

痙攣に伴う脳内マロンジアルデヒド の変動に関する研究

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）

澤 木 惇

Key words : 脳内マロンジアルデヒド,
ペンチレンペトラゾール
ジベンゾイルグアニジン,
電気刺激
E11マウス

緒 言

Willmore ら (1, 2) が, ラット脳軟膜下に鉄塩を注入すると, 約10分後に反復するてんかん様放電が起り, さらに6週間後には, Golgi染色neuroneの減少, 星状細胞のgliosis, dendritic spinesの減少及びdendritic branchingやvaricositiesの減少などヒトの病巣部位と同様な組織変化が認められることを報告して以来, このモデルが外傷性てんかんの秀れた実験モデルとされている(3, 4). その後, Rubin and Willmore(5)は, ラット大脳皮質運動領に鉄塩を注入して形成されるてんかん様発作波が, free radical scavengerである α -tocopherolの投与で抑制できることを認め, 外傷性てんかんの発現機構には膜の過酸化が関連していることを推定した. また, Willmore and Rubin(6)は, ラット大脳皮質に鉄イオンを投与すると, 投与部位に脂質過酸化の指標とされるマロンジアルデヒド(MDA)(7)が著明に増加することを観察し, 出血のさい赤血球から遊離される鉄が, 細胞膜不飽和脂質の過酸化を誘発し, ついで組織細胞膜の変性を引き起こして, てんかん源性焦点を導く可能性があることを指摘している. また最近教室の高知(8)は, ラット大脳皮質に鉄イオンを投与すると, 投与部位にMDAの増加, superoxide radicalsの増加を認め, 外傷性てんかんの発現機構には, 鉄イオンによるsuperoxide radicalsの発生が引き金となっていることを報告している. これらの諸知見から, 一般に外傷, 脳出血あるいは脳梗塞後には,

赤血球からヘム化合物が溶出して鉄イオンを生成することが想定され($\text{Hb} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$, $\text{MetHb} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$), これら鉄イオンは OH^- , H_2O_2 と反応すると容易に O_2^- 及び $\text{HO}\cdot$ を生成し, これら superoxide free radicalsは膜不飽和脂質を過酸化し, endoperoxideやhydroperoxideを生成するが, そのさいニューロン膜のイオン機構の変動を生じ, やがてはてんかん源性焦点形成を導く可能性があることが想定される.

さきに教室の平松ら(9)は, E11マウスの痙攣準備状態, ddYマウスのペンチレンペトラゾール(PTZ)痙攣の直前期及びsubmaximal電撃痙攣(ECS)時には, 小脳の還元型glutathione(GSH)に対する酸化型glutathione(GSSG)の比の増加が認められ, glutathioneが, この酸化還元反応に付随したfree radicalのscavengerとして, 作用していることが指摘された. また, 鉄イオンによるてんかんモデルにおいてもGSH/GSSG比の低下を認めている(8).

本論文では, 鉄イオンによるてんかんモデル以外の他の痙攣モデルにおいてもその痙攣発現機構が上記のsuperoxide radicals反応の仮説を支持するかどうかを検討するため, E11マウス痙攣(10), 及びddYマウスのECS, PTZ及びジベンゾイルグアニジン(DBG)痙攣(11), の各痙攣過程での前脳, 脳幹及び小脳のMDAを測定し, 各痙攣モデルにおける痙攣発現と, 膜脂質過酸化との関係を検索した.

実験方法

第一節 実験動物

E_lマウス及び ddYマウス(雄)を使用した。E_lマウスは当施設で飼育しているものを使用し、ddYマウスは静岡実験動物より購入した。飼育は室温24℃、湿度55%とし、12時間明暗サイクル(1~13時を明期とし、13~1時を暗期とした)の条件下でおこなった。飼料は、オリエンタル酵母(MF, NMF)を使用し、水は給水ビンで自由に摂水させた。E_lマウスは簡単な放り上げ刺激により容易に痙攣を誘発しうる。すなわちE_lマウスを生後4週目より1週間に1回、板上で約10cmの高さに80回の放り上げ刺激を毎週行なうと、通常、4週間の放り上げ刺激で痙攣を起こすようになる。実験に際しては同腹のE_lマウスを2群に分け、その1群に放り上げ刺激を行った。なお放り上げ刺激群のマウスは毎週の放り上げ刺激により連続して5回以上痙攣を起こすマウスを使用した。E_lマウスの対照群にはE_lマウスの母系であり、痙攣素因を有さないddYマウスを使用し、E_lマウスについての実験と同様に同腹のddYマウスを2群に分け、その1群には放り上げ刺激をE_lマウスと同様に1週間に1回連続して6週間の放り上げ刺激を行なった。

