

ラット海馬Carbachol誘導 振動及び 帯電気刺激 のてんかん様発火抑制に内因性アデノシン受容体が 関与する

著者	澤田 豊宏
その他のタイトル	Endogenous adenosine receptors are involved in the suppression of epileptic discharges by Carbachol induced beta oscillations and beta frequency electrical stimulation in rat hippocampus slices
学位授与年度	令和2年度
学位授与番号	17104甲生工第409号
URL	http://hdl.handle.net/10228/00008367

ラット海馬 Carbachol 誘導 β 振動
及び β 周波数帯電気刺激のて
んかん様発火抑制に内因性ア
デノシン受容体が関与する

令和元年度

九州工業大学院

生命体工学研究科 生命体工学専攻 博士後期課程

人間・脳機能講座

学籍番号：14899017

氏名：澤田豊宏

目次

1.1	諸言.....	5
1.2	脳波.....	6
1.2.1	脳波.....	6
1.2.2	B 波.....	7
1.2.3	B 波に発生に関わる中隔アセチルコリン投射系.....	7
1.2.4	記憶学習に関与する B 波.....	8
1.2.5	睡眠時の見られる脳波.....	10
1.3	てんかん.....	11
1.3.1	てんかん.....	11
1.3.2	てんかんと睡眠の関与.....	13
1.3.3	現在のてんかん治療法.....	14
1.4	海馬.....	16
1.4.1	海馬の構造と機能.....	16
1.4.2	記憶学習に関与する海馬.....	18
1.5	アデノシン.....	19
1.5.1	アデノシンの代謝と役割.....	19
1.5.2	アデノシンの神経系への影響.....	21
2	目的.....	23
3	方法.....	24
3.1	測定環境.....	24
3.2	海馬スライス標本作製.....	25
3.3	細胞外記録実験法.....	26
3.3.1	薬品誘導 B 波及びてんかん波測定法.....	27
3.3.2	海馬ミニスライスを用いた発生源実験法.....	28
3.4	電気刺激を用いた実験方法.....	29
3.4.1	興奮性シナプス後電位 (PEPSP) 実験法.....	30

3.4.2	BURST 電気刺激実験法.....	31
3.4.3	周波数電気刺激実験法.....	32
3.5	統計解析手法.....	34
3.6	使用薬品.....	37
4	結果.....	38
4.3	薬品誘導海馬神経活動.....	38
4.3.1	CARBACHOL (CCH) 誘導 B 振動 (CIBO).....	38
4.3.2	てんかん様発火に対する薬物依存性と濃度依存性.....	39
4.3.3	CIBO 及びてんかん様発火の発生源.....	51
4.3.4	CIBO と ICTAL DISCHARGES の比較.....	56
4.4	CIBO によるてんかん様発火の抑制.....	58
4.4.1	CIBO 中に抑制されるてんかん様発火.....	58
4.4.2	てんかん様発火への CARBACHOL 投与によって誘導される CIBO.....	66
4.5	CIBO のてんかん様発火抑制に関するアセチルコリン受容体の関与.....	68
4.5.1	ニコチン性アセチルコリン受容体との関与.....	68
4.5.2	ムスカリン性アセチルコリン受容体との関与.....	69
4.5.2.1	CIBO によるてんかん様発火抑制とムスカリン性受容体サブタイプとの関与.....	69
4.6	CARBACHOL による PEPSP の変化.....	71
4.7	CIBO によるてんかん様発火抑制とアデノシン受容体との関与.....	75
4.7.1	CIBO とアデノシン受容体との関与、またその時のてんかん様発火誘導.....	75
4.7.2	アデノシン受容体サブタイプと CIBO のてんかん様発火抑制との関与.....	77
4.8	CIBO の INTER BURST INTERVAL における BURST 電気刺激に対する BURST 誘導性.....	79
4.9	B 周波数帯電気刺激によるてんかん様発火の抑制.....	81
4.9.1	B 周波数帯電気刺激によるてんかん様発火の抑制.....	81
4.9.2	B 周波数帯電気刺激 STIMULATION INTERVAL 延長のてんかん様発火に対する効果.....	83
4.10	B 周波数帯電気刺激のてんかん様発火抑制に対するアデノシン受容体とサブタイプとの関与.....	84
4.11	⊙ 周波数帯電気刺激のてんかん様発火抑制に対するアデノシン受容体とサブタイプとの関与.....	91

4.12	⊕ 周波数帯電気刺激のてんかん様発火抑制に対するアデノシン受容体の関与	91
4.13	B 周波数帯と ⊕ 周波数帯電気刺激におけるてんかん様発火抑制の差	95
4.14	結果のまとめ	98
5	考察.....	100
5.1	CCH により ICTAL DISCHARGES とは異なる CIBO が誘導される	100
5.2	CIBO と INTERICTAL DISCHARGES の発生源は CA3 である	102
5.3	CIBO はてんかん様発火を抑制する	103
5.3.1	CIBO によるてんかん様発火抑制はムスカリン性受容体 M1、M3、M4 と関与する.....	104
5.3.2	CARBACHOL による PEPSP の減少はてんかん様発火を促進する	105
5.4	CIBO の IBI 中に振動誘導性が変化する	106
5.5	アデノシン受容体(P1R)が CIBO によるてんかん様発火の抑制に関与する	106
5.5.1	アデノシン受容体(P1R)の阻害は CIBO てんかん様発火抑制を阻害する.....	107
5.5.2	細胞外アデノシン濃度は CIBO のてんかん様発火の抑制における IBI と関与する可能性がある	110
5.6	B 周波数帯電気刺激はてんかん様発火を抑制し、その抑制には P1R が関与する	112
5.6.1	B 周波数帯電気刺激の STIMULATION INTERVAL を延長することによりてんかん様発火は抑 制されない	116
5.6.2	B 周波数帯と ⊕ 周波数帯電気刺激の効果の違い	117
5.7	本研究結果を下にした、てんかん治療の提案	121
6	結論.....	123
7	今後の課題	124
8	謝辞.....	125
9	参考文献.....	126

1 序論

1.1 諸言

近年、基礎科学研究の発展に伴い脳機能に関する研究と解明が進み、ヒトの認知や記憶学習、行動、脳状態が脳波 (Electroencephalogram : EEG) により反映されることも判明し、心理学においても機能的近赤外分光分析法 (functional Near - Infrared Spectroscopy : fNIRS) や磁気共鳴機能画像法 (functional Magnetic Resonance Imaging : fMRI) 等を用いた研究によりそれらが密接な関連を持つことが知られてきた。この脳波は周波数によりクラス化されており、脳波を用いた研究は行動や認知、情動と脳機能の解明だけでなくうつ病、てんかん、統合失調症、アルツハイマー等の神経疾病の研究に関しても多々用いられてきておりその病態解明や治療において脳波を用いる有効性が確立してきた。しかし明確な原因や根本的治療は未だ完全ではない。中枢神経疾病で最も頻度の高い神経疾病であるてんかんは症状や発症の複雑性から未だ完全な解明に至っていない。てんかん発症時、記憶の欠損といったてんかんと記憶の関与もあり記憶学習に関与する θ 波はてんかんを抑制する可能性が見いだされてきた。しかし同じく記憶学習に関与する β 波については未だ不明である。記憶学習に重要な大脳辺縁系脳器官の 1 つである海馬では、記憶学習と関連のある β 振動などの機能的な神経振動が観察される一方で、海馬は病理的なてんかんの焦点となっている。本研究では記憶学習に関与する脳波と神経疾病のうちのてんかんと関与に焦点を当てて研究を行った。脳波を用いた研究はヒトに限らず、サルやウサギ、ネコといった哺乳類からラットやマウス、モルモット等のげっ歯類等多種多様である。本研究ではラットの海馬を用いて脳波の研究を行った。その結果 β 波も θ 波と同様にてんかん波を抑制することが明らかになり、抑制の要因として間欠的に誘導される脳波の Interval が鍵となることも判明した。さらにその抑制に

はてんかんやアルツハイマー等の神経疾病に関与すると言われているアデノシン受容体の活性が必要であることも判明し、今後のてんかん治療へ向けての新たな可能性を示した。

1.2 脳波

1.2.1 脳波

脳内は状態に応じた様々な種類の脳波が見られ、1924年 Hans Berger によって最初に電気現象として発見された[1]。脳波はヒトの脳に存在する多数の神経細胞同期発火によるものと考えられており、神経細胞間のシナプスという接点を介して神経回路を形成し神経情報の伝達と処理を行なっている[2]。EEG の場合大脳皮質表層近辺のシナプス電位変動の総和を頭皮から測定される。これらは周波数によってクラス分けされており例えば δ 波 (0.5 ~ 3.5 Hz) は深い睡眠時に[3][4]、 θ 波 (4.0 ~ 7.0 Hz) は作業記憶や記憶の埋め込み、感情的な興奮、恐怖条件時に[3][5][6]、 α 波 (8.0 ~ 12.0 Hz) は短期記憶や覚醒休息時に[3]、 β 波 (12.0 ~ 30.0 Hz) は運動制御や記憶の想起に[7]、 γ 波 (30.0 ~ 70.0 Hz) は不安、注意、感覚統合、記憶形成時に見られる[3][8][9]。また 80 Hz 以上の High Frequency Oscillation (HFO) も最近では注目されている[10]。これら周波数の違いは神経の局所回路と神経細胞特性変化を反映していることも明らかになってきており、さらに周波数が異なる脳波は局所領域の神経細胞相互作用を可能にすることも示されている[11]。モデルの研究において、高周波数帯の脳波よりも低周波数帯領域の脳波は神経の機能的結合をサポートする可能性が示唆されており[12]、 θ 波及び β 波 / γ 波のネストは長期記憶からの検索及び作業記憶におけるエンコード処理のメカニズムに関わることが提案されており、覚醒時におけるサルの研究からも証拠が得られている[5][6][13]。以上のことから脳波は記憶や学習、休

息や運動制御といった様々な状態を反映しており脳機能の役割を解明するにあたって重要な意味を成す。

1.2.2 β 波

β 周波数帯 (12.0 ~ 30.0 Hz) の周波帯は運動制御や記憶の想起、選択時、作業記憶やさらには知覚といった多数の機能に関係があるとされている。しかし、 β メカニズムの詳細については未だ不明な点が多い。その原因として得られた生データをフィルタリングし平均化することで他の周波数帯 (例えば γ や θ 波) として認識される可能性が高いことや、 β 領域の活性が非常に短い持続時間 (< 150 ms) で観察されることが多いため、スペクトル解析の際に低周波数帯パワーとなることが多いためであった[14]が、その後の解析手法の発展により β 周波数帯の振動現象は頻繁に観察され研究が進んできた。局所的な β 活動は多数の機能と関与するとされているが、病理学的な β も見られていることがわかっている。最も顕著な例が Parkinson's disease (PD) であり新皮質や視床下核では異常な β 波が見られ、また大脳基底核の異常な β 周波数帯活動が PD 患者の運動緩慢に関与することがわかっている[15][16]。この異常な β 周波数帯活動現象の原因は視床下核と淡蒼球の相互作用から生じるとされている[17]。また別の研究では一次運動皮質を薬理的に刺激することで間欠的な β 波が誘導されることも示されている[18]。このように β 波の発生には大脳基底核や皮質等の様々な場所が関与することがわかっている。

1.2.3 β 波に発生に関わる中隔アセチルコリン投射系

リズムの発生には様々な場所が関わるが大脳辺縁系からも β 波が誘導されることもわかっている。例えば、Berke らはマウスを迷路内で走らせた際に海馬で θ 波や β 波が見られたことを見出した[19]。一方で、中核を電気損傷することで海馬の θ 波が

見られなくなりまた空間タスクも実行できなくなった[20]。これらの記憶学習に関与する脳波は内側中隔核から海馬 CA3 領域へのアセチルコリン (ACh) や γ アミノ酪酸 (Gamma - AminoButylic Acid : GABA) 投射による興奮性神経と抑制性神経の相互作用によるものとわかっている[21][22]。PD の研究において、アセチルコリン受容体の Carbachol (CCh) をラットの線条体に注入すると局所電場電位 (Local Field Potential : LFP) の β 波の増強が誘発された[23]。また、*in vitro* 研究において Shimono らは、海馬スライスに CCh を投与することで錐体細胞の β 振動が誘導されることやその伝播の様子も明らかにし[24]、Arai らもラットの海馬で CCh により β 振動を誘導し、発生源は CA3 であることも明らかにした (図 1)。そしてその β 振動は N-メチル - D - アスパラギン酸 (N - Methyl - D - aspartic Acid : NMDA) 受容体が β 振動に関与することも明らかにした。さらに、この CCh によって誘導される β 振動 (CIBO) はムスカリン性アセチルコリン受容体 (mACh) が関与し、その中でも興奮性である M1、M3 のサブタイプが関与することが明らかとなった[25]。これらの結果から海馬内 β 振動の誘導には中隔核から海馬への ACh 投射が必要であり、また海馬のみでも mACh 受容体を作動させることで θ 波や β 波を振動現象として再現可能である。

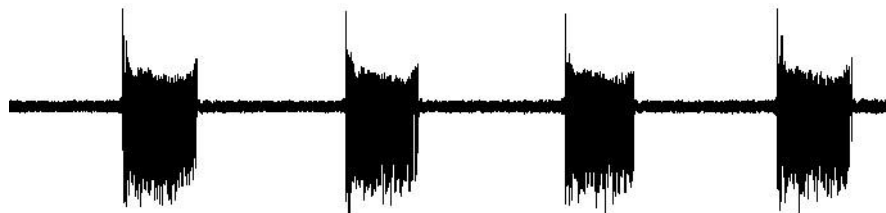


図 1 本研究で誘導されたラット海馬 CCh 誘導 β 振動 (CIBO)。

1.2.4 記憶学習に関与する β 波

様々な脳波のなかでも θ 波や β 波は記憶学習に関与し、 θ 波は特に記憶処理において研究されている周波数帯である[26][27]。作業期記憶において海馬での θ 波は間隔入

力の認知処理におけるネットワークを反映し、その θ 波が維持されることによって新しい情報の入力処理を促進することが示されている[28]。 θ 波は場所細胞との関係も報告されており、 θ 波と海馬場所細胞の時間的相関関係は空間的な場所情報を特定し細胞群の時間調整を反映し[29][30]、海馬でのスパイクコヒーレンスは θ 周波数帯で強く見られるため位置情報を伝搬させる可能性がある[31]。また、先述した Berke らの迷路内で走らせたマウス海馬から 1 周目は θ 波が見られたことから新規環境における記憶の埋め込みに、その後の 2 周目以降は β 波が見られたことから記憶の想起に関わる可能性を示した[19]。さらに θ 波は海馬ネットワーク表現にも関与しており、スライスにおける θ 振動中に長期増強 (Long - Term Potentiation : LTP) を誘導すると、LTP がより増強される[32]、また LTP と長期抑圧 (Long - Term Depression : LTD) による刺激は θ 波の位相と関与すると考えられている[33]。このように θ 波は記憶学習やエンコードには大きく関与している。 β 波については以前から運動に感覚処理に関係づけられてきたており、運動前から運動中にかけて感覚皮質や体性感覚野の β 波パワーが減少 (脱同期化) し運動後に再び β 波パワーが戻る (同期化) [34]–[37]。しかし、感覚運動野の β 波の機能的役割は未だ明確になっておらず、最近の見解では現在の“状態”維持に役割があるのではないかと示唆されている[7]。 β 波の記憶学習や情報処理における関係や役割も明らかになってきた。 β 波は作業記憶における物体認識や記憶保持に行われるエンコード、言語処理、長期記憶へのエンコード等において海馬で誘導されることがわかっている[13][38]–[41]。さらにトップダウン処理にも関わっており対象物の探索中において β 波が顕著に現れたのに対して、探索の少ないボトムアップ処理では γ 波が顕著であった[42][43]。スパイク発火率の結果から神経活動と γ 波や α 波は相関があることがわかっているが、 β 波の関係については不明確なままである。

1.2.5 睡眠時の見られる脳波

睡眠は急速眼球運動 (Rapid Eye Movement : REM) 睡眠と非急速眼球運動 (Non - Rapid Eye Movement : NREM) が交互に出現することで形成され、NREM 睡眠中の海馬と新皮質との記憶伝達は海馬リップル (80 ~ 250 Hz) 、新皮質スピンドル (11 ~ 16 Hz) と低速振動 (< 1 Hz) により調節されると考えられている[44]-[47]。NREM 睡眠のうち徐波睡眠中 (slow wave sleep : SWS) には δ 波が増加すると言われているが、 β 波や γ 波も発生し広範囲で相互作用しており、覚醒時と分布が部分的に同じということから睡眠中の記憶統合を覚醒状態の再現をすることで役割を果たすと考えられている[48]。また、 α 波は NREM 睡眠開始の兆候として知られている[49]。REM 睡眠中については未だ不明な点は多いものの、REM 睡眠中の記録電位が覚醒行動中の作業記憶や認知時に似ており、夢の形成や記憶統合に関与する可能性が示されている[26][50]。また REM 睡眠中で前頭葉の前帯状皮質 (Anterior Cingulate Cortex : ACC) と背外側前頭皮質 (DorsoLateral Prefrontal Cortex : DLPFC) にて β 波と θ 波が見られ、これら離れた領域のコヒーレンスが見られたことから記憶の固定に関与する可能性が示されている[51]。また、REM 睡眠中は覚醒時に比べて ACC には M2 への高濃度の ACh 入力があり、抑制を活性化することで DLPFC を抑制していることがわかっており夢の非理論的な性質と覚醒中の意識的な差は DLPFC の沈黙化からくるのではないかという考えもある[52][53]。以上のことから睡眠時には特徴的な脳波が見られ記憶の統合や感情記憶の強化に重要な役割を果たすと考えられているが未だに未解明な点が多い。

1.3 てんかん

1.3.1 てんかん

てんかんは中枢神経の中で最も高い疾病の一つで約 5000 万人のてんかん患者が全世界で見られると報告されている[54]。症例ごとにその病態や原因は多様であり未だに解明されておらず一つの疾病概念ではまとめることは出来ないためてんかん症候群とも呼ばれることがある。そのてんかん治療のために適切な療法を行うためにてんかん発作型国際分類 (International League Against Epilepsy : ILAE) [55]を用いて分類する必要がある。2010 年においては発作が片側大脳半球のみのネットワークのみで発生し局在する焦点発作と、発作が大脳両半球ネットワーク内で発生し発作に巻き込まれる全般発作に大きく分けられ、さらに焦点発作は意識障害の有無、全般発作は欠伸発作やミオクロニー発作、間代発作、強直発作等症状によって分けられる。てんかん発作の分類には脳波を用いることは有用でありてんかん発作時には発作間欠期波 (interictal discharges) と発作時に生じる発作波 (ictal discharges) が見られる (図 2) [56]。ここで、発作 EEG が開始される前において前兆である Aura が確認される。Aura はてんかん診断においては重要であり、通常てんかん発作時には記憶障害が認められるが Aura の段階では患者を感覚異常として認識することができる。その症状は様々で幻聴や幻覚、体温変化やパニックなどが見られる。この Aura の段階で脳内では異常放電が見られるため、単純部分発作として診断される。患者本人が Aura を認知することで発作部位を特定する手がかりとなりうるため特に重要視される。また Aura のみが見られ、発作を伴わない場合もある。

interictal 後には発作性脱分極へのシフトが発生し連続的な発火が誘導される。

てんかんの発生は興奮性と抑制性のバランスが崩れることが原理と考えられている [57]。その破綻にはイオンチャネルの異常が深く関与しており、治療薬の標的となっている。熱性けいれんと乳児重症ミオクロニーてんかんでは電位依存性 Na チャネル

のミスセンス変異が報告されており、GABA 作動性介在ニューロンに存在する Na チャネル ($Na_v1.1$) 障害により抑制性神経の活動低下がてんかん発作の原因ではないかと言われている[58][59]。新生児けいれんや発作性ジスキネジアを伴う全身けいれんでは電位依存性 K チャネル ($KCNQ2$ 、 $KCNQ3$) のミスセンス変異が報告されており、外向き K 電流 (M - current) の低下が報告されている。その結果相対的に神経細胞の興奮性が高くなる[60]。欠伸発作を伴う若年性ミオクロニーてんかんや小児欠伸てんかんでは GABA 受容体サブタイプ遺伝子の異変が報告されている。GABA 受容体に GABA が結合することで Cl イオンが細胞内に流入し膜電位を過分極させることで神経の興奮を抑制させるが、GABA_A 受容体 γ_2 サブユニット ($GABRG2$) や $\alpha 1$ サブユニット ($GABRA1$) のミスセンス変異により GABA 作動性電流が抑制されていた[61][62]。

動物実験において *in vitro* 海馬スライスでもこれらの機構を利用したてんかん様の放電を誘導することが可能で、Karnup らは海馬 CA1 スライスに GABA_A 受容体阻害薬である Bicuculline - methioide (BIC) や SR-95531 (GBZ : GBZ)、Picrotoxine (PTX) を投与することで interictal discharges と ictal discharges を誘導させることに成功している (図 2) [63]。本研究においてもこれらを利用し海馬スライスへの GABA_A 受容体薬を投与し、epileptiform discharges を誘導させることに成功した。これら動物を用いて抗てんかん薬の新たな開発や外科的治療、病態、成因解明に向けて多々研究がなされてきている。

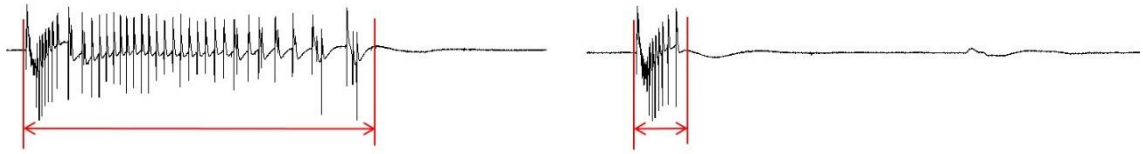


図 2 本研究で誘導された $GABA_A$ 受容体阻害薬により誘導された **interictal discharges** (左) と **ictal discharges** (右) 。

1.3.2 てんかんと睡眠の関与

てんかんと睡眠の関与についても多くの報告があり、睡眠不足はてんかん発作を高める可能性があるとして指摘した[64][65]。ヒトの患者において欠伸てんかんは傾眠中及び覚醒と睡眠の間のサイクル時に現れ、特に NREM 睡眠時に発作が見られる[66]–[68]。REM 睡眠時にはてんかん発作の誘導率は NREM や覚醒時と比較して有意に低く、REM 睡眠によるてんかん抑制の可能性も示されている[69][70]。明確な原因は未だ不明であるがその原因の結果として NREM 睡眠と REM 睡眠の EEG 記録から見られる違いが挙げられる。すなわち NREM 睡眠時の EEG は比較的高いパワーと顕著な低周波振動活動を特徴としている。対して REM 睡眠時は低いパワーで不規則であり、一部領域において REM 睡眠中には θ 振動が見られ覚醒時と類似していることも特徴として挙げられている。この低いパワーは主にコリン作動性中脳網様体 (Midbrain Reticular Formation : MRF) 神経による視床脱分極によるものとされており皮質への伝達し非同期を促す活動が存在する。これにより高いパワーのである徐波やスピンドルが誘導されず、てんかんのような異常同期も見られない可能性も示唆されている[69][71]。

1.3.3 現在のてんかん治療法

現在、てんかんの治療法においては様々に行われており内科的治療と外科的治療に分けられる。内科的治療には GABA 機能増強及び電位依存性 Na または Ca チャネル阻害を作用機序とするガバペンチンやジアゼパムといった抗てんかん薬による薬物療法[72]がありこれにはステロイド治療やケトン食療法も含まれる。外科的治療には切除療法、遮断外科、迷走神経刺激（Vagus Nerve Stimulation : VNS）や脳深部刺激（Deep Brain Stimulation : DBS）、反復経頭頭蓋磁気刺激（repetitive Transcranial Magnetic Stimulation : rTMS）が用いられている。一般に第一選択薬の投与により 70 %はコントロール可能であり、残りの 30 %のうち第二選択薬の上乗せで 15 %は発作を抑制することが可能である[73]。残りの投薬コントロール不可能な 15 %のうち、5 %は外科的治療で発作が抑えられ、残りの 10 ~ 15 %がすべての治療において難治である。

てんかんは神経活動の興奮抑制バランスにおいて興奮が抑制に対して優位になると発作が起きることがわかっている[57]。抗てんかん薬の作用はこの抑制レベルを上げて興奮を抑えることにある。例えば、電位依存性 Na チャネルを標的としててんかんを抑制する薬剤としてはカルマゼピンやラモトリギンが挙げられる。

一方投薬でもコントロールできない場合、外科的治療が適用されるがその中でも 1970、80 年代から始まった DBS や VNS を用いたてんかん抑制は様々な研究が進められている。DBS はパルスジェネレータに接続された埋め込み電極を介して脳深部へ電気刺激を行っててんかん治療を行う方法でその効果は視床前核、海馬、小脳での刺激により大幅に改善されている[74]。海馬においては主に高周波数 (> 100 Hz) での刺激においててんかん発作が有意に減少しているが、5 Hz のような低周波刺激でもてんかんの抑制が認められた[75]。それらの抑制機構は主に Na⁺チャネルの脱分極性阻害効果が主である[76]。脱分極性阻害によるてんかん抑制は刺激部位の神経回路を

不活性化にし、さらに連続した刺激は多くの電力を消費するため刺激パターンの最適化を用いたてんかん抑制を生じさせる研究が必要である。そのため、現在用いられている θ 周波数帯のてんかん抑制と本研究で用いた β 周波数帯との比較をすることで差別化を図るとともにより良いてんかん抑制のパターンを調べた。

DBS は他にも PD、振戦、ジストニアといった運動障害やうつ病や強迫性障害といった精神障害治療にも適用されつつある[77]。最近では脳の状態に応じて即座に刺激を最適化する適応深部刺激 (Adapted DBS) が PD に対して用いられている。また、VNS も DBS と同じく埋め込まれた電極からの刺激によりてんかん治療を試みる方法であるがこちらは刺激場所が副交感神経系の左頸部迷走神経であることが DBS とは異なる。未だ不明な点も多くあるが少しずつ根拠が明らかになってきており、てんかんや、アルツハイマー、うつ病、統合失調症に効果が認められている[78][79]。また海馬 GABA レベルを調節し認知機能を高める効果もある[80][81]。

また、高周波数帯振動 (HFO) は正常な認知過程でも見られるがてんかんにおける病的な HFO (てんかん性 HFO) も見られ、てんかん原性領域の代理マーカー候補として注目されており、HFO の出現部位を考慮し外科的切除をすることで発作抑制の可能性も見いだされている[82][83]。

脳波での抗てんかんの研究も行われており、例えば θ 波がてんかんを抑制する研究は中隔へ CCh を投与することで海馬でのてんかん波が消失し θ 波へ推移したことで実証された。また同研究は 4 ~ 8 Hz の中核刺激でも同様の結果が得られたことも示した[84]。 θ 波だけでなく、 β 波もてんかん波を抑制する可能性も示されており、 β 海馬スライスを用いた研究において PTX によって誘導された interictal discharges は CCh によって β 振動に推移し、てんかんが抑制された結果がある。さらに CCh 投与により興奮性シナプス後電位 (population Excitatory PostSynaptic Potential : pEPSP) が有意に減少したことから interictal discharges の抑制には CCh によるコリン作動性

受容体活性化の減少によるものとされた[85]。しかしこのてんかんの抑制にはコリン作動性受容体活性減少のみが抑制の根本的な原因であるかどうかは研究する余地がありさらに β 波とてんかんとの関与は未だ研究が少ないことも加えて本研究では β 波とてんかん波の関与とその原因を海馬のラットスライスを用いて調査した。

1.4 海馬

1.4.1 海馬の構造と機能

海馬は記憶や学習について様々な研究が行われている部分である。まず海馬の構造について述べる。海馬は、図 3 のような落花生型の形態を持ち、大脳皮質側頭葉に位置する海馬体の一部である。海馬への入力は嗅内野からの貫通枝、内側中隔核、乳頭体上核、青斑核、縫線核から上行してくる脳弓、反対側半球 CA3 と歯状回 (Dentate Gyrus) 門から交連線維が通る腹側海馬交連がある。海馬はアンモン角 (Cornu Ammonis) と歯状回から成り立っている。アンモン角は、さらに CA1 から CA4 までの 4 領域に分けられる[86]。そして海馬には神経細胞の層構造が存在する。アンモン角と歯状回では図 4 のように神経細胞が規則的な層を構造形成している。海馬をスライスすると線状に並んだ神経細胞を見ることができる。アンモン角は、透明層・上昇層・錐体細胞体層・放線層・網状層・分子層の 6 層に分けられている。本研究では CA3 の錐体細胞層で記録を行ったが、ここに存在するのは錐体細胞 (pyramidal cell) と呼ばれる円錐形の細胞であり CA1、CA2、CA3、CA4 と続く興奮性神経が平行に並んだ密な層である。また歯状回に関しては、分子層・顆粒細胞体層・歯状回門層の 3 層に分けられている。歯状回に存在する細胞は主に顆粒細胞 (granule cell) と呼ばれる球形の細胞であり、こちらも興奮性神経である。顆粒細胞の軸索である苔状繊維 (mossy fiber) は無髄であり CA3 では放線層において、苔状繊維が歯状回を通り CA3 に入力する。また貫通枝 (perforant path) は CA1 の分子層

を貫通し、CA3に入力する。CA3の錐体細胞から出る軸索は海馬から出るが、反回する軸索側枝（Schaffer collaterals）がある。これはCA3錐体細胞からSchaffer collateralsを通してCA1に入力する。以上のように海馬では回路網を形成しており(図4)、海馬体を横断する層板状の構造単位を作ると考えられている。さらに主要軸索は次の細胞に興奮性シナプス後電位をもたらす興奮性シナプスを形成する。また海馬には次の細胞に抑制性シナプス後電位（Inhibitory PostSynaptic Potential：IPSP）をもたらす抑制性シナプスを形成するものもある。抑制には種類があり、上昇層の籠細胞（basket cell）等は錐体細胞の興奮により軸索側枝を受けて多くの錐体細胞に対してフィードバックに抑制をかける。また他に、苔状線維がある透明層等は入力繊維を直接受けて錐体細胞に抑制をかける介在ニューロンがある。これはフィードフォワードに抑制をかけている[87]。

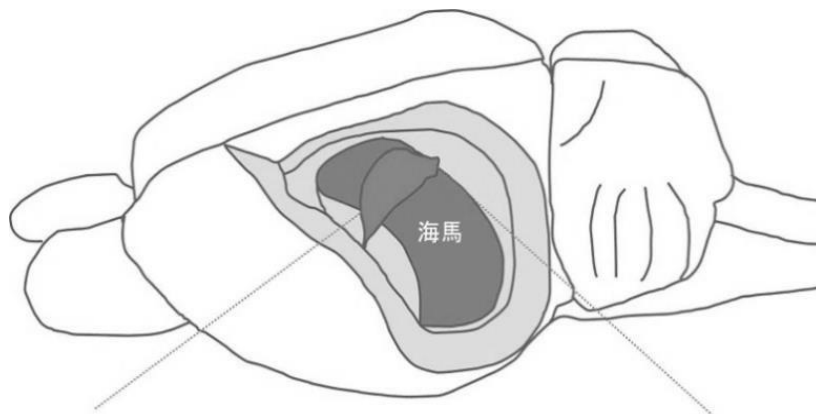


図 3 海馬の位置。大脳側頭葉の内側部で側脳室下角底部に位置する(図はラットにおける海馬の場所を示す)。

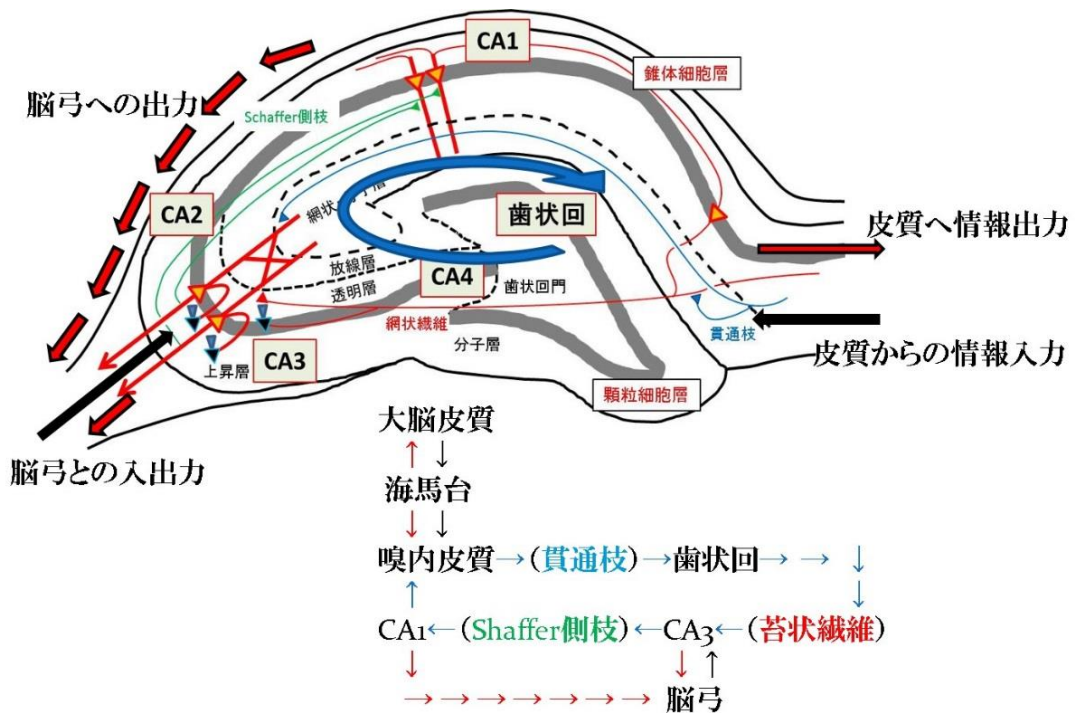


図 4 海馬の構造とネットワーク。海馬に入力された情報は CA1、CA3、DG の tri ネットワークを形成する。

1.4.2 記憶学習に關与する海馬

海馬は大腦皮質と記憶の形成や固定に密接な關係を持つ。これは兩側側頭葉内側部 (海馬や扁桃體を含む) を破壊した研究で明らかになった[88][89]。これらの研究では新規情報をもとにする作業記憶は保持するが数カ月後のその記憶はない。しかし新規記憶より過去の記憶は覚えている。また海馬破壊時に見られる健忘症候群でも短期記憶の障害が見られる。これらのことから海馬は短期的な記憶から長期記憶への転送(記憶の固定)に重要な役割を果たすことが明らかとなった。感覚情報をもとに得られた記憶はまず大腦新皮質を通り、海馬 - 嗅内皮質ネットワークに保存された後に長期的な記憶のために新皮質内に統合されると考えられている[90][91]。またラットを用いた研究においても回避タスクにおいてグルタミン酸受容体阻害薬である

AP5 や CNQX を海馬と嗅内皮質に注入すると健忘症を引き起こし、テストパフォーマンスを低下させたことから記憶の形成や探索には海馬と扁桃体におけるグルタミン酸受容体の活性が必要であることがわかっている[92]。また最近の治験ではエンGRAM細胞の活性が記憶の想起に関わることが示されている。エンGRAM細胞は”学習”として永続的な変化をし、再活性化により記憶の想起をもたらすとされている。恐怖条件を用いてラベル化された海馬エンGRAM細胞を光刺激により活性化することで恐怖条件におけるフリージングを誘発する可能性が示された[93]。さらに新皮質の前頭前野エンGRAM細胞が海馬-嗅内皮質ネットワークと扁桃体両方から入力を紹介した初期学習中にも生成されることが判明した[94]。これにより新規学習にて新皮質と海馬ネットワークに一時的に情報が保持され長期記憶への移行の際に新皮質への移行が可能になる記憶学習のメカニズムが明らかになった。

以上のことから新規記憶固定や学習、記憶の想起において海馬の活動は重要である。

1.5 アデノシン

1.5.1 アデノシンの代謝と役割

アデノシンやアデノシン三リン酸 (Adenosine TriPhosphate : ATP) 等のプリン化合物は中枢神経系の細胞から放出され、様々な細胞の受容体を介して神経の機能に作用することは 80 年以上前に行われた心臓へのアデノシン注射が呼吸異常を誘発し無気力と睡眠を導いた報告から目されている[95]。その後の研究によりアデノシンは神経細胞とグリア細胞から放出され、覚醒から睡眠への誘発効果や覚醒から睡眠した際の睡眠時間と深さ調節、神経保護、記憶学習、脳の血液循環といった生理的なものから[96]–[98]てんかんや虚血、アルツハイマー病といった病的なものまで関与することが判明した[99]–[101]。

細胞内ではアデノシンは ATP が NTP Dase により 5'アデノシン 1リン酸 (AMP) に変換され、その後 5'N Tase により AMP からアデノシンへと変換される。また SAH hydhrase により S - アデノシルホモシステイン (SAH) から生産される。細胞内アデノシンはアデノシンキナーゼにより AMP に、アデノシンデアミナーゼによりイノシンと NH₃ に変換される。生産されたアデノシンはトランスポーターにより細胞外に放出される。この放出は虚血、低酸素、てんかん発作によりアデノシン放出が増加することがわかっている[102]。さらに重要なことに、アデノシンは細胞表面に存在するエクトヌクレオチダーゼにより細胞内から放出された ATP を Ecto - NTPDase1 により AMP に、変換された AMP は Ecto - 5'N Tase によりアデノシンに変換することもわかっている[103] (図 5)。エクトヌクレオチダーゼによるアデノシン生産は非常に高速で (約 1 ms) あり、細胞外アデノシンは隣接する細胞に作用して機能調節を行うが残りはトランスポーターにより細胞内に再取り込みされ、低濃度の細胞外アデノシン (25 ~ 250 nM) に調節される。

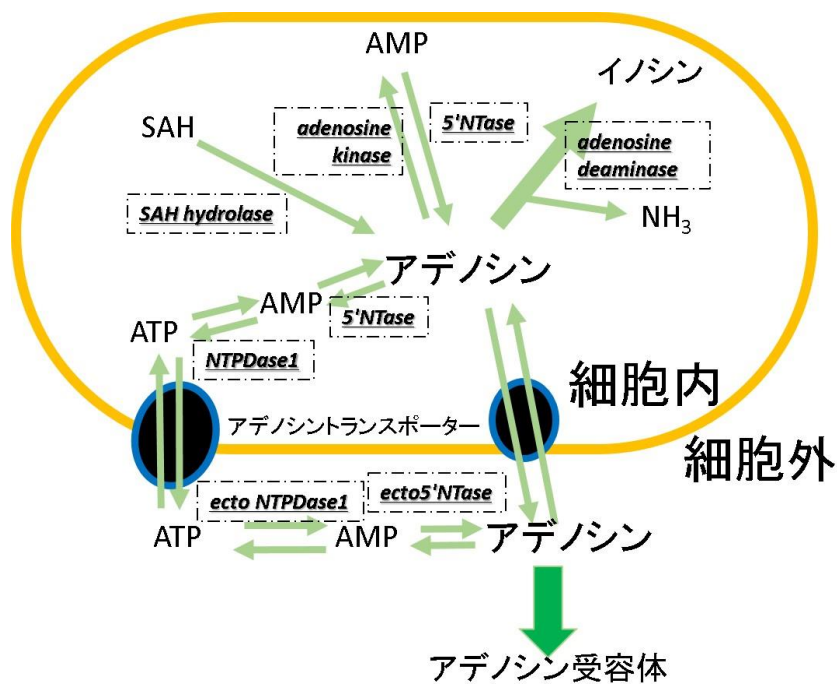


図 5 アデノシンの代謝。アデノシンは細胞内と細胞外で作られる。

1.5.2 アデノシンの神経系への影響

アデノシンをリガンドとするアデノシン受容体 (P1R) は G タンパク質共役受容体 (GPCR) の受容体で 4 つの異なるサブタイプ (A1R、A2AR、A2BR、A3R) が存在する[104]。古くからアデノシンシグナル伝達はサイクリック AMP (cAMP) を生成するアデニル酸シクラーゼの抑制または活性化によるものとされている。A1R および A3R は Gi/o タンパク質とリンクしアデニル酸シクラーゼを抑制し、A2A および A2B は Gs タンパク質とリンクしアデニル酸シクラーゼを活性化する[105][106]。

A1R は海馬と皮質で前シナプスに最も発現して線条体では中程度にしか発現しないが A2AR は線条体で最も発現して海馬、皮質は僅かである[107][108]。また A2BR は結腸、直腸、膀胱で高い発現を示し、脳では見られない。A3 は肺、肝臓、心臓などの末梢器官で主に発現し、脳では海馬と小脳で僅かに見られる。この発現の違いは機能的に重要であり PD 運動障害の改善への対象となっている。

アデノシンは多様な A1R、A2RA メカニズムを介して海馬ネットワークに効果を及ぼすことがわかっている。

A1R を介してアデノシンは前シナプスのグルタミン酸放出を減少させ後シナプスの G 蛋白質活性化型内向き整流性カリウムチャンネル (G protein - activated Inwardly Rectifying potassium (K) channel : GIRK) を活性化により興奮性グルタミン酸作動性伝達を抑制し NMDAR を調節している[109]。また、A2AR ではグルタミン酸放出を増加させ、AMPA を調節することで興奮性を高める。アデノシンは海馬の GABA 作動性伝達も調節することがわかっている。A1R の活性化により持続的な伝達を介するシナプス外 GABA_AR を活性化する、この作用は錐体細胞と CB₁R⁺/CKK⁺介在神経で発生する。A2AR の活性化はパルブアルブミン (parvalbumin : PV) 神経から他の介在神経への GABA 放出を増加させることで錐体細胞の脱抑制と海馬の興奮性を

増加させる。また、アデノシンはグリア機能と神経終末に影響を与えることにより前、後シナプス周辺に作用する。

GABA 輸送体 GAT - 1 は主に GABA 作動性前末端で発現され、A2AR 活性により GABA の輸送が増強され GABA の放出が促進される。A1R、A2AR を介した GAT - 1、GAT - 3 の GABA 取り込みは細胞外アデノシンの濃度に依存する。低濃度アデノシンは A1R 活性化によりアストロサイトへの GABA 取り込みを阻害し、逆に高濃度のアデノシンは A2R 活性化により GABA 取り込みを促進することで細胞外アデノシン濃度を調節している。アストロサイトにおける A1R と A2AR のヘテロマー化のメリットは受容体過剰な活動が機能全体の内在化につながるため、抑制と興奮の両面を機能させることで全体の急激な変化を防ぐことができる。

これら A1R、A2R の機能や役割を解明するために **caffeine** が用いられる。**caffeine** は非選択的アデノシン受容体拮抗薬でありコーヒーや緑茶などに含まれ、**caffeine** の適量摂取は注意力と精神及び認知能力の安定効果があり、さらにはてんかん発作を減少させる結果やアルツハイマー病の記憶力低下を予防する可能性があると報告されている[110]-[112]。しかし高濃度の摂取は不安や不快感、不眠症やてんかん発作の悪化を誘発する[113][114]ことからアデノシン受容体活性の両側面が見つかっている。

caffeine による海馬スライスにおけるシナプス伝達と可塑性についても報告があり、**caffeine** がアデノシン受容体に拮抗することによりシナプス伝達を 40 %程促進させたが LTP を 35 %減少させた。さらに **caffeine** によるこれらの効果は A1R がシナプス伝達に関与し、A2AR は LTP に関与することも示されている[115]。

以上のことからアデノシンはさまざまな生理学的だけでなく病理学的プロセスを調節することがわかっている。

2 目的

海馬で見られる脳波のうち θ 波や β 波は記憶学習と深く関係しており、これらは中隔核からの ACh 作動性及び GABA 作動性神経の投射により誘導される振動現象であるものと考えられており、さらに皮質や視床とも密接している。この神経活動の同期振動現象は海馬内ネットワークのみでも形成されることがわかっており、中隔核等からの入力を遮断した海馬スライスに ACh 受容体作動薬である CCh を還流投与することで θ 波や β 波を振動現象として誘導され、再現することができる。一方、病理学的な脳波のうちてんかん波はてんかん症状の発作中に interictal discharges や ictal discharges として見られる。これらは神経細胞の異常同期によるものと考えられており、興奮性の異常活性や抑制性神経の欠落が原因であることも判明している。さらには海馬内でも epileptic discharges は確認されており、海馬もまたてんかん発作発生の原因の 1 つであることがわかっている。 β 振動と同様にてんかん波も海馬スライスにおいて interictal discharges や ictal discharges として再現可能で本研究では抑制性神経である GABA_AR を阻害することで再現した。 θ 波がてんかんを抑制する結果や可能性は多く示されている、一方で β 波もてんかんを抑制する可能性が示されておりその原因は神経伝達の減少である可能性が示唆されているが、てんかんの抑制に関して振動現象の存在は有効であるかどうかは未だ不明な点がある。そこで本研究では β 波とてんかんの波形を海馬スライスで再現しその関係性と中枢神経系の様々な機能に關与するアデノシン受容体との関係性を調べた。

3 方法

本実験は、九州工業大学大学院生命体工学研究科、動物実験委員会の承認（生 2019-003）を得て、委員会作成ガイドラインに従って実験を行った。

3.1 測定環境

本研究ではスライスしたラットの海馬を保存及び測定するための測定チャンバー（図 6 図 7）を用いた。右側をスライス測定用に、左側をスライス保存用のレーンとして使用した。各レーンには人工脳脊髄液（Artificial Cerebro Spinal Fluid : ACSF）をポンプ及びチャンバー内のヒーターにより 33.5 °C、マイクロチューブポンプ（東京理化器械株式会社、MP-1000）を用いて流量 1.5 ml / min で還流するよう設定した。

