

マウス脳内 guanidino 化合物に関する研究

第 2 編

けいれんにとまなう脳内 guanidino 化合物の変動について

岡山大学医学部脳代謝研究施設機能生化学部門 (主任 森 昭胤教授)

平 松 千 明

(昭和55年2月28日受稿)

Key words: Guanidino 化合物, 発作機序,
Pentylentetrazol けいれん,
電気刺激けいれん

緒 言

マウス脳内には種々の guanidino 化合物が存在する。taurine の N 位 guanidine 基置換体である taurocyamine (guanidinotaurine) は、ウシ、ラット、マウスおよびウサギ脳に存在することが Mori ら¹⁻³⁾ によって明らかにされてきた。Mizuno ら^{4,5)} は taurocyamine をウサギ大槽内に注入すると、10分後にまず間代性けいれんが出現し、つづいて強直性けいれんが1~2時間にわたって数10回繰り返すことを明らかにしているが、最近 Mori ら⁶⁾ はネコ大槽内に taurocyamine を注入すると、4~5分のちに海馬回後部から棘波が出現し、この棘波が taurine によって抑制されることなど深部脳波学的に観察している。またけいれん素因を有する CBA マウス⁷⁾ の脳内 taurocyamine 値は、分析した12系統中最高であった。これらの諸事実は taurocyamine が中枢神経系におけるけいれん発作機序に関与していることを示唆するものである⁸⁾。今回はさらに pentylentetrazole および電気刺激けいれん (ECS) 時のマウス脳内 guanidino 化合物を分析した結果、けいれん時に taurocyamine の著明な変動を認めたので報告する。

実 験 方 法

1) 実験動物: ddY マウス (雄) を藤井医化学試験動物 (神戸) より入手した。飼育室は室温 24℃、湿度55%、12時間明暗サイクルとなるように午前1時から午後1時まで明るくした。飼料はマウス用固型飼料 (MF; オリエンタル酵母) を用い、水は自由に摂取させた。この条件下で飼育した7週令 (25g) のものを使用した。

2) Pentylentetrazole けいれん実験: Pentylentetrazole (80 μ g/kg) を腹腔内投与し、けいれんの経過をけいれん直前期、けいれん中期およびけいれん後期と分類した。けいれん中期は間代性けいれんについて強直性伸展が惹起された時期とし、けいれん直前期はけいれん中期に致る時間の2/3の時期とした。けいれん後期は、けいれん後50秒間静止している状態を選んだ。対照実験群には生理食塩水を用いた。

3) 電気刺激けいれん実験: マウスの耳介の部分のみ外部に出るように作成した microwave 照射用 holder にマウスを挿入した後、耳介を生理食塩水で湿らせ、ECS 用クリップで耳介をはさみ、電圧60V および80V、いずれも0.5秒間通電を行った。そのさい60V 通電によってけいれんの発現しなかったものをけいれん直前期、

