

## ep 系マウスの痙攣阻止に関する実験的研究

## 第 2 編

## Diphenylhydantoin の ep 系マウス脳物質代謝におよぼす影響について

(本論文の要旨は第11回日本生化学会中国・四国部会総会において発表した)

岡山大学医学部第1(陣内)外科教室(指導:陣内教授)

大学 院 生 笠 原 潤 治

〔昭和37年7月30日受稿〕

## 第1章 緒 言

私は本論文第1編において各種抗痙攣剤の ep 系マウスの痙攣発作におよぼす影響を検索し, glutamic acid, asparagine,  $\gamma$ -aminobutyric acid (以下 GABA と略す), および  $\gamma$ -amino- $\beta$ -hydroxybutyric acid (以下 GABOB と略す) はこれらの大量を連続投与しても, ep 系マウスの痙攣発作に対してなんら抑制効果を示さないけれども, diphenylhydantoin (以下 Dph. と略す) は ep 系マウス痙攣発作を阻止し, その痙攣発作に対して極めて有効なることを見出した。抗痙攣剤の痙攣発作におよぼす影響についての検索について, 抗痙攣剤がいかなる脳代謝系のいかなる過程に, いかにして選択的かつ有意に影響をおよぼすかを見出すことがその発作活動と直接関係していると思われる機構を解明してゆく上に必要となつてくる。脳代謝には acetylcholine (以下 Ach と略す) 代謝のほか, 脳の興奮過程の生化学的背景として水分電解質代謝や glutamic acid およびその関連アミノ酸代謝などがあり, これらすべての機構が互いに密接に関連しており, それらを分離して考えることはできない。

したがって私は本編において, ep 系マウスの痙攣発作に対して極めて強い抑制効果を示す Dph. 100 mg/kg を連続投与した際, ep 系マウスのこれらの脳代謝系にどのような影響をおよぼすかについて若干の実験を試みた。すなわち, まず ep 系マウス大脳の cholinesterase (以下 ChE と略す) 活性を目標として Ach 代謝の問題をとりあげ, ついで ep 系マウス大脳皮質の含水量, ナトリウムおよびカリウム量について水分電解質代謝を調べ, さらに ep 系マウス大脳の glutamic acid, GABA お

よび glutamic decarboxylase 活性につき glutamic acid およびその関連アミノ酸代謝の問題をとりあげ, Dph. の主としてこれらにおよぼす影響を検索した。

## 第2章 実験方法

## 第1節 実験動物

ep 系マウスは第1編, 第2章, 第1節においてのべたと同様のものを用いた。対照として, ep 系マウスと同一成長時期の, ほぼ同体重の CF-I 系純系マウスを使用した。

## 第2節 Dph. の投与方法

第1編, 第2章, 第3節においてのべた方法にしたがつて, Dph. の 100 mg/kg を ep 系マウスおよび CF-I 系マウスに1日1回3週間連続経口投与した。

## 第3節 測定試料

無投与と安静時ならびに Dph. の 100 mg/kg を連続投与した際の1週間目および3週間目のマウス全大脳またはその皮質を用いて諸種の測定を行なった。マウスは興奮させぬように自由に放置しておき大型の鉢で, 一挙に断頭してその大脳を剔出した。

## 第4節 ChE 活性値の測定法

ChE の定量には, 従来 Ach を主体とする基質に組織を混じて加熱し, 分解して出てくる酢酸をアルカリで滴定するか, あるいは予め基質に重曹を処方して置いて, 酢酸によつて炭酸ガスを発生させ, その容積をはかる方法等が使われているが, 最近酢酸発生による基質 pH の低下  $-\Delta\text{pH}$  を測定して組織 ChE 濃度を知らうとする検査方法が相ついで報告された。すなわち Vorhaus, Scudamore and Kark (1950)<sup>1)</sup>, Alcalde (1950)<sup>2)</sup> および高橋, 柴田法<sup>3)</sup> などであつて, 私は高橋, 柴田法を参照して, Ach 製剤 Ovisot を使い, phenolred を比色による

反応の進行をみる指示薬とし、堀場製作所製の HRL, PH-meter M-3 型を使つて基質の pH および組織の pH をはかり  $-\Delta\text{pH}$  を測定した。上述のごとく剔出したマウス大脳を直ちにドライ・アイス・アセトン中に、投下し凍結せしめたのち正確に秤量し、Ringer 液を混じて 10% の homogenate とした。

### 試 薬

(1) 緩衝液 (pH 8.3): 200 ml 容ビーカーにバルビタール 0.6 g をとり、蒸溜水 100 ml を加え加温溶解後室温に冷し、これにバルビタールナトリウム 2.0 g および  $\beta$ -グリセロリン酸ナトリウム 2.5 g を加えて、500 ml メスシリンデルに移し、標線まで蒸溜水を追加する。phenolred を指示薬として pH を測定し、8.3 であることを確かめ、もしこれより高ければ 1 N-HCl を加えて調整する。この緩衝液は少量のクロロホルムを加えて氷室に保存すれば 2 ヶ月間は安定である。

(2) Ach 液: 塩化アセチルコリン (第一製薬会社の注射薬 Ovisot) 0.1 g を使用直前蒸溜水 2.0 ml に溶解して作製した。

(3) 40mg/dl phenolred 液: phenolred (特級品) 100 mg を秤り、0.1 N-NaOH 3.0 ml および水 7.5 ml を加えて加温溶解し、放冷後水を追加して全量を 250 ml とする。

(4) エゼリン液:

i) 保存液: 硫酸エゼリン 0.1 g を水 20 ml に溶かし褐色瓶に入れて氷室に保存する。

ii) 使用液: 保存液 1 ml を水で 10 倍に薄める。これも氷室に保存し明らかに着色 (桃色) するまでは使用しうる。

### 実施:

試験管 A および B にそれぞれ下記の順序に試薬を加えて転倒混和後直ちに 37°C 恒温槽にひたす。

A (対照) 緩衝液 1.5 ml + 蒸溜水 3.0 ml + Ach 液 0.5 ml + phenolred 液 0.15 ml

B (組織) 緩衝液 1.5 ml + 蒸溜水 3.0 ml + Ach 液 0.5 ml + 10% homogenate 0.2 ml + phenolred 液 0.15 ml

正確に加温 1 時間後 A, B 両試験管を槽よりとり出し、すばやくエゼリン液 1~2 滴を加えて混和すると、ChE 活性を阻害する。pH meter にて A, B 両試験管液の各 pH すなわち pH(A) および pH(B) を求むれば、ChE 活性は  $\Delta\text{pH} = \text{pH}(B) - \text{pH}(A)$  によつて表わされる。

### 第 5 節 含水量測定法

デッキグラスをあらかじめ化学天秤にて正確に秤

量し、これを  $P_0$  とする。ついでマウス大脳皮質を厚さ 1 mm,  $3 \times 3 \text{ mm}^2$  大に切り、この薄片の平均 10 個を先のデッキグラスに載せて秤量し、これを  $P_1$  とする。ついで 100°C の乾燥器に入れ完全に恒量となつたときの重さを  $P_2$  とする。このようにしてえられた測定値より、マウス大脳皮質の全水量が計算できるが、実験成績としては、下記の式のごとく、全水量を乾燥前の組織重量に対する百分比で表わした。  

$$\text{全水} = (P_1 - P_2 / P_1 - P_0) \times 100 (\%)$$

### 第 6 節 ナトリウムおよびカリウム定量法

デッキグラスを濃塩酸にて洗い、ついで脱イオン水にて十分洗滌し、これを正確に秤量する。次にマウス大脳皮質 80 mg 前後を厚さ 1 mm,  $3 \times 3 \text{ mm}^2$  大に切つた平均 10 個の薄片とし、これを上記のデッキグラスに載せ、ついで 100°C の乾燥器に入れ完全に恒量となるまで乾燥し、再び秤量する。かくして大脳皮質の乾燥重量を知りうる。次にデッキグラスと同様に処理した試験管内にデッキグラスを含めた上記試料を粉碎して入れる。これに濃硫酸および過酸化水素水を加えて湿性灰化したのち、脱イオン水にて 20 ml とし、これを日立製焰光光度計 FPF 2 型にてナトリウムおよびカリウムの値を測定し、mEq/g dry weight を求めて成績とした。

