

Diamox の抗痙攣効果に関する研究

第 3 編

Diamox の脳髄 Cholinesterase 活性値に及ぼす影響

岡山大学医学部第 1 (陣内) 外科教室 (指導: 陣内教授)

副 手 河 原 佳 正

〔昭和 33 年 2 月 6 日受稿〕

第 1 章 緒言ならびに文献

神経系の化学的刺戟伝導機序の研究は Acetylcholine (以下 Ach と略記す) にはじまり, 1921年 Loewi¹⁾ は Ach 様物質が迷走神経興奮の刺戟伝導作用を有することをあきらかにし, Dale & Feldberg²⁾ は運動神経からの横紋筋刺戟伝導が Ach によりおこなわれるとのべ, また自律神経節の Synapsis の興奮伝導も Ach がなすものとして, Chang & Gaddum³⁾, Kahlson⁴⁾ 等は節前神経線維の刺戟時に Ach が生じ, これが介在神経細胞を興奮させ, 節後神経線維に興奮を伝えると考えた。

痙攣痙攣機制に関する生化学的方面とくに酵素化学的研究からの追求は, 1939年 Nachmansohn⁵⁾ によりはじめられた。そもそも脳組織の Ach には結合 Ach と遊離 Ach とがあり, 前者は生理的に非活性のものであり, Ach 分解酵素である Cholinesterase (以下 ChE と略す) の作用をうけず⁶⁾, 後者は活性のものであつて ChE の作用をうけて Choline と醋酸とに分解し, 生理的活性を失うのである。この遊離 Ach の生成は, まず生体内で結合 Ach ができ, それから温度, 水素イオン濃度の変化により遊離 Ach が生成される。Ach の体内生成は主に Cholinacetylase⁹⁾ によつてなされ, また Ach の生体内合成にはアセト醋酸, クエン酸, グルタミン酸等が関与する⁸⁾。

Ach はきわめて不安定な物質であるが, ChE は安定な物質である。ChE には Ach 代謝とくに関係深い特異的 ChE と, Ach 代謝に対する役割の不明瞭な非特異的 ChE とがあり, 両者はまったく性質を異にしている。すなわち特異的 ChE は脳神経組織に分布し, Ach 濃度の稀薄な場合でも活性度の最大値を示し⁹⁾, 生理的に Ach の分泌される神経,

筋肉等にある ChE である。したがつて脳神経組織の生化学的研究に重要なものはこの特異的 ChE といえる。

Welsh & Hyde¹⁰⁾ は脳髄機能の程度とそこにおける Ach 濃度は平衡関係にあるという。Nachmansohn¹¹⁾¹²⁾ も特異的 ChE 活性値の高い処では Ach 代謝が盛んであり, ChE 活性値の程度をみれば Ach 代謝乃至神経機能の程度を推察しうるといつている。

Ach 代謝の変動と痙攣との関係をみると, Feldman & Gellhorn¹³⁾ は Strychnine 痙攣時に蛙脳の Ach 量が著増することを認め, 中島¹⁴⁾ はカルチアゾール痙攣を起した白鼠脳の Ach 量の測定をおこない, 痙攣直前に遊離 Ach 量は増加するが総 Ach は減少することを報告し, この遊離 Ach の蓄積状態が痙攣を誘発するものであるとのべている。Freedman¹⁵⁾ は ChE 活性値の抑制作用のある Diisopropylfluorophosphate (D. F. P) の投与により中枢神経の Ach が増加すれば痙攣発作が起るといい, Brenner¹⁶⁾ は Ach を脳表面に作用させると脳波に大発作様の異常波を認めるとのべた。Richter¹⁷⁾ は興奮痙攣時の白鼠では総 Ach 量が減少することをあきらかにし, Jobias¹⁸⁾ 等は Picrotoxin 及び Strychnine 投与後白鼠及び蛙脳の総 Ach の減少を認め, Jower¹⁹⁾ は痙攣発作後の痙攣患者の脳脊髄液に Ach が増加することを証明した。金沢²⁰⁾ もまた痙攣患者の脳脊髄液中の Ach は真正痙攣大発作型で発作の強度, 頻度の高い例ほど高く, それはまた年長者ほど証明しやすいとのべている。

ChE 活性値と痙攣時の変動とに関する文献を續けば, 沖²¹⁾ は真正痙攣患者の大脳皮質で ChE 活性値の増加を認め, Pope²²⁾ も同様の痙攣焦点の大脳皮質あるいは他の部の大脳皮質に比し ChE 活性値の

