

# *In vivo* microdialysis electrode biosensor を用いた Ca<sup>2+</sup> および K<sup>+</sup> 依存性 glutamate 遊離に対する zonisamide, carbamazepine の効果

## Effects of Zonisamide and Carbamazepine on Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> Evoked Hippocampal Glutamate Releases

岡 田 元 宏\* 河 田 祐 子\* 桐 生 一 宏\*  
和 田 一 丸\* 水 野 和 久\* 田 崎 博 一\*  
兼 子 直\*

**要旨：**抗てんかん薬 carbamazepine (CBZ), zonisamide (ZNS) の抗てんかん作用発現機序解明を目的に, *in vivo* microdialysis electrode biosensor を用いた細胞外 glutamate (GLU) 濃度の real time monitoring による, Ca<sup>2+</sup> および K<sup>+</sup> 依存性 GLU 遊離に対する CBZ, ZNS 両剤の効果を比較検討した。細胞外 GLU 濃度は細胞外 Ca<sup>2+</sup> 濃度の変化 (0~3.4 mM) に影響されなかったが, 細胞外 K<sup>+</sup> 濃度の増加 (100 mM) により, 一過性初期増加, ついで多相性間歇的増加相が生じた。CBZ (100 μM) そして ZNS (1 mM) 灌流投与は, この一過性初期増加, 多相性間歇的増加相を抑制した。特に CBZ は多相性間歇的増加相の抑制効果が ZNS よりも強く, 逆に ZNS は一過性初期増加抑制効果が CBZ よりも強力であった。この K<sup>+</sup> 依存性 GLU 遊離に対する, CBZ, ZNS の抑制効果が CBZ, ZNS 両剤の抗てんかん作用発現機序に関与する可能性が示唆される。

てんかん治療研究振興財団研究年報 1997 ; 9 : 97-104

**Key Words :** glutamate, hippocampus, microdialysis electrode, carbamazepine, zonisamide.

### 緒 言

興奮性アミノ酸の一種, L-glutamate (GLU) の機能過剰亢進がけいれん発作発現機序に関与することは, 数多くの実験結果から証明されている<sup>2~4, 20, 22~24)</sup>。近年, *in vivo* microdialysis により中枢神経系内の神経伝達物質遊離量の測定が可能となり, てんかん患者<sup>2, 3, 20)</sup>, キンドリングラット<sup>23)</sup>, けいれん誘発物質投与等のてんかんモデル動物を対象とし

た実験<sup>4, 11, 12, 22, 24)</sup> から, てんかん発作前後の細胞外 GLU 濃度の比較検討行われている。

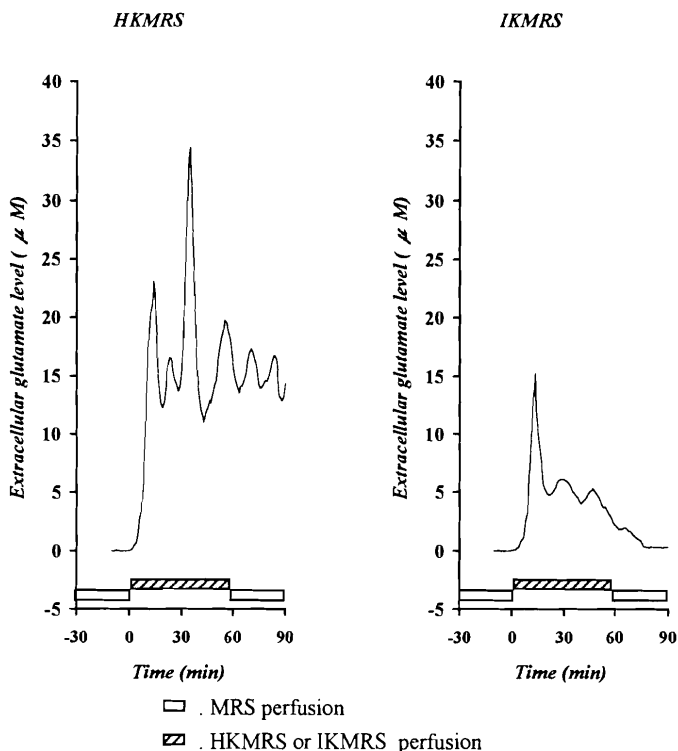
しかし, 部分発作の第一選択薬である carbamazepine (CBZ), そして CBZ と抗てんかん作用スペクトラムを一部共有すると考えられる zonisamide (ZNS) は, GLU 受容体に対する親和性が低いことは報告されてはいるが, GLU 機能に対する作用の詳細はいまだ十分に検討されていない<sup>6~8, 14, 15, 18, 19, 21)</sup>。

