

Patho-physiological Changes in γ -aminobutyric Acid and Benzodiazepine Receptor in the Brain of EI Mouse

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7806

El マウス誘発痙攣における脳内 γ -アミノ酪酸結合能, ベンゾジアゼピン結合能の変化

金沢大学医学部小児科学講座 (主任: 谷口 昂教授)

入 道 秀 樹

(昭和60年6月13日受付)

けいれん素因をもつ El マウスにおける脳内 γ -アミノ酪酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) およびベンゾジアゼピン (benzodiazepine, BZP) 受容体の結合能について, 年齢, けいれん発作および抗けいれん剤投与による変化を検討した。対照として同年令の ddY マウスを使用した。凍結融解, 遠心による洗浄をくり返し得られた脳膜分画を各々 GABA および BZP 結合能の測定に用い, 放射性リガンドとして ^3H -GABA, ^3H -diazepam を使用した。両受容体の結合能は生下時に低く以後急速に増加し生後 6 週令で成熟 El マウスの値に達していた。また対照である ddY マウスとの間には発達による差は認められなかった。放り上げ刺激誘発けいれん後 15 分および 30 分で GABA 結合能は低下し, BZP 結合能は増加を認め, 60 分後には両結合能は共にけいれん前の値に戻っていた。また放り上げ刺激によりけいれんが誘発されない 6 週令において刺激後 30 分で GABA 結合能の低下および BZP 結合能の増加傾向を認めた。対照である ddY マウスでは放り上げ刺激による変化は認められず, この両結合能の変化は El マウスに特異的であり, 刺激による変化は, けいれん準備状態ですでにみられ, けいれん発作により増強されると思われた。これら GABA 結合能の減少および BZP 結合能の増加はけいれん不応期と時間的に一致しており, この時点で両受容体の腹分画中の内因性 GABA 濃度の増加が認められた。フェノバルビタール (20 mg/kg), フェニトイン (50 mg/kg), パルプロン酸 (250 mg/kg), アミノオキシアセト酸 (25 mg/kg) およびジアゼパム (5 mg/kg) 投与では両結合能の変化はみられず, パルプロン酸投与による受容体膜分画中の GABA 濃度に変化は認められなかった。以上の結果より, (1) El マウスにおける両受容体の結合能は発達過程および安静時には対照と変らない, (2) 放り上げ刺激による GABA 結合能の低下および BZP 結合能の増加がみられ, けいれんにより増強される, (3) これら両結合能の変化は内因性 GABA 濃度の増加によるものであり, かつけいれん不応期の発現機序に重要な役割をもつ, と思われた。

Key words γ -aminobutyric acid receptor binding, benzodiazepine receptor binding, seizure, El mouse

近年哺乳動物の中枢神経系に γ -アミノ酪酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 受容体¹⁾, 及びベンゾジアゼピン (benzodiazepine, BZP) 受容体^{2,3)}の存在が証明されて来ている。

GABA は抑制系神経伝達物質として, GABA 系ニューロンは抑制系のニューロンとして広く知られている。実験でてんかんにおけるてんかん焦点部位の

GABA 濃度, GABA 受容体及び L-グルタミン脱炭酸酵素 (L-glutamate decarboxylase, GAD) の減少が報告されている⁴⁾。BZP 受容体に関しては, BZP 系薬物の薬理作用と BZP 結合能が相関する事が示されている⁵⁾。けいれん重積状態において BZP 系薬物が著効を呈する事は周知の事実である。

この様に GABA 受容体及び BZP 受容体はけいれ

Abbreviations: AOAA, aminooxyacetic acid; BZP, benzodiazepine; DZP, diazepam; GABA, γ -aminobutyric acid; GAD, L-glutamate decarboxylase; PB, phenobarbital; PHT, phenytoin; VPA, valproic acid.

んと深い関係にあると考えられる。今回遺伝性けいれん素因を有するEIマウスについて、1) 年齢による受容体結合能の変化、2) けいれん発作後の受容体結合能の変化、3) 抗けいれん剤投与による受容体結合能の変化について検討した。

材料および方法

I. 実験動物

1954年に国立予防衛生研究所の今泉によって発見され1964年に国際登録されたEIマウスを使用した。EIマウスは生後4週令より週に1回の割合で平衡感覚を狂わせる様な放り上げ刺激を加える事で生後8週令頃より約30秒間続く全身性の強直性間代性けいれんをおこす事で知られている。今回の実験に使用したEIマウスは1981年に譲り受けたもので100~110世代のものである。対照としてEIマウスの母系であるddYマウスを使用した。

1. 年齢による受容体結合能の推移

反応系の蛋白濃度が一定となる様に、生後1日令5匹、1週令3匹、2週令2匹分の脳を1つにまとめ各々1検体として、また4、6、8、10、12週令以上では各1匹を使用し、各週令共に6検体で検討した。対照としてddYマウス生後2週令2匹、4、6、8、12週令各1匹の各々6検体で受容体結合能を測定した。

2. けいれん発作による受容体結合能の変化

生後16週令前後のEIマウスに放り上げ刺激誘発けいれんをおこさせ、放り上げ刺激前、刺激後けいれん中、けいれん後15分、30分、60分、120分の各々6匹について受容体結合能の変化を経時的に検討した。

3. 放り上げ刺激による変化

放り上げ刺激を40回行なってもけいれんが誘発されない年齢である6週令の刺激前、刺激後15分、30分、60分の各々6匹について受容体結合能の変化を検討した。また対照として同年令のddYマウスおよびddYマウスに放り上げ刺激を40回施行した群各4匹について結合能の変化を検討した。

4. 薬物による処置

16週令のマウスに対し、生理食塩水にて0.3%のフェノバルビタール(PB)、0.5%のフェニトイン(PHT)、2.5%のバルプロン酸(VPA)、0.25%のアミノキシアセト酸(AOAA)、0.05%のジアゼパム(DZP)の各溶液を作製しPB(20 mg/kg)、PHT(50 mg/kg)、VPA(250 mg/kg)、AOAA(25 mg/kg)、DZP(5 mg/kg)となる様に各々0.3~0.4 mlを腹腔内に投与した。投与後60分に放り上げ刺激を行ないけいれんの抑制を確認後直ちに断頭した。対照としては生理食塩水を同量腹腔内投与したものを用いた。

