

E1-マウスにおけるバルプロ酸の抗けいれん作用と脳内 γ -アミノ酸・アスパラギン酸・グルタミン酸濃度に及ぼす影響

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/2297/9071

E1-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

金沢大学医学部小児科学教室 (主任: 谷口 昂教授)

村 田 祐 一

(昭和58年3月25日受付)

けいれん系のE1-マウスを使い、バルプロ酸(以下VPAと略)の抗けいれん性機序を明らかにする為、脳内γ-アミノ酪酸(以下GABAと略)、アスパラギン酸、グルタミン酸濃度に及ぼす効果を評価した。対照として、脳内GABA濃度を増加させて抗けいれん作用をなすことが知られているアミノオキシ酢酸(以下AOAAと略)の効果を評価した。バランスを崩す姿勢刺激、すなわち何回かの、15~20 cm 空中に放り上げる事により、生後12~13週齢のE1-マウスはけいれんをおこす。VPA 250 mg/kg またはAOAA 20 mg/kg を腹腔内注射の後に、放り上げ刺激に対する反応の評価と脳内GABA、アスパラギン酸、グルタミン酸を測定した。小脳を除いた脳は液体窒素中で凍結し、溶ける前にすばやくとり出した。GABA、アスパラギン酸、グルタミン酸の濃度は酵素法によって測った。VPA (250 mg/kg) の投与は、E1-マウスを放り上げ刺激によるけいれんから、注射後15分から90分にわたり阻止した。この期間中、脳内アスパラギン酸濃度は2 μmol/g 湿重量以下に減少していた。対照的に、脳内GABA濃度は、VPA注射後15分値では変化がなかった。しかし注射後30分値でピークレベルに増加した。3 μmol/g 湿重量は越えなかった。アスパラギン酸とGABAの両レベルはVPA注射の6時間以内に治療前のレベル約3.3 μmol/g と2.2 μmol/g 湿重量にもどった。しかし、VPA投与は脳内グルタミン酸濃度に有意な変化をおこさなかった。放り上げによるけいれんは、AOAA (20 mg/kg) 注射後90分から6時間にわたり完全に阻止された。その期間中、脳内GABA濃度は4 μmol/g 湿重量以上に増加した。これらの結果はE1-マウスにおけるけいれん阻止に必要と思われる脳内濃度は、GABAでは4 μmol/g 湿重量以上、アスパラギン酸では2 μmol/g 湿重量以下を示していた。それ故、VPA投与におけるE1-マウスのけいれん抑制は、脳内GABA濃度の増加よりもアスパラギン酸濃度減少により強く依存していると考えた。

Key words E1 mouse, Aspartic acid, γ-Aminobutyric acid, Valproic acid.

バルプロ酸(以下VPAと略)は、はじめ溶剤として使われていたが、1963年Meunier¹⁾らにより抗けいれん作用が発見された。現在難治性の小発作てんかん群をはじめとして、大発作、純粋小発作等と広範に使われ、すぐれた抗けいれん作用を示している^{2)~6)}。

その抗けいれん作用は抑制性神経伝達物質のγ-アミノ酪酸(以下GABAと略)の脳内濃度増加作用によるものと考えられている⁷⁾。しかし、治療域での使用量では脳内GABA濃度の増加は充分でないという。近年、興奮性神経伝達物質のアスパラギン酸の脳内濃度

を減少させる作用も報告されている⁸⁾⁹⁾。

そこで、著者はVPAの抗けいれん作用の機序を解析する為、放り上げ刺激により人間の大发作とよく似た発作をおこすことが知られている、E1-マウス¹⁰⁾にVPAを腹腔内注射した。そして、その脳内GABA、アスパラギン酸、グルタミン酸濃度の変化を調べた。VPAの脳内アスパラギン酸濃度減少作用が、その抗けいれん作用とよく相関することを見出した。

材 料 と 方 法

Effects of Valproic Acid on Seizure Thresholds and Brain Concentrations of γ-Aminobutyric Acid, Aspartic acid and Glutamic acid in E1 mouse. **Yuichi Murata**, Department of Pediatrics, (Director: Prof. N. Taniguchi), School of Medicine, Kanazawa University.

E1-マウスは、1954年に発見され、1959年に国立予防衛生研究所の今泉により、当初 ep-マウスとして報告された特殊系マウスである。1964年に国際登録により E1-マウスと命名された。このマウスは外観上、他の健常なマウスとは変わらないが、生後8週以降より、平衡感覚を失わせる様な刺激により容易に痙攣が誘発されるようになる。しかも痙攣により死ぬことはない。今回の実験には、この E1-マウスの F78~F80 で、週齢 12~13 週のものに雌雄関係なく使用した。28 日齢までは、その匹数にかかわらず同一ケージ内に、同一腹の仔と母親とともに飼育した。29 日齢以降は親から離して、雌雄別々とし、1 ケージ内に 3~5 匹の飼育数とした。飼育条件は、温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 68%、人工照明（明期：6~18 時、暗期：18~6 時）とした。実験は 14~24 時の間に行った。

第 5 週齢日より、週 1 回の放り上げ刺激を行い、容易に発作をおこすようにした。痙攣発作を簡単に記述すると、以下のように経過する。マウスを上下に軽く放り上げるとピクピクという動作とともに、チュッチュッ……と啼泣して突然横転する。次いで強直性痙攣期、間代性痙攣期を経て回復していく。これ以外で途中でとん坐するものは不完全発作とした。

VPA は鍾紡株式会社より原末の提供を受けた。原末を生理食塩水で $0.3\sim 0.4\text{ ml}$ が約 250 mg/kg になるように調整し、E1-マウスの腹腔内に注射した。

一方、GABA トランスアミナーゼを選択的に阻害し、脳内 GABA 濃度のみを増加させることが知られているアミノオキシ酢酸（以下 AOAA と略）¹¹⁾ を、脳内 GABA 濃度のみを増加させた場合の抗けいれん作用を知るための対照とした。そして、約 20 mg/kg を腹腔内注射した。

