

改良型神経伝達物質放出測定装置による E1 マウス海馬 切片よりの神経伝達物質放出と抗てんかん薬 ゾニサミドの影響に関する研究

岡山大学医学部附属分子細胞医学研究施設神経情報学部門 (指導: 森 昭胤教授)

遠 藤 敦

(平成 7 年 1 月 9 日受稿)

Key words : E1 マウス, アスパラギン酸, γ -アミノ酪酸, ゾニサミド, けいれん

緒 言

興奮性アミノ酸であるグルタミン酸およびアスパラギン酸, ならびに, 抑制性アミノ酸である γ -アミノ酪酸 (GABA) 系の異常が, けいれんあるいはてんかんの発症に重要な役割を演じていると考えられており, てんかん患者の他, E1 マウスなどの自然発症てんかんモデルや, その他の実験動物について様々な研究がなされている¹⁻⁶⁾.

E1 マウスは, 1959年, 今泉ら^{7,8)}によって発見され, 純系化された強直性間代性けいれんを起こす優性遺伝性マウスである. E1 マウスのけいれん発作は自然発症性であるが, けいれんの実験モデルとして使用する場合には通常, 放り上げ刺激やシーソー刺激⁹⁾などの体位変換刺激を生後 4 週齢頃より 1 週間に 1 回または 2 回与え, けいれん発現後この刺激をさらに 4 週間継続することにより, ほぼ 100% の E1 マウスが, 放り上げ刺激によりけいれん発作を誘発されるようになる. 本研究においては上記の刺激を与え, けいれん発作が容易に誘発されるものを stimulated E1 マウス (E1 [s]) とし, 上記の刺激を与えていないものを non-stimulated E1 マウス (E1 [ns]) として区別した.

E1 [s] については, 現在まで多くの研究が行われており, 脳波記録によると, E1 [s] の安静時において, 両側性, 散発性の棘波が出現すること¹⁰⁾や, けいれん中には高振幅多棘波あるいは

発作波が出現すること¹¹⁾が観察されており, 発作型としては complex partial seizures with secondary generalization あるいは側頭葉てんかんのモデルとされている¹²⁾. また, E1 マウスのけいれん発現機構に関しては, アミノ酸の他, acetylcholine, catecholamine, 5-hydroxytryptamine, glutathione, RNA, c-AMP, カルシウムおよびグルコース代謝などの多岐にわたる生化学的異常が認められている¹³⁾.

それらの異常のうち, 興奮性および抑制性アミノ酸神経伝達系の異常は特に注目されており, いくつかの報告がなされているが¹⁴⁻¹⁶⁾, 脳の部位別分析を行った検討によると放り上げ刺激を行っていないもの, すなわち E1 [ns] の大脳皮質や海馬においては, 興奮性アミノ酸であるグルタミン酸およびアスパラギン酸が, 対照マウス (ddY 系マウス: E1 の母系でけいれん素因がない) に比較して高値であること, および放り上げ刺激を与えてけいれんを誘発させているもの, すなわち E1 [s] においてはそれらが, いずれも E1 [ns] に比べ低下していることなどが認められている. 他方, E1 [s] の抑制性アミノ酸である GABA は E1 [ns] に比し, 海馬および線条体において低下していることが明らかにされている¹⁷⁾. さらに, けいれん直前期には, 脳の特定部位でグルタミン酸値が有意に増加し, アスパラギン酸と GABA 値が有意に減少することが認められている¹⁷⁾. これらの事実は E1 マウスの脳内においては, けいれん発現機構に関係

して、グルタミン酸とともにアスパラギン酸および GABA の代謝異常のあることを示唆するものである。

ゾニサミド (3-sulfamoyl-methyl-1, 2-benzisoxazole) (Fig. 1) は臨床的には部分発作 (partial-onset generalized seizures, simple partial and/or complex partial seizures) に有効であり、強直、間代発作を伴う全般発作の治療にも広汎に使用されている抗てんかん薬であるが¹⁸⁾、薬理的にはゾニサミドは、GABA レセプターのベンゾジアゼピンあるいはムシモール結合部位に結合すること¹⁹⁾、および培養脊髄神経細胞の発作性活動電位を抑制すること²⁰⁾などが知られている。本研究においては EI マウスの発作発現機構とともにゾニサミドの抗けいれん作用機序解明の一環として、EI マウスの海馬切片からの GABA 放出を新たに改良した神経伝達物質放出測定装置を用いて測定し、それらに及ぼすゾニサミドの影響を検討することを試みた。さらに、EI マウスの [³H] アスパラギン酸放出に関してわれわれの研究室よりすでに報告が行われているので、[³H] アスパラギン酸の放出についても一部検討した。