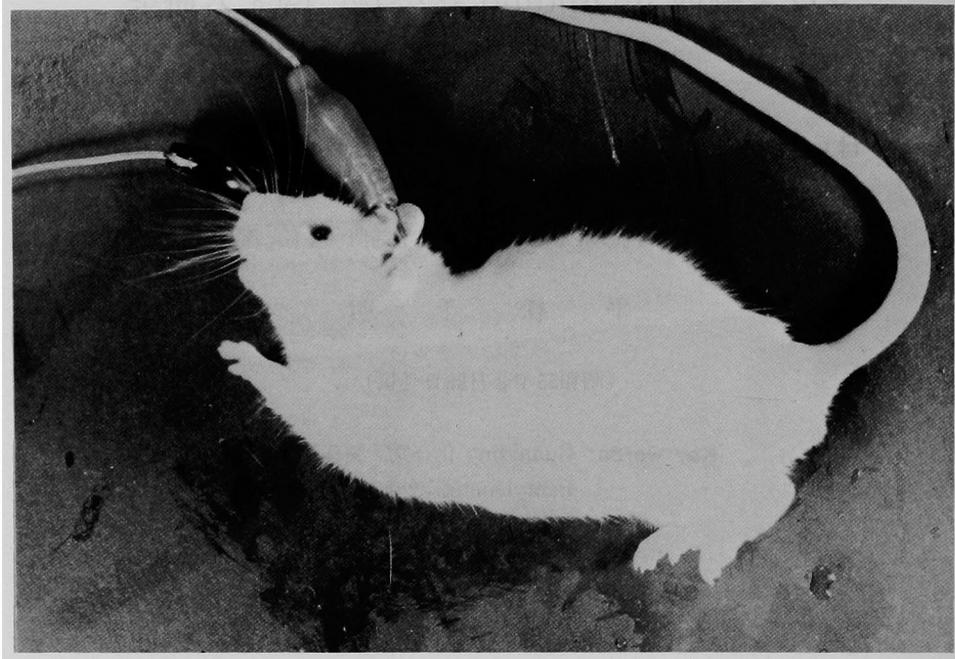


図1：電気刺激によるけいれん中のマウス
A：間代性けいれん発作中



図1：電気刺激けいれん中のマウス
B：強直性けいれん発作中（最大発作）

80V 通電によって惹起されたけいれん発作中のものをけいれん中期とした(図1)。なお、痙攣により惹起された比較的長期間にわたる変化を知るため、けいれん後1週間生存しているものについても検索を行った。脳の固定は ECS 通電10秒後に microwave 照射法により行った。

4) マウス脳固定法: マウス脳の固定は、メタボスタット NJE2601 (新日本無線) を使用し、microwave の頭部照射 (3 kw 0.2秒間) により行った。

5) 試料の調製: マウス脳を摘出し、秤量後1% picric acid により除蛋白し、冷凍遠心分離後、上清を Dowex 2 × 8 (Cl⁻) で過剰の picric acid を除去した後、減圧乾固し、0.01N

HCl (pH2.2) に溶かし、分析用試料を調製した。分析までは凍結保存した。

6) guanidino 化合物分析法: 高速液体クロマトグラフに、phenanthrenequinoneを用いた蛍光測定法を回路に組み込んだ guanidino 化合物自動分析装置 (G-520; 日本分光) を使用し分析を行った。

実験結果

1) Pentylene-tetrazole けいれん: Pentylene-tetrazole けいれん時の脳内 guanidino 化合物の分析例を図2に、分析結果を表1に示す。対照群に比し taurocyamine の有意の増加がけいれん直前期に認められるが、この値はけいれん中

