

# 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）

高 知 宏 喜

（昭和57年11月14日受稿）

**Key words:** 鉄イオンてんかん, フリーラジカル,  
活性酸素, 過酸化脂質, グルタチオン

## 緒 言

1978年, Willmore ら<sup>1</sup>は, 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 neuron の減少, 星状細胞の gliosis, dendritic spines の減少及び dendritic branching や varicosities の減少などヒトてんかんの病巣部位と同様な組織変性が認められる報告している<sup>2</sup>. また Rosen ら<sup>3</sup>は, ヘモグロビンをラットの大脳皮質に注入すると慢性てんかん様放電が起り, その病巣部位は外傷性てんかんにみられる病理組織像と同様な所見であることから, ヘモグロビンから遊離される鉄イオンが外傷性てんかんのひきがねであろうと述べている. さらに Reid ら<sup>4</sup>は, ネコの鉄イオンによるてんかん焦点組織の細胞外電位記録実験において, 鉄イオンによるてんかん源性焦点の電気生理学的特徴は, ヒトてんかん源性焦点において認められる所見ときわめて似ていると報告している. 従って, これらの諸所見は鉄イオンによるてんかん源性焦点が, 外傷性てんかんの秀れた実験モデルとして使用される可能性を示すものである.

その後, Rubin ら<sup>5</sup>は,  $\alpha$ -tocopherol と selenium を投与すると, 鉄イオンによるてんかん様発作波が抑制されることから, 外傷性てんかんの発生機構には膜の過酸化が関連しているであろうと推定しており, また Willmore ら<sup>6</sup>は, 出血のさい赤血球から遊離される鉄が, 細胞膜脂質の過酸化を誘発し, ついで組織細胞の

変性をひき起こす可能性を指摘している.

今回著者は, 鉄イオンてんかん源性焦点の発現機構をさらに明確化するため, 鉄イオンをラット大脳皮質感覚運動領域に投与後, その組織部位において, 細胞膜脂質の過酸化反応のひきがね作用を行なうと考えられる free radicals あるいは活性酸素の経時的変化について詳細に検索を行ない, さらに過酸化脂質及び酸化型 glutathione (GSSG) 並びに還元型 glutathione (GSH) の変動についても検索を行ない興味ある諸知見をえたので報告する.

## 実験方法

### 第1節 実験動物

体重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, MF (オリエンタル酵母) を使用し, 水は給水ビンで自由に摂取させた.

### 第2節 てんかん源性焦点の作成

ラットを ethylether 麻酔下で脳定位固定器で固定後, 大脳皮質, 左感覚運動領域に0.1M 塩化第二鉄溶液5μlをマイクロシリンジで, 1分間に1μlの速度で注入した. 対照群には生理食塩水5μlを同様にして注入した.

### 第3節 皮質脳波の記録

ラットを ethylether 麻酔下で固定後, 頭皮を縦切開し, 附着筋肉及び骨膜を剥離したのち頭蓋骨を露出した. そのさい骨からの点状出血は歯科用ドリルで骨の挫滅をして止血を行なった. ついで前頭部, 後頭部左右対称に4ヶの穴を開け, これに径1mm, 長さ10mmの螺旋電極を

を脳表面に接するように挿入した。ついで周囲を歯科用セメントで固定後、これらの電極から双極誘導で脳波計(日本光電、MP-L-72)を用いて脳波を記録した。

#### 第4節 フリーラジカルの分析

##### 1) 試料の採取

塩化第二鉄溶液注入5, 10, 15, 30分後にラットを断頭後、直ちに全脳を氷上で摘出後、径3mm、長さ300mmのガラス管に深さ4~5cmまで注入し、液体チッ素で固定後、分析開始まで-80°Cに保存した。

##### 2) フリーラジカルの測定

フリーラジカルの測定は、電子スピン共鳴(ESR)装置(日本電子、JESFE3AX)を用い、5GHz,  $3309 \pm 2500$  pulse, -196°Cの条件下で行なった。

#### 第5節 活性酸素の分析

##### 1) 試料の採取

塩化第二鉄溶液注入5, 15分後にラットを液体チッ素で固定後、断頭し、分析開始まで-80°Cで保存した。

##### 2) 活性酸素の測定

活性酸素の測定は、頭部を解凍後、大脳皮質の焦点組織及び対側部位を氷上で直ちに摘出したのち、Chan and Fishmanらの方法<sup>7</sup>に従い、行なった。すなわち、脳組織30~50mgにKrebs Ringer (KR) 液1mlを加え、テフロン棒付ガラスホモゲナイザー管でホモゲナイズ後、nitroblue tetrazolium (1mg/ml KR) 0.4mlを加え、O<sub>2</sub>供給のもとに37°C、30分間インキュベーションを行なった。ついでスーパーオキサイドディスクターゼ溶液(30μg/ml) 1mlを加え、0°Cで10,000回転、10分の遠心分離を行なった。得られた沈殿物(nitroblue formazon, NBF)にピリシン3mlを加え、100°Cで1時間水浴加熱後、再び0°Cで10,000回転、10分遠心分離を行ない、得られた上清について、分光光度計(日立、124型)を用い、波長515nmの条件で比色測定した。

#### 第6節 過酸化脂質の分析

##### 1) 試料の採取

塩化第二鉄溶液注入0, 3, 5, 10, 15, 30分後にラットを液体チッ素で固定し、断頭後、

頭部を分析開始まで-80°Cに保存した。

##### 2) 過酸化脂質の測定

過酸化脂質の測定は、大石らの方法<sup>8</sup>に従って行なった。すなわち、解凍後、直ちに氷上で左右大脳半球を摘出した後、脳組織(500~800mg)に10倍量の生理食塩水を加え、テフロン棒付ガラス管でホモゲナイズした。ついで磨碎液0.1mlに8.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) 溶液0.2ml, 20%酢酸緩衝液(PH3.5)1.5ml, 1%チオバルビツール酸(TBA)溶液1.5mlを加え、さらに蒸留水0.7mlを加えて全量を4mlとし、攪拌後100°Cで1時間加熱した。水で冷却後、蒸留水1ml及びn-ブタノール・ピリシン混液(15:1)5mlを加え、5分間攪拌後、0°C, 3,000回転で15分遠心分離を行なった。ついで分離された有機層について、分光螢光光度計(島津、RF502)を用い、励起波長515nm、螢光波長532nmの条件で螢光測定を行なった。

