

## コバルト誘導てんかん性大脳皮質の サイクリック AMP 合成系に関する研究

岡山大学医学部第一生理学教室 (指導: 堀 泰雄教授)

浅 木 秀 樹

(平成3年4月30日受稿)

**Key words:** サイクリック AMP, アデノシン, 2-クロロアデノシン,  
コバルト誘導てんかん, ラット大脳皮質

### 緒 言

大脳皮質へのコバルトの局所投与によって、てんかん活動が誘導されることは、これまでに多くの報告により明らかにされてきた。ここで、コバルトはそのほとんどの場合において、powder<sup>1)</sup>, gelatine pellet<sup>2)</sup>および wire<sup>3)</sup>として用いられてきた。それらの方法の他、コバルト塩溶液を大脳皮質の局所に微量注入することによりてんかん活動を誘導する方法も報告されている<sup>4,5)</sup>。一方、コバルト誘導てんかんの機構については、ノルアドレナリン作動性ニューロン系の関与<sup>6,7)</sup>等、広範な知見が得られているが、なお未知の点が多い。

ラット大脳皮質のサイクリック AMP 含量が、凍結によるてんかん活動の出現に際して増加することが報告されている<sup>8)</sup>。同様のサイクリック AMP の脳内含量の増加はペニシリンによるてんかん活動出現においても見出されている<sup>9)</sup>。脳切片においては、そのサイクリック AMP レベルが、種々の薬物によって上昇することが知られている<sup>10,11)</sup>。このサイクリック AMP レベルの上昇には、使用される動物の種類や脳構造によって異なる特徴がみられ、ラット大脳皮質においてはアデノシン、ノルアドレナリン等の効果が詳細に調べられてきた<sup>12-15)</sup>。

最近、Hattori ら<sup>16)</sup>は、きわめて長期間その活動が持続する鉄誘導てんかん活動をもつラット大脳皮質において、ノルアドレナリンに応答してのサイクリック AMP 合成が持続的に変化し

ていることを報告した。一方、アデノシンは、中枢神経系ことにそのシナプス伝達において、neuromodulator として重要な役割を担っていることが明らかにされてきている<sup>17)</sup>。また、大脳皮質アデノシン感受性サイクリック AMP 合成系の応答も、鉄誘導てんかん活動の発達に伴って変化することが報告されている<sup>18)</sup>。これらの知見は、大脳皮質てんかん活動にサイクリック AMP 合成系の機能変化が関与していることを示唆している。

コバルト誘導てんかんにおいては、サイクリック AMP 合成系に変化がみられるか否かについては明らかではない。本研究においては、ラット大脳皮質の側感覚運動野に塩化コバルト溶液を注入し、その後50日間以上にわたり行動上の変化とともに皮質脳液を観察した。その間のいくつかの時期のラットから大脳皮質切片を作製し、アデノシン等に対するサイクリック AMP 合成系の応答を調べ、てんかん活動の発達との関係を検討した。

### 材 料 と 方 法

#### 1. 塩化コバルト溶液の注入

Wistar 系雄性ラット (体重190~240 g) を用いた。大脳皮質への塩化コバルト溶液の注入は、Hattori ら<sup>4)</sup>の方法に従って行った。ラットを pentobarbital (35 mg/kg, i. p.) 麻酔下で脳定位固定装置に固定し、左感覚運動野に滅菌作製した 5  $\mu$ l の 100 mM 塩化コバルト溶液をマイクロシリンジを用いて緩徐に注入した。注入点は

bregma より前方へ1.5mm左外側へ3.5mmで、深さは頭蓋骨背表面より1.5mmであった。対照群のラットには、同量の生理食塩水を同じ方法で注入した。注入後、皮質脳波記録用のステンレス製ねじ電極を頭蓋骨に植え込み、小型ソケットのそれぞれの端子に接続し、歯科用レジンで頭蓋骨に慢性的に固定した。

## 2. 皮質脳波の記録

皮質脳波の記録は、手術終了直後から50日間以上の期間にわたって行った。脳波記録は、1週間に少なくとも3回行い、それぞれの記録は1個体について3時間以上連続して行った。これらの脳波記録は、単極導出および双極導出を併用し、無麻酔無拘束下で行った。

## 3. 大脳皮質切片の作製

大脳皮質切片は、コバルト塩溶液あるいは生理食塩水注入の8~50日後のラットから作製した。これらのうちでも主として用いられたのは、注入の17~19日後のラットから得られた皮質切片であった。皮質脳波記録の15~25時間後にラットを断頭屠殺し、摘出した大脳皮質を左右前後に四分した。この場合、注入点は左前半部皮質に含まれた。それぞれの大脳皮質部位から厚さ400 $\mu$ mの切片をMcIlwain tissue chopperを用いて作製した。

## 4. 大脳皮質切片のインキュベーション

大脳皮質の各部位から得られた切片を95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>であらかじめ通気したKrebs-Ringer bicarbonate-glucose 液中でおだやかに攪拌して均一にした後、メジウムを除去した。Krebs-Ringer bicarbonate-glucose 液の組成は、118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub> および10 mM glucose であった。皮質切片(約3 mg タンパク質)を5 mlの同液中で60分間インキュベートした後、メジウムを除去した。つづいて、10 $\mu$ M 8-フェニルテオフィリン、0.2 mM DL-4-(3-butoxy-4-methoxybenzyl)-2-imidazolidinone (Ro 20-1724), 20 $\mu$ M ジピリダモール, 1 unit/ml アデノシン・デアミナーゼ等の添加あるいは無添加の Krebs-Ringer bicarbonate-glucose 液5 mlを切片に加え、さらに20分間インキュベートした。この場合、ア

