

Effect of Valproic Acid, Acetazolamide and Ethosuximide on Seizure Threshold and Subcellular Concentration of γ -Aminobutyric Acid, Aspartic Acid and Glutamic Acid in El 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/2297/7767

抗けいれん剤と脳細胞分画の神経伝達物質の変化

金沢大学医学部小児科学教室 (主任: 谷口 昂教授)

岡 本 正 樹

(昭和60年1月17日受付)

放り上げ刺激にてけいれん発作をおこす EI マウスを用いて、バルプロ酸 (valproic acid, VPA), アセタゾラミド (acetazolamide, AZA), エトサクシミド (ethosuximide, ESM) などの抗けいれん作用と、脳の各細胞分画の γ -アミノ酪酸 (γ -aminobutyric acid, GABA), アスパラギン酸 (aspartic acid, Asp), グルタミン酸 (glutamic acid, Glu) 濃度との関係を検討した。けいれんを獲得した成熟 EI マウスの腹腔内に、VPA 250 mg/kg, AZA 400 mg/kg, ESM 400 mg/kg をそれぞれ注射し、15分、30分、1時間、2時間、3時間、6時間後の各時間毎に放り上げ刺激を行い、けいれんの有無を確認した後、直ちに断頭し液体窒素中にて脳を凍結させた。細胞分画の調製は氷冷中 ($0-2^{\circ}\text{C}$) にて以下のごとく行った。小脳を除く全脳を 0.32 M の sucrose のもとでホモゲネートし、 $1,000\times g$ 10分間遠心する。その上清を $20,000\times g$ 20分間遠心して、その上清を supernatant fraction (S分画)、その沈渣を crude synaptosomal fraction (P分画) とした。各分画における GABA, Asp, Glu 濃度は酵素的微量測定法にて測定した。P分画でのシナプトゾームの存在は電子顕微鏡で確認した。その結果 VPA では、注射後 15分~60分の間でけいれん抑制がみられ、脳細胞分画の P分画の GABA の増加 ($p<0.05$) を、30分、60分に認めた。AZA では、注射後 1時間~2時間の間でけいれん抑制がみられた。それに伴い脳細胞分画では、P分画の Glu 濃度の減少 ($p<0.05$) を認めた。また ESM では、注射後 30分~60分でけいれん抑制がみられた。しかし脳細胞分画の神経伝達物質の変化と抗けいれん効果との間には特別な関係はみられなかった。以上より神経終末部での神経伝達物質の変化をより密接に反映していると思われる P分画の変化から、VPA の抗けいれん作用には、GABA 濃度の増加、AZA では Glu 濃度の減少が関与していることが示唆された。

Key words anticonvulsant, neurotransmitter, EI mouse.

現在 20 種類以上の薬剤が、抗けいれん剤として臨床に使用されている。これらの薬剤は分子構造を基本にして、8つのグループに分類される¹⁾。このうち神経伝達物質としての脳内アミノ酸に影響を与えらると思われる直鎖脂肪酸、スルホンアミド、琥珀酸アミドの3つのグループから、それぞれバルプロ酸 (valproic acid, VPA), アセタゾラミド (acetazolamide, AZA), エトサクシミド (ethosuximide, ESM) を選んだ。そしてけいれん系の EI マウスを用いて、この3種の抗けいれん剤の抗けいれん作用と脳内神経伝達物質の変動について検討した。その方法としては、脳細胞を超遠心分画法を用い、神経伝達物質が高濃度に含まれて

いると言われている神経終末部(シナプトゾーム分画、P分画)とその上清(S分画)に分け、抗けいれん剤投与後の各分画での γ -アミノ酪酸 (γ -aminobutyric acid, GABA), アスパラギン酸 (aspartic acid, Asp), グルタミン酸 (glutamic acid, Glu) 濃度を測定した。

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、命名されたけいれん系の EI マウスを使用した。この EI マウスは生後 8 週頃より、平衡感覚を失わせる様な放り上げ刺激 (約 15~20 cm の高さに放り上げ

Abbreviations: Asp, aspartic acid; AZA, acetazolamide; ESM, ethosuximide; GABA, γ -aminobutyric acid; GABA-T, aminobutyrate aminotransferase; GAD, glutamate decarboxylase; Glu, glutamic acid; SSA-DH, succinate semialdehyde dehydrogenase; VPA, valproic acid.

る)により,容易に全身性の強直性間代性けいれんをおこすことで知られている.今回実験に使用したEIマウスは,1981年5月に国立予防衛生研究所から譲りうけたもので,F90-95のものを使用した.EIマウスは,生後4~5週令日より週1回の放り上げ刺激を行い,けいれんを獲得した12~14週令(体重,30-40g)の成熟マウスのみを使用した.また対照としては,ddY系マウスを使用した.

II. 使用薬剤と投与量

VPA(鐘紡株式会社),AZA(日本レダリー株式会社),ESM(三共製薬)を,それぞれEIマウスの腹腔内に注射するために,生理食塩水を用いて2.5%のVPA,4%のAZA,4%のESMの各溶液をつくり,0.3~0.4ml腹腔内に注射した.

III. 実験方法

VPA群(n=3-4)とAZA群(n=3-4)については注射前,注射後15分,30分,1時間,2時間,6時間,一方ESM群(n=3-4)は注射前,注射後30分,1時間,2時間,3時間,6時間の各々の時間に,50回の放り上げ刺激を行った.けいれん発作の有無を確かめてから,直ちに断頭し液体窒素中にて脳を凍結した.また断頭時に薬物の血中濃度測定のためにヘパリン採血をした.脳は凍結中に速やかに取り出し小脳を除いた.取り出した脳の細胞分画の調製とアミノ酸濃度測定のための抽出は,図1のごとく行い,操作はすべて

氷冷中(0-2°C)にて行った.

GABA, Asp, Glu濃度の測定は,加藤²⁾とGrahamら³⁾の酵素的微量測定法を一部改変して行った.EIマウスの血清中のVPA,ESM濃度は酵素免疫法のEMIT法で測定した⁴⁾.AZA濃度は,高速液体クロマトグラフィ-法⁵⁾にて測定した.尚蛋白質量の測定は,Lowry法⁶⁾にて行った.

IV. 電顕用試料作製法⁷⁾⁸⁾

遠心後の沈渣(P分画)を遠心管に入れたままの状態に,5%のグルタルアルデヒド緩衝液を約3ml加え,0°Cの状態に18時間固定した.カコジル酸ナトリウム緩衝液で遠心管内の沈渣を洗滌後,その沈渣を取り出し,室温で2.5%のオスミウム酸溶液で5時間固定した.その固定した沈渣を0.5mmの大きさに細切り,アルコールで脱水後,酸化プロピレンで洗滌した.その小片を50%のエボンプロピレンオキシド混合液で4時間,75%のエボンプロピレンオキシド混合液で0°Cで一晩,室温で3時間の包埋操作法によって固定した.固定切片は,酢酸ウラニルとクエン酸鉛で染色した.

