

# Actinomycin D の高等動物中枢神経系に対する作用

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 光 雄

M. Taira : Effects of Actinomycin D on the Central Nervous System of Higher Animals

[昭和48年6月15日受稿]

## はじめに

Actinomycin D は Vining と Waksman<sup>1)</sup>によって Streptomyces から分離された制癌剤であり、その作用機転はこれが生体内の DNA と結合することにあると考えられている (Kawamata ら<sup>13)</sup>, Rauen ら<sup>20</sup>)。この物質は直接脳髄に投与された場合には、数日間の潜時のうち実験動物に全身痙攣を起しめることが、Johnson ら<sup>12</sup> および Koenig ら<sup>14</sup>によって報告されているが、これらは断片的な記載のみである。

本研究においては、髄液内に与えられた actinomycin D の哺乳動物中枢神経系に対する作用、特にこの物質により誘発された痙攣の経過とその機構についての脳波学的な検討を行なった。

まず著者は髄液内投与時における actinomycin D の痙攣閾量を決定するとともに、actinomycin D の中枢作用の、その投与量の変化による差異を観察した。ついで actinomycin D に構造上極めて類似しながら生体内 DNA に結合しないことを特長とする actinomycinic acid を同様に髄液内に投与し、actinomycin D 投与のさいの変化と比較検討した。

他方、長い潜時を持つ痙攣剤として、methionine sulfoximine (Mellanby<sup>21, 22</sup>), Gastaut ら<sup>23</sup>, Proler ら<sup>24</sup> が知られているが、この痙攣閾量を actinomycin D の場合と同一条件で決定し、両物質の痙攣作用に相加性があるかどうかを検討した。

また、哺乳動物中枢神経系に強力な抑制作用を持つと考えられる  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA),  $\gamma$ -amino- $\beta$ -hydroxybutyric acid (GABOB),  $\gamma$ -amino- $\beta$ -sulfonylbutyric acid (S-GABA) などの物質が actinomycin D による痙攣を抑制す

するか否かを観察した。

## 実験方法

Behavioural な痙攣に関する実験にはすべて、中等大の成熟したイヌ (主として体重 6~12kg) を雌雄を問わずに用いた。脳波学的検索には体重 2.5~3.5kg のネコを用いた。諸物質の髄液内投与は、Cisterna magna より行なわれた。被験物質は適当濃度の水溶液として、イヌにはその 0.5~1.0ml を、ネコには 0.2~0.4ml を注入した。

使用した薬物は、つきの通りである。

Actinomycin D (Rutgers 大学 S. A. Waksman 教授より恵与), actinomycinic acid (大阪大学川俣教授より恵与), DNA (和光純薬、ニシン精液製), methionine sulfoximine (Calbiochem),  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) (科研化学),  $\gamma$ -amino- $\beta$ -hydroxybutyric acid (GABOB) (科研化学),  $\gamma$ -amino- $\beta$ -sulfonylbutyric acid (S-GABA) (科研化学)。これらの溶液の pH はそれぞれ、actinomycin D 6.4, actinomycinic acid 5.6, DNA 3.6, methionine sulfoximine 6.5, GABA 7.9, GABOB 6.9, S-GABA 6.9 であった。そのさい溶液の pH が酸性の場合も、それをその数倍量の髄液に混ぜ合わせると、髄液の緩衝能力により、pH がほぼ中性になることを確認した。なお、髄液自身の pH は 7.2 付近であった。

Behavioural な痙攣に関する実験の場合、薬物注入後はイヌを実験室内に自由に行動させ、昼夜をわかつたずく観察した。実験室の温度は 15~20°C であった。

脳波的検索では、ネコの頭蓋骨に小ビスを埋めて、脳表面の誘導電極とした。また Jasper と Ajmone-

Marsan の atlas にしたがって、定位的に直径0.2mmのエナメル被覆銅線を2本はり合わせて先端の被覆をはがした並行双極針状電極をネコの脳内に刺入し、脳深部の誘導電極とした。本実験では routine の方法として、皮質運動領(1. mot), 皮質視覚領(7. vis), 被殻(2. put), 視床の Centre median(3. CM), 視床腹外側核(5. VL), 中脳網様体(4. MRF), および海馬(6. hippocampus)の7か所に誘導電極が配置された。不関電極として、小ビスが頭蓋後頭結節に埋め込まれた。

実験は動物が誘導電極配置の手術から充分に恢復して後に、行なわれた。薬物投与後数日間にわたって1日2回脳波が記録されたが、痙攣発現前は動物は勿論無麻酔、無拘束とした。しかし動物が全身痙攣を繰り返すときは、筋電図の混入を避けるために flaxedil (gallamine triethiodide) による非動化が行なわれた。この場合には気管切開による人工呼吸と股静脈よりの flaxedil の継時投与がなされた。また切開にさいしては、epontol (propanidid) による超短時間麻酔を行ったが、脳波記録は手術後少なくとも数時間にわたったので、data にはこの麻酔薬の影響は除外できた。

### 実験成績

#### 1. Actinomycin D の痙攣作用 (イヌによる)

髓液内に投与された actinomycin D による痙攣の特長は、第1にその潜時は数日に及ぶほど長いことであり、第2にはその痙攣量の幅が狭いこと、すなわち一定の痙攣量以下では勿論痙攣が起こり難いが、その痙攣量を越えてもまた痙攣が起こり難くなることである。

第1表は、種々の量の actinomycin D 投与量による痙攣の有無を、まとめたものである。痙攣量0.025mgが投与されたとき、42例中33例に全身痙攣が見ら

れ、その潜時は約4日（平均 $89.5 \pm 10$ 時間）であった。この場合動物は全例、激しい痙攣を繰り返しながら死に至った。

この物質を痙攣量よりも多く与えると、動物は48時間以内に痙攣前駆期の諸症状（後記参照）を示すようになるが、その大部分は痙攣潜時に死亡する。

痙攣量以下の同物質投与の場合には、4~5日後に、痙攣前駆期の症状が起り、ある場合にはそのまま死亡し、ある場合には生存をつづけた。

髓液内投与の actinomycin D の致死量は0.0063mgであり、これは痙攣量の4分の1である。

Actinomycin D の痙攣作用の経過は、以下のように、痙攣潜伏期、痙攣前駆期、痙攣期に分けられる。

#### A. 痙攣潜伏期

Actinomycin D 注入の当日（第1日）は、動物の状態はほとんど正常であった。翌日（第2日）には動物は元氣を失ない、食欲もなくし、その上しばしば嘔吐した。しかし歩行などの運動は正常であった。第3日には動物は全く元氣を失なって、実験室の床に横たわったままになった。食欲も全くなかった。その後動物は四肢に硬直を起こし、動物を立てようとしても動物は硬直のために倒れてしまった。また動物は無関状態になり、種々の刺激にも反応しなかった。

#### B. 痙攣前駆期

通常第4日目頃に、動物は床に横たわったまま、tremor, 四肢の myoclonic jerk, running fitなどを繰り返して起こした。動物は苦悶の表情を表わし、時には凶暴性を帯びた。この凶暴性は防禦的なもので、主として攻撃に対するものであった。

#### C. 痙攣期

痙攣前駆期の tremor や myoclonic jerk は、急に全身痙攣に移行した。Actinomycin D による大

型発作は定型的なもので、まず強直性痙攣、ついで間代性痙攣、最後に歩行性痙攣に移行した。痙攣期の初期にはまずこの大型発作が間歇的に起こるが、その極期にはこれが重積して起こり、いわゆる Status epilepticus を呈した。ついでこの大型発作は再び間歇的になり、動物は次第に衰弱して死に至った。Actinomycin D 痙攣量投与のさいの生存時間は、平均 $122 \pm 40$ 時間であった。

第1表 イヌの大槽内に投与された actinomycin D の作用

投与量(mg)	全身痙攣例 / 実験例	全身痙攣潜時 (時間)	予後	生存時間 (時間)
1.5~0.15	0/4	—	全例死亡	58
0.05	1/5	75	全例死亡	80
0.025(痙攣量)	33/42	* $89.5 \pm 10$	全例死亡	* $122 \pm 40$
0.0125	1/4	102	全例死亡	148
0.0063	1/2	106	全例死亡	275
0.0031~0.0016	0/2	—	全例生存	—

