

## クエン酸鉄投与及び純酸素負荷マウスの グアニジノ化合物の変動に関する研究

岡山大学医学部附属分子細胞医学研究施設神経情報学部門 (指導: 森 昭胤教授)

渡 邊 省 吾

(平成 4 年 8 月 17 日受稿)

**Key words :** hyperoxygenation, iron ion, guanidino compounds, methylguanidine, free radicals

### 緒 言

グアニジノ化合物は生体内に広く分布しており、尿素生成における arginine (Arg) や筋収縮における creatinine (CRN) などのごとく、哺乳動物での極めて重要な役割が知られている反面、それらの毒性に関しても古来、多くの報告がなされている<sup>1)</sup>。

Brieger<sup>2)</sup>は CRN がコレラ菌によって分解されて methylguanidin (MG) が生成されることを明らかにするとともに、MG を実験動物に投与すると呼吸困難、筋線維性収縮及び全身けいれんを誘発することを、すでに 1887 年に報告しており、20 世紀の初期には guanidine (G) やその他の G 誘導体の神経毒性、特に強直性けいれんを起こすテタヌスの病因物質としての研究が若干報告されている<sup>3-7)</sup>。

Jinnai ら<sup>8)</sup>は  $\gamma$ -guanidinobutyric acid (GBA) をウサギの大槽内に注入すると強直性、間代性けいれんが誘発することを観察し、脳波学的にグアニジノ化合物による発作波を 1966 年に初めて記録し、続いて guanidinoethane-sulfonic acid (taurocyamine (GES))<sup>9)</sup>, guanidinoacetic acid (GAA)<sup>10)</sup>, creatine, CRN, creatine phosphate, N-acetylarginine (NAA)<sup>11)</sup>, 及び MG<sup>12)</sup>などもウサギ大槽内に注入するとけいれんを誘発することを観察している。またその後も、 $\alpha$ -guanidinoglutaric acid (GGA)<sup>13), 14)</sup>, homoarginine (HArg)<sup>15)</sup>,  $\delta$ -guanidinovaleric acid<sup>16)</sup>,  $\alpha$ -keto- $\delta$ -

guanidinovaleric acid<sup>17)</sup>, 及び 2-guanidinoethanol<sup>18)</sup>もラットなどの実験動物のけいれんあるいは脳波記録による発作波を誘発することが、当研究室において見いだされてきた<sup>1)</sup>。また最近になって MG がキンドリングラット脳において著明に増加することも明らかにされた<sup>19)</sup>。

他方、1968 年 Cohen ら<sup>20)</sup>が guanidinosuccinic acid (GSA) を尿毒症患者の血清から分離同定したのに端を発し、尿毒症の発症並びに病態における GSA, MG, GAA, CRN などのグアニジノ化合物の関与様式が活発に研究されている<sup>21)</sup>。また、Terheggen ら<sup>22)</sup>による高アルギニン血症の発見は臨床学的のみならず、遺伝学的にも非常に興味あるものであり、本疾患患者の血中に特異的に検出される  $\alpha$ -keto- $\delta$ -guanidinovaleric acid はけいれん誘発物質であることが、当研究室との共同研究により明らかにされている<sup>17)</sup>。さて、当研究室においては、ここ十数年来、外傷性てんかんの成因に関する研究が行われているが、てんかん焦点形成のメカニズムには、頭部外傷による出血、溢血に端を発する血球よりの hemoglobin, さらに鉄イオンの遊離と、それらを介する活性酸素種 ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot OH$  及び  $H_2O_2$ ) の発生が重要な役割を演ずることが明らかになった<sup>22-24)</sup>。すなわち、外傷部組織内に hemoglobin あるいは鉄イオンを介して発生した活性酸素種、特に  $\cdot OH$  は強い過酸化作用を有し、神経細胞膜を構成する不飽和脂質を過酸化して神経細胞膜障害をおこさせるが、他方、ラット脳ホモジェネートに鉄塩を過酸化水素と

ともに投与すると・OHが発生し、MG及びGAAが著明に生成することが見いだされている<sup>25)</sup>。またさらに、マウスを高濃度酸素にて長期飼育すると $O_2^-$ 及び・OHの発生が亢進し、過酸化脂質生成の指標とされる thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) の生成が亢進すること、及び $O_2^-$ の発生に対する防御機構とされる superoxide dismutase (SOD) 活性が亢進することなどが明らかにされている<sup>26)</sup>。従って、本研究においてはマウスに純酸素を負荷した場合、並びにクエン酸鉄を投与した場合について、脳、血清、肝、腎及び筋組織中のグアニジノ化合物の変動を測定し、活性酸素種の生体内グアニジノ化合物に及ぼす影響を検討した。