高いことを証明している。しかして人血清、脳脊髄液の ChE 活性値 (非特異的 ChE) は逆の結果がみられ、Jod²³⁾ は癲癇患者の血清 ChE 活性値は低く、Schütz²⁴⁾ は血清 ChE 活性値の低いほど発作頻度が増加するとのべている。また沖中²⁵⁾ は癲癇患者脳脊髄液中の ChE 活性値の減少を報じている。近藤²⁶⁾ はカルチアゾール誘発痙攣を起した犬の脳髄 ChE 活性値を痙攣各時期について追求したところ、痙攣前期に ChE 活性値は低下し、極期に著増し、痙攣了後30分で正常に復帰するが、これは特異的 ChE が減少して結合 Ach から遊離 Ach の遊離が促進され、ChE 活性値の低下により遊離 Ach の分解が抑制される結果その蓄積を起し、ために痙攣発作を誘発するものであると推測している。寺山²⁷⁾ は脳 Ach 代謝に対する癲癇治療剤の効果を Phenobarbital, Aleviatin, Minoaleviatin でしらべ、抗大発作剤と抗小発作剤との間では ChE 活性値に対して抑制と促進というまったく逆の関係がみられたという。

以上のごとく先人は ChE 活性値の低下は Ach の蓄積となつてあらわれ、その結果痙攣を誘発されるものであるとして ChE 活性値と痙攣との間における因果関係を重要視している。

私は第1編においては Diamox の脳含水量におよぼす影響をしらべて脱水の著明なことを証明し、第2編においては脳髄遊離アミノ窒素におよぼす影響をしらべてその増量することを認め、Diamox の抗痙攣効果を立証したのであるが、痙攣と密接な関係にある脳髄 ChE 活性値に対して Diamox がいかなる影響をあたえるかを検索するために本実験を試みた。

第2章 実験材料ならびに方法

第1節 実験動物

実験動物としては、1週間に上同一食餌で飼育した体重 2~4 kg 内外の成熟猫を、性別を考慮せず使用した。

第2節 Diamox の使用量および使用方法

Diamox 注射液 (pH 8.4~8.8 である Diamox Natron 等量混合液) を作製し、当 pro kg 30 mg を猫の後脚筋肉内に注射した。

第3節 脳髄採取時期の決定

第1編脳含水量の実験成績にならい、正常時、注射後9時間及び24時間とした。

第4節 レンズ核の採取法

第1編第2章第4節でのべたと同一方法で大脳を取り出し、大脳から軟膜を剥離したのち、附着した血液は重炭酸ソーダを含まないリンゲル液できれいにこれを洗い去り、Gyrus sylvius ant. の中央部を境にして前額面に大脳半球を前後に切離すると、島と内包との間にレンズ核をあきらかにみるができる。さらにこの面に平行に約 2 mm の厚さに切つてゆき、おのおのについてレンズ核を周囲の白質から鋭的にメスで切離して集めた。

このようにして集めたレンズ核を氷室内に保存して、3日以内に実験を行つた。

第5節 実験方法

酵素作用の測定は Ammon にならい、Warburg 検圧装置をもちいて実施したが、細目の点は藤田の著書および沖中、吉川の論文を参照した。Ammon の方法とは Ach が ChE により分解されてできた醋酸を、あらかじめ反応系に加えたリンゲル液の重曹に反応させ、その結果発生する CO₂ 量を検圧計により測定することによつて、ChE の酵素作用を CO₂ 発生量をもつてあらわしたものである。

a) レンズ核組織片を正確に秤量したのち乳鉢をもちいて5分間よくすりつぶし、リンゲル液で 500 倍の組織懸濁液を調製し、おのおの容器主室に 2 cc 宛入れ、ただちに測定した。リンゲル液は実験の都度毎回新しく調製し、pH 7.4 で、リンゲル液の組成を示せばつぎのごとくである。