第2節 PTZ

PTZを生理食塩水に溶解後、50及び80mg/kgをddYマウスの腹腔内に投与し、対照群には生理食塩水を投与した。痙攣中期は、間代性強直性痙攣が出現した時期(50秒後)とし、痙攣前期は間代性強直性痙攣が出現する時期の3分の2の時期(35秒後)とした。痙攣後は、無動状態の時期(2分後)とした。

第3節 DBG 痙攣

DBGは、ジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解後、150mg/kgをddYマウスの腹腔内に投与し、対照群にはDMSOを投与した。痙攣中期は間代性強直性痙攣が出現した時期(75分後)とし、痙攣前期はミオクローヌスが出現する時期(20分後)とした。痙攣後期は、痙攣後無動状態の時期とした。

第4節 電気刺激(ECS)痙攣

ddYマウスの角膜を生理食塩水で湿らせたのち、4, 7, 10mAの各電流を角膜に0.5秒間通電した。Maximal ECS(10mA)は、後肢強

直性伸展出現を目標としたが、痙攣後の死亡例はなかった。痙攣重積状態のモデルには、上記条件下に電流を10分おきに10回通電した。

第5節 MDAの測定方法

1) 試料の調整

i) 脳組織

マウスを液体チッ素で固定後、氷上で直ちに全脳を摘出したのち、前脳、脳幹及び小脳に部位別し、分析開始まで-80℃に保存した。分析は少なくとも保存1週間以内に行なった。

ii) 血液

マウスの眼底静脈より血液を採取し、血清分離を行なったのち、すぐにMDAの分析を行なった。

2) MDAの分析

i) 脳組織

組織のMDAの分析は、大石らの方法(7)に従って行なった。すなわち秤量後、組織をテフロン棒付ホモゲナイザー管に入れ、あらかじめ氷冷した重さの10倍量の生理食塩水を加えた。ついで氷の中にゆっくりと3回上下にホモゲナイズしたのち、共栓付ガラス遠心管(容量10ml)に、この磨砕液0.1mlをとり、8.1% SDS溶液0.2ml、20%酢酸緩衝液(pH3.5) 1.5ml及び0.8% TBA溶液1.5mlを加え、蒸留水0.7mlを加えて全量4.0mlとした。ついでこの溶液をミキサーで攪拌後、100℃で1時間加熱し、水で冷却後、蒸留水を1ml加え、さらにn-ブタノール・ピリジン混液(15:1) 5mlを加えて、共栓をして、振とう機で5分間振とうした。その後3,000rpmで15分間遠心分離し、得られたn-ブタノール・ピリジン層を、ピペットで約3ml以上別の試験管にとり、分光蛍光光度計で、蛍光測定を行なった(励起波長515nm、蛍光波長532nm)。

ii) 血清

血清中のMDAの分析は、八木の方法(12)に従って行なった。すなわち共栓付ガラス遠心管(容量10ml)に血清50 μ lをとり、生理食塩水450 μ lを加えたのち、1/12N H₂SO₄ 4.0mlを加えて、軽く攪拌した。ついで10%リンタングステン酸0.5mlを加えて攪拌後、約5分間室温放置し、2,500rpmで10分間遠心分離した。得られた上清を捨てたのち沈澱物に1/12N H₂SO₄

Table 1. Effect of throwing stimulation on malondialdehyde level in E ℓ mouse brain (nmol/g, m \pm SD)

	n	Forebrain	n	Brainstem	n	Cerebellum
Eℓ						
Non-stimulated control group	9	39.1 \pm 4.8	9	22.7 \pm 2.8	9	43.8 \pm 6.2
Stimulated group (Interictal period)	9	45.1 \pm 7.8	9	31.0 \pm 4.0 ^b	9	42.3 \pm 4.9
ddY						
Non-stimulated control group	8	38.9 \pm 3.7	8	33.0 \pm 3.9	8	47.5 \pm 5.5
Stimulated group	8	33.7 \pm 2.9 ^a	8	36.4 \pm 6.7	8	41.6 \pm 11.4

a p<0.01, compared with non-stimulated control group.

b p<0.001, compared with non-stimulated control group.

0.5mlを加え、ミキサーで強く攪拌し、再び1/12N H₂SO₄ 1.5ml, 10%リンタンクスチン酸0.3mlを加え攪拌した。その後、2,500rpmで10分間遠心分離し、上清を捨て、沈澱物に再び1/12N H₂SO₄ 0.5mlを加え、ミキサーで強く攪拌し、さらに1/12N H₂SO₄ 1.5ml, H₂O 2.0ml, 1%TBA1.0mlを加えたのち、100°C 60分間加熱し、水で冷却後、n-ブタノール5.0mlを加えて5分間振とう抽出操作を行なった。ついで再び2,500rpmで15分間の遠心によって分離したn-ブタノール層をピペットで約3ml以上を別の試験管にとり、この試料について分光蛍光光度計で蛍光測定した(励起波長515nm, 蛍光波長553nm)。なお、組織及び血清中のMDAの測定には、標準品としてテトラメトキシプロパンを使用した。

