

頭部外傷後の遅発性けいれん易発症における
「脳ペリサイト／グリア細胞連関」の関与

坂井 研太

福岡大学薬学部薬学疾患管理学教室 〒814-0180 福岡市城南区七隈 8-19-1

**Reactive pericytes trigger glial activation and late-onset hypersusceptibility
to seizure after traumatic brain injury in mice**

Kenta Sakai

Department of Pharmaceutical Care and Health Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Fukuoka University, 8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan

Abstract

Traumatic brain injury (TBI) develops late posttraumatic epilepsy (LPTE) characterized by long and unexpected latencies until the onset of seizure. LPTE is drug-resistant in at least one-third of patients and the mechanism of onset of LPTE is unknown. Therefore, there is a clear need for novel therapeutic strategies to prevent the onset of seizure after TBI. We hypothesized that LPTE occur due to TBI-induced the dysfunction of the neurovascular unit (NVU) constituted by cell types such as pericytes and glial cells (astrocytes and microglia). In this study, we focused on the pericyte reactivity in mice subjected to brain injury using controlled cortical impact (CCI) to understand how TBI causes the uncoordinated crosstalk in the NVU and develops the altered neuronal excitability.

Impaired glutamate uptake and the lowered expression levels of glutamate transporter (Excitatory amino acid transporter: EAAT) in astrocytes are involved in the development of neuronal hyperexcitability in TBI. Brain pericytes located on the capillaries are surrounded by astrocytic endfeet expressing EAAT. Although this anatomical observation raises the possibility that brain pericytes are associated with the function of astrocytic glutamate transporter EAAT, the effects of pericytes on it have not been examined. In the second chapter of this article, we aim at investigating if the altered astrocytic glutamate uptake activity in CCI mice are caused by the reactive pericytes.

In the histological analyses, platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) β expression in pericytes were significantly increased from early phase (1 h to 4 days) after CCI. The expressions of Iba1 and GFAP as markers of microglia and astrocyte, respectively, were increased from 4 to 28 days after CCI. EAAT2 expression were significantly decreased at 28 days after CCI. The severities of seizure induced by pilocarpine were gradually increased with a significant difference at 28 days after CCI. These findings suggest that the increased PDGFR β expression in pericytes precedes microglial activation, the lowered glutamate uptake activity in astrocytes and neuronal hyperexcitability after CCI. Then, CCI mice were treated with an inhibitor of PDGFR β signaling pathway, imatinib, for 5 days after CCI. Imatinib apparently lowered seizure susceptibility to pilocarpine, suppressed microglial activation and improved the decreased EAAT2 expressions at postoperative day 28. While the reactive pericytes is implicated in the downregulation of EAAT2 expression in astrocytes, the activity of glutamate uptake

via EAAT2 in cultured astrocytes were upregulated when brain pericytes were cocultured with astrocytes under the physiological conditions. These findings raise the possibility that the reactive pericytes in CCI mice directly downregulate the glutamate uptake activity in astrocyte.

In conclusion, our findings suggest that brain pericytes with the rapidly increased PDGFR β expressions might drive TBI-induced microglial activation and downregulated glutamate uptake in astrocytes, leading to neuronal hyperexcitability and the onset of LPTE. The functional crosstalk between pericytes and glial cells should be considered as a possible hallmark for the regulation of neuronal excitability under the pathological conditions such as TBI.

keywords : Traumatic brain injury, Reactive pericytes, PDGFR β , Imatinib, Glial cells

【緒言/目的】

転倒・転落、スポーツ外傷、交通事故などによる頭部外傷 (traumatic brain injury: TBI) 受傷者は、全世界において年間 5000 万人に昇る [1]。TBI 受傷者は急性傷害からの回復後、数か月から十数年の無症候期を経て、遅発性けいれんを発症する。その生涯発症率は数十%に上るが、TBI 後の遅発性けいれんに対する抗けいれん薬の効果は限定的なため、予防・治療法の開発は喫緊の課題である [2]。脳神経活動は、脳微小血管構成細胞、グリア細胞および脳神経細胞から構成される neurovascular unit (NVU) により協調的に制御されている。TBI 後の遅発性けいれんに神経細胞を標的とした抗けいれん薬が奏功しないことから [3]、TBI 後の無症候期における NVU 不調和がけいれん発症へと導いている可能性がある。すなわち、TBI 後の遅発性けいれんを予防・軽減するには、受傷後緩徐に進行する NVU 不調和を複合的に治療する必要がある。