各薬物の注射前、注射後 15 分、30 分、60 分、90 分、120 分、6 時間の各々の時間に、50 回の放り上げ刺激（高さ $10\sim 20\text{ cm}$ 位）を行った。刺激の直後、または、けいれん発作をおこした時は間代性痙攣期からその直後にかけて断頭し、液体窒素中で凍結した。同時に断頭部よりへパリン採血をした。脳は凍結している間に、速やかに小脳と嗅球を除いた全脳をとり出して測定した。脳重量は 270 mg 前後であった。

抽出は 3 M-過塩素酸でホモジナイズし、 $3,000\text{ G}$ 、15 分間遠心した。その後、上清を 2 M- KHCO_3 で pH $6\sim 7$ に調整し、1 時間、氷冷静置の後 $10,000\text{ G}$ 、10 分間遠心した。その上清を測定まで、 -20°C で凍結保存した。血漿も同様に保存した。

血漿中の VPA 濃度は酵素免疫法の EMIT 法で測定した。脳内 GABA、アスパラギン酸、グルタミン酸は、これらのアミノ酸の代謝と関与する酵素反応を利

用した“酵素的微量測定法”によって測った。すなわち、加藤尚彦¹²⁾と Graham¹³⁾らの方法を一部改変して測定した。

まず GABA は、過剰量の α -ケトグルタル酸と NADP^+ の存在下で GABA を下記の 2 つの反応により NADPH に転換し、その蛍光を測定する方法である。

(1) $\text{GABA} + \alpha\text{-ケトグルタル酸} \xrightarrow{\text{トランスアミナーゼ}} \text{コハク酸セミアルデヒド} + \text{グルタミン酸}$

(2) $\text{コハク酸セミアルデヒド} + \text{NADP}^+ \xrightarrow{\text{脱水素酵素}} \text{コハク酸} + \text{NADPH} + \text{H}^+$

反応液として、ピロリン酸塩緩衝液 (0.1 M , pH 8.4) 3 ml 、GABASE [0.075 M -リン酸緩衝液に 25% (v/v) グリセロールを含むものに 1 単位/ml の割合に溶解] 0.5 ml 、 NADP^+ (1 mM/L , pH 7.0) 0.5 ml 、 α -ケトグルタミン酸 (60 mM/L , pH 7.0) 0.5 ml 、0.4% 2-メルカプトエタノール 0.5 ml の混合液を調整する。この反応液 $50\ \mu\text{l}$ と試料 $100\ \mu\text{l}$ とを混合し、室温で 45 分間反応させた後、 0°C で 1 N-NaOH $10\ \mu\text{l}$ を加えて、 60°C で 15 分間温浴により、 NADPH を保存して基質を破壊する。その後、 0°C で $0.03\%\text{ H}_2\text{O}_2$ - 9 N-NaOH $320\ \mu\text{l}$ を加え、 60°C で 10 分間温浴し、強アルカリによる蛍光増加をした後、日立 204 形分光けい光光度計により、 $340\text{ m}\mu$ の波長で励起し、 $450\text{ m}\mu$ で測定した。

アスパラギン酸は、過剰量の α -ケトグルタル酸と NADH の存在下に、下記の 2 つの反応によりアスパラギン酸を NAD^+ に転換し、その蛍光を測定する方法である。

(1) $\text{アスパラギン酸} + \alpha\text{-ケトグルタル酸} \xrightarrow{\text{トランスアミナーゼ}} \text{オキザル酢酸} + \text{グルタミン酸}$

(2) $\text{オキザル酢酸} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{脱水素酵素}} \text{リンゴ酸} + \text{NAD}^+$

反応液は、 200 mM -イミダゾール塩酸 (pH 7.0) 3 ml 、 α -ケトグルタミン酸 (60 mM/L , pH 7.0) 0.5 ml 、 NADH (1 mM/L) 0.5 ml 、 GOT (2 mg/ml) $100\ \mu\text{l}$ 、リンゴ酸脱水素酵素 (5 mg/ml) $20\ \mu\text{l}$ 、0.4% 2-メルカプトエタノール 0.5 ml を調整する。この反応液 $50\ \mu\text{l}$ と試料 $50\ \mu\text{l}$ とを混合し、室温で 45 分間反応させる。その後、 0°C で 1 N-HCl $10\ \mu\text{l}$ を加え、室温で 30 分間放置する。すなわち NAD^+ を保存し、基質を破壊する。その後再び 0°C で 9 N-NaOH $200\ \mu\text{l}$ を加えて、 38°C 30 分間温浴で蛍光増加を行う。その後、 $340\text{ m}\mu$ で励起し、 $450\text{ m}\mu$ で測定する。

グルタミン酸は、過剰量の NAD^+ の存在下でグルタミン酸を下記の反応により NADH に転換し、その蛍光を測定する方法を用いた。

$\text{グルタミン酸} + \text{NAD}^+ \xrightarrow{\text{脱水素酵素}} \alpha\text{-ケトグルタル酸}$

酸+NH₃+NADH+H⁺

反応液として、200 mM-トリス塩酸緩衝液 (pH 8.4) 2.5 ml, NAD⁺ (15 mg/5 ml 緩衝液) 1.0 ml, ADP (26 mg/5 ml 緩衝液) 0.5 ml, グルタミン酸脱水素酵素 (10 mg/ml) 0.45 ml, 0.4% 2-メルカプトエタノール 0.5 ml の混合液を調整する。この反応液 50 μl と試料 50 μl とを室温で 40~45 分間混合反応の後、0°C 中で 1 N-NaOH 20 μl を加え、70~80°C で温浴することにより、NADH を保存し、基質を破壊する。その後、0°C

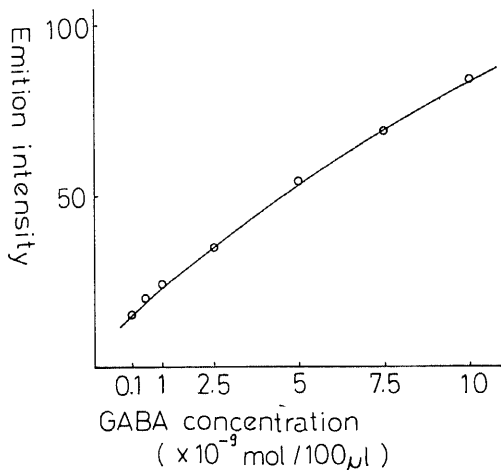


Fig. 1. Relationship between fluorescence of the NADP⁺ product produced from the conversion of NADPH by alkaline-peroxide treatment and GABA levels in the 1×10⁻¹⁰ to 1×10⁻⁸ mol range.