## 実験方法

### 1. 実験動物

体重約30 gのマウス (ddY系、雄) を使用し、室温24℃で飼育した。飼料は、オリエンタル酵母株式会社製 MF を使用し、水は給水ビンで自由に摂水させた。

### 2. 鉄塩投与法

Ferric citrate ( $FeC_6H_5O_7$  : 10mg  $Fe^{3+}$ /kg 体重) を隔日に腹腔内投与し、第3回目の投与の翌日屠殺した。

### 3. 酸素負荷法

内部を100%酸素( $O_2$ )に保つように特別に作成したマウス飼育ケージ内にてガスボンベより純 $O_2$ ガスを通気しながら1週間飼育した。

### 4. 分析試料の作成

マウスを頸椎脱臼により屠殺後、氷盤上にて脳、肝、腎、筋(腓腹筋)を摘出した。また、血液より血清を分離した。これらの試料は分析実験まで-80℃に保存した。

### 5. グアニジノ化合物の分析

それぞれの組織に1% picric acid 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 2×8を加え、picric acid を除去後、ろ過した。血清には1/2量のtrichloroacetic acid (30%) を加えて除蛋白した。ついでそれらのろ過液を減圧乾固し、残渣を0.01N・HCl (pH2.2) で溶解後、その200  $\mu$ l を phenanth-

renequinon 反応を繰り込んだ高速液体クロマトグラフ (Jasco, 東京) を用いて、グアニジノ化合物の分析を行った。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 (4.2×125mm, Jasco, 東京)；カラム温度, 70℃；溶出液の流速, 1.1 ml/min；phenanthrenequinone 溶液の流速, 0.5 ml/min；NaOH 溶液の流速, 0.5 ml/min；恒温槽, 70℃；反応コイル, 0.5mm I.D.×5 m；検出器, 蛍光光度計 (Jasco FP-110, Ex 365nm, Em 495 nm)；試料, 200  $\mu$ l；溶出液, (1)pH3.00, 0.4N citrate buffer (10.3分)(2)pH3.50, 0.4N citrate buffer (4.0分)(3)pH5.25, 0.4N citrate buffer (4.2分)(4)pH10.0, 0.4N citrate buffer (9.4分)(5)1 N・NaOH (5.2分)；蛍光試薬, (1)2 N・NaOH, (2)9, 10-phenanthrenequinone/dimethyl formamide (250mg/l)。

### 6. 実験試薬

Ferric citrate (片山化学), GSA, guanidino-propionic acid (GPA) (Sigma), NAA・ $H_2O$  (Eastman), HArg・HCl (Calbiochem), G・HCl 及び MG・HCl (東京化成), Arg (片山化学), GBA (第一薬品), CRN (半井化学), GAA (和光純薬) 及び GES (小野薬品) を使用した。

GGA は Mori et al.<sup>27)</sup>によって合成されたものを使用した。

### 7. 有意差検定

有意差検定は、two-tailed Student's t-test を用いて行った。

## 実験結果

### 1. マウス脳内グアニジノ化合物

Fig. 1A 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 GES (10  $\mu$ M), GSA (5  $\mu$ M), GGA (20  $\mu$ M), GAA (3  $\mu$ M), NAA (3  $\mu$ M), GPA (3  $\mu$ M), CRN (50  $\mu$ M), GBA (20  $\mu$ M), Arg (20  $\mu$ M), HArg (10  $\mu$ M), G (20  $\mu$ M) 及び MG (2  $\mu$ M) の順にそれらの peak が出現した。Fig. 1B は、対照マウス脳の分析例である。マウス脳から、それぞれ GAA, NAA, CRN, GBA, Arg 及び MG が検出定置された。

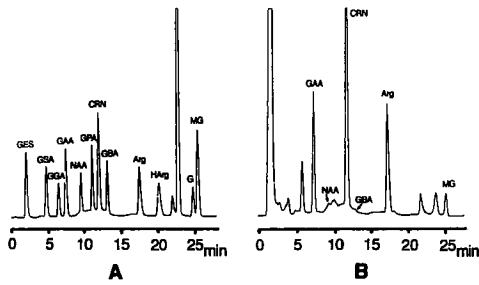


Fig. 1 Chromatogram of guanidino compounds.  
A. Standard substances, B. mouse brain.

