

てんかん様過剰神経活動による海馬神経回路の異常形成

池谷 俊二

てんかん様過剰神経活動による海馬神経回路の異常形成

東京大学大学院薬学系研究科生命薬学専攻

池谷裕二

# 目次

## 第1章 はじめに

海馬苔状線維について	1
てんかんと海馬	2
本研究で何を明らかにするのか	3

## 第2章 培養海馬切片を用いた検討

緒言	5
方法	5
結果	7
考察	13

## 第3章 歯状回顆粒細胞の単離培養を用いた検討

緒言	17
方法	17
結果	19
考察	20

## 第4章 小児てんかんモデルを用いた検討

緒言	22
pilocarpine 誘発痙攣	23
アニメート試験	24
モリスの水迷路試験	25
自発的岐路交替運動	26
ステップスルー試験	27
組織化学的検討	27
LTP	28
考察	29

## 第5章 さいごに

なぜ海馬苔状線維なのか?	33
小児てんかんの後遺症について	34
L型Ca <sup>2+</sup> チャンネル阻害薬について	34

参考文献	36
------	----

謝辞	41
----	----

## 第1章 はじめに

## 海馬苔状線維について

海馬苔状線維(mossy fiber)は、歯状回顆粒細胞から主にCA3野錐体細胞または歯状回門(dentate hilus)の介在神経に投射する神経線維である(図1B)。“苔状線維”という名称は、1893年にスペインのCajalにより初めて付与され、これは線維のゴルジ染色像が、当時既に知られていた小脳苔状線維と類似していたことに由来している<sup>2)</sup>。海馬苔状線維の研究の歴史は古く、簡素かつ精緻な層構造を保持しているために中枢神経系における有用な研究対象となっている海馬体の神経連絡の中で、最初に投射が解明された神経線維である<sup>6)</sup>。苔状線維は、他の中枢神経系の組織とは大きく異なる興味深い性質を数多く持ち合わせている<sup>3)</sup>。以下にその数例を挙げる。

## 1) 無髄神経線維である

通常アミノ酸系およびニコチン作動性の神経軸索はミエリン化された有髄神経線維の形態を示すが、苔状線維は終末の伝達物質が興奮性アミノ酸であるにも関わらず無髄神経線維である<sup>2)</sup>。

## 2) 神経終末は巨大シナプスを形成する

その直径は大きいもので10 $\mu\text{m}$ にも達し、これは苔状線維が起始する神経細胞である顆粒細胞の大きさそのものに匹敵する<sup>7,8)</sup>。これに伴いシナプス後側スパインも巨大かつ複雑な形態をとる。

1)および2)の特徴は、興奮性アミノ酸作動性の神経線維ではなく、むしろカテコラミン系のそれと類似したものである。しかし、そのシナプスボタンは、興奮性アミノ酸作動性神経に特有なシナプス後膜の裏打ち構造が厚い非対称性シナプスである。

3) 神経終末にZn<sup>2+</sup>を豊富に含有する

このZn<sup>2+</sup>は、神経活動に伴い放出され、苔状線維終末に含まれる神経伝達物質や神経ペプチドまたはそれらの受容体と相互作用することで、神経細胞の興奮性を調節していると考えられており<sup>9,14,15,16,19)</sup>、さらに近年になると、Zn<sup>2+</sup>が神経栄養因子や成長因子の活性を調節し苔状線維の形成や維持に関与していることも示唆されている<sup>14,16)</sup>。しかしZn<sup>2+</sup>の正確な役割は未だ不明である。一方、Zn<sup>2+</sup>を豊富に含有するというこの性質を利用して、苔状線維を選択的に染色するTimm法は、簡便かつ有用な実験手技として幅広く利用され、苔状線維の研究に多大な貢献をしている。

## 4) 生後に形成される

中枢神経系の発生学的成熟の大半は胎生期に行われるが、一部の脳組織は生後に発達する。海馬では歯状回顆粒細胞の発生が、胎生後期に始まり生後早期にまでわたるため<sup>4)</sup>、それに伴い軸索で

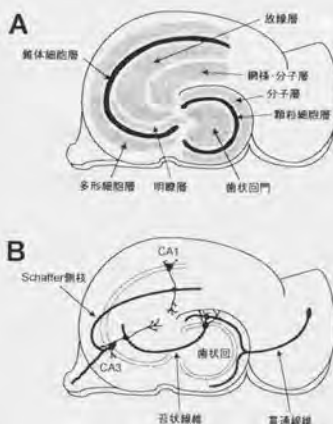


図1 海馬の模式図

A. 海馬構造。海馬の神経細胞群は歯状回の顆粒細胞層とアモン角の錐体細胞層に大別される。B. 海馬の主要神経回路。貫通線維-歯状回、苔状線維-CA3野、Schaffer側枝-CA1野の三経路が存在する。

ある苔状線維の発達も生後に行われる。齧歯類の苔状線維の形成時期は、主に生後第 2-3 週目である<sup>7,26,65,165</sup>。ヒトの場合は詳しく研究されていないが、生後 2 年程度は海馬の発達が持続するという報告例からも<sup>97</sup>、乳児期から幼児期にかけての期間が苔状線維の形成時期に相当するものと考えられる。また、苔状線維の形成は、その速度は低いながら成体に達してからも行われ、量的な増減を介した可塑性を示す中枢神経系では極めて例外的な神経組織である。現在のところ苔状線維にこのような特殊な性質が与えられている理由は不明である（第 5 章参照）。

#### 5) 記憶、学習への関与が示唆される海馬神経回路を形成する

これまでの数多くの研究により、海馬が記憶、学習に重要な脳部位であることが示されている<sup>47,157,194,195</sup>。海馬における主要神経回路を図 1B に示した。この神経回路の一部を形成している苔状線維は、歯状回とアンモン角を連合する唯一の神経投射として特に重要な位置を占めている。

#### 6) 長期増強現象 (long-term potentiation, LTP) の形成機構が特殊である

ある特定の刺激に応じて神経伝達効率が長期的に亢進する現象である LTP は、記憶、学習の基礎をなすシナプス可塑性の 1 例として盛んに研究されている<sup>16,34,88,107</sup>。苔状線維の LTP の形成機構は、一般的な LTP の機構と比較して極めて特殊である<sup>127</sup>。一般的な LTP の形成機構としては、シナプス後膜の N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体が活性化され  $Ca^{2+}$  が流入し<sup>35</sup>、これが  $Ca^{2+}$  /カルモジュリン依存性キナーゼ II ( $Ca^{2+}$ /calmodulin kinase II, CaMKII)<sup>105,106</sup> やタンパクキナーゼ C (protein kinase C, PKC)<sup>2</sup> などの酵素を活性化しシナプス後膜の反応性を上げ、また  $Ca^{2+}$  は一方で、一酸化窒素 (NO) 合成酵素を活性化し、産生した NO がシナプス前終末に逆行伝達され<sup>128,135</sup>、グルタミン酸の放出量を増大させる<sup>17</sup> というカスケードが想定されている。一方、苔状線維の LTP では、NMDA 受容体の活性化は必要なく<sup>69</sup>、むしろシナプス前終末の P 型  $Ca^{2+}$  チャネル<sup>27</sup> または代謝型グルタミン酸受容体<sup>170</sup> の活性化に伴う細胞内  $Ca^{2+}$  の動員により、カルモジュリンを介して I 型アデニルシクラーゼを賦活化し<sup>185</sup>、これにより産生した環状 AMP がタンパクキナーゼ A (protein kinase A, PKA) を活性化して<sup>81</sup>、グルタミン酸の放出量を増大させる<sup>189</sup> という機構が考えられている。すなわち、苔状線維の LTP の形成機構には一般的なものとの共通部分はなく、その特殊性からも興味深い研究対象となっている。

#### 7) てんかん患者または実験モデル動物において異常発芽が観察される

苔状線維の終末は、CA3 野明瞭層 (stratum lucidum) および歯状回門に分布している (参考: 図 1A)。しかし、てんかん発作を発したヒトあるいは実験動物では、CA3 野多形細胞層 (stratum oriens) または歯状回内側分子層 (molecular layer) に苔状線維が異常発芽することが報告されている<sup>11,29,174,176</sup>。この現象は特に側頭葉てんかん患者で頻りに観察される。

### てんかんと海馬

てんかんは、大脳皮質の異常神経発射に由来した発作を反復する疾患の総称である。国民全体の約 1% という多数の患者が存在し<sup>70</sup>、とりわけ乳児期から幼児期にかけて高い発症率を示すことが報告されている<sup>122</sup>。てんかんと海馬の関係は古くから示唆されており、とりわけ側頭葉てんかんにおける海馬の重要な役割は多くの研究により主張されている<sup>146</sup>。側頭葉てんかんは、最も頻度が高くかつ治療が困難なてんかん<sup>153</sup>としてこの分野における主要な研究対象になっており、同時に、キンドリング<sup>171</sup> やカニン酸モデル<sup>125</sup> 等の側頭葉てんかんをよく模倣する実験モデルも確立され、臨床および実験動物の両レベルでの解明が進んでいる。そして、側頭葉てんかん患

者または実験動物の脳の解剖学的解析により、数多くの病理学的変性が海馬に認められている。以下にその数例を挙げる。

### 1) 海馬硬化

これはてんかん発作に伴う神経細胞の脱落に由来したグリア細胞の増殖の結果である<sup>115)</sup>。この神経細胞の脱落は過剰な神経活動による興奮毒性が原因であると想定されているが<sup>120)</sup>、細胞脱落のパターンは非常に特徴的である<sup>111)</sup>。最も顕著に脱落が観察される部位は歯状回門であり、続いてCA3野またはCA1野の錐体細胞の脱落が見られる。一方、歯状回顆粒細胞およびCA2野錐体細胞では一般に神経細胞死は観察されない。この特異な細胞死のパターンは、興奮毒性に対する耐性の差に由来したものであると考えられている。

### 2) 苔状線維の異常発芽

詳細は既述の通り。なお、この異常発芽は歯状回門に存在する介在神経である苔状細胞の脱落に伴い生じる現象であると考えられている<sup>112,151)</sup>。この現象が目される理由は、これにより海馬神経回路のパターンが変化する点にある。すなわち、苔状線維の異常発芽により海馬は新たな性質を獲得する可能性が考えられる。特に歯状回顆粒細胞に直接反回性回路を形成することから歯状回の興奮性が上昇することが予想される。この可能性を検討した研究が数グループにより行われているが、現在のところ統一した見解は得られていない。本現象が、海馬の恒常的な興奮性の上昇に寄与し、てんかんの慢性化の基礎機構になっているとする報告がある一方で<sup>37,108,173,176)</sup>、むしろ抑制性の賦活に対する影響の方がより重要であるとするデータも報告されている<sup>46)</sup>。異常発芽の生理的意味は今後解明されるべき重要な課題である。

### 3) 遺伝子発現

幾多の報告がなされているが、神経栄養因子または成長因子の mRNA 発現量の変化は<sup>21,49,86)</sup>

1) および 2) の現象との関連からもとりわけ興味深い現象である。

## 本研究で何を明らかにするのか

### 1) 形成中の苔状線維に対する研究

苔状線維は生後に形成されるにも関わらず、これまでの苔状線維の研究は専ら既に形成された線維に対して行われている。一方、苔状線維が形成される時期は 'critical period' と呼ばれ、疾患や外傷に対する感受性が上昇する時期に相当する。当然、形成中の苔状線維に対してもこうした要因が多大な影響を及ぼすことが想定される。したがって、苔状線維の形成に対する研究は、様々な疾患や外傷の影響を包括的に理解する上で非常に重要となる。この観点から、本研究では、これまでに殆ど研究されていない形成中の苔状線維に対して焦点を絞った。また *in vivo* での研究は様々な実験的制約を余儀なくされるため、*in vitro* で苔状線維の形成過程を再現する実験系の確立を試みた。この実験系は本研究のみでなく、今後多様な用途に有用な実験モデルを提供するものと思われる。

### 2) 苔状線維の形成に対するてんかん様神経活動の作用の検討

この検討には大きく 2 つの意義が見出せる。i) てんかんは乳児期から幼児期にかけて最も発症率が高く、この時期は苔状線維が形成される時期と一致する。したがって、苔状線維の形成に対するてんかん様の過剰神経活動の影響を検討することは、小児てんかん患者脳で生じる可能性のある現象を解明する上で極めて重要な意味をもつ。ii) 神経系において正確な神経回路の形成

には、適切な神経発火のパターンが必要であるとされている<sup>64,72</sup>。これは主に神経筋接合部を用いた研究により提唱されたものであるが、複雑な構築を有する中枢神経系を用いた研究は困難であるため、中枢神経系におけるこの仮説の実証例は未だに少ない。この点において、苔状線維は生後に形成されるため、他の中枢神経系の組織と比較して神経回路の形成過程の観察が容易であると思われる。したがって本検討には、苔状線維に対する上記の仮説の適合性を確認するという意味も含蓄される。

なお、本検討の結果、てんかん様の条件下では、i) 苔状線維の正常なシナプスの形成が抑制され、異常なシナプスが形成される、ii) こうして形成された神経回路では異常な神経伝達のパターンが観察される、ことが明かとなった（第2章参照）。

### 3) 苔状線維の形成に対するてんかん様神経活動の効果の機構解明

てんかんは比較的予後の良い疾患として分類されるが、小児てんかんに関してはこれは当てはまらず様々な後遺症を遺存することが知られている。とりわけ認知、学習障害は最も一般的にみられる後遺症であるが、この原因は未だ解明されていない。本研究では、2) で既述した、てんかん様の神経活動により記憶、学習に重要である苔状線維が異常形成するという発見を踏まえ、こうした後遺症が苔状線維の発達異常に由来したものであると想定した。この観点のもとで、2) で観察された現象の機構を解明することは、学術的興味以外にも、小児てんかんの後遺症の機構解明という重要な側面をもつ可能性がある。

第2～4章では、1-3) の巨視的視点のもとに研究を行った。

## 第2章 培養海馬切片を用いた検討

## 緒言

海馬苔状線維の発達過程を *in vitro* で観察できる実験系を確立することを目的として、海馬切片の組織培養を行った。本研究では静置培養法を採用した(図2A)<sup>58,166</sup>。この手法は、多孔質膜を介して培養液から栄養を供給し、切片上面の飽湿空気より酸素を供給するという巧妙な仕組みを用いており、簡便な培養法として近年頻りに利用されている。この手法により培養された切片は、2次元的構造のみでなく、他の組織培養法とは異なり培養切片に垂直な方向の構築もある程度保持しており、より生体に近い状態が保存されている(図2B)。

ラット苔状線維は主として生後第2週目に形成されるため、本研究では苔状線維がまだ殆ど形成されていない生後6日齢のラットから海馬切片を調製し、培養下で苔状線維が形成される過程を観察した。

## 方法

海馬組織培養<sup>84,166</sup>

6日齢のWistar系雄性ラットを氷冷麻酔した後、迅速に全脳を摘出し、 $O_2/CO_2/95:5$ を通気した氷冷Gey's balanced salt solution (BSS)中で約2分間洗浄した。瞬間接着剤を用いてステージに固定した後、同緩衝液中でvibratome(堂坂イーエム)を用い300  $\mu\text{m}$ 厚の水平切片を作成し、海馬を摘出した。適当な海馬切片を選択した後、polytetrafluoroethylene製の多孔質膜(0.4  $\mu\text{m}$ 径)を貼付した直径30 mmのウェル(Millipore)上に切片を配置し、さらにこれを1 mlの培養液を満した6穴プレート(Falcon)に挿入した(図2A)。培養する海馬スライスは1ウェルあたり上限3枚とし、 $CO_2$ を通気した36  $^{\circ}\text{C}$ の飽湿インキュベーター内で培養した。以後3.5日毎に培養液0.7 mlを交換した。用いた培養液の組成はminimum essential medium:Hank's BSS:horse serum/2:1:1である。本条件で50日以上にわたり安定して海馬切片を培養することが可能であった。

## 培養海馬切片の切斷

いくつかの実験では培養8日目の海馬切片の切斷を行った。剃り刃を装備したマニピュレーターを用い、実体顕微鏡下で歯状回上錐体葉および下錐体葉の先端を通過する線に沿って切片を截斷した(図7A)。

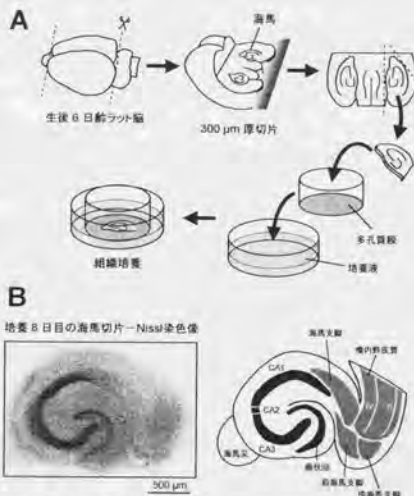


図2 海馬切片の組織培養

A. 静置培養の手法。生後6日齢のラット脳より300  $\mu\text{m}$ 厚の切片を作成し、摘出した海馬を、多孔質膜上で組織培養した。B. 組織培養した海馬のNissl染色像。右はこれに対応した模式図。



### 誘発電位の細胞外記録

培養した海馬を多孔質膜と共に適当な大きさに摘出し、32 °C 人工脳脊髄液中で1時間以上安定化した後、実験に使用した。特に断りのない場合は、歯状回顆粒細胞層 (stratum granulare) を刺激し、CA3 野錐体細胞層 (stratum pyramidale) より誘発電位を細胞外記録した (図 6A)。記録された誘発電位の最大値 (刺激強度は 700-1200  $\mu$ A) を、苔状線維-CA3 野シナプス数の指標として用いた<sup>123,167</sup>。人工脳脊髄液の組成は、NaCl: 127 mM, KCl: 1.6 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 1.24 mM,  $\text{MgSO}_4$ : 1.3 mM,  $\text{CaCl}_2$ : 2.4 mM,  $\text{NaHCO}_3$ : 26 mM, Glucose: 10 mM である。

### 3,3'-dilinolenyloxycarbocyanin perchlorate (Dil) 蛍光染色

Dil は細胞膜に挿入され、膜の流動性に依存して細胞表面を受動拡散する蛍光色素で、固定された組織においても使用可能な双方向性の神経トレーサーとして広く利用されている<sup>90</sup>。

培養海馬切片を 4 % paraformaldehyde/0.1 M リン酸緩衝液で固定し、24 時間後に同固定液中で歯状回顆粒細胞層上に Dil の微結晶を注意深く静置した。色素の非特異拡散および退光を抑える目的で 4 °C の低温遮光下にて 1 週間保存した後、蛍光像を共焦点レーザー顕微鏡 (MRC-600 BioRad, Hercules) を用いて観察した。明視野観察により測定視野を決定し、アルゴンレーザー由来の 514 nm 可視波で G 励起し、550 nm のバンドパスフィルターを介して蛍光像を得た。

### propidium iodide (PI) 蛍光染色

PI は損傷を受けた細胞膜から取り込まれ DNA に結合することにより蛍光を発する色素で、神経細胞死を評価する良いマーカーである<sup>117,140,190</sup>。

0.5 % PI を含有した培養液に 36 °C で 24 時間曝露し、培養海馬切片に色素を取り込ませた。蛍光像の観察は上記の手法に順じた。必要がある場合は、蛍光像を 5 回の加算平均に付した後、256 階調、512×768 画素の画像として光磁気ディスクに保存し、CoMOS Ver. 6.01 (BioRad) を用いてオフライン解析を行った。歯状回顆粒細胞層、CA1 野および CA3 野錐体細胞層の全 3 部位に、各 3 つの 20×20 画素ピクセル (82.5  $\mu\text{m}^2$  相当) を作成し、そのピクセル内の蛍光強度の平均値を算出した<sup>126,169</sup>。

### Timm 染色

Timm 染色法は  $\text{Zn}^{2+}$  に対する化学反応を利用した染色法であり、同イオンを多く含有する海馬苔状線維の神経終末を選択的に検出する染色法として広く用いられている<sup>38,149</sup>。

培養海馬切片を 0.1 M リン酸緩衝液で 10 分間洗浄した後、0.37 % sodium sulfide に 4 °C で 15 分間浸し、直ちに 10 % formalin で固定した (4 °C, 15 分間)。再び、0.1 M リン酸緩衝液で洗浄した後 (15 分間、各 2 回)、70 %、96 % の希釈系列 ethanol で脱イオンした (15 分間、各 2 回)。15 分以上風乾し、physical development を用いて 26 °C、50 分間の還元反応を遮光下で行った。physical development は、1.7 %  $\text{AgNO}_3$  と 0.085 % hydroquinone をクエン酸により pH 緩衝した 20 % arabic gum に溶解したものを用いた。蒸留水を用いて反応を停止した後、明視野顕微鏡を用いて Timm 染色像を観察した。必要な場合には、これを白黒写真に収めスキャナーを用いて画像を取り込んだ。CA3 野門隙層、CA3 野多形細胞層、歯状回門および歯状回分子層の全 4 部位に、約 100  $\mu\text{m}^2$  に相当する画素ピクセルを各 3 つ作成し、そのピクセル内の白黒レベルの平均値を算出した。白黒レベルは 101 階調からなり白を 0、黒を 100 と定義し、得られた平均値と、CA3 野放射線層 (stratum radiatum) における平均値との差を Timm 染色強度として採用した。

