

# 鉄塩誘導てんかん原性焦点組織におけるグアニジノ化合物の変動に関する研究 — 特にラジカル反応によるグアニジノ化合物の生成について

岡山大学医学部脳代謝研究施設機能生化学部門 (主任: 森 昭胤教授)

福 島 正 登

(昭和62年2月10日受稿)

**Key words:** 鉄塩誘導てんかん原性焦点, グアニジノ化合物, ラット, ラジカル反応, メチルグアニジン

## 緒 言

鉄塩又はヘム化合物を齧歯類動物の大脳皮質に注入又は微小電極を用いて投与すると、大脳皮質の局所に浮腫、空洞性壊死及びグリオーシスが現われる。それらの経過において、脳波記録により急性のてんかん発作波の出現が認められ、その発作波は反復出現したのち、慢性てんかん焦点を形成する<sup>1-6)</sup>。鉄がニューロンの周囲部などの好脂環境に遊離されると、Fenton及びHaber-Weiss反応により活性酸素ラジカルが非酵素的に生じ、それらのラジカルにより多不飽和脂質が過酸化される<sup>7-15)</sup>。その際、構成成分の中に不飽和脂質を含む $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPaseも障害されて活性が低下する<sup>16,17)</sup>。また、抗酸化剤のビタミンEとセレンウム<sup>18)</sup>又は、抗酸化作用を有する<sup>19)</sup>小柴胡湯合桂枝加芍薬湯<sup>20)</sup>は、鉄塩誘導てんかん発作波の出現を抑制し、ビタミンEとジメチルスルホキシド(OHラジカルスカベンジャー)<sup>21)</sup>は、鉄塩投与により増加する脳内マロンジアルデヒド並びに浮腫を軽減する。これらの事実から、外傷による出血、溶血に基づくニューロン膜障害がニューロンのイオン輸送機構などの機能不全をもたらす、のちにはてんかん焦点の形成へと移行することが示唆される<sup>6, 22)</sup>。一方、発作機構への脳内神経伝達物質の関与については多くの報告がある<sup>23)</sup>が、特にモノアミンについては一般に、脳内のモノ

アミンが減少するとけいれん閾値は低下し、脳内のモノアミンが増加するとけいれん閾値は上昇するという概念が得られている<sup>24)</sup>。またアミノ酸神経伝達物質は、けいれん発現機構に密接に関与していることが知られている<sup>23)</sup>。先に我々は、鉄塩投与後の脳内モノアミン並びにアミノ酸を分析し、5-ヒドロキシトリプタミン(5-HT)は部位によりわずかながら変動することを認めしたが、ノルエピネフリン、ドーパミン、グルタミン酸、アスパラギン酸、 $\gamma$ -アミノ酪酸、グリシン及びタウリン等の値は、全く影響をうけないことを観察し、鉄塩誘導てんかん原性焦点形成には、これらの神経伝達物質含有ニューロンはそれほど大きく関与していないことを示唆した<sup>25)</sup>。

他方、グアニジノ酢酸(guanidinoacetic acid, GAA)<sup>26)</sup>、メチルグアニジン(methylguanidine, MG)<sup>27)</sup>などの多くのグアニジノ化合物は、齧歯類動物の大脳皮質上又は脳室内に投与すると、発作放電又はけいれんを誘発する<sup>28-36)</sup>。また、脳内のGAAなどのグアニジノ化合物はけいれんに伴って大きく変動することが示されている<sup>37-39)</sup>。これらの知見は、ある種のグアニジノ化合物はけいれん又は発作波の発現と密接に関係していることを示唆している。

本報告においては、鉄塩投与後、ラットの脳内グアニジノ化合物を経時的に分析した結果、脳全域のGAAとMGが鉄塩投与15~30分後に

一過性に著明に増加すること、及び投与24~48時間後には一旦正常値に回復するが、投与2ヶ月後には再び増加していることを観察した。従って、さらに脳内GAAとMGの生成経過を明らかにするため、ラット脳ホモジェネートに鉄塩と過酸化水素を加えてインキュベートし、*in vitro*におけるグアニジノ化合物とラジカルの生成について検討し、鉄塩誘導でんかん原性焦点形成メカニズムの一面をとらえた。

## 実験方法

### 第1節 実験動物

体重約250gのラット(Sprague-Dawley, 雄)を使用し、室温24°C, 湿度55%で飼育した。飼料は、オリエンタル酵母MFを使用し、水は給水ビンで自由に摂水させた。

### 第2節 てんかん原性焦点の作成

ラットをエチルエーテル麻酔下で固定後、大脳皮質、左感覚運動領野に0.1M塩化第二鉄溶液5 $\mu$ lをマイクロシリンジで、1分間に1 $\mu$ lの速さで注入した。対照群には生理食塩水5 $\mu$ lを同様に注入した。

### 第3節 グアニジノ化合物の分析

#### 1) 試料の採取

塩化第二鉄溶液注入15, 30, 60分, 24時間, 48時間及び2ヶ月後に、ラットを断頭した。次いで直ちに全脳を氷上で摘出後、Glowinski and Iversen<sup>40)</sup>の方法に従い、大脳皮質、海馬、線条体、視床下部、中脳、橋延髄及び小脳に部位別し、分析開始まで試料を-30°Cに保存した。

#### 2) グアニジノ化合物の分析

組織に1%ピクリン酸を加え、テフロン棒付ガラス管でホモジェナイズした。ついでホモジェネートを遠心分離し、得られた上清にDowex 2 $\times$ 8を加え、ピクリン酸を除去後、ろ過した。そのろ過液を減圧乾固し、残渣を0.01N塩酸(pH2.2)で溶解後、その50 $\mu$ lをフェナンスレンキノン反応を繰り込んだ高速液体クロマトグラフ(Jasco G-520, 東京)を用いて、グアニジノ化合物の分析を行なった。

なお、グアニジノ化合物の分析条件は次の通りである：カラム, Guanidino pak (4.2 $\times$ 125mm, Jasco, 東京)；カラム温度, 70°C；溶出液の流速,

1.1 ml/min；フェナンスレンキノン溶液の流速, 0.5 ml/min；水酸化ナトリウム溶液の流速, 0.5 ml/min；恒温槽, 70°C；反応コイル, 0.5 mm I.D.  $\times$  5 m；検出器, 蛍光光度計(Jasco FP-110, Ex365 nm, Em495 nm)；試料, 50 $\mu$ l；溶出液, (1)pH3.00, 0.4Nクエン酸ナトリウム緩衝液(9.5分)(2)pH3.50, 0.4Nクエン酸ナトリウム緩衝液(2.8分)(3)pH5.25, 0.4Nクエン酸ナトリウム緩衝液(2.4分)(4)pH10.0, 0.4Nクエン酸ナトリウム緩衝液(3.0分)(5)1N水酸化ナトリウム(10分)；蛍光試薬, (1)2N水酸化ナトリウム, (2)9, 10-フェナンスレンキノン/ジメチルホルムアミド(500 mg/ml)。

### 第3節 *in vitro*の実験

#### 1) 試料の作成

ラット脳組織に0.03Mトリス塩酸/0.1M塩化カリウム(1:19, pH7.4)を5倍量加え、テフロン棒付ガラス管でホモジェナイズした。次いでホモジェネート0.5mlに0.1M塩化第二鉄溶液を5 $\mu$ l, 過酸化水素を50 $\mu$ l加え、37°Cで0~90分インキュベートした。次いでグアニジノ化合物の分析には、試料に30%トリクロル酢酸を0.5ml加え、3,000回転で15分遠心した。得られた上清をグアニジノ化合物分析試料とし、分析開始まで-30°Cに保存した。またラジカルの分析には、試料を直ちに-80°Cに凍結した。

#### 2) ESRによるラジカルの分析

凍結試料を解凍後、試料を200 $\mu$ lとり、これにトラッピング剤, 5, 5-dimethyl-1-pyrroline-1-oxide (DMPO)を20 $\mu$ l加えたのち、ミキサーで攪拌後、反応液を特殊偏平水溶液セルに移し、DMPO添加60秒後よりESR spectrometer(日本電子JEOL JES-FE1 $\times$ G)を用いてOHラジカル及び過酸化中間体ラジカルを分析した。

ラジカル量は、内部標準物質に酸化マンガンを使用し、酸化マンガンの信号強度と各ラジカルの信号強度との比を求め、ついで既知スピンの数の2, 2, 6, 6-tetramethyl-4-hydroxyl-piperidine-1-oxyl (TEMPOL)の信号強度との比により、スピン数で表示した。

なお、用いたラジカルの分析条件は、次のとおりである：power, 8.0 mW；response, 0.3 sec；modulation, 0.2 mT；温度, 室温；ampli-

tude,  $3.2 \times 1,000$ ; magnetic field,  $335 \pm 5$  mT; sweep time, 0.5分.

#### 第4節 実験試薬

Guanidinosuccinic acid, guanidinopropionic acid (Sigma), N-acetylarginine  $\cdot$  H<sub>2</sub>O (Eastman), homoarginine  $\cdot$  HCl (Calbiochem), guanidine  $\cdot$  HCl 及び methylguanidine  $\cdot$  HCl (東京化成), arginine (片山化学), guanidinobutyric acid (第一薬品), creatinine (半井化学), guanidinoacetic acid (和光純薬) 及び guanidinoethanesulfonic acid (小野薬品) を使用した.

$\alpha$ -Guanidinoglutaric acid は Mori et al.<sup>38)</sup> によって合成されたものを使用した.

#### 第5節

有意差検定は, two-tailed Student's *t*-test を用いて行なった.

### 実験結果

#### 第1節 ラット脳内グアニジノ化合物

Fig. 1 A は, 12種のグアニジノ化合物標品混合液のクロマトグラムである. 左より guanidinoethanesulfonic acid (GES,  $10 \mu\text{M}$ ), guanidinosuccinic acid (GSA,  $5 \mu\text{M}$ ),  $\alpha$ -guanidi-

noglutaric acid (GGA,  $20 \mu\text{M}$ ), GAA ( $3 \mu\text{M}$ ), N-acetylarginine (NAA,  $3 \mu\text{M}$ ), guanidinopropionic acid (GPA,  $3 \mu\text{M}$ ), creatinine (CRN,  $50 \mu\text{M}$ ), guanidinobutyric acid (GBA,  $20 \mu\text{M}$ ), arginine (Arg,  $20 \mu\text{M}$ ), homoarginine (HArg,  $10 \mu\text{M}$ ), guanidine (G,  $20 \mu\text{M}$ ) 及び MG ( $20 \mu\text{M}$ ) の順にそれらの peak が出現した.

Fig. 1 B は, 対照ラット大脳皮質のグアニジノ化合物の分析例である. ラットの脳皮質, 海馬, 線条体, 視床下部, 中脳, 橋延髄及び小脳から, それぞれ GAA, NAA, CRN, GBA, Arg, HArg 及び MG が検出定量された (Fig. 2, Table 1 ~ 5).