デノシンや2-クロロアデノシンは、20分間のインキュベーションが10分経過した時点で添加した。すべてのインキュベーションは、95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>を通気しながら、37°Cで行った。メジウム中のアデノシン、2-クロロアデノシンの濃度は、0.1 mM であった。インキュベーション終了後、メジウムを除去し、2.5 mlの氷冷7%トリクロロ酢酸を切片に加えて氷冷水槽中でホモジナイズした。

## 5. サイクリック AMP 試料の調製

ホモジネート2.0 mlに、回収率検定の目的で0.05 pmolの[<sup>3</sup>H]サイクリック AMP (約2,900 dpm)を加え、つづいて0.2 mlの1 N塩酸を加えて4°Cで、2,000 $\times$  g, 15分間遠心した。上清に6 mlの水飽和エーテルを加えて振とうした後、エーテル層を吸引除去した。このエーテルによる抽出操作は4回行った。得られたサイクリック AMP を含む水層を、0.1 N塩酸と平衡させたDowex 50 W-X 8 (200~400メッシュ, H<sup>+</sup>型)のカラム(0.7 $\times$ 3 cm)に適用した<sup>19)</sup>。カラムを3.0 mlの0.1 N塩酸、0.5 mlの蒸留水で順次洗った後、サイクリック AMP を5.5 mlの蒸留水で溶出させ、溶出液を凍結乾燥した。

## 6. サイクリック AMP の定量

凍結乾燥試料を適当量(0.4~5.0 ml)の4.0 mM EDTA を含む50 mM トリス-塩酸緩衝液(pH 7.4)に溶解し、サイクリック AMP を定量した。サイクリック AMP の定量は、cyclic AMP assay kit を用いて protein binding 法により行った。その方法は、Gilman<sup>20)</sup>, Brown ら<sup>21)</sup>の方法に基づいている。試料の一部は回収率検定に用いた。サイクリック AMP 量は、ホモジネートの mg タンパク質当たりの pmol 数で表した。

## 7. タンパク質の定量

ホモジネートのタンパク質含量は、ウシ血清アルブミンを標準として Lowry ら<sup>22)</sup>の方法で測定した。

## 8. 試薬

アデノシン、2-クロロアデノシンおよびアデノシン・デアミナーゼは Sigma 社より、8-フェニルテオフィリンは Calbiochem 社より、[8-<sup>3</sup>H] サイクリック AMP (26.5 Ci/mmol)

および cyclic AMP assay kit は Amersham 社より購入した。Ro 20-1724 は日本ロッシュ社より、ジピリダモールは日本ベーリンガー社より、それぞれ提供された。その他は、市販品の特級試薬を使用した。

## 9. 統計学的処理

サイクリック AMP 量の差の検定には、分散分析および Student' *t* test を用いた。

## 結 果

### 1. 塩化コバルト溶液注入による異常脳波の出現

ラット大脳皮質左感覚運動野への塩化コバルト溶液の注入によって、孤立性スパイクやポリスパイクが出現した。これらのスパイク活動は注入直後から出現した。注入後のいくつかの異なる時期で観察されたスパイクの出現頻度を Table 1 に示す。スパイク出現は、多くの個体において注入側優勢であった。その頻度は注入直後から増加し、注入の 2～3 週間後に最高になり、その後は注入の 40～50 日後にかけて速やかに減少した。これらの異常脳波の出現に伴って、四肢や顔面の局所的、間代性けいれんがことにその極期に観察された。

生理食塩水を注入した対照群では、スパイク活動等の異常脳波の出現および行動上の異常は認められなかった。

### 2. 大脳皮質切片サイクリック AMP 含量のアデノシンによる増加とその増加に及ぼす 8-フェニルテオフィリンおよびジピリダモールの影響

塩化コバルト溶液あるいは生理食塩水注入の 17～19 日後のラットから得られた大脳皮質切片

をアデノシン、8-フェニルテオフィリン添加あるいは無添加条件下でインキュベーション後のサイクリック AMP 含量を Table 2 に示す。薬物無添加条件下でインキュベートした切片のサイクリック AMP 含量には、コバルト塩溶液注入群と対照群において相違はみられなかった。皮質切片を 0.1 mM アデノシンとインキュベートすると、サイクリック AMP 量は無添加条件下の 6～10 倍に増加した。この上昇したサイクリック AMP レベルは、コバルト塩溶液注入群と対照群で異なる場合があった。すなわち、コバルト塩溶液注入群では対照群より大きいアデノシンによるサイクリック AMP レベル上昇が、左前半部皮質で観察された。その他の 3 皮質部位においては、そのような相違はみられなかった。

Table 2 に示すように、皮質切片サイクリック AMP レベルのアデノシン (0.1 mM) による上昇は、アデノシン受容体のアンタゴニストである 8-フェニルテオフィリン (10  $\mu$ M) によって 80～85% 抑制された。この抑制の程度は、皮質部位が異なってもほぼ等しかった。したがって、8-フェニルテオフィリンで抑制されたサイクリック AMP レベルも、抑制されない場合と同様に、左前半部皮質ではコバルト塩溶液注入群で対照群より高かった。その他の皮質部位では、相違はみられなかった。