## 2. クエン酸第二鉄投与によるグアニジノ化合物の変動

### 1) Guanidinoacetic acid (GAA)

Fe 投与により腎 GAA 含有量が著明に減少し、筋 GAA 含有量はわずかながら有意に増加した。脳、肝、及び血清 GAA 含有量には有意の変動は認められなかった (Fig. 2A)。

### 2) N-Acetylarginine (NAA)

Fe 投与により腎 NAA 含有量が著明に減少した。他の臓器及び血清には変動は認められなかった (Fig. 2B)。

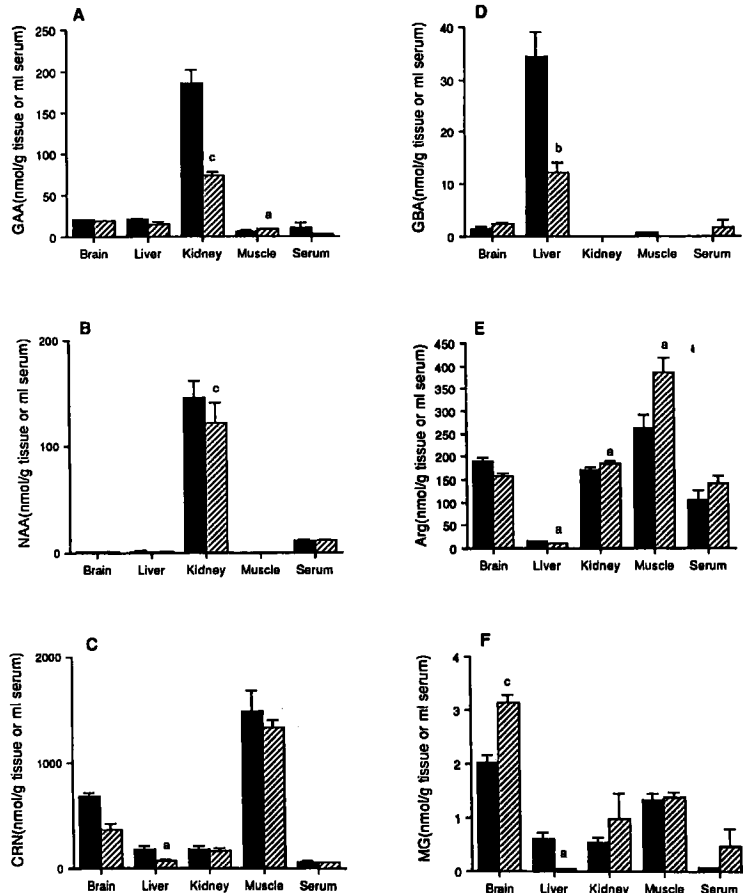


Fig. 2 Effect of ferric citrate on guanidino compounds levels in various organs. Each value represents mean  $\pm$  SEM of 8 to 11 mice. a:  $p < 0.05$ , b:  $p < 0.01$ , c:  $p < 0.001$  vs control. A: guanidinoacetic acid, B: N-acetylarginine, C: creatinine, D:  $\gamma$ -guanidinobutyric acid, E: arginine, F: methylguanidine. ■ Control, ▨ +Fe

## 3) Creatinine (CRN)

Fe 投与により肝 CRN 含有量が有意に減少した。他の臓器及び血清には有意の変動は認められなかった (Fig. 2C)。

4)  $\gamma$ -Guanidinobutyric acid (GBA)

Fe 投与により肝 GBA 含有量が著明に減少した。他の臓器及び血清には変動は認められなかった (Fig. 2D)。

## 5) Arginine (Arg)

Fe 投与により肝 Arg 含有が有意に減少し、腎及び筋 Arg 含有量は逆に増加した。脳及び血清 Arg 含有量には有意な変動は認められな

かった (Fig. 2E)。

## 6) Methylguanidine (MG)

Fe 投与により脳 MG 含有量が著明に増加した。腎及び血清 MG 含有量も増加しているが、統計学的には有意差が認められなかった。肝 MG 含有量は逆に有意に減少した (Fig. 2F)。

