

博士論文

熱性けいれんフェノタイプに
対する GABA_A 受容体賦活薬の
影響に関する検討

笠原 由佳

目次

緒言	2
実験方法	5
実験動物.....	5
熱性けいれんモデルマウスの作製.....	5
手術.....	6
局所場電位記録.....	6
組織化学的手法.....	7
LA event 及び Epileptic event の検出.....	8
データ解析.....	9
結果.....	10
複雑型熱性けいれんモデルマウスの作製.....	10
高濃度 GABA _A 受容体賦活薬は複雑型熱性けいれんに対する感受性を増加させる	10
高濃度 GABA _A 受容体賦活薬はけいれんフェノタイプを増悪させる	11
高濃度 GABA _A 受容体賦活薬による影響は発達に伴い、変化する	12
熱性けいれん誘導条件下における局所場電位記録法の確立.....	12
高濃度 GABA _A 受容体賦活薬は熱性けいれん誘導中の神経活動を増大させる	14
図.....	16
考察.....	16
謝辞.....	52

緒言

熱性けいれんは、乳幼児期に生じる最も一般的な痙攣性疾患である (Koyama and Mastuki, 2010; Koyama et al., 2012)。多くの場合は 38 °C 以上の発熱を伴い、主に生後 6 ヶ月~5 歳の乳幼児期に生じる。その発症率は全世界において 2 - 14 % にも上る (Tsuboi et al., 1984; Hauser, 1994)。発症率には人種、民族、地域差が関与することが示唆されており、特に日本では 7 - 11% と比較的高い。

熱性けいれんは、単純型と複雑型の二つに分類される。米國小児科学会の定義によると、単純型は持続時間が 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熱性けいれんである。複雑型は、①焦点性発作、②15 分以上持続する発作、③24 時間以内の複数回の発作のうち一項目以上を満たす熱性けいれんである。全患者のうち約 60 - 70 % が単純型であり、約 30 - 40 % が複雑型である (Nelson et al., 1984)。単純型は一般的に予後が良好であることが報告されている。一方で、複雑型は将来的なてんかんの発症に関与する可能性が明らかにされている (Cendes et al., 1993; French et al., 1993; Chungath et al., 2008)。このため、複雑型熱性けいれんの迅速かつ適切な治療が期待される。現在、この治療薬としてベンゾジアゼピン系やバルビツール酸系の GABA_A 受容体賦活薬が汎用されている (Khosroshahi et al., 2011; Camfield and Camfield, 2014; Salehiomran et al., 2016)。GABA_A 受容体は Cl⁻チャンネルを内蔵するイオンチャンネル型受容体である。ベンゾジアゼピン系薬は

GABA_A受容体のベンゾジアゼピン結合部に作用し、Cl⁻チャンネルの開口頻度を増加させる。それに対して、バルビツール酸系薬はピクロトキシン結合部位に作用し、Cl⁻チャンネルの開口時間を延長させる (Study and Barker, 1981; Treiman, 2001)。これらの GABA_A 受容体賦活薬は、GABA の抑制性作用を増強し、熱性けいれん発症時の神経回路の過剰な興奮を緩和することで、抗痙攣作用を示すと考えられている。実際、これまでの数々の研究から熱性けいれんにおける GABA_A 受容体賦活薬の有効性が明らかにされている (Appleton et al., 1995; Chamberlain et al., 1997; Lahat et al., 2000; Mahmoudian and Zadeh, 2004)。しかしながら、一部の研究ではその有効性及び安全性について疑問が呈されている (Dzhala and Staley, 2003; Khalilov et al., 2003; Khalilov et al., 2005)。このように見解が一致しない原因の一つとして、GABA の作用が発達に伴って変化することが考えられる。

GABA の作用は、細胞内 Cl⁻イオン濃度及び Cl⁻平衡電位に依存的して決定される。これらは主に K⁺-Cl⁻共輸送体アイソフォーム 2 (KCC2) 及び Na⁺-K⁺-2Cl⁻共輸送体アイソフォーム 1 (NKCC1) といった陽イオン - Cl⁻共輸送体 (CCCs) により制御される。KCC2 は Na⁺/K⁺ 勾配を利用し、Cl⁻イオンを細胞外に排出させる。一方、NKCC1 は Cl⁻イオンを細胞内に流入させる。成熟した神経細胞では NKCC1 に対し、KCC2 の発現量が多く、細胞外に比べて細胞内の Cl⁻イオン濃度が低く保たれている。このため、GABA が受容体に結合すると Cl⁻イオンが細胞内に流入し、細胞は過分極する。それに対して、未成熟な神経細胞では KCC2 に比べて NKCC1 の発現

量が多く、細胞内の Cl⁻イオン濃度が高いため GABA が受容体に結合すると Cl⁻イオンが細胞外に流出し、細胞は脱分極する (Fukuda et al., 1998; Ben-Ari, 2002; Payne et al., 2003)。以上のことから、熱性けいれんが頻発する発達期の脳内では未成熟な神経細胞が多く存在するため、GABA_A 受容体賦活薬が神経細胞の脱分極を誘引し、熱性けいれんを悪化させる可能性が考えられる。しかしながら、GABA_A 受容体賦活薬が熱性けいれんに及ぼす影響の詳細は未だに明らかとなっていない。この理由として、熱性けいれんの影響を評価する指標が多様であること、熱性けいれん発症時における測定技術の適応が困難であることが挙げられる。そこで、本研究では特に複雑型熱性けいれんに着目し、GABA_A 受容体賦活薬が熱性けいれんに及ぼす影響についてモデルマウスを用い、多様な評価指標を使用し、新規測定系を確立することで検討した。

実験方法

実験動物

実験には日本 SLC より購入した生後 10 - 14 週齢の C57BL/6J マウスを用いた。全ての動物実験は東京大学動物実験実施マニュアルに従い、動物実験委員会の承認を得た上で、実験動物への苦痛を最小限に抑える努力の下行った（承認番号：P24-14）。

熱性けいれんモデルマウスの作製

複雑型熱性けいれんを模倣するため、ヘアドライヤーモデルを用いた (Bender et al., 2004; Koyama et al., 2012; Tao et al., 2016; Koyama, 2017)。生後 11 日齢のマウスをガラスチャンバーに入れ、ヘアドライヤーにより誘導した高温条件 (40 - 44 °C) に暴露した (図 1A)。2 分ごとに直腸温を測定し、39.5 - 43 °C となるよう 30 分間維持した (図 1B)。チャンバーの真横に設置したビデオカメラ (CMS-V40BK; Sanwa, Tokyo, Japan) により発作誘導中の行動を撮影した。発作行動のうち、後肢の対称的な屈伸の繰り返しを伴う間代性発作を評価指標として用いた (Kasahara et al., 2018)。

熱性けいれん誘導 15 分前に生理食塩水、ジアゼパム (0.01 and 1 mg/kg; Wako,

Osaka, Japan; Liljelund et al., 2005)、ペンチバルビタール (0.37 and 37 mg/kg; nacalai, Kyoto, Japan; Dubé et al., 2006)、ブメタニド (10 mg/kg; Sigma, St. Louis, MO, USA; Töllner et al., 2014) を皮下投与した。

手術

生後 10 日齢のマウスをイソフルランガス (0.5 - 1.5 %) 及びリドカイン (0.043 mg/kg) により麻酔した。麻酔したマウスを 3D プリンターにより設計・作製した固定台に設置、頭皮を切開した後、片側の頭頂連合野内側もしくは一次体性感覚野 (AP 1.0 mm, LM \pm 0.2 mm, DV -2.0 mm) をターゲットとし、26 ゲージの注射針を用いて頭蓋骨を除去し、記録電極を埋め込んだ (図 5D)。グラウンド及び参照電極は前頭皮質に設置し、瞬間接着剤 (LOCTITE 454, Henkel, Germany) と歯科用セメント (Super-Bond C&B, SUM MEDICAL, Japan) を用いて頭蓋に固定した。電極はウレタンエナメルワイヤー (直径 140 μ m) 及び 3D 設計・作製したプラスチックビーズにより作製した (図 5C)。記録後に電極跡を特定するため、蛍光色素 (DiI, 80 mg/ml, Invitrogen) をアセトン、エタノール混合液 (1:1) に溶かし、電極先端に塗布した。手術後、マウスの体温低下を防ぐため、ヒートプレートの上に乗せて一晩回復させた。

局所場電位記録

手術の翌日、局所場電位 (LFP) 記録を行った。電極を埋め込んだマウスに軽量化

した小動物用痙攣脳波収録・解析システム (8200 system Series, Pinnacle Technology, Inc., KS, USA) を接続し、常温のガラスチャンバーに入れた。10 分間の順化を行った後、30 分間 LFP を記録した。生理食塩水、ジアゼパム、ペントバルビタール、ブメタニドを皮下投与し、その 15 分後に熱性けいれん誘導下における LFP 記録を行った (図 5A, B)。熱性けいれん誘導中は 2 分ごとに直腸温を測定し、39.5 - 43 °C となるよう 30 分間維持した。記録は熱性けいれん誘導開始後、最長 50 分間行った。29 匹のうち 17 匹が記録中に死亡した。

データは Sampling rate 1000 Hz、500 Hz の low-pass フィルターをかけて取得した。シグナルは 4.0 mw 以上かつ 4.0 mV 以下で数値化された。

組織化学的手法

熱性けいれん誘導終了後、イソフルラン麻酔下で 4 °C に冷却した phosphate buffered saline (PBS) 及び 4 % paraformaldehyde (PFA) により灌流を行った。断頭して脳を摘出し、4 °C の PFA で 16 時間以上後固定を行った。脳は切片作製まで 4 °C で保存し、DTK-1500 ヴィブラトーム (Dosaka, Japan) を用いて bregma から posterior 側に 100 µm 厚の冠状切片を作製した。切片は PBS により洗浄し (10 分間、3 回)、室温で Hoechst (1 : 1000) を 10 分間処置することにより、細胞核を染色した。さらに PBS により洗浄し (10 分間、3 回)、Permafluor (Thermo Fisher, Waltham, MA) で封入した。