実験結果

第1節 E ℓ マウスの痙攣

E ℓ マウスに放り上げ刺激を行ない、痙攣を起

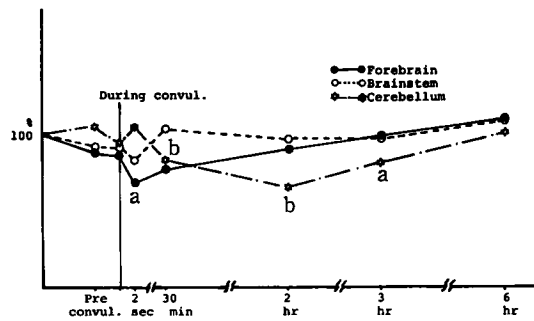


Fig 1. Effects of convulsions on malondialdehyde level in E ℓ mouse brain. The symbols represent percentage of mean value in each group in the case of 100% of mean value in the interictal period. Animals were used 4-10 mice in each group. There were significances in Student t-test.

a p<0.05, compared with interictal period.

b p<0.005, compared with interictal period.

c p<0.001, compared with interictal period.

Table 2. Effects of maximal ECS on malondialdehyde level in ddY mouse brain (nmol/g, m \pm SD)

	n	Forebrain	n	Brainstem	n	Cerebellum
Control	10	41.2 \pm 10.4	10	36.0 \pm 5.56	10	39.8 \pm 4.21
ECS (1)	10	39.8 \pm 3.39	9	33.2 \pm 4.16	8	49.2 \pm 10.5 ^a
Control	9	50.1 \pm 6.65	9	38.8 \pm 3.43	9	46.8 \pm 8.06
ECS (8)	7	50.3 \pm 4.50	7	44.4 \pm 4.63 ^a	7	45.8 \pm 6.05
Control	10	36.0 \pm 9.06	9	34.8 \pm 7.72	10	46.4 \pm 7.00
ECS induced status epilepticus	10	38.5 \pm 8.49	9	43.8 \pm 7.94 ^a	10	84.6 \pm 13.8 ^b

a p<0.02, compared with control group.

b p<0.001, compared with control group.

ECS : 10mA, 0.5sec.

Table 3. Effects of submaximal ECS on malondialdehyde level in ddY mouse brain (nmol/g, m±SD)

	n	Forebrain	n	Brainstem	n	Cerebellum
Control	10	31.3±3.25	10	36.4±7.33	8	39.7±5.91
ECS 4mA	9	32.9±5.56	8	32.6±4.88	7	40.7±6.41
ECS 7mA	9	31.3±3.51	9	27.5±4.07 ^a	6	34.6±3.00
ECS 10mA	9	29.4±4.56	10	31.7±5.53	9	34.4±4.96

a p<0.01, compared with control group.

ECS : 0.5sec.

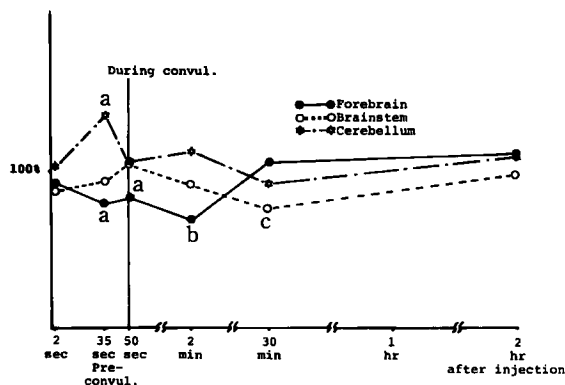


Fig 2. Effects of convulsions by pentylenetetrazol on malondialdehyde level in ddY mouse brain. The symbols represent percentage of mean value in each group in the case of 100% of mean value in control group. Animals were used 7—13 mice in each group. There were significances in Student t-test.

a p<0.05, compared with control group.

b p<0.005, compared with control group.

c p<0.001, compared with control group.

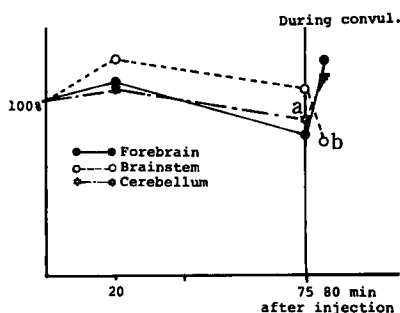


Fig 3. Effects of convulsions by dibenzoylguanidine on malondialdehyde level in ddY mouse brain. The symbols represent percentage of mean value in each group in the case of 100% of mean value in control group. Animals were used 9—21 mice in each group. There were significances in Student t-test.

a p<0.05, compared with control group.

b p<0.02, compared with control group.

