

Methylguanidine の発作発現機構に関する生理学的研究

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)

清水 義 央

(平成2年2月22日受稿)

Key words : methylguanidine, guanidino compound, experimental seizures, GABA-receptor antagonist, anticonvulsant

緒 言

哺乳動物の脳内には、15種以上のグアニジノ化合物の存在が報告されており¹⁾、そのうちのいくつかは、けいれん誘発物質として知られている²⁾。例えば、2-N-acetyl-arginine³⁾⁴⁾、creatinine (CTN)⁵⁾、creatine⁵⁾、guanidinoacetic acid⁵⁾、あるいは4-guanidinobutyric acid⁶⁾をネコやネコの大槽内に投与すると強直性、間代性のけいれんを引き起こす。また2-guanidinoethanol⁷⁾⁸⁾、2-guanidinoglutaric acid⁹⁾、5-guanidinovaleric acid¹⁰⁾、あるいはhomocysteine¹¹⁾をラットなどの実験動物の大脳皮質感覚運動野に直接作用させると、脳波にはスパイク放電などの発作波が誘発される。以上のような報告から、中枢神経系の異常興奮に際して、グアニジノ化合物が何らかの役割を演じていることが示唆されている。

さて、methylguanidine (MGua) は1887年 Brieger¹²⁾によって新しいグアニジノ化合物として同定された。その後、MGua は尿毒症患者の血清中に増加することが見いだされた¹³⁾¹⁴⁾。イヌやウサギの尿管を結紮して作成した実験的尿毒症動物の血清中や脳中で MGua が増加すること¹⁴⁾¹⁵⁾、また、イヌに MGua を投与すると、尿毒症性脳症に類似した症状が発現すること¹⁶⁾、さらに、MGua をウサギやラットの脳室内や大槽内に投与すると強直性・間代性のけいれん発作が誘発されること¹⁴⁾¹⁷⁾、なども見いだされ、MGua は尿毒症性脳症を発現する uremic toxin である、と考えられた¹⁸⁾¹⁹⁾。

一方、MGua は遺伝的にけいれん素因を有する EI 及び CBA マウスの脳内に高濃度に含まれていること²⁰⁾、また、電気刺激により誘発したけいれん中のマウス脳内で MGua が増加すること²¹⁾、などの実験結果より、けいれんの発現機序にも MGua が何らかの役割を演じていることが示唆された。しかし、MGua がけいれん発作を誘発する機序はまだ明らかではない。

本研究では MGua をラットの脳室内に投与し、その行動に及ぼす影響、及び、大脳皮質感覚運動野上に投与し、その脳波に対する影響を調べた。さらに、誘発された脳波変化に対する4-アミノ酪酸 (GABA) 受容体アゴニストや各種抗けいれん薬の効果を調べることにより、MGua により誘発される脳波変化の発現機序について検討した。

実験材料と方法

1. 実験動物

実験には体重250-300gの Sprague-Dawley (SD) 系雄ラットを使用した。

2. 行動に及ぼす MGua の影響及び抗けいれん薬の効果の検討

ラットをエーテルで麻酔し、脳定位固定装置に固定後、頭蓋骨 (bregma から後方0.8mm, 右側方2.5mm) にカニューレを植立して MGua を側脳室 (脳硬膜下3mm) に投与するためのガイドとした。手術3-5日後にこのカニューレを通して右側脳室に MGua を投与し、ラット行動観察用逆円錐台形 (底部直径60cm, 開口部直径80cm, 高さ45cm) open field 内でラットの行動

に与える変化を観察した。

一匹のラットには、ガイドカニューレの他に、bregma より前方 2 mm で左右側方 2 mm, 及び後方 4 mm で左右側方 3 mm, また、前方 5 mm (不関電極として使用) の 5 部位に硬膜外ビス電極を植立しコネクターと結線した。コネクターは歯科用レジンで頭蓋骨に固定し、行動を観察すると共に脳波も観察した。

3. 脳波に与える MGua の影響及び抗けいれん薬等の効果

ラットにエーテル麻酔下で挿管し人工呼吸下に succinylcholine chloride (SCC) で非動化した。ラットは脳定位固定装置に固定し、bregma より前方 2 mm で左右側方 2 mm, 及び後方 4 mm で

左右側方 3 mm の 4 部位に硬膜外ビス電極を植立し脳波記録用とし、さらに背側頸部正中部の筋肉内に針電極を刺入し不関電極とした。脳波は単極及び双極導出法で記録し、それぞれ、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 - 不関電極 (E), vi) LO - E, vii) RF - E, 及び viii) RO - E とした。また、bregma より後方 1 mm, 左方 2 mm の大脳皮質感覚運動野上の頭蓋骨を 2×2 mm 除去後、その部の脳硬膜を剝離して薬物投与野とした。対照脳波を約 2 時間記録後、MGua 溶液 $10 \mu\text{l}$ を直径 2 mm の濾紙に浸して薬物投与野に置くことにより MGua を投与し、脳波変化を 3 - 4 時間に

