

Inhibitory Effect of MK-801 on Long-term Potentiationlike Phenomenon Induced by Perforant Path Kindling in the Dentate Gyrus of Rabbits

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/2297/8191

貫通路-歯状回の急性キンドリングに伴う長期増強様現象に 対する MK-801 の抑制効果に関する研究

金沢大学医学部神経精神医学講座 (主任：山口成良教授)

藤 元 君 夫

(平成2年3月12日受付)

雄の成熟ウサギの急性刺激実験でキンドリングに伴う長期増強 (long-term potentiation, LTP) 様現象に対する N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体拮抗薬 (+)-10,11-dihydro-5-methyl-5H-dibenzo [a; d] cycloheptene-5,10-imine maleate (MK-801) の効果を検討した。一側海馬の貫通路-歯状回の急性キンドリングによって歯状回で LTP 様現象を誘発した後、リングル液に溶解した10 μ M の MK-801 をあらかじめ挿入して置いたプローブからマイクロインジェクションポンプを用いて 0.05 μ l/min の速度で全量 5 μ l をその歯状回に直接注入した。MK-801 は LTP 様現象を次第に抑制し、最終的に LTP 様現象によって増大した集合スパイクの振幅の63 $\pm$ 19% (平均値 $\pm$ 標準偏差) を減少させた。1 μ M ではその抑制効果は比較的弱かった。またキンドリングをしないで LTP 様現象を起こさない通常の反応波に対しては MK-801 はほとんど効果がなかった。また MK-801 は一種のてんかん様放電とみられる群発性反応波 (burst response) に対してはほぼ完全な抑制効果を示した。これらの所見は NMDA 受容体の活性化がキンドリングにおける LTP 様現象や群発性反応波に密接に関与することを示唆している。

Key words epilepsy, kindling, MK-801, long-term potentiation, burst response

キンドリングとは Goddard ら¹⁾によれば電気刺激の反復によって生じる種々のてんかん性反応の進行性増強を意味し、通常慢性実験で1日1回の約24時間間隔の発作誘発刺激を用いて行われている。Jibiki ら²⁻⁵⁾、Kubota ら⁶⁾は急性実験で通常数時間の許容時間内に分単位の短い時間間隔の発作誘発刺激を用いて慢性実験におけるキンドリングと類似のてんかん様発作波の進行性増強が生じることを報告し、これを『急性キンドリング』と呼びキンドリングの微小電極解析に好適なモデルとして提唱した。急性キンドリングにおいても慢性実験におけるキンドリングと同様に一定強度の発作誘発電気刺激の繰り返しによって、刺激部位の脳局所の後発射 (after-discharge) の持続時間の延長、その伝播による他の部位での投射性の発作波から独自性

の発作波への変化、またこの変化に伴う発作波の二次性全般化や刺激間隔期における自発性の発作波がみられる。またそれらの進行性増強は一旦起こると不可逆的で、この点でも慢性実験のキンドリングと類似している。また Jibiki ら^{3b)}はこのようなキンドリング効果の本態を探る目的で、急性キンドリングを用いてその刺激間隔期における神経活動の変化を調べ、刺激部位やそのミラー部位で基礎生理学でいう長期増強 (long-term potentiation, LTP) と類似した興奮性シナプス伝達の増強が生じることを報告した。この LTP 様現象は慢性実験でもみられ、キンドリングにおける発作波の進行性増強そのものを惹起する一つの神経変化としてみなされる。また上述のごとくキンドリングがその発展過程において刺激部位以外の部位で単なる

Abbreviations: AP-5, 2-amino-5-phosphonovalerate; AP-7, 2-amino-7-phosphono-heptanoate; LTP, long-term potentiation; MK-801, (+)-10,11-dihydro-5-methyl-5H-dibenzo [a; d] cycloheptene-5,10-imine maleate; NMDA, N-methyl-D-aspartate

伝播性の発作波から独自性の発作波を生じるようになることや、刺激間隔期で自発的な発作波を生じるようになることから、そのようなてんかん原性の獲得に至るまでの準備状態としての神経変化としてもみなしうる。さらに広義に考えると、てんかん発作の反復に伴う一種の神経可塑性としてヒトのてんかんにおける発作間欠期における非発作性症状の解明の糸口とも考えられる興味深い現象と思われる。今回この LTP 様現象の基礎的メカニズムを探る目的で、興奮性シナプス伝達物質であるグルタミン酸の後シナプスにおける受容体の非競合性拮抗薬である (+)-10,11-dihydro-5-methyl-5H-dibenzo [a; d] cycloheptene-5, 10-imine maleate (MK-801) を用いて、この薬物の急性キンドリングに伴う LTP 様現象に対する効果を検討した結果について報告する。

材料および方法

I. 実験動物および脳刺激部位

体重 2.5~3.0kg の雄の成熟ウサギ36羽を用い、その一側海馬の貫通路-歯状回を実験部位として急性刺激実験を行った。動物をハロセン麻酔した後、気管切開して筋弛緩剤ツボクロリンクロライドによる非動化

を行い、人工呼吸下に置いた。気管チューブと CO₂ ガス分析装置を接続し、実験中の呼吸終末値は 30~35 mmHg の範囲にあるようにした。頭部をセミクロニックホルダー (成茂, 東京) で固定し、実験中イヤークロムは用いなかった⁹⁾。Ridge[®] の脳図譜に基づき、前頂 (bregma) から側方 6mm, 尾側 4mm の位置を中心に直径約 10mm の丸い穴を右側の頭蓋骨に開け、硬膜を切開して脳表面を露出した。脳表は乾燥を防ぐためにミネラルオイルで浸した。脳波記録のために両側の前頭部と後頭部の頭蓋骨にネジ電極を固定した。図 1 に示したように先端直径 1~2 μ m, 電気抵抗 1~5K Ω のタングステン記録電極と直径 0.6mm の双極性同芯刺激電極および直径 0.5mm の MK-801 (Merck Sharp & Dohme Research Lab, New Jersey, U. S. A) の注入用プローブの三つを一組として各々の先端をほぼ同じ高さに揃え、プローブと記録電極の先端間距離は 1mm に固定させて電極ホルダーに取り付け、油圧式マイクロマニピュレーターで上記の脳表の中心点より徐々に脳深部に刺入した。この刺入は皮質層分析すなわち 0.2msec の矩形波パルス, 500 μ A, 10~30秒間隔の一定強度の単発刺激によって生じる外界電位 (field potential) の反応波を VC-10 メモリーオシロスコープ (日本光電, 東京) とこれに接続した X-Y レコーダー (理科電機, 東京) で 50~100 μ m の深さ毎に観察記録しながら行い、図 2 に示すごとく特有の位相逆転 (phase reversal) のみられる部位を歯状回と同定した¹⁰⁾。その部位の脳表からの深さは 3100~3950 μ m (3659 $\pm$ 256 μ m, 平均値 $\pm$ 標準偏差) であった。次にもう一つの双極性同芯刺激電極を前頂から側方 1mm, 尾側 4mm の位置の脳表より刺入し、この電極でやはり一定強度の単発刺激を行って歯状回の記録電極から得られる反応波を観察しながら、図 4 A の最上段 (BEFORE KINDLING) に示した波形で最大振幅の反応波の得られる部位を貫通路と同定した。その脳表からの深さは 4100~5000 μ m (4684 $\pm$ 294 μ m, 平均値 $\pm$ 標準偏差) であった。なお MK-801 注入用のプローブは最初から CMA/100 マイクロインジェクションポンプ (Carnegie Medicin, Stockholm, Sweden) と接続させて用いた。

