

コバルトてんかん源性焦点組織の α -guanidinoglutamic acid 及びその他の guanidino 化合物に関する研究

岡山大学医学部脳代謝研究施設機能生化学部門（主任：森 昭胤教授）

赤 木 正 幸

（昭和56年9月7日受稿）

Key words : コバルト焦点, α -guanidinoglutamic acid, guanidino 化合物, EEG, 発作機序

緒 言

哺乳動物の脳内には, taurocyamine, guanidinosuccinic acid, guanidinoacetic acid, N-acetylarginine, β -guanidinopropionic acid, creatinine, γ -guanidinobutyric acid, arginine, guanidine, methylguanidine, homoarginine などの guanidino 化合物が存在する¹⁻⁴⁾ (図1)が, それらのうち taurocyamine⁵⁾, guanidinoacetic acid⁶⁾, N-acetylarginine⁷⁾, γ -guanidinobutyric acid⁸⁾及び methylguanidine⁹⁾ はいずれも数mgをウサギ, イヌ, ネコなどの大槽内に注入すると痙攣発作が誘発されることが知られている。また痙攣時の脳内 guanidino 化合物を液体クロマトグラフィーで分析すると, taurocyamine はマウスの pentylenetetrazol 痙攣直前期に増加し, 電気刺激痙攣時に減少していること¹⁰⁾, methylguanidine は実験的尿毒症ウサギにおいて増加していること¹¹⁾が見出され, これらの guanidino 化合物が痙攣と密接に関係していることが示唆された。

他方, Kopeloff¹²⁾がマウスの大脳皮質にコバルト粉末を塗布すると seizure が誘発されることを報告して以来, コバルトてんかん源性焦点形成法は実験てんかんモデルの1つとして注目をあびてきており, コバルト焦点組織を用いた数多くの生化学的な研究がなされている。小山 (1972)¹³⁾は, コバルト焦点組織に release される amino acid を分析した結果, コバルトてんかん源性焦点形成の原因は glutamic acid の減少と glutamic acid の release の増加にあることを

指摘している。その後 Van Gelder¹⁴⁾はコバルト投与3~4日めはてんかん源性焦点が形成される時期であるが, その時期には glutamic acid decarboxylase (GAD) activity が有意に増加していることを報告している。さらに Dodd ら¹⁵⁾もコバルト焦点組織では glutamic acid の release が非焦点組織に比し3倍も増加していることを認めている。また Ross と Craig (1981)¹⁶⁾はコバルトてんかん源性焦点組織の γ -aminobutyric acid (GABA) の transport を調べた結果, seizure が頻繁にみられるコバルト投与7日めには high affinity の GABA transport が対照に比し著明に減少していることを報告している。これらの諸知見から, コバルトてんかん源性焦点形成には glutamic acid が大きく関与していることが示唆される。

著者は, ネコの大脳皮質にコバルト粉末を投与後, 焦点組織の guanidino 化合物を高速液体クロマトグラフィーで分析し, コバルト粉末投与24時間後に大きな未知物質のピークの出現を認め, この未知物質を抽出し GC/MS で分析した結果, α -guanidinoglutamic acid (GGA) であることを確認した。著者はさらにこの物質を合成し, ウサギの大脳皮質に投与して, 脳波記録により発作波の出現を観察した。また, コバルト焦点組織の諸 guanidino 化合物についても分析を行い, コバルトてんかん源性焦点の形成機構について検索を行なった。

実験方法

第1節 実験動物

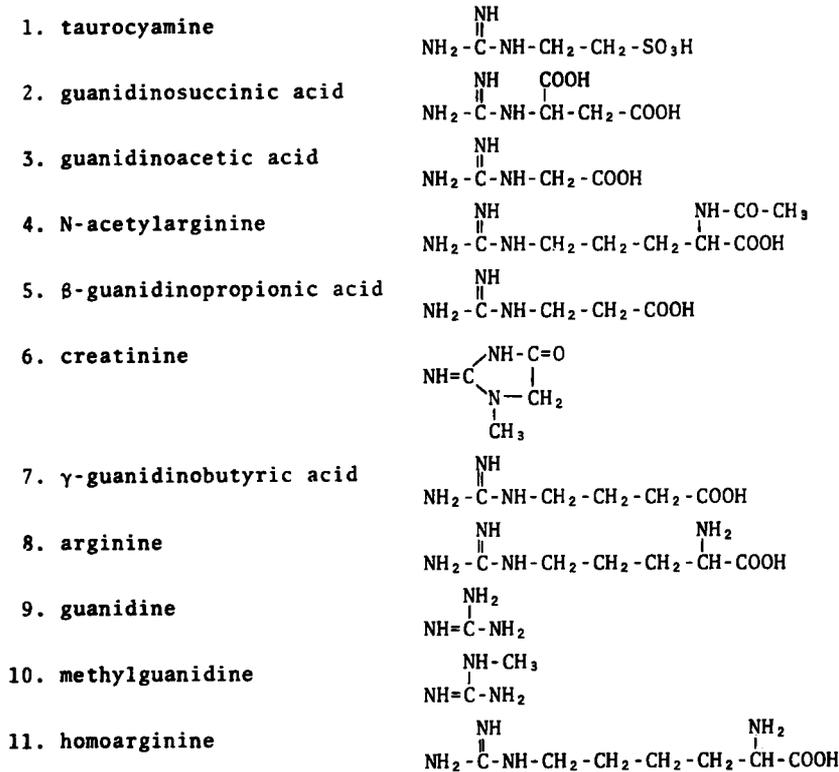


Fig. 1 Guanidino compounds in mammalian brain.

体重 2～4 kg の成熟ネコ（雌雄）及び、体重 2～3 kg の成熟ウサギ（雄）を使用した。飼料は、ネコにはネコ用飼料及び固型飼料（KS, CS, オリエンタル酵母）を、ウサギにはウサギ・モルモット用固型飼料（RC-4, オリエンタル酵母）を用い、水は自由に摂取させた。

第2節 てんかん源性焦点の作成

ネコ左大脳皮質感覚運動領野の 2 cm² 上に、殺菌したコバルト粉末（Grain Size #200, Arssay 99.99%, 高純度化学研究所08838A）を約300mg 塗布し、筋膜などの柔組織で被膜後さらにワセリンで覆った。また、長期実験については頭皮を縫合した。

第3節 試料の採取

ネコ左大脳皮質のコバルト塗布部位及びその周辺部位と、対側部位（各650mg）をすばやく摘出後、液体窒素で凍結固定し、分析開始まで -20℃ で保存した。また GC/MS 分析には両側大脳皮質へコバルトを塗布し、3時間後に両側コバルト塗布部位を摘出し、それらのネコ 4 匹分の

試料をプールして分析試料とした。

第4節 試料の調整

1) Guanidino 化合物標準試料

Guanidino 化合物の標準試料としては、taurocyamine (GT, 10 nmol/ml), guanidinosuccinic acid (GSA, 10 nmol/ml), guanidinoacetic acid (GAA, 5 nmol/ml), N-acetylarginine (N-AA, 3 nmol/ml), β -guanidinopropionic acid (GPA, 5 nmol/ml), creatinine (CRN, 50 nmol/ml), γ -guanidinobutyric acid (GBA, 10 nmol/ml), arginine (Arg, 20 nmol/ml), homoarginine (HArg, 10 nmol/ml), guanidine (G, 20 nmol/ml), methylguanidine (MG, 5 nmol/ml) を 0.01 N 塩酸 (pH 2.2) に溶解して使用した。

2) 脳試料の前処理

組織に 5 倍量の 1% picric acid を加えテフロン棒ガラスホモゲナイザーでホモゲナイズ後、13,000 g で 20 分間、冷凍遠沈を行なった。次に上清の picric acid を Dowex 2 × 8 (Cl⁻型) に

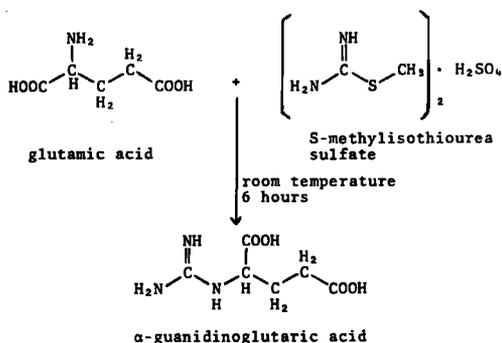


Fig. 2 Synthesis of α -guanidinoglutaric acid.

