

脳 の 窒 素 代 謝

第 14 篇

モノ弗化醋酸ナトリウム投与大黒鼠脳髓 アンモニア, グルタミン並びにアミノ酸量

岡山大学医学部神経精神医学教室 (主任: 奥村二吉教授)

太 田 典 子

[昭和 34 年 2 月 14 日受稿]

緒 言

神経組織に於けるアンモニアの消長については、古来、識者の関心を寄せるところであつた。1922年、田代¹⁾が蛙坐骨神経に電気刺戟を加えて、アンモニアの増量する事を認めたのをはじめ、脳興奮時にも、これが増加しているという Conway²⁾ の知見、イカの神経線維を用いた塚田³⁾ の実験等の興味ある記載を経て、1948年、Richter & Dawson⁴⁾ は大黒鼠を液体窒素に投入して急冷することにより、安静時の脳アンモニアは、極めて少量しか存しないが、電気刺戟其他による痙攣時、急激に之が増量する事を確認し、人々の注意を喚起した。更に、Geiger et al.⁵⁾, Bülow & Hohmes⁶⁾, Krebs et al.⁷⁾, Winterstein⁸⁾ 其他、この方面には多くの研究があげられるが、他方、アンモニアの生理作用については、これが、脳の解糖、呼吸等の酵素作用を増強するという Weil-Malherbe⁹⁾ の説をはじめ、Dickens & Greville¹⁰⁾, Elliott et al.¹¹⁾ の研究など、いづれも、アンモニアが、脳髓機能と極めて密な関係にある事を強調しており、特に、Vladimirova¹²⁾ は、大脳半球のアンモニア量は、直ちに、中枢神経系の機能状態の生化学的指数であるとさえ極言している。しかし乍ら、この様なアンモニアの源泉については、今日尚、不明な点が多く、Adenyl 酸¹³⁾, グルタミン酸¹⁴⁾, 或は直接、蛋白自体から、Proteolysis¹⁵⁾ により発するなどの諸説があり、また、著者の教室に於ても、アンモニア発生面を探求し、若干の成果をおさめて来ているのであるが、いづれにしても、尚、多くの疑点を残している現状である。

著者は、モノ弗化醋酸ナトリウム (以下 SMFA と略す) を投与することによつて、脳髓アンモニ

アを極端に増加せしめた際、これと関係の深い、グルタミン酸、グルタミン、 γ アミノ酪酸及びアスパラギン酸の変動を追求する事により、この際激増せるアンモニアの源をさぐり、その行方をたづねて、ひいては、アンモニア発生並びに処理機構の一端をうかがわんと、以下の実験を試みた。

実験方法

体重 100~150 g の大黒鼠を台上に締結、固定し、開頭、眼下に脳髓を眺めながら摘出、直ちにドライアイス・アセトン冷剤中に投入し、凍結させる。

1) アンモニアの測定

上記脳髓を秤量、10%三塩化醋酸液を用いて 0°C に保冷しつつ、10倍の homogenate を作り、5分間、遠心沈澱 (2500回転/分) し、予め、外室へ飽和炭酸カリ 1.0 cc、内室には田代氏指示薬含有、0.0004 N-塩酸 1.0 cc を入れて準備しておいた Conway Unit²⁾ の外室に、その上清を 0.5 cc 正確に注加する。外室の内容を混合し、Unit を1時間静置し、発生するアンモニアを内室の塩酸に吸収せしめた後、0.0015 N 水酸化バリウムを以て滴定する。同様の操作を三塩化醋酸液についても行い、これを盲検とする。一次標準としては、硫酸アンモニウム標準液を測定した。

2) グルタミンの測定⁴⁾¹⁶⁾

上記アンモニア測定時の検液を 70°C、75分間、加温し、発生するアンモニアを、Conway 微量拡散分析法により測定した。盲検としては 10%三塩化醋酸を、一次標準としては、グルタミン標準液を測定し、予め存する遊離アンモニア量を除外して、グルタミン量を定めた。

3) アミノ酸の測定(7)(18)(19)

