

Effects of paroxetine on amygdala-kindling model of epilepsy in rats: accelerative change by co-administration with pindolol

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/2297/17281

ラット扁桃核キンドリングモデルにおけるパロキセチンの効果 — 5-HT_{1A}自己受容体拮抗薬, ピンドロールの併用による促進作用について—

金沢大学大学院医学系研究科脳医学専攻脳情報病態学
(旧講座名: 神経精神医学)
(主任: 三邊義雄教授)

平 尾 直 久

選択的セロトニン(5-hydroxytryptamine, 5-HT)再取り込み阻害薬(selective serotonin reuptake inhibitor, SSRI)は、5-HT_{1A}受容体拮抗薬の併用により早期に効果が発現することが知られている。今回はSSRIのてんかんへの影響とその神経機序をより明らかにする目的で、5-HT_{1A}自己受容体拮抗薬のピンドロールを併用し、パロキセチンのラット扁桃核キンドリング発作およびキンドリング発展過程における効果を検討した。キンドリング形成後のラットにパロキセチン(5, 10, 20mg/kg)とピンドロール(10mg/kg)を単独または併用投与し、全身けいれん誘発閾値で電気刺激を行った。その結果、パロキセチン単独投与では発作抑制効果を認めなかったが、両薬剤の併用により両側前肢クローヌスと後発射の持続時間が有意に短縮した。さらに、この抑制効果は5-HT合成阻害薬パラクロロフェニルアラニンの前処置により消失した。キンドリングの発展では、パロキセチン(10mg/kg)とピンドロール(10mg/kg)を単独または併用投与し、安定した全身けいれんが誘発されるまで、後発射閾値より20 μ A高い強度で連日刺激を行い、行動と脳波上の変化を観察した。パロキセチン単独投与群では、11~12日目に行動上の発作段階が有意に遅延した。併用投与群では、発作進展は全体に遅れ、9日目に有意に遅延した。また、後発射持続時間は5, 13~15, 17日目に有意に短縮し、初回全身けいれんまでの刺激回数も有意に増加した。本研究から、パロキセチンとピンドロールの併用により、扁桃核キンドリング形成後の発作発現およびキンドリングの発展過程に対し抑制効果が得られ、この効果発現には5-HT_{1A}自己受容体を介した5-HTの遊離調節および神経伝達の増強が重要であることが示唆された。

Key words Epilepsy, 5-HT_{1A} receptors, Paroxetine, Pindolol, Serotonin

セロトニン(5-hydroxytryptamine, 5-HT)は必須アミノ酸であるトリプトファンから生合成される生理活性アミンで、元来は腸管や血管の平滑筋収縮物質として発見された。中枢神経系においては、ドーパミン神経系やノルアドレナリン神経系などとともに脳内モノアミン神経系のひとつとして知られており、その役割が最も注目される神経伝達物質のひとつである。中枢における5-HT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、辺縁系など脳の広範な部位に投射している¹⁾。また、その受容体も少なくとも7種類のファミリーに分類され、さらにアミノ酸配列により合計14のサブタイプから構成されていることが選択的リガンドによる薬理的・分子生物学的手法により明らかにされている²⁾。このように広範な投射領域と多数の受容体の存在から5-HTは多彩な作用を有し、痛覚、体温調節、性行動、睡眠あるいは摂食行動などの生理機能に関連することが知られ

ている。また、精神機能の調節にも重要な役割を担っており、不安障害やうつ病、統合失調症などの関係が示唆されている³⁾。

向精神薬において最も5-HT神経系に関係した薬物のひとつが選択的5-HT再取り込み阻害薬(selective serotonin reuptake inhibitor, SSRI)である。現在、知られている五種類のSSRIのうち、パロキセチンとフルボキサミン、セルトラリンの3剤が国内で承認、市販され、うつ病やパニック障害、強迫性障害などの治療に第一選択薬として広く使用されている。SSRIは神経終末部の5-HTトランスポーターによる5-HTの再取り込みを阻害することで、シナプス間隙に放出された5-HT濃度を上昇させ、その薬理作用を発揮する。従来の三環系・四環系抗うつ薬はけいれんを惹起するものが多いことが知られているが³⁾、SSRIについては副作用としてのけいれん惹起性が少ないとされ、てんかん患者の抑うつ症状の治療にも有用ではないかとの期待が持たれている⁴⁾。

平成19年10月30日受付, 平成19年12月10日受理

Abbreviations: AD, afterdischarge; ADD, afterdischarge duration; ADT, afterdischarge threshold; GST, generalized seizure triggering threshold; GTC, generalized tonic-clonic convulsion; 5-HT, 5-hydroxytryptamine; 5-HTP, L-5-hydroxytryptophan; p-CPA, para-Chlorophenylalanine; PET, positron emission tomography; SSRI, selective serotonin reuptake inhibitor

基礎的な研究からは脳内の5-HT神経系がてんかん発作の発現機序に密接に関与する可能性が示されており⁹⁾, 5-HTが海馬における神経細胞の自発放電および発作活動に対して抑制効果を有することなどが報告されている⁶⁾⁷⁾. SSRIに関して、動物モデルを用いた研究においてその抗てんかん効果を示唆する報告が複数みられている⁵⁾⁹⁾¹⁰⁾.

てんかんの動物モデルのひとつにキンドリングモデルがある。脳のある部分に1日1回反復して電気刺激を加えると、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、刺激回数の増加に伴い進行性かつ持続性に増強し、ついには全身けいれんが安定して惹起されるようになる。こうした反復電気刺激によるてんかん様反応の増強は1969年にGoddardら¹¹⁾によって記載され、キンドリング効果と呼ばれた。キンドリング形成後は電気刺激を休止しても、長期にわたるけいれん準備状態が生じ、二次性全般化発作が自発的に反復して起こることが知られている¹²⁾. このモデルでは、部分発作から二次性全般化に至る過程を脳波および行動変化の両面から段階的にとらえることが可能であり、キンドリング形成後も発作の全般化過程が各回の発作にて再現されるため全般化発作の神経機構を研究するうえで好適なモデルと考えられる。また、海馬や扁桃核を一次焦点としたキンドリング発作はヒトの側頭葉てんかんの類似点が多く、側頭葉てんかんの動物モデルとしても有用なモデルである¹³⁾.

キンドリングモデルに関連した5-HTの研究は1970年代から90年代に盛んに行われている。Wadaら¹⁴⁾は海馬キンドリング形成後のネコに5-HTの前駆物質であるL-5-ヒドロキシトリプトファン(L-5-hydroxytryptophan, 5-HTP)を投与し、外側膝状体および海馬発作に対して抑制的に働くことを報告している。しかし、5-HT神経系は多様な受容体を有することもあり、てんかん発作との関連については必ずしも一定の見解に達していない。Wadaら¹⁵⁾¹⁶⁾は5-HTの各受容体について、選択的作動薬あるいは拮抗薬を用いた詳細な検討を行い、ネコの海馬焦点発作¹⁵⁾およびキンドリング形成後の発作¹⁶⁾、またラット扁桃核キンドリングの発展過程¹⁷⁾において、5-HT_{1A}受容体は抑制的に、5-HT₂受容体は促進的に働く可能性を示唆している。SSRIに関しては、Siegelら¹⁰⁾がネコ扁桃核キンドリング発作に対してフルオキセチンの、Wadaら⁹⁾がネコ海馬キンドリング発作におけるフルオキセチンとパロキセチンの抑制効果をそれぞれ報告している。

