てんかん原性獲得過程におけるセロトニン受容体の関与：ラット扁桃核キンドリング モデルによる研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9441

金沢大学十全医学会雑誌　第108巻　第5号　504－514（1999）

てんかん原性獲得過程におけるセロトニン受容体の関与：ラット扁桃核キンドリングモデルによる研究

金沢大学医学部神経精神医学講座（主任：越野好文教授）
白　石　　潤

側頭葉てんかんの慢性実験モデルである扁桃核キンドリングを用いて，てんかん原性獲得過程におけるセロトニン受容体の役割を検討した．本研究では，セロトニン1A受容体作動薬 8-ヒドロキシ-(ジ-n-プロピルアミノ) テトラリン[8-hydroxy-(di-n-propylamino)tetralin, 8-OH-DPAT]，セロトニン2受容体作動薬 1-(2,5-ジメトキシ-4-イオドフェニル)-2-アミノプロパン[1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane, DOI]，セロトニン2受容体拮抗薬 ケタンセリン，セロトニン3受容体作動薬 1-(*m*-クロロフェニル)-ビグアナイド[1-(*m*-chlorophenyl)-biguanide, *m*-CPBG]およびセロトニン4受容体拮抗薬 (1-ブチル-4-ピペリジニルメチル)-8-アミノ-7-クロロ-1,4-ベンゾジオキサン-5-カーボキシレート ハイドロクロライド [(1-butyl-4-piperidinylmethyl)-8-amino-7-chloro-1,4-benzodioxan-5-carboxylate hydrochloride, SB 204070A]を使用した．扁桃核に深部電極を刺入したラットの後発射閾値を決定した後，各薬物の連日投与下で，後発射閾値より20μA高い刺激強度による電気刺激を1日1回加えた．全身けいれんが安定して誘発されるようになるまで刺激を続け，その間の行動および脳波上の発作発展を観察し，薬効を判定した．8-OH-DPAT (1mg/kg) の皮下投与では，全身けいれん誘発までの刺激回数には対照群と有意差はなかったが，行動上の発作段階はキンドリング刺激の9～11日目で有意に減少した．また，後発射持続時間も5日目で短縮した．一方，DOI (1mg/kg) の皮下投与では，発作段階は4～10日目に増加し，全身けいれん誘発までに要する刺激回数も対照群の平均14.3回に比べ7.3回と少なかった．DOIの促進効果は，ケタンセリン(1mg/kg) の前処置により拮抗され，各発作指標に有意な変化はみられなかった．ケタンセリンの単独投与では，発展パターンに変化はなかった．*m*-CPBG (40μg) の脳室内投与により，発作段階は5～11日目で増加し，後発射持続時間も10～11日目で延長した．さらに，初回の全身けいれん誘発までに要した刺激回数も有意に減少し，全身けいれん誘発時の後発射持続時間も平均35秒から71秒に延長した．SB 204070A (1mg/kg) の皮下投与では，初回全身けいれん誘発時のけいれん持続時間が短縮したが，発展過程における発作段階と後発射持続時間に変化はなかった．本研究の成績から，扁桃核キンドリング発作の発展過程に対して，セロトニン1A受容体は抑制的に働く一方，セロトニン2受容体およびセロトニン3受容体は促進的に作用することが示唆された．また，セロトニン4受容体は本質的な役割を有しない可能性が示唆された．セロトニン系はキンドリング発展の神経機構に密接に関与し，てんかん原性獲得過程におけるセロトニンの役割は受容体亜型により異なることが示された．

Key words　epilepsy, kindling, amygdala, serotonin, receptor subtype

セロトニンは腸管や血管の平滑筋収縮物質として発見されたが，その後中枢神経系にも神経伝達物質として存在することが確認された[1]．セロトニン作動性神経細胞の細胞体は中脳縫線核群 (縫線核，網様体) に存在し，線条体，黒質，視床，視床下部，大脳皮質，辺縁系など広範な脳部位に投射している[2]．中枢神経系においてセロトニンは，睡眠，体温調節，性行動あるいは摂食行動に関係しており，さらに精神分裂病や気分障害などの精神障害との密接な関連も示唆されている[3]．

近年の標識リガンドを用いた受容体結合実験によりセロトニン受容体は現在7種のファミリーと14種類の亜型に分類されている[4][5]．セロトニン1A受容体は，ラットでは海馬，中隔核，扁桃体，背側縫線核など[6]に存在し，情動と関係の深い大脳辺縁系に多く分布することから，抑うつ症状や不安との関連が推測されており，セロトニン1A受容体部分作動薬のブスピロン[7]はベンゾジアゼピン系とは異なる新しい抗不安薬として臨床応用されている．セロトニン2受容体は，末梢の血管平滑筋に多く分布しているが，中枢神経系では大脳皮質と尾状核に高密度に存在している[8]．強力なセロトニン2受容体拮抗薬であるLSDが幻覚惹起作用を有し，すでに臨床で使用されているリスペリドンなどの非定型抗精神病薬がセロトニン2受容体拮抗作用をもつことなどから，セロトニン2受容体とドーパミン系の相互作用も示唆され，精神分裂病の病態に深く関与していることが推測されている[9]．さらに，セロトニン2受容体の拮抗による臨床効果として，徐波睡眠の増加や抗パーキンソン作用が

平成11年7月29日受付，平成11年9月2日受理

Abbreviations：AD, afterdischarge ; ADD, afterdischarge duration ; ADT, afterdischarge threshold ; DOI, 1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane ; 8-OH-DPAT, 8-hydroxy-(di-n-propylamino)tetralin ; 5-HTP, L-5-hydroxytryptophan ; *m*-CPBG, 1-(*m*-chlorophenyl)-biguanide

あげられている[10]．セロトニン3受容体は，迷走神経背側核や三叉神経核などの脳幹の他，孤束核，膠様質，脊髄，海馬，扁桃核などに存在している[11]．現在，抗腫瘍薬の副作用である嘔吐の治療薬として，セロトニン3受容体拮抗薬が臨床で用いられている．また，セロトニン3受容体拮抗薬のもつ認知機能の促進効果も報告され[12]，抗痴呆薬としての有用性も示唆されている．セロトニン4受容体は，嗅結節，側座核，線条体，淡蒼球，黒質，上丘，海馬に高密度に存在し，痛覚，気分障害，協調運動，視覚機能に関連している可能性が示唆されている．また，最近では，アルツハイマー病患者の海馬においてセロトニン4受容体数の減少が報告され，セロトニン4受容体作動薬が空間学習能と記憶を改善することが示されている[13]．

脳のある部位に電気刺激を1日1回反復して加えると，最初は行動や脳波上にわずかにみられたてんかん様反応が，進行性かつ持続性に増強し，ついには二次性全般発作が安定して惹起されるようになる．この効果は電気刺激を休止しても，その後1年以上の長期にわたって保持され，形成された二次性全般発作は自発的に反復して起こることが知られている．この現象はキンドリングと呼ばれ，1969年Goddardら[14]により初めて記載された．その後，ネコの深部脳波と行動を同時記録したWadaら[15]の研究から，キンドリング形成後には長期にわたるけいれん準備状態が生じ，自発てんかん発作が起こること[16]が明らかにされた．これらの結果から，実験てんかんモデルとしてのキンドリングの有用性が確立され，難治性てんかん，特に側頭葉てんかんの動物モデルとして現在まで広く用いられてきている．

前述のように，脳内セロトニン系は精神神経症状の発現に重要な役割を担っていることを示す膨大な知見が集積されている．これに反し，てんかんとの関連を調べた研究は乏しい．また，キンドリングモデルを用いた薬理学的研究では，γ-アミノ酪酸（γ-aminobutyric acid）系やカテコラミン系がキンドリングに対して抑制的に働くことが明らかにされている[17]が，脳内セロトニン系については矛盾する報告が多い．特に，セロトニン受容体亜型の役割に関しては不明な点が多く，キンドリングにおける脳内セロトニンの役割については意見の一致をみていない．

キンドリング形成後の発作発現とセロトニン受容体亜型との関連を検討した研究[18]では，ネコの海馬キンドリング発作に対してセロトニン1A受容体は抑制的に作用し，セロトニン2受容体は発作の二次性全般化に促進的に働く可能性が示唆されている．しかしながら，キンドリング形成後の発作発現とキンドリングの発展過程では薬物の作用が異なるなど，その基盤に異なる神経機構が想定されており[19]，両者を区別して論じることが必要である．そこで今回の研究では，セロトニン受容体亜型のうち，情報伝達系や生理機能が比較的明らかにされており，作動薬あるいは拮抗薬が開発されているセロトニン1A，セロトニン2，セロトニン3およびセロトニン4受容体について，キンドリングの発展過程，すなわちてんかん原性獲得過程に対する作用の相違を検討した．今回の研究では，セロトニン1A受容

Table 1. Seizure parameters of kindling development in rats receiving daily treatment with saline or 8-OH-DPAT

Drug	n	First response		First stage 5 seizure		
		ADT (μA)	ADD (s)	Number of stimulations	ADD (s)	Latency for bilateral clonus (s)
Saline	7	68.1±8.9	3.7±0.5	13.3±1.4	48.9±2.7	6.5±2.8
8-OH-DPAT	7	72.7±9.5	3.4±0.5	14.9±1.3	52.9±2.8	4.1±1.9

Values are $\bar{x}$±SEM. ADD, after discharge duration; ADT, afterdischarge threshold.

