神経化学

VOL. 3 SUPPLEMENT OCTOBER 1964



神経化学懇話会

各種痙攣パターンの局所神経化学的研究

9 1 頁　Table 1

Ach(mμM／G)左　6行目の空欄に３０Sec

Pch(μM／G)左上の空欄にPALLIUA を追加願います。

一般演題８のうち，２９頁の写真不鮮明のため差し替え願います。

Fig.1

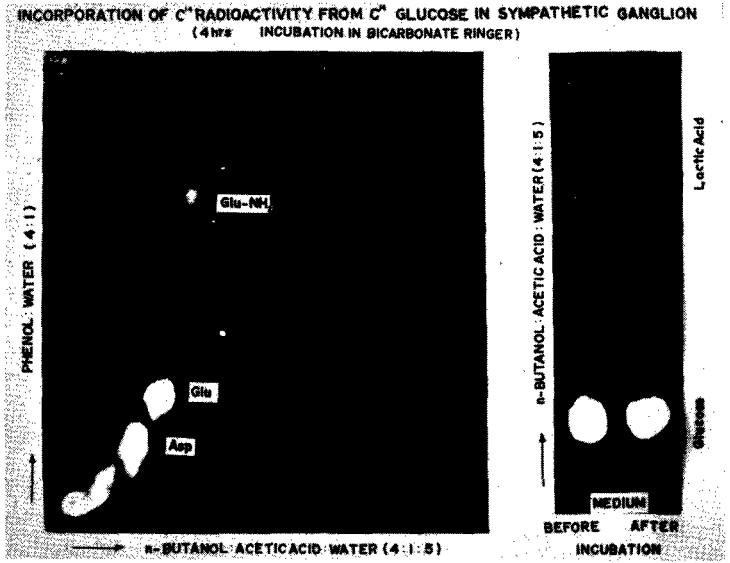
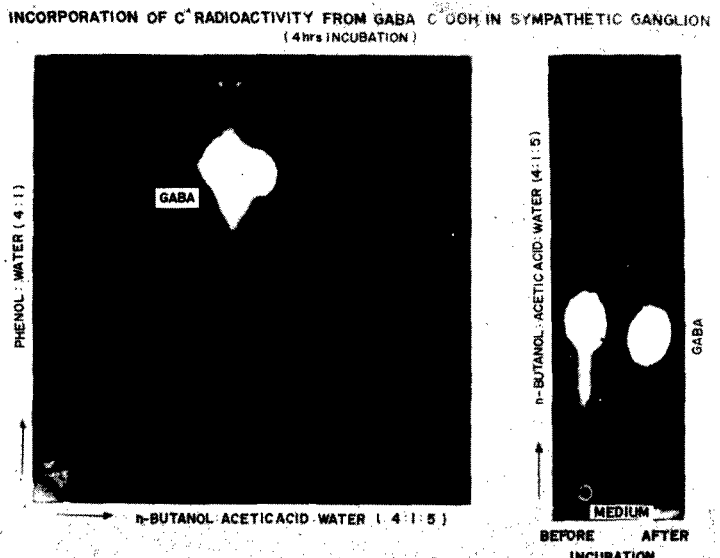


Fig.2



PHENYLKETONURIA; THE PATHOGENETIC PROBLEMS OF A MOLECULAR DISEASE AFFECTING THE NERVOUS SYSTEM

W. Eugene Knox, M. D.

Since Sir Archibald E. Garrod's clear recognition in 1908 of the relationship between gene, enzyme, and disease in certain conditions which he called "inborn errors of metabolism,"[1] we have had a very successful model for understanding the etiology of inherited diseases. The details of the relationship between the gene and the enzyme have been greatly clarified by the results of biochemical genetics. Everyone is familiar with Beadle and Tatum's aphorism of "One gene--one enzyme," and everyone knows that the gene consists of DNA in which the order of the bases codes the order of amino acids in the enzyme protein made from the pattern of that gene. This development in our understanding can be said to have culminated in Pauling's recognition of sickle cell anemia as a "molecular disease,"[2] one in which the genetic alterations in the sequence of amino acids in the hemoglobin fully accounted for the signs and symptoms of the disease.

Whereas the relationship between the gene and the qualitative structure of the enzyme protein is now remarkably simple and clear, the rest of the relationship discovered by Garrod, that between the abnormal enzyme and the disease, is still a challenge to medical science. The situation in sickle cell anemia was deceptively simple. The altered sequence of amino acids in sickle cell hemoglobin decreased the solubility of the reduced form of the hemoglobin so that it crystallized out in the red cells <u>in vivo</u>, causing stasis, ischemia, more deoxygenation of hemoglobin, and more crystallization. This vicious cycle depended upon

simple physical properties, and it adequately accounted for the crises of infarction and hemolysis which characterize sickle cell anemia. But in most hereditary diseases, the relation between the altered enzyme and the signs and symptoms of disease, that is, the pathogenesis of the disease, is less direct. Typical of the indirect relationships met are those in phenylketonuria, where an abnormal enzyme protein in the liver results in dysfunction of the brain. Analysis of the causal chains between function of a liver enzyme and function of the brain in phenylketonuria, or analysis of the pathogenesis of any inherited disease, is more than an exercise in applying known scientific principles. By knowing and being able to interrupt these causal chains, hereditary diseases can be successfully treated. Today we still must accept the genes which each individual receives, but we do not have to accept their consequences. The successful prevention of mental deficiency in phenylketonuric children makes this clear. It is not yet clear, however, why the untreated phenylketonurics cannot think, while the treated ones can. The interest in this problem reaches beyond our concern with any particular disease of the nervous system.

The biochemical genetics of phenylketonuria is remarkably well understood. After Følling's[3] description of the syndrome in 1934 as a familial type of mental deficiency characterized by the excretion of phenylpyruvic acid, only 25 years elapsed before the metabolic basis of the disease was clear. Jervis proved that the condition is inherited through a single autosomal gene, a double dose of which produces the disease.[4] He also showed that large amounts of phenylalanine accumulate in the body of these patients.[5] He located the metabolic error as the inability to oxidize phenylalanine to tyrosine.[6] Finally, Jervis demonstrated that the phenylalanine hydroxylase of the liver was inactive in these patients;[7] and

subsequent workers, in confirming this, have demonstrated that the defect must reside in the protein and not in a deficiency of cofactors required for the reaction. Tests for distinguishing the heterozygotes of phenylketonuria were then developed which depended upon the fact that individuals with one abnormal gene have less of the enzyme than normal individuals, as predicted by the one-to-one relationship of gene and enzyme.[8] A rational therapy was then developed. It is best described as a preventive regimen which consists of feeding a low phenylalanine diet to prevent the accumulation of phenylalanine in the body. It was developed and first used by Bickel[9] and by Armstrong and Tyler.[10] Proof was slow in coming that the therapy was effective, because the most successful results were obtained only in very young children. Recently, attention has focused upon the brain to discover its subtle defect. Although earlier autopsy results did not disclose any known pathological basis for the mental defect, there is now growing certainty that a defective myelination exists at least in the younger patients. It is at least encouraging to dicover <u>some</u> abnormality in the central nervous system of patients whose mental function is abnormal. Let us consider now what deleterious influences would be exerted on the brain by this liver abnormality.

The inherited abnormality in phenylketonuria concerns solely the phenylalanine hydroxylase of the liver. Other abnormalities do not exist, except as secondary consequences of this primary abnormality of a liver enzyme.[11] In particular, the brain is not hereditarily defective. This is shown by the apparent normality of the affected children at birth and for some weeks thereafter. Indisputable evidence is provided by the successful prevention of mental deficiency by a low phenylalanine diet which prevents accumulation of excessive phenylalanine

during the first 4 to 6 years of life. After that age, a normal diet can be taken without serious deterioration of the patient's mental state; and untreated phenylketonurics, after the period of childhood, pass a lifetime with elevated phenylalanine levels without significant further deterioration of their mental state. These facts indicate that the mental defect in phenylketonuria is secondary to the accumulation of phenylalanine and that this effect is exerted primarily on the developing central nervous system during a sensitive period in the first years of life. Presumably all of us passed through an equally sensitive stage in the development of our brains, but we were fortunate that high levels of phenylalanine did not accumulate. Absence of the liver enzyme merely allows phenylalanine to accumulate.

The metabolic consequences to the developing nervous system of high levels of phenylalanine and significant levels of the unusual metabolites through which phenylalanine overflows is a very complicated one. Considerable interest has been attracted by decreased levels of serotonin in the blood of phenylketonurics because of the association of this compound with brain function, although years of investigation of serotonin has made it clear enough that meddling with serotonin impairs brain function. Involvement of serotonin in the pathogenesis of phenylketonuria has not yet been shown either in patients treated with serotonin precursors to overcome the deficiency or in experimental animals. Recent positive experiments by Woolley[12] remain to be evaluated in animals that are more clearly defective in the same way as are phenylketonuric patients.

A striking effect of the very high levels of phenylalanine in the blood of phenylketonurics is its depression of the levels of other amino acids. In addition, it inhibits the transport of amino acids across

cells. Such an effect could have wide repercussions in the metabolism of the organism, including even an effective deficiency of serotonin precursors, as well as of essential building blocks for cellular metabolism. The phenylalanine levels in phenylketonuria are 30 times those in normal individuals, but the total α-amino nitrogen in the blood remains substantially unchanged. This means that the other amino acid levels are depressed, a fact well documented by the studies of Linneweh.[13] In addition, the inhibition of amino acid transport into cells by high levels of phenylalanine, first recognized in in vitro experiments, was demonstrated directly in a phenylketonuric patient, and the inhibition was shown to be eliminated when the phenylalanine level in the blood was lowered by low phenylalanine diet. These observations raise the possibility that a disturbance of amino acid supply to the developing brain cells may be at least in part responsible for the abnormalities produced. The possible connections between such an abnormality of amino acid metabolism and the dysmyelination of the brain is still obscure. However, Crome[14] and his colleagues have recently called attention to the fact that the phenylketonuric brains are, on the average, lighter in weight than normal ones. Their first provisional assays indicate an abnormally low cerebroside content of the phenylketonuric brains. Both observations lend support to the view that the damage which is done to the brain of the phenylketonuric during the sensitive period in the first few years of life, the time which coincides with myelination of the human brain, is in fact some disturbance of the subtle process of myelination.

1. Garrod, A. E., Inborn Errors of Metabolism. Oxford, London, 1909.
2. Pauling, L., Itano, H. A., Singer, S. J., and Wells, I. C., Science 110, 543, 1949.
3. Følling, A., Ztschr. physiol. Chem. 227, 169, 1934.
4. Jervis, G. A., J. Ment. Sci. 85, 719, 1939.
5. Jervis, G. A., Block, R. J., Bolling, D., and Kanze, L., J. Biol. Chem. 134, 105, 1940.
6. Jervis, G. A., J. Biol. Chem. 169, 651, 1947.
7. Jervis, G. A., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 82, 514, 1953.
8. Hsia, D. Y. Y., Driscoll, K., Troll, W., and Knox, W. E., Nature, London, 178, 1239, 1956.
9. Bickel, H., Gerrard, J., and Hickmans, E. M., Acta pediat. 43, 64, 1954.
10. Armstrong, M. D., and Tyler, F. H., J. Clin. Invest. 34, 565, 1955.
11. Knox, W. E., "Phenylketonuria" in The Metabolic Basis of Inherited Disease, edited by J. B. Stanbury, J. B. Wyngaarden, and D. S. Fredrickson. McGraw-Hill, New York, 1960.
12. Woolley, D. W., and Van Der Hoeven, T., Science 144, 1593, 1964.
13. Linneweh, F., and Ehrlich, M. Klin. Wchnschr. 40, 225, 1962.
14. Crome, L., and Pare, C. M. B., J. Ment. Sci. 106, 862, 1960.

神経化学

VOL. 3 SUPPLEMENT OCTOBER 1964

第７回神経化学懇話会

大阪朝日生命ホール
10月9日（金），10日（土）

目　次

一　般　演　題

1　神経疾患に関する免疫化学的研究 ---------- 1
有岡　巌・矢内純吉・
辻尾武彦（阪大・医・神経）
荻田善一（阪大・医・遺伝）

2　Near-Freezing Method による脳部位別アセチルコリン定量法 ---------- 4
高橋　良　インディアナ大・精神
東京医歯大・精神

3　神経終末の新分離法 ---------- 8
黒川正則（東大・医・脳研）
坂本哲彦・加藤　誠・
秋元波留夫（東大・医・精神）

4　脳白質の研究 ― 細胞分画における知見 ―---------- 12
加藤尚彦・平山　皓・
秋元波留夫（東大・医・精神）
黒川正則（東大・医・脳研）

5　脳ATPaseに対するメトアンフエタミンの影響 ---------- 16
加藤伸勝・二階堂　享・
江副　勉　（都立松沢病院）

6　脳のイノシタイドとそれへの^{32}P 組入れについて ---------- 20
林　浩平・八木原嘉幸・中村　勇・
山添三郎（群大・医・生化）

7　脳切片におけるアミノ酸の能動輸送 ---------- 24
―― 特にGABA取り込みの局所的特徴について ――
中村陸郎・永山素男・
秋元波留夫（東大・医・精神）

8　白鼠剔出頸部交感神経節のアミノ酸代謝の研究 ---------- 28
永田　豊・横井幸雄・
塚田裕三（東邦大・医・二生理）

9 C^{14} －グルコースを用いたネコ脳のアミノ酸タンパク代謝の研究 ------- 32
大森文太郎・大月三郎・
（岡山大・医・神経）

シンポジウム：脳の構成物質

S-1 脳組織におけるRibonuclease Inhibitorの存在とその精製の試み ---------- 36
間瀬桂吉・阿部幸子・
（新潟大・医・脳研）

S-2 神経系に存在する生物学的活性ポリペプチド ---------- 40
井上章・片岡喜由・桝村純生・
堀清記・塩栄夫（京大・医・二生理）

S-3 牛脳中の酸性ペプチド(I) ---------- 42
柿本泰男・中島照夫・金沢彰・
武貞昌志・清水宏俊・宮本英七・
佐野勇（阪大・医・精神）

S-4 牛脳中の酸性ペプチド(II) ---------- 46
金沢彰・柿本泰男・中島照夫・
武貞昌志・清水宏俊・宮本英七・
佐野勇（阪大・医・精神）

S-5 L－チロシン水酸化酵素
── 脳および交感神経分布臓器に特異なカテコールアミン生合成酵素 ------- 50
永津俊治 National Heart Inst.Clin Biochem;
名大・医・生化

一般演題

10 肝臓酵素の活性調節と視床下部(III)
特にその神経性機構の解析について ---------- 53
嶋津孝・藤本孝知・
福田葵（阪大・医・三解剖）

11 マウスの部分脳におけるＮＡＤの確認とHydrazine 2HClの影響 ---------- 57
斉藤章二・望月安雄・
徳永友喜子・加倉井祥子・
小島勝彌（慶大・医・薬理）

12 脳腫瘍の診断における乳酸脱水素酵素Isozymeの応用 ---------- 61
千ケ崎裕夫・高倉公朋・
佐野圭司（東大・医・脳外科）
島薗順雄（東大・医・生化）

13 X線照射の脳蛋白質代謝並びに脳組織呼吸に及ぼす影響について ---------- 65
原隆夫・中沢省三・古沢善文・
宮沢登（新潟大・医・脳外科）

14 脳の核酸に及ぼすTricyano－amino－propeneの影響について ---------- 69
中脩三・大橋健男・山上栄・
川北幸男（大阪市大・医・神経）

15 慢性覚せい剤中毒マウスの脳クレアチン燐酸アデニンヌクレオチドの変動 ---------- 73
── 行動異常の神経化学的研究 ──
大須賀恒夫・清水俊郎・
台弘（群大・医・精神）

シンポジウム：神経系病態の生化学

S－6 白鼠及び猿に依る実験的フエニールケトン尿症の研究 ---------- 77
平野修助・野口鉄也・
塚田裕三（東邦大・医・二生理）

S－7 実験的Porphyrin症の神経化学的研究 ---------- 81
中尾喜久・宇尾野公義・
井形昭弘・田辺　等・
朝長正徳・和田　攻・
（東大・医・中尾内科）

S－8 マウス脳室内注入法より見た痙攣誘発とイオン特にCaイオンとの関係 ---------- 85
喜田富太郎・神谷大雄・
柴田邦治（近畿大・薬理）

S-9 各種痙攣パターンの局所神経化学的研究 ---------- 89
融　道男・高見沢ミサ・
仮屋哲彦・小林暉佳・
小林健一・高橋良・
（東医歯大・神経）

S-10 ミオクロヌスてんかんに関する生化学的ならびに組織化学的研究 ---------- 93
難波益之（山口医大・精神）

S-11 黒内障性白痴脳の脂質の分析と組織化学 ---------- 96
渚瀬正・酒井正雄・井上勝義・
田野稔郎（横浜市大・医・神経）

S-12 Biochemistr of Multiple Sclerosis
C.M. Plum　Biochem. Res. Lab.
Kolonien Filadelfia
Dianalund
Denmark

招待講演

Histamine and the Nervous System, including
Original Studies on Histamine Formation and its Inhibition
W.G. Clark　Vetenans Administration
Hospital
Psycho Pharmacology Res. Lab.
Sepulveda, Calif, U.S.A.

II Biochemical Aspects of Phenylketonuria
W.E. Knox　Camcer Res Inst. New England
Deaconess Hosp. and
Harvard Univ.
Boston, Mass. U.S.A.

1 神経疾患に関する免疫化学的研究

有岡　巖・矢内純吉・
辻尾武彦（阪大・医・神経）
荻田善一（阪大・医・遺伝）

われわれは、神経疾患について、主として免疫化学の方法を用いて研究しているがまずウィルソン病での所見を述べる。

ウィルソン病では、血清セルロプラスミン値が極めて低いことが、特徴の1つとされている。

最近 Hirshman ら[1]は、セルロプラスミンについて2つの分画をえ、その1つを澱粉ゲル電気泳動したところ、ウィルソン病例のものは、正常のものと泳動距離が異っていると報告した。この実験では、長期にわたり貯蔵した血清を資料としたため、変性の可能性がある。

そこで、われわれは、ウィルソン病の血清セルロプラスミンと正常のそれとの異同を検討する目的で、免疫化学的方法を用いて以下の実験を行なった。

資料と方法

血清：下記の例からえた血清を使用した。

1) 正常例 ---------- 6例　　2) 患者(神経症状を示す) — 5例

3) 患者の姉で血清セルロプラスミン値が著しく低いもので、"candidate"またはヘテロと考えられるもの ---------- 1例

4) 患者の母で、ヘテロと思われるもの ---------- 1例

抗血清：つぎのような全血清に対する抗血清を使用した。

1) ポリヴァレントの抗正常馬血清　　2) モノヴァレントの抗正常家兎血清。

いずれの抗血清によっても、同一所見をえたので、以下共に抗血清と記載する。

免疫泳動：Scheidegger の様式による寒天ゲルを使用したミクロ免疫電気泳動を行なった。Hirschfeld[2]のベロナール緩衝液を7倍に稀釈したもの100 mlに寒天1g、さらに添加物としてポリビニールピロリドン750 mgおよびグリセリン5 mlを加えて[3]温めこれを用いてスライドグラス上に厚さ1 mmの寒天ゲル膜を作成し、このゲル上に正常人及び患者血清を並べて泳動し、泳動終了後両泳動帯間に小溝を作りこの中へ抗血清を注ぎ、37°Cの恒温槽にへれ24時間後の沈降線につき観察した。泳動槽には、Hirschfeld[2]による泳動槽用ベロナール緩衝液を2倍に稀釈したものを用いた。泳動条件は、6~8°Cで、6.5 volt/cm、泳動時間は2時間とした。

Double diffusion plate test：Ouchterlony の様式によった。0.05M 燐酸緩衝液で中性にした生理的食塩水で1%の寒天液を作りゲルを調製した。図に示したサイズのもので、24時間後の沈降線を観察した。

反応：免疫泳動および double diffusion test において、沈降線を観察した後セルロプラスミンの検出のために各々に p-フェニレンジアミン[4]および O-ジアニシジン反応[5]を施行した。(以後これら両反応を単にセルロプラスミン反応と記する)

また別にアクリルアミドゲルを用いた不連続電気泳動[6]を行ない、セルロプラスミン反応陽性分画を観察した。

所見と考察

A. 正常血清：免疫泳動法によるセルロプラスミン反応陽性沈降線には、図1の上段にみられるように、major と minor precipitin line と仮称する2種類のものがみられた。泳動距離から、前者はα_2-グロブリン分画に含まれるセルロプラスミンによる沈降線であると考えた。後者は下記のようにして、リポ蛋白によるものと結論した。

図1において、Hとしるされている分画はセルロプラスミン反応陽性で、また、リピッドの反応を示し、泳動距離上リポ蛋白と考えられた。また、minor precipitin line がリピッドの反応を示すこと、および、その位置的関係から、この沈降線はリポ蛋白によるものと結論した。また、アクリルアミドゲルを用いた不連続電気泳動によっても、セルロプラスミン反応陽性分画は2つみられ、1つはα_2グロブリン分画に、他はリポ蛋白分画に相当していた。これらから、minor precipitin line について上記の結論を確かめた。

double diffusion test によっても、同様 major と minor precipitin line と仮称する2種のセルロプラスミン反応陽性沈降線をみた(図2, 1)。この場合、免疫泳動像と比較し、前者がセルロプラスミン沈降線で、後者がリポ蛋白沈降線であると考えた。このことは、minor precipitin line がズダンブラックBにより非常に強く染色されることからも確かめた。

免疫泳動、アクリルアミドゲルを用いた不連続電気泳動および double diffusion test において、2種類のセルロプラスミン反応陽性分画の存在がみられたが、この所見からp-フェニレンジアミンおよびO-ジアニシジン反応はセルロプラスミン(α_2グロブリン分画に含まれる)に特異的なものでないので、セルロプラスミンが heterogenous な蛋白[9-11]か否かは結論出来ない。

以上セルロプラスミン反応陽性沈降線を示標として検討し、6例からの正常血清に関する限り、各例についての沈降線はそれぞれ pattern of identity を示し、セルロプラスミンには個体差をみいだしえなかった(図2の1および2)

B. 患者血清：免疫泳動法では血清セルロプラスミン値が低いため、その沈降線はより微弱であり、一部の例ではみいだしうる程度の発色をえなかった。しかし発色した沈降線を認めた例では、その免疫泳動的位置は正常のものと同一であった(図1下段)。

つぎに、double diffusion test により、5例の患者血清と姉の血清について検討した。2種類のセルロプラスミン反応陽性沈降線がみられたが(図2の3)、いずれのものも、それぞれpattern of identityを示し、セルロプラスミンには免疫化学的に個体差をみないとの所見をえた。

C. 患者、ヘテロおよび正常例の血清の比較：上述のごとく、正常例および患者において、それぞれに個体差をみないことから、正常例および患者の各1例とヘテロのセルロプラスミン反応陽性沈降線の比較を行なった。図2の4および5にみるように、それぞれについての2種の沈降線は pattern of fusion を示した。すなわち、ウィルソン病では、患者においても、ヘテロにおいても、その血清セルロプラスミンは免疫化学的に正常のものと異ならない。患者の血清セルロプラスミン(α_2グロブリン分画に含まれる)が、免疫化学的に正常であることは、前述の免疫泳動像からも考えられる。

結論

免疫化学的方法により、ウィルソン病患者の血清セルロプラスミンを解析し、つぎの結論をえた。

1. 検討したいずれの例においても、p-フェニレンジアミンおよびo-ジアニシジン反応陽性の2種類の沈降線をえた。その1つはα₂グロブリン分画に含まれるセルロプラスミン。他はリポ蛋白のものであった。

2. 血清セルロプラスミンがheterogenousか否かは決定出来なかったが、いずれにしても、ウィルソン病およびそのヘテロの血清セルロプラスミンは正常のものと免疫化学的に異まらない。

文献

1. Hirschman,S,Z., Morell,A. and Scheinberg,I.H. : Ann. N.Y. Acad. Sci., 94, 960, 1961
2. Hilschfeld,J. : Science Tools, 7, 18, 1960
3. 荻田善一：核と細胞質, 5, 7, 1963
4. Houchin,O.B. : Clin. Chim. Acta, 4, 519, 1958
5. Jensen,K. : Acta Neurol. Scand., 39, 237, 1963
6. Ogita,Z. and Nagahama,M. : SABCO JOURNAL, 1, 49, 1964
7. Broman,L. : Nature, 182, 1655, 1958
8. Morell,A.G. and Scheinberg,I.H. : Science, 131, 930, 1960
9. McAlister,R., Martin,M. and Benditt,E.R. : Nature, 181, 027, 1961
10. Paulik,M.D. and Bearn,A.G. : Clin. Chim. Acta, 7, 374, 1962
11. Richterich,R., Temperli,A. und Aebi,H. : Biochim. Biophys. Acta, 56, 240, 1962

図1

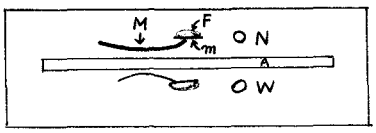
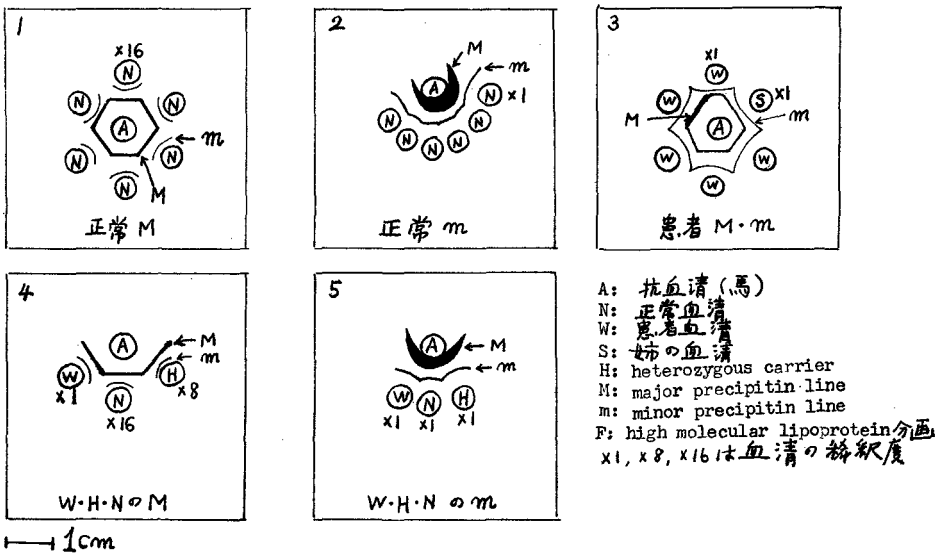


図2



2 Near-Freezing Method による脳部位別アセチルコリン定量法

高橋　良　インディアナ大・精神
東京医歯大・精神

中枢神経系(CNS)各領野のアセチルコリン(Ach)量については今日迄若干の報告があるが、Achの急速な代謝のためにそれらの値の妥当性については少からず疑問がある。Ach定量のための脳標品の取出し方に問題があるからである。それ故CNSにおけるAchのneurotransmitter説はもっぱらcholinesterase (ChE)とcholineacetylaseのCNS内分布に基づいて説かれてきており、この説を支持するAch直接定量の実験も一二の報告(1,2)をのぞき全脳Ach量に関するものであった。又最近Mitchellにより報告された脳Achの重要性を示す実験(6)も脳皮質刺激により髄液中に遊出されたAchの定量に関するものであった。今日in situの脳Achの固定には液体空気凍結が最も確実な方法とされている。痙攣時の脳Achの減少は特別な場合即ち麻酔下かep nausにおいてAch量があらかじめ高い場合(4,5)以外は凍結法によってのみ明瞭に証明される。しかし凍結法の欠点は脳部位別定量を必要とする場合に著しい技術的困難をもたらすことである。凍結法で脳部位別Achを定量した報告にはCrossland and Merrick(2)のものがあるが、彼等自身その技術的困難さを認めており、しかも測定しえたのはラット脳の四大部分にすぎない。

この報告は脳各部分のin situのAch量の測定を可能にする新しい方法を提出するものであるが、原理は動物脳の温度を急速に0°Cに低下させることにより Ach代謝を停止させ、かつ脳部分の解剖が注意深く行えるようにすることである。これは動物を一定量の液体窒素(−196°C)の中に一定時間投下することによってなされ、直後断頭し、0°~1°Cの低温箱内で脳が摘出解剖される。この條件ではfreezingとthawingは起らない。その後Ach量がbioassayによって測定される。以上の原理の妥当性と測定の信頼性についてdataが以下示される。

実　験　方　法

200~250gのWistar系albinoラットが用いられ実験條件は三実験群によってことなり、以下の通りである。

Near-Freezing (NF) method　脳温度を0°Cに低下させるためにラットをどの位長くliquid nitrogen (liquid N_2)に沈めるかを測定するため、bead thermistorを前頭脳皮質上と視床内に埋め、ラットを円柱wire cageに入れ実に4lのliquid N_2中に正確な時間沈め(正確度0.1秒以内)、その後ラットを直ちに0°C低温箱に移した。終始脳温度はbridge circuit, DC amplifierとへてOffner type recorderに記録された。更に他の群ではliquid N_2から出した後断頭し、同様に温度が測定された。最終的な実験條件が確定後はラット脳は低温箱内で所要の9領域に解剖され、liquid N_2内で凍結された。その後Ach定量に用いられた。低温箱はcommercial cryostatと同様、窓と両手を入れる手袋をもち、温度は0~1°Cに保たれた。

脳組織の他の取出し方　NF法との比較のため対照群と痙攣群のラットがNF法

※この研究は演者がInstitute of Psychiatric Research, Indiana Universityに滞在中(1962−1964) Dr. Aprisonと共に行った研究の一部である[8].

の他次の二つの方法で殺された。一つは liquid N_2 による完全凍結法（5分間沈める）と一つは guillotine による断頭法である。これらの場合は全脳（小脳，橋-延髄をのぞく）の Ach 量が測定された。

脳 Ach 抽出法　最少 10 mg 程度の小量脳組織も用いられたので收量のよい acidic alcohol 抽出法（3,7）が用いられた。脳組織は frozen powder として抽出液中に加えられた。

Ach 測定法　上述の理由で感度のよい bioassay として Venus marcenaria の心臓を用いる方法（threshold 10^{-10}~10^{-11} g/ml）がえらばれた。[9,10] UML, neguramine, chymotrypsin による前処置が夫々 serotonin, histamine, substance P による干渉の可能性を除くため用いられた。

実驗結果と考察

液体窒素中投下時間と脳温度　thermistor を埋没したラットが急速に liquid N_2 に沈められ、そのまゝ残された場合、脳表面の温度が 0°C に低下するのに2匹のラットでは 24秒かゝり、第3のラットでは 40秒であった。視床の場合はこの間隔は更に長く 68秒 83秒であった。(Fig 1) これらの data はラットが liquid N_2 中に沈んだ後、脳温度は極く短時間しかもある一定の時間殆んど変化なく、その後急速に 0°C 以下にさがることを示している。

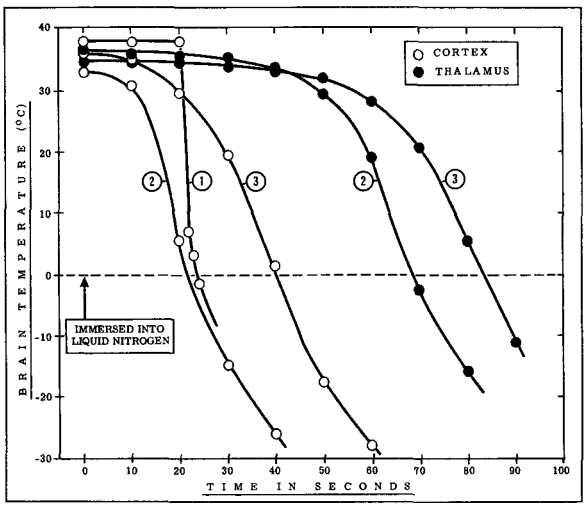


Fig. 1. Time course of temperature change of the cerebral cortices and thalami of rats immersed in liquid nitrogen. Data from 3 different rats are shown; 3 records of the temperature change in the cerebral cortices and 2 in the thalami. Recordings are shown only until the temperature dropped to -25°C in the cortices and -10°C in the thalami.

次にラットをどの位 liquid N_2 中に沈めたら脳表面温度が 0°C に低下し、しかもそれ以下にさがらぬようにできるかを求めて実驗が行われた。まず thermistor を埋没せぬ 28 ラットの観察から至適投下時間が 10~11 秒の近くにあることが認められた。次に Fig 2 に示されたようにこの時間前後で温度測定が行われた場合、9.5秒の投下時間が至適のように思われた。しかし視床の場合（Fig 略）は、14秒から 16秒であった。従って脳皮質を 0°C にさげるのに適切な投下時間では視床の温度は 0°C にさがらず、視床に適切な時間では脳皮質は凍ってしまう。freezing 後の thawing は free Ach の遊離と ChE の作用により Ach の相当の消失をきたすから、この凍結は絶対にさけなければならない。更に Fig 2 から分るように 9.5秒の投下時間では皮質温度が 0°C に低下するまでに 4分間かゝっている。この時間は Ach を in situ に固定するには長すぎるように思われた。この長い時間は三つの可能性によると考えられた。1)脳以外の凍結組織の熱絶縁効果　2)短時間 body が熱源として働く可能性　3)両者の合併。それ故同様の温度実驗が liquid N_2 から取出したのち断頭したラットについて行われた。又以上の効果の他に反対方向に働く factor の介入する可能

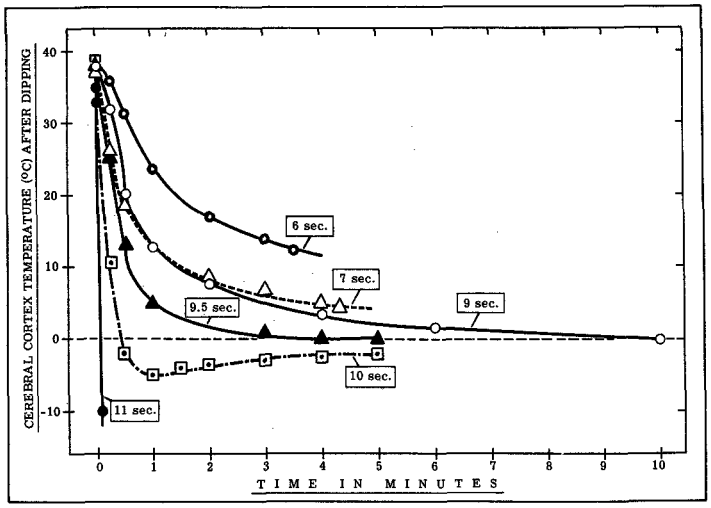


Fig. 2 Time course of temperature change of the cerebral cortex after the rat was removed from liquid nitrogen. The animals were immersed for the duration (in seconds) indicated next to each curve. The zero time temperature reading was made just as the rat was removed from the liquid nitrogen.

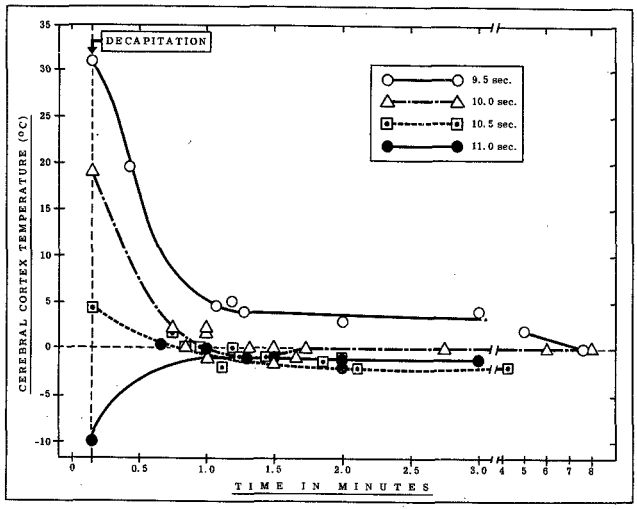


Fig. 3 Time course of temperature of cerebral cortex of rats which were immersed into liquid nitrogen for the periods indicated, then decapitated and heads placed in 0°C cold-chamber. Temperature values prior to decapitation (9 seconds) were obtained from data given in Fig. 2. Decapitation occurred 10 seconds after removal from liquid nitrogen. Data for 9.5 seconds was obtained with 2 rats, for 10 seconds with 3 rats, for 10.5 seconds with 3 rats, and for 11 seconds with 2 rats.

性が考えられた。即ち 4)凍結した屍体の冷却効果(Fig 2の10秒 11秒を見よ)である。従って断頭処置によって上の2)および4)の條件が起る可能性が除かれる。さて9.5秒 10秒 10.5秒投下し 断頭したラットの脳皮質の温度は急速に0°Cにさがり それ以下に深くさがらない(Fig 3)。10秒間投下のdataは皮質温度が1~1.5分以内に0°Cにさがり凍結しないことを示した。ある場合1~2分間0°C以下にわずかに下ったが、その後低温箱の0°Cの温度に戻った。11秒間投下の場合は皮質がわずかに凍結した。それ故 10秒の投下時間が、もし脳の内部の温度も適当な早い時間に0°Cに低下するならば 部位別Ach量の測定に最も適当な條件と思われた。この場合の視床の温度を測定したdata (Fig 3)は13~16分以内に0°Cに達することを示した。他のすべての部位の温度も測定の結果この時間以内に0°Cに低下することが示された。実際に脳が冷温箱内で小部分に解剖される場合は各部分の温度は更に早く0°Cに低下する筈である。一方断頭から脳の解剖終了までに15~16分かかった。それ故以上の條件はラット脳の部位別Ach定量に実際的最適條件であると思われる。

Near-Freezing method の妥当性の証明 痙攣中の動物脳Ach減少は完全凍結法でのみ認められ、断頭による場合認められないという事実が利用された。断頭 完全凍結(CH)

NFの三実験群が夫々正常群、痙攣群に分けられ全脳Ach量が測定された。断頭群では全脳がAch定量に用いられるまで16分間室温におかれた。NF群ではラットをliquid N_2中に10秒間投下後断頭し、冷温箱内で脳が摘出され16分間0°Cにおかれた。以上の実験結果はTable 1に示された。断頭群では痙攣ラットのAch量が2.6%と有意差のない減少を示したにすぎないが、他の二群では痙攣ラットは42.8%(CF) 44.8%(NF)の減少を示した。更にCFとNF法の正常対照群のAch量は18.7 mμmole/gで同一であり、断頭群の15.2 mμmole/gより高かった。

Table 1. The comparison of Brain* ACh Concentration (mμmole/g) of the Rat at Rest and During Convulsions by Three Different Methods of Sacrifice+

Method	at rest	convulsion	ACh decrease(%)
Decapitation	15.2 ± 1.88	14.8 ± 2.80	2.6%
Complete-freezing (CF)	18.7 ± 1.25‡	10.7 ± 2.28	42.8%
Near-freezing (NF)	18.7 ± 1.58‡	10.3 ± 0.92	44.9%

* Whole brain minus the cerebellum, pons and medulla-oblongata
\+ All groups consisted of 6 rats each except the two marked ‡; these had 5 rats each.
ACh results given as mean ± S.D.

NF法の妥当性を証する別二のdataとして次の実験結果が得られた。脳が9部分に分けられたのち、小脳、橋延髄をのぞき再び集められ全脳標品として処理された。3匹のラットのこれらの全脳Ach量は17.8, 20.7, 19.1 mμmole/gでありこれらはTable1のCF, NF法による全脳Ach量とよく一致する。

ラット脳各部位のAch量　Near-Freezing methodにより測定されたラットの各部分のAch量と組織重量はTable 2に示される。これらの値の分布の一部はCrossland and Merrick[2]により報告された完全凍結法による脳4大部分の値の分布とよく対応するが絶対値はより高い。Ach抽出法の差と思われる。小脳、橋延髄をのぞく全脳の平均重量はTable 2から計算され1226 mgであるが、この脳のAch量が同じくTable 2から計算されると17.6 mμmole/gであり、同じnear-freezing methodにより直接全脳に対して与えられた値18.7 mμmole/g (Table 1)とよく近似する。この方法は更に鳥脳のAch分布測定に対して適用され、同じく万足すべき結果が得られた。従ってNear-Freezing methodは今後脳機能とAch代謝の関係の研究に有用であると期待される。

Table 2. ACh Concentration and Tissue Weight of Several Brain Areas of the Rat*

Part	Ach Conc. (mμmole/g)	Tissue Wt. (mg)
Telencephalon**	16.9 ± 1.92 (6)	933 ± 43.1 (8)
Diencephalon	22.3 ± 1.84 (6)	151 ± 10.7 (6)
Mesencephalon	16.7 ± 2.68 (5)	142 ± 13.4 (8)
Pons-Medulla	12.3 ± 2.39 (6)	156 ± 17.0 (6)
Cerebellum	2.3 ± 0.74 (5)	237 ± 12.8 (6)
Caudate Nucleus	37.5 ± 2.69 (6)	40.4 ± 9.4 (6)
Olfactory Bulb	16.4 ± 4.07 (5)	40.3 ± 6.1 (6)
Gray Matter+	7.9 ± 1.87 (5)	-------
White Matter+	3.3 ± 0.80 (4)	-------

* ACh concentration (mean ± S.D.) and tissue weight (mean ± S.D.) was determined in the different group of animals.
\+ Gray and white matter were taken from forebrain.
** Telencephalon includes the caudate nucleus and other basal ganglion.
Number of animals given in parentheses.

