

# 脳 の 窒 素 代 謝

## 第 3 編

### クロールプロマデン投与大黒鼠脳髓アンモニア 並にアミノ酸について

岡山大学医学部神経精神医学教室 (主任: 奥村二吉教授)

河 井 清

〔昭和32年11月26日受稿〕

#### 緒 言

私はすでに、第1編において、神経・精神疾患者の髄液アンモニア量を測定し、分裂病者に多量であつて、急性興奮期に増量は著しく、慢性停留期には少い事を証明し、アンモニアが脳の興奮制止過程と密接な関連にあることを示すものと推論した。更に第2編においては、大黒鼠を用い、脳内アンモニア量、並びにこれと関係の深いアミノ酸について探索を進め、脳アンモニアの源泉についても論及した。今回は、これらアンモニア並びにアミノ酸が、精神医学と関係の深いクロールプロマデンにより如何に変動するかを検討して見たいと思う。従来、脳のアンモニアの研究では、電気刺戟によりアンモニアが増加するという田代の研究<sup>1)</sup>、アンモニアを組織外に放出するという塚田の研究<sup>2)</sup>、興奮に伴つてアンモニアが増加するという Conway の研究<sup>3)</sup>が先づ挙げられ、この外、アンモニアと痙攣、麻酔との関係を追求した Richter and Dawson<sup>4)</sup>、Geiger et al.<sup>5)</sup>、Bülow and Hohmes<sup>6)</sup>、Krebs et al.<sup>7)</sup>、Winterstein<sup>8)</sup>、Waelsch<sup>9)</sup>、Weil-Malherbe<sup>10)</sup>の研究等がある。他方、クロールプロマデンと脳の物質代謝に関する研究としては、実験動物の酸素消費量の低下、組織呼吸の低下、並に大黒鼠の視床及び視床下部における著明な ATP の増加<sup>11)12)13)</sup>等の実験的所見が得られている。

#### 実 験 方 法

##### (1) アンモニア量の測定<sup>3)</sup>

摘出大黒鼠脳髓を秤量、10%三塩化醋酸液で、10倍の homogenate を作り、5分間遠心沈澱の後、予め外室に飽和炭酸カリ液 1.0 cc、内室に N/1000 塩酸 1.0 cc を入れて準備した Conway unit の外室に、その上清をピペットで 0.5cc 秤量する。外室の内容を混合し、unit を 1 時間静置し、呼吸の後、内室の塩酸を N/468 水酸化バリウムを以て滴定する。同様の操作を 10%三塩化醋酸液についても行い、これを盲検、又、硫酸アンモニウム液について行いこれを一次標準とし、計算により、アンモニア量を定めた。

##### (2) アミノ酸の測定<sup>16)17)18)</sup>

摘出脳髓を 75% アルコールを用い、15倍の homogenate を作製し、この 1.0 cc に更に 30 倍容量の 75% アルコールを加え<sup>14)</sup>、共栓付遠沈管内にて充分振盪、遠沈、extract をとり、重湯煎上、蒸発皿を用いて乾燥し、これを 1.0cc の水にて再び溶かし、遠沈、上清 0.1cc をペーパーの原点につける。これを型の如く、25% 含水フェノールを展開溶媒として<sup>15)</sup>展開の後、0.1% ニンヒドリンブタノール液を噴霧、発色したアミノ酸呈色斑より、色素を抽出、比色により、その量を定めた。同時にその都度、アミノ酸標準液をも測定し、一次標準とする。

## 実験結果

## (1) In vivo の実験

## a) クロールプロマジン急性投与例

実験動物としては大黒鼠、体重 100 g 程度のものをえらび、皮下にクロールプロマジン(吉富製薬コントミン) 50 mg/kg 注射する。鼠は次第に寡動となり、40~1時間の後、傾眠状態となり、やがて深い昏睡に陥る。この時をみはからつて実験に供するのである。脳摘出の術式は開頭脳摘出法による事とした。すなわち、鼠を台上に固定し、開頭、眼下に脳髄を眺めながら摘出、直にドライアイスアセトン冷剤中に投入、凍結させるのである。これを前記の如く homogenize し、得られたアンモニア並にアミノ酸量を第1表、第2表に示す。

第1表 クロールプロマジン急性投与例

例数	1	2	3	4	5	6	平均
アンモニア量 mg%	0.41	0.44	0.30	0.38	0.41	0.09	0.34

第2表 クロールプロマジン急性投与例

例数	グルタミン酸 mg%	グルタミン mg%	γアミノ酪酸 mg%
1	175.5	39.4	35.4
2	134.0	77.4	29.4
3	181.4	192.2	37.5
4	133.0	113.0	26.3
5	170.4	108.3	43.3
平均	158.9	106.1	34.4

