

ラット扁桃核キンドリングに伴う海馬歯状回ニューロンの脱落現象

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2012-05-09 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 吉田, 和典 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10098/5379

ラット扁桃核キンドリングに伴う 海馬歯状回ニューロンの脱落現象

吉田 和典

心理学教室

(平成6年10月19日受理)

EFFECTS OF THE AMYGDALOID KINDLING ON THE HIPPOCAMPAL CELLS IN RATS.

Kazunori YOSHIDA

Department of Psychology

Abstract : The present study reports the effects of rat amygdaloid kindling on the sensitivity of the hippocampal dentate cells. Following the daily kindling stimulations in the unilateral amygdala (kindling group), the cells located in the hippocampal dentate hilar region significantly decreased bilaterally as compared with those of the two control groups, one which did not receive any kindling stimulations and the other which did not show the generalized convulsion but reveal only partial or weak seizure-like behavior after daily stimulations in the other sites of the amygdaloid nucleus. These results suggest that the hippocampal cells, especially located in the dentate hilar region, have more sensitivity to the amygdaloid kindling and almost all these cells may be GABAergic neurons.

Key Words : kindling, amygdala, hippocampus, rat, hilus, neuronal loss

序及び目的

キンドリング現象とは、脳内（特に扁桃核）に微弱な電気刺激を与え続けると、徐々にてんかん様の行動パターンを呈するようになることである⁽³⁾。これは一旦形成されると消去されることなく永久に持続することが知られている。従って、この現象はてんかんモデル⁽²⁾や神経の可塑性モデル⁽³⁾⁽⁶⁾⁽⁹⁾として確立している。著者はすでにこの現象の永続性に対して、中隔-海馬神経回路が重要な働きを担っていることを破壊法⁽⁵⁾⁽⁶⁾⁽⁷⁾や誘発電位法⁽⁸⁾を用いて報告してきた。すなわち、扁桃核キンドリング刺激により、中隔-海馬投射系に何らかの機能的及び形態学的変化の生じていることが予測された。本研究は、扁桃核キンドリングによる海馬での形態学的変容過程を詳細に把握するために、キンドリング形成後の海馬内ニューロン数を計測し、統制

群との比較検討を行った。結果の一部はすでに学会で報告した¹⁰⁾。

方 法

被験体は Wistar 系雄ラット（体重350～500g, 10～12週令）を15匹用いた。ネンブタール麻酔下（35mg/kg, i.p.）でキンドリング刺激電極の植え込み手術を行った。刺激電極は0.25mmステンレススチール線2本を、Paxinos & Watsonの脳図譜⁷⁾を参照に右扁桃核の外側基底核に刺入した（キンドリング群：n=5）。刺激統制群（n=5）として、同じ電極を扁桃核の背側或いは内側部に刺入した。手術から一週間の回復期の後、キンドリング刺激手続きを行った。まず両群とも、キンドリング刺激強度である後発射（after discharge: AD）閾値を測定した。翌日よりキンドリング刺激（60Hz, sine wave, 1sec）を一日一回行い、全身けいれん発作（stage 5）が連続数回出現するまで続けた（キンドリング群）。刺激統制群も同じキンドリング刺激を6～26回行ったが、すべて無反応や不動状態（Stage 0）或いは顔面に限局したけいれんなどの部分発作（stage 2）にとどまり、この時点でこの群は実験を終了した。

すべての実験終了後、深麻酔下で生理的食塩水及び7%ホルマリン溶液で脳を灌流固定し、20%シュクロース液に一晩浸潤させた。30 μ mの連続凍結前額断薄切片を作成し、Neutral Red でニッスル染色を行い光学顕微鏡を用いて海馬内ニューロン数を測定した。

今回は背側海馬の歯状回 Hilus 全領域を検索対象とした。背側海馬の吻側極から990 μ mを一枚目とし、360 μ m毎に一枚で計10切片（吻側極から4230 μ mまで）で、左右合計20標本の歯状回 Hilus 内ニューロン数を調べた。日齢をほぼ対応させた統制群（n=5）についても同様の方法で脳切片を作成し、比較検討した。

