

## N-メチル-D-アスパラギン酸脳室内投与の マウス脳内アミノ酸への影響

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)

岡 村 裕 司

(平成2年9月7日受稿)

**Key words** : N-methyl-D-aspartic acid, excitatory amino acids,  
inhibitory amino acids, running fits, mouse EEG

### 緒 言

脳内にはグルタミン酸 (Glu), アスパラギン酸 (Asp),  $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) などのアミノ酸が一定の濃度関係を保って、遊離の状態でも存在していることが知られているが、ある種のアミノ酸あるいはその代謝産物は脳の神経活動と密接に関係することが知られている。例えば、Glu や Asp は神経細胞内にその合成系が存在すること、神経細胞を  $K^+$  や電気刺激により脱分極させると放出量が増加すること<sup>1,2)</sup>、大脳皮質、脊髄、視床、線条体、尾状核あるいは海馬の神経細胞を興奮させること<sup>3,4)</sup>、さらに脳や脊髄のシナプトゾーム分画には取り込み機構などの放出された Glu や Asp の不活性化機構が存在すること<sup>5,6)</sup>、などの事実から興奮性神経伝達物質と一般に考えられている<sup>7)</sup>。この Glu や Asp は大脳皮質と視床、線条体、赤核、脊髄あるいは上丘を結ぶ経路<sup>8)</sup>、海馬と側坐核、乳頭体あるいは中隔野を結ぶ経路<sup>9)</sup>、海馬内交連線維<sup>9)</sup>、嗅球顆粒細胞<sup>10)</sup>、嗅球と大脳皮質を結ぶ経路<sup>8,10)</sup>、小脳登上線維や小脳顆粒細胞<sup>11)</sup>、内耳神経<sup>12)</sup>、あるいは一次知覚線維<sup>13)</sup>などの多くの系で神経伝達に携わっていることが知られている。また、中枢神経系の興奮性アミノ酸レセプターは特定の生理機能と関連した分類ではないが、薬物を投与した時の電気生理学的な反応性の相違や、薬物との結合性の相違などから N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 型、カイニン酸型、キスカル酸型の少なくとも3種類、もしくは2-アミ

N-4-ホスホ酪酸 (AP 4) 型を加えた4種類のサブタイプに便宜上分類されている<sup>14)</sup>。

さて、NMDA 型興奮性アミノ酸レセプターのアゴニストの一つである NMDA をマウス、ラット、ネコなどの動物に投与すると疾走発作とそれに続く全身性强直性伸展発作を来し死亡することが知られている<sup>15-18)</sup>。本研究では NMDA を ddY 系統のマウス脳室内に投与して、その誘発する行動、脳波変化、および脳内の各種アミノ酸含量を経時的に観察することにより、NMDA の脳内アミノ酸に対する影響を検討し、NMDA 誘発発作の発現機構に於けるアミノ酸系神経伝達物質の関与を検討した。

### 対象と方法

#### 1. 実験動物

実験動物には ddY 系統のマウス (雄, 6-8 週齢) を使用した。マウスは室温 25°C, 湿度 55%, 12 時間の明暗サイクル (午前 7 時より午後 7 時まで明期) のもとで、少なくとも 1 週間飼育した後に実験に使用した。飼料はオリエンタル酵母製固形飼料 MF を使用し、水と共に自由に摂取させた。

#### 2. NMDA の脳室内投与方法

NMDA (Sigma 社製) は生理食塩水にて溶解し、NaOH にて pH 7 に調整後 1 mM の溶液とし、その 2  $\mu$ l (NMDA: 2 nmol) を側脳室内に投与した。また、脳室内投与による脳圧亢進などの影響を考慮し、対照群のマウスの側脳室内には生理食塩水を同量投与した。

行動および脳内アミノ酸値に及ぼす NMDA の影響を検討する際には、無麻酔下に中島の簡便法<sup>19)</sup>に従って溶液を投与した。すなわち無麻酔のマウスを片手に持ち、他方の手で後頭頂骨の正中辺りから吻側へ10から15mm程度切開した後、両眼の中央を左右に走る下大脳静脈より尾方へ3mm、矢状縫合から側方へ1mmの部位よりマイクロシリンジを使用して脳室内に投与した。

脳波におよぼす NMDA の影響を検討する際には、プレグマより後方1mm、左側方1mmの位置からマイクロシリンジを使用して脳室内に投与した。

### 3. 脳波におよぼす NMDA の影響の検討

マウスは、エーテル麻酔下で気管内に挿管し脳定位固定装置に固定後、人工呼吸下にサクシニルコリンで非動化した。プレグマの前方1.5mm、左右側方1mm、またプレグマの後方3mm、左右側方1.5mmの4部位に硬膜外プラチナ電極をそれぞれ固定して脳波記録用電極とした。さらに背側頸部正中の皮下に針電極を刺入し不関電極(E)とし、単極および双極導出法で脳波記録を行った。すなわち、i) 左前頭部電極(LF)-左後頭部電極(LO)、ii) 右前頭部電極(RF)-右後頭部電極(RO)、iii) LF-RF、iv) LO-RO、v) LF-E、vi) LO-E、vii) RF-E、viii) RO-Eの導出法で脳波を記録した。他方、脳波の記録中は左右前腕に刺入した針電極を使用して心電図も記録してマウスの一般状態の目安とした。NMDA の影響の検討に際しては、投与後1時間半から2時間脳波を観察した。

### 4. 脳内アミノ酸におよぼす NMDA の影響

脳内各種アミノ酸におよぼす NMDA の影響を検討するために NMDA 投与直後、発作中、投与10分後、投与1時間後にマイクロウエーブを頭部に照射(3kW, 0.2秒)することにより脳を固定した。氷盤上で直ちに脳を摘出し、Glowinski ら<sup>20)</sup>の方法に従い、大脳皮質、小脳、海馬、線条体の4部位を分離した。試料は、アミノ酸の抽出操作を行うまで-80℃にて凍結保存した。

秤量したマウス脳組織はアミノ酸の抽出と除蛋白のために10倍量の1%ピクリン酸でホモゲナイズした。ついで遠心分離(4℃, 15分, 3,000rpm)後上清を分離、さらに沈査に塩酸(0.01N,

