

## 熊本大学学術リポジトリ

### Kumamoto University Repository System

Title	てんかんモデル（キンドリング）におけるdipotassium clorazepateの抗てんかん効果
Author(s)	天野, 浩一郎
Citation	
Issue date	2008-03-11
Type	Thesis or Dissertation
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2298/11189">http://hdl.handle.net/2298/11189</a>
Right	

学 位 論 文

Doctor's Thesis

論文題名： てんかんモデル (キンドリング) における dipotassium

clorazepate の抗てんかん効果

(Anticonvulsant effect of dipotassium clorazepate on kindling)

著者名： 天野浩一郎  
Koichiro Amano

指導教員名：熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻神経精神科学 池田学教授

審査委員名： 神経内科学担当教授 内野誠  
小児発達学担当教授 三池輝久  
総合診療科学担当教授 木川和彦  
薬剤情報分析学担当教授 入江徹美

2007 年度

## 目次

① 要旨.....	p 1
② 学位論文の骨格となる参考論文①関連論文および、 参考論文②その他の論文のリスト.....	p 2
③ 謝辞.....	p 2
④ 略語一覧.....	p 2
⑤ 研究の背景と目的.....	p 3
⑥ 実験方法.....	p 3
⑦ 実験結果.....	p 6
⑧ 考察（文献的考察を含む）.....	p 12
⑨ 結語.....	p 13
⑩ 参考文献.....	p 13

[ 要 旨 ] 抗 不 安 薬 である dipotassium clorazepate ( DC, 7-chloro-1,3-dihydro-2-oxo-5-phenyl-1H-1, 4-benzodiazepine-3-carboxylate potassium hydroxide) の抗てんかん効果の有無と特徴について、てんかんモデルであるキンドリングモデルを用いて検討した。Wistar 系成熟雄性ラットを用いて左背側海馬に電極を留置し 1 週間後に左海馬を後発射誘発閾値 (ADT) 強度で刺激を開始した。1 日 1 回刺激を繰り返し 5 回の全般化痙攣 (Racine の stage 5) 発作を誘発した後に刺激強度を下げて全般化痙攣誘発閾値 (GST) を求めた。DC は 0.5 mg/kg、1.0 mg/kg、2.0 mg/kg、5 mg/kg を腹腔内投与しその 30 分後に GST 強度で刺激をした。DC は 1.0 mg/kg 以上の投与量で抗てんかん効果を認めたが、辺縁系の発作 (Racine の stage 0,1,2) は完全には抑制困難であった。DC は 5 mg/kg を投与しても後発射を完全には抑制できなかった。さらに刺激強度を上げて刺激したが、DC の抗てんかん効果には影響は与えなかった。

次に別のラット群を用いて左扁桃核に刺激電極を留置し 1 週間の回復期間を経て刺激し ADT を求めた後、左扁桃核を 1 日 1 回 ADT 強度で刺激した。DC 5 mg/kg を腹腔内投与しその 30 分後に左扁桃核を刺激する操作を繰り返し扁桃核キンドリングの進展に及ぼす DC の影響を検討した。DC はコントロール群に比較して有意に扁桃核キンドリングの進展を遅延させた。DC は最初の 7 回の刺激まで刺激反対側の運動皮質の後発射持続時間が刺激部位の後発射持続時間と比較して有意に短かったが、コントロール群では刺激反対側の運動皮質の後発射持続時間は刺激部位の後発射持続時間と比較して最初の 3 回のみで短かった。

次に海馬キンドリングおよび扁桃核キンドリングが完成したラット群に対して連続 7 日間 0.5 mg/kg、1 mg/kg、2 mg/kg、5 mg/kg を投与し GST 強度で刺激する操作を繰り返し抗てんかん効果の変化を比較した。DC は 2 mg/kg と 5 mg/kg 投与で扁桃核キンドリング発作を有意に抑制した一方、海馬キンドリング発作は 1 mg/kg 以上の投与で有意に抑制した。

さらに扁桃核キンドリングが完成した別のラット群を用いて DC 5 mg/kg と diazepam 5 mg/kg を投与して 30 分後に刺激をする操作を 10 日間行い抗てんかん効果の変化を比較した。Tolerance は DC 投与群では発作 stage で投与 6 日後に、後発射持続時間で投与 7 日後に、発作潜時で投与 4 日後に出現したのに対して、diazepam 投与群では発作 stage で投与 4 日後に、後発射持続時間で投与 4 日後に、発作潜時で投与 3 日後に出現した。Tolerance が出現した際の血清 desmetyldiazepam 濃度と出現していない時の desmetyldiazepam 濃度は diazepam 群と DC 群とで有意差はみられなかった。

以上より DC は海馬・扁桃核キンドリング発作に対して抗てんかん効果を有し、その作用は主としてキンドリング焦点の発作閾値の上昇作用より後発射の伝播を減衰させる作用によると考える事が合理的であると考えられた。DC の抗てんかん効果を扁桃核キンドリングと海馬キンドリングで比較検討した結果、抗てんかん効果の有効量の相違から海馬と扁桃核キンドリングの関連する神経機構が必ずしも同一でない可能性が推察された。DC

の反復投与では tolerance の出現がみられたが、diazepam より tolerance の出現は遅くその出現と血中濃度との関連がなかった事より tolerance は metabolic なものより functional な要因の関与が推察された。以上より DC は今後てんかんの治療薬としての可能性を検討してみる価値があると考えられた。

#### [参考論文]

1. Kouichiro, Amano., Junichi, Takamatsu., Hisakazu, Kaneyama., Chihiro, Miyazaki., Motonori, Deshimaru., Shiro, Sumiyoshi., Akira, Ogata., and Taihei, Miyakawa. Anticonvulsant effects of dipotassium clorazepate on hippocampal kindled seizures in rats. *Psychiatry. Clin. Neurosci.* 52: 459-462, 1998.
2. Kouichiro, Amano., Junichi, Takamatsu., Akira, Ogata., Shouichi, Katsuragi., Chihiro, Miyazaki., C., Motonori, Deshimaru., Shiro, Sumiyoshi., and Taihei, Miyakawa. Effect of dipotassium clorazepate on amygdaloid-kindling and comparison between amygdaloid- and hippocampal-kindled seizures in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 385: 111-117, 1999.
3. Kouichiro, Amano., Shouichi, Katsuragi., Junichi, Takamatsu., Akira, Ogata., Chihiro, Miyazaki., Motonori, Deshimaru., and Taihei, Miyakawa. Differences between the tolerance characteristics of two anticonvulsant benzodiazepines in the amygdaloid-kindled rat. *Life. Sci.* 69: 1049-1055, 2001.

