

キンドリングの刺激前後に於ける海馬内 γ -アミノ酪酸の放出量の 動態変化

植田 勇人、鶴 紀子
(宮崎医科大学 精神科)

UEDA, Y. AND TSURU, N. (Department of Psychiatry, Miyazaki Medical College, Kihara 5200, Kiyotake cho, Miyazaki, 889-16 Japan)

Sequential changes of extracellular γ -aminobutyric acid concentration before and after convulsion in the amygdaloid kindling rats

To measure the sequential changes of extracellular hippocampal γ -aminobutyric acid (GABA) concentration in brain dialysates during the development of the amygdaloid kindling in rats, we used a microdialysis procedure combined with a high performance liquid chromatography-electrochemical detection. Brain dialysates were collected every 5 min duration before and after stimulus from the bilateral ventral hippocampal in the two developing conditions consisted of stage 3 and five consecutive stage 5 (5*C-5) following kindling. Extracellular GABA levels were increased gradually and came to be plateau at 15-20 min lasting for several hours after stimulus. The enhancement of GABA level were 2.5-3.0 fold that of the baseline at 5*C-5, and while 1.5-2.0 fold increase at C-3. This result reveals that the amygdaloid kindling in rats was accompanied by a progressive, long-lasting, and stimulus-induced enhancement of extracellular GABA levels in the both hippocampi.

はじめに

キンドリングモデルにおいて、けいれん発作発展メカニズムや長期に持続するけいれん準備性獲得機序に対して、GABAの関与が注目されており [1] [6]、細胞外液 (シナプス間隙) 中の神経伝達物質の動態を検索する方法の一つであるマイクロダイアリーシス法 (MD) を用いて発作間歇期でのGABAの動態変化が主に研究されてきた [4] [10]。キンドリングの完成は24時間間隔で加えられる微弱電気刺激と漸増性に増強する発作の結果であることを考えると、発作間歇期のみではなくけいれん発作直後のGABAの動態変化を発作段階に分けて測定検討することが、キンドリングの神経化学的機序解明にとって重要な課題であると考えられる。そこで今回我々は、feed-forward trisynaptic excitatory chain等そのユニークな神経解剖学的特徴よりキンドリングの発展に重要な箇所であると考えられている海馬腹側部に注目し、同一ラットのキンドリング過程において部分発作と全汎発作に達した段階での刺激前後で、両側海馬腹側部内におけるGABAの動態を検討し、その動態変化がてんかん原性獲得にどのように関与しているのかを考察する。

