

慢性脳局所アナフィラキシー家兎脳髓のヒョリンエステラーゼ活性値, 遊離アミノ窒素及び神経細胞内ケトエノール顆粒に関する研究

第 2 編

慢性脳局所アナフィラキシー家兎脳髓の遊離アミノ窒素に関する研究

(本研究は文部省科学研究費の補助による)

(本論文要旨は第53回日本精神神経学会並びに第63回岡山医学総会に発表)

岡山大学医学部第一(陣内)外科教室(指導:陣内教授)

副 手 昌 山 哲 朗

〔昭和31年3月3日受稿〕

目 次

第1章 緒言並に文献	第2節 牛脳灰白質ホスファチッド加牛血清群
第2章 実験材料並に実験方法	第3節 α 型連鎖状球菌群
第1節 実験動物	第4節 小 括
第2節 抽出液作製法	第4章 総括並に考按
第3節 遊離アミノ窒素定量法	第5章 結 論
第3章 実験成績	
第1節 正常家兎群	

第1章 緒言並に文献

私は前編において牛脳灰白質ホスファチッド加牛血清(以下牛脳灰「ホ」加牛血清と略記する)の4倍稀釈液を静脈内に注入する方法と, α 型連鎖状球菌(以下 α 連菌と略記する)を副鼻腔内に注入する方法とをもちいて、2種の慢性脳局所アナフィラキシー家兎(以下慢性脳局「ア」家兎と略記する)を生成し、各々皮質運動領, アンモン角, レンズ核のChE活性値が正常群に比して増加しており、これは痙攣準備状態が附与されたためであると推論した。

近年脳髓におけるChE以外の葡萄糖¹⁾²⁾, 乳酸, アミノ酸, リポイド³⁾, 無機物質及びその他の還元物質に関しても生化学的研究が著々と成果をあげつつある。ことに脳髓アミノ酸代謝は、脳における神経組織の代謝機能

及び痙攣機序と密接な関係があるとされ、最近とみに注目をあびている。しかし実際において脳髓の遊離アミノ酸に関する業績は比較的少いようである。まず清水教授⁴⁾は大量の牛脳をもちい、脳髓内のグルタミン酸(以下「グ」酸と略記する), アラニン, ワリン, ヒスチチン, ロイシン, チロシン, アルギニン等を分離定量した。Krebs⁵⁾, Weil-Malherbe⁶⁾, van Slyke, Hamilton⁷⁾等は脳髓全遊離アミノ窒素量の25~80%は「グ」酸であるといっている。また脳髓内における「グ」酸の特異的な作用機序からも、遊離アミノ酸の変動は主として「グ」酸を中心とした変動と考えられるのである。すなわちこの脳内「グ」酸の脳新陳代謝についてWeil-Malherbe⁸⁾が詳細な実験を行い、「グ」酸代謝は神経機能にエネルギーを供給する代謝であるとしたが、のちに「グ」酸の酸化的脱アミノ反応は直接に

エネルギー源とはなりえないものであり、神経機能と関連して作用する特殊な代謝であるとみなした。また同時に脳髄内において「グ」酸及びグルタミンの合成が行われていることも報告している。中教授²⁶⁾も脳組織呼吸と「グ」酸 Na, 及びアンモニアとの間に密接な関係があることを認め、Krebs⁹⁾は「グ」酸が脳切片についてKイオンの維持又は恢復に関係をもつといい、岡本¹⁰⁾は「グ」酸がアセチルコリンの生成を促進するのではないかと報告している。

つぎに痙攣機序と「グ」酸の関係も密接なものがあるとされ、林教授¹¹⁾等は「グ」酸 Na を皮質運動領野その他特定の部位に注入、塗布すると、局在的な刺激効果として間代性痙攣が起ることを発見し、岡本¹²⁾、須田¹³⁾、内山¹³⁾、石塚¹⁴⁾等がこの痙攣機序に関して詳細な報告をおこなっている。また Haber & Saidel¹⁵⁾、和田¹⁶⁾等により痙攣時における「グ」酸を中心とする遊離アミノ窒素量の減少が報告され、最近教室の井上¹⁷⁾、友沢¹⁸⁾は痙攣家兎脳髄に同様の減少をみると発表している。高木¹⁹⁾は痙攣時の犬脳髄各部の遊離アミノ窒素を測定しレンズ核における著明な減少を観察報告している。また井上¹⁷⁾は潜在性脳局「ア」家兎脳髄における遊離アミノ窒素量は正常群に比して減少の傾向を示しており、痙攣誘発時とくに著明であることを認めている。また清水²⁶⁾は葡萄糖附加灌流実験法により脳局「ア」家兎脳髄においては糖の消費が抑制されることを認め、さらに宇都宮²⁰⁾はこれに「グ」酸を附加することで正常に戻ることより脳局「ア」家兎脳髄では「グ」酸が不足しているのではないかといつている。