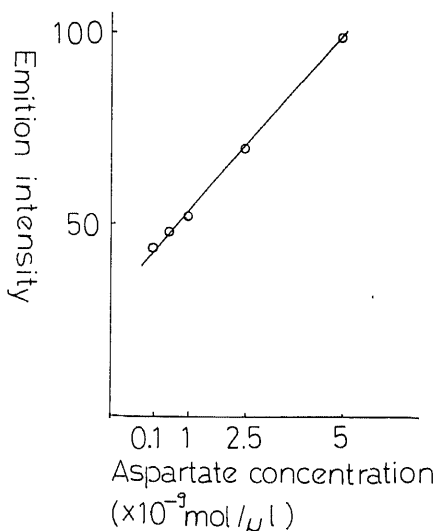


Fig. 2. Relationship between fluorescence product to NAD⁺ in strong alkali and aspartate levels in the 1×10⁻¹⁰ to 5×10⁻⁹ mole range.

中で 0.03% H₂O₂-9 N-NaOH 200 μl を混合し、60°C で 10 分間温浴により蛍光増加を行う。その後、340 mμ で励起し、450 mμ で測定した。

なお測定成績は、平均値±標準偏差で表わし、有意差検定には、t テスト法を用いた。

結 果

図 1, 2, 3 に示してあるように、脳内 GABA, アスパラギン酸, グルタミン酸濃度を測定する為に、既知の標準試料の吸光度を測定して標準曲線を得た。抽出した試料は全て、この標準曲線内に入っていた。

E1-マウスのけいれん発作は、VPA 約 250 mg/kg 注射の後、50 回放り上げ刺激にもかかわらず、注射後 15 分から 90 分にかけて抑制された。しかし 120 分以降は抑制されなかった。一方 AOAA 約 20 mg/kg 注射群では 30 分後より、けいれん発作の域値の上昇がみられた。90 分以降は 50 回の放り上げ刺激にもかかわらず、発作は抑制された。

VPA 250 mg/kg 注射後の血漿中 VPA 濃度 (図 4) は 15 分後に 558±97 μg/ml と急激に上昇した。30 分後も 540±134 μg/ml と、ほぼ同一レベルを保ち、その後減少した。6 時間後には、血漿中からは検出できなかった。発作と血漿中の VPA レベルとの関係を見ると、血漿中の VPA 濃度が、約 170 μg/ml 以上で発作は抑制されていた。

脳内 GABA 濃度 (図 5) は注射前のコントロール群で 2.24±0.27 μmol/g 湿重量であった。注射後 15 分値では 2.12±0.17 μmol/g 湿重量と変化しなかった。

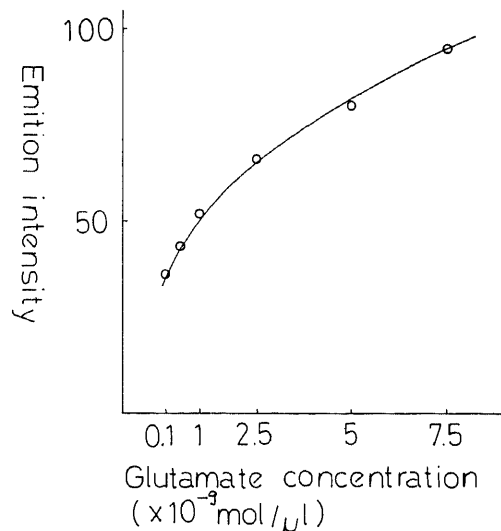


Fig. 3. Relationship between NADH fluorescence and glutamate levels in the 1×10⁻¹⁰ to 7.5×10⁻⁹ mole range.

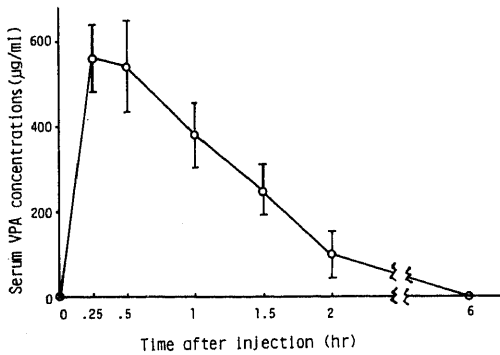


Fig. 4. Changes of VPA plasma concentrations after i. p. injection of VPA (250 mg/kg) in El-mouse. Each point represents a mean \pm SD of 3-7 mice.

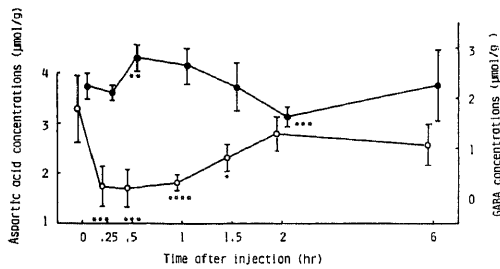


Fig. 5. Effect of i. p. injection of VPA (250 mg/kg) in brain GABA and aspartate concentrations as a function of time after injection. Each point represents a mean \pm SD of 3-7 mice. ●, Brain GABA; ○, Brain aspartate; Significance vs. pretreatment value: * p < 0.05; ** p < 0.02; *** p < 0.01; **** p < 0.001

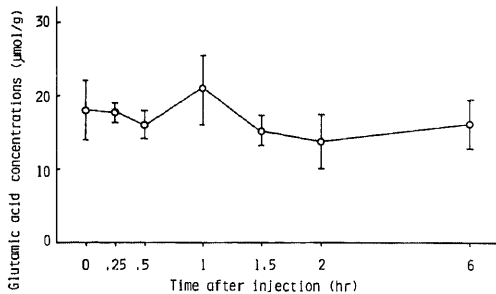


Fig. 6. Effect of i. p. injection of VPA (250mg/kg) as a function of time after injection. Each point represents a mean \pm SD of 3-7 mice.