5ml)を加え震盪後、遠心分離(4℃, 15分間, 10,000rpm)をおこない上清を分離した。得られた上清を合わせ、陰イオン交換樹脂(Dowex 2×8)によりピクリン酸を除去した後乾固し、希塩酸(pH2.2, 1ml)に溶解しアミノ酸分析用試料とした。アミノ酸分析はアミノ酸自動分析装置(IRIKA Automatic Amino Acid Analyzer Type A-5500E)を用いて行った。

### 5. 統計学的処理

アミノ酸分析により得られた NMDA 投与群と対照群の脳湿重量あたりのアミノ酸量は Student's t-test により有意差検定を行った。また、アミノ酸量の変化の検討は脳内に比較的多量に存在する Glu, Asp, グルタミン (Gln), GABA, グリシン (Gly) およびタウリン (Tau) 量に付いて行った。

## 結 果

### 1. 行動におよぼす NMDA の影響

マウスに NMDA を投与すると、約10秒後に突如として疾走発作 (running fits) をきたしたが、疾走は20-30秒ほどでおさまった。その後マウスの行動は抑制されてほとんど動かなくなるが、しだいに抑制状態から回復し約20分後には対照群のマウスの行動との間に差は認められなくなった。また、一部のマウスは疾走発作中に転倒し、そのまま全身性硬直性伸展を示した後に死亡した。

一方、対照群のマウスには、疾走発作や行動抑制などの異常行動は観察されなかった。

### 2. 脳波におよぼす NMDA の影響

マウス脳室内に NMDA を投与すると約10秒後より投与反対側の後頭部に中振幅速波が出現し5-10秒続いた。その後脳波は抑制されほぼ平坦となったが、約4-5分後より除波が出現し、しだいにその周波数および電圧を増し、8-10分後よりは速波成分も混入しだした。脳波はその後しだいに回復し、約20分後にはほぼ完全に回復した。また、心電図には NMDA 投与後から期外収縮などの不整脈も時折出現した。しかし、脳波の回復する20分後には不整脈も消失した (Fig. 1)。

生理食塩水のみを投与した対照群のマウス脳

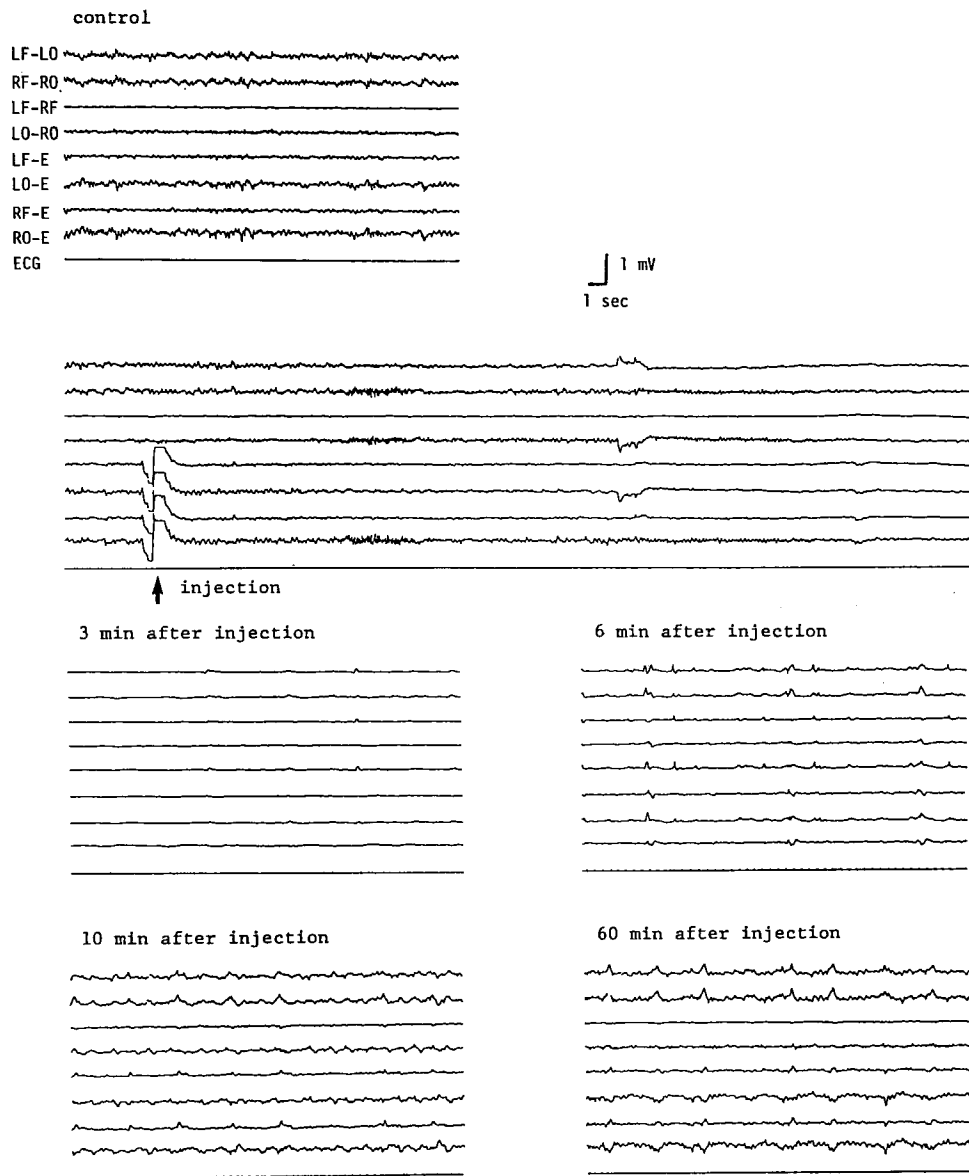


Fig. 1 Effect of NMDA on the EEG of mouse. NMDA (1 mM, 2  $\mu$ l) was injected intraventricularly into mouse. EEGs were recorded from 4 epidural electrodes : LF-LO, bipolar recording from left frontal electrode (LF) to left occipital electrode (LO); RF-RO, bipolar recording from right frontal electrode (RF) to right occipital electrode (RO); LF-RF, bipolar recording from LF to RF; LO-RO; bipolar recording from LO to RO; LF-E, unipolar recording from LF; LO-E, unipolar recording from LO; RF-E, unipolar recording from RF; RO-E, unipolar recording from RO; and ECG, electrocardiogram.