このように「グ」酸を中心とする脳髄アミノ酸が脳新陳代謝及び痙攣機序と密接な関係があるとみなされるのであるが、私は前編において生成した慢性脳局「ア」家兎脳髄について遊離アミノ窒素量を測定し、この痙攣準備状態を附与された脳髄の新陳代謝がどのような変動を生じているのかを知ろうとして本研究を企てた次第である。

第2章 実験材料並に実験方法

第1節 実験動物

a) 正常家兎は前編、第2章、第1節に用いたと同様の2kg前後白色成熟家兎を使用した。

b) 牛脳灰「ホ」加牛血清群(以下P群と略記する)は、前編、第2章、第2節、第3節及び第4節にのべた方法にて、牛脳灰「ホ」加牛血清の4倍稀釈液を家兎耳静脈より6ヶ月間反覆注入したのち、1ヶ月間及び3ヶ月間無処置に放置したもの(以下各々P₁群、P₃群と略記する)を実験材料として使用した。

c) α連菌群(以下A群と略記する)は、前編、第2章、第2節及び第4節に述べた方法にて、家兎副鼻腔内に生菌10mg宛6ヶ月間反覆注入したのち、4ヶ月及び8ヶ月間無処置に放置したもの(以下各々A₄群、A₈群と略記する)を実験材料として使用した。

第2節 抽出液作製法

脳の採取は、両側頸動脈より失血致死せしめ、直ちに開脳し脳を一塊として剔出した。剔出脳は丁寧に硬脳膜及び凝血を除去し、一側大脳半球をとり秤量したのち蓋付瓶の中に入れ硫酸々性純アルコール10ccを添加し、72時間氷室内に保存した。本操作は後述の脱脂及び除蛋白を容易にするためである。72時間後に瓶中より取出し、濾紙にて純アルコールを払拭し、乳鉢内にて倍量の石油エーテル(沸点40°C以下)と混和して十分に磨砕する。磨砕後石油エーテルを注加して蓋付瓶内に入れ室温に放置し、24時間後に3000回転、15分間遠沈をおこない、石油エーテルを更新した。この操作を3回反覆して脱脂を終り、ついで10倍量の蒸溜水を添加、40°C、1時間重湯煎中にて攪拌しつつ抽出を行つた。この抽出液を無灰濾紙にて濾過し、液量を測定しておいた。

この濾液5ccに0.6% KH₂PO₄ 5cc, 10% Squibb氏尿素分解酵素溶液0.1ccを加え、孵卵器内に30分間放置した。この操作により濾液中の尿素は分解される。

ついでFolin-Wu氏変法にて除蛋白を行つ

た。すなわち 1/12 N 硫酸 16cc に抽出液 2cc を加え、10g/dl タングステン酸ソーダ溶液 2cc を添加し十分に振盪混和、暫時静置したのち無灰濾紙にて濾過した。この濾液を硬質コルペンに採り、水酸化マグネシウム浮遊液数滴を滴下、5~10 分間煮沸し容積を半減せしめた。ついで氷醋酸を滴下し、液が酸性となり水酸化マグネシウムが溶解するにいたらしめる。硬質コルペンは蒸溜水少量にて洗い、初めの容積となるようにした。遊離アミノ窒素の定量には、この液 5cc を使用した。

盲験には 10% Squibb 氏尿素分解酵素溶液 1cc に 10g/dl タングステン酸ソーダ溶液 0.5cc 及び 1/12N 硫酸 4cc を加え、10cc となるよう蒸溜水で稀釈、振盪したのち孵卵器に 30分間放置した。これを無灰濾紙にて濾過し、濾液 1cc を 100cc となるよう稀釈した。この液 5cc をもちいて盲験を行つた。

