様式Ｃ－１９

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２４年　５月　１５日現在

機関番号：１７１０２
研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2009～2011
課題番号：21591114
研究課題名（和文）　局所皮質異形成ラットのてんかん原性獲得には皮質ネットワークが関与する
研究課題名（英文）　Cortical network is responsible for the acquisition of epileptic activity in pre-natal focal cortical dysplasia model
研究代表者
重藤　寛史（SHIGETO HIROSHI）
九州大学・大学病院・講師
研究者番号：50335965

研究成果の概要（和文）：胎児脳に冷却損傷を与え両側皮質に異形成を作成したラットでは海馬から生じる自発てんかん発作を生じた．免疫染色定量評価では，皮質異形成部のグルタミン受容体興奮性の増大に続いて海馬のグルタミン受容体興奮性の増大を認め，Phase locking 解析では異形成部と海馬の同期性が発作前に増加した．これらは，皮質－海馬のネットワークを介して海馬の興奮性が経時的に増大していくことを示唆していると考えられた．

研究成果の概要（英文）：Applying freeze lesioning in the bilateral frontoparietal lobes during the prenatal period, we developed a cortical dysplasia rat model that can show spontaneous temporal lobe seizures. Immunohistochemical examinations using semiquantitative densitometry revealed the glutamine hyper-excitability at dysplasic lesion accelerate the hippocampal excitability. Phase locking analysis between dysplasic lesion and hippocampus showed the increment of synchronization between these two structures before the start of hippocampal seizure. These findings suggest the excitability in hippocampus increases gradually via the network between cortical dysplasia and hippocampus.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
２００９年度	2,200,000	660,000	2,860,000
２０１０年度	600,000	180,000	780,000
２０１１年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総　計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学
キーワード：てんかん・皮質異形成・ネットワーク・グルタミン酸受容体・脳波・臨床神経生理学

様式Ｃ－１９

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

１．研究開始当初の背景

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ヒトにてしばしば認められ，異常な皮質構築を特徴として時に異常な細胞も認められる．ヒトの異形成の新皮質より摘出した脳のスライスを用いた In vitro の研究では，内因性の興奮性の存在が証明されている．また，MRI で認められた異形成の皮質より脳波記録や脳磁図の記録にて内因性のてんかん原性が明らかにされている．さらに，異形成部に挿入した脳波記録では発作期や発作間欠期のてんかん性放電が認められている．しかしながら，明らかに神経学的な異常を有していない症例においても局所皮質異形成が MRI で認められることもある．このように，局所皮質異形成のてんかん原性に対する機序は未だよく分かっていない．我々は以前の報告で，出生前の胎児期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る新たな局所皮質異形成ラットモデルを作製した．このモデルの局所皮質異形成では，著明な皮質の層構造異常を伴っており，樹状突起や軸索の方向性も失われていた．さらに，シャム手術の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，さらには海馬てんかん獲得が有意に早い段階で完成した．今回の研究において，我々は胎生期後期のラットの両側頭蓋に凍結損傷を与えることによって両側の大脳半球に局所皮質異形成を有する新しいラットモデルを作製した．

２．研究の目的

この研究の目的は，前頭葉の皮質異形成病変が，どのように興奮性の増大をもたらし，何故海馬で易てんかん性が生じるのかを明らかにすることである．

３．研究の方法

Sprague-Dawley（SD）ラットの妊娠 18 日目にペントバルビタール（50mg/kg，腹腔内投与）にて全身麻酔．リドカインによる局所麻酔を下腹部皮膚，腹直筋，腹膜に行ったのち，腹部を縦に切開し，両側の子宮を部分的に腹腔内から取り出した．直径 2.3 mm の半球性の先端を持った金属性のプローブを子宮壁外から 4 秒間，ラット胎児の頭蓋部に接触させた．手術後，子宮を腹腔内に戻し，0.9% 生理食塩水で腹腔内を満たした．腹膜，筋層，皮膚を縫合し，母ラットをケージに戻し，麻酔から覚醒するまで保温した．母ラットは出産まで通常通りに飼育した．子ラットは胎生 22 日目で出生し，出生後 28 日目まで母ラットに飼育された．

