自然発症てんかんラットの開発

芹川 忠 夫

京都大学医学部附属動物実験施設

目 次

I. はじめに	の半優性遺伝性
II. 研究内容	5. SER を用いた抗てんかん薬の長期投与
に対する新しい評価方法の検討：SER に
対するフェノバルビタール長期投与の
影響
1. 自然発症てんかんラット (SER) の作出	III. SER に関するその他の知見と展望
2. SER におけるてんかん発作の発症推移	IV. おわりに
3. zitter 遺伝子座のラット染色体第IV 連関
群へのあてはめ	
4. tremor ラットにおける欠神様発作とそ	

I. はじめに

これまで、てんかんの病態およびその治療方法については、多くの研究がなされてきた。これらの研究において、最も重要な課題の一つはヒトのてんかん発作に似たモデル動物を作成することにあった。その主なものは、脳の特定部位を刺激することによるてんかん焦点の形成や、薬物や強い音刺激などによるけいれん発作の誘発であった [6]。また、自然発症性にてんかん様の発作をおこす動物に発作が安定して得られるように処置が加えられ、研究に利用されてきた。すなわち、EI マウスにおいては、放り上げ刺激が [22, 23]、Genetically epilepsy-prone rat (GEPR) では、音刺激が [5]、繰り返し加えられた。けいれん発作を起こすミュータントマウスには、epf, sps, staggerer, weaver, lurcher, および quaking 等があり [6, 14]、スナネズミのてんかん発作もよく知られている。tottering マウス [11] には欠神様発作があることが報告されており、いくつかのラットコロニーにも、類似の発作を起こす動物が知られていた [13, 25, 26]。

本研究においては、自然に生じた2種の類似の表現型を持つミュータントから、交配によって、新たな特性を

もつ遺伝性の明確な自然発症てんかんラットが作出された。このラットの特性が明らかにされると共に、これを用いた抗てんかん薬の新しい評価システムが開発された。

II. 研究内容

1. 自然発症てんかんラット (SER) の作出

1980年に、京都大学医学部附属動物実験施設で全身性の振戦を発症する tremor ラットが近交系の作出過程にあった Kyo : Wistar ラットから発見された [28]。遺伝解析の結果、これは tremor (*tm*) と名付けられた常染色体の劣性遺伝子 *tm* によって発現すると推定された [27]。病理形態学的検査によって、振戦の他に、被毛と触毛の屈曲、精巣・卵巣の萎縮、および中枢神経組織における空胞形成が認められた。加えて、このラットは、高週齢になるとケージ内をあばれ回り、けいれん発作で倒れる異常な行動を現した [28]。

一方、旧西ドイツのハノーバーにある実験動物中央研究所の Dr. Rehm らは、1978年に SD 系ラットに由来する zitter ラットと名付けられた別の振戦ラットを発見した [12]。これは、zitter (*zi*) と名付けられた常染色体性劣性遺伝子によるミュータントであり、tremor ラットと同様に、触毛の異常と中枢神経組織の空胞形成が

Review : Development of the Spontaneously Epileptic Rat—Tadao SERIKAWA, Institute of Laboratory Animals, Faculty of Medicine, Kyoto University, Yoshida Konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan

本論文は第38回日本実験動物学会総会（1991年5月29日～31日、於 北海道大学）における第3回日本実験動物学会賞受賞講演の内容を要約したものである。

Table 1. Phenotypic characteristics of zitter rat and tremor rat

	Zitter rat (<i>zi/zi</i>)	Tremor rat (<i>tm/tm</i>)
Whisker	Bent	Curled
	Not discernible at birth	Discernible at birth
Hair	Normal	Waved hair
Gonad	Normal	Atrophied
CNS*	Vacuole	Vacuole
Tremor	Mainly at hind body from 2 weeks of age	At whole body from 2 weeks of age
Seizure	Flaccid paresis, with increasing age	Wild running, with increasing age

* Central nervous system

Fig. 1. Mating scheme of the production of SER

認められた。両性共に不妊ではなかったが、高週齢になると弛緩性の麻痺が現れた。

そこで、1983年に Dr. Rehm から *zitter* ラットの分与を受け、両者を比較研究することにした。Table 1 に、両者の表現型がまとめられている。*tm* 遺伝子と *zi* 遺伝子が同じ遺伝子座にあるのか否かを調べるため、また異なる遺伝子座のミュータントならば、これらを共にホモ型に持つダブルミュータントにおいて、新たな表現型を持った動物が得られることが期待されるので、以下の交配実験を行った [16]。

3匹の zitter ラットと *tm* 遺伝子についてヘテロと確認された雄とを交配して得られた41匹のラットはすべて

正常型であった。このことから、両遺伝子は、異なる遺伝子座にあることがわかった。そこで、ダブルミュータントを作出すべく、また両者の遺伝性を確認すべく、雌雄の F_1 動物を tm 遺伝子についてヘテロと確認されている tremor ラットと交配することによって、 F_1 ラットの中から雌4匹、雄2匹の tm 遺伝子についてヘテロ型の動物を選び出し、その雌雄を交配した。得られた165匹の F_2 動物を5週齢で振戦、触毛と被毛の異常、生殖器の萎縮の有り無しをもとに分類した。識別が不明瞭な tremor 表現型群とダブルミュータント表現型群を1群にまとめた、正常型群：zitter 表現型群：tremor およびダブルミュータント表現型群は、87：33：45（匹）