II. 膜分画の調整

マウスを断頭にて殺し液体窒素中に頭部を凍結し、その後速やかに小脳および脳幹部を除いた大脳部を取り出し-80°Cに凍結した。この大脳に20倍容の0.32 M シュクロースを加え、Potter-Elvehjemのテフロンホモジナイザーで8往復ホモジネートし、1,000×g、10分間遠心しこの上清を2つに分けて各々GABA結合膜分画、BZP結合膜分画の調整に使用した。

1. GABA結合膜分画の調整

Greenleeら⁶⁾の方法を若干改変し図1のごとくGABA結合膜分画を得た。

まず上記のホモジネート上清を18,000×g、20分間遠心し、その沈渣に脱イオン水20倍容を加え超音波ホモジネートし8,000×g、20分間遠心にて上清およびbuffy coatを得た。この上清およびbuffy coatを25,000×g、25分間遠心し、その沈渣に20倍容の50 mM Tris-Citrate buffer (pH, 7.1)を加え再度遠心し沈渣を-20°Cに凍結した。12~18時間後に融解し25,000×g、25分間遠心の沈渣を再び-20°Cに凍結保存した。約10日後これを25,000×g、25分間の遠心操作を2回くり返し、蛋白濃度が0.5~0.6 mg/mlとなる様に上記緩衝液に懸濁しGABA結合膜分画として使用した。

2. BZP結合膜分画の調整

Möhlerら⁷⁾の方法を若干改変しBZP結合膜分画を調整した。ホモジネートの上清を18,000×g、20分間遠心後、その沈渣に50 mM Tris-HCl buffer (pH, 7.4)を20倍容加え25,000×g、25分間の遠心を2回くり返し蛋白濃度が0.6~0.8 mg/mlとなる様に上記緩衝液に懸濁しBZP結合膜分画とした。

III. 受容体結合能の測定

1. GABA結合能の測定

50 mM Tris-Citrate buffer (pH, 7.1) 0.435 ml, 脱イオン水50 μl, ³H-GABA (New England Nuclear, 比活性30.8 Ci/mmol)を最終濃度5 nMになる様に希釈して15 μl, これに膜分画0.5 mlを加え計1 mlとし、45分間水中で反応させた。反応後速やかにWhatman GF/Cガラスフィルター(ポアサイズ1.2 μ)で吸引漏過し、フィルターを脱イオン水5 mlで3回洗浄後、シンチレーター(トルエンIL, POPOP 50 mg, DPO4g)5 mlを加え液体シンチレーションカウンターで測定しこれを総結合量とした。上記脱イオン水の代わりにGABA(最終濃度1 mM)50 μlを加えたものを非特異的結合とし、総結合量よりこれを差引いた値を特異的結合とした。

2. BZP結合能の測定

50 mM Tris-HCl buffer (pH, 7.4) 0.44 ml, ³H-

diazepam (New England Nuclear, 比活性 76.7 Ci/mmol) 10 μ l (最終濃度 0.5 nM) および蒸留水 50 μ l に膜分画 0.5 ml を加え計 1 ml とし, 氷水中で 60 分間反応させ, 反応後速やかに Whatman GF/C ガラスフィルターで吸引漏過し, そのフィルターを緩衝液 5 ml で 3 回洗浄後同様に測定し総結合量とした. 非特異的結合の測定には蒸留水の代りにジアゼパム 50 μ l (最終濃度 3 μ M) を加えた.

総結合および非特異的結合の測定は同一検体で 3~4 回行った.

IV. 受容体膜分画中の GABA 濃度の測定

16 週令 EI マウスの安静時, バルプロン酸 250 mg/kg 腹腔内投与後 60 分および放り上げ刺激誘発後 1 時間後 20 分の各々から調整した GABA および BZP 受容体膜分画に含まれる GABA 濃度を Graham ら⁷⁾の酵素的微量測定法で測定した.

V. 蛋白濃度測定は Lowry 法⁸⁾によった.

VI. 有意差検定には student's t-test を用いた.

成 績

1. 年令による受容体結合能の推移

GABA および BZP 受容体の特異的結合能を組織重量当りに換算し 12~16 週令マウスを 100% として表わした.

EI マウスの GABA 受容体結合能は図 2 のごとく生後 1 日令で約 30%, 1 週令で約 65%, 2 週令で 80% と急速に増加し 4 週令でほぼ 12 週令以上と同程度となり, 8 週令では 140% と成熟 EI マウスより高くなっていった. ddY マウスでも 2 週令約 75%, 4 週令約 105%, 8 週令 150% と同様の増加傾向が得られた. EI マウスの BZP 受容体結合能は図 3 の様に生後 1 日令で約 25%, 2 週令約 55%, 4 週令 85%, 6 週令でほぼ成熟