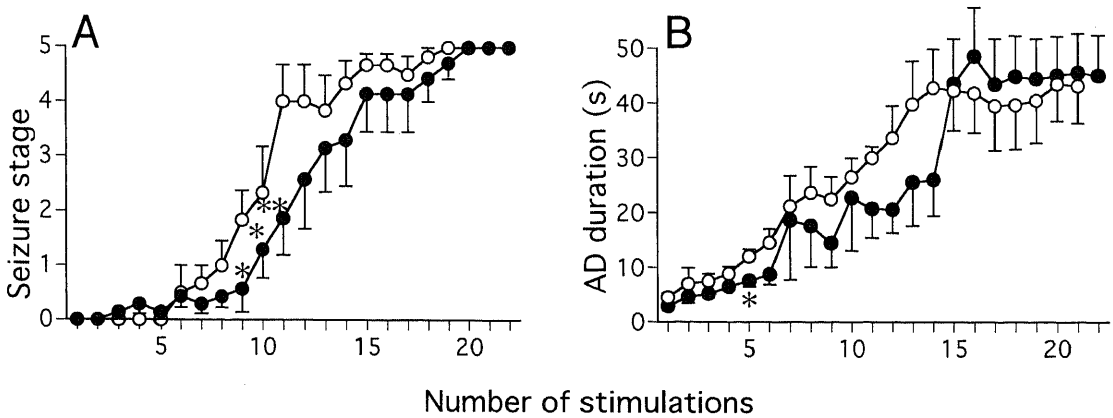


Fig. 1　Development of seizure response during amygdaloid kindling with daily administration of 8-OH-DPAT. (A) Behavioral seizure stage, (B) after discharge (AD) duration. After determining the AD threshold on day 1, 1ml/kg saline (○) or 1mg/kg 8-OH-DPAT (●) was injected subcutaneously 15 min prior to each kindling stimulation from day 2. Seizure stages are graded as follows : stage 0, no response; stage 1, rhythmic mouth and facial movement; stage 2, rhythmic head nodding; stage 3, forelimb clonus; stage 4, rearing and bilateral forelimb clonus; stage 5, rearing and falling. Values are $\bar{x}$ ± SEM (n = 7 per group). *p< 0.05, **p<0.01 compared with saline-treated group (Mann-Whitney *U*-test).

体作動薬8-ヒドロキシ-(ジ-n-プロピルアミノ)テトラリン [8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin, 8-OH-DPAT], セロトニン2受容体作動薬1-(2,5-ジメトキシ-4-イオドフェニル)-2-アミノプロパン [1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane, DOI], セロトニン2受容体拮抗薬ケタンセリン, セロトニン3受容体作動薬1-(*m*-クロロフェニル)-ビグアナイド [1-(*m*-chlorophenyl)-biguanide, *m*-CPBG]およびセロトニン4受容体拮抗薬SB 204070A[(1-butyl-4-piperidinylmethyl)-8-amino-7-chloro-1,4-benzodioxan-5-carboxylate hydrochloride]を使い, これらの薬物の反復投与が, ラット扁桃核キンドリングの行動および脳波上の発展過程に及ぼす影響を検討した.

対象および方法

Ⅰ. 動物および試薬

1. 動物

手術時の体重300～320 gのウィスター系雄性ラットを用いた. ラットは, ステンレスゲージに1匹ずつ入れ, 実験時以外は水と餌を自由に摂取できるようにした.

2. 試薬

8-OH-DPAT (Research Biochemicals Inc., Natick, USA), DOI (Research Biochemicals Inc.), ケタンセリン (Research Biochemicals Inc.), *m*-CPBG (Research Biochemicals Inc.) およびSB 204070A (SmithKline Beecham Pharmaceuticals, Harlow, UK) を使用した.

Ⅱ. 方法

1. 電極およびカニューラ挿入手術

深部電極には, ポリエステルで被覆した直径0.18mmのニクロム線 (ユニークメディカル, 大阪) を3本をより合わせて1本とし, 先端を斜めに切断したものを用いた. 3本のニクロム線の内の1本を刺激用電極, 1本を脳波記録用電極に使用した. 不関電極として, 直径1.4mm, 長さ3.7mmのステンレス鋼のネジを用いた.

ペントバルビタール (50mg/kg, ネンブタール®, ダイナボット, 大阪) の腹腔内投与による麻酔下で, 頭部をセミクロニックホルダー (成茂, 東京) に固定した. Paxinosら[20]のラット脳図譜に基づき, 前頂 (bregma) を指標に, 左側扁桃核 (後方2.8mm, 側方5.0mm, 下方8.5mm) に深部電極を刺入した. 不関電極は頭蓋上に2個固定した. 各電極を10極ソケット (第一電子工業, 東京) にステンレス鋼線で接続した後, 瞬間接着剤 (アロンアルファ®, 東亜合成化学, 東京) と歯科用セメント (三木科学工業, 京都) でソケットを頭蓋上に固定した.

脳室内への薬物投与実験では, 扁桃核に深部電極を刺入した後, 薬物投与用のインジェクションカニューラ (エイコム, 京都) を介して薬物が右側の脳室内 (後方 0.9mm, 側方1.4mm, 下方3.6mm) に注入できるようにガイドカニューラ (外径0.5mm, 内径0.4mm) を挿入した.

2. 後発射閾値の決定

手術後1週間以上の回復期間をおいた後に, 後発射

Table 2. Seizure parameters of kindling development in rats receiving daily treatment with saline, DOI or DOI+ketanserin

Drug	n	First response		First stage 5 seizure		
		ADT (μA)	ADD (s)	Number of stimulations	ADD (s)	Latency for bilateral clonus (s)
Saline	6	59.2±7.7	3.7±0.5	14.3±1.4	47.8±9.4	5.7±9.4
DOI	6	54.9±4.2	3.4±0.5	7.3±1.1*	40.1±2.5	1.5±0.8*
DOI+ketanserin	6	61.0±10.9	3.6±2.2	14.8±1.9	45.5±9.5	6.8±2.6

Values are $\bar{x}$±SEM. ADD, after discharge duration; ADT, afterdischarge threshold.
*$p<0.05$ compared with control and DOI+ketanserin groups (Scheffe's test).

