

## 鉄イオン脳内注入による実験的てんかん原性焦点組織における acetylcholine 代謝の研究

岡山大学医学部脳代謝研究施設機能生化学部門 (指導: 森 昭胤教授)

河 上 雄 之 介

(平成2年2月26日受稿)

**Key words :** acetylcholine turnover, head injury, choline acetyltransferase, cholinesterase, brain edema

### はじめに

鉄イオンをラットやネコの大脳皮質内に投与すると、脳波に持続性反復性の局所発作放電が誘発され<sup>1)</sup>、その際形成された焦点の組織病理学的所見は、外傷性てんかん患者の焦点組織像と極めて良く一致することが知られている<sup>2)</sup>。この鉄イオンが誘発するてんかん様焦点形成の要因は、鉄イオンにより発生した活性酸素ラジカルがニューロン膜を過酸化させるため、正常の神経伝達が不能となり、その結果てんかん様焦点が形成されると考えられている<sup>3)</sup>。

頭部外傷の後などに起こる外傷性てんかん発作焦点の発現機序も、鉄の関与が想定されている。つまり、脳内に出血した赤血球から遊離したヘモグロビンや、その中に含まれる鉄が活性酸素ラジカルを発生させ、細胞膜を障害することによりてんかん焦点が形成されると想定されている。この為、鉄イオン投与によるてんかん原性焦点形成ラットは、外傷性てんかんのよい実験モデルと考えられている。しかし、てんかん焦点が形成される際に、どのような神経伝達物質系の、また、どのような伝達異常が関与しているかは、まだ明らかではない。

さて、末梢神経系と同じように中枢神経系でも acetylcholine (ACh) が神経伝達をしている系のあることは良く知られている。また、ACh をネコの大脳皮質に直接投与すると脳波にてんかん様発作波が発現するが<sup>4)</sup>、ACh の拮抗薬である atropin を投与しておくくと ACh を投与し

ても発作波が出現しない<sup>5)</sup>ことから、ACh 作動性神経伝達系は、けいれん発現機構にも関与していると考えられている。この為、てんかんの発現機構を明らかにする目的で、いろいろなけいれんやてんかんモデル動物を使用して ACh 作動性神経伝達系の異常が調べられている。例えば、ネコの大脳皮質の表面に cobalt を植え込むと、約3週間後にはけいれん発作が出現してくる<sup>6)</sup>。このけいれんの出現前に大脳皮質では、ACh の合成酵素である choline acetyltransferase (CAT) [E.C. 2.3.1.6] 活性<sup>7)</sup>、ACh 含量<sup>8)</sup>、ACh の分解酵素である acetylcholinesterase (AChE) [E.C. 6.1.1.7] 活性<sup>7)</sup>が低値を示し、3週間目には対照値に回復する。この為、cobalt 誘発けいれんにも、その発現機構に ACh 作動性神経伝達系が関与していると考えられている。

本研究では、鉄イオン注入法により作成した外傷てんかんモデル動物を使用し、鉄の注入後てんかん発現までの間の大脳皮質の CAT 活性、ACh 量、AChE 活性の経時的変化を調べることにより、外傷性てんかんの発現機構における ACh 作動性神経伝達系の関与の有無を検討した。

### 実験方法

#### ① 実験動物

体重250—350 g の雄 Sprague Dawley ラットを使用した。ラットは Sham 群、HCl 群、Fe 群の3群にグループ分けし、以下の実験に使用した。

## ② モデル作成法

ラットはエーテル麻酔下で脳定位固定装置に固定し、bregma より後方1mm, 左側方1mmの大脳皮質感覚運動野上の頭蓋骨に直径1mmの穴を開け、この穴を通して脳硬膜下2mmの大脳皮質に溶液を注入(注入速度1 $\mu$ l/min)した。

Fe 群のラットには、FeCl<sub>3</sub> を生理食塩水に100 mM に溶解し、その5 $\mu$ l (鉄イオン:500nmol) を大脳皮質内に注入した。また、HCl 群のラットには、塩酸で pH 1.8 (FeCl<sub>3</sub> 溶液と等水素イオン濃度) に調整した生理食塩水を5 $\mu$ l 大脳皮質内に注入し、水素イオン濃度変化の対照とした。Sham 群のラットには頭蓋骨の穿孔のみで、何も注入せず、手術によるストレスや麻酔の影響を除く為の対照とした。ラット脳内の ACh 量には日内変動があることが報告されている為<sup>9)</sup>、ラットの屠殺は午前9-12時に行った。

## ③ CAT 活性測定法

Fe 群と HCl 群のラットは注入30分, 1, 3, 6, 9, 12, 24時間, 及び7日後に、また Sham 群のラットは手術30分, 6, 及び24時間後に断頭により屠殺した。注入側の大脳皮質(注入部位を中心に5mm四方), 及びその対側の対照部位の大脳皮質を氷上で摘出し(図1), 酵素活性測定まで-80℃で保存した。