文　献

1. Aprison, M.H. and Nathan P., Amer. J. Physiol. 189; 389, (1957)
2. Crossland J. and Merrick A.J., J. Physiol., 125; 56, (1954)
3. Crossland J. Method in Medical Research Vol 9. p. 125 Chicago (1961)
4. Elliott K.A.C., Swank R.C. and Henderson N., Amer. J. Physiol. 162; 469 (1950)
5. Kurokawa M., Machiyama Y. and Kato M., J. Neurochem., 10; 341 (1963)
6. Mitchell J.H., J. Physiol. 165; 98, (1963)
7. Stone W.E. Arch. Biochem. Biophys. 59; 181, (1955)
8. Takahashi R. and Aprison M.H., J. Neurochem. (1966) in press
9. Welsh J.H. and Taub R., Biol. Bull., 95; 346, (1948)
10. Welsh J.H. and Twarog B., Method in Medical Research, Vol. 8, p. 187, Chicago (1950)

3 神経終末の新分離法

黒川正則（東大・医・脳研）
坂本哲彦・加藤誠・
秋元波留夫（東大・医・精神）

Hebb & Whittaker (1958)[3] および Whittaker (1959)[15] は密度勾配遠心を用いて脳の粗ミトコンドリアを分画し，ミトコンドリアとは明らかに異なり，かつ結合アセチルコリン（ACh）の大部分をふくむ分画を分離した。その後電顕的検討によって，この分画が主として神経終末から成ることが明らかにされた（Gray & Whittaker, 1962）。[2] 類似の観察は他の研究者によっても報告されている（de Robertis et al., 1962）。[1] これらの方法はいずれも高張蔗糖液の不連続密度勾配を用いており，等張蔗糖液に浮遊した粗ミトコンドリアを密度勾配の上端に重層して 50,000 g, 120分遠心すると神経終末は 0.8M–1.2M (Whittaker, 1959), または 1.0M–1.2M (de Robertis et al., 1962) の界面に分布するものである。

これらの分離法はそれなりに確立されたものと見做してよいであろうが，一方次に述べるような欠点をもっている。

1) 粒子層が蔗糖液の界面をはさんで上下に比較的広い中で分布するため毎回の実験で厳密に同質の分画を採取する点で困難を感ずる。

2) 粗ミトコンドリア採取後，最終的に神経終末を沈渣として分離するまでに千時間前後が必要である。このため神経終末の調製当日に各種の定量を平行して行なうことは時間的に制約を免かれがたい。特に ACh については，定量を翌日にもちこすと比較的大きな測定誤差を覚悟しなければならない。

3) 低張蔗糖液中で粒子内 ACh の約 50% が比較的容易に遊出されることはよく知られている。[10][15] しかし低張側のみではなく高張側でも，ことに 0.5M 以上の場合には浸透圧変化による ACh の非特異的遊出が観察される。したがって神経終末の生化学的性質をしらべる際，高張蔗糖液中でえられる神経終末は必ずしも最良の材料とはいいがたい。

我々は前に粗ミトコンドリアを用いて，粒子内 ACh の遊出と反応液のイオン構成との関係を検討したが，[11] 神経終末についてこの種の実験を行なう際，神経終末を比較的短時間内に，かつ非特異的な ACh 遊出がなるべく起らない条件下で分離することが必要であると考えた。以下その一方法を述べる。また分離神経終末の性質を調べる試みの一つとして，神経終末における Na^+ 依存性 ATPase の存在を検討した。

実験方法 モルモットの後頸部を強打，放血後脳を摘出，側脳室をひらいて皮質下白質を切片状に除去，のこりの灰白質部分をテフロン軸・ガラス管ホモジェナイザーを用いて 0.32M 蔗糖液内で 10% のホモジェネートとした。テフロン軸は先端が球型のもの（Dounce 型に類似のもの）を用いた。1,000 g（以下すべて gav. を意味する），10分遠心後の上清を 14,500 g で 15分間遠心し，沈渣を定量（2.5～3 ml./g. 原組織）の等張蔗糖液に均一に浮遊したものを粗ミトコンドリア（Mt）とした。これはホモジェネート ACh の 60～62% をふくんでいる。ACh の定量は蛙腹直筋によった。コリン・アシラーゼ（ChA）の測定条件は既報[9] のごとくであるが，各分画における アシル・CoA 合成系の活性差が律速条件となるのを防ぐために，鳩肝アセトン粉末の抽出液に aging を行ない（Kaplan & Lipmann, 1948），[7] その過剰量を反応液に加えた。Na系では K系にくらべて ACh の生成量が約 30% 低いため，反応液組成

は K 塩に統一し，肝アセトン粉末の抽出にも 20mM $KHCO_3$ を用いた。しかし筋肉における K^+ の干渉を除くため，反応後稀釈によって K^+ 濃度を 1.88 mM におとした。顆粒分画における不活性 ChA はエーテル振盪によって活性化した。[4] 乳酸脱水素酵素(LDH)はピルビン酸による NADH の酸化により測定($-\Delta E_{340}$/分, 24°C)，緩衝液は Johnson (1960)[5] に従ってトリエタノラミン・塩酸(pH 7.4, 終濃度 50mM)を使用した。コハク酸脱水素酵素(SDH)はチトクローム c の還元により測定(ΔE_{550}/分, 24°C; Kuff & Schneider, 1954)。[8] ただし未処理の組織では活性が一定しがたいため，組織液を 0.1%(終濃度) Triton-X-100 で 0~4°C, 60~90 分間処理したのち定量した。この処理によって活性は約 2 倍に増加し，かつ安定化する。ATPase 活性は標準反応液 $MgCl_2$ 6mM, KCl 5mM, NaCl 100mM, Tris-HCl (pH 7.4) 30mM 中における Tris-ATP (3mM) からの P_i 遊出量(38°C, 15分)をもって表した。タンパクは Lowry 等の方法(1951)[12] によって定量，牛血清アルブミンを規準にとった。

<u>神経終末の分離</u>　重層には 0.32M 蔗糖液に溶解した Ficoll (M.W. 400)(Pharmacia, Uppsala; 日本住化学工業)を用い，遠心は日立 40P 冷凍遠心機を使用した。すなわち第 1 図(左)のごとく RPS 40 水平ローター用遠心チューブの下部から 12% F 2.0 ml, 3% F 2.0 ml を重層し，常温に 30分，0~4°C に 60分静置して界面および濃度が十分平衡に達したのち，1.0 ml の粗ミトコンドリア液を上端に重ね，3 本のチューブを 16,000 RPM (20,893 g) で 15分間遠心すると，第 1 図(右)のように 3 層が分離する。0.32M 蔗糖液層を A, 3% F 層を B, 12% F 層を C とした。尖端をまげた Pasteur ピペットで各層を分割採取後，F 濃度を蔗糖液で 1/2 におとし，40,000 RPM (105,400 g; RP 40) で 20分遠心して A, B, C の沈渣を得た。C の沈渣は固く decantation が可能であるが，A および B の沈渣は比較的崩れやすいため，上清の除去は Pasteur ピペットを用いる必要がある。重層遠心後の肉眼的所見は次のごとくである。蔗糖液相はほとんど透明で A 帯は純白，3% F 液相は軽度に白濁し B 帯は多少灰白味を帯び最下面はいくぶん黄色い。12% F 液相は透明，C 帯は褐色である。0.8M~1.2M 蔗糖液の重層にくらべて肉眼的に目立つ点は各層の粒子帯が界面に接して密に限局し，界面をはさんで上下に広く分布しないことである。このため蔗糖液の場合よりも鮮明に各層を採取することが出来る。A, B, C 各分画における ACh, ChA, LDH, SDH, タンパクの分布を第 1 表に示し，比較のため蔗糖重層法による値を併記した。両者は比較的近似しているが我々の Ficoll 重層法では A→B→C に向って，Whittaker の蔗糖重層法では C→B→A に向って cross-contamination が多い傾向がある。LDH は Johnson & Whittaker[6] によって神経終末内細胞液の marker と見做されたものである。我々の実験では粗ミトコンドリア液の約 5% の LDH が A 層の遠心上清に見出される。B 層，C 層の遠心上清では LDH 活性は証明されないから，A 上清における LDH はおそらく粗ミトコンドリア分画における細胞液の混入によるものであろう。Ficoll 重層法の考案中我々の

FIGURE 1. DENSITY GRADIENT CENTRIFUGATION USING FICOLL MEDIA

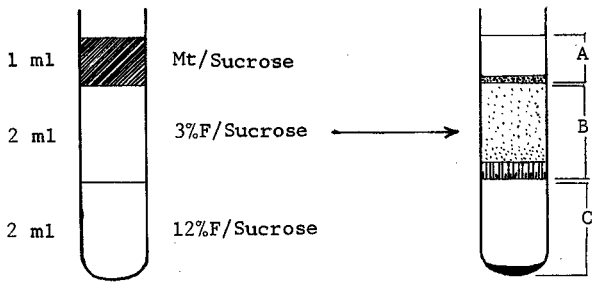


TABLE I. THE DISTRIBUTION OF ACh, ChA, LDH, SDH, AND PROTEIN IN SUBFRACTIONS FROM THE PRIMARY MITOCHONDRIAL FRACTION

	Mt (units/g)	A (% distribution)	B (% distribution)	C (% distribution)	Recovery (% of Mt)
ACh	7.52 ± 0.17 (4)	7.5%	74.2%	18.3%	78%
RSA	1.00	0.32	1.61	0.62	
ChA	700 (1)	6.5%	80.0%	13.5%	95%
RSA	1.00	0.27	1.74	0.45	
LDH	20.3 ± 0.04 (4)	13.4%	60.5%	26.1%	90%
RSA	1.00	0.56	1.31	0.88	
SDH	6.70 ± 0.05 (4)	0 %	24.1%	75.9%	93%
RSA	1.00	0	0.52	2.54	
Protein	40.4 ± 0.10 (4)	23.8%	46.4%	29.8%	89%

Units: ACh μmmoles; ChA ummoles ACh formed/30min; SDH E550/min; LDH E340/min; protein mg.

RSA; % of recovered activity/% of recovered protein

ACh*	18 %	74 %	8 %	69%
LDH	14 %	68 %	18 %	90%
SDH	4 %	35 %	61 %	85%
ACh**	33 %	67 %	0 %	96%
SDH	13 %	16 %	71%	58%
Total N	53 %	30 %	17 %	76%

* Johnson and Whittaker (1963); ** Whittaker (1959)

気付いたのは次の諸点である。

1) A, B, Cの各層の分離に敏感に影響するのはFicollの濃度であって0.5%～1.0%の濃度変化によってかなりの分布変化が認められる。Ficollは吸湿性であるため秤量時，溶液の保存中注意を要する。

2) 粗ミトコンドリアの洗滌，または老化は分離に変化を与え一般的にはA→B→Cに向う混入の増加を招く。

3) 重層チューブの冷却には十分注意しなければならない。冷却が不十分な場合にはB帯の下面が滑らかさを失い，かつ12%F液相に怒張の浮遊物が残ることがある。

以上の点に注意すればFicoll法はきわめて良好な再現性を示すものである。蔗糖重層法にくらべて明らかなる利点な所要遠心時間が約1/6に短縮されること，Ficollによる粒子内AChの非特異的な遊出がほとんど認められないことである(第2表)。Ficoll法によるA, B, C各層の電顕所見な現在検討中である。

水平ローター(RPS 40)の1回遠心ではモルモット1匹分の皮自質(約1.5g.)を処理するのが適量であるが，大量の組織を分画するためには2層法を用いてアングル・ローター(RP 30)を使用することも可能である。すなわちまずCとA+Bを分ケ，ついでAとBを分ケるものであるが，この際は3%Fの代りに4%Fを用いる方が分離が良好である。これは2)に述べた理由の他，A+BをCから分離採取する際，多ケのFicollを吸引混入するためもあるようである。

TABLE 2. NON-SPECIFIC RELEASE OF PARTICULATE ACh DUE TO OSMOLARITY

	ACh remained in pellets after treatment (μmmoles/g cortex)
0.32M Sucrose	7.15 (3)
0.80M Sucrose	5.61 (3)
1.00M Sucrose	5.50 (3)
12% F/Sucrose	7.31 (3)
4% F/Sucrose	7.10 (3)
0.16M NaCl	7.31 (2)

Sucrose series: Mt pellets were dispersed in each sucrose medium, kept standstill at 0-4°C for 60 min, and centrifuged at 105 400g for 20 min, with the addition of NaCl to the final concentration of 50 mM.

Ficoll series: Standstill at 0-4°C for 30 min, and then similarly centrifuged.

神経終末における Na^+ 依存性ATPaseの存在　末梢神経材料を用いた Skou (1957)[14] の指摘以後 Mg^{2+} の存在下で $K^+ + Na^+$ によって活性化される ATPases の存在が各種の組織で検討され，この酵素系が ouabain によって阻害される理由によって，Na^+ 輸送との関係が主張さ

れ transport ATPase の名称が与えられている。中枢神経系では大半の活性がミクロソーム分画に回収され細胞膜における存在が推定されているが、一部の活性は粗ミトコンドリア分画にも見出される[13](第3表)。神経終末はある意味では細胞体の分身と見做しうるものであるから、我々は神経終末分画にこの ATPase 活性が存在する可能性を推定しこれを検討しつつある。第4表に示すごとく粗ミトコンドリアにおける ATPase 活性の約半分は神経終末分画に存在し、RSA は粗ミトコンドリアよりも高い。またこの活性は 100μM ouabain, 6mM Ca^{2+} によってほぼ完全に阻害される点で、従来ミクロソーム分画で証明されている transport ATPase と共通の性質を備えている。このし一方 A分画にもかなりの ATPase 活性が認められるため、ミクロソームの混入による可能性も除外しえない。この点はさらに検討中である。なおミトコンドリアの ATPase については Na^+ による活性の増加は認められない。

TABLE 3. Na-K-STIMULATED ATPase ACTIVITIES OF PRIMARY SUBFRACTIONS FROM GUINEA-PIG CEREBRAL CORTEX

	H	N	Mt	Ms	S
Protein mg/g	97.6	9.9	36.0	17.1	32.7
ATPase Na(-)					
unit/g cortex	183	15	68	82	21
Unit/mg protein	1.88	1.52	1.89	4.80	0.64
R S A	1.00	0.78	0.97	2.48	0.33
ATPase Na(+)					
unit/g cortex	336	20	111	128	19
unit/mg protein	3.45	2.02	3.09	7.50	0.58
R S A	1.00	0.69	1.06	2.59	0.20

Unit: μmoles Pi liberated/15 min (37.5°C)

H Homogenates (0.32M sucrose)
N 1 000g-10 min (wash once)
Mt 10 000g-15 min (wash twice)
Ms 30 000g-40 min
S Supernatant

TABLE 4. DISTRIBUTION OF ATPases IN SUBFRACTIONS FROM THE PRIMARY MITOCHONDRIAL FRACTION

	Mt	A	B	C
ATPase Na(-)				
unit/g cortex	57	12	32	22
unit/mg protein	1.57	2.45	2.46	1.66
% distribution	———	18.1%	48.5%	33.4%
R S A	1.00	1.16	1.16	0.78
ATPase Na(+)				
unit/g cortex	112	25	68	28
unit/mg protein	2.97	5.11	5.22	2.11
% distribution	———	20.6%	56.1%	23.3%
R S A	1.00	1.33	1.35	0.59

Unit: The same as in Table 3.

文 献

1) De Robertis E., de Iraldi P., de Lores Arnaiz R.G. and Salganicoff L. (1962) J. Neurochem. 9, 23
2) Gray E.G. and Whittaker V.P. (1962) J. Anat. 96, 79
3) Hebb C.O. and Whittaker V.P. (1958) J. Physiol. 142, 187
4) Hebb C.O. and Smallman B.N. (1956) J. Physiol. 134, 385
5) Johnson M.K. (1960) Biochem. J. 77, 610
6) Johnson M.K. and Whittaker V.P. (1963) Biochem. J. 88, 44
7) Kaplan N.O. and Lipmann F. (1948) J. biol. Chem. 174, 37
8) Kuff E.L. and Schneider W.C. (1954) J. biol. Chem. 206, 677
9) Kurokawa M., Kato M. and Machiyama Y. (1961) Biochim. Biophys. Acta 50, 385
10) Kurokawa M., Machiyama Y. and Kato M. (1963) J. Neurochem. 10, 341
11) 黒川正則, 加藤誠, 町山幸輝, 坂本哲彦, 秋元淑留夫 (1964) 神経進歩, 8(3) 587
12) Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. (1951) J. biol. Chem. 193, 265
13) Schwartz A., Bachelard H.S. and McIlwain H. (1962) Biochem. J. 84, 626
14) Skou J.C. (1957) Biochim. Biophys. Acta 23, 394
15) Whittaker V.P. (1959) Biochem. J. 72, 694

4 脳白質の研究 ── 細胞分画における知見 ──

加藤尚彦・平山　皓・
秋元波留夫（東大・医・精神）
黒川正則（東大・医・脳研）

脳の白質は，従来脂質の抽出材料として重要な役割を果して来たが，代謝的特徴に関しては灰白質に比較して関心が乏しい。これは白質が一般的に灰白質よりも低い代謝活性を示すこと，小動物では実験に充分な量を採取し難いことに関係あるだろう。一方では，白質切片は，特殊な実験条件下で，構造的特徴を反映するとみられる代謝的特徴を示し[7]，また種々の病的状態の際に，灰白質とは異なる被損傷性が認められること，さらに白質自体，細胞体成分としてはほとんどグリア性要素に限られていること等から，灰白質に対する単なる量的比較としてではなく，より独自な立場から検討する必要があると思われる。この報告では，まず白質成分の基本分画を確立し，同時にグリア性と推定されている二三の酵素の細胞内分布を調べることも目標にした。

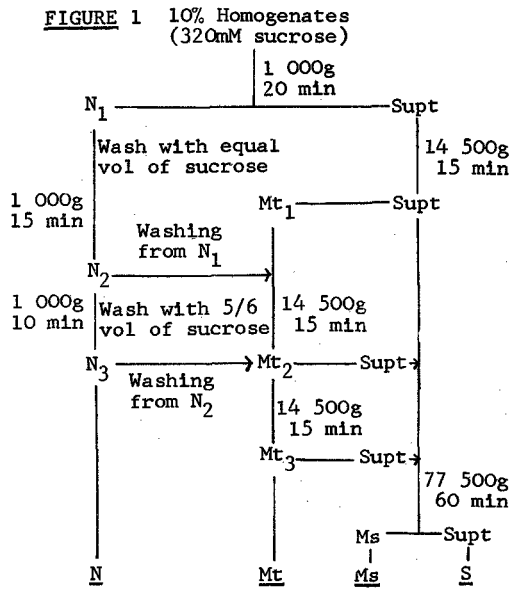
〈実験方法〉　成犬の上腕静脈へ，ヘパリン加の d-tubocurarine（6 mg）を注射して動物を無動化した後，頸動脈を切断して放血を行い，放血後約5分間で脳を摘出した。心臓動は放血後もしばらく持続する。完全灌流により血液を除去するには長時間を必要とするので，血液は脳半球の前額面切断片を，繰り返し洗滌することによって除いた。洗滌後の切片から，眼科用メス類を用いて冷却下に白質の centrum ovale のみを採取した。所要時間は 20～30 分，採取量は 4～6 g である。テフロンホモジナイザー（Dounce 型類似）を用い，0.32 M 蔗糖液内で磨砕し，約10％ホモジェネートとし，これから分画操作を行った。分画には久保田冷凍遠心機および日立 40P 冷凍遠心機を用い，ネーの方法を用いた。

DNA および RNA は，Schmidt-Thanhauser の変法[5]により分離し，DNA は Indole 反応[1]（490 mμ），RNA は Orcinole 反応[2]（675 mμ）により定量した。標準曲線として，DNA（サケ精子より抽出）2.5～15 μg/ml，RNA（酵母より抽出した Sigma 製品をさらに精製）2～15 μg/ml を用いた。

タンパクは牛血清アルブミンを標準とし，Lowry 法[8]により定量したが，白質では，アルカリ不溶性の物質が，発色後軽度の混濁として残存するため，遠心により除去した。

総窒素は micro-Kjeldahal 法により定量，コハク酸脱水素酵素（SDH）は[6]チトクローム C の還元（ΔE 550/分，24°C）によって表わした。活性を安定化する目的で Triton X-100（最終濃度 0.1％）を用いて，0°～4°C で 60～90 分処理，かつ対照セ

FIGURE 1　10% Homogenates (320mM sucrose)



ルにおける混濁の繁殖化を防ぐため、微量の K_2SO_4 を加え、試料セル近似のイオン強度をあたえた。この条件下では、ある程度の混濁が残っても測定を妨げなかった。

AchE, ChE の定量は、Ellman ら[4]（1961年）に従ったが、活性が低いためと、混濁除去のため次の如き変法を考案した。すなわち、Na_2HPO_4-KH_2PO_4 緩衝液 67mM, pH 8.0, Dithio-bisnitrobenzoic Acid（DTNB）330 mM を測定する分画一定量と、37.5°C で10分間予備振盪後、アセチル・チオコリン（AthCh）0.5 mM, またはブチリル・チオコリン（ButhCh）1 mM を加えてさらに10分間振盪し、過剰量のエゼリン（10^{-4}M）により反応を停止させ、10,000 g × 7分の冷却遠心後、上清を412 mμ で比色した。発色は沈澱に吸着されなかった。この発色は少くとも10分間は吸光度 0.800 以内で時間に対し直線関係にあり、一方DTNBの組織による非特異的破壊は、基質を含まぬ対照により除去することが出来た。後述の如くAchE, ChEの分別が必要であるが、DFPによる阻害は油性懸濁液によるかぎり一定を期しがたく、また測定時に混濁を残すため、さらに検討中である。なおAthCh, ButhCh は、それぞれAChE, ChEにたいする基質として、ACh, BuCh とほとんど同様に利用されることが知られている。

ATPase の測定は 6 mM $MgCl_2$, 5 mM KCl, 30 mM Tris-HCl（pH 7.4）の基準組成を用い、Na^+ による活性化をみるために 100 mM NaCl を用いた。37.5°C, 6分間の予備振盪後 Tris-ATP 3 mM を加え、37.5°C, 15分間に生成する P_i の量を測定して、ATPase の活性を表現した。

発酸脱水酵素は、比較的生理的条件下で、微量定量を行う目的で Cutolo[3] によって示唆されたNADHの酸化による方法を検討中であるが、なお未完成である。

〈実験結果〉　基本分画における所見を第一表にまとめた。

N分画にはDNAは、96.5%, SDHは18.8%分布している。最初1,000 g, 20分のやや過剰な遠心力によって混入したミトコンドリアは、洗滌時の遠心時間の短縮によって除去され此、Mt分画に回収される。最初に1,000 g, 10分で遠心する場合はN分画におけるDNAの回収率が劣り、かつSDHの混入はやや増加する。

Mt分画には、SD

Table 1

The subcellular distribution of DNA, RNA, succinate dehydrogenase, protein and total nitrogen in primary fractions from the dog cerebral white matter

	H	N	Mt	Ms	S	Recovery
	(Units/g)		(% distribution)			(% of H)
DNA	493 ± 49	96.5%	3.1%	0.4%	0%	109%
RNA	842 ± 59	22.4%	17.7%	26.9%	33.0%	96%
SDH	3.11 ± 0.25	18.8%	75.0%	6.2%	0%	67%
RSA	1.00	0.76	2.52	0.42	0	
Protein	65.6 ± 3.6	24.8%	29.7%	14.6%	30.9%	97%
Total N	13.3 ± 0.1	27.3%	34.6%	15.1%	23.0%	115%

Units: DNA & RNA μg; protein & total N mg; SDH ΔE550/min
RSA: % of recovered activity/% of recovered protein.
Number of experiments 5.

Hが75%分布し，RSAも高いことから，Mt分画におけるミトコンドリアの回収は良好と見做してよい。しかしミクロゾームについては，適当なmarkerがないため，Mt分画に対するミクロゾームの混入の程度は，十分に判断できない。現在この点を検討中であるが，暫定的に14,500 g，15分間の遠心力を用いている。白質においては，アルカリ不溶性物質が多いため，タンパク発色時に安定性を欠くが，同時に定量した窒素の分布とおおむね平行している。たんぱく窒素量から計算したタンパク量は測定値よりも高く，これは白質のごとく脂質に富む組織におけるタンパク定量法の限界を示すものと思われる。Mt分画では，窒素量の分布がタンパク量の分布よりもやや多いがこれはMt分画に多量のミエリンが存在することに関係があるものと推定される。RNAの分布はMt分画で低く，これは他の研究者による灰白質の所見と一致している。

コリンエステラーゼの分布

オニ表に示した如く，%分布およびRSAから判断して，コリンエステラーゼのほとんどの活性がMs，Sの両分画に分布していることは明らかである。しかしMs分画とS分画の間では，total ChE（AChEおよびBuChE）の分布にちがいが認められる。

Table 2

The subcellular distribution of cholinesterase activity

	H (Unit/g)	N	Mt	Ms	S	Recovery (% of H)
			(% distribution)			
Total ChE	11.1	5.6%	16.5%	40.5%	37.4%	114%
RSA	1.00	0.23	0.56	2.78	1.24	
BuChE	4.7	10.4%	12.9%	21.3%	55.4%	125%
RSA	1.00	0.42	0.44	1.46	1.80	

Unit: ΔE_{412}/min; RSA, expressed on protein basis.

BuChEはS分画に半分以上分布し，Ms分画ではS分画の半分に満たないが，RSAはよく似ている。これはBuChEが遊離可溶成分とするよりも，有形成分である軽いミクロゾームにあると考えた方が説明し易い。total ChEは，Ms，Sの両分画に40%前後集っているがRSAからするとMs分画に非常に高く，S分画でも混入としては説明しがたい。BuChEによるAthChの分解を考慮し，BuChE%／total ChE%をとってみると，S分画では1.48で，Ms分画では0.53であることから，Ms分画にはAChEが多くS分画にはBuChEが多いと考えられるであろう。，centrum ovaleにおけるMs分画には，軸索とグリアからのミクロゾームの重い部分，S分画には遠心力の不充分なため軽いミクロゾームの部分と遊離可溶成分が集ると思われるので，本報告でのS分画は，BuChEに富む軽いミクロゾームが集っている可能性が考えられる。Aldridge & Johonson（1959）による ラット全脳では，145,000 g，60分と本報告よりやや大きな遠心力で，BuChEはMs相当分画に24%，S相当分画に27%，AChEはMs相当分画に38%，S相当分画に9%の分布を示し，本報告の値および上記の推定に対して根拠をあえている。また組織化学的証明（Koelle）によって，神経細胞の軸索にAChEが，グリアの細胞体にBuChEが認められている。現在DFPによる両コリンエステラーゼの分別と，高遠心力による細かい分布をさらに検討中である。

ATPaseの分布　末梢神経や脳灰白質で報告されているようなNa依存性ATPaseが，脳白質においても証明される。（オニ表）　たがしその活性は，たとえばモルモ

ットの灰白質にくらべて，1/4～1/6にすぎない。細胞内分布は従来の報告に一致して，タンパクmg当りの活性，RSAはMs分画に多い。しかし湿組織g当りの活性は，Mt分画にも少なからず証明される。Mt分画における活性は，Ms分画の混入としてのみは説明しがたい。Na^+による活性化は，Mt分画では3.45倍，Ms分画では1.77倍である。

このことは，Mt分画においてNa^+依存性ATPaseが，Ms分画とは異なる構造に存在する可能性を示しているが，その解明は今後の問題である。

Table 3

The subcellular distribution of Na-K-stimulated ATPase activity

	H	N	Mt	Ms	S
ATPase activity without Na					
unit/g tissue	38.3	10.6	12.8	27.1	7.6
unit/mg protein	0.58	0.67	0.68	2.92	0.38
% of rec ATPase		18.3%	22.0%	46.6%	13.2%
RSA on protein basis	1.00	0.74	0.74	3.20	0.43
ATPase activity with Na					
unit/g tissue	90.9	15.8	44.1	48.0	8.4
unit/mg protein	1.38	1.00	2.34	5.20	0.42
% of rec ATPase		13.6%	37.8%	41.3%	7.3%
RSA on protein basis	1.00	0.35	1.27	2.83	0.24

Unit: μmoles Pi liberated/15 min (37.5°C)

文　献

1) Ceriotti G. (1952) J. biol. Chem. 198, 297
2) Ceriotti G. (1955) J. biol. Chem. 214, 59
3) Cutolo E. (1957) Giorn. biochim. 6, 270
4) Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V. & Featherstone R.M. (1961) Biochem. Pharmacol. 7, 88
5) Hutchison W.C. & Munro H.N. (1961) Analyst 86, 768
6) Kuff E.L. & Schneider W.C. (1954) J. biol. Chem. 206, 677
7) Kurokawa M. (1960) J. Neurochem. 5, 283
8) Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. & Randall R.J. (1951) J. biol. Chem. 193, 265

5 脳ATPaseに対するメトアンフエタミンの影響

加藤伸勝・二階堂　享・
江副　勉（都立松沢病院）

脳および神経のATPaseについては，とくにその酵素の脳内分布および細胞内分布，さらにはsubcellular fractionにおけるその酵素の性質について，多くの研究者によつて研究されている．脳内分布，細胞内分布はBonting[1]，Palladin[2]が，subcellular fractionの分布およびその特性については，Skou[3]，Deul[4]が精細に調べている。

そして，一般的にいって，本酵素が充分な活性を示すためには，Mgが必要とされ，Mgの存在下では，Na. Kイオンの添加によつて活性がさらに高められ　またCa，高濃度のKイオンによつて，その活性が抑制されることなどが明らかにされている。一方，この酵素は分劃された各fractionでは，イオン環境の変化，pH，さらにはとり出されてからの時間的経過によつて，その活性の示し方が異なることなども指摘され，單一の酵素と考えにくい成績もえられている。また，この酵素がNa，Kによつて影響をうけやすい点から，この酵素が膜を通過するNa，Kの能動輸送に連関をもつ働きを演ずるという推測すらもたれている。

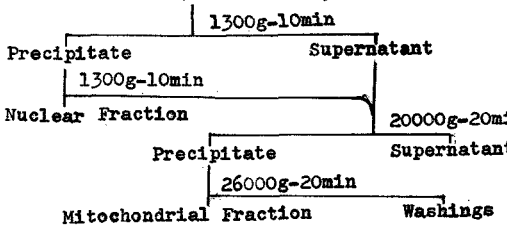
われわれは，こうした酵素自体の性質の究明の一助に，この酵素が薬物に対して，どのように反応するかということに関心を寄せ　また，薬物に対する反応の違いの有無から，subcellular fractionの本酵素の性質の異同を追求することを試みた。

また，とくにわれわれが過去に発表してきたメトアンフエタミンによる脳の解糖減退の機序の解明に資するために，ATPaseが解糖過程ではたす役割を考慮にいれ，今回はメトアンフエタミンの脳ATPase活性におよぼす影響につき検討を加えることにした。

実験材料および方法

実験動物には，主として雄のモルモットを用いた。断頭后直ちに脳を摘出して，大脳皮質のみをとり，秤量后0.32M蔗糖液でテフロン・ホモジェナイザーでホモジェネートをつくる。subcellularのfractionationはPalladinの方法により Fig. 1のように行なつた。

Fig. 1. Separation of Subcellular Units of Guinea Pig Brain Cortex



実験は三つの条件下で行つた。すなわち，①メトアンフエタミンの試験管内附加実験（終末濃度を1.6×10^{-3}，1.6×10^{-4}，1.6×10^{-5} Mとした。），②急性実験（20mg/Kgのメトアンフェタミンを皮下注射し，40分后に断頭，実験に供す。），③慢性実験（6mg/kgのメトアンフェタミンを20日以上注射，注射終了后48時間で実験した。）の三つとした。

ATPaseの測定法：

ATPaseの活性の測定のための反応液は，總液量を2.5mlとし，酵素液は0.5ml中，蛋白量がホモジェネートでは4mg，ミトコンドリアでは3mg，上清では2mg位になるように調整して加えた。ATPは0°Cでdisodium塩をH型のIR 120のカラムを通し，これを1M tris液でpH 7.4にしてtrisATPとして用い，反応液にはFig. 2 (B)の結果から，終末濃度5mMになるように加えた。activatorとしてのMgは終末濃度で5

mM, Mg, Na, K はそれぞれ 5mM, 150mM, 20mM になるように加えた。反応液のpHを7.4にするため pH 7.4 の tris buffer を終末濃度 125mM になるように入れ，附加実験の場合に限りメトアンフェタミンを前述の濃度になるよう加えた。

反応温度は37°C，基質は温度平衡に達したのち反応液に加え，反応時間は15分とした。われわれの行った予備実験では，Fig 2 (A)に示すように30分までは，酵素活性は直線的に進行する。

反応は倍量の20% TCA 加で打切り，遠心后上清につき，Allen 法によつて無機燐を測定した。なお，蛋白量の測定は，エーテル・アルコールで脱脂后，Biuret法で比色定量した。

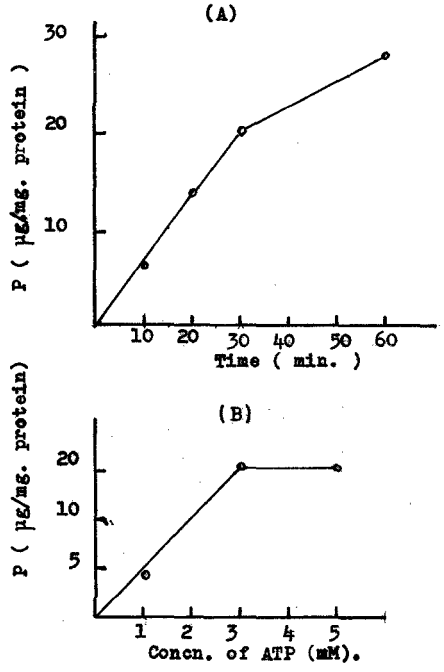
実験成績および考察

われわれの成績では，ホモジェネートの activator なし，Mg activation の値は，それぞれ Tab. 1 のように，10μg P，53μg P/mg protein/15min で，Palladin[2] の rabbit 腦の値に近似している。メトアンフェタミンの ATPase 活性への影響については，

① 附加実験成績は Fig. 3 の通りである。ホモジェネート，ミトコンドリア 上清の三者について行つたが，ミトコンドリア，上清についての成績は，結果を検討中なのでここでは触れない。ホモジェネートの成績では，いづれの濃度の附加も，activatorなし，Mg activation の場合は，明らかに活性の促進が見られている。そのうち Mg activation の系では，促進の割合が最も多い。しかし，Mg, Na, K activation の系では，統計的な有意差は認められない。

② 急性実験および慢性実験の成績は Tab. 1 に示す通りである。

Fig. 2. Effect of (A) time of incubation, and (B) substrate concentration on liberation of inorganic phosphate from ATP at 37°. Guinea pig brain homogenate. In (A) ATP concentration is 5 mM.



急性実験のホモジェネートの成績では，いづれも対照に比し，活性促進が見られている。この場合は activator なし，および Mg activation では，附加実験に類似の傾向が見られるが，Mg, Na, K系では促進の割合は少ない。概して急性実験では，ホモジェネートに関する限りは，メトアンフェタミンは試験管内附加実験と類似の作用を示している。

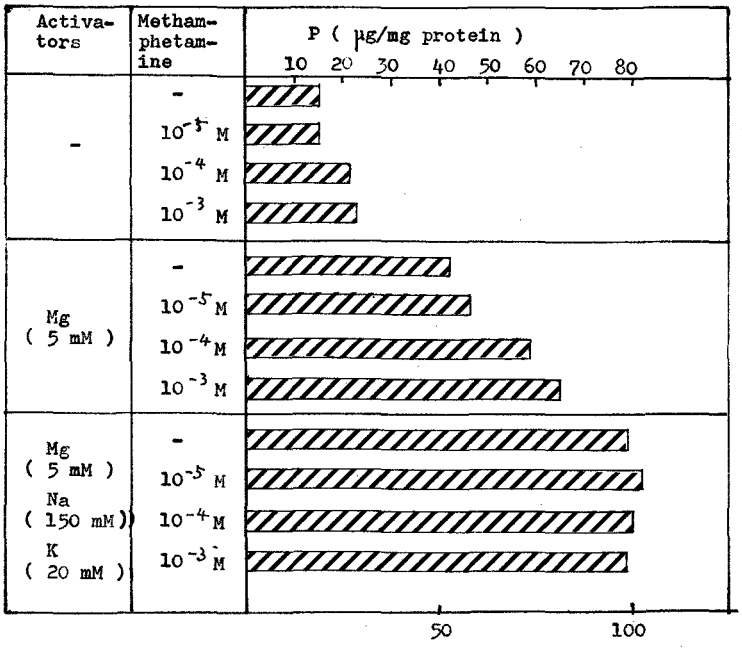
然るに慢性実験となると急性実験とは異なり，有意差の見られるのは，activator なしの場合だけで，他は対照との差が現われなくなる。

ミトコンドリアの成績では，急性実験例は大体において，ホモジェネートの成績に類似した活性増加の傾向が認められるが，慢性実験例になると，activator なしでは明らかに活性抑制が見られ，他の系では有意差が認められない。

上清を見ると，急性実験例はすべての系で促進の傾向が認められているが，慢性実験になると，寧ろ抑制の傾向が現われる。

これらの成績を通覧すると，まず第一に附加実験から推測されるようにメトアンフェタミンは，直

Fig. 3. Effect of Methamphetamine on Adenosine Triphosphatase of Brain Homogenate.



接作用としては，脳ATPase活性を促進させる薬物であることに気付かれる．しかも，その作用はactivatorが充分に加えられない系で現われる．またfull activityを発揮していると思われるMg, Na, K系では，それ以上活性を増加させることはないようである．われわれの用いたMg 5mM, Na 150mM, K 20mMの濃度は，大体においてSkou[5]がfull activityをうる条件と一致するものなので，この系に関する限り，これ以上のactivityは期待できないであろう．

さて，このようにメトアンフェタミンは直接作用としては，脳ATPaseの活性を促進させるが，これを生体内に注射した場合は，直接作用そのままの形で効果が現われるとは限らない．われわれの急性実験の成績は，大体附加実験のそれに類似はしているが，ただ，急性実験例では附加実験で殆ど影響が見られなか

Table 1. Adenosine Triphosphatase Activity in Cellular Fractions of the Brain Tissue in the Absence of Activators and under the Activation by Magnesium, and Magnesium, Sodium and Potassium.
(In μg P per mg of protein in 15 min at 37°C)

	Homogenate			Mitochondria			Supernatant		
	-	Mg	Mg Na K	-	Mg	Mg Na K	-	Mg	Mg Na K
Control	8	45	108	33	56	104	10	54	113
	10	66	105	22	59	98	9	42	82
	10	48	105	22	70	131	4	44	80
	10	53	106	26	62	111	8	47	92
Chronic Expts.	19	43	101	-	48	92	10	38	67
	12	50	121	18	71	116	6	38	65
	17	50	90	10	50	121	7	40	65
	16	48	104	14	56	110	8	39	66
Acute Expts.	17	64	109	23	74	128	11	57	103
	23	93	126	22	73	127	11	71	113
	20	79	118	23	74	128	11	64	108

Mg 5 mM
Na 150 mM
K 20 mM

ついたMg,Na,K activationで，各fractionにやや促進の傾向が見られる点である。しかし，これも有意差がどうかさらに例数をふやして検討する必要があろう。

問題は慢性実験例である。ホモジェネートのactivatorなしでは，促進が見られているのに，Mg，Mg,Na,K activationの系ではそれが見られないこと，ミトコンドリア，上清では，三つの系が無影響，またはやや抑制するかに見られることなどが注目される。

ホモジェネートの場合，急性実験では，メトアンフェタミンの直接効果により一様に促進が見られているのに，慢性実験ではそうならない理由としては，第一には，メトアンフェタミンの直接効果がすでになくなっていること，第二には，脳ATPaseの活性そのものが，慢性のメトアンフェタミンの刺戟によって，持續的に高められた結果，Mg，Mg,Na,K activationに応じにくくなっていることなどが考えられる。

ミトコンドリアの成績は解釈が難かしいが，一つには，Deul[4]によって指摘されているようにミトコンドリアのATPaseはマイクロソームのATPaseとは至適pHが異なるので，われわれの条件ではfull activityがえられないため，見掛けの活性低下が起っているのかも知れない。この点はpHをかえて再検する必要もあろう。

上清で活性抑制が起っている点も問題であるが，マイクロソームを含むfractionのATPaseは，ミトコンドリアATPaseとは必ずしも同じ性質のものではなく，このATPaseは，メトアンフェタミンにsensitiveで，持續的な刺戟に耐性がなく，その結果，Mg，Mg,Na,K activationに応ずる能力が失はれてしまう可能性が考えられる。結局，上清中のATPaseのこれらのイオンに対する反応性がメトアンフェタミンによって失はれる結果が，ホモジェネートのATPase系のイオンに対する不応性に投影される，と考えることができよう。

要するに慢性のメトアンフェタミン投与によって，脳ATPaseはその薬物の直接作用とは別の二次的影響をうけることが確認された。

總括

モルモット脳ATPaseにつき，ホモジェネート，ミトコンドリア，上清について，その性質をactivatorなし，Mg，Mg,Na,K activationの系に関し検討を加え，さらにそれらのメトアンフェタミンに対する反応性を検討した。その結果

1) メトアンフェタミンの脳ATPaseに対する影響は，直接作用としてはATPaseの活性を促進させる傾向が認められた。
2) メトアンフェタミンの急性投与実験では，試験管内附加実験に類似のATPase活性促進の成績がえられた。
3) メトアンフェタミンの慢性投与実験では，直接作用とは別の作用があることが確認された。

主要文献

1) Bontin, S. L., Simon, K. A. & Hawkins, N. A., Archiv. Biochem. Biophys. 95 (1961) 416.
2) Palladin, A. V., Regional Neurochemistry (1961) ed. Kety, S. S. & Elkes, J. Perhamon Press, Oxford.
3) Skou, J. C., Biochim. Biophys. Acta, 23 (1957) 394.
4) Deul, D. H. & McIlwain, H. J. Neurochem. 8 (1961) 246.
5) Skou, J. C., Biochim. Biophys. Acta, 58 (1962) 314.

6 脳のイノシタイドとそれへの ^{32}P 組入れについて

林　浩平・八木原嘉幸・中村　勇・
山　添　三　郎　（群大・医・生化）

昨年度の總会において演者らは，モルモット脳切片を無ナトリウム溶液（choline-Ringer）中でincubateした後Naイオンと^{32}Pを加え，さらにincubateすると，リン脂質への^{32}P組入れは増加するが，その増加はイノシタイド分画で最も著しく，かつイノシタイド分画のNaイオン添加による^{32}P組入れ増加がウアベインによって抑制されることから，脳リン脂質の中ではイノシタイドが，恐らくはイオンの能動輸送と関連して注目されるべきものであろうと報告した。

その後上記のC-M（クロロホルム-メタノール）で抽出されるイノシタイドは主としてMPI（monophoaphoinositide）で少量のDPI（diphosphoinositide）も含まれていることを確かめた。しかしBallouらがイノシタイドの中でそのリン酸部分の代謝回転が最も高いのはTPI（triphosphoinositide）のモノエステルリン酸であることを報告してからこのpolyphosphoinositideが注目されるようになった。今回は切片および生体内で，これら各種イノシタイドへの^{32}P組入れを比較観察した結果について報告する。

実験方法

切片のincubation：前回の報告と同様に行った。すなわちモルモット3匹分の脳表層より得られた切片をブドウ糖を含むcholine-Ringer 5 ml中で37°C，15分incubateした後，mediumの2 mlをNaCl-Ringerにおきかえ，^{32}Pを加えてさらに20分incubateした後メタノールを加えて反応を停止させ，沪紙上で切片を洗滌後脂質を抽出した。

生体内実験：モルモット頭蓋骨縫合部に小さな孔をあけ，前頭部硬膜下に^{32}Pを注入し，一定時間後脳を取り出し頭頂部および後頭部の大脳部分（白質を含む）より脂質を抽出する。

抽出と分画：脂質の抽出および水洗はFolchの方法に従った。水洗後N_2気流下で40°C以下で充分に乾燥させ，クロロホルムに溶かし，硝子フィルターで沪過した溶液を硅酸カラムで分画した。各分画成分の同定は主として硅酸沪紙ペーパークロマトグラフィーによった。蛋白結合イノシタイドの抽出はDawsonのtriphosphoinositideの抽出法に従った。すなわちC-M抽出残渣をHCl C-Mで2回抽出し抽出液を水洗した。fluffの收率が100%でないことを考慮して，水洗した下層（脂質のクロロホルム溶液）をそのまま乾燥させてからアルカリ水解を行った。

アルカリ水解と脱アシル産物のカラムクロマト：アルカリ水解および水解物のDowex-1-formate型カラムによる分画はHawthorneらの方法に従った。carrierとしてFolchのDPIの水解物を加えてから吸着を行った。

実験結果

硅酸カラムで得られたイノシタイド分画の同定：切片内において^{32}Pでラベルされたリン脂質は，硅酸カラムによって図1のように分画される。I_1およびI_2分画はともにイノシトールを含んでおりイノシタイドであると考えられる。I_1およびI_2分画を

アルカリ水解後，Folch のDPI水解物を添加して Dowex-1-formate 型カラムに吸着させ分画した結果は図2および図3に示されている。このレジンカラムの結果 I_1 および I_2 の ^{32}P 活性はそれぞれMPIおよびDPIに相当していることがわかる。したがって前回報告したNaイオン添加で ^{32}P 活性が著しく増加し，ウアベイン添加でその増加が抑制されたイノシタイドは主に MPI であることが確かめられた。

蛋白結合イノシタイドへの ^{32}P 組入れに及ぼすNaイオン添加およびウアベインの影響：表1には，脳切片を choline-Ringer だけで incubate した場合，choline-Ringer にNaイオン添加，およびNaイオンとウアベインを添加して incubate した場合に C-M 抽出イノシタイド（硅酸カラムで分画されたもの）と蛋白結合イノシタイド（図4に示されたレジンカラムの各分画）へ組入れられた ^{32}P を C-M 抽出リン脂質のリン酸 1000 μg 相当の切片当りに換算して示してある。表1の結果から，(1) 表1の A/B 比にみられるように蛋白結合イノシタイドの ^{32}P 活性は C-M 抽出イノシタイドの ^{32}P 活性に比して著しく少ない，(2) Naイオン添加による ^{32}P 活性の増加およびウアベイン添加による抑制は，蛋白結合イノシタイドでも C-M 抽出イノシタイドとほとんど同じ程度にみられる，(3) 蛋白結合イノシタイドの ^{32}P 活性は TPI よりも DPI に多く存在し，MPI にはほとんど認められない。

生体内における脳の C-M 抽出イノシタイドおよび蛋白結合イノシタイドへの ^{32}P 組入れ：前頭部硬膜下に ^{32}P を注入してから 120 分後に脳をとり出し，後頭部の大脳部分 1 g より抽出された C-M 抽出脂質の硅酸カラムクロマトおよび蛋白結合イノシタイドの脱アシル産物のレジンカラムクロマトの結果はそれぞれ図5および図6に示さ

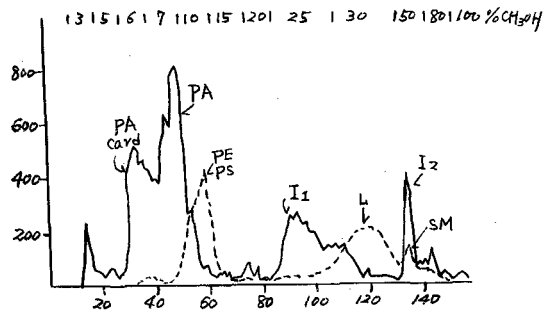


図1 切片で ^{32}P をラベルした脳リン脂質の硅酸カラムクロマトグラフ.

実線 ^{32}P 活性，点線 Lipid-P.
PA, phosphatidic acid; Card, cardiolipin;
PE, PS, phosphatidyl ethanolamine (serine);
I, inositide; L, lecithin; SM, sphingomyelin.