吸着させたのち減圧乾固し、その乾固試料を 0.01 N 塩酸 (pH 2.2) で溶解後、その 200 μ l を高速液体クロマトグラフに注入した。なお試料は分析開始までは -20°C で保存した。

第 5 節 Guanidino 化合物の高速液体クロマトグラフィー

Guanidino 化合物の分析は Mori ら (1978) の方法³⁾に準拠した高速液体クロマトグラフィーを用いて分析を行なった。装置は、日本分光製、蛍光検出器 JASCO FP-100 B を備えつけた高速液体クロマトグラフ JASCO G-520 を使用した。なお、イオン交換樹脂は CM-10 S (JASCO) を使い、カラム温度は 60°C とした。移動相には 4

種類の 0.2 N sodium citrate buffer を 0.4 ml/min の流速で次の条件に従って使用した。

1) pH 3.0, 試料注入前 40 分。2) pH 3.3, 試料注入後 12 分。3) pH 4.9, 23 分。4) pH 10.0, 25 分。分析終了後、0.5 N sodium hydroxide 20 分。蛍光試薬は 0.05 % 9, 10-phenanthrenequinone/dimethylformamide 溶液を使用し、その流速は 0.2 ml/min とした。蛍光反応は内径 0.5 mm \times 8 m のチューブで 60°C , 2 分間とし、検出は Ex 365 nm, Em $>$ 460 nm で行なった。

第 6 節 GGA の合成

GGA の合成は Zervas & Bergmann の guanidino 化合物合成法¹⁷⁾に準拠して行なった。すなわち、glutamic acid と同モルの S-methylisothiurea とを 1 N NaOH に溶解し、室温で 6 時間放置後、Amberlite IR-120 (H^{+} 型) カラムに吸着させた。ついで水洗後、2 N NH_4OH で脱着し、坂口反応 (+) 分画を集めて減圧濃縮し、水-ethylalcohol から再結晶した (図 2)。

第 7 節 GC/MS 測定

1) GGA 標準試料

Mori ら⁴⁾の方法に従って行なった。すなわち、GGA 合成標品 10 mg に水 1.0 ml を加え pyridine 1.0 ml, acetylacetone 1.0 ml を加えたのち、so-

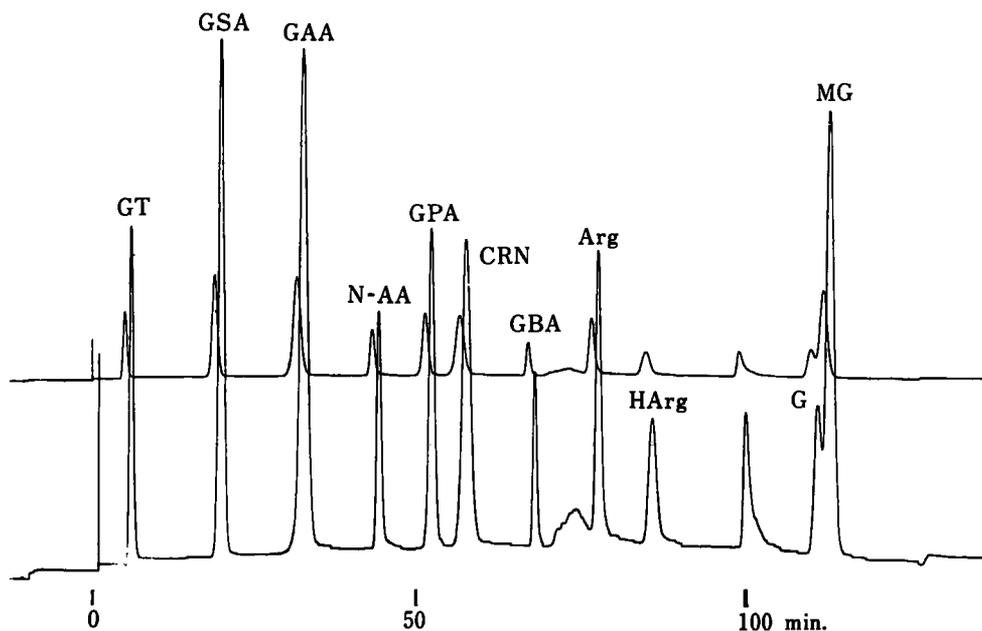


Fig. 3 High pressure liquid chromatogram of standard substances of guanidino compound.

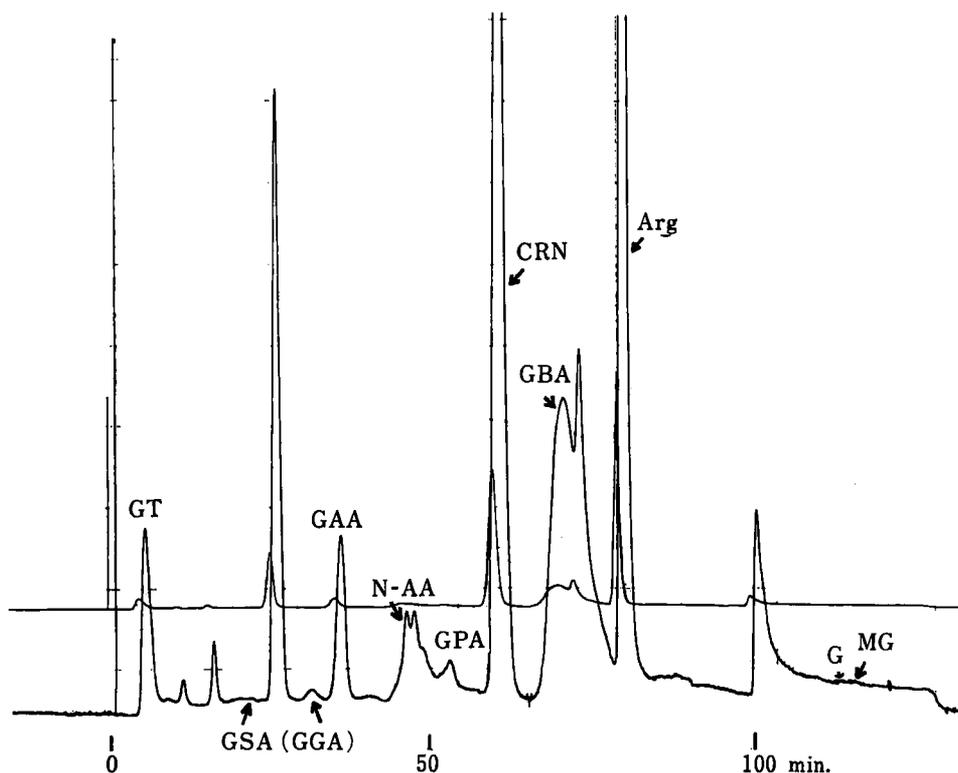


Fig. 4 High pressure liquid chromatogram of normal cat cortex.