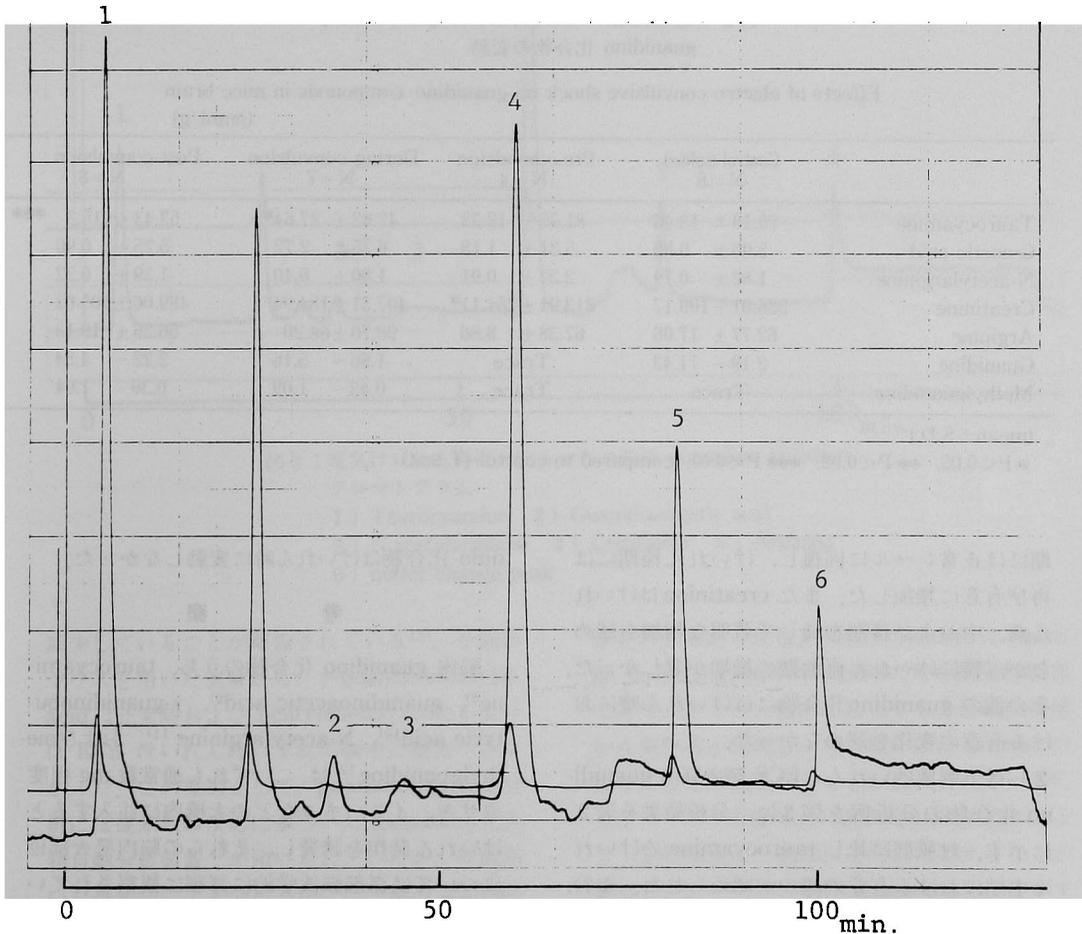


図2: Pentylene-tetrazole けいれん時におけるマウス脳内 guanidino 化合物のクロマトグラム

- 1) Taurocyamine 2) Guanidinoacetic acid 3) N-acetylarginine
4) Creatinine 5) Arginine 6) buffer change peak

表1: Pentylenetetrazole けいれん時におけるマウス脳内 guanidino 化合物の変動

Effects of pentylenetetrazol (80mg/kg) on guanidino compounds in mice brain (nmol/g)

	Control (saline) N=8	Pre-convulsion N=8	During convulsion N=7	Post-convulsion N=6
Taurocyamine	169.40 ± 31.43	215.21 ± 55.90*	193.06 ± 77.10	239.52 ± 31.27***
G-acetic acid	11.59 ± 3.46	11.72 ± 1.72	10.80 ± 2.12	15.02 ± 5.28
N-acetylarginine	6.37 ± 4.44	4.90 ± 0.84	4.24 ± 0.92	6.01 ± 3.07
Creatinine	591.98 ± 225.57	2379.13 ± 1745.16**	982.79 ± 234.74*	1043.94 ± 247.93***
Arginine	275.94 ± 58.11	216.94 ± 78.57	232.86 ± 61.77	230.44 ± 48.68
Guanidine	17.53 ~ 4.52	3.43 ~ 11.08	11.62 ~ 19.46	4.02 ~ 10.51
Methylguanidine	1.58 ~ 0.55	1.06 ~ 1.48	0.82 ~ 2.22	1.34 ~ 2.87

(mean ± S.D.)

* P < 0.05, ** P < 0.02, *** P < 0.005, compared to control (T-test).

表2: 電気刺激けいれん時におけるマウス脳内 guanidino 化合物の変動

Effects of electro convulsive shock on guanidino compounds in mice brain (nmol/g)

	Control (saline) N=8	Pre-convulsion N=4	During convulsion N=7	Post-convulsion N=8
Taurocyamine	75.16 ± 13.46	81.35 ± 12.33	42.62 ± 27.64*	53.43 ± 15.3 ***
G-acetic acid	5.00 ± 0.89	5.31 ± 1.18	6.25 ± 2.72	5.25 ± 0.90
N-acetylarginine	1.82 ± 0.79	2.32 ± 0.91	1.80 ± 0.40	1.39 ± 0.22
Creatinine	536.01 ± 109.17	813.91 ± 264.11*	407.51 ± 184.94	489.06 ± 105.02
Arginine	62.77 ± 17.06	67.38 ± 8.86	98.70 ± 68.20	56.26 ± 19.13
Guanidine	2.19 ~ 71.43	Trace	1.86 ~ 5.16	2.22 ~ 4.54
Methylguanidine	Trace	Trace	0.43 ~ 1.09	0.39 ~ 1.04

(mean ± S.D.)

* P < 0.05, ** P < 0.02, *** P < 0.01, compared to control (T-test).