II. 貫通路刺激およびキンドリング誘発

16羽のウサギで以下の手順で実験を行った。初めに貫通路を単発刺激し歯状回における外界電位の反応波を記録した。刺激強度を変えて反応波を観察し、0.5 mV 以下の比較的小さい集合スパイク (population spike) が出現するような一定の刺激強度を設定した。この刺激のパラメーターは 0.2msec の矩形波パルス、

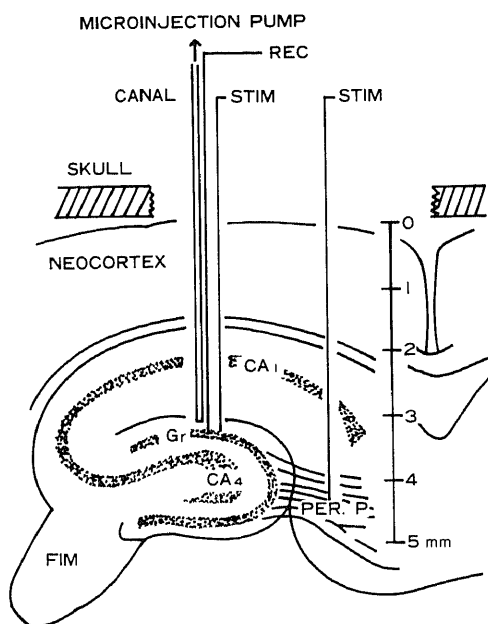


Fig. 1. Schema of stimulation of rabbit brain. CA₁, CA1 region; CA₄, CA4 region; FIM, fimbria; Gr, granule cell layer; PER. P., perforant path; REC, a tungsten recording electrode; STIM, stimulating electrode.

200~800 μ A, 30秒間隔 (0.03Hz) であった。なお反応波は DAT1100 加算平均装置 (averager) (日本光電) を用いて 4 個を加算平均して観察記録した。対照記録は 30 分間行い、一定強度の単発刺激による反応波

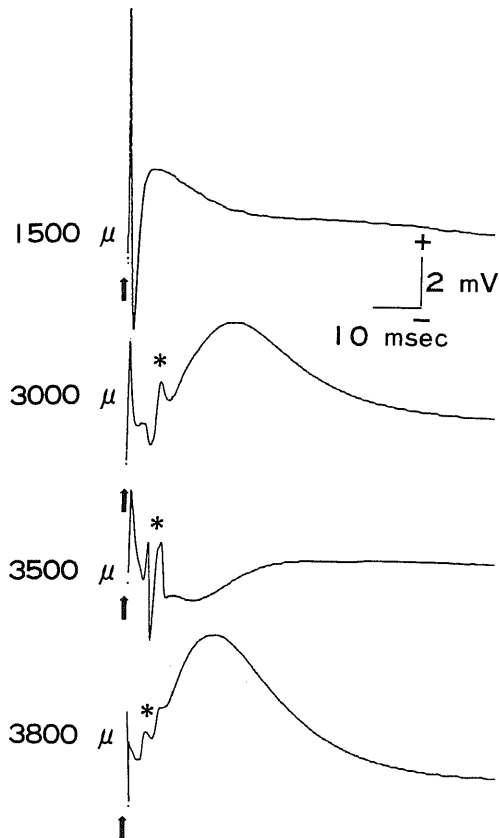


Fig. 2. Identification of the dentate gyrus in a laminar analysis. Responses in the dentate gyrus show a phase reversal simultaneously with the insertion of electrodes into its gyrus (3500 μ m depth). When electrodes are inserted downward still more, responses reveal the second phase reversal (3800 μ m). The width between the first and second reversal points corresponds to the dendrite layer of the dentate granule cells (usually 300 μ m width). In the present study, the recording electrode was always placed at the depth of 50 μ m above the second reversal point, since the depth is presumed to be situated at the basal portion of the dendrite¹⁰⁾. Arrow marks, single shocks at a constant intensity (monopolar square pulses of 0.2 msec duration, 500 μ A, 10 sec stimulus interval); *, population spike; numerals, depths from the cortical surface.

の観察を主としたが、他に刺激強度を 3~5 段階に変えてその反応波の変化を観察する、いわゆる入力-出力曲線 (input/output curve) を作成するための操作も行った。

次に貫通路の一定強度の発作発射誘発刺激 (テタヌス刺激) の反復によって歯状回の発作発射の進行性増強を観察する急性キンドリング操作を行った。この場合まず比較的弱いテタヌス刺激からはじめて電流値のみを変えることによって次第に刺激強度を上げ、10秒以内の短い発作発射を誘発する刺激強度を発作発射誘発閾値とみなし、この閾値強度より 100 μ A 高い値をそのキンドリングのためのテタヌス刺激の強度とした。この刺激のパラメーターは 1 msec の矩形波パルス、400~800 μ A, 60 Hz, 1 sec の刺激時間で、5 分間隔で刺激を繰り返した。この急性キンドリングは後述のごとく LTP 様現象を誘発するのが目的であるが、LTP 様現象は少ないテタヌス刺激の回数で十分に起こりうるため 3~5 回だけの刺激の反復を行った。この急性キンドリング後、再び貫通路を対照記録で行った様に一定強度と入力-出力曲線作成のための可変強度の両方で単発刺激して歯状回の反応波の変化を観察した。