Fig.2. Behavior and EEG recorded from the left frontal cortex (CX) and left hippocampus (HPC) during the absence like seizure (A) and the tonic seizure (B)

となり、両遺伝子が独立遺伝すると仮定した $9(92.8):3(30.9):4(41.3)$ の比に適合した ($\chi^2=0.837$)。ダブルミュータント型の表現型を確かめるために、*zi* 遺伝子をホモに持つ F_2 ラットをランダム交配したところ、*zitter* ラットとは異なる表現型を持ったラットが得られた。この型のラットを1匹以上産んだペアの産仔成績をまとめると、*zitter* 表現型群：ダブルミュータント表現型群は、ほぼ $3:1$ (34匹:12匹) となった。これは、*zi* 遺伝子と *tm* 遺伝子が独立して遺伝していることを確認する結果であった。

このダブルミュータントは、後に述べるように成長するとてんかん様の発作を自然発症することから、Spontaneously Epileptic Rats (SER) と名付けられた。SERは、その後、Fig. 1 に示したように兄妹交配で継代され近交化が進められている。

2. SER におけるてんかん発作の発症推移

SER は、自然発症性にあるいはわずかな外来刺激によって、繰り返し発症する強直けいれんと行動を一時的に停止し、意識の低下を疑わせる欠神様の状態を現した (Fig. 2)。慢性記録電極を用いた大脳皮質と海馬の自発脳波の検査では、前者の発作時には、低振幅速波が、後者の発作時には $5-7$ Hz の棘徐波結合の群発放電が、おのおのの行動異常に一致して両部位から現れた (Fig. 2) [15, 18]。

21匹の雄と22匹の雌からなる43匹のSERを用いて、発作発現の時期、行動の変化、体重の推移および生存日齢を調べた [18, 20]。欠神様発作は、5週齢より一部のSERに認められ、7週齢以降すべての個体に発症した。発作の回数は、7週例で、 1.8 ± 1.4 回/分で、それ以降ほぼ同じ程度であった。1回当たりの持続回数は11週齢、15週齢でそれぞれ 4.2 ± 1.5 秒、 5.6 ± 3.7 秒であり、延長する傾向があった。強直発作は、自然発症するが、

息の吹きかけ、体に触れるといった軽度の外来刺激によっても、容易に誘発することができた。発症時には、突然上体が伸長した後、腰部、四肢の伸展が続く。この時、通常挙尾も見られた (Fig. 2-B)。その後、全身のものがき行動を示して、正常に戻った。発作の発現程度は、5分間隔で与えた拍手刺激による発作と自然発症性に生じた発作を集計して、評価した。6週齢で20例のうち2例に発症がみられ、週齢の増加とともに発症個体は増加した。12週齢以降では全ての個体に発症が見られた。5分毎の拍手刺激によって、発作が起こることが多く、0.2回/分であった。7週齢、15週齢における1回あたりの持続時間は、それぞれ 18.7 ± 8.7 秒および 21.0 ± 5.3 秒であり、ほぼ一定であった。

SER においては、2週齢頃から頭部に軽度の震えが観察され、3週齢までにすべての個体に強度な全身性の振戦が発症した。それ以降、振戦は徐々に軽度となり、12週齢頃においては明らかではなかった。これに反して、7週齢頃から一部の個体によるめき歩行が現れはじめ、12週齢頃にはすべての個体にこの行動異常が観察され、死亡時まで続いた。

SER は、離乳時頃から体重の増加傾向が小さく、10週齢では、対照動物の雌、 187.5 ± 8.5 g と、雄、 284.4 ± 10.5 g に対して、SER は雌、 178.9 ± 24.8 g と、雄 192.4 ± 14.7 g であり、有意に低値であった。平均生存週齢は雌で 14.0 ± 2.5 週齢、雄で 15.7 ± 2.2 週齢であった。3. zitter 遺伝子のラット染色体第 IV 連関群へのあてはめ

SER の形質発現に関与している *zi* 遺伝子と *tm* 遺伝子は、異なる遺伝子座にあることが、SER の作出過程における交配成績から推定された。本研究では、zitter ラットについて、標識遺伝子のタイピング、*zi* 遺伝子に連鎖する標識遺伝子の検索、および振戦、触毛の屈折、中枢神経組織の空胞形成の3つの表現型が同じ遺伝子に起因しているか否かについて調べられた [29]。利用した標識遺伝子座は、毛色遺伝子 5 座と生化学的遺伝子 30 座であった。検査に用いた zitter ラットは、ドイツから導入後、F8 代に至ったものであったが、すべての遺伝子座において、ホモの遺伝子型であった。zitter ラットが発見されてから、我々がこのラットを入手するまでに、5 年経過していることから、このラットの近交係数はかなり高いと思われた。zitter ラットとできるだけ多くの標識遺伝子型において異なる遺伝子型をもつ近交系ラットとして、BN/fMaiKyo と TM/Kyo を選び出した。これらの系統との間で、戻し交配実験を行い、*zi* 遺伝子に連鎖する標識遺伝子を検索した。*zi* 遺伝子型は、

Table 2. Genetic analysis for phenotypes of zitter rat: relationships among tremor, bent whiskers, and vacuoles in the CNS in backcross progenies

Backcross		Vacuole ¹		Whisker ²	
		+	-	+	-
(Zi x TM) x Zi	Tremor				
	+	34	0	32	2*
	-	0	48	0	48
	Vacuole				
	+			32	2*
	-			0	48
(Zi x BN) x Zi	Tremor				
	+	55	0		
	-	2	52		

¹+: presence, -: absence, ²+: bent, -: normal, Zi: zitter rat, *: The 2 individuals are the same.