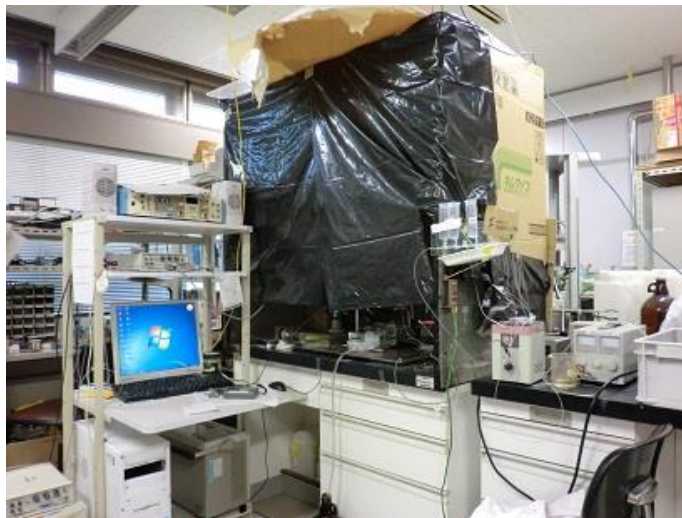


図 6 電気生理実験系。空調設備の影響を最小限にし、外光によりスライスにおける場所の特定を阻害されないため黒色マルチシートで覆った。

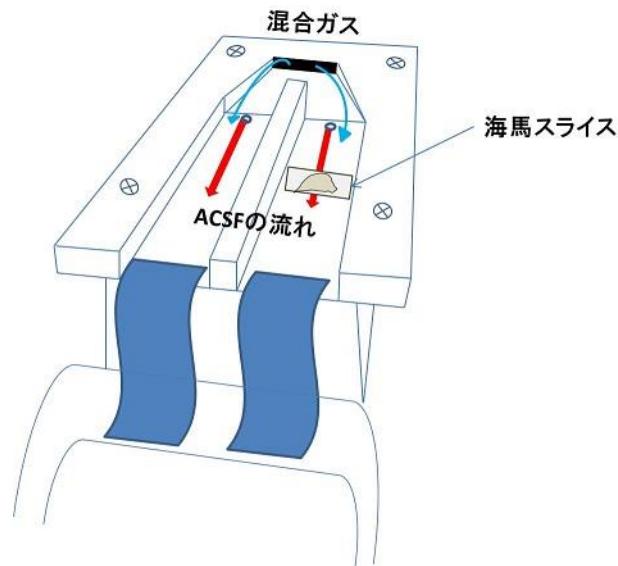


図 7 測定用チャンバーの模式図。チャンバー内は常に温度と流量固定されており、95 %O² - 5 %CO² 混合ガスを通気している。また図には示していないが保存及び測定時にはチャンバーに穴の空いた蓋をし、スライス乾燥や酸欠による細胞死を防いだ。また測定では穴から電極を差し込み測定した。

3.2 海馬スライス標本作製

本実験では Wistar 系の雄ラット (3~5 週齢、体重 70~200 g) から作成した海馬スライスの標本を用いた。海馬スライス標本の作製は次の心臓打撲法と呼ばれる脳摘出方法を用いて行った。

スライス標本の保存液、灌流液として用いた ACSF の組成は以下の通りである。

(単位 : mM) 124 NaCl, 5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 2 MgSO₄, 26 NaHCO₃, 10 Glucose, 2 CaCl₂

ACSF 作製のための試薬は、全て和光純薬工業株式会社より購入した。

心臓打撲法

1. 流量 1.5 ml / min のイソフルランで 3.5 min ~ 5.5 min 程麻酔して完全に眠らせた後、ラットの心臓を圧迫して心臓を停止させた。
2. 速やかに開頭し小脳から大脳にかけて摘出し、氷冷させた ACSF に保存した。

スライス作成方法

1. メスを用いて大脳と小脳を分離した後、脳梁を切断し左右両半球に分離した。
2. 分離した左半球は再び氷で冷やした ACSF に冷却保存した。その後、半球切断面を下にし、海馬が長軸方向と垂直になるようにマイクロスライサー台（堂坂 EM 社製 D.S.K.Microslicer Zero1）へ固定後、厚さ 450 μm でスライスを作製した。
3. スライスの海馬以外の部分はメスを使いトリミングし、図 8 のような海馬スライス標本を作製した。
4. スライス標本は $33\pm 1^\circ\text{C}$ で保温したインキュベーターで保存した。また、海馬スライス標本はスライス作製時のダメージからの回復を考慮して 1 時間 30 分チャンバー内で ACSF 還流保存した。

3.3 細胞外記録実験法

細胞外記録電極には 2 M NaCl を充填した抵抗 1.0 ~ 2.0 M Ω のガラス微小電極（Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG 社製）を用いた。記録電極からのシグナルは増幅器（CYGNUS Technology 社製）で 1000 倍に増幅し ER - 1 細胞外アンプ（CYGNUS Technology 社製）を用いて 1 Hz ハイパス及び 300 Hz ローパスフィルターを通した後、解析ソフトウェア（LaBDAQ2000、松山アドバンス社製及び Clampfit10.3, Axon Instruments 社製）でサンプリング周波数 1000 Hz でデジタル化し波形を取り込み、5 分間のデータを連続記録した。全ての記録において ACSF のみのデータをスライスの control として取得した。

3.3.1 薬品誘導 β 波及びてんかん波測定法

記録電極は CA3 の錐体細胞層 (stratum pyramidale) に設定し細胞外記録を行った。CCh 誘導 β 振動やてんかん測定、アデノシンの関与の実験は基本的にこの場所で記録した。

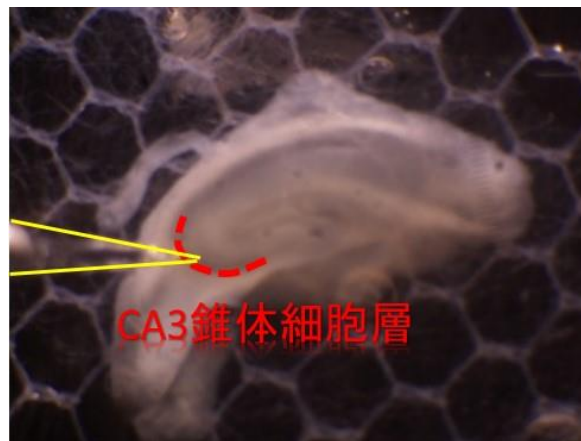


図 8 海馬スライス標本と記録電極位置。赤色破線は CA3 錐体細胞層を示し、黄色は記録電極を示す。

この実験では CIBO 誘導実験、てんかん様発火誘導実験、CIBO とてんかん様発火関与実験、mAChR との関与実験、PIR との関与実験を行った。プロトコルを図 9 にまとめる。

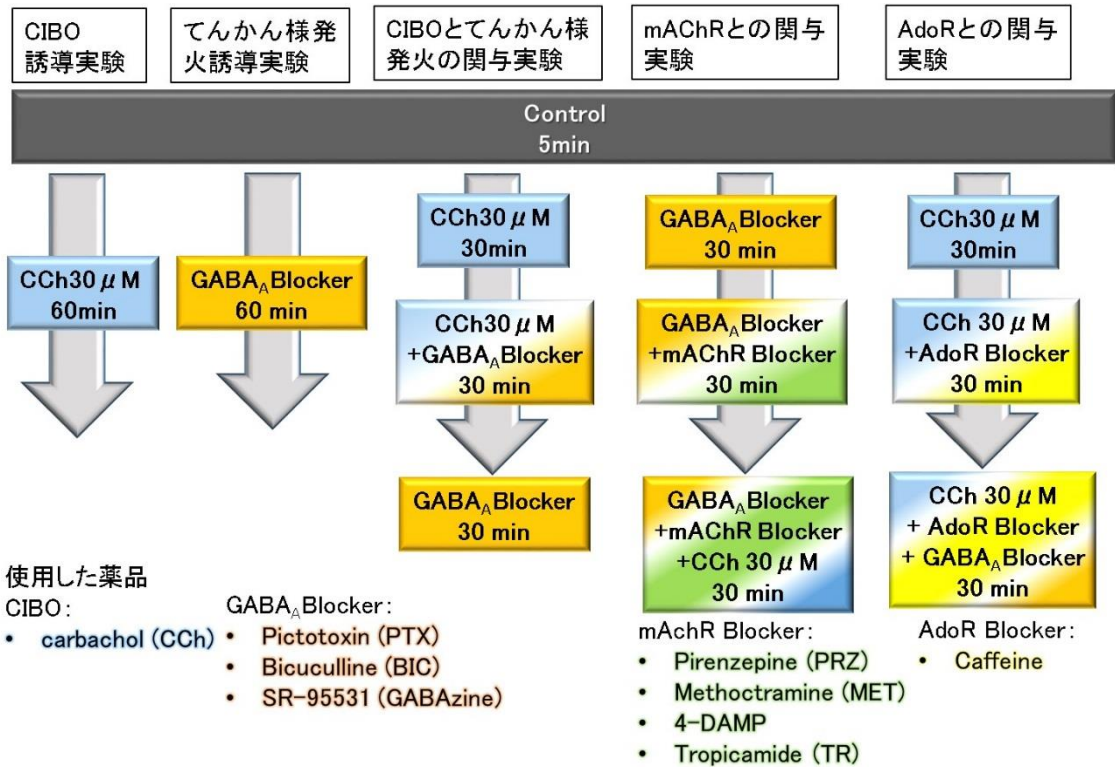


図 9 薬品誘導 β 波及びてんかん波測定法実験プロトコル。mAChR：ムスカリン性アセチルコリン受容体。PIR：アデノシン受容体。

3.3.2 海馬ミニスライスを用いた発生源実験法

今回の研究では β 波や discharges の発生源を特定するために、スライス作成方法の 3 の過程において DG、CA1 を含めたスライスと CA3 のみのスライスに切り分け、海馬分離スライス標本も作製した(図 10)(図 11)。

発生源解析の測定は control において CA3 測定を 10 分行った後、30 μ M CCh または 10 μ M PTX、BIC、GBZ を 30 分間投与し、電極を CA1 に移動させ 10 分、最後に DG へ移動させ 10 分の順に測定を行った。CCh または GABA_A 受容体阻害薬品投与後 30 分後に control と同じ過程で行った。

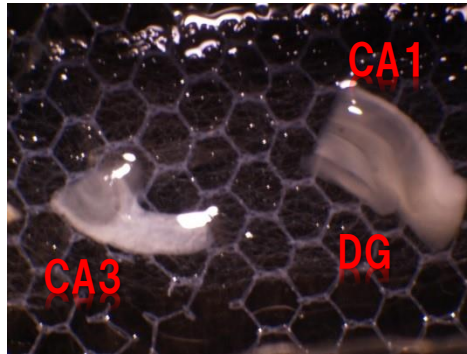


図 10 海馬ミニスライス標本。CA3 のみと CA1 - DG スライスを分離し、同じシート上で保存及び測定した

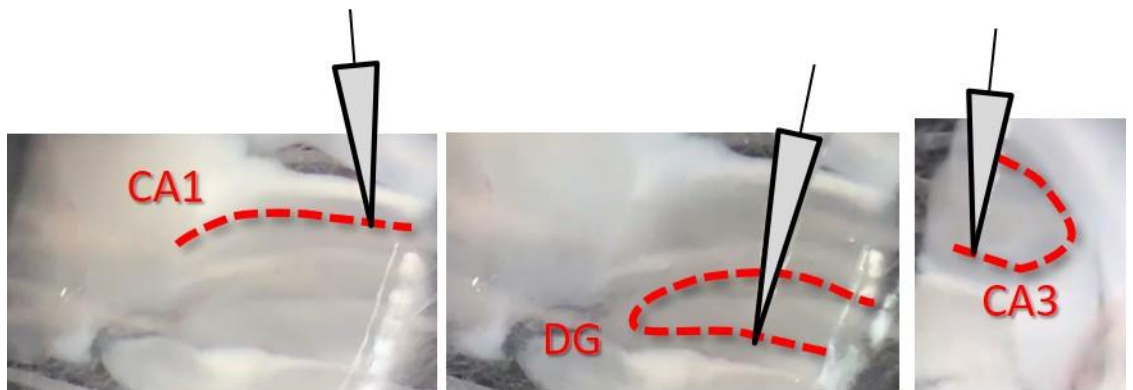


図 11 発生源実験での電極位置。灰色の三角は電極を、赤色線は測定部位の層を示す (左) CA1 錐体細胞層 (中) DG 顆粒細胞層 (右) CA3 錐体細胞層。

3.4 電気刺激を用いた実験方法

刺激電極は外径 300 μm の同心円双極性刺激電極 (FHC 社製、CBDPF75) を用いて Schaffer collaterals に配置し刺激を行い(図 12)、電流刺激は電気刺激装置 (日本光電 SEN 3301) とアイソレータ (日本光電 SS 202J) を用いた。刺激頻度はコントロール状態では 1 分に 1 回の間隔を設けて調節した。記録部位は実験内容によって異なるが CA3 領域であることは共通である。

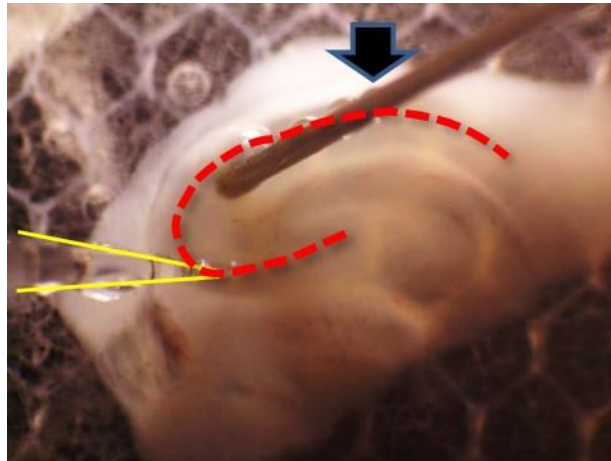


図 12 刺激電極と記録電極の配置。電気刺激を用いた実験では刺激電極（舌矢印）は CA3 から CA1 への入力線維である Schaffer collaterals に配置し、逆行性に刺激を行った。黄色：電極、赤色：錐体細胞層

3.4.1 興奮性シナプス後電位（pEPSP）実験法

CA3 でのシナプス伝達度合いを測るために、電気刺激を用いて pEPSP を誘発させる方法を用いた実験を行った。記録電極は CA3 放線層（stratum radiatum）に配置された。刺激強度は最大振幅の 50% の振幅で pEPSP を誘発するように調整され、実際は 2 - 300 μ A であった。トリガ 10 ms 後に刺激が行われ、持続時間は 200 μ s の単発刺激で得られた。シグナルは細胞外記録法と同様に 1000 倍に増幅させた。1 Hz ハイパス及び 3 kHz ローパスフィルターを通してサンプリング周波数 10 kHz に設定された。刺激後 3 ~ 4 ms 後に見られる負の成分の slope と Amplitude を pEPSP の指標とした(図 13)。CCh 濃度依存による pEPSP 実験については投与 30 分後の状態を比較した。振動が見られた際には IBI の半分のタイミングで pEPSP を測定した。

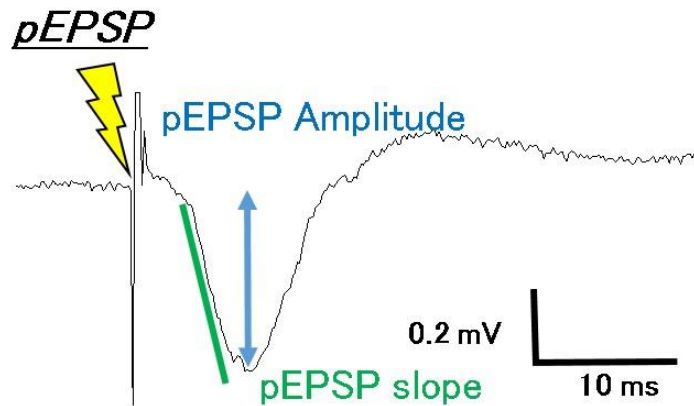


図 13 pEPSP 測定に用いられた指標。刺激 3~4 ms 後に見られる最初の負成分を解析した。

3.4.2 Burst 電気刺激実験法

CIBO での IBI 中の振動現象誘導を電気的な Burst 刺激による誘導率を調べる実験を行った。記録電極は CA3 錐体細胞に配置された。CIBO が誘導されてから 30 分後に Burst 電気刺激実験を開始した。トリガ 10 ms 後に刺激が行われ、持続時間は 200 μ s、Interval : 10 ms (100 Hz) を 100 回刺激行った。シグナルは細胞外記録法と同様に 1000 倍に増幅させた。1 Hz ハイパス及び 3 kHz ローパスフィルターを通してサンプリング周波数 10 kHz に設定された。この刺激を行った Phase は Nishimura ら[116]の研究をもとに行われた (図 14)。

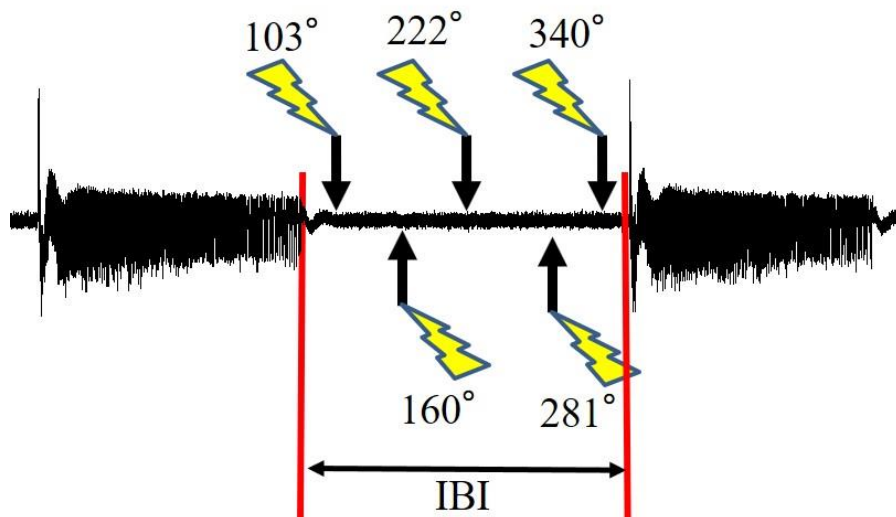


図 14 Burst 電気刺激実験法。この実験では CIBO の IBI に Burst 電気刺激を行い振動誘導の有無を調べた。

3.4.3 周波数電気刺激実験法

CIBO を電気刺激としててんかんが誘導されている海馬スライスに適用する実験も起こった。記録電極は CA3 錐体細胞層に配置され、刺激強度は最大振幅で行った。刺激パラメータは CIBO によって得られた parameter を基に設定され、トリガ後 10 ms 後に刺激が start し、刺激単発持続時間 200 μ s、刺激間隔(Interval) 60 ms (16.6 Hz)、刺激強度 500 - 1000 μ A を 150 回刺激することで刺激時間(Stimulation duration) 9 s をまとめて 1 セットとし、次のセットの刺激までの間隔 (Stimulation interval) を 23 s に設定し、これを β 周波数帯電気刺激として 10 セット繰り返し行った (図 15 上)。また θ 周波数帯電気刺激として Interval のみを 125 ms (8 Hz) に設定しこれを θ 周波数帯電気刺激とした(図 15 下)。

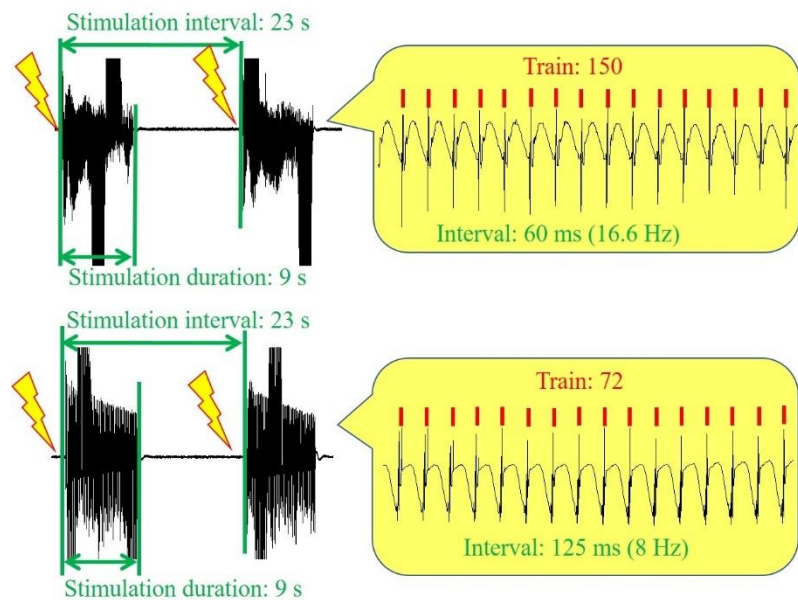


図 15 周波数電気刺激。(上左) β 周波数帯電気刺激とそのパラメータ。(上右) 刺激開始部分の拡大図。(下左) θ 周波数帯電気刺激とそのパラメータ。(下右) 刺激開始部分の拡大図。赤は刺激箇所を示す。刺激間隔の Interval のみを θ 周波数帯になるように変更した。

この実験ではまず $5 \mu\text{M}$ GBZ によりてんかん様発火を 30 分間誘導させた。その後周波数電気刺激を行う実験または Stimulation interval (control : 23 s) を 39 s に長く設定し周波数帯電気刺激を行った。また、アデノシン受容体やそのサブタイプとの関与を調べるために、てんかん様発火を 30 分間誘導させた状態での周波数帯電気刺激を行い刺激終了後再びてんかん波が誘導されたことを確認した後、GBZ と各種阻害薬を混合した溶液を投与し 30 分後に周波数帯電気刺激を行った(図 16)。

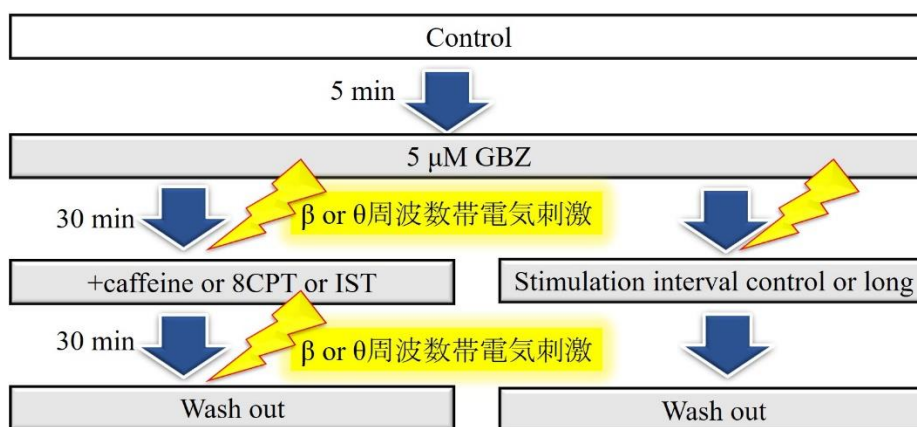


図 16 周波数帯電気刺激実験プロトコル。

3.5 統計解析手法

データ解析は、Clampfit 10.3 (Axon Instruments) を用いて行った。

3.5.1 薬品誘導による波形の解析方法

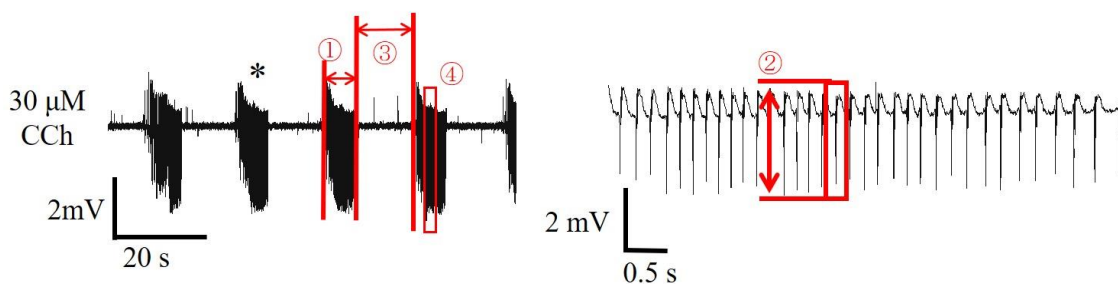


図 17 振動パラメータ解析方法。(左) 解析に用いた典型例を示す。(右)*
の拡大図

振動パラメータとして下記項目を解析した。

- ① Duration: 振動の開始から終了までの時間を持続時間 (Duration) と定義した。
- ② Amplitude: 周波数安定期間における時間窓での $mV [max] - mV [min]$ を振幅として定義した (安定期間の詳細は④参照)。
- ③ Inter Burst Interval (IBI): 振動終了から次の振動開始までの時間を IBI と定義した。

- ④ Period : interictal discharges が終了して次の interictal discharges 開始までの時間を Period と定義した。
- ⑤ CCh 誘導振動現象における周波数解析はスパイク周期の逆数を周波数としてプロットすると図 18 のように振動が誘導されてから 2000 ms - 3000 ms で安定することがわかった。

そこでその安定している期間の 1024 ms 時間窓に Clampfit 10.3 内の高速フーリエ変換 (Fast Fourier Transform : FFT) 解析を適用することで周波数ピークパワースペクトルを求めた (図 19)。

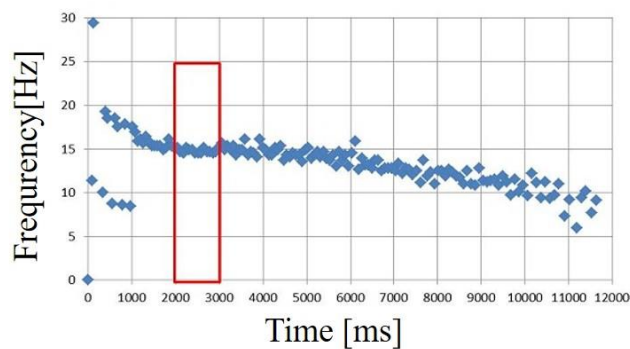


図 18 振動内周波数の経時変化。FFT 解析は赤で囲まれた周波数プロットの時間帯を選択し、振幅と共に解析対象とした。

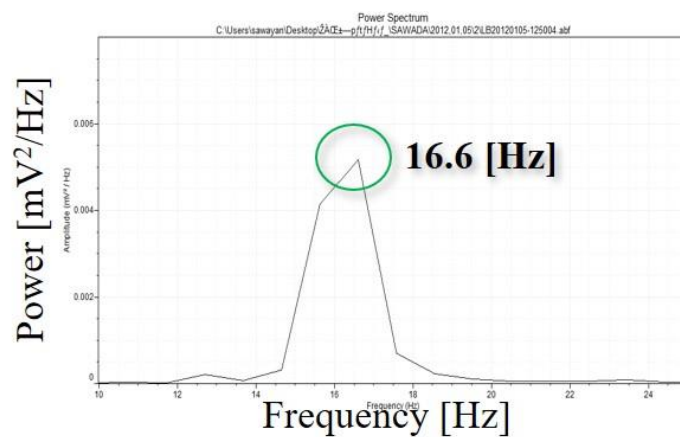


図 19 FFT 解析結果。パワースペクトルのピークを振動の周波数と定義した。

3.5.2. 周波数帯電気刺激における解析

周波数帯電気刺激による抑制可能かどうかは刺激終了後から次の刺激までにてんかん様発火が誘導されるか否かで判断した。

刺激終了後に再度てんかん波が誘導されたが、その誘導されるまでの時間を(Recovery time) Δt [s] と定義した。また薬品投与前 (pre drug) と投与後 (post drug) の Δt [s] を pre drug から post drug の値で割ることで Δt -relative として相対的に比較した(式 1)。

$$\Delta t\text{-relative} = \Delta t(\text{pre drug}) / \Delta t(\text{post drug}) \dots \dots (\text{式 1})$$

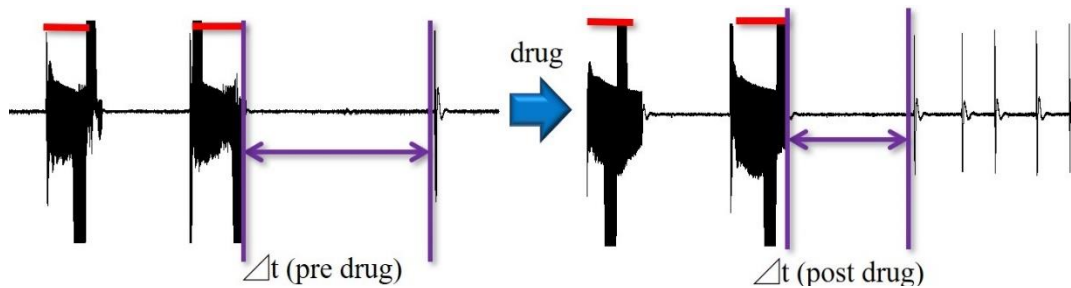


図 20 電気刺激における解析。刺激(赤)終了後から再度てんかん様発火が誘導されるまでの時間を Δt とした。(左)薬品投与前と(右)投与後の典型例。

3.6 使用薬品

使用した薬品は以下の通りである。

表 1 使用薬品と作用。()内は本文における略語を示す。

薬品名	作用
4-DAMP	M3 selective antagonist
8-cyclopentyl-1,3-dimethylxanthine (DPCPX)	Adenosine Receptor A1 antagonist
8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (8CPT)	Adenosine Receptor A1 antagonist
Atropine sulfate	mAChR antagonist
Bicuculline (BIC)	GABA _A R antagonist, Ca ²⁺ activated K ⁺ channel blocker
Caffeine	Adenosine Receptor P1R antagonist
Carbachol (CCh)	AChR agonist
D-Tubocarine Chloride	nAChR antagonist
Istradefylline (IST)	Adenosine Receptor A2A antagonist
Methoctramine (MET)	M2 selective antagonist
Picrotoxin (PTX)	GABA _A R antagonist
Pirenzepine (PRZ)	M1 selective antagonist
SR-95531 (GBZ)	GABA _A R antagonist
Tropicamide (TRP)	M4 selective antagonist

使用薬品は Sigma、Wako から購入した。あらかじめ高濃度でストックし、薬品を灌流前に解凍した後 ACSF に溶解させ海馬スライスに投与した。

4 結果

4.3 薬品誘導海馬神経活動

4.3.1 Carbachol (CCh) 誘導 β 振動 (CIBO)

ラットの海馬スライスに $30 \mu\text{M}$ CCh を灌流投与すると、5-10 分後から振動現象が誘導された。誘導されて 10 分までは振動が不安定な状態であるが、30 分以降は振動現象が安定し少なくとも 90 分は間欠的な振動現象が誘導され続けていた(図 21)。

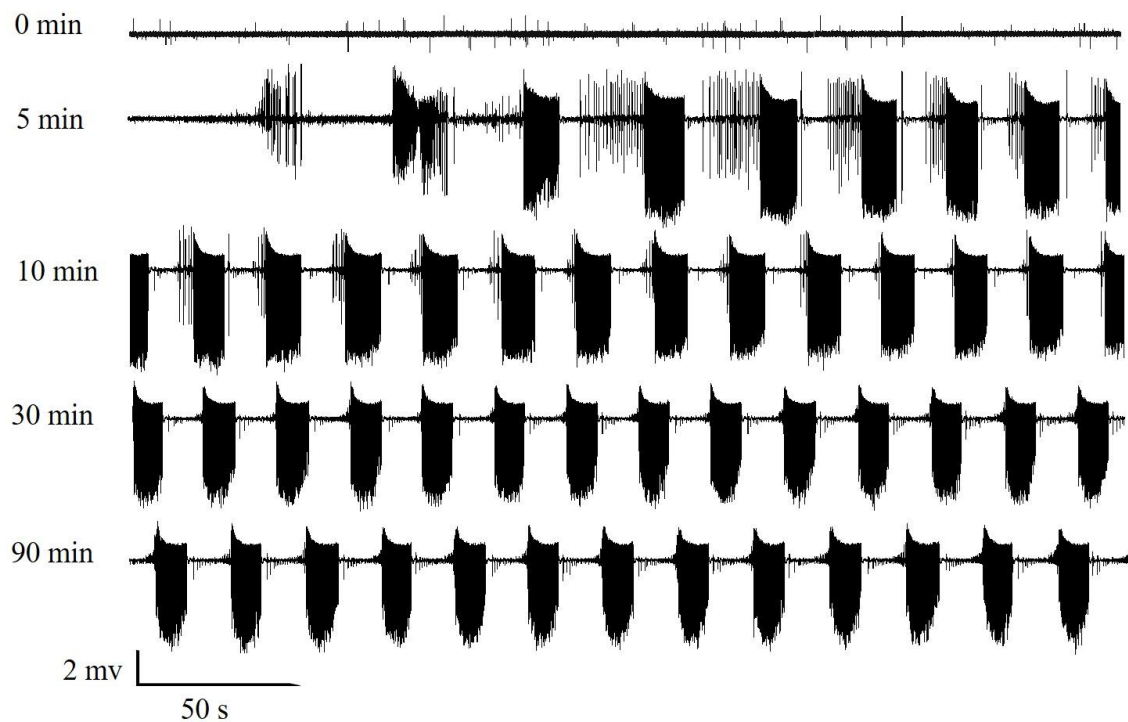


図 21 $30 \mu\text{M}$ CCh によって誘導された振動現象。振動は 5-10 分以内に形成され、その後 90 分は持続された。

3.5 統計解析手法で前述した解析方法に従って、振動の周波数は FFT 解析を用いて解析された。この振動のピーク周波数を求めたところ 16.6 Hz でありこの振動は β 振動であると判断した。 β 振動の持続時間、振幅、IBI、周波数の平均パラメータはそれぞれ 9.31

± 1.70 s、 2.97 ± 0.457 mV、 19.5 ± 4.36 s、 16.5 ± 0.997 Hz (n = 26、平均値 \pm 標準平均誤差)であった。

さらに、振動が誘導されてから 5 分毎の振動パラメータを解析し振動直後(0 min)のパラメータを基準として相対比較を行ったところ、いずれのパラメータにおいても有意な差は見られず経時的な変化は見られないことが確認された(図 22)。(n = 5、ANOVA、Duration p = 0.63、Amplitude p = 0.96、IBI p = 0.99、Frequency p = 0.97)

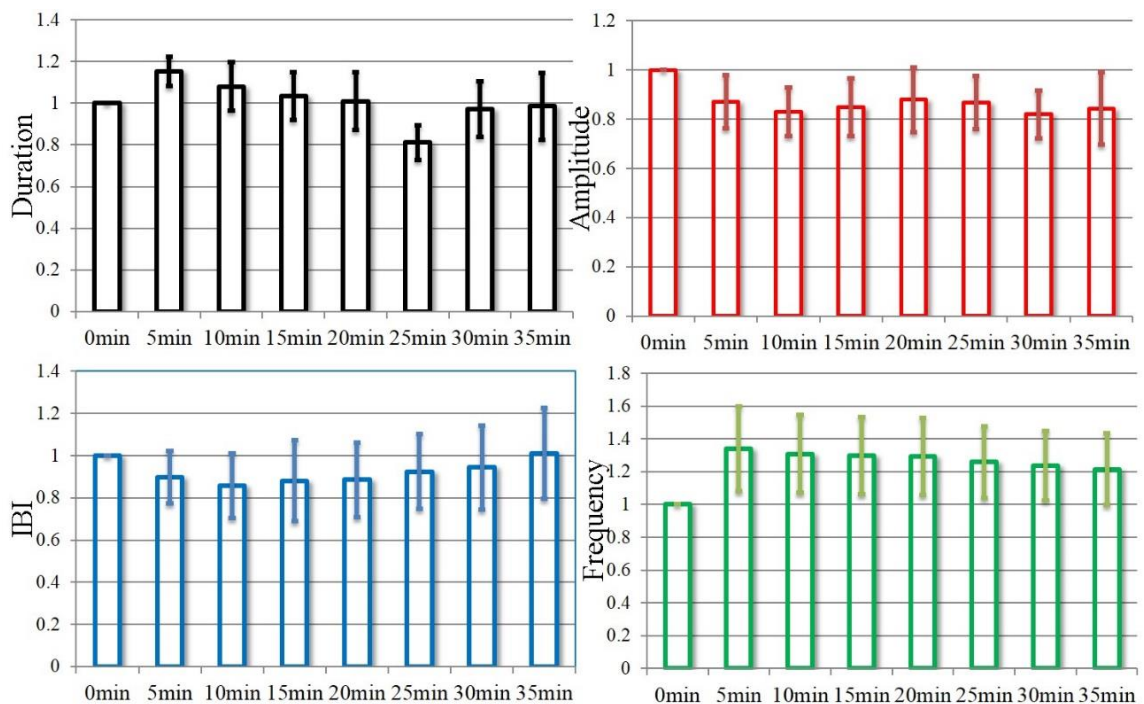


図 22 振動後 5 分毎のパラメータ相対比較。投与して誘導された最初の振動を基準として 5 分毎の相対値を求め比較を行った。

4.3.2 てんかん様発火に対する薬物依存性と濃度依存性

海馬スライスに GABA_AR 阻害薬(PTX、BIC、GBZ)を投与するといずれにおいても Duration が 2 s 以上の長い ictal discharges とそれ以下の短い interictal discharges が確認された (図 23)。

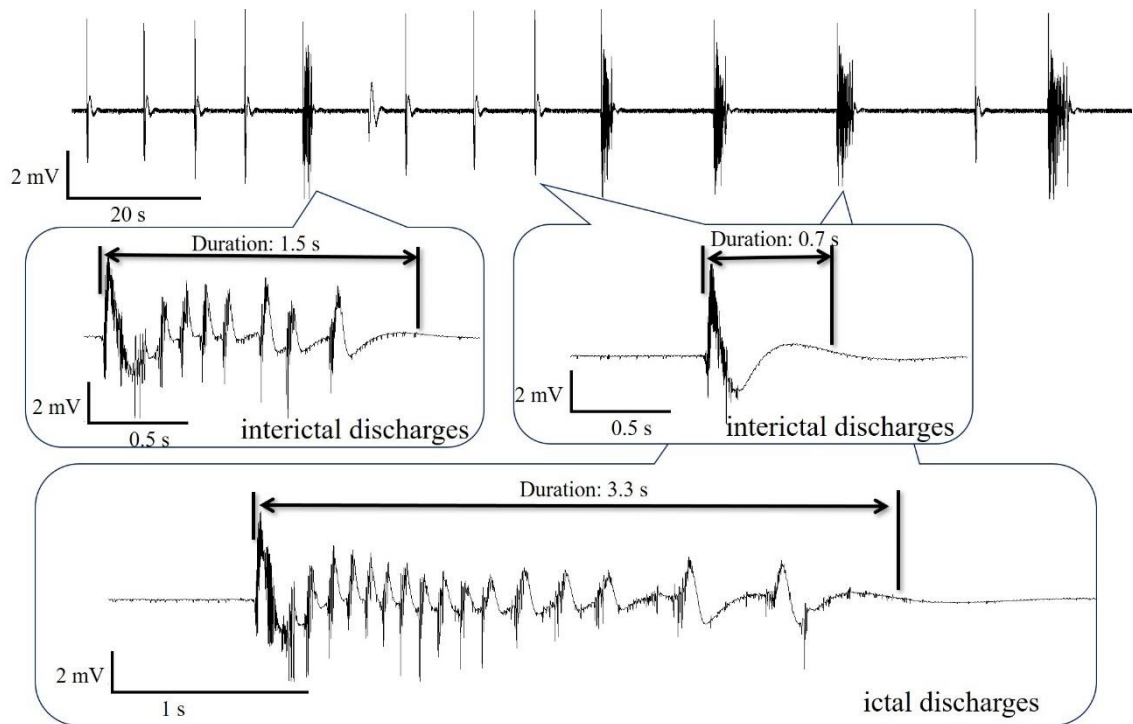


図 23 GABA_AR 阻害薬投与で見られる ictal discharges (下段)、interictal discharges (中段)。

PTX

まず PTX の結果を述べる。PTX を 0.2 μ M、2 μ M、10 μ M、20 μ M で投与すると、interictal discharges は 0.2 μ M 以上で、ictal discharges は 2 μ M 以上で誘導された (図 24) (0.2 μ M n = 4、2 μ M n = 4、10 μ M n = 5、20 μ M n = 5)。ictal discharges と interictal discharges の Duration、Amplitude、IBI または Period、Frequency はそれぞれ表 2、表 3 のようになった。また ictal discharges の各パラメータを濃度別に比較を行ったところ、全てにおいて有意な差は見られなかった(図 25 PTX 誘導 ictal discharges の濃度依存性。(ANOVA、Duration p = 0.29、Amplitude p = 0.40、IBI p = 0.12、Frequency p = 0.56、全て n = 3) (ANOVA、Duration p = 0.29、Amplitude p = 0.40、Period p = 0.12、Frequency p = 0.56))。

同じく interictal discharges についても濃度別に比較したところ全てにおいて有意な差は見られなかった(図 26) (ANOVA、Duration $p = 0.68$ 、Amplitude $p = 0.56$ 、Period $p = 0.20$ 、Frequency $p = 0.54$)。これらの結果から PTX 誘導の ictal discharges は interictal discharges のパラメータには濃度依存性がないことが示された。

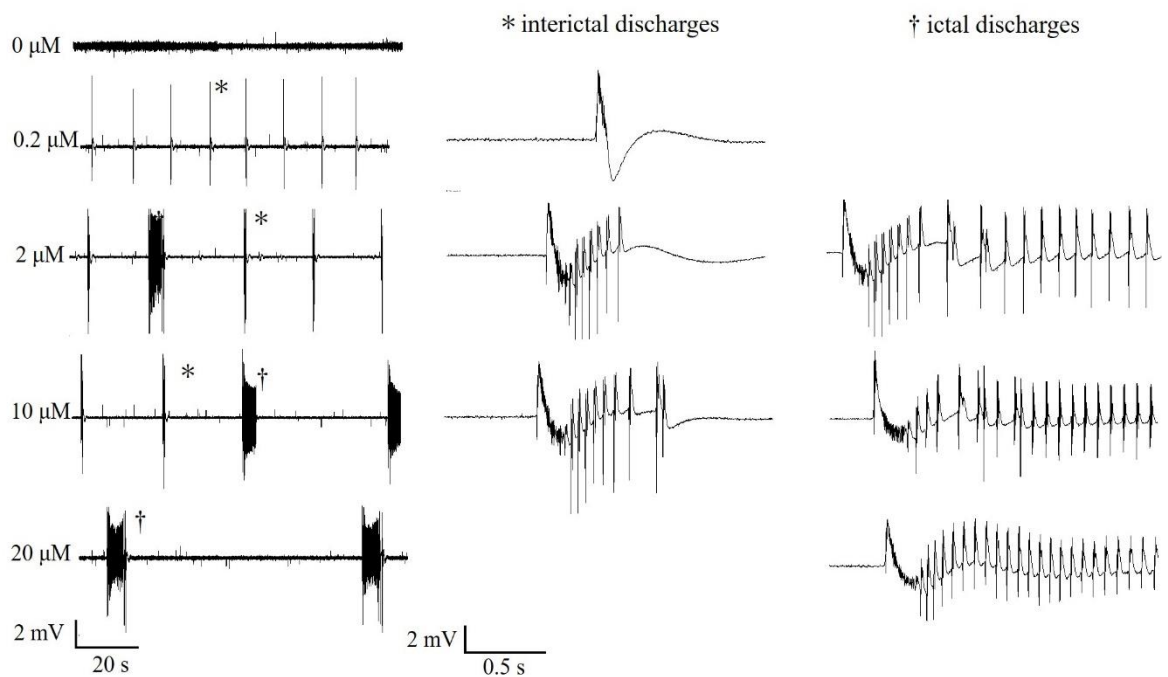


図 24 濃度別 PTX 誘導 ictal discharges(†)と interictal discharges(*) (データは投与 60 分後の典型例を示す)。中縦と右縦の列は拡大図を示す。

表 2 PTX 誘導 ictal discharges 濃度別平均パラメータ(平均値 ± 標準平均誤差)

ictal	Duration [s]	Amplitude [mV]	IBI [s]	Frequency [Hz]
2 μ M	6.87 ± 0.18	5.95 ± 2.03	69.26 ± 19.27	9.84 ± 0.56
10 μ M	4.47 ± 1.70	5.26 ± 1.97	44.21 ± 12.01	12.15 ± 0.39
20 μ M	4.45 ± 0.96	3.51 ± 0.57	50.18 ± 10.05	8.89 ± 0.66

表 3 PTX 誘導 interictal discharges 濃度別平均パラメータ

interictal	Duration [s]	Amplitude [mV]	Period [s]	Frequency [Hz]
0.2 μ M	1.22 \pm 0.15	3.54 \pm 1.70	9.68 \pm 2.09	0.10 \pm 0.02
2 μ M	1.50 \pm 0.01	7.28 \pm 3.28	10.72 \pm 4.40	0.10 \pm 0.03
10 μ M	1.46 \pm 0.24	5.22 \pm 1.64	13.81 \pm 5.16	0.10 \pm 0.03
20 μ M	1.32 \pm 0.08	3.63 \pm 0.63	27.38 \pm 9.17	0.05 \pm 0.003

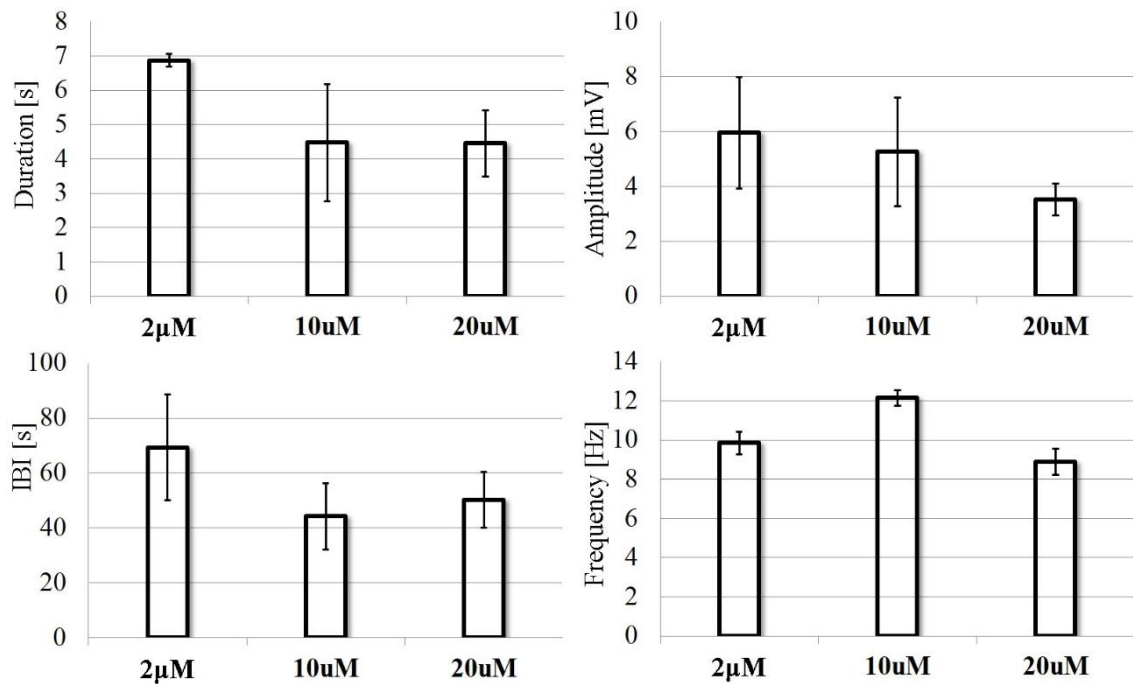


図 25 PTX 誘導 ictal discharges の濃度依存性。(ANOVA、Duration $p = 0.29$ 、Amplitude $p = 0.40$ 、IBI $p = 0.12$ 、Frequency $p = 0.56$ 、全て $n = 3$)