標識リガンドを用いた受容体結合実験により、5-HT_{1A}受容体は海馬や扁桃核などの神経終末部以外にも、中脳縫線核の5-HT神経細胞体にも高密度に存在し、自己受容体としての役割を持つことが知られている⁹⁾. SSRIの臨床的な抗うつ作用の発現には、従来の三環系抗うつ薬と同様に数週間から1ヶ月程度の連続した投与を必要とし、その機序として、反復投与による前シナプス性の5-HT_{1A}自己受容体の脱感作および負のフィードバックの抑制が関与していると考えられている¹⁹⁾. 微量透析法を用いた研究では5-HT_{1A}自己受容体拮抗作用を有するピンドロールとSSRIを併用することにより、SSRIの単独投与時に比較して、神経終末部の細胞外5-HT濃度が上昇することが示されており²⁰⁾²²⁾、抗うつ作用の発現についても両剤の併用による促進効果が報告され²³⁾、この仮説を支持している。

SSRIは使用頻度も多く、けいれんに対する効果とその機序を明らかにすることは臨床上也意義が多い。5-HT神経系は数多くの受容体による多彩な作用を有するが、SSRIの効果発現という

観点からは、5-HT_{1A}自己受容体の働きを検討する必要がある。本研究では、SSRIの抗けいれん作用の発現について、抗うつ作用と同様に5-HT_{1A}自己受容体を介した5-HT神経伝達の増強が重要であるとの仮説をもとに、扁桃核キンドリング発作に対するパロキセチンとピンドロールの併用投与の効果について検討した。また、これまでにSSRIのキンドリング発展過程における効果を検討した研究はない。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、その基盤となるメカニズムは異なることが想定されており¹³⁾、薬物の効果についても両者を区別して論じることが重要である。今回はキンドリングの発展過程においてもパロキセチンの効果を検証し、ピンドロールの併用投与についての検討を併せて行った。

対象および方法

この研究は文部科学省の「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に基づき行った。また、金沢大学動物実験委員会の承認を得た(承認日平成19年5月22日、承認番号070746号、実験課題名:ラット扁桃核キンドリングモデルにおけるパロキセチンの効果—5-HT_{1A}自己受容体拮抗薬の併用による検討—)。

I. 動物および試薬

1. 動物

手術時の体重300~320gのウイ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

パロキセチン(Paroxetine hydrochloride hemihydrate)(Glaxo-SmithKline, Harlow, UK)、ピンドロール(Pindolol)(Sigma, St.Louis, USA)、パラクロロフェニルアラニン(parachlorophenylalanine methyl ester, p-CPA)(Sigma)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本より合わせて1本とし、先端を斜めに切断したものをを用いた。3本のニクロム線の内の1本を刺激電極、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、ネプター®、ダイナボット、大阪)の腹腔内投与による麻酔下で十分に鎮痛効果が得られたことを確認の後、苦痛のないよう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²⁴⁾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(三木化学工業、京都)でソケットを頭蓋上に固定した。

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、後発射閾値(afterdischarge threshold, ADT)を決定した。定電流刺激装置S-

9357(日本光電, 東京)を用いて60Hz, 2秒間の2相性正弦波の電気刺激を与えた。刺激強度10 μ Aで扁桃核刺激を開始し, 後発射(afterdischarge, AD)が出現するまで10 μ A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ADTとした。

3. 行動上の発作段階の判定

行動上の発作段階は, Racine²⁵⁾に基づき, 第0段階(無反応), 第1段階(顔面のちくでき), 第2段階(點頭), 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(転倒を伴う全身強直間代けいれん)の6段階に区分した。

4. キンドリングの完成および全身けいれん誘発閾値の決定

ADTで1日1回の反復電気刺激を加えていき, 第5段階の全身強直間代けいれん(generalized tonic-clonic convulsion, GTC)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。

キンドリング完成後, 連日10 μ Aずつ刺激強度を下げていき, GTCが惹起される最小の刺激強度を求め, 全身けいれん誘発閾値(generalized seizure triggering threshold, GST)を定めた。なおキンドリング完成後は, 電気刺激にGSTを用いることで安定してGTCが惹起されるが, それより低い刺激強度ではてんかん反応が惹起されないことが報告されており, 薬物投与後の刺激強度にはGSTを用いた。

III. 薬物投与

1. キンドリング発作に対する効果(実験1)

1)パロキセチンまたはピンドロールの単独投与実験

GSTを決定後, 最終のGTC誘発から1週間以上の間隔をおいた後に薬物の投与実験を行った。9匹のラットに対しパロキセチン(5, 10, 20mg/kg)またはピンドロール(10mg/kg)を腹腔内投与した。対照薬にはそれぞれ生理食塩水1ml/kgを腹腔内投与した。パロキセチンは生理食塩水(大塚製薬, 東京)に, ピンドロールは生理食塩水に最小量の酢酸(Sigma)を加え, それぞれ直前に溶解し投与した。薬物投与後の一般行動の変化を観察し, パロキセチンは投与60分後に, ピンドロールは投与80分後にキンドリング部位である左側扁桃核に対しGSTによる電気刺激を行った。各薬物の投与間隔は少なくとも1週間とし, GSTによる刺激でGTCが安定して惹起されることを確認してから, 薬物を投与した。各薬物の投与量や電気刺激までの時間は過去に報告されたラットの行動薬理学的研究を参考に決定した²¹⁾²⁶⁾。

2)パロキセチンとピンドロールの併用投与実験

1)と同様の方法で, パロキセチン(10mg/kg)とピンドロール(10mg/kg)の併用投与実験を行った。ラット9匹に対しまずピンドロールを腹腔内投与し, その20分後にパロキセチンを腹腔内投与し, さらにその60分後にGSTによる電気刺激を行った。対照薬にはそれぞれ生理食塩水1ml/kgを用いた。

Table. 1 Seizure parameters of kindling development in rats receiving daily treatment with saline or paroxetine

Drug	n	First response		First stage 5 seizure			
		ADT(μ A)	ADD (s)	Number of stimulations	ADD (s)	Latency for bilateral clonus(s)	Duration of bilateral clonus(s)
Saline	7	40 / 60-20	4 / 45-3	10 / 11-7	48 / 113-26	3 / 7-1	20 / 42-12
Paroxetine	7	40 / 80-20	4 / 16-2	13 / 15-5	52 / 109-19	1 / 20-1	26 / 42-16

Values are median / range. ADT, afterdischarge threshold; ADD, afterdischarge duration.

Table. 2 Seizure parameters of kindling development in rats receiving daily treatment with saline or pindolol

Drug	n	First response		First stage 5 seizure			
		ADT(μ A)	ADD (s)	Number of stimulations	ADD (s)	Latency for bilateral clonus(s)	Duration of bilateral clonus(s)
Saline	7	60 / 60-40	4 / 13-3	7 / 14-5	28 / 113-15	2 / 5-1	19 / 31-13
Pindolol	7	40 / 80-20	7 / 15-3	9 / 16-6	28 / 43-20	3 / 21-1	19 / 42-9

Values are median / range. ADT, afterdischarge threshold; ADD, afterdischarge duration

Table. 3 Seizure parameters of kindling development in rats receiving daily treatment with saline and saline or pindolol and paroxetine

Drug	n	First response		First stage 5 seizure			
		ADT(μ A)	ADD (s)	Number of stimulations	ADD (s)	Latency for bilateral clonus(s)	Duration of bilateral clonus(s)
Saline + saline	7	40 / 60-40	4 / 45-4	7 / 11-6	32 / 113-26	3 / 7-1	19 / 31-12
Pindolol + paroxetine	7	40 / 80-40	4 / 7-3	11* / 15-8	37 / 53-15	4 / 7-1	17 / 25-9

Values are median / range. *p<0.05 compared with saline treated group. ADT, afterdischarge threshold; ADD, afterdischarge duration.