30分後には $2.80 \pm 0.27 \mu\text{mol/g}$ 湿重量と有意に増加した。その後120分値で減少したが、6時間後には $2.25 \pm 0.71 \mu\text{mol/g}$ 湿重量とコントロール値に復していた。一方、脳内アスパラギン酸濃度はコントロー

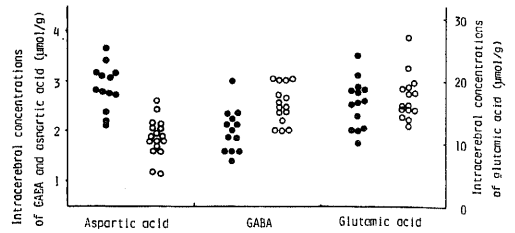


Fig. 7. Relationship of convulsion to brain GABA, aspartate and glutamate concentrations after i. p. injection of VPA (250 mg/kg). ●, attack positive; ○, attack negative

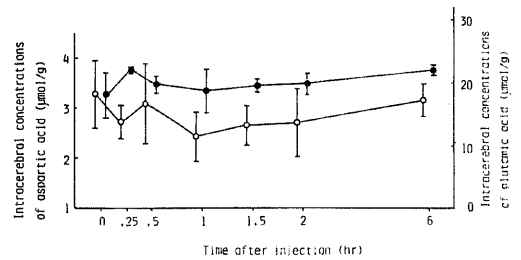


Fig. 8. Effect of i. p. injection of AOAA (20 mg/kg) in brain aspartate and glutamate concentrations. ○, Brain aspartate; ●, Brain glutamate

ル値が $3.28 \pm 0.68 \mu\text{mol/g}$ 湿重量であった。注射後15分値では $1.91 \pm 0.21 \mu\text{mol/g}$ 湿重量と有意に減少し、30分、60分値ともほぼ一定最低値を保った。その後増加し、120分値ではほぼコントロール値に復していた。脳内グルタミン酸濃度は、コントロール値が $18.1 \pm 3.8 \mu\text{mol/g}$ 湿重量であった。経時的には有意な変化はみなかった (図6)。

けいれん発作の有無と脳内GABA、アスパラギン酸濃度との関係のみたものが図7である。脳内GABA濃度は $1 \sim 3 \mu\text{mol/g}$ 湿重量の範囲内で変動している。発作の無い群でやや高い傾向があるが、GABAが高くても発作をおこしている例もある。一方、脳内アスパラギン酸濃度は約 $1 \sim 4 \mu\text{mol/g}$ 湿重量の範囲内で変動している。発作の無い群では、発作群に比べて明らかに低濃度である。しかも、その濃度が約 $2 \mu\text{mol/g}$ 湿重量以下では発作をおこしてはいない。

次いでAOAA 20 mg/kg注射群での変化をみると、脳内アスパラギン酸濃度とグルタミン酸濃度とは共に有意な変動をしなかった (図8)。脳内GABA濃度は次第に増加した。注射後30分値では $3.12 \pm 0.20 \mu\text{mol/g}$ 湿重量と有意に増加した (図9)。同時に発作閾値の上昇も観察した。90分値では $3.99 \pm 0.25 \mu\text{mol/g}$ 湿重量とコントロール値の2倍弱となり、その後も増加した。発作は完全に抑制されていた。発作

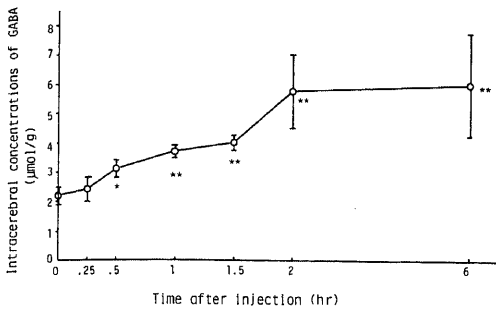


Fig. 9. Effect of i. p. injection of AOAA (20 mg/kg) in brain GABA concentrations. Each point represents a mean \pm SD of 4-7 mice. Significance vs. pretreatment value: * $p < 0.02$; ** $p < 0.01$

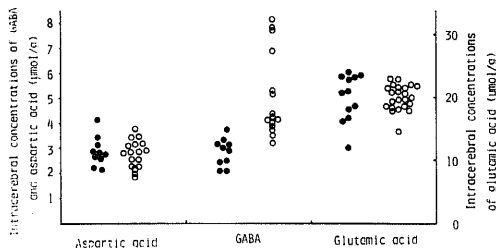


Fig. 10 Relationship of convulsion to brain GABA, aspartate and glutamate concentrations after i. p. injection of AOAA (20 mg/kg). ●, attack positive; ○, attack negative

抑制時の脳内 GABA 濃度は $4 \mu\text{mol/g}$ 湿重量以上であった (図 10)。

血漿中 VPA レベルと脳内アスパラギン酸濃度との関係をみたのが図 11 である。VPA レベルの増加に伴い脳内アスパラギン酸濃度は減少している。つまり、VPA 濃度が $300 \mu\text{g/ml}$ までは急速に減少し、それ以上では減少程度は少ないようである。脳内 GABA、グルタミン酸濃度には、明瞭な関係はみられなかった。

