

ラットのカイニン酸誘発海馬発作の伝播経路におけるミクログリア活性化と熱ショック蛋白27kDaの発現

谷脇, 予志秀
九州大学大学院医学研究院脳神経病研究施設神経内科

<https://doi.org/10.15017/7218221>

出版情報：福岡医学雑誌. 92 (2), pp.27-39, 2001-02-25. Fukuoka Medical Association
バージョン：
権利関係：



原 著

ラットのカイニン酸誘発海馬発作の伝播経路における
ミクログリア活性化と熱ショック蛋白 27 kDa の発現

九州大学大学院医学研究院脳神経病研究施設神経内科 (指導: 吉良潤一 教授)

同臨床神経生理学分野 (指導: 加藤元博 元教授, 飛松省三 教授)

谷 脇 予 志 秀

**The Microglial Activation and the Expression of Heat Shock Protein 27 through
the Propagation Pathway of Kainic Acid-induced Hippocampal Seizure in the Rat**

Yoshihide TANIWAKI

Department of Neurology (Director: Professor J. Kira) and Clinical Neurophysiology (Director: Professor emeritus. M. Kato and Professor S. Tobimatsu), Neurological Institute, Graduate School of Medical Sciences, Faculty of Medicine, Kyushu University Fukuoka 812-8582, Japan

Abstract We studied activation of microglia and expression of the 27kDa heat shock protein (HSP27) in the brain during kainic acid-induced acute hippocampal seizures in rats. The microglial activation was observed at 6 hrs after seizure induction, but the expression of HSP27 was delayed until 3 days after seizure induction. The gross anatomical distributions of the two phenomena in the brain structures were almost identical, being localized not only in the primary focus at the dorsal hippocampus ipsilateral to the kainic acid injection, but also in selected remote brain structures that was highly consistent with the propagation pathways of the hippocampal seizure as detected previously by metabolic mapping. These structures included the hippocampus, amygdala, entorhinal cortex, piriform cortex, sensorimotor cortex, hypothalamus and thalamus. A close observation, however, revealed a difference in distribution of the two phenomena in the layers of the contralateral hippocampus: The HSP27 expression showed a layer-specific distribution, being localized selectively in the molecular layer and hilus of the dentate gyrus, and the radiatum and molecular layers of the CA-3 subfield suggesting the expression in the neuropil. On the other hand, the distribution of the microglial activation was non-specific to the layers, being scattered in the whole regions of the dorsal hippocampus. There were no apparent morphological changes in the neurons in these structures, except for the ipsilateral dorsal hippocampus, by light microscopic examinations with hematoxylin-eosin staining.

These findings thus indicate that activation of microglial cells and expression of HSP27 occur transsynaptically by epileptic activities through the propagation pathways of hippocampal seizure and suggest that these phenomena may reflect a part of early microenvironmental alterations in epileptic brain.

Key words: Hippocampal seizure, Microglial activation, HSP27 expression, Propagation pathway

はじめに

ミクログリアがさまざまな脳傷害、例えば虚血¹⁶⁾、電気凝固による病巣⁷⁾、炎症⁶⁾、慢性てんかんモデル¹¹⁾¹³⁾に反応して活性化されることが知られている。我々は以前、ラットのカイニン酸誘発海馬発作においてミクログリア活性化が発作伝播経路に沿って、その一次焦点の遠隔部位にも、ニューロンの見かけ上の形態学的変化を伴わずに出現することを報告した²⁰⁾。この結果は、ミクログリアの活性化がニューロンの器質的障害時のみならず、てんかん活動などニューロンの機能的変化によっても起こり、しかもそれは経シナプス性に生じることを示唆している。

熱ショック蛋白 (HSP) は、細胞が熱ストレスや他の有害な刺激に反応して産生されることが知られている¹⁴⁾。HSP は分子量によって亜型に分類され、HSP105 (105 kDa)、HSP90 (90 kDa)、HSP70 (70 kDa)、HSP27 (25-30 kDa) と呼ばれている。Plumier ら¹⁸⁾ はラットのカイニン酸誘発海馬発作において HSP27 の発現がみられ、その HSP27 陽性細胞はグリア原線維性酸性蛋白 (GFAP) が陽性であることからアストロサイトであると報告し、また Gramsbergen と Berg⁹⁾ はこのモデルにおける GFAP の発現について、脳内分布、時間経過の点から検討した。これらの結果から、ラットのカイニン酸誘発海馬発作においては、ミクログリアの活性化のみならず、アストロサイトの機能的変化も伴う可能性が強く示唆されている。

我々は、これらのグリア細胞の機能的な変化がてんかん発作の早期に生じる脳の生物学的反応の一つであり、発作による脳の機能的、形態的变化に何らかの役割を果たしているとの作業仮説のもとに、その検索の第一段階として、てんかん発作によるミクログリア活性化と共にアストロサイトの指標マーカーである HSP27 発現の詳細について、脳内分布と時間経過の点から検討を行った。

方 法

動物と発作誘導

成熟雄性 Sprague-Dawley ラット (体重 250~400 g) 合計 24 匹を使用した。カイニン酸を左背側海馬に局所注入する群 (局所注入群) と腹腔内投与する群 (全

身投与群) に分けて海馬発作を誘発した。

局所注入群: 14 匹のラットを使用した。腹腔内ペントバルビタール麻酔下で、ステンレスワイヤ (直径 0.3 mm) を内部に挿入したステンレスガイドカニューレ (外径 0.6 mm) を、左背側海馬 (A=-4.2, L=+4.0, D=+3.0) へ脳定位的に挿入した。カニューレは、歯科用セメントを使用して頭蓋骨に固定した。この手術操作後 7 日間の回復期間をおいた後、発作誘発を行った。発作は磷酸緩衝液 (pH 7.4, 0.2 M) に溶解したカイニン酸 (Sigma 社, 2 mg/ml) を、ハミルトン・マイクロフィルターで濾過して無菌化した後、カニューレを通して 0.6 μ l (1.2 μ g) の量を 1 分間かけて左背側海馬に注入した。カイニン酸注入後 6 時間にわたって行動観察し、発作の開始時間、回数および持続時間を記録した。それ以後は全身痙攣の有無についてのみ観察した。発作の重症度は Racine¹⁹⁾ の評価基準に従って、以下の 5 段階に分類し、6 時間の観察時間中に到達した最高の発作段階を、それぞれの「発作進展段階」とした。