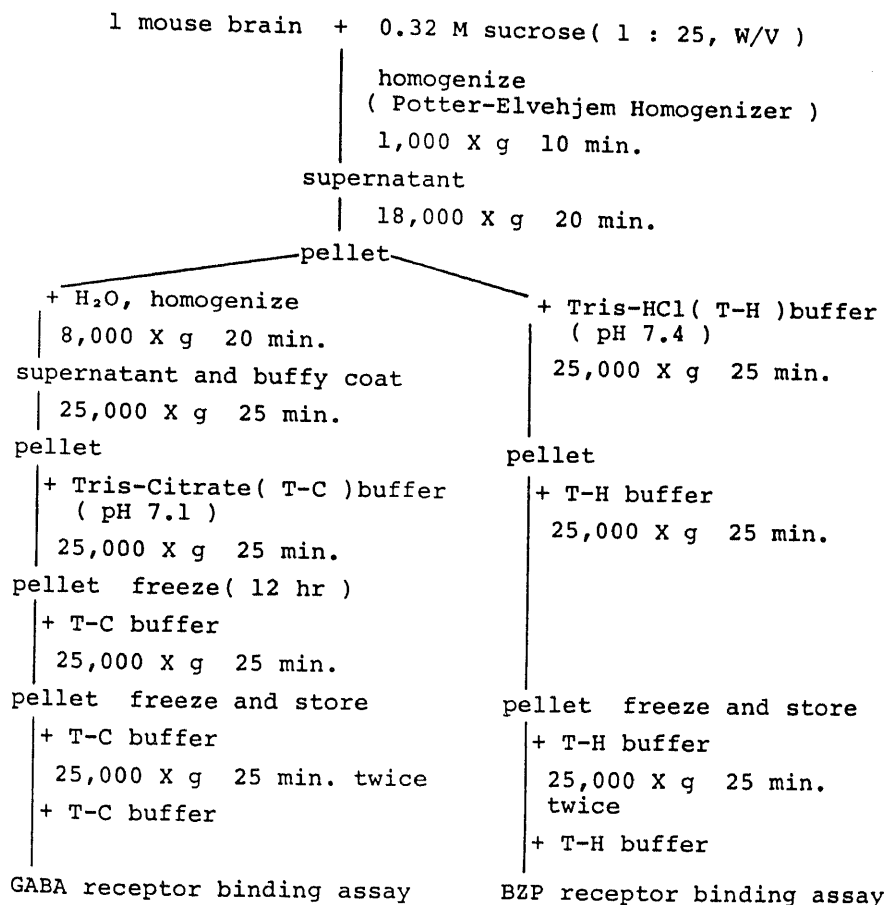


Fig. 1. Preparation of the membrane fractions for GABA and benzodiazepine receptor binding assay.

マウスと同程度となっていた。ddYマウスでは2週令約55%、4週令90%、6週令92%であった。

GABA, BZP 両受容体の結合能ともEIマウスのけいれん発現期である6~10週令の期間で対照であるddYマウスと変る所はなかった。

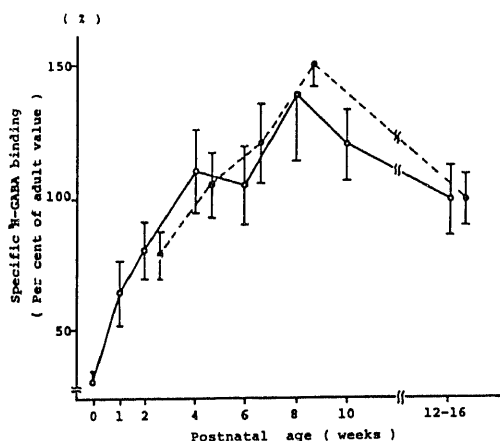


Fig. 2. Postnatal changes of ^3H -GABA binding. Specific ^3H -GABA bindings were measured in the forebrain (whole brain minus cerebellum and brainstem) of EI mouse (\circ - \circ), and ddY mouse (\bullet - \bullet). Tissue was pooled from mice of the same age to yield sufficient membranes for binding assay. Specific binding was calculated as fmol/g tissue and expressed as per cent compared to adult (12-16 weeks). Values represent mean \pm SD ($n=6-8$).

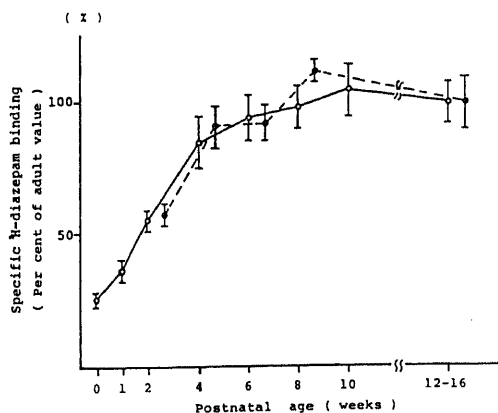


Fig. 3. Postnatal changes of ^3H -diazepam binding. Specific ^3H -diazepam bindings were measured in the forebrain of EI mouse (\circ - \circ) and ddY mouse (\bullet - \bullet). Specific binding was calculated in the same manner as Fig. 2. Values represent mean \pm SD ($n=6-8$).

2. けいれんによる受容体結合能の経時的変化

EIマウスに放り上げ刺激によるけいれんを起こさせGABA, BZP 両結合能の経時的変化を調べた。GABA受容体結合能は図4の様にけいれん前 101.8 ± 9.1 (fmol/mg protein), けいれん中 102.6 ± 19.5 に対しけいれん後15分, 30分では各々 70.6 ± 17.1 ($p < 0.01$), 65.0 ± 8.3 ($p < 0.001$) でけいれん前に比し有意に低下していた。けいれん後60分では 102.0 ± 21.6 とけいれん前の値に戻っていた。

BZP受容体結合能は図5の様にけいれん前 55.0 ± 1.6 (fmol/mg protein) に対しけいれん後15分, 30分では各々 62.6 ± 2.6 ($p < 0.001$), 61.5 ± 4.2 ($p < 0.01$) で有意な増加を示していた。60分後では $53.7 \pm$

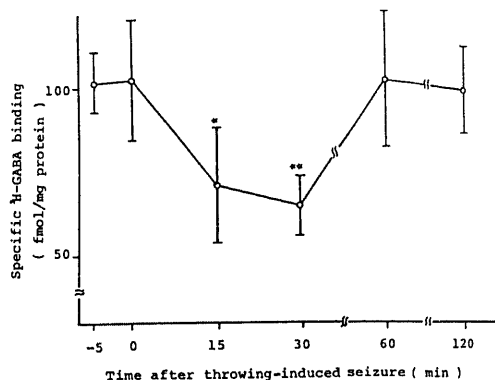


Fig. 4. Temporal changes in ^3H -GABA binding in EI mice subjected to throwing-induced seizure. Values represent mean \pm SD ($n=6$) of specific ^3H -GABA binding (fmol/mg protein) at a concentration of 5 nM. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ compared to the value before a seizure.

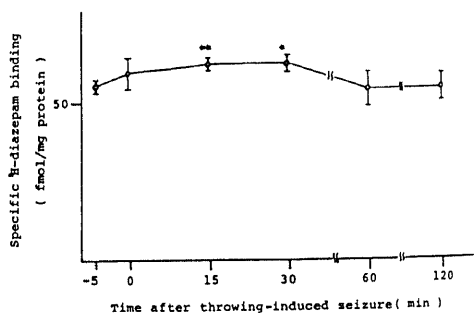


Fig. 5. Temporal changes in ^3H -diazepam binding in EI mice subjected to throwing-induced seizure. Values represent mean \pm SD ($n=6$) of specific ^3H -diazepam binding (fmol/mg protein) at a concentration of 0.5 nM. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ compared to the value before a seizure.