**[謝辞]** 御指導・御校閲を頂いた熊本大学医学教育部博士課程臨床医科学専攻神経精神科学 池田学教授に深謝いたします。また御指導・御助言をいただきました熊本大学名誉教授 宮川太平教授、熊本大学脳神経外科学 倉津純一教授に厚く感謝いたします。研究の遂行に際しては、中尾昇一郎氏、藤岡洋介氏、久野稔之氏、若松朋大氏、大坪国宏氏、隈部ヒロ子さんに技術的な協力を得られた事に深く感謝いたします。研究に使用した Dipotassium clorazepate を快く提供し、援助してくださった大日本製薬会社（大阪市）に謝意を表します。

**[略語一覧]** DC ; dipotassium clorazepate、ADT ; after-discharge threshold、GST ; generalized-seizure triggering threshold、HPLC ; High performance liquid chromatography

**[研究の背景と目的]** 抗痙攣剤として使用されている diazepam は痙攣重積状態で経静脈的投与で有効な薬であるが、経静脈的投与で有効な症例の中に diazepam の経口的投与では必ずしも有効でない場合がある。これは半減期が短いためとされている<sup>1)</sup>。Diazepam の代謝産物である desmetyldiazepam は、動物実験での pentylenetetrazol キンドリングで diazepam とほぼ同程度の抗てんかん効果を有する事が報告されている<sup>2)</sup>。しかしながら

desmetyldiazepam は治療薬として開発されておらず desmetyldiazepam を臨床的に投与することは困難である。Dipotassium clorazepate (以下 DC) は 1960 年代後半に開発された抗不安薬である diazepam の主要な代謝産物である desmetyldiazepam が脱炭酸した構造を持っている<sup>3)</sup>。DC はヒトの体内ではその殆どが desmetyldiazepam の形で存在している<sup>4)</sup>。さらに DC は diazepam よりも血中の desmetyldiazepam の濃度が高いと報告されている<sup>4)</sup>。DC が pentylenetetrazol 誘発痙攣と electroshock テストで発作を抑制したことが報告されている<sup>5,6)</sup>。

脳のある一部を一定の刺激条件で反復して電気刺激していると、初めは行動と脳波上にわずかなてんかん様反応 (辺縁系の部分発作) を示すにすぎなかったものが、次第に反応の増強をきたしやがて全身痙攣 (二次性全般化痙攣) がみられるようになる。反復電気刺激によるこうしたてんかん様反応の増強をキンドリングという<sup>7)</sup>。キンドリングは複雑部分発作の二次性全般化痙攣モデルである<sup>7)</sup>。キンドリングモデルを用いた DC の抗てんかん効果は検討されていず、ヒトにおけるてんかん発作への効果も検討されているものは少ない<sup>8,9)</sup>。したがって DC の抗てんかん効果の有無および抗てんかん効果の特徴をてんかんモデル (キンドリング) を用いて検討する事は、従来から治療が困難であることが知られている複雑部分発作の発症メカニズムの解明に貢献できるのみならずヒトのてんかん発作の治療法の開発にとって有用であると考えられる。そこで、キンドリングモデルを用いて DC の抗てんかん効果の有無、抗てんかん効果の特徴、発作焦点部位の差異による抗てんかん効果の相違、diazepam や DC 反復投与の効果の比較について検討した。

**[対象および方法]** 成熟雄性 (10 週齢、体重 210 g-330 g) Wistar 系雄性ラットを用いた。電極は直径 0.2 mm の絶縁ステンレス線を 3 本よりあわせて 3 極の深部電極に用いた。先端を斜めに切断したものの切断面を電極の先端として刺激または脳波記録を行った。餌と水は制限せず与えた。深部電極留置は Nembutal<sup>®</sup> (50 mg/kg) を腹腔内投与して麻酔下に行った。脳定位的に Paxinos and Watson のラット脳図譜<sup>10)</sup> に従って、左側扁桃核 (anterior 3 mm; lateral 4.5 mm; vertical 8.5 mm) または左背側海馬 (anterior 2.8 mm; lateral 2.0 mm; vertical 3 mm) に深部電極を挿入し留置した。またビス電極は両側運動皮質の脳波記録のために前頭部頭蓋骨に、ラットの体をアースさせるために右上眼窩骨に、基準電極として頭骸骨の lambda から 3 mm 後方に留置した。1 週間の回復後キンドリングに供した。キンドリングは 60 Hz 正弦波 1 秒間の双極刺激を定電流刺激装置計 (NIPPON KOHDEN S-6207 A) を用いて、10  $\mu$ A で刺激を開始し後発射が誘発されるまで 10 分間隔で刺激強度を上げて行った。なお 1 日の刺激回数は 4 回以下とした。後発射が誘発される最低刺激強度を後発射誘発閾値 (after-discharge threshold ; 以下 ADT) として、以後 ADT 強度で左扁桃核ないし海馬を 1 日 1 回 (1 秒間) 刺激し脳波同時記録した。キンドリング発作は基本的に Racine の分類<sup>11)</sup> に従って分類した。すなわち stage 0 : 運動症状は伴わないが後発射はみられている、stage 1 : 顔面の痙攣、stage 2 : 口の咀嚼を伴う頭部の

點頭、stage 3：前肢の痙攣、stage 4：後肢で立ちカンガルー肢位をとる、stage 5：転倒を伴う強直・間代性痙攣である。連続 5 回の二次性全般化強直間代痙攣発作（Racine の stage 5）を確認した後、全般化痙攣が出現しなくなるまで 1 日 1 回刺激強度を 1/2 強度毎に下げた。全般化痙攣が出現しなくなったのを確認した後、さらに全般化痙攣が出現するまで 10  $\mu$ A 毎に刺激強度を上げ、全般化痙攣が出現した最初の刺激強度を全般化痙攣誘発閾値（generalized seizure triggering threshold；以下 GST）とした。GST はそれぞれの施行の前に再評価した。

