実験技術

マウス熱性けいれんモデルの作製

笠原 由佳, 池谷 裕二, 小山 隆太

要約: 熱性けいれんは乳幼児期において最も頻発するけいれんである。このため、これまで熱性けいれんが将来の脳機能に及ぼす影響について多大な関心が寄せられてきた。熱性けいれんが脳機能に及ぼす影響を分子細胞レベルで解明するためには、動物モデルの利用が必須である。環境大気温を上昇させ、間接的にげっ歯類の体温を上昇させる高温チャンバーモデルは、セットアップが簡便かつ安定した再現性が得られる優れた熱性けいれんモデルである。本稿では、高温チャンバーモデルの特徴を説明しながら、筆者らの研究室で実際に用いられている実験プロトコルを記述し、最後には実験的熱性けいれん誘導の評価基準を紹介する。

1. はじめに

熱性けいれんは、38℃以上の発熱に伴うけいれんで、主に生後6ヵ月～5歳の乳幼児期に生じる。全世界における有病率は2～14%と報告されている。人種、民族差、地域差が言及されており、欧米における有病率は2～4%であるのに対し、日本では7～11%と比較的高い(1-3)。

熱性けいれんは、単純型と複雑型に分類される。米国小児科学会によれば、単純型熱性けいれんは持続時間が15分未満の全般性発作であり、24時間以内に複数回反復しないものと定義されている。一方、複雑型熱性けいれんは、①焦点性発作、②15分以上持続する発作、そして③24時間以内の複数回の発作のうち一項目以上を満たすものである。全患者のうち約60～70%が単純型であり、約30～40%が複雑型との報告がある(4)。単純型は一般に予後が良好であることが多いが、複雑型に関しては、その後のてんかん発症に関与する可能性が示唆されている。Chungathらの報告によれば、複雑型熱性けいれんを経験した患者におけ

るてんかん発症率は10～20%であり、これは一般人口のてんかん発症率の約10倍以上である(5)。さらに、前述の複雑型の基準三項目をすべて満たした熱性けいれんを発症した場合、成人までにてんかんを発症する確率は50%にまで達することが報告されている(6)。また、後方視的研究により、側頭葉てんかん患者の30～70%で複雑型熱性けいれんの既往があると報告されている(7,8)。一方、Shinnerらの前方視的研究では、複雑型けいれんと側頭葉てんかんの相関は確認されなかった(9)。

熱性けいれんが、てんかん発症につながる脳構造の変化を引き起こす可能性を検証するためには、細胞・分子のアプローチが必要である。しかし、細胞・分子のアプローチをヒトの組織に対して十分におこなうことは、倫理的及び実験科学的な限界により困難である。熱性けいれん動物モデルを用いれば、熱性けいれんが脳構造及び機能にもたらす影響を直接的かつ前方視的に検証できる(10-12)。現在、熱性けいれんの動物モデルとして、ヘアドライヤーモデル(13-15)や高温チャンバーモデル(16,17)などが広く用いられている。これらの実験系の立ち上げは簡便であり、再現性が高いことから優れたモデルであると考えられる。しかしながら、筆者らの経験から、初めて熱性けいれんモデルを利用する実験者にとって、けいれん誘導環境のセットアップにはいくつかの注意点が必要であることがわかった。本稿では、この点を踏まえ、高温チャンバーモデルにおける熱性けいれんの誘導原理と方法を概説する。本実験モデル動物の有用性と手法の詳細を少しでも多くの方にご理解頂き、今後の熱性けいれん研究に役立てて頂けたら幸いである。

キーワード: 熱性けいれん, てんかん, モデルマウス

東京大学大学院 薬学系研究科 薬品作用学教室 (〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1)

E-mail: rkoyama@mol.f.u-tokyo.ac.jp 原稿受理日: 2017年8月17日

Title: Mouse model of febrile seizures Author: Yuka Kasahara, Yuji Ikegaya, Ryuta Koyama