3) p-CPA 前処置後のパロキセチンとピンドロールの併用投与実験

さらに脳内5-HT系の関与をより明らかにする目的で、5-HT合成阻害薬p-CPAの前処置を行った。ラット18匹を用いGSTおよびGST決定時のAD持続時間(afterdischarge duration, ADD)に差がないようにp-CPA投与群9匹と対照の生理食塩水投与群9匹の2群に分けた。p-CPAは直前に生理食塩水に溶解した。p-CPA100mg/kgまたは生理食塩水2ml/kgを1日1回、同時刻に連続して3日間腹腔内投与し、最終投与の72時間後に2)と同じ方法でパロキセチンとピンドロールの併用投与実験を行った。

2. キンドリングの発展過程に対する効果(実験2)

1) パロキセチンの単独投与実験

ADTの決定後、表1に示すように、ADTおよび初回のADDに差がないようにラット14匹を2群に分け、それぞれパロキセチン投与群、対照群とした。刺激2日目よりパロキセチン10mg/kgまたは対照薬として生理食塩水1ml/kgを1日1回反復して腹腔内投与し、それぞれの施注から60分後にADTより20 μ A高い刺激強度を用いて左側扁桃核に対して電気刺激を加えた。

2) ピンドロールの単独投与実験

ラット14匹をADTおよび初回のADDに差がないようにピンドロール投与群、対照群の2群に分けた(表2)。1)と同様の方法でピンドロール10mg/kgまたは対照薬として生理食塩水1ml/kgを1日1回反復して腹腔内投与し、各注射の80分後に電気刺激を行った。

3) パロキセチンとピンドロールの併用投与実験

ラット14匹をADTおよび初回のADDに差がないように2群に分け、それぞれ薬物投与群、対照群とした(表3)。1日1回まずピンドロールを投与し、その20分後にパロキセチンを投与、さらにその60分後に電気刺激した。各薬物は腹腔内投与し、対照にはそれぞれ生理食塩水1ml/kgを用いた。

IV. 薬効判定

実験1については両側前肢クローヌス発現までの潜時、両側前肢クローヌスの持続時間、ADDを測定し、各薬物の効果を判定した。

実験2に関してはキンドリング完成までの行動上の発作段階とADD、さらに初回の第5段階の全身けいれんが誘発されるま

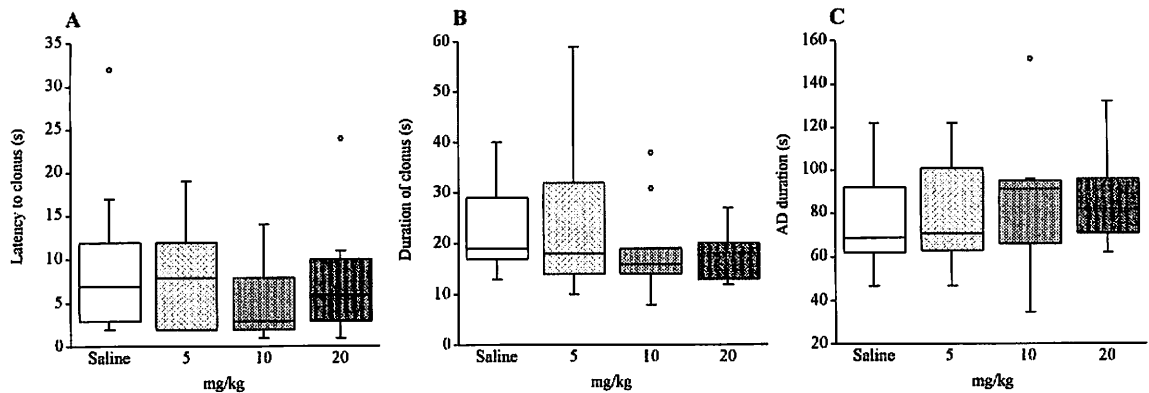


Fig. 1 Effect of intraperitoneal administration of paroxetine on latency to bilateral forelimb clonus (A), duration of bilateral forelimb clonus (B), afterdischarge duration (C) of amygdala kindled seizures. Data are depicted as box plots ($n = 9$). Boxes indicate data between 25th and 75th percentile with the horizontal line reflecting the median. Whiskers extend down to the smallest value and up to the largest. Dots represent outside values, i.e. values outside the inner fences. AD, afterdischarge

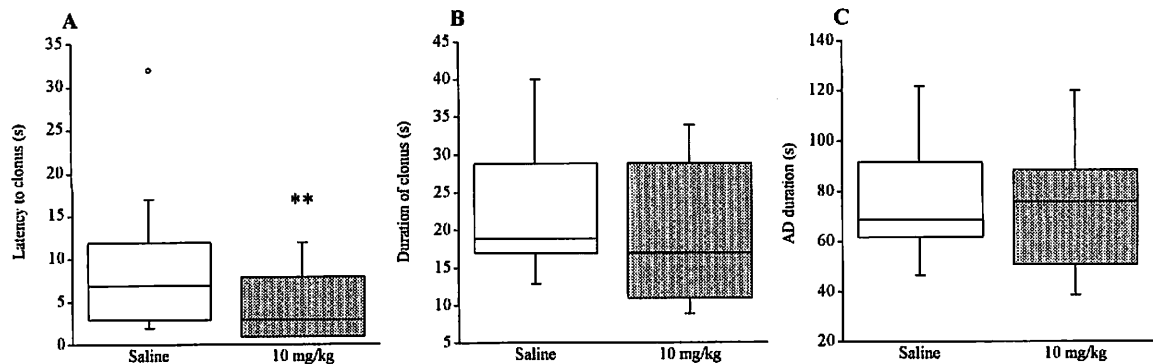


Fig. 2 Effect of intraperitoneal administration of pindolol (10 mg/kg) on latency to bilateral forelimb clonus (A), duration of bilateral forelimb clonus (B), afterdischarge duration (C) of amygdala kindled seizures. Data are depicted as box plots ($n = 9$). Boxes indicate data between 25th and 75th percentile with the horizontal line reflecting the median. Whiskers extend down to the smallest value and up to the largest. Dots represent outside values, i.e. values outside the inner fences. ** $P < 0.01$ compared with saline control. AD, afterdischarge.

でに要した刺激回数および初回全身けいれんのADDを評価した。なお、実験中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、各回の電気刺激前後に行動観察と脳波記録を行った。

V. 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。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成し、Klüver-Barrera染色を行い電極刺入位置を組織学的に確認した。

VI. 統計解析

実験1のパロキセチンとピンドロールの単独投与実験および併用投与実験についてはWilcoxonの符号付順位検定を用いた。実験1のp-CPA前処置後の併用投与実験に関してはMann-

Whitney U検定で2群間を比較した。実験2においては刺激回数ごとにMann-Whitney U検定を用い2群間の比較を行った。各実験ともに危険率5%未満を有意差ありとした。成績の数値は中央値で表示した。

成 績

I. キンドリング発作に対する効果

1. パロキセチンまたはピンドロール単独投与の効果(実験1-1)

パロキセチンまたはピンドロール単独投与後の両側前肢クローヌス発現までの潜時、両側前肢クローヌスの持続時間、ADDの変化をそれぞれ図1、2に示す。パロキセチン単独投与では用量に依存して両側前肢クローヌスの持続時間が短縮する傾向を示したが、対照薬とした生理食塩水との間に有意差はなかった。他の2つの指標についても対照薬との間に有意な変化はみられなかった。