### 第 7 節 Glutamic acid および GABA の定量法

Moore, Spackman and Stein<sup>4)</sup> の "Improved System" に準拠して、イオン交換樹脂 Amberlite IR-120 を使用して行つた。その概略についてのべる。

(1) イオン交換樹脂: Amberlite IR-120 (400~600 mesh) を使用し、Hamilton<sup>5)</sup> の方法にしたがつてこれを処理、分割し、その B-fraction を 50 cm の column に、C-fraction を 150 cm の column に使用した。その要点は次のごとくである。

(2) イオン交換 column の作成: Moore, Spackman and Stein<sup>4)</sup> の方法にしたがつて作成した。また樹脂流入時の圧は 20 cm Hg とした。

(3) Column 溶出に用いる緩衝液: 第 1 表に示すごとき緩衝液を使用した。これらは Moore, Spackman and Stein<sup>4)</sup> の使用しているものに準拠しているが、thiodiglycol を加えていない。

(4) Column にかかる圧力と流速: column の圧力は加圧装置にて緩衝液を入れてある分液漏斗上を 18~20 cmHg に加圧した。流速は、150 cm column では 8~10 ml/hr., 50 cm column の場合は 10~12 ml/hr. である。

第1表 クエン酸緩衝液の組成

PH	Sodium concn., N	Citric acid	Na OH	HCl	Final vol., liters	Phenol added to Final vol., g.
		H <sub>2</sub> O, g.	(97%), g.	(concd.) ml.		
2.2 ± 0.03	0.20	105	42	80	5	0
3.25 ± 0.01	0.20	840	330	426	40	40
4.26 ± 0.02	0.38	532	312	307	20	20

使用前 1 l 当り 5 ml の Emagen S<sup>6)</sup> を加える。

(5) 組織抽出液の作成：マウスを断頭して、dry ice-aceton 中に投入し凍結せしめたのち、大脳を剔出し 5 匹を 1 群として 1.0 g を秤量後 1% ピクリン酸水溶液を加えて 15 ml となし、homogenize したのち遠沈し、その上澄部分 10 ml をとり、これをイオン交換樹脂 Dowex 1-X5 (Cl 型) の column に通し、ピクリン酸を吸着分離せしめる。このさいアミノ酸は溶出するが、さらに 0.02 N HCl を 5 ml ずつ 5 回 column に通し、アミノ酸を完全に溶出せしめ、この溶出液を合せて一緒にし、一旦蒸発乾固せしめたのち前記 pH 2.2 の緩衝液に溶かして、計算により最初にとつた 1.0 g の組織が 5 ml になるように希釈し、これの 1 ml を 1 回の分析のために使用した。

(6) Column 分析の手技：まず上記の組織抽出液 1 ml を column の上端に添加するのであるが、150 cm column の場合には最初 30°C の温度で pH 3.25 の緩衝液を使用して、glutamic acid および glycine の peak が溶出し終るまで流出を続ける（流出量約 210 ml）。次いで 50 cm column では、同様に試料を流して pH 4.26 の緩衝液を 30°C で使用すると、酸性および中性アミノ酸の peak 後に GABA が溶出してくる（流出量約 160 ml）。

(7) 定量：column の溶出液は fraction collector にて、2 ml 分画に分け、比色はニンヒドリン改良反応<sup>7)</sup>により、定量は Moore and Stein<sup>8)</sup> の記載にしたがつて、L-leucine により求めた標準曲線により算出した。回収率については、glutamic acid および GABA については 100 ± 3% 範囲内にあり、これらの同定は Stein の記載<sup>8)</sup> にしたがつた。

#### 第8節 Glutamic decarboxylase 活性値の測定法

森ら<sup>9)</sup>の方法にしたがい、次のごとく実験系をもちいて測定した。

標準実験系：Thumberg 管に下記のごとく加えて全量 3.0 ml とし、これを N<sub>2</sub> 中に 72 時間 38°C

に incubate したのち 7.0 ml の ethylalcohol を加えて反応を停止せしめたのち、遠心沈澱を行ない、その上清 1 ml を放射能測定用ステンレス試料皿にとり、常法にしたがい赤外燈下で乾燥せしめ、神戸工業製の 2π Gas Flow Counter にて β 線の測定を行ない、counts per minute (cpm) を測定し、

1. 20% brain homogenate	2.0 ml
(buffer: phosphate pH=6.60)	
2. glutamic acid (10mg/ml)	0.5 ml
3. D. L-glutamic acid-1- <sup>14</sup> C	0.25 μc
	= 0.5 ml
全量	3.0 ml

これから <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> として実験系から散逸した放射能の cpm を計算し、対照（同一実験系を incubate せず ethylalcohol を加えて同様に操作を行なつたもの）の cpm 測定によつてえられた値との比 (%) を求め、これを glutamic decarboxylase の活性値とした。

### 第3章 実験成績

#### 第1節 ep 系マウスの体重におよぼす影響

実験に先だち、Dph. の 100 mg/kg を ep 系マウスおよび CF-I 系マウス各 10 匹に 3 週間連続投与し、その間 3 日毎に体重を測定した。その成績は第 2 表のごとくである。すなわち両者とも経過中時に軽度の失調が認められたものもあつたけれども、各々の平均値では体重の変化に有意の差は認められなかつた。

第2表 Diphenylhydantoin 投与の ep 系マウスの体重におよぼす影響

投与日数	0	3	6	9	12	15	18	21
ep系マウス 体重 g	29.0	28.4	28.5	28.8	28.5	28.4	28.6	28.2
CF-I系マウス 体重 g	29.3	29.2	28.9	29.0	29.0	28.8	28.8	28.6

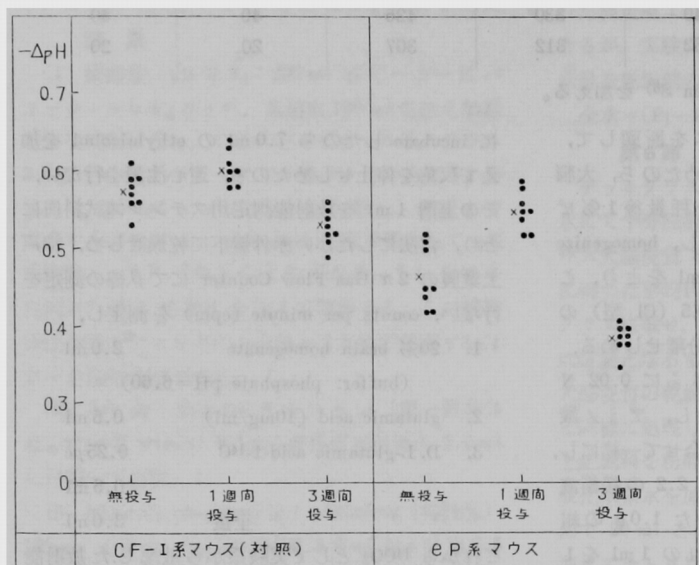
(各10匹の平均値)

## 第2節 ep 系マウス大 脳ChE

## 活性値におよぼす影響

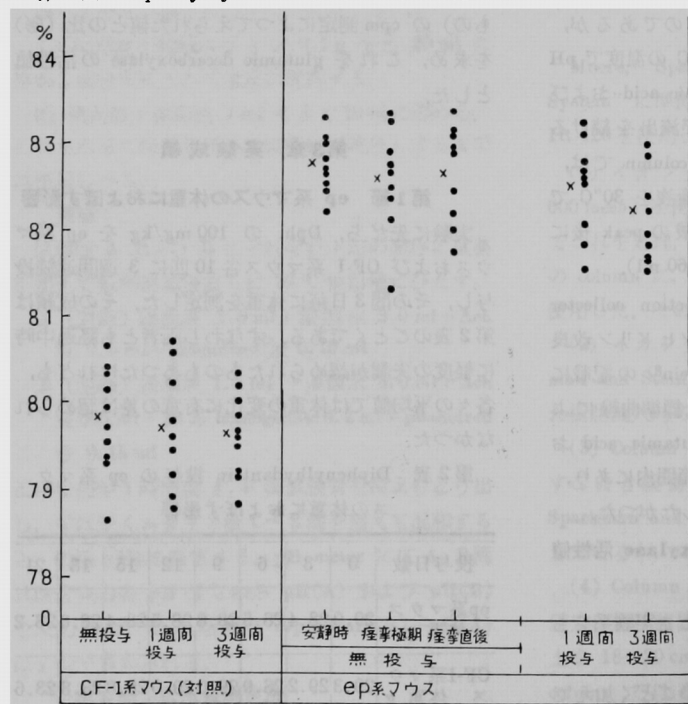
第2章, 第4節においてのべたとき実験方法に

第1図 Diphenylhydantoin 投与の大脳 cholinesterase 活性値におよぼす影響



× 平均値

第2図 Diphenylhydantoin 投与の大脳皮質全水量におよぼす影響



× 平均値

より, ep 系マウス大脳の ChE 活性値を測定した。その成績は第1図に示すごとくである。

## (1) 無投与と安静時の場合

CF-I 系マウス(対照)では動揺範囲は  $-\Delta pH 0.53 \sim 0.61$  で, 8例の平均  $-\Delta pH 0.57$  である。

