

大脳皮質における燐酸代謝に関する研究

第 2 編

潜在性脳局所アナフィラキシー家兎大脳皮質の燐酸代謝について

(本論文の要旨は第475回岡山医学会通常例会において発表した)

岡山大学医学部第1(陣内)外科教室(指導:陣内教授)

医学士 東 徹

〔昭和34年6月13日受稿〕

第1章 緒言ならびに文献

真正癲癇の原因を究明するさい、その研究の対象として最良のものは、癲癇患者の大脳である。かかる意味で私どもの教室では以前より外科手術によつて剔除せられた癲癇患者の大脳皮質をもちいて、多くの組織学的、生化学的研究が続けられており、私も第1編において真正癲癇患者および非癲癇患者の大脳皮質への³²Pのincorporationを比較検討したが、真正癲癇患者の大脳を随時に無数にうるということは極めて困難であり、実験上種々の制約をうけるものである。従つて実験的に動物に真正癲癇に類似した状態を惹起せしめて実験を行わんと企てた。

かかる目的で教室の榊原¹⁰⁾、清水¹¹⁾、笠井¹²⁾、大杉⁴⁾等は動物に種々の抗原を反復注射することにより、脳に器質的变化を起さない程度の脳局所アナフィラキシーを惹起せしめ、真正癲癇患者に類似の状態を実験動物に起させることに成功した。これを私どもは潜在性脳局所アナフィラキシー動物(以下潜在性脳局「ア」動物と略記す)とよんでおり、この動物は対照動物に比し、カルデアゾール痙攣閾値の長期間にわたる低下を認めている¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾¹³⁾。また榊原¹⁰⁾、清水¹¹⁾、井上¹⁴⁾、沖²⁾、兼松⁷⁾、宇都宮¹⁵⁾等はこれら潜在性脳局「ア」家兎について脳波、遊離Amino窒素、糖代謝、cholinesterase活性など、かく方向から検索し、種々の点で真正癲癇ときわめて類似していることを明かにした。また最近糖代謝のさらに詳細な酵素系について、あるいは種々のAmino酸代謝についても比較追究しているが、もし潜在性脳局「ア」家兎と真正癲癇患者の脳が類似な態度をとりつづけるならば、両者は同一起因により発

生した病変であろうし、何かの点で異つた点を見出すことが出来れば、それこそ真正癲癇特有な性格として注目されねばならないであろうと考えており、このように考えて両者の比較検討についての研究が続けられているわけである。私は第1編の真正癲癇患者脳の研究に引つづいて、本編では潜在性脳局「ア」家兎について同様の実験をおこなつてみた。

第2章 実験方法

第1節 実験動物

体重2kg前後の健康な白色成熟家兎をもちいて、潜在性脳局「ア」家兎を作成して使用した。対照としては同種の正常家兎をもちいた。

第2節 潜在性脳局「ア」家兎作成法

牛脳灰白質燐脂質加牛血清(以下牛脳灰「ホ」加牛血清と略記する)を抗原としてみちいた教室笠井¹²⁾の方法にならつて潜在性脳局「ア」家兎を作成した。

第1項 抗原の作成法

1) 牛血清の作成法

新鮮な牛血液より血清を分離し、54°C、30分間重湯煎にて非働性となし、0.5%の割合に石炭酸を加えて作成した。

2) 新鮮牛脳灰「ホ」加牛血清の作成法

新鮮な牛大脳皮質を乳鉢にて摺磨して泥状となし、これに多量の局方酒精を加えてよく攪拌し、遠沈器にて上清を分離し、この上清を重湯煎にて40°Cに保ちながら流水ポンプで減圧しながら酒精を蒸発せしめる。これに少量のエーテルを加え振盪溶解し、この上清に多量のアセトンを加えると白色の沈澱物をうる。この沈澱物のアセトン蒸発乾燥し、再び

エーテルを加えて溶解し、その上清に多量のアセトンを加え 40°C に加温、冷却してアセトンを放棄する。かくしてアセトン可溶性物質を完全に除去し、白色沈澱物を真空硫酸乾燥器で乾燥し、1) で作成した非働性牛血清 2 cc に 10mg の割合に混じて牛脳灰「ホ」加牛血清とした。