dium bicarbonate で pH を 8.0~9.0 に調整後、100℃ の温浴中で 10 時間 reflex し、dimethylpyrimidyl 化した。この反応混液を減圧乾固後、水 10ml に溶解し、この溶液を ethylether にて 3 回洗浄後減圧再び乾固した。その乾固試料を HCl 飽和 n-butanol 10ml に溶解し、温浴上で 3 時間 reflex して butylester 化した。ついで減圧乾固し、得られた syrup 様物質 (約 2 mg) を pyridine-methanol (1:1) 0.2ml に溶解し、その 1 μ l を GC/MS 用試料とした。

2) ネコ脳試料

組織に 1% picric acid を加えてホモゲナイズ後、13,000 g で 20 分間、冷凍遠沈した。ついで、得られた上清の picric acid を Dowex 2 \times 8 (Cl⁻型) に吸着させたのち、減圧乾固した。この乾固試料は少量の水に溶解し、東洋濾紙 No. 526 (40 \times 40 cm) に spot したのち、n-butanol: acetic acid: 水 (12:3:5) で展開、GGA 合成標品と一致する Rf 値の部分を取り、60~70℃ の水で抽出して、再び減圧乾固した。この試

料を水 1.0ml に溶解し、pyridine 1.0ml, acetylacetone 1.0ml を加えたのち、上記 GGA 標準試料と同様な操作により dimethylpyrimidyl 化して GC/MS 用試料とした。

3) GC/MS

GC/MS は Jalco JMS-D, 300 型質量分析計を使用した。測定条件は下記のごとくである。
Gas chromatography, Column length: 90cm, Column packing: OV-1, 3%, Column temperature: 230℃, Carrier gas: Helium, 1.0kg/cm²

Mass spectrometry, Ion source: EI, Accelerating voltage: 3.0KV, Ionizing voltage: 70 eV, Emission current: 300 μ A.

第 8 節 GGA の局所的投与

GGA を生理食塩水に溶解 (40mg/ml, 0.2M) 後、GGA 溶液に浸した濾紙 (4 \times 4 mm) を大脳皮質左感覚運動領野の上においた。

第 9 節 皮質脳波の記録

ネコ及びウサギにエチルエーテル麻酔下で気

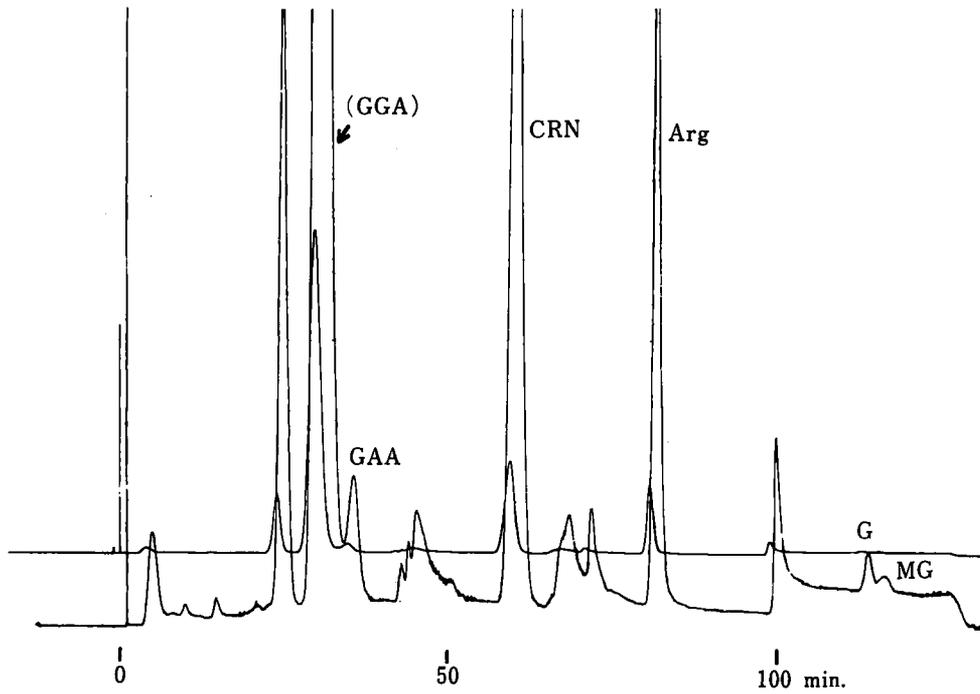


Fig. 5 High pressure liquid chromatogram of cat cobalt focus 24 hours after application.

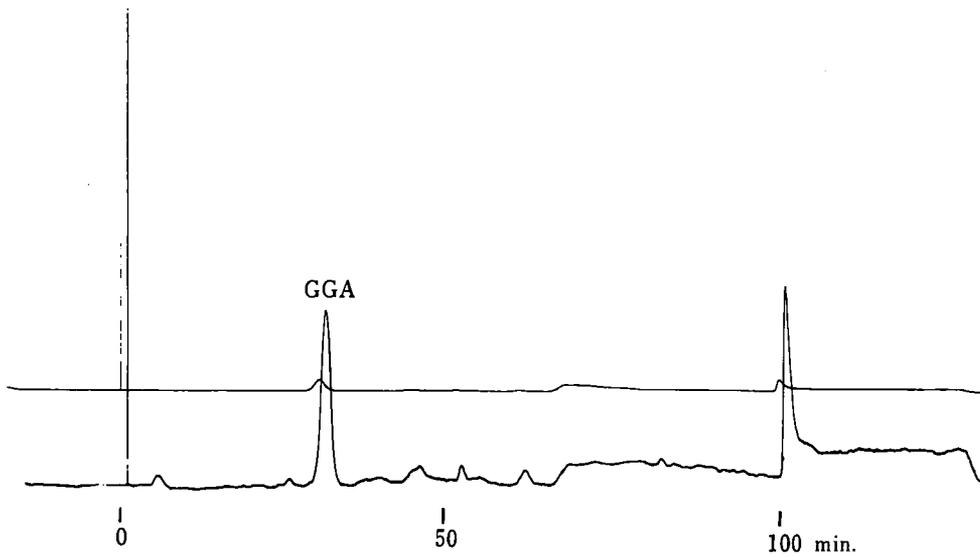


Fig. 6 High pressure liquid chromatogram of synthesized α -guanidinoglutamic acid

管内挿管を施し、サクシンで非動化後、東大式脳固定装置に固定して開頭した。ついで、ネコには両側前頭及び後頭部に綿電極をおき、ウサギには左大脳皮質感覚運動領野の周囲に綿電極をおき、それらから皮質脳波を記録した。