Table 1. Effects of NMDA injected intraventricularly on amino acid levels in mouse brain

	cortex		cerebellum		hippocampus		striatum	
	control	NMDA	control	NMDA	control	NMDA	control	NMDA
Tau								
pre-running fits	11.1±0.3	9.0±0.8	9.6±0.7	7.4±0.8	15.1±3.2	7.5±0.5	13.6±0.7	11.3±0.8*
during running fits	13.7±1.5	10.5±0.8	8.1±2.6	13.0±1.6	10.0±1.6	14.1±1.4	15.6±3.9	19.5±1.3
10 min after injection	11.5±1.9	9.0±0.8	10.0±1.8	13.3±1.3	33.5±9.2	14.7±0.4	14.1±4.7	14.8±1.1
1 hour after injection	10.4±2.3	8.1±0.8	10.6±3.3	7.5±0.7	16.8±2.1	10.4±0.6	11.1±1.6	33.5±3.0
Asp								
pre-running fits	2.9±0.2	2.8±1.0	4.6±0.7	2.0±0.4	4.5±1.0	2.3±0.5	3.6±0.2	3.4±0.9
during running fits	4.0±0.7	2.6±0.6	2.1±0.7	4.6±2.2	3.0±0.4	4.5±1.5	4.2±0.4	5.5±1.3
10 min after injection	3.1±0.2	2.8±0.9	3.9±0.4	4.4±1.1	5.6±1.7	3.1±0.6	3.8±1.0	4.6±1.2
1 hour after injection	1.7±0.4	1.9±1.1	3.5±1.6	2.6±0.8	3.1±0.6	1.8±0.6	1.8±0.7	2.5±1.4
Glu								
pre-running fits	12.2±0.5	11.3±0.9	12.3±1.0	8.7±0.7	17.7±3.6	8.8±0.5	12.8±0.5	13.2±1.0
during running fits	13.7±2.0	10.1±0.7	9.3±1.7	12.4±1.3	9.8±1.4	16.7±1.7*	13.3±2.8	17.4±1.3
10 min after injection	11.1±1.6	10.4±0.9	10.8±1.5	16.9±1.6	22.4±7.1	15.1±0.7	12.8±4.3	14.2±1.1
1 hour after injection	6.4±1.3	8.2±1.3	9.9±2.9	8.4±0.9	14.1±2.7	9.7±0.7	7.2±2.4	10.1±1.4
Gln								
pre-running fits	4.4±0.8	4.1±0.9	4.6±0.8	4.0±0.9	7.0±1.9	3.6±0.5	5.6±0.4	5.8±1.0
during running fits	4.6±0.8	4.4±0.9	3.5±1.4	7.6±2.2	3.7±0.6	6.2±1.7	5.8±1.4	8.5±1.5
10 min after injection	5.3±0.8	3.8±0.7	5.8±0.9	6.6±1.1	11.5±4.2	5.1±0.4	6.8±2.1	4.5±0.7
1 hour after injection	3.0±0.8	4.4±1.5	5.2±1.3	5.2±1.0	6.7±1.4	4.6±0.7	3.6±1.3	5.5±1.5
Gly								
pre-running fits	1.3±0.1	1.1±0.8	2.9±0.4	1.8±0.6	2.2±0.3	1.0±0.4	1.6±0.3	1.7±1.0
during running fits	2.0±0.4	1.2±0.6	2.6±0.5	3.1±1.2	1.7±0.2	2.6±1.5	2.0±0.3	2.6±1.3
10 min after injection	1.7±0.3	1.9±1.1	2.8±0.3	4.9±1.8	3.7±1.1	2.7±0.7	2.2±0.5	3.1±1.4
1 hour after injection	0.6±0.2	0.7±1.2	2.4±0.8	2.1±0.9	1.5±0.4	1.1±0.8	0.7±0.2	1.4±2.1
GABA								
pre-running fits	2.3±0.2	2.3±1.0	4.2±1.0	2.1±0.5*	3.9±0.6	1.7±0.4*	3.1±0.2	3.2±1.0
during running fits	3.0±0.7	2.1±0.7	3.2±0.2	4.3±1.3	2.5±0.5	4.0±0.9	3.0±0.5	4.7±1.6
10 min after injection	3.4±1.3	3.7±1.1	2.6±0.5	7.3±2.8*	4.9±1.8	4.8±1.0	3.8±1.0	6.2±1.6
1 hour after injection	1.0±0.2	1.4±1.4	1.5±0.5	1.9±1.3	2.6±0.4	1.9±0.7	1.6±0.4	2.6±1.7

mean±SEM (nmol/mg tissue), n = 4 - 5, \*: p<0.05, compared with control by Student's t-test

波には、大きな変化は認められなかった。

### 3. 脳内アミノ酸含量におよぼす NMDA の影響

#### 1) 脳内 Glu 量におよぼす NMDA の影響

海馬の Glu 量は対照群と比べて、疾走発作中に有意に増加したが、10分以後には対照群の値と比べ有意な差は認められなくなった。しかし、大脳皮質、小脳、線条体においては、Glu 量の有意な変化は実験期間中認められなかった (Table 1, Fig. 2)。

#### 2) 脳内 Asp 量におよぼす NMDA の影響

本研究で調べた大脳皮質、小脳、海馬及び線条体内の Asp 量は、実験期間中 NMDA 群と対照群との間に有意な差は認められなかった (Table 1, Fig. 3)。

NMDA 投与群の海馬においては疾走発作中の

Asp 量は投与1時間後の Asp 量に比べて有意に多かった。

#### 3) 脳内 Gln 量におよぼす NMDA の影響

大脳皮質、小脳、海馬及び線条体では実験期間中、NMDA 投与群と対照群との間に有意な変化は認められなかった (Table 1, Fig. 4)。

#### 4) 脳内 GABA 量におよぼす NMDA の影響

小脳及び海馬の GABA 量は NMDA 投与直後に有意に減少した。小脳の GABA 量はその後増加し、10分後には対照群と比べて有意に増加したが、投与1時間後には対照群の値に回復した。しかし、大脳皮質及び線条体の GABA 量は、いずれの時間においても対照群と比べて有意な差は認められなかった (Table 1, Fig. 5)。