材料と方法

1. 実験動物

EI マウスは当教室で飼育保存しているものを使用した。実験動物は12時間明暗サイクル (午前6時より午後6時までを明期) のもとに飼育した。飼料はオリエンタル酵母工業(株)製の標準飼料 MF を使用し、水は自由に摂取させた。

EI マウスにけいれんを誘発させるために、生後4週目より、放り上げ刺激 (月曜と木曜の2回、板上で約10cmの高さに80回放り上げる) を毎週連続して行った。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

激を行い EI [s] とし、放り上げ刺激を行わないものを EI [ns] とした。なお、放り上げ刺激群 EI [s] は、毎回の放り上げ刺激により、少なくとも連続して5回以上けいれんを起こすマウスを使用した。放り上げ刺激は、朝9時から12時の間に行った。EI の発作の頻度は雌雄に関係ないので、実験には20-25週齢のものを性差なく使用した。屠殺は頸椎脱臼によったが、EI [s] においては最終けいれん誘発後、少なくとも24時間後のものを用いた。全脳は迅速に摘出し、氷上で、Glowinski and Iversen の方法²¹⁾に従って両側海馬を摘出した。

2. 試薬

ゾニサミドは大日本製薬(株)より恵与された。[³H] アスパラギン酸および [³H] GABA は NEN Research Products 社より購入した。その他の試薬は市販の最高純度のものを使用した。

3. 神経伝達物質放出測定法

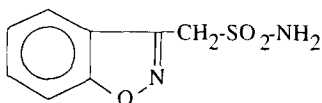
摘出した両側海馬を、秤量 (15-22mg) したのち、海馬組織を神経細胞層の構造が水平面に垂直になるように固定し、McIlwain tissue chopper を用いて、2次元 (縦横) にそれぞれ0.3 mm の厚さに切片を作成し、ただちに4.5ml の Krebs-Ringer-bicarbonate-glucose buffer (KRB 液) に投入した。KRB 液の組成 (各々 mM) は下記のごとくである。

NaCl	124
KCl	3.5
KH ₂ PO ₄	1.2
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.3
CaCl ₂	1.2
NaHCO ₃	25
glucose	10
(pH: 7.4)	

他方、神経伝達物質放出刺激に用いた高K⁺濃度灌流液には、上記のうち NaCl および KCl の濃度を下記に変えた。

NaCl	74
KCl	53.5

実際の神経伝達物質放出の測定は以下に述べる手順で行った。まず、海馬切片は95% O₂-5% CO₂飽和の KRB 液中で5分間、37℃の水槽中にて、あらかじめインキュベートした。このプレインキュベーションの後、500μM [³H] アス



Zonisamide (1-Sulfamoylmethyl-1, 2-benzisoxazol; C₈H₈N₂O₂S)

Fig. 1 Chemical structure of zonisamide.

パラギン酸あるいは $[^3\text{H}]$ GABA (最終放射能
量、各370 KBq/5 ml) を KRB 液に加え、さら
に37°Cで30分間インキュベートし、上記の $[^3\text{H}]$
標識アミノ酸を切片に取り込ませた。次いで、
切片を特殊なステンレススチール製のチェン
バー(シリンジ) (アドバンテック東洋株)を一部
改良したもの (Fig. 2) に移すと共に、培養液を
濾過した。市販品のシリンジの内部には1枚の
ステンレス・メッシュ (ポアサイズ0.1×0.2
mm) が配置されているが、筆者はさらにもう1

枚のステンレス・メッシュを挿入し、両メッ
シュの間に海馬組織片を保持できるように改良し
た (Fig. 2)。まず、下半分を使用して、下方の
ステンレス・メッシュ上にインキュベート後の
海馬切片を含む KRB 液を流して培養液のみを
流出させた。培養液の濾取後、ステンレス・メ
ッシュ上に均一に置かれた海馬組織切片上にポ
リエチレンテレフタレート製のリングとさらにも
う1枚ステンレス・メッシュをサンドイッチ
状に重ね、シリンジの上半部分を接続した。つ
いで、シリンジの上下を反転し気泡を除いた後、
Fig. 3 に示す神経伝達物質放出測定装置にシリ
コンチューブ (内径1.0mm) で接続し、ペリスタ
ポンプ (Atto Co.,Ltd.) を用いて灌流 (流速:
1.55ml/min) を行った。灌流流出液は全実験期
間30秒ごとにフラクション・コレクター (Signal
Fracon, 東京化学工業産業) を用いて液体シン
チレーターカウンター用バイアルに収集した (1
フラクション : 35 drops/tube/30 sec)。