2. 熱性けいれんモデル動物

実験的熱性けいれんモデルとして、体温上昇により熱性けいれんを誘導するモデルが主に用いられている。体温上昇を人工的に誘導するモデルとして、前述したヘアドライヤーモデル及び高温チャンバーモデルに加え、温水モデル(18, 19)、リポ多糖投与モデル(20)、マイクロウェーブモデル(21)などがある。これらの実験的熱性けいれんモデル動物における体温上昇過程そのものは、実際に臨床でみられる熱性けいれんと必ずしも一致しないが、発熱によって誘導されるけいれんという点では一致している。そのため、これらのモデルは熱性けいれんの持続時間や重篤度の評価、そして、特に熱性けいれんの予後を分子細胞生物学的に研究するために適している。また、ナトリウムチャンネルのサブユニットである SCN1B, SCN1A, SCN2A や GABA_A 受容体の γ サブユニット 2 が「熱性けいれんプラス (genetic epilepsy with febrile seizures plus: GEFS₊)」の責任遺伝子と考えられているため(22, 23)、これらの変異マウスが熱性けいれんプラスのモデルとして利用できる可能性がある。熱性けいれんプラスは複雑型熱性けいれんの亜型であり、6歳までに頻回の熱性けいれんを起こし、6歳以後にも有熱時発作が続くか、無熱性全般発作を起こす家族性症候群である(24)。

3. 熱性けいれんの誘導メカニズム

近年、熱性けいれんの発症に関与する因子として炎症性サイトカインのひとつであるインターロイキン 1 β (IL-1 β) が注目を集めている。Dubé らは、IL-1 β を脳室内に投与した結果、熱性けいれんの発作閾値が低下したことを報告している。さらに、IL-1 β 受容体欠損マウスにおいて発作閾値が上昇し、発作時脳波記録において、連続した棘波が発生することが明らかにされた(25)。なお、同様の結果は Fukuda らによっても報告されている(26)。また、IL-1 β シグナルは、GABA_A 受容体の機能を阻害するとともに、NMDA 受容体の機能を促進することで神経細胞の過剰興奮を引き起こし、けいれん発作を誘起することが示唆されている(27, 28)。

今回紹介する高温チャンバーモデルにおける熱性けいれん誘導メカニズムとして、呼吸性アルカローシスが報告されている(17)。本モデルでは、赤外線ランプによりマウス周囲の環境大気温度を緩やかに上昇させ、間接的にラット又はマウスの体温を上昇させる。体温が上昇するにしたがって呼吸頻度が上昇し、過呼吸状態となり脳内の pH が上昇した。さらに、重炭酸

をラットに腹腔内投与することにより pH を上昇させた場合も発作が生じた。また、5%CO₂ をチャンバー内に充填することによりアルカローシスを抑制すると、熱性けいれんの発症が阻害された。以上から、高熱により生じた、脳内の呼吸性アルカローシスが熱性けいれんの発症に関与することが示唆された。

4. 実験方法

1) 使用動物

基本的には生後 10~14 日齢の C57BL/6J 雄マウスを用いる。これは、この時期におけるマウスの海馬の発達程度が、ヒトにおいて熱性けいれんが頻発する乳幼児期の海馬の発達程度と類似しているとされているためである(29)。さらに、この時期のマウスにおいてけいれん発作が生じる体温の閾値が、ヒトにおける複雑型熱性けいれんが発症する体温の閾値に近似しているためである。生後 10~14 日齢の間においても、熱性けいれん誘導時にみられるマウスの行動は異なる。週齢が早いほど強直性けいれん発作に至る時間(潜時)は短縮し、遅いほど延長する。安定して熱性けいれんを誘導するためには、潜時が約 14.5 分かつ、けいれん誘導の体温閾値が約 40.0°C となるよう週齢に応じて容器内気温及び外部気温を設定する必要がある(図 1)。また、業者からマウスを購入した場合、個体間で体重のばらつきが大きい可能性があるため注意する。マウスの体重が軽く、発達が極端に遅いと考えられる場合(具体的には生後 11 日齢で 4.5 g 未満など)、発作の体温閾値や体温上昇率に影響を及ぼすためその個体を使用しないことが望ましい。なお、本実験はすべて東京大学の動物実験ガイドラインに従い、動物への苦痛を最小限に抑えるための最大限の努力の下に