## 膜電位の光生理学的測定

培養 8 日目の海馬切片を多孔質膜と共に切り出し実験に使用した。oxonol 系の膜電位感受性色素 RH482 2.0 mg/ml で 5 分間染色した後、人工脳脊髄液中で 15 分以上洗浄して光学的測定を開始した。tungsten/halogen ランプ (12 V/100 W)、干渉フィルター (700 ± 20 nm) および 4 倍対物レンズを装備した倒立顕微鏡と HR Deltaron 1700 (Fuji Photo Film) を用いて測定を行った。1 試行の測定時間は 512 frame (1 frame=0.6 ms) とし、S/N 比を向上させる目的で連続した 16 試行の結果を加算平均した。電磁シャッターを用いて 1 試行あたりの露光時間を 1 秒間とし、色素の退色を極力抑えた。また、測定中は灌流を停止し、灌流液面の揺れを回避した。

## 結果

## てんかん様神経発射

痙攣薬として知られている  $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA)<sub>A</sub> 受容体阻害薬 picrotoxin 50  $\mu$ M を培養 8 日目の海馬切片に適用すると、43 例中 42 例 (97.7%) で CA3 野錐体細胞層から同調性自発発火が誘導された。これは、多重発火を伴った神経発射 (図 3Bb) が規則性をもって繰り返されるものであり (図 3Ba)、電位感受性 Na<sup>+</sup>チャンネル阻害薬 0.5  $\mu$ M tetrodotoxin で完全に阻害された (図 3C)。また、痙攣薬を適用しない場合は、82 例中 2 例 (2.4%) においてのみ自発発火が観察されたが、これは単回発火の神経活動であり規則性も見られなかった。

picrotoxin 誘発神経発射には濃度依存性が認められ、神経発射が観察された切片の割合 (図 4Aa) および神経発射が観察された切片における発射の頻度 (図 4Ab) は、picrotoxin の濃度と正に相関し 50  $\mu$ M でほぼ最大の効果が得られた。しかし 1 回の発射における発火回数には濃度依存性が認められず (図 4Ac)、神経発射の発火パターンは picrotoxin の濃度により変化しないと考えられた。また、神経発射は培養開始直後の切片では比較的誘導しにくく、数日培養した切片で安定して誘導することができた (図 4B)。神経発射は海馬の全ての部位に誘導することができたが、

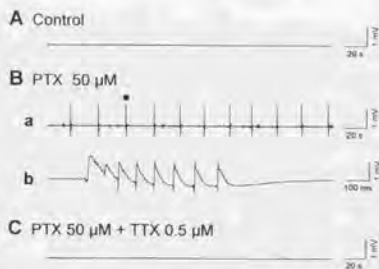


図3 picrotoxin により誘発される CA3 野てんかん様神経発射の典型例

A. 通常の灌流液中での記録例。B. picrotoxin 50  $\mu$ M 存在下での記録例。●で示した発射をもに拡大した。C. picrotoxin 50  $\mu$ M と tetrodotoxin 0.5  $\mu$ M の存在下での記録。PTX: picrotoxin, TTX: tetrodotoxin。

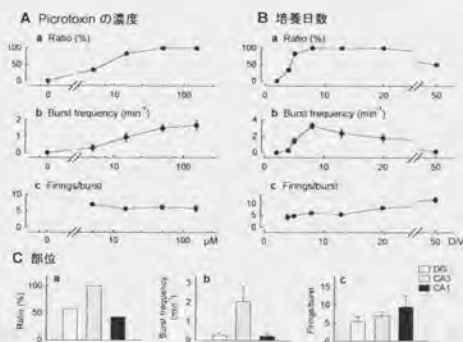


図4 picrotoxin 誘発神経発射の性質

A. 濃度依存性。B. 培養日数との関係。C. 部位差 (歯状回, CA3 野, CA1 野)。a. 神経発射が観察された培養海馬切片の割合。b. 神経発射の生じる頻度 (1 分あたりの回数)。c. 1 回の神経発射に見られる平均発火数。mean ± S.E.M. n=5-7。

CA3 野で最も生じやすく CA1 野と歯状回では比較的生じにくかった (図 4C)。

piretoxin とは異なる作用機序を有する痙攣薬 bicuculline 10  $\mu$ M (GABA<sub>A</sub> 受容体阻害薬)、pentylenetetrazol 1 mM (GABA 受容体または電位感受性 K<sup>+</sup>チャンネル阻害薬)、4-aminopyridine 2 mM (電位感受性 K<sup>+</sup>チャンネル阻害薬) および pilocarpine 10  $\mu$ M (muscarine<sub>1</sub> 受容体作動薬) を用いても、てんかん様神経発火が誘導された (図 5)。

#### 苔状線維の形成

海馬切片の培養開始後、苔状線維が形成される過程を電気生理学的に観察した。歯状回顆粒細胞層を刺激し CA3 野錐体細胞層より得られる誘発電位の大きさの最大値を、

苔状線維-CA3 野の機能的シナプス数の指標とした (図 6A)。誘発電位は 5-10 ms の潜時を持った陽性電位として記録され (図 6B)、この大きさは培養日数を経るに従い徐々に増大し培養 11 日目程度で安定した大きさが得られるようになった (図 6C)。この条件下で培養液中に picrotoxin 50  $\mu$ M を慢性的に添加した場合、誘発電位の増大は有意に阻害された。以下の電気生理学的検討においては培養 8 日目の誘発電位の大きさを比較に用いた。picrotoxin の作用は濃度依存性を示し、その作用は 50  $\mu$ M 程度で最大になり、150  $\mu$ M の高濃度下で培養しても誘発電位の増大は完全には阻害されなかった (表 1)。また、この picrotoxin の作用は tetrodotoxin 0.5  $\mu$ M により完全に阻害された (表 1)。てんかん様神経活動を誘発した picrotoxin 以外の痙攣薬 bicuculline, pentylenetetrazol, 4-aminopyridine, pilocarpine の全 4 種の作用を検討したところ、全ての薬物に苔状線維のシナプス形成に対する阻害作用が認められた (表 1)。

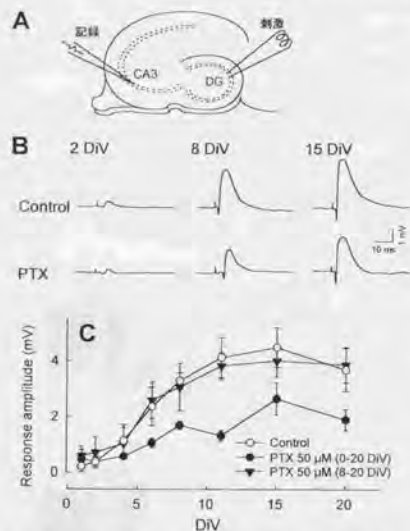


図 6 苔状線維の形成に対する picrotoxin の阻害作用

A. 刺激及び記録の部位。B. CA3 野誘発電位の典型例。C. 最大誘発電位の大きさの時間経過。○: picrotoxin 非存在下で培養した切片。●: picrotoxin 50  $\mu$ M 存在下で培養した切片。誘発電位の増大が有意に抑制された ( $P < 0.01$ , two-way ANOVA)。▼: 培養 8 日目以降 picrotoxin 存在下で培養した切片。DG: 歯状回, PTX: picrotoxin, DIV: days in vitro, mean  $\pm$  S.E.M.,  $n = 3-7$ 。

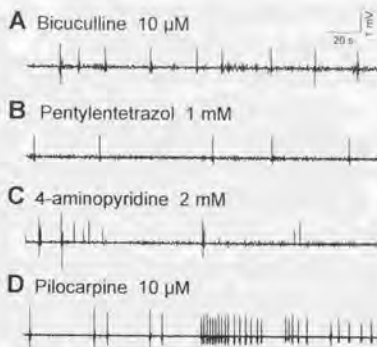


図 5 様々な薬物による CA3 野てんかん様神経発火  
A. Bicuculline (GABA<sub>A</sub> 受容体阻害薬) 10  $\mu$ M. B. Pentylenetetrazol (GABA 受容体または電位感受性 K<sup>+</sup>チャンネル阻害薬) 1 mM. C. 4-aminopyridine (電位感受性 K<sup>+</sup>チャンネル阻害薬) 2 mM. D. Pilocarpine (muscarine<sub>1</sub> 受容体阻害薬) 10  $\mu$ M。

次に、picrotoxin が形成された苔状線維に対してはどのような影響を及ぼすかを検討した。既に苔状線維の形成が進んでいる培養 8 日目以降に慢性的に添加した場合には、picrotoxin の作用は観察されず、対照群との間に差は見られなかった (図 6C▼)。この結

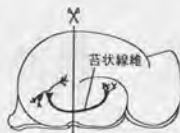
Drugs	n	Response amplitude (mV) (%)	
Control	4	3.50 ± 0.30	100.0 ± 9.6
PTX 1 μM	4	3.02 ± 0.15	86.3 ± 4.3
15 μM	5	2.10 ± 0.46**	60.0 ± 13.1
50 μM	6	1.61 ± 0.12**	46.0 ± 3.4
150 μM	5	1.92 ± 0.38**	54.9 ± 8.0
TTX 0.5 μM	5	3.21 ± 0.55	91.7 ± 19.0
PTX 50 μM + TTX 0.5 μM	6	3.49 ± 0.33**	99.7 ± 9.4
Bicuculline 10 μM	6	1.68 ± 0.11**	48.0 ± 3.1
Pentylenetetrazol 1 mM	6	1.78 ± 0.12**	50.3 ± 3.4
+aminopyridine 2 mM	6	1.67 ± 0.09**	47.7 ± 2.6
Pilocarpine 10 μM	6	1.69 ± 0.32**	47.4 ± 9.1

表1 苔状線維の形成に対するてんかん様神経活動の作用  
各薬物の存在下で培養し培養8日目に苔状線維シナプス応答を記録した。PTX, picrotoxin, TTX, tetrodotoxin, \*\* $P < 0.01$  vs. Control, \* $P < 0.01$  vs. PTX 50 μM, ANOVA followed by Tukey's test (mean ± S.E.M.).

以上の検討で認められた picrotoxin によるシナプス形成の阻害効果が、苔状線維-CA3 野シナプスに局限したものであるかを確認するために、シャッファー側枝 (Schaffer collateral) -CA1 野シナプスに関しても同様の検討を行った (図9)。培養8日目に、歯状回顆粒細胞層を刺激し CA3 野錐体細胞層から得られる誘発電位と、CA1 野放線層を刺激し CA1 野錐体細胞層から得られる誘発電位を同一切片より記録し各々比較した。苔状線維-CA3 野シナプスの形成は picrotoxin の適用により阻害されたが、シャッファー側枝-CA1 野のシナプス反応は picrotoxin により影響を受けなかった (図9A)。また培養8日目に切断した海馬切片に対しても同様の検討を行った。切断直後から picrotoxin を添加し7日後にシナプス応答を記録した。picrotoxin の存在下で、苔状線維-CA3 野シナプスの再形成は有意に阻害され、シャッファー側枝-CA1 野シナプスの再形成も阻害される強い傾向が認められた ( $P = 0.0502$ , Student's *t* test) (図9B)。

Dil 蛍光色素を用いて苔状線維の伸展を観察した。培養2日目では苔状線維は殆ど観察されなかったが ( $n = 6$ ) (図10A)、培養8日目には歯状回から CA3 野に向かって苔状線維が伸展している様子が観察された ( $n = 6$ ) (図10B)。これは picrotoxin 存在下でも同様に観察された ( $n = 5$ ) (図10C)。

## A 切断直後



## B 切断7日後



図7 培養海馬切片の切断と再接合

A, 切断直後, B, 切断7日後。写真は Nissl 染色像を、右はこれに対応した模式図を示している。

果は picrotoxin が苔状線維の発達過程に対してのみ効果を示すことを示唆している。そこでこの考えを確認するために培養8日目に苔状線維を一度切断し、これが再び形成する過程に対する picrotoxin の作用を検討した。切断された海馬切片は培養を継続すると再接合し (図7)、それに伴い切断直後には全く観察されなかった苔状線維のシナプス応答は徐々に回復した (図8)。切断直後から picrotoxin を添加すると、シナプス応答の回復は有意に阻害された (図8)。

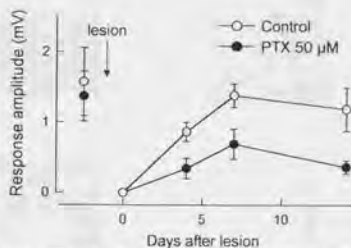


図8 苔状線維の再生に対する picrotoxin の阻害作用

培養7日目に海馬切片を図7に示した様に切断し、その後で苔状線維シナプス応答を記録した。○ picrotoxin 非存在下, ● picrotoxin 50 μM を切断直後から添加。誘発電位の回復が picrotoxin 存在下で有意に抑制された ( $P < 0.01$ , two-way ANOVA). PTX, picrotoxin, mean ± S.E.M.,  $n = 5-11$ .

PI 蛍光色素を用いて picrotoxin の神経細胞の生存に対する作用を検討した。picrotoxin 50  $\mu\text{M}$  を慢性添加しても培養 14 日目まで有意な細胞死は検出されなかった (図 11)。なお、図 11 には神経毒カイニン酸 400  $\mu\text{M}$  に 40 分間暴露し 24 時間後の PI 蛍光像を positive control として掲載した。カイニン酸は測定した全ての部位において細胞死を誘導した。

苔状線維のシナプス形成における picrotoxin の阻害作用を薬理的に解析した。picrotoxin が誘発するてんかん様発射は神経細胞に断続的な脱分極を誘導し、電位感受性チャネルを透過して  $\text{Ca}^{2+}$  が流入すると考えられたため、nicardipine 10  $\mu\text{M}$  (電位感受性 L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル阻害薬)、nifedipine 10  $\mu\text{M}$  (同)、 $\text{NiCl}_2$  50  $\mu\text{M}$  (電位感受性 T 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル阻害薬) および 2-amino-5-phosphopentanoic acid 50  $\mu\text{M}$  (AP5) (NMDA 受容体阻害薬) の picrotoxin の作用に対する効果を検討した (表 2)。nicardipine は picrotoxin の作用を濃度依存的に抑制した。同様の薬理作用をもつ nifedipine を適用した場合にも picrotoxin の作用が抑制された。また、nicardipine を培養 4-8 日目の picrotoxin 処置後半の 5 日間のみにも適用しても、同様の抑制効果を示した。一方、 $\text{NiCl}_2$

## A 2 DIV



## B 8 DIV

苔状線維



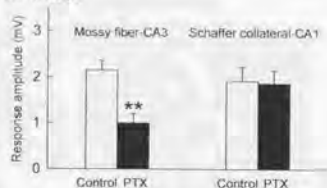
## C 8 DIV in PTX



図 10 picrotoxin 存在下における苔状線維の伸長

苔状線維を神経トレーサー Dil より歯状回顆粒細胞から逆行性染色し、共焦点顕微鏡下で観察した。A, picrotoxin 非存在下で 2 日間培養した切片。B, picrotoxin 非存在下で 8 日間培養した切片。C, picrotoxin 50  $\mu\text{M}$  存在下で 8 日間培養した切片。DG: 歯状回。PTX: picrotoxin。

## A Intact



## B Lesioned

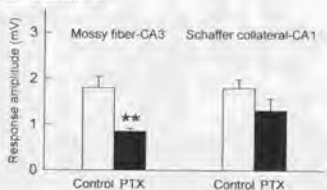


図 9 苔状線維と Schaffer 側枝のシナプス形成に対する picrotoxin の効果の比較

A, 培養 8 日目の誘発電位の大きさ。B, 培養 8 日目に切片を切断し、7 日間培養後の誘発電位の大きさ。PTX: picrotoxin。 \*\* $P < 0.01$  vs. Control, Student's *t* test (mean  $\pm$  S.E.M.,  $n=4$ )。

および AP5 は picrotoxin の作用に影響を与えなかった。なお、nicardipine は picrotoxin が誘発するてんかん様発射には影響を与えなかった (図 12)。同図に

## A Control



## B PTX



## C Kainate

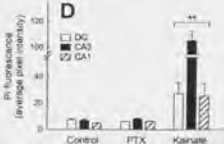


図 11 神経細胞生存に対する picrotoxin の効果

培養 14 日目に PI 色素で染色し死亡した神経細胞を共焦点顕微鏡下で検出した。A, picrotoxin 非存在下で 14 日間培養した切片。B, picrotoxin 50  $\mu\text{M}$  存在下で 14 日間培養した切片。C, picrotoxin 非存在下で 13 日間培養した切片を、カイニン酸 400  $\mu\text{M}$  に 40 分間暴露し、さらに 24 時間培養したもの。D, 蛍光強度を測ったもの。DG: 歯状回。PTX: picrotoxin。 \*\* $P < 0.01$  vs. Control, two-way ANOVA (mean  $\pm$  S.E.M.,  $n=4$ )。

Drugs	n	Response amplitude	
		(mV)	(%)
Control	6	1.50 ± 0.29	100.0 ± 8.7
PTX 50 μM	6	1.70 ± 0.15**	51.9 ± 4.5
Nic 10 μM	3	2.87 ± 0.57	86.9 ± 17.2
PTX 50 μM + Nic 0.3 μM	5	1.70 ± 0.30	51.5 ± 9.1
+ 1 μM	8	2.51 ± 0.18	76.1 ± 5.5
+ 3 μM	7	5.38 ± 0.26**	102.4 ± 7.9
+ 10 μM	6	3.31 ± 0.30**	100.3 ± 9.1
+ 14.8 D.V. 10 μM	7	7.01 ± 0.42*	91.2 ± 12.7
Nifedipine 10 μM	3	3.07 ± 0.19	93.0 ± 5.7
PTX 30 μM + Nifedipine 10 μM	3	3.02 ± 0.29*	91.5 ± 8.8
NaCl <sub>2</sub> 50 μM	5	2.94 ± 0.25	89.1 ± 7.7
PTX 50 μM + NaCl <sub>2</sub> 50 μM	6	0.99 ± 0.15	30.1 ± 4.6
AP5 50 μM	5	1.10 ± 0.50	93.8 ± 15.0
PTX 50 μM + AP5 50 μM	6	1.63 ± 0.17	49.4 ± 5.0

表2 picrotoxin の効果に対する Ca<sup>2+</sup>透過性チャネル阻害薬の作用

各薬物の存在下で培養し 8 日目に苔状線維シナプス応答を記録した。Nic および nifedipine L 型 Ca<sup>2+</sup>チャネル阻害薬。NaCl<sub>2</sub> T 型 Ca<sup>2+</sup>チャネル阻害薬。AP5: NMDA 受容体阻害薬。PTX: picrotoxin, Nic: nicardipine. \*\*P<0.01 vs Control, \*P<0.05, \*P<0.01 vs PTX 50 μM. ANOVA followed by Tukey's test (mean ± S.E.M.).

は carbachol 1 μM のデータを positive control として示した。carbachol は picrotoxin が誘発する神経発射の頻度を有意に上昇させた。

培養 8 日目の海馬切片における苔状線維の神経終末の分布を Timm 染色により観察した。対照群では CA3 野明瞭層および歯状回門に苔状線維の終末が観察されたが (図 13A)、picrotoxin 添加群では明瞭層の Timm 染色の強度は低下し、CA3 野多形細胞層が Timm 陽性となった (図 13B)。

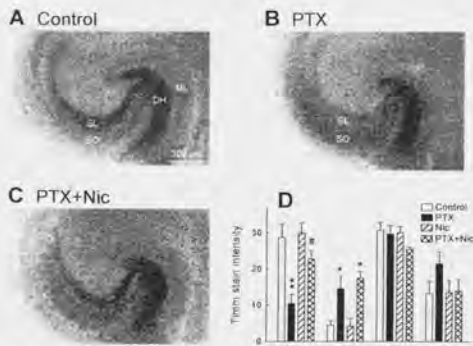


図 13 picrotoxin による苔状線維シナプスの異所性形成

培養 8 日目に海馬切片を Timm 染色した。写真は、無処置切片 (A)、picrotoxin 50 μM 存在下 (B) または picrotoxin 50 μM および nicardipine 10 μM (C) の共存存在下で培養した切片の Timm 染色視野像である。各部位の Timm 染色の強度を D に纏めた。SL: 明瞭層, SO: 多形細胞層, DH: 歯状回門, ML: 分子層, PTX: picrotoxin, Nic: nicardipine. \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs Control, \*P<0.05 vs PTX. ANOVA followed by Tukey's test (mean ± S.E.M., n=4).