#### （実験 1）海馬キンドリング発作に対する DC の抗てんかん効果（治療効果）

DC の抗てんかん効果を調べる前に、少なくとも 2 回の安定した stage 5 発作を起こしたラットを用いた。DC は生理食塩水に溶解して腹腔内投与した。DC は 0.5 mg/kg、1.0 mg/kg、2.0 mg/kg、5.0 mg/kg の投与量で生理食塩水に溶解して用量 1 ml/kg で腹腔内投与し、30 分後に GST 強度の刺激を行った。同じラットへの DC の投与間隔は、少なくとも 2 週間の間隔を開けた。また生理食塩水はコントロール群として生理食塩水のみを投与し 30 分後に刺激した。発作 stage の変化および脳波変化を観察した。

#### （実験 2）DC の抗てんかん効果に対する刺激強度の影響

10 回以上 stage 5 発作を繰り返した別の海馬キンドリング群のラットを用いて、DC を投与後に GST に 200  $\mu$ A を加えた強度の刺激を行い実験 1 と同じ方法で DC の抗てんかん効果の変化を検討した。DC の投与量は、実験 1 で明らかに抗てんかん効果が確かめられた 2.0 mg/kg と 5.0 mg/kg を用いた。GST 強度で刺激するコントロール群は DC 2.0 mg/kg と 5.0 mg/kg を用い GST 強度の刺激を行った。発作と脳波変化を比較検討した。

#### （実験 3）扁桃核キンドリング発作に対する DC の抗てんかん効果（治療効果）

キンドリングが完成したラットを用いて、DC 0.5 mg/kg、1 mg/kg、2 mg/kg、5 mg/kg の DC を生理食塩水に溶解して用量 1 ml/kg の単位で腹腔内投与し、30 分後に GST 強度の刺激を行った。発作 stage および後発射持続時間の変化を検討した。

#### （実験 4）扁桃核キンドリング進展に対する DC の効果（予防効果）

刺激電極を扁桃核に留置し、1 週間の回復後、実験 1 と同じ方法で ADT を求めた。実験 1 で明らかに抗てんかん効果が得られた DC 5.0 mg/kg を投与し、その 30 分後に ADT 強度で刺激した。刺激強度は実験中 ADT 強度で統一した。DC は 1 日 1 回最初の stage 5 発作が出現するまでもしくは 15 回の刺激回数に到達するまで投与した。コントロール群として、生理食塩水を投与して 30 分後に ADT 強度で刺激し発作 stage と後発射持続時間の変化を検討した。DC 投与群とコントロール群で比較した。

### (実験 5) 海馬および扁桃核キンドリング発作に対する DC の反復投与における抗てんかん効果の比較

他の実験で使用していない stage 5 発作を 10 回以上繰り返した他のラット群を用いて刺激を繰り返した。扁桃核キンドリングおよび海馬キンドリングが完成したラット群を用いて、実験 1 と同じ方法で連続 7 日間 1 日 1 回刺激をした。DC の投与量は実験 1 で用いた同じ投与量の DC を用いた。

### (実験 6) 扁桃核キンドリング発作に対する Diazepam と DC の反復投与における抗てんかん効果の比較

5 回以上全般化痙攣が出現した別のラット群を用いて diazepam と比較検討した。1 日 1 回 diazepam を標準溶解液に溶解して投与した。標準溶解液は、40 %プロピレングリコール、10 %エタノール、50 %蒸留水からなる溶解液に溶解した。実験方法は実験 1 と同じ方法で、DC あるいは diazepam を投与 30 分後に GST 強度の刺激をし、その操作を 24 時間間隔で 10 日間繰り返し抗てんかん効果を比較検討した。12 匹のラットは 2 つの群に分けて実験 4 で明らかな抗てんかん効果がみられた DC 5 mg/kg を投与した。コントロール群として生理食塩水群と標準溶解液群を用いた。刺激強度は実験中統一して用いた。なおラットは 10 回目の全般化痙攣が出現した 24 時間を経ても刺激を行った。

### 血中濃度の測定

実験 1 および実験 3 ではキンドリング発作終了後に、実験 5 では施行 7 日目と発作 stage が変化した時にキンドリング発作が終了した直後に、実験 6 では初回の施行と 10 回目の施行が終了してから発作が終了した直後に採血を行い、血清を -20 °C に保存して血清 desmetyldiazepam 濃度を測定した。血清 desmetyldiazepam 濃度は大日本製薬会社に依頼して HPLC 法にて測定した。主な概略は、0.5 ml の血清に 1 N KOH 2 ml と CHCl<sub>3</sub> 8 ml を加えた溶液を加えた。10 分間攪拌し 10 分間 2500 回転して遠心分離した。有機層は 40°C で乾燥のために蒸発させた。残留物は 0.2 ml の内標準液 (MeOH の中に 2 mg の diazepam) と溶解液 10 ml を HPLC に注入した。HPLC は Shimadzu LC-6A を用いて行った。解析条件は移動相 1 % の AcOH: i-PrOH: CH<sub>3</sub>CN 1.0 (20:5:10) ; 流速 1.0 ml/min、UV 吸光度 230 nm で行った。

### 副作用

薬物投与期間中ラットの行動の変化を観察した。副作用の評価は、sedation、ataxia、muscle weakness について rating scale (grade 0: none, grade 1: mild, grade 2: moderate, grade 3: severe) を用いて定量評価した。各ラット、投与量毎に総 score を出し評価した。Handling への反応を記録し、ataxia と sedation に特に注意を払った。Muscle weakness はラットの頸部と肢をつまんで評価した。Sedation は堅く動きが乏しくなってじっと静止



している時も sedation ありと評価した。

### 統計解析

後発射持続時間の変化の評価には Student's t-test を用い発作 stage の退行の評価には Fisher's exact probability test を用いた。Diazepam と DC の 10 日間反復投与における発作 stage、後発射持続時間、発作出現まで潜時に対する抗てんかん効果の比較には、repeated measures of analysis of variance (ANOVA) を用いた。ANOVA で有意差がみられた項目の測定値群と pretreatment (baseline) での測定値群との有意差の検定には Games-Howell test を用いた。

実験終了後それぞれのラットはペントバルビタールを過量投与し溜流した後、脳を取り出し 10 %ホルマリンに固定した。留置した深部電極の位置の確認は組織学的に確認した。挿入した深部電極は扁桃核および海馬に挿入されていた事を確認した。

50 %のラットでキンドリング発作を抑制するのに必要な ED<sub>50</sub> 値は Litchfield と Wilcoxon の方法<sup>12)</sup> に従って算出した。