鉄塩投与後には, グアニジノ化合物のうち GAA と MG が時間経過に従って, いずれも一過性の著しい変動を示したのち, 2ヶ月後においては有意の増加が認められた (Fig. 2 ~ 7). すなわち, GAA は, 鉄塩投与15分後に, 海馬, 視床下部, 中脳及び小脳で有意に増加し (Fig. 2), 投与30分後には線条体, 視床下部及び小脳で有意に増加していた (Fig. 3). しかし, 投与60分後には逆に, GAA は大脳皮質, 海馬, 視床下部, 中脳, 橋延髄及び小脳で有意に低下し (Fig. 4), 海馬においては投与24時間後にも低下していた (Fig. 5).

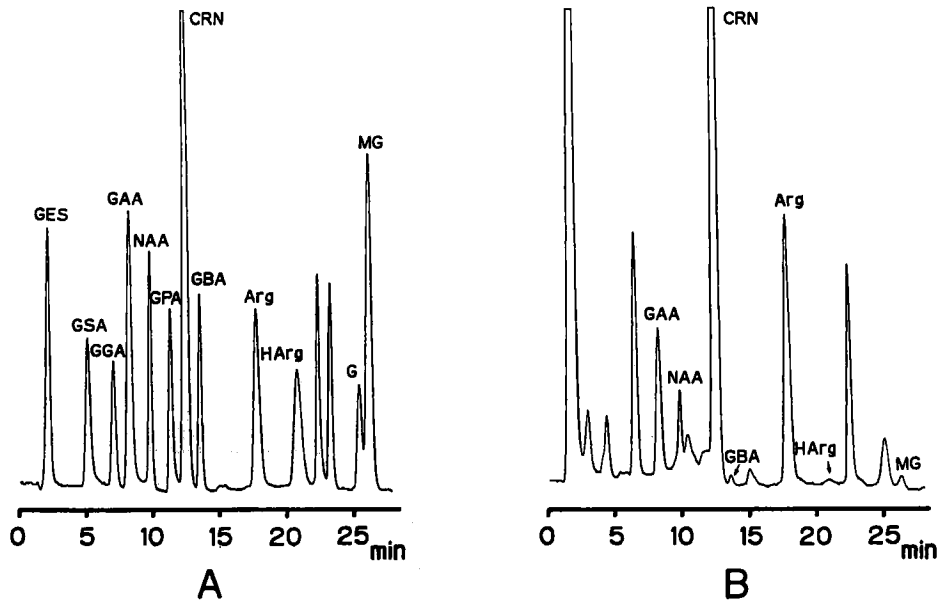


Fig. 1 Chromatogram of guanidino compounds. A. Standard substances, B. rat cortex.

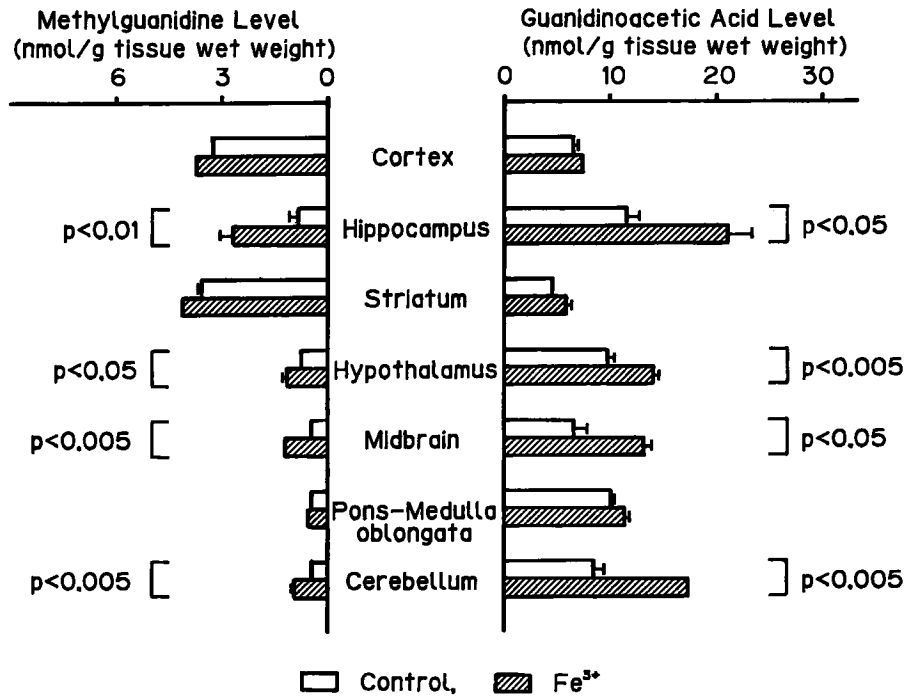


Fig. 2 Levels of methylguanidine and guanidinoacetic acid in the rat brain 15 min after ferric chloride injection. The values are means  $\pm$  SEM of 5 determinations.

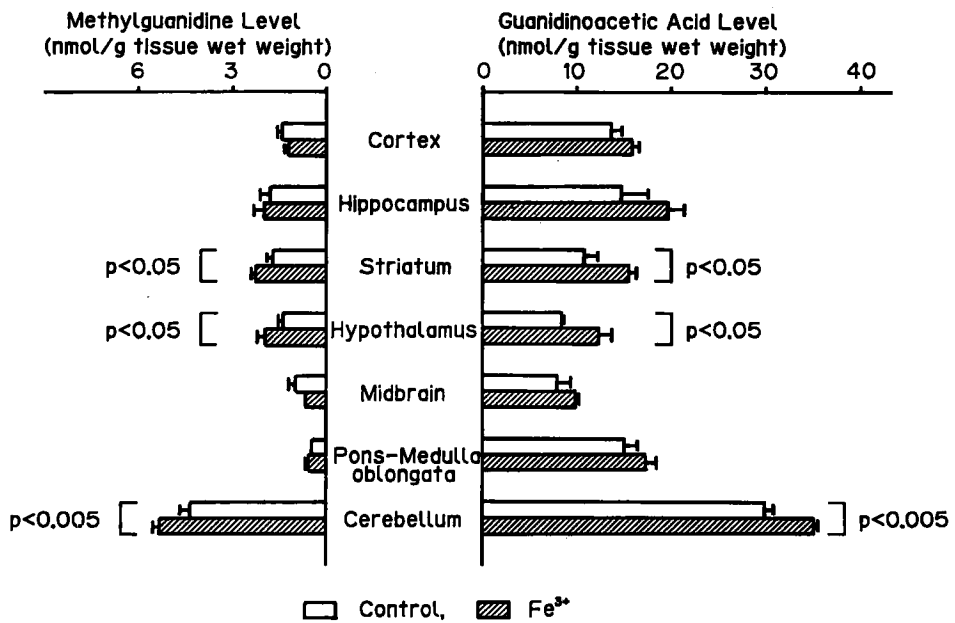


Fig. 3 Levels of methylguanidine and guanidinoacetic acid in the rat brain 30 min after ferric chloride injection. Values are means  $\pm$  SEM of 6 to 7 determinations.

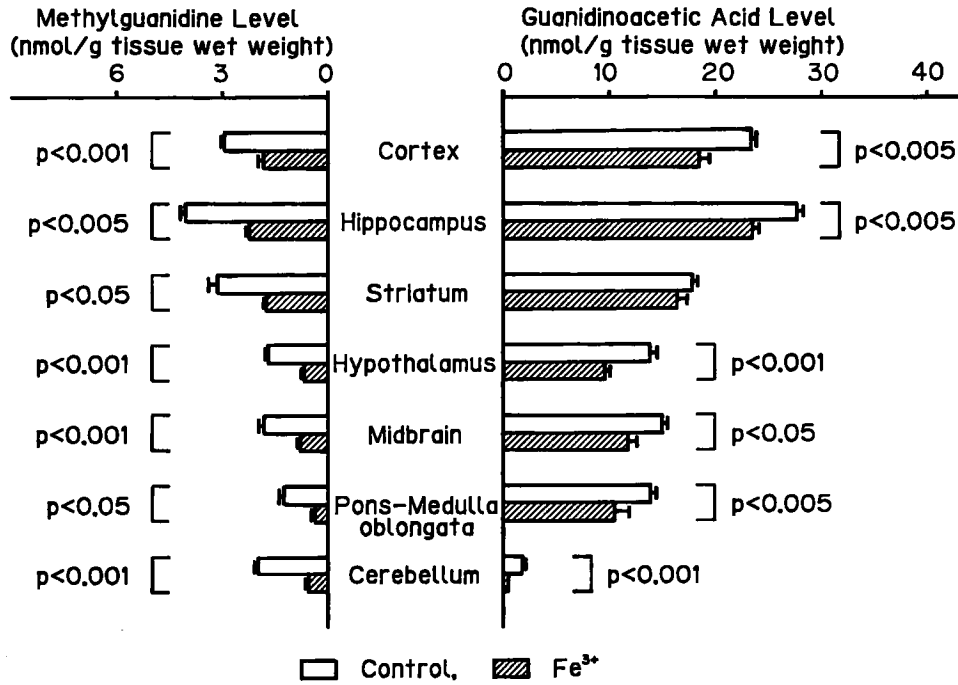


Fig. 4 Levels of methylguanidine and guanidinoacetic acid in the rat brain 60 min after ferric chloride injection. The values are means  $\pm$  SEM of 5 determinations.

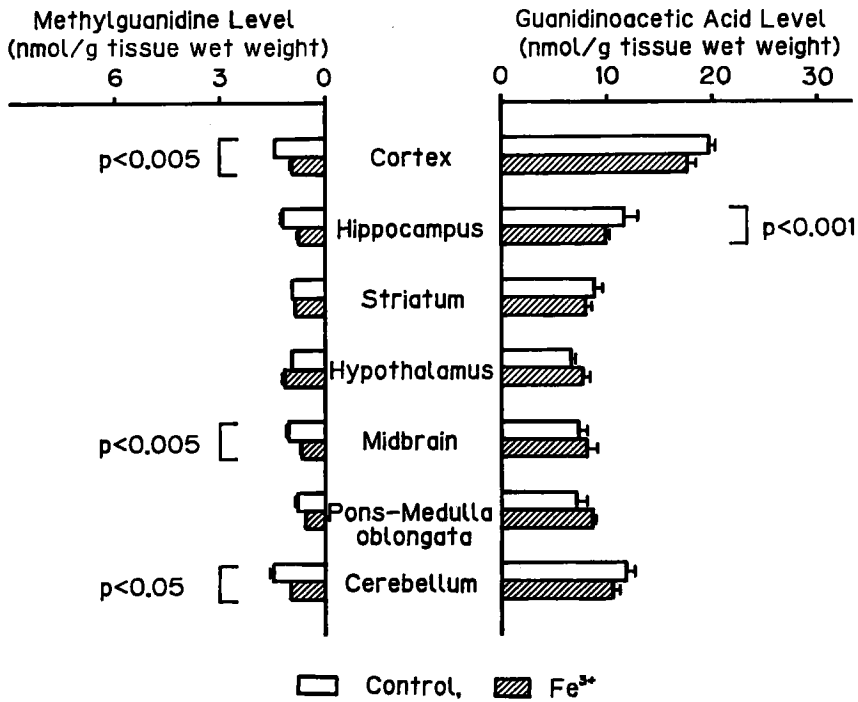


Fig. 5 Levels of methylguanidine and guanidinoacetic acid in the rat brain 24 hours after ferric chloride injection. The values are means  $\pm$  SEM of 5 to 6 determinations.