9.0 g/l NaCl	溶液	100 cc
11.5 g/l KCl	溶液	2 cc
12.2 g/l CaCl ₂	溶液	2 cc
13.0 g/l NaHCO ₃	溶液	20 cc

b) 基質溶液

実験に際して基質溶液は毎回新しく調製し、塩化 Ach (Roche) を 2.5% (0.16 mol) の割合にリンゲル液に溶かし、おのおの容器側室に 0.2 cc 宛入れてもちいた。したがつて容器主室の懸濁液と混和した後の主室内全量 2.2 cc 中における Ach 最終濃度は約 0.015 mol となる。Ach の自己分解はわずかで修正の要を認めなかつた。

c) 測定条件

容器主室に組織懸濁液 2 cc を入れ、側室に基質溶液 0.2 cc を入れたのち、5% の割合に CO₂ を含む N₂ ガスを充分に通気し、ガス腔を本混合ガスで充填して振盪装置に連結した。恒温槽の温度は 38°C、振盪回数は毎分 90 回内外とした。測定は、

まず10分ほど振盪し、圧が平衡に達したのち、側室の基質溶液を主室に混入し、3分後より読みを開始して10分ごとに値をとり、40分間振盪を続けておのおの値より計算して CO₂ 発生量を求めた。対照として同じ基質溶液の同量と懸濁液の代りに同量のリンゲル液をいれたものを使用し、同時に測定して修正を行った。

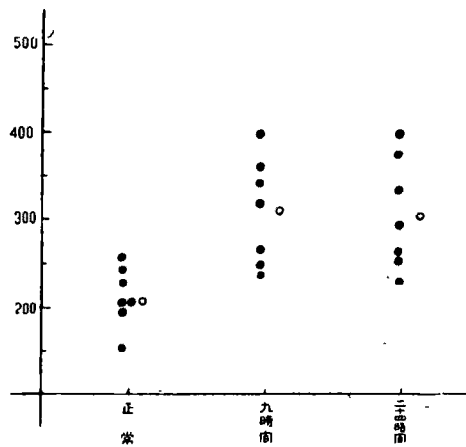
第3章 実験成績

以下に記載する酵素値は、新鮮脳組織 100 mg が30分間に発生する CO₂ cmm をもつてあらわしたものである。なお実験には同一材料につき常に2本以上の Manometer を使用して測定し、その平均値をとった。実験成績を示せば、第1表、第1図に示す

第1表 レンズ核 ChE 活性値

実験番号	注射後断頭迄の時間	ChE 活性値	正常時に対する%
1	正 常	227.8	
2		245.5	
3		154.1	
4		206.2	
5		258.4	
6		209.4	
7		193.6	
平均		213.6	
標準偏差		32.2	100.0
8	9 時間	231.3	
9		359.7	
10		271.1	
11		319.7	
12		398.0	
13		336.7	
14		248.6	
平均		309.3	
標準偏差		56.7	144.8
15	24 時間	290.9	
16		253.1	
17		266.8	
18		398.8	
19		226.4	
20		378.7	
21		328.5	
平均		306.2	
標準偏差		60.1	143.4

第1図 レンズ核 ChE 活性値
CO₂ cmm/30 分新鮮重量 100mg



とおりでである。

第1節 正常群

正常群 7 例における ChE 活性値は平均 213.6, 標準偏差 ± 32.2 であつた。

第2節 注射後9時間群

注射後 9 時間群 7 例における ChE 活性値は平均 309.3, 標準偏差 ± 56.7 であつた。これを正常時に対する百分比であらわせれば 144.8% である。

第3節 注射後24時間群

注射後 24 時間群における ChE 活性値は平均 306.2, 標準偏差 ± 60.1 であつた。これを正常時に対する百分比であらわせれば 143.4% である。

第4章 総括ならびに考按

神経系の興奮伝導が Ach によつておこなわれることがあきらかになつて以来、神経系における Ach 代謝の生化学的研究が相ついでおこなわれた。さらに Nachmansohn⁶⁾ は Ach 分解酵素である ChE の意義を重要視し、神経の刺戟伝導を酵素化学的に説明せんとした。

脳組織ではまず結合 Ach が生成せられ、さらにこれを出発点として Cholinacetylase から遊離 Ach の生成が行われる⁷⁾。この合成にはグルタミン酸が関与し、グルタミン酸により Cholinacetylase の作用が賦活されて Ach の生成が促進せられるのである。ここに生成された Ach は ChE とくに特異的 ChE により Choline と醋酸とに分解されるが、この反応は可逆反応であり、Choline および醋酸塩の濃度の高いときは ChE はこれら Ach を合成する。

脳機能、換言すれば刺戟伝導作用とそこにおける Ach 濃度が平衡関係にあるといわれ¹⁰⁾, Nachmansohn¹¹⁾¹²⁾ もこの説を肯定する 1 人であり、特異的 ChE 活性値の高い処では Ach 代謝の盛んなことを認めている。