LA event 及び Epileptic event の検出

LFP の解析は Python により行った。直腸温測定時のシグナルは除去し、ハムノイズを取り除くため、49 - 51 Hz notch-filter をかけた。取得したデータに対し、ヒルベルト変換を行い、5 ms kernel の Gaussian-filter をかけることにより LFP envelope を算出した。熱性けいれん誘導前 30 分 間における LFP envelope の平均 (mean) と標準偏差 (SD) はそれぞれ $40.7 \pm 2.0 \mu\text{V}$ 、 $5.3 \pm 0.3 \mu\text{V}$ であった。LFP envelope が $\text{mean} + 50 \times \text{SD}$ を超えた場合、LA event の候補として検出した。LFP onset 及び offset は初めに $\text{mean} + 20 \times \text{SD}$ 以上となった時、 $\text{mean} + 20 \times \text{SD}$ 以下となった時とした。Event の持続時間が 10 ms 未満であるものは除外した。Event 間隔が 200 ms よりも小さい場合、一つの event とみなした。LAevent 候補のうち、i) LFP トレースのピークの絶対値が $\text{mean} + 50 \times \text{SD}$ 超、ii) ピークの立ち上がり時間が 10 ms 以上 200 ms 以下、iii) sharpness index (正のピーク数 / 負のピーク数) が 2 超の全ての項目を満たすものを LAevent と定義し、検出した (図 7)。LA event の中で初めのピークが 3 mV 以上である event を Epileptic event として定義した。また、Epileptic event の持続時間は event の onset と offset の間と定義した (図 10)。これらの解析はヒトにおける脳波記録を参考として行った (Kane et al, 2017)。

データ解析

データの解析は、Python により作成したプログラムおよび ImageJ を用いてオフラインで行った。データは $\text{mean} \pm \text{SEM}$ で表示し、一元配置分散解析 (one-way ANOVA) 後、Tukey-Kramer 法により多重比較を行った。

結果

複雑型熱性けいれんモデルマウスの作製

ヘアドライヤーにより誘導した高温条件 (40 - 44 °C) に生後 11 日齢のマウスを曝し (図 1A)、熱性けいれんにおいて生じる 38 °C 以上の高熱を再現した。徐々にマウスの体温を上昇させ、39.5 °C以上に 30 分間保持することにより (図 1B)、複雑型熱性けいれんに特徴的である長時間持続し、頻発する発作が生じることを確認した。また、口部自動症や正向反射の消失といった側頭葉てんかんで認められる発作行動が観察されたことから、生じた発作が焦点性である可能性が考えられる。

高濃度 GABA_A 受容体賦活薬は複雑型熱性けいれんに対する感受性を増加させる

初めに、GABA_A 受容体賦活薬がけいれんフェノタイプに与える影響について検討した。GABA_A 受容体賦活薬として、ベンゾジアゼピン系であるジアゼパム (0.01 及び 1 mg/kg) 及びペントバルビタール (0.37 及び 37 mg/kg) を用いた。評価指標として、発作行動の中でも視覚的に明らかであり、四肢の屈伸・伸長を繰り返してガタガタとふるえる間代性発作に着目した。熱性けいれんに対する感受性を評価するため、間代性発作の発症率、潜時、体温閾値を測定した (図 2A, 3A, B)。間代性発作の発生率は生理食塩水群で 100 % (5/5) であった (図 1A, 表 1)。0.01 mg/kg ジアゼパムを投与した場合、発生率は 0 % (0/4) となった。一方、1.0 mg/kg ジアゼパム、0.37 mg/kg、37 mg/kg ペントバルビタールを投与した場合、発症率は 100 %

(5/5、5/5)であった。さらに、GABAが脱分極性に作用する可能性について検討するため、NKCC1阻害薬であるブメタニド(10 mg/kg)を用いた。ブメタニド単独投与投与群における間代性発作の発生率は50%(2/4)であった。1.0 mg/kg ジアゼパムもしくは37 mg/kg ペントバルビタールとブメタニドを共投与した場合、発症率はそれぞれ0%(0/5)、20%(2/4)となった。間代性発作が生じるまでの潜時及び体温閾値は間代性発作の発生率が100%であった群においてのみ測定した。潜時は、1.0 mg/kg ジアゼパムもしくは37 mg/kg ペントバルビタールを投与した際、生理食塩水に比べて短縮した(図3A)。体温閾値は生理食塩水に比べ、1.0 mg/kg ジアゼパムもしくは37 mg/kg ペントバルビタールを投与した際に低下した(図3B)。以上の結果から、高濃度のジアゼパム及びペントバルビタールは脱分極性GABAシグナリングを介し、複雑型熱性けいれんへの感受性を増加させることが考えられる。

高濃度GABA_A受容体賦活薬は熱性けいれんフェノタイプを増悪させる

次に、熱性けいれんの重篤度に与える影響について評価するため、間代性発作が持続する時間を測定した(図2B)。持続時間は1.0 mg/kg ジアゼパムもしくは37 mg/kg ペントバルビタールを投与した際、生理食塩水群に比べて減少しなかった。37 mg/kg ペントバルビタールの投与はむしろ持続時間を延長させた。この37 mg/kg ペントバルビタールによる作用は、ブメタニドの共投与により抑制された。これらの

結果から、高濃度のペントバルビタールは脱分極性 GABA シグナリングを介し、けいれんフェノタイプを増悪させる可能性が示唆される。

高濃度 GABA_A 受容体賦活薬による影響は発達に伴って変化する

高濃度 GABA_A 受容体賦活薬によるけいれんフェノタイプへの影響が、発達の程度に関与するか検討するため、生後 14 日齢のマウスを用いて複雑型熱性けいれんの誘導を行った。間代性発作の発生率は生理食塩水群で 60 % (3/5) であった (図 4A, 表 2)。1.0 mg/kg ジアゼパムもしくは 37 mg/kg ペントバルビタールを投与した場合、ブメタニドの共投与の有無に関わらず、発症率は 0 % (全て 0/5) であった。ブメタニド単独投与投与群における間代性発作の発生率は 40 % (2/5) であった。間代性発作の持続時間は全群で差が認められなかった (図 4B)。これらの結果から、高濃度の GABA_A 受容体賦活薬は生後 14 日齢において、間代性発作の発生を阻害することが明らかとなった。高濃度の GABA_A 受容体賦活薬によるけいれんフェノタイプへの影響は、発達の程度に応じて変化する可能性が示唆される。

熱性けいれん誘導条件下における局所場電位記録法の確立

GABA_A 受容体賦活薬が複雑型熱性けいれんに与える影響について神経活動レベルで検討するために、まず、熱性けいれんモデルマウスにおいて *in vivo* 局所場電位 (LFP) 記録法により神経活動を記録する系を確立した。乳幼児期マウスにおいて LFP 記録を行った知見は極端に少ない。この理由として、乳幼児期のマウスは小さ

く、市販の手術用の頭部固定台が使用できないこと、頭蓋骨が脆弱であるため従来の記録電極や基盤の固定が困難であることが挙げられる。そこで、3D プリンターを用い、乳幼児期マウス専用の頭部固定台及び小型かつ軽量化した記録電極及び基盤を新たに設計・印刷した (図 5C)。これにより、記録電極のより安定した設置・固定が可能となり、乳幼児期マウスにおける LFP 記録を可能にした。さらに、高温条件誘導装置と組み合わせ、熱性けいれん誘導下における LFP 記録システムを確立した (図 5 A, B)。このシステムを用い、間代性発作の発生と同時にてんかん様脳波が生じることを確認した (図 6A)。なお、LFP は片側の頭頂連合野内側もしくは一次体性感覚野 (AP 1.0 mm, LM \pm 0.2 mm, DV -2.0 mm) から記録した (図 5D)。

自由行動下において LFP 記録を行った場合、神経活動由来ではなく身体の動きに由来した電位の変動 (ノイズ) が生じる (図 6B)。間代性発作などの激しい発作行動を伴う場合、顕著な神経活動の上昇がみられるため、従来の研究の多くはこの特徴的な電位変化についてのみ着目し、行動によるノイズを除去していない。本研究では、神経活動に由来した電位変化をより特異的に抽出するための新たな指標を確立した。本指標により抽出された電位変化を Large amplitude (LA) event と名付けた。まず、熱性けいれん誘導前 30 分間における LFP envelope の平均 (mean) と標準偏差 (SD) を算出した ($40.7 \pm 2.0 \mu\text{V}$ 、 $5.3 \pm 0.3 \mu\text{V}$)。LFP envelope が $\text{mean} + 50 \times \text{SD}$ 超のものを、LA event 候補として検出した。LA event 候補の中から、i) LFP トレースのピークの絶対値が $\text{mean} + 50 \times \text{SD}$ 超、ii) ピークの立ち上

がり時間が 10 ms 以上 200 ms 以下、iii) sharpness index (正のピーク数 / 負のピーク数) が 2 超の全ての項目を満たすもの LA event と定義し、検出した (図 7)。

高濃度 GABA_A 受容体賦活薬は熱性けいれん誘導中の神経活動を増大させる

確立した記録システムを用い、GABA_A 受容体賦活薬が熱性けいれん中の神経活動に与える影響について検討した。検出した LA event について疑似カラーラスタープロット及び累積度数分布表を作成した (図 8, 9A)。1.0 mg/kg ジアゼパムもしくは 37 mg/kg ペントバルビタールを投与した場合、大きな振幅を持つ LA event が増加する様子が観察された (図 8B, 9A)。特に LA event が増加する傾向がみられた、熱性けいれん誘導開始 10 分間に着目し、LA event の振幅の大きさを定量した (図 9B)。この結果、1.0 mg/kg ジアゼパムの投与により振幅が増大する傾向がみられた。また、37 mg/kg ペントバルビタールの投与により振幅は優位に増大した。GABA_A 受容体賦活薬による振幅の増大傾向及び増大は、ブメタニドの共投与によって抑制された。

大きな神経活動が頻発することで、てんかん様脳波の発生に寄与する可能性が考えられる。そこで、3mV 以上の特に大きな振幅を持つ神経活動を Epileptic event と定義し、検出した (図 10)。Epileptic event の発生率は熱性けいれん誘導前 30 分間において約 1.6 % であり、誘導開始 10 分間において約 24.0 % であった (図 11)。

LA event に対する Epileptic event の発生回数は、1.0 mg/kg ジアゼパムもしくは 37mg/kg ペントバルビタールの投与により増加し、これらの増加はブメタニドの共

投与により抑制された (図 12)。ブメタニドの単独投与により発生回数は変化しなかった。Epileptic event の潜時は 1.0 mg/kg ジアゼパムもしくは 37mg/kg ペントバルビタールの投与により短縮した (図 13A)。Epileptic event が生じる間隔は 37 mg/kg ペントバルビタール単独投与に比べ、ブメタニドの共投与により延長した (図 13B)。Epileptic event の持続時間に対する影響は、1.0 mg/kg ジアゼパムと 37 mg/kg ペントバルビタールで異なった (図 13C)。