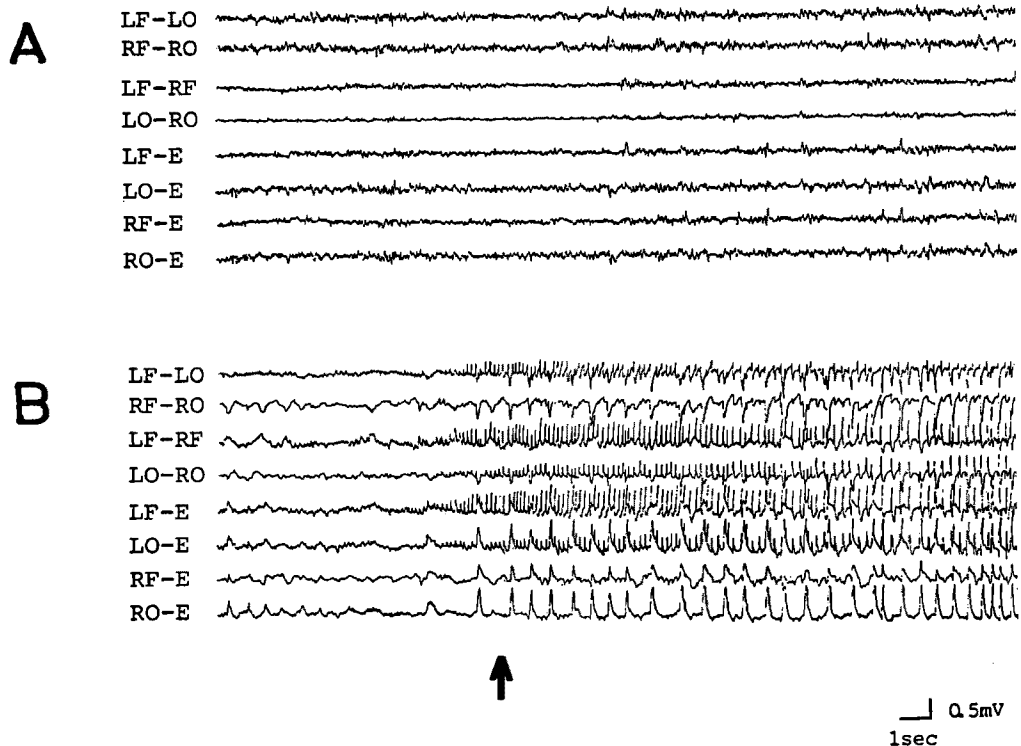


図1 無麻酔・無拘束ラット脳波に対する methylguanidine (MGua) の効果

(A) MGua 投与前の脳波

(B) MGua (100mM, $10 \mu\text{l}$) をラット右側脳室に投与12分後の脳波。脳波に ictal seizures pattern が始まった。矢印からは前肢の間代性の発作が始まり、ictal seizures pattern が終了するまで続いた。脳波は双極導出法及び単極導出法にて記録した。LF-LO: 左前頭部-左後頭部, RF-RO: 右前頭部-右後頭部, LF-RF, LO-ROの双極導出法, LF-E: 左前頭部よりの, LO-E: 左後頭部よりの, RF-E: 右前頭部よりの, 及び, RO-E: 右後頭部よりの単極導出法記録。

わたり観察した。脳波の記録中には、ラットの左右前腕に刺入した針電極を使用して心電図も記録し、ラットの一般状態の目安とした。

抗けいれん薬などの効果の検討のためには、MGua により誘発される脳波変化が完成した後 (MGua 投与20-40分後) に、各薬物を投与してその効果を調べた。さらに、GABA_A レセプター・アゴニストの一つの muscimol (Mus) については、前記の方法に加え、Mus 投与約20分後に MGua を投与して、MGua の発作波誘発性に対する影響も調べた。

4. 使用した薬物

MGua (1-methylguanidine hydrochloride, 東京化成工業株式会社) は100mM に蒸留水で溶解し、行動に対する影響の検討にはその10 μ l (MGua 1 μ mol) をガイドカニューレを通して脳室内に、また、脳波に対する影響の検討には

その10 μ l を薬物投与野 (大脳皮質感覚運動野) の大脳表面に投与した。

Phenobarbital (PB) (10%フェノバルル注射液, 三共株式会社) は20mg/kg を、diazepam (DZP) (ホリゾン注射液, 山之内製薬) は10mg/kg を、phenytoin (PHT) (アレビアチン注射液, 大日本製薬) は25mg/kg を、valproic acid sodium (VPA) (協和発酵株式会社) は200mg/kg を、さらに、ethosuximide (ESM) (エメサイドシロップ5%, 小玉株式会社) は50-200mg/kg を腹腔内に投与して、MGua により誘発される脳波変化に対する効果を調べた。また、Mus (Sigma, U.S.A.) は1mM, 5mM, 10mM に蒸留水に溶解して、その10 μ l を直径2mmの濾紙に浸して薬物投与野に置くことにより投与した。

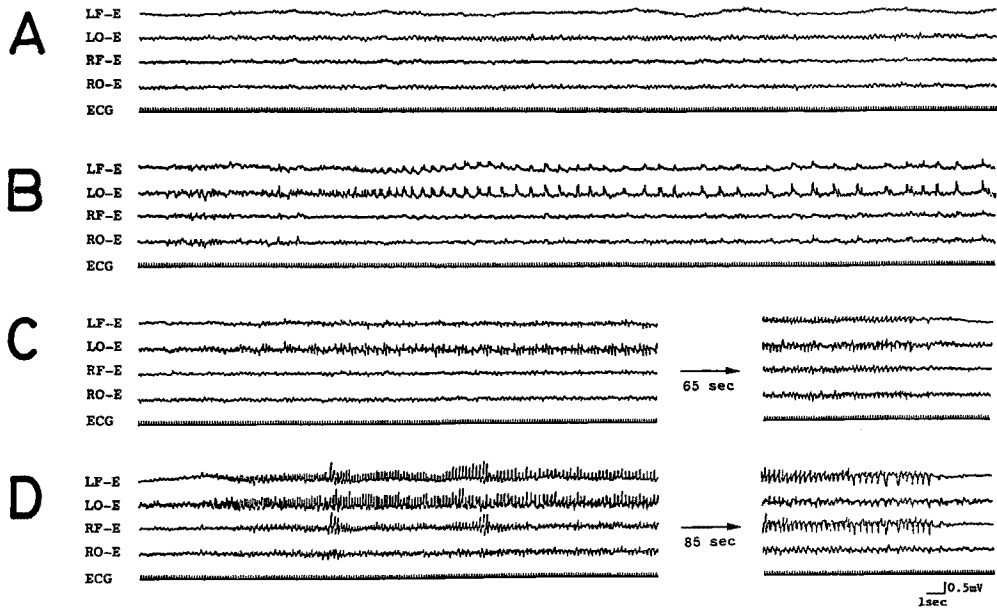


図2 ラット脳波に対する methylguanidine (MGua) の効果

(A) MGua 投与前の脳波

(B) MGua (100mM, 10 μ l) をラット左大脳皮質感覚運動野に投与5分後の脳波。MGua 投与側に spike が認められる。

(C) MGua 投与15分後の脳波

(D) MGua 投与46分後の脳波。ictal seizures pattern が認められる。

脳波は双極導出法及び単極導出法にて記録したが、ここには単極導出での結果を示す。LF-E: 左前頭部, LO-E: 左後頭部, RF-E: 右前頭部, 及び, RO-E: 右後頭部よりの記録。ECG: 心電図。

実験結果

1. 行動に及ぼす MGua の影響及び抗けいれん薬の効果の検討

① MGua の影響

無麻酔・無拘束ラットの脳室内に MGua を投与すると、ラットは open field 内を歩き回り始め、数分後より running fits, 強直性及び間代性けいれんをきたした。髭, 首, 前足などの twitching も見られ, また, 小さな音刺激などに対しても飛び上がるなどの過剰な反応を示し, 全体として被刺激性が亢進していることが示唆された。

