

モルモット海馬スライスにおける シナプス結合とてんかん波の関係

緒方 元気

目次

第1章 序論	1
第1節 緒言	3
第2節 海馬の位置と構造.....	5
第3節 海馬の機能	6
第4節 シナプス長期増強 (LONG-TERM POTENTIATION)	7
第5節 脳内神経振動現象.....	10
第6節 てんかん	11
第7節 ビキュキュリン誘導てんかんモデル	12
第8節 てんかんと CAMKII	13
第9節 電気的神経リズム現象と細胞内分子メカニズム	16
第10節 本研究の目的.....	17
第2章 実験方法	19
第1節 人工脳脊髄液 (ACSF: ARTIFICIAL CEREBROSPINAL FLUID).....	21
第2節 海馬スライス標本作成法	21
第3節 海馬スライス電場電位測定	23
第4節 BLIND ホールセルパッチクランプ記録.....	25
第5節 記録電極及び刺激電極の作成方法.....	25
第6節 使用薬品・投与方法	26
第7節 データ解析	27
第3章 実験結果	29
第1節 モルモット海馬スライスにおけるビキュキュリン誘導てんかん波に 対するシナプス可塑性の役割.....	31
第1項 ビキュキュリン誘導てんかん波 bicuculline-induced epileptic discharges (BIED).....	31
第2項 てんかん波の発生源	33
第3項 AMPA 受容体とギャップ結合の活性化が BIED 誘導に必要な	34
第4項 BIED 誘導時のシナプス増強は AP5 または KN-93 によって阻害され る.	37
第5項 BIED に対する NMDA 受容体活性化の効果	38
第6項 BIED 周波数に対する CaMKII 活性化の効果.....	42
第7項 AMPA 受容体を介したシナプス伝達が BIED 周波数と周期性を調節 する	46
第2節 海馬錐体細胞 GIANT EPSP パターン依存的な神経同期過程.....	48
第1項 ビキュキュリン誘導てんかん波と giant EPSP.....	48
第2項 Giant EPSP の形はてんかん波の過渡期を調節する.....	51
第4章 考察	57

第1節	ギャップ結合と AMPA 受容体を介したシナプス伝達は BIED 誘導に必要	59
第2節	BIED の発生は NMDA 受容体と CAMKII 依存的シナプス増強を伴う.	60
第3節	シナプス増強は BIED の周波数上昇と周期的な発火に必要.	61
第4節	てんかん発生メカニズムとシナプス増強	62
第5節	シナプス増強による BIED 周波数調節機構	65
第6節	GIANT EPSP 依存的な神経同期過程.....	68
第5章	結語.....	71
謝辞.....		76
参考文献.....		77

第1章 序論

第1節 緒言

脳は、無数の神経細胞の複雑なネットワークを活用して情報処理を行っている。これら神経ネットワークでは、神経細胞の同期的自発活動である電気的な振動現象(神経リズム)が観察される。近年、脳内神経リズムが脳内情報処理の機能として重要な役割を持っている事がわかってきた。また一方で、脳疾患の一つであるてんかん発作のような異常な神経リズムが脳内で生じ、記憶過程のような正常な脳内情報処理を妨害する事がわかっている。このように脳内神経リズムは、生物に対して有益な性質と有害な性質を持っている。そのため神経リズム活動の研究は、脳内情報処理機構の理解ならびに、脳の異常活動が原因となる疾患を理解するうえで重要なテーマであると考えられる。

リズム生成には、神経細胞の電気的なネットワークが必要であり、また一つの神経細胞内にはタンパク質や DNA などの複雑な分子ネットワークが形成されている。脳神経ネットワークで生じる電気的な神経リズムによって、細胞内分子ネットワークが調節、活性化され、これら二つのネットワークが相互作用し脳内情報処理をしていると考えられる。そのため、脳神経ネットワークの神経リズム現象と細胞内分子ネットワークがどのように相互作用し脳として機能しているかを調べる事は非常に興味深いと考えられる。さらに、これら脳内で生じるリズム活動は、脳内神経ネットワークで自発的に生じる現象であり、どのように神経細胞が自発的に同期し神経リズム活動を生じているのか、あまり理解されていない。

記憶・学習に重要な脳器官である海馬では、記憶学習と関連のある θ リズムなどの機能的な神経リズムが観察される一方で、海馬は側頭葉てんかんの焦点となり、病的なてんかん波も生じる。てんかん患者数は、総人口の1~2%と言われており、非常に一般的で重篤な疾患である。その為に、これまで多くの研究がなされてきた。現在、てんかんが生じる主な原理は、脳内の興奮性と抑制性のバランス崩壊だと考えられている[1] (図 1-1)。つまり、てんかん発火は、何らかの原因による興奮性の異常上昇、または抑制性の減弱により生じると考えられている。てんかんの過剰興奮のモデルであるキンドリングてんかんモデルにおいては、シナプス長期増強がてんかん波の発生原因であると考えられている。しかし一方で、シナプス長期増強は、記憶・学習の基礎課程とも考えられている。そこで、生物はてんかん波発生の原因となると考えられている“シナプス長期増強”を記憶・学習に用いるという危険を犯すだろうか、疑問が生じた。つまり、記憶・学習が促進しても、すべての人がてんかんを発症するわけでは無いので、シナプス長期増強がてんかん波の根本原因だと考える事には、矛盾を感じたのが本研究の発端である。

以上のように、てんかん波の発生機構に関しては不明な点が多い。そこで本研究では、ビキュキュリン誘導てんかん波モデルを用いて、以下の点に着目し、てんかん波の発生機構を明らかにした。

1. てんかん波発生とシナプス結合性の関係.
2. てんかん波発生とシナプス可塑的变化の関係.
3. てんかん波発生とシナプス可塑的变化を誘導する細胞内分子ネットワークとの相互作用.
4. てんかん波発生と神経細胞同期過程の関係.

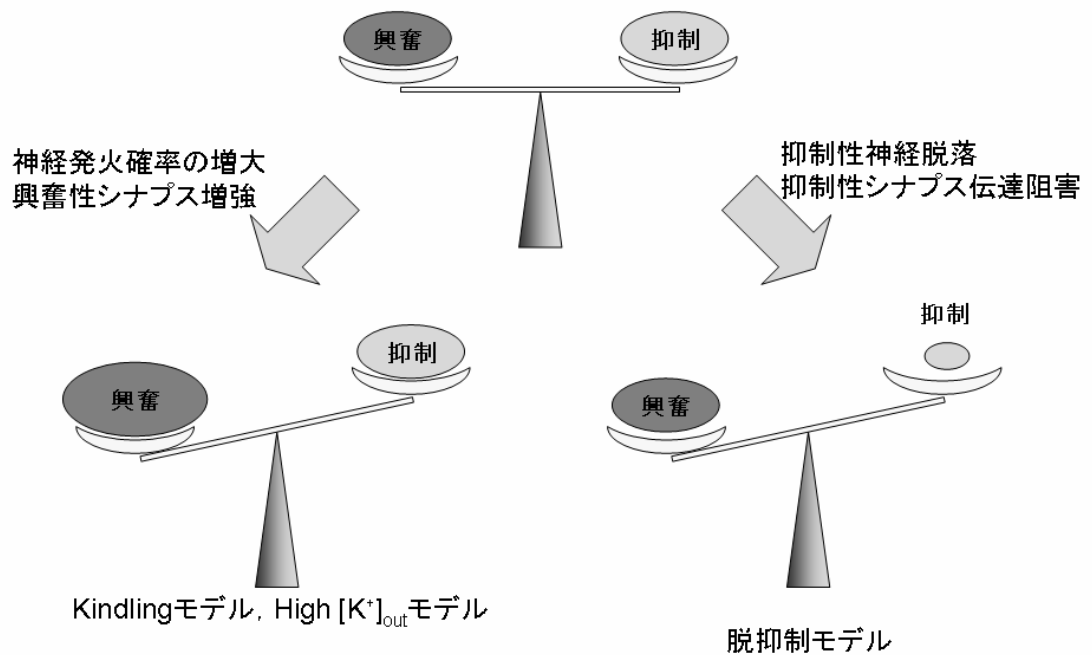


図 1-1. てんかん発生仮説 —バランス仮説—.

てんかんは、興奮性の活動が抑制性と比べ相対的に異常増大したときに、発生する。例えば、神経発火確率の増大や興奮性シナプス増強による、興奮性活動。または、抑制性神経の脱抑制や抑制性シナプス伝達阻害による抑制性活動の抑圧により、抑制性活動に対する、興奮性活動の相対的増大が生じると考えられている。

第2節 海馬の位置と構造

モルモットの海馬は、側頭葉内側部に位置しており(図 1-2A), 系統発生学的には、古い終脳(古皮質: archicortex)の主要な部分である。s

海馬を長軸に直角に輪切りにすると図 1-2B のようになっており、大小二つの馬蹄形が、その口を互いに噛み合わせたような形をとっている。小さな馬蹄形は、細胞体の形から顆粒細胞と名付けられ、歯状回(dentate gyrus; DG)を形成している。

大きい馬蹄形は、錐体細胞と呼ばれる神経細胞の集まりであり、アンモン角(Cornus Ammonis; CA)を形成している。アンモン角は、CA1~CA4の4つの領域に分かれている。CA4は歯状回の上刃と下刃に挟まれた領域で、これに続いて大型の錐体細胞で作られるCA3, CA2が続きCA1では小型の錐体細胞が密集し脳側室に面して並んでいる。

海馬は大脳皮質のさまざまな部位からの入力を受けるが、それらの入力は内嗅野を介する。内嗅野由来の神経入力である貫通枝は有髄軸索であり、CA1(図 1-2B.1), CA3(図 1-2B.2)錐体細胞の樹状突起先端部とDG顆粒細胞樹状突起(図 1-2B.3)にシナプス結合を作っている。

また、DG顆粒細胞の出力は無髄軸索で、苔状線維と呼ばれ、CA3, CA4錐体細胞の樹状突起起始部にシナプス結合(図 1-2B.4)を作っている。CA3, CA4の錐体細胞からの出力は有髄軸索で、海馬采を通過して海馬外へ出て行くが、その一部は途中で反回し、シャプファー側枝を形成している。シャプファー側枝は、CA2, CA1錐体細胞の樹状突起にシナプス(図 1-2B.5)を作っている。また、シャプファー側枝からCA3錐体細胞樹状突起部へ反回性側枝を伸ばし、反回性回路を形成(図 1-2B.6)している。CA1錐体細胞の出力の一部は、海馬台へ投射するが、海馬台を通過して嗅内野5層へ、または、海馬采を通過して海馬外へ出力される。以上のシナプスは全てグルタミン酸を伝達物質とする興奮性シナプスである。しかしながら、海馬内にはまた、抑制性神経があり、顆粒細胞や錐体細胞と抑制系ネットワークを形成している。抑制性神経は、 γ -アミノ酪酸(γ -aminobutyric acid; GABA)を伝達物質としている。抑制系ネットワークには2種類あり、顆粒・錐体神経細胞などの興奮性細胞と、順行性回路を形成しているものと(図 1-2B.7), 反回性の抑制性回路を形成しているものである(図 1-2B.8)。海馬内では、このような興奮性、抑制性神経からなる神経回路網が形成され、情報処理を行っていると考えられている。

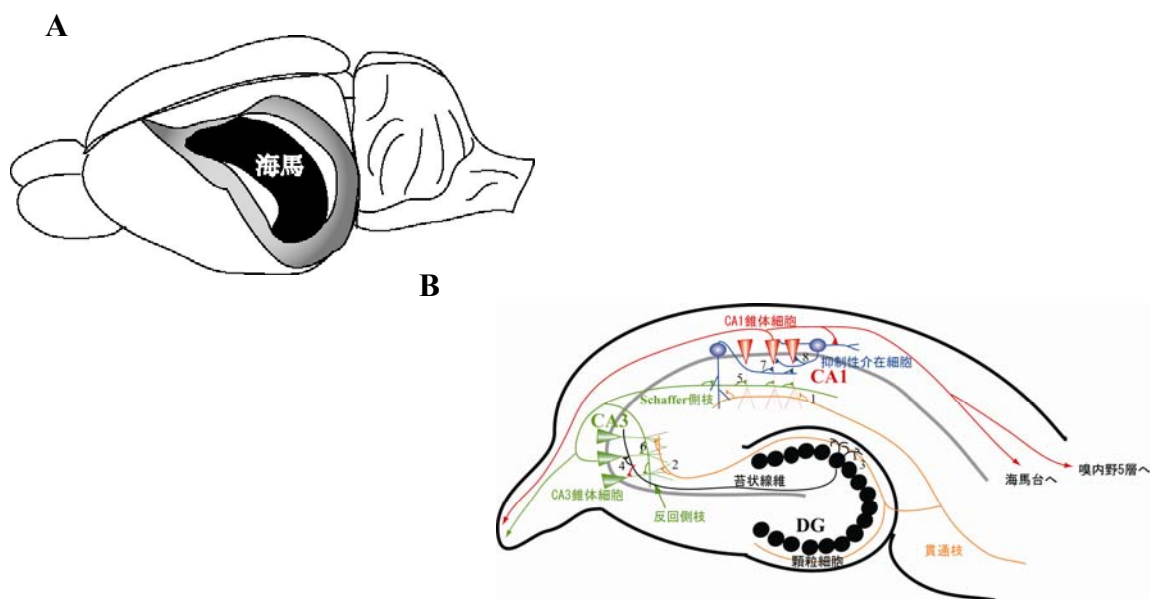


図 1-2. 海馬の位置と構造.

A. 脳内海馬の位置 B. 海馬の構造と主要な神経回路網(番号の詳細な説明は本文参照)

第3節 海馬の機能

海馬が、記憶・学習と関連していることが知られるようになったのは、難治性てんかん治療の為に、海馬を含む側頭葉内側部の一部(海馬の前2/3, 扁桃体, 海馬傍回)を除去手術された H.M という患者の研究がきっかけとなった[2]. H.M.は、てんかん治療のために 27 歳の時に手術を受けた. 術後、てんかんは、起こらなくなったが、重度の記憶障害が残った. 彼の知能へは特別影響が無く、過去の 10 から 20 代前半の記憶は残っていた. しかしながら、術後は、新しい記憶をほとんど覚えられない順行性健忘が見られた. ただ、非常に短い、数字を数分間覚えているような記憶能力は保たれていた. 従って海馬は、記憶学習に関連する器官であると考えられる. また、脳虚血により新しい事が覚えられない、順行性健忘を起こした患者 R.B.は、後の解剖検査により、海馬 CA1 錐体細胞にのみ細胞変性が見られた. しかし、扁桃体、視床背内側核、乳頭体、前脳基底部などには変性は、認められなかった[3]. このことは、海馬 CA1 の単独損傷のみによっても、長期記憶の形成に障害が生じる事を示唆している. さらに海馬が関連する記憶障害は、サルの子海馬体破壊実験でも確認されている. 例えば、遅延非見本合わせ課題をサルに学習させた後、海馬体の破壊を行うと成績がより大きく低下した[4]. しかし、

海馬体のみでは成績は低下せず、扁桃体[5]、海馬傍回、嗅周皮質等との同時破壊が必要であるという報告もある。このため、海馬体のみならず、その周辺部部位も含んだ広範囲なシステムが記憶に関わっている可能性もある。

海馬と記憶形成との関わりを調べるために、記憶課題の学習後、様々な経過時間で、サル、海馬体の破壊を行う実験によれば[6]、海馬体破壊手術をすると2~4週間前に学習した課題成績が悪く、以前の事を思い出せない逆行性健忘が生じていた。しかし、それ以上過去に学習した課題の成績は、手術前と同じであった。つまり、新しい記憶は海馬内に一定時間保持された後に、次第に他の部位へ長期記憶として移動するものと予想される。

さらに海馬は、場所・空間記憶とも大きく関係している部位だと考えられている[7]。空間地図情報を多く記憶しておく必要のある、ロンドンのタクシードライバーの海馬は、大きく発達しており[8]、道順を想起する際に、海馬が活動する事がfMRIで確認されている[9]。ラットの実験においても、海馬破壊により空間学習の低下が報告されている[10]。さらに海馬には特定の場所で応答する場所細胞が同定されている[11]。

以上の様なヒトの臨床症例、及びサル、ラットにおける海馬と記憶・学習の研究より、海馬は長期記憶を貯蔵しておく場所ではないが、中短期記憶の貯蔵部位であり、さらに空間記憶に重要な働きをしていると考えられている。

第4節 シナプス長期増強 (Long-term potentiation)

シナプスの可塑的变化により、シナプスの伝達効率が長期に増強される長期増強(long-term potentiation ; LTP)は、記憶・学習の基礎過程と考えられている。LTPは、海馬スライスでの実験においてテタヌス刺激(頻度が5~400 Hz, 持続時間~30secの刺激)や、 θ バースト刺激(例; 刺激が100 Hz, 5パルスの1バーストを、頻度5 Hzで4-5バースト刺激する刺激パターン(図 1-3))によって誘導されることが知られている。生体内海馬においても、 θ リズム発生中に自発的バースト発火が観察されるため、これにより、 θ バースト刺激によるLTP機構と同様な現象が、生体内でも起きていると考えられる。また、これらLTP機構の主因が、シナプス前細胞にあるもの、またはシナプス後細胞に在るものの2種類がある。海馬におけるシナプス前細胞主因のLTPは、苔状線維-CA3錐体細胞間シナプスで起こり、シナプス後細胞主因のLTPは、CA3錐体細胞-CA1錐体細胞間、CA3錐体細胞-CA3錐体細胞間のシナプスで観察される事が知られている[12, 13]。

シナプス前細胞型 LTP は、シナプス後細胞での NMDA (N-methyl-D-aspartate) 受容体(NMDAR)の活性化は必要なく、シナプス前終末の電位依存性 Ca^{2+} チャンネルまたは代謝型グルタミン酸受容体の活性化に伴う細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇により生じる。その結果、カルモジュリンを介して I 型アデニル酸シクラーゼが賦活化し、これにより産生した cAMP (cyclic adenosine 3':5'-monophosphate)がタンパクキナーゼ A (protein kinase A ; PKA)を活性化して、Rab3 タンパクを介しグルタミン酸の放出量を増大させるという機構が考えられている[14, 15]。これは、Rab3A ノックアウトマウスで、苔状線維-CA3 間シナプスでの LTP が消失する結果と一致している[16]。さらに、シナプス前細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は、また、 Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII), PKA の活性化を引き起こし、シナプス小胞をアクチン線維に結合させているシナプシン I をリン酸化する。リン酸化されたシナプシン I のアクチン線維に対する親和性は減少し[17]、アクチン線維からのシナプス小胞の遊離が起こる。そのような神経伝達物質放出に関係しているシナプシン I のノックアウトマウスでは、LTP 誘導に影響しない[18-20]。だが、実際に、LTP 誘導によりシナプシン I のリン酸化反応が亢進しているため[21]、シナプシン I リン酸化反応の LTP の増強度に関与している可能性は否定できない。さらに、自己リン酸化型 CaMKII は、シタキシニン IA とも結合し伝達物質放出を調節している[22]。シナプス前細胞における LTP では、最終的にはグルタミン酸放出量が増加すると考えられる。

一方、海馬における、シナプス後細胞型の LTP は、シナプス後細胞にある NMDAR に依存的な LTP であると考えられている。その LTP 誘導機構を、図 1-4 を用いて説明する。

海馬 CA3 錐体細胞-CA1 錐体細胞間、CA3 錐体細胞-CA3 錐体細胞間シナプスにおいて、シナプス前細胞から放出されたグルタミン酸は、AMPA(α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate)受容体(AMPA)に結合してシナプス後細胞を脱分極させ興奮性シナプス後電位 (excitatory synapse postsynaptic potential ; EPSP)を生じさせる。この時、NMDAR にグルタミン酸が結合しても、NMDAR チャンネルを介した Ca^{2+} の流入は起こらない。これは、NMDAR チャンネルが静止膜電位付近では Mg^{2+} によってブロックされているからである。そのため、シナプス後細胞の脱分極が小さいと、NMDAR を介した Ca^{2+} の流入は生じないと考えられる。しかしながら、テタヌス刺激や、 θ バースト刺激を与え、シナプス後細胞を非常に大きく脱分極させる事により、NMDAR の Mg^{2+} ブロックが外れ、NMDAR を介し Ca^{2+} 流入が生じる。この細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇により、カルシウム依存性プロテインキナーゼ (protein kinase C ; PKC), カルシウム依存性カルモジュリン (Ca^{2+} /calmodulin ; CaM)が活性化される。活性化された CaM は、CaMKII や CaMKIV などの CaM 依存性蛋白キナーゼを活性化する。活性化された CaMKII は、AMPA をリン酸化することにより活性化し、AMPA コンダクタンスを増大させる[23]。さらには細胞骨格系のリン酸化により AMPAR のシナプス後膜へ

の trafficking を引き起こす[24]. この結果, シナプス後細胞におけるシナプスコンダクタンスが増大し, EPSP の増強が生じる. さらに, CaMKII は, 2分子の CaM の結合により, CaM が外れても自己リン酸化が維持され, 長時間リン酸化による活性状態を保つ事が出来る. この為, 長時間にわたり AMPAR や NMDAR をリン酸化し, 受容体の活性を高めシナプス伝達効率の, 数時間にわたる増強を可能にしている. さらに細胞内 Ca^{2+} , PKC, CaM により調節を受けた MAPK (mitogen-activated protein kinase), CaMKIV は, 遺伝子発現に関与する転写調節因子である CREB (cAMP response element binding protein)をリン酸化し, LTP に関与する転写・翻訳を促進すると考えられている. この結果, 受容体や, 樹状突起スパイン部における関連蛋白の発現量増加により, 長期の LTP が生じていると考えられる.

PKC は, CaMKII 同様, NMDAR や AMPA などをリン酸化する他に, Ca^{2+} 活性化型カリウムチャンネルを不活性化することによって, 錐体細胞の発火後過分極電位が阻害し, 興奮性を増大させる[25].

以上のような, シナプス後細胞で生じる LTP には, NMDAR に依存した LTP 以外にも, 電位依存性 Ca^{2+} チャンネル(voltage-dependent Ca^{2+} channel; VDCC)に依存した機構[26], 代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)に依存した機構 [27] が存在する. NMDAR の阻害薬である AP5(D,L-2-amino-5-phosphonovalerate)を投与後, LTP を誘導する刺激(高頻度刺激や θ バースト刺激)を与えると, ゆっくりとした LTP が生成する. これは VDCC 阻害薬であるニフェジピンによって阻害されるため, VDCC 依存性 LTP と考えられる[26]. さらに, AP5 とニフェジピン投与下において, 最大刺激強度の θ バースト刺激を行うと, ゆっくりとした LTP が誘導された[27]. この LTP は, mGluR の阻害薬である MCPG によって阻害されたので, mGluR 依存性 LTP と考えられる.

前記した海馬内抑制性シナプスの抑制は, 上記 LTP 現象を増強する事が分かっている[28]. このため, 抑制性神経も, LTP 誘導の調節に関与していると考えられる.