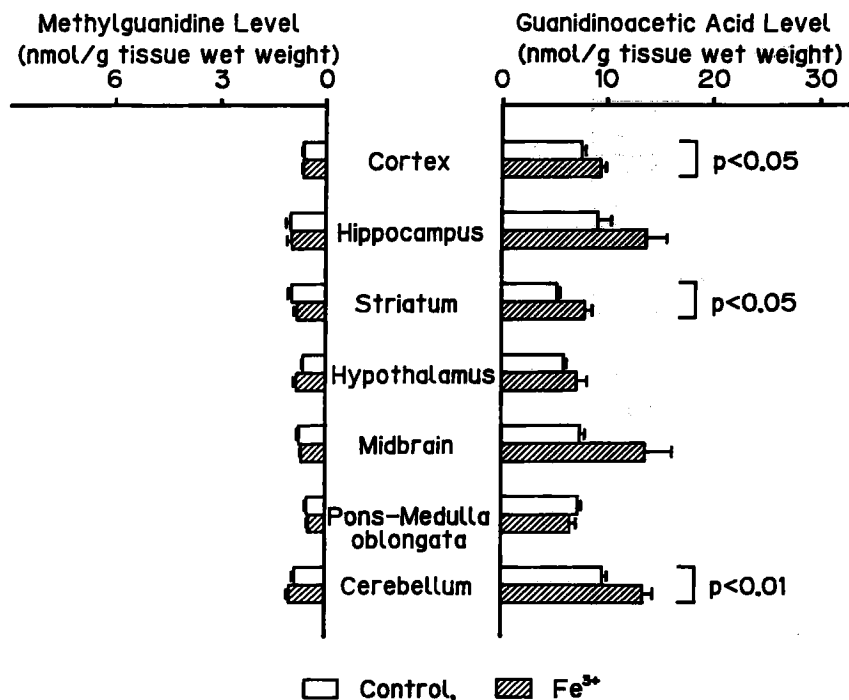


Fig. 6 Levels of methylguanidine and guanidinoacetic acid in the rat brain 48 hours after ferric chloride injection. The values are means  $\pm$  SEM of 7 to 10 determinations.

しかし、投与48時間後には、GAAは大脳皮質、線条体、小脳で増加し (Fig. 6)、さらに投与2ヶ月後には、GAAは大脳皮質、海馬、線条体及び小脳で著明に増加していることが観察された (Fig. 7)。

他方、MGは、投与15分後に海馬、視床下部、中脳及び小脳で有意に増加し (Fig. 2)、投与30分後には、線条体、視床下部及び小脳で増加していた (Fig. 3)。ついで投与60分後には、MGは、大脳皮質、海馬、線条体、視床下部、中脳、橋延髄及び小脳で逆に低下したのち (Fig. 4)、投与24時間後には、MGは、大脳皮質、中脳及び小脳でまだ低下していた (Fig. 5)。しかし投与48時間後には、対照群の値に一旦回復した (Fig. 6)。その後、投与2ヶ月後にはMGは、大脳皮質、海馬、線条体、中脳及び小脳で著明に増加していることが観察された (Fig. 7)。

その他のグアニジノ化合物、すなわちNAA、GBA、Arg及びCRNは、GAA及びMGほど大きな変動は認められなかった。すなわち、NAA

は、投与15分後に視床下部と小脳で有意に増加し、投与30分後には線条体で有意に増加し、海馬及び視床下部で低下していた。投与60分後には、NAAは大脳皮質と小脳で低下していたが、投与24時間後には、大脳皮質、海馬、線条体、視床下部及び小脳で増加し、中脳と橋延髄で低下していた。なお投与2ヶ月後には、大脳皮質においてのみ有意の低下が認められた (Table 1)。なお、48時間後のNAAは、クロマトグラムにおける未同定のピークと重なったために定量分析不可能であった。GBAは、投与30分後に大脳皮質で有意に増加していたが、投与60分後には中脳と小脳で増加していた。しかし、投与2ヶ月後には、小脳で逆に低下していた (Table 2)。Argは、海馬で鉄塩投与30分後に減少し、60分後に増加していた。しかし、投与48時間後にはArgは橋延髄で低下し、投与2ヶ月後には変動は認められなかった (Table 3)。HArgは投与30分後に大脳皮質でのみ増加が認められた (Table 4)。CRNは、鉄塩投与後の早期には変

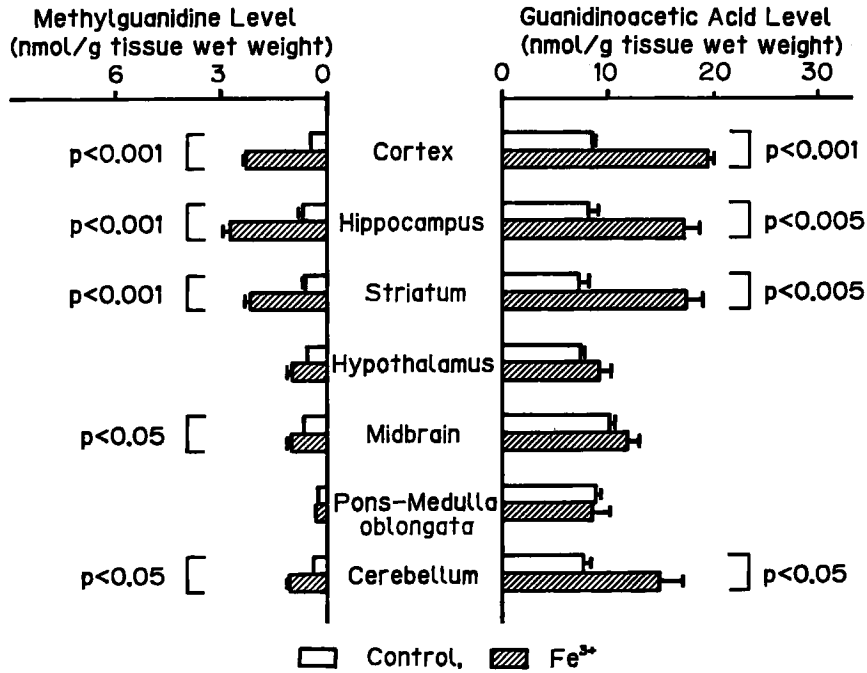


Fig. 7 Levels of methylguanidine and guanidinoacetic acid in the rat brain 2 months after ferric chloride injection. The values are means  $\pm$  SEM of 5 to 6 determinations.

Table 1 N-Acetylarginine level in the rat brain after ferric chloride injection

		N-Acetylarginine level (nmol/g tissue wet weight)				
		15 min	30 min	60 min	24 hrs	2 months
Cortex	Control	3.40 $\pm$ 0.16 (5)	1.97 $\pm$ 0.17 (6)	4.45 $\pm$ 0.26 (5)	1.24 $\pm$ 0.08 (8)	3.59 $\pm$ 0.12 (5)
	Fe	3.21 $\pm$ 0.14 (5)	1.70 $\pm$ 0.09 (7)	3.42 $\pm$ 0.11 (5) <sup>a</sup>	3.16 $\pm$ 0.13 (9) <sup>c</sup>	2.76 $\pm$ 0.11 (6)
Hippocampus	Control	5.68 $\pm$ 0.25 (5)	3.23 $\pm$ 0.26 (6)	7.11 $\pm$ 0.25 (5)	1.18 $\pm$ 0.08 (8)	5.63 $\pm$ 0.25 (4)
	Fe	7.03 $\pm$ 1.03 (5)	1.96 $\pm$ 0.06 (6) <sup>a</sup>	6.60 $\pm$ 0.27 (5)	3.48 $\pm$ 0.19 (9) <sup>c</sup>	4.40 $\pm$ 0.07 (6)
Striatum	Control	5.07 $\pm$ 0.23 (5)	3.14 $\pm$ 0.11 (6)	6.33 $\pm$ 0.19 (5)	3.44 $\pm$ 0.31 (7)	7.65 $\pm$ 1.56 (5)
	Fe	5.33 $\pm$ 0.33 (5)	5.52 $\pm$ 0.13 (7) <sup>c</sup>	6.31 $\pm$ 0.60 (5)	5.30 $\pm$ 0.48 (9) <sup>a</sup>	4.08 $\pm$ 0.22 (6)
Hypothalamus	Control	9.04 $\pm$ 0.32 (5)	8.79 $\pm$ 0.63 (7) <sup>a</sup>	14.34 $\pm$ 0.68 (5)	3.50 $\pm$ 0.23 (8)	12.86 $\pm$ 2.18 (5)
	Fe	11.12 $\pm$ 0.71 (5) <sup>a</sup>	6.56 $\pm$ 0.40 (7) <sup>a</sup>	15.05 $\pm$ 0.63 (5)	5.03 $\pm$ 0.44 (9) <sup>a</sup>	8.95 $\pm$ 0.28 (6)
Midbrain	Control	6.79 $\pm$ 0.61 (5)	5.47 $\pm$ 1.01 (7)	8.91 $\pm$ 0.37 (5)	6.21 $\pm$ 0.33 (7)	7.60 $\pm$ 0.46 (5)
	Fe	6.81 $\pm$ 0.39 (5)	4.65 $\pm$ 0.28 (7)	8.96 $\pm$ 0.50 (5)	3.87 $\pm$ 0.44 (9) <sup>b</sup>	6.70 $\pm$ 0.25 (6)
Pons-Medulla oblongata	Control	5.54 $\pm$ 0.24 (5)	4.17 $\pm$ 0.16 (6)	7.04 $\pm$ 0.34 (5)	3.68 $\pm$ 0.25 (8)	5.35 $\pm$ 0.31 (5)
	Fe	6.01 $\pm$ 0.36 (5)	4.13 $\pm$ 0.29 (7)	6.98 $\pm$ 0.31 (5)	2.59 $\pm$ 0.29 (9) <sup>a</sup>	4.80 $\pm$ 0.14 (6)
Cerebellum	Control	2.78 $\pm$ 0.13 (5) <sup>b</sup>	2.10 $\pm$ 0.22 (7)	5.53 $\pm$ 0.31 (5)	1.07 $\pm$ 0.08 (8) <sup>b</sup>	3.99 $\pm$ 0.19 (5)
	Fe	4.05 $\pm$ 0.18 (5) <sup>b</sup>	1.86 $\pm$ 0.10 (7)	4.16 $\pm$ 0.37 (5) <sup>a</sup>	2.05 $\pm$ 0.20 (9) <sup>b</sup>	4.23 $\pm$ 0.10 (5)

The values represent the means  $\pm$  S.E.M. with experimental numbers in parentheses.