第3節 遊離アミノ窒素定量法

定量は Van-Slyke²¹⁾ のガス検圧法により行つた。すなわち藤井²²⁾、赤堀²³⁾、藤田の記載にもとずき、Van-Slyke & Neil の装置を用い、抽出室は 50cc のものを使用した。

試薬としては

1) 亜硝酸ソーダ液は 1l の水に NaNO₂ 800g を加温溶解せしめた。

2) 氷醋酸

3) アルカリ性過マンガン酸カリ液は、1l の 10% NaOH に 50g の KMnO₄ を飽和せしめた。この液は毎回新に作製し、使用前室温に放置して空気を飽和せしめた。

4) カプリールアルコールを用意した。

測定には、濾液 5cc を抽出室に入れ、氷醋酸 1cc を数回に洗込み、カプリールアルコール 1 滴を加えて泡沫の発生を防いだ。抽出室を真空として 1 分間 200~300 回前後の速度にて 2 分間振盪し、その際抽出された空気を排出せしめ、2cc の亜硝酸ソーダ溶液を室内に注入する。直ちに N₂ ガス及び NO ガスが盛に発生する。水銀面を抽出室の 50cc 目盛附近にまで下げ、この時の反応温度に応じて所定の時間を放置し、最後の 1 分間はガスの発生

を完全とするために 200~300 回前後の速度で振盪した。この時発生したガスを Hempel-pipette 内に移行せしめ、pipette 内のアルカリ性過マンガン酸カリ液と混和せしめて NO ガスを吸収、N₂ ガスのみを再び抽出室内に返した。水銀面を所定の標線までさげて N₂ ガスの圧を測定し、計算により脳髓新鮮重量 1g 中の遊離アミノ窒素量 (mg) に換算した。

また同時に全く同様の操作をもつて盲験をおこない、亜硝酸ソーダ溶液及び尿素分解酵素溶液により生ずる誤差を求めて補正をおこなつた。

なお実験に先立ち、グリシン 0.1g を 50cc の蒸溜水に溶解し、本操作により定量して計算値 (0.7466mg) と一致することを確かめた。

第3章 実験成績

第1節 正常家兎群

正常家兎 15 匹における脳髓遊離アミノ窒素量を、新鮮脳重量 1g 換算値にて示せば平均 0.4161mg、標準偏差 ±0.0444 である。これを表示すれば第 1 表のごとくである。

第 1 表 正常群

	アミノ窒素量
1	0.3608
2	0.5362
3	0.4103
4	0.4356
5	0.3421
6	0.3315
7	0.3816
8	0.5015
9	0.4298
10	0.3991
11	0.4026
12	0.4261
13	0.4262
14	0.4084
15	0.4501
平均	0.4161
標準偏差	±0.0444

第 2 表 P 群

	アミノ窒素量
1	0.3265
2	0.2756
3	0.2827
4	0.3132
5	0.3820
6	0.2784
7	0.3231
8	0.2812
9	0.3056
10	0.2057
11	0.3726
12	0.3266
13	0.3419
14	0.3781
15	0.3101
平均	0.3135
標準偏差	±0.0352

第2節 P 群

P 群 (P₁ 群 8 匹, P₃ 群 7 匹) 15 匹におけ

る脳髄遊離アミノ窒素量を、新鮮脳重量 1g 換算値にて示せば平均 0.3135 mg、標準偏差 ± 0.0352 である。これを表図示すれば第 2 表、

第 3 表 A 群

		アミノ窒素量
1	A ₈ 群	0.2774
2		0.3265
3		0.2040
4		0.3608
5		0.2860
6		0.2850
7		0.2056
8	A ₄ 群	0.3210
9		0.3021
10		0.2980
11		0.2907
12		0.2502
13		0.3718
14		0.3450
15		0.3311
平均		0.2970
標準偏差		± 0.0480

第 1 図のごとくである。

第 3 節 A 群

A 群 (A₄ 群 8 匹, A₈ 群 7 匹) 15 匹における脳髄遊離アミノ窒素量を、新鮮脳重量 1g 換算値にて示せば、平均 0.2970mg、標準偏差 ± 0.0480 である。これを表図示すれば第 3 表、第 1 図のごとくである。

