

## 学位論文の要旨

学位の種類： 課程博士

氏名： 津田宏重

学位論文題目： A Neonatal Rat Model of Cortical Dysplasia  
(新生児ラットにおける皮質形成異常モデル)

共著者名： 橋詰清隆、澤村 淳、松尾厚子、田中達也

### Brain Research 投稿中

研究目的：

神経画像診断の発達に伴い、難治性てんかん患者で皮質形成異常が発見されることが多くなり、外科的に治療可能なてんかん症候群として近年注目されているが、その治療成績は未だに満足すべきものではない。皮質形成異常のてんかん原性については、病変内の異常な神経細胞がてんかん原性を有すると言われているが、病変周辺の正常神経細胞の役割については解明されていない。このため、皮質形成異常のてんかん原性の機序を解明するには、より基礎的なアプローチが必要である。皮質形成異常のてんかん原性を研究する上では、常に一定の形成異常を持ち、自発けいれん発作が出現することが望ましいが、両方を満たすモデルはこれまでにはないのが現状である。そこで我々はその両方の条件を満たすモデルを作成するために、新生児ラットの大脳皮質内にアミノ酸興奮性物質であるカイニン酸を微量注入し、大脳皮質形成異常のモデルを作成し、病理組織学的、電気生理学的に検討した。

材料・方法

生後 0~2 日の新生児ラット 43 匹を用いた。ハロセン吸入麻酔下に新生児ラットはの頭部をあらかじめ作成した石膏型に固定した。Bregma より lateral 3mm、anterior 2mm の部位に 27G の注射針を用いて頭皮上から頭蓋を穿孔した。注射針は 1 分間留置した後に抜去することで、ほとんど出血なしに頭蓋を穿孔できた。注入針は、外径 0.6mm のステンレスパイプ内に外径 0.3mm のステンレスパイプを先端が 3mm 露出するように入れてハンダ固定したものを用い、定位手術装置を用いて頭皮から 3mm 刺入して固定した。カイニン酸はリン酸緩衝液 (pH8.0) で溶解し、 $1.0\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、 $2.0\mu\text{g}/\mu\text{l}$  の 2 種類の濃度溶液を作成し、マイクロシリンジで  $0.5\mu\text{l}$  を約 1 分間かけて注入した。注入後カイニン酸の拡散を待つために 3 分間留置してから注入針を抜去した。カイニン酸注入後は、急性のけいれん発作の有無を確認するために約 1 時間、肉眼的に観察した。その後は母ラットと共に飼育箱で飼育した。離乳期の過ぎる約 3 週間は母ラットと共に飼育し、その後は個別に飼育した。カイニン酸注入の 1 ヶ月後 9 匹、2 ヶ月後 21 匹のラットをネンブタール深麻酔下で生理食塩水、10%ホルマリンで灌流固定した後に脳を

摘出した。摘出した脳は冠状断で薄切して病理標本を作成し、H-E 染色、cresyl violet 染色で観察した。5 匹のラットは約 6 ヶ月後にネンブタール麻酔下に、双極電極を sensory motor cortex での medial と lateral の部位及び対側の medial の位置に刺入し、術後 1 週間以上経過してからデジタルビデオ EEG モニタリング装置にて行動及び脳波を観察した。