結 果

(1)キンドリング現象の発展過程

表1に示したように、最終発作段階である Stage 5 に達するまでの刺激回数は、キンドリング群で 9.2 ± 2.7 回で、総刺激回数は 12.6 ± 4.8 回であった。これらの結果は従来のキンドリング発展過程で見られる値とほぼ同じで、正常なキンドリング発展を示したと考えられる。刺激統制群と比較すると、5例とも発作段階は最終的に Stage 5 に達せず、Stage 0～2の部分発作（一側のひげや前肢のけいれん発作）にとどまった。またこの群の総刺激回数は 18.2 ± 7.4 回で、キンドリング群より刺激回数が多かった。

刺激強度である後発射閾値（afterdischarge threshold: ADT）を両群で比較すると、それぞれ $106 \pm 49 \mu\text{A}$ と $66 \pm 5 \mu\text{A}$ であった。キンドリング群でやや高いが、2例を除けばほぼ同じ刺激強度とみなされた。

ラット扁桃核キンドリングに伴う海馬歯状回ニューロンの脱落現象

表1. キンドリング群及び刺激統制群のキンドリング発展過程

群	被験体No.	Stage 5までの 刺激回数	総刺激回数	Stage 5の回数	A D T
K	YK-56	9	10	2	70
	YK-57	13	22	3	150
	YK-61	5	9	3	180
	YK-92	8	11	3	60
	YK-94	11	11	1	70
S C	YK-50	(2)	26	-	60
	YK-55	(0)	6	-	70
	YK-58	(2)	26	-	60
	YK-79	(2)	17	-	70
	YK-90	(1)	16	-	70

K:キンドリング群, S C:刺激統制群, ADT:後発射閾値 (μA)。

Stage 5は最終発作段階で, S C群の括弧内の数字は最終的に達した発作段階を示している。Stage 0:無反応ないし不動状態, Stage 1:ひげや顔面のけいれん, Stage 2:點頭, Stage 3:前肢のけいれん, Stage 4:後肢のけいれん及び立ち上がり, Stage 5:全身けいれん及び転倒。

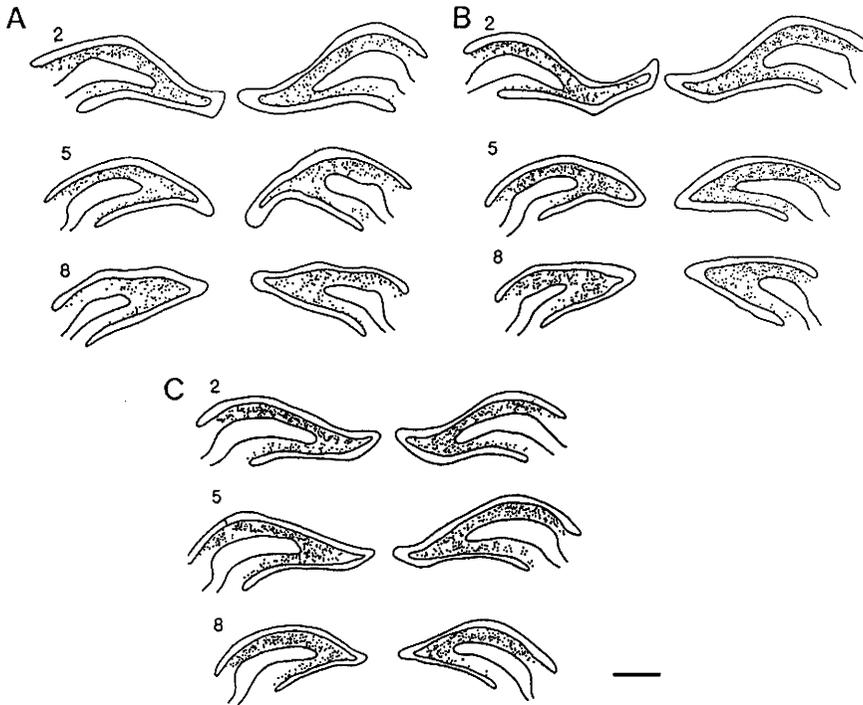


図1. 各群の海馬歯 Hilus 内のニューロン分布

顕微鏡描画装置により前額断標本の海馬歯状回 Hilus のみを描き, ニッスル染色像からニューロンの位置をプロットした。A, B, Cはそれぞれキンドリング群, 刺激統制群, 統制群を示している。左の数字は背側海馬の吻側極より990 μm (1) から360 μm 毎に尾側部4230 μm (10) までの切片に対応する。すなわち海馬吻側極から1350 (2), 2430 (5) 3510 (8) μm となる。スケールは500 μm を示す。

