

原 著

cAMP による chemical kindling と electrical kindling への transfer

cAMP-induced Chemical Kindling and Transfer to Electrical Kindling

横 山 昇*

要旨: ラットの扁桃核に cAMP の subconvulsive dose を反復注入すると, electrical kindling と同様の発作進展が認められた。この chemical kindling は cAMP の容量に依存して促進され, cAMP の分解酵素に対して阻害作用をもつ EDTA の併用により更にその形成が促進された。chemical kindling 後には electrical kindling が有意に促進された。

以上のことから, AM の cAMP は AM electrical kindling の発作発展の基盤をなす transsynaptic change の形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。

てんかん研究 1988 ; 6 : 138-143

Key words: amygdala, cAMP-induced chemical kindling, electrical kindling, transfer of chemical to electrical kindling, EDTA.

はじめに

Goddard⁷⁾ により紹介された kindling は, 今日最も有用なてんかんモデルのひとつとみなされている。そこでは, partial symptom から始まり全身けいれんに至る過程が観察され, いったん全身けいれんに至るとけいれん感受性は長期にわたって維持される^{7,18,19)}。この kindling の物質的背景については種々の検討が加えられ, catecholamine¹²⁾ や γ -aminobutyric acid (GABA)³⁾ などの抑制性伝達物質系の脱抑制や興奮性アミノ酸¹⁶⁾ などの興奮性伝達物質系の機能促進が明らかにされている。

当教室ではかねてより, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) や cyclic guanosine 3',5'-monophosphate (cGMP) などの環状ヌクレオ

チドに着目し, ラットや家兎の扁桃核 (AM) kindling 後には 2 週間から 30 日間を経ても脳内の cAMP や cGMP が有意に上昇していることを明らかにしてきた^{13,14)}。更に, われわれはこれらの誘導体である db-cAMP や db-cGMP の AM 注入により AM kindling けいれんと同様の全身けいれんが誘発され, その効果は db-cAMP においてより強力であることを明らかにしてきた⁹⁾。これらの結果から, われわれは cAMP と cGMP は AM kindling のけいれん感受性の維持に関与し, ことに, cAMP の役割が重要であろうと結論した。しかし cAMP の発作進展への関与については今後の課題として残されていた。

chemical kindling はこの問題を解決するうえで極めて有用な手段である^{4,20,21)}。しかし, Wasterlain²²⁾ によって示されたように, db-cAMP の

* 福島県立医科大学神経精神医学

[〒960-12 福島市光が丘 1]

Noboru Yokoyama

Department of Neuropsychiatry, Fukushima Medical College, Fukushima, Japan

1988年3月14日受理

反復注入によっては kindling の完成 をみることができない。その理由は、われわれが明らかにしたようにこの物質が注入部位にかなり強い neuronal damage を誘発するために、次回の db-cAMP の注入に反応しなくなるためであろうと考えられる。

一方、cAMP そのものは細胞膜を通過しにくく、かつ、phosphodiesterase によって直ちに分解されるために脳内に投与しても十分な効果は発揮されないとされてきた⁶⁾。しかし、われわれは予備実験において、cAMP のラット AM への1回注入により、容量依存性にてんかん発作が誘発され、その作用は cAMP の分解酵素、すなわち、phosphodiesterase に対して阻害作用をもつ ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA) により増強されること、しかも、db-cAMP とは異なり注入部位の neuronal damage をもたらさないことを明らかにした。そこで本研究では、cAMP の subconvulsive dose の反復注入により chemical kindling の作製を試み (cAMP kindling)、EDTA を併用したときのそれ (cAMP-EDTA kindling) と比較した。更に、chemical kindling 後の electrical kindling への transfer についても検討した。