III. LTP 様現象に対する MK-801 の効果

1. 10 μ M MK-801 (実験 I)

MK-801 は リンゲル液 (NaCl, 147 mM; KCl, 4 mM; CaCl₂, 3 mM; 大塚製薬, 東京) に溶解し、過去の脳切片による研究で用いられている濃度に準じて 10 μ M に固定した。注入速度はリンゲル液だけを注入した予備的研究で、早い速度では灌流そのものによって反応波が抑制される現象がみられたため、反応波にほとんど影響のない 0.05 μ l/min の非常に遅い速度に

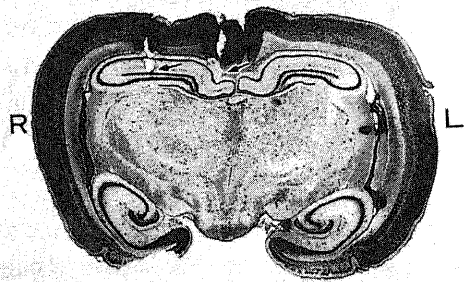
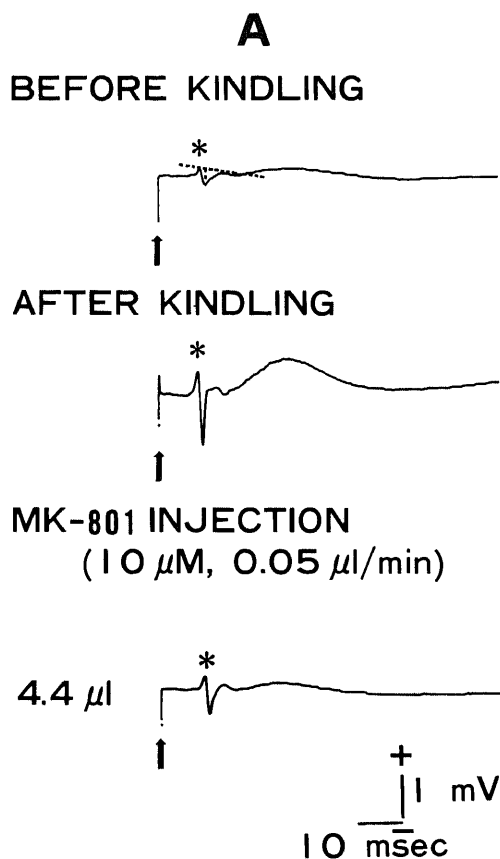


Fig. 3. Histological analysis of experimental sites. Arrow marks, the perforant path (medial) and the dentate gyrus (lateral). R, right; L, left. $\times 2.8$.



固定した。注入全量は5 μ lとし、その100分間の注入時間中は対照記録で用いたのと同じ強度で貫通路を単発刺激して齒状回の反応波の変化を観察記録した。注入終了後、再び対照記録で行った様に一定強度と可変強度の両方で単発刺激して齒状回の反応波の変化を1~2時間観察した。

2. 1 μ M MK-801 (実験II)

8羽のウサギで、MK-801 濃度の差による効果の違いを観察するため、1 μ Mの MK-801 溶液を用いて上記と同様の実験を行った。

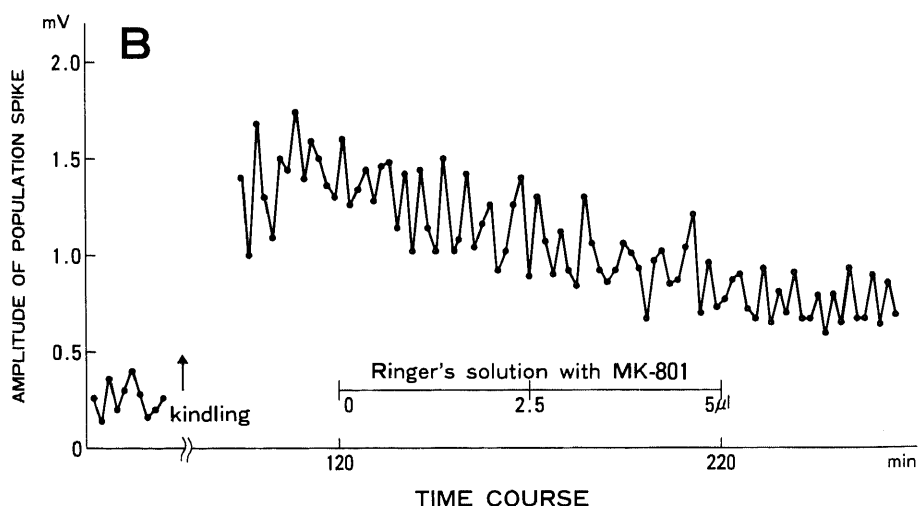
3. 対照実験 (リングル液のみの注入) (実験III)

5羽のウサギで対照実験としてリングル液そのものの LTP 様現象に対する注入効果を調べるため、上記の実験と同様の方法で、急性キンドリング後 MK-

Fig.4. Effect of MK-801 on kindling-induced LTP-like phenomena (Experiment I).

(A) Method of measurements. Dotted lines in an uppermost response (BEFORE KINDLING) show how to measure the population spike amplitude from tangent across onset and offset of spike to the peak of the spike. The second and the third traces show the responses after kindling, and after 4.4 μ l of 10 μ M MK-801 injection respectively. *, population spike.

(B) Serial changes of population spike amplitudes in the same experiment. The arrow indicates the stage of the kindling stimuli. After 120 minutes, Ringer's solution with 10 μ M MK-801 was injected at a fixed speed of 0.05 μ l/min.



