

EI マウス脳内チロシンおよびトリプトファンならびに 関連代謝産物の局所的変動に関する研究

岡山大学医学部脳代謝研究施設機能生化学部門 (指導: 森 昭胤教授)

鈴木 茂 樹

(平成 2 年 2 月 26 日受稿)

Key words : tyrosine, tryptophan, 5-hydroxytryptophan, serotonin, kynurenine, regional distribution

緒 言

今泉ら¹⁾は1959年マウスの自然発生脳水腫の研究中に、突然てんかん様けいれんを起こすマウスを発見した。それは国際的に EI 系 F25 代優性として登録されている (1964)²⁾。EI マウスは、生後 4 週齢頃より放り上げ刺激を毎週 1 ~ 2 回加えると、7 週齢頃よりけいれんを容易に誘発することができる。また遺伝的にけいれん準備状態が規定されており、発作誘導に薬物や電気等の刺激を必要としないことから、EI マウスはすぐれた実験的てんかんモデルとして一般的に使用されるに至った。

EI マウスのけいれん発現機構については、すでに多くの研究がなされており、アセチルコリン³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾、アンモニア⁷⁾及びアミノ酸⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾、アミン¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾、核酸¹⁸⁾¹⁹⁾²⁰⁾²¹⁾及び蛋白質²²⁾などにおける異常が報告されている。

脳内アミンに関しては、EI マウスは他系統のマウスに比し、生来ドパミン (DA) セロトニン (5-HT) 値は高く、ノルエピネフリン (NE) 値が低いことが明らかにされている²³⁾。しかし、放り上げ刺激を行い連続して 5 回以上けいれんを起こした EI マウス (EI (+)) においては、いずれも有意に低下する。平松¹³⁾は EI (+) に 5-HT の前駆物質である 5-ヒドロキシトリプトファン (5-HTP) を L-2-hydrazino- α -methyl- β - (3, 4-dihydroxyphenyl)propionic acid) (MK486, 末梢性脱炭酸酵素阻害剤) と共に投与すると、脳内 5-HT が上昇するとともに

に EI マウスけいれんの発現が著明に減少することを観察した。この事実は 5-HT が EI マウスの発作感受性に密接に関与していることを示すものであり、さらに EI マウスの 5-HT 代謝についての詳細な研究が行われた結果、EI マウスにおいては 5-HT 含有神経細胞のシナプス機能が抑制されており、特に大脳皮質においてその障害が顕著であることが示された¹³⁾。

本研究においては、最近開発されたクローメトリック直列センサーを利用した 3 次元クロマトグラムシステムを用いて EI マウスの脳内チロシン及びトリプトファン並びに関連代謝産物の局所的変動を同時測定することにより、EI マウス脳代謝異常をさらに詳細に検討し、発作発現機構の生化学的解析を試みた。

実験方法

1. 実験動物

EI マウス及び ddY マウス (雄) を使用した。EI マウスは、当教室にて飼育保存しており、ddY マウスは井上実験動物より入手したものである。

ddY マウスは EI マウスの母系であり、けいれん素因を有していないことから EI マウスの対照として用いた。実験動物は 12 時間明暗サイクルのもとで飼育した。飼料はオリエンタル酵母製 (MF) を使用し、水は給水瓶で自由摂取させた。

けいれんを誘発させるための放り上げ刺激は、EI マウスを 1 日に 1 回、板上で約 10cm の高さに 80 回の放り上げ刺激を毎週 2 回 (水曜日と土曜

日) 行った。

実験に際しては、同腹の EI マウスを 2 群に分け、その 1 群に放り上げ刺激を行った。放り上げ刺激は、朝 9 時から 12 時の間に行った。実験には生後 3, 4 ヶ月齢(体重約 30 g)の EI (+) 及び EI (-) を使用し、ddY マウスも同齢のものを使用した。

マウスは 1 群 10 匹とし、各々のマウスの頭部をマイクロウェーブ(3 kW, 0.2 秒)で固定した。脳摘出後、直ちに氷板上で脳組織を Growinski & Iversen の方法²⁴⁾に従って 7 つの部位(大脳皮質、視床下部、線条体、中脳、海馬、橋延髄、小脳)に分け、-80℃の超低温冷蔵庫に保管した。

2. 試料の前処理

7 つの部位に分割した各脳組織を 5 倍量の 0.1 規定過塩素酸溶液にてホモゲナイズした(その溶液は 0.1 mM ピロ亜硫酸ナトリウムと 0.02 mM EDTA-2Na を含んでおり、完全に窒素パージ処理を行ってある。)

ホモゲナイズ後さらに 2 分間窒素パージを行い、0℃で 30,000 回転で 30 分間遠沈を行った。その上澄液を 200 μ l 採取して 0.45 ミクロンのミリポアフィルターにて濾過した後、80 μ l を高速液体クロマトグラフ(HPLC)へ試料として注入した。