脳波を記録しながら行動を観測した例においては, 上記の行動変化に加えて, 唾液分泌の亢進が認められた。また, 脳波記録には, 髭, 首, あるいは手足が twitching を発現している時, あるいはけいれん発作時には polyspikes や spike bursts が観察された (図 1)。

② MGua 誘発行動異常に対する抗けいれん薬の効果

けいれんが認められた後, ESM 100mg/kg を投与しても行動に特別な変化は認められなかった。また, DZP を投与すると, ラットは一時的な wet dog shake 様運動を示した。その後に, 行動は抑制されてラットは脱力を示したが, けいれんは抑制された。

2. 脳波に与える MGua の影響及び抗けいれん薬等の効果

① ラット脳波に対する MGua の効果

SCC で非動化したラットの大脳皮質感覚運動野上に MGua を投与すると, 2—10分後に投与側の脳波に単発性の spike が出現し始め, 次第にその頻度を増し, poly spikes や spike bursts となった。MGua の投与 7—20分後に脳波には postictal depression を伴った ictal seizures patterns (ISP) が出現し始めた。また, ISP には 3 cps spike & wave complex (SWC) と思われる波形の混入が認められた。これらの spike

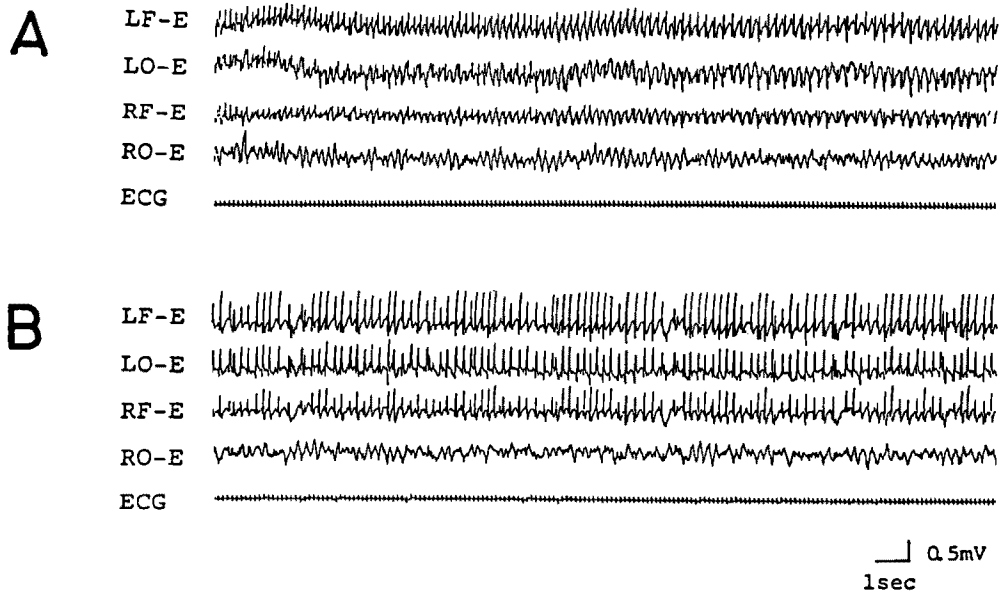


図 3 Methylguanidine (MGua) 誘発 spike に対する ethosuximide (ESM) の影響

(A) MGua (100mM, 10 μ l) を大脳皮質感覚運動野 (薬物投与野) 上に投与32分後の脳波, MGua により 3 cps の spike & wave complex が認められる。

(B) ESM (200mg/kg) を腹腔内に投与41分後 (MGua 投与94分後) の脳波, MGua により誘発された spike は継続している。

電極の配置と記録法は図 2 と同じ。

活動は次第に MGua 投与反対側にも波及し、ついには投与側とほぼ同期して、繰り返し出現した。しかし、RO-E に明かな高振幅の spike 活動が認められない、つまり、対側半球への spike の伝播が完成しない例も数例あった。これらの spike bursts や ISP は脳波観察終了時、(MGua 投与 3—4 時間後) も続いていた (図 2)。

② MGua 誘発脳波変化に与える抗けいれん薬等の効果

抗けいれん薬等はそれぞれ、MGua の誘発する spike が ISP を呈し高振幅状態で安定した後 (MGua 投与約 20—40 分後) に投与し、MGua 誘発脳波変化に対する影響を検討した。

1) MGua 誘発脳波変化に対する ESM の効果

MGua 誘発 spike が完成した後に ESM を 50 mg/kg, 100mg/kg, 200mg/kg 投与したが、いずれの投与量でも約 3 時間の脳波観察中に spike, ISP 及び SWC の抑制はまったく認められなかった (図 3)。

2) MGua 誘発脳波変化に対する VPA の効果

MGua 誘発 spike が完成した後に VPA を 200mg/kg 投与したが、約 3 時間の脳波観察中に spike, ISP 及び SWC の抑制はまったく認められなかった (図 4)。

3) MGua 誘発脳波変化に対する PHT の効果

MGua 誘発 spike が完成した後に PHT を 25 mg/kg 投与したが、spike, ISP 及び SWC の抑制は認められなかった (図 5)。

4) MGua 誘発脳波変化に対する PB の効果

MGua 誘発 spike が完成した後に PB を投与すると、spike 活動はしだいに抑制され、40—50 分後には spike, IPS 及び SWC が完全に消失し (図 6)、spindle waves の認められる例もあった。しかし、ISP や SWC は抑制されるにもかかわらず、MGua を投与した薬物投与野付近で spike が完全には抑制されず、低振幅の spike が継続する場合も約半数に認められた。