### [結果]

(実験 1) DC は 1 mg/kg 以上で用量依存性に海馬キンドリング発作を抑制した (Table 1)。発作 stage が 3 および 4 へ退行した施行はみられず、発作 stage が 1 か 2 へ退行した施行は 14 施行 (50%) でみられた。発作 stage が完全に抑制されたのは、2 mg/kg 投与群で 7 施行中 1 施行 (3.6%)、5 mg/kg 投与群で 7 施行中 2 施行 (7.1%) にみられた。後発射持続時間がコントロール群と比較して有意に短縮されていたのは、1 mg/kg 以上の投与群でみられたが、後発射を完全に抑制することは困難であった。投与量を上げてても辺縁系発作は完全には抑制できなかった。

Table 1 Effects of single administration of DC on hippocampal kindled seizures

	Stage 0	1,2	5	Inhibition of generalization (%)	AD duration (% of baseline)	Serum desmetyldiazepam concentration (µg/ml)
Control (n = 7)	0	0	7	0	83.5	
Clorazepate						
0.5 mg/kg (n = 7)	0	1	6	14.3	62.4	0.3 ± 0.1
1.0 mg/kg (n = 7)	0	3*	4	42.9	50.5*	0.9 ± 0.3
2.0 mg/kg (n = 7)	1	5**	1	85.7	39.1*	1.9 ± 0.6
5.0 mg/kg (n = 7)	2	5**	0	100	25.1**	5.2 ± 0.5

\*P < 0.05, \*\* P < 0.01, with Fisher's exact probability test or Wilcoxon's signed rank test. AD, after-discharge. AD duration is divided by the average of AD duration before the treatment of DC and multiplied by 100. Serum desmetyldiazepam concentration is represented as the average ± SD.

血清 desmetyldiazepam 濃度は DC の投与量と線形の関連がみられた ( $Y=1.09X-0.2341$ ,  $r=0.92$ ;  $P<0.0001$ )。ED<sub>50</sub> 値は 1.1 で二次性全般化癇攣発作を抑制する 95%信頼区間は 0.7-1.7 mg/kg でその時の血清 desmetyldiazepam 濃度は 0.97 µg/ml であった。

(実験 2) 刺激強度を上げても二次性全般化癇攣や部分発作、後発射持続時間の抑制に有意な影響はなかった。(Table 2)

Table 2 Effects of stimulus intensity on the anticonvulsant efficacy of DC

	Stage 0	1,2	5	AD duration (% of baseline)
DC 2 mg/kg				
GST (n = 7)	1	5	1	39.1
GST + 200 µA (n = 7)	0	6	1	43.4
DC 5 mg/kg				
GST (n = 7)	2	5	0	25.1
GST + 200 µA (n = 7)	1	6	0	34.7

AD duration is divided by the average of AD duration before the treatment of DC and multiplied by 100

(実験 3) DC は用量依存性に扁桃核キンドリング発作を抑制した。2 mg/kg 以上の投与で後発射持続時間は有意にコントロール群よりも抑制された。(Table 3)

Table 3 Effects of single administration of DC on amygdaloid-kindled seizures

	Stage 0	1,2	5	Inhibition of generalization(%)	After-discharge duration (% of baseline)
Control	0	0	7	0	87.2
DC (mg/kg)					
0.5	0	1	6	14.3	69.1
1.0	0	3	4	42.9	48.1*
2.0	0	6**	1	85.7	35.1*
5.0	1	5**	1	85.7	29.1**

After-discharge duration is divided by the average of after-discharge duration before the treatment with DC and multiplied by 100. \*p <0.05,

\*\*p <0.01, with Fisher's exact probability test or Wilcoxon's signed rank test.

発作 stage 3 および 4 への退行は確認されなかった。発作 stage 1 および 2 への退行は 15 施行 (53.6 %) でみられ、完全な発作の抑制は 5 mg/kg 投与群で 1 施行 (3.6 %)

みられた。2 次性全般化痙攣の  $ED_{50}$  値は  $1.45 \text{ mg/kg}$  でその 95 %信頼区間は  $0.7\text{-}2.8 \text{ mg/kg}$  であった。後発射持続時間の有意な抑制は  $2 \text{ mg/kg}$  以上の投与群で見られたが、後発射の完全抑制は  $5 \text{ mg/kg}$  投与群でも 7 施行中 1 施行のみであった。扁桃核キンドリングにおける desmetyldiazepam 濃度は、DC  $0.5 \text{ mg/kg}$  投与で  $0.17 \pm 0.03 \text{ }\mu\text{g/ml}$ 、DC  $1.0 \text{ mg/kg}$  投与で  $0.35 \pm 0.06 \text{ }\mu\text{g/ml}$ 、DC  $2.0 \text{ mg/kg}$  投与で  $0.48 \pm 0.13 \text{ }\mu\text{g/ml}$ 、DC  $5.0 \text{ mg/kg}$  投与で  $1.46 \pm 0.43 \text{ }\mu\text{g/ml}$  であった。2 次性全般化の  $ED_{50}$  の投与量に相当する血清 desmetyldiazepam 濃度は  $0.41 \text{ }\mu\text{g/ml}$  であった。濃度の上昇は用量依存性がみられた。

(実験 4) DC はコントロール群に比較して有意に扁桃核キンドリングの進展を遅延させた。

(Fig. 1)

