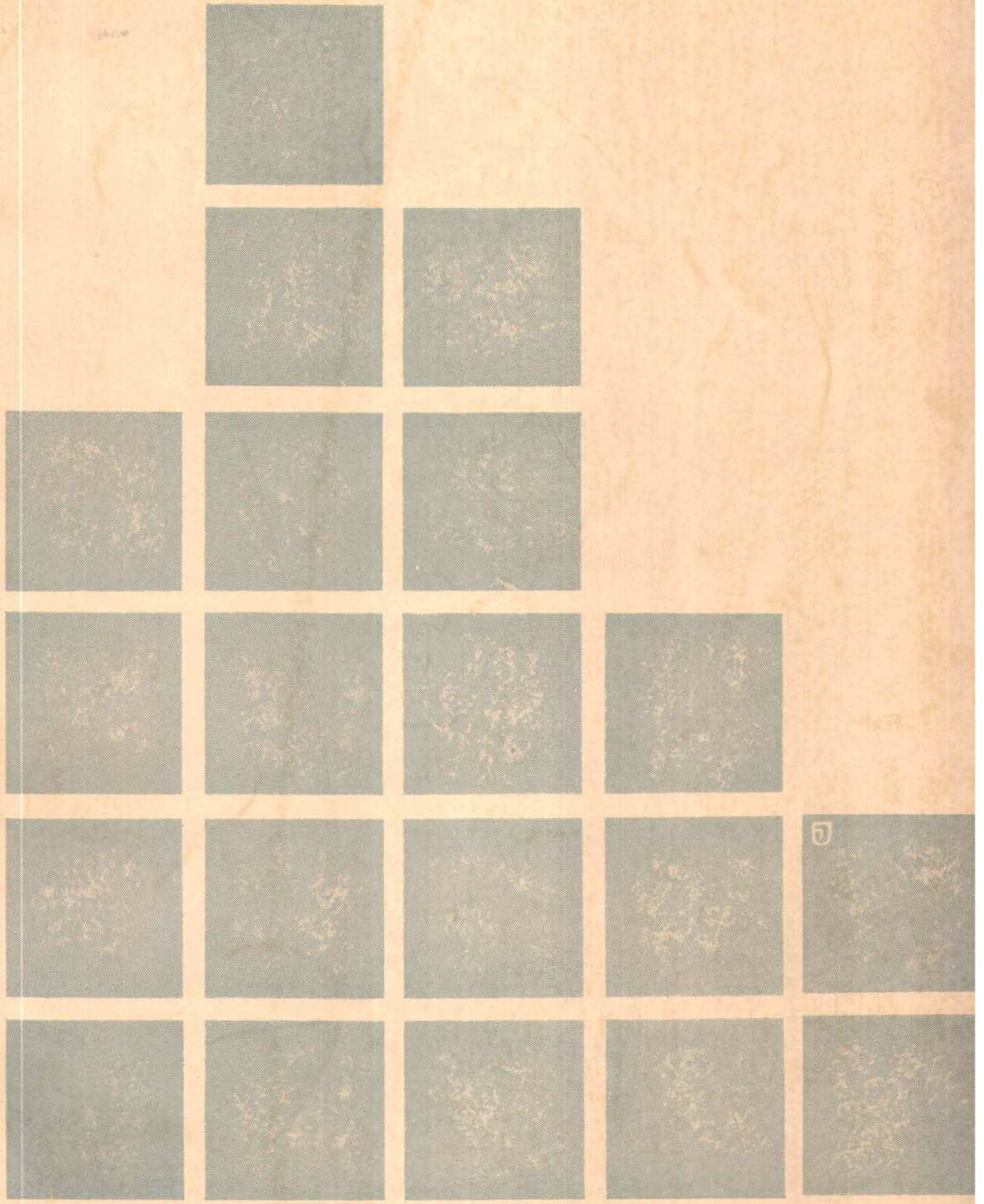
神経化学

VOL. 5 SUPPLEMENT OCTOBER 1966



神 経 化 学 懇 話 会

神経化学

VOL. 5 SUPPLEMENT OCTOBER 1966

第9回神経化学懇話会

於　　大　阪

10月7日（金），8日（土）

目　　次

1 脳アセチルコリンの新抽出法（10分）……1
融　道男（東京医歯大・神経）
M. H. Aprison（インディアナ大・生化）

2 鳥脳のカテコールアミン代謝，(2)モノアミンオキシダーゼ（MAO）の特性（10分）……5
十河孝博・高橋　良
（東京医歯大・神経）

3 脳のCarnitine 定量法の吟味（10分）……9
斉藤章二・松本茂信・
徳永友喜子（慶大・医・薬理）
木原弘二（慶大・医・分子生物）

4 人脳内および動物組織内のホモカルノシンの定量（5分）……13
金沢　彰・宮本英七・
公文　明・佐野　勇
（阪大・医・神経）

5 ウシ脳からのN－アセチル－α－アスパラチルグルタミン酸……16
の精製，同定および動物体内分布（15分）
宮本英七・柿本泰男・
公文　明・佐野　勇
（阪大・医・神経）

6 フラビンの血液脳関門透過性と脳内FAD，FMNの生合成（5分）……20
永津俊治（愛知学院大 歯 生化）
永津郁子（名大・医・解剖）
奥田　潤・八木国夫
（名大・医・第一生化）

7 ニコチン酸ヌクレオチドの脳細胞膜透過性とその代謝経路（15分）……22
出口武夫・市山　新・
西塚泰美・早石　修
（京大・医・医化）

8 脳乳酸脱水素酵素アイソザイムの研究，
Ⅱ 発育過程におけるホルモンおよびアクチノマイシンDの影響（10分）……26
伊藤 斉・三浦貞則・
森 文彦・舛沢郁二・
浅香富允（慶大・医・神経）

9 脳ミトコンドリアの特性，特にMg^{++}の脳ミトコンドリアに対する作用……29
瀬田喜一郎・荒木 裕・
小沢和恵・半田肇
（京大・医・脳神経外科）

10 神経系細胞核の研究