ピンドロール単独投与では両側前肢クローヌス発現までの潜時について、生理食塩水投与後の中央値7秒に対しピンドロー

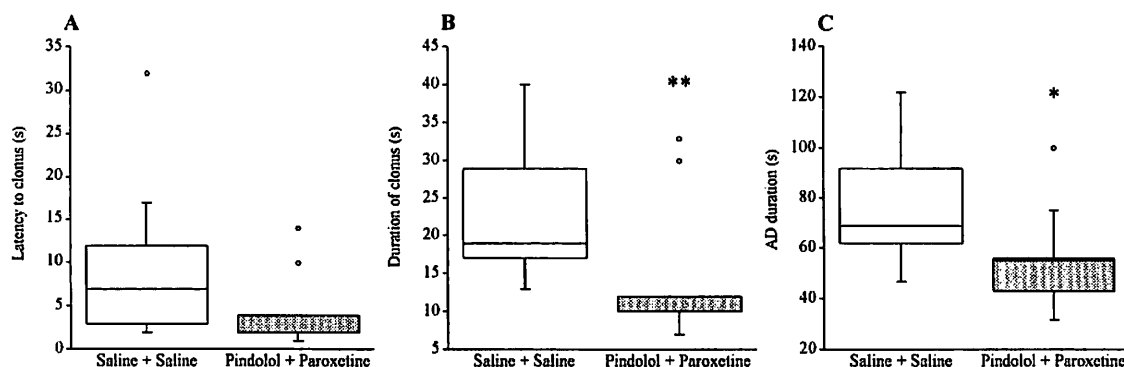


Fig. 3 Effect of a concomitant intraperitoneal administration of paroxetine (10 mg/kg) and pindolol (10 mg/kg) on latency to bilateral forelimb clonus (A), duration of bilateral forelimb clonus (B), afterdischarge duration (C) of amygdala kindled seizures. Data are depicted as box plots (n = 9). Boxes indicate data between 25th and 75th percentile with the horizontal line reflecting the median. Whiskers extend down to the smallest value and up to the largest. Dots represent outside values, i.e. values outside the inner fences. * P < 0.05, ** P < 0.01 compared with saline control. AD, afterdischarge.

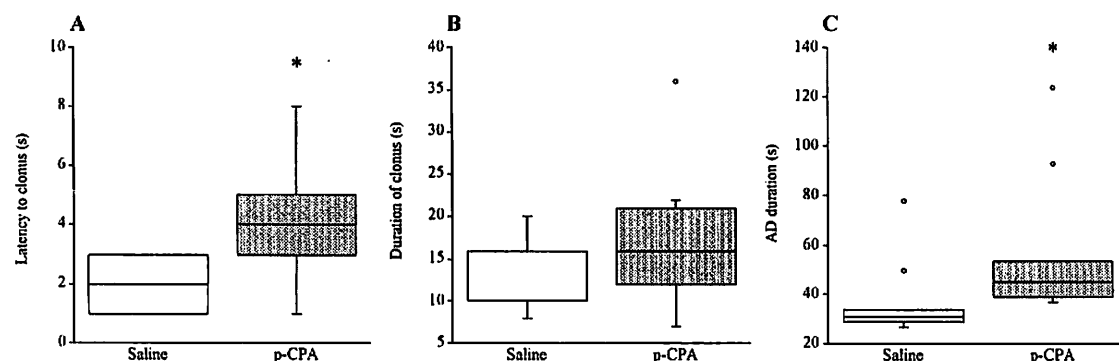


Fig. 4 Effect of pretreatment with para-chlorophenylalanine to a subsequent intraperitoneal administration of paroxetine (10 mg/kg) and pindolol (10 mg/kg) on latency to bilateral forelimb clonus (A), duration of bilateral forelimb clonus (B), afterdischarge duration (C) of amygdala kindled seizures. Data are depicted as box plots (n = 9 per group). Boxes indicate data between 25th and 75th percentile with the horizontal line reflecting the median. Whiskers extend down to the smallest value and up to the largest. Dots represent outside values, i.e. values outside the inner fences. * P < 0.05 compared with saline-treated group. AD, afterdischarge. p-CPA, para-chlorophenylalanine.

ル投与後は3秒と有意に短縮した($p < 0.01$)。両側前肢クローヌスの持続時間およびADDには生理食塩水との間に有意差は認められなかった。

なお、パロキセチン20mg/kg投与の約5分後に自発運動の低下がみられたが、他の行動変化や背景脳波の変化はみられなかった。

2. パロキセチンとピンドロール併用投与の効果(実験1-2))

パロキセチンとピンドロールの併用投与後の効果を図3に示す。それぞれの単独投与では発作持続時間の変化はみられなかったが、両薬剤併用時には両側前肢クローヌスの持続時間が中央値10秒、ADDが中央値55秒と、それぞれ生理食塩水投与時の19秒、69秒に比べ有意に短縮した($p < 0.01$, $p < 0.05$)。両側前肢クローヌス発現までの潜時について有意差はなかった。

3. p-CPA前処置後のパロキセチンとピンドロール併用投与の効果(実験1-3))

p-CPA前処置後の両薬剤併用投与の効果を図4に示す。ADDは生理食塩水前処置群の中央値31秒に比較して45秒と有意な延長を認めた($p < 0.05$)。また、両側前肢クローヌスの持続時間においては対照群との間に有意差はなく、p-CPA前処置なしでの両薬剤併用投与と実験のみられた発作持続時間に対する抑制効果は阻害された。両側前肢クローヌス発現までの潜時につい

ては中央値4秒と対照群の2秒に対して有意に延長した($p < 0.05$)。

II. キンドリングの発展過程に対する効果

1. パロキセチン単独投与の効果(実験2-1))

扁桃核キンドリングの発作発展過程に対するパロキセチンの効果を図5に示す。パロキセチン投与群は、対照群と比較して行動上の発作段階が遅延し、投与後11日目および12日目に有意に発作段階が減少した($p < 0.05$)。ADDにおいては対照群との間に有意差は認めなかった。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刺激回数、中央値で対照群が10回、パロキセチン投与群が13回で、両群間に有意な変化はなかった。また、初回全身けいれんのADDについてもパロキセチン投与群が中央値52秒、対照群が48秒と両群間に有意差は認められなかった。

2. ピンドロール単独投与の効果(実験2-2))

ピンドロールを単独投与した場合の効果を図6に示す。行動上の発作段階およびADDは、対照群と比して有意差はなかった。表2に示すように、全身けいれんが初めて誘発されるまでの刺激回数は中央値9回、初回全身けいれんのADDは中央値28秒と、それぞれ対照群の7回、28秒との間に有意な変化はみられなかった。

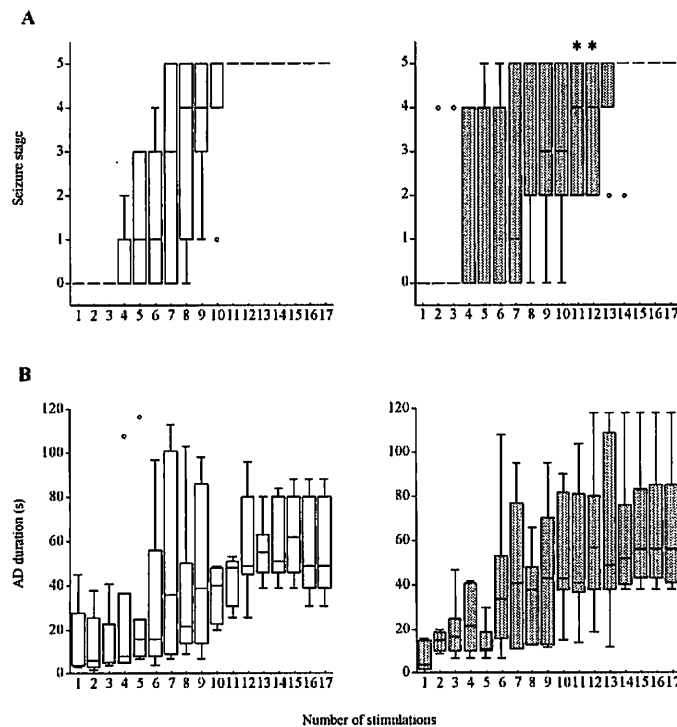


Fig. 5 Development of seizure response during amygdaloid kindling with daily administration of paroxetine. (A) Behavioral seizure stage, (B) after discharge (AD) duration. After determining the AD threshold on day 1, 1 ml/kg saline or 10 mg/kg paroxetine was injected i.p. 60 min prior to each kindling 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. Data are depicted as box plots ($n = 7$ per group). Empty and gray boxes indicate saline-treated group and paroxetine-treated group. Boxes indicate data between 25th and 75th percentile with the horizontal line reflecting the median. Whiskers extend down to the smallest value and up to the largest. Dots represent outside values, i.e. values outside the inner fences. * $P < 0.05$ compared with saline-treated group.