4.7とけいれん前の値に戻っていた。

3. 放り上げ刺激による受容体結合能の経時的变化
放り上げ刺激にもけいれんを起こさない6週令の時期に放り上げ刺激を行ない、GABA, BZP受容体の結合能の経時的变化を調べた。

GABA受容体結合能は図6の様に刺激前 103 ± 10.2 (fmol/mg protein) に対し刺激後30分で 71.2 ± 21.4 ($p < 0.01$)と有意な低下を示した。15分、60分後では差はなかった。

BZP受容体結合能は図7の様に刺激前 58.2 ± 6.3 (fmol/mg protein) に対し30分後 63.8 ± 8.1 と増加傾向がみられたが有意差は認めなかった。

4. EIマウス, ddYマウスおよび放り上げ刺激後のddYマウスの結合能の比較

GABA, BZP両受容体の結合能を蛋白量当りおよび組織重量当りで示したのが表1である。両結合能はいずれもEIマウスとddYマウス, ddYマウスと放り上げ刺激を行なったddYマウスの間には差は認められ

なかった。

5. 薬物による受容体結合能の変化

EIマウスにPB, PHT, VPA, AOAA, DZPおよび対照として生食を腹腔内に投与し、投与後60分のGABA, BZP両受容体の結合能を対照を100%で示したのが図8である。GABA, BZP両結合能は上記薬剤全てで有意な変化は認められなかった。

6. 受容体膜分画中のGABA濃度

表2の様にGABA受容体膜分画においては、EIマウス安静時 82.0 ± 12.7 (nmol/mg protein) に対しけいれん後20分では 140.8 ± 36.7 ($p < 0.05$)と有意に増加していた、バルブロン酸投与では差はみられなかった。

BZP受容体膜分画ではEIマウス安静時 38.2 ± 6.2 (nmol/mg protein) に対しけいれん後20分では 53.6 ± 4.4 ($p < 0.01$)と有意な増加をみたがバルブロン酸投与では差はなかった。

7. GABA, BZP両受容体の結合能に対する外因性GABAの影響

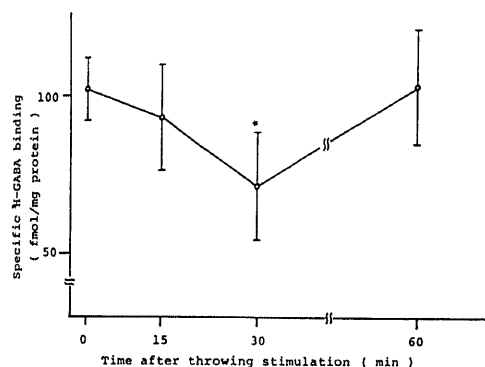


Fig. 6. Temporal changes in ^3H -GABA binding in 6-week-old EI mice subjected to throwing stimulation (40 times). Values represent mean \pm SD ($n=6$) of specific ^3H -GABA binding (fmol/mg protein) at 5 nM. * $p < 0.01$ compared to the value before the stimulation.



Fig. 7. Temporal changes in ^3H -diazepam binding in 6-week-old EI mice subjected to throwing stimulation. Values represent mean \pm SD ($n=6$) of specific ^3H -diazepam binding (fmol/mg protein) at 0.5 nM.

Table 1. Specific bindings of ^3H -GABA and ^3H -diazepam in EI mice, ddY mice and 40 times throwing-stimulated ddY mice.

Strain (n)	Specific binding			
	GABA binding		benzodiazepine binding	
	(fmol/mg protein)	(pmol/g tissue)	(fmol/mg protein)	(pmol/g tissue)
EI (4)	86.4 ± 13.0	1.32 ± 0.21	61.4 ± 3.6	2.15 ± 0.13
ddY (4)	94.6 ± 18.0	1.42 ± 0.26	62.2 ± 6.2	2.18 ± 0.22
ddY st. (4)	90.7 ± 16.2	1.37 ± 0.24	54.6 ± 6.8	1.92 ± 0.24

Values represent mean \pm SD ($n=4$).

EI マウスではけいれんにより GABA 結合能の減少, BZP 結合能の増加がみられ, またけいれん後の受容体膜分画中の GABA 濃度の増加が認められた。この成績よりけいれん後の両受容体の結合能の変化は内因性 GABA の増加に起因すると考えられた。そこで安静時の EI マウスより調整した両受容体の結合能測定系に最終濃度 $0.01 \mu\text{M}$ – $10.0 \mu\text{M}$ となる様に GABA 溶液を 0.1 ml 加え各々の緩衝液の量を 0.1 ml 減じ前記の方法で測定し GABA を加えない場合と比較した。表 3 の様に GABA 受容体結合能は GABA 濃度 $0.01 \mu\text{M}$ で 20%, $0.1 \mu\text{M}$ で 40%, $0.5 \mu\text{M}$ で 70%, $10 \mu\text{M}$ で 95% の減少をみた。

BZP 受容体結合能は GABA 濃度 $0.01 \mu\text{M}$ で 5%, $0.1 \mu\text{M}$ で 15%, $0.5 \mu\text{M}$ で 30%, $10 \mu\text{M}$ で 80% の増加を認めた。

考 察

γ -アミノ酪酸⁹⁾およびその合成律速酵素である L-グルタミン脱炭酸酵素活性¹⁰⁾は抑制系の神経細胞内に局

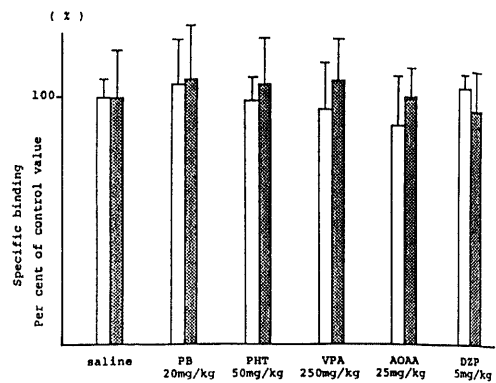


Fig. 8. Effects of acute administration of anti-epileptic drugs on specific ³H-GABA (▨) and ³H-diazepam (□) bindings in EI mice at concentrations of 5 nM and 0.5 nM, respectively. Values are expressed as mean ± SD (n=6) in per cent of the control value. Analysis by Student's t-test showed no significant difference between treated mice and control.