CAT 活性測定は、Kaneda らの方法<sup>10)</sup>に準拠して行った。反応液には、5mM choline chloride, 0.4mM acetyl-CoA, 0.1mM eserine sulfate, 150mM NaCl, 及び10mM EDTA-2Na を含む50mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) を用いた。脳試料は25mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) でホモジナイズし、脳湿重量で約2mg相当量を酵素活性の定量に使用した。脳ホモジネイトを反応液に入れ(最終量200 $\mu$ l), 37℃で20分間 incubate した後、100 $\mu$ l の1M perchloric acid を加えることにより反応を停止した。この中に測定の為の内部標準として ethylhomocholine (EHC) を10nmol 加え、1,500 $\times$ g で20分間遠心分離(4℃)した後、上清中の反応により生成した ACh 量を後述の固定化酵素反応器と電気化学検出器の付いた高速液体クロマトグラフ(ECD-HPLC)で定量<sup>11)</sup>した。酵素活性は単位時間、単位蛋白質量に対

する生成 ACh 量で表した。

## ④ ACh 量の定量法

Fe 群と HCl 群のラットは注入30分, 1, 3, 6, 9, 12, 24時間, 及び7日後に、また Sham 群のラットは手術30分, 6, 及び24時間後に屠殺した。脳内 ACh 量は死後急速に酵素分解を受ける為<sup>12)</sup>、酵素失活の目的で、頭部にマイクロウェーブ照射することにより脳を固定した。マイクロウェーブ固定は、マイクロウェーブアプリアレーター NJE2601型(新日本無線株式会社製)を用い、2.45GHz, 5kWのマイクロウェーブを0.7秒間照射することにより行った。氷上でCAT活性測定の際に採取したのと同部位の大脳皮質を摘出し、ACh 量定量まで-80℃で保存した。

Fe 群と HCl 群のラット大脳皮質内 ACh 量の定量には、Maruyama によるガスクロマトグラフィー(GC)法<sup>13)</sup>を一部変更<sup>14)</sup>し、また Sham 群では Fujimori ら<sup>11)</sup>による固定化酵素反応器付き ECD-HPLC 法を使用した。なお、両方法で得られた ACh 値はほぼ同じであった。

GC 法では、脳試料は内部標準物質として butyrylcholine chloride を加えた氷冷1N formic acid/acetone (15:85v/v) でホモジナイズし、1,100 $\times$ g, 4℃で20分間遠心分離し上清を採取した。上清は氷冷 ethylether で洗浄した後、吸引乾固した。乾固下試料を200 $\mu$ lの蒸留水に溶解し、KI $\cdot$ I<sub>2</sub> (KI:0.2g/ml, I<sub>2</sub>:0.18g/ml) 水溶液20 $\mu$ l を加え反応後、沈澱物を50 $\mu$ lの acetonitrile に溶解した。イオン交換樹脂 AG 1-x8 5mgを加えてかくはん後、上清中の ACh 量を熱分解ガスクロマトグラフィー(P-GC)法で定量した。ガスクロマトグラフは GC-3BF 型(島

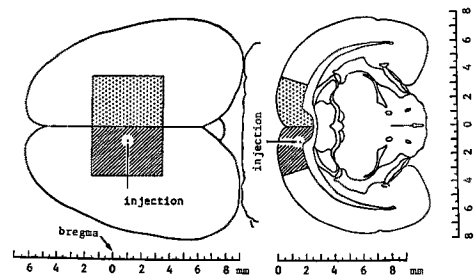


図1 注入部位と試料採取部位

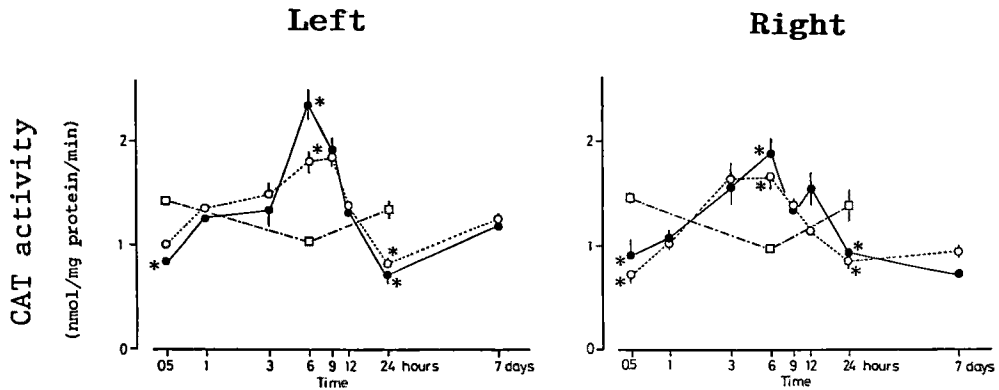


図2 Choline acetyltransferase (CAT) 活性の経時的変化

- Fe 群 (鉄イオン投与群)
- - -○- - - HCl 群 (塩酸性生理食塩水投与群)
- Sham 群 (偽手術群)

