

蛍光検出高速液体クロマトグラフィーによるマウス脳内 バルプロ酸の定量とその薬理学への応用

松山賢治[Ⓡ], 宮崎長一郎, 山下達也, 市川正孝*

(1989年6月17日受理)

マウスに対してバルプロ酸 (VPA) 200 mg/kg を腹くう内投与した後, HPLC を用いて脳内及び血中の VPA 蛍光定量を行った. 同時に VPA 投与により引き起こされる脳内アミノ酸, 4-アミノ酪酸 (GABA), アスパラギン酸塩及びグルタミン酸の変化を検討した. その結果, VPA の抗てんかん作用は抑制性アミノ酸である GABA の有意な上昇と同時に, 興奮性アミノ酸であるアスパラギン酸とグルタミン酸の有意な減少に基づくものであることが実証された.

1 緒 言

バルプロ酸 (VPA) は, 広い抗てんかんスペクトルを有する薬物である¹⁾²⁾. その薬理作用は血中濃度とは一致せず, いわゆる持ち越し効果 “carried over effect” があることが指摘されている³⁾.

VPA の血中濃度測定に関して, 従来, HPLC 法ではフェナシルプロミドを用いた UV ラベル化法が繁用されてきた⁴⁾ が, 低濃度域の定量に際しては, 精度・感度の点で問題が多く, 脳内の VPA 濃度測定法などにはどうしても GC/MS⁵⁾ を使用せざるを得ない状況であった.

ところで, 近年, Yamaguchi らは, 有機酸類の簡便で高感度な定量法として, 蛍光試薬, 3-Bromomethyl-6,7-dimethoxy-1-methyl-2(1H)-quinoxalinone (Br-DMEQ) を用いる定量法を報告している⁶⁾⁷⁾. 本報告では, この優れた蛍光ラベル化剤である Br-DMEQ を VPA の HPLC による定量に適用し, 血中及び脳内の VPA の微量定量を行った. 同時に, VPA の薬理作用の本態である脳内抑制性アミノ酸 (4-アミノ酪酸: GABA) 並びに興奮性アミノ酸 (アスパラギン酸: Asp, グルタミン酸: Glu) の定量を行い, 上述の carried over effect について考察を行ったので以下に詳述する.

2 実 験

2・1 試薬及び装置

バルプロ酸ナトリウム (Lot: 71125-00) は, 協和発

酵工業より供与を受けた. *o*-Phthalaldehyde (OPA), 5-aminovaleic acid (AVA), 2-mercaptoethanol 及び各種アミノ酸は, 東京化成工業, 3-bromomethyl-6,7-dimethoxy-1-methyl-2(1H)-quinoxalinone (Br-DMEQ) は和光純薬工業, 18-crown-6 は Aldrich Chemical, 他のすべての試薬は, ナカライテクスより試薬特級品を購入し, 使用した.

アミノ酸測定に使用した高速液体クロマトグラフは, Waters 製の, モデル 510 型高圧ポンプ, 420-AC 蛍光検出器, 740 データモジュール, 680 型グラジエントコントローラー及び WISP 710 型全自動サンプルプロセッサを使用した. 又, VPA 蛍光誘導体の検出には, 島津分光蛍光 HPLC モニター RF-535 (島津製作所) を用いた.

2・2 血清及び脳内 VPA 濃度の測定

マウス (ddY, 雄, 体重約 20 g) に, バルプロ酸ナトリウムを VPA として 200 mg/kg を腹くう内投与した. 投与後 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 8.0 時間に採血し, その血清 100 μ l に内標準物質 (I.S.) として 15 μ g/ml の cyclohexanecarboxylic acid (CCA) 100 μ l を添加, かき混ぜ後, 6% 過塩素酸 (PCA) 200 μ l を添加し, 除タンパクを行った. ペンタン 2.0 ml をサンプルに加えて, 15 分間振り混ぜた後, 15 分間 3500 rpm にて遠心分離, ペンタン相を分取した. そのペンタン相に硫酸ナトリウムと炭酸カリウムをそれぞれ 10 mg ずつ入れ, 0.5 mg/ml の Br-DMEQ アセトニリル溶液を 100 μ l 添加し, 更に 2.0 mg/ml の 18-crown-6 アセトニリル溶液 100 μ l を加えた. 反応液を 50°C の水浴