注入の 17～19 日後のラットにおいて、アデノシン、ジピリダモール添加あるいは無添加条件下でインキュベーション後の皮質切片サイクリック AMP 含量を Table 3 に示す。アデノシン (0.1 mM) 添加および無添加条件下ともに、アデノシン取込み阻害剤であるジピリダモール

Table 1 Electrocorticographic spike frequency at different stages after injection of cobalt chloride solution into the left sensorimotor cortex

Cortical side	Frequency (spikes/min)					
	0-3	8-10	17-19	29-32	40-50	60-70 days
Ipsilateral	0.2	18.1	22.7	10.8	3.4	0.2
Contralateral	0.1	1.3	1.9	1.4	0.4	0.1

Each value represents the mean of spike frequency detected on the ipsilateral and contralateral cortex to the injection site of 17 different rats. Values of standard deviation were less than 15%.

Table 2 Cyclic AMP contents of cortical slices after incubation with or without adenosine and 8-phenyltheophylline

Group and cortical area	Cyclic AMP (pmol/mg protein)		
	No addition	Adenosine	Adenosine + 8-Phenyltheophylline
<b>Cobalt</b>			
Left anterior	11.2±1.1	106.1±8.1 <sup>b</sup>	29.7±2.1 <sup>a</sup>
Right anterior	11.0±0.8	70.7±4.5	22.5±1.4
Left posterior	10.8±0.9	69.8±3.8	21.4±1.6
Right posterior	11.1±1.0	71.5±4.7	22.4±1.7
<b>Control</b>			
Left anterior	11.4±1.0	72.4±4.4	22.7±1.8
Right anterior	11.1±0.8	70.1±4.0	21.2±1.3
Left posterior	11.3±0.9	73.0±4.6	23.3±1.5
Right posterior	10.9±0.8	69.6±3.9	20.5±1.2

Cortical slices were prepared from rats 17 to 19 days after injection of cobalt chloride solution (Cobalt) or saline (Control). The concentration of adenosine was 0.1 mM and the concentration of 8-phenyltheophylline was 10  $\mu$ M. Each value represents the mean  $\pm$  SEM of 6 or 7 different experiments. Significantly different from the value of control rats : <sup>a</sup>p < 0.05 ; <sup>b</sup>p < 0.01.

Table 3 Cyclic AMP contents of cortical slices after incubation with or without adenosine and dipyridamole

Group and cortical area	Cyclic AMP (pmol/mg protein)			
	No addition	Dipyridamole	Adenosine	Adenosine + Dipyridamole
<b>Cobalt</b>				
Left anterior	11.1±0.9	15.4±1.3	104.8±7.5 <sup>a</sup>	109.8±7.6 <sup>b</sup>
Right anterior	11.3±1.0	15.9±1.5	72.5±4.2	75.8±5.4
Left posterior	10.9±0.8	14.8±1.1	73.2±4.1	76.7±5.5
Right posterior	11.1±1.1	15.3±1.3	70.8±3.9	73.4±5.0
<b>Control</b>				
Left anterior	11.2±0.8	15.6±1.1	71.2±4.9	74.6±5.1
Right anterior	11.0±0.9	15.3±1.2	69.7±4.5	73.2±5.0
Left posterior	11.4±1.0	15.0±1.2	72.6±4.0	74.0±5.2
Right posterior	10.9±0.8	14.9±1.0	69.9±4.1	75.8±5.5

Cortical slices were prepared from rats 17 to 19 days after injection of cobalt chloride solution (Cobalt) or saline (Control). The concentration of adenosine was 0.1 mM and the concentration of dipyridamole was 20  $\mu$ M. Each value represents the mean  $\pm$  SEM of 5 or 6 different experiments. Significantly different from the value of control rats : <sup>a</sup>p < 0.01 ; <sup>b</sup>p < 0.005.

(20  $\mu$ M) は皮質切片サイクリック AMP 含量に大きな影響は及ぼさなかった。したがって、アデノシンとジピリダモールの存在下においても、アデノシン単独の場合と同様に、左前半部皮質のサイクリック AMP レベルは、コバルト塩溶液注入群で対照群より高かった。その他の皮質部位では、相違はみられなかった。

3. 大脳皮質切片サイクリック AMP 含量のアデノシンおよび 2-クロロアデノシンによる増加とその増加に及ぼす Ro 20-1724 の影響  
注入の 17~19 日後のラットにおいて、Ro 20-1724 添加あるいは無添加条件下でアデノシンあるいはアデノシン受容体のアゴニストである 2-クロロアデノシンとインキュベーション

後の皮質切片サイクリック AMP 含量を Table 4 に示す。皮質切片を Ro 20-1724 無添加条件下でインキュベートすると、サイクリック AMP 含量は 0.1 mM 2-クロロアデノシンによって薬物無添加の場合の 10~16 倍に増加し、そのサイクリック AMP レベル上昇効果はアデノシンのそれより大きかった。別に行われた実験もまた、切片サイクリック AMP レベル上昇におけるアデノシンや 2-クロロアデノシンの効果は濃度依存性であり、いずれにおいても 0.1 mM は最大効果を示すのに充分の濃度であり、そのとき 2-クロロアデノシンがアデノシンより大きい効果をもっていることを示していた。Table 4 に示すように、2-クロロアデノシンによるサイクリック AMP レベル上昇は、アデノシンの場合と同様に、左前半部皮質では、コバルト塩溶液注入群で対照群より大きかった。その他の皮質部位では、そのような相違はみられなかった。