CAT 活性は 1 分間に 1 mg の蛋白が産生する acetylcholine の量で示す。

\* : Sham 群と比較して 5% の危険率で有意差有り。(N = 6 ~ 10)

表1 Sham 群 (偽手術群) の choline acetyltransferase の変化

左側大脳皮質		右側大脳皮質	
手術後の時間	0.5	手術後の時間	0.5
6	+	6	+
24	-	24	-
			+

+ : 5% の危険率で有意差有り。

津製作所製) を、また熱分解装置は PYR-MS 型 (小滝製作所製) を使用した。

ECD-HPLC 法では、脳試料を 0.01% EDTA 含有 0.2% perchloric acid 1 ml でホモジナイズし ACh を抽出した。内部標準物質として 10 nmol の EHC を加え、10,000 × g、4 °C で 20 分間遠心分離し上清を採取した。AChE と cholineoxidase を固定した固定化酵素反応カラム (BAS-Japan 製) と電気化学検出器の付いた高速液体クロマトグラフ (ECD-HPLC) で ACh を定量した。

⑤ AChE 活性定量法

3 群のラットは 30 分、6 時間、24 時間後に断頭屠殺した後、氷上で CAT 活性測定の際に採取したのと同部位の大脳皮質を摘出し、AChE 活性定量まで -80 °C で保存した。

AChE 活性の測定にはコリンエステラーゼテ

スト・ワコー (和光純薬製) を用いて測定した。脳試料を 1 ml の蒸留水でホモジナイズし、その 50 μl を ACh を含む反応液と 37 °C で 60 分間反応させた。ACh の分解により生成した acetic acid 量を m-nitrophenol の程色反応を使用して定量した。酵素活性は単位時間、単位蛋白質量に対する生成 acetic acid 量つまり ACh 分解量で表した。

⑥ 蛋白定量

タンパク質の定量は Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad Labs., U.S.A.) を使用して行った。

⑦ 統計処理法

得られた結果は分散分析法にて統計処理をした。

実験結果

① CAT 活性の変化

Sham 群の CAT 活性は手術側、反対側共に 6 時間後に低値を示した。しかし、左右差は認められなかった (図 2、表 1、4)。

HCl 群の CAT 活性は左 (注入側) 右 (反対側) 共に 30 分後には Sham 群に比べて低値を示し、その後しだいに増加して 6 時間後には Sham 群に比べて高値を示した。その後 CAT 活性値

表2 HCl 群 (塩酸酸性生理食塩水投与群) の choline acetyltransferase 活性の変化

投与側 (左側大脳皮質)							
投与後の時間	0.5	1	3	6	9	12	24
1	-						
3	-	-					
6	+	+	-				
9	+	+	-	-			
12	-	-	-	-	+		
24	-	+	+	+	+	+	
168	-	-	-	+	+	-	+

投与反対側 (右側大脳皮質)							
投与後の時間	0.5	1	3	6	9	12	24
1	+						
3	+	+					
6	+	+	-				
9	+	-	-	-			
12	+	-	-	+	-		
24	-	+	+	+	+	+	
168	+	+	+	+	+	+	+

+ : 5%の危険率で有意差有り。

表4 Choline acetyltransferase 活性の左右差

時間	0.5	1	3	6	9	12	24	168
Sham 群	-			-			-	
HCl 群	-	-	-	-	+	-	-	+
Fe 群	-	-	-	-	+	-	-	+

+ : 5%の危険率で有意差有り。

は低下して24時間後には Sham 群に比べて低値となった。注入側の CAT 活性は7日後には回復していたが、注入反対側では低値のままだった。また、注入9時間と7日後には左(注入側)の方が高 CAT 活性値を示した(図2, 表2, 4)。

Fe 群の CAT 活性値も HCl 群の CAT 活性値の変化と同様、30分で低値、6時間で高値、24時間で低値を示し、7日後に注入側のみが回復していた。また、注入9時間と7日後には左(注入側)の方が高 CAT 活性値を示した(図2, 表3, 4)。

## ② ACh 量の変化

手術後 Sham 群の左右の大脳皮質内の ACh

表3 Fe 群 (鉄イオン投与群) の choline acetyltransferase 活性の変化

投与側 (左側大脳皮質)							
投与後の時間	0.5	1	3	6	9	12	24
1	-						
3	+	-					
6	+	+	+				
9	+	+	+	+			
12	-	-	-	-	-		
24	-	+	+	+	+	+	
168	-	-	-	+	+	-	+