実験方法

1. 実験動物と電極植え込み手術

Wistar 系雄性ラット (体重 200~250 g) 30匹を用いた。Nembutal 麻酔下 (40 mg/kg, i.p.) に、左側 AM に 23-G の stainless tube よりなる guide cannula を留置した。guide cannula の外壁には直径 0.2 mm のニクロム線より作製した脳波記録用の双極電極を、その先端が guide cannula の先端より 1 mm 下方に位置するようにアロンアルファで接着した。両側の感覚運動領皮質の硬膜上にはビス電極をおき、前頭洞においたビス電極を不関電極とした。guide cannula および電極はデンタルセメントで頭蓋骨上に固定した。術後7日間以上の回復期間をおいて実験に供した。

2. chemical kindling と electrical kindling

cAMP として cAMP-Na (Sigma) を用いた。cAMP kindling には生理食塩水を、cAMP-EDTA kindling には NaCl (40 mM)、L-histidine (8

mM)、TES (8 mM)、EDTA (0.4 mM) を組成とする buffer solution を vehicle として用いた。いずれの場合にも 66.7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度で cAMP を溶解した。これらの溶解液を2日に1回の割合で、1分以上かけて左側 AM にマイクロシリンジで注入した。脳波と行動の観察は3時間にわたって行った。electrical kindling は 100 μA step で計測した後発射の閾値強度 (ADT, 60 Hz, 矩形波, 1 sec 刺激) を1日1回左側 AM に加えて作製した。chemical および、electrical kindling の発作進展は Racine¹⁷⁾ に基づき次の5段階に分類した。Stage 1, Mouth and facial movements; Stage 2, Head nodding; Stage 3, Forelimb clonus; Stage 4, Rearing; Stage 5, Falling.

3. 組織学的検索

実験終了後、すべてのラットの脳を Nembutal 深麻酔下に生理食塩水と10%ホルマリン溶液で灌流固定し、凍結切片を作製してクレシルバイオレット染色を行い、注入部位を中心に光顕的検索を行った。その結果、すべての guide cannula と電極は意図した部位に位置していた。また、注入部位の左側 AM には明らかな neuronal damage は認められなかった。

実験1 chemical kindling

(1) cAMP kindling : 実験動物として15匹を用い、cAMP 100群 (N=5)、cAMP 200群 (N=5)、Vehicle 群 (N=5) の3群に分けた。cAMP 100群には cAMP 100 $\mu\text{g}/0.15 \mu\text{l}$ を、cAMP 200群には cAMP 200 $\mu\text{g}/0.3 \mu\text{l}$ を、Vehicle 群には生理食塩水 0.3 μl を左側 AM に注入した。

(2) cAMP-EDTA kindling : 実験動物として15匹のラットを用い、cAMP 100-E群 (N=5)、cAMP 200-E 群 (N=5)、Vehicle-E 群 (N=5) の3群に分けた。cAMP 100-E 群、cAMP 200-E 群にはそれぞれ前述の EDTA を含む buffer solution に溶解した cAMP 100 $\mu\text{g}/0.15 \mu\text{l}$ 、および cAMP 200 $\mu\text{g}/0.3 \mu\text{l}$ を左側 AM に注入した。Vehicle-E 群には buffer solution 0.3 μl のみを注入した。