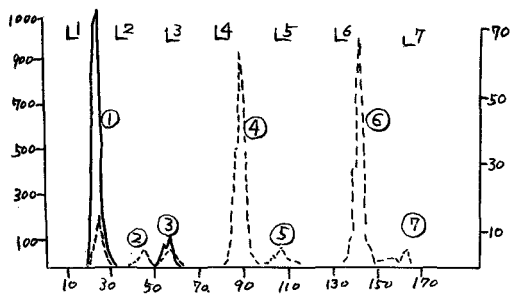


図2 イノシタイド分画（図1 No.84-110）のアルカリ水解物のレジンカラムクロマトグラフ

Dowex-1 formate form 1 × 15 cm.
1, 5mM sod borate-60mM ammoniam formate
2, 〃 -120 〃 〃
3, 〃 -180 〃 〃
4, 0.2M formate - 0.1M formic acid
5, 0.3M 〃 - 〃 〃
6, 0.5M 〃 - 〃 〃
7, 1N HCl

① GPI, ② GPS, ③ inorg.P, PA,
④ GPIP, ⑤ IDP, ⑥ GPIDP
⑦ ITP

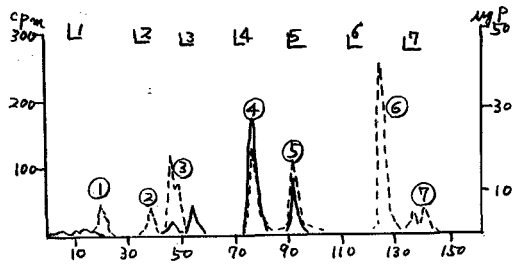


図3 イノシタイド分画(図1 No.131-137)のアルカリ水解物のカラムクロマトグラフ

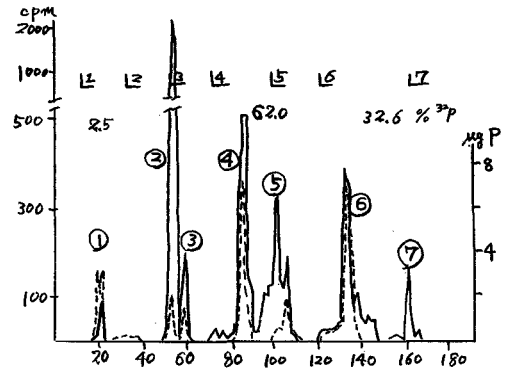


図4 切片内蛋白結合イノシタイド脱アシル物のカラム

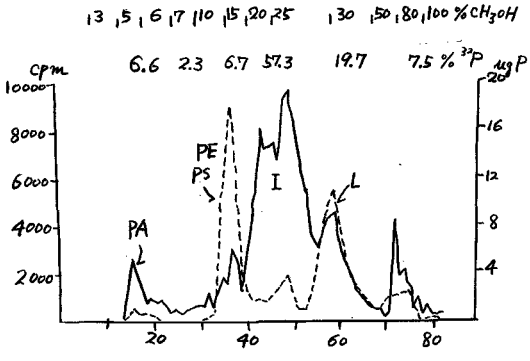


図5 生体内で32Pをラベルされたリン脂質硅酸カラム

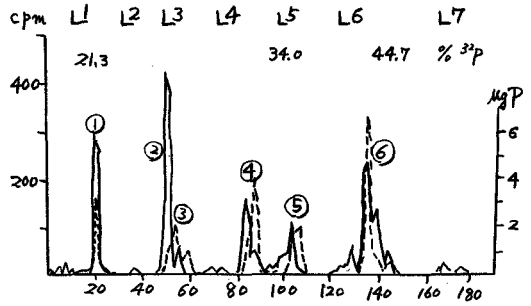


図6 生体内で32Pをラベルされた蛋白結合イノシタイドのカラム

れている。この両方のカラムクロマトのパターンから計算された，それぞれのイノシタイドに組入れられた ^{32}P-カウントは表2にまとめられている。この結果から，(1) 生体内においても蛋白結合イノシタイドに組入れられる ^{32}P はC-M抽出イノシタイドに比して著しく少ない。(2) 切片における場合と異なって，蛋白結合イノシタイドの ^{32}P 活性はTPIで最も高く，MPIにも ^{32}P 組入れが認められる。(3) 切片と生体の場合とではC-M抽出脂質（硅酸カラムの脂質）への ^{32}P 組入れの様相が非常に異なっている。すなわち生体内では切片の場合に比してPA（phosphatidic acid）の ^{32}P 活性が非常に低い。specific activityでみると生体内ではPAとMPIのそれがほぼ等しく，切片の場合はPAの方が大きい。

また，^{32}P 注入後15分という短時間の結果は全体として ^{32}P 組入れが少ないだけでとくに蛋白結合イノシタイドへの ^{32}P 組入れが多いという結果は得られなかった。

考察および結論

1）C-M抽出脂質にはMPI以外にDPIも含まれ，蛋白結合イノシタイドにはTPIおよびMPIが含まれている。

2）^{32}P 組入れはC-M抽出MPIで最も多く，蛋白結合イノシタイドには全体として少ない。著者らの行ったスケールの実験では量の少ないそれぞれのイノシタイドのspecific activityを正確に出すことはできなかったが，Ballouらが報告した量を基準にするとspecific activityもMPIが最も大きいことになる。それぞれのイノシタイドの正確なspecific activityを比較するための大量実験を目下行っている。

3) C-M 抽出 MPI の specific activity が最も高く，かつそれは PA の specific activity にほぼ等しいことを示す以上の結果は PA ⇌ MPI の反応が脳の何らかの作能と関連して重要な意義をもつ可能性を暗示している．

表1. 脳切片での各種イノシタイドへの ^{32}P 組入れ

C-M 抽出脂質の1000μgP に相当する切片量当りの cpm.

	C-M extractable inositides (主に MPI)	Protein bound inositides			A/B
		DPI	TPI	B DPI+TPI	
a) Choline (15分) → Choline (20分)	104,358	6,510	3,550	10,060	10.4
b) Choline → Nacl	360,934	40,610	21,370	61,980	5.8
c) Choline → Nacl, Ouabain	173,065	30,610	19,950	50,560	3.4

表2. 生体内における脳の各種イノシタイドへの ^{32}P 組入れ

1g. の新鮮脳当りの cpm.

^{32}P 注入後 分	C-M extractable inositide (主に MPI)	Protein bound inositides			
		MPI	DPI	TPI	MPI+DPI+TPI
120	219,440	718	1,144	1,504	3,366
105	195,868	443	1,192	1,751	3,386

7 脳切片におけるアミノ酸の能動輸送

── 特にGABA取り込みの局所的特徴について ──

中村陸郎・永山素男・
秋元波留夫（東大・医・精神）

Stern ら[7]の報告以来脳切片によるアミノ酸の能動輸送に関聯して幾つかの研究が報告されているが，その結果脳の切片が腸管や腹水腫瘍細胞等と共通した性質 ── エネルギー供給に依存して濃度勾配にさからって蓄積が起ること，競合阻害が見られること，無機イオンの濃度による影響等 ── を有することが明らかとなった。更に腹水腫瘍細胞で最初に報告された交換輸送 (Exchange diffusion) と同じ現象が脳切片に於てヒスチジンとメチオニンの間に起ることも観察されて居る[5]。

ところで従来脳の切片による実験は主として大脳皮質の切片のみを用いて行われて来た。脳切片によるアミノ酸輸送の研究もこの例外ではない。しかし脳組織が形態上並びに機能上局所的に多様性を有することを考える時に大脳皮質という脳内の特定の部位の切片だけについてアミノ酸の取り込みを見たのでは極めて不充分である。そこで我々は脳切片によるアミノ酸取り込みの局所的検討を試みた。偶々研究の途上 in situ でγ-アミノ酪酸（以下GABAと略す）の濃度が高い視床四丘体部の切片が著しくGABAを取り込む性質を有することを見出したので今回は特にGABAの取り込みの局所的検討を中心に報告する。

〈実験方法〉

動物は成熟モルモットを用い，切片採取の部位としては大脳皮質，視床四丘体部，皮質下白質（subcortical white matter）の三つを選んだ。大脳皮質切片は原則として大脳両半球の第三層切片を使用した。視床四丘体部は小脳をつけたまゝ脳を取り出した後腹側面を上に向けた位置で両側の視床の外側部と終脳との間を出来得る限り終脳側で切り離して視床を分離，次に視床四丘体部を上方に向け視床の外側縁及び頭側縁に附着する終脳の一部を出来るだけ取り除き，且つ下丘の尾側で小脳及び橋を切離して両側の視床及び四丘体を含む材料を得た。こうして得られた材料から視床 → 四丘体の方向に通常三層の切片を採取し実験に使用した。（従ってこの部位の切片にはEpithalamusの一部が含まれて居る。）白質の切片は黒川[2]の記載に従い両側の皮質下白質から作製した。切片の作製はすべて厚さ0.4ミリのglass guideを用いfree handにて行った。

Incubation mediumは3.0 mlのKrebs-Ringer phosphate bufferを用い，その組成は126 mM-NaCl, 5.0 mM-KCl, 1.3 mM-KH_2PO_4, 1.3 mM-$MgSO_4$, 2.7 mM-$CaCl_2$ 及び9.9 mM-Sodium phosphate buffer (pH 7.4) からなり，通常基質として10 mM-Glucoseを添加してある。Incubationには Warburg の vesselを用い切片は通常一つのvesselに対して大脳皮質及び視床四丘体部の場合は大体120～150 mg，白質の場合は60～90 mg程度を使用気相は100% O_2 で置換し，37°Cでincubationを行った。Incubation前の切片の濡重量は針金のrider上で，incubation後のそれは沪紙製の皿の上でいずれもtorsion balanceを用いて測定した。

GABA，グルタミン酸，アスパラギン酸，β-アラニンの分離定量には脳切片を75%エタノールで2回抽出を行い遠心上清に水飽和クロロホルムを加えて水層を分離，その一定量をCellulose powder (Macherey, Nagel & Co.) を用いた薄層クロマトグラフィーによ

り展開し 之に塚田ら[10]のニンヒドリンによる二段発色法を応用して定量を行った。

展開の溶媒としては，グルタミン酸（以下 Glu と略す），アスパラギン酸（以下 Asp と略す）の場合はフェノール：水（4：1）を，GABA 及び β－アラニン（以下 β-Ala と略す）の場合は Lovell & Elliott[3] に従いn－ブタノール：酢酸：水（12：3：5 v/v）を使用した。75 % エタノールの濃度はその都度 large scale にて % を補正し，切片内のアミノ酸量の算定には切片中の水分量を 80 % として計算を行った。

チロジン（以下 Tyr と略す）は Udenfriend & Cooper [12] の方法で，ヒスチジン（以下 His と略す）は Macpherson [4] に従い定量した。

〈実験結果〉

(1) 脳の三つの部位の切片による種々のアミノ酸の取り込みの比較

大脳皮質，視床四丘体部，白質の切片による GABA，L-Glu，L-Asp，β-Ala，DL-Tyr，L-His の取り込みの結果を表1及び表2に示す。表1では60分間 incubation 後の取り込みの量を final wet weight 1 g 当りの μmole 数で示し，表2ではその際の Distribution ratio を示す。先ず第一に視床四丘体部の切片が大脳皮質のそれに比較して GABA を著しく高度に取り込む性質を有することが分る。大脳皮質の切片による GABA の取り込みの量はほぼ同様の条件下で行われた塚田ら[11]の値（16.7 μmole/g）に近似した値である。これに対し視床四丘体部の切片は大脳皮質のそれの約2倍の取り込み量を示した。なお大脳皮質及び視床四丘体部の in vivo に於ける GABA 量（μmole/g-fresh weight）を測定して各々 2.4（2例の平均値），3.6（3例の平均値）という値を得た。従って in vivo の GABA 量と GABA の取り込みの量との間にはある程度の相関関係が認められる。

〔表1〕
モルモット脳の三つの部位の切片によるアミノ酸の取り込み量（μmole/g）

（ ）内は例数。

medium 中に加えたアミノ酸		大脳皮質	視床四丘体部	白質
GABA	(5 mM)	16.5 ± 2.2 (7)	31.2 ± 4.0 (9)	8.7 ± 1.5 (7)
L-Glutamic acid	(")	28.5 ± 1.6 (3)	23.4 ± 2.6 (4)	23.6 ± 1.1 (3)
L-Aspartic acid	(")	21.4 (2)	18.6 (2)	12.7 (2)
β-Alanine	(")	19.0 (2)	29.3 (2)	14.6 (2)
DL-Tyrosine	(2 mM)	4.5 (2)	4.5 (2)	2.2 (2)
L-Histidine	(")	10.9 (2)	8.8 (2)	5.4 (2)

〔表2〕
アミノ酸取り込みの際の Distribution ratio (Slice/medium比)

（ ）内は例数。

medium 中に加えたアミノ酸		大脳皮質	視床四丘体部	白質
GABA	(5 mM)	5.7 ± 1.0 (7)	13.2 ± 1.9 (9)	1.8 ± 0.3 (5)
L-Glutamic acid	(")	10.4 ± 1.4 (3)	6.7 ± 1.3 (4)	5.5 ± 1.0 (3)
L-Aspartic acid	(")	6.4 (2)	5.3 (2)	3.3 (2)
DL-Tyrosine	(2 mM)	3.1 (2)	2.5 (2)	1.1 (2)
L-Histidine	(")	8.2 (2)	6.6 (2)	3.2 (2)

方白質の切片では僅かな取り込みしか見られない。β-Ala も又 GABA と同様視床四丘体部の切片で最も高い取り込みを示した。GABA 及びβ-Ala 以外の4つのアミノ酸はすべて大脳皮質の切片が視床四丘体部及び白質よりも高い取り込みを示し、以下大体視床四丘体、白質の順で之に続く。L-Glu, L-Asp, L-His は白質の切片によってもかなり顕著な蓄積が認められた。

(2) 大脳皮質及び視床四丘体部の切片による GABA の取り込みの検討

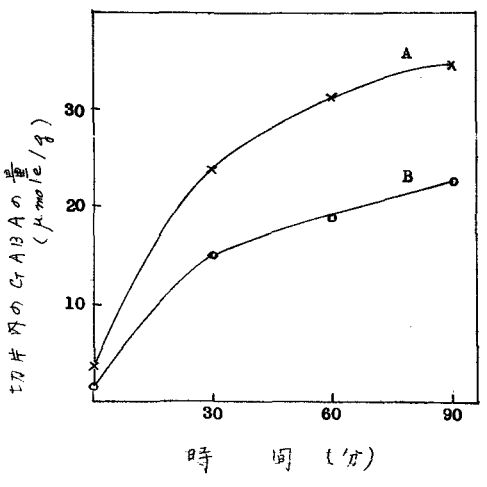
視床四丘体部内で部位別に取り込みに差があるかどうかを検討してみたが、表3に示す様に視床と四丘体では特に上層に関しては著しい差は認められなかった。

次に大脳皮質と視床四丘体部の切片による GABA 取り込みの時間的経過及び medium 中の GABA 濃度と取り込みの量との関係を検討した結果を第1図及び第2図に示す。この両者からも視床四丘体部の切片が大脳皮質の切片に比較して顕著に GABA を取り込むことが分る。たゞ medium の濃度が1～2 mM の様に低くなると両者の取り込みの量は接近するが、之は incubation 中に medium 内の GABA 量が視床四丘体の方で大脳皮質の方よりも著明に減少することが原因の一つと考えられる。

〔表3〕 GABA 取り込みの視床四丘体内に於ける部位的検討 (切片は 70～90 mg 程度を用いた)

	取り込み (μmole/g.)	Slice/Medium 比
視床上層(1～3層)	35.5 (2)	11.3 (2)
下層(4～6層)	28.4 (1)	8.9 (1)
四丘体上層(1～3層)	38.0 (2)	13.5 (2)
下層(4～6層)	37.0 (1)	11.0 (1)

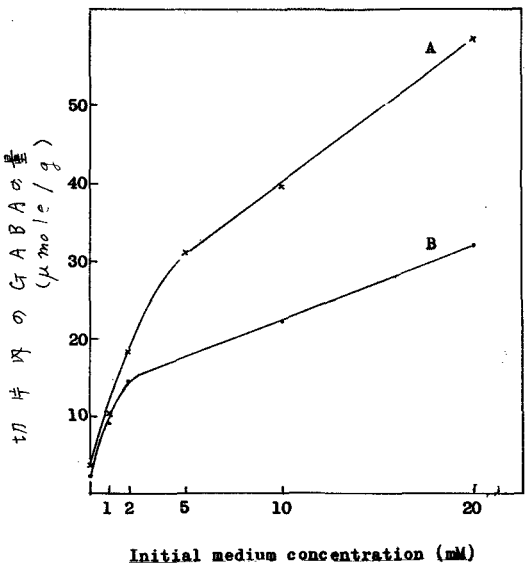
〔第1図〕 GABA 取り込みの時間的経過



A：視床四丘体部, B：大脳皮質

Initial medium concentration : 5 mM

〔第2図〕 Medium 中の GABA の濃度と GABA の取り込み量との関係



A：視床四丘体部, B：大脳皮質

〈考察〉

GABA の取り込みが我々の調べた三つの部位の切片で顕著な差異を示す背景としてはその部位の組織学的構造が密接に関連していることは当然予想されることである。現在迄に得られた結果からは確定的なことが云える段階ではないが、ある程度の臆測は可能であろう。白質の切片による GABA の取り込みが低いということから、GABA 取り込みの主役をなしているものが glia cell や axon ではなくて神経細胞（細胞体及び dendrite を含めて）である可能性が先ず考えられる。そこで若し GABA が神経細胞にのみ能動的に取り込まれ且つ視床四丘体部と大脳皮質とで切片全体に占める神経細胞の比率が等しいと仮定すると，i）視床四丘体部の神経細胞の一部に GABA に対する取り込みの著しく高い細胞が存在するか，ii）視床四丘体部の神経細胞が平均して GABA に対して高い蓄積の能力を有するが等の可能性が考えられるであろう。

Roberts ら[7][8]は GABA の in situ に於ける濃度が主として合成酵素であるグルタミン酸脱炭酸酵素のレベルによって調節されると考えたが，他等の説に合致しない所見も報告されて居り[9]，一元的に代謝酵素のレベルだけで説明することにはかなり無理があるように思われる。我々の行った実験の結果は in situ に於ける GABA の濃度と切片による取り込みとの間に相関関係が存在する可能性を示唆して居り、局所の物質の濃度を調節する要因として膜を介しての輸送という問題を無視出来ないことを示していると云えよう。

最後に局所別の切片による GABA 及び β-Ala の取り込みが他の4つのアミノ酸のそれと著しく異なることが認められたが、このことは脳で少くとも GABA と β-Ala は他の4つのアミノ酸とは異った輸送系を介して運ばれて居ることを示唆して居る。

〈文　献〉

1) Hirsch,H.E., and Robins,E.; J.Neurochem.,9,63 (1962)

2) Kurokawa, M. ; J.Neurochem.,5,283 (1960)

3) Lovell, R.A.S.J., and Elliott, K.A.C. ; J.Neurochem.,10,479 (1963)

4) Macpherson, H.T.; Biochem.J.,40,470 (1946)

5) Nakamura,R. ; J.Biochem.,53,314(1963)

6) 栗村ら，神経研究の進歩，4，606（昭和35年）

7) Roberts, E., and Eidelberg, E., "International Review of Neurobiology",Vol.2,279,Academic Press, (1960)

8) Sisken, B.,Roberts,E., and Baxter,C.F.,"Inhibition of the Nervous System and -Aminobutyric acid Pergamon Press. Oxford, p.219-225 (1960)

9) Stern,J.R.,Eggleston,L.V.,Hems,R., and Krebs,H.A.; Biochem.J.,44,410 (1949)

10) 塚田裕三，永田豊；生化学，32，51（1961）

11) Tsukada,Y.,Nagata,Y. and Hirano,S.;J.Neurochem.,10,241(1963)

12) Udenfriend,S., and Cooper,J.R.; J.Biol.Chem.,196,227 (1952)

8 白鼠剔出頸部交感神経節のアミノ酸代謝の研究

永田　豊・横井幸雄・
塚田裕三（東邦大・医・二生理）

鼠の交感神経節は神経細胞，神経線維及びそれらを結ぶシナップスを含む単純な系で，生体より剔出後も良好な環境に保てば 24時間以上に亘って電気刺激によるシナップス伝達の活動電位を記録出来，又比較的高い物質代謝を示す。そこで神経系の機能と代謝とを同一標本で測定し，両者の関連性を追求する目的には好適な材料である。既に Larrabee ら①② により交感神経節の炭水化物，燐脂質等の代謝が機能と関連して調べられて来たが，我々はここでアミノ酸の代謝及びその能動輸送について検討した。

実験方法

体重 200 g 前後の白鼠をウレタンで麻酔し頸部交感神経を剔出し，神経節の周囲の結合織被膜を注意深く除去する。1ヶの神経節の湿重量は 1 mg前後である。標本は，生理的溶液（NaCl: 136 mM, KCl: 5.6 mM, $CaCl_2$: 2.22 mM, $MgCl_2$: 1.2 mM, $NaHCO_3$: 16.2 mM 及びブドウ糖 5.5 mM）中 37°で 95 % O_2, 5 % CO_2 ガスを通じながら incubate する。溶液は使用前に濾過して細菌発育による代謝測定の誤差を除いた。Incubation のあとで節前及び節後線維を切断し神経節のみを微小 homogenizer にて磨細し② 75 % ethanol で除蛋白，熱風乾燥後 0.1 ml の水に溶かして一定量を東洋沪紙 No. 51 につけ，4:1-phenol: 水又は 4:1:5-n-butanol: 醋酸: 水で 10時間展開後乾燥，0.15 % ninhydrin-純 ethanol 溶液に浸して 75°, 30分加温し沪紙上にアミノ酸を発色せしめる③。発色スポットは切り抜き 0.8 ml-60 % ethanol で抽出，ミクロキューベットで（容量: 0.5 ml）570 mμ でアミノ酸を比色定量した。神経節内の各種アミノ酸は大量試料につきアミノ酸自動分析装置で同定を行った。Uniformly labelled C^{14} ブドウ糖又は γ-アミノ酪酸-$C^{14}OOH$（各 10 μc/ml）中で incubate した神経節から上記の方法で抽出した遊離アミノ酸は paperchromatography で展開，分離後 X 線フィルムに接触させて 7週間感光後ラベルされたスポットにつき検索した。

実験成績及び考察

1）遊離アミノ酸の分布

温血動物の脳内にはグルタミン酸（Glu）アスパラギン酸（Asp）グルタミン（Glu-NH_2）γ-アミノ酪酸（GABA）等が遊離形として比較的高濃度に存在するが特に GABA 及び N-アセチルアスパラギン酸（NAA）は脳にのみ存在する特異なアミノ酸として注目されてゐる。ネズミの神経組織の間でアミノ酸含量を比較してみると第1表の如く末梢神経組織では中枢に比して Glu や Asp の量が

Table 1　FREE AMINO ACID CONTENTS OF VARIOUS NERVOUS TISSUES IN RAT (μ-moles/g-w.w., Mean ± S.D.)

	Aspartic acid	Glutamic acid	γ-Aminobutyric acid	N-Acetylaspartic acid
Cervical sympathetic ganglion	3.93 ± 0.38 (9)	3.66 ± 0.66 (9)	< 0.1	< 0.1
Vagus nerve fibre	1.97 ± 0.21 (7)	1.66 ± 0.14 (7)	< 0.1	< 0.1
Sciatic nerve fibre	0.68 ± 0.06 (8)	0.72 ± 0.09 (8)	< 0.1	< 0.1
Spinal cord (Cauda equina)	0.82 ± 0.22 (3)	1.16 ± 0.14 (3)	< 0.1	< 0.1
Spinal cord	2.22 ± 0.12 (6)	2.75 ± 0.22 (6)	1.62 ± 0.19 (6)	4.88 (2)
Brain cortex	3.67 ± 0.49 (6)	8.63 ± 0.16 (6)	3.87 ± 0.16 (6)	5.45 (2)
Cerebellum	1.20	4.13	1.28	.....
Midbrain	1.91	3.89	1.86	4.29

Free amino acids were determined by quantitative paperchromatography of aqueous ethanol extracts.

少くとGABAとNAAは認められない。交感神経節ではそれらの中間を示しGluがAspに比して少くGABAおよびNAAは存在せずこの点は末梢神経的であるとみえよう。Floreyら④は交感神経節にGABAは何等影響を与えないこと，および神経節のextractを甲殻類のstretch receptorに作用させてもinhibitionを与へないことをみて居り，同様的にこの組織にはGABAが存在しないことを既に報告してゐる。

2) C^{14}ブドウ糖よりアミノ酸へのIncorporation.

神経節をC^{14}ブドウ糖（10 μc/ml）を含むRinger中で好気的に4時間incubateして遊離アミノ酸と抽出，Dowex-50を通してブドウ糖，乳酸を除去後二次元paper chromatographyで分離Radio-autogramをとると第1図にみられる如く脳と同様各アミノ酸への活潑なincorporationがみられるがGABAに相当するスポットは認められなかった。又GABA-C^{14}OOH溶液中でincubate

Fig.1

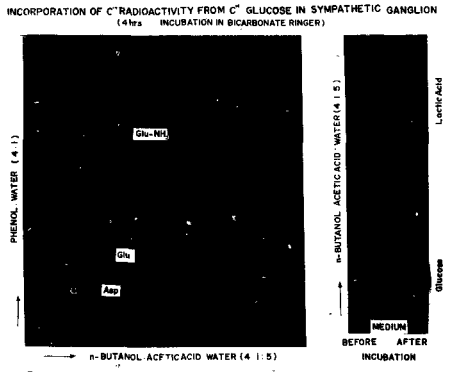


Fig.2

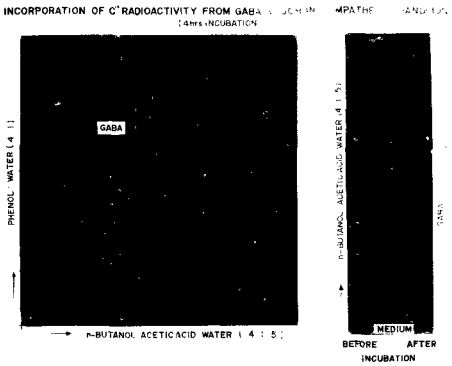


Table 2

EFFECTS OF INCUBATION ON AMINO ACID CONTENTS IN SYMPATHETIC GANGLION

(μ-moles/g-w.w.)

CONDITIONS / INCUBATION TIME	CONTROL Glu.	CONTROL Asp.	Ca^{++}FREE RINGER Glu.	Ca^{++}FREE RINGER Asp.	NO GLUCOSE RINGER Glu.	NO GLUCOSE RINGER Asp.	K^{+}RICH RINGER Glu.	K^{+}RICH RINGER Asp.
0 HOUR	3.66	3.93						
1 HOUR	3.06	4.15	11.3	3.30	5.46	5.06	6.42	3.05
2 HOUR	5.36	3.12	9.45	1.54	3.93	4.66	4.33	2.14
3 HOUR	7.57	3.09	7.62	1.61	5.22	6.01	....	....

してもGABAから他のアミノ酸への転入はみられず（第2図）この点脳組織とは明らかに異ってゐる。⑤神経節ではGABA-C^{14}OOHより$C^{14}O_2$の産生は認められるのであって肝，腎組織でのGABAの代謝系と似てゐるとみえる。次に神経節をglucose bicarbonate Ringer中でincubateして時間と共に遊離アミノ酸の変動を追求してみるとGluは増加する傾向を示しAspはあまり変化しなかった。溶液中のCa^{++}を除いて神経細胞が持続的な活動状態にあるときにはGluは増加しAspは減少する。又ブドウ糖を除いた溶液中でincubateするとAspが著しく増加する。K^{+}-rich Ringerでは著変がみられなかった。この様に，incubationの過程で神経節内のアミノ酸量は或る変動を示してくるが，神経機能との関連性については更に検討を要する問題であらう。

3) アミノ酸の能動輸送

交感神経節をアミノ酸を5mM含んだ溶液中でincubateすると脳切片の場合⑥と同様L-及びD-Glu，Asp及びGlu-NH_2は時間と共に濃度勾配に逆って能動的に組織内にとり込まれる（図3）がその程度は脳の場合に比して著しく少ないが，4時間のincubationでも依然として猶とり込みは上昇の傾向にある。これは神経節が結合織の被膜に包まれて居りincubationによる組織の破壊が比較的少いと考えられる。然しながら神経節内には

存在しないGABAは全くとり込みがみられず，神経節にはGABAのとり込み機構も存在しないことを示唆してみる。然し逆に脳切片でアミノ酸のとり込みの旺盛なことは細胞或いは細胞膜の破壊してみることがその主なる要因であるかも知れない。このことは蛋白質，核酸，脂質等の高分子物質の代謝は切片では極めて低く，神経節では in vivo の脳とほぼ同様の結果が得られることからも推論される。次にアミノ酸の能動輸送に及ぼす諸要因をD-Glu を用いて検討してみると第3表の如くで，溶液中の K^+ を除くとそのとり込みは抑制されるし，Ouabaine (5×10^{-4}M) を添加してもそのとり込みは抑えられる。又溶液中からブドウ糖を除いたり，低温にして代謝を下げるとD-Glu の蓄積は減少するのがみられた。この様な事実からD-Glu のとり込み機構はブドウ糖からのエネルギーを利用する能動的な過程であると考えることが出来るし，K^+ free や Ouabaine の効果は脳切片④で認められた現象と全く同一である。

Fig.3

TIME COURSE OF AMINO ACIDS ACCUMULATION INTO CERVICAL SYMPATHETIC GANGLION
(INCUBATED IN 5mM AMINO ACID SOLUTION)

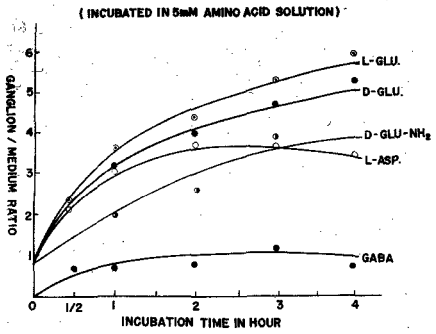


Table 3

EFFECT OF VARIOUS CONDITIONS ON D-GLUTAMATE ACCUMULATION IN SYMPATHETIC GANGLION
(Incubated in 5 mM D-glutamate solution)

INCUBATION TIME / CONDITIONS	1 HOUR		3 HOUR	
	D-Glu. in Ggl.	Change %	D-Glu. in Ggl.	Change %
CONTROL	10.9		14.5	
NO GLUCOSE RINGER	8.48	- 22.3	8.17	- 43.8
LOW TEMPERATURE (2°C)	6.06	- 44.4	6.23	- 57.0
K^+ FREE RINGER	3.33	- 69.5	7.35	- 49.3
OUABAINE (5×10^{-4}M)	6.96	- 36.0	7.88	- 45.7
TRITON X-100 (5,000 x Dilution)	4.88	- 44.4	6.23	- 57.0

4) 神経節の代謝と電気刺激

図4-a,b に示す様な毛細管で作った微小電極に剔出交感神経節を装着し incubation を行いながら節前線維より電気刺激を与えると節後線維よりシナップスを伝導した活動電位を記録することが出来，正常Ringer 液中では10時間以上に亘って活動電位の低下は認められない。GABA，D-Glu (各5mM) 等アミノ酸中で incubate を行った場合も，1時間以内ではこれら potential に著明な変化は認められず，又 Ouabaine (10^{-4}M) を加えても明らかな変化は見出されなかった。然し溶液中のブドウ糖を除くと活動電位は時間と共に減少するのがみられた。この様に何れの場合にも電気的反応に著しい変化がみられなかったことは，神経節にとり込まれるアミノ酸の量が極めて少く細胞破壊が軽微であることも一つの原因であろうが，シナップス伝導や神経線維からの活動電位そのものは代謝的依存性が少いことも考

INCUBATION CHAMBER FOR ELECTRIC STIMULATION & RECORDING

Fig.4-a

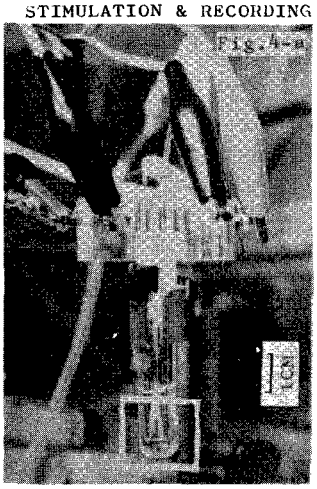
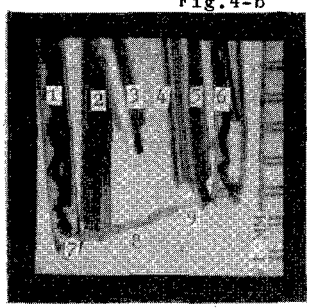
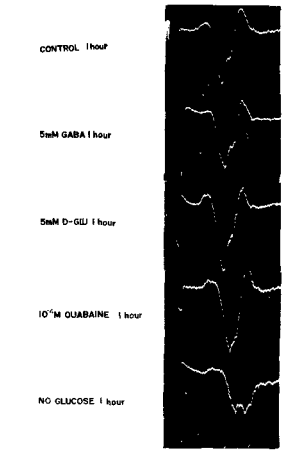


Fig.4-b



1&2:Recording electrodes,
3:Ground,
4:Bubling tube,
5&6:Stimulating electrodes,
7:Postganglionic nerve,
8:Ganglion body,
9:Preganglionic nerve,

Fig.5



處されてよいであろう。(第5図)

まとめ

(1) 交感神経節内の遊離アミノ酸の分布の特徴はグルタミン酸がアスパラギン酸に比して少く，GABA及びN-アセチルアスパラギン酸は存在しない。

(2) 神経節ではブドウ糖はグルタミン酸，アスパラギン酸等の遊離アミノ酸へ活発に代謝されるがγ-アミノ酪酸生成系は存在しない。

(3) アミノ酸(グルタミン酸，アスパラギン酸)の能動輸送系は脳に比して極めて弱くγ-アミノ酪酸の能動蓄積は認められない。

(4) アミノ酸やOuabaineは短時間の間では神経節の興奮性に著しい変化を与へない。

文献

(1) Larrabee,M.G. and Klingman,J.D., In "Neurochemistry" 2nd Ed. Elliott, Quastel and Page Ed.,p. 150, C.C.Thomas, Springfield, Ill. (1962)

(2) Larrabee,M.G., Klingman,J.D. and Leicht,W.S., J. Neurochem. 10, 594, (1963)

(3) 塚田，永田，生化学，33, 51, m(1961)

(4) Florey,E. and McLennan,H., J. Physiol. 129, 384, (1955)

(5) Tsukada,Y., Nagata,Y., Hirano,S. and Matsutani,T., In "Inhibition in the Nervous System and γ-Aminobutyric Acid." p. 169, Pergamon Press, New York. (1960)

(6) Tsukada,Y., Nagata,Y., Hirano,S. and Matsutani,T., J. Neurochem. 10, 256, (1963)

9 C^{14} - グルコースを用いたネコ脳のアミノ酸タンパク代謝の研究

大森 文太郎・大月 三郎
（岡山大・医・神経）

血中グルコースは脳に摂取されてエネルギー源となる重要な物質であるのみならずその代謝物質が脳の内在物質の生合成に利用されていることは、in vivo の実験で C^{14}- グルコースの炭素分子が速やかに脳のアミノ酸，タンパク，リピッド等に移行するという Winzler ら[1]，Geiger ら[2]，Vrba ら[3]，大月ら[4]，Cremer ら[5]の報告によって明らかである。C^{14}- グルコースを動物に投与する場合，単一投与では血中放射能は急速に上昇した後速やかに減少する。一定の実験時間内において組織の内在物質の放射能は，ある物質では血中放射能と似た増加・減少曲線を示すものもあり，又ある物質では除々に増加曲線のみ示すものもある。したがって、ある特定の実験時間において，各内在物質の放射活性を比較した場合には、除々に放射能が増加した物質の方が、速やかにそれが増加・減少した物質よりも代謝回転が速いと考え誤まる危険が存在する。特にタンパク質のような比較的代謝回転の遅い物質を問題とする場合には、この誤りをおかし易い。したがって我々は、ネコの動脈内に C^{14}- グルコースを持続注入することによって、一定時間脳循環血中の放射能を一定に保つという実験条件を採用した。この条件のもとで、脳の細胞内単位中の総アミノ酸，グルタミン酸，アスパラギン酸，DEAE－セファデックスカラムによる各種タンパク分画への C^{14} のとりこみをしらべた。この場合非極性 detergent である Triton X-100 が細胞内顆粒の優れた溶解剤である（Brunngraber ら[6]，Roodyn ら[7]）所から，粗ミトコンドリア分画とミクロソーム分画については Triton X-100 で溶解した上清を用いた。

一方ネコにおいては、石井ら[8]による硬膜外圧迫法を応用して慢性圧迫脳を作り，この際の代謝の変動をしらべた。

【実験方法】

1．慢性圧迫脳：石井らの硬膜外圧迫法によって，右前頭葉硬膜外に生理的食塩水を入れたバルーンを入れ、2～3ヶ月間慢性圧迫を行った成猫に，A. femoralis より C^{14}- グルコース 200 μc を 2～3 時間にわたり，1 定濃注入した後 脳を摘出凍結した。この脳の右半球について実験を行った。

慢性圧迫による組織学的所見は、バルーンにより圧迫された部に直径約 1.3～1.5 cm の圧痕を認め，その変形した部位ならびに他の領域は外観的に変化を認めない。割面では，圧迫変形した皮質下白質に径 0.4 cm の軟化壊死巣を認め，直接圧迫された皮質はやや中が狭くなっているが皮質・白質の境界は明瞭である。髄鞘染色ではクロウケノの増殖肥大，顆粒細胞の出現が見られ，皮質は粗になり，中心部は壊死空洞となっている。圧迫部の皮質では，神経細胞は全般に hyperchromatized で軽度の細胞硬化の像を示し，圧迫部の辺縁では，神経細胞の水腫性変化が見られる。又反対側前頭葉では白質に病変はないが，神経細胞及び膠細胞に水腫性変化を認めた。

2．遠心分離：脳は 0.32 M 蔗糖液中，テフロンホモジナイザーにてホモジナイズし，1000 g．10 分間遠心し，その沈渣を核分画（N）とした。その上清を 25,000 g，15 分間遠心し、沈渣を粗ミトコンドリア分画（Mc）とした。更にその上清を 10,5000

g，60分間遠心し，ミクロソーム分画（Ms）とSoluble Cytoplasma（S）とにわけた。Mt分画およびMs分画については，0.5% Triton X-100を含む0.02M燐酸ソーダ緩衝液PH8.0を加えて，テフロンホモジナイザーにてホモジナイズし，105,000g 20分間遠心し，Triton溶性分画とTriton不溶性分画とに分けた。各分画について，それぞれタンパク量および放射能を測定した。なおタンパク量はLowry法[7]により，γ放射能はウェルガンマフロカウンターを使用した。

3．カラムクロマトグラフィー：Mt，MsのTriton溶性分画およびS分画を，それぞれ2.5×40cmのSephadex G25カラムにつけ，0.02M燐酸ソーダ緩衝液（PH.8.0）を流して，5mlごとに採取し，吸光度260mμおよび280mμにて測定し，macromolecular substanceとmicromolecular substanceの二つに分けた。前者については，1.6×19cmのDEAE Sephadexカラムにつけ，0.02M燐酸ソーダ緩衝液（PH 8.0）中のNaClの濃度を0より0.1Mづつ1Mまで階段状に上げてタンパクを溶出した。溶出液は5mlごとに採取し，タンパク量を測定し同一ピークに属する溶出液をまとめて，薄結乾燥した後，少量の水にとかし，5～7%になる様にトリクロール酢酸を加えてタンパクを沈澱せしめ，沈渣を95%エタノールにて3回洗った後2N NaOHに溶かして，タンパク量および放射能を測定した。なおTriton溶性分画のDEAE Sephadexカラムの溶出液には0.2% Tritonを加えてクロマトグラフィーを行った。

4．アミノ酸の定量：Sephadex G25カラムにより集めた，micromolecular substanceのピークを減圧濃縮後1g brain相当量を1×7.5cmのDowex 50H⁺型のカラムにつけ6N HClにてアミノ酸を溶出する。これを減圧乾燥後，少量の水にとかし，その一部にてRosen法によりアミノ酸測定および放射能測定を行った。残部を1×30cmのDowex 1×8のカラムにつけ，0.5M酢酸にてグルタミン酸，アスパラギン酸を溶出せしめ，各々について，アミノ酸量および放射能を測定した。

【実験結果】

1．各細胞内単位の代謝率：U-C^{14}-グルコース静脈注入開始後3時間にて脳を摘出し，遠心法により分けた各分画の放射能を測定し，Lowry法によってえられたタンパク量との比（S.A）を見た。この時脳血中グルコースの放射能は常に一定（11,648～13,528 CPM/ml blood）に保った。

正常ネコ脳ではMt分画，Ms分画共にTriton溶性分画の方がTriton不溶性分画よりもあきらかに高いS.Aを示した。この事は慢性脳圧迫ネコに於いても同様であったが，慢性脳圧迫ネコでは正常ネコに比し，全般的にS.Aが低かった。Triton溶性分画およびS分画はグルコース，乳酸，遊離アミノ酸等の低分子物質を含んでいるのでSephadex G25カラムにより低分子物質をのぞき高分子物質のみについて，S.Aをしらべて見ると，Mt分画，S分画では正常ネコ，脳圧迫ネコ共に差異が見られなかった。ただMs

表1．各細胞内単位代謝率

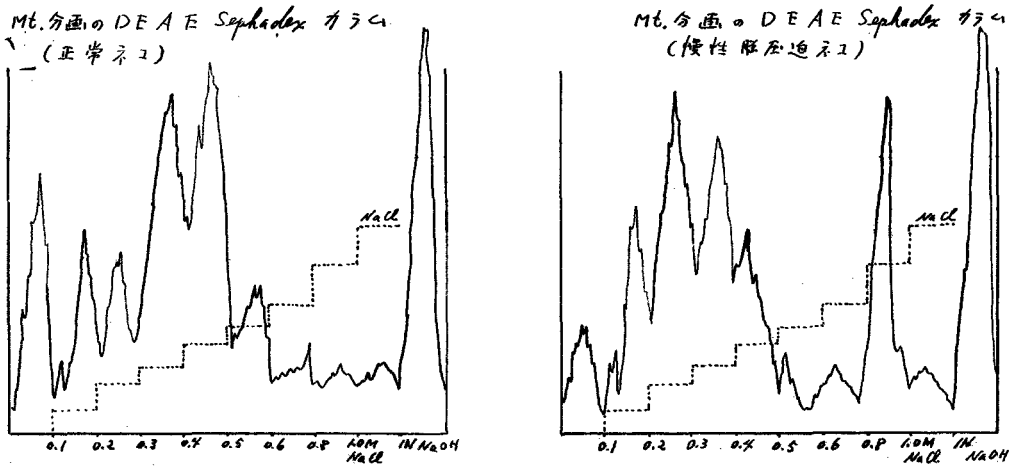
	正常ネコ			慢性脳圧迫ネコ		
	Total mg Prot/g	CPM/g	CPM/mg Prot.	Total mg Prot/g	CPM/g	CPM/mg Prot.
N.	33.8	2635	78	46.2	6146	133
Mt. Triton insolub.	134.4	4680	35	79.2	3377	43
Mt. Triton solub.	47.0	13635	290	91.1	15357	169
Ms. Triton insolub.	4.8	326	68	3.4	108	33
Ms. Triton solub.	13.8	4532	328	15.2	4080	268
S.	42.2	18576	440	60.5	16558	274

分画に於いては、脳灰白質のS.Aが正常ネコのSAの1/3以下に低下していた。Roodyn[7]によれば、Triton X-100は、RNAよりもタンパク、燐脂質等を強力に溶かすので、これ等の結果はミクロソームに於けるタンパク、燐脂質等の代謝が障害された事を示すものである。

表2. Sephadex G25カラムによる高分子物質分画の代謝率

	正常ネコ			慢性脳灰白質ネコ		
	total mg Prot/g	CPM/g	CPM/mg Prot	total mg Prot/g	CPM/g	CPM/mg Prot
Mt. Triton solub.	40.0	680	17.0	72.1	1394	19.3
Ms. Triton solub.	9.1	385	42.3	10.1	132	13.0
S.	32.4	1870	57.7	40.1	2276	56.7

2. DEAE Sephadexカラムによるタンパク溶出パターンについて：Mt分画のTriton溶性分画について、Sephadex G25カラムにより集めた高分子物質をDEAE Sephadexカラムにつけ、タンパク溶出カーブを書くと同時に各ピークについてS.Aを測定した。正常ネコに於いては図に示す様に0.3Mを中心に0.1Mよりのダイにわたって高いピークが出現し、次に0.02M燐酸ソーダ緩衝液(PH8.0)のみによって最初に溶出するピークが認められる。放射能は最初のピーク、すなわち0.02M燐酸ソーダ緩衝液のみによって溶出した部位に集り、その他の部位にはほとんど認められなかった。この事は等電点がPH8.0に近いものか、あるいはnon polar proteinのturn overが高い事を示唆する。Trauman[10]は羊の心筋のミトコンドリアに於いては、non polar proteinのturn overが高く、これは多分ミトコンドリア膜を形成しているリポタンパクであり、このリポタンパクはミトコンドリア自体に於いて生合成されるらしいとのべているが、脳のミトコンドリアに



於いても、同じ様な傾向のある事を示すものと思われる。しかしながら脳のMt分画はミエリン破片、ミナップス顆粒などを混在する雑分画であるために、これらに由来するタンパクのうちにも代謝回転の速いものがある事を否定出来ない。S分画においても程度ではあるが同様の傾向を示した。慢性脳灰白質ネコに於いては、Mt分画のタンパク溶出カーブは正常のものとは異っており、燐酸ソーダ緩衝液のみにより溶出する最初のピークはタンパク量が正常のものに比較して少なく、0.8M NaClにより溶出する高いピークが認められた。これは組織学的に白質の高度な変化や神経細胞の変化を反影するものであろう。なおこれらの各ピークに関して、Polyacrylamid-gelによ

3 Disc 泳動法によりタンパクの同定を行う予定である。

3．各分画のアミノ酸の specific activity（S.A）について：Mt，Ms の Triton 溶性分画及び S 分画について．それぞれ遊離アミノ酸の S.A をくらべたが，その結果は S 分画が最も S A が高く，次いで Mt 分画．最も S.A の低かったのは Ms 分画であった。次に慢性脳圧迫ネコにおいて，各分画の遊離アミノ酸の S.A を見たが，各分画共に正常ネコに比較して，S.A は同程度または程度の低下を見た。又 Mt 分画，S 分画について．グルタミン酸，アスパラギン酸の S A をくらべたが Mt 分画，S 分画共に，S A は同じであった。この事実は Ryall [11] がグルタミン酸．GABA は細胞内にかなり性た分布しているという報告と一致している。これ等の事より脳の慢性圧迫により脳萎縮，又は脳浮腫が来る事により，脳の遊離アミノ酸量は，やや減少するも．その specific activity においては変化を来さない事を示すものと考える。

表 3.