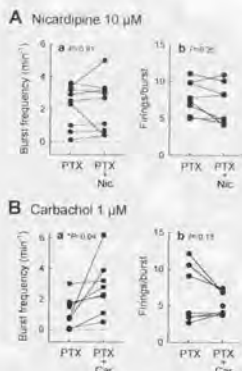


図 12 picrotoxin 誘発発射に対する nicardipine の効果

培養 8 日目の切片を用いて、nicardipine 10 μM 適用前後での picrotoxin 誘発発射を、神経発射の頻度 (左) および神経発射 1 回あたりの平均発火数 (右) を指標に評価した (A)。positive control として carbachol (muscarinic 受容体作動薬) 1 μM を用いた (B)。PTX: picrotoxin, Nic: nicardipine, Car: carbachol, paired t test.

また、picrotoxin と nicardipine を共添加した場合には、明瞭層の Timm 染色強度が回復した (図 13C)。各部位の Timm 染色の強度を図 13D に纏めた。明瞭層では picrotoxin により苔状線維の終末の密度が有意に低下し、これは nicardipine の共添加で回復した。一方、CA3 野多形細胞層では、picrotoxin により苔状線維の終末の密度は有意に上昇し、この作用は nicardipine によって影響を受けなかった。歯状回門では有意な差は見られなかった。また、歯状回分子層では picrotoxin により苔状線維の終末の密度が上昇する傾向が見られた。

培養 8 日目に歯状回刺激による誘発電位を同一切片から多点記録し、苔状線維の投射の様子を電気生理学的に解析した。CA3 野明瞭層、錐体細胞層および多形分子層の全 3 部位から細胞外記録を行った (図 14A)。錐体細胞層から記録した誘発電位では、図 6 で既に述べた結果と同様の結果が得られた。明瞭層からは、樹状突起で得られる典型的なシナプス反応である陰性電位が記録された。この陰性電位の大きさは picrotoxin の添加により有意に減少し、これは nicardipine の共処置により完全に回復した。一方、CA3 野多形細胞層からは対照群では殆ど誘発電位は記録されなかったが、picrotoxin 単独処置群および nicardipine の共添加群では、明瞭な陰性誘発電位が記録された。

#### picrotoxin 処置海馬切片の解析

これまでの検討から picrotoxin の存在下で培養した海馬切片では、苔状線維が異常な神経回路を形成していることが示された。したがって、この海馬切片では神経伝達のパターンが何らかの影響を受けている可能性が想定される。そこで培養 8 日目に、光生理学的手法により神経活動の伝播を 2 次元的に観察した。図 15A は歯状回刺激後の神経伝達の様子を、図 15B は各部位における膜電位の時間経過を示している。通常

の培養切片では、記録した全 7 例で歯状回の刺激後、歯状回→CA3 野→CA1 野へと神経活動が順次伝播する様子が観察されたが (参考: 図 1B)、picrotoxin 50  $\mu\text{M}$  を処置した切片では、7 例中 6 例で図 15 に示した様に歯状回から CA3 野への神経伝達が観察されなかった。nicardipine の共存下で培養した切片では 7 例中 5 例で通常の神経伝達が観察された。また、picrotoxin の存在下で培養した切片では、歯状回の興奮時間が延長しており、これは nicardipine の共添加により回復した。最大膜電位変化の 50% 以上の変化量を維持する時間は、対照群で  $17.3 \pm 3.2$  ms、picrotoxin 処置群で  $58.6 \pm 8.7$  ms、picrotoxin と nicardipine の共添加群で  $20.1 \pm 3.9$  ms であった。

次に苔状線維-CA3 野シナプス伝達の頻回刺激 (100 Hz, 5 回) に対する応答を記録した。通常培養切片で観察される応答を図 16A に示した。picrotoxin で処置した切片では、17 例中 8 例で刺激後 250-1000 ms に反復する微小陽性電位が観察された。これは AP5 50  $\mu\text{M}$  により完全に阻害された。また picrotoxin と nicardipine の共存下で培養した切片ではこの様な遅発性発射は全く観察されなかった。

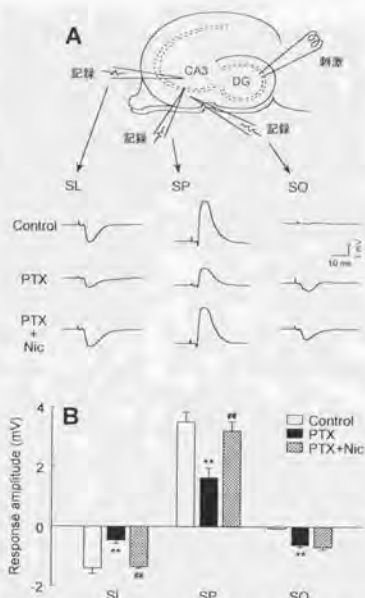


図 14 picrotoxin による苔状線維シナプスの異所性形成

picrotoxin 50  $\mu\text{M}$  存在下、または picrotoxin 50  $\mu\text{M}$  および nicardipine 10  $\mu\text{M}$  の共存下で培養し、培養 8 日目に誘発電位を記録した。A. 刺激及び記録の部位 (上図)。誘発電位の典型例 (下図)。B. 最大誘発電位の大きさの棒圖。DG: 歯状回、SL: 明瞭層、SP: 錐体細胞層、SO: 多形細胞層、PTX: picrotoxin、Nic: nicardipine。\*\* $P < 0.01$  vs. Control, # $P < 0.01$  vs. PTX, ANOVA followed by Tukey's test (mean  $\pm$  S.E.M.,  $n=5$ )。)

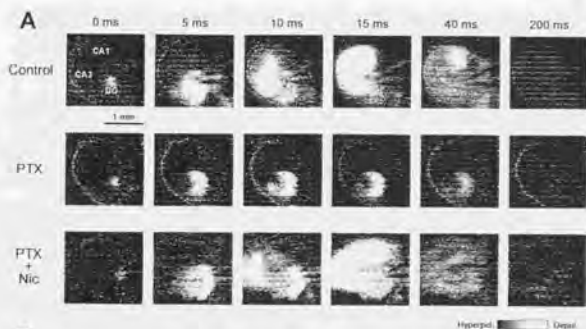


図15 picrotoxin 処置切片における神経活動伝播パターンの変化

picrotoxin 50  $\mu\text{M}$  存在下、または picrotoxin 50  $\mu\text{M}$  および nicardipine 10  $\mu\text{M}$  の共存下で培養し、培養 8 日目に電位感受性色素を用いて歯状回刺激後の神経活動の伝播を観察した。A、神経伝達の様子。B、各部位における膜電位変化の時間経過。DG、歯状回、PTX picrotoxin、Nic, nicardipine。

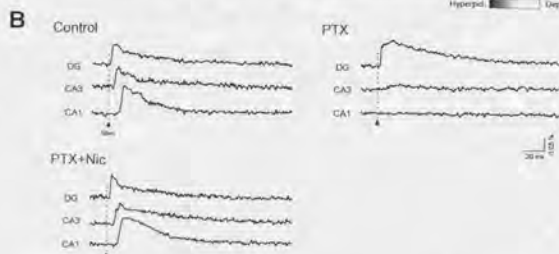
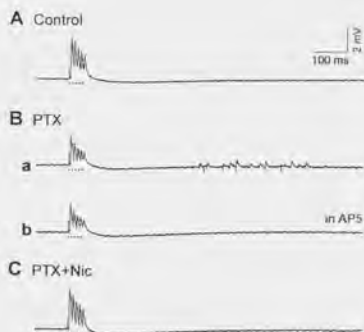


図16 picrotoxin 処置切片の頻回刺激に対する苔状線維シナプス応答

無処置切片 (A)、picrotoxin 50  $\mu\text{M}$  存在下 (Ba)、または picrotoxin 50  $\mu\text{M}$  および nicardipine 10  $\mu\text{M}$  (C) の共存下で 8 日間培養した切片から苔状線維シナプス応答を記録した。●は高頻度刺激 (100 Hz, 5 回) を与えた時間を示している。Ba と同一切片で AP5 90  $\mu\text{M}$  を灌流した後の記録例を Bb に示した。PTX, picrotoxin、Nic, nicardipine。



## 考察

培養海馬切片において、苔状線維-CA3 野シナプスの形成は picrotoxin の存在下で阻害された。picrotoxin の作用は、1) 濃度依存性を示し、この濃度は picrotoxin がてんかん様発射を誘発する濃度とよく一致した、2) tetrodotoxin により阻害された、3) picrotoxin とは作用機序の異なる他の痙攣薬を用いて模倣された、という 3 点から、picrotoxin が誘発したてんかん様の神経活動が苔状線維のシナプス形成を阻害したことが示唆された。苔状線維の形成が進行した後に picrotoxin を添加した場合は、同薬の効果が得られなかったという結果は重要である。形成された苔状線維を一度切断した後に再生される過程が picrotoxin で阻害されるという結果も併せて考えると、形



成過程の苔状線維に対しては異常な神経活動は抑制的に作用するが、既に形成されている苔状線維に対しては影響を及ぼさないことが示唆される。これは、培養を開始した時点で既に形成が完了しているシャッファー側枝-CA1野シナプスには picrotoxin が影響を及ぼさなかったが、切断されたシャッファー側枝が再生する過程に対しては picrotoxin が阻害効果を示したという結果からも支持される。なお、シャッファー側枝に対する picrotoxin の作用が、若干弱かったのは、同薬物が CA1野においては CA3野ほどの神経発射を誘発しなかったことに依存していると考えられる。以上を考え合わせると、てんかん様神経活動がシナプス形成を阻害する作用は、1) 形成中の線維に対してのみ現れ、2) 苔状線維に局限したものではなく比較的一般的な現象である、と想定された。

過剰な神経活動により神経細胞が脱落する例が報告されているため<sup>66,65,119,150</sup>、死細胞を選択的に染色する PI 蛍光色素を用いた検討を行った。しかしながら、本研究では picrotoxin による CA3野の神経細胞の脱落は観察されなかった。このことから、picrotoxin の作用は苔状線維の標的である CA3野の神経細胞が脱落したことによるものではないことが示された。

苔状線維の形成過程は、1) 軸索伸展、および 2) シナプス形成の大きく 2段階に分類される。神経トレーサーである Dil 蛍光色素を用いた検討により、苔状線維は picrotoxin 存在下でも対照群と同様に CA3野に向かって伸展することが示された。このことから、picrotoxin は軸索伸展ではなく、シナプス形成の過程に作用することで、苔状線維の形成を阻害したことが示唆される。

本研究では、電位感受性 L 型  $Ca^{2+}$ チャネル阻害薬が picrotoxin の作用を抑制することを見出した。一方、T 型  $Ca^{2+}$ チャネル阻害薬および NMDA 受容体阻害薬にはこの様な作用が認められなかった。これら結果は、てんかん様神経活動に応じて活性化した L 型  $Ca^{2+}$ チャネルを通じて細胞内に流入した  $Ca^{2+}$ が、シナプス形成を抑制したことを示している。一般的に、シナプス形成に細胞内  $Ca^{2+}$ の存在が必要であることを考慮すると<sup>15</sup>、シナプス形成には至適な細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度が存在し、picrotoxin 存在下では  $Ca^{2+}$ の濃度が過剰に上昇したために、逆にシナプス形成が阻害されたものと理解される。

Timm 染色法を用いた検討により、picrotoxin が苔状線維の CA3野明瞭層におけるシナプス形成を阻害することが再確認されたが、同時にさら興味深い事実が明らかとなった。picrotoxin 存在下では、明瞭層のシナプス数が減少しただけでなく、正常な条件下では苔状線維が決してシナプスを形成しない CA3野多形細胞層において神経終末が確認された。この現象は、電気生理学的検討によっても確認された。したがって、picrotoxin の存在下で形成された異常なシナプスは生理学的機能を有していることが明らかとなった。

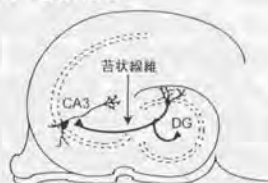
以上の検討から想定される現象を図 17 の模式図に示した。本研究で観察された picrotoxin の作用は、単純に苔状線維のシナプス形成の阻害効果というより、むしろ苔状線維がシナプスを形成すべき対象の混乱化であると考えられることができる。神経系において正確な神経回路が形成されるためには、適切な神経活動パターンが必要であるとされている<sup>64,72</sup>。適切な神経活動が欠如した場合には、神経は正確な標的とシナプスを形成できず、過剰なシナプスが異常形成されると考えられている。苔状線維のシナプス形成に関しては、この仮説の整合性に対する直接的な証拠はないものの、苔状線維が形成される時期に相当する生後第 2 週目で CA3野に特徴的な神経発火パターンが記録されることが報告されていることから<sup>62</sup>、苔状線維の形成にもこうした適切な神経活動パターンが必要であると想定される。したがって、てんかん様の過剰神経活動により苔状

線維の異常な神経回路が形成されたという現象は、正常な発達過程に必須な神経発火パターン崩壊に起因する標的の混乱化であると考えられる。なお、L型  $Ca^{2+}$  チャネル阻害薬が苔状線維の本来投射すべき標的におけるシナプス形成に対してのみ効果を持ったという事実から、苔状線維の正常なシナプス形成と、異常なシナプス形成との間に、機構的な差違が存在することが示唆される。これらを詳細に解明していくことは、今後の重要な課題である。

軸索のガイダンスには接着分子が重要な役割を演じている<sup>42,94</sup>。本研究は苔状線維の形成における  $Ca^{2+}$  の役割を示唆しているが、実際、細胞内  $Ca^{2+}$  は接着分子の発現<sup>135</sup> や活性<sup>45,44,143,147,187</sup> を調節していることが知られている。例えば、培養筋細胞<sup>194</sup> や培養上皮細胞<sup>67</sup> においては、L型  $Ca^{2+}$  チャネル阻害薬が接着分子の発現量を上昇させることが示されている。さらに、細胞内  $Ca^{2+}$  の上昇によりある種の接着分子の細胞内領域が切断されることも報告されている<sup>36,147</sup>。また、Doherty らは数多くの実験を行い、接着分子による神経突起の伸展作用がL型およびN型  $Ca^{2+}$  チャネルの活性化を介していることを示唆している<sup>43</sup>。苔状線維と接着分子という観点から見た場合、picrotoxin により苔状線維の正確な神経投射が失われるという結果は、limbic system-associated membrane protein (LAMP) との関連から興味深い。LAMP は、辺縁系に広く分布する免疫グロブリンスーパーファミリーに属する 64-68 kDa の糖蛋白である<sup>31,100,193</sup>。近年、抗 LAMP 抗体を幼若ラットにくも膜下投与すると苔状線維の正確な神経投射パターンが失われることが示された<sup>133</sup>。さらに最近、neural cell adhesion molecule (NCAM) の関与も示唆されている。ポリシアル化された NCAM は、新生細胞に豊富に発現しているが、このポリシアル基を酵素処理により除去すると、やはり苔状線維が異常発達し<sup>138</sup>、CA3 野から記録される苔状線維シナプス応答の大きさも減少する<sup>134</sup>。これらの報告された結果と、本研究の結果は極めて類似しており、細胞内  $Ca^{2+}$  がこうした接着分子の活性を調節し苔状線維の軸索ガイダンスを行っている可能性が示唆される。これらのことから、的確な神経回路形成における神経活動依存性の機構と接着分子を介した機構を広くとらえるうえで、本研究は重要な示唆を与えるものと思われる。

picrotoxin 処置により苔状線維が異常な神経回路を形成した切片では、1) 歯状回から CA3 野への神経伝達が生じなかった、2) 歯状回の興奮時間が延長した、3) 歯状回の頻回刺激により CA3 野に遅発性後発射が観察された、等の異常な現象が観察された。1) の結果から、歯状回-CA3 野間の異常な線維連絡の下では、歯状回の刺激により CA3 野錐体細胞に活動電位を惹起できる程度の十分なシナプス後電位を誘導することができなかったことが示された。これは picrotoxin で処置した切片ではシナプス応答の大きさが有意に小さかったという結果からも支持される。また、

## A Control



## B PTX



## C PTX + Nic



— 正常な苔状線維

図 17 picrotoxin が苔状線維の投射に及ぼす影響 (想定図)  
無細胞切片 (A), picrotoxin 50  $\mu$ M 存在下 (B), または picrotoxin 50  $\mu$ M および nicardipine 10  $\mu$ M (C) の共存下で培養した切片。PTX: picrotoxin, Nic: nicardipine

2) および 3) の結果は、図 17 で示した様な歯状回における直接反回性回路の形成に伴い歯状回の興奮性が上昇した結果であると考えられる。さらに 3) の現象が AP5 で阻害されたことから、亢進された歯状回の興奮性神経伝達に NMDA 受容体の活性化が関与していることが示唆された。てんかん患者または動物モデルにおいて、歯状回の NMDA 受容体 mRNA の発現量が上昇し、貫通線維-歯状回シナプス伝達の NMDA 受容体成分が増大することが示されている<sup>97</sup>。こうした NMDA 受容体の異常な機能亢進が、歯状回の恒常性興奮に関与していると思われる。

picROTOXIN 処置切片では歯状回-CA3 野の神経伝達が生じなかった。苔状線維は海馬の主要神経回路を形成しているため、この状態は海馬の機能に重篤な支障をきたしていることを意味している。たとえば、この現象を *in vivo* に適用した場合、小児てんかんでは予後に海馬の機能障害による何らかの後遺症が観察される可能性が想定される。実際に、小児てんかんの予後には認知、学習障害を生じる例が報告されているが、こうした後遺症はまさに海馬の発達異常に由来したものであるかもしれない<sup>172</sup>。また、picROTOXIN 処置切片では顔回刺激の後、数百 ms にわたりてんかん様の神経伝達を観察された。この結果は、てんかん様条件に暴露された切片は自らてんかん原性を獲得することを意味している。これはてんかんの慢性化の基礎機構かもしれない。実際に、小児てんかんが慢性化する症例は数多く報告されている<sup>51, 114</sup>。本研究では、さらに、これらの現象が電位感受性 L 型  $Ca^{2+}$  チャンネル阻害薬で阻害されることを示した。したがって、同薬が *in vivo* においても有効であれば、てんかんの後遺症および慢性化に対する治療薬の候補として期待される。

## 第3章 歯状回顆粒細胞の単離培養を用いた検討

### 緒言

前章では海馬組織培養を用いて、てんかん様の条件下で苔状線維のシナプスが異常形成することを明らかにした。しかし、組織培養系は、1) グリア細胞を多く含有している、2) 培養液中に血清を含有している、等の問題点があり、前章で行った以上の詳細な解析は困難であった。そこで本章では、苔状線維の起始細胞である歯状回顆粒細胞の単離培養を行い、苔状線維のシナプス形成を観察した。この単離培養系には、1) グリア細胞の混入が少なく、かつ神経細胞同士も互いに接していないため、グリア細胞や神経細胞同士の相互作用などの複雑な要因が比較的少なく実験結果の考察が容易になる、2) 無血清培養が可能となり機構解明に必須な薬理的解析が容易になる、等の利点がある。

歯状回顆粒細胞の大半は周産期に形成される<sup>45)</sup>。そこで、顆粒細胞を効率良く得るために、生後のラットから培養細胞を調製し、培養下で形成されたシナプスに対して薬理的検討を行った。

### 方法

#### 顆粒細胞の単離培養

3日齢のWistar系ラットを水浴麻酔した後、迅速に全脳を摘出し、 $O_2/CO_2/95:5$ を通気した氷冷Gey's BSS中で海馬体を摘出した。さらに海馬支脚複合体、続いてアンモン角を切除し、歯状回のみを慎重に摘出した(図18A)。組織片をメスで粉碎し、0.25% trypsin (Difco)、0.01% deoxyribonuclease I (Sigma)、0.5% glucoseを含有するリン酸緩衝液 2.1 ml 中、37°Cで30分間の酵素処理を行った。馬血清 (ICN biomedical) 1 ml を添加した後、1200 rpm で5分間の遠心に付し上清を除去した。組織片を再び培養液 2 ml で満たし、内径 850  $\mu\text{m}$  のプラスチック製チップで数回吸排を反復し細胞を単離した。2重のナイロン膜 (25  $\mu\text{m}$  径) で濾過し組織塊を除去した後、予め poly-L-lysine (Sigma) でコーティングした 48 穴プレート (Costar) に、40,000 cells/cm<sup>2</sup> の密度で細胞を播種した。以上の手法により、ラット 1 匹あたり約 500,000 個の細胞を得ることが可能であった。幾つか実験では、アンモン角から得た細胞も同様な手法で培養した。培養液は、L-glutamine 73  $\mu\text{g}/\text{ml}$  および 2% B-27 supplement (Life Technologies) を含有する Neurobasal (Life Technologies) を用いた。また、播種後は細胞の生存率の向上を図り、Neurobasal にさらに等量の astrocyte-conditioned medium (ACM) を添加して使用し、24 時間後に ACM を含有しない培養液に交換した。また、実験によっては、24 時間後以降は、cytosine  $\beta$ -D-arabino-furanoside (AraC) (Sigma) 2  $\mu\text{M}$  を培養液に添加した。培養 4 日目に培養液を再換し、培養 7 日目に実験に用いた。