前述脳髓を秤量, 75%アルコールを用い, 15倍のhomogenateを作り, その1.0 ccに更に, 30倍容量の75%アルコールを加え, 共栓付遠沈管に入れ, 充分振盪の後, 遠沈, extractをとり, 重湯煎上にて蒸発乾固し, これに, 1.0 ccの再蒸溜水を加え乾燥物を溶かす. 之を再び遠沈し, 不溶性物質を除き, 上清液0.1 ccをペーパークロマトグラフィーに供した. 濾紙は東洋濾紙, No. 51 (40×40 cm)を用い, 原点に試料を毛细管ピペットを用いてつける. 試料の乾燥をまつて25%含水フェノールを展開溶媒²⁰⁾とし, 室温にて上昇法展開を行い送風乾燥後0.1%ニンヒドリンブタノール液を噴霧²⁰⁾, 風乾後, 93°C, 30分に保ち, 発色せしめ²⁰⁾, 現われたアミノ酸呈色斑を切りとり, 5.0 ccの50%プロピルアルコール液を加え, 得られた呈色液を波長570 mμ, ベックマン型光電比色計を用いて吸光度を測定した. 同時に, その都度, 展開せしめたアミノ酸標準液の呈色斑より得た標準グラフにより, アミノ酸量を定めた.

実験結果

第1表は, SMFA投与によつてひきおこされ

第1表 モノ弗化醋酸ナトリウム(SMFA)
(50 mg/kg)投与による痙攣時大
黒鼠脳髓所見

mg %	アンモニア	グルタミン	グルタミン酸	γアミノ酪酸	アスパラギン酸
例数					
1	1.54	67.8	121.0	25.9	51.1
2	3.12	56.6	127.3	25.9	40.1
3	1.87	67.4	113.7	23.8	37.2
平均	2.18	63.9	120.7	25.2	42.8
対照	0.62	80.3	158.4	35.2	30.8

た全身痙攣時の脳髓所見である. 注射はSMFA 50 mg/kgを水溶液として腹腔内に注射した. これにより大黒鼠は次第に不安状態を示し, 10~20分の後には必ず, 全身痙攣をひきおこす. この痙攣の始まるのを待つて, 開頭, 脳摘出をする. 脳髓アンモニア量は平均2.18 mg%で, 対照0.62 mg%と比較すると, 著明に増加している. グルタミンは平均63.9mg%で対照80.3mg%に比べて減少を示しグルタミン酸, γアミノ酪酸は, それぞれ, 120.7 mg%, 25.2 mg%と減少を, アスパラギン酸のみ42.8 mg%

と著明な増加を示していた. 以上が痙攣時所見であるが, SMFA 50 mg/kg投与では, 痙攣は必発するが, 間もなく死を来すので, 時間的追求に更に好都合である20 mg/kgの量を選び行つたのが, 第2表以下である.

第2表は, SMFA 20 mg/kg投与, 10分後の脳髓所見である.

第2表 SMFA (20 mg/kg)投与後10分

mg %	アンモニア	グルタミン	グルタミン酸	γアミノ酪酸	アスパラギン酸
例数					
1	0.78	62.6	163.8	24.6	49.2
2	0.73	60.9	174.0	25.2	50.6
3	0.70	64.8	146.1	24.6	41.7
平均	0.74	62.8	161.3	24.8	47.2
対照	0.62	80.3	158.4	35.2	30.8

アンモニアは平均0.74 mg%で僅かに増加, グルタミンは62.8 mg%と減少, グルタミン酸は161.3 mg%で著変なく, γアミノ酪酸は24.8 mg%で減少, アスパラギン酸のみ47.2 mg%と著増を示していた.

第3表は, SMFA 20 mg/kg投与後30分を経て行つた実験結果である, 脳髓アンモニアは1.31 mg%

第3表 SMFA (20 mg/kg)投与後30分

mg %	アンモニア	グルタミン	グルタミン酸	γアミノ酪酸	アスパラギン酸
例数					
1	1.09	65.0	145.6	35.1	46.4
2	1.30	66.1	176.9	27.1	47.1
3	1.53	69.3	156.2	27.1	42.2
平均	1.31	66.8	159.6	29.8	45.2
対照	0.62	80.3	158.4	35.2	30.8

で, 10分のものより更に増加を示していた. グルタミン, γアミノ酪酸は66.8 mg%, 29.8 mg%で減少を, グルタミン酸は159.6 mg%で不変, アスパラギン酸は45.2 mg%でやはり著明な増加を示していた.

第4表は同じくSMFA 20 mg/kg投与後, 1時間の値であるが, アンモニアは1.14 mg%とやはり増加, グルタミン, γアミノ酪酸は, 72.6 mg%, 22.3 mg%で減少を示し, アスパラギン酸の増加も38.6 mg%と増加度はさして著しくはなくなつていた.