ステージ I: 口と顔の運動

ステージ II: 點頭

ステージ III: 前肢間代痙攣

ステージ IV: 後肢での起立

ステージ V: 転倒

全身投与群: カニューレ挿入という物理的損傷による脳の生物学的反応の可能性を除外するために、5 匹のラットにカニューレを挿入せず、カイニン酸 10 mg/kg を腹腔内に注入し、行動変化を 6 時間記録した。

対照群: 5 匹のラットに焦点発作グループと同様の方法で 0.6 μ l 磷酸緩衝液を左背側海馬に 1 分かけて注入し、6 時間行動観察を行った。

免疫染色

局所注入群ではカイニン酸局所投与後 6 時間 (n=5)、3 日間 (n=5)、4 週間 (n=4) で、全身投与群ではカイニン酸腹腔内投与後 3 日間 (n=5) で、対照群では磷酸緩衝液局所投与後 3 日間 (n=5) で、ラットをペントバルビタールの過量投与によって深麻酔し、4%パラホルムアルデヒドを溶解した磷酸緩衝液で灌流した。灌流固定後の脳は頭蓋から取り出し、それぞれ 10%、15%および 20%蔗糖溶液を溶解した

0.1 M 磷酸緩衝液中に、濃度の薄い順からそれぞれ 12 時間ずつ、4℃にて浸透させた。その後脳は、-20℃に維持したクリオ・マイクロームで 10~20 μm 厚の冠状断を作製し、ゼラチンでコーティングしたスライドに貼り付けた。免疫染色は間接免疫ペルオキシダーゼ法¹⁰⁾により行った。切片は 0.3% H₂O₂ を溶解したメタノール液注で 30 分間、室温でインキュベートし、0.1% Triton X-100 入り 0.05 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.6) で 2 回、それぞれ 5 分間洗浄した。切片は、5% 脱脂粉乳を溶解した TBST 緩衝液 (0.05 M Tris-HCl, pH 7.6, 0.5 M NaCl, 0.05% NaN₃, 0.05% Tween20) 中で、抗 CD 11 b 抗体 (単クローン抗体 OX-42, Amersham Life Sciences, 1 : 500)²¹⁾、抗 HSP27 家兎抗体 (愛知県心身障害者コロニー稲熊豊博士より分与, 1 : 100)、抗 HSP27 家兎抗体 (StressGen, 1 : 500) と共に、4℃で一晩インキュベートした。ミクログリアの免疫染色は OX-42 で、HSP27 は抗 HSP27 家兎抗体と抗 HSP25 家兎抗体で行った。0.1% Triton X-100 入りの Tris-HCl 緩衝液で 2 回洗浄後、磷酸緩衝液で 1 : 200 に希釈した horseradish peroxidase 標識二次抗体 (Vector Labs, Burlingame, CA, USA) を組織切片と反応させた免疫反応を 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 溶液 (0.02% DAB / 0.01% H₂O₂ / 50 mM Tris-HCl pH 7.6) により可視化した。切片はヘマトキシリンによる核染色を行った。ニューロンの形態学的変化は、ヘマトキシリンエオジン (HE) 染色によって評価した。

ミクログリアの免疫染色において、活性化ミクログリアはアメーバ状で腫大した細胞体を持つものと定義し、非活性化ミクログリアは細胞体が小さく、多数の繊細な突起を持つものと定義した¹⁶⁾。

これらの実験計画は九州大学医学部動物実験倫理審査委員会により承認された。

結 果

行動の変化

対照群：磷酸緩衝液のみを左背側海馬に注入した対照群では、どのラットにも行動の変化は見られなかった。

局所注入群：左背側海馬へのカイニン酸局所投与を

行ったラットは、Racine¹⁹⁾ によって定義された辺縁系発作の進展段階に従った行動の変化を示した。カイニン酸投与後 6 時間で屠殺したラットでは、5 匹のラットのうち 4 匹はステージ IV まで発作が進展し、他の 1 匹はステージ III まで進展した。3 日間後に屠殺したラットでは、カイニン酸注入後 6 時間までに 5 匹のラットのうち 2 匹はステージ IV まで、他の 2 匹はステージ I、残りの 1 匹はステージ II まで発作が進展した。4 週間後に屠殺したラットでは、カイニン酸注入後 6 時間までに 4 匹のうち 2 匹はステージ IV、2 匹はステージ I まで進展した。しかし、いずれのラットでもカイニン酸注入後発作段階を観察した時間は 6 時間のみであり、3 日および 4 週間後に屠殺したラットでは 6 時間以後にも発作が進展して全身痙攣を示し、すべてのラットが最終的にはステージ IV まで進展した。従って、カイニン酸注入後 6 時間までの発作進展段階は初期の発作進展の速度を示すものと考えられた。

全身投与群：腹腔内へカイニン酸投与を行ったラットでは、局所注入群と同一の時間経過で、同一の行動変化による発作進展が見られた。従って、全身投与群でも辺縁系構造が優先的に発作に関わったことが明らかとなった。すべてのラットは 6 時間の観察時間内にステージ IV まで進展した。

ミクログリア活性化と HSP27 発現

対照群：磷酸緩衝液注入 3 日後には、カニューレ挿入部位周囲にのみ活性化ミクログリアが見られ、脳全体には非活性化型ミクログリアが認められた (図 1 a, b)。HSP27 陽性細胞も同様にカニューレ挿入部位周囲のみで見られた (図 1 c, d)。

局所注入群：

1. カイニン酸注入 6 時間後：5 匹すべてのラットにおいて、活性化ミクログリアは注入側背側海馬に局限して認められた。他の脳構造には活性化ミクログリアは見られなかった。