#### ACM の調製<sup>192)</sup>

3日齢のWistar系ラットより大脳皮質を摘出し、上記と同様な手法で細胞を単離した。75 ml 培養フラスコ (Falcon) に 1,500,000 cells/cm<sup>2</sup> の密度で細胞を播種した。培養 2 日目に、培養フラスコを 2 分間、200 rpm で計 2 回振盪し、I 型アストロサイト以外の細胞を剥離した。培養液は、 $\text{NaCO}_3$  1.89 mg/ml、sodium pyruvate 120  $\mu\text{g}/\text{ml}$  および 10% 牛胎児血清 (三光純薬) を含有する Dulbecco's modified eagle medium を使用し、3 日毎に交換した。播種してから約 1 カ月後、アストロサイトが単層の石垣状になったことを確認し、5 mM EDTA、0.25% trypsin を含有するリン酸

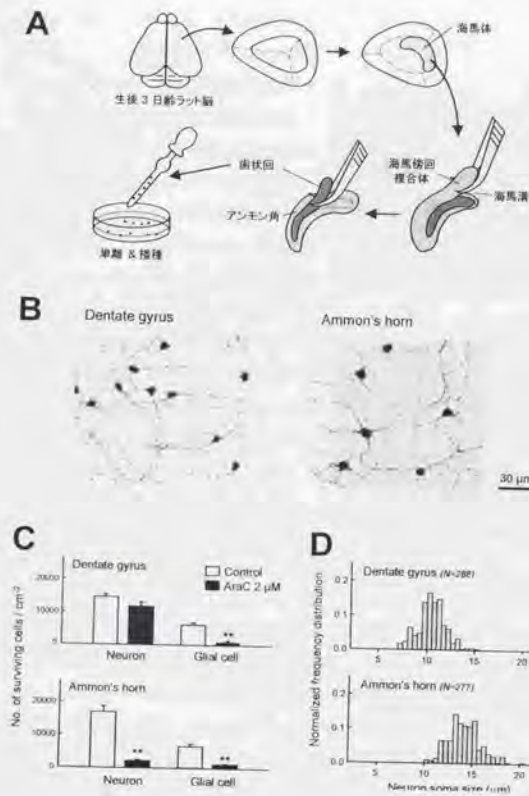


図18 歯状回顆粒細胞の単離培養

A. 培養法。生後3日齢のラット脳より歯状回（またはアンモシ角）を摘出した後、酵素処理により細胞を単離し接種した。B. 培養7日目の神経細胞のNissl染色像。右は歯状回。右はアンモシ角から得た細胞の明視野像。C. 神経細胞およびグリア細胞の生存に及ぼすAraC (DNA合成阻害薬) 2 μMの効果。AraCを培養2日目から添加し、培養7日目に生存細胞を計数した。D. 培養7日目の神経細胞の直径。\**P*<0.01, Student's *t* test.

緩衝液中、37 °Cで2分間の処理に付した後、5,000 cells/cm<sup>2</sup>の密度で再播種した。再びアストロサイトが定常状態に達した後、3日間条件付けた培養液を0.22 μm径のフィルターで濾過しACMを得た。

#### FMI-43 蛍光染色

FMI-43 はシナプス小胞のエンドサイトーシスに伴い細胞内に取り込まれ蛍光を発する色素で、機能的シナプスを染色するために広く利用されている<sup>15,16</sup>。培養7日目に培養液をBSS 0.25 mlに換置し1時間以上安定化した後、さらに、FMI-43

ecular Probe) 20 μM および KCl 40 mM を含有する BSS 0.25 ml を加え、細胞を BSS 0.25 ml で慎重に2回洗浄し、共焦点顕微鏡を用いて FMI-43 の蛍光像を得た。詳細は第2章の Dil 蛍光観察の方法に準じた。小さな赤い蛍光斑点は、KCl 40 mM の暴露により消失するため、機能的なシナプスが染色されたものであると判断した。1 ウェルにつき 211 × 317 μm<sup>2</sup> × 4 の領域を任意に選択し、領域内の蛍光斑点を計数することで1 ウェル中の総シナプス数を逆算した。なお計数の際は、グリア細胞によるものと思われる非特異染色に細心の注意を払った。また実験後に培養細胞を Nissl 染色し、明視野顕微鏡下で神経細胞を計数し、1 ウェルあたりの神経細胞数を逆算した。総シナプス数を神経細胞数で除算し得られる神経細胞1個あたりの平均シナプス数を指標として実験に使用した。また図19の実験では、同時に Lucifer yellow CH 色素を用いて蛍光二重染色を行った。この色素は、1) 水溶性に富み、2) 毒性が極めて低い、という性質から生細胞の染色に頻繁に用いられている<sup>16d</sup>。1% Lucifer yellow CH アンモニウム塩 (Molecular Probe) を充填したガラス電極で培養細胞をパッチクランプし 2 nA、200 ms の内向き電流を 1 Hz で2分間適用した。FMI-43 に対しては 488 nm 励起で 515 nm バンドパスフィルターを用いて、また、Lucifer yellow CH に対しては 515 nm 励起で 550 nm バンドパスフィルターを用いて蛍光像を観察した。

## 結果

まず始めに、錐体細胞が優位であるアンモン角から得た培養細胞(図18B右)と比較することにより、本手法で得た細胞(図18B左)が実際に顆粒細胞であることを確認した。培養7日目の神経細胞またはグリア細胞の生存数を図18Cに纏めた。通常の培養液中で培養すると、神経細胞とグリア細胞の生存細胞数には、歯状回とアンモン角との間で差は見られなかった。DNA合成阻害薬であるAraC 2  $\mu$ M の存在下で培養すると、グリア細胞の生存数は有意に低

下した。このとき、アンモン角の神経細胞数も減少したが、歯状回の神経細胞の生存には変化がなかった。この結果は、アンモン角から得た神経細胞の生存はグリア細胞の存在に高度に依存しているが、歯状回の神経細胞はグリア細胞には依存しないことを示唆している。次に、神経細胞の細胞体の直径を計測した(図18D)。歯状回の神経細胞の直径は  $10.46 \pm 0.08 \mu\text{m}$  (mean  $\pm$  S.E.M,  $n=288$ )、アンモン角の細胞は  $14.12 \pm 0.11 \mu\text{m}$  ( $n=277$ ) であり、歯状回から得られた細胞の方が有意に小さかった ( $P < 0.01$ , Student's *t* test)。実際、海馬では錐体細胞よりも顆粒細胞の方が小さいため<sup>8</sup>、本実験系で歯状回より得られた細胞は顆粒細胞であると判断した<sup>12,99,102,103,178</sup>。また、以下の実験では、より優れた顆粒細胞を得るために、培養液中にAraC 2  $\mu$ M を添加した。

以上の手法により得た顆粒細胞を7日間培養すると、苔状線維が伸展しシナプスを形成することが確認された(図19A)。そこで、痙攣薬 picrotoxin 50  $\mu$ M、bicuculline 10  $\mu$ M、pentylentetrazol 1 mM、pilocarpine 10  $\mu$ M を培養1日目から7日目の6日間慢性適用した時に、形成されるシナプス数がどの様な影響を受けるかを検討した。しかしながら、これら薬物は形成シナプス数には影響を与えなかった。これは、本培養系では痙攣薬が効率良く膜電位の脱分極を誘導できないことに由来しているものと考えられた<sup>30,184</sup>。そこで、脱分極を誘導するために高濃度(30 mM)の $K^+$ を含有する培養液(high  $K^+$ )中で、神経細胞を培養したところ、図19Bに示した様にシナプス形成が異常に亢進された。結果を表3に纏めた。high  $K^+$ 処置により形成されるシナプス数は約2倍に増加した。この結果は、第2章の組織培養を用いた研究で見られたてんかん様条件下における苔状線維の異常形成とよく一致し、本現象はその基礎機構を担っていると考えられた。

次に、high  $K^+$ の効果に対して薬理的検討を行った。まず、膜電位感受性の $Ca^{2+}$ 透過性チャネル阻害薬の作用を検討した。L型 $Ca^{2+}$ チャネル阻害薬 nicardipine 2  $\mu$ M、T型 $Ca^{2+}$ チャネル阻害薬 NiCl<sub>2</sub> 20  $\mu$ M、N型 $Ca^{2+}$ チャネル阻害薬  $\omega$ -conotoxin GVIA 1  $\mu$ M、NMDA受容体阻害薬 AP5 30  $\mu$ M を high  $K^+$ と同時に適用したところ、nicardipine のみが high  $K^+$ によるシナプス形成促進作用を阻

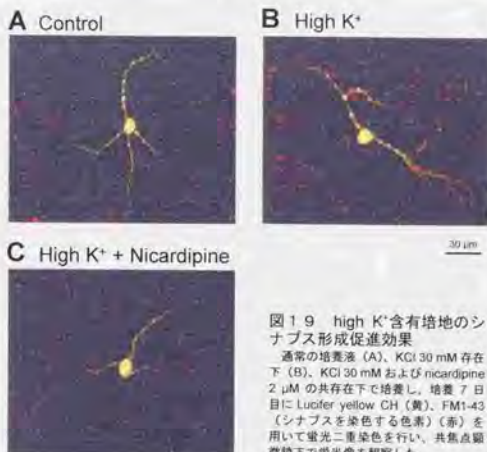


図19 high  $K^+$ 含有培地のシナプス形成促進効果

通常の培養液 (A)、 $KCl$  30 mM 存在下 (B)、 $KCl$  30 mM および nicardipine 2  $\mu$ M の共存下で培養し、培養7日目に Lucifer yellow CH (黄)、FM1-43 (シナプスを染色する色素) (赤) を用いて蛍光二重染色を行い、共焦点顕微鏡下で蛍光像を観察した。

害したが、他の薬物による影響は見られなかった。また、これらの薬物は、通常の培養液で培養したときのシナプス形成には影響を与えなかった。次に、細胞内  $Ca^{2+}$  により活性化される細胞内情報伝達系の阻害薬の作用をいくつか検討した。CaMKII 阻害薬 KN93 5  $\mu$ M、PKC 阻害薬 calphostin C 30 nM、非特異的チロシンキナーゼ阻害薬 genistein 3  $\mu$ M、PKA 阻害薬 KT5720 10  $\mu$ M を適用したところ、KN93 のみが high  $K^+$  の作用を阻害した。また、KT5720 は通常の培養条件下で観察されるシナプス形成を促進したが、他の薬物には通常の条件では影響が見られなかった。

様々な細胞において、脱分極に伴い神経栄養因子や成長因子が分泌されることが報告されている<sup>18,24</sup>。これらの因子は、苔状線維の形態変化<sup>9,10,13,2</sup>やてんかん原性<sup>13,12</sup>に関与すると考えられている。したがって、high  $K^+$  の効果が、脱分極に伴い放出された神経栄養因子や成長因子を介している可能性が想定される。これらの因子は、phospholipase

Cy (PLCy)、mitogen-activated protein kinase (MAPK) や phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K) などの細胞内情報伝達系を活性化するため<sup>9,12</sup>、high  $K^+$  の効果に対する PLCy 阻害薬 U73122 5  $\mu$ M、MAPK キナーゼ阻害薬 PD98059 30  $\mu$ M および PI 3-K 阻害薬 wortmannin 100 nM の作用を検討した。しかしながら、いずれの薬物も high  $K^+$  の作用には影響を与えなかった。

神経細胞の生存数も同時に計測した (表 3)。high  $K^+$  処置により神経細胞の生存数は約 1.2 倍に増加し、この high  $K^+$  の効果は、nicardipine および genistein により阻害された。

### 考察

本研究の手法により得られた培養細胞は、アンモン角から得られた細胞と比較し細胞体の直径が小さかったため顆粒細胞であると判断した。また、アンモン角の細胞は AraC の存在下では生存率が極めて低かったため、より優位な顆粒細胞を得るために培養液に AraC を添加した。これにより殆ど顆粒細胞のみの培養系 (但し 10%未満のグリア細胞を含む) を作成することが可能となった。したがって、本実験系で観察されるシナプスは、その大半が苔状線維のシナプスであると考えられる。

high  $K^+$  の条件下で培養すると、神経細胞の生存数および形成されたシナプス数は共に増大した。

Drug	n	No. of survival neurons/cm <sup>2</sup>	No. of synaptic contacts/neuron
<i>in normal K<sup>+</sup></i>			
Control	8	15021 ± 488	19.89 ± 1.77
Nicardipine	8	15704 ± 696	20.17 ± 1.06
NI <sub>2</sub>	8	15343 ± 464	21.11 ± 1.82
$\omega$ -Conotoxin	8	14864 ± 883	22.13 ± 1.72
AP5	8	15202 ± 760	21.35 ± 2.05
KN93	8	14469 ± 392	20.40 ± 1.82
Calphostin C	8	15560 ± 352	20.81 ± 1.72
Genistein	8	15125 ± 401	20.37 ± 2.05
KT5720	6	15048 ± 744	56.06 ± 2.68**
U73122	6	14480 ± 392	21.53 ± 2.51
PD98059	6	15200 ± 352	21.40 ± 2.20
Wortmannin	6	15200 ± 400	19.67 ± 0.98
<i>in high K<sup>+</sup></i>			
Control	8	18217 ± 760*	43.72 ± 4.64**
Nicardipine	8	15265 ± 272*	21.34 ± 2.35**
NI <sub>2</sub>	8	17469 ± 704	44.22 ± 3.98
$\omega$ -Conotoxin	8	18440 ± 840	43.34 ± 3.09
AP5	8	17868 ± 624	43.21 ± 4.08
KN93	8	17802 ± 1056	19.04 ± 1.20**
Calphostin C	8	19521 ± 1280	39.50 ± 3.73
Genistein	7	15164 ± 402*	50.84 ± 3.75
KT5720	6	18904 ± 608	45.36 ± 4.82
U73122	6	17864 ± 502	42.87 ± 5.29
PD98059	6	17736 ± 484	40.88 ± 1.15
Wortmannin	6	17784 ± 368	40.21 ± 2.14

表 3 high  $K^+$  含有培地の細胞生存およびシナプス形成促進効果に対する各薬物の作用。

各薬物の存在下で培養し、培養 7 日目に生存細胞数およびシナプス数を測定した。high  $K^+$ : KCl 30 mM, Nicardipine L 型  $Ca^{2+}$  チャンネル阻害薬 2  $\mu$ M, NI<sub>2</sub> T 型  $Ca^{2+}$  チャンネル阻害薬 20  $\mu$ M,  $\omega$ -Conotoxin GVIA: N 型  $Ca^{2+}$  チャンネル阻害薬 1  $\mu$ M, AP5: NMDA 受容体阻害薬 30  $\mu$ M, KN93: CaMKII 阻害薬 5  $\mu$ M, Calphostin C: PKC 阻害薬 30 nM, Genistein: 非特異的チロシンキナーゼ阻害薬 3  $\mu$ M, KT5720: PKA 阻害薬 10  $\mu$ M, U73122: PLCy 阻害薬 5  $\mu$ M, PD98059: MAPK キナーゼ阻害薬 30  $\mu$ M, Wortmannin: PI 3-K 阻害薬 100 nM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. Control in normal  $K^+$ , \*\* $P < 0.01$  vs. Control in high  $K^+$ , ANOVA followed by Tukey's test (mean ± S.E.M.).

しかし、1) 生存細胞数が約1.2倍に増加したのに対し、シナプス数は約2倍に増大した、2) high  $K^+$  のシナプス形成の亢進作用は KN93 により阻害されたが、神経細胞の生存促進効果は影響を受けなかった、3) 逆に、genistein は生存促進効果のみを阻害し、シナプス形成亢進作用には影響を与えなかった、等の理由から、high  $K^+$  処置による神経細胞の生存数増加とシナプス数の増大は別の機構を介したものであると考えられる。

本培養系ではグリア細胞が少ないため、軸索が伸展しシナプスを形成する際のガイダンス機能を担う細胞はないと考えられる。しかも、生体または組織培養とは異なり、単離培養系では、顆粒細胞が厳然とした層構造を有して並列していないため、シナプス形成の適所性、異所性を論じることができない。しかしながら、1) 組織培養切片において、てんかん様の激しい脱分極を伴う条件下では苔状線維のシナプス形成が異常亢進し異所性を示した点、および、2) 単離培養細胞では、慢性的脱分極の条件によりシナプス数が激増したこと、の2つの現象の方向性は合致し、さらに、nicardipine が1) および2) の両現象を共に阻害したことも併せて考えると、2) は1) の現象の(少なくとも部分的な)基礎機構を担っているものと考えられる。したがって、本章の実験系は、苔状線維の異常形成のより簡略化されたモデルであると思われる。そこで2) の現象に対して詳細な薬理的検討を試みた。

high  $K^+$  の効果がnicardipineにより阻害されたことから、脱分極に伴うL型 $Ca^{2+}$ チャネルの活性化がシナプス形成の異常亢進の引き金となっていると考えられる。また他の $Ca^{2+}$ 透過性チャネル阻害薬が有効でなかったことから、L型 $Ca^{2+}$ チャネルの重要性が示された。これまでも数多くのグループが、神経突起の伸長や分岐形成およびシナプス形成が細胞内 $Ca^{2+}$ により調節されていることを報告している<sup>25,53,95,110</sup>。Audesirkらは<sup>10</sup>、ニワトリ脳の培養神経細胞を用いて、神経突起形成にL型 $Ca^{2+}$ チャネルの活性化が不可欠であることを示しており、また当研究室の志鷹らは<sup>148</sup>、ラット海馬の培養神経細胞を用いて、神経突起の分岐形成とL型 $Ca^{2+}$ チャネルの発現の相関性を報告している。これら報告は、苔状線維の形成がL型 $Ca^{2+}$ チャネルの活性により調節されていることを示した本研究の結果とよく一致する。さらに本章では、CaMKII阻害薬KN93によりhigh  $K^+$  の効果が抑制されることも示された。これは、これまでに報告のない全く新しい知見である。PC12<sup>152</sup>または3T3線維芽細胞<sup>158</sup>では、脱分極や栄養因子の突起伸長に対する促進作用がCaMKII阻害薬で抑制されることが示されている。さらに、Neuro2aおよびNG108-15等の神経芽細胞にCaMKIIの $\alpha$ サブユニットを強制発現させると、突起伸長が促進されることも報告されている。これらを考慮すると、high  $K^+$  の作用は軸索伸長の亢進効果に基づいたものである可能性が挙げられる。この可能性を解明していくことは今後の課題である。

nicardipine および KN93 は、通常の培養条件下ではシナプス形成に影響を及ぼさなかった。この結果は、これらの薬物が異常なシナプス形成のみを抑制し、通常のシナプス形成には影響を与えないことを示している。第2章の組織培養を用いた検討でも、nicardipine は picrotoxin が存在する場合のみ作用を現しており、第2章と第3章で極めて一貫した結果が得られている。このことから、本章の実験系が、第2章で見られた高次元の現象を忠実に再現するよいモデルであることが強く裏付けられる。今後、本実験系が様々な角度からより有用に利用されることを期待する。



## 第4章 小児てんかんモデルを用いた検討

## 緒言

てんかんの発症率は乳児期から小児期にかけて飛躍的に上昇するが<sup>12)</sup>、この時期のてんかんは様々な後遺症を遺すことが知られており、とりわけ認知力および記憶、学習能力の障害は顕著に観察される<sup>3,52,55,118,139,158,168)</sup>。実際に、国民全体の2%を占める知的障害者のうち3割弱もの患者が小児期にてんかんを発症しているという本邦のデータも残されている。しかし、認知、学習障害といった後遺症の発生機構の解明は不十分であり、現在のところこれらの後遺症を予防する手段は確立されていない。