脳ペリサイトは脳微小血管に存在する血管周皮細胞で、脳血管内皮細胞およびアストロサイトと共に血液脳関門 (BBB) を構成する。また脳ペリサイトが存在する脳微小血管は、NVU 構成細胞であるアストロサイトのエンドフィート、ミクログリアおよび神経軸索突起に囲まれていることから、脳ペリサイトがこれら NVU 構成細胞機能の調節に関わっている可能性がある。実際に脳ペリサイトは脳血管内皮細胞の密着結合能や神経細胞機能を直接制御し血液脳関門および脳神経機能の恒常性維持に関与する [4, 5]。すなわち正常な脳ペリサイトは NVU 構成員として、他の NVU 構成細胞と協調し、脳神経回路網を制御し得る。一方、病態下では NVU における脳ペリサイトの機能は一変する。炎症性メディエーター刺激に応答した脳ペリサイトは matrix metalloproteinase 9 を放出し BBB 機能を障害する。脳ペリサイトの炎症刺激に対する反応性は、他の BBB 構成細胞である脳血管内皮細胞やアストロサイトのそれよりも高かった [6]。大変興味深いことに、脳内炎症担当細胞であるミクログリアの炎症刺激に対する反応性は、脳ペリサイトのそれと比較して著しく低く、炎症反応性脳ペリサイトから放出される液性因子は、ミクログリアの活性化を誘導する [7]。これらの知見は、脳内炎症および炎症を伴う病態の形成において脳ペリサイトは中核的な役割を担い、グリア細胞の活性化を含む非協調的な NVU 病態を誘導している可能性を示唆する。

TBI は脳損傷を契機として、脳内の炎症性関連因子の増加 [3]、NVU 構成細胞であるミクログリアやアストロサイトの活性化 [8, 9]、また神経細胞の過剰興奮 [10-12] など特徴的な反応を誘発する。TBI により、アストロサイトにおけるグルタミン酸の取り込み異常およびグルタミン酸輸送体 (excitatory amino acid transporter: EAAT) 発現の低下が生じる。このような TBI による NVU 機能異常が、遅発性の二次的脳機能障害の起因となる可能性がある。実際に、ミクログリアとアストロサイトの TBI 後の活性化は、脳神経回路の易興奮を誘導することから [13, 14]、頭部外傷後の遅発性けいれん易発症病態の形成に NVU

機能異常が寄与することが示唆される。しかし、脳ペリサイトが頭部外傷後のグリア細胞の活性化などのNVU機能異常に伴うけいれん易発症病態の形成に関与するかは不明である。そこで本研究では、脳ペリサイトをTBI後のグリア細胞活性化や神経易興奮性などのNVU機能異常を牽引する基幹細胞であると捉え、遅発性けいれんの易発症病態形成機構を解明する。

【実験方法】

1. 頭部外傷モデルマウス作製

雄性C57BL/6Jマウス（6–8週齢，体重18–23 g, Charles River Laboratory Japan, Yokohama）を使用した。頭部外傷の負荷はcontrolled cortical impact (CCI) の手法を用いて行った [15]。Controlled pneumatic impactor (AMS 201, AmScien Instruments, Richmond, VA, USA) を使用し，左脳開頭部に次の条件（深度0.5 mm，速度 3.0 ± 0.02 m/s，インパクト持続時間120 ms）で直径3 mmのflat-tipを打ち付け，頭部外傷（CCI負荷）を与えた。

2. 組織学的解析

CCIマウスより作製した脳切片（bregmaから約-1.8 mm～-2.3 mm）を免疫組織化学染色に供した。脳切片をTris-buffered salineで希釈した0.2% Triton-X 100 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 溶液で洗浄し，ブロッッキングを行った。その後NVU構成細胞である脳ペリサイト，ミクログリアおよびアストロサイトの変化を観察するために，各細胞のマーカートンパク質を特異的に認識する一次抗体（抗PDGFR β 抗体：脳ペリサイト，抗Iba1抗体：ミクログリアおよび抗GFAP抗体：アストロサイト）を処理した。翌日，二次抗体を処理した脳切片を，BZ-X710 microscope (Keyence, Osaka) を用いて観察した。海馬dentate gyrusおよびCA1を含む観察領域における各マーカートンパク質の発現量をBZ-X Analyzer software (Keyence) を用いて定量した。