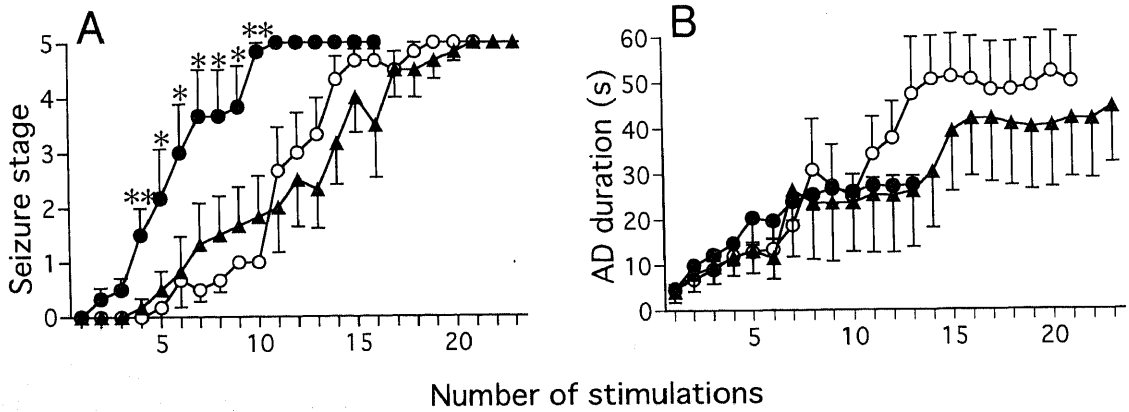


Fig. 2 Development of seizure response during amygdaloid kindling with daily administration of DOI. (A) Behavioral seizure stage, (B) AD duration. After determining the AD threshold on day 1, 1ml/kg saline (○), 1mg/kg DOI (●) or 1mg/kg DOI plus 1mg/kg ketanserin (▲) was injected subcutaneously prior to each kindling stimulation from day 2. Values are $\bar{x}$ ± SEM (n = 6 per group). *$p<0.05$, **$p<0.01$ compared with saline-treated group (Kruskal-Wallis with post-hoc Scheffe's test).

(afterdischarge, AD) 閾値を決定した．定電流刺激装置 S-9357 (日本光電，東京) を用いて60 Hz，2秒間の2相性正弦波の電気刺激を与えた．刺激強度10 μAで扁桃核刺激を開始し，ADが出現するまで10 μAずつ刺激強度を上げた．初めてADが出現した時の刺激強度をAD閾値とした．薬物投与下の刺激実験には，AD閾値より20 μA高い刺激強度を用いた．

3．行動上の発作段階の判定

行動上の発作段階は，Racine[21]に基づき，第0段階 (無反応)，第1段階 (顔面のちく搦)，第2段階 (点頭)，第3段階 (一側前肢のクローヌス)，第4段階 (両側前肢のクローヌス)，第5段階 (転倒を伴う全身けいれん) の6段階に区分した．第5段階の全身けいれんが連続して3回惹起された時点でキンドリングが完成したと規定した．

4．薬物投与

1）実験1 8-OH-DPATの効果

AD閾値の決定後，表1に示すように，AD閾値および初回のAD持続時間に差がないようにラット14匹を2群に分け，それぞれ，対照群，8-OH-DPAT投与群とした．8-OH-DPATは生理食塩水 (大塚製薬，東京) に溶解した．8-OH-DPATの投与量は，ラットの自発運動の亢進を生じる用量[22]の1mg/kgとした．刺激2日目より8-OH-DPAT 1mg/kg，または対照薬として生理食塩水1ml/kgを1日1回反復して皮下投与し，各注射の15分後に扁桃核に電気刺激を加えた．

2）実験2 DOIおよびケタンセリン前処置の効果

AD閾値を決定した後，対照群6匹，DOI投与群6匹およびケタンセリンを前処置したDOI投与群6匹の3群に分けた．この際，実験1と同様，3群間でAD閾値,初回のAD持続時間に差がないようにした (表2)．投与量は，ラットのセロトニン症候群などに関する行動薬理学的研究[23][24]を参考にDOI，ケタンセリンともに1mg/kgとした．刺激2日目より生理食塩水に溶解したDOI 1mg/kgあるいは生理食塩水 1ml/kgを1日1回反復して皮下投与し，15分後に扁桃核を刺激した．ケタンセリン前処置群では，ケタンセリン1mg/kg投与の30分後にDOI 1mg/kgを皮下投与し，その15分後に刺激した．

3）実験3 ケタンセリンの効果

ケタンセリン単独投与の効果を明らかにするために，ラットをAD閾値および初回のAD持続時間に差がないように対照群6例，およびケタンセリン投与群6例の2群に分け (表3)，刺激2日目より生理食塩水に溶解したケタンセリン1mg/kg，あるいは生理食塩水1ml/kgを1日1回反復して皮下投与し，30分後に電気刺激した．

4）実験4 *m*-CPBGの効果

AD閾値および初回のAD持続時間に差がないように，ラットを対照群7匹と*m*-CPBG投与群7匹の2群に分けた (表4)．*m*-CPBGの投与量は，ラット扁桃核キンドリング発作の持続時間に有意な効果を示した40 μg[25]とした．*m*-CPBGは，0.15M，pH7.2のリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline) (Sigma, St Louis, USA) に溶解した．刺激2日目より*m*-CPBG 40 μg，または対照薬としてリン酸緩衝生理食塩水を1日1回脳室内に投与した．ステンレススチール製のインジェクションカニューラをポリエチレンチューブを用いて50 μlのマイクロシリンジ (Hamilton Co., Nevada, USA) に接続し，マイクロインジェクションポンプ (Carnegie Medicin, Stockholm, Sweden) で薬物を注入した．*m*-CPBG溶液は脳室内に2分間かけて5 μl注

Table 3. Seizure parameters of kindling development in rats receiving daily treatment with saline or 1 mg/kg ketanserin

Drug	n	First response		First stage 5 seizure		
		ADT (μA)	ADD (s)	Number of stimulations	ADD (s)	Latency for bilateral clonus (s)
Saline	6	43.3±5.6	5.6±0.51	17.4±1.4	47.0±7.3	3.7±1.1
Ketanserin	6	46.7±7.1	3.6±0.51	12.8±2.5	46.8±2.5	3.3±0.9

Values are $\bar{x}$±SEM. ADD, after discharge duration; ADT, afterdischarge threshold.

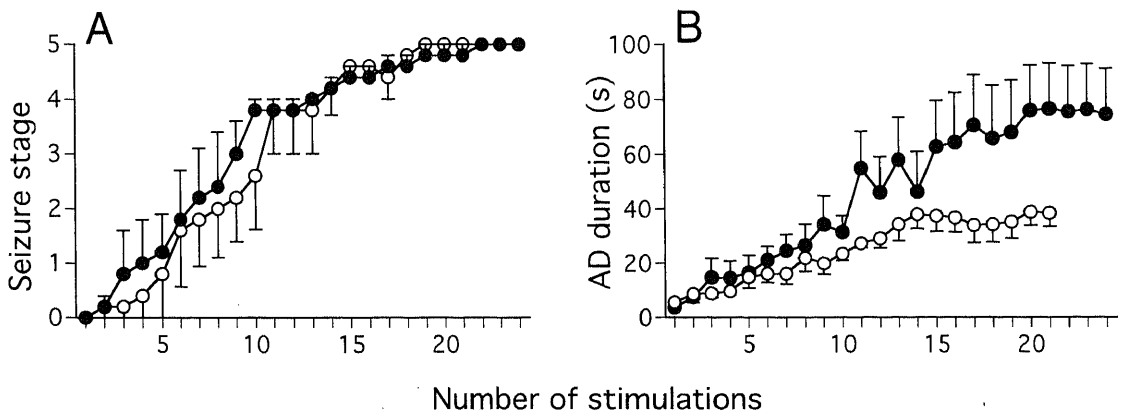


Fig. 3　Development of seizure response during amygdaloid kindling with daily administration of ketanserin. (A) Behavioral seizure stage, (B) AD duration. After determining the AD threshold on day 1, 1ml/kg saline (○) or 1mg/kg ketanserin (●) was injected subcutaneously 30 min prior to each kindling stimulation from day 2. Values are $\bar{x}$ ± SEM (n = 6 per group).