切片の灌流は (Fig. 4), まず、95% O_2 -5%
 CO_2 飽和 (以下いずれも同様) の KRB 液を用
いて10分間行った後、コックを切り替えて高 K^+
濃度灌流液で2分間灌流した (Stim. 1)。ついで、
コックを切り替えて、再び KRB 液で10分間灌
流したのち、再びコックを切り替えて薬物 (ゾ
ニサミド) を添加した高 K^+ 濃度灌流液で2分間

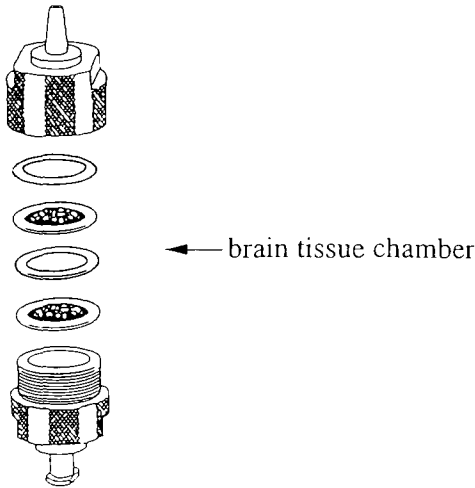


Fig. 2 Stainless steel syringe holder.

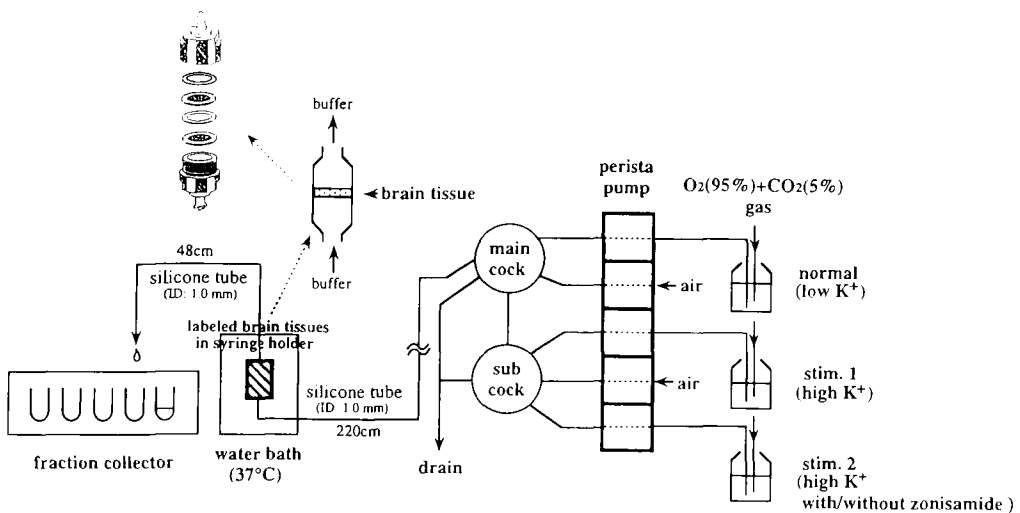


Fig. 3 Experimental apparatus for neurotransmitter release.

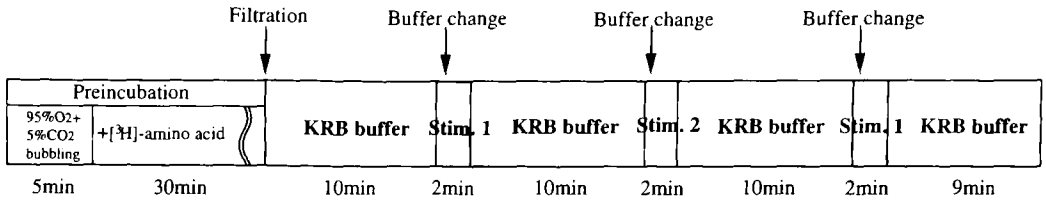


Fig. 4 Experimental schedule in neurotransmitter release from isolated hippocampal slices.