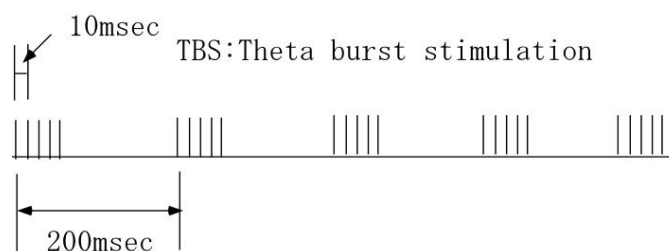


図 1-3. θ バースト刺激パターン

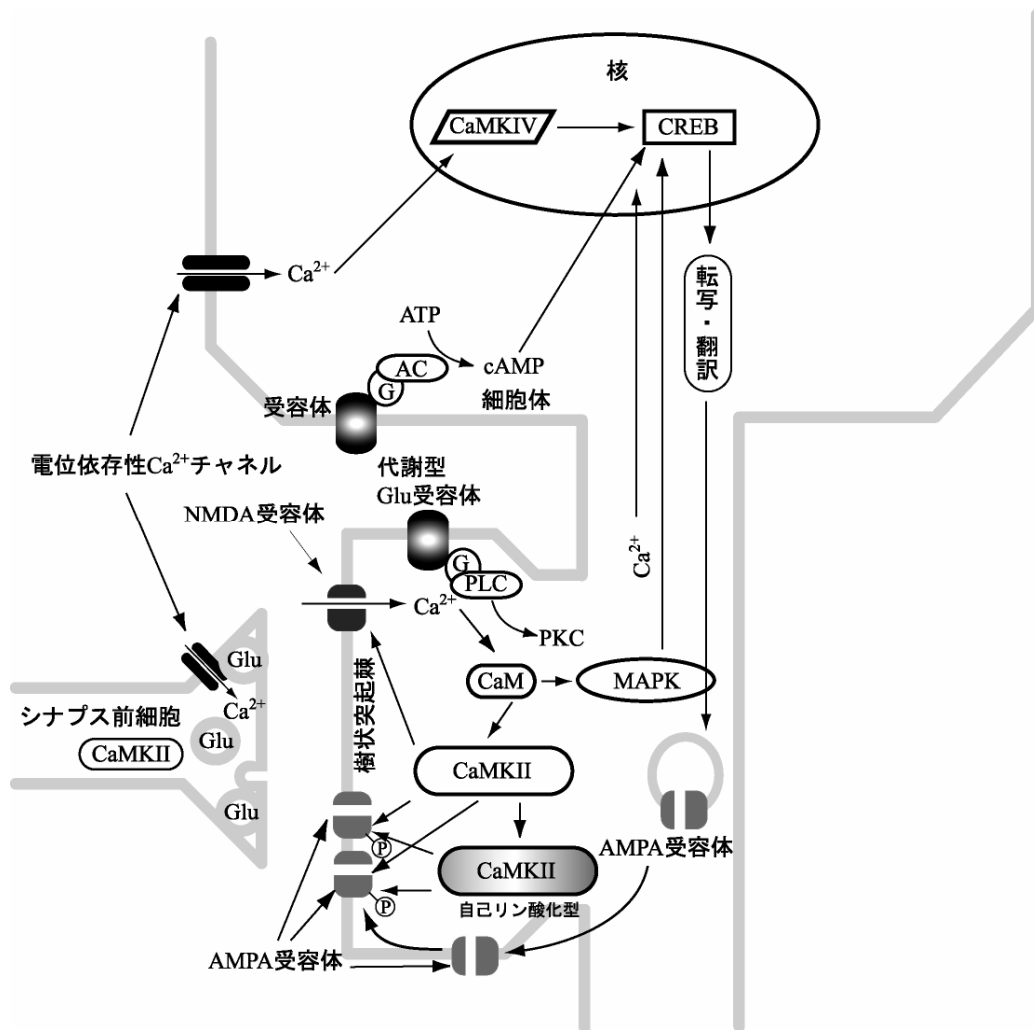


図 1-4. 海馬 LTP 誘導に關与する細胞内ネットワーク

第5節 脳内神経振動現象

脳内海馬からは、様々な周波数帯域の神経振動現象が観察される。一般的に、脳波(神経振動)は、脳神経の集合的な活動を表すものであり、生物の状態によって多様な振動現象が観察される。神経リズムは脳中枢神経の多くの部位で観測され、注意、視覚認識、学習過程等に関わっている[29-32]。さらに、神経リズム現象が、脳内情報処理にとってどのような機能的役割を担っているかを探る研究も、最近盛んに行われている。また、機能的な神経振動に対して病理的な神経リズムとして、てんかん発作時に現れる、発作波も観察される。

げっ歯類海馬における神経リズム活動は、3つの周波数帯域に分けられている。それらは、4-12Hzの θ 周波数帯、12-30Hzの β 周波数帯、 >30 Hzの γ 周波数帯であり、各々、 θ リズム、 β リズム、 γ リズムと呼ばれている。 θ リズムはこれらのリズムで一番良く研究されており、動物の行動や記憶・学習過程に関与していると考えられている[33]。記憶・学習に重要な海馬において、 θ リズムと記憶の基礎過程であるLTPの間には非常に密接な関係がある。 θ リズムは、中隔から海馬へのコリン作動性神経とGABA作動性神経の入力の相互作用により生じている[34]。中隔の破壊により、 θ リズムが消失したラットでは、空間記憶・学習の阻害が報告されている[35]。さらに、 θ リズムによってLTPがより増強される。つまり、 θ リズム発生中に、LTP誘導を行うと、 θ リズムが生じていない時に比べ、より強いシナプス可塑的变化が生じることが報告されている[36]。またラットを新しい環境に置き、探索行動をする時に θ リズム発生が観察され、探索行動、場所記憶学習との関連が示唆されている。以上のことから、海馬における θ リズムと記憶学習過程は大きく関係していると考えられている。

また、海馬では、 θ リズム発生中に同時に約40Hzの γ リズムの発生が観測されている。 γ リズムは、最初に嗅覚システムで解析された[37]。その後視覚野でも観測され、Singerらによって、視覚野で起こる γ リズム及び空間的に離れている神経間での同期現象が発見された[31]。それらの現象は視覚情報処理における結合問題を解く鍵を担っているのではないかと考えられている。さらに、海馬においても、 γ リズムも θ リズム同様、記憶情報処理との関わりが示唆されており、Lismanによりモデルが提案されている[38]。人の短期記憶は約7つ前後のことしか覚えられないといわれており(マジックナンバー7)、Lismanのモデルは、この事を、 θ リズム・ γ リズムの二つの波を用いたモデルを用いて説明している。つまり、5Hzの θ リズムの1周期(200 msec)には、40Hzの γ リズム(1周期25 msec)の波が8つ入る事になる。これら θ リズムと γ リズムとの2重振動により情報のコード化を表現するモデルとなっている。

様々な振動現象が海馬で観察され、実際に探索行動やLTP増強と関連する事からも、これら神経振動現象が脳内情報処理において重要な役割を担っていると考えられる。今後、神経振動現象と海馬情報処理機構との関係を解明するべく、更なる研究を進めていく事は、重要なことであると言えよう。

第6節 てんかん

てんかんは、最も一般的な神経疾患の一つで、国や地域、人種にかかわらず総人口の約1~2%が生涯に一度は罹患すると言われてい

る。つまり、日本全体で約 100 万人のてんかん患者が存在する事が予測される。てんかんは、脳の神経細胞が同期的に過剰に発火し、発作を繰り返し発症する事により症状がひどくなる病気である。また側頭葉てんかんは、先ほどまでの行動を忘れてしまう短期的な記憶の欠落などの記銘力障害(記憶障害)が生じることが知られている。てんかん発作の原因として、脳の奇形性の腫瘍や皮質形成異常、事故や脳梗塞などによる脳の外傷や損傷がある。また、分子レベルでのてんかん発症メカニズムはいまだ不明な点が多いが、チャネルや受容体に関する様々なてんかん原因遺伝子の同定がなされてきている[39].

てんかん波の発火現象は、大きく 2 つに分ける事が出来る。発作間欠期(interictal state)に生じる発作間欠期波(interictal discharges ; IIDs)と、発作(ictus)・発作発現(ictal onset)時に生じる発作波(ictal discharges ; IDs)がある。IIDs は、発作性脱分極シフト(paroxysmal depolarizing shift ; PDS)が起こり、それに伴ってバースト発火が生じる。PDS は、活動電位の後に生じる成分である脱分極性後電位(depolarizing afterpotential ; DAP)が加重した電位成分だと考えられている。PDS の発生後は、長く大きな後過分極(afterhyperpolarization ; AHP)が生じ発火活動が停止する。これら、PDS によるバースト発火と、AHP が繰り返され、数秒から数十秒周期で IIDs が生じる。また、IIDs は、IDs-IDs 間に生じる発火現象であるが、IIDs 単独で生じる場合もある。IDs は、律動的、同期的な神経集団の長いバースト状の発火現象である。海馬スライスでは、PDS や、IIDs が生じてても、IDs が生じる事はほとんど無い。これは、PDS の後に、強い AHP が生じるためだと考えられている。このために、PDS に続く持続的な IDs が発生しにくい状態であると考えられている。海馬とは逆に、AHP の小さい扁桃核では PDS から IDs に移行しやすいと言われている。この AHP が、PDS から IDs, または IIDs への移行の鍵を握っている可能性が示唆される[40]. この AHP には Ca^{2+} 依存性 K^{+} チャネルが重要な役割を担っていると考えられている。PDS によって NMDAR, VDCC を介し細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇する事により、 Ca^{2+} 依存性 K^{+} チャネルが開き神経細胞を過分極に移行させることが予測される。

海馬のみを含むスライスでは IDs の観察は一般には難しいが、IDs を観察できる実験系は扁桃核以外にもある。大脳新皮質や海馬周辺部位(例えば嗅内野)を含む脳スライスを用いる事により IDs と IIDs を同時に測定することが出来る[41].

第7節 ビキュキュリン誘導てんかんモデル

海馬は、側頭葉てんかんの焦点となり得る脳内器官である。そのような側頭葉てんかんモデルの一つに、ビキュキュリン(BIC)誘導てんかんモ

デルがある。海馬スライスにおいて、ビキュキュリン、ペニシリン、ピクロトキシンなどの、GABA_A受容体阻害薬の投与により自発的な発作性発火が引き起こされる[42, 43]。これら脱抑制てんかんモデルは、スライス、急性、慢性動物実験において、てんかんのメカニズム研究に精力的に用いられてきた。このモデルは、てんかん誘導の原因に脱抑制が関わる可能性を示唆している。

海馬スライスにおいて、ビキュキュリンの灌流投与により、抑制性シナプス後電位(inhibitory postsynaptic potential ; IPSP)が抑制され[40]、興奮性細胞の興奮性が増大し、海馬錐体細胞の自発的発火頻度が増大し、IIDs様の自発的・周期的な神経細胞集団の同期的てんかん様発火が誘導されるようになると考えられている。このてんかん様発火現象に伴い海馬において可塑的变化が同時に起こる事が報告されている[44]。

第8節 てんかんと CaMKII

CaMKIIの α サブユニット(後述)遺伝子のヌルミュータントマウス(-/-)は、海馬を含む側頭葉てんかんを発現する[45]。このことは、CaMKIIが海馬におけるてんかん発現と密接な関係にあることを示唆している。

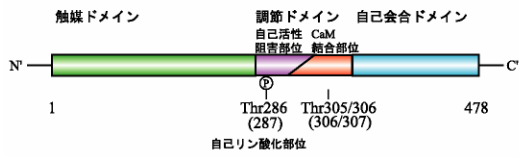
CaMKIIは、中枢神経系において高レベルで発現する[46]細胞内蛋白質リン酸化酵素であり、特に海馬において総蛋白量の~2%を占め[47]、LTPに関与する。

CaMKIIは、 α 、 β 、 γ 、 δ の4種サブユニットにより構成され、中枢神経細胞では α (52 kDa)、 β (60 kDa)が特異的に発現している。細胞内でのCaMKIIは、8~12個の α ・ β サブユニットがホモ、あるいはヘテロオリゴマーを形成している[48]。各CaMKIIサブユニットは図1-5Aのように、触媒ドメイン、調節ドメイン、自己会合ドメインから構成されている。通常は触媒ドメインにある活性化部位が、調節ドメインに在る自己活性阻害部位によって阻害されている。細胞内Ca²⁺濃度上昇により、活性化されたCaMがCaMKIIのCaM結合部位に結合すると、CaMKIIの活性化部位と自己阻害部位の結合が離れ、構成的活性化型のCaMKIIになる。また、2分子のCaMが隣同士のCaMKIIサブユニットに結合することにより、一方のCaMKIIサブユニットの活性化部位が残りのサブユニットの自己リン酸化部位(自己活性阻害部位)Thr286/287(α/β)をリン酸化する。このように自己リン酸化反応が次々サブユニット間で生じ、活性化オリゴマーが協同的に形成される[7, 49]。その結果、他のさまざまな基質蛋白質をリン酸化出来るようになる。一度、活性化オリゴマーが形成されると、Ca²⁺が減少し、CaMが解離してもThr286/287(α/β)の自己リン酸化により構成的活性型が維持でき、CaMKIIオリゴマー活性が維持される事がわかっている[50]。また、自己リン酸化型のCaMKIIはCaMに対す

る親和性が増大する。活性化型 CaMKII はプロテインフォスファターゼ 1 (PP1), PP2A 等の脱リン酸化酵素により, 非活性化状態に戻る。(図 1-5 参照)

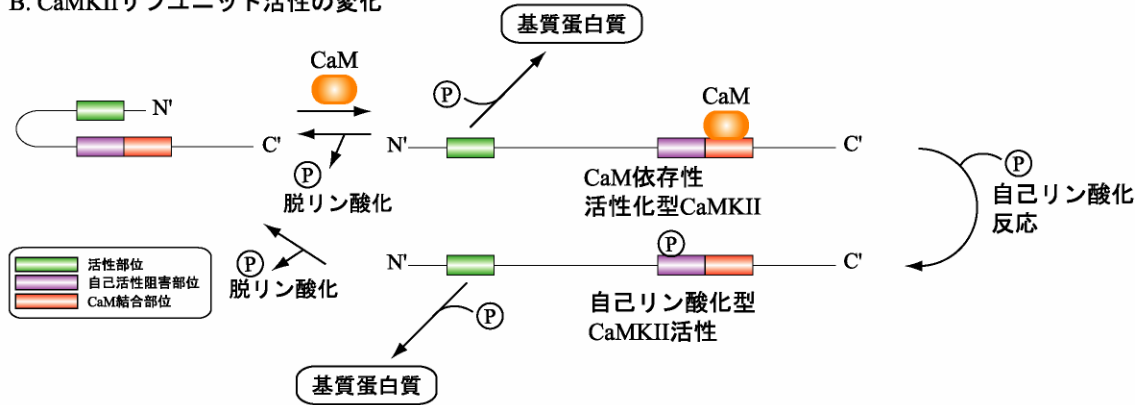
てんかん誘導中, 細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇する報告がなされている[44]. また, その結果 CaMKII の活性が上昇している報告もある[51]. 一方で, αCaMKII のノックアウトマウスや, mRNA アンチセンスヌクレオチドを用いて, αCaMKII の蛋白質量を減少させると, てんかんが誘導される[45, 52]. 海馬内における CaMKII 活性が増大しても, CaMKII 蛋白質量が減少しても, てんかん波が発生する事になる. 以上のことから, 細胞内分子としての CaMKII が, てんかんに対してどのような役割があるのか解明する事は, 非常に興味深い事だと考えられる.

A. α CaMKIIサブユニットのドメイン構造



*()は β サブユニットの場合

B. CaMKIIサブユニット活性の変化



C. 様々な活性化型CaMKIIオリゴマー

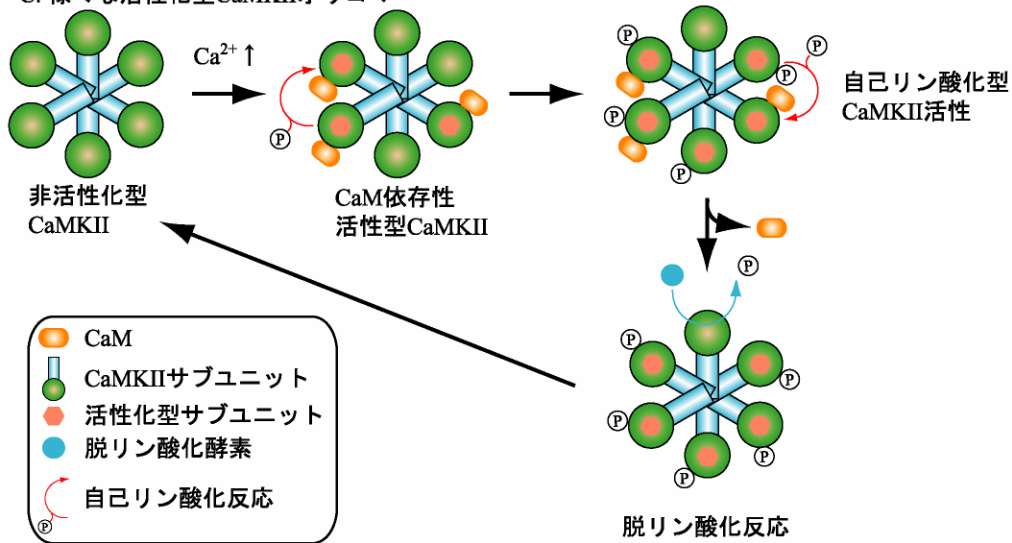


図 1-5. CaMKII の構造と活性化メカニズム(論文[50]を元に改変)

第9節 電氣的神経リズム現象と細胞内分子メカニズム

シナプス後部位での細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇によって、海馬 CA1 領域において LTP または LTD(long-term depression)のどちらが生じるか決まる。細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇レベルが高い場合には LTP が誘導され、上昇レベルが低い場合には LTD が誘導される[53]。現在、前者では CaMKII が活性化し細胞内基質蛋白質のリン酸化が亢進し、後者ではカルシニューリン等のフォスファターゼによりそれらの脱リン酸化反応が進むと考えられている。しかし実際には、CaMKII、カルシニューリンは細胞内酵素ネットワークの一要素でしかないので、 Ca^{2+} 上昇レベルの違いにより細胞内で活性化される分子ネットワークが変化し、LTP または LTD が誘導されていると考えられる。

海馬スライスの実験では、LTP は 100Hz で 1 秒間のテタヌス刺激や、 θ バースト刺激(100Hz, 5 発のバーストを 5Hz で 4-5 回刺激)により誘導され、低頻度刺激(1 Hz, 15 分間)では LTD が誘導される。このことは、電氣的刺激パターンが異なる細胞内分子ネットワークを活性化していると示唆される。Schulman らは、CaMKII に 4 Hz, 200 ミリ秒の Ca^{2+} スパイク刺激を与えると、CaMKII の活性化型へ変化する割合が最大になることを報告した[54]。また、LTP 誘導の刺激パターンの違いが、海馬 CA1 領域の自己リン酸化型 CaMKII の活性レベルに対し影響を与える報告がある[21]。 θ バーストの刺激は、10 Hz, 10 sec 間刺激する刺激に比べ、CA1 領域の自己リン酸化型 CaMKII 活性を約 20%上昇させた。また、海馬 θ リズム誘導中は LTP が増強する事[36]からも、神経リズム発火パターンが、リズムパターンに依存した異なる細胞内分子ネットワークを活性化していると考えられる。逆に、CaMKII などの細胞内分子が活性を持ち神経の電氣的活動を調節する事により、神経リズムが調節されている可能性もあるだろう。CaMKII が関与する細胞内生化学ネットワークは、LTP を増強するような θ リズム周波数の発生の安定化または調節に関与し、LTD に関する PP1、カルシニューリンなどの脱リン酸化酵素ネットワークは、1 Hz の神経振動の安定化、または調節をしているかもしれない。

神経リズム現象と細胞内分子ネットワークの相互関係を解明することは、脳の情報処理を考える上で、非常に重要な研究になると考えられる。

第10節 本研究の目的

てんかん患者数は、総人口の1~2%と言われており、非常に一般的で重篤な疾患である。その為に、これまで多くの研究がなされてきた。そして現在、てんかんが生じる主な原理は、脳内の興奮性と抑制性のバランス崩壊だと考えられている[1, 55]。つまり、てんかん発火は、何らかの原因による興奮性の異常上昇、または抑制性の減弱により生じると考えられている。過剰興奮モデルであるキンドリングてんかんモデルにおいては、シナプス長期増強がてんかん波の発生原因と考えられている[56]。しかし一方で、キンドリング誘導てんかんにおいても、シナプス増強が必要ないという報告[57]や、シナプス長期増強が原因とならない、てんかん発火も報告がある[58]。さらに本実験で用いたビキュキュリン誘導てんかん波モデルでは、シナプス増強がてんかん発火の発生原因なのか、てんかん発火の結果なのか、またその役割は何であるのか、良くわかっていない。以上のように、てんかん波の発生機構に関しては不明な点が多い。そこで、我々は、モルモット海馬スライスビキュキュリン誘導てんかんモデルを用い、てんかん波の発生機構を明らかにすることを目的とした。

始めに、てんかん波発生に対する、受容体、チャネル、ギャップ結合の役割を調べた。その結果、海馬 CA3 神経細胞間の AMPA 受容体とギャップ結合がてんかん波の発生に必要な事が分かった。また、てんかん波に対する NMDA 受容体、CaMKII 依存的なシナプス可塑的变化の役割について調べた。その結果、てんかん波の発生にはシナプス増強は必要ないが、てんかん発火に伴って NMDA 受容体、CaMKII 活性化依存的なシナプス増強が生じる事が分かった。以上の事から、てんかん発生とシナプス増強の関係、ならびに、てんかん発生におけるシナプス増強の役割について考察した。

また、てんかん発生中、個々の神経細胞は自発的に同期発火している。てんかん発生していない状況からてんかん波が出来ていく、てんかん波成熟過程を調べるために、単一神経細胞がどのように活動し神経細胞の同期発火を生じているか観察した。第3章第2項では、ビキュキュリン誘導てんかん波発生過程における単一錐体神経細胞の活動変化を観察するために、ホールセルパッチクランプ法を用いて、単一錐体神経細胞活動と局所電位と同時記録を行った[59, 60]。この結果より、錐体神経細胞の発火パターンの違いによって、てんかん波成熟過程に違いが生じる事が明らかになったので、その項では、その現象について考察を行った。

第2章 実験方法

第1節 人工脳脊髄液 (ACSF: artificial cerebrospinal fluid)

スライス標本の保存液，灌流液として人工脳脊髄液(artificial cerebro-spinal fluid ; ACSF)を用いた．組成は以下の通りである．124 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.25 mM NaH₂PO₄, 2 mM MgSO₄, 26 mM NaHCO₃, 10 mM Glucose, 2 mM CaCl₂. ACSF は，実験を行う日に，各溶液のストック溶液を用いて調整した．0.15 M NaHCO₃ ストック溶液は，ACSF 作成の前に CO₂ ガスを 30 分間通気後，使用した．作成した ACSF は，95% O₂ / 5% CO₂ 混合ガスを通気した後，常に混合ガスを通気し実験に用いた．この時 pH は 7.4 であった．ACSF 作成のための試薬は，全て和光純薬工業株式会社より購入した．

第2節 海馬スライス標本作成法

本実験では，76 匹の Hartley 系の雄のモルモット(3~4 週齢，体重 150~250 g)から作成した海馬スライス標本を用いた．本実験は，九州工業大学大学院生命体工学研究科，動物実験委員会の承認を得て，委員会作成のガイドラインに従って実験を行った．海馬スライス標本の作製は，記録の安定性向上のために以下に記した 2 つの脳摘出手法を用いて行った．主に細胞外記録を行う場合は打撲法，主にホールセルパッチクランプ記録を行う場合は心臓灌流法を用いた．最終的な海馬スライスの作成方法は，2 つの摘出方法においても以下に記した同じ手法を用いた

脳摘出方法

1. 心臓打撲法

1. ジエチルエーテルで麻酔をした後，モルモットの心臓を圧迫し，心停止させた．
2. 速やかに開頭後，小脳から大脳にかけて摘出し，氷冷した ACSF に浸し十分に冷却した．

2. 心臓灌流法

1. モルモットをジエチルエーテルで麻酔後開胸し、カニューレを装着したシリンジを用いて心臓から約 0 °C に冷やした ACSF を全身に灌流した。
2. 体内の血液が ACSF と置換したら速やかに断頭し、脳全体を摘出した。
3. 摘出した脳は、氷冷した ACSF に浸し十分に冷却した。

スライス作成方法

1. 大脳は、メスを用いて小脳を分離後、左右両半球に分離した。
2. 分離した脳片半球は、半球切断面を下にしてスライサー(D.S.K 社製, DTK-1000 ZERO 1)に固定後、500 μm 間隔で sagittal section 方向にスライスを行った。
3. その後、不要な部分をトリミングし、海馬の長軸方向に対し垂直にスライスされた図 2-1 のような厚さ 500 μm の海馬スライス標本を作製した。
4. スライス標本は、27°C の恒温槽内に設置したインターフェース式インキュベータ内で実験に用いるまで保存した。また、海馬スライスは、スライス作製時のダメージからの回復のために、スライス作成後 1 時間インキュベーションを行い、実験に用いた。インキュベータ内は、ACSF で満たされ常に 95% O_2 / 5% CO_2 混合ガスの通気を行った。



図 2-1. モルモット海馬スライス標本

厚さ 500 μm の海馬スライス標本。白の縦、横のバーはそれぞれ、1 mm を示している。

第3節 海馬スライス電場電位測定

実験は、33.4°Cに保たれた測定用チャンバ(中澤製作所製)を用いて行った。海馬スライス標本は、測定用チャンバ中央部のナイロンメッシュを張ったリング上に置いた。スライスには、常にマイクロチューブポンプ(東京理化器械株式会社製, MP-3)を用いて流速約 1.5 ml/min で ACSF を灌流した。尚、海馬スライス標本の表面の乾燥と酸素欠乏を防ぐため、スライス表面に加湿した 95 % O₂ / 5 % CO₂ 混合ガスを常に補給した(図 2-2)。記録電極には、2M NaCl を充填した、ガラス微小電極(抵抗 1~2.5 MΩ)を用い、刺激電極には双極性タングステン電極を用いた。

てんかん波の電場電位測定時において、記録電極は CA3 野の細胞体層(st. pyramidale)に配置し細胞外記録を行った。集合 EPSP (population EPSP ; pEPSP)記録時、記録電極は CA3 野の st. pyramidale 又は st. radiatum に配置した。また、刺激電極を放線層(st. radiatum)に配置し、commissural fiber/シャプアー側枝を刺激した。電流刺激は、電気刺激装置(日本光電 SEN-3301)とアイソレーター(日本光電 SS-202J)を用いて、パルス幅 200 μsec で行い、最大 pEPSP 振幅の 1/2 になるように刺激強度を調節した。

測定された電位は、高感度生体電位増幅器(Cygnus Technology 社製, ER-1 Extracellular Amplifier)を用いて 1000 倍に増幅した。10kHz のローパス・フィルター、1Hz のハイパスフィルターを通した後、アナログ/デジタル変換ボード(マイクロサイエンス(株)社製, ADM-676PCI)または、DIGIDATA 1322A(Axon Instruments)を介して、コンピュータに取り込んだ。

コンピュータでのデータ測定ソフトウェアには、LaBDAQ-9X(株松山アドバンス製)または、pCLAMP8.2(Axon Instruments)を用いた。

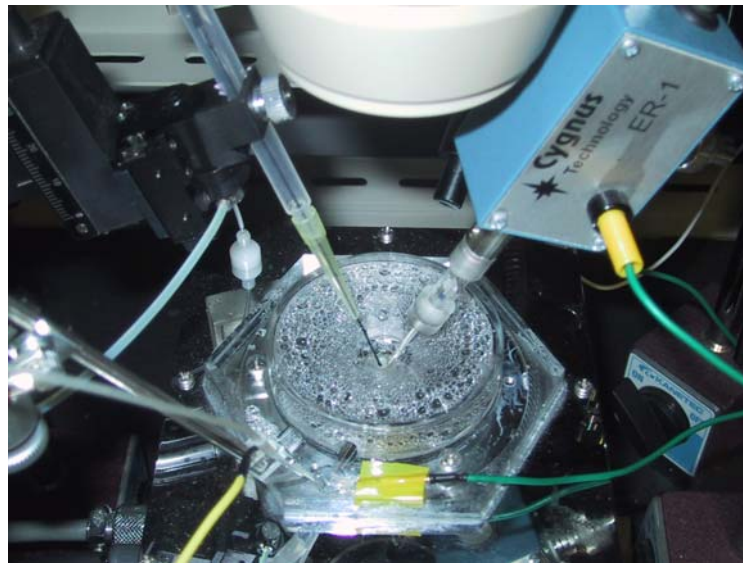
LaBDAQ-9X を用いた場合：

サンプリング周波数 1kHz で測定した。てんかん波データの測定には、1分おきに1分間記録した。pEPSP はサンプリング周波数 10kHz で記録を行った。

pCLAMP8.2 を用いた場合：

サンプリング周波数 10kHz で測定した。てんかん波のデータは、1ファイル5分間のデータをインターバルなしに連続記録を行った。

A



B

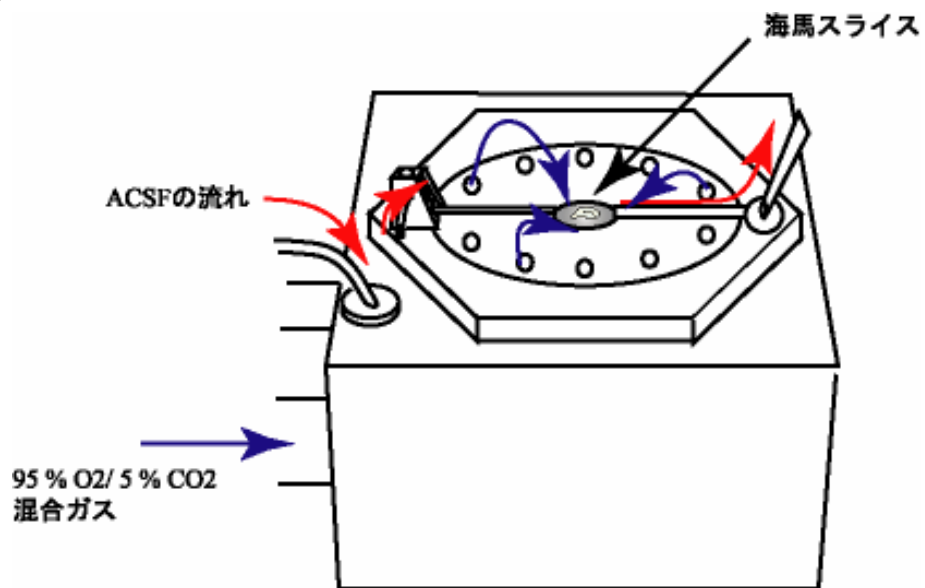


図 2-2. 測定用チャンバ A: 測定用チャンバでの記録の様子. 刺激電極(左側)と記録電極(右側). B: 測定用チャンバ模式図. 混合ガスと ACSF の流れを示した.