実験方法

1) 実験動物及び処置: ペントバルビタール麻酔下、Wistar系雄性ラット8匹を使用し、刺激用兼記録用双極電極を右側扁桃体外側基底核 (Lambdaより6.0mm前方, 5.0mm右側方, 8.5mm頭蓋表面より下方) に、記録用単極電極を左扁桃体外側基底核 (Lambdaより6.0mm前方, 5.0mm左側方, 8.5mm頭蓋表面より下方) に、又MDに用いる2本のプローブ挿入用2.2Gガイドカニューレ先端が左右海馬腹側部表面に位置 (Bregmaより5.6mm後方, 5.0mm両側方, 3.0mm頭蓋表面より下方) するようにそれぞれ植え込み、デンタルセメントで固定した。2) Kindling: 術後一週間後にMDを用いて海馬腹側部内よりGABAの基礎値測定用のサンプルを回収し、測定時まで-70度にて保存した。その後直ちに後発射誘発閾値強度の電気刺激 (60 Hz, 200 μ A, 1 msec) の矩形波電流を右側扁桃体に植え込んだ双極電極を通じて、毎日2秒間、1日1回加えるというキンドリング操作を開始した。脳波の導出については両側扁桃体から深部脳波を記録し後発射の発展を観察した。キンドリング発展過程の観察にはRacineの五段階評価 [9] を行い、ステージ3に至った部分発作段階 (C-3) と5回連続してステージ5 (C-5) を迎えた発作段階 (5 * C-5) のけいれん持続時間 (PSD, GSD) を測定した。3) 微小透析 (MD) は基礎値測定のための初回刺激前と、ラットがRacineの分類でC-3に最初に到達した時点から24時間後に加える刺激前後と、C-5が4回連続した時点から24時間後の刺激前後で行った。ただし、初回C-3を迎え次回の刺激でステージが進行或いは退行しC-3を示さなかったものや、C-5が4回連続しても次回の刺激でC-5を示さずステージが後退したラットは実験群から除外した。今回行ったMDは中原ら [8] の方法に準じた。透析膜に長さ5mmのキュプロファン膜 (molecular weight cut off 7000-8000, Nikkiso, Japan) を使用し、灌流にはマイクロインフュージョンポンプを用い、2.0 μ l/minの速度でリンゲル液を刺激側海馬 (ipsilateral side) 及び対側海馬 (contralateral side) の腹側部を同時に灌流しはじめ、2時間の定常状態を設けた後、A灌流液の回収を行った。回収時期は、刺激10分前から刺激80分後までとし、間歇的に5分間の灌流液の回収を行い、回収液10 μ lをHPLC-ECD法によるGABA濃度測定に使用し、刺激後80分までのGABAの経時変化を追跡した。発作間歇期のGABA濃度の比較にはそれぞれの基礎値と初回C-3、4回目のC-5それぞれ最終発作から24時間後に行う刺激前の放出量を比較し検討した。4) GABA濃度測定; GABA濃度測定にはまずオーフタルアルデヒド (OPA) 誘導体化試薬2 μ lと試料10 μ lとを25℃にて2.5分間、反応させ誘導体化した後、直ちにODSカラム (Eicompak MA-5 ODS, 4.6 ϕ \times 150mm) を装着した高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に注入、電気化学検出器 (ECD; EICOM, Co. LTD, Japan) を用いて検出した。設定条件はECD印加電圧+700mV/Ag/AgCl、移動相としてpH3.5の0.05M NaH₂PO₄・2H₂O溶液500mlとメタノール500ml、EDTA・2Na5mgをよく混合したものを用い、1.0ml/minの流速で測定した。OPA誘導体化試薬の作成はOPA 13.5mgと2-メルカプトエタノール10 μ lを、10%のエタノールを含んだ0.1Mの炭酸バッファー2.5mlに溶解したものを使用した。5) 統計処理: GABAの経時変化についての統計処理はSTAGE (C-3, 5 * C-5), SIDE (ipsi-, contra-), TIME COURSEの3つの要因について3-way ANOVA followed by Tukey testを用い、基礎値と各発作段階の刺激前値即ち発作間歇期に於けるGABA濃度の比較についてはMann-Whitney U-testをもちいた。