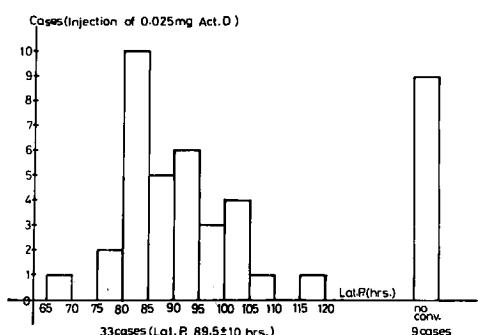
\* 平均値士標準偏差

Actinomycin D を痙攣量 (0.025mg) 投与した場合の痙攣例33例の痙攣潜時を、第1図に histogram として示す。潜時は80~85時間を peak として、やや崩れた標準分布を示している。第2図は同じく痙

第1図 Actinomycin D 0.025mgのイヌの大槽内投与による全身痙攣の潜時

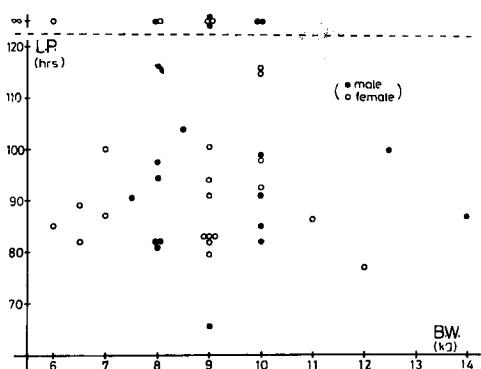
縦軸：例数  
横軸：痙攣潜時（時間）

42例中33例が全身痙攣を起こし、9例は痙攣を起こさなかった。



第2図 Actinomycin D 0.025mg投与による痙攣潜時とイヌの体重との関係

縦軸：痙攣潜時（時間）（∞：痙攣（-））  
横軸：イヌの体重（kg）（●：雄、○：雌）  
イヌの体重差または雌雄の別は、actinomycin D 0.025mg投与による痙攣潜時に、有意の差をもたらさなかった。



痙攣潜時と動物の体重（および雌雄）との関係である。用いられた動物の体重の範囲では、体重の差および雌雄の別は痙攣潜時には関係がなかった。

## 2. Actinomycin D の脳波におよぼす影響（ネコによる）

イヌの actinomycin D 痙攣量を参考にして、ネコにおける同物質の痙攣量を求めた。イヌの体重 1kgあたりの痙攣量を計算して、これにネコの体重を掛けると約 0.008mgになるが、この量の actinomycin D の投与では、ネコに痙攣は起こらなかった。ネコにおけるこの物質の痙攣量は、イヌの場合と同量の、0.025~0.031mg であった。

この量の actinomycin D をネコの Cisterna magna 内に投与すると、やはり数日の後に、ネコは繰り返して全身痙攣を起こすようになった。動物が数回全身痙攣を起こすのを確かめた後、flaxedil により動物の非動化が行なわれた。本実験では、この状態において、seizure discharge 誘発のために、四肢の他動的な屈伸運動、または flash による光刺激が動物に与えられた。

第3図は、actinomycin D 0.031mgによって、その投与後4日目に起こされた定型的な generalized seizure discharge の単極誘導記録である。この3葉の記録は、同一の seizure discharge からとられた。同図、A は発作波の初期の記録であるが、ここで見られる矢印において、発作波誘発のための四肢の屈伸が動物に与えられた。この記録で見られるように、発作誘発から約15秒たつと、まず小振幅の spike があらわれる。これは大脳皮質と視床 VL 核に優位であり、hippocampus には、まったくあらわれない。そしてこれにひきつづき、全誘導に高振幅 spike の群発が記録された。さらに、この spike のなかにしだいに slow wave が混じるようになり、全誘導に同期して、頻度の高い spike and wave または polyspike and wave complex が繰り返された。

同図、B は、発作波中期の記録である。同図の A の終りから B のはじめまでの間隔は、120秒である。同図、B すなわち発作波の中期では、全誘導に同期して、規則正しく spike and wave または polyspike and wave complex が繰り返されている。しかしこれの頻度は、同図、A に見られる発作波初期のものよりも減少している。

同図、C は、発作波末期の記録である。同図、B の終りと C のはじめの間隔は、40秒である。ここでは、やはり spike and wave または polyspike and

第3図 Actinomycin Dのネコの大槽内投与による generalized seizure discharge I (単極誘導)

Actinomycin D 0.031mg投与後、4日目。本図の3葉は、ひとつの seizure discharge の経過から記録された。動物は flaxedil により非動化されている。

## A : Seizure discharge の初期

他動的な四肢の屈伸（矢印）が動物に与えられてから約20秒後、spike の群発が全誘導にあらわれ、その後しだいに spike に slow wave が混じるようになった。

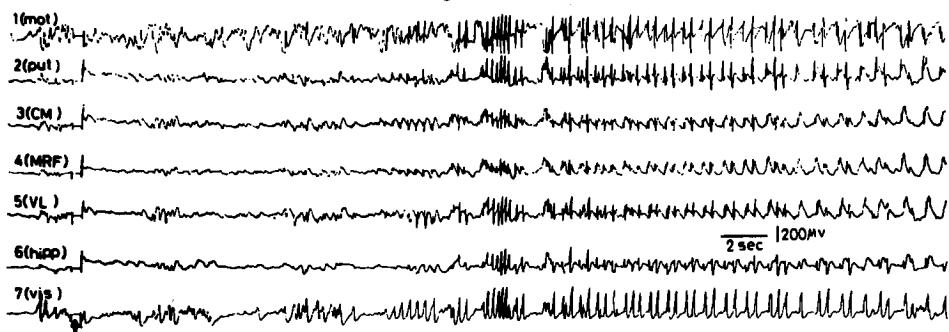
## B : seizure discharge の中期

この写真は、写真Aより120秒後にとられた。この時期には全誘導にわたって、比較的規則正しく spike and wave または polyspike and wave があらわれている

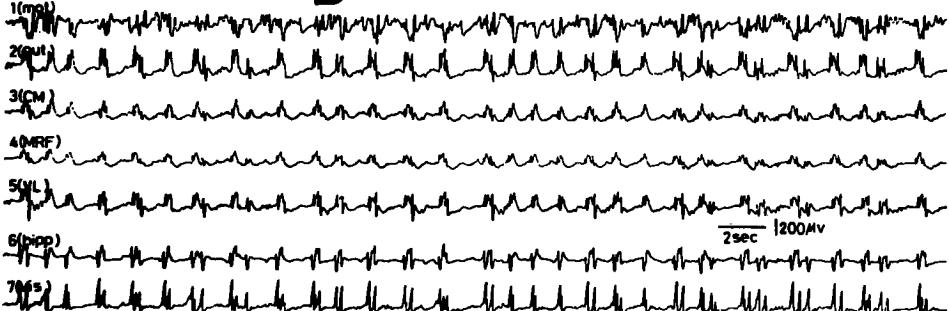
## C : Seizure discharge の終期

これは、写真Bより40秒後にとられた。各 spike and wave complex の間隔が、しだいに長くなっている

## A (4days actD 0.031mg)



## B



## C



第4図 Actinomycin Dによるネコの generalized seizure discharge II (単極誘導)

Actinomycin D 0.031mg投与後、4日目。本図の2葉は、連続して記録された：動物は非動化されている

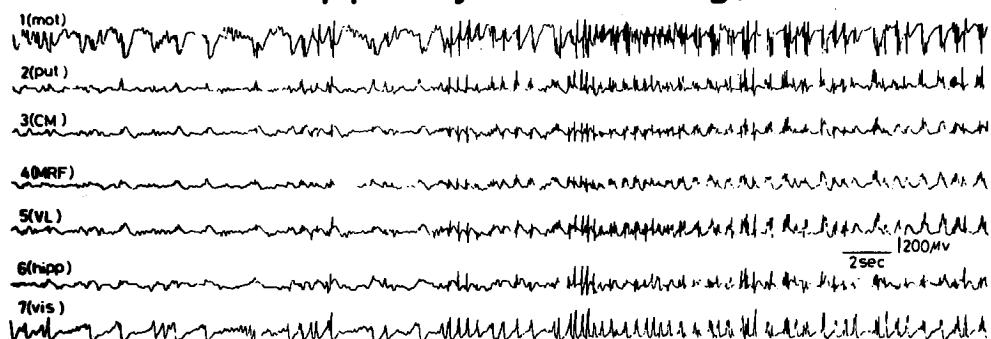
A : Seizure discharge の前期

四肢の屈伸運動から数秒の後、これの記録が始められた。すなわちこの発作誘発から約30秒後に、全誘導に spike の群発が見られ、それはしだいに spike and wave の形になった