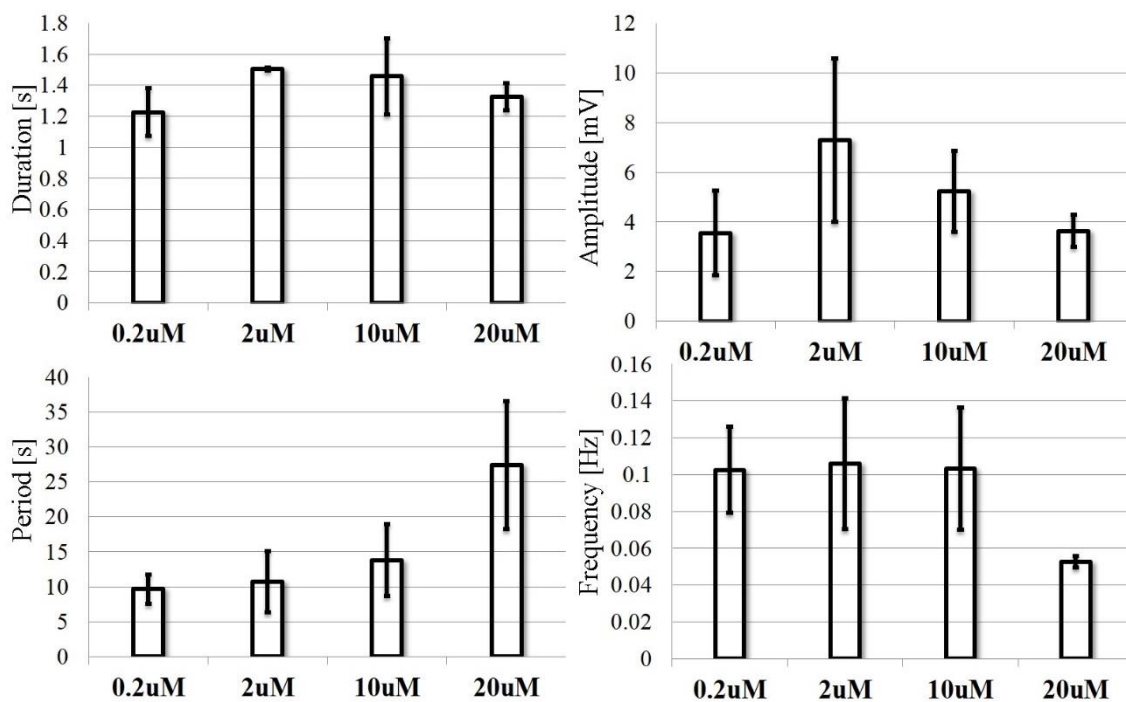


図 26 PTX 誘導 interictal discharges の濃度依存性。(ANOVA、Duration $p = 0.68$ 、Amplitude $p = 0.56$ 、Period $p = 0.20$ 、Frequency $p = 0.54$ 、0.2 μM $n = 3$ 、2 μM $n = 3$ 、10 μM $n = 4$ 、20 μM $n = 3$)

次に濃度別に ictal discharges と interictal discharges の出現率を調べた。これは各濃度で投与 60 分後の状態を見て、データに使用したスライスの枚数から ictal discharges と interictal discharges が見られたスライスの枚数を別にカウントしその割合を示す。その結果、濃度が低いと interictal discharges が多く見られ、濃度を上げていくに連れて ictal discharges が誘導されるようになることがわかった(図 27) (0.2 μM $n = 3$ 、2 μM $n = 3$ 、10 μM $n = 4$ 、20 μM $n = 3$)。

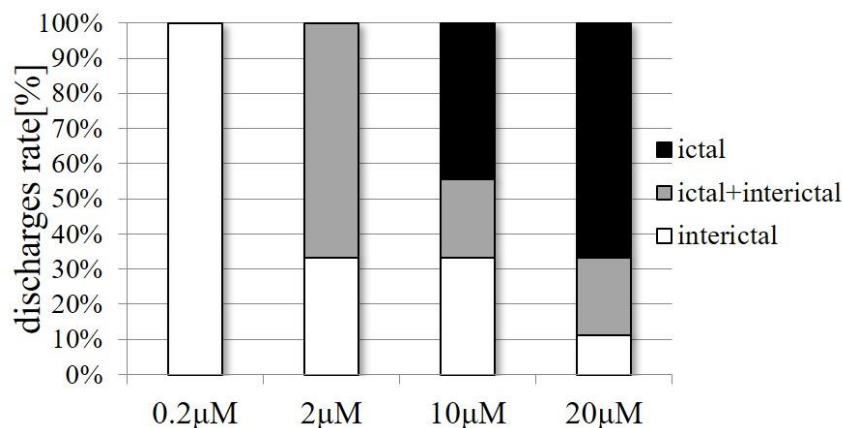


図 27 PTX における interictal discharges と ictal discharges の出現率。濃度上昇に依存して ictal discharges の出現率が増加した。

BIC

次に BIC を 1 μM、5 μM、10 μM、20 μM で投与すると PTX と同様に interictal discharges と ictal discharges が誘導され(図 28)、その濃度依存的な変化について調べた(図 29)。interictal discharges は 1 μM 以上の濃度において確認でき、ictal discharges は 5 μM 以上で確認することができた。これらのデータは 1 μM (n = 3)、5 μM (n = 4)、10 μM (n = 4)、20 μM (n = 3) の結果から得られた。持続時間、振幅、IBI、周波数はそれぞれ表 4、表 5 のようになった(20 μM BIC 投与時の interictal discharges、BIC 1 μM 投与時の ictal discharges については 3 例以下であったため載せていない)。また ictal discharges の各パラメータを濃度別に比較を行ったところ、周波数のみに有意な差が見られ濃度上昇に伴い周波数が上昇した(図 29 : ANOVA、Duration p = 0.14、Amplitude p = 0.85、Period p = 0.49、Frequency p < 0.005)。

interictal discharges についても濃度別に比較したところ全てにおいて有意な差は見られなかった(図 30 : ANOVA、Duration p = 0.68、Amplitude p = 0.67、Period p = 0.19、

Frequency $p = 0.33$)。これらの結果から BIC 誘導の ictal discharges は周波数と関連することがわかった。

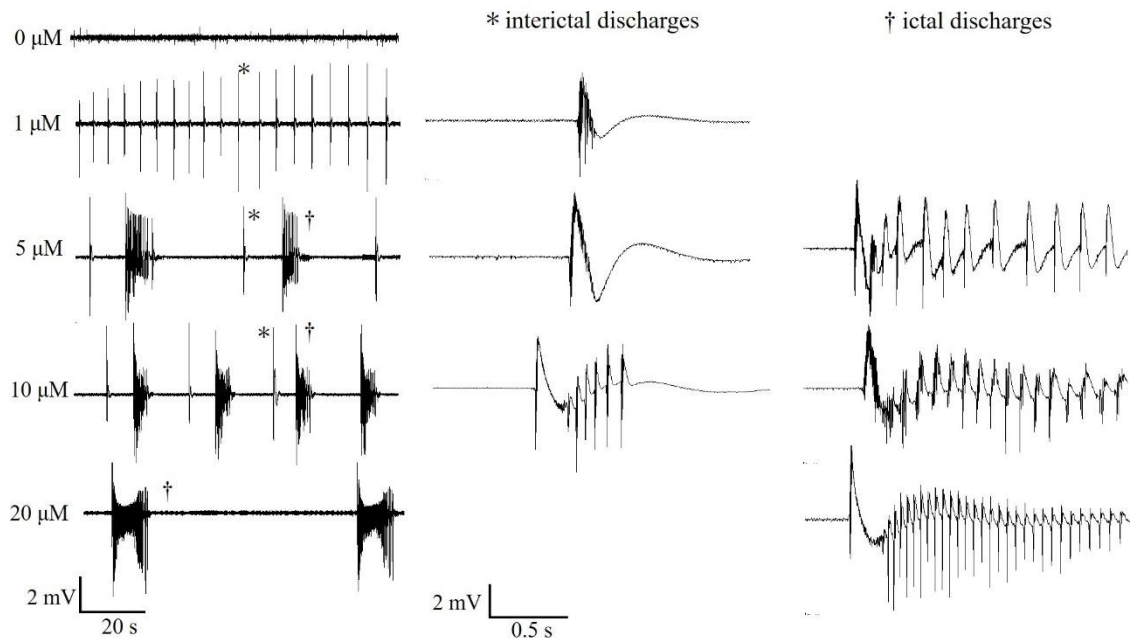


図 28 濃度別 BIC 誘導 ictal discharges(†)と interictal discharges(*) (データは投与 60 分後の典型例を示す)。中縦と右縦の列は拡大図を示す。

表 4 BIC 誘導 ictal discharges の濃度別平均パラメータ

ictal	Duration [s]	Amplitude [mV]	IBI [s]	Frequency [Hz]
5 μ M	3.41 \pm 1.12	3.96 \pm 1.67	25.0 \pm 8.08	4.66 \pm 1.00
10 μ M	4.46 \pm 1.33	3.76 \pm 1.05	35.0 \pm 11.72	6.18 \pm 0.94
20 μ M	7.16 \pm 1.28	3.18 \pm 0.35	46.8 \pm 15.01	11.2 \pm 0.84

表 5 BIC 誘導 interictal discharges の濃度別平均パラメータ

interictal	Duration [s]	Amplitude [mV]	Period [s]	Frequency [Hz]
------------	--------------	----------------	------------	----------------

1 μ M	0.794 \pm 0.20	6.10 \pm 1.61	8.59 \pm 2.14	0.132 \pm 0.03
5 μ M	0.553 \pm 0.13	4.55 \pm 1.48	6.02 \pm 0.93	0.168 \pm 0.02
10 μ M	0.651 \pm 0.20	3.97 \pm 1.54	10.8 \pm 2.08	0.106 \pm 0.02

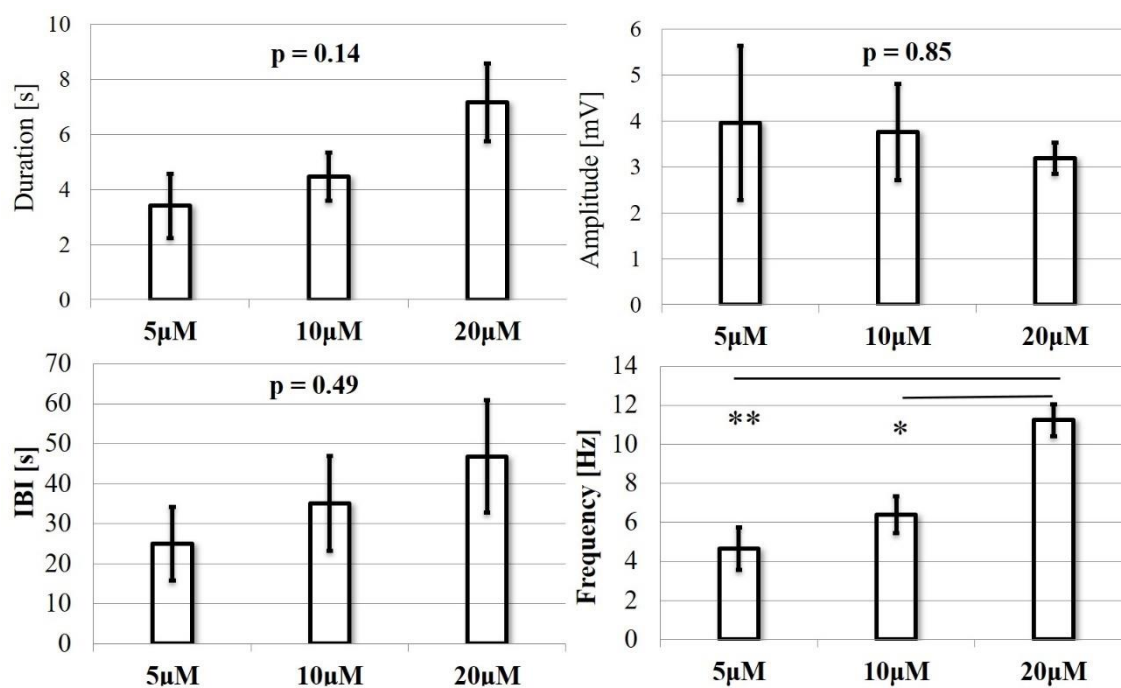


図 29 BIC 誘導 ictal discharges の濃度依存性。(ANOVA、Duration $p = 0.14$ 、Amplitude $p = 0.85$ 、Period $p = 0.49$ 、Frequency $p < 0.005$ ** : $p < 0.01$ * : $p < 0.05$ 、5 μ M $n = 3$ 、10 μ M $n = 3$ 、20 μ M $n = 4$)

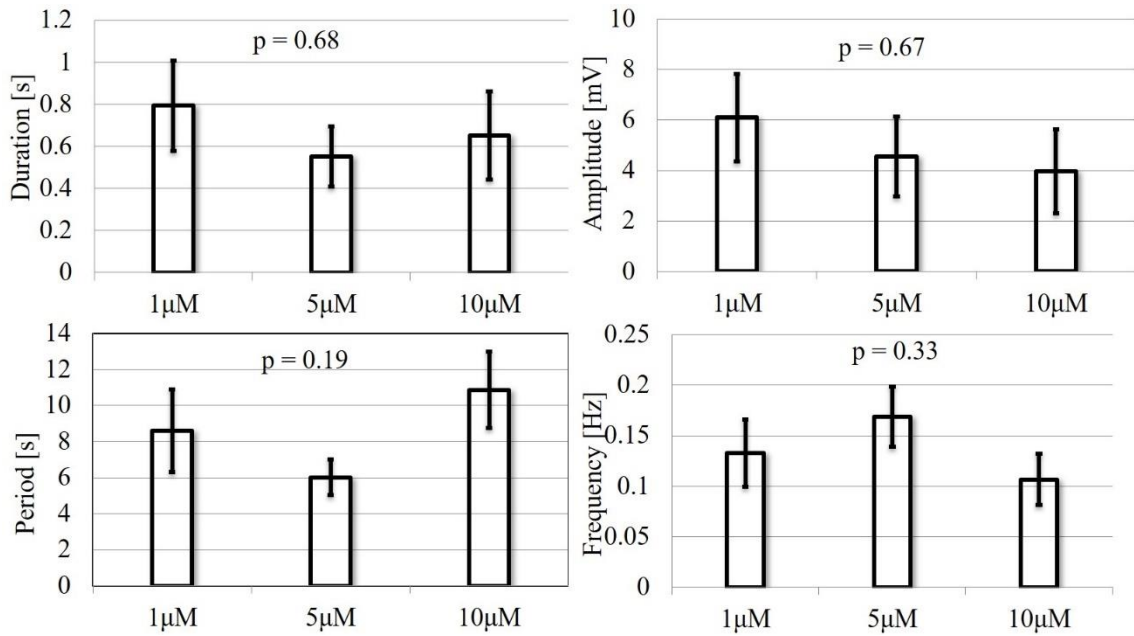


図 30 BIC 誘導 interictal discharges の濃度依存性。(ANOVA、Duration $p = 0.68$ 、Amplitude $p = 0.67$ 、Period $p = 0.19$ 、Frequency $p = 0.33$ 、1 μM $n = 4$ 、5 μM $n = 5$ 、10 μM $n = 5$)

次に濃度別に ictal discharges と interictal discharges の誘導率を調べた。その結果、PTX と同様に濃度が低いと interictal discharges が多く見られ、濃度を上げていくに連れて ictal discharges が誘導されることがわかった(図 31)。(1 μM $n = 4$ 、5 μM $n = 5$ 、10 μM $n = 5$ 、20 μM $n = 5$)

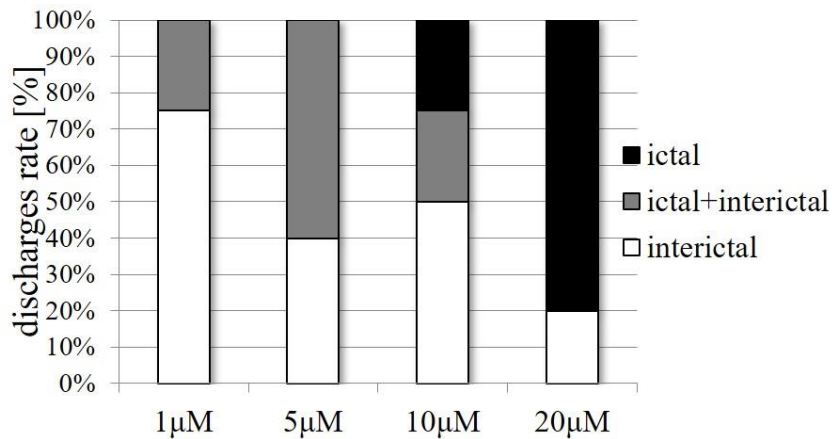


図 31 BIC における interictal discharges と ictal discharges の出現率。濃度上昇に依存して ictal discharges の出現率が増加した。

GBZ

GBZ を 0.1 μM 、1 μM 、5 μM 、10 μM 、20 μM 投与すると 0.1 μM 以上の濃度で interictal discharges が誘導され、5 μM 以上で ictal discharges が誘導された(図 32)(0.1 μM n = 4、1 μM n = 3、5 μM n = 5、10 μM n = 4、20 μM n = 4)。ictal discharges 及び interictal discharges の持続時間、振幅、IBI、Period、周波数はそれぞれ表 6、表 7 のようになった(5 μM における ictal discharges は 1 枚のみであったためデータは示していない)。ictal discharges において振幅にのみ有意な差が見られた(図 33: student t-test、Duration p = 0.65、Amplitude p < 0.05、Period p = 0.28、Frequency p = 0.83)。interictal discharges についてはいずれのパラメータにおいても有意な差は見られなかった(図 34 : ANOVA、Duration p = 0.26、Amplitude p = 0.12、Period p = 0.07、Frequency p = 0.27)。

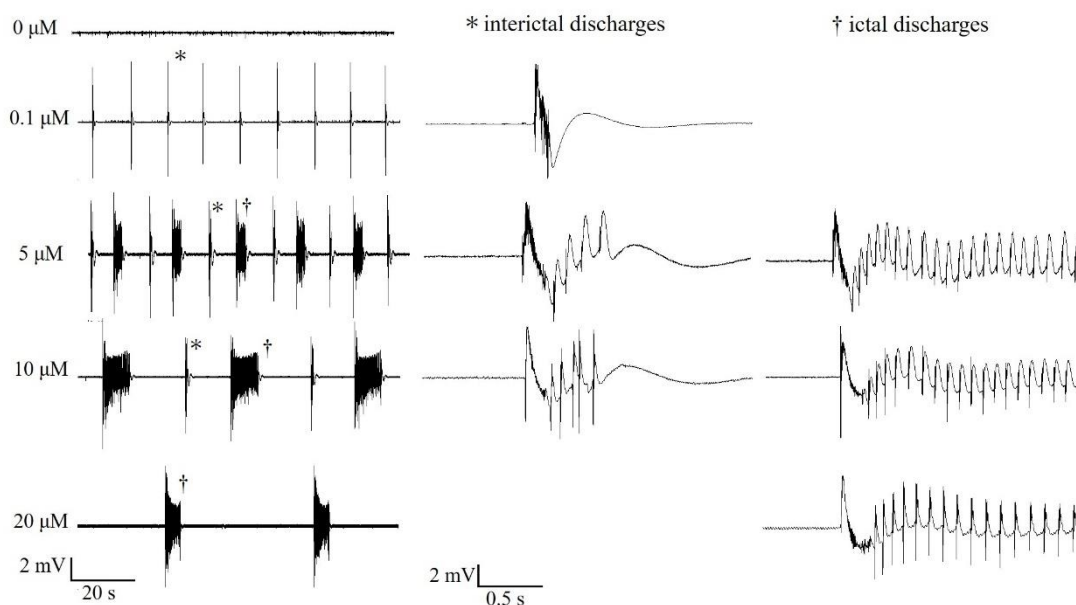


図 32 濃度別 GBZ 誘導てんかん様発火(データは投与 60 分後を示す)

表 6 GBZ 誘導 ictal discharges の濃度別平均パラメータ

ictal	Duration [s]	Amplitude [mV]	IBI [s]	Frequency [Hz]
10 μ M	4.07 \pm 1.09	2.00 \pm 0.21	43.91 \pm 19.36	12.62 \pm 4.43
20 μ M	4.81 \pm 1.09	4.94 \pm 1.15	37.8 \pm 7.94	8.87 \pm 0.62

表 7 GBZ 誘導 interictal discharges の濃度別平均パラメータ

interictal	Duration [s]	Amplitude [mV]	Period [s]	Frequency [Hz]
0.1 μ M	0.48 \pm 0.04	6.44 \pm 3.82	11.8 \pm 3.43	0.10 \pm 0.04
1 μ M	0.78 \pm 0.15	5.29 \pm 0.89	20.6 \pm 5.11	0.05 \pm 0.01
5 μ M	1.09 \pm 0.29	7.33 \pm 0.86	8.14 \pm 2.54	0.16 \pm 0.05
10 μ M	0.44 \pm 0.09	4.00 \pm 0.60	8.28 \pm 0.97	0.10 \pm 0.01
20 μ M	0.72 \pm 0.21	10.2 \pm 1.02	14.5 \pm 1.35	0.06 \pm 0.01

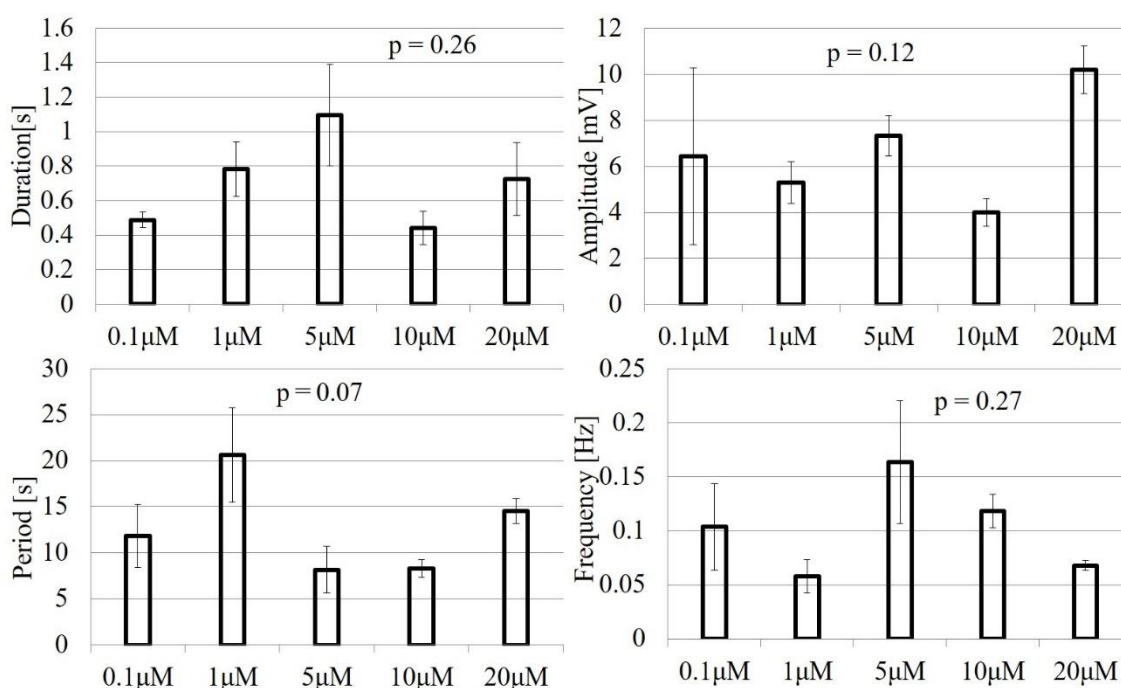


図 33 GBZ 誘導 ictal discharges の濃度依存性。(student t-test、Duration $p = 0.65$ 、Amplitude $p < 0.05$ 、IBI $p = 0.28$ 、Frequency $p = 0.83$ * : $p < 0.05$ 、10 μM $n = 4$ 、20 μM $n = 4$)

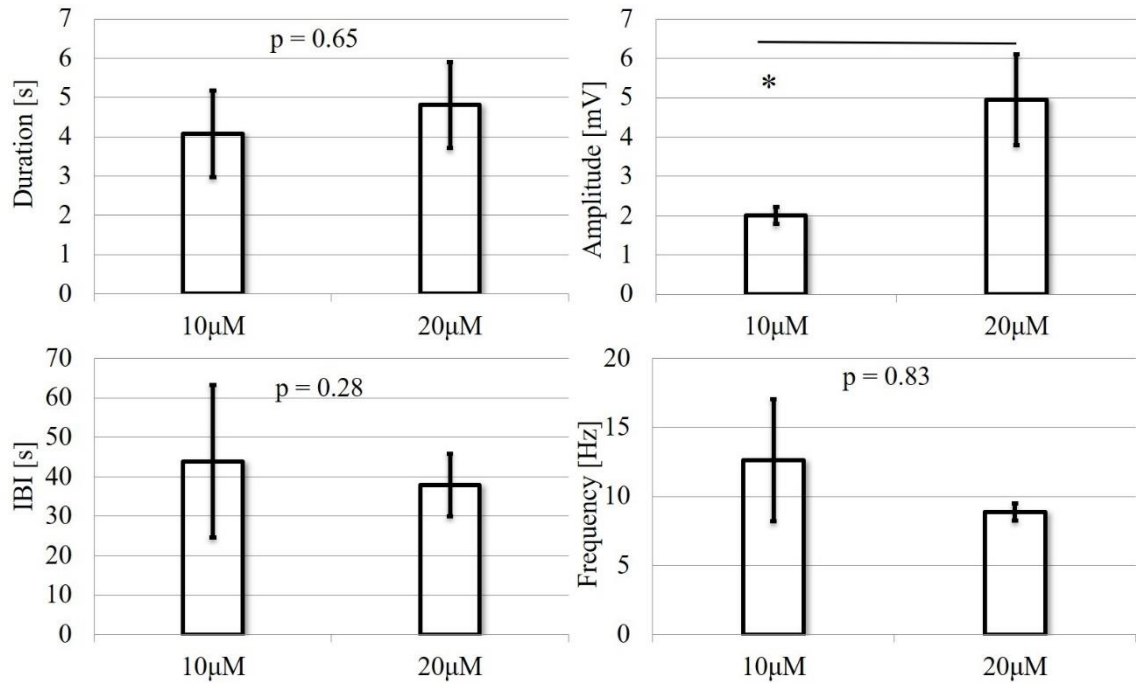


図 34 GBZ 誘導 interictal discharges の濃度依存性。(ANOVA、Duration $p = 0.26$ 、Amplitude $p = 0.12$ 、Period $p = 0.07$ 、Frequency $p = 0.27$ 、0.1 μM $n = 3$ 、1 μM $n = 4$ 、5 μM $n = 5$ 、10 μM $n = 3$ 、20 μM $n = 4$)

濃度別に ictal discharges と interictal discharges の出現率を調べた。その結果、PTX や BIC と同様に濃度が低いと interictal discharges が多く見られ、濃度を上げていくに連れて ictal discharges が誘導されるようになることがわかった(図 35) (1 μM $n = 4$ 、5 μM $n = 5$ 、10 μM $n = 5$ 、20 μM $n = 5$)。

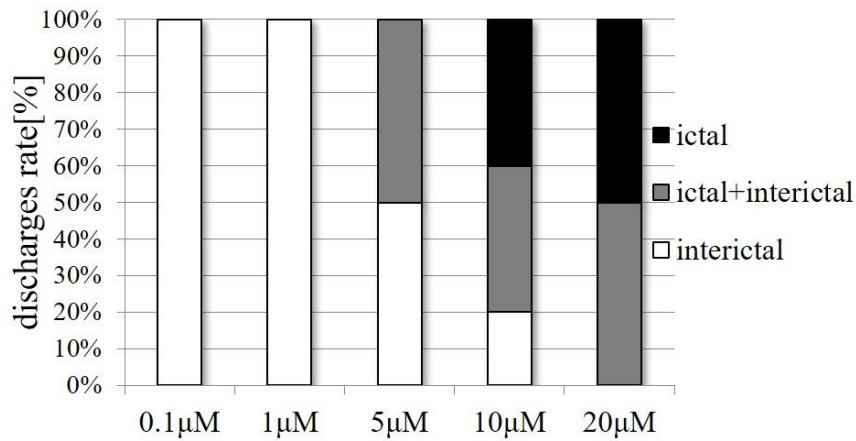


図 35 GBZ における interictal discharges と ictal discharges の出現率。濃度上昇に依存して ictal discharges の出現率が増加した。

4.3.3 CIBO 及びてんかん様発火の発生源

CIBO の発生源

CIBO の発生源を特定するために海馬ミニスライス標本を用いて実験を行った。分離していない海馬ミニスライス標本では CIBO が CA3、CA1、DG で誘導された(図 36)。一方、海馬ミニスライス標本では CA3 のみ CIBO が誘導された(図 37)これらの結果から CIBO の発生源は CA3 であり、CA3 のみでも CIBO は誘導可能であることがわかった。

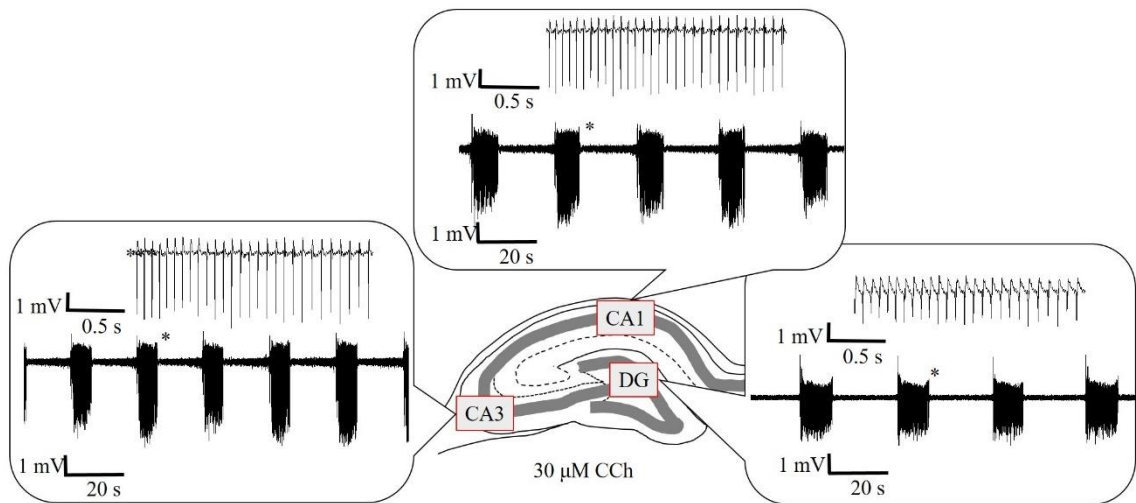


図 36 通常海馬スライスの CIBO 発生源。CA3、CA1、DG 領域において CIBO が誘導された (n = 3)。各上は部位の*における CIBO の拡大図。

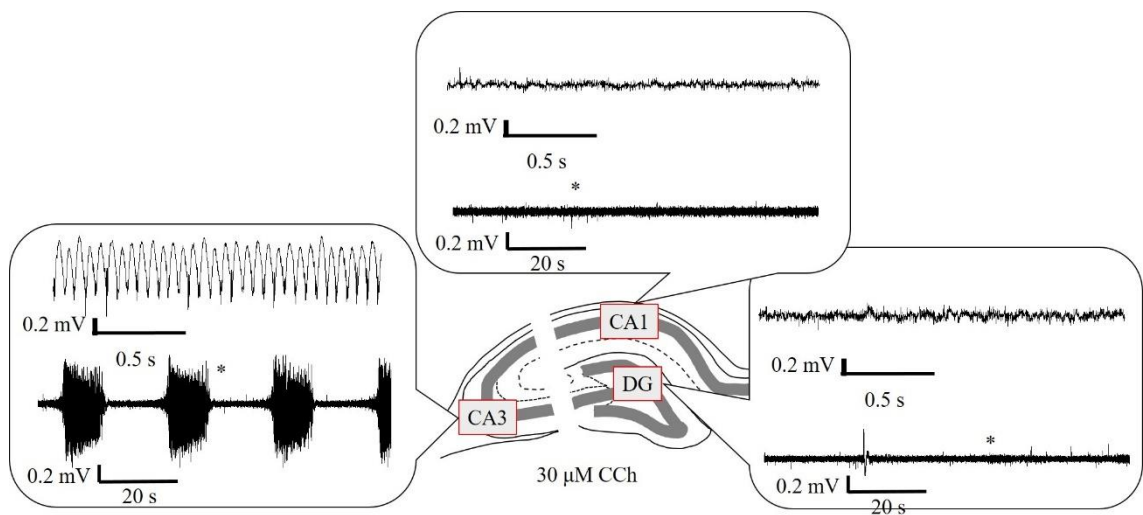


図 37 海馬ミニスライスの CIBO 発生源。CA3 領域のみ CIBO が誘導された (n = 3)。各枠の上段は*の拡大図を示す。

PTX、BIC、GBZ の発生源

CIBO 同様 てんかんに関する発火においても発生源を PTX、BIC、GBZ 誘導 てんかん様発火を用いて調べた。その結果、CIBO と同様に通常海馬スライスでは CA3、CA1、DG 領域において interictal discharges と ictal discharges が誘導されたが、海馬

ミニスライスではCA3領でのみ interictal discharges が誘導され ictal discharges は誘導されなかった。この結果は PTX、BIC、GBZ 全ての薬品において同じ結果であり、CA3 は interictal discharges の発生源であり、ictal discharges は CA3 のみでは発生しないことがわかった(PTX：図 38 図 39、BIC：図 40 図 41、GBZ：図 42 図 43)。

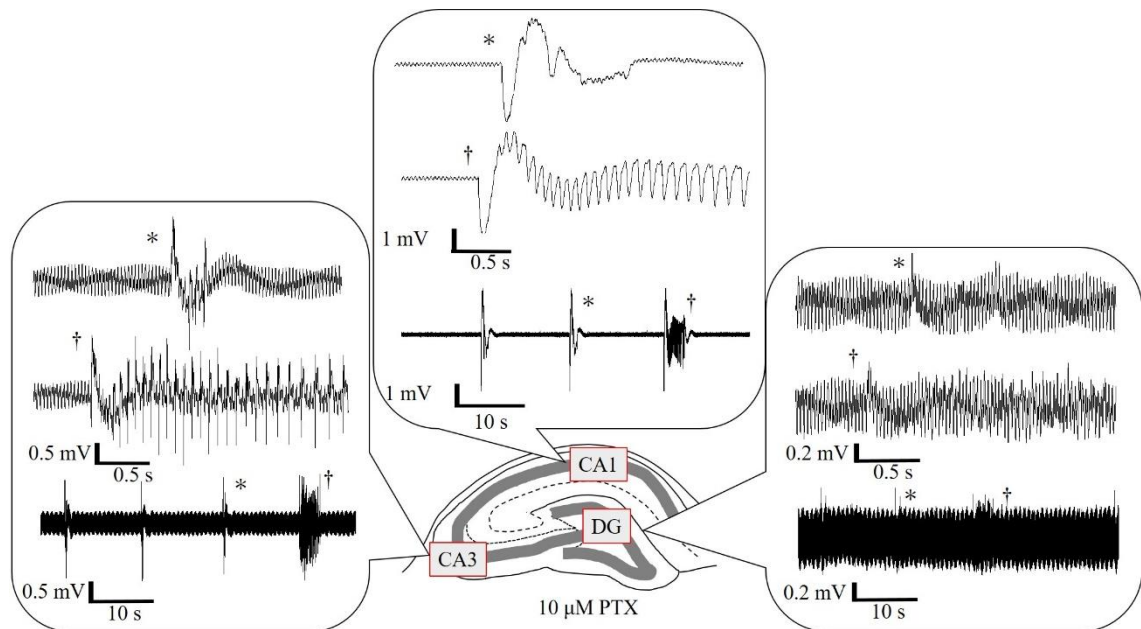


図 38 海馬スライスの PTX 誘導てんかん波発生源。CA3、CA1、DG 領域において interictal discharges (*) と ictal discharges (†) が誘導された。

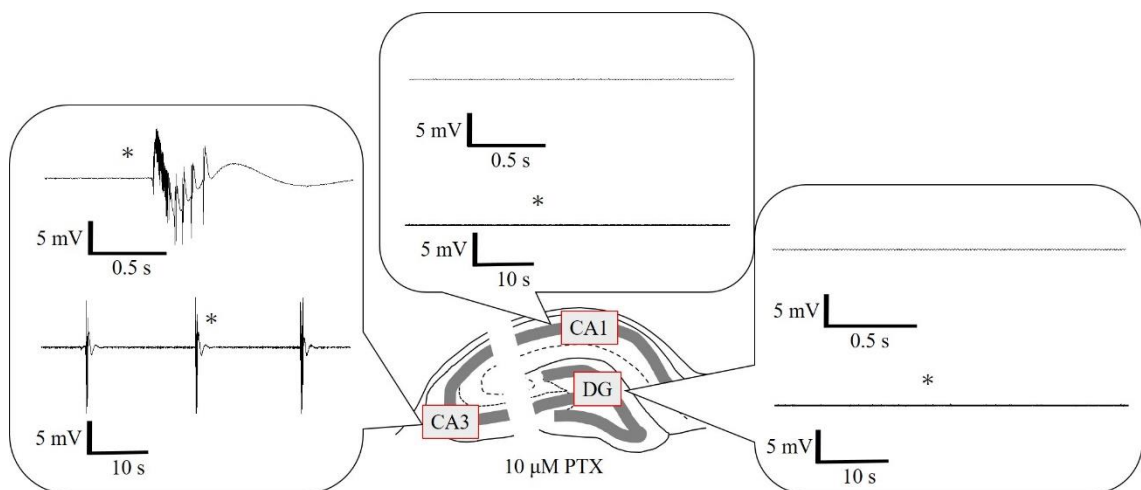


図 39 海馬ミニスライスの BIC 誘導てんかん様発火発生源。CA3 領域のみ interictal discharges のみが誘導された。各枠の上段は*の拡大図を示す。

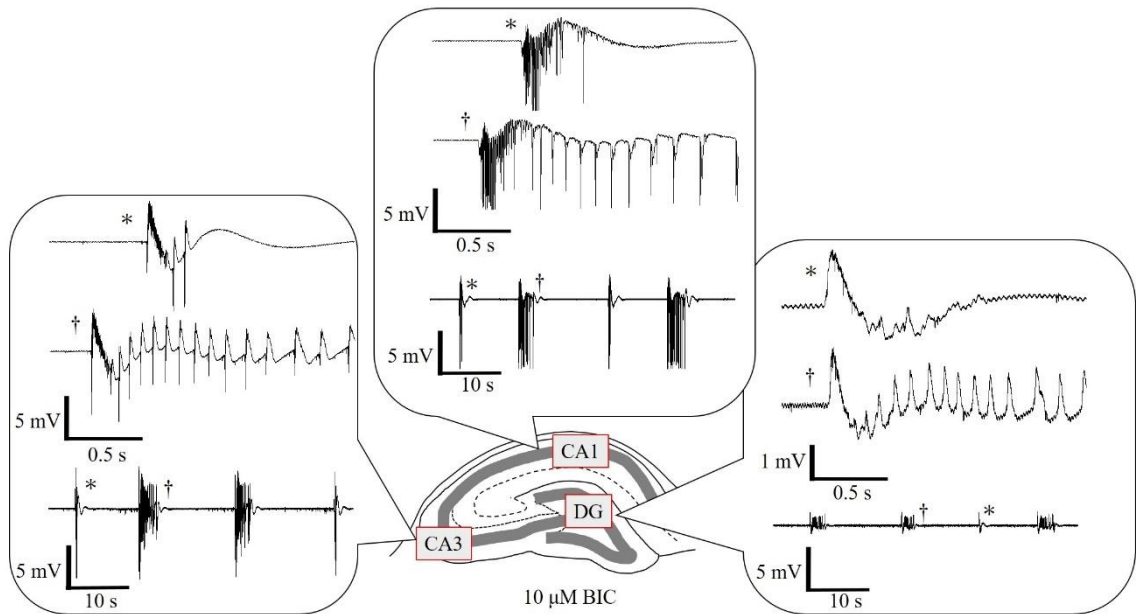


図 40 海馬スライスの BIC 誘導てんかん波発生源。CA3、CA1、DG 領域において interictal discharges (*) と ictal discharges (†) が誘導された。

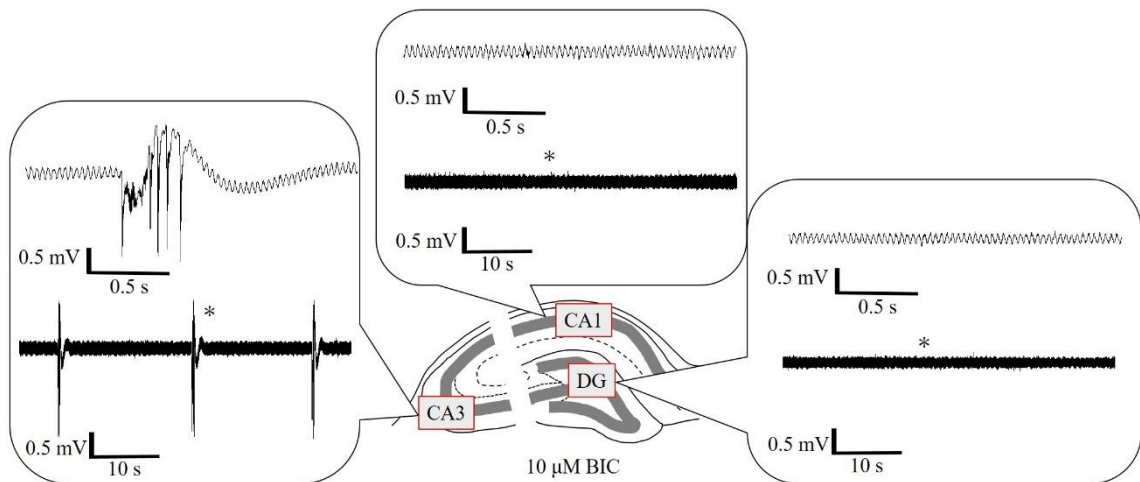


図 41 海馬ミニスライスの BIC 誘導てんかん様発火発生源。CA3 領域のみ interictal discharges のみが誘導された。各枠の上段は*の拡大図を示す。

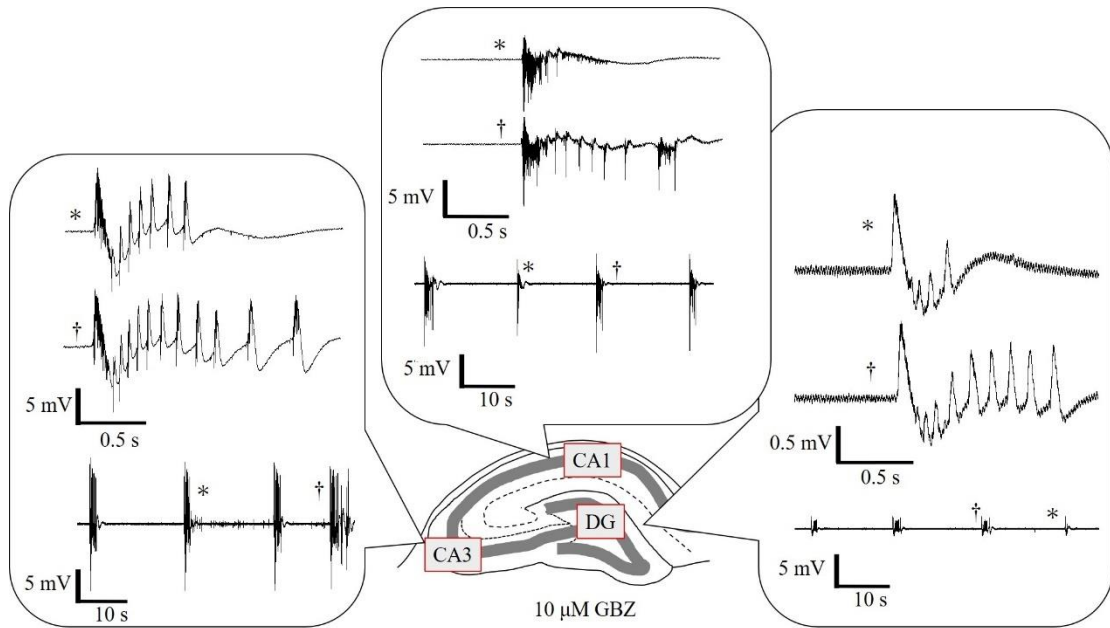


図 42 海馬スライスの GBZ 誘導てんかん波発生源。CA3、CA1、DG 領域において interictal discharges (*) と ictal discharges (†) が誘導された。

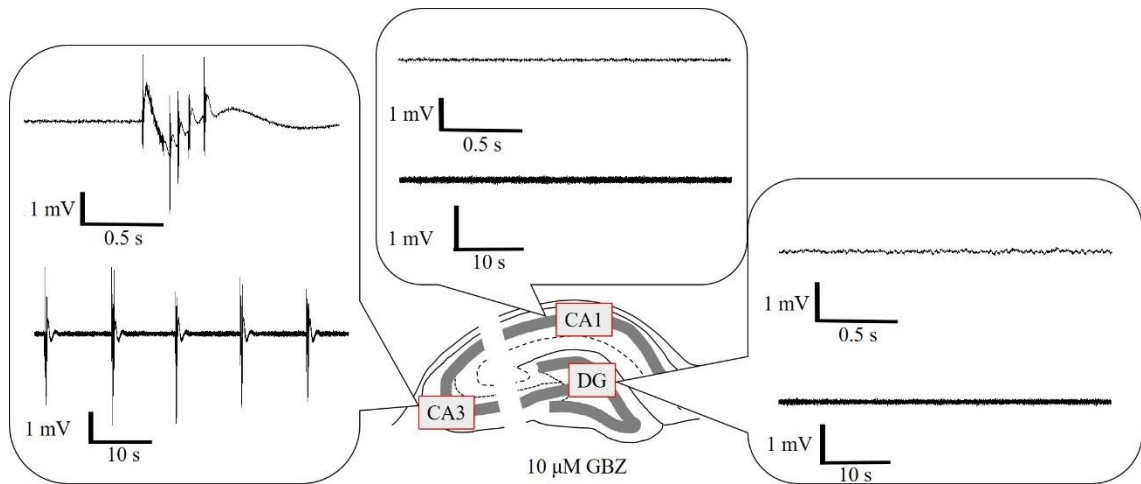


図 43 海馬ミニスライスの GBZ 誘導てんかん様発火発生源。CA3 領域のみ interictal discharges のみが誘導された。各枠の上段は * の拡大図を示す。

4.3.4 CIBO と ictal discharges の比較

CIBO と ictal discharges はどちらも振動現象を含んでおり、非常に形状が似ているため、20 μM CIBO と PTX、BIC、GBZ によって誘導される ictal discharges の振動パラメータを用いて比較し、誘導される振動現象が同じものであるか異なるものであるかを検討した。その結果 CIBO は全ての ictal discharges に対して長い持続時間と高い周波数を持っており、一方で振幅と IBI は有意に小さかった。これらの結果は CIBO と ictal discharges は異なるものであることを示す結果となった(図 44 図 45 図 46)。