小脳における投与10分後の GABA 量は、投与直後及び投与1時間後と比べて有意に多かつ

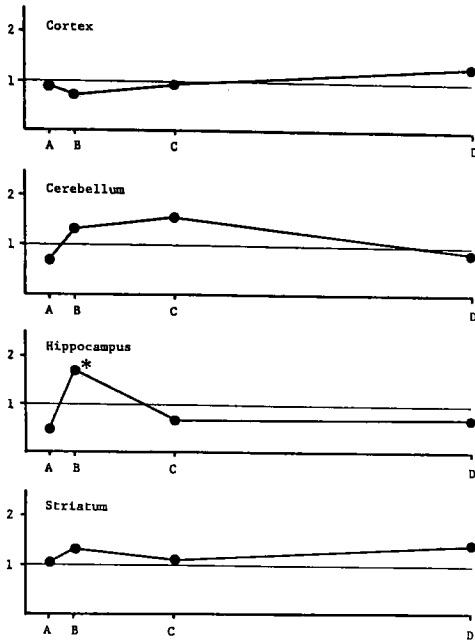


Fig. 2 Effect of NMDA on the Glu level in mouse brain. NMDA (1 mM, 2  $\mu$ l) was injected intraventricularly into mouse. Mice were sacrificed by the microwave irradiation pre-running fits (A), during running fits (B), 10 minutes (C) and 1 hour (D) after the injection. Values are expressed as the ratio to the saline injected group (control). \* :  $p < 0.05$  compared with control. n = 4 - 5

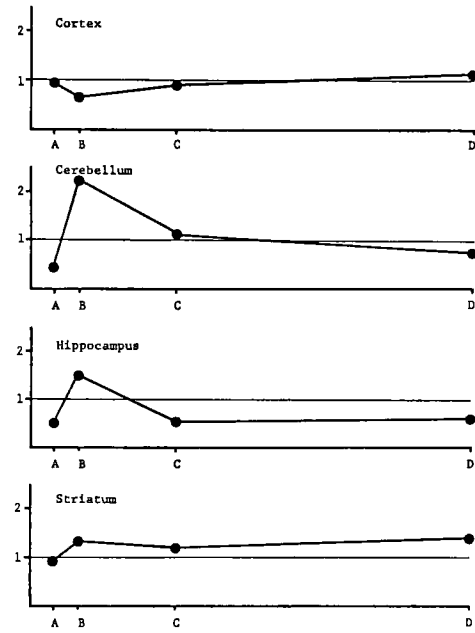


Fig. 3 Effect of NMDA on the Asp level in mouse brain. NMDA (1 mM, 2  $\mu$ l) was injected intraventricularly into mouse. Mice were sacrificed by the microwave irradiation pre-running fits (A), during running fits (B), 10 minutes (C) and 1 hour (D) after the injection. Values are expressed as the ratio to the saline injected group (control). \* :  $p < 0.05$  compared with control. n = 4 - 5

た。

5) 脳内 Gly 量におよぼす NMDA の影響

大脳皮質, 小脳, 海馬及び線条体では, いずれの時間においても対照群と比べ有意な差は認められなかった (Table 1, Fig. 6).

6) 脳内 Tau 量におよぼす NMDA の影響

線条体内の Tau 量は NMDA 投与直後に対照群と比べて有意に減少していた。しかし大脳皮質, 小脳, 海馬では, いずれの時間においても対照群と比べ Tau 量の有意な差は認められなかった (Table 1, Fig. 7).

考 察

脳内において, 神経線維は複雑なネットワークを形成し, シナプスではさまざまな神経伝達

物質が放出され, 互いに影響しあっていると考えられているが, ある種のアミノ酸は脳内でエネルギー代謝に関わると共に神経伝達物質としても働いている。酸性アミノ酸である Glu は一部の神経細胞に抑制性に働くことも報告されているが<sup>21,22)</sup>, 一般的には Asp と共に興奮性の神経伝達物質として働いていると考えられている<sup>7)</sup>。近年, アミノ酸神経伝達物質はけいれんやてんかんの関連において多くの研究がなされている。林<sup>23,24)</sup>は Glu や Asp をイヌの大脳皮質に直接投与したり脳室内に注入するとけいれんが誘発されることを観察し報告した。また, ネコ大脳皮質にコバルトを投与して誘導したてんかん焦点組織においては, Glu, Asp 及び GABA が減少していること<sup>25,26)</sup>, Glu の放出が亢進して

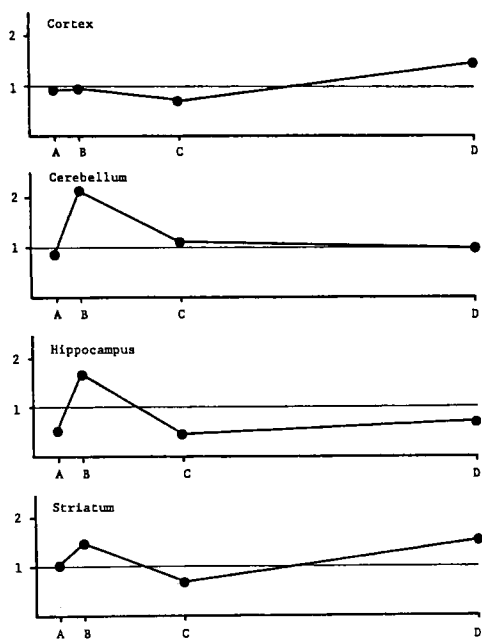


Fig. 4 Effect of NMDA on the Gln level in mouse brain. NMDA (1 mM, 2  $\mu$ l) was injected intraventricularly into mouse. Mice were sacrificed by the microwave irradiation pre-running fits (A), during running fits (B), 10 minutes (C) and 1 hour (D) after the injection. Values are expressed as the ratio to the saline injected group (control). \*:  $p < 0.05$  compared with control.  $n = 4 - 5$