(2)キンドリングによる海馬ニューロンの変化

海馬歯状回 Hilus ニューロンをニッスル染色像から観察した結果、長径が約20~30 μm のやや大型のニューロンから10 μm 以下のニューロンなど、形態も双極或多極型などさまざまなニューロンが混在していた。このように Hilus のニューロンは明らかに顆粒細胞や錐体細胞とは異なる形態を有していた。これらの個々のニューロンを顕微鏡描画装置を用いて表した結果(図1)、海馬吻側極から990 μm を一番目とし、360 μm 毎に番号を付けて(図の番号が対応)、刺激統制群及び統制群と比較すると、キンドリング群(A)のニューロン数が顕著に減少している傾向が見られた。また、両側共に減少する傾向が認められた。これらの例では、キンドリング群(表

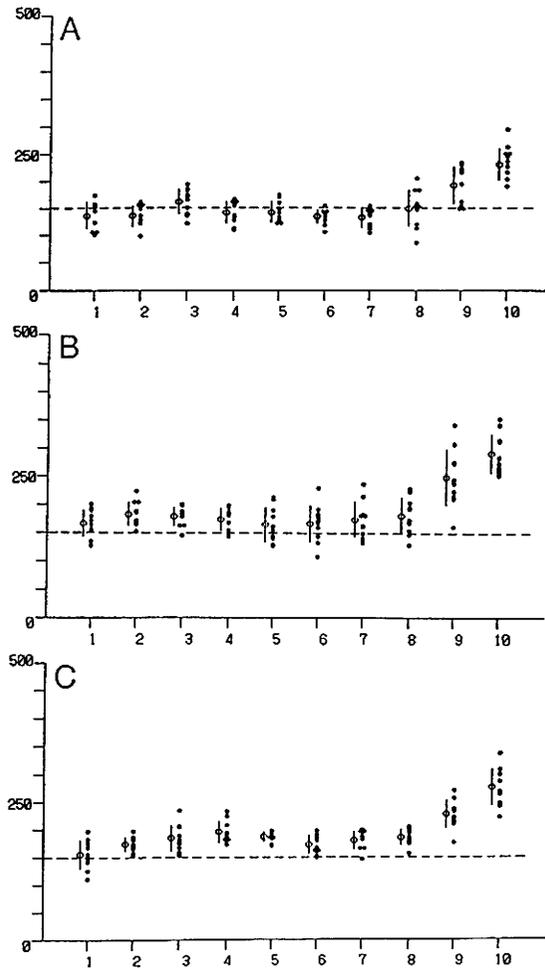


図2. 各群毎のHilus内ニューロン数の変化

A, B, Cはそれぞれキンドリング群, 刺激統制群, 統制群を示している。縦軸に各群の両側Hilusニューロン数(黒丸)と平均値±標準偏差(白丸)を、横軸に図1と同じ海馬吻側-尾側方向を示している。点線はニューロン数150個のレベルを示している。