入し，対照薬として等量の溶媒のみ5μlを注入した．注入終了後，薬物を拡散させるために1分間インジェクションカニューラを留置し，15分後に電気刺激を加えた．

5）実験5 SB 204070Aの効果

AD閾値およびAD持続時間に差がないようにラットを対照群7匹とSB 204070A投与群7匹の2群に分けた (表5)．SB 204070Aの投与量は，ラットでの抗不安作用[26]を参考に1mg/kgとした．刺激2日目より生理食塩水に溶解したSB 204070A 1mg/kg，あるいは生理食塩水1ml/kgを1日1回反復して皮下投与し，10分後に電気刺激した．

5．薬効判定

キンドリング完成までの行動上の発作段階とAD持続時間を測定し，各薬物の効果を判定した．さらに初回の第5段階の全身けいれんが誘発されるまでに要した刺激回数および初回全身けいれんのAD持続時間と前肢クローヌス発現までの潜時も評価した．なお，実験時にはラットをアクリル製の透明な行動観察箱 (30×30×35cm) に入れ，行動観察と脳波記録を行った．

6．電極刺入部位の確認

実験を終了したラットは，ペントバルビタールの深麻酔下で電極に直流電流を通電した後，開胸し左心室から生理食塩水および10%ホルマリン溶液を注入して脳を灌流固定した．実験4で使用したラットでは，墨汁を混入した生理食塩水をインジェクションカニューラを介して脳室内に注入した．その後脳を取り出し，10%ホルマリン溶液で固定後，セロイジン包埋し，15μmの連続切片標本を作製し，Klüver-Barrera染色を行い電極刺入位置を組織学的に確認した．

7．統計解析

実験1，3，4，5では，Mann-Whitney U検定を用いて2群間を比較した．実験2では，Kruskal-Wallis検定で3群間を比較し，有意差が認められた場合にはScheffeの多重比較を行った．各実験ともに危険率5%未満を有意差ありとした．成績の数値は平均値±標準誤差で表示した．

成　　績

Ⅰ．実験1 8-OH-DPATの効果

扁桃核キンドリングの発作発展パターンに対する8-OH-DPATの効果を図1に示す．8-OH-DPAT投与群は，対照群と比較して行動上の発作発展が遅延し，9日目から11日目にかけて有意に発作段階が減少した (9～10日目，$p<0.05$；11日目，$p<0.01$)．AD持続時間においても8-OH-DPAT投与群は遅延する傾向があり，5日目で有意に短縮した ($p<0.05$)．表1に示すように，第5段階の全身けいれんが初めて誘発されるまでの平均刺激回数は，対照群が13.3回，8-OH-DPAT投与群が14.9回で，両群間に有意差はなかった．また，初回全身けいれんのAD持続時間，および前肢クローヌス発現までの潜時にも両群間に有意差はなかった．

Ⅱ．実験2 DOIおよびケタンセリン前処置の効果

DOI単独投与およびケタンセリンで前処置した場合の発作発展パターンの変化を図2に示す．DOI単独投与群では，対照群と比較して4日目から10日目において行動上の発作段階が有意

Table 4. Seizure parameters of kindling development in rats receiving daily treatment with saline or *m*-CPBG

Drug	n	First response		First stage 5 seizure		
		ADT (μA)	ADD (s)	Number of stimulations	ADD (s)	Latency for bilateral clonus (s)
Saline	7	77.1±16.0	14.1±6.1	11.7±0.6	35.0±3.0	6.0±1.3
m-CPBG	7	80.0±8.7	13.7±5.9	8.6±0.6 **	71.1±16.6 *	4.1±1.2

Values are $\bar{x}$±SEM. ADD, after discharge duration; ADT, afterdischarge threshold.
*$p<0.05$, **$p<0.01$, compared with control group (Mann-Whitney U-test).

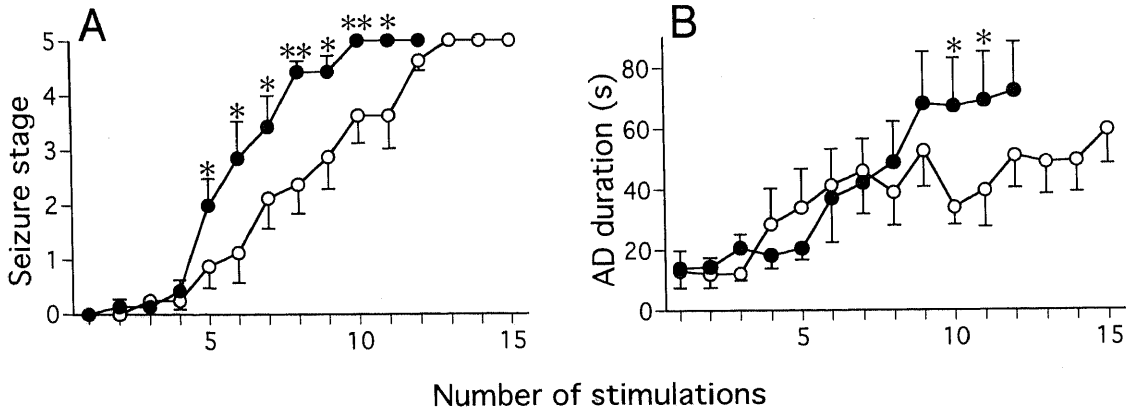


Fig. 4 Development of seizure response during amygdaloid kindling with daily intracerebroventricular treatment with *m*-CPBG. (A) Behavioral seizure stage, (B) AD duration. After determining the AD threshold on day 1, vehicle (○) or 40μg *m*-CPBG (●) was injected 15 min prior to each kindling stimulation from day 2. Values are $\bar{x}$ ± SEM (n = 7 per group). * $p< 0.05$, ** $p<0.01$ compared with vehicle-treated group (Mann-Whitney U-test).

Table 5. Seizure parameters of kindling development in rats receiving daily treatment with saline or SB 204070A

Drug	n	First response		First stage 5 seizure			
		ADT (μA)	ADD (s)	Number of stimulations	ADD (s)	Latency for bilateral clonus (s)	Duration of bilateral clonus (s)
Saline	7	68.6±8.5	7.1±2.2	10.7±0.9	39.3±9.6	4.3±0.8	28.1±5.6
SB 204070A	7	61.4±7.9	7.6±2.1	11.0±0.5	44.4±7.7	4.1±1.4	22.0±2.1*

Values are $\bar{x}$±SEM. ADD, after discharge duration; ADT, afterdischarge threshold.
*$p<0.05$ compared with control group (Mann-Whitney *U*-test).

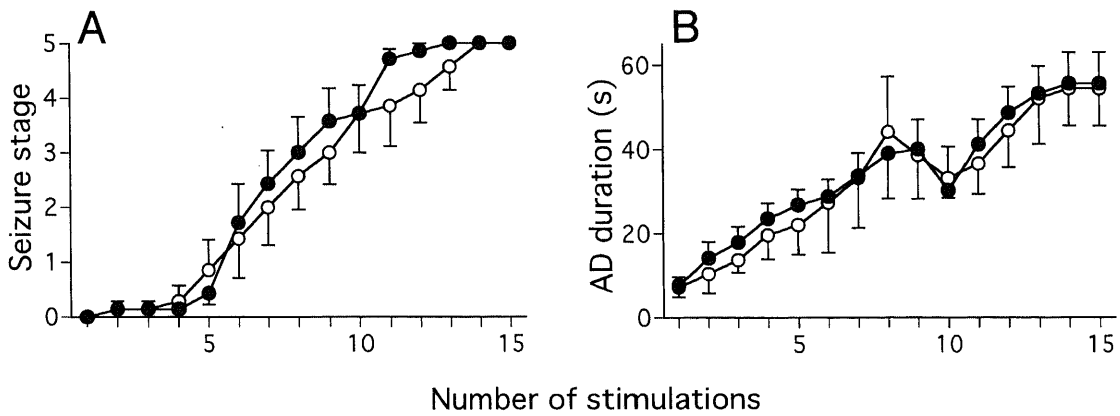


Fig. 5　Development of seizure response during amygdaloid kindling with daily treatment with SB 204070A. (A) Behavioral seizure stage, (B) AD duration. After determining the AD threshold on day 1, 1ml/kg saline (○) or 1mg/kg SB 204070A (●) was injected subcutaneously 10 min prior to each kindling stimulation from day 2. Values are $\bar{x}$ ± SEM (n = 7 per group). *p< 0.05, **p<0.01 compared with saline-treated group (Mann-Whitney *U*-test).

に増加した (5～9日目, $p<0.05$; 4, 10日目, $p<0.01$). これに対して, ケタンセリン前処置群では対照群と類似した行動上の発作発展を示し, 対照群との間に有意差はなかった. AD持続時間には3群間に有意差はなかった.