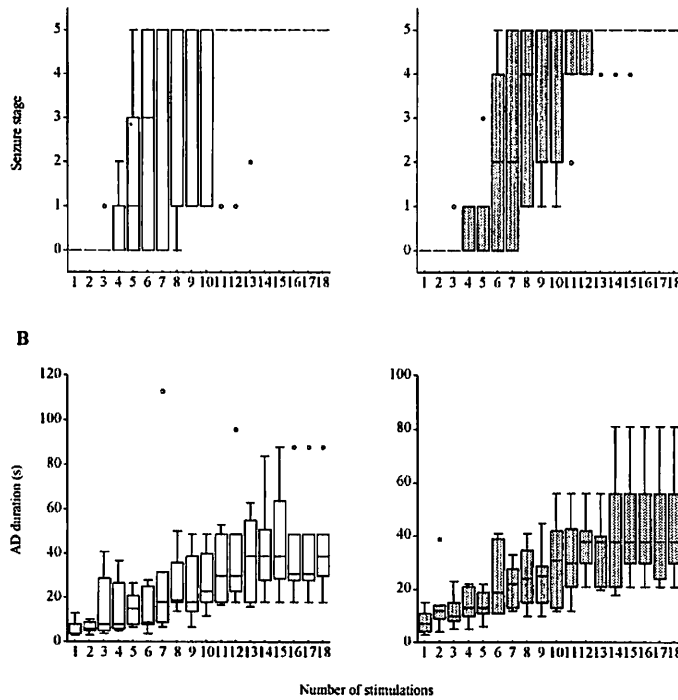


Fig. 6 Development of seizure response during amygdaloid kindling with daily administration of pindolol. (A) Behavioral seizure stage, (B) after discharge (AD) duration. After determining the AD threshold on day 1, 1 ml/kg saline or 10 mg/kg pindolol was injected i.p. 80 min prior to each kindling stimulation 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. Data are depicted as box plots (n = 7 per group). Empty and gray boxes indicate saline-treated group and pindolol-treated group. Boxes indicate data between 25th and 75th percentile with the horizontal line reflecting the median. Whiskers extend down to the smallest value and up to the largest. Dots represent outside values, i.e. values outside the inner fences.

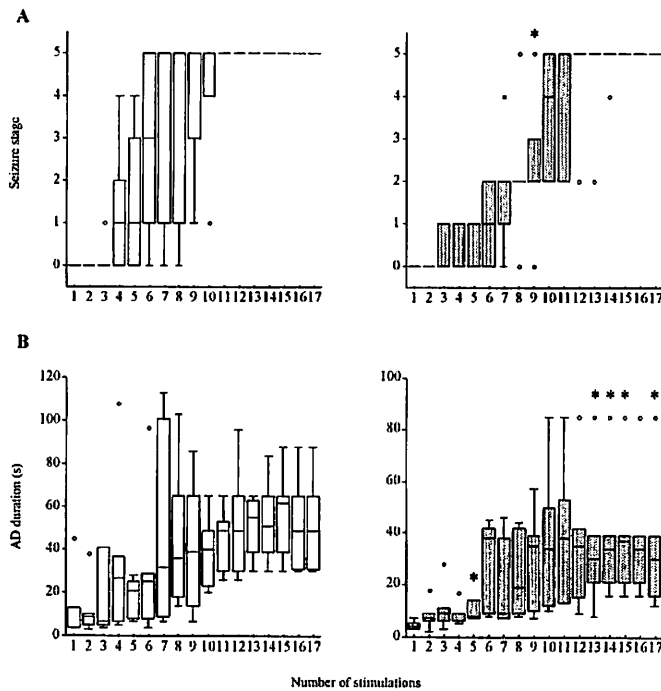


Fig. 7 Development of seizure response during amygdaloid kindling with daily administration of paroxetine and pindolol. (A) Behavioral seizure stage, (B) after discharge (AD) duration. After determining the AD threshold on day 1, the rats received an i.p. injection of 1 ml/kg saline plus 1 ml/kg saline or 10 ml/kg paroxetine plus 10 ml/kg pindolol. Paroxetine and pindolol were injected 60 min and 80 min prior to electrical 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. Data are depicted as box plots (n = 7 per group). Empty boxes indicate saline-treated group. Gray boxes indicate paroxetine plus pindolol-treated group. Boxes extend from 25th to 75th percentile with the horizontal line reflecting the median. Whiskers extend down to the smallest value and up to the largest. Dots represent outside values, i.e. values outside the inner fences. * P < 0.05 compared with saline-treated group.

3. パロキセチンとピンドロール併用投与の効果(実験2-3)

パロキセチンとピンドロール併用投与後の発作発展過程に対する効果を図7に示す。全体的に行動上の発作段階は遅延する傾向がみられ、投与9日目に対照群と比較して発作段階が有意に減少した($p < 0.05$)。ADDについても両薬剤の併用投与群は短縮する傾向があり、投与5日目および13から15日目、17日目に有意に短縮した($p < 0.05$)。また、表3のように初回の全身けいれんが誘発されるまでの刺激回数は中央値11回と対照群の7回に比べて有意に増加した($p < 0.05$)。初回全身けいれんのADDは中央値37秒と対照群の32秒との間に有意差はなかった。

考 察

てんかんと5-HT系の関係についてはこれまでに多くの研究がなされている⁹⁾。縫線核を電気刺激し、投射部位での5-HT放出を増加させるとラット扁桃核キンドリング発作の抑制²⁷⁾やネコ扁桃核発作の閾値の上昇¹⁰⁾が認められる。また、5-HTPがネコの外側膝状体および海馬キンドリング発作に対して抑制的に作用し、発作段階の減少とADDの短縮がみられる¹⁴⁾など、5-HTが発作に抑制的に作用する可能性が報告されている。しかし一方で、ラット扁桃核キンドリング発作において5-HTPは前肢クロウスの持続時間を延長させる²⁸⁾という報告や、セロトニン拮抗薬(メテルゴリン, ミアンセリン)が前肢クロウスの持続時間を短縮する²⁹⁾、家兎の扁桃核キンドリング発作で5-HTP投与により発作持続時間が延長する²⁹⁾などの矛盾する見解もみられている。このようにてんかんにおける5-HT神経系の働きは依然として定説を得ていないが、脳内5-HT濃度を上昇させる薬理的操作がてんかん発作に対し抑制的に作用するとの報告が多く、SSRIのてんかん発作に対する抑制的効果が期待される根拠となっている。

実際にSSRIのてんかん発作への影響を検討した研究からもいくつかの知見が得られている。最大電撃けいれんラットを用いた実験で、後肢の伸展強直がフルオキセチンによって抑制されることが示され³⁰⁾、遺伝性自然発症てんかんラットではセロトリンが聴原性けいれんを抑制することが報告されている⁹⁾。深部梨状葉皮質のピククリン誘発性の辺縁系運動発作においては、フルオキセチンが用量依存的に発作抑制効果を示し³¹⁾、またラットの海馬焦点発作についてもフルオキセチン投与後に発作閾値の上昇がみられたことが報告されている³²⁾。最近では、ラットのピロカルピン誘発けいれんにおいてフルオキセチン³³⁾やシタロプラム³⁴⁾の抗けいれん作用が示唆され、マウスのベンチレンテトラゾール誘発けいれんに対するフルオキセチンの抑制効果も示されている³⁵⁾。このようにSSRIの投与がてんかんに対し抑制的に働くという報告が多い一方で、フルオキセチンが、欠神てんかんの動物モデルであるWistar Albino Glaxo/Rijswijkラットにおける脳波上の棘徐波複合の出現を増加させること³⁶⁾やラットのベンチレンテトラゾール誘発けいれんの出現率を高める³⁷⁾などの相反する報告がみられている。