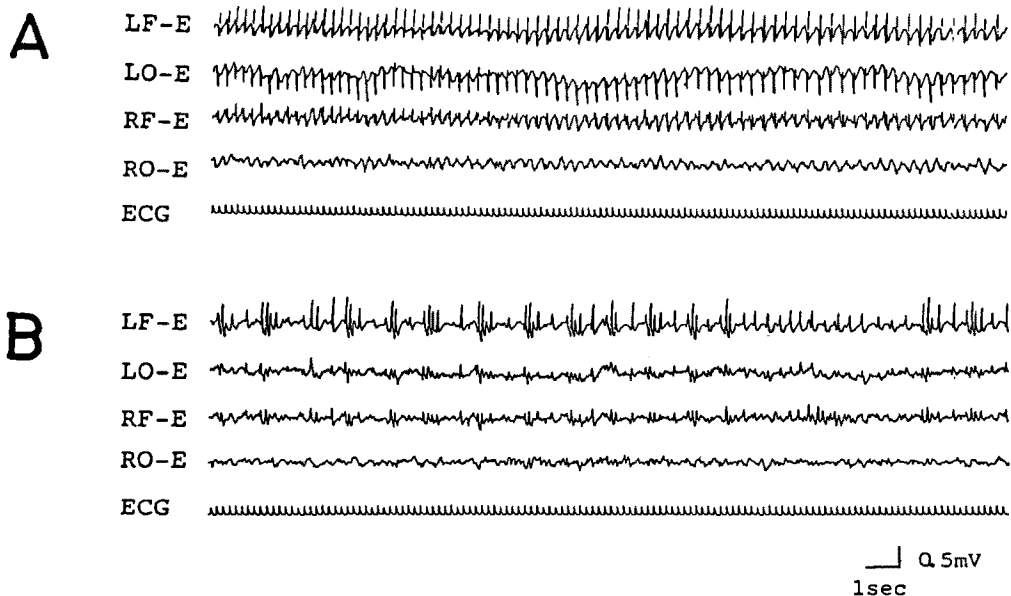


図 4 Methylguanidine (MGua) 誘発 spike に対する valproate (VPA) の影響

(A) MGua (100mM, 10 μ l) を大脳皮質感覚運動野 (薬物投与野) 上に投与 19 分後の脳波。MGua により spike が誘発されている。

(B) VPA (200mg/kg) を腹腔内に投与 70 分後 (MGua 投与 94 分後) の脳波。MGua により誘発された spike に変化は認められない。

電極の配置と記録法は図 2 と同じ。

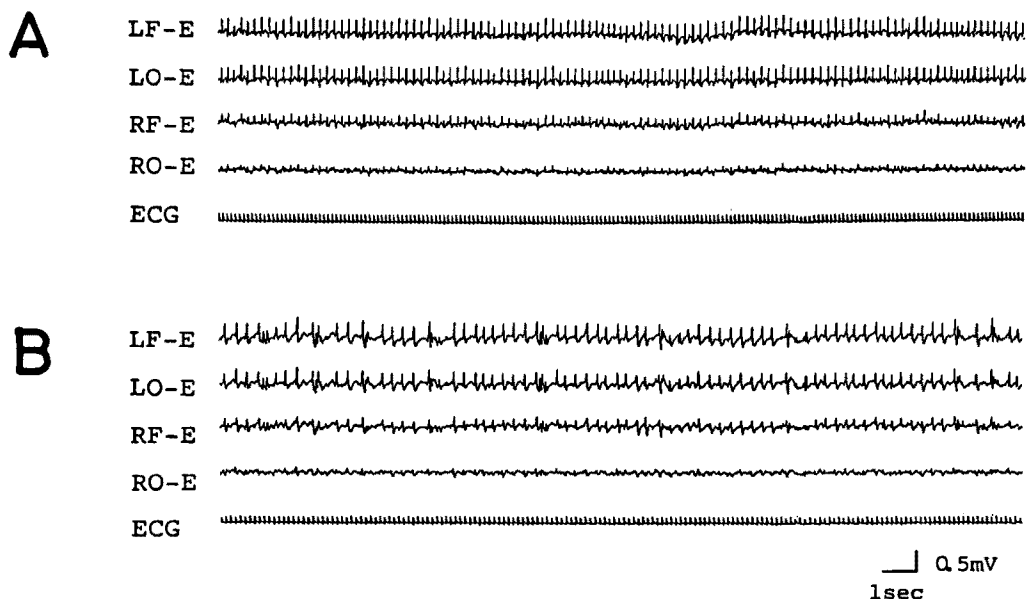


図5 Methylguanidine (MGua) 誘発 spike に対する phenytoin (PHT) の影響
 (A) MGua (100mM, 10 μ l) を大脳皮質感覚運動野 (薬物投与野) 上に投与10分後の脳波。MGua により spike が誘発されている。
 (B) PHT (25mg/kg) を腹腔内に投与45分後 (MGua 投与87分後) の脳波。MGua により誘発された spike に変化は認められない。
 電極の配置と記録法は図2と同じ。

5) MGua 誘発脳波変化に対する DZP の効果

MGua 誘発 spike が完成した後に DZP を投与すると、約10分後より spike 活動はしだいに抑制され、spike 活動は認められなくなった (図7)。しかし、DZP 投与1時間後より postictal depression の時間が長く、持続性の短い ISP、あるいは、sporadic spikes の認められた例もあった。

6) MGua 誘発脳波変化に対する Mus の効果

MGua 誘発 spike が完成した後に Mus (10 nmol, 50nmol あるいは100nmol) を薬物投与野より投与しても、spike 活動はまったく影響されず、Mus には spike の抑制効果は認められなかった (図8)。

Mus (50nmol) を薬物投与野に投与して、その約20分後に MGua (1 μ mol) を薬物投与野に投与しても、MGua により誘発されるはずの spike 活動は誘発されなかった (図9)。

考 察

MGua は1887年 Brieger¹²⁾によって新しいグアニジン化合物として報告されたが、さらに彼は、MGua は Kommabacillen による CTN の酸化的分解により生成し、哺乳動物に呼吸困難や筋肉の振戦のほか、全身けいれんを引き起こす毒性の強い物質であると報告している。MGua は哺乳動物の体内でも、Brieger¹²⁾の唱えたように、CTN の酸化的分解によって主として肝臓で生成されている²²⁾²³⁾と考えられている。しかし、MGua は血液脳関門を通過しにくい¹⁴⁾²⁴⁾、尿毒症¹⁴⁾やけいれん²⁰⁾に脳内で増加する MGua は血中の CTN が脳内に移行し生成されるものと考えられている¹⁴⁾。

上記のごとく、MGua は全身けいれんを引き起こす毒性の強い物質であると報告された。このため、MGua は当時よりけいれんとの関係が注目されていた。後に、尿毒症患者の血中や坐骨神経中などで増加することも報告され¹³⁾¹⁵⁾、