考察

熱性けいれんは主に GABA_A 受容体賦活薬によって治療される。しかしながら、その有効性及び安全性については一貫した知見が得られておらず (Appleton et al., 1995; Chamberlain et al., 1997; Lahat et al., 2000; Dzhala and Staley, 2003; Khalilov et al., 2003; Mahmoudian and Zadeh, 2004; Khalilov et al., 2005)、GABA_A 受容体賦活薬が熱性けいれんに与える影響の詳細は不明である。そこで、本研究では動物モデルを用い、多様な評価指標により GABA_A 受容体賦活薬が複雑型熱性けいれんに与える影響について検討した。初めに行動フェノタイプへの影響について観察した。この結果、生後 11 日齢において高濃度のジアゼパム及びペントバルビタールにより間代性発作の発生率が減少しないこと、潜時が短縮し、体温閾値が低下することを明らかにした (図 2A, 3)。さらに、間代性発作の持続時間がジアゼパムにより短縮せず、高濃度のペントバルビタールにより延長することを示した (図 2B)。間代性発作の発症率、潜時、体温閾値は熱性けいれんへの感受性を、持続時間は重篤度をそれぞれ反映する。以上から、高濃度のジアゼパム及びペントバルビタールは複雑型熱性けいれんへの感受性を増加させ、特にペントバルビタールは熱性けいれんをより重篤化することが示唆される。本研究では、高濃度のジアゼパム及びペントバルビタールが複雑型熱性けいれんのけいれんフェノタイプを増悪させることを明らかにした。

GABA_A 受容体賦活薬が GABA の興奮性作用を増強し、けいれんフェノタイプを悪化させた可能性が考えられる。未成熟神経細胞において GABA が興奮性に作用する一因として、Cl⁻イオンの細胞内流入を担う NKCC1 が Cl⁻イオンの細胞外流出を担う KCC2 に比べ、高発現していることが挙げられる。NKCC1 を阻害することで細胞内の Cl⁻イオン濃度が減少し、GABA が抑制的に作用すると考えられる。NKCC1 阻害薬であるブメタニドを高濃度のジアゼパムもしくはペントバルビタールと共投与した場合、間代性発作の発生率が減少した (図 2A)。さらに、ブメタニドの投与によりペントバルビタールによって延長した間代性発作の持続時間が短縮した (図 2B)。これらの結果から、NKCC1 の阻害により高濃度のジアゼパム及びペントバルビタールによるけいれんフェノタイプの増悪が抑制されると示唆される。本研究は、GABA_A 受容体賦活薬が GABA の興奮性作用を増強し、複雑型熱性けいれんのフェノタイプを悪化させる可能性を明らかにした。

GABA の作用は、発達に伴って興奮性から抑制性へと切り替わる (GABA スイッチ)。GABA_A 受容体賦活薬によるけいれんフェノタイプの増悪作用が、実験に用いた生後 11 日齢のマウスにおいて GABA スイッチが未完了であることに関与するか検討した。生後 14 日齢のマウスを用いて熱性けいれんを誘導したところ、高濃度のジアゼパム及びペントバルビタールにより間代性発作の発生率が低下することが明らかとなった (図 4A)。また、生後 11 日齢で認められた高濃度のペントバルビタールによる間代性発作の持続時間の増加は、生後 14 日齢において認められなかった

(図 4B、非表示群における持続時間は全て 0 秒)。以上の結果から、GABA_A 受容体賦活薬の作用が発達に伴って変化することが明らかとなった。これらのことから、生後 11 日では GABA スイッチが未完了であるため、高濃度 GABA_A 受容体賦活薬によりけいれんフェノタイプが増悪すると考えられる。それに対して、生後 14 日では GABA スイッチが完了しているため、けいれんフェノタイプが改善されると考察される。

以上から、本研究では生後 11 日齢のマウスでは GABA スイッチが未完了であるため、高濃度 GABA_A 受容体賦活薬は GABA の興奮性作用を増強し、複雑型熱性けいれんのフェノタイプを悪化させる可能性を明らかにした。しかしながら、実際にブメタニドが NKCC1 の阻害によって細胞内 Cl⁻イオン濃度を減少させ、GABA の抑制性作用を誘起したかは不明である。また、生後 11 日齢で低濃度のジアゼパムにより間代性発作の発生率の減少が認められたことから (図 2A)、GABA_A 受容体賦活薬を高濃度で用いた場合、その鎮静作用が過剰に発現し、熱の発散が抑制され、けいれんフェノタイプの悪化に繋がった可能性も考えられる。GABA_A 受容体賦活薬の影響についてさらに追究するためには、電気生理学的手法を用い、熱性けいれんの焦点である海馬に存在する抑制性神経細胞の GABA_A 受容体を介した Cl⁻電流や電位応答の反転電位を測定する必要がある。

GABA_A 受容体賦活薬が複雑型熱性けいれん発症時の神経活動に与える影響について検討するため、まず、熱性けいれんモデルマウスにおける新規 *in vivo* LFP 記

録法を新たに確立した (図 5)。3D プリンターを用いて乳幼児期マウスに適した頭部固定台を設計・印刷することで、より正確に記録電極を設置できた。さらに、小型化及び軽量化した記録電極や基盤を使用することで乳幼児期マウスへの負担が軽減され、より安定した LFP 記録が可能となった (図 5C)。過去の乳幼児期マウスを用いた痙攣性疾患に関する研究では、記録された LFP シグナルが実際に神経活動に由来するか明らかにされていない。本研究で確立した新規検出指標を用いることで、行動由来のノイズを分離・除去し、熱性けいれんの誘導中に生じた神経活動をより特異的に観察、評価することが可能となった (図 6, 7, 10, 11)。

乳幼児期における *in vivo* LFP 記録では、その大きさや丈夫さからラットが用いられることが多い (Dubé et al., 2000; Dubé et al., 2006)。ラットに比べ、マウスでは遺伝学的研究ツールがより豊富であるため、マウスを用いた実験系の確立は重要な課題の一つである。本研究で確立した乳幼児期マウスにおける *in vivo* LFP 記録法の導入により、より効率的な遺伝学的検討が可能になると考えられる。

熱性けいれんの発症時には、特徴的なてんかん様脳波が生じる (Sofijanov et al., 1992; Kanemura et al., 2012)。本研究で行った熱性けいれん誘導時の LFP 記録において、熱性けいれん患者で観察されるような段階的かつ連続的なシグナルの変化が認められた (図 6、Morimoto et al., 1991)。このことから、本実験系で使用した熱性けいれんモデルは、熱性けいれん患者における神経活動を模倣していると考えられる。熱性けいれんの発症時期を正確に予測することは不可能であり、ヒトにおい

て熱性けいれん発症時の発作行動と LFP の関連性を追究することは困難である。本研究で確立した新規複雑型熱性けいれんモデルマウスにおける *in vivo* LFP 記録法はこの追究を可能にし、熱性けいれん発症メカニズムのさらなる解明に貢献することが期待される。

本記録システムにより、熱性けいれん誘導初期において、神経活動の振幅の大きさが高濃度のジアゼパムの投与により増加する傾向があること、高濃度のペントバルビタールの投与により増加することが明らかとなった (図 8,9)。これらの結果は、GABA_A 受容体賦活薬が複雑型熱性けいれん発症時の神経活動を亢進することを示唆する。また、高濃度のジアゼパム及びペントバルビタールは *Epileptic event* の潜伏時間を短縮した。大きな神経活動の発生は、てんかん様脳波の発生に繋がる可能性があることから、GABA_A 受容体賦活薬によりてんかん様脳波が生じやすくなる可能性が考えられる。ジアゼパム及びペントバルビタールの影響がブメタニドの共投与により抑制されたことにより、高濃度の GABA_A 受容体賦活薬は GABA の興奮性作用を増強し、複雑型熱性けいれん発症時の神経活動を亢進すると推測される。

熱性けいれんに対するブメタニドの有効性については、未だに議論が分かれている (Koyama et al., 2012; Reid et al., 2013; Vargas et al., 2013; Ben-Ari et al., 2016; Hernan and Holmes, 2016)。ブメタニドは生理的条件下でイオン化するため脳への移行性が低く、末梢に強く作用するため、正確に中枢神経系に及ぼす作用について評価することは難しい。中枢神経系に存在する NKCC1 への作用を強化するため、脳

への移行性が高いプロドラッグや新たな NKCC1 阻害薬の開発が試みられている (Erker et al., 2016; Hampel et al., 2018)。また、NKCC1 は脳に広く分布し、様々な神経細胞やグリア細胞に発現する可能性が示されている (Kanaka et al., 2001)。このため、発達期における NKCC1 の阻害はその後の脳の発達や機能に多大な影響を及ぼすと考えられる。実際に、発達期におけるブメタニドの長期投与は皮質の形成異常を誘導し、自閉症や統合失調症様の行動を惹起すると示唆されている (Wang and Kriegstein, 2011)。これらの影響についても十分に検討した上で、NKCC1 阻害薬を用いたより効果的かつ安全な複雑型熱性けいれん治療法が期待される。

本研究では、ブメタニド単独による熱性けいれんに対する影響は認められなかったが、GABA_A 受容体賦活薬による増悪作用の一部を抑制することを明らかにした。動物モデルを用いた過去の知見では、ブメタニドとフェノバルビタールの共投与が乳幼児期の痙攣性疾患を改善することが報告されている (Dzhala et al., 2008; Cleary et al., 2013)。しかしながら、バルビツール酸系の GABA_A 受容体賦活薬は、小児において神経障害を誘引し、認知障害や気分障害に結び付く可能性が報告されている (Brodie and Kwan, 2012; Kaushal et al., 2016)。このため、一般的にバルビツール酸系薬に比べて安全性の高いベンゾジアゼピン系薬を用いた、ブメタニドとジアゼパムの共投与は、より有効かつ安全な複雑型熱性けいれんの新規療法となり得ると考えられる。ブメタニドとジアゼパムの併用療法の有効性についてさらに追究するためには、薬剤濃度、GABA スイッチの程度、熱性けいれんの進行の程度などに

よる GABA_A 受容体賦活薬及びブメタニドの作用の差異にも着目した検討が必要である。本研究により得られた知見は、将来的なてんかん発症に結び付くような複雑型熱性けいれんの新たな治療戦略の確立に貢献し得ることが期待される。