表2に示すように, 初回の全身けいれんが誘発されるまでに要した平均刺激回数はDOI投与群で7.3回で, 対照群の14.3回に比べて有意に少なく ($p<0.05$), 扁桃核キンドリング形成の促進が示唆された. 一方, ケタンセリン前処置群の平均刺激回数は14.8回で対照群と有意差はなく, ケタンセリンの前処置によりDOIの促進効果は拮抗された. 初回の全身けいれんにおける前肢クローヌス発現までの潜時も, 対照群の5.7秒に対してDOI投与群では1.5秒と有意に短縮した ($p<0.05$). 一方, ケタンセリン前処置群では6.8秒と対照群と有意差はなく, 潜時に対するDOIの促進効果もケタンセリン前処置により拮抗された.

Ⅲ. 実験3 ケタンセリンの効果

ケタンセリン単独投与の効果を図3に示す. 行動上の発展段階は, 対照群と有意差はなかった. AD持続時間は, ケタンセリン投与群が発作の後半で延長する傾向を示したが, 有意な差はなかった. 初回の全身けいれん誘発までに要した平均刺激回数も, 対照群の13.1回に対し, ケタンセリン単独投与群は16.8回で, 両群間に有意差はなかった.

Ⅳ. 実験4 *m*-CPBGの効果

m-CPBGの効果を図4に示す. *m*-CPBG投与により行動上の発展段階は, 5日目から11日目まで対照群より有意に増加した ($p<0.05$). AD持続時間も, *m*-CPBG投与群で延長する傾向を示し, 10～11日目で有意差がみられた ($p<0.05$). さらに, 表4に示すように, 初回の全身けいれん誘発までに要した平均刺激回数も, 対照群の11.7回に対して*m*-CPBG投与群で8.6回と有意に減少し ($p<0.01$), *m*-CPBG投与によりキンドリング形成が促進されることが示された. 初回の全身けいれん誘発時のAD持続時間も, 対照群の平均35.0秒に対してm-CPBG投与群では平均71.1秒と有意に延長した ($p<0.05$).

Ⅴ. 実験5 SB 204070Aの効果

SB 204070Aの効果を図5に示す. 発作段階とAD持続時間にSB 204070A投与群と生食投与群の間に有意差はなかった. また, 表5に示すように, 初回の全身けいれん誘発までに要した平均刺激回数, および初回全身けいれん時のAD持続時間と潜時にも有意差はなかった. 一方, 初回全身けいれん時の全身けいれん持続時間は, 生食投与群の28.1秒に対してSB 204070A投与群では22.0秒と有意に短縮した ($p<0.05$).

考　察

キンドリングモデルは, 部分発作から全身けいれんに至る発展過程を行動と脳波の両面から段階的にとらえることが可能なことから, てんかん発作の二次性全般化の神経機構を研究するうえで好適なモデルとされている. キンドリング形成後の発作発現とキンドリングの発展, すなわちてんかん原性獲得過程とでは異なる神経機構が想定されており[19], 薬物の作用を評価する際には, 両者を明確に区別して論じることが重要である.

キンドリングとセロトニン系についてはこれまで多くの研究がなされている. キンドリング形成後の発作発現に関する研究では, 縫線核の電気刺激により投射部位でのセロトニン放出を増加させると, ラット扁桃核キンドリング発作が抑制され[27], ネコ扁桃核発作の閾値が上昇すること[28]が示されている. 長谷

川[29]は，海馬キンドリングを形成したネコにおいて全身投与されたセロトニン前駆物質L-5-ヒドロキシトリプトファン (L-5-hydroxytryptophan, 5-HTP) が海馬発作の発作段階およびAD持続時間を用量依存的に抑制することを報告している．これに対して，ラット扁桃核発作に対しては5-HTPは影響を与えない[30]，あるいは前肢クローヌス持続時間がむしろ延長することが示され[31]，またセロトニン拮抗薬 (ミアンセリン) では前肢クローヌス持続時間が短縮すること[31]が報告されている．

次に，キンドリングの発展過程に関するセロトニンの影響については，縫線核の破壊により扁桃核キンドリング形成が促進され，新皮質キンドリングの発作症状が増悪することが報告されているが[32]，他方縫線核破壊が扁桃核や海馬キンドリングの発展に影響しないともいわれる[33]．セロトニン合成阻害剤の投与により脳内セロトニン濃度を低下させると扁桃核や新皮質キンドリング形成が促進されるとの報告[34]がある一方，扁桃核や海馬キンドリングに対しては抑制的[35]あるいは不変[36]とも報告されている．さらに，5-HTPを各回刺激前に投与することで扁桃核キンドリング形成の遅延が示されている[33]一方，不変との報告[35]もある．

以上のように，キンドリング形成後の発作発現およびキンドリング発展過程に対するセロトニン系の影響については矛盾する結果が報告され，一定の見解に達していないが，脳内セロトニン濃度を低下させる薬理学的操作がキンドリング発展過程に促進的に作用するとの報告が多い．これらの実験結果の不一致の要因として，薬物の投与量・投与方法などの薬理学的操作，キンドリング部位，実験動物の違いに加え，セロトニン受容体亜型別の検討がされていないことが考えられる．そこで，本研究では，ラット扁桃核キンドリングの発展過程におけるセロトニン受容体の役割を明らかにする目的で，セロトニン1A，2，3および4受容体の作動薬あるいは拮抗薬を用いて検討した．

実験1では，セロトニン1A受容体作動薬8-OH-DPATが電気刺激前に投与された結果，行動および脳波上の発作発展を有意に抑制したことから，セロトニン1A受容体がラット扁桃核キンドリングの発展過程に対して抑制的に作用する可能性が示唆された．セロトニン1A受容体の活性化によりニューロンの過分極が惹起されることが示されており[37][38]，今回の結果はセロトニン1A受容体のもつ神経生理学的特性と一致する．さらに，8-OH-DPATがキンドリング完成後の発作誘発閾値を上昇させ[39][40]，セロトニン1A受容体の活性化が海馬スライスのCA1神経細胞のてんかん様放電を抑制すること[41]も報告されており，今回の結果は発作活動に対する抑制系としてのセロトニン1A受容体の重要性をさらに支持する知見と考えられる．

選択的リガンドを用いた研究より，セロトニン1A受容体はラットの海馬，扁桃核，および中脳縫線核に高密度に存在し[42]，このうち縫線核ではセロトニン神経細胞体に存在する自己受容体として機能すること[43]が知られている．微量透析法による研究[44]では，今回と同じ投与量である8-OH-DPAT 1mg/kgの反復投与により縫線核の自己受容体が脱感作され，その結果，投与7日目以降に神経終末より放出されるセロトニン量が増加することが示されている．今回，8-OH-DPATの抑制効果がキンドリング発展の後半部に観察されたことから，8-OH-DPATの反復投与に伴う自己受容体の脱感作が本剤の抑制効果に関与した可能性が推測される．

次に，セロトニン2受容体のキンドリング発作発展に与える影響をDOIとケタンセリンを用いて検討した．実験2で示したように，セロトニン2受容体作動薬のDOI投与により行動上の発作段階が促進され，初回の全身けいれん誘発までに要する刺激回数も減少した．このDOIの促進効果はセロトニン2受容体拮抗薬であるケタンセリンの前処置により完全に拮抗された．以上より，セロトニン2受容体はキンドリングの発展に対して促進的に関与することが示唆された．

ラットの側座核スライスでセロトニン投与による後シナプス性興奮がセロトニン1や3受容体拮抗薬では影響を受けず，セロトニン2受容体拮抗薬により阻害される[45]．また，モルモットの延髄スライスを用いた実験でDOIが前庭神経細胞膜の脱分極を引き起こし，その効果はケタンセリンで拮抗される[46]．したがって，セロトニンにより惹起される興奮作用には，主にセロトニン2受容体が関与していると考えられるが，キンドリングに対する促進効果を認めた今回の結果もセロトニン2受容体の興奮作用を示唆した従来の神経生理学的研究と矛盾しない．さらに，初回の全身けいれん誘発時に前肢クローヌス発現までの潜時がDOI投与で短縮し，この効果がケタンセリンで拮抗されたことから，セロトニン2受容体が扁桃核キンドリング形成後の発作の二次性全般化に関与することが示唆された．これらの結果は，ネコの海馬キンドリング形成後の二次性全般化にセロトニン2受容体が促進的に作用することを示唆した中村の報告[18]と一致する．セロトニン2受容体は，ラットの大脳皮質，尾状核および前障に高密度に存在するが[47]，これらの脳部位はキンドリング発作の全般化に重要である[48][49]．したがって，今回のDOIの二次性全般化に対する促進効果にこれらの脳部位におけるセロトニン2受容体を介した興奮作用が関与していたと考えられる．