第4節 blind ホールセルパッチクランプ記録

記録電極は、内液が 140 mM K-gluconate, 10 mM KCl, 0.2 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 2 mM Na₂ATP, 10 mM HEPES, and 0.1 mM spermine (pH 7.3 with 140 mM KOH)を用い(抵抗 4~8 MΩ), カレントクランプモードでホールセルパッチクランプを行った. 液間電位を計測した結果, -10 mVを得た, そのため, 全ての表示電位において液間電位の補正を行った.

錐体細胞の膜電位測定には, Patch Clamp PC-501A(Warner Instrument社製)のパッチクランプ用アンプを用いた. 測定モードは, zero current クランプモードに設定した. 測定膜電位は, 5 k Hz low pass フィルター, 5 倍の Gain を介し出力した. アンプから出力されたデータは, アナログ デジタル変換機 DIGIDATA 1322A (Axon Instruments)を介して, pCLAMP8.2(Axon Instruments)ソフトウェアを用いてサンプリング周波数 20kHz でコンピュータに記録した.

すべて CA3 錐体細胞からの測定結果は, レコーディング中に静止膜電位が 5mV 以上変化せず, インプットレジスタンスが測定始めより 20% 以上変化しないデータを用いた.

測定した平均静止膜電位は, -61.84 ± 1.23 mV (n = 9)であった.

第5節 記録電極及び刺激電極の作成方法

細胞外記録電極には, 無芯のガラスキャピラリー管(1.5mm 外形・75 mm 長, エルマ販売株式会社製)を, ホールセル記録には, 有芯のガラス管(1.5mm 外形・75 mm 長, World Precision Instruments, Inc.製), プラー(PC-10, NARISHIGE 社製)を用いて, 2 段引きで作成した. 細胞外記録用には 1~2 MΩ, ホールセル記録用には 4~8 MΩ の電極抵抗になるように, プラーの設定を行った.

双極刺激電極は, エナメル樹脂コーティングにより絶縁処理を行ったタングステン線を用いた. 刺激電極先端は, 飽和亜硝酸カリウム溶液を用い電解研磨を行った.

第6節 使用薬品・投与方法

本実験では、表 2-1 に示した薬品をそれぞれの実験に用いた。CaMKII 活性化阻害薬は、ACSF に溶解後、ガラス微小管に充填し、記録電極より約 500 μ m 灌流方向上流に、シリンジポンプ (Harvard Apparatus, Inc. 製, Syringe Pump Model 11 single syringe) を用いて投与した (流速 50 μ l/h)。CaMKII 活性化阻害薬以外の使用薬物は全て、ACSF と共に灌流投与を行った。

表 2-1. 使用薬品名リスト

nifedipine は和光純薬工業株式会社製品、KN-93, KN-92, KN-62 は CALBIOCHEM 社製品、その他の薬品はすべて SIGMA 社製品のものを利用した。

薬品名	効果
ビキュキュリン(BIC) (-)-bicuculline methbromide, 1(S), 9(R)	GABA _A 受容体阻害薬
Saclofen (β -(Aminomethyl)-4-chlorobenzeneethanesulfonic acid)	GABA _B 受容体阻害薬
テトロドトキシシン (TTX)	電位依存性 Na ⁺ チャネル阻害薬
CNQX(6-cyano-7-nitor-oquinoxaline-2, 3-dione)	AMPA 受容体阻害薬
GYKI 52466 (1-(4-Aminophenyl)-4-methyl-7,8-methylene dioxy-5H-2,3-benzodiazepine hydrochloride)	AMPA 受容体アロステリック阻害薬
AP5 (DL-2-amino-5-phosphonopentanoic acid)	NMDA 受容体競合阻害薬
MK-801 (5R,10S)-(+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine hydrogen maleate)	NMDA 受容体阻害薬
MCPG (α -methyl-4-carboxyphenylglycine)	代謝型グルタミン酸受容体阻害薬
nifedipine	L 型電位依存性 Ca ²⁺ チャネル阻害薬
carboxolone	ギャップ結合阻害薬
KN-93 (2-N-(2-hydroxyethyl)-N-(4-methoxy-benzenesulfonyl)] amino-N-(4-chlorocinnamyl)-N-methylbenzyl amine)	CaMKII 活性化阻害薬
KN-92 (2-N-4-methoxybenzenesulfonyl)] amino-N-(4-chlorocinnamyl)-N-methylbenzyl amine)	KN-93 のアナログ体 (KN-93 のネガティブコントロール)
KN-62 (1-N,O-bis(1,5-isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl-4-phenylpiperazine)	CaMKII 活性化阻害薬

第7節 データ解析

1. てんかん波周波数解析

1. LaBDAQ-9X を用いて記録されたデータは，1 ファイル 1 分間のデータである．その 1 ファイルの測定結果よりてんかん波の平均周期を求め，その逆数をてんかん波周波数とした．

2. pCLAMP 8.2 を用いて記録されたデータは，clampfit の Event detection 機能を用いて周波数を求めた．

2. てんかん波振幅解析

てんかん波の振幅は，ベースライン(0 mV)から正の値のピーク値までとした．

3. pEPSP 解析

pEPSP の始めの傾きを，pEPSP の指標として用いた．pEPSP の傾きは，刺激後 6 – 13 msec 間の pEPSP の 3.5 msec 間を最小二乗法により直線近似した値を用いた．その後，コントロール値の平均値を 1 と規格化し，各種薬物投与群との傾きを比較した．

4. Giant EPSP 解析

図 2-3. で示したように，ホールセルクランプ記録で得られたデータから周波数，振幅，持続時間を求めた．周波数はバーストの始めから次のバーストの始めの周期から計算し求めた．振幅は，静止電位からスパイク成分の下の部分までを測定した．持続時間は，静止膜電位より電位が高い時間から求めた(図 2 – 3.).

5. 変動係数 Coefficient of variation (CV)値の計算

てんかん波発生の周期性を統計学的検討するために，てんかん波発生周期の変動係数(CV 値)を用いた．CV 値は次の式より求めた．

$$\text{CV value (\%)} = \frac{\text{the standard deviation (SD) of the interval}}{\text{the mean of the interval}} \times 100$$

CV 値は，てんかん波平均周期に対する，相対的な散らばりを表す指標である．CV 値の範囲は，0～100%で示した．100%に近い高い CV 値は，てんかん波周期が Gaussian 分布である事を示す[61]．この事は，てんかん

波が、不規則かつ確率論的に発生している事を意味する。また低い CV 値は、てんかん波が一定周期で生じていることを示し、てんかん波発生が周期的であることを意味する。

6. 統計解析及びグラフ作成

統計解析, グラフ作成には, StatView (SAS Institute 社製), Microsoft Excel (Microsoft 社製), KaleidaGraph (Synergy Software 社製)を用いた。本論文での統計解析には One-way ANOVA posthoc test の Scheffe test, two-way ANOVA with repeated-measure, 対応ありの t 検定, 対応なしの t 検定を用いた。p 値が 0.05 より小さい値の時に, 統計的有意差があるとみなした。

図, 文章中のデータすべては, 平均値±標準誤差として示している。

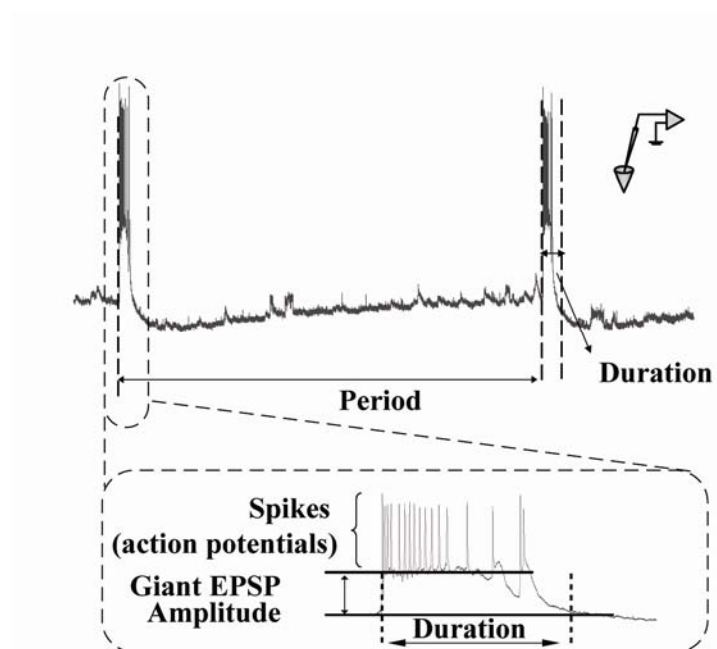


図 2-3. Giant EPSP 測定パラメータの定義

第3章 実験結果

第1節 モルモット海馬スライスにおけるビキュキュリン誘導てんかん波に対するシナプス可塑性の役割

第1項 ビキュキュリン誘導てんかん波 **bicuculline-induced epileptic discharges (BIED)**

BIED は、モルモット海馬スライスの CA3 細胞体層より記録を行った。ビキュキュリン投与前の海馬スライス CA3 領域からは、自発的なてんかん様活動、または集合発火などの自発的な活動は観察されなかった(図 3-1-2A)。海馬スライスへのビキュキュリン(BIC)(5~20 μ M)投与によって、すべてのスライスにおいて BIED が観察された(n=18, 図 3-1-2A)。てんかん発火は、ビキュキュリン投与開始後 4~5 分で生じ始めた (図 3-1-2C)。

BIED 周波数は、始めに上昇し、その後次第に減少し、定常になった(図 3-1-2B, C)。この周波数変化の傾向はビキュキュリン濃度に依らなかった(図 3-1-2C)。また、この周波数が変化している期間(てんかん波発生後~7 分間)を過渡期(transient period: TP)、安定している期間(てんかん波発生後 8 分以降)を定常期(steady state (SS))と名づけた(図 3-2-2A)。定常期の BIED は、0.08~0.14Hz の周波数で周期的に発生した。周期性を示す CV 値は、20 μ M ビキュキュリンのとき $5.85 \pm 1.09\%$ (n=4)であった。BIED 周波数は、ビキュキュリン投与開始後約 20 分で定常になった。ビキュキュリン投与開始後 50 から 60 分後の定常状態の各ビキュキュリン濃度におけるてんかん波の発生周波数は、 0.092 ± 0.003 Hz (5 μ M, n=7), 0.089 ± 0.001 Hz (10 μ M, n=5), 0.104 ± 0.003 Hz (20 μ M, n=6)であった。20 μ M ビキュキュリン投与時の平均周波数は、5 μ M ビキュキュリン(p=0.0012), 10 μ M ビキュキュリン(p=0.003, ANOVA with post-hoc test as Scheffe test)投与時に比べて有意に高かった。

ビキュキュリンを洗い流すと、BIED の周波数は次第に減少し、その後 60 分間も BIED は残った。しかし、ビキュキュリン洗い流し 3 時間後には、BIED は消滅した。

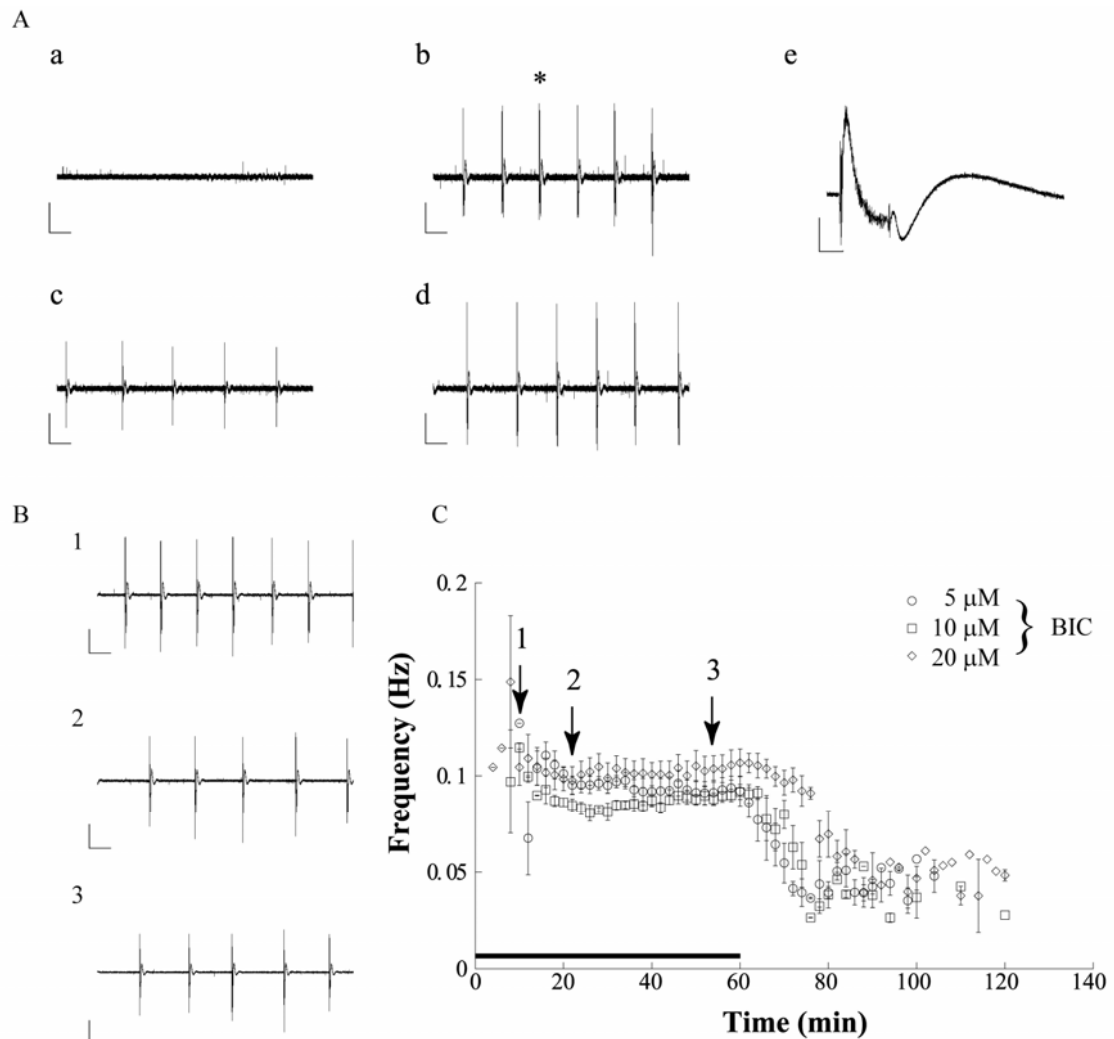


図 3-1-1. CA3 領域で観察された各ビキュキュリン濃度によって誘導されるてんかん波

A : 各ビキュキュリン濃度で誘導された, てんかん波の典型例 ((a) control, (b), 5 μ M, (c), 10 μ M, and (d) 20 μ M BIC). (e)は, (b)の*部分のてんかん波の時間軸を拡大したものである. (a)-(d)のスケールは 0.5 mV, 5 sec, (e)のスケールは 0.5 mV, 100 msec を示している. B : C 中の各数字が示す時間でのてんかん波典型例 (10 μ M BIC). C : BIED 周波数経時変化. 実線は各濃度のビキュキュリン投与時間を示す. 時間 0 min は, ビキュキュリン投与開始時間を示す (5 μ M: 7 slices from 6 guinea pigs, 10 μ M: 5 slices from 5 guinea pigs, and 20 μ M: 6 slices from 5 guinea pigs).

第2項 てんかん波の発生源

てんかん波が海馬スライスのどの領域で発生しているかを特定するために、CA3領域とCA1-DG領域とを切り離したミニ海馬スライスを用いて、 $10\ \mu\text{M}$ ビキュキュリンの環流投与を行った(図 3-1-2). 記録は、CA3, DG, CA1野の細胞体層から細胞外記録を行った. てんかん波は、CA3領域でのみ誘導され、DG, CA1野からてんかん波は測定されなかった. また、通常の見海馬スライスでは、CA1, DG野共にてんかん波が記録された. このことから、てんかん波発生源はCA3野に存在し、CA3領域で発生したてんかん波がCA1, DG領域に伝播したと考えられる.

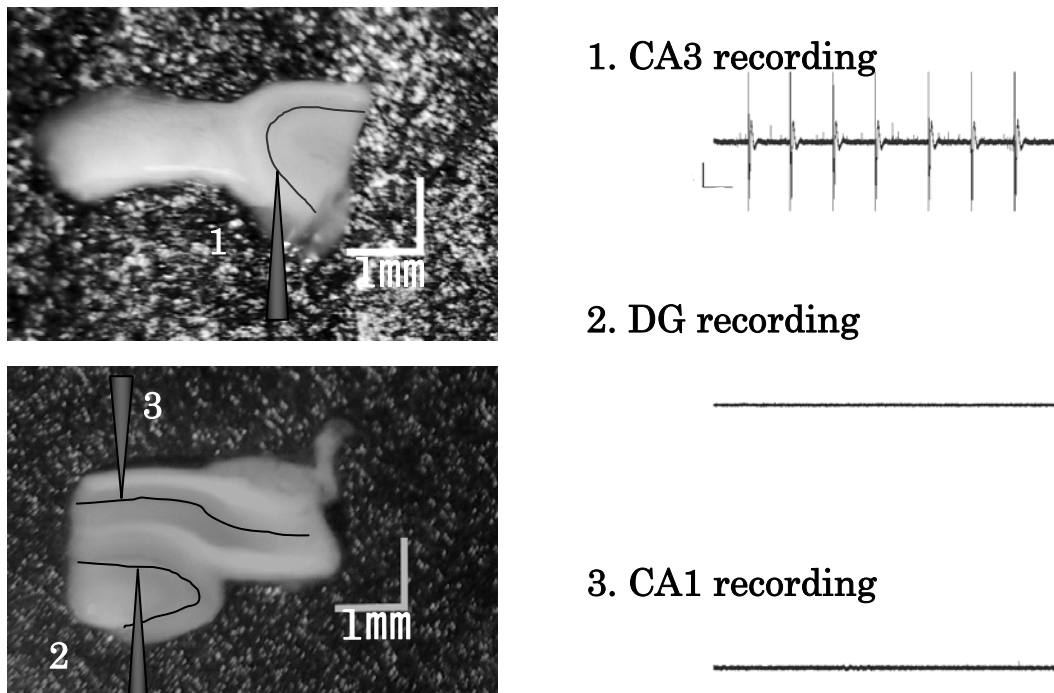


図 3-1-2. ミニ海馬スライスにおけるビキュキュリン誘導てんかん波
左図中と右図の 1-3 の数字は、記録電極の位置と、その位置から得られた電場電位の典型例である. 挿入図のスケールは $0.5\ \text{mV}$, $5\ \text{sec}$.

