

# ヒト髄液中のグアニジノ化合物に関する研究 —特にてんかん患者について—

岡山大学医学部脳代謝研究施設機能生化学部門（指導：森 昭胤教授）

藤 本 昇

（昭和58年11月29日受稿）

**Key words** : グアニジノ化合物,  
髄液, てんかん,  
グアニジノエタンスルホン酸

## 緒 言

1967年, Moriら<sup>1,2)</sup>は, pentylentetrazol をウサギに投与して痙攣を誘発させ, 痙攣直前あるいは, 痙攣中に大脳を摘出し, その抽出液中に,  $\gamma$ -guanidinobutyric acid (GBA)が増加すること, また GBA をウサギ大槽内に投与すると痙攣を誘発する作用のあることを報告した<sup>3)</sup>. 以来, グアニジン基を有する化合物の痙攣誘発作用に関する報告は数多い. 動物生体内に存在することが知られているグアニジノ化合物のうち, guanidinoethanesulfonic acid (GES)<sup>4-6)</sup>, guanidinoacetic acid (GAA)<sup>7)</sup>, creatine<sup>7)</sup>, creatinine (CRN)<sup>7)</sup>, creatinephosphate<sup>7)</sup>, N-acetylguanidine (NAA)<sup>8)</sup>, methylguanidine (MG)<sup>9)</sup>,  $\alpha$ -guanidinoglutaric acid (GGA)<sup>10,11)</sup>, homo-arginine (HArg)<sup>12)</sup> を動物の脳室内, 大槽内, あるいは感覚運動領野に投与すると, 同様な痙攣, 異常興奮を誘発することが示され, 中枢神経系での異常興奮に際して, グアニジノ化合物が, 何らかの役割を担っている可能性が示唆された.

ヒトのてんかん痙攣発作は, 大脳灰白質の局所に突発する異常な過剰放電に起因しているが, この過剰放電がどのような機序で発生するかを解明するため, 電気生理学的に, あるいは生化学的に, 多くの研究がなされている. てんかん患者におけるグアニジノ化合物の研究も, その最初は40年以上も前に溯り, 1940年, Murrayら<sup>13)</sup>は potassium ferricyanide を用いた呈色

反応により, 大発作型てんかん患者血中で, guanidine-like substancesが多いこと, 発作直前には, それが増加し, 痙攣中は最大に達することを報告している. その後, Palmerら<sup>14)</sup>が同様な検索を行い, 間歇期の値は正常範囲内にあるとしている. また, Plum<sup>15)</sup>は, 種々グアニジノ化合物の生成に関与していると考えられる arginine (Arg) のクリアランスが, てんかん患者で増加していることを報告した. しかし, 血清中にみられるその他のグアニジノ化合物には, 対照群に比べ, 差のなかったことを報告している<sup>16)</sup>. 一方, てんかん患者と髄液中のグアニジノ化合物に関しては, 戴<sup>17)</sup>の報告があるのみで, 戴は, 坂口反応を回路に組み込んだ液体クロマトグラフィーを用いて, ヒト髄液中に Arg, GES の2種類のグアニジノ化合物を検出し, さらに, てんかん患者では GES が減少していることを報告している.

このように, グアニジノ化合物とてんかんに関して, いくつかの検討がなされているが, 1966年, Yamadaら<sup>18)</sup>が一置換グアニジノ化合物の蛍光発色試薬として, phenanthrenequinone (PQ) が有用であることを見出し, 近年の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析の発達と相まって, 多種類のグアニジノ化合物を連続して, しかも高感度で短時間に分析することが可能になった<sup>19)</sup>. そこで, 今回, ヒト髄液中のグアニジノ化合物について, 総合的に検討し, さらに, てんかん患者髄液について分析したところ, 戴の報告とは異なり, 非神経系疾患患者では GES

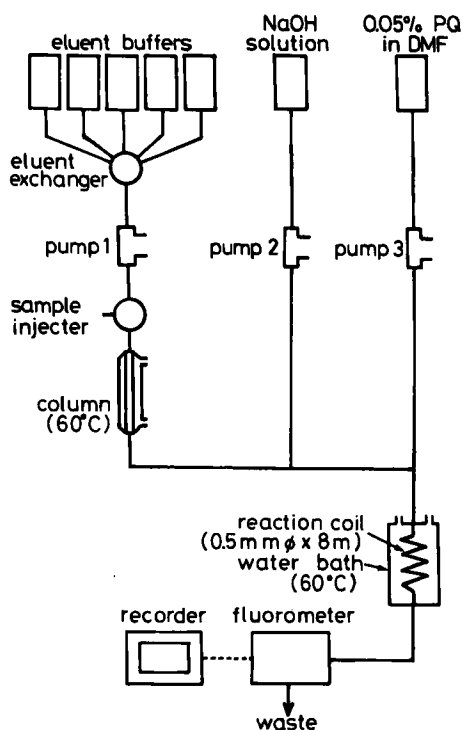


Fig. 1 Flow diagram of guanidino compound analyser.

は検出されず、てんかん患者で、GES が著明に増加しているもののあることを見出した。

### 実験方法

#### 1) グアニジノ化合物の定量分析法

陽イオン交換樹脂を用いた HPLC による方法で、グアニジノ化合物の検出のために、PQ 反応<sup>18,20)</sup>を回路に組み込んだ自動分析装置 (JASCO G-520, 日本分光工業株式会社) を用いた。グアニジノ化合物分析装置の流路構成図を Fig. 1 に示した。グアニジノ化合物の分離には、強酸性陽イオン交換樹脂 ( $-\text{SO}_3^-$ ) を充填したカラムを用いた。樹脂の粒径は  $11.5 \mu\text{m}$ 、架橋度 (divinylbenzene) は 10% である。カラムに吸着したグアニジノ化合物を stepwise pH gradient buffer で順次溶出分離し、溶出液を 2M-NaOH でアルカリ性にし、0.05% PQ/dimethylformamide (DMF) 溶液と混合し、 $60^\circ\text{C}$  で反応させた後、反応生成物を蛍光検出する。検出には JASCO FP-100B 蛍光光度計 (日本分光工業株式会社) を用い、 $E_x = 365$ ,  $E_m > 460\text{nm}$  で行った。試料注入量は  $200 \mu\text{l}$  である。その他