期には正常レベルに回復し、けいれん後期には再び有意に増加した。また creatinine はけいれん前、中および後期を通じて著明な増加を認めしたが、特にけいれん直前期の増加が著しかった。その他の guanidino 化合物にはけいれん時における有意の変化を認めなかった。

2) 電気刺激けいれん: ECS 時の脳内 guanidino 化合物の分析例を図3に、分析結果を表2に示す。対照群に比し taurocyamine のけいれん中期における有意の減少が認められた。なお、この減少はけいれん1週間後においても完全に回復しなかった。また creatinine はけいれん直前期に有意の増加を認めしたが、けいれん中には正常レベルに回復していた。その他の guani-

dino 化合物はけいれん時に変動しなかった。

考 察

脳内 guanidino 化合物のうち、taurocyamine⁵⁾、guanidinoacetic acid⁹⁾、 γ -guanidinobutyric acid¹⁰⁾、N-acetylarginine¹¹⁾、および methylguanidine¹²⁾ は、いずれも通常数 mg 程度ウサギ、イヌ、ネコなどの大槽内に注入するとけいれん発作を誘発し、それらの脳内発火部位については深部脳波学的に詳細に観察されている。さらにウサギの pentylenetetrazole けいれん直前およびけいれん中の脳内には γ -guanidinobutyric acid が増加し、そのさい arginine、guanidinoacetic acid および taurocyamine が

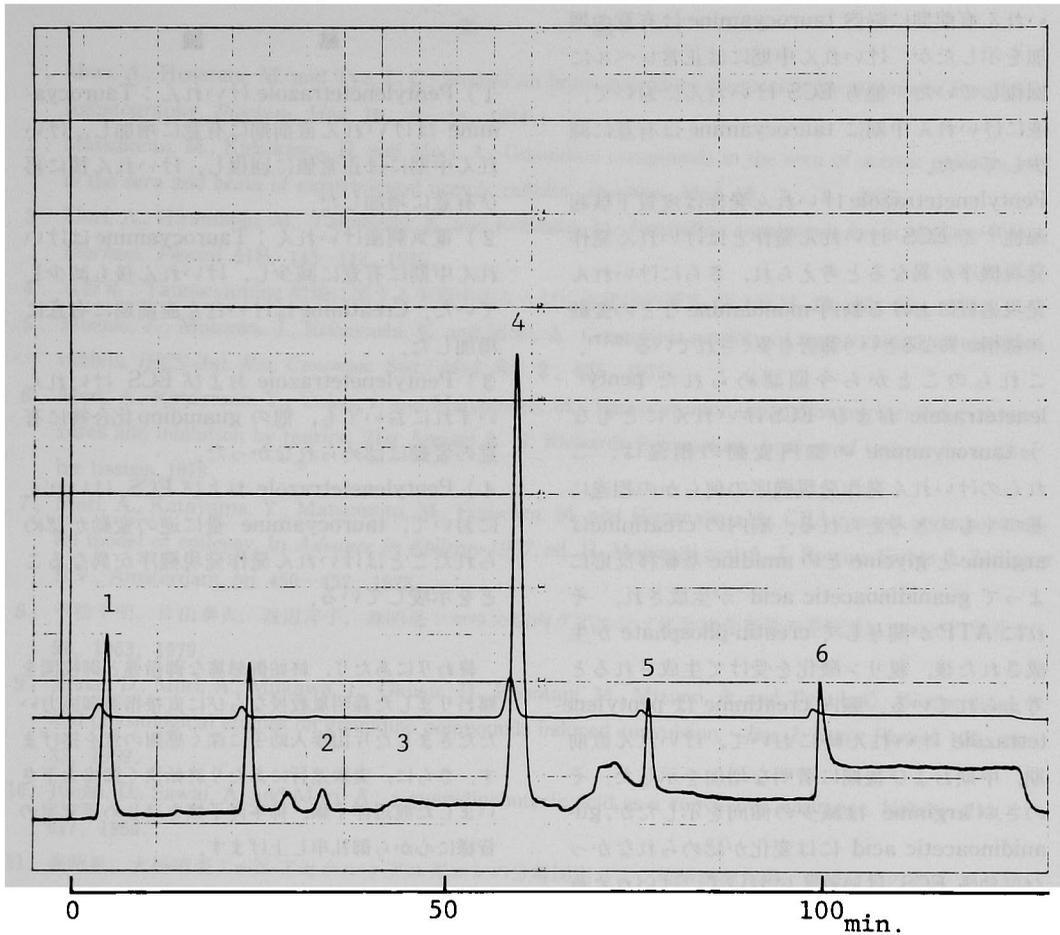


図3：電気けいれん時におけるマウス脳内 guanidino 化合物のクロマトグラム
 1) Taurocyamine 2) Guanidinoacetic acid
 3) N-acetylarginine 4) Creatinine 5) Arginine
 6) buffer change peak