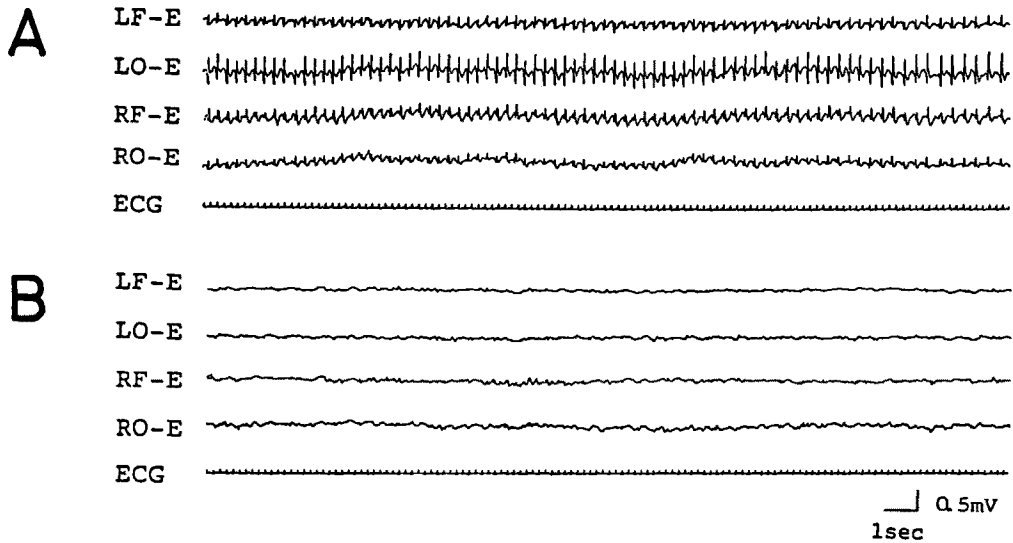


図6 Methylguanidine (MGua) 誘発 spike に対する phenobarbital (PB) の影響
 (A) MGua (100mM, 10 μ l) を大脳皮質感覚運動野 (薬物投与野) 上に投与33分後の脳波, MGua により spike が誘発されている。
 (B) PB (20mg/kg) を腹腔内に投与86分後 (MGua 投与131分後) の脳波, MGua により誘発された spike は消失している。
 電極の配置と記録法は図2と同じ。

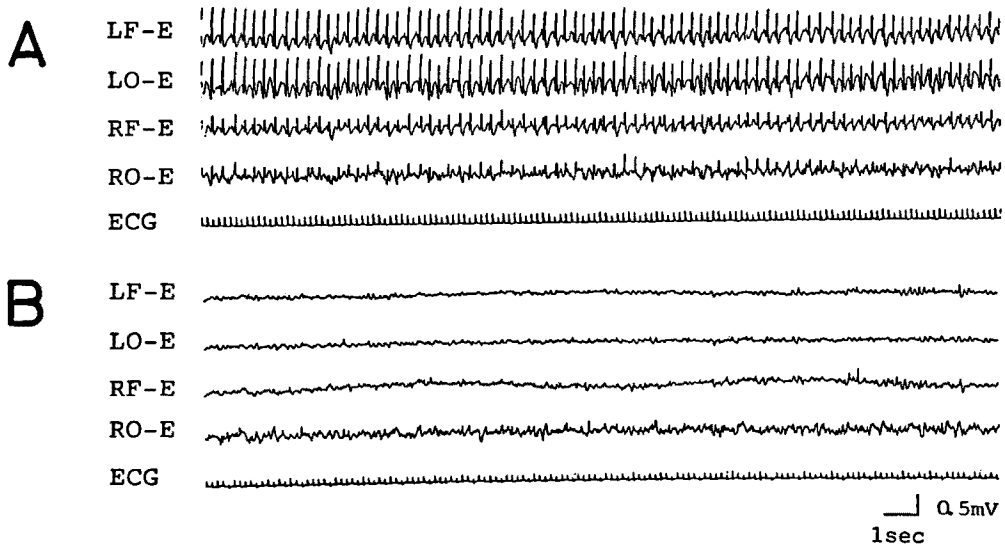


図7 Methylguanidine (MGua) 誘発 spike に対する diazepam (DZP) の影響
 (A) MGua (100mM, 10 μ l) を大脳皮質感覚運動野 (薬物投与野) 上に投与38分後の脳波, MGua により spike が誘発されている。
 (B) DZP (10mg/kg) を腹腔内に投与17分後 (MGua 投与81分後) の脳波, MGua により誘発された spike は消失している。
 電極の配置と記録法は図2と同じ。

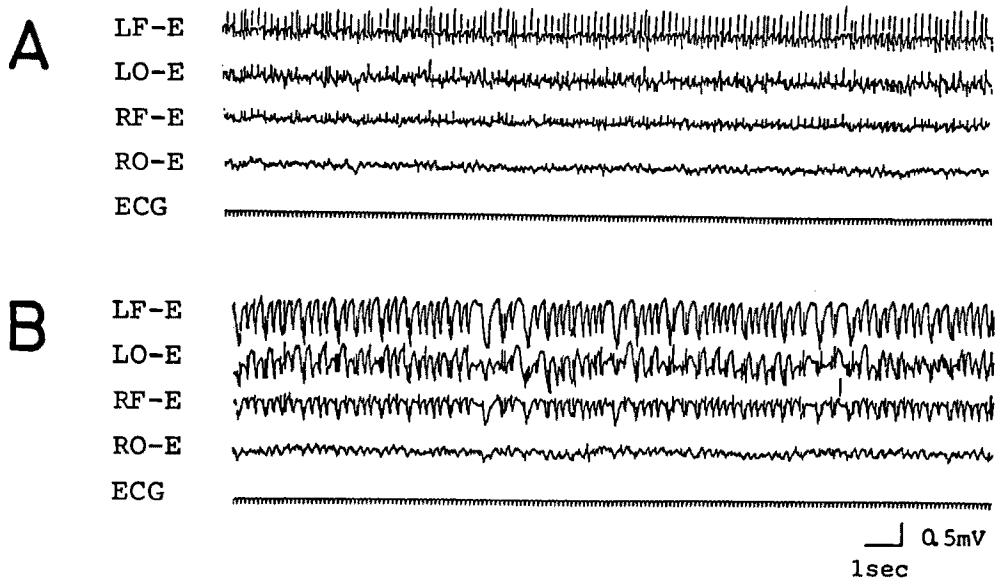


図8 Methylguanidine (MGua) 誘発 spike に対する muscimol の影響

(A) MGua (100mM, 10 μ l) を大脳皮質感覚運動野 (薬物投与野) 上に投与30分後の脳波。MGua により spike が誘発されている。

(B) Muscimol (5mM, 10 μ l) を薬物投与野に投与20分後 (MGua 投与50分後) の脳波。MGua により誘発された spike に変化は認められない。