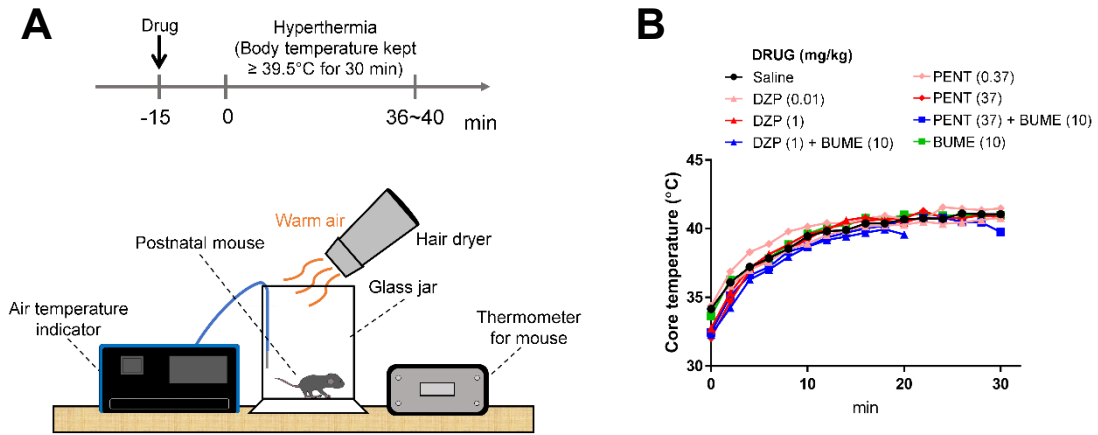


図 1. 複雑型熱性けいれんモデルの確立

- A) 実験タイムコース。生後 11 日齢のマウスを高温条件に暴露した。直腸温を 39.5°C 以上に 30 分間維持し、複雑型熱性けいれん様の発作を誘導した。熱性けいれん誘導開始 15 分前に薬剤を投与した。下図は熱性けいれん誘導装置の模式図。
- B) 熱性けいれん誘導時における直腸温変化。GABA_A 受容体賦活薬として、ベンゾジアゼピン系であるジアゼパム (DZP, 0.01 mg/kg, 1 mg/kg) 及びバルビツール酸系であるペントバルビタール (PENT, 0.37 mg/kg, 37 mg/kg)、NKCC1 阻害薬であるブメタニド (BUME, 10 mg/kg) を使用した。 ($n = 4 - 5$ mice)

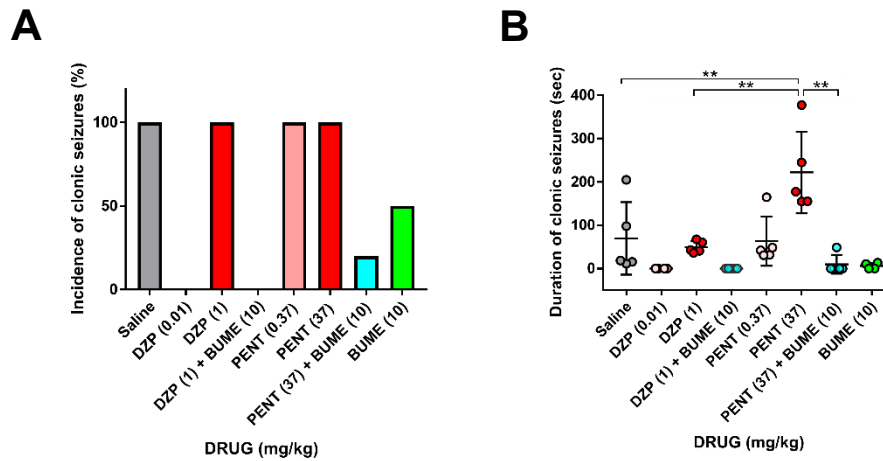


図 2. 高濃度の GABA_A 受容体賦活薬は間代性発作の持続時間を延長させる

- A) 間代性発作の発生率。低濃度のジアゼパムにより発生率が低下した。一方、高濃度のジアゼパム及びペントバルビタールにより発生率は変化しなかった。ブメタニドにより発生率が低下する傾向が認められた。(n = 4-5 mice. Saline, 5 / 5; 0.01 mg/kg DZP, 0 / 4; 1 mg/kg DZP, 5 / 5; 1 mg/kg DZP + 10 mg/kg BUME, 0 / 5; 0.37 mg/kg PENT, 5 / 5; 37 mg/kg PENT, 5 / 5; 37 mg/kg PENT + 10 mg/kg BUME, 1 / 5; 10 mg/kg BUME, 2 / 4)
- B) 間代性発作の持続時間。高濃度のペントバルビタールにより持続時間が延長した。ブメタニドを共投与した場合、高濃度ペントバルビタールによる持続時間の延長が抑制された。 (**P < 0.01, Tukey's test, n = 4 - 5 mice)

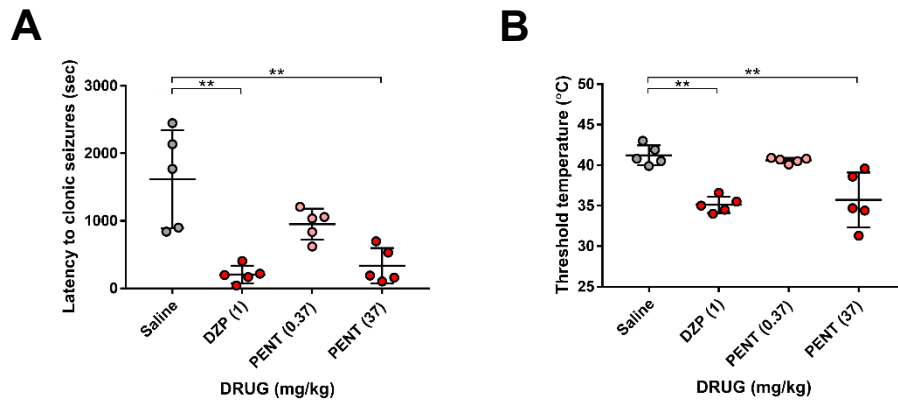


図 3. 高濃度の $GABA_A$ 受容体賦活薬は間代性発作の潜時を短縮し、体温閾値を低下させる

- A) 間代性発作が生じるまでの潜時。高濃度のジアゼパム及びペントバルビタールにより潜時が短縮した。 (** $P < 0.01$, Tukey's test, $n = 5$ mice)
- B) 間代性発作が生じる体温閾値。高濃度のジアゼパム及びペントバルビタールにより体温閾値が低下した。 (** $P < 0.01$, Tukey's test, $n = 5$ mice)

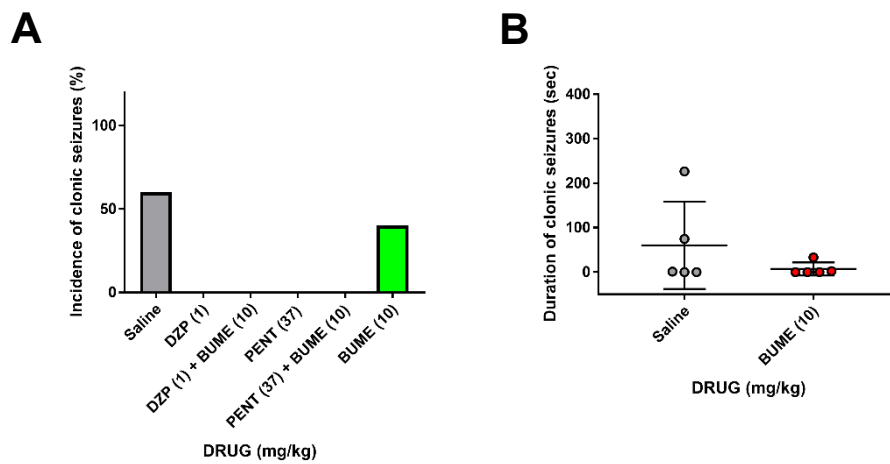


図 4. 成長に伴って GABA_A 受容体賦活薬の影響は変化する

- A) 生後 14 日齢のマウスにおける間代性発作の発生率。発達に伴い、発生率が低下した。高濃度のジアゼパム及びペントバルビタールにより発生率が低下した。(n = 4 - 5 mice. Saline, 3 / 5; 1 mg/kg DZP, 0 / 5; 1 mg/kg DZP + 10 mg/kg BUME, 0 / 5; 37 mg/kg PENT, 0 / 5; 37 mg/kg PENT + 10 mg/kg BUME, 0 / 5; 10 mg/kg BUME, 2 / 5)
- B) 生後 14 日齢のマウスにおける間代性発作の持続時間。間代性発作が生じた生理食塩水群とブメタニド群において持続時間の差は認められなかった。(**P < 0.01, Tukey' s test, n = 5 mice)