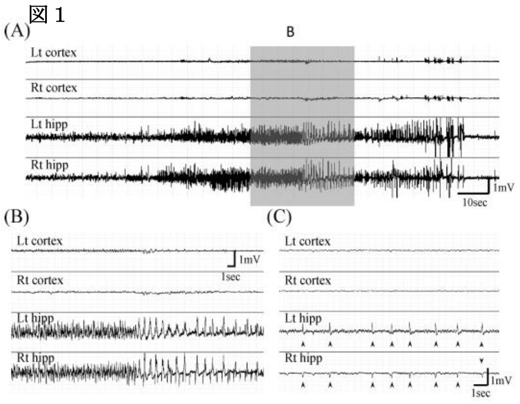
子ラットは以下のように分類した：グループ A；それぞれの大脳半球に縦方向に 2 ヶ所の病変，14 匹)，グループ B：胎生期に凍結損傷を与えないが、グループ A と同様の位置に偽凍結損傷を与えた（11 匹）．グループ A はさらに 2 つのグループに分類；グループ A1 は出生後 77 日目まで脳波記録を実施した群（9 匹），グループ A2 は、脳波記録を実施せずに出生 28 日目でサクリファイスされた（5 匹）．グループ B も 2 つのグループに分類；グループ B1 は出生後 77 日目まで脳波記録(6 匹)，グループ B2 は脳波記録なしに出生後 28 日目でサクリファイスした．すべての実験は九州大学動物実験ガイドラインに沿って行い，使用動物数と動物の苦痛を最小限にするように計画した．

ニクロム線を（直径 0.2 mm）をねじって 2 重にしたものを深部記録電極として，両側の前内側部（ブレグマから 2 mm 前方，正中から 4 mm 外側，皮質表面から 1 mm 深部）と両側海馬 C3 領域（ブレグマから 4 mm 後方，正中から 5 mm 外側，皮質表面から 5.5 mm 深部）に定位的に埋め込んだ．基準電極としてねじ電極を前頭骨に設置した．グループ A1，B1 にて出生後 35 日目から 77 日目までの間，3 日間毎に 12 時間，脳波とビデオにてラットの脳波と行動を記録した．

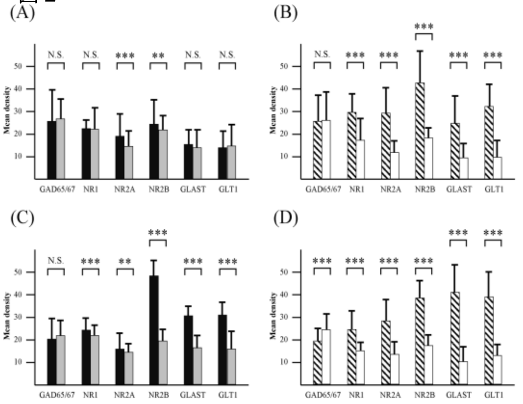
組織学的および免疫組織科学的検討を行うために、グループ A2 と B2 は出生後 28 日目でサクリファイスされ，グループ A1、B1 は脳波記録後の出生後 78 日目でサクリファイスされた．組織は 4μm 毎に切片を作成しヘマトキシリン-エオジン（HE）染色とクルーバー-バレラ（KB）染色を行った．glutamic acid decarboxylase 65/67（GAD65/67)、NMDAR1（NR1)、-2A（NR2A)、-2B（NR2B)、glutamate/aspartate transporter（GLAST)、glial glutamate transporter 1（GLT1)で免疫染色を行い，Image J version 1.43u software for Windows （based on NIH Image; Wayne Rasband, NIH, Maryland, USA）を用いたデンシトメトリーによる半定量的解析を行った．グループ A1，A2，B1，B2 それぞれのラット 5 匹の海馬 C1 と C3 領域から錐体細胞または細胞間領域を選択した（GAD 65/67, n=170 細胞; NR1, NR2A, NR2B, n=250 細胞; GLAST and GLT1, n=100 領域）．同様に，各グループのラット 5 匹に対しグループ A1，A2 からは皮質異形成部，グループ B1，B2 からは正常皮質の細胞または細胞間領域をそれぞれ選択した．GAD65/67，NR1，NR2A，NR2B 染色に対しては，核を除いた細胞質の濃度を測定して正常皮質下白質の濃度を標準化の

ために引き算した．GLAST と GLT1 染色に対しては，それぞれ約 5000 ピクセルの領域の濃度を測定して，同様に標準化のために正常皮質下白質の濃度を引き算した．比較には Unpaired t 検定を用いた．
海馬と皮質異形成部のてんかん性活動の関連をみるために，発作前 2 分～発作終了後 2 分までの左皮質異形成部（Ch1），右皮質異形成部（Ch2），左海馬（Ch3），右海馬（Ch4）の深部電極の活動を抽出し，Phase lag index (PLI)を用いて，10 秒間のエポック毎，周波数(2-40Hz)毎にチャンネル間の同期を評価した．