図 1 熱性けいれんの体温閾値

高温チャンバーモデルにおいて間代性けいれん発作もしくは強直性けいれん発作が生じた際の直腸温。約 40.0°C でこれらのけいれん発作が生じた。哺乳 11 日齢のマウス 10 匹から測定した。

行った（承認番号：P29-15）。

2) 生理食塩水及び薬物の投与

筆者らは、熱性けいれん誘導時の体温上昇に伴う脱水症状を予防するため、熱性けいれん誘導後のマウスに常温の生理食塩水を皮下投与している（体重1gに対し10 μ l）。熱性けいれん誘導前の投与も可能だが、マウスの体温をわずかに低下させるため、高温チャンバー処置による体温の上昇を遅らせることがある。熱性けいれん誘導前の薬物投与が必要な場合はこの問題は避けられないので、溶媒対照群を必ず用意する。薬物をエタノールなどの有機溶媒等に溶解し、投与量中の水含有量が10分の9以下となる場合、薬物を投与後にさらに生理食塩水（10 μ l/g）を投与する。

3) 熱性けいれんの誘導

実験に使用する各機器の詳細については後述する。ここでは熱性けいれん誘導の概要を記述する（図2）。コントロールとして熱性けいれん処置群と同日齢のマウスを用いる。コントロールマウスは、熱性けいれん誘導マウスと状況を合わせるため、15分間親元から分離した後生理食塩水（10 μ l/g）を投与し、10分後に母マウスに戻す。なお、これらの処置はすべて室温でおこなう。また、熱性けいれんの誘導により生じた結果が高熱によるものなのか、けいれん発作によるものなのか区別する必要がある。このために、高熱誘導の直前に短時間型バルビツール酸系鎮静剤であるペントバルビタールを投与し、高熱は誘導されるが、けいれん発作の発生は阻止されるような高温コントロール群

を用いることがある。

①ガラス容器内に赤外線を照射し、容器内気温（容器底面から高さ4~5 cmの点の温度）を32~33.5°Cに設定する。実験開始30分以上前からガラス容器の予熱をおこなう。容器内の空気の温度が34°C以上となる状態が長時間持続した場合、マウスの死亡率が上昇するため注意する。

②赤外線ランプ照射直前にマウスの直腸温を測定する。ガラス容器に入れ、赤外線照射を開始した後は3分毎にマウスを容器外に出し、直腸温を測定する。マウスの直腸を傷つけないよう（出血が指標となる）、プローブの先端にワセリンを付け、マウスの背中に水平となるように2~3 mm直腸内に挿入する。温度計に表示された数値は変動しやすいので、3秒以上安定して表示された温度を直腸温として記録する。1回の直腸温測定に1分以上かかった場合、次の測定をおこなわない。

③間代性けいれん発作または強直性けいれん発作が生じた場合は直腸温が38.5°C以上の状態を合計10~15分間維持する。幼若マウスにおける間代性けいれん発作と強直性けいれん発作の特徴を述べる。まず、間代性けいれん発作は、筋肉の収縮と弛緩が規則的に交互に繰り返して生じ、四肢が屈曲伸長を繰り返してガタガタとふるえる発作である。実験的熱性けいれん誘導中に生じる間代性けいれん発作は、転倒した際の起き上がり行動と類似している。これらを区別するため、転倒後3秒以上けいれん発作が持続するものを間代性け

図2 熱性けいれん誘導の概要

高温チャンバーモデルにおいて使用する器具の配置。また、それぞれについて留意すべき誘導条件を記載した。

いれん発作と定義した。一方、強直性けいれん発作は、筋肉の持続的な収縮（筋のつっぱりあるいはこわばり）が生じる発作である。本実験系における強直性けいれん発作は、四肢が緊張状態（つっぱっている状態）にあり、この状態が2秒以上維持するものと定めた。