ホスホジエステラーゼ阻害剤である Ro 20-1724 (0.2 mM) を添加すると、いずれの皮質部位においてもサイクリック AMP 含量はアデノシンあるいは 2-クロロアデノシンを単独に添加した

場合に比較して約 2 倍に増加した。Table 4 に示すように、この Ro 20-1724 添加によって増加したサイクリック AMP レベルを比較すると、Ro 20-1724 無添加の場合と同様に、左前半部皮質では、コバルト塩溶液注入群で対照群よりサイクリック AMP 含量が大きかった。その他の皮質部位では、相違はみられなかった。アデノシン、2-クロロアデノシン無添加の皮質切片サイクリック AMP の基礎レベルも、Ro 20-1724 の添加によって 2~3 倍に上昇したが、この場合はコバルト塩溶液注入群と対照群とで相違はみられなかった。

4. 大脳皮質切片サイクリック AMP 含量のアデノシン・デアミナーゼ存在下における 2-クロロアデノシンによる増加とその増加に及ぼす 8-フェニルテオフィリンの影響

注入の 17~19 日後のラットにおいて、アデノシン・デアミナーゼの存在下で、2-クロロアデノシンあるいは 2-クロロアデノシンと 8-フェニルテオフィリンとインキュベーション後の皮質切片サイクリック AMP 含量を Table 5 に示す。皮質切片サイクリック AMP 含量は、ア

Table 4 Effects of Ro 20-1724 on cyclic AMP accumulation elicited by adenosine or 2-chloroadenosine in cortical slices

Group and cortical area	Cyclic AMP (pmol/mg protein)			
	Adenosine	Adenosine + Ro 20-1724	2-Chloro-adenosine	2-Chloro-adenosine + Ro 20-1724
<b>Cobalt</b>				
Left anterior	105.8±7.6 <sup>a</sup>	201.1±15.1 <sup>b</sup>	169.4±12.2 <sup>a</sup>	355.9±24.5 <sup>b</sup>
Right anterior	71.4±4.6	135.8±9.4	113.0±8.3	237.3±16.1
Left posterior	70.5±4.9	137.5±8.8	118.3±8.1	243.5±15.9
Right posterior	72.7±4.0	140.2±9.1	115.7±8.0	240.1±15.8
<b>Control</b>				
Left anterior	72.5±4.3	137.3±9.5	116.5±8.1	244.1±15.7
Right anterior	71.8±4.5	135.9±9.1	114.8±7.8	241.0±16.2
Left posterior	69.7±3.7	133.8±9.1	117.0±7.9	243.4±16.0
Right posterior	70.9±4.2	135.0±8.9	114.9±8.4	242.0±16.1

Cortical slices were prepared from rats 17 to 19 days after injection of cobalt chloride solution (Cobalt) or saline (Control). The concentration of adenosine and 2-chloroadenosine was 0.1 mM and the concentration of Ro 20-1724 was 0.2 mM. The cyclic AMP content after incubation with Ro 20-1724 alone was approximately 35 pmol/mg protein and nearly equal between the groups of rats. Each value represents the mean ± SEM of 5 or 6 different experiments. Significantly different from the value of control rats: <sup>a</sup>p < 0.01; <sup>b</sup>p < 0.005.

デノシン・デアミナーゼ (1 unit/ml) を添加したのみでは、無添加の基礎レベルとほとんど相違はみられず、またコバルト塩溶液注入群と対照群においても相違はみられなかった。アデノシン・デアミナーゼの存在下で2-クロロアデノシン (0.1 mM) を添加すると、サイクリック AMP 含量は約7~10倍に増加した。この上昇したサイクリック AMP レベルは、アデノシンや2-クロロアデノシン単独の場合と同様に、左前半部皮質では、コバルト塩溶液注入群で対照群より高かった。その他の皮質部位ではそのような相違はみられなかった。

Table 5 に示すように、アデノシン・デアミナーゼ存在下での2-クロロアデノシン (0.1 mM) によるサイクリック AMP レベル上昇は、8-フェニルテオフィリン (10  $\mu$ M) によって80~85%抑制された。この抑制の程度は、皮質部位間ではほぼ等しく、8-フェニルテオフィリンで抑制されたサイクリック AMP レベルは、左前半部皮質では、コバルト塩溶液注入群で対照群より高かった。その他の皮質部位では相違はみられなかった。

#### 5. 大脳皮質切片サイクリック AMP 合成の2-クロロアデノシンに対する応答のコバルト塩溶液注入後の変化

コバルト塩溶液あるいは生理食塩水注入後の異なる4時期で得られた大脳皮質切片をアデノシン・デアミナーゼの存在下で2-クロロアデノシンとインキュベーション後のサイクリック AMP 含量を Table 6 に示す。コバルト塩溶液注入ラットの左前半部皮質では、アデノシン・デアミナーゼ存在下での2-クロロアデノシンによるサイクリック AMP レベル上昇の程度が、注入後の時期によって顕著に変化した。すなわち、コバルト塩溶液注入群では、注入の8~10日後にはすでに対照群より大きいサイクリック AMP 合成応答がみられた。その応答は、その後おわずかに増加し、注入の17~19日後に最高になった。その後は、注入の29~32日後にかけて応答は速やかに低下した。その応答はその後漸次低下し、注入の40~50日後では対照群と同レベルに戻った。それ以降は、サイクリック AMP 合成応答に変化は全くみられなかった。右前半部皮質や左右の後半部皮質ではサイクリック AMP 合成応答の変化はいずれの時期において