Table 1. Conditions of guanidino compound analysis

	System 1	System 2
Column	Finepak GEL-220(JASCO) $\phi 3.0 \times 150 \text{ mm}$	Guanidinopak(JASCO) $\phi 4.6 \times 125 \text{ mm}$
Column temperature	$60^\circ\text{C}$	$60^\circ\text{C}$
Mobile phase	0.2M-sodium citrate buffers and 0.6M-sodium hydroxide 1) pH3.0, 35min before sampling 5min after sampling 2) pH3.3, 25min 3) pH4.9, 25min 4) pH10.0, 35min 5) 0.6M-NaOH, 25min (total 150min)	0.4M-sodium citrate buffers and 1.0M-sodium hydroxide 1) pH3.0, 20min before sampling 2) pH3.5, 10min' after sampling 3) pH5.25, 10min 4) pH10.0, 15min 5) 1.0M-NaOH, 10min (total 65min)
Flow rate		
Mobile phase	0.4 ml/min	1.0 ml/min
Analytical reagent		
2M-NaOH	0.2 ml/min	0.5 ml/min
PQ in DMF	0.2 ml/min	0.5 ml/min
Reaction temperature	$60^\circ\text{C}$	$60^\circ\text{C}$

の分析条件は、Table 1 に示したように2種類のシステムによる。両分析条件では、各々のグアニジノ化合物の保持時間が変わるのみで、感度、直線性、再現性に差異は認められなかった。システム1においては1検体の分析に要する時間が150分であるが、システム2では65分となり、分析時間の大幅な短縮がなされた。

グアニジノ化合物の標準試料には、GES, guanidinosuccinic acid (GSA), GGA, GAA, NAA,  $\beta$ -guanidinopropionic acid (GPA), CRN, GBA, Arg, HArg, guanidine (G), MG を希塩酸(pH 2.2) に溶解して用いた。これらグアニジノ化合物の検出限界は、GGA, CRN, GBA, HArg, G を除くと、0.1 nmol/ml 以下であり、前記5種の化合物も2.0 nmol/ml 以下である。直線性、再現性については、すでに報告した<sup>21)</sup>。各グアニジノ化合物の定量は、peak の高さから、比例計算により算出した。

## 2) 髄液試料

髄液は、非神経系疾患患者(腰痛症等の整形外科患者)76例、てんかん患者 primary generalized epilepsies 22例 (generalized tonic-clonic epilepsies 21例, massive myoclonic epilepsy 1例) から、腰椎穿刺により採取した。非神経系疾患患者は男性54例(16—75才)、女性22例(22—64才)であった。てんかん患者は、男性12例(28—56才)、女性10例(19—67才)であった。また非神経系疾患患者4例、てんかん患者2例からは、髄液5 ml ずつを続けて3回採取し、グアニジノ化合物の髄液濃度勾配を検討した。最初に得られた髄液5 ml を第1分画とし、次の5 ml を第2分画、最後の5 ml を第3分画とした。

## 3) 髄液の前処理方法

髄液は1N-塩酸でpHを2.0—2.2に調整したのち、限外濾過膜 Amicon Centriflo CF 25(Amicon Corp., MA) を用いて、800×g, 0°C で20分間遠心を行い、得られた濾液を分析試料とした。なお試料の保存は-20°Cで行った。この操作によるグアニジノ化合物の回収率は、Table 2 に示したように、個々のグアニジノ化合物で多少差があり、80—101%であった。

## 4) グアニジノ化合物の髄液—血清—尿関連の検討

Table 2. Recovery studies of guanidino compounds added to cerebrospinal fluid (CSF)

Guanidino compounds added to 1 ml of CSF (nmol)	Recovery % mean $\pm$ S.D. (n=3)	
GES	7.5	97 $\pm$ 4
GSA	10.0	93 $\pm$ 3
GGA	5.0	88 $\pm$ 0
GAA	5.0	94 $\pm$ 3
NAA	0.75	80 $\pm$ 13
GPA	5.0	91 $\pm$ 2
CRN	50.0	93 $\pm$ 3
GBA	10.0	88 $\pm$ 3
Arg	20.0	98 $\pm$ 8
HArg	2.5	101 $\pm$ 11
G	20.0	92 $\pm$ 4
MG	5.0	98 $\pm$ 2

非神経系疾患患者18例から、髄液及び血液をほぼ同じ時間に採取し、また、これらを採取した同じ日の24時間尿を得、髄液、血清中のグアニジノ化合物濃度、及び、尿中排泄量に相関があるかどうかを検討した。血液は採血後直ちに血清を分離し、0.1 N-塩酸でpHを2.0—2.2に調整したのち限外濾過を行った。尿は24時間尿の一部を1N-塩酸でpH 2.0—2.2に調整し、希塩酸(pH 2.2)で20倍希釈したのち限外濾過を行った。限外濾過の条件は髄液の場合と同じである。これらの濾液について分析を行った。

## 5) 髄液中GESの高圧濾紙電気泳動による確認

非神経系疾患患者及びてんかん患者髄液をプールし、それぞれ4 ml について、上記方法で限外濾過を行い、これら濾液について次の処理を行った。まず Amberlite CG-120 (H<sup>+</sup>)カラムに通し、その流出液及び水で溶出される部分を、さらに Dowex 2×8 (HCOO<sup>-</sup>)カラムに通した。その流出液及び水で溶出される部分を凍結乾燥したのち、残渣を少量の水に溶解し、濾紙(Toyo No. 51, 東洋科学産業株式会社)上に塗布し、高圧濾紙電気泳動を行った。高圧濾紙電気泳動には東洋製作所製電気泳動槽 model HPE-V 及び直流発生装置 model V-IV を用いた。泳動溶媒としては0.6 N 蟻酸—2N 酢酸(1:1)混液(pH 1.9)を用い、電圧300 V/cm で180分間泳動を行った。GES の検出には、0.2% PQ/ethanol