本報告では, CBZ, ZNS 両抗てんかん薬の,

\*弘前大学医学部神経精神医学講座  
〔〒036 弘前市在府町 5〕

Motohiro Okada, Yuko Kawata, Kazuhiro Kiryu, Kazumaru Wada, Kazuhisa Mizuno, Hiroichi Tasaki and Sunao Kaneko

Department of Neuropsychiatry, School of Medicine, Hirosaki University.



**Fig. 1** Effects of  $K^+$  evoked stimulation on hippocampal extracellular glutamate level. The figures illustrate the changes in hippocampal extracellular glutamate level by sustained perfusion of HKMRS (100 mM of  $K^+$  including modified Ringer's solution) or IKMRS (50 mM of  $K^+$  including modified Ringer's solution). The opened columns show the perfusion with modified Ringer's solution (MRS). The striped columns show the perfusion of each HKMRS or IKMRS. Ordinate indicates the hippocampal extracellular glutamate level ( $\mu M$ ), and abscissa indicates time in minutes (min).

抗てんかん作用発現機序解明を目的に、*in vivo* microdialysis electrode biosensor (MEB) を用い、GLU 遊離に対する CBZ, ZNS 両剤の効果を比較検討した。

## 対象と方法

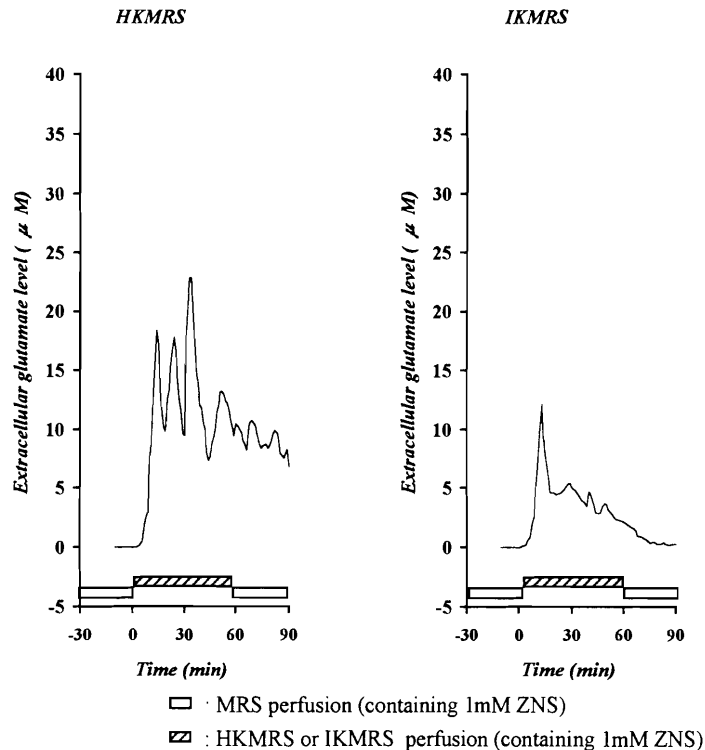
### 1. 透析液組成

Microdialysis probe 灌流透析液は修正リンゲル液を用い、 $K^+$  および  $Ca^{2+}$  濃度を変え、同価の ion strength の  $Na^+$  を減少した各種修正リンゲル液、 $K^+$  100 mM 含有 (HKMRS)、 $K^+$  50 mM 含有 (IKMRS)、