Table 5 Cyclic AMP contents of cortical slices after incubation with or without 2-chloroadenosine and 8-phenyltheophylline in the presence of adenosine deaminase

Group and cortical area	Cyclic AMP (pmol/mg protein)		
	Adenosine deaminase	Adenosine deaminase + 2-Chloroadenosine	Adenosine deaminase + 2-Chloroadenosine + 8-Phenyltheophylline
Cobalt			
Left anterior	10.6 $\pm$ 0.8	106.9 $\pm$ 8.4 <sup>b</sup>	29.7 $\pm$ 2.1 <sup>a</sup>
Right anterior	10.5 $\pm$ 0.6	72.2 $\pm$ 6.1	22.5 $\pm$ 1.8
Left posterior	10.4 $\pm$ 0.7	72.0 $\pm$ 4.9	22.0 $\pm$ 1.7
Right posterior	10.6 $\pm$ 0.7	71.9 $\pm$ 4.6	21.7 $\pm$ 1.4
Control			
Left anterior	10.8 $\pm$ 0.7	73.4 $\pm$ 5.8	21.3 $\pm$ 1.6
Right anterior	10.5 $\pm$ 0.6	71.8 $\pm$ 4.7	20.8 $\pm$ 1.5
Left posterior	10.3 $\pm$ 0.8	72.5 $\pm$ 5.0	21.9 $\pm$ 1.5
Right posterior	10.5 $\pm$ 0.6	71.7 $\pm$ 5.1	21.2 $\pm$ 1.8

Cortical slices were prepared from rats 17 to 19 days after injection of cobalt chloride solution (Cobalt) or saline (Control). During 20-min incubation, 1 unit/ml adenosine deaminase was present in the medium. The concentration of 2-chloroadenosine was 0.1 mM and the concentration of 8-phenyltheophylline was 10  $\mu$ M. Each value represents the mean  $\pm$  SEM of 6 or 7 different experiments. Significantly different from the value of control rats: <sup>a</sup>p < 0.05; <sup>b</sup>p < 0.01.

Table 6 Cyclic AMP accumulation elicited by 2-chloroadenosine in the presence of adenosine deaminase at different stages

Group and cortical area	Cyclic AMP (pmol/mg protein)			
	8-10	17-19	29-32	40-50 days
<b>Cobalt</b>				
Left anterior	101.5±7.3 <sup>a</sup>	107.3±7.9 <sup>b</sup>	79.6±5.6	73.7±5.0
Right anterior	73.4±5.2	71.5±5.0	72.3±5.4	73.1±5.3
Left posterior	71.1±5.0	70.8±5.1	71.0±5.2	72.6±5.2
Right posterior	72.8±5.3	72.1±5.3	71.6±5.1	71.3±4.9
<b>Control</b>				
Left anterior	74.4±5.7	73.5±5.4	74.2±5.3	73.1±5.2
Right anterior	72.5±4.9	71.2±5.0	72.9±5.1	72.7±4.7
Left posterior	72.0±5.1	72.6±5.1	71.5±4.8	72.4±5.1
Right posterior	72.2±5.5	72.0±4.9	72.1±5.0	72.8±4.8

Cortical slices were prepared from rats at four different time periods after injection of cobalt chloride solution (Cobalt) or saline (Control). The slices were incubated with 0.1 mM 2-chloroadenosine in the presence of 1 unit/ml adenosine deaminase. Each value represents the mean ± SEM of 5 to 7 different experiments. Significantly different from the value of control rats: <sup>a</sup>p < 0.05; <sup>b</sup>p < 0.01.

もみられなかった。生理食塩水を注入した対照群では、いずれの皮質部位およびいずれの時期においても、これらの応答はほぼ一定であり、変化しなかった。

### 考 察

ラット大脳皮質への塩化コバルト溶液注入により、てんかん活動を誘導することができることは、Hattori<sup>4)</sup>、Veregge と Frost<sup>5)</sup>等によって報告されてきた。コバルトによる実験的てんかん活動の誘導において従来主として行われてきたコバルトの powder 等を用いる方法と比較して、コバルト塩溶液をマイクロシリンジを用いて注入するという本研究で用いた方法は、コバルトてんかん活動の誘導方法の中でも簡便な方法である。コバルト塩溶液注入により出現するてんかん活動の脳波学的あるいは行動学的特徴は、コバルトを用いる他の方法で誘導される場合と類似している。ことに、皮質脳波上に出現するスパイク等の異常脳波の消長、すなわちコバルト塩溶液注入の2~3週間後にスパイク出現頻度が最高になり、その後減少するという結果は、これまでに報告されてきた他の方法によるほぼ3週間後までに最大のてんかん活動が出現し、その後減少するという知見<sup>1,2,23)</sup>とき