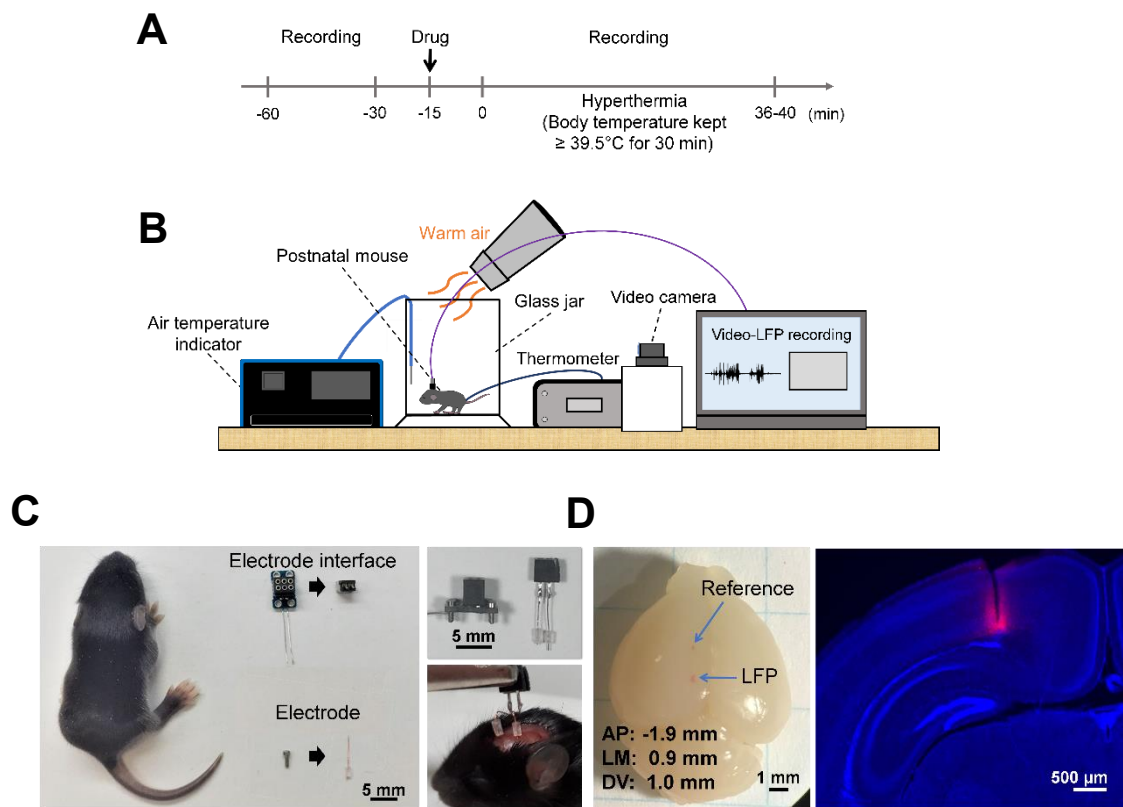


図 5. 乳幼児時期マウスにおける新規局所場電位記録法の確立

- A) 実験タイムコース。生後 10 日齢で手術を行い、翌日に熱性けいれん誘導下における局所場電位記録を行った。薬剤は熱性けいれんの誘導 15 分前に処置した。
- B) 熱性けいれん誘導時における局所場電位記録の模式図。
- C) 既存の基盤（左 electrode interface）及び記録電極（左 electrode）と 3D プリンターを用いて小型化、軽量化した基盤（右 electrode interface）及び記録電極（右 electrode）。作製した部品を組み立て（右上図）、マウスの脳に埋め込んだ（右下図）。

D) 記録電極は頭頂連合野内側もしくは一次体性感覚野 (AP: -1.9 mm, LM: 0.9 mm, DV: 1.0 mm) に、参照電極は前頭皮質に埋め込んだ。マゼンタ (DiI) は記録電極跡を示している。

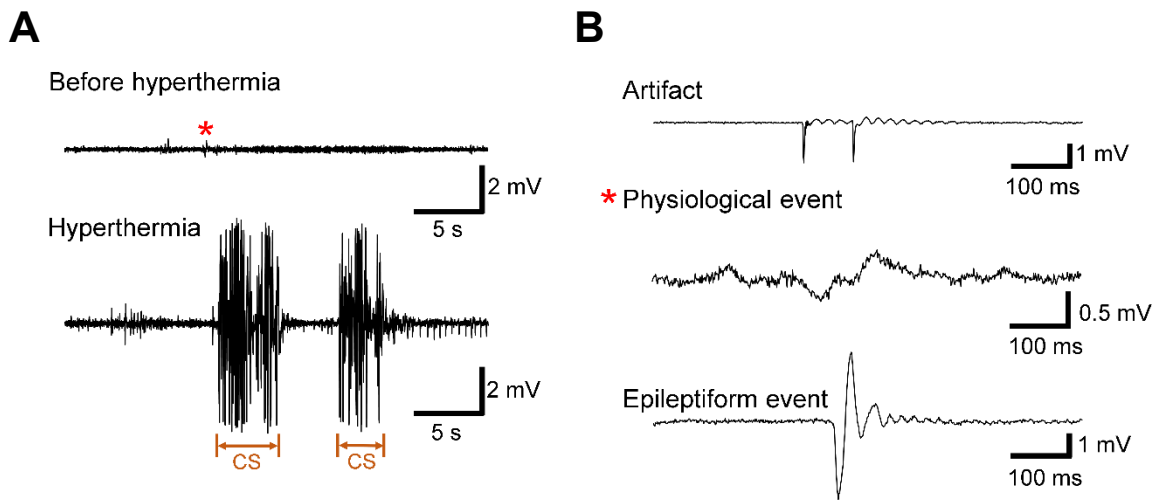


図 6. 熱性けいれん誘導条件下における神経活動

- A) 熱性けいれん誘導前（上）及び誘導中（下）における LFP トレース。間代性発作が生じている際（CS）にてんかん様脳波が観察された。
- B) 代表的な人工的（Artifact）、生理的（physiological event, *）なトレースとてんかん様脳波（Epileptiform event）の拡大図。

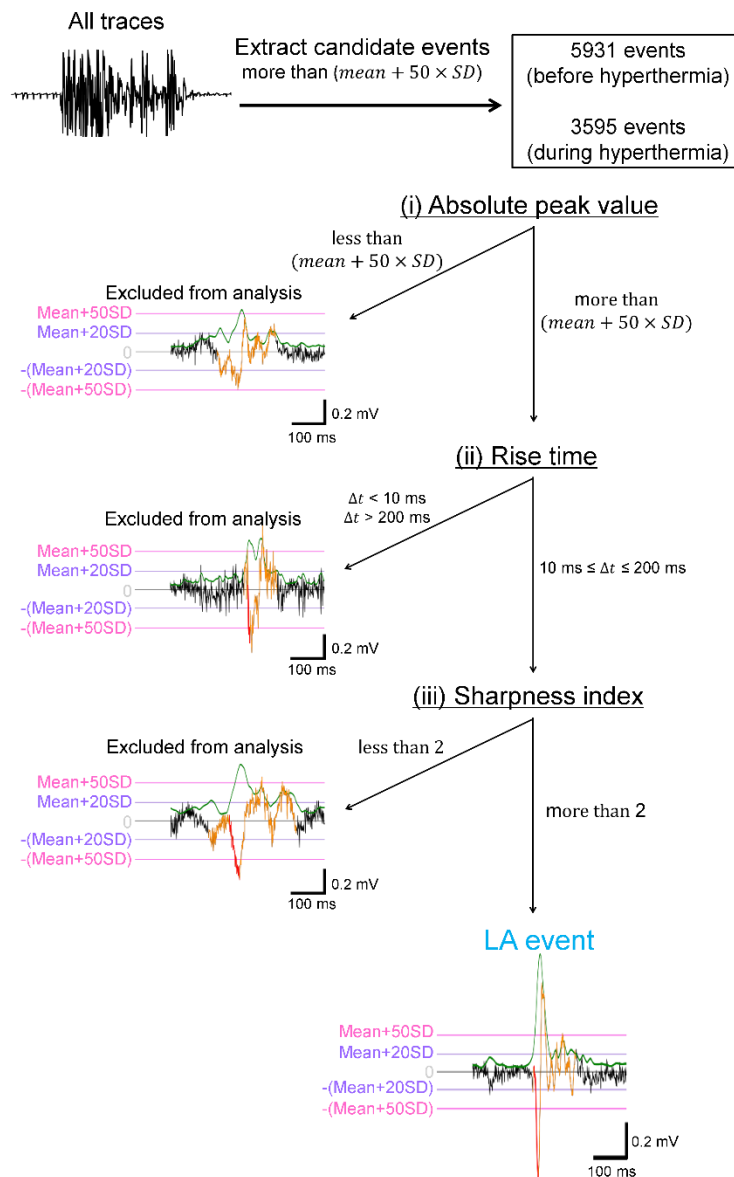


図 7. LA event の検出

LFP トレースのうち、i) ピークの絶対値が $\text{mean} + 50 \times \text{SD}$ 超、ii) event の立ち上がり時間が $10 \text{ ms} \leq \Delta t \leq 200 \text{ ms}$ 、iii) sharpness index (正のピーク数 / 負のピーク数) > 2 を全て満たすものを LA event として検出した。

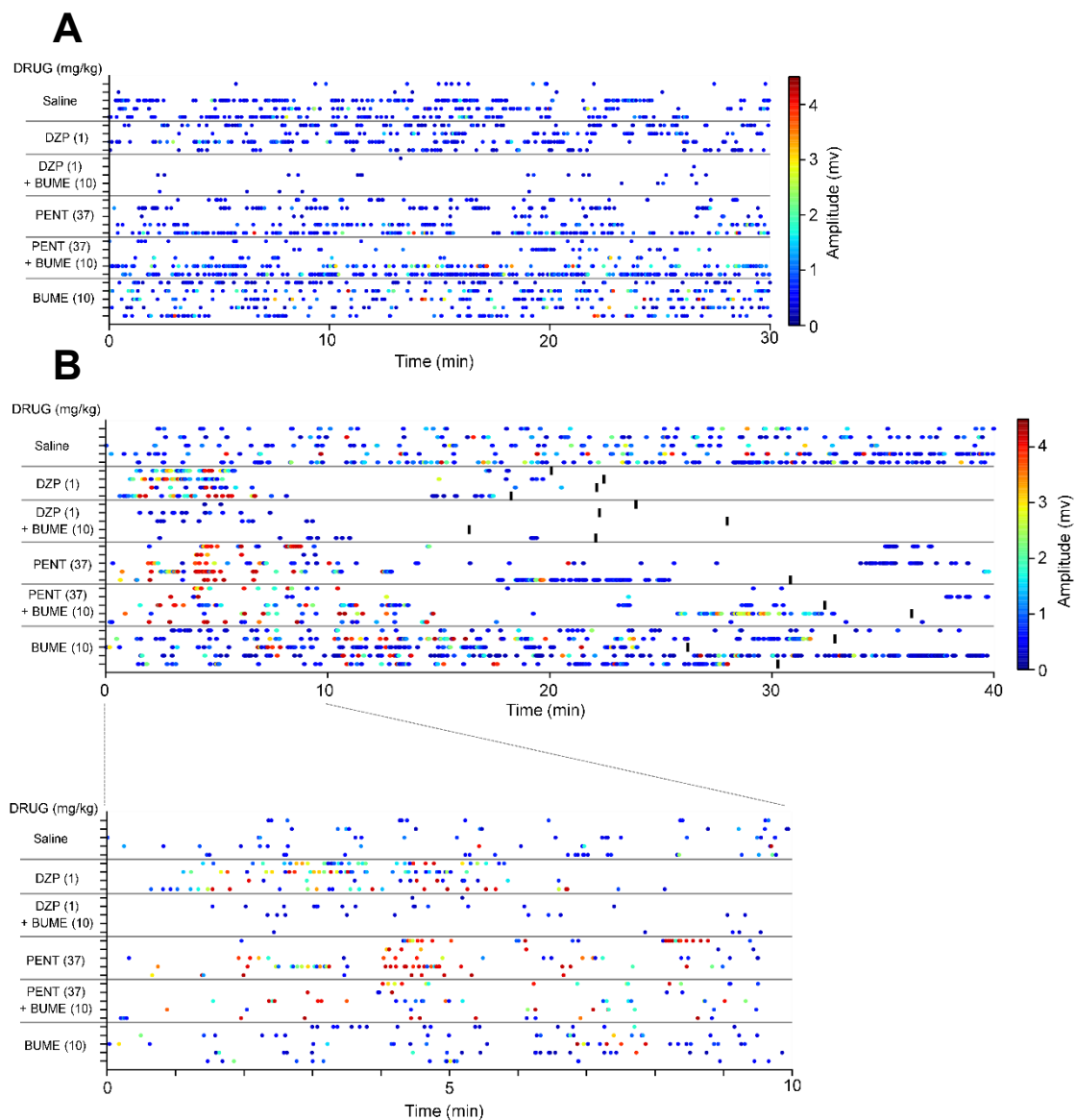


図 8. LA event の振幅

A) 熱性けいれん誘導前 30 分間に生じた LAevent の疑似カラーラスタプロット。

ドットは LA event を表し、暖色に近いほど振幅が大きく、寒色に近いほど振幅が小さい。縦軸の目盛りは各個体を示す。(n = 4 - 5 mice)