実験成績

第1節 Guanidino 化合物標準物質の高速液体クロマトグラフィー

図3は guanidino 化合物標準物質の高速液体クロマトグラムである。試料注入後, taurocy-

MASS SPECTRUM
 SAMPLE: GUANIDINO GLUTARIC ACID DERIV
 NOTE :EI-MODE 70 V
 RIC CHROMATOGRAM

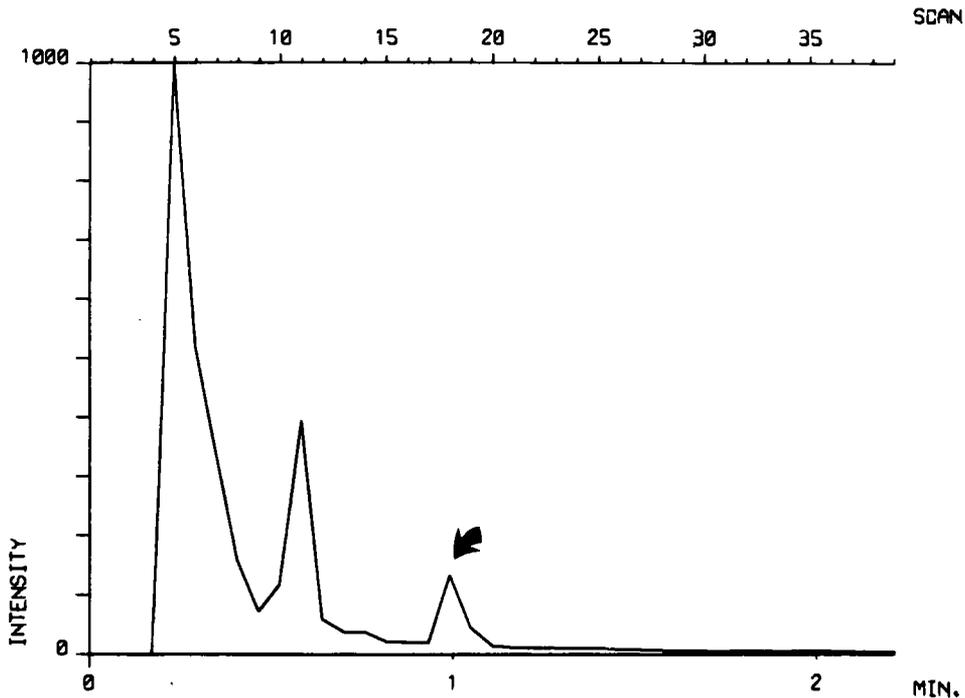


Fig. 7 Gas chromatogram of dimethylpyrimidyl-unknown substance-butylester of cat cobalt focus.

mine, guanidosuccinic acid, guanidinoacetic acid, N-acetylarginine, β -guanidinopropionic acid, creatinine, γ -guanidinobutyric acid, arginine, homoarginine, guanidine, methylguanidine が順次系統的に分離溶出された。第2節 正常ネコ大脳皮質及びコバルト焦点組織の guanidino 化合物

1) 正常ネコ大脳皮質

高速液体クロマトグラフィーの結果、正常ネコ大脳皮質には図4に示された如く、taurocyamine, guanidosuccinic acid, guanidinoacetic acid, N-acetylarginine, β -guanidinopropionic acid, creatinine, γ -guanidinobutyric acid, arginine, guanidine, methylguanidine が存在し、そのほかにいくらかの未知物質のピークが認められた。

2) ネココバルト焦点組織

コバルト塗布24時間後のコバルト焦点組織では、正常ネコ大脳皮質に存在する guanidino 化

合物のうち N-acetylarginine が消失していた。ところが guanidosuccinic acid の溶出ピークの次に、正常ネコではわずかししか認められなかった未知物質の著しく高いピークの出現が認められた(図5)。

第3節 合成 GGA 標品の高速液体クロマトグラフィー

図5は合成標品 GGA 50 nmol/ml の高速液体クロマトグラムである。GGAは試料注入後30分に溶出された。この溶出保持時間はコバルト投与24時間後の焦点組織分析に認められた大きな未知物質のピークの溶出保持時間と一致した。

第4節 コバルト焦点組織中未知物質の GC/MS による同定

1) ネココバルト焦点組織中未知物質のガスクロマトグラフィー

図7はネココバルト焦点組織から未知物質を抽出し、dimethylpyrimidyl 化並びに butylester 化した試料のクロマトグラムである。このク

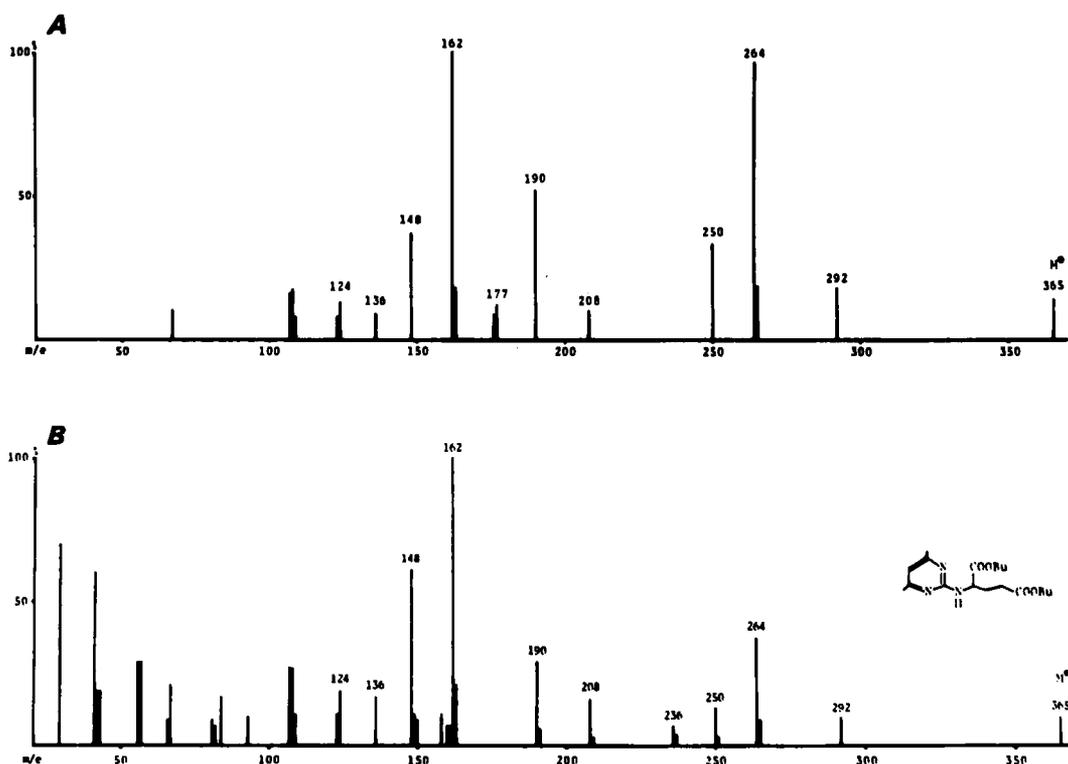


Fig. 8 Mass spectrum.

A) Dimethylpyrimidyl-GGA-butylester.

B) Dimethylpyrimidyl-unknown substance-butylester of cat cobalt focus.

ロマトグラム中の保持時間1.0分のピークは合成GGAをdimethylpyrimidyl化並びにbutylester化した試料のピークと一致した。

2) 合成GGA及びコバルト焦点組織中未知物質のマススペクトロメトリー

合成標品GGA及びコバルト焦点組織より抽出した未知物質をそれぞれdimethylpyrimidyl誘導体のbutylesterとして測定したマススペクトラムを図8-A, Bに示した。すなわち、合成GGA誘導体のspectrum(図8-A)には、m/e 365(M⁺)のほか292, 264, 250, 208, 190, 162などの高比強度の諸イオンが観察されたが、未知物質誘導体spectrum(図8-B)においてもm/e 365(M⁺)のほか292, 264, 250, 208, 190, 162が観察された。従ってコバルト焦点組織に出現する大きな未知物質のピークはGGAであると同定された。

第5節 コバルトてんかん源性焦点組織のGGA
ネコのコバルトてんかん源性焦点組織及び対

m/e	Fragment	Structure
365	M ⁺	
292	M-73	-O-Bu
264	M-101	-CO-Bu
250	M-115	-CH ₂ -COO-Bu
236	M-129	-CH ₂ CH ₂ -COO-Bu
208	M-157	-COO-Bu, Butene
190	M-175	-COO-Bu, -HO-Bu

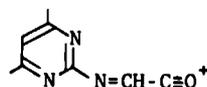


Fig. 9 Ion peaks in mass spectrum of dimethylpyrimidyl-GGA-butylester.