わめてよく一致している。これらの点から、コバルト塩溶液を注入するこの方法は、コバルトてんかん活動を誘導するのに有用な方法であると考えられる。

アデノシン、アデノシン・アゴニストの2-クロロアデノシン等の添加に反応してラット大脳皮質切片のサイクリック AMP 含量の増加することが知られている<sup>12,15,24)</sup>。本研究の結果は、コバルト塩溶液注入ラットにおいても同様なサイクリック AMP 合成応答がみられることを示している。また本研究結果は、アデノシンや2-クロロアデノシンに対するサイクリック AMP 合成が、コバルト塩溶液を注入され、てんかん活動を示すラット大脳皮質では、生理食塩水を注入された対照群のラットのそれとは異なることを示している。この場合、アデノシン、2-クロロアデノシンに対するサイクリック AMP 合成応答は、コバルト塩溶液注入ラットの注入点を含む皮質部位で増加した。この応答の増加は、ホスホジエステラーゼ阻害剤の Ro 20-1724<sup>25,26)</sup>の存在下においてもみられたので、サイクリック AMP の分解系ではなく合成系の変化がこの応答増加に関与していることが示唆される。

中枢神経系におけるアデノシン受容体には、アデニル酸サイクラーゼとそれぞれ抑制的および

び促進的に共役した A1 および A2 の受容体の存在することが明らかにされてきている<sup>27)</sup>、これらのうち A1 受容体についてはその受容体機構が比較的良好に調べられている<sup>17,28)</sup>。しかしながら、アデニル酸サイクラゼと促進的に共役している A2 受容体については良好なリガンドが発見されておらず、その知見の多くは、脳切片や無細胞標品を用いたサイクリック AMP 合成応答を指標として得られてきた<sup>24,29,30)</sup>。本研究において、アデノシンや 2-クロロアデノシンのサイクリック AMP レベル上昇効果は濃度依存性であり、アデノシン・アントゴニストの 8-フェニルテオフィリン<sup>31)</sup>によって強く抑制された。さらに、サイクリック AMP レベル上昇におけるアデノシンの効果は、アデノシン取込み阻害剤のジピリダモール<sup>32,33)</sup>によって大きな影響は受けなかった。これらの結果は、本研究で観察されたアデノシン、2-クロロアデノシンのサイクリック AMP レベル上昇効果は、大脳皮質細胞表面のアデノシン受容体、おそらく A2 受容体を介していることを示唆しており、コバルト塩溶液注入によってアデニル酸サイクラゼを含めたその機能の変化する可能性が考えられる。

中枢神経系におけるシナプス伝達において、重要な役割をもつアデノシンは種々の脳内構造から電気的あるいは化学的刺激に伴う興奮に際して放出されることが報告されている<sup>34)</sup>。本研究においては、このような内在性のアデノシンによってもたらされるかも知れない干渉を除去する目的で、アデノシン・デアミナーゼで内在性のアデノシンを分解し、アデノシン・デアミナーゼの基質になり難い 2-クロロアデノシンを添加することによって、サイクリック AMP 合成応答を調べた。その結果、アデノシンや 2-クロロアデノシンを単独に添加した場合と同様のサイクリック AMP 合成応答の変化が観察された。このことから、アデノシン感受性サイクリック AMP 合成系の応答性そのものがコバルト塩溶液注入によって変化することが示唆される。さらに、これらのサイクリック AMP 合成応答の増大と減少は、皮質脳波上に出現するスパイク活動の増強発達や減弱さらには消失の時間経過と合わせてよく一致した対応を示しており、本

研究で得られたサイクリック AMP 合成応答の変化がコバルト塩溶液注入によって誘導されるてんかん活動の出現、発達等の現象の神経化学的基礎になっている可能性を示している。

大脳皮質のてんかん活動の出現に際してサイクリック AMP の脳内含量の増加することが報告されてきた<sup>8,9)</sup>。最近、サイクリック AMP の脳内への注入をくり返すことによって発作活動の誘発やその発達が促されることが報告された<sup>35)</sup>。これらの知見は、サイクリック AMP がてんかん活動等の異常脳活動に関係していることを示唆しているが、コバルト誘導てんかんにおいてはそのメカニズムにサイクリック AMP が関与しているといった証拠はこれまで得られていない。コバルト誘導てんかんよりさらに長期間持続する活動として注目されてきた鉄誘導てんかんにおいて、Hattori<sup>18)</sup>、Hattori ら<sup>16)</sup>は、このてんかん活動の出現に伴って大脳皮質のアデノシンあるいはノルアドレナリン感受性サイクリック AMP 合成系の応答が変化することを見出した。脳波学的、行動学的結果から明らかなように、コバルト誘導てんかん活動と鉄誘導てんかん活動は、ことにその持続性において著しい相違がみられる。しかしながら、これまでに得られたこれらの知見と本研究で得られた知見を総合すると、コバルト誘導てんかん活動と鉄誘導てんかん活動において、それらの神経化学的過程の少なくとも一部は類似しており、サイクリック AMP 合成系の機能変化が種々のてんかん活動に共通な基礎過程であることが示唆される。

## 結 論

てんかん活動を誘導するために、ラット大脳皮質の一側感覚運動野に塩化コバルト溶液を注入し、皮質脳波および行動上の変化を観察した後、大脳皮質の四部位から得られた切片をアデノシンおよび 2-クロロアデノシン添加あるいは無添加条件下でインキュベーション後のサイクリック AMP 含量を測定した。