Table 4. Effects of convulsions by pentylenetetrazol on malondialdehyde level in ddY mouse brain (nmol/g, m±SD)

	n	Forebrain	n	Brainstem	n	Cerebellum
Control 50sec after inj.	8	36.8±6.21	7	46.1±7.96	8	49.5±7.37
Pentylenetetrazol 50mg/kg 50sec after inj.	8	30.9±4.04 ^a	8	40.0±9.30	6	56.9±8.88
Pentylenetetrazol 80mg/kg Tonic convulsions (About 50sec after inj.)	9	30.5±4.04 ^a	7	48.0±6.55 ^b	7	52.5±5.49

a p<0.05, compared with control group.

b p<0.05, compared with pentylenetetrazol 50mg/kg group.

こすようになったものの発作間歇期には、E1 マウスの無処置群（無痙攣群）に比べて脳幹の MDA が有意に増加していた（表 1）が、前脳及び小脳には対照群に比べて変化が認められな

かった。一方 ddY マウスに放り上げ刺激を 6 週間行なったものでは、ddY マウスの無処置対照群のものに比べて、前脳の MDA のみが有意に低下していた。E1 マウスの痙攣過程における脳

Table 5. Malondialdehyde level in serum of E1 mouse (nmol/ml, m±SD)

	age	n	serum
Non-stimulated control group	8months	6	5.60±0.99
Stimulated group (Interictal period)	8months	5	3.68±0.89 ^a

a p<0.01, compared with non-stimulated control group.

Table 6. Effects of maximal ECS on malondialdehyde level in serum of ddY mouse (nmol/ml, m±SD)

	age	n	serum
Control	6weeks	10	5.05±1.60
ECS (1)	6weeks	10	3.68±0.98 ^a
Control	7weeks	10	5.04±1.93
ECS (8)	7weeks	7	3.39±1.18

a p<0.05, compared with control group.

ECS : 10mA, 0.5sec.

内MDAの変化は図1に示すごとく痙攣直前期及び痙攣中期には変化が認められなかったが、痙攣直後には前脳のMDAが、対照の発作間歇期に比べて、有意に低下していた。また痙攣30分後には小脳にMDAの有意な低下が認められ、さらに痙攣2時間後には最低値を示すが、このMDAの低下は、痙攣6時間後には、発作間歇期の値に回復した。

第2節 ECS

1回のECSによって、小脳のMDAが対照群に比べて有意に増加し、1日1回、8回のECSを行なった場合には脳幹のMDAが対照群に比べて有意に増加していた(表2)。ECS痙攣重積状態において、脳幹及び小脳のMDAが増加し、特に小脳での増加が著明であった(表2)。次に、通電時間を一定にして、通電量(mA)を減少させ閾値下刺激を加えると7mAの通電によって脳幹のMDAが有意に低下していた(表3)。

第3節 PTZ痙攣

痙攣直前、中及び後期には、前脳のMDAが対照群に比べ有意に低下していたが、そのさい痙攣後の低下は著明であった(図2)。しかし痙攣30分後には、対照群に回復していた。小脳では痙攣直前期にのみ著明なMDAの増加が認められ、痙攣中及び痙攣後には変化が認められなかった。脳幹では痙攣30分後に有意な低下

が認められたが、この低下は痙攣2時間後には対照値に回復した。

他方、痙攣を起こさせない量、すなわち閾値下量のPTZ 50mg/kgを腹腔内投与した場合には、前脳のMDA値は、対照群に比べて有意に低下していた。そのさい脳幹及び小脳には変化は認められなかった(表4)。

第4節 DBG痙攣

痙攣中には、小脳のMDA値が対照群に比べて有意に低下しており痙攣後には脳幹のMDA値が有意に低下していた。しかし、痙攣直前期には、脳内MDA値の有意な変化は認められなかった(図3)。

第6節 痙攣とマウス血清中のMDA値

E1マウスの発作間歇期には、血清中のMDA値は無痙攣群に比べて有意に低下していた(表5)。つぎに1回の最大電撃痙攣後には、血清中のMDA値は対照群に比べて有意に低下しており、又1日1回、8回の最大電撃痙攣後にも血清中のMDA値は低下していたが、有意差は認められなかった(表6)。また、間代性強直性痙攣が出現後の血清中のMDA値は有意に低下しており(表7)、DBG痙攣後の血清中のMDA値も対照群に比べて有意に低下していた(表8)。

考 按

頭部外傷にともなう出血の際、溶血によって生じるヘモグロビン由来の鉄イオンが酸素と反応し、O₂・やOH・を生成するが、これらのsuperoxide radicalsが脳細胞膜の不飽和脂質に作用して過酸化脂質を生成する。その結果としてMDAなどのアルデヒドや酸が生成されるが、そのさいニューロン膜のconformationの変化に基づくイオン機構の変化をともないてんかん源性焦点を形成することが想定されている(5, 6, 8)。本論文においては、鉄塩以外の他の痙

Table 7. Malondialdehyde level in serum of ddY mouse after convulsions by pentylenetetrazol (nmol/ml, m±SD)

	age	n	serum
Control 2 min after inj.	9 weeks	10	5.84±0.47
After convulsions by pentylenetetrazol (80mg/kg, about 2 min after inj.)	9 weeks	8	4.37±0.45 ^a

a p<0.001, compared with control group.