第1表はアンモニア量であるが、最低0.09 mg%, 最高 0.44 mg %であつて、6例の平均は 0.34 mg %である。これを第3表正常鼠のアンモニア量、平均0.64 mg %と比較すると、半量近い減少という事になる。

第3表 対照例

例数	1	2	3	4	5	6	7	平均
アンモニア量 mg%	0.33	1.20	0.72	0.72	0.54	0.36	0.60	0.64

次にアミノ酸量であるが、第2表に示したように、グルタミン酸は5例平均158.9 mg%,

グルタミンは 106.1 mg %, γアミノ酪酸は、平均 34.4 mg %である。これを第4表の対照群と比較すると、グルタミン酸、γアミノ酪酸はやや少な目、グルタミンはやや多量という事になる。

第4表 対照例

例数	グルタミン酸 mg%	グルタミン mg%	γアミノ酪酸 mg%
1	181.5	72.8	
2	209.7	110.3	49.5
3	121.5	77.6	42.3
4	114.2	99.8	43.7
5	110.1	45.3	10.2
6	191.0	136.5	27.5
7	137.2	112.5	27.5
8	177.0	87.1	51.7
9	177.0	109.5	36.7
10	180.0	94.5	49.5
平均	159.9	94.5	37.2

## b) クロールプロマジン慢性投与例

実験動物としては、大黒鼠 100 g 程度のものをえらび、per kg 20 mg のクロールプロマジンを連日、皮下に注射、30日乃至50日に及ぶ。この際、大黒鼠は次第に寡動となり、最初の内は体重はむしろ増加するが、20日乃至30日以後ともなると次第に体重も減少し始め、死を呈するものが続出するので、注射量は適宜、加減しなければならなくなる。更に続けると、全く昏迷様となり、刺戟に対する反応に極めて鈍くなる。かくして得られた大黒鼠を、最後の注射後、24時間目に実験に供した。第5表はアンモニア量である。

第5表 クロールプロマジン慢性投与例

例数	1	2	3	4	5	6	7	平均
アンモニア量 mg%	1.05	0.78	1.11	0.85	1.05	0.85	0.83	0.93

これによると、アンモニア値、最高 1.11 mg %, 最低 0.78 mg %, 7例平均は 0.93 mg %であつて、対照群平均 0.64 mg %に比較すると明かに多量を示すのである。次に第6表に示すアミノ酸量であるが、グルタミン酸は、7例平均、167.3 mg %, グルタミンは同じ

く、113.4mg%,  $\gamma$ アミノ酪酸も49.7mg%であるから、第5表、対照例の氨基酸値と比較すると、何れも幾分多量のようなのである。

第6表 クロールプロマチン慢性投与例

	グルタミン酸 mg%	グルタミン	$\gamma$ アミノ酪酸
1	167.7	134.1	33.2
2	159.3	105.4	27.8
3	166.7	159.3	36.4
4	148.2	129.7	29.1
5	140.9	66.3	58.2
6	193.2	95.7	76.7
7	195.5	103.3	86.6
平均	167.3	113.4	49.7

(2) In vitro の実験

前記の如く作製したクロールプロマチン慢性投与鼠を断頭、脳髄を摘出、氷冷せる Krebs-bicarbonate-Ringer 液中に入れ、安全剃刀の刃を用い、厚さ 0.2~0.4 mm、重量 30~50 mg の切片を作る。これを基質を含まない Krebs-bicarbonate-Ringer 液 (pH 7.4) に浮遊せしめ、38°C にて、Warburg 円錐状容器 (気相は空気) を用い incubate する。1時間毎に外液のアンモニア並に切片内のグルタミン酸、アスパラギン酸を測定する。

第7表 クロールプロマチン慢性投与鼠  
脳切片アンモニア発生量

経過時間	1	2	3	4	4.5
アンモニア量 $\mu\text{M/g}$	6.2	7.1	9.3	12.7	10.6

第7表は、クロールプロマチン慢性投与鼠脳切片のアンモニア発生量である。値は実験に供した4例の平均であるが、1時間で、6.2  $\mu\text{M/g}$ 、2時間で 7.1  $\mu\text{M/g}$ 、3時間で 9.3  $\mu\text{M/g}$ 、4時間で 12.7  $\mu\text{M/g}$ 、4時間半で 10.6  $\mu\text{M/g}$  であり、これを第8表の対照と比較すると、