#### 成績

カイニン酸 0.5 $\mu$ g、1.0 $\mu$ g いずれの群でも注入後約 20 分後に全ての新生児ラットにけいれん発作を認めた。発作は、対側の下肢から始まる場合や腹部から始まる場合があり、それが全般化して四肢の tonic seizure や clonic seizure、また人の新生児で見られるベダルを踏むような発作を認めた。この発作は約 24 時間観察された後消失した。その間に発作重積状態となり死亡したラットは 43 匹中 3 匹認めた。原因は不明だが、注入翌日までに母ラットに食べられていたラットは 10 匹であった。生存した 30 匹のラットは 1~2 ヶ月そのまま成長させたが、その間にラットに明らかな自発けいれん発作は観察されなかった。1 カ月後のそれぞれ 3 匹ずつ、2 カ月後は 0.5 $\mu$ g 注入した 5 匹の脳の病理所見（肉眼的所見、H.E 染色、cresyl violet 染色）を検討した。肉眼的には、大脳皮質の表面にわずかにメチレンブルーに青く染まる部位があり、カイニン酸の注入部位が確認できた。カイニン酸を 1.0 $\mu$ g 注入したものには、皮質内に Freeze-lesion モデルのように注入した部位に pseudo gyrus は認めなかったが、注入針による空隙を認めるものもあった。カイニン酸を 0.5 $\mu$ g 注入したものの 8 匹中 3 匹に freeze resion モデルのような pseudo gyrus を認めた。また全てのモデルの注入部位周囲においては大脳皮質の神経細胞の層構造が不規則に乱れていた。乱れた層構造を構成している神経細胞の中には核が濃染しているもの (pyknosis) や奇異な形態の神経細胞を認め、その極性も乱れていた。注入部位の反対側にはそのような所見は認めず、カイニン酸を注入した部位に大脳皮質の形成異常を認めた。Palmini による皮質形成異常の分類では、type II であった。1 カ月後と 2 カ月後との病理組織学的な変化として、脳自体の成熟度以外に病理学的な違いはみられなかった。ビデオモニタリングでは、注入部位と思われる sensory motor cortex に間歇的に slow な spike and wave と spike burst が多発性に見られた。その burst は同側の内側の sensory motor cortex や対側にも及ぶこともあったが、臨床的な発作は出現しなかった。

#### 考案

新生児ラットの脳は、生後でも neural migration は終了しておらず、生後 0~2 日目が、人の neural migration が起こる胎生 18 週~24 週にあたるといわれている。カイニン酸がラットの大脳皮質内に確実に注入されていること、注入部位の周囲に大脳皮質形成異常が認められることより、カイニン酸注入直後の全身けいれんは、大脳皮質局所ので

んかん性興奮が速やかに2次性全般化したものと考えられた。幼若な脳はてんかん原性閾値が低く全般化しやすいことも直後から全身けいれんに至った原因と考えられた。そして、その神経細胞の過剰興奮の結果、新生児の大脳皮質で正常な migration が障害され、lamination の異常や異常な神経細胞の出現による皮質形成異常が形成されたと考える。ラットが成長した6ヶ月間は自発けいれん発作を認めなかったが、それは皮質形成異常における神経細胞の興奮が局所内で小さいため、発作を起こすまでには至らなかった可能性がある。また、げっ歯類は皮質が人と比較して発達していないため、局所的な皮質形成異常では発作を起こすのにいたらないとも言われている。また人の大脳皮質形成異常でもその発症年齢を考えるとある程度成長しないと出現しないことより自発性発作の出現については今後の経時的な観察が必要であると考えられる。今後本モデルにおいて脳循環代謝や神経興奮、抑制機構を調べることによって皮質形成異常のてんかん原性が解明できる可能性を示した。

#### 結論

新生児ラットの大脳皮質にカイニン酸を局所注入することで、局所的な大脳皮質形成異常を作成することができた。カイニン酸の神経興奮作用により、その後の neural migration に異常をきたした結果と考える。

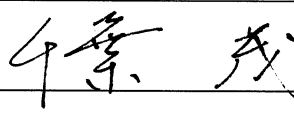

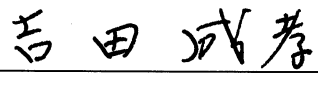

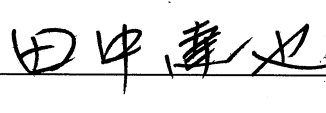

引用文献

P. Humphreys, G.D. Rosen, D.M. Press, G.F. Sherman, A.M. Galaburda Freezing lesions of the developing rat brain: A model for cerebrocortical microgyria. *Journal of Neuropathology and Experimental neurology* 50 (1991) 145-160