* 長崎大学医学部附属病院薬剤部: 852 長崎県長崎市坂本町 7-1

中にて加温し, ペンタン相を留去し, 残留物を得た。

得られた残留物を冷却し反応停止後, 5 μ l を HPLC に注入した。

脳に関しては, 薬物投与後, 経時的に断頭, 脳を摘出し, ひょう量した。脳重量に対し倍量のリン酸緩衝液 (pH 6.0) を加えてホモジナイズした。サンプルは, 11000 rpm, 5 分間遠心分離後, 上清 300 μ l に内標準物質として 5 μ g/ml の CCA 溶液を 300 μ l 添加後, 6% PCA を 1.0 ml 加え除タンパク, 次にペンタン 8 ml を加えて抽出操作を行った。

以下の操作は, 血清中 VPA 測定と同様に行った。

HPLC の条件は, カラムに Superspher RP-18 (125 \times 6 mm i.d., 4 μ m, Merck,) を使用し, 移動相は, MeOH/CH₃CN/H₂O (49/21/30) 混合液を流量 1.0 ml/min で使用した。VPA 誘導体の検出波長は, 励起波長 370 nm, 蛍光波長 455 nm に設定した。Fig. 1 に脳より抽出した VPA 並びに内標準物質のクロマトグラムを示す。

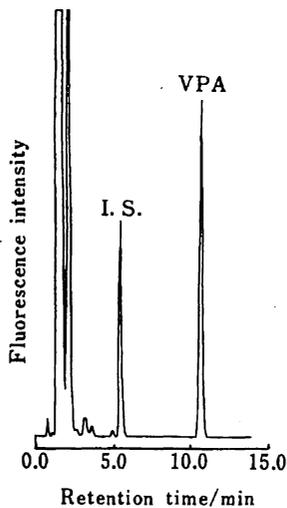


Fig. 1 Chromatogram of Br-DMEQ derivatives of CCA (I.S.) and VPA

Column: Merck Supersphere RP-18 (125 \times 6 mm i.d.); Fluorescence detection: Ex. 370 nm, Em. 455 nm; Mobile phase: 49% methanol, 21% acetonitrile and 30% water

2.3 バルプロ酸の脳内アミノ酸に及ぼす影響

マウス (ddY, 雄, 体重約 20 g) に, バルプロ酸ナトリウムを VPA として 200 mg/kg を腹くう内投与した。投与後 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 8.0 時間の後断頭し, 脳を摘出後ひょう量し, アミノ酸定量用

の内標準物質として 800 μ g/ml の AVA を 1 ml を添加後, 0.5 M トリクロロ酢酸 4 ml と共にホモジナイズした。ホモジェネートをセントリフロー CF 25 (AMICON DIV., W. R. GRACE & CO.,) を用いて 2000 rpm にて限外濾過し, 濾液をアミノ酸定量分析に使用した。

アミノ酸定量は, 著者らが先に報告した HPLC による方法⁹⁾ に準じて行った。Fig. 2 に脳内アミノ酸のクロマトグラム並びに条件を示す。

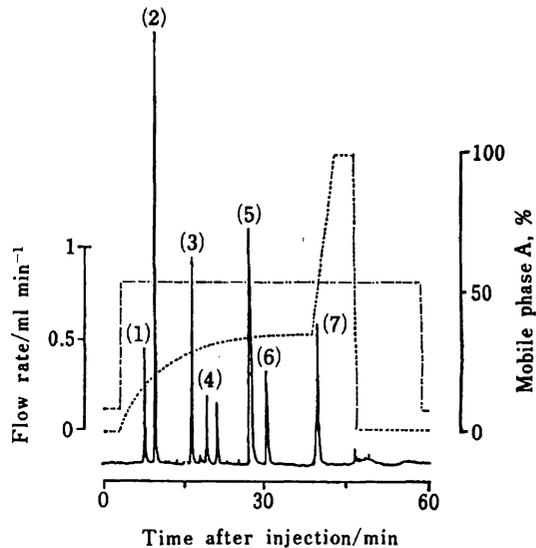


Fig. 2 Chromatogram of OPA-2-mercaptoethanol amino acid derivatives

Mobile phase was a 65% methanol and a mixture of 3% THF, 2% methanol and Na₂HPO₄-NaOAc buffer, pH 6.7, was the mobile phase B. The dotted line and the chain line represent the gradient pattern and flow rate, respectively. Numbered peaks were identified as follows: (1) aspartate; (2) glutamate; (3) glutamine; (4) glycine; (5) taurine; (6) GABA; (7) AVA (I.S.)