$Ca^{2+}$  3.4 mM (HCMRS)、 $Ca^{2+}$  0 mM (FCMRS) を作成した<sup>16)</sup>。また、MEB 内部には、4.3 mM 磷酸緩衝液により pH 7.4 調整した磷酸修正リンゲル液 (PMRS) を充填した<sup>1)</sup>。

### 2. O-Phenylenediamine コーティング前処置

Ascorbate 等の白金電極感受性物質の影響を除去する目的で、O-Phenylenediamine (OPDA) コーティングを行った。Electrode 内に PMRS を充填し、15 分間 100%  $N_2$  ガスでバブリングを行った PMRS 液に浸透した後、+650 mV に過電圧し、 $N_2$  ガスでバブリング



**Fig. 2** Effects of zonisamide on  $K^+$  evoked hippocampal glutamate release. The opened columns show the perfusion with modified Ringer's solution (MRS) including 1 mM of zonisamide (ZNS). The striped columns show the perfusion of each HKMRS (100 mM of  $K^+$  including modified Ringer's solution) or IKMRS (50 mM of  $K^+$  including modified Ringer's solution) containing 1 mM of ZNS. Ordinate indicates the hippocampal extracellular glutamate level ( $\mu M$ ), and abscissa indicates time in minutes (min). ZNS inhibited  $K^+$  evoked glutamate release significantly.

を行った OPDA 5 mM 含有 PMRS に液を変更し、15 分間 OPDA コーティングを行った。コーティング終了後、洗浄のため、再び  $N_2$  ガスでバブリングを行った PMRS に 15 分間浸透した<sup>1)</sup>。

### 3. *In vivo* microdialysis electrode biosensor

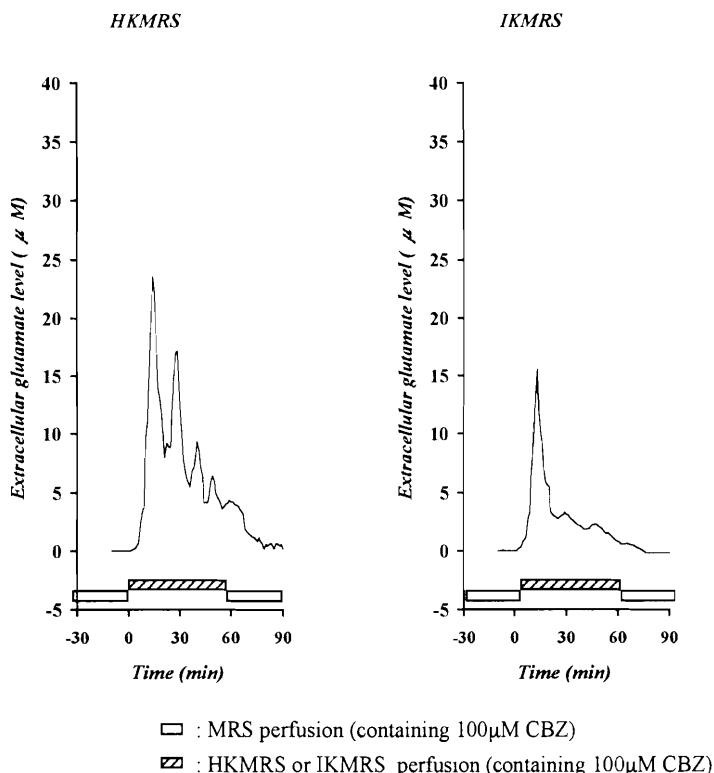
OPDA コーティング前処置を行った後、glutamate oxidase 100 U/ml を含有した PMRS を細胞外 GLU 濃度測定用 electrode (Sycopel, UK) に充填し、これに薬物投与用 microdialysis probe (EICOM, Kyoto)

