

## ep 系マウスの痙攣阻止に関する実験的研究

## 第 3 編

## parabiosis による ep 系マウスの痙攣阻止に関する研究

(本論文の要旨は第58回日本精神神経学会総会に発表した)

岡山大学医学部第1(陣内)外科教室(指導:陣内教授)

大学院 生 笠 原 潤 治

〔昭和37年7月30日受稿〕

## 第1章 緒 言

1954年、今泉<sup>1)</sup>によつて発見された ep 系マウスは、生理的な体位変換刺激によつて、成熟マウスでは 100% に痙攣発作を惹起しうる特異な純系マウスであるが、この ep 系マウスは最近内外の非常な関心を集めており、成瀬<sup>2)3)</sup>はすでにこのマウスの生化学的観察を報告している。私も本論文第2編において、ep 系マウスには痙攣発作と極めて深い関係にある脳代謝に異常があることを明らかにするとともに、ep 系マウスの痙攣発作に極めて有効な diphenylhydantoin 投与の ep 系マウス脳代謝に及ぼす影響を明らかにした。私どもの教室でもこの ep 系マウスの生化学的ならびに生理学的研究を進めているが、その過程において、私はたまたま ep 系マウスと他の純系マウスとの間に parabiosis を作成してみた場合、果して ep 系マウスの痙攣が消失するだろうかあるいは逆に他の純系マウスが痙攣を起すようになるだろうかということに興味を持ち、実験を試みたところ、ep 系マウスの痙攣発作を完全に阻止せしめることを発見した。したがつて、この極めて興味深い現象に関して、2, 3の実験的考察を加えて報告する。

そもそも parabiosis を最初に試みたひとは Paul Bert (1862) であるが、その後漸く 1902年 Sauerbruch & Heyde がこれに関する研究を発表し、また同時に両人により初めて、parabiosis なる名称が与えられ、parabiosis とは2動物を手術により分離できないように癒着させ血行等を互に通じさせ肉體関係を一緒にして共存させたものをいうと定義された、以後この方面の研究にますます多くの関心が

向けられ、とくに parabiosis によるホルモンの移行に関する研究は数多く報告され、parabiosis はその研究にとつて極めて大切な実験方法とされている。最近では特殊な実験として、高血圧および immunological tolerance に関する研究にまで応用せられるようになってきた。

## 第2章 実験方法

## 第1節 実験動物および発作誘発方法

生後 12 週以上経過し、40 回以下の他動的な体位変換刺激で必ず定型的な痙攣発作を起すように訓練した ep 系マウスを使用した。生後 12 週未満の ep 系マウスでは同様の体位変換刺激では必ずしも痙攣を起さない。

ep 系マウスの発作誘発に必要な他動的な体位変換刺激は第1編、第2章、第1節においてのべたごとく、すべて今泉<sup>1)</sup>の原法<sup>1)</sup>に従がつて行なつた。

Parabiosis の“対”として使用したマウスは ep 系マウスと同一成長時期の、ほぼ同体重のものを使用し、他の純系マウスとして、主として CF-I 系マウスを用い、そのほか Cb 系および C<sub>3</sub>H 系マウスも使用した。またマウスはすべて雌雄のいずれをも使用した。

## 第2節 Parabiosis 形成術

1. 2匹のマウスを手術台に背位に並べ、相触せしめ、その相対する腹部の広さ、釣り合いを見計つて固定する。

2. マスクにエーテルを滴下して、顔面を被い適度の麻酔を維持する。エーテル麻酔は手術の首尾に対して最も重大な役割を演ずるものであるから、とくにエーテルは麻酔用の良品を選び、浅過ぎてあば

れたり深過ぎて死亡したりすることのないよう、絶えず麻酔状態をよく計りながらかけ続ける。

3. 2匹の相対する腹側部の毛を短く刈り、マキユロクロームにて十分に消毒する。

4. 胸部下方から、鼠径部近くまで皮膚を縦に4cm切開する。

5. 背側皮膚を3号絹糸にて連続縫合する。

6. 次に腹膜を肋弓近くから下方3cm縦に切開する。この際皮膚切開面と同様に2匹とも同長にして同位に相対するようにする。

7. 2匹の腹膜切開面の背側腹膜を2号絹糸にて連続縫合し、

8. ついで、腹側腹膜の連続縫合を行なう。この際1cm前後の間隔をおき、背側腹膜縫合部に糸をかけ腹側腹膜とを一緒に縫合する。つまり2匹の腹膜縫合に3~4ヶ所位の接合を行なつて、2匹の腹膜交通口に小別けした窓をつけておくことになる。これにより腹腔内の体液交通はあるが、腸管が貫通せぬようにするとともに、癒着を強固にすることができる。