結果

(1) cAMP kindling

cAMP 100群のいずれの動物においても、初回注入時には脳波および行動上の変化は認められな

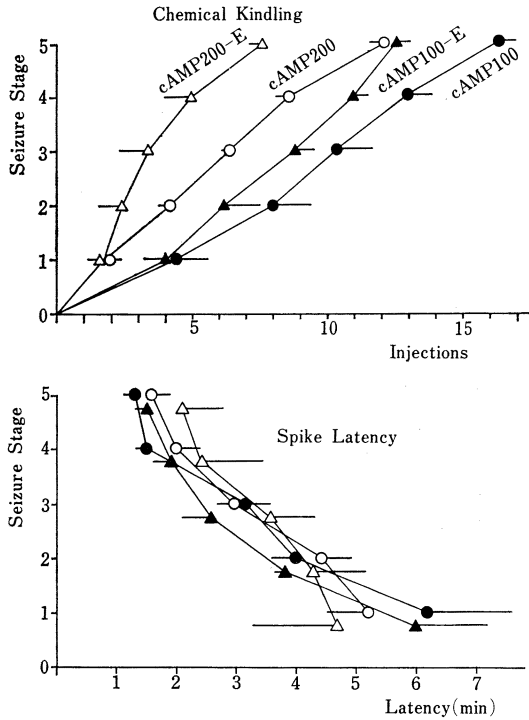


Fig. 1 TOP-Rate of chemical kindling

The values are mean \pm S.E.M. Chemical kindling was accomplished by repeated spaced intra-AM injections of cAMP 100 μ g (closed circles), cAMP 200 μ g (open circles), cAMP 100 μ g combined with EDTA (closed triangles), and cAMP 200 μ g combined with EDTA (open triangles). The abscissa indicates the number of drug injections required to evoke the first seizure of the class specified on the ordinate.

BOTTOM-Latency for the spike onset.

The values are mean \pm S.E.M. Symbols are the same as in the TOP. The abscissa indicates the latency for the spike onset at the first seizure of the class specified on the ordinate.

かった。cAMP 200群では1/5例に、注入約15分後に注入側 AM に限局した散発性棘波が出現したが、明らかな発作症状は認められなかった。

cAMP 100群と cAMP 200群のすべての動物に反復投与により棘波群発がみられるようになり、それに伴って発作症状の進展が認められた。cAMP 100群と cAMP 200群はそれぞれ16.4回、12.2回で初回の Stage 5 に達した (Fig. 1. TOP)。すなわち、cAMP 200群は cAMP 100群に比し有意に発作の進展が促進された ($p < 0.01$, Table

Table 1 Rate of chemical kindling

Values are mean \pm S.E.M. Numbers in Parentheses = range.

Group	N	Injections to the first Stage 5 seizure
cAMP 100	5	*-16.4 \pm 0.6 (15-18) *
cAMP 200	5	-12.2 \pm 0.6 (10-14) *
cAMP 100-E	5	*-12.6 \pm 0.5 (11-14) *
cAMP 200-E	5	-7.6 \pm 1.0 (6-9)

* $P < 0.01$ by Student's t-test.

1)。発作進展過程は、cAMP 100, cAMP 200 の両群において electrical kindling と同様のものであった。cAMP 100群および cAMP 200群のいずれにおいても、反復投与により、棘波群発が出現するまでの潜時の短縮が認められた (Fig. 1. BOTTOM)。Vehicle 群では15回以上の注入を繰り返しても、脳波および行動上の変化は認められなかった。

(2) cAMP-EDTA kindling

cAMP 100-E 群では初回投与時に、2/5例に注入約5分後から約15分後にかけて左側 AM に限局した散発性棘波を認め、そのうちの1例は Stage 1 の発作症状を示した。残りの3/5例では脳波および行動上の変化は認められなかった。cAMP 200-E 群では初回注入時、3/5例に注入約3分後に左側 AM に限局した棘波群発が認められ、そのうちの1例は Stage 3 を、2例は Stage 1 の発作症状を示した。しかし、残りの2/5例には脳波と行動の変化は認められなかった。

cAMP 100-E 群と cAMP 200-E 群では反復注入により発作症状の進展が認められ、最初の Stage 5 にそれぞれ12.6回、7.6回で達した (Fig. 1. TOP)。すなわち、cAMP 200-E 群は cAMP 100-E 群に比し有意に発作進展が促進された ($p < 0.01$, Table 1)。cAMP 100-E 群および cAMP 200-E 群のいずれにおいても、棘波群発までの潜時は反復投与によって短縮された (Fig. 1. BOTTOM)。Vehicle-E 群では15回以上の注入を繰り返しても脳波と行動の変化は認められなかった。