いること<sup>27,28)</sup>より, Gluの遊離がコバルト誘導てんかん焦点における局所性発作放電を引き起こすことが示唆された。さらに, Van Gelderら<sup>29)</sup>はてんかん患者大脳皮質焦点組織においては Glu及び Tauの減少している症例が多く, Aspや GABAも低値の症例のあることを示しており, これらの症例ではアミノ酸系神経伝達物質の異常がてんかんの成因となっている可能性が示唆された。このため, 興奮性神経伝達物質である Gluや Aspの拮抗剤や, 抑制性神経伝達物質のアゴニストを抗てんかん薬として使用しようという合理的な抗てんかん薬の開発が進められている<sup>30)</sup>。

さて, 中枢神経系の興奮性アミノ酸レセプターは3-4種類のサブタイプに分類されている

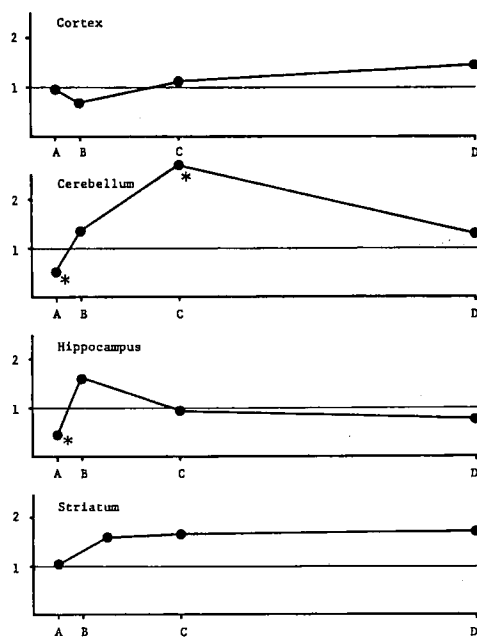


Fig. 5 Effect of NMDA on the GABA level in mouse brain. NMDA (1 mM, 2  $\mu$ l) was injected intraventricularly into mouse. Mice were sacrificed by the microwave irradiation pre-running fits (A), during running fits (B), 10 minutes (C) and 1 hour (D) after the injection. Values are expressed as the ratio to the saline injected group (control). \*:  $p < 0.05$  compared with control.  $n = 4 - 5$

が<sup>14)</sup>, 本研究では NMDA 型興奮性アミノ酸レセプターのアゴニストの一つである NMDA を ddY 系統のマウス脳室内に投与してその誘発する行動, 脳波変化, および脳内の各種アミノ酸含量を経時的に観察した。

NMDA をマウス脳室内に投与するとマウスは疾走発作を示した。Kitaら<sup>15)</sup>は NMDA をマウス脳室内に投与した時の最少致死量は700 pmolと報告した。しかし Watkins<sup>31)</sup>は NMDA の致死量をもっと多量と報告し, 彼は実験に 5 nmol の量を使用した。本研究で投与した NMDA 量は 2 nmol であり, 一部のマウスが死亡したことは納得できる。

NMDA を脳室内に投与してもマウスの大脳皮質脳波には spike などの発作波は認められず,

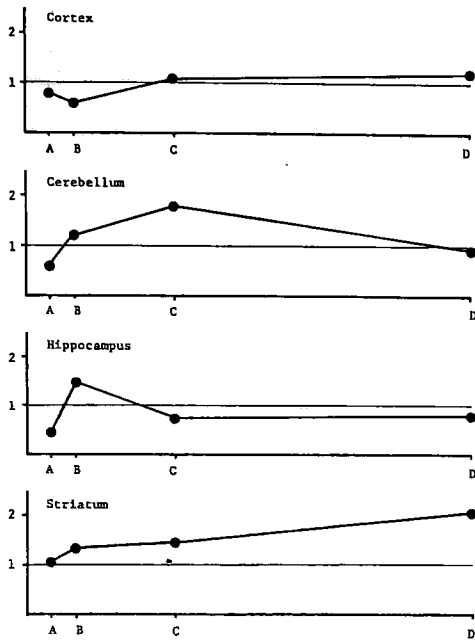


Fig. 6 Effect of NMDA on the Gly level in mouse brain. NMDA (1 mM, 2  $\mu$ l) was injected intraventricularly into mouse. Mice were sacrificed by the microwave irradiation pre-running fits (A), during running fits (B), 10 minutes (C) and 1 hour (D) after the injection. Values are expressed as the ratio to the saline injected group (control). \*:  $p < 0.05$  compared with control. n = 4 - 5

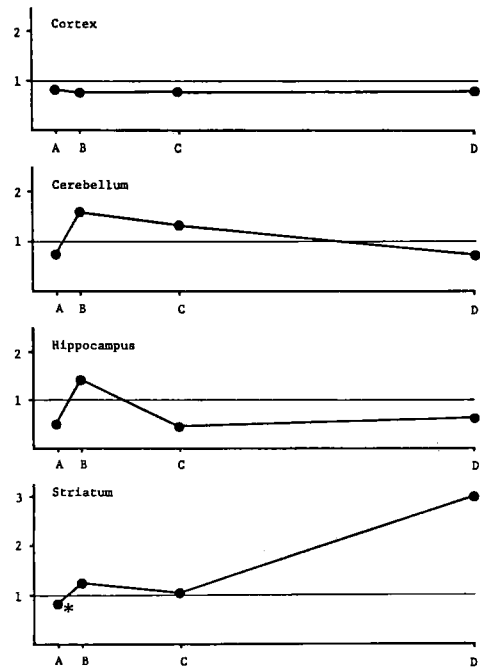


Fig. 7 Effect of NMDA on the Tau level in mouse brain. NMDA (1 mM, 2  $\mu$ l) was injected intraventricularly into mouse. Mice were sacrificed by the microwave irradiation pre-running fits (A), during running fits (B), 10 minutes (C) and 1 hour (D) after the injection. Values are expressed as the ratio to the saline injected group (control). \*:  $p < 0.05$  compared with control. n = 4 - 5