成 績

I. EIマウスとddYマウスの脳の細胞分画における各アミノ酸濃度の比較

P分画では,GABAの濃度はddYマウスで9.9±

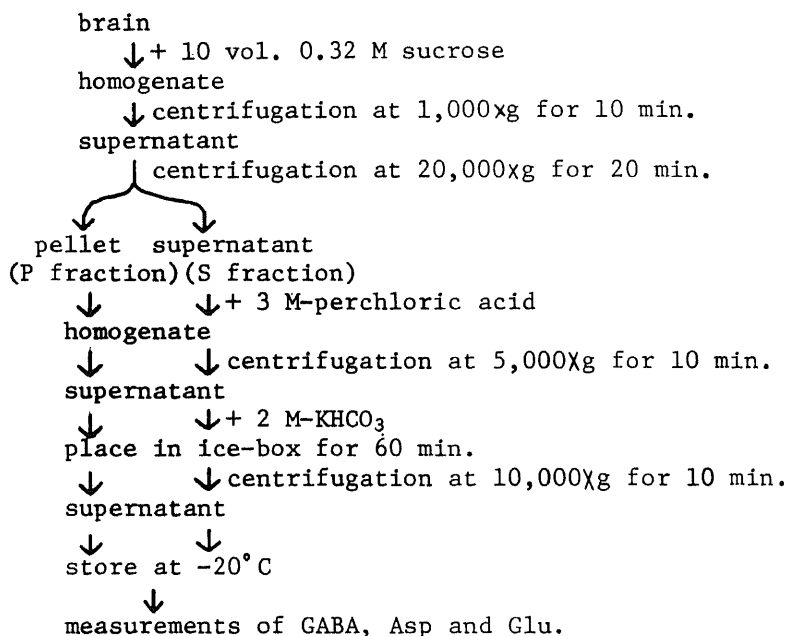


Fig. 1. Flow chart of preparation of subcellular fraction and method of extraction.

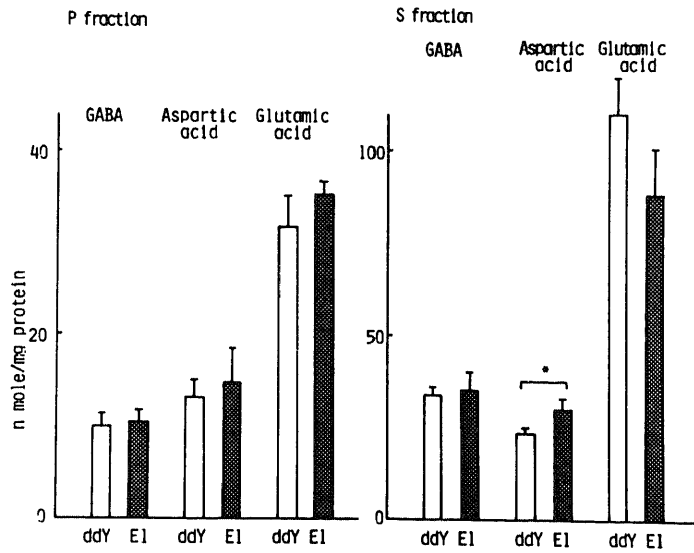


Fig. 2. GABA, aspartic acid and glutamic acid levels in the crude synaptosomal fraction (P fraction) and the supernatant fraction (S fraction) of ddY and El mouse. The bar represents the mean \pm SD of 3-4 mice. \square , ddY; \blacksquare , El; * $p < 0.05$.

Table 1. Serial changes in serum concentration of VPA, AZA and ESM

Serum level ($\mu\text{g/ml}$)	Time after injection (min)					
	15	30	60	120	180	360
VPA ($\mu\text{g/ml}$)	608 \pm 20	518 \pm 43	411 \pm 30	250 \pm 23	—	N.D.
AZA ($\mu\text{g/ml}$)	459 \pm 65	302 \pm 24	239 \pm 21	35 \pm 11	—	4.7 \pm 2.2
ESM ($\mu\text{g/ml}$)	—	630 \pm 22	422 \pm 31	232 \pm 28	125 \pm 33	8.7 \pm 3.1

Values represent the mean \pm SD of 3-4 mice.
N.D., not detected; /, not determined.

1.3, El マウスで 10.4 ± 1.3 (n mole/mg protein), Asp の濃度は ddY で 13.3 ± 1.5 , El で 14.8 ± 3.6 (n mole/mg protein), Glu の濃度は ddY で 31.8 ± 3.4 , El で 35.4 ± 1.4 (n mole/mg protein) であった (図 2)。ともに有意差はなかった。

S 分画では, GABA の濃度は ddY マウスで 34.0 ± 2.0 , El マウスで 35.0 ± 5.0 (n mole/mg protein), Asp の濃度は ddY で 23.8 ± 0.5 , El で 31.2 ± 2.6 (n mole/mg protein), Glu の濃度は ddY で 111.6 ± 10.2 , El で 88.8 ± 13.5 (n mole/mg protein) であった。Asp 濃度でのみ El マウスの方が ddY に比べ高値であった ($p < 0.05$)。また各アミノ酸の濃度は, 蛋白あたり P 分画の方が S 分画に比べ低値であった。

II. VPA 投与群の脳内アミノ酸濃度の経時的変動

VPA 投与では, 注射後 15 分から 1 時間にけいれん抑制がみられた。その時の VPA の血中濃度は, 15 分後で $608 \pm 20 \mu\text{g/ml}$ と最高値に達し, 6 時間後では測定されなかった (表 1)。またけいれん抑制がみられなかった 2 時間後でも, 血中濃度は $250 \pm 23 \mu\text{g/ml}$ とかなり高値を示した。半減期は 75 分であった。脳の細胞分画での各アミノ酸濃度は, GABA では, P 分画で 15 分, 30 分, 60 分後と増加を示し, 30 分, 60 分後で有意な増加を示した (図 3)。S 分画では, 2 時間, 6 時間後に有意な減少をみた。Asp では P 分画で 15 分, 30 分後にやや減少を示したが, 有意差はなかった (図 4)。Glu では S 分画で 1 時間後に有意な増加を示した他は

特に変化はみられなかった (図5)。

III. AZA 投与群の脳内アミノ酸濃度の経時的変動

けいれんの抑制は主に注射後1時間~2時間にみられた。血中濃度は15分後で $459 \pm 65 \mu\text{g/ml}$ と最高に達し、6時間後では0に近かった。半減期は40分であった。脳の細胞分画での各アミノ酸濃度については、GABAでは、P分画で1時間後に増加をみたが有意差はなかった(図6)。AspではP分画で1時間、2時間、6時間後に減少を示したが有意差はみられなかった(図7)。GluではP分画で30分、1時間、2時間後に減少をみとめ、1時間、2時間後の減少は有意であつ