ep 系マウスでは動揺範囲は  $-\Delta pH 0.42 \sim 0.52$  で, 8例の平均  $-\Delta pH 0.46$  である。

## (2) Dph. 1週間投与の場合

CF-I 系マウスでは動揺範囲は  $-\Delta pH 0.58 \sim 0.64$  で, 8例の平均  $-\Delta pH 0.60$  である。

ep 系マウスでは動揺範囲は  $-\Delta pH 0.52 \sim 0.59$  で, 8例の平均  $-\Delta pH 0.55$  である。

## (3) Dph. 3週間投与の場合

CF-I 系マウスでは動揺範囲は  $-\Delta pH 0.49 \sim 0.56$  で, 8例の平均  $-\Delta pH 0.53$  である。

ep 系マウスでは動揺範囲は  $-\Delta pH 0.35 \sim 0.41$  で, 8例の平均  $-\Delta pH 0.39$  である。

すなわち, ep 系マウスの無投与の場合の平均値は対照の無投与の平均値に比し, 平均 19.3% の低下が認められた。ep 系マウスの1週間投与では ep 系マウス無投与に比し平均 19.8% の増加を示したけれども, 3週間投与では無投与より平均 16.4% の低下が認められた。対照においても, Dph. の1週間投与はその無投与に比しわずかに増加しており, その3週間投与は無投与に比しやや低下しており, ep 系マウスと同様の傾向が認められたけれども, この変動は ep 系マウスにみられたほど顕著な差ではなかった。

## 第3節 ep 系マウス大脳皮質含水量におよぼす影響

第2章, 第5節においてのべた実験方法により ep 系マウス大脳皮質の含水量(全水)を測定した。その成績は第2図に示すごとくで



ある。

(1) 無投与と安静時の場合

a) CF-I 系マウス (対照) では動揺範囲は 78.68~80.67 % で, 10例の平均 79.83 % である。

b) ep 系マウスでは安静時動揺範囲は 82.21~83.31 % で, 9例の平均 82.76 % である。

痙攣極期動揺範囲は 81.32~83.35 % で, 9例の平均 82.59 % である。

痙攣直後動揺範囲は 81.75~83.38 % で, 9例の平均 82.66 % である。

痙攣極期も痙攣直後も安静時に比べてほとんど有意の差はない。

(2) Dph. 1 週間投与の場合

CF-I 系マウスでは動揺範囲は 78.79~80.71 % で, 9例の平均 79.70 % である。ep 系マウスでは動揺範囲は 81.55~83.26 % で, 9例の平均 82.51 % である。

(3) Dph. 3 週間投与の場合

CF-I 系マウスでは動揺範囲は 78.84~80.35 % で, 10例の平均 79.65 % である。

ep 系マウスでは動揺範囲は 81.51~83.00 % で, 9例の平均 82.24 % である。

すなわち無投与と安静時の場合 ep 系マウス大脳皮質の全水量は対照たる CF-I 系マウスに比し, 明らかに増加を認めた。ep 系マウスでは安静時, 痙攣極期, 痙攣直後にそれぞれ測定したが, 有意の差は認められなかった。Dph. 投与の場合 1 週間および 3 週間投与の値は無投与の値と比較して有意の差は認められなかった。また対照においても同様有意の差は認められなかった。すなわち Dph. (100 mg/kg) の投与により両者とも大脳皮質の全水量はほとんど影響をうけないことを知った。

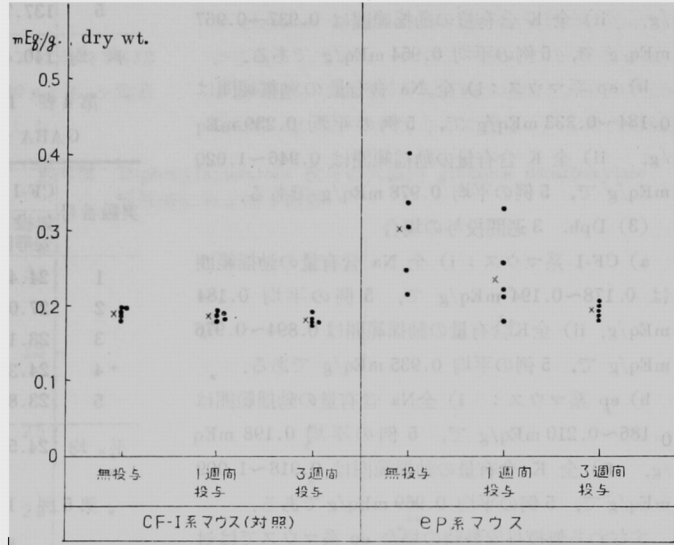
第 4 節 ep 系マウス大脳皮質 Na および K 含有量におよぼす影響

第 2 章, 第 6 節においてのべた実験方法により, ep 系マウス大脳皮質の全 Na および全 K 含有量を測定した。その成績は第 3, 4 図に示すごとくである。

(1) 無投与と安静時の場合

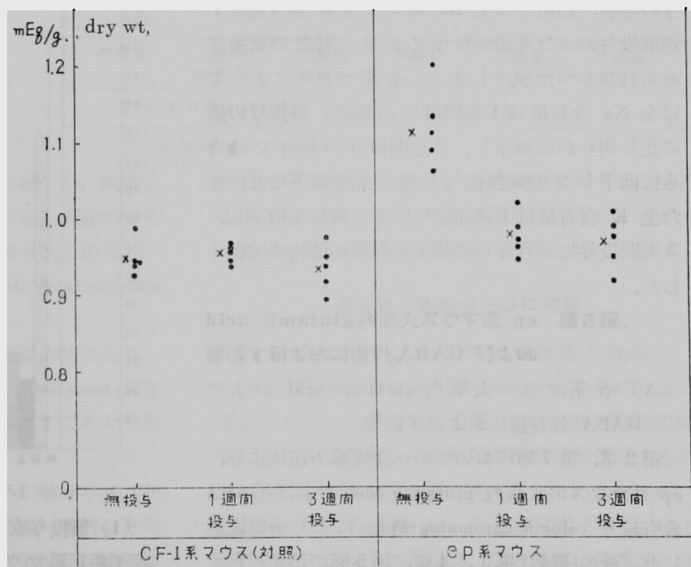
a) CF-I 系マウス (対照): i) 全 Na 含有量の動揺範囲は 0.180~0.199 mEq/g で, 5 例の平均 0.190 mEq/g. ii) 全 K 含有量の動揺範囲は 0.926

第 3 図 Diphenylhydantoin 投与の大脳皮質全 Na 含有量におよぼす影響



単位は大脳皮質乾燥重量 1 g 中の全 Na 含有量: mEq/g. dry wt. を示す × 平均値

第 4 図 Diphenylhydantoin 投与の大脳皮質全 K 含有量におよぼす影響



単位は大脳皮質乾燥重量 1 g 中の全 K 含有量: mEq/g. dry wt. を示す × 平均値

～0.988 mEq/g で、5例の平均 0.948mEq/g である。

b) ep 系マウス：i) 全 Na 含有量の動揺範囲は 0.218～0.406 mEq/g で、5例の平均 0.304 mEq/g。ii) 全 K 含有量の動揺範囲は 1.063～1.200 mEq/g で、5例の平均 1.125mEq/g である。