<sup>a</sup>p < 0.05, <sup>b</sup>p < 0.01, <sup>c</sup>p < 0.001 vs control.

動が認められなかったが投与48時間後に海馬線条体、視床下部及び橋延髄で低下していた。また投与2ヶ月後にはCRNは大脳皮質で有意に増加し、視床下部で著明に低下していること

が認められた (Table 5)。

第2節 ラット脳ホモジェネートへ鉄塩と過酸化水素添加によるMG及びGAAの生成

*in vivo*の実験成績において、鉄塩投与後の

Table 2 Guanidinobutyric acid level in the rat brain after ferric chloride injection

		Guanidinobutyric acid level (nmol/g tissue wet weight)					
		15 min	30 min	60 min	24 hrs	48 hrs	2 months
Cortex	Control	4.39±0.47 (5)	3.54±0.38 (6)	5.78±0.13 (5)	4.60±0.34 (5)	4.75±0.32 (10)	3.80±0.28 (5)
	Fe	4.25±0.33 (5)	4.61±0.24 (7) <sup>a</sup>	5.90±0.11 (5)	5.05±0.49 (8)	4.57±0.15 (7)	3.27±0.26 (6)
Hippocampus	Control	5.98±0.49 (5)	6.12±0.45 (7)	8.07±0.38 (5)	5.93±0.56 (4)	6.88±0.41 (10)	6.85±0.46 (5)
	Fe	5.98±0.78 (5)	7.06±0.75 (7)	8.08±0.32 (5)	6.09±0.56 (5)	6.37±0.57 (8)	5.09±0.55 (6)
Striatum	Control	5.41±0.61 (5)	5.98±0.37 (7)	7.55±0.37 (5)	5.90±0.39 (8)	6.44±0.36 (10)	5.56±0.55 (5)
	Fe	5.13±0.39 (5)	6.80±0.32 (7)	8.46±0.43 (5)	Trace-5.139	5.77±0.26 (8)	4.72±0.92 (5)
Hypothalamus	Control	7.00±0.45 (5)	8.88±0.50 (7)	7.91±0.54 (5)	10.75±1.47 (5)	7.63±0.44 (9)	6.02±0.37 (5)
	Fe	8.56±0.95 (4)	8.25±0.53 (7)	8.66±0.80 (5)	Trace-13.59	7.08±0.77 (8)	5.04±0.55 (6)
Midbrain	Control	5.04±0.69 (5)	5.10±0.85 (6)	6.60±0.22 (5)	6.40±0.35 (7)	6.84±0.47 (10)	5.11±0.26 (5)
	Fe	4.91±0.46 (5)	5.30±0.46 (7)	8.31±0.38 (5)	5.54±0.48 (5)	7.11±0.57 (8)	4.35±0.29 (6)
Pons-Medulla oblongata	Control	4.54±0.53 (5)	5.77±0.50 (7)	6.63±0.57 (5)	5.69±0.61 (6)	5.83±0.31 (9)	4.15±0.30 (5)
	Fe	3.69±0.58 (5)	5.17±0.37 (7)	7.31±0.60 (5)	4.79±0.49 (5)	4.86±0.35 (8)	3.82±0.41 (6)
Cerebellum	Control	6.80±0.78 (5)	10.63±1.38 (7)	6.02±0.43 (5)	8.17±0.53 (8)	7.56±0.36 (10)	6.07±0.27 (5)
	Fe	8.40±0.84 (5)	7.32±0.47 (7)	10.88±0.16 (5)	8.92±1.30 (7)	8.26±0.42 (8)	4.07±0.57 (5)

The values represent the means ± S.E.M. with experimental numbers in parentheses.

<sup>a</sup>p<0.05, <sup>b</sup>p<0.01 vs control.

Table 3 Arginine level in the rat brain after ferric chloride injection

		Arginine level (nmol/g tissue wet weight)					
		15 min	30 min	60 min	24 hrs	48 hrs	2 months
Cortex	Control	116.58±3.82 (5)	103.70±10.57 (6)	112.24±4.72 (5)	135.32±2.28 (8)	97.16±4.99 (10)	127.60±3.89 (5)
	Fe	121.54±3.91 (5)	118.99±4.00 (7)	118.59±5.91 (5)	143.74±11.08 (9)	101.85±6.32 (8)	121.64±3.94 (6)
Hippocampus	Control	116.78±6.01 (5)	129.03±3.71 (6)	104.75±2.08 (5)	117.66±3.02 (7)	119.72±8.24 (10)	119.31±4.55 (5)
	Fe	143.63±18.69 (5)	114.28±3.41 (6) <sup>a</sup>	114.69±3.39 (5) <sup>a</sup>	113.97±8.10 (9)	117.41±6.36 (7)	129.88±7.06 (6)
Striatum	Control	144.22±9.07 (5)	167.98±7.04 (7)	138.81±6.07 (5)	154.64±3.80 (7)	152.36±3.13 (10)	150.08±14.50 (5)
	Fe	140.52±15.94 (5)	155.32±6.69 (7)	153.71±6.50 (5)	156.20±6.53 (9)	143.16±5.14 (8)	151.71±10.70 (6)
Hypothalamus	Control	154.92±1.49 (5)	204.70±21.64 (7)	144.54±4.74 (5)	175.73±7.56 (8)	142.67±5.45 (10)	151.04±11.76 (5)
	Fe	155.68±8.66 (5)	161.69±9.41 (7)	165.36±6.97 (5)	168.61±10.42 (9)	135.41±5.82 (8)	144.79±4.31 (6)
Midbrain	Control	117.71±9.19 (5)	140.50±28.6 (7)	121.14±5.41 (5)	177.69±7.25 (7)	138.03±8.10 (10)	139.22±16.42 (5)
	Fe	127.10±7.03 (5)	114.83±5.12 (7)	135.48±13.42 (5)	135.56±12.16 (9)	136.37±1.91 (8)	121.07±4.66 (6)
Pons-medulla oblongata	Control	162.68±8.46 (5)	185.24±10.22 (7)	152.77±6.70 (5)	185.20±13.95 (8)	154.89±10.41 (9)	128.85±4.37 (5)
	Fe	143.98±11.57 (5)	182.20±10.34 (7)	175.66±7.41 (5)	143.06±9.41 (9)	119.36±9.58 (8)	135.51±7.09 (6)
Cerebellum	Control	130.78±9.85 (5)	157.43±11.14 (7)	145.33±7.67 (5)	174.11±6.24 (8)	117.68±6.58 (10)	105.13±3.37 (5)
	Fe	147.79±11.22 (5)	148.74±14.92 (7)	157.82±6.93 (5)	138.97±14.42 (9)	101.13±2.92 (7)	105.20±9.95 (5)

The values represent the means ± S.E.M. with experimental numbers in parentheses.

<sup>a</sup>p<0.05 vs control.

ラット脳内グアニジノ化合物の変動のうち、GAAとMGに特に著明な変動が認められたので、次に *in vitro* において、脳ホモジェネートへ鉄塩と過酸化水素添加によるGAAとMGの生成について検討を行った。

Fig. 8は、ラット脳ホモジェネート0.5 mlに一定濃度(0.1 M)の塩化第二鉄溶液5  $\mu$ lと種々の濃度の過酸化水素を加え、37°Cで5分間インキュベートしたときのMGとGAAの生成量を

示したものである。MGの生成は、過酸化水素の濃度に依存して徐々に増加した。しかし、GAAの生成は、0.35%過酸化水素により最高値を示したが、さらに濃度を加えて3.5%過酸化水素によっては抑制された。

Fig. 9, 10は、ラット脳ホモジェネートに0.1 M塩化第二鉄溶液(5  $\mu$ l)と35%過酸化水素(50  $\mu$ l)を加え、37°Cでインキュベートした時のMGとGAAの生成量を示している。組織中のMGは、



Table 4 Homoarginine level in the rat brain after ferric chloride injection

		Homoarginine level (nmol/g tissue wet weight)					
		15 min	30 min	60 min	24 hrs	48 hrs	2 months
Cortex	Control	1.65±0.14 (5)	1.30±0.12 (6)	1.94±0.23 (5)	1.45±0.12 (7)	1.25±0.16 (10)	1.56±0.18 (5)
	Fe	1.59±0.18 (5)	1.65±0.08 (7) <sup>a</sup>	2.06±0.30 (5)	1.31±0.10 (9)	1.21±0.14 (8)	1.39±0.14 (6)
Hippocampus	Control	1.60±0.24 (4)	1.79±0.25 (5)	2.60±0.29 (5)	N.D.-1.41	1.45±0.11 (10)	1.92±0.05 (4)
	Fe	N.D.-2.18	2.27±0.21 (7)	2.09±0.27 (5)	1.05±0.20 (6)	1.31±0.14 (7)	N.D.-2.61
Striatum	Control	1.96±0.17 (5)	2.31±0.30 (6)	2.23±0.18 (5)	1.42±0.23 (6)	1.62±0.09 (10)	1.79±0.09 (3)
	Fe	1.94±0.16 (5)	2.11±0.13 (7)	2.26±0.16 (5)	1.57±0.22 (5)	1.46±0.09 (8)	1.94±0.19 (6)
Hypothalamus	Control	N.D.-3.54	3.90±0.59 (7)	5.34±1.07 (5)	N.D.-19.82	1.55±0.19 (10)	2.65±0.67 (4)
	Fe	N.D.-5.93	3.22±0.20 (7)	2.88±0.39 (5)	-	1.77±0.21 (6)	N.D.-3.04
Midbrain	Control	2.06±0.19 (5)	1.81±0.24 (7)	3.98±0.99 (5)	2.21±0.22 (8)	1.58±0.11 (10)	1.52±0.15 (5)
	Fe	1.64±0.22 (4)	1.90±0.13 (7)	2.37±0.33 (5)	1.68±0.19 (6)	1.58±0.17 (8)	2.06±0.20 (6)
Pons-Medulla oblongata	Control	2.39±0.14 (5)	1.93±0.10 (7)	3.23±0.50 (5)	1.57±0.15 (8)	1.58±0.14 (9)	1.54±0.17 (5)
	Fe	2.42±0.29 (5)	2.40±0.26 (7)	2.36±0.12 (5)	1.87±0.17 (7)	1.55±0.18 (8)	1.97±0.22 (6)
Cerebellum	Control	2.23±0.22 (5)	1.82±0.22 (7)	3.77±0.62 (5)	1.94±0.11 (6)	1.80±0.16 (9)	2.12±0.09 (4)
	Fe	2.43±0.22 (4)	2.22±0.07 (7)	2.74±0.25 (5)	1.76±0.23 (9)	1.53±0.19 (7)	1.48±0.27 (5)

The values represent the means ± S.E.M. with experimental numbers in parentheses.  
<sup>a</sup>p<0.05 vs control. N.D.: not detected.