ラット扁桃核キンドリングに伴う海馬歯状回ニューロンの脱落現象

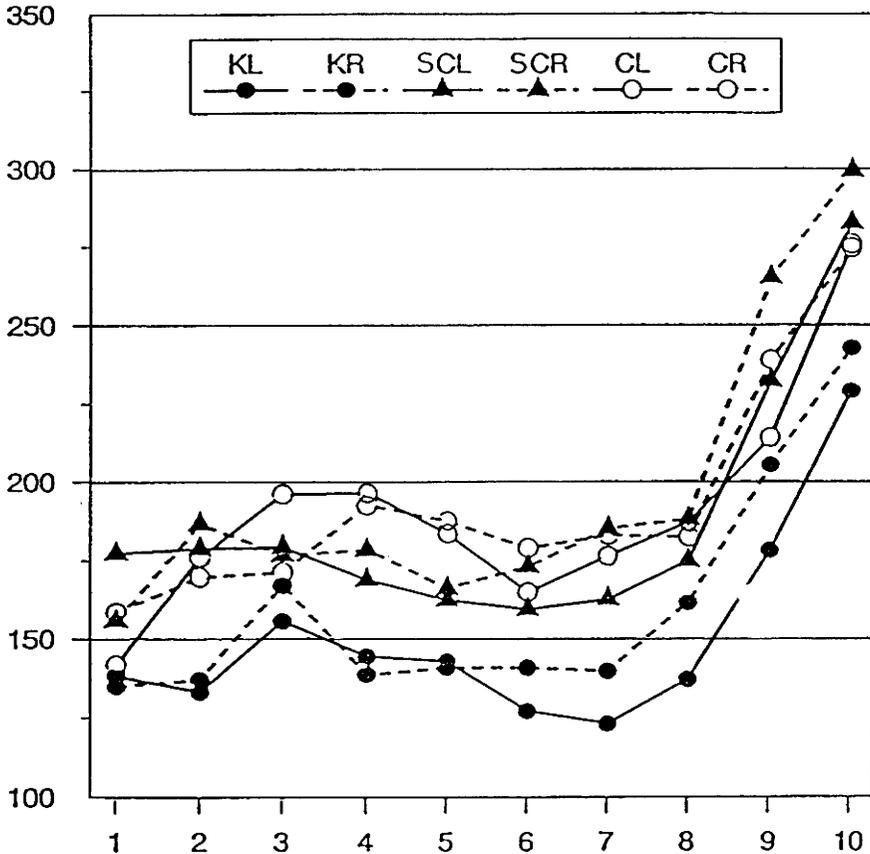


図3. 各群のHilus内ニューロン数の平均値

K, S, Cはそれぞれキンドリング群 (n=5), 刺激統制群 (n=5), 統制群 (n=5) で, L, Rは左右Hilusを示している。横軸の数字は図1と同様である。

1のYK-94)と刺激統制群(表1のYK-90)で刺激強度は同じで、総刺激回数はむしろ刺激統制群の方が多かった。すなわちニューロンの減少傾向は、単に刺激強度や刺激回数による効果ではないことが考えられた。減少したニューロンの形態に関しては今回は区別して計測しなかったが、小形のニューロンが減少する傾向が見られた。

吻側-尾側10切片の海馬歯状回Hilusニューロン数を両側に計測し各群で比較すると(図2), キンドリング群(A)は吻側-尾側方向のすべてのレベルでニューロン数約150前後であった。それに対して, 刺激統制群(B)と統制群(C)では, ニューロン数が150以上であった。各群の平均値を吻側-尾側方向で比較すると(図3), キンドリング群で, 海馬吻側極から1710 μ m(レベル3)及び3510 μ m(レベル8)以上の尾側部位で150以上のニューロン数が観察されたが, それ以外のレベルでは150以下であった。2つの統制群と比較してもすべてのレベルでキンドリング群より多く, また2つの統制群間では顕著な差は認められなかった。