側部位のGGAを分析した結果を表1に示した。まず正常ネコ大脳皮質感覚運動領野には約1 nmol/gのGGAが存在することを認めた。次に

Table 1 Effect of cobalt on α -guanidinoglu-
taric acid level of the cat cerebral
cortex

		(nmol/g, wet weight, M±S.D.)		
	n	non-focus	focus	
Control	6	1.0±0.4	1.0±0.4	
Co applied	1hr	0.2~17.1 (6.4)	0.3~48.7 (12.2)	
	2hrs	0.2~17.5 (3.8)	0.2~15.3 (3.3)	
	4hrs	11.1±3.8*	12.6±4.8*	
	24hrs	33.7~588.2 (311.0)	8875.2±4311.7*	
	37-42days	0.1±0	0.6±0.1	

*p<0.001, compared with control
A parenthesis shows mean.

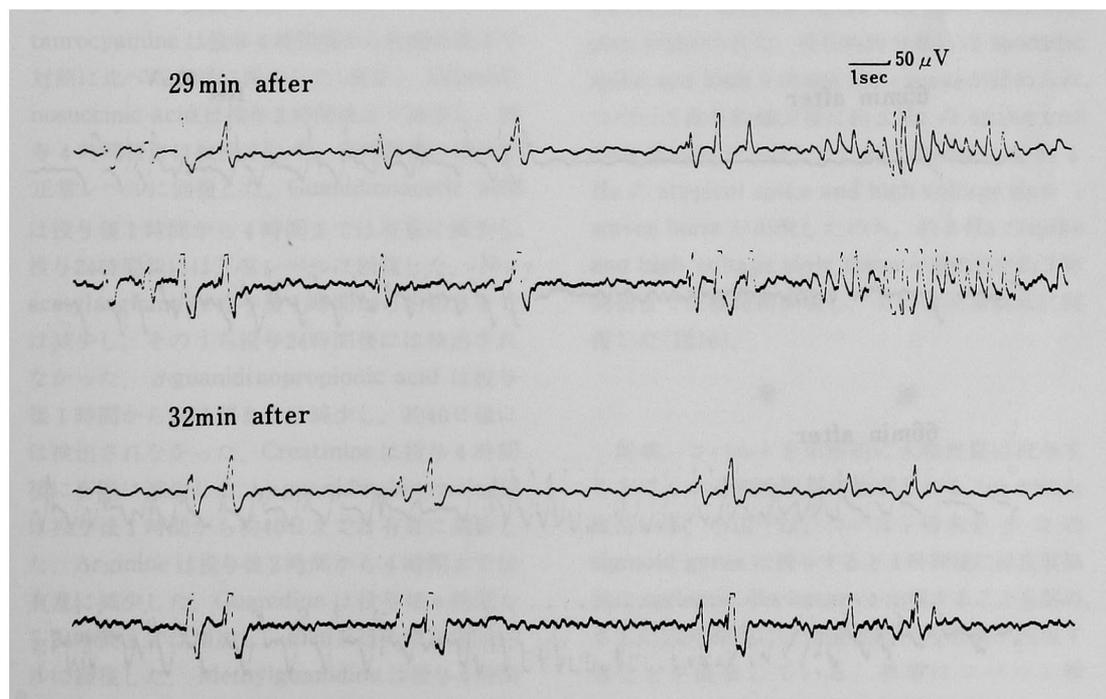
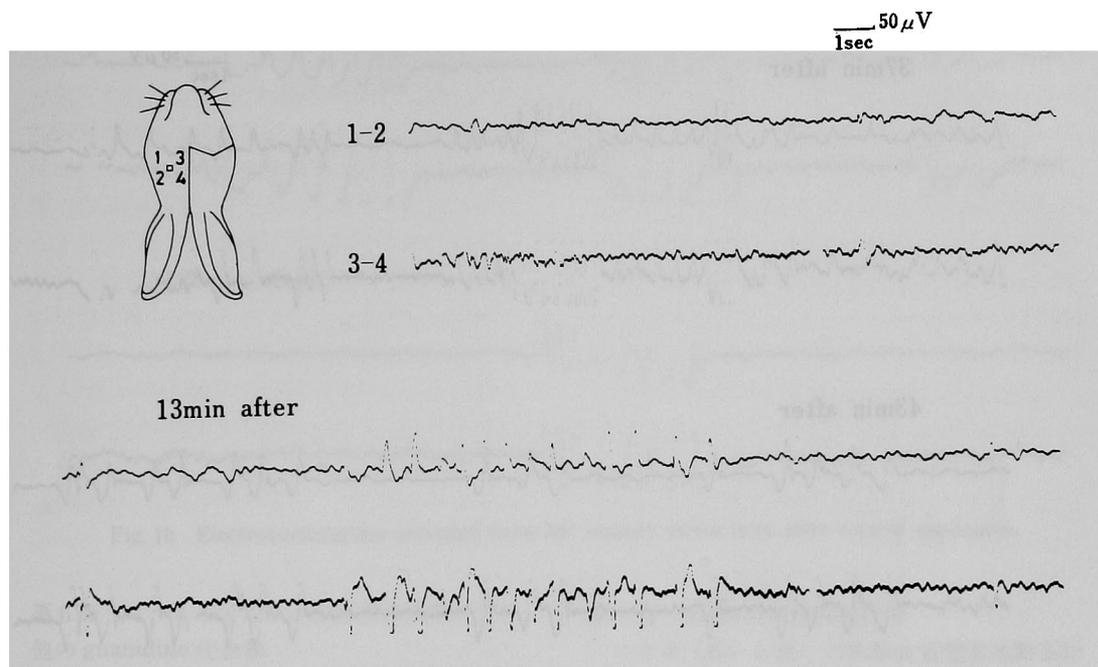
コバルトを投与すると焦点組織及び対側部位のGGAは投与後1時間から2時間にわたって増加し、投与4時間後では両部位とも対照に比し有意に増加することが認められた。投与24時間後にはてんかん源性焦点組織のGGAは8.88 μ mol/gと著明に増加し、対側部位もそれよりは少ないが311 nmol/gと増加しているのが認められた。なお、40日後には焦点組織のGGAは0.6 nmol/gに減少し、対側部位は正常レベルに回復していた。