	正常ネコ		慢性脳圧迫ネコ	
	μmol/g.	CPM/μmol	μmol/g.	CPM/μmol
Mt. Triton solub. 分画 glut.	1.67	3567	1.09	3237
〃 Asp.	1.25	2004	0.61	1467
S 分画 glut.	3.23	3457	1.93	2761
〃 Asp.	2.00	2001	0.42	1800

〔文献〕

1. Winzler, R.J., Moldave, K., Rafelson, M.E., & Pearson, H.E.; J. Biol. Chem. 199, 458 (1952)
2. Geiger, A., Kawakita, Y. & Barkulis, S.S; J. Neurochem. 5, 323 (1960)
3. Vrba, R., Gaitonde, M.K. & Richter, D.; J. Neurochem. 9, 465 (1962)
4. Otsuki, S. & Geiger, A.; J. Neurochem. 10, 415 (1963)
5. Cremer, J.E.; J. Neurochem. 11, 165 (1964)
6. Brunngraber, E.G., Aguilar, V. & Occony, W.G.: J. Neurochem. 10, 433 (1963)
7. Roodyn, D.B; Biochem. J. 85, 177 (1962)
8. Ishii, S., Hayner, K., Kelly, W.A. & Evans, J.P.; J. Neurosurg. 16, 182 (1959)
9. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randell, R.J; J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
10. Truman, D.E.S.; Biochem. J. 91, 59 (1964)
11. Ryall, R.W; J. Neurochem. 11, 131 (1964)

S-1 脳組織における Ribonuclease Inhibitor の存在とその精製の試み

間瀬桂吉・阿部幸子
（新潟大・医・脳研）

脳組織におけるRNA－RNAase系がタンパク合成、分泌、細胞分裂のみならず神経活動にかかわっても重要なcontrolling factorの一つになっているのではないかという推測のもとに脳組織のRNAaseの基本的性格を明らかにする研究を行ってきた。[7] しこうして脳細胞分画についてRNAase活性を検討したところ他の諸分画に比し上清分画は著しく活性が低い、のみならずこの上清分画は膵臓からの結晶RNAaseや脳ミトコンドリヤ、マイクロソーム分画のRNAaseに対しても阻害的にはたらくことを知った。この阻害は非透析性で、加熱失活することなどから蛋白性のものと思われその精製を試みんとした。

実験材料及び方法

RNA標品：RNAaseの基質としてのRNAは市販のものはかなりのタンパクを含むに上に盲検値が高くそのままでは使えない。そのために市販のコーボRNA（Nutritional Biochemicals corporation）よりHakim[5]の方法あるいはphenol法で精製した。乾燥標品についての分析ではK塩としてP含量8.3％，N含量13.1％，ε(P) 7300　塩基組成のモル比はアデニン：グアニン：シトシン：ウラシル＝1.00：0.93：0.90：1.18であった。[7]

RNAase：標準とするRNAaseはウシ膵臓からの結晶品（sigma社）を使用した。

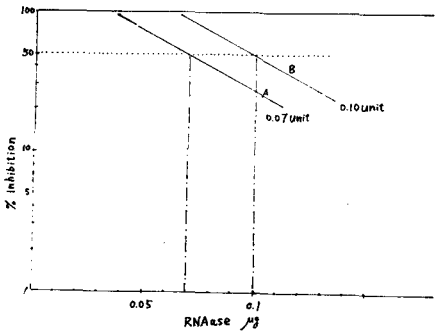
RNAase inhibitor活性測定法：一定量の膵RNAに対する上清分画あるいはその部分的精製品の阻害度を測定する方法をとった。反応組成は全容0.6 ml中に0.03 M Veronal buffer (pH 7.8) 0.2 ml.（酸性RNAaseに対する阻害をみるには0.03 M acetate buffer pH 5.8）0.1％のgelatinを含む膵RNAase溶液0.1 ml，1％RNA水溶液0.2 ml.，上清分画あるいはinhibitor 0.1 mlを含むようにした。37° 30分インキュベート後，0.6 ml. のacid-ethanol（76％のエチルアルコールや1Nの塩酸を含む）を加え冷所に少なくとも1時間放置．3000 r.p.m. 10分の遠心上清より0.5 mlとり，水で6倍に稀釈し260 mμにおける吸光度を測定した。RNAaseなど上清分画あるいはinhibitorなしで同様にインキュベートを行い、この際の値をブランクとして差引いた。RNAaseの量とinhibitorの阻害度との間には普通の正方眼紙にプロットしたとき直線的関係は得られなかったが、これを片対数方眼紙にプロットするとき直線関係が得られ、より広範囲のinhibitor濃度に亙って測定し得るようになる。inhibitorの活性はそれが50％阻害をおこすようなRNAase量をもってその単位とした。例えば附1のA標品の場合はその0.1 mlがRNAase 0.05 γを75％阻害し、0.1 γを28％位阻害するが　50％阻害の線を延長してその交差点から横軸におろした点即ち0.07がその単位となる。同様にB標品は0.1単位ということになる。

RNAase inhibitorを含む上清分画の調製：　Wistar系ラット体重200 g　前後の雄．通常1回に8匹、断頭後直ちに肝臓をとりだし、細かくきざみ、3倍容の0.25Mショ糖溶液を加えクリアランスの小さい（0.3mmぐらい）テフロン－ガラスホモゲナイザーで完全にホモ化ナイズし、これを一旦8000×g 10分遠心、その上清を日立超遠心機で40,000 r.p.m. 90分遠心、上清を駒込ピペットで注意深く吸いとる。ホモジェナイズが不充分

だったり，0.25Mショ糖であまり薄め過ぎるとinhibitorのロスを伴う。

DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー：DEAE-セルロース(生化学研究所より入手)5gを通常のやく前処理したのちカラムにつめ(1.6×17cm)，0.01M K-phosphate buffer (pH 6.4)-0.001M EDTAで平衡化させこれに上記脳の上清分画を流して吸着させた。次いで0.15M，0.70MおよびIM NaCl含む0.01M K-phosphate buffer-0.001M EDTA溶液でstepwiseに溶出を行った。溶出速度は10ml/hrで，オートマティックフラクションコレクターで4.0mlづつ分取した。操作は0-4°の冷蔵室内で行った

Fig1 Inhibition of increasing quantities of crystalline pancreatic RNAase by RNAase inhibitor



Hydroxylapatiteカラムクロマトグラフィー：Hydroxylapatite $Ca_5(PO_4)_3OH$ は$CaCl_2$とNa_2HPO_4とよりTiselius[13]らの方法で作製した。これを1.8×7.0cmにつめ0.154M NaCl-0.045M K-Phosphate buffer (pH 6.8)で平衡後DEAE-セルロースで部分的に精製した試料をvisking tubeで濃縮しこれをカラムに流して吸着させ，0.154M NaCl-0.045M K-Phosphate buffer (pH6.8)から0.154M NaCl-0.45M K-phosphate buffer (pH6.8)のgradient elutionを行った。溶出速度は6ml/hr，オートマティックフラクションコレクターで4.0mlづつ分取した

成績

1) 初めに一般の蛋白精製法に準じ硫安分画法，アルコール分画法を試みたが，いずれにおいても活性が大きく失われ不適当と思われた。

2) DEAE-セルロースクロマトグラフィーでは，初めに着色物質と共に多量のタンパクが溶出してくるがこれはinhibitor活性を示さないので捨てた。次いでFig. 2に示すごとくStepwise elutionで3つのmajor peakが得られたが，inhibitor活性は0.70MのNaCl含むbuffer salineで溶出される分画が最高であった，この操作で初めの上清分画の約20倍に精製することができた(Table 1)。

3) Hydroxylapatiteクロマトグラフィー：DEAE-セルロースクロマトでinhibitor活性の高かった分画を濃縮して行ったが，Fig. 3に見られるごとくK-phosphate bufferのgradient elutionで3つのピーク得られた。しかしinhibitorの比活性を上げるまでには至らなかった

4) 部分的に精製したinhibitorの性質：DEAE-セルロースクロマトからの活性ある分画は殆ど無色透明で，bufferに対し透析したもの，蛋白含量は約1mg/ml. RNA量はorcino法で約80μg/ml. molish反応ではcarbohydrateは検出されなかった。このものの活性は室内(0.03M veronal buffer pH7.8に対し48hr)によっては失われず，これに対し65°2分間の加熱により殆ど完全に失活する(Table 2)。貯蔵の際の安定性については，氷室(0-4°)で少なくとも2週間，凍結(-20°)では少なくとも1ケ月間はその活性は全く保たれていた。

考察

脳細胞蛋白の合成におけるRNAの意義，RNAを構成するプリン、ピリミジンヌクレオサドの諸種代謝過程におけるcofactorとしての役割はかなりはっきりと理立されているように思われる。がしかしRNAaseの機能については一般の臓器においても不明のまゝ残されている。　RNAの分解を介しての蛋白合成の規制，代謝過程に必要なcofactorとしてのヌクレオサドの供給等々に付くであろうことは非常に魅惑的な推論であるがin Situでの実証はない。

脳細胞内においてもRNAase活性のあることは古くから知られ，種々の刺激やストレスの際にニッスル顆粒の消失（chromatolysis）の説明に用いられてきている。[2][4]

ニッスル顆粒はendoplasmic reticulumに特殊に配列された核蛋白であり，他臓器のリボソームに相当するものであることは明らかにされているが，[8]近年Dattaら[1]が山羊大脳皮質からのリボソームにRNAase活性を見出したことはchromatolysisとの関連において一層の興味をひくものがある。

リボソームにRNAase活性の存在することは微生物から動物に至って普遍的なことがらであるが，これらは通常ではlatentであり，高濃度の尿素の存在、熱処理，トリプシン処理等ではじめて活性を現わす。[3]この実験リボソームのRNAaseは尿素をとりても活性を有するが，やはり高濃度の尿素の存在で活性が増大するという。[1]これらのことは上記の処理によってinhibitorの如きものが除かれるかあるいは不活化されることを示すものと考えることが出来る。

RNAase inhibitorも広く分布するものようであるが[9][6]，in Situにおける役割はこれまた全くわからない。これまでRNAaseを阻害するものとしてCu^{++}の如き金属イオン，ヘパリン，ペニシリン，SDS等のdetergentなどが知られているが。[11]脳上清からのinhibitorは非透析性，熱失活性，molish テスト陰性などからみて，上記のものと異り，又植物のinhibitorとも異り，Rothら[9]が肝より見出した蛋白性inhibitorと類似のものではないかと思われる。実験成績のべたごとく，この脳上清からのinhibitorはかなりlabileで一般蛋白の精製に用いられる硫安，アルコール処理は不適であった。これに対しDEAE-セルロースクロマトは有力で，これで得られたものは冷所に保存すればかなり長期に安定である。その他抽出精製上の注意としてはよく組織をホモジェナイズすること，又余り稀釈しないことなどがあげられる。

脳上清からのinhibitorが肝上清からのものと全く同じものであるかどうかは更に検討を要するが，肝より高度に精製したものでは金属イオンにより不活化をうけることが報ぜられており，[12]又Rothら[10]によれば同じく肝上清からのinhibitorはPCMBやPb^{++}によってinactivateされることからSH基を有する蛋白でないかとの推測もなされている。

これらの知見はRNAase活性の低い上清，その他の分画でも適当な処理をほどこせば重要なRNAase源となり得ること，又RNAase活性の測定にあたって金属イオンに注意を払わぬと誤りをおかす恐れのあることを示すものであろう。

これまでの成績ではまだ精製不充分であり，種々の精製法を試みる必要がある。そして更にその性質も明らかにしていき，生体内における RNA-RNAase-RNAase inhibitorの統一的理解に近づきたいものである。

文 献

(1) Datta, R. K., Bhattacharyya, D. and Ghosh, J.J., J. Neurochem. 11, 87 (1964)

(2) Einarson, L., Amer. J. Anat. 53, 141 (1933)

(3) Elson, D., Biochim. et Biophys. Acta 36, 372 (1959)

(4) Gersh, I., and Bodian, D., J. Cell Comp physiol, 21, 253 (1943)

(5) Hakim, A.A. J. Biol. Chem., 225, 689 (1957)

(6) Llamas, R. and Coronas, E., Proceeding of the Fifth International Congress, Moskow (1961) Section II, Biochemistry of the Nervous System

(7) 岡瀬祥吉, 生化学 才34巻 才8号 339 (1962)

(8) Palay, S. and Palade, G.E., J. Biophys. Biochem. Cytol. 1. 69 (1955)

(9) Roth, J.S., Biochim. et Biophys. Acta, 21, 34 (1956)

(10) Roth, J.S., J. Biol. Chem., 231, 1085 (1958)

(11) Schmidt, G. "The Nucleic Acid" vol. I 572 (1955) ed. by Chargaff. E. and Davidson, J. N.

(12) Shortman, K., Biochem. et Biophys. Acta 51, 37 (1961)

(13) Tiselius, A., Hjerten, S., and Levin, O., Arch Biochem. Biophys., 65, 132 (1956)

8

Fig.2 DEAE-cellulose chromatography

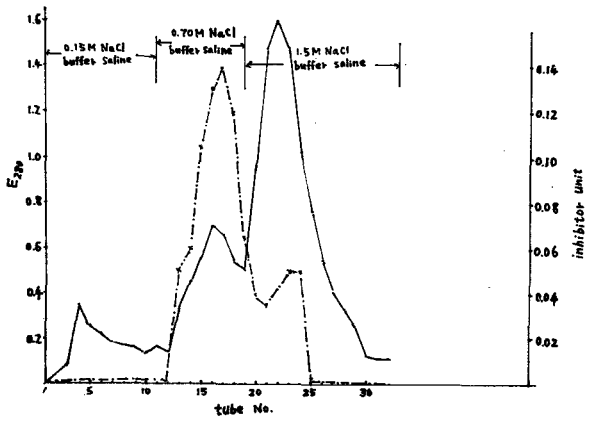


Table 1

Partial purification of RNAase inhibitor from rat brain supernatant

Fraction	Total volume(ml)	Total units	Protein (mg)	Specific activity (Units/mg Protein)	Recovery (%)
Original supernatant	20	13.5-14.0	280-300	0.045 - 0.050	100
All fractions from DEAE-cellulose chromatography	28-32	10.7-12.3	19.2-21.1	0.52 - 0.56	77-88
Three most active fractions from DEAE-cellulose chromatography	12	4.4-4.7	4.8-5.1	0.82 - 0.92	31-34

Table 2

Effect of dialysis or heating on partially purified ribonuclease inhibitor.

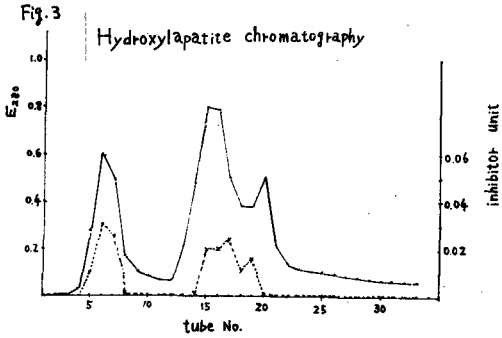
	E_{260}
RNA	0.040
RNA + RNAase (0.05γ)	0.550
〃 + 〃 + inhibitor (0.1cc)	0.050
〃 + 〃 + dialysed inhibitor (0.1cc)*	0.050
〃 + 〃 + heated inhibitor (0.1cc)**	0.545

incubation : 37°, 30 min

* dialysis : against cold water or 0.03M veronal buffer (pH 7.8) 48 hr.

** heating : 65°, 2 min

Fig.3 Hydroxylapatite chromatography



S-2 神経系に存在する生物学的活性ポリペプチッド

井上　章・片岡喜由・桝村純生・
堀　清記・塩　栄夫（京大・医・二生理）

神経系に存在する生物学的活性ポリペプチッドの中で、下垂体後葉ホルモンに関しては、かなり詳細な研究がなされたことは良く知られているが、Substance P については、その30年以上に亘る研究の歴史があるにもかかわらず、大して注目をされずに現在にいたっている。[a] しかし最近ポリペプチッドの精製法及び合成法の長足の進歩に伴い、Bradykinin の合成が成功したことに端を発し、Substance P の精製、純化に多くの努力が払われる様になった。二、三の研究所ではすでに、Substance P を単一な分画として分離しており、[b] 構造式も近い将来なされることと思われるが、Substance P の生理学的な存在意義についても、特に知覚伝達との関連において注目されて来た。すなわち、Substance P が、脳の細胞内顆粒分布において、アセチルコリンと非常に良く似た挙度をとり、神経終末分画に高濃度に存在すること、[c] 及び部位的分布が知覚神経系に良く一致していること、モルヒネ拮抗性等がその根拠となる様である。しかし脳の様に極端な機能的分化を示す組織では、顆粒分布の旦的で分離した分画の均一性については非常に不満足な解答しか得られない。従ってかなり機能的に単一な組織を選ぶ目的で、末梢神経中の Substance P の挙度を追究することが本実験の一つの目的である。

一方 Substance P の精製過程において、その粗抽出標品から性質が Bradykinin によく似たポリペプチッドが抽出されて、注目されて来たが、この satelite polypeptide に関しても多くの生理学的あるいは生化学的興味が含まれている様に思われる。Zetler が報告した如き塩化第二鉄処理により、P物質から kinin 様物質を分離して、神経系に存在する satelite polypeptide の検討を合成 Bradykinin と比較して行ったことを報告する。

牛脊髄後根、迷走神経、脾臓神経を、Euler の方法により、[d] 二本のエボナイト、ローラーで圧搾して、10倍量等張原液又は KPB の Press Juice とした。600g、10分の遠心沈澱で low speed sediment を除いた後、50,000g、60分で high speed sediment を得て、上清と合計三分画を分離した。Substance P は pH 4.0、100°C、10分で抽出後、70%飽和硫安で塩析し、70% メタノールに溶解後、アルミナカラムに吸着せしめ、50%、35%、25% 及び H_2O 溶出分画について測定は生物検討で行った。粗 Substance P 標品は牛脳細片を塩酸酸性で10分間100°Cで抽出し Euler の方法により エタノール抽出を3回繰り返した後、70%硫安で塩析して得た。更に前塩化第二鉄処理により Zetler の A、B、C 三分画を分離し夫々について生物検定による比較と、生化学的な検討を合成 Bradykinin 及び mg 当たり 25 単位の Substance P 標品を使って行った。

生物検定にはモルモット人廻腸片、ラット十二指腸、ラット子宮を主として用いたが、微量定量の目的で Gaddum[e] が報告した様に、盲腸の腸と腹う方法を試みた。すなわち、アフリライト製（径約 2mm）マイクロバス中の、腸管の収縮を photocell に

受ける光の量の変化で追いペン書きレコーダーに記録して活性を見積った。

末梢神経中のSubstance Pの顆粒分画り結果の一例は下の様であるが、Substance Pの60%以上が結合型として存在しており 従来脳で得て来た結果[6][7]と大体一致しているが腸膜神経中の結合型ノルアドレナリンは20～30%にすぎない様である。

	Substance P (unit/g)	protein (mg/10g)	specific activity
low speed sediment	0.16	2.38	6.8
high speed sediment	0.90	4.49	20.0
supernatant	0.64	59.50	1.1
(迷走神経)			

Substance P 粗標品から trypsin 処理で得た kinin 様物質[8]は Substance P に比較するとラット子宮筋に対しても活性が強く、又この物質は Bradykinin 抽出法で抽出されるので Bradykinin と良く似た物質であることが予想される。

1) U.S. von Euler & J.H. Gaddum; J. Physiol. 72. 74. (1931)
2) 井上 章, 片岡喜由; 蛋白質、核酸、酵素. 9巻 5号 10頁 (1964)
3) A. Inouye, K. Kataoka & Y. Shinagawa. Biochim. Biophys. Acta. 71. 491. (1963)
4) U.S. von Euler; Ann. N.Y. Acad. Sci. 104. 449 (1962)
5) J.H. Gaddum & J.C. Szerb; Brit. J. Pharmacol. 17. 451 (1951)
6) R.W. Ryall; Biochem. Pharmacol. 11. 1235. (1962)
7) K. Kataoka; Jap. J. Physiol. 12. 89 (1962)
8) A. Inouye, K. Kataoka & T. Tsuguoka; Jap. J. Physiol. 11. 319 (1961)

S-3 牛脳中の酸性ペプチド(I)

柿本泰男・中島照夫・金沢　彰・
武貞昌志・清水宏俊・宮本英七・
佐野　勇　（阪大・医・精神）

脳には未同定のアミノ化合物が多数存在することが知られている。これらの物質を分離同定する目的で牛脳の抽出液をイオン交換クロマトグラフィーで精製し、まず3種の化合物を分離した。元素分析およびアミノ酸組成の分析からそれらの構造を推定し、合成によって同定した。

〔実験材料〕

同定のために用いた物質は一般につぎの方法で合成した。

1) γ-グルタミルペプチド

カルボベンゾキシグルタミン酸γ-メチルエステルにヒドラジンを作用させγヒドラジドとし、アジドとした後，遊離アミノ酸のナトリウム塩と縮合せしめ，接触還元によってカルボベンゾキシ基を除去した。

2) α-グルタミルペプチド

カルボベンゾキシグルタミン酸γ-メチルエステルにジオキサン中でエトキシカルボニールクロリッドを作用させ酸無水物をつくり、これに遊離アミノ酸ナトリウム塩の水溶液を加え、カルボベンゾキシα-グルタミルアミノ酸γ-メチルエステルを合成した。けん化後、接触還元によりα-グルタミルアミノ酸を得た。

3) α-グルタミニルペプチド

カルボベンゾキシα-グルタミル・アミノ酸γ-メチルエステルをアンモニア水中でカルボベンゾキシα-グルタミニルアミノ酸とし、接触還元を行った。

γ-L-グルタミル-L-グルタミン酸　m.p. 191-2°, $[\alpha]_D^{16}$ +6.8 (c, 1, 1N HCl)
$C_{10}H_{16}N_2O_7$ (276.26) 実測値 C 43.28 H 5.97 N 9.66
計算値 C 43.48 H 5.84 N 10.14

γ-L-グルタミル-L-グルタミン　m.p. 193-4°, $[\alpha]_D^{16}$ +9.8 (c, 1, 1N HCl)
$C_{10}H_{17}N_3O_6$ (275.29) 実測値 C 43.50 H 6.57 N 15.03
計算値 C 42.90 H 6.22 N 15.64

γ-L-グルタミルグリシン　m.p. 192-25°, $[\alpha]_D^{24}$ +8.0 (c, 2 H_2O)
$C_7H_{12}N_2O_5$ (204.18) 実測値 C 40.80 H 6.11 N 13.62
計算値 C 41.17 H 5.92 N 13.72

α-L-グルタミルグリシン　m.p. 176-7.5°
実測値 C 40.84 H 5.97 N 13.42
計算値 C 41.17 H 5.92 N 13.72

α-L-グルタミル-L-グルタミン酸は大阪大学理学部金子研究室芝氏にいただいた。

〔実験〕

アミノ化合物分画の調製　つぎの操作を3回くりかえし計28.5 kg，75ヶの牛

脳を処理した。

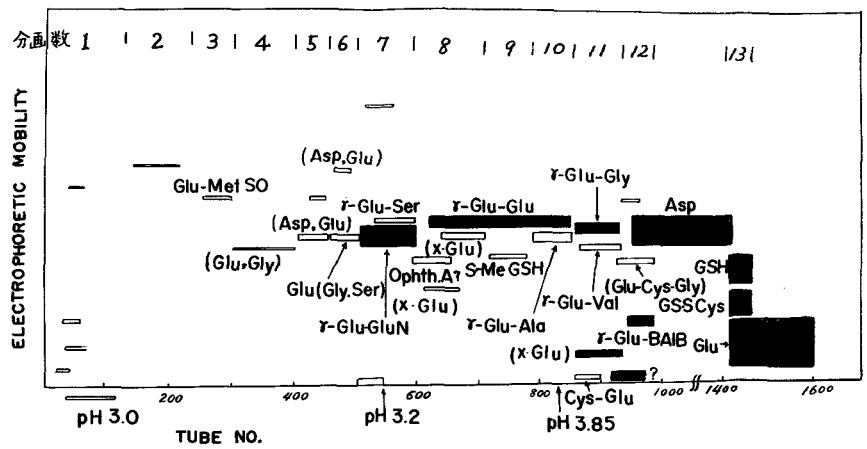
死後1～3時間(冬期)の牛脳8～10kgを至約1cmの少片とし、脳の半量(V/W)の20%トリクロール酢酸にひたし実験室に持ち帰った。脳の半量の水を加えホモジネートとし、さらにホモジネートと等量の5%トリクロール酢酸を加え撹拌後、遠沈上清を得た。上清をセライトを用いて沪過、沪液を2等分し、それぞれを6.5×50cmのAmberlite IR-120, X8(100～200メッシュ)H型のカラムに通した。レジンを4ℓの水で洗い、吸着されたアミノ化合物を4Nアンモニアーエタノール(1:1)で溶出した。溶出液を減圧濃縮し約100mℓとし、酢酸を加えpH 4.5とし一夜冷蔵庫に保存、沈殿物を沪別、沪液を－20°で保存した。

酸性アミノ化合物分画の調製　上記の濃縮溶出液を3分しそれぞれを6×42cmのDowex 1, X8(100～200メッシュ)酢酸型のカラムに通し、ついでレジンを1.3ℓの水で洗った。吸着された化合物は2N酢酸で溶出し、0.9から2ℓの溶出液を集めて減圧乾固した。

酸性アミノ化合物のイオン交換クロマトグラフィーによる精製

酸性アミノ化合物の全分画を2等分し、それぞれを5.3×13.7cmのAmberlite IR-120, X8(200×400メッシュ)のカラム上でイオン交換クロマトグラフィーを行った。レジンは前もってピリジン-酢酸-水(1, 40, 3200)pH 3.0の緩衝液で平衡化し、溶出液としては最初は同じ緩衝液を用い、8ℓ目からピリジン-酢酸-水(1, 12, 990), 11.8ℓ目からピリジン-酢酸-水(5, 24, 1975), 16ℓ目からピリジン-酢酸-水(1, 1, 80　)の緩衝液で溶出した。溶出液は16mℓづつ集め、80mℓごとに0.5mℓをとり減圧乾固し、その1/5を高圧沪紙電気泳動にかけ、その分画にふくまれるアミノ化合物をニンヒドリン反応で検出した。高圧沪紙電気泳動は、ピリジン-酢酸-水(1:10:190)pH 3.4の緩衝液で、100ボルト/cmの電位差で30分行った。イオン交換クロマトグラフィーからの溶出液量を横軸に、電気泳動における移動距離を縦軸にとると図1のようなパターンが得られる。同じ物質をふくむ溶出液をあわせて図に示すように13分画とした。

図1

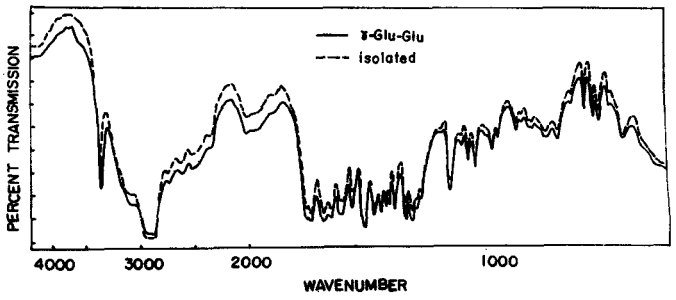


γ-L-グルタミル-L-グルタミン酸

精製　第8,9,10分画を,それぞれDowex 1のカラム上で，ピリジン酢酸緩衝液ついで2N酢酸を溶出液とするイオン交換クロマトグラフィーによって精製し、目的の物質をふくむ分画をあわせ減圧乾固し、結晶状の残渣を水エタノールから結晶させた。再結晶後，針状結晶101.5 mg，m.p. 191～2°，$[\alpha]_D^{16}$ + 6.6 (c, 1, 1N HCl) を得た。　$C_{10}H_{16}N_2O_7$　実測値　C 43.13　H 5.97　N 10.35
計算値　C 43.48　H 5.84　N 10.14

同定　酸加水分解（6N HCl，105°，16時間）でグルタミン酸2モルを生ずる。分離化合物のジニトロフェノール（DNP）誘導体は酸加水分解で各1モルのDNPグルタミン酸とグルタミン酸を生ずるので、分離化合物はαあるいはγグルタミールグルタミン酸と推定された。元素分析値は推定構造のそれを与える。沪紙電気泳動および沪紙クロマトグラフィー，および赤外吸収スペクトル(図2)の結果から分離化合物はγグルタミルグルタミン酸であり、旋光度測定の結果からγ-L-グルタミル-L-グルタミン酸と同定された。Beckman/Spincoモデル120アミノ酸分析器で，Amberlite CG120，0.2Mクエン酸緩衝液pH3.25，30°で合成品および分離化合物は共に124 mlにピークを示す。

図2

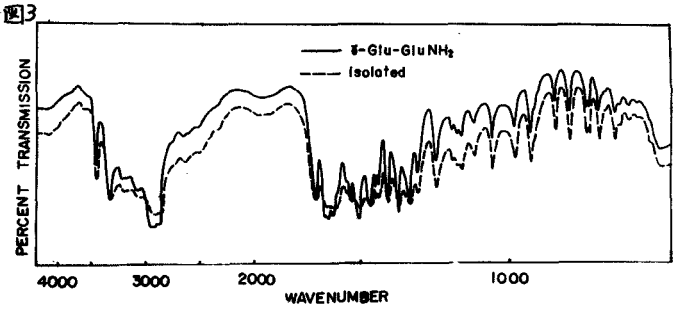


γ-L-グルタミル-L-グルタミン

精製　第7分画を上と同様に精製し、水エタノールから再結晶を2回くりかえし針状結晶123.1 mg，m.p. 191-2°を得た。$[\alpha]_D^{16}$ +11.0 (c, 1, 1N HCl)
$C_{10}H_{16}N_2O_7$　実測値　C 43.00　H 6.39　N 15.28
計算値　C 42.90　H 6.22　N 15.64

同定　酸加水分解でグルタミン酸2モルおよびアンモニアを生ずる。DNP誘導体の酸加水分解はそれぞれ1モルのDNPグルタミン酸とグルタミン酸とを与える。0.1N塩酸中で100°2時間加熱するとγ-グルタミルグルタミン酸を生ずる。元素分析値と以上の分析結果とから分離化合物をγ-グルタミルグルタミンと推定した。そこでこの物質を合成し、高圧沪紙電気泳動，沪紙クロマトグラフィーにおける性質，赤外吸収スペクトル(図3)および旋光度を分離化合物と比較した結果その推定構造の正しいことを確かめた。上記のアミノ酸分析の条件で分離

図3



した化合物も合成品も共に106 mℓ にピークを示す。

γ-L-グルタミルグリシン

精製　沪11分画を先ずDowex 1, ピリジン-酢酸緩衝液で、ついで Dowex 50, x2, ピリジン-ギ酸緩衝液でイオン交換クロマトグラフィーを行って精製した。減圧濃縮後残渣を水エタノールから結晶させ針状結晶12.3 mg, m.p. 188～8.5° を得た。

$C_7H_{12}N_2O_5$　実測値　C 40.92　H 6.23　N 13.96
計算値　C 41.17　H 5.92　N 13.72

同定　酸加水分解でグルタミン酸およびグリシン各1モルを生ずる。DNP法でN末端はグルタミン酸と決定され、その立体配置はL型であることを、加水分解後グルタミン酸脱炭酸酵素によって決定した。これらの結果から分離した化合物はγあるいはγ-L-グルタミルグリシンであると推定した。これら2つの化合物を合成し、それらの沪紙クロマトグラフィおよび高圧沪紙電気泳動における性質および赤外吸収スペクトル(図4)を分離化合物と比較し、分離化合物をγ-L-グルタミルグリシンと同定した。

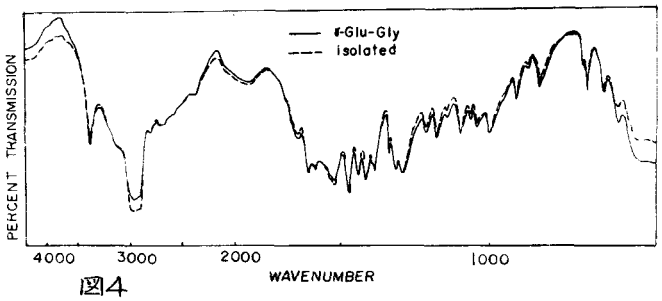


図4

〔考察〕

牛脳から3種のペプチドを分離したが、これらの自然界における存在は報告されていない。これらの化合物が分離操作中に生じた人工産物である可能性は1)操作中に蛋白質の加水分解を起す可能性はない, 2)蛋白質中にγ-グルタミル結合の存在は知られていない, 3)次報でのべるように蛋白質の構成アミノ酸以外のアミノ酸をふくむγ-グルタミルペプチドが存在することからほぼ否定出来る。実験に用いた牛脳は死後1～3時間を経過しており、死後の含量の変化は否定出来ない。またわれわれの分離した物質の他の組織中の存在についても今後検討を要する。

γ-グルタミルペプチドの合成に関与する酵素としては1)γ-グルタミルトランスペプチダーゼと2)グルタミン酸のγ-カルボキシ基の活性化酵素が知られている。これらの酵素が脳内に存在するか、あるいはわれわれの分離した化合物の生合成に関与しているか否かについては現在明らかではない。分解には上のγ-グルタミルトランスペプチダーゼやジペプチダーゼなどが関与すると考えられるが、今後研究する予定である。

〔綜括〕

牛脳28.5 kgからγ-L-グルタミル-L-グルタミン酸、γ-L-グルタミル-L-グルタミンおよびγ-L-グルタミルグリシンを結晶として分離し、酸加水分解およびN末端決定により構造を推定し、合成品と沪紙クロマトグラフィー、高圧沪紙電気泳動、イオン交換クロマトグラフィにおける性質、赤外吸収スペクトル、旋光度、融点、元素分析値を比較し同定した。

S-4 牛脳中の酸性ペプチド(III)

金沢 彰・柿本泰男・中島照夫・
武貞昌志・清水宏俊・宮本英七・
佐野 勇（阪大・医・精神）

前報に3種のγ-グルタミルペプチドの分離同定を報告した。これにひきつづき2種のγ-グルタミルペプチドを分離同定した。また4種を精製し、結晶としては分離できなかったがアミノ酸順列の決定および合成によって同定した。

〔実験材料〕

第1報と同様の方法で下記のペプチドを合成した。

1) γ-L-グルタミル-L-β-アミノイソ酪酸 m.p. 196-200°, $[\alpha]_D^{24}$ +24.6 (c, 1, H_2O)
$C_9H_{16}N_2O_5$ (232.24) 実測値 C 46.44 H 6.89 N 11.92
計算値 C 46.54 H 6.94 N 12.06

2) γ-L-グルタミル-D-β-アミノイソ酪酸 m.p. 206-212°, $[\alpha]_D^{24}$ -27.2 (c, 1, H_2O)
$C_9H_{16}N_2O_5$ (232.24) 実測値 C 46.29 H 6.90 N 12.16
計算値 C 46.54 H 6.94 N 12.06

3) α-L-グルタミル-D-β-アミノイソ酪酸
カルボベンゾキシ-α-L-グルタミル-D-β-アミノイソ酪酸の接触還元溶液を用いた。

4) γ-L-グルタミル-L-アラニン

5) γ-L-グルタミル-L-バリン
4), 5)はRowlandsら の方法で合成した。

6) γ-L-グルタミル-L-セリン m.p. 175-180°, $[\alpha]_D^{25}$ +8.8 (c, 1, H_2O)
$C_8H_{14}N_2O_6$ (234.21) 実測値 C 40.95 H 6.10 N 11.65
計算値 C 41.02 H 6.02 N 11.96

7) α-L-グルタミル-L-セリン m.p. 171-172°, $[\alpha]_D^{25}$ +29.25 (c, 1, H_2O)
$C_8H_{14}N_2O_6$ (234.21) 実測値 C 41.51 H 6.09 N 11.74
計算値 C 41.02 H 6.02 N 11.96

8) α-L-グルタミニル-L-セリン m.p. 171-172°, $[\alpha]_D^{25}$ +5.8 (c, 1, H_2O)
$C_8H_{15}N_3O_5$ (233.22) 実測値 C 40.82 H 6.58 N 17.41
計算値 C 41.63 H 6.48 N 18.02

9) S-メチルグルタチオンはグルタチオンをジメチル硫酸でメチル化して得た。
m.p. 194-195°, $[\alpha]_D^{25}$ -26.12 (c, 1, H_2O)
$C_{11}H_{17}O_6N_3S$ (319.34) 実測値 C 41.62 H 6.05 N 12.95
計算値 C 41.06 H 5.37 N 13.46

〔実験〕

第1報にのべたように酸性アミノ化合物分画をイオン交換クロマトグラフィーによって13の分画にわけた。そのうち数コの分画を精製し同定を行った。

1) γ-L-グルタミル-L-β-アミノイソ酪酸

精製 第12分画をDowex 1×10, ピリジン酢酸緩衝液ついでDowex 50×2, ピリジン酢

酸緩衝液を用いてイオン交換クロマトグラフィーを行って精製し、炭末で処理したのち，水-アセトンより結晶させ，4.7mgの結晶，m.p. 192-197°を得た。

$C_9H_{16}N_2O_5$

実測値 C 44.29　H 7.34

計算値 C 46.54　H 6.95

同定　酸加水分解によりグルタミン酸とβ-アミノイソ酪酸を得た。N末端はグルタミン酸で、グルタミン酸は酵素的にL型と決定した。尿中に存在するβ-アミノイソ酪酸はD型であるのでα-およびγ-L-グルタミル-D-β-アミノイソ酪酸を合成したところ、前者は沪紙クロマトグラフィー，沪紙電気泳動で分離物質と性質を異にし，後者は分離物質と一致した。しかし赤外スペクトルは図1のように異なっていた。融点や溶解度も異なっていた。そこでγ-L-グルタミル-L-β-アミノイソ酪酸を合成したところ、上述のいずれの性質も分離化合物と一致した。赤外スペクトルは図2に示した。なおγ-L-グルタミル-L-β-アミノイソ酪酸，γ-L-グルタミル-D-β-アミノイソ酪酸および分離化合物は，いずれも才1報でのべた条件のアミノ酸自動分析器で，127mlにピークを示す。

図1

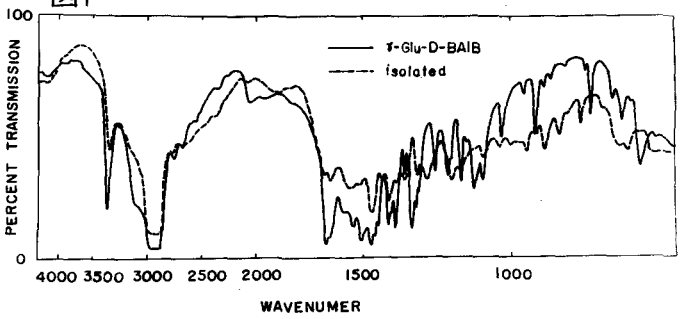
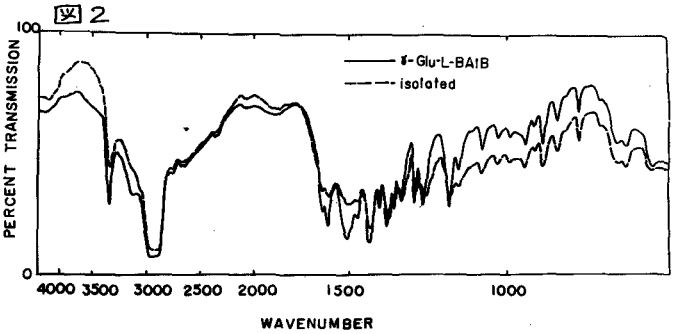


図2



2）γ-グルタミルアラニン

精製　才10分画を上述の化合物と同様の方法で精製し、沪紙電気泳動，沪紙クロマトグラフィー上でニンヒドリン反応により、単一の発色斑を示す溶液を得たが結晶化しえなかった。

同定　溶液の一部を酸加水分解に用い，グルタミン酸とアラニンとを検出し、前者がN末端であることをDNP法で決定した。著者らの経験によれば，電気泳動でγ-グルタミルペプチドはα-ペプチドよりも陽極側への移動距離が大である。この通則から分離した化合物をγ-グルタミルアラニンと推定，合成し，沪紙クロマトグラフィー，沪紙電気泳動により、精製した化合物をγ-グルタミルアラニンと同定した。

3）γ-グルタミルセリン

精製　才7分画をDowex 1×10，ピリジン-酢酸緩衝液を用いたイオン交換クロマトグラフィーで精製しニンヒドリン反応でしらべたかぎり，単一の化合物をふくむ分画を得た。

同定　酸加水分解、DNP法によりグルタミルセリンと考え，α-およびγ-L-グルタミル-L-セリンおよびα-L-グルタミル-L-セリンを合成し、沪紙クロマトグラフィー，沪

紙電気泳動の結果精製した化合物はγ-グルタミルセリンであると同定した。

4) γ-グルタミルバリン

γ-グルタミルアラニンと同じ方法で才11分画から精製し，同定した。

5) S-メチルグルタチオン

精製　才9分画をDowex 1×10，ピリジン-酢酸緩衝液を用いて精製し，ニンヒドリン反応で沪紙クロマトグラフィー，沪紙電気泳動上単一の発色斑を呈する溶液を得た。

同定　酸加水分解により等モルのグルタミン酸，S-メチルシステインおよびグリシンを生じ，N末端はDNP法でグルタミン酸，C末端はカルボキシペプチダーゼ法でグリシンと決定した。この成績から，精製した化合物はS-メチルグルタチオンであろうと予想し，この化合物を合成し，沪紙クロマトグラフィー，沪紙電気泳動上の性質から推定構造を確認した。

6) S-システイニルグルタチオン

精製　才13分画は大量のグルタミン酸，アスパラギン酸，グルタチオンとこの物質を含み，Dowex 50×2，ピリジン-ギ酸緩衝液によるイオン交換クロマトグラフィーでまずグルタミン酸，アスパラギン酸をのぞき，Dowex 1×10，ピリジン-酢酸緩衝液によるイオン交換クロマトグラフィーでグルタチオンをのぞき，最後にDowex 50×2，ピリジン-ギ酸緩衝液によるイオン交換クロマトグラフィーで精製した。減圧乾固すると水に比較的難溶性の結晶を生じ，再結晶により226.5 mg.　m.p. 226.5~228°　の結晶を得た。

$C_{13}H_{22}N_4O_8S_2$	実測値	C 36.63	H 5.42	N 13.59	S 14.91
	計算値	C 36.61	H 5.20	N 13.14	S 15.04

同定　過ギ酸々化後酸加水分解を行うと，グルタミン酸，グリシン各1モル，システイン酸2モルを生ずる。N末端はグルタミン酸，C末端はグリシンであった。分離化合物の過ギ酸々化物は，システイン酸およびグルタチオンスルフォン酸からなることを沪紙クロマトグラフィー，沪紙電気泳動で見出したので，分離化合物はS-システイニルグルタチオンと推定した。分離化合物は才1報の条件のアミノ酸自動分析器で263 mlにピークを示し，それは等モルのグルタチオンとシステインとの空気酸化物と同じ溶出パターンを示す。

〔考察〕

この実験で同定された化合物のうち，γ-グルタミルアラニンおよびγ-グルタミルバリンは植物中に，さらに後者は人尿中に存在が知られている。γ-グルタミル-β-アミノイソ酪酸はアヤメ科植物の球根中に見出された。その立体配置は決定されなかったが著者らの合成実験の結果と比較すると，球根のはγ-L-グルタミル-D-β-アミノイソ酪酸であり，著者らの脳から分離した物質とは異なる。S-システイニルグルタチオンは，おそらくは分離操作中にグルタチオンおよびシステインとから形成された人工産物であろう。

著者らが得た脳からのペプチドの脳内濃度を結晶として得た量や，既知量の合成品と沪紙クロマトグラム上で比較して得た量から計算すると表1のようになる。ペプチドの量は大体，遊離アミノ酸量と平行しているが，注目に値するのは，1) γ-グルタミル-β-アミノイソ酪酸の含量が遊離アミノ酸量にくらべて多いこと，2) アスパラギ

ン酸，γ-アミノ酪酸の脳内含量が高いにもかゝわらず，これらを含くむγ-グルタミルペプチドが見出されないこと，また3）尿中にはβ-アスパラチルペプチドが数多く，γ-グルタミルペプチドが少ないのに反し，脳内にβ-アスパラチルペプチドがほとんど見出されなかったことである。

表1

Peptides	Concentration ug/g tissue	Amino Acid	Concentration ug/g tissue
γ-Glu-Glu	7 – 10	Glu	800 – 1300
γ-Glu-GluNH_2	7 – 10	GluNH_2	500 – 700
γ-Glu-Gly	0.7 – 1	Gly	100 – 200
γ-Glu-BAIB	0.3 – 0.4	BAIB	1 – 2
γ-Glu-Ser	0.2 – 0.4	Ser	100 – 200
γ-Glu-Ala	0.5 – 1	Ala	100 – 200
γ-Glu-Val	0.1 – 0.2	Val	50 – 100
GS-SMe	0.1 – 0.2	GSH	200 – 500
GS-SCy	15 – 20	CyS	40 – 100