考 察

現在、さまざまな抗てんかん薬が臨床応用され、てんかんの治療を容易にしている。しかし、それら抗てんかん剤の作用機序についてはまだ充分には解明されていない。その作用機序の解明は、大きく 2 つに大別されるだろう。その一つは、実験てんかん動物の電気生理学的レベル、もしくは可能であれば単一ニューロンレベルでの作用機序の解明である。もう一つは、生化学的、つまり分子レベルでの作用機序の解明である。それらには、エネルギー代謝、電解質代謝、アセチルコリン代謝、アミノ酸およびアミン代謝等、多岐にわ

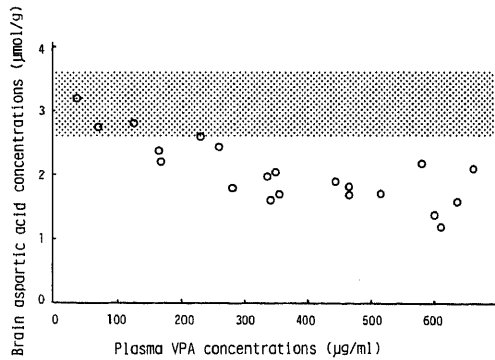


Fig. 11. Relationship of brain aspartate concentrations to plasma VPA concentrations. Shaded area is mean \pm SD of pretreatment value.

たっている。今回の研究では、後者のアミノ酸代謝に焦点をあてた。

脳の全遊離アミノ酸のなかでグルタミン酸が最も高濃度である。グルタミン酸と代謝的に密接に関係しているグルタミン、アスパラギン酸、および GABA を合わせると、脳の全遊離アミノ酸の 70% 近くをこの 4 つのアミノ酸が占めている。この割合は、いろいろな哺乳動物で共通にみられる¹⁴⁾。このうち、GABA は主要な抑制性神経伝達物質である。グルタミン酸、アスパラギン酸はそれぞれ興奮性神経伝達物質として知られている。一方、グルタミンには神経伝達物質としての働きはない。その他、含有量の多いアミノ酸としてはタウリン、グリシンおよび N-アセチルアスパラギン酸がある。タウリンの大脳皮質、脳幹での抑制作用は GABA に比べてはるかに弱い。一方、グリシンは哺乳動物の脊髄と脳幹で抑制的に働かしらうとしか判ってはいない。N-アセチルアスパラギン酸は神経細胞のイオン平衡の維持に関与するという可能性が考えられている。これらのことから、遊離アミノ酸中では、GABA、グルタミン酸、アスパラギン酸が神経伝達物質としてより重要な位置にあると考えられる。そこで、著者は VPA の作用機序を考える上で、小脳、臭球を除いた全脳中の GABA、アスパラギン酸、グルタミン酸について分析した。

従来、アミノ酸分析に使用されて来た、クロマトグラフィ法は、個々のアミノ酸のピークが重なり分離が不十分な場合があった。しかし、今回使用した酵素的微量測定法は、測定する物質のアミノ酸代謝に関与する特別な酵素反応を利用する為、特異性が高く、しかも簡単で、一度に大量に測定できる¹³⁾。

これまでの VPA の作用機序についての研究の大部分は、脳内 GABA 濃度に関するものであった。それらの研究では、脳内 GABA 濃度の増加は抗けいれん作

用の発現と作用時期とによく相関しているという。Godin⁷⁾は1969年にその効果についてはじめて報告している。それによると、ウイスター系のラットにVPA 400 mg/kgを腹腔内注射をしたところ、1時間後の脳内GABA濃度は約60%増加したという。VPAはこのGABAを生成および分解するのに必要な酵素に影響を与えるという。GABA分解酵素であるGABAトランスアミナーゼに対するVPAの抑制作用は、生成酵素であるグルタミン酸脱炭酸酵素に与えられる抑制作用よりもかなり強力である¹⁵⁾。それ故、脳内GABA濃度の増加がおこると考えられる。

Cieselski¹⁶⁾らは聴原発作マウスを使った研究から、VPA 400 mg/kg投与によりマウスは、2時間にわたり完全に音刺激による発作が抑制されることを報告している。この時の脳内GABA濃度は、最高に増加した時点でコントロールより60%増加していたという。

Simler¹⁷⁾らはVPAのGABAトランスアミナーゼ抑制は競合作用によるものだという。VPAのGABA濃度増加に関する研究は、GABAを調節する他の酵素についてもなされている。コハク酸セミアルデヒドロゲナーゼは、5および10 mMのVPAで有意に抑制される¹⁸⁾。Anlezark¹⁹⁾²⁰⁾らによると、5 mMのVPAはコハク酸デヒドロゲナーゼを90%抑制するという。このレベルはマウスに600 mg/kgのVPAを投与した量に相当する。

Foler²¹⁾は生体中でのVPAの脳内GABA濃度増加による抗けいれん作用を疑問視している。つまり生体中ではGABAトランスアミナーゼの抑制作用は弱いことを見出ししている。

イソニアジッドによっておこる発作と脳内GABA濃度減少の両者は、VPAの投与により阻止される。つまり、LöscherとFrey²²⁾はジアゼパン、エトサクシמיד、トリメサジオン、VPAは、イソニアジッドによるGABA減少とグルタミン酸脱炭酸酵素の抑制に対抗することを報告している。一方、AOAAとエタノラミン-O-硫酸塩はGABAトランスアミナーゼの強力な抑制剤であり、適量では抗けいれん作用を持つ。そして、VPA以上に脳内GABA濃度を増加させる。AOAAで治療したネズミでは、コバルト巢でGABA濃度は増加し、同じことがVPA治療でもみられるという²³⁾。脳波の部分棘波はAOAA投与で減少するが、VPA投与では減少しないという。AOAAの投与量を増加していくと、脳内GABA濃度も増加していく、しかし抗けいれん作用は不明確になっていくという。それ故、抗けいれん作用を脳内GABA濃度の増加のみにもとめるには疑問が残る。