第 4 節 小括

1) 正常家兎脳髄における遊離アミノ窒素量は 0.4161 mg であつて、この成績

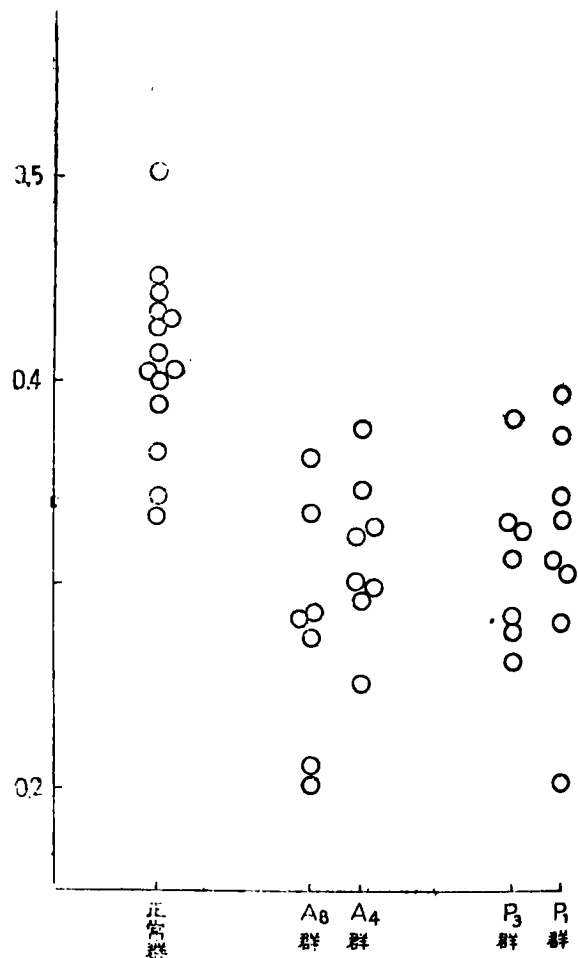
は井上、友沢の成績と一致している。

2) P 群家兎脳髄における遊離アミノ窒素量は 0.3135mg で、正常群に比して 25% の減少を示している。

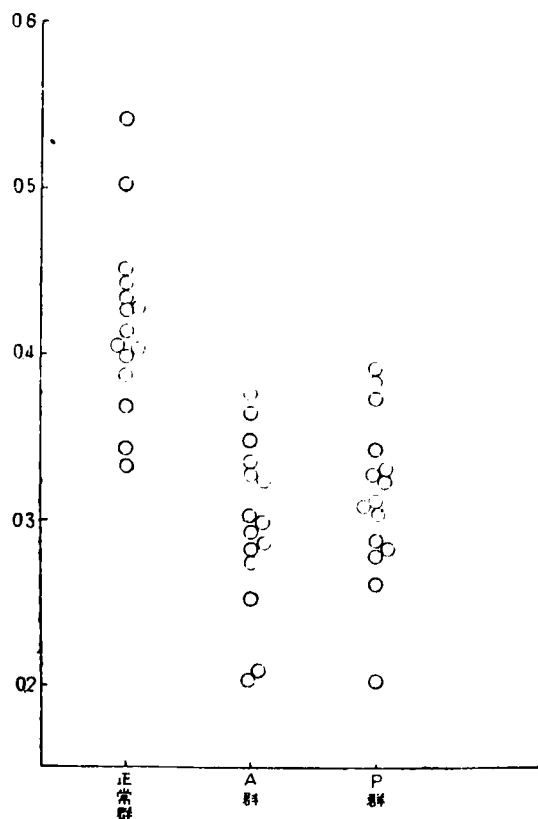
3) A 群家兎脳髄における遊離アミノ窒素量は 0.2970mg で、正常群に比して 29% の減少を示している。

4) 上述の成績を P 群は P₁ 群, P₃ 群, A 群は A₄ 群, A₈ 群と無処置期間別に図示すると第 2 図のごとくであつて、効果注射終了後の放置期間が長期となつても遊離アミノ窒素量の減少は増加してきていないことがわかる。

第 2 図 遊離アミノ窒素量 (無処置期間別)