第2項 感作の方法

家兎の耳静脈内に pro kg 2 cc の新鮮牛脳灰「ホ」加牛血清を 1 日 1 回、2 日間連続注射し、12 日後それぞれ Arthus 反応をおこない、陽性の家兎を以下の実験に使用した。

第3項 効果注射

感作後家兎の耳静脈内に pro kg 1cc の牛脳灰「ホ」加牛血清を 2 週間間隔で 5 回注射した。

なお、実験に際してはいずれも最終効果注射後、

14 日以上を経過したものを使用した。

第3節 実験材料

最終効果注射後 14~20 日経過した潜在性脳局「ア」家兎を正中断頭し、ただちに大脳を剔出、氷冷した生理的食塩水中で大脳皮質を分離し、第1編と同様に pH 7.6 磷酸 buffer の 20% homogenate として使用した。

第4節 ³²P の調製

第1編と同様英国 Amersham, The Radiochemical Center 製の ³²P を蒸留水で 1 μc/cc に希釈して使用した。

第5節 実験方法

第1項 実験系

第1編と同様 Thumberg 管に以下のものを入れる。
500mg/cc glucose 2cc

第 1 表

潜在性脳局「ア」家兎の ³²P の移行割合 (%)

正常家兎の ³²P の移行割合 (%)

分劃	時間	症例	潜在性脳局「ア」家兎の ³² P の移行割合 (%)								正常家兎の ³² P の移行割合 (%)									
			I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	平均	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	平均
溶酸性無機	1	1	92.0	91.5	85.0	84.1	82.8	82.3	82.4	88.7	86.6	82.5	91.7	92.4	91.4	90.8	95.5	95.9	91.7	91.5
	3	3	89.8	92.1	82.5	83.5	81.2	84.7	82.6	89.7	85.6	86.3	93.2	92.9	93.7	93.7	96.0	96.2	94.4	93.3
	6	6	91.1	94.1	85.0	85.8	87.0	85.0	86.6	90.8	88.3	88.6	94.1	96.6	94.3	95.2	96.3	96.8	95.4	94.7
	12	12	91.6	94.2	87.4	88.7	80.1	88.2	88.6	91.5	90.0	91.4	96.6	96.4	95.1	96.9	97.1	97.9	95.9	95.9
	24	24	91.2	93.9	88.7	91.4	91.1	87.2	88.5	92.6	90.6	91.3	97.0	96.1	95.2	97.9	97.3	97.6	95.8	96.0
溶酸性有機	1	1	3.6	3.5	5.0	8.4	4.9	5.5	6.2	4.1	5.2	3.4	1.5	1.5	2.2	3.5	1.2	1.3	1.7	2.0
	3	3	4.0	3.5	10.8	8.5	9.2	4.4	7.5	4.5	6.6	2.9	1.9	1.8	3.0	3.8	1.5	1.7	1.7	2.3
	6	6	2.3	1.1	9.9	8.4	4.7	5.5	5.9	4.0	5.2	2.7	2.3	1.8	2.4	2.9	1.3	1.4	1.8	2.1
	12	12	2.3	2.0	7.3	5.3	5.1	4.3	5.1	3.8	4.4	1.7	1.7	1.9	2.0	1.9	0.9	1.2	1.6	1.6
	24	24	3.6	2.3	6.6	2.2	4.2	7.2	5.2	3.6	4.4	2.6	1.9	2.0	1.8	0.8	0.9	1.3	1.8	1.6
磷脂質分劃	1	1	0.5	1.6	1.0	1.0	0.6	0.6	1.1	0.9	0.9	0.8	0.1	0.1	0.8	0.5	0.2	0.3	0.1	0.4
	3	3	1.9	1.3	1.8	1.5	0.5	1.8	1.3	1.2	1.4	0.9	0.1	0.1	0.4	0.3	0.2	0.3	0.1	0.3
	6	6	2.3	1.2	0.5	1.5	0.3	0.6	1.2	1.0	1.1	0.1	0.2	0.1	0.9	0.2	0.3	0.2	0.2	0.3
	12	12	1.8	0.8	1.0	1.9	1.0	1.5	1.0	1.1	1.3	0.4	0.2	0.1	0.5	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2
	24	24	0.5	1.0	0.7	1.3	0.5	1.0	1.0	0.7	0.8	0.3	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1
核酸分劃	1	1	2.2	2.1	5.6	3.1	10.7	8.4	7.5	4.0	5.5	11.7	6.2	5.5	5.1	4.8	1.6	1.8	5.2	5.2
	3	3	1.9	2.0	3.8	3.1	7.9	7.8	6.2	3.2	4.5	8.5	4.2	4.7	2.0	2.0	1.1	1.2	3.6	3.4
	6	6	2.0	2.3	3.3	1.9	6.6	6.6	4.1	2.7	3.7	7.5	2.9	1.1	1.7	1.5	1.1	1.0	2.4	2.4
	12	12	2.0	1.8	3.0	2.0	3.0	4.5	3.7	2.1	2.8	5.5	1.1	1.2	1.7	0.8	0.8	0.3	2.1	1.7
	24	24	2.2	1.5	2.8	2.2	3.2	3.1	3.5	2.0	2.6	4.7	0.7	1.5	2.0	1.1	0.5	0.5	2.1	1.6
磷蛋白質分劃	1	1	1.7	1.3	3.4	3.4	1.7	3.2	2.8	2.3	2.5	1.6	0.5	0.5	0.5	0.4	1.5	0.7	0.3	0.8
	3	3	2.4	1.1	1.9	2.4	1.2	1.3	2.4	1.4	1.8	1.4	0.6	0.5	0.9	0.2	1.2	0.6	0.2	0.7
	6	6	2.3	1.3	1.3	2.4	1.4	2.3	2.2	1.5	1.8	1.1	0.5	0.4	0.7	0.2	1.0	0.6	0.2	0.6
	12	12	2.3	1.2	1.3	2.1	0.8	1.5	1.6	1.5	1.5	1.0	0.4	0.4	0.7	0.2	1.1	0.5	0.3	0.6
	24	24	2.5	1.3	1.2	1.9	1.0	1.5	1.7	1.1	1.5	1.1	0.3	0.3	0.9	0.1	1.1	0.5	0.2	0.6