B) 熱性けいれん誘導中に生じた LA event の疑似カラーラスタープロット。高濃度のジアゼパム及びペントバルビタールにより、特に熱性けいれん誘導開始 10 分間において (下拡大図) 暖色を示す LA event が増加する傾向が認められた。(n = 4 - 5 mice)。

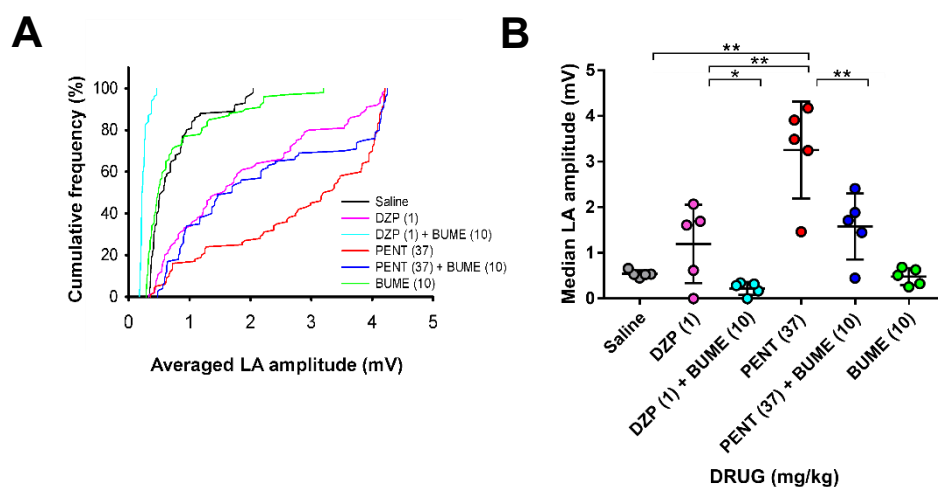


図 9. 高濃度の GABA_A 受容体賦活薬により LA event の振幅が増大する

- A) 熱性けいれん誘導開始 10 分間における LA event の振幅の累積度数分布。高濃度のジアゼパム及びペントバルビタールにより振幅が増大する傾向が観察された。ブメタニドの共投与により、振幅の増大が抑制される傾向が認められた。(n = 4 - 5 mice)
- B) 熱性けいれん誘導開始 10 分間における LA event の振幅。高濃度ペントバルビタールにより振幅が増大した。ブメタニドを共投与した場合、ジアゼパムもしくはペントバルビタール単独投与に比べ、振幅が減少した。(*P < 0.05, **P < 0.01, Tukey' s test, n = 4 - 5 mice)

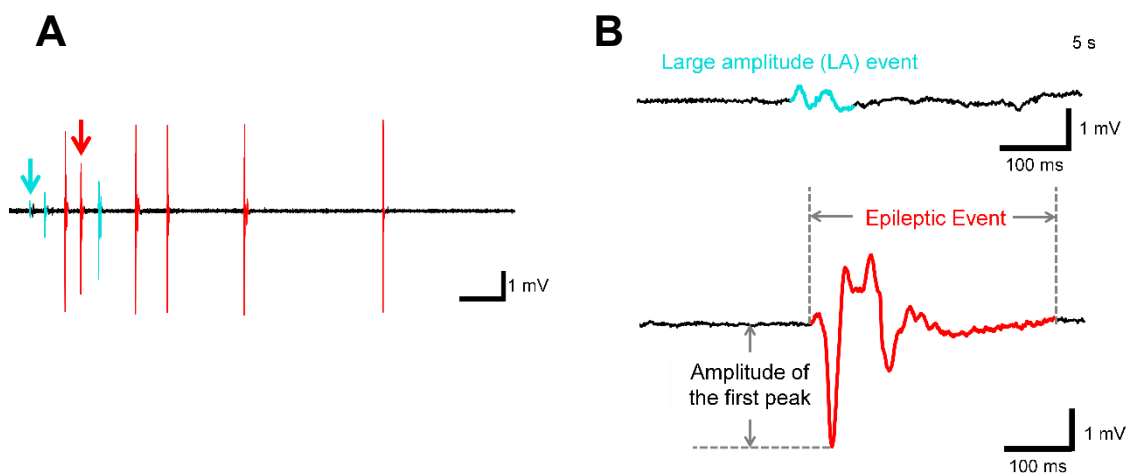


図 10. Epileptic event の検出

A) 熱性けいれん誘導中に観察される神経活動。LAevent（青矢印、青線）のうち、初めのピークが 3 mV 以上のものを Epileptic event（赤矢印、赤線）として検出した。

B) LAevent（上図、青線）及び Epileptic event（下図、赤線）の拡大図。

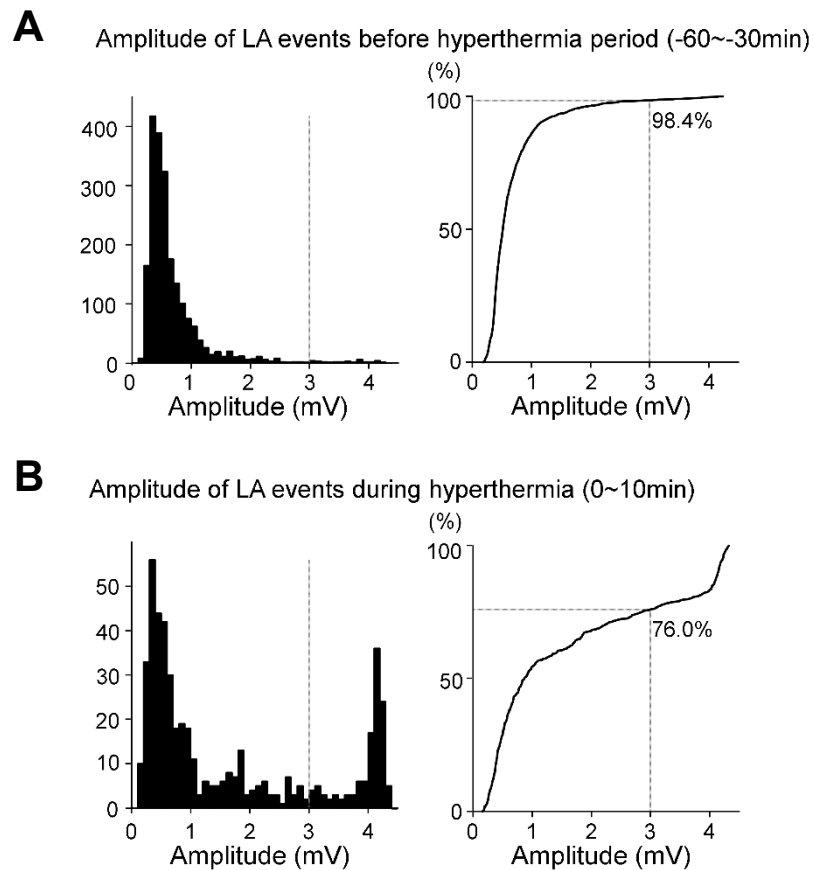


図 11. LA event の振幅の分布

G) 熱性けいれん誘導開始前 30 分間に生じた LA event の振幅の累積分布。点線は

3 mV を示す。3 mV 以下の LA event は 98.4 %存在した。

H) 熱性けいれん誘導時に生じた LA event の振幅の累積分布。点線は 3 mV を示す。

3 mV 以下の LA event は 76.0 %存在した。

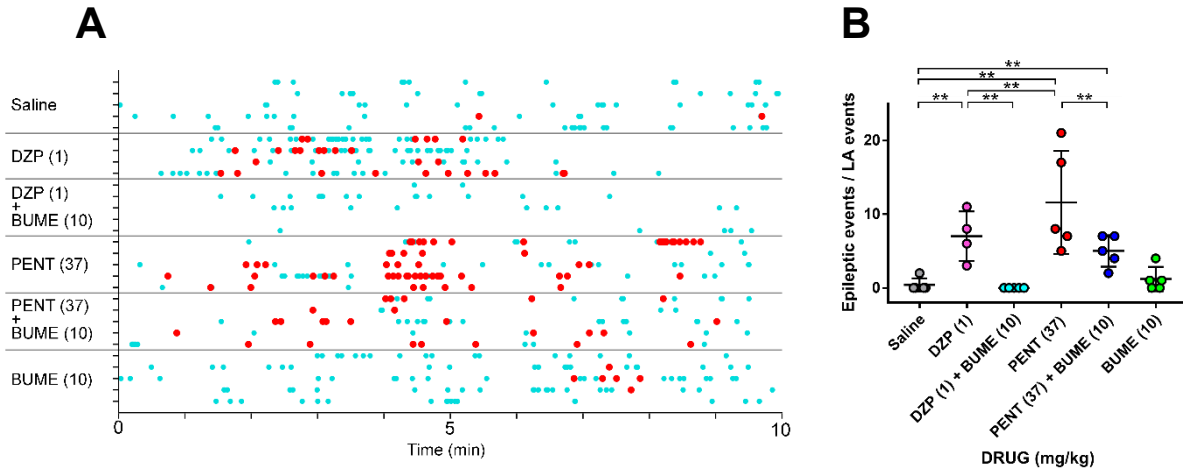


図 12. 高濃度の GABA_A 受容体賦活薬により Epileptic event が増加する

- A) 熱性けいれん誘導開始 10 分間に生じた LA event (青) と Epileptic event (赤) のラスタープロット。縦軸の目盛りは各個体を示す。(n = 4 - 5 mice)
- B) 熱性けいれん誘導開始 10 分間に生じた LA event に対する Epileptic event の回数。高濃度のジアゼパム及びペントバルビタールにより増加し、ブメタニドの共投与によりこれらの増加が抑制された。(**P < 0.01, Tukey's test, n = 4 - 5 mice)