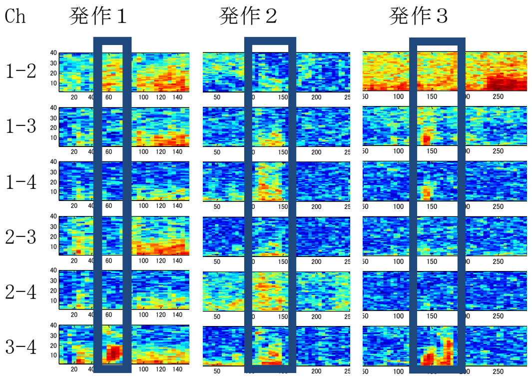
４．研究成果
（１）グループ A1 の 9 匹中 7 匹のラットにおいて出生後 47～72 日目の間に計 15 回の自発性の海馬発作がみられた．脳波上，自発性海馬発作のてんかん性放電は両側の海馬に限局していて皮質には及んではいなかった（図１A および B）．自発発作はグループ B ではみられなかった．脳波上の海馬発作時の臨床的な発作症状は，長時間持続する無動，口周囲の動き，強く体幹全体を振るわせる動きが観察され，痙攣はみられなかった．

図１


（２）組織切片では HE および KB 染色にて皮質形成異常が認められ，皮質の層構造は完全に破綻しており，極性を失った様々なサイズの神経細胞群がこの領域においてみられ，異所性の皮質が時にみられた．異常部位に近接する内側と外側の皮質はともに正常な皮質構造を呈していた．Binucleated neurons、balloon cells、dysmorphic neurons といった異常細胞は認められなかった．海馬では著明な異常はみられなかった．発作を起こしたラットと起こさなかったラットの皮質の病変と海馬において有意な違いはみられなかった．
（３）免疫染色による半定量では，コントロールラットと比較して，グループ A2 のラットの海馬にて NR2A と NR2B の染色強度が有意に上昇していたが，GAD 65/67，NR1，GLAST，GLT1 の染色強度に違いはみられなかった（図 2A；NR2A：p ＜ 0.0001；NR2B：p ＜ 0.01）．A1 のラットでは海馬の NR1，NR2A，NR2B，GLAST，GLT1 の染色強度が有意に上昇していたが（図 2B；p ＜ 0.0001），GAD 65/67 の染色強度に違いはみられなかった．グループ A2 ラットの皮質異形成部において NR1，NR2A，NR2B，GLAST，GLT1 の染色強度が有意に上昇していたが（図 2C；NR1，NR2B，GLAST and GLT1：p＜0.0001；NR2A：p＜0.01），GAD 65/67 の染色強度に違いはみられなかった．グループ A1 ラットの皮質異形成部において NR1，NR2A，NR2B，GLAST，GLT1 の染色強度が有意に上昇していた（図 2D；p ＜ 0.0001）．

図２


（４）Phase locking 解析では，発作前に皮質異形成部と海馬が同期して活動する現象がみられ，海馬発作時には両側海馬の同期が見られた（図３）．

図３


（結論）胎児脳に冷却損傷を与え，両側皮質に異形成を作成したラットでは，海馬から生じる自発てんかん発作を生じ，症候はヒト側頭葉てんかんに酷似していた．免疫染色定量評価では，生後 28 日では皮質異形成部のグルタミン受容体興奮性と GLAST,GLT1 の増大および海馬のグルタミン受容体興奮性の増大を認め，生後 78 日目ではこれらの増大がより顕著となり，海馬では生後 28 日目では認めなかった GLAST,GLT1 の増大も認めるよ

うになった．Phase locking 解析では異形成部と海馬の同期性が発作前に増加する現象がみられた．これらは，前頭葉に皮質異形成が存在することにより皮質－海馬のネットワークを介して海馬の興奮性が経時的に増大していくことを示唆していると考えられた．