－ノイロン性と非ノイロン性核の分別分離法－（15分）……32
加藤尚彦・黒川正則
（東大・医・脳研）
稲村 博（東大・医・精神）

11 神経系細胞核の研究
－ATP：NMNアデニルトランスフエラーゼ活性－（10分）……36
黒川正則・加藤尚彦
（東大・医・脳研）
稲村 博（東大・医・精神）

12 脳灌流法によるネコ脳代謝の研究（10分）……40
大月三郎・渡辺昌祐・森光淳介・
枝松一安・中島良彦・帆秋孝幸・
二宮淳明（岡山大・医・神経）

13 脳解糖呼吸系の研究，(I) アミノ酸・アセチルコリンとの関係（15分）……44
成瀬 浩（国立精神衛生研）
永山素男・中村陸郎（東大・医・神経）
S.－C. Cheng （コロンビア大）

14 モルモット大脳皮質切片におけるγ－アミノ〔1－^{14}C〕酪酸の代謝（15分）……48
町山幸輝（東大・医・精神）
R. Balazs・D. Richter（MRC
Neuropsychiat. Res. Unit, England）

15 脳組織の解糖系の調節 （10分） ……52
高 垣 玄吉郎（慶大・医・生理）

16 節後神経切断・白鼠剔出交感神経節のアミノ酸代謝の研究（10分） ……56
永 田 豊・渡 部 昌 子
（東邦大・医・2生理）
塚 田 裕 三（慶大・医・生理）

17 脳組織の3′，5′－AMP濃度に及ぼす神経ホルモンの影響（15分）……60
垣 内 史 郎（大阪府立中宮病院）
T.W.Rall（Western Reserve Univ.）

18 Glia Cell－line（培養株）とその性状
－とくに細胞別の単離培養株との比較から－（10分） ……64
中 沢 恒 幸・鶴 水 隆・
望 月 延 泰（慶大・医・神経）
塚 田 裕 三・野 口 鉄 也
（慶大・医・生理）
立 沢 寧（慶大・医・相沢内科）

19 異染性白質変性症およびGargoylism脳皮質の脂質分析 ……68
－糖脂質の変化を中心として－
横 井 晋（群大・医・精神神経）
酒 井 正 雄・田 野 稔 郎・
金子 善彦（横浜市大・医・神経）