801 を含まないリング液を注入する実験を行った。

4. 対照実験 (キンドリングを行わない場合の MK-801 の影響) (実験IV)

7羽のウサギで LTP 様現象を伴わない、通常の反応波に対する MK-801 の効果を調べる実験を行った。上記の実験と同様にまず貫通路の単発刺激による歯状回の反応波の対照記録を行い、その後キンドリングを行わず LTP 様現象を誘発しないで $10\mu\text{M}$ の MK-801 を注入し、その注入中、および注入後の反応波の変化を観察した。

IV. 反応波の解析

反応波の解析に関しては図 4 A (BEFORE KINDLING) に示すごとく 4 個の加算平均した波形についてその集合スパイクの振幅を測定した。またキンドリング直前の対照記録の時期、MK-801 注入直前のキンドリング後の時期、注入終了直後の 3 つの時期でそれぞれ加算平均した反応波形 5 個の集合スパイクを平均し、さらにそれらの値を対照記録の値を 100 としたパーセンテージに換算して表し、各時期における変化を測定した。

V. 脳組織標本の作成

実験終了後二つの刺激電極に直流通電を行ってその先端部位を電気凝固した後、脳をホルマリン固定した。その後、脳切片にし、ニッスル染色によって組織標本を作り、図 3 に示すごとく貫通路と歯状回に電極が刺入されていたことを確認した。タングステン記録針の位置はその刺激電極の 1 つと先端をそろえて刺入したことから推定できた。

成 績

I. 貫通路-歯状回のキンドリングによる発作発射の進行性増強

貫通路に対する最初のテタヌス刺激によって歯状回で 16~24 秒 (19.6 ± 3.5) の間持続する発作発射が誘発された。その後 5 分間隔でのテタヌス刺激の反復によって刺激毎に発作発射が歯状回で誘発され、しかも 3~5 回のその刺激の繰り返しによってその発作発射の持続時間の延長がみられた。ただしその延長に至る過程においては逆に短縮する場合も時々みられた。またその繰り返しによって発作発射が刺激側の後頭部を最初として大脳皮質にも伝播し、その伝播性の発作発射の個々の波が次第に増大してみられた。ただしこのような伝播性の発作発射の発達は総てのウサギで最終刺激においても不十分で、発作発射の全般化や独自性の発作発射の出現は明瞭ではなかった。かくして部分的なキンドリングの発達がみられた。

II. LTP 様現象に対する MK-801 の抑制効果 (実験 I)

1. 一定強度による反応波の変化

図 4 A に 1 例の実験データから貫通路の一定強度の単発刺激による歯状回における反応波のキンドリング前の対照記録、キンドリング後の変化、および $10\mu\text{M}$ の MK-801 注入中の変化を示した。反応波は対照記録では前述のごとく比較的小さい集合スパイクとこれに続く陽性緩電位から成り、これらの成分の大きさはキンドリング前の 15~30 分間の記録中ではほとんど変化しなかった。キンドリング後これら成分の著しい増大がみられ LTP 様現象が生じた。ただしその増大の程度は実験によりかなり変動がみられ、16 例全体では MK-801 注入直前の時期で集合スパイクの大きさは $180 \sim 375\%$ ($259 \pm 51\%$) を示した。その後 $10\mu\text{M}$ の MK-801 の注入により全例で通常 $1 \sim 2\mu\text{l}$ 、すなわち時間にして 20~40 分でこれら成分の抑制が始まり、集合スパイクも陽性緩電位も次第に小さくなった。この抑制の程度も実験によりかなり差がみられたが、16 例中 12 例で集合スパイクの大きさが LTP 様現象によって増大した部分の半分以上が抑制され、その中の 2 例ではほぼ対照記録に近い大きさにもどっているのがみられた。結局 16 例全体では集合スパイクの大きさは MK-801 注入終了直後の時期で $100 \sim 250\%$ ($162 \pm 44\%$) に減衰した。この抑制効果を LTP 様現象により増大した部分のパーセンテージで表すと全例で $32 \sim 100\%$ ($63 \pm 19\%$) の抑制がみられた。なおこのような抑制効果は MK-801 注入終了後 1~2 時間の観察期間中はほぼ維持された。この図 4 A の例では $4.4\mu\text{l}$ の注入時点で、LTP 様現象によって増大した集合スパイクの振幅はその増大部分の約 60% が抑制され、その後はこの高さをほぼ維持していた。図 4 B は図 4 A の例の反応波の変化の全容をグラフで経時的に示したものである。個々の刺激による反応波の集合スパイクの大きさはこのグラフでわかるように実際にはかなり変動した。特に LTP 様現象の出現後はこの変動が一層顕著となり、MK-801 注入終了後もかなり変動を示しつつ減衰した。また図 5 にこの実験 I の 16 例全体の上述のデータ値を棒グラフで示した。

2. 入力-出力曲線での変化

図 6 に別の 1 例の実験の入力-出力曲線による変化を示した。横軸に 4 段階の異なった刺激強度を、縦軸に集合スパイクの振幅を示している。キンドリング前の対照記録におけるグラフで示すように、刺激強度を上げると集合スパイクは段階的に増大した。キンドリング後では、個々の刺激強度によって集合スパイクが

対照記録と比べると著しく増大してみられ、このグラフからも LTP 様現象が明瞭に生じていることがわかる。MK-801 の注入終了後でグラフは対照記録のそれにほぼ戻っており、MK-801 による抑制効果がこの入力-出力曲線からも明瞭にわかった。

3. LTP 様現象に対する MK-801 の抑制効果の濃度依存性 (実験 II)

図 5 に $1 \mu\text{M}$ MK-801 の 8 例のデータ値をグラフで示した。LTP 様現象によって増大した MK-801 の注入開始直前の集合スパイクの振幅は $210 \sim 296\%$ ($241 \pm 29\%$)、その注入終了直後の時期でのそれは $176 \sim 250\%$ ($208 \pm 23\%$) であった。実験 I と同様に LTP 様現象により増大した部分のパーセンテージで表すと $8 \sim 61\%$ ($21.4 \pm 18\%$) が抑制され、この値を実験 I のそれ、すなわち $63 \pm 19\%$ と対比すると student の t 検定で有意差がみられた ($p < 0.01$)。このように $1 \mu\text{M}$ の MK-801 の注入は上述の $10 \mu\text{M}$ でのそれと比べると LTP 様現象を比較的軽度抑制した。

4. 対照実験 (実験 III)

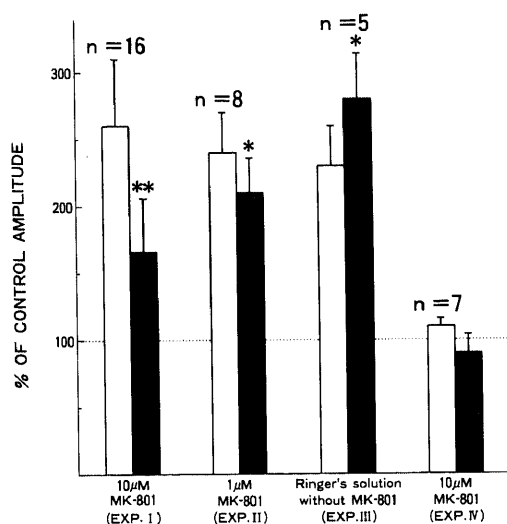


Fig. 5. Changes of population spike amplitudes. In each of Experiment I-IV, the mean value of 20 responses elicited just before and after drug injection was expressed as % of those in control recordings just before kindling. Marks * and ** express the presence of significant difference in Student's t-test on comparison of responses just before and after the injection, showing $0.01 < p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively. □, before injection; ■, after termination of injection.