3. 測定条件

HPLC 装置は、直列の 16 クロマトリック化学検出器を有する、一定の電圧値で増加するようにセットした Neurochem(ESA Inc. Bedford, MA) を用いた。カラムは逆相カラム C18(ESA Inc. Bedford, MA) を 37℃ の設定で使用した。電圧範囲は 0 mV ~ 900 mV とし、60 mV 間隔で

16 個の検出器に電圧を印加して、稼動検出させた。

グラジェント条件は Fig. 1 の通りであり、冷却器付オートサンプラーを用いて自動注入による分析を行った。

4. クロマトデータ解析

専用データ解析ソフトを用い、自動データ解析を行った。ピークについては、そのピーク純度を確認する Ratio 精度 0.7 以上のものを信頼できるデータとして選択した。

5. 統計処理

得られた実験成績の有意差は Student's t-test によって行った。

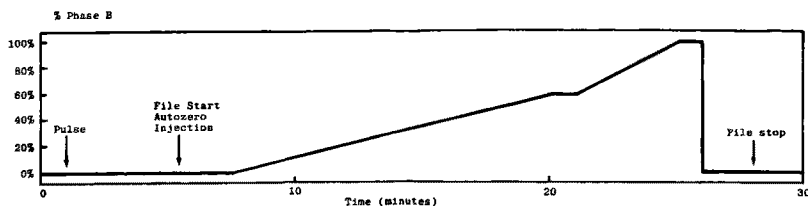
実験成績

1. トリプトファン及びその代謝産物

トリプトファン(Trp)及び Trp 由来の代謝産物である 5-HTP, 5-HT, 5-ヒドロキシインドール酢酸(5-HIAA), キヌレニン(KYN)及びキサンツレン酸の測定ができた。

Trp は ddY と EI (-) 間において有意差は認められないが、EI (+) では大脳皮質、線条体、中脳及び小脳において ddY 及び EI (-) に比較し有意の低下が認められた。また橋延髄においても EI (+) は EI (-) に比較し低下が認められた。海馬、視床下部においても同様の傾向が見られるが、統計学的有意差は認められなかった(Fig. 2)。

5-HTP は EI においては橋延髄を除くいずれの部位においても ddY に比較し著明な高値を示した。EI (-) と EI (+) を比較すると大脳皮質及び中脳においては EI (+) では有意の低



Phase A : 0.1M sodium phosphate and 10mg/ml sodium dodecyl sulfate at a pH of 3.35
Phase B : 50% methanol/water and 50mg/l sodium dodecyl sulfate at a pH of 3.45

Fig. 1 Gradient condition of HPLC.