(2) Dph. 1 週間投与の場合

a) CF-I 系マウス：i) 全 Na 含有量の動揺範囲は 0.182～0.195 mEq/g で、5例の平均 0.188 mEq/g。ii) 全 K 含有量の動揺範囲は 0.937～0.967 mEq/g で、5例の平均 0.954 mEq/g である。

b) ep 系マウス：i) 全 Na 含有量の動揺範囲は 0.184～0.333 mEq/g で、5例の平均 0.239 mEq/g。ii) 全 K 含有量の動揺範囲は 0.946～1.020 mEq/g で、5例の平均 0.978 mEq/g である。

(3) Dph. 3 週間投与の場合

a) CF-I 系マウス：i) 全 Na 含有量の動揺範囲は 0.178～0.194 mEq/g で、5例の平均 0.184 mEq/g。ii) 全 K 含有量の動揺範囲は 0.894～0.976 mEq/g で、5例の平均 0.935 mEq/g である。

b) ep 系マウス：i) 全 Na 含有量の動揺範囲は 0.186～0.210 mEq/g で、5例の平均 0.198 mEq/g。ii) 全 K 含有量の動揺範囲は 0.918～1.009 mEq/g で、5例の平均 0.969 mEq/g である。

すなわち無投与と安静時の場合 ep 系マウスでは対照の CF-I 系マウスに比し、大脳皮質全 Na および全 K 含有量は明らかに増加している。Dph. 投与の場合、対照では全 Na および全 K 含有量は 1 週間投与および 3 週間投与により、有意の変動はみられなかったが、しかし ep 系マウスにおいては全 Na 含有量は 1 週間投与の場合、無投与の値に比し明らかに低下し、3 週間投与の場合ではさらに低下して対照無投与の値にまで低下した。また全 K 含有量は 1 週間投与により著しく低下し、3 週間投与によりさらに低下し対照の値にまで低下した。

### 第5節 ep 系マウス大脳内 glutamic acid および GABA 代謝におよぼす影響

#### A) ep 系マウス大脳内 glutamic acid および GABA 含有量におよぼす影響

第2章、第7節においてのべた実験方法により、ep 系マウスの大脳内 glutamic acid および GABA 含有量を column chromatography により分離定量した。その成績は第3、4表、第5図に示すごとくである。すなわち

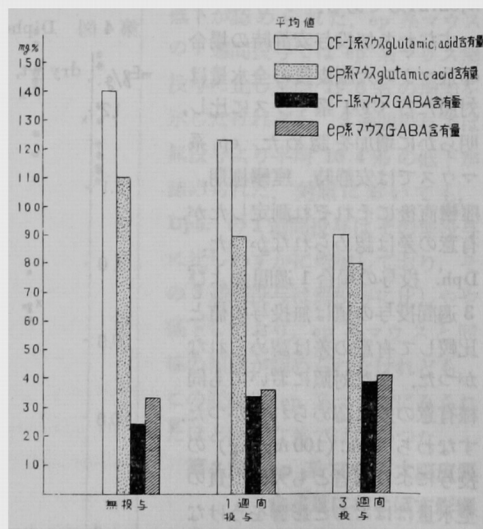
第3表 Diphenylhydantoin 投与の大脳内 glutamic acid 含有量 (mg%) におよぼす影響

実験番号	CF-I 系マウス(対照)			ep 系マウス		
	無投与 安静時	1 週間 投与	3 週間 投与	無投与 安静時	1 週間 投与	3 週間 投与
1	142.81	125.19	90.75	107.75	88.61	81.77
2	150.04	120.64	89.89	120.10	90.05	77.67
3	131.63	121.24	88.49	118.56	90.46	79.32
4	140.10	125.91	92.02	105.45	89.65	82.24
5	137.76			98.92		
平均	140.47	123.25	90.29	110.16	89.69	80.25

第4表 Diphenylhydantoin 投与の大脳内 GABA 含有量 (mg%) におよぼす影響

実験番号	CF-I 系マウス(対照)			ep 系マウス		
	無投与 安静時	1 週間 投与	3 週間 投与	無投与 安静時	1 週間 投与	3 週間 投与
1	24.44	34.06	40.12	32.36	37.65	43.02
2	27.00	36.32	37.70	35.95	36.10	41.67
3	23.10	31.98	39.23	31.41	35.45	39.36
4	24.33			31.89		41.40
5	23.80			34.90		
平均	24.53	34.12	39.02	33.30	36.40	41.36

第5図 Diphenylhydantoin 投与の大脳内 glutamic acid および GABA 含有量におよぼす影響



(1) 無投与と安静時：a) 大脳内 glutamic acid 量は CF-I 系マウス (対照) では平均 140.47mg% であり、ep 系マウスでは平均 110.16 mg% であり、

ep 系マウスは対照に比し平均 27.6% の低下が認められた。

b) 一方大脳内 GABA は CF-I 系マウス (対照) では平均 24.53 mg %, ep 系マウスでは平均 33.30 mg % であり, ep 系マウスは対照に比し平均 35.8% の増加が認められた。

(2) 1 週間投与の場合: a) glutamic acid 量は CF-I 系マウスでは平均 123.25 mg %, ep 系マウスでは平均 89.69 mg % と, 両者ともそれぞれの無投与の値に比し低下した。

b) 一方 GABA は CF-I 系マウスでは平均 34.12 mg %, ep 系マウスでは平均 36.40 mg % と両者ともそれぞれ無投与の値に比し増加した。

(3) 3 週間投与の場合: a) glutamic acid 量は CF-I 系マウスでは平均 90.29 mg %, ep 系マウスでは 80.25 mg % であり, 両者とも 1 週間投与の値よりさらに低下を示した。

b) 一方 GABA は CF-I 系マウスでは, 平均 39.02 mg %, ep 系マウスでは平均 41.36 mg % であり, 両者とも 1 週間投与の値よりさらに増加を示した。

すなわち ep 系マウスでは対照の CF-I 系マウスよりも大脳内 glutamic acid 量は低下しており, GABA 量は増加している成績を示した。そして無投与安静時の ep 系マウスと対照との間にみられたこれら glutamic acid 量および GABA 量の著明な差は, Dph. の

1 週間投与さらに 3 週間投与により縮少し, 両者ともたがいに歩み寄りを示した。これらの成績の平均値のみを棒グラフで図示したものが第 5 図である。

#### B) ep 系マウス大脳内 glutamic decarboxylase 活性値におよぼす影響

第 2 章, 第 8 節においてのべた実験方法により, ep 系マウスの大脳内 glutamic decarboxylase 活性値を測定した。その成績は第 6 図に示すごとくである。すなわち

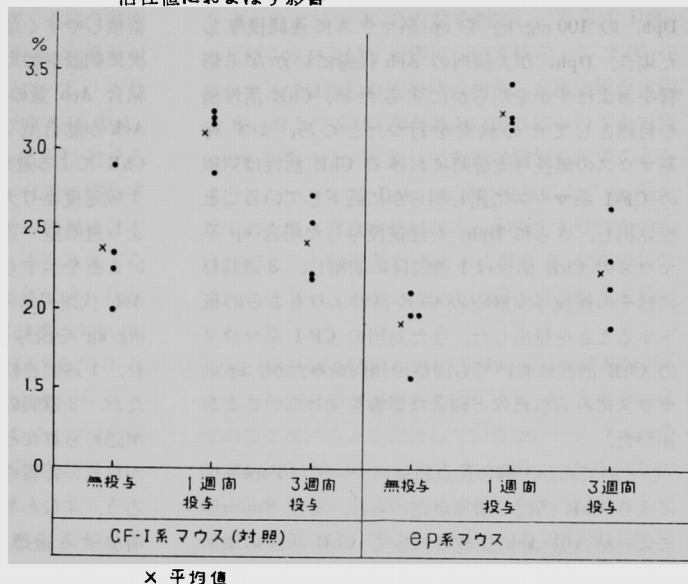
(1) 無投与と安静時の場合: a) CF-I 系マウス (対照) では動揺範囲は 2.00~2.90% で, 4 例の平均は 2.38% であり, b) ep 系マウスでは動揺範囲は 1.57~2.11% で, 4 例の平均は 1.91% である。