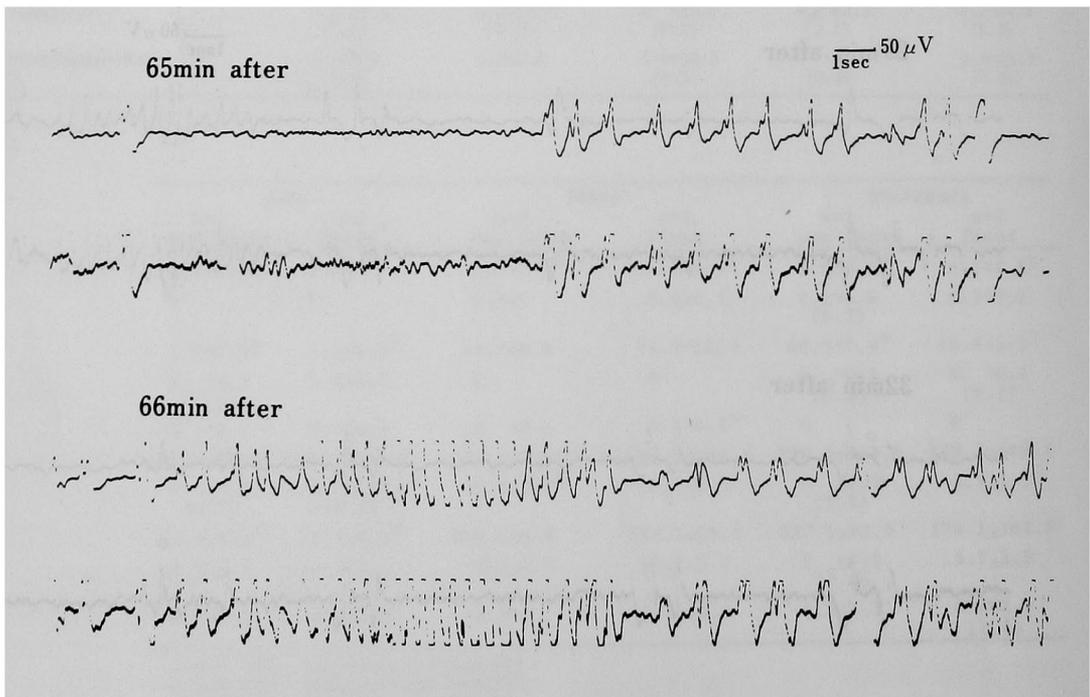
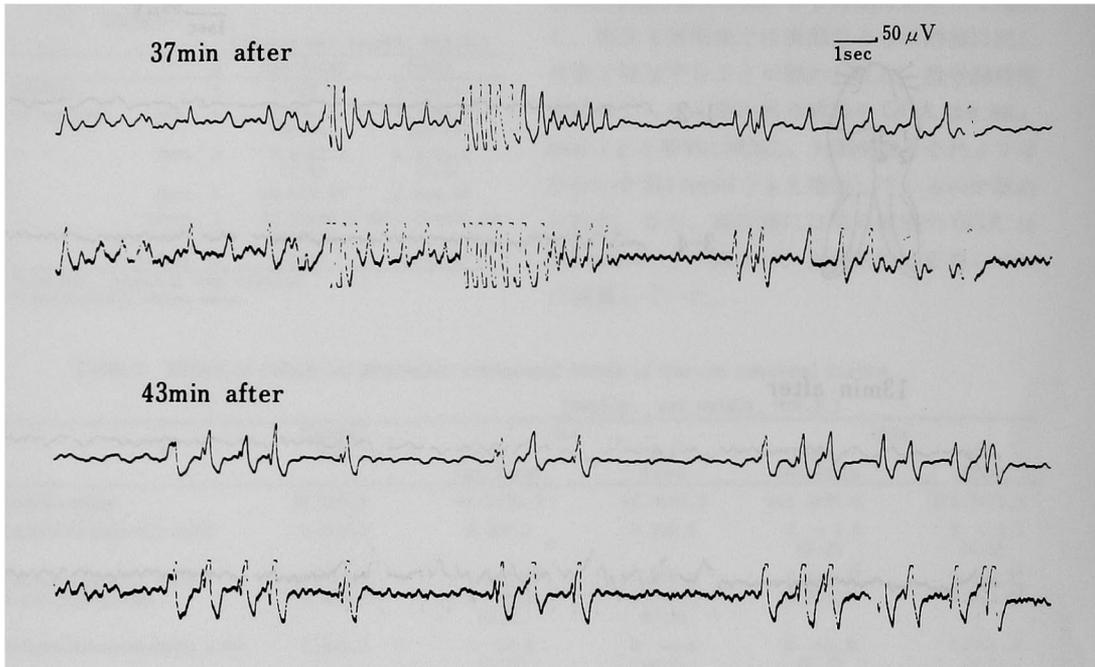
Table 2 Effect of cobalt on guanidino compound levels of the cat cerebral cortex

	Control n=6	1hr				2hrs	
		n=5 non-focus	n=5 focus	n=5 non-focus	n=5 focus	n=5 non-focus	n=5 focus
Taurocyamine	35.1±9.8	44.2±35.3	58.8±42.5	162.3±81.6	173.7±71.8		
Guanidinosuccinic acid	0.6±0.2	0.3±0.1	0.8±0.6	0 ~ 1.0 (0.2)	0 ~ 0.2 (0.1)		
Guanidinoacetic acid	12.7±3.8	7.1±3.7 ^e	7.9±3.6	5.4±2.3 ^b	6.3±2.3 ^c		
N-acetylarginine	1.9±1.0	0 ~ 0.6 (0.2)	0 ~ 0.6 (0.2)	0.9±0.4	0.6±0.4 ^e		
β -Guanidinopropionic acid	1.2±1.1	0 ~ 0.5 (0.2)	0 ~ 0.6 (0.2)	0 ~ 0.8 (0.3)	0.1~1.2 (0.5)		
Creatinine	944.8±600.9	1193.5±849.3	1247.5±617.7	708.1±395.7	1138.9±807.9		
γ -Guanidinobutyric acid	27.8±11.6	3.6±2.4 ^b	3.8±2.2 ^b	3.9±1.7 ^b	3.6±1.1 ^b		
Arginine	318.2±210.4	148.4±88.6	137.5±42.8	84.4±21.2 ^e	94.0±19.9 ^e		
Guanidine	0.1~26.0 (5.0)	0.2~15.4 (5.7)	0 ~ 13.2 (5.1)	0.2~12.3 (2.7)	0.2~14.8 (5.3)		
Methylguanidine	0 ~ 9.8 (1.8)	1.2±0.8	1.5~14.3 (4.5)	0 ~ 2.1 (0.6)	0.5~11.3 (2.9)		

4hrs		24hrs		37~42days	
n=5 non-focus	n=5 focus	n=2 non-focus	n=2 focus	n=2 non-focus	n=2 focus
8.0±1.7 ^a	8.5±4 ^a	9.7±2.1 ^d	11.8±0.1 ^d	9.0±3.7 ^d	6.2±2.6 ^c
0	0	0.3±0	0.8±0.1	0.1~0.6 (0.3)	0.3±0.2
1.0±0.3 ^a	1.1±0.5 ^a	13.7±8.8	31.8±30.4	60.5±7.0 ^a	15.4±1.1
0 ~ 0.4 (0.1)	0.8±0.7	0	0	0 ~ 0.2 (0.1)	0 ~ 0.2 (0.1)
0 ~ 0.1	0 ~ 0.1	0 ~ 0.1	0.2±0.1 ^e	0	0
195.6±59.6 ^e	204.2±66.1 ^e	1549.2±258.2	1564.7±316.6	890.3±169.6	549.3±460.1
0 ~ 5.3 (1.2)	0 ~ 18.5 (6.4)	6.0±0.7 ^d	4.0±0.8 ^c	0 ~ 2.1 (1.1)	2.5±1.1 ^c
10.1±3.5 ^d	11.5±4.4 ^d	261.0±4.4	312.1±18.5	337.5±42.3	179.1±161.9
10.5±3.5	11.3±2.7	8.2±1.1	16.6±3.7	0 ~ 4.0 (2.0)	3.7±2.9
0.3±0.2	0.3±0.1	0.9±0	2.1±0.4	1.2±1.1	0.3~2.0 (1.2)

a p<0.001, compared with control
b p<0.005, compared with control
c p<0.01, compared with control
d p<0.02, compared with control
e p<0.05, compared with control
A parenthesis shows mean.