第3項 AMPA 受容体とギャップ結合の活性化が BIED 誘導に必要である

BIED の発生には、どのような種類のチャネル、受容体を介した神経ネットワークが重要であるのか、各々の受容体、チャネルの阻害薬を用いて薬理的に調べた。グルタミン酸受容体である、AMPA 受容体、NMDA 受容体、代謝型グルタミン酸受容体、また、グルタミン酸受容体の他には、シナプス長期増強に関与している電位依存性 Ca^{2+} チャネル、 $GABA_B$ 受容体を阻害した。また、電気シナプスである、ギャップ結合の阻害も行った。

ギャップ結合を阻害するために carbenoxolone (500 μ M) を AMPA 受容体を阻害するために GYKI 52466 (50 μ M) を用いた。または代謝型グルタミン酸受容体を阻害するために MCPG (50 μ M) を、電位依存性 Ca^{2+} チャネルを阻害するために nifedipine (500 μ M)、 $GABA_B$ 受容体を阻害するために saclofen (20 μ M) を、NMDA 受容体を阻害するために MK801 (100 μ M) を使用し、MCPG, nifedipine, saclofen, MK801 の薬品は、カクテル(MnsMK) とし同時に投与した。

Carbenoxolone の BIED 誘導前投与は、BIED 誘導を阻害した(n = 4, 図 3-1-3A)。BIED 発生中の carbenoxolone は、BIED を消滅させた(n = 4, 図 3-1-3B)。さらに、GYKI52466 もまた、BIED の誘導を阻害し、かつ BIED の発生を消滅させた(図 3-1-3C, D)。これらの結果から、AMPA 受容体とギャップ結合の活動が BIED 誘導の鍵となる重要な要素であると考えられる。

次に AMPA 受容体とギャップ結合以外の代謝型グルタミン酸受容体、電位依存性カルシウムチャネル、 $GABA_B$ 受容体、NMDA 受容体を阻害するためにビキュキュリン投与開始 15 分前から、MnsMK カクテルを投与した。その結果、MsnMK カクテルは、BIED の誘導を阻害することは出来なかった(n = 4, 図 3-1-3E, 11)。さらに、てんかん発火の周期性は不規則であり、CV 値は、ビキュキュリン投与時の波形に比べ、有意に増加した(図 3-1-3F, 11)。よって、MsnMK の投与によって、NMDA 受容体を阻害した時のように、BIED の発生周期の規則性は乱れた。さらにシナプス増強が、てんかん発火の促進に影響しているならば、NMDA 受容体阻害と同様に、電位依存性カルシウムチャネルの阻害も周波数を減少させる可能性がある。なぜならば、電位依存性カルシウムチャネルを介した、シナプス増強[26]が生じている可能性があるからである。そこで、BIC 投与 15 分前から nifedipine(20 μ M)投与し、電位依存性カルシウムチャネルの阻害を行った(図 3-1-5)。しかしながら、NMDA 受容体阻害時のような周波数減少や周期性の乱れは観察されず、ビキュキュリンのみを投与した時と同じような周波数経時変化を示した(図 3-1-5)。よって、電位依存性カルシウムチャネルは、てんかん波の発生、維持、調節には関与していないと考えられる。

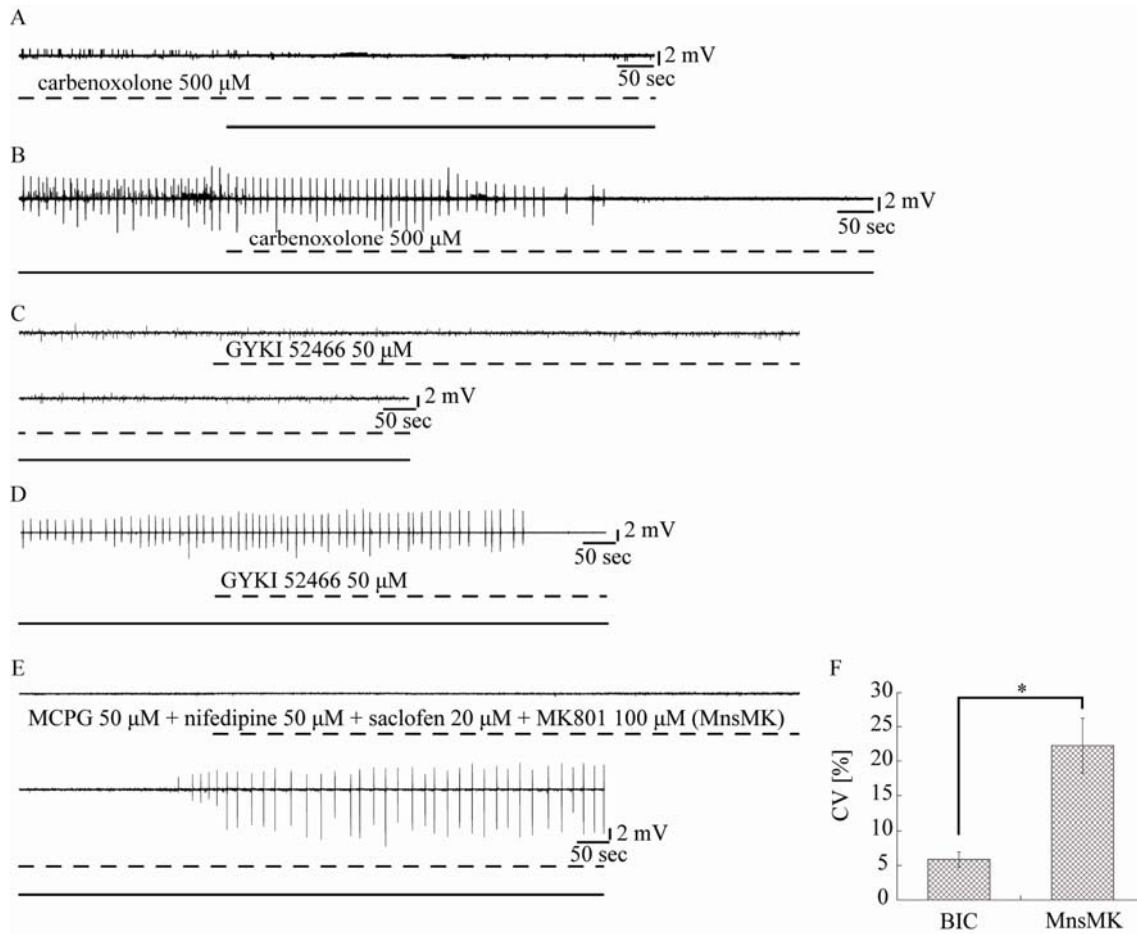


図 3-1-3. BIED 誘導にはギャップ結合と AMPA 受容体を介したシナプス伝達が必要. A-E は, それぞれの薬品を投与下の電場電位典型例を示した. F は MnsMK カクテルを投与時の CV 値. MnsMK は有意に CV 値を上昇させた (* $p < 0.05$, student t-test. BIC; 4 slices from 3 guinea pigs, and the MnsMK cocktail; 4 slices from 3 guinea pigs).

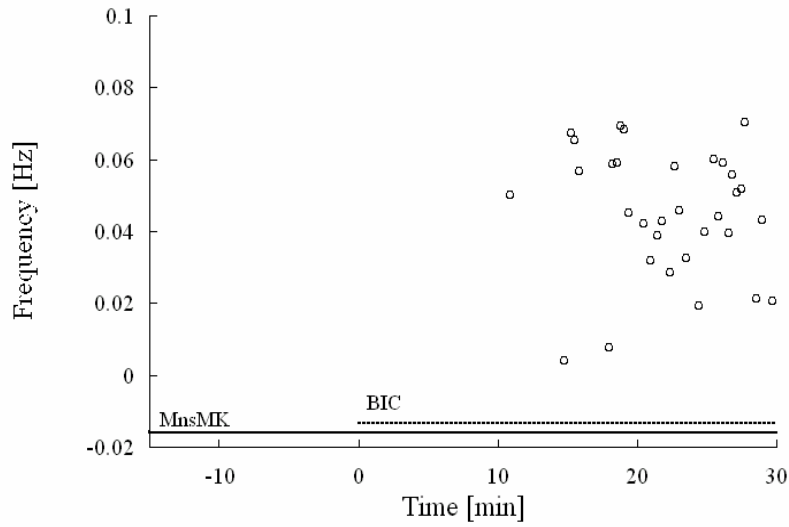


図 3-1-4. MnsMK 投与時のてんかん波周波数経時変化

1 枚の海馬スライスから得られた, MnsMK 投与時の周波数経時変化. 各プロットの周波数は, その時間に生じた発火の前に生じた発火との間隔から求めた. 20 μ M BIC 投与 15 分前から, MnsMK の投与を開始した.

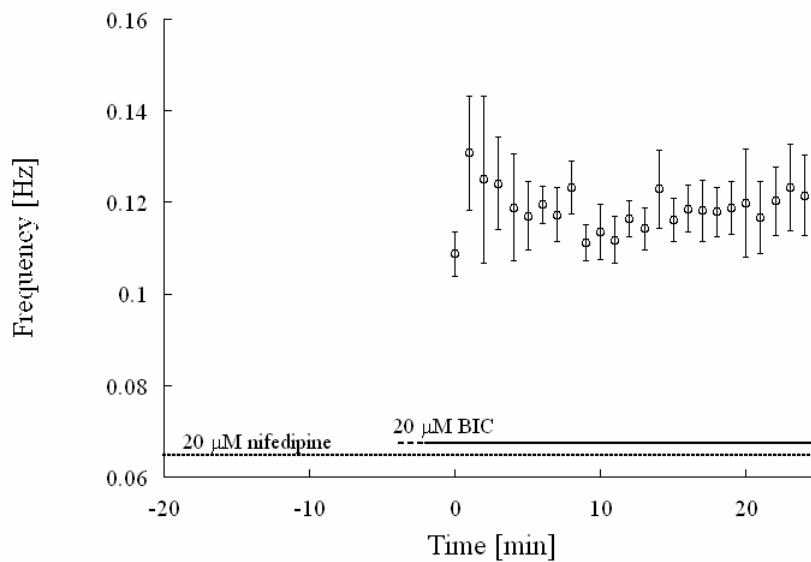


図 3-1-5. Nifedipine 投与時のてんかん波経時変化

てんかん波発火の開始時間を 0 とした周波数経時変化. Nifedipine は, BIC 投与 15 分前から投与した. BIC 投与後約 4 から 5 分後にてんかん波が発生した ($n = 3$).

第4項 BIED 誘導時のシナプス増強は AP5 または KN-93 によって阻害される。

自発的なてんかん波は、恐らくシナプス可塑的変化の余功として、またはシナプス可塑性に伴って生じると考えられる[62]。しかしながら、BIED において、BIED 誘導に伴ってシナプス可塑的変化が生じるのか、また、生じたとしたならば、そのシナプス可塑性は NMDA 受容体、または CaMKII 依存的なのか解かっている。そこで、BIED に伴ってシナプス可塑的変化が生じるのか、また、シナプス可塑的変化が生じるならば、NMDA 受容体の阻害薬である AP5, CaMKII の阻害薬である KN-93 がシナプス可塑的変化を抑制するか調べた。

20 μ M ビキュキュリンの 60 分間投与によりてんかん波を誘導し、ビキュキュリン投与前と washout 210, 240 分後の pEPSP の傾きを測定し比較した。ビキュキュリン washout 210, 240 分後には、てんかん波は消失していた。各阻害効果を確実にする為に、AP5 (100 μ M) はビキュキュリン投与 15 分前、KN-93 (50 μ M) は 45 分前から投与開始し、ビキュキュリン投与中も投与し続け、その後すべての薬品は washout した(図 3-1-6A)。

図 3-1-6B は、てんかん誘導前の pEPSP とビキュキュリン washout 後 240 分の pEPSP の典型例を示した。BIED 誘導に伴って、pEPSP の傾きは有意に増大した($p < 0.05$ two-way ANOVA, 図 3-1-6C)。てんかん波誘導前(control)の relative pEPSP の傾きは、 1.01 ± 0.03 ($n = 4$)、またビキュキュリン washout 後 210 分と 240 分の relative pEPSP の傾きは 1.61 ± 0.11 ($n = 4$) and 1.67 ± 0.05 ($n = 4$)であった。つまり、pEPSP は、BIED に伴って約 1.6 倍に増強された。また、このシナプス増強は、AP5, KN-93 の投与によって阻害された。BIED 誘導前の pEPSP の傾きと、ビキュキュリンと AP5 または CaMKII の同時投与を行った後の washout 後 210, 240 分後の pEPSP の傾きには有意な差は見られなかった(図 3-1-6C)。AP5 を投与したとき、BIED 誘導前の relative pEPSP は 1.01 ± 0.020 ($n = 4$)、またビキュキュリン washout 後 210 分と 240 分の relative pEPSP の傾きは、 1.07 ± 0.12 と 1.11 ± 0.10 ($n = 4$)であった。KN-93 を投与したとき、BIED 誘導前の relative pEPSP は 1.00 ± 0.036 ($n = 4$)、またビキュキュリン washout 後 210 分と 240 分の relative pEPSP の傾きは、 1.07 ± 0.16 and 1.07 ± 0.16 ($n = 4$)であった。

したがって、これらの結果は、BIED 誘導に伴って NMDA 受容体、ならびに CaMKII の活性化に依存したシナプス増強が誘導されることを示している。

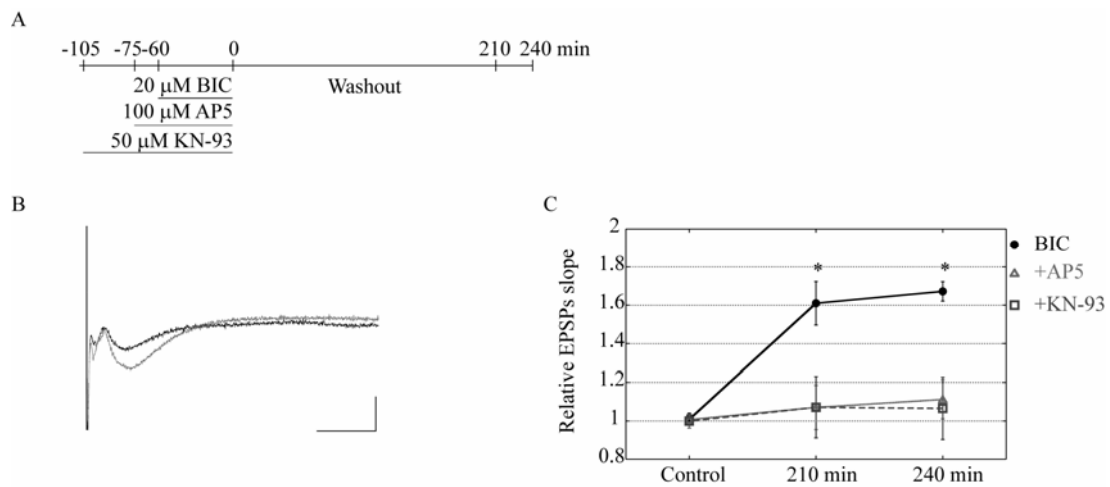


図 3-1-6. AP5, KN-93 による BIED 誘導シナプス増強の阻害.

A : 実験プロトコル. B : pEPSP 典型例. 黒はコントロール, 灰色はビキュキュリン投与 240 分後の pEPSP の波形を示す. スケールは 0.5 mV, 20 msec. C : relative pEPSP slope の経時変化. (BIC: 4 slices from 4 guinea pigs, 100 μM AP5: 4 slices from 4 guinea pigs, and 50 μM KN-93: 4 slices from 4 guinea pigs, * $p < 0.01$, Two-way ANOVA with repeated -measures).

第5項 BIED に対する NMDA 受容体活性化の効果

BIED 誘導期間中, NMDA 受容体, CaMKII 依存的なシナプス増強が生じている事が分かった. ここでは, NMDA 受容体の阻害が BIED にどのような影響を与えるか, NMDAR 阻害薬である AP5(100 μM)または MK-801(100 μM)の投与により調べた. NMDA 受容体を十分に阻害するために, ビキュキュリン投与開始 15 分前から AP5 の投与を行った. AP5 投与によって, BIED の発生は阻害されなかったが, BIED の発生頻度を減少させた(図 3-1-9). ビキュキュリンのみの投与を行った場合の 1 分間あたりの発火頻度は, 6 から 7 であった. また, この値は, ビキュキュリン濃度によって違いは無かった. しかしながら, AP5 投与によって BIED の発火頻度は有意に減少した(図 3-1-7B). AP5 投与時(投与期間後半 10 分間)の平均発火頻度は, 0.54 ± 0.47 (5 μM BIC, $n = 3$), 3.83 ± 0.93 (10 μM, $n = 3$), 3.75 ± 0.66 (20 μM, $n = 3$)であった(図 3-1-7C). 次に, AP5 とビキュキュリンを washout すると, 約 5 分で BIED は消失した. これら結果が, AP5 に因るものかスライスに因るものか検証するために, AP5 と

ビキュキュリンを 60 分間 washout した後に再度ビキュキュリンの投与を行った。2 度目のビキュキュリン投与を行った時の平均発火頻度(投与期間後半 10 分間)は, 6.83 ± 0.08 ($5 \mu\text{M}$, $n = 3$), 6.87 ± 0.69 ($10 \mu\text{M}$, $n = 3$), 6.88 ± 0.55 ($20 \mu\text{M}$, $n = 3$)であり, ビキュキュリンのみの投与時と有意な差は無かった(図 3-1-7C). この結果から, BIED 誘導前の AP5 による NMDA 受容体阻害は, BIED を抑圧することがわかった。

BIED 発生後に対する AP5 の効果を調べるために, 2 度目のビキュキュリン投与開始 30 分後から AP5 の投与を行った(図 3-1-7B). その時の平均発火頻度(投与期間後半 10 分間)は, 6.83 ± 0.08 ($5 \mu\text{M}$, $n = 3$), 6.87 ± 0.69 ($10 \mu\text{M}$, $n = 3$), 6.88 ± 0.55 ($20 \mu\text{M}$, $n = 3$)であった(図 3-1-7C). BIED 発生後に対する AP5 投与は, 若干発火頻度を減少させたが, ビキュキュリンのみ投与時の発火頻度と比べ有意な差は無かった(図 3-1-7C)

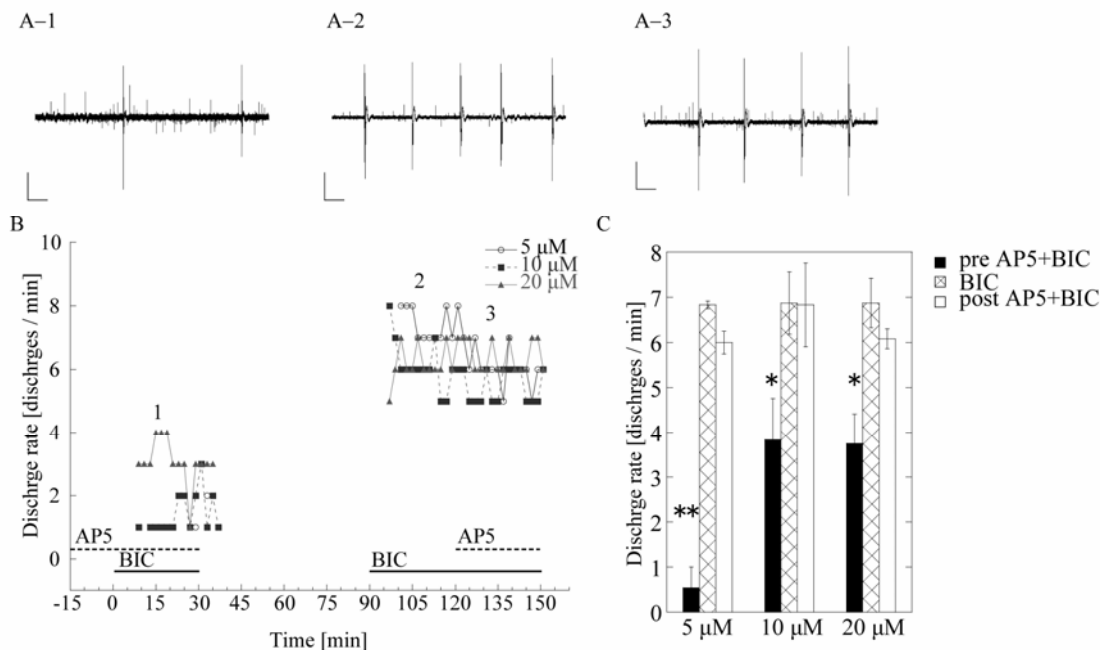


図 3-1-7. BIED 単位時間当たりの発火頻度に対する AP5 の効果

A : AP5 投与中の $10 \mu\text{M}$ ビキュキュリンによって誘導されたてんかん波典型例. 各数字は図 B の各数字の時間の時の典型例を示している. スケールは 0.5 mV , 5 sec を示す. B : 各ビキュキュリン濃度の際の単位時間当たりの発火頻度の経時変化典型例. AP5 投与時, 発火頻度が減少したので周波数解析より 1 分間での発火頻度の解析を行なった. C : 棒グラフは, 各ビキュキュリン投与開始 20-30 分後の 1 分間あたりのてんかん波発生頻度を示している. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 対応ありの t 検定. $5 \mu\text{M}$: 3 slices from 3 guinea pigs, $10 \mu\text{M}$: 3 slices from 3 guinea pigs, $20 \mu\text{M}$: 3 slices from 3 guinea pigs)

さらに、BIED 誘導前の AP5 投与は、BIED 発生の周期性を乱した(図 3-1-8). ビキュキュリンのみによって誘導された BIED は、発火周期がほぼ一定で、周期的なてんかん発火が観察された(図 3-1-1). しかしながら、BIED 誘導前から AP5 を投与すると、てんかん発火はランダム、かつ確率論的に生じた。また、てんかん発火の間隔は非常に不規則であった(図 3-1-8A). 発火パターンの不規則性を調べるために CV 値の計算を行った。BIED 誘導前の AP5 投与時、CV 値の平均値は $35 \pm 7.6\%$ (図 3-1-8C; $n = 4$) であった。また、この値は、ビキュキュリンのみの投与時に比べ有意に上昇していた。

これらの結果から、ビキュキュリンによって誘導されるてんかん波には、二つの相があると考えられる。一つは、ビキュキュリンによって、てんかん発火が起こり定常状態に移行する、つまりてんかん波周波数が変化する、ビキュキュリン投与直後の過渡期。もう一つは、てんかん波の周波数が一定である定常期である。これらの局面は、AP5 の投与時期による変化の違いによっても区別できると考えられる。

AP5 は、グルタミン酸と競合的な NMDA 受容体の阻害薬である[63]。また、てんかん発火中は、多くの神経細胞が同期的に発火し[64]、多くのグルタミン酸が放出されている。よって AP5 では、NMDA 受容体の十分な阻害効果が得られない可能性が残っている。そのため、私は NMDA 受容体の open channel blocker である MK801[65]と AP5 の同時投与を行った。MK801 と AP5 の同時投与により NMDA 受容体を阻害しても、BIED は生じた。しかしながら、MK801 と AP5 の同時投与は、AP5 投与時と同様に BIED の発火頻度を有意に減少した(図 3-1-9). 同時投与中の平均発火頻度(投与期間後半 10 分間)は、 1.17 ± 0.93 ($5 \mu\text{M}$ BIC, $n = 3$), 1.90 ± 0.31 ($10 \mu\text{M}$, $n = 4$), 2.49 ± 0.89 ($20 \mu\text{M}$, $n = 4$)であり、ビキュキュリンのみの時に比べて有意に減少した。MK801, AP5 とビキュキュリンを 60 分間 washout した後、再度ビキュキュリンの投与を行った時の平均発火頻度は、 3.67 ± 1.36 ($5 \mu\text{M}$, $n = 3$), 4.54 ± 0.28 ($10 \mu\text{M}$, $n = 4$), 6.21 ± 1.04 ($20 \mu\text{M}$, $n = 4$)であった(図 3-1-9).

以上の結果から、NMDA 受容体の活性化は、ビキュキュリン誘導てんかん波(BIED)の発生には必要ないと考えられるが、NMDA 受容体の活性化は、てんかん波の発火頻度の上昇、ならびにてんかん波を周期的に生じさせるのに必要だと考えられる。

$5 \mu\text{M}$ ビキュキュリンによって誘導されたてんかん波は、 $10 \mu\text{M}$ または $20 \mu\text{M}$ ビキュキュリン投与時より AP5, MK801 の効果が大きかった。この結果は、 $5 \mu\text{M}$ ビキュキュリンによる GABA_A 受容体の阻害効果が小さい可能性を示していると考えられる。つまりビキュキュリン阻害のためには、 $10 \mu\text{M}$ が必要だと考えられる。そのため、この項以降の実験では、 $20 \mu\text{M}$ のビキュキュリンを用いた。

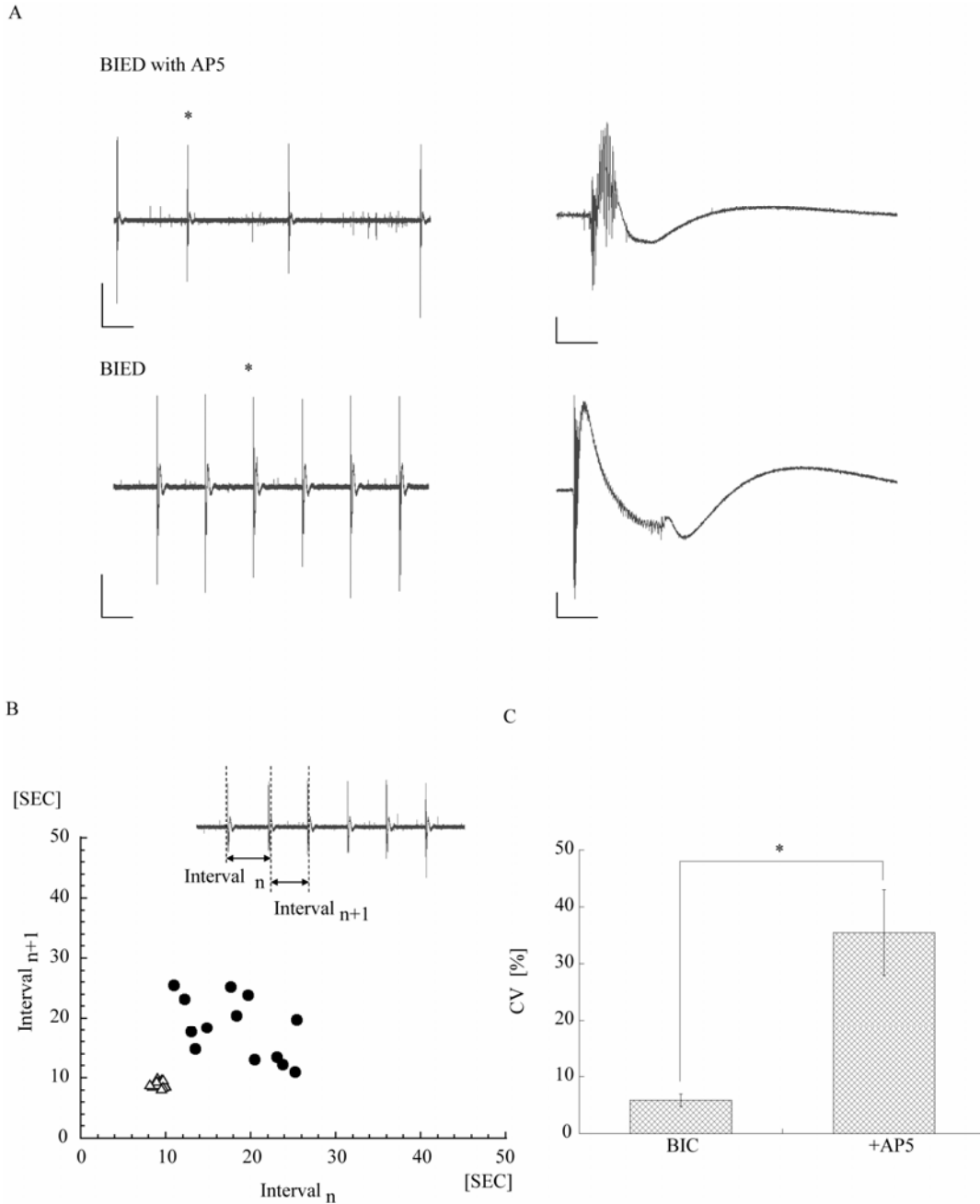


図 3-1-8. 規則的な BIED の発生は NMDA 受容体の活性化によって作られる
 A : 20 μ M ビキュキュリンによって誘導された BIED 典型例. 上は AP5 投与時, 下はコントロール BIED. 各右側のトレースは, アスタリクの発火を時間拡大した図. B : \square は 20 μ M ビキュキュリンによって誘導されたコントロール BIED. \bullet AP5 の BIED 誘導前投与時. 挿入図のように, それぞれの点は発火間のインターバルとそれに続く発火とのインターバルをプロットした. C : BIED (20 μ M BIC; BIC)の CV 値と pre-AP5 (100 μ M)投与時の CV 値. (* p <0.05, paired t-test, BIC: 4 slices from 3 guinea pigs, AP5: 4 slices from 3 guinea pigs).