9. 次に腹側皮膚を互いに連続縫合する。そしてさらに、頸部および尾根部の皮下に糸を通して一針ずつ縫合固定し、手術を終る。

10. 尾はさらにセロテープを貼つて2匹のものを十分にしっかりと一緒に巻きつける。

かくしてできあがった parabiosis のマウスは保温に気をつけ、餌および水を十分に与えるよう留意した。

### 第3節 Parabiosis 後の痙攣発作の判定

Parabiosis 形成後のマウスおよび parabiosis 分離後のマウスに毎日1回(今泉原法<sup>1)</sup>)による体位変換刺激をあたえ、痙攣発作の有無を判定した。すなわち(+)は100回以下の刺激で発作の起つたもの、および100回の刺激で発作が起らなくとも、さらに1~2分の休止期間後直ちに40回の刺激を与えて発作を起したものであり、(-)は100回刺激を与え、1~2分の休止期間をおき、さらに40回の刺激を与えても発作の起らなかつたものである。

### 第4節 <sup>90</sup>Y による実験

ep 系マウスと CF-I 系マウスとの parabiosis 形成直後、1日目、7日目、14日目および21日目のものを使用し、まず ep 系マウスの左股静脈を露出し、次いで CF-I 系マウスの心臓内に <sup>90</sup>Y の  $136 \times 10^3$  cpm 量を注射し、その直後より15秒間隔にて2分間 ep 系マウスの左股静脈より0.1cc ずつ

血液をツベルクリン用注射器にて採取し、これを  $1 \times 1 \text{ cm}^2$  大の濾紙に吸着乾燥し、常法に従つて Geiger-Müller Counter にて放射能を測定した。

<sup>90</sup>Y は <sup>90</sup>Sr の崩壊によつて生ずる <sup>90</sup>Y をイオン交換樹脂法によつて分離したもので、岡山県衛生研究所より恵与されたものである。

## 第3章 実験成績

第2章、第2節でのべた方法により、ep 系マウスと他の純系マウスとの間に parabiosis を形成し、ep 系マウスの痙攣にいかなる影響を及ぼすかをしらべ、同時にまたその際他の3種の純系マウスにつき、雌雄の各々4つの組合せについてもあわせて検索した。その成績は第1表のごとくである。

すなわち、まず対照として ep 系マウス同志の組合せの場合は術後の日数がいかに経過しても、発作は両者とも依然として存続するが、しかし ep 系マウスと他の純系マウスとの parabiosis の場合は雌雄のいずれの組合せについても、はじめは ep 系マウスの方に痙攣発作がみられたけれども、3日から5日、おそくとも6日以後になると ep 系マウスにも全例において、いかに誘発刺激を与えても痙攣発作が全く起らなくなり、100日以上観察しても、痙攣発作は全く認められなかつた。parabiosis の手術を行なつたものの約80%は長期生存が可能であつた。

ep 系マウスと他の純系マウスとの parabiosis 形成後、初めのうち ep 系マウスにのみおこる痙攣発作が観察されるが、その期日とその例数とを示したものが第2表である。この表からわかるごとく、ep 系マウスのみ大部分のものは術後3~4日まで、少数例のみ5日まで、痙攣発作の発現するのをみとめ、6日以後では全例において ep 系マウスの痙攣発作は全く消失した。

さらに、いまその消失の仕方について、ep 系マウスの雄と CF-I 系マウスの雄との parabiosis 18例のグループを選び、さらに詳細に検討してみると、第3表に示すごとくである。すなわち18例中8例は A に示すごとく、術後3日まで、18例中5例は B に示すごとく術後4日まで ep 系マウスの痙攣発作が存続し、18例中2例のみが C に示すごとく5日まで痙攣がみられた。このような経過をとりながら、6日目からは全く痙攣が消失した。また1例ずつではあるが、E, F のように、一度消失して、また起るような経過をとつて、痙攣が消失した型もみ