リングル液のみを注入した場合は MK-801 を含むリングル液の注入後にみられたような抑制効果はみられず LTP 様現象によって増大した集合スパイクはむしろかえって増大した (図 5)。リングル液注入直前の集合スパイクの振幅は $173 \sim 300\%$ ($231 \pm 32\%$)、リングル液注入終了直後それは $216 \sim 340\%$ ($280 \pm 34\%$) であった。

5. 通常の反応波に対する MK-801 の効果 (実験 IV)

LTP 様現象を伴わない通常の反応波に対する MK-801 の影響を 7 例について示した (図 5)。キンドリングを行わず LTP 様現象を誘発しないで単発刺激だけ行った場合は、 $10 \mu\text{M}$ の MK-801 の注入はほとんど効果を示さなかった。

III. 群発性反応波に対する MK-801 の抑制効果

キンドリングを行った 29 例の実験中 7 例に、また $10 \mu\text{M}$ の MK-801 の注入を行った 16 例中 4 例でキンドリング後、LTP 様現象にひき続いて著しく増大した陽性緩電位の上昇相に重畳して高振幅の集合スパイクの群発、群発性反応波 (burst response) がみられた。この群発性反応波はキンドリング前の通常の反応波ではみられない。この群発性反応波の潜時は $20 \sim 22 \text{ msec}$ で、通常の集合スパイク (潜時 $8 \sim 10 \text{ msec}$) の誘発後 $10 \sim 12 \text{ msec}$ の時間間隔を置いて発現した。図 7

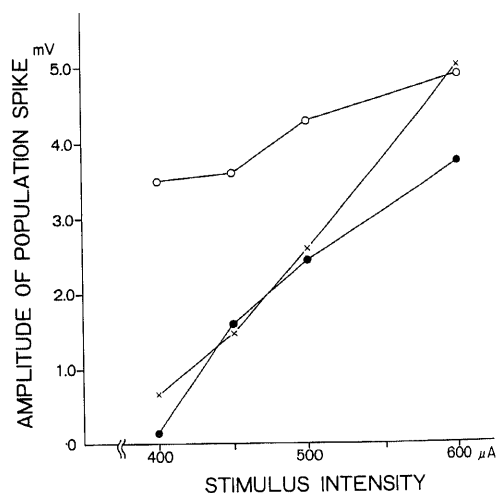


Fig. 6. Effect of MK-801 on kindling-induced LTP-like phenomena demonstrated by input/output curves. The axis of abscissas shows the stimulus intensity of a single shock. ●—●, before kindling; ○—○, after kindling; ×—×, after termination of MK-801 injection.

に1例の実験におけるこの特異な成分に対する $10\mu\text{M}$ のMK-801の抑制効果を示した。この特異な成分は4例の実験すべてでMK-801の注入によって次第に抑制され、 $5\mu\text{l}$ の注入終了の時点ではほぼ消失した。

考 察

今回の実験ではMK-801が脳血流関門を通過でき、全身投与が可能な物質であるにもかかわらずその投与方法については脳内に直接注入する方法を用いた。これはMK-801の作用部位を明確にするためである。本研究と同様に貫通路を単発刺激して歯状回で反応波を記録し、その反応波に対するMK-801の全身投与(腹腔内注射)による効果をみた過去の研究では、MK-801が実験部位の歯状回とは別の脳幹に作用して集合スパイクを二次的に抑制することが報告されている¹³⁾。貫通路-歯状回における主要な神経伝達物質はグルタミン酸であり¹²⁾、歯状回顆粒細胞層はN-methyl-D-aspartate (NMDA)受容体の高い分布を示す部位の一つであると報告されている¹³⁾。またラットの脳切片を用いたMK-801の薬理効果に関する基礎的研究においては、MK-801は中枢神経系のグルタミン酸受容体の三つのサブタイプの中でNMDA受容体介在性の脱分極性電位を選択的に抑制し、キスカル酸やカイニン酸受容体介在性の成分には効果がないことが知られている¹⁴⁻¹⁶⁾。その抑制効果は 75nM の濃度以上で生じ、 $100\mu\text{M}$ 以上では非特異的な結合が生じるとされている¹⁴⁾。通常 $1\sim 30\mu\text{M}$ が用いられているので本研究ではこれらの基礎的研究に準拠して比較的に低い $1\mu\text{M}$ と $10\mu\text{M}$ の濃度を用いた。さらにMK-801は他のNMDA受容体拮抗薬すなわち2-amino-5-phosphonovaleate (AP-5)や2-amino-7-phosphono-heptanoate (AP-7)等の様にグルタミン酸と競合してNMDA受容体を遮断する薬物と異なり、その作用部位はNMDA受容体そのものよりもその受容体の活性化と連動して開口するカルシウムイオンチャンネルと考えられている¹⁴⁻¹⁶⁾。

今回の研究における主な所見は急性キンドリングによって生じたLTP様現象がMK-801の注入によって抑制された事実である。この抑制効果がMK-801そのものの効果であることは、対照実験でリング液のみの注入ではそのような抑制効果が全くみられなかったことから明らかである。またこのMK-801による抑制効果は濃度依存性に効果が異なる。またLTP様現象を誘発しない通常の反応波に対してはMK-801はほとんど抑制効果を持たないことから、このMK-801による抑制効果はLTP様現象そのものに対する効果と

みなし得る。なおこのような通常の反応波に対して効果のないことは生体外でのMK-801やAP-5を用いた研究と一致している¹⁷⁻¹⁹⁾。かくして今回の研究の主要所見すなわちMK-801のLTP様現象に対する抑制効果は、キンドリングにおけるLTP様現象の発現にはNMDA受容体介在性の興奮性シナプス伝達が関与す