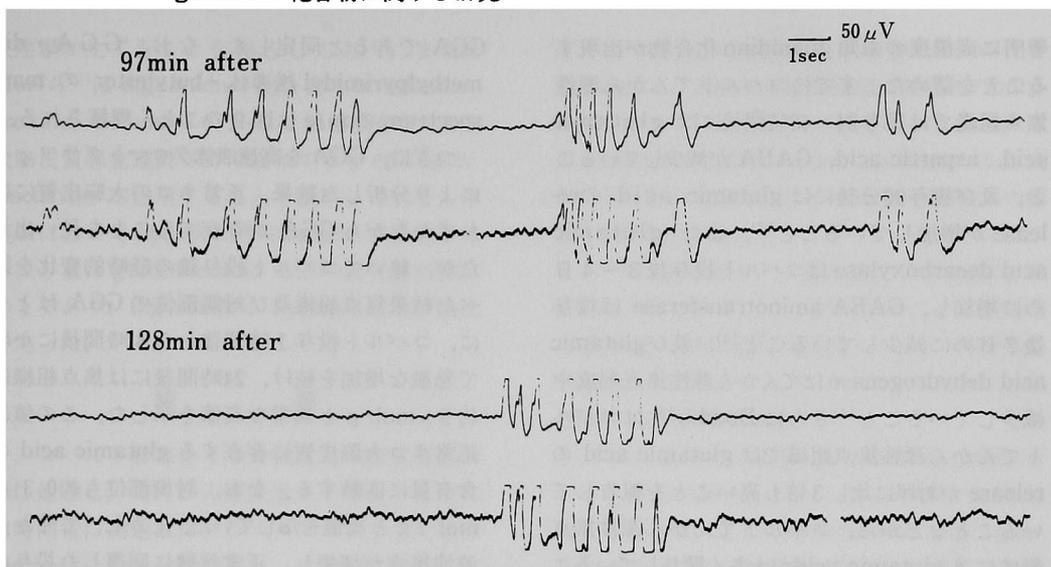


Fig. 10 Electrocorcogram recorded from left sensory motor area after topical applicaton.

第6節 コバルトてんかん源性焦点組織のその他の guanidino 化合物

コバルト粉末を投与し, 1, 2, 4, 24時間後及び約40日後の guanidino 化合物は, 時間的経過にともなって変動が認められた。すなわち, taurocyamine は投与4時間後から約40日後まで対照に比べて有意に減少した(表2)。Guanidinossuccinic acid は投与2時間後より減少し, 投与4時間後には検出されず, 24時間後には再び正常レベルに回復した。Guanidinoacetic acid は投与後1時間から4時間までは有意に減少し, 投与24時間後には正常レベルに回復した。N-acetylarginine は投与後1時間から約40日までは減少し, そのうち投与24時間後には検出されなかった。β-guanidinopropionic acid は投与後1時間から24時間までは減少し, 約40日後には検出されなかった。Creatinine は投与4時間後に有意に減少した。γ-guanidinobutyric acid は投与後1時間から約40日までは有意に減少した。Arginine は投与後2時間から4時間までは有意に減少した。Guanidine は投与後4時間から24時間までは増加し, 約40日後には正常レベルに回復した。Methylguanidine は投与4時間後には減少し, 24時間後には正常レベルに回復した。なお, 一般にコバルト焦点部位と対側部位との間には有意の差が認められなかった。

第7節 GGA の発作誘発作用

ウサギ (N=5例) の大脳皮質感覚運動領野に GGA 0.2 M 溶液に浸した濾紙片 (4 × 4 mm) をおくと, 約10分後に high voltage slow waves 及び atypical spike and slow wave complex が認められた。投与約30分後には sporadic spike and high voltage slow wave が認められ, つづいて投与約40分後に約 3 Hz の spike and slow waves が出現した。約1時間後には約 4 Hz の atypical spike and high voltage slow waves burst が出現したのち, 約 2 Hz の spike and high voltage slow wave が濾紙添付約3時間後まで反復持続出現し, その後正常脳波に回復した(図10)。

考 按

従来, コバルトを局所的に大脳皮質に投与するとてんかん源性焦点が形成されることが知られている。小山¹³⁾は, コバルト粉末をネコの sigmoid gyrus に投与すると1時間後には皮質脳液に epileptic discharges が出現することを認め, さらに24時間後には強直性間代性痙攣が出現することを観察している。著者はコバルト粉末をネコ大脳皮質の感覚運動領野に投与し, 24時間後にコバルト焦点組織の guanidino 化合物を高速液体クロマトグラフィーで分析した結果,

著明に高濃度の未知 guanidino 化合物が出現することを認めた。すでにコバルトてんかん源性焦点組織では投与24~48時間後には glutamic acid, aspartic acid, GABA が減少していること、及び投与90分後には glutamic acid の release が増加していること¹³⁾、また glutamic acid decarboxylase はコバルト投与後3~4日めに増加し、GABA aminotransferase は投与後7日めに減少していること¹⁴⁾、及び glutamic acid dehydrogenase はてんかん源性焦点形成中減少していること¹⁴⁾さらに Doddら¹⁵⁾はコバルトてんかん源性焦点組織では glutamic acid の release が対照に比し3倍も高いことを報告していることなどから、コバルトてんかん源性焦点形成には glutamic acid が大きく関与していることが示唆されていた。

哺乳動物の脳内に存在する guanidino 化合物のうち数種のものには構造式(図1)からみると、taurocyamine は taurine から、guanidinosuccinic acid は aspartic acid から、glycoamine は glycine から、 β -guanidinopropionic acid は alanine から、 γ -guanidinobutyric acid は γ -aminobutyric acid からそれぞれ arginine の amidine 基を受容して生成されるものと想定されている。今回見出した GGA はこれらのことを勘案すると glutamic acid から生成されたものと想定される。

さて、本報告において GGA の同定には GC/MS を使用したが、従来一般に guanidino 化合物は guanidine 基が揮発性に欠けるため、GC/MS 分析は不可能とされていた。しかし、Vetter-Diechtlら¹⁶⁾が arginine の dimethylpyrimidyl 化を可能にして以来、Moriら⁴⁾は arginine, guanidinoacetic acid, β -guanidinopropionic acid, γ -guanidinobutyric acid, guanidinosuccinic acid¹⁹⁾を揮発性の dimethylpyrimidyl 誘導体に変え、さらに carboxyl 基を butylester 化して GC/MS で分析することに成功している。今回は GGA 並びにコバルト焦点組織から抽出した未知 guanidino 化合物を上記の方法に従って、dimethylpyrimidyl 誘導体にし、carboxyl 基を butylester 化し、GC/MS で分析した結果、コバルト焦点組織に見出した未知 guanidino 化合物は

GGA であると同定した。なお、GGA・dimethylpyrimidyl 誘導体・butylester の mass spectrum の m/e は図9のごとく理解される。

つぎに、GGA を高速液体クロマトグラフィーにより分析した結果、正常ネコの大脳皮質にはわずかながら GGA が存在することを見出したが、続いてコバルト投与後の経時的変化を調べた結果焦点組織及び対側部位の GGA はともに、コバルト投与1時間後から4時間後にかけて急激な増加を続け、24時間後には焦点組織は約 $9 \mu\text{mol/g}$ と異常な高値を示した。この値は正常ネコ大脳皮質に存在する glutamic acid の含有量に匹敵する。なお、対側部位も約 $0.3 \mu\text{mol/g}$ と高値を示していた。しかし、てんかん源性焦点が消失し、正常状態に回復した投与約40日後には、これらの GGA 値は正常レベルに回復していることを認めた。

その他 GGA 以外の guanidino 化合物の変動を調べると、taurocyamine, guanidinosuccinic acid, guanidinoacetic acid, N-acetylarginine, β -guanidinopropionic acid, creatinine, γ -guanidinobutyric acid, arginine 及び methylguanidine は GGA とは逆に投与後1時間から24時間にかけて減少しており、また投与約40日後には taurocyamine, γ -guanidinobutyric acid は対照に比し著明に低下していることを観察した。これらの実験結果から考えると、glutamic acid よりの arginine を amidine 基 donor とする transamidinase が異常に活性化されたため、arginine を共通の amidine donor とするその他の transamidinase 反応の低下をきたし、guanidine 以外の guanidino 化合物の減少をきたしたものと理解される。taurocyamine 及び γ -guanidinobutyric acid の長期にわたる著明低下の原因は現時点では説明できない。