VPAは実験動物の脳内GABA濃度を増加させる。

そして、その増加は抗けいれん作用期間にかなりよく相関していることは疑いのない事実である。しかし、抗けいれん作用の発現時期と脳内GABA濃度増加について厳密にみたものは手許の文献にはない。つまり、脳内GABA濃度の増加がどの程度以上になると抗けいれん作用を示すのかを対照をたてて報告してあるものはない。また、多くの報告はVPA注射後30分以降の脳内GABA濃度の変化をみていて、それ以前のものについてはふれていない。ふれてあっても脳内GABA濃度の増加は少ない。それゆえ、抗けいれん作用の発現機序とVPAによる脳内GABA濃度の増加時期とは一致していない。

GABAを増加させるために必要なVPAの量は、人間の抗てんかん薬としての使用量に比べるとかなり多い。人間ではVPAの治療有効血中濃度は50~100 $\mu\text{g/ml}$ といわれ²⁴⁾、30~50 mg/kg/日を使用する。今回の実験ではE1-マウスの発作を阻止するのに必要な血中VPA濃度は170 $\mu\text{g/ml}$ 以上であった。しかも、その量では脳内GABA濃度の増加は大きくなかった。また、ペンチレンテトラゾールによりひきおこされる強直発作を阻止するのに必要なVPAの量 (ED_{50} : 120 mg/kg i.p.) では脳内GABA濃度に変化を与えないという。

VPAの抗けいれん剤としての一般治療量を使用した後、VPAの脳内もしくは髄液中濃度が5~10 mMであったとの報告は人間と実験動物ではない。それゆえ、VPAが脳内GABA濃度を変化させる程のGABAトランスアミナーゼ、または、コハク酸セミアルデヒドロゲナーゼを抑制するという可能性は低いと考える。

今回の著者の実験では、E1-マウスにVPAを従来の投与量より少ない約250 mg/kgを腹腔内注射した。その結果、従来のように脳内GABA濃度の増加をみたが、増加程度は充分とはいえなかった。しかし、これまでの実験では見落されていたと考えられるアスパラギン酸の脳内濃度の低下がVPAの抗けいれん作用とよく相関することを見出した。つまり、VPA約250 mg/kg腹腔内注射の15分後でけいれん発作が抑制された時点では、まだ脳内GABA濃度が増加していなくて、アスパラギン酸濃度が有意に減少していた。その後も発作抑制時期に一致して、アスパラギン酸濃度が約2 $\mu\text{mol/g}$ 湿重量以下と減少していた。

さらに、測定した3種のアミノ酸のうち脳内GABA濃度のみを増加させるため、AOAA約20 mg/kgを注射した。つまり、VPAの脳内GABA濃度の増加とその抗けいれん作用程度を知る為の対照とした。

その結果、AOAA注射で、脳内GABA濃度が3

$\mu\text{mol/g}$ 湿重量以上で発作閾値の上昇をみた。発作の完全抑制がみられたのは、脳内 GABA 濃度が $4 \mu\text{mol/g}$ 湿重量以上の時であった。しかし、VPA による脳内 GABA 濃度の増加は $3 \mu\text{mol/g}$ 湿重量を越えることはなかった。つまり、VPA 250 mg/kg 腹腔内注射時の脳内 GABA 濃度増加作用は、けいれん発作閾値の上昇をもたらす程強くはないと考えられる。これらのことより、E1-マウスに対する VPA の抗けいれん作用は、従来、他の動物実験で示されて来たように脳内 GABA 濃度増加作用によるものよりも、脳内アスパラギン酸濃度減少作用によるものの方が、より重要な因子と考えた。

なお、E1-マウスにおける、これら 3 種類の神経伝達物質に及ぼす痙攣発作との関係については竹内が報告している²⁵⁾。それによるとアスパラギン酸のみが痙攣発作の直前から発作中にかけて減少したという。他の 2 種類には変化がなかったという。今回の著者の実験では発作直後のものより、VPA 注射により発作が抑制されたものの方が脳内アスパラギン酸濃度は低かった。それゆえに、この脳内アスパラギン酸濃度の低下現象は VPA の作用によるものと考える。

Kukino ら⁸⁾により、VPA の脳内アスパラギン酸濃度の減少作用が報告されている。しかし、抗けいれん作用との関係についてはあまり重視していない。Schecher ら⁹⁾は、DBA/2 マウスに VPA 400 mg/kg を腹腔内注射して、経時的に脳内 GABA、アスパラギン酸濃度を測定している。同時に音刺激による発作発現と抑制とについて観察している。その結果、発作抑制の開始時期に一致して脳内 GABA 濃度の増加と脳内アスパラギン酸濃度の減少を観察している。しかし、注射後 15 分値の脳内 GABA 濃度は変化なく、脳内アスパラギン酸濃度は有意に低下しているのに、抗けいれん作用については記載していない。それゆえ、脳内 GABA 濃度の増加と発作抑制開始時期が一致するかには疑問が残る。

アミノ酸以外の神経伝達物質に対する VPA の作用も重要である。てんかんを含む種々の神経疾患でトリプトファン代謝異常が示唆されている。動物実験でも、モノアミンの一種のセロトニンを枯渇させると痙攣閾値は低下し痙攣はおこりやすくなる。また、セロトニンを上昇させると痙攣閾値は上昇する。森ら²⁶⁾は、E1-マウスに MK 486 と 5 セドロトリプトファンを投与し、脳内セロトニンを上昇させ、その時の E1-マウスの発作頻度の減少を報告している。しかし経時的な関連性および他の神経伝達物質については測っていない。一方、Horten²⁷⁾らは、VPA $400\sim 600 \text{ mg/kg}$ を DBA/2 マウスに投与し、音刺激によるけいれんの抑制と脳

内 GABA、ホモバニリン酸、5-ヒドロキシインドール酸（セロトニンの終末代謝産物）濃度との関係のみをみている。その結果、けいれん抑制時期と脳内 GABA 濃度増加との関連性を強調しているが、他の 2 者に関しては増加はみられたが、けいれん抑制時期とは関連がなかったという。それゆえ、今回の実験ではセロトニンに関して検討していないが、支障はないと考える。