Table 8. Malondialdehyde level in serum of ddY mice after convulsions by dibenzoylguanidine (nmol/ml, m±SD)

	age	n	serum
Control DMSO, 45min after inj.	7 weeks	10	4.20±1.02
After convulsions by dibenzoylguanidine (150mg/kg, about 45min after inj.)	7 weeks	8	3.27±0.69 ^a

a p<0.05, compared with control group.

率モデルにおいてもこの仮説が支持されるかどうかについて検討を行なった結果、E₁マウス痙攣、ECS、PTZ 痙攣及びDBG痙攣のいずれにおいても、各痙攣過程において脳内部位による多少の相異は認められるが、MDAに何らかの変動が観察された。例えば、痙攣が容易に起こるようになったE₁マウスの発作間歇期には、脳幹のMDAが有意に増加しており、ECSを8回負荷した後には、脳幹にMDAの有意な増加を認めた。またECSによる痙攣重積状態には、脳幹にMDAの有意な増加を認め、さらに小脳にも著明なMDAの増加を認めた。これらのことから、反復して発作の起こっている状態では、一般にMDAが増加することが明らかにされた。さらに平松ら(13)はてんかん患者並びに他の神経疾患患者の髄液中のMDAを測定し、てんかん患者の血清並びに髄液中のMDA値は対照に比し低下していること及び重積痙攣並びにmyoclonusの症例では髄液中のMDAは高値であることを観察したが、これらの所見は、本論文の実験痙攣モデルについて得られた成績と同一機序に基づくものと考えられる。

つぎに単発性痙攣に基づく脳内MDAの変動について検討した結果、各実験モデルの相異に

よりMDAの変動は脳内の部位的相異が認められるが、一般的に共通する変化として、単発性痙攣の際には、MDAは一過性に低下することが認められた。また血清中の変化としては、各痙攣モデルに共通して、一般に痙攣後にはMDA値が有意に低下していた。なお痙攣の開始に伴ってMDA値が低下する原因の1つとして、この時期には一過性に極めて多量のエネルギーが消費されるため正常時における解糖系からのエネルギーのみによっては供給が十分でなく、脂質からの糖新生も亢進された結果、不飽和脂質の値も低下したものと推定される。

最近、平松ら(14)は、E₁マウスの痙攣中及びddYマウスのPTZ痙攣直前期並びに痙攣中には全脳の有機free radicalsが著明に低下することを電子スピン共鳴(ESR)法で認め、そのさい有機free radicalsの低下と一致して、Cu²⁺が増加していることを観察した。従ってこれらの過程においては、構造内にCuを含むglutathione peroxidaseやsuperoxide dismutaseの酵素活性が非常に高まっており、これらの酵素の働きによって有機free radicalsが減少すると共にMDA値も低下したことが想定される(図4)。

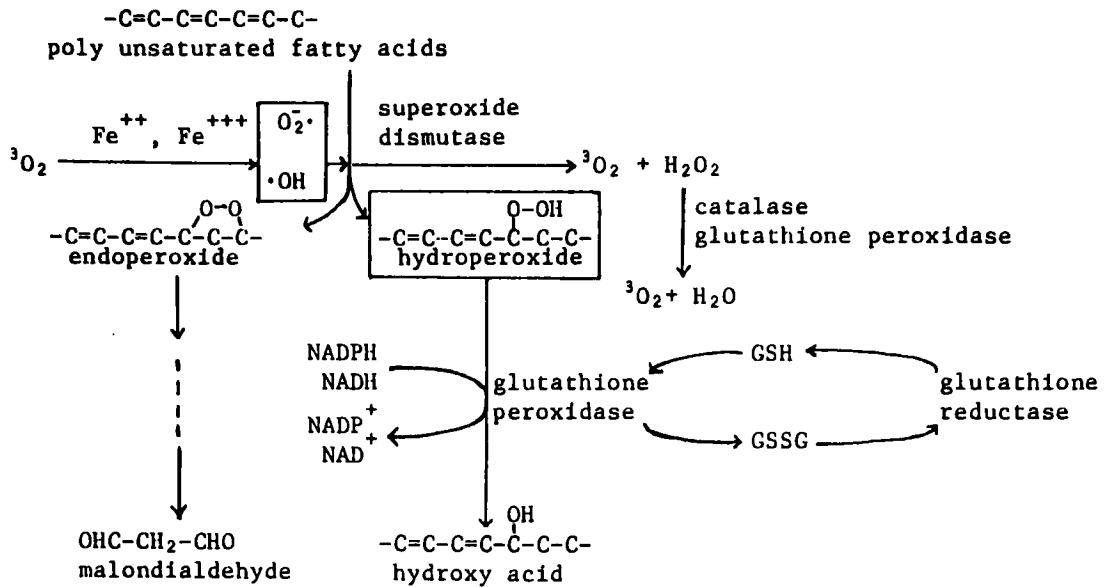
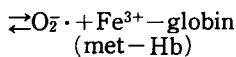
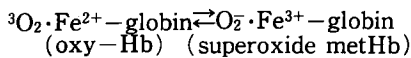