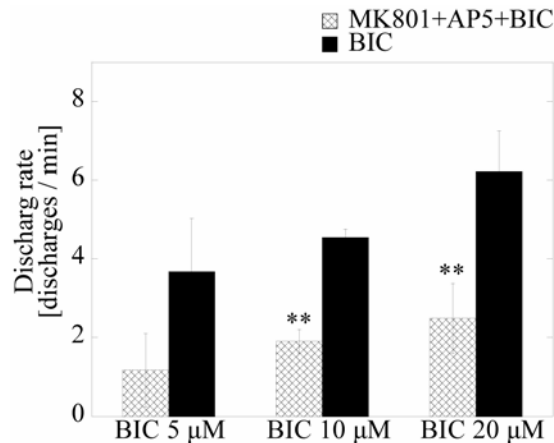


図 3-1-9. BIED 周波数に対する MK801 と AP5 の効果

棒グラフは、各ビキュキュリン投与開始 20-30 分後の 1 分間あたりの BIED 発火頻度を示している。BIED 発火頻度は MK801 と AP5 の同時投与によって有意に減少された。 (** $p < 0.01$, paired t-test. 5 μM : 3 slices from 2 guinea pigs, 10 μM : 4 slices from 3 guinea pigs, 20 μM : 4 slices from 3 guinea pigs)

第6項 BIED 周波数に対する CaMKII 活性化の効果

これまでの結果より、NMDA 受容体を介したシナプス増強は、てんかん波の発生周波数と発生周期の規則性を制御していることが示された。NMDA 受容体依存的なシナプス増強は、CaMKII 活性化系の細胞内シグナルを介して生じる[66, 67]事がわかっている。よってここでは、CaMKII 活性化阻害薬である KN-93, または KN-62 を用いて、CaMKII 活性化阻害によるてんかん波生成に対する効果について調べた。CaMKII 阻害薬は膜透過性阻害薬である。よって阻害薬を細胞内へ十分に作用させる為に、ビキュキュリン投与 45 分前から 60 分間、局所投与法を用いて(実験方法参照)CA3 領域に投与した。後述するが、BIED 誘導後の KN-93 投与は、てんかん波周波数へ影響が無かった(データは不表示)ために、CaMKII 阻害薬はビキュキュリンの投与期間中に停止した。CaMKII 活性化阻害薬の局所投与を行っても、BIED は生じた。BIED 周波数の経時変化は、図 3-1-1C で示したコントロール BIED の周波数経時変化と似ていたが、定常期の周波数が異なった(図 3-1-10B)。図 3-1-10B 中の 50~60 分の平均周波数は、 0.116 ± 0.003 Hz (vehicle, $n = 3$), 0.090 ± 0.002 Hz (50 μM KN-62, $n = 3$), 0.114 ± 0.003 Hz (50 nM KN-93, $n = 3$), 0.088 ± 0.003 Hz (500 nM KN-93, $n = 3$), 0.090 ± 0.002 Hz (50 μM , $n = 3$), 0.111 ± 0.003 Hz

(500 nM KN-92, n = 3)だった(図 3-1-11A). KN-92(negative control), Vehicle(control, ACSF の局所投与)と比較し, 500 nM, 50 μ M KN-93, 50 μ M KN-62 を投与すると, 定常的なてんかん波周波数に有意な減少が見られた(図 3-1-11A). しかしながら 300 nM KN-93 の投与によって, 発生周波数に有意な差は生じなかった. これは, KN-93 の Kd 値が 370 nM であるため, 300 nM の濃度では CaMKII 阻害効果が無かったのではないかと考えられる.

KN-93 が BIED 発生後に効果があるか確かめるために, ビキュキュリン投与開始 30 分後の BIED 発生中に KN-93 (500 μ M)の投与を行った. その結果, BIED 平均周波数は 0.103 ± 0.003 Hz となり, コントロール BIED 周波数と比べ有意な差は無かった($p = 0.75$, $n = 3$).

これらの結果から, BIED 誘導前の CaMKII 活性化阻害は, BIED 誘導を阻害せず, 定常期の周波数を減少することを示した. また, BIED 発生後の CaMKII 活性化阻害は効果が無いことを示した. さらに, CaMKII 阻害薬は, CV 値には影響しなかった(図 3-1-11B). したがって, CaMKII 阻害薬は定常状態の周波数を減少させるが, 周期的に発火する規則性は壊さないことがわかった.

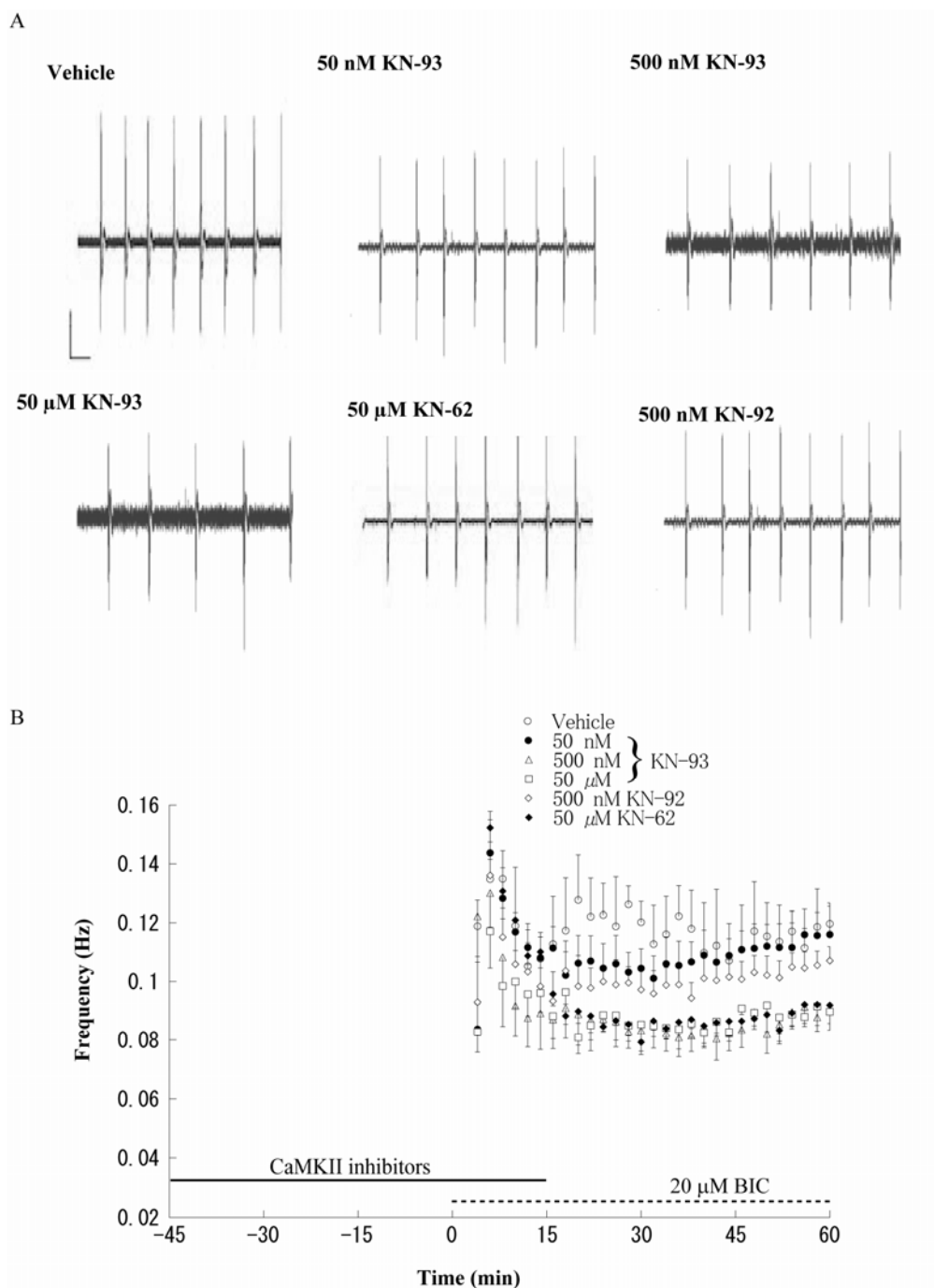


図 3-1-10. CaMKII 阻害薬の BIED 周波数経時変化に対する効果

A. CaMKII 阻害薬を加えた時のてんかん波典型例. 各濃度のビキュキュリン投与時の 60 分後の 1 分間のてんかん波典型例. スケールは, スケールは 0.5 mV, 5 sec を示す. B. 図中下方の黒横棒は CaMKII 阻害薬の投与期間を示し, 点線は 20 μM ビキュキュリンの投与期間を示す. (Vehicle: 3 slices from 2 guinea pigs, 50 μM KN-62: 3 slices from 3 guinea pigs, 50 nM KN-93: 4 slices from 2 guinea pigs, 500 nM: 4 slices from 2 guinea pigs, 50 μM: 4 slices from 2 guinea pigs, 500 nM KN-92: 5 slices from 4 guinea pigs)

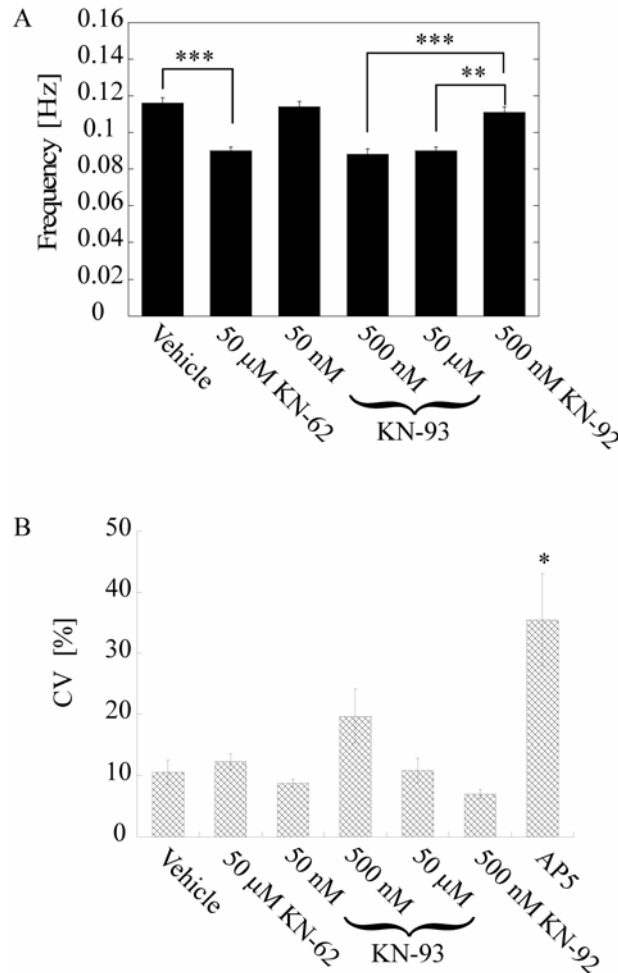


図 3-1-11. CaMKII 阻害薬の BIED 周波数と CV 値に対する効果

A : BIED 周波数に対する CaMKII 阻害薬の効果. B : BIED 周期 CV 値に対する CaMKII 阻害薬の効果(*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ANOVA with the post-hoc test as Scheffe test, vehicle; 3 slices from 2 guinea pigs, 50 μ M KN-62; 3 slices from 3 guinea pigs, 50 nM KN-93; 4 slices from 2 guinea pigs, 300 nM KN-93; 3 slices from 3 guinea pigs, 500 nM KN-93; 4 slices from 2 guinea pigs, 50 μ M KN-93; 3 slices from 2 guinea pigs, 500 nM KN-92; 5 slices from 4 guinea pigs, and 100 μ M AP5; 4 slices from 3 guinea pigs).

第7項 AMPA 受容体を介したシナプス伝達が BIED 周波数と周期性を調節する

NMDA 受容体, CaMKII 依存的なシナプス増強は BIED 発生に伴って生じた(第3章第2項). シナプス増強が抑圧された時, BIED 周波数は減少した(図 3-1-7, 3-1-11). 以上のことから, AMPA 受容体を介したシナプス伝達が BIED 周波数を調節できると考えられる. そこでその点を調べるために, BIED 発生中に CNQX(1-20 μM)を投与した. 1 μM CNQX は BIED 周波数に対して効果が無かった. 3 - 10 μM の CNQX によって, 有意に BIED 周波数を減少させた(図 3-1-12A). 20 μM CNQX は BIED の発生を阻害した(図 3-1-9A). 各 CNQX 濃度投与中の BIED 平均周波数は, 0.085 ± 0.003 Hz (BIC, $n = 3$), 0.0089 ± 0.0016 Hz (1 μM CNQX, $n = 3$), 0.069 ± 0.003 Hz (3 μM , $p < 0.05$, $n = 3$), 0.048 ± 0.006 Hz (5 μM , $p < 0.001$, $n = 3$), 0.023 ± 0.011 Hz (10 μM , $n = 3$)となった.

さらに CNQX の 5 μM 以上の投与は, 有意に BIED の発生規則性を乱し, CV 値を上昇させた(図 3-1-9B). 平均 CV 値は, $16.73 \pm 4.17\%$ (1 μM CNQX, $n = 3$), $15.66 \pm 3.17\%$ (3 μM , $n = 4$), $19.87 \pm 1.73\%$ (5 μM , $n = 4$), $35.02 \pm 6.01\%$ (10 μM , $n = 3$)であった.

また実際に, CA3 間の pEPSP の測定を行うと, 5 μM 以上の CNQX によって濃度依存的に pEPSP は減少し(図 3-1-9C), 10 μM 以上では有意な差が見られた.

これらの結果から, AMPA 受容体を介したグルタミン酸伝達は BIED 発生と関係があり, AMPA 受容体を介したシナプス伝達強度は BIED の発生周波数とてんかん波発生の規則性を調節していると考えられる.

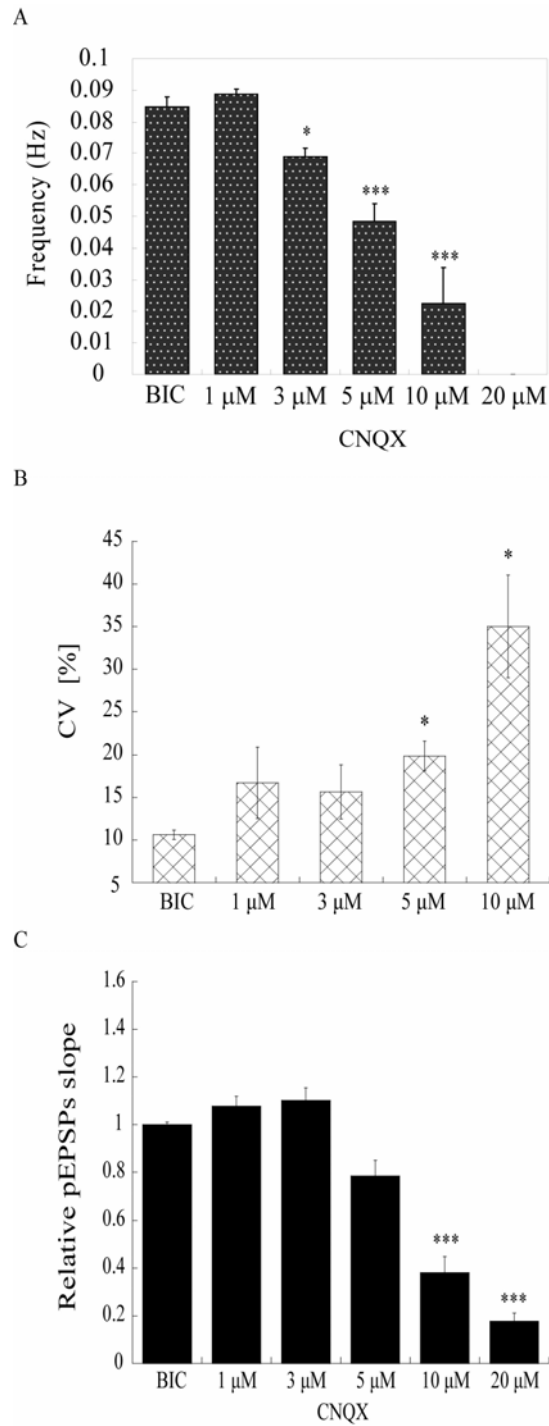


図 3-1-12. シナプス伝達強度は BIED 周波数と周期性を調整する。

A : BIED 周波数に対する CNQX 濃度依存的な効果. B : CV 値に対する CNQX 濃度依存的な効果. C : 各 CNQX 濃度依存的な興奮性シナプス (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, BIC: 3 slices from 3 guinea pigs, 1 μM : 3 slices from 3 guinea pigs, 3 μM : 4 slices from 3 guinea pigs, 5 μM : 4 slices from 3 guinea pigs, 10 μM : 3 slices from 3 guinea pigs, 20 μM : 3 slices from 3 guinea pigs).

第2節 海馬錐体細胞 giant EPSP パターン依存 的な神経同期過程

第1項 ビキュキュリン誘導てんかん波と giant EPSP

海馬スライスにおけるビキュキュリン誘導てんかん波発生時における錐体細胞同士の同期過程を調べるために、海馬 CA3 領域の細胞外記録とホールセルパッチクランプ法による CA3 錐体細胞膜電位の同時記録を行った。

CA3 細胞体層からの細胞外記録において、ビキュキュリン投与前、自発的なてんかん波やその他の神経細胞の同期的発火は観察されなかった。また錐体細胞からのホールセルクランプ記録においても、てんかん様活動や giant EPSP は観察されなかった[59, 60, 68]。しかしながら、自発的な活動電位や EPSP は、記録したすべての CA3 錐体細胞から観察された。

てんかん波は、上述のように 20 μ M ビキュキュリンを ACSF に溶かし海馬スライスへ灌流投与によって誘導した。てんかん発火は、ビキュキュリン投与開始後から 4～5 分で誘導された。また、電場電位のてんかん波と共に錐体細胞からは giant EPSP が観察された(図 3-2-1)。てんかん波の発生周波数は、図 3-1-1C で示した結果と同様に、てんかん波発生直後に上昇し、すぐ後に減少した。このような周波数変化の後に、発生周波数は、てんかん波発生 5～10 分後に安定した(図 3-2-2A)。細胞外記録で得られたてんかん波振幅は単調に増加し、発生後 5～10 分後に安定した(図 3-2-2B)。電場電位の振幅の大きさは、同期している錐体細胞の数を反映している。そのためてんかん波の過渡期の振幅増加は、錐体細胞同士の自己同期化が生じ、同時に発火する神経細胞の数が増加している過程だと考えられる。

ホールセルクランプ記録で錐体細胞から記録された giant EPSP の周波数経時変化も、細胞外記録によるてんかん波周波数経時変化と同様であった(図 3-2-4)。Giant EPSP の振幅の経時変化もまた、電場電位の振幅経時変化と同様に単調増加し、その後、定常になった(図 3-2-5)。Giant EPSP の持続時間は、周波数の経時変化のように、始めに増加し、その後減少していき定常状態になった(図 3-2-4)。

これらの結果から、個々の錐体細胞は、過渡期に少数の錐体細胞が同期し、その同期集団から徐々に大きくなる EPSP を受け取り、そしてそれらの同期集団は成長し、最終的に CA3 全体の錐体細胞が同期し、全ての錐体細胞は同期活動をする事を示唆している。

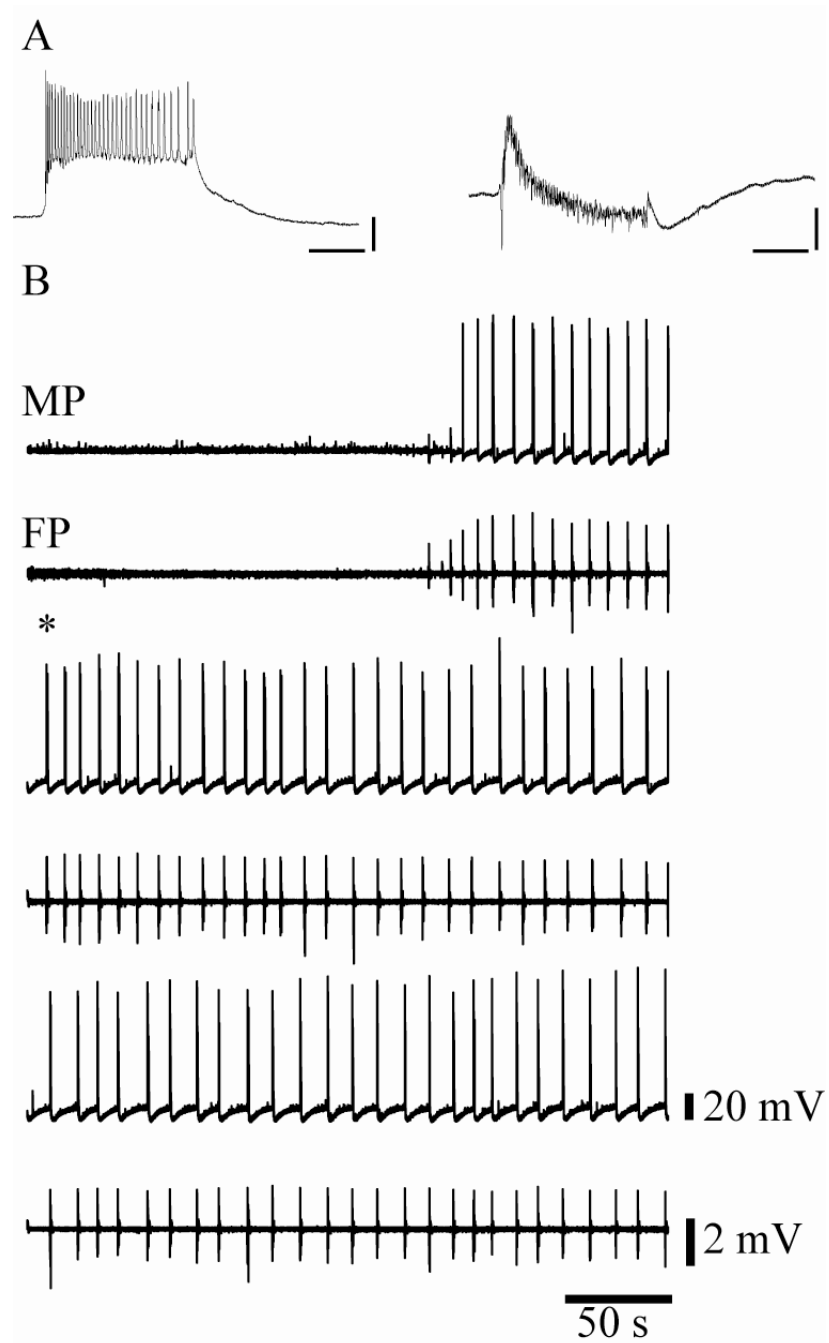


図 3-2-1. てんかん誘導初期の電場電位と錐体細胞膜電位の典型例. A : B のアスタリスク(*)部分のCA3錐体細胞から記録した膜電位変化(左)とCA3電場電位(右). スケールバー : 100 msec, 20 mV (左), 100 msec, 1 mV (右). B : CA3錐体細胞から記録した膜電位(MP)とCA3細胞体層から記録した電場電位(FP)変化(15分間). トレースの始まりからビキュキュリン(20 μ M)の投与を開始した. 細胞外記録電極とホールセル記録電極間の距離は500 μ m離れている.