を装着した MEB を、体重 250~300 g の雄生 Wistar 系ラットの海馬 ( $A=-5.8$  mm,  $L=4.8$  mm,  $V=-4.0$  mm) にウレタン (1.0 g/kg, s.c) 麻酔下で挿入した。挿入後 4~6 時間後に、probe への透析液灌流を開始した。測定値の安定を確認後、各種薬剤の投与を開始した<sup>16-18)</sup>。

### 4. Study Design

1)  $Ca^{2+}$  および  $K^+$  刺激性 GLU 遊離の測定

MEB 挿入 4~6 時間後に、microdialysis probe に MRS の灌流を開始した後に、MEB 測定値の安定化確認後、透析液を MRS から



**Fig. 3** Effects of carbamazepine on  $K^+$  evoked hippocampal glutamate release. The opened columns show the perfusion with modified Ringer's solution (MRS) including 100  $\mu$ M of carbamazepine (CBZ). The striped columns show the perfusion of each HKMRS (100 mM of  $K^+$  including modified Ringer's solution) or IKMRS (50 mM of  $K^+$  including modified Ringer's solution) containing 100  $\mu$ M of CBZ. Ordinate indicates the hippocampal extracellular glutamate level ( $\mu$ M), and abscissa indicates time in minutes (min). CBZ inhibited  $K^+$  evoked glutamate release significantly.

HKMRS, IKMRS, HCMRS, FCMRS に変更し、60 分間灌流した。

## 2) $Ca^{2+}$ および $K^+$ 刺激性 GLU 遊離に対する ZNS, CBZ の効果の検討

MEB 挿入 4~6 時間後に、microdialysis probe に MRS の灌流を開始した後に、MEB 測定値の安定化確認後、CBZ (100  $\mu$ M) あるいは ZNS (1 mM) を溶解した MRS に変更した。MEB 測定値の安定化確認後、透析液を CBZ (100  $\mu$ M) あるいは ZNS (1 mM) 含有 HKMRS, IKMRS, HCMRS, FCMRS に変更し、60 分間灌流した。

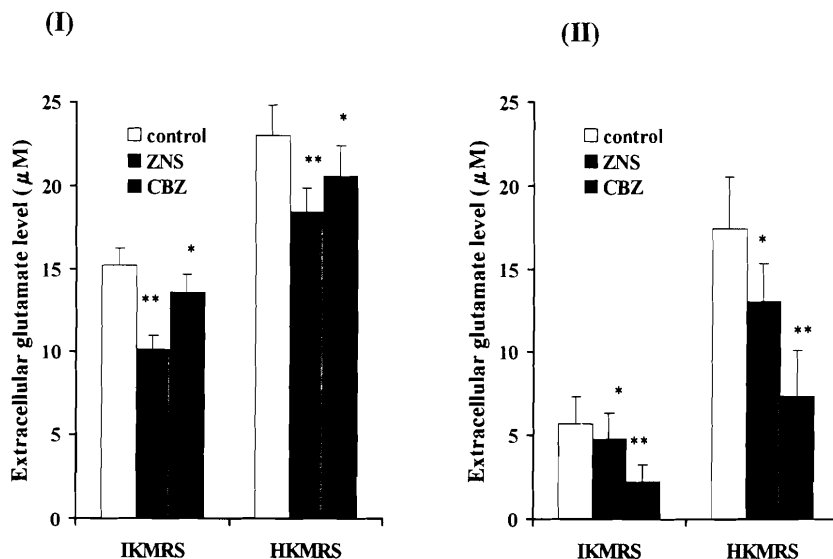
## 5. CBZ, ZNS 移行率測定

CBZ (100  $\mu$ M), ZNS (1 mM) 灌流による、脳実質への移行率は *in vitro* 実験により測定した<sup>5, 15, 18)</sup>。