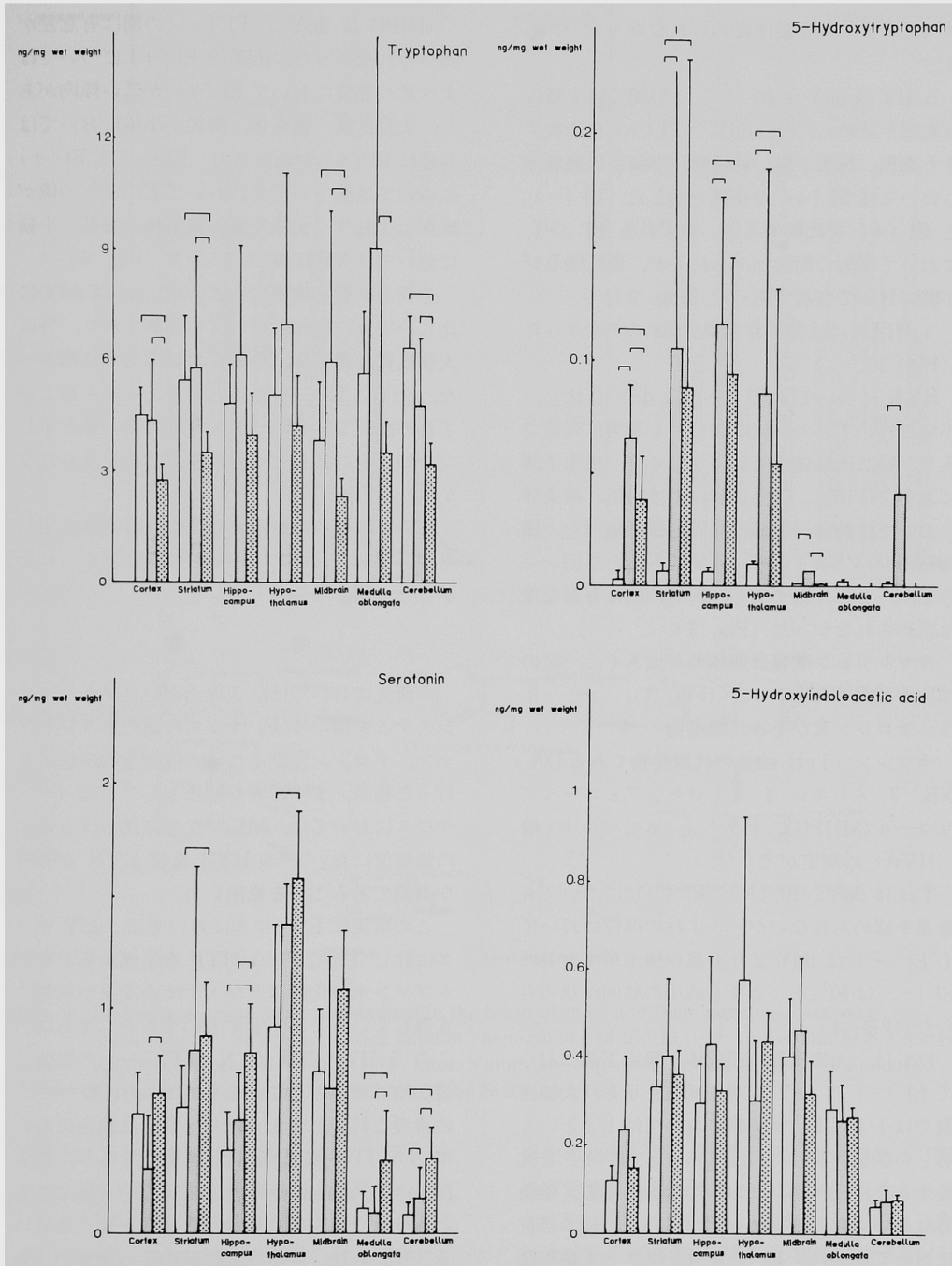


Fig. 2 Contents of tryptophan and its metabolites in the brain of mice.
 Open column : ddY mice, dotted column ; non-stimulated EI (EI (-)) mice, and heavy dotted column ; stimulated EI (EI (+)) mice. Values are expressed as mean±SD of 10 animals.
 □ : p < 0.05 compared to each group by Student's t-test.

下が認められたが、他の部位においては低下の傾向はあるが有意差は認められなかった (Fig. 2)。

5-HT は ddY と El (-) との間では小脳に有意差が認められた。ddY と El (+) を比較すると海馬、視床下部、橋延髄、小脳及び線条体においては El (+) が高値を示した。El (-) と El (+) を比較すると、いずれも El (+) において増加の傾向がみられるが、橋延髄及び小脳において有意であった (Fig. 2)。

5-HIAA には特に有意差が認められなかった (Fig. 2)。

KYN については El (-) は ddY に比し、小脳以外いずれの部位においても著明に高値であり、特に大脳皮質においては8倍、視床下部においては10倍、海馬においては14倍、線条体においては10倍、中脳においては2倍以上、橋延髄においては3倍という値であった。El (-) と El (+) を比較すると、両者の間に有意な差は認められなかった (Fig. 3)。

キサントレン酸量は個体差が大きく、一定の傾向が認められなかった (Fig. 3)。

2. チロシン及びその代謝産物

チロシン (Tyr) 由来の代謝産物である DA, NE, 3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニールグリコール (MHPG), チラミン, ホモバニリン酸 (HVA) の測定ができた。

Tyr は ddY, El (-), El (+) について有意差を認められないが、いずれの部位においても El (-) は ddY よりも高い値を示すと共に El (+) は El (-) よりも減少の傾向が認められた (Fig. 4)。

DA は、大脳皮質、線条体、視床下部において El (-) は ddY に対し低値を示し、大脳皮質では 1/4 以下、線条体においては 1/3 という著しい低値を示した。El (-) と El (+) を比較すると、El (+) においては大脳皮質、線条体において有意に増加が認められた。他の部位においては ddY, El (-), El (+) とともに値が著しく低かった (Fig. 4)。

NE は El (-) と ddY を比較して有意な差と傾向は見られなかったが、El (+) は ddY に比し海馬、中脳、橋延髄、小脳において有意に

増加していた (Fig. 4)。

MHPG は ddY と El (-) の間に有意差が認められなかった。ddY と El (+) についてはすべての部位において El (+) が低い傾向があり、大脳皮質、線条体、海馬、小脳においては有意に El (+) が低かった。El (-) と El (+) については全ての部位において El (+) の値が減少しており、大脳皮質、線条体、海馬、小脳においては有意に減少していた (Fig. 4)。

チラミン量を比較すると、El (-) は ddY に比しいずれの部位においても高値であり、特に大脳皮質、線条体、小脳において有意に高かった。ddY と El (+) を比較すると中脳を除くいずれの部位でも El (+) が有意に高い値を示した。El (+) と El (-) の間では差が見られなかった (Fig. 5)。

HVA は線条体が他の部位よりも高値を示したが各部位においての一定の傾向は認められなかった (Fig. 5)。

考 察

本研究においては、3次元クローメトリックシステムを用いて El マウスの脳内トリプトファン、チロシン及びそれらの代謝産物の測定を行った結果、まず顕著な結果として、El (-) マウスにおいては、ddY マウスに比しほとんどの脳部位において 5-HTP 及び KYN が著明な高値であることを見出した。