HSP27 陽性細胞はカニューレ挿入部位周囲のみに認められ、注入側海馬やその他の脳部位には見られなかった。

HE 染色ではニューロンの形態学的変化は見られなかった。

2. カイニン酸注入 3 日後：活性化ミクログリアは

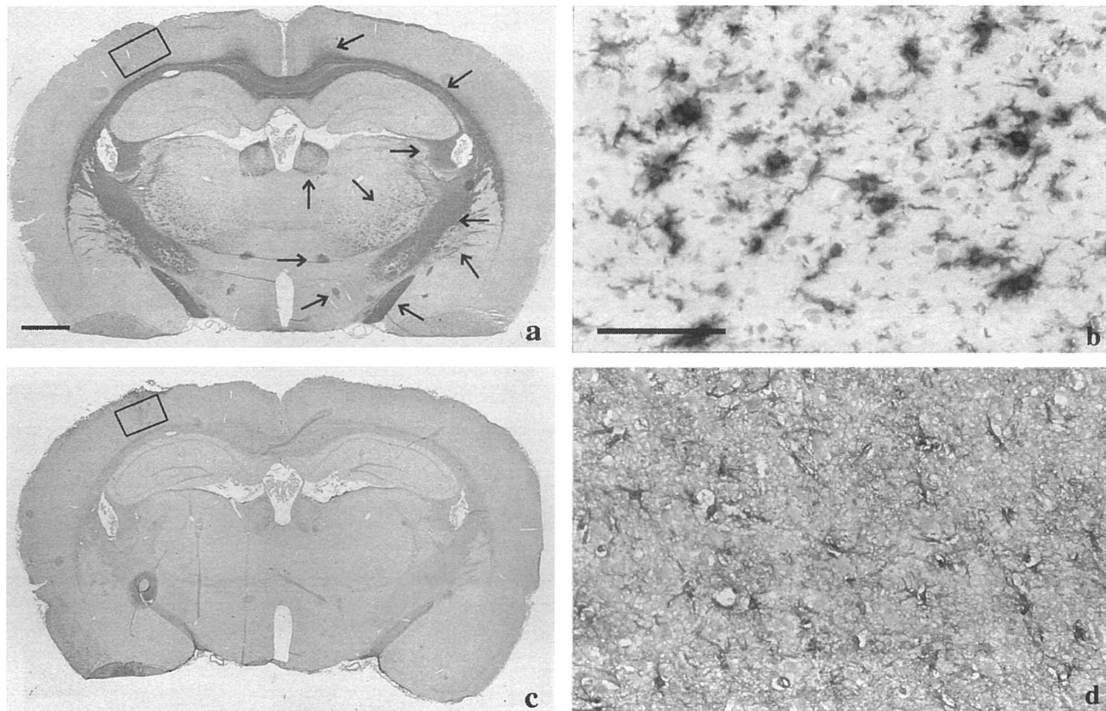


図1 対照群（左背側海馬に燐酸緩衝液注入）でのミクログリア（a, b）と HSP27（c, d）免疫染色。冠状断の顕微鏡写真。燐酸緩衝液注入3日後。

a：カニューレ挿入部位（四角で囲んだ部分）のミクログリア活性化を示す。その他の脳部位におけるミクログリア活性化は見られない。矢印で示す部位（背側から腹側へ帯状回皮質，大脳白質，海馬采，手綱核，視床網様核，内包，尾状核-被殻，乳様体視床路，脳弓，および視索）は非特異的染色。両側海馬では，CA-1,2 および3 野の錐体細胞および歯状回の顆粒細胞がヘマトキシリンにより薄く染色されている。b：図1 a の四角で囲んだ領域（カニューレ挿入部位）の拡大写真。活性化ミクログリアはOX-42 抗体で強く染色され，ニューロンはヘマトキシリンの対比染色で淡く染色されている。c：カニューレ挿入部位（四角で囲んだ部分）の HSP27 陽性細胞を示す。その他の脳部位における HSP27 陽性細胞は見られない。d：図1 c の四角で囲んだ領域（カニューレ挿入部位）の拡大写真。HSP27 陽性細胞を認める。

本図と以下の図で，脳切片の左側が左半球を示す。

スケールバー：a, c 1 mm；b, d 0.1 mm

脳の広範な領域に散在した（表1，図2 a）。すなわち，注入側背側海馬を中心に，新皮質（前頭葉，感覚運動野，頭頂葉，聴覚野，視覚野），古皮質（嗅内野，梨状葉，帯状回），海馬（CA-1 野，CA-3 野，歯状回），中隔，扁桃体，視床下部（背側領域，腹内側核，外側領域），視床（背外側核，腹後側・腹外側核）および脳梁に分布していた。しかし，大脳基底核，小脳および脳幹には同側，対側ともに，ミクログリアの活性化はまったく見られなかった（表1）。活性化が最も顕著な部位は海馬で，注入側に著しいが，すべてのラットにおいて両側性に見られた（図2 a, b）。次いで新皮

質各領域，嗅内野，梨状葉および視床背外側核にも明らかな活性化が認められたが，これらの部位は海馬と違い，必ずしも両側性ではなく，注入側では全例に認められたが，反対側には出現していないラットもあった（表1）。扁桃体ではすべてのラットにおいて，同側のみ分布を認めた。

背側海馬におけるミクログリアの活性化は注入側と対側で，その程度と分布に相違が見られた。注入側では歯状回顆粒細胞層を除いて，広い領域で活性化が生じており，特に CA-2 野と CA-3 野の錐体細胞層，および歯状回の門で顕著であった（図2 b）。一方，反対

表1 左背側海馬へのカイニン酸注入3日後の活性化ミクログリアとHSP27陽性細胞の分布

構 造 物	活性化ミクログリア (n=5)		HSP27 陽性細胞 (n=5)	
	同 側	対 側	同 側	対 側
新皮質				
前頭葉	+++++	++---	+++++	++---
感覚運動野	+++++	+++++	+++++	+++++
頭頂葉	+++++	+++++	+++++	+++++
聴覚野	+++++	++---	+++++	+++++
視覚野	+++++	+++++	+++++	+++++
古皮質				
嗅内野	+++++	+++--	+++++	+++--
梨状葉	+++++	+++--	+++++	+++--
帯状回	+++++	+++--	++---	++---
基底核				
線条体	-----	-----	-----	-----
淡蒼球	-----	-----	+-----	-----
黒質	-----	-----	-----	-----
脚間核	-----	-----	-----	-----
視床下核	-----	-----	-----	-----
辺縁系				
海馬 CA-1 野	+++++	+++++	+++++	+++--
CA-3 野	+++++	+++++	+++++	+++++
齒状回	+++++	+++++	+++++	+++++
中隔	+++++	++---	+++++	++---
扁桃体	+++++	-----	+++++	+++++
分界条底核	-----	-----	-----	-----
外側手綱核	-----	-----	-----	-----
視床下部				
腹内側核	+++--	++---	-----	-----
外側領域	++---	++---	++---	-----
背側領域	+++--	++---	+++--	-----
視床				
前腹側核	-----	-----	-----	-----
背内側核	-----	-----	-----	-----
背外側核	+++++	++---	+++--	++---
腹後側・腹外側核	+++--	-----	-----	-----
中心正中核	-----	-----	-----	-----
後側核群	-----	-----	-----	-----
内側膝状体核	-----	-----	-----	-----
外側膝状体核	-----	-----	-----	-----
小脳 #	-----	-----	-----	-----
脳幹 #	-----	-----	-----	-----
白質				
脳梁	+++--	+++--	+++++	+++++
内包	-----	-----	-----	-----