## 結 果

### 1. CBZ, ZNS 移行率

CBZ および ZNS の移行率は、それぞれ  $20.2 \pm 1.9\%$ ,  $18.7 \pm 2.6\%$  であった。これらの結果から、脳実質の CBZ 濃度は 20.2  $\mu$ M, ZNS は 187  $\mu$ M で、有効濃度範囲内と予測された<sup>9, 14, 15, 18, 19)</sup>。



**Fig. 4** Comparison between the effects of antiepileptic drugs on K<sup>+</sup> evoked hippocampal glutamate release.

The hippocampal extracellular glutamate release was measured in perfusates for 60 min during perfusion with HKMRS (100 mM of K<sup>+</sup> including modified Ringer's solution) or IKMRS (50 mM of K<sup>+</sup> including modified Ringer's solution) containing 1mM of ZNS (stripped column), 100 μM of CBZ (closed column) or no agent (opened column: control).

(I) indicates the effects of ZNS and CBZ on initial transient rise of K<sup>+</sup> evoked hippocampal glutamate release. Ordinate indicates the mean levels of initial transient rise of K<sup>+</sup> evoked hippocampal glutamate release (mean ± SD, n=6), and abscissa indicates time in minutes (min).

(II) indicates the effects of ZNS and CBZ on later phasic rises of K<sup>+</sup> evoked hippocampal glutamate release. Ordinate indicates the mean levels of later phasic rises of K<sup>+</sup> evoked hippocampal glutamate release (mean ± SD, n=6), and abscissa indicates time in minutes (min). These data were analyzed statistically by two-way analysis of variance with Tukey's multiple comparison test (\*\*:p<0.01, \*:p<0.05).

## 2. Ca<sup>2+</sup> および K<sup>+</sup> 刺激性 GLU 遊離

Ca<sup>2+</sup> および K<sup>+</sup> 刺激による、細胞外 GLU 濃度の増加を Fig. 1 に示した。FCMRS および HCMRS 灌流は細胞外 GLU 濃度に影響を与えなかった (data not shown)。HKMRS 灌流刺激では、刺激開始直後に一過性の急激な初期増加が認められ、以後多相性の増加が間歇的に出現した (Fig. 1)。IKMRS 灌流刺激では、初期増加は認められたが、多相性間歇的増加は認められず、これに代わり緩徐な増加相が認められた (Fig. 1)。

## 3. K<sup>+</sup> 刺激性 GLU 遊離に対する ZNS, CBZ の効果

CBZ, ZNS の K<sup>+</sup> 刺激性細胞外 GLU 濃度の増加に対する効果を Fig. 2, 3, 4 に示した。両剤共に、HKMR, IKMRS 灌流刺激による GLU 遊離を抑制した。ZNS は CBZ に比し、初期増加抑制効果が強く (Fig. 2, 4), 逆に CBZ は ZNS に比し、HKMRS 灌流刺激により生じた多相性間歇的増加、そして、IKMRS 灌流刺激時に生じた緩徐な増加相に対して抑制効果が強く認められた (Fig. 3, 4)。

## 考 察

GLU 遊離形式は数多く検討され、細胞外  $K^+$  濃度の増加による GLU 遊離の増加 ( $K^+$  sensitive) は確認されている<sup>25)</sup>。一方、細胞外  $Ca^{2+}$  濃度の減少による細胞外 GLU 濃度の減少 ( $Ca^{2+}$  dependent) は認められていない<sup>26)</sup>。本実験結果も同様に、 $K^+$  sensitive,  $Ca^{2+}$  independent 遊離形式のみ認められた。

MEB を用いた real time monitoring により、 $K^+$  灌流刺激による GLU 遊離の増加は、一過性初期増加、そして HKMRS 灌流時には、一過性初期増加に引き続き多相性間歇的増加、また IKMRS 灌流刺激時には、多相性間歇的増加は認められず、緩徐な増加相の3種類の増加相が確認された。