Table 2. GABA concentrations in GABA and BZP receptor membranes.

Treatment (n)	GABA concentration (nmol/mg protein)	
	GABA membrane	BZP membrane
control (4)	82.0 ± 12.7	38.2 ± 6.2
seizure (4)	140.8 ± 36.7 **	53.6 ± 4.4 *
VPA inj. (4)	87.0 ± 13.2	40.2 ± 1.1

GABA concentrations were measured at 20 min before (control) and after a seizure, and 60 min after intraperitoneal injection of VPA (250 mg/kg). Values represent mean ± SD (n=4). Significant differences compared to control are marked by asterisks (*P<0.01, **P<0.05).

Table 3. Effects of exogenous GABA on receptor bindings of GABA and BZP.

GABA conc.		specific bindings	
(μM)	(n)	³ H-GABA (%)	³ H-diazepam (%)
none	(4)	100 ± 9	100 ± 5
0.01	(4)	79 ± 10	104 ± 5
0.1	(4)	64 ± 11	116 ± 6
0.5	(4)	31 ± 8	132 ± 7
10.0	(4)	5 ± 3	182 ± 10

Graded dose of GABA (from 0.01 to $10.0 \mu\text{M}$) were added to GABA and BZP receptor binding assay systems. Values are expressed as mean ± SD (n=4) in per cent of control.

在し、この神経を刺激する事によりカルシウムイオン依存性にGABAが放出され¹¹⁾、放出されたGABAの不活性化機構としてNa⁺依存性の高親和性の取り込み機構の存在が示されている¹²⁾。またイオン電気泳動的にGABAを加える事によりシナプス後膜の過分極がおこり¹³⁾、さらにGABA拮抗薬であるピククリンによってこの過分極が阻害されること¹⁴⁾が知られている。これらの事からGABAは抑制系神経伝達物質であると考えられている。

近年Zukinら¹⁵⁾はラット脳シナプス膜にNa⁺非依存性の高親和性の³H-GABA結合部位を報告した。その後この脳シナプス膜をTriton X-100処理¹⁶⁾、又は凍結融解洗浄操作¹⁷⁾をくり返す事によりこの³H-GABA結合部位が高親和性(KD=20 nM)及び低親和性(KD=250 nM)の2種より成る事が示された。高親和性結合部位の脳内分布は、小脳、大脳皮質、中脳、海馬、線状体、延髄、視床下部の順に多い事が認められている¹⁸⁾。この分布はGABA濃度の脳内分布¹⁷⁾とは必ずしも一致していない。又オートラジオグラフィ¹⁹⁾によりGABA結合部位の分布が検討され従来のGADを用いた組織学的免疫法¹⁹⁾、生理学的方法によるGABAニューロンの分布とおよその一致をみるが、完全には一致していない。この様に不確実な点も存在するが現在このNa⁺非依存性の結合部位はGABAニューロンの受容体と考えられている。

脳シナプス膜の抽出方法によりGABAの解離定数及び最大結合部位数が変化する事が知られており、これは内因性のGABA受容体結合阻害物質によるものと思われる。この内因性の阻害物質としてリン脂質²⁰⁾、熱に安定な分子量15,000の酸性蛋白質(GABAモジュリン)²¹⁾、分子量500以下の物質(GABA受容体結合阻害因子)²²⁾、およびシナプス膜に存在するGABA自体²³⁾が知られている。

マイナートランキライザーであるベンゾジアゼピン系化合物に対する特異的結合部位の存在が近年報告されている²³⁾。

この結合部位は高親和性であり、種々のBZP系薬物により拮抗的に結合阻害を受け、その結合阻害作用と生体における薬理作用の強さの間に相関関係が認められている²⁴⁾。この脳内分布は大脳皮質、小脳、扁桃核、海馬、視床下部の順に多く認められている²⁵⁾。しかし現在のところこのBZP受容体結合部位に対する内因性リガンドに関してGABAモジュリン²⁴⁾、 β -カルボリン²⁶⁾等の可能性が示されているが未だ明らかではない。

BZP受容体結合能はGABA及びムチモールにより増強され、この増加はGABAアンタゴニストである

ピククリンによって拮抗されること²⁶⁾、Cl⁻イオンによりBZP結合部位の親和性が増加し、この効果はGABAによるBZP結合能の増強作用と相加的にあらわれる事²⁷⁾、またGABA結合部位とBZP結合部位が同時に可溶化されること²⁸⁾等よりGABA受容体、BZP受容体およびCl⁻イオノフォアが複合体を形成しており、さらに最近フェニトイン²⁹⁾、バルビツール³⁰⁾もこの受容体複合体に関係する事が知られてきている。

今回このGABA、BZP両受容体結合能とけいれん発作との関係について検討した。

GABA系ニューロンの年令による発達に関してCoyleら³¹⁾はラットにおいて大脳のGABA濃度は生下時にすでに成熟ラットの約50%であり、生後4週令で成熟レベルに達し、またGABAシナプスに特異的なGAD及びGABA受容体結合能は組織重量当りで示すと生下時約25%で4週令で成熟ラットのレベルに達する事を示している。EIマウスのGABA結合能の年令による発達は組織重量当りでは生後1日令で約30%、4週令で成熟レベルに達し8~10週令で成熟レベルより高い値を示した。しかしこれはEIマウスの母系であるddYマウスでも同様の発達経過をとりEIマウスに特異的とは考えられなかった。

BZP結合能の年令による発達に関してBraestrupら³²⁾はラットで生下時25%、4~6週令で成熟レベルに達する事を示している。EIマウスでも生後1日令約25%、4週令85%、6週令でほぼ成熟レベルに達しており過去の報告と同様の結果であった。またEIマウスとddYマウスを同年令(12~16週令)で比較しても蛋白濃度、組織重量当りでは全く差が認められず、GABA、BZP両受容体の結合能は共にEIマウスのけいれん発現期である6~10週令の間でも差は認められなかった。

Paulら³³⁾は電気刺激誘発けいれんにおけるBZPの総結合部位数の経時的増加を示し、BZP系薬物がけいれん重積状態に対し著効を呈するのはこの為ではないかと述べている。