Fig 4. Possible mechanism for lipid peroxides formation by ferric or ferrous ion.

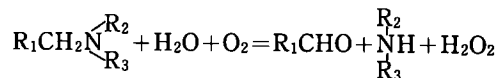
他方、反復痙攣の状態においては、痙攣モデルあるいは脳内部位の相異はあるが、いずれにせよ MDA の増加が認められた。すでにラットの鉄イオンてんかん源性焦点組織では MDA が増加していることが知られているが、その原因は鉄イオンによる superoxide radicals の生成に起因していることが示されている (6, 8, 13)。平松らは最近鉄イオンを投与したラット大脳皮質組織中には投与直後に $\cdot OOH$ が著明に増加することを ESR trapping 法により証明した (14)。又、平松ら (15) は、鉄イオン投与後のラット大脳皮質投与部位における metHb 結合 Fe^{3+} の増加を ESR 法で認めているが、発作間歇期の EI マウス脳及び PTZ 痙攣直前期の ddY マウス脳においても同様に metHb 結合 Fe^{3+} が増加することを認めている (14)。すでに superoxide radicals は Hb (Fe^{2+}) から metHb (Fe^{3+}) への自動酸化の過程で生じることがあきらかになされている (16)。すなわち



この過程でへモグロビンより放出された電子が酸素と反応して $O_2^{\cdot-}$ を生成するものと理解され

る。また、鉄イオンあるいはへム化合物を組織や不飽和脂肪酸を混入した溶液に加えると、 $O_2^{\cdot-} \cdot OH$ 及び H_2O_2 が生成されることが ESR 法などによって示されており (17~20)、さらに、鉄は、ミトコンドリア、マイクロソーム、赤血球及びリポソームの膜脂質、及び不飽和脂肪酸の酸化を触媒することも知られている (21~25)。これらの諸知見を勘案すると、痙攣発現の因子の1つとして当然へモグロビンに構成されている鉄イオンが重要な役割を演じていることが推定される。

MDA 生成の系路として、次の過程も考えられる。すなわち、アミン代謝に帰因するものである。脳内のドーパミン、ノルエピネフリン及びセトロニン (5-HT) は、いずれも、それらの代謝の最初の段階においてモノアミン酸化酵素 (MAO) によって酸化的脱アミノ化されるが、そのさい、下記のごとく過酸化水素が生成される (26)。



(R_1 は基質残基, R_2, R_3 は H 原子または, アルキル基を示す.)

ここに生成した過酸化水素が先述のごとく鉄イ

オンと反応すると superoxide radicals を生じ、過酸化脂質生成の引き金になることが理解される (27)。

過酸化脂質は通常、上述のごとく superoxide radicals により起こされた一連の free radicals 反応の結果と考えられるが、その他にもリン脂質の不飽和脂肪酸、例えば decosa-hexaenoic acid や arachidonic acid の代謝過程によっても生成される (28, 29)。Prostaglandins は arachidonic acid から生成されるが、その途中の代謝過程においても MDA が生成される (30)。また PTZ, ECS, あるいは bicuculline 痙攣後に脳遊離脂肪酸が増加する (31~36) ことが知られているが、これらの諸報告は、痙攣に伴ない膜構成脂質成分が過酸化反応を受けるとともに、一部は脂肪酸の形としても遊離されたことを示唆するもので、今後痙攣に伴なう脳内脂質代謝のより詳細な解明が待たれる。

結 論

EI マウス痙攣、電撃痙攣 (ECS)、ペンチレンテトラゾール (PTZ) 痙攣及びジベンゾイルグアニジン (DBG) 痙攣の各痙攣過程における膜構成脂質の過酸化反応をマロンジアルデヒド (MDA) を指標として測定し、以下の知見を得た。
(1) EI マウス脳幹 MDA 値は発作間歇期において対照 (無痙攣の EI マウス) に比し増加していた。
(2) ddY マウス脳内 MDA は maximal ECS を