てんかんによる学習障害の実験動物レベルでの再現は、幾つかのグループが試みているが、未だ完全には成功していない。キンドリング<sup>17)</sup>やカイニン酸<sup>125)</sup>処理を施した実験的てんかんモデル動物で学習障害が観察されているものの、それは成体においてのみであり、未成熟な動物では、てんかんによる学習障害や中枢神経系の機能障害は軽度であるか観察されないのが一般的である<sup>154,155,159,17)</sup>。ヒトではより低年齢でてんかんを発症した方が後遺症の残遺が顕著であり<sup>20,31,40,41,129)</sup>、この点で、ヒトと実験動物の間には大きな違いが認められる<sup>76,78)</sup>。これが小児てんかんにおける認知、学習障害の研究を遅滞させている主要な原因の1つである。てんかんに対する感受性に見られるヒトと実験動物との差が何に依存するのかわからないが、最も重要と考えられる理由は、1) てんかんが内因的事象として発症したものであるのか、外的に誘導されたものであるのかの差、2) てんかんを誘発する際に幼若動物では、発症率および致死率の問題により痙攣誘発の条件の緩和を余儀なくされる、の2点であろう。

こうした現状の中で、現在報告されているてんかんモデルの内、pilocarpine てんかんモデルのみが、幼少時のてんかんが後に学習障害を誘引すると報告されている<sup>10)</sup>。pilocarpine てんかんモデルは比較的近年に確立されたモデルであり、1) 観察されるてんかんの様式がヒトの側頭葉てんかんをよく模倣し<sup>170,172)</sup>、かつ2) 手法が簡便であるという理由から、現在のてんかん研究の分野における最も有用な手法の1つとして用いられている<sup>179)</sup>。pilocarpine による痙攣の型は、特徴的な2つの段階に分かれる。投与数分後から数時間に渡り観察される急性相は、振顫および筋間代に代表される四肢痙攣から重複発作 (status epilepticus) に至る、pilocarpine による直接作用と考えられる痙攣を主症状とする。この急性相の後には、数日に渡る間期が続く。この間は、動物は平常状態を保ち、発作は観察されない。間期に続く慢性相では、1日に数回の大発作を生じるようになり、これは数カ月以上にわたり観察される。本研究ではこの pilocarpine モデルを採用した。

培養海馬切片を用いた第2章の研究で、てんかん様環境による苔状線維の異常形成が nicardipine で改善されることを示した。したがって、小児てんかんの後遺症に見られる記憶、学習障害が、第1章で考察した様に苔状線維の発達異常に由来するのであれば、こうした後遺症もやはり nicardipine で予防される可能性がある。そこで、未成熟の動物を用いた pilocarpine てんかんモデルで観察される学習障害に対する nicardipine の作用を検討することを目的として、pilocarpine 投与と同時に nicardipine の連回投与を開始し、動物が成熟した後に、行動薬理試験を試みた。

## pilocarpine 誘発痙攣

## 方法

## pilocarpine 処置

14日齢の未成熟の ddY 系雄性マウスに、高用量の pilocarpine を投与し痙攣を誘導した。pilocarpine の用量は、文献上では通常 380 mg/kg が用いられるが<sup>179</sup>、この用量を14日齢のマウスに適用した場合、対照群の生存率は 80.0 % (5 匹中 4 匹) と比較的良好であったものの、nicardipine 投与群では 6.7 % (15 匹中 1 匹) と良い成績が得られなかった<sup>186</sup>。したがって、本研究では用量を 200 mg/kg と低く設定した<sup>101</sup>。この用量では死亡する動物はなく、かつ投与した全ての動物に痙攣を誘発することが可能であった。pilocarpine (200 mg/kg, i.p.) 適用時には、同葉の末梢神経系に対する作用を抑制することを目的として、30分前に scopolamine-MeBr (1 mg/kg, i.p.) を投与した。pilocarpine 投与後には海馬 CA 領域からの脳波の記録および痙攣回数(筋間代のみ)の観察を行った。nicardipine 処置群では scopolamine の投与と同時に、nicardipine (2 mg/kg, s.c.) を投与し、加えて翌日から同用量の nicardipine を 1 日 1 回の頻度で連続投与した。行動薬理試験はマウスが 5 週齢に達してから行った(図 20)。薬物は 10 ml/kg の投与容積を用い、溶媒は nicardipine の 10% dimethyl sulfoxide/saline を除き saline を用いた。各群全 10 匹のマウスを使用した。

## 脳波記録

xylozine (1 mg/mouse, i.m.) で麻酔した 13 日齢のマウスを、脳定位固定装置に固定し、ステンレス製双極電極(直径 0.2 mm)を海馬 CA 領域に挿入した(AP: -1.5 mm, LM: 1.3 mm, DV: -1.5 mm)。対側の頭蓋に極小ネジを挿入し、Toughron-Rebase (三木化学工業)で頭蓋全体を固定した(図 23A)。この日齢のマウスは頭蓋の成長が著しいため、手術から実験使用までの回復時間は 12 時間とした。また、術後は、38 W の白熱灯を約 50 cm の距離から照射し体温を維持を図った。脳波の測定は、鉄網籠(20×20×10 cm)の中で行い、双極電極の一方から単極誘導法により記録した(high cut: 2 kHz, low cut: 0.5 Hz)。不閃電極は、鉄網籠に接地した(この場合の双極間の抵抗は 14 MΩであった)。動物を鉄網籠に移して 1 時間以上の馴化時間の後に、脳波測定を開始した。実験後に vibratome (堂阪イーエム)を用い、400 μm 厚の新鮮切片を作成し電極の位置を確認した。

## 結果

pilocarpine 投与の約 5 分後から痙攣が観察された。痙攣は、四肢の振動を主症状とし、これに筋間代が重なる形で観察され(図 21)、数時間にわたる重積発作に陥る個体も見られた(30 例中 17 匹)。筋間代の回数は、pilocarpine 投与後の 30 分から 1 時間が最大であり、6 時間後には消沈

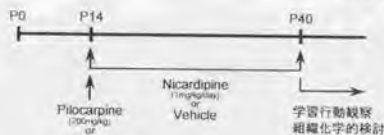


図 20 実験スケジュール

14日齢の幼若マウスに pilocarpine 200 mg/kg を腹腔内投与してんかん発作を誘導した。これと同時に nicardipine 1 mg/kg を連日皮下投与し、マウスが 40 日齢に達した時点で各種実験を開始した。

## A Pilocarpine 投与前



## B Pilocarpine 投与30分後



図 21 pilocarpine 誘発痙攣

pilocarpine 投与前(A)および投与 30 分後(B)のマウス。投与後のマウスの写真は筋間代の様子を表している。

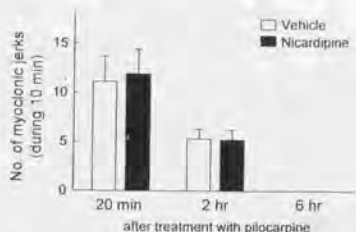
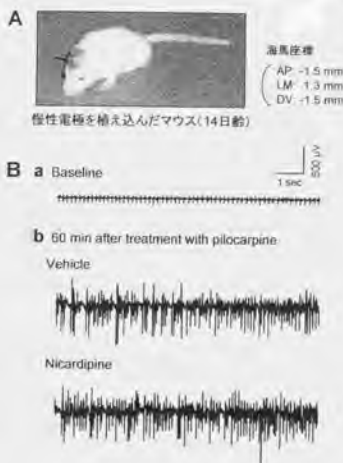


図22 pilocarpine 誘発筋間代に対する nicardipine の効果 (↑)

pilocarpine 投与 20 分、2 時間、6 時間後から 10 分間の筋間代を計数した。nicardipine は pilocarpine 処置 30 分前に投与した。mean  $\pm$  S.E.M.,  $n=10$ 。

図23 pilocarpine 投与後の脳波発作に対する nicardipine の効果 (→)

A. 脳波記録用に慢性電極を植え込んだ 14 日齢のマウス。B. pilocarpine 投与前 (a) および投与 60 分後 (b) の海馬脳波。Nicardipine は pilocarpine 処置 30 分前に投与した。AP: 吻尾側、LM: 外内側、DV: 背腹側。



した。図 22 は、投与後各時における筋間代の 10 分あたりの回数を示している。脳波は、pilocarpine 投与前に観察されていた  $\theta$  波が消失し、てんかん発作時の脳波の特徴である高振幅徐波および多棘波が観察された。これらは発作間歇期にも認められた。pilocarpine 投与 1 時間後の海馬脳波を図 23B に示した。nicardipine を投与したマウスでは、若干の鎮静が観察されたが、脳波および筋間代の回数に对照群のマウスとの差は観察されなかった (図 21, 22)。また、重複発作の持続時間は、溶媒を前処置した群で  $230.7 \pm 22.3$  分 (mean  $\pm$  S.E.M.,  $n=6$ )、nicardipine 前処置群で  $251.1 \pm 36.9$  分 ( $n=6$ ) であり、両者に有意な差は認められなかった。

pilocarpine を投与したマウスでは、体重増加の遅滞が観察された (図 24)。これは nicardipine の連続投与により影響を受けなかった。また、この体重増加の遅滞は、pilocarpine 投与の約 3 週間後までに消失し、行動薬理試験を行った時点では各群に体重差は認められなかった。

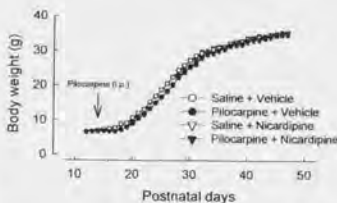


図24 pilocarpine 投与による体重増加の遅滞 pilocarpine 投与群では体重の増加が有意に遅滞した ( $P<0.01$ , two-way ANOVA), mean  $\pm$  S.E.M.,  $n=10$ 。

## アニメート試験

### 方法

図 25A に示した様な三重同心円状の円筒形ケージ AT-320 (東洋産業) の中でマウスを放ち運動量を測定した。ケージ壁に埋め込んだ全 144 個の赤外線検知器から 10 Hz でサンプリングし、マウスの運動を評価した。動物を測定用のケージに移して 5 分間の馴化の後、30 分間の運動量を、水平移動回数、方向転換回数および立ち上がり回数を指標として測定した。立ち上がり回数は、ケージ底より 65 mm の高さに設置した検知器によって検出した。

## 結果

各群で運動量の差は認められなかった (図 25B)。

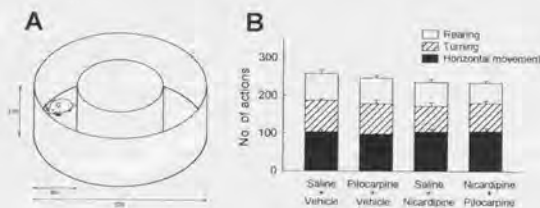


図 25 pilocarpine てんかんマウスにおける自発運動量

A. 実験に用いた装置の概略図。単位 mm。B. 通路内での立ち上がり行動、方向転換行動および水平移動の各回数を 30 分間測定した。mean  $\pm$  S.E.M,  $n=10$ 。

## モリスの水迷路試験

## 方法

18-19 °C の透明水を満たした直径 680 mm の円筒形の青色プラスチック製プールに直径 100 mm の透明なプラットフォームを壁面から 170 mm 離して設置した (図 26A)。試験は、visible platform 試行、6 日間の試験試行および probe 試行の全 8 日間 (Day 0-7) の日程で行った。なお、試験前日には 60 秒間の自由遊泳により遊泳への馴化を図った。

プールの縁上に東西南北 (E, W, S, N) の 90 °毎に固定された 4 点を遊泳開始位置として用い、

遊泳開始時にはマウスをプール壁に向けた状態で水面に放した。

Behavior Tracing Analyzer BTA-2A を用いて遊泳の様子を観察し、プラットフォーム上に 0.5 秒以上滞在した時点で、プラットフォームへ到達したものと判断した。各試行では、遊泳を開始してからプラットフォームに到達するまでの回避潜時、遊泳していた時間の割合 (遊泳時間率) および遊泳速度を指標として学習過程を評価した。遊泳時間は 90 秒を上限とし、制限時間内にプラットフォームに到達しなかった個体は、実験者の手でプラットフォームへ誘導し、回避潜時を 90 秒とした。また、遊泳後はマウスをプラットフォーム上に 60 秒間放置し、周囲を十分に観察させた。

visible platform 試行 (Day 0) は、マウスの視覚および水に対する嫌

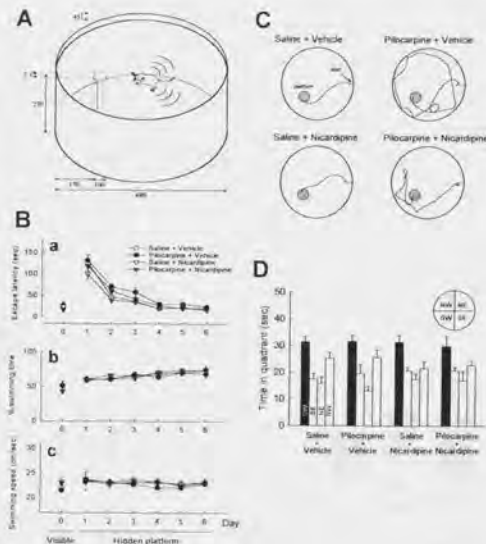


図 26 pilocarpine てんかんマウスの水迷路学習障害に対する nicardipine の改善作用

A. 水迷路試験に用いた装置の概略図。単位: mm。B. 回避潜時 (a)、遊泳時間率 (b) および遊泳速度 (c) の時間経過。pilocarpine 単独処置群で学習過程の有意な遅延が観察され ( $P=0.0179$ , two-way ANOVA)。これは nicardipine の投与で改善される傾向を示した ( $P=0.1235$ , 同)。C. Day 3 における遊泳軌跡の典型例。D. Probe 試験の結果。mean  $\pm$  S.E.M,  $n=10$ 。

悪情動が正常であることを確認するための試験である。黒色プラットフォームを区画南東 (SW) の中心の水面上 5 mm に設置し、遊泳開始点 E からマウスを遊泳させた。試験試行 (Day 1-6) では無色プラットフォームを区画 SW の水面下 5 mm に設置し、1日4回の遊泳により、マウスがプラットフォームの絶対的空間位置を学習する過程を観察した。各日の4回の遊泳は4つの遊泳開始点を各1回ずつ使用し、遊泳開始点の使用順位は連日無作為に選択した。probe 試行 (Day 7) では、プラットフォームを設置せず、遊泳開始点 E からマウスを 90 秒間自由に遊泳させ、各4区画内に居留した総時間を測定した。

### 結果

visible platform 試行では、各群の遊泳の様子に差は見られなかったが (図 26B, Day 0)、試験試行で、pilocarpine 処置マウスの空間学習の獲得過程に若干ではあるが有意な遅滞が認められた (図 26Ba)。試験試行 Day 3 までの前半3日間は特に学習障害が顕著であった。この障害は nicardipine の連続投与により改善される傾向を示した。また pilocarpine で処置していないマウスに nicardipine を投与しても、学習過程には影響が見られなかった。図 26C に Day 3 における遊泳軌跡の典型例を示した。また、試験試行中に同時に記録した遊泳時間率および遊泳速度の2つの指標に群差は観察されなかった (図 26Bb, c)。最終日に行った probe 試行では、各群に差は観察されなかった (図 26D)。なお、図 26D では、区画 SW が試験試行中にプラットフォームを設置した位置である。

### 自発的岐路交替運動

#### 方法

図 27A に示す様な対称な3本の黒色アームからなる放射状迷路内にマウスを放ち、その直後からマウスが迷路内を探索する様子を 8 分間観察した。迷路内では、マウスは作業記憶に基づき自発的にアームを選択するが、その選択順位の様式は空間記憶の一形態として評価することが可能である<sup>13)</sup>。アームには予め識別番号を附記し、実験者のみがそれを識別することができる。連続した3回のアーム選択の中で、各アームを1回ずつ選択する運動 (自発的岐路交替運動) の達成率を測定した。

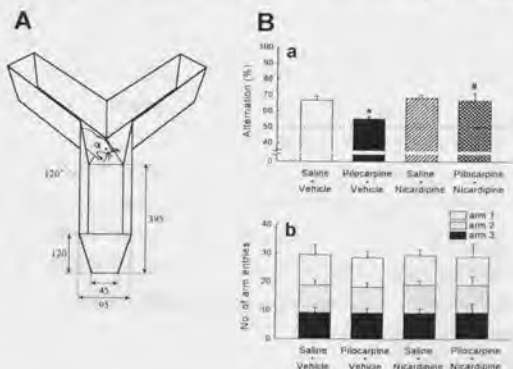
#### 結果

pilocarpine 処置マウスでは、自発的岐路交替運動率が有意に低下し、これは nicardipine の連続投与により改善された。また nicardipine 単独投与による作用は認められなかった (図 27Ba)。なお、この試行で各アームの選択回数

の群差および選択偏向は見られなかった (図 27Bb)。

図 27 pilocarpine でんかんマウスの自発的岐路交替運動障害に対する nicardipine の改善作用

A, 自発的岐路交替運動の観察に用いた装置の概略図。単位: mm。B, 自発的岐路交替運動の割合 (a) と各アームの選択回数 (b)。\* $P < 0.05$  vs. Saline+Vehicle, \*\* $P < 0.05$  vs. Pilocarpine+Vehicle, ANOVA followed by Tukey's test (mean  $\pm$  S.E.M.,  $n = 10$ )。



## ステップスルー試験

## 方法

明暗箱に床グリッドを備えた2連式ステップスルー学習装置 Model PA-M1 (小原)を使用した(図28A)。試験は学習試行と試験試行の各1日づつ全2日間の日程で行った。学習試験ではマウスを明室に入れ、部屋扉から5 cmの位置にある暗室内の検知器を遮断した時に暗室の床グリッドに36 Vの電圧を負荷した。この嫌悪刺激に反応しマウスが明室に回避した時点で学習試験を終了した。試験試行では、マウスを明室に入れ300秒間放置し、電圧の負荷は行わなかった。各試行では、明室に入れられた動物が検知器を横切るまでの時間(反応潜時)を指標とした。また試験試行では300秒以内に動物が検知器を横切らなかった場合は反応潜時を300秒とした。なお、各試行では暗室側に背を向けた状態でマウスを明室に放した。

## 結果

学習試行では群差が見られなかったが、試験試行では pilocarpine 処理マウスの反応潜時が有意に短縮し、これは nicardipine の連続投与で改善された(図28B)。なお、nicardipine 単独処置による試験試行への影響は見られなかった。

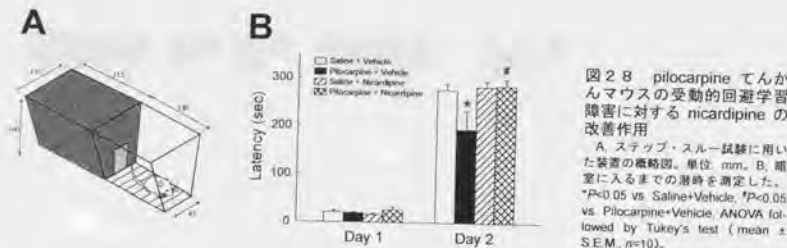


図28 pilocarpine 処理マウスの受動的回避学習障害に対する nicardipine の改善作用

A. ステップ・スルー試験に用いた装置の概略図。単位 mm。B. 暗室に入るまでの潜時を測定した。  
\* $P < 0.05$  vs. Saline+Vehicle, # $P < 0.05$  vs. Pilocarpine+Vehicle, ANOVA followed by Tukey's test (mean  $\pm$  S.E.M.,  $n=10$ ).