#### 第7節 GSH及びGSSGの分析

##### 1) 試料の採取

塩化第二鉄溶液注入5, 15分及び1時間後にラット頭部をマイクロウェーブ(新日本無線、NJE2601, 5KW, 2sec)で照射後、大脳皮質を氷上で摘出し、分析開始まで-80°Cで保存した。

##### 2) GSH及びGSSGの測定

GSH及びGSSGの測定は、Hissin and Hilfの方法<sup>9</sup>に従って行なった。すなわち、脳組織(150~300mg)に25%ピロリン酸1ml及び0.005M EDTA含有0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(PH8.0)3.75mlを加え、ポリトロンでホモゲナイズ後、100,000gで30分、冷凍遠心を行なった。GSHの分析には、得られた上清0.5mlに0.005M EDTA含有0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(PH8.0)4.5mlを加え、さらにその0.1mlに同一の0.1Mリン酸緩衝液(PH8.0)2mlをえたのち、o-phthalaldehyde(OPT, 100μg)含有メタノール0.1mlを加えて室温で15分放置した。又GSSGの分析には同一の上清0.5mlに0.04MN-ethylmaleimide0.2mlを加えて30分室温放置後、0.1N NaOH4.3mlを加え、さらにその0.1mlに0.1N NaOH2mlをえた後、OPT(100μg)含有メタノール0.1mlを加えて室温で15分

放置した。ついで分光螢光光度計(島津, RF 502)を用い、励起波長350 nm, 螢光波長420 nm の条件で、GSH 及び GSSG を測定した。

### 実験結果

#### 第1節 皮質脳波

左大脳皮質感覚運動領域に塩化第二鉄溶液を注入すると約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のが観察された(Fig. 1-1)。

**Effect of ferric ion on rat ECoG  
15 min. after inj.**

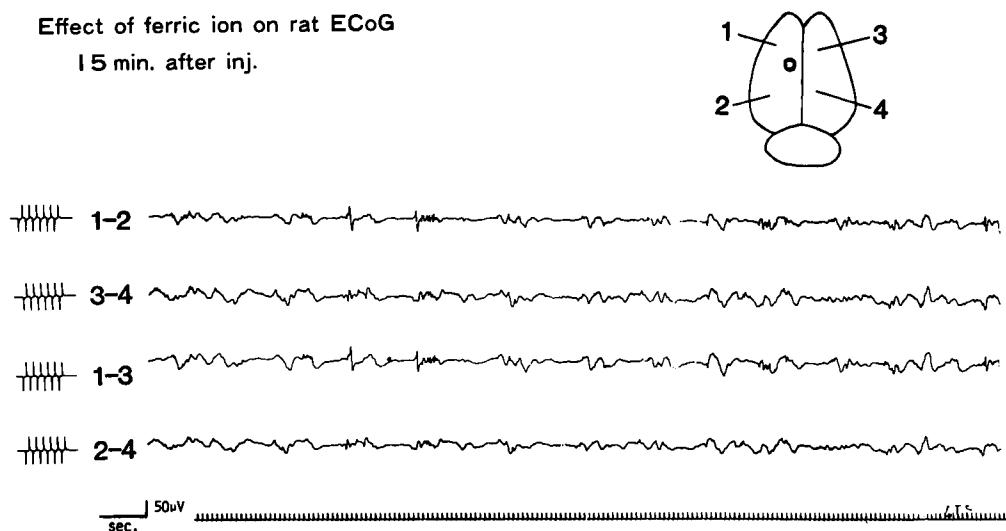


Fig. 1-1

**20 min. after inj.**

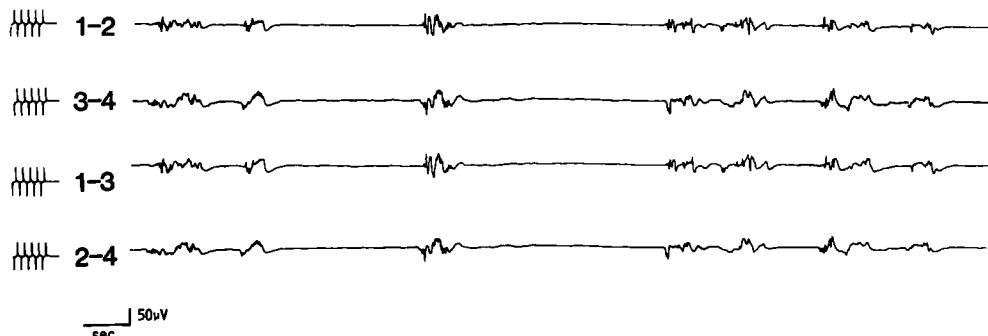


Fig. 1-2

注入20分後より両側性に spike あるいは polyspike discharges が認められ、spike and wave

#### 第2節 ESRによるフリーラジカルの測定

ESRによるフリーラジカルの測定結果は、

がこの時期に出現した(Fig. 1-2)。

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するのが観察された(Fig. 1-3, 4)。

以後、spike あるいは polyspike discharges は比較的一定の周期で出現することが認められたが、注入1~5ヶ月後における観察においては発作放電の振幅が増加しており、100 μV以上のものが多発しているのが認められた(Fig. 1-5, 6)。