振戦、触毛の屈折、および小脳における空胞形成の有り無しについてそれぞれ判別した。Table 2 に、その結果をまとめた。F₁ 動物には、いずれの *zi* 型突然変異表型もみられなかった。戻し交雑仔では、非振戦型で、小脳に空胞形成が認められた2個体と触毛は正常であるが、振戦と空胞形成が認められる2個体があったが、その他については振戦型の個体は、すべて空胞形成が認められ、非振戦型の個体には、その形態異常は認められなかった。

F₁ 動物と zitter ラット間で、その表現型が異なる9遺伝子座と小脳の空胞形成に基づく *zi* 遺伝子座との連鎖を調べた。(zitter x TM) x zitter と (zitter x BN) x zitter の交配実験において、*zi* と *Hao-1* (Hydroxyacid oxidase-1) 遺伝子座間では、組み換え型が109匹中10匹であり、両者は1%水準で有意に連鎖していることが見つかった。*Hao-1* と同様にラット染色体第 VI 連関群に属する *Sup-1* (精囊腺蛋白) を加えて3点テストをおこなって得られた組み換え価は、それぞれ、*zi* 対 *Hao-1* が 0.09、*zi* 対 *Sup-1* が 0.32 *Hao-1* 対 *Sup-1* が 0.28 であった。Cramer *et al.* の報告 [4] を加えると、*Sup-1*, *a*, *Hao-1*, *zi* の順序であると推定された。

ラットとマウス間の染色体の相同性を考慮して、*Hao-1*, *Sup-1*, *a* 遺伝子座が位置するマウス第 2 染色体の *zi* 遺伝子座に相当する領域を調べてみると、zitter ラットの表現型と関連性のある触毛や被毛の異常を現す *ro* (rough) と *we* (wellharrig) 遺伝子座が見つけられた (Fig. 3)。しかし、これらが *zi* 遺伝子と類似した他の表現型をもっているか否かについては、明らかではな

った。

この交配実験において、zitter ラットの振戦、触毛、空胞形成の3つの表現型が必ずしも一致して遺伝しなかったことから、これらの表現型は、一つの遺伝子座の多面発現ではなく、それぞれに関与する遺伝子が個別に隣接して存在している可能性が指摘された。

4. tremor ラットにおける欠神様発作とその半優性遺伝性

脳に固定電極を設置した2～3ヵ月齢の tremor ラットを用いた行動と脳波の同時検査によって、SER の起源となった tremor ラットにも SER と類似の欠神様発作があることが、明らかになった [17]。調べた6匹すべてのラットは振戦やけいれんを起こすことなく、時折、1～20秒間、急に不動の姿勢を示した。この欠神様行動に呼応して、大脳皮質と海馬に5～7 Hz の棘徐波結合からなる群発放電が1～17秒間続いた。この発射は15分あたり12～29回、記録された。tremor ラットの由来した Kyo : Wistar ラットと zitter ラットの行動と脳波には、このような異常は認められなかった。

tremor ラットの振戦、触毛・被毛の屈曲、卵巣・精巣の萎縮および海綿状脳症が、劣性遺伝様式をとることは、既に報告されていたが [27]、欠神様発作の遺伝様式は明らかではなかった。そこで、tremor ラットの欠神様発作の発症推移とその遺伝様式について調べた [7]。tremor ラット (*tm/tm*) の同腹正常型ラット14匹を行動と脳波の同時検査を行ったところ、そのうち7匹にも、同様の群発放電を伴う欠神様発作が観察された。これらの動物を後に、*tm* 遺伝子をヘテロ型にもつ tremor heterozygous rat と交配する後代検定を行った結果、発作を現したラットは *tm* 遺伝子座についてヘテロ型であり、発作を現さなかったラットは、その wild ホモ型であると判定された。ついで、tremor homozygous ラットと tremor heterozygous ラットの欠神様発作を週齢を追って比較した (Fig. 4 参照)。tremor homozygous ラットにおいては、調べた6匹のうち3匹に、10週齢から発作が現れ、14週齢以降ではすべての個体にそれが認められた。一方、tremor heterozygous ラットにおいては、14週齢で調べた7匹のうち、1匹に欠神様発作がみられ、26週齢になると、そのすべてに発作が確認された。22週齢における、その発作頻度、持続時間および一定時間あたりの発作全時間は、tremor homozygous ラットでは、それぞれ、 194.0 ± 17.7 回/90分、 2.4 ± 0.1 秒、および 462.0 ± 43.3 秒/90分であり、tremor heterozygous ラットでは、 79.4 ± 25.7 回/90分、 1.6 ± 0.1 秒、および 138.0 ± 61.5 秒/90分であった。以上のよ

Fig. 3. Comparison of rat linkage group IV on chromosome 3 and mouse chromosome 2. Linkage distances are described on the left side.