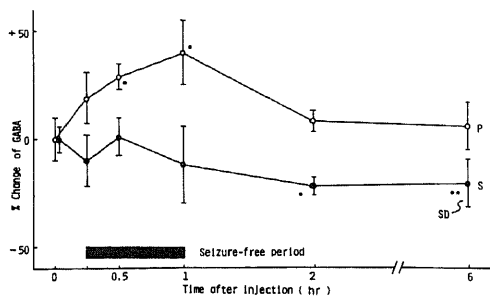


Fig. 3. Changes from control values of GABA levels in the crude synaptosomal fraction (P) and the supernatant fraction (S) of E1 mouse brain after intraperitoneal injection of VPA (250 mg/kg). Each point represents the mean \pm SD of 3-4 mice.

○, crude synaptosomal fraction; ●, supernatant fraction.

* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$.

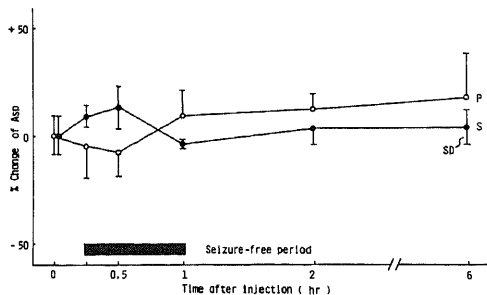


Fig. 4. Changes from control values of aspartic acid levels in the crude synaptosomal fraction (P) and the supernatant fraction (S) of E1 mouse brain after intraperitoneal injection of VPA (250 mg/kg). Each point represents the mean \pm SD of 3-4 mice.

○, crude synaptosomal fraction; ●, supernatant fraction.

た。S分画では、2時間後にのみ有意な減少をみとめた(図8)。

IV. ESM 投与群の脳内アミノ酸濃度の経時的変動

ESM投与では、けいれんの抑制は注射後30分~60分の間でみられた。血中濃度は30分で $630 \pm 22 \mu\text{g/ml}$ と最高に達し、6時間後ではほぼ0に近かった。半減期は60分であった。脳の細胞分画での各アミノ酸濃度の変化は、GABAではP分画、S分画ともに変化はみられなかった(図9)。Aspでは、P分画で1時間後に

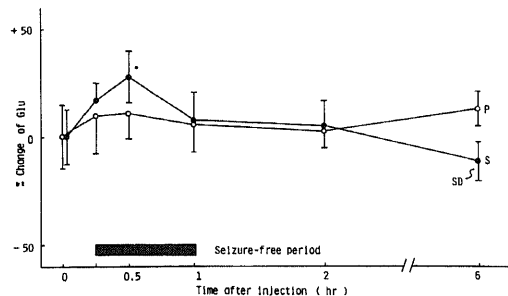


Fig. 5. Changes from control values of glutamic acid levels in the crude synaptosomal fraction (P) and the supernatant fraction (S) of E1 mouse brain after intraperitoneal injection of VPA (250 mg/kg). Each point represents the mean \pm SD of 3-4 mice.

○, crude synaptosomal fraction; ●, supernatant fraction.

* $p < 0.02$.

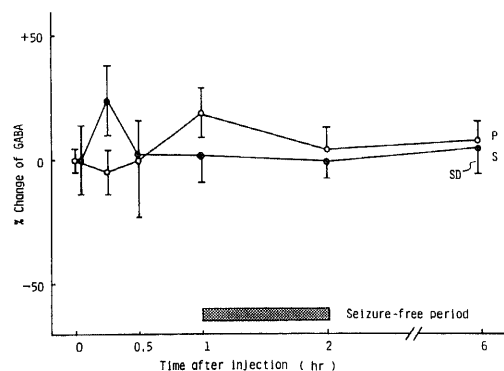


Fig. 6. Changes from control values of GABA levels in the crude synaptosomal fraction (P) and the supernatant fraction (S) of E1 mouse brain after intraperitoneal injection of AZA (400 mg/kg). Each point represents the mean \pm SD of 3-4 mice.

○, crude synaptosomal fraction; ●, supernatant fraction.

のみ有意な減少をみとめた(図10). Glu では, P分画で3時間, 6時間後に減少をみたが有意差はなかった(図11).

V. P分画の電顕所見

図12にP分画の電顕像を示す. この分画は主としてシナプトゾームとミトコンドリアに富み, 時として1つのシナプトゾーム中に, シナプス小胞とミトコンド

リアと一緒に含まれるのが観察される. 一方, シナプス前膜とシナプス後膜との間に存在する肥厚部については, はっきりとしたものは観察されない.

考 察

今回の研究の目的は, けいれん系のEIマウスを用いて, 臨床で使用されている各種抗けいれん剤の脳内神経伝達物質に及ぼす影響について, 検討することであ

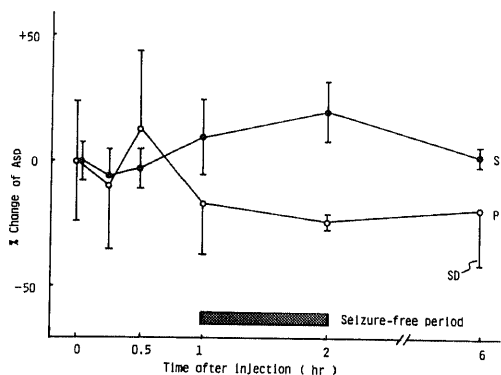


Fig. 7. Changes from control values of aspartic acid levels in the crude synaptosomal fraction (P) and the supernatant fraction (S) of EI mouse brain after intraperitoneal injection of AZA (400 mg/kg). Each point represents the mean \pm SD of 3-4 mice. \circ , crude synaptosomal fraction; \bullet , supernatant fraction.

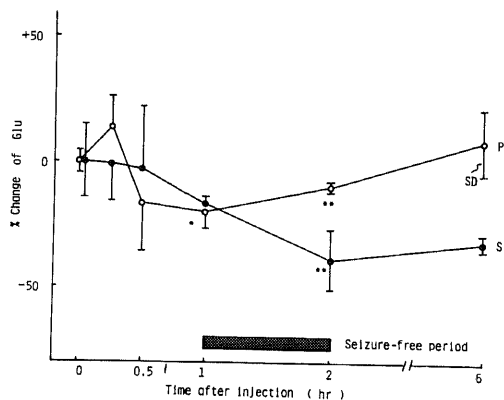


Fig. 8. Changes from control values of glutamic acid levels in the crude synaptosomal fraction (P) and the supernatant fraction (S) of EI mouse brain after intraperitoneal injection of AZA (400 mg/kg). Each point represents the mean \pm SD of 3-4 mice. \circ , crude synaptosomal fraction; \bullet , supernatant fraction. * $p < 0.02$, ** $p < 0.05$.