+ それぞれのラットで、活性化ミクログリアあるいはHSP27陽性細胞が見られたもの

- それぞれのラットで、コントロールグループと比較して、活性化ミクログリアあるいはHSP27陽性細胞の誘導が見られなかったもの

HSP27陽性細胞は脳幹神経核および小脳プルキンエ細胞に見られたが、それはコントロールグループにも見られた

側ではやはり広範な分布を示すものの、活性化の程度は著しくなく、また層的分布も錐体細胞層、門などの細胞体が存在する層に強いという傾向は示さなかった。

HSP27 陽性細胞は活性化ミクログリアとほぼ同じ分布を示した(表 1, 図 2 c, d)。しかしながら、これら二つの現象にはいくつかの違いも見られた。すなわち活性化ミクログリアの分布と異なり、HSP27 の発現は 5 匹中 3 匹のラットにおいて両側扁桃体に見られ、2 匹のラットが視床背外側核に発現を欠き、そして 1 匹のラットでは淡蒼球の同側にも発現が見られた。

背側海馬における HSP27 発現の分布はミクログリア活性化と同様、注入側と対側で、その程度と分布に相違が見られた。注入側では CA-3 野の錐体細胞層と

歯状回顆粒細胞層を除いて、HSP27 発現は広い範囲で見られた(図 2 d)。一方、対側ではその分布に層特異性がみられ、この点がミクログリア活性化の分布と著しく異なる点であった。すなわち、対側背側海馬におけるミクログリア活性化分布が広範であったのに対し、HSP27 は歯状回の分子層と門、および CA-3 野の放線層と分子層に選択的に発現していた(図 2 a~d, 3 a~d)。

これらのミクログリア活性化及び HSP27 の発現状態は、カイニン酸注入後 6 時間までの発作進展段階(ステージ IV およびステージ I が 2 匹ずつ、ステージ II が 1 匹)による明らかな差は認められなかった。

HE 染色によるニューロンの形態学的変化として、

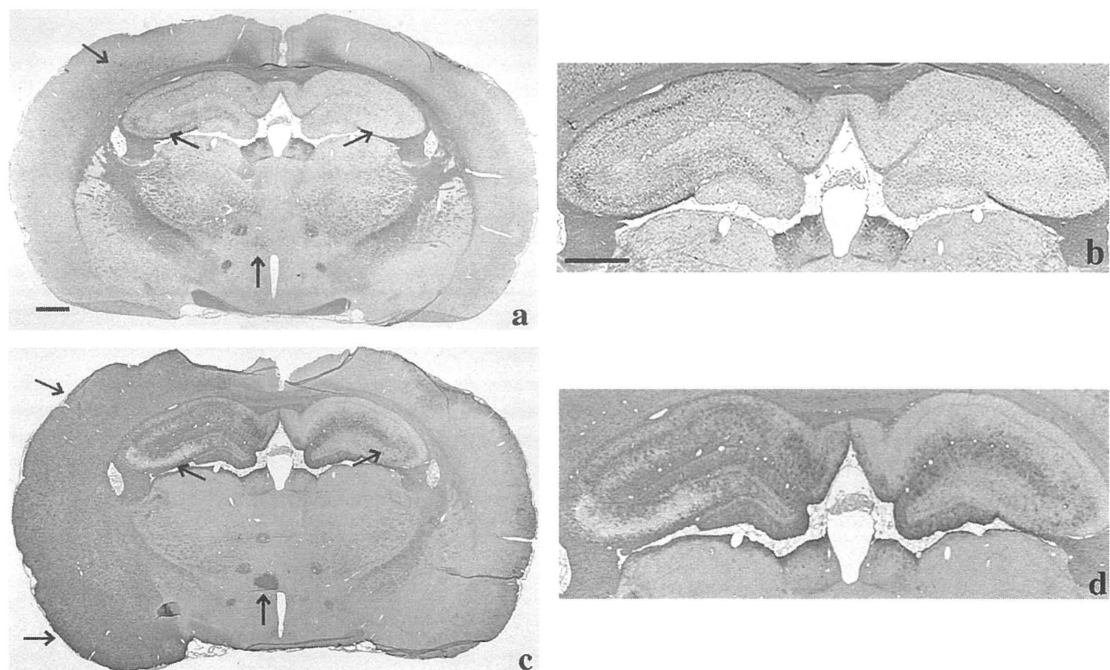


図 2 局所注入群(左背側海馬にカイニン酸注入)でのミクログリア(a, b)と HSP27(c, d)免疫染色。冠状断の顕微鏡写真。カイニン酸注入 3 日後。a: 活性化ミクログリアは矢印で示すように注入側(左)では、背側海馬とその直上の新皮質、背側視床下部領域に見られ、さらに対側の背側海馬にも認められる。b: 図 2 a の両側海馬の拡大写真。同側海馬では、歯状回顆粒細胞層を除いて、広い領域でミクログリアの活性化が起こっている。特に CA-2 野と CA-3 野の錐体細胞層および歯状回の門で著しい。対側海馬でのミクログリア活性化の分布は図 3 a, b に示す。c: HSP27 陽性細胞は注入側海馬で最も顕著に見られ、その他同側では新皮質、扁桃体、背側視床下部領域でも認められる(矢印)。対側の背側海馬にも明瞭な HSP27 発現が認められる(矢印)。d: 図 2 c の両側海馬の拡大写真。同側では CA-3 野の錐体細胞層と歯状回顆粒細胞層を除いて、HSP27 陽性細胞は広い領域で見られる。対側海馬での HSP27 陽性細胞の分布は図 3 c, d に示す。
スケールバー: a, c 1 mm; b, d 1 mm

カイニン酸注入部位である同側背側海馬錐体細胞層と歯状回門のニューロンがすべて消失していた。しかし、反対側背側海馬にはニューロンの形態学的変化は見られず(図3e, f), またその他の脳部位にも変化を認めなかった。