わずかに中振幅速波が5-10秒間観察されただけで、むしろ NMDA は大脳皮質脳波には抑制的に働いた。この速波は時間的に疾走発作をおこす時期と一致しており、この速波と疾走が対応していることを示唆する。原ら<sup>17)</sup>は N-メチル-D, L-アスパラギン酸 (NMDLA) をネコの腹腔内に投与すると約20分後より海馬に高振幅棘波が出現するが大脳皮質には発作波は認められないこと、さらに視床下部の腹内側核を破壊すると海馬の発作波は新皮質に伝播することを報告している。しかし、田縁ら<sup>18)</sup>は NMDLA を大量にネコの腹腔内に投与すると大脳皮質脳波にも発作波が波及すると報告している。本研究で脳波を記録したのは大脳皮質であり、NMDA 量も比較的少量であったため spike などの発作

波が観察されなかったものと思われる。また原ら<sup>17)</sup>田縁ら<sup>18)</sup>は NMDLA を腹腔内に投与したにもかかわらずその影響は60分以内に消失したことを報告している。本研究でも約20分で NMDA の誘発する行動変化、脳波変化は回復している。この結果は、生体内ではレセプターに結合した NMDA はレセプターから離れ易く、しばらくするとシナプス領域外へ運び出されることを示唆しているのかもしれない。

さて、NMDA が疾走発作を誘発することが指摘されてから四半世紀を経過したが、NMDA 誘発発作の成因に関する神経生化学的研究は少ない。Watkins ら<sup>31,32)</sup>は脳内神経細胞のアミノ酸代謝を調べる目的で CFW 系統のマウスに5

nmol の NMDA を脳室内に注入して脳内アミノ酸に対する影響を調べ、NMDA 注入 8 分後に全脳内の Asp, Glu, Gly, Gln, GABA, アラニン及びセリン量は対照群との間に有意な差は認められないと報告した。Watkins らは注入 8 分後の一点で、また全脳でアミノ酸に対する影響を検討したのみであった。この為、本研究では脳波及び行動に対する影響の検討の結果より NMDA 誘発発作を 4 期に分け、A) NMDA 投与後で疾走発作が誘発される前(投与10秒以内)、B) 疾走発作中(投与約15秒後)、C) 行動び脳波の抑制期(投与10分後)、及び D) NMDA の影響から回復後(投与1時間後)の4時期、また脳を大脳皮質、小脳、海馬、線条体に分けてアミノ酸量を測定した。さらに、マウス脳内アミノ酸の死後変化を最少にする目的でマイクロウエーブ照射法により頭部を固定した<sup>39)</sup>。この結果、疾走発作前には小脳及び海馬において GABA の、線条体においては Tau の有意な減少が認められた。また、発作中には海馬において Glu の有意な増加が、抑制期には小脳において GABA の有意な増加が観察された。さらに、海馬における発作中の Glu 含量は発作前に比べ有意に増加しており、小脳における抑制期の GABA 含量は発作前や回復後における GABA 量に比べ有意に高い値を示すことが明らかとなった。

さて、以上の脳内各部位の経時的アミノ酸量変化は以下の一連の過程を示唆する。つまり、脳室内に NMDA を投与すると、ネコ脳波の検討から示されたように<sup>17,18)</sup>まず海馬内の NMDA レセプターが活性化され海馬の神経細胞が異常興奮をおこす。これを抑制するために海馬の GABA 作動性神経細胞の働きが活発になり GABA が放出され、その結果海馬の GABA 含量が低下する。また線条体では抑制性神経伝達物質あるいは神経調節因子と考えられる Tau<sup>34,35)</sup>も GABA と同様の機構で減少する。さらに、疾走を抑えようとして小脳の星状細胞、籠細胞やプルキニエ細胞より GABA が放出代謝<sup>36)</sup>されその含量は低下する。この結果 GABA による抑制系の機能が低下し興奮は抑制しきれず疾走が始まる。また海馬には NMDA 非感受性で Asp 放出を抑制するオートレセプターの存在が

報告されているが<sup>37)</sup>、NMDA は Glu の放出に関係するオートレセプターに働き Glu の放出を抑制し Glu を蓄積する。その後、しだいに GABA の合成系が促進され GABA 作動性神経細胞の活動が活発化し疾走発作はおさまるが、GABA 合成能の増加はしばらく続き小脳においては過剰に蓄積される。やがて NMDA もシナプス外に流出し脳機能も正常化し、マウスの脳波活動や行動が正常化する1時間後にはアミノ酸含量も対照群との間に差がなくなるものと思われる。

一方、他の神経伝達物質系に対する NMDA の影響はあまり詳細に調べられていない。加太ら<sup>38,39)</sup>はラット脳の線条体におけるモノアミン放出量におよぼす興奮性アミノ酸アゴニストの影響を脳透析法を用いて経時的に測定し、NMDA はドーパミン (DA) の代謝産物であるジヒドロキシフェニール酢酸やホモバニリン酸量を増加させるが、セロトニン (5-HT) 代謝産物である 5-ヒドロキシインドール酢酸量には影響を与えないことを見いだした。このため、NMDA は線条体内では DA 放出量を増加させるが、5-HT 作動性神経細胞の活動には影響を与えないであろうと報告している。また、Roberts ら<sup>40)</sup>も海馬スライスからの DA 放出量が Glu や NMDA により増加することを報告している。さらに、Pycock ら<sup>41)</sup>は NMDA を両側黒質に注入した際に生じる行動変化に対する薬物の影響を検討した結果、NMDA 誘発作用変化は DA 系の神経伝達を介して発現すると、また Donzanti ら<sup>42)</sup>も両側側坐核に NMDLA を注入した際に起こる行動変化は DA 系の神経活動によるものと報告している。この他の神経伝達物質に関する研究成果として、Lehmann ら<sup>43)</sup>は NMDA により海馬でのアセチルコリン (ACh) の放出が増加することを見いだし、NMDA 誘発発作に対する ACh 系神経伝達の経路の関与を示唆している。今回の研究では NMDA 誘発発作の成因について興奮性及び抑制性アミノ酸の関与に付いて新知見を得た。しかし、脳機能の発現のためには脳内の神経線維は複雑なネットワークを形成し、その間のシナプスではさまざまな神経伝達物質が放出され、互いに影響しあい、複雑な機構を形成しているものと思われる。このため、NMDA