B : Seizure discharge の後期

Spike and wave の間隔が増し、やがて seizure discharge が終了した

### A (4days actD 0.031mg)



### B



wave complex が全誘導に同期してあらわれているが、その間隔はしだいに長くなる。同図、Cの終りとともにこの seizure discharge は終了し、その後しばらくの間脳波には振幅の低下が見られ、spike は出現しなかった。この generalized seizure discharge の持続は、約4分30秒であった。

第4図は、actinomycin Dによる generalized seizure discharge の単極誘導記録のいまひとつの例である。この場合には seizure discharge の持続は短く、A、B 2枚の記録は、連続してとられたものである。同図、Aの記録は、動物四肢の屈伸運動から数秒後に開始された。ここで見られるように、記録開始から約10秒で、散発性の spike がはじまっ

ている。これは大脳皮質において、もっとも優位である。この場合発作波誘発から約30秒後に、全誘導に群発性の spike があらわれている。そしてこれは第3図で見られたように、しだいに spike and wave または polyspike and wave complex に変っていくが、本図では seizure discharge の全経過が短く、約30秒である。同図、Bの後半で見られるように、seizure discharge 終了後しばらくの間、spike はあらわれない。

Actinomycin Dによって発作が数時間以上にわたって反復して起こる場合、比較的初期に起こる発作波は一般に持続が長く、動物が発作を繰り返して一般状態が悪くなると、発作波の持続は短縮する。第

第5図 Actinomycin Dによるネコの generalized seizure discharge III(皮質脳波(1, 7) - 単極誘導, 深部脳波(2, 3, 4, 5, 6) - 双極誘導)

Actinomycin D 0.031mg投与後, 4日目. 本図の3葉は, 連続して記録された. 動物は非動化されている

Calibration: 3葉とともに, 1, 7~200  $\mu$ V, 2, 5, 6~100  $\mu$ V, 3, 4~50  $\mu$ V

A: Seizure discharge の初期

四肢屈伸より約15秒後に, 記録が始められた. この発作誘発より約45秒後に, spike の群発があらわれた. これは大脳表面(1, 7)ならびに視床 VL 核(5)で, 顕著だった.

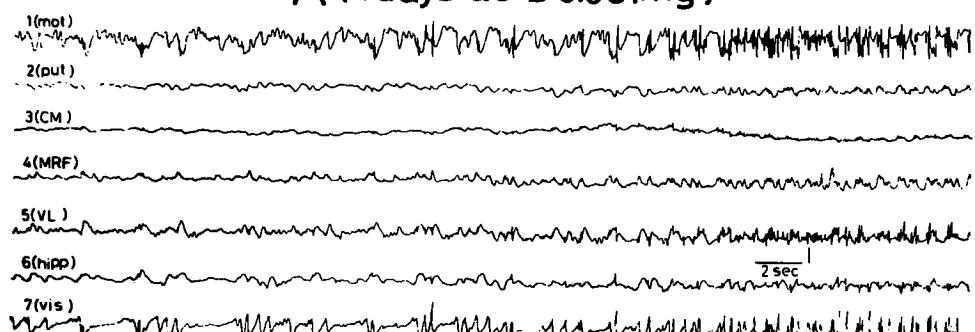
B: Seizure discharge の中期

不規則な形の spike and wave complex が, 大脳皮質と視床 VL 核に連続して出現した. 他の部位では, これに対応して slow wave が優勢に見られた

C: Seizure discharge の終期

Generalized seizure discharge が消失した後にも皮質および VL 核には spike が散発的に出現している

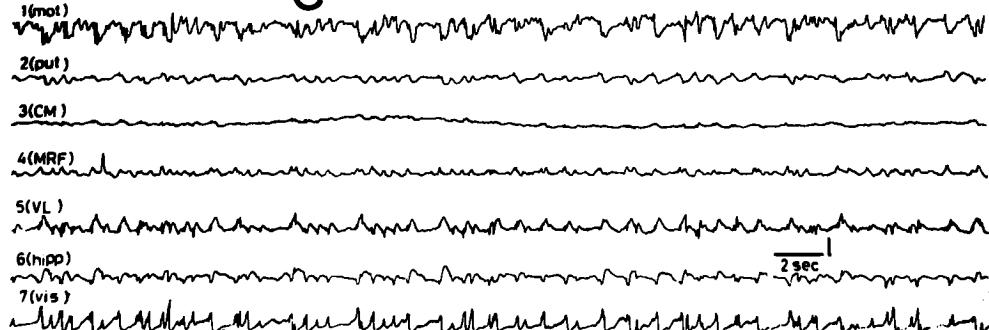
**A (4days actD 0.031mg)**



**B**



**C**



3図は発作反復の初期にとられたもので、その持続は長く、第4図は動物がかなりすでに痙攣を繰り返した後にとられたものであり、その持続は短い。

第5図は、actinomycin Dにより起きたgeneralized seizure dischargeのいまひとつの例である。この3枚の記録は、連続してとられている。同図では、表面脳波(1, 7)は単極誘導であるが、深部脳波(2, 3, 4, 5, 6)は双極誘導である。双極誘導の記録はその増幅率を上げているが、これについては同図の説明を参照されたい。同図、Aの記録は、発作誘発のために動物の四肢を屈伸させてから約15秒後に、開始された。記録開始より約20秒後に、大脳皮質から散発性のspikeが記録された。さらに10秒後、多くの誘導に群発性のspikeが記録された。これは大脳皮質と視床VL核に優位であり被殻と視床Centre medianにはほとんど認められ

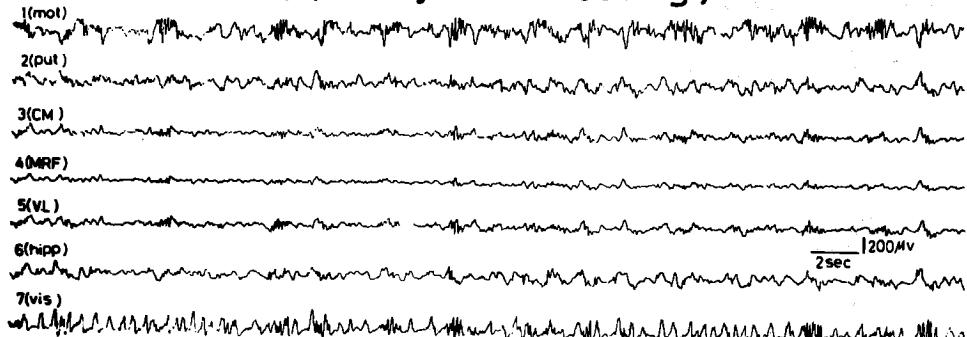
なかった。Seizure dischargeは同図、B; Cとつづくが、本図においてはspike and wave complexの出現は前掲の2図よりも不規則であり、また明瞭なspike成分が認められたのは、大脳皮質(運動領と視覚領)ならびに視床VL核のみであった。

第6図は、actinomycin Dによる発作間歇期のseizure dischargeである。これはgeneralized seizure dischargeの数分後に単極誘導により記録されたもので、動物は非動化されている。ここでは数個のspike群が、ある間隔を置いて散発的に見られている。これらspikeは大脳皮質と視床VL核に優位であるが、全誘導に同期してあらわれることもある。Actinomycin D投与から数日の後、動物はこのような脳波を呈しながら、ときどき、特に発作誘発行為の後、前記のgeneralized seizure dischargeを示す。

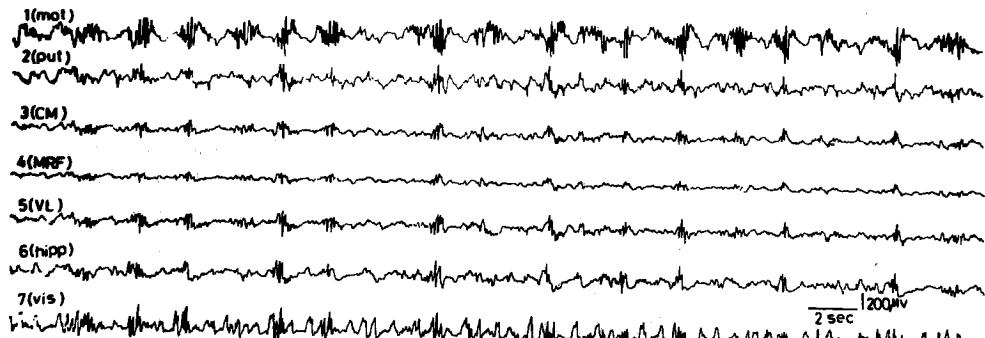
第6図 ネコの発作間歇期のseizure discharge(単極誘導)