嗣つて Ach 代謝と痙攣との関係を文献的にみよ。Feldman & Gellhorn¹³⁾, Freedman¹⁵⁾ 等はともに Ach の蓄積により痙攣が誘発されるといい、中島¹⁴⁾もまた同様の意見をのべている。

一方 Ach 代謝と平衡関係にあるといわれる ChE 活性値と痙攣との関係はどうであろうか。沖²¹⁾, Pope²²⁾ は癲癇患者大脳における ChE 活性値が高いことを証明し、畠山²⁶⁾, 松岡²⁹⁾も痙攣準備状態をもつたとおもわれる慢性脳局所アナフィラキシー家兎においては ChE 活性値の高いことを認めている。近藤²⁰⁾はカルデアゾール誘発痙攣を起した大脳髓の ChE 活性値を痙攣各時期について追求し、痙攣前期に ChE 活性値が低くなり、極期に著増することをみたが、これは特異的 ChE の減少によつて遊離 Ach の遊離が促進せられ、かつ、できた遊離 Ach の分解が抑制せられるために痙攣が起るものと考えている。

かくのごとく痙攣と密接不離の関係を有する ChE 活性値に対して、Diamox はいかなる影響を与えるであろうかと思ひ本実験を行つた次第である。

各群 7 例宛の猫について測定をおこなつた私の実験成績を示せば、つぎのごとくである。まず正常猫のレンズ核における ChE 活性値を平均値で示せば 213.6 ± 32.2 であつた。ついで Diamox 注射後 9 時間では 309.3 ± 56.7 、さらに 24 時間では 306.2 ± 60.1 となり、正常時の値を 100 としてその比率をみれば 9 時間値、24 時間値はそれぞれ 144.8 および 143.4 となり、実に 50% に近い上昇をみるのであり、24 時間を経過するもほとんど減少を示さない。

ここで私は一つの疑問をもつにいたつた。すなわち、私は実験前 Diamox が抗痙攣剤である以上 ChE 活性値を抑制するものと考えて実験をおこなつた。しかるに案に相違して逆に高い活性値を認めたのであり、これはいかなる機転によるものか、またこれで従来 of ChE に対する見解から果して実験の意味づけができるであろうか。私は第 2 編において Diamox が遊離アミノ窒素量を増加させることをのべて抗痙攣効果を証明した。第 2 編においてのべたごとく全脳髓の遊離アミノ窒素の大部分はグルタミン酸であり、グルタミン酸は Ach 合成系とくに Cho-

linacetylase の作用を促進する⁸⁾。かくのごとく Diamox が間接的に Cholinacetylase の Ach 合成作用を促せば、当然 Ach の生成は増加し、かつ Ach 代謝の盛んな場所では ChE 活性値が高いことは諸人¹¹⁾¹²⁾の認める処であれば、Diamox の投与により ChE 活性値が高くなつてもなんら不思議はないとおもう。さらに寺山²⁷⁾は抗大発作剤と抗小発作剤の間には ChE 活性値に対して抑制と促進というまつたく逆の関係をみたという事があり、江副²⁸⁾もまた抗痙攣剤である Phenobarbital, Barbitol および Aleviatin が 10^{-4} ~ 10^{-6} M. L の低濃度では in vitro においてグルタミン酸脱水素酵素に対して明らかに促進的に働き、Ach 合成系を促進するといつてゐることからみても、必ずしも抗痙攣剤が ChE 活性値を抑制するものではないと考えられる。実際 Ach の蓄積が痙攣を惹起するものではあるが、それは Ach の蓄積が一定濃度以上に達したときにはじめて痙攣という状態があらわれるものと考えられ、また近時組織の Ach 量と Cholinacetylase 量とは平衡関係をみるが、Ach 量と ChE 量とは必ずしも平衡するものではないという文献²⁹⁾からみても、必ずしも ChE 活性値が高いからといつて Ach 量が増加しているとは考えられず、またたとえ Ach が増量しているとしても ChE によりどんどん分解されるならば、痙攣にいたることなく終息するものと推察できる。

このように ChE 活性値の高いことと抗痙攣効果とはまつたく矛盾するものではないと考えられる。したがつて Diamox の抗痙攣効果は脳含水量の著減、遊離アミノ窒素の増量に加うるに ChE 活性値の上昇により Ach 分解の促進という面でおこなわれるものと考えたい。