3. CCI負荷マウスのpilocarpine誘発けいれん感受性に関する評価

けいれん誘発薬pilocarpineに対する感受性は，CCI負荷後7，14，21および28日目に評価した。0.9% NaCl (Otuka Pharmaceutical Factory, Inc., Tokushima) に溶解した(-) scopolamine methyl nitrate (1 mg / kg, i.p., Sigma Aldrich, MO, USA) をマウスに投与した。30分後，0.9% NaClに溶解したpilocarpine hydrochloride (250, 290, 350 mg/kg, i.p., Sigma Aldrich) を投与し，けいれん発作の重症度を90分間評価した。けいれん発作重症度は，一般的なRacine scale [16] を一部改変した方法で評価した。

4. Imatinib投与

脳ペリサイトのPDGFR β シグナル活性を阻害するために，PDGFRチロシンキナーゼ阻害剤imatinib (200 mg/kg, p.o., Wako) を，CCI負荷当日（0日目）からCCI負荷後4日目まで（計5日間），12時間間隔で1日2回経口投与した。但し，0日目はCCI負荷の12時間前と2時間前に投与した。Vehicleにはdistilled waterを使用した。Imatinibを投与したCCIマウスを用いて，負荷後28日目におけるグリア細胞の活性化およびpilocarpine誘発けいれん感受性を評価した。

5. 脳ペリサイトおよびアストロサイトの共培養系作製

ヒト由来脳ペリサイト (Human brain vessel pericytes, ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA, USA) およびヒト由来アストロサイト (Normal human astrocytes, Lonza, Basel, Switzerland) を使用した。脳ペリサイトは，poly-L-lysine (Sigma Aldrich) で被覆されたインサート (ThinCert™ - 24well, Greiner bio-one, Kremsmünster, Austria) に 2.5×10^4 cells/wellで播種した。アストロサイトは，poly-L-lysine でコーティングされた24-wellプレートに 10×10^4 cells/wellで播種した。播種した翌日に脳ペリサイトを含むインサートを，アストロサイトを含む24-wellプレートに移動し，アストロサイトの培養用培地中で72時間共培

養した (pericyte coculture)。対照群として、アストロサイト単一培養系を作製した (astrocyte monoculture)。

6. アストロサイトにおける³H-L-glutamateの取り込み実験

培養用培地を除去後、脳ペリサイトと共培養および単一培養したアストロサイトを、assay buffer (125 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1.25 mM NaH₂PO₄, 23 mM NaHCO₃, 10 mM glucose and 2 mM MgSO₄, buffered to pH 7.4, 37 °C) で2回洗浄した。その後、³H-L-glutamate (PerkinElmer, Waltham, MA, USA, 0.5 μCi/mL, 10.2 nM) を含む assay buffer (37 °C) を添加し、CO₂ インキュベーター (37 °C) 内で1, 2, 5および10分間インキュベーションした。インキュベーション後、プレートを氷上に置き、氷冷したPBSで3回洗浄することで³H-L-glutamateの取り込みを停止させた。細胞を溶解させるため、0.3 mol/L NaOHを200 μL添加し、CO₂ インキュベーター内で2日間留置した。細胞溶解液をシンチレーションカクテル (Pico-Fluor™ Plus, PerkinElmer) に入れ、液中に含まれる放射活性を、液体シンチレーションカウンター (LSA 2910TR, PerkinElmer) を用いて測定した。また、Na⁺-free assay bufferは、assay buffer中のNaClを等モルのcholine chloride (Wako) に置換することにより調製した。³H-L-glutamateの取り込み活性は、論文を参考にし、cell/medium ratio (μL/mg protein) として表した。

$$\text{Cell/medium ratio } (\mu\text{L/mg protein}) = \frac{{}^3\text{H-radioactivities in the cells} \text{ (disintegration per minute (dpm)/mg protein)}}{{}^3\text{H-radioactivities in assay buffer (dpm}/\mu\text{L})}$$