Actinomycin D 0.031mg投与後、4日目。本図の記録は、generalized seizure dischargeの数分後になされた。2葉の記録は、連続してとられた。動物は非動化されている。全誘導にかなり規則正しく、群発性のspikeがあらわれている

### A (4days actD 0.031mg)



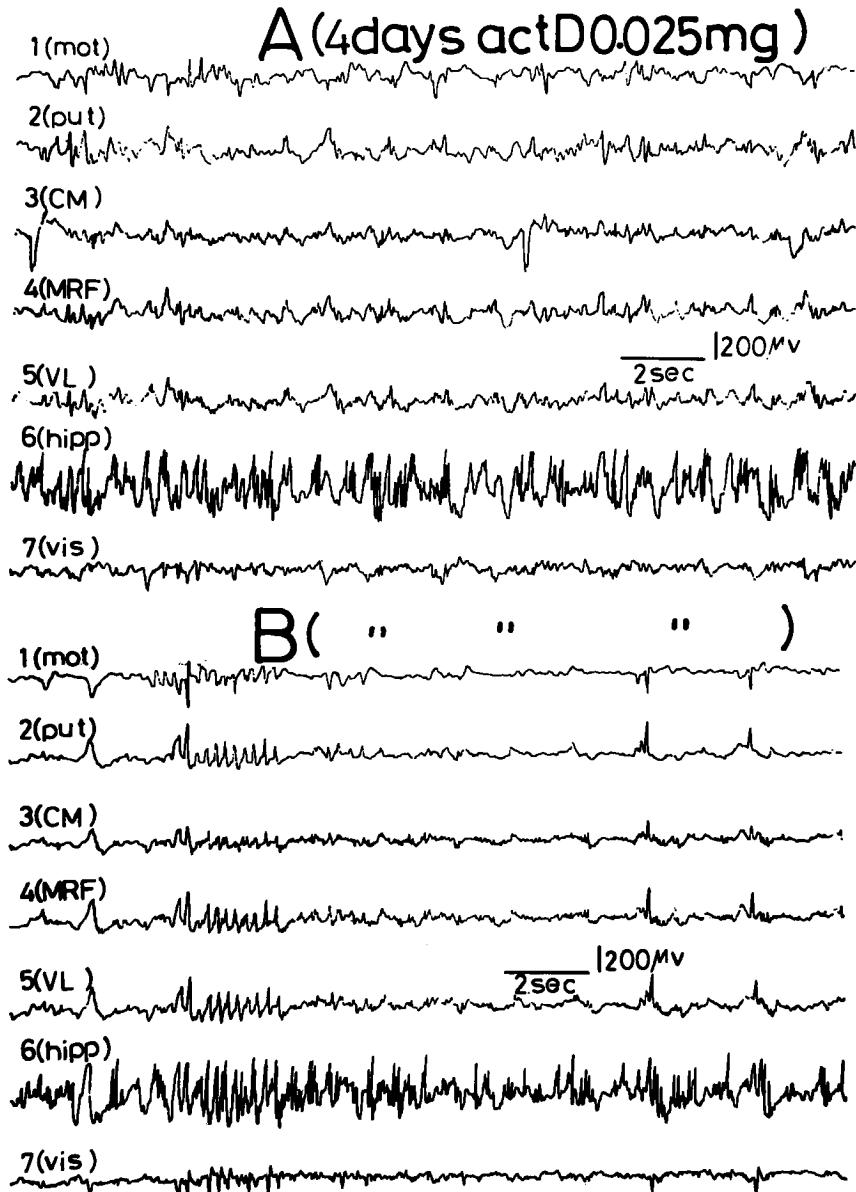
### B



第7図 Actinomycin D投与によるネコの hippocampal spike discharge (単極誘導)

Actinomycin D 0.025mg投与後、4日目。2葉の記録は、連続してなされた。動物は非動化されている。

Hippocampus に、spike discharge があらわれている



Actinomycin D による脳波上の、generalized seizure discharge 以外の所見として、この物質を与えて数日後に、hippocampus にのみ spike が出現する例がしばしば見られた。第7図は、actinomycin D 0.025mg投与から4日後の記録である。これは単極誘導で、動物が全身痙攣を数回繰り返したので、非動化した後の記録である。Hippocampus の

みに spike があらわれ（同図、A）、あるいはときにそれとともに他の誘導にも spike があらわれている（同図、B）。この例では、非動化した後に generalized seizure discharge は一度も見られなかった。

Hippocampal spike discharge は、いくつかの実験例にあらわれたが、前掲の第3図～第5図のよ

うに、これが必発というわけではなかった。

またネコにおいても、actinomycin D 投与により全身痙攣を起こす前に、いわば痙攣前駆期の症状として、tremor や myoclonic jerk を呈することが

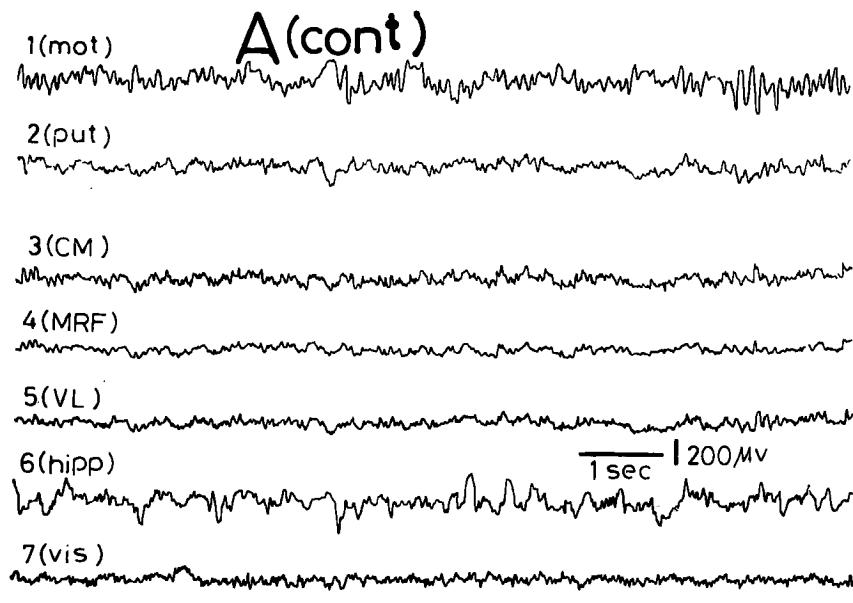
あった。第 8 図、B は、actinomycin D 0.008mg 投与の 4 日後に、myoclonic jerk の発生と同時に記録されたものである。これは単極誘導であり、動物はいまだ全身痙攣を起こさず、したがって非動化され

第 8 図 Actinomycin D によるネコの 8 cps 波の出現（単極誘導）

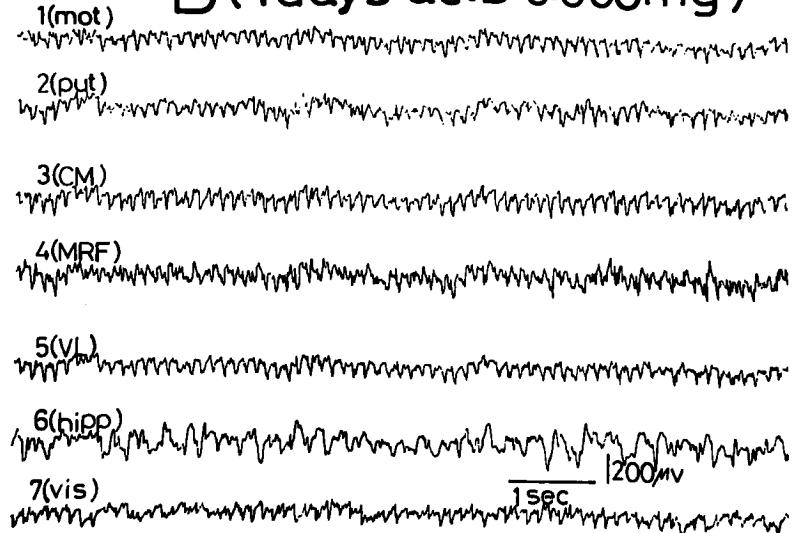
A : 投与前

B : Actinomycin D 0.008mg 投与後、4 日目。

本例では動物は全身痙攣を起こさず、したがって非動化されていない。動物が myoclonic jerk を起こしている間、hippocampus 以外の全誘導に規則正しい 8 cps 波が出現した