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 23 件）
① 重藤寛史：神経内科医としてのてんかん診療．臨床神経 査読あり 51：661-668，2011.
② 重藤寛史：てんかんの初期診療と最近のトピックス．福岡医学雑誌 査読あり 102：195-202，2011.
③ 松山友美，重藤寛史，佐竹真理恵：高齢初発非けいれん性全般てんかん重積状態の１例．臨床神経　査読あり 51:43－46，2011
④ Shigeto H, Sakata A, Morioka T, Takase K, Hagiwara K, Kamada T, Kanamori Y, Hashiguchi K, Tobimatsu S, Yamashita N, Kira J：Peri-orbital electrodes as a supplemental recording for detection of ictal discharges in medial temporal lobe epilepsy. Neurology Asia 査読あり 16：303-3-7，2011.
⑤ Hagiwara K, Okamoto T, Shigeto H, Ogata K, Somehara Y, Matsushita T, Kira J, Tobimatsu S. Oscillatory gamma synchronization binds the primary and secondary somatosensory areas in humans. Neuroimage 査読あり 51：412-420，2010.
⑥ Samura K, Morioka T, Hashiguchi K, Miyagi Y, Shigeto H, Sakata A, Tanaka S, Sasaki T：Temporal lobe epilepsy associated with ‘triple pathology’ of hippocampal sxlerosis, focal cortical dysplasia and cavernoma in the ipsilateral frontal lobe. Epilepsy & Seizure 査読あり 2：34-41，2009.
⑦ Takase K, Shigeto H, Kamada T, Ohyagi Y, Kira J：Efficacy of mediodorsal thalamic nucleus stimulation in a rat model of cortical seizure. Fukuoka Igaku Zasshi 査読あり 100：274-280，2009.
⑧ Takase K, Shigeto H, Suzuki SO, Kikuchi H, Ohyagi Y, Kira J：Cortical kindling in a focal freeze lesion rat model. J Clin Neurosci. 査読あり 16：94-98，2009.

〔学会発表〕（計　79 件）
① 重藤寛史ら，自発てんかん発作を有する皮質異形成ラットモデルの組織学的検討．九州山口てんかん外科研究会，2012.2.4 福岡　タカクラホテル
② 重藤寛史，実験てんかん－臨床へのフィードバック．Kyushu Neuroscience Conference，2011.9.30 福岡　都ホテル
③ 鎌田崇嗣ら，自発てんかん発作を有する両側皮質異形成ラットモデルの作成とその免疫組織化学的検討．日本神経学会総会，2011.5.19 名古屋国際会議場
④ Kamada et al，Occurrence of spontaneous seizure activity in a bilateral prenatal freeze-lesion rat model. American Epilepsy Society 64 rd annual meeting，2010.12.7 San Antonio USA
⑤ 鎌田崇嗣ら，両側皮質異形成ラットで認めた自発性てんかん性放電．日本てんかん学会学術集会，2010.10.14　岡山
⑥ 鎌田崇嗣ら，両側皮質異形成ラットモデルの自発性てんかん性放電の有無の検討．日本神経学会総会，2010.5.19 東京国際フォーラム
⑦ Takase et al，Prenatal freeze lesioning produces epileptogenic focal cortical dysplasia. American Epilepsy Society 63 rd annual meeting，2009.12.4-8 Boston USA
⑧ 高瀬敬一郎ら，ラット胎生期に作製した局所皮質異形成モデルにおけるてんかん原性の検討（Juhn and Mary WADA 奨励賞受賞講演）2009.10.22-23 日本てんかん学会学術集会　弘前
⑨ 萩原綱一ら，Phase-locking value を用いた 1 次･2 次体性感覚野の機能的連関の評価. 日本生体磁気学会, 2009. 5.28-29 日本生体磁気学会　金沢
⑩ Kanamori et al，APPLICATION OF MINIMUM NORM ESTIMATION TO THE ANALYSIS OF INTERICTAL EPILEPTIC DISCHARGES: COMPARING WITH RECORDING OF ELECTROCORTICOGRAM. Asian and Oceanic congress of clinical neurophysiology，2009.4.15-18 Seoul Korea

〔図書〕（計 1 件）
① 重藤寛史，吉良潤一：てんかんのビデオ脳波モニタ．別冊医学のあゆみ　てんかん治療 Update―研究と臨床の最前線　辻貞俊編　総 154 ページ(内 104-109)　医歯薬出版社　東京, 2011.

〔産業財産権〕
○出願状況（計０件）
○取得状況（計０件）

〔その他〕
ホームページ
http://www.med.kyushu-u.ac.jp/neuro/

６．研究組織
(1)研究代表者
　重藤　寛史（SHIGETO HIROSHI）
　九州大学・大学病院・講師
　研究者番号：50335965

(2)連携研究者
　鈴木　諭（SUZUKI SATOSHI）
　九州大学・大学院・医学研究院・准教授
　研究者番号：90294917

　岡本　剛（OKAMOTO TSUYOSHI）
　九州大学・大学院・医学研究院・准教授
　研究者番号：90432913

　高瀬　敬一郎（TAKASE KEI-ICHIRO）
　九州大学・大学院・医学研究院・講師
　研究者番号：00467903

　鎌田崇嗣（KAMADA TAKASHI）
　九州大学・大学病院・学術研究員
　研究者番号：70614460

　上原　平（UEHARA TAIRA）
　九州大学・大学病院・臨床助教
　研究者番号：30631585