誘発発作の成因の神経生化学的解明のためには神経ペプチドなどその他の神経伝達系に対する NMDA の影響についても今後検討される必要があるものと思われる。

### 結 論

ddY 系統のマウス脳室内に NMDA を投与し、行動、脳波、及び脳内アミノ酸値におよぼす影響を検討した。

1. 無麻酔下に NMDA を脳室内に投与すると、投与約10秒後より疾走発作が誘発された。その後行動が抑制されたが、しだいに正常状態に回復した。
2. NMDA 脳室内投与10秒後、投与反対側後方より中振幅速波が出現し5-10秒間続いた。その後脳波は抑制されたが、約20分後には回復した。

3. NMDA 投与直後、すなわち疾走発作直前に、小脳および海馬の GABA 量及び線条体の Tau 量が減少した。発作中には海馬において Glu 量の増加が認められ、投与10分後、すなわち疾走発作終了後に小脳の GABA 量は増加していた。

4. 以上の結果は、発作の誘発には GABA 神経伝達系の機能低下が、また発作からの回復には Glu 神経伝達系の機能低下と GABA 神経伝達系の機能亢進が関与していることを示唆する。

最後に、本研究に対し終始御懇切な御指導と御校閲を賜りました森昭胤教授、また直接御指導いただきました加太英明技官と横井功助手、さらに実験の遂行に御協力いただきました研究室の皆様にご心より御礼申し上げます。

### 文 献

- 1) Bradford HF: Metabolic response of synaptosomes to electrical stimulation: Release of amino acids. *Brain Res* (1970) **19**, 239—247.
- 2) Wedege E, Luqmani Y and Bradford HF: Stimulated incorporation of amino acids into proteins of synaptosomal fractions induced by depolarizing treatments. *J Neurochem* (1977) **29**, 527—537.
- 3) Curtis DR, Phillis JW and Watkins JC: The chemical excitation of spinal neurones by certain acidic amino acids. *J Physiol* (1960) **150**, 656—682.
- 4) Curtis DR and Watkins JC: Acidic amino acids with strong excitatory actions on mammalian neurones. *J Physiol* (1963) **166**, 1—14.
- 5) Henn FA, Goldstein MN and Hamberger A: Uptake of the neurotransmitter candidate glutamate by glia. *Nature* (1974) **249**, 663—664.
- 6) Curtis DR, Duggan AW and Johnston GAR: The inactivation of extracellularly administered amino acids in the feline spinal cord. *Exp Brain Res* (1970) **10**, 447—462.
- 7) Watkins JC: Excitatory amino acid transmitters. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* (1981) **21**, 165—204.
- 8) 坂元 昇, 高辻功一: 大脳皮質: 化学的神経機能解剖学, 遠山正彌, 塩谷弥兵衛編, 厚生社, 大阪 (1987) pp 236—294.
- 9) 篠田 晃: 海馬: 化学的神経機能解剖学, 遠山正彌, 塩谷弥兵衛編, 厚生社, 大阪 (1987) pp 302—312.
- 10) 遠山正彌: 嗅覚: 化学的神経機能解剖学, 遠山正彌, 塩谷弥兵衛編, 厚生社, 大阪 (1987) pp 457—472.
- 11) 遠山正彌: 小脳: 化学的神経機能解剖学, 遠山正彌, 塩谷弥兵衛編, 厚生社, 大阪 (1987) pp 138—148.
- 12) 松永 享, 武田憲昭: 聴覚: 化学的神経機能解剖学, 遠山正彌, 塩谷弥兵衛編, 厚生社, 大阪 (1987) pp 473—486.
- 13) 稲垣 忍: 末梢神経: 化学的神経機能解剖学, 遠山正彌, 塩谷弥兵衛編, 厚生社, 大阪 (1987) pp 509—593.
- 14) 荻田喜代一, 米田幸雄: 興奮性アミノ酸レセプター: 新脳のレセプター, 小川紀雄編, 世界保健通信社, 大

- 阪 (1989) pp 281—327.
- 15) Kita T, Kamiya H and Kiyota C : Effect of intraventricular injection of N-methylated GABA-derivatives on the central nervous system of conscious mice. *Biochem Pharmacol* (1963) **12**, 213—214.
  - 16) Crawford JM : The effect upon mice of intraventricular injection of excitant and depressant amino acids. *Biochem Pharmacol* (1963) **12**, 1443—1444.
  - 17) 原 俊夫, 矢吹 篤, 美濃部欣平 : N-Methyl-DL-aspartic acid のネコの行動ならびに脳電気活動に及ぼす影響. 条件反射 (1964) 特集, 71—75.
  - 18) 田縁修治, 成田四郎, 関場一恵, 後藤蓉子, 岩沢 克 : N-メチルアスパラギン酸による疾走発作について. 条件反射 (1964) 特集, 76—82.
  - 19) 中島晋介 : Vitamin B<sub>6</sub> 拮抗体による痙攣とその抑制効果について. *昭和医誌* (1972) **32**, 193—202.
  - 20) Glowinski J and Iversen LL : Regional studies of catecholamines in the rat brain-I ; The disposition of [<sup>3</sup>H] norepinephrine, [<sup>3</sup>H] dopamine and [<sup>3</sup>H] dopa in various regions of the brain. *J Neurochem* (1966) **13**, 655—669.
  - 21) Yamamoto C, Yamashita H and Chujo T : Inhibition and excitation induced by glutamic acid on cerebellar interneurons. *Jpn J Physiol* (1977) **27**, 225—234.
  - 22) Okamoto K and Quastel JH : Effects of N-methylamino acids and convulsants on spontaneous action potentials in guineapig cerebellar slices. *Br J Pharmacol* (1977) **59**, 551—560.
  - 23) Hayashi T : A physiological study of epileptic seizures following cortical stimulation in animals and its application of human clinic. *Jpn J Physiol* (1952) **3**, 46—64.
  - 24) Hayashi T : Effects of sodium glutamate on the nervous system. *Keio J Med* (1954) **3**, 183—192.
  - 25) Koyama I : Amino acids in the cobalt-induced epileptogenic and nonepileptogenic cat's cortex. *Can J Physiol Pharmacol* (1972) **50**, 740—752.
  - 26) Emson PC and Joseph MH : Neurochemical and morphological changes during the development of cobalt-induced epilepsy in the rat. *Brain Res* (1975) **93**, 91—110.
  - 27) Dodd PR and Bradford HF : Release of amino acids from the maturing cobalt-induced epileptic focus. *Brain Res* (1976) **111**, 377—388.
  - 28) Dodd PR, Bradford HF, Abdul-Ghani AS, Cox DWG and Continho-Netto J : Release of amino acids from chronic epileptic and subepileptic foci in vivo. *Brain Res* (1980) **193**, 505—517.
  - 29) Van Gelder NM, Sherwin AL and Rasmussen T : Amino acid content of epileptogenic human brain : Focal versus surrounding regions. *Brain Res* (1972) **40**, 385—393.
  - 30) Meldram B : Amino acid neurotransmitter and new approaches to anticonvulsant drug action. *Epilepsia* (1984) **25**, S 140—S 149.
  - 31) Watkins JC : The effects of excitatory and inhibitory amino acids on the metabolism of endogenous brain amino acids in the nembutalized mouse. *Brain Res* (1971) **29**, 293—313.
  - 32) Whittaker VK and Watkins JC : The effect of the neuronal excitant N-methyl-D-aspartate on the metabolism of mouse brain amino acids labelled from [<sup>14</sup>C] bicarbonate and L- [<sup>14</sup>C] aspartate. *Brain Res* (1972) **43**, 227—234.
  - 33) 栗山欣弥, 村松 信, 栗原悦雄, 結城武彦 : マイクロウエーブ照射による脳内神経伝達物質代謝関連酵素の不活性化 : 中枢薬理におけるマイクロウエーブ照射法の理論と応用, 丸山悠司編, ソフトサイエンス社, 東京 (1981) pp 81—90.
  - 34) Barbeau A, Inoue N, Tsukada Y and Butterworth RF : The neuropharmacology of taurine. *Life Sci* (1975) **17**, 669—678.