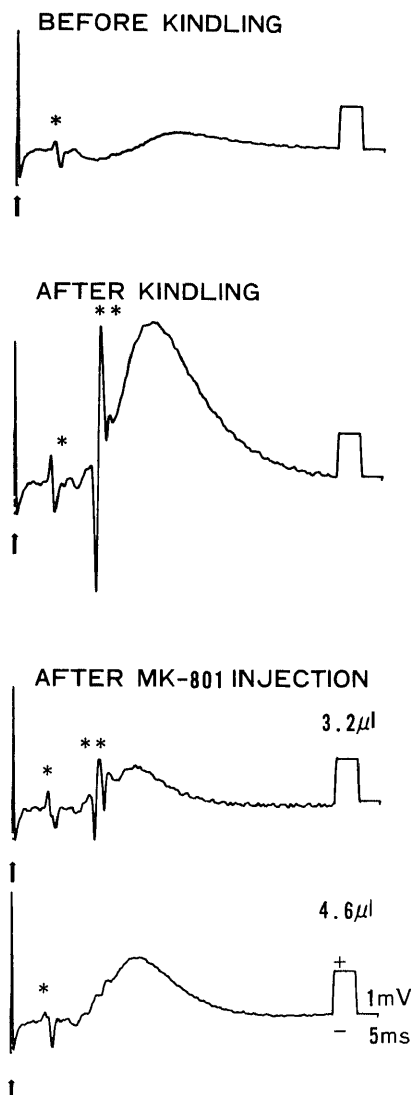


Fig. 7. Effect of MK-801 on kindling-induced burst responses. The four traces show the responses before kindling, after kindling, and after $3.2\mu\text{l}$ and $4.6\mu\text{l}$ of $10\mu\text{M}$ MK-801 injection respectively. *, usual population spike; **, burst response (negativity downward).

ることを示唆する。成績で述べたごとく MK-801 は過半数の実験で LTP 様現象により増大した集合スパイクを半分以下に抑制した。それゆえ LTP 様現象におけるこの活性化された NMDA 受容体の関与は相当大きいものと思われる。

基礎的分野においては、発作波を誘発しない比較的弱い強度のテタヌス刺激によって誘発された LTP と、AP-5 や AP-7 または MK-801 等の NMDA 受容体拮抗薬との関係を調べた研究が最近多くみられる¹⁴¹²⁰。これらの研究では NMDA 受容体拮抗薬の投与は LTP の発現に先立ち前処置の形で行われ、その前処置によって LTP の発現が抑制されるという報告がほとんどである。このような前処置による効果は LTP 発現の初めの段階で NMDA 受容体が関与することを示唆し、その後の LTP の維持には非 NMDA 受容体が関与しており、NMDA 受容体-イオンチャンネルは Mg^{2+} イオンによって遮断されていると考えられている²¹。本研究は薬物の投与が LTP 様現象の発現後に行われた点が大きな特徴である。本研究と類似したものとして、最近 Mody ら²²はラットの慢性実験で海馬と扁桃核のキンドリングの確立後脳切片を作成し、その歯状回顆粒細胞の細胞内記録からキンドリングされたニューロンでは興奮性シナプス伝達の増強がみられ、それがその増強後に投与された AP-5 によって抑制されることから、キンドリングにおけるシナプス伝達の増強に NMDA 受容体の活性化が関与していることを報告している。この Mody らの研究や本研究のようにシナプス伝達の増強や LTP 様現象の発現後の NMDA 受容体拮抗薬の投与によってそれらの現象が抑制されることは、NMDA 受容体の活性化がそれらの現象の発現の初めの段階よりもむしろその維持に関与していることを示し、このような報告は現在のところまだきわめて少ない。おそらくキンドリングにおける LTP 様現象の発現にはその始まりのみならずその維持にも NMDA 受容体の活性化が密接に関与するものと思われる。その発現機序を推測すると、キンドリングの際、発作誘発刺激により歯状回顆粒細胞は強い脱分極状態となる。この脱分極状態は電気刺激による後発射中の細胞内記録による過去の研究から知られているように後発射中も持続する²³。この脱分極状態によって後シナプス膜における NMDA 受容体の活性化が起こり、それと連動してカルシウムイオンチャンネルの Mg^{2+} イオンによる遮断阻害は減少し、 Ca^{2+} イオンの流入が起こるためと考えられる。この Ca^{2+} イオンの流入が一旦生じると後シナプス膜はキンドリング前とは異なる性質をもつと考えられる。過

去の研究ではキンドリング後の NMDA 受容体の数そのものは増加しないとされているが²⁴、NMDA 受容体やそれと連動するイオンチャンネルの感受性が変化し、それらの活性化が起こり易い状態になるのかもしれない。なおこのようなキンドリング後のシナプスの変化に関連する事柄として、形態学的研究によれば貫通路-歯状回のキンドリング後、歯状回における樹状突起に発芽や軸索の成長等のシナプスの再構築がみられることが報告されている²⁵。

本研究において得られたもう一つの所見は急性キンドリングによってスパイクの群発と思われる通常ではみられない大きな集合スパイクの出現と、これに対する MK-801 の比較的強い抑制効果がみられたことである。この異常な成分は慢性実験²⁶や脳切片²⁷²⁸における研究で、キンドリング後、自発的に生じるかまたは単発刺激によって誘発される群発性反応波と類似している。これらの研究では群発性反応波はペニシリンの局所投与によるてんかんモデルなどでみられるいわゆる発作性脱分極性変位 (paroxysmal depolarizing shift) すなわち大きな脱分極とそれに重畳したスパイクの群発と類似することから、一種のてんかん様反応波とみなされている²⁹。Racine ら²⁹や Kairiss ら²⁹は慢性実験におけるラットのキンドリングやそのキンドリング後に作成した海馬切片の研究で、貫通路-歯状回では LTP 様現象のごとき通常の興奮性シナプス伝達の増強は生じるが、群発性反応波は自発的にもまた単発刺激によっても誘発されないことを報告した。しかし Walther ら³⁰は海馬切片を用いて歯状回で低濃度の Mg^{2+} 溶媒下においててんかん様群発 (epileptiform burst) が誘発されることを報告した。また Yamamoto ら³¹は歯状回の一部だけからなる脳切片で溶媒から Cl^{-} を除去して抑制性シナプスを遮断することで単発刺激により潜時の長い (40msec) てんかん様群発が誘発されると報告している。この Yamamoto らの知見は歯状回がそれ自身のみで群発性反応波を誘発する能力を持つことを示唆し、これらの脳切片の研究にかんがみると本研究のように歯状回で群発性反応波が誘発されることは十分あり得ると思われる。最近 Jibiki らはウサギで 5 分間隔の発作誘発刺激によるキンドリングの発達を急性実験と慢性実験の間で比較し、急性の実験条件は慢性のそれよりも低い発作誘発刺激閾値や高いキンドリング感受性を示すことをみている⁹。この知見にかんがみると本研究における群発性反応波の発現には急性の実験条件が関与しているかもしれない。