γ-グルタミルペプチドの脳内含量は遊離のアミノ酸にくらべて低濃度ではあるが，かなり広範囲の種類のアミノ酸がγ-グルタミルペプチドの形で存在することは，γ-グルタミル転移酵素によってγ-グルタミル残基が非特異的に種々のアミノ酸に転移される事実と符号し，各アミノ酸の量的平衡を保つのに役立つ可能性を示唆するものである。その他，γ-グルタミルペプチドの存在意義については種々の可能性が考えられるが，今後の研究にまたねばならない。

脳から分離したペプチド中のβ-アミノイソ酪酸の立体配置がL型であることは，人尿中から分離された同アミノ酸がD型であることと対比して興味がある。このアミノ酸の排泄は遺伝的に常染色体性劣性遺伝子によって規定され，その遺伝子の存在頻度が人種的に異なることから，人類の遺伝生化学の重要な研究課題である。このアミノ酸の排泄を規定するのは腎細尿管における再吸収の機構ではなく，体内におけるこのアミノ酸の分解酵素の活性であろうことは最近明らかとなったが，このアミノ酸はチミンの分解産物であるとされながらその代謝経路が未だ明らかにされていない。また著者らは死後十数時間の人肝より，β-アミノイソ酪酸を分離したところD型であった。以上の結果から，チミンの代謝により生ずるβ-アミノイソ酪酸がD型かL型か，このアミノ酸が尿中に排泄される前に立体配置の転換がおこるのか，γ-グルタミルペプチドへのとりこみの際にD型からL型に変わるのか等，興味ある問題が多い。

〔綜括〕

牛脳28.5kgからγ-L-グルタミル-L-β-アミノイソ酪酸，S-システイニルグルタチオンを結晶として分離し，γ-グルタミルアラニン，γ-グルタミルセリン，γ-グルタミルバリンおよびS-メチルグルタチオンを精製し，酸加水分解，N末端およびC末端決定により構造を推定し，合成品と沪紙クロマトグラフィー，高圧沪紙電気泳動を比較し，さらに結晶として分離した化合物についてはイオン交換クロマトグラフィーにおける性質，赤外吸収スペクトル，融点，溶解度，元素分析値を比較して同定した。

S-5 L－チロシン水酸化酵素

－脳および交感神経分布臓器に特異なカテコールアミン生合成酵素

永津俊治 National Heart Inst. Clin Biochem;
名大・医・生化

一　般　演　題

ドーパー脱炭酸酵素の発見（1939）(1)以来，カテコールアミンの生合成は，チロシン→ドーパー→ドーパミン→ノルアドレナリン→アドレナリンの経路によることが仮定された。後年のアイソトープによる研究（7，9）はこの生合成経路の存在を確証した。一方，1960年ドーパミン－β－水酸化酵素が発見されたが(2)，第一段階のチロシンよりドーパーの生成に関与する酵素は未発見であつた。メラニンを生成するチロシナーゼの関与，あるいは，この反応はin vitroで非酵素的に起りうること(8)から，in vivoでも非酵素的反応の存在も推定されていた。

著者らはUdenfriendの研究室（NIH）でこの酵素の解明を意図して研究をすすめ脳，副腎，交感神経分布臓器にL－チロシンよりL－ドーパーの生合成に特異的に関与するチロシン水酸化酵素と名ずけられるべき新しい酵素の存在することを発見した（3，4，5）。この酵素は補酵素としてテトラヒドロプテリジンを必要とする。この酵素の哺乳動物での臓器分布はカテコールアミンの分布と一致する。

1. 実　験　方　法

この酵素は活性が低いのでアイソトープ測定法が必要であつた。(1) L－チロシン－^{14}C またはL－チロシン－^{3}H を基質に用い生成したドーパーをアルミナカラムで分離して液体シンチレーションスペクトロメーターで測定する方法，(2) L－チロシン－3，5－^{3}H を基質として生成したTHOをDowex－50－H^{+}カラムで分離して定量する方法(6)，の2つの方法を用いた。哺乳動物臓器にはドーパー脱炭酸酵素が広く分布しているので，ドーパーのドーパミンへの移行を防ぐためドーパー脱炭酸酵素の阻害剤を加えた。生成したドーパーの同定は，ペーパークロマトグラフィー，高圧沪紙電気泳動，アルミナカラム，IRC－50カラム，Dowex－50カラム，ドーパーの螢光反応による螢光スペクトルなどの各種の方法を併用した。ドーパー脱炭酸酵素の阻害剤なしでは生成したドーパーはドーパミンに移行する。このことは生成したドーパーはL型であることを証明する。

従来この酵素の発見を困難にしていた今1つの理由として，組織切片，ホモジェネートなどの粗酵素標品では加熱失活せしめた標品をブランクにとると容易に非酵素的反応が起ることがあげられる。著者らは酵素反応のみを測定するため，ブランクにはD－チロミン－^{14}C を基質として用いた。例えば正常の副腎，脾臓の組織切片ではL－チロシンのみよりドーパーが生成されるが，加熱した切片ではL－およびD－チロシンよりほとんど同じ量のドーパー生成がみられ，ブランク直が高くなる。このことは加熱した標品は適当なブランクではないことを示す。

2. 酵素の臓器分布

本酵素の臓器分布はカテコールアミンの分布と密接に一致し，このことは本酵素がカテコールアミンの生合成に極めて重要な役割をなしていることを示す。副腎髄質は最も活性が高いが，皮質には活性は認められない。脳は副腎髄質についで活性が高く脳内活性分布は尾状核，視床下部，視床，中脳，延髄，大脳皮質，小脳の順

であり，カテコールアミンの高度に分布する線条体脳幹部に活性が集中的に存在する。副腎髄質，脳の他にも，心臓，脾臓などの交感神経分布臓器にも酵素が存在する。人間の Pheochromocytoma にも本酵素の高い活性が認められた。

3. 酵素の細胞内分布

初期の補酵素を加えない実験条件では，脳の細胞内酵素分布は，15000Gでおちる粒子分画に活性が分布し，15000Gの上清には全く活性がなかつた。さらにこの 15000G粒子分画を Sucrose gradient で分画すると活性はミトコンドリア分画に認められた(4)。しかしその後補酵素としてテトラヒドロプテリジンの関与が明らかになり，これを加えると酵素活性が著しく増大し，細胞内活性分布が異なつてくることが発見されたので，細胞内の定量的分布は現在さらに研究中である。これに反して副腎髄質では補酵素を添加しない場合でも約60％は20000Gでおちる粒子に存在し，約40％は105000G遠沈の上清に認められた。高速遠沈の上清に活性の存在することは可溶性の酵素の存在を示しその後の精製を可能にした。副腎髄質のhomogenization を Waring blenderで強く行なうと活性は高速遠沈の上清に移行することから粒子に結合した酵素が可溶化されたものであることがわかる。

4. 酵素の性状

牛の副腎髄質を Waring blender でホモジエネートとし，105000G 60分遠沈した上清より出発して可溶性の酵素を精製することに成功した。第1回の硫安分画で活性は失われるが mercaptoethanol の添加によりやゝ恢復する。このことは還元型の補酵素の開与を示す。そこで種々の物質を検討した結果 2 － amino － 4 －hydroxy － 6，7 － dimethyl tetrahydropteridine($DMPH_4$)，tetrahydrofolate(THF) などのテトラヒドロプリテリジンが補酵素として働くことを発見した。アスコルビン酸，グルタチオン，2，6－ジクロロフエノールインドフエノールなどの他の還元物質は無効であつた。このことはフエールアラニン水酸化酵素の場合と類似であり，天然の補酵素も類似構造のテトラヒドロプテリジンであり，$DMPH_4$ やTHFは単に天然補酵素の代理をしていると考えられる。しかし一方 $DMPH_4$ やTHFが酵素に結合した未知の補酵素を還元して活性化する可能性も残つており，このメカニズムの解明には高度の酵素精製が必要である。脳の粒子の酵素活性は α，α'－dipyridyl で抑制されることから Fe^{+2} の関与が推定されたが(3)，THF を補酵素とした場合 Fe^{+2} は著明に酵素活性を増大する。$DMPH_4$ を補酵素とした場合活性増大は著明ではない。硫安分画した標品は補酵素に完全に dependent である。無酸素条件下では反応は全くすゝまないが，100％酸素下では反応は低下する。基質はL－チロシンに全く特異的であつてD－チロシン，m－チロシン，チラミン，トリプトファンなどは全く基質とならない。現在までのところTHF を補酵素とした場合比活性の増大は約2000倍まで精製されたが，これは内在性阻害物質の精製過程での除去にもよるので正確な精製度ではない。

5. 阻害剤

フエニールアラニン，トリプトファンなどの天然に存在するL－アミノ酸およびその誘導体は阻害作用を示す。L型のみ阻害剤として活性でD型は阻害しない。臨床上とくに興味のあることは，L－フエニールアラニンが阻害することである。フエニールケトヌリアの場合フエーニールアラニンは血中濃度 $1 \sim 3 \times 10^{-3}$ M にも

達し，チロシン（1×10^{-4}M）よりはるかに高くなる。in vitro ではこの条件で脳の粒子の酵素標品では８０％の阻害が認められた。従つて in vivo でもフエニールケトヌリアではチロシン水酸化酸素はフエニールアラニンで著明に阻害されることが推定され，従つてカテコールアミシの生合成の阻害が考えられる。これがフエニールケトヌリアの症状形成の一因子であるかは興味ある問題である。

Ｌ－チロシンの種々の誘導体は強力な阻害剤となりうる。阻害様式はＬ－チロシンに対して拮抗的である。Ｌ－α－メチルチロシンはその１つであるが，最近Ｌ－α－メチルチロシン－^{3}H を用いてこのものは基質となりうることを発見した。その反応速度はＬ－チロシンと比べて極めておそい。

種々のカテコール体も阻害するがノルアドレナリンは強力な阻害作用をもつ。ノルアドレナリンが阻害することは，ノルアドレナリンの生合成の最終生成物が第１段階の酵素を阻害することになり，もしこのチロシン水酸化酵素の段階が律速段階であれば，ノルアドレナリン生合成に Feed back mechanism が働いていることを示す。チロシン水酸化酸素の酵素活性はドーパー脱炭酸酵素，ドーパミン－β－水酸化酵素と比べて極めて低く，ノルアドレナリン生合成の律速段階であると考えられる。精製酵素の Km -値を比べるとチロシン水素化酵素10^{-5}M に対してドーパー脱炭酸酵素5×10^{-4}M，ドーパミン－β－水酸化酵素10^{-8}M であり，チロシン水酸化酵素は常に最大速度で働いていることを示す。

チロシン，ドーパーは共に血液脳関門を通過するが，ドーパミン，ノルアドレナリンは通過しがたい。他方血中にはドーパーは存在しないので，脳内のドーパミン，ノルアドレナリンの生合成は血中のチロシンが脳内に移行し，脳内のチロシン水酸化酵素によつてドーパーをへてドーパミンよりノルアドレナリンとなるものと考えられる。

本研究は著者が米国 Public Health Service International Fellow として Dr. Sidney Udenfriend の研究室で協同研究したものであつて，こゝに Dr. Udenfriend に深く感謝の意を表します。

文　献

(1) Holtz,P., Naturwissenschaften,27,724(1939).

(2) Levin,E.Y., Lovenberg,B.,and Kaufman,S., J.Biol.Chem., 235, 2080(1960).

(3) Nagatsu,T., Levitt,M.,and Udenfriend,S., Biochem, Biopys.Research Commun. 14, 543 (1964).

(4) Nagatsu,T., Levitt,M., and Udenfriend,S., Fed. Proc. 23, 480(1964).

(5) Nagatsu,T., Levitt,M., and Udenfriond,S., J. Biol.Chem., in press.

(6) Nagatsu,T., Levitt,M., and Udenfriond,S., Anal. Biochem., in press.

(7) Udenfriend,S., Cooper,J.R., Clark,C.T., and Beer,J.E., Science, 117,663(1953).

(8) Udenfriend,S., Clark,C.T., Axelrod,J., and Brodie,B.B., J.Biol.Chem., 208,731 (1954).

(9) Udenfriend,S., and Wyngarden,J.B., Biochim.et Biophys. Acta 20, 48(1956).

10 肝臓酵素の活性調節と視床下部(II)
特にその神経性機構の解析について

嶋津　孝・藤本孝知・
福田　葵（阪大・医・三解剖）

高等動物の代謝調節を考える上で、下等生物には見られない一つの特徴は、脳神経系並びに内分泌系による調節機構が存在することにあるといえる。1960年以来、私共は最高の自律中枢である視床下部が肝臓酵素の活性調節に際して、どのような役割を果しているかについて研究してきた（1～7）。この研究過程において、tryptophan pyrrolase（2，4，5）、tyrosine transaminase（6）、alanine transaminase（6）などの肝酵素系は既知の内分泌ホルモンの関与を除外した後においても、視床下部の影響下に活性変動をもたらすことを見出してきた。更に、DAB-demethylase、aniline 4-hydroxylase、acetanilide 4-hydroxylase のような肝酵素系はメチルコラントレンの作用を仲介として、視床下部の支配下にあることが示唆される（3）。これに反し、serine dehydrase、glutamine synthetase、xanthin oxidase、ornithine carbamyltransferase などの諸酵素は視床下部の影響を受けにくいもののようである（6）。これらの成績の一部は既に、第5回及び第6回神経化学懇話会において発表したところである。

このように従来の私共の研究から、肝臓酵素の中には、その活性消長が視床下部自律中枢の影響下にある一群の酵素系が存在することが明らかである。自律神経系の最高位にある視床下部と遠くはなれた肝臓内の酵素との間に、一應の対応関係が成立するわけであるけれども、視床下部からの影響が肝臓に至る道筋についての解析が残された一つの課題として提起されると思う。視床下部よりの影響は常識的には、自律神経線維を通して、末梢の臓器にまで伝達されるものと想像されるけれども、視床下部は他面、神経分泌という特殊な機能を持っており、ホルモン性物質産生の場でもある。従って、視床下部から分泌される未知のホルモン性因子（humoral factor）が上記の肝酵素活性の調節に関与している可能性も考えられる。これらの点について、現在までに得られた知見を以下に報告することとしたい。

視床下部の影響がhumoral factorによるものであるかどうかを調べるためには、妊娠動物を使用した。妊娠動物の母体と胎児との間には、体液の交流はあるけれども神経性の連絡はない。従って、humoral factorによってひき起される変化ならば、母体肝のみならず胎児肝にも影響が現れるはずである。

他方、視床下部の影響が神経性機構（neural factor）にもとずくものであるかどうかを調べるためには、末梢自律神経（内臓神経）の刺激を行った。

これら両面の実験結果から、視床下部による肝酵素の活性調節は体液性（humoral）機構に基ずくと考えるよりは、むしろ、神経性機構によるものであることを推論したい。

実験方法

◎妊娠家兎を用いた実験 —— 体重2.0～2.5 Kg の♀家兎を人工的に発情させたものを交尾させ、妊娠27～28日目に実験に用いた。視床下部刺激実験では、交尾後27～28日目に妊娠母体の視床下部交感性中枢（腹内側視床下核）又は副交感性中

核（外側視床下核）に電極を挿入し、既に報告した方法（４，５）によって、４分間隔で２０秒宛の電気刺激を１８～２０時間に亘って繰返した。刺激終了後は動物を殺し、母体肝並びに胎児肝をとり出し、直ちに酵素活性の測定を行った。本実験で示標として用いた酵素はtryptophan pyrrolase 及びtyrosine transaminase の２種類で、活性定量法は前報の通りである（４～６）。tryptophan pyrrolase は肝ホモジェネートを用いて測定し、tyrosine transaminaseはホモジェネートを１２０００×g、１０分間、遠心した上清部分を用いて定量した。

トリプトファン又はコーチゾン注射の実験では、妊娠２７～２８日目の家兎の母体腹腔内に夫々、注射を行った。トリプトファンの注射量は１００ mg/Kg とし、コーチゾンの注射はプレドニンを以って代用し、投与量は１０ mg/Kg とした。予め行った基礎実験によると、tryptophan pyrrolase の活性が最も高くなるのは、トリプトファン注射の場合には注射後８～１０時間目であり、プレドニン注射の場合には１３～１７時間目であるので、この時間で動物を殺して酵素活性の定量を行った。胎児肝は同一母体から由来するものは原則として、一まとめにして酵素定量に供した。

◎ 腹部交感神経（内臓神経）刺激実験 ―― 左側内臓神経を横隔膜直下で遊離し、これに私共の考案した小型のプラスチック板に取り付けた白金電極を埋没する。即ち、白金電極露出部に交感神経をのせ、上からプラスチック小片でおさえ、歯科用ワックスで包み周囲への漏電を防ぐ。電極からの導線はビニールチューブにて絶縁し、側腹部から腹腔外に取り出し、皮下に固定する。手術の影響を除くために術後１週間経過してから導線を通して、視床下部刺激と同様の方法にて電気的刺激を行った。対照動物としては開腹によって内臓神経を分離後、再び腹壁を閉じ、術後１週間経過したものを用いた。

実験結果並びに考察

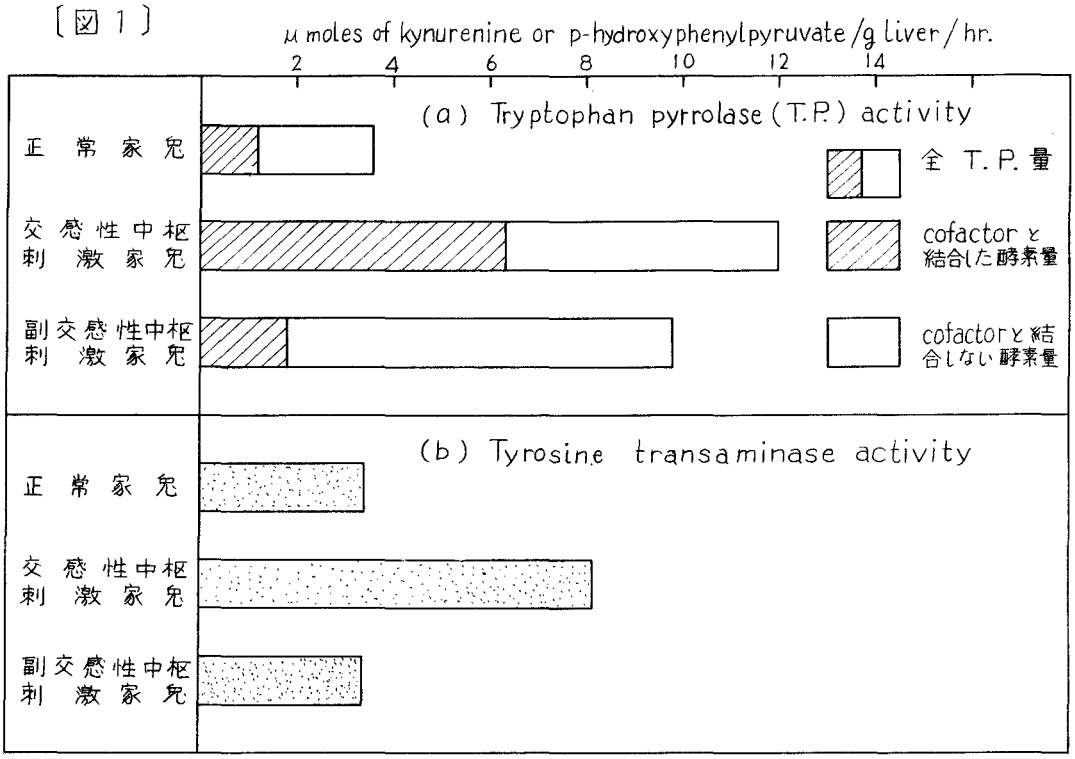
視床下部の電気刺激によって活性上昇をきたす肝酵素のうち本実験ではtryptophan pyrrolase 及びtyrosine transaminase の両酵素を取り上げた。既に報告してきたように、tryptophan pyrrolase は視床下部交感性中枢或いは副交感性中枢の電気刺激によって著明な活性上昇をひき起す。その際、図１（a）に示すように、交感性中枢刺激では増加した全酵素蛋白量のうち、約半分がcofactorと結合しているのに対し、副交感性中枢刺激では増量した全酵素蛋白量の僅か 1/5 が cofactorと結合しているに過ぎない結果を得ている。更に、交感性中枢又は副交感性中枢刺激後の本酵素の活性上昇は、副腎摘除動物においても認められることから、本酵素の活性誘導（enzyme induction）には

① トリプトファン注射による基質性誘導（Knox，１９５１）
② コーチゾン注射によるホルモン性誘導（Knox，１９５１）　及び
③ 交感性中枢（腹内側視床下核）の刺激による酵素誘導（Shimazu，1962）
④ 副交感性中枢（外側視床下核）の刺激による酵素誘導（Shimazu，1962）

の４因子が関与していることを示唆してきた（２，４，５，７）。

一方、tyrosine transaminase も視床下部の電気刺激によって活性上昇が認められるが、図１（b）に示すように交感性中枢刺激時には約２倍強の活性誘導が起るのに対し、副交感性中枢刺激では影響が認められない。従って、この酵素の活性誘導に

〔図1〕



は ① コーチゾン（Lin and Knox, 1957）
② 交感性中枢（Shimazu, 1963）
の2因子が関与していることを報告した（6, 7）。
妊娠末期家兎の母体肝並びに胎児肝におけるこれら両酵素に対する上記 inducer の影響を検討すると表1、表2の如くなる。

〔表1〕妊娠家兎母体肝及び家兎胎児肝の tryptophan pyrrolase 活性に及ぼす inducer の効果。

Inducer	未処置	トリプトファン注射	コーチゾン注射	交感性中枢刺激	副交感性中枢刺激
正常家兎肝	1.2 ± 0.3	3.6 ± 1.7	3.0 ± 0.7	9.7 ± 2.1	6.5 ± 0.7
妊娠家兎母体肝	0.8 ± 0.3	1.6 ± 0.9	1.3 ± 0.4	4.4 ± 2.2	3.1 ± 1.6
家兎胎児肝	0.16 ± 0.06	0.17 ± 0.07	0.18 ± 0.07	0.18 ± 0.07	0.14 ± 0.04

各実験群共5～11例の平均値で示す。酵素活性は μmoles of kynurenine / g. liver / hr. で表した。

まず tryptophan pyrrolase について眺めると、本酵素の活性は妊娠母体肝では正常

動物肝に比して若干低く、且つ、トリプトファン注射、コーチゾン注射、交感性中枢或いは副交感性中枢刺激などの inducer に反応して起る酵素誘導の程度も著明に低下していることが判る。これは妊娠によって、母体の酵素合成能が低下していることを示すもので、酵素合成に必要なアミノ酸素材が胎児側にひっぱられることが原因の一つではないかと思われる。担癌動物肝においても、本酵素の誘導が低下している事実(8)を思い起すと、妊娠状態と担癌状態との間には類似した一面があることを想像させる。一方、胎児肝の本酵素活性は極めて低く、4種の inducer を母体に与えても胎児肝酵素は全く response を示さない。特に、コーチゾン或いはトリプトファンのような humoral inducer によっても胎児肝 tryptophan pyrrolase の活性誘導は認められないのであって、この実験のみから視床下部刺激の影響が humoral factor によって仲介されるかどうかを決定することは出来ない。とまれ、胎児肝 tryptophan pyrrolase の誘導が全く起り得ないことは、胎児肝における本酵素蛋白の生成機構が正常に働いていないことを想像させる。

次に、tyrosine transaminase について検討すると(表2)、本酵素も tryptophan pyrrolase と同様に、胎児肝での活性は低い値を示している。交感性中枢刺激では、妊娠母体肝酵素は著明な活性上昇をきたすにも拘らず、胎児肝酵素は全く影響を受けていない。これに反し、コーチゾン投与は母体肝酵素のみならず胎児肝酵素に対しても、著明な活性誘導をひきおこす。即ち、コーチゾンのような humoral inducer ならば、胎児肝 tyrosine transaminase は母体肝酵素と同様に、その影響を受けることを示しており、交感性中枢刺激の影響が humoral factor によるものであるならば、母体肝及び胎児肝の両方に影響が現れてよいはずである。つまり、この実験結果は視床下部の電気刺激による肝酵素誘導が、humoral factor に基ずくとは考えにくい事を暗示している。

〔表2〕妊娠母体肝及び胎児肝の tyrosine transaminase 活性に及ぼす inducer の効果。

	未処置	コーチゾン注射	交感性中枢刺激
妊娠母体肝	3.8 ± 1.0	15.7 ± 0.9	11.5
家兎胎児肝	0.9 ± 0.1	1.9 ± 0.3	0.9 ± 0.1

そこで、家兎の末梢自律神経を刺激してみた。肝臓に交感神経線維を送っている内臓神経を横隔膜直下で露出し、既述の方法で電気刺激を与えた。表3に示すように、対照として sham-operation を行った家兎の肝 tryptophan pyrrolase 活性は術後1週間目には正常動物とほゞ同じ値を示している。これに対し、内臓神経刺激家兎の本酵素活性は対照値に比して約4倍の上昇を示した。

〔表3〕家兎肝 tryptophan pyrrolase 活性に及ぼす内臓神経刺激の影響。

対照家兎(sham-operated)	内臓神経刺激家兎
1.5 ± 0.4	6.4 ± 1.9

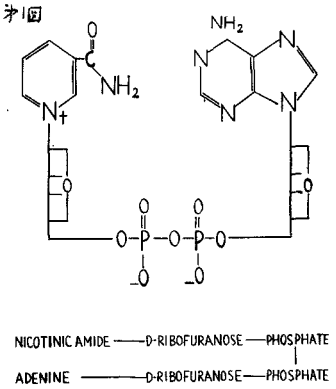
従って、上述の妊娠家兎を用いた実験並びに内臓神経刺激の実験から得られる知見は、自律中枢による肝臓酵素の活性調節が体液性機構に基ずくと考えるよりは、むしろ神経性機構によるものであることを示唆していると思われる。今後、parabiosis などの動物実験を通して、更にこの問題を解明してゆきたい。

文献 1) Shimazu,T., Proc.Symp.Chem.Physiol.Pathol.,1,126(1961); 2) Shimazu,T., Biochim.Biophys.Acta,65,373(1962); 3) Shimazu,T., Proc.Symp.Chem.Physiol.Pathol.,3,147(1963) 4) Shimazu,T., J.Biochem.,55,163(1964); 5) 嶋津 孝, 神経進歩, 7, 707 (1963); 6) 同前, 8(3), 134 (1964) 7) 嶋津 孝, 現代の生化学(下)(化学増刊号)(1964); 8) 嶋津 孝, 種の生化学(蛋白質酵素特集号)(1964)

11 マウスの部分脳におけるＮＡＤの確認とHydrazine 2HClの影響

斉藤章二・望月安雄・徳永友喜子
加倉井祥子・小島勝爾
（慶大・医・薬理）

Nicotinicamide Adenine Dinucleotide（NAD）は第一図に示すような構造をもち，生体内においてアルコールまたはアルデヒド脱水素酵素の補酵素として存し，水素伝達体としての役割をもっている（第1図）。ヒトの赤血球[7]，第1図マウスの肝，全脳，腎，脾，筋肉および睾丸[6]，ラットの腎，脾，筋肉，肝，副腎，横隔膜，心筋，乳腺，全脳，胸腺，膵および精腺またウサギおよびモルモットの卵巣，脳，血液[4]などについてNADが同定されている。従ってこの補酵素は脳に特異的に存在するものではない。しかしながら脳において特異とみられるGABAとNADとは密接な関係が保たれている。すなわちGABAは，ビタミンB_6を補酵素としてトランスアミネートされsuccinic semialdehydeになり，さらにNADによってsuccinic acidに酸化されることは周知の事実である。最近Hydrazine 2HCL（以下H.と略）の一定量をマウスの腹腔内に注射すれば，脳のGABAレベルの増加と共に，脳のNADレベルの著明な減少を来たすことがわれわれによって発見された[11a]。ヒドラジッド痙攣剤に属し，しかもこの痙攣剤のうちで最も簡単な構造（N_2H_4）をもち，強力なcarbonyl trapping agentであるH.が上記のような薬理作用を示すことは，NADのみならずGABAの脳における真の生理的意義の解明に役立つものと思われる。GABAの脳における生理的意義にかんし否定的な見解を示す研究者が多くなってきたが，最近の趨勢では，GABAの意義を次の3つのどれかに求めている現状である。1)単なる中間代謝産物の1つに過ぎない[8]。2)脳における抑制的伝達物質である。3)脳機能の調節的物質である[3]。



一方NADの構造の中心をなし，その作用基とみなされるnicotinicamideが食餌に甚だしく欠乏すると重篤な脳神経症状すなわち記憶障碍，指南力減退，脳炎症状などを起し，nicotinicamideの投与によってこれら症状の急速な回復を招来する。そして，この物質の欠乏はNADレベルの低下の結果おこされたのであるという[2]。

われわれの従来のH.に関する報告をまとめると，H.は特有な間代性痙攣をおこし，全脳のGABAレベルの増加を来すことは，すでに他の研究者[8][9]と同様認められるけれども，H.を非痙攣量と痙攣量の2つに分けて実験すると前者の場合においても著明なしかも約20m続くGABAレベルの増加を招来し，また後者の場合，CD_{98}のような量において20m内外で間代をおこすが，そのさいにはGABAレベルの増加は殆んど全く認められないのである[11b]。この結果はH.による痙攣とGABAの増加する作用の機序は異ることを示すものである。なおH.による間代痙攣はビタミンB_6によっては防禦できるが，nicotinicamideによって全く防禦できぬ，かつグルタミン酸代謝物ことにグルタミン酸およびアスパラギン酸などの変動をもしらべてみると，H.はグルタミン酸に対し殆んど変化を与えず，アスパラギン酸の増加を来すものであることを確めている[11a]。

以上の諸事実からわれわれは，Hydrazine 2HCLは脳のcell furnaceにおいて酸化過

程を阻害する性質をもち，その過程のごく1部分の現象として，GABAがtransaminateされてsuccinic semialdehydeとなり，さらに酸化されてsuccinateになる経路においてH.がNADを阻害して或いは恐らくGABAの酸化経路をも阻害してGABAの濃度のレベルに著明な増加を来すものであろうと説いた[11a]。換言すればH.の痙攣をおこす作用機転は，GABAレベルの増加する機序と全く異るもののようである。従来の諸家の報告[8][19]は，この両者を同一視していることからおこる混乱のためにGABAの生理的役割について誤解しているようである。

今回は動物としてマウスを使い，全脳または部分脳におけるNADおよびNADHの定量法の吟味およびその後の実験した結果について報告することにする。

dd系20g前後の雄のマウスを恒温室（20±2°C），実験動物中央研究所製の固型飼料にて飼育した動物をドライアイスエタノールにて瞬時に致死させ，全脳または脳を4部に分け，小脳を除いた大脳，間脳（線條体を含む）および中脳延髄の3部位についてGABAおよびNAD，NADHの各濃度をそれぞれ定量した。

NADの定量法を二大別すると，bioassayとchemicalに分けることができる。前者は，Hemophilusを使用するが，培地を一定に発育させる困難および少くとも完成には8hrも要する[7]ことから，またNADのみならずnicotinamide ribosideおよびmononucleotideもこの細菌の発育を促進するという非特異性をもつ[6]として現在bioassay法は行われず，専ら用いられているのはchemical methodsである。その1つの方法として'Huff et al[5]が始め，Levitas，Kaplanなどによって行われている螢光法で，N'-methylnicotinamideがアルカリ溶液中でketonesと反応して緑青の螢光を発し，その酸性化で青となるのを加熱して定量する方法である。この方法は資料が微量ですむ長所があるが，NADやNADPが共存して出てくる欠点もある。そのほかpaperおよびion exchange resin columnのchromatographyの方法もある。

NADまたはNADHなどの組織よりの固定法は以上述べたほかに数多く考案されており，その術式はいずれも一長一短であり，確実にしかも容易に行える方法はないようである。現在米国の文献の多くは，Levitas et alの螢光法を採用しているようであり，われわれはこの方法の経験はないので実際にどんな程度のものかわからないが，近く（39年10月）Fahlandの螢光光度計が入手できるので追試するつもりである。最も精度の高い方法として推賞できるのはGlock & Mcleanの方法であり，殆んどすべての動物組織よりのNAD，NADP，NADHおよびNADHPを固定している。しかし術式試薬その他の煩しさで，われわれの経時的に多数の実験を重ねていくには不適当のようである。

そこでわれわれは，第2表にみるように組織よりの抽出法は，Glock & Mclean法によって行い，NADの定量はRacker法（第1表参），NADHの定量はアセトアルデヒドを使う酵素法によって行った（第2表，第1表）。

Racker法の原理は，乾燥パン酵母からアルコール脱水素酵素を精製し，この酵素によってマウスの全脳または部分脳に含有されるNADがNADHになるのを第2図に示すように波長340mμにおいてこの還元型のNADが吸收帯を現わすことによって分光分析する（第2図）。この方法の長所は，NADに対して非常に特異的に作用し，NADP

は僅かに 1/1500 の量しか現われず，他の類似構造物質（nicotinamide mononucleotide，nicotinamide riboside など）も殆んど反応しない。しかし，Racker の酵素法にも欠点があり，アルコール脱水素酵素がその第3の補酵素たる Co 亜にも反応して絶対的な特異性を欠くために NAD の量が増加して現われてくること，また NADH の量がやはり増加し NAD/NADH が 1.1 ± 0.05 の値と出る，

第1,2表

GLOCK & MCLEAN の変法

組織（全脳 200～300 mg：肝 50 mg）

NAD の抽出（0.1 N HCL 5c.c.）　NADH の抽出（0.1N NAOH 5c.c.）

ホモジナイズ

0.25 M グリシルグリシン緩衝液 PH 8.7（5°C 以下で操作）

H_2O を加えて 15c.c. にする

0.1 N NAOH 5c.c.（中和）　0.1N HCL 5c.c.（撹拌しながら滴下）

20.000g 30m 0°C 遠沈

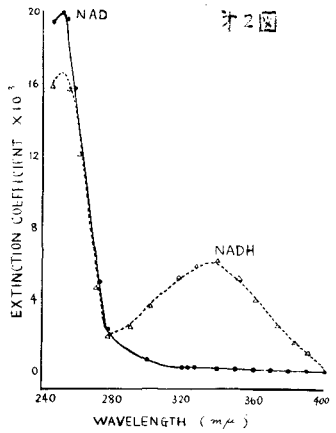
上清（0°C）

RACKER 法により測定（日立分光々度計使用）

0.5M アセトアルデヒド（低温）0.02cc
0.1 M リン酸カリウム緩衝液 PH 7.5　3c.c. とする
340mμ の吸光度測定（粗酵素の場合その吸光度）
アルコール脱水素酵素 0.3 cc
340mμ の吸光度の減少測定
（1m 以内に測定のこと）

Glock & Mclean の法のアルカリ抽出法ではその値は 1.8 ± 0.1 となり，あきらかにの抽出法の誤りであることを指摘している[4]。この誤りを直すために Glock ら[4]は NAD と NADH とは酸性およびアルカリにおいて安定であることを利用し，両物質を分別したわけである。(1) Racker の法で最も問題となる点は，この方法の基本となるアルコール脱水素酵素の精製である。われわれはまず Boehringer & Sohne GmbH Mannheim 社製の酵母よりの酵素を標準にして，精製酵素と粗酵素とを瀬屑法[12]により作製して，両酵素のマウス全脳または部分脳の至適濃度を求め第1表中に記したような値をえた。粗酵素を用いるとき NADP の混在する資料は避けた方が宜しいといわれている[12]が，脳には NADP および NADPH が微量しか存在しないのでこれを無視できる。たゞ肝または腎組織のように NADP が多量存在する時は，粗酵素の使用は無理である。肝組織の場合は Glock & Mclean 法に準じて行った。(2) 除蛋白の場合，成書では 5% と読してあるが，脳の除蛋白には 7～8% のものを使う方が良い結果を得ている。(3) 最後の上清とエタノールピロリン酸にアルコール脱水素酵素を加え，総量 6 c.c. として室温に 10 m 放置するときこの時間を精確に行い，特に夏期の高温時注意が肝要であり，分光々度計による測定には精度の高い計器を必要とする。(4) 組織（脳）よりの NAD の回収率は，抽出している間に行った場合，95～98% の値を得た。(5) 後述するようにわれわれの方法によって NAD と NADH との比は 1.87 であり Glock らの値と相似であった（第3図参照）。

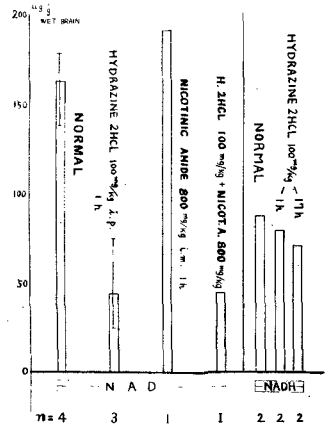
第2図



マウスの全脳における NAD レベルおよび NADH レベルを測定した結果は，第3図に示してある（第3図）。

正常マウスの NAD レベルは，4例平均で 163.3（144.8～178.9）μg/g wet brain であった。また NADH レベルは 2 例平均で 87.3（77.9～96.7）μg/g の値をえた。しかるに Hydrazine 2HCL の非痙攣量 100mg/kg を腹腔内に注射した後これを経て全脳の NAD および NADH をしらべた

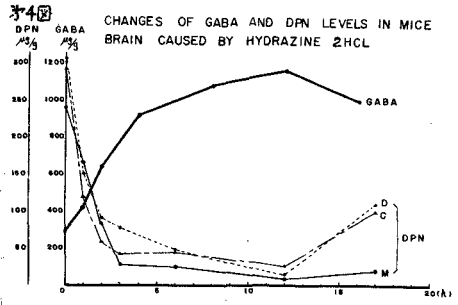
第3図 NAD & NADH CONTENTS IN MICE WHOLE BRAIN



ところ，NADレベルは著明に減少し3例の平均値44.1（25.0～75.7）μg/gに対し，NADHレベルは正常と殆んど変りなかった（79.2（60.9～97.5）μg/g 2例）。また800mg/kgのnicotinicamideの筋注後1hのNAD値は，多少増加の傾向が認められた（第3図）。そこでマウスの脳を3部分に分けて，各部分のNADレベルを測定し，なお上記と同量のnicotinicamideおよびH.を投与して前と同様の実験を試みた。正常のNADレベルは，大脳，間脳に於て殆んど同様，中脳延髄に於て多少少く，3例平均値はそれぞれ，292.8（262.3～309.9），293.8（257.3～328.9）および237.3（212.9～251.5）μg/gであった（第4図参照）。またnicotinicamideによって軽度の増加，H.によって著明な減少が認められた。

つぎに第4図にみるように，100mg/kgの非痙攣量のH.の腹腔内注射によって起るマウスの各脳部分におけるNADレベルの変化を，注射後1，2，3，6，12および17hの6回に亘ってそれぞれ測定してみた。そして同量のH.の投与後における各時期の全脳のGABAレベルの変化をしらべ，NADとGABAとの変動がどのような関係にあるかをしらべてみた（第4図）。まず各部分脳におけるH.によるNADレベルの急激な低下が注目され，同時に大脳と間脳の各部分のそれの低下と中脳のそれの低下する態度が異ることが大いに注目される。すなわち前者の低下よりも後者の低下がゆるやかであることである。そして注射後12hたって各脳ともNADは最低値に達し，以後回復するが，またここで注目されるのは中脳延髄部分の回復が遅いことである。このことはすでに報告[11b]したように各脳部分におけるGABAレベルの変動のうち中脳延髄のそれの変動が，このNADの変動と全く似ていることである。そして全脳のGABAレベルの増加は，第4図にみるようにNADレベルの低下と全く対称的に変化している。

第4図 CHANGES OF GABA AND DPN LEVELS IN MICE BRAIN CAUSED BY HYDRAZINE 2HCL



C....CEREBRUM , D...DIENCEPHALON , M....MESENCEPHALON

以上の結果から考察すると(1)脳におけるNADの薬物による影響についての報告は数少なくiproniazidによって強く減少した[1]と主張している。この薬物の構造がH.に相似であることは興味がひかれる。(2) H.によって惹起されるマウス全脳または部分脳のNADレベルの減少とGABAレベルの増加とが全く対称的に変化することは，これまでのわれわれの説をさらに確実にするものであり，この際の両物質は，単なる代謝過程の中間物質に過ぎないことを示している。(3)しかしH.による痙攣発作時のGABAの役割については何ともいうことは出来ない。

文献：1) Bonasera,N.,et al.,Bioch.Pharmacol.,12,633~636(1963) 2) Burton,R.M.,Inhibition in the nervous system & GABA(edited by E.Roberts) Pergamon Press, Oxford. 249~259(1960). 3) Elliot,K.A.C.,ibid.,Pergamon Press,Oxford.260,(1960) 4) Glock,G.E., & McLean,P.,Bioch.J.,61,381~388(1955) 5) Huff,J.W. & Perlzweig,W.A.,J.biol.Chem.150,395(1943) 6) Kaplan,N.O. et al., ibid.,219,287～298(1956) 7) Levitas,N. et al.,ibid.,167,169～175(1947) 8) Maynert,E.W. & Kaji,H.,J.P.E.T.,137,114～(1962) 9) Medina,M.A.,ibid.,140,133～137,(1963) 10) Racker,E.,J.biol.Chem.,184,313～319(1950) 以下省略

12 脳腫瘍の診断における乳酸脱水素酵素 Isozyme の応用

千ケ崎裕夫・高倉公朋・
佐野圭司（東大・医・脳外科）
島薗順雄（東大・医・生化）

I. はじめに

脳神経外科領域において脳腫瘍は最初にとりあげられた疾患であるが，現在でもなお最大の課題である。特にそれを早期に診断し，適切な治療を行うことが最も重要であるのはいう迄もない。我々はその1つの試みとして血清中および髄液中の酵素変動に注目した。第1表は種々の中枢神経疾患における血清および髄液中の（GOT, GPT）transaminase，乳酸脱水素酵素（LDH）の値を示したものである。GOT, GPT 活性値は Reitman-Frankel 法により測定し，その単位は karman 単位（$=OD_{340} \times 10^3/min$ 25°~26°C/ml）であらわされている。LDH は Wrobrewski 法にしたがって測定し，活性値は血清（髄液）1ml の1分間の吸光度減少が 0.001 の場合を1単位としてあらわされている。この表の中で良性腫瘍の代表である meningioma では，これら活性値はほぼ正常範囲にとどまるものに対し，悪性腫瘍の代表である glioma では，いずれの酵素も正常値より高い値を示す事は注目すべき点である。しかしこれらはあく迄各群の平均値の相違であって個々の症例については必ずしもはっきり区別されるわけではない。脳腫瘍の存在の有無，更にはどのような種類の脳腫瘍が存在しているのかを単に量的な相違でなく質的に区別できないだろうか。そこで我々は髄液中，腫瘍組織中の乳酸脱水素酵素（LDH）isozyme の pattern を比較検討することにより脳腫瘍の診断に関していくつかの興味ある新知見を得たので報告したい。

Neurological disorders and GOT, GPT and LDH activities

		GOT		GPT		LDH	
	Case No.	Serum	CSF	Serum	CSF	Serum	CSF
Normal	35	20±5	8±5	7±4	3±3	150±25	20±17
Head Injury	51	54	32	33	21	283	76
Cerebrovascular lesion	15	52	22	32	6	272	28
thrombosis	4	67	4	48	10	440	48
aneurysm A-V malformation	11	40	30	18	9	190	30
Brain tumor	52	42	20	34	11	236	65
glioma	25	46	27	55	18	340	83
meningioma	10	26	14	12	7	166	23
Epilepsy	5	13	6	4	3	160	20

（第1表）

II 実験方法

Method

Cerebrospinal fluid 2-5 ml
(Protein 0.1-1.0mg)
↓
dialized against 30-50% PVP
(PH 7.4)
↓
Agar gel electrophoresis
(6×9×0.1 cm)
Veronal buffer, PH 8.4, 0.05M
200 V, 12 mA 2.5 hrs
↓
Staining
Solution I 3.4 ml
Solution II 0.2 ml
DPN 0.4 ml (4mg)
Incubation 37°C, 1.5hrs
↓
Densitometry and Planimetry

（第2表）

LDH isozyme の分離はほぼ Van Der Helm の方法にしたがった。髄液 2~5 ml 中の蛋白を高張 polyvinylpyrolidon（30~50%, pH 7.4）で12時間~24時間透析濃縮した後，寒天電気泳動を行った。pH 8.6，0.05 M の Veronal buffer を使用。寒天ゲルは 6 cm × 9 cm × 0.1 cm 大，電流 200 V，12 mA 2時間~2時間半。次に寒天ゲルの上に染色液を重畳し，37°C 1.5時間 incubate し，LDH 酵素活性を Nitro-BT で染色した。染色液は使用直前に新しく調製した。

染色液 I： sodium lactate 50% 1.4 ml,
Nitro BT 25mg, sodium cyanide 50mg,
phosphate buffer 0.1 M 90ml (pH 7.4)

染色液II　phenazine methosulfate　1mg/ml

反応形式を模式的に表わせば

lactate ⟩⟨ DPN ⟩⟨ phenazine methosulfate (reduced) ⟩⟨ Nitro-BT
pyruvate ⟨⟩ DPNH ⟨⟩ phenazine methosulfate ⟩⟨ Nitro-BT (reduced)