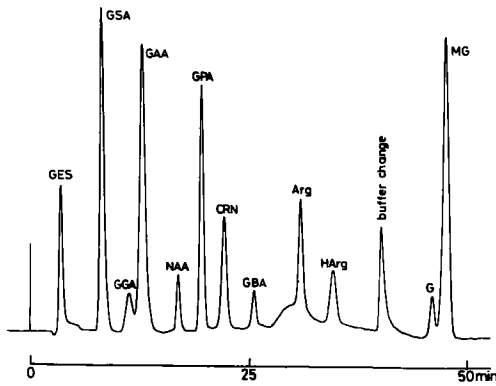


Fig. 2 Chromatogram of a standard mixture of guanidino compounds.

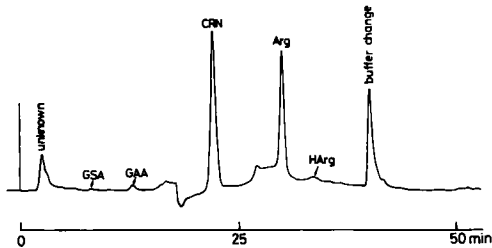


Fig. 3 Chromatogram of guanidino compounds in CSF of non-neurological patient.

トグラム (分析条件システム 2 による) を示した。標準溶液中には GES (10  $\mu$ M), GSA (10  $\mu$ M), GGA (20  $\mu$ M), GAA (5  $\mu$ M), NAA (3  $\mu$ M), GPA (5  $\mu$ M), CRN (50  $\mu$ M), GBA (10  $\mu$ M), Arg (20  $\mu$ M), HArg (10  $\mu$ M), G (20  $\mu$ M), MG (5  $\mu$ M) が含まれている。

Fig. 3 に髄液を分析して得られたクロマトグラムを示した。Arg, CRN の他、微量ながら、HArg, GAA, GSA が検出された。非神経系疾患患者髄液中グアニジノ化合物濃度を、Table 3 に示したが、CRN が最も多く、次いで Arg, HArg であった。また GAA は 76 例中 51 例に、GSA は 27 例に検出された。これらの測定値には性差は認められなかった。

CRN, Arg, HArg について、性別に、年齢との相関を検討した (Fig. 4)。CRN は男性では年齢との相関は認められなかったが、女性では、加齢に従い、髄液中 CRN が増加していた。Arg は男女いずれにも、年齢との正の相関が認められ、男性では相関係数  $r = 0.2739$  ( $p < 0.05$ ,  $n = 54$ )、女性では  $r = 0.4609$  ( $p < 0.05$ ,  $n = 22$ ) で女性の方が相関は強かった。HArg については男女とも加齢による変化はなかった。

## 2) 非神経系疾患患者グアニジノ化合物の髄液—血清—尿相関

Table 3. Guanidino compounds in human CSF of non-neurological patients

Sex	Male	Female	Total
N	54	22	76
Age (years)	16—75	22—64	16—75
GES	N.D.	N.D.	N.D.
GSA	N.D.— 0.2	N.D.— 0.2	N.D.— 0.2
GAA	N.D.— 0.2	N.D.— 0.2	N.D.— 0.2
CRN	66.4 $\pm$ 12.8	64.8 $\pm$ 13.9	65.9 $\pm$ 13.1
Arg	24.5 $\pm$ 6.4	23.6 $\pm$ 4.9	24.2 $\pm$ 6.0
HArg	0.6 $\pm$ 0.4	0.6 $\pm$ 0.3	0.6 $\pm$ 0.3

Unit : nmol/ml (mean  $\pm$  S.D.), N.D. : not detected.

溶液及び、10%水酸化ナトリウム/60% ethanol 溶液の等量混液を噴霧し、風乾後、蛍光を検出した。

## 実験成績

1) 非神経系疾患患者髄液中のグアニジノ化合物  
Fig. 2 にグアニジノ化合物標準試料のクロマ

非神経系疾患患者 18 例についての、髄液—血清—尿相関は Fig. 5 にまとめて示した。GSA については、髄液で 18 例中 8 例が検出されなかったもので、血清—尿相関のみを示した。髄液—血清では、いずれのグアニジノ化合物もその濃度に相関はみられなかった。血清—尿では、Arg 及び HArg に正の相関関係が認められた。