7. EAAT 阻害剤処理

EAAT2阻害剤 dihydrokainic acid (DHK, 500 μM, Tocris, UK) を添加した [³H]-L-glutamate 含有 assay buffer を、ペリサイトと共培養および単一培養したアストロサイトに10分間処理し、 [³H]-L-glutamate の取り込み実験を行った。対照群には、UCPH-101の溶媒 dimethyl sulfoxide あるいはDHKの溶媒 distilled water を添加した [³H]-L-glutamate 含有 assay buffer を使用した。

8. 脳ペリサイト培養培地の作製

脳ペリサイト (2.5 × 10⁴ cells/well) を poly-L-lysine で被覆されたインサート (ThinCert™ - 24 well) に播種し、脳ペリサイト培養用培地中で培養した。翌日、培地をアストロサイト培養用培地 (AGM™ astrocyte growth medium, Lonza) に交換し、さらに24 あるいは48 時間培養した。その培養液を脳ペリサイト培養培地 (pericyte-conditioned medium (CM)) とした。Pericyte-CMで72時間処理された単一培養アストロサイトを用いて³H-L-glutamate取り込み実験を行った。アストロサイトによるグルタミン酸の取り込みに対する pericyte-CMの濃度依存的な影響を検討するため、AGM™ astrocyte growth mediumで2倍に希釈した pericyte-CM (pericyte-CM (50%)) および希釈していない pericyte-CM (pericyte-CM (100%)) を、それぞれ単一培養アストロサイトに72時間処理した。Pericyte-CMを含まないAGM™ astrocyte growth mediumのみ (pericyte-CM (0%)) を72時間処理したアストロサイトを対照群とした。

9. 統計学的解析

結果は、平均 ± 標準誤差または中央値 (四分位範囲) で表示し、p 値が0.05未満の場合、統計的に有意であると判定した。

【結果/考察】

1. CCI負荷によるミクログリアおよびアストロサイト活性化に先行して増加する脳ペリサイトPDGFRβ発現

CCI負荷マウスの外傷側海馬では、受傷後早期 (1時間後) から脳ペリサイトマーカーであるPDGFRβ (Fig. 1 A) 発現が急増し、外傷後4日目までその増加は持続した。一方、ミクログリアおよびアストロサ

イトそれぞれの特異的のマーカである Iba1 (Fig. 1 B) および GFAP (Fig. 1 C) の発現量の顕著な増加は、外傷後4日目から認められた。脳ペリサイトにおける PDGFR β 発現量増加は、受傷後7日目でほとんど認められなくなるものの、Iba1およびGFAPの顕著な発現増加は28日目まで持続した。これら知見は、TBI後早期では、脳ペリサイトのTBIに対する反応性は、グリア細胞のそれと比較し高いことを示す。

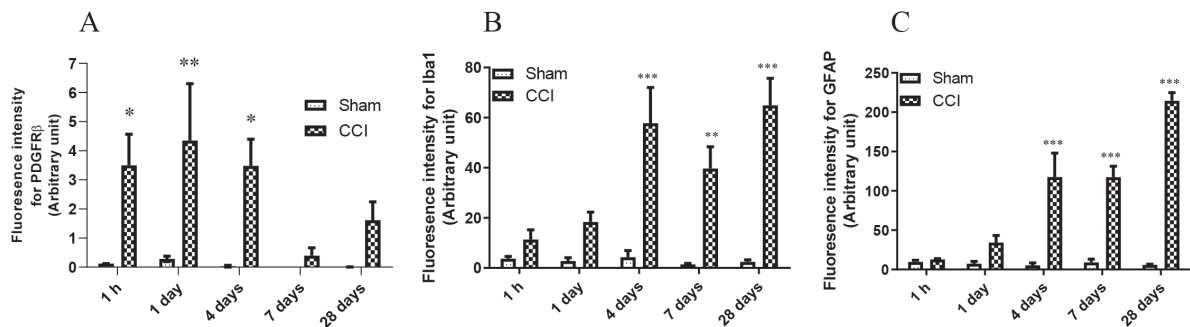


Fig. 1 Time-dependent changes in (A) PDGFR β , (B) Iba1 and (C) GFAP immunoreactivities in the injured ipsilateral hippocampus after CCI.