Fig. 4. Occurrence of absence like seizure (5-7 Hz spike and wave complexes on EEG) in tremor homozygous rats (■: % positive rats, -■-: total duration (sec/90 min)) and tremor heterozygous rats (□: % positive rats, -□-: total duration (sec/90 min))

うに、いずれの値も、後者は、前者よりも有意に低い値を示した。以上の結果から、tremor ラットの欠神様発作は、半優性遺伝すると考えられた。

そこで、行動や脳波に異常が認められない BN/fMai-

Table 3. Genetic analysis for phenotypes of tremor rat : relationships among absence-like seizure, tremor, curled whiskers and hairs, vacuole of CNS, and atrophy of gonad in backcross progenies ; (BN×tremor heterozygous rat) F₁ (tm/+)×tremor heterozygous rat

		Tremor ¹		Vacuole ¹		Gonad ²		Whisker ³		Total
		+	-	+	-	+	-	+	-	
Absence-like seizure	+	8	15	9	14	9	14	9	14	23
	-	0	7	0	7	0	7	0	7	7
Whisker	+	8	1*	9	0	9	0			
	-	0	21	0	21	0	21			
Gonad	+	8	1*	9	0					
	-	0	21	0	21					
Vacuole	+	8	1*							
	-	0	21							
Total		8	22	9	21	9	21	9	21	30

¹+ : presence, - : absence ; ²+ : atrophy, - : normal ; ³+ : curled, - : normal

* : This individual was the same.

Kyo ラットと tremor ラットを交配実験に用いて, tremor ラットにおけるその他の異常表現型と共に, 欠神様発作の遺伝性を解析した。(BN×tremor heterozygous ラット) F₁ (tm/+)×tremor heterozygous ラットで得られた戻し交雑仔30匹の行動と脳波を同時記録した。欠神様発作を示したラットと示さなかったラットとの比は, 23 : 7 となり, 優性遺伝の期待値 3 : 1 ($\chi^2 = 0.09$) を否定しなかった。戻し交雑仔の中に振戦は, 不明瞭であったが, 触毛・被毛の屈曲, 精巢あるいは卵巣の萎縮, 海綿状脳症をもつラットが見つかった。このラットを含めて, 上記3種の tremor 表現型を表している9例は, すべて欠神様発作を示し, その正常型ラット21匹のうち, 14匹に発作が認められた (Table 3)。以上の結果, 欠神様発作もまた tm 遺伝子座に起因すると考えられ, そのヘテロ型は, ホモ型に比べて量的に少ない発作であったことから, 半優性遺伝すると結論した。zi 遺伝子の場合と同様に, 複数のミュータント表現型は必ずしも一致して遺伝しなかったことより, これらすべての表現型は, 近接する遺伝子群によって支配されている可能性があると考えられた。

5. SER を用いた抗てんかん薬の長期投与に対する新しい評価方法の検討 : SER に対するフェノバルビタール長期投与の影響

SER の欠神様発作と強直発作がヒトの抗てんかん薬によって, 抑制されるか否かを調べるため, ヒトにおいて抑制効果の異なる3タイプの薬剤, 5種を用いて, 単回

投与による SER の発作抑制効果が調べられた [15]。これまでの実験と同様に, 大脳皮質と海馬に慢性記録電極を設置した2~3ヵ月齢の SER を用いて, 薬剤投与前15分間と投与後15~30分, および45~60の各15分間における欠神様発作と強直発作の発症全時間を記録した。その結果, ヒトの大発作治療薬である Phenytoin (10mg/kg, 20mg/kg, i. p., n=4) は, 欠神様発作に影響を与えることなく, 強直発作を抑制した。ヒトの小発作 (欠神) 治療薬である Trimethadione (10mg/kg, i. p., n=5) と Ethosuximide (100mg/kg, i. p., n=5) は, 欠神様発作を抑制したが, 強直発作を抑制しなかった。さらに, Phenobarbital (10mg/kg, i. p., n=5) と Sodium valproate (100mg/kg, i. p., n=5) はいずれも欠神様発作と強直発作の両者を共に抑制した。以上の結果から, 抗てんかん薬に対する効果の面では SER の強直発作はヒトの大発作に対応するものであり, SER の欠神様発作はヒトの小発作に対応すると考えられた。このように, SER は, 明らかにタイプの異なる2種類のてんかん発作を合わせもつことが薬剤に対する反応性からも確かめられた。以上の結果から, SER は新しい抗てんかん薬の開発に応用できると推察された。

臨床においては, 抗てんかん薬は長期間連続的に投与されることが普通である。そこで, 抗てんかん薬の長期投与効果を評価する上で, この SER が応用できるか否かを, フェノバルビタールを例にとって2つの実験が, 企画された [19]。最初の実験では, 0.1% フェノバルビ

Fig. 5. Effects of continual phenobarbital (PB) intake on body weight and survival in SER. PB group was given *ad libitum* food pellets containing 0.1% PB from age 7 weeks. Body weight (mean values): $\diamond$ -, PB group (16 each sex); $\blacklozenge$ -, control group (22 each sex). Survival: $\square$ -, PB group, $\blacksquare$ -, control group.