Table 1 Absence or Presence of Convulsion after Parabiosis

Combination	Sex	Number of Cases	(+)Presence (-)Absence in 5-day period		(+)Presence (-)Absence later than 6 days	
			ep-mouse	other strain	ep-mouse	other strain
			ep × ep	ep ♂ × ep ♂ ep ♀ × ep ♀ ep ♂ × ep ♀	6 6 5	+ + + + + +
ep × CF-I	ep ♂ × CF-I ♂ ep ♀ × CF-I ♀ ep ♂ × CF-I ♀ ep ♀ × CF-I ♂	18 16 11 12	+ + + +	- - - -	- - - -	- - - -
ep × Cb	ep ♂ × Cb ♂ ep ♀ × Cb ♀ ep ♂ × Cb ♀ ep ♀ × Cb ♂	7 8 5 7	+ + + +	- - - -	- - - -	- - - -
ep × C <sub>3</sub> H	ep ♂ × C <sub>3</sub> H ♂ ep ♀ × C <sub>3</sub> H ♀ ep ♂ × C <sub>3</sub> H ♀ ep ♀ × C <sub>3</sub> H ♂	7 6 6 6	+ + + +	- - - -	- - - -	- - - -

Table 2 The Number of Days in Which Convulsive Seizure Persisted after Parabiosis between ep-Mice and Other Strain Mice

Combination of Parabiosis	Numbers of Experiments	The Period in Which Convulsive Seizure was observed			
		2 days	3 days	4 days	5 days
ep ♂ CF-I ♂	18	1	9	6	2
ep ♀ CF-I ♀	16	0	8	6	2
ep ♂ CF-I ♀	11	1	5	3	2
ep ♀ CF-I ♂	12	2	6	3	1
ep ♂ Cb ♂	7	1	4	2	0
ep ♀ Cb ♀	8	1	4	2	1
ep ♂ Cb ♀	6	1	2	2	1
ep ♀ Cb ♂	7	0	3	2	2
ep ♂ C <sub>3</sub> H ♂	7	0	3	3	1
ep ♀ C <sub>3</sub> H ♀	6	1	3	2	0
ep ♂ C <sub>3</sub> H ♀	5	0	2	1	2
ep ♀ C <sub>3</sub> H ♂	6	0	3	2	1
ep ♂ ep ♂ ep ♀ ep ♀ ep ♂ ep ♀	6 6 5	Seizure could be observed in both of the pair irrespective of the lapse of time after parabiosis operation.			

Table 3 Variation in the Cessation of Convulsive Seizure in ep-Mice (18 Parabiosed Cases=ep ♂ × CF-I ♂)

Types	Period in days										Cases	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
A	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	.....	8
B	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	.....	5
C	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	.....	2
D	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	.....	1
E	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	.....	1
F	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	.....	1

(+) Presence of Convulsion in ep-Mice  
 (-) Absence

られた。またいずれの場合にも、術後4~5日目には多数例に不全頓挫型の痙攣発作が観察された。

さらに ep 系マウスと CF-I 系マウスとの parabiosis のその他の雌雄の組合せについても、また ep 系マウスと Cb 系マウスまたは C<sub>3</sub>H 系マウスとの parabiosis の場合にも、第4表に示すごとく、大多数は A, B に示すごとく経過をとり、少数例のみ C にみられる経過をとりつつ、6日目からは ep 系マウスにも全例において痙攣発作が起こらなくなるのを認めた。

次に、ep 系マウスの痙攣消失の機序を検討せんがために、parabiosis 接合部の血液交通の有無を確認せんと試みた。すなわち第2章、第4節でのべたごとく実験方法により、アイソトープを用いて実験を行なつた。その成績は第1図に示すごとく、<sup>90</sup>Y を parabiosis 施行後7日目に CF-I 系マウスの心臓内に注入すると15秒後には ep 系マウスの左股静脈血に高度の radioactivity が認められ、したが

Fig. 1 <sup>90</sup>Y Appearance in Blood of Left Femoral Vein of ep-Mouse after Intracardial Injection into CF-I Mouse, 7 Days after the Onset of Parabiosis

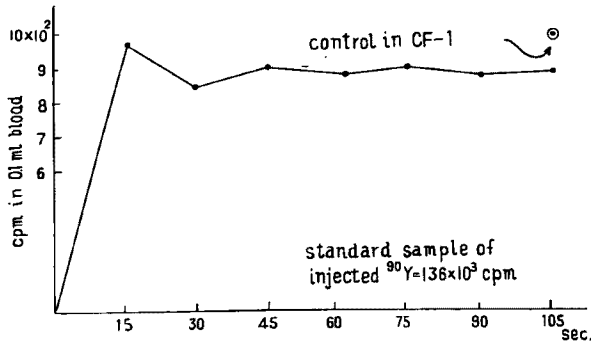


Table 4 Variation in the Cessation of Convulsion in ep-Mice after Parabiosis and the Number of Cases