2. CCI負荷後のpilocarpine誘発けいれん感受性の遅発性亢進

TBI後の神経易興奮性を経時的に評価するため、受傷後7、14、21および28日に発作閾値下限量のけいれん誘発剤pilocarpineをCCIマウスに投与し、けいれん強度を測定した。Pilocarpineに対する感受性はCCI受傷後経時的に上昇（経時的なけいれん閾値の低下）し、受傷後28日において最も増大することから、TBI後の脳神経回路網の易興奮性は、脳ペリサイトの病変化（PDGFR β 発現の急増）およびグリア細胞の活性化に遅延して形成されることが判った。

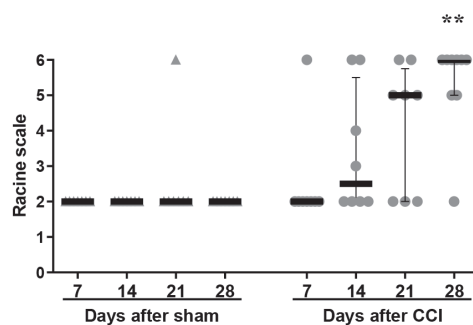


Fig. 2 The severity of convulsive behavior in sham and CCI mice at postoperative day 7, 14, 21 and 28.

3. CCI後早期の脳ペリサイトPDGFR β 発現増大が誘導するミクログリア活性化とpilocarpine誘発けいれん感受性亢進

CCI負荷に対する脳ペリサイトの反応を抑制するためPDGFR β シグナル阻害剤imatinibをCCI負荷後早期に投与した。その後、外傷側海馬のミクログリアおよびアストロサイトの各特異的のマーカの発現増加とpilocarpine誘発けいれんの感度上昇に対する病変化脳ペリサイトの関与について検討した。脳ペリサイトにおけるPDGFR β 発現量増加が認められた受傷後の5日間imatinibをCCIマウスに投与すると、受傷後28日のミクログリアIba1発現量の増加 (Fig. 3 A) およびけいれん強度の増大 (Fig. 3 B) が有意に抑制された。一方で、増加したアストロサイトGFAP発現量に変化は認められなかった。従ってPDGFR β

発現が急増した脳ペリサイト（すなわちCCI負荷により病変化した脳ペリサイト）がグリア細胞機能変化および遅発性のけいれん感受性亢進を惹起させた可能性がある。

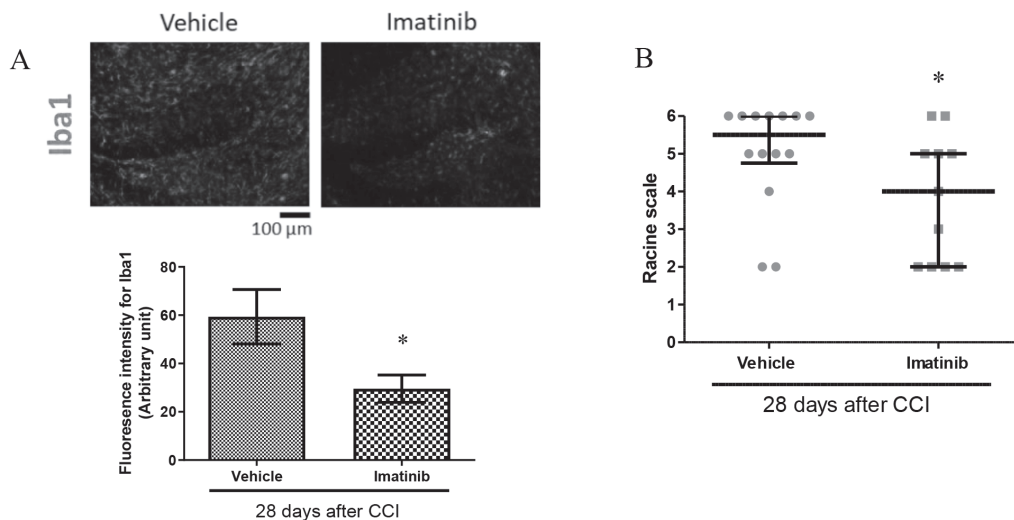


Fig. 3 Effect of subchronic imatinib treatment in the early phase after CCI on (A) activated microglia in the injured ipsilateral hippocampus and (B) the hypersusceptibility to a sub-threshold dose of pilocarpine in CCI mice at postoperative day 28.