本実験で用いたDOIはセロトニン2A受容体作動薬として作用する一方で，セロトニン2C受容体の部分作動薬としても作用する[50]ことから，いずれの受容体亜型が今回の結果により密接に関与したかを考慮する必要がある．ケタンセリンはセロトニン2A受容体に強い親和性を有する一方，セロトニン2C受容体への親和性はセロトニン2A受容体の1/30～1/50と極めて弱い[51]．さらに，最近のセロトニン2C受容体変異体マウスを用いた研究で，セロトニン2C受容体がてんかん発作に対して，むしろ抑制的に働くことが示唆されている[52]．したがって，今回の結果は主にセロトニン2A受容体を介した作用に基づくと推測されるが，この点を明らかにするためにはセロトニン2受容体の各亜型に選択的に作用する薬物を用いたキンドリング研究が必要である．

DOI反復投与により，セロトニン2受容体のダウンレギュレーションが生じ[53]，セロトニン2受容体刺激時にみられる首振り行動 (head shake) が減弱すること[54]が指摘されているが，Darmaniら[55][56]は，マウスにDOIを連日投与した結果，投与2日目から首振り運動は単回投与に比べ有意に減少したが，投与6日目以降は有意な変化がなかったことから，セロトニン2受容体のダウンレギュレーションは連続投与により消失することを示唆している．今回のDOIの発作発展に対する促進効果は，連日投与後も減弱することなく，キンドリング完成まで持続しており，DOI連続投与によるダウンレギュレーションの影響は少ないものと推測される．

実験4では，セロトニン3受容体作動薬*m*-CPBGを脳室内に投与した結果，発作段階とAD持続時間が促進され，キンドリ

ング完成までの刺激回数も減少した．すなわち，セロトニン3受容体がキンドリング発展過程に対して興奮性に作用することが示唆された．セロトニン3受容体の細胞内伝達系は他のセロトニン受容体とは異なり，イオンチャネル内蔵型受容体であり，セロトニン3受容体の活性化が細胞膜の脱分極を惹起し，受容体と共役する陽イオンチャンネルの開口により後シナプス性の興奮を引き起こすと考えられている[11]．また，スライス切片を用いた研究は，セロトニン3受容体の活性化を介してニューロンの興奮が惹起されることを示しており[57]，今回の結果はセロトニン3受容体の持つ神経生理学的特性と一致する．

てんかんとセロトニン3受容体の関連を検討した報告は少ないが，セロトニン3拮抗薬ICS 205-930がエタノール離脱後の聴原発作を抑制し[58]，同じくセロトニン3拮抗薬のザコプリドがDBA/2マウスの聴原発作の潜時を延長させる[59]ことから，聴原てんかんモデルにおけるセロトニン3拮抗薬の抑制効果は今回の結果と矛盾しない．さらに筆者らは，ラット扁桃核キンドリング完成後の発作のAD持続時間と全身けいれん持続時間が*m*-CPBG投与後に延長することを認めており[25]，セロトニン3受容体はキンドリングなどの実験てんかんモデルにおいては興奮性に働くものと推定される．一方，セロトニン3受容体拮抗薬MDL-72222がエタノール離脱後のマウスのけいれん発作をむしろ増悪させることが報告されており[60]，セロトニン3受容体の作用がてんかんモデルによって異なる可能性がある．また，セロトニン3受容体に亜型が存在する可能性が指摘されており[61]，今後の検討が必要である．

実験5では，セロトニン4受容体拮抗薬SB 204070Aはキンドリング発展過程に有意な影響を与えなかった．SB 204070Aは，セロトニン4受容体に強い親和性と選択性を有し，末梢投与によっても脳内移行がきわめて良好な薬物であるが[62]，今回の結果から，セロトニン4受容体はキンドリング発展過程には本質的な役割をもたない可能性が示唆された．一方，初回の全身けいれん誘発時のけいれん持続時間が短縮したことより，SB 204070Aがキンドリング形成後の発作を抑制する可能性が推測されるが，微量透析法を用いた研究で，セロトニン4受容体の刺激がラット線条体のドーパミン放出[63]と前頭葉のアセチルコリン放出[64]を増加させることが示されており，今後はセロトニン以外の神経伝達物質に与えるSB 204070Aの影響を明らかにする必要がある．セロトニン4受容体が，排便行動，痛覚，空間学習や記憶に関連することを示唆する報告は多いが，てんかんとの関連についてはCagnottoら[65]の研究があるにすぎない．彼らは，ラットの海馬歯状回キンドリングに伴うセロトニン受容体の変化をオートラジオグラフィーで測定した結果，セロトニン1A受容体は増加するが，セロトニン4受容体には変化が生じないことを報告しており，今回の結果を支持する所見である．

以上，本研究の結果から，セロトニンがキンドリング発作の発展過程，すなわちてんかん原性獲得過程に密接に関わっていること，そしてその働きは受容体亜型により異なることが示唆された．てんかん，特に側頭葉てんかんの精神症状として，抑うつと不安がしばしば認められ[66]，てんかん治療における重要な精神医学的問題と考えられている．本邦では，抑うつ症状の治療薬として三環系または四環系抗うつ薬が使用されるが，これらの薬物はけいれん誘発作用を有すること[67]が知られている．一方，セロトニン1Aやセロトニン2受容体と抑うつ，不安との関連が示唆されており，セロトニン1A作動薬のブスピロンおよびタンドスピロンは，乱用や依存の少ない抗不安薬として臨床に使用されている．今回，セロトニン受容体とてんかんとの密接な関連が示されたことから，セロトニン1A作動薬を含めたセロトニン関連薬物の抑うつ症状や不安を伴うてんかん患者の治療における有用性が示唆される．

結　論

本研究では，ラット扁桃核キンドリングの発展過程におけるセロトニン1A，2，3および4受容体の役割を明らかにする目的で，各受容体の作動薬あるいは拮抗薬を用いて検討し，以下の結果を得た．

1．セロトニン1A受容体作動薬8-OH-DPAT 1mg/kgの皮下投与により，行動上の発作段階がキンドリング刺激の9～11日目にかけて，対照群と比較して有意に減少した．また，AD持続時間も5日目で有意に短縮した．

2．セロトニン2受容体作動薬DOI 1mg/kgの皮下投与により，発作段階は4～10日目に増加した．また，DOI投与群では，初回の全身けいれんが誘発されるまでに要した平均刺激回数は7.3回で，対照群の14.3回に比べて有意に少なかった．そして，セロトニン2受容体拮抗薬ケタンセリン1mg/kgの前処置により，DOIの促進効果は完全に拮抗された．

3．ケタンセリン1mg/kgの単独投与では，有意な効果はなかった．

4．セロトニン3受容体作動薬*m*-CPBG 40μgの脳室内投与により，発作段階は5～11日目まで増加し，AD持続時間も10～11日目で延長した．さらに，初回の全身けいれん誘発に要した刺激回数も有意に減少した．

5．セロトニン4受容体拮抗薬SB 204070A 1mg/kgの投与により，初回全身けいれん誘発時のけいれん持続時間が短縮したが，発展過程における発作段階とAD持続時間に変化はなかった．

今回の成績から，脳内セロトニン系がキンドリングの発展過程，すなわちてんかん原性獲得過程に密接に関与していることが示された．さらに，セロトニンの作用は受容体亜型によって異なり，セロトニン1A受容体は抑制的に，セロトニン2受容体およびセロトニン3受容体は促進的に作用することが示唆された．一方，セロトニン4受容体は本質的な役割を有しない可能性が示唆された．

謝　辞

稿を終えるに臨み，御指導と御校閲を賜りました恩師金沢大学医学部神経精神医学講座越野好文教授に深甚の謝意を表します．また御指導いただいた山口成良名誉教授，終始直接の御助言，御指導をいただきました和田有司助教授に心から感謝致します．さらに，本研究に御協力いただいた中村充彦博士，および平尾直久医学士，標本作製に御協力いただいた小林克治講師，および池田輝男文部技官に感謝致します．最後に本研究の遂行に御協力いただいた金沢大学医学部神経精神医学教室の各位に厚くお礼を申し上げます．