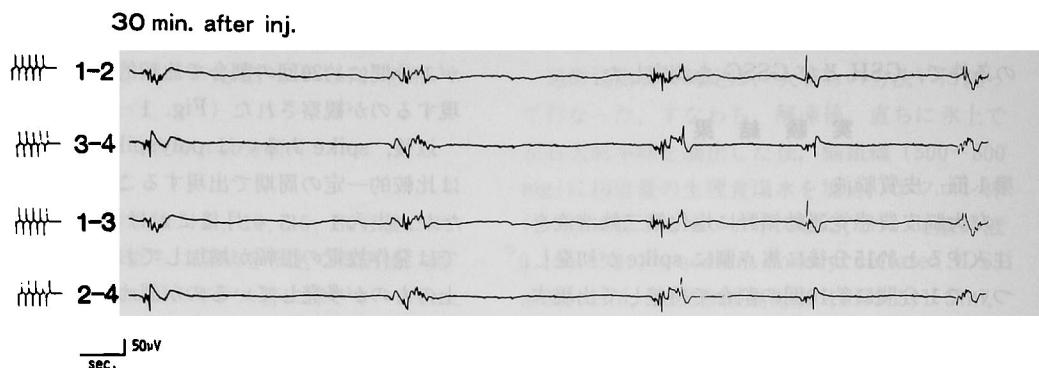


Fig. 1-3

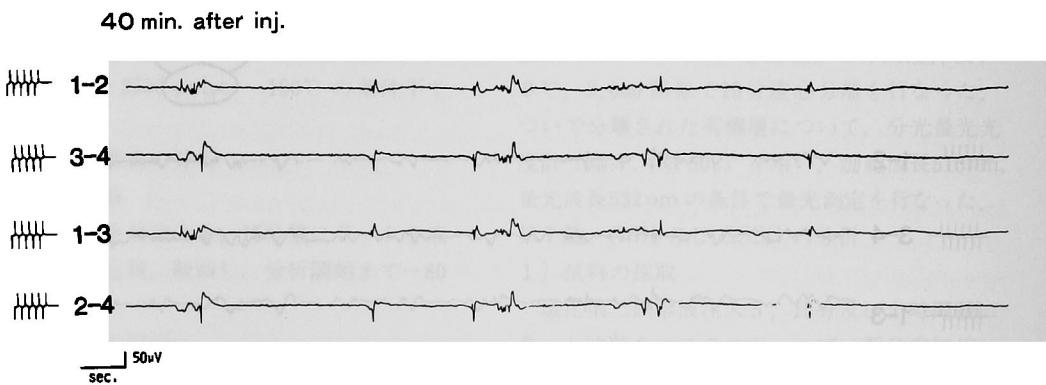


Fig. 1-4

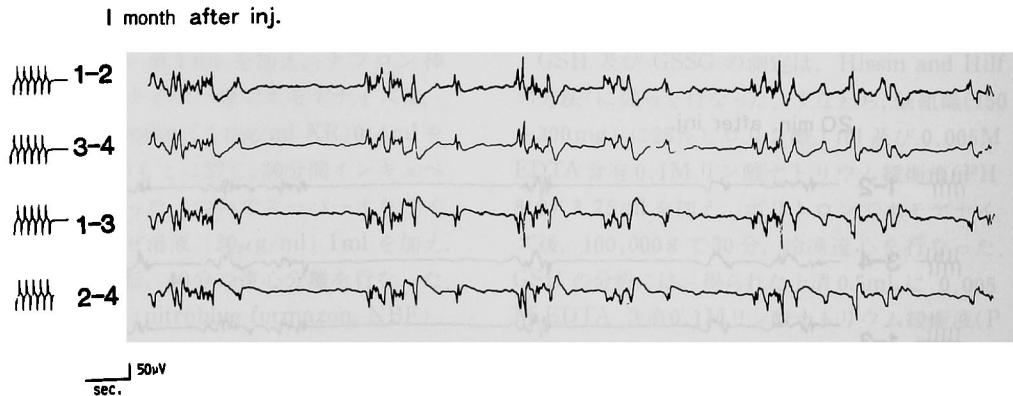


Fig. 1-5

Fig. 2 に示す如く、全脳では  $G=2.01$  のフリー ラジカルのほかに、メトヘモグロビンの  $\text{Fe}^{3+}$  を示す  $G=6.00$ 、メトヘモグロビン以外の蛋白に結合している  $\text{Fe}^{3+}$  を示す  $G=4.32$ 、蛋白に結合している  $\text{Cu}^{2+}$  を示す  $G=2.05$  及び未同定

の金属イオン  $G=2.27$  が検出された。

1) Fig. 3 は、塩化第二鉄溶液注入 5, 10, 15, 30 分後におけるメトヘモグロビン結合の 3 値の鉄イオン ( $G=6.00$ ) の変動を示したものであるが、注入 5 分後に、対照に比べて有意なシグ