以上の報告はほとんどが急性投与下での研究である。SSRIの急性単回投与後には5-HT_{1A}自己受容体の賦活を介した5-HT神経活動の抑制が惹起されることが示唆されている¹⁹⁾。そのため急性投与では負のフィードバックによる神経終末部の5-HT放出量の減少が生じ、SSRIの5-HT再取り込み阻害により引き起こされる5-HTの増加を相殺する可能性がある。これに対し、慢性投与下では5-HT_{1A}自己受容体の脱感作が生じ、急性投与時

に抑制された5-HT神経活動が正常レベルに回復することが、縫線核の5-HT神経細胞の自発放電頻度を検討した電気生理学的研究で示されている¹⁹⁾。微量透析法を用いた研究ではフルボキサミンの反復投与後に前頭葉皮質で著明な5-HT量の増加が認められることが示され³⁸⁾、オートラジオグラフィによる研究でも、フルオキセチンの慢性投与後に縫線核の5-HT_{1A}受容体結合能は低下するが、海馬では機能的変化が生じないこと³⁹⁾が報告されている。また、ラットの海馬焦点発作におけるフルオキセチンの急性および慢性投与時の効果の比較が行われ、急性単回投与ではみられなかった発作抑制効果が、慢性投与後に発揮されるという結果が示されている⁴⁰⁾。これらの報告はいずれもSSRIの抗てんかん作用の発現には5-HT_{1A}自己受容体の脱感作を介した5-HT神経伝達の増強が重要であるという仮説を支持するものと考えられる。

今回の研究では、この仮説をさらに検証するため、ラット扁桃核におけるキンドリング形成後の発作について、パロキセチンに5-HT_{1A}受容体拮抗作用をもつピンドロールを併用投与し、その効果を検討した。その結果、それぞれの単回投与では発作抑制効果はみられなかったが、両薬剤併用時に両側前肢クロウスの持続時間とADDの有意な短縮を認めた。

現存する5種類のSSRIは化学構造式が全く異なり、5-HT再取り込み阻害能の強度および選択性、薬物半減期や活性代謝産物の有無など相違点が多い。これまでのSSRIのてんかん発作への影響を検討した実験的研究の多くはフルオキセチンを用いたものであり、その他のSSRIに関する研究は充分ではない。パロキセチンは、その特徴としてSSRIの中では5-HT再取り込み阻害作用が最も強く、有効な代謝産物を有さない⁴¹⁾ことなどがあげられる。SSRIがてんかん発作に対する抑制的効果を有するのか、また、その効果発現に対し5-HT神経系がどのように関連するのかをより明らかにするために、最も適した薬剤と考えられる。実験1-2)ではパロキセチンとピンドロールとの併用により、パロキセチン単独の急性単回投与ではみられなかった発作抑制効果が観察された。これは、遺伝性自然発症てんかんラットの聴原性けいれん²⁶⁾またはラット海馬焦点発作⁴²⁾について、フルオキセチンとピンドロールを併用し、その発作抑制効果を報告した過去の研究と矛盾しない。

5-HT_{1A}受容体はラットにおいては海馬や扁桃核などの後シナプスにも高密度に存在することが知られており²⁾、これまでのキンドリングの研究¹⁹⁾⁻¹⁷⁾ではこの後シナプスの5-HT_{1A}受容体は、てんかんに対し抑制的な働きをもつことが知られている。ピンドロールは5-HT_{1A}受容体拮抗作用を有するが、これまでの電気生理学的手法や微量透析法を用いた研究から、後シナプス性の5-HT_{1A}受容体ではなく前シナプス性の5-HT_{1A}自己受容体により強い拮抗作用をもつことが示唆され²²⁾、PETを用いた研究でも5-HT_{1A}自己受容体に高い占有率を示すことが報告されている⁴³⁾。以上のことから、今回の併用投与によって認められた発作抑制効果はピンドロールが後シナプス性の5-HT_{1A}受容体に作用した結果ではなく、5-HT_{1A}自己受容体の阻害により負のフィードバックを抑制し、神経終末部の5-HT濃度を上昇させたことに起因するものと推測される。

自己受容体による5-HT神経活動の調節には縫線核の5-HT_{1A}受容体とともに神経終末部の5-HT_{1B/1D}受容体も関与している²²⁰⁾。5-HT_{1B}受容体は中枢神経系においては線条体や前頭葉皮質、海馬などに集中して存在することが知られているが²⁾、最近では5-

HT_{1B/1D}受容体蛋白が縫線核にも存在することが明らかにされ、5-HT遊離のみならず、その神経発火も調節している可能性が報告されている⁴⁴⁾。これまでの研究で、ピンドロールは5-HT_{1A}自己受容体拮抗作用のみならず5-HT_{1B}受容体拮抗作用を有し、フルオキセチンと併用した際に生ずる細胞外の5-HT濃度の上昇には、5-HT_{1B}受容体を介した作用も関連している可能性が示されている²⁰⁾。5-HT_{1B/1D}自己受容体の作用は5-HT_{1A}自己受容体の作用と比べ副次的であることが示唆されている⁴⁵⁾が、今回のパロキセチンとピンドロールの併用投与でみられた発作抑制効果には、5-HT_{1A}自己受容体のみならず5-HT_{1B/1D}自己受容体が関与した可能性も考えられる。

また、ピンドロールは5-HT_{1A}自己受容体への拮抗作用の他にアドレナリンβ受容体拮抗作用を有することが広く知られている²⁰⁾。実験1-3)では、パロキセチンとピンドロールの併用投与でみられた発作抑制効果の発現にいずれの受容体が関与するかをより明らかにする目的で、5-HT合成阻害薬であるp-CPAによる前処置を行い、5-HTが枯渇したと推測される状態での併用投与実験を行った。その結果、パロキセチンとピンドロールの併用投与でみられた発作持続時間の短縮がp-CPAの前処置により阻害されることが示された。この結果はBrowningら²⁰⁾のラット聴原てんかんモデルでの報告に合致し、今回の併用投与による抗てんかん作用の発現が5-HT神経系を介していることを示唆するものである。また、今回の研究ではp-CPAの前処置により、前処置なしの併用投与実験では認めなかったAD持続時間の有意な延長がみられた。これまでにもてんかんモデルにおけるp-CPAの促進的な作用が報告されている⁹⁾。p-CPAはトリプトファンの水酸化酵素阻害薬であり、中枢での大幅な5-HTレベルの低下を起こすことが知られており²⁰⁾、今回のp-CPAの発作促進作用についても、5-HTの濃度低下に起因する可能性が大きいと推察された。

本研究ではパロキセチンのてんかんに対する作用機序をより明確にする目的で、ラット扁桃核キンドリングの発展過程に対してもその効果を検証し、加えてピンドロールとの併用投与実験を行った。その結果、パロキセチン単独投与群では、対照の生理食塩水投与群と比較して、行動上の発作段階が投与11および12日目に有意に減少した。ピンドロール併用群では全体に発作段階の遅延傾向がみられ、9日目に有意な減少を認めた。また、初回の全身けいれんが誘発されるまでの刺激回数も有意に増加した。ADDについてもピンドロール併用群は早期から短縮する傾向があり、5日目と13から15日目、17日目に有意な変化を示した。