Fig. 6. Effects of continual phenobarbital (PB) intake on tonic seizure in SER. PB group was given *ad libitum* food pellets containing 0.1% PB from age 7 weeks. Frequency of tonic seizure which occurred spontaneously during 2-hours observation period, was counted. —: PB group (8 each sex), ---: control group (8 each sex). Values described are means.

タール (以下 PB) の混入された固形飼料を7週齢から自由摂取させることによって、強直発作が継続的に抑制されるか、また体重や生存期間にどのような影響が現れるかが調べられた。飼料内の PB 含有濃度は、予備実験によって、運動量の過度な抑制効果を示さない量として、求められた。血漿中の PB 濃度は、8, 9, 11, 14, 17 および 20週齢に、酵素免疫抗体によって測定された。強直発作の発症頻度は、透明のアクリル樹脂性の観察箱の中に放置された SER の行動を毎週2時間ビデオに記録した後、2時間あたりの発作回数としてまとめられた。体重と摂餌量は、毎週計測された。雌雄各16匹の PB 投与 SER 群と雌雄各22匹の対照 (PB 非投与) 群を用いた。血漿中の PB 濃度は、投与開始1週後に最も高く、雄で、 $78.0 \pm 8.6 \mu\text{g/ml}$ 、雌で $109.7 \pm 4.7 \mu\text{g/ml}$ 、であったが、その後下降し、11~17週齢では雄で35

~ $50 \mu\text{g/ml}$ 、雌で30~ $70 \mu\text{g/ml}$ を維持した。PB 投与群の体重は対照群に比べて、16週齢まで有意に高い値であった (Fig. 5)。17週齢以降に生存していた個体についても PB 投与群の体重は有意に高かった。生存期間についてみると、雄において PB 投与群は、顕著な延長がみられた (Fig. 5)。雄における平均死亡週齢を比較すると、PB 投与群は、 22.3 ± 1.2 週齢、対照群は 16.5 ± 0.9 週齢であった。また雌においても PB 投与群が 19.1 ± 1.5 週齢、対照群が 15.7 ± 0.8 週齢であり、PB 投与群に延長傾向が認められた。強直発作に対する発作抑制効果は、雌雄各8匹の PB 投与群と、雌雄各8匹の対照群について、各週齢2時間あたりの発作回数が比較された (Fig. 6)。6週齢においては、いずれの動物からもこの発作は検出されなかったが、PB 投与前の7週齢では、9匹 (雄4匹、雌5匹) に発作がみられた。16匹の対照

Fig. 7. Effects of continual phenobarbital (PB) intake on absence like seizure and tonic seizure in SER receiving PB pellets *ad libitum* from age 11 weeks (0 days after PB intake). Total duration of tonic seizure: $\blacklozenge$ -, 6 male rats; $\diamond$ -, 6 female rats. Total duration of absence like seizure: $\blacksquare$ -, 6 male; $\square$ -, 6 female. Values described are means.

群のうち、11匹は8週齢から、残りの5匹は9週齢から発作が検出された。7週齢からPBを投与された群においては、9週齢まで発作は認められなかった。10週齢から雌で15週齢まで、雄で16週齢まで、この強直発作の発症頻度は有意に低い値であった。しかし、その後発作頻度の抑制は見られなかった。この抑制効果の消失は、過度の発作によるものか、PBに対するトレランスによるものと考えられる。また時折、強直性けいれんに続いて発症する wild jumping or running 発作は、対照群の雄8匹、雌6匹に合計26回観察されたが、PB投与群では、1匹の雄と2匹の雌に合計3回観察されたのみであった。

欠神様発作に対するPB長期投与の影響を検討するため、雌雄各6匹のSERを用いて第2の実験が行われた。これらの動物の10週齢時において大脳皮質と海馬に記録電極を慢性的に設置して11週齢において、PB投与前の行動と脳波を対照値として記録した。その後、0.1% PB含有固形飼料を給餌して飼育した。行動と脳波の同時検査は3日後、7日後(12週齢)、14日後(13週齢)に行った。欠神様発作は、11週齢の雄で 66.2 ± 2.8 秒/15分、雌で 101.8 ± 15.4 秒/15分、記録されたが、その発作は雌雄いずれにおいても調べられたPB投与3週後(14週齢)まで、有意な抑制は認められなかった(Fig. 7)。強直性けいれんの発症時間についても、同時に記録され

たが、これについては、PB投与3日後から2週後まで、有意な抑制がみられた。単回投与の実験においては、PBは、SERの強直発作と欠神様発作を共に抑制したが、この長期投与実験では欠神様発作の抑制効果は、認められなかった。この結果は、PBが欠神様発作の急性治療には効果があるが、長期投与には疑問視されていることに一致した。