Fig. 1-6

Fig. 1 Effect of  $\text{Fe}^{3+}$  on rat electrocorticogram

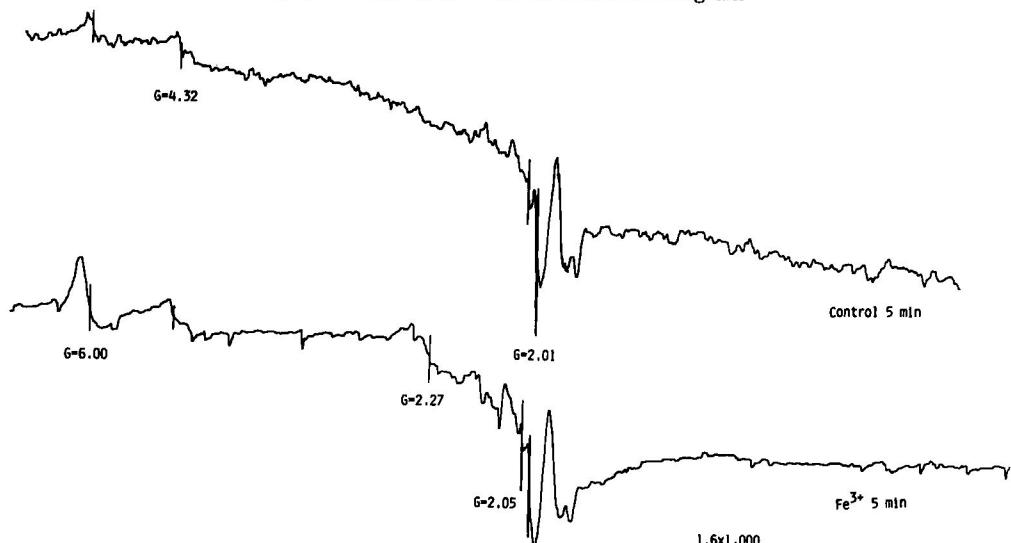


Fig. 2 ESR signals in  $\text{Fe}^{3+}$  applied rat cerebrum

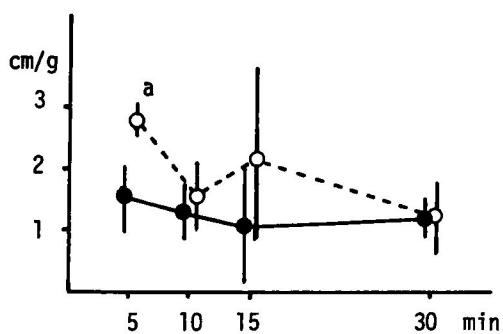


Fig. 3  $\text{Fe}^{3+}$ -metHb in  $\text{Fe}^{3+}$  applied rat cerebrum  
a.  $p < 0.01$ , compared with control.

$n = 4$ ,  $m \pm S.D.$ , ○  $\text{Fe}^{3+}$ , ● control.

ナルの増加が認められた。

2) Fig. 4は、有機フリー・ラジカル  $G=2.01$  の

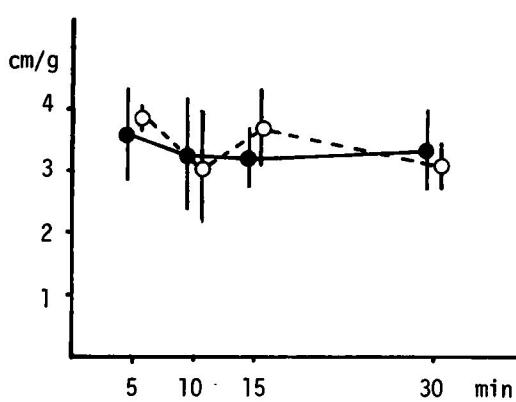


Fig. 4 Free radical in  $\text{Fe}^{3+}$  applied rat cerebrum  
 $n = 4$ ,  $m \pm S.D.$ , ○  $\text{Fe}^{3+}$ , ● control

変動を示したものである。塩化第二鉄溶液注入

5分より30分後まででは、対照に比し有意な増加は認められなかった。

3) Fig. 5, 6 は蛋白結合の3価の鉄イオンG=4.32及び蛋白結合の2価の銅イオンG=2.05の変動を示したものである。これらのイオンは塩化第二鉄溶液注入5分より30分後まででは、対照に比し有意差は認められなかった。

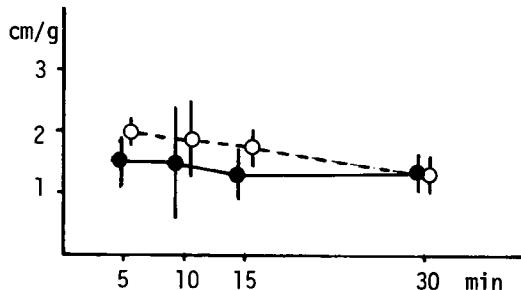


Fig. 5  $\text{Fe}^{3+}$ -protein in  $\text{Fe}^{3+}$  applied rat cerebrum  $n=4$ ,  $m \pm \text{S.D.}$ , ○  $\text{Fe}^{3+}$ , ● control.

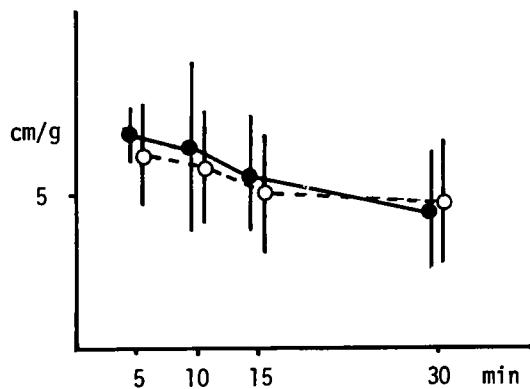


Fig. 6  $\text{Cu}^{2+}$ -protein in  $\text{Fe}^{3+}$  applied rat cerebrum  $n=4$ ,  $m \pm \text{S.D.}$ , ○  $\text{Fe}^{3+}$ , ● control.

### 第3節 活性酸素

左大脳皮質の塩化第二鉄溶液注入部位の活性酸素値は、注入5分及び15分後において対照群に比し有意に増加していた(Fig. 7)。一方、対側では、注入5分及び15分後に活性酸素は対照群に比し増加の傾向にあるが、統計的には有意差は認められなかった。

### 第4節 過酸化脂質

左大脳皮質の塩化第二鉄溶液注入部位では、注入直後より過酸化脂質は対照群に比べて有意に増加しており、注入3分では急激な増加を示し、以後30分までその増加は一定であった(Fig.