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神経機構が異なると考えられており、薬物効果の評価を行う場合には、明確な区別が必要であると言われている¹³⁾。これまでSSRIについて、キンドリングの発展過程に対する効果を検討した研究はないが、5-HTの影響についてはこれまでにいくつかの検討が行われている。縫線核の破壊⁴⁶⁾やp-CPAの投与による脳内5-HT濃度を低下させる操作⁴⁷⁾が扁桃核や新皮質のキンドリング形成に対して促進的に働くことが報告されている。一方で、これらの操作が海馬や扁桃核キンドリングの発展には抑制²⁹⁾または影響しないとする報告⁴⁸⁾もみられる。また、電気刺激を行う前に5-HTPを投与することで扁桃核キンドリングの遅延が示される⁴⁹⁾一方で、不変との報告²⁹⁾もある。これらの実験結果の不一致の原因のひとつ

として5-HT受容体亜型別の検討が不充分であることがあげられる。Wadaら¹⁷⁾¹⁸⁾はキンドリングの発展に対する5-HT_{1A}から5-HT₃受容体までの各受容体別の検討を行い、5-HT_{1A}受容体は抑制的に、5-HT₂および5-HT₃受容体は促進的に作用する可能性を示唆した。これは全て後シナプス性の5-HT受容体についての検討であるが、その考察の中で5-HT_{1A}受容体の抑制的作用には5-HT_{1A}受容体作動薬8-ヒドロキシ-2-(ジ-n-プロピルアミノ)テトラリン[8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin]の反復投与による縫線核の5-HT_{1A}自己受容体の脱感作が関与する可能性が言及されている。今回、パロキセチン単独投与時にみられた抑制効果が、ピンドロールの併用により早期にかつ強調されて認められたことは、5-HT_{1A}自己受容体を介した5-HT神経伝達の増強が、キンドリングの発展過程の抑制についても重要であるという考えをより支持するものと思われた。

以上、今回の研究では、キンドリング発作の発現過程において、5-HT_{1A}自己受容体拮抗薬であるピンドロールの併用により、パロキセチンの単独投与ではみられなかった発作抑制効果を認めた。また、パロキセチンの単独投与がキンドリングの発展過程を抑制し、さらにピンドロールの併用により、その抑制効果が促進されることを示した。これは、5-HT神経伝達を増強させる薬理学的操作が抗てんかん効果の発現に重要であるという仮説を支持するものと考えられた。SSRIは5-HT選択性の高い薬剤であり、既にてんかん患者に対する抗てんかん効果を示唆する報告もみられている⁴⁹⁾。てんかん患者の抑うつ症状は臨床重要問題であり、慎重な抗うつ薬の選択が必要である。本研究より、抑うつ症状を呈したてんかん患者の治療に、パロキセチンを始めとするSSRIとピンドロールの併用療法が寄与する可能性が推察された。

結 論

本研究ではラット扁桃核キンドリング発作とキンドリングの発展に対するパロキセチンとピンドロールの併用投与の効果を検討し、以下の結果を得た。

ラット扁桃核キンドリング発作について

1. パロキセチンの単独投与では、有意な効果はなかった。
2. ピンドロールの単独投与では両側前肢クローズ発現までの潜時が、対照の生理食塩水投与時に比べ有意に短縮した。
3. パロキセチンとピンドロールの両薬剤併用時には、両側前肢クローズの持続時間およびADDが、対照に比べ有意に短縮した。
4. p-CPAによる前処置を行ったパロキセチンとピンドロールの併用投与では、p-CPA前処置なしでの併用投与実験でみられた発作持続時間に対する抑制効果が阻害された。

ラット扁桃核キンドリングの発展について

1. パロキセチン単独投与群では、11日目および12日目にかけて、対照の生理食塩水投与群に比べ有意に発作段階が遅延した。
2. パロキセチンとピンドロールの併用投与時には、対照群と比較して9日目に発作段階に有意な遅延を認めた。パロキセチン単独投与群では変化がみられなかったADDについても、5日目、13から15日目、17日目に有意に短縮した。また、初回の全身けいれんが誘発されるまでの刺激回数は対照群と比べて有意に増加し、パロキセチンのキンドリングの発展に対する抑制効果が促進された。

謝 辞

稿を終了するに臨み、御指導と御校閲を賜りました金沢大学大学院脳医科学専攻脳情報病態学講座三邊義雄教授に深甚の謝意を表します。また御指導いただいた越野好文前教授、和田有司福井大学医学部教授、終始直接の御助言、御指導をいただきました中村充彦助教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白石潤博士、市川俊介医学士に感謝致します。最後に本研究の遂行に御協力をいただいた金沢大学大学院脳医科学専攻脳情報病態学講座の各位に厚くお礼を申し上げます。

文 献

- 1) 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
- 2) Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. Molecular pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 71: 533-554, 2002
- 3) Pruefer C, Norra C. Mood disorders and their treatment in patients with epilepsy. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 17: 20-28, 2005
- 4) Seethalakshmi R, Krishnamoorthy ES. Depression in epilepsy: phenomenology, diagnosis and management. *Epileptic Disord* 9: 1-10, 2007
- 5) Bagdy G, Kecskemeti V, Riba P, Jakus R. Serotonin and epilepsy. *J Neurochem* 100: 857-873, 2007
- 6) Cavalleiro EA, Elisabetsky E, Campos CJ. Effect of brain serotonin level on induced hippocampal paroxysmal activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 15: 363-366, 1981
- 7) Segal M. Physiological and pharmacological evidence for a serotonergic projection to the hippocampus. *Brain Res* 94: 115-131, 1975
- 8) Wada Y, Nakamura M, Hasegawa H, Yamaguchi N. Effect of serotonin uptake inhibiting antidepressants on hippocampal kindled seizures in cats. *Neurosci Res Commun* 12: 119-124, 1993
- 9) Yan QS, Jobe PC, Daily JW. Further evidence of anticonvulsant role for 5-hydroxytryptamine in genetically epilepsy-prone rats. *Br J Pharmacol* 115: 1314-1318, 1995
- 10) Siegel J, Muphy GJ. Serotonergic inhibition of amygdala-kindled seizures in cats. *Brain Res* 174: 337-340, 1979
- 11) Goddard GV, McIntyre DC, Leech CK. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp Neurol* 25: 295-330, 1969
- 12) Wada JA, Sato M, Corcoran ME. Persistent seizure susceptibility and recurrent spontaneous seizures in kindled cats. *Epilepsia* 15: 465-478, 1974
- 13) Sato M, Racine RJ, McIntyre DC. Kindling: Basic mechanisms and clinical validity. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 76: 459-472, 1990
- 14) Wada Y, Hasegawa H, Nakamura M, Yamaguchi N. Serotonergic inhibition of limbic and thalamic seizures in cats. *Neuropsychobiology* 25: 87-90, 1992
- 15) Wada Y, Nakamura M, Hasegawa H, Yamaguchi N. Intra-hippocampal injection of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetrilin (8-OH-DPAT) inhibits partial and generalized seizures induced by kindling stimulation in cats. *Neurosci Lett* 159: 179-182, 1993
- 16) 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
- 17) Wada Y, Shiraishi J, Nakamura M, Koshino Y. Role of serotonin receptor subtypes in the development of amygdaloid kindling rats. *Brain Res* 747: 338-342, 1997
- 18) Wada Y, Shiraishi J, Nakamura M, Koshino Y. Effects of the 5-HT₃ receptor agonist 1-(m-chlorophenyl)-biguanide in the rat kindling model of epilepsy. *Brain Res* 759: 313-316, 1997
- 19) de Montigny C, Chaput Y, Blier P. Modification of serotonergic neuron properties by long-term treatment with serotonin reuptake blockers. *J Clin Psychiatry* 51 (Suppl B): 4-8, 1990
- 20) Dawson LA, Nguyen HQ. The role of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B/1D} receptors on the modulation of acute fluoxetine-induced changes in extracellular 5-HT: the mechanism of action of (±)pindolol. *Neuropharmacology* 39: 1044-1052, 2000
- 21) Dreshfield LJ, Wong DT, Perry KW, Engleman EA. Enhancement of fluoxetine-dependent increase of extracellular serotonin (5-HT) levels by (-)-pindolol, an antagonist at 5-HT_{1A} receptors. *Neurochemical Research* 21: 557-562, 1996
- 22) Romero L, Bel N, Artigas F, de Montigny C, Blier P. Effect of pindolol on the function of pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors: in vivo microdialysis and electrophysiological studies in rat brain. *Neuropsychopharmacology* 15: 349-360, 1996
- 23) Pérez V, Puigdemont D, Gilaberte I, Alvarez E, Artigas F. Augmentation of fluoxetine's antidepressant action by pindolol: analysis of clinical, pharmacokinetic, and methodologic factors. *J Clin Psychopharmacol* 21: 36-45, 2001
- 24) Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2nd ed, Academic Press, San Diego, 1986
- 25) Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 32: 281-294, 1972
- 26) Browning RA, Wood AV, Merrill MA, Dailey JW, Jobe PC. Enhancement of the anticonvulsant effect of fluoxetine following blockade of 5-HT_{1A} receptors. *Eur J Pharmacol* 336: 1-6, 1997
- 27) Kovacs DA, Zoll JG. Seizure inhibition by median raphe nucleus stimulation in rat. *Brain Res* 70: 165-169, 1974
- 28) 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
- 29) Stach R, Lazarova MB, Kacz D. Serotonergic mechanism in seizures kindled from the rabbit amygdala. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 316: 56-58, 1981
- 30) Buterbaugh GG. Effect of drugs modifying central serotonergic function on the response of extensor and nonextensor rats to maximal electroshock. *Life Sci* 23: 2393-2404, 1978
- 31) Prendiville S, Gale K. Anticonvulsant effect of fluoxetine on focally evoked limbic motor seizures in rats. *Epilepsia* 34: 381-384, 1993
- 32) Watanabe K, Minabe Y, Ashby CR Jr, Katsumori H. Effect of acute administration of various 5-HT receptor agonists on focal