減少していることが報告されている¹³⁾。今回のマウスを用いた実験から、 γ -guanidinobutylic acid は正常時および pentylenetetrazole あるいは ECS けいれん時いずれの脳中に検出できなかった。この原因として、guanidino 化合物の分析には従来坂口反応に基づいた guanidino 化合物自動分析装置¹¹⁾が用いられていたが、今回用いた蛍光法による分析方法では一般の guanidino 化合物に対する検出感度は極めて高いにもかかわらず γ -guanidinobutyric acid のみは検出感度が極めて悪く、正常およびけいれん中の脳内にほとんど検出されなかったことによ

るものと考えられる。Taurocyamine は taurine の N 位 guanidine 置換体で中枢興奮性物質であり、ネコの大槽内に注入すると海馬回後部から発作波が出現し、この発作波は taurine の投与により抑制されることが認められている⁹⁾。またマウスの行動量が taurocyamine 投与により一定時間後に一過性に著明に増加することが観察され、そのさい脳内 dopamine 値が低下することが明らかにされている¹⁴⁾。従って taurocyamine は中枢神経系においては dopamine 系を介して作用することが示唆されている。今回の pentylenetetrazole けいれんにおいては、け

いれん直前期に脳内 taurocyamine は有意の増加を示したが、けいれん中期には正常レベルに回復していた。他方 ECS けいれんにおいて、逆にけいれん中期に taurocyamine は有意に減少していた。

Pentylentetrazole けいれん発作は皮質下核起源性¹⁵⁾で ECS けいれん発作とはけいれん発作発現機序が異なると考えられ、さらにけいれん発現過程における脳内 monoamine などの変動の様相が異なるという報告も多くされている^{16,17)}。これらのことから今回認められた pentylentetrazole および ECS けいれんにともなう taurocyamine の脳内変動の相違は、これらのけいれん発作発現機序の何らかの相違に基づくものと考えられる。脳内の creatinine は arginine と glycine との amidine 基転移反応によって guanidinoacetic acid が生成され、それに ATP が関与して creatin-phosphate が生成された後、脱リン酸化を受けて生成されると考えられている。脳内 creatinine は pentylentetrazole けいれん時において、けいれん直前期、中期および後期に著明な増加を示した。そのさい arginine は減少の傾向を示したが、guanidinoacetic acid には変化が認められなかった。他方 ECS けいれんにおいて、けいれん直前期にのみ creatinine の増加が認められたが、けいれん中には正常レベルに回復していた。また、そのさい arginine および guanidinoacetic acid には有意な変動が認められなかった。中枢神経系における種々の guanidino 化合物は amidine 基転移反応により生成されると考えられているが、その詳細な過程についてはまだ十分明らかにされていない。これらの guanidino 化合物の代謝過程を明らかにし、これらの発作発現機序における役割を明確化することが今後の研究課題であろう。

結 論

- 1) Pentylentetrazole けいれん：Taurocyamine はけいれん直前期に有意に増加し、けいれん中期には正常値に回復し、けいれん後に再び有意に増加した。
- 2) 電気刺激けいれん：Taurocyamine はけいれん中期に有意に減少し、けいれん後も減少していた。Creatinine はけいれん直前期に有意に増加した。
- 3) Pentylentetrazole および ECS けいれんいずれにおいても、他の guanidino 化合物に有意の変動は認められなかった。
- 4) Pentylentetrazole および ECS けいれんにおいて、taurocyamine 量に逆の変動が認められたことはけいれん発作発現機序が異なることを示唆している。

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指導御協力いただきました片山泰人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渡辺洋子嬢、柿本洋子嬢をはじめ研究室の皆様から御礼申し上げます。