Combi-nation	Sex	Total number	A type Cases					
			B	C	D	E	F	
ep × CF-I	ep ♂ × CF-I ♂	18	8	5	2	1	1	1
	ep ♀ × CF-I ♀	16	6	6	2	0	2	0
	ep ♂ × CF-I ♀	11	5	3	2	1	0	0
	ep ♀ × CF-I ♂	12	5	2	1	2	1	1
ep × Cb	ep ♂ × Cb ♂	7	4	2	0	1	0	0
	ep ♀ × Cb ♀	8	4	2	1	1	0	0
	ep ♀ × Cb ♀	6	2	1	1	1	0	1
	ep ♀ × Cb ♂	7	3	2	2	0	0	0
ep × C <sub>3</sub> H	ep ♂ × C <sub>3</sub> H ♂	7	2	3	1	0	1	0
	ep ♀ × C <sub>3</sub> H ♀	6	3	2	0	1	0	0
	ep ♂ × C <sub>3</sub> H ♀	5	2	1	2	0	0	0
	ep ♀ × C <sub>3</sub> H ♂	6	2	2	1	0	1	0

って15秒以内の短時間に ep 系マウスの血行に入っていくことが判明した。また parabiosis 後14日目および21日目の場合においても同様の成績を得た。そして parabiosis 後 ep 系マウスの痙攣発作が消失したもものではその血流交通を形態学的にも確認することができた。すなわち ep 系マウスと CF-I 系マウスの腹膜接合部における毛細血管吻合の存在および血管の移行像を認めた。しかしながら parabiosis 直後のものおよび施行後1日目のものではアイソトープを用いた実験においてもまた形態学的にも血液交流は証明されなかつた。

さて、これらの parabiosis の縫合部を切開し、再び両者を分離した場合の検索を行なつたが、

その成績は第5表に示すごとくである。すなわち parabiosis 後の日数が3日以内の場合の分離では、分離後1日目より ep 系マウスは痙攣を起したが、parabiosis によつて、ep 系マウスに痙攣発作がみられなくなつてから分離したもものでは、分離後2~3日経過すると、ep 系マウスは再び個有の痙攣発作を起すようになった。

生後、定期的な体位変換刺激を与えていても、まだ痙攣発作を一度も起したことはない生後7週目の ep 系マウスと、この ep 系マウスと同一成長時期の CF-I 系マウスとの間に parabiosis を行ない、またそ

Table 5 Appearance of Seizure in ep-Mouse Separated from Parabiosis  
(+) Seizure Observed  
(-) No Seizure Observed

No. of Exp.	Combination of Parabiosis	Term of Parabiosis	Days after Separation					
			1	2	3	4	5	6
1	ep ♂ CF-1 ♂	3	+	+	+	+	+	+
2	ep ♂ CF-1 ♂	12	-	+	+	+	+	+
3	ep ♀ CF-1 ♀	21	-	-	+	+	+	+
4	ep ♂ CF-1 ♂	35	-	-	+	+	+	+
5	ep ♂ CF-1 ♂	56	-	-	+	+	+	+

の際雌雄の4つの組合せにつき各々4組ずつ試みたが、この場合はCF-I系マウスおよびep系マウスともに最初から痙攣発作は起らず、長期生存例でもその期間中一度も痙攣発作はみられなかつた。しかしこの生後7週目のep系マウス同志のparabiosisでは、この場合も雌雄の3つの組合せにつき4組ずつ施行したが、両者とも全例において、早いものでは生後9週頃より、おそくとも生後10週頃には典型的な痙攣発作がみられるようになった。

#### 第4章 総括ならびに考按

ep系マウスと他の正常マウスとの間にparabiosisを施行すると、おそくとも6日以後になるとep系マウスの痙攣発作が完全に阻止されることを発見し、さらにこの現象は血液交流と密接な関係があり、正常マウスの血液成分のep系マウスへの流入に起因することを明らかにした。すなわちparabiosis形成直後より初めのうちは血液交流が起らないため、その間はep系マウスの痙攣発作は存続するが、しかしparabiosis施行後4～5日、おそくとも6日以後になると、創傷治癒機転により、毛細血管の吻合が起り血流交流が始まつて、そのため痙攣発作が阻止されるようになってくるものと推定される。したがってこれを裏付けるため、アイソトープを用いて、正常マウスからep系マウスへ血流交流が行なわれていることを証明し、また形態学的にも毛細血管の吻合および血管の移行像を確認した。