(2) 1 週間投与の場合: a) CF-I 系マウスでは動揺範囲は 2.86~3.25% で, 4 例の平均 3.12% であり, b) ep 系マウスでは動揺範囲は 3.15~3.44% で, 4 例の平均は 3.25% である。

(3) 3 週間投与の場合: a) CF-I 系マウスでは動揺範囲は 2.20~2.72% で, 4 例の平均は 2.42% であり, b) ep 系マウスでは動揺範囲は 1.89~2.65% で, 4 例の平均は 2.25% である。

すなわち, 無投与と安静時においては ep 系マウスの glutamic decarboxylase 活性値は対照に比し明らかに低下しており, これに Dph. を投与すると, 1 週間投与では両者とも著明に増加し, その増加の程度は ep 系マウスに比し著しく, そのため両者

第 6 図 Diphenylhydantoin 投与の大脳内 glutamic decarboxylase 活性値におよぼす影響



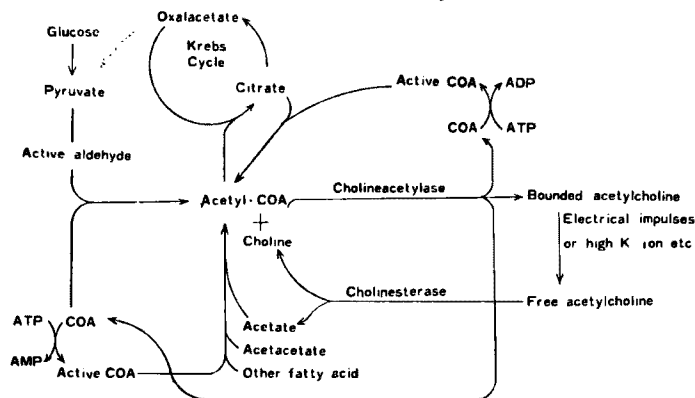
はほぼ同じ値を示したが, 3 週間投与すると, 両者とも 1 週間投与の値に比して著明に低下し, いずれも対照無投与安静時の値にまで回復した。

#### 第 5 章 総括ならびに考察

##### 1) ep 系マウスの大脳内 ChE 活性と Dph.

今日 Ach の代謝は第 7 図のごとく行われていると考えられている。そして遊離 Ach が神経細胞の興奮に伴って増量し, その結果痙攣発作を誘発することを裏づける知見が数多く報告されている<sup>10)~16)</sup>。したがってこの遊離 Ach の分解酵素である ChE 活性に変化がみられた場合, 脳の興奮伝導機制と密接な関係にある Ach 代謝に相当な影響がおよぼさ

第7図 Metabolism of acetylcholine



れることは容易に考えられるところである。

さて ep 系マウスの痙攣に対して極めて有効な Dph. の 100 mg/kg を ep 系マウスに連続投与した場合、Dph. が大脳内の Ach 代謝にいかなる影響をおよぼすかを明らかにするため、ChE 活性値を目標としてその検索を行つたところ、まず ep 系マウスの無投与安静時における ChE 活性は対照の CF-I 系マウスに比し明らかに低下していることを見出し、さらに Dph. を連続投与した場合 ep 系マウスの ChE 活性は 1 週間目に増加し、3 週間目にはその無投与安静時の ChE 活性よりもさらに低下することを見出した。また対照の CF-I 系マウスの ChE 活性においても同様の傾向をみたが、ep 系マウスにみられたほど顕著な影響を受けないことを知つた。

ひとのてんかん脳の焦点組織については Pope ら<sup>17)</sup>により ChE 活性の増加が認められ、また Tower<sup>18)</sup>により結合型 Ach 生成の減少と ChE 活性の増加が認められており、結合型 Ach 生成の減少は Ach 結合能力の障害によるものであり、したがって遊離 Ach が増加し、その代償としててんかん脳の焦点組織では ChE 活性が亢進しているのであろうとのべている。また教室の沖<sup>19)</sup>も治療の目的で剔除された真性てんかん患者の大脳皮質においても ChE 活性の増加を認め、重症患者ほど活性度が高いとのべている。一方 ep 系マウスの Ach 代謝の消息についてはさきに加藤<sup>20)</sup>により研究され、Warburg 検圧法により ChE 活性値を測定し、無痙攣 ep 系マウス（生後一度も他動的体位変換刺激を受けたことがなく、したがって生後一度も痙攣発作を起したことのない成熟マウス）では ChE 活性は対照より亢進しているが、痙攣を起した ep 系マウスではかえ

つて対照に比し低下していることを見出している。この所見は私の用いた実験方法により得られた成績と一致している。加藤<sup>20)</sup>はさらに ep 系マウスの総 Ach は正常マウスに比して増加していることを明らかにしたが、このことは ep 系マウス脳における cholineacetylase の活性の増加により説明しようと報告し<sup>21)</sup>、また ep 系マウス大脳皮質切片の Ach 生成については静止系では結合型の増加を、刺

激系では遊離型の増加を示し、痙攣群にみられる ChE 活性の有意の低下の結果、遊離 Ach が脳内に蓄積しやすくなることが考えられるとのべている。次に刺激を加えて痙攣の発現するまでの変化は脳の結合 Ach 量の減少であり、このことは刺激の結果 Ach が結合型より遊離型に変化し、そしてその際 ChE による遊離 Ach の分解速度が結合型 Ach の生成速度より大であることを示し、Ach が結合型より遊離型へ速やかに移行するほど痙攣がおきやすいことを示すものであらうとのべている。かかる Ach 代謝異常のある ep 系マウスに Dph. の 100 mg/kg を投与した場合、早期に痙攣発作が阻止され、1 週間連続投与時、ChE 活性の亢進がみられたが、3 週間の長期投与後 ChE 活性の著明な低下が認められたということは、Dph. が Ach 代謝にかなりの影響をおよぼしたことを意味するものであらう。すなわち 1 週間投与時の ChE 活性の亢進は増加せる遊離 Ach の増加に応じた ChE 活性の一時的増加と考えられ、さらに 3 週間の長期投与時の著明な低下は、Ach 生合成の減少により、または結合型から遊離型への移行の抑制により遊離 Ach が減少した結果によるものと考えられる。この点を明確に説明せんがためには cholineacetylase、結合型および遊離型 Ach の変動等についてさらに検索をすすめるなくてはならないであらう。Mc Lennan ら<sup>22)</sup>は in vitro に incubate された正常ラット大脳皮質切片に直接 Dph. を添加した場合、Dph. の低濃度では遊離 Ach 生成の亢進がみられるが、高濃度では反対に遊離 Ach の生成が抑制されると報告している。また Tower ら<sup>23)</sup>は Dph. を in vivo に急性負荷した正常動物より得られた大脳皮質切片において、結合 Ach 生成の増加を認めているけれども、

遊離 Ach ではなんらの変化もみられないと報告している。結合 Ach から遊離 Ach への移行の亢進ならびに抑制が電解質代謝ならびに glutamic acid およびその関連アミノ酸代謝等の異常により影響をうけるという可能性は否定できない。すなわち Quastel<sup>24)</sup> はすでに  $K^+$  ion や  $NH_4^+$  ion が in vitro で脳スライスの遊離 Ach の生成の増大をきたすことを報告し、Ach の生合成には Nachmansohn<sup>25)26)</sup> により glutamic acid などが関与するとのべられている。最近教室の山口<sup>56)</sup> はひとのてんかん脳および脳局所アナフィラキシー家兎の ChE 活性の亢進に対しても glutamic acid およびその関連アミノ酸の添加により ChE 活性が正常 level に回復されることを明らかにしている。

以上のことから ep 系マウスでは後述の glutamic acid および GABA の異常のみならず、大脳皮質内 Na および K の異常も認められ、これらの異常が Ach 代謝異常にかなりの影響をおよぼしていることも考えられる。したがって ep 系マウスに Dph. を連続投与した場合、Dph. の ChE 活性に対する直接作用というよりも、むしろ Ach 代謝に関与する他の代謝系の異常を回復せしめ、その結果さほど興奮伝導物質を要求しなくなり ChE 活性の低下をきたしたものと解釈される。いずれにせよ、Dph. の痙攣阻止に関しては、電解質の変動や glutamic acid 系アミノ酸代謝の変動も関係しているであろうし、ただ Ach 代謝の変動のみで説明できるものではないであろう。しかしながら Dph. が ep 系マウスの痙攣発作を抑制するという明白な事実、いかなる代謝過程に原因しているにせよ、とにかく Ach 代謝を改善せしめていることを示しているといつてよいであろう。