4. CCIにより病変化した脳ペリサイトが誘導する外傷側海馬のグルタミン酸輸送体の発現低下

TBIによるアストロサイトの細胞外グルタミン酸調節機能異常における病変化脳ペリサイトの関与を明らかにするため、CCI負荷後のアストロサイトにおけるNa⁺駆動性グルタミン酸輸送体EAAT2の発現に、脳ペリサイトが及ぼす影響を検討した。CCI負荷28日後の外傷側海馬においてEAAT2発現量が減少することを免疫組織学的染色により明らかにした (Fig. 4 A)。脳ペリサイトのPDGFRβ 発現が増加した

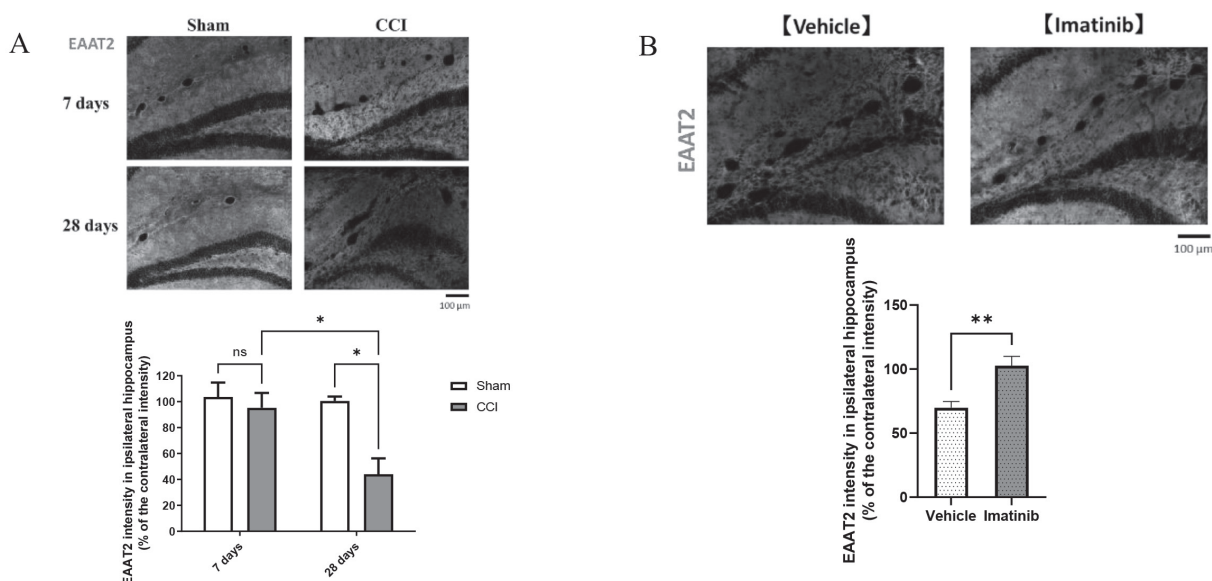


Fig. 4 EAAT2 immunoreactivities in the injured ipsilateral hippocampus after CCI. (A) Time-dependent changes of EAAT2 expression levels in hippocampus. (B) Effect of subchronic imatinib treatment in the early phase after CCI on EAAT2 expression at postoperative day 28.

受傷後5日間のimatinib投与では、受傷後28日におけるEAAT2発現量減少が抑制される傾向が認められた (Fig. 4 B)。これら知見は、TBI後の病変化脳ペリサイトが、アストロサイトのグルタミン酸輸送体の発現やグルタミン酸取り込み能に影響している可能性を示唆する。

5. 脳ペリサイトによるアストロサイトEAAT2を介したグルタミン酸取り込み能の上昇

アストロサイトのNa⁺駆動性グルタミン酸輸送体を介したグルタミン酸取り込み能に及ぼす脳ペリサイトの影響について検討した。脳ペリサイトとアストロサイトを共培養し、アストロサイトのグルタミン酸取り込み能を評価した。脳ペリサイトと共培養したアストロサイト (共培養群) では、グルタミン酸取り込み速度がアストロサイト単一群と比較して増加した (Fig. 5 A)。Na⁺非存在下におけるグルタミン酸取り込み阻害効果は、アストロサイト単一群と比較して、脳ペリサイトを共培養したアストロサイト群でより顕著であった (Fig. 5 B)。脳ペリサイトの共存により、アストロサイトのNa⁺依存的なグルタミン酸取り込み経路が活性化することが判った。EAAT2の選択的阻害薬DHKで処理すると、脳ペリサイトにより増強されたアストロサイトのグルタミン酸取り込み能が阻害された (Fig. 5 C)。従って、脳ペリサイトはアストロサイトのEAAT2を介したグルタミン酸取り込み能を活性化する可能性が考えられる。Pericyte-CMを負荷したアストロサイトでは、その負荷量に依ってグルタミン酸取り込み活性が増加し