Bowdlerら³⁴⁾はこれを追試しBZP結合能の増加を否定している。またMimakiら³⁵⁾はS/Dラットにおける電気刺激およびペンチレンテトラゾール誘発けいれんで共にBZP結合能の増加を示し、聴性誘発けいれんラットでは安静時にすでにBZP結合能は増加しておりけいれん後の変化は認められなかったと報告している。

GABA結合能に関してはHortonら³⁶⁾は聴性誘発けいれんマウスにおいて結合部位数の減少および解離定数の低下を示している。

EIマウスではBZP結合能はけいれん後15分、30

分で有意に増加し、60分以後ではけいれん前の値に戻っていた。またけいれん準備状態と考えられる6週令EIマウスに放り上げ刺激を加えるとBZP結合能は30分後に増加の傾向が認められた。

GABA結合能はけいれん後15分、30分で有意に減少し、60分でけいれん前の値に戻っていた。また6週令では刺激後30分で有意な低下をみた。対照であるddYマウスに放り上げ刺激を加えたところGABA、BZP両結合能には全く変化みとめられなかった。これらの事より両受容体の結合能の変化はEIマウスに特異的であり、けいれん準備状態ですでに認められ、けいれん発作によって増強されると考えられた。このBZP結合能の増加とGABA結合能の減少は時間的に一致しており、またEIマウスの放り上げ刺激誘発けいれんの不応期の時間的経過³⁷⁾とも良く一致している。この事より両受容体結合能の増減はけいれん不応期と何らかの関係があると考えられた。

GABA受容体結合を阻害する内因性物質としてリン脂質、GABAモジュリン、GABA受容体阻害因子およびGABAそのものものが知られている。またBZP受容体結合を増強する内因性物質としてはGABA³⁸⁾、Clイオン³⁹⁾等が報告されており、凍結融解、頻回洗浄をしたBZP受容体膜において濃度依存的にBZP結合を増強する事が知られている。

これらの事よりGABA、BZP両結合能に同時に影響する内因性物質としてGABAが最も考えられる。実際にEIマウスのけいれん後20分におけるGABAおよびBZP受容体膜分画に含まれるGABA濃度はけいれん前に比し有意に増加していた。Bowdlerら²⁴⁾はラット電気刺激誘発けいれん後に海馬、大脳皮質、視床下部等におけるGABA濃度の増加を示し、その時間的推移がけいれん後の閾値の上昇時期と相関する事を示している。またNuttら⁴⁰⁾はけいれん後の閾値の上昇に関しGABA系ニューロンの関与を示している。今回反応系にGABAを外因性に加えたところ、GABA濃度として0.1 μ M程度でGABA結合能を約50%阻害し、BZP結合能を15%増強していた。

以上の事よりけいれん後のGABA結合能の減少およびBZP結合能の増加は内因性GABA濃度の増加によると考えられ、この内因性GABA濃度の増加がけいれん不応期の原因ではないかと考えられた。

各種抗けいれん剤投与によるBZP結合能の変化は種々報告されている。Mimakiら³⁵⁾はS/Dラットにおいてバルプロン酸投与により用量依存性のBZP結合能の増加を認めている。またGallagerら⁴¹⁾はGABAアゴニストであるムシモール、 $-$ (p-chlorophenyl)GABAやAOAA投与によりBZP結合能が増加する

事を報告している。

今回EIマウスに対しフェノバルビタール、フェニトイン、バルプロン酸、AOAA、ジアゼパムを投与したがGABA、BZP両結合能には共に変化は認められなかった。膜標品の上清に含まれるPB、PHT、VPAの濃度を酵素免疫法⁴²⁾で測定したがいずれも感度以下であり、これら抗けいれん剤は膜分画抽出過程でほとんど除去されており、これら薬剤の結合能に及ぼす影響はほとんどないと考えられた。またVPAは脳内GABA濃度を増加させる事が知られている⁴³⁾。しかし今回VPA(250 mg/kg)腹腔内投与後60分では両受容体膜分画に含まれるGABA濃度は対照と差がみられなかった。おそらく膜分画の抽出過程で増加したGABAの大部分が除去され、このため両結合能の変化が認められなかったと考えられる。このことよりけいれん後のGABA濃度の増加は受容体との結合を含む細胞膜と固く結合した型でおこるのに対し、VPA投与後のGABA濃度の増加は遊離した型を主とし、膜と結合しているとしても抽出過程で遊離し除去されると思われた。

臨床的にけいれん発作は機能的、または器質的障害によっておこり、また抗けいれん剤の効果も発作型またはてんかんの型により様々であり、多因子性の病態であると考えられる。今回使用したEIマウスのけいれん発作は遺伝性に規定されかなり画一的な経過をとるものであるが、それでも多くの脳内物質の異常が報告されている。例えばアセチルコリン系⁴⁴⁾、カテコールアミン系⁴⁵⁾、セロトニン系⁴⁶⁾、アミノ酸系⁴⁷⁾等の異常が知られている。また自然発生したてんかん性ヒトにおいてBZP結合能の温度に対する不安定性が報告されており⁴⁸⁾、今後GABA系ニューロンの脳内各部位における受容体の性状およびその変化、ならびに各種神経伝達物質との相互関係についての検討が必要と思われた。

結 論

EIマウス脳内GABA及びBZP結合部位とけいれんとの関係について検討し次の結論を得た。

1. EIマウスの年齢によるGABA、BZP両結合能の発達変化は対照であるddYマウスと同様であり、そのけいれん発現時期においても差はなかった。

2. EIマウスではけいれん後15分、30分でBZP、GABA結合能は各々増減し60分後に共に回復をみた。この変化はけいれん準備段階ですでにみられ、けいれんによって増強されると思われた。またこの変化は内因性GABA濃度の増加に起因し、けいれん不応期との関係が示唆された。

3. 各種抗けいれん剤 (PB, PHT, VPA, AOAA, DZP) による両結合能に対する影響は認められなかった。

4. バルブロン酸投与による GABA 濃度の増加は遊離型を主とし、一方けいれんによる GABA 濃度の増加は膜と結合した型でおこっている可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました恩師谷口昂教授に心から感謝の意を表します。また御協力下さいました小児科神経グループの諸先生に感謝いたします。