第 1 図 遊離アミノ窒素量



第 4 章 総括並に考按

私は前編に述べたごとく、牛脳灰「ホ」加牛血清の 4 倍稀釈液を家兎耳静脈内に注入する方法、 α 連菌を副鼻腔内注入して頭蓋内に

逆行せしめる方法とをもちいて、比較的自然的に近く、かつごく軽い抗原抗体反応を長期間反覆せしめ、痙攣誘発をおこなわないで、しかも長期間の無処置期間を放置した慢性脳局「ア」家兎を生成した。しかしてこの慢性脳局「ア」家兎脳髓各部について、Acetylcholin 分解酵素 Cholinesterase (以下 ChE と略記する) 活性値を測定し特異な神経組織の過敏状態を生じていることをしり、実験的痙攣準備状態が附与されていると推論したのであるが、私はさらにこのような家兎脳髓の遊離アミノ窒素量を測定比較することにより、脳新陳代謝がどのような変動を生じているかを知りたいと考えて本実験を企てた。

私の実験では、慢性脳局「ア」家兎群の脳髓遊離アミノ窒素量が P 群、A 群共に正常群に比して 25%、29% と明らかに減少を示している。またこの減少の傾向は、効果注射終了後の無処置期間が長期となつても増加してこないことより、比較的永続性のある変化であると考えられる。また抗原の種類及び感作方法の異つた P 群、A 群の成績がさしたる差を認めないことから、このような変動は脳局「ア」状態によつて生じたものであると考えられるのである。

すでにのべたごとく、脳髓全遊離アミノ窒素量の過半数は「グ」酸であり、脳髓内における特異的な「グ」酸の作用機序により、遊離アミノ窒素の変動は主として「グ」酸を中心としたものであると考えられるのである。すなわち Krebs⁹⁾、Weil-Malherbe⁸⁾、中²⁶⁾等により、脳内「グ」酸が脳内代謝過程において特異にしてかつ非常に重要な役割をなしていることが報告されている。最近「グ」酸の各種脳内反応機序は、相互に関係しあつて統一された代謝の流れを作つていられると考へられており、主な作用としては脳機能と直結する NH₃ を固定する作用、脳組織内の K を一定量に維持し、これと密接な関係があるとされる嫌気性解糖の抑制、好気性解糖の促進作用があり、さらに Ach 合成を促進する作用があると考へられている。すなわち「グ」酸を中

心とする脳髓遊離アミノ窒素の変動は、脳内における各種代謝の異常を表わすものであり、同時に各種代謝に異常を惹起せしめるものでもあると考えられる。このことは脳における最も著明な異常代謝を代表する痙攣時の脳内「グ」酸の変動と、「グ」酸による痙攣誘発に関する多くの報告によつてもしることが出来る。すなわち Haber & Saidel¹⁵⁾、和田¹⁶⁾等は痙攣時に「グ」酸を中心とする脳髓遊離アミノ窒素が著明に減少することを報告し、岡本²⁴⁾は皮質において痙攣による「グ」酸の変動を認め、この変動が痙攣を起す原因により異なることを確めている。教室の井上¹⁷⁾、友沢¹⁸⁾も家兎脳髓の遊離アミノ窒素量及び「グ」酸が痙攣誘発時に著明な減少を示すことを認め、高木¹⁹⁾は犬脳髓各部の遊離アミノ窒素量の変動を痙攣各期について測定し、とくにレンズ核における減少が著しいと報告している。また林教授²⁵⁾及びその門下¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾は「グ」酸 Na を注入或は塗布することにより、脳の部位により特定な運動現象及び自律神経系の変化を起さすことが出来ると発表している。

つぎに脳局「ア」家兎脳髓の遊離アミノ窒素に関しては、教室の井上¹⁷⁾が減少を認め、宇都宮²⁰⁾は灌流実験で「グ」酸附加により糖代謝が正常化することから脳内「グ」酸の減少を推論している。

私の実験においても慢性脳局「ア」家兎脳髓に遊離アミノ窒素量の減少を認めたのであるが、痙攣誘発による後天的変化を除外してあることより考へて、この減少は痙攣発作時における異常代謝とは別個のものとするべきであろう。すなわち痙攣発作時にみられるような比較的一過性の代謝変動ではなく、もつとその脳髓に固定した異常代謝によるものとおもわれ、このことは無処置期間が長期となつても遊離アミノ窒素量の減少が正常に復してこない成績からも考へられるところである。こゝでさきにのべた慢性脳局「ア」家兎脳髓における永続的な Ach 代謝の異常亢進と考へあわせてみると、この「グ」酸を中心とする遊離アミノ窒素の変動が、痙攣準備状