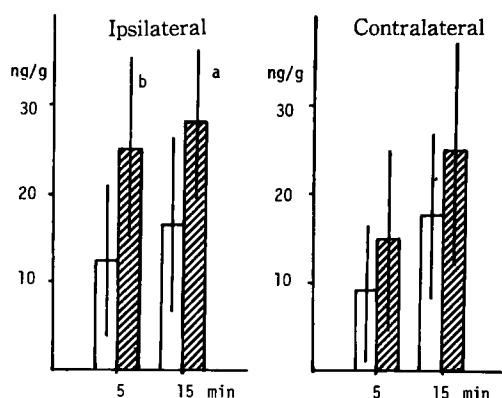


Fig. 7 Active oxygen formation in  $\text{Fe}^{3+}$  applied rat cerebrum

a.  $p < 0.05$ , compared with control.

b.  $p < 0.01$ , compared with control.

$n = 7 \sim 13$ ,  $m \pm \text{S.D.}$ , ■  $\text{Fe}^{3+}$ , □ control.

8)。注入5, 15分及び30分後では対照群に比べて有意差が認められた。一方、対側では注入30分後までには、過酸化脂質の変化は対照群と相違が認められなかった。

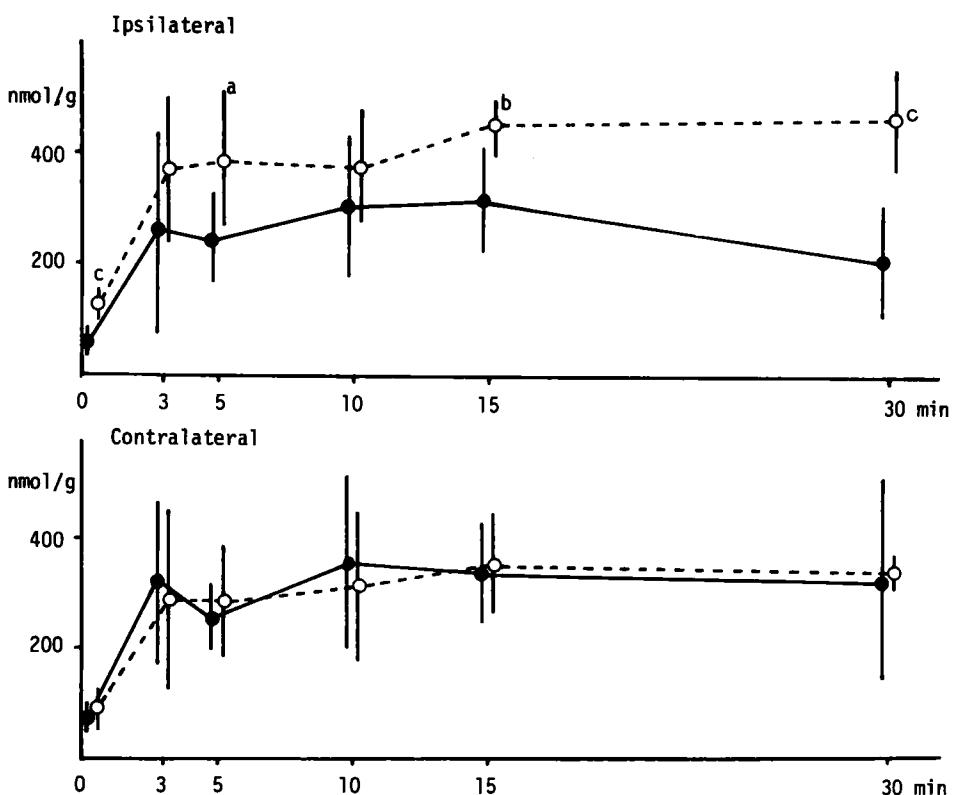
### 第5節 GSH 及び GSSG

Fig. 9は、塩化第二鉄溶液注入5, 15, 60分後のGSH, GSSG, total glutathione及びGSH/GSSG比の変化を示したものである。注入部位ではtotal glutathioneは注入5, 15, 60分では変化は認められないが、正常群に比べてGSHは有意に減少し、GSSGは有意に増加していた。対側においてもこれらの変化は、ほぼ同様であった。

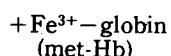
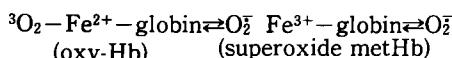
## 考 察

頭部外傷にともなう出血にさいして、溶血によって生じたヘモグロビン由来の鉄イオンが酸素と反応し、スーパーオキサイドアニオンやハイドロキシラジカルを生成するが、これらの活性酸素が脳細胞膜に作用してedemaを発生させ、さらにてんかん源性焦点を形成することが想定されている<sup>6</sup>。すでに鉄イオンあるいはヘ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、スーパーオキサイドアニオン、ハイドロキシラジカル及び過酸化水素が生成されることが示されている<sup>10,11</sup>。

また、スーパーオキサイドアニオンは、ヘモグ

Fig. 8 Lipid peroxide level in  $\text{Fe}^{3+}$  applied rat cerebruma.  $p < 0.02$ , compared with control.b.  $p < 0.005$ , compared with control.c.  $p < 0.001$ , compared with control. $n = 8 \sim 9$ ,  $m \pm S.D.$ , ○  $\text{Fe}^{3+}$ , ● control.