灌流した(Stim. 2). 上記灌流の終了後, 組織切片の放出機能が正常であることを確認するため, KRB 液で10分間, ついで Stim. 1 と同様に高K⁺濃度灌流液で2分間, さらに KRB 液で9分間の灌流を行って灌流を終了した. ついで, 灌流期間中に収集した溶出液の各フラクションに, 液体シンチレーター (Clear sol 1. ナカライ) を加えて, 液体シンチレーション・カウンター (Tricarb-2260, Packard) により, 各フラクション中の放射能量を測定した. それらの測定値から Fig. 5 上段に示すようなグラフを得ることができるが, 高K⁺濃度灌流液 (Stim. 1) およびゾニサミド添加高K⁺濃度灌流液 (Stim. 2) に対応して溶出した全 [3H] 標識アミノ酸の放射能 (dpm) から組織切片の非刺激性の自発放出量 (spontaneous release: それぞれ SR 1 および SR 2) の dpm を差し引いた値, すなわち刺激によって促進された [3H] 標識アミノ酸 (K⁺-stimulated release: それぞれ KR 1 および KR 2) の dpm を計算した. さらに, ゾニサミドの [3H] 標識アミノ酸放出の効果は次のように rKR (relative KR) により判定した.

$$\begin{aligned} \text{KR 1} &= \text{Stim. 1 による } [^3\text{H}] \text{ 全放出量 (dpm)} - \text{SR 1 (dpm)} \\ \text{KR 2} &= \text{Stim. 2 による } [^3\text{H}] \text{ 全放出量 (dpm)} - \text{SR 2 (dpm)} \\ \text{rKR} &= \text{KR 2 (dpm)} / \text{KR 1 (dpm)} \end{aligned}$$

3. 統計処理

統計処理は Kruskal-Wallis test によった.

結 果

従来, われわれの研究室において使用していた脳切片よりの神経伝達物質放出測定装置²³⁻²⁵⁾を, 特に脳切片灌流チェンバー, 灌流液切替え用コックおよび連結チューブに改良を加え Fig. 2 および Fig. 3 に示すような神経伝達物質測定実験系を作成した. Fig. 5 上段に改良型神経伝達

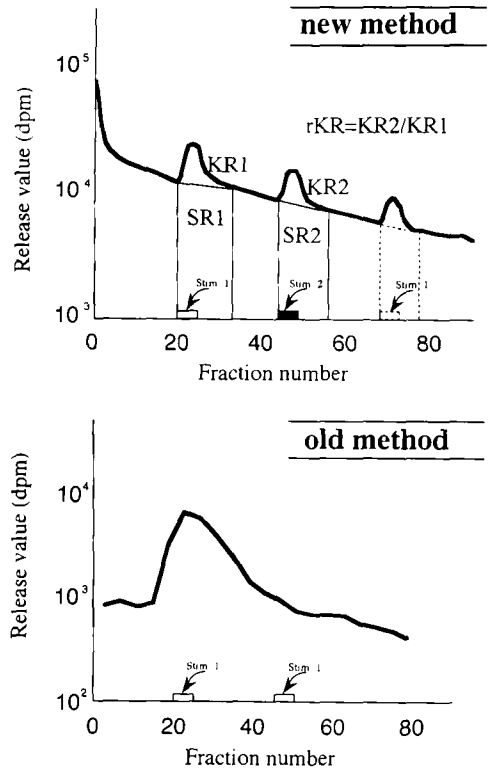


Fig. 5 Representative patterns of [3H]-amino acid release from hippocampal slices of El mice using the new method (upper panel) and the old method (lower panel). KR1 and KR2 show [3H]-amino acid release stimulated by high K⁺ (50mM) (Stim. 1) and high K⁺ with/without zonisamide (Stim. 2), respectively.

物質放出測定装置を用いたときの [3H] 標識アミノ酸の放出パターンを示し, 従来の装置を用いた場合の結果 (Fig. 5 下段) と対比させた. 本研究で用いた改良型装置を用いると, 放出 [3H] 標識アミノ酸量の基礎値が高く, また, 高K⁺刺激に対して3回とも鋭敏に反応して放出された

(Fig. 5 上段)。一方、従来の装置では高K⁺刺激に対して [³H] 標識アミノ酸の放出反応は1回のみしか起らず、しかもゆっくりとした放出反応で、刺激を終了しても [³H] 標識アミノ酸の放出は直ちには停止せず、反応の鋭敏さに劣っていた (Fig. 5 下段)。