## 3. 純酸素負荷によるグアニジノ化合物の変動

## 1) Guanidinoacetic acid (GAA)

O<sub>2</sub> 負荷により腎 GAA 含有量が著明に減少し、筋 GAA 含有量は有意に増加した。脳、肝、及び血清 GAA 含有量には有意の変動は

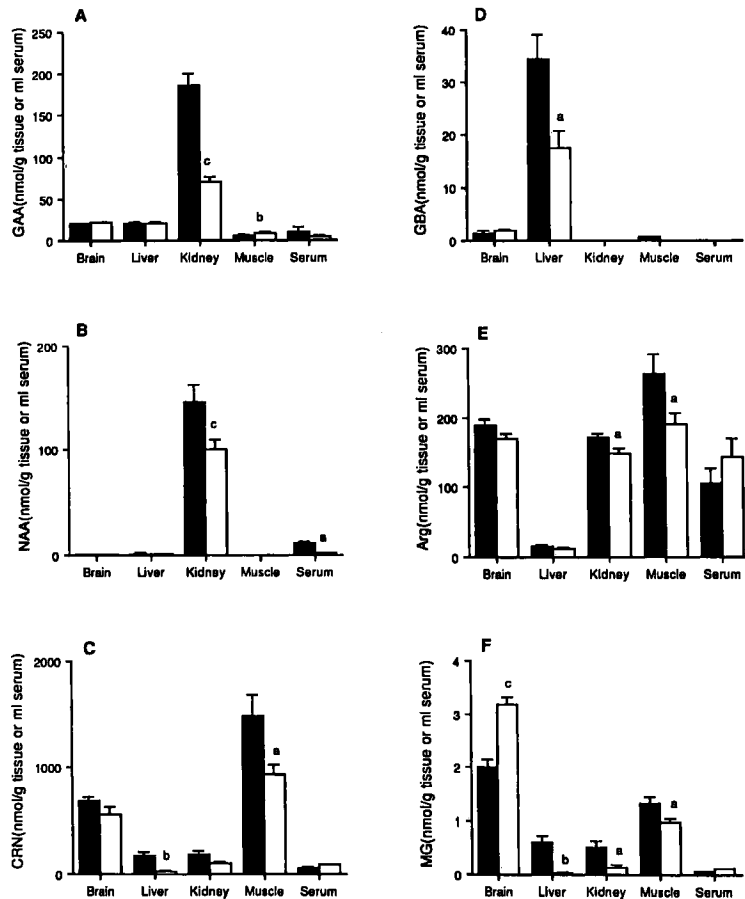


Fig. 3 Effect of pure oxygen on guanidino compounds levels in various organs Each value represents mean $\pm$ SEM of 8 to 11 mice. a:  $p < 0.05$ , b:  $p < 0.01$ , c:  $p < 0.001$  vs control. A: guanidinoacetic acid, B: N-acetylarginine, C: creatinine, D:  $\gamma$ -guanidinobutyric acid, E: arginine, F: methylguanidine ■ Control □ +O<sub>2</sub>

認められなかった (Fig. 3A).

## 2) N-Acetylarginine (NAA)

O<sub>2</sub>負荷により腎 NAA 含有量は著明に減少し、血清 NAA 含有量は有意に減少した。他の臓器には変動は認められなかった (Fig. 3B).

## 3) Creatinine (CRN)

O<sub>2</sub>負荷により肝及び筋 CRN 含有量が有意に減少した。脳、腎及び血清 CRN 含有量には有意の差は認められなかった (Fig. 3C).

## 4) $\gamma$ -Guanidinobutyric acid (GBA)

O<sub>2</sub>負荷により肝 GBA 含有量が著明に減少した。他の臓器及び血清 GBA 含有量には変動は認められなかった (Fig. 3D).

## 5) Arginine (Arg)

O<sub>2</sub>負荷により腎及び筋 Arg 含有量が有意に減少した。脳、肝、及び血清 Arg 含有量には変動は認められなかった (Fig. 3E).

## 6) Methylguanidine (MG)

O<sub>2</sub>負荷により脳 MG 含有量が著明に増加した。肝、腎及び筋 MG 含有量は逆に有意に減少した。血清 MG 含有量には変動は認められなかった (Fig. 3F).