この事実は El マウスにおいては、ddY マウスに比し Trp より 5-HTP を生成するトリプトファン水酸化酵素及び KYN 合成系が異常に亢進していることを示すものである。さらに、この 5-HTP 及び KYN の El (-) の高値は遺伝的に規定されているものであり、El マウスの重要な特徴と考えられる。Trp は脳内において 5-HTP を経て 5-HT を生成するが、他方 formyl-kynurenine を介し、KYN を経てさらにキサントレン酸を生成する過程が知られている。KYN は、中枢神経において内因性のけいれん物質であることが Lapin ら²⁵⁾によって明らかにされている。従って El マウスにおいて遺伝的に KYN が高値であることはきわめて興味深く、El マウスのけいれん発現機構の主要な因

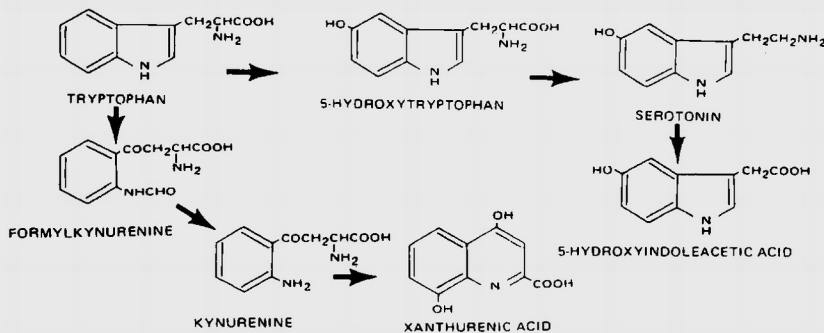
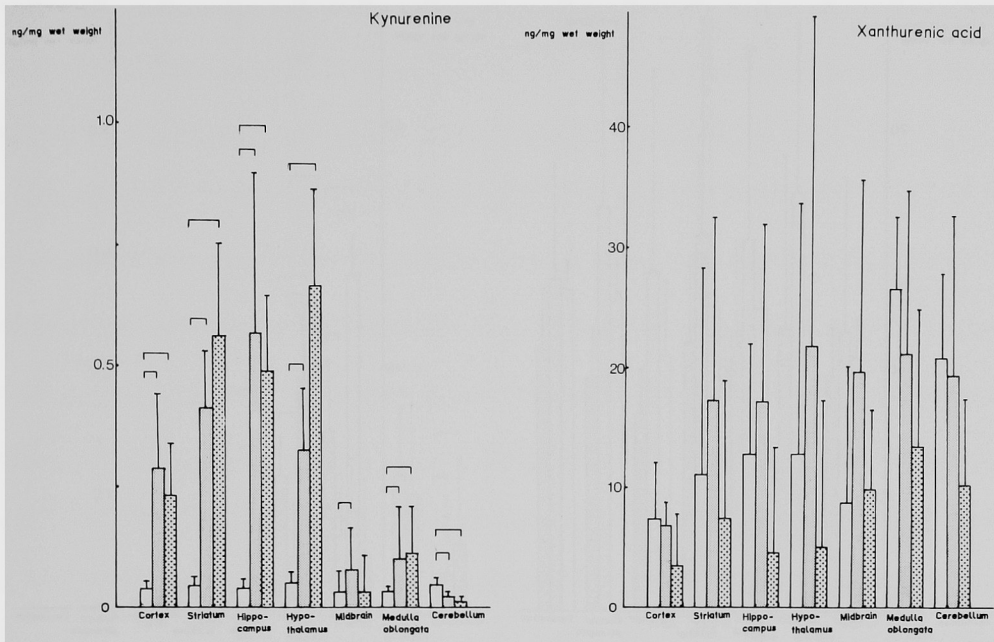


Fig. 3 Contents of tryptophan metabolites in the brain of mice and their metabolic pathway. Open column ; ddY mice, dotted column ; non-stimulated EI (EI (-)) mice, and heavy dotted column ; stimulated EI (EI (+)) mice. Values are expressed as mean±SD of 10 animals. □ : p < 0.05 compared to each group by Student's t-test.