この群発性反応波に対する MK-801 による抑制効

果は、それがリング液のみの注入では抑制されないことからみて MK-801 そのものによると考えられる。低濃度の $1\mu\text{M}$ の MK-801 ではその抑制は比較的弱いことから、その抑制効果は LTP 様現象に対する効果と同様濃度依存性である。また MK-801 はこの群発性反応波が重畳する通常ではみられない大きな陽性緩電位をも抑制した。このような抑制効果はそれらの特異な波の発現にやはり NMDA 受容体の活性化およびそれと連動するイオンチャンネルの活性化に伴う Ca^{2+} の細胞内流入が関与することを示唆する。おそらく歯状回の群発性反応波の発現には NMDA 受容体介在性のシナプス伝達に関与し、このために顆粒細胞に著しく強い脱分極電位が生じるためと思われる。群発性反応波が重畳する大きな陽性緩電位はこの脱分極電位を反映するのではなからうか。またこの陽性緩電位の大きさからみて、そのシナプス伝達は顆粒細胞の樹状突起層の通常よりもはるかに広汎な部位で生じるのかもしれない。群発性反応波はこの脱分極電位がある閾値レベルを越えて誘発されると考えられる。Racine ら²⁰はこの群発性反応波そのものは神経膜の内因性メカニズムによって生じると考えている。 $10\mu\text{M}$ の MK-801 によって通常の集合スパイクの LTP 様現象による増大が抑制はされても完全に遮断されないのに対して、群発性反応波が完全に押えられるのは LTP 様現象が部分的に非 NMDA 受容体介在性の成分を含むのに対し、このてんかん様反応波の発現には上記のような NMDA 受容体の関与があつて初めて生じるような強い脱分極電位を必要とするためと思われる。MK-801 がこの脱分極電位を群発性反応波の発現閾値以下に抑制することで完全に遮断すると考えられる。MK-801 を含めて競合性、非競合性の NMDA 受容体の拮抗薬のキンドリング発達に対する抑制効果、また電気刺激やいれん惹起性薬物によるてんかん様発作波に対する抑制効果に関する報告は最近多くみられる²⁰⁻²²。一方、Mody ら²³はキンドリング後の海馬スライスを用いた前述の研究で、 Mg^{2+} を含まない灌流液にスライスを置いた場合に生じる特異なスパイクの群発に対して AP-5 が著しい抑制効果を示すことを報告している。しかしこのようなキンドリングにおける群発性反応波に対する NMDA 受容体の拮抗薬の抑制効果に関する報告はまだきわめて少ない。今後の研究の進展が期待される。

結 論

急性刺激実験下で成熟ウサギ海馬の貫通路-歯状回の急性キンドリングによって LTP 様現象を誘発した

後、NMDA 受容体の非競合性拮抗薬である MK-801 を直接その歯状回に投与し、この薬物の急性キンドリングに伴う LTP 様現象に対する効果を検討し、次の結論を得た。

1. $10\mu\text{M}$ の MK-801 は16例全体で LTP 様現象によって増大した集合スパイクの振幅の $63\pm 19\%$ (平均値±標準偏差) を抑制した。また $1\mu\text{M}$ では $10\mu\text{M}$ と比べるとその抑制の程度は弱かった。リング液のみを注入した対照実験では抑制効果はみられず LTP 様現象によって増大した集合スパイクはむしろなお増大した。キンドリングを行わず LTP 様現象を誘発しないで単発刺激だけを行った対照実験では MK-801 はその通常の反応波に対してはほとんど効果を示さなかった。

2. キンドリングを行った29例の実験中7例に、特に $10\mu\text{M}$ の MK-801 の注入を行った16例中4例でキンドリング後、単発刺激によって増大した集合スパイクに続いて著しく増大した陽性緩電位の上昇相にキンドリング前の通常の反応波ではみられない高振幅の群発性反応波 (burst response) がみられた。またこれら4例のすべてで MK-801 注入の最終時期で LTP 様現象による通常の集合スパイクの増大は抑制されても完全ではないのに対し、この特異な成分は MK-801 によってほぼ完全に消失した。

これらの結果は LTP 様現象や群発性反応波の発現における NMDA 受容体の活性化の関与を示唆するものと思われる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に終始御援助、御指導および御校閲をいただいた恩師山口成良教授に心からの謝意を表します。そして直接御助言、御指導をいただいた金沢大学医学部神経精神医学教室の地引逸亀講師、協同研究者で御指導、御援助をいただいた窪田 孝博士および脇田茂樹学士に厚く御礼申し上げます。

なお、本論文の要旨は第23回日本てんかん学会(東京、1989)において発表した。

恩師山口成良教授の遺暦を記念して本論文を捧げます。

文 献

- 1) Goddard, G. V., McIntyre, D. C. & Leech, C. K.: A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp. Neurol.*, 25, 295-330 (1969).
- 2) Jibiki, I., Ohtani, T. & Kubota, T.: "Convulsoid responses" suggesting development of autonomous epileptogenicity. *Exp. Neurol.*, 80,

529-548 (1983).

3) Jibiki, I., Ohtani, T., Kubota, T. & Yamaguchi, N.: Development of kindling in acute experiments and serial changes of field excitatory and inhibitory postsynaptic potentials during the 'acute kindling'. *Brain Res.*, **209**, 210-215 (1981).

4) Jibiki, I., Kubota, T. & Yamaguchi, N.: Acute kindling: Interstimulation interval effects and spontaneous interictal or ictal epileptiform discharges. *Jpn. J. Psychiatr. Neurol.*, **42**, 315-321 (1988).

5) Jibiki, I., Kubota, T. & Yamaguchi, N.: Acute Kindling: Discrepancy between lengthening of after-discharge duration and increase of field EPSP evoked in kindled site during interstimulation interval. *Jpn. J. Psychiatr. Neurol.*, **42**, 323-330 (1988).

6) Jibiki, I., Kubota, T. & Yamaguchi, N.: Comparison of kindling in acutely and chronically prepared rabbits. in contribution.

7) Kubota, T., Jibiki, I., Hirose, S. & Yamaguchi, N.: Antiepileptic effects under steady state of phenytoin serum levels produced in acute experiments. *Epilepsia*, **28**, 169-178 (1987).