*In vitro* 実験では、電極外  $K^+$  濃度を 0 mM から 100 mM に増加した場合の電位変化は、GLU 濃度 2~3  $\mu$ M の増加相当の増加に留まったこと、そして一過性初期増加は細胞外  $K^+$  濃度依存性に増加したことから、 $K^+$  濃度の増加により生じる神経細胞の脱分極由来の GLU 遊離であるものと推察される。IKMRS 灌流刺激は  $K^+$  刺激を継続して行っているにも関わらず、一過性初期増加後、緩徐な増加相に移行していることから、海馬神経細胞群の  $K^+$  刺激に対する脱感作により生じている可能性が示唆される。また、HKMRS 灌流刺激時にのみ認められた多相性間歇的増加相は、IKMRS 灌流時には認められなかったことから、 $K^+$  刺激により生じた神経細胞の興奮とは異なる機序、例えば spreading depression 等の現象により生じている可能性もある<sup>13)</sup>。細胞外  $K^+$  濃度の増加により生じる神経伝達物質遊離の増加は、細胞外  $K^+$  濃度の増加により生じる神経細胞の脱分極によるものと解釈されているが<sup>25)</sup>、本実験結果からは、 $K^+$  刺激により生じる GLU 遊離は脱分極だけでは十分に説明し得ない。今後、生理学的な検討も加えて、さらに詳細な検討をする必要があるものと考えられる。

中枢神経系内 GLU 系機能の過剰亢進は、けいれん発作発現機序に関与することが多くの実

験から証明されている。しかし、けいれん誘発物質投与によるけいれんモデルでは、けいれん発作前後の細胞外 GLU 濃度の変化は認められていない<sup>11, 12)</sup>。一方、ヒトてんかん患者、kindling ラットでは<sup>23)</sup>、てんかん発作発現前、あるいはてんかん発作時に細胞外 GLU 濃度の増加が認められている<sup>2, 3, 20)</sup>。すなわち、GLU 系機能の亢進は、けいれん発作発現機序となりうるが、けいれん発作中 GLU 遊離亢進が生じないことから、けいれん発作伝搬には GLU 系機能亢進は関与せず、逆にてんかん発作中には GLU 遊離亢進が生じていることから、てんかん発作伝搬に GLU 系機能亢進が関与する可能性が示唆される。

今回検討した、CBZ, ZNS 両剤は  $K^+$  刺激性 GLU 遊離 3 様式すべてを抑制したが、この作用機序として、両剤の電位依存性  $Na^+$  チャンネル抑制効果<sup>7, 8, 19, 21)</sup>、そして、 $K^+$  依存性 GLU 遊離を抑制することが知られている<sup>27)</sup> 抑制性神経伝達物質 monoamine 系の機能亢進作用が関与している可能性がある<sup>14, 15, 18, 19)</sup>。しかし、ZNS は初期増加相抑制作用が強く、CBZ は多相性間歇的増加相、緩徐な増加相抑制効果が強かったことから、両剤の抗てんかん作用のスペクトラムが異なる可能性が高い。これまでの検討から、ZNS の全般発作、あるいは二次性全般化抑制作用が報告されている<sup>10)</sup>。本研究における ZNS の一過性初期増加相抑制作用も、ZNS の二次性全般化抑制作用を示唆しうるものであり、ZNS の臨床的な二次性全般化抑制作用の一端を説明するものと考えられる。

## 文 献

- 1) Asai, S., Iribe, Y., Kohno, T., et al. (1996) Real time monitoring of biphasic glutamate release using dialysis electrode in rat acute brain ischemia. *Neuroreport* 7, 1092-1096.
- 2) Carlson, H., Ronne-Engstrom, E., Ungerstedt, U., et al. (1992) Seizure related elevations of extracellular amino acids in human focal epilepsy. *Neurosci Lett* 140, 30-32.
- 3) During, M.J. and Spencer, D.D. (1993) Ex-

- tracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain. *Lancet* **341**, 1607–1610.
- 4) Gruenthal, M., Armstrong, D.R., Ault, B., et al. (1986) Comparison of seizures and brain lesions produced by intracerebroventricular kainic acid and bicuculline methiodide. *Exp Neurol* **93**, 621–630.
  - 5) Juergens, S.U. (1987) Simultaneous determination of zonisamide and nine anti-epileptic drugs and metabolites in serum. *J Chromatogr* **385**, 233–240.
  - 6) Loiseau, P. and Uche, B. (1995) Carbamazepine: Clinical Use. In; *Antiepileptic Drugs*, Fourth Edition, eds by Levy, R.H., Mattson, R.H. and Meldrum, B.S., 555–566, Raven Press, New York.
  - 7) Macdonald, R.L. (1995) Carbamazepine: Mechanisms of action. In; *Antiepileptic Drugs*, Fourth Edition, eds by Levy, R.H., Mattson, R.H. and Meldrum, B.S., 491–498, Raven Press, New York.
  - 8) Macdonald, R.L. and Meldrum, B.S. (1995) General Principles, Principle of antiepileptic drugs action. In; *Antiepileptic Drugs*, Fourth Edition, eds by Levy, R.H., Mattson, R.H. and Meldrum, B.S., 61–77, Raven Press, New York.
  - 9) Masuda, Y., Utsui, Y., Shiraishi, T., et al. (1975) Relationships between plasma concentration of diphenylhydantoin, phenobarbital, carbamazepine and 3-sulfamoylmethyl-1,2-benzisoxazole (AD810), a new anticonvulsant agent, and their anticonvulsant or neurotoxic effects in experimental animals. *Epilepsia* **20**, 623–633.
  - 10) Masuda, Y., Karasawa, T., Shiraishi, Y., et al. (1980) 3-Sulfamoylmethyl-1,2-benzisoxazole, a new type of anticonvulsant drug. Pharmacological profile. *Arzneimittelforschung* **30**, 477–483.
  - 11) Millan, M.H., Chapman, A.G. and Meldrum, B.S. (1993) Extracellular amino acid levels in hippocampus during pilocarpine-induced seizures. *Epilepsy Res* **14**, 139–148.
  - 12) Millan, M.H., Obrenovitch, T.P., Sarna, G.S., et al. (1991) Changes in rat brain extracellular glutamate concentration during seizures induced by systemic picrotoxin or focal bicuculline injection: an *in vivo* dialysis study with on-line enzymatic detection. *Epilepsy Res* **9**, 86–91.
  - 13) Obrenovitch, T.P., Richards, D.A., Sarna, G.S., et al. (1995) Combined intracerebral microdialysis and electrophysiological recording: methodology and applications. *J Neurosci Methods* **47**, 139–145.
  - 14) Okada, M., Kaneko, S., Hirano, T., et al. (1992) Effects of zonisamide on extracellular levels of monoamine and its metabolites, and on  $Ca^{2+}$  dependent dopamine release. *Epilepsy Res* **13**, 113–119.
  - 15) Okada, M., Kaneko, S., Hirano, T., et al. (1995) Effects of zonisamide on dopaminergic system. *Epilepsy Res* **22**, 193–205.
  - 16) Okada, M., Mizuno, K., Okuyama, M., et al. (1996a) Magnesium ion augmentation of inhibitory effects of adenosine on dopamine release in the rat striatum. *Psychiatry Clin Neurosci* **50**, 147–156.
  - 17) Okada, M., Mizuno, K. and Kaneko, S. (1996b) Adenosine  $A_1$  and  $A_2$  receptors modulate extracellular dopamine levels in rat striatum. *Neurosci Lett* **212**, 53–56.
  - 18) Okada, M., Kiryu, K., Kawata, Y., et al. (1997a) Determination of the effects of caffeine and carbamazepine on striatal dopamine release by *in vivo* microdialysis. *Eur J Pharmacol* **321**, 181–188.
  - 19) Okada, M., Hirano, T., Mizuno, K., et al. (1997b) Biphasic effects of carbamazepine on the dopaminergic system in rat striatum and hippocampus. *Epilepsy Res* **28**, 143–153.
  - 20) Ronne-Engstrom, E., Hillered, L., Flink, R., et al. (1992) Intracerebral microdialysis of extracellular amino acids in the human epileptic focus. *J Cereb Blood Flow Meta* **12**, 873–876.
  - 21) Seino, M., Naruto, S., Ito, T., et al. (1995) Other Antiepileptic Drugs: Zonisamide. In; *Antiepileptic Drugs*, Fourth Edition, eds by Levy, R.H., Mattson, R.H. and Meldrum, B.S., 1011–1023, Raven Press, New York.
  - 22) Steppuhn, K.G. and Turski, L. (1993) Modulation of the seizure threshold for excitatory amino acids in mice by antiepileptic drugs and chemoconvulsants. *J Pharmacol Exp Ther* **265**, 1063–1070.