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. 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.
3. Mori, A., Hiramatsu, M., Takahashi, K. and Kohsaka, M.: Guanidino compounds in rat organs. *Comp. Biochem. Physiol.* **51B**, 143—144, 1975.
4. 水野見: Taurocyamine 痙攣に関する生理学的ならびに生化学的研究, 阪大医誌 **23**, 13—20, 1971.
5. Mizuno, A., Mukawa, J., Kobayashi, K. and Mori, A.: Convulsive activity of taurocyamine in cats and rabbits, *IRCS (Int. Res. Commun. Syst.) Med. Sci.* **3**, 835, 1975.
6. Mori, A., Katayama, Y., Yokoi, I. and Matsumoto, M.: Taurocyamine (guanidinotaurine) induced seizures and inhibition by taurine. 21st Annual A. N. Richards Symposium, Actions of taurine on excitable tissues, 1979.
7. Mori, A., Katayama, Y., Matsumoto, M., Fujiwara, M. and Hiramatsu, M.: CBA mouse, an experimental model of epilepsy, In *Advance in Epilepsy-1977*, ed. H. Meinardi and A. J. Rowan, Swets & Zeilinger B.V., Amsterdam, pp. 450—452, 1978.
8. 平松千明, 片山泰人, 渡辺洋子, 森昭胤: マウス脳内グアニジノ化合物含有量の系統差について, 生化学 **51**, 1063, 1979.
9. Jinnai, D., Mori, A., Mukawa, J., Okusu, H., Hosotani, M., Mizuno, A. and Tye, L. C.: Biochemical and physiological studies on guanidino compounds induced convulsion, *Jpn. J. Brain Physiol.* **106**, 28—33, 1969.
10. Jinnai, D., Sawai, A. and Mori, A.: γ -guanidinobutyric acid as a convulsive substance. *Nature*, **212**, 617, 1966.
11. 森昭胤, 大楠晴美: α -N-アセチル- γ -アルギニンの分離同定および痙攣誘発作用, 神経研究の進歩 **15**, 304—306, 1971.
12. Matsumoto, M., Kobayashi, K., Kishikawa, H. and Mori, A.: Convulsive activity of methylguanidine in cats and rabbits, *IRCS (Int. Res. Commun. Syst.) Med. Sci.* **4**, 65, 1976.
13. 沢井愛次郎: γ -グアニジノ酪酸の痙攣作用ならびに代謝に関する実験的研究 阪大医誌 **22**, 171—179, 1970.
14. 平松緑, 小原節子, 平松千明, 難波君衣, 森昭胤: Taurocyamine 投与によるマウス脳内モノアミンの変動ならびに行動の異常について, 含硫アミノ酸 **2**, 79—85, 1979.
15. 六川二郎, 早川徹, 中谷進, 岩田吉一, 小林清史: メトラゾールとメジマイドとの発作波賦活における特異性, 脳と神経 **19**, 671—675, 1967.
16. Kobayashi, K. and Mori, A.: Brain monoamines in seizure mechanism, *Folia Psychiatr. Neurol. Jpn.* **31**, 483—489, 1977.
17. Kilian, M. and Frey, H.H.: Central monoamines and convulsive thresholds in mice and rats. *Neuropharmacology* **12**, 681—692, 1973.

Guanidino compounds in mouse brain

II. Guanidino compound levels in brain in relation to convulsions

Chiaki HIRAMATSU

Department of Neurochemistry, Institute for Neurobiology,

Okayama University Medical School

(Director : Prof. A. Mori)

1. Brain guanidino compound levels in ddY mice were analysed in the pre-convulsive stage, during convulsion and at the post-convulsive stage of convulsive seizures induced by pentylenetetrazol or electric stimulation.
2. Significantly increased levels of taurocyamine was found in the pre-convulsive stage, just after pentylenetetrazol injection. This recovered temporarily to normal levels during convulsion, though the level increased again in the post-convulsive stage. Marked increases in creatinine were observed throughout the convulsive seizure induced by pentylenetetrazol; i.e. in the pre-convulsive stage, during convulsion and in the post-convulsion stage.
3. Significantly decreased levels of taurocyamine were found during electrically induced convulsions. Increased levels of creatinine were found in the pre-convulsive stage.