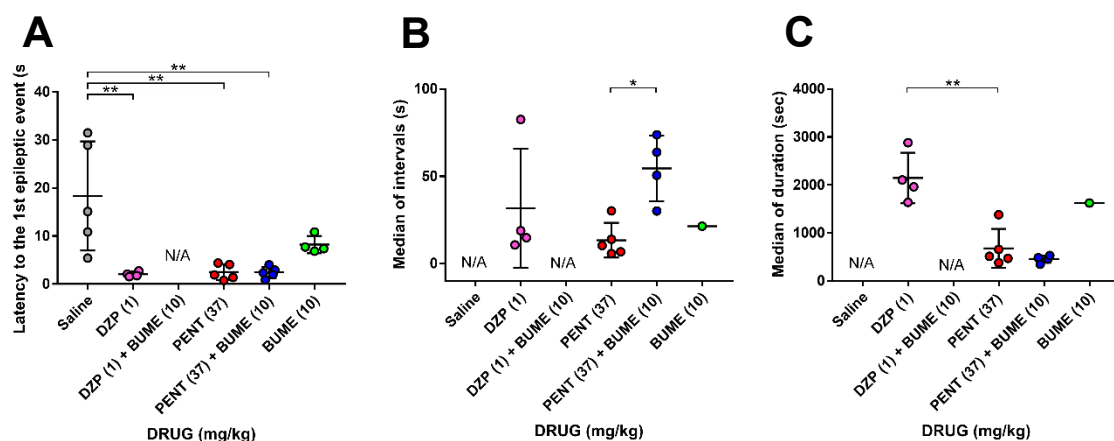


図 13. 高濃度の GABA_A 受容体賦活薬により Epileptic event の潜時が短縮する

- A) 熱性けいれん誘導開始 10 分間における、初めの Epileptic event が生じるまでの潜時。ジアゼパム、ペントバルビタール、ブメタニドにより潜時が短縮した。
(**P < 0.01, Tukey' s test, n = 4 - 5 mice)
- B) 熱性けいれん誘導開始 10 分間における、Epileptic event が生じる間隔。ペントバルビタールとブメタニドの共投与により、間隔が延長した>(*P < 0.05, Tukey' s test, n = 4 - 5 mice)
- C) 熱性けいれん誘導開始 10 分間における、Epileptic event の持続時間。ジアゼパムを投与した場合、ペントバルビタールに比べて持続時間が延長した。(**P < 0.01, Tukey' s test, n = 4 - 5 mice)

Drug	Saline	PENT			DZP			BUME
Conc. (mg/kg)	-	0.37	37	37	0.01	1	1	10
Bume. (+/-)	-	-	-	+	-	-	+	+
Body weight at P11 (g)	5.4 ± 0.26	4.5 ± 0.12	5.3 ± 0.16	5.3 ± 0.12	6.0 ± 0.17	5.6 ± 0.15	5.0 ± 0.19	5.2 ± 0.20
Seizure	5/5	5/5	5/5	1/5	0/4	5/5	0/5	2/4
Death	0/5	0/5	0/5	1/5	0/4	5/5	5/5	1/4
Average temp. (°C)	39.6 ± 0.46	40.0 ± 0.47	39.4 ± 0.57	37.7 ± 0.02	39.4 ± 0.40	38.8 ± 0.73	37.7 ± 0.02	39.6 ± 0.50
Highest temp. (°C)	42.1 ± 0.30	42.2 ± 0.16	42.1 ± 0.07	41.1 ± 0.16	41.2 ± 0.16	41.3 ± 0.18	40.2 ± 0.17	41.6 ± 0.14

表 1. 生後 11 日齢のマウスにおける熱性けいれん誘導の概要

生後 11 日齢で熱性けいれんを誘導した際の生理食塩水 (Saline)、ペントバルビタ

ール (PENT, 0.37 mg/kg, 37 mg/kg)、ジアゼパム (DZP, 0.01 mg/kg, 1.0 mg/kg)
各群における体重、間代性発作の発生個体数 (Seizure)、死亡個体数 (Death)、熱
性けいれん誘導中の平均直腸温 (Average temp.)、最高直腸温 (Highest temp.)。ブ
メタニド (BUME) の有無を+/-で示している。

Drug	Saline	PENT		DZP		BUME
Conc. (mg/kg)	-	37	37	1	1	10
BUME (+/-)	-	-	+	-	+	+
Body weight at P14 (g)	6.1 ± 0.13	6.4 ± 0.095	6.3 ± 0.13	6.4 ± 0.073	6.2 ± 0.17	6.3 ± 0.10
Seizure	3/5	0/5	0/5	0/5	0/5	2/5
Mortality	0/5	0/5	0/5	5/5	5/5	5/5
Average temp. (°C)	40.7 ± 0.45	39.8 ± 0.64	39.7 ± 0.63	40.3 ± 0.56	39.6 ± 0.68	40.7 ± 0.65
Highest temp. (°C)	42.8 ± 0.27	42.0 ± 0.18	42.1 ± 0.15	42.3 ± 0.13	42.3 ± 0.26	42.6 ± 0.055

表 2. 生後 14 日齢のマウスにおける熱性けいれん誘導の概要

生後 14 日齢で熱性けいれんを誘導した際の生理食塩水 (Saline)、ペントバルビタール (PENT, 37 mg/kg)、ジアゼパム (DZP, 1.0 mg/kg) 各群における、体重、間代

性発作の発生個体数 (Seizure)、死亡個体数 (Death)、熱性けいれん誘導中の平均直腸温 (Average temp.)、最高直腸温 (Highest temp.)。ブメタニド (BUME, 10 mg/kg) の有無を+/-で示している。

引用文献

1. Appleton R, Sweeney A, Choonara I, Robson J, Molyneux E (1995) Lorazepam versus diazepam in the acute treatment of epileptic seizures and status epilepticus. *Dev Med Child Neurol.* 37:682-688.
2. Ben-Ari Y (2002) Excitatory actions of GABA during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci* 3:728–739.
3. Ben Ari, Y., Damier, P., and Lemonnier, E. (2016). Failure of the Nemo Trial: Bumetanide Is a Promising Agent to Treat Many Brain Disorders but Not Newborn Seizures. *Front Cell Neurosci.* 10, 90.
4. Bender RA, Dubé C, Baram TZ (2004) Febrile seizures and mechanisms of epileptogenesis: insights from an animal model. *Adv Exp Med Biol* 548: 213-225.
5. Brodie MJ, Kwan P (2012) Current position of phenobarbital in epilepsy and its future. *Epilepsia* 53 Suppl 8: 40-46.

6. Camfield P, Camfield C. (2014) Are febrile seizures an indication for intermittent benzodiazepine treatment, and if so, in which cases? *Epileptic Disord.* 16: 84-88.
7. Cendes F, Andermann F, Dubeau F, Gloor P, Evans A, Jones-Gotman M, Olivier A, Andermann E, Robitaille Y, Lopes-Cendes I (1993) Early childhood prolonged febrile convulsions, atrophy and sclerosis of mesial structures, and temporal lobe epilepsy: an MRI volumetric study. *Neurology* 43: 1083-1087.
8. Chamberlain JM, Altieri MA, Futterman C, Young GM, Ochsenschlager DW, Waisman Y (1997) A prospective, randomized study comparing intramuscular midazolam with intravenous diazepam for the treatment of seizures in children. *Pediatr Emerg Care.* 13:92-94.
9. Cleary RT, Sun H, Huynh T, Manning SM, Li Y, Rotenberg A, Talos DM, Kahle KT, Jackson M, Rakhade SN, Berry G, Jensen FE (2013) Bumetanide enhances phenobarbital efficacy in a rat model of hypoxic neonatal seizures. *PLoS One* 8: e57148.
10. Dubé C, Chen K, Eghbal-Ahmadi M, Brunson K, Soltesz I, Baram TZ (2000) Prolonged febrile seizures in the immature rat model enhance hippocampal excitability long term. *Ann Neurol* 47: 336-344.

11. Dubé C, Richichi C, Bender RA, Chung G, Litt B, Baram TZ (2006) Temporal lobe epilepsy after experimental prolonged febrile seizures: prospective analysis. *Brain* 129: 911-922.
12. Dzhala VI, Staley KJ (2003) Excitatory actions of endogenously released GABA contribute to initiation of ictal epileptiform activity in the developing hippocampus. *J Neurosci.* 23:1840-1846.
13. Dzhala VI, Brumback AC, Staley KJ (2008) Bumetanide enhances phenobarbital efficacy in a neonatal seizure model. *Ann Neurol.* 63:222-235.
14. Erker T, Brandt C, Tollner K, Schreppel P, Twele F, Schidlitzki A, Loscher W (2016) The bumetanide prodrug BUM5, but not bumetanide, potentiates the antiseizure effect of phenobarbital in adult epileptic mice. *Epilepsia* 57: 698-705.
15. French JA, Williamson PD, Thadani VM, Darcey TM, Mattson RH, Spencer SS, Spencer DD (1993) Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: I. Results of history and physical examination. *Ann Neurol* 34: 774-780.
16. Fukuda A, Muramatsu K, Okabe A, Shimano Y, Hida H, Fujimoto I, Nishino H (1998) Changes in intracellular Ca²⁺ induced by GABA_A receptor activation

- and reduction in Cl^- gradient in neonatal rat neocortex. *J Neurophysiol* 79:439–446.
17. Guevara-González J, Dimas-Rendón I, Guevara L, Guevara-Campos J, Cauli O (2018) Febrile seizure and related syndromes. *Neurol Psychiatry Brain Res* 27: 1-5.
 18. Hampel P, Romermann K, MacAulay N, Loscher W (2018) Azosemide is more potent than bumetanide and various other loop diuretics to inhibit the sodium-potassium-chloride-cotransporter human variants hNKCC1A and hNKCC1B. *Sci Rep* 8: 9877.
 19. Hauser WA (1994) The prevalence and incidence of convulsive disorders in children. *Epilepsia Suppl* 2:S1-S6.
 20. Hernan, A.E. and Holmes, G.L. (2016). Antiepileptic drug treatment strategies in neonatal epilepsy. *Prog.Brain Res.* 226, 179-193.
 21. Kanaka C1, Ohno K, Okabe A, Kuriyama K, Itoh T, Fukuda A, Sato K. (2001) The differential expression patterns of messenger RNAs encoding K-Cl cotransporters (KCC1,2) and Na-K-2Cl cotransporter (NKCC1) in the rat nervous system. *Neuroscience.* 104(4):933-46.