B (4 days actD 0.008mg)



ていない。ここでは hippocampus を除く全誘導に、規則正しい 8 cps の波が見られ、これは myoclonic jerk が終るまでつづいていた。

以上が、actinomycin D 髓液内投与による、ネコ脳波の特記すべき点である。

### 3. Actinomycinic acid の髓液内投与

Actinomycin D のラクトン環が開いた形の actinomycinic acid は、構造上 actinomycin D に類似しながら、生体内の DNA と結合しないことが知られている。この物質の作用を actinomycin D と比

第 2 表 イヌの大槽内への actinomycinic acid の投与

投与量 (mg)	例 数	痙攣および行動異常	予 後
0.1	2	なし	全例生存
0.05	2	なし	全例生存
0.025	2	なし	全例生存
0.0125	2	なし	全例生存

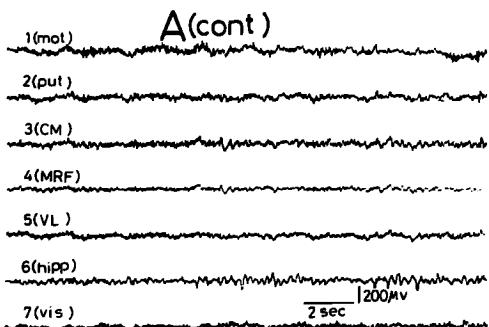
第 9 図 Actinomycinic acid 投与のネコの脳波 I  
(単極誘導)

A : 投与前

B : Actinomycinic acid 0.008mg 投与の翌日。

著変なし

C : 同投与の 5 日後。著変なし



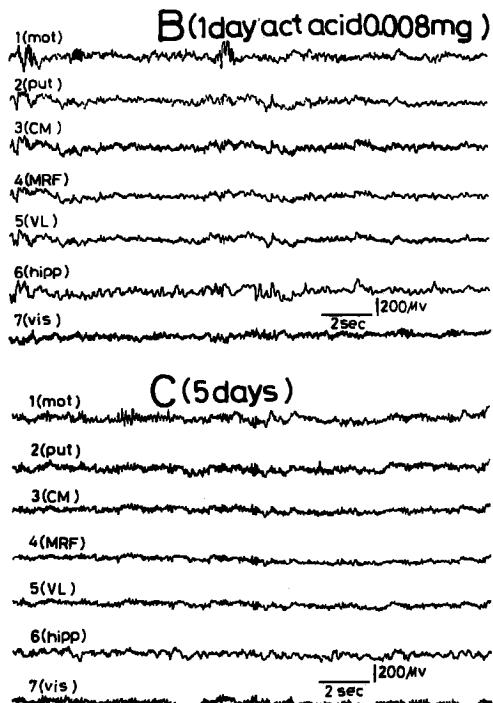
較するため、これの actinomycin D 痙攣量付近を動物の髄液内に注入し、動物の behaviour および脳波を観察した。

### A. Behaviour について (イヌによる)

Actinomycin D の痙攣量である 0.025mg を中心にして、0.1~0.0125mg の actinomycinic acid を 8 例のイヌの髄液内に投与したが、見るべき変化は何もあらわれなかった (第 2 表)。以上の実験例では、behaviour 観察のかぎりでは、動物は全く正常と変らず、全身痙攣はおろか一切の不随意運動や運動失調を呈さず、食欲も旺盛であり、動物は物質投与前と同様によく尾を振り、人になついた。また、実験の結果死亡したものは 1 例もない。これらは actinomycin D の場合と、全く対照的な結果であった。

### B. 脳波について (ネコによる)

Actinomycinic acid 0.008~0.031mg をネコの髄液内に投与し、脳波に及ぼす影響を見た。第 9 図は同物質 0.008mg、第 10 図は 0.031mg 投与のさいの脳波記録である。これらの場合、投与後約 1 週間観察し



第10図 Actinomycinic acid 投与のネコの脳波II

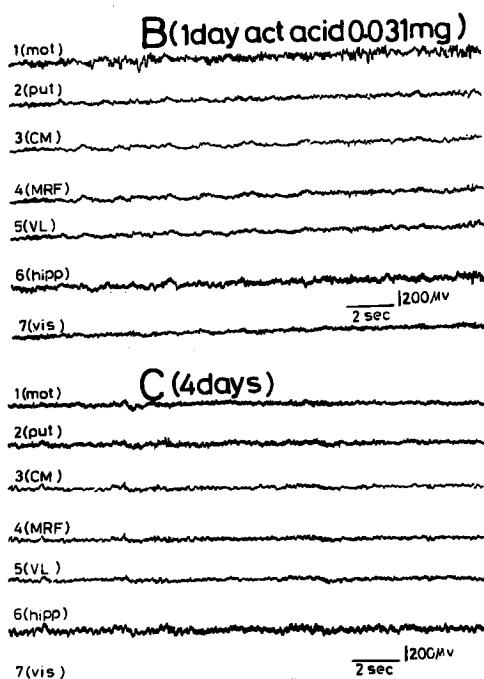
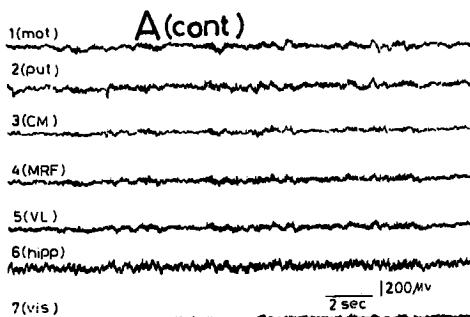
(単極誘導)

A : 投与前

B : Actinomycinic acid 0.031mg投与の翌日.

著変なし

C : 同投与の4日後. 著変なし



たが、脳波の上には seizure activity はおろか、顕著な変化は、何も見られなかった。この間、ネコの behaviour にも、見るべき変化はなく、生存をつづけた。

#### 4. Actinomycin D と DNA との同時投与（イヌによる）

Actinomycin D の痙攣誘発作用に及ぼす DNA の拮抗作用の有無を調べるために、下記の実験を試みた。

まず予備実験として、20mg DNA の髄液内単独投与を行なったが、動物に全く変化が起らぬことを確認した。

本実験としては、まず actinomycin D 0.025mg と DNA 20mg を、同時に髄液内に投与し、さらに、痙攣潜伏期間中 1 日 1 回 DNA 20mg を髄液内に追加投与した。その結果、同一の実験条件を与えた 14 例中、10 例に痙攣が観察された（平均潜時は  $94.0 \pm 10.0$  時間）。そのさい痙攣の有無にかかわらず、動物はすべて死亡した。すなわち、actinomycin D に DNA をあわせて与えても、痙攣発生率、痙攣潜時、あるいは死亡率は、actinomycin D 単独投与のさいと有

意の差が認められなかった。また、痙攣の激しさ、その連続性の pattern なども、actinomycin D 単独投与の場合とほとんど変わらなかった。

#### 5. Actinomycin D と methionine sulfoximine

の痙攣誘発についての干渉作用（イヌによる）

まず actinomycin D の場合と同一条件で、methionine sulfoximine の単独投与を試みた。その結果を第 3 表に示す。実験動物の半数以上に痙攣を起こさせる有効投与量は、0.18mg であることがわかった。この場合 10 例中 8 例に痙攣が認められ、その平均潜時は  $14.0 \pm 3.0$  時間であった。Methionine sulfoximine は actinomycin D とならんで、長潜時を持つ痙攣剤であるといわれるが、前者の潜時は後者の数分の 1 に過ぎない。また、methionine sulfoximine による痙攣の全経過は、ほぼ actinomycin D 痙攣の時間経過を数分の 1 に短縮したと考えて大差はない。ただ前者の場合はその痙攣の極期において、後者のように全身痙攣が連続して起こることはなかった。また両薬物の痙攣閾量投与においては、死亡率は methionine sulfoximine のほうが、actinomycin D よりも高い傾向があった。