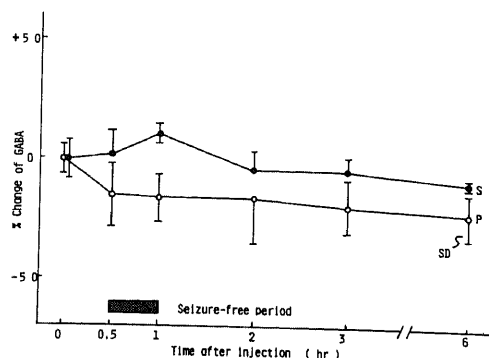


Fig. 9. Changes from control values of GABA levels in the crude synaptosomal fraction (P) and the supernatant fraction (S) of EI mouse brain after intraperitoneal injection of ESM (400 mg/kg). Each point represents the mean \pm SD of 3-4 mice. \circ , crude synaptosomal fraction; \bullet , supernatant fraction.

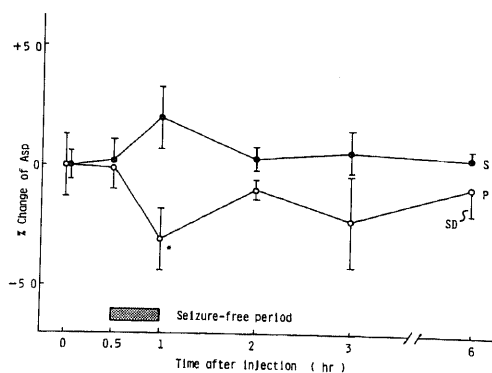


Fig. 10. Changes from control values of aspartic acid levels in the crude synaptosomal fraction (P) and the supernatant fraction (S) of EI mouse brain after intraperitoneal injection of ESM (400 mg/kg). Each point represents the mean \pm SD of 3-4 mice. \circ , crude synaptosomal fraction; \bullet , supernatant fraction. * $p < 0.05$.

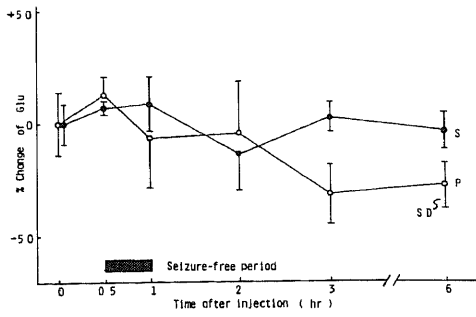


Fig. 11. Changes from control values of glutamic acid levels in the crude synaptosomal fraction (P) and the supernatant fraction (S) of E1 mouse brain after intraperitoneal injection of ESM (400 mg/kg). Each point represents the mean \pm SD of 3-4 mice.
 ○, crude synaptosomal fraction ; ●, supernatant fraction.

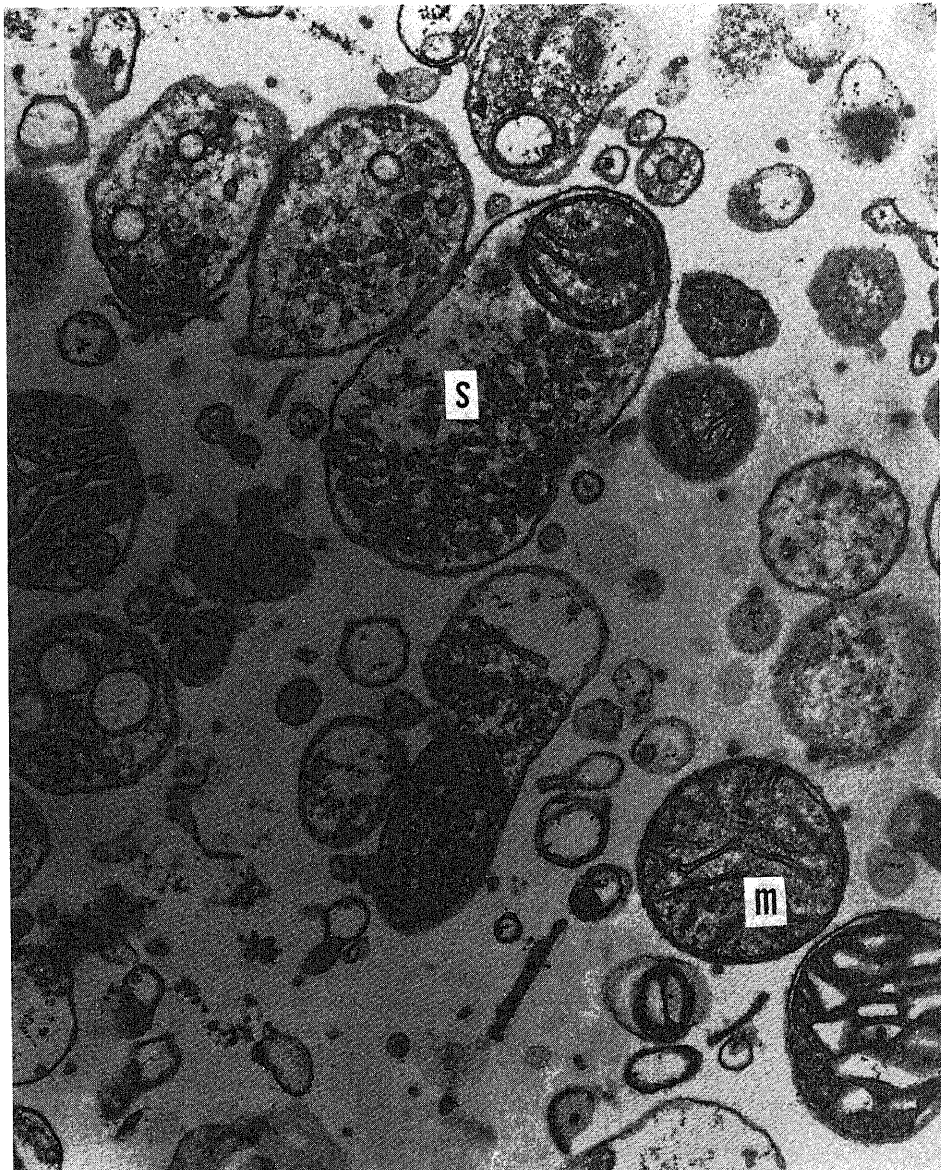


Fig. 12. Electron micrograph of the crude synaptosomal fraction (P fraction). m, mitochondria ; s, synaptosomes ; $\times 20,000$.