## 組織化学的検討

## 方法

行動試験が全て終了した後、各群7匹ずつを組織化学的検討に使用した。マウスを頸椎脱臼した後、直ちに脳を摘出し、ドライアイスを用いて急速に凍結した。これを $-15^{\circ}\text{C}$ で1時間以上保存した後、OCT compound (Miles Laboratory)を用いてステージに固定し、 $-10^{\circ}\text{C}$ から $-20^{\circ}\text{C}$ で保温したクリオスタット(クリオカット1800、ファイテック)を用い $14\ \mu\text{m}$ 厚の冠状切片を作成した。albuminをコーティングしたスライドガラス(松波ガラス)に切片を貼着し、室温で1時間以上風乾した。これを $0.1\ \text{M}$ リン酸緩衝液で10分間洗浄した後、 $0.37\%$  sodium sulfide に浸し( $4^{\circ}\text{C}$ 、15分間)、直ちに $10\%$  formalin で固定した( $4^{\circ}\text{C}$ 、15分間)。再び、 $0.1\ \text{M}$ リン酸緩衝液で洗浄した後(15分間、2回)、 $70\%$ 、 $96\%$ の希釈系列 ethanol で脱イオンし(15分間、各2回)15分以上風乾した。その後、 $1.7\%$   $\text{AgNO}_3$ 、 $0.085\%$  hydroquinone および  $20\%$  arabic gum を含有するクエン酸緩衝液を用いて、 $26^{\circ}\text{C}$ で50分間の遮光反応を行い、蒸留水で反応を停止した。対比染色として Nissl 染色を用いた。malinol (武藤化学)封入プレパレートを作成し、明視野顕微鏡下で海馬の Timm 染色像の観察を行った。また同時に細胞密度の測定も行った。

## 結果

対照群では、CA3 野明瞭層および歯状回門が Timm 陽性であった (図 29A, E)。pilocarpine 処置マウスでは、全ての例において CA3 野多形細胞層が Timm 陽性となった (図 29F)。また、全 7 例中 2 例では歯状回内側分子層 (inner molecular layer) も Timm 陽性となるものが見られた (図 29B)。しかし、これら現象は nicardipine を連回処理したマウスでは全く観察されなかった (図 29D, H)。

歯状回顆粒細胞層、歯状回門、CA3 野および CA1 野錐体細胞層の全 4 部位の細胞密度を測定した。pilocarpine 処置マウスで歯状回門の細胞が脱落している傾向が見られた以外は、群差は見られなかった (図 30)。

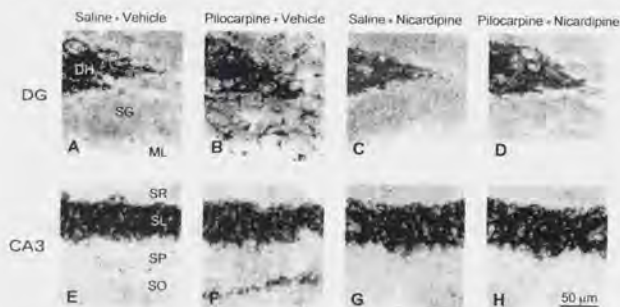


図 29 pilocarpine てんかんマウスにおける苔状線維芽に対する nicardipine の効果

新鮮凍結海馬切片の Timm 染色明視野像。対比染色として Nissl 染色を行った。A-D は歯状回層部、E-H は CA3 野の部分拡大像である。DG: 歯状回、DH: 歯状回門、SG: 顆粒細胞層、ML: 分子層、SR: 放射層、SL: 明瞭層、SP: 錐体細胞層、SO: 多形細胞層。

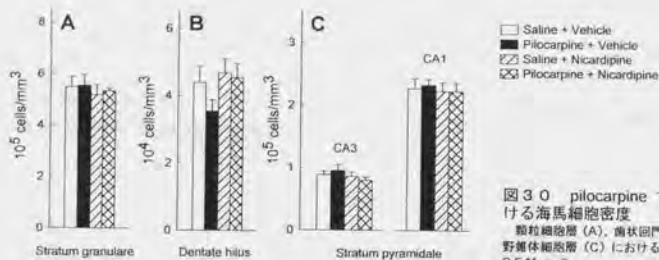


図 30 pilocarpine てんかんモデルにおける海馬細胞密度

顆粒細胞層 (A)、歯状回門 (B)、CA3 野または CA1 野錐体細胞層 (C) における神経細胞の密度。mean  $\pm$  S.E.M.,  $n=7$ 。

## LTP

## 方法

行動試験が全て終了した後、各群 3 匹ずつを電気生理学的検討に使用した。マウスを頸椎脱臼した後、直ちに脳を摘出し、 $O_2:CO_2:95:5$  を通気した氷冷人工脳脊髄液中で約 2 分間洗浄した。瞬間接着剤を用いてステージに固定した後、vibratome で 300  $\mu$ m 厚の水平切片を作成し海馬体を摘出した。その後、32  $^{\circ}$ C の同組成の人工脳脊髄液中で 1 時間以上の安定化時間を置き、実験に使用した。歯状回顆粒細胞層を刺激し、CA3 野明瞭層より誘発電位を細胞外記録した。誘発電位は、興奮性シナプス後電位 (field excitatory postsynaptic potential, fEPSP) の大きさが最大の半分を与える刺激強度 (100-400  $\mu$ A) で記録し、これが十分に安定したと考えられる時点から 20

分後に、テタヌ刺激を適用した。テタヌ刺激は、最大の fEPSP の大きさを与える刺激強度 (500-800  $\mu$ A) で、100 Hz、1秒間を20秒間隔で2回与えることにより行った。テタヌ刺激の適用後は fEPSP の変化を60分間観察した。記録中は誘発場電位を随時デジタル変換した後、オフライン解析により fEPSP の最大傾きを算出した。

### 結果

各群で記録された fEPSP の傾き(最大の半分)は、対照群で  $0.52 \pm 0.10$  V/s (mean  $\pm$  S.E.M.,  $n=9$ )、pilocarpine 単独処置群で  $1.03 \pm 0.11$  V/s ( $n=6$ )、nicardipine 単独処置群で  $0.52 \pm 0.07$  V/s ( $n=8$ )、pilocarpine および nicardipine 共処置群で  $0.70 \pm 0.09$  V/s ( $n=6$ ) であり、pilocarpine 処置群で有意に大きな fEPSP が記録された ( $P<0.01$ , ANOVA followed by Tukey's test) (図31)。

対照群ではテタヌ刺激に伴い fEPSP の傾きは増大し LTP が観察されたが(図31A)、pilocarpine を投与したマウスでは LTP が観察されなかった(図31B)。これは、さらに nicardipine を連続投与したマウスでも同様であった(図31D)。なお、nicardipine を単独処置したマウスでは LTP が正常に観察された(図31C)。

### 考察

本研究では、文献値よりも低用量の pilocarpine 200 mg/kg を適用した。この用量でも全てのマウスに振顫および筋間代等の明瞭な発作を誘導することができた<sup>10)</sup>。この発作は、1) 痙攣の型、2) 高振幅徐波および多棘波の脳波的観察、および3) これらの脳波が発作間歇期にも観察されたことの3点から、典型的な pilocarpine 誘発痙攣でありかつ側頭葉てんかん患者の精神運動発作をよく模倣していると考えられた<sup>130,179)</sup>。ただし1) 重積発作に陥る割合が低かった、2) 慢性相の反復発作が観察されなかった等、成体動物に高用量の pilocarpine を投与した場合に観察される発作型との相異点も挙げられる。1) に関しては他報によると、成体では8割以上の動物で重積発作が観察されるが<sup>28,116)</sup>、本研究では、57% (30例中17例)であった。また、2) に関しては、同様の既報が存在するものの<sup>10)</sup>、1)、2) いずれの差異もその理由は定かでない。考えられる可能性として1) 日齢、2) 種、3) 薬物の投与用量、等の相違が挙げられる。ただし通常通りの380 mg/kg の pilocarpine

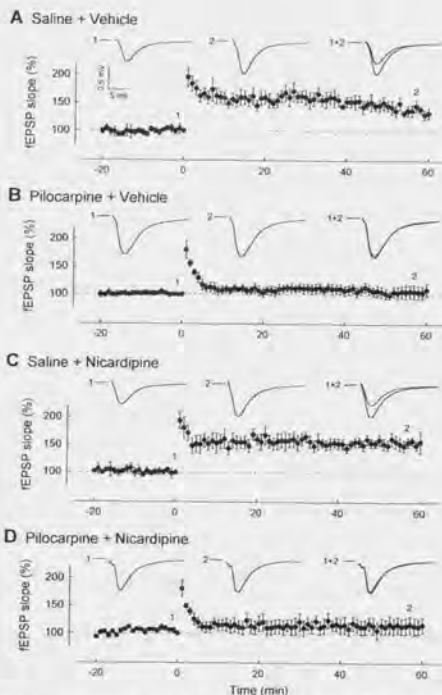


図31 pilocarpine てんかんモデルにおける苔状線維-CA3 野シナプスの LTP

A-D の各図の上側にテタヌ直前(1)および適用57分後(2)の典型波形を示した。グラフの横軸はテタヌ適用時からの時間を、縦軸はテタヌ直前の fEPSP の傾きを基準とした相対値を示している。mean  $\pm$  S.E.M.,  $n=6$ 。



を投与した場合においても 200 mg/kg の場合と同様な成績が得られたため、3) は主要な要因ではないものと思われる。なお、成体動物の場合で既に報告がある様に<sup>179</sup>、本研究でも pilocarpine 投与後に体重増加の遅滞が観察された。しかし、投与後 3 週間程度で対照群との体重差はなくなり、行動薬理試験では体の大きさによる影響を考慮に入れる必要はないと思われる。

pilocarpine 誘発痙攣に対する nicardipine の前処置の影響を検討したが、痙攣回数および脳波上で nicardipine の影響は観察されなかった。dihydropyridine 系の電位感受性  $Ca^{2+}$  チャンネル阻害薬は抗痙攣作用を示さないという報告は既にあり<sup>181,182</sup>、このことは、培養海馬切片における picrotoxin 誘発てんかん様発射が nicardipine による影響を受けなかったという第 2 章の結果によっても支持される。

本研究における学習行動観察では、水迷路試験、自発的岐路交替運動およびステップスルー試験の全 3 種の試験において、pilocarpine 処置マウスに記憶、学習能力の低下が観察された。水迷路試験と自発的岐路交替運動は、共に空間学習試験に属する試験であるが、自発的岐路交替運動は作業記憶により遂行される試験であるのに対し<sup>131</sup>、水迷路試験は作業記憶と参照記憶の 2 種の空間記憶を手掛かりとして遂行されるものである<sup>23,75</sup>。pilocarpine 処理により自発的岐路交替運動の障害が見られたという結果は、このてんかんモデルマウスでは作業記憶に異常が生じたことを示している。また、水迷路試験の Day 3 以降は殆ど学習障害が観察されなかったことから、参照記憶ではなくむしろ作業記憶の障害が生じていることが示唆される<sup>96</sup>。

pilocarpine による学習障害が、1) pilocarpine によって誘引されたてんかんに起因したものなのか、2) pilocarpine の何か別の作用に依存した現象なのか、という点は重要な問題である。一般的には、コリン作動薬はむしろ学習能力を亢進するとされ<sup>19,50,53</sup>、pilocarpine に関しても短期的には学習行動試験の成績を向上させるとの報告がある<sup>95,137</sup>。すなわち、コリン作動薬としての pilocarpine は今回の学習行動試験の結果と逆の作用を有しており、さらに投与スケジュールおよび投与量の差を考慮すれば、本研究でみられた学習障害は、pilocarpine の薬物としての直接的な作用ではなく、pilocarpine が誘発する発作を介した作用であると思われる。

自発的岐路交替運動とステップスルー試験においては、pilocarpine 処置マウスで生じる記憶、学習障害が nicardipine の連続投与により抑制されることが示された。水迷路試験では、nicardipine の作用は傾向のみであったが、これは pilocarpine の水迷路試験に対する作用自体が微弱であったために、有意な差が検出できなかったものと判断した。なお、pilocarpine や nicardipine を処置したマウスで見られたこれらの学習行動試験における遂行能力への影響は、1) アニメート試験、水迷路試験における遊泳時間率および遊泳速度、自発的岐路交替運動におけるアームの選択回数で群差が見出せなかったこと、2) 水迷路試験における visible platform 試行で群差が見られなかったこと(視覚異常および嫌悪刺激に対する情動モチベーションに差がなかったと解釈される)、3) nicardipine 単独投与群には何れの試験でも対照群と差が見られなかったことの 3 点から純粋な記憶、学習能力の変化に基づくものであると考えられる。

以上の点を考慮すると、pilocarpine による学習障害が nicardipine を連投したマウスで見られなかったという結果は、てんかんによる何らかの機質的または機能的な変性を nicardipine が抑制したことを示唆している。そこで想定される変性に関して幾つかの検討を行った。てんかん患者またはてんかんモデル動物において最もしばしば観察される中枢神経系の機質的変性は、海馬岩状線維の異常発芽と<sup>11,29,72,174,179</sup>、海馬神経細胞の脱落 (hippocampal sclerosis) である<sup>136</sup>。これらの

変性は成体動物を用いた pilocarpine てんかんモデルでも確認されているが<sup>116</sup>、本研究では、未成熟のマウスを用いているため、両現象が今回のマウスで生じているかを検討した。その結果、pilocarpine 処置群で、海馬苔状線維の異常発芽が認められたが、神経細胞の顕著な脱落は観察されなかった。後者に関しては既に報告があるものの<sup>101</sup>、前者は、幼若動物の pilocarpine てんかんモデルにおいては初めての所見である。異常発芽は、小児てんかんや未成熟な動物でも生じるが<sup>98,109</sup>、成体の場合に比べててんかんに対する耐性が高いと報告されている<sup>154</sup>。今回のてんかんモデルでは、成体の場合と同様に苔状線維の異常発芽が観察された。しかし、この異常発芽は、CA3野では全ての動物において観察されたが、歯状回では7例中2匹にしか観察されなかった。通常、苔状線維の異常発芽は、歯状回によりしばしば見られる現象であるため、この結果は興味深い。ただし、これが、1) 用いた動物の日齢に依存したものなのか、2) pilocarpine によるてんかんの発作型の差に起因したものなのかは不明である。なお、有意な差は認められなかったが、pilocarpine 処置マウスの歯状回門において、細胞密度が減少する傾向が見られた。歯状回門には多種の介在神経が存在し<sup>8</sup>、ある種の神経細胞はてんかんによって脱落することが示されている。近年、歯状回門の苔状細胞の脱落と苔状線維の異常発芽の関連性が示唆されており<sup>112,151</sup>、今回の研究で観察された歯状回門の神経脱落は、同時に観察された苔状線維の異常発芽との関連からはよく一致する。

苔状線維の異常発芽が、てんかんによる産物なのか、てんかんの原因であるのかは、いまだ統一的な見解は得られていない<sup>112</sup>。少なくともこの現象が、てんかんまたはてんかんによる神経組織の部分的崩壊により誘導されることは確実であるが<sup>174,179</sup>、その一方で、苔状線維の異常発芽に由来した直接的な反回性の興奮性入力回路の形成により海馬歯状回の興奮性が上昇し、てんかん原性に寄与していると推測している報告も多数存在する<sup>37,108,173,176</sup>。したがって、本研究で、苔状線維の異常発芽が歯状回において十分に観察されなかったことと、pilocarpine による重複発作や慢性相の痙攣が見られなかったこととの因果関係は双方に解釈され議論は困難である。しかし重要なことは、歯状回で苔状線維の発芽が見られた2例の動物は何れも、他の動物と比較して学習障害が重度であったという点である。さらに、nicardipine が pilocarpine による学習障害と苔状線維の異常発芽の両者を共に抑制したことも併せて考えると、マウスの学習能力と異常発芽の関係が強く示唆される。これまでに苔状線維の異常発芽と学習能力の相関は殆ど議論されておらず、この意味で今回の結果は重要な側面を有していると思われる。しかし残念ながら、今回の研究では動物の例数が十分でないこともあり、痙攣の重度、苔状線維の異常発芽の程度および学習障害の程度の3者の相関をより深く論じることはできない。これらを解明することは、今後のこの分野における最も重要な課題の一つである。

海馬 LTP は、記憶、学習の基礎をなすシナプス可塑性の1例として知られている<sup>16,74,82,107</sup>。LTP に対するてんかん発作の影響に関しては幾つかの相反する報告があり、統一的な見解が得られていないものの、本研究では、pilocarpine を処置したマウスにおいて苔状線維-CA3 野シナプス伝達の LTP は観察されなかった。てんかん様発射自体が LTP を誘導するという報告を考慮すると<sup>14,73</sup>、pilocarpine を処置したマウスでは、てんかんまたは異常発芽由来の過剰な神経活動により、LTP の機構が既に飽和していた可能性がある<sup>120,161,162</sup>。実際に、pilocarpine 処置マウスの海馬から記録された fEPSP が、対照群よりも有意に大きかったことから、pilocarpine 処置マウスの CA3 野では長期増強が先行していた可能性が支持される。pilocarpine 処置による LTP 形成の障害は、

nicardipine では改善されなかった。nicardipine は pilocarpine による学習障害を改善したためこの結果は一見矛盾する。1) 苔状線維-CA3 野シナプス以外の LTP が何らかの影響を受けている、2) 近年盛んに議論される様に、LTP はそもそも記憶、学習の基礎機構ではない<sup>22,79,80</sup>、などの説明が可能であろうが、本研究の結果から導かれる結論は、pilocarpine による学習障害を nicardipine が改善する作用は苔状線維-CA3 野 LTP を介していない、という点のみである。

nicardipine は pilocarpine 誘発発作には影響を与えなかったが、発作の後遺症と考えられる学習障害と苔状線維の異常発芽を抑制した。本章の主要な目的は、てんかんの後遺症を生じる実験系を確立し、更にこの実験系で有効な薬物を探すことにある。そして nicardipine がその薬物として良い候補となることを見出した。現在のてんかん治療は、てんかん自体の抑制に主眼が置かれている。もちろん、てんかんを抑制することが可能である場合は、これが最良の手段である。しかし、てんかんの発生を薬物によって制御できない場合には、てんかんによる後遺症を予防するという二次的な考え方が必要である。実際に、1) 現在のてんかんの薬物治療による奏効率は 50% 未満と極めて低く<sup>26,48,111</sup>、しかも、2) 生後間もない時期は興奮性と抑制性神経系の均衡が変遷するため<sup>71,90,122</sup>、この時期にてんかんの危険率が上昇するのは避けられない<sup>77,121</sup>、といった理由から、てんかん自体の抑制よりも、てんかんによる副次的な障害を抑制しなければならないという臨床的要求が現実には多いと思われる。しかし現在のてんかん研究は、てんかんの抑制、治癒に多くの努力がなされているにも関わらず、てんかん患者の予後に注意が払われることは少ないように思える。この意味で、てんかんの重要な後遺症の一つとして認知、記憶障害を取り上げ、これを容易に再現できる実験系を確立した本研究の意義は大きいと考えている。さらに、この実験系を用い nicardipine が有効であることを見出した。nicardipine には抗てんかん作用こそないものの、同薬を臨床応用する意味は少なからずあると思われる。今後、本研究が基礎となりてんかん研究に新たな光明が拓かれることに期待している。

## 第5章 さいごに

## なぜ海馬苔状線維なのか？

第1章で言及した様に、苔状線維は他の中枢神経系には見られない特性を示す。特に疾患との関連性に関しては古くから議論されており、本研究でも主眼を置いてきた。しかし、なぜ苔状線維だけにこうした現象が観察されるのであろうか。これは、今回の様な研究を行う上で常居する根本的疑問であり、中枢神経系の機能や疾患を巨視的に掌握する上で解決される必要のある課題でもある。しかしながら、現時点ではこの間に対する満足のいく回答は得られていない。近年、Dudekらは<sup>46</sup>、この疑問に対し興味深い提言をしている。要約すれば「他の神経組織とは異なり、苔状線維には Timm 染色という選択的な染色法が存在する。すなわち苔状線維は比較的容易に研究可能な唯一の脳部位であり、てんかん等では海馬の全ての部位に病変が生じているのであろうが、われわれ研究者には苔状線維の研究のみしか許されていない」という考えである。これは部分的には正しいと思われる。実際にてんかんの研究で、CA1野の変性に関する報告例も多少ではあるが存在する<sup>14</sup>。また、第2章で明らかにした様に、てんかん様条件下で重篤な障害を受けるのは形成中の線維であり、これは苔状線維に限らず Schaffer 側枝でも同様であった。しかし、最も重要なことは、Schaffer 側枝などの苔状線維以外の神経線維は、胎生期に既にその形成を完了しているという事実である。てんかん様の環境に対して最も高い感受性を示す過程が「発達過程」ということであれば、生後に形成される苔状線維が生後早期に頻発するてんかんの影響を最も受け易いことは自明である。したがって、てんかんで苔状線維の可塑性がしばしば取り上げられる理由は、苔状線維が容易な研究対象となるということではなく、苔状線維の形成時期が生後であるという点にあると考えられる。すなわち、これまでの疑問の論点は「なぜ苔状線維は生後に形成されるのか」という点に集約されると思われる。それでは、苔状線維が生後に形成されることの利点は何であろうか。これへの回答は逆に、一般的な神経組織はどうして胎生期に形成されるのかという疑問にもつながる。神経系は言うまでもなく生命の維持に必要な根源的活動を管理する重要な組織である。そして、この規矩は個体の生涯を通じて貫徹する不変の基礎規程である。逆に、この制御機構の崩壊は個体の終焉への危機を示顕している。この崩壊を生じないために、中枢神経系は可塑性や再生を認可しない堅固たる構造を持続する必要がある。これが中枢神経系が胎生期に形成される理由であると考えられる。これにより誕生時に構築されていた神経構成は死ぬまで保持されるのである。これこそが生命維持のために生体が採用した最良の手段であったのであろう。しかし、これだけでは生命の維持は困難である。生体がより延命するためには外界への適応能力を併せ持つ必要がある。臨機応変に外界の変化に適応すること、換言すれば認知-学習-記憶-変成という行為、このために必要な性質こそが可塑性である。可塑性は生理学的可塑性と構造学的可塑性に分類されるが、生体は生命維持のためにこうした可塑性という特性も一方で必要とした。神経組織が恒性と可塑性という相反する両現象を具有しているのは、まさにそうした理由が根幹にあるのであろう。ここで重要なことは、生体制御の変容を意味するこの可塑性という性質は一方で、制御機構の崩壊すなわち生体機能障害(疾患)という危険と隣接しているという点である。この危険性を最小限に抑留するために生体が採用した手段は、可塑性を与える神経組織を限局するという方法である。古くから記憶、学習に重要な脳部位であるとされてい