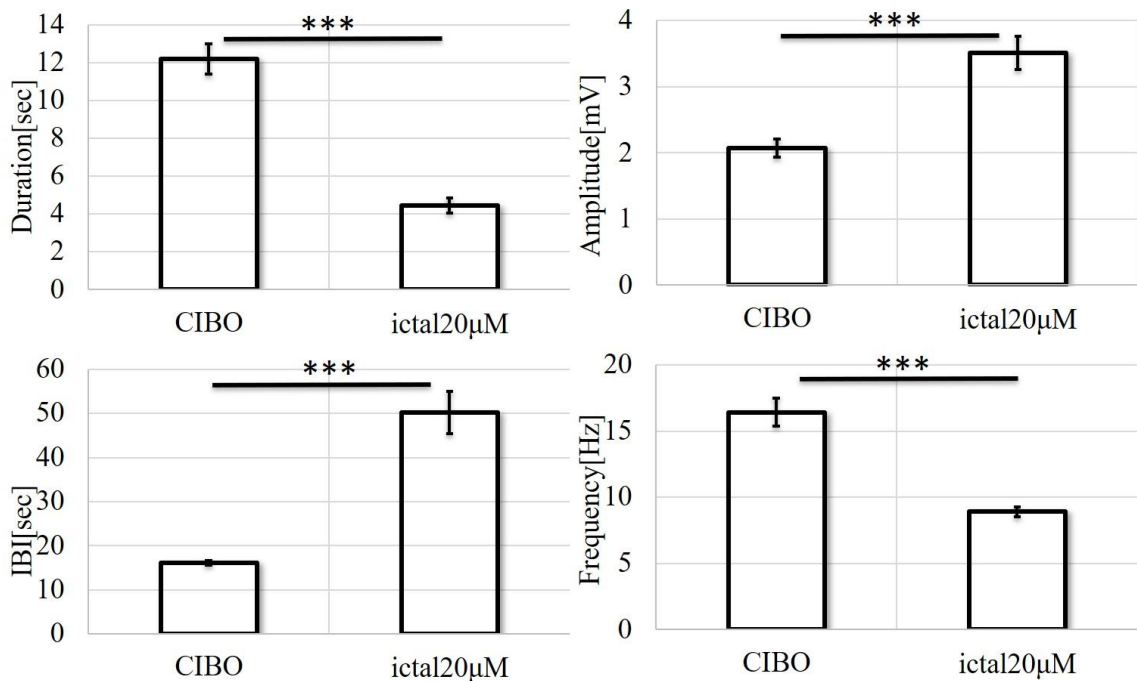


図 44 CIBO と PTX 誘導 ictal discharges のパラメータ比較 (Student t-test *** :
 $p < 0.001$)

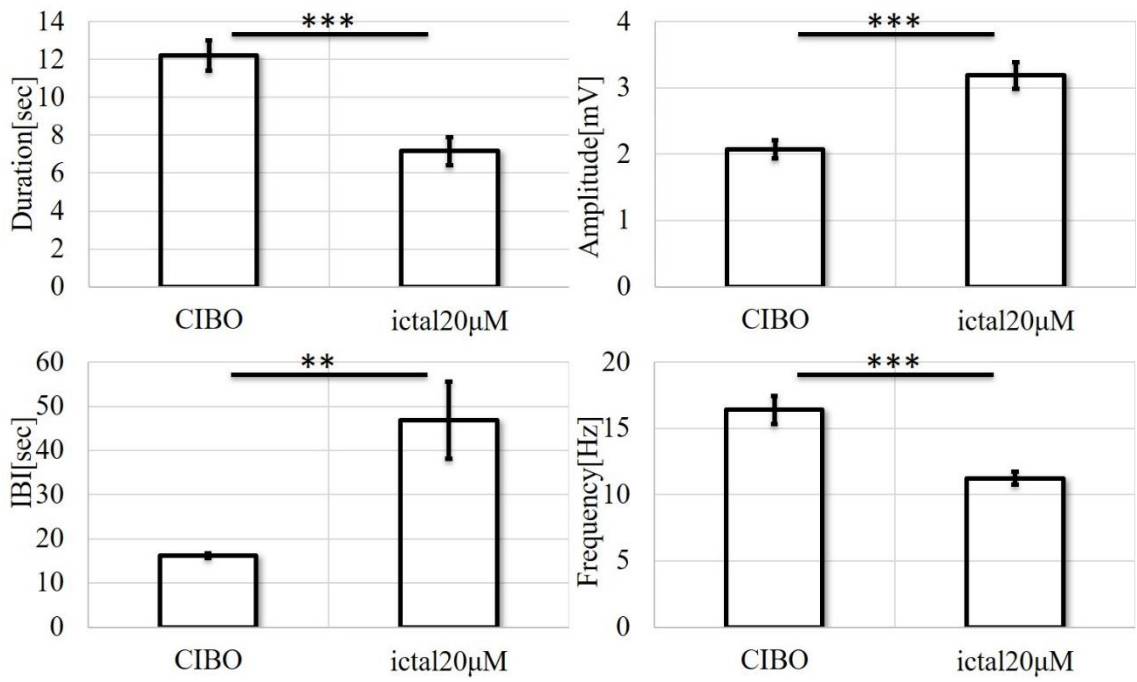


図 45 CIBO と BIC 誘導 ictal discharges のパラメータ比較 (Student t-test ** : $p < 0.01$ 、*** : $p < 0.001$)。

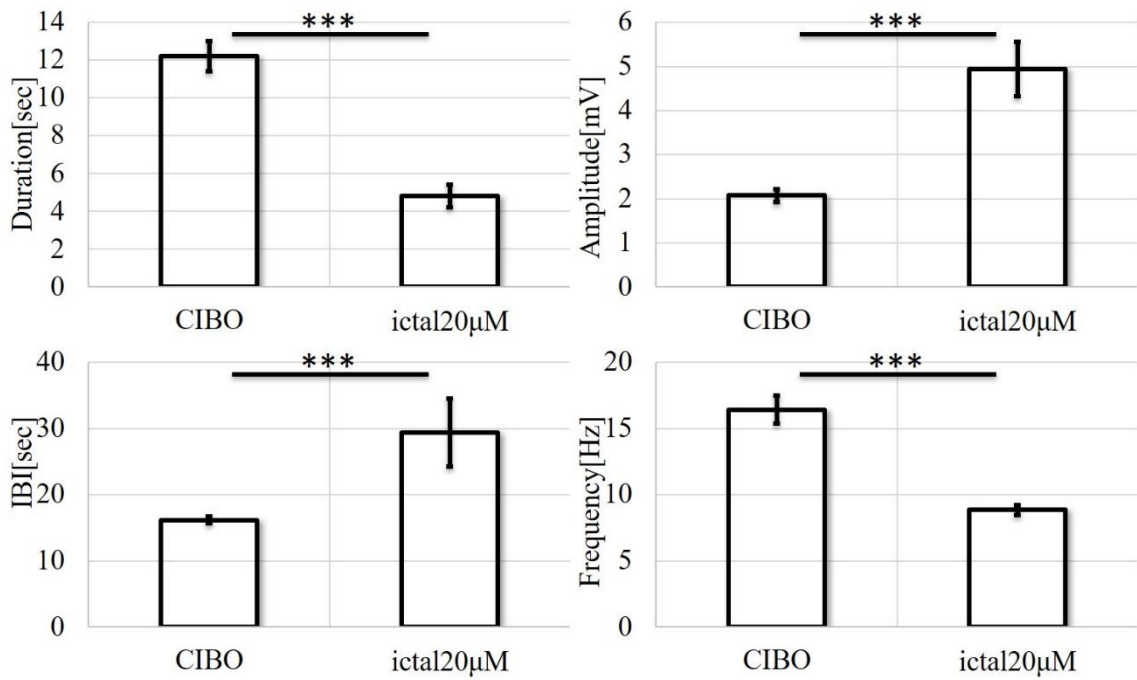


図 46 CIBO と GBZ 誘導 ictal discharges のパラメータ比較 (Student t-test

*** : $p < 0.001$)

4.4 CIBO によるてんかん様発火の抑制

4.4.1 CIBO 中に抑制されるてんかん様発火

PTX

30 μM CCh 投与し 30 分間 CIBO を誘導させた後に、PTX と 30 μM CCh を混合した溶液に切り替え振動の変化を観察した。またその PTX 濃度は 0.2 μM 、2 μM 、10 μM 、20 μM で行い、濃度依存性を見た。その結果 control 海馬スライスにおいて 0.2 μM 以上では interictal discharges が、2 μM 以上で ictal discharges が出現したが、いずれの濃度においても CIBO 中には ictal discharges 及び interictal discharges は誘導されず、 β 振動の消失は見られなかった(図 47)。その後 CCh を洗い流し PTX のみの投与に切り替えた所、切り替え 10 分以内に interictal discharges が現れた。CIBO へ PTX 投与した 30 分後の値から CIBO へ PTX を投与した直後 0 分の値で正規化することにより β 振動のパラメータ変化を算出し、PTX 濃度毎の振動パラメータを比較した。その結果、いずれのパラメータにおいても有意な差は見られなかった(図 48)。

(ANOVA : Duration $p = 0.11$ 、Amplitude $p = 0.42$ 、IBI $p = 0.13$ 、Frequency $p = 0.21$)。

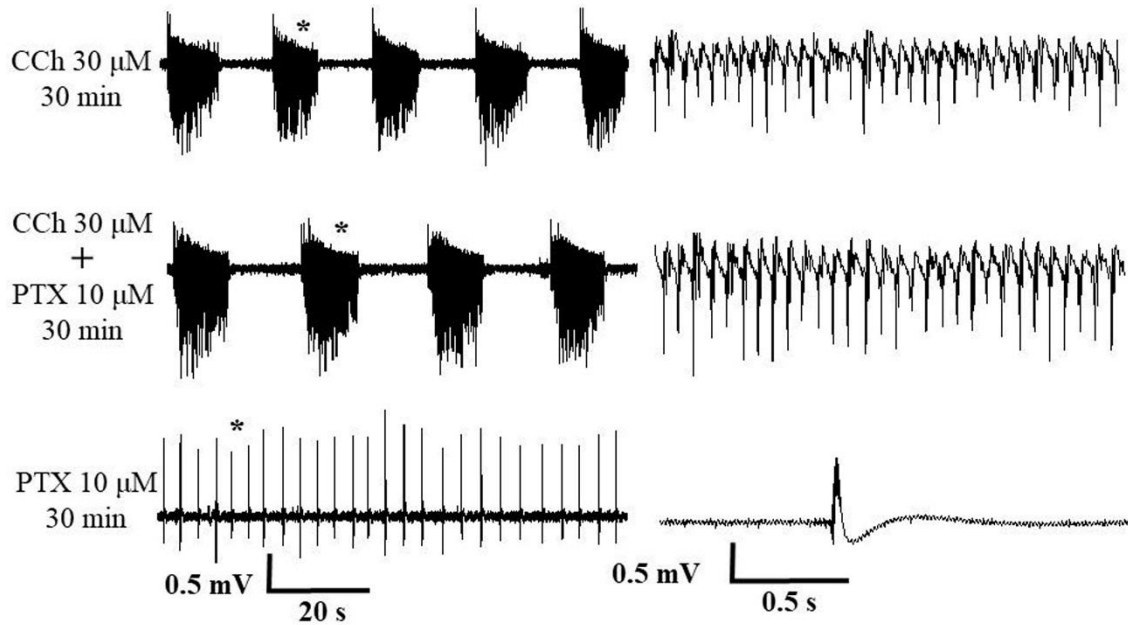


図 47 CIBO への PTX 投与 (図は 10 μM PTX の典型例を示す)。CIBO 誘導

中には interictal discharges は見られない。

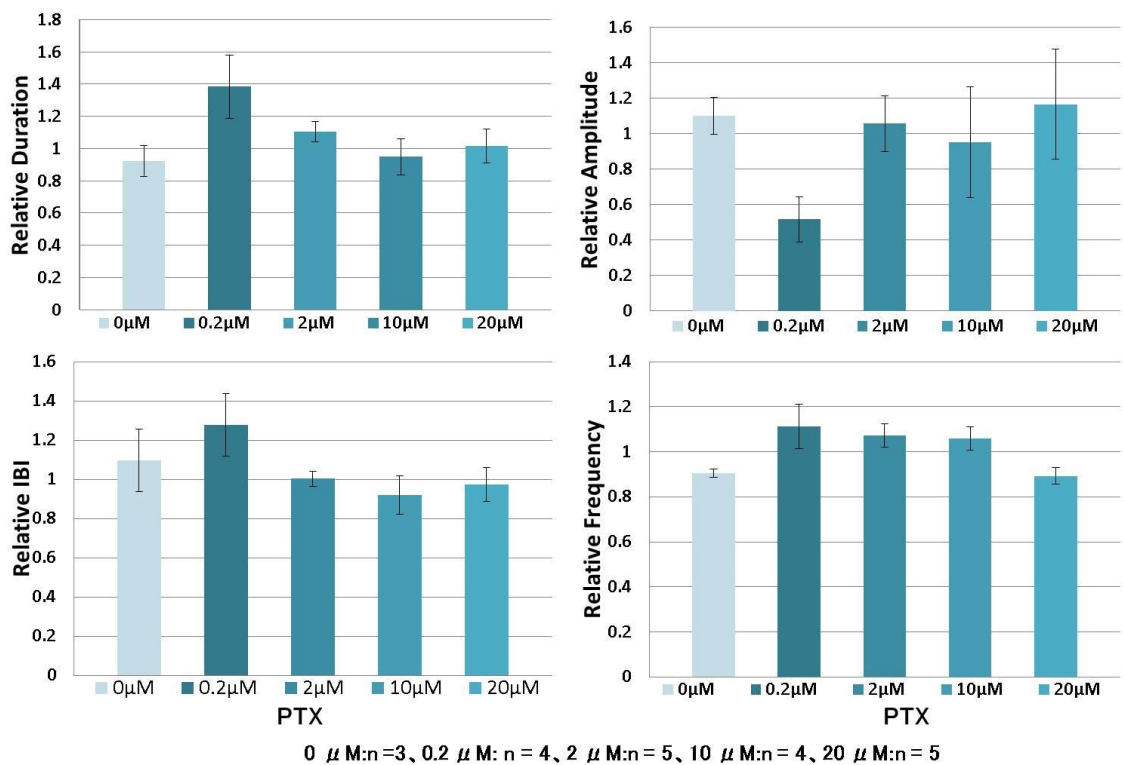


図 48 CIBO への PTX 投与時のパラメータ変化の相対比較。いずれの濃度にお

いても振動パラメータ変化は見られなかった。

CIBO + PTX 後に CCh を wash out すると約 10 分以内に全てにおいて interictal discharges が発生した。この β 振動後の interictal discharges と PTX のみ投与時の interictal discharges、 β 振動が誘導されない濃度での CCh における PTX 投与時のパラメータを比較すると図 49 のように Duration 以外のパラメータにおいて有意な差が見られた (ANOVA、Duration : $p = 0.58$ 、Amplitude : $p < 0.001$ 、Period : $p < 0.001$ 、Frequency : $p < 0.001$) (PTX $n = 5$ 、CCh15 + PTX $n = 3$ 、PTX After CIBO $n = 3$)。

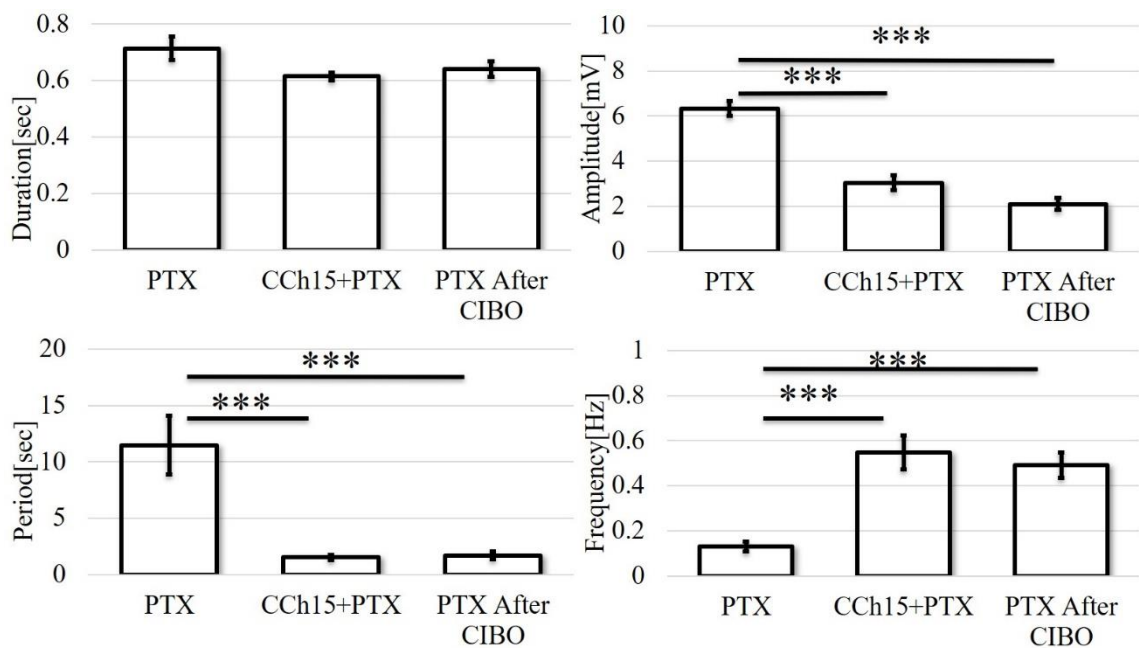


図 49 PTX のみの投与で誘導される interictal discharges、CIBO が誘導されない低濃度 15 μ M CCh 投与時に誘導される interictal discharges、CIBO 後の PTX のみの投与時に見られる interictal discharges (PTX After CIBO)。

BIC

30 μ M CCh を投与し 30 分間 CIBO を誘導させた後に、BIC と 30 μ M CCh を混合した溶液に切り替え振動の変化を観察した。またその BIC 濃度は 1 μ M、5 μ M、10 μ M、20 μ M で行い、濃度依存性を見た。その結果 control 海馬スライスにおいて 0.1 μ M 以

上では interictal discharges が、10 μM 以上で ictal discharges が出現したが、いずれの濃度においても CIBO 中には ictal discharges 及び interictal discharges は誘導されず、 β 振動の消失は見られなかった(図 50)。その後 BIC のみの投与に切り替えた所、10 分以内に interictal discharges が現れた。CIBO へ BIC 投与した 30 分後の値から CIBO へ BIC を投与した直後 0 分の値で正規化することにより β 振動のパラメータ変化を算出し、BIC 濃度毎の振動パラメータを比較した。その結果、全てのパラメータにおいて有意な差は見られなかった(図 51) (ANOVA: Duration $p = 0.41$ 、Amplitude $p = 0.23$ 、IBI $p = 0.26$ 、Frequency $p = 0.47$)。

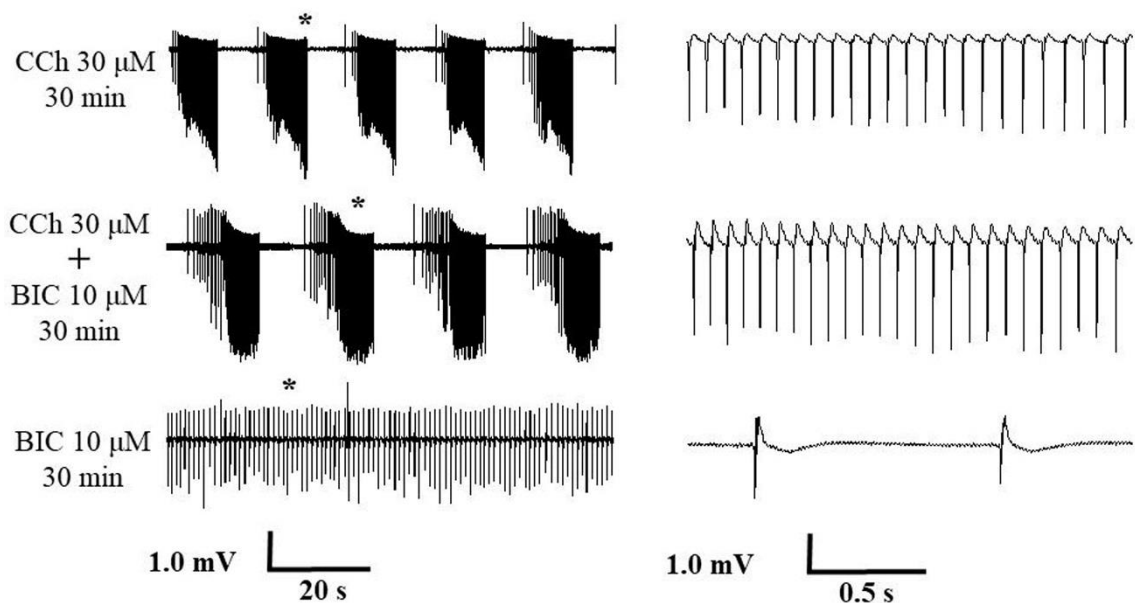


図 50 CIBO への BIC 投与(図は 10 μM BIC の典型例を示す)。CIBO 誘導中には interictal discharges は見られない。

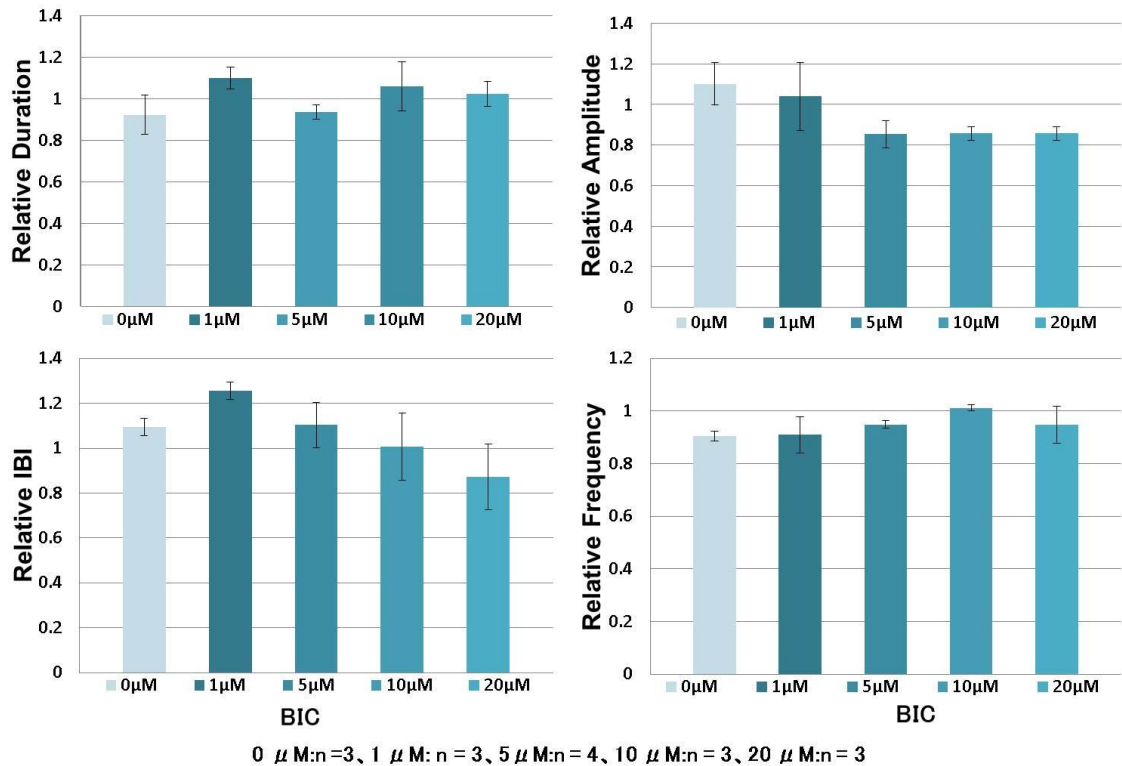


図 51 CIBO への BIC 投与時のパラメータ変化の相対比較。いずれの濃度においても振動パラメータ変化は見られなかった。

PTX と同様に CIBO + BIC 後に CCh を wash out すると約 10 分以内に全てにおいて interictal discharges が発生した。この β 振動後の interictal discharges と BIC のみ投与時の interictal discharges、β 振動が誘導されない濃度での CCh における BIC 投与時のパラメータを比較すると図 52 のように Duration 以外のパラメータにおいて有意な差が見られた(ANOVA、Duration : $p = 0.62$ 、Amplitude : * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ 、Period : ** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、Frequency : ** $p < 0.01$) (BIC $n = 5$ 、CCh15 + BIC $n = 4$ 、BIC After CIBO $n = 3$)。

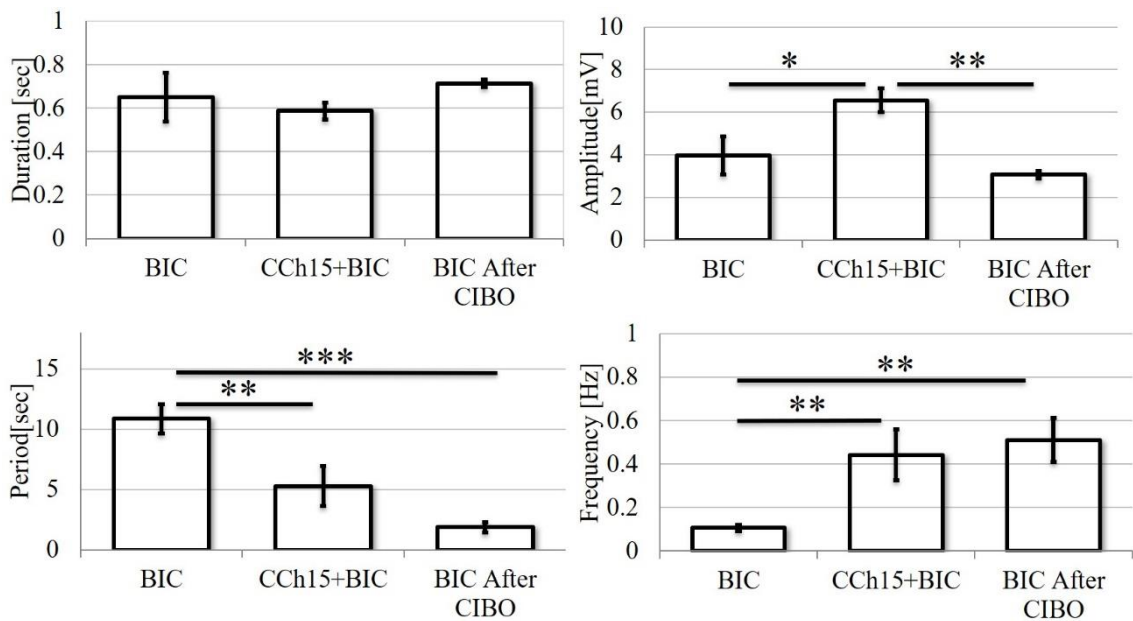


図 52 BIC のみの投与で誘導される interictal discharges、CIBO が誘導されない低濃度 15 μ M CCh 投与時に誘導される interictal discharges、CIBO 後の BIC のみの投与時に見られる interictal discharges (BIC After CIBO)。

GBZ

GBZ についても PTX や BIC と同様な実験を行った。GBZ 濃度は 1 μ M、5 μ M、10 μ M、20 μ M の濃度依存性を見た。その結果、control 海馬スライスにおいて 1 μ M 以上では interictal discharges が、5 μ M 以上で ictal discharges が出現したが、いずれの濃度においても CIBO 中には ictal discharges 及び interictal discharges は誘導されず、 β 振動の消失は見られなかった(図 53)。その後 BIC のみの投与に切り替えた所、切り替え 10 分以内に interictal discharges が現れた。CIBO へ GBZ 投与した 30 分後の値から CIBO へ GBZ を投与した直後 0 分の値で正規化することにより β 振動のパラメータ変化を算出し、GBZ 濃度毎の振動パラメータを比較した。その結果、何れのパラメータにおいても有意な差は見られなかった(図 54)。(ANOVA : Duration $p = 0.97$ 、Amplitude $p = 0.46$ 、IBI $p = 0.62$ 、Frequency $p = 0.67$)

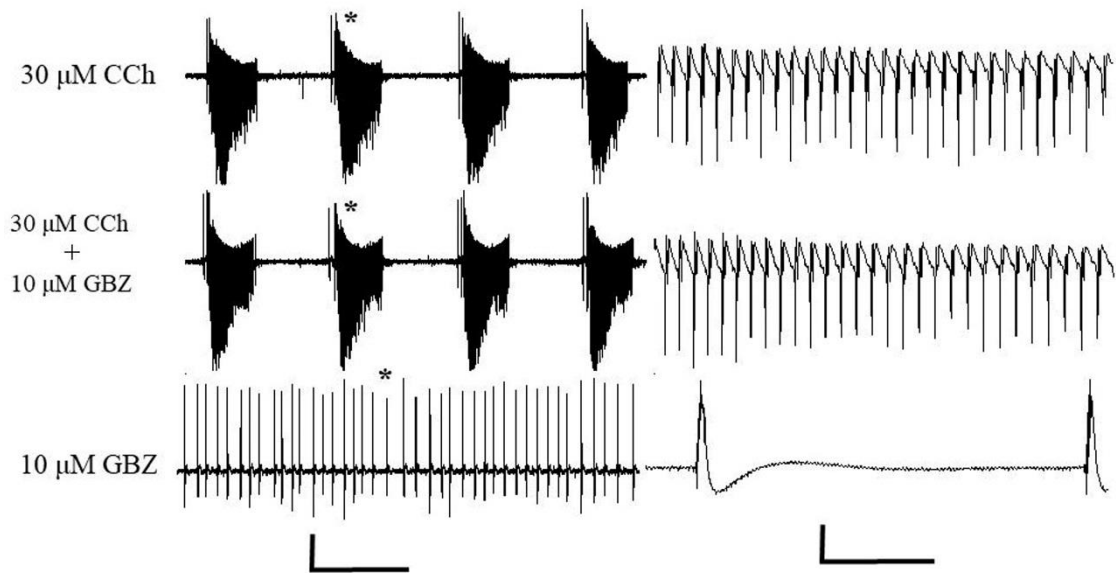


図 53 CIBO への GBZ 投与(図は 10 μ M GBZ の典型例を示す)。CIBO 誘導中には interictal discharges は見られない。

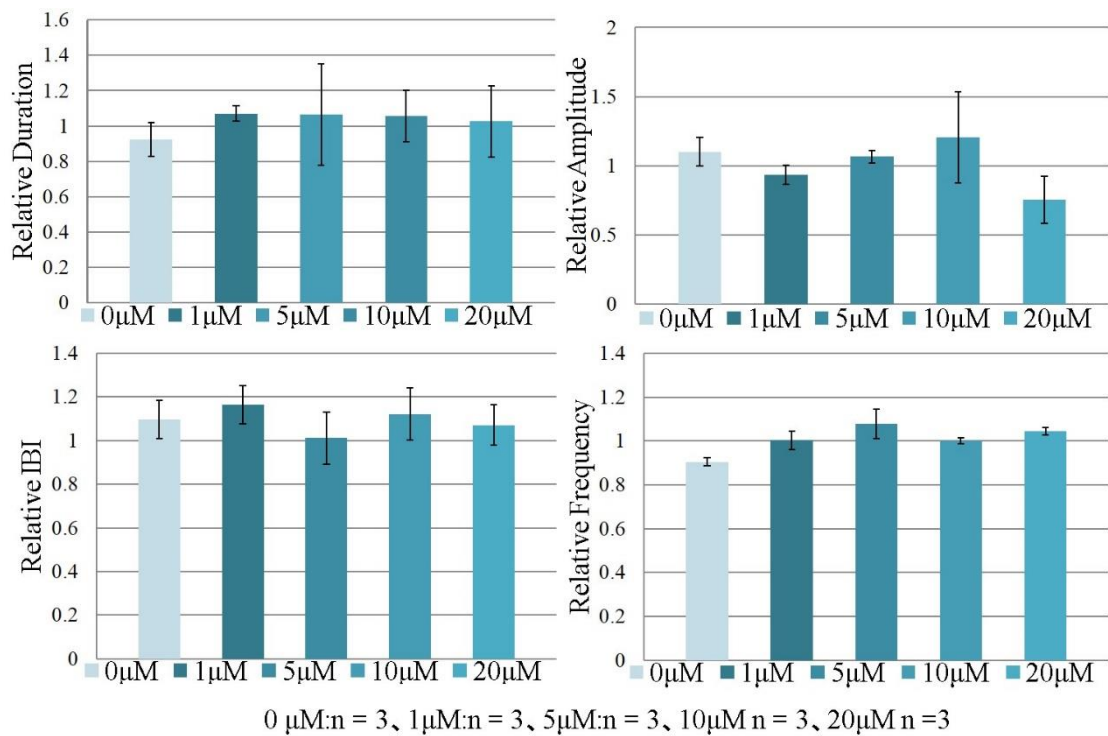


図 54 CIBO への GBZ 投与時のパラメータ変化の相対比較。いずれの濃度においても振動パラメータ変化は見られなかった。

PTX や BIC と同様に CIBO + GBZ 後に CCh を wash out すると約 10 分以内に全てにおいて interictal discharges が発生した。この β 振動後の interictal discharges と GBZ のみ投与時の interictal discharges、 β 振動が誘導されない濃度での CCh における GBZ 投与時のパラメータを比較すると図 55 のように Period、Frequency において有意な差が見られた (ANOVA、Duration : $p = 0.16$ 、Amplitude : $p = 0.29$ 、Period : *** $p < 0.001$ 、Frequency : ** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$) (GBZ $n = 3$ 、CCh15 + GBZ $n = 4$ 、GBZ After CIBO $n = 3$)。

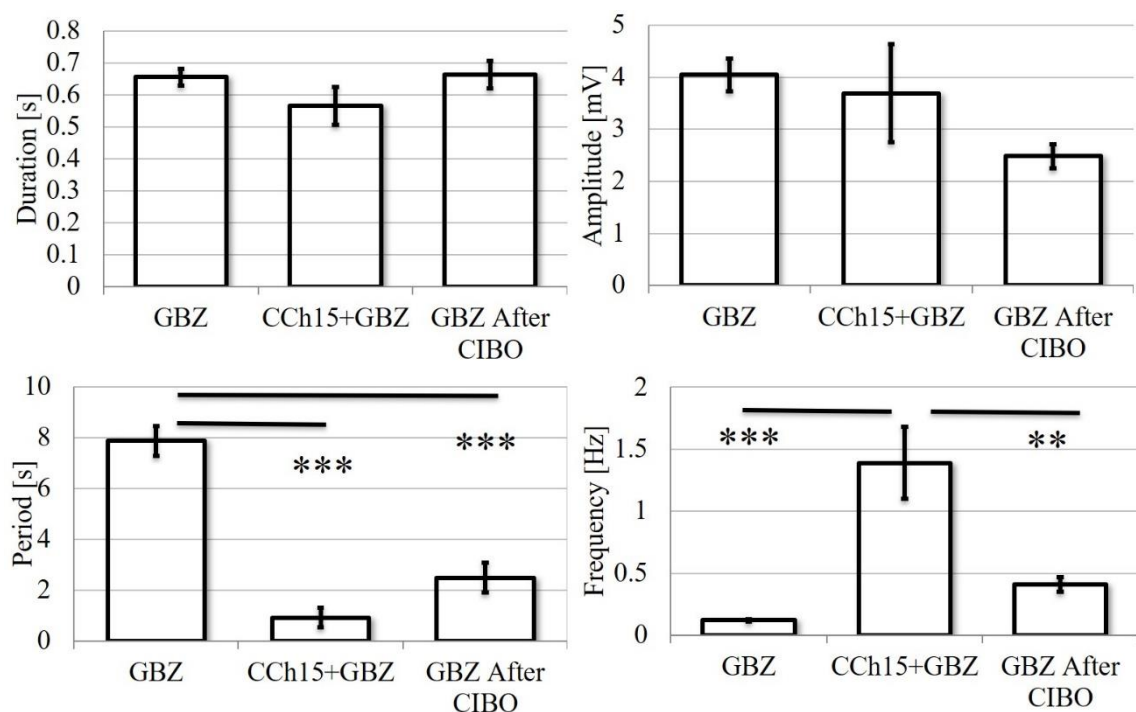


図 55 GBZ のみの投与で誘導される interictal discharges、CIBO が誘導されない低濃度 15 μ M CCh 投与時に誘導される interictal discharges、CIBO 後の GBZ のみの投与時に見られる interictal discharges (GBZ After CIBO)。

これらの結果から、測定した海馬スライスにおいて interictal discharges も誘導可能であるが CIBO が誘導中には薬品やその濃度に依存せず interictal discharges が誘導されないことがわかった。

4.4.2 てんかん様発火への Carbachol 投与によって誘導される CIBO

CIBO 誘導中には discharges が誘導されないことで CIBO がてんかん様発火を抑制する可能性が示された。この結果をさらに確信付けるために次にてんかん様発火誘導中に CCh を投与し、スパイク変化を見て CIBO がてんかん波を抑制するかどうかの実験を Hashimoto ら[85]の先行研究をもとに行った。

10 μ M PTX を control スライスに投与し、interictal discharges が誘導されてから 30 分後に 30 μ M CCh + 10 μ M PTX 混合溶液をスライスに投与した。

その結果、先行研究同様に interictal discharges が 30 μ M CCh 投与 10 分後に CIBO に遷移した(n = 3)。

同様に BIC、GBZ に関しても PTX 同様に CIBO 変化した(BIC : 図 56 中、GBZ : 図 56 下)。さらに今回、interictal discharges だけでなく ictal discharges においても CIBO に変化した結果が示された(図 56 下)。

以上の結果から interictal discharges と ictal discharges は 30 μ M CCh により CIBO に遷移しててんかん様発火が抑制されたことが示された。

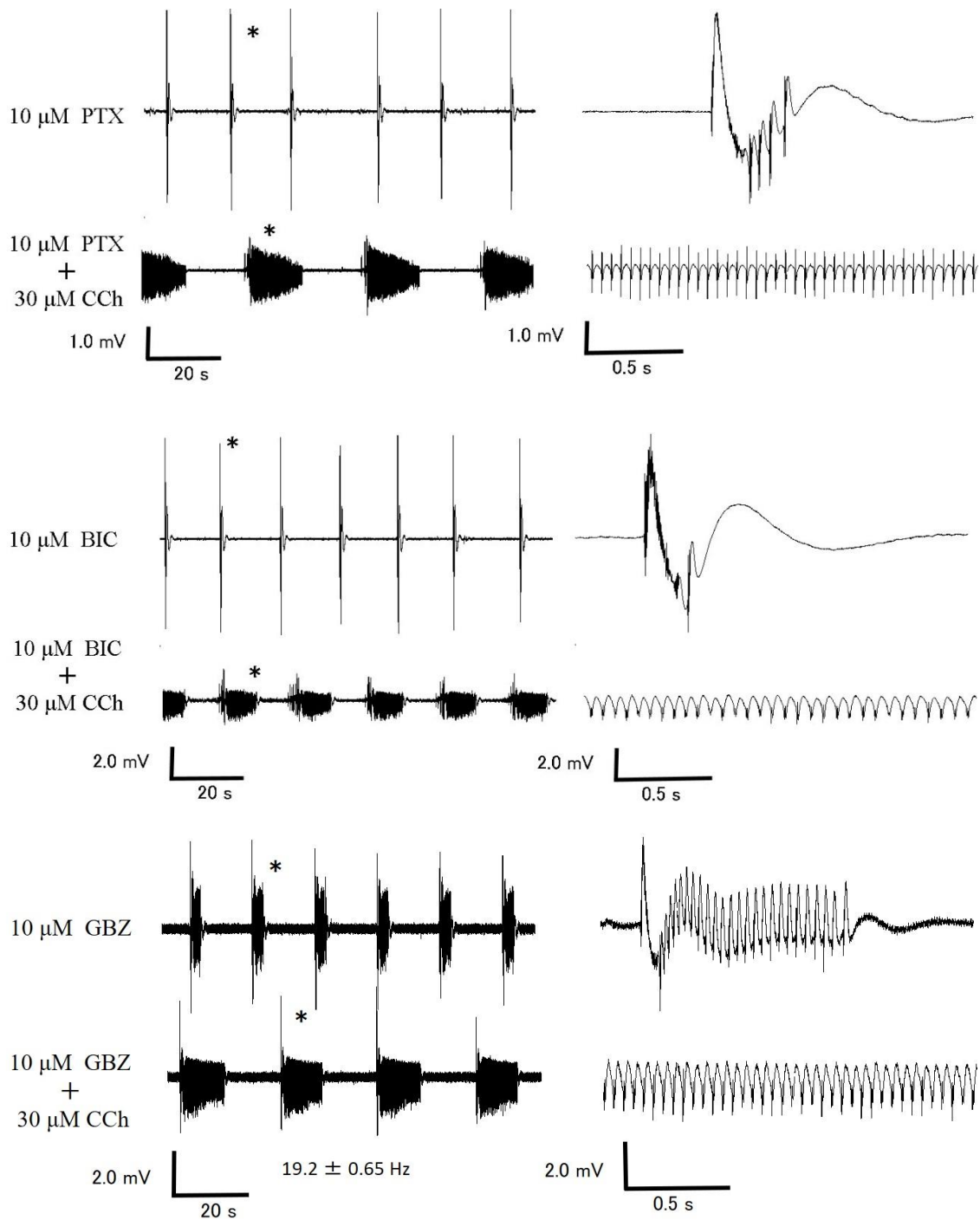


図 56 海馬スライスにおける PTX、BIC、GBZ 10 μ M 誘導 interictal discharges 及び ictal discharges への 30 μ M CCh の効果。全ての薬品における ictal 及び interictal discharges が CIBO へ遷移した(各 n = 3)。

4.5 CIBO のてんかん様発火抑制に関するアセチルコリン受容体の関与

CIBO に用いる CCh はアセチルコリン受容体 (AChR) 作動薬である。前述のようにこの受容体にはニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) とムスカリン性アセチルコリン受容体 (mAChR) に分けられ、さらに mAChR は 5 つのサブタイプ M1 ~ 5 が存在する。先行研究において Arai らは CIBO には M1、M3 が関与することを明らかにした[25]。本研究ではまず、CIBO が mAChR のみに関与することを再現し、CIBO による discharges が mAChR のどのサブタイプに関与するかを調べた。ただし、選択的 M5 阻害薬は見つからなかったため今回は調べなかった。

4.5.1 ニコチン性アセチルコリン受容体との関与

30 μ M CCh 投与により CIBO を誘導させ、その後 CCh に nAChR 阻害薬である 50 μ M D-tubocarine 混合溶液を投与した。その結果 CIBO に対して影響を与えなかった(図 57)。この結果は先行研究と同じ結果である。

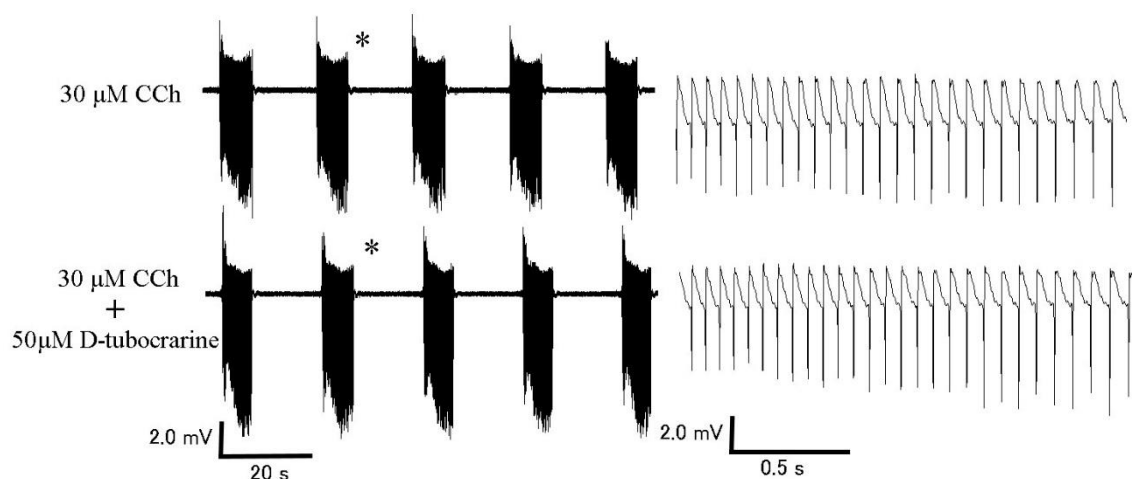


図 57 CIBO への 50 μ M D - tubocarine 投与。右列は * の拡大である。

4.5.2 ムスカリン性アセチルコリン受容体との関与

同プロトコルで 30 μ M CCh 投与により CIBO を誘導させ、その後 CCh に mAChR 阻害薬である 30 μ M atropine sulfate 混合溶液を投与すると、10 分後に CIBO の消失が確認された(図 58)。この結果は先行研究と同じ結果であり再現性が認められた。

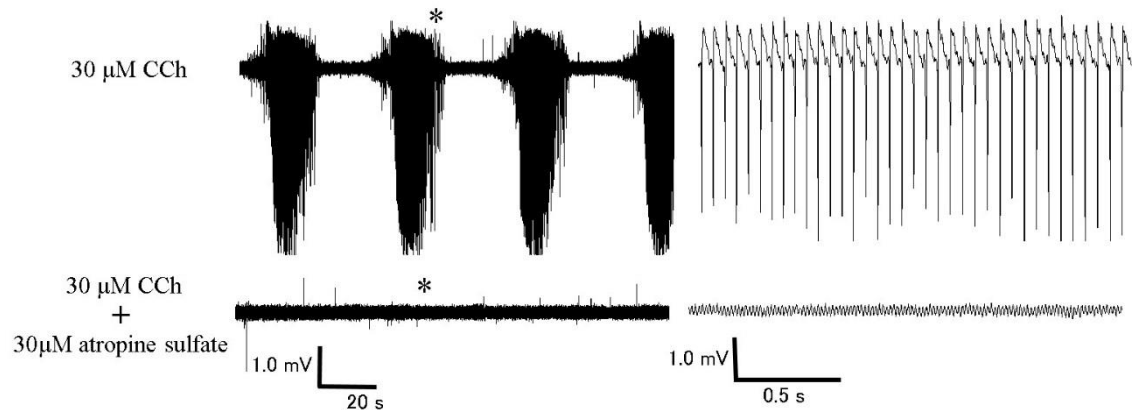


図 58 CIBO への 30 μ M atropine sulfate 投与。右列は*の拡大である。

4.5.2.1 CIBO によるてんかん様発火抑制とムスカリン性受容体サブタイプとの関与

CIBO には mAChR が関与することが本研究でも明らかになった。次に interictal discharges が CIBO に遷移し、CIBO がてんかん様発火を抑制するという可能性を示した結果をもとにこの CIBO のてんかん様発火抑制が mAChR サブタイプと関与するかを調べた。まず、PTX10 μ M を投与し interictal discharges を 30 分間誘導した。その後、M1 - M4 阻害薬 (M1、M2、M3 阻害薬は 1 μ M で M4 阻害薬は 10 μ M) のいずれかを加えて 30 分間投与し、その後さらに 30 μ M CCh を加えることで CIBO 誘導の有無を 30 分間測定した。その結果 CIBO が誘導されたのは M2 を阻害した場合のみで M1、M3、M4 阻害時には CIBO は誘導されなかった(図 59) (各 n=4)。