ビン ( $\text{Fe}^{2+}$ ) からメトヘモグロビン ( $\text{Fe}^{3+}$ ) への自動酸化の過程で生じることがあきらかにされている<sup>12</sup>。今回著者は、鉄イオン投与 5 分後にメトヘモグロビン結合 3 倍の鉄イオン ( $\text{Fe}^{3+}-\text{globin}$ ) の増加を認めたが、この過程は、次式に示されるものと考えられる。



すなわち、この過程でヘモグロビン ( $\text{Fe}^{2+}$ ) より放出された電子が酸素と反応して活性酸素 ( $\text{O}_2^{\cdot}$ ) を生成するものと理解される。

他方、有機フリーラジカルについては鉄塩注入 5 分～30 分間の間においては、本実験系では対照との間に有意差を認めなかつたけれども、正

常脳においては、有機フリーラジカルはほとんど検出されないとされており、対照例においても生食注入という脳組織侵襲操作のみによって、鉄イオン注入とほぼ同様なフリーラジカルの生成がおこるものと理解される。

なお、その他の蛋白結合金属イオンについては、実験群と対照群の間に有意差が認められなかつた。不飽和脂質の過酸化は、スーパーオキサイドアニオンやハイドロキシラジカルなどの活性酸素によってひきおこされ、結果として、マロンジアルデヒドなどのアルデヒドや酸が生成されることが知られている。すでに鉄は、ミトコンドリア、ミクロゾーム、赤血球及びリポゾームの膜脂質、並びに不飽和脂肪酸の酸化を触媒することが知られている<sup>13~17</sup>。

Willmore ら<sup>6</sup>は、鉄イオン投与 15 分後から 1 時

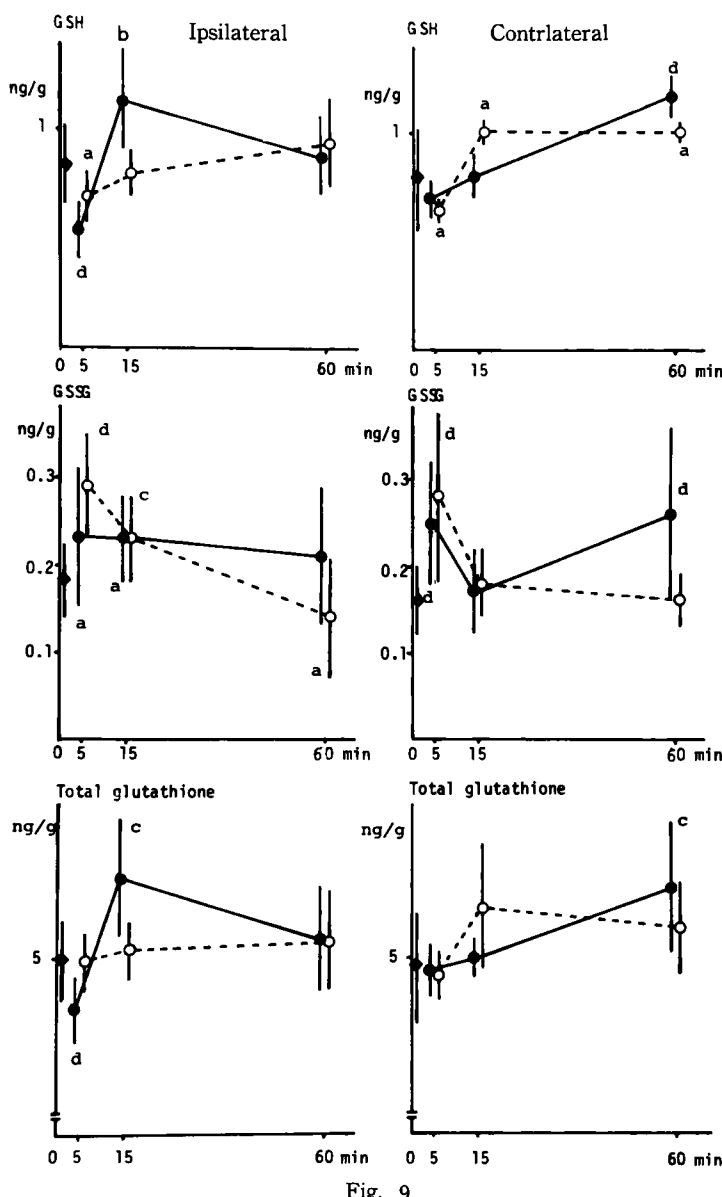


Fig. 9

間後には過酸化脂質は最高に達し、1時間後から漸次減少し、12時間後に対照値に回復していることを認めている。一方著者は、鉄イオン投与側で投与5分後にはすでに過酸化脂質は対照群に対して有意な増加を認めた。この過酸化脂質の増加は、活性酸素によりひきおこされた一連のフリーラジカル反応の結果と考えられるが他方、このような過酸化脂質はリン脂質の不飽和脂肪酸、例えば decosahexaenoic acid や arachidonic acid から、酵素による過酸化反応に

よっても生じる<sup>18,19</sup>。Prostaglandins は arachidonic acid から生成されるが、その途中の段階においてもマロンシアルデヒドが生成される<sup>20</sup>。しかし、arachidonic acid 及び prostaglandins は、電気刺激、bicuculline 並びに pentylenetetrazol 痙攣直後に一過性に増加し、その後数分で急激に減少する<sup>21,22,23</sup>ので、今回認められた鉄イオン投与後の過酸化脂質の長時間にわたる増加とは異なるものと思われる。スーパーオキサイドアニオンは脳内においてはスーパーオキサイドディスクターゼにより酸化されて酸素と過酸化水素になり、過酸化物、hydroperoxide は GSH と glutathione peroxidase により hydroxy acid と GSSG に代謝される。著者は、鉄イオン投与側で投与5分後には、total glutathione は無変化であるが GSH は低下し、逆に GSSG が増加していることを認め、glutathione redox state が亢進していることを明らかにした。

Willmore ら<sup>24</sup>は、フリー ラジカルの防御剤である  $\alpha$ -tocopherol と glutathione

peroxidase に関する selenium の投与で、鉄イオンによるてんかん様発作波の出現が抑制されたことを報告している。この所見は、鉄イオン投与後に活性酸素が生成し、ついで膜上で一連のフリーラジカル反応が生じるという著者の見解を支持するものである。また Hattori ら<sup>25</sup>は、別の approach から、鉄イオンてんかん源性焦点の発現機構をとらえている。すなわち彼らの研究によると、鉄イオン注入30~60日後では、ラット大脳皮質切片上に、adenosine による c-