(3) cAMP kindling と cAMP-EDTA kindling

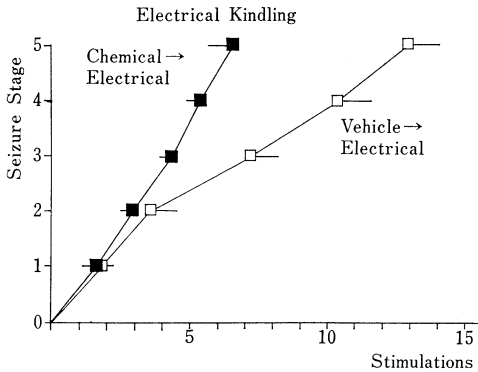


Fig. 2 Transfer of chemical to electrical kindling
Values are mean \pm S.E.M. The abscissa indicates the first seizure of the class specified on the ordinate.

間の比較

cAMP 100-E 群の発作進展は cAMP 100 群より有意に早く ($p < 0.01$, Table 1), cAMP 200-E 群と cAMP 200 群の間の発作進展についても有意の差を認めた ($p < 0.01$, Table 1)。このように EDTA の併用により cAMP kindling の形成が有意に促進された。

実験 2 chemical kindling から electrical kindling への transfer

実験 1 で用いた cAMP 200 群のうちの 3 匹, cAMP 200-E 群のうちの 2 匹を用い, Stage 5 が 3 回連続繰り返された後, 1 週間の休止期をおいて左側 AM の electrical kindling を行った。Control 群には実験 1 の Vehicle 群 5 匹を用い, 同様に electrical kindling を行った。

結果

結果を Fig. 2 および Table 2 に要約した。cAMP 200 群と cAMP 200-E 群では最初の Stage 5 にそれぞれ 6.7 回, 6.0 回で達し, 両者をあわせた平均は 6.6 回であった。これに対し, Control 群では 13.0 回の電気刺激を要した。このように, chemical kindling 後には electrical kindling の発作進展が有意に促進された ($p < 0.01$, Table 2)。

考 察

本研究において, ラットの AM に cAMP の subconvulsive dose を反復注入すると chemical kindling が可能であることが示された。この che-

Table 2 Transfer of chemical to electrical kindling

Values are mean \pm S.E.M. Numbers in Parentheses = range.

Group	N	Times to the Stage 5 seizure	
		Chemical	Electrical
Chemical	5	10.8 \pm 1.0 (8-13)	6.6 \pm 0.4 (6-8) *
Vehicle	5	(Saline)	13.0 \pm 2.3 (11-17)

The chemical group animals came from cAMP 200 and cAMP 200-E groups, i.e., 3 from cAMP 200 and 2 from cAMP 200-E, respectively. Vehicle group animals, which had received saline, were employed as controls.

* $P < 0.01$ by Student's t-test.

mical kindling は容量依存性に促進され, しかも, EDTA の併用はそれを更に促進した。

cAMP は種々の神経伝達物質の second messenger として細胞内の情報伝達にあずかり^{2,8)}, 興奮性の生理作用をもつことが確認されている^{11,15)}。そして, cAMP の分解酵素である phosphodiesterase は神経細胞内に限局して存在し⁵⁾, EDTA はこの phosphodiesterase に対し強い阻害作用を有することが知られている¹⁾。本研究でみられた結果は, cAMP と EDTA がもつこれらの薬理作用と矛盾するものではない。したがって, 脳内, すなわち, 細胞外に投与された cAMP は細胞内に移行し, EDTA は細胞内でその分解を阻害したと考えるのが妥当であろう。

cAMP の誘導體である db-cAMP は強い cAMP 様作用を有し, 脳内に注入するとてんかん性の変化が惹起されることが知られている⁶⁾。ことに, ラットの AM に注入すると electrical kindling と同様の全身けいれんが誘発される^{9,10,22)}。しかし, Wasterlain²²⁾ によって示されたように, db-cAMP の subconvulsive dose をラットの AM に反復注入しても kindling 効果は得られない。このことは, 本実験に先立つ予備実験においてわれわれも確認した (未発表)。すでに当教室の板垣⁹⁾が報告したように, db-cAMP は興奮作用とともに神経毒作用をもち, 注入部位の neuronal damage を誘発する。恐らくはこのことのために,