## 考 察

先に当研究室の福島は<sup>25)</sup>ラット脳内に塩化第二鉄溶液を注入して、MG 及び GAA が増加することを見いだすとともに、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 及び過酸化中間体ラジカルが増加することを報告している。本研究においては、種々の鉄塩のうち比較的過酸化作用の強いことが知られている ferric citrate<sup>26)</sup>をマウス腹腔内に投与するとともに、マウスを純酸素中に飼育して直接酸素ストレスを負荷して生体内グアニジノ化合物の変動を調べた結果、脳内に MG が増加することのほか、他のグアニジノ化合物についても種々の変化が認められた。

GAA は慢性腎不全患者の血清中においては増加し、尿中排泄が減少していることが知られている<sup>29,30)</sup>。また GAA はけいれん誘発作用のあることも知られており<sup>31)</sup>MG とともに腎不全に伴うけいれんの原因物質の1つであると想定されている。GAA は生体内では主として腎において

glycine と Arg から transaminidase によって生成されることが知られている<sup>31)</sup>。従って GAA 含有量は腎において特に高いが、Fe 投与及び O<sub>2</sub> 負荷によって著明に減少するのは transaminidase 活性の阻害によることが推定される。

NAA は最初 Ohkusu and Mori<sup>32)</sup>によってウシ脳中に発見されたグアニジノ化合物で諸臓器中特に腎に高濃度に存在しており、Arg とほぼ等量であることが知られている。NAA についての知見は生化学的にもとぼしいが、Fe 投与及び O<sub>2</sub>負荷によって著明に減少するのは GAA 生成に関与する transaminidase と同様に、NAA の N-acetyl 化に関与する酵素 (N-acetyltransferase) の活性阻害が推定される。

CRN の筋収縮機構に関する重要な役割 (Lohmann 反応<sup>33)</sup>) については古来知られているところであるが、本研究の成績も CRN 含有量は筋に特に高かった。CRN は肝においては Fe 投与により、また肝、筋においては O<sub>2</sub>負荷により減少した。CRN は生体内では creatine を介して GAA から生成されるが、本研究においては肝及び筋における GAA はいずれも減少していないので、GAA からの生成過程のいずれかの活性阻害が予想される。

GBA は肝に特異的に高濃度に存在することが認められた。GBA は哺乳動物においては Arg と  $\gamma$ -aminobutyric acid との transamidination 反応による生成が報告されているが<sup>34)</sup>、肝には  $\gamma$ -aminobutyric acid はほとんど存在しないので、肝における transamidination による生成過程は疑問である。従って Fe 投与及び O<sub>2</sub>負荷により肝 GBA が著明に減少する原因も不明である。

Arg は CRN について高濃度に存在するグアニジノ化合物であり、グアニジノ化合物の代謝にとっては transamidination 反応における amidine 基供与体として、その中心となる物質であるが、Fe 投与により腎及び筋において Arg 含有量が増加し、肝においては逆に減少した。哺乳動物においては Arg は transaminidase によって amidine 基を失って ornithine になるほか、arginase によって lysine を生成する。また、前述の如く N-アセチル化されて NAA を

生成することなども考えられる。従って、Fe による腎及び筋の Arg 含有量の増加は、GAA や GBA について想定された transaminase 活性のみの阻害を考える他に、arginase 活性の阻害<sup>35)</sup>なども考慮せねばならない。なお、Fe による肝 Arg 含有量の減少、及び  $O_2$  負荷による腎及び筋の Arg 含有量の減少は、Fe あるいは  $O_2$  負荷により組織内に発生した  $O_2^-$  及び  $\cdot OH$  などの活性酸素種による細胞膜障害<sup>36)</sup>に基づく Arg の細胞内取り込み機能の障害による可能性が考えられる。この細胞膜機能障害は勿論他臓器においてもおこっていることが推定されるけれども、Arg の代謝過程の抑制度との相対的な関係で、結果的に、Arg 含有量の増加となる場合、一見不変となる場合、あるいは減少となる場合があるのかもしれない。

MG が慢性腎不全患者血漿中に著明に増加することが Giovanetti ら<sup>37,38)</sup>によって報告されて以来、腎不全原因物質としての MG に関する研究が多く報告されている<sup>39)</sup>。さらに、MG はウサギなどの実験動物の大槽内に投与すると反復して間代性けいれんが誘発されること<sup>12)</sup>やキンドリಂಗラットの脳中に GAA とともに増加すること<sup>19)</sup>などが明らかにされ、内因性神経毒性物質あるいはけいれん物質としての MG が最近注目されている。MG は生体内では CRN より creatol を介して生成されるが、その過程は活性酸素種 ( $O_2^-$ ,  $\cdot OH$ ) により促進することが明らかにされている<sup>40,41)</sup>。本実験において MG が Fe 投与あるいは  $O_2$  負荷によって脳内に増加することが観