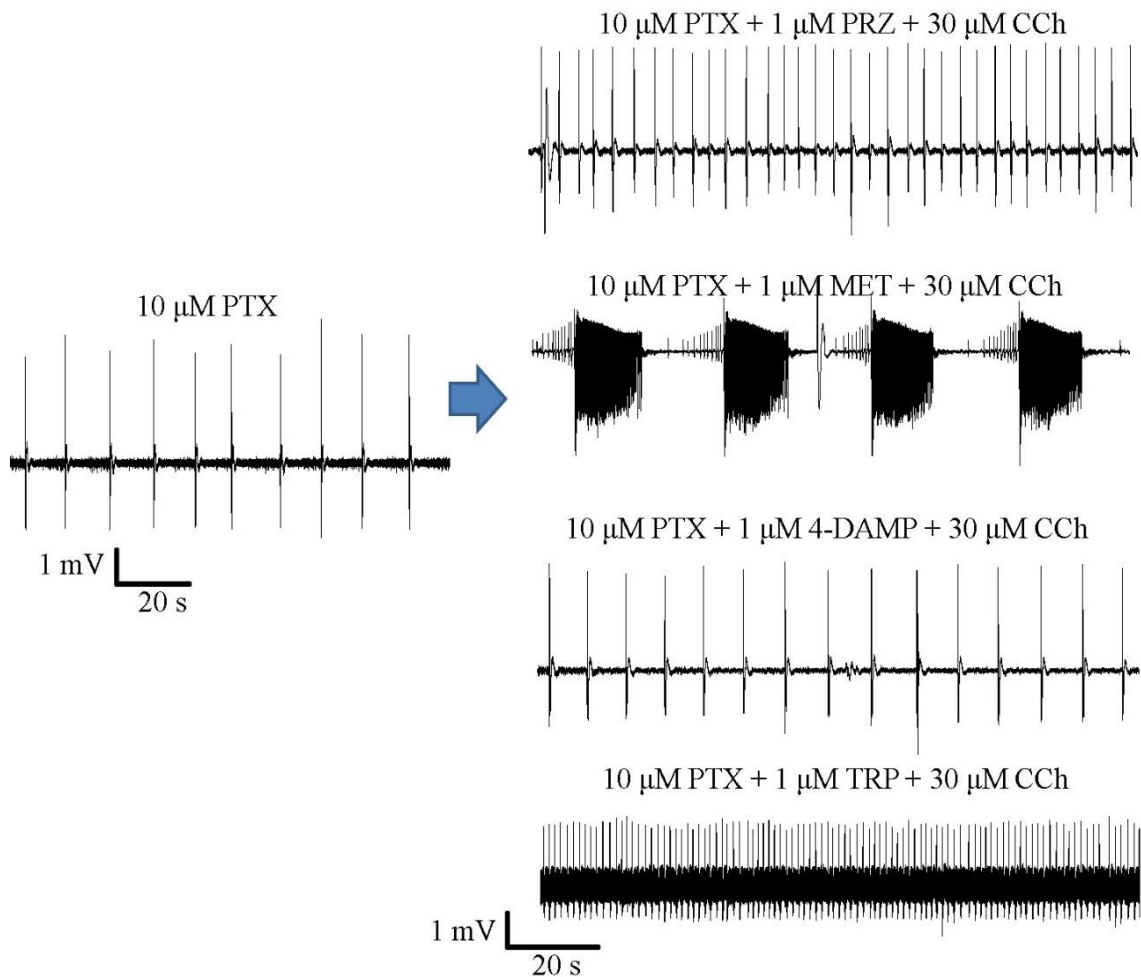


図 59 CIBO のてんかん様発火抑制と mAChR サブタイプとの関与。M1、M3、M4 阻害時には CIBO は誘導されず、interictal discharges が誘導された。一方 M2 阻害ではそれまで誘導されていた interictal discharges から CIBO へと誘導された。PRZ : M1 阻害薬、MET : M2 阻害薬、4-DAMP : M3 阻害薬、TRP : M4 阻害薬

次に M1、M3、M4 阻害時に誘導される interictal discharges のパラメータ比較を行ったところいずれの阻害薬を用いてもパラメータに優位な差は見られなかった (Duration : $p = 0.43$ 、Amplitude : $p = 0.25$ 、Period : $p = 0.88$ 、Frequency : $p = 0.11$) (各 $n = 4$)。

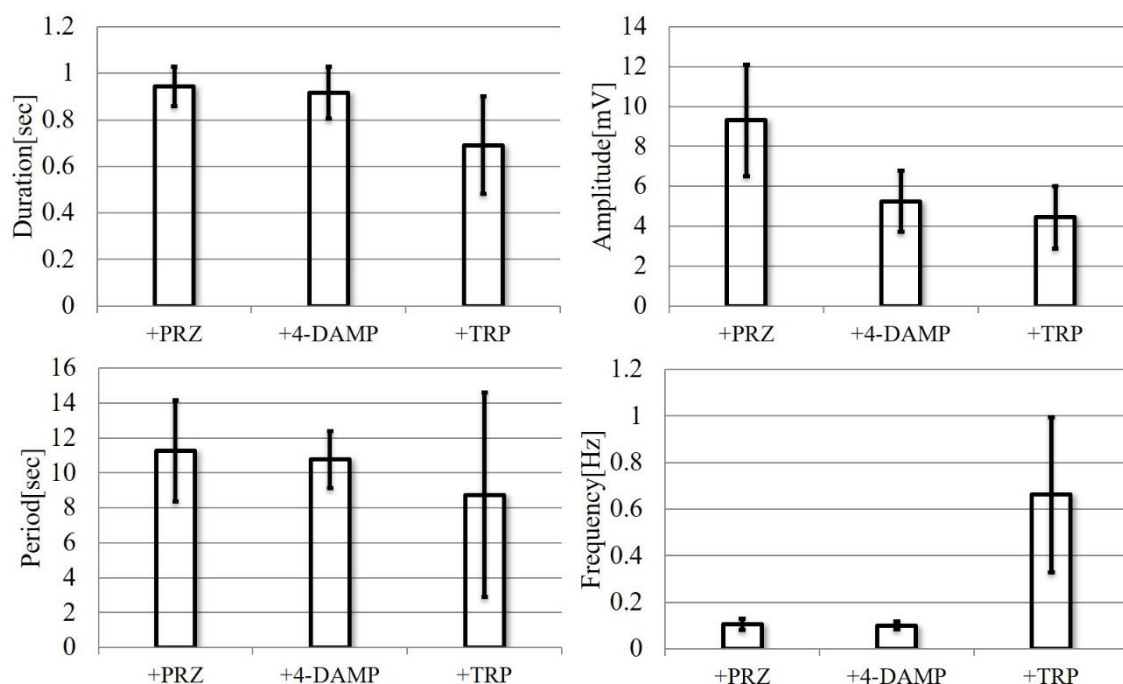


図 60 M1、M3、M4 阻害時に誘導される interictal discharges のパラメータ比較(Duration: $p = 0.43$ 、Amplitude: $p = 0.25$ 、Period: $p = 0.88$ 、Frequency: $p = 0.11$)(各 $n = 4$)。

以上の結果から CIBO の interictal discharges 抑制には mACh サブタイプ M1、M3、M4 が関与する可能性が示された。

4.6 Carbachol による pEPSP の変化

CIBO が ictal 及び interictal discharges を抑制する可能性が示唆され、次にその原因について調査するために、Schaffer 側枝の逆行性刺激によって引き起こされる CA3 放射状層での pEPSP 測定を用いた興奮性シナプス結合に対する CCh の影響を調査した。電気刺激後 3 ~ 4 ms 後に見られる負の成分の slope と Amplitude を pEPSP の指標とし、control 時に得られた pEPSP の値を基準として CCh 投与 30 分後の値に対して正規化を行った(図 61)。その結果、control slope が -2.89 ± 0.74 に対して 15 μM CCh 投与は

-0.78 ± 0.15 となり 27 %の有意な減少を示し、その後 CCh washout では -0.76 ± 0.11 で 26 %と有意な減少が続いた。また 30 μM CCh では slope が -0.24 ± 0.04 と control の 40 %という有意な減少を示し、その後 CCh washout では -0.41 ± 0.03 と control の 68 %まで回復した。同じく Amplitude に関しては control では 4.04 ± 0.71 mV に対して 15 μM CCh では 1.38 ± 0.18 mV で control に対して 34 %、CCh 30 μM では 0.32 ± 0.04 mV で control に対して 47 %の有意な減少が見られた。その後の washout では 15 μM CCh では 1.73 ± 0.20 mV で 42 %、30 μM CCh では 0.58 ± 0.03 mV で 85 %にまで回復した(図 62)。

以上の結果から 15 μM CCh、30 μM CCh において有意な pEPSP 減少が示された。

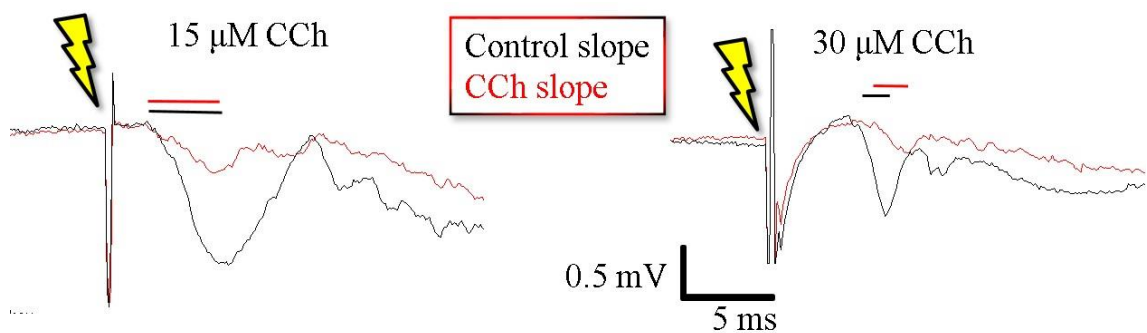


図 61 control と CCh 投与時の pEPSP。(左) control(黒色)と CCh 15 μM(赤色)の pEPSP を示す。(右)左と同様に 30 μM の pEPSP 変化を示す(n = 4)。黒色と赤色バーは pEPSP の指標に用いた時間窓を示す。

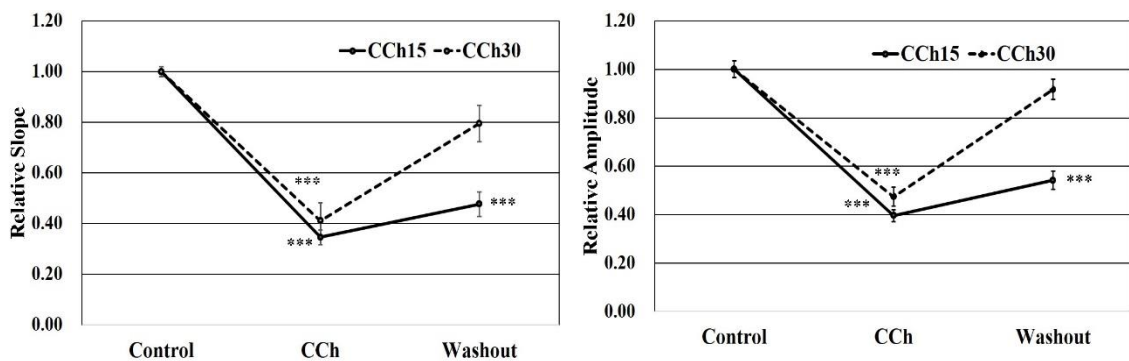
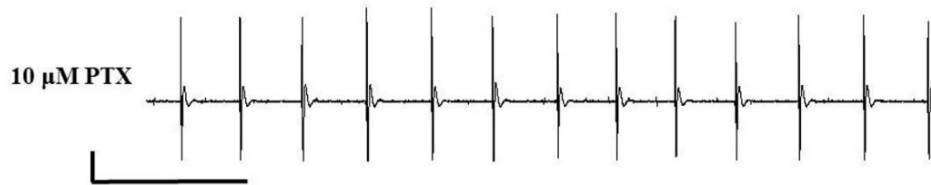
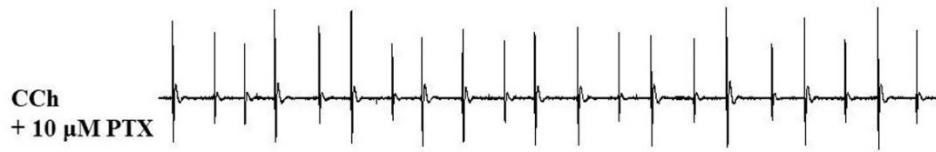


図 62 CCh による pEPSP 比較。(左) CCh 15 μ M (実線) と 30 μ M CCh (破線) の control に対する Relative slope。(実線) 15 μ M CCh (青) と 30 μ M CCh (破線) の control に対する Relative amplitude (ANOVA : *** $p < 0.001$) ($n = 4$)。

CCh による pEPSP 減少は本研究でも示され、振動現象が見られない低濃度 CCh でも pEPSP 減少が見られた。次に、振動現象が見られない低濃度 CCh 投与中に PTX、BIC、GBZ のてんかん様発火誘導薬を投与し誘導されるかどうか検証した。

その結果、低濃度 CCh 投与により pEPSP が減少しているにも関わらず interictal discharges が 10 μ M PTX、BIC、GBZ それぞれによって誘導された(図 63)。これらの結果は CIBO によるてんかん波抑制は pEPSP 減少だけではなく、振動現象の誘導が必要である可能性が強く示される結果となった。

15 μ M CCh



15 μ M CCh



15 μ M CCh

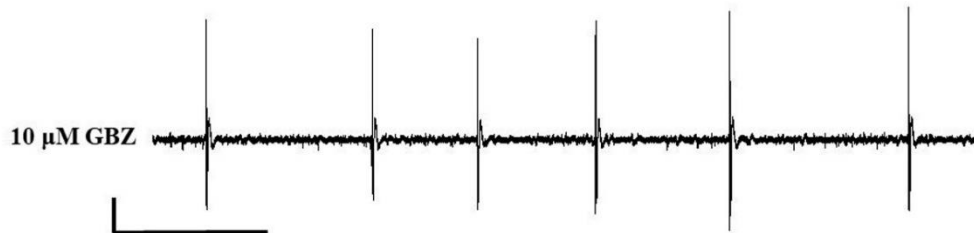
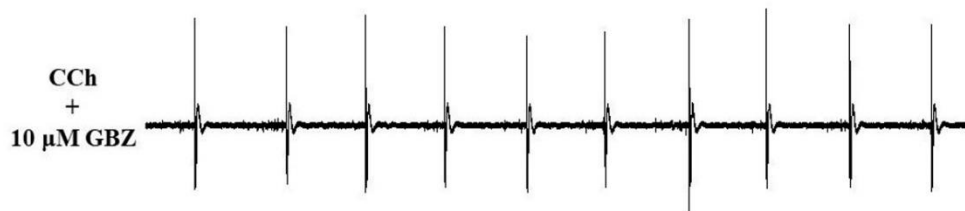


図 63 低濃度 (15 μ M CCh) 中に誘導される interictal discharges(n = 3)。ステータスバーは縦 1mV、横 20 s を示す。

4.7 CIBO によるてんかん様発火抑制とアデノシン受容体との関与

4.7.1 CIBO とアデノシン受容体との関与、またその時のてんかん様発火誘導
てんかん抑制には CIBO の振動現象の存在が重要であることが示された。次のこの間欠的に誘導される振動現象のメカニズムについて調べるためにアデノシン受容体 (P1R) との関与を非選択的 P1R 受容体阻害薬である caffeine を用いて CIBO との関与を調べた。

CIBO を誘導した後、100 μ M caffeine を投与したところ図 64 中のように CIBO の変化はなく、パラメータ比較をしても caffeine の効果は見られなかった(図 65) (student t-test : Duration p = 0.34、Amplitude p = 0.35、IBI p = 0.11、Frequency p = 0.38) (n = 7)。

しかしその後 caffeine に加えて 5 μ M GBZ をさらに加えた溶液を投与したところ、CIBO が消失し interictal discharges が誘導された。この結果は CIBO の振動現象維持には P1R の活性が関与することを示す結果となった(図 64 下)。

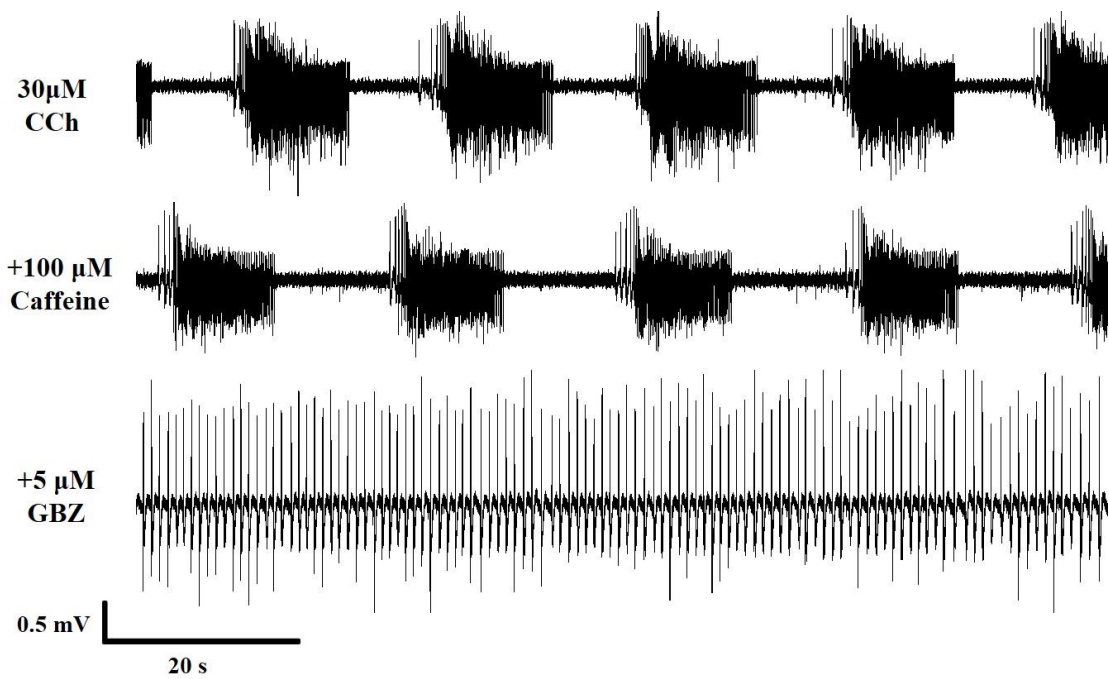


図 64 CIBO への P1R 阻害とその際に GABA_AR 阻害により誘導される interictal discharges。CIBO への 100 μM caffeine 投与による P1R 阻害のみでは CIBO に影響を及ぼさなかったがさらに 5 μM GBZ 投与による GABA_AR 阻害を行うと CIBO は消失し、interictal discharges が誘導された ($n=7$)。

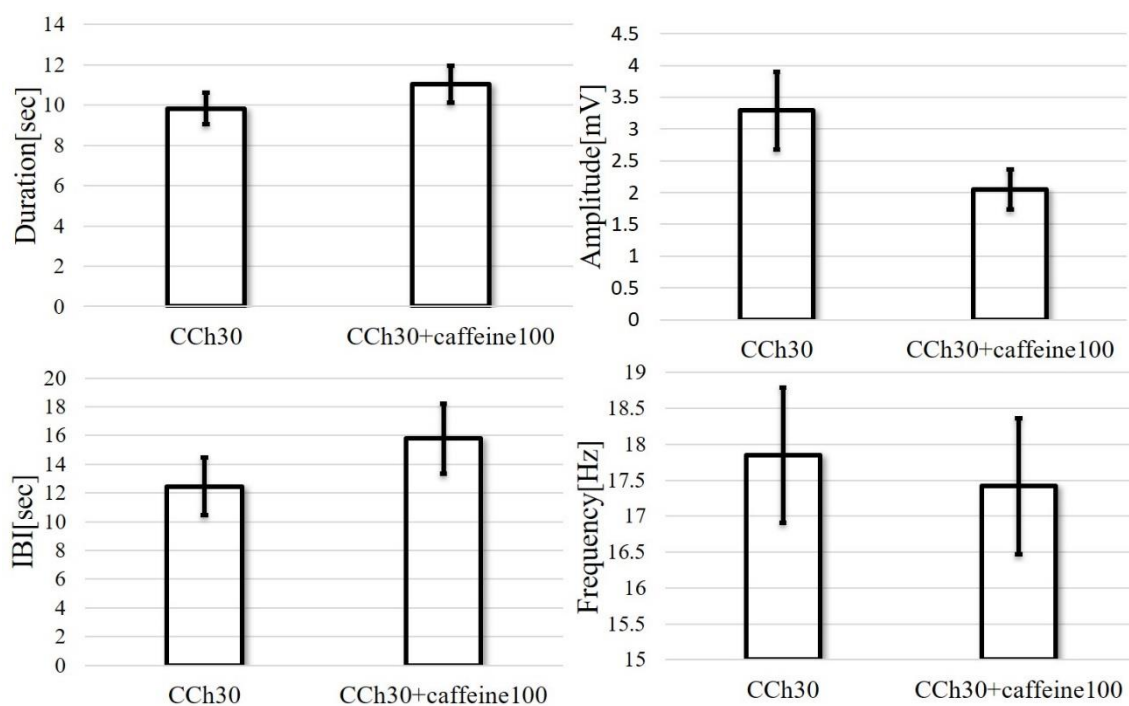


図 65 CIBO と CIBO + 100 μM caffeine 投与のパラメータ比較。CIBO への PIR 阻害はパラメータに有意な変化を示さなかった (対応あり student t-test : Duration $p = 0.34$ 、Amplitude $p = 0.35$ 、IBI $p = 0.11$ 、Frequency $p = 0.38$) (各 $n = 7$)。

4.7.2 アデノシン受容体サブタイプと CIBO のてんかん様発火抑制との関与
 さらに PIR のサブタイプである A1 の阻害薬である DPCPX 0.5 μM を CIBO 誘導 30 分後に投与することで、CIBO 誘導前の interictal discharges の誘導とともに IBI が有意に延長された(図 66 中及び図 67)。しかし CIBO は消失することはなかった。さらに 10 μM GBZ を加えて投与することで CIBO は消失し interictal discharges が誘導された(図 66 下)。

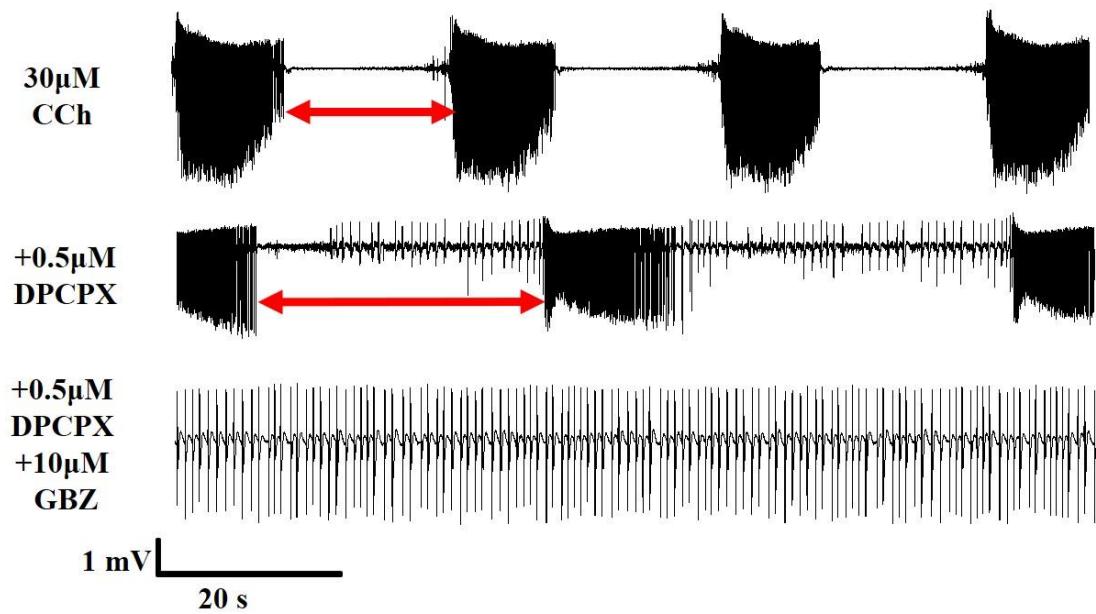


図 66 CIBO への A1 阻害による IBI 延長と GABA_AR 阻害による interictal discharges 誘導。(上)CIBO。(中)CIBO への 0.5 μ M DPCPX 投与。赤矢印は IBI を示す。(下)CIBO への DPCPX 及び 10 μ M GBZ 投与。

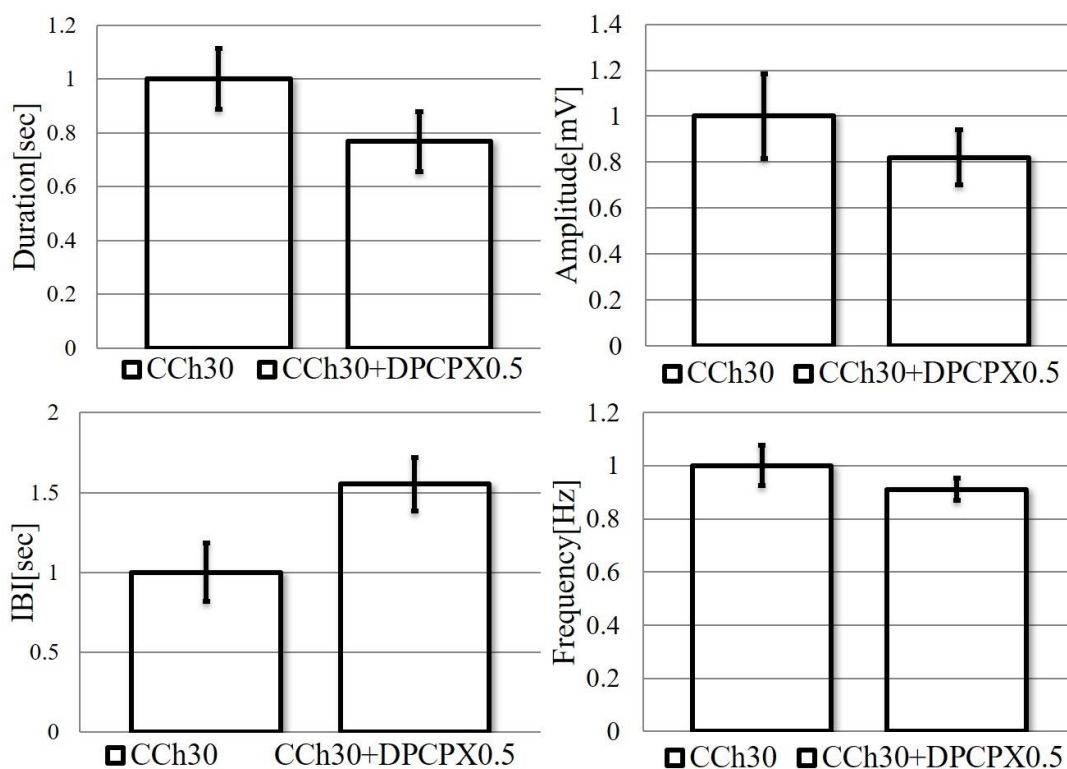


図 67 CIBO と DPCPX を加えた際のパラメータ比較。IBI にのみ有意な差が見られた。(student t-test : Duration $p = 0.19$ 、IBI ** $p < 0.01$ 、Amplitude $p = 0.54$ 、Frequency $p = 0.45$) (各 $n = 5$)

4.8 CIBO の Inter Burst Interval における Burst 電気刺激に対する Burst 誘導性
 CIBO は間欠的な振動現象であり、振動間には何も応答を示さない期間 (IBI) が存在する。また先行研究において Nishimura らは CIBO の IBI フェイズにおいて CA3 と CA1 のシナプス長期増強 (LTP) が IBI 後半で特に誘導されることを明らかにし、CA3 と CA1 領域間の β リズム長期増強の同期が必要であることを示した [116]。そこで IBI のフェイズごとに Burst を誘導する電気刺激を行い、振動の誘導性を検証した。電気刺激は全て CIBO 誘導 30 分後以降に行われ、刺激前の 3 つの IBI 平均から各フェイズに対応する時間を決定し、刺激を行った。また電気刺激を行った後、次の刺激まで 10 分間の時間を設けた (図 68)。

CIBO 直後 (103°) の刺激で4回中に誘導された振動は0回。160°のフェイズでの刺激は4回中に誘導された振動は1回。222°のフェイズでの刺激は4回中に誘導された振動は3回。281°のフェイズでの刺激は4回中に誘導された振動は3回。340°のフェイズでの刺激は4回中に誘導された振動は4回全ての結果となり、IBI 後半フェイズにつれて Burst 電気刺激による振動が誘導されやすい結果となった(図 69)。

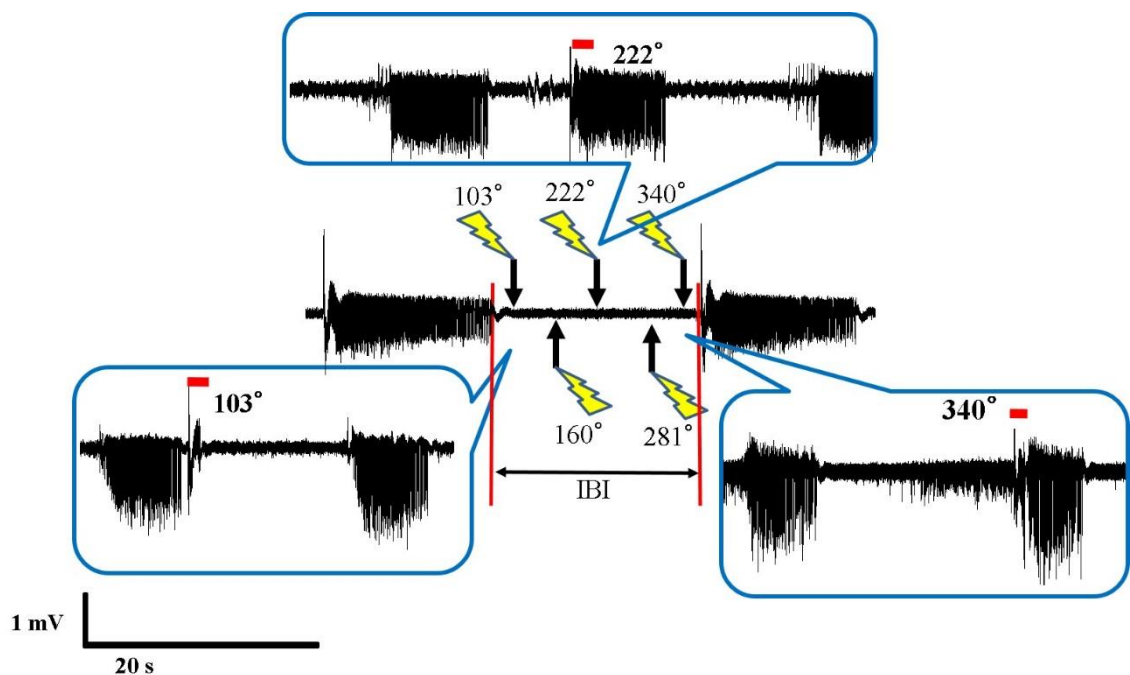


図 68 IBI 各フェイズにおける Burst 電気刺激による振動誘導。赤色は電気刺激期間を示す (IBI 1 区間につき刺激は 1 セットで 10 分は間隔をおいた)。IBI における 0 %、25 %、50 %、75 %、90 % はそれぞれ 103°、160°、222°、281°、340° に相当。

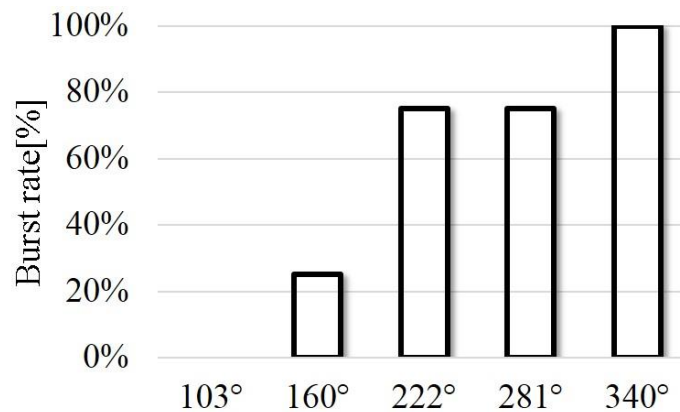


図 69 IBI 各フェイズにおける Burst 電気刺激による振動誘導率。IBI 後半での振動誘導率が上昇している。

4.9 β 周波数帯電気刺激によるてんかん様発火の抑制

CIBO のてんかん抑制には β 周波数帯領域の振動現象が必要であることが判明した。他の研究により θ 周波数帯刺激によりてんかんは抑制される結果を示されており、次にこの β 振動現象による抑制は予め設定した電気刺激(β 周波数帯電気刺激)によっても抑制可能であるかを検証し、β 周波数帯刺激のてんかん抑制を調べた。

4.9.1 β 周波数帯電気刺激によるてんかん様発火の抑制

まず 5 μM GBZ により interictal discharges や ictal discharges を 30 分間誘導させた後、CIBO のパラメータをもとに設定した β 周波数帯電気刺激 (Start interval : 10 ms、Duration : 200 μs、Interval : 60 ms、Train : 150、Stimulation interval : 23 s、SET CYCLE : 10) を行ったところ、β 周波数帯電気刺激によって 24 枚中 21 枚のスライスでてんかん波が抑制された。3 枚のスライスで interictal discharges 及び ictal discharges が Stimulation interval 後半において抑制されなかった (図 70 図 71) (n = 24)。

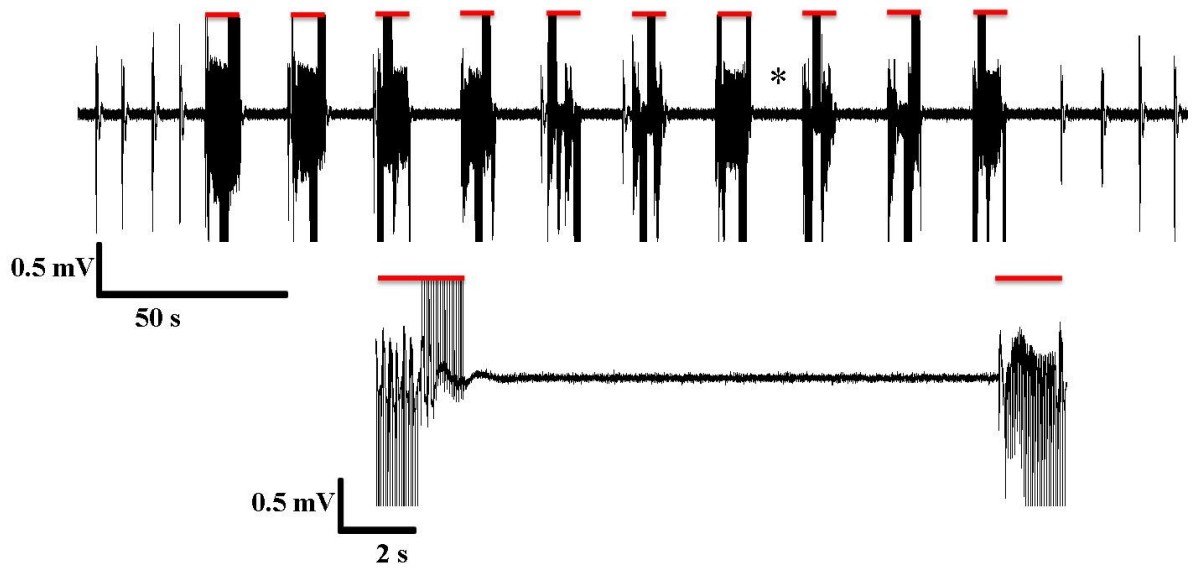


図 70 interictal discharges への β 周波数帯電気刺激。10 μ M GBZ によって誘導された interictal discharges は β 周波数帯電気刺激により抑制された。赤色の線は β 周波数帯電気刺激を示し、下は*部分の拡大図を示す。

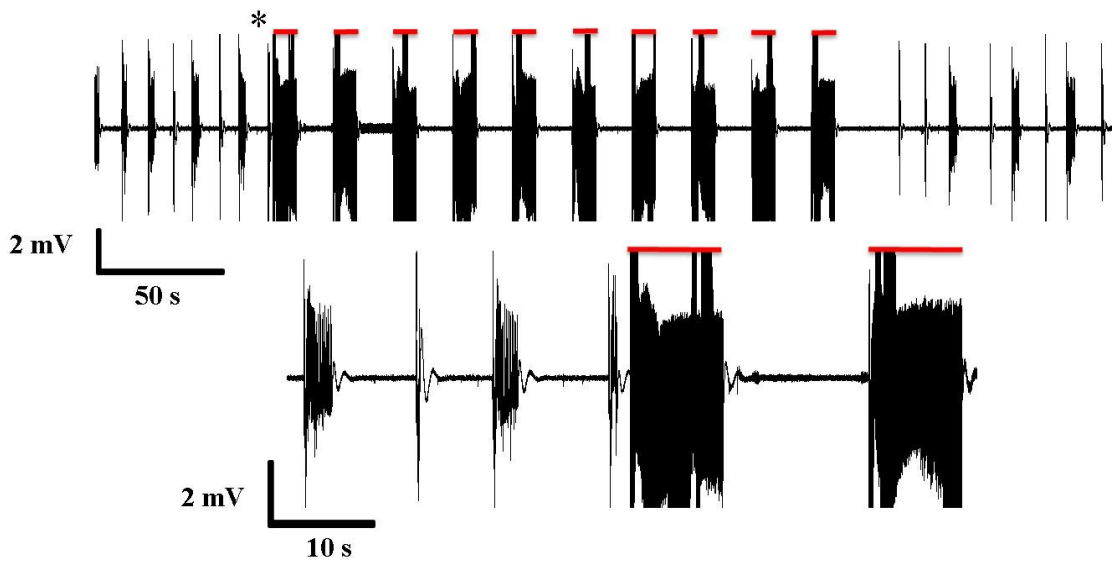


図 71 ictal discharges への β 周波数帯電気刺激。 β 周波数帯電気刺激は ictal discharges も抑制した。赤色の線は β 周波数帯電気刺激を示し、下は*部分の拡大図を示す。

4.9.2 β 周波数帯電気刺激 Stimulation interval 延長のてんかん様発火に対する効果

CIBO によるてんかん抑制は β 周波数帯の電気的な刺激によっても抑制された。次にこの β 周波数帯電気刺激における Stimulation interval を延長させ、てんかん様発火誘導の有無を検証しててんかん抑制と Stimulation interval との関与を調べた。その結果、CIBO の IBI パラメータをもとに設定された β 周波数帯電気刺激 control Stimulation interval (23 s) では interictal discharges は誘導されなかった(図 72 上)(n = 5)。しかし、Stimulation interval を延長させた long Stimulation interval (39 s) の刺激では interictal discharges が誘導され、てんかん様発火波を抑制することができなかった(図 72 下)。この結果はてんかん様発火抑制には CIBO の振動現象に加え、IBI の長さが重要であることを示す。

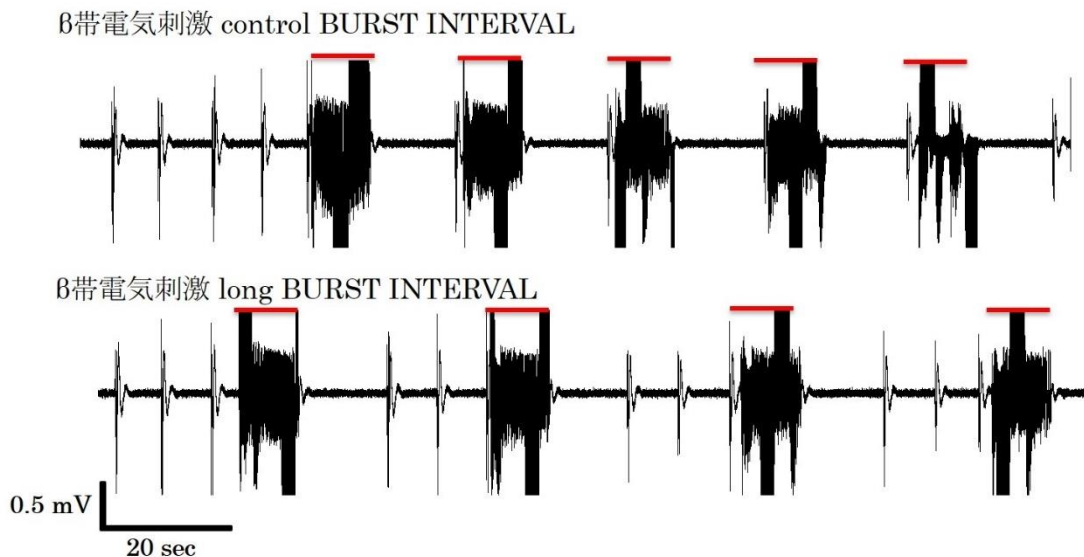


図 72 (上) β 周波数帯電気刺激は interictal discharges を抑制するが、(下) Stimulation interval の延長は interictal discharges が誘導される。

4.10 β 周波数帯電気刺激のてんかん様発火抑制に対するアデノシン受容体とサブタイプとの関与

P1R は様々な中枢神経系に存在し神経疾病とも関連性があることが示されている。さらに連続的な神経興奮からアデノシンが放出されることがわかっている。ここでは β 周波数帯の刺激によるてんかん波抑制とアデノシンをリガンドとする P1R との関与とさらにそれらのサブタイプを A1、A2A について調べた。

5 μM GBZ 投与により interictal discharges を 30 分間誘導した後、50 μM caffeine もしくは 100 μM を加えて 30 分間投与した。その後、 β 周波数帯電気刺激を行ったところ、GBZ のみの投与による interictal discharges は β 周波数帯電気刺激によって抑制されたが(図 73A)、GBZ 誘導 interictal discharges への 50 μM caffeine (図 73B)及び 100 μM 投与(図 73C)による P1R 阻害は β 周波数帯電気刺激で抑制されず、Stimulation interval の後半で interictal discharges 誘導された。

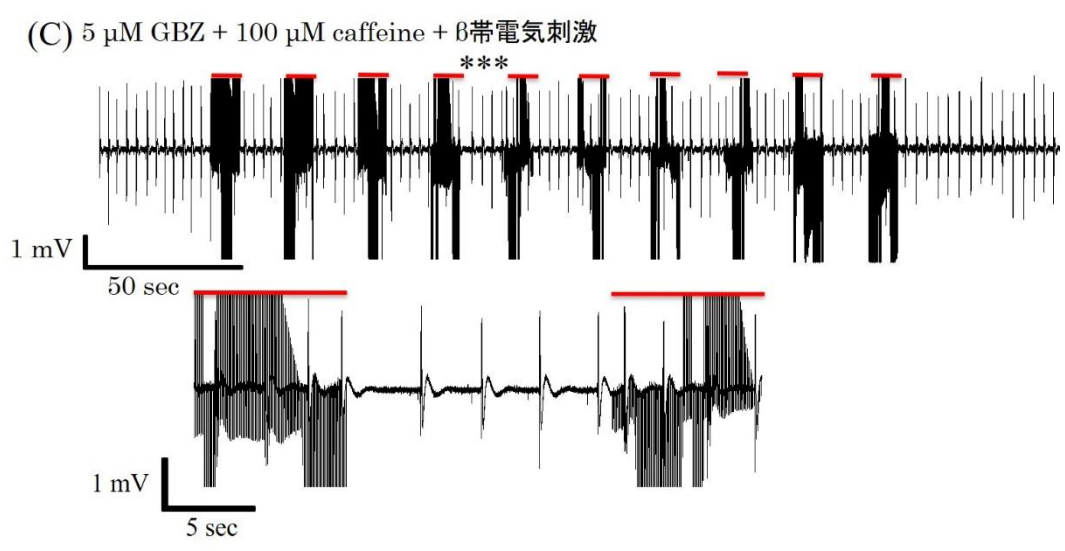
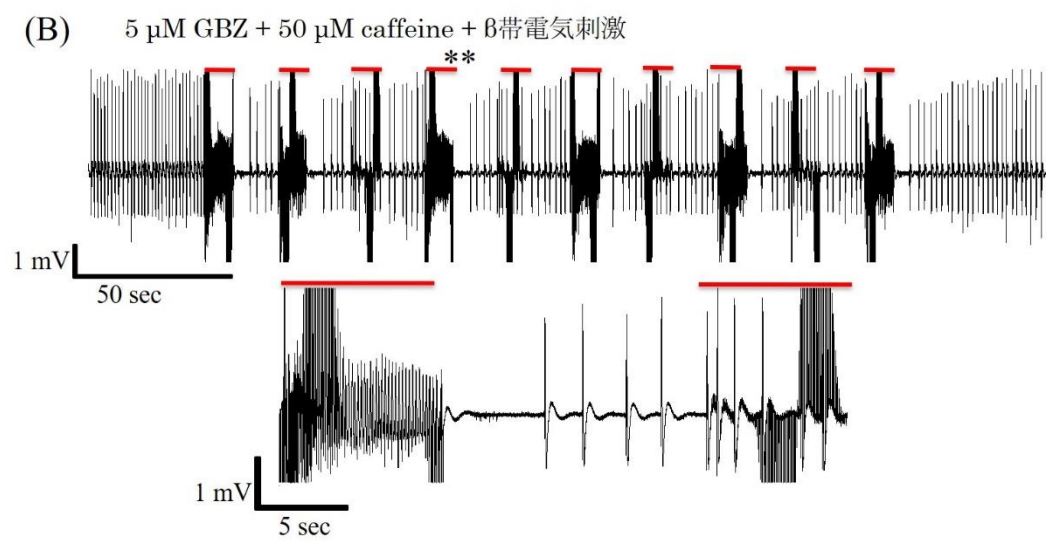
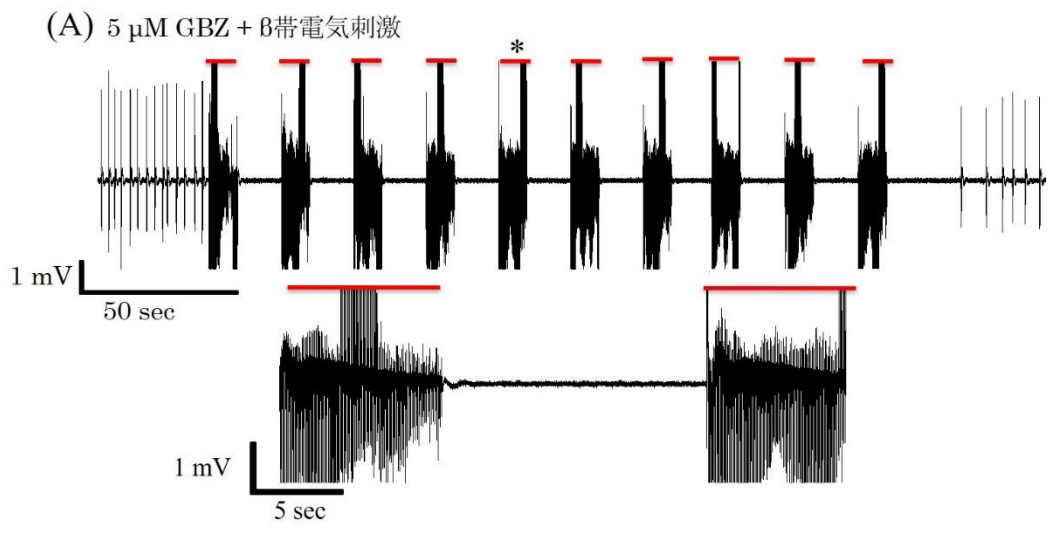