Ⅲ. 新しい知見と展望

SERに関して論文発表されたその他の知見について、以下に紹介する。

浅野らは、SERに認められる wild jumping or running 発作の行動学的解析[1]、SERのけいれん発作誘発のための外的刺激に対する感受性[3]、およびSERの行動発達[2]について検討を加えた。wild jumping or running 発作の解析は、ビデオ撮影と振動型行動量解析装置が用いられた。その結果、この発作は強直性けいれんの2.1%において、その終了後27秒以内に発症した。この発作時の、高い行動量の増加は、この行動量解析装置において、特異な単一の高緯度ピークとして捉えられ、消灯時間帯においてもその発症を調べることが可能となった。wild jumping or running 発作は、点灯時間帯には、8時間あたり、0~9回、消灯時間帯には、0~6.7回の頻度で、調べた4匹(8~14週齢の期間)すべてに発症した。このように、この発作は昼夜の別なく、自然発症していることが明らかとなった。けいれん発作誘発試験は、SERとその親系統と比較することによって、行われた。接触、光(1200 lux, 1秒間隔)および音(8, 12 kHz, 95 db)刺激に対して、13週齢時で70~100%のSERは、強直性けいれんを発症したが、その他のラット系統には、全くその発症は認められなかった。強い電気刺激(20 or 30 mA)を与えられた非てんかんラット系統(Kyo: Wistar, F 344/N)においては、容易に強直-間代けいれん(SERにみられる発作型とは異なる。)が発症したが、tremor ラット、zitter ラットとともにSERはその発症はむしろ起こり難いものであった。SERにおいては、これらの外的誘発刺激は自然発症する強直発作の単なる引金であると考えられた。SERの生後の行動発達とオペラント学習行動が、上記の研究と同様に親系統と比較検討された。tremor とSERには眼瞼開裂後の立ち直り反射、traction performance および rotarod performance の発達の遅れが、そして zitter ラットには rotarod performance の発達遅延がみられた。また、SERにおいては、オペラント行動の明らかな遅延が認められた。

SER の中枢神経系の病理組織学的所見については、乾らが強直発作の出現する以前の35日齢と欠神様発作、強直発作、および wild jumping or running 発作が頻発している2~3ヵ月齢について、比較検査している[8]。振戦の顕著な35日齢では、脳幹と小脳に著しい空胞形成とミエリン低形成が認められた。空胞は、ミエリン層の開離と樹状突起の腫大によって生じて、星状膠細胞の原発性膨化に関連していると考えられた。よろめき歩行と上述したてんかん発作を発症する2~3ヵ月齢では、プルキンエ細胞軸索の膨化(トルペード)や弱齢時に観察されていた空胞に加えて、小脳顆粒層にもその形成が認められた。変性した神経細胞や好酸性スフェロイドが、黒質と腹側被蓋核に観察された。これらの脳部位は、いくつかの実験モデルにおいて強直けいれんに関連しているとされている。また、小脳に見られる所見は、よろめき歩行と関連性があることが指摘された。

近藤らは、SER の中枢神経系における2つの主要な病理所見であるミエリン低形成と空胞形成あるいは海綿状脳症について、その親系統である zitter ラットと tremor ラットとを比較検討した[9]。その結果、3つの系統いずれにも程度の差はあるが、この2つの所見は認められたが、ミエリン低形成は、主に zitter ラットに、空胞形成は tremor ラットに由来するものであると推定された。ミエリン低形成は有髄線維数あるいは密度の減少に加えて、髄鞘の薄化あるいは異常な髄鞘の形成によっていた。これは、振戦に関連する所見であると考えられた。SER は zitter 突然変異に起因するミエリン低形成と tremor 突然変異に起因する空胞形成が相互に強められたものと推論された。

久世らは、SER の脳幹を含む海綿状脳症に注目して、聴性脳幹反応(ABR)の発達をその親系統とともに調べた[10]。その結果、tremor ラットの2週齢時では、対照ラットとして用いた Kyo: Wistar と同じく、2~3波が観察されたが、正常ラットにみられるその後の波数の増加(I~V)は認められなかった。一方、SER および zitter ラットにおいては、コルチ器並びに聴神経に由来するI波のみが2週齢から認められるのみで、成熟後もこれらのラットでは、II波以降の波は不明瞭であった。これらのミュータント系統のいずれにおいてもその第I波の潜時時間の延長が認められた。コルチ器と聴神経に著変は認められなかったが、SER とその親系統において聴覚機能低下があることが、明らかとなった。

主要な抑制性神経伝達物質である γ -aminobutyric acid (GABA) は、GABA-A/BDZ/picrotoxin リセプター複合体としてその機能を働かせる。いくつかのて