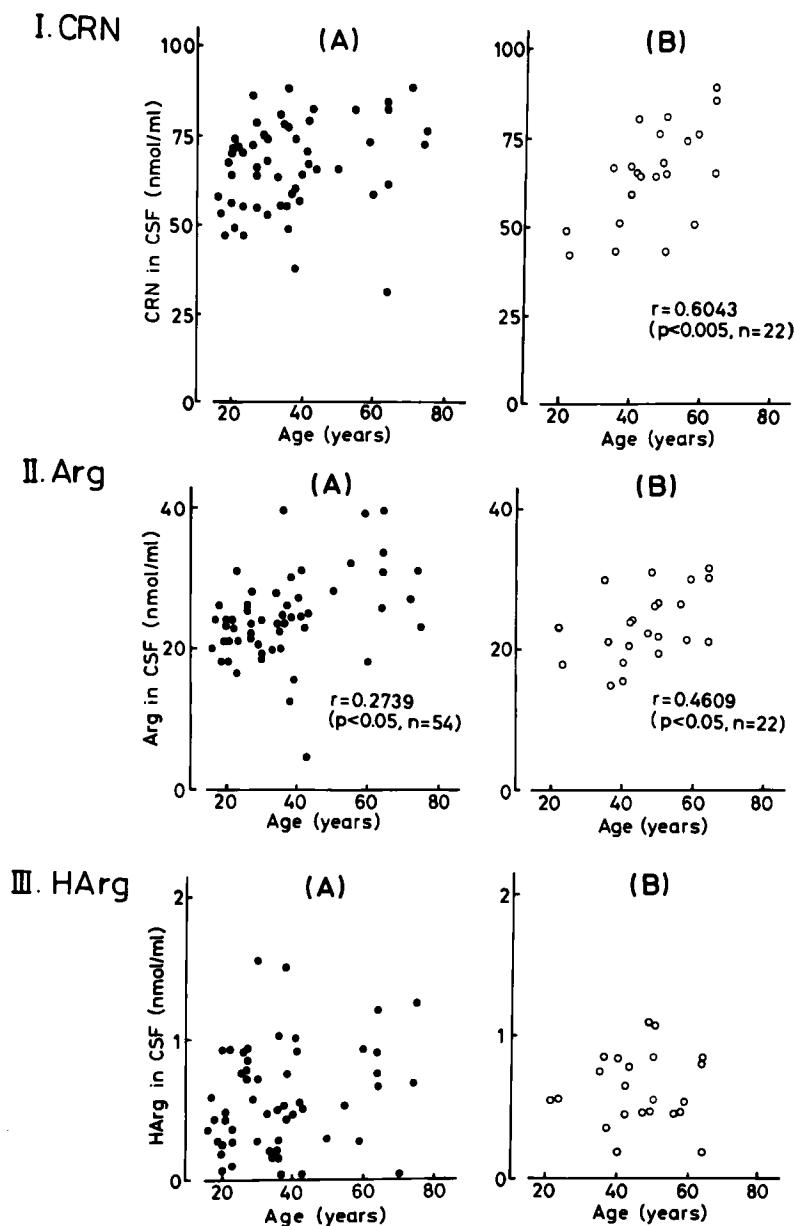


Fig. 4 Correlation between guanidino compound levels in CSF and age. (A) male subjects, (B) female subjects.

髄液一尿では、HArg に正の相関、CRN に負の相関が認められた。

3) てんかん患者髄液中のグアニジノ化合物

てんかん患者髄液中のグアニジノ化合物濃度は Table 4 に示したように Arg, CRN, HArg, GSA, GAA が非神経系疾患患者と同様に検出

された他、非神経系疾患患者では検出されなかった GES と一致するピークが検出されるものがあった。てんかん患者髄液中グアニジノ化合物のクロマトグラムを Fig. 6 に示したがチャートの最初にみられる unknown peak の直後の peak は完全に GES 標品と一致した (Fig. 7)。GES

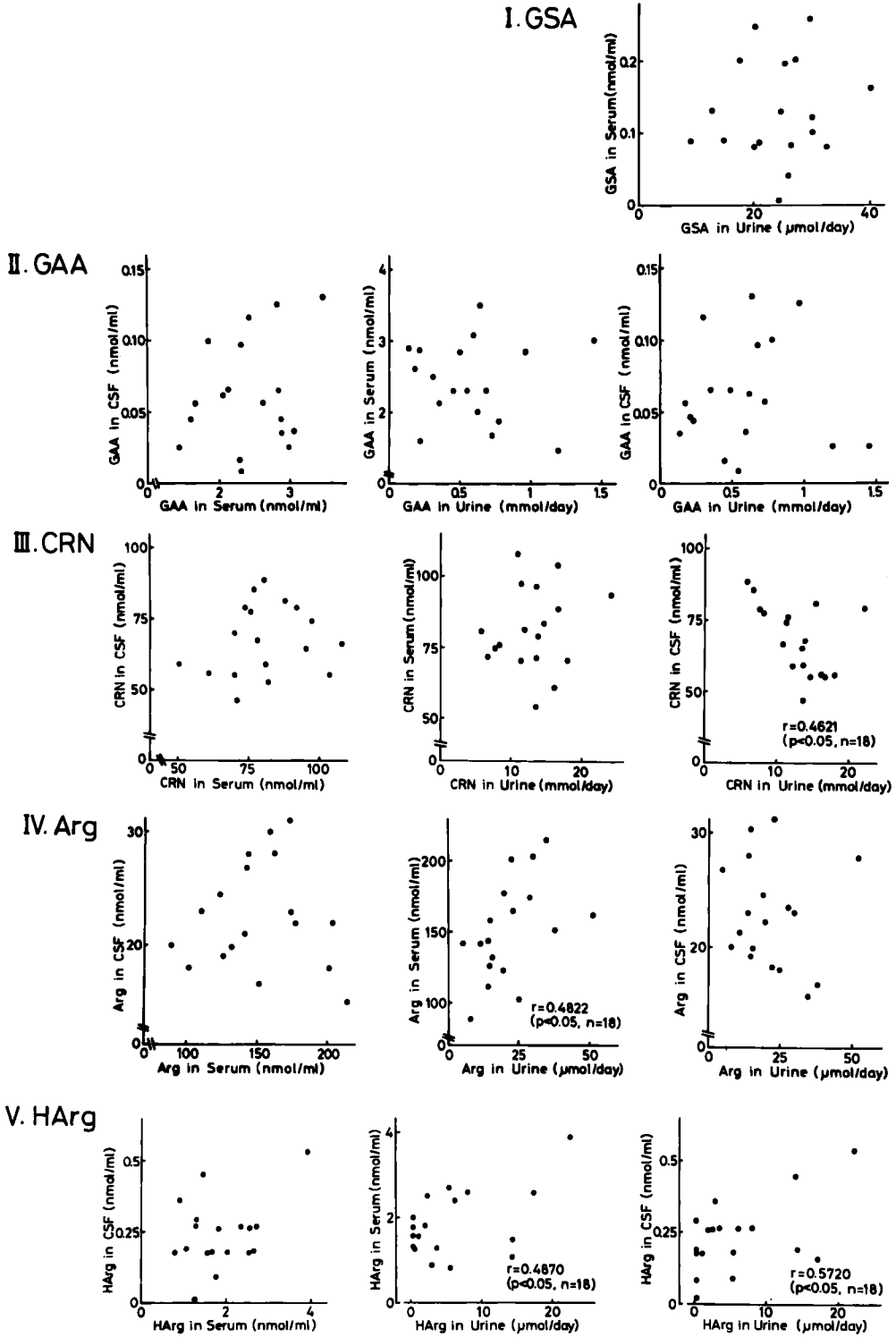


Fig. 5 Correlation among guanidino compound levels in CSF, serum and urine.