1 $\mu\text{c}/\text{cc}$ ^{32}P 2cc
 20% homogenate 10cc
 toluol 1~2滴

これをよく振盪してから38°Cに incubate し、1時間、3時間、6時間、12時間、24時間目に各々2ccをとり出し、第2項のごとく分割した。

第2項 各種磷酸化合物分離方法

第1編と全く同様に Schneider⁶⁾法に準じて溶酸性分割、磷脂質分割、核酸分割、燐蛋白質分割に分離し、さらに溶酸性分割を溶酸性無機磷酸分割、溶酸性有機磷酸分割に分離した。

第3項 試料の放射能測定法ならびに成績記載の方法

第1編と同様、各分割液の一定量をステンレス製放射能測定用試料皿に入れ、重湯煎上にて乾燥せし

め、神戸工業製PA-7H増巾器使用の Geiger-Müller Counter で放射能を測定し、各時間毎に各分割カウント数の総和を求め、これを100とした時の百分率で各分割の移行量の割合を表わした。

第3章 実験成績

実験成績は第1表に示す如くで、各分割の時間的変動を第1~5図でグラフにより表わした。このグラフの△は脳局「ア」家兔群、●は正常家兔群で、平均値は各々△---△および●---●で表わした。

第2章に述べたごとき実験系を incubate し1時間、3時間、6時間、12時間、24時間目に、Schneiderの方法に準じて、溶酸性無機磷酸分割、溶液性有機磷酸分割、磷脂質分割、核酸分割、燐蛋白質分割に分離した。

第1節 溶酸性無機磷酸分割

第1図に示すごとく、脳局「ア」家兔例では平均1時間目86.6%、3時間目85.6%と減少し、ついで6時間目88.3%、12時間目90.0%、24時間目90.6%と漸次増加する。正常家兔例の平均は1時間目に最低の値91.5%をとり、漸次93.3%、94.7%、95.9%、96.0%と増加する。両者とも incubate 後直ちに減少し、脳局「ア」家兔では3時間目、正常家兔では1時間目に最低となり以後次第に増加し、12時間目以後はほぼ一定となる。いずれの時間においても脳局「ア」家兔例の平均値は正常家兔例に比べて常に低い値をとっている。