Table 5 Creatinine level in the rat brain after ferric chloride injection

		Creatinine level (nmol/g tissue wet weight)					
		15 min	30 min	60 min	24 hrs	48 hrs	2 months
Cortex	Control	368.13±36.41(5)	425.26±50.70(6)	464.26±28.01(5)	641.86±69.04(8)	438.49±33.20(10)	325.66±31.34(5)
	Fe	351.03±61.93(5)	435.13±42.86(7)	539.83±64.95(5)	551.38±39.62(9)	349.09±43.20(8)	441.85±10.94(6) <sup>a</sup>
Hippocampus	Control	664.66±133.19(5)	686.15±46.15(7)	694.41±56.64(5)	767.42±71.06(8)	684.04±74.51(10)	1154.65±225.30(5)
	Fe	600.47±71.34(5)	763.11±152.55(7)	683.22±98.64(5)	657.15±85.84(8)	437.46±69.42(8) <sup>a</sup>	724.00±70.24(6)
Striatum	Control	434.28±55.84(5)	494.17±39.81(6)	580.44±61.69(5)	670.27±57.62(8)	705.42±73.26(10)	709.06±192.69(5)
	Fe	382.31±73.45(5)	689.98±85.55(7)	702.74±145.17(5)	752.78±83.61(9)	353.73±75.95(8) <sup>a</sup>	603.38±133.53(6)
Hypothalamus	Control	831.01±124.29(5)	829.23±40.72(7)	621.81±113.68(5)	757.31±54.34(7)	634.66±71.94(10)	1353.34±144.78(5)
	Fe	674.24±40.35(5)	914.99±172.92(7)	808.89±240.05(5)	932.98±153.36(9)	423.01±89.05(8) <sup>a</sup>	733.26±83.79(6) <sup>a</sup>
Midbrain	Control	358.83±57.04(5)	572.98±95.41(7)	425.47±39.43(5)	692.26±61.10(7)	508.81±76.53(10)	575.67±159.16(5)
	Fe	352.44±45.09(5)	346.80±49.22(7)	528.25±134.04(5)	671.68±64.28(9)	371.60±23.76(8)	441.85±23.69(6)
Pons-Medulla oblongata	Control	364.57±76.09(5)	596.60±36.79(6)	309.48±25.50(5)	567.89±39.33(7)	507.18±35.99(9)	452.10±75.70(5)
	Fe	335.53±112.84(5)	488.53±85.46(7)	405.01±114.00(5)	481.75±38.03(9)	350.73±37.66(8) <sup>a</sup>	428.71±45.21(6)
Cerebellum	Control	517.92±89.91(5)	880.85±143.09(7)	591.60±79.03(5)	776.59±34.89(8)	513.60±73.51(9)	598.23±105.57(5)
	Fe	397.90±62.06(5)	753.60±168.09(7)	685.33±82.06(5)	673.70±73.45(8)	498.55±43.54(8)	557.87±71.26(5)

The values represent the means ± S.E.M. with experimental numbers in parentheses.  
<sup>a</sup>p<0.05, <sup>b</sup>p<0.01 vs control.

鉄塩と過酸化水素の添加により3分以内に急激に約2倍に増加し、インキュベーション60分後にはさらに高値を示した。この高値は、さらにインキュベーション90分後においても認められた(Fig. 9)。他方、GAAは、鉄塩と過酸化水素を加えた直後より有意に増加し、インキュベーション30分後に最高値を示した。この増加は、インキュベーション90分後においても認められ

た(Fig. 10)。なお、鉄塩と過酸化水素を加えた直後のMGは、クロマトグラムにおけるグアニジンのピークと重なったために定量分析不可能であった。第3節 脳ホモジェネートへ鉄塩と過酸化水素添加後のラジカルの発生

Fig. 11は、ラット脳ホモジェネートに鉄塩と過酸化水素を加え、インキュベーション5分後のラジカルのESRによる分析例を示している。

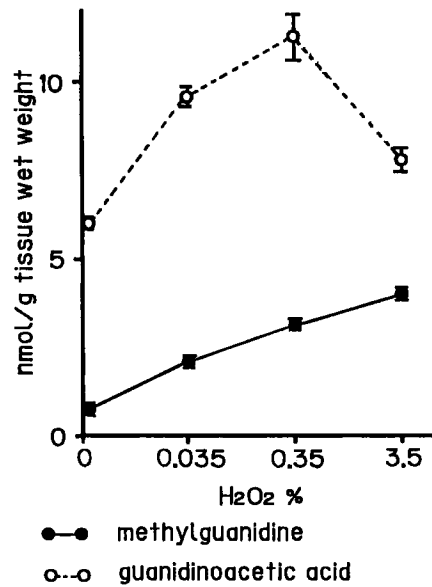


Fig. 8 Effect of hydrogen peroxide on formation of methylguanidine and guanidinoacetic acid in homogenate of rat brain with ferric chloride.

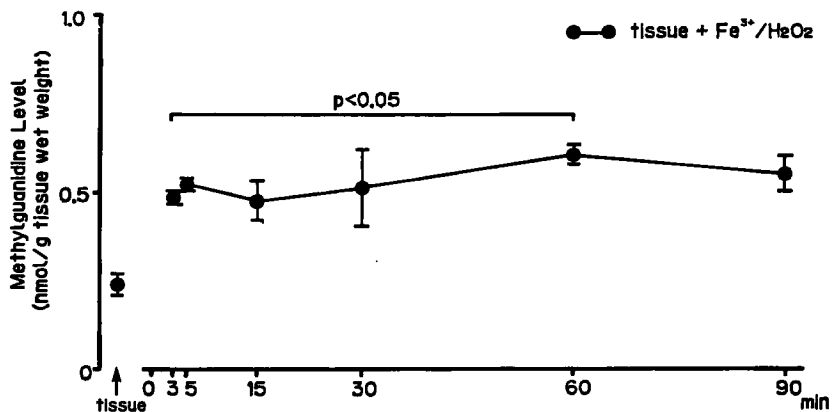


Fig. 9 Methylguanidine formation in homogenate of rat brain with ferric chloride and hydrogen peroxide. The values are means  $\pm$  S.E.M. of 4 to 6 determinations.

OHラジカルは、DMPO-OHスピニアダクトとして、quartetシグナル ( $A_N = A_B = 14.7G$ )を検出し、過酸化中間体ラジカル(Xラジカル)はDMPO-Xスピニアダクトとしてhexadシグナル ( $A_N = 11.9G$ ,  $A_B = 23.9G$ )を検出する。

Fig. 12は、ラット脳ホモジネートに鉄塩と過酸化水素を加え、インキュベーション後のOHラジカルの発生量を示している。OHラジカルは、鉄塩と過酸化水素の添加直後からイン

キュベーション5分後まで急激に増加した。その後OHラジカルは一過性に減少したのちインキュベーション60分後まで増加したが、インキュベーション90分後には減少していた(Fig. 12)。過酸化中間体ラジカルは、鉄塩のみの添加によっても増加したが、それに過酸化水素を加えると、さらに急激に増加した。このラジカルの発生量はインキュベーション60分後まではほぼ一定であったが、90分後にはほぼ組織レベルにま

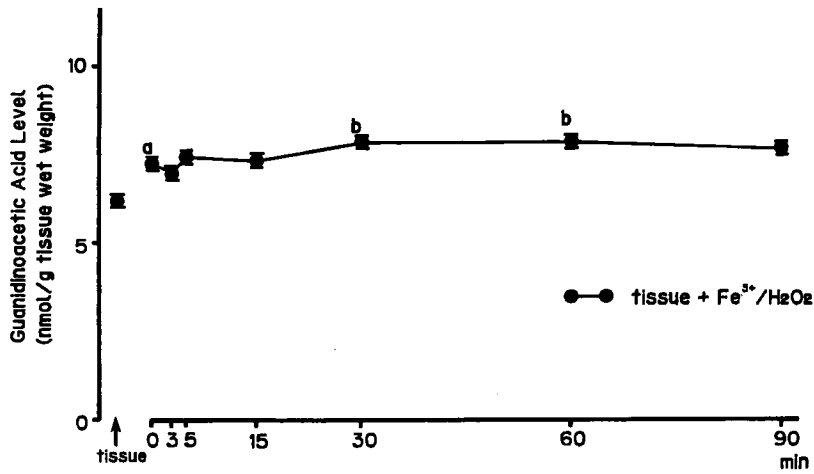


Fig. 10 Guanidinoacetic acid formation in homogenate of rat brain with ferric chloride and hydrogen peroxide. The values are means  $\pm$  S.E.M. of 4 to 6 determinations. <sup>a</sup>p<0.001 vs tissue, <sup>b</sup>p<0.05 vs 0 min.

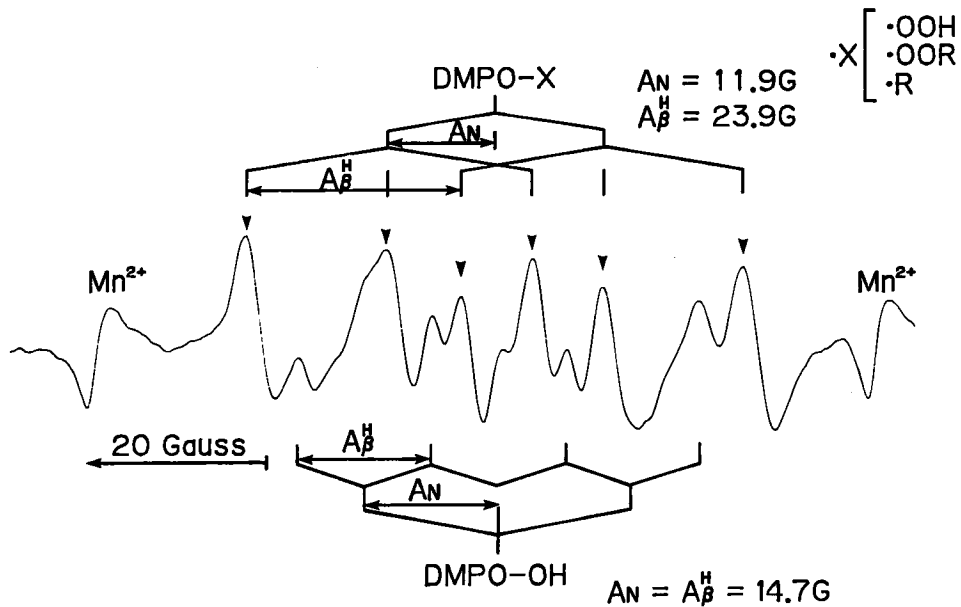


Fig. 11 Electron spin resonance spectrum of DMPO-X and DMPO-OH.