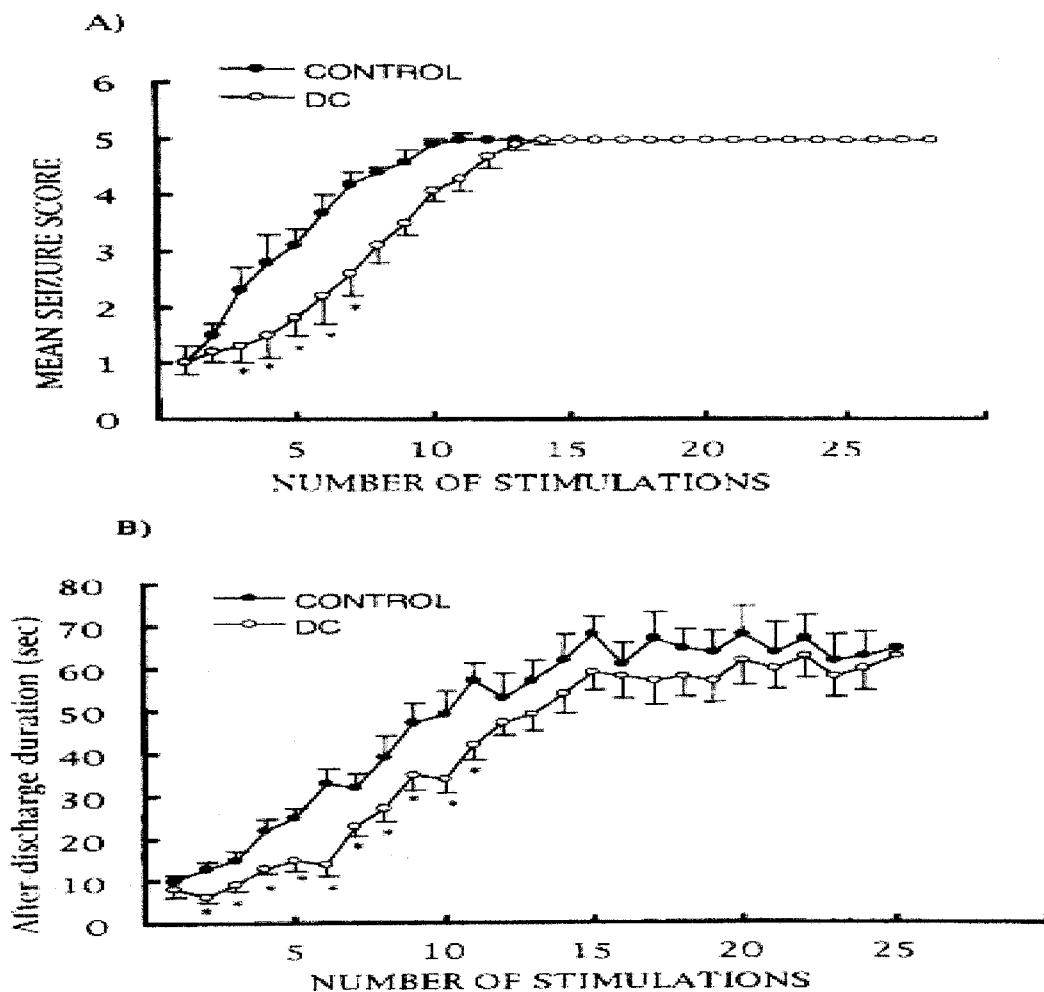


Fig. 1. Pretreatment with dipotassium clorazepate (5 mg; open circles) significantly retarded kindling. Each point represents the mean  $\pm$  S.D. \*  $P < 0.05$  with Student's *t*-test compared with control group (closed circles).

最初に stage 5 に達したのは DC 5 mg/kg 投与群では 14.1 ± 1.4 回の刺激を必要としたが、コントロール群は 10.2 ± 1.7 回の刺激で達しており有意に多くの刺激を要した。

DC は刺激開始 7 日目の刺激まで刺激反対側の運動皮質の後発射持続時間が刺激部位の後発射持続時間と比較して有意に短かったが、コントロール群では刺激反対側の運動皮質の後発射持続時間は刺激部位の後発射持続時間と比較して刺激開始 3 日目の刺激まで有意に短かった。(Table 4)

Table 4 A comparison of after-discharge duration between the contralateral motor cortex and the stimulated amygdala

	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7
DC-treated group							
Contralateral cortex	2.1 ± 0.6*	1.9 ± 0.8*	2.3 ± 1.0*	5.5 ± 0.9*	9.1 ± 1.5*	8.5 ± 1.3*	11.4 ± 2.1*
Stimulated amygdala	8.9 ± 0.8	7.5 ± 0.5	9.3 ± 0.7	12.2 ± 1.2	14.5 ± 1.0	13.5 ± 2.2	22.2 ± 1.7
Control group							
Contralateral cortex	3.5 ± 0.5*	2.2 ± 0.61	5.1 ± 0.7	17.2 ± 1.7	20.3 ± 0.8	28.3 ± 1.4	29.3 ± 1.7
Stimulated amygdala	10 ± 0.41	6 ± 0.4*	8.5 ± 0.5*	21.3 ± 1.2	23.2 ± 1.1	32.2 ± 1.0	30.5 ± 2.2

\* p < 0.05 with Student's t-test compared with after-discharge duration in the stimulated amygdala

(実験 5) 効果的な施行回数がコントロール群より多い場合 ( $\chi^2$  test) を effective とみなした (Table 5)。DC の 7 日間の反復投与では扁桃核キンドリングでは 2 mg/kg で 3 日間、5 mg/kg で 4 日間発作を抑制したが、海馬キンドリングでは 2 mg/kg で 4 日間、5 mg/kg で 5 日間発作を有意に抑制した (Table 5)。コントロール群と比較して effective な施行回数が有意に多かったのは、海馬キンドリングで 5 mg/kg 投与群であった。Tolerance の出現と扁桃核キンドリングと海馬キンドリングで有効血中濃度は有意な相違はみられなかった。

Table 5 Number of effective trials of DC in amygdaloid-kindled rats and hippocampal-kindled rats. The figure in the column indicates the number of effective trials on each day

	Amygdaloid-kindled rat					Hippocampal-kindled rat				
	Control	0.5	1	2	5	Control	0.5	1	2	5
Day 1	0	1	2	6*	6*	0	1	3	6*	7*
Day 2	0	1	2	6*	6*	0	0	3	6*	6*
Day 3	0	0	2	5**	5**	0	1	2	5**	6**
Day 4	0	1	1	4	5**	0	0	3	5**	5**
Day 5	0	0	1	2	4	0	1	2	4	5**
Day 6	0	0	0	2	2	0	1	2	3	4
Day 7	0	0	0	2	2	0	0	1	3	3

\* p < 0.01, \*\* p < 0.05

DC を 7 日間反復投与した場合の血清 desmetyldiazepam 濃度は扁桃核キンドリング群で 7 日目の施行直後に DC 0.5 mg/kg 投与で  $0.16 \pm 0.05 \mu\text{g/ml}$ 、DC 1.0 mg/kg 投与で  $0.39 \pm 0.04 \mu\text{g/ml}$ 、DC 2.0 mg/kg 投与で  $0.77 \pm 0.07 \mu\text{g/ml}$ 、DC 5.0 mg/kg 投与で  $1.22 \pm 0.55 \mu\text{g/ml}$  であった。一方海馬キンドリング群では、7 日目の施行直後に DC 0.5 mg/kg 投与で  $0.13 \pm 0.03 \mu\text{g/ml}$ 、DC 1.0 mg/kg 投与で  $0.38 \pm 0.10 \mu\text{g/ml}$ 、DC 2.0 mg/kg 投与で  $0.82 \pm 0.22 \mu\text{g/ml}$ 、DC 5.0 mg/kg 投与で  $1.41 \pm 0.38 \mu\text{g/ml}$  であった。海馬キンドリングと扁桃核キンドリングで血清 desmetyldiazepam 濃度に有意な差はみられなかった。また扁桃核キンドリングおよび海馬キンドリング間で、effective な施行と ineffective な施行では血清 desmetyldiazepam 濃度の有意な相違はみられなかった (Table 6)。