る。

神経伝達物質と言われているアミノ酸の GABA, Asp, Glu はけいれんに対して重要な生化学的因子の 1 つである。Asp, Glu は興奮性の伝達物質であると考えられており、静脈内注入や脳室内注入によって、seizure focus の spike activity の増加をきたす⁹⁾。また GABA は中枢神経における抑制系の伝達物質であり、静脈内注入や脳室内注入によって、spike activity の減少をもたらすと言われている¹⁰⁾。動物の脳内の GABA 量を減少させる多くの薬剤はけいれんを誘発する¹¹⁾。反対に脳内の GABA 量を増加させる多くの薬剤は抗けいれん作用を有する¹²⁾。さらに神経終末部での GABA の含有量は、脳全体の GABA 含有量より脳の興奮の状態と、より密接な関連があると思われる。残念ながら神経終末部の GABA 含有量の薬剤による変化を直接に測定することは、技術的には不可能である。しかし全脳より超遠心分画法にて、シナプトゾームが豊富に含まれる分画をつくる方法は確立されており^{13)~16)}、これにより神経終末部での GABA 濃度の変化は容易に測定できる。こうして得られたデータは、無傷動物の神経終末での真の状態を表わしているかどうかに関しては、ある程度の疑問が残るが、この方法が現在のところ最も良い方法と思われる。Wood ら⁹⁾ はシナプトゾーム豊富な分画は、神経終末部での GABA 濃度の薬剤による変化を評価するのに、十分モデルとして使用できると言っている。細胞分画とくにシナプトゾーム分画の調製法には、いろいろな方法がある。今回の研究に用いた方法では、純粋なシナプトゾーム分画は得られず、crude なシナプトゾーム分画を用いた。この分画を電子顕微鏡でみると、シナプス小胞を含むシナプトゾームに混って、ミトコンドリアも存在していた。

シナプス前終末部に普遍的に存在しているシナプス小胞が、伝達物質の貯蔵と放出に直接かかわる構造物であることは、よく知られている。アセチルコリンやノルアドレナリンがシナプス小胞中に高濃度に存在することは、超遠心分画法によって得られたシナプス小胞について証明されている¹⁷⁾。しかし伝達物質としてのアミノ酸については、超遠心分画法で分離したシナプトゾームやシナプス小胞に、GABA, Asp, Glu が高濃度に含まれているという成績を示した報告は、現在のところみられない。しかしシナプス間隙に放出された [³H] 標識 GABA は、ニューロンの神経終末と細胞体を選択的に取り込まれる¹⁸⁾ という報告はある。脳をホモゲナイズし、超遠心分離を行う過程で、アミノ酸が流出するためなのかもしれない。あるいは伝達物質のアミノ酸には、Katz ら¹⁹⁾ の小胞仮説はあてはまらな

いかもしれない。しかし脳組織の GABA, Asp, Glu 濃度は、アセチルコリンやノルアドレナリンに比べて著しく高いことから、シナプス小胞に特に高濃度に含まれていないとしても、神経終末部から放出され、シナプス間隙で有効濃度に達して、伝達が行われることは可能であると思われる。

今回の研究の結果から、各アミノ酸濃度のシナプトゾーム分画 (P 分画) と上清 (S 分画) での比較では、蛋白あたり S 分画の方が P 分画の 2~3 倍と高い濃度を示した。他の報告でも S 分画の方が P 分画にくらべて、1.5~2 倍高い濃度を示している⁷⁾⁸⁾。これらの事実は、ホモゲナイズされた脳の遠心分離を行う過程で、アミノ酸がある程度流出することを示しているのではないかと考えられる。既に報告されている脳の細胞分画での各アミノ酸濃度を著者の成績と比較してみると、GABA では、シナプトゾーム分画 (P 分画) の濃度は約 20~30 n mole/mg protein^{7)8)20)~22)} と著者の結果より 2~3 倍高い濃度であった。しかし Löscher²³⁾ の報告では、著者の結果とあまり差はなかった。Asp, Glu に関しては、細胞分画のレベルでの報告は少なく、Sarhan ら²²⁾ の報告だけである。今回の結果に見られた P 分画、S 分画のアミノ酸濃度と、他の報告者との差については、原因が明らかでないが、抽出方法や測定方法による違いではないかと考えられる。一方 El マウスと ddY マウスの脳の細胞分画でのアミノ酸濃度の比較では、GABA, Asp, Glu とともに、P 分画では有意差はみられなかった。S 分画では Asp のみ、El マウスの方が ddY に比べ有意に高かった。全脳レベルでの Kurokawa ら²⁴⁾ の報告にみられるような、El マウスでは GABA の量が多く、Asp, Glu の量は少ないという結果は得られなかった。

次に使用した抗けいれん剤の生化学的作用と脳内アミノ酸濃度との関係について述べる。VPA は 1963 年に初めて抗けいれん剤として認められた²⁵⁾。その作用は最大電撃けいれんに対して最も効果があり、またベンチレンテトラゾールけいれんにも有効であると言われている。それは GABA 作動性シナプス伝達の変化を通してその効果を現わす。そして GABA 濃度を増加させ²⁶⁾²⁷⁾、その GABA 含有量は、動物実験にて抗けいれん作用の発現・持続と関係している²³⁾²⁶⁾。しかし他の報告では、全脳の GABA の増加は抗けいれん作用とは、関係がないというのみみられる^{28)~31)}。脳内 GABA の増加の原因は、GABA の合成、分解に関与する酵素と VPA との相互作用による。VPA のアミノ酪酸アミノトランスフェラーゼ (aminobutyrate aminotransferase, GABA-T) への抑制効果は弱い³²⁾、次の分解酵素である琥珀酸セミアルデヒド脱水素酵素

(succinate semialdehyde dehydrogenase, SSA-DH) に対しての抑制作用は強い³¹⁾³²⁾。また VPA はグルタミン酸デカルボキシラーゼ (glutamate decarboxylase, GAD) に対しても促進させる働きもある³³⁾。以上のデータは、VPA による GABA 代謝の変化を細胞分画レベルでの分析によって、明らかにされた。VPA は選択的に、シナプトゾームでの GABA 濃度を増加させる²²⁾³⁴⁾。GABA の増加は、脳内の各部位で異なり、高濃度の GAD と GABA が含まれる所が最も高い³⁵⁾。そして GAD は大部分シナプトゾーム分画に存在することがわかっている。これらの結果より、VPA は選択的に GABA 作動性神経終末で GABA を増加させるので、全脳レベルでの測定では十分とはいえない。そして VPA の GABA 上昇は、GABA 分解の抑制より、むしろ GABA 合成の促進によるのではないかと考えられている³³⁾。しかし上記のことが確立するには、以下に述べるいくつかの問題点もある³⁶⁾。