第3表 イヌの大槽内に投与された methionine sulfoximine の作用

投与量 (mg)	全身痙攣例／実験例	全身痙攣の平均潜時 (時間)	死亡例／実験例	生存時間 (時間)
0.5	3/3	9	2/3	19
0.4	2/2	12	1/2	20
0.36	4/5	9	4/5	30
0.3	1/1	10	1/1	
0.27	1/2	11	0/2	—
0.18	8/10	*14.0±3	4/10	30
0.09	1/4	19	1/4	68

\* 平均値±標準偏差

第4表 イヌの大槽内に投与された actinomycin D (act D) と methionine sulfoximine (MS) との干渉 (本文参照)

投与量 (mg) act D → MS 75時間	全身痙攣例／実験例	全身痙攣の平均潜時 (MS投与後、時間)	死亡例／観察例
0.025+0.18	6/8	14.0	8/8
0.025+0.09	3/3	13.5	3/3
0.025+0.045	2/3	26.5	3/3
0.0125+0.18	1/6	23	3/3
0.0063+0.18	3/6	12	3/6
0.0031+0.18	2/3	18.5	1/3

りもはるかに低い。

ついで actinomycin D と methionine sulfoximine とが痙攣誘発について、いかなる干渉態度を示すかを観察した。この結果は第4表に示される。このさい、両物質の痙攣潜時の差を考慮して、最初に actinomycin D を脳液内に注入し、それから潜時の差である75時間後に、methionine sulfoximine を注入した。

すなわち、まず痙攣量の actinomycin D を投与し、この作用を、痙攣閾量あるいはそれ以下の methionine sulfoximine が変化させるかどうか検討した。結果は明らかに前者の作用は後者によって影響されなかった。

ついで、この逆に、痙攣量以下の actinomycin D

第5表 イヌの actinomycin D 痙攣に対する 酪酸誘導体の効果 (\*本文参照)

酪酸誘導体	投与量 (mg)	例 数	効 果
GABA	50	3	なし
GABOB	100	1	なし
GABOB	80	1	なし
GABOB	50	2	なし
GABOB	30	1	*若干あり
S-GABA	100	3	なし

をあらかじめ投与し、これが痙攣閾量の methionine sulfoximine の作用を変化させるかどうかを検討した。ここでは、痙攣量の半量～4分の1量の actinomycin D をあらかじめ投与したのち、痙攣有効量である 0.18mg の methionine sulfoximine を投与したが、痙攣は認められなかった。特に痙攣量の半量 (0.0125mg) の actinomycin D と 0.18mg の methionine sulfoximine を投与した場合、もし両者に痙攣誘発について相加性があれば、半数以上に痙攣が起るはずであるが、実際には 6 例中 1 例にのみ痙攣が認められたにすぎない。

#### 6. Actinomycin D 痙攣に対する酪酸誘導体 (GABA, GABOB, S-GABA) の作用

まず痙攣量の actinomycin D を脳液内に注入し、あるいは間代性痙攣初発時に、あるいは定型的な間代性痙攣を数度繰返した後に、あるいは痙攣極期の連続痙攣を起しているときに、50mg の GABA, 30～100mg の GABOB, あるいは 100mg の S-GABA ( $\gamma$ -amino- $\beta$ -sulfonylbutyric acid) を脳液内に投与して、これら酪酸誘導体の痙攣に対する影響を観察した。

その結果は第5図に示されるが、合計 11 例中 GABOB 投与の 1 例を除いて、酪酸誘導体は actinomycin D 痙攣にはほとんど抑制効果をもたらなかった。前記の 1 例は、actinomycin D により間代性痙攣

を主徴とする全身痙攣を約20時間繰返したのち、30mgのGABOBを髄液内投与した例であるが、この場合はそれまでの明瞭な間代性痙攣がmyoclonic jerkあるいはtremorに変わった。しかし、これは痙攣初発より20時間を経過した例であるので、この例のみからGABOBのactinomycin D痙攣に対する抑制作用を論することはできない。

### 考 察

1. Actinomycin Dが生体内のDNAと特異的に結合することは、Kawamataら<sup>13)</sup>およびRauenら<sup>20)</sup>により証明されている。Actinomycin Dによる痙攣誘発作用も当然まずこの神経細胞内DNAとの結合に帰因することが推定される。他方、この物質と構造上非常に類似しているactinomycinic acidの投与では全く痙攣が見られぬことも、この物質が、DNAと結合しないことを考えると、actinomycin D痙攣の一次的な成因が、この物質の生体内DNAとの結合であるという推定を有力たらしめる。

Hayashiは薬物痙攣に関するその広範な業績をmonograph<sup>10)</sup>にまとめているが、多くの痙攣剤は数分から数時間の潜時で痙攣を引き起こすものである。例外的に長潜時のうち痙攣を起こすのはmethionine sulfoximineであるが、これでも痙攣潜時は十数時間程度である。その点、平均潜時が89.5±10時間であるactinomycin Dはきわめて特殊なものといいう。この点より考えればその痙攣は、metrazol, strychnine,あるいはglutamic acidなどによる一般的な薬物痙攣よりも、むしろcobalt powderやalumina creamの脳髄内埋没による『慢性てんかん焦点』の痙攣(Kopeloffら<sup>18)</sup> Ward<sup>21)</sup> Cesa-Bianchiら<sup>9)</sup>に類似性が求められる。

一方、温血動物脳髄ではepileptogenic neuroneの細胞内電位誘導により、発作波出現の機構に関する研究がすすめられている。Matsumotoら<sup>19)</sup><sup>20)</sup><sup>21)</sup><sup>22)</sup> Prince<sup>26)</sup><sup>27)</sup> Dichterら<sup>5)</sup><sup>6)</sup>は、epileptogenic neuroneの特長は、paroxysmal depolarization shift(PDS)と呼ばれる群発性のspikeを伴なう一時的な膜の脱分極であるという。彼らはここでPDSの成因は、神経細胞膜の変化あるいはシナプス活動の変化によるという。軟体動物巨大神経細胞を用いて、ChalazonitisおよびTakeuchi<sup>28)</sup>はmetrazolにより、その細胞内電位がPDSによく似た形に変わることを報告している。さらに、竹内<sup>29)</sup>は同一材料で、metrazol, bemegrideなど数種の痙攣剤に

より同様な変化が起こるのを確認している。Chalazonitisらはこの細胞内電位の変化を、シナプス活動の変化というより、細胞膜の性質の変化として理解すべきと考えている。

したがって、actinomycin Dを投与すると、この物質が神経細胞内のDNAと結合し、DNA dependent RNA合成が阻害されて(Goldbergら<sup>21)</sup> Shatkin<sup>22)</sup>)そのため神経細胞内の蛋白合成阻害が起こり、その結果が細胞膜の変化あるいはシナプス活動の変化を生ぜしめ、上記の研究者らが観察したPDSを呈するところのepileptogenic neuroneがつくられるのであろうか?、あるいはactinomycin Dの生体内DNAとの結合により、何らかの物質代謝異常が発生し、そのさい產生される異常代謝産物が神経細胞に、epileptogenicに作用するのであろうか?

