

D-19 定量 RT-PCR および *In situ hybridization* による

イハラてんかんラット(IER) 海馬における

GABA 合成酵素(GAD)、GABA_A 受容体、GABA transporter (GAT) の各 mRNA 発現の解析滋賀医科大学第2病理学講座¹⁾、同脳外科²⁾、同検査部³⁾、ICR 基礎研究所⁴⁾○早瀬ヨネ子¹⁾、天野 殖¹⁾、福岡順也¹⁾、辻 篤司²⁾、
菅原正清³⁾、伊原信夫⁴⁾

[目的] γ -aminobutyric acid (GABA) は脳における主たる抑制性の伝達物質であり GAD で合成され、GABA 受容体を介して働く。また海馬終末では GABA の濃度とその作用の持続時間は主として GABA transporter によって調節されている。IER では海馬の GABA 結合能増加が示されているが、てんかん発作は進展する。この詳細について考察するために我々は IER における GAD65、67、GABA_A 受容体 ($\alpha 1, 2, 4, 5, \beta 2, 3, \gamma 1, 2S, 2L$ subunits)、GAT-1 の mRNA 発現量を定量 RT-PCR にて検討した。また *In situ hybridization* (ISH) により、海馬における各 mRNA 発現分布強度を検索した。

[材料と方法] 2、5、10 月齢のてんかんラットおよび対照ラット雄各 6 匹を用いた。てんかん発作は stage5 強直間代性痙攣を陽性とした。海馬を取りだし定量 RT-PCR にて mRNA 発現量を比較した。また digoxigenin-labeled cRNA probe を用いて ISH をおこなった。

[結果] IER では GAD 65、67 は発作発症以前の 2 ヶ月より上昇し、ISH では hilus の interneuron につよくみられた。GABA_A 受容体 $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 4, \alpha 5, \gamma 1, \gamma 2S, \gamma 2L$ subunits はてんかん発症後の 5、10 ヶ月で増加し、特に $\alpha 2$ subunits の増加が著明であった。 $\beta 2$ は差がなく、 $\beta 3$ は 2 ヶ月には高いがもとに戻った。GAT-1 は 5、10 ヶ月で減少して、特に発作焦点と考えられる海馬 hilus 部から CA3 内側部にかけての細胞で signal の消失がみられた。

[考察] IER ではてんかん発作発症以前より GAD や GABA_A 受容体 β subunit の増加があり、発作進展に伴って GABA_A 受容体 α, γ subunit の増加、GAT-1 の減少がみられた。これらはシナプス間隙での GABA 量の増加に働いていると考えられた。また GAT-1 の低下による GABA 逆転放出能の低下は、被刺激時のてんかん脳の易興奮性に貢献していると考えられた。IER では海馬の神経細胞の脱落はなく、これらの変化は神経細胞の機能的な変化と考えられる。

D-20 てんかん原性確立過程に関わる Nitric Oxide(NO) と Nitric Oxide Synthetase(NOS) の役割-

東京都精神医学総合研究所、神経生理¹⁾日本大学医学部精神神経²⁾東邦大学医学部精神神経³⁾○村島 善也¹⁾ 笠茂 公弘²⁾ 鈴木 二郎³⁾

[目的] NOは生理的条件下では長期増強(LTP)をはじめ、神経伝達の重要な因子として働いているが、その一方で OONO というフリーラジカルを形成し、強力な細胞傷害因子としても働く。また、NOはNOSにより生成されるが、NOSには主として神経系に局在しているnNOSと、主として免疫系細胞に局在しており、酵素誘導の起こりやすいiNOSの2つの代表的アイソザイムが知られている。iNOSについてはフリーラジカルを産生し、細胞死を起こして免疫系の制御に関与しており、一方、中枢神経系のNOSについては、nNOSは神経伝達上の役割が示唆されているが、他にiNOS様のフリーラジカル産生作用についても否定されてはいない。我々は本学会にて、ELマウスでは、海馬を中心にフリーラジカルの脳内局所部位での上昇がみとめられること、さらに海馬におけるNOの役割が異常可塑性成立における神経伝達に関与している可能性について報告してきた。そこで、ELマウス脳におけるNOの上昇がどのNOSに由来するのかを発達過程及び発作履歴過程を追って検討した。

[方法] 10,20,30週齢の発作履歴を繰り返したELマウス(EL[s])、観察する限り発作履歴のないELマウス(EL[ns])、コントロールとしてELマウスの母系であるDDYマウス各6匹を用いた。側頭皮質、頭頂皮質、海馬の試料をhomogenateとし、これを15,000rpmで20分摂氏4度で遠心した上清をWestern blotにかけた。SDS polyacrylamidegel で電気泳動を行い、Sigma社のnNOS及びiNOSモノクローナル抗体を一次抗体として用い、horseradish peroxidaseを結合した2次抗体を用い、市販のLumiglo Substrate Kitで発色検出した。

[結果] EL[s]海馬のiNOSは10週齢から徐々に上昇し始め20週齢で既にピークを迎え、30週齢でも20週齢と同レベルであった。nNOSは10週齢では検出されず、20週齢でも極めて弱かったが、30週齢では急激に増大していた。EL[ns]でもこの傾向は同じであったが検出されたi,nNOSの量はEL[s]に比べて全ての週齢で低値であった。側頭、頭頂皮質については海馬で見られたような大きな変化は認められなかった。

[結論] ELマウス海馬におけるNOの上昇は30週齢でのみ上昇していたが、これは、異常可塑性成立における神経伝達に関与しているnNOSとフリーラジカルの上昇に関係するiNOSの両方が関与しているものと思われる。