- hippocampal seizures in freely moving rats. *Eur J Pharmacol* 350: 181-188, 1998
- 33) Hernandez EJ, Williams PA, Dudek FE. Effects of fluoxetine and TFMPP on spontaneous seizures in rats with pilocarpine-induced epilepsy. *Epilepsia* 43: 1337-1345, 2002
- 34) Clinckers R, Smolders I, Meurs A, Ebinger G, Michotte Y. Anticonvulsant action of GBR-12909 and citalopram against acute experimentally induced limbic seizures. *Neuropharmacology* 47: 1053-1061, 2004
- 35) Ugale RR, Mittal N, Hirani K, Chopde CT. Essentiality of central GABAergic neuroactive steroid allopregnanolone for anticonvulsant action of fluoxetine against pentylenetetrazole-induced seizures in mice. *Brain Res* 1023: 102-111, 2004
- 36) Jakus R, Graf M, Juhasz G, Gerber K, Levay G, Halasz P, Bagdy G. 5-HT_{2C} receptors inhibit and 5-HT_{1A} receptors activate the generation of spike-wave discharges in genetic rat model of absence epilepsy. *Exp Neurol* 184: 964-972, 2003
- 37) Zienowicz M, Wisłowska A, Lehner M, Taracha E, Skórzewska A, Maciejak P, Płaźnik A. The effect of fluoxetine in a model of chemically induced seizures-behavioral and immunocytochemical study. *Neurosci Lett* 373: 226-231, 2005
- 38) Bel N, Artigas F. Chronic treatment with fluvoxamine increases extracellular serotonin in frontal cortex but not in raphe nuclei. *Synapse* 15: 243-245, 1993
- 39) Welner SA, de Montigny C, Desroches J, Desjardins P, Suranyi-Cadotte BE. Autoradiographic quantification of serotonin_{1A} receptors in rat brain following antidepressant drug treatment. *Synapse* 4: 347-352, 1989
- 40) Wada Y, Shiraishi J, Nakamura M, Hasegawa H. Prolonged but not acute fluoxetine administration produces its inhibitory effect on hippocampal seizures in rats. *Psychopharmacology* 118: 305-309, 1995
- 41) Tulloch IF, Johnson AM. The pharmacologic profile of paroxetine, a new selective serotonin reuptake inhibitor. *J Clin Psychiatry* 53: 7-12, 1992
- 42) Wada Y, Hirao N, Shiraishi J, Nakamura M, Koshino Y. Pindolol potentiates the effect of fluoxetine on hippocampal seizures in rats. *Neurosci Lett* 267: 61-64, 1999
- 43) Martinez D, Hwang D, Mawlawi O, Slifstein M, Kent J, Simpson N, Parsey RV, Hashimoto T, Huang Y, Shinn A, Van Heertum R, Abi-Dargham A, Caltabiano S, Malizia A, Cowley H, Mann JJ, Laruelle M. Differential occupancy of somatodendritic and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors by pindolol: a dose - occupancy study with [¹¹C]WAY100635 and positron emission tomography in humans. *Neuropsychopharmacology* 24: 209-229, 2001
- 44) Barnes NM, Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38: 1083-1152, 1999
- 45) Davidson C, Stamford JA. Effect of chronic paroxetine treatment on 5-HT_{1B} and 5-HT_{1D} autoreceptors in rat dorsal raphe nucleus. *Neurochem Int* 36: 91-96, 2000
- 46) 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
- 47) Munkenbeck KE, Schwark WS. Serotonergic mechanisms in amygdaloid-kindled seizures in rats. *Exp Neurol* 76: 246-253, 1982
- 48) 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
- 49) Favale E, Audenino D, Cocito L, Albano C. The anticonvulsant effect of citalopram as an indirect evidence of serotonergic impairment in human epileptogenesis. *Seizure* 12: 316-318, 2003

Effects of paroxetine on amygdala-kindling model of epilepsy in rats - Accelerative change by co-administration with pindolol -

Naohisa Hirao, Department of Psychiatry and Neurobiology, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 _ J.Juzen Med Soc., **116**, 151 – 162 (2007)

Key words epilepsy, paroxetine, pindolol, 5-HT_{1A} receptors, serotonin

Abstract

The present study assessed the effects of concomitant administration of paroxetine and a serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT)_{1A} receptor antagonist, pindolol on generalized kindled seizures from the rat amygdala (AM). Fully kindled rats received an intraperitoneal injection of paroxetine (5, 10, 20 mg/kg) or pindolol (10 mg/kg) or co-administration of paroxetine (10 mg/kg) and pindolol (10 mg/kg). After the drug administration, rats received electrical stimulation at the generalized seizure-triggering threshold. Paroxetine alone did not induce significant changes in any seizure parameters. Co-administration of paroxetine and pindolol resulted in a significant reduction in the duration of afterdischarge (AD) and bilateral forelimb clonus. The inhibitory effect of co-administration was eliminated by pretreatment with para-chlorophenylalanine. We also examined the effects of co-administering paroxetine and pindolol on the development of kindling seizure from AM in rats. After the drug injection, rats received daily electrical stimulation at a current 20 μ A above the AD threshold until generalized seizures were elicited on three consecutive days. Paroxetine (10 mg/kg) alone suppressed behavioral seizure development, with a significant decrease on days 11 and 12 compared with that in the saline-administered control. Co-administration of paroxetine (10 mg/kg) and pindolol (10 mg/kg) tended to delay behavioral seizure stage, with a significant decrease on day 9. Co-administration of these drugs also significantly increased the number of stimulations needed to elicit the first generalized seizures, and caused a significant reduction in AD duration on day 5 and from days 13 to 15, day 17. These findings suggest that the co-administration of paroxetine and pindolol has an inhibitory effect on AM kindled seizures and kindling development. Furthermore, the present study demonstrates that the 5-HT system participates in the expression of seizures, and that blockade of presynaptic 5-HT_{1A} autoreceptors plays an important role in the seizure-inhibiting mechanism of paroxetine.