投与反対側 (右側大脳皮質)							
投与後の時間	0.5	1	3	6	9	12	24
1	-						
3	+	+					
6	+	+	-				
9	+	+	-	+			
12	+	+	-	-	-		
24	-	-	+	+	+	+	
168	-	+	+	+	+	+	-

+ : 5%の危険率で有意差有り。

量は30分、6時間、24時間後にも変化は認められなかった。また、左右差も認められなかった。HCl 群と Fe 群の左大脳皮質(注入側)の ACh 量は注入24時間後に低下し、7日後には回復していた。しかし、右大脳皮質(注入対側)の ACh 量に変化は無かった。また、注入後左右の大脳皮質の ACh 量に差は認められなかった(図3, 表5, 6, 7)。

## ③ AChE 活性の変化

Sham 群の AChE は手術後左右共に変化は認められず、左右差も無かった(図4)。

HCl 群の右大脳皮質(注入対側)の AChE 活性には経時変化は無かったが、24時間後には Sham 群の活性よりも少し低値だった。しかし、注入側の AChE 活性は注入30分後に Sham 群より低値を、6時間後には高値を示したが、24時間後には Sham 群と差は無かった。また、左右の大脳皮質間に差は無かった(図4, 表8)。

Fe 群の AChE 活性値に認められた変化は、左大脳皮質で注入6時間後に、30分後と24時間後に比べて高値を示していたことだけだった。しかし、その時も Sham 群との間に有意な差は

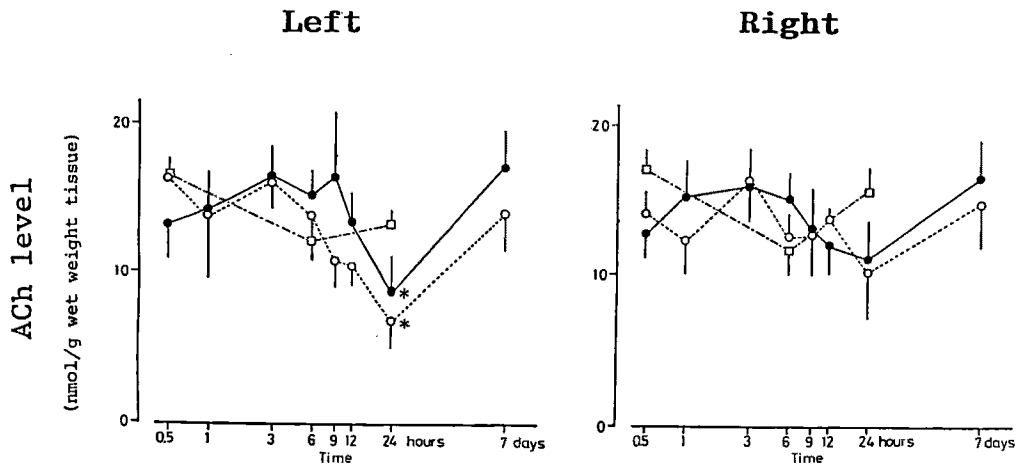


図3 Acetylcholine (ACh) 量の経時的変化  
 —●— Fe 群 (鉄イオン投与群)  
 - - -○- - - HCl 群 (塩酸性生理食塩水投与群)  
 - - -□- - - Sham 群 (偽手術群)  
 ACh 量は脳の湿重量1グラムあたりの ACh 量で示す。  
 \* : Sham 群と比較して5%の危険率で有意差有り。(N = 6 ~12)

表5 Sham 群 (偽手術群) の acetylcholine 量の変化

左側大脳皮質			右側大脳皮質		
手術後の時間	0.5	6	手術後の時間	0.5	6
6	-	-	6	+	-
24	-	-	24	-	-

+ : 5%の危険率で有意差有り。

無かった。またどの時間でも、AChE 活性値に左右差は無かった (図4, 表9)。

考 察

鉄イオンをラットの大脳皮質感覚運動野に注入すると、脳波には poly spikes や, ictal seizures pattern が繰り返し出現し、ラットは強直性・間代性けいれんを示す<sup>11)15)</sup>。この鉄イオン誘発けいれん発作の成因は以下の様に考えられている。鉄イオンを脳内に注入すると、脳組織中で周囲の高脂質環境において、鉄イオンと H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> との反応 (Fenton 反応) などにより・OH や・OOH などの活性酸素ラジカルが脳内で発生する<sup>16)</sup>。神経細胞などの細胞膜を構成する多不飽和脂質は活性酸素ラジカルにより二重結合部位において

表6 HCl 群 (塩酸性生理食塩水投与群) の acetylcholine 量の変化

投与側 (左側大脳皮質)							
投与後の時間	0.5	1	3	6	9	12	24
1	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-
24	+	-	+	+	-	-	+
168	-	-	-	-	-	-	+