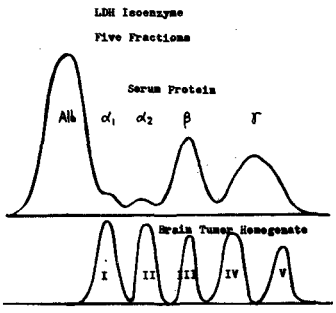
次に5分間 ethanol, acetic acid 溶液で固定し，その後数時間 5% acetic acid で洗浄した。次に寒天ゲルをセロファンにうつして乾燥させた後，520mμ の波長で densitometry を行い活性値の曲線を描き，更に planimetry を行って LDH isozyme の活性値を%で現わした。組織の場合は，組織 1～2g を 3～5倍容の生食で teflon homogenizer を使って十分 homogenize した後 1.0×10^3 g 1時間冷凍遠沈を施行し，その上清あるいはそれを適当に稀釈して，寒天電気泳動を行った。

実験結果と考察

LDH isozyme の命名法については図1の如く，Wieme の命名法にしたがって，陽極側，すなわち α_1-globulin とともに泳動されるものから L_I, L_{II}, L_{III}, L_{IV}, L_V となずけた。

オ1の分画 L_I は albumin と α_1-globulin の間にあり，オ2分画 L_{II} は α_2-fraction のあたりにあり，オ3の分画 L_{III} は β-globulin の所にあり，オ4の分画は γ-globulin の前に，オ5の分画 L_V は γ-globulin の最終部にある。

（オ1図）



次に正常髄液の LDH isozyme pattern をみるとオ2図のごとくで，L_I 50%, L_{II} 34%, L_{III} 13%, L_{IV} 3% で L_V は殆んどみとめられない。オ3図は正常脳組織（前頭葉）の pattern で L_I, L_{II}, L_{III}, L_{IV} がほぼ同じくみとめられ，L_V は僅かしか認められない。これらに対して脊脳腫瘍患者のその髄液中，あるいは腫瘍組織自身の中の LDH isozyme の pattern がどのように変化するかを調べてみた。

Percentages of the Five LDH Fractions
Normal Cerebrospinal Fluid

I	II	III	IV	V
50	34	13	3	0

（オ2図）

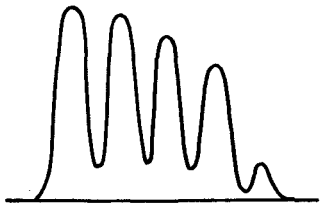


まず glioma の症例についてのべると，オ4図，オ5図は同じ患者 glioblastoma の例の，それぞれ，髄液中，および腫瘍自身の homogenate についての LDH isozyme pattern である。髄液中では正常の場合と異なり，L_I の比較的減少，L_{III}, L_{IV} の著明な増加，がみとめられ，組織中では，健常脳組織と違って，L_V の増加が認められる。我々はこの図4，図5の所見と正常の場合とを比較した結果，髄液中の L_{III}, L_{IV}，特に L_V の増加は腫瘍組織自身から

Percentages of the Five LDH Fractions
Normal Brain Homogenate

I	II	III	IV	V
33	28	22	13	4

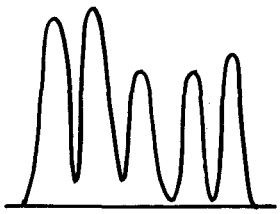
（オ3図）



Percentages of the five LDH Fractions

Glioma (CSF)

I	II	III	IV	V
27	33	14	12	14

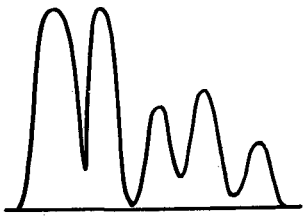


(オ 4 図)

Percentages of the five LDH Fractions

Glioma (Homogenate)

I	II	III	IV	V
30	26	13	18	9

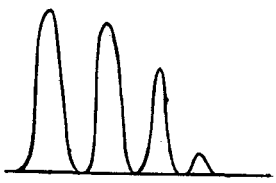


(オ 5 図)

Percentages of the Five LDH Fractions

Meningioma (1) (CSF)

I	II	III	IV	V
47	34	13	4	0

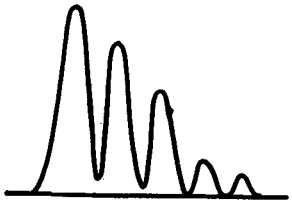


(オ 6 図)

Percentages of the Five LDH Fractions

Meningioma (2) (CSF)

I	II	III	IV	V
49	28	16	5	2



(オ 8 図)

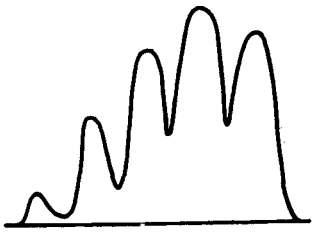
由来したものであろうと考えている。オ6図は meningioma の例の髄液中の pattern であるが，殆んど正常の pattern を示す。しかるに同症例の腫瘍組織自身の homogenate はオ7図に示すように，全く別の pattern を示す。従って meningioma のような良性の腫瘍においては髄液中の LDH と腫瘍組織中の LDH とは全く無関係に増減することが認めうれる。オ8図は同じ meningioma でもかなり大きく発育した例であるが，髄液中の pattern として若干の L_{III}, L_{IV} の出現をみる場合がある。しかし全体としては極めて正常の pattern に類似している。我々はこのような場合には expansive に発育した腫瘍が，かなりの大きさに育てば，周囲の健常な脳組織をある程度破壊するために若干の L_{III}, L_{IV} の出現をみるようになったのではないかと推定している。同様に良性腫瘍の例として聴神経腫瘍，脳下垂体腫瘍の例でも，いずれも髄液中の pattern は正常の場合と殆んど相違がない。

次に興味ある例として転移性脳腫瘍の1例をのべる。hepatoma の頭蓋内転移の例で，オ9図は髄液中オ10図は脳腫瘍組織の homogenate 中の LDH isozyme の pattern を示す。両者とも一見して極めて類似した pattern を示す。このことからも glioma の場合と同じように，悪性腫瘍の場合には，腫瘍組織自身が崩壊して髄液中に滲出し，髄液中の LDH の起原となっていることが証明される。

Percentages of the five LDH Fractions

Meningioma (1) Homogenate

I	II	III	IV	V
3	14	22	31	30

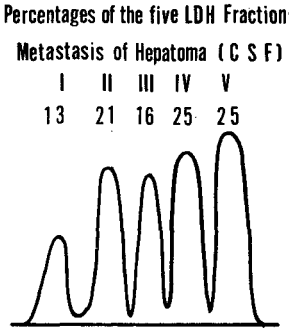


(オ 7 図)

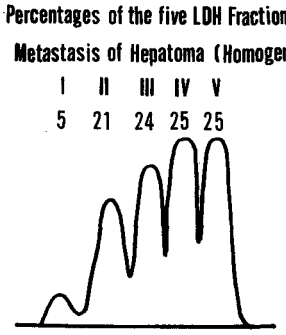
オ11図は parasitic granuloma の例の髄液中の LDH の pattern であるが，この pattern は他に類似性を求めうるとすれば，我々が行ったものの中では，オ12図に示すごとく急性髄膜炎の髄液中の LDH isozyme pattern と相似している。

オ3表，オ4表は今迄我々の行った脳腫瘍31例についての結果を綜合したものである。

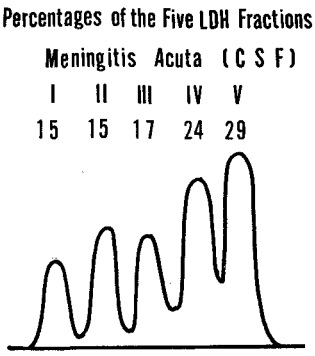
髄液中については脳腫瘍中，glioma，転移性腫瘍，先天性腫瘍は明らかに正常の pattern と異なり，



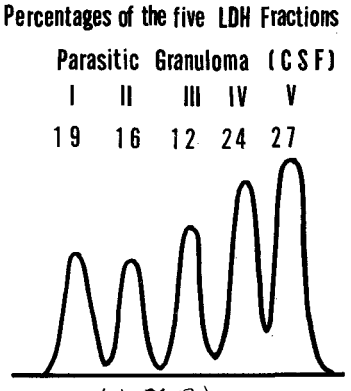
(オ 9 図)



(オ 10 図)



(オ 12 図)



(オ 11 図)

それにより各々を鑑別することが可能であるが，良性腫瘍の場合は，正常の髄液に比し，はっきりした相違を示さない。腫瘍自身の homogenate について行った結果では，各腫瘍は正常脳と異った特徴の pattern を示すが，興味ある点は同じ meningioma でも meningothelial の場合と，angioblastic の場合とは全く違った pattern を示すことである。又悪性腫瘍の内容液については同じ外観を呈していても glioma の場合と，hemangioblastoma の場合とは明らかに区別できるという点は興味ある事実である。

(オ 3 表)

Percentages and Ranges of the Five LDH Fractions
Cerebrospinal Fluid

	Fraction	I	II	III	IV	V
Normal	8 cases	50 (42-56)	34 (30-36)	13 (10-19)	3 (1-8)	0 (0-2)
Glioma	12	25 (32-16)	33 (26-40)	17 (10-28)	14 (9-19)	11 (4-22)
Meningioma	8	47 (37-58)	33 (28-40)	15 (6-23)	4 (2-9)	1 (0-3)
Acoustic Neurinoma	2	47 (38-55)	33 (25-42)	13 (12-14)	7 (6-8)	0 (0)
Pituitary Adenoma	4	51 (45-58)	34 (28-36)	14 (12-16)	1 (0-2)	0 (0-1)
Craniopharyngioma	1	43	37	19	1	0
Hemangioblastoma	1	48	38	12	2	0
Teratoma	1	54	35	10	1	0
Parasitic Granuloma	1	19	16	12	24	27
Metastatic Tumor (Hepatoma)	1	13	21	16	25	25

(オ 4 表)

Percentages and Ranges of the Five LDH Fractions
Tissue Homogenate

	Fraction	I	II	III	IV	V
Normal Brain	4 cases	33 (29-41)	28 (26-28)	20 (15-22)	17 (13-20)	2 (1-4)
Glioma	4	34 (23-40)	28 (26-30)	13 (12-15)	14 (5-23)	11 (8-15)
Meningioma	5					
Meningothelial	3	2 (2-3)	8 (3-14)	23 (22-25)	35 (31-42)	32 (28-37)
Angioblastic	2	21 (21-22)	24 (23-26)	19 (17-21)	22 (22-23)	14 (9-16)
Metastatic Tumor (Hepatoma)	1	5	21	24	25	25
Tumor Cyst						
Glioma	4	24 (7-26)	37 (23-36)	22 (15-24)	26 (10-28)	17 (4-26)
Hemangioblastoma	1	44	41	15	0	0

III おわりに

以上我々は髄液中の LDH isozyme の pattern を追及分析することにより，脳腫瘍の診断特に病理組織学的な診断の推定を行うさいの一助となりうることを示した。この検査法は今日迄行われてきた他の診断法と違った全く新しい分野に属するもので，今後更に症例を加えて十分検討していきたい。

13 X線照射の脳蛋白質代謝並びに脳組織呼吸に及ぼす影響について

原隆夫・中沢省三・古沢善文・
宮沢登（新潟大・医・脳外科）

放射線が生体に重大な影響を與えることは，動物実験及び臨床的経験から広く知られている事実である。現在脳腫瘍に対して手術後療法或は，手術によらず照射療法のみが行なはれることも多くなっている。かゝる際，中枢神経系の障碍も，全身的な副作用は治療上の難点となっており，このことから直接照射される腫瘍部位以外の脳部分更に全身にも代謝的変化が生じていることが考えられる。照射の脳に及ぼす影響の病理学的な研究は多くなされているが，[1] 生化学的な研究は少い。我々は放射線の脳並びに全身への影響を解明するために，蛋白代謝と組織呼吸を中心に一連の実験を行なったのでこゝに報告する。

実験方法

実験動物は，体重200g前後のウィスターアルビノラッテを使用し，非照射群（対照）と照射群に2分した。X線照射には18KVP，15mA，1.96 r/min.，1.0mm銅，0.5mmアルミフィルターの装置を使用した。照射はすべて *in vivo* で行ない，それに続く実験は *in vitro* 或は *in vivo* で行なった。以下夫々を *in vitro* の実験或は *in vivo* の実験と呼ぶことにする。

【I】 *in vitro* の実験

照射部位，照射條件及び照射してから断頭屠殺までの期間により次の各群に分けた。

(A) 頭部照射群（頭部照射は兎を固定し頭部以外の体部は鉛板で保護し頭部のみを遮線箇内に入れて行った。）

第1群：500rを24時間毎に6回，計3,000rを照射し，最終照射後2時間で断頭

第2群：3,000r 1回照射し，6日後断頭

(B) 全身照射群

第1群：300rを24時間毎に4回，計1,200r照射し，最終照射後2時間で断頭

第2群：600rを24時間毎に2回，計1,200r照射し，2回目の照射後2時間で断頭

第3群：500r1回照射後1ヶ月で断頭

屠殺後，直ちに脳，肝及び脾を氷冷食塩水中に取出し，ほゞ0°Cに保たれた冷凍室内で Stadie-Riggs型 slicer を用いて，大脳皮質，肝及び脾の切片を作成した。

反応系の組成：切片の湿重量100mgをあらかじめ反応溶液を入れ0°Cに保たれたWarburg容器に移す。反応溶液には改変せるMcIlwein溶液（表1）を用い，基質としては glucose を終濃度10mMになるように添加した。Warburg検圧計容器内組成は表2の如くである。

酸素消費量の測定：Warburg検圧計の気相を充分酸素で置換したのち37°Cで10分間の予備振盪を行ない，その後10分毎に目盛を読み60分間反応させたのち，終濃度5%になるように三塩化醋酸(TCA) を添加して，反応を停止させた。

蛋白質分画の精製法：TCAで反応を停止させた切片浮遊液を Potter-Elvehjem の glass-homogenizer を用いて，homogenate を作った。この homogenate から沈澱をとり，冷TCA洗滌3回，5%TCA 90°C 15分抽出洗滌，冷TCA洗滌3回，95% ethanol洗滌，60°C ethanol-ether混液10分洗滌，50°C chloroform-methanol（1:1容）混液10分洗滌，次いで石油ether-

ether-acetone 混液洗滌(12:6:1 v/v)の順で処理し，精製蛋白を得た。

比放射能の測定法：精製せる蛋白質分画を充分乾燥させたのち，直示微量天秤(島津製)で重量を測定し，次いで gas flow counter (RIDL製)を用いて ^{14}C 放射能を測定した。この ^{14}C 放射能と乾燥重量とから比放射能を算定したが，この際，血漿蛋白質を基準として実験的に得られた補正曲線から自己吸收の補正を行なった。

表 1. 改変せる McIlwain 溶液の組成 PH 7.4

1) 0.9 % NaCl	112,9 ml
2) 1.15% KCl	5,2 ml
3) 1.22% $CaCl_2$	1,6 ml
4) 2.11 % KH_2PO_4	1,1 ml
5) 3.82 % $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,1 ml
6) Tris-HCl 緩衝溶液 PH 7.4	8,1 ml

表 2. Warburg 検圧計容器内組成

主室	改変 McIlwain 溶液	0.8 ml.
	M/10 - glucose	0.1 ml.
	^{14}C - leucine	0.1 ml (0.5μc)
	slice	100 mg
副室	20 % KOH	0.1 ml
気相：酸素 PH 7.4		

L-leucine ^{14}C (U) : R.C.C. Amersham England 50μc/0.16 mg

表 3

改変 McIlwain 溶液 PH 7.4	6.7 ml
M/10 - glucose	0.7 ml
^{14}C - orotic acid	
slice	1,500 mg

Orotic acid - 6 - ^{14}C monohydrate 66.9 μc/mg : R.C.C. Amersham England

(II) in vivo の実験

in vitro の実験での頭部照射の第1群と同一照射條件，即ち 500 r × 6 計 3,000 r の最終照射後2時間目に，ツ反用注射器で ^{14}C-leucine 3μc/0.1 ml を大槽内 注入した。注入に際しては，浅い ether 麻酔下で，頸部の皮膚及び筋肉を切開し直視下で行なった。注入後約3分で歩行を始め，四肢の麻痺は見られなかった。注入後1時間或は2時間で断頭し，冷凍室内で脳を取出し，直ちに氷冷生理的食塩水で組織に取込まれていない free の ^{14}C-leucine を充分洗い流し，大脳皮質湿重量 300 mg に蒸溜水 3.0 ml を加え homogenate を作り，12 % 過塩素酸(PCA)を等量添加遠心し，沈渣に 6% PCA 3.0 ml を加えて洗い，この上清を先の上清と合した。沈渣からは前述した方法で蛋白質を精製した。上清は苛性加里で中和し，過塩素酸カリウム塩として沈澱させ，蒸溜水で液量を 20 ml にし酸溶性分画と名付けた。

比放射能の測定法：蛋白質分画は，in vitro と同様な方法を用いた。酸溶性分画の比放射能は溶液 2.0 ml を放射能測定用皿で充分乾燥させた後，gas flow counter で測定し，取込活性は次の如く相対比放射能で表した。

$$\text{相対比放射能} = \frac{\text{蛋白質分画の比放射能 (counts/min./mg prot.)} \times 100}{\text{酸溶性分画比放射能 (counts/min./mg wet wt)} \times 100}$$

核酸の実験 in vitro の実験の頭部照射第1群と同一照射條件で，照射終了後2時間で断頭し，直ちに氷冷生理的食塩水に脳を取出す。4匹の大脳皮質より 1,500 mg の切片を作り，第3表の反応系中で 37°C，3時間振盪する。振盪終了後，Schmidt - Tanhauser - Schneider の方法により，DNA，RNA を抽出し，DNA は diphenylamin 反応 RNA は Orcinol 反応，更に夫々を紫外吸收法をも併用して定量した。比放射能の測定は，DNA の PCA 溶液，RNA 水解物の PCA 溶液を，夫々苛性加里で中和して PCA を沈澱除去し，その上清を放射能測定用皿に移して充分乾燥させ，gas flow counter で放射能を測定し，自己吸收の補正をも行なった。先に測定した DNA，RNA の量から比放射能 (counts/min./mg DNA or RNA) を算出した。

Fig.1. Effect of Irradiation of Rat Head on the Incorporation of labeled Leucine into the Proteins of Brain, Liver and Spleen Slices

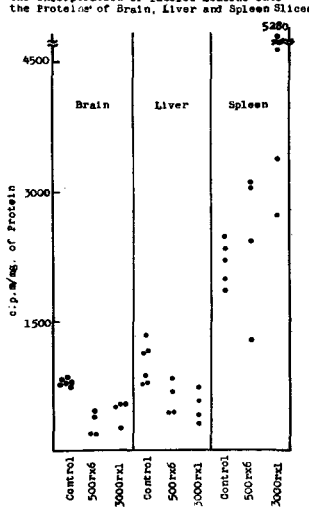


Fig.2. Effect of Irradiation of Rat Head on the Respiration of Brain, Liver and Spleen Slices

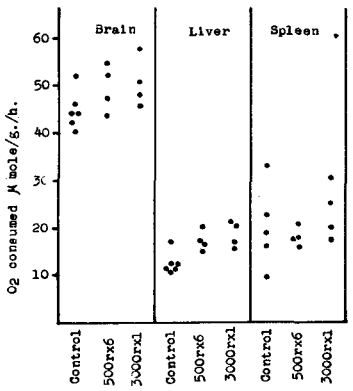


Fig.4. Effect of Irradiation of Whole Body of Rat on the Respiration of Brain, Liver and Spleen Slices

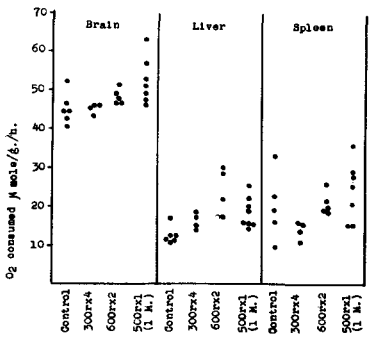


Fig. 3. Effect of Irradiation of Whole Body of Rat on the Incorporation of labeled Leucine into the Proteins of Brain, Liver and Spleen Slices

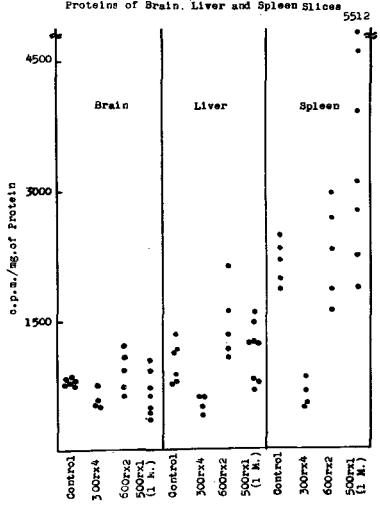
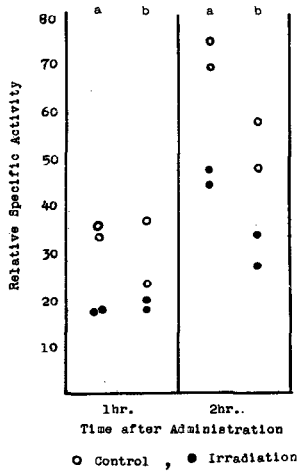


Fig.5. Effect of Irradiation of Rat Head on the Incorporation of Intracisternally Administered Labeled Leucine into the Brain Protein



実験結果及び考察

頭部照射の場合，脳では in vitro の2群及び in vivo の2群共に，アミノ酸の蛋白への取り込みの抑制がみられる．又全身照射300γ×4群では，膵が最も強く抑制され肝，脳の順になっている。これはDNAの代謝回転の早さ[2]の順になっている。一般に蛋白合成に対する照射の影響は非常に少いといはれているが，照射條件によって，このような著明な抑制を示すことは，興味ある結果である。しかもこの蛋白合成の抑制に対し酸素消費は，大部分が逆に促進している故に　少くともこの呼吸系に対する作用からは，蛋白合成の抑制は説明出来ない。現在までに，得られた我々の核酸分析の結果からも，上記蛋白合成の抑制は説明出来ない。全身照射600γX2群では，アミノ酸の蛋白への取り込みは，肝では明らかに亢進し，脳でもその傾向がみられた。これと他の抑制を来す照射條件と考え合せると，X線照射は，條件により(線量，期間，個体差)蛋白代謝を或は促進，或は抑制すると判断されよう。X線照射の副作用が少くなると言はれている分割照射と一回照射の脳組織に対する効果の差は，我々の條件では見出されなかった。次に脳に照射した場合肝への取り込みが著明に抑制され，酸素消費は逆に亢進している。膵ではかゝる抑制は認められない。このことは，脳と肝の間に，抑制機構に関して密接な関係があることを示唆していると考えられる。

文献

1) Clemente C.D. and Holst, E.A., Arch. Neurol. Psychiat., 71, 66, 1954.

2) Hevesy, G.C., Brit. J. of Radiol., 29, 465, 1956.

14 脳の核酸に及ぼすTricyano－amino－propeneの影響について

中脩三・大橋健男・山上栄・
川北幸男（大阪市大・医・神経）

Tricyano－amino－propene（以下tri-apと略す）はmalononitrilのdimerであって，かって精神分裂病やそううつ病の治療に試みられたこともあった。最近でもこの薬物を用いてニ三の行動科学的研究[1]が行われている。神経化学的には，これを静脈注射すると，1時間後K神経細胞のRNA量及び蛋白量が増加し，[6] glia細胞のRNA量が減少することが，Hydén等[6][7]Kよって認められた。その際塩基組成にも変化が認められている。[7] すなわち，神経細胞のRNAでは，Cytosineが減少し，Guanineが増加するのK対し，glia細胞では，Guanineが減少し，Cytosineが増加する。また神経細胞内では，核のRNAが増加し，その塩基組成では，Guanineが著明に増加し，Uracilが減少するが細胞質では核ほど著しくないがやはりGuanineが増加し，Cytosineが減少することが認められた。これらの変化は，特殊な細胞質RNAが核RNAの変化Kよって，inducedされて生ずるものであろうと考えられている。Hydén等の結果は，いずれもmicrodissectionによって得られた材料について，ultramicrospectrophotometryによって測定されたものであって，通常の生化学的分析方法では，いずれも対照との間K有意の差を認めていない。

この研究ではモルモットにTriapを単独または，連続的K注射して，脳のsubcellular unitの核酸に及ぼすTriapの影響を検討した。これKよって細胞内のRNAの相関関係とそれK及ぼすTriapの効果が比較出来るのではないかと考え，以下の実験を行った。

実験方法

体重300－400gのモルモットをTriapの単独注射群と連続注射群とに分けた。投与方法はいずれも腹腔内で20mg／体重Kgを注射した。連続注射群では，毎日同量ずつを注射し，最終注射後1時間で断頭して実験に供した。対照群には同容量ずつの蒸溜水（滅菌）を同様に注射した。なお，注射期間に著しい体重の減少は認められなかった。Triap注射したモルモットを一晩絶食させて断頭後，4－5匹の脳髄をプールし，0.25M sucrose－10^{-4}M.EDTA内でホモジナイズした。分画遠心は，前報[12][13][14]の如く行ったが，以下の点を改良した。1）ミトコンドリア分画は，12,000g，15分間で分離した。2）microsome分画の分離は78,000g，120分間で行った。全脳及び各分画のRNAの抽出はKirby[8]の原法をDingman等[5]が改良した方法で行った。連続注射群では，核酸の抽出はSantén－Agranoff[15]法を用い，単独注射群ではphenol法[8]を用いた。たゞし，前者の場合も塩基分析に供したRNAはphenol法で抽出した。

塩基の分析には，分離したRNAを1NHCl，100°C，1時間加水分解した。加水分解液中のnucleotideおよびnucleosideはisopropanol－5.7N HCl（65：35）の溶媒系を用いて，paper chromatographyを行った。Purine塩基とpyrimidine nucleotideは紫外線ランプで検出し，各スポットを鋏で切り出し細片とした。0.1NHClの4mlで2日間溶出した。各溶出液はBeckmann DU Spectrophotometerを用いて波長249－278mμで吸収を測定した。NucleotideおよびNucleosideはCrosbie等[3]の方

法で計算し、moles per 100 mole として表わした。分離した nucleotide および nucleoside の同定には Rf 値（guanine 0.21, adenine 0.37, Cytidylic acid 0.59, Uridylic acid 0.78）と紫外線吸収曲線[13][13][14]を用いた。

核酸の定量は前報で行った。

結果及び考察

表1は Triap の連続注射群とその対照群について Santen - Agranoff 法[15]で抽出定量した全脳の核酸の変化を示す。RNAは、3日、6日および12日と経時的に両群とも無処置群よりも減少率が大きくなる。特に、triap 投与群では6日および12日において減少率が著しく、27%、39%の減少率を認める。また、対照群の減少率も大で、ほぼ20%の減少率がある。この結果は、Triap が神経細胞の RNA の producer として働くという Egyhazi[6]の見解とは一致しない。しかし、Egyhazi[6]等の実験は単独静脈注射であること、glia細胞の RNA の減少が著しいため、たとえ神経細胞では RNA 量が増加しても、全体として定量すれば減少を示すのかも知れないことを等の点について考慮する必要がある。いずれにしても、脳の RNA はかなり不安定で、長期間 Triap を連続注射すると減少するようである。たゞ対照群も減少している所から Triap そのものの特異的な効果とは考えにくい。

DNA については、Triap 注射群および対照群のいずれについても無処置群との間に有意の差を認めることが出来なかった。これは脳の DNA が比較的安定で、外界の刺激によって大きく変ることがないことを示唆するものである。

表1. Effect of chronic Injection of Tricyano-amino-propene on the Total amounts of Nucleic Acids of Guinea Pig Brain. (determined by Santen and Agranoff's method. phosphorous mg per 100 gm wet tissue)

	RNA	DNA
control	22.30	7.40
Three successive injection		
Triap	21.35(-4%)	7.05(-5%)
water	19.75(-11%)	8.20(+11%)
Six successive injection		
Triap	16.33(-27%)	7.60(+3%)
water	18.30(-18%)	8.00(+8%)
Twelve successive injection		
Triap	13.55(-39%)	7.40(0)
water	17.85(-20%)	8.00(+8%)

表2. Effect of a single injection of Tricyano-amino-propene on the total amount of RNA of Guinea Pig Brain. (determined by Kirby's method, phosphorous mg per 100 gm wet tissue)

	RNA	increased
control	10.45	—
1 hr after injection	11.19	7%
3 hrs. after injection	11.30	8%
6 hrs. after injection	10.83	4%

表2はTriapの単独注射後1時間，3時間および6時間にそれぞれ断頭して，phenol法[8]で抽出定量した全脳のRNA量の変化を示す。いずれの時間においても，RNAの増加を認めず，無処置群との間に有意の差は見られなかった。この結果 Triap は 20mg/kg体重を長期間連続注射すると，RNA量をかえって減少させるが 単独注射では RNA量は変らないことが認められた。

つぎでphenol法[8]で抽出したRNAの塩基組成をtriapの連続注射群及び単独注射群について検討した。(表3. 表4) まず無処置群についてみれば Guanine および Cytosine の mol 比が高く 特に Guanine においてその傾向が著しい。また Purine 対 Pyrimidine 比はいずれも1よりも大きい。6 Amino 塩基(A+C)と6 Keto 塩基(G+U)との比は1よりも遥かに小さかった。Magasanik[10]は生細胞のRNAは多くの細胞でGC型で，G+C/A+Uの比はいずれも1よりも大であると述べているが，脳組織の場合もこれをよく一致する。このことは Deluca 等[4]や Datta 等[3]によっても認められている。Triapの単独注射群，連続注射群の塩基組成はいずれも無処置群との間に大きな差違を認めない。Egyhazi等[6]もtriap注射後1時間の全脳のRNAの塩基組成に何等変化が認められなかったことを報告した。彼等によれば Neuroglia と neuron とは10:1の割合に存在するため glia の蓄積は総計すると神経細胞のそれと等しくなる。したがって microdissection で認められた triapの neuron と glia に対する効果の差は macro な分析では見出し得ない理由だと述べている。Triapの細胞質RNAに及ぼす効果を表5に示す。無処置群では，mitochondria，microsome，cell sap との間にそれほど大きな塩基組成の差は認められない。いずれもGC型で特に guanine が多い。Purine と Pyrimidine の比もほぼ1に近い，たゞ 6 Amino (A+C) 対 6 Keto (G+U) 塩基の比は多少異なる。mitochondria は1以下，cell sapでは更に小さい。これは cell sapにおいて guanine が特に多いためであろう。Magasanik も[10]他の組織，例えば肝や膵臓において 細胞質RNAの塩基組成に著しい差がないと述べている。脳でも，植村等[11]，Datta 等[3]によってこうした傾向が認められている。

triapの単独注射群の細胞質RNAの塩基組成の変化については，guanine の軽度の増加と cytosine の減少とが各分画に共通して認められた。microsomeではこの傾向がかなり目立っている。その結果，Purine と Pyrimidine 比の増加，A+C/G+U比の減少が認められる。cell sap ではこの傾向が更に著しくなるようである。これ等の結果は triap によって とにかく細胞質RNAの塩基組成に何等かの変化がもたらされることを示唆するものである。Hydén 等[7]も microdessection によって得た細胞質RNAを microelectrophoretic Analysis を行い，triap は guanine を増加させ，Cytosine を減少させることを認め，神経細胞の細胞質RNAに何等かの新しいRNAが induce されるのではないかと考えているが，我々の得た結果と考え合せて興味ある所である。

特にこの場合核のRNAの機能が重要で何等かの塩基組成の変化が核RNAに起っているのかも知れない。こういった面から核を Mandel 等[9]の方法で精製し Triapの核RNAに対する効果について検討を加えつゝある。

REFERENCES 1) Chamberlain T. J., Rothschild G. H. and R. W., Proc. Nation. Acad. Sci., 49, 9 918(1963) 2) Crosbie G. W., Smellie R. M. S. and Davidson J. N., Biochem. J., 54, 287(1953) 3) Datta R. K. and Ghosh J. J., J. Neurochem., 10, 363(1963) 4) Deluca H. A., Rossiter R. J. and Strickland K. P., Biochem. J., 55, 193(1953) 5)Dingman W. and Sporn M. B., Biochim. Biophys. Acta, 61, 164 (1962) 6) Egyhazi E.and Hyden H., The Journal biophys. Biochem. Cytol 10, 403 (1961)

7) Hyden H. and Egyhazi E. J. cell Biol., 15, 37(1962) 8) Kirby K. S., Biochem. J., 64, 405(1956) 9) Mandel P., Borkowski T., Harth S. and Mardell R. J. Neurochem., 8, 126(1961) 10) Magasanik B., The Nucleic Acids (Edited by Chargaff E. and Davidson J. N.) vol.1, p.373 11) 植村慶一．塚田裕三．飯田幸子 神経化学 Vol 2. Supl. 68 (1963) 12) Yamagami S., Masui M. and Kawakita Y., J. Neurochem., 10, 849, (1963) 13) 山上 栄. 精神経誌 65, 855(1963). 14) 山上 栄 神経研究の進歩 印刷中(1964). 15) Santen R.J. and Agranoff B.W., Biophys. Biochem. Acta 72. 262(1963)

表3. Effect of single injection Tricyano-amino-propene on the RNA base composition of Guinea Pig Brain (moles/100 moles).

	number of experiments	Adenine	Guanine	Cytosine	Uracil	Pu/Py	$\frac{A+C}{G+U}$
control	4.	19.5 ±0.19,	36.0±0.81,	28.3±0.11,	16.3±0.70,	1.24.	0.91.
1hr after injection	3.	19.2 ±0.40,	37.3±0.57,	27.5±0.33,	16.1±0.31,	1.30.	0.87.
3hrs after injection.	3.	19.0±0.08,	36.1±0.38,	28.7±0.48,	16.2±0.21,	1.23,	0.91,
6hrs after injection.	3.	18.8±0.73,	37.1±0.67,	27.8±0.54,	16.3±0.64,	1.27.	0.87.
12hrs after injection.	3.	18.9 ±0.47,	37.1±0.68,	27.4±0.62,	16.5±0.87	1.28,	0.86.

表4. Effect of chronic injection of Tricyano-amino-propene on the RNA base composition of Guinea Pig Brain (moles/100 moles).

	number of experiments	Adenine	Guanine	Cytosine	Uracil	Pu/Py	$\frac{A+C}{G+U}$
3 successive injection.	4.	19.2±0.26,	36.3±0.15.	28.5±0.63.	16.0±0.19,	1.25	0.91
6 successive injection	3.	18.4±0.21,	37.4±0.50.	29.1±0.45	15.1±0.82	1.26	0.90
12 successive injection.	3.	19.4±0.08.	35.8±0.64.	27.9±0.38	16.8±0.39	1.23	0.90

表5. Effects of single injection of Tricyano-amino-propene on base composition of the cytoplasmic RNA from Guinea Pig Brain.

1) mitochndria	Control.	3 hrs.	6 hrs.	3) cell sap	Control.	3 hrs.
Adenine	19.91	22.17	21.71	Adenine	17.64	17.56
Guanine	30.38	30.70	31.40	Guanine	34.56	36.10
Cytosine	29.91	27.26	26.84	Cytosine	29.06	26.62
Uracil	19.80	19.87	20.05	Uracil	18.74	19.72
Pu/py ratio	1.01	1.12	1.13.	Pu/Py ratio	1.09	1.16
A+C/G+U	0.99	0.98	0.94	A+C/G+U	0.88	0.79

2) microsome	Control	3 hrs.	6 hrs.
Adenine	19.09	18.88	20.56
Guanine	31.64	34.73	33.16
Cytosine	30.70	29.69	26.25
Uracil	17.57	16.70	20.03
Pu/Py ratio	1.05	1.16	1.16
A+c/G+U	1.01	0.94	0.88

15 慢性覚せい剤中毒マウスの脳クレアチン燐酸アデニンヌクレオチドの変動

── 行動異常の神経化学的研究 ──

大須賀恒夫・清水俊郎・
台　弘（群大・医・精神）

先に清水らは慢性覚せい剤中毒マウスにおいて、脳内アンモニア、アセチルコリンが種々の刺激に対して無選択的に一律に反応し、またその恢復に著しい遷延を来すことを報告した。[4] この所見は台　平尾らがこの中毒マウスで見出した行動上の異常、すなわち反応形式の多様性の喪失（刺激に対する汎発的反応性、stimulus generalization）、および反応持続の異常性と相似の現象である。[7] 台はこのような行動異常を自閉性と呼んでいる。

一方methamphetamine（MA）慢性中毒動物において、高橋康夫は脳slice中のATPの減少を認め、[6] また高橋、栗田は[2]脳hexokinase活性の減少を報告している。その後江副らはMA中毒動物に認められた解糖減退がATPの補強によって恢復されることを示した。[1]

以上のような知見にもとずき、われわれは正常マウス、MA慢性中毒マウスについて、脳クレアチン燐酸（CrP）、アデニンヌクレオチド（ATP，ADP，AMP）の脳内含有量を測定し、特に刺激に対する変動の様相を追求した。本研究で刺激として用いた方法は、車かご内全治という条件である。車かごは元来運動量測定のために用いられたものであるが、マウスによって廻転される車はその慣性によって中のマウスに更に疾走を開始するよう刺激となることが判ってから、緩慢かつ長期に作用する刺激として転用されている。従って刺激量は主として時間で規定され、反応はむしろ刺激的環境に対する適応と見なすことができる

実験方法

実験動物

体重25～30g雄のdd・N系マウス。MA慢性中毒マウスは、methamphetamine HCl 4mg/kgを3週間以上連日皮下注射して作り、物質の測定には最終注射終了後5時間以上経過したものを用いた。対照マウスは無処置。

刺激条件：

刺激装置としては円周50cmの車かごを用い、1時間以内の刺激をする場合には、そのまま液体酸素内に投入できるように考案した即時固定用小車かごを用い、50時間以上の刺激をする場合には、通常の車かごを用いた。

動物の処理

ATP、ADP、AMP、CrP、無機燐酸（Pi）等の脳不安定成分の測定には、液体酸素迅速固定法による凍結homogenized脳粉末を用いた。adenosine triphosphate－creatine phosphotransphersase（creatine phosphokinase.，CPK）活性の測定の場合には、動物を断頭によって殺し、素早く脳を取り出して0.1 M glycine buffer（pH 9.0）中にて脳軟膜や血液を除き、大脳の半球を、上記のglycine buffer 7.0 ml中にて、氷冷しながらpotter-Elvehjem glass homogenizerを用いてhomogenizeした。

化学的測定：

1．CrPおよびPiの測定

CrPとPiは高橋法によって測定した。[5] 液体酸素による迅速固定法を用いて作った凍結

homogenized 脳粉末を 5.0 ml の 8.0 % Trichloracetic acid で抽出し、12,000 G で 10 分間冷凍遠沈後上清 1.0 ml をとって、660 mμ で比色定量し、CrP + Pi と Pi の値を求め、CrP の値は両者の差から算出した。

2. ATP, ADP, AMP の測定

上述の凍結 homogenized 脳粉末を 5.0 ml の 3.0 % perchloric acid で抽出し、12,000 G で 10 分間冷凍遠沈して上清各 1.0 ml 中に含まれる ATP および ADP, AMP を、Biochemica "Boehringer" より市販されている ATP-Test kits, および ADP/AMP-Test kits を用いて酵素学的に測定した。その原理は下記の反応による DPN-H の減少量を紫外部吸収(340 mμ)によって測定するものである。なお ATP の測定の際には、抽出液中の perchloric acid を KOH で中和して氷冷沈澱除去した。

3. CPK 活性の測定

上述の資料を 12,000 G で 15 分間冷凍遠沈し、上清を脳重量の 2,000 倍になるように稀釈して、その 1.0 ml を測定に供した。CPK 活性は Biochemica "Boehringer" より市販されている Cpk-Test kits を用いて、37 °C で下記の反応による DPN-H の減少を紫外部吸収 (366 mμ) で測定した。

ATP-Test

$$\begin{cases} 3\text{-PG} + \text{ATP} \xrightleftharpoons{\text{PGK}} 1.3\text{-PG-P} + \text{ADP} \\ 1.3\text{-PG-P} + \text{DPN-H} + \text{H}^+ \xrightleftharpoons{\text{GAPDH}} \text{GAP} + \text{Pi} + \text{DPN} \end{cases}$$

ADP/AMP-Test

$$\text{ⓐ} \begin{cases} \text{ADP} + \text{PEP} \xrightleftharpoons{\text{PK}} \text{pyruvate} + \text{ATP} \\ \text{pyruvate} + \text{DPN-H} + \text{H}^+ \xrightleftharpoons{\text{LDH}} \text{lactate} + \text{DPN} \end{cases}$$

$$\text{ⓑ}\quad \text{AMP} + \text{ATP} \xrightleftharpoons{\text{MK}} 2\,\text{ADP}$$

AMP はⓑで生じた ADP をⓐの反応によって測定する。

CPK-Test

$$\begin{cases} \text{creatine} + \text{ATP} \xrightarrow[\text{CPK}]{\text{PH 9.0}} \text{ADP} + \text{CrP} \\ \text{PEP} + \text{ADP} \xrightleftharpoons{\text{PK}} \text{pyruvate} + \text{ATP} \\ \text{pyruvate} + \text{DPN-H} + \text{H}^+ \xrightleftharpoons{\text{LDH}} \text{lactate} + \text{DPN} \end{cases}$$

Abbreviations:

3-PG = 3-phosphoglycerate	GAPDH = GAP dehydrogenase	MK = myokinase
1.3-PG-P = D-1,3-diphosphoglycerate	PEP = phosphoenolpyruvate	
GAP = D-glyceraldehyde-3-phosphate	PK = pyruvate kinase	
PGK = phospoglycerate kinase	LDH = lactic dehydrogenase	

実験結果

脳 CrP, アデニンヌクレオチドの安静値

表 I に示す如く、対照群の脳 CrP は文献値にくらべてやや高く，Pi は低値を示しており、アデニンヌクレオチドはやや高値を示している。これらの文献値との相違は実験方法や実験条件の違いによるものと思われる。対照群と MA 慢性中毒群とを比較してみると、CrP では後者がわずかに低く、Pi はわずかに高いが、推計学的には差は認められなかった。アデニンヌクレオチドにおいては、MA 慢性中毒群は対照群にくらべて、ATP は約 15 % 減少しており、この差は $0.05 < p < 0.1$ で有意である。ADP はほとんど変りなく、AMP

では約25%増加しており、この差は $0.05<p<0.1$ で有意である。

車かご刺激による昼動の時間的経過

図に示すように、CPについては、対照群および MA 慢性中毒群共に、車かごに入れると、10分では両群とも値は低下するが、その低下率にはほとんど差がなり。1時間車かごに入れると両群とも安静値より高くなる。MA 慢性中毒群の1時間値は対照群の安静値よりも高くなり、1時間値とほぼ同じになる。50時間車かごの中に飼育すると、対照群は安静値にもどってしまうが、MA中毒群では1時間値よりもさらに高くなり、安静値より約15%増加する。この差は推計学的に $0.001<p<0.01$ で有意であり、対照群の50時間値にくらべても $0.001<p<0.01$ で有意の差を示す。車かご内飼育1週間でも MA 慢性中毒群は、値は下ってはくるが、対照群の50時間値よりも高く、安静値には恢復しない。すなわち対照群は50時間以内で恢復するのに対し、MA中毒群は対照群より遅れて最高値に達し、恢復はるかに遅延する。

Pi については、各測定値のばらつきが大きく、CPとの間にはっきりとした対称的増減は見られなかった。これは脳内に含まれる種々の燐化合物からの遊離によるものと思われる。

ATP については、対照群の車かご内飼育では、50時間、1週間ともにほとんど変化なく、安静値とほぼ同じ値を示す。MA 慢性中毒群の車かご内飼育では、50時間で対照群の値より高くなり、安静値より約25%上昇して、推計学的に $0.01<p<0.02$ で有意の差を示す。1週間の車かご内飼育では、50時間からは下降して対照群の1週間値よりも低くなるが、未だ安静値には恢復しない。ここでも恢復の遅延が見られる。ADP, AMP については、MA 慢性中毒群の AMP の安静値が50時間の車かご内飼育で約20%減少し推計学的に $0.05<p<0.1$ で有意の差を示したのみで、ほとんど変化を認めない。

Table I. Effects of revolving activity upon phosphate metabolism in mice brain

Phosphate	in Home cage		in Revolving wheel (50 hrs.)	
	Control mice	MA-intoxicated mice	Control mice	MA-intoxicated mice
	(μmoles/g tissue)	(μmoles/g tissue)	(μmoles/g tissue)	(μmoles/g tissue)
ATP	2.83 ± 0.24 (7)	2.47 ± 0.41 (14)*	2.89 ± 0.16 (4)	3.10 ± 0.16 (4)
ADP	0.75 ± 0.03 (7)	0.73 ± 0.09 (14)	0.79 ± 0.07 (4)	0.75 ± 0.10 (4)
AMP	0.32 ± 0.07 (7)	0.40 ± 0.09 (14)*	0.32 ± 0.04 (4)	0.32 ± 0.05 (4)
CrP	3.51 ± 0.46 (12)	3.36 ± 0.45 (13)	3.48 ± 0.23 (8)	3.85 ± 0.12 (9)**
Pi	4.69 ± 0.79 (12)	4.71 ± 0.46 (13)	4.00 ± 0.61 (8)	4.20 ± 0.67 (9)