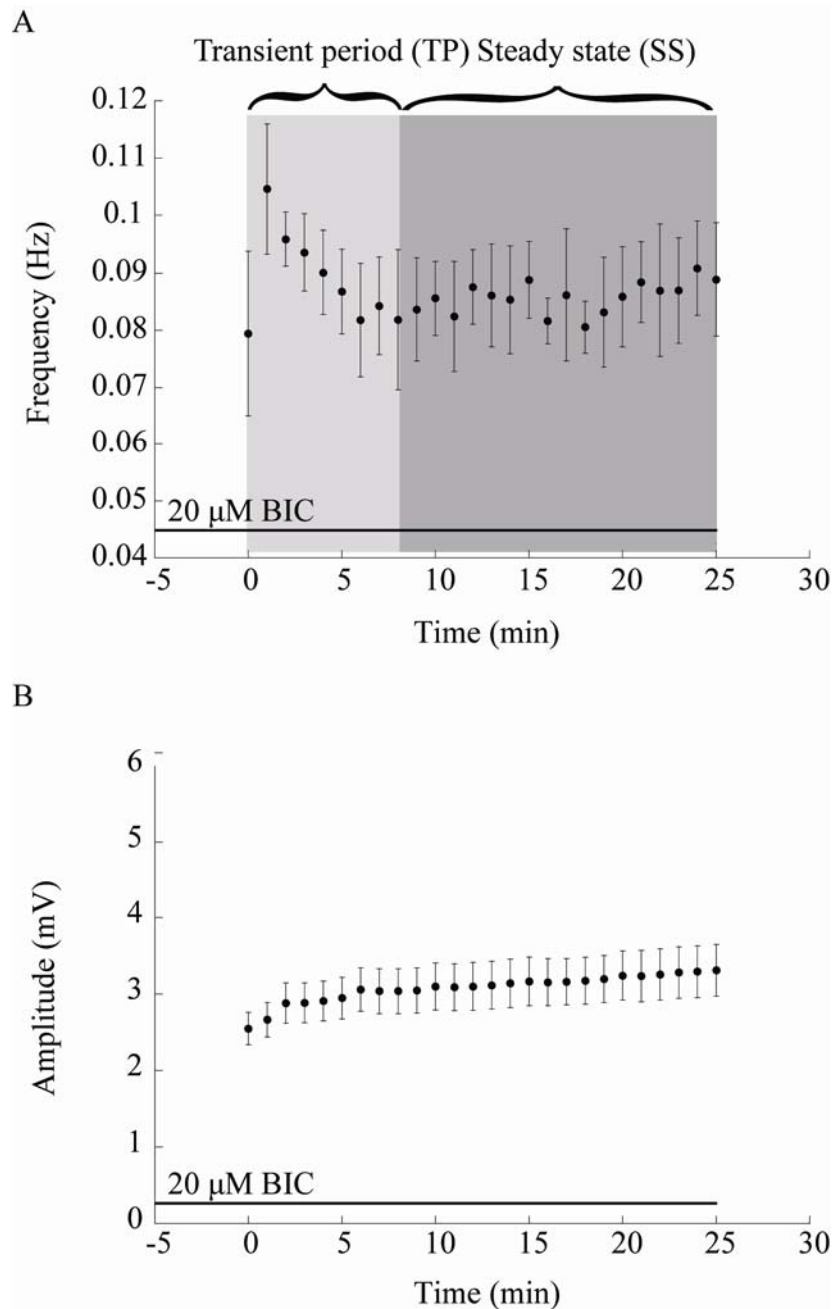


図 3-2-2. てんかん波の発達. A: てんかん波周波数経時変化. B: てんかん波電場電位振幅経時変化

第2項 Giant EPSP の形はてんかん波の過渡期を調節する

これまでの結果より、てんかん波の過渡期に錐体細胞間の同期発火が起こっていると考えられる。そこで第2項では、錐体細胞で観察される giant EPSP 変化が、てんかん波過渡期の周波数、細胞外記録の振幅に対し、どのような影響を与えるか調べた。Giant EPSP の振幅と持続時間は、アパミンと AP5 投与によって変化させた(図 3-2-3)。錐体細胞では、Giant EPSP に引き続き後過分極 (afterhyperpolarization; AHP) が生じる。Small-conductance Ca²⁺ activated K⁺ channel (SK channel)の阻害薬であるアパミン(100 μ M)は、AHP を抑える。そのため、アパミン投与によって、giant EPSP の持続時間を有意に長くした(図 3-2-3A)。しかしながら、アパミンは、giant EPSP 振幅に対して有意な影響は及ぼさなかった。NMDA 受容体はシナプス可塑性に重要な役割を持っているが、同様に、ゆっくりとした EPSP の誘導にも関与している[69]。AP5(100 μ M)の投与は、giant EPSP の持続時間は有意に短くし、さらに振幅も有意に減少させた(図 3-2-3B)。

実際に、アパミンにより延長された giant EPSP がてんかん波に対してどのような影響を与えるか調べた。SK チャネルの阻害を確実にするために、アパミンはビキュキュリン(20 μ M)投与前 15 分から ACSF と共に灌流投与した。アパミン投与によって、てんかん波の過渡期の周波数変化スピードを増加させ(Fig. 図 3-2-4A)、過渡期の期間を短縮させた。周波数は、急速に上昇し、てんかん波発生後 5 分以内には定常になった(図 3-2-4a)。定常時のてんかん波周波数は、コントロールのてんかん波周波数との間に有意な差は無かった(図 3-2-4A)。この結果から、アパミンにより延長された giant EPSP は、てんかん波の過渡期を短縮することが示唆される。そのため、錐体細胞の神経ネットワークは、延長された giant EPSP によってコントロール状態から急速に同期振動状態に変化すると考えられる。よってアパミンは、錐体細胞間の同期を促進する。

次に、AP5 によって短縮された giant EPSP がてんかん波の過渡期に対してどのような効果を与えるか調べた。AP5 もアパミンと同様に、ビキュキュリン投与開始 15 分前からの投与を行った。AP5 の投与によって、てんかん波は生じたが通常のてんかん波とは異なった。また、てんかん波の過渡期の期間は延長された(図 3-2-4B)。周波数の経時変化はコントロール状態と異なり徐々に増加し定常値に近づいていった(図 3-2-4B)。また、giant EPSP の振幅と持続時間は、徐々に増加し一定になった(図 3-2-5)。以上の結果から、AP5 によって短縮された giant EPSP は、錐体細胞の興奮性を減少させ、てんかん波が定常状態に安定になるまでのスピードを減速させることを示している。また、AP5 投与によって誘導されたてんかん波の発生周期が不規則なことより(図 3-1-8)、AP5 は錐体細胞間の同期発火を不規則に、確率論的に生じさせていると考えられる。

アパミンまたは AP5 のてんかん波誘導前投与は、てんかん波の過渡期、発生過程に影響を与えた。しかしながら、定常期の発生周波数に対して、アパミン投与は影響しなかった(図 3-2-4A)。さらに、てんかん波定常期への AP5 投与もまた、てんかん波周波数に対し影響を与えなかった(第 3 章第 1 節第 4 項(図 3-1-7B,C))。以上のことから、アパミン、AP5 による giant EPSP の変化は、てんかん波の過渡期の周波数変化に影響を与えるが、一旦定常状態になったてんかん波に対しては、影響しないと考えられる。よって giant EPSP の形態は、てんかん波過渡期に錐体細胞間の同期過程の調節に重要な役割を持っていると考えられる。

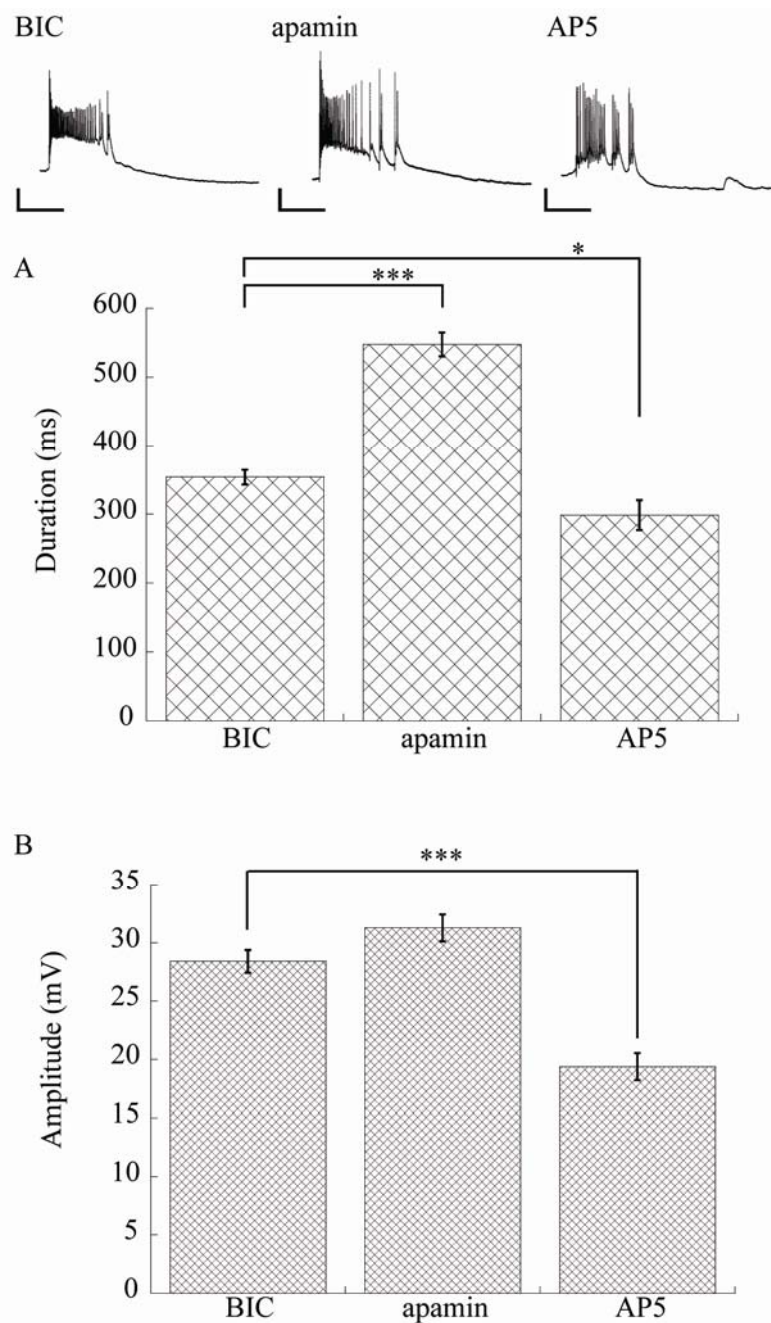


図 3-2-3. Giant EPSP に対するアパミンと AP5 の効果. A : Giant EPSP 持続時間に対する効果. 図 3-2-2 の 0~5 分間のデータから求めた. アパミンは有意に持続時間を延長し, AP5 は有意に持続時間を短縮させた($n=3$; $*p < 0.05$, $***p < 0.001$). 上段の挿入図は, 各々の典型例を示す. B : Giant EPSP 振幅に対する効果. アパミンは振幅を上昇させたが有意な差は示さなかった. AP5 は有意に振幅を減少させた($n=3$; $***p < 0.001$).

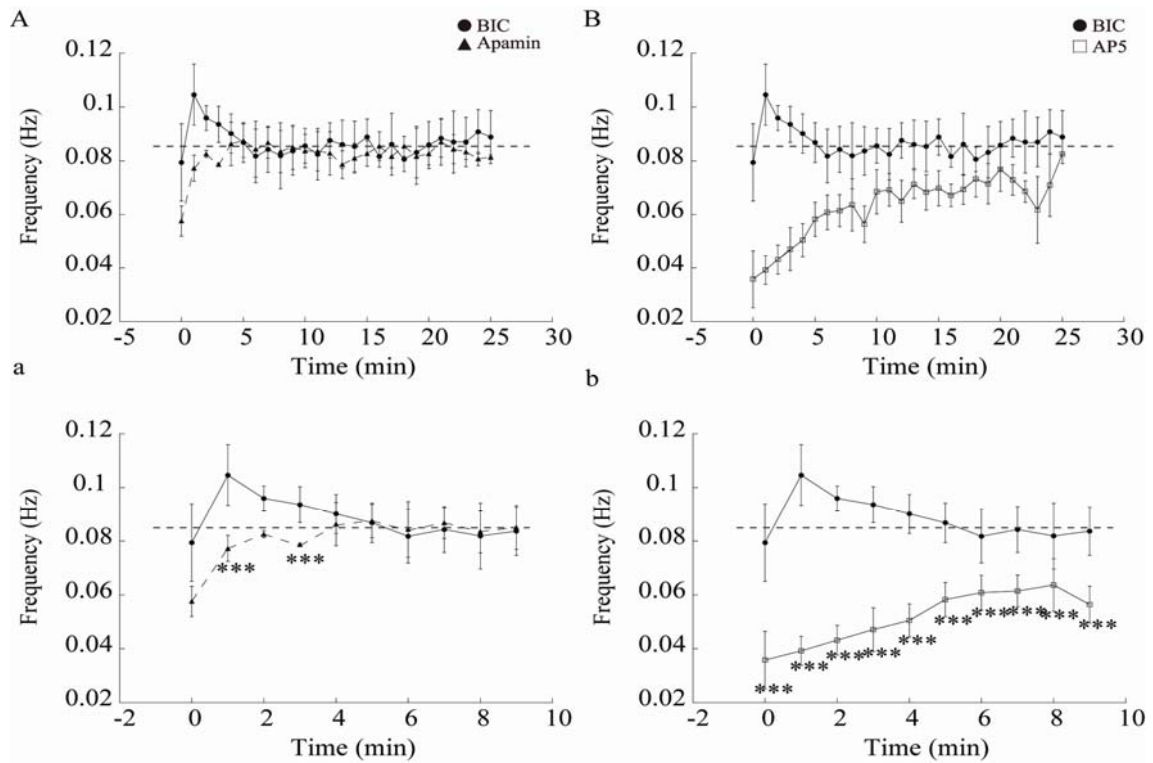


図 3-2-4. てんかん波周波数変化に対するアパミンと AP5 による giant EPSP 形態変化の効果. A: てんかん波周波数に対するアパミンの効果. 時間 0 はてんかん波の開始時間を示している. a: 上図の 0—10 分間を拡大した図を示す(左 b も同様). 点線は定常期の平均周波数を示す. アパミンによって, てんかん波周波数が定常になるまでの時間が短縮された. B: てんかん波周波数経時変化に対する AP5 の効果. AP5 によって, てんかん波周波数が定常になるまでの時間は延長した($n = 3$; $***p < 0.001$, compared with BIC).

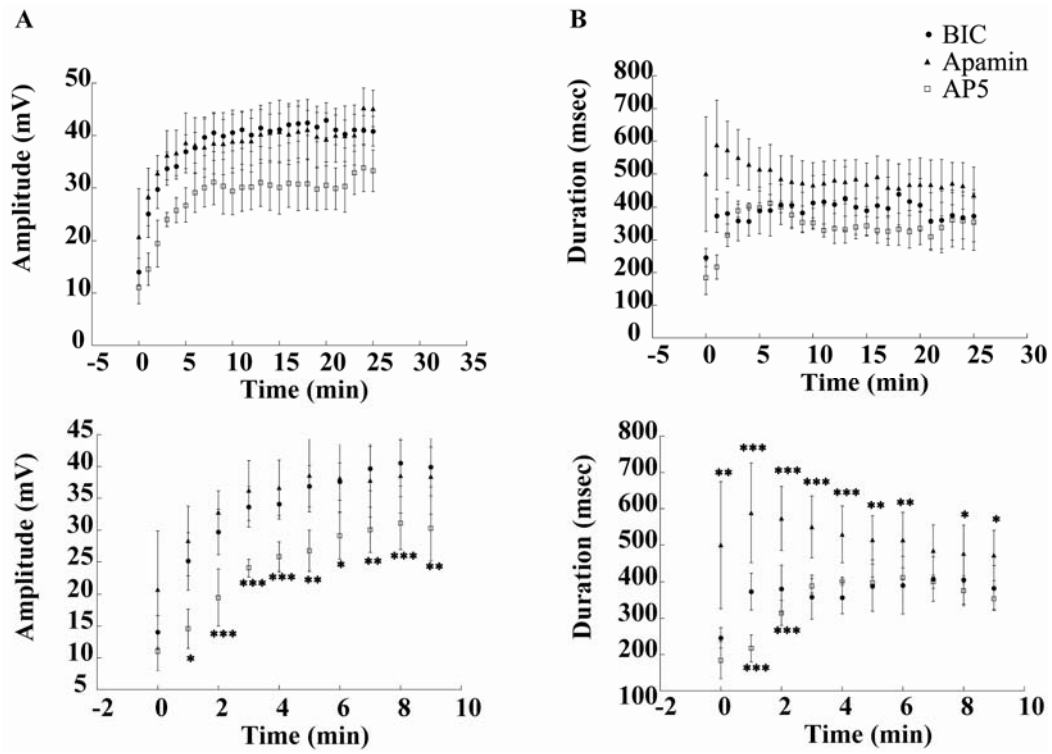


図 3-2-5. てんかん波中の giant EPSP 振幅, 持続時間に対すアパミン, AP5 の効果. A: てんかん波中の giant EPSP 振幅の経時変化 a: 上図の 0-10 分間の拡大図(b も同様). B: てんかん波中 giant EPSP 持続時間の経時変化(n = 3; *p < 0.05, **<0.01, ***p < 0.001, compared with BIC).

第4章 考察

第1節 ギャップ結合と AMPA 受容体を介したシナプス伝達は BIED 誘導に必要

AMPA 受容体とギャップ結合以外の、GABA_B 受容体、電位依存性カルシウムチャネル、代謝型グルタミン酸受容体、NMDA 受容体の阻害を行っても、BIED は発生した(図 3-1-3E, 3-1-4). Dudek らは、ギャップ結合がてんかん様同期活動の発生に重要であり、ケミカルシナプスと関係なくてんかん波が生じる事を報告した[58]. しかしながら、我々の結果は、Carbenoxolone によるギャップ結合の阻害は、BIED の発生と維持の両方を阻害した. また、GYKI52466 による AMPA 受容体の阻害もまた、BIED の発生と維持の両方を阻害した. 以上の結果から、BIED の発生、維持には AMPA 受容体とギャップ結合の両方の活動が絶対必要であると考えられる.

CA3 におけるギャップ結合としては、錐体細胞体間、抑制性神経間が観察されている[70, 71]. 神経細胞集団の同期発火により、細胞内の液性が[72]アルカリ性に傾き、ギャップ結合のコンダクタンス上昇(活性化)が生じると考えられている[72]. 本実験において、ビキュキュリンの投与は興奮性神経細胞の発火確率を上昇させ、小さな細胞集団(数個の神経細胞)の同期発火を誘発すると考えられる. その同期発火により、ギャップ結合のコンダクタンスが上昇し、隣接する神経細胞間の同期発火確率が上昇すると考えられる. 同期発火によるギャップ結合コンダクタンス上昇が起こると、それによってさらに錐体細胞の同期化が生じると考えられるので、同期の錐体細胞集団がだんだんと成長していくと考えられる. その結果、徐々に同期発火することの出来る細胞の数が上昇し、てんかん発火のような神経細胞集団の同期的異常発火が生じると考えられる.

コンピュータシミュレーションの結果によると、神経細胞同士のネットワークが、スモールワールドネットワークを持つ時にてんかん発火が発生しやすいとの報告がある[73]. スモールワールドネットワークとは、多くの神経細胞同士の結合は近距離の結合をもち、幾つかの神経細胞は長距離の結合性を持つネットワークである[74](図 4-1). 海馬の神経ネットワークは、ギャップ結合による近距離間の神経細胞同士の結合と、また軸索を伸ばし、AMPA 受容体を介したシナプ結合による長距離神経細胞間結合の二つを持つために、スモールワールドネットワーク性を有すると考えられる. ギャップ結合と AMPA 受容体を介したシナプ結合の片方でも欠けると、スモールワールドネットワークは形成されない. よって、ギャップ結合と AMPA 受容体がてんかん発火の発生、維持に必要なだという今回の結果は、ビキュキュリンを投与する事により、AMPA 受容体とギャップ結合の活性が生じ、海馬 CA3 ネットワークの中にスモールワールドネットワークが創出され、BIED が生じたと考えられる. また、通常は海馬内でてん

かん発火が観察されない事より、通常ではギャップ結合のコンダクタンスの増加は無く海馬内スモールワールドネットワークは創出しないのではないだろうか。

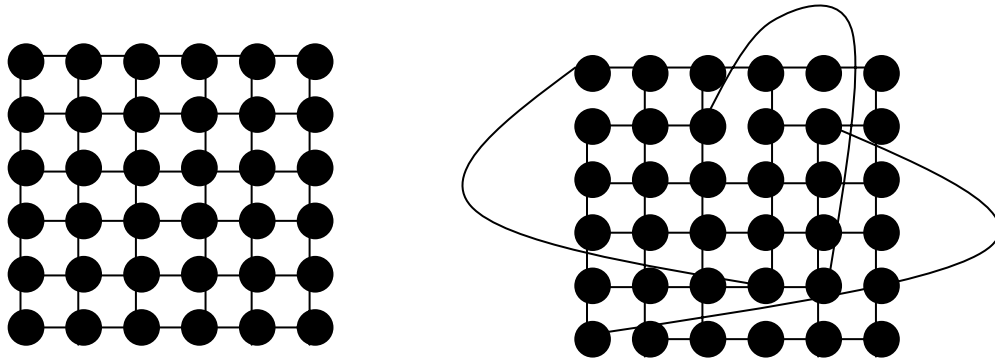


図 4-1. 正方格子ネットワークとスモールワールドネットワーク

左の図は、正方格子ネットワーク。右の図は、スモールワールドネットワーク。黒丸は神経細胞(ノード)を示し、線は結合を示す。スモールワールドネットワークは、幾つかの長距離結合を持つ。神経回路の場合、右図は、方向性のある結合になる。

第2節 BIED の発生は NMDA 受容体と CaMKII 依存的シナプス増強を伴う。

ビキュキュリン誘導てんかん波(Bicuculline-Induced Epileptic Discharges: BIED)の誘導中、海馬スライス CA 3 錐体細胞シナプス間で、NMDA 受容体、ならびに CaMKII 活性依存的なシナプス増強が生じていた(図 3-1-6)。Schneiderman らの先行研究において、てんかん波に伴って NMDA 依存的なシナプス増強が報告されている[44]。本研究では、初めて CaMKII 依存的なシナプス増強が BIED の発生に伴って生じていることを見つけた。BIED の発生に伴って生じるシナプス増強は、長期増強(LTP)誘導同様、NMDA 受容体、CaMKII 活性依存的[66, 67]であるので、LTP メカニズムと同様の機構で生じていると考えられる。LTP 機構において、CaMKII は NMDA 受容体の下流反応系に位置する[75, 76]。また、GABA_A 受容体の抑制は、LTP 誘導を促進する[28]。

さらに今回観察されたシナプス増強は、ビキュキュリンによる抑制性シナプス後電位(IPSP)抑制そのものによる、pEPSP の増大の可能性が残っている。しかしながら、ビキュキュリンを完全に除去する為にビキュキュリンの洗い流しを4時間行ったが、それでもなお、pEPSP の増強は観測された。従って、IPSP 抑制による増強の可能性は無いと考えている。もしシナ

プス増強が、ビキュキュリンの洗い流しが不十分な為に、GABA_A 受容体を介した抑制性伝達の阻害によって生じていたならば、おそらく pEPSP 増強は、ビキュキュリンの洗い流しによって抑圧されるだろう。さらに、BIED に伴ったシナプス増強は、ビキュキュリンも同時に投与されているにもかかわらず、AP5 または KN-93 によって阻害された(図 3-1-6)。以上の結果から、不十分なビキュキュリン洗い流しのための抑制性伝達阻害によるシナプス増強の可能性は、無いと考えられる。今回のシナプス増強は、てんかん発火に伴って NMDA 受容体を介した Ca²⁺流入による CaMKII の活性により生じたと考えられる。

キンドリングてんかんモデルでは、シナプス増強がてんかん波の誘導に重要だと考えられている [56]。しかしながら、本研究では、AP5, MK801, KN-93 や KN-62 によるシナプス増強阻害にもかかわらず、BIED の発生は阻害できなかった(図 3-1-6, -7, -9, -10)。このことから、シナプス増強は、ビキュキュリン誘導てんかんモデルでのてんかん誘導には必要ない事を示唆している。従って、このモデルにおいて、GABA_A 受容体を介した抑制性伝達の阻害が、てんかん波誘導に重要だと考えられる。

第3節 シナプス増強は BIED の周波数上昇と周期的な発火に必要。

CaMKII 阻害薬と NMDA 受容体阻害薬は、BIED の発生は阻害しないが、BIED 発生に伴ったシナプス増強を阻害し(図 3-1-6)、BIED 周波数を減少させた(図 3-1-7, -9, -11)。これらの結果は、シナプス増強が BIED 周波数を上昇させていることが示唆される。CaMKII 阻害薬と NMDA 受容体阻害薬そのものが BIED 周波数を調節している可能性も示唆される。しかしながら、BIED 発生後の各阻害薬投与は、周波数を減少させるような効果を示さなかった。従って、CaMKII 阻害薬、NMDA 受容体阻害薬によるシナプス増強阻害によって、てんかん波周波数が減少させられていると考えられる。本研究の結果は、BIED 発生に伴ったシナプス増強は、BIED 周波数を調節している事を示した。Bains らの先行研究では、低周波数刺激による CA3 シナプス間のシナプス抑圧は抗てんかん作用があることが報告されている [77]。そして、シナプス抑圧がてんかん波の発生を停止すると報告されている。本研究の結果、CaMKII 阻害薬と NMDA 受容体阻害薬はシナプス抑圧も示さなかったし、BIED の発生を抑えることも無かった。

CaMKII 阻害薬と NMDA 受容体阻害薬の BIED 誘導前の投与は、周波数を減少させたが、BIED 発生後の各阻害薬の投与は影響が無かった。また CaMKII 阻害薬の投与をビキュキュリン投与てんかん発生初期に止めても、周波数減少効果があった。以上の結果から、NMDA 受容体阻害薬と