投与反対側 (右側大脳皮質)							
投与後の時間	0.5	1	3	6	9	12	24
1	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-
168	-	-	-	-	-	-	-

+ : 5%の危険率で有意差有り。

過酸化を受け、最終的に malondialdehyde (MDA) などを生ずる<sup>3)</sup>。この細胞膜損傷は神経細胞の活動を保つために必要なナトリウム・カリウムポンプを動かしている Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase

の障害<sup>17)</sup>などをもたらす。このため神経細胞の正常活動が妨げられ、けいれんが発現するものと考えられており、頭部外傷後1週間以内に発症する早期けいれん (early epilepsy) の原因と考えられる<sup>18)</sup>。

ACh 作動性神経伝達系がけいれん発現機構に関与しているという報告は枚挙にいとまがない。しかし、ACh 作動性神経伝達系がどの様にして、てんかん発現機構に関与しているかは、報告により異なる。

ACh 量は、遺伝的にてんかん素因を有する EL マウスや CBA マウスのけいれん直前期<sup>19)</sup>、lithium と pilocarpine により誘発されたけいれん中<sup>20)</sup>、あるいは、bicuculline や dimeflin により誘発されたけいれん中<sup>21)</sup>に増加する。しかし、cobalt 誘発けいれんの発作性獲得の準備期間<sup>8)</sup>、電撃けいれん後<sup>22)23)</sup>、あるいは、pentylentetrazole (PTZ) 誘発けいれん中<sup>21)</sup>に減少すること。さらに、picrotoxin 誘発けいれん中には、増加<sup>24)</sup>と減少<sup>21)</sup>の相異なる報告がなされている。

この、けいれんと ACh 量の関係の二面性は、ACh 放出量の報告にも見られる。ACh 放出量は、lithium と pilocarpine により誘発されたけいれん中<sup>20)</sup>、bicuculline<sup>25)</sup>、PTZ<sup>25)26)27)</sup>、picrotoxin や strychnine<sup>26)</sup>で誘発されたけいれ

ん中に増加することが報告されている。しかし、strychnine や電撃けいれん中には、その放出に変化は認められないことも報告されている<sup>27)</sup>。

ACh の合成酵素である CAT 活性は、cobalt 誘発けいれんの発作性獲得の準備期間<sup>7)</sup>には低下

表7 Fe 群 (鉄イオン投与群) の acetylcholine 量の変化

投与側 (左側大脳皮質)							
投与後の時間	0.5	1	3	6	9	12	24
1	-						
3	-	-					
6	-	-	-				
9	-	-	-	-			
12	-	-	-	-	-		
24	-	-	+	-	-	-	
168	-	-	-	-	-	-	+

投与反対側 (右側大脳皮質)							
投与後の時間	0.5	1	3	6	9	12	24
1	-						
3	-	-					
6	-	-	-				
9	-	-	-	-			
12	-	-	-	-	-		
24	-	-	-	-	-	-	
168	-	-	-	-	-	-	-

+ : 5%の危険率で有意差有り。

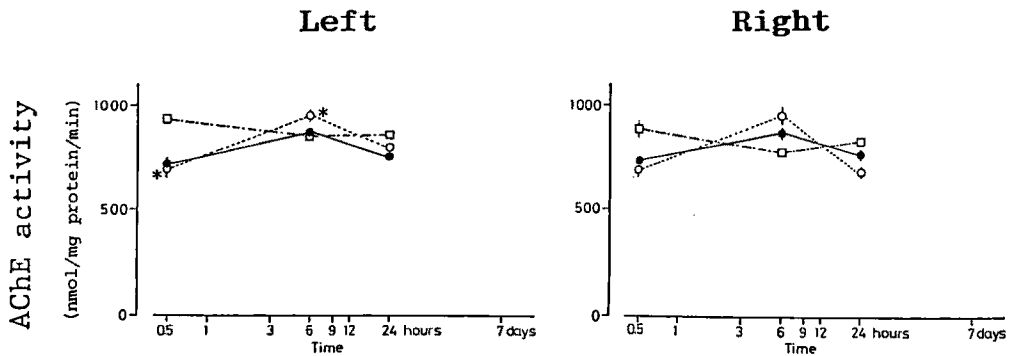


図4 Acetylcholinesterase (AChE) の経時的変化

- Fe 群 (鉄イオン投与群)
- HCl 群 (塩酸酸性生理食塩水投与群)
- Sham 群 (偽手術群)

AChE 活性は1分間に1mgの蛋白が分解する acetylcholine の量で示す。

\* : Sham 群と比較して5%の危険率で有意差有り、(N = 6 ~ 7)