態を附与された特異な脳内代謝過程の一つのあらわれであろうと解釈されうるのである。またこのような慢性脳局「ア」の成績が抗原の種類及び感作方法が異なつても差異を認めえない点より、上述の脳内異常代謝は慢性脳局「ア」状態によつて生じたものと考えられる。

私は2種の方法をもつて長期に抗原抗体反応を反覆することにより、その家兎脳髓に比較的永続性のある遊離アミノ窒素量の減少を認めたのであるが、これはアレルギー成囚による痙攣準備状態附与に因するものであると考える次第である。

第5章 結 論

牛脳灰「ホ」加牛血清の4倍稀釈液を静脈内に注入する方法と、 α 連菌を副鼻腔内に注入する方法とを用いて6ヶ月間抗原抗体反応を反覆したのち、1ヶ月間以上8ヶ月間の無

処置期間をおいた慢性脳局「ア」家兎を生成し、脳髓遊離アミノ窒素量を測定しつぎの所見をえた。

1) 慢性脳局「ア」家兎脳髓の遊離アミノ窒素量は正常家兎に比して著明の減少を認めた。

2) 抗原の種類及び感作方法による差異は殆ど認められなかつた。

3) 効果注射終了後の無処置期間が長期となつても、脳髓遊離アミノ窒素量の減少は変動を見なかつた。

4) 非常に弱い抗原抗体反応を長期間反覆することにより、家兎脳髓における遊離アミノ窒素量は比較的永続性と考えられる減少を示し、これは実験的痙攣準備状態附与による脳内代謝異常に因するものと考えられる。

擧筆するにあたり、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なる謝意を捧げる。

文 献

- 1) 中 脩三：精神々経誌，49；87（1945）
- 2) Elliot & Penfield：J. of Neurophysiol.，11；485（1948）
- 3) Mc Quarry：American J. of Dis. of Child.，38；451（1929）
- 4) Shimizu：Biochem. Zeit.，117；252（1921）
- 5) Krebs, Eggleston & Hens：Biochem. J.，44；159（1949）
- 6) Weil-Malherbe：Bioch. J.，30；（1936）
- 7) Hamilton：J. Biol. Chem.，158；397，（1945）
- 8) Weil-Malherbe：Metabolism & Funktion in Nervous Tissue, Biochemical Society Symposia., No. 8；23（1952）（岡本彰祐：神経化学，263（1954）より引用）
- 9) Krebs：Biochem. J.，33；551（1939）
- 10) 岡本歌子，岡本彰祐：神経化学，294（1954）より引用
- 11) 林 麟：条件反射，4；181（1942）
- 12) 岡本彰祐：日本生理誌，13；555（1951）
- 13) 須田勇，内山寿恵子，阿部歌子，水野節子：条件反射，11～12；49（1944）
- 14) 石塚保：条件反射，6；47（1943）
- 15) Haber & Saidel：Federation Proceed.，7；1（1948）
- 16) 和田 淳：精神々経誌，53；20（1951）
- 17) 井上圭爾：岡山医学会雑誌，64；1646（1952）
- 18) 友沢久雄：第14回日本脳神経外科学会に発表
- 19) 高木秀雄：岡山医学会雑誌，65；1113（1953）
- 20) 宇都宮信博：岡山医学会雑誌，65；1345（1953）
- 21) Van-Slyke：J. Biol. Chem.，16；231（1913）
- 22) 藤井暢三：生化学実験法（定量篇），73（1947）
- 23) 赤堀四郎：アミノ酸及び蛋白質，176（1946）
- 24) 岡本彰祐：生体の科学，5；46（1953）
- 25) 中 脩三：生体の科学，4；3，10（1935）
- 26) 清水準也：岡山医学会雑誌，65；43（1953）

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

On the Cholinesterase activity, free aminonitrogen and
ketoenolic granuli in nerve cells in chronic
cerebral local anaphylactic rabbits.

Part II. On free aminonitrogen in rabbits brain with chronic
cerebral local anaphylaxis (CCLA)

By

Tetsuro HATAYAMA

The free aminonitrogen in the brain with CCLA was strikingly decreased in comparison with that of the normal, and no difference was observed between the kinds of antigen or the methods of sensitization.

The decrease of free aminonitrogen was not influenced by protraction of the period without procedures after the last anaphylactic reactions, and the decrease was seen to be long-standing, when these very slight anaphylactic reactions were repeated for a long time. This is considered to be due to the abnormal brain metabolism in the state of an experimental epileptic arrangement.