る海馬で可塑性という現象が極めて屢次に観察されるということは、海馬こそが選ばれた神経組織であることを示している。なかでも苔状線維に見られる可塑性は顕著である。そして、この線維だけが生後に形成される理由は、より高次の可塑性を与えるためなのであろう。一般に形成された直後の線維は高い可塑性を示すし、なによりも、生後に次々と形成させることで神経回路の様態を大胆に変化させること可能となる。しかも、苔状線維は興奮性神経であるにも関わらず例外的に無髄軸索である。ミエリン鞘は可塑性や再生の妨げになることを考慮すれば<sup>2)</sup>、無髄軸索であるという点は高度な可塑性を発現するために極めて有利に作用すると言える。この様に生体は、苔状線維という神経組織に対してとりわけ高度な可塑性を認可し、また、そのために苔状線維のみに用意周到な機構を与えている。裏を返せば、この理由で、苔状線維は、疾患という病理レベルに最も近い神経組織となってしまった。苔状線維には、疾患という危険因子を代償として、高次の可塑性を支持するための分子機構が施与されている。これが本文節の最初で行った問いかけへの回答であると考えている。

#### 小児てんかんの後遺症について

てんかんは比較的良好的な予後を示す疾患として知られているが、幼少期にてんかんを発した場合には重篤な後遺症を生じる危険率が飛躍的に上昇する。一方、てんかんの発症率は幼少期に特に上昇し、したがって、てんかんの後遺症が問題になる臨床例は相当数に昇る。てんかんの後遺症としては様々なものが枚挙されるが、とりわけ、認知障害、学習障害といった脳高次機能障害が最も問題視されている。臨床からの報告によると、小児てんかんの数～10%程度はそうした後遺症を生じているし、一方で、知的障害者の3割弱が、幼少期にてんかんを発症しているという。これら数値は、てんかんの後遺症が問題となるケースの多さを物語っている。一方、小児てんかんの慢性化も重要な問題である。成年のてんかん、特に側頭葉てんかんの大多数は、幼少期に発症したてんかんが慢性化した結果であると考えられている。しかしながら、歓迎されざるこれらの予後に対する臨床的対処法は、残念ながら未だ十分に確立されていない。これには、後遺症の発生機構が十分に解明されていないため対処が困難であるという理由もあるが、そもそも、てんかん自体の発症機作でさえ判断としないため、これまでのてんかん研究が、てんかんそのもの、あるいはその治療といったレベルにしか焦点が当ててきていないということが根底にある。てんかんの治療が完全に行われれば、当然後遺症への杞憂も必要なく、最良の対処法となるであろう。しかし、現在のてんかん治療法は未だ完全ではなく、その奏効率は50%以下であり、いわゆる難治性てんかんの割合が少なくない。しかも、幼少期にてんかんの発症率が上昇することは、基本的に脳の発達過程上避けられない。こうした現状下では、てんかんを抑制することよりも、てんかんにより生じる副次的な結果にもっと目を向ける必要があるのではなからうか。てんかんを抑制できない場合は、てんかんによる後遺症を制御するという考え方こそが、現在の臨床で要求される対応法であると思われる。本研究では、この視点のもとに研究を行い、てんかんの後遺症または慢性化の機構が、海馬の発達異常に基づくという可能性を提唱した。これが契機となり、てんかんの予後に関する研究がより盛んに行われることを期待する。

#### L型Ca<sup>2+</sup>チャネル阻害薬について

本研究で、L型Ca<sup>2+</sup>チャネル阻害薬が、てんかん発作（発射）による組織変化および後遺症を

抑制することを示した。しかし、1) 機構は何か、2) なぜL型Ca<sup>2+</sup>チャネル阻害薬だけが有効なのか、3) 実際に臨床応用が可能か、という点が十分に解明されていない。1)、2) に関しては今後の更なる検討を待たなければなるまい。これらを解明することは、てんかん後遺症の治療薬や予防薬の開発に貴重な足掛かりを提示するであろう。3) は、てんかんの後遺症の予防に対する臨床的要求が多いという事実からも重要な問題である。しかし、私の考えでは、少なくとも本研究で用いた nicardipine を臨床適用する意義は少ないように思える。現実には、verapamil を始めとした nicardipine 以外のL型Ca<sup>2+</sup>チャネル阻害薬には、抗てんかん作用を有するものが少なくない。本研究は、難治性てんかんでは後遺症の予防に着眼する必要があるという観点に基づいて行ってきたが、実際に臨床応用を考慮する場合は、他のL型Ca<sup>2+</sup>チャネル阻害薬の様に抗てんかん作用を併有する薬物の方が、てんかん発作の抑制と後遺症の予防という2重の側面が期待されるためより好ましいと考えられる。さらに重要なことは、第2章および第4章の結果からも明らかな様に、L型Ca<sup>2+</sup>チャネル阻害薬は部分的にしか効果を示さず、同薬によっては抑制できない後遺症も存在した。確かに、本研究で有効性が認められたのはL型Ca<sup>2+</sup>チャネル阻害薬のみであったが、より多くの薬物をスクリーニングすれば同薬よりも適合性の高い薬物を見出すことが可能であろう。そのためにも、本研究において確立された第2～4章の全3種の実験系は有用なスクリーニング系を提供するものと思われる。

## 参考文献

1. Adams B, Sazgar M, Oschobo P, Van der Zee CE, Diamond J, Fahnestock M, Racine RJ (1997) Nerve growth factor accelerates seizure development, enhances mossy fiber sprouting, and attenuates seizure-induced decreases in neuronal density in the kindling model of epilepsy. *J Neurosci* 17:5288-5296.
2. Akers RF, Lovinger DM, Colley PA, Linden DJ, Routtenberg A (1986) Translocation of protein kinase C activity may mediate hippocampal long-term potentiation. *Science* 231:587-589.
3. Alpheris WC, Aldenkamp AP (1990) Computerized neuropsychological assessment of cognitive functioning children with epilepsy. *Epilepsia* 31:535-40.
4. Altman J, Bayer SA (1990) Prolonged sojourn of developing pyramidal cells in the intermediate zone of the hippocampus and their settling in the stratum pyramidale. *J Comp Neurol* 301:343-364.
5. Altman J, Bayer SA (1990) Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *J Comp Neurol* 301:365-381.
6. Amaral DG (1978) A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *J Comp Neurol* 182:851-914.
7. Amaral DG, Dent JA (1981) Development of the mossy fibers of the dentate gyrus: I. A light and electron microscopic study of the mossy fibers and their expansions. *J Comp Neurol* 195:51-86.
8. Amaral DG, Witter MP (1995) Hippocampal formation. In: *The rat nervous system*, second edition (Paxinos G, eds), pp443-493. Sydney, Australia: Academic Press.
9. Assaf SY, Chung SH (1984) Release of endogenous  $Zn^{2+}$  from brain tissue during activity. *Nature* 308:734-736.
10. Audestirk G, Audestirk T, Ferguson C, Ferguson C, Lomnie M, Shugarts D, Rosack J, Caracciolo P, Gisi T, Nichols P (1990) L-type calcium channels may regulate neurite initiation in cultured chick embryo brain neurons and NIE-115 neuroblastoma cells. *Dev Brain Res* 55:109-120.
11. Babb TL, Kupfer WR, Pretorius JK, Crandall PH, Levesque MF (1991) Synaptic reorganization by mossy fibers in human epileptic fascia dentata. *Neuroscience* 42:351-363.
12. Branes D, Lopez-Garcia JC, Chen M, Bailey CH, Kandel ER (1996) Reconstitution of the hippocampal mossy fiber and associational-commissural pathways in a novel dissociated cell culture system. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:4706-4711.
13. Basarsky TA, Parpura V, Haydon PG (1994) Hippocampal synaptogenesis in cell culture: developmental time course of synapse formation, calcium influx, and synaptic protein distribution. *J Neurosci* 14:6402-6411.
14. Ben-Ari Y, Represa A (1990) Brief seizure episodes induce long-term potentiation and mossy fibre sprouting in the hippocampus. *Trends Neurosci* 13:312-318.
15. Betz WJ, Bewick GS (1992) Optical analysis of synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction. *Science* 255:200-203.
16. Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39.
17. Bliss TV, Douglas RM, Errington ML, Lynch MA (1986) Correlation between long-term potentiation and release of endogenous amino acids from dentate gyrus of anaesthetized rats. *J Physiol* 377:391-408.
18. Blochl A, Thoenen H (1995) Characterization of nerve growth factor (NGF) release from hippocampal neurons: evidence for a constitutive and an unconventional sodium-dependent regulated pathway. *Eur J Neurosci* 7:1220-1228.
19. Blokland A (1995) Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory? *Brain Res Rev* 21:285-300.
20. Bourgeois BF, Prensly AL, Palkes HS, Talent BK, Busch SG (1983) Intelligence in epilepsy: a prospective study in children. *Ann Neurol* 14:438-444.
21. Bugra K, Pollard H, Charton G, Moreau J, Ben-Ari Y, Khrestchatsky M (1994)  $\alpha$ GF, bFGF and  $\beta$ GF mRNAs show distinct patterns of induction in the hippocampus following kainate-induced seizures. *Eur J Neurosci* 6:58-66.
22. Cain DP (1997) LTP, NMDA, genes and learning. *Curr Opin Neurobiol* 7:235-242.
23. Cain DP, Saucier D (1996) The neuroscience of spatial navigation: focus on behavior yields advances. *Rev Neurosci* 7:215-231.
24. Cajal SR (1893) *Estructura del Asta de Ammon*. *Anal Soc Esp Hist Nat* 22:53-114.
25. Cambray-Deakin MA, Burgoyne RD (1992) Intracellular  $Ca^{2+}$  and N-methyl-D-aspartate-stimulated neurogenesis in rat cerebellar granule cell cultures. *Dev Brain Res* 66:25-32.
26. Camfield PR, Camfield CS (1996) Antiepileptic drug therapy: when is epilepsy truly intractable? *Epilepsia* 37:560-65.
27. Castillo PE, Weisskopf MG, Nicoll RA (1994) The role of  $Ca^{2+}$  channels in hippocampal mossy fiber synaptic transmission and long-term potentiation. *Neuron* 12:261-269.
28. Cavalheiro EA, Leite JP, Bortolotto ZA, Turski WA, Ikonomidou C (1991) Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia* 32:778-782.
29. Cavazos JE, Golarai G, Satula TP (1991) Mossy fiber synaptic reorganization induced by kindling: time course of development, progression, and permanence. *J Neurosci* 11:2795-2803.
30. Chen G, Trombley PQ, Van den Pol AN (1996) Excitatory actions of GABA in developing rat hypothalamic neurons. *J Physiol* 494:451-464.
31. Chevrie JJ, Aicardi J (1972) Childhood epileptic encephalopathy with slow spike-wave. A statistical study of 80 cases. *Epilepsia* 13:259-271.
32. Claiborne BJ, Amaral DG, Cowan WM (1986) A light and electron microscopic analysis of the mossy fibers of the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 302:206-219.
33. Cohan CS (1992) Depolarization-induced changes in neurite elongation and intracellular  $Ca^{2+}$  in isolated Heli-soma neurons. *J Neurobiol* 23:983-996.
34. Collingridge GL, Bliss TV (1995) Memories of NMDA receptors and LTP. *Trends Neurosci* 18:54-56.
35. Collingridge GL, Kehl SJ, McLennan H (1983) Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J Physiol* 334:33-46.
36. Covault J, Liu QY, el-Deeb S (1991) Calcium-activated proteolysis of intracellular domains in the cell adhesion molecules NCAM and N-cadherin. *Mol Brain Res* 11:11-16.
37. Cronin J, Obenaus A, Houser CR, Dudek FE (1992) Electrophysiology of dentate granule cells after kainate-induced synaptic reorganization of the mossy fibers.

38. Danşcher G, Zimmer J (1978) An improved Timm sulphide silver method for light and electron microscopic localization of heavy metals in biological tissues. *Histochemistry*, 55:27-40.
39. Davis SA, Fitch MT, Memberg SP, Hall AK, Raisman G, Silver J (1997) Regeneration of adult axons in white matter tracts of the central nervous system. *Nature*, 390:680-683.
40. Dikmen S, Matthews CG, Harley JP (1975) The effect of early versus late onset of major motor epilepsy upon cognitive-intellectual performance. *Epilepsia*, 16:73-81.
41. Dikmen S, Matthews CG, Harley JP (1977) Effect of early versus late onset of major motor epilepsy on cognitive-intellectual performance: further considerations. *Epilepsia*, 18:31-36.
42. Dodd J, Jessell TM (1988) Axon guidance and the patterning of neuronal projections in vertebrates. *Science*, 242:692-699.
43. Doherty P, Ashton SV, Moore SE, Walsh FS (1991) Morphoregulatory activities of NCAM and N-cadherin can be accounted for by G protein-dependent activation of L- and N-type neuronal  $Ca^{2+}$  channels. *Cell*, 67:21-33.
44. Doherty P, Singh A, Rimon G, Bolsover SR, Walsh FS (1993) Thy-1 antibody-triggered neurite outgrowth requires an influx of calcium into neurons via N- and L-type calcium channels. *J Cell Biol*, 122:181-189.
45. Doherty P, Walsh FS (1991) The contrasting roles of NCAM and N-cadherin as neurite outgrowth-promoting molecules. *J Cell Sci*, Suppl 15:13-21.
46. Dudek FJ, Obenaus A, Schweitzer JS, Wuain JP (1994) Functional significance of hippocampal plasticity in epileptic brain: electrophysiological changes of the dentate granule cells associated with mossy fiber sprouting. *Hippocampus*, 4:259-265.
47. Eichenbaum H, Otto T, Cohen NJ (1992) The hippocampus—what does it do? *Behav Neural Biol*, 57:2-36.
48. Elwes RD, Johnson AL, Shorvon SD, Reynolds EH (1984) The prognosis for seizure control in newly diagnosed epilepsy. *New Engl J Med*, 311:944-947.
49. Ernfors P, Bengzon J, Kokkila Z, Persson H, Lindvall O (1991) Increased levels of messenger RNAs for neurotrophic factors in the brain during kindling epileptogenesis. *Neuron*, 7:165-176.
50. Everitt BJ, Robbins TW (1997) Central cholinergic systems and cognition. *Annu Rev Psychol*, 48:649-684.
51. Falconer MA (1970) The pathological substrate of temporal lobe epilepsy. *Guy's Hosp Rep*, 119:47-60.
52. Farwell JR, Dodrill CB, Batzel LW (1985) Neuropsychological abilities of children with epilepsy. *Epilepsia*, 26:395-400.
53. Fibiger HC (1991) Cholinergic mechanisms in learning, memory and dementia: a review of recent evidence. *Trends Neurosci*, 14:220-223.
54. Frederickson CJ, Gage FH, Howell GA, Stewart GR, Kesslak JP, Stuart PR, Klienick MA (1984) A possible role of mossy fiber zinc in sympathetic sprouting. In: *The Neurobiology of Zinc. Part A physicochemistry, Anatomy, and Techniques* (Frederickson CJ, Howell GA, Kasarskis EJ, eds.), pp173-187. New York: Alan R. Liss.
55. Funakoshi A, Morikawa T, Muramatsu R, Yagi K, Seino M (1988) A prospective WISC-R study in children with epilepsy. *Jpn J Psychia Neurol*, 42:562-564.
56. Gaarskjaer FB (1985) The development of the dentate area and the hippocampal mossy fiber projection of the rat. *J Comp Neurol*, 241:154-170.
57. Gaarskjaer FB (1986) The organization and development of the hippocampal mossy fiber system. *Brain Res Rev*, 396:335-357.
58. Gahwiler BH, Capogna M, Dehance D, McKinney RA, Thompson SM (1997) Organotypic slice cultures: a technique has come of age. *Trends Neurosci*, 20:471-477.
59. Gall CM, Lauterborn JC, Guthrie KM, Stinis CT (1997) Seizures and the regulation of neurotrophic factor expression: associations with structural plasticity in epilepsy. *Adv Neurol*, 72:9-24.
60. Godement P, Vinsselew J, Thanos S, Bonhoeffer F (1987) A study in developing visual systems with a new method of staining neurones and their processes in fixed tissue. *Development*, 101:697-713.
61. Golgi C (1886) *Sulla Fina Anatomia Degli Organi Centrali Del Sistema Nervoso*. U Hoepli, pp225.
62. Gomez-Di Cesare CM, Smith KL, Rice FL, Swann JW (1997) Axonal remodeling during postnatal maturation of CA3 hippocampal pyramidal. *J Comp Neurol*, 384:165-180.
63. Goodman CS (1996) Mechanisms and molecules that control growth cone guidance. *Annu Rev Neurosci*, 19:341-377.
64. Goodman CS, Shatz CJ (1993) Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell*, 72:77-98.
65. Gould E, Cameron HA (1996) Regulation of neuronal birth, migration and death in the rat dentate gyrus. *Dev Neurosci*, 18:22-35.
66. Greene JG, Greenamyre JT (1996) Bioenergetics and glutamate excitotoxicity. *Prog Neurobiol*, 48:613-634.
67. Hailer NP, Blaheta RA, Harder S, Scholz M, Encke A, Markus BH (1994) Modulation of adhesion molecule expression on endothelial cells by verapamil and other  $Ca^{2+}$  channel blockers. *Immunobiology*, 191:38-51.
68. Hamlyn LH (1961) Electron microscopy of mossy fiber endings in Ammon's horn. *Nature*, 190:645-646.
69. Harris EW, Cotman CW (1986) Long-term potentiation of guinea pig mossy fiber responses is not blocked by N-methyl D-aspartate antagonists. *Neurosci Lett*, 70:132-137.
70. Hauser WA, Hesdorffer DC (1990) *Epilepsy: frequency, causes, and consequences*. New York: Demos.
71. Hauser WA, Kurland LT (1975) The epidemiology of epilepsy in Rochester, Minnesota, 1935 through 1967. *Epilepsia*, 16:1-66.
72. Haydon PG, Drapeau P (1995) From contact to connection: early events during synaptogenesis. *Trends Neurosci*, 18:196-201.
73. Hesse GW, Teyler TJ (1976) Reversible loss of hippocampal long term potentiation following electroconvulsive seizures. *Nature*, 264:562-564.
74. Heymach JV, Krutgen A, Suter U, Shooter EM (1996) The regulated secretion and vectorial targeting of neurotrophins in neuroendocrine and epithelial cells. *J Biol Chem*, 271:25430-25437.
75. Hodges H (1996) Maze procedures: the radial-arm and water maze compared. *Cog Brain Res*, 3:167-181.
76. Holmes GL (1991) The long-term effects of seizures on the developing brain: clinical laboratory issues. *Brain Dev*, 13:393-409.
77. Holmes GL (1996) Intractable epilepsy in children. *Epilepsia*, 37:14-27.
78. Holmes GL (1997) Epilepsy in the developing brain: lessons from the laboratory and clinic. *Epilepsia*, 38:12-30.
79. Holscher C (1997) Long-term potentiation: a good model for learning and memory? *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychia*, 21:47-68.
80. Honig MG, Hume RI (1989) DiI and DiO: versatile fluorescent dyes for neuronal labelling and pathway tracing. *Trends Neurosci*, 12:333-341.
81. Horton HL, Levitt P (1988) A unique membrane protein is expressed on early developing limbic system axons and cortical targets. *J Neurosci*, 8:4653-4661.