第2節 溶酸性有機磷酸分割

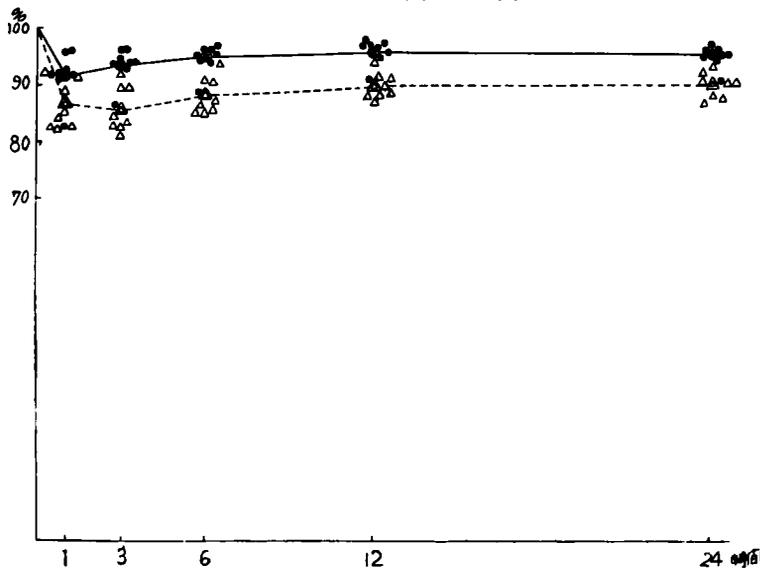
第2図に示すごとく、脳局「ア」家兔例では各時間の平均値は5.2%、6.6%、5.2%、4.4%、4.4%で、正常家兔平均値は2.0%、2.3%、2.1%、1.6%、1.6%で、脳局「ア」家兔例は対照例に比し2.5~2.8倍の値を示し、両者とも3時間目に最高の値をとり、以後減少する。

第3節 磷脂質分割

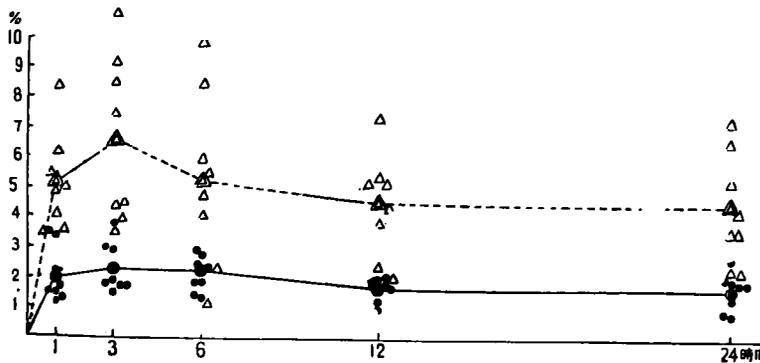
第3図に示すごとく、本分割における移行の割合は一般にきわめ

- ● 正常家兔
- 正常家兔平均値
- △ △ 潜在性脳局「ア」家兔
- △---△ 潜在性脳局「ア」家兔平均値

第1図 溶酸性無機磷酸分割



第2図 溶酸性有機磷酸分割



て少く、脳局「ア」家兎の各時間毎の平均値は0.9%, 1.4%, 1.1%, 1.3%, 0.8%で、正常家兎の平均値は0.4%, 0.3%, 0.3%, 0.2%, 0.1%である。脳局「ア」家兎例では移行の割合が正常家兎例に比し2.2~8倍大きく、3時間目まで増加し、以後減少するが、対照例は1時間で最高値をとり、以後減少する。

第4節 核酸分割

第4図に示すごとく、各時間の脳局「ア」家兎平均値は5.5%, 4.5%, 3.7%, 2.8%, 2.6%で、正常家兎では5.2%, 3.4%, 2.4%, 1.7%, 1.6%で、前者の値は後者の1~1.6倍で、incubate後急激に増加して1時間目に最高となり、以後急速に減少するが、12時間以後はほぼ一定となる。