図 73 P1R 阻害は β 周波数帯電気刺激によって interictal discharges が抑制されない。下は*の拡大図を示す。赤色は β 周波数帯電気刺激の適用期間を示す。(A)GBZ 5 μM によって誘導される interictal discharges は β 周波数帯電気刺激によって抑制される ($n = 5$)。 (B) interictal discharges 誘導中に 50 μM caffeine 投与した場合、 β 周波数帯電気刺激による interictal discharges の抑制が見られない ($n = 4$)。 (C) (B)と同様に 100 μM caffeine においても interictal discharges の抑制は見られなかった ($n = 5$)。

さらに、 β 周波数帯電気刺激中に誘導される interictal discharges の総数を比較したところ有意な差は見られなかったものの、caffeine 投与によりスパイク数は上昇することがわかった(図 74)(ANOVA : $p = 0.09$, 5 μM GBZ $n = 5$, + 50 μM caffeine $n = 4$, + 100 μM caffeine $n = 5$)。

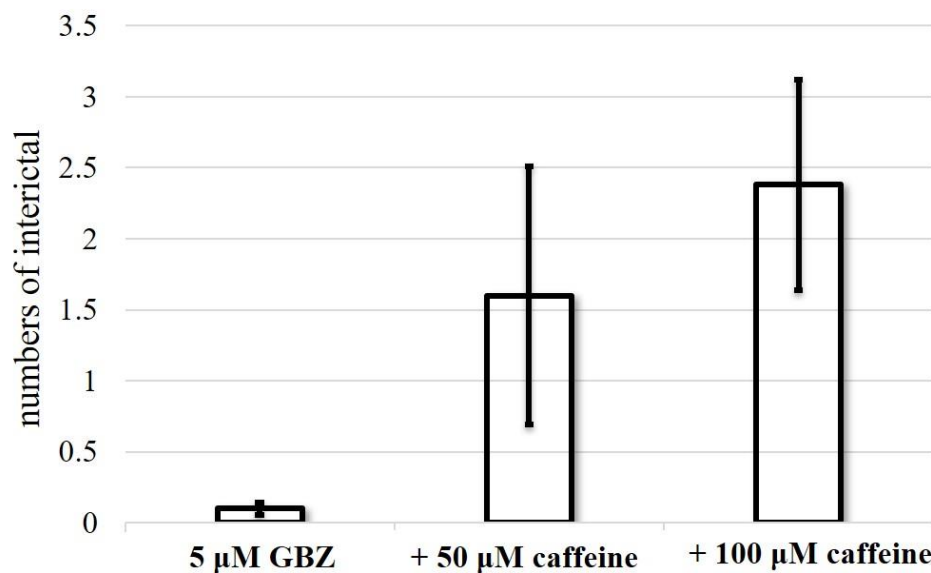


図 74 β 周波数帯電気刺激中に誘導された interictal discharges 総数比較。 caffeine 投与により誘導される interictal discharges の総数は大きく上昇した。

β 周波数帯電気刺激終了後、いずれのスライスにおいても recovery interval の後に interictal discharges または ictal discharges が再び誘導されたが、caffeine の投与はその recovery interval を有意に短くした(図 75) (ANOVA : * $p < 0.05$ 、5 μM GBZ n = 5、+ 50 μM caffeine n = 4、+ 100 μM caffeine n = 5)。

以上の結果から PIR 阻害によりてんかん様発火は β 周波数帯電気刺激でも抑制できず、また刺激後から再びてんかん様発火が誘導されるまでの時間(Δt [s])も短くて てんかん様発火が誘導されやすい状態であることが示された(図 75) (ANOVA, Fisher : *** $p < 0.001$ 、5 μM GBZ n = 5、+ 50 μM caffeine n = 4、+ 100 μM caffeine n = 5)。

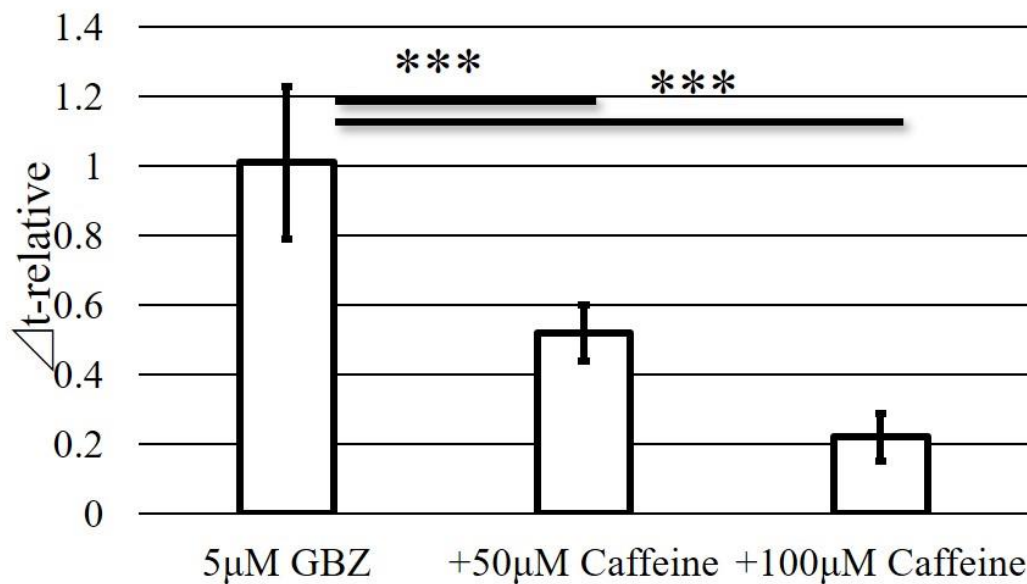


図 75 β 周波数帯電気刺激終了から interictal discharges が再び誘導される時間 (Δt [s])の比較。Caffeine 投与により有意に短くなった。

PIR サブタイプとの関与

上のことから β 周波数帯のてんかん様発火抑制には P1R が関与することが示された。P1R にはサブタイプが存在しそれらがどのように関与するかを調べるために A1 及び A2A の阻害薬を用いた状態で電気刺激を行いその効果を調べた。

まず A1 との関与については、5 μ M GBZ 投与によりてんかん波を誘導し、そこに A1 阻害薬である 50 nM 8CPT を 30 分投与し β 周波数帯電気刺激を行った。その結果、抑制されていたてんかん様発火は 8CPT 投与により抑制されず、 β 周波数帯電気刺激のてんかん様発火抑制には A1 受容体が関与することが示された(図 76 上)。次に A2A との関与については、5 μ M GBZ 投与によりてんかん波を誘導し、そこに A2A 阻害薬である 50 nM IST を 30 分投与し β 周波数帯電気刺激を行ったがてんかん様発火の抑制は維持された(図 76 下)。

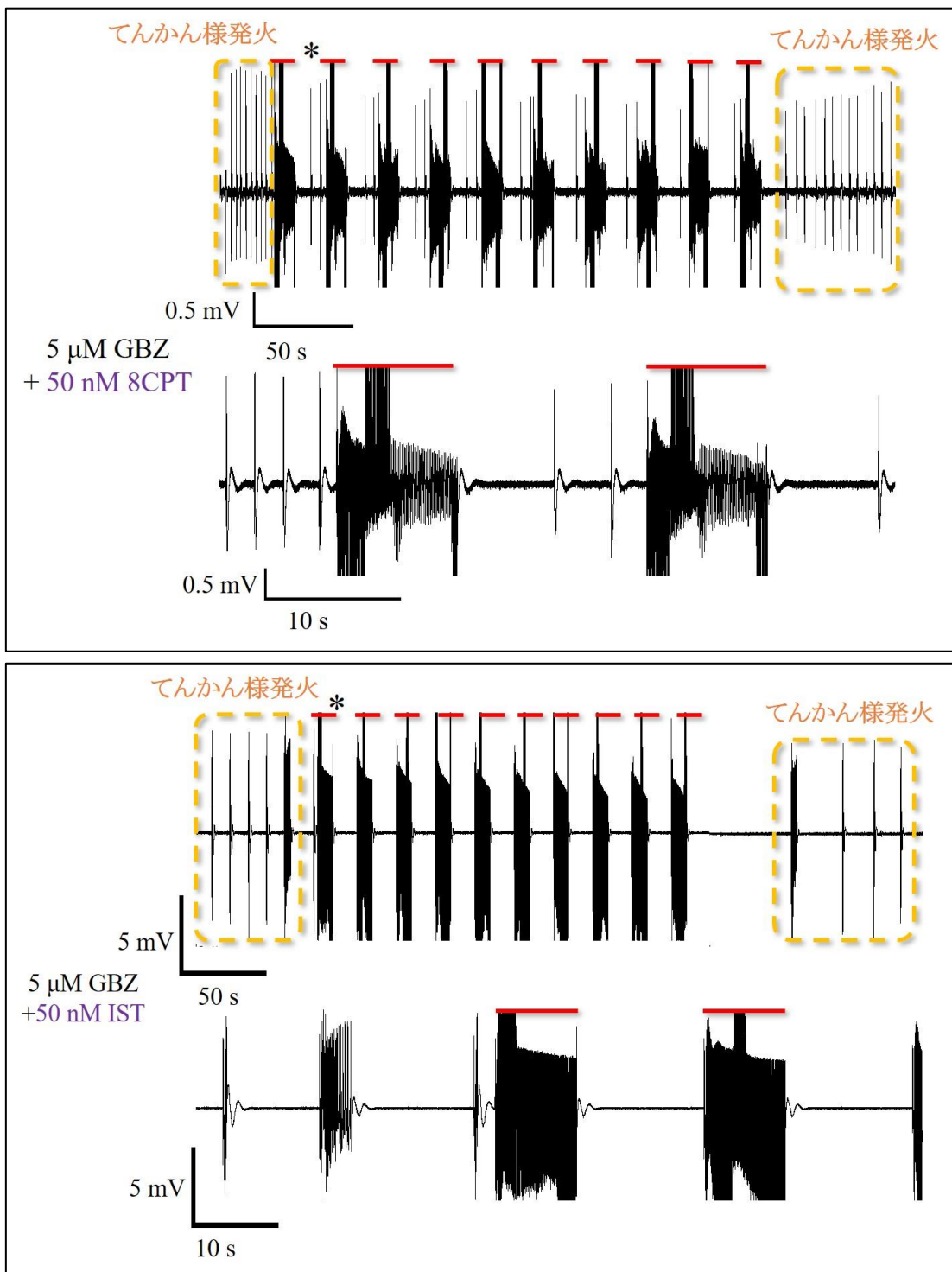


図 76 β 周波数帯電気刺激のてんかん様発火抑制における P1R サブタイプの関与。

(上) A1 を阻害する 8CPT 投与によりてんかん様発火は抑制されなくなった ($n =$

6)。(下) A2A を阻害する IST 投与はてんかん様発火抑制に変化をもたらさなかった (n=8)。各枠内の下は*部分の拡大を示す。

次に電気刺激終了後に再度てんかん様発火が誘導されたが、その誘導されるまでの時間を回復時間(Recovery time) Δt [s]として P1R サブタイプの間を GBZ のみと比較したところ、A1 阻害と A2A 阻害の間でのみ有意差が見られた (図 77)。(ANOVA, Fisher: * p < 0.05, 5 μ M GBZ n = 5, + 50 nM IST n = 6, + 50 nM 8CPT n = 8)。また有意な差は見られなかったが、GBZ のみの状態よりも A2A の阻害は刺激により Δt が増加傾向に、A1 阻害は Δt が減少傾向にあった。このことは A1、A2A の活性はてんかん様発火の誘導時間を調節しているかもしれないことを示す。

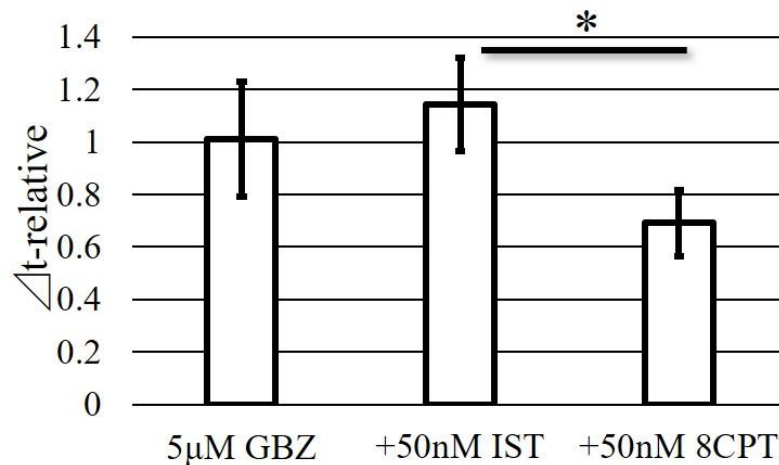


図 77 P1R サブタイプと Δt -relative の関係。A1 阻害と A2A 阻害の間に有意な差が見られた。GBZ 誘導てんかん様発火への β 周波数帯電気刺激とサブタイプ間に有意な差は見られなかったがそれぞれ傾向は見られる。

4.11 θ 周波数帯電気刺激のてんかん様発火抑制に対するアデノシン受容体とサブタイプとの関与

θ 周波数帯と β 周波数帯といった周波数依存的なてんかん抑制についての違いやその機構については未だ不明な点が多い。そこで θ 周波数帯と β 周波数帯電気刺激のてんかん抑制の差を調べた。予め $5 \mu\text{M}$ GBZ 投与によりてんかん波を誘導させ、 θ 周波数帯電気刺激を行ったところ 30 枚のスライス中、11 枚のスライスでてんかん様発火は抑制されなかった(図 78)。

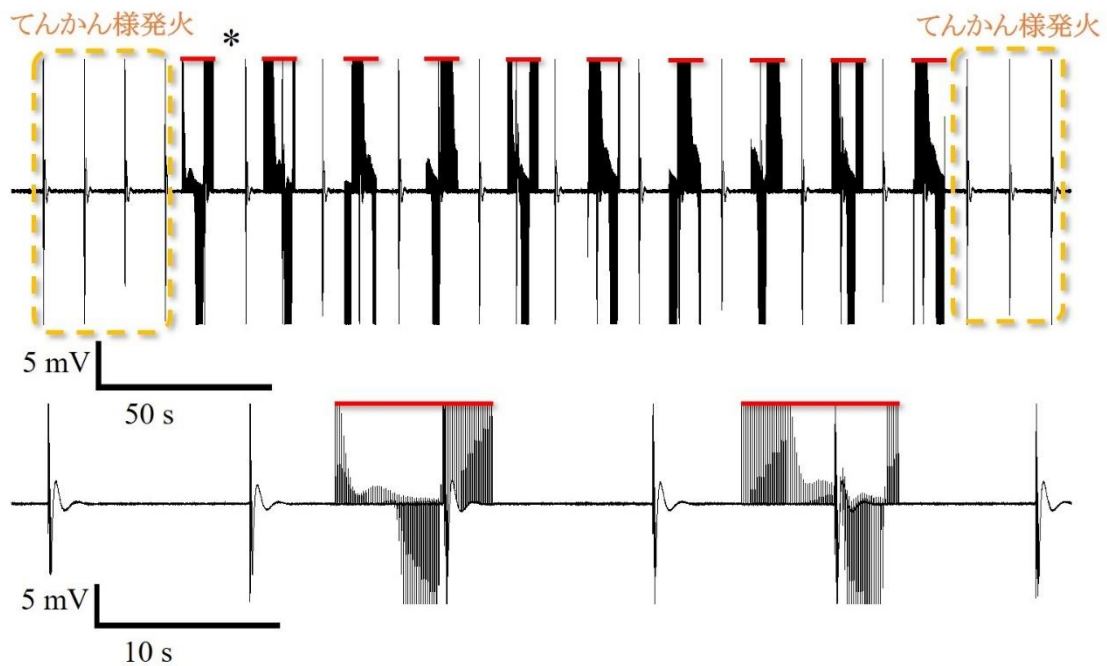


図 78 $5 \mu\text{M}$ GBZ 投与によるてんかん様発火への θ 周波数帯電気刺激 (赤線部) は抑制できないスライスが多く見られた。下は*の部分の拡大図。

4.12 θ 周波数帯電気刺激のてんかん様発火抑制に対するアデノシン受容体の関与

β 周波数帯電気刺激のてんかん様発火の抑制にはアデノシン受容体である P1R の関与が示された。そこで θ 周波数帯電気刺激についても同様に検証した。その結果、 θ 周波数帯バー

ストによりてんかん波が抑制されたスライスは $50\ \mu\text{M}$ 及び $100\ \mu\text{M}$ Caffeine 投与すると、抑制されずにてんかん様発火が誘導された。従って、 β 周波数帯電気刺激のてんかん様発火の抑制と同様に θ 周波数帯電気刺激においても PIR が関与することが示された(図 79)。

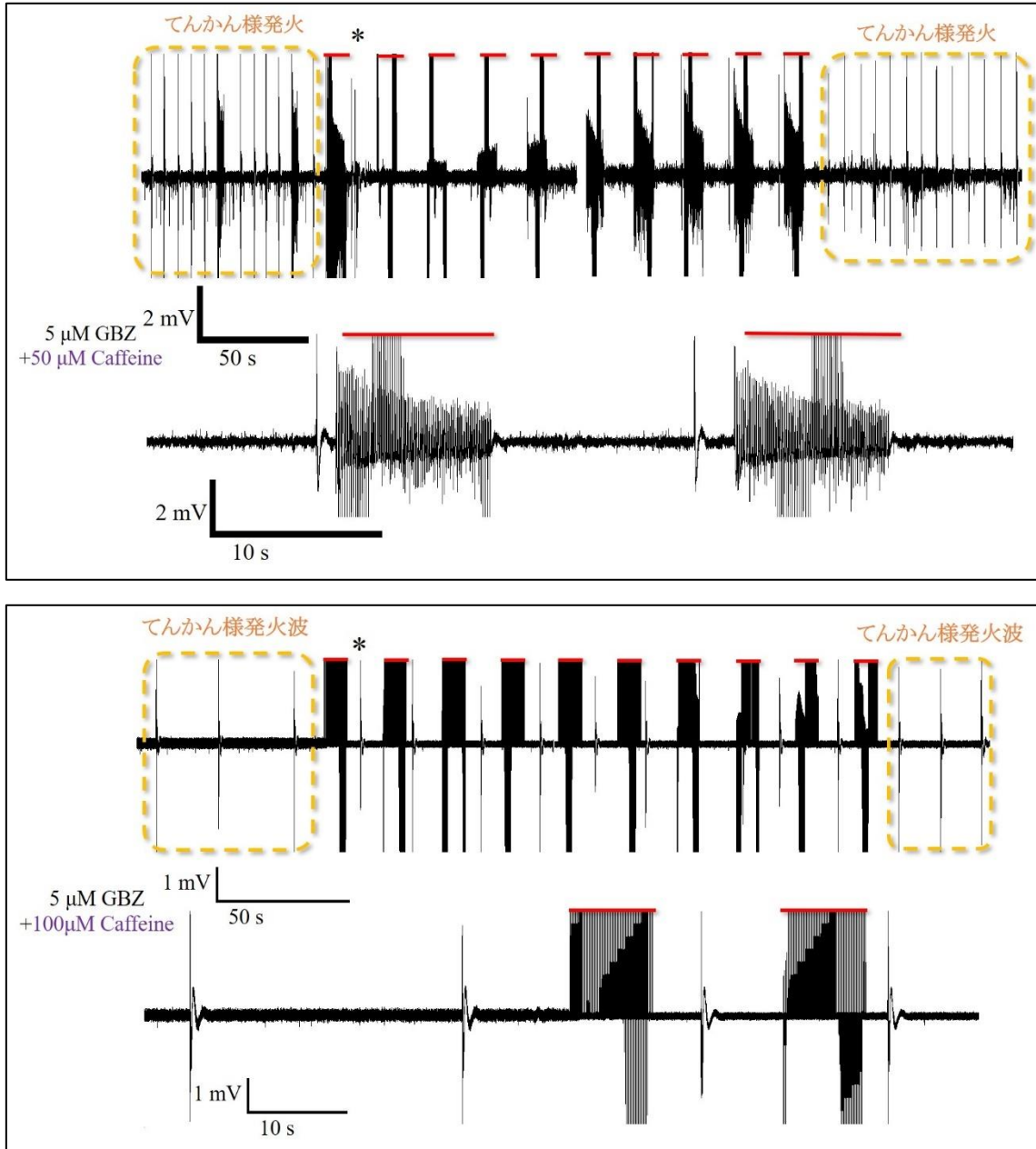
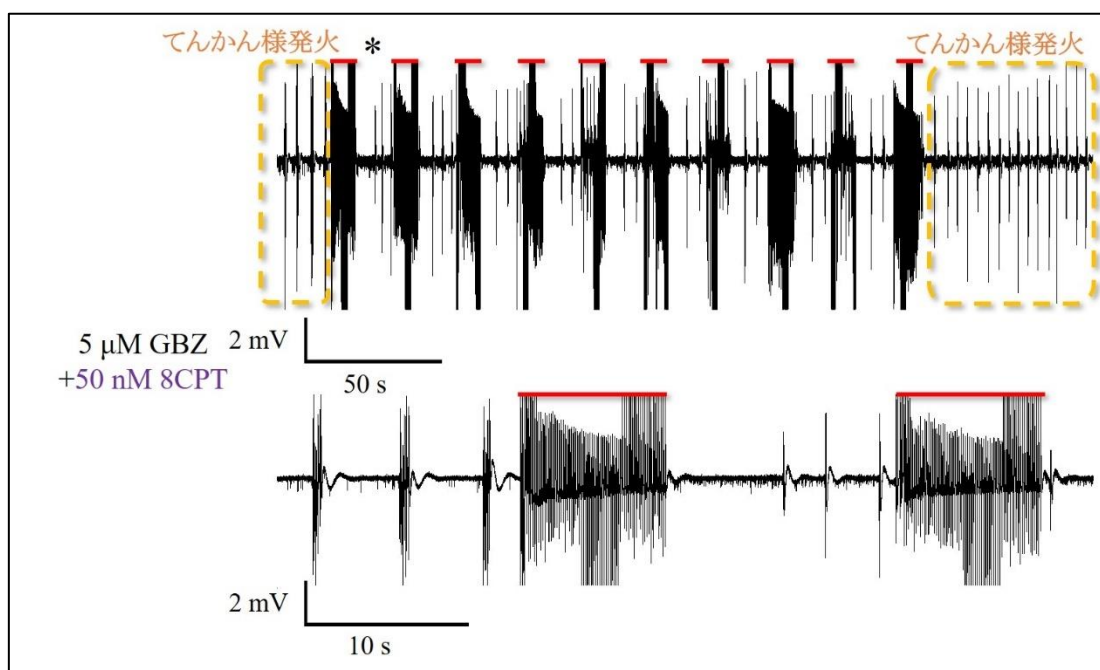


図 79 θ 周波数帯電気刺激によって抑制されていたスライスにおいて、 $5\ \mu\text{M}$ GBZ 誘導てんかん様発火は $50\ \mu\text{M}$ (上)、 $100\ \mu\text{M}$ (下) Caffeine 投与による PIR 阻害により抑制が見られなくなった。各枠内の下は*の部分の拡大図($n = 6$)。

P1R サブタイプとの関与

上のことから θ 周波数帯のてんかん様発火抑制にも P1R が関与することが示された。 β 周波数帯の電気刺激と同様に P1R サブタイプが存在しそれらがどのように関与するかを調べるために A1 及び A2A 阻害薬を用いた状態で θ 周波数帯電気刺激を行いその効果を調べた。

A1 阻害薬である 50 nM 8CPT の投与における θ 周波数帯電気刺激は、 β 周波数帯電気刺激と同様に抑制されていたスライスでのてんかん様発火は 8CPT 投与により抑制されなかった(図 80 上)。また、A2A 阻害薬である 50 nM IST 投与は θ 周波数帯電気刺激によるてんかん様発火の抑制が維持された(図 80 下)。



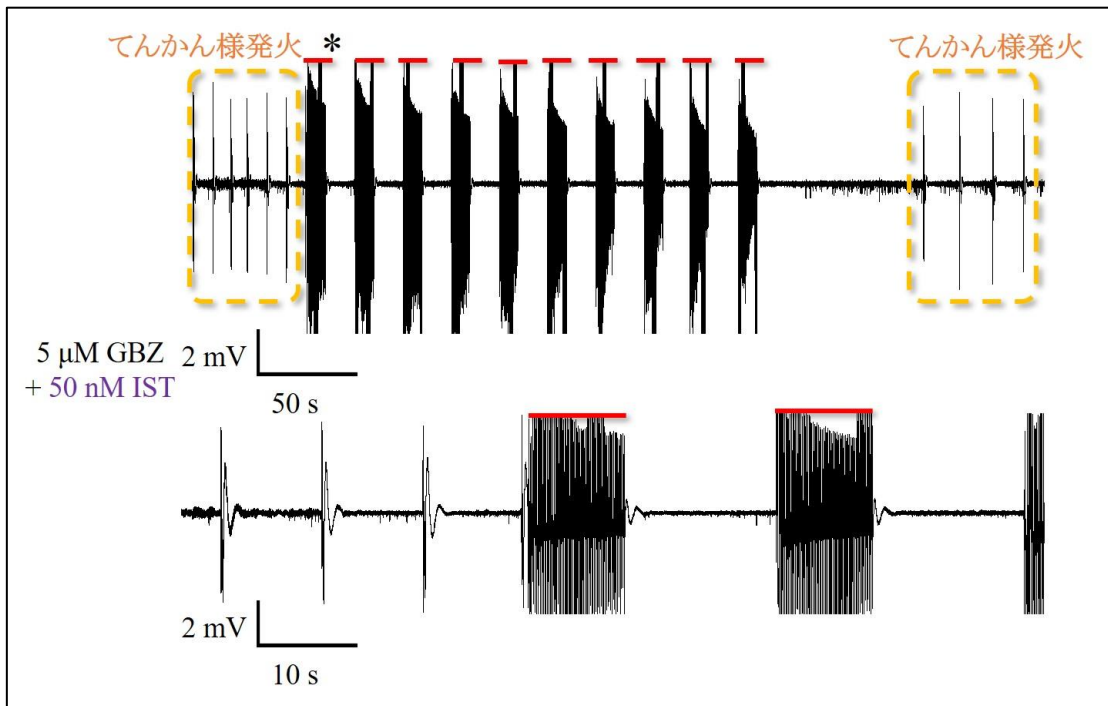


図 80 θ 周波数帯電気刺激のてんかん様発火抑制における P1R サブタイプの関与。

(上) A1 を阻害する 8CPT 投与によりてんかん様発火は抑制されなくなった ($n = 6$)。 (下) A2A を阻害する IST 投与はてんかん様発火抑制に変化をもたらさなかった ($n = 7$)。各枠内の下は*部分の拡大を示す。

次に電気刺激終了後に再度てんかん様発火が誘導されるまでの時間 Δt [s] と P1R サブタイプの関与を GBZ のみと比較したところ、A1 阻害と A2A 阻害の間でのみ有意差が見られた (図 77)。 (ANOVA, Fisher: $* p < 0.05$, 5 μ M GBZ $n = 5$, + 50 nM IST $n = 7$, + 50 nM 8CPT $n = 6$)。また有意な差は見られなかったが、 β 周波数帯電気刺激の結果同様に GBZ のみの状態よりも A2A の阻害は刺激により Δt が増加傾向に、A1 阻害は Δt が減少傾向にあった。このことは A1、A2A の活性はてんかん様発火の誘導時間を調節し、さらに β 周波数帯と同様なメカニズムを持つ可能性があることを示す。

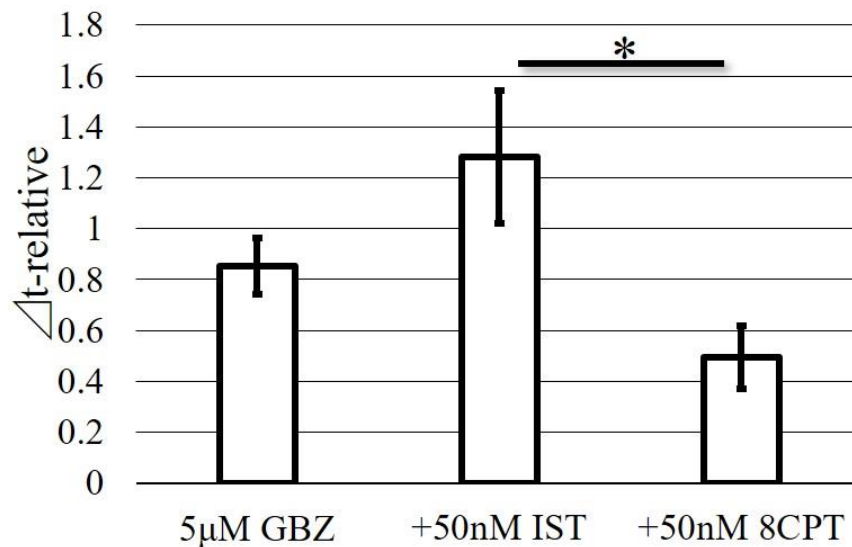


図 81 P1R サブタイプと Δt -relative の関係。A1 阻害と A2A 阻害の間に有意な差が見られた。GBZ 誘導てんかん様発火への θ 周波数帯電気刺激とサブタイプ間に有意な差は見られなかったがそれぞれ傾向は見られる。

4.13 β 周波数帯と θ 周波数帯電気刺激におけるてんかん様発火抑制の差

以上の結果から β 周波数帯と θ 周波数帯のてんかん様発火に対する電気刺激の抑制に対する比較をすることでてんかん様発火抑制に関する周波数依存性を調べた。 θ 周波数帯の電気刺激では 30 枚のスライス中、11 枚のスライスでてんかん様発火が抑制されなかった。一方で β 周波数帯電気刺激によって 24 枚中 21 枚のスライスにおいててんかん様発火が抑制され、3 枚のスライスは抑制されなかった。 θ 周波数帯電気刺激は β 周波数帯電気刺激と比較して抑制率が低く、電気刺激における抑制できなかったスライス枚数でカイ 2 乗 (χ^2) 検定を行ったところ有意確率 $2.10E-08 < 0.05$ となり、 θ 周波数帯電気刺激はてんかん様発火の抑制が低いことがわかった。また、1 枚のスライスで刺激を 10 回行ったが、Stimulation interval 中に誘導されたてんかん様発火の回数を θ 、 β 周波数帯で比較したところ、 β 周波数帯電気刺激では 225 回の刺激中 8 回、 θ 周波数帯電気刺激では 270 回の刺激中 66 回でてんかん様発

火が誘導され、カイ 2 乗(χ^2)検定を行ったところ有意確率 $5.07E-81 < 0.05$ となり θ 周波数帯電気刺激では抑制率が低いことが示された。

β 周波数帯電気刺激と θ 周波数帯電気刺激のてんかん波抑制機構にPIRが関与することが示された。また、PIRのサブタイプ A1、A2A についてのてんかん様発火抑制の関与についてさらに調べた。

まず A1 との関与については、どちらの周波数帯電気刺激においてもてんかん様発火の抑制が見られず、その抑制には A1 受容体の活性化の関与が共通で必要であることが示された(図 73、図 79)。

次に刺激終了後に再度てんかん波が誘導されたが、その誘導されるまでの時間を回復時間 (Recovery time) Δt [s]を θ 、 β 周波数帯刺激で比較した。その結果、有意な差は見られなかった($p = 0.108$)が θ 周波数帯バースト電気刺激における Δt は短い傾向だった(図 82)。

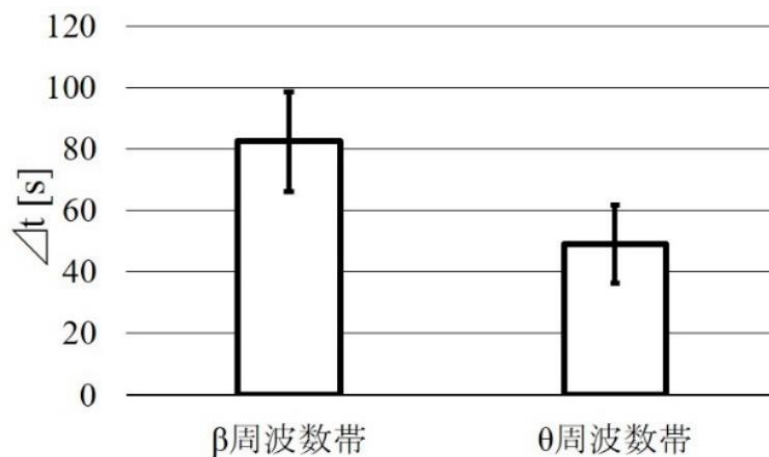


図 82 β 周波数帯と θ 周波数帯電気刺激の Δt (対応なし student t-test、 $p = 0.108$ 、 β 周波数帯電気刺激は $n = 25$ 、 θ 周波数帯電気刺激は $n = 30$)。

この Δt -relative を各薬品について値を求め、比較を行った。つまり Δt -relative が1より変化すれば Δt が drug の影響を受ける事を示す。5 μM GBZ については投与 30 分後の β 、 θ 電気刺激により得られた Δt とその後さらに 30 分後 5 μM GBZ を続けて投与し、電気刺激を与えて得られた Δt との比を Δt -relative とした。このとき β 、 θ 周波数帯電気刺激による Δt -relative の違いは見られず (β 周波数帯: $p = 0.145$ 、 θ 周波数帯: $p = 0.352$ 、対応あり t-test) 電気刺激による Δt への経過時間の影響はなかった (図 83, 5 μM GBZ)。

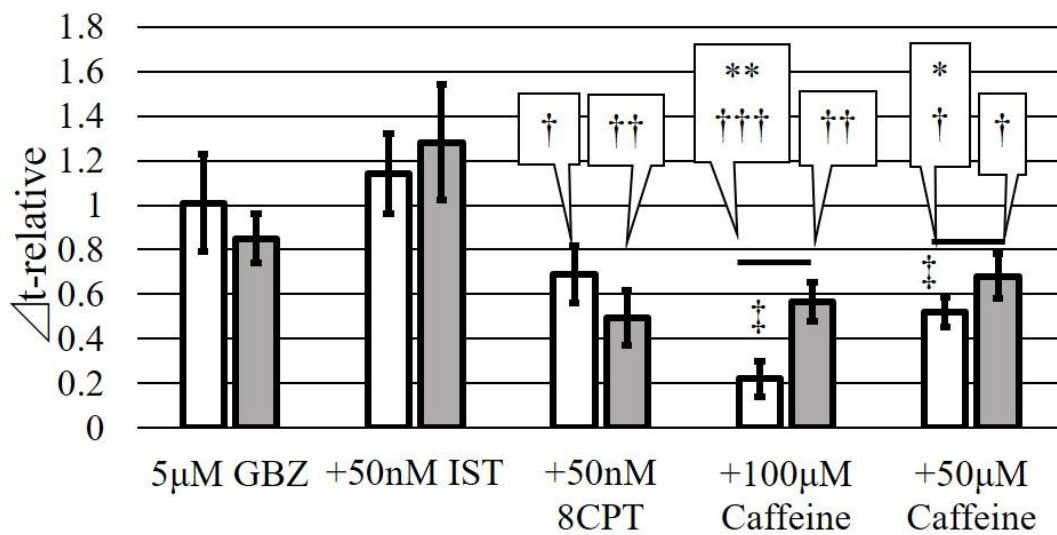


図 83 β 周波数帯及び θ 周波数帯電気刺激と A1、A2 受容体阻害による Δt -relative の比較. (ANOVA、* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ vs 5 μM GBZ、† : $p < 0.05$ 、†† : $p < 0.01$ 、††† : $p < 0.001$; vs + 50 nM IST、‡ : $p < 0.05$ β vs θ 周波数帯パースト電気刺激、但し同色バー同士を比較した。白バー : β 周波数帯、灰バー : θ 周波数帯電気刺激)

これらのことから β 周波数帯と θ 周波数帯のてんかん様発火抑制には差が見られ、それらはアデノシン受容体である P1R とそのサブタイプ A1 を阻害することでてんかん様発火は抑制されない結果となった。さらに A2A を阻害する 50 nM IST の投与は 5 μM GBZ のみ投与との比較では見られなかった Δt -relative の差が見られ、A2A は Δt を若干延長させ逆に A1 は

Δt を短縮させる可能性が示されたがここには β 周波数帯と θ 周波数帯の差は見られず共通の効果を持つものと言える。

以下、 β 周波数帯と θ 周波数帯の差を表 2 にまとめた。

表 2. β 周波数帯と θ 周波数帯電気刺激の違いまとめ。てんかん様発火に対する抑制率と Stimulation interval で抑制されなかった刺激回数、及び Caffeine 投与による Δt -relative に β 周波数帯と θ 周波数帯の差が見られた。

		<u>β周波数帯</u>	<u>θ周波数帯</u>	<u>β vs θ比較</u>
てんかん様発火が抑制されたスライス枚数の確率[%]		88	30	(χ^2)検定 p = 2.10E-08 < 0.05
Stimulation interval で抑制されなかった刺激回数の確率[%]		3.13	24.4	(χ^2)検定 p = 5.07E-81 < 0.05
Δt [s]		82.3 \pm 16.4	48.9 \pm 12.6	Student t-test: p = 0.108
+ 100 μM Caffeine	てんかん抑制率[%]	0	0	
	Δt -relative	0.22 \pm 0.07	0.56 \pm 0.08	Student t-test: p = 0.03 < 0.05
+ 50 μM Caffeine	てんかん抑制率[%]	0	0	
	Δt -relative	0.52 \pm 0.06	0.67 \pm 0.10	Student t-test: p = 0.04 < 0.05
+ 50 nM 8CPT	てんかん抑制率[%]	0	0	
	Δt -relative	0.69 \pm 0.12	0.49 \pm 0.12	Student t-test: p = 0.29 > 0.05
+ 50 nM IST	てんかん抑制率[%]	100	100	
	Δt -relative	1.14 \pm 0.17	1.28 \pm 0.25	Student t-test: p = 0.56 > 0.05

4.14 結果のまとめ

本設における結果を纏めると下記のようなになる

1. 30 μ M CCh 以上で CIBO が誘導された。
2. GABA_AR 阻害によりてんかん様発火を ictal discharges と interictal discharges とし て誘導され、濃度依存性があった。
3. CIBO と interictal discharges の発生源は CA3 領域であった。
4. CA3 領域のみのミニスライスでは interictal discharges は発生したが、 ictal discharges は発生しなかった。
5. CIBO は ictal discharges とは異なるパラメータを示した。

6. CIBO 誘導中にはてんかん様発火は誘導されない。
7. てんかん様発火は 30 μ M CCh の投与により CIBO に遷移した。
8. CIBO は mAChR と関与し CIBO のてんかん様発火抑制には mAChR のサブタイプである M1、M3、M4 が関与する。
9. CIBO が誘導されない低濃度の 15 μ M CCh では pEPSP が有意に減少していたが interictal discharges は誘導された。
10. CIBO の IBI は後半になるに従って振動が誘導された。
11. CIBO パラメータをもとに設定した β 周波数帯の刺激においてもてんかん様発火は抑制された。
12. β 周波数帯電気刺激は Stimulation interval を延長させると interictal discharges が抑制されなかった。
13. Caffeine による P1R 阻害による β 周波数帯電気刺激は interictal discharges が抑制されなかった。
14. P1R 阻害は濃度依存的に β 周波数帯電気刺激後における interictal discharges の再誘導までの時間(Δt)を短くした。
15. てんかん様発火に対する β 周波数帯と θ 周波数帯の抑制には違いが見られ、てんかん様発火抑制には β 周波数帯がより有効であった。
16. β 周波数帯と θ 周波数帯のてんかん様発火に対する抑制はアデノシン受容体でありどちらもサブタイプの A1 を介することは共通であった。

5 考察

5.1 CCh により ictal discharges とは異なる CIBO が誘導される

AChR 作動薬である 30 μ M CCh によって β 周波数帯をピークに含む振動現象、CIBO が誘導された。ここで CIBO のメカニズムを紹介しておく。CCh により活性化する mAChR は介在ニューロンである CCK IN と錐体細胞である Py に存在する。さらに先行研究により CIBO は M1、M3、M4 が関与することが明らかとなった。M1、M3 は興奮性に、M4 は抑制に存在するとわかっており CCh によりそれぞれを活性化させ興奮と抑制を行う。本来、Py は介在ニューロンにより抑制されている状態であるが、CCh により活性化した CCK IN は Py に対して GABA 放出を促進させ抑制を行う一方、Py は mAChR を介してより活性化し CA3 錐体細胞の特徴であるリカレントネットワーク(錐体細胞同士の相互活性化)により活動を行う。また、CCh により pEPSP が減少していることも示されており、これは Py の GluR を介した神経伝達による同期が減少している可能性がある。これにより細胞外記録から見られる波形は小規模な神経細胞群の連続した発火であり、その結果が CIBO である可能性ある(図 84)。

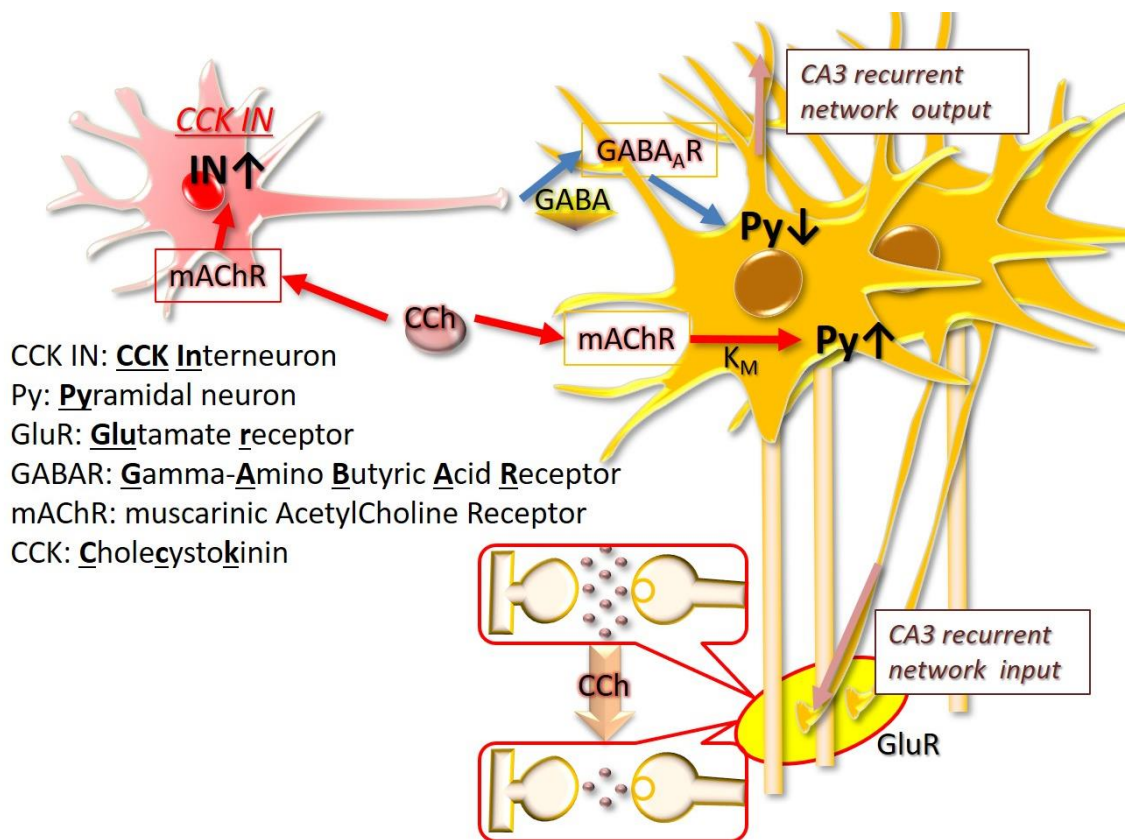


図 84 CIBO メカニズム。CIBO は CCh を投与し CCK IN と Py に存在する mAChR を介した活性による興奮と抑制のバランスによって振動現象が誘導されていると考えられている。

一方で PTX や BIC、GBZ といった GABA_AR を阻害することで誘導される ictal discharges もまた振動現象であった。これらはどちらも振動現象であり、形状も類似しているがいくつか違いがある。まず本研究にて明らかにしたパラメータの違いである。CIBO は PTX、BIC、GBZ 全てにおいて持続時間と周波数が高く、振幅と IBI が短い結果が得られた。ictal discharges の連続スパイクは PV⁺ニューロンの脱分極による同時発火の促進と PV⁺ニューロン活動後のリバウンドスパイクによるものであるとされている論文もある[117]。

さらには ictal discharges は interictal discharges のような短いスパイクと共存することがあるが CIBO は振動現象が間欠的に一定の IBI を設けて誘導されることから ictal discharges は神経同期ネットワークが不安定であるが、CIBO は安定していることも考えられる。実際、 θ 振動では GABA 作動性神経が振動の時間的パターンを決定することも示されている[118]。

以上のことから CIBO と ictal discharges は形状こそ似ているものの全く異なる振動であることをここで示す。

5.2 CIBO と interictal discharges の発生源は CA3 である

CIBO とてんかん様発火の発生源を特定するためにまず切り離さないスライスで測定したところ、CIBO も interictal discharges も CA3、CA1、DG 全領域で観察された。次に、CA3 を切り離した海馬ミニスライスを用いて実験を行ったところ、CIBO の振動現象と interictal discharges は CA3 のみで観察された(図 37 から図 43)。以上の結果からこれらの発生源は CA3 であることが判明し、CA1 及び DG に伝搬していることが判明した。

CCh 誘導 θ 振動に関しては CA3 における独立した発生源が見つかっており、CIBO に関しても同じことが言える可能性がある[119]。interictal discharges に関しても CA3 の局所的なネットワークで生成可能であった。CA3 にはリカレントネットワークが存在し、CA3 錐体細胞がフィードバックに興奮させる。これにより interictal discharges は誘導されることとなるが ictal discharges については大規模な同期が必要であり、その同期には PV⁺ニューロンの脱分極のみではなく、GABA_AR 阻害による脱分極の上昇によって CA3-CA1-DG ネットワークを巻き込んだ大規模な同期が必要である可能性が高いため、ictal discharges は CA3 のみでは誘導されない結果となった。また、CIBO 生成には CA3 の局所ネットワークのみで生成されるが ictal discharges は CA3