実験結果

キンドリング発展過程でC-3に必要な刺激回数は7.63 \pm 1.11回 (平均 \pm 標準偏差)、5 * C-5には17.13 \pm 1.54回の

INTERICTAL GABA OVERFLOW

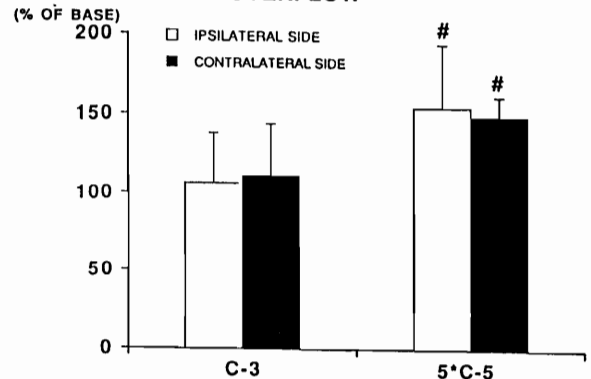


Fig. 1 *P < 0.01 vs. baseline overflow

刺激回数を要した。又、PSDは 25.8 ± 6.9 秒、GSDは 48.7 ± 4.3 秒であった。キンドリング初回刺激前のGABA濃度はipsi-で 0.12 ± 0.04 、contra-では $0.09 \pm 0.05 \mu M$ であった。GABAとも基礎値にはipsi-とcontra-間で左右差を認めなかった。各発作段階のけいれん発作より24時間後の発作間歇期に於けるGABAの変化をFig.1に示す。部分発作では両側とも基礎値との間に有意差を認めなかったが、全汎発作では約150%前後と有意な上昇率を認めた。発作前後急性期のGABAの経時変化についてであるが (Fig. 2)、C-3、5 * C-5 両段階ともにipsi-とcontra-の間にGABAの動態パターンに有意な変化は認めなかった (SIDE EFFECT: $F 1,136 = 0.697$, n.s.) が、刺激後より徐々に増大し、(TIME EFFECT: $F 8,136 = 33.768$, $P = 0.0001$) 始め約15分~20分後には定常状態に達し、刺激後80分まで有意な変化を示さなかった。定常状態におけるGABAの放出は、5 * C-5時が両側とも約270%前後でC-3時の約200%前後の放出量を上回っていた (STAGE EFFECT: $F 1,136 = 84.490$, $P = 0.0001$)。

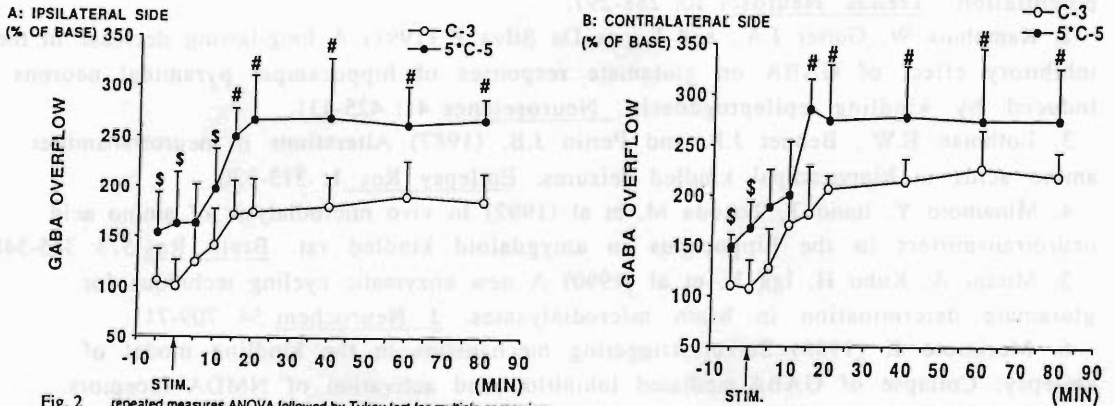


Fig. 2 repeated measures ANOVA followed by Tukey test for multiple comparison * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared to the corresponding value of C-3

考察

Glutamateは脳内に高濃度に存在する興奮性神経伝達物質として知られ、その受容体であるNMDA受容体の活性化は、すでに興奮性シナプス伝達効率の亢進と発作の全汎化との直接的関与が指摘されており、一方抑制性伝達物質であるGABA受容体の機能低下がけいれん準備状態の維持機構として注目され、これら興奮系と抑制系との間の不均衡バランスがてんかん原性焦点の形成とキンドリング発作発現に深く関与していると考えられる [6]。しかしながらNMDA受容体の賦活がGABA受容体の機能を修飾するといった昨今の報告 [10] にみるように、これら興奮系の賦活化と抑制系の機能低下とがまったく独立して起るのではなく、興奮系と抑制系との間の相互作用が存在すると推測できる。GABAの動態変化では、キンドリング初期段階、少なくとも部分発作段階 (C-3) でのキンドリング刺激はGABA濃度が基礎値の状態に加えられているのに対して、キンドリング後半段階では、もはや細胞外液GABA濃度が完全に基礎値に回復していない状態で、さらに電気刺激が反復して加えられていることを意味する (Fig. 2)。即ち、24時間間隔で脳の一定部位に加えられる微弱電気刺激は、GABAの細胞外液濃度を徐々に上昇せしめ、ついにはその連続する刺激過程で細胞外液GABA濃度が不可逆的に基礎値に回復しない状態を招来するものと思われる。GABAが刺激後長期持続性の濃度上昇を示す原因として刺激によって細胞内に流入するCa++により活性化されるカルモジュリンによってGABA代謝にかかわる酵素が不可逆的な障害を受けることやGABA-REUPTAKEの低下等の関与が推測される。