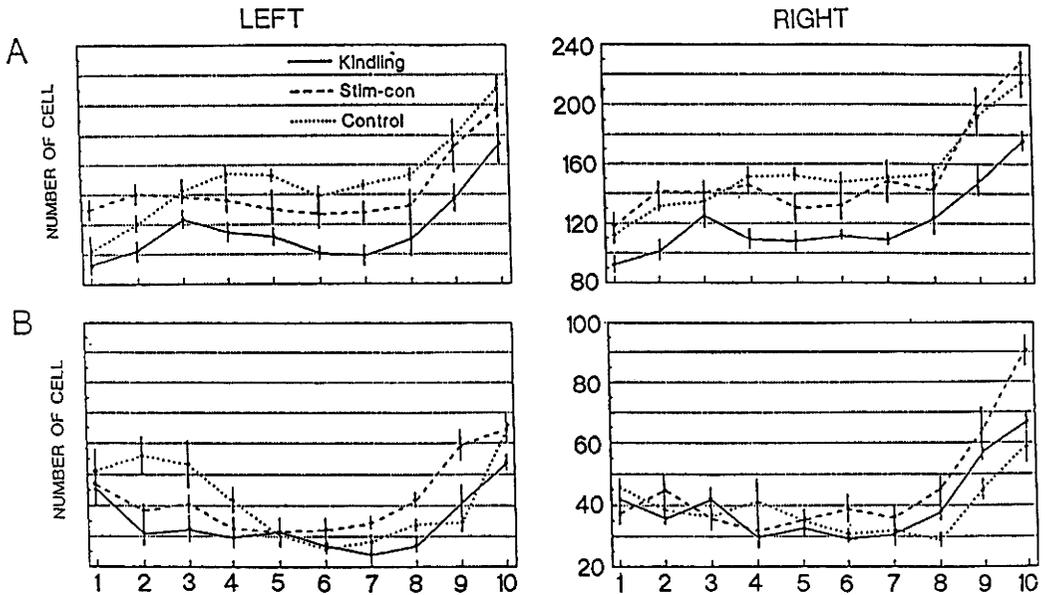


図4. Hilusの部位によるニューロン数の変化

A, BはHilusの背側部と腹側部を示し、左右の吻側-尾側方向でのニューロン数の変化を示している。特に、Hilusの背側部ニューロンに一定した減少が認められる(図1を参照)。

歯状回 Hilus ニューロンを背側部と腹側部を別々に計測した結果(図4)、図3と同様に背側部ではキンドリング群が2つの統制群と比べてすべてのレベルで減少しているのが明らかとなった。しかしながら、腹側部では左側で吻側-尾側の中央部で群差が見られず、特に右側では群間に顕著な差は認められなかった。すなわち、キンドリング群の歯状回 Hilus ニューロンの減少はほとんど背側部位に局限した現象であったことが考えられた。

三要因分散分析(群×吻側尾側×左右差)の結果、群間に1%水準で有意差が認められた($F=19.36, df=2/12$)(図5)。下位検定を行った結果、キンドリング群が他の2つの統制群と比べて有意に減少していることが判明した($P<0.01$)。刺激統制群と統制群の間には有意な差は認められなかった。吻側-尾側要因では、1%水準で有意差が認められ($F=50.68, df=9/108$)、下位検定の結果、990 μm レベル(1)と比べて1350 μm , 2430 μm ($P<0.05$)及び1710 μm , 2070 μm , 3510 μm , 3870 μm , 4230 μm ($P<0.01$)の各レベルにおいて有意にニューロン数が多かった。しかし、交互作用で有意差は認められず、各群及び両側とも同様の傾向を示していることが示唆された。左右差要因では有意差は認められなかった。しかしながら、吻側尾側要因と左右要因の交互作用に有意差が認められ($F=2.16, df=9/108, P<0.05$)、下位検定を行った結果、3870 μm (9)レベルでのみ、左側が右側に比べて有意に減少する結果が得られた($P<0.01$)。しかしながら、その他のすべてのレベルでは有意差は認められず、また、群間と左