で減少した (Fig. 13).

第4節 ラジカル発生量とMG, GAA 生成量との関係

Table 6 に示すように, ラット脳ホモジェネートに鉄塩と過酸化水素を加え, インキュベーション中に発生する OH ラジカル量は, MG 生成量との間に有意な正の相関関係 ( $r=0.492$ ,  $p<$

0.025) が認められた. しかし, 過酸化中間体ラジカル量とMG生成量又は, OH ラジカル量と過酸化中間体ラジカル量あるいはGAA生成量との間には, 有意な相関関係は認められなかった.

第5節 CRN添加後のMGの生成

脳ホモジェネートへ鉄塩と過酸化水素添加によるMGの著しい生成は, 何に由来するかを調

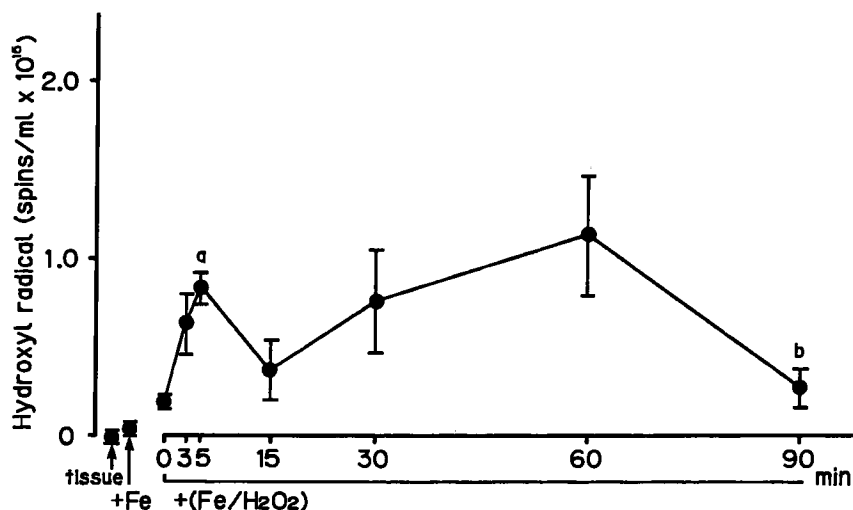


Fig. 12 Generation of hydroxyl radical in homogenate of rat brain with ferric chloride and hydrogen peroxide. The values are means  $\pm$  S.E.M. of 3 to 4 determinations. <sup>a</sup> $p < 0.005$  vs 0 min, <sup>b</sup> $p < 0.05$  vs 5 min.

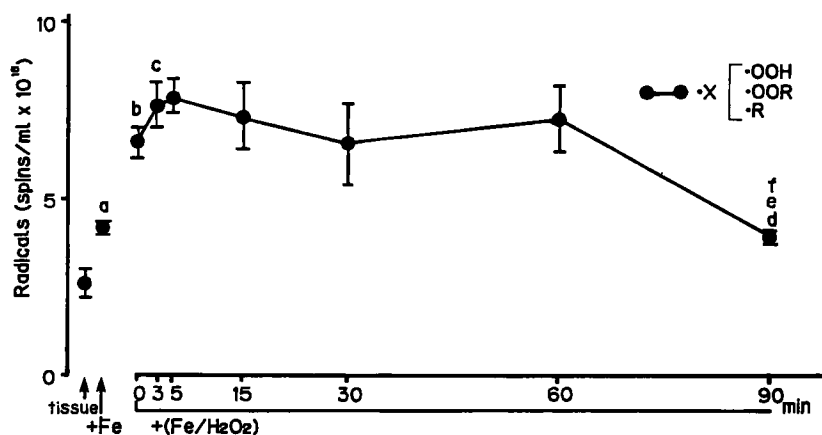


Fig. 13 Generation of peroxide intermediate (X) radical (s) in homogenate of rat brain with ferric chloride and hydrogen peroxide. The values are means  $\pm$  S.E.M. of 3 to 4 determinations. <sup>a</sup> $p < 0.05$  vs tissue, <sup>b</sup> $p < 0.005$  vs tissue, <sup>c</sup> $p < 0.05$  vs tissue +  $Fe^{3+}$ , <sup>d</sup> $p < 0.05$  vs 0 min, <sup>e</sup> $p < 0.05$  vs 3 min, <sup>f</sup> $p < 0.005$  vs 5 min.

Table 6 Relationship between generation of radicals and formation of methylguanidine (MG)

	$\cdot OH$	$\cdot X$
MG	$y = 0.017x + 0.442$ $r = 0.492$ $N = 22$ $p < 0.025$	(-)

(-): not significant.

べるために、Arg, GAA 及び CRN をそれぞれ 0.1~10 mg/ml 添加し、37°C で 5 分インキュベーション後の MG と GAA の分析を行なった結果、MG は、CRN を添加すると、濃度依存性に著明に増加したが、Arg 又は GAA の添加ではむしろ逆に減少した。他方、GAA は、Arg 又は CRN の添加によっても生合成には影響が認められなかった (Fig. 14)。

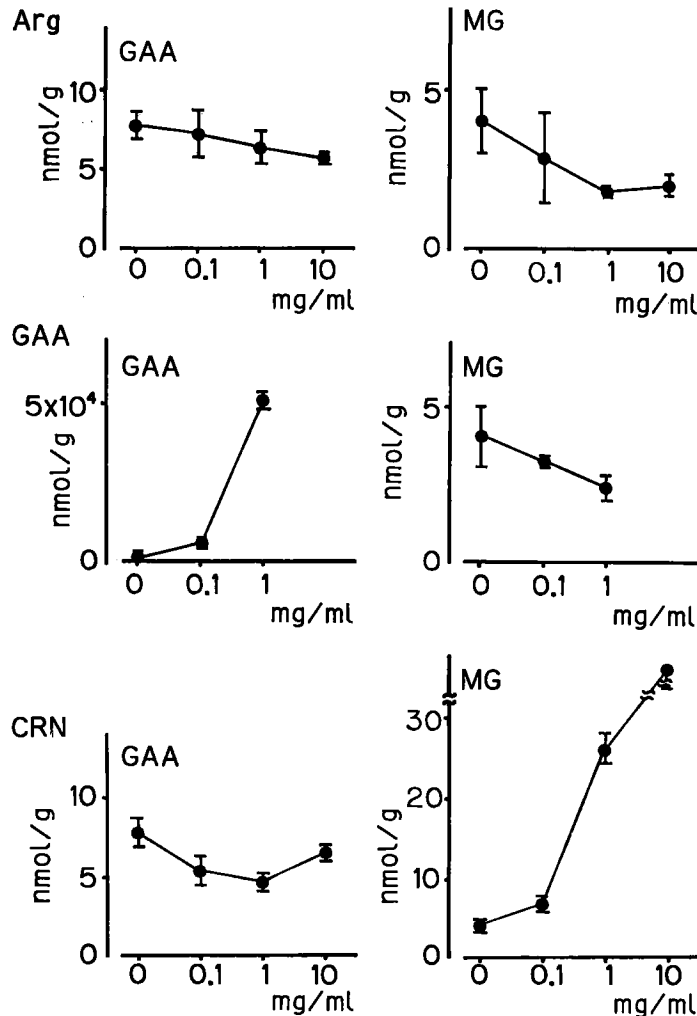


Fig. 14 Formation of guanidinoacetic acid (GAA) and methylguanidine (MG) in homogenate of rat brain with ferric chloride and hydrogen peroxide after addition of arginine (Arg), guanidinoacetic acid (GAA) and creatinine (CRN). The values are means  $\pm$  S.E.M. of 4 to 5 determinations.

## 考 察

本報告においては、鉄塩誘導てんかん原性焦点形成に脳内グアニジノ化合物がどのように関与しているかについて検索するため、鉄塩投与後の脳内グアニジノ化合物の変動を時間経過に従って観察した。その結果、脳7部位のMGとGAAは、鉄塩投与15～30分後に一過性に増加したのち、投与60分後には減少し、投与24～48時間後にはほぼ対照値に一旦回復したものの、

てんかん原性焦点の固定している時期である投与2ヶ月後には著明に増加していることが観察された。特にこれらの変動が大きくみられたのは、大脳皮質、海馬、線条体、小脳であった。先に高知<sup>12)</sup>は、塩化第二鉄溶液をラット大脳皮質の運動領野に注入すると、約15分後に焦点側にspikeが初発し、ついで1分間に約10回の割合で持続して出現するが、注入30～40分後には、polyspike dischargesが1分間に約20回の割合で比較的規則正しく出現し、以後spikeある

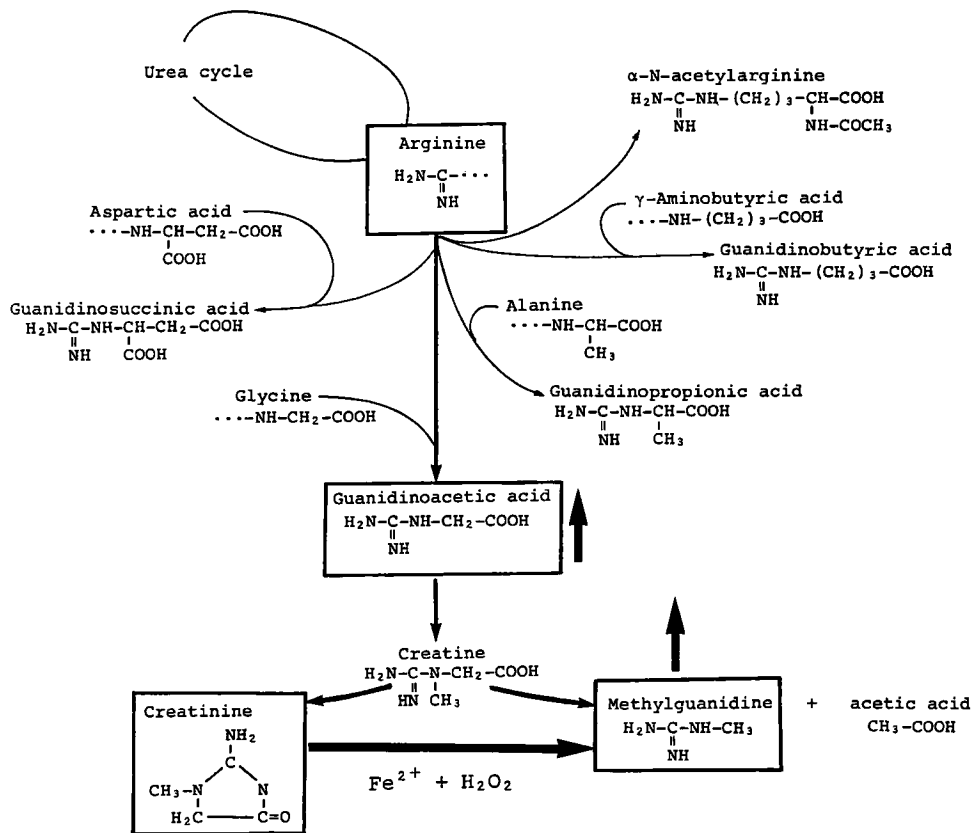


Fig. 15 Possible metabolic pathway of methylguanidine in the rat brain with ferric chloride induced seizures.