改良型神経伝達物質放出測定装置が従来の装置より優れていることが確認できたので、まず、EIマウス海馬切片よりの [³H] アスパラギン酸の放出を測定するとともに、その放出に対するゾニサミドの影響を検討した。その結果、この装置を使用した EI[ns] の海馬切片よりの高K⁺濃度灌流液 (Stim. 1) による [³H] アスパラギン酸放出量は $7.62 \pm 3.31 (\times 10^3)$ dpm であった。ついでゾニサミド (20および50mg/l) を添加した高K⁺濃度灌流液 (Stim. 2) による放出を測定したが、ゾニサミドのいずれかの濃度においても [³H] アスパラギン酸の放出量には有意な影響が認められなかった (Fig. 6)。

次に、EI[ns] の海馬切片よりの [³H] GABA

の放出量を測定した結果、Stim. 1による放出量は $51.1 \pm 9.61 (\times 10^3)$ dpm であった。ゾニサミド (25および50mg/l) を添加した高K⁺濃度灌流液によっては、ゾニサミドの用量依存的に [³H] GABA の放出は亢進した (Fig. 7)。しかし、EI[s] の海馬切片については、ゾニサミド添加高K⁺濃度灌流液による、そのような [³H] GABA 放出量促進作用は認められなかった (Fig. 8)。

考 察

神経伝達物質放出の研究は1970年代より行われている^{26,27)}が、われわれの研究室においては従来、Minchinの方法 (1983)¹⁹⁾に準拠し、若干の工夫を加えた装置を用いて脳切片よりのセロトニン、タウリン²³⁾およびアスパラギン酸^{24,25)}の放出に関する研究を行ってきた。本実験においては、それらを改良した装置を用いたが、その主な改良点は次のごとくである。

まず、従来のプラスチック注射器を利用した

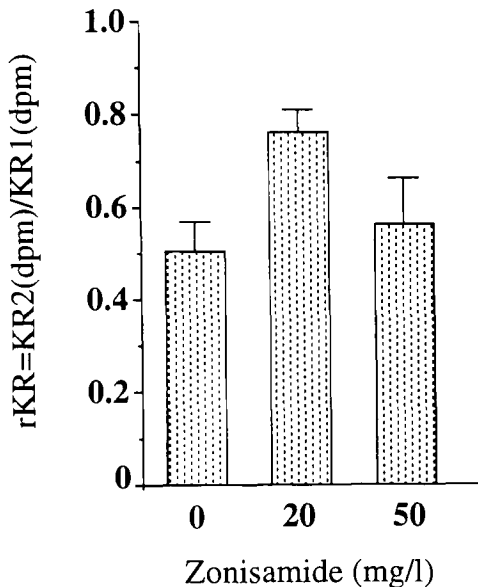


Fig. 6 Changes in [³H] aspartic acid release from hippocampal slices of EI[ns] mice (20-25 weeks old) by zonisamide. Each value represents the mean \pm SEM of 8-10 animals.

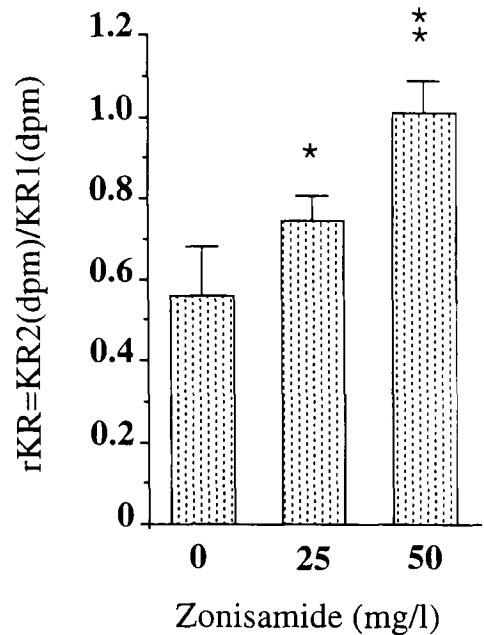


Fig. 7 Changes in [³H] GABA release from hippocampal slices of EI[ns] mice (20-25 weeks old) by zonisamide. Each value represents the mean \pm SEM of 6-10 animals. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. control (0mg/l of zonisamide).