Table 4. Guanidino compounds in CSF of epileptic patients

N	22
Age(years)	19 — 67
GES	N.D. — 50.8
GSA	N.D. — 0.1
GAA	N.D. — 0.1
CRN	67.1 ± 20.0
Arg	25.3 ± 5.2
HArg	0.4 ± 0.3

Unit : nmol/l (mean ± S.D.)

N.D. : not detected

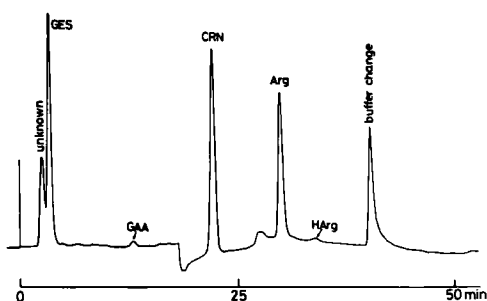


Fig. 6 Chromatogram of guanidino compounds in CSF of epileptic patient.

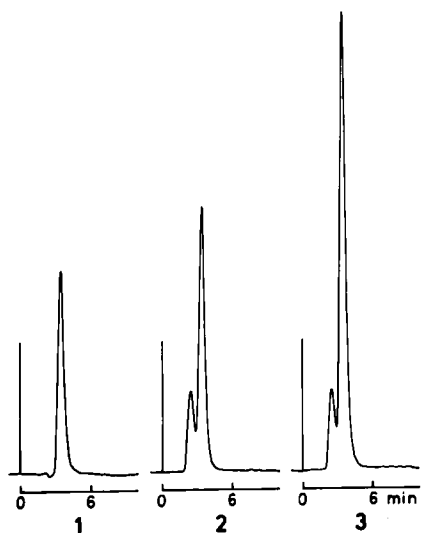


Fig. 7 Chromatogram of authentic GES and GES in CSF of epileptic patient.

1. authentic GES
2. CSF of epileptic patient
3. authentic GES + CSF of epileptic patient

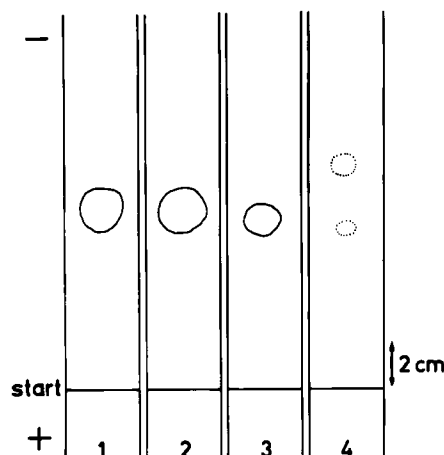


Fig. 8 High voltage paper electrophoresis of GES.

1. authentic GES
2. authentic GES + CSF of epileptic patients
3. CSF of epileptic patients
4. CSF of non-neurological patients

の検出されたものは22例中13例であり、その測定値はばらつきが大きく、最高値は50.8 nmol/mlであり、13例の平均をとると10.1 nmol/mlであった。GESの検出されたものは、全て generalized tonic-clonic epilepsies であり、GESの検出されなかったものに、massive myoclonic epilepsy 1例が含まれていた。

4) 髄液中GESの高圧紙電気泳動による確認  
てんかん患者髄液で、HPLCチャート上GESと一致するピークを高圧紙電気泳動法により確認したところ、てんかん患者髄液では、陰極側に7.5cm移動した位置に、GES標品と一致する青白色蛍光を発するスポットが得られた(Fig. 8)。

5) 非神経系疾患患者及びてんかん患者髄液中グアニジノ化合物の濃度勾配

Fig. 9に髄液中グアニジノ化合物の濃度勾配を検討した結果を示した。GSA, GAA, CRN, Arg, HArgについては髄液の濃度勾配は認められなかった。てんかん患者では、GESが、第2分画でやや減少する傾向があるが、第3分画で著明な増加が認められた。また非神経系疾患患者で、第2分画でGESが検出されたものが1例あった。

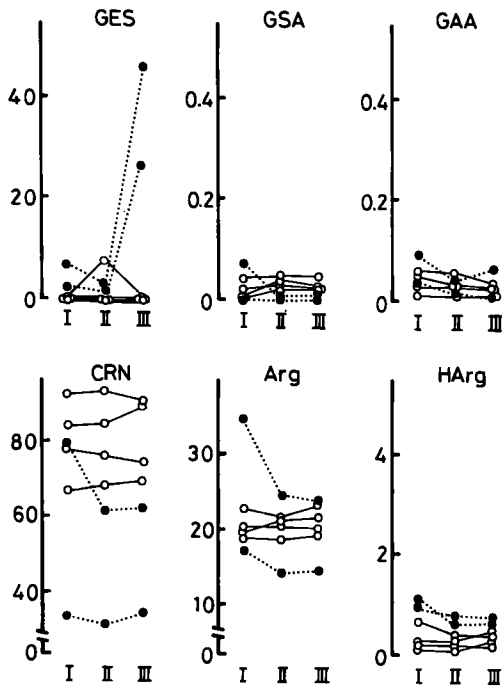


Fig. 9 Concentration gradients of guanidino compounds in CSF. Ordinate represents the guanidino compound levels (nmol/ml). I: the first fraction, II: the second fraction, III: the third fraction. (●) epileptic patient, (○) non-neurological patient.