子であると想定される。KYNはEI (+)においてはEI (-)に比し大脳皮質、海馬においては減少し、線条体、視床下部においては増加を示している。これは反復するけいれん発作の結果の変動と考えられるが、発作発現機構にいかに関係するかについては不明である。

5-HTはけいれん機構に関しては抑制的に作用するという多くの知見が得られている¹³⁾²³⁾。本

研究の結果からは、ddYとEI(-)の間で5-HTの有意差は小脳以外ほとんど認められなかったが、EI(+)においてはEI(-)あるいはddYに比較して高値を示した。これは反復するけいれんに対し、けいれん抑制系として代償性に増加したものと考えられる。同様にEI(-)とEI(+)の相違点としてEI(+)におけるTrpの減少、5-HTPの減少が認められた。

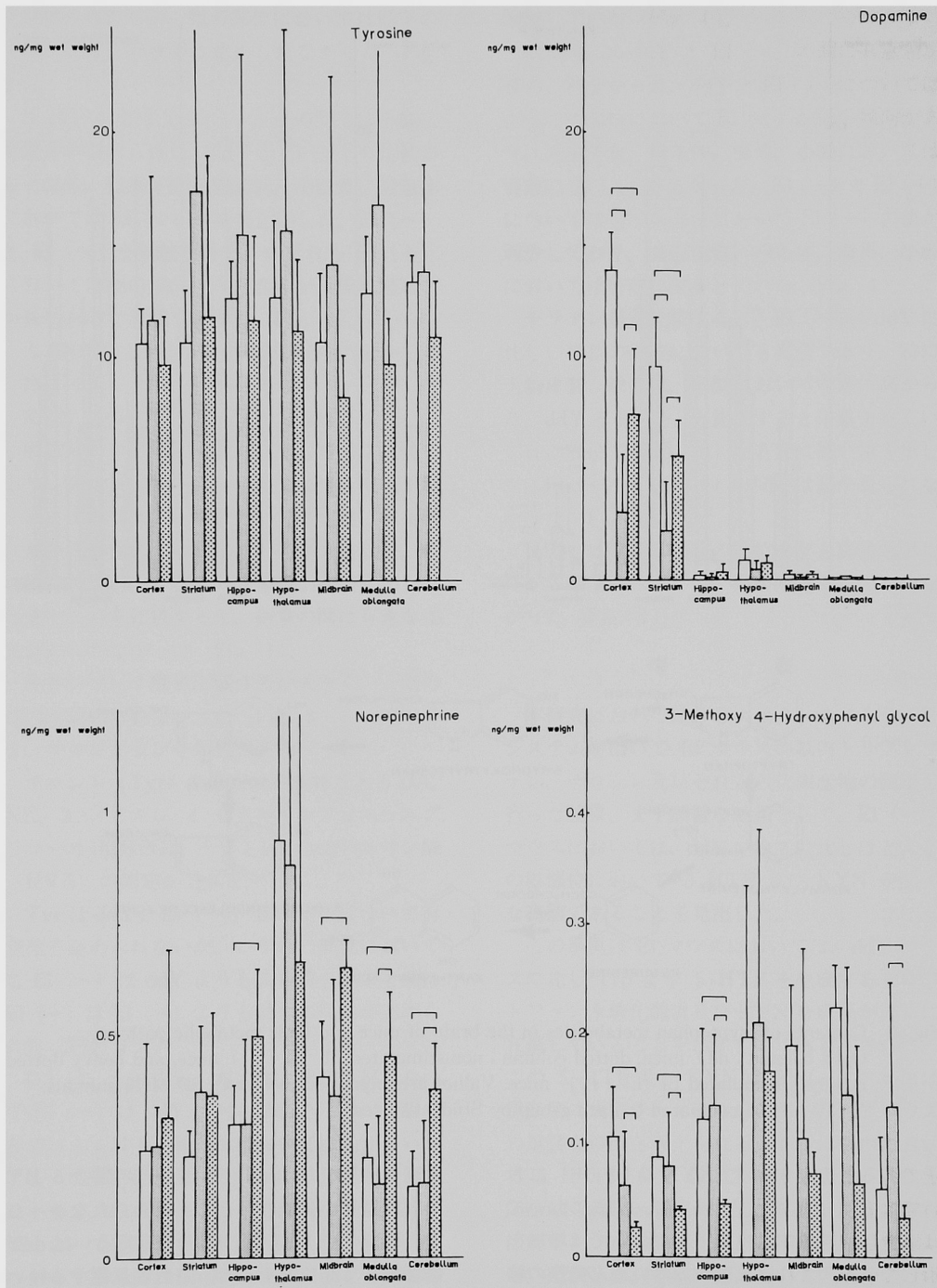


Fig. 4 Contents of tyrosine and its metabolites in the brain of mice. Open column : ddY mice, dotted column : non-stimulated EI (EI (-)) mice, and heavy dotted column : stimulated EI (EI (+)) mice. Values are expressed as mean \pm SD of 10 animals. \square : $p < 0.05$ compared to each group by Student's t-test.