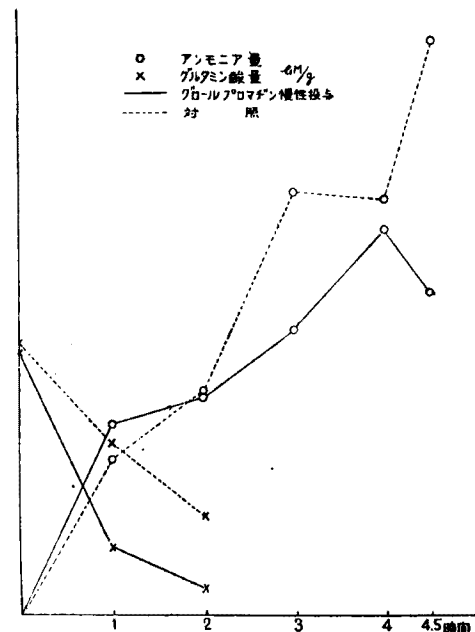
第8表 対照鼠脳切片アンモニア発生量

経過時間	1	2	3	4	4.5
アンモニア量 $\mu\text{M/g}$	5.1	7.3	13.8	13.6	18.9

最初の1時間に発生するアンモニア量は、対照平均 5.1  $\mu\text{M/g}$  より上廻り、2時間目には対照 7.3  $\mu\text{M/g}$  に略々等しく、3時間以後は、対照 13.8  $\mu\text{M/g}$ 、4時間値 13.6  $\mu\text{M/g}$ 、4時間半 18.9  $\mu\text{M/g}$  に比し、可成り少量であるといえるようである。これを要するにクロールプロマチン慢性投与鼠では、アンモニア産生は、1時間迄は、対照例にまさり、2時間以後は劣るという事になる。

次にグルタミン酸の消長であるが、0時平均 8.7  $\mu\text{M/g}$  のものが、1時間目には 2.1  $\mu\text{M/g}$ 、すなわち 6.6  $\mu\text{M/g}$  の減少、2時間目には、更に 0.9  $\mu\text{M/g}$  となるから、1.2  $\mu\text{M/g}$  の減少という事になる。この減少度はアンモニア発生1時間 6.2  $\mu\text{M/g}$ 、2時間 7.1  $\mu\text{M/g}$  (単位時間増加 0.9  $\mu\text{M/g}$ ) とほぼ平行しており、この傾向は、対照群と何等変る所はない。アスパラギン酸は、0時 1.9  $\mu\text{M/g}$ 、1時間 1.6  $\mu\text{M/g}$ 、2時間 0.8  $\mu\text{M/g}$  であつた。この間の関係を第9表に示す。尚、対照群のそれを第10表に示しておく。又、第1図にこの間の消息を一括して示す。

第 1 図



第9表 クロールプロマチン慢性投与鼠  
脳切片内アミノ酸

経過時間	0	1	2
グルタミン酸 $\mu\text{M/g}$	8.7	2.1	0.9
アスパラギン酸 $\mu\text{M/g}$	1.9	1.6	0.8

第10表 対照鼠脳切片内アミノ酸

経過時間	0	1	2
グルタミン酸 $\mu\text{M/g}$	8.9	5.6	3.2
アスパラギン酸 $\mu\text{M/g}$	3.5	3.8	3.1

## 考 察

先づ、前掲の Data について考えて見る。クロールプロマチン急性投与例の平均アンモニア値、0.34 mg %は、対照群に比較すれば約半量であるから、著明なアンモニアの減少が見られるという事になる。一体、麻酔時に脳髄遊離アンモニアが減少する事はよく知られている所であり、Richter and Dawson<sup>4)</sup>も健常鼠のアンモニア値は平均0.28 mg %であるが、Nembutal で30分麻酔したものでは0.06 mg %に低下すると報告している。一方、Winterstein<sup>5)</sup>によつて、Urethane で麻酔した兎の坐骨神経について、同様にアンモニア形成が減弱する事が報告されているのを合せ考えても、麻酔剤によつて脳機能が減弱すると共に脳アンモニア形成も抑制されるものと考えられるのである。従つて、この場合のアンモニア減少は、クロールプロマチンの麻酔効果による脳機能低下の結果としてよく理解出来る。また、この際のアミノ酸値の変化についても、従来、得られている結果の如く<sup>10)</sup>である。次に慢性投与の場合であるが、アンモニア量は、平均0.93 mg %であるから、対照に比べると遙に多量である。痙攣に際して、脳内遊離アンモニアが増加し<sup>3)20)</sup>、同じく脳内グルタミン酸が減少する事<sup>21)22)</sup>はすでに知られており、このアンモニア増加は、脳内に絶えずおこっているアンモニアの産生が、アンモニア処理機構<sup>9)23)</sup>の能力を上廻るためであろうとされている。この所見と、クロー

ルプロマチン慢性投与時所見とを比較してみると、アンモニアの増加は共通であるが、後者では、グルタミン酸の低下は起つておらず、これの脱炭酸によつて生ずる $\gamma$ アミノ酪酸にいたつてはむしろ増加すらみられるのである。従つてこの点が、どうも痙攣時とはことなるようである。