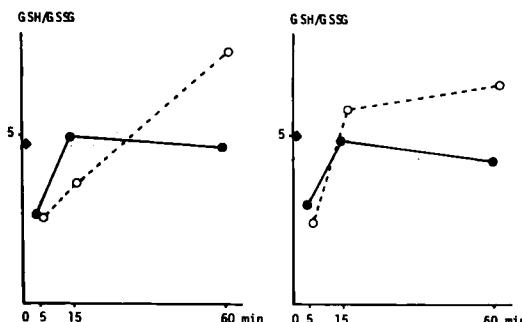


Fig. 9 Oxidized and reduced glutathione levels in  $\text{Fe}^{3+}$  applied rat cerebrum

- a.  $p < 0.05$ , compared with normal group.
  - b.  $p < 0.01$ , compared with normal group.
  - c.  $p < 0.005$ , compared with normal group.
  - d.  $p < 0.001$ , compared with normal group.
- $n=4\sim22$ ,  $m \pm S.D.$ ,  $\bullet$ control,  $\blacklozenge$ normal group.

の鉄イオンの増加、活性酸素の増加、過酸化脂質の増加、並びに glutathione redox state の亢進を明らかにしたが、これらのことから、鉄イオンてんかん源性焦点の発現機構を模式的に示すと Fig. 10 になる。すなわち第一段階では 2 値あるいは 3 値の鉄イオン投与で、スーパー オキサイドアニオンやハイドロキシラジカルのような活性酸素が生じる。第二段階では、生成された活性酸素が膜を構成している不飽和リン脂質の二重結合に作用して endoperoxide や hydroperoxide などの過酸化脂質を生成する。ついで endoperoxide は結果的にマロンジアルデヒドを生成するが、他方 hydroperoxide は、GSH と glutathione peroxidase の作用を介して

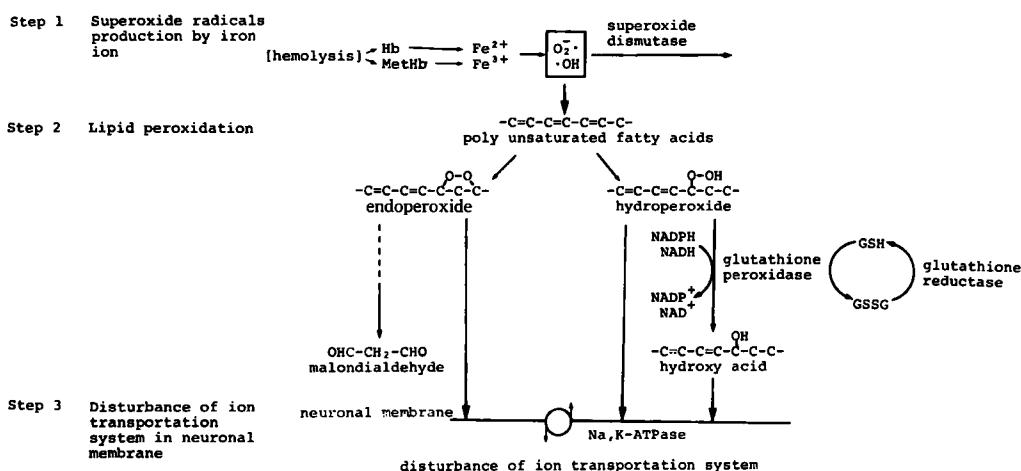


Fig. 10 Possible mechanism for epileptogenic focus formation by ferric or ferrous ion

AMP の増加が亢進することを認め、この焦点形成機構には、adenosine receptor が関与していることを示唆している。しかし、著者は、塩化第二鉄溶液をラット大脳皮質に投与して少なくとも 15 分後には、てんかん様発作波が出現することを認め、また Willmore ら<sup>1</sup>も、塩化第二鉄イオンのラット大脳皮質への投与では、約 8 分後にてんかん様発作波が出現することを認めている。少なくとも、鉄イオン投与後 8～15 分までの間にニューロンやグリアの膜上に何らかの変化が生じていると思われる。

著者は、今回ラット大脳皮質に塩化第二鉄溶液投与 5 分後に、メトヘモグロビン結合 3 値

hydroxy acid を生成する。第三段階は、これらの膜構成不飽和脂質の過酸化による神経細胞膜の変化であるが、このさい構成成分として不飽和脂肪酸を含む  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase の変性が推定される。従って、 $\text{Na}^+$  あるいは  $\text{K}^+$  の神経細胞膜における透過性が変化するが、神経細胞におけるこれらの変化は、やがててんかん源性焦点の形成へと発展するものと想定される。すなわち、すでに  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase の活性化には高度不飽和脂肪酸をもつリン脂質が必要であることが判明しているが、さらに Sun<sup>26</sup>は、 $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase 活性は、過酸化脂質により抑制されることも観察しており、その機構として  $\text{K}^+$

channel の変化を重要視している。また, Svo-boda ら<sup>27</sup>は、ラット大脳皮質のミクロゾーム分画の  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase 活性の鉄イオン投与による低下は過酸化脂質の生成によることを明らかにしている。これらはいずれも、上述の仮説を支持するものと考えられる。

### 結 論

0.1M 塩化第二鉄溶液をラット大脳皮質感覺運動領野に注入すると、約15分後にてんかん様発作波が出現し、その後約6ヶ月まで持続して出現することを皮質脳波記録により観察した。つぎにこの鉄イオンてんかん源性焦点の発現機構を明確化するため、鉄イオン投与後ラット焦点組織のメトヘモグロビン結合3価の鉄イオン、フリーラジカル、活性酸素、過酸化脂質、並びに還元型 glutathione 及び酸化型 glutathione の経時的変化について検索を行なった結果、投与約5分後に、メトヘモグロビン結合3価の鉄イオンの増加、活性酸素の増加、過酸化脂質の