なお本論文の一部は，21st International Epilepsy Congress (Sydney, 1995)，および第19回日本生物学的精神医学会（大阪，1997）において発表した．

文　献

1）Villalon CM, Terron JA, Ramirez-san Juan E, Saxena PR. 5-hydroxytryptamine: considerations about discovery, receptor classification and relevance to medical research. Arch Med Res 26: 331-344, 1995

2）Green JP. Histamin and serotonin. *In* G Siegel, B

Agranoff, RW Albers, P Molinoff (eds), Basic Neurochemistry, 4th ed, p253-269, Raven Press, New York, 1989

3) 山脇成人, 早川 浩. セロトニンの中枢薬理. 薬物・精神・行動 12: 43-54, 1992

4) Glennon RA, Dukat M. Serotonin receptor subtypes. *In* FE Bloom, DJ Kupfer (eds), Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress, p415-429, Raven Press, New York, 1995

5) Martin GR, Humphrey PP. Receptor for 5-hydroxytryptamine: current perspectives on classification and nomenclature. Neuropharmacology 33: 261-273, 1994

6) Marcinkiewicz M, Verge D, Gozlan H, Pichat L, Hamon M. Autoradiographic evidence for the heterogeneity of 5-HT1 sites in the rat brain. Brain Res 291: 159-163, 1984

7) Feighner JP, Merideth CH, Hendrickson GA. A double-blind comparison of buspirone and diazepam in outpatients with generalized anxiety disorder. J Clin Psychiatry 43: 103-108, 1982

8) Hoyer D, Pazos A, Probst A, Palacios JM. Serotonin receptors in the human brain. II. Characterization and autoradiographic localization of 5-HT_{1C} and 5-HT_2 recognition sites. Brain Res 376: 97-107, 1986

9) Kapur S, Remington G. Serotonin-dopamine interaction and its relevance to schizophrenia. Am J Psychiatry 153: 466-476, 1996

10) Sharpley AL, Solomon RA, Fernando AI, da Roza Davis JM, Cowen PJ. Dose-related effects of selective 5-HT_2 receptor antagonists on slow wave sleep in humans. Psychopharmacology 101: 568-569,1990

11) Kilpatrick GJ, Bunce KT, Tyers MB. 5-HT_3 receptors. Med Res Rev 10: 441-475, 1990

12) Greenshaw AJ. Behavioural pharmacology of 5-HT_3 receptor antagonist: a critical update on therapeutic potential. Trends Pharmacol Sci 14: 265-270, 1993

13) Fontana DJ, Daniels SE, Wong EH, Clark RD, Eglen RM. The effects of novel, selective 5-hydroxytryptamine (5-HT)4 receptor ligands in rat spatial navigation. Neuropharmacology 36: 689-696, 1997

14) Goddard GV, McIntyre DC, Leech CK. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. Exp Neurol 25: 295-330, 1969

15) Wada JA, Sato M. Generalized convulsive seizures induced by daily electrical stimulation of amygdala in cat. Neurology 24: 565-574, 1974

16) Wada JA, Sato M, Corcoran ME. Persistent seizure susceptibility and recurrent spontaneous seizures in kindled cats. Epilepsia 15: 465-478, 1974

17) 森本 清, Goddard GV. キンドリング (Kindling): 最近の動向と展望. 神経精神薬理 9: 461-491, 1987

18) 中村充彦. てんかんの神経機構における脳内セロトニン系の関与. 十全会誌 102: 836-846, 1993

19) Sato M, Racine RJ, McIntyre DC. Kindling: basic mechanisms and clinical validity. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 76: 459-472, 1990

20) Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 2nd ed, Academic Press, San Diego, 1986

21) Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 32: 281-294, 1972

22) Tricklebank MD, Forler C, Fozard JR. The involvement of subtypes of the 5-HT_1 receptor and of catecholaminergic systems in the behavioural response to 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin in the rat. Eur J Pharmacol 106: 271-282, 1984

23) Pranzatelli MR. Evidence for involvement of 5-HT_2 and 5-HT_{1C} receptors in the behavioral effects of the 5-HT agonist 1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl aminopropane)-2 (DOI). Neurosci Lett 115: 74-80, 1990

24) Yap CY, Taylor DA. Involvement of 5-HT_2 receptors in the wet-dog shake behaviour induced by 5-hydroxytryptophan in the rat. Neuropharmacology 22: 801-804, 1983

25) Shiraishi J, Wada Y, Nakamura M, Kikuchi M, Koshino Y. Effects of the 5-HT_3 agonist 1-(*m*-chlorophenyl)-biguanide in the rat kindling model of epilepsy. Inaugural congress of Asian Oceanian epilepsy organization. Abstract, 42, 1997

26) Silvestre JS, Fernandez AG, Palacios JM. Effects of 5-HT_4 receptor antagonists on rat behaviour in the elevated plus-maze test. Eur J Pharmacol 309: 219-222, 1996

27) Kovacs D, Zoll JG. Seizure inhibition by median raphe nucleus stimulation in rat. Brain Res 70: 165-169, 1974

28) Siegel J, Murphy GJ. Serotonergic inhibition of amygdala-kindled seizures in cats. Brain Res 174: 337-340, 1979

29) 長谷川英裕. 光過敏性てんかんモデルおよびキンドリング発作におけるセロトニン前駆物質 5-ヒドロキシトリプトファンの抑制効果. 十全会誌 100: 803-815, 1991

30) Löscher W, Czuczwar SJ. Evaluation of the 5-hydroxytryptamine receptor agonist 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin in different rodent models of epilepsy. Neurosci Lett 60: 201-206, 1985

31) Ashton D, Leysen JE, Wauquier A. Neurotransmitters and receptor binding in amygdaloid kindled rats: serotonergic and noradrenergic modulatory effects. Life Sci 27: 1547-1556, 1980

32) Racine R, Coscina DV. Effects of midbrain raphe lesions or systemic p-chlorophenylalanine on the development of kindled seizures in rats. Brain Res Bull 4: 1-7, 1979

33) Araki H, Aihara H, Watanabe S, Ohta H, Yamamoto T, Ueki S. The role of noradrenergic and serotonergic systems in the hippocampal kindling effect. Jpn J Pharmacol 33: 57-64, 1983

34) Munkenbeck KE, Schwark WS. Serotonergic mechanisms in amygdaloid-kindled seizures in rat. Exp Neurol 76: 246-253, 1982

35) Stach R, Lazarova MB, Kacs D. Serotonergic mechanism in seizures kindled from the rabbit amygdala. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 316: 56-58, 1981

36) Araki H, Aihara H, Watanabe S, Yamamoto T, Ueki S. Effects of reserpine, α-methyl-p-tyrosine, p-chlorophenylalanine and 5, 7-dihydroxytryptamine on the hippocampal kindling effect in rats. Jpn J Pharmacol 33: 1177-1182, 1983

37) Andrade R, Nicoll RA. Pharmacologically distinct actions of serotonin on single pyramidal neurons of the rat hippocampus