次に、脳切片のアンモニア産生であるが、最初の1~2時間に発生されるアンモニア量は、対照に比して何等おとる所はない。殊に最初、1時間迄のアンモニア産生は、対照を上廻つており、同時に切片内におけるグルタミン酸の減少度も、対照より著明なのである。つまり、クロールプロマチン慢性投与では、グルタミン酸からのアンモニア産生が特に活発といえるわけである。所が、2時間目以後となるとそうではない。却つてアンモニア産生は対照よりおとつているのである。が、このアンモニアの源泉はグルタミン酸とは違うものようであるから、又、別の観点から理解せねばならぬのであろう。この点に関しては今後の研究に俟ちたい。

## 総 括

クロールプロマチン急性投与、並に慢性投与鼠の脳髄遊離アンモニア量を Conway 微量拡散分析法で、アミノ酸量を Paperchromatograph 法で測定した。

- 1) クロールプロマチン急性投与時には、脳髄遊離アンモニアは減少する。
- 2) クロールプロマチン慢性投与時には、脳髄遊離アンモニアは増加するが、グルタミン酸の減少はみられない。
- 3) クロールプロマチン慢性投与鼠脳切片のアンモニア産生、並にグルタミン酸減少度は最初の1時間において、対照よりも著明である。が、その後のアンモニア産生は、対照よりも劣つている。

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜りました奥村教授に謹んで感謝の意を捧げます。

参 考 文 献

- 1) 田代: *Am. J. Physiol.* **60**, 519, 1922.
- 2) 塚田, 高垣: *科学*, **23**, No. 12, 629, 1953.
- 3) Conway, E. G.: 微量拡散分析法及び誤差論 (石坂音治訳)
- 4) Richter, D. and Dawson, R. M. C.: *J. B. C.* **176**, 1199, 1948.
- 5) Geiger, A. et al.: *Science*. Vol. **118**, 655, 1953.
- 6) Bülow, M. and Hohmes, E. G.: *Biochem. Z.*, **245**, 459, 1932.
- 7) Krebs, H. A. et al.: *Biochem. J.*, **44**, 159, 1949.
- 8) Winterstein, H.: *Naturwissenschaft*, **21**, 22, 1933.
- 9) Waelsch, H.: *Adv. in Protein. Chem.* **VI**, 301, 1951.
- 10) Weil-Malherbe, H.: *Biochem. J.*, **32**, 2257, 1938.
- 11) 黒川, 成瀬, 加藤, 矢部: *精神神経学雑誌*, **59**, 21, 1957.
- 12) Abood, L. G.: *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* **88**, 638, 1956.
- 13) Grenell, R. G. et al.: *Arch. Neurol. Psychiatr.* **73**, 347, 1955.
- 14) Wingo, W. J. and Awapara, J.: *J. B. C.* **187**, 267, 1950.
- 15) Roberts, E. and Frankel, S.: *J. B. C.* **187**, 55, 1950.
- 16) 桑田: *クロマトグラフィー*, 昭27.
- 17) 佐竹: *クロマトグラフィー*, 昭27.
- 18) 化学の領域: *クロマトグラフィー特集*, 5.
- 19) Dawson, R. M. C.: *Biochem. J.*, **49**, 138, 1951.
- 20) 塚田: *神経研究の進歩*, **2**, 126, 1957.
- 21) Cravioto, R. O. et al.: *Proc. Soc. Expl. Biol. Med.* **78**, 856, 1951.
- 22) Dawson, R. M. C.: *Biochem. Biophys. Acta.* **11**, 548, 1953.
- 23) Krebs, H. A.: *Biochem. J.*, **29**, 1935.

Nitrogen Metabolism of the Brain.

Part 3

The Ammonia and Amino Acid Contents of the Rat Brain  
in case of the Injection of Chlorpromazine.

By

Kiyoshi Kawai

Department of Neuro-psychiatry, Okayama University Medical School.  
(Director: Prof. Nikichi Okumura)

Ammonia of the rat brain in case of the injection of chlorpromazine was measured by Conway's microdiffusion method, and amino acid by the paperchromatography, and the following results have been obtained in the respective measurements.

1) Following the injection of chlorpromazine (50mg/kg per once), the ammonia contents of the rat brain decreased to 0.34 mg. per cent.

2) In case of repeated injection of chlorpromazine (20 mg/kg every day), the ammonia contents of rat brain increased to 0.93 mg per cent, and the simultaneous decrease of glutamic acid was not found.

3) The amounts of ammonia formed by above mentioned brain slices were found to be 6.2  $\mu$ M/g. for the first one hour, 7.1  $\mu$ M/g in two hours, 9.3  $\mu$ M/g. in three hours and 12.7  $\mu$ M/g in four hours, respectively. Namely, in this case, the increase of ammonia formation was found during the first one hour and the decrease of it was found thereafter.