まず第 1 に、酵素に対して影響を与えるために必要な薬剤の濃度が高すぎる。そして臨床的に有効な濃度での GAD の促進、GABA-T、SSA-DH の抑制がまだはっきりしていない。第 2 に、シナプトゾームでの GABA 量の増加は、抗けいれん作用を現すにはあまりに少なすぎる²⁸⁾。第 3 には、シナプトゾームでの GABA の増加は、イソニアジドけいれん、または最大電撃けいれんに対するけいれん防止効果とは関係がなかった²³⁾²⁸⁾、という報告がある。第 4 には、全脳またはシナプトゾームの GABA の増加が、シナプスからの GABA の遊離を促進するという証明がないという点である。にもかかわらず、VPA によるシナプトゾームの GABA の増加が、ペンチレンテトラゾールけいれんに対する抗けいれん作用と密接な関連があった²³⁾、ということから現在 GABA 代謝仮説が強く支持されている。今回の研究でも同様に、El マウスのけいれん抑制効果と脳の細胞分画、とくにシナプトゾーム豊富な P 分画での GABA の増加との間に有意な関係がみられたことは、上記の説を支持する所見である。

次に VPA と他の神経伝達物質としてのアミノ酸の関係について述べる。最も多いのは Asp との関連で、VPA 投与によって Asp 濃度の減少をみとめるというものである^{37)~41)}。一方 Sarhan ら²²⁾は、Asp 濃度の減少は、脳の細胞分画では上清の部分での変化であって、シナプトゾーム分画での変化は、Asp に関してはほとんど認められず、反対に GABA は、シナプトゾーム分画での増加を認めるが、上清では変化はなかった。そしてシナプトゾーム分画での GABA 濃度の特異的な増加は、全脳での GABA 濃度の増加より重要であると言っている。しかし Chapman ら³⁹⁾、Chapman⁴⁰⁾は

脳の部位別でのアミノ酸濃度を検討し、VPA 投与により、GABA 濃度は皮質においてのみ増加を示し、一方 Asp 濃度は皮質と海馬で減少を示した。Glu 濃度は海馬と線条体で減少し、皮質、小脳で増加していたと報告している。Asp 濃度減少のメカニズムは不明であるが、可能性としては、Asp 合成に関与する酵素 (アスパラギン酸トランスアミナーゼあるいはピルビン酸カルボキシラーゼ) に対する VPA の直接的な作用が示唆される。

次に AZA は、1952 年 Bergstrom ら⁴²⁾により初めて、てんかんの治療に用いられた。AZA は炭酸脱水酵素という特定の酵素に対する阻害作用が、明確に知られている点で特異な位置を占める薬剤である。AZA の抗けいれん作用の発現機序に関してはいくつかあげられる。1つは脳内炭酸ガスの蓄積によって、神経細胞の興奮性を低下させる。そして脳内アミノ酸の変化をきたし、特に GABA、Glu、グルタミンの増加をみとめるとの Woodbury ら⁴³⁾の報告がみられる。その他に脳内モノアミンにも影響を与えられている⁴⁴⁾。今回の研究結果では、Woodbury ら⁴³⁾の報告とは相反する結果が得られた。すなわち抗けいれん効果と脳の細胞分画の P 分画での Glu 濃度の減少との間に、有意な関係がみられたことである。AZA による脳内アミノ酸濃度の変化についての報告は、他にほとんどみられないので今後の研究が待たれる。

一方脳内の Glu 濃度に影響を与える抗けいれん剤としては、フェノバルビタール、ジアゼパム、トリメタディオンなどが報告されている。ジアゼパム投与では、脳内 Asp 濃度の上昇と Glu 濃度の減少をみとめる⁴⁵⁾⁴⁶⁾。これはジアゼパム投与による鎮静作用の結果、脳皮質におけるグルコース利用率の減少、また神経細胞の活動の低下による代謝率の減少によることが示唆される。今回の研究の結果みられた AZA 投与による Glu の減少も、同様のことが起つたためと推測される。しかし Glu 濃度の低下と抗けいれん作用については、はっきりと説明した論文はみあたらない。

一方 ESM はサクシミドの化合物で、臨床的に使用されて約 20 年を経過するが、けいれんの作用機序については詳しく知られていない。神経細胞での生化学的な作用というのは、細胞膜機能への作用で、Na⁺-K⁺ ATP アーゼ活性の抑制であると言われている⁴⁷⁾⁴⁸⁾。また Nahorski⁴⁵⁾はラットへの ESM 投与で、脳内グルコースの上昇、脳内・血液グルコース比の増加、脳内フルクトース 1, 6-2 燐酸、ピルビン酸、 α -オキソグルタル酸、Asp 濃度の減少を報告している。さらに Patsalos ら⁴⁹⁾は、ESM を 10 日間 (150 mg/kg/day) ラットに投与した場合、全脳と部位別の GABA、

タウリンには変化はなく、皮質下での Asp, Glu 濃度の増加をみとめたと言っている。今回の研究では、ESM 投与で El マウスのけいれん抑制はみられたが、脳の細胞分画での各種アミノ酸濃度については、P 分画で Asp が1時間後にのみ有意な減少をみとめた他は、あまり変化はみられなかった。したがって ESM 投与では、けいれん抑制と伝達物質と言われているアミノ酸の間には、特別な関係はみられないものと思われる。また AZA, ESM 投与時の脳内アミノ酸の変化に関してのこれまでの報告は、すべて全脳あるいは脳の局在での変化であって、細胞分画とくにシナプトゾーム豊富な分画での変化ではない。したがって今後この方面で、さらに検討が必要と思われる。

結 論

VPA, AZA, ESM の抗けいれん作用を、El マウスを用いて、投与後の脳の細胞分画を行い、分画別の GABA, Asp, Glu 濃度を測定して検討した。その結果次の結論が得られた。

1) El マウスと ddY マウスの脳の細胞分画においてのアミノ酸濃度比較では、特に有意な差はみられなかった。

2) VPA 投与では、注射後 15 分から 1 時間にけいれん抑制がみられ、脳の細胞分画の P 分画では、けいれん抑制期間に一致して、GABA の増加をみとめた。

3) AZA 投与では、注射後 1 時間から 2 時間にけいれん抑制がみられ、脳の細胞分画の P 分画では、けいれん抑制期間に一致して、Glu の減少をみとめた。

4) ESM 投与では、注射後 30 分から 1 時間にけいれん抑制をみとめたが、脳の細胞分画でのアミノ酸濃度の変化とけいれん抑制との間には、特別な関係はみられなかった。