### 考 按

Bonas ら<sup>22,23</sup>が尿毒症患者尿中に、GSA が増加していることを見出し、グアニジノ化合物が窒素代謝に関連して重要な役割を担っていることが証明されて以来、腎不全あるいはウレアサイクル疾患と関連して、ヒトの尿及び血液中のグアニジノ化合物に関する報告は多い。しかし、髄液中のグアニジノ化合物についての報告は少なく、特に神経疾患と関連しては、戴<sup>17</sup>の報告があるのみである。戴はグアニジノ化合物の検出に坂口反応を用いた液体クロマトグラフィーにより分析を行っており、Arg の他、GES を検出している。Arg の測定値は今回の測定値とほぼ一致しているが GES は正常コントロール群で、数 nmol/ml とし、さらにてんかん患者、脳腫瘍、精神分裂病患者では GES が減少していることを報告している。今回用いた PQ 蛍光法に

よる HPLC は、坂口反応比色法に比べ、50 倍以上の感度が得られており、戴の報告している濃度で GES が存在するならば、十分検出可能であるはずだが、今回非神経系疾患患者では、GES は検出されず、てんかん患者 13 例で GES に一致するピークが検出された。この戴の成績との相違が何に起因するものであるかは明らかでないが、PQ 法を用いた分析チャート上でも、GES の直前に、非特異的な物質によると思われるピークが出現しており、このように、イオン交換カラムと step-wise gradient 溶媒を用いた分析法の場合、最初に溶出される部位や、溶媒が切り変わる部位で、分析チャート上に、非特異的なピーク、あるいは幾種類かの物質によるピークが重なって出現しやすく、ピークを読み誤まる危険が考えられる。そこで著者は、非神経系疾患患者及び HPLC で GES に一致するピークの認められたてんかん患者髄液について、さらに高圧紙電気泳動法を用いて確認したところ、てんかん患者では、GES 標品に一致する位置に強い蛍光を認めた。

また、PQ 蛍光検出により測定感度が上昇したことにより、Arg, CRN の他、微量成分として、HArg, GAA, GSA が髄液中に存在することが明らかとなった。

これら、グアニジノ化合物について、髄液—血清—尿相関を検討したところ、血清—尿では、Arg 及び HArg に正の相関関係が認められ、血中濃度と排泄量に関連のあることが示唆されたが、髄液濃度と血清濃度には全く相関関係が認められなかった。髄液—尿で HArg, CRN に相関が認められたが、これらの物質に、髄液—血清濃度には相関がないことから、有意なものとは思われない。

髄液—血清で、グアニジノ化合物濃度に全く相関が認められなかったことは、一般にグアニジノ化合物が血液—脳関門を通過しにくいと考えられていることとよく一致する。進藤<sup>24</sup>は <sup>15</sup>N-Arg をマウス腹腔内に投与すると、10 分後に脳 Arg に <sup>15</sup>N が取り込まれるが、肝や腎に比べると遅れており、また脳への Arg の取り込みは、血液—脳関門に carrier を介した能動輸送系が知られていることから、脳内への取り込



みが制御されていることを示唆している。哺乳動物脳内にその存在が知られているグアニジノ化合物としては、Arg, CRN, creatine の他、GAA, GES, GBA, NAA, HArg, GSA, GGA があるが<sup>25,26)</sup>その由来は明らかでない。すなわち、グアニジノ化合物の代謝については、肝、腎ではかなり研究されているが<sup>27-31)</sup>脳内の代謝については全くわかっていないのが現状である。しかし脳内にもウレアサイクル酵素である argininosuccinic acid synthetase, argininosuccinase 活性が証明されており<sup>32)</sup>、また活性は低い、transamidinase も脳内に存在することが報告され、GAA, GBA の生成が示されている<sup>33)</sup>。このように脳内でもグアニジノ化合物の生合成が行われていることは考えられる。しかし、髄液中に測定されるグアニジノ化合物が、血液由来のものであるか、脳代謝の結果であるのか、あるいは、その両方によるものであるのか、現在のところでは明らかでない。

髄液中の物質には、濃度勾配のあることが知られている<sup>34)</sup>。そこで、グアニジノ化合物についても濃度勾配を検討したが、Arg, CRN, GSA, GAA, HArg については、濃度勾配は認められなかった。しかし、てんかん患者髄液の GES は、第2分画でやや減少していたが、第3分画で急激に増加していることが示された。GES については、他のグアニジノ化合物に比べ、脳内変化が活発に行われている可能性が考えられる。また、非神経系疾患患者1例では、第2分画に GES が検出されるものがあり、正常状態でも GES の存在する可能性が示唆され、今後、さらに検討が必要と思われる。

GES の生合成については、Robin<sup>35)</sup> は、無脊椎動物で、Arg の amidine 基が、hypotaurine に transamidination され、さらに酸化されて、GES が生成されるものと推定している。片山ら<sup>36)</sup> は、guanidino-<sup>14</sup>C-arginine をマウスに投与し、脳及び腎の GES 分画に放射能を検出したこと、腎より精製した transamidinase により、Arg と taurine から GES が生成されたことから、Arg-taurine の transamidination 反応を推定している。しかし、マウス脳より抽出した transamidinase を用いた実験では GES の生成を認めな

かった<sup>37)</sup>。このように、GES の生合成については問題点も多いが、Monaco ら<sup>38)</sup>は、てんかん患者血中の taurine が増加していることを報告しており、脳内においても、アミノ酸平衡、及びそれらの代謝に変化が occuri、GES の生成が促進される可能性も考えうる。