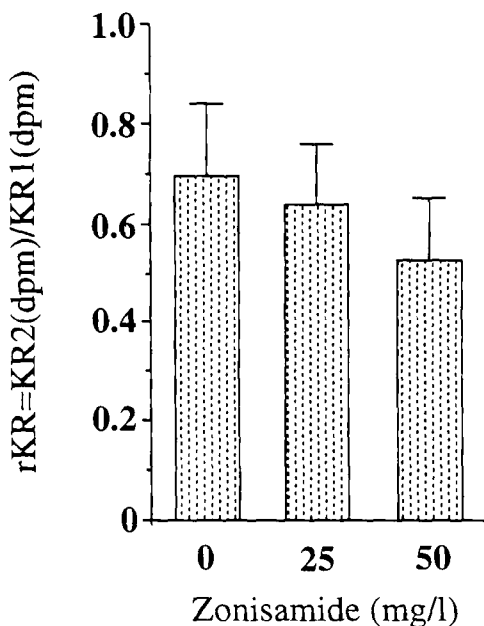


Fig. 8 Changes in [^3H]GABA release from hippocampal slices of El[ns] mice (20-25 weeks old) by zonisamide. Each value represents the mean \pm SEM of 8-10 animals.

切片灌流チャンバーのかわりに、ステンレスチール製のルーロック式注射器ホルダーを用いて、ステンレス製メッシュプレート2枚で組織切片を保持し、外部より密封して、恒温槽内で温度制御 (37°C) して灌流ができるようにしたことである。このことにより従来の脳組織切片のプレインキュベーションから灌流チャンバーへの移動、固定の操作が、容易かつ迅速に行われるようになり、また、切片に対する灌流の流れが均一化され、さらにチャンバー内容が従来のもの (内容量1.0ml) に比し、約1/3 (0.37 ml) にすることができた。そのため、従来の方法^{24,25)}により放出される [^3H] 標識アミノ酸 (アスパラギン酸) のチャンバー内での拡散が少ないため Fig. 5 (上段) で示されるグラフ上での立ち上がりが鋭くなり、より正確な測定値が得られるようになった。また、従来法においては高K⁺濃度灌流液による刺激を1実験につき1回しか行えなかったが、本装置においては脳切片の放出機能が長時間にわたって安定しており、

少なくとも連続して3回の刺激 (Stim. 1, Stim. 2 および海馬組織片の放出機能が正常であることの確認のための再度の Stim. 1) に対応して、 [^3H] 標識アミノ酸放出の測定が可能であった。次に、灌流方法についても改良を加えた。まず、Fig. 3 に示すごとく、KRB 液、および2種類の高K⁺濃度灌流液は常にペリスタポンプにより連結チューブを流れているが、コックにより必要のない灌流液はドレインへと流れ出ている。灌流実験はメインコックとサブコックを併用して、高K⁺濃度灌流液 (Stim. 1 bottle)、あるいはゾニサミドを添加した高K⁺濃度灌流液 (Stim. 2 bottle) が、それらのコックの切替えにより、直ちにチャンバーに移行するよう工夫されている。また、両コックとも空気を同時に流しており、コック切替え時に、連結シリコンチューブ中に小さな気泡を挿入することにより、切り替えられた灌流の混合を防ぐようにした。

本研究においては、上記の改良型神経伝達物質測定装置を用いて、抗てんかん薬であるゾニサミドが、El [ns] 海馬切片よりの GABA 放出を用量依存的に著明に促進することを見いだした。El マウスの脳内アミノ酸についてはこれまでいくつかの報告がなされている。すなわち、El [ns] においては、El の母系で、けいれん素因のない ddY マウスに比較して、脳内アスパラギン酸や、グルタミン酸などの値が高いことや、安静時の El [ns] と El [s] を比べると、El [s] ではアスパラギン酸、グルタミン酸、GABA 値が低下していること、さらに、El [s] のけいれん直前期には、グルタミン酸量が増加し、アスパラギン酸や GABA は逆に低下し、その変動は特に大脳皮質、海馬、中脳において顕著であることが報告されている¹⁷⁾。

El マウスは先天的にけいれん素因を有し、自然発生的にけいれん発症が誘発されるが、われわれは、通常実験に便利のため、放り上げ刺激を行い、放り上げ刺激によってけいれん誘発されるようになった El マウス、すなわち El [s]、を用いて、実験の必要に応じてけいれんを誘発させているが、これらの刺激誘発発作は、毎週2回定期的に行っており、てんかん患者発作頻度として考えると、かなり重症なてんかんモデ