recorded in vitro. J Physiol (Lond) 394: 99-124, 1987
38) Colino A, Halliwell JV. Differential modulation of three separate K-conductances in hippocampal CA1 neurons by serotonin. Nature 328: 73-77, 1987
39) Wada Y, Nakamura M, Hasegawa H, Yamaguchi N. Role of serotonin receptor subtype in seizures kindled from the feline hippocampus. Neurosci Lett 141: 21-24, 1992
40) Wada Y, Nakamura M, Hasegawa H, Yamaguchi N. Intra-hippocampal injection of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin (8-OH-DPAT) inhibits partial and generalized seizures induced by kindling stimulation in cats. Neurosci Lett 159: 179-182, 1993
41) Salgado D, Alkadhi KA. Inhibition of epileptiform activity by serotonin in rat CA1 neurons. Brain Res 669: 176-182, 1995
42) Middlemiss DN, Tricklebank MD. Centrally active 5-HT receptor agonists and antagonists. Neurosci Biobehav Rev 16: 75-82, 1992
43) Vergé D, Daval G, Marcinkiewicz M, Patey A, el Metikawy S, Gozlan H, Hamon M. Quantitative autoradiography of multiple 5-HT_1 receptor subtypes in the brain of control or 5,7-dihydroxytryptamine-treated rats. J Neurosci 6: 3474-3482, 1986
44) Kreiss DS, Lucki I. Chronic administration of 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT differentially desensitizes 5-HT_{1A} autoreceptors of the dorsal and median raphe nuclei. Synapse 25: 107-116, 1997
45) North RA, Uchimura N. 5-Hydroxytryptamine acts at 5-HT_2 receptors to decrease potassium conductance in rat nucleus accumbens neurones. J Physiol (Lond) 417: 1-12, 1989
46) Bobker DH. A slow excitatory postsynaptic potential mediated by 5-HT_2 receptors in nucleus prepositus hypoglossi. J Neurosci 14: 2428-2434, 1994
47) Pazos A, Cortes R, Palacios JM. Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. II. Serotonin-2 receptors. Brain Res 346: 231-249, 1985
48) Corcoran ME, Urstad H, McCaughran JA Jr, Wada JA. Frontal lobe kindling in the rat. Can J Neurol Sci 2: 501-508, 1975
49) Kudo T, Wada JA. Claustrum and amygdaloid kindling. *In* JA Wada (ed), Kindling 4, 1st ed, p397-408, Plenum Press, New York, 1990
50) Hoyer D, Waeber C, Schoeffter P, Palacios JM, Dravid A. 5-HT_{1C} receptor-mediated stimulation of inositol phosphate production in pig choroid plexus. A pharmacological characterization. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 339: 252-258, 1989
51) van Wijngaarden I, Tulp MT, Soudijn W. The concept of selectivity in 5-HT receptor research. Eur J Pharmacol 188: 301-312, 1990
52) Heisler LK, Chu HM, Tecott LH. Epilepsy and obesity in serotonin 5-HT_{2C} receptor mutant mice. Ann N Y Acad Sci 861: 74-78, 1998
53) McKenna DJ, Nazarali AJ, Himeno A, Saavedra JM. Chronic treatment with (±) DOI, a psychotomimetic 5-HT_2 agonist, downregulates 5-HT_2 receptors in rat brain. Neuropsychopharmacology 2: 81-87, 1989
54) Berendsen HH, Broekkamp CL. Attenuation of 5-HT1A and 5-HT_2 but not 5-HT_{1C} receptor mediated behavior in rats following chronic treatment with 5-HT receptor agonists, antagonists or anti-depressants. Psychopharmacology (Berl) 105: 219-224, 1991
55) Darmani NA, Martin BR, Glennon RA. Withdrawal from chronic treatment with (±)-DOI causes super-sensitivity to 5-HT_2 receptor-induced head-twitch behaviour in mice. Eur J Pharmacol 186: 115-118, 1990
56) Darmani NA, Martin BR, Glennon RA. Behavioral evidence for differential adaptation of the serotonergic system after acute and chronic treatment with (±)-1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane (DOI) or ketanserin. J Pharmacol Exp Ther 262: 692-698, 1992
57) Sugita S, Shen KZ, North RA. 5-hydroxytryptamine is a fast excitatory transmitter at 5-HT_3 receptors in rat amygdala. Neuron 8: 199-203, 1992
58) Kostowski W, Dyr W, Krzascik P. The abilities of 5-HT_3 receptor antagonist ICS 205-930 to inhibit alcohol preference and withdrawal seizures in rat. Alcohol 10: 369-373, 1993
59) Semenova TP, Ticku MK. Effects of 5-HT receptor antagonists on seizure susceptibility and locomotor activity in DBA/2 mice. Brain Res 588: 229-236, 1992
60) Grant KA, Hellevuo K, Tabakoff B. The 5-HT_3 antagonist MDL-72222 exacerbates ethanol withdrawal seizures in mice. Alcohol Clin Exp Res 14: 410-414, 1993
61) Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Harting PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphery PPA. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). Pharmacol Rev 46: 157-203, 1994
62) Wardle KA, Ellis ES, Baxter GS, Kennett GA, Gaster LM, Sanger GJ. The effects of SB 204070, a highly potent and selective 5-HT_4 receptor antagonist, on guinea-pig distal colon. Br J Pharmacol 112: 789-794, 1994
63) Steward LJ, Ge J, Stowe RL, Brown DC, Bruton RK, Stokes PR, Barnes NM. Ability of 5-HT_4 receptor ligands to modulate rat striatal dopamine release in vitro and in vivo. Br J Pharmacol 117: 55-62, 1996
64) Consolo S, Arnaboldi S, Giorgi S, Russi G, Ladinsky H. 5-HT_4 receptor stimulation facilitates acetylcholine release in rat frontal cortex. Neuroreport 5: 1230-1232, 1994
65) Cagnotto A, Crespi D, Mancini L, Manzoni C, Presti ML, Gariboldi M, Vezzani A, Mennini T. Lasting increase in serotonin 5-HT_{1A} but not 5-HT_4 receptor subtypes in the kindled rat dentate gyrus: dissociation from local presynaptic effects. J Neurochem 70: 850-857, 1998
66) Betts TA. Depression, anxiety and epilepsy. *In* EH Reynolds, et al (eds), Epilepsy and Psychiatry, 1st ed, p60-71, Churchill Livingstone, New York, 1981
67) Dessain EC, Schatzberg AF, Woods BT, Cole JO. Maprotiline treatment in depression: A perspective on seizures. Arch Gen Psychiatry 43:86-90, 1986

Role of Serotonin Receptors in the Acquisition of Epileptogenesis: Studies with an Amygdala Kindling Model of Epilepsy in Rats Jun Shiraishi, Department of Neuropsychiatry, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., **108,** 504 — 514 (1999)

Key words epilepsy, kindling, amygdala, serotonin, receptor subtype

Abstract

The present study was conducted to identify the role of serotonin (5-HT) receptor subtypes in the acquisition of epileptogenesis by means of an amygdala kindling model, a chronic experimental model of human temporal lobe epilepsy. The drugs used were the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin (8-OH-DPAT), the 5-HT_2 receptor agonist 1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane (DOI), the 5-HT_2 receptor antagonist ketanserin, the 5-HT_3 receptor agonist 1-(*m*-chlorophenyl)-biguanide (*m*-CPBG), and the 5-HT_4 receptor antagonist (1-butyl-4-piperidinylmethyl)-8-amino-7-chloro-1,4-benzodioxan-5-carboxylate hydrochloride (SB 204070A). We determined the afterdischarge (AD) threshold in rats implanted with depth electrodes in the amygdala. After the administration of one of the drugs, rats received daily electrical stimulation at a current 20μA above the initially determined AD threshold until generalized seizures were elicited on three consecutive days. Drug effects were evaluated on the basis of behavioral and electroencephalographic seizure development. The subcutaneous (s.c.) administration of 8-OH-DPAT (1mg/kg) suppressed behavioral seizure development, with a significant decrease from day 9 to day 11 when compared with that in the saline-administrated control. 8-OH-DPAT also tended to reduce AD duration, with a significant effect on day 5. In contrast, DOI (1mg/kg, s.c.) caused a significant increase in the behavioral seizure stage from days 4 to 10, and significantly reduced the number of stimulations needed to elicit the first generalized seizure as compared with the control. These facilitatory effects of DOI were completely blocked by pretreatment with ketanserin (1mg/kg, s.c.), and significant effects were no longer found in any seizure parameter. Ketanserin (1mg/kg, s.c.) alone produced no significant effect on seizure development. Intracerebroventricular treatment with *m*-CPBG (40μg) significantly facilitated the behavioral seizure stage from day 5 to day 11 and increased the AD duration on days 10 and 11. This compound also reduced the number of stimulations needed to elicit the first generalized seizure and significantly increased the AD duration of the first generalized seizure. SB 204070A (1mg/kg, s.c.) caused no significant change in the pattern of seizure development, although it did reduce the duration of bilateral forelimb clonus during the first generalized seizure. These results suggest that the activation of 5-HT_{1A} receptors can retard the development of amygdala kindling, whereas 5-HT_2 and 5-HT_3 receptors play a facilitatory role in kindling development. They also suggest that 5-HT_4 receptors are not critically involved in the developmental seizure process. The present study provides evidence that the 5-HT system participates in the mechanism underlying kindling development, and that the role of 5-HT in the acquisition of epileptogenesis differs depending on the 5-HT receptor subtype.