つぎに、合成した GGA をウサギ大脳皮質の感覚運動領野に投与すると、10分後には spike and slow wave complex が出現し、投与1時間後には burst が1時間持続して出現することを観察したことから、GGA は発作誘発物質であることを明らかにした。林²⁰⁾は sodium glutamic acid あるいは sodium aspartic acid の 1~2M 溶液をイヌの大脳皮質運動領野に与えると間代

性痙攣が生ずることを報告しており、また、Moriら²¹⁾は diguanidino 化合物の hirudonine, arcaine, audonine 0.1~0.2 M 溶液をウサギの大脳皮質感覚運動領野に投与すると epileptic discharge が出現することを観察している。本実験において epileptic discharges を誘発させる投与量は glutamic acid などの投与量の10分の1であり、diguanidino 化合物とは同一濃度であった。

結 論

1. コバルト粉末をネコ大脳皮質の感覚運動領野に塗布し、てんかん源性焦点を作成したのち、24時間後に高速液体クロマトグラフィーで guanidino 化合物を分析すると、正常脳に認められる taurocyamine, guanidinosuccinic acid, guanidinoacetic acid, β -guanidinopropionic acid, creatinine, γ -guanidinobutyric acid, arginine, guanidine, methylguanidine のほかに、著明に高濃度な未知 guanidino 化合物が認められた。

2. Glutamic acid と S-methylisothiourea とから α -guanidinoglutamic acid を合成し、dimethylpyrimidyl 誘導体の butylester として GC/MS による確認を行った。

3. コバルト焦点組織より未知 guanidino 化合物を抽出し、dimethylpyrimidyl 誘導体の butylester として GC/MS の分析を行った結果、未知 guanidino 化合物の mass spectrum は合成した GGA の spectrum と一致し、未知物質の構造を GGA と決定した。

4. GGA は正常ネコ大脳皮質に 1 n mol/g 程度存在するが、コバルト粉末投与により経時的に増加し、24時間後に最高値に達し、対側部位も増加をきたした。しかし、焦点の消失した40日後には正常値に回復していた。

5. GGA 以外の大脳内 guanidino 化合物はコバルト粉末の投与により、guanidine 以外は減少を示した。また taurocyamine 及び γ -guanidinobutyric acid は40日後においてもなお減少していた。

6. GGA 0.2 M をウサギの大脳皮質感覚運動領野に投与すると spike and wave complex が出現し、burst が1時間にわたって観察された。

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直接御指導御協力いただきました片山泰人講師、平松緑助手に深く感謝の意を捧げます。

文 献

1. Mori, A., Hosotani, M. and Tye, L.C.: Studies on brain guanidino compounds by automatic liquid chromatography. *Biochem. Med.* 10, 8-14, 1974.
2. 森 昭胤: 自然界における guanidino 化合物の存在とその測定方法, *臨床化学*, 9, 232-246, 1980.
3. Mori, A., Katayama, Y., Higashidate, S. and Kimura, S.: Fluorometrical analysis of guanidino compounds in mouse brain. *J. Neurochem.* 32, 643-644, 1979.
4. Mori, A., Ichimura, T. and Matsumoto, H.: Gas chromatography-mass spectrometry of guanidino compounds in brain. *Anal. Biochem.* 89, 393-399, 1978.
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. Jinnai, D., Mori, A., Mukawa, J., Ohkusu, H., Hosotani, M., Mizuno, A. and Tye, L.C.: Biological and physiological studies on guanidino compounds induced convulsion. *Jpn. J. Brain Physiol.* 106, 3668-3673, 1969.
7. 大楠晴美: α -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, *阪大医誌*, 21, 49-55, 1970.

8. Jinnai, D., Sawai, A. and Mori, A.: γ -Guanidinobutyric acid as a convulsive substance. *Nature* **212**, 617, 1966.
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. 平松千明：マウス脳内 guanidino 化合物に関する研究。岡山医誌, **92**, 427—434, 1980.
11. Matsumoto, M., Kishikawa, H. and Mori, A.: Guanidino compounds in the sera uremic patients and in the sera and brain of experimental uremic rabbits. *Biochem. Med.* **16**, 1—8, 1976.
12. Kopeloff, L.M.: Experimental epilepsy in the mouse. *Proc. Soc. Exp. Med.* **104**, 500—504, 1960.
13. Koyama, I.: Amino acids in the cobalt-induced epileptogenic and nonepileptogenic cat's cortex. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **50**, 740—752, 1972.
14. Van Gelder, N.M. Glutamate dehydrogenase, glutamic acid decarboxylase, and GABA aminotransferase in epileptic mouse cortex. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **52**, 952—959, 1974.
15. Dodd, P.R., Bradford, H.F., Abdulghani, A.S., Cox, D.W.G. and Continho-Netto.: Release of amino acids from chronic epileptic and subepileptic foci *in Vivo*. *Brain Res.* **193**, 505—517, 1980.
16. Ross, S.M. and Craig, C.R.: Studies on γ -aminobutyric acid transport in cobalt experimental epilepsy in the rat. *J. Neurochem.* **36**, 1006—1011, 1981.
17. Zervas, L. and Bergmann, M.: Das Sogen. Arginylarginin von E. Fisher, ein α , δ -bisguanido-n-valeriansäureanhydred. (25. Mitteilung über Umlagerungen peptidähnlicher Stoffe.) *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **61**, 1195—1203, 1928.
18. Vetter-Diechtl, H., Vetter, W. and Biemann, K.: Ein für Massenspektrometrie und gaschromatographie geeignetes Argininderivat. *Experientia* **24**, 340—341, 1968.
19. 洲脇貞吉：実験的高アルギニン血症ウサギに関する研究，第2編アルギニン大量負荷ウサギ尿中の guanidinosuccinic acid について。岡山医学会誌, **90**, 1393—1397, 1978.
20. Hayashi, T.: *Neurophysiology and Neurochemistry of Convulsion*. Dainihon-Tosho, Co. LTD. Tokyo, 1959.
21. Mori, A., Hiramatsu, M., Numoto, A. et Y. Robin: Action convulsivante des derives guanidiques, l'hirudonine, l'arcanine et l'audonine. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, **175**, 755—760, 1981.

**α -Guanidinoglutaric acid and other guanidino compounds in
a cobalt epileptogenic focus of cat cerebral cortex**

Masayuki AKAGI

Institute for Neurobiology. Okayama Univ. Medical School

(Director: Prof. A. Mori)

An epileptogenic cortical focus was induced by the topical application of cobalt powder to the sensori-motor cortex, then guanidino compounds in the cobalt focus were analysed by HPLC. An extraordinarily high peak was observed in the epileptogenic focus 24 hours after the cobalt application. α -Guanidinoglutaric acid (GGA), which is synthesized from glutamic acid and S-methylisothiourrea sulfate, was confirmed by GC/MS as a dimethylpyrimidyl derivative of GGA.

An unknown substance was isolated from the cobalt focus and identified as GGA by the same GC/MS technique as in the case of an authentic sample. GGA was present in the normal cat cortex in amounts of 1n mol/g. GGA increased after cobalt application, and reached a maximum after 24 hours. The abnormal GGA recovered to the normal level about 40 days after the application by which time the cobalt focus had disappeared. Other guanidino compounds, that is taurocyamine, guanidinosuccinic acid, guanidinoacetic acid, β -guanidinopropionic acid, creatinine, γ -guanidinobutyric acid, arginine, and methylguanidine, except for guanidine tended to decrease in the cobalt focus. Taurocyamine and α -guanidinobutyric acid were still decreased 40 days after the cobalt application.

Spike and wave complex was induced after topical application of 0.2M GGA to the sensori-motor cortex, and a burst continued for one hour.

**Key words: cobalt focus, α -guanidinoglutaric acid, guanidino compounds,
EEG, seizure mechanism**