察されたが、これは Fe あるいは高濃度  $O_2$  が生体内で活性酸素種を発生させることに基づくものと考えられる<sup>36,42)</sup>。なお、MG の生成増加が脳においてのみ認められるのは、脳の酸素消費量が他の諸臓器に比し極めて大量であること、従って、Fig. 4 に示すごとく  $O_2$  より還元されて生ずる  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  及び  $\cdot OH$  の発生の効率が大きいことによるものと考えられる。他方、肝においては Fe 投与において、また肝、腎、筋においては  $O_2$  負荷により MG 値が減少しているが、これらの臓器においては Fe あるいは酸素が、MG 生成系への影響以上に他の細胞障害に関与する機構に強く関与した結果、全般的に細胞機能の低下をきたしていることが想定される。

## 結 論

1. クエン酸第二鉄をマウス腹腔内に投与した群と純酸素 ( $O_2$ : 100%) 中でマウスを飼育して、直接  $O_2$  ストレスを負荷した群の、生体内グアニジノ化合物の変動を調べた。
2. GAA と NAA 量は腎に多く、Fe 投与及び  $O_2$  負荷によって、腎において減少した。
3. CRN は Fe 投与により肝で有意に減少し、 $O_2$  負荷により肝、筋で有意に減少した。
4. GBA は、肝に特異的に高濃度に存在し、Fe 投与及び  $O_2$  負荷によって、肝 GBA 含有量は著明に減少した。
5. Arg は Fe 投与により腎及び筋において増加し、肝においては有意に減少した。 $O_2$  負荷により腎及び筋において有意に減少した。
6. MG は Fe 投与及び  $O_2$  負荷によって、脳において増加した。一方、Fe 投与により肝 MG 含有量は減少し、 $O_2$  負荷により肝、腎、筋において MG 含有量は減少した。MG の生成増加が脳内においてのみ認められた。これは脳の  $O_2$  消費量が他の諸臓器に比して極めて大量であることより、 $O_2$  から還元されて生ずる  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  及び  $\cdot OH$  の発生の効率が大きいことによるものと考えられた。

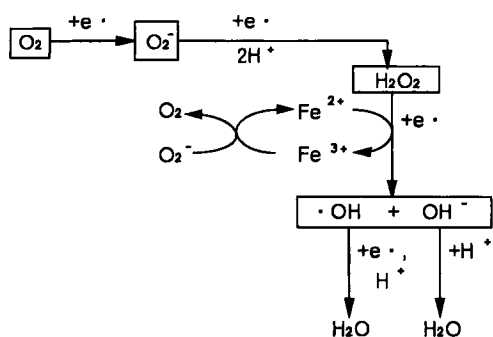


Fig. 4 The four step reduction of oxygen and iron catalyzed  $\cdot OH$  formation