## 2. ep 系マウスの大脳皮質の水分電解質代謝と Dph.

てんかん発現の機序の一つとして、古くから水分代謝障害、あるいは脳の含水状態の異常があるという報告は数多く、事実てんかん患者に水分摂取を制限して痙攣発作を減少、あるいは消失せしめているいくつかの報告もあり<sup>27)~30)</sup>、脳における水分蓄積が痙攣誘発の一因になりうることは周知の事実である。そして脳含水量および水分移動に最も密接な関係を有する電解質はなんぞく Na および K が痙攣発作と極めて深い関係があることも容易に考えられるところであり、しかもこのことを裏づけるに足る知見が数多く報告されている。すなわち宮川<sup>57)</sup> ら

は水投与による実験により痙攣発作の直前直後ににおいて大脳皮質の K の減少を認めており、一方 Mc Quarrie<sup>58)</sup> は灰白質の K 含有量の減少が抗痙攣作用の重要な一面であると主張している。また Calfer<sup>59)</sup> はラットおよび家兎で、electroshock および metrazol 注射による痙攣後には大脳皮質神経細胞内 K の減少と Na の増加とを認めて、かかる電解質移動は大脳皮質神経細胞膜の透過性を変え、神経細胞の活動に影響するらしいといっている。一方 Na は Hodgkin の神経興奮に関する Na 説<sup>60)</sup> が発表されている、重要な役割を演ずるものとして注目されている。

以上の諸家の報告から電解質、とくに Na および K は脳の興奮性に重大な関係があることがわかる。したがって私は ep 系マウスにつき大脳皮質全水量、全 Na および全 K 含有量を測定し、さらに Dph. のそれらにおよぼす影響について検索し、まず ep 系マウスでは無投与と安静時の場合、大脳皮質全水量、全 Na および全 K 含有量のいずれにおいても対照の CF-I 系マウスに比して有意な増加を示すことを見出した。そして Dph. の連続投与により ep 系マウスの大脳皮質全水量はなんら影響を受けなかつたけれども、大脳皮質全 Na および全 K 含有量はいずれも低下し、対照の level に回復することを見出した。

ひとのてんかん脳については Pappius and Elliott<sup>31)</sup> はてんかんと非てんかんの間に Na、K 含有量に有意の差がないことを報告しているが、一方 Tower<sup>18)</sup> は slice を incubate したとき medium からの K の取込みがてんかん脳焦点では非てんかん脳にくらべて極めて少なく、Na の medium への移行も非てんかん脳にくらべて極めて少ないことを見出し、てんかん脳では Na および K 代謝の異常があることを指摘しており、なお、この異常性に対して asparagine および aspartic acid が有効なことをあわせて観察している。一方教室の横田<sup>32)</sup> および小林<sup>33)</sup> は実験的てんかん動物である脳局所アナフィラキシー動物について調べ、その結果 Na および K 含有量が正常動物に比し増加していることを明らかにしている。ep 系マウスにおいても大脳皮質の全水量、全 Na および全 K 含有量が対照のマウスに比して増加しているということは、ep 系マウスの痙攣準備性を意味する所見として極めて興味深い。しかし ep 系マウスにみられた水分電解質の異常が ep 系マウスの痙攣発作の原因であるか、それとも

たんに発作の結果であるかについては容易に結論することはできない。

さて水分電解質の異常の認められた ep 系マウスに Dph. を連続投与した場合には、水分電解質に異常のない対照マウスでは全く変動がみられなかったのに対して大脳皮質の全水量は変われなかつたけれども、全 Na および K 含有量は対照マウスの level にまで回復することを知った。このことは ep 系マウスの痙攣発作が消失したことからみて、Dph. が ep 系マウスの電解質代謝異常の機構に直接または間接に影響をおよぼし、大脳皮質神経細胞膜に物理化学的安定をもたらしたものと解される。Woodbury<sup>34)35)</sup> は Dph. について電解質代謝に対する作用機序を裏付けるごとき知見を報告している。すなわち、Dph. を正常ラッテに投与すると、大脳皮質の細胞内 Na が対照に比して低下し、したがって細胞外 Na の細胞内 Na に対する比 ( $[Na^+]_o/[Na^+]_i$ ) は増加するが、細胞内 K の細胞外 K に対する比 ( $[K^+]_o/[K^+]_i$ ) は変らないことを明らかにし、さらに放射性 Na ( $Na^{22}$ ) を用いた研究により  $Na^{22}$  の turn over の増加に鑑み、細胞内 Na の減少は Dph. が活性 Na の細胞外への排出を亢進せしめることを示すものであるとのべ、この作用

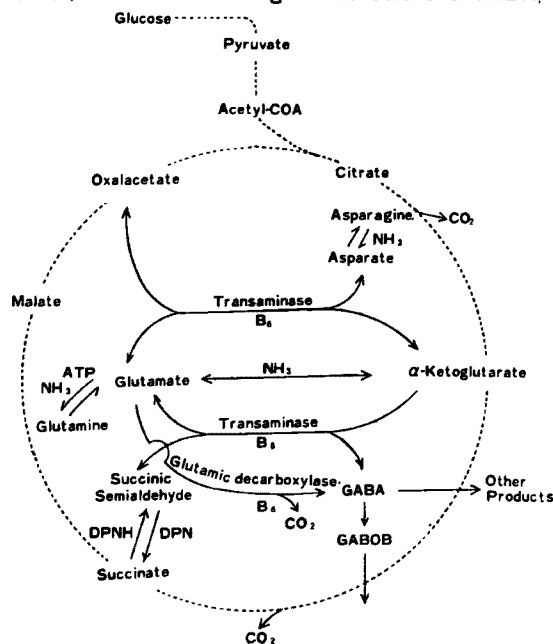
を Dph. の抗痙攣剤としての作用機序と想定している。なお、今後 ep 系マウスの電解質異常および Dph. による回復過程についてはさらに細胞内外の pattern で検討しなくてはならないと考えている。

### 3. ep 系マウス大脳内 glutamic acid および GABA 代謝と Dph.

glutamic acid およびその関連アミノ酸の代謝過程は第 8 図のごとき関係にあり、生体内では一定の条件下で自由に移行し合っているものと考えられている。脳において glutamic acid から glutamic decarboxylase の作用により一部 GABA が生ずる (Robert ら<sup>36)37)</sup>, Awapara<sup>38)</sup>) が、GABA は transaminase の作用により再び glutamic acid に戻り、(Robert ら<sup>36)39)</sup>, Bessman<sup>40)</sup>) glutamic acid と GABA との代謝面で一つの cycle を描いており、この cycle は脳の機能となんらか密接な関係があるものと考えられており、痙攣およびその抑制に関して数多くの報告がなされている。ep 系マウスにおいてもこの代謝過程を明らかにすることは極めて重要なことであろう。したがって私は ep 系マウスの大脳内 glutamic acid および GABA の含有量と glutamic decarboxylase 活性値とを測定し、さらにこれらにおよぼす Dph. の影響を調べた。その

結果まず ep 系マウスでは対照マウスに比し、無投与安静時における大脳内 glutamic acid 量は著明に低下しているが、GABA は逆に増加していることを見出した。この成績はさきに成瀬ら<sup>41)42)</sup> により報告された成績と一致している。成瀬ら<sup>41)42)</sup> はさらに ep 系マウスでは glutamine および aspartic acid の低下も認めているが、その他の脳内遊離アミノ酸では正常マウスとの間に有意な差異は認められないと報告している。いずれにせよ glutamic acid およびその関連アミノ酸にのみ異常が認められるということは ep 系マウスに特異な所見であり、痙攣準備性と関連せる所見として極めて重要な意義をもつものと考えられる。このように考えてくると、ep 系マウスの痙攣準備性の原因をなしているものは、glutamic acid および GABA の代謝の異常であり、その代謝異常をもたらすものはこの代謝に関与する酵素の欠陥であろうということは容易に考えられるところで

第 8 図 Metabolism of glutamic acid and GABA.