第 5 章 結 論

猫に Diamox を注射してレンズ核の ChE 活性値を検した。

- 1) 正常猫レンズ核における ChE 活性値は 213.6 ± 32.2 であつた。
- 2) Diamox 注射後 9 時間の ChE 活性値は 309.3 ± 56.7 であり、正常時に比し 44.8% の上昇を認めた。
- 3) Diamox 注射後 24 時間の ChE 活性値は 306.2 ± 60.1 であり、正常時に比しなお 43.4% の上昇をみた。

擱筆するに当り終始御懇篤なる御指導と御校閲を

賜つた恩師陣内教授に深甚の謝意を捧げるものである。

文 献

- 1) Lowi: Pflügers Arch. f. gesamt. Physiol. 189, 239 (1921), Pflügers Arch. f. gesamt. Physiol. 214, 678 (1926), 大杉: 岡山医学会雑誌, 65, 1429~1434 (昭28) より引用.
- 2) Dale & Feldberg: J. Physiol. 86, 353~380 (1936)
- 3) Chang & Gaddum: J. Physiol. 79, 255~285 (1933)
- 4) Kahlson: J. Physiol. 96, 277~292 (1939)
- 5) Nachmansohn, D.: Bull. Soc. Chem. Biolo. Paris, 21, 761~796 (1939)
- 6) Quastel: Biochem. J. 30, 1668~1681 (1936)
- 7) Nachmansohn, D.: J. Neurophysiol. 6, 397~403 (1943)
- 8) Stedmann: Biochem. J. 31, 817~827 (1937)
- 9) Mendel: Science. 98, 201~202 (1943)
- 10) Welsh & Hyde: J. Neurophysiol. 7, 41~49 (1944)
- 11) Nachmansohn, D.: Bull. Soc. Chem. Biolo. Paris, 21, 761~796 (1939)
- 12) Nachmansohn, D.: J. Neurophysiol. X(1) 11~22 (1947)
- 13) Feldman & Gellhorn: Am. J. Physiol. 132, 588~593 (1941), 近藤: 岡山医学会雑誌, 65, 1255~1269 (昭28) より引用.
- 14) 中島 日本外科学会雑誌, 52, 23~36 (1951)
- 15) Freedman: Am. J. Physiol. 156, 117~124 (1949)
- 16) Brenner: Arch. Neurol. & Psychiat. 48, 382~395 (1942)
- 17) Richter & Crossland: Am. J. Physiol. 159, 247~255 (1949)
- 18) Tobias: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 61, 51~54 (1946)
- 19) Tower & Mac Eachern: Canad. J. Res. 27, 120~131 (1947), Canad. J. Res. 27, 105~115 (1949)
- 20) 金沢: 脳神経領域, 7, 181~190 (昭29)
- 21) 沖: 岡山医学会雑誌, 64, 1632~1637 (1952)
- 22) Pope: Research. pub. Assoc. Research Nervous Mental Disease, 26, 218 (1947), 近藤: 岡山医学会雑誌, 65, 1255~1269 (昭28) より引用.
- 23) Tod & Jones: Quart. J. Med. 6, 1~3 (1937)
- 24) Schütz: J. Physiol. 102, 269~280 (1943)
- 25) 沖中, 吉川: 医学と生物学, 25, 10~13 (1952)
- 26) 近藤: 岡山医学会雑誌, 65, 1255~1269 (昭28)
- 27) 寺山 Folia Psychiatrica et Neurologica Japonica, 6, 266~278 (昭28)
- 28) 江副 精神々経学雑誌, 54, 510~511 (1952)
- 29) 緒方 医学のあゆみ, 17, 129~132 (昭29)

Studies on the Anticonvulsive effects of Diamox

Part III.

The Effects of Diamox on the Cholinesterase Activities in the Brain

By

Yoshimasa Kawahara

Dept. of Surgery, Okayama University Medical School
(Director: Prof. Dr. D. Jinnai)

The effects of Diamox on the cholinesterase activities in nucleus lenticularis of cats brain were measured.

The experiments were performed by Ammon method taking the samples at 9 and 24 hours respectively after the injection of Diamox.

Concerning about the mean values of each 7 cases, the cholinesterase activities showed 44.8% increase at 9 hours and 43.4% increase at 24 hours.

The anticonvulsive effects of Diamox were considered to be caused by the acceleration of the acetylcholin decomposition of cholinesterase from these experimental results.