いは polyspike discharges は比較的一定の周期で出現するようになり、注入1~5ヶ月後には、発作放電の振幅や頻度も増加することを報告している。このように鉄塩投与15分から30分のでんかん様発作波が早期に出現する時期並びに鉄塩投与2ヶ月後のてんかん原性焦点が固定している時期に、MGとGAAが脳内に著明に増加していることは非常に興味深い。

すでにMG及びGAAは、ネコ、ウサギの大槽内投与により発作放電を誘発することが知られている<sup>26,27)</sup>。また、鉄塩誘導てんかん原性焦点以外のてんかんモデルにおいても、けいれんとグアニジノ化合物の関係がすでに報告されている。すなわち、ウサギのpenylenetetrazol けいれん開始時にはウサギ髄液中のGAAとCRNが増加すること<sup>41)</sup>、あるいはElマウス(自然発症てんか

んマウス)は、けいれん準備性を獲得すると、MGが脳皮質、小脳、中脳、橋延髄で高くなり、GAAが、橋延髄で高くなることなどが知られている<sup>37)</sup>。このように、GAA並びにMGは、発作波が出現する時期並びにてんかん原性焦点形成期に著明に増加することは、これらのグアニジノ化合物がてんかん原性焦点形成に何らかの形で関与していることを示唆している。

他方、鉄塩投与60分後にMG及びGAAが脳全域で減少し、又投与24時間後においてもMGは脳皮質、中脳、小脳で、GAAは海馬でなおも減少していたが、この時期にはMG及びGAAの代謝が活発に行われる一方で、それらの生合成が間に合わず、一過性の低値を示すことが想定された。

腎臓においては、Fig. 15に示すように、グア

ニジノ化合物の代謝経路が明確にされている。また脳においても, L-argining-glycine amidinotransferase が検出されており<sup>42)</sup>, Arg と glycine との amidine 基の転移反応により glycine から GAA が生成され, 次いで creatine, CRN が生成されると考えられている。従って, この時期には L-arginine-glycine amidinotransferase 活性が低下していることが推定される。今回, 鉄塩投与後に脳内の MG と GAA が全く同じ変動を示すことが認められたが, これは MG が GAA を介して生成されている可能性を示唆している。

従来, 鉄塩の水溶液や鉄を含むヘム化合物を多不飽和脂肪酸や細胞内オルガネラ浮遊液に加えると, スーパーオキシドラジカル( $O_2^{\cdot-}$ ), 一重項酸素( $^1O_2$ ), 過酸化水素( $H_2O_2$ ), ヒドロキシラジカル( $\cdot OH$ ) などの活性酸素が生成されることが知られている<sup>9,10,43-45)</sup>。その他, ヘモグロビン( $Fe^{2+}$ ) からメトヘモグロビンへの自己酸化過程やヘマチン化合物によっても酸素のフリーラジカルが発生することが明らかにされている<sup>45-47)</sup>。そこで次に, ラット脳ホモジェネートに Fenton 試薬<sup>7)</sup>, すなわち, 鉄塩と過酸化水素を添加後の MG と GAA の生成を調べた。その結果, OH ラジカルは脳ホモジェネート中には検出されないが, 鉄塩と過酸化水素を添加すると, 急激に OH ラジカルが発生し, インキュベーション 5 分後には最高値を示すこと, 過酸化中間体ラジカルは, これらの添加直後には対照脳ホモジェネート中の 3 倍となり, インキュベーション 5 分後にはやはり最高値を示すことがわかった。この過酸化中間体ラジカルは現在未同定であり,  $\cdot OOH$ ,  $\cdot OOR$  又は  $\cdot R$  ( $R$ ; アルキル基) と考えられている。MG 及び GAA もこれらのラジカル発生に伴って増加し, インキュベーション 5 分後に最大となることが示された。MG は, これらの反応系では対照脳ホモジェネート値の約 2 倍に増加したが, GAA の増加は約 20% に過ぎなかった。しかし, MG 及び GAA は, インキュベーションの期間中, ラジカルの発生に伴って増加しており, MG の増加は OH ラジカルの発生量に依存していることが示された。他方, *in vivo* での鉄塩投与による GAA の著明な

増加は, Fenton 反応に基づく GAA の生成量が MG の生成量に比べてずっと少ないことから, 鉄塩投与により発生するラジカル反応に由来するばかりでなく, 酵素を介した反応によることが想定された。

MG は肝臓においては, CRN から生合成されることが知られている<sup>48)</sup>。そこで本実験においてはラジカル反応により生成する MG が, Arg, GAA 及び CRN のいずれから生成されるかを検討した結果, MG は CRN から生成されることが明らかになった。MG の神経化学的作用に関しては現在十分な解明がなされていないが, 多くのグアニジノ化合物のうち, MG のみがウサギ脳組織ミクロソーム分画の  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase 活性を抑制することが報告されている<sup>49)</sup>。従って, 鉄塩投与により過剰に脳内で生成された MG は, 神経細胞膜でのイオン輸送機構に障害をもたらし, おそらくは抑制性ニューロン系の障害を介して, 中枢神経系の過活動の現象をひき起こす可能性が想定される。

MG と GAA の他に, 鉄塩投与後のラット脳においては, NAA, GBA, Arg, HArg 及び CRN の変動が部位により異なって認められた。けいれんに伴う脳内の内在性グアニジノ化合物の変動については他の実験でてんかんモデル動物についても報告がなされている。すなわち, コバルトてんかん原性焦点組織には,  $\alpha$ -guanidinoglutamic acid が著明に増加すること<sup>38)</sup>, マウスの pentylenetetrazol けいれんにおいては, GES がけいれん前期及び後期に増加し, CRN がけいれん前期, 中期及び後期に増加すること<sup>39)</sup>, また電気刺激けいれんにおいては, GES がけいれん中及びけいれん後に増加し, CRN がけいれん前に増加すること<sup>39)</sup>, 聴原発作ラットの preconvulsive running phase においては, NAA, CRN 及び G が増加していること<sup>50)</sup> が見出されている。さらに El マウスについては, けいれん準備性を獲得したマウスでは, CRN が大脳皮質と橋延髄で, Arg が小脳で増加し, NAA が中脳で増加していること, けいれん直前期には Arg が海馬, 小脳, 中脳, 橋延髄で増加し, CRN は海馬, 小脳, 中脳, 橋延髄で減少していること, けいれん中には NAA が小脳と海馬で増加し,

CRN が海馬, 小脳, 橋延髄で減少, 中脳で増加, NAA が橋延髄で減少していること, またけいれん後にはCRNが大脳皮質, 海馬, 橋延髄で減少していることが観察されている<sup>37)</sup>. 以上の諸知見は, 今回得られた鉄塩てんかん原性焦点組織での変化と異なるが, いずれも, グアニジノ化合物がけいれん発現機構に密接に関与していることを示すものである. しかしどのようなグアニジノ化合物がけいれんのどの時期にどの部位でどのように変化するかは, 実験てんかんモデルによって異なるようである. このような観点からも, 鉄塩投与後の脳内MGとGAAの変動は特徴的といえよう.

### 結 論

1. 鉄塩投与後の脳内グアニジノ化合物のうち, GAAとMGがラット脳7部位において投与15~30分後に一過性に増加し, ついで投与60分後には正常レベル又はそれ以下に減少したが, 投与24~48時間後にはほぼ正常レベルに回復した. しかし, てんかん焦点の固定された時期である投与2ヶ月後にはGAA及びMG値は正常レベルの2~3倍に増加していることが明らかになった.
2. その他のグアニジノ化合物, すなわち, NAA, GBA, Arg, HArg, CRNは, 鉄塩投与後, それぞれ時間経過及び部位により異った変動が認められたが, GAA及びMGほど顕著ではなかった.
3. 脳ホモジェネートへ鉄塩と過酸化水素を添

加すると急激にOHラジカルと過酸化中間体ラジカルの発生が増加し, その後一定値を保ったのち, 90分後には消失した.

4. ラット脳ホモジェネートへ鉄塩と過酸化水素を添加すると直ちにMGとGAAが増加し, 60分後には最大値に達した.
5. 鉄塩と過酸化水素によるOHラジカルの発生とMGの生成との間には, 正の相関関係が認められた.
6. ラット脳ホモジェネートへ鉄塩と過酸化水素を添加して生成するMGは, 前駆物質としてのCRN濃度に依存し, Arg及びGAAの添加によっては影響を受けなかった.
7. 以上より, 鉄塩誘導てんかん原性焦点においては, 鉄塩投与により生じたOHラジカルに起因して, CRNから生成する過剰のMGがニューロンに作用して, てんかん原性焦点を形成する可能性が示唆された.

### 謝 辞

稿を終るに臨み, 終始御懇篤な御指導と御校閲を承りました, 森 昭胤教授並びに, 直接御指導御協力いただきました, 平松 緑博士に深く感謝の意を捧げます.

また, 実験に御協力下さいました, 枝松 礼嬢及び, 教室の皆様は厚くお礼申し上げます.

本研究の要旨は, 第59回日本生化学会大会において発表した.

### 文 献

1. Willmore LJ, Hurd, RW and Sybert, GW: Epileptiform activity initiated by pial iontophoresis of ferrous and ferric chloride on rat cerebral cortex. *Brain Res* (1978) **152**, 406-410.
2. Willmore LJ and Rubin JJ: Formation of malonaldehyde and focal brain edema induced by subpial injection of FeCl<sub>2</sub> into rat isocortex. *Brain Res* (1982) **246**, 113-119.
3. Willmore LJ, Sybert GW and Munson JB: Recurrent seizures induced by cortical iron injection: a model of post traumatic epilepsy. *Ann Neurol* (1978) **4**, 329-336.
4. Rosen AD and Frumin NV: Focal epileptogenesis following intracortical hemoglobin injection. *Exp Neurol* (1979) **66**, 277-284.
5. Turkanis SA and Karler R: Central properties of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol and its metabolites in iron-induced epileptic rats. *Neuropharmacology* (1982) **21**, 7-13.