3 結 果

3.1 血清中及び脳内 VPA 濃度

Fig. 3 に血清中及び脳内 VPA 濃度推移を示した。図からも明らかなように, VPA の血中と脳内濃度比は約 3 で, 本薬物は比較的脳内移行性の良好な薬物であることがうかがえる。血中並びに脳内濃度に関して, one-compartment pharmacokinetic model を用いて計算した結果, 血中消失半減期は, 1.11 時間, 脳内消失半減期は, 0.99 時間となり, VPA の脳内及び血中消失パターンはほぼ同じであることが判明した。

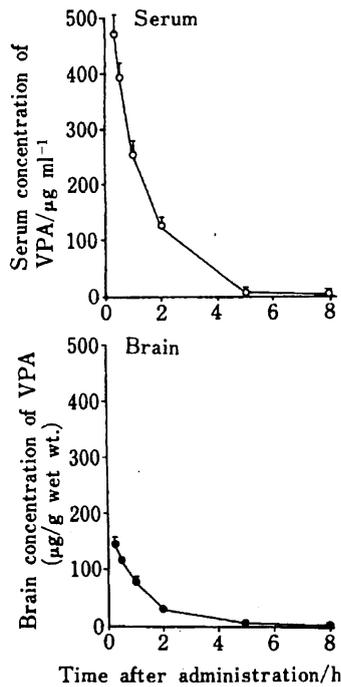


Fig. 3 Time course of VPA concentration in mouse serum (upper) and brain (down) after the intraperitoneal administration of 200 mg/kg of VPA

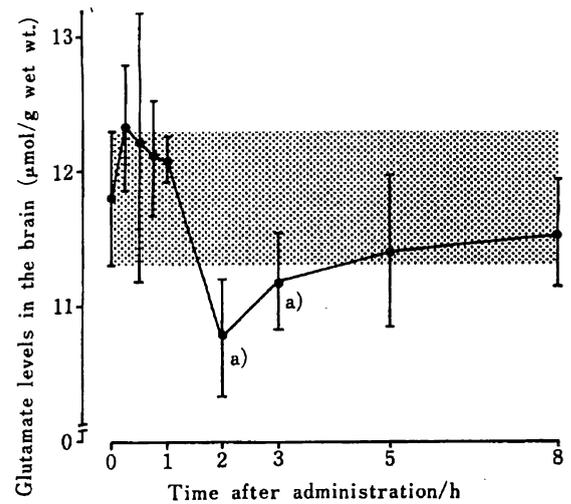


Fig. 5 Time course of glutamate levels in mouse brain after the intraperitoneal administration of 200 mg/kg of VPA

The shadowed area represents the mean \pm S.D. for levels of the control ($11.78 \pm 0.52 \mu\text{mol/g wet wt.}$, $n=6$). Vertical bars indicate standard deviation of 6 animals. Statistical significance in the two-tailed Student's *t*-test; a) $p < 0.05$

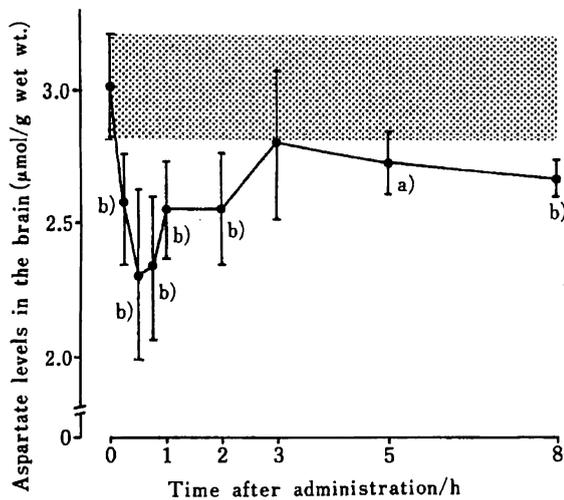


Fig. 4 Time course of aspartate levels in mouse brain after the intraperitoneal administration of 200 mg/kg of VPA