GES はウサギ、ネコの大槽内に投与すると特異な強直性痙攣が誘発され、また脳波記録により海馬に始まる発作波が認められること<sup>4,5)</sup>、この痙攣は抑制性神経伝達物質と考えられている taurine により拮抗されることが報告されている<sup>6)</sup>。GES がてんかんにおいても、その痙攣発現機構に関与している可能性が示唆される。また最近、GES が脳を含む動物組織中の taurine を減少させることが報告され<sup>39,40)</sup>、生体内における taurine-GES の相互作用を示す知見として興味深いものがある。

本研究において、てんかん患者髄液で GES が大量に検出される症例のあることが見出されたが、GES と臨床症状との関連については明らかにすることができず、さらに検討が必要と思われる。

## 結 論

Phenanthrenequinone 蛍光反応を回路に組み込んだグアニジノ化合物自動分析装置を用い髄液中のグアニジノ化合物の定量分析を行い次のような知見を得た。

1. 非神経系疾患患者髄液中には、Arg, CRN の他、微量成分として、HArg, GAA, GSA が検出された。Arg, CRN (女性)、には年齢との正の相関が認められた。
2. 血清—尿では、Arg, HArg 含有量に正の相関関係が認められたが、髄液—血清では、グアニジノ化合物含有量に相関関係は認められなかった。
3. てんかん患者には非神経系疾患患者には認められなかった GES が検出される症例があった。
4. HPLC で観察された GES に一致するピークは、高圧—紙電気泳動法によっても GES であることが確認された。
5. 髄液中の GES には濃度勾配のあることが明らかにされた。

終わりにあたり、終始御懇篤な御指導と御校閲を賜りました森 昭胤教授ならびに、御指導御協力いただきました渡辺洋子助手に深く感謝の意を捧げます。さらに実験遂行にあたり終始快く御協力下さ

いました研究室の皆様にご心から御礼申し上げます。また貴重な髄液試料を提供していただきました河田病院副院長西岡博輔先生、ならびに福山仁風荘病院長末丸紘三先生に厚く御礼申し上げます。

#### 文 献

1. 森 昭胤：痙攣発現機構とアミノ酸，とくに  $\gamma$ -グアニジノ酪酸について。第17回日本医学会講演集 1, 396—400, 1967.
2. Jinnai, D. and Mori, A.:  $\gamma$ -Aminobutyric acid metabolism in seizure mechanism. *Jpn. J. Brain Physiol.* **84**, 15—22, 1967.
3. Jinnai, D., Sawai, A. and Mori, A.:  $\gamma$ -Guanidinobutyric acid as a convulsive substance. *Nature* **212**, 617, 1966.
4. 水野 昇：Taurocyamine 痙攣に関する生理学的ならびに生化学的研究。大阪大学医学雑誌 **23**, 13—20, 1971.
5. Mizuno, A., Mukawa, J., Kobayashi, K. and Mori, A.: Convulsive activity of taurocyamine in cats and rabbits. *IRCS Med. Sci.* **3**, 385, 1975.
6. Mori, A., Katayama, Y., Yokoi, I. and Matsumoto, M.: Inhibition of taurocyamine (guanidinotaurine)-induced seizures by taurine. In *The Effects of Taurine on Excitable Tissues*, ed. S.W. Schaffer, S.I. Baskin and J.J. Kocsis, Spectrum Publications, New York, pp.41—48, 1981.
7. Jinnai, D., Mori, A., Mukawa, J., Ohkusu, H., Hosotani, M., Mizuno, A. and Tye, L.C.: Biochemical and physiological studies on guanidino compounds induced convulsion. *Jpn. J. Brain Physiol.* **106**, 3668—3673, 1969.
8. 大楠晴美： $\alpha$ -N-acetyl-L-arginine のウシ脳よりの分離およびその痙攣作用に関する研究。大阪大学医学雑誌 **22**, 49—55, 1970.
9. Matsumoto, M., Kobayashi, K., Kishikawa, H. and Mori, A.: Convulsive activity of methylguanidine in cats and rabbits. *IRCS Med. Sci.* **4**, 65, 1976.
10. 赤木正幸：コバルトてんかん源性焦点組織の  $\alpha$ -guanidinoglutaric acid 及びその他の guanidino 化合物に関する研究。岡山医学会雑誌 **93**, 1105—1119, 1981.
11. Shiraga, H. and Mori, A.: Convulsive activity of  $\alpha$ -guanidinoglutaric acid in rats. *IRCS Med. Sci.* **10**, 855—856, 1982.
12. Yokoi, I., Toma, J. and Mori, A.: Effect of homoarginine on the EEG activity of rat. *Neurosci. Lett. (Supplement)* **13**, S142, 1983.
13. Murray, M. and Hoffmann, C.R.: The occurrence of guanidine-like substances in the blood in essential epilepsy. *J. Lab. Clin. Med.* **25**, 1072—1073, 1940.
14. Palmer, H.D., Mc Nair Scott, D.B. and Elliott, K.A.C.: A note on the blood guanidine level in migraine subjects. *J. Lab. Clin. Med.* **28**, 735—737, 1943.
15. Plum, C.M.: Renal handling of free amino acids in normal adults, in patients with epilepsy, and in patients with Spielmeier-Vogt-Batten disease. *Dan. Med. Bull.* **22**, 194—201, 1975.
16. Plum, C.M.: Studies on the occurrence of guanidino compounds in serum and urine of patients with epilepsy and patients with Spielmeier-Vogt-Batten's syndrome. *Dan. Med. Bull.* **27**, 207—211, 1980.
17. 戴 礼忠：液体クロマト自動分析を用いた guanidino 化合物—新定量法に関する研究。大阪大学医学雑誌 **24**, 229—238, 1972.