Table 6 Serum concentration of DC in amygdaloid-kindled rats and hippocampal-kindled rats.  
Values are expressed as mean  $\pm$  standard deviation

Serum concentration of DC ( $\mu\text{g/ml}$ )		
Dose	Effective trials	Ineffective trials
Amygdaloid-kindled rats		
2.0 mg/kg	$0.62 \pm 0.14$	$0.69 \pm 0.19$
5.0 mg/kg	$1.12 \pm 0.63$	$1.3 \pm 0.49$
Hippocampal-kindled rats		
1.0 mg/kg	$0.33 \pm 0.08$	$0.48 \pm 0.11$
2.0 mg/kg	$0.72 \pm 0.04$	$0.83 \pm 0.17$
5.0 mg/kg	$1.35 \pm 0.29$	$1.42 \pm 0.37$

(実験 6) DC と diazepam の 10 日間投与における各キンドリング発作のパラメータ (発作 stage、後発射持続時間、発作出現までの潜時) に対する抗てんかん効果の変化を Fig. 2 に示した。生理食塩水およびコントロール溶媒液を反復投与しても発作 stage、後発射持続時間、発作出現までの潜時に対して有意な変化はなく投与開始前 (pretreatment) と各施行を較べても有意な変化はみられなかった。

DC は 10 日間の投与では tolerance が発作 stage は投与 6 日後に、後発射持続時間は投与 7 日後に、発作出現までの潜時は投与 4 日後に出現したのに対して、diazepam 投与群では tolerance が発作 stage は投与 4 日後に、後発射持続時間は投与 4 日後に、発作出現までの潜時は投与 3 日後に出現したように DC の方が diazepam より tolerance の出現が遅かった (Fig. 2)。DC および diazepam 投与終了後はすべてのラットが刺激を行うと stage 5 発作が出現した。さらにこの 3 つの発作のパラメータはどれも pretreatment レベルと較べて有意な変化はみられなかった。

DC 投与群では、投与初日で血清 desmetyldiazepam 濃度は  $1.1 \pm 0.5 \mu\text{g/ml}$  で投与 10 日後では  $0.9 \pm 0.6 \mu\text{g/ml}$  で有意な変化はみられなかった。一方 diazepam 投与群では、投与初日で血清 desmetyldiazepam 濃度は  $0.8 \pm 0.4 \mu\text{g/ml}$  で投与 10 日後では  $1.0 \pm 0.6 \mu\text{g/ml}$  で有意な変化はみられなかった。DC と diazepam 投与群で血清 desmetyldiazepam 濃度は有意な相違はみられなかった。

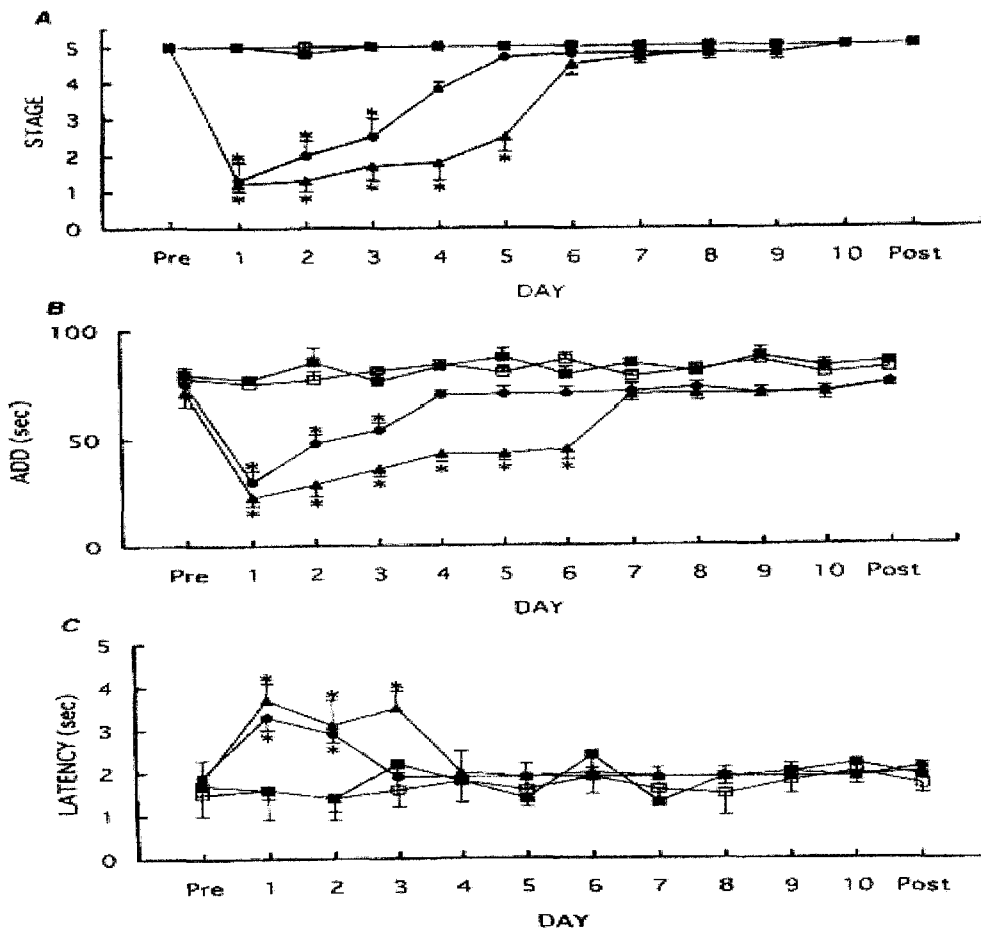


Fig. 2. Effects of dipotassium clorazepate and diazepam on daily changes in three seizure parameters. Closed square: standard vehicle; open square: physiological saline; closed circle: diazepam; closed triangle: dipotassium clorazepate; Pre: pretreatment; Post: posttreatment; ADD: After-discharge duration. Values are mean  $\pm$  S.D. Significant differences by Games-Howell test: \* $p < 0.05$  following ANOVA (repeated measure design)