db-cAMP によっては chemical kindling の完成をみることができなかったと考えられる。

db-cAMP とは対照的に cAMP では chemical kindling が可能であり、しかも注入部位には明らかな neuronal damage を認めなかった。したがって、注入部位に neuronal damage のないことが cAMP による chemical kindling の成立を理解するうえで重要と考えられる。cAMP の反復注入は、electrical kindling と同様の漸次進行的な発作進展と棘波群発出現までの潜時の短縮をもたらした。これらのことから、cAMP の反復注入は electrical kindling と同様の transsynaptic change⁷⁾ と注入部位の neuron の興奮性の増大をもたらしたと理解することができよう。そして、chemical kindling 後には electrical kindling が有意に促進されたという事実は、cAMP の反復注入により形成された transsynaptic change と AM の neuron の興奮性の増大は電気刺激にも応ずるものであることを示している。以上のことから、AM electrical kindling の発作進展には AM の cAMP が関与していることが示唆される。

先にわれわれはラットや家兎の AM kindling 後には AM や関連脳部位の cAMP の持続的増加が認められることを報告した^{13,14)}。この先のわれわれの結果と本研究の結果から、AM の cAMP は、AM kindling の発作進展とけいれん感受性の維持に重要な役割を果たしていることが示唆される。

ま と め

cAMP の subconvulsive dose をラットの扁桃核 (AM) に反復注入し chemical kindling の作製を試み、cAMP の分解酵素阻害剤である EDTA を併用した場合と比較した。更に、chemical kindling 後の electrical kindling への transfer についても検討し、次の結果を得た。

1) ラットの AM に cAMP の subconvulsive dose を反復注入すると electrical kindling と同様の発作進展が認められた。この chemical kindling は容量依存性に促進され、更に cAMP 分解酵素阻害剤である EDTA の併用によりその発作進展は有意に促進された。

2) chemical kindling の完成したすべてのラ

ットにおいて、注入部位である AM に明らかな neuronal damage を認めなかった。

3) chemical kindling 完成後には electrical kindling の発作進展が有意に促進された。

以上の結果から、cAMP とけいれんとの関係について考察し、cAMP が AM kindling の発作進展とけいれん感受性の維持に重要な役割を果たしていることを示唆した。

謝辞：稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜りました熊代永教授に謹んで感謝の意を表します。また、本研究の実施にあたり直接の御指導をいただきました当教室の森則夫医博をはじめ、御協力いただきました同僚の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

なお、本研究の一部は第18回日本てんかん学会1984、宇都宮、アメリカてんかん・脳波合同学会1986、シアトル、において発表した。

文 献

- 1) Appleman MM, Thompson WJ, Russell TR. Cyclic nucleotide phosphodiesterases. In: Greengard P, Robinson GA, eds. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* vol 3. New York: Raven Press, **1973**; 65-93.
- 2) Bartfai T. Cyclic nucleotides in the central nervous system. In: Horecker BL, Chock PB, eds. *Current Topics in Cellular Regulation.* vol 16. New York: Academic Press, **1980**; 225-269.
- 3) Burnham WM, Racine RJ, Okazaki MO. Kindling mechanisms: II. Biochemical studies. In: Wada JA, ed. *Kindling 3.* New York: Raven Press, **1986**; 283-299.
- 4) Cain DP. Bidirectional transfer of electrical and carbachol kindling. *Brain Res* **1983**; 260: 135-138.
- 5) Florendo NT, Barnet RJ, Greengard D. Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase: Cytochemical localization in cerebral cortex. *Science* **1971**; 173: 745-747.
- 6) Gessa GL, Krishna G, Forn J, et al. Behavioral and vegetative effects produced by dibutylrlyl cyclic AMP injected into different areas of the brain. *Adv Biochem Pharmac* **1970**; 3: 371-381.
- 7) Goddard GV, McIntyre DC, Leech CK. A permanent changes in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp Neurol* **1969**;