3. カイニン酸注入4週間後: ミクログリア活性化とHSP27発現の分布は, 3日後のラットと比較する

とその分布が狭まって限局化する傾向を示し, 新皮質と視床(特に背外側核)での変化が著しく減少して, 海馬優位性が顕著となっていた(表2)。両者の分布はほぼ一致しており, 同側海馬に最も著明で, 対側海馬がこれに次ぎ, 梨状葉皮質では4匹中2匹ながら両側性発現を示した。

HE染色による形態変化では, ニューロンの消失は

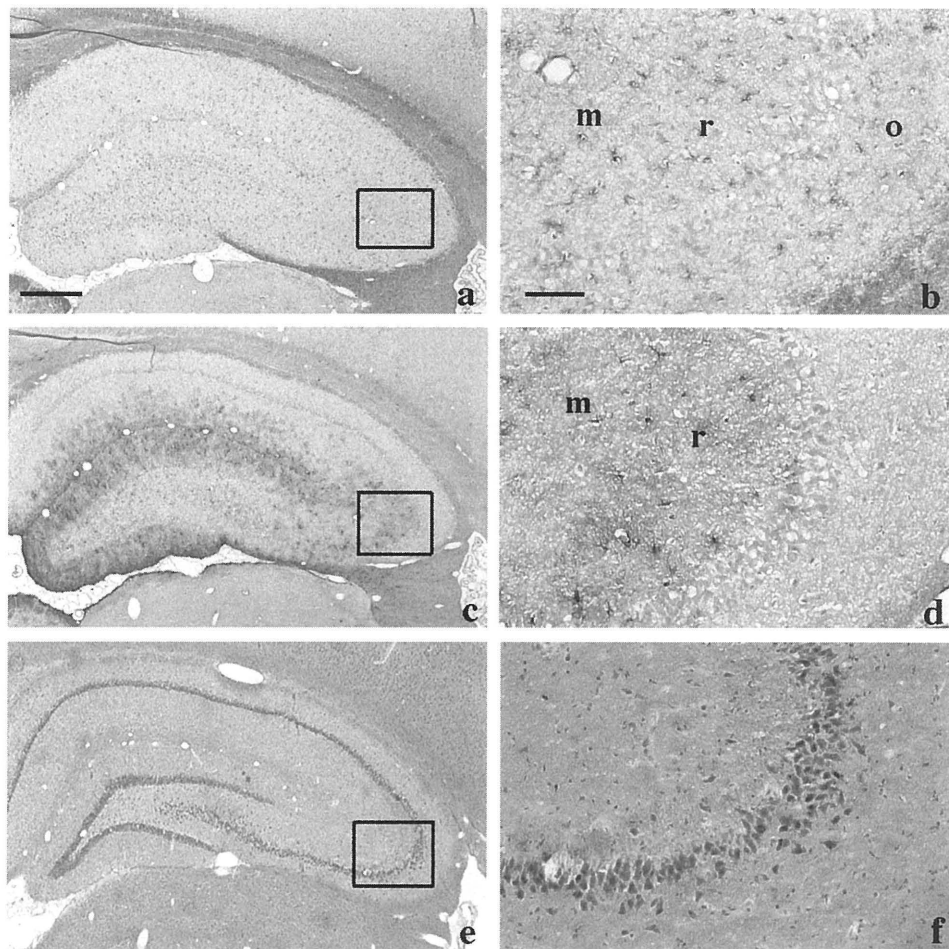


図3 局所注入群(左背側海馬にカイニン酸注入)での対側海馬におけるミクログリア(a, b)とHSP27(c, d)の免疫染色およびヘマトキシリン-エオジン染色(e, f)。冠状断の顕微鏡写真(図2と同一ラット)。カイニン酸注入3日後。a: 活性ミクログリアは海馬全体に点在している。b: 図3aの四角で囲んだ領域の拡大写真。活性ミクログリアは分子層(m), 放線層(r)とオリエン層(o)に見られる。c: HSP27陽性細胞は歯状回の分子層と門およびCA-3野の分子層と放線層に見られる。d: 図3cの四角で囲んだ領域の拡大写真。HSP27陽性細胞は分子層と放線層に見られる。e: ヘマトキシリン-エオジン染色では, 錐体細胞と顆粒細胞の形態学的変化は見られない。f: 図3eの四角で囲んだ領域の拡大写真。

スケールバー: a, c, e 0.5mm; b, d, f 0.1mm

表 2 左背側海馬へのカイニン酸注入 4 週間後の活性化ミクログリアと HSP27 陽性細胞の分布

構 造 物	活性化ミクログリア (n = 4)		HSP27 陽性細胞 (n = 4)	
	同 側	対 側	同 側	対 側
新皮質				
前頭葉	-----	-----	-----	-----
感覚運動野	-----	-----	-----	-----
頭頂葉	-----	-----	-----	-----
聴覚野	-----	-----	-----	-----
視覚野	-----	-----	-----	-----
古皮質				
嗅内野	++--	++--	-----	-----
梨状葉	++--	++--	++--	++--
帯状回	-----	-----	-----	-----
基底核				
線条体	-----	-----	-----	-----
淡蒼球	-----	-----	-----	-----
黒質	-----	-----	-----	-----
脚間核	-----	-----	-----	-----
視床下核	-----	-----	-----	-----
辺縁系				
海馬 CA-1 野	++++	+++--	++++	+++--
CA-3 野	++++	++--	+++--	+-
齒状回	++++	+-	+++--	+-
中隔	+---	+---	+---	+---
扁桃体	-----	-----	-----	-----
分界条底核	-----	-----	-----	-----
外側手綱核	-----	-----	-----	-----
視床下部				
腹内側核	-----	-----	-----	-----
外側領域	-----	-----	-----	-----
背側領域	-----	-----	-----	-----
視床				
前腹側核	-----	-----	-----	-----
背内側核	+---	+---	+---	+---
背外側核	+---	-----	-----	-----
腹後側・腹外側核	-----	-----	-----	-----
中心正中核	-----	-----	-----	-----
後側核群	+---	+---	+---	+---
内側膝状体核	-----	-----	-----	-----
外側膝状体核	-----	-----	-----	-----
小脳	-----	-----	-----	-----
脳幹	-----	-----	-----	-----
白質				
脳梁	-----	-----	-----	-----
内包	-----	-----	-----	-----