ある。そこで, glutamic acid から GABA が生成される過程に作用する glutamic decarboxylase の活性を検討してみるに, この酵素は ep 系マウスにおいて無投与と安静時には低下していることを見出した。一方教室の宇野<sup>65)</sup> は ep 系マウスの GABA-glutamic acid transaminase 活性を検索し, 正常マウスとの間に活性の有意な差をみないと報告している。一方, ep 系マウスでは GABA 含有量が増加しているので, glutamic decarboxylase 活性の低下と考え合せて, GABA の増量は GABA より GABOB あるいはその他の代謝経路の活性低下によるものと考えられる。

私どもの教室ではひとの真性てんかん脳のアミノ酸代謝系の変化についてもかなり究明しており, 井上(圭)<sup>43)</sup> は真性てんかん脳では遊離アミノ酸の著明な減少があることを報告し, 山本ら<sup>44)</sup> は column chromatography により, 大脳皮質の遊離アミノ酸分析を行ない, 真性てんかん脳では glutamic acid が増加し, GABA が減少していることを見出し, そして国土<sup>45)</sup> は GABA-glutamic acid transaminase 活性には有意の差が認められないことを報告し, 森ら<sup>9)</sup> は GABA 生成の主要な過程である glutamic decarboxylase 活性の低下を明らかにしている。ep 系マウスでは脳内 glutamic acid および GABA の代謝異常に関してひとの真性てんかんとは全く趣きを異にしているけれども, 両者ともにこれらの代謝系の酵素活性に異常が存在するという点では共通しており, 痙攣準備性に関連して極めて注目し価値するところである。GABA は教室の井上(和)<sup>61)</sup> により, 生体の条件いかによっては痙攣抑制物質である GABOB にも移行しうることが明らかにされ, 一方林ら<sup>62)63)</sup> により, GABA は痙攣発動物質の pre-causer でもありうることが報告されている。また ep 系マウスにおいてみられた痙攣抑制あるいは痙攣発動の transmitter としての GABA の増量が痙攣発動にむかうほど過剰であるかどうかを断定することはできない。井上(和)<sup>64)</sup> はひとの真性てんかん大脳皮質では GABOB の量が低下していることを明らかにしているが, ep 系マウスでは脳中における GABOB の含有量および分布などについてはまだ知られておらず, 論議することはできない。

さて, glutamic acid および GABA の代謝系に異常の認められた ep 系マウスに, Dph. を連続投与した場合, 脳内 glutamic acid は対照と同様さ

らに低下し, 逆に GABA は対照と同様一層増加し, 3 週間の連続投与では両者の無投与と安静時に認められた glutamic acid および GABA 含有量の差は縮小し, いずれも互いに歩み寄りを示していることを明らかにした。この際, glutamic acid の低下, GABA の増加に対応して, 脳内 glutamic decarboxylase 活性は 1 週間目に著明に亢進し, 3 週間の連続投与では対照の無投与と安静時の level に回復していることを見出した。そして Dph. 投与による glutamic acid および GABA 含有量および glutamic decarboxylase 活性の変動は ep 系マウスでも対照でも全く同様の態度を示した。

痙攣抑制物質たる GABOB の生成過程が glutamic acid → GABA → GABOB であることよりみて, Dph. の長期投与による glutamic acid の低下, glutamic decarboxylase の一時増加後正常 level への回復, および GABA の増加などの一連の過程は ep 系マウスの痙攣阻止に重要な関係があるものと推察される。

以上 Dph. の連続長期投与は ep 系マウスの Ach 代謝, 電解質代謝および glutamic acid および GABA の代謝異常に好影響をおよぼし, これらの代謝異常を正常 pattern または正常 level に回復せしめるけれども, これらの代謝系の変化のうちいずれが痙攣消失に対して第一義的なものであるかを結論することはできない。

また, 抗痙攣剤の作用を検討する際考慮すべき今一つの extracerebral factor がある。すなわち脳外臓器におよぼす作用の結果として, 痙攣発作に対して顕著な抑制効果をもたらすかもしれないという点である。この点については Dph. の下垂体副腎系におよぼす影響についての数多くの研究がある<sup>46)~54)</sup>。これらの研究を総括要約してみると, Dph. は副腎皮質に直接作用することも考慮に入れねばならず, また Dph. の長期投与によつて起る中毒症状のあるものはこの作用に起因しているかも知れない。また Dph. の大量または長期投与は副腎皮質機能を抑制し, 比較的少量では早期に副腎皮質を刺激するが, やがて抑制がおこり, その結果, 痙攣が抑制されることも考えられる。副腎皮質ホルモンが脳の電解質およびアミノ酸代謝に関連して, 脳の興奮性に影響をおよぼす点についてもかなり究明されている。以上のような事実から考えると, ep 系マウスにおける高められた脳興奮性というものも副腎皮質の刺激

状態に起因するものであるかも知れず、したがって Dph. を投与すると副腎皮質機能が抑制されて、それにともない脳の代謝異常も回復するのではないかと考えられぬことはない。

いずれにしても遺伝的に痙攣準備性の異常亢進とそれに関連せる脳代謝異常の証明された ep 系マウスはその痙攣抑制過程に欠陥があり、これに Dph. を連続投与すると、ep 系マウスの異常代謝系に直接または間接に作用し、それらの異常を正常 pattern ないしは正常 level に回復せしめて、その結果 ep 系マウスの痙攣発作が阻止されるものと思われ、この点 Dph. は ep 系マウスの痙攣発作に対しても極めて有効な抗痙攣剤といえよう。

## 第6章 結 論

Diphenylhydantoin の 100 mg/kg を 3 週間連続経口投与した際における CF-I 系マウスおよび ep 系マウスの大脳 ChE 活性値、大脳皮質含水量、Na, K 含有量、大脳内 glutamic acid 含有量、GABA 含有量および glutamic decarboxylase 活性値の消長を比較検索し、つきのごとき結論を得た。

1) 無投与時においては、ep 系マウスの大脳 ChE 活性値は対照に比して明らかに低下している。これに Dph. を連続投与すると、ep 系マウスでは対照に比して ChE 活性値の変動が著しく、1 週間目にはかなり増加し、3 週間目では無投与の値よりもさらに低下している。

2) 無投与においては ep 系マウス大脳皮質全水量は対照に比して明らかに増加を示すが、Dph. の

連続投与は ep 系マウスでも対照の CF-I 系マウスでもその大脳皮質全水量にはなんらの影響も与えない。

3) 無投与時においては ep 系マウスの大脳皮質全 Na および K 含有量は対照に比し明らかに増加している。これに Dph. を連続投与すると、対照ではほとんど影響をうけないけれども、ep 系マウスでは大脳皮質の全 Na, K 含有量はともに低下し、対照の level に回復する。

4) 無投与時においては、ep 系マウスの大脳内 glutamic acid 量は対照に比し明らかに低下しており、逆に GABA 量は明らかに増加している。これに Dph. を連続投与すると、対照でも ep 系マウスでも glutamic acid 量は低下し、逆に GABA は増加し、無投与時の ep 系マウスと対照との間にみられた glutamic acid および GABA 含有量の著明な差はいずれも縮小し、たがいに歩み寄りを示す。

5) 無投与時においては ep 系マウスの大脳内 glutamic decarboxylase 活性値は対照に比し明らかに低下しており、これに Dph. を連続投与すると、対照でも ep 系マウスでも glutamic decarboxylase 活性値は 1 週間目に一時増加し、3 週間目ではいずれも対照の無投与時の値にまで低下するが、その動揺は ep 系マウスにおいて顕著である。