稿を終えるに臨み、終始御懇篤な御指導と御校閲を賜りました森 昭胤教授、直接御指導いただきました枝松 礼学士に深く感謝の意を捧げます。また

本研究に御協力いただきました研究室の皆様にご心より御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Mori A : Biochemistry and neurotoxicology of guanidino compounds : history and recent advances. Pavlovian J Biol Sci (1987) **22**, 85—94.
- 2) Brieger L : Zur kenntniss der stoffwechselproducte des Cholera bacillus. Klin Wochenschr (1887) **44**, 317—320.
- 3) Fühner H : Curarestudien I. Die periphere Wirkung des Guanidins. Arch Exp Pathol Pharmacol (1907) **50**, 1—49.
- 4) Noël Paton D and Findlay L : The parathyroid : — Its nature, cause, and relation to idiopathic tetany. Part IV : The etiology of the condition and its relationship to guanidine and methylguanidine intoxication. Q J Exp Physiol (1917) **10**, 315—344.
- 5) Frank E, Streen R and Nothmann M : Die Guanidin- und Dimethylguanidin-Toxikose des Säugetiers und ihre physiopathologische Bedeutung. Z Gesamte Exp Med (1921) **24**, 341—370.
- 6) György P and Vollmer H : Beeinflussung der Guanidinvergiftung durch Sauezufuhr. Arch Exp Pathol Pharmacol (1922) **95**, 200—205.
- 7) Nelken L : Über den Einfluss der Guanidinvergiftung auf den Calcium und Phosphatgehalt des Blutes. Klin Wochenschr (1923) **1**, 261.
- 8) Jinnai D, Sawi A and Mori A :  $\gamma$ -Guanidinobutyric acid as a convulsive substance. Nature (1966) **212**, 617.
- 9) Mizuno A, Mukawa J, Kobayashi K and Mori A : Convulsive activity of taurocyamine in cats and rabbits. IRCS Med Sci (1975) **3**, 385.
- 10) Jinnai D, Mori A, Mukawa J, Ohkusu H, Hosotani M, Mizuno A and Tye LC : Biochemical and physiological studies on guanidino compounds induced convulsion. Jpn J Brain Physiol (1969) **106**, 3668—3673.
- 11) 森 昭胤, 大楠晴美 :  $\alpha$ -N-アセチル-L-アルギニンの分離同定および痙攣誘発作用について. 神研の進歩 (1971) **15**, 303—306.
- 12) Matsumoto M, Kobayashi K, Kishikawa H and Mori A : Convulsive activity of methylguanidine in cats and rabbits. IRCS Med Sci (1976) **4**, 65.
- 13) 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.
- 14) Shiraga H and Mori A : Convulsive activity of  $\alpha$ -guanidinoglutaric acid in rats. IRCS Med Sci (1982) **10**, 855—856.
- 15) Yokoi I, Toma J and Mori A : The effect of homoarginine on the EEG of rats. Neurochem Pathol (1984) **2**, 295—300.
- 16) Shindo S, Tsuruta K, Yokoi I and Mori A : Synthesis of  $\delta$ -guanidinovaleric acid and its effect on EEG of rats. Neurosciences (1984) **10**, 177—182.
- 17) Marescau B, Hiramatsu M and Mori A :  $\alpha$ -Keto- $\delta$ -guanidinovaleric acid-induced electroencephalographic epileptiform discharges in rabbits. Neurochem Pathol (1983) **1**, 203—209.
- 18) Edaki A, Watanabe Y, Yokoi I, Shiraga H, Fujii T and Mori A : 2-Guanidinoethanol-induced convulsive seizures in rat. Neurosciences (1986) **12**, 106—107.

- 19) Hirayasu Y, Morimoto K and Otsuki S : Increase of methylguanidine and guanidinoacetic acid in the brain of amygdala-kindled rats. *Epilepsia* (1991) **32**, 761—766.
- 20) Cohen BD, Stein IM and Bonas JE : Guanidinosuccinic aciduria in uremia. A possible alternate pathway for urea cycle. *Am J Med* (1968) **45**, 63—68.
- 21) Cohen BD : Guanidino compounds : Implications in uremia ; in *Guanidines : Historical, Biochemical, and Clinical Aspects of the Naturally Occurring Guanidino Compounds*, Mori, Cohen and Lowenthal eds, Plenum Press, New York (1985) pp265—275.
- 22) Terheggen HG, Schwenk A, Lowenthal A, Van Sanke M and Colombo JP : Argininemia with arginase deficiency. *Lancet* (1969) **2**, 748—749.
- 23) Mori A, Hiramatsu M, Yokoi I and Edamatsu R : Biochemical pathogenesis of post-traumatic epilepsy. *Pavlovian J Biol Sci* (1990) **25**, 54—62.
- 24) Mori A, Hiramatsu M, Edamatsu R and Kohno M : Possible involvement of oxygen free radicals in the pathogenesis of post-traumatic epilepsy, in *Medical, Biochemical and Chemical Aspects of Free Radicals*, Hayaishi, Niki, Kondo and Yoshikawa eds, Elsevier, Amsterdam (1989) pp1249—1252.
- 25) 福島正登 : 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. *岡山医誌* (1987) **99**, 787—806.
- 26) Mori A, Hiramatsu M and Yokoi I : Post-traumatic epilepsy, free radicals and antioxidant therapy ; in *Free Radicals in the Brain : Aging, Neurological and Mental Disorders*, Prilipko ed, Springer-Verlag, Berlin (1992) pp 109—122.
- 27) Mori A, Akagi M, Katayama Y and Watanabe Y :  $\alpha$ -Guanidinoglutaric acid in cobalt-induced epileptogenic cerebral cortex of cats. *J Neurochem* (1980) **35**, 603—605.
- 28) Minotti G and Aust SD : An investigation into the mechanism of citrate-Fe<sup>2+</sup>-dependent lipid peroxidation. *Free Radical Biol & Med* (1987) **3**, 379—387.
- 29) Cohen BD : Guanidinosuccinic acid in uremia. *Arch Intern Med* (1970) **126**, 846—850.
- 30) Prez G, Rey A, Michlus M and Stein I : Cation-exchange chromatography of guanidine derivatives in plasma of patients with chronic renal failure. *Clin Chem* (1976) **22**, 240—242.
- 31) Hird FJR, Davuluri SP and McLean RM : Evolutionary relationships between arginine and creatine in muscle ; in *Ureacycle Diseases*, Lowenthal, Mori and Marescau eds, Plenum Press, New York (1982) pp401—406.
- 32) Ohkusu H and Mori A : Isolation of N-acetyl-L-arginine from cattle brain. *J Neurochem* (1969) **16**, 1485—1486.
- 33) Lohmann K : Über die enzymatische Aufspaltung der Kreatin-phosphorsäure ; zugleich ein Beitrag zum chemismus der Muskelkontraktion. *Biochem Z* (1934) **271**, 264—277.
- 34) Shimoyama M : Studies on arginine and other guanidoderivatives. XVI The influence of the addition of several kinds of acceptors on enzyme transamidation from glycocyamine by hog kidney preparation. *Bull Osaka Med Sch* (1961) **7**, 105—110.
- 35) Edlbacher S, Kraus J and Leuthardt : Die Sterrerung der Arginasewirkung durch Sauerstoff. 9. Mitteilung zur Kenntnis der Arginase. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* (1933) **217**, 89—104.
- 36) Soushorn PA and Powis G : Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc* (1988) **63**, 381—389.
- 37) Giovannetti S, Biagini M and Cioni L : Evidence that methylguanidine is retained in chronic renal failure. *Experientia* (1968) **24**, 341—342.