20 中毒性神経障害時のポルフイリン体とCoA 活性（第1報）（10分）……72
猪 股 丈 二・中 沢 恒 幸
（慶大・医・神経）
高 杉 正・須 藤 忠 四・
中 山 栄 基・菊 野 正 隆
（上智大・理・生物化学）

21 「水俣病」の発症機構，
とくに「水俣病」原因物質の胎仔への移行についての実験的研究（10分） ……76
清 田 一 民・井 上 赳・
高 木 元 昭・藤 田 英 介・
寺 岡 葵（熊大・医・精神）

22 慢性覚せい剤中毒動物脳の解糖減退機序の解析（５分）……80
加藤伸勝・小林暉佳・
江副勉（都立松沢病院）

23 慢性覚せい剤中毒動物の脳セロトニンと関連酵素活性（５分）……84
高野介佐・五十貝いち・
船渡川誠一郎（群大・医・精神）
台弘（東大・医・精神）

24 Methamphetamine 慢性中毒マウスの行動
ならびに脳内アンモニアに対するNH_4Cl投与の効果（１０分）……88
荒川泰（群大・医・精神）
台弘（東大・医・精神）

25 躁うつ病とカテコールアミン代謝（１０分）……92
長尾佳子・高見沢ミサ・
土屋健二・小林暉佳・
小林健一・仮屋哲彦・
高橋良（東京医歯大・医・神経）

26 Eck 氏瘻犬における ℓ－トリプトファン誘発性「昏睡」（５分）……96
荻原一晃・茂在敏司
（東大・医・中尾内科）
平井俊策（東大・医・老人）

27 リボヌクレオシド－2′，3′－
環状フォスフォジエステラーゼの神経組織における分布（１０分）……98
栗原正・塚田裕三
（慶大・医・生理）

28 神経組織の蛋白質の抽出分離に関する研究（１５分）……102
野口鉄也・野村正彦・
塚田裕三（慶大・医・生理）

29 白鼠神経細胞体蛋白へのアミノ酸の取り込みに対する麻酔剤の影響（１０分）……106
佐武明・阿部幸子・
松川恵子（新大・医・脳研）

30 脳ポリゾームの調製（15分）……109
高橋康夫・鈴木雄二
（新大・医・脳研）

31 ラツテ脳ミクロゾームの免疫化学的研究（15分）……113
植村慶一・塚田裕三
（慶大・医・生理）

32 実験的アレルギー性脳脊髄炎（EAE）の脂質化学的研究－I（10分）……117
立沢寧・相沢豊三
（慶大・医・相沢内科）

33 脳脂質に関する研究－第II報，髄鞘形成期のニワトリ脳脂質への
^{14}C－acetate および ^{14}C－glucose のとりこみについて－（5分）……121
立沢寧（慶大・医・相沢内科）
菅野剛史（慶大・医・医化）
中沢恒幸（慶大・医・神経）

34 〔γ-^{32}P〕ATPによる脳のイノシタイドおよびホスフアチヂンへの^{32}P 組入れ（10分）……125
林浩平・八木原嘉幸・
中村勇・片桐章・
荒川泰・山添三郎
（群大・医・生化）

35 脳燐脂質への^{32}Pの取込みにおよぼすINAH痙攣の影響について（5分）……129
田尾重良・鈴木隆・
小林義康（北大・医・精神）

特別講演：薬理活性アミン類の領域における最近の進歩……131
ベルンハード・ウイツトコツプ（雨糸古府）
米国国立関節炎・代謝病研究所
ベセスダ・メリイランド州

1 脳アセチルコリンの新抽出法

融　　道　男（東京医歯大・神経）
M.H.Aprison（インディアナ大・生化）

文献上にみられる脳アセチルコリン（ACh）の値は、たとい同種動物の同じ脳部位を用い、同様の固定方法を用いたものでも、かなりの変異を示している。これは一方では、生物学的定量法の限界を示しているものであろうが、他方、現在までその抽出法が充分検討されていなかったことも原因となっている。このたび新しく考案した