第4表 SMFA (20 mg/kg) 投与後1時間

mg %	アンモニア	グルタミン	グルタミン酸	γアミノ酪酸	アスパラギン酸
例数					
1	1.00	69.4	114.7	21.8	39.5
2	0.97	81.0	122.7	22.5	40.9
3	1.45	67.4	108.9	22.5	35.5
平均	1.14	72.6	115.4	22.3	38.6
対照	0.62	80.3	158.4	35.2	30.8

第5表は、同じく、投与後2時間目のものである。アンモニアは2.18 mg%で著増を、グルタミン、グ

第5表 SMFA (20 mg/kg) 投与後2時間

mg %	アンモニア	グルタミン	グルタミン酸	γアミノ酪酸	アスパラギン酸
例数					
1	1.84	63.2	131.7	24.3	41.0
2	1.81	92.5	134.1	20.3	37.3
3	2.89	60.6	134.6	22.1	40.5
平均	2.18	72.1	133.5	22.2	39.7
対照	0.62	80.3	158.4	35.2	30.8

ルタミン酸、γアミノ酪酸は、72.1 mg%, 133.5 mg%, 22.2 mg% で減少を、アスパラギン酸は39.7 mg%で、やはり増加を示している。

第6表は、同じく4時間後の価であるが、脳髄ア

第6表 SMFA (20 mg/kg) 投与後4時間

mg %	アンモニア	グルタミン	グルタミン酸	γアミノ酪酸	アスパラギン酸
数例					
1	3.03	29.1	90.8	24.2	68.5
2	2.21	69.6	132.4	25.3	38.1
3	2.92	44.2	121.0	23.0	28.8
平均	2.72	47.6	114.4	27.5	45.1
対照	0.62	80.3	158.4	35.2	30.8

ンモニアは2.72 mg%と著明な増加を、グルタミンは47.6 mg%と著明な減少を、グルタミン酸、γアミノ酪酸も、それぞれ、114.4 mg%, 27.5 mg%と減少を、アスパラギン酸は、45.1 mg%と再び著明な増加を示していた。

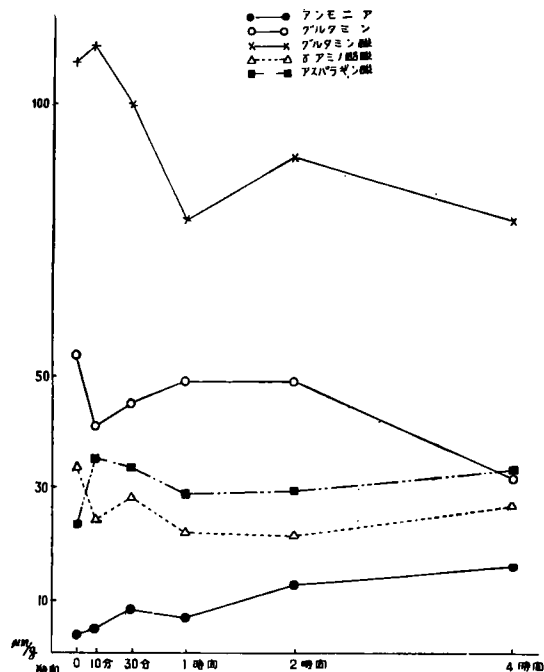
以上の結果を一括して表に示せば第7表の如くなる。単位をμM/g になおしてグラフに示せば、第1図の如くである。

これについて見ると、先づ、アンモニアは注射後、時を追うて増加、4時間後には、4倍以上の増量を

第7表 SMFA 投与後大黒鼠脳髄諸物質の時間的推移：()内は対照との比

mg %	アンモニア	グルタミン	グルタミン酸	γアミノ酪酸	アスパラギン酸
例数					
対照	0.62 (1.0)	80.3 (1.0)	158.5 (1.0)	35.2 (1.0)	30.8 (1.0)
10分	0.74 (1.19)	62.8 (0.78)	161.3 (1.01)	24.8 (0.70)	47.2 (1.53)
30分	1.31 (2.11)	66.8 (0.83)	159.6 (1.00)	29.8 (0.84)	45.2 (1.47)
1時間	1.14 (1.83)	72.6 (0.90)	115.4 (0.70)	22.3 (0.63)	38.6 (1.25)
2時間	2.18 (3.51)	72.1 (0.89)	133.5 (0.90)	22.2 (0.63)	39.7 (1.27)
4時間	2.72 (4.38)	47.6 (0.59)	114.4 (0.70)	27.5 (0.80)	45.1 (1.46)

第1図 SMFA 投与後大黒鼠脳髄諸物質の時間的推移



示している。グルタミンは、最初、著明な減少を示すが、時が経つにつれて再び増加を、4時間目には、また著明な減少を示している。グルタミン酸は、全経過を通じて減少を示しているが、その率は特に最初の1時間目に著明であつた。γアミノ酪酸も全期