CaMKII 阻害薬は BIED の過渡期に影響を与え、定常期には影響し無い事が示唆される。

さらに本研究の CNQX 投与実験の結果から、低い興奮性シナプス結合強度は、規則的な BIED 周期性を乱す事を明らかにした。この結果は、CA3 興奮性シナプス結合強度が BIED の周期性を調節している事を示唆している。さらに、NMDA 受容体阻害薬は BIED の周期性を乱し(図 3-1-8)、CaMKII 阻害薬は周期性を乱さない結果を得た(図 3-1-11)。NMDA 受容体は、シナプス増強と関係があるのと同様に、大きな時定数を持つ slow EPSP の発生にも関係している[78]。従って、NMDA 受容体阻害薬による NMDA 受容体の阻害は、シナプス増強の阻害のみならず、CA3 シナプス間の伝達も抑制してしまう。一方、CaMKII 阻害薬はシナプス増強のみを阻害する。さらに、BIED の発生源は CA3 神経回路であるので、BIED の発生周期は、CA3 錐体細胞間のグルタミン酸興奮性シナプス伝達強度によって調節されていると考えられる。

第4節 てんかん発生メカニズムとシナプス増強

てんかんは、脳内の興奮性と抑制性のバランスが壊れる事により発生すると一般に考えられている[55]。つまり、てんかん発火は、何らかの原因によって興奮性が異常に上昇した場合、または抑制性が減弱した場合に生じると考えられている。過剰興奮モデルであるキンドリングてんかんモデルにおいては、シナプス長期増強がてんかん波の発生原因と考えられ[56]、しかし一方で、キンドリング誘導てんかんにおいても、シナプス増強が必要ないという報告[57]、シナプス長期増強が原因とならない、てんかん発火も報告がある[58]。さらに、本研究の結果から、シナプス増強はてんかん発火の発生に必要なことがわかった。本節では、なぜシナプス増強がてんかん発火の原因では無い場合があるのかを考察し、実際のてんかん波の発生には AMPA 受容体とギャップ結合の活性化が必要であると論じた。

これまで、キンドリングモデル等の興奮性上昇てんかんモデルでは、高頻度刺激による興奮性シナプス増強がてんかん発火発生原因だと考えられてきた(図 4-2)。しかしながら、LTP を誘導してもてんかん発火が生じない報告[40, 79]や高速キンドリング刺激によって、シナプス増強は生じないがてんかん痙攣は生じるというような報告[57, 79, 80]があり、図 4-2 に示したような単純なてんかん発火発生メカニズムではないようである。

本研究の結果より、ビキュキュリン投与による脱抑制によって、図 4-3 に示したような過程を経ててんかん発火が生じるのではないかと仮説を立てた。まず始めに、CA3 錐体細胞は自発発火する性質があるので、脱抑制により海馬錐体細胞の自発発火確率は上昇する。海馬 CA3 領域のような

AMPA 受容体とギャップ結合を介したシナプス結合を持つ興奮性リカレントネットワークにおいて、確率論的に 2~3 個の錐体細胞の同期発火が生じると考えられる[81]. それら同期発火現象は、前述の機構によりギャップ結合のコンダクタンスを上昇させる[72]. その結果、発火している細胞と隣接する神経細胞の同期発火確率は、ギャップ結合を介して上昇させられ、同期発火する神経細胞の数が増加していく。同期発火すればギャップ結合が活性化し、ギャップ結合が活性化すれば同期発火していくと言う“ポジティブフィードバック経路”が生じると考えられる(図 4-3). この“神経同期発火とギャップ結合コンダクタンス上昇のポジティブフィードバック経路”が形成され促進するか否かがてんかん発火の発生のキーを握っており、てんかん波発生にとって非常に重要だと考えている。また、てんかん発火に対するシナプス増強の役割は、第 2 節で考察したようなてんかん発火の発生周波数、発生の規則性の制御に加えて、さらにこのポジティブフィードバック経路の促進効果の役割を持っているかもしれない。

以上のようなてんかん発火発生過程は、脱抑制モデルのみに適用できるわけではなく、キンドリングモデルのような、興奮性を亢進させるてんかんモデルにおいても同様な解釈が出来るのではないかと考えている。図 4-4 は、高頻度反復刺激誘導てんかんモデル(キンドリングモデルなど)におけるてんかん波発生過程の模式図を示した。図 4-3 に示した、モデルと同様に“神経同期発火とギャップ結合コンダクタンス上昇のポジティブフィードバック経路”がてんかん発火発生に重要だと考えている。高頻度反復刺激によるてんかん発火の発生原因は、これまでシナプス増強だと考えられていた。しかしながら、高頻度反復刺激そのものが、神経細胞集団の同期発火を生じさせ(図 4-4)、ギャップ結合のコンダクタンスを上昇させる[72]と考えられる。その為に、“神経同期発火とギャップ結合コンダクタンス上昇のポジティブフィードバック経路”が生じ、てんかん波が発生すると考えられる。その中でシナプス増強は、高頻度反復刺激によって生じるがてんかん波の発生原因ではないのでは？と私は考えている。MK-801 によって、キンドリング刺激によるシナプス増強を阻害しても、てんかん発火が生じること[82]、高速キンドリング刺激によって、シナプス増強は生じなくてもてんかん発火が生じること[57, 79]などからも、高頻度反復刺激を行ってシナプス増強が生じなくてもてんかん発火が生じている。この事は、シナプス増強がてんかん発火発生の原因なのではなく、“神経同期発火とギャップ結合コンダクタンス上昇のポジティブフィードバック経路”の生成が直接的な原因である可能性を示唆するものと思われる。また、Jahromi らによる、ギャップ結合の阻害はテタヌス刺激誘導てんかん発火を抑制した[83]。この結果もまた、シナプス増強が原因ではなくギャップ結合がてんかん発火の発生に重要である事を示唆している。

以上の事から、私はてんかん発火の発生には、“神経同期発火とギャップ結合コンダクタンス上昇のポジティブフィードバック経路”の生成が重要であると考えている。そして、平行して生じるシナプス増強は、てんかん発火の周波数や規則性を調節していると考えている。この事はシナプス増強がてんかん波発生に促進的な作用をもつ可能性を否定するものではなく、むしろてんかん発生に重要なポジティブフィードバック経路の生成を促進する作用を持っているのではないかと考えている。

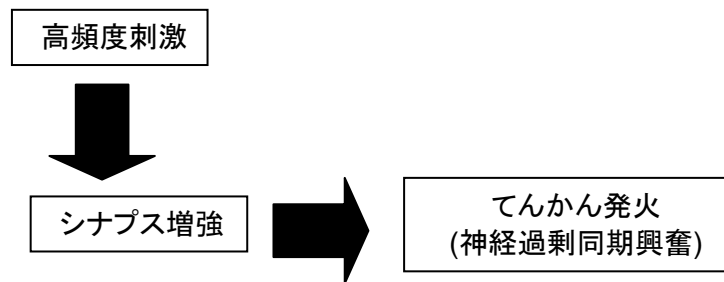


図 4-2. 高頻度反復刺激誘導てんかん発生経路

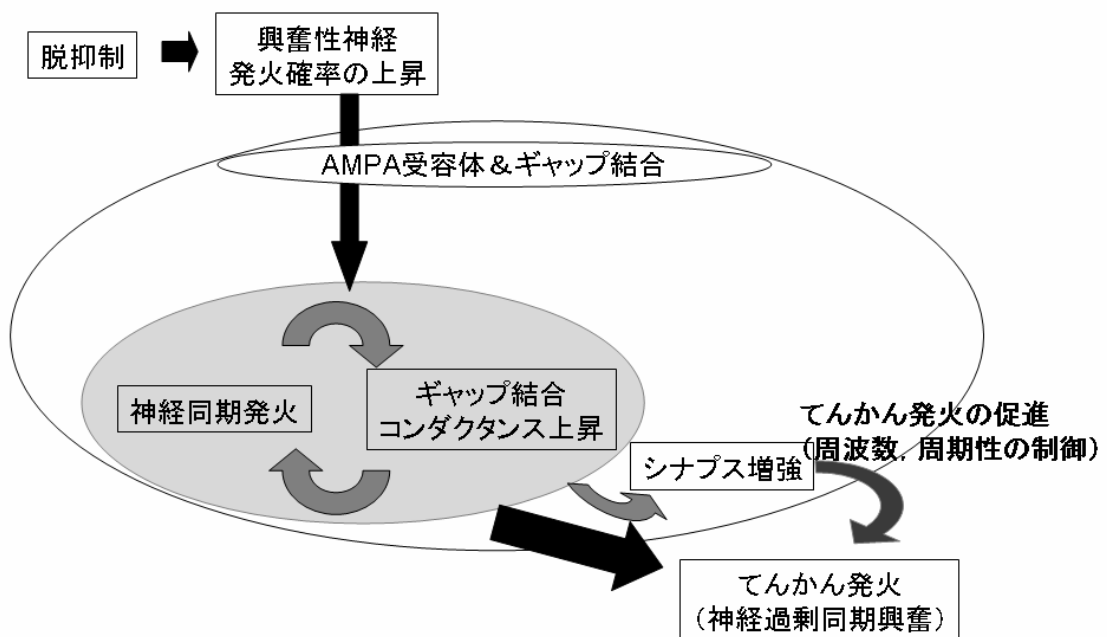


図 4-3. 脱抑制誘導てんかん発生経路

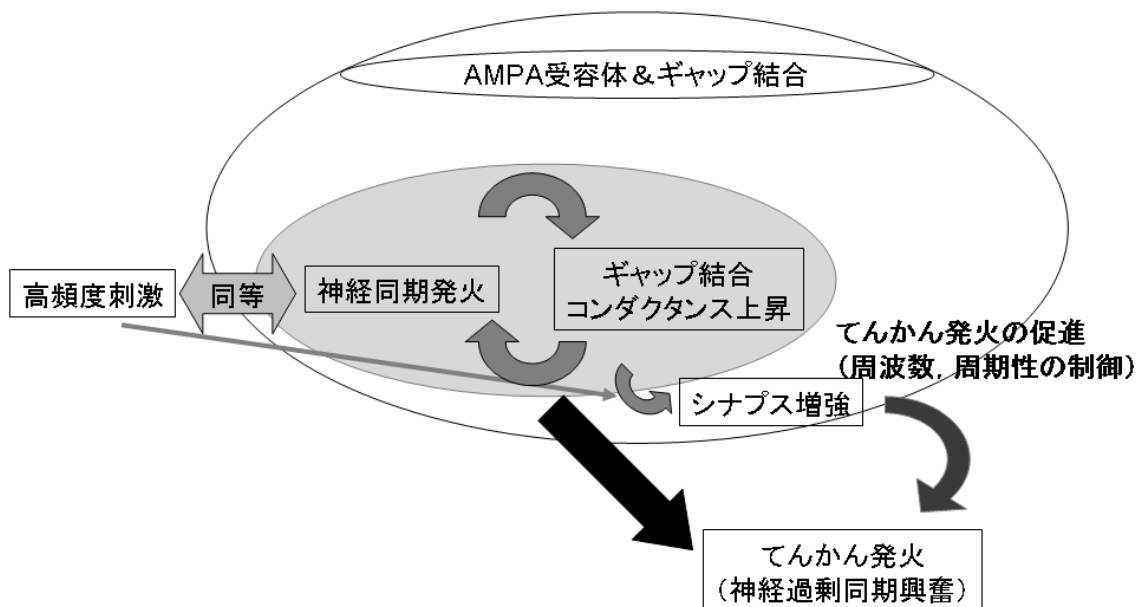


図 4-4. 新・高頻度反復刺激誘導てんかん発症経路

第5節 シナプス増強による BIED 周波数調節機構

BIED は海馬 CA3 ネットワーク内で誘導される(第 3 章 1-2). BIED は CA3 錐体細胞集団の同期的発火によって生じる. 通常海馬スライスにおいて, 自発的なてんかん様同期活動は, 錐体細胞と抑制性介在神経のフィードバック, またはフィードフォワード抑制結合[84]の為に, 発生する事が出来ない. 海馬スライス CA3 錐体細胞は, 自発的に発火する性質を持っている. しかし, 抑制性介在神経からの入力のために, 他の細胞を発火させる可能性は非常に低い(図 4-5A1). また, CA3 神経細胞同士は, リカレントな興奮性シナプス結合が存在する[85]. それぞれの CA3 錐体細胞は, 他の CA3 錐体細胞と, 少なくとも平均 2%の確率で結合している[86]. BIED はビキュキュリンによる $GABA_A$ 受容体の阻害によって生じる[87]. ビキュキュリン投与後, 錐体細胞への IPSP は抑制され, 錐体細胞はバースト発火ようになる. その結果, 他の錐体細胞へのバースト活動伝播確率が上昇し[86], 多くの錐体細胞が発火活動し, BIED を生じる同期的活動をす

るようになると考えられる。また、CA3 錐体細胞の中には、BIED の周期性をつくるペースメーカーニューロンとなる細胞がいくつか存在すると考えられる。ペースメーカーニューロンは繰り返し発火し、ペースメーカーニューロンと結合を持つ錐体細胞に AMPA 受容体を介した EPSP を生じさせる[64]。この時、ギャップ結合も同時に活動し[72]、錐体細胞集団は、前述したように AMPA 受容体とギャップ結合を介して同期的な発火を生じると考えられる。また、同期発火している錐体細胞の数が上昇し BIED を発生させる閾値に到達した時、BIED の活動は始まる[88]。BIED 発生と同時に、NMDA 受容体と CaMKII 依存的なシナプス増強が生じ、錐体細胞間のシナプス伝達確率が上昇する[86]。錐体細胞 1 つの刺激によって、同期的てんかん活動が生じる[89]事からも、ペースメーカーニューロンによって BIED が誘導されると考えられる。また、ペースメーカーニューロンが CA3 領域に多数存在したときは、一つのペースメーカーニューロンの活動に引き込まれ、BIED の周期的な活動を生じているのではないかと考えられる。

本研究は、シナプス結合強度の変化が BIED 周波数を調節している事を示した(図 3-1-12)。BIED の定常期には、BIED に伴ったシナプス増強によってシナプス結合強度は飽和していると考えられる(図 4-5A3)。また、ペースメーカーニューロンからの反復入力がある BIED の周期を形成していると考えている(図 4-5B)。CaMKII によるシナプス増強の阻害や、低濃度(3 μM)の CNQX の投与は BIED 周波数を減少させた(図 3-1-9, -10, -11)。この時、ペースメーカーニューロンの発火周波数が変化しないが、シナプス結合強度の減少のために、ペースメーカーニューロンからの EPSP は減少していると考えられる。そのために、ペースメーカーニューロン活動によって、同期的活動をしている錐体細胞の数を BIED 発生閾値まで到達させる時間が延長されるためだと考えられる。その結果、EPSP が大きな時と比べ周波数が減少すると考えられる(図 4-5B)。一方、NMDA 受容体を阻害した場合や、高濃度(5 μM 以上)の CNQX 投与を行った場合、周波数を減少し、かつ発生周期の規則性を乱した(図 3-1-8, 12)。この状態で EPSP は、通常の BIED 発生時と比べ小さいと考えられる。そのために、ペースメーカーニューロンからの伝達確率が減少し、広範囲の錐体細胞の同期的活動を誘導しにくい状態になっていると考えられる。また、いくつかのペースメーカーニューロン同士の引き込みが出来なく、海馬スライス上にいくつかのペースメーカーニューロンが存在していると考えられる。その結果、図 4-5C のように、ペースメーカーニューロンを中心とした島のような同期的発火領域が生じ、BIED が不規則的に確率論的に生じているのではないだろうか。よって、BIED の周期は長く、不規則になるのではないだろうか(図 4-5C)。

以上の仮説は、今後更に明らかにするために研究を進める必要がある。

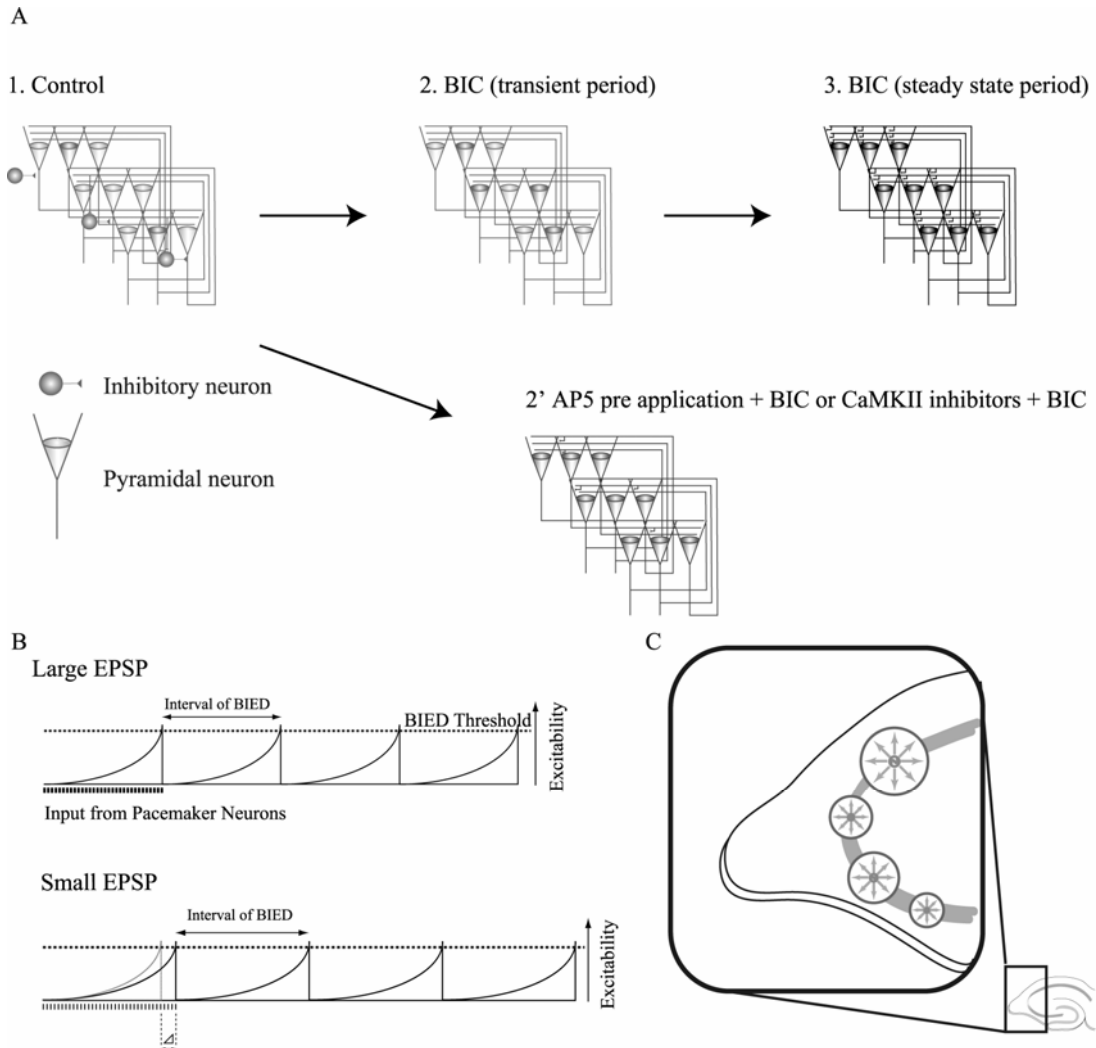


図 4-5. BIED 周波数調節モデル

A : 海馬スライス CA3 ネットワークの異なる状態を示した。線の色の濃さは、細胞間の結合強度の強さを示している。また、細胞体の色の濃さは、錐体細胞の活動性を示している。B : シナプス結合強度の違いにより生じる異なる BIED 周波数。||| は、ペースメーカー細胞からの周期的な入力を示す。太さにより、シナプス入力強度を表現した。ペースメーカーからの入力により同期的に活動する錐体細胞の数が増え、BIED 発生閾値に達したときに、てんかん発火が生じる。シナプス入力弱い場合 (small EPSP)、ペースメーカーからの入力も弱くなり、神経細胞集団を発火閾値まで興奮性を上昇させる時間が長くなる。そのために Δ 分発火周期が延長される。C : CA3 錐体細胞間のシナプス結合が非常に小さい場合、ペースメーカーからの信号伝達確率が低下し、信号を伝播できる錐体細胞の数が少なくなる。そして、島のように幾つかの同期集団が形成されていると考えられる。

第6節 Giant EPSP 依存的な神経同期過程

3章2節では BIED の神経活動同期過程について、BIED 周波数と電場電位振幅の経時変化の解析によって調べた。BIED 発生直後から、周波数と振幅は約 10 分間徐々に変化して行き、定常になった(図 3-2-2)。定常期、錐体細胞集団は同期的に活動し、周期的な BIED を生じている。一方過渡期には、周波数、振幅が変化する。この過渡期の変化は、神経細胞集団の自発的同期過程によって生じると考えられる。本研究の結果は、(1)アパミン投与により延長された giant EPSP(long giant EPSP)は、BIED の過渡期を短縮し、BIED 発生をすぐに定常的にし(図 3-2-4A)、(2)AP5 投与によって短縮された giant EPSP(short giant EPSP)は、BIED 過渡期を延長し、BIED 周波数を低下させた(図 3-2-4B)。また、(3)giant EPSP 特性の違いは、定常期の BIED 周波数には影響が無かった(図 3-2-6)。以上の結果より giant EPSP の性質は BIED が定常に発生するまでの時間を決定し、定常期の振動状態を決定すると考えられる。

BIED の発生は、前節で述べたような錐体細胞間の同期過程を経て生じると考えられる。そのような錐体細胞間の同期過程において、giant EPSP の形態は、個々の錐体細胞バーストパターンと関係している。Long または、short giant EPSP は、図 4-6A, B で示すように錐体細胞のバーストパターンに変化を与え、シナプス増強を介した神経同期過程に影響を与えると考えられる。アパミン投与による Long giant EPSP は、錐体細胞のスパイク発生確率も上昇させていると考えられる。そのために、シナプス前・後の同時発火確率が上昇し、スパイクタイミング依存的なシナプス増強(STDP)[90]が生じやすいと考えられる。よって、アパミン投与によって延長された long giant EPSP は神経細胞間の同期過程を促進し、BIED が定常になる時間を短縮すると考えられる。一方、AP5 投与による short giant EPSP は、スパイク確率が減少していると考えられる。また、NMDA 受容体は、シナプス増強や STDP 誘導にも重要な受容体である[91]。そのために、シナプス増強が抑圧され、神経細胞同士の同期が困難になると考えられる。

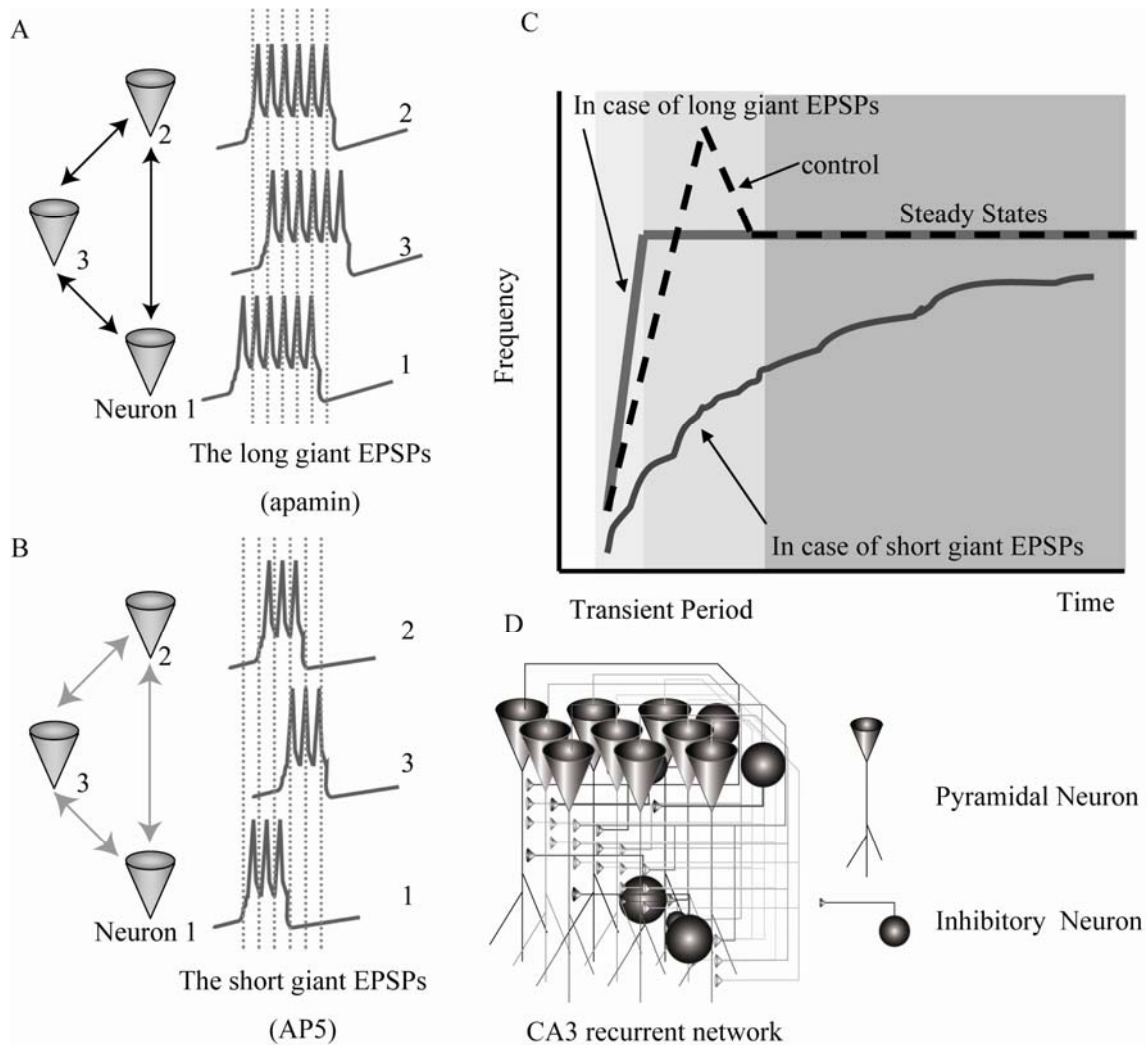


図 4-6. Giant EPSP 特性に依存した神経同期過程モデル

A, B: 錐体細胞間と giant EPSP の関係を示した。A は, long giant EPSP の場合。B は shot giant EPSP の場合。円錐は CA3 錐体細胞を示し, 矢印はシナプス結合を示し, 色の濃淡はシナプス結合強度を示す。トレースは giant EPSP とスパイクを模式的に示した。C: BIED 周波数経時変化模式図。Giant EPSP パターンの違いにより, 神経細胞間の同期スピードが異なる。D: 海馬 CA3 神経細胞ネットワーク。CA3 錐体細胞は, 興奮性リカレントシナプス結合を持っている。そのためピキュキュリンによる脱抑制により, A, B 示したような錐体細胞間の同期現象が生じやすいと考えられる。