8) Jibiki, I., Avoli, M., Gloor, P., Giarretta, D. & McLachlan, R. S.: Thalamocortical and intrathalamic interactions during slow repetitive stimulation of n. centralis lateralis. *Exp. Brain Res.*, **61**, 245-257 (1986).

9) Ridge, J. W.: The stereotactic dissection of the excised rabbit brain. *J. Neurochem.*, **11**, 765-778 (1964).

10) 永田実男: 家兎海馬齒状回顆粒細胞の電気生理学的性質—とくにその海馬発作における役割について—. *精神経誌*, **68**, 480-501 (1966).

11) Abraham, W. C. & Mason, S. E.: Effects of the NMDA receptor/channel antagonists CPP and MK-801 on hippocampal field potentials and long-term potentiation in anesthetized rats. *Brain Res.*, **462**, 40-46 (1988).

12) White, W. F., Nadler, J. V., Hamberger, A., Cotman, C. W. & Cummins, J. T.: Glutamate as transmitter of hippocampal perforant path. *Nature*, **270**, 356-357 (1977).

13) Monaghan, D. T. & Cotman, C. W.: Distribution of N-methyl-D-aspartate-sensitive L-

[³H] glutamate-binding sites in rat brain. *J. Neurosci.*, **5**, 2909-2919 (1985).

14) Coan, E. J., Saywood, W. & Collingridge, G. L.: MK-801 blocks NMDA receptor mediated synaptic transmission and long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Neurosci. Lett.*, **80**, 111-114 (1987).

15) Foster, A. C. & Wong, E. H. F.: The novel anticonvulsant MK-801 binds to the activated state of the N-methyl-D-aspartate receptor in rat brain. *Br. J. Pharmacol.*, **91**, 403-409 (1987).

16) Wong, E. H. F., Kemp, J. A. & Priestley, T.: The anticonvulsant MK-801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 7104-7108 (1986).

17) Crunelli, V., Forda, S. & Kelly, J. S.: Blockade of amino acid-induced depolarizations and inhibition of excitatory post-synaptic potentials in rat dentate gyrus. *J. Physiol.*, **341**, 627-640 (1983).

18) Mody, I., Lambert, J. D. C. & Heinemann, U.: Low extracellular magnesium induces epileptiform activity and spreading depression in rat hippocampal slices. *J. Neurophysiol.*, **57**, 869-888 (1987).

19) Morris, R. G. M., Anderson, E., Lynch, G. S. & Baudry, M.: Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature*, **319**, 774-776 (1986).

20) 山本長三郎: 海馬のシナプス長期増強. *神経進歩*, **32**, 605-616 (1988).

21) Collingridge, G. L. & Bliss, T. V. P.: NMDA receptors—their role in long-term potentiation. *Trends Neurosci.*, **10**, 288-293 (1987).

22) Mody, I., Stanton, P. K. & Heinemann, V.: Activation of N-methyl-D-aspartate receptors parallels changes in cellular and synaptic properties of dentate gyrus granule cells after kindling. *J. Neurophysiol.*, **59**, 1033-1054 (1988).

23) 地引逸亀, 山口成良: てんかん—最近の進歩, てんかんのメカニズム. *Clin. Neurosci.*, **5**, 380-383 (1984).

24) Okazaki, M. M., McNamara, J. O. & Nadler J. V.: N-methyl-D-aspartate receptor autoradiography in rat brain after angular bundle

kindling. *Brain Res.*, **482**, 359-364 (1989).

25) Sutula, T., Xiano-Xian, H., Cavazos, J. & Scott, G.: Synaptic reorganization in the hippocampus induced by abnormal functional activity. *Science*, **239**, 1147-1150 (1988).

26) Racine, R. J., Kairiss, E. W. & Smith, G. K.: The evolution of the burst response versus enhancement. In J. A. Wada (ed.), *kindling 2*, 1st ed., p15-29, Raven Press, New York, 1981.

27) Slater, N. T., Stelzer, A. & Galvan, M.: Kindling-like stimulus patterns induce epileptiform discharges in the guinea pig in vitro hippocampus. *Neurosci. Lett.*, **60**, 25-31 (1985).

28) Stasheff, S. F., Bragdon, A. C. & Wilson, W. A.: Induction of epileptiform activity in hippocampal slices by trains of electrical stimuli.

Brain Res., **344**, 296-302 (1985).

29) Kairiss, E. W., Racine, R. J. & Smith, G. K.: The development of the interictal spike during kindling in the rat. *Brain Res.*, **322**, 101-110 (1984).

30) Walther, H., Lambert, J. D. C., Jones, R. S. G., Heinemann, U. & Hamon, B.: Epileptiform activity in combined slices of the hippocampus, subiculum and entorhinal cortex during perfusion of low magnesium medium. *Neurosci. Lett.*, **69**, 156-161 (1986).

31) Yamamoto, C. & Kawai, N.: Generation of the seizure discharge in the sections from the guinea pig brain in chloride-free medium in vitro. *Jpn. J. Physiol.*, **18**, 620-631 (1968).

Inhibitory Effect of MK-801 on Long-term Potentiation-like Phenomenon Induced by Perforant Path Kindling in the Dentate Gyrus of Rabbits Kimio Fujimoto, Department of Neuropsychiatry, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med. Soc.*, **99**, 409—419 (1990)

Key words epilepsy, kindling, MK-801, long-term potentiation, burst response

Abstract

The effect of MK-801, a non-competitive NMDA receptor antagonist, on kindling-induced long-term potentiation (LTP)-like phenomena, were investigated in the unilateral perforant path-dentate gyrus of male adult rabbits. After the LTP-like phenomena were induced in the dentate gyrus, with perforant path kindling, in acute experiments (acute kindling), 10 μ M MK-801 in Ringer's solution was applied directly to the dentate gyrus at a fixed perfusion speed of 0.05 μ l/min, through a probe. The intracortical application of 5 μ l of MK-801 suppressed the LTP-like phenomena progressively and finally produced a $63 \pm 19\%$ (mean $\pm$ S.D.) reduction of potentiated population spikes. The injection of 1 μ M MK-801 revealed a relatively mild suppressive effect on the LTP-like phenomena. Ringer's solution alone had no inhibitory effect. MK-801 had little effect on the responses revealing no LTP-like phenomena. In addition, the injection of 10 μ M MK-801 almost completely suppressed "the burst responses", i.e. a sort of epileptiform discharge which has been rarely elicited by a single shock after kindling. These findings suggest that the activation of NMDA receptors underlie the kindling-induced LTP-like phenomena and burst responses.