82. Howell GA, Welch MG, Frederickson CJ (1984) Stimulation-induced uptake and release of zinc in hippocampal slices. *Nature*, 308:736-738.
83. Huang YY, Li XC, Kandel ER (1994) cAMP contributes to mossy fiber LTP by initiating both a covalently mediated early phase and macromolecular synthesis-dependent late phase. *Cell*, 79:69-79.
84. Ikegaya Y, Yoshida M, Saito H, Nishiyama N (1997) Epileptic activity prevents synapse formation of hippocampal mossy fibers via L-type calcium channel activation in vitro. *J Pharmacol Exp Ther*, 280:471-476.
85. Ikonomidou C, Turksi J (1995) Excitotoxicity and neurodegenerative diseases. *Curr Opin Neurol*, 8:487-497.
86. Isackson PJ, Huntsman MM, Murray KD, Gall CM (1991) *BDNF* mRNA expression is increased in adult rat forebrain after limbic seizures: temporal patterns of induction distinct from *NGF*. *Neuron*, 6:937-948.
87. Isokawa M, Levesque MF (1991) Increased NMDA responses and dendritic degeneration in human epileptic hippocampal neurons in slice. *Neurosci Lett*, 129:69-73.
88. Izquierdo I, Medina JH (1995) Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. *Neurobiol Learn Mem*, 63:19-32.
89. Jeffery KJ (1997) LTP and spatial learning—where to next? *Hippocampus*, 7:95-110.
90. Johnston MV (1996) Developmental aspects of epileptogenesis. *Epilepsia*, 37:S2-9.
91. Kaplan DR, Stephens RM (1994) Neurotrophin signal transduction by the *Trk* receptor. *J Neurobiol*, 25:1404-1417.
92. Kazianka A (1994) Receptor tyrosine kinases and their targets. *Curr Opin Genet Dev*, 4:5-14.
93. Kim JS, Levin ED (1996) Nicotinic, muscarinic and dopaminergic actions in the ventral hippocampus and the nucleus accumbens: effects on spatial working memory in rats. *Brain Res*, 725:231-240.
94. Klostermann S, Bonhoeffer F (1996) Investigations of signaling pathways in axon growth and guidance. *Pers Dev Neurobiol*, 4:237-252.
95. Kovacs JD, Rand MN, Lankford KL, Waxman SG (1994) Intracellular calcium mobilization and neurite outgrowth in mammalian neurons. *J Neurobiol*, 25:252-264.
96. Kostakos M, Persinger MA, Peredery O (1993) Deficits in working but not reference memory in adult rats in which limbic seizures had been induced before weaning: implications for early brain injuries. *Neurosci Lett*, 158:209-212.
97. Kretschmann JD, Kamradt G, Krauthausen I, Sauer B, Wingert F (1986) Growth of the hippocampal formation in man. *Bibliotheca Anat*, 99:27-52.
98. Lauberg S, Zimmer J (1981) Lesion-induced sprouting of hippocampal mossy fiber collaterals to the fascia dentata in developing and adult rats. *J Comp Neurol*, 200:433-459.
99. Lerea LS, Butler LS, McNamara JO (1992) NMDA and non-NMDA receptor-mediated increase of *c-fos* mRNA in dentate gyrus neurons involves calcium influx via different routes. *J Neurosci*, 12:2973-2981.
100. Levitt P (1984) A monoclonal antibody to limbic system neurons. *Science*, 223:299-301.
101. Liu Z, Gatt A, Werner SI, Mikati MA, Holmes GL (1994) Long-term behavioral deficits following pilocarpine seizures in immature rats. *Epilepsy Res*, 19:191-204.
102. Lopez-Garcia JC, Arancio O, Kandel ER, Baranes D (1996) A presynaptic locus for long-term potentiation of elementary synaptic transmission at mossy fiber synapses in culture. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:4712-4717.
103. Lowenstein DH, Arsenault L (1996) The effects of growth factors on the survival and differentiation of cultured dentate gyrus neurons. *J Neurosci*, 16:1759-1769.
104. Lyles JM, Amin W, Bock E, Weill CL (1993) Regulation of NCAM by growth factors in serum-free myotube cultures. *J Neurosci Res*, 34:273-286.
105. Malenka RC, Kauer JA, Perkel DJ, Mauk MD, Kelly PT, Nicoll RA (1989) An essential role for postsynaptic calmodulin and protein kinase activity in long-term potentiation. *Nature*, 340:554-557.
106. Malinow R, Schulman H, Tsien RW (1989) Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science*, 245:862-866.
107. Martinez JL Jr, Derrick BE (1996) Long-term potentiation and learning. *Annu Rev Psychol*, 47:173-203.
108. Masikawa LM, Urano K, Sperling M, O'Connor MJ, Burdette LJ (1992) The functional relationship between antidromically evoked field responses of the dentate gyrus and mossy fiber reorganization in temporal lobe epileptic patients. *Brain Res*, 579:119-127.
109. Mathern GW, Leite JP, Pretorius JK, Quinn B, Peacock WJ, Babb TL (1994) Children with severe epilepsy: evidence of hippocampal neuron losses and aberrant mossy fiber sprouting during postnatal granule cell migration and differentiation. *Dev Brain Res*, 78:70-80.
110. Mattson MP, Kater SB (1987) Calcium regulation of neurite elongation and growth cone motility. *J Neurosci*, 7:4034-4043.
111. Mattson RH, Cramer JA, Collins JE, Smith DB, Delgado-Luscueta AV, Browne TR, Williamson PD, Treiman DM, McNamara JO, McCutchen CB et al. (1985) Comparison of carbamazepine, phenobarbital, phenytoin, and primidone in partial and secondarily generalized tonic-clonic seizures. *New Engl J Med*, 313:145-151.
112. McNamara JO (1994) Cellular and molecular basis of epilepsy. *J Neurosci* 14:3413-3425.
113. Meldrum BS, Bruton CJ (1992) Epilepsy. In: Greenfield's neuropathology (Adams JH, Duchen LW, eds), pp1246-1283. New York: Oxford.
114. Meier CL, Obenaus A, Dudek FE (1992) Persistent hyperexcitability in isolated hippocampal CA1 kainate-lesioned rats. *J Neurophysiol*, 68:2120-2127.
115. Meldrum BS, Corsellis JAN (1984) Epilepsy. In: Greenfield's neuropathology (Adams JH, Corsellis JAN, Duchen LW, eds), pp921-951. New York: Wiley.
116. Mello LE, Cavalheiro EA, Tan AM, Kupfer WR, Pretorius JK, Babb TL (1993) Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. *Epilepsia*, 34:985-995.
117. Meucci O, Miller RJ (1996) gp120-induced neurotoxicity in hippocampal pyramidal neuron cultures: protective action of TGF- $\beta$ 1. *J Neurosci*, 16:4080-4088.
118. Mizrahi EM (1994) Seizure disorders in children. *Curr Opin Pediatr*, 6:642-646.
119. Mody I, MacDonald JF (1995) NMDA receptor-dependent excitotoxicity: the role of intracellular  $Ca^{2+}$  release. *Trends Pharmacol Sci*, 16:356-359.
120. Moore SD, Barr DS, Wilson WA (1993) Seizure-like activity disrupts LTP in vitro. *Neurosci Lett* 163:117-119.
121. Moshe SL (1993) Intractable seizures in infancy and early childhood. *Neurology*, 43:S2.
122. Moshe SL (1993) Seizures in the developing brain. *Neurology*, 43:S3-7.
123. Muller D, Buchs PA, Stoppini I (1993) Time course of synaptic development in hippocampal organotypic cultures. *Dev Brain Res*, 71:93-100.
124. Muller D, Stoppini I, Wang C, Kiss JZ (1994) A role for polysialylated neural cell adhesion molecule in lesion-induced sprouting in hippocampal organotypic cultures. *Neuroscience*, 61:441-445.
125. Nadler JV (1981) Minireview. Kainic acid as a tool for

- the study of temporal lobe epilepsy. *Life Sci*, 29:2031-2042.
126. Nakagami Y, Saito H, Matsuki N (1997) Basic fibroblast growth factor and brain-derived neurotrophic factor promote survival and neuronal circuit formation in organotypic hippocampus culture. *Jpn J Pharmacol*, 75:319-326.
  127. Nicoll RA, Malenka RC (1995) Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 377:115-118.
  128. O'Dell TJ, Hawkins RD, Kandel ER, Arancio O (1991) Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88:11285-11289.
  129. O'Leary DS, Lovell MR, Sackellares JC, Herent S, Giordani B, Seidenberg M, Boll TJ (1983) Effects of age of onset of partial and generalized seizures on neuropsychological performance in children. *J Nerv Ment Dis*, 171:624-629.
  130. Olney JW, de Gubareff T, Labryere J (1983) Seizure-related brain damage induced by cholinergic agents. *Nature*, 301:520-522, 1983.
  131. Olton DS, Papas BC (1979) Spatial memory and hippocampal function. *Neuropsychologia*, 17:669-682.
  132. Patel MN, McNamara JO (1995) Selective enhancement of axonal branching of cultured dentate gyrus neurons by neurotrophic factors. *Neuroscience*, 69:763-770.
  133. Pimenta AF, Zhukareva V, Barbe ME, Reinoso BS, Grimley C, Henzel W, Fischer L, Levitt P (1995) The limbic system-associated membrane protein is an Ig superfamily member that mediates selective neuronal growth and axon targeting. *Neuron*, 15:287-297.
  134. Rashid K, Van der Zee CE, Ross GM, Chapman CA, Stansiz J, Riopelle RJ, Racine RJ, Fahnestock M (1995) A nerve growth factor peptide retards seizure development and inhibits neuronal sprouting in a rat model of epilepsy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92:9495-9499.
  135. Renkonen R, Memmender A, Ustinov J, Mattila P (1990) Activation of protein kinase C is crucial in the regulation of ICAM-1 expression on endothelial cells by interferon-gamma. *Int Immun*, 2:719-724.
  136. Represa A, Niquet J, Pollard H, Ben-Ari Y (1991) Cell death, gliosis, and synaptic remodeling in the hippocampus of epileptic rats. *J Neurobiol*, 26:413-425.
  137. Riekkinen P Jr, Sirvio J, Valjakka A, Miettinen R, Riekkinen P (1991) Pharmacological consequences of cholinergic plus serotonergic manipulations. *Brain Res*, 552:23-26.
  138. Rivkin A, Malouf AT (1997) PSA-NCAM and mossy fiber development in hippocampal slice cultures. *Soc Neurosci Abstr*, 767.8.
  139. Rodin EA, Schmalz S, Twitty G (1986) Intellectual functions of patients with childhood-onset epilepsy. *Dev Med Child Neurol*, 28:25-33.
  140. Rosenbaum DM, Michaelson M, Batter DK, Doshi P, Kessler JA (1994) Evidence for hypoxia-induced, programmed cell death of cultured neurons. *Annals Neurol*, 36:864-870.
  141. Ross GM, Shamovsky IL, Lawrence G, Sole M, Dostaler SM, Jimmo SL, Weaver DF, Riopelle RJ (1997) Zinc alters conformation and inhibits biological activities of nerve growth factor and related neurotrophins. *Nature Med*, 3:872-878.
  142. Ryan TA, Reuter H, Wendland B, Schweizer FE, Tsien RW, Smith SJ (1993) The kinetics of synaptic vesicle recycling measured at single presynaptic boutons. *Neuron*, 11:713-724.
  143. Saffell JL, Walsh FS, Doherty P (1992) Direct activation of second messenger pathways mimics cell adhesion molecule-dependent neurite outgrowth. *J Cell Biol*, 118:663-670.
  144. Sagar HJ, Oxbury JM (1987) Hippocampal neuron loss in temporal lobe epilepsy: correlation with early childhood convulsions. *Annals Neurol*, 22:334-340.
  145. Schuman EM, Madison DV (1991) A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science*, 254:1503-1506.
  146. Schwartzkroin PA (1994) Role of the hippocampus in epilepsy. *Hippocampus*, 4:239-242.
  147. Sheppard A, Wu J, Rutishauser U, Lynch G (1991) Proteolytic modification of neural cell adhesion molecule (NCAM) by the intracellular proteinase calpain. *Biochimica Biophysica Acta*, 1076:156-160.
  148. Shitaka Y, Matsuki N, Saito H, Katsuki H (1996) Basic fibroblast growth factor increases functional L-type Ca<sup>2+</sup> channels in fetal rat hippocampal neurons: implications for neurite morphogenesis. *J Neurosci*, 16:6476-6489.
  149. Sloviter RS (1982) A simplified Timm stain procedure compatible with formaldehyde fixation and routine paraffin embedding of rat brain. *Brain Res Bull*, 8:771-774.
  150. Sloviter RS (1983) "Epileptic" brain damage in rats induced by sustained electrical stimulation of the perforant path. I. Acute electrophysiological and light microscopic studies. *Brain Res Bull*, 10:675-697.
  151. Sloviter RS (1994) On the relationship between neuropathology and pathophysiology in the epileptic hippocampus of humans and experimental animals. *Hippocampus*, 4:250-253.
  152. Solem M, McMahon T, Messing RO (1995) Depolarization-induced neurite outgrowth in PC12 cells requires permissive, low level NGF receptor stimulation and activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *J Neurosci*, 15:5966-5975.
  153. Spencer SS, So NK, Engel J Jr, Williamson PD, Levesque MF, Spencer DD (1993) In: *Surgical treatment of the epilepsies*, second edition (Engel J Jr, eds), pp359-377. New York: Raven Press.
  154. Sperber EF, Haas KZ, Stanton PK, Moshe SL (1991) Resistance of the immature hippocampus to seizure-induced synaptic reorganization. *Dev Brain Res* 60:88-93.
  155. Sperber EF, Stanton PK, Haas K, Ackermann RF, Moshe SL (1992) Developmental differences in the neurobiology of epileptic brain damage. *Epilepsy Res*, 9:S67-81.
  156. Squire LR, Zola-Morgan S (1991) The hippocampus, memory, and space. *Hippocampus*, 1:269-271.
  157. Squire LR, Zola-Morgan S (1991) The medial temporal lobe memory system. *Science*, 253:1380-1386.
  158. Stafstrom CE (1995) Neonatal seizures. *Pediatr Res*, 16:248-255.
  159. Stafstrom CE, Chronopoulos A, Thurber S, Thompson JL, Holmes GL (1993) Age-dependent cognitive and behavioral deficits after kainic seizures. *Epilepsia*, 34:420-432.
  160. Stengaard-Pedersen K, Fredens K, Larsson LI (1981) Inhibition of opiate receptor binding by zinc ions: possible physiological importance in the hippocampus. *Peptides*, 2:27-35.
  161. Stewart C, Jeffery K, Reid I (1994) LTP-like synaptic efficacy changes following electroconvulsive stimulation. *Neuroreport*, 5:1041-1044.
  162. Stewart C, Reid I (1993) Electroconvulsive stimulation and synaptic plasticity in the rat. *Brain Res* 620:139-141.
  163. Stewart GR, Frederickson CJ, Howell GA, Gage FH (1984) Cholinergic denervation-induced increase of chelatable zinc in mossy-fiber region of the hippocampal formation. *Brain Res*, 290:43-51.
  164. Stewart WW (1978) Functional connections between cells as revealed by dye-coupling with a highly fluorescent naphthalimide tracer. *Cell*, 14:741-759.
  165. Stirling RV, Bliss TV (1978) Hippocampal mossy fiber

- development at the ultrastructural level. *Prog Brain Res*, 48:191-198.
166. Stoppini L, Buchs PA, Muller D (1991) A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods*, 37:173-182.
167. Stoppini L, Buchs PA, Muller D (1993) Lesion-induced neurite sprouting and synapse formation in hippocampal organotypic cultures. *Neuroscience*, 57:985-994.
168. Stores G (1971) Cognitive function in children with epilepsy. *Dev Med Child Neurol*, 13:390-393.
169. Strasser U, Fischer G (1995) Quantitative measurement of neuronal degeneration in organotypic hippocampal cultures after combined oxygen/glucose deprivation. *J Neurosci Methods*, 57:177-186.
170. Sugiyama H, Ito I, Okada D (1990) Roles of metabotropic and ionotropic glutamate receptors in the long-term potentiation of hippocampal mossy fiber synapses. *Adv Exp Med Biol*, 268:387-394.
171. Sutula TP (1990) Experimental models of temporal lobe epilepsy: new insights from the study of kindling and synaptic reorganization. *Epilepsia*, 31:845-854.
172. Sutula TP, Cavazos JE, Woodard AR (1994) Long-term structural and functional alterations induced in the hippocampus by kindling: implications for memory dysfunction and the development of epilepsy. *Hippocampus*, 4:254-258.
173. Sutula TP, Golarai G, Cavazos J (1992) Assessing the functional significance of mossy fiber sprouting. *Epilepsy Res*, 7:S251-259.
174. Sutula T, He XX, Cavazos J, Scott G (1988) Synaptic reorganization in the hippocampus induced by abnormal functional activity. *Science*, 239:1147-1150.
175. Sutula T, Koch J, Golarai G, Watanabe Y, McNamara JO (1996) NMDA receptor dependence kindling and mossy fiber sprouting: evidence that the NMDA receptor regulates patterning of hippocampal circuits in the adult brain. *J Neurosci*, 16:7398-7406.
176. Tauck DL, Nadler JV (1985) Evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal formation of kainic acid-treated rats. *J Neurosci*, 5:1016-1022.
177. Thurber S, Chronopoulos A, Stafstrom CE, Holmes GL (1992) Behavioral effects of continuous hippocampal stimulation in the developing rat. *Dev Brain Res*, 68:35-40.
178. Tong G, Malenka RC, Nicoll RA (1996) Long-term potentiation in cultures of single hippocampal granule cells: a presynaptic form of plasticity. *Neuron*, 16:1147-1157.
179. Turski L, Ikonomidou C, Turski WA, Bortolotto ZA, Cavalheiro EA (1989) Review: cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine, a novel experimental model of intractable epilepsy. *Synapse*, 3:154-171.
180. Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L (1983) Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res*, 9:315-335.
181. Tusell JM, Vendrell M, Serratos J, Trullas R (1992) Lindane-induced convulsions in NMRI and OF1 mice: antagonism with (+)MK-801 and voltage-dependent calcium channel blockers. *Brain Res*, 593:209-214.
182. Van der Zee CE, Rashid K, Le K, Moore KA, Stansic J, Diamond J, Racine RJ, Fahnestock M (1995) Intraventricular administration of antibodies to nerve growth factor retards kindling and blocks mossy fiber sprouting in adult rats. *J Neurosci*, 15:5316-5323.
183. Van Luijckelaar EL, Ates N, van der Staf FJ (1994) The effects of chronic treatment with a calcium channel antagonist on two types of generalized epilepsies in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 48:575-579.
184. Wang J, Reichling DB, Kyzozis A, MacDermott AB (1994) Developmental loss of GABA- and glycine-induced depolarization and Ca<sup>2+</sup> transients in embryonic rat dorsal horn neurons in culture. *Eur J Neurosci*, 6:1275-1280.
185. Weisskopf MG, Castillo PE, Zalutsky RA, Nicoll RA (1994) Mediation of hippocampal mossy fiber long-term potentiation by cyclic AMP. *Science*, 265:1878-1882.
186. Wielosz M, Mlynarczyk M, Kleinrok Z (1995) Effect of nifedipine on lithium-pilocarpine-induced seizures in the rat. *Pol J Pharmacol*, 47:279-284.
187. Williams EJ, Doherty P, Turner G, Reid RA, Hemperly JJ, Walsh FS (1992) Calcium influx into neurons can solely account for cell contact-dependent neurite outgrowth stimulated by transfected L1. *J Cell Biol*, 119:883-892.
188. Williams EJ, Mittal B, Walsh FS, Doherty P (1995) A Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase inhibitor, KN-62, inhibits neurite outgrowth stimulated by CAMs and FGF. *Mol Cell Neurosci*, 6:69-79.
189. Xiang Z, Greenwood AC, Kairiss EW, Brown TH (1994) Quantal mechanism of long-term potentiation in hippocampal mossy-fiber synapses. *J Neurophysiol*, 71:2552-2556.
190. Xiang H, Hochman DW, Saya H, Fujiwara T, Schwartzkroin PA, Morrison RS (1996) Evidence for p53-mediated modulation of neuronal viability. *J Neurosci*, 16:6753-6765.
191. Xie X, Hiler RC, Smart TG (1994) Modulation of GABA-mediated synaptic transmission by endogenous zinc in the immature rat hippocampus in vitro. *J Physiol*, 478:75-86.
192. Yoshida M, Saito H, Katsuki H (1995) Neurotrophic effects of conditioned media of astrocytes isolated from different brain regions on hippocampal and cortical neurons. *Experientia*, 51:133-136.
193. Zaeco A, Cooper V, Chantler PD, Fisher-Hyland S, Horton HL, Levitt P (1990) Isolation, biochemical characterization and ultrastructural analysis of the limbic system-associated membrane protein (LAMP), a protein expressed by neurons comprising functional neural circuits. *J Neurosci*, 10:73-90.
194. Zola-Morgan SM, Squire LR (1990) The primate hippocampal formation: evidence for a time-limited role in memory storage. *Science*, 250:288-290.
195. Zola-Morgan S, Squire LR (1993) Neuroanatomy of memory. *Annu Rev Neurosci*, 16:547-563.

## 謝辞

松木則夫教授をはじめ齋藤洋名誉教授、西山信好助手、阿部和穂助手、香月博志助手の御指導、御鞭撻に心より感謝致します。

博士研究にあたり終始暖かな励ましと御協力を頂きました薬品作用学教室の皆様に深く感謝致します。