Actinomycin Dと同時にDNAを髄液内に投与してもかかわらず、痙攣を防止できなかったことは、予想に反する結果であるが、これはおそらく外から投与した水溶液としてのDNAの核内存在様式との差に基づくことと推定される。髄液内に投与されたDNAは、そこにはいつまでも止まらずに速かに流れ去ってしまうものか、それともactinomycin DとDNAとでは髄液から神経細胞に至るまでの組織透過性に大きな差があるのか、このような事柄も考慮されるべきであろう。

2. 脳波的所見としては今日までにわずかにJohnsonら<sup>12)</sup>のみが、actinomycin投与(彼らはactinomycin Dを用いていない)のさいの脳波を断片的に報告しているに過ぎない。彼らはサルの大脳皮質の、left central regionに1mgのactinomycin(これは本研究に比べれば、非常に大量な投与である)を注入して、左側表面誘導にslow waveの出現、また右側表面誘導に不規則なspikeの混合を観察しているが、これらの変化はあまり顕著なものではない。また彼らはこれに併せて、脳組織の壊死を報告している。

Actinomycin Dによるgeneralized seizureの脳波は、すでに記録されているmetrazolあるいはelectroshockによるもの(Cookら<sup>4)</sup> Starzlら<sup>23)</sup> Chatrianら<sup>31)</sup>)と、本質的には同様な経過を示した。ただ、actinomycin痙攣の極期においては、spike and waveの反復を特長とする間代性痙攣期の持続が、数分におよぶほど長かった。

Actinomycin D投与により、hippocampusに顕著なspike dischargeが見られたことがあった。

同時に hippocampus 以外の部位にも spike があらわれる場合があったが、これは hippocampus において圧倒的に優位であった。この事柄は、 limbic system のうち hippocampus, amygdala, cortex pyriformis などが発作波発射の閾値が低く、この部位ではわずかな機械的刺激によって容易に spike を見ること（小池上<sup>15)</sup>）に一致する。しかし本研究では hippocampal spike は必発の現象ではなく、またこれは hippocampus に限局することが多く、これが generalized seizure discharge に発展することは本実験例では見られなかった。

いずれにしても脳液内に投与された actinomycin D は脳の特定箇所を特異的に epileptogenic にするのではなく、恐らく脳の広範な部分に epileptogenic な変化を与えるのであろうと推定される。

3. 痙攣誘発のさいの metrazol と bemegrideのごとく (Drossopoulo ら<sup>17</sup>), 2種の痙攣剤は相加的に働く場合が普通である。Actinomycin D の痙攣作用を閾下の methionine sulfoximine が妨げないのは理解できるとしても、痙攣閾量の methionine sulfoximine と痙攣量の半量付近の actinomycin D とが痙攣誘発のために相加性を示すどころか、後者がかえって前者の痙攣作用の打消しに働いたのは、予想に反する結果であった。これは恐らく、両物質の痙攣作用の機構が異なることを示すものであろうし、さらに、methionine sulfoximine の痙攣誘発作用を妨げたのは、actinomycin D の痙攣誘発作用以外の作用に基づくものであろう。Johnson ら<sup>18)</sup>が脳の壞死を記載しているように、一般に動物は actinomycin D の脳液内投与により、痙攣を誘発する以外にも、中枢神経系全般にわたる重篤な侵襲を受ける。この点 actinomycin D は痙攣誘発に特異的な物質ではない。痙攣閾量の methionine sulfoximine と痙攣量の半量付近の actinomycin D との投与の場合、おそらく actinomycin D による中枢神経系の重篤な変化が、同時に起こっているであろう。その閾下の痙攣作用を越えて、methionine sulfoximine の痙攣作用を抑制する形であらわれるのではないか？また methionine sulfoximine 痙攣には、methionine, glutamine, asparagine などのアミノ酸が拮抗的に働くという報告がある (Tower<sup>35)</sup>), Actinomycin D の投与により生じた物質代謝の変化が methionine sulfoximine 痙攣に拮抗的な物質をつくり出す可能性も、否定し得ぬであろう。

Methionine sulfoximine 痙攣の生化学的機構に

ついてはいまだに定説はないが、同物質による中枢神経内の glutamine 産生の阻害 (Peters ら<sup>25</sup>), また acetylcholine の減少 (Tower ら<sup>37</sup>) などが報告されている。いずれにしても、methionine sulfoximine の痙攣機構は、actinomycin D のような核酸代謝の問題には結びつかないのであるまいか？

4. GABA は Krnjevic ら<sup>17) 18)</sup>により、高等動物大脳皮質神経細胞のあるものに顕著な抑制作用を有することが証明され、これらの細胞における抑制性伝達物質の有力な候補にあげられている。GABOB は Hayashi<sup>19)</sup>により、高等動物運動系に強い抑制作用を有することが報告されている。また S-GABA については少数例の実験報告であるが、この物質が高等動物の metrazol ならびに electroshock による痙攣を抑制するという記載がある (斎藤<sup>20</sup> 斎藤 ら<sup>21</sup>)。しかし actinomycin D による痙攣に対しては、これら 3種の酪酸誘導体は確実な抑制効果をほとんど示さなかった。酪酸誘導体の抗痙攣作用は、用いた痙攣剤の種類、すなわちその痙攣誘発の機構の違いによって異なるのであろう。

上述のごとく、actinomycin D 痙攣の特長は、第 1 に潜時が他の痙攣剤に比して著しく長い点、痙攣発作が反復すること、また、この一次的な成因がこの物質の生体内 DNA との結合として理解できる点である。Actinomycin D 痙攣はこれらの特長により種々の実験的てんかんのうちでも特に、症候性てんかんの機構解明に、電気生理学、生化学あるいは形態学など広範な研究手段の下において、重要な意義を持つであろうと推測され、今後多くの領域におけるこれらの応用的研究が期待される。

## 要 約

1. Actinomycin D をイヌの脳液内に投与すると、3～5日の長い潜時で動物は全身痙攣を起こした。この痙攣量は 0.025mg であり、それによって 42 例中 33 例に痙攣が見られ、その平均潜時は 89.5 ± 10 時間であった。痙攣型は定型的な全身痙攣であり、動物は激しく痙攣を繰返したのち全例死に至った。

2. Actinomycinic acid を脳液内に投与しても痙攣は認められなかった。

3. ネコの脳液内に actinomycin D を投与して数日後に、動物は脳波上定型的な generalized seizure discharge を反復して示した。この場合まず高振幅 spike の群発が起り、これに spike and

wave または polyspike and wave complex がつづいた。やがて spike and wave complex の出現頻度がだいに減少し、発作波が終了した。また actinomycin D 投与により、hippocampus に顕著な spike discharge が見られることがあった。

また痙攣前駆期において、myoclonic jerk の発生と同時に、hippocampus を除く全誘導に 8 cps の規則的な波が見られた。

他方、actinomycinic acid の投与によっては、脳波上にも顕著な変化はあらわれなかった。

4. Actinomycin D と同時に DNA を髄液内に投与し、その拮抗作用の有無をしらべたが、この DNA の投与によっては、actinomycin D 痙攣は防止できなかった。

5. Actinomycin D と methionine sulfoximine との干渉作用を検討し、痙攣閾量以下の methionine sulfoximine は actinomycin D の痙攣作用を妨げないが、逆に痙攣量の半量付近の actinomycin D

は methionine sulfoximine の痙攣作用を抑制することを観察した。

6. GABA, GABOB, S-GABA の actinomycin D 痙攣に対する確実な抑制作用は、ほとんど認められなかった。

本研究は今はなき慶應義塾大学医学部林巖名謹教授により計画され、その御指導のもとになかばまでなされた。その不幸なる御逝去にひきつづいて、岡山大学医学部脳代謝研究施設機能生化学部門森昭胤教授の御指導ならびに御鞭撻をえた。また同病態生化学部門高坂睦年教授および同機能生化学部門竹内宏助教授の御鞭撻をえた。

本研究に使用した actinomycin D はその発見者 Rutgers 大学 S. A. Waksman 教授より、actinomycinic acid は大阪大学微生物病研究所川俣順一教授より恵与されたものである。

これらの方々に衷心より厚く、感謝の意を表する。

## 参考文献

- 1) Cesa-Bianchi, M.G., Mancia, M. and Mutani, R. : Experimental epilepsy induced by cobalt powder in lower brain-stem and thalamic structures. EEG clin. Neurophysiol., **22**; 525 (1967)
- 2) Chalazonitis, N. et Takeuchi, H. : Amples oscillations du potentiel de membrane induites par le métrazol (neurones autoactifs d'Helix pomatia). C.R. Soc. Biol., **162**; 1552 (1968)
- 3) Chatrian, G.E. and Petersen, M.C. : The convulsive patterns provoked by indoklon, metrazol and electroshock: some depth electrographic observations in human patients. EEG clin. Neurophysiol., **12**; 715 (1960)
- 4) Cook, L.C. and Walter, W.G. : The electro-encephalogram in convulsions induced by cardiazol. J. Neurol. Neurosurg. Psychiat., **1**; 180 (1938)
- 5) Dichter, M. and Spencer, W.A. : Penicillin-induced interictal discharges from the cat hippocampus. I. Characteristics and topographical features. J. Neurophysiol., **32**; 649 (1969)
- 6) Dichter, M. and Spencer, W.A. : Penicillin-induced interictal discharges from the cat hippocampus. II. Mechanisms underlying origin and restriction. J. Neurophysiol., **32**; 663 (1969)
- 7) Drossopoulou, G., Gastaut, H., Verdeau, G.&J. and Schuller, E. : Comparison of EEG "activation" by pentamethylenetetrazol (metrazol) and bemegride (megimide). EEG clin. Neurophysiol., **8**; 710 (1956)
- 8) Gastaut, H., Toga, M. and Naquet, R. : Clinical, electrographical and anatomical study of epilepsy induced in dogs by the ingestion of agenized proteins. In "Second international colloquium on temporal lobe epilepsy" ed. by M. Baldwin and P. Bailey, C.C. Thomas, Springfield, **268** (1958)
- 9) Goldberg, I.H. and Rabinowitz, M. : Actinomycin D inhibition of desoxyribonucleic acid-dependent synthesis of ribonucleic acid. Science, **136**; 315 (1962)