+ それぞれのラットで、活性化ミクログリアあるいは HSP27 陽性細胞が見られたもの

- それぞれのラットで、コントロールグループと比較して、活性化ミクログリアあるいは HSP27 陽性細胞の誘導が見られなかったもの

海馬に限られ、同側ではすべての領域の錐体細胞層に、対側では特に CA-1 野に強くニューロンの消失が見られた。

全身投与群：カイニン酸腹腔内投与 3 日後では、活性化ミクログリアは各領域の新皮質、嗅内野皮質、梨状葉皮質、線条体、淡蒼球、海馬、中隔、扁桃体、視床下部、視床および脳梁に広範囲に分布していた。HSP27 陽性細胞はこれらの部位に加えて、帯状回、脚間核、視床下核、分界条底核、外側手綱核および内包にも見られた（表 3）。これらの活性ミクログリアと HSP27 発現の脳内分布状態は局所注入群の 3 日後の状態と根本的に類似し、辺縁系、古皮質、新皮質に著明な変化が認められた。しかし、局所注入群と異なる点は、ミクログリア活性化と HSP27 発現の分布は、全身投与群で左右対称性の傾向がより強く認められたこと、さらに大脳基底核（線条体と淡蒼球）、視床背内側核および中心正中核に陽性所見がみられたことであった。すべてのラットにおいて、脳幹と小脳には活性化ミクログリアも HSP27 陽性細胞も認められなかったことは局所注入群と同一所見であった。

HE 染色による形態学的な変化として、海馬の錐体細胞の消失が CA-1, CA-3 野のすべての領域で両側性に見られた。しかし歯状回の顆粒細胞消失は認めず、他の脳構造でも明らかなニューロンの形態学的変化は認めなかった。

考 察

カイニン酸誘発海馬発作におけるミクログリア活性化と HSP27 発現

1. 局所注入群

ミクログリア活性化はカイニン酸注入後 6 時間で観察された。この時間では、それは一次焦点部位（左背側海馬）にのみ限局していた。一方、HSP27 発現は 6 時間後では認められず、3 日後に初めて観察された。両者の発現時間が異なることから、二つの現象が基本的に同一過程に基づいて生じるものではないことが示唆される。

カイニン酸注入 3 日後の活性化ミクログリアと HSP27 陽性細胞の脳内分布はほとんど同じで、左背側海馬の一次焦点が最も顕著であるが、それだけでなく、その遠隔部位にも陽性所見が観察された。これらの分

布は、局所脳糖代謝¹²⁾や局所脳血流⁹⁾の測定によって明らかにされた海馬発作活動の脳内伝播経路と非常によく一致していた。これらのミクログリア活性化と HSP27 発現は、単にカニューレ挿入という物理的脳損傷によって惹起されたものではないことは、以下の理由から明らかである。すなわち、この二つの現象はカイニン酸を注入していない対照群ではカニューレ挿入部位のみで観察されたこと（この部位の現象は挿入による脳損傷によると考えられる）、カニューレを挿入しなかった全身投与群では両者の分布が局所注入群とほとんど同じであったことなどがあげられる。さらに、この二つの現象が注入部位からのカイニン酸の脳内拡散によるものではないことは、これらの分布が注入部位から連続的に広がることなく、海馬一次焦点とのニューロン結合が明らかにされている反対側海馬や他の大脳辺縁系諸構造、古皮質、視床下部や視床の諸核などの発作伝播経路⁹⁾¹²⁾に従って、選択的かつ不連続的にみられており、加えて発作伝播経路以外の脳部位には観察されなかったことから明らかである。従って、我々は、HSP 発現はミクログリア活性化と同様²⁶⁾、急性海馬発作活動の脳内伝播経路に従って、経シナプス性に出現したと結論する。

ミクログリア活性化と HSP27 発現は、発作の一次焦点と伝播経路に当たる遠隔脳部位においてニューロンの明らかな形態学的変化を伴わずに認められた。従って、これらの現象はニューロン損傷の結果生じたものではなく、ニューロンの過剰興奮という機能的異常の結果生じた可能性が強いと考える。

ミクログリア活性化と HSP27 発現はカイニン酸注入 4 週間後にも見られた。この研究において、時間経過の評価は正確にはできないが、二つの現象は発作開始から少なくとも 4 週間は持続すると考えられる。

2. 全身投与群

活性化ミクログリアと HSP27 陽性細胞の脳内分布はほとんど同じであり、この二つの現象は局所注入群における脳内分布とも非常に類似していた。すなわち、全身投与群においても局所注入群と同様、ミクログリア活性化と HSP27 発現は海馬で最も顕著であり、さらに海馬発作の脳内伝播経路に相当する脳構造を中心に、これらの現象が認められた。しかも、伝播経路か

表3 腹腔内へのカイニン酸注入3日後の活性化ミクログリアとHSP27陽性細胞の分布

構 造 物	活性化ミクログリア (n=5)		HSP27 陽性細胞 (n=5)	
	同 側	対 側	同 側	対 側
新皮質				
前頭葉	+++++	+++++	+++++	+++++
感覚運動野	+++--	+++--	+++++	+++++
頭頂葉	++---	++---	+++++	+++++
聴覚野	+++--	+++--	+++++	+++++
視覚野	++---	++---	+++++	+++++
古皮質				
嗅内野	+++++	+++++	+++++	+++++
梨状葉	+++++	+++++	+++++	+++++
帯状回	-----	-----	++---	++---
基底核				
線条体	+-----	+-----	++---	++---
淡蒼球	+-----	+-----	++---	++---
黒質	-----	-----	-----	-----
脚間核	-----	-----	+-----	+-----
視床下核	-----	-----	+-----	+-----
辺縁系				
海馬 CA-1 野	+++++	+++++	+++++	+++++
CA-3 野	+++++	+++++	+++++	+++++
齒状回	+++++	+++++	+++++	+++++
中隔	+++++	+++++	+++++	+++++
扁桃体	+++++	+++++	+++++	+++++
分界条底核	-----	-----	++---	++---
外側手綱核	-----	-----	+-----	+-----
視床下部				
腹内側核	+++++	+++++	+++--	+++--
外側領域	+++++	+++++	+++++	+++++
背側領域	+++++	+++++	+++++	+++++
視床				
前腹側核	-----	-----	-----	-----
背内側核	+++++	+++++	+++++	+++++
背外側核	+++--	+++--	++---	++---
腹後側・腹外側核	+-----	+-----	+-----	+-----
中心正中核	+++++	+++++	+++++	+++++
後側核群	-----	-----	-----	-----
内側膝状体核	-----	-----	-----	-----
外側膝状体核	-----	-----	-----	-----
小脳	-----	-----	-----	-----
脳幹	-----	-----	-----	-----
白質				
脳梁	+-----	+-----	++---	++---
内包	-----	-----	+-----	+-----