#### 副作用

体重の変化はコントロール群が平均 5.8 %の増加であったのに対して DC 群は投与 7 日までに平均 4.4 %の増加であった。コントロール群と DC 群で体重の有意な変化はみられ

なかった。DC 5 mg/kg 投与群では投与 30 分後までに sedation がみられた。DC 投与群は投与初日で sedation の score が平均  $2.2 \pm 0.4$  (severe 3/15 ラット, moderate 12/15 ラット) で投与 7 日後では sedation の score が平均  $1.8 \pm 0.6$  (severe 1/15 ラット; moderate 10/15 ラット; mild 4/15 ラット) であった。Ataxia と muscle weakness は投与初日が平均  $0.4 \pm 0.5$  (mild 6/15 ラット)、平均  $0.5 \pm 0.2$  (mild 8/15 ラット) であった。投与 7 日後には ataxia と muscle weakness は平均  $0.2 \pm 0.4$  (mild 2/15 ラット)、平均  $0.3 \pm 0.5$  (mild 4/15 ラット) であった。

### [考察]

DC は用量依存性に海馬キンドリング発作を抑制した。その抑制の特徴としては、二次性全般化癇攣発作は抑制したが、辺縁系の部分発作は高用量を用いても抑制する事が困難であった。二次性全般化癇攣を抑制するよりも辺縁系の部分発作を抑制する方がより薬物は高用量を要すると報告されている<sup>13, 14, 15)</sup>。Wise らは運動発作の抑制は後発射出現の抑制か後発射伝播の抑制によると強調している<sup>16)</sup>。DC は投与量を上げてても焦点部位の後発射を完全には抑制することは困難であった。先行研究では刺激強度がキンドリングモデルで抗てんかん効果に影響するという報告<sup>15, 17)</sup>がある。今回の検討では、刺激強度を上げてても DC の抗てんかん効果は影響を受けなかった。以上より DC の抗てんかん効果は主としてキンドリング焦点での発作閾値の上昇作用より後発射伝播の減衰によると考えるのが妥当のように推察された。

血清 desmetyldiazepam 濃度は服用後 30 分から 1 時間で最高濃度に達すると報告されている<sup>4)</sup>。ベンゾジアゼピン系薬物の抗てんかん効果を検討したほとんどの研究<sup>14, 15, 18)</sup>では、抗てんかん効果を調べる 30 分前に薬物を腹腔内投与しており今回の研究でも同じ方法を用いた。扁桃核キンドリング発作では、従来の抗てんかん薬の有効な血中濃度は、ヒトでの desmetyldiazepam の治療有効濃度とほぼ同じであったという報告がある一方<sup>17, 19)</sup>血清 desmetyldiazepam 濃度は臨床効果と関連がなかったという報告<sup>1, 20)</sup>もある。今回の二次性全般化癇攣の ED<sub>50</sub> は 1.1 で、その時の血清 desmetyldiazepam 濃度は 0.97 でその効果は用量依存性であり DC の抗てんかん効果は血清 desmetyldiazepam 濃度と関連していた。今回の研究では、DC は用量依存性に発作を抑制し、その際血清 desmetyldiazepam 濃度は上昇していたことより、DC の抗てんかん効果は desmetyldiazepam によって促進されるとした Frey ら (1988) の報告<sup>21)</sup>を支持した。

扁桃核は辺縁系の中でも最もキンドリングされやすい部位とされており<sup>7)</sup>、代表的な抗てんかん薬は扁桃核と海馬キンドリング発作で効果の相違があることが報告されている<sup>22)</sup>。そこで、扁桃核キンドリング発作に対する DC の抗てんかん効果も検討してみた結果、用量依存性に DC は扁桃核キンドリング発作を抑制した。海馬キンドリングと扁桃核キンドリング発作に対する DC の抗てんかん効果の比較検討では、海馬キンドリング発作の方が扁桃核キンドリング発作に対するよりも抑制効果が強かった。この効果の相違は他の抗てんかん薬

である zonisamide や clobazam でも報告されている<sup>22,23)</sup>。この相違は、海馬キンドリングと扁桃核キンドリングに関わる神経機構が異なる可能性が推察された。これは海馬キンドリングの後に扁桃核キンドリングを行うと扁桃核キンドリングの完成が促進されたが、逆の順番ではキンドリングの完成への促進効果はみられなかったという報告<sup>24)</sup>や、腹側扁桃核遠心路を外科的に切除しても扁桃核キンドリングに影響しなかったという報告<sup>25)</sup>からも海馬キンドリングと扁桃核キンドリングに関わる神経機構が異なる可能性を示唆していると考えられる。

抗てんかん薬の使用においては、tolerance の出現が問題となる<sup>26)</sup>。DC の投与では pentylenetetrazol 誘発痙攣において tolerance が出現したという報告<sup>27)</sup>があるが、キンドリングモデルを用いた検討はない。今回の実験ではキンドリングモデルにおいても tolerance が出現することが明らかとなったが、diazepam との比較では tolerance の出現が有意に遅かった。その理由については明らかではない。DC と diazepam との抗てんかん効果の比較では、今回の実験では DC の ED<sub>50</sub> 値は 1.45 で diazepam の ED<sub>50</sub> 値が 1.2 であった<sup>13)</sup>と報告されていることから DC と diazepam はほぼ同程度の抗てんかん効果を持つと考えられる。Diazepam と desmetyldiazepam は中枢性ベンゾジアゼピンレセプターに対してほぼ同程度の親和性があると報告されている<sup>28)</sup>。Desmetyldiazepam の内因性の活動を計算すると diazepam を 1 とした場合 diazepam の約半分(0.43)であった<sup>28)</sup>。同程度の抗てんかん効果を得るには、中枢性ベンゾジアゼピンレセプターの占有率が diazepam の 2 倍必要となる。したがって、DC の tolerance の出現が diazepam に較べて遅かったのは、中枢性ベンゾジアゼピンレセプターでの内因性の活性が低かったためであろうと推察された。DC を長期間投与するには tolerance の出現に注意する必要がある。Tolerance が出現した際には、DC を間欠的に投与したり休薬期間を設けたり、他のベンゾジアゼピン系薬剤と交互に使用するなどの工夫が必要と考えられる。

#### [結語]

DC はラットに対する抗てんかん効果があり、てんかんの治療薬としての可能性を検討してみる価値がある薬であると考えられた。

#### [参考文献]

- 1) Booker, H.E. Clorazepate dipotassium in the treatment of intractable epilepsy. JAMA. 229: 552-555, 1974.
- 2) Marcucci, F., Guaitani, A., Kvetina, J., Mussini, E., and Garattini, S. Species difference in diazepam metabolism and anticonvulsant effect. Eur. J. Pharmacol. 4: 467-470, 1968.
- 3) Mattson, R.H. The benzodiazepines. In "Antiepileptic Drugs" eds. Woodbury, D.M. pp. 497-516. Raven Press, New York, 1972.