のみでは誘導されなかった。これは海馬ネットワークに存在する CA3-CA1-DG の tri ネットワークが ictal discharges 生成に関与する可能性が高いことが示されている。細胞の同期数を示すと言われている振幅は異常大規模同期である ictal discharges に対し、小規模同期である CIBO に沿っている。

5.3 CIBO はてんかん様発火を抑制する

本研究は主に CIBO とてんかん様発火の関与について調査した内容である。以前、Hashimoto らの PTX 誘導による interictal discharges は CCh 投与により CIBO に遷移し、さらに CIBO のてんかん様発火抑制は pEPSP 減少によるものと結論づけていた [85]。本研究においても PTX のみならず BIC や GBZ 誘導の ictal discharges や interictal discharges は CCh(30 μ M)投与により CIBO に遷移した。またその際の pEPSP は有意に減少している結果を示し、CIBO はてんかん様発火を抑制し pEPSP 減少も関与するという結論と再現性を示した。

しかしその後の実験で低濃度な 15 μ M CCh 投与では海馬スライス上には CIBO が誘導されない一方、pEPSP は control の ACSF 投与時に比べて有意に低い、つまり振動現象は誘導されなくても pEPSP は減少していることもわかった。

興味深いことに、この時 GABA_AR 阻害薬 PTX、BIC、GBZ 投与より interictal discharges が誘導された。pEPSP が低下しているにも関わらず、てんかん様発火が誘導されるという結果は CIBO のてんかん様発火の抑制には pEPSP 減少以外にも抑制のメカニズムが存在する結果を示した。

てんかん様発火が抑制される 30 μ M CCh の投与と抑制されない 15 μ M CCh 投与時の海馬スライス上での違いを検討したところ、30 μ M CCh 投与で誘導される間欠的な振動現象の存在に着目した。DBS におけるてんかん抑制においても脳内で振動現象を誘導しててんかんを抑制していることから振動現象の存在は重要ではないかと考

え CIBO によって誘導される間欠的な振動におけるてんかん抑制メカニズムを調査した。以降は CIBO の振動と IBI に着目した結果と考察である。

5.3.1 CIBO によるてんかん様発火抑制はムスカリン性受容体 M1、M3、M4 と関与する

まず、振動現象に関わる mAChR とてんかん抑制の関与について述べる。nAChR 阻害薬である D-tubocurarine の投与は CIBO に変化を与えず、一方で mAChR 阻害薬である Atropine sulfate の投与は CIBO を消失させた(図 57、図 58 及び[25])。そして、mAChR サブタイプの M1、M3、M4 阻害時の GABA_AR 阻害は interictal を抑制されない結果となった。M1、M3 は主に GTP 結合タンパク質 (Gq/11) と共役し、ホスファチジルイノシトール代謝の促進と IP3 の生産を介して K⁺チャンネル (KM) チャンネルの閉口をもたらす。一方 M2 と M4 は GTP 結合タンパク質 (Gi/o) と共役し、アデニル酸シクラーゼを抑制して細胞内 cAMP 濃度の低下や、GIRK の活性化を引き起こすことで抑制の作用をもたらす。また M4 は GABA 放出の促進効果も明らかになっている[120]。CIBO は錐体細胞の M1、M3 活性化による脱分極と M4 活性化による GABA 放出の興奮と抑制のバランスにより成り立っている可能性が高い。今回は mAChR 阻害を行った上で GABA_AR を阻害した。上項目でも述べたとおり、CIBO のてんかん抑制には振動現象が関与することが判明しているため、CIBO 生成に関与しない M2 はてんかん様発火の抑制に関与しない。予め M1、M3 を阻害し KM チャンネルによる脱分極を引き起こさないため CIBO が生成されない。また M4 の阻害による GABA 放出の促進を阻害することで興奮性が高くなり PTX による interictal discharges の脱抑制状態をさらに促進している可能性が高い。さらに、以前 Arai らは CIBO 誘導後 mAChR 阻害を行い、CIBO との関与を調べた[25]。今回は CIBO 誘導前に mAChR 阻害を行うこと

で CIBO のてんかん様発火の抑制には M1、M3、M4 が関与することがここで明らかとなった。

5.3.2 Carbachol による pEPSP の減少はてんかん様発火を促進する

CIBO が誘導されない濃度の CCh は interictal discharges のスパイク周波数を上昇させる結果となった。CCh 投与により mAChR が活性化し、Ca 依存性非特異的カチオン電流 (I_{can}) とそれに伴う過分極減少のプラトー相が生じることで錐体細胞と介在神経両方の活性化により振動現象が生じ、振動現象が生じた後、遅い後過分極 (slow After Hyper Polarization : sAHP) が後続することがわかっている[121]。このプラトー電位はグルタミン酸阻害や GABA_AR 阻害でも海馬台で生じることがわかっており振動現象の生成に関わっているとされている。プラトー電位は海馬台では 50 μ M CCh 以上で生じるとされている[122]。しかし今回測定を行った場所は海馬 CA3 である。リカレントなネットワークを有するこの領域はプラトー電位が生じる閾値が異なる可能性がある。それを前提に考えると、CCh を CIBO が誘導されない濃度で投与した場合、Ca²⁺流入により神経細胞が脱分極方向に向かうが閾値まで達しないためプラトー電位も生じず振動は誘導されない。しかしこの状態で GABA_AR を阻害すると Cl⁻流入がなくなり膜電位の脱分極が発火閾値まで動き神経発火が見られる。Kawasaki らは 30 μ M CCh 以上で AHP 減少が見られ、彼らのプラトー電位が見られる濃度 (50 μ M CCh) より低いので本研究においてもプラトー電位による振動が見られる濃度 (30 μ M) より低い濃度 (15 μ M) の投与は AHP の減少が誘導されている可能性が高い。過分極成分が減少している結果スパイクの Frequency が上昇している可能性が高い。また図 62 の結果から pEPSP 減少も低濃度で見られている。これは CA3 でのシナプス伝達低下を示し、CA3 錐体細胞の興奮上昇による大規模な神経同期が誘導されない可能性がある。このため振幅に関しては CCh 存在下では振幅が

小さくなる可能性が高い。これは CIBO と ictal discharges の振幅が有意に異なる結果に繋がると考えている。

5.4 CIBO の IBI 中に振動誘導性が変化する

CIBO には約 9 s の IBI が存在しこの時はスパイクが見られない。先行研究において、Nishimura らは振動と IBI を含んだバーストフェイズにおいて CA3 と CA1 の LTP の違いについてフェイズ位相間で調べた。その結果 CA3 は CIBO の全フェイズにおいて LTP が誘導されており特に IBI 後半において LTP 増加が見られた、CA1 においても IBI 後半において LTP が誘導されており、CIBO の振動各位相に対する LTP の誘導依存性を示した[116]。これらの LTP 増加は GABA 伝達の減少による脱抑制によるものとされており、 θ 振動においては振動中よりも IBI で抑制が働いていることがわかっている[123]。 β リズムの断続的な振動が、海馬神経ネットワークの CA3 と CA1 でのシナプス変化の時間的な区切りを決定する可能性があり、記憶のエンコード及び探索に関与するとされている。

本研究ではこの IBI における刺激誘発性の振動誘導性を調べた。その結果、刺激による振動誘導性は IBI 後半に上昇した。このフェイズでは LTP 増加と脱抑制状態が見られるため刺激による振動現象の誘導率が上昇した可能性が高い[124]。

5.5 アデノシン受容体(P1R)が CIBO によるてんかん様発火の抑制に関与する

CIBO がてんかんを抑制する原因について P1R との関与について調べたところ、CIBO に対しての P1R 阻害は振動を消失させず、パラメータに影響を与えなかった。しかしここに GABA_AR 阻害を GBZ によって行ったところ、CIBO は消失し interictal

discharges が誘導された。この結果から間欠的な CIBO によるてんかん抑制には P1R の活性が関与することが示された。

5.5.1 アデノシン受容体(P1R)の阻害は CIBO てんかん様発火抑制を阻害する
細胞外のアデノシンは CCK₊ 介在ニューロンに存在する P1R を 活性化させ神経終末の錐体細胞へ神経伝達物質である GABA の放出を促す。GABA と結合した錐体細胞の GABA_AR は Cl⁻流入により錐体細胞が抑制される。さらに、錐体細胞にも P1R は分布しており、アデノシンが P1R に結合することで活性化される。活性化された P1R は GIRK を活性化し錐体細胞が抑制される(図 85)。

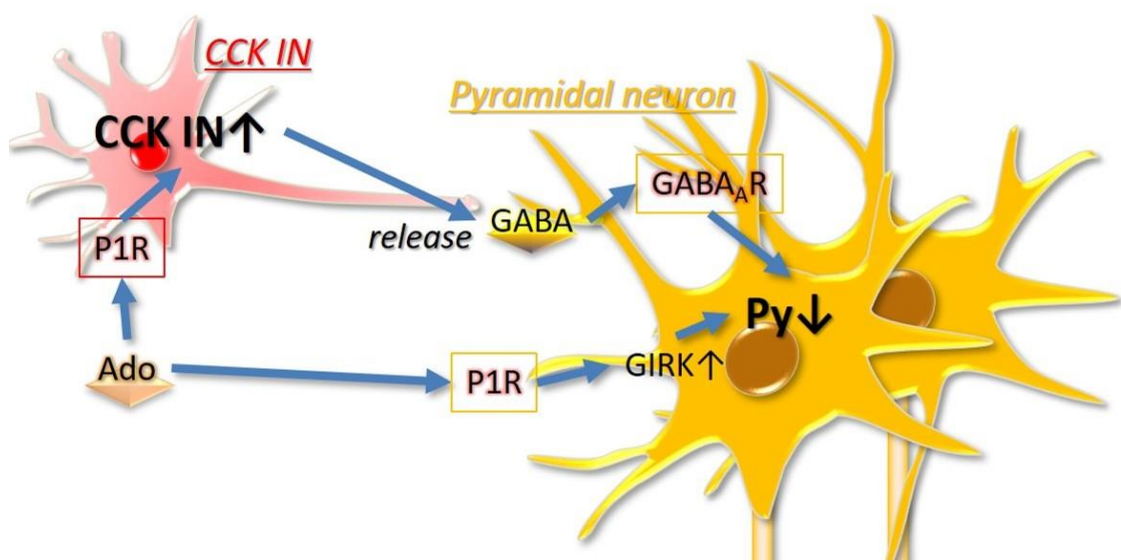


図 85 アデノシンが P1R を介して錐体細胞を抑制する。CCK IN : CCK 介在ニューロン。Py : 錐体細胞。GIRK : 内向き正流性 K チャンネル。P1R : アデノシン受容体。Ado : アデノシン

CIBO に caffeine による P1R 阻害の効果がなかったのはアデノシンへと加水分解される前の ATP による P2Y 受容体(P2YR)が関与する可能性もある。グリアから放出される ATP によって活性化する P2YR は CCK⁺ 介在ニューロンにも存在することがわか

っている[125]。活性化した P2YR は K2P カリウムチャンネルを阻害し CCK⁺介在ニューロンを活性化させる。P1R が阻害されても P2YR を介した抑制は残っているため CIBO に変化を与えなかった可能性が高いと考察する。

また、CIBO のような連続した神経活動の興奮や電気刺激後には細胞外 K⁺増加だけでなくアデノシンや ATP 放出も見つかっている[99][126]。そのため、β 周波数帯電気刺激や CIBO においても P1R による 2 経路の抑制と P2YR による抑制の少なくとも 3 経路による抑制がある可能性が高い。今回の実験で CIBO に P1R を阻害し、さらに GABA_AR を阻害する GBZ を投与することで P1R を介する介在ニューロンと錐体細胞の抑制経路と P1R 経路の抑制が外れる。すると錐体細胞の大規模な同期が誘発され interictal discharges のようなてんかん波が誘発されると考える(図 86)。

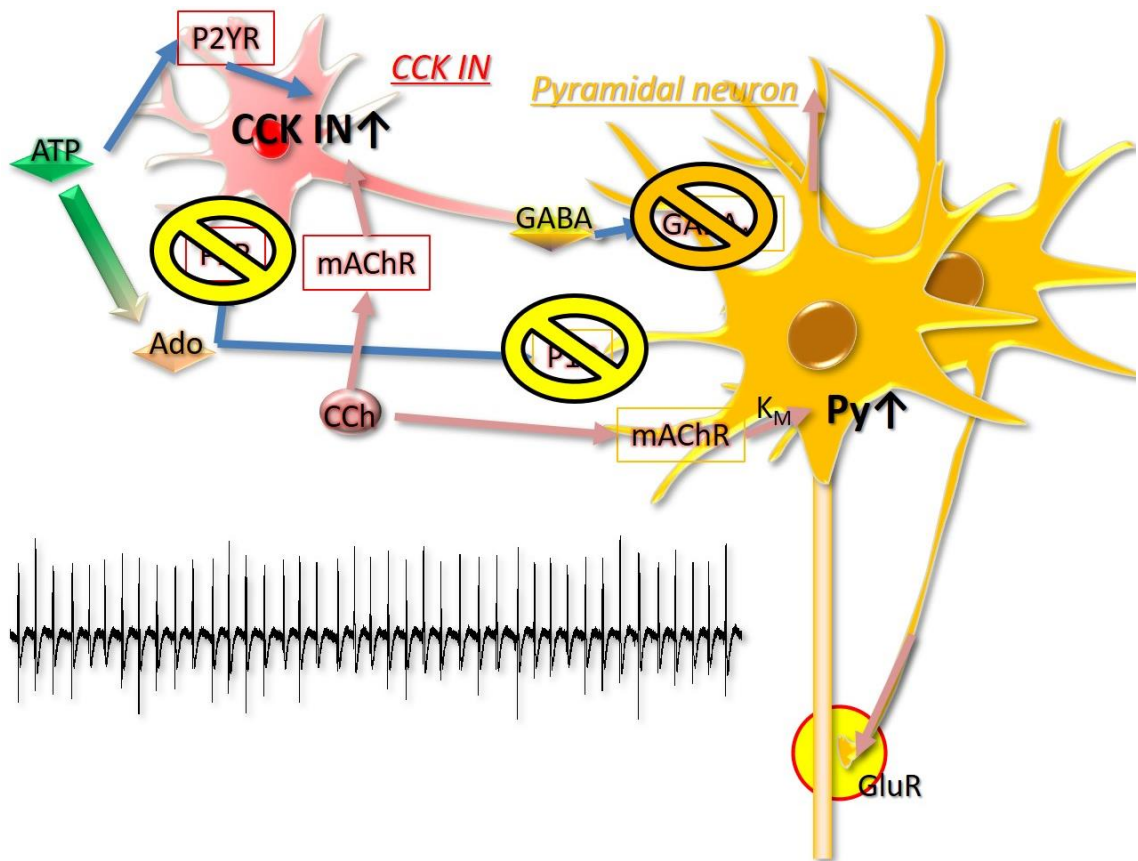
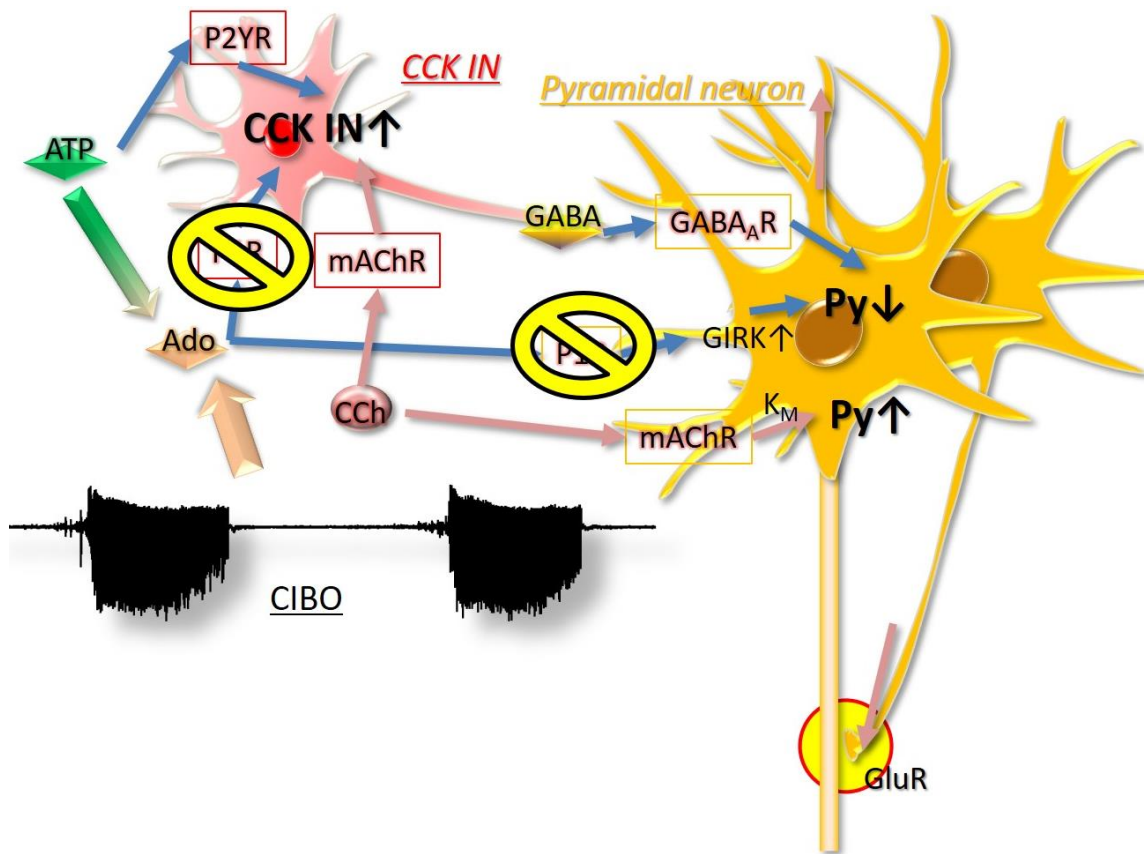


図 86 CIBO への caffeine 投与及び追加 GBZ 投与による CIBO てんかん抑制阻害。(上) CIBO は mAChR と GluR を介して CIBO を誘導する。連続した神経活動は細胞外の ATP 及びアデノシン放出を誘導し P1R を活性化する。ここに caffeine を投与し、P1R を阻害しても P2YR を介した CCK IN の GABA 放出による抑制経路が残っているため、CIBO は維持される。(下)ここに GABA_AR を阻害する GBZ を投与することで GABA に関する抑制が阻害され、脱分極度合いが上昇する。

5.5.2 細胞外アデノシン濃度は CIBO のてんかん様発火の抑制における IBI と関与する可能性がある

CIBO への A1R 阻害により IBI が延長化され interictal discharges が抑制されなかった。さらに後半でも述べるが CIBO パラメータの IBI から設定された INTERVAL をもつ β 周波数帯の電気的な刺激においても P1R を阻害すると interictal discharges や ictal discharges は抑制できなかったことから CIBO のてんかん抑制には P1R の活性が必要であることが明らかとなった。

細胞外のアデノシン濃度は膜輸送体のアデノシン取り込みにより濃度を変化させることが明らかになっている。CIBO により細胞外に放出されたアデノシンは P1R を活性化させ、錐体細胞を抑制させる。しかしその後アデノシンの細胞内取り込みにより細胞外アデノシン濃度が低下し、てんかん様発火の抑制効果がなくなるタイミングで再び CIBO の振動が誘導されることによりてんかん様発火が誘導されないのではないかと考える。つまり CIBO の振動がてんかん様発火誘導に先行している可能性が考えられる(図 87)。

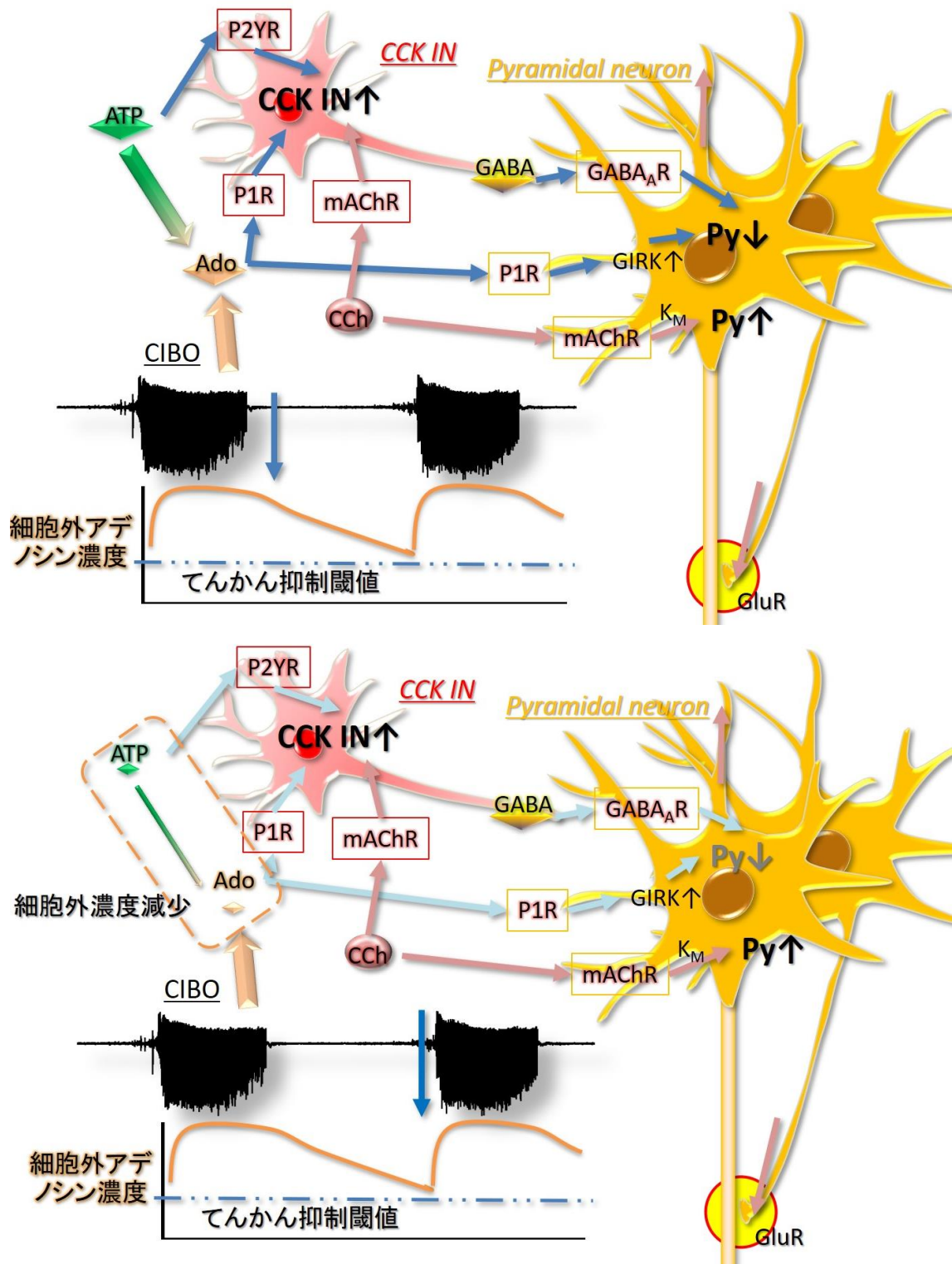


図 87 CIBO とてんかん様発火抑制に関する細胞外アデノシン濃度イメージ。

(上) CIBO 直後は神経活動により細胞外アデノシン濃度が高く P1R の

抑制効果が持続している。(下)膜輸送体の取り込みにより経時的に細胞外アデノシン濃度が下がり P1R 経路の抑制が下がってきている。

5.6 β 周波数帯電気刺激はてんかん様発火を抑制し、その抑制には P1R が関与する

CIBO がてんかん様発火を抑制することは本研究で判明した。この CIBO は CCh による薬理的なものであり、てんかん様発火の抑制が薬品依存であるのかそれとも結果として誘導された振動現象そのものが有効であるのかは不明である。そこで次に CIBO をもとに設定したパラメータを用いた電気刺激 (β 周波数帯電気刺激) を海馬ラットスライスに適用することで CIBO のてんかん様発火の抑制における原因を調査した。その結果図 70 で示すように、予め誘導した interictal discharges や ictal discharges は β 周波数帯電気刺激を適用することで消失し、刺激をやめるとその数十秒後に再び誘導され、 β 周波数帯電気刺激においてもてんかん様発火が抑制されることが判明した。難治性てんかん患者に適用される DBS や VNS は神経疾病の患者に有効であるがその根底メカニズムは未だに不明であり、特に神経振動を用いた電気刺激の効果は未だわかっていない部分が多い。過去の研究において、AC または DC 波形の電気刺激は *in vitro* での High-K⁺および low-Ca²⁺てんかん様発火を抑制することが示されている[127]-[129]。また、Jun らは PTX 誘導てんかん様発火も海馬 CA3 において 50 Hz の電気刺激により抑制されることが示されている[128]。さらに、50 Hz の正弦波刺激を 1 秒 On - 1 秒 Off (Duty Cycle : 50 %) を 1 セットとして繰り返し 60 秒間行ったところ low-Ca²⁺てんかん様発火を完全に抑制できた結果もある。この結果はヒト臨床においても有効であるとされており、VNS を用いた刺激では二相性パルス (120 μ m、140 Hz、Duty Cycle : 1.68 %) によりてんかん波が抑制された例も

ある[130][131]。低周波刺激のてんかん抑制メカニズムはいくつかの仮説がある。1つは興奮性神経の高周波刺激が細胞外カリウムの蓄積をもたらし、神経を持続的に脱分極させ、Na⁺チャンネルを持続的に活動電位が発生しないレベルまで不活性化するという細胞外カリウムの大幅な増加による「脱分極ブロック」によるもの[132]。さらにこの刺激後の抑制はカリウムのアンダーシュートに関係するともある[133]。他には、GABA_BのIPSPとsAHPによって媒介される仮説もある[134]。シナプス後膜のGABA_B受容体はGIRKチャンネルを活性化し、細胞膜過分極を引き起こす。またGABA_B受容体はアデニル酸シクラーゼの活性を抑制し、細胞内cAMP生成抑制によりシナプス伝達抑制を抑制する可能性もあるとされている。本研究においてもβ周波数帯(16.6 Hz)と14 sのIBIを設けた電気刺激によりてんかん波が抑制された。今回はさらにPIRを阻害することでてんかん様発火を抑制できなかったことからINTERVALとPIRとの関与を主に考察として述べる。まず細胞外アデノシンは錐体細胞及びCCK介在ニューロンのPIRを活性化し、これにより興奮と抑制が行われていることは前章でも述べた。電氣的な刺激により細胞外にアデノシンが放出されることがわかっており、今回のβ周波数帯電気刺激により細胞外アデノシン濃度が上昇しPIRとGIRKを介して錐体細胞及び同期活性によるてんかん様発火の抑制が行われている可能性が高い(図88上)。CIBOのてんかん様発火と同様に刺激後は膜輸送体によるアデノシン及びATPの細胞内への取り込みにより細胞外アデノシン濃度が減少してゆく。もしてんかん様発火の閾値がPIRによるてんかん様発火抑制効果にあるのであれば、閾値以下になりてんかん様発火が誘導される前にβ周波数帯電気刺激により再び細胞外にアデノシンを放出させることでてんかん様発火の誘導を防ぐことが可能になるサイクルを形成していると考察する。

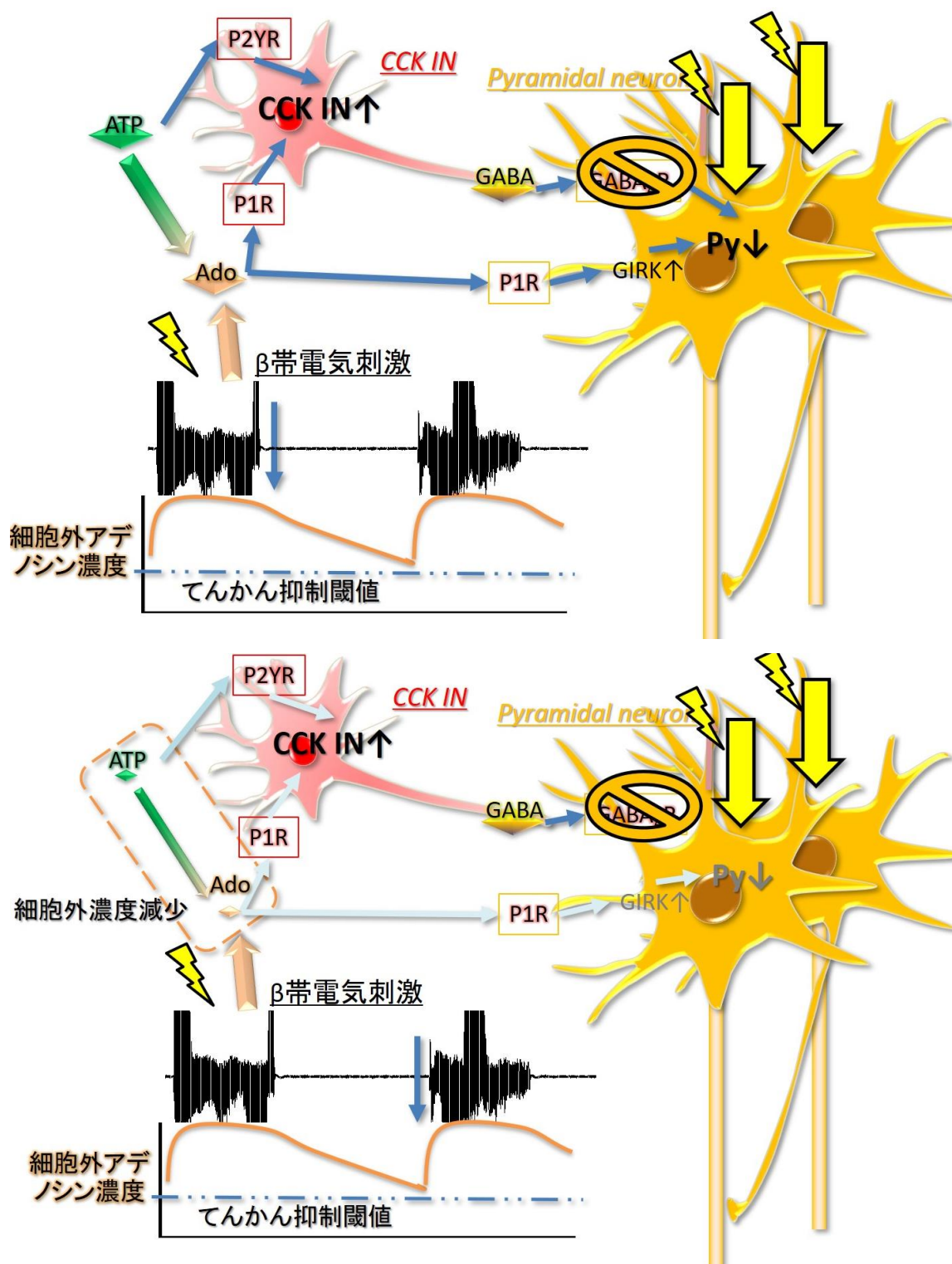


図 88 β 周波数帯電気刺激とてんかん様発火抑制に関する細胞外アデノシン濃度イメージ。(上)刺激により直後は細胞外アデノシン濃度が高く P1R の抑制

効果が持続している。(下)膜輸送体の取り込みにより経時的に細胞外アデノシン濃度が下がり P1R 経路の抑制が下がってきている。

さらに β 周波数帯電気刺激において P1R を阻害することでてんかん抑制が見られなかった。このことについても P1R の活性がてんかん様発火抑制と関与する証拠となりうる。GABA_A 阻害に加えて P1R の阻害を行い CCK IN 経路及び P1R 経路の抑制を低下させることで GABA_A 遮断及び GIRK 活性低下により錐体細胞の活性が上昇し、異常同期であるてんかん様発火が誘導される(図 89)。

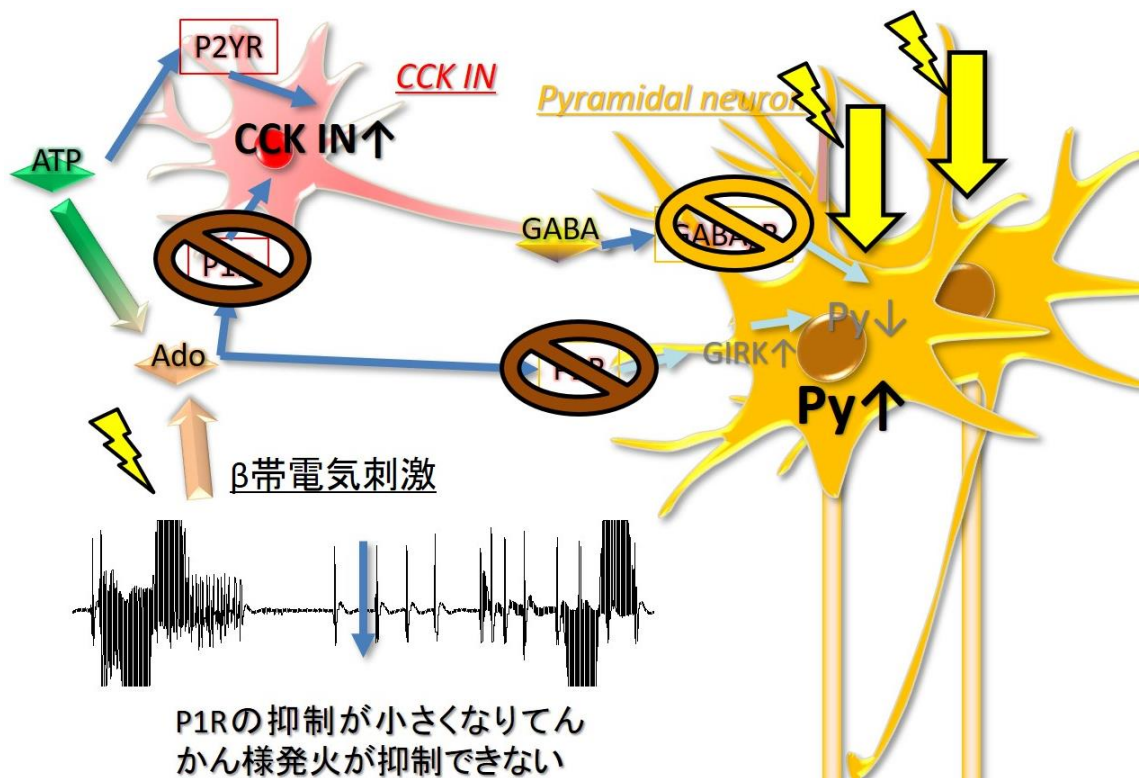


図 89 β 周波数帯電気刺激のてんかん様発火抑制は P1R と関与する。 β 周波数帯電気刺激により抑制されていたてんかん様発火は caffeine の P1R 阻害により抑制されなくなった。

5.6.1 β 周波数帯電気刺激の Stimulation interval を延長することによりてんかん様発火は抑制されない

β 周波数帯電気刺激により ictal discharges や ictal discharges は有意に抑制された。しかし、Stimulation interval を長くすると後半から interictal discharges が誘導された。この原因関しても細胞外アデノシン濃度との関与が考えられる。刺激直後は図 88 上のようにアデノシン濃度上昇により P1R 活性化を介して錐体細胞の抑制が存在し、図 88 下の抑制効果がなくなるアデノシン濃度低下直前に再び電気刺激を行うことで細胞外アデノシン濃度を上昇させている。つまりてんかん様発火の抑制は決められた IBI や Stimulation interval が重要となっていると考えられる。ここで刺激の Stimulation interval を延長化させることで細胞外アデノシン濃度の低下が進み、てんかん抑制の閾値以下の濃度まで低下したため interictal discharges のような同期発火が誘導されたものと思われる。

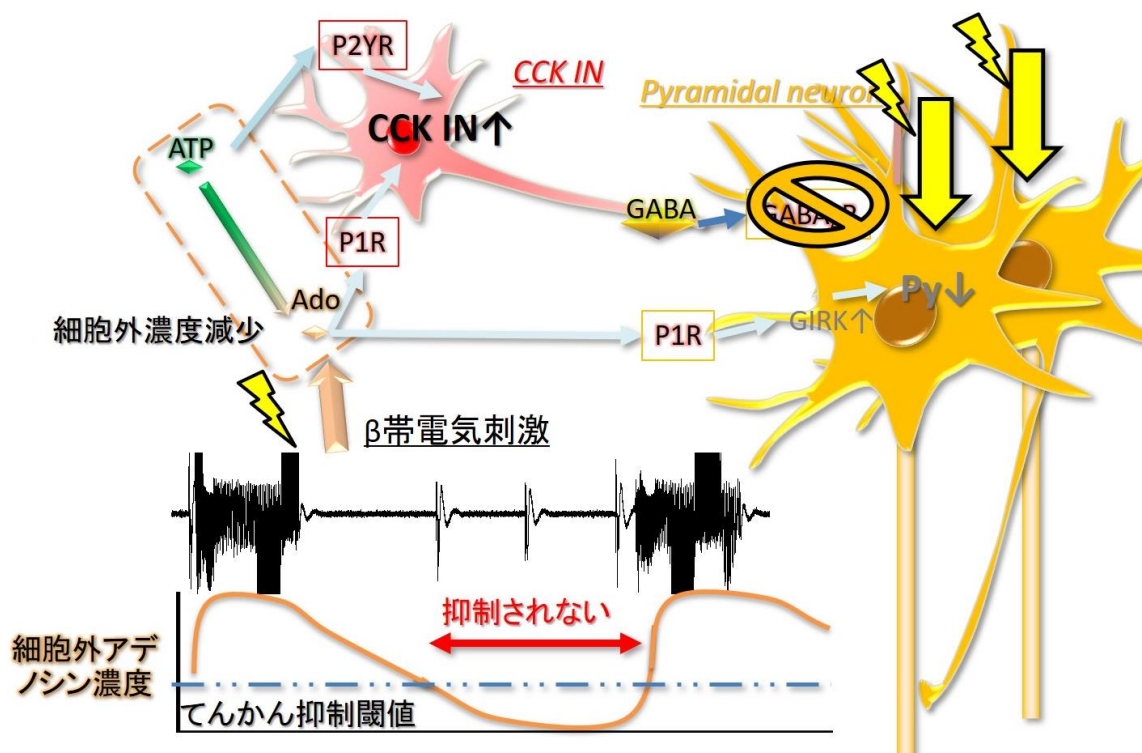


図 90 Stimulation interval を延長させた β 周波数帯電気刺激。CIBO をもとに設定した Stimulation interval よりも長く設定した電気刺激はてんかん様発火が抑制されなかった。

5.6.2 β 周波数帯と θ 周波数帯電気刺激の効果の違い

今回、さらに β 周波数帯と θ 周波数帯電気刺激によるてんかん波抑制の差について調べた。その結果、 θ 周波数帯電気刺激は β 周波数帯よりも抑制率が低いことが示された。この抑制に関してはどちらも P1R が関与し、さらにサブタイプは A1 が電気刺激によるてんかん様発火抑制に関与することを明らかにした。電気刺激による細胞外アデノシン放出または酵素による ATP からアデノシン変換により錐体細胞上の A1 が活性化され、GIRK による錐体細胞抑制は共通の効果であるが、上で述べた細胞外アデノシン濃度が低いことによりてんかん様発火が誘導される可能性を考慮すると、 θ 周波数帯が β 周波数帯の電気刺激よりも抑制率が低い結果は θ 周波数帯の電気刺激はシア妨害へのアデノ

シン濃度が低いためではないかと考察する。さらに有意差こそないものの、 θ 周波数帯電気刺激における Δt 、つまり刺激後に再びてんかん様発火が誘導されるまでの時間が β 周波数帯よりも短い傾向であったのもこの可能性を示唆している(図 82)。

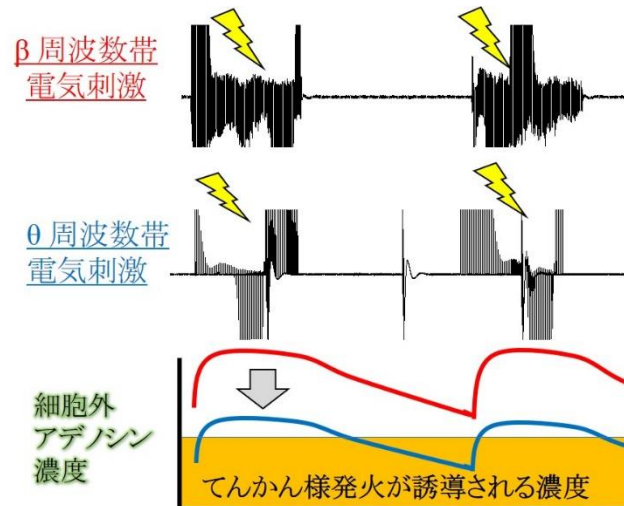
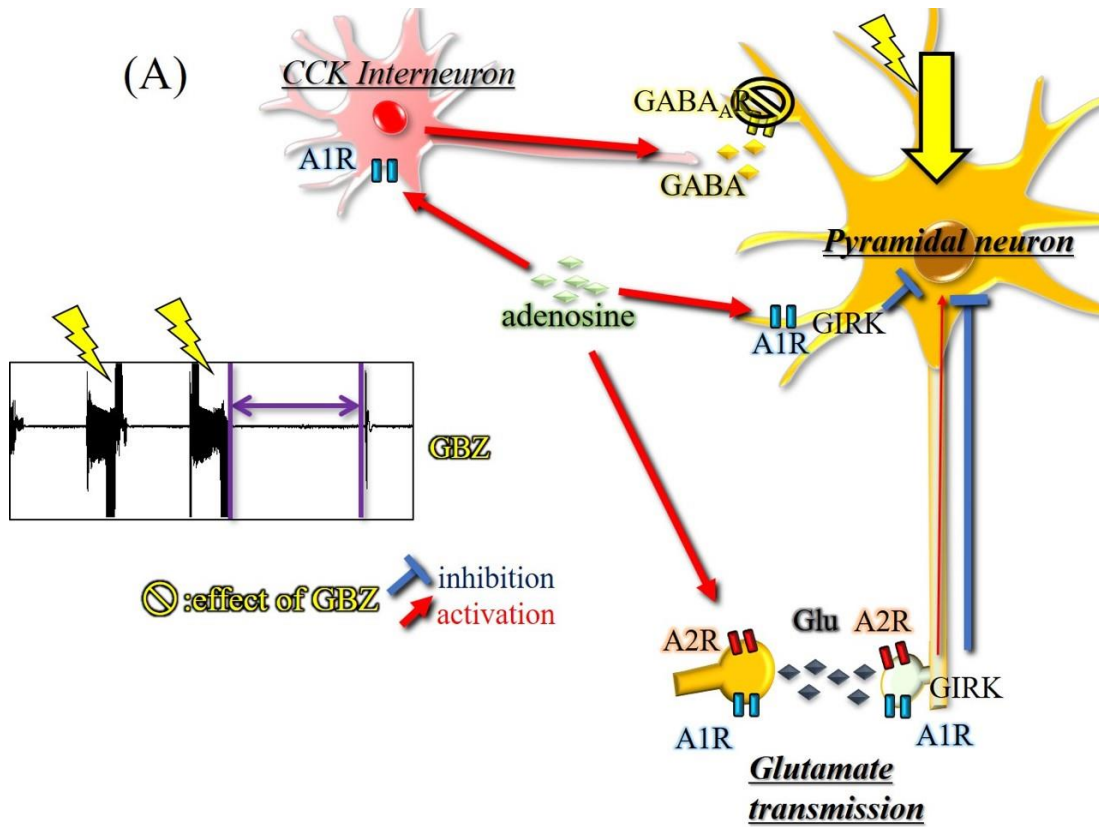


図 91 β 周波数帯と θ 周波数帯電気刺激の考察。 β 周波数帯よりも θ 周波数帯電気刺激は細胞外へのアデノシン放出が低い可能性を示す。

さらに、PIR サブタイプである A1、A2A は Δt を調節する可能性が示された。A1 は Py と樹状突起シナプス上に存在する GIRK を介した抑制が存在し、電気刺激により細胞外へ放出されたアデノシンにより活性化する。それにより GBZ による GABAR 阻害によって誘導されるてんかん様発火は抑制される(図 92 A)。

そのため、A1R を阻害する 8CPT の投与は錐体細胞の抑制を抑制し、加えて A2R 活性化による前シナプスからのグルタミン酸放出増加により AMPAR を調節し[109]錐体細胞の活性化と異常同期率が増加し刺激後のてんかん様発火が誘導されやすく結果として Δt の短縮につながった可能性がある(図 92 B)。そして一方、A2R 阻害は錐体細胞の興奮性を低下させ Δt が延長化される傾向につながった可能性がある(図 92 C)。このように電気刺激によるアデノシン放出が海馬神経回路を変化させ、てんかん抑制が起こったと推察される。これはこれまでの DBS の主な原因である Na^+

チャネルの脱分極性阻害とは異なる機構によるてんかん波抑制である。ただし A2R 分布は脳内では線条体で最も発現しており海馬、皮質は僅かであるため[96]、 Δt 増加が僅かであった結果はそのためであったかもしれない。