間を通じて減少を示していた。アスパラギン酸は、最初の10分で著明な増加を示したのち、僅かに減少傾向を示し、4時間目になつて再び著明な増加を示していた。

考 察

以上の実験により、先づ、SMFA 50 mg/kg 投与と大黒鼠は痙攣を起し、その脳髄アンモニアが著明に増量したこと、20 mg/kg 投与群も、同じく脳髄アンモニアの著しい増加を示す事を認めた。

痙攣に伴つて脳髄アンモニアが増量する事は、既に周知の事実であるが、1948年 Richter & Dawson⁴⁾が、塩化アンモン投与による痙攣時、脳髄アンモニアは、9.0 mg%にも及ぶ増加を示したと述べ、河田²¹⁾²²⁾も、電気衝撃による痙攣時のアンモニア増量を報告している。また、Torda, Wolf²²⁾, Benitz, Pscheidt & Stone²³⁾らは、このほか、弗化醋酸中毒、ペンタゾール、ACTH 投与で、脳髄アンモニアが増加する事をのべ、更に、かくして増加せるアンモニアは、神経細胞に対し、刺戟的に作用すると言及している。著者の実験も、また同様の結果を示した。

さて、この時増量するアンモニアの発生源について考えるに、一般に脳髄アンモニアは、脳の種々の状態に伴つて増減し、且、死後には、特に爆発的に増量するものであり、緒論でものべたごとく、その源泉については、今日尚、不明の域を出でないのであるが、著者らは、むしろ多元的なものではないかと考えているのである。

Stone²³⁾らも、1954年、弗化醋酸投与時増加するアンモニアの源泉について、考察を加えているが、これによると、弗化醋酸投与時、アンモニア増加と共に Citrate の蓄積が起る点から、TCA Cycle の block を考え、これにより、グルタミン酸、アスパラギン酸が代償的に脱アミノされて、TCA Cycle の member となり、この際遊離したアンモニアこそ、増量するアンモニアにほかならぬと、先づ考えた。ところが、事實は、アンモニアの増加が Citrate の蓄積に先行しているのであつて、その点で前述の考えと矛盾する事から、更にアンモニアの源泉を他に求めようと、ATP 及びグルタミンの態度を検討した。しかし、いづれもアンモニアの増量をよく説明するに足る変化を示さず、殊に、グルタミン値は、終始変化を示さなかつたので、これが、アンモニアの源泉であるとは、到底考えられぬばかりでなく、

更に、この事は、弗化醋酸中毒時の、"Glutamic acid Glutaminase System" の役割に疑問を投げかけるものである、としてをり、従つて、やはりアンモニアの源泉としては、アスパラギン酸、グルタミン酸を考えねばならぬと結論している。

著者の得た結果では、SMFA 投与時、アンモニアの増加に伴い、グルタミン酸、グルタミン、 γ アミノ酪酸が減少し、アスパラギン酸のみは増加していた。従つて、この場合、グルタミン酸がアンモニアの源泉であると考えて矛盾はないのである。

次にグルタミンであるが、アンモニアが増加しているにもかかわらず、グルタミンは増加しておらず、さきに河田の行つた、塩化アンモン投与時の所見、すなわち、アンモニアの増加に伴つて、グルタミンの増加が著明にみられた事から、少くもこの際は、グルタミン合成系がアンモニア処理にたづさわつていて、従来 of 想定を裏付けたものと、全く逆の結果を示したのであつて、これは、SMFA 投与によるグルタミン合成系の阻害を示唆しているものと、考えられるのである。

次に、 γ アミノ酪酸は、終始減少を示していた。このアミノ酸は、グルタミン酸の脱炭酸によつて生ずるのであるから、両者が一致した傾向を示す事は当然であろう。

さて、次はアスパラギン酸である。四者中、このアミノ酸のみ、アンモニアと同じく増量を示していた。しかも、その傾向は、最初と最後に強く現われている。河田の塩化アンモン投与時にも、始と終にアスパラギン酸の増量が著明で、彼は、この事から、アスパラギン酸合成能を想定しているのであるが、著者の場合も、これとよく一致し、増量アンモニアは、専ら、アスパラギン酸合成過程により処理されたと云うべきであろう。

総 括

著者は、モノ弗化醋酸ナトリウム (SMFA) 投与時大黒鼠脳髄アンモニア並びにグルタミンを、Conway 微量拡散分析法で、アミノ酸を、Paper-chromatograph 法で測定し、次の結果を得た。

