熱性けいれん、内側側頭葉てんかん、けいれん重積、サイトカイン、動物モデル

### 1. 研究開始当初の背景

内側側頭葉てんかん患者の既往歴では、乳幼児期の熱性痙攣重積がしばしば認められる。しかし逆に熱性痙攣重積を起こした小児の前方視的研究では、思春期以降に内側側頭葉てんかんを発症する患者は稀であり、症例報告が散見される程度である。このことは熱性痙攣重積後に内側側頭葉てんかんを発症する患者は、何らかの特殊な素因を持つ患者群である可能性を示唆し、この後天性てんかん原性獲得の機序は未だ解明されていない。一方我々は、臨床上で得られる血清や髄液中サイトカインの異常値が痙攣の原因か結果かの結論を得ないという問題を解決するため、幼弱ラット温熱誘発痙攣モデルを用いて、熱性痙攣の発作発現自体に与える中枢神経系サイトカインの影響についての研究を行ってきた。それによって種々のサイトカインの中でも IL-1 $\beta$  は温熱誘発痙攣の発作発現を促進し、逆に IL-6 および IL-10 は発作発現を抑制することを明らかにした。

### 2. 研究の目的

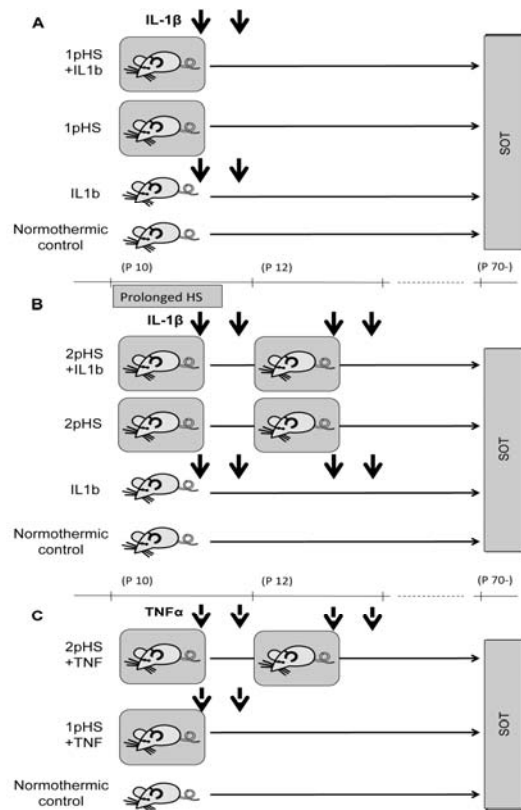
そこで本研究では上記動物モデルを改修し、遷延性熱性痙攣の動物モデルを作成した。この遷延性温熱誘発痙攣モデルを用いて、乳幼児期の遷延性熱性痙攣が内側側頭葉てんかんの原因となるのか、また代表的炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$  と TNF $\alpha$  を用いて、幼弱脳での炎症性サイトカインは内側側頭葉てんかん発症に影響を及ぼすのかについての検討を行った。

### 3. 研究の方法

実験 1：ヒトの乳幼児期にあたる日齢 10-15 の Lewis 雄性ラットを使用した。麻酔鎮静下に頭部を定位脳固定装置に装着し、右側海馬に深部脳波電極を挿入し、後頭葉硬膜上にも脳波電極を装着した。Baram 等の方法に準じて、温熱負荷装置 (Air-Therm ATX; World Precision Instruments Ltd.) にて持続的に安定した温熱負荷を行った。温熱負荷装置内の温度は 40.0-41.5 $^{\circ}$ C に調節した。発作開始から 30 分間温熱負荷を続け、断続的および持続的な発作の持続時間を積算し、これを遷延性温熱誘発痙攣 (prolonged hyperthermia-induced seizure: pHs) モデルとした。