増加および、glutathione redox state の亢進を認めた。

以上の実験結果から、鉄イオンてんかん源性焦点形成の機序として、鉄イオンにより活性酸素が生成され、ついで生じる一連のフリーラジカル反応によるニューロン膜脂質の過酸化が重要な役割を演じていることを示唆した。

### 謝 辞

稿を終るに臨み、終始御懇意な御指導と御交際を賜わりました森 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 ESR の測定に御援助いただいた日本電子、河野雅弘氏に謝意を表します。

### 文 献

- 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.
- 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.
- Rosen, A.D. and Frumin, N.V.: Focal epileptogenesis after intracortical hemoglobin injection. *Exp. Neurol.* **66**, 277—284, 1979.
- Reid, S.A. and Sybert, G.W.: Acute  $\text{FeCl}_3$ -induced epileptogenic foci in cats: electrophysiological analyses. *Brain Res.* **188**, 531—542, 1980.
- Rubin, J.J. and Willmore, L.J.: Prevention of iron-induced epileptiform discharges in rats by treatment with antiperioxidants. *Exp. Neurol.* **67**, 472—480, 1980.
- Willmore, L.J. and Rubin, J.J.: Formation of malonaldehyde and focal brain edema induced by subpial injection of  $\text{FeCl}_2$  into rat isocortex. *Brain Res.* **246**, 113—119, 1982.
- Chan, P.H. and Fishman, R.A.: Transient formation of superoxide radicals in polyunsaturated fatty acid-induced brain swelling. *J. Neurochem.* **35**, 1004—1007, 1980.
- 大石誠子：過酸化脂質測定法、最新医学、**33**, 660—663, 1978.
- Hissin, P.J. and Hilf, R.: A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem.* **74**, 214—226, 1976.
- Aisen, P.: Some physicochemical aspects of iron metabolism. *Ciba Found. Symp.* **51**, 1—14, 1977.
- O'Brien, P.J.: Intracellular mechanisms for the decomposition of a lipid peroxide, I. Decomposition of a lipid peroxide by metal ions, heme compounds and nucleophiles. *Canad. J. Biochem.* **47**, 312—319,

1971.

12. Misra, H.P. and Fridovich, I.: The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. *J. Biol. Chem.* **247**, 6960—6962, 1972.
13. Tappel, A.L.: Vitamin E and free radical peroxidation of lipids. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **203**, 12—28, 1972.
14. Smith, G.H. and Dunkley, W.L.: Initiation of lipid peroxidation by a reduced metal ion. *Arch. Biochem. Biophys.* **98**, 6—48, 1962.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. Niehaus, W.G. and Samuelsson, B.: Formation of malonaldehyde from phospholipid arachidonate during microsomal lipid peroxidation. *Eur. J. Biochem.* **6**, 126—130, 1968.
20. Hamberg, M. and Samuelsson, B.: Oxygination of unsaturated fatty acids by the vesicular gland of sheep. *J. Biol. Chem.* **242**, 5344—5354, 1967.
21. Bazan, N.G., De Liberti, S.A.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.
22. 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.
23. Försterman, V., Heldt, R., Knappen, F. and Hertting, G.: Potential anticonvulsive properties of endogenous prostaglandins formed in mouse brain. *Brain Res.* **240**, 303—310, 1982.
24. Willmore, L.J. and Rubin, J.J.: Antiperoxidant pretreatment and iron-induced epileptiform discharges in the rat: EEG and histopathologic studies. *Neurology* **31**, 63—69, 1981.
25. 石塚稻夫, 力納いつ, 新村幸雄: 膜脂質の多様性と膜タンパクとの相互作用, 生体の化学, **20**, 12—25, 1978.
26. Sun, A.Y.: The effect of lipoxidation on synaptosomal ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )—ATPase isolated from the cerebral cortex of squirrel monkey. *Biochim. Biophys. Acta.* **266**, 350—360, 1972.
27. Svoboda, P. and Mosinger, B.: Catecholamines and the brain microsomal Na, K-adenosinetriphosphatase, I. Protection against lipoperoxidative damage. *Biochem. Pharmacol.* **30**, 427—432, 1981.
28. Hattori, Y., Inaba, K., Moriwaki, A. and Hori, Y.: Regional difference in cyclic AMP response to adenosine of rat cerebral cortex with an iron-induced epileptic focus. *Acta Med. Okayama* **36**, 313—316, 1982.

**Brain active oxygen, free radicals, lipid peroxide  
and the redox state of glutathione in the Fe<sup>3+</sup> induced  
epileptic focus of the rat**

Hiroyoshi KHOCHI

Department of Neurochemistry, Institute for Neurobiology,

Okayama University Medical School

(Director: Prof. A. Mori)

Epileptic discharges were induced 15 minutes after 0.1M FeCl<sub>3</sub> was injected into the rat sensory motor cortex and continued for 6 months after the injection. In order to study the Fe<sup>3+</sup> induced seizure mechanism, Fe<sup>3+</sup> bound methemoglobin, free radicals, active oxygen, malondialdehyde and reduced and oxidized glutathione were measured in the foci of rats after the FeCl<sub>3</sub> injection. It was found that Fe<sup>3+</sup> induced a significant increase in Fe<sup>3+</sup> bound methemoglobin, active oxygen and malondialdehyde and accelerated the glutathione redox reaction 5 minutes after the injection. Fe<sup>3+</sup> was thought to induce lipid peroxidation by free radical reaction and thus produce the epileptic focus.