- 5: 295-330.
- 8) Greengard P. Possible role for cyclic nucleotides and phosphorylated membrane proteins in postsynaptic actions of neurotransmitters. *Nature* **1976**; 260: 101-108.
 - 9) Itagaki S. Experimental seizure model induced by dibutyl derivatives of cyclic nucleotides. *J Jpn Epil Soc* **1983**; 1: 88-98.
 - 10) Kuriyama K, Kakita K. Cholera toxin induced epileptogenic focus: An animal model for studying roles of cyclic AMP in the establishment of epilepsy. In: *Neurochemistry and Clinical Neurology*. New York: Alan R Liss Inc, **1980**; 141-155.
 - 11) Libet B, Kobayashi H, Tanaka T. Synaptic coupling into the production and storage of a neuronal memory trace. *Nature* **1975**; 258: 155-157.
 - 12) McIntyre DC. Catecholamine involvement in amygdala kindling of the rat. In: Wada JA, ed. *Kindling 2*. New York: Raven Press, **1981**; 67-85.
 - 13) Mori N. Long-lasting increase of regional cAMP and cGMP in amygdaloid kindled rat brain. *J Jpn Epi Soc* **1983**; 1: 79-87.
 - 14) Nikkuni S. Seizure susceptibility and cyclic nucleotides in amygdaloid kindled rabbits. *Fukushima J Med Sci* **1982**; 32: 37-49.
 - 15) Onozuka M, Kishi K, Furuichi H, et al. Behavior of intracellular cyclic nucleotide and calcium in pentylentetrazole-induced bursting activity in snail neurons. *Brain Res* **1983**; 269: 277-286.
 - 16) Peterson DW, Collins JF, Bradford HF. The kindled amygdala model of epilepsy: anticonvulsant action of amino acid antagonists. *Brain Res* **1983**; 275: 169-172.
 - 17) Racine R, Okujava V, Chipashvili S. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroenceph Clin Neurophysiol* **1972**; 32: 295-299.
 - 18) Sato M, Wada JA. Review on the kindling preparation: A new experimental model of epilepsy. *Brain and Nerve* **1975**; 27: 257-276.
 - 19) Wada JA, Sato M, Corcoran ME. Persistent seizure susceptibility and recurrent spontaneous seizure in kindled cats. *Epilepsia* **1974**; 15: 465-478.
 - 20) Wasterlain CG, Jonck V. Chemical kindling by muscarinic amygdaloid stimulation in the rat. *Brain Res* **1983**; 311-323.
 - 21) Wasterlain CG, Fairchild MD. Transfer between chemical and electrical kindling in the septal-hippocampal system. *Brain Res* **1985**; 331: 261-266.
 - 22) Wasterlain CG, Supulveda CA. The kindling phenomenon: a pharmacological approach. In: *The 10th International Congress of Electroencephalography and Clinical Neurophysiology, Symposes of Symposia and Workshops* **1981**: 102-103.

Summary

cAMP-induced Chemical Kindling and Transfer to Electrical Kindling

Noboru Yokoyama

Repeated spaced injection of an initially subconvulsive dose of cAMP into the rat amygdala (AM) produced progressive seizure development similar to electrical kindling. The chemical kindling was accomplished in a dose dependent manner. Furthermore, when combined with EDTA, an inhibitor of phosphodiesterase which catabolizes cAMP, the seizure development was remarkably facilitated. When the animals which had been chemically kindled were subjected to electrical kindling, very rapid seizure development was observed.

In the previous study, we have demonstrated that AM electrical kindling in rats or rabbits resulted in a sustained increase of cAMP in the AM and related brain areas. Taken together, it is suggested that cAMP is involved in both the seizure development and the maintenance of seizure susceptibility induced by AM electrical kindling.

J. Jpn. Epil. Soc. 1988; 6: 138-143