第5節 燐蛋白質分割

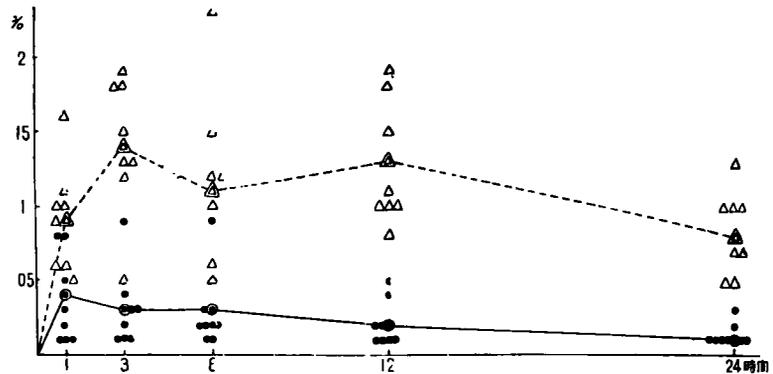
第5図に示すごとく、脳局「ア」家兎平均値は2.5%, 1.8%, 1.8%, 1.5%, 1.5%であり、正常家兎平均値は0.8%, 0.7%, 0.6%, 0.6%, 0.6%で、脳局「ア」家兎例は対照例に比し約2.5~3倍の値をとり、ともに1時間値が最高で3時間以後はやや減少するが、ほぼ一定の値をとる。

第4章 総括ならびに考按

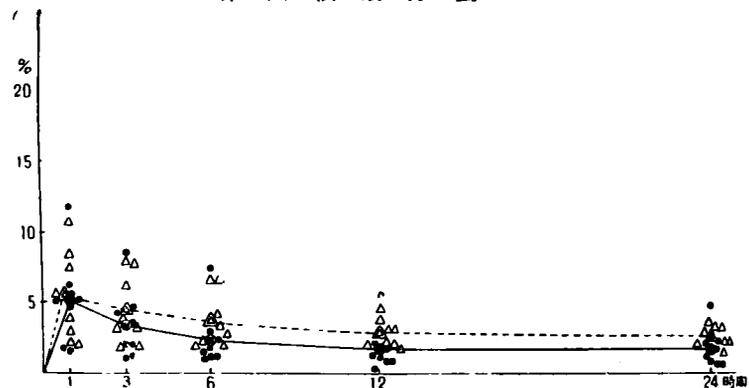
私どもの教室でおこなわれている真正癲癇の原因究明の研究の一環として、実験的に癲癇性素因を賦与されていると考えられる潜在性脳局「ア」家兎大脳皮質の³²P incorporationの研究をおこない、潜在性脳局「ア」家兎では無機燐酸から溶酸性有機燐酸分割、燐脂質分割、核酸分割、燐蛋白質分割への合成反応が一率に促進されていることを観察した。

すなわち無機燐酸が諸種物質への合成に利用されなかつたか、あるいは一旦合成されたが、再び無機燐酸に分解されたと考えられる溶酸性無機燐酸分割

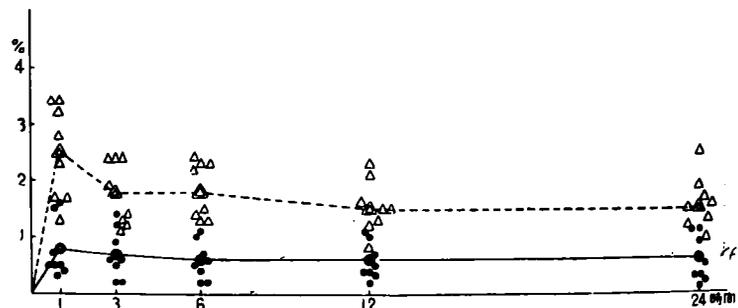
第3図 燐脂質分割



第4図 核酸分割



第5図 燐蛋白質分割



は、第1編でも述べたごとく、生体内合成反応の総括的な indicator と考えられるが、この無機燐酸分割が潜在性脳局「ア」家兎群では、対照群にくらべて少いということは、潜在性脳局「ア」家兎群では燐酸代謝が総括的にみても促進していることを示している。いまこれを詳細に観察すると、正常家兎群では平均1時間で91.5%に下り、3時間目、6時間目と漸次上昇し、12時間目95.9%となり以後は安定している。一方潜在性脳局「ア」家兎群では3時間で最低値85.6%となり、以後漸次上昇し、12時間で90.0%となり以後安定する。いま12時間目における両者の比率をとると、正常家兎平均値を100とすれば、潜在性脳局「ア」家兎群では94となる。これら