以上のことから、ep系マウスには痙攣抑制に関

連したなんらかの物質が欠損しており、それがある程度に達すると脳の物質代謝に欠陥が生じ、興奮処理機構が正常に営まれなくなつて体位変換刺激により容易に痙攣を起すのであるが、それに他の正常マウスとparabiosisを行なうと、正常マウスの血液からep系マウスに欠乏している物質がep系マウスの体内に移行してそのために痙攣が起らなくなるものと考えられる。事実parabiosisにより一旦痙攣発作の消失したep系マウスを分離すると、再び個々の痙攣発作が生ずるところからみても、正常マウスの血液中に存在しているこの物質によつて補給されている間はep系マウスの痙攣が阻止されているものと解釈される。いずれにせよこの物質はblood-brain barrierを容易に通過して、脳の興奮処理機構を正常化せしめるものと想定される。したがって私どもの教室では、正常マウスの血清中に存在するであろうと思われるこの物質をAnti-convulsion factor (Factor A C) と仮称して、目下追求中であるが、この物質の化学的追求め今後に残された重要な課題の一つであろう。なお、さらにparabiosisによつてep系マウスにみられた脳代謝の異常がどのように変化するであろうかということについてもなお追求中である。

#### 第5章 結 論

ep系マウス同志およびep系マウスと他の正常な純系マウスとの間にparabiosisを施行し、次のごとく結論をえた。

- 1) ep系マウス同志のparabiosisでは術後の日数がいかに経過しても両者とも痙攣発作は存続する。
- 2) ep系マウスと正常マウスとのparabiosisでは雌雄4つの組合せのいずれにおいても、おそくとも6日以後になると、すべてep系マウスの痙攣発作は阻止され、100日以上観察しても痙攣は全く阻止されている。
- 3) ep系マウスと正常マウスとのparabiosisにより、ep系マウスの痙攣発作が阻止された時期のものでは、アイソトープの注入により、あるいは形態学的に両者間における血液交流の存在が確認される。
- 4) ep系マウスと正常マウスとのparabiosis施行後両者を分離すると、ep系マウスの痙攣阻止前の分離では、分離後1日目よりep系マウスに痙攣発作が現われるが、ep系マウスの痙攣阻止後分離したもので、分離後2～3日目より再びep系マ

ウス個有の痙攣発作が出現する。

5) 生後定期的な体位変換刺激を与えられても、まだ一度も痙攣発作のみられない生後7週目の ep 系マウスと同一成長時期の正常マウスとの parabiosis では両者とも初めから痙攣発作はみられず、長期生

存期間中一度も痙攣発作はみられない。

稿を終るにあたり御指導、御鞭撻下さり、御校閲を賜わつた恩師陣内教授に深い感謝の意を表するとともに、実験にあたり種々御助言をいただいた当教室の森博士に深謝する、

#### 参 考 文 献

- 1) 今泉他：実験動物，8，6，1959.  
 2) Naruse, H. et al.: J. Neurochem., 5, 359,  
 1960.  
 3) 秋元，成瀬他：神経研究の進歩，4，548，昭35.

## Experimental Study on Inhibition of the ep-Mouse Convulsion

### Part 3 Inhibition of the ep-Mouse Convulsion by Parabiosis Formation with Normal Mouse

By

Junzi Kasahara

Department of Surgery and Neurosurgery, Okayama Univ. Med. School  
 (Director: Prof. D. Jinnai)

Parabiosis was attempted between ep-mice and normal pedigree mice.

1. Parabiosis between two ep mice could not affect the convulsive seizure in both animals regardless the passage of time after parabiosis.

2. In the possible four pairs of parabiosis between the ep-mice and normal mice, consisted of a male and female each or *visa versa*, it was found that in every pair the convulsive seizure in every ep-mouse was suppressed in 6 days after the parabiosis and thereafter, and after 100 days convulsive seizure was completely inhibited.

3. In an isotope  $^{90}\text{Y}$  utilization and also in morphological observation, circulatory communication was established between the parabiosed mice after convulsion ceased to occur.

4. When the parabiosis was cut off in two different stages, the ep-mouse convulsive seizure persisted if the separation was done before the atolishment of convulsion, but the seizure occurred again 2 or 3 days later in the case separated after cessation of convulsive seizure.

5. In the case of the parabiosis between a 7 week-old ep-mouse given periodical postural stimulation but shown not a single convulsive seizure and a normal pedigree mouse of the same age, there could be observed not any convulsive seizure from the very beginning and as long as they survived.