なお本論文の一部は第9回北陸てんかん懇話会(1985年)にて発表した。

文 献

- 1) Zukin, S. R., Young, A. B. & Snyder, A. S.: Gamma-aminobutyric acid binding site in the rat central nervous system. *Proc. Natl. Sci. USA.*, **71**, 4802-4807 (1974).
- 2) Möhler, H. & Okada, T.: Properties of ³H-diazepam binding to benzodiazepine receptors in rat cerebral cortex. *Lif. Sci.*, **20**, 2101-2110 (1977).
- 3) Squires, R. F. & Braestrup, C.: Benzodiazepine receptors in rat brain. *Nature*, **266**, 732-734 (1977).
- 4) Bakay, R. A. E. & Harris, A. B.: Neurotransmitter, receptor and biochemical changes in monkey cortical epileptic foci. *Brain Res.*, **206**, 387-404 (1981).
- 5) Möhler, H. & Okada, T.: Biochemical identification of the site of action of benzodiazepines in human brain by ³H-diazepam binding. *Lif. Sci.*, **22**, 985-996 (1978).
- 6) Greenlee, D. V., VanNess, P. C. & Olsen, R. W.: Endogenous inhibitor of GABA binding in mammalian brain. *Lif. Sci.*, **22**, 1653-1662 (1978).
- 7) Graham, L. T. Jr. & Aprison, M. H.: Fluorometric determination of aspartate, glutamate and γ -aminobutyrate in nerve tissue using enzymic methods. *Anal. Biochem.*, **15**, 487-497 (1966).
- 8) Lowry, O. H., Rosebough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. L.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 9) Hökfelt, T. & Ljungdahl, A.: Autoradiographic identification of cerebellar cortical neurons accumulating labelled gamma-aminobutyric acid. *Exp. Brain Res.*, **14**, 354-362 (1972).
- 10) Ribak, C. E.: The immunocytochemical localization of GAD within stellate neurons of rat visual cortex. *Anat. Rec.*, **187**, 692-693 (1977).
- 11) Iversen, L. L., Mitchell, J. F., Neal, M. J. & Vasanta, S.: The effect of stimulation of inhibitory pathways on the release of endogenous γ -aminobutyric acid from the cat cerebral cortex. *Br. Phar. Soci.*, 5 th-6 th, 452-453 (1970).
- 12) Iversen, L. L. & Kelly, J. S.: Uptake and metabolism of γ -aminobutyric acid by neurons and glial cells. *Biochem. Pharmacol.*, **24**, 933-938 (1975).
- 13) Krnjevic, K.: Ionophoretic studies on cortical neurons. *Int. Rev. Neurobiol.*, **7**, 41-98 (1964).
- 14) Curtis, D. R., Duggan, A. W., Felix, D., Johnston, G. A. & McLennan, H.: Antagonism between bicuculline and GABA in the cat brain. *Brain Res.*, **33**, 57-73 (1971).
- 15) Enna, S. J. & Snyder, S. H.: Influences of ions, enzymes, and detergents on γ -aminobutyric acid receptor binding in synaptic membrane of rat brain. *Molecu. Pharmacol.*, **13**, 442-453 (1977).
- 16) Enna, S. J. & Snyder, S. H.: Properties of γ -aminobutyric acid (GABA) receptor binding in rat brain synaptic membrane fractions. *Brain Res.*, **100**, 81-97 (1975).
- 17) Okada, Y., Nitsch-Hassler, C., Kim, J. S., Bak, I. J. & Hassler, R.: Role of γ -aminobutyric acid (GABA) in the extrapyramidal motor system. 1. Regional distribution of GABA in rabbit, rat, guinea pig and baboon CNS. *Exp. Brain Res.*, **13**, 514-518 (1971).
- 18) Palacios, J. M., Young, W. S. & Kuhar, M. J.: Autoradiographic localization of γ -aminobutyric acid (GABA) receptors in the cat cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **77**, 670-674 (1980).
- 19) Roberts, E.: Immunocytochemical studies of GABA neurons, p28-45. *In* Krogsgaard-Larsen, P., Scheel-Kruger, J. & Kofod, H. (ed.), *GABA-Neurotransmitters*. Academic Press, New York, 1979.
- 20) Johnston, G. A. R. & Kennedy, S. M. E.: GABA receptors and phospholipids, p507-516. *In* F. Fonnum (ed.), *Amino acids as chemical transmitters*. Plenum Press, New York, 1978.
- 21) Toffano, G., Guidotti, A. & Costa, E.: Purification of an endogenous protein inhibitor of