Weitz²⁸⁾らは、新生児の重篤で難治なけいれんで、髄液中のアスパラギン酸濃度が正常の 3 倍以上に増加している例を報告している。他のアミノ酸は正常範囲内であった。治療薬はフェノバルビタール（血中濃度で充分量）の他、クロナゼパム、VPA を使用しているが発作はコントロールされなかった。しかし、VPA の血中濃度、その後の髄液中アスパラギン酸濃度に関する記載はない。それ故、充分量の VPA 使用による髄液中のアスパラギン酸濃度の変化と痙攣閾値との関係が今後の問題として残っている。

従来の研究では VPA の使用量が 400 mg/kg 以上とかなり大量に使われていたのに比べ、著者の VPA 使用量は約 250 mg/kg とかなり少ない量であった。その為、従来強調されていた脳内 GABA 増加作用と抗けいれん作用との関係がうすれ、見とおされていた脳内アスパラギン酸濃度の減少作用と抗けいれん作用との関係が明らかになったと考える。

今回の実験では小脳、嗅球を除く全脳を使用し、脳の各部位による検討はしていない。VPA の作用点はその他の実験により、脳幹網様体、とくに下行系に対する鋭敏は抑制作用、海馬、扁桃体などの辺縁系に対する強い抑制作用、脊髄に対する抑制作用が知られている²⁹⁾。今後はこれらの作用部位での変動を確かめる必要がある。

結 論

E1-マウスを使い、その脳内 GABA、アスパラギン酸、グルタミン酸濃度におよぼす VPA の作用と抗けいれん作用について検討した。脳内 GABA 濃度のみを増加させる対照として AOAA を用いた。その結果、①発作は VPA 群では注射 15 分後から 90 分後まで抑制された。AOAA 群では注射後 30 分より発作閾値の上昇をみた。②発作抑制時の血漿中 VPA 濃度は約 $170 \mu\text{g/ml}$ 以上であった。③ VPA 注射 15 分後の発作抑制をみた時点で、アスパラギン酸は有意に減少していたが、GABA、グルタミン酸には変化はなかった。④発作抑制に必要な脳内濃度は、各々、GABA では $4 \mu\text{mol/g}$ 湿重量（コントロールの 1.6 倍）以上、アスパラギン酸では $2.0 \mu\text{mol/g}$ 湿重量（コントロールの 0.6 倍）以下と考えられたが、VPA による脳内 GABA

濃度の増加は $3.0 \mu\text{mol/g}$ 湿重量以下であった。以上より、VPA 約 250 mg/kg 注射時の E1-マウスの発作抑制作用は、脳内 GABA 濃度増加によるよりも、アスパラギン酸減少作用がより重要な因子と考えた。

謝 辞

稿を終るに当り、御校閲を賜りました恩師谷口昂教授に深謝いたします。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 E1-マウスの入手に御協力下さいました田辺製薬KKの藤沢慶夫殿、又、VPAの原末を提供して下さいましたカネボウ薬品KKに御礼申し上げます。

なお本論文の要旨は、第 21 回日本神経化学会にて発表した。

文 献

- 1) Meunier, H., Carraz, G., Menuier, Y., Eymard, P. & Amiard, M.: Proprietes Pharmacodynamiques de l'acide n-dipropylacetique. *Therapie*, **18**, 435-538 (1963).
- 2) Haigh, D. & Forysthe, W. I.: The treatment of childhood epilepsy with sodium valproate. *Develop. Med Child Neurol.*, **17**, 743-748 (1975).
- 3) Lance, J. W., Anthony, M.: Sodium valproate and clonazepam in the treatment of intractable epilepsy. *Arch. Neurol.*, **34**, 14-17 (1977).
- 4) Sherard, E. S. Jr., Steiman, G. S. & Couri, D.: Treatment of childhood epilepsy with valproic acid: Results of the first 100 patients in a 6 month trial. *Neurology*, **30**, 31-35 (1980).
- 5) Pavone, L., Incorpora, G., Rosa, M. L., Volti, S. L., Mollica, F.: Treatment of infantile spasms with sodium dipropylacetic acid. *Develop. Med Child Neurol.*, **23**, 454-461 (1981).
- 6) Bachman, D. S.: Use of valproic acid in treatment of infantile spasms. *Child Neurology*, **39**, 49-52 (1982).
- 7) Godin, Y., Heiner, L., Mark, J. & Mandel, P.: Effects of n-propylacetate, an anticonvulsive compound, on GABA metabolism. *J. Neurochem.* **16**, 869-873 (1969).
- 8) Kukino, K. & Deguchi, T.: Effects of sodium dipropylacetate on γ -aminobutyric acid and biogenic amines in rat brain. *Chem. Pharm. Bull.* **25** (9), 2259-2262 (1977).
- 9) 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).
- 10) 今泉清・伊藤昭吾・沓掛源次郎・滝沢隆安・藤原公策・土川清: マウスのてんかん様異常について。実験動物, **8** (8), 6-10 (1959).
- 11) Baxter, C. F. & Roberts, E.: Elevation of γ -aminobutyric acid in brain: Selective inhibition of γ -aminobutyric- α -ketoglutaric acid transaminase. *J. Biol. Chem.* **236**, 3287-3294 (1961).
- 12) 加藤尚彦: アミノ酸伝達候補物質の微量測定法, 神経伝達物質測定法マニュアル(森昭胤編)第1版 146-172, 医歯薬出版, 東京(1979).
- 13) Graham, L. H. Jr. & Aprison, M. H.: Fluorometric determination of aspartate, glutamate and γ -aminobutyrate in nerve tissue using enzymic methods. *Analytical Biochemistry* **15**, 487-497 (1966).
- 14) 高垣玄吉郎: 脳のアミノ酸濃度, 神経化学 I, 74, 共立出版株式会社, 東京(1981).
- 15) Horton, R. W., Anlezark, G. M., Sawayama, M. C. V. B. & Meldrum, B. S.: Monoamine and GABA metabolism and the anticonvulsant action of di-n-propylacetate and etanolamine-O-sulphate. *Eur. J. Pharmacol.*, **41**, 387-397 (1977).
- 16) Ciesielski, L., Maitre, M., Cash, C. & Mandel, P.: Regional distribution in brain and effect on cerebral mitochondrial respiration of the anticonvulsive drug n-dipropylacetate. *Biochem. Pharmacol.*, **24**, 1055-1058 (1975).
- 17) 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. Pharmacol.*, **22**, 1701-1708 (1973).
- 18) Harvey, P. K. P., Bradford, H. F. & Davison, A. N.: The inhibitory effect of sodium n-dipropylacetate on the degradative enzymes of the GABA shunt. *FEBS Lett.*, **52**, 251-254 (1975).
- 19) Anlezark, G. M., Horton, R. W., Meldrum, B. S., Sawayama, M. C. B. & Stepheson, J. D.: γ -Aminobutyric acid metabolism and the anticonvulsant action of etanolamine-O-sulfate and di-n-propylacetate. *Br. J. Pharmacol.* **56**, 483-384 (1976).
- 20) Anlezark, G., Horton, R. W., Meldrum, B. S. & Sawayama, M. C. B.: Anticonvulsant action of etanolamine-O-sulfate and di-n-propylacetate