6. Willmore LJ, Sybert GW and Munson JB: Chronic focal epileptiform discharges induced by injection of iron into rat and cat cortex. *Science* (1978) **200**, 1501–1503.
7. Walling C: Fenton's reagent revisited. *Accounts of Chem Res* (1975) **8**, 125–131.
8. Aust SD and Svingen BA: The role of iron in enzymatic lipid peroxidation; in *Free Radicals in Biology*, Pryor Ed. Vol. 5, Academic Press, New York (1982) pp 1–28.
9. Czapski G and Ilan YA: On the generation of the hydroxylation agent from superoxide radical. Can the Haber-Weiss reaction be the source of OH radicals? *Photochem Photobiol* (1978) **28**, 651–653.
10. Koppenol WH, Butler J and Leeuwen JW: The Haber-Weiss cycle. *Photochem Photobiol* (1978) **28**, 655–660.
11. Willmore LJ, Hiramatsu M, Kochi H and Mori A: Formation of superoxide radicals after FeCl<sub>3</sub> injection into rat isocortex. *Brain Res* (1983) **277**, 293–296.
12. 高知宏喜: 鉄イオンてんかん源性焦点組織のフリーラジカル反応と発作発現機構に関する研究. *岡山医誌* (1983) **95**, 271–282.
13. Hiramatsu M, Khochi Y and Mori A: Active oxygen and free radical reaction in Fe<sup>3+</sup>-induced epileptogenic focus of rat. *Folia Psychiatr Neurol Jpn* (1983) **37**, 295–296.
14. 森 昭胤: けいれん発現機構に関する研究, とくに活性酸素による細胞膜脂質過酸化反応の関与について. *病態生理* (1984) **3**, 856–859.
15. Hiramatsu M, Mori A and Kohno M: Formation of peroxy radical after FeCl<sub>3</sub> injection into rat isocortex. *Neurosciences* (1984) **10**, 281–284.
16. Mori A, Watanabe Y and Yokoi I: Effect of ferric ion on activities of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase and Mg<sup>2+</sup>-ATPase in rat brain. *IRCS Med Sci* (1986) **14**, 707–708.
17. Gilbert JC and Sawas AH: ATPase activities and lipid peroxidation in rat cerebral cortex synaptosomes. *Arch Int Pharmacodyn* (1983) **263**, 189–196.
18. Willmore LJ and Rubin JJ: Antiperoxidant pretreatment and iron-induced epileptiform discharges in the rat: EEG and histopathologic studies. *Neurology* (1981) **31**, 63–69.
19. 平松 緑, 枝松 礼, 河野雅弘, 森 昭胤: 小紫胡湯合桂枝加芍薬湯の radical 消去作用について. *Neurosciences* (1987) **13**, 印刷中.
20. 森 昭胤, 平松 緑: 新しい外傷性てんかんモデル—鉄塩投与によるてんかん源性焦点と小紫胡湯合桂枝加芍薬湯の発作放電抑制効果について. *漢方医学* (1983) **7**, 12–16.
21. Willmore LJ and Rubin JJ: The effect of tocopherol and dimethyl sulfoxide on focal edema and lipid peroxidation induced by isocortical injection of ferrous chloride. *Brain Res* (1984) **296**, 389–392.
22. Willmore LJ, Sybert GW and Munson JB: Recurrent seizures induced by cortical iron injection: a model of post traumatic epilepsy. *Ann Neurol* (1978) **4**, 329–336.
23. 森 昭胤: てんかん発作と神経伝達物質—実験てんかんモデルについての研究. *病態生理* (1985) **4**, 343–350.
24. 森 昭胤, 小林清史: 痙攣—とくに脳内アミンとの関係について—. *蛋白質核酸酵素* (1977) **22**, 411–414.
25. Hiramatsu M, Fukushima M, Kabuto H, Edamatsu R and Mori A: Amino acids, 5-hydroxytryptamine, and catecholamines in iron-induced epileptogenic foci of the rat; in *Advances in Epileptology*, Wolf, Dam, Janz and Dreifuss eds. Vol 16, Raven Press, New York, 1987.
26. Jinnai D, Mori A, Mukawa J, Ohkusu H, Hosotani M, Mizuno A and Tye LC: Biological and phy-

- siological studies on guanidino compounds induced convulsion. *Jpn J Brain Physiol* (1969) 106, 3668-3673.
27. Matsumoto M, Kobayashi K, Kishikawa H and Mori A: Convulsive activity of methylguanidine in cats and rabbits. *IRCS Med Sci* (1976) 4, 65.
  28. Mizuno A, Mukawa J, Kobayashi K and Mori A: Convulsive activity of taurocyamine in cats and rabbits. *IRCS Med Sci* (1975) 3, 385.
  29. 大楠晴美:  $\alpha$ -N-acetyl-L-arginine のウシ脳よりの分離およびその痙れん作用に関する研究. *阪大医誌* (1970) 21, 49-55.
  30. Jinnai D, Sawai A and Mori A:  $\gamma$ -Guanidinobutyric acid as a convulsive substance, *Nature* (1966) 212, 617.
  31. Shiraga H, Hiramatsu M and Mori A: Convulsive activity of  $\alpha$ -guanidinoglutaric acid and the possible involvement of 5-hydroxytryptamine in the  $\alpha$ -guanidinoglutaric acid induced seizure mechanism. *J Neurochem* (1986) 47, 1832-1836.
  32. Yokoi I, Toma J and Mori A: The effect of homoarginine on the EEG of rats. *Neurochem Pathol* (1984) 2, 295-300.
  33. Nakae I: Synthesis of N,N'-dibenzoylguanidine and its convulsive action. *Neurosciences* (1981) 7, 205-217.
  34. Shindo S, Tsuruta K, Yokoi I and Mori A: Synthesis of  $\gamma$ -guanidinovaleric acid and its effect on EEG of rats. *Neurosciences* (1984) 10, 177-182.
  35. Marescau B, Hiramatsu M and Mori A:  $\alpha$ -keto- $\delta$ -guanidinovaleric acid induced electroencephalographic, epileptiform discharges in rabbits. *Neurochem Pathol* (1983) 1, 203-209.
  36. Mori A, Hiramatsu M, Numoto A and Robin Y: Action convulsivante des derives guanidiques, 1'hirudonine, 1'araine et 1'audonine. *CR Soc Biol (Paris)* (1981) 175, 755-760.
  37. 平松 緑, 枝松 礼, 森 昭胤: El マウスのけいれん発現機構と脳内 guanidino 化合物. 第9回グアニジン化合物研究会 (1986) 42-43.
  38. Mori A, Akagi M, Katayama Y and Watanabe Y:  $\alpha$ -Guanidinogutaric acid in cobalt-induced epileptogenic cerebral cortex of cats. *J Neurochem* (1980) 35, 603-605.
  39. 平松千明: マウス脳内 guanidino 化合物に関する研究. *岡山医誌* (1980) 92, 427-434.
  40. Glowinski J and Iversen LL: Regional studies of catecholamines in the rat brain---I. *J Neurochem* (1966) 13, 655-669.
  41. 藤川信昌: 大槽内留置カテーテル法による, けいれんに伴う髄液中の guanidino 化合物の変動に関する研究. *岡山医誌* (1987) 99, 印刷中.
  42. McGuire DM, Gross MD, Elde RP and Van Pilsun JF: Localization of L-arginine-glycine amidinotransferase protein in rat tissues by immunofluorescence microscopy. *J Histochem Cytochem* (1986) 34, 429-435.
  43. Motohashi N and Mori I: Superoxide-dependent formation of hydroxyl radical catalyzed by transferrin. *FEBS (Fed Eur Biochem Soc) Lett* (1983) 157, 197-199.
  44. Fong K, Mccay PB and Poyer JL: Evidence for superoxide-dependent reduction of  $Fe^{3+}$  and its role in enzyme-generated hydroxyl radical formation. *Chem-Biol Interactions* (1976) 15, 77-89.
  45. Gutteridge JMC: The role of superoxide and hydroxyl radicals in phospholipid peroxidation catalysed by iron salts. *FEBS (Fed Eur Biochem Soc) Lett.* (1982) 150, 454-458.
  46. Misra HP and Fridovich E: The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. *J Biol Chem* (1972) 247, 6960-6962.

47. Weber R, Oudega B and Van Gender BF: Generation of superoxide radicals during the autoxidation of mammalian oxihemoglobin. *Biochem Biophys Acta* (1973) 302, 475-478.
48. Nagase S, Aoyagi K, Narita M and Tojo S: Biosynthesis of methylguanidine in isolated rat hepatocytes and *in vivo*. *Nephron* (1985) 40, 470-475.
49. Matsumoto M and Mori A: Effects of guanidino compounds on rabbit brain microsomal Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase activity. *J Neurochem* (1976) 27, 635-636.
50. Wiechert P, Marescau B, De Deyn P and Lowenthal A: Guanidino compounds in serum and brain of audiogenic sensitive rats during the preconvulsive running phase of cerebral seizures. *Neurosciences* (1987) 13, 35-40.

## Guanidino compounds in iron-induced epileptogenic foci of rats

Masato FUKUSHIMA

Department of Neurochemistry, Institute for Neurobiology,

Okayama University Medical School

(Director: Prof. A. Mori)

Changes in the levels of guanidino compounds in the cortex, hippocampus, striatum, hypothalamus, midbrain, pons and medulla oblongata and cerebellum were analyzed by high performance liquid chromatography after an injection of ferric chloride into the sensory motor cortex of SD rats. Levels of guanidinoacetic acid (GAA) and methylguanidine (MG) changed greatly 15 and 30 min after the injection, but recovered to normal levels 24 to 48 hours after the injection. GAA and MG increased two or three times the normal level 2 months after the injection, at which time iron-induced epileptogenic foci were formed. Levels of other guanidino compounds, i.e., N-acetylarginine, guanidinoacetic acid, arginine (Arg), homoarginine and creatinine (CRN) also changed, though the extent of the changes was not as marked as with GAA and MG.

Rapidly increased generation of hydroxyl radical and peroxide intermediate radical(s) was observed by electron spin resonance analysis after addition of ferric chloride and hydrogen peroxide to rat brain homogenate. Levels of MG and GAA also increased. A significant relationship between the generation of hydroxyl radical and the formation of MG was recognized. The formation of MG in the system was dependent on the concentration of CRN but independent of the concentration of Arg and GAA.

These results suggest that MG formed from CRN may act on neurones after iron injection into the rat brain, thus forming epileptogenic foci.