- 4) Hoffman, D.J., and Chun, A.H.C. GLC determination of plasma drug levels after oral administration of clorazepate potassium salts. *J. Pharm. Sci.* 64: 1668-1671, 1975.
- 5) Brunaud, M., Navarro, J., Salle, J., and Siou, G. Pharmacological, toxicological, and tetraological studies on dipotassium-7-chloro-3-carboxy-1, 3-dihydro-2, 2-dihydroxy-5-phenyl-2H-1, 4-benzodiazepine clorazepate (dipotassium clorazepate, 4306 CB), a new tranquilizer. *Arzneim. Forsch.* 20: 123-124, 1970.
- 6) Plotnikoff, N.P., and O'Brien, G.S. Comparison of anticonvulsant effects of clorazepate dipotassium and diazepam: Four week anticonvulsant study in Rhesus monkeys. *Dis. Nerv. Sys.* 35: 87-90, 1974.
- 7) Goddard, G.V., McIntyre, D.C., and Leech, C.K. A permanent change in brain function from daily electrical stimulation. *Exp. Neurol.* 25:295-330, 1969.
- 8) Berchou, R., Rodin, E., and Russell, M. Clorazepate therapy for refractory seizures. *Neurology.* 31: 1483-1485, 1981.
- 9) Miribel, M.M.J., and Marinier, R. Resultats therapeutiques de quelques benzodiazepines en prise chronique dans l'epilepsie grave de l'enfant. *J.Med. Lyon.* 47: 1583-1588, 1966.
- 10) Paxinos, G., and Watson, C. In "The Rat Brain In Stereotaxic Coordinates" 2nd edn. Academic Press, New York, 1986.
- 11) Racine, R. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 32: 281-294, 1972.
- 12) Litchfield, J.T., and Wilcoxon, F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 96: 99-113, 1948.
- 13) Albertson, T.E., Joy, R.M., and Stark, L.G. A pharmacological study in the kindling model of epilepsy. *Neuropharmacol.* 23: 1117-1123, 1984.
- 14) Albright, P.S., and Burnham, W.M. Development of a new pharmacological seizure model: Effects of anticonvulsants on cortical- and amygdala-kindled seizures in the rat. *Epilepsia.* 21: 681-689, 1980.
- 15) Aston, D., and Wauquier, A. Behavioral analysis of the effects of 15 anticonvulsants in the amygdaloid kindled rat. *Psychopharmacol.* 65: 7-13, 1979.
- 16) Wise, R.A., and Chinerman, J. Effects of diazepam and phenobarbital on electrically-induced amygdaloid seizures and seizure development. *Exp. Neurol.* 45: 355-363, 1974.
- 17) Hamada, K., Ishida, S., Yagi, K., and Seino, M. Anticonvulsant effects of zonisamide on amygdaloid kindling in rats. *Neurosciences.* 16: 407-412, 1990.
- 18) Tietz, E.I., Rosenberg, H.C., and Chiu, T.H. A comprison of the anticonvulsant

- effects of 1,4 and 1,5 benzodiazepines in the amygdala-kindled rat and their effects on motor function. *Epilepsy. Res.* 3: 31-40, 1989.
- 19) Wada, J.A., Osawa, M., Wake, A., Corcoran, M.E., and Troupin, A. Acute anticonvulsant effects of diphenylhydantoin, Phenobarbital, and carbamazepine: a combined electroclinical and serum level study in amygdaloid kindled cats and baboons. *Epilepsia.* 17: 77-88, 1976.
  - 20) Wilensky, A.S., Ojemann, L.M., Temkin, N.R., Troupin, A., and Dodrill, C.B. Clorazepate and Phenobarbital as antiepileptic drugs: A double-blind study. *Neurology.* 29: 458-466, 1979.
  - 21) Frey, H.H., and Scherkl, R. Clorazepate, correlation between metabolism and anticonvulsant activity. *Eur. J. Pharmacol.* 158: 213-216, 1988.
  - 22) Kamei, C., Oka, M., Masuda, Y., Yoshida, K., and Shimizu, M. Effects of 3-sulfamoyl-methyl-1,2-benzoxazole (AD-810) and some antiepileptics on the kindled seizures in the neocortex, hippocampus and amygdala in rats. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 249: 164-176, 1981.
  - 23) Ichimaru, Y., Gomita, Y., and Moriyama, M. Effects of clobazam on amygdaloid and hippocampal kindled seizures in rats. *J. Pharmacol. Biodyn.* 10:189-194, 1987.
  - 24) Sato, M. An experimental study of epilepsy with kindling effect procedure: II. Study on the secondary epileptogenesis of hippocampal seizure with transference phenomenon. *Jpn. J. Psychiatr. Neurol.* 77: 509-522, 1975.
  - 25) Racine, R.J., Paxinos, G., Mosher, J.M., and Kairiss, E.W. The effects of various lesions and knife-cuts on septal and amygdala kindling in the rat. *Brain. Res.* 454: 264-274, 1988.
  - 26) Browne, T.R., and Penry, J.K. Benzodiazepines in the treatment of epilepsy. *Epilepsia.* 14: 277-310, 1973.
  - 27) Scherkl, R., Kurudi, D., and Frey, H.H. Tolerance to the anticonvulsant effect of clorazepate and clonazepam in mice. *Pharmacol. Toxicol.* 62:38-41, 1988.
  - 28) Gobbi, M., Barone, D., Mennini, T., and Garattini, S. Diazepam and desmetyldiazepam differ in their affinities and efficacious at central and periferal benzodiazepine receptors. *J. Pharm. Pharmacol.* 39: 388-391, 1987.