* : $0.05<P<0.1$, ** : $0.001<P<0.01$ —— Significant difference

Table II. CPK activity

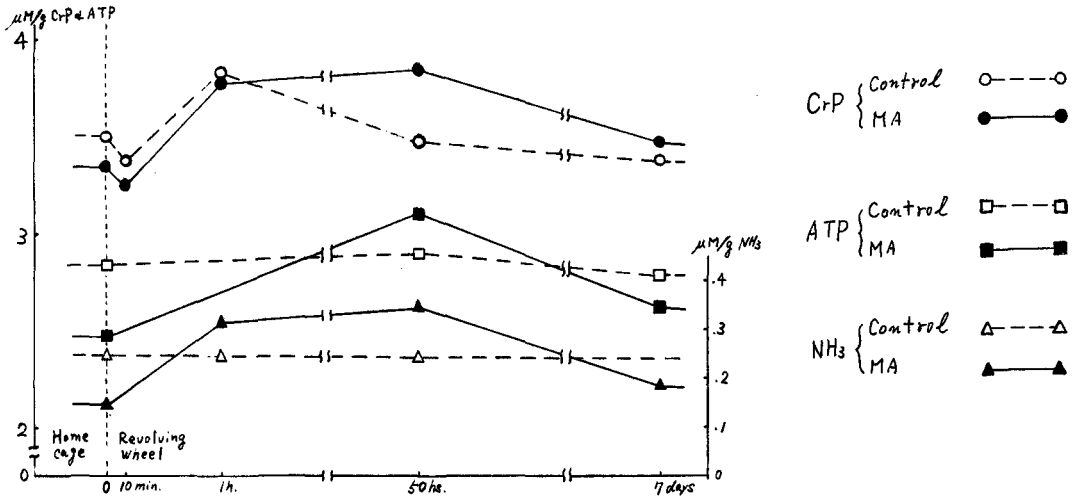
Control mice	MA-intoxicated mice
42.1 ± 1.7 (9)	41.9 ± 3.0 (10)

μmoles/g/min. (37°C)

表II. に示す通り CPK 活性については MA 慢性中毒群と対照群との間に全く差を認めない。

考察

慢性覚せい剤中毒動物で、脳 ATP が軽度に減少するという私共の成績は、高橋康夫の以前の報告と一致している。ただし CrP は有意の減少を示さなかった。この



Time-course of Changes in CrP, ATP and Ammonia Levels in Brain depending upon Change in Living Condition

所見は中毒動物で既に知られている NH_3 の減少、Ach の増加と並んで、その際の運動減退の背後に神経活動の減少を想定させるもののようである。

本報告の中心は CrP および ATP の単なる刺激による時間的変動であって、その動きは NH_3 の場合に認められた経過と好対照を示して極めてよく似ている。すなわち、これら3物質ともMA慢性中毒群は対照群より遅れて最高値に達し、その値は対照群の最高値よりも高く、増加率が大となる。さらに対照群は30時間以内に定常値に恢復しているのに対し、中毒群では単なる刺激1週間後にもなお定常値に復帰しない。

3物質の動きがこのように時間的に一致するのは、3者のレベルを決定する化学的過程に因果関係があるのか、あるいは共通の神経現象の異る側面であるのかを考えさせるものである。CrP と ATP の間の交互を媒介する CPK 活性には異常がないし、CrP と ATP の変動は平行しているから、問題は NH_3 と ATP の関連となる。NH_3 レベルの増加を NH_3 生成と glutamine 合成のバランスできまるとするならば、NH_3 固定系への ATP の供給が円滑さを欠くことが、NH_3 増加の原因となれるであろう。ATP のレベル自体が低いことを考えると、ATP の生成よりも処理の問題であり、それに関連する酵素活性の異常か、或は何等かの Compartmentalization で説明されるものであろう。我々は現在更に CPK の状態や ATPase について検討をすすめている。

慢性覚せい剤中毒動物の行動特性のうち、運動の緩慢な経過、走行ずけの遅滞(森口)[3]と共に、一度獲得された行動の固着傾向、条件行動消去の遅滞(森口)は重要な特徴である。本報告で示された化学物質の変動の経過は、行動特性と深い関連があることを示唆しているが、両者の間の因果関係についてはまだ何もいうことはできない。

文献 (1)江副,加藤ら 神経化学 5, 別号, 50 (1962)
(2)葉山稔 精神誌誌 62, 1259 (1958)
(3)森口幸雄 動物心理学報告, 49 (1963)
(4)清水健太郎ら 神経進歩 6, 651 (1962)
(5)高橋春雄 生化学 26, 690 (1955)
(6)高橋康夫 精神分裂病, 中巻三編, 93 医学書院, 東京 (1959)
(7)台, 平尾 脳と神経 16, 31 (1963)

S-6 白鼠及び猿に依る実験的フエニールケトン尿症の研究

平野修助・野口鉄也・
塚田裕三（東邦大・医・二生理）

塚田[1]は先に3%L-フェニールアラニン(Phe),3%L-チロジン(Tyr)添加固形飼料を幼若白鼠に連続的に与えて実験的にフェニールケトン尿症(PKU)を作り得る事を報告した。尿中フェニールピルビン酸(PPA)排泄は上記飼料投与後40日目に仔鼠にのみ認められた。一方血中Phe値の増加は比較的少くTyr値が著明に増加しており,実験的PKUよりも寧ろ,Tyr血症に似た様相を示した。又脳中諸物質含量にも著変が認められなかった。

そこで今回は7%L-Phe実験食で白鼠及び猿を飼育し弁別学習及び脳内アミノ酸分布の異常を調べ,併せて,肝中Phe,Tyr代謝系の諸酵素の活性を検索した。

実験方法：

I.飼育条件：(A) Wister純系白鼠を用い出産後7日目より親鼠に3%L-Phe,3%L-Tyr添加固形食を与え,仔鼠はその母乳により飼育した。飼育後14日目で仔鼠を親から分離し,時后7%L-Pheのみを添加した固形食で飼育を続けた。採尿に当っては,予め尿器に濃H_2SO_4(0.3-0.5 ml)を入れ更に流動パラフィンを重畳した。(B).出産後4ヶ月の日本猿(Macaca fuscata)を猿用固形食で飼育し,同時に実験群には1日 1.5-2.0g/Kg body wt.の割でL-Phe入り飲料水を与えた。採尿方法は白鼠と同様に行った。

II.定量操作：(A)尿の化学定量：PPAの定量はSaifer & Harrisa方法[2]に準じて行った。ホモゲンチジン酸(Homg)の定量には,ペーパークロマトで分離后抽出し,Roseman & Dorfmanの方法[3]で定量した。

(B)血液の化学定量：Pheの定量はMcCamanの方法[4],LaDuの方法[5]及びペーパークロマトグラフィ(n-Butanol: Acetic Acid: Water=20:3:5)の方法を併用し,Tyrの定量はUdenfriend & Cooperの方法[6]で行った。

(C)脳内アミノ酸の定量：白鼠では浮血后断頭屠殺し剔出組織を用いた。アスパラギン酸(Asp)グルタミン酸(Glu)γ-アミノ酪酸(GABA)グルタミン(Glu-NH_2)は組織をアルコール除蛋白后塚田らの方法[7]で定量し,Phe,Tyrは血液と同様の方法で行った。又同一資料をAmino Acid Autoanalyserでもcheckした。猿ではチオペンタンで前麻酔し,Ether Open Drop麻酔下に開頭后前頭葉の一部を剔出し資料とした。(D)肝中の諸酵素活性の測定：白鼠では浮血后断頭屠殺し剔出組織を0.9%KClでhomogenizeして酵素資料とした。Phe-Hydroxylaseは Udenfriend & Cooperの方法[8],各種Transaminase及びp-ハイドロキシフェニールピルビン酸(pHPPA) Oxidaseは Knoxの方法[9]で行った。又猿では前記麻酔下に肝右葉の一部を剔出し酵素資料とした。(E)学習実験：被験動物を学習開始3日前より食餌量を常時の1/3に落し,学習室としては暗静室を用いた。

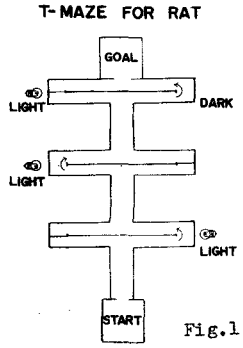


Fig.1

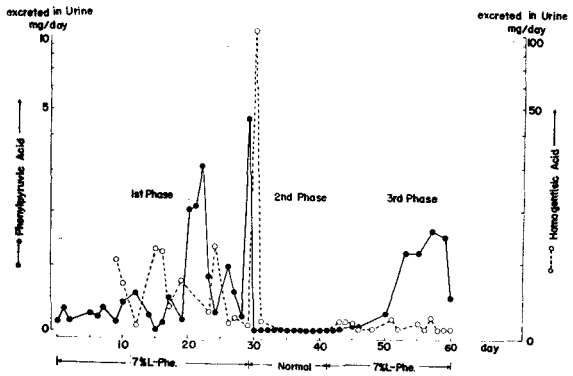
(i)白鼠一丁字迷路(Fig1)を用いて食餌条件づけによる明暗弁別学習を行った。即ち明暗暗の順序を一定とし,明暗の位置を毎日任意に変化させ1010施行で10日間の学習を行った。学習能力の指標として,Latency(Start Boxの中に留る時間) Time(Start to Goalの所要時間)及びErrorの回数をとった。(ii)猿ースキナーボックス(Fig6)を用いて食餌条件づけに依る明暗弁別学習を10100施行10日間行い,次いで○X弁別学習を10100施行6日間行った。尚○X弁別学習ではErrorの際に30V A.C. 2秒間の電気刺激を左足蹠に加えた。

実験結果及び考按：

I 7%L-Phe食飼育白鼠:

Fig 2 に示す如く 7%L-Phe 食投与を開始すると(第1相)直ちに尿中にPPAが現われ一定の周期を繰返しながら,その排泄量は次第に増大する。一方 Homg の排泄は3%アミノ酸飼育の場合と同様PPA排泄周期の最も低い時に増加するがその排泄量は3%飼育条件の際よりもはるかに少い。30日目に正常食に変えると(第2相)直ちに Homg の尿中排泄が一過性に激増しその後はPPAもHomgもともに尿中より消失した。再び実験食に戻すと(第3相)先ずHomg の排泄が現われ次いでPPAが見られる。肝中酵素活性の変化は(Table1), Phe-Hydroxylase では第1相で正常の1/5に減じ正常食に戻した第2相では正常の1/2に迄回復するが第3相で再び減少の傾向を示す。又Phe-akg Transaminase, Tyr-akg Transaminase は第1相,第3相に活性上昇があり,第2相では正常に復帰している。Phe-pyr Transaminase は何れの相でも活性上昇を示し pHPPA Oxidase には著しい変化が認められなかった。血中Phe値は7%L-Phe食投与の時期(第1相,第2相)で高値を示していた。(Table2) 此の様に7%L-Phe食では血中Phe値の増加を招来する他肝中Phe-Hydroxylase が低下しTyr生成が抑制される。尿中へのPPAとHomg の排泄周期の変動とそれらの位相にずれが現われる事は極めて興味あることで生体内に於けるPhe,Tyr代謝の調節機構を思わせる。Knox[10]らはモルモット肝でHydrocortisoneによるpHPPA Oxidase, Tyr-akg Transaminase の活性変化を報告して居りHormone のこれら代謝系に対する調節機構の存在を示した。然しKnox の報告する如きTyr-akg Transaminase の活性増加の見られる際にpHPPA Oxidase の活性低下があるという事は吾々の実験では全く見られなかった。脳内アミノ酸中Asp, Glu-NH$_2$, Glu には変化は認められないが,GABA にのみ著しい低下が見られた。(Table3) 即ち7%L-Phe食投与の時期(第1相,第3相)にGABA の値は正常の約2/3に減少し第2相では血中Phe値の減少に伴って正常値に復した。Hanson,[11] Tashian[12]らは Glutamic Decarboxylase に対してPhe誘導体が阻害作用を持つことを報告しているが,阻害に必要な濃度が非常に高い

Fig.2 7%L-PHENYLALANINE FEEDING RATS



Tab.1 Enzyme Activities in Liver Tissue in Various Phases of 7% L-Phenylalanine Feeding Rats

Phase	Phe * Hydroxylase	Phe-αKg** Transaminase	Phe-Pyr** Transaminase	Tyr-αKg*** Transaminase	pHPP**** Oxidase
Control	2.00	62.5	47.6	27.6	6.57
1	0.41	79.0	71.7	30.8	7.86
2	1.17	62.8	64.0	25.8	7.41
3	1.09	66.2	55.5	29.8	6.56

Activities of these enzymes are indicated as the amounts of tyrosine, phenylpyruvic acid** and p-hydroxyphenylpyruvic acid*** formation.(umoles/g-Liver/hr) p-Hydroxyphenylpyruvic acid oxydase**** activities are indicated as the amounts of p-hydroxyphenylpyruvic acid consumption. (umoles/g-Liver/hr)

Tab.2 Serum Phenylalanine and Tyrosine Contents in Varous Phases of 7% L-Phenylalanine Feeding Rats

Phase	Phenylalanine (umoles/ml)	Tyrosine (umoles/ml)
Control	0.07	0.05
1	2.30	0.66
2	0.49	0.16
3	5.10	0.26

Serum phenylalanine was fluorometrically determined.
Serum tyrosine was determined chemically as a nitroso-naphthol derivatives.

Tab.3 Amino Acids Contents in Brain Tissue in Various Phases of 7% L-Phenylalanine Feeding Rats

Phase	Asp	Glu-NH_2	Glu	GABA	Phe	Tyr
Control	3.75	4.43	10.0	2.65	0.10	0.08
1	2.75	3.43	8.43	1.45	1.21	0.52
2	4.00	5.03	11.0	2.66	0.13	0.22
3	3.52	3.70	8.93	1.75	0.80	0.26

These values given in the table are umoles/g-wet weght tissue and determined by naperchromatography.

点は疑問かもたれる。然しin vivoでGABAが明らかに減少することはGABAの分解酵素系の活性変化としても考慮されねばならない。脳内Pheは1相で10倍以上に増加しTyrは5倍に留った。脳内ではPPAは認めることは出来なかった。

Ⅱ 白鼠学習実験 (Fig.3)

7%L-Phe食投与群,3%アミノ酸食投与群,及び対照群に丁字迷路明暗分別学習を行ったところ,Latency, Timeに差は全く認められないが,Errorの回数にのみ7%L-Phe食群は他の二群に比しその増加があり知能発育の遅滞を推測させる結果を得た。7%L-Phe投与群で見られる如く脳内GABAが著しく低い事と,知能発育の遅滞とが直接関連し得るか否かは明らかでないが,Wolley[13]らの報告によると,実験的PKUでやはりアミノ酸の脱炭酸反応により生成する脳内セロトニンが減少すると云い,知能発育の度合と脳内セロトニン量とが平行することを報告している。吾々はPKU患者解剖例の新鮮脳のアミノ酸含量を定量しGABAが減少していることを認めた。いずれにせよ高Phe血症が持続的に存在することにより種々なる障害がひき起されるものと見做される。

Fig.3

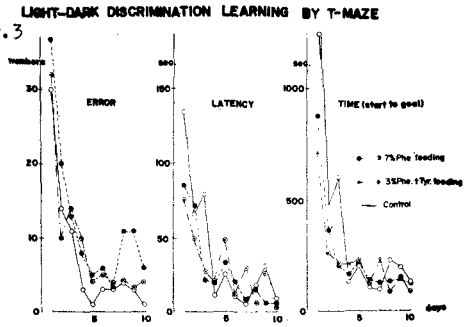
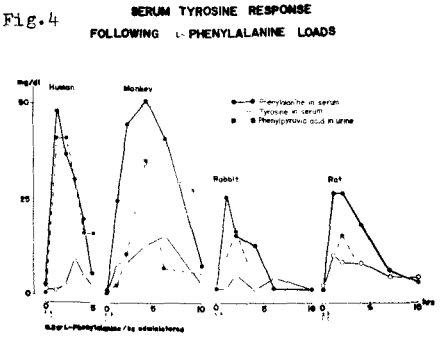


Fig.4



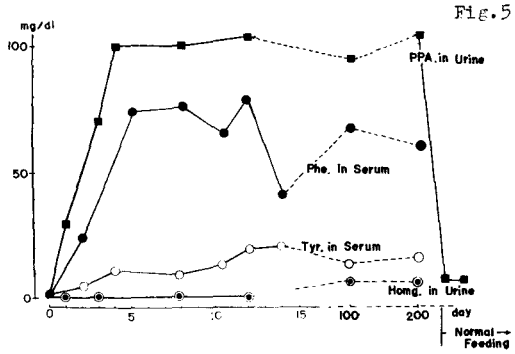
Ⅲ 高Phe飼育猿

ヒト,サル,ネズミ,ウサギの各動物に対し0.2g/Kg body wt.の割合でL-Pheを全口投与で二重負荷を行い,血中Phe値及びTyr値の変動を見ると,ヒトとサルのパターンが類似することを認めた。(Fig.4)

そこで猿では,白鼠よりも更に精細な知能発育状態を検討し得る為,猿を前記の飼育条件下に置いた。高L-Phe投与後血中のPhe値は急速に上昇し40-70mg/dlでTyrは比較的低い。又PPAの尿中排泄は飼育後直ちに認められ,その排泄量は常に70-100mg/dlと高値を示し一方Homgの排泄は最大排泄量10mg/dlと極めて少くヒトのPKUと酷似した様相を示した。(Fig.5) 高L-Phe投与後7ヶ月目で剖出した肝の酵素活性を見ると(Table4)実験群に於いてPhe-Hydroxylase活性は著に減少しTransaminaseも活性上昇を示していたがpHPPA Oxidaseには著変はなかった。又同時に剖出した脳組織のアミノ酸分布では白鼠同様GABAの減少が認められた。(Table5)

高L-Phe投与後6ヶ月目からスキナーボックス

Fig.5



Tab.4

Enzyme Activities in Liver Tissue of High Phenylalanine Feeding Monkey

Condition	Phe* Hydroxylase	Phe-αKG** Transaminase	Phe-Pyr** Transaminase	Tyr-αKG*** Transaminase	pHPP**** Oxidase
Control	1.78	52.0	12.6	21.6	204.0
High Phe	0.34	63.7	16.0	26.6	216.0

Activities of these enzymes are indicated as the amounts of tyrosine*, phenylpyruvic acid** and p-hydroxyphenylpyruvic acid*** formation.(umoles/g-Liver/hr) p-Hydroxyphenylpyruvic acid oxidase**** activities are indicated as the amounts of p-hydroxyphenylpyruvic acid consumption.(umoles/g-Liver/hr)

(Fig.6)で対照群及び実験群に明暗弁別学習を行うと Fig.7 に見る如く対照群では正解数は第2日目でほぼ100%となり誤りは8日目で20%以下となるが実験群では正解数誤数共に対照群に比して劣る。次いで行ったOX弁別学習では更にその差が著しく強化後5日目で対照群は正解数が90%以上に達した。然し実験群では、この時期にも殆んど弁別不能で条件強化する事が出来ず高L-Phe飼育による実験的PKUで知能発育に明らかに障害をもたらしたと考えられる。又脳波についても異常の有無を検討したが特に病的と見られる所見は得られなかった。正常食に復した後の生化学的変化の経緯と知能発育の経過との関連については目下追究中である。

Tab.5 Amino Acids Contents in Brain Tissue of High Phenylalanine Feeding Monkey

Condition	Asp	Glu-NH_2	Glu	GABA
Control	1.26	1.23	5.15	2.30
High Phe	1.42	1.08	6.00	1.37

These values given in this table are umoles/g-tissue weight and determined by paperchromatography.

Fig.6

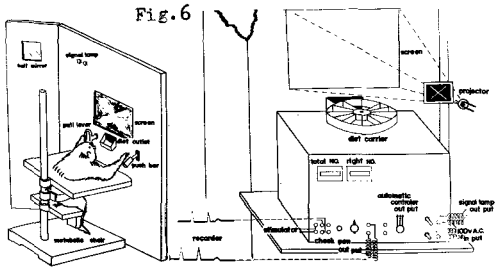
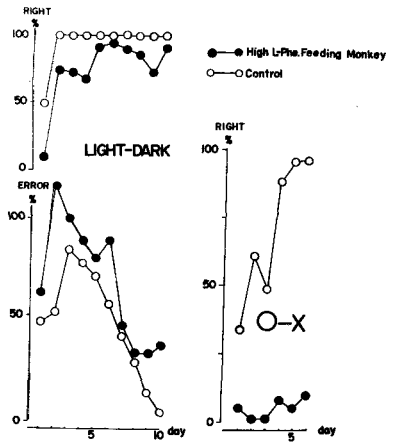


Fig.7 DISCRIMINATION LEARNING (MONKEY)



まとめ:

1) 7%L-Phe食で白鼠を飼育すると血中Phe値が高値を示し尿中にも直ちにPPAが現われる。30日目に正常食に変えると血中Phe値は減少し,PPAもHomgと共に現われなくなる。再び7%L-Phe食に戻すと血中Phe値が増加し,PPAの尿中排泄が起る。

2) 7%L-Phe食で1ヶ月飼育後の白鼠肝中のPhe-Hydroxylase活性は正常の½に減じて正常食に変えると½に迄恢復する。Phe-akg, Phe-pyr Transaminase及びTyr-akg Transaminaseでは実験食で活性が増し,pHPPA Oxidaseは殆んど変化がない。

3) 7%L-Phe食飼育白鼠脳内アミノ酸分布は,Tyr, Pheの増加とGABAの低下が見られる。

4) 7%L-Phe食白鼠の食餌条件付けによる明暗弁別学習ではErrorの上で対照群に劣る。

5) 日本猿を高Phe飼育した場合にも血中Phe値の著しい増加と飼育開始直後からのPPA尿中排泄が認められるが,Homgの排泄は殆んどない。

6) 高L-Phe飼育の猿脳内アミノ酸分布でもGABAの低下が認められ,肝内酵素活性は白鼠の場合と同様である。

7) 高L-Phe飼育猿では食餌条件付けによる明暗及びOX弁別学習で明らかに弁別能力が低下している

文献:

1) 塚田平野松谷:神経進歩 7,721 (1963) 2) Saifer,A.,Harris,A.F.:Clin.Chem.,5,203 (1959) 3) ROseman,S., Dorfman,A.;J.Biol.Chem.,192,105 (1951) 4)McCaman,M.W.,Robins,E.:J.Lab.Clin.Med.,59,885 (1962) 5) La Du,B.N.,Michael,P.J.,Bethesda,B.A.:J.Lab.Clin.Chem.,55,491 (1960) 6). Udenfriend,S.,Cooper, J.R.:J.Biol.Chem., 196,227 (1952) 7) 塚田永田:生化学 33, 51 (1961) 8). Udenfriend,S.,Cooper,J.R.: J.Biol.Chem.,194.503 (1952) 9)Lin,E.C.C.,Pitt,B.M.,Civen,M.,Knox,W.E.:J.Biol.Chem.,233,668 (1958) 10). Knox,W.E..Goswami,M.N.D..:J.Biol.Chem.,235,2662 (1960) 11). Hanson,A.:Acta.Chem.Scand. 13, 1366 (1959) 12). Tashian,R.E.:Metabolism,10 393 (1961) 13). Woolley,W.W.,Van d. Hoeven,:Science 144, 883 (1964)

S-7 実験的Porphyrin症の神経化学的研究

中尾喜久・宇尾野公義・井形昭弘・
田辺等・朝長正徳・和田攻
（東大・医・中尾内科）

急性間歇性Porphyrin症は、Porphyrin代謝異常（肝のPorphyrin体増加、尿中Heme前駆物質Porphobilinogen（PBG）、Aminolevulinic Acid（ALA）の排泄増加）と神経症状の発来を主体とする代謝疾患である。一方各種の薬品（ⓐSedormid[1]、Allylisopropylacetamide（AIA）[2]、Barbiturate[3]、ⓑHexachiorobenzene[4]、ⓒ3.5-Dicarbethoxy 1.4-dihydrocollidine（D.D.C.）[5]など）が生化学的に類似の変化を動物に惹起せしめることが知られ、種々の研究がなされているが現在Porphyrin代謝異常はそのUnderutilization（Block）説よりOverproduction説が有力である。しかし多彩な神経症状を惹き起こす機序は解明されていない。Porphyrin体及びPBG[6]、ALA[7]投与は実験的に小動物に症状を発現せしめない。又臨床的にも症状の発現と前駆物質の排泄とは完全な一致を見ない[8]。Denny-Brown、Sciarra[9]は、病理組織学的に実験的急性麻痺との類似性から血管系痙縮に続発する病変にもとずくものであると考へた。しかしHierons[10]は、各症状が後遺症を残さず回復することから、むしろ生化学的な細胞変化にその原因を求めている。

一方実験的Porphyrin症からOverproductionによる二次的必須物質欠乏説が考へられ、Talman[11]らのPurine体産生障害説がある。又Rimington[12]らはSuccinylCoAとGlycineとの結合過剰によるAcetylCoA、Acetylcholine産生障害説を出している。いずれにしても今日本症の発現機構は、不明といわざるを得ない。

我々は、DDCによる実験的Porphyrin症に於て、その発現機構と治療につき二、三の知見を得たので報告する。

〈実験方法及び試薬〉 モルモット♀ 350～450gr、犬 7～10 Kg♂を使用。
D.D.Cは、Haley法[13]を改良して合成后、エタノール水で溶解、析出を繰返した結晶を、0.25M Sucrose中に浮遊して、モルモットには一日DDC量 1.5gr/kg、犬には 2gr/kg 経口投与、一部オリーブ油に 1：10（W/V）に溶かし犬の髄腔内、腹腔内に投与した。犬では、同一犬の脳肝を生検により経時的に観察した。

肝、尿のALA、PBG、Aminoaceton（AA）は、Urata、Granickによる Column chromatography法[14]、組織Porphyrin体は、Schwartz、Watson変法[15]、肝、脳のミトコンドリア分離、ALA Synthetase（ALAS）AAS活性測定は、Urata、Granick法[14]によった。 Catarase は DilleWatkinsのヨード滴定法[16]を改良（肝は5% Homogenateで0℃5分、脳は10%、10分で測定）して用いた。Ferro-Protoporphyrin Chelataseは、Labbeの光電比色法及び一部 Fe^{59}のHeminへのIncorporation法で測定した[17]。（但し酵素抽出には5% Chole酸使用、気相は空気）

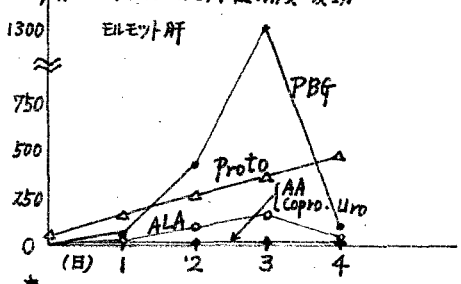
被検組織は、ホルマリン及びセロイジン固定后、H.E.、Nissl その他で染色すると共に生組織につき Monoamine oxidase（MAO）は亜テルル酸カリ法[18]、Cholinesterase（ChE）はチオコリン法[19]、Succinyldehydrogenase（SDH）は、NitroBT法[20]、Cytochrome oxidase（CyO）はNadi反応法[21]、Phosphorylase（PhR）は沃度法[22]でいずれも組織化学的に検索した。

〈実験成績〉 DDC投与動物は、食欲不振、体重減少、脱毛、振顫、四肢脱力、歩行障害を示す。

肝、尿のHeme前駆物質の変動（図1）：PBG、ALAは3日を最高として増加、Porphyrin体（主としてProto）は増加しつづけ4日目には 400 μM/gr まで達する。尿中AAは変動ない。

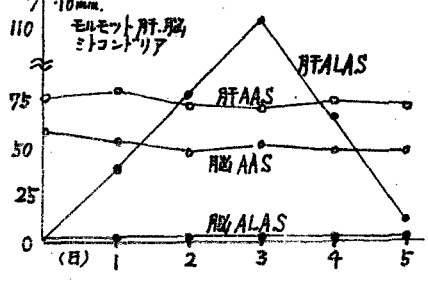
肝、脳ミトコンドリアの酵素（図2）：肝ALASは前値ではほとんど証明されないが3日で

図1 Heme前駆物質の変動



尿						
	PBG	6.4	17.2	58.5	36.0	μM/day
	ALA	1.8	2.7	5.2	2.2	〃
	AA	0.82	0.90	1.02	0.92	〃

図2. ALAS. AASの変動



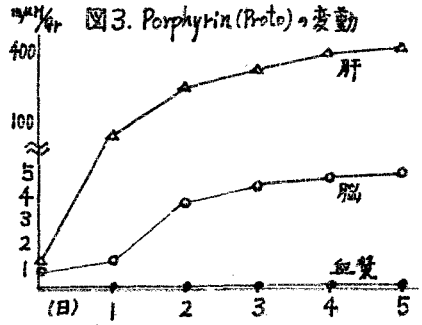
最高活性増加を示すがAASには変動がない。

脳のALASは、発症右も証明不能であった。

AASは肝同様変動を示さない。

各臓器のPorphyrin体：主としてProtoが肝では前値の数百倍、脳では4倍に増加を示した。(図3)

図3. Porphyrin(Proto)の変動



髄腔内投与の影響：肝ALASは、経口、腹腔内投与例の約1/3の活性を示した。脳ALASは証明不能であり脳の病理組織では、酵素活性とほぼ比例した変化が認められた。(図4)

図4 DDC髄腔内投与の影響

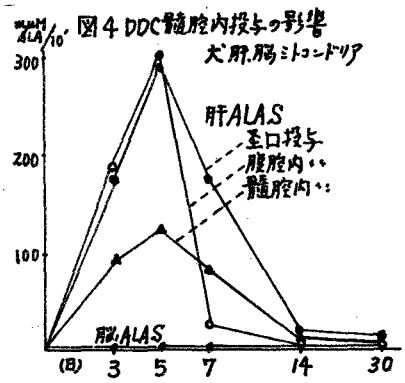


図5 薬剤のALAS. AASに及ぼす影響(1)

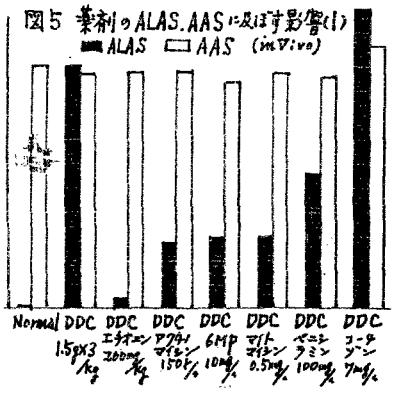
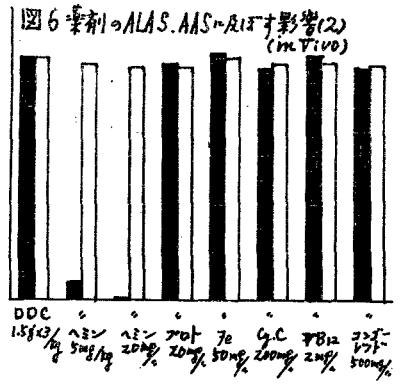


図6 薬剤のALAS. AASに及ぼす影響(2) (in Vivo)



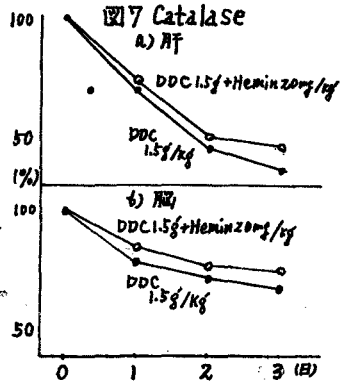
各種薬剤の影響：尿中PBG. ALA. 肝ALAS活性増加を、Ethionineは200mg/kgでほぼ完全に抑制。Actinomycin 150γ/kg. 6MP 10mg/kg Mitomycin 0.5mg/kgは約70%抑制。逆にCortison 7mg/kgでは30%増加を認めた。AASには、ほとんど影響ない。(いずれもDDCと共に連日、腹腔内投与す)

表2 HeminのALASへの影響 (in Vitro)

	DDCモルモット肝ミトコンドリア	〃 Hemin 200μM	〃 20μM	〃 2μM	〃 0.2μM
ALA prod. mμM/10'	285	285	265	285	295
	DDCモルモット肝ミトコンドリア	〃 Proto-P 200μM	〃 20μM	〃 2μM	〃 0.2μM
ALA prod. mμM/10'	285	265	270	300	275

Heminその他の影響：Heminは20mg/kgでほぼ完全に肝ALAS活性増加を抑えるが、Proto(同量)、Fe 50mg/kg、Cytochrome C(100mg/kg)はほとんど影響を示さない。又Congo Red(5%液10cc/kg)投与も影響を認めない。(図5.6)

図7 Catalase



In Vitroでの Proto. HeminのALASへの影響：DDC動

表3 Chelatase

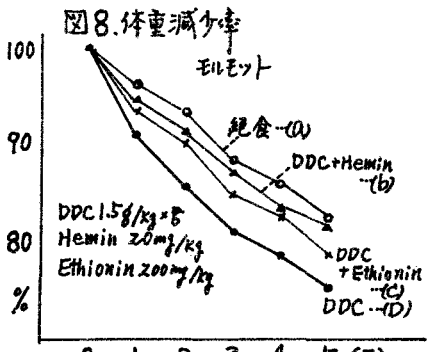
	肝		脳	
	Proto P 減少 mμM/h	酵素活性減少率(%)	Proto P 減少 mμM/h	酵素活性減少率(%)
対照	6.8		6.0	
1日	3.5	48.6	3.8	36.7
2日	3.8	46.5	2.5	58.0
3日	3.0	55.8	2.4	60.0

物肝より作製したミトコンドリアを使用最高濃度200mμMでも影響を示さない。

Catalase：肝では3日目には60%減少，Hemin併用投与にても，ほとんど同様に減少を示した。脳でも同様に他の薬剤の影響を受けず3日目に50%減少した。

Chelatase：オ1日より相当の減少を示す。(表3)

体重減少 生存率：DDCモルモットは1日30gr(5~10%)体重減少を示す。Hemin投与でALASを抑えると減少率は，対照絶食動物と近似する様になる。



	0	1	2	3	4	5 (日)
(a)	5/5	5	5	5	5	5
(b)	5/5	5	5	5	5	5
(c)	5/5	5	5	5	4	4
(d)	5/5	5	5	4	2	0
(e)	5/5	5	5	5	5	4

生存率

(e) DDC + Cortison 7mg/kg

又ALA抑制 Cortisonが生存率に好影響を示した。(図8)

病理組織所見：早期には，大脳皮質，脳幹神経細胞，小脳プルキンエ細胞，前角細胞，神経節細胞の急性腫脹，染色質溶解を末期には神経細胞萎縮，硬化，空胞形成，グリア細胞の増殖を示した。各所見は，肝ALAS，尿中PBG，ALA量には，全く関係がない。

組織化学的所見：脳のSDH，PhR，CyO，MAO，ChEいずれも著明な変化を示さない。肝では，初期には，著明な変化を示さないが，肝Porphyrin顆粒出現と平行して，同部のSDH，CyO，MAOに著明な減弱が認められた。

〈考察及び結論〉

実験的DDC Porphyrin症は，生化学的に人の急性間歇性Porphyrin症と類似しており，しかも神経症状を呈し，病理組織学的にも神経細胞を中心として変化を認めた。又Heme前駆物質の増加は，明らかにOverproductionによるものであり，TCA cycleからHemeに至る経路の最初の反応にあずかるALASの活性が著しく増加しており，しかもその活性増加は，Amino酸利用障害を来たすEthionin，Messenger RNA合成阻害を示すActinomycin，DNA阻害剤Mitomycin，Purine代謝拮抗剤6MPで抑制され，同じAminoketon反応であるAASには影響がないことから，蛋白合成を伴ったEnzyme Inductionと考へられる。

次に興味のあることは，Heminが少量でそのInductionを抑制することである。Proto，Feでは，その作用が極めて弱いし，又Cyt.C，VB12などPorphyrin金属を有する物質にもその作用はない。又Congo RedによるRES blockでも，DDC Porphyrin症は発症する。In VitroでHeminは直接ALASに影響を及ぼさない。

実験的Porphyrin症で肝のCatalaseが著明に減少すること，Catalase合成阻害のあること[23]は多くの報告があり，DDC Porphyrin症でも同様であった。しかも，Hemin，Ethioninでで，ALA活性増加を抑制しても，Catalase低下は同程度に認められる。以上の事実からDDC Porphyrin症では，Catalase活性減少と直接関係ある事件が第一義的なものと考へられALAS活性増加及びそれによるPBG，ALA，Porphyrin体増加は，二次的現象と考へられる。

DDC投与で肝Chelataseが減少することはOnizawaらの報告があり[24]，我々の実験で

も才1日から約40%の減少を示した。又DDC Porphyrin症の特徴として Protoの蓄積がより著明であること，上記 Heminが ALAS活性増加を抑えることから，DDCは Chelatase を Blockし，それによる Hemeの減少による Possitive feedbackが ALAS に働きかけ Heme前駆物質の Overproduction を誘発せしめるのではないだろうか。Heminが微生物で ALASに対し Negative feedbackに働くことは Lascelles[25]，Burnham[26]の報告がある。又 Toxohormoneは Catalase合成抑制と同時に肝 Porphyrin体を増加せしめるという。[27]

脳に於て Urata Granick法では正常，DDCモルモット，犬で ALAS活性は証明出来なかった。が Porphyrin体は約4倍に増加し，Catalase減少 Chelatase減少と肝と同様の変化を示すしかも肝 ALAS増加の有無とは関係がない。以上のことは，やはり脳に於ても肝と同じ因子が肝と同様に作用を及ぼしていると考へられ，脳の変化は PBG，ALA，Porphyrin体と直接関係を有しないと結論出来る。Labbeらは[28] AIAは Catalase低下と Chelatase増加と惹起するという。一方 Lascelles[25]は，ALAS活性は Hemeと O_2 を含む Electron transport chainにより調節されているという。AIA Porphyrin症では，Terminal Respirationが Blockされ，その feedbackが働いていないのではないだろうか。

尿中 AA排泄，脳肝の AAS不変は Rimington説と相反する所見であり，人の Porphyrin症でも AA排泄は不変であるという。[29]

生存率は，ALAS活性を抑制した群に高く，体重減少も少いことは ALAS Inductionが二次的に各種代謝に悪影響を及ぼしていると考へられる。組織化学的に Porphyrin体顆粒出現と同時に，同部の SDH，CyO，MAOが減弱を示すことは，これを裏書きするものと考へられる。Porphyrin体は SDH等の阻害を示すという報告もある。[30]

Cortisonは，ALAS，PBG増加を促進させるが，生存率は高く，二次的障害を改善するものと考へられる。Heminが ALAS増加を抑制し二次的障害を防止すること，Cortisonが好影響を示すことは，Porphyrin症治療上有意義と考へられる。

<文　献>

1) Schmid, R. etal. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 81：685 (1952)　2) Goldberg, A. etal. Proc. Roy. Soc. B., 143：257 (1955)　3) Goldberg, A., Biochem. J. 57：55 (1954)　4) Ockner, R. K. etal. nature 189：499 (1961)　5) Solomon, H. M. etal. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 100：583 (1959)　6) Goldberg, A. Brit. J. Pharmacol：9：91 (1959)　7) Jarrett, A. Lancet Jan 21. 125 (1956)　8) Acker, B. Lancet. Jun 10. 1256 (1961)　9) Denny Brown, D. etal. Brain. 68：1. (1945)　10) Hieron, R. Brain 80：176 (1957)　11) Talman, E. L. J. Biol. Chem. 212：663 (1955)　12) Rimington, C. Reports at 7th international Congress of Neurology (1961)　13) Haley, etal. J. chem. soc. 3115 (1951)　14) Urata, G. etal. J. Biol. Chem. 283：811 (1963)　15) Swartz, S. etal. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 95：216 (1957)　16) Dille, R. etal. J. Lab. Clin. Med. 33：480 (1948)　17) Labbe, R. F. Biochem. et Biophys. Acta. 31：589. (1959)　18) 高杤。日病理誌 45：307 (1956)　19) Koelle, G. B. J. Pharmacol. Exper. Therap. 103：53 (1951)　20) Nachlas, M. M. etal. J Histochem. Cytochem. 5：420 (1957)　21) Burston, M. S. J. Histochem. Cytochem. 7：112 (1959)　22) 武内 etal. 東京医事新誌 71：519. (1954)　23) Schmid, R. etal. J. Biol. Chem. 217：263 (1955)　24) Onisawa, J. etal. J. Biol. Chem. 238：724. (1963)　25) Lascelles, J. J. gen. Microbiol. 23：487 (1960)　26) Burnham, B. F. etal. Biochem. J. 87：462 (1963)　27) Ono, T. Gann 47：171 (1956)　28) Labbe Biochem. et Biophys. Acta. 41：185 (1960)　29) Tschudy. Lancet 2：660 (1963)　30) Silverstein. Bioch. Pharm. 11 431 ('62)

S-8 マウス脳室内注入法より見た痙攣誘発とイオン特にCaイオンとの関係

喜田富太郎・神谷大雄・
柴田邦治（近畿大・薬理）

最近私達はHaley & McCormick法に従い無麻酔，無拘束マウスの脳室内に多数の痙攣誘発又は抑制物質，その他イオンを注入する実験を行い夫々報告してきた.[1-14] 初めに種々の痙攣誘発物質を溶解した0.9% NaCl溶液 0.02cc/20g注による痙攣致死量をLD95 (mg/20g) の値で求めた結果 Tab. 1 に示すように，EDTA-2Na, tripolyphosphate, fumaric acid, Na-oxalate, trisodium citrate, NaF又はnicotineなどのCa++とchelateや難溶性物質を形成し易いものでは，何れもLD95は比較的大であった．しかし痙攣誘発能を痙攣開始迄の潜時と痙攣致死迄の時間で比較してみると，前者は殆ど零乃至極く短時間であり，後者は痙攣致死迄の時間も一般に短かかった．これに対してprotoveratrine, coriamyrtin, picrotoxinin, picrotin, ouabain, 又はsaponin等のいわゆる膜作用物質はその逆で，LD95は小で，又痙攣誘発迄の時間と痙攣致死時間共に比較的長いという特徴が認められた．

Tab. 1

convulsants	LD_{95} (mg)	time before convulsion (sec.)	time before death (sec.)
EDTA-2Na	200	immediately	4 ～ 8
tripolyphosphate	50	〃	30 ～ 36
fumaric acid	100	〃 ～ 17	60 ～ 180
Na-oxalate	200	immediately	4 ～ 8
trisodium citrate	200	〃	3 ～ 5
NaF	200	〃 ～ 6	6 ～ 140
nicotine tartrate	50	immediately	10 ～ 20
protoveratrine A	2	8 ～ 39	70 ～ 429
coriamyrtin	2	11 ～ 89	53 ～ 150
picrotoxinin	2	38 ～ 80	84 ～ 260
picrotin	20	120 ～ 300	30 ～ 310
ouabain	>2	13 ～ 60	450 ～ 1800
saponin (Merck)	200	immediately	35 ～ 120
N-methylaspartic acid·H_2O DL	3.3	〃	33 ～ 65
〃 D	0.4	〃	6 ～ 10
N-methyl-DL-glutamic acid	5	2 ～ 3	11 ～ 13
N-acetyl-DL-aspartic acid	200	immediately	79 ～ 94
DL-β-hydroxyglutamic acid threo	10	〃 ～ 8	6 ～ 10
〃 erythro	10	3 ～ 4	7 ～ 13
GABA-choline	200	immediately ～10	68 ～ 182
DL-homocysteic acid	60	immediately	25 ～ 62
D-homocysteic acid	15	〃	27 ～ 38
hydroquinone	200	〃	300
dexamethasone-21-phosphate di-Na	80	〃	12 ～ 25

この様なデータは脳細胞膜のある場所から Ca^{2+} を deprive することが痙攣誘発のより直接的な階程ではなかろうかと想定するのに好都合である．先に吾々の発見した新しい痙攣誘発物質 N-methyl-D-aspartic acid[2] では $LD_{95}=0.4\mu g$ という極めて微量で注射直後より極めて激しい痙攣を起し，反転跳躍又は疾走型痙攣から引続き典型的な T.F 乃至 T.E を起して死亡した．　D型での効果を期待するためには，DL型では更に大量の 3.3 mg が必要で，又炭素数の1つ多い N-methyl-DL-glutamic acid では 5 mg が，又 N-acetyl-DL-aspartic acid では 200 mg もの大量が必要であった．

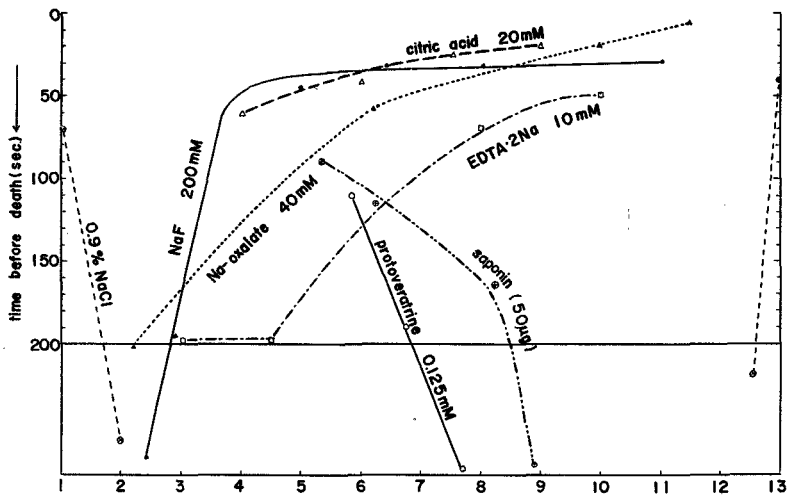


Fig. 1

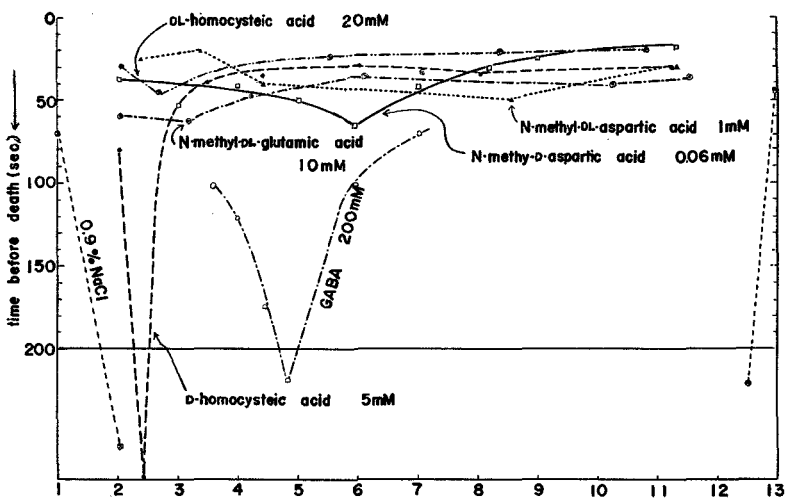


Fig. 2

更に吾々は従前より痙攣誘発の mechanism がお互に異った立場から論議されて来た薬物5種（coriamyrtin, EDTA, ouabain, thiosemicarbazide 又は N-methyl-D-aspartic acid）を選び，その LD_{95} を脳室内に注入して誘発させた痙攣が medium 中の高濃度 Ca^{2+} によって抑制度の強弱はあっても，何れの薬物痙攣に対しても共通して抑制を示すという成績を得ている[1]．Mg^{2+} も抑制効果はあるが，ouabain, EDTA に対する抑制は弱いようである．

Ca^{2+} の抑制度が Ca^{2+} と痙攣物質との chelating activity と必ずしも平行的でない点から，Ca^{2+} の抑制作用機序は脳脊髄液などの，いわゆる external medium 中での Ca^{2+} との結合によるよりも寧ろ，Ca^{2+} の関与した細胞膜に対する直接作用であろうとする考え方が妥当と思われる．

そこで膜に結合する Ca^{2+} が labile になることが痙攣誘発の重要な step ではなかろうかという作業仮説から，痙攣物質殊に chelating agent などではこれを溶解する medium の pH がアルカリ側に傾くに従い chelate が安定となり，従ってアルカリ側で痙攣が強く現れ

る可能性が想定される。そこで痙攣誘発物質をpHの異る0.9% NaCl mediumに溶解しマウス脳室内に注入後，痙攣誘発迄の時間，痙攣致死時間，致死率などを主なる判定基準に，又痙攣の様相を従なる基準としてその効果を比較検討した。尚使用したマウスは一群6～10匹でその成績は明らかに注入技術の失敗によるものを除き算術平均で示した。Fig. 1, 2 はpHと痙攣致死迄の時間との関係を示したもので NaF 200, citric acid 20, Na-oxalate 40, 又はEDTA-2Na 10各mM conc.では何れもmedium pHがアルカリ側に向うに従って痙攣致死時間の短縮即ち痙攣誘発能の減弱が認められたのに反し，protoveratrine 0.125mM 又はsaponin (50μg) では逆にアルカリ側に向い痙攣致死時間の延長が認められた。この様に痙攣誘発物質の作用はpHの変化により異った変化をする2群に分けることが出来た。尚0.9% NaCl 単独ではpH 2以下又は12.5以上程度でないと痙攣致死は起らなかった。従って少くともcationizeされたfreeのNaやanionizeされたfree Clの作用ではないと思われる。Fig. 2によるとN-methyl-D-aspartic acid 0.06, N-methyl-DL-aspartic acid 1, GABA 200, 又はD-homocysteic acid 5各mM では何れもmedium pHがアルカリ側に向うに従い致死時間が短縮する曲線と，逆に酸性側に向い致死時間が短縮する曲線とが共存している様である。しかしDL-homocysteic acid 200やN-methyl-DL-glutamic acid 10各mMではこの様な傾向は不明瞭であった。これらのアミノ酸又はその関連物質がこの様な二相性の作用を現わすためには，anionic siteとcationic siteの間の炭素数3～4程度が必要で，又D型の方がより強力であると思われる。

別にmedium pHと致死率との関係をしらべたが，citric acidなどではアルカリ側に向い致死率が増強されたが，saponin又はprotoveratrineではその逆であった。又N-methyl-D-aspartic acid 又はD-homocysteic acidではアルカリ側に向い致死率が増加する曲線と，酸性側に向い致死率が増加する2種の異った曲線を併有していた。アルカリ側に向い痙攣誘発能が増強される物質では脳脊髄液中でのCa^{2+}とのchelateが予想されるので，実験可能なEDTAを選び，EDTA-4Naのcontrolと予めMg又はCaとchelateしたもつpHを6.0に調整し痙攣致死迄の時間を比較実験した。その成績はFig. 3に示しているが，EDTA-4Na 10, 25又は50 mM単独で何れも短時間内に典型的な痙攣致死を起すのに対して，EDTA-2Na-1Caでは痙攣の誘発も極く軽度で，しかも致死迄の時間は∞でありその抑制効果は極めて強力と思われる。EDTA-2Na-1Mgの場合は10～25mMという低濃度の場合のみ痙攣致死時間が∞又は延長されており，その効果はCaに較べると遙かに弱いようである。別に致死率との関係を求めたがこの場合の成

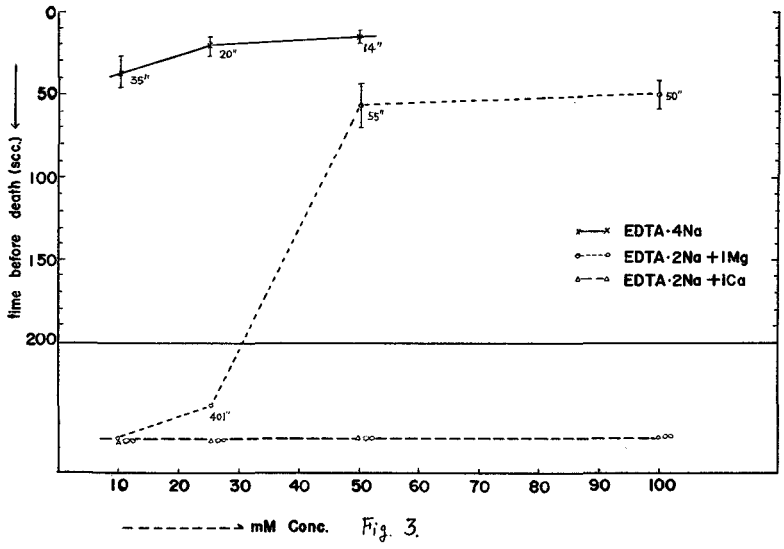


Fig. 3.