表 8 HCl 群 (塩酸性生理食塩水投与群) の acetylcholinesterase 活性の変化

投与側 (左側大脳皮質)		投与反対側 (右側大脳皮質)	
手術後の時間	0.5 6	手術後の時間	0.5 6
6	+	6	-
24	- -	24	- -

+ : 5%の危険率で有意差有り。

表 9 Fe 群 (鉄イオン投与群) の acetylcholinesterase 活性の変化

投与側 (左側大脳皮質)		投与反対側 (右側大脳皮質)	
手術後の時間	0.5 6	手術後の時間	0.5 6
6	+	6	-
24	- +	24	- -

+ : 5%の危険率で有意差有り。

が、また、電撃けいれん後には増加すること<sup>23)</sup>が報告されている。

さらに、ACh 分解酵素である AChE 活性は、lithium と pilocarpine により誘発されたけいれん中<sup>20)</sup>には変化が認められず、cobalt 誘発けいれんの発作性獲得の準備期間<sup>7)</sup>や電撃けいれん直後<sup>28)</sup>には減少していることが報告されている。しかし、電撃けいれん直後に増加しているという報告<sup>29)</sup>もある。

以上の様に、ACh 作動性神経伝達系がどの様にして、てんかん発現機構に関与しているかは、報告により異なり、まだその首尾一貫した回答は得られていない。

さて、本研究では、ラットの大脳皮質感覚運動野に鉄イオンを注入し、鉄の注入後大脳皮質の CAT 活性、ACh 量、AChE 活性の経時的变化を調べることに、外傷性てんかんの発現機構における ACh 作動性神経伝達系の関与を検討した。しかし、得られた結果を総合すると、CAT 活性、ACh 量及び AChE 活性の3者共に、鉄イオンを注入した Fe 群と塩酸性生理食塩水を注入した HCl 群との間に、けいれん発現機構に関与していると考えられるほどの大きな差は認められなかった。これは、ACh 系神経細胞に及ぼす影響は鉄イオンに関与しているというよりは、むしろ注入された酸による水素イオン濃度の増加によるものであることを示唆する。塩酸性生理食塩水をラットの大脳皮質に投与してもスパイク活動は誘発されない。このため、本研究で観察された ACh 量及び ACh 代謝の変化は、鉄イオン誘発スパイクやけいれんの発現のための原因にはならないと思われる。

次に、鉄イオンあるいは塩酸性生理食塩水を注入した大脳皮質、及びその対側の脳皮質では、注入30分後に CAT 及び AChE 活性の

低下が認められた。この結果は、酸注入30分後には ACh の合成や神経終末からの放出が減少していることを示唆する。ついで CAT 活性はしだいに上昇し、6 時間後から12 時間後までの間、ACh 合成活性を表す CAT 活性は Sham 群のそれより上昇していた。しかし ACh 量には変化が認められないことより、この結果は ACh の放出が増加し、それにつれて ACh の合成も活発になったことを示唆する。その後、CAT 活性は減少し24 時間後には Sham 群のそれより低下した。この時、ACh 量も減少していることは、ACh の放出は継続しているにもかかわらず、何等かの原因で CAT 活性は低下するために、ACh 含量に低下が認められたことを示唆する。

頭部外傷を受けると、数時間後より脳浮腫が出現してくるが、この発生機序として次のような活性酸素ラジカルの関与する機構が想定されている<sup>30)</sup>。つまり、①外傷により細胞内の phospholipase が活性化され<sup>31)</sup>細胞膜リン脂質から arakidonic acid (AA) が遊離される。②遊離した AA は cyclooxygenase, lipoxygenase 及び prostagrandin synthetase により prostagrandins に代謝されるが、この時に副産物として superoxide が発生する<sup>32)33)34)</sup>。③発生した活性酸素ラジカルは血管内皮細胞を破壊して脳浮腫を発生させる。この仮定に対し cyclooxygenase の抑制剤である indomethacin や活性酸素消去剤である superoxide dismutase あるいは vitamine E などの投与により、脳浮腫の発生が防止できることなどの、傍証が報告されている<sup>35)36)</sup>。塩酸性生理食塩水や鉄溶液を脳内に注入すると、機械的障害や圧迫などで脳の組織や微細血管の内皮細胞が破壊され、細胞内にカルシウムが流入し、その結果、phospholipase C の活性が増加して脳浮腫が起きた

と想定される。このため、本研究に用いた方法で酸性物質の注入のために脳浮腫が発生した可能性が高い。

以上のことより、本研究で認められた ACh 代謝や含量の変化は、注入された酸により発生した脳浮腫による頭蓋内圧の上昇により大脳皮質にある ACh 作動性神経が刺激されたことを示唆する。あるいは、神経細胞膜に存在するナトリウム・カリウムポンプ障害により神経細胞は脱分極するが、大脳皮質にある ACh 作動性神経が脱分極あるいは刺激されたことも示唆しているのかもしれない。