こうしたGABAの動態はキンドリング初期段階では発作症状を抑止するという一過性の代償機構とし

て作用するとも考えられる。しかしながらキンドリング発展過程で徐々にNMDA受容体が賦活化されるにしたがって、GABAによる発作の抑止能力も徐々に減弱し、逆にキンドリング後半段階ではオートラジオグラム法やpaired pulse inhibitionで指摘されているようなDOWN-REGULATION、DESENSITIZATIONといったGABA受容体の機能低下がglutamatergic neuronの脱分極性亢進に影響を及ぼすものと考えた。この過程で漸増性に興奮性シナプス伝達効率の増強がもたらされる結果、まず扁桃体・海馬等の辺縁系内に強力なepileptic circuitが形成される一方で、他の脳部位においても同様なメカニズム即ち興奮系と抑制系の不均衡が進行し、辺縁系間との間に興奮性シナプス伝達の亢進を主体とする経シナプス変化が生じ可塑的变化としてのキンドリング完成に結びつく結論した。

文献

1. Collingridge G.L. and Bliss T.V.P. (1987) NMDA receptors - their role in long-term potentiation. Trends Neurosci 10: 288-297.
2. Kamphuis W, Gorter J.A., and Lopes Da Silva F (1991) A long-lasting decrease in the inhibitory effect of GABA on glutamate responses of hippocampal pyramidal neurons induced by kindling epileptogenesis. Neuroscience 41: 425-431.
3. Lothman E.W., Bennet J.P. and Perlin J.B. (1987) Alterations in neurotransmitter amino acids in hippocampal kindled seizures. Epilepsy Res 1: 313-320.
4. Minamoto Y, Itano T, Tokuda M, et al (1992) In vivo microdialysis of amino acid neurotransmitters in the hippocampus in amygdaloid kindled rat. Brain Res 573: 345-348.
5. Mitani A, Kubo H, Iga K, et al (1990) A new enzymatic cycling technique for glutamate determination in brain microdialysates. J Neurochem 54: 709-711.
6. Morimoto K (1989) Seizure-triggering mechanisms in the kindling model of epilepsy: Collapse of GABA-mediated inhibition and activation of NMDA receptors. Neurosci Biobehav Rev 13: 253-260.
7. Nakase H, Tada T, Eguchi T, et al (1992) Sequential changes in content of excitatory amino acids in the focus epilepsy in seizure induction. Jpn J Psychiatry Neurol 45: 495-497.
8. Nakahara D, Ozaki N, Miura Y, et al (1989) Increased dopamine and serotonin metabolism in rat nucleus accumbens produced by intracranial self-stimulation of medial forebrain bundle as measured by in vivo microdialysis. Brain Res 495: 178-181.
9. Racine, R.J. (1972) Modification of seizure activity by electrical stimulation. Motor seizure. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 32: 281-294.
10. Stelzer A, Slater NT and Bruggencate GT (1987) Activation of NMDA receptors blocks GABAergic inhibition in an in vitro model of epilepsy. Nature 326: 698-701.
11. Zhang W.Q., Hudson P.M., Sobotka T.J., et al (1991) Extracellular concentrations of amino acid transmitters in ventral hippocampus during and after the development of kindling. Brain Res 540: 315-318.