以上より神経終末部での神経伝達物質の変化をより密接に反映していると思われる P 分画の変化より、VPA の抗けいれん作用には、GABA 濃度の増加、AZA では Glu 濃度の減少が関与していることが示唆される。

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の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。さらに電頭試料作製および撮影に、御協力下さいました小児科長沖武博士に厚く御礼申し上げます。

なお本論文の一部は、第 17 回日本てんかん学会(1983 年、京都)にて発表した。

文 献

- 1) Meldrum, B. S.: Mechanisms of action of anticonvulsant drugs, p333-343. *In* F. C. Rose (ed.), *Research progress in epilepsy*. Pitman, London, 1983.
- 2) 加藤尚彦: アミノ酸伝達候補物質の微量測定法。神経伝達物質測定マニュアル(森 昭風編)第 1 版, 146-172 頁, 医歯薬出版, 東京, 1979.
- 3) Graham, L. T. Jr. & Aprison, M. H.: Fluorometric determination of aspartate, glutamate and γ -aminobutyrate in nerve tissue using enzymic methods. *Analytical Biochem.*, **15**, 487-497 (1966).
- 4) Bastiani, R. J., Phillips, R. C., Schneider, R. S. & Ullman, E. F.: Homogeneous immunochromic drug assays. *Am. J. Med. Tech.*, **39**, 211-216 (1973).
- 5) Solow, E. B. & Green, J. B.: The simultaneous determination of multiple anticonvulsant drug levels by gas-liquid chromatography. *Neurol.*, **22**, 540-550 (1972).
- 6) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. L.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 7) Wood, J. D., Kuryro, E. & Newstead, J. D.: Aminoxyacetic acid induced changes in γ -aminobutyrate metabolism at the subcellular level. *Can. J. Biochem.*, **56**, 667-672 (1978).
- 8) Wood, J. D., Russell, M. P., Kuryro, E. & Newstead, J. D.: Stability of synaptosomal GABA levels and their use in determining the *in vivo* effects of drugs: Convulsant agents. *J. Neurochem.*, **33**, 61-68 (1979).
- 9) Curtis, D. R. & Watkins, J. C.: The pharmacology of amino acid related to γ -aminobutyric acid. *Pharmacol. Rev.*, **17**, 347-391 (1965).
- 10) Roberts, E.: γ -Aminobutyric acid and nervous system function-A perspective. *Biochem. Pharmacol.*, **23**, 2637-2649. (1974).
- 11) Tapia, R.: Biochemical pharmacology of GABA in CNS, p1-58. *In* L. L. Iversen, S. D. Iversen & S. H. Snyder (ed.), *Handbook of Psycho pharmacology*. Plenum Press, New York, 1975.
- 12) Wood, J. D. & Peesker, S. J.: The anticonvulsant action of GABA elevating agents: A re-

- evaluation. *J. Neurochem.*, **25**, 277-282 (1975).
- 13) **Hajos, F.**: An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity. *Brain Res.*, **93**, 485-489 (1975).
- 14) **Gray, E. G. & Whittaker, V. P.**: The isolation of nerve endings from brain: An electron-microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation. *J. Anat.(Lond.)*, **96**, 79-88 (1962).
- 15) **Cotman, C. W.**: Isolation of synaptosomal and synaptic plasma membrane fraction, p445-452. *In S. Fleischer & L. Packer (ed.), Methods in enzymology*, Vol. 31. Academic Press, New York, 1974.
- 16) **Dodd, P. R., Hardy, J. A., Oakley, A. E., Edwardson, J. A., Perry, E. K. & Delaunoy, J. P.**: A rapid method for preparing synaptosomes: Comparison, with alternative procedures. *Brain Res.*, **226**, 107-118 (1981).
- 17) **Barker, L. A., Dowdall, M. J. & Whittaker, V. P.**: Choline metabolism in the cerebral cortex of guinea pigs. *Biochem. J.*, **130**, 1063-1080 (1972).
- 18) 高垣玄吉郎: 神経生化学 I, 220-270 頁, 共立出版, 東京. 1981.
- 19) **Katz, B.**: The transmission of impulses from nerve to muscle and the subcellular unit of synaptic action. *Proc. Roy. Soc. B*, **155**, 455-477 (1962).
- 20) **Wood, J. D., Russell, M. P. & Kurylo, E.**: The γ -aminobutyrate content of nerve endings (synaptosomes) in mice after the intramuscular injection of γ -aminobutyrate elevating agents: a possible role in anticonvulsant activity. *J. Neurochem.*, **35**, 125-130 (1980).
- 21) **Wood, J. D., Schousboe, A. & Krosggaard Larsen, P.**: *In vivo* changes in the GABA content of nerve endings (synaptosomes) induced by inhibitors of GABA uptake. *Neuropharm.*, **19**, 1149-1152 (1980).
- 22) **Sarhan, S. & Seiler, N.**: Metabolic inhibitors and subcellular distribution of GABA. *J. Neurosci. Res.*, **4**, 399-421 (1979).
- 23) **Löscher, W.**: Relationship between drug-induced changes in seizure thresholds and the GABA content of brain and brain nerve endings. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmac.*, **317**, 131-134 (1981).
- 24) **Kurokawa, M., Naruse, H. & Kato, M.**: Metabolic studies on ep mouse, a special strain with convulsive predisposition. *Progress in Brain Res.*, **21A**, 112-130 (1966).
- 25) **Meunier, G., Carraz, G., Meunier, Y., Eymard, P. & Aimard, M.**: Propriétés pharmacodynamiques de l'acide n-dipropylacétique. *Thérapie*, **18**, 435-438 (1963).
- 26) **Simler, S., Ciesielski, L., Maitre, M., Randrianarisoa, H. & Mandel, P.**: Effect of sodium n-dipropylacetate on audiogenic seizures and brain γ -aminobutyric acid level. *Biochem. Pharmac.*, **22**, 1701-1708 (1973).
- 27) **Ciesielski, L., Simler, S. & Mandel, P.**: Effect of repeated convulsive seizures on brain GABA levels. *Neurochemical Res.*, **6**, 267-273 (1981).
- 28) **Wood, J. D., Kury, E. & Tsui, S. K.**: Interactions of di-n-propylacetate, gabaculine, and amino-oxyacetic acid: anticonvulsant activity and the γ -aminobutyrate system. *J. Neurochem.*, **37**, 1440-1447 (1981).
- 29) **Wood, J. D.**: The role of γ -aminobutyric acid in the mechanism of seizures. *Progress in Neurobiology*, **5**, 77-95 (1975).
- 30) **Emson, P. C.**: Effects of chronic treatment with amino-oxyacetic acid or sodium n-dipropylacetate on brain GABA levels and the development and regression of cobalt epileptic foci in rats. *J. Neurochem.*, **27**, 1489-1494 (1976).
- 31) **Anlezark, G., Horton, R. W., Meldrum, B. S. & Sawaya, M. C.**: Anticonvulsant action of ethanolamine-o-sulphate and di-n-propylacetate and the metabolism of γ -aminobutyric acid in mice with audiogenic seizures. *Biochem. Pharmac.*, **25**, 413-417 (1976).
- 32) **Van Der Laan, J. W., De Boer, T. & Brainvels, J.**: Di-n-propylacetate and GABA degradation. Preferential inhibition of succinic semialdehyde dehydrogenase and indirect inhibition of GABA-transaminase. *J. Neurochem.*, **32**, 1769-1780 (1979).
- 33) **Löscher, W.**: Valproate induced changes in GABA metabolism at the subcellular level. *Biochem. Pharmac.*, **30**, 1364-1366 (1981).
- 34) **Iadarola, M. J. & Gale, K.**: Dissociation between drug induced increases in nerve terminal and non-nerve terminal pools of GABA *in vivo*. *Europ. J. Pharmac.*, **59**, 125-129 (1979).
- 35) **Iadarola, M. J. & Gale, K.**: Evaluation of