- 10) Hayashi, T. : Neurophysiology and neurochemistry of convulsion. Dainihon Tosho, Tokyo (1959)
- 11) Hayashi, T. : The inhibitory action of  $\beta$ -hydroxy- $\gamma$ -aminobutyric acid upon the seizure following stimulation of the motor cortex of the dog. J. Physiol., 145; 570 (1959)
- 12) Johnson, H.C., Walker, A.E., Case, T.J. and Kollros, J.J. : Effects of antibiotic substances on the central nervous system. Arch. Neurol. Psychiat., 56; 184 (1946)
- 13) Kawamata, J. and Imanishi, M. : Interaction of actinomycin with deoxyribonucleic acid. Nature, 187; 1112 (1960)
- 14) Koenig, H., Spehlmann, R. and Jacobson, S. : Encephalopathy and convulsive disorder produced by actinomycin D. Epileptogenesis through interference with RNA synthesis. Trans Amer. Neurol. Ass., 91; 273 (1966)
- 15) 小池上春芳：大脳辺縁系. 中外医学社. 東京 (1965)
- 16) Kopeloff, N., Whittier, J.R., Pacella, B.L. and Kopeloff, L. : The epileptogenic effect of subcortical alumina cream in the rhesus monkey. EEG clin. Neurophysiol., 2; 163 (1950)
- 17) Krnjevic, K. and Phillis, J.W. : Iontophoretic studies of neurones in the mammalian cerebral cortex. J. Physiol., 165; 274 (1963)
- 18) Krnjevic, K. and Schwartz, S. : Is  $\gamma$ -aminobutyric acid an inhibitory transmitter? Nature, 211; 1372 (1966)
- 19) Matsumoto, H. : Intracellular events during the activation of cortical epileptiform discharges. EEG clin. Neurophysiol., 17; 294 (1964)
- 20) Matsumoto, H. and Ajmone-Marsan, C. : Cortical cellular phenomena in experimental epilepsy: interictal manifestations. Exp. Neurol., 9; 286 (1964)
- 21) Matsumoto, H. and Ajmone-Marsan, C. : Cortical cellular phenomena in experimental epilepsy: ictal manifestations. Exp. Neurol., 9; 305 (1964)
- 22) Matsumoto, H., Ayala, G.F. and Gumnit, R.J. : Neuronal behavior and triggering mechanism in cortical epileptic focus. J. Neurophysiol., 32; 688 (1969)
- 23) Mellanby, E. : Diet and canine hysteria. Brit. Med. J., 2; 885 (1946)
- 24) Mellanby, E. : Further observations on the production of canine hysteria by flour treated with nitrogen trichloride, agene process. Brit. Med. J., 2; 288 (1947)
- 25) Peters, E.L. and Tower, D.B. : Glutamic acid and glutamine metabolism in cerebral cortex after seizures induced by methionine sulphoximine. J. Neurochem., 5; 80 (1959)
- 26) Prince, D.A. : Inhibition in "epileptic" neurons. Exp. Neurol., 21; 307 (1968)
- 27) Prince, D.A. : The depolarization shift in "epileptic" neurons. Exp. Neurol., 21; 467 (1968)
- 28) Proler, M. and Kellaway, P. : The methionine sulfoximine induced syndrome in the cat. Epilepsia, 3; 117 (1962)
- 29) Rauen, H.M., Kersten, H. and Kersten, W. : Zur Wirkungsweise von Actinomycinen. Z. Physiol. Chem., 321; 139 (1960)
- 30) 斎藤宜基：抗痙攣物質としての  $\gamma$ アミノ  $\beta$ ハイドロオキシ酷酸 (GABOB),  $\gamma$ アミノ  $\beta$ スルフォニール酷酸 (S-GABA) および  $\gamma$ アミノ  $\beta$ フオニール酷酸 (P-GABA) の比較研究, 条件反射. 77; 1 (1967)
- 31) 斎藤宜基, 長岡二郎：犬の C.S.F.投与によるメトラゾール痙攣に対する S-GABA の抑制作用, 条件反射, 82; 11 (1967)
- 32) Shatkin, A.J. : Actinomycin D and vaccinia virus infection of hela cells. Nature, 199; 357 (1963)
- 33) Starzl, T.E., Niemer, W.T., Dell, M. and Forgrave, P.R. : Cortical and subcortical electrical activity in experimental seizures induced by metrazol. J. Neuropath. exp. Neurol., 12; 262 (1953)

- 34) 竹内宏：向神経性薬物作用の細胞レベルにおける解析——軟体動物巨大神経細胞による。条件反射, 111; 92 (1971)
  - 35) Tower, D.B. : Nature and extent of the biochemical lesion in human epileptogenic cerebral cortex. Neurology, 5; 113 (1955)
  - 36) Tower, D.B. : The evidence for a neurochemical basis of seizures. In "Second international colloquium on temporal lobe epilepsy" ed. by M. Baldwin and P. Bailey, C.C. Thomas, Springfield, 301 (1958)
  - 37) Tower, D.B. and Elliott, K.A.C. : Experimental production and control of an abnormality in acetylcholine metabolism present in epileptogenic cortex. J. appl. Physiol., 5; 375 (1953)
  - 38) Vining, L.C. and Waksman, S.A. : Paper chromatographic identification of the actinomycins. Science, 120; 389 (1954)
  - 39) Ward, A.A.jr. : The epileptic neurone. Epilepsia, 2; 70 (1961)
- 

### Effects of Actinomycin D on the Central Nervous System of Higher Animals

Mitsuo TAIRA

Division of Neurochemistry, Institute for Neurobiology, Okayama University Medical School ( Director : Prof. Akitane MORI )

#### ABSTRACT

When a dose of actinomycin D was intrathecally injected into higher animals (dogs and cats), these animals experienced generalized seizures after a latent period of several days.

The critical seizure producing quantity was 0.025 mg on the dog. Actinomycin D combines with DNA in the nervous tissue of the brain, this may be the cause of the seizure effect.

When the same dose (0.025 mg) of actinomycinic acid, which has a chemical structure resembling that of actinomycin D, but does not combine with DNA in the tissue, was injected into the cerebro-spinal fluid of the dog, the animals did not show any behavioural change.

Electroencephalographic studies of the actinomycin D seizure were carried out on the cat. Several days after the administration of actinomycin D, the animal showed the typical generalized seizure discharges. A generalized seizure discharge induced by actinomycin D began with the occurrence of frequent spikes in group in all of recording sites, then the repetition of a spike and wave complex or a polyspike and wave complex followed. The intervals of each spike and wave complex gradually grew longer, and the seizure discharge stopped.

After the actinomycin D administration, the electroencephalogram sometimes showed remarkable spike discharges occurring in the hippocampal region. They occurred mostly in hippocampus, but to a lesser degree spike discharges occurred in the other regions.

In the preconvulsive state after the actinomycin D administration, regular waves of 8 cps occasionally appeared simultaneously with the occurrence of myoclonic jerks.

In the case of the injection of actinomycinic acid into the cat, no significant change occurred on the electroencephalogram.

However, the injection of DNA into the cerebrospinal fluid, simultaneously performed, with the injection of actinomycin D, did not stop the seizure effect of the latter.

Methionine sulfoximine, characterized by a seizure effect with a long latent period, was also injected into the cerebro-spinal fluid of the dog. The critical seizure producing quantity was 0.18 mg. These two convulsants with long latent period, the actinomycin D and the methionine sulfoximine, did not produce seizure effects when combined in different proportions.

Three butyric acid derivatives (GABA, GABOB and S-GABA) did not arrest the actinomycin D seizure effect.