んかんモデルにおいて、この異常が報告されている。そこで、白坂らは、中枢神経型のベンゾジアゼピン(BDZ)リセプターについて、SER とその親系統を調べた[21]。SER と tremor ラットの海馬において、そのアフィニティー(KD)には、著変はなかったが、BDZ リセプター濃度(B max)の低下を見つけた。この異常は、tremor 遺伝子に基づく欠神様発作に関連していると考えられた。一方、SER の脳幹においてはKDの有意な減少とB maxの増加が見られた。これは、強直発作に関連している可能性があることが指摘された。この傾向は zitter ラットにおいても認められたので、この変異は zitter 遺伝子に基づくものであると考えられた。

thyrotropin-releasing hormone (TRH) と TRH リセプターは広く中枢神経系に分布して、ドーパミン、ノルエピネフリン、セロトニン、アセチルコリン、GABA、およびグルタメートといった神経伝達物質の機能に影響を与える。TRH は、いくつかのてんかん発作に抑制効果があることは知られているが、その作用機序については、十分な理解がなされていない。そこで、氏原らは、TRH の SER のてんかん発作に対する抑制効果について検討した[24]。TRH (5, 10mg/kg, i. v.) の投与によって、SER の欠神様発作と強直発作は、共に抑制された。この抑制効果は、ドーパミンリセプターのブロック剤である haloperidol (0.5, 1.0mg/kg, i. p.) の前投与によって失われた。TRH のドーパミン遊離作用が知られていることを考え合わせて、SER のてんかん発作に対する TRH の抑制効果は、ドーパミン神経末端から遊離するドーパミンを通して作用する可能性が指摘された。

ここに紹介したように、各分野で、SER およびその親系統の特性の詳細な評価とてんかん発症機構を解明する研究が始められてきた。研究対象となる SER については、形質がより一層均一となるように近交化が進められているが、この SER 系統には、*tm*, *zi* 両遺伝子座が共に野生型であり、他の遺伝子背景が SER と同じである真の対照動物がいないという難点がある。これは、zitter ラットにおいても同様である。この問題を解決するために、近交系となった tremor ラットから分岐した *tm* 遺伝子を持たない WTC ラット系統に *zi* 遺伝子を戻し交配によって導入して、WTC-*zi/zi* 系統を作る作業が進められている。この新しい zitter ラットと近交化された tremor ラット系統のヘテロ型、すなわち WTC-*tm/+* を交配することから新たな SER (WTC-*zi/zi*, *tm/tm*) を作れば、WTC がこれら3つのミュータント系の共通の対照動物となる。

N. おわりに

以上、本研究において、自然に生じた類似の表現型をもつ2系統のミュータントから、高い頻度で2種あるいは3種のてんかん発作を自然発症するこれまでに報告例のない遺伝性の明確な自然発症てんかんモデルが得られた。今後、このラットは、新しいてんかん薬の評価に利用されると共に、そのてんかん発症機構の解明がなされるであろう。その研究の成果は、ヒトのてんかん発症機構の解明、さらにてんかんの根本的な治療に結び付く可能性がある。この疾患モデル動物の開発は、これを利用研究する側からだけでは、成し得るものではなかった。特に、両性共に不妊であるSERとtremorラットにおいては、その維持、繁殖および供給を安定させておくことが、極めて重要な課題であった。

本研究に対して第3回日本実験動物学会賞が与えられたこの機会に、御支援、御協力を頂いた諸先生方に改めて御礼を申し上げます。(本研究課題は、昭和62年度、文部省科学研究補助金一般研究(C)に採択された。研究課題番号61580037、研究代表者：芹川忠夫)