1 日 1 回、8 日間の負荷をすると、脳幹において増加が認められ、ECS による痙攣重積状態においては、脳幹及び小脳において増加が認められた。

(3) EI マウスの痙攣後には、前脳、小脳の MDA は一過性に低下するが、痙攣 6 時間後には発作間歇期の値に回復した。

(4) ECS (10mA) 後には、小脳の MDA が増加していた。ECS (7mA) では、脳幹の MDA が低下していた。

(5) PTZ の痙攣直前期には、小脳の MDA が増加し、前脳においては低下していたが、痙攣中及び痙攣後には前脳においてさらに低下を示した。また脳幹においても痙攣 30 分後に一過性に低下が認められた。

(DBG 痙攣中には小脳の MDA が低下し、痙攣後には脳幹の MDA が低下していた。

(7) 痙攣モデルの種類及び脳内部位により多少異なるけれど、痙攣後には MDA 値の一過性に低下する部位がある。しかし反復痙攣が起る場合には、逆に MDA 値は増加することが明らかにされた。

謝 辞

稿を終るに臨み、終始御懇篤な御指導と御校閲を賜りました森 昭胤教授ならびに、直接御指導、御協力いただきました平松 緑助手に感謝の意を捧げます。また、本論文の遂行にあたり、御援助いただいた教室の皆様へ心から御礼申し上げます。

文 献

1. Willmore, L.J., Sybert, G.W. and Munson, J.B.: Chronic focal epileptiform discharges induced by injection of iron into rat and cat cortex. *Science* 200, 1501-1503, 1978.
2. Reid, S.A., Sybert, G.W., Boggs, W.M. and Willmore, L.J.: Histopathology of the ferric-induced chronic epileptic focus in cat: a golgi study. *Exp. Neurol.* 66, 205-219, 1979.
3. Rosen, A.D. and Frumin, N.V.: Focal epileptogenesis after intracortical hemoglobin injection. *Exp. Neurol.* 66, 277-284, 1979.
4. Reid, S.A. and Sybert, G.W.: Acute FeCl₃-induced epileptogenic foci in cats: electrophysiological analyses. *Brain Res.* 188, 531-542, 1980.
5. Rubin, J.J. and Willmore, L.J.: Prevention of iron-induced epileptiform discharges in rats by treatment with antiperoxidants. *Exp. Neurol.* 67, 472-480, 1980.
6. Willmore, L.J. and Rubin, J.J.: Formation of malonaldehyde and focal brain edema induced by subarachnoid

- injection of FeCl_2 into rat isocortex. *Brain Res.* **246**, 113—119, 1982.
7. 大石誠子：過酸化脂質測定法，最新医学 **33**，660—663，1978.
 8. 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，**95**，271—282，1983.
 9. Hiramatsu, M. and Mori, A.: Reduced and oxidized glutathione in brain and convulsions. *Neurochem. Res.* **6**，301—306，1981.
 10. 今泉 清，伊藤昭吾，沓掛源次郎，滝沢隆安，藤原公策，上川 清：マウスのでんかん様異常について，実験動物，**8**，6—10，1959.
 11. Nakae, I.: Synthesis of $\text{N,N}'$ -dibenzoylguanidine and its convulsive action. *Neurosciences*, **7**，205—217，1981.
 12. 八木國夫：過酸化脂質の測定，臨床検査，**23**，115—120，1979.
 13. 平松 緑，Marescau, B. and Lowenthal, A.: てんかん及びその他の神経疾患患者の血清並びに髄液中の過酸化脂質について，脳研究会会誌，**9**，112—113，1983.
 14. 平松 緑，河野雅弘，加太英明，森 昭胤：痙攣と脳内過酸化ラジカル及び Fe^{3+} ， Cu^{2+} について，神経化学，**22**，285—287，1983.
 15. Willmore, L.J., Hiramatsu, M., Kochi, H. and Mori, A.: Formation of superoxide radicals after FeCl_3 injection into rat isocortex. *Brain Res.* **277**，393—396，1983.
 16. Misra, H.P. and Fridovich, I.: The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. *J. Biol. Chem.* **247**，6960—6962，1972.
 17. Aisen P.: Some physicochemical aspects of iron metabolism. *Chiba Foundation Symposium* **51**，1—14，1977.
 18. Floyd, R.A.: Hydroxyl free-radical spin-adduct in rat brain synaptosomes observations on the reduction of the nitroxide. *Biochim. Biophys. Acta* **756**，204—216，1983.
 19. Kalyanaraman, B., Mottley, C. and Mason, R.P.: A direct electron spin resonance and spin-trapping investigation of peroxy free radical formation by hematin/hydroperoxide systems. *J. Biol. Chem.* **258**，3855—3858，1983.
 20. O'Brien, P.J.: Intracellular mechanism for the decomposition of a lipid peroxide by metal ions, heme compounds and nucleophiles. *Canad. J. Biochem.* **47**，312—319，1971.
 21. Tappel, A.L.: Vitamin E and free radical peroxidation of lipids. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **203**，12—28，1972.
 22. Smith, G.H. and Dunkley, W.L.: Initiation of lipid peroxidation by a reduced metal ion. *Arch. Biochem. Biophys.* **98**，6—48，1962.
 23. Hunter, F.E., Gebicki, J.M., Hoffsten, P.E., Weinstein, J. and Scott, A.: Swelling and lysis of rat liver mitochondria induced by ferrous ions. *J. Biol. Chem.* **238**，828—835，1963.
 24. Gross, S. and Melhorn, D.K.: Vitamin E, red cell lipids and red cell stability in prematurity. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **203**，141—162，1972.
 25. Fong, K.L., McCay, P.B., Poyer, J.L., Keele, B.B. and Misra, H.: Evidence that peroxidation of lysosomal membranes is initiated by hydroxyl free radicals produced during flavin enzyme activity. *J. Biol. Chem.* **248**，7792—7797，1973.
 26. Tipton, K.F.: The prosthetic groups of pig brain mitochondrial monoamine oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **159**，451—459，1968.
 27. Kappus, H. and Sies, H.: Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: Redox cycling and lipid peroxidation. *Experientia* **37**，1233—1358，1981.