熱性けいれんモデルを利用した研究には、直腸温や高熱処置時間のみを記載し、けいれん誘導状況に関する記載が少ないものが多い。筆者らは、実験的熱性けいれん誘導の再現性を高めるために、熱性けいれん発作誘導成功の明確な判断基準を設定した。すなわち、直腸温が38.5℃以上の状態を合計10分以上15分以下で維持した際に、間代性けいれん発作または強直性けいれん発作の持続時間が10秒以上、10秒未満でも2回以上繰り返し生じること、のいずれか一つ以上を満たすことである。実際に発作が生じている時間を発作持続時間として計測する。直腸温維持時間に幅があるのは、個体によっては早い段階で強直性けいれんが生じ、そのまま高温維持を行うと死亡してしまうためである。また、高熱誘導中に間代性けいれんに至らない軽度のけいれんのみが生じた場合には、熱性けいれん誘導が失敗したと判断し、熱性けいれん群から除外する。

高熱誘導中にマウスの正向反射が消失した場合は、マウスをガラス容器外に出して休ませる。正向反射が回復し次第、容器内に戻して赤外線照射を再開する。なお、各マウスのけいれんフェノタイプを詳細にノートに記述し、後から逆行トレースが可能な状況にしておくことが重要である。

④直腸温が38.5℃以上の状態が15分経過した時点で、上述定義による熱性けいれん発作が確認されない場合は、直腸温を測定せずに（直腸温測定のためにガラス瓶からマウスを出すと、体温が低下するため）、最大10分間の赤外線照射を追加する。この追加照射をおこなうと、間代性けいれん発作または強直性けいれん発作が生じることが多い。追加照射の間に上述定義による熱性けいれん発作が確認されれば、熱性けいれん誘導の成功となる。なお、追加照射の際に正向反射の消失が生じた場合は、マウスが死亡する可能性が高いため照射を終了する。

⑤赤外線ランプ照射後、生理食塩水を体重1gに対し10μl投与し、10分間室温で回復させてから親元に返す。

4) マウスの状態

熱性けいれんを効率よく誘導するためには、マウスの体温を段階的に上昇させなければならない。具体的には、高熱処置開始から約9分後に直腸温が38.5℃以上となるように心がける（図3）。これより急激にマウ

図3 熱性けいれん誘導時の直腸温変化

高温チャンバーモデルにおけるマウスの直腸温変化。直腸温は3分おきに測定した。約9分で38.5℃以上となる。哺乳11日齢のマウスを10匹用いた。

スの体温が上昇する場合は、間代性けいれん及び強直性けいれんが生じるより先に正向反射が消失し、死亡する可能性が高い。一方、体温の上昇の程度がこれ以下となる場合はけいれん発作の閾値体温になかなか到達せず、そのまま正向反射が消失することが多い。なお、初期の体温の上昇率はマウスの体温とガラス容器内の温度の差に影響されるため、この差を可能な限り減少させる。熱性けいれん誘導時（開始0秒）におけるマウスの体温が34.5℃以上の場合はガラス容器内の温度を33℃付近で設定する。マウスの体温が32℃以下と低い場合は、容器温度を32℃付近に設定する。

5) 実験室内の環境

生後マウスの体温は外部の気温の影響を受けやすい。基本的に、直腸温の測定時にマウスをガラス容器外に出すと、マウスの体温上昇速度は低下する。そして、ガラス容器内とガラス容器外の気温の差が小さい場合、体温上昇速度は低下せず、マウスの体温が急激に上昇し、死亡する可能性が高くなる。一方、ガラス容器内とガラス容器外の気温の差が大きく、体温低下が急激に生じる際はけいれん発作の潜時が延長する。このため、熱性けいれん誘導中は外部気温が上昇しやすいので特に注意しながら、外部気温を26～28℃に維持し、ガラス容器内とガラス容器外の気温の差が適切になるようにする。直腸温計として用いているマイクロプロブ温度センサーをガラス容器の周囲20cm以内の位置に静置して観察することで、ガラス容器外部の気温を常時モニターできる。また、気温差が適切であるか否かは、マウスの体温が熱性けいれん処置開始から約9分後に38.5～39.0℃となるかで判断できる。筆者

の場合、外部気温が28℃付近となる場合は、容器内温度は33℃付近に設定する。実験室内気温が26℃付近となる場合は、容器内温度を32℃付近に設定する。また、実験室内の空調機が稼働し、マウスに風が当たる可能性も考慮する必要がある。マウスに直接冷風が当たる場合は、容器外にマウスを出した際に体温が急激に低下する可能性があるため、容器内温度を33℃付近とする。逆に、温風が当たる場合は、容器内温度を32℃付近とする。ここで紹介した容器内温度は、容器の形状によっても変化する可能性があることに留意されたい。