1) SMFA 投与による痙攣時には、脳髄アンモニアは、2.18 mg%，グルタミンは、63.9 mg%，グルタミン酸、 γ アミノ酪酸、アスパラギン酸は、それぞれ、120.7 mg%，25.2 mg%，42.8 mg%であつた。

2) SMFA 投与後の時間的観察では

イ) 脳髄アンモニアは次第に増加し、4時間に至つて、対照値の4倍強に達する。

ロ) グルタミン酸は、4時間迄の全期間を通じて減少を示すが、その度合は、最初の1時間目において最も強い。

ハ) グルタミンも、全期間を通じて減少を示すが、最初と最後に、より著明な減少を示す。

ニ) γ アミノ酪酸は減少する。

ホ) アスパラギン酸は、最初の10分で著明な増加、後、減少の傾向を示し、4時間に至つて、再び著明な増加を示す。

文 献

- 1) Tashiro: *Am. J. Physiol.*, **60**, 519, 1922.
- 2) Conway, E. G. : 微量拡散分析法及び誤差論, 石坂音治訳.
- 3) 塚田, 高垣: *科学*, **23**, No.12, 629, 1953.
- 4) Richter, D. and Dawson, R. M. C. : *J. Biol. Chem.*, **176**, 1199, 1948.
- 5) Geiger, A. et al. : *Science*, **118**, 655, 1953.
- 6) Bülow, M. and Hohmes, E. G. : *Biochem. Z.*, **245**, 459, 1932.
- 7) Krebs, H. A. : *Biochem. J.*, **29**, 1951, 1935.
- 8) Winterstein, H. : *Naturwissenschaft*, **21**, 22, 1933.
- 9) Weil-Malherbe, H. : *Biochem. J.*, **44**, 159, 1949.
- 10) Dickens, F. and Greville, C. D. : *Biochem. J.*, **29**, 1468, 1935.
- 11) Elliott, W. H. et al. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **21**, 22, 1933.
- 12) Vladimirova, E. A., : 神経系の生化学, 松本淳治訳, **45**, 1957.
- 13) Riebeling, C. : *Zschr. f. N. u. P.*, **157**, 418, 1937.
- 14) 塚田: 酵素化学シンポジウム, **11**, 1, 1956.
- 15) Weil-Malherbe, H. : *Biochem. J.*, **61**, 210, 1955.
- 16) Harris. : *J. Clin. Invest.*, **22**, 569, 1943.
- 17) 桑田 クロマトグラフィー, 昭27, 広川書店
- 18) 佐竹・クロマトグラフィー, 昭27, 共立出版社
- 19) 化学の領域 クロマトグラフィー特集, 5.
- 20) Roberts, E. and Frankel, S. : *J. Biol. Chem.*, **187**, 55, 1950.
- 21) 河田: 岡医誌, **70**, (4), 1103, 1958.
- 22) Torda, C. & Wolf, H. G. : *Fed. Proc.*, **11**, 163, 1952.
- 23) Benitz, D., Pscheidt, G. R. and Stone, W. E. : *Am. J. Physiol.*, **176**, 488, 1954.
- 24) 河田・岡医誌, **70**, (6), 2285, 1958.

Nitrogen Metabolism of the Brain

Part 14 Influences Sodium Monofluoroacetate on Ammonia,
Glutamine and Amino Acids in the Rat Brain.

By

Tsuneko Ōta

Department of Neuropsychiatry, Okayama University Medical School
(Director: Prof. Nikichi Okumura)

Administering the Sodium Monofluoroacetate, SMFA, to the rat, the quantitative determination of ammonia and glutamine in the rat brain was made by the Conway's microdiffusion analysis and on the other hand amino acids by the paperchromatography.

The results as follow,

To wit:

1) In the convulsion stage caused by SMFA administration, ammonia content in its brain was 2.18 mg%, glutamine 63.9 mg%, glutamic acid 120.7 mg%, γ -aminobutylic acid 25.2 mg% and aspartic acid 42.8 mg%.

2) About the hourly observation after the SMFA administration to the rat.

a) Ammonia content in its brain showed gradual increase in 4 hours up to 4 times of control value.

b) Glutamic acid content showed always low level in 4 hours but the lowest one in the first one hour.

c) Glutamine content also decreased in all 4 hours, remarkably at the first and the last.

d) γ -amino butylic acid content decreased.

e) Aspartic acid content increased remarkably in the first 10 minutes, and then decreased. But it showed remarkably increased at the 4th hour again.