The shadowed area represents the mean \pm S.D. for levels of the control ($3.03 \pm 0.2 \mu\text{mol/g wet wt.}$, $n=6$). Vertical bars indicate standard deviation of the mean of 6 animals. Statistical significance in the two-tailed Student's *t*-test; a) $p < 0.05$, b) $p < 0.01$

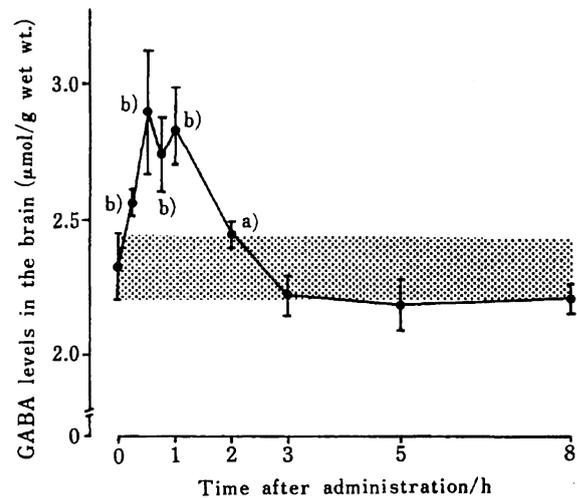


Fig. 6 Time course of GABA levels in mouse brain after the intraperitoneal administration of 200 mg/kg of VPA

The shadowed area represents the mean \pm S.D. for the control ($2.32 \pm 0.12 \mu\text{mol/g wet wt.}$, $n=6$). Vertical bars indicate standard deviation of the mean of 6 animals. Statistical significance in the two-tailed Student's *t*-test; a) $p < 0.05$, b) $p < 0.01$

3・2 VPA 投与によるマウス脳内アミノ酸の変動

ddY 雄性マウスに対して VPA 200 mg/kg を腹くう内投与し, 経時的に 6 種脳内アミノ酸 (Asp, Glu, Gln, Gly, Tau, GABA) を測定した. 有意な変化を示した Asp, Glu 及び GABA についてそれぞれ Fig. 4, Fig. 5 及び Fig. 6 に示した.

興奮性アミノ酸である Asp は, control 群に対して, VPA 投与後, 15 分で有意に減少し, 30 分後に最小値を示し, この有意な減少傾向は 8 時間まで持続した. 一方, 抑制性アミノ酸である GABA は Asp と対照的に投与後直ちに上昇し, 30 分で control 群に対し約 30% 上昇した後, 3 時間後にコントロール値に戻った. 一方, 代表的興奮性アミノ酸である Glu は投与 2 時間及び 3 時間後において有意な低下を認めた.

4 考 察

VPA の脳内アミノ酸へ及ぼす影響を VPA 脳内濃度と対比しながら経時的に検討したが, 従来から報告されているように, 抑制性神経伝達物質である GABA の有意な上昇が認められると同時に興奮性伝達物質である Asp 並びに Glu の減少が認められたことは VPA の抗てんかん作用の面から極めて興味深い.

GABA 上昇の原因としては, 従来より GABA-shunt における GABA 代謝酵素の GABA-transaminase (GABA-t)^{9)~11)} や succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH)¹²⁾ に対する酵素阻害によるものとされていたが, *in vivo* において GABA-t や SSADH を阻害するにたる VPA 脳内濃度を得るには難しいと指摘されていた¹³⁾. Nau ら¹⁴⁾ は, こうした観点から glutamic acid decarboxylase (GAD) 活性の測定を行い, GAD 活性の上昇を認め, VPA による GABA 上昇の要因を GAD に求めている. 又, Porter ら¹⁵⁾ は, *in vitro* において, Asp が GAD の強力な inactivator であるという興味深い結果を報告している. 著者らの今回の検討では, Asp の有意な減少に伴う GABA の前駆物質である Glu の減少並びに GABA の増加が連続的に認められた. 以上のことから, VPA による GABA 上昇及び Glu 減少メカニズムには, GABA-t や SSADH の直接的な酵素阻害のみならず, 生成酵素 GAD の inactivator である Asp の減少に伴う negative feedback の解除による GABA の生合成促進が関与していると推察される. Dunn ら¹⁶⁾ は, VPA の抗てんかん作用は抑制性アミノ酸である GABA と興奮性アミノ酸である Asp と Glu とのバランスで評価すべきであると指摘している. 今回の検討で, VPA の脳内濃度がほぼ消失した 8 時間にお

いて, 興奮性アミノ酸の Asp が投与後 8 時間において有意に低下しつづけるという事実は, 緒言で触れた VPA の carried over effect³⁾ との関連性が示唆され極めて興味深いものである.