22. Kane N, Acharya J, Benickzy S, Caboclo L, Finnigan S, Kaplan P, Shibasaki H, Pressler R, Putten M (2017) A revised glossary of terms most commonly used by clinical electroencephalographers and updated proposal for the report format of the EEG findings. Revision 2017. *Clin Neurophysiol Pract* 2: 170-185.
23. Kanemura H, Mizorogi S, Aoyagi K, Sugita K, Aihara M (2012) EEG characteristics predict subsequent epilepsy in children with febrile seizure. *Brain Dev* 34: 302-307.
24. Kasahara Y, Ikegaya Y, Koyama R (2018) Neonatal Seizure Models to Study Epileptogenesis. *Front Pharmacol* 9: 385.
25. Kaushal S, Tamer Z, Opoku F, Forcelli PA (2016) Anticonvulsant drug-induced cell death in the developing white matter of the rodent brain. *Epilepsia* 57: 727-734.
26. Khalilov I, Holmes GL, Ben-Ari Y (2003) In vitro formation of a secondary epileptogenic mirror focus by interhippocampal propagation of seizures. *Nat Neurosci*. 10:1079-1085.

27. Khalilov I, Le Van Quyen M, Gozlan H, Ben-Ari Y (2005) Epileptogenic actions of GABA and fast oscillations in the developing hippocampus. *Neuron* 48: 787-796.
28. Khosroshahi N, Faramarzi F, Salamati P, Haghighi SM, Kamrani K (2011) Diazepam versus clobazam for intermittent prophylaxis of febrile seizures. *Indian J Pediatr* 78: 38-40.
29. Knudsen FU (1985) Recurrence risk after first febrile seizure and effect of short term diazepam prophylaxis. *Arch Dis Child* 60:1045-9.
30. Knudsen FU, Paerregaard A, Andersen R, Andersen J (1996) Long term outcome of prophylaxis for febrile convulsions. *Arch Dis Child* 74:13-8.
31. Koyama R, Matsuki N (2010) Novel etiological and therapeutic strategies for neurodiseases: mechanisms and consequences of febrile seizures: lessons from animal models. *J Pharmacol Sci* 113: 14-22.
32. Koyama R, Tao K, Sasaki T, Ichikawa J, Miyamoto D, Muramatsu R, Matsuki N, Ikegaya Y (2012) GABAergic excitation after febrile seizures induces ectopic granule cells and adult epilepsy. *Nat Med* 18: 1271-1278.

33. Koyama, R (2017) "Experimental febrile seizures in rodents." In *Animal Models for the Study of Human Disease* 2nd edition, ed. P.M. Conn (Elsevier Press) 755-768.
34. Lahat E, Goldman M, Barr J, Bistritzer T, Berkovitch M (2000) Comparison of intranasal midazolam with intravenous diazepam for treating febrile seizures in children: prospective randomised study. *BMJ*. 321:83-86.
35. Liljelund P, Ferguson C, Homanics G, Olsen RW (2005) Long-term effects of diazepam treatment of epileptic GABAA receptor beta3 subunit knockout mouse in early life. *Epilepsy Res* 66:99–115.
36. Mahmoudian T, Zadeh MM (2004) Comparison of intranasal midazolam with intravenous diazepam for treating acute seizures in children. *Epilepsy Behav.* 5:253-255.
37. Mamelle N, Mamelle JC, Plasse JC, Revol M, Gilly R (1984) Prevention of recurrent febrile convulsions--a randomized therapeutic assay: sodium valproate, phenobarbital and placebo. *Neuropediatrics* 15: 37-42.
38. McKinlay I, Newton R (1989) Intention to treat febrile convulsions with rectal diazepam, valproate or phenobarbitone. *Dev Med Child Neurol* 31: 617-625.

39. Morimoto T, Nagao H, Sano N, Takahashi M, Matsuda H (1991) Electroencephalographic study of rat hyperthermic seizures. *Epilepsia* 32: 289-293.
40. Payne JA, Rivera C, Voipio J, Kaila K (2003) Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. *Trends Neurosci* 26:199–206.
41. Reid AY, Riazi K, Campbell TG, Pittman QJ (2013) Increased excitability and molecular changes in adult rats after a febrile seizure. *Epilepsia* 54: e45-e48.
42. Rosman NP, Colton T, Labazzo J, Gilbert PL, Gardella NB, Kaye EM, Van Bennekom C, Winter MR (1993) A controlled trial of diazepam administered during febrile illnesses to prevent recurrence of febrile seizures. *N Engl J Med* 329: 79-84.
43. Salehiomran M, Hoseini SM, Ghabeli JA (2016) Intermittent Diazepam versus Continuous Phenobarbital to Prevent Recurrence of Febrile Seizures: A Randomized Controlled Trial. *Iran J Child Neurol* 10: 21-24.

44. Sofijanov N, Emoto S, Kuturec M, Dukovski M, Ellenberg JH, Hirtz DG, Nelson KB (1992) Febrile seizures: clinical characteristics and initial EEG. *Epilepsia* 33: 52-57.
45. Study RE, Barker JL (1981) Diazepam and (-)-pentobarbital: fluctuation analysis reveals different mechanisms for potentiation of gamma-aminobutyric acid responses in cultured central neurons. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 78: 7180-7184.
46. Tao K, Ichikawa J, Matsuki N, Ikegaya Y, Koyama R (2016) Experimental febrile seizures induce age-dependent structural plasticity and improve memory in mice. *Neuroscience* 318: 34-44.
47. Temkin NR (2001) Antiepileptogenesis and seizure prevention trials with antiepileptic drugs: meta-analysis of controlled trials. *Epilepsia* 42: 515-524.
48. Töllner K, Brandt C, Töpfer M, Brunhofer G, Erker T, Gabriel M, Feit PW, Lindfors J, Kaila K, Löscher W (2014) A novel prodrug-based strategy to increase effects of bumetanide in epilepsy. *Ann Neurol* 75:550–562.
49. Treiman DM (2001) GABAergic mechanisms in epilepsy. *Epilepsia* 42 Suppl 3: 8-12.

50. Tsuboi T (1984) Epidemiology of febrile and afebrile convulsions in children in Japan. *Neurology* 34:175-181.
51. Uhari M, Rantala H, Vainionpaa L, Kurttila R (1995) Effect of acetaminophen and of low intermittent doses of diazepam on prevention of recurrences of febrile seizures. *J Pediatr* 126: 991-995.
52. Vargas E, Petrou S, Reid CA (2013) Genetic and pharmacological modulation of giant depolarizing potentials in the neonatal hippocampus associates with increased seizure susceptibility. *J Physiol* 591: 57-65.
53. Wang DD, Kriegstein AR. (2011) Blocking early GABA depolarization with bumetanide results in permanent alterations in cortical circuits and sensorimotor gating deficits. *Cereb Cortex*. 21(3): 574-87.

謝辞

本研究を行うにあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室 池谷裕二教授に心よりお礼を申し上げます。私が博士 1 年次に研究室に配属されて以来、池谷先生からは親身にご指導頂き、感謝の念が堪えません。先生の研究に対する真摯な姿勢から多くのことを学ばせていただきました。

本研究を行うにあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室 小山隆太准教授に心よりお礼を申し上げます。研究のいろはもわからない私に対し、根気強くご指導頂き、研究者としてまた、人として成長する機会を頂きました。研究に打ち込み、その中で常に楽しさを見出すことができたのは先生のお陰にほかなりません。小山先生からご指導をいただいたこの 3 年間の経験を糧に、今後の研究生活に励んでいきたいと存じております。

本研究を行うにあたり、様々な角度から貴重なご指導ご助言を賜りました東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室 佐々木拓哉助教には深く感謝致します。先生の的確なコメントにより研究を一層進めることができました。

研究室でのセミナーを始めとする議論の場において、本研究に対して様々な観点

から有益なご助言を賜りました東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室 中嶋藍助教、松本信圭助教並びに化学物質安全性評価システム構築教室 竹内春樹准教授に心よりお礼を申し上げます。

本研究に対する有益なご助言を賜りました横浜市立大学大学院医学研究院分子薬理神経生物学研究室 五嶋良郎教授に心よりお礼を申し上げます。

本研究を行うにあたり、親身にご指導いただきました東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室卒業生 柴田和輝博士、森下皓平君、上田英輝君、羅総君に心から感謝いたします。研究の進め方や実験技術、知識など多くのことを指導してくださいました。

博士課程を同期として共に過ごし、切磋琢磨した東京大学薬学系研究科薬品作用学教室 阿部麗実さん、石川智愛さん、宮脇健行君に心よりお礼を申し上げます。

本研究を行うにあたり、同じグループとして、共に研究に励んできました東京大学大学院薬学系研究科薬品作用学教室 井形秀吉君に心から感謝いたします。実験の手伝いやディスカッションにこころよく応じていただきました。あなたが居なければ本研究が形になることはなかったといっても過言ではありません。今後の活躍を

心から願っています。

同研究グループとして本研究をあらゆる面からサポートしていただき、また多くのご助言をいただきました東京大学薬学系研究科薬品作用学教室 周至文君、星雄高君、安藤めぐみさん、平木俊光君、小野寺純也君、荒木匡君、折田健君、河野怜奈さん、大柿安里さん、キムギュリさんに心よりお礼を申し上げます。

日々の研究生生活を送る中で、温かいご支援をいただきました薬品作用学教室の先輩、後輩の皆さまに心よりお礼を申し上げます。

最後に、長きにわたる学生生活を支えてくれました母 笠原忍、兄 笠原成浩、兄 横川勇仁、姉 横川真琴、祖母 山田綾子に心から感謝し、本論文の結びとさせていただきます。