+ それぞれのラットで、活性化ミクログリアあるいはHSP27陽性細胞が見られたもの

- それぞれのラットで、コントロールグループと比較して、活性化ミクログリアあるいはHSP27陽性細胞の誘導が見られなかったもの

らはずれる脳幹と小脳では、両現象は陰性であった。また、カイニン酸投与後の行動変化も局所投与群と同様で、Racine¹⁹⁾による発作発展段階と良く一致して行動変化が認められた。従って、カイニン酸の全身投与によっても、発作閾値が最も低い海馬にまず発作が誘発され、辺縁系発作が優位に起こるものと考えられる¹⁵⁾²³⁾。

しかし、全身投与群では、ミクログリア活性化、HSP27 発現とも局所注入群に比べ、より広範で左右対称性の分布を示した。すなわち局所注入群では見られなかった線条体、淡蒼球、視床背内側核および中心正中核にもこれらの現象が認められた。この結果は、カイニン酸の腹腔内投与により、脳のより広範な部位にカイニン酸が直接作用して毒性を発揮したと考えられ、例えば運動系にも一次焦点からの二次性伝播に加えて、直接的作用があったことが推定される¹¹⁾。

HSP27 の意義

本研究結果で注目されたものの一つは、対側海馬での HSP27 発現の層特異的分布であった。すなわち、HSP27 発現は歯状回の分子層と門、および CA-3 野の放線層と分子層に選択的に認められた。ミクログリア活性化の分布はこのような層特異性を示さなかった。一方、カイニン酸注入側の海馬では、HSP27 発現、ミクログリア活性化とも層的特異性を示さず、全般的にびまん性の分布を示した。注入側では発作による影響に加えて、カイニン酸が背側海馬内に広範に拡散し、その結果毒性作用が直接的に、びまん性に生じたためと考えられる。

対側海馬で HSP27 発現が見られた層は、いずれもシナプス結合が高密度に形成されている層であった。すなわち、歯状回分子層には顆粒細胞の樹状突起が伸びており、それには門の苔状細胞の軸索突起が密なシナプス結合を形成している²⁰⁾。門の苔状細胞には貫通線維と歯状回顆粒細胞の軸索突起（苔状線維）がシナプスを形成し²²⁾、また CA-3 野の放線層と分子層には錐体細胞の樹状突起が伸びて、苔状線維との間に密なシナプスを形成している⁴⁾。従って、これらの層における HSP27 発現は、海馬のシナプス集合部におけるアストロサイトの反応を表現していると考えられ⁹⁾¹⁸⁾、発作によるシナプス活動の異常亢進が直接的原因とも

考えられる。シナプス活動の異常亢進によって、シナプス前ニューロン終末からの神経伝達物質、神経活性物質、各種イオン等の異常放出、シナプス後ニューロンにおけるイオンチャネル変化や二次メッセンジャー機能賦活による細胞内機能の変化²⁸⁾等が生じ、これらの変化に対してアストロサイトが反応した可能性を否定できない。

側頭葉てんかんでは、ヒトにおいても、また動物モデルにおいても、発作の反復によって海馬の形態的变化、特に海馬硬化を生じ、さらにこれはてんかん原性変化を生じると考えられている²⁵⁾²⁷⁾。海馬硬化は、錐体細胞と苔状細胞の死と、歯状回分子層（顆粒細胞上領域）内側層での発芽を特徴とし²⁷⁾、HSP27 発現は海馬硬化像に関係するニューロン群変化と密接に関連して起こることが分かる。しかも HSP27 発現はニューロンの明らかな形態的变化が生じる前に起こるので、アストロサイトの反応が発作による海馬ニューロンの機能的、形態的变化のごく初期過程に密接な関連をもっている可能性が考えられる。

HSP の中で、70 kDa クラス（HSP70）の発現がてんかん発作に関連して起こることが報告されている。すなわち、カイニン酸誘発発作によって障害されやすいニューロンに HSP70 の急速な誘導が見られ、その後アポトーシスを起こしたことが観察されている⁵⁾²⁴⁾。今後てんかん発作モデルについて、HSP27 と HSP70 の発現を検索することは、発作によるアストロサイトとニューロンの相互作用を追求する上で重要なことと考える。

ミクログリア活性化の意義

ミクログリア活性化の意義についてはなお論争が続いている。死に陥ったニューロンを貪食して、清掃過程に果たすミクログリアの役割はよく知られている。さらに最近の研究では、活性化ミクログリアが損傷ニューロンを修復・再生するという報告や¹⁷⁾、逆にニューロンの死や機能低下を引き起こすという報告があり²⁾³⁾、発作によるニューロン変化にミクログリアが何らかの影響を持つことが示唆されている。この点についてはなお今後の研究が必要である。

てんかんとの関係

てんかん発作の反復によって、キンドリング現象や海馬硬化など、脳に機能的・形態学的変化が起こることは周知の事実である。そしてこれらの変化は、結果的にてんかん原性変化に影響を及ぼすと考えられている。さらにてんかん発作は、そのごく早期に“長期増強効果”などの脳機能変化を生じることも知られている。さらに本研究によって、発作後早期に、ニューロンの変化のみならず、ミクログリア活性化とHSP27発現というグリア細胞の変化がてんかん焦点部位のみならず、焦点とは離れた発作伝播経路内の遠隔脳部位において、ニューロンの見かけ上の形態学的変化なしに出現することが示された。ただし、この研究におけるニューロンの形態学的変化は、HE染色による光顕レベルの検索であるので、特殊染色や免疫染色または電顕による検索を行えば、何らかの変化を早期に検出できた可能性は否定できない。しかし、いずれにしても、本研究は生理学的に検出できる機能的変化以外に、ニューロンを取り巻く脳の微小環境の変化がてんかん焦点とその伝播経路内に、発作後早期に生じていることの一端を明らかにしたもので、まだ十分に解明されていない脳内の他の生物学的反応と共に、これらがてんかん原性の増強・抑制、ニューロンの障害・保護等、てんかん発作に伴う種々の脳変化に関与している可能性が考えられる。てんかん発作に伴う早期の脳微小環境の変化とその意義を明らかにすることは、てんかんの治療、発作による脳の二次的障害の予防等、臨床的にも重要な意味を持つと思われ、今後なお一層の研究が必要であると考えられる。

謝 辞

ご指導頂いた九州大学大学院医学研究院脳神経病研究施設神経内科吉良潤一教授、および同臨床神経生理の加藤元博 元教授、飛松省三教授に深謝致します。また、研究上の示唆やご援助をして頂いた同臨床神経生理の島 史雄助教授、谷脇恭講師、後藤純信博士に感謝致します。さらに多くの技術的援助を頂いた同神経病理岩城 徹教授、抗HSP27ウサギ抗体を提供して頂いた稲熊 豊博士（愛知県心身障害者コロニー）に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Anderson PB, Perry VH and Gordon S:

The kinetics and morphological characteristics of the macrophage-microglial response to kainic acid-induced neuronal degeneration. *Neuroscience* 42: 201-214, 1991.