ラット扁桃核キンドリングに伴う海馬歯状回ニューロンの脱落現象

右差との交互作用も有意ではなかったことから、キンドリングによる Hilus ニューロンの減少は両側共に均等に生じていたと考えられた。

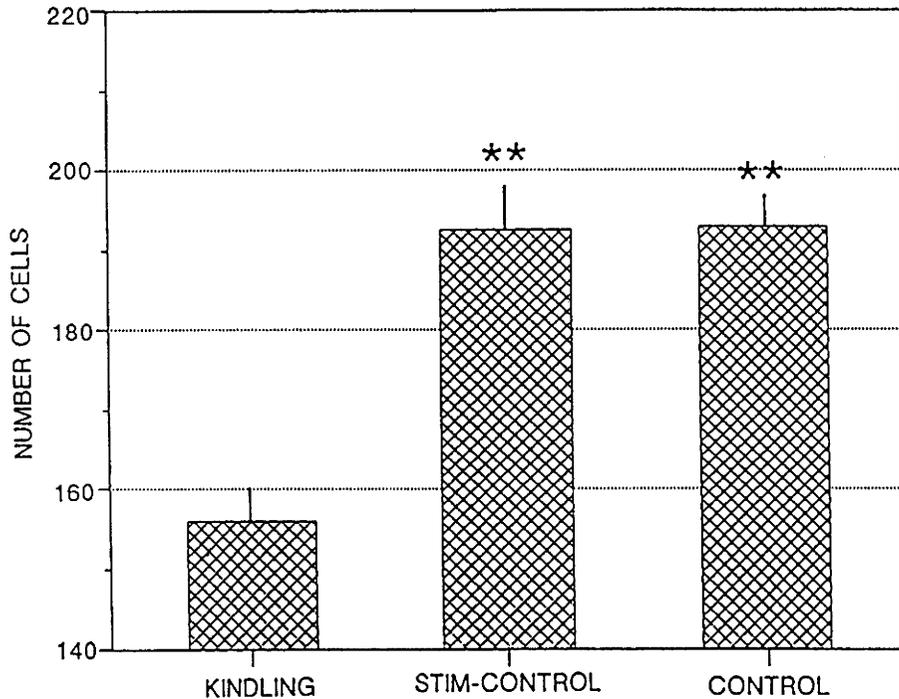


図5. Hilus の総ニューロン数の比較

三要因分散分析 (群×吻側・尾側×左右差) の結果, 群間に1%水準で有意差が認められ, 下位検定 (チューキー法) の結果, キンドリング群 (KINDLING) が他の2群に比べて1%水準 (***) で有意に減少していた。刺激統制群 (STIM-CONTROL) と統制群 (CONTROL) 間には有意差は認められなかった。

考 察

本実験結果から、ラットの扁桃核キンドリングによって、背側海馬の中の少なくとも歯状回の Hilus ニューロンは有意に減少することが明かとなった。しかもその影響は両側の Hilus に及んでいた。キンドリング刺激を行った扁桃核と同側の海馬ニューロンが時間的に対側海馬よりより早く脱落していたかどうかについては今回は言及できないが、キンドリング完成後には海馬ニューロンの脱落現象が両側にまで波及していたことは明らかである。また、刺激統制群との差が認められたことから、キンドリング後の海馬ニューロン脱落は、単に高頻度の刺激や強度によるものではなく、数回にわたる連続した全身けいれん発作によるニューロンの異常興奮の結果生じたものと考えられる。Hilus 以外の海馬領域 (CA1, CA2, CA3 の錐体細胞層や上行層及び放射状層, 歯状回の分子層など) でも同様に観察したが (結果では示していないが), 顕著なニューロン減少は認められなかった。このことから、キンドリングに対して海馬

歯状回の Hilus ニューロンが特異的に感受性が高いことが示された。

以前から、海馬内には GABA ニューロンが豊富に存在することが知られており⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾、海馬全域に散在しているが、やはり Hilus にその分布が集中している。一方で、実験てんかん（キンドリング）や人の側頭葉てんかんで海馬の GABA ニューロン或いは介在ニューロンの変容が数多く報告されている⁽¹⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁸⁾。さらに、これらの GABA ニューロンの機能低下による脱抑制⁽⁹⁾の観点から、キンドリングの発展や永続性のメカニズムが説明されている。Kamphuis ら⁽⁶⁾は海馬 CA1 への入力系である Shaffer 側枝のキンドリングを行った結果、キンドリング中や完成直後には GABA ニューロンの有意な変化は認められず、完成から約一ヶ月後に、CA1 領域の GABA ニューロンが有意に減少していることを報告している。すなわち、GABA ニューロンの変容経過は長期的で緩慢であることが予測される。

以上の様に、海馬歯状回 Hilus での GABA ニューロンについて直接言及している報告はないが、本実験で得られたニューロン脱落現象は、おそらく GABA を含有するニューロンであり、このニューロンの機能低下が、扁桃核キンドリングの永続性を助長する結果に結びついていたと考えられる。今後、これらの仮説を免疫組織化学的に確認し、その他の神経伝達物質（アセチルコリン、カテコールアミン、ソマトスタチンなど）を含有するニューロンについても同時に検討していく必要がある。

要 約

ラットの扁桃核キンドリングに伴う海馬ニューロンの形態学的変容過程をニッスル染色像から観察し、刺激統制群と正常な統制群との比較検討を行った。今回は特に海馬歯状回 Hilus ニューロンについて検討した。得られた結果をまとめると次の通りである。

- (1)キンドリング完成後、海馬歯状回 Hilus のニューロン数は、刺激統制群や統制群と比較して有意に減少していた。刺激統制群と統制群との間には有意差は認められなかった。
- (2)キンドリング群での Hilus ニューロンの減少は左右両側に均等に生じ、特に Hilus の背側部で顕著であった。