- the high affinity binding of γ -aminobutyric acid to synaptic membranes of rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **75**, 4024-4028 (1978).
- 22) **Yoneda, Y. & Kuriyama, K.**: Presence of a low molecular weight endogenous inhibitor on ^3H -muscimol binding in synaptic membranes. *Nature*, **285**, 670-673 (1980).
- 23) **Napia, C., Bergman, M. O., Van Ness, P. C., Greenlee, D. V. & Olsen, R. W.**: GABA binding in mammalian brain: inhibition by endogenous GABA. *Life Sci.*, **27**, 1001-1011 (1980).
- 24) **Guidotti, A., Toffano, G. & Costa, E.**: An endogenous protein modulates the affinity of GABA and benzodiazepine receptors in rat brain. *Nature*, **275**, 553-555 (1978).
- 25) **Braestrup, C., Nielsen, M. & Olsen, E.**: Urinary and brain β -carboline-3-carboxylates as potent inhibitors of brain benzodiazepine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **77**, 2288-2292 (1980).
- 26) **Tallman, J. F., Thomas, J. W. & Gallager, D. W.**: GABAergic modulation of benzodiazepine binding site sensitivity. *Nature*, **274**, 383-385 (1978).
- 27) **Costa, T. & Rodbard, D.**: Is the benzodiazepine receptor coupled to a chloride anion channel? *Nature*, **277**, 315-317 (1979).
- 28) **Ito, Y., Kuriyama, K., Ueno, E., Nishimura, C. & Yoneda, Y.**: Solubilization and partial purification of cerebral GABA receptors, p316-327. *In* Okada, Y. & Roberts, E. (ed.), *Problem in GABA research from brain to bacteria*. Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford-Princeton, 1982.
- 29) **Gallager, D. W., Mallorga, P. & Tallman, J. E.**: Interaction of diphenylhydantoin and benzodiazepines in the CNS. *Brain Res.*, **189**, 209-220 (1980).
- 30) **Lundberg, F. L., Snowman, A. & Olsen, R. W.**: Barbiturate receptor sites are coupled to benzodiazepine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **77**, 7468-7479 (1980).
- 31) **Coyle, J. T. & Enna, S. J.**: Neurochemical aspects of the ontogenesis of GABAergic neurons in the rat brain. *Brain Res.*, **111**, 119-133 (1976).
- 32) **Braestrup, C. & Nielsen, M.**: Ontogenetic development of benzodiazepine receptors in the rat brain. *Brain Res.*, **1471**, 170-173 (1978).
- 33) **Paul, S. M. & Skolnick, P.**: Rapid changes in brain benzodiazepine receptors after experimental seizure. *Science*, **202**, 892-894 (1978).
- 34) **Bowdler, J. M. & Green, A. R.**: Regional rat brain benzodiazepine receptor number and γ -aminobutyric acid concentration following a convulsion. *Br. J. Pharmacol.*, **76**, 291-298 (1982).
- 35) **Mimaki, T. & Yamamura, H. I.**: Modulation of benzodiazepine receptor binding by antiepileptic drugs and seizures. *Med. J. Osaka Univ.*, **32**, 15-24 (1981).
- 36) **Horton, R. W., Prestwich, S. A. & Meldrum, B. S.**: γ -aminobutyric acid and benzodiazepine binding sites in audiogenic seizure-susceptible mice. *J. Neurochem.*, **39**, 864-870 (1982).
- 37) 鈴木二郎: 遺伝性てんかんモデル, *神経進歩*, **23**, 904-915 (1979).
- 38) **Karobath, M. & Sperk, G.**: Stimulation of benzodiazepine receptor binding by γ -aminobutyric acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **76**, 1004-1006 (1979).
- 39) **Martin, I. L. & Candy, J. M.**: Facilitation of benzodiazepine binding by sodium chloride and GABA. *Neuropharmacology*, **17**, 993-998 (1978).
- 40) **Nutt, D., Cowen, P. J. & Green, A. R.**: Studies on the post-ictal rise in seizure threshold. *Eur. J. Pharmacol.*, **71**, 287-295 (1981).
- 41) **Gallager, D. W., Tomas, J. W. & Tallman, J. E.**: Effect of GABAergic drugs on benzodiazepine binding site sensitivity in rat cerebral cortex. *Biochem. Pharmacol.*, **27**, 2745-2749 (1978).
- 42) **Bastiani, R. J., Phillips, R. C., Schneider, R. S. & Ullman, E. F.**: Homogeneous immunochemical drug assays. *Am. J. Med. Tech.*, **39**, 211-216 (1973).
- 43) **Loscher, W. & Vetter, M.**: Relationship between drug-induced increases of GABA levels in discrete brain areas and different pharmacological effects in rats. *Biochem. Pharmacol.*, **33**, 1907-1914 (1984).
- 44) 黒川正則: Ep系マウスにおける脳アセチルコリンの研究. *神経進歩*, **7**, 75-83 (1963).
- 45) **Hiramatsu, M.**: Brain monoamine levels and El mouse convulsions. *Folia Psych. Neurol. Jpn.*, **35**, 261-266 (1981).
- 46) 平松 緑・森 昭: El-mouseの脳内serotonin代謝について. *生化学*, **491376** (1977).
- 47) **Naruse, H., Kato, M., Kurokawa, M., Haba, R. & Yabe, T.**: Metabolic defects in a convulsive

strain of mouse. *J. Neurochem.*, 5, 359-369 (1960).
48) Squires, R., Naquet, R., Riche, D. & Braestrup, C.: Increased thermolability of benzo-

diazepine receptors in cerebral cortex of a baboon with spontaneous seizure: A case report. *Epilepsia*, 20, 215-221 (1979).

Patho-physiological Changes in γ -aminobutyric Acid and Benzodiazepine Receptor in the Brain of El Mouse Hideki Irimichi, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 - J.Juzen Med.Soc., 94, 653-663 (1985)

Key words: γ -aminobutyric acid receptor binding, benzodiazepine receptor binding, seizure, El mouse

Abstracts

The effects of age, seizure and anticonvulsant administration on γ -aminobutyric acid (GABA) and benzodiazepine (BZP) bindings of the respective receptors were examined in the synaptosomal membrane prepared from the brain of the convulsive El strain and that of the age matched control of ddY strain. The membrane fraction containing GABA and BZP receptors was prepared by repeated freezing-thawing and washing. Bindings of GABA and BZP receptors were assayed using ^3H -GABA and ^3H -diazepam as radiolabelled ligand, respectively. These receptor bindings were low in the neonatal brain and increased with age until 6 weeks of age. There was no significant difference in the ontogenic development of these two receptors between El and ddY mice. In El mice, however, the seizure induced by throwing decreased the receptor binding of GABA and increased that of BZP 15 to 30 min after the onset of seizure; they returned to the basal level by 60 min. This convulsion-induced changes in these receptor bindings were observed also in El mice at the age of 6 weeks, when they did not yet respond to throwing stimulation with overt convulsion. In contrast, no significant changes of receptor bindings to GABA and BZP were noted in ddY mice subjected to throwing. The alteration in binding of these receptors in El mice was suspected to exist before the seizure-susceptible age of 8 weeks, and was potentiated by seizure. Changes of receptor bindings to GABA and BZP following seizure were associated with a post-ictal rise in seizure threshold and, at the same time, endogenous membrane-bound GABA content was increased. Acute administration of phenobarbital (20 mg/kg), phenytoin (50mg/kg), valproic acid (250mg/kg), amino-oxyacetic acid (25 mg/kg) or diazepam (5 mg/kg) produced no significant change in binding of these two receptors. Membrane-bound GABA content was also unchanged by the administration of valproic acid. These results indicate (1) that there is no significant difference either in the developmental process or in an unstimulated state of these two receptor bindings between El and ddY mice, (2) that throwing-induced seizure induces a decrease in the receptor binding of GABA and an increase in that of BZP, and these changes exist before reaching the seizure-susceptible age, and (3) that membrane-bound GABA content is increased in accordance with the changes in binding of these receptors, suggesting an important role of endogenous GABA in the post-ictal rise in seizure threshold.