文 献

- [1] Asano, Y., Okaniwa, A., Serikawa, T., and Yamada, J. (1990). Behavioural characteristics of wild jumping or running episodes in the double mutant spontaneously epileptic rat. *Lab. Anim.*, **24**, 131-136.
- [2] Asano, Y., Okaniwa, A., Serikawa, T., and Yamada, J. (1990). Delayed postnatal behavioral development in spontaneously epileptic rats and tremor rats, and poor operant performance in spontaneously epileptic rats. *Exp. Anim.*, **39**, 69-74.
- [3] Asano, Y., Okaniwa, A., Serikawa, T., and Yamada, J. (1990). Sensitivity of spontaneously epileptic rats to external stimuli that induce seizures. *Exp. Anim.*, **39**, 207-212.
- [4] Cramer D. V., Mowery, P. A., and Adams, M. (1981). Biochemical markers in rats; linkage relationships of aconitase (*Acon-1*), aldehyde dehydrogenases (*Ald-2* and *Ald-c*), alkaline phosphatase (*Akp-1*), and hydroxyacid oxidase (*Hao-1*). *Biochem. Genet.*, **24**, 217-227.
- [5] Dailey, J. W., Reigel, C. E., Pravin, K., Mishra, P. K., and Jobe, P. C. (1989). Neurobiology of seizure predisposition in the genetically epilepsy-prone rat. *Epilep. Res.*, **3**, 3-17.
- [6] Fisher, R. S. (1989). Animal models of the epilepsies. *Brain Res. Review*, **14**, 245-278.
- [7] Higashiguchi, T., Serikawa, T., Yamada, T., Kogishi, K., Kondo, A., and Yamada, J. Semidominant expression of absence-like seizure in tremor rats. *Behavioral Genet.* (in press).
- [8] Inui, Y., Yamamura, T., Yuasa, H., Kawai, Y., Okaniwa, A., Serikawa, T., and Yamada, J. (1990). The spontaneously epileptic rat (SER), a zitter *tremor double mutant rat: histological findings in the central nervous system. *Brain Res.*, **517**, 123-133.
- [9] Kondo, A., Nagara, H., Akazawa, K., Tateishi, J., Serikawa, T., and Yamada, J. (1991). CNS pathology in the neurological mutant rats zitter, tremor and zitter-tremor double mutant (spontaneously epileptic rat, SER). *Brain*, **114**, 979-999.
- [10] Kuse, H., Inui, T., Asano, Y., Hori, M., Okaniwa, A., Serikawa, T., and Yamada, J. (1991). Auditory Brainstem Response (ABR) in spontaneously epileptic rats (SER) and their parent mutants. *J. Vet. Med. Sci.*, **53**, 629-636.
- [11] Noebel, J. L. and Sidman, R. L. (1979). Inherited epilepsy: spike-wave and focal motor seizures in the mutant mouse tottering. *Science*, **204**, 1334-1336.
- [12] Rehm, S., Mehraein, P., Anzil, A. P., and Deerberg, F. (1982). A new mutant with defective overhairs and spongy degeneration of the central nervous system: clinical and pathological studies. *Lab. Anim. Sci.*, **32**, 70-73.
- [13] Robinson, P. F. and Gilmore, S. A. (1980). Spontaneous generalized spike-wave discharges in the electrocorticograms of albino rats. *Brain Res.*, **201**, 452-458.
- [14] Seyfried, T. N. and Glaser, G. H. (1985). A review of mouse mutants as genetic models of epilepsy. *Epilepsia*, **26**, 143-150.
- [15] Sasa, M., Ohno, H., Ujihara, H., Fujita, Y., Yoshimura, M., Takaori, S., Serikawa, T., and Yamada, J. (1988). Effects of antiepileptic drugs on absence-like and tonic seizures in the spontaneously epileptic rat, a double mutant rat. *Epilepsia*, **29**, 505-513.
- [16] Serikawa, T. and Yamada, J. (1986). Epileptic seizures in rats homozygous for two mutations, zitter and tremor. *J. Hered.*, **77**, 441-444.
- [17] Serikawa, T., Ohno, Y., Sasa, M., Yamada, J., and Takaori, S. (1987). A new model of petit mal epilepsy: spontaneous spike and wave discharges in tremor rats. *Lab. Anim.*, **21**, 68-71.
- [18] Serikawa, T., Yamada, J., Ohno, Y., Sasa, M., Ujihara, H., Akaike, A., Fujita, Y., and Takaori, S. (1987). A genetically defined epileptic model in rats. *Transpl. Proc.*, **19**, 3205-3206.
- [19] Serikawa, T., Kogishi, K., Yamada, J., Ohno, Y., Ujihara, H., Fujita, Y., Sasa, Y., and Takaori, S. (1990). Long-term effects of continual intake of phenobarbital on the spontaneously epileptic rat. *Epilepsia*, **31**, 9-14.
- [20] Serikawa, T., Yamada, J., Ujihara, H., Ohno, Y., Sasa, M., and Takaori, S. (1991). Ontogeny of absence-like and tonic seizures in the spontaneously epileptic rat. *Lab. Anim.*, **25**, 216-221.
- [21] Shirasaka, Y., Ito, M., Mitsuyoshi, I., Mikawa, H., Serikawa, T., and Yamada, J. (1991). Benzodiazepine receptor binding in the spontaneously epileptic rat and its parental strains. *Exp. Neurol.*, **113**, 255-259.
- [22] Sugaya, E., Ishige, A., Sekiguchi, K., Iizuka, S., Itoh, K., Sugimoto, A., Aburada, M., and Hosoya, E. (1986). Pentylentetrazol-induced convulsion and effect of anti-convulsants in mutant inbred strain El mouse. *Epilepsia*, **27**, 354-358.
- [23] Suzuki, J. (1976). The paroxysmal discharges of the EEG in El mouse. *Experientia*, **32**, 336-338.
- [24] Ujihara, H., Renming, X., Sasa, M., Ishihara, K.,

- Fujita, Y., Yoshimura, M., Kishimoto, T., Serikawa, T., Yamada, J., and Takaori, S. (1991). Inhibition by thyrotropin-releasing hormone of epileptic seizures in spontaneously epileptic rats *Europ. J. Pharmacol.* **196**, 15-19.
- [25] Van Luijtelaar, E. L. J. M., and Coenen, A. M. L. (1988). Circadian rhythmicity in absence epilepsy in rats. *Epilep. Res.* **2**, 331-336.
- [26] Vergnes, M., Marescaux, C., Depaulis, A., Micheletti, G., and Warter, J. M. (1987). Ontogeny of spontaneous petit mal-like seizures in Wistar rats. *Develop. Brain Res.* **30**, 85-87.
- [27] Yamada, J., Serikawa, T., Ishiko, J., Inui, T., Takada, H., Kawai, Y., and Okaniwa, A. (1985). Rats with congenital tremor and curled whiskers and hair. *Exp. Anim.* **34**, 183-188.
- [28] 山田昌夫・中島一男・芹川忠夫・山田淳三 (1982). Kyo : Wistar 系ラットに発見された触毛, 被毛の曲がり を伴った振戦ラットについて. *実験動物*, **31**, 233-239.
- [29] Yamada, T., Mori, M., Hamada, S., Serikawa, T., and Yamada, J. (1989). Assignment of tremulous body mutant gene zitter (*zi*) to linkage group IV of the rat (*Rattus norvegicus*). *J. Hered.* **80**, 383-386.