電極の配置と記録法は図2と同じ。

uremic toxin としての注目も浴び、けいれんとの関係や尿毒症での代謝障害との関連において多くの研究がなされている。また、前述のごとく、イヌに MGua を経口投与すると、血小板減少、血液寿命短縮による貧血などの血液系への障害、食欲不振、流涎、下痢、消化管でのカルシウム吸収能の低下などの消化器系への影響、運動神経伝達速度の低下、運動失調、協同運動不全、傾眠状態あるいはけいれんなど末梢及び中枢神経への影響など、尿毒症に類似した症状が発現すること¹⁶⁾¹⁸⁾が報告されている。また、尿管を結紮して作成した実験的尿毒症ウサギやイヌの血清中や脳中で MGua が増加すること¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾が報告され、さらに、MGua をウサギやラットの脳室内や大槽内に投与すると強直性・間代性のけいれん発作が誘発されること¹⁴⁾¹⁷⁾、ウサギの大脳皮質感覚運動野へ投与すると spike などの発作波が誘発されること¹⁴⁾も明らかとなった。以上の報告は、MGua は尿毒症脳症の際にけいれんを発生させる uremic toxin であるこ

とを強く示唆する。

一方、①MGua はけいれんを誘発すること¹²⁾¹⁴⁾¹⁶⁾¹⁷⁾、②MGua は audiogenic sensitive rat が強直性けいれんを起こしている時に血清中の濃度が増加すること²⁵⁾、また、前述のごとく、③けいれん素因を持つ EI 系統や CBA 系統のマウス脳内に高濃度に含まれること²⁰⁾、さらに、④マウス脳内で電気刺激けいれん中に MGua が増加すること²¹⁾、などの理由から、MGua とけいれんの関係が注目された。このため、MGua 誘発けいれんの発現機序について、生理学的、生化学的な検討がいくつか行われてきた。

神経伝達物質の代謝に関し、glutamic acid (Glu) の代謝に関連するいくつかの酵素活性に及ぼす MGua の効果が検討された²⁶⁾。この結果、MGua は Glu-oxaloacetate transaminase (GOT)、Glu-pyruvate transaminase (GPT)、及び Glu-decarboxylase の活性には影響しないことが明らかとなった。この結果は、MGua 誘発けいれんの発現機序に Glu 系の神経伝達は関与

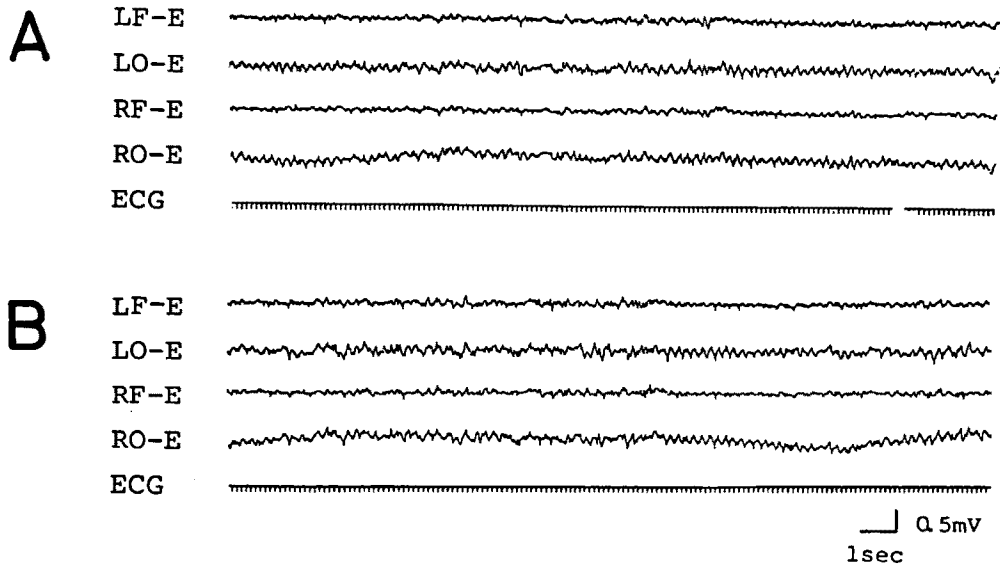


図9 Methylguanidine (MGua) 誘発 spike 発現に対する muscimol の影響
 (A) Muscimol (5 mM, 10 μ l) を薬物投与野に投与10分後の脳波。
 (B) MGua (100 mM, 10 μ l) を大脳皮質感覚運動野 (薬物投与野) 上に投与10分後の脳波。MGua により spike は誘発されていない。MGua 投与3時間まで脳波を観察したが spike は誘発されなかった。
 電極の配置と記録法は図2と同じ。

していないことを示唆する。これに対し、松本ら²⁷⁾は MGua に acetylcholinesterase 活性阻害作用のあることを見だし、けいれん発現に acetylcholine (ACh) 系の神経伝達の関与を想定している。

一方、0.5 mM の MGua は Mg^{2+} -ATPase 活性にはなんらの影響を与えないが、 Na^+ 、 K^+ -ATPase 活性を70%に抑制することが見いだされた²⁸⁾。神経細胞膜内に存在する Na^+ 、 K^+ -ATPase は、刺激伝導のために Na^+ および K^+ の濃度勾配の保持と再構築をおこなっていると、一般に考えられている。このため、MGua により細胞内のイオン環境が崩れて細胞は脱分極を起し、その結果けいれんが起こるのではないかと報告されている。しかし、カタツムリ食道下神経節にある2種類の巨大神経細胞の自発発火に対し、1.4 mM の MGua を含んだ灌流液で灌流しても発火頻度に変化がないことが報告されている²⁹⁾。この結果は、MGua は Na^+ 、 K^+ -ATPase 活性を抑制するが、神経細胞に脱分極を起させるほど強く活性を抑制してはいな

いことを示唆する。

以上のように MGua 誘発けいれんの発現機序についていくつかの研究が行われたが、まだその機序は明確ではない。また、ACh 系神経伝達の関与に関しても、ACh 分解酵素だけの検討のため、ACh の合成や ACh 放出についての検討の余地が大きく残っている。

さて、本研究では MGua をラット脳内に投与するとけいれんが誘発され、ラットの大脳皮質感覚運動野に投与すると spike, ISP および SWC が誘発されることが観察された。また、MGua の誘発する発作波に対し、DZP 及び PB が抑制効果を示した。しかし、ESM, VPA 及び PHT には抑制効果は認められなかった。Mus は、MGua により誘発された発作波に抑制効果はなかったが、MGua により発作波が誘発されることを防ぐ効果を持っていることが明かとなった。

本研究で観察した MGua 誘発発作波の第一の特徴は、その発作波の中に多くの SWC が認められたことである。てんかんの小発作 (petit mal) は脳波に 3 cps の spike & wave complex が観