績も致死時間との関係と同様であった。　この様な Ca^{2+} に原因を求める仮説は更に髄液中 Ca^{2+} の定量を ^{45}Ca などを用いて動物実験することにより確かめねばならない。
又図示していないが，他に medium pH のアルカリ化に従い痙攣誘発作用を増強したものとしては $Na_2B_4O_7$ 200; pyrophosphate 10; tripolyphosphate 100; Na_2HPO_4 100; $NaHCO_3+Na_2CO_3$ buffer 100; sarcosine 200; γ-dimethylaminobutyric acid 100各 mM conc. などであった。　又痙攣誘発能が medium pH によって全く影響されないものもあった。例えば succinate-Na 100; L-aspartic acid 33.3; γ-dimethylaminobutyric acid 100; coriamyrtin 0.179; thiosemicarbazide-HCl 100; glycine 200各 mM conc. 及び ouabain 20μg/0.02cc などである。
次に弱塩基性イオン，塩基性アミノ酸，又はその関連物質の作用を示すと，medium pH がアルカリ側に向うに従い behavior での鎮静が増強された。即ち taurine 200; arginine 100; ornithine 100; L-lysine 100; histidine 100 各 mM conc. などである。
以上を総括して痙攣誘発の mechanism には多々あるとしても，マウスの脳室内に多数の化学物質を直接適用し短時間内観察でのモデル実験から，その mechanism の少くも一部には次の2つの step の関与が考えられる。
その1つは citric acid や EDTA に見られるように恐らく膜の Ca^{2+} と chelate することなどによる Ca^{2+} の depletion が一つの trigger になるのではないかとする想定で，今1つは N-methyl-D-aspartic acid や GABA において酸性側 pH で見られる H^+ の影響，taurine や histidine においてアルカリ側で見られる OH^- の影響などから考えて，痙攣誘発の方向に働くのがアミノ酸構造中 positive charge の部分であり，逆に抑制的に働くのが negative charge の部分であろうとする想定から出発した生体側の receptor の想定である。
しかしこの想定を裏付ける実験を行うには幾多の困難が横たわっている。そして N-methyl-D-aspartic acid による典型的な痙攣誘発にはこの2つの step が関与しているように思われる。

文　献

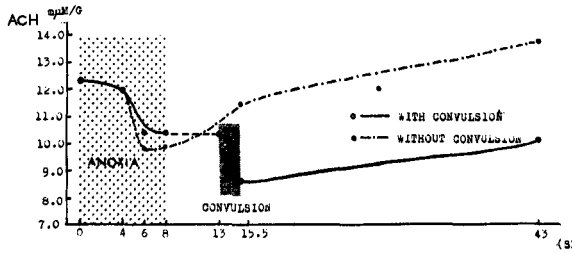
(1) 喜多：日薬理誌., 59　508 (1963).
(2) Kita, T., Kamiya, H. and Kiyota, C.: Biochem. Pharmacol., London, 12 213 (1963).
(3) 喜多・神谷・清田：第24回日本薬理学会近畿部会講演発表 (Nov. 1963).
(4) 喜多・清田・神谷：「條件反射」印刷中

S-9 各種痙攣パターンの局所神経化学的研究

融　道男・高見沢ミサ・
仮屋哲彦・小林暉佳・
小林健一・高橋良（東医歯大・神経）

dd系マウスを窒素ガスによる急性のanoxic anoxiaの条件下におき、その際の動物の行動変化を観察し、その各時期の神経化学的背景について研究した時、われわれは次のような事実を見出した[1]。すなわち、ほぼ完全に99%窒素ガスで置換された容器内に移し8秒間のanoxia負荷ののち空気中にとり出したマウスは、6秒後に14%が痙攣を起した。このanoxia後痙攣は強直様であり、伸展性の要素を欠き、1～3秒間持続し引きつづいて両側後肢に同期した間代性痙攣様運動がみられるものであつた。この時の脳（終脳+間脳）のAcetylcholine (ACh)の変化はFig.1に示すように、anoxia後痙攣を起す前に既に正常値より低いことが注目された。高橋ら[2]が報告したように、通電による最大痙攣（MES）の不応期は、通電後減少したAChが正常値に回復する時期に一致している。そこでanoxia後痙攣を起す時点で通電刺激を加えたところ、動物は痙攣を起さず、この通電に対する不応期は、ACh値が正常に復帰するanoxia負荷後35秒（95%信頼限界28～44秒、但し、anoxia後痙攣を起さなかつた群について）まで続いた。頭蓋通電により誘発された発作発射は、電気生理学的にみると、まず新皮質から発生する[3]とされているので、この通電に対しては応じない時点でanoxia後痙攣が起ることは、anoxia後痙攣が皮質から起るものではないことを暗示している。anoxiaに対する抵抗性は、脳の各部位によつて異なり、系統発生的に新らしい部分――物質代謝が高度に分化した部分ほど抵抗性が弱く、古い部分ほど強い抵抗性を持つというmetabolic gradientの存在が認められており、またSugar & Gerard ら[4]が確かめたように、anoxiaによる変化からの回復の序列もこの勾配に従うとされているので、われわれのみたanoxia後痙攣が、強直性の要素が強く、かつ、終脳、間脳のAChが正常値より低い値にある時起つていることは、この痙攣が回復の早い下位の脳領域に関連したものであると思われ、それゆえ脳のAChの変動を考えるとき、終脳、間脳に限らず、より下位の脳領域の動きもあわせて観察していくことが必要と思われた。

Fig. 1　Change of Brain ACh Content of Mice induced by Anoxia



今回は従来の通電痙攣のほかに、脊髄性痙攣といわれるStrychnine痙攣をとりあげ、その痙攣パターンの差異を脳内の局所別AChならびにPhosphocreatine(PCr)の変動との関連においてみるために、下記のごとき実験を行なつた。

実験動物はWistar系ラット（体重180～300g、♂）を用い、電気刺激はWoodburyの装置により、最大痙攣を生ずるに充分な140mA、0.2秒を通電条件とした。Strychnineはすべてのラットに痙攣を起す4mg/Kgを皮下注射した。

Fig. 2 Change of ACh and PCr Content from several Brain Areas of Rat by elect rically induced Convulsion

Change of ACh Content from several Brain Areas of Rat injected with Strychnine

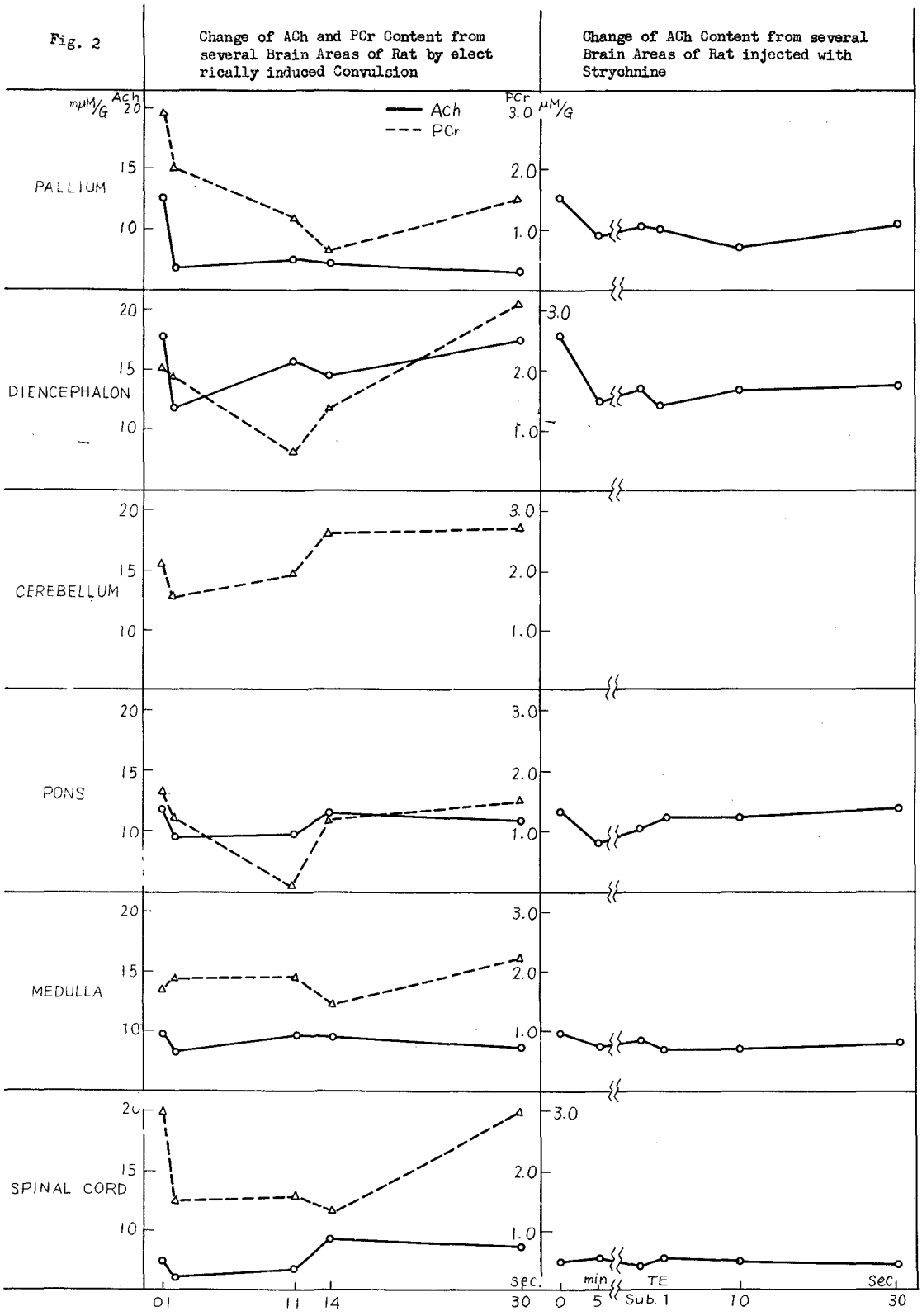


Table 1 Change of Ach and PCr Content from several Brain Areas of Rat by electrically induced Convulsion and Strychnine Injection

ACh (mμM/G)

	PALLIUM	DIENCEPHALON	PONS	MEDULLA	SPINAL CORD
Control	12.60±0.66(4)	17.71±2.42(4)	11.88±0.77(3)	9.74±2.53(3)	7.48±0.61(3)
ELECT. STIM.					
1 sec.	6.99(2)	11.83(2)	9.41±1.76(3)	8.14±3.03(4)	6.05(2)
11 sec.	7.66(2)	15.68±0.99(3)	9.96(2)	9.74(1)	6.93±0.83(3)
14 sec.	7.21(2)	14.47(2)	11.50(2)	9.63(2)	9.35±1.16(3)
	6.66(2)	17.55(2)	10.84(2)	8.86(2)	8.69(2)
STRYCHNINE					
5min.after Inj.	9.52(2)	12.27(2)	8.75(2)	9.90(2)	8.00(2)
Subconvul. State	10.34(2)	13.48(2)	9.13±3.08(4)	8.86±2.12(4)	7.21±1.38(4)
1 sec. after TE	10.01±0.83(3)	12.21±0.50(4)	10.11±1.76(4)	9.35±2.31(4)	7.70(2)
10 sec. after TE	8.58±1.82(3)	13.53±1.98(3)	11.11±3.41(3)	8.80±2.81(4)	7.15±1.05(4)
30 sec. after TE	10.51±0.72(3)	13.70±2.53(3)	11.88±3.69(3)	9.08(1)	7.10±2.20(3)
3 sec. Shaking at 5 min. after Inj.	8.42(2)	12.10(2)	8.97(2)	7.21(2)	7.59(2)
10sec. Shaking at 5min. after Inj.	9.02(2)	13.53±0.44(3)	6.99(2)	8.03±0.72(3)	6.77(2)

PCr (μM/G)

		DIENCEPHALON	CEREBELLUM	PONS	MEDULLA	SPINAL CORD
Control	2.95±0.85(3)	2.05(2)	2.12±0.15(3)	1.66±0.84(3)	1.72(2)	2.97±0.51(4)
1 sec.	2.01(2)	1.89±0.49(3)	1.58(1)	1.21(2)	1.86(2)	1.49±0.23(3)
11 sec.	1.20±0.58(3)	0.63(2)	1.98±0.58(3)	0.11(2)	1.89(2)	1.60(2)
14 sec.	0.67±0.17(3)	1.38±0.73(4)	2.63±0.96(6)	1.19±0.36(5)	1.44±0.66(3)	1.33±0.49(4)
30 sec.	1.52±0.47(4)	3.13±0.02(3)	2.66(2)	1.49(2)	2.27(2)	3.0(2)

動物は液体窒素で凍結し、ACh測定はCrossland[1]、PCrは高橋[5]の方法により行なった。中枢神経系はZemanら[9]を参照しつつ、嗅脳をのぞくPallium, Diencephalon, Cerebellum, Pons, Medulla, Spinal Cord(上位から3cm)の6部位に分割した。

実験結果ならびに考察 (Fig.2, Table 1)

Table 1に示すごとく、AChの安静時の値は200～250gのラットでほぼ同様な分割法ならびに抽出法によるCrosslandら[2]の値, Cerebral Hemispheres 15.4, Upper Brain stem 19.8, Cerebellum 2.42, Medulla & Pons 10.45 (各mμM/g)と近似している。CerebellumはACh含有量がきわめて少なく、われわれの測定では各時期の変化をとらえるにいたらなかったが、安静時値として1.7 1 mμM/gを得ている。Spinal Cordの値はかつてWelshら[8]が非凍結で測定した値(5.5 mμM/g)があるが、この報告は他の部位の値がすべて低値を示しているのでにわかに比較し難い。

(1) 通電痙攣 通電痙攣の経過は、Tonic Flexion約1秒, Tonic Extension約10秒, Clonic約3秒だつたので、通電後1秒, 11秒, 14秒および回復過程をみるため30秒後の時点でAChを測定した。通電1秒後にPallium, Diencephalonで

急激なAChの下降がみられる。PalliumのAChは30秒後にまだ回復の徴をみせないが、Diencephalonでは11秒で安静時の値に近づいているのが注目された。Pons以下は痙攣全経過を通じほとんど変化はないものと推定される。このことから、従来われわれの測定していた脳領域(終脳+間脳)の変化は、少なくとも2つの領域の異なつた変動の合成であつたことがわかる。痙攣からの回復はDiencephalonにおいて、より急速であり、これは、同時に測定したPCrの回復過程が、Palliumでは遅れていることがその裏づけとなろう。

(2) Strychnine痙攣　　Strychnine注射後平均10分35秒でTonic Extension typeの痙攣を起すが、それまでに反射性亢進、不規則な筋縮様運動、持続的振戦などが痙攣準備状態として観察される。全身の筋の持続性強直であるこの痙攣は1分以上続き、最後に間代性痙攣を示し、死亡する。この経過中注射後5分、痙攣を起す徴候がみえた時(痙攣発現約3秒前)、痙攣発現1秒後、10秒後、30秒後と経時的にAChを測定した。一方われわれが皮下注射を用いたため痙攣発現までの時間が個体によりきわめて不規則であり、痙攣準備状態にいたるAChの変化をとらえられないことをおそれ、注射後5分の時点で容器を振盪させて刺激を与え・人為的に痙攣準備状態をつくり　振盪3秒後ならびに10秒後の時点をも測定の対象とした。

Palliumでは、注射後5分ですでに減少の傾向を示し、痙攣の開始に向つて徐々に減少するが、痙攣開始にあたり、急激な下降はみられず、痙攣開始後30秒では回復の傾向を示す。Diencephalonでも注射後5分ですでに減少を示し、痙攣開始1秒後に最も低い値を示したが、10秒後に回復の傾向をみせる。Ponsでは痙攣が開始するまでは同様に減少する。この傾向は振盪刺激を加えた場合にも同様にみられている。しかし痙攣がはじまると回復しはじめていることは特徴的といえよう。Medullaでは、全般的に著明な変化をみせず、振盪刺激において減少の傾向を示すようであるが、確証を得るには至つていない。Spinal Cordでは、有意な変化はどの時点においてもとらえられなかつた。

Strychnineの作用点は、その機構は充分解明されていないとはいえSpinal Cordに正確に局在化されている。しかしSpinal Cord以外に、Cortex, Medulla, Cerebellumに対する作用も認められている。われわれの実験結果をみると、痙攣のはじまる数分前から、Pallium, Diencephalon, PonsのAch量が減少の傾向を示しており、痙攣の発現に際して通電痙攣ほどの変動を示さぬ点は、この痙攣に特徴的であるといえよう。しかし、われわれの方法ではSpinal Cordにおいて何等の変化も証明し得ていない。この点に今後この痙攣を解明するいとぐちがあると思われる。

文　献

1) Crossland,J.: J. Physiol. 114:318,1951.　2) Crossland,J. et al.: J. Physiol. 125:56,1954.　3) 宮坂：神経進歩　5:227,1960.
4) Sugar,O. et al.: J. Neurophysiol. 1:558,1938.　5) 高橋：生化学 26:690,1955.　6) Takahashi,R. et al.: J. Neurochem. 7:103,1961.
7) 融ら：精神経誌　66:70,1964.　8) Welsh,J.H. et al.: J. Neurophysiol. 7:41,1944.　9) Zeman,W. et al.: Craigie's Neuroanatomy of the Rat. Academic Pr.,1963.

S-10 ミオクロヌスてんかんに関する生化学的ならびに組織化学的研究

難波益之（山口医大・精神）

中枢神経系の遺伝性代謝疾患は代謝過程における酵素系の異常に基ずくことが予想される(1)。かかる疾患には Tay-Sachs型, Niemann-Pick病, Gaucher病, van Bierke病, Pfaundler-Hurler病, metachromatic leucodystrophy 等が知られているが，ここに述べる症例は上述のいずれにも属さない特殊な疾患である。

この症例の臨床症状は，これまで進行性家族性ミオクロヌスてんかんと呼ばれたものにほぼ一致し，病理組織学的には中枢神経内に特有の小体が発見されると同時に，肝臓線維と心筋線維にも特有な物質が沈着している。

生存中の生化学的検査についての詳細な内容はすでに難波ら(2)が報告したが，その中で異常所見と思われたものは，血清糖蛋白濾紙電気泳動像でのアルブミン分画の増加とα-分画の出現，また血清アミラーゼ，GOTならびにGPTの増加である。

今回の報告では，小体の発生場所，小体の構造および組織化学的研究の結果を述べる。

小体は中枢神経内神経細胞の胞体，樹状突起およびアストログリアの胞体内に存在するほか，一見細胞成分との関係が不明瞭のものもある。他方，神経細胞の軸索，脳神経を含む末梢神経，Auerbach ならびに Meissner神経叢には見当らない。このことは細胞成分との関係が不明確な小体を除外すれば，小体発生の母体が中枢神経内外胚葉性細胞々体とその樹状突起にしか存在しないことを暗示する。

小体と中枢神経局所との間には一定の特殊関係が認められる。小脳歯状核，黒質，視床外側核の一部および脳幹網様体等の神経細胞には小体が特に多数見出せるが，Purkinje 細胞，Betz 細胞および下オリーブ核神経細胞には稀であるかまたは欠く。すなわち，小体の発生に関しては脳の局所特異性がある。

小体の構造は，一般に内部が蜂窩状を呈する球形で，大一中型小体ではその表面が細胞々体で被覆されている。小型小体は大一中型小体に対して内容が単純で，母地に近いものと考えられる。電子顕微鏡像では，四酸化オスミウムとウラニール酢酸カリ処理後の超薄切片に，蜂窩の断面があたかも網状に現われる。網状の網糸すなわち小蜂窩の壁は電子密度の高い二枚の外層と電子密度の低い一枚の層計3層から成り，壁の表面は平滑である。また壁とそれに囲まれた各小窩内には電子密度のやや低い物質が充たす。このことは，あらかじめ組織に Baker の ヒ リガン抽出法を行って標本における電顕像では，壁の電子密度が高まりから境界鏡利な素材として現われることで確められる。

中一大型小体は光顕像で外内二層に区別され，外層は微細顆粒状で顆粒と顆粒間基質を区別できる。また外層内には細い放射構造が認められる。電顕像では前記の蜂窩壁は大部分細断しているが，母地の多形はまばらに散在されている。外層内側では細断の傾向が強く，さらに蜂窩壁は断化しまるいは微細顆粒状にもなる。中一大型小体外層にはしばしば Nissl 小体の一部が混入しているが，小型小体にはそれを見ない。

内層は外層よりさらに著明な形態的変化をする。内層の外側部では蜂窩状構造がほ

とんど報縁的となり，外層に比較して電子密度はははだ低い。その中には種度に膨化し，また互に分離した蜂窩態の横断面が円型と現われている。これによってみると，おそらく分離した蜂窩態は管状に近い構造を持っと思われる。以上の部分の内側に光顕像で索状を呈する内層のもっともうすい部がある。この部では小嚢態が再び集合しあたかも葡萄の房状に見える。電顕像で内層中心に見えとれる電子密度の極めて高い星芒状構造は，光顕像における同名のものに一致するが，その中にはやはり変型した小嚢態が見えとれる。すなわち小体の構造を通観すると，小型小体は母地にもっとも近く，中一大型小体外層はそれに次ぎ，内層から中心へ向けて漸次崩壊が進行しているように思われる。また他方では，中一大型小体の複雑な構造は，外層内 Nissl 小体を除いては他の物質が新に加わったためではなくて，母地を起源とした一連の変化の過程をかしていることが窺える。このことはつぎに述べる組織化学的所見の解釈に重要な示唆を与える。

組織化学的検査の結果は表に示す。

総ての小体におけるズダンBB (postchromation)，ナイルブリュー硫酸塩，岡本の燐脂質証明法，Feyrter 染色の陽性および Baker のピリダン抽出試験の結果は，ピリダン抽出後の電顕像と相まって，pearse(3)，Lison(4)および岡本(5)によると燐脂質の存在を物語る。

多糖類物質における諸反応は，脂質反応と違って小体の微細構造に従い異なる。

すなわち中一大型小体の外層は小型小体に比べて顆粒状を呈することを述べたが，その顆粒はアルシアンブリュー染色陰性，Best カルミン染色中等度陽性，トルイダンブリュー染色 PH 7.0 で β-メタクロマジアを呈するのに対し，顆粒周基質は Best カルミン染色を除いて小型小体にほとんど一致する。両者ともうすいムコ多糖類あるいはその近似物質の存在を否定できないが，すくなくとも酸性ムコ多糖類には一致しないようだ。外層内放射構造は外層の他の部分に比較して粘液多糖類に対する諸反応がもっとも鮮明に現われるが，PAS 反応とアルシアンブリュー染色におけるアセチル化，メチル化，saponification ならびにトルイダンブリューメタクロマジア，ヒアルロニダーゼ消化試験等の結果を総合すると，やはり酸性粘液多糖類には一致しない。

内層の塩性質は外層がらはるかに異なり，PAS 反応，アルシアンブリュー染色，Best カルミン染色およびトルイダンブリューメタクロマジアがもっとも鮮明に現われるとともに，ピリダン抽出に対しても耐性を示し，同処理後も Feyrter 染色ならびにアルシアンブリュー染色は陽性を示す。

文献

1). Cummings, J. N.: Metabolism 9, 247 (1960).
2). 雑誌　：精神経誌 63, 1105 (1967).
3) pearse, A. G. E.: Histochemistry, London
4) Lison, L.: Histochemie Animale (本京訳)(1960).
5) 岡本：顕微鏡的組織化学．東京 (1956).

小体の組織化学的所見 (1)

	方法	外層 顆粒	差像	層 放射構造	内 雲紫状	層 中心星芒
脂質	岡本法(燐脂質)	+	+	+	+	+
	岡本法(糖脂質)	−	−	−	−	−
	ズダンIII	−	−	−	−	−
	ズダンBB (パラフィン標本 postchromation)	+	+	±	++	+
	同上 Baker ピリゲン抽出後	−	−	−	−	−
	ナイルブリー硫酸塩 (パラフィン標本)	+	+	+	+	+
	同上 Baker ピリゲン抽出後	−	−	−	±	±
	Feyrter 染色 (パラフィン標本)	+++	+	++	+++	++
	同上 Baker ピリゲン抽出後	−	−	−	++	+
	石炭酸無水酢酸法 (コレステロール)	淡黄褐色			−	−
	石炭酸フクシン染色	−	−	−	−	−
蛋白	Feulgen 反応	−	−	−	−	−
	Millon 反応	±	±	±	+	−
	テトラゾニウム反応	−	−	?	+	+
	Hg-ブロムフェノールブリー	+	+	+	+	+

(2)

		外層 顆粒	差像	層 放射構造	内 雲紫状	層 中心星芒
	PAS	+	+	++	++	++
III ムコ多糖類	PAS アセチル化	−	−	−	+	+
	同上 0.1N KOH	±	±	++	++	+
	PAS メチル化	+	+	++	++	+
	同上 0.1N KOH	+	+	++	++	+
	PAS ヒアルロニダーゼ消化	+	+	++	++	++
	アルシアンブルー染色	−	+	++	++	+
	同上メチル化	−	−	−	−	−
	同上 0.1N KOH	−	−	−	−	−
	同上 Baker ピリゲン抽出後	−	−	−	++	+
	Best カルミン	++	+	++	++	+
	同上唾液消化	++	+	++	++	+
	鉄の捕捉反応 (Hale)	−	−	+	+	−
	同上 (河津5)	−	−	+	−	−
	ムチカルミン (Clara)	?	?	?	−	−
	同上 (Mayer)	?	?	?	−	−
	アミロイド (Mayer)	−	?	?	?	?
	同上 (Lendrum)	−	−	−	−	−
	Lugol ヨード反応	黄の弱褐色			紫の弱紫色	
	トルイダンブリー PH 7.0	β	β	β	β	β
	4.1	−	−	−	β	β
	2.5	−	−	−	β	β

S-11 黒内障性白痴脳の脂質の分析と組織化学

猪瀬　正・酒井正雄・井上勝義・
田野稔郎（横浜市大・医・神経）

形態学的に脳に著しい変化が証明されて，しかも先天性代謝異常とみられる疾患のうち，最近とくに目ざましい発展をとげつゝある研究分野の一つはLipidosisであろう。

なかでもAmaurotic Family Idiocy（AFIと略す）は，古くから研究されている疾患であるが，近時再び研究の焦点に立つようになつた。本疾患の脳脂質の化学的分析は，Klenk[3]によつて開拓されたが，AFI Tay-Sachs型脳の神経細胞に沈着している脂質が特異な糖脂質で，1 Molの脂肪酸，1 Molのsphingosin，1 Molのglucose，1 Molのgalactose，1 MolのN-acetyl-galactosamineと1 MolのN-acetyl-neuraminic acidからなることが明らかにされた。そして，彼はそれをganglioside と呼んだ。今日では，Tay-Sachs脳の脂質成分の分析は，さらに進展して，新知見がもたらされているが，わが国では，東大伝研の山川教授の研究室が，その最尖端を行つていて，世界的な業績が発表されつゝある。

一方，組織化学的研究も活潑で，国際的シンポジウムもたびたび催されているが，特定の脂質に対する特異的染色法の発見の困難，組織中の脂質の化学的－物理化学的存在様式の複雑さなどから，主として経験的染色結果に頼らざるを得ない。AFIのTay-Sachs型と若年型（Spielmeyer-Vogt）との間に，神経細胞内沈着物の染色性の差があることは，以前から注目されていたが，本疾患の各類型－乳児型(Tay-Sachs)，遅発乳児型，若年型（Spielmeyer-Vogt），遅発型（Kufs）－ の組織化学的所見の差異の有無についても，未だ明確な系統的検索結果は得られていないようである。

われわれは，AFIの各類型のできるだけ多くの症例について脂質分析を行なうとともに，それと並行して，脂質など細胞内沈着物の組織化学的染色を試みようと努力しつつあるが，未だ研究途上にあつて，みるべき成果をあげるまでにはいつていない。

1) 脂質分析について

〔分析方法〕

Formol 固定脳を1～2㎜の厚さに切り出して，軟膜と血管をできるだけ除き，さらに皮質と白質にわける。約12時間流水中で水洗したのち，沪紙に挟んで水分を充分に除き，湿重量を測定する。

1. 抽出方法

山川，牧田[5),6)]の方法によつて，acetoneを用いてhomogenate を作り，acetone不溶部分をSoxhletでChloroform-Methanol（2：1）〔以下CMと略記〕で抽出，CM可溶部分をetherに溶かして氷室に放置し，ether可溶部分と不溶部分にわける。ether不溶部分を粗糖脂質とする。

2. カラムクロマトグラフィー

硅酸（Mallinckrodt，100メツシュ）は120℃，5時間活性化し，Hyflos-uper celは予め，塩酸及び苛性ソーダで洗つて，粗い部分を集め，120℃，1時間加熱し，硅酸：Hyflosuper cel（2：1）の混合物をカラムに充填する。硅

酸1gに対して粗糖脂質約10mgの割合でカラムにかけ，CMの混合比を順次変え，10mlづつ分劃採取する。

3. 糖の定量及び流出曲線の作製

各分劃から0.4mlづつ採出して，Anthrone 試薬を用いて発色させ，標準はgalactoseを用いて，吸光度を625mμで測定して，Fig.1のような流出曲線を作る。この流出曲線にもとづいて，分劃を大きな分劃に大別し，減圧乾燥させる。

4. 薄層クロマトグラフイー

粗糖脂質及び大別された分劃のそれぞれについて，常法で作製したシリカゲル薄層クロマトグラフイー（Kieselgel-G使用）を行ない，Chloroform：Methanol：水（65：25：4）で展開後，Anthrone 試薬を噴霧し，120℃，15分間加熱で呈色させ，各糖脂質分劃の同定を行なう。純品としては，山川，牧田両氏から分与されたphrenosin，kerasin，cerebron 硫酸ester及びganglioside を用いた。

表Ⅰ，Ⅱには，それぞれ各脂質粗分劃の乾燥重量100mg 中の重量（mg）と，各脂質粗分劃相互の割合を示してある。

総脂質量としてみると，各症例間に特に大きな差異を認めることはできない。いずれの症例でも，皮質より白質に脂質が多く存在する。たゞ，Gargoylism の症例では，ether 不溶分劃が対照例及びAFI例にくらべて少なくなつている。またAFI例では，ether 可溶分劃が，対照例及びGargoylism 例にくらべて少なくなつている。つぎに，acetone 可溶分劃とCM分劃の割合をみると，AFIでは多くは1以上でしかも1.38以下であるのに，Gargoylism では1以下，対照例では4.8でかなりの差異がある。さらに，ether 可溶分劃と不溶分劃を比較してみると，AFIでは，ether 不溶分劃がふえていることが明らかである。

Table Ⅰ　Lipid content of the grey and white matter

Case №.	Diagnosis		Acetone soluble Fraction	C.M* soluble Fraction	Ether soluble Fraction	Ether insoluble Fraction
1	A.F.I.	G.M.	13.8	17.2	3.3	13.9
		W.M.	15.2	19.0	3.5	15.4
2	A.F.I.	G.M.	15.5	9.8	5.5	7.0
		W.M.	27.2	22.7	5.0	17.5
3	A.F.I.	G.M.	10.2	11.9		
		W.M.	18.9	26.2		
4	A.F.I.	G.M.	14.6	14.9	4.9	10.0
		W.M。	22.3	28.2	8.2	20.0
5	Gargoylism	G.M.	14.6	14.3	5.7	8.6
		W.M.	30.1	19.8	12.6	6.6
6	Control (2 y/o)	W.M.	9.5	41.1	23.0	18.0

mg in 100mg dry weight

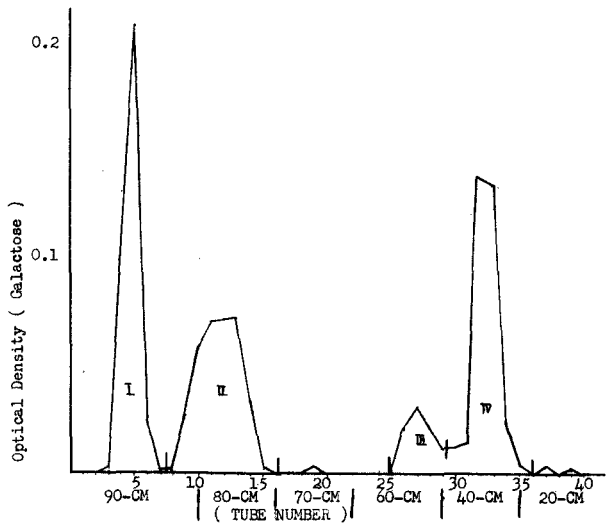
C.M. ・ Chloroform－Methanol

A.F.I. ： Amaurotic Family Idiocy

Table Ⅱ　　Ratio of the lipid content

Case No.	Acetone soluble Fraction : C.M. soluble Fraction	Ether soluble Fraction : Ether insoluble Fraction
1 G.M.	1 : 1.25	1 : 4.16
W.M.	1 : 1.30	1 : 4.45
2 G.M.	1 : 0.71	1 : 1.26
W.M.	1 : 0.84	1 : 3.48
3 G.M.	1 : 1.16	
W.M.	1 : 1.38	
4 G.M.	1 : 1.00	1 : 2.00
W.M.	1 : 1.27	1 : 2.40
5 G.M.	1 : 0.97	1 : 1.52
W.M.	1 : 0.66	1 : 0.58
6 W.M.	1 : 4.28	1 : 0.79

Fig. I Chromatography on silicic acid of the sphingolipids of Case No. 4 (Grey Matter).



ところで，acetone分劃は cholesterol ，ether分劃は燐脂質を，ether不溶分劃は sphingomyelin及び糖脂質を主体としており，脂質粗分劃の割合の変化は，それら脂質の構成変化を物語つているとみられる。従つて，AFIでは相対的にではあるが，sphingomyelin及び糖脂質が著しく増加し，燐脂質が減少していることがわかる。

Fig.1は症例4（遅発乳児型？）の皮質のカラムクロマトグラフイーによる流出曲線である。図中にある大小四つのピークは薄層クロマトグラフイーでそれぞれ，第Ⅰ分劃はcerebroside，第Ⅱ分劃は cerebron 硫酸 ester，第Ⅳ分劃が ganglioside であることを，純品を用いて同定してある。このクロマトグラムから解ることは，ganglioside の著しい増加，cerebron 硫酸 ester の増加及び cerebroside

の減少である。なお，正常脳では現われない第Ⅲ分劃の出現をみる。細かい分析がまだ終つていないため本抄録には間に合わなかつたが，他のAFIの症例でも同様の傾向が認められる。

丸山及びその他，[6] 北川及びその他，[2] 牧田，山川ら[4)5)]が，Tay-Sachs 脳について報告した分析結果もほぼ同じである。

われわれはAFIの各病型について分析を行なつているが，それらの糖脂質のこまかい相違については結論を得ていない。

2) 組織化学的所見について

著者の1人井上[1]は，かつてAFIの若年型について組織化学的研究結果を発表したが，今回もそれに準じて，各症例についてroutineの染色法を試みた。その結果，Sudan Ⅲ，Sudan black B，PAS，Nile blue，Luxol fast blue などは，いずれも陽性であり，coupled tetrazonium反応も陽性で，文献にみられる所見と一致する。問題は，neuraminic acidを染め出すというBial 試験である。さきの井上の検索では，若年型では陰性であつたが，われわれの第4例では疑陽性，第1例（Tay-Sachs）では陰性であつた。Bial 試験には手技そのものにも問題があるし，多くの学者もその陽性所見について疑問をもつているので，慎重な検討を必要とすると思う。なお，Toluidine blue やFeyrter によるmetachromasiaは，多くの症例で桃色，赤色のmetachromasiaをみるが，時にそれが明らかでないこともある。また，等電点をしらべてみると，若年型では大体において，4～5の間にあるが，第1例では5.0，第4例で3.6～4.4 であつて，諸家の発表している結果とやゝ異なる。この点なお検討を要する。AFIが，他のLipidosisといかなる染色法で，最も明瞭に鑑別し得るかは組織化学にとつては重要な課題である。

以上われわれの研究内容の概略を記したが，組織化学的手技が，化学的分析のレベルから甚だ遠いことを痛感する次第である。

文　献

1) 井　上　：　横浜医学　11，1500，1961

2) Kitagawa et al. ：　Acta path. Jap. 12，129，1962

3) Klenk,E.：　Z. physiol. Chem. 262，128，1939

4) 牧　田　：　綜合医学　19，23，1962

5) Makita, A. et Yamakawa, T.：　Jap. J. Exp. Med. 33，361，1963

6) Maruyama, Y. et al. ：　Med. J. Shinshu Univ. 5，237，1960

I Histamine and the Nervous System, including
Original Studies on Histamine Formation and its Inhibition

W.G. Clark Vetenans Administration
Hospital
Psycho Pharmacology Res. Lab.
Sepulveda, Calif, U.S.A.

(Chief, Psychopharmacology Research Laboratories, Veterans Administration Hospital, Sepulveda, California, U.S.A., and Associate Clinical Professor, Department of Biological Chemistry, University of California Center for Health Sciences, Los Angeles, California, U.S.A.)

The biosynthesis, storage, distribution, release, metabolism, function and methods of determination of histamine and its metabolites in the nervous system will be briefly reviewed.

Original work on the purification, properties, kinetics, co-factors, and inhibitors of mammalian histidine decarboxylase will be discussed. The enzyme has been purified from mouse mast cell tumors, rat stomach fundus and rat embryos and compared with mammalian dopa decarboxylase.

Original work will be described on the decarboxylation of dopa and 5-hydroxytryptophan-1-^{14}C in vivo and their inhibition, by measuring the respired $^{14}CO_2$ in mice.

Studies on the decarboxylation of histidine and histamine storage by blood basophils will also be described.

MEMO

MEMO

MEMO

MEMO

MEMO

編集委員（ＡＢＣ順）

鳩谷　竜	川北　幸男	高坂　睦年	黒川　正則
成瀬　浩	佐野　勇	佐藤　倚男	高垣玄吉郎
高橋　良	高橋　康夫	塚田　裕三	宇尾野公義

昭和39年９月10日　印刷
昭和39年９月15日　発行
神経化学　別巻
編集者　（代表）塚田裕三
編集所　東京都大田区大森西５丁目21番地
東邦大学医学部第二生理学教室内　神経化学懇話会
印刷及製本　東京都文京区後楽１丁目５番地　中央商会
表紙印刷所　東京都北区西ヶ原３丁目46番地　杏林舎
発行所　東京都文京区曙町11番地　緒方書店

会員外の方で本誌の希望は，実費でお頒けしますから上記の編集所宛にお申出下さい

神経化学 VOL. 3 SUPPLEMENT

第7回神経化学懇話会抄録集

昭和39年10月9日（金）
10日（土）
於　朝日生命ホール講堂（大阪）

シンポジウム

脳の構成物質

神経系病態の生化学

一般演題

緒方書店刊