- 2) Banati RB, Gehrmann J, Czech C, Mönning U, Jones LL, König G, Beyreuther K and Kreutzberg GW: Early and rapid de novo synthesis of Alzheimer BA4-amyloid precursor protein (APP) in activated microglia. *Glia* 9: 199-210, 1993.

- 3) Boje KM and Arora PK: Microglia-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain. Res.* 587: 250-256, 1992.

- 4) Gaarskjaer FB: Organization of mossy fiber system of the rat studied in extended hippocampi. *J. Comp. Neur.* 178: 73-88, 1978.

- 5) Gass P, Prior P and Kiessling M: Correlation between seizure intensity and stress protein expression after limbic epilepsy in the rat brain. *Neuroscience* 65: 27-36, 1995.

- 6) Gehrmann J, Gold R, Linington C, Lannes-Vieira, Wekerle H and Kreutzberg GW: Spinal cord microglia in experimental allergic neuritis: evidence for fast and remote activation. *Lab. Invest.* 67: 100-113, 1992.

- 7) Gehrmann J, Shoen SW and Kreutzberg GW: Lesion of the rat entorhinal cortex leads to a rapid microglial reaction in the deafferented dentate gyrus. A light and electron microscopical study. *Acta Neuropathol.* 82: 442-455, 1991.

- 8) Goto Y, Araki T, Kato M and Fukui M: Propagation of hippocampal seizure activity arising from the hippocampus: a local cerebral blood flow study. *Brain Res.* 634: 203-213, 1994.

- 9) Gramsbergen JP and Berg KJ: Regional and temporal profiles of calcium accumulation and glial fibrillary acidic protein levels in rat brain after systemic injection of kainic acid. *Brain Res.* 667: 216-228, 1994.

- 10) Hitotsumatsu T, Iwaki T, Fukui M and Tateishi J: Distinctive immunohistochemical profiles of small heat shock proteins (heat shock protein 27 and alpha B-crystallin) in human brain tumors. *Cancer* 77: 352-361, 1996.

- 11) Kato M, Malamut BL, Caveness WF, Hosokawa S, Wakisaka S and O'Neill RR: Local cerebral glucose utilization in newborn and pubescent monkeys during focal motor seizures. *Ann. Neurol.* 7: 204-212, 230-232, 1980.

- 12) Kato M, Tegoshi S and Araki T: Propagation of acute seizure activities observed by local

cerebral glucose metabolism. *Jpn. J. Psychiatry Neurol.* 45: 265-270, 1991.

13) Kaur C and Ling EA: Activation and re-expression of surface antigen in microglia following an epidural application of kainic acid in the rat brain. *J. Anat.* 180: 333-342, 1990.

14) Lindquist S and Kraig EA: The heat-shock proteins. *Ann. Rev. Genet.* 22: 631-677, 1988.

15) Lothman EW and Collins RC: Kainic acid induced limbic seizures: metabolic, behavioral, electroencephalographic and neuropathological correlates. *Brain Res.* 218: 299-318, 1981.

16) Morioka T, Kalehua AN and Streit WJ: The microglial reaction in the rat dorsal hippocampus following transient forebrain ischemia. *J. Cerebral Blood Flow Metab.* 11: 966-973, 1991.

17) Nakajima K and Kohsaka S: Functional roles of microglia in the brain. *Neurosci. Res.* 17: 187-203, 1993.

18) Plumier JC, Armstrong JN, Landry J, Babity JM, Robertson HA and Currie RW: Expression of the 27,000 mol. WT heat shock protein following kainic acid-induced status epilepticus in the rat. *Neuroscience* 75: 849-856, 1996.

19) Racine RJ: Modification of seizure activity by electrical stimulation: II, Motor Seizure. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 32: 281-294, 1972.

20) Ribak CE, Seress L and Amaral DG: The development, ultrastructure and synaptic connections of the mossy cells of the dentate gyrus. *J. Neurocytol.* 14: 835-857, 1985.

21) Robinson AP, White TM and Mason DW: Macrophage heterogeneity in the rat as delineated

by two monoclonal antibodies MRC OX-41 and MRC OX-42, the latter recognizing complement receptor type 3. *Immunology* 57: 239-247, 1986.

22) Scharfman HE and Schwartzkroin PA: Response of cells of the rat fascia dentata to prolonged stimulation of the perforant path: sensitivity of hilar cells and changes in granule cell excitability. *Neuroscience* 35: 491-504, 1990.

23) Schwob JE, Fuller T, Price JL and Olney JW: Widespread patterns of neuronal damage following systemic or intracerebral injections of kainic acid: a histological study. *Neuroscience* 5: 991-1014, 1980.

24) Shimosaka S, So YT and Simon RP: Distribution of HSP72 induction and neuronal death following limbic seizures. *Neurosci. Lett.* 138: 202-206, 1992.

25) Sloviter RS: Feedforward and feedback inhibition of hippocampal principal cell activity evoked by perforant path stimulation: GABA-mediated mechanisms that regulate excitability in vivo. *Hippocampus* 1: 31-40, 1991.

26) Taniwaki Y, Kato M, Araki T and Kobayashi T: Microglial activation by epileptic activities through the propagation pathway of kainic acid-induced hippocampal seizure in the rat. *Neurosci. Lett.* 217: 29-32, 1996.

27) Taub DL and Nadler JV: Evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal formation of kainic acid-treated rats. *J. Neurosci.* 5: 1016-1022, 1985.

28) Yamamoto C: Long-term potentiation and long-term depression in hippocampus. *Advances in Neurolog. Sci.* 38: 34-45, 1994.

(受付 2001-1-26)