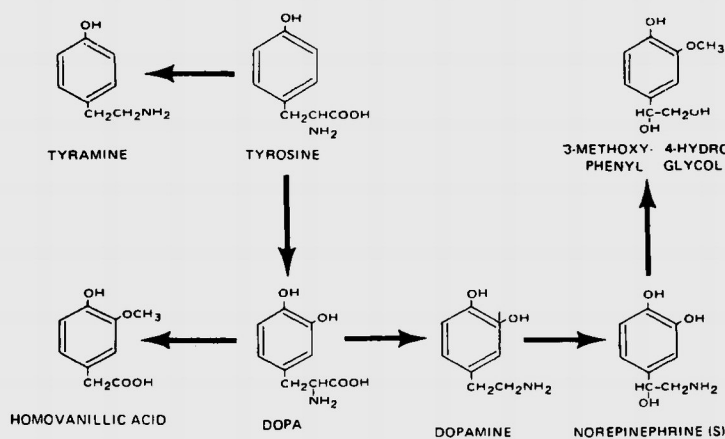
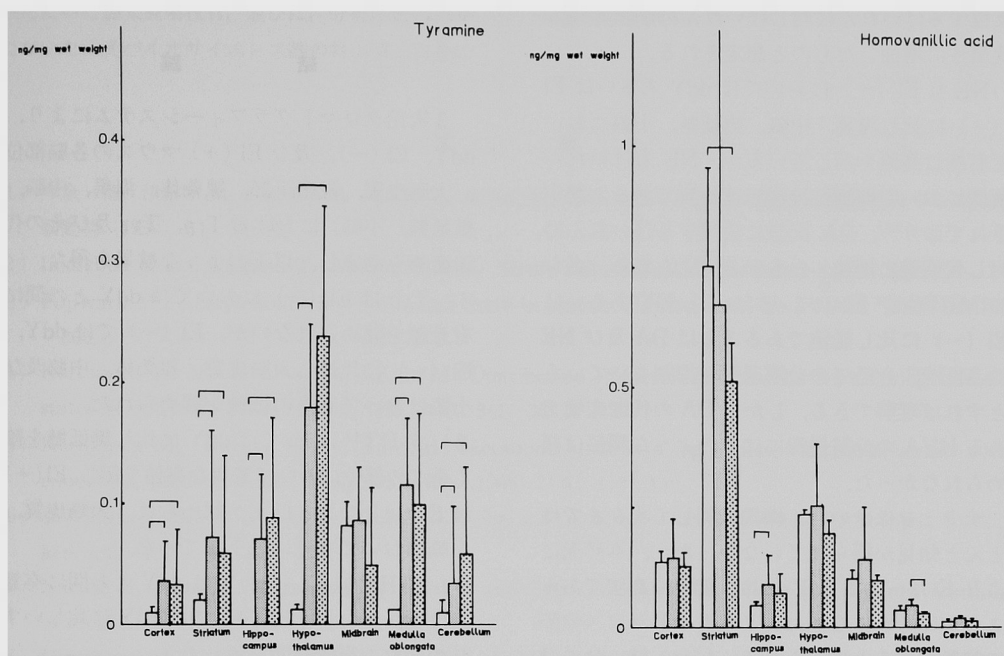


Fig. 5 Contents of tyrosine metabolites in the brain of mice and their metabolic pathway. Open column ; ddY mice, dotted column ; non-stimulated EI (EI (-)) mice, and heavy dotted column ; stimulated EI (EI (+)) mice. Values are expressed as mean±SD of 10 animals. □: p < 0.05 compared to each group by Student's t-test.

チロシン代謝系については、まずEI (-)のddYに対するDAの著明な低値が注目される。この低値も遺伝的に規定されたものであり、EIマウスの特徴であると考えられる。DAはけいれん機構に関しては抑制性伝達物質であると考

えられている¹³⁾²⁶⁾。また森ら²⁷⁾はヒト脳てんかん焦点においてDAが周囲の非焦点組織に比し低値であることを報告している。DAはEI (+)においてはEI (-)に比し著明に増加しているが、これも5-HTにおいて認められたごとく

反復するけいれんに対しけいれん抑制系として代償性に増加したものと想定される。

NE も EI (+) においては ddY あるいは EI (-) に比し海馬, 中脳, 橋延髄, 小脳において有意に高値を示しているが, NE もけいれん機構において抑制性神経伝達物質であると想定されており²⁶⁾, DA 同様に反復するけいれんに対し代償性に増加したものと考えられる。さらに MHPG が EI (+) において ddY あるいは EI (-) に比し低値であることは DA 及び NE の MHPG を経ての分解過程が抑制されているとすれば理解できる。しかし DA の代謝産物である HVA の分解過程にはそのような関係は認められなかった。

チラミンはけいれん機構に関して現在までほとんど知見が得られていなかったが, 本研究により EI (-) は ddY に比し著明に高値であることが明らかになった。これも EI マウスの脳の特徴であると考えられる。しかしけいれん機構にいかに関与するかについては不明である。

本研究においては, 最近開発された 3 次元クロマトグラムシステム (Neurochem) を用いて行った。Neurochem は HPLC と直列配置の多極式クローメトリック検出器及びシステムコントロールとデータ処理を行うコンピューターによって構成されており, 複合物質, 共溶出物質等を 3 次元で異なったピークとした検出が, 1 回の試料注入で行える。さらにいくつかの電極からの Ratio を得ることにより, 複合物質の純度も正確に知ることができる。