1. コバルト塩溶液注入ラットの皮質脳波上には、注入直後からスパイク活動が観察され、その活動は多くの個体において注入側優勢であつ



た。スパイク出現頻度は、注入の2～3週間後に最高になり、その後減少した。これらの異常脳波の出現に伴って異常行動が観察された。

2. 皮質切片サイクリック AMP レベルは、アデノシンおよび2-クロロアデノシンによって、それぞれ6～10倍および10～16倍に上昇した。

3. このサイクリック AMP 合成応答は、アデノシン・アンタゴニストの8-フェニルテオフィリンによって強く抑制された。

4. アデノシンあるいは2-クロロアデノシンに対するサイクリック AMP 合成応答は、コバルト誘導てんかん性皮質の第一次焦点領域で大きく、他の皮質部位ではそのような変化はみられなかった。

5. てんかん性大脳皮質におけるサイクリック AMP 合成応答の増加は、アデノシン取込み阻害剤のジピリダモール、ホスホジエステラーゼ阻害剤の Ro 20-1724, あるいはアデノシン・デ

アミナーゼの有無に関係なくみられた。

6. サイクリック AMP 合成応答増加は、脳波学および行動学的結果と一致して、注入の8日後にはすでに認められ、応答はその後なおわずかに増加し、注入の17～19日後に最高になった後対照群と同じレベルに戻った。

これらの結果は、コバルト誘導てんかん性大脳皮質の第一次焦点領域におけるアデノシン感受性サイクリック AMP 合成の変化がコバルト誘導てんかん活動の一つの重要な神経化学的過程であることを示唆する。

稿を終えるに臨み、本研究に対し御指導と御校閲を賜りました岡山大学医学部第一生理学教室堀泰雄教授ならびに服部幸雄助教授に深甚の謝意を表します。また実験の遂行にあたり御協力いただきました岡山大学医学部第一生理学教室員各位に深謝します。

## 文 献

- 1) Dow RS, Fernández-Guardiola A and Manni E : The production of cobalt experimental epilepsy in the rat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* (1962) **14**, 399—407.
- 2) Fischer J, Holubář J and Malík V : A new method of producing chronic epileptogenic cortical foci in rats. *Physiol Bohemoslov* (1967) **16**, 272—277.
- 3) Colasanti BK, Hartman ER and Craig CR : Electrocorticogram and behavioral correlates during the development of chronic cobalt experimental epilepsy in the rat. *Epilepsia* (1974) **15**, 361—373.
- 4) Hattori Y, Moriwaki A, Hayashi Y, Sunami T and Hori Y : Regional difference in depolarization-elicited accumulation of cyclic AMP in cobalt-induced epileptic cortex of the rat. *Acta Med Okayama* (1985) **39**, 489—492.
- 5) Veregge S and Frost Jr JD : Relationship between single-unit activity and the electroencephalogram in a neocortical, cobalt-induced epileptogenic focus. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* (1988) **69**, 34—44.
- 6) Trottier S, Berger B, Chauvel P, Dedek J and Gay M : Alterations of the cortical noradrenergic system in chronic cobalt epileptogenic foci in the rat : a histofluorescent and biochemical study. *Neuroscience* (1981) **6**, 1069—1080.
- 7) Trottier S, Claustre Y, Caboche J, Dedek J, Chauvel P, Nassif S and Scatton B : Alterations of noradrenaline and serotonin uptake and metabolism in chronic cobalt-induced epilepsy in the rat. *Brain Res* (1983) **272**, 255—262.
- 8) Walker JE, Lewin E, Sheppard JR and Cromwell R : Enzymatic regulation of adenosine 3',5'-monophosphate (cyclic AMP) in the freezing epileptogenic lesion of rat brain and in homologous contralateral cortex. *J Neurochem* (1973) **21**, 79—85.
- 9) Křivánek J and Mareš P : Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in epileptogenic foci induced by