察されることが一つの特徴とされている。そこで筆者は MGua 投与ラットが小発作のモデルになり得るか否かを検討した。Pentylentetrazol (PTZ) や最大電撃けいれんを抑制する効果のある³⁰⁾ESM は、小発作の治療に大変よく使用されている。また、succinic semialdehyde dehydrogenase 活性を阻害しシナプトゾーム内に GABA 濃度を上昇させること³¹⁾³²⁾により抗けいれん効果を表す VPA も、小発作を抑制するためによく使用されている。そこで、MGua により誘発される SWC に対する ESM と VPA の効果を調べたが、MGua 誘発 SWC に対して ESM も VPA も抑制効果はなかった。このため、MGua 投与ラットは小発作のモデルには適当ではないと考えられる。

GABA_A 認識部位は PB 認識部位、DZP 認識部位および Cl⁻ チャンネルと複合体を形成していると考えられている³³⁾³⁴⁾。毒きのこの殺虫成分として分離された Mus は、動物体内で代謝を受けにくく、また [³H]-GABA のレセプター結合性などに対する効果から³⁵⁾³⁶⁾、GABA_A レセプターの強力なアゴニストと考えられている。Mus は電撃けいれん³⁷⁾、PTZ 誘発けいれん³⁸⁾、GABA 拮抗物質により誘発されるけいれん³⁸⁾³⁹⁾などに抑制効果を持つ。本研究では MGua が誘発した spike 活動を Mus は抑制しなかった。しかし、Mus をあらかじめ投与しておき、その後 MGua を投与すると MGua は spike を発現しなかった。本結果は、あらかじめ Mus により GABA レセプターを占拠しておけば、MGua は効果を発揮できないが、MGua により spike が誘発されてしまうと、Mus は MGua の誘発した spike 活動を抑制できないことを示す。こ

れは、GABA レセプターに対し Mus の方が MGua より結合しやすく、逆に、MGua の方が Mus より離れにくいことを意味しているのかもしれない。さらに GABA アゴニストの DZP と PB も MGua 誘発 spike を抑制した。これは、MGua は GABA レセプターを占拠して spike を誘発させるが、PB や DZP のレセプターには影響しないことを示唆する。

PHT はその主たる作用は、シナプトゾーム膜にある Na⁺ チャンネルの閉塞にあると考えられているが⁴⁰⁾、PHT にはシナプトゾームにある Glu や GABA の高親和性取り込みを増加する効果のあることも報告されている⁴¹⁾。しかし、本研究では PHT は MGua の誘発する spike になんらの影響も及ぼさなかった。VPA や PHT でシナプトゾーム内の GABA 量を増加しても MGua 誘発 spike には効果がないことは、MGua の spike 誘発機構に GABA レセプターのみが係わっていることを強く示唆する。

結 論

MGua をラット脳内に投与するとけいれんや spike が誘発されるが、これらの発現やその抑制機序に GABA 系の神経伝達に関与していることが示唆された。

稿を終わるにあたり、御懇篤な御指導と御校閲を賜りました森 昭胤教授、また直接御指導御協力いただきました横井 功助手、加太英明文部技官に深く感謝の意を捧げます。さらに、実験遂行にあたりましては終始快く御協力下さいました研究室の皆様 に心から御礼申し上げます。

文 献

- 1) Robin Y and Marescau B: Natural guanidino compounds; in Guanidines, Mori, Cohen and Lowenthal eds. Plenum Press, New York (1985) pp. 383-438.
- 2) Yokoi I, Edaki A, Watanabe Y, Shimizu Y, Toda H and Mori A: Effects of anticonvulsants on convulsive activity induced by 2-guanidinoethanol; in Guanidines II, Mori, Cohen and Koide eds. Plenum Press, New York (1989) pp. 169-181.
- 3) Ohkusu H and Mori A: Isolation of α -N-acetyl-L-arginine from cattle brain. J Neurochem (1969) 16, 413-424.

- 4) Mori A and Ohkusu H : Isolation and identification of alpha-N-acetyl-L-arginine and its effect on convulsive seizure. *Adv Neurol Sci (Tokyo)* (1971) **15**, 303—306.
- 5) Jinnai D, Mori A, Mukawa J, Ohkusu H, Hosotani M, Mizuno A and Tye LC : Biochemical and physiological studies on guanidino compounds induced convulsions. *Jpn J Brain Physiol* (1969) **160**, 3668—3673.
- 6) Jinnai D, Sawai A and Mori A : γ -Guanidinobutyric acid as a convulsive substance. *Nature* (1966) **212**, 617.
- 7) Watanabe Y, Shindo S and Mori A : Identification of 2-guanidinoethanol in human urine. *Eur J Biochem* (1985) **147**, 465—468.
- 8) 枝木 彰 : 2-Guanidinoethanol のけいれん誘発作用に関する生理学的研究. *岡山医誌* (1987) **99**, 1333—1347.
- 9) Shiraga H and Mori A : Convulsive activity of α -guanidinoglutaric acid in rats. *IRCS Med Sci* (1982) **10**, 855—856.
- 10) Yokoi I, Tsuruta K, Shiraga H and Mori A : δ -Guanidinovaleric acid as an endogenous and specific GABA-receptor antagonist, Electroencephalographic study. *Epilepsy Res* (1987) **1**, 114—120.
- 11) Yokoi I, Toma J and Mori A : The effect of homoarginine on the EEG of rats. *Neurochem Pathol* (1984) **2**, 295—300.
- 12) Brieger L : Zur Kenntniss der Stoffweehsel producte des Cholera bacillus. *Berliner Klinische Wochenschrift* (1887) **44**, 817—820.
- 13) Giovannetti S, Biagini M and Cioni L : Evidence that methylguanidine is retained in chronic renal failure. *Experientia* (1968) **15**, 341—342.
- 14) 松本路子 : 尿毒症におけるグアニジノ化合物に関する研究. *岡山医誌* (1975) **87**, 673—686.
- 15) Giovannetti S, Balestri PL and Barsotti G : Methylguanidine in uremia. *Arch Intern Med* (1973) **131**, 709—713.
- 16) Giovannetti S, Biagini M, Balestri PL, Navalesi R, Giagnoni P, de Matteis A, Ferro-Milone P and Perfetti C : Uraemia-like syndrome in dogs chronically intoxicated with methylguanidine and creatinine. *Clin Sci* (1969) **36**, 445—452.
- 17) Matsumoto M, Kobayashi K, Kishikawa H and Mori A : Convulsive activity of methylguanidine in cats and rabbits. *IRCS Med Sci* (1976) **4**, 65.
- 18) Balestri PL, Biagini M, Pindi R and Giovannetti S : Uremic toxins. *Arch Intern Med* (1970) **126**, 843—845.
- 19) 横井 功 : 疾患からみた尿毒症物質 : 脳機能障害. *腎と透析* (1987) **23**, 645—649.
- 20) 平松千明 : マウス脳内 guanidino 化合物に関する研究. 第1編. 脳内 guanidino 化合物の系統差について. *岡山医誌* (1980) **92**, 419—425.
- 21) 平松千明 : マウス脳内 guanidino 化合物に関する研究. 第2編. けいれんにとまなう脳内 guanidino 化合物の変動について. *岡山医誌* (1980) **92**, 427—434.
- 22) Aoyagi K, Nagase S, Narita M and Tojo S : Role of active oxygen on methylguanidine synthesis in isolated rat hepatocytes. *Kidney Int* (1987) **32**, s-229—s-233.
- 23) Nagase S, Aoyagi K, Narita M and Tojo S : Biosynthesis of methylguanidine in isolated rat hepatocytes and in vivo. *Nephron* (1985) **40**, 472—475.
- 24) Yokoi I, Edaki A, Watanabe Y, Shiraga H, Fujii T and Mori A : Guanidino compounds in rabbit brain, serum and other organs. *Neurosciences* (1986) **12**, 27—32.
- 25) Wichert P, Marescau B, De Deyn P and Lowenthal A : Guanidino compounds in serum and brain