- 23) Ueda, Y. and Tsuru, N. (1994) Bilateral seizure-related changes of extracellular glutamate concentration in hippocampus during development of amygdaloid kindling. *Epilepsy Res* **18**, 85–88.
- 24) Takano, K., Tanaka, T., Fujita, T., et al. (1995) Zonisamide: Electrophysiological and metabolic changes in kainic acid-induced limbic seizures in rat. *Epilepsia* **36**, 644–648.
- 25) Westerink, B.H.C., Damsma, G., Rollema, H., et al. (1987) Scope and limitations of *in vivo* brain dialysis: a comparison of its application to various neurotransmitter systems. *Life Sci* **41**, 1763–1776.
- 26) Westerink, B.H.C., Hofsteede, H.M., Damsma, G., et al. (1988) The significance of extracellular calcium for the release of dopamine, acetylcholine and amino acid in conscious rats, evaluated by brain microdialysis. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **337**, 373–378.
- 27) Yamamoto, B.Y. and Davy, S. (1992) Dopamine modulation of glutamate release in striatum as measured by microdialysis. *J Neurochem* **58**, 1736–1742.

## Summary

### **Effects of Zonisamide and Carbamazepine on $\text{Ca}^{2+}$ and $\text{K}^{+}$ evoked Hippocampal Glutamate Releases**

Motohiro Okada, Yuko Kawata, Kazuhiro Kiryu, Kazumaru Wada,  
Kazuhisa Mizuno, Hiroichi Tasaki and Sunao Kaneko

The effects of antiepileptic drugs, carbamazepine (CBZ) and zonisamide (ZNS) on  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{K}^{+}$  evoked hippocampal glutamate releases were monitored by using dialysis electrode in an attempt to elucidate their antiepileptic mechanisms of action. An increase in extracellular  $\text{K}^{+}$  level produced concentration-dependent rise of hippocampal extracellular glutamate. This  $\text{K}^{+}$  evoked hippocampal glutamate release was composed of two phasic rises which were composed of an initial transient rise and a series of multiple phasic rises. An increase in extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  level did not affect hippocampal extracellular glutamate level, however, an increase in extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  level enhanced  $\text{K}^{+}$  evoked hippocampal glutamate release. Therapeutic concentration of both CBZ and ZNS did not affect basal hippocampal extracellular glutamate level, whereas these antiepileptic drugs inhibited  $\text{K}^{+}$  evoked hippocampal glutamate release. In addition, therapeutic concentration of CBZ and ZNS inhibited the stimulatory effects of  $\text{Ca}^{2+}$  on  $\text{K}^{+}$  evoked hippocampal glutamate release. These results indicate that, at least partially, glutamate is involved in the mechanisms of antiepileptic action of CBZ and ZNS.

**Ann. Rep. Jpn. Epi. Res. Found. 1997 ; 9 : 97–104**