実験 2：日齢 10 のラットを、pHS を 1 回誘発する群 (1pHS 群)、pHS 誘発直後と翌日に IL-1 $\beta$  (500ng) を点鼻投与した群 (1pHS+IL1 $\beta$  群)、IL-1 $\beta$  点鼻のみを行った群 (IL1 $\beta$  群)、および対照群の 3 群に分けた。実験 1 と同様にラットを 40.0-41.5 $^{\circ}$ C の温熱負荷装置に留置し持続的に発作を誘発し、発作発生から 30 分間温熱負荷を持続した。発作誘発後

は加温装置よりラットを取り出し 36 $^{\circ}$ C 台までの復温を確認した。その後 Galic 等の方法に従い、日齢 70 日にカイニン酸 15mg/kg を腹腔内投与し seizure onset time (SOT: Racine score 3 出現までの時間) を測定し、成熟期での痙攣準備性の指標とした。次に同様に日齢 10 のラットを、日齢 10 と 12 に pHs を誘発する 2 回群 (2pHS 群)、日齢 10 と 12 の pHs 誘発直後と翌日に IL-1 $\beta$  (500ng) を点鼻した群 (2pHS+IL1 $\beta$  群)、IL-1 $\beta$  点鼻のみを行った群 (IL1 $\beta$  群)、および対照群に分けた。上記と同様に持続的に発作を誘発し、日齢 70 日に SOT を測定した。更に同様に日齢 10 のラットを、日齢 10 と 12 に pHs を誘発し発作直後と翌日に TNF $\alpha$  (2mg) を点鼻した群 (2pHS+TNF 群)、日齢 10 に pHs を誘発し発作直後と翌日に TNF $\alpha$  (2mg) を点鼻した群 (1pHS+TNF 群)、および対照群に分けた。これまでと同様に持続的に発作を誘発し、日齢 70 日に SOT を測定した。

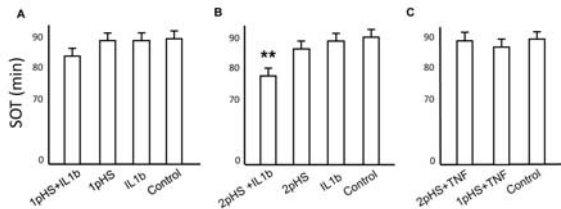


### 4. 研究成果

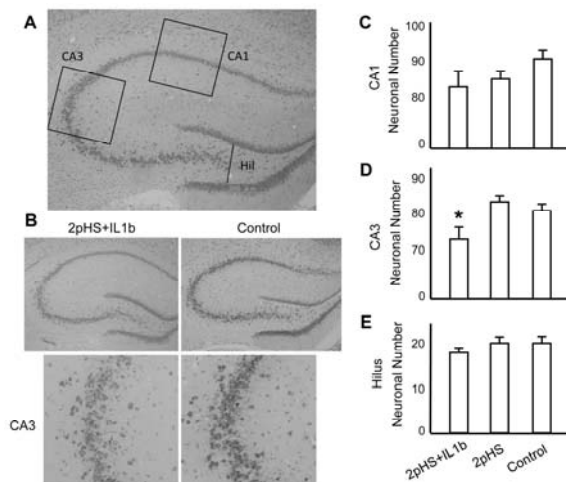
実験 1：持続的な温熱負荷により全てのラットではほぼ同様の発作が認められた。発作は繰り返し出現する動作停止や顔面痙攣から始まり、徐々に全身を伸展させて体位保持不能となるパターンで、脳波上で発作波は海馬から先進して記録された。発作出現時の中心部体温は 40.2 $\pm$ 0.2 $^{\circ}$ C であり、累計発作時間は 20-23 分であった。

実験 2 : 1pHS 群および 1pHS+IL1b 群の SOT は、対照群の SOT に比して有意差は認められなかった。次に 2pHS+IL1b 群の SOT は  $76 \pm 3$  分 (mean  $\pm$  SE) であり、対照群の  $92 \pm 3$  分に比し有意に短縮したが ( $p=0.008$ )、その他 2pHS 群と IL1b 群の SOT は対照群と比し有意差は認められなかった。最後に 2pHS+TNF 群および 1pHS+TNF 群の SOT は、対照群の SOT に比して有意差は認められなかった。