ル動物といえる。それに対して、EI [ns] はけいれん発作歴が短く、軽症のてんかんモデル動物といえる。

本実験においてゾニサミドはEI [ns] に対しては、GABAの海馬よりの放出を著明に促進したが、これは比較的経過が短く、比較的軽症のてんかん症例に対しては、極めて有効に抑制性神経伝達物質すなわちGABA神経系を促進させること、すなわち機能低下しているEI [ns] のGABA神経系を放出の段階で賦活することを示唆している。EIマウスにおいては、GABA神経系に異常があることは既に明らかであり、特に海馬におけるGABA神経系の機能低下やGABA神経細胞の欠損が明らかにされている^{28,29)}。また、EIマウスのけいれんはムシモール、バクロフェン、ベンゾジアゼピン、 γ -ピニールGABA、バルプロ酸などのGABAレセプターやGABA代謝に関与する薬物によって抑制されることも明らかにされている³⁰⁾。しかし、ゾニサミドのEIマウスのけいれんに対する抑制作用は、GABAの放出機構に直接関係するものに加えて、ドーパミンやセロトニン神経系などの神経伝達系を介する抗けいれん作用³¹⁾を追求することも今後の研究課題である。

結 論

1. 従来、われわれが使用してきた脳切片より

の神経伝達物質放出測定装置の切片灌流チェンバーおよび灌流経路の制御方法を改良し、より正確かつ安定にEIマウス海馬切片よりの神経伝達物質(アスパラギン酸およびGABA)の測定実験を行った。

2. EIマウス海馬切片よりのアスパラギン酸に及ぼすゾニサミドの影響を調べた結果、ゾニサミド(20mg/lおよび50mg/lの濃度)によっては影響は認められなかった。

3. EIマウス海馬切片よりのGABA放出に対するゾニサミドの影響を調べた結果、EI [ns] においてはゾニサミド(25mg/lおよび50mg/l)は用量依存的にGABAの放出を促進することが明らかとなった。しかし、EI [s] においてはゾニサミドはGABAの放出に有意な影響を与えなかった。

稿を終るに臨み、終始御懇篤な御指導と御校閲を賜りました森昭胤教授、ならびに本研究の遂行にあたり、種々ご協力をいただいた教室の平松緑博士(現、勸学形県テクノポリス財団生物ラジカル研究室)、金野郁雄技官(現、岡山大学医学部RI研究センター)、河合元子研究生に心から御礼申し上げます。