本研究に際し, 有益な助言を載しました福岡大学薬学部山口政俊助教授, 原 周司博士に深謝致します. 又, バルプロ酸ナトリウムを提供して戴いた協和発酵工業に感謝致します.

文 献

- 1) R. M. Pinder, R. N. Brodgen, T. M. Speight, G. S. Avery: *Drugs*, **13**, 81 (1977).
- 2) D. Simon, J. K. Penry: *Epilepsia*, **16**, 549 (1975).
- 3) A. J. Rowan, C. D. Binnie, C. A. Warfield, J. W. A. Meijer: *Epilepsia*, **20**, 61 (1979).
- 4) M. Nakamura, K. Kondo, R. Nishioka, S. Kawai: *J. Chromatogr.*, **310**, 450 (1984).
- 5) H. Nau, W. Wittfoht, H. Schäfer, C. Jakobs, D. Rating, H. Helge: *J. Chromatogr.*, **226**, 69 (1981).
- 6) M. Yamaguchi, S. Hara, R. Matsunaga, M. Nakamura, Y. Ohkura: *J. Chromatogr.*, **346**, 227 (1985).
- 7) M. Yamaguchi, R. Matsunaga, S. Hara, M. Nakamura, Y. Ohkura: *J. Chromatogr.*, **375**, 27 (1986).
- 8) C. Miyazaki, M. Ogasawara, M. Ichikawa, K. Matsuyama, S. Goto: *J. Pharm. Dyn.*, **11**, 202 (1988).
- 9) G. Anlezark, R. W. Horton, B. Meldrum, M. C. V. Sawaya: *Biochem. Pharmacol.*, **25**, 423 (1976).
- 10) L. J. Fowler, J. Beckford, R. A. John: *Biochem. Pharmacol.*, **24**, 1267 (1975).
- 11) J. W. Van der Laan, Th. Boer, J. Bruinels: *J. Neurochem.*, **32**, 1769 (1979).
- 12) M. Maitre, L. Ossola, P. Mandel: *FEBS Lett.*, **72**, 53 (1976).
- 13) W. Löscher, G. Bohme, H. Schäfer, K. Kochen: *Neuropharmacology*, **20**, 1187 (1981).
- 14) H. Nau, W. Löscher: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **220**, 654 (1982).
- 15) T. G. Porter, D. L. Martin: *J. Neurochem.*, **48**, 67 (1987).
- 16) A. Dunn, S. C. Bondy: "Functional chemistry of the brain", (1974), (Spectrum Publications, Inc., New York).

☆

Fluorometric determination of valproic acid in mouse brain by HPLC and applications to pharmacology. Kenji MATSUYAMA, Choichiro MIYAZAKI, Tatsuya YAMASHITA and Masataka ICHIKAWA (Nagasaki University Hospital, Department of Hospital Pharmacy, 7-1, Sakamoto-machi, Nagasaki-shi, Nagasaki 852)

A fluorometric HPLC method for the determination of valproic acid (VPA) in mouse brain was developed using 3-bromomethyl-6,7-dimethoxy-1-methyl-2(1H)-quino-

xalinone(Br-DMEQ) as a prelabelling reagent. The method was used to study the interrelations among the concentrations of VPA, γ -aminobutyrate as an inhibitory amino acid and glutamate or aspartate as an excitatory amino acid in mouse brain. The brain levels of VPA decreased with a half life of 0.99 h and attained almost zero at 5 h after the intraperitoneal administration of VPA at a dose of 200 mg/kg to mice. The administration of VPA gave rise to a significant increase in γ -aminobutyrate in response to a significant decrease in aspartate and glutamate in mouse brain. In particular, aspartate continued to decrease up to 8 h after adminis-

tration whereas VPA disappeared at 5 h. The present observations are considered closely correlated to the "carried over effect" of VPA.

(Received June 17, 1989)

Keyword phrases

fluorometric HPLC; valproic acid; glutamate; γ -aminobutyrate; aspartate; pharmacokinetics of valproic acid in the brain.