また上記結果で有意差を認めた 2pHS+IL1b 群を用いて、日齢 70 で海馬の病理学的評価



を行ったところ、CA3 領域では対照群に比して有意な錐体細胞の減少が認められたが ( $74 \pm 3$  vs.  $80 \pm 3$  cell;  $p = 0.038$ )、CA1 および Hilus 領域では有意差は認められなかった。



【考察】ラットを用いた研究で、幼弱期の末梢での炎症は長期にわたり痙攣準備性に影響を及ぼすとの報告がある。幼弱ラット (日齢 14) を用いた rapid kindling モデルでの検討では、Lipopolysaccharide (LPS) を投与されたラットでは rapid kindling は促進され、この効果は IL-1 receptor antagonist により打ち消されると報告されている。一方、同様にラットを用いた研究で、幼弱期 (日齢 14) の LPS 投与により成人期の痙攣準備性は亢進し、この亢進は TNF- $\alpha$  抗体の脳室内投与で抑制されとの報告がある。また同様に幼弱期に TNF  $\alpha$  を脳室内投与することにより、成熟期の痙攣閾値は低下すると報告されている。このように幼弱期の炎症性変化は、IL-1  $\beta$  や TNF  $\alpha$  を介する機序で成人期の神経細胞興奮にも影響を及ぼすとの基礎的知見がある。つまりヒトでも、幼弱

期の病的な炎症性サイトカイン産生は、幼弱期の痙攣準備性のみならず成人期のおてんかん原性にも影響を及ぼす可能性がある。

ヒトでのサイトカイン遺伝子プロモーター領域の機能変化を伴う遺伝子多型の研究では、IL-1  $\beta$  の *IL1B* -511T アレルは熱性痙攣重積の既往を持つ内側側頭葉てんかんの患者で有意に高いと報告されている。この多型は IL-1  $\beta$  の産生促進に関与すると考えられており、熱性痙攣重積の既往を持つ内側側頭葉てんかんの患者は IL-1  $\beta$  を産生し易い素因をもつ可能性がある。幼弱ラットを用いた研究では、遷延性温熱誘発痙攣後には海馬での内因性 IL-1  $\beta$  の産生が増加し、48 時間後には前値に復するとの報告がある。これらの研究結果は、熱性痙攣重積時に IL-1  $\beta$  を過剰産生してしまう児では、内側側頭葉てんかんを発症し易い可能性を示唆する。

今回の幼弱ラットを用いた遷延性温熱誘発痙攣モデルでは、遷延性痙攣誘発後の IL-1  $\beta$  投与により成熟期の痙攣準備性は亢進したが、TNF  $\alpha$  投与による影響は認められなかった。これらのサイトカインは中枢神経系ではグルタミン酸受容体を介した作用も有すると報告されている。グルタミン酸は中枢神経系における興奮性神経伝達物質であり、てんかん原性や記憶の形成に重要な long-term potentiation に関与する重要な物質である。動物実験での知見では、温熱負荷によりグルタミン酸はラット後頭部皮質の細胞外液で増加し、温熱誘発痙攣を発生させる因子となり、更にグルタミン酸は特殊な状態下でその受容体を過剰に活性化し、結果的に神経細胞を死に至らしめる場合もある。グルタミン酸受容体は、NMDA 型、カイニン酸型、AMPA 型のイオンチャネル型受容体と、代謝型受容体に大別される。IL-1  $\beta$  は NMDA 受容体のアゴニストであり、ラットの海馬神経細胞内への Ca 流入を促進し、ギンドリング形成にも関与すると報告されている。また幼弱ラット温熱誘発痙攣モデルを用いた研究でも、温熱誘発痙攣ギンドリング現象は NMDA 受容体機能を介して形成されると報告されている。これに対して培養海馬神経細胞を用いた研究では、TNF  $\alpha$  は AMPA 受容体の神経細胞表面への移動を促進させ、グルタミン酸による細胞障害、過剰な細胞内 Ca 流入、更には神経細胞死を惹き起こすと報告されている。本研究での IL-1  $\beta$  と TNF  $\alpha$  投与による結果の差異は、遷延性温熱誘発痙攣モデルでの成熟期の痙攣準備性亢進には、AMPA 受容体ではなく NMDA 受容体機能の関与が重要であることを示唆する。