以上のことから、扁桃核キンドリングによる海馬歯状回 Hilus のニューロン減少は、単にキンドリングの刺激回数やその強度、あるいは部分発作による影響ではなく、数回にわたる最終的な全身けいれん発作による影響であると考えられる。その影響は片側のみのキンドリング刺激でも両側の海馬に及ぶことが示された。このような Hilus ニューロンの減少がキンドリングの永続性の一つの要因と考えられる。これらの減少したニューロンは、従来の研究報告から見ると、そのほとんどが GABA 性のニューロンであることが示唆される。

参考文献

- (1) de Lanerolle, N.C., Kim, J. H., Robbins, R.J. and Spencer, D.D. Hippocampal interneuron loss and plasticity in human temporal lobe epilepsy. *Brain Res.*, 1989, 495, 387-395.
- (2) Gamurani, H., Onteniente, B., Seguela, P., Geffard, M. and Calas, A. Gamma-amino-butyric acid immunoreactivity in the rat hippocampus. A light and electron microscopic study with anti-GABA antibodies. *Brain Res.*, 1986, 364, 30-38.
- (3) Goddard, G.V., McIntyre, D.C. and Leech, C.K. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp. Neurol.*, 1969, 25, 295-330.
- (4) Itagaki, S. and Kimura, H. Retardation of resynthesis of GABA-transaminase in some brain regions of amygdala-kindled rats. *Brain Res.*, 1986, 381, 77-84.
- (5) Kamphuis, W., Wadman, W.J., Buijs, R.M. and Lopes da Silva, F.H. The development of changes in hippocampal GABA immunoreactivity in the rat kindling model of epilepsy: a light microscopic study with antibodies. *Neuroscience*, 1987, 23 (2), 433-446.
- (6) Leech, C.K. and McIntyre, D.C. Kindling rates in inbred mice: an analog to learning? *Behav. Biol.*, 1976, 16, 439-452.
- (7) Paxinos, G. and Watson, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 2nd edition. Academic Press, New York, 1986.
- (8) Peterson, G.M., Ribak, C. and Oertel, W.H. A regional increase in the number of hippocampal GABAergic neurons and terminals in the seizure-sensitive gerbil. *Brain Res.*, 1985, 340, 384-389.
- (9) Racine, R.J., Gartner, J.G. and Burnham, W.H. Epileptiform activity and neuronal plasticity in limbic structures. *Brain Res.*, 1972, 47, 262-268.
- (10) Sloviter, R.S. Decreased hippocampal inhibition and a selective loss of interneurons in experimental epilepsy. *Science*, 1987, 235, 73-76.
- (11) Soriano, E. and Frotscher, M. A GABAergic axo-axonic cell in the fascia dentata controls the main excitatory hippocampal pathway. *Brain Res.*, 1989, 503, 170-174.
- (12) Wada, J.A. Kindling. New York Raven Press, 1976.
- (13) Wise, R.A. and Chinerman, J. Effect of diazepam and phenobarbital on electrically induced amygdaloid seizures and seizure development. *Exp. Neurol.*, 1974, 45, 355-363.
- (14) Woodson, W., Nitecka, L. and Ben-Ari, Y. Organization of the GABAergic system in the rat hippocampal formation: a quantitative immunocytochemical study. *J. Comp. Neurol.*, 1989, 280, 254-271.
- (15) 吉田和典, 実験でんかん (Kindling) の生理心理学的研究—扁桃核 Kindling の永続性に及ぼす海馬損傷効果—, 福井医科大学一般教育紀要, 1983, 3, 25-44.

吉 田 和 典

- (16) Yoshida, K. Influences of bilateral hippocampal lesions upon kindled amygdaloid convulsive seizure in rats. *Physiol. Behav.*, 1984, 32, 123-126.
- (17) 吉田和典, Kindling 現象の永続性と中隔-海馬損傷効果, 昭和59・60年度文部省科学研究費補助金, 総合研究A研究成果報告書, 1986, 33-39.
- (18) 吉田和典, ラット扁桃核キンドリングに伴う海馬ニューロンの形態学的検討 (第2報), 日本心理学会第56回大会論文集, 1992, 688.
- (19) 吉田和典, 岡 宏, 山崎捨夫, 扁桃核キンドリングと中隔-海馬系の役割 (第4報), 第16回日本脳波・筋電図学会抄録, 1986, 241.