28. Hochstein, P. and Ernster, L.: ADP-activated lipid peroxidation coupled to the TPNH oxidase system of microsomes. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **12**, 388—394, 1963.
29. Niehaus, W.G. and Samuelsson, B.: Formation of malonaldehyde from phospholipid arachidonate during microsomal lipid peroxidation. *Eur. J. Biochem.* **6**, 126—130, 1968.
30. Hamberg, M. and Samuelsson, B.: Oxygenation of unsaturated fatty acids by the vesicular gland of sheep. *J. Biol. Chem.* **242**, 5344—5354, 1967.
31. Bazan, N.G.Jr.: Effects of ischemia and electroconvulsive shock on free fatty acid pool in the brain. *Biochim. Biophys. Acta* **218**, 1—10, 1970.
32. Bazan, N.G.Jr.: Changes in free fatty acids of brain by drug-induced convulsions, electrochock and anesthesia. *J. Neurochem.* **18**, 1379—1385, 1971.
33. Bazan, N.G., Suzana, A., Liberti, M. and De Turco, E.B.R.: Arachidonic acid and arachidonoyldiglycerols increase in rat cerebrum during bicuculline-induced status epilepticus. *Neurochem. Res.* **7**, 839—843, 1982.
34. Berchtold-Kanz, E., Anhut, H., Heldt, R., Neufang, B. and Hertting, G.: Regional distribution of arachidonic acid metabolites in rat brain following convulsive stimuli. *Prostaglandins* **22**, 65—79, 1981.
35. Marion, J., Wolfe, L.S.: Increase in vivo of unesterified fatty acids, prostaglandin $F_{2\alpha}$ but not thromboxane B_2 in rat brain during drug induced convulsions. *Prostaglandins* **16**, 99—110, 1978.
36. Siesjö, Bo. K., Ingvar, M. and Westerberg, E.: The influence of bicuculline-induced seizures on free fatty acid concentrations in cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum. *J. Neurochem.* **39**, 796—802, 1982.

Implication of brain malondialdehyde in seizure mechanism

Atsushi SAWAKI

Department of Neurochemistry, Institute for Neurobiology,

Okayama University Medical School

(Director : Prof. A. Mori)

Changes in malondialdehyde (MDA) associated with convulsions were studied in *E ℓ* and *ddY* mice brain.

Convulsions in *E ℓ* mice are easily induced by "tossing" stimulation. The brainstem MDA level in the interictal period of stimulated *E ℓ* mice was higher than in the non-stimulated control *E ℓ* mice. The MDA levels in the forebrain and cerebellum were lower after convulsions, but returned to the interictal period level 6 hours after convulsions.

In the experimental status epilepticus induced by ECS, the MDA levels in the brainstem and cerebellum were higher. The brainstem MDA level was also higher after daily maximal ECS for 8 days in *ddY* mice. The cerebellum MDA level was higher after ECS (10mA), and the brainstem was lower after ECS (7mA). In the case of pentylenetetrazol induced convulsions, the cerebellum MDA level was higher before convulsions, and the forebrain level was lower before, during and after convulsions. The brainstem level was also lower 30min after convulsions. In addition, the cerebellum level was lower during convulsions induced by dibenzoylguanidine (DBG), and the brainstem level was lower after convulsions by DBG.

These results showed that generally the MDA level in the brain was lower after convulsions, but higher in particular brain regions after frequent convulsions, though experimental models of epilepsy and regional changes in MDA levels were different.