今回の研究は、IL-1  $\beta$  を過剰に産生してしまう素因を持つ乳幼児では、繰り返す熱

性痙攣重積は成人期での痙攣原性の亢進やてんかん原性の形成、更には内側側頭葉てんかん発症にも関与する可能性を示唆すると思われた。今後は同動物モデルを用いて、長時間脳波検査を用いたてんかん原性の評価、更には治療的介入の可能性についての検討を続ける必要がある。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① Hino H, Takahashi H, Suzuki Y, Tanaka J, Ishii E, Fukuda M. Anticonvulsive effect of paeoniflorin on experimental febrile seizures in immature rats: possible application for febrile seizures in children. PLoS ONE (査読有) 7;2012:e42920.
- ② 福田光成. 発熱とけいれんのメカニズム. 小児科診療 (査読無) 76;2012:873-878.
- ③ 福田光成、日野ひとみ、鈴木由香、菊池知耶、森本武彦、石井榮一、後天性てんかん原性獲得にかかわる中枢神経系サイトカインの役割—幼弱ラット温熱誘発痙攣重積モデルでの検討—、てんかん治療研究振興財団研究年報 (査読無) 23;2012:31-36.

[学会発表] (計5件)

① Fukuda M, Hino H, Suzuki Y, Kikuchi C, Morimoto T, Ishii E. Postnatal interleukin-1 $\beta$  enhanced adulthood seizure susceptibility after prolonged experimental febrile seizure in infantile rats. 12th International Child Neurology Congress - 11th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology. June, 1, 2012, Brisbane, Australia.

② Hino H, Takahashi H, Suzuki Y, Kikuchi C, Tanaka J, Ishii E, Fukuda M. Paeoniflorin suppresses experimental febrile seizures and inhibits glutamate-mediated neuronal excitability and neuronal death. 12th International Child Neurology Congress - 11th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology. June, 1, 2012, Brisbane, Australia.

③ 福田光成、日野ひとみ、鈴木由香、菊池知耶、森本武彦、石井榮一. 後天性てんかん原性獲得にかかわる中枢神経系サイトカインの役割. てんかん治療研究振興財団 研究助成報告会. 2012年3月8-9日. 大阪

④ 福田光成. 熱性けいれんの臨床と病態生理. 平成23年度温熱生理研究会. 2011年9月1日. 岡崎

⑤ 福田光成、日野ひとみ、鈴木由香、菊池知耶、森本武彦. IL-1 $\beta$ は成人期の痙攣準備性を促進させる—幼弱ラット温熱誘発痙攣重積モデルでの検討—. 第45回日本てんかん学会. 2011年10月6-7日. 新潟

[図書] (計1件)

- ① 福田光成、熱性けいれんと憤怒けいれん、中山書店、子どものけいれん・てんかんガイド、2013年160-165.

[その他]

ホームページ等

<http://www5.m.ehime-u.ac.jp/pediatrics/index.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

福田 光成 (Fukuda Mitsumasa)  
愛媛大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号：80274330

##### (2) 研究分担者

鈴木 由香 (Suzuki Yuka)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・寄附講座准教授  
研究者番号：00304634  
江口 峰斉 (Eguchi Minenari)  
愛媛大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：50420782  
田中 潤也 (Tanaka Junya)  
愛媛大学・プロバイオ医学研究センター・教授  
研究者番号：70217040