この新しい装置による知見は 5-HT の挙動が, 平松ら¹³⁾²⁶⁾の実験結果とは相違していたが, その原因はそれぞれ実験に使用した EI マウスの脳内成分が純化あるいは系代に従って変化した可能性が考えられる以外に, 測定方法の違いによることも十分考慮される。DA についても¹³⁾²³⁾ 5-HT と同様なことが考えられる。

この測定により, 上述の物質のほか, caffeic acid, normetanephrine, 4-methoxyphenylethylamine, guanine, guanosine, 4-hydroxyphenyllactic acid 等の成分が検出された。これらの物質についてはマススペクトル等による同定確認を行ったのち報告する予定であ

る。

結 論

3次元クロマトグラフィシステムにより, ddY, EI (-), 及び EI (+) マウスの各脳部位 (大脳皮質, 視床下部, 線条体, 海馬, 中脳, 橋延髄, 小脳) における Trp, Tyr 及びその代謝産物を測定し, 以下のような結果を得た。

1) Trp は EI (-) においては ddY との間に有意差を認められないが, EI (+) では ddY, EI (-) に比較し大脳皮質, 線条体, 中脳及び小脳において有意の低値が認められた。

2) 5-HTP は EI では ddY に比し橋延髄を除く全ての部位において著明な高値を示し, EI (+) は EI (-) に比し低下が認められ, 大脳皮質, 中脳において有意に低下していた。

3) 5-HT は EI (-) では ddY との間に有意差はなかったが, EI (+) では ddY に比しいずれの部位も高値傾向を示した。

4) KYN は EI では ddY に比し, 大脳皮質, 海馬, 橋延髄及び小脳において著明に高値であった。

5) DA は EI (-) では ddY に比し低値を示し, 大脳皮質, 線条体, 視床下部においては特に著しい低値を示した。EI (+) は EI (-) に比し大脳皮質, 線条体で有意に増加していた。

6) NE は EI (-) と ddY では有意差はないが, EI (+) は ddY に比し有意に高値の部位があった。

7) MHPG は EI (-) では ddY に比し低い傾向を示し, EI (+) はさらに低値を示した。

8) チラミンは EI (-) では ddY に比し全ての部位で高値であり, EI (+) も ddY に比し中脳以外全ての部位で有意に高値を示した。

以上の成績から EI マウス脳については Trp 及び Tyr の先天的な代謝異常があることが示唆され, 特に内因性けいれん物質である KYN の異常高値と 5-HT, DA, NE など抑制系神経伝達物質の反復するけいれんに対応する変化が注目された。

稿を終るに当たり, 御指導, 御校閲を賜った森昭胤教授に深甚なる謝意を表すと共に, 直接御指導

いただいた加太英明技官, 並びに, 分析に御協力い 深謝致します。
いただいた二光バイオサイエンス(株)の村山清志次長に

文 献

- 1) 今泉 清, 伊藤昭吾, 沓掛源次郎, 滝沢隆安, 藤原公策, 土川 清: マウスのてんかん様異常について. 実験動物 (1959) **8**, 6—10.
- 2) Imaizumi K and Nakano T: Mutant Stocks, Strain: El. Mouse News Letter (1964) **31**, 57.
- 3) Fujiwara M: Acetylcholine level of mouse brain in preconvulsive states. Jpn J NRA (1980) **6**, 192—202.
- 4) Kurokawa M, Machiyama Y and Kato M: Distribution of acetylcholine in the brain during various states of activity. J Neurochem (1963) **10**, 341—348.
- 5) Kurokawa M, Naruse H and Kato M: Metabolic studies on ep mouse, a special strain with convulsive predisposition. Prog Brain Res (1966) **21A**, 112—130.
- 6) 藤原正昭, 松本路子, 森 昭胤: El 系, CBA 系および A 系マウス脳内アセチルコリン含有量について. 脳研会誌 (1977) **3**, 124—125.
- 7) Naruse H, Kato M, Kurosawa M, Haba R and Yabe T: Metabolic defects in a convulsive strain of mouse. J Neurochem (1960) **5**, 359—369.
- 8) Hiramatsu M, Suzuki S, Edamatsu R, Shimada M and Mori A: 20-th Annual Meeting of the Japan Epilepsy Society (1986).
- 9) Hattori H, Ito M and Mikawa H: γ -Aminobutyric acid binding sites and γ -aminobutyric acid concentrations in epileptic El mouse brain. Eur J Pharmacol (1985) **119**, 217—223.
- 10) Mori A, Yokoi I and Kabuto H: 2-Amino-5-phosphonopentanoate prevents convulsions and decreases cerebral glutamate level in El mice. IRCS Med Sci (1986) **14**, 475.
- 11) Iwata H, Yamagami S, Lee E, Matsuda T and Baba A: Increases of brain taurine contents of El mice by physiological stimulation. Jpn J Pharmacol (1979) **29**, 503—507.
- 12) Hiramatsu M, Ogawa K, Kabuto H and Mori A: Reduced uptake and release of 5-hydroxytryptamine and taurine in the cerebral cortex of epileptic El mice. Epilepsy Res (1987) **1**, 40—45.
- 13) Hiramatsu M: Brain monoamine levels and El mouse convulsions. Folia Psychiatr Neurol Jpn (1981) **35**, 261—266.
- 14) Hiramatsu M: Brain 5-hydroxytryptamine level, metabolism, and binding in El mice. Neurochem Res (1983) **8**, 1163—1175.
- 15) Hiramatsu M and Mori A: Brain catecholamine concentrations and convulsion in El mice. Folia Psychiatr Neurol Jpn (1977) **31**, 491—495.
- 16) Hiramatsu M and Mori A: Distribution of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid in brains of El and ddY mice. IRCS Med Sci (1980) **8**, 84.
- 17) Hiramatsu M and Mori A: El mouse seizure and 5-hydroxytryptamine in the brain. IRCS Med Sci (1980) **8**, 719—720.
- 18) Yamagami S, Ohno K, Tsuji M, Mori K and Kawakita Y: Developmental alteration in RNA metabolism of El mouse brain. Folia Psychiatr Neurol Jpn (1981) **35**, 253—260.
- 19) Onishi H, Yamagami S, Mori K and Kawakita Y: Effect of convulsions on the synthesis of heterogenous nuclear RNA associated with polyadenylate and oligoadenylate sequences from El