- 35) Kuriyama K : Does taurine have a function ? Taurine as a neuromodulator. *Fed Proc* (1980) **39**, 2680—2684.
- 36) Laxer KD, Robertson LT, Julien RM and Dow RS : Antiepileptic drugs : Phenytoin : Relationship between cerebellar function and epileptic discharges : in *Antiepileptic Drugs : Mechanisms of Action*, Glaser, Penry and Woodbury eds, Raven Press, New York (1980) pp 415—427.
- 37) McBean GJ and Roberts PJ : Glutamate-preferring receptors regulate the release of D-[<sup>3</sup>H]aspartate from rat hippocampal slices. *Nature* (1981) **291**, 593—594.
- 38) Kabuto H, Yokoi I, Mizukawa K and Mori A : Effects of an N-methyl-D-aspartate receptor agonist and its antagonist CPP on the level of dopamine and serotonin metabolites in rat striatum collected in Vivo by using a brain dialysis technique. *Neurochem Res* (1989) **14**, 1075—1080.
- 39) 加太英明, 横井 功, 秋山賢次, 戸田洋子, 山本正恒, 岡村裕司, 河上雄之介, 森 昭胤 : ラット脳線条体における monoamine release におよぼす興奮性アミノ酸 agonists の影響. *Neurosciences* (1989) **15**, 130—132.
- 40) Roberts PJ and Anderson SD : Stimulatory effect of L-glutamate and related amino acids on [<sup>3</sup>H] dopamine release from rat striatum : An in vitro model for glutamate actions. *J Neurochem* (1979) **32**, 1539—1545.
- 41) Pycock CJ and Dawbarn D : Acute motor effects of N-methyl-D-aspartic acid and kainic acid applied focally to mesencephalic dopamine cell body regions in the rat. *Neurosci Lett* (1980) **18**, 85—90.
- 42) Donzanti BA and Uretsky NJ : Effects of excitatory amino acids on locomotor activity after bilateral microinjection into the rat nucleus accumbens : Possible dependence on dopaminergic mechanisms. *Neuropharmacol* (1983) **22**, 971—981.
- 43) Lehmann J, Schneider J, McPherson S, Murphy DE, Bernard P, Tsai C, Bennett DA, Pastor G, Steel DJ, Boehm D, Cheney DL, Liebman JM, Williams M and Wood PL : CPP, a selective N-methyl-D-aspartate (NMDA) -type receptor antagonist : Characterization in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* (1987) **240**, 737—746.

**Effect of N-methyl-D-aspartic acid on amino  
acids levels in the mouse brain**

**Yuji OKAMURA**

**Department of Neurochemistry, Institute for Neurobiology,**

**Okayama University Medical School,**

**Okayama 700, Japan**

**(Director : Prof. A. Mori)**

The naturally-occurring dicarboxylic amino acids, L-glutamate (Glu) and L-aspartate, are the principal neurotransmitter candidates for excitatory synaptic transmission in vertebrate central nervous systems. The receptors activated by these amino acids are classified by their most selective and potent agonists, i. e. , N-methyl-D-aspartic acid (NMDA), kainic acid, and quisqualic acid.

In this study, I examined the effects of NMDA on behavior, electroencephalogram (EEG), and brain amino acids levels after intraventricular injection in mice. When NMDA was intraventricularly injected into mice, running fits were observed 10-30 seconds after injection, followed by a sedative phase and returned to a normal behavior within 15-20 minutes after injection. In the EEG, middle voltage fast waves were observed 10-20 seconds after injection, followed by EEG suppression for a few minutes and the appearance of high voltage slow waves 4-5 minutes after injection. About 20 minutes after the injection the EEG was normal. No spike discharge was observed during this observation. Glu levels increased in the hippocampus during running fits, while GABA levels decreased in the cerebellum and hippocampus before running fits, and increased in the cerebellum 10 minutes after NMDA injection. The taurine level decreased in the striatum before running fits. All amino acids observed recovered to control levels 60 minutes after NMDA injection. These results indicate that the NMDA-induced running fits are not accompanied by spike discharges in the EEG, and are related to Glu and GABA neurons.