N.Chevassus-au-Lous, S.C. Baraban, J-L. Gaiarsa, Y. Ben-Ari Cortical malformations and epilepsy: New insights from animal models *Epilepsia* 40(1999) 811-821

F. Bartolomei, M. Gavarnet, C. Dravet, M. Guye. J.Y. Bally-Berard, P. Genton, C. Raybaud, J. Regis, J.L. Gastaut, Late onset epilepsy associated with regional brain cortical dysplasia *European Neurology* 42 (1999) 11-16.

## 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	津 田 宏 重
<p>審査委員長  </p> <p>審査委員  </p> <p>審査委員  </p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p style="margin: 10px 0;">A Neonatal Rat Model of Cortical Dysplasia</p> <p style="margin: 10px 0;">(新生児ラットにおける皮質形成異常モデル)</p>			
<p>目的：ヒト難治性てんかんの原因である皮質形成異常のてんかん原性メカニズムについては、未だに解明されていない。皮質形成異常の実験モデルに求められる条件として、常に一定の局在性皮質形成異常を認め、かつ、当該部位にてんかん原性が獲得されることが必要であるが、これまでに満足すべきモデルは報告されていない。本研究では、新しい皮質形成異常の実験モデルを作成することを目的に、新生児ラット（生後 0～2 日）の皮質内にカイニン酸を微量注入し、行動学的、電気生理学的、および組織学的検討を行った。</p> <p>方法：ハロセン吸入麻酔下で生後 0 日～2 日の新生児ラット(n=76)を 2 群に分けて、大脳皮質にカイニン酸 0.5 <math>\mu</math>g(n=58)または 1.0 <math>\mu</math>g(n=18)を注入した。Bregma より lateral 3.0 mm、anterior 2.0 mm の部位に 27G の注射針を用いて頭皮上から頭蓋を穿孔し、その後同部に直径 0.3 mm のステンレスパイプを頭皮から 3.0 mm 刺入してカイニン酸を注入した。</p>			

1 ヶ月後(n=6)および 2 ヶ月後(n=12)に、10%ホルマリンで灌流後、ラット脳を取り出して組織学的検討を行った。また、6 ヶ月後(n=5)に、脳波ビデオ同時モニタリングを行い、行動・脳波を観察した。

結果：すべてのラットにおいて、カイニン酸注入直後から約 24 時間まで全身けいれん発作が観察されたが、その後はこの発作は認められなかった。カイニン酸注入後の組織学的変化を 1 ヶ月後と 2 ヶ月後に検討したところ、カイニン酸注入部周辺の大脳皮質で神経細胞の層構造が不規則となり、同部位に異常な形態の神経細胞(dysplastic neuron)が出現していた。これらは、Palmini (1994) による大脳皮質形成異常の分類で grade II に相当していた。6 ヶ月以降の脳波では、棘波の群発(spike burst)が高頻度に認められた。

考察：本研究によって、新生児ラット大脳皮質へのカイニン酸局所注入が皮質形成異常をもたらすことが明らかになった。そのメカニズムとして、カイニン酸の神経興奮作用によってその後の神経細胞の移動や成熟(neuronal migration)に異常が生じた可能性が考えられる。本モデルでは、カイニン酸投与後 24 時間以降の臨床的観察ではてんかん発作を認めなかったが、生後 6 ヶ月の時点においても広範性に発作波の群発が認められた。したがって、今後は発達期における発作症状と脳波の詳細な研究を行い、本モデルのてんかん原性について関してさらに検討することが必要である。

なお、各審査委員は論文提出者に試問を行い、本論文の内容および関連領域に関して十分な回答を得た。以上より、本審査委員会は、本論文が医学博士の学位論文に値すると判定した。