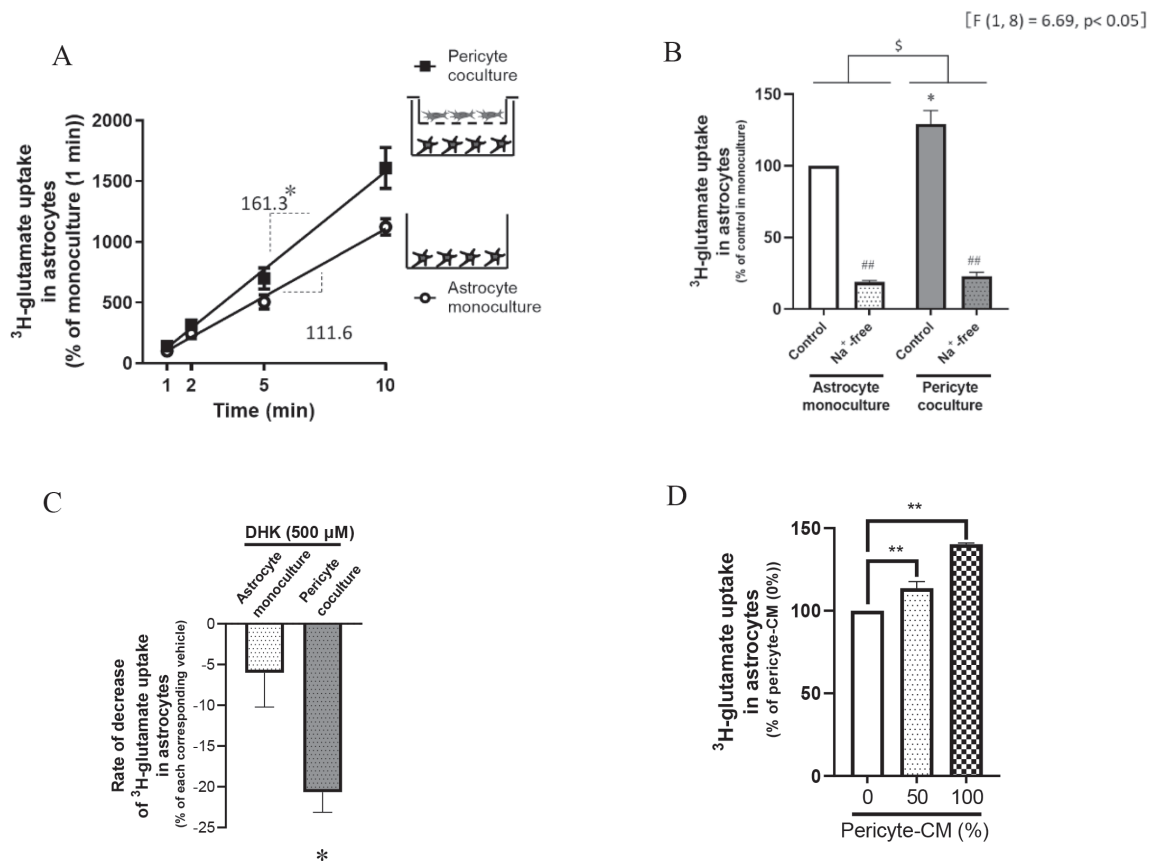


Fig. 5 Brain pericytes increase the glutamate uptake in astrocytes via sodium-dependent glutamate transporter EAAT2. (A) Time-course of [³H]-L-glutamate uptake in astrocytes cultured with pericytes (pericyte coculture) or without pericytes (astrocyte monoculture). (B) Effect of Na⁺-free condition on the glutamate uptake of astrocytes in astrocyte monoculture and pericyte coculture. (C) Effect of DHK (500 μM), a selective inhibitor of EAAT2, on the glutamate uptake in astrocyte monoculture and pericyte coculture. (D) Effect of pericyte-conditioned medium (CM) on the glutamate uptake in astrocyte monoculture.