and the metabolism of γ -aminobutyric acid (GABA) in mice with audiogenic seizures. *Biochem. Pharmacol.*, **25**, 413-417 (1976).

21) Fowler, L. J., Beckford, F. & John, R. A., : An analysis of the kinetics of the inhibition of rabbit brain γ -aminobutyrate aminotransferase by sodium n-dipropylacetate and some other simple carboxylic acid. *Biochem. Pharmacol.*, **24**, 1267-1270 (1975).

22) Löscher, W. & Fery, H. H. : Zum Wirkungsmechanismus von Valproinsure. *Arzneim. Forsch.*, **27**, 1081-1082 (1977).

23) 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).

24) Aird, R. B. & Woodbury, D. M. : The management of epilepsy., C. C. Thomas, Spring-

field, III, 162-165 (1974).

25) 竹内直司 : E1-マウスの痙攣素因ならびに痙攣発作時における脳遊離アミノ酸値の変動に関する研究. *大阪大学医学部雑誌*, **20**, 387-398 (1968).

26) 森昭胤・平松緑 : 生理活性アミンとけいれん-特にE1-マウスのけいれんに関して-. *蛋白質核酸酵素*, **26**, 1819-1823 (1981).

27) Horton, R. W., Anlezark, G. M., Sawayama, M. C. B. & Meldrum, B. S. : Monoamine and GABA metabolism and anticonvulsant action of di-n-propylacetate and etanolamine-O-sulphate. *Eur. J. Pharmacol.* **41**, 387-397 (1977).

28) Weitz, R., Merlob, P., Amir, J. & Reisner, S. H. : A possible role for aspartic acid in neonatal seizures. *Arch. Neurol.* **38**, 258-259 (1981).

29) 君島健次郎 : Depakene (sodium valproate)の薬理作用, Depakeneの基礎と臨床, 1-16,株式会社協和企画, 東京(1981).

Effects of Valproic acid on Seizure Thresholds and Concentrations of γ -Amino butyric acid, Aspartic acid and Glutamic acid in El mouse Yuichi Murata, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 - *J. Jupun Med. Soc.*, **92**, 413-422 (1983)

Key words: El mouse, Aspartic acid, γ -Aminobutyric acid, Valproic acid

Abstract

In order to elucidate the mechanism of anticonvulsant action of valproic acid (VPA), the effect of VPA on brain levels of γ -aminobutyric acid (GABA), aspartic acid and glutamic acid was studied using a convulsive strain of the El mouse. In the control experiments, the effect of amino-oxyacetic acid (AOAA), which is known to act as an anticonvulsant by increasing the intracerebral concentrations of GABA, was also evaluated. The convulsive response of El mice, 12 to 14 weeks old, was inducible by means of postural stimulation unbalancing them, i.e., throwing the mouse up in the air 15 to 20 cm several times. Evaluation of such a response to throwing maneuver and determination of brain GABA, aspartic acid or glutamic acid in the brain were performed sequentially after the intraperitoneal injection of 250 mg/kg VPA or 20 mg/kg AOAA. The whole brain except cerebellum was frozen in liquid nitrogen and rapidly dissected out before the thaw set in. The concentrations of GABA, aspartic acid and glutamic acid were determined by the use of enzymic methods.

The administration of VPA (250 mg/kg) protected El mice from the occurrence of throwing-induced seizures throughout 15 to 90 min after the injection. During this seizure-free period, brain concentrations of aspartic acid were maintained at decreased levels ($<2.0 \mu\text{mol/g}$ wet weight). In contrast, GABA concentrations in the brain showed no appreciable changes approximately 15 min after the VPA administration, but increased to the peak levels, though less than

3 $\mu\text{mol/g}$ of wet weight, 30 min after the Both levels of aspartic acid and GABA in the brain returned to pretreatment levels, about 3.3 and 2.2 $\mu\text{mol/g}$ of wet weight, respectively, within 6 hr of the VPA injection. However, VPA administration did not cause any significant changes in brain glutamic acid. The occurrence of throwing-induced seizures was completely inhibited 90 min to 6 hr after the administration of AOAA (20 mg/kg). During this period, only an increases in brain levels of GABA ($>4 \mu\text{mol/g}$ of wet weight) was noted.

The results indicated that the intracerebral concentrations which appeared to be necessary for seizure protection in El mice were more than 4.0 $\mu\text{mol/g}$ of wet weight ($\sim 1.6 \text{ X}$ of pretreatment values) for GABA and less than 2.0 $\mu\text{mol/g}$ of wet brain weight ($\sim 0.6 \text{ X}$ pretreatment values) for aspartic acid. From these experimental findings, it was speculated that inhibition of El mouse's seizures by VPA administration might largely be mediated by the decrease of aspartic acid brain concentrations rather than the elevation of intracerebral concentrations of GABA.