- mouse brain as a convulsive strain. *Exp Neurol* (1984) **83**, 98—107.
- 20) Yamagami S, Onishi H, Ohno K, Mori K and Kawakita Y : Alteration of RNA synthesis in vivo in intact cerebral cortex nuclei induced by convulsions in seizure susceptible El mice. *Exp Neurol* (1987) **95**, 167—177.
- 21) 古塚大介, 山上栄, 千頭孝史, 平山栄一, 森浩一, 川北幸男 : El マウス大脳皮質のシナプトゾーム蛋白合成に及ぼす発作の影響. *医のあゆみ* (1985) **134**, 195—196.
- 22) Mody I, Baimbridge KG and Miller JJ : Distribution of calbindin-D_{28k} (CaBP) in the cerebral cortex and hippocampus of the epileptic (El) mouse. *Epilepsy Res* (1987) **1**, 46—52.
- 23) Mori A : El mice : Neurochemical approach to the seizure mechanism. *Neurosciences* (1988) **14**, 275—285.
- 24) Glowinski J and Iversen L : Regional studies of catecholamines in the rat brain — I. *J Neurochem* (1966) **13**, 655—669.
- 25) Lapin I P : Kynurenines and Seizures. *Epilepsia* (1981) **22**, 257—265.
- 26) Mori A : Alterations in biogenic amines in epileptic El mouse brain and in human epileptic focus ; in *Art and Science of Epilepsy*, Suguki, Seino, Fukuyama and Komai eds. *Excerpta Medica*, Amsterdam (1989) pp35—38.
- 27) 岸川秀実 : カテコールアミン代謝に関する基礎的ならびに臨床的研究II. てんかんのカテコールアミン代謝に関する基礎的ならびに臨床的研究. *岡山医誌* (1975) **87**, 463—480.

**Regional distribution of tyrosine, tryptophan and their metabolites
in the brain of El mice**

Shigeki SUZUKI

Department of Neurochemistry, Institute for Neurobiology,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. A. Mori)

The contents of tyrosine (Tyr), tryptophan (Trp) and their metabolites in brain regions of ddY, non-stimulated El (El(-)) and stimulated El (El(+)) mice were measured using a Three Dimensional HPLC System.

In the cerebral cortex, striatum, midbrain and cerebellum, Trp contents of El(+) mice were higher than those of ddY and El(-) mice. The contents of 5-hydroxytryptophan in El (-) or (+) mice brain were lower than those in ddY mice except in the medulla oblongata. Those in the cerebral cortex, and midbrain of El(+) mice were lowest. Brain regional serotonin (5-HT) contents of El (+) mice seemed to be slightly higher than those of ddY and El (-) mice. In the cerebral cortex, hippocampus, medulla oblongata and cerebellum of El (+) or (-) mice, the kynurenin contents were remarkably high compared to ddY mice.

Although brain Tyr content did not differ between the three groups, the dopamine contents in the cerebral cortex, hypothalamus and striatum of El (+) mice were lower than those in ddY mice, and those in the cerebral cortex and striatum of El (+) mice were higher than those in El (-) mice. The norepinephrine contents did not differ between El (-) and ddY mice, but some brain regions of El (+) mice had higher levels. The content of 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol of El (-) mice was lower, and in El (+) mice was lowest in 7 brain regions. The tyramine contents in El (-) or (+) mice brains were higher than those in ddY mice, except in the midbrain of El (+) mice.

These data, suggest a possible genetic metabolic abnormality of Try and Tyr in the brains of El mice.