6) 加熱チャンバー装置

①ガラス容器

ヒートランプをガラス容器間近で照射するため、容器は高温となりやすい。なお、厚みがあり、外部との熱交換がおこりにくいガラス製の容器を用いる。また、容器内におけるマウスの行動を観察するために十分な底面積を持ち(狭すぎると、マウスが側面に寄り掛かり、行動が制限されるため)、かつ、容器内の温度が調節しやすいよう容器内体積が大きすぎないものが望ましい。筆者らは厚み0.5 cm、直径11 cm、高さ17 cmのガラス製容器を使用している。赤外線照射が集中する底面には、ろ紙(厚さ0.2 mm、直径90 mm ADVANTEC)を両面テープで固定することで底面の高温化によるマウスの行動への影響及び体温調節の障害を防ぐ。ろ紙がしっかりと固定されていない場合、マウスが転倒し、発作が生じる原因となる可能性があるので注意する。ろ紙には糞尿が付着するので、マウス毎に交換している。

②ヒートランプ

ガラス容器内の温度をできる限り均一にするため、ビン全体に赤外線を照射できる広い電球外径を持つヒートランプを用いる。筆者らは室町機械、HL-1ヒートランプを使用している。ヒートランプは、①で記載したガラス容器を使用した場合、容器に接触しない限界までガラス容器に近付け、底面に対して水平となるように設置する。このとき、底面からの高さは約18 cmとなる。

③温度コントローラ

熱性けいれんを効率よく誘導するためには、ガラス容器内の温度をできるだけ一定に維持する必要がある。著者らはPhysitemp社のTCAT-2D実験動物用温度コントローラを用いている。マイクロプローブ温度センサー(RET-2, Physitemp)を容器の底面から高さ4~5 cm地点、及び壁面から1 cmの地点にビニールテープ等で固定し、リアルタイムで容器内気温を測定する。このとき、ガラス容器及びマウスに接触しないよう注意する。上述したHL-1ヒートランプをTCAT-2D温度コントローラに接続して用いることで、容器内温度変化に応じて自動的に赤外線の照射時間が調整され、より簡便かつ正確に容器内部温度を維持できる。

④直腸温計

生後マウスの直腸温を測定するために、Physitemp社のRET-4マイクロプローブ温度センサーを使用している。筆者らは動物用微小精密温度計(BAT-12, Physitemp)と組み合わせて使用し、直腸温を0.1℃単位で3分毎に記録している。

表 1 熱性けいれん誘導モデルの長所及び短所

実験モデル	高温チャンバーモデル (16, 17)	ヘアドライヤーモデル (13-15)	温水モデル (18, 19)	リボ多糖投与モデル (20)	マイクロウェーブモデル (21)
実験条件の概要	生後11~15日齢のマウスをガラス容器に入れ、赤外線ランプの照射によりビン内空気を32~33.5℃とし、体温を上昇させる。	生後10~11日齢のラットもしくは生後11~15日齢のマウスをガラス容器に入れ、ヘアドライヤーにより約43.3~44.3℃の温風をあて、体温を上昇させる。	生後約22日齢のラットの頭部及び体の一部を45~55℃の温水に暴露する。	生後14日齢のラットに100~200 µg/kgのリボ多糖を腹腔内投与することにより体温を上昇させ、カイン酸などのけいれん誘導薬を同時に腹腔内投与する。	生後13~17日齢のラットに918 MHzのマイクロウェーブを照射し、体温を上昇させる。
長所	外気温を自動で特定の温度に保つことができ、実験条件を一定にすることが可能である。このため、再現率が高く、汎用される。	実験系の立ち上げ及び操作が簡便であり、頻繁に利用されるモデルの一つである。死亡率が低い。	実験系の立ち上げ及び操作が簡便である。短時間の高温処置(約4~10分)による熱性けいれんの誘導が可能である。	実際にヒトでみられる細菌感染による発熱を模倣している。死亡率が低い。	高温による体表面の火傷などのストレスがない。生後17日と発達後期のラットにおいても誘導できる。
短所	赤外線ランプを点滅させて外気温を保つため、マウス毎のランプ照射時間が一定ではない。外気温が比較的低いため(32~33.5℃)、室内温度などの外部環境の影響を受けやすい。	ヘアドライヤーの位置を手動で操作するため、外気温の調節が困難である。また、ドライヤーの温風が高温であるため、動物が火傷を負う可能性がある。	熱性けいれんの誘導率が約75%と比較的低く、けいれんの程度が弱い。温水が高温であるため、ラットが火傷を負う危険性がある。	体温の上昇率が低く(40℃以下)、熱性けいれんの誘導率が約50%以下と比較的低い。けいれん誘導薬を同時に投与するため、生じたけいれん発作が発熱により生じたものか判断することが困難である。	特殊な器具等が必要であるため、実験系の立ち上げが困難である。熱性けいれんの誘導率が約70%以下と比較的低く、けいれんの程度が弱い。