稿を終るにあたり御指導、御鞭撻下さり、御校閲を賜わった恩師陣内教授に深く感謝の意を表するとともに、実験にあたり種々御助言をいただいた当教室の森博士に深謝する。

## 参 考 文 献

- 1) Vorhaus, L. J., Scudamore, H. H. and Kark, R. M.: *Gastroenterology*, 15(2), 304, 1950.
- 2) Alcalde J. M. O.: *J. Lab. & Clin. Med.*, 36(3), 391, 1950.
- 3) 高橋, 紫田: *医学と生物学*, 20(3), 96, 1951.
- 4) Moore, S., Spackman, P. H. and Stein, W. H.: *Analyt. Chem.*, 30, 1185, 1958.
- 5) Hamilton, D. B.: *Analyt. Chem.*, 30, 914, 1958.
- 6) Moore, S. and Stein, W. H.: *J. Biol. Chem.*, 192, 663, 1951.
- 7) Moore, S. and Stein, W. H.: *J. Biol. Chem.*, 211, 907, 1954.
- 8) Moore, S. and Stein, W. H.: *J. Biol. Chem.*, 167, 367, 1948.
- 9) 森, 近藤: 第10回日本生化学会中国四国部会総会発表 (1961)
- 10) 中島: *日本外科学会雑誌*, 52, 23, 1951.
- 11) Miller, F. R., Stavratsky, G. W. & Woonston, G. A.: *J. Neurophysiol.*, 3, 131, 1940.
- 12) Feldberg, W.: *Physiol. Rev.*, 25, 596, 1945.
- 13) Forster, F. M.: *Arch. Neurol. & Psychiat.*, 54, 391, 1945.
- 14) Barnstein, M. B.: *J. Neurophysiol.*, 9, 349, 1946,



- 15) Freedman, A. M.: *Am. J. Physiol.*, **156**, 117, 1947.
- 16) Stone, W. E.: *Am. J. Phys. Med.*, **36**, 222, 1957.
- 17) Pope, A. et al.: *Research Publ. A. Nerv. & Ment. Dis.*, **26**, 218, 1947.
- 18) Tower, D. B.: *Neurology*, **5**, 113, 1955.
- 19) 沖: 岡山医学会雑誌, **64**, 1925, 昭27, (1952).
- 20) 加藤: 精神神経学雑誌, **61**, 1691, 1959.
- 21) 加藤他: 精神神経学雑誌, **63**, 375, 1961.
- 22) Mc Lennan, H. & Elliott, K. A. C.: *J. Pharmacol. & Exper. Ther.*, **103**, 35, 1951.
- 23) Tower, D. B. & Elliott, K. A. C.: *J. Applied Physiol.*, **5**, 375, 1953.
- 24) Quastel, J. H., Tennenbaum, M. & Wheatley, A. B. M.: *Biochem. J.*, **30**, 1668, 1936.
- 25) Nachmansohn, D.: *J. Biol. Chem.*, **176**, 677, 1948.
- 26) Nachmansohn, D. & Wilson, I. B.: *Advances in Enzymology*, **12**, 259, 1951.
- 27) Mc Quarrie, I.: *Am. J. Dis. Child.*, **38**, 451, 1929.
- 28) Byron: *Quart. J. Med.*, **1**, 289, 1932.
- 29) Mc Quarrie, I.: *Am. J. Int. Med.*, **6**, 497, 1932.
- 30) 宮川: 熊本医学会雑誌, **44**, 325, 1940.
- 31) Pappius, H. M. & Elliott, K. A. C.: *Canad. J. Biochem. & Physiol.*, **32**, 484, 1954.
- 32) 横田: 岡山医学会雑誌, **68**, 1959, 昭31(1956).
- 33) 小林: 岡山医学会雑誌, **71**, 3983, 昭34(1959).
- 34) Woodbury, D. M.: *J. Pharmacol. & Exper. Ther.*, **115**, 74, 1955.
- 35) Woodbury, D. M., Koch, A. and Vernadakis, A.: *Neurology*, **8**, 113, 1958.
- 36) Roberts, E. & Frankel, S.: *J. Biol. Chem.*, **187**, 55, 1950.
- 37) Roberts, E. & Frankel, S.: *J. Biol. Chem.*, **188**, 789, 1950. *ibid.*: **190**, 505, 1951.
- 38) Awapara, J., Landua, A. J. R. and Seale, B.: *J. Biol. Chem.*, **187**, 35, 1950.
- 39) Roberts, E. and Bregoff, H. M.: *J. Biol. Chem.*, **201**, 393, 1953.
- 40) Bessman, S. P., Rossen, J. and Layne E. C.: *J. Biol. Chem.*, **201**, 385, 1953.
- 41) 成瀬: 精神神経学雑誌, **61**, 1701, 1959.
- 42) Naruse, H. et al.: *J. Neurochem.*, **5**, 359, 1960.
- 43) 井上(丰): 岡山医学会雑誌, **64**, 1637, 昭27, (1952).
- 44) Yamamoto, Y., Mori, A. and Jinnai, D.: *J. Biochem.*, **49**, 368, 1962.
- 45) 国土: 岡山医学会雑誌, **71**, 5651, 1959.
- 46) Costa, P. J., Claser, G. H. & Bonnycastle, D. D.: *Arch. Neurol. Psychiat.*, Chicago **74**, 88, 1955.
- 47) Bonnycastle, D. D. & Bradley, A. J.: *Fed. Proc.*, **15**, 403, 1956.
- 48) Endröczy, V. E., Lissák, K. & Szereday, Z.: *Endokrinologie*, **31**, 360, 1954.
- 49) Staple, P. H.: *Lancet.*, **1**, 1074, 1951.
- 50) Staple, P. H.: *J. Endocrin.*, **9**, 18, 1953.
- 51) Staple, P. H.: *J. R. micr. Soc.*, **74**, 10, 1954.
- 52) Woodbury, D. M. and Goodman, L. S.: *Fed. Proc.*, **12**, 381, 1953.
- 53) Woodbury, D. M.: *Pharmacol. Rev.*, **10**, 275, 1958.
- 54) 高橋, 石川: 精神神経学雑誌, **60**, 529, 昭33 (1958).
- 55) Stein, W. H.: *J. Biol. Chem.*, **201**, 45, 1953.
- 56) 山口: 岡山医学会雑誌, **71**, 4672, 昭34 (1959).
- 57) 宮川: 熊本医学会雑誌, **14**, 1999, 1938.
- 58) Mc Quarrie, I.: *Am. J. Dis. Child.*, **72**, 472, 1946.
- 59) Calfer, H. F. and Essex, H. E.: *Amer. J. Physiol.*, **150**, 27, 1947.
- 60) 佐藤: 神経の興奮と伝導. 金芳堂(1956)より引用。
- 61) 井上(和): 生化学, **31**, 127, 1959.
- 62) 林: 日本生理学雑誌, **21**, 925, 1959.
- 63) 林他: 第2回 GABA, GABOB 及び関連物質研究会発表 1961.
- 64) 井上(和): 生化学, **32**, 127, 1960.
- 65) 宇野: 岡山医学会雑誌, **73**, 785, 1961.

## Experimental Study on Inhibition of the ep-Mouse Convulsion

### Part 2 Diphenylhydantoin Effects on Cerebral Metabolism of the ep-Mouse

By

Junzi Kasahara

Department of Surgery and Neurosurgery, Okayama Univ. Med. School

(Director: Prof. D. Jinnai)

Daily dosage of 100 mg/kg of diphenylhydantoin was administered on the ep-mouse for 3 weeks and cholinesterase activity, water, Na, K, glutamic acid, GABA ( $\gamma$ -aminobutyric acid) and glutamic decarboxylase activity in cerebrum were followed during the course.

1. The ChE activity of the ep-mouse at rest appeared to be lower than that of the normal mouse. Diphenylhydantoin manifested an increment of the ChE activity at the end of the first week and, in contrast, a decrement at the end of the 3rd week of its administration course in both groups. It is, however, interesting to note that the variation of both directions was found to be greater in the ep-mouse than in the normal mouse.

2. The content of total water in the ep-mouse was more than that in the normal mouse. Diphenylhydantoin did not make any change in the water content in either groups.

3. The total Na and K contents were greater in the ep-mouse than in the normal mouse. The administration of diphenylhydantoin did not affect their contents in the normal mouse, but showed a decrement in both contents down to the normal level in the ep mouse.

4. The cerebrum of the ep-mouse contained more glutamic acid and, in contrast, less GABA than that of the normal mouse. After the diphenylhydantoin administration, glutamic acid was found to be decreased and GABA to be increased in both mice. It is to be noted that the difference in the contents of glutamic acid and GABA between the ep-mouse and the normal mouse was approaching each other in the course of the administration.

5. Glutamic decarboxylase activity was lower in the ep mouse than in the normal mouse. In the course of diphenylhydantoin administration, the activity was found to be increased beyond the level of the normal mouse at the end of the first week and to be decreased down to the normal level at the end of the 3rd week in both mice.

---