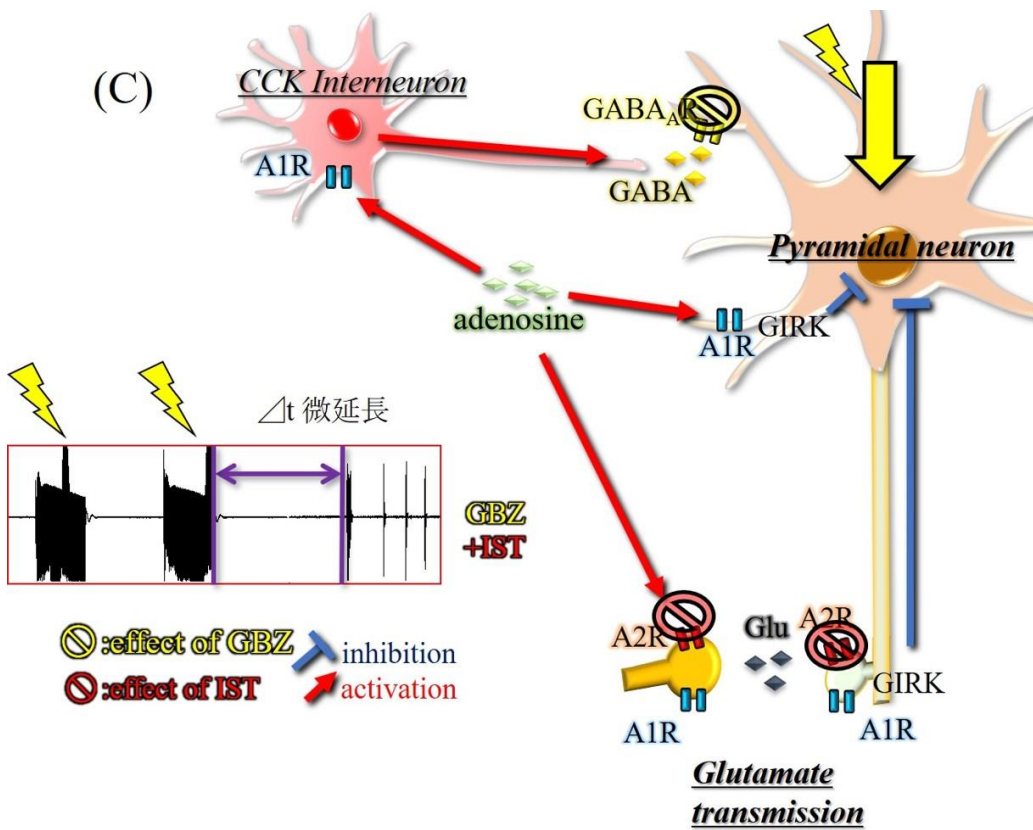
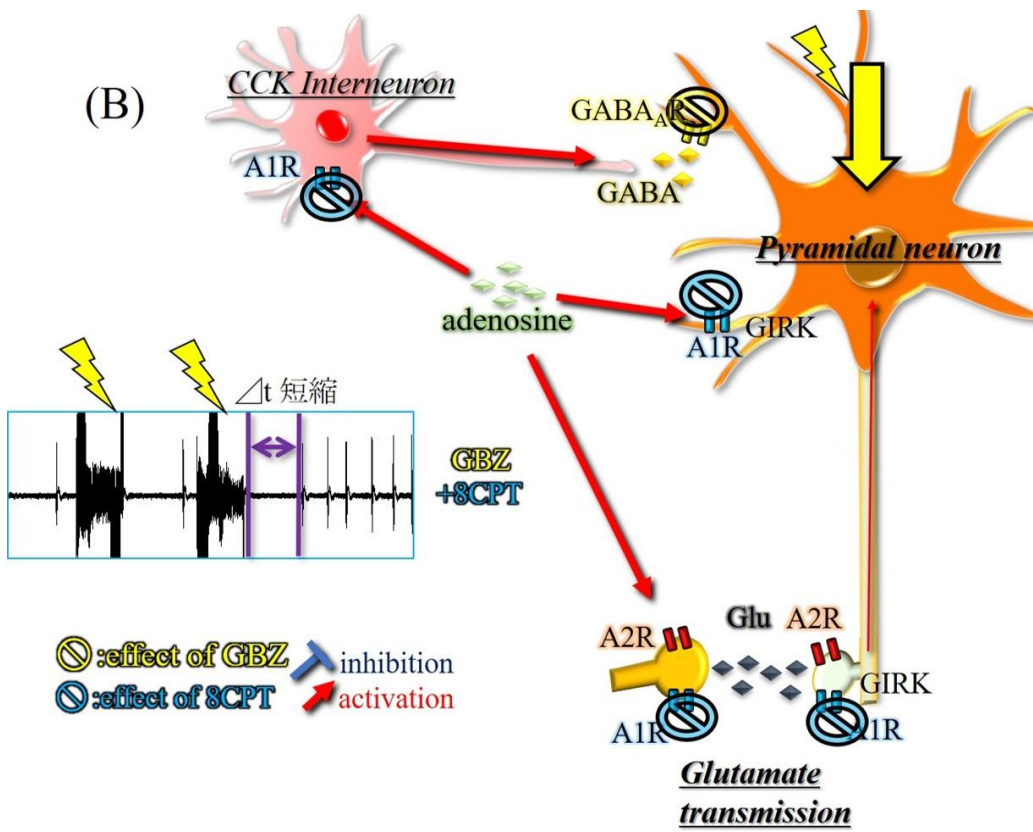
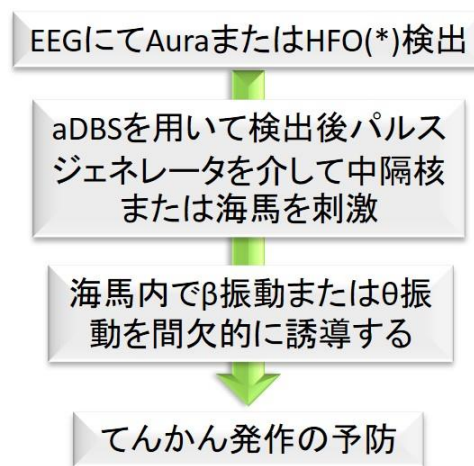


図 92 P1R サブタイプが Δt を調節するメカニズム。(A)電気刺激による細胞外アドレノシン放出により P1R の A1R と A2R が活性化し GIRK による錐体細胞の抑制が働くためてんかん様発火が抑制される。(B)8CPT による A1R 阻害は GIRK による抑制を阻害し錐体細胞間の異常同期を誘導させ安い状態により Δt が短縮される。(C)IST による A2R 阻害は錐体細胞の興奮作用を阻害させ僅かに Δt を延長させる。

5.7 本研究結果を下にした、てんかん治療の提案

本研究により海馬 in vitro スライスにおいて CIBO はてんかん波を抑制し、さらにはそのてんかん抑制には β 周波数帯の振動現象が重要であることを示した。この結果をてんかんの外科的治療への可能性について述べる。最初に述べたとおり、てんかん治療における薬剤によるコントロール効果がみられない感謝は 15%存在し、そのために DBS や VNS、rTMS を用いられた外科的治療が全国において適用されている。本研究の結果により β 振動を海馬内に誘導させることでてんかんの抑制及び予防につながるかと考えている。その方法としてまず DBS を用いたてんかん治療への可能性を述べる。DBS は視床前核、海馬、小脳への電気刺激によりてんかん症状を含む神経疾病を抑える方法である。てんかんの治療としては θ 領域の海馬への刺激やアセチルコリン投射を含んだ中隔核への刺激が治療結果としてあげられているが β に関する可能性に関しては未だ示されていない。本研究の結果から β 周波数の活動でもてんかん波が抑制されることから中隔核への刺激や海馬への直接 β 刺激によっても抑制される可能性を示す。これにより、てんかん治療へ適用される DBS の刺激周波数領域が θ から θ 及び β へと範囲を拡張することができる。海馬内では θ 波のみならず β 波も誘導されることから何らかの影響により β が誘導された際でもてんかん波への対応が可能になることも示され得る。VNS についても同様に迷走神経から求心性への刺激により θ 波や β 波が誘導される可能性が示された際、本研究は DBS 同様広範囲で適用可能な周波数帯によりてんかん治療への進歩が見られるかもしれない。

また、従来までの DBS は常時刺激することでてんかん抑制につながっていたが本研究において示された一定の Interval を設けて間欠的に刺激することでてんかん波の抑制は患者への負担を軽減させ QOL を向上させる可能性もある。この DBS は主に発作後パルスジェネレータによる刺激を行い発作の抑制を行ってきたが、発作前の状態を検知し発作前に海馬内で β 振動を誘導させることでてんかん発作の予防につながるのではないかと提案する。最近では脳内の状態に応じて刺激を調節する aDBS が考案されている。これによりてんかん発作前に前兆として見られる HFO や感覚異常として見られる Aura を検出することで自動的にてんかん発作を予防する方法も十分に考えられる。



(*)High Frequency Oscillation

図 93 本研究の結果をもとに提案するてんかん予防に向けてのプロトコル。

6 結論

間欠的に誘導される CIBO を予め誘導させることで $GABA_A$ R 阻害によって誘導される ictal discharges と interictal discharges は誘導されなかった。一方、予め interictal discharges や ictal discharges を誘導させた後 CCh の投与により CIBO に変化した結果から CIBO はてんかん様発火を有意に抑制したことを明らかにし、その抑制は濃度依存でも薬品依存でもないことも判明した。このてんかん抑制の原因とメカニズムをその後追求した。まずこのてんかん抑制は mAChR のサブタイプが関与することが判明し KM チャネル関連の膜脱分極と抑制性神経の活動の相互作用によるもので CIBO の誘導にも関与することが判明した。ここで CIBO が誘導されない状態であると interictal discharges が誘導される可能性も示している。次に CCh による pEPSP の変化を見ることでシナプス神経伝達度合いを調べると CIBO 誘導中において確かに pEPSP が減少しており、先行研究と一致していた。しかし CIBO が誘導されない濃度の CCh でも pEPSP 減少が見られるにも関わらず interictal discharges が誘導される結果を示した。これは CIBO のてんかん抑制における原因が振動である可能性を見出した。ではこの振動現象を CCh といった薬理的なものではなく、人工的な β -like な電気刺激において有効であるか調べたところ CIBO の時と同様に interictal discharges や ictal discharges は消滅した。この結果は振動現象の存在がてんかん抑制の原因となることを強く示す結果となり、さらには β 周波数帯の aDBS や VNS といったてんかん外科的治療への応用につながる可能性も見出した。次に、中枢神経の作用に深く関わるアデノシンとの関与を調べた。CIBO の A1R、A2R 同時阻害は CIBO 変化をもたらさなかったがその後の $GABA_A$ R 阻害により CIBO が消滅し、interictal discharges が誘導される結果を示し、P1R がてんかん抑制の関与を見出した。さらに P1R サブタイプ A1R 阻害は CIBO の IBI 有意な延長を示した。この A1R 阻害による IBI 延長に基づいて β 周波数帯電気刺激の Stimulation interval を延長させたところ、

interictal discharges の誘導が見られた。この結果は振動現象の決められた IBI がてんかん抑制の根本になりうる指標でありそこには P1R が関与する可能性も示された。これらを纏めた CIBO のてんかん抑制の考察として、本研究では P1R 阻害を行う caffeine を用いた実験によりアデノシンが介する経路がてんかん抑制に関与する経路を示す。CIBO によって細胞外へグリア等から放出されるアデノシンは A1R の活性により CCK⁺を介して錐体細胞への GABA 放出を促す経路と GIRK チャネル活性による錐体細胞の抑制の経路による多重抑制が存在し、GABA_AR 阻害のみでは間欠的に誘導される CIBO に変化をもたらさないが、P1R を阻害することで両方の抑制経路を阻害することでてんかん抑制が不能になったと考察する。また別経路として CIBO 等の連続した神経の興奮により放出される ATP により活性化した P2Y が CCK⁺を介して錐体細胞への GABA 放出を促す経路も考えられるため、さらなる抑制も考えられる。本研究の結果は CIBO のてんかん抑制には間欠的に誘導される振動現象が重要でありその振動間の時間は P1R の活性が特に重要であることが示された。加えて今回、 θ 周波数帯との電気刺激よりも β 周波数帯電気刺激はてんかん様発火の抑制率が高いことが示されそのメカニズムには共通の機構がある事が示された。

7 今後の課題

今回の結果により CIBO はてんかんを抑制する結果が得られた。しかし今回のてんかん波はスライスに投与した *in vitro* 急性てんかんであるため、慢性的なてんかんにも同様の抑制効果があるかを今後調べる必要がある。さらに医用工学的応用へ繋げるために *in vivo* を用いた実験を行う必要がある。つまり海馬内への直接薬理投与、中隔核への刺激または海馬への局所刺激による海馬内 β 振動を誘導させることでてんかん波が抑制可能かどうかを試験する必要がある。

加えて今回のてんかん抑制に関与する P1R には他にもサブタイプが存在する。今回用いた caffeine は非選択的 P1R であるため、さらに細かく A1R や A2R などについても調べていく必要があり、また CIBO とてんかん抑制における ATP 関与の P2Y による抑制経路、さらに GABA_BR に関する代謝型抑制経路関しても CIBO とてんかん波、IBI の関与も実験的に調べる必要がある。

β 周波数帯の振動によりてんかん様発火が抑制され、それらは Stimulation interval が重要でありそれは P1R とも関与することが示された。 θ 周波数帯よりも抑制効果が高いこの周波数帯は刺激時間によってもその効果は変わるのか、また今回刺激回数を 10 回に設定したが少ない回数でより神経ネットワークへの負担を軽減させつつてんかん様発火抑制は可能なのかを調べていきたい。CCK 以外に SOM や PV における抑制回路が皮質の β および γ 帯域振動を調整することもわかってきており、てんかん様発火の抑制における θ 領域との違いを抑制性介在ニューロンとの関与からも調べていきたい。

8 謝辞

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

学位論文の審査を快くお引き受けくださり、貴重な助言をいただきました大坪義孝准教授、立野勝巳准教授、相原威教授に厚くお礼申し上げます。

また本研究を行うにあたり様々な御援助を頂きました研究室の皆様に深く感謝いたします。

9 参考文献

- [1] H. Berger, “Über das Elektrenkephalogramm des Menschen - Dritte Mitteilung,” *Arch. Psychiatr. Nervenkr.*, vol. 94, no. 1, pp. 16–60, 1931, doi: 10.1007/BF01835097.
- [2] S. F. Farmer, “Rhythmicity, synchronization and binding in human and primate motor systems,” *J. Physiol.*, vol. 509, no. 1, pp. 3–14, 1998, doi: 10.1111/j.1469-7793.1998.003bo.x.
- [3] G. G. Knyazev, “Motivation, emotion, and their inhibitory control mirrored in brain oscillations,” *Neurosci. Biobehav. Rev.*, vol. 31, no. 3, pp. 377–395, 2007, doi: 10.1016/j.neubiorev.2006.10.004.
- [4] M. Steriade, D. A. McCormick, and T. J. Sejnowski, “Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain,” *Science*, vol. 262, no. 5134, pp. 679–685, 1993, doi: 10.1126/science.8235588.
- [5] O. Jensen and J. E. Lisman, “Hippocampal sequence-encoding driven by a cortical multi-item working memory buffer,” *Trends Neurosci.*, vol. 28, no. 2, pp. 67–72, 2005, doi: 10.1016/j.tins.2004.12.001.
- [6] J. Lisman and G. Buzsáki, “A neural coding scheme formed by the combined function of gamma and theta oscillations,” *Schizophr. Bull.*, vol. 34, no. 5, pp. 974–980, 2008, doi: 10.1093/schbul/sbn060.
- [7] A. K. Engel and P. Fries, “Beta-band oscillations-signalling the status quo?,” *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 20, no. 2, pp. 156–165, 2010, doi: 10.1016/j.conb.2010.02.015.
- [8] P. Fries, “Neuronal Gamma-Band Synchronization as a Fundamental Process in Cortical Computation,” *Annu. Rev. Neurosci.*, vol. 32, no. 1, pp. 209–224, 2009, doi: 10.1146/annurev.neuro.051508.135603.

- [9] O. Jensen, J. Kaiser, and J. P. Lachaux, “Human gamma-frequency oscillations associated with attention and memory,” *Trends Neurosci.*, vol. 30, no. 7, pp. 317–324, 2007, doi: 10.1016/j.tins.2007.05.001.
- [10] K. Kobayashi *et al.*, “Very Fast Rhythmic Activity on Scalp EEG Associated with Epileptic Spasms,” *Epilepsia*, vol. 45, no. 5, pp. 488–496, 2004, doi: 10.1111/j.0013-9580.2004.45703.x.
- [11] M. Rosanova, A. Casali, V. Bellina, F. Resta, M. Mariotti, and M. Massimini, “Natural frequencies of human corticothalamic circuits,” *J. Neurosci.*, vol. 29, no. 24, pp. 7679–7685, 2009, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0445-09.2009.
- [12] N. Kopell, G. B. Ermentrout, M. A. Whittington, and R. D. Traub, “Gamma rhythms and beta rhythms have different synchronization properties,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 4, pp. 1867–1872, 2000, doi: 10.1073/pnas.97.4.1867.
- [13] M. Siegel, M. R. Warden, and E. K. Miller, “Phase-dependent neuronal coding of objects in short-term memory,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 50, pp. 21341–21346, 2009, doi: 10.1073/pnas.0908193106.
- [14] J. Feingold, D. J. Gibson, B. DePasquale, and A. M. Graybiel, “Bursts of beta oscillation differentiate postperformance activity in the striatum and motor cortex of monkeys performing movement tasks,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 112, no. 44, pp. 13687–13692, 2015, doi: 10.1073/pnas.1517629112.
- [15] S. Little and P. Brown, “The functional role of beta oscillations in Parkinson’s disease,” *Park. Relat. Disord.*, vol. 20, no. SUPPL.1, pp. S44–S48, 2014, doi: 10.1016/S1353-8020(13)70013-0.
- [16] P. Brown, “Abnormal oscillatory synchronisation in the motor system leads to impaired movement,” *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 17, no. 6, pp. 656–664, 2007, doi: 10.1016/j.conb.2007.12.001.

- [17] M. D. Bevan, P. J. Magill, D. Terman, J. P. Bolam, and C. J. Wilson, "Move to the rhythm: Oscillations in the subthalamic nucleus-external globus pallidus network," *Trends Neurosci.*, vol. 25, no. 10, pp. 525–531, 2002, doi: 10.1016/S0166-2236(02)02235-X.
- [18] N. Yamawaki, I. M. Stanford, S. D. Hall, and G. L. Woodhall, "Pharmacologically induced and stimulus evoked rhythmic neuronal oscillatory activity in the primary motor cortex in vitro," *Neuroscience*, vol. 151, no. 2, pp. 386–395, 2008, doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.10.021.
- [19] J. D. Berke, V. Hetrick, J. Breck, and R. W. Greene, "Transient 23-30 Hz oscillations in mouse hippocampus during exploration of novel environments," *Hippocampus*, vol. 18, no. 5, pp. 519–529, 2008, doi: 10.1002/hipo.20435.
- [20] J. Winson, "Loss of hippocampal theta rhythm results in spatial memory deficit in the rat," *Science (80-.)*, 1978, doi: 10.1126/science.663646.
- [21] T. F. Freund and M. Antal, "GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus," *Nature*, 1988, doi: 10.1038/336170a0.
- [22] L. V. Colom, S. Nassif-Caudarella, C. T. Dickson, J. W. Smythe, and B. H. Bland, "In vivo intrahippocampal microinfusion of carbachol and bicuculline induces theta-like oscillations in the septally deafferented hippocampus," *Hippocampus*, 1991, doi: 10.1002/hipo.450010406.
- [23] M. M. McCarthy, C. Moore-Kochlacs, X. Gu, E. S. Boyden, X. Han, and N. Kopell, "Striatal origin of the pathologic beta oscillations in Parkinson's disease," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 28, pp. 11620–11625, 2011, doi: 10.1073/pnas.1107748108.
- [24] K. Shimono, F. Brucher, R. Granger, G. Lynch, and M. Taketani, "Origins and distribution of cholinergically induced β rhythms in hippocampal slices," *J. Neurosci.*, vol. 20, no. 22, pp. 8462–8473, 2000, doi: 10.1523/jneurosci.20-22-08462.2000.
- [25] J. Arai and K. Natsume, "The properties of carbachol-induced beta oscillation in rat hippocampal slices," *Neurosci. Res.*, vol. 54, no. 2, pp. 95–103, 2006, doi: 10.1016/j.neures.2005.10.011.

- [26] B. Gyorgy, "Theta oscillations in the hippocampus," *Neuron*, vol. 33, no. 3, pp. 325–340, 2002, [Online]. Available: [papers3://publication/uuid/90B140FB-AC03-4F7C-9968-EF84D84A3009](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11811111/).
- [27] W. Klimesch, "Memory processes, brain oscillations and EEG synchronization," *Int. J. Psychophysiol.*, vol. 24, no. 1–2, pp. 61–100, 1996, doi: 10.1016/S0167-8760(96)00057-8.
- [28] C. D. Tesche and J. Karhu, "Theta oscillations index human hippocampal activation during a working memory task," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 2, pp. 919–924, 2000, doi: 10.1073/pnas.97.2.919.
- [29] G. Dragoi and G. Buzsáki, "Temporal Encoding of Place Sequences by Hippocampal Cell Assemblies," *Neuron*, vol. 50, no. 1, pp. 145–157, 2006, doi: 10.1016/j.neuron.2006.02.023.
- [30] O. Jensen and J. E. Lisman, "Hippocampal CA3 region predicts memory sequences: Accounting for the phase precession of place cells," *Learn. Mem.*, 1996, doi: 10.1101/lm.3.2-3.279.
- [31] G. Agarwal *et al.*, "Spatially Distributed Local Fields in," *Science (80-.)*, vol. 344, no. May, pp. 626–630, 2014, doi: 10.1126/science.1250444.
- [32] K. Natsume and K. Kometani, "Θ-Activity-Dependent and -Independent Muscarinic Facilitation of Long-Term Potentiation in Guinea Pig Hippocampal Slices," *Neurosci. Res.*, vol. 27, no. 4, pp. 335–341, 1997, doi: 10.1016/S0168-0102(97)01167-X.
- [33] P. T. Huerta and J. E. Lisman, "Bidirectional synaptic plasticity induced by a single burst during cholinergic theta oscillation in CA1 in vitro," *Neuron*, vol. 15, no. 5, pp. 1053–1063, 1995, doi: 10.1016/0896-6273(95)90094-2.
- [34] R. Hari and R. Salmelin, "Human cortical oscillations: A neuromagnetic view through the skull," *Trends Neurosci.*, vol. 20, no. 1, pp. 44–49, 1997, doi: 10.1016/S0166-2236(96)10065-5.
- [35] G. Pfurtscheller and F. H. Lopes Da Silva, "Event-related EEG/MEG synchronization and desynchronization: Basic principles," *Clin. Neurophysiol.*, vol. 110, no. 11, pp. 1842–1857, 1999, doi: 10.1016/S1388-2457(99)00141-8.

- [36] B. E. Kilavik, M. Zaepffel, A. Brovelli, W. A. MacKay, and A. Riehle, “The ups and downs of beta oscillations in sensorimotor cortex,” *Experimental Neurology*. 2013, doi: 10.1016/j.expneurol.2012.09.014.
- [37] F. van Ede, O. Jensen, and E. Maris, “Tactile expectation modulates pre-stimulus A-band oscillations in human sensorimotor cortex,” *Neuroimage*, vol. 51, no. 2, pp. 867–876, 2010, doi: 10.1016/j.neuroimage.2010.02.053.
- [38] B. Spitzer, E. Wacker, and F. Blankenburg, “Oscillatory correlates of vibrotactile frequency processing in human working memory,” *J. Neurosci.*, vol. 30, no. 12, pp. 4496–4502, 2010, doi: 10.1523/JNEUROSCI.6041-09.2010.
- [39] A. S. C. França *et al.*, “Beta2 oscillations (23-30 Hz) in the mouse hippocampus during novel object recognition,” *Eur. J. Neurosci.*, vol. 40, no. 11, pp. 3693–3703, 2014, doi: 10.1111/ejn.12739.
- [40] S. Weiss and H. M. Mueller, “‘Too many betas do not spoil the broth’: The role of beta brain oscillations in language processing,” *Front. Psychol.*, vol. 3, no. JUN, pp. 1–15, 2012, doi: 10.3389/fpsyg.2012.00201.
- [41] S. Hanslmayr, B. Spitzer, and K. H. Bäuml, “Brain oscillations dissociate between semantic and nonsemantic encoding of episodic memories,” *Cereb. Cortex*, vol. 19, no. 7, pp. 1631–1640, 2009, doi: 10.1093/cercor/bhn197.
- [42] T. J. Buschman and E. K. Miller, “Top-down versus bottom-up control of attention in the prefrontal and posterior parietal cortices,” *Science (80-.)*, vol. 315, no. 5820, pp. 1860–1864, 2007, doi: 10.1126/science.1138071.
- [43] T. J. Buschman and E. K. Miller, “Serial, Covert Shifts of Attention during Visual Search Are Reflected by the Frontal Eye Fields and Correlated with Population Oscillations,” *Neuron*, vol. 63, no. 3, pp. 386–396, 2009, doi: 10.1016/j.neuron.2009.06.020.

- [44] P. Battaglia, G. R. Sutherland, and B. L. McNaughton, “Hippocampal sharp wave bursts coincide with,” *Learn. Mem.*, pp. 697–704, 2004, doi: 10.1101/lm.73504.anesthetized.
- [45] D. Ji and M. A. Wilson, “Coordinated memory replay in the visual cortex and hippocampus during sleep,” *Nat. Neurosci.*, 2007, doi: 10.1038/nm1825.
- [46] A. K. Lee and M. A. Wilson, “Memory of sequential experience in the hippocampus during slow wave sleep,” *Neuron*, vol. 36, no. 6, pp. 1183–1194, 2002, doi: 10.1016/S0896-6273(02)01096-6.
- [47] B. P. Staresina *et al.*, “Hierarchical nesting of slow oscillations, spindles and ripples in the human hippocampus during sleep,” *Nat. Neurosci.*, 2015, doi: 10.1038/nm.4119.
- [48] M. Le Van Quyen *et al.*, “High-frequency oscillations in human and monkey neocortex during the wake-sleep cycle,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 113, no. 33, pp. 9363–9368, 2016, doi: 10.1073/pnas.1523583113.
- [49] J. Ehrhart, M. Toussaint, C. Simon, C. Gronfier, R. Luthringer, and G. Brandenberger, “Alpha activity and cardiac correlates: Three types of relationships during nocturnal sleep,” *Clin. Neurophysiol.*, vol. 111, no. 5, pp. 940–946, 2000, doi: 10.1016/S1388-2457(00)00247-9.
- [50] K. Louie and M. A. Wilson, “Temporally structured replay of awake hippocampal ensemble activity during rapid eye movement sleep,” *Neuron*, vol. 29, no. 1, pp. 145–156, 2001, doi: 10.1016/S0896-6273(01)00186-6.
- [51] S. Vijayan, K. Q. Lepage, N. J. Kopell, and S. S. Cash, “Frontal beta-theta network during REM sleep,” *Elife*, vol. 6, pp. 1–19, 2017, doi: 10.7554/eLife.18894.
- [52] M. Medalla and H. Barbas, “The anterior cingulate cortex may enhance inhibition of lateral prefrontal cortex via m2 cholinergic receptors at dual synaptic sites,” *J. Neurosci.*, vol. 32, no. 44, pp. 15611–15625, 2012, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2339-12.2012.
- [53] A. Muzur, E. F. Pace-Schott, and J. A. Hobson, “The prefrontal cortex in sleep,” *Trends Cogn. Sci.*, vol. 6, no. 11, pp. 475–481, 2002, doi: 10.1016/S1364-6613(02)01992-7.

- [54] P. N. Banerjee, D. Filippi, and W. Allen Hauser, “The descriptive epidemiology of epilepsy-A review,” *Epilepsy Res.*, vol. 85, no. 1, pp. 31–45, 2009, doi: 10.1016/j.eplepsyres.2009.03.003.
- [55] A. T. Berg *et al.*, “Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009,” *Epilepsia*, vol. 51, no. 4, pp. 676–685, 2010, doi: 10.1111/j.1528-1167.2010.02522.x.
- [56] D. W. Kim, J. S. Sunwoo, and S. K. Lee, “Headache as an Aura of Epilepsy: Video-EEG Monitoring Study,” *Headache*, vol. 56, no. 4, pp. 762–768, 2016, doi: 10.1111/head.12754.
- [57] Y. Shu, A. Hasenstaub, and D. A. McCormick, “Turning on and off recurrent balanced cortical activity,” *Nature*, vol. 423, no. 6937, pp. 288–293, 2003, doi: 10.1038/nature01616.
- [58] A. K. Alekov, M. M. Rahman, N. Mitrovic, F. Lehmannhorn, and H. Lerche, “A sodium channel mutation causing epilepsy in man exhibits subtle defects in fast inactivation and activation in vitro,” *J. Physiol.*, vol. 529, no. 3, pp. 533–539, 2000, doi: 10.1111/j.1469-7793.2000.00533.x.
- [59] I. Ogiwara *et al.*, “Nav1.1 localizes to axons of parvalbumin-positive inhibitory interneurons: A circuit basis for epileptic seizures in mice carrying an *Scn1a* gene mutation,” *J. Neurosci.*, vol. 27, no. 22, pp. 5903–5914, 2007, doi: 10.1523/JNEUROSCI.5270-06.2007.
- [60] Y. Sugiura *et al.*, “Lack of potassium current in W309R mutant KCNQ3 channel causing benign familial neonatal convulsions (BFNC),” *Epilepsy Res.*, vol. 84, no. 1, pp. 82–85, 2009, doi: 10.1016/j.eplepsyres.2008.12.003.
- [61] S. Baulac *et al.*, “First genetic evidence of GABAA receptor dysfunction in epilepsy: A mutation in the $\gamma 2$ -subunit gene,” *Nat. Genet.*, vol. 28, no. 1, pp. 46–48, 2001, doi: 10.1038/ng0501-46.
- [62] P. Cossette *et al.*, “Mutation of GABRA1 in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy,” *Nat. Genet.*, vol. 31, no. 2, pp. 184–189, 2002, doi: 10.1038/ng885.

- [63] S. Karnup and A. Stelzer, "Seizure-like activity in the disinhibited CA1 minislice of adult guinea-pigs," *J. Physiol.*, vol. 532, no. 3, pp. 713–730, 2001, doi: 10.1111/j.1469-7793.2001.0713e.x.
- [64] D. R. Bennett, "Sleep deprivation and major motor convulsions," *Neurology*, 1963, doi: 10.1212/wnl.13.11.953.
- [65] E. A. Rodin, E. D. Luby, and J. S. Gottlieb, "The electroencephalogram during prolonged experimental sleep deprivation," *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, 1962, doi: 10.1016/0013-4694(62)90060-3.
- [66] M. G. Terzano, L. Parrino, P. G. Garofalo, C. Durisotti, and C. Filati-Roso, "Activation of partial seizures with motor signs during cyclic alternating pattern in human sleep," *Epilepsy Res.*, 1991, doi: 10.1016/0920-1211(91)90009-5.
- [67] S. T. Herman, T. S. Walczak, and C. W. Bazil, "Distribution of partial seizures during the sleep-wake cycle: Differences by seizure onset site," *Neurology*, 2001, doi: 10.1212/WNL.56.11.1453.
- [68] L. Parrino, A. Smerieri, and M. G. Terzano, "Combined influence of cyclic arousability and EEG synchrony on generalized interictal discharges within the sleep cycle," *Epilepsy Res.*, 2001, doi: 10.1016/S0920-1211(00)00192-3.
- [69] M. Ng and M. Pavlova, "Why Are Seizures Rare in Rapid Eye Movement Sleep? Review of the Frequency of Seizures in Different Sleep Stages," *Epilepsy Res. Treat.*, vol. 2013, pp. 1–10, 2013, doi: 10.1155/2013/932790.
- [70] D. Minecan, A. Natarajan, M. Marzec, and B. Malow, "Relationship of Epileptic Seizures to Sleep Stage and Sleep Depth," *Sleep*, vol. 25, no. 8, pp. 56–61, 2002, doi: 10.1093/sleep/25.8.56.
- [71] R. A. España and T. E. Scammell, "Sleep Neurobiology from a Clinical Perspective," *Sleep*, vol. 34, no. 7, 2011, doi: 10.5665/sleep.1112.

- [72] E. Burakgazi and J. A. French, “Treatment of epilepsy in adults,” *Epileptic Disord.*, 2016, doi: 10.1684/epd.2016.0836.
- [73] R. H. Mattson, “Medical management of epilepsy in adults,” in *Neurology*, 1998, doi: 10.1212/wnl.51.5_suppl_4.s15.
- [74] M. C. H. Li and M. J. Cook, “Deep brain stimulation for drug-resistant epilepsy,” *Epilepsia*, vol. 59, no. 2, pp. 273–290, 2018, doi: 10.1111/epi.13964.
- [75] S. N. Lim *et al.*, “Low and High Frequency Hippocampal Stimulation for Drug-Resistant Mesial Temporal Lobe Epilepsy,” *Neuromodulation*, vol. 19, no. 4, pp. 365–372, 2016, doi: 10.1111/ner.12435.
- [76] D. Bianchi *et al.*, “On the mechanisms underlying the depolarization block in the spiking dynamics of CA1 pyramidal neurons,” *J. Comput. Neurosci.*, 2012, doi: 10.1007/s10827-012-0383-y.
- [77] S. Miocinovic, S. Somayajula, S. Chitnis, and J. L. Vitek, “History, applications, and mechanisms of deep brain stimulation,” *JAMA Neurology*. 2013, doi: 10.1001/2013.jamaneuro1.45.
- [78] M. M. Troester and D. K. Naritoku, “Vagus nerve stimulation,” in *Epilepsy: Mechanisms, Models, and Translational Perspectives*, 2010.
- [79] M. J. C. Sjögren, P. T. O. Hellström, M. A. G. Jonsson, M. Runnerstam, H. C. so. Silander, and E. Ben-Menachem, “Cognition-enhancing effect of vagus nerve stimulation in patients with Alzheimer’s disease: A pilot study,” *J. Clin. Psychiatry*, 2002, doi: 10.4088/JCP.v63n1103.
- [80] J. Smucny, A. Visani, and J. R. Tregellas, “Could vagus nerve stimulation target hippocampal hyperactivity to improve cognition in schizophrenia?,” *Front. Psychiatry*, vol. 6, no. MAR, pp. 1–5, 2015, doi: 10.3389/fpsy.2015.00043.

- [81] D. C. Smith *et al.*, “Electrical stimulation of the vagus nerve enhances cognitive and motor recovery following moderate fluid percussion injury in the rat,” *J. Neurotrauma*, 2005, doi: 10.1089/neu.2005.22.1485.
- [82] J. Jacobs *et al.*, “High-frequency electroencephalographic oscillations correlate with outcome of epilepsy surgery,” *Ann. Neurol.*, vol. 67, no. 2, pp. 209–220, 2010, doi: 10.1002/ana.21847.
- [83] T. Akiyama *et al.*, “Focal resection of fast ripples on extraoperative intracranial EEG improves seizure outcome in pediatric epilepsy,” *Epilepsia*, vol. 52, no. 10, pp. 1802–1811, 2011, doi: 10.1111/j.1528-1167.2011.03199.x.
- [84] J. W. Miller, G. M. Turner, and B. C. Gray, “Anticonvulsant effects of the experimental induction of hippocampal theta activity,” *Epilepsy Res.*, 1994, doi: 10.1016/0920-1211(94)90040-X.
- [85] A. Hashimoto, T. Sawada, and K. Natsume, “The change of picrotoxin-induced epileptiform discharges to the beta oscillation by carbachol in rat hippocampal slices,” *Biophys. Physicobiology*, 2017, doi: 10.2142/biophysico.14.0_137.
- [86] M. A. Rubin, A. C. Medeiros, P. C. B. Rocha, C. B. Livi, G. Ramirez, and D. O. Souza, “Effect of guanine nucleotides on [3H]glutamate binding and on adenylate cyclase activity in rat brain membranes,” *Neurochem. Res.*, 1997, doi: 10.1023/A:1027367624250.
- [87] D. J. Linden and A. Routtenberg, “The role of protein kinase C in long-term potentiation: a testable model,” *Brain Research Reviews*. 1989, doi: 10.1016/0165-0173(89)90004-0.
- [88] W. B. SCOVILLE and B. MILNER, “Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions.,” *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, vol. 20, no. 1, pp. 11–21, 1957, doi: 10.1136/jnnp.20.1.11.
- [89] B. Milner, S. Corkin, and H. L. Teuber, “Further analysis of the hippocampal amnesic syndrome: 14-year follow-up study of H.M.,” *Neuropsychologia*, 1968, doi: 10.1016/0028-3932(68)90021-3.
- [90] L. Nadel and M. Moscovitch, “Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex,” *Curr. Opin. Neurobiol.*, 1997, doi: 10.1016/S0959-4388(97)80010-4.

- [91] B. J. Wiltgen, R. A. M. Brown, L. E. Talton, and A. J. Silva, “New circuits for old memories: The role of the neocortex in consolidation,” *Neuron*. 2004, doi: 10.1016/j.neuron.2004.09.015.
- [92] A. Quillfeldt, “Sequential Role of Hippocampus and Amygdala, Entorhinal Cortex and Parietal Cortex in Formation and Retrieval of Memory for Inhibitory Avoidance in Rats,” vol. 9, no. November 1996, pp. 786–793, 1997.
- [93] X. Liu *et al.*, “Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall,” *Nature*, vol. 484, no. 7394, pp. 381–385, 2012, doi: 10.1038/nature11028.
- [94] T. Kitamura *et al.*, “Engrams and circuits crucial for systems consolidation of a memory,” *Science (80-.)*, vol. 356, no. 6333, pp. 73–78, 2017, doi: 10.1126/science.aam6808.
- [95] A. N. Drury and A. Szent-Györgyi, “The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart,” *J. Physiol.*, 1929, doi: 10.1113/jphysiol.1929.sp002608.
- [96] K. A. Jacobson and Z. G. Gao, “Adenosine receptors as therapeutic targets,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 5, no. 3, pp. 247–264, 2006, doi: 10.1038/nrd1983.
- [97] T. Porkka-Heiskanen, R. E. Strecker, M. Thakkar, A. A. Bjørkum, R. W. Greene, and R. W. McCarley, “Adenosine: A mediator of the sleep-inducing effects of prolonged wakefulness,” *Science (80-.)*, 1997, doi: 10.1126/science.276.5316.1265.
- [98] T. V. Dunwiddie and S. A. Masino, “The Role and Regulation of Adenosine in the Central Nervous System,” *Annu. Rev. Neurosci.*, 2001, doi: 10.1146/annurev.neuro.24.1.31.
- [99] E. Beamer, G. Conte, and T. Engel, “ATP release during seizures – A critical evaluation of the evidence,” *Brain Res. Bull.*, vol. 151, no. December 2018, pp. 65–73, 2019, doi: 10.1016/j.brainresbull.2018.12.021.
- [100] T. Porkka-Heiskanen and A. V. Kalinchuk, “Adenosine, energy metabolism and sleep homeostasis,” *Sleep Medicine Reviews*. 2011, doi: 10.1016/j.smr.2010.06.005.

- [101] J. L. Albasanz, S. Perez, M. Barrachina, I. Ferrer, and M. Martín, “Up-regulation of adenosine receptors in the frontal cortex in Alzheimer’s disease,” *Brain Pathol.*, 2008, doi: 10.1111/j.1750-3639.2007.00112.x.
- [102] N. Dale and B. Frenguelli, “Release of Adenosine and ATP During Ischemia and Epilepsy,” *Curr. Neuropharmacol.*, vol. 7, no. 3, pp. 160–179, 2009, doi: 10.2174/157015909789152146.
- [103] M. S. Bynoe, C. Viret, A. Yan, and D. G. Kim, “Adenosine receptor signaling: A key to opening the blood-brain door,” *Fluids and Barriers of the CNS*. 2015, doi: 10.1186/s12987-015-0017-7.
- [104] B. B. Fredholm, A. P. IJzerman, K. A. Jacobson, J. Linden, and C. E. Müller, “International union of basic and clinical pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors - An update,” *Pharmacological Reviews*. 2011, doi: 10.1124/pr.110.003285.
- [105] D. van Calker, M. Müller, and B. Hamprecht, “ADENOSINE REGULATES VIA TWO DIFFERENT TYPES OF RECEPTORS, THE ACCUMULATION OF CYCLIC AMP IN CULTURED BRAIN CELLS,” *J. Neurochem.*, 1979, doi: 10.1111/j.1471-4159.1979.tb05236.x.
- [106] B. Kull, P. Svenningsson, and B. B. Fredholm, “Adenosine A(2A) receptors are colocalized with and activate G(olf) in rat striatum,” *Mol. Pharmacol.*, 2000, doi: 10.1124/mol.58.4.771.
- [107] R. A. Cunha, “Neuroprotection by adenosine in the brain: From A1 receptor activation to A2A receptor blockade,” *Purinergic Signalling*. 2005, doi: 10.1007/s11302-005-0649-1.
- [108] P. Svenningsson, C. Le Moine, G. Fisone, and B. B. Fredholm, “Distribution, biochemistry and function of striatal adenosine A(2A) receptors,” *Progress in Neurobiology*. 1999, doi: 10.1016/S0301-0082(99)00011-8.
- [109] D. M. Rombo, J. A. Ribeiro, and A. M. Sebastião, “Hippocampal GABAergic transmission: a new target for adenosine control of excitability,” *J. Neurochem.*, vol. 139, no. 6, pp. 1056–1070, 2016, doi: 10.1111/jnc.13872.

- [110] K. Germé, J. B. Faure, E. Koning, and A. Nehlig, “Effect of caffeine and adenosine receptor ligands on the expression of spike-and-wave discharges in Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg (GAERS),” *Epilepsy Res.*, vol. 110, pp. 105–114, 2015, doi: 10.1016/j.eplepsyres.2014.11.022.
- [111] R. Forghani and K. Krnjević, “Adenosine antagonists have differential effects on induction of long-term potentiation in hippocampal slices,” *Hippocampus*, 1995, doi: 10.1002/hipo.450050109.
- [112] R. A. Cunha and P. M. Agostinho, “Chronic caffeine consumption prevents memory disturbance in different animal models of memory decline,” in *Journal of Alzheimer’s Disease*, 2010, doi: 10.3233/JAD-2010-1408.
- [113] M. J. Mackow, B. Krishnan, W. E. Bingaman, I. M. Najm, A. V. Alexopoulos, and D. R. Nair, “Increased caffeine intake leads to worsening of electrocorticographic epileptiform discharges as recorded with a responsive neurostimulation device,” *Clin. Neurophysiol.*, vol. 127, no. 6, pp. 2341–2342, 2016, doi: 10.1016/j.clinph.2016.03.012.
- [114] K. Gilliland and D. Andress, “Ad lib consumption, symptoms of caffeinism, and academic performance,” *Am. J. Psychiatry*, 1981, doi: 10.1176/ajp.138.4.512.
- [115] J. P. Lopes, A. Pliássova, and R. A. Cunha, “The physiological effects of caffeine on synaptic transmission and plasticity in the mouse hippocampus selectively depend on adenosine A1 and A2A receptors,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 166, no. June, pp. 313–321, 2019, doi: 10.1016/j.bcp.2019.06.008.
- [116] M. Nishimura, H. Nakatsuka, and K. Natsume, “Phase dependency of long-term potentiation induction during the intermittent bursts of carbachol-induced β oscillation in rat hippocampal slices,” *Biophys.*, vol. 8, pp. 173–181, 2012, doi: 10.2142/biophysics.8.173.

- [117] M. Chang *et al.*, “Brief activation of GABAergic interneurons initiates the transition to ictal events through post-inhibitory rebound excitation,” *Neurobiol. Dis.*, 2018, doi: 10.1016/j.nbd.2017.10.007.
- [118] B. Hangya, Z. Borhegyi, N. Szilágyi, T. F. Freund, and V. Varga, “GABAergic neurons of the medial septum lead the hippocampal network during theta activity,” *J. Neurosci.*, vol. 29, no. 25, pp. 8094–8102, 2009, doi: 10.1523/JNEUROSCI.5665-08.2009.
- [119] J. Konopacki, M. Bruce MacIver, B. H. Bland, and S. H. Roth, “Carbachol-induced EEG ‘theta’ activity in hippocampal brain slices,” *Brain Res.*, 1987, doi: 10.1016/0006-8993(87)91009-2.
- [120] H. M. Zhang, D. P. Li, S. R. Chen, and H. L. Pan, “M2, M3, and M4 receptor subtypes contribute to muscarinic potentiation of GABAergic inputs to spinal dorsal horn neurons,” *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2005, doi: 10.1124/jpet.104.079939.
- [121] M. Lévesque and M. Avoli, “Carbachol-Induced theta-like oscillations in the rodent brain limbic system: Underlying mechanisms and significance,” *Neurosci. Biobehav. Rev.*, vol. 95, no. October, pp. 406–420, 2018, doi: 10.1016/j.neubiorev.2018.10.018.
- [122] H. Kawasaki, C. Palmieri, and M. Avoli, “Muscarinic receptor activation induces depolarizing plateau potentials in bursting neurons of the rat subiculum,” *J. Neurophysiol.*, 1999, doi: 10.1152/jn.1999.82.5.2590.
- [123] K. Natsume and K. Kometani, “Suppression of pair-pulse depression of the population spike in the dentate gyrus during carbachol-induced theta-like activity in guinea pig hippocampal slices,” *Neurosci. Res.*, 1997, doi: 10.1016/S0168-0102(97)00079-5.
- [124] H. Wigström and B. Gustafsson, “Facilitated induction of hippocampal long-lasting potentiation during blockade of inhibition,” *Nature*, 1983, doi: 10.1038/301603a0.
- [125] Z. Tan *et al.*, “Glia-derived ATP inversely regulates excitability of pyramidal and CCK-positive neurons,” *Nat. Commun.*, vol. 8, pp. 1–15, 2017, doi: 10.1038/ncomms13772.

- [126] H. G. E. Lloyd, K. Lindström, and B. B. Fredholm, "Intracellular formation and release of adenosine from rat hippocampal slices evoked by electrical stimulation or energy depletion," *Neurochem. Int.*, 1993, doi: 10.1016/0197-0186(93)90095-M.
- [127] B. J. Gluckman, E. J. Neel, T. I. Netoff, W. L. Ditto, M. L. Spano, and S. J. Schiff, "Electric field suppression of epileptiform activity in hippocampal slices," *J. Neurophysiol.*, 1996, doi: 10.1152/jn.1996.76.6.4202.
- [128] J. Lian, M. Bikson, C. Sciortino, W. C. Stacey, and D. M. Durand, "Local suppression of epileptiform activity by electrical stimulation in rat hippocampus in vitro," *Journal of Physiology*. 2003, doi: 10.1113/jphysiol.2002.033209.
- [129] R. S. Ghai, M. Bikson, and D. M. Durand, "Effects of applied electric fields on low-calcium epileptiform activity in the CA1 region of rat hippocampal slices," *J. Neurophysiol.*, 2000, doi: 10.1152/jn.2000.84.1.274.
- [130] E. Češková, "Vagus nerve stimulation," *Ceska a Slovenska Psychiatrie*. 2002, doi: 10.3171/ped.2008.2.11.377.
- [131] D. M. Labiner and G. L. Ahern, "Vagus nerve stimulation therapy in depression and epilepsy: Therapeutic parameter settings," *Acta Neurol. Scand.*, 2007, doi: 10.1111/j.1600-0404.2006.00732.x.
- [132] P. A. Rutecki, F. J. Lebeda, and D. Johnston, "Epileptiform activity induced by changes in extracellular potassium in hippocampus," *J. Neurophysiol.*, 1985, doi: 10.1152/jn.1985.54.5.1363.
- [133] M. Bikson, J. Lian, P. J. Hahn, W. C. Stacey, C. Sciortino, and D. M. Durand, "Suppression of epileptiform activity by high frequency sinusoidal fields in rat hippocampal slices," *J. Physiol.*, vol. 531, no. 1, pp. 181–191, 2001, doi: 10.1111/j.1469-7793.2001.0181j.x.

- [134] S. Toprani and D. M. Durand, “Long-lasting hyperpolarization underlies seizure reduction by low frequency deep brain electrical stimulation,” *J. Physiol.*, vol. 591, no. 22, pp. 5765–5790, 2013, doi: 10.1113/jphysiol.2013.253757.