本研究の要旨は、平成5年10月28日第20回日本脳研究会(鹿児島)において発表した。

文 献

- 1) Bradford H and Peterson DW : Current views of the pathobiochemistry of epilepsy. *Mol Aspects Med* (1987) **9**, 133-152.
- 2) Meldrum B : Excitatory amino acids in epilepsy ; in *Excitatory Amino Acid Transmission*, Hicks T P, Lodge D and McLennan H eds, Alan R. Liss, New York (1987) pp 189-196.
- 3) Krnjevic K : Significance of GABA in brain function ; in *GABA Mechanisms in Epilepsy*, Tunnilliff G and Raess BU eds, Wiley-Liss. Inc. New York (1991) pp 47-87.
- 4) Bradford HF and Dodd PR : Biochemistry and basic mechanisms in epilepsy ; in *Biochemistry and Neurological Disease*, Davison AN eds, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1976) pp 114-167.
- 5) Sherwin AL and van Gelder NM : Amino acid and catecholamine markers of metabolic abnormalities in human focal epilepsy. *Adv Neurol* (1986) **44**, 1011-1032.
- 6) 森 昭胤 : けいれんの神経化学. *Clinical Neuroscience* (1994) **12**, 263-266.
- 7) 今泉 清, 伊藤昭吾, 沓掛源次郎, 滝沢竜安, 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.
- 8) Imaizumi K and Nakano T : Mutant stocks. Strain : El. Mouse News Letter (1964) **31**, 57.
 - 9) Naruse H, Kato M, Kurokawa M, Haba R and Yabe T : Metabolic defects in a convulsive strain of mouse. J Neurochem (1960) **5**, 359-369.
 - 10) 杉生亮 : ep 系マウスの病態生理に関する実験的研究. 第2編 ep 系マウスの脳波ならびに各種抗痙攣剤のこれに及ぼす影響について. 岡山医誌 (1963) **75**, 161-178.
 - 11) Suzuki J : The paroxysmal discharges of the EEG in El mouse. Experimentia (1976) **32**, 336-338.
 - 12) Seyfried TN and Glaser GH : A review of mouse mutants as genetic models of epilepsy. Epilepsia (1985) **26**, 143-150.
 - 13) Mori A : El mice. Neurosciences (1988) **14**, 275-285.
 - 14) 成瀬 浩 : 痙攣の神経科学的研究-第3報 脳アンモニア及びアミノ酸について. 精神神経誌 (1959) **61**, 1701-1710.
 - 15) 竹内直司 : El マウスの痙攣素因ならびに痙攣発作時における脳遊離アミノ酸の変動に関する研究. 阪大医誌 (1968) **20**, 387-398.
 - 16) Hattori H, Ito M and Mikawa H : γ -Aminobutyric acid, benzodiazepine binding sites and γ -aminobutyric acid concentrations in epileptic El mouse brain. Eur J Pharmacol (1985) **119**, 217-223.
 - 17) 鈴木茂生 : El マウス脳内遊離アミノ酸のけいれん準備性獲得及びけいれんに伴う局所の変動に関する研究. 岡山医誌 (1987) **99**, 1517-1528.
 - 18) Peters DH and Sorkin SEM : Zonisamide. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in epilepsy. Drugs (1993) **45**, 760-787.
 - 19) Mimaki T, Suzuki Y, Tagawa T, Tanaka J, Itoh N and Yabuuchi H : [3 H] Zonisamide binding in rat brain. Jpn J Psychiatry Neurol (1988) **42**, 640-642.
 - 20) Rock DM, Maedonald RL and Taylor CP : Blockade of sustained repetitive action potentials in cultured spinal cord neurons by zonisamide (AD 810, C 1912), a novel anticonvulsant. Epilepsy Res (1989) **3**, 138-143.
 - 21) Glowinski J and Iversen LL : Regional studies of catecholamine in the rat brain. J Neurochem (1966) **13**, 655-669.
 - 22) Minchin MCW, Williams J, Bowdler JM and Green AR : Effect of electroconvulsive shock on the uptake and release of noradrenaline and 5-hydroxytryptamine in rat brain slices. J Neurochem (1983) **40**, 765-768.
 - 23) 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.
 - 24) Janjua NA, Mori A and Hiramatsu M : Increase aspartic acid release from the iron-induced epileptogenic focus. Epilepsy Res (1990) **6**, 215-220.
 - 25) Higashihara Y, Hiramatsu M and Mori A : Aspartic acid release from cerebral cortical slices of El mice with high seizure susceptibility. Res Commun Chem Pathol Pharmacol (1990) **70**, 155-171.
 - 26) Korpi ER and Oja SS : Efflux of phenylamine from rat cerebral cortex slices as influenced by extra- and intracellular amino acids. J Neurochem (1979) **32**, 789-796.
 - 27) Korpi ER and Oja SS : Comparison of two superfusion systems for study of neurotransmitter release from rat cerebral cortex slices. J Neurochem (1984) **43**, 236-242.
 - 28) Murashima Y, Kasamo K and Suzuki J : Distribution of GABA concentrations and GAD activities in the partial cortex and the hippocampal CA1 in El mouse. Jpn J Neurol Psychiatry (1990) **44**, 442-444.

- 29) 徐 文錫：El マウスの海馬におけるグルタミン酸， γ -アミノ酪酸及び Glial fibrillary acidic protein の免疫組織化学的研究. 岡山医誌 (1994) **106**, 103—115.
- 30) Kwon MJ：GABA 系作動薬の El マウスけいれん及び脳内アミノ酸に及ぼす影響に関する研究. 岡山医誌 (1987) **99**, 1539—1548.
- 31) Kaneko S, Okada M, Hirano T, Kondo T, Otani K and Fukushima Y：Carbamazepine and zonisamide increase extracellular dopamine and serotonin levels *in vivo*, and carbamazepine does not antagonize adenosine effect *in vitro*：mechanisms of blockade of seizure spread. Jpn J Psychiatry Neurol (1993) **47**, 371—373.

**Effect of zonisamide on neurotransmitter release from hippocampal slice
of El mice: A study of neurotransmitter release using
an improved experimental system**

Atsushi ENDO

Department of Neuroscience, Institute of Molecular and Cellular Medicine,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. A. Mori)

Using an experimental apparatus for estimating neurotransmitter release from brain slices, which involved an improved type of perfusion chamber and more well-controlled tube lines than the previous one were aspartic acid and γ -aminobutyric acid (GABA) release from hippocampal slices from epileptic El mice estimated more exactly and stably. Zonisamide had no effect on the aspartic acid release from hippocampal slices of El mice by zonisamide. However, zonisamide accelerated dose dependently GABA release from hippocampal slices of non-stimulated El mice, though no such acceleration was observed in stimulated El mice, *i. e.*, repeatedly convulsed El mice.