18. Yamada, S. and Itano, H.A.: Phenanthrenequinone as an analytical reagent for arginine and other mono-substituted guanidines. *Biochim. Biophys. Acta* **130**, 538—540, 1966.
19. Yamamoto, Y., Saito, A., Manji, T., Nishi, H., Ito, K., Maeda, K., Ohta, K. and Kobayashi, K.: A new automated analytical method for guanidino compounds and their cerebrospinal fluid levels in uremia. *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* **24**, 61—68, 1978.
20. Itano, H.A. and Yamada, S.: 2-Aminophenanthroimidazole, fluorescent product of the reaction of phenanthrenequinone with arginine. *Analytical Biochem.* **48**, 483—490, 1972.
21. Mori, A., Watanabe, Y. and Fujimoto, N.: Fluorometrical analysis of guanidino compounds in human cerebrospinal fluid. *J. Neurochem.* **38**, 448—450, 1982.
22. Bonas, J.E., Cohen, B.D. and Natelson, S.: Separation and estimation of certain guanidino compounds. Application to human urine. *Microchem. J.* **7**, 63—77, 1963.
23. Natelson, S., Stein, I. and Bonas, J.E.: Improvements in the method of separation of guanidino organic acids by column chromatography. Isolation and identification of guanidinosuccinic acid from human urine. *Microchem. J.* **8**, 371—382, 1964.
24. 進藤省一郎: L-[Amidino-<sup>15</sup>N]-arginine のグアニジノ化合物への代謝に関する研究. 岡山医学会雑誌 **95**, 623—635, 1983.
25. 森 昭胤: 天然界における Guanidino 化合物の存在とその測定方法. 臨床化学 **9**, 232—246, 1980.
26. Matsumoto, M., Kishikawa, H. and Mori, A.: Guanidino compounds in the sera of uremic patients and in the sera and brain of experimental uremic rabbits. *Biochem. Med.* **16**, 1—8, 1976.
27. Cohen, B.D., Stein, I.M. and Bonas, J.E.: Guanidinosuccinic aciduria in uremia. A possible alternate pathway for urea synthesis. *Am. J. Med.* **45**, 63—68, 1968.
28. Natelson, S., Koller, A., Tseng, H.-Yu and Dods, R.F.: Canaline carbamoyltransferase in human liver as part of a metabolic cycle in which guanidino compounds are formed. *Clin. Chem.* **23**, 960—966, 1977.
29. Walker, J.B.: Studies on the mechanism of action of kidney transamidinase. *J. Biol. Chem.* **224**, 57—66, 1957.
30. Funahashi, M., Kato, H., Shiosaka, S. and Nakagawa, H.: Formation of arginine and guanidinoacetic acid in the kidney *in vivo*. Their relations with the liver and their regulation. *J. Biochem.* **89**, 1347—1356, 1981.
31. Strandholm, J.J., Buist N.R.M. and Kennaway, N.G.: Homoargininosuccinic acid synthesis by an enzyme from pig kidney. *Biochim. Biophys. Acta* **237**, 293—295, 1971.
32. Kato, H., Oyamada, I., Mizutani-Funahashi, M. and Nakagawa, H.: New radioisotopic assays of argininosuccinate synthetase and argininosuccinase. *J. Biochem.* **79**, 945—953, 1976.
33. 喜多富太郎, 神谷大雄: 脳トランスアミジネースについて—中枢抑制剤の薬理学的研究—IV. 日薬理誌 **58**, 411—416, 1962.
34. 小林清史, 土井 亨: 脳脊髄液におけるホモバニリン酸の濃度勾配. 医学と生物学 **92**, 159—162, 1976.
35. Robin, Y.: Metabolism of arginine in invertebrates: relation to urea cycle and to other guanidine derivatives. In *Urea Cycle Diseases*, ed. A. Lowenthal, A. Mori and B. Marescau. Plenum Press, New York, pp.407—417, 1983.
36. 片山泰人, 進藤省一郎, 沢木 惇, 渡辺洋子, 平松千明, 森 昭胤: Taurocyamine の生合成に関する研究. 含硫アミノ酸 **2**, 297—304, 1979.
37. 進藤省一郎, 沢木 惇, 片山泰人, 平松千明, 中江 勲, 津尾道雄, 森 昭胤: 脳内タウロシアミンの生合成に関する研究. 脳研究会誌 **6**, 78—79, 1980.

38. Monaco, F., Mutani, R., Durelli, L. and Delsedime, M.: Free amino acids in serum of patients with epilepsy: significant increase in taurine. *Epilepsia* **16**, 245—249, 1975.
39. Huxtable, R.J., Laird II, H.E. and Lippincott, S.E.: The transport of taurine in the heart and the rapid depletion of tissue taurine content by guanidinoethyl sulfonate. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **211**, 465—471, 1979.
40. Huxtable, R.J. and Lippincott, S.E.: Comparative metabolism and taurine-depleting effects of guanidinoethanesulfonate in cats, mice and guinea pigs. *Arch. Biochem. Biophys.* **210**, 698—709, 1981.

**Analysis of guanidino compounds in human cerebrospinal fluid.  
— Guanidinoethanesulfonic acid is observed in some epileptics—**

**Noboru FUJIMOTO**

**Department of Neurochemistry, Institute for Neurobiology,  
Okayama University Medical School, Okayama 700, Japan**

Guanidino compounds in cerebrospinal fluid (CSF) of nonneurological and epileptic patients were investigated. After separating using high performance liquid chromatography, and reacting with phenanthrenequinone, the compounds were analyzed fluorometrically.

Arginine (Arg), creatinine (CRN) and homoarginine (HArg) were found in all subjects. Trace amounts of guanidinosuccinic acid (GSA) and guanidinoacetic acid (GAA) were detected in some subjects regardless of disease state. Positive correlations were noted in females between Arg and CRN levels and age. Serum Arg and HArg levels were related to in urine concentrations, but there was no association between CSF guanidino compound levels and serum levels.

Guanidinoethanesulfonic acid (GES) was detected in the CSF of some epileptic patients. This was confirmed by high voltage paper electrophoresis. This finding suggests that GES may relate to epileptic seizure mechanism.