- penicillin. *Neurosci Lett* (1977) **6**, 329—332.
- 10) Daly JW : Cyclic Nucleotides in the Nervous System. Plenum Press, New York (1977) pp 97—209.
  - 11) Nathanson JA : Cyclic nucleotides and nervous system function. *Physiol Rev* (1977) **57**, 157—256.
  - 12) Rall TW and Sattin A : Factors influencing the accumulation of cyclic AMP in brain tissue. *Adv Biochem Psychopharmacol* (1970) **3**, 113—133.
  - 13) Forn J and Krishna G : Effect of norepinephrine, histamine and other drugs on cyclic 3', 5'-AMP formation in brain slices of various animal species. *Pharmacology* (1971) **5**, 193—204.
  - 14) Perkins JP and Moore MM : Characterization of the adrenergic receptors mediating a rise in cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate in rat cerebral cortex. *J Pharmacol Exp Ther* (1973) **185**, 371—378.
  - 15) Schultz J and Daly JW : Accumulation of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate in cerebral cortical slices from rat and mouse : stimulatory effect of  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic agents and adenosine. *J Neurochem* (1973) **21**, 1319—1326.
  - 16) Hattori Y, Moriwaki A, Hayashi Y and Hori Y : Regional difference in responsiveness of norepinephrine-sensitive cyclic AMP-generating systems of rat cerebral cortex with iron-induced epileptic activity. *J Neurochem* (1990) **54**, 518—525.
  - 17) Snyder SH : Adenosine as a neuromodulator. *Annu Rev Neurosci* (1985) **8**, 103—124.
  - 18) Hattori Y : Regional difference in responsiveness of adenosine-sensitive cyclic AMP-generating systems in chronic epileptic cerebral cortex of the rat. *J Neurochem* (1990) **55**, 1294—1303.
  - 19) Otten J, Johnson GS and Pastan I : Regulation of cell growth by cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate. Effect of cell density and agents which alter cell growth on cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate levels in fibroblasts. *J Biol Chem* (1972) **247**, 7082—7087.
  - 20) Gilman AG : A protein binding assay for adenosine 3' : 5'-cyclic monophosphate. *Proc Natl Acad Sci USA* (1970) **67**, 305—312.
  - 21) Brown BL, Albano JDM, Ekins RP, Sgherzi AM and Tampion W : A simple and sensitive saturation assay method for the measurement of adenosine 3' : 5'-cyclic monophosphate. *Biochem J* (1971) **121**, 561—562.
  - 22) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* (1951) **193**, 265—275.
  - 23) Emson PC and Joseph MH : Neurochemical and morphological changes during the development of cobalt-induced epilepsy in the rat. *Brain Res* (1975) **93**, 91—110.
  - 24) Bazil CW and Minneman KP : An investigation of the low intrinsic activity of adenosine and its analogs at low affinity (A<sub>2</sub>) adenosine receptors in rat cerebral cortex. *J Neurochem* (1986) **47**, 547—553.
  - 25) Mah HD and Daly JW : Adenosine-dependent formation of cyclic AMP in brain slices. *Pharmacol Res Commun* (1976) **8**, 65—79.
  - 26) Schultz J : Inhibition of 3', 5'-nucleotide phosphodiesterase in guinea pig cerebral cortical slices. *Arch Biochem Biophys* (1974) **163**, 15—20.
  - 27) Van Calker D, Müller M and Hamprecht B : Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J Neurochem* (1979) **33**, 999—1005.
  - 28) Daly JW : Adenosine receptors : targets for future drugs. *J Med Chem* (1982) **25**, 197—207.
  - 29) Anand-Srivastava MB and Johnson RA : Regulation of adenosine-sensitive adenylate cyclase from rat brain striatum. *J Neurochem* (1980) **35**, 905—914.

- 30) Daly JW, Butts-Lamb P and Padgett W : Subclasses of adenosine receptors in the central nervous system : interaction with caffeine and related methylxanthines. *Cell Mol Neurobiol* (1983) **3**, 69—80.
- 31) Smellie FW, Davis CW, Daly JW and Wells JN : Alkylxanthines : inhibition of adenosine-elicited accumulation of cyclic AMP in brain slices and of brain phosphodiesterase activity. *Life Sci* (1979) **24**, 2475—2481.
- 32) Huang M and Daly JW : Adenosine-elicited accumulation of cyclic AMP in brain slices : potentiation by agents which inhibit uptake of adenosine. *Life Sci* (1974) **14**, 489—503.
- 33) Nimit Y, Skolnick P and Daly JW : Adenosine and cyclic AMP in rat cerebral cortical slices : effects of adenosine uptake inhibitors and adenosine deaminase inhibitors. *J Neurochem* (1981) **36**, 908—912.
- 34) Phillis JW and Wu PH : The role of adenosine and its nucleotides in central synaptic transmission. *Prog Neurobiol* (1981) **16**, 187—239.
- 35) Yokoyama N, Mori N and Kumashiro H : Chemical kindling induced by cAMP and transfer to electrical kindling. *Brain Res* (1989) **492**, 158—162.

**The cyclic AMP-generating system of cobalt-induced  
epileptic cerebral cortex**

**Hideki ASAKI**

**Department of Physiology,**

**Okayama University Medical School,**

**Okayama 700, Japan**

**(Director : Prof. Y. Hori)**

A cobalt chloride solution was injected into the unilateral sensorimotor cortex of rats to induce epileptic activity. The cyclic AMP contents of slices incubated with or without adenosine and 2-chloroadenosine were determined in four cortical areas after electroencephalography and behavioral examination in cobalt-injected rats. Electrographic spike activity appeared immediately after injection of cobalt. In the majority of cobalt-injected rats, the spike activity was dominant in the primary epileptic region of the cortex. The spike frequency reached a maximum level two to three weeks after the injection and declined thereafter. The electrographic activity was followed by abnormal behavior. Adenosine and 2-chloroadenosine elevated the cyclic AMP levels in the cortical slices 6-to 10-fold and 10-to 16-fold, respectively. The elicitation of cyclic AMP accumulation was strongly inhibited by the adenosine antagonist 8-phenyltheophylline. The cyclic AMP accumulation elicited by adenosine or 2-chloroadenosine was increased in the primary cortical area of cobalt-induced epilepsy, but in the other cortical areas there was no deviation in cyclic AMP accumulation. The increase in cyclic AMP accumulation was observed regardless of the presence or absence of the adenosine uptake inhibitor dipyridamole, phosphodiesterase inhibitor Ro 20-1724, and adenosine deaminase. The increased accumulation of cyclic AMP in the primary epileptic cortex was detected as early as 8 days after the injection. The cyclic AMP accumulation slightly increased thereafter. It reached a plateau 17 to 19 days after the injection and then turned to the control levels, in harmony with the electrographic and behavioral profiles. These findings suggest that alterations in adenosine-sensitive generation of cyclic AMP in the primary epileptic region of the cortex are part of the neurochemical process of cobalt-induced epilepsy.