5. 終わりに

熱性けいれんに伴う現象及びその発症メカニズムについて分子・細胞レベルで理解するうえで、動物モデルは必須である。また、ヒトを対象とした臨床研究においては実験手法が制限されていることに加え、遺伝要因や環境要因などが大きく、熱性けいれんによる影響だけを評価することは困難である。一方で、動物モデルから得られた結果をヒトに外挿して解釈する際には注意が必要である。適切な動物モデルを用いて得られた知見と臨床研究から得られた知見を相補的に利用することで、熱性けいれんに関する研究がさらに発展することを期待したい。

著者の利益相反：開示すべき利益相反は無い。

文 献

- 1) Hauser WA. *Epilepsia*. 1994;35 Suppl 2:S1-S6.
- 2) Tsuboi T. *Neurology*. 1984;34:175-181.
- 3) 香川和子, 他. 二瓶健次, 編. 熱性けいれん, New Mook 小児科 2. 金原出版; 1992. P. 23-25.
- 4) Nelson KB, et al. *N Engl J Med*. 1984;295:1029-1033.
- 5) Chungath M, et al. *Nat Clin Pract Neurol*. 2008;4:610-621.
- 6) Annegers JF, et al. *N Engl J Med*. 1987;316:493-498.
- 7) Cendes F, et al. *Neurology*. 1993;43:1083-1087.
- 8) French JA, et al. *Ann Neurol*. 1993;34:774-780.
- 9) Shinnar S. *Ann Neurol*. 1998;43:411-412.
- 10) Koyama R, et al. *J Pharmacol Sci*. 2010;113:14-22.
- 11) Koyama R. *Animal models for the study of human disease*. Elsevier; 2013. P. 889-901.
- 12) 市川淳也, 他. *日薬理誌*. 2010;136: 219-224.
- 13) Dubé C, et al. *Ann Neurol*. 2000;47:336-344.
- 14) Koyama R, et al. *Nat Med*. 2012;18:1271-1278.
- 15) Tao K, et al. *Neuroscience*. 2016;318:34-44.
- 16) Holtzman D, et al. *Science*. 1981;213:1034-1036.
- 17) Schuchmann S, et al. *Nat Med*. 2006;12:817-823.
- 18) Ullal GR, et al. *Seizure*. 1996;5:221-228.
- 19) Jiang W, et al. *Epilepsia*. 1999;40:5-19.
- 20) Heida JG, et al. *Epilepsia*. 2004;45:1317-1329.
- 21) Hjerlesen DL, et al. *Bioelectromagnetics*. 1983;4:341-355.
- 22) Scheffer IE, et al. *Brain*. 1997;120 (Pt 3):479-490.
- 23) Nakayama J. *Brain Dev*. 2009;31:359-365.
- 24) Kaneko S, et al. *Neurosci Res*. 2002;44:11-30.
- 25) Dubé C, et al. *Brain Dev*. 2009;31:366-371.
- 26) Fukuda M, et al. *Seizure*. 2009;18:211-214.
- 27) Wang S, et al. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000;292:497-504.
- 28) Viviani B, et al. *J Neurosci*. 2003;23:8692-8700.
- 29) Avishai-Eliner S, et al. *Trends Neurosci*. 2002;25:518-524.