第5章 結語

てんかんが生じる主な原理は、脳内の興奮性と抑制性のバランス崩壊だと考えられており、てんかん発作中、脳神経細胞は同期過剰興奮発火を繰り返して起こす。そして、脳神経ネットワーク内でシナプスの可塑的変化が生じているのではないかと考えられてきた。また、キンドリング仮説によれば、シナプス増強がてんかん波発生の原因であると考えられている。しかしながら、そのシナプス増強が、てんかん波発生原因なのか結果なのか、またその役割は何であるのか、良くわかっていなく、てんかん波の発生機構に関しては不明な点が多い。そこで、我々は、モルモット海馬スライスビキュキュリン誘導てんかんモデルを用い、てんかん波の発生機構を明らかにすることを目的とした。

その結果、ビキュキュリン誘導てんかん波の発生には、海馬 CA3 領域の神経ネットワークと、CA3 神経ネットワーク間の AMPA 受容体とギャップ結合の両方が必要であり、その他のチャンネル、受容体はてんかん波の発生に必要なことが解かった。さらに、ビキュキュリン誘導てんかん波にともなって、シナプス増強が生じ、またそのシナプス増強は、NMDA 受容体、ならびに Ca^{2+} /カルモジュリンキナーゼ II (CaMKII) 依存的であることが解かった。さらに、NMDA 受容体阻害薬または CaMKII 阻害薬による、てんかん波シナプス増強の抑制は、てんかん発火そのものの発生は抑制しなかった。しかしながら有意に、てんかん波の発生周波数を減少させた。また、AP5, MK801 による NMDA 受容体の阻害は、てんかん発火周期の規則性を乱した。さらに、てんかん波発生中に、AMPA 受容体競合阻害薬 CNQX を投与すると、てんかん波周波数は濃度依存的に減少した。

以上の結果から、ビキュキュリン誘導てんかん波モデルでは、キンドリング仮説で言われているように、シナプス増強はてんかん波の原因ではなく、AMPA 受容体とギャップ結合を介した興奮性ネットワークの脱抑制によって生じる。また、シナプス増強は、てんかん発火によって生じ、てんかん発生原理とは独立したものだと考えられる。これまでキンドリング仮説において、シナプス増強によっててんかん波が生じると考えられていた。これは、人工的な反復高強度刺激そのものが、脱抑制により生じる発火と同等の役割をし、ギャップ結合の活性化を生じさせ、“ギャップ結合と同期発火とのポジティブフィードバック経路”を形成しているのではないかと考えている。しかし、この仮説においてもシナプス増強がてんかん発生に促進的な作用をもつ可能性を否定するものではない。本研究から、てんかん中のシナプス増強はてんかん波の定常発生周波数と周期性を制御する役割を持つことが示唆された。この事は、*in vivo* キンドリングモデルにおいて、てんかん発作の回数を重ねるごとに、てんかん発火頻度が上昇する事、さらには、人のてんかん患者においても、てんかん発火頻度が高いほど、重篤な症状が生じる[92]事とも一致する。この事から、てんかん発火自身によるシナプス増強は、てんかん発作頻度や症状を調節している事が示唆される。

また、本研究では、てんかん波生成過程を理解するために、一つ一つの神経細胞の活動性が神経の同期過程にどのような影響を与えているのか調べた。また、てんかん波誘導過程において、錐体細胞の giant EPSP の特性の違いが神経細胞同期過程を調節する事がわかった。この事は、神経細胞が持つ活動性の違いによって、神経の同期活動が自律的に調節されている事を示唆している。

本研究の結果から、私はてんかん発火の発生には、“神経同期発火とギャップ結合コンダクタンス上昇のポジティブフィードバック経路”の活性化が重要であると考えている。そして、平行して生じるシナプス増強は、てんかん発火の周波数や規則性を調節し、てんかん発生に重要なポジティブフィードバック経路活性化を促進する作用も持っているのではないかと考えている。今後さらに、てんかん発生とギャップ結合の関係を明らかにする必要がある。

謝辞

本研究を行うにあたり，終始多大なる御指導ならびに御鞭撻を賜りました，夏目季代久教授に心より感謝申し上げます。

学位論文の審査を快くお引き受けくださり，貴重なご助言をいただきました九州工業大 林 初男 教授，石塚 智 助教授，熊本大学 林田 祐樹 助教授に厚く御礼申し上げます。

なお，本研究は，九州工業大学 21 世紀 COE プログラム「生物とロボットが織りなす脳情報工学の世界」の補助を受けて行われました。ここに感謝いたします。

最後になりましたが，本研究を行うにあたって，常に御援助頂きました夏目研究室の全ての皆様に感謝いたします。

参考文献

- [1] Y. Shu, A. Hasenstaub and D. A. McCormick, Turning on and off recurrent balanced cortical activity, *Nature*, Vol. 423, (2003) 288-93.
- [2] W. B. Scoville and B. Milner, Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. 1957, *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, Vol. 12, (2000) 103-13.
- [3] S. Zola-Morgan, L. R. Squire and D. G. Amaral, Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus, *J Neurosci*, Vol. 6, (1986) 2950-67.
- [4] S. Zola-Morgan and L. R. Squire, Memory impairment in monkeys following lesions limited to the hippocampus, *Behav Neurosci*, Vol. 100, (1986) 155-60.
- [5] M. Mishkin, Memory in monkeys severely impaired by combined but not by separate removal of amygdala and hippocampus, *Nature*, Vol. 273, (1978) 297-8.
- [6] S. M. Zola-Morgan and L. R. Squire, The primate hippocampal formation: evidence for a time-limited role in memory storage, *Science*, Vol. 250, (1990) 288-90.
- [7] H. Okamoto and K. Ichikawa, Switching characteristics of a model for biochemical-reaction networks describing autophosphorylation versus dephosphorylation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II, *Biol Cybern*, Vol. 82, (2000) 35-47.
- [8] E. A. Maguire, D. G. Gadian, I. S. Johnsrude, C. D. Good, J. Ashburner, R. S. Frackowiak and C. D. Frith, Navigation-related structural change in the hippocampi of taxi drivers, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 97, (2000) 4398-403.
- [9] E. A. Maguire, R. S. Frackowiak and C. D. Frith, Recalling routes around london: activation of the right hippocampus in taxi drivers, *J Neurosci*, Vol. 17, (1997) 7103-10.
- [10] R. G. Morris, P. Garrud, J. N. Rawlins and J. O'Keefe, Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions, *Nature*, Vol. 297, (1982) 681-3.
- [11] M. A. Wilson and B. L. McNaughton, Dynamics of the hippocampal ensemble code for space, *Science*, Vol. 261, (1993) 1055-8.
- [12] D. Liao, N. A. Hessler and R. Malinow, Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice, *Nature*, Vol. 375, (1995) 400-4.
- [13] D. K. Selig, R. A. Nicoll and R. C. Malenka, Hippocampal long-term potentiation preserves the fidelity of postsynaptic responses to presynaptic bursts, *J Neurosci*, Vol. 19, (1999) 1236-46.
- [14] P. E. Castillo, R. Janz, T. C. Sudhof, T. Tzounopoulos, R. C. Malenka and R. A. Nicoll, Rab3A is essential for mossy fibre long-term potentiation in the hippocampus, *Nature*, Vol. 388, (1997) 590-3.
- [15] M. G. Weisskopf, P. E. Castillo, R. A. Zalutsky and R. A. Nicoll, Mediation of hippocampal mossy fiber long-term potentiation by cyclic AMP, *Science*, Vol. 265, (1994) 1878-82.
- [16] G. Lonart, R. Janz, K. M. Johnson and T. C. Sudhof, Mechanism of action of rab3A in mossy fiber LTP, *Neuron*, Vol. 21, (1998) 1141-50.
- [17] R. Goold, K. M. Chan and A. J. Baines, Coordinated regulation of synapsin I interaction with F-actin by Ca²⁺/calmodulin and phosphorylation: inhibition of actin binding and bundling, *Biochemistry*, Vol. 34, (1995) 1912-20.

- [18] T. W. Rosahl, M. Geppert, D. Spillane, J. Herz, R. E. Hammer, R. C. Malenka and T. C. Sudhof, Short-term synaptic plasticity is altered in mice lacking synapsin I, *Cell*, Vol. 75, (1993) 661-70.
- [19] T. W. Rosahl, D. Spillane, M. Missler, J. Herz, D. K. Selig, J. R. Wolff, R. E. Hammer, R. C. Malenka and T. C. Sudhof, Essential functions of synapsins I and II in synaptic vesicle regulation, *Nature*, Vol. 375, (1995) 488-93.
- [20] D. M. Spillane, T. W. Rosahl, T. C. Sudhof and R. C. Malenka, Long-term potentiation in mice lacking synapsins, *Neuropharmacology*, Vol. 34, (1995) 1573-9.
- [21] K. Fukunaga, L. Stoppini, E. Miyamoto and D. Muller, Long-term potentiation is associated with an increased activity of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II, *J Biol Chem*, Vol. 268, (1993) 7863-7.
- [22] A. Ohyama, K. Hosaka, Y. Komiya, K. Akagawa, E. Yamauchi, H. Taniguchi, N. Sasagawa, K. Kumakura, S. Mochida, T. Yamauchi and M. Igarashi, Regulation of exocytosis through Ca²⁺/ATP-dependent binding of autophosphorylated Ca²⁺/calmodulin-activated protein kinase II to syntaxin 1A, *J Neurosci*, Vol. 22, (2002) 3342-51.
- [23] A. Barria, D. Muller, V. Derkach, L. C. Griffith and T. R. Soderling, Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation, *Science*, Vol. 276, (1997) 2042-5.
- [24] M. Maletic-Savatic, T. Koothan and R. Malinow, Calcium-evoked dendritic exocytosis in cultured hippocampal neurons. Part II: mediation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, *J Neurosci*, Vol. 18, (1998) 6814-21.
- [25] K. Minami, K. Fukuzawa and Y. Nakaya, Protein kinase C inhibits the Ca(2+)-activated K⁺ channel of cultured porcine coronary artery smooth muscle cells, *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 190, (1993) 263-9.
- [26] L. M. Grover, Evidence for postsynaptic induction and expression of NMDA receptor independent LTP, *J Neurophysiol*, Vol. 79, (1998) 1167-82.
- [27] K. Natsume, Y. Fueta, T. Ishidao, K. Arashidani, K. Kometani and H. Hori, Supra-maximum theta-burst stimulation induces a novel form of metabotropic glutamate receptor-dependent long-term potentiation in CA1 of rat hippocampal slices., The abstract of International Symposium on Neuronal Signaling and Protein Phosphorylation-Dephosphorylation (Fukuoka, Japan), (2000), P-51
- [28] H. Wigstrom and B. Gustafsson, Facilitated induction of hippocampal long-lasting potentiation during blockade of inhibition, *Nature*, Vol. 301, (1983) 603-4.
- [29] S. L. Bressler, R. Coppola and R. Nakamura, Episodic multiregional cortical coherence at multiple frequencies during visual task performance, *Nature*, Vol. 366, (1993) 153-6.
- [30] S. F. Farmer, Rhythmicity, synchronization and binding in human and primate motor systems, *J Physiol*, Vol. 509 (Pt 1), (1998) 3-14.
- [31] W. Singer and C. M. Gray, Visual feature integration and the temporal correlation hypothesis, *Annu Rev Neurosci*, Vol. 18, (1995) 555-86.
- [32] R. D. Traub, J. G. Jefferys and M. A. Whittington, Simulation of gamma rhythms in networks of interneurons and pyramidal cells, *J Comput Neurosci*, Vol. 4, (1997) 141-50.
- [33] A. J. Heynen and D. K. Bilkey, Induction of RSA-like oscillations in both the in-vitro and in-vivo hippocampus, *Neuroreport*, Vol. 2, (1991) 401-4.
- [34] J. Konopacki and H. Golebiewski, Theta-like activity in hippocampal formation slices: cholinergic-GABAergic interaction, *Neuroreport*, Vol. 4, (1993) 963-6.
- [35] J. Winson, Loss of hippocampal theta rhythm results in spatial memory deficit in the rat, *Science*, Vol. 201, (1978) 160-3.

- [36] K. Natsume and K. Kometani, Theta-activity-dependent and -independent muscarinic facilitation of long-term potentiation in guinea pig hippocampal slices, *Neurosci Res*, Vol. 27, (1997) 335-41.
- [37] J. E. Skinner, M. Molnar and Z. J. Kowalik, The role of the thalamic reticular neurons in alpha- and gamma-oscillations in neocortex: a mechanism for selective perception and stimulus binding, *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, Vol. 60, (2000) 123-42.
- [38] J. E. Lisman and M. A. Idiart, Storage of 7 +/- 2 short-term memories in oscillatory subcycles, *Science*, Vol. 267, (1995) 1512-5.
- [39] S. Hirose, M. Okada, K. Yamakawa, T. Sugawara, G. Fukuma, M. Ito, S. Kaneko and A. Mitsudome, Genetic abnormalities underlying familial epilepsy syndromes, *Brain Dev*, Vol. 24, (2002) 211-22.
- [40] 日本生物学的精神医学会, 佐藤光源, 加藤進昌, てんかん -けいれん準備性と発作発現の神経機構, 株式会社 学会出版センター, 1995.
- [41] T. Nagao, A. Alonso and M. Avoli, Epileptiform activity induced by pilocarpine in the rat hippocampal-entorhinal slice preparation, *Neuroscience*, Vol. 72, (1996) 399-408.
- [42] R. M. Lebovitz, Autorhythmicity of spontaneous interictal spike discharge at hippocampal penicillin foci, *Brain Res*, Vol. 172, (1979) 35-55.
- [43] H. S. Swartzwelder, W. W. Anderson and W. A. Wilson, Mechanism of electrographic seizure generation in the hippocampal slice in Mg²⁺-free medium: the role of GABA_A inhibition, *Epilepsy Res*, Vol. 2, (1988) 239-45.
- [44] J. H. Schneiderman, C. A. Sterling and R. Luo, Hippocampal plasticity following epileptiform bursting produced by GABA_A antagonists, *Neuroscience*, Vol. 59, (1994) 259-73.
- [45] L. S. Butler, A. J. Silva, A. Abeliovich, Y. Watanabe, S. Tonegawa and J. O. McNamara, Limbic epilepsy in transgenic mice carrying a Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II alpha-subunit mutation, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 92, (1995) 6852-5.
- [46] M. K. Bennett, N. E. Erondy and M. B. Kennedy, Purification and characterization of a calmodulin-dependent protein kinase that is highly concentrated in brain, *J Biol Chem*, Vol. 258, (1983) 12735-44.
- [47] N. E. Erondy and M. B. Kennedy, Regional distribution of type II Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in rat brain, *J Neurosci*, Vol. 5, (1985) 3270-7.
- [48] P. T. Kelly, S. Shields, K. Conway, R. Yip and K. Burgin, Developmental changes in calmodulin-kinase II activity at brain synaptic junctions: alterations in holoenzyme composition, *J Neurochem*, Vol. 49, (1987) 1927-40.
- [49] A. M. Zhabotinsky, Bistability in the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase-phosphatase system, *Biophys J*, Vol. 79, (2000) 2211-21.
- [50] J. Lisman, H. Schulman and H. Cline, The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory, *Nat Rev Neurosci*, Vol. 3, (2002) 175-90.
- [51] M. Raza, S. Pal, A. Rafiq and R. J. DeLorenzo, Long-term alteration of calcium homeostatic mechanisms in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy, *Brain Res*, Vol. 903, (2001) 1-12.
- [52] S. B. Churn, S. Sombati, E. R. Jakoi, L. Severt and R. J. DeLorenzo, Inhibition of calcium/calmodulin kinase II alpha subunit expression results in epileptiform activity in cultured hippocampal neurons, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 97, (2000) 5604-9.
- [53] A. Artola and W. Singer, Long-term depression of excitatory synaptic transmission and its relationship to long-term potentiation, *Trends Neurosci*, Vol. 16, (1993) 480-7.
- [54] P. De Koninck and H. Schulman, Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca²⁺ oscillations, *Science*, Vol. 279, (1998) 227-30.

- [55] M. F. Bear, B. W. Connors and M. A. Paradiso, *Neuroscience: Exploring the Brain*, Second edn., 2001.
- [56] G. V. Goddard, Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity, *Nature*, Vol. 214, (1967) 1020-1.
- [57] E. Maru, Is synaptic potentiation necessary for the development of kindling? *Jpn J Psychiatry Neurol*, Vol. 45, (1991) 291-6.
- [58] F. E. Dudek, T. Yasumura and J. E. Rash, 'Non-synaptic' mechanisms in seizures and epileptogenesis, *Cell Biol Int*, Vol. 22, (1998) 793-805.
- [59] G. Ogata and K. Natsume, Dependence of neuronal synchronization process on the giant EPSP pattern of hippocampal pyramidal cells, *Journal of Signal Processing*, Vol. 10, (2006) 239-242.
- [60] G. Ogata and K. Natsume, Synchronization process of neurons depends on giant EPSP of hippocampal pyramidal cells, *Journal of Signal Processing*, Vol. 10, (2006) 399-406.
- [61] R. Refinetti, An extremely simple procedure for the analysis of circadian and estrous periodicity, *Physiol Behav*, Vol. 50, (1991) 655-9.
- [62] Y. Ben-Ari and M. Gho, Long-lasting modification of the synaptic properties of rat CA3 hippocampal neurones induced by kainic acid, *J Physiol*, Vol. 404, (1988) 365-84.
- [63] C. E. Herron, R. Williamson and G. L. Collingridge, A selective N-methyl-D-aspartate antagonist depresses epileptiform activity in rat hippocampal slices, *Neurosci Lett*, Vol. 61, (1985) 255-60.
- [64] R. D. Traub and J. G. Jefferys, Simulations of epileptiform activity in the hippocampal CA3 region in vitro, *Hippocampus*, Vol. 4, (1994) 281-5.
- [65] E. J. Coan, W. Saywood and G. L. Collingridge, MK-801 blocks NMDA receptor-mediated synaptic transmission and long term potentiation in rat hippocampal slices, *Neurosci Lett*, Vol. 80, (1987) 111-4.
- [66] K. Fukunaga, D. Muller and E. Miyamoto, CaM kinase II in long-term potentiation, *Neurochem Int*, Vol. 28, (1996) 343-58.
- [67] N. Hardingham, S. Glazewski, P. Pakhotin, K. Mizuno, P. F. Chapman, K. P. Giese and K. Fox, Neocortical long-term potentiation and experience-dependent synaptic plasticity require alpha-calcium/calmodulin-dependent protein kinase II autophosphorylation, *J Neurosci*, Vol. 23, (2003) 4428-36.
- [68] D. Johnston and T. H. Brown, Control theory applied to neural networks illuminates synaptic basis of interictal epileptiform activity, *Adv Neurol*, Vol. 44, (1986) 263-74.
- [69] Y. Inaba, P. de Guzman and M. Avoli, NMDA receptor-mediated transmission contributes to network 'hyperexcitability' in the rat insular cortex, *Eur J Neurosci*, Vol. 23, (2006) 1071-6.
- [70] T. Fukuda and T. Kosaka, Gap junctions linking the dendritic network of GABAergic interneurons in the hippocampus, *J Neurosci*, Vol. 20, (2000) 1519-28.
- [71] R. R. Poznanski, W. G. Gibson and M. R. Bennett, Electrotonic coupling between two CA3 hippocampal pyramidal neurons: a distributed cable model with somatic gap-junction, *Bull Math Biol*, Vol. 57, (1995) 865-81.
- [72] J. L. Perez Velazquez and P. L. Carlen, Gap junctions, synchrony and seizures, *Trends Neurosci*, Vol. 23, (2000) 68-74.
- [73] T. I. Netoff, R. Clewley, S. Arno, T. Keck and J. A. White, Epilepsy in small-world networks, *J Neurosci*, Vol. 24, (2004) 8075-83.
- [74] D. J. Watts and S. H. Strogatz, Collective dynamics of 'small-world' networks, *Nature*, Vol. 393, (1998) 440-2.
- [75] K. Fukunaga and E. Miyamoto, A working model of CaM kinase II activity in hippocampal long-term potentiation and memory, *Neurosci Res*, Vol. 38, (2000) 3-17.

- [76] A. J. Silva, C. F. Stevens, S. Tonegawa and Y. Wang, Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice, *Science*, Vol. 257, (1992) 201-6.
- [77] J. S. Bains, J. M. Longacher and K. J. Staley, Reciprocal interactions between CA3 network activity and strength of recurrent collateral synapses, *Nat Neurosci*, Vol. 2, (1999) 720-6.
- [78] E. J. Coan and G. L. Collingridge, Characterization of an N-methyl-D-aspartate receptor component of synaptic transmission in rat hippocampal slices, *Neuroscience*, Vol. 22, (1987) 1-8.
- [79] E. Maru, [Neuronal plasticity associated with learning and epileptic seizures: LTP and KIP], *Seishin Shinkeigaku Zasshi*, Vol. 103, (2001) 866-81.
- [80] Z. Liu, T. Nagao, G. C. Desjardins, P. Gloor and M. Avoli, Quantitative evaluation of neuronal loss in the dorsal hippocampus in rats with long-term pilocarpine seizures, *Epilepsy Res*, Vol. 17, (1994) 237-47.
- [81] I. Aradi and G. Maccaferri, Cell type-specific synaptic dynamics of synchronized bursting in the juvenile CA3 rat hippocampus, *J Neurosci*, Vol. 24, (2004) 9681-92.
- [82] M. E. Gilbert and C. M. Mack, The NMDA antagonist, MK-801, suppresses long-term potentiation, kindling, and kindling-induced potentiation in the perforant path of the unanesthetized rat, *Brain Res*, Vol. 519, (1990) 89-96.
- [83] S. S. Jahromi, K. Wentlandt, S. Piran and P. L. Carlen, Anticonvulsant actions of gap junctional blockers in an in vitro seizure model, *J Neurophysiol*, Vol. 88, (2002) 1893-902.
- [84] T. F. Freund and G. Buzsaki, Interneurons of the hippocampus, *Hippocampus*, Vol. 6, (1996) 347-470.
- [85] R. Miles and R. K. Wong, Excitatory synaptic interactions between CA3 neurones in the guinea-pig hippocampus, *J Physiol*, Vol. 373, (1986) 397-418.
- [86] R. D. Traub and R. Miles, *Neuronal networks of the hippocampus.*, Cambridge University Press, 1991.
- [87] L. J. Larson-Prior and N. T. Slater, GABAergic inhibition and epileptiform discharges in the turtle hippocampus in vitro, *Brain Res*, Vol. 460, (1988) 369-75.
- [88] R. D. Traub, J. G. Jefferys and M. A. Whittington, Functionally relevant and functionally disruptive (epileptic) synchronized oscillations in brain slices, *Adv Neurol*, Vol. 79, (1999) 709-24.
- [89] R. Miles and R. K. Wong, Single neurones can initiate synchronized population discharge in the hippocampus, *Nature*, Vol. 306, (1983) 371-3.
- [90] G. Q. Bi and M. M. Poo, Synaptic modifications in cultured hippocampal neurons: dependence on spike timing, synaptic strength, and postsynaptic cell type, *J Neurosci*, Vol. 18, (1998) 10464-72.
- [91] H. X. Wang, R. C. Gerkin, D. W. Nauen and G. Q. Bi, Coactivation and timing-dependent integration of synaptic potentiation and depression, *Nat Neurosci*, Vol. 8, (2005) 187-93.
- [92] R. M. Pressler, R. O. Robinson, G. A. Wilson and C. D. Binnie, Treatment of interictal epileptiform discharges can improve behavior in children with behavioral problems and epilepsy, *J Pediatr*, Vol. 146, (2005) 112-7.