の成績を人脳をもちいた実験, すなわち真正癲癇と非癲癇との関係と比較対照してみると, 全く傾向を一にしているが, 全体的にみて, 人脳では家兎脳よりも無機磷酸代謝が活潑であることがわかる. すなわち, もつとも安定していると考えられる12時間値をとつてみると, 非癲癇例平均値は91.7%, 真正癲癇例平均値は80.3%で, その比は100:87であり, 正常家兎平均値は95.9%, 潜在性脳局「ア」家兎平均値は90.0%で, その比は100:94である.

つぎに溶酸性有機磷酸分劃も第1編の人脳で観察したのとはほぼ同様な経過をとつていことがわかる. すなわち, 両者とも3時間目に peak を有する curve となり, 12時間目頃から安定となる. 活性という点からみると, 人脳の方が家兎より活潑である.

磷脂質分劃は人脳例の場合と同様, きわめて ^{32}P の incorporation の率が少く, 測定試料中の放射能も弱いため, 測定の際の counts 数が少いので, 図の curve が smooth でないが, 正常家兎例は peak の点で非癲癇例と類似した経過をとるけれども, 潜在性脳局「ア」家兎例では3時間まで増加して漸次減少するが, 真正癲癇例では1時間値と3時間値は変化なく, 3時間以後減少する. しかも脳局「ア」家兎の促進の比率は真正癲癇例のそれより大であり, 脳局「ア」家兎例の一つの特徴となつている.

核酸分劃は両群ともに1時間目に peak を有する curve となり, 他の分劃と同様に12時間以後は安定

する. この分劃もやはり潜在性脳局「ア」家兎例の移行の割合が対照に比して大である. これを人脳例と比較すると, 全体の傾向は類似しているが, 家兎例の incorporation の割合は人脳例のそれに比し, 極めて小さく, 脳局「ア」家兎の促進率も癲癇例のそれに比し低い. すなわち, 潜在性脳局「ア」家兎では磷脂質分劃に顕著な差があらわれているに反し, 真正癲癇例では核酸分劃に著しい差をみとめる.

磷蛋白質分劃も両群とも1時間以内に peak を有する curve となり, 3時間以後はほとんど安定する. 他の分劃と同様, 脳局「ア」家兎例の移行の割合が対照例に比し促進している. これを人脳例と比較すれば, 一般に人脳の方が移行割合が大であるが, 脳局「ア」家兎の促進率は真正癲癇のそれとほとんど同じで, 類似した経過をとつている.

第5章 結 論

潜在性脳局「ア」家兎および正常家兎の大脳皮質の磷酸代謝を radioisotope ^{32}P をもちいて比較検討した結果, 次の結論をえた.

1) 潜在性脳局「ア」家兎では溶酸性有機磷酸分劃, 磷脂質分劃, 核酸分劃および磷蛋白質分劃の ^{32}P の移行はいずれも亢進している.

2) またこれらの諸分劃のうち, 磷脂質分劃での促進がとくに著明である.

Phosphoric Acid Metabolism in Cerebral Cortex

Part II Phosphoric acid metabolism in cerebral cortex of rabbit with latent local anaphylaxis

By

Tohru HIGASHI

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

By pursuing the behaviours of the ^{32}P incorporation into phosphoric acid fractions in the brain homogenate of the rabbit with latent local cerebral anaphylaxis and in that of normal rabbit using the method described in Part I, the following results were obtained.

1) The rate of the ^{32}P incorporation into acid soluble-organic, lipid, nucleic acid and phosphoprotein fraction in the cerebral cortex of the rabbit with latent local anaphylaxis was much more accelerated as compared with that of normal rabbit.

2) The accelerating ratio of lipid fraction was especially high as compared with that of other fractions.