### 結 論

- 1) ラットの脳皮質に鉄イオンを注入することにより作成した外傷てんかんモデル動物を使用し、鉄の注入後、大脳皮質の choline acetyltransferase (CAT) 活性, acetylcholine (ACh) 量, acetylcholinesterase (AChE) 活性の経時的変化を調べた結果を得た。
- 2) HCl 注入群(HCl 群)と鉄イオン注入群(Fe 群)の CAT 活性は、注入側、反対側共に30分後には対照群に比べて低値を、6時間後には高

値を示し、24時間後には低値を示した。HCl 群と Fe 群の注入側の ACh 量は注入24時間後に低下し、7日後には回復していた。Fe 群の注入側の AChE 活性値は、注入6時間後に高値を示した。

3) 鉄イオンあるいは HCl 投与側では、投与30分後に ACh の turnover は低下し、その後増加して、6時間後に極大となり、その後、また低下することを示唆している。しかし、鉄イオンを投与された大脳皮質と、pH 変化の対照の為に HCl を投与された大脳皮質との間に大きな差はなかった。

4) この結果は、注入された酸により起こった脳浮腫による頭蓋内圧の上昇により、ACh 作動性神経が刺激されたことを示唆する。

稿を終わるにあたり、御懇篤な御指導と御校閲を賜りました森 昭胤教授、また直接御指導御協力いただきました横井 功助手、渡辺洋子助手、及び鳴田真勝医学博士に深く感謝の意を捧げます。さらに実験遂行にあたりましては始終快く御協力下さいました研究室の皆様から御礼申し上げます

### 文 献

- 1) 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.
- 2) Reid SA, Sybert GW, Boggs WM and Willmore LJ : Histopathology of the ferric-induced chronic epileptic focus in cat : a golgi study. *Exp Neurol* (1979) **66**, 205—219.
- 3) 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.
- 4) Ferguson JH and Cornblath DR : Acetylcholine epilepsy : Relationship of surface concentration, chronicity of denervation, and focus size. *Exp Neurol* (1975) **46**, 302—314.
- 5) Ferguson JH and Jasper HH : Laminar DC studies of acetylcholine-activated epileptiform discharges in cerebral cortex. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* (1971) **30**, 377—390.
- 6) Dow RS, Fernandez-Guardiola A and Manni E : The production of cobalt experimental epilepsy in the rat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* (1962) **14**, 399—407.
- 7) Emson PC and Joseph MH : Neurochemical and morphological changes during the development of cobalt-induced epilepsy in rat. *Brain Res* (1975) **93**, 91—110.
- 8) Hoover DB, Craig CR and Colasanti BK : Cholinergic involvement in cobalt-induced epilepsy in the rat. *Exp Brain Res* (1977) **29**, 501—513.
- 9) Hanin I, Massarelli R and Costa E : Acetylcholine concentrations in rat brain : diurnal oscillation.



- Science (1970) **170**, 341.
- 10) Kaneda N and Nagatsu T : Highly sensitive assay for choline acetyltransferase activity by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr* (1985) **341**, 23–30.
  - 11) Fujimori K and Yamamoto K : Determination of acetylcholine and choline in perchlorate extracts of brain tissue using liquid chromatography-electrochemistry with an immobilized-enzyme reactor. *J Chromatogr* (1987) **414**, 167–173.
  - 12) 藤原正昭, 松本路子, 森 昭胤 : E $\delta$ 系, CBA系およびA系マウス脳内アセチルコリン含有量について. *脳研会誌* (1977) **3**, 124–125.
  - 13) 丸山悠司, 細谷英吉 : 熱分解ガスクロマトグラフィー (PGC) およびガス-マススペクトロメトリー (MS) による生体内アセチルコリン (ACh) の測定法とその応用. *医のあゆみ* (1975) **92**, 43–52.
  - 14) Shirakabe Y : Synthesis of phenylethylguanidine and its effects on neurotransmitters of mouse brain and electroencephalogram of rat. *Neurosciences (Kobe)* (1982) **8**, 161–170.
  - 15) Rosen AD and Frumin NV : Focal epileptogenesis after intracortical hemoglobin injection. *Exp Neurol* (1979) **66**, 277–284.
  - 16) 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**, 393–396.
  - 17) 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.
  - 18) 森 昭胤 : 生化学的研究の進歩 — 特に外傷性てんかんの成因についての実験的研究 —. *小児内科* (1990) **22**, 13–18.
  - 19) Fujiwara M : Acetylcholine level of mouse brain in preconvulsive states. *Jpn J NRA* (1980) **6**, 192–202.
  - 20) Jope RS, Simonato M and Lally K : Acetylcholine content in rat brain is elevated by status epilepticus induced by lithium and pilocarpine. *J Neurochem* (1987) **49**, 944–951.
  - 21) Pedata F, Mulas A, Pepeu IM and Pepeu G : Changes in regional brain acetylcholine levels during drug-induced convulsions. *Eur J Pharmacol* (1976) **40**, 329–335.
  - 22) Woolley DE, Timiras PS, Rosenzweig MR, Krech D and Benett EL : Strain differences in seizure responses and brain cholinesterase activity in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* (1963) **112**, 781–785.
  - 23) Longorni R, Mulas A, Novak BO, Pepeu IM and Pepeu G : Effect of single and repeated electroshock application on brain acetylcholine levels and choline acetyltransferase activity in the rat. *Neuropharmacology* (1976) **15**, 283–286.
  - 24) Svenneby G and Roberts E : Elevated acetylcholine contents in mouse brain after treatment with bicuculline and picrotoxin. *J Neurochem* (1974) **23**, 275–277.
  - 25) Gardner CR and Webster RA : Convulsant-anticonvulsant interactions on seizure activity and cortical acetylcholine release. *Eur J Pharmacol* (1977) **42**, 247–256.
  - 26) Hemsworth BA and Neal MJ : The effect of central stimulant drugs on acetylcholine release from rat cerebral cortex. *Br J Pharmacol* (1968) **34**, 543–550.
  - 27) Celesia GG and Jasper HH : Acetylcholine released from cerebral cortex in relation to state of activation. *Neurology (Minneapolis)* (1966) **16**, 1053–1063.
  - 28) Appleyard ME, Green AR and Smith AD : Regional acetylcholinesterase activity in rat brain following a convulsion. *Br J Pharmacol* (1984) **82**, 248.
  - 29) Appleyard ME, Green AR and Smith AD : Acetylcholinesterase activity in regions of the brain