- 38) Giovannetti S, Balestri PL and Barsotti G : Methylguanidine in uremia. *Arch Intern Med* (1973) **131**, 709—713.
- 39) Mori A, Cohen B and Koide H (eds) : *Guanidines II. Further Explorations of the Biological and Clinical Significance of Guanidino Compounds*, Plenum Press, New York (1989).
- 40) Aoyagi K, Nagase S, Narita M and Tojo S : Role of active oxygen on methylguanidine synthesis in isolated rat hepatocytes. *Kidney Int* (1987) **22**, S 229—S 233.
- 41) Nakamura K, Ienaga K, Yokozawa T, Fujitsuka N and Oura H : Production of methylguanidine from creatinine via creatol by active oxygen species : Analyses of the catabolism in vitro. *Nephron* (1991) **58**, 42—46.
- 42) Aust P : Some physiological aspects of iron metabolism. *Ciba Found Symp* (1977) **51**, 1 —14.

**Effects of ferric citrate or hyperoxygenation on guanidino compounds  
in mouse organs**

**Seigo WATANABE**

**Department of Neuroscience,  
Institute of Molecular and Cellular Medicine,  
Okayama University Medical School,  
Okayama 700, Japan  
(Director : Prof. A. Mori)**

The guanidino compounds in various mouse organs after i.p. administration of ferric citrate(Fe) and after inhalation of pure oxygen(O<sub>2</sub>) were studied.

Guanidinoacetic acid and N-acetylarginine levels were markedly higher in the kidney, and they decreased after administration of Fe or inhalation of O<sub>2</sub>. Creatinine decreased in the liver after administration of Fe, and it decreased in the liver and muscle after inhalation of O<sub>2</sub>.  $\gamma$ -Guanidinobutyric acid level was significantly higher in the normal liver, but decreased after administration of Fe or inhalation of O<sub>2</sub>. Arginine(Arg) increased in the kidney and muscle after administration of Fe, while it decreased in the liver. Arg decreased in the kidney and the muscle after inhalation of O<sub>2</sub>.

Methylguanidine(MG) increased in the brain after administration of Fe or inhalation of O<sub>2</sub>. However, MG decreased in the liver after administration of Fe, and also decreased in the liver, kidney and muscle after inhalation of O<sub>2</sub>.

MG increased only in the brain. This finding suggested that the reactive oxygen species(O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,  $\cdot$ OH) were most effective there, because oxygen consumption in the brain was much more than in the other organs.