- of audiogenic sensitive rat during the preconvulsive running phase of cerebral seizures. *Neurosciences* (1980) **13**, 35—39.
- 26) 進藤省一郎, 片山泰人, 森 昭胤: グルタミン酸系酵素におよぼす諸種グアニジノ化合物の作用について, 脳研会誌 (1979) **5**, 96—97.
- 27) 松本路子, 藤原正昭, 森 昭胤: ウサギ脳アセチルコリン系酵素に及ぼすグアニジノ化合物の影響, 脳研会誌 (1977) **3**, 128—129.
- 28) Matsumoto M and Mori A: Effects of guanidino compounds on rabbit brain microsomal Na⁺, K⁺-ATPase activity. *J Neurochem* (1976) **27**, 635—636.
- 29) Matsumoto M, Yokoi I, Takeuchi H and Mori A: Effects of guanidino compounds on the electrical activity of giant neurons identified in subesophageal ganglia of the African giant snail *Achatina fulica* *Férussac*. *Comp Biochem Physiol* (1976) **54**, 123—125.
- 30) Ferrendelli JA and Kupferberg HJ: Antiepileptic drugs: Succinimides; in *Antiepileptic Drugs: Mechanisms of Action*. Glaser, Penry and Woodbury eds. Raven Press, New York (1980) pp. 587—596.
- 31) Van der Laan JW, De Boer TH and Bruinuels J: Di-n-propyl-acetate and GABA degradation: Preferential inhibition of succinic semialdehyde dehydrogenase and indirect inhibition of GABA-transaminase. *J Neurochem* (1979) **32**, 1769—1780.
- 32) Löscher W and Frey HH: On the mechanism of action of valproic acid. *Arzneim Forsch* (1977) **27**, 1081—1082.
- 33) Olsen RW: GABA-benzodiazepine-barbiturate receptor interaction. *J Neurochem* (1981) **37**, 1—13.
- 34) Olsen RW: The GABA postsynaptic membrane receptor-ionophore complex. *Mol Cell Biochem* (1981) **39**, 261—279.
- 35) Snodgrass SR: Use of ³H-muscimol for GABA receptor studies. *Nature* (1978) **273**, 392—394.
- 36) Beamont K, Chilton WS, Yamamura HI and Enna SJ: Muscimol binding in rat brain: Association with synaptic GABA receptors. *Brain Res* (1978) **148**, 153—162.
- 37) Löscher W: Comparative assay of anticonvulsant and toxic potencies of sixteen GABA mimetic drugs. *Neuropharmacol* (1982) **21**, 803—810.
- 38) Lloyd GK, Munari C, Worms P, Bassi L, Bancard J, Talairach J and Morselli PL: The role of GABA mediated neurotransmission in convulsive states: in *GABA and Benzodiazepine Receptors*. *Advances in Biochemical Pharmacology*, Costa, DiChiara and Gessa eds. Raven Press, New York (1981) pp. 199—206.
- 39) Matthews WD and McCafferty GP: Anticonvulsant activity of muscimol against seizures induced by impairment of GABA-mediated neurotransmission. *Neuropharmacol* (1979) **18**, 885—889.
- 40) Crane P and Swanson PD: Diphenylhydantoin and the cations and phosphates of electrically stimulated brain slices. *Neurology* (1970) **20**, 1119—1124.
- 41) De Weer P: Phenytoin: Blockage of resting sodium channels; in *Antiepileptic Drugs: Mechanism of Action*. Glaser, Penry and Woodbury eds. Raven Press, New York (1980) pp. 353—361.

A physiological study of methylguanidine-induced seizures**Yoshihisa SHIMIZU****Department of Neurochemistry, Institute for Neurobiology,****Okayama University Medical School,****Okayama 700, Japan****(Director : Prof. A. Mori)**

The CNS action of methylguanidine (MGua) was investigated in male S. D. rats. The effects of a GABA-agonist and anticonvulsants on the MGua-induced EEG changes were studied. Several min after an intraventricular injection of 10 μ l of a MGua solution (100mM), rats displayed running fits, tonic- and clonic-convulsion with myoclonic twitching accompanied by polyspikes and spike bursts in the EEG. Diazepam (DZP) (10mg/kg, i. p.) inhibited the convulsive activity, but ethosuximide (ESM) (200mg/kg, i. p.) showed no effect.

Sporadic spike discharges began 2-10min after MGua (1 μ mol) application to the pia mater of the sensorimotor cortex, and thereafter, a recurrent ictal seizure pattern (ISP) was induced. The ISPs were suppressed by DZP (10mg/kg) and phenobarbital (PB) (20mg/kg), injected after the completion of ISPs induced by MGua. Spike discharges were not induced by the application of MGua together with muscimol (50nmol), although muscimol did not suppress the ISPs following their completion. Intraperitoneal injection of either ESM (50-200mg/kg), valproate (200mg/kg) or phenytoin (25 mg/kg), after the completion of ISPs, did not affect the ISPs.

These findings suggest that GABA_A receptors might participate in the induction mechanism of MGua-induced seizure activities, and that DZP and PB receptors might play a role in the mechanism which suppresses MGua-induced Seizures.