- following a convulsion. *J Neurochem* (1986) **46**, 1789—1793.
- 30) Hall ED and Braughler JM : Central nervous system trauma and stroke. *Free Radical Biol Med* (1989) **6**, 303—313.
  - 31) Wei EP, Lamb RG and Kontos HA : Increased phospholipase C activity after experimental brain injury. *J Neurosurg* (1982) **56**, 695—698.
  - 32) Kukreja RC, Kontos HA, Hess ML and Ellis EF : PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH and NADPH. *Circ Res* (1986) **59**, 612—619.
  - 33) Chan PH and Fishman RA : Transient formation of superoxide radicals in polyunsaturated fatty acid-induced brain swelling. *J Neurochem* (1980) **35**, 1004—1007.
  - 34) Chan PH and Fishman RA : The role of arachidonic acid in vasogenic edema. *Fed Proc* (1984) **43**, 210—213.
  - 35) Wei EP, Kontos HA, Dietrich WD, Povlishock JT and Ellis EF : Inhibition by free radical scavengers and by cyclooxygenase inhibitors of pial arteriolar abnormalities from concussive brain injury in cats. *Circ Res* (1981) **48**, 95—103.
  - 36) Yoshida S, Busto R, Ginsberg MD, Abe K, Martinez E, Watson BD and Scheinberg P : Compression-induced brain edema : modification by prior depletion and supplementation of vitamin E. *Neurology* (1983) **33**, 166—172.

**Acetylcholine turnover on the experimental epileptic focus  
of the rat cerebral cortex**

**Yunosuke KAWAKAMI**

**Department of Neurochemistry, Institute for Neurobiology,**

**Okayama University Medical School,**

**Okayama 700, Japan**

**(Director : Prof. A. Mori)**

The effect of iron ion injection on acetylcholine (ACh) turnover was studied in the cerebral cortex of male Sprague-Dawley rats. Rats were divided into 3 groups : rats of the Fe-group were injected with 500 nmol of  $\text{Fe}^{3+}$  in the left sensorimotor cortex, rats of the HCl-group were injected with HCl-acidified saline (pH 1.8) in the left sensorimotor cortex, and a sham-operated group acted as a control (Sham-group).

On both sides of the cortex, the choline acetyltransferase (CAT) activity of the HCl- and Fe-groups decreased 30 min after, increased 6 h after, and then decreased 24 h after the injection compared with the activity of the Sham-group. At no time was there any difference between the CAT activities of the HCl- and Fe-groups. On both sides of the cortex, the ACh content of the HCl- and Fe-groups decreased transiently 24 h after injection, but there was no difference in ACh content between the two groups. In the left cortex of the Fe- and HCl-groups, acetylcholinesterase (AChE) activity, which showed no difference between the two groups, decreased 30 min after injection.

These findings suggested that cortical neurons especially AChergic neurons might be irritated by a transient increase in intracranial pressure due to brain edema induced by the injection of acid into the cortex, as no specific effect of  $\text{Fe}^{3+}$ -injection was observed in this study.