- increases in nerve terminal-dependent vs nerve terminal-independent compartments of GABA *in vivo*. Brain Res. Bull., 5, 13-19 (1980).
- 36) Macdonald, R. L.: Mechanisms of anti-convulsant drug action, p1-23. In T. A. Pedley & B. S. Meldrum (ed.), Recent advances in epilepsy. Churchill Livingstone, London & New York, 1983.
- 37) Kukino, K. & Deguchi, T.: Effects of sodium dipropylacetate on γ -aminobutyric acid and biogenic amines in rat brain. Chem. Pharm. Bull., 25, 2257-2262 (1977).
- 38) Schechter, P. J., Tranier, Y. & Grove, J.: Effect of n-dipropylacetate on amino acid concentrations in mouse brain: correlations with anti-convulsant activity. J. Neurochem., 31, 1325-1327 (1978).
- 39) Chapman, A. G., Riley, K., Evans, M. C. & Meldrum, B. S.: Acute effects of sodium valproate and γ -vinyl GABA on regional amino acid metabolism in the rat brain: incorporation of 2- [14 C] glucose into amino acids. Neurochem. Res., 7, 1089-1105 (1982).
- 40) Chapman, A. G.: The effect of valproate on cerebral amino acid metabolism and its relationship to anti-convulsant effect, p371-383. In F. C. Rose (ed.), Research progress in epilepsy. Pitman, London, 1983.
- 41) 村田祐一: El マウスにおけるバルプロ酸の抗けいれん作用と脳内 γ -アミノ酪酸, アスパラギン酸, グルタミン酸濃度に及ぼす影響. 十全医会誌, 92, 413-422 (1983).
- 42) Bergstrom, W. H., Carzoli, R. F., Lombroso, C., Davidson, D. T. & Wallace, W. M.: Observations on the metabolic and clinical effects of carbonic anhydrase inhibitors in epileptics. Am. J. Dis. Child., 84, 771-772 (1952).
- 43) Woodbury, D. M. & Esplin, D. W.: Neuropharmacology and neurochemistry of anticonvulsant drugs. Proc. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis., 37, 24-56 (1959).
- 44) 乾 正: Diamox の薬効機序 (その抗てんかん剤としての位置づけ), 9-10 頁, 日本レダリー, 東京, 1978.
- 45) Nahorski, S. R.: Biochemical effects of anticonvulsants trimethadione, ethosuximide and chlordiazepoxide in rat brain. J. Neurochem., 19, 1937-1946 (1972).
- 46) Carlsson, C. & Chapman, A. G.: The effect of diazepam on the cerebral metabolic state in rats and its interaction with nitrous oxide. Anesthesiology, 54, 488-495 (1981).
- 47) Gilbert, J. C., Scott, A. K. & Wyllie, M. G.: Effects of ethosuximide on adenosine triphosphatase activities of some subcellular fractions prepared from rat cerebral cortex. Bri. J. Pharmac., 50, 452-453 (1974).
- 48) Gilbert, J. C. & Wyllie, M. G.: The effects of the anti-convulsant ethosuximide on adenosine triphosphatase activities of synaptosomes prepared from rat cerebral cortex. Bri. J. Pharmac., 52, 139-140 (1974).
- 49) Patsalos, P. N. & Lascelles, P. T.: Changes in regional brain levels of amino acid putative neurotransmitters after prolonged treatment with the anti-convulsant drugs diphenylhydantoin, phenobarbitone, sodium valproate, ethosuximide, and sulthiame in the rat. J. Neurochem., 36, 688-695 (1981).

Effect of Valproic Acid, Acetazolamide and Ethosuximide on Seizure Threshold and Subcellular Concentration of γ -Aminobutyric Acid, Aspartic Acid and Glutamic Acid in E1 Mouse
Masaki Okamoto, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 — J. Juzen Med. Soc., 94, 69–80 (1985)

Key words: Anticonvulsant, Neurotransmitter, E1 mouse

Abstract

In order to elucidate the mechanisms of anticonvulsive action of valproic acid, acetazolamide and ethosuximide, subcellular levels of γ -aminobutyric acid (GABA), aspartic acid and glutamic acid in brain were studied using a convulsive strain of E1 mouse with throwing-induced seizure. The adult E1 mouse with acquired convulsion was injected intraperitoneally with 250 mg/kg of valproic acid, 400 mg/kg of acetazolamide or ethosuximide. A seizure response to throwing was evaluated at 15, 30 min, 1, 2, 3 and 6 hr after the injection. Immediately after throwing, the mouse was decapitated and the whole brain except cerebellum was dissected out, frozen in liquid nitrogen and rapidly homogenized in 0.32 M sucrose. The homogenate was centrifuged at 1,000 \times g for 10 min. After a further centrifugation at 20,000 \times g for 20 min, the supernatant fraction (S fraction) and pellet (P fraction) were obtained. The P fraction consisted mainly of synaptosomes and mitochondria, which was confirmed by electron microscopy. In both fractions, concentrations of GABA, aspartic acid and glutamic acid were determined by the enzymatic microassay. An administration of valproic acid suppressed throwing-induced seizure for a period of 15 to 60 min after the injection. During this seizure-free period, the GABA level of P fraction was significantly elevated ($P < 0.05$). An injection of acetazolamide inhibited seizure for 1 to 2 hr, which was associated with decrease in the glutamic acid level in P fraction ($P < 0.05$). In contrast, no consistent correlation was observed between seizure activity and subcellular amino acid levels in the ethosuximide-treated mice. These results suggest that inhibition of seizure by valproic acid and acetazolamide is attributed to an increase in GABA and a decrease in glutamic acid concentration in synaptosomes, respectively.