た (Fig. 5 D)。従って、健常下では、脳ペリサイトは液性因子の放出を介してアストロサイトのグルタミン酸取り込み能を促進的に維持していることを示唆する。以上、CCIマウスにおいて外傷後早期の脳ペリサイトPDGFR β シグナル阻害が遅発的なEAAT2発現量減少を抑制するとの結果と総合すれば、PDGFR β シグナルが活性化した病変化脳ペリサイトがCCI後のアストロサイトのグルタミン酸取り込み能低下を誘導している可能性がある。

本研究は、CCI負荷後早期の脳ペリサイトPDGFR β 発現上昇が、グリア細胞機能異常および遅発性の脳神経回路網の易興奮性を誘導することを解明した。本知見は、TBIにより病変化した脳ペリサイトがNVU不調和を牽引し、遅発性けいれん発症へと導く可能性を提示する。未だ発症機序が不明で有効な治療法が確立されていないTBI後の遅発性けいれんに関して、その病態形成の基幹細胞として脳ペリサイトを提起する本研究は、遅発性けいれんを予防・抑制するための治療法開発の隘路を切り開くものである。

【参考文献】

1. Andrew I R Maas et al. Traumatic brain injury: integrated approaches to improve prevention, clinical care, and research. *Lancet Neurol.* 2017 Dec; 16 (12):987-1048.
2. Brandon P Lucke-Wold et al. Traumatic brain injury and epilepsy: Underlying mechanisms leading to seizure. *Seizure.* 2015 Dec; 33: 13-23.
3. Kyria M Webster et al. Inflammation in epileptogenesis after traumatic brain injury. *J Neuroinflammation.* 2017 Jan 13; 14 (1): 10.
4. Shinya Dohgu et al. Brain pericytes contribute to the induction and up-regulation of blood-brain barrier functions through transforming growth factor- β production. *Brain Res.* 2005 Mar 21; 1038 (2):208-15.
5. Hiroyuki Takahashi et al. Brain pericyte-derived soluble factors enhance insulin sensitivity in GT1-7 hypothalamic neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Feb 20; 457 (4):532-7.
6. Fuyuko Takata et al. Brain pericytes among cells constituting the blood-brain barrier are highly sensitive to tumor necrosis factor- α , releasing matrix metalloproteinase-9 and migrating in vitro. *J Neuroinflammation.* 2011 Aug 26; 8: 106.
7. Junichi Matsumoto et al. Tumor necrosis factor- α -stimulated brain pericytes possess a unique cytokine and chemokine release profile and enhance microglial activation. *Neurosci Lett.* 2014 Aug 22; 578: 133-8.
8. Julia Lier et al. Fast microglial activation after severe traumatic brain injuries. *Int J Legal Med.* 2020 Nov; 134 (6):2187-2193.
9. Songbai Xu et al. Role of Astrocytes in Post-traumatic Epilepsy. *Frontiers in neurology. Front Neurol.* 2019 Nov 13; 10:1149.
10. P M Vespa et al. Nonconvulsive seizures after traumatic brain injury are associated with hippocampal atrophy. *Neurology.* 2010 Aug 31; 75 (9):792-8.
11. Robert F Hunt et al. Posttraumatic epilepsy after controlled cortical impact injury in mice. *Experimental neurology. Exp Neurol.* 2009 Feb; 215 (2):243-52.
12. Dongjun Guo et al. Rapamycin attenuates the development of posttraumatic epilepsy in a mouse model of traumatic brain injury. *PLoS One.* 2013 May 14; 8 (5):e64078.
13. Ila P Karve et al. The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. *Br J Pharmacol.* 2016 Feb; 173 (4):692-702.
14. Sanjib Mukherjee et al. Neuroinflammatory mechanisms of post-traumatic epilepsy. *J Neuroinflammation.* 2020 Jun 17; 17 (1):193.

- 15 K.E. Saatman et al. Differential behavioral and histopathological responses to graded cortical impact injury in mice. *J Neurotrauma*, 23 (8) (2006), pp. 1241 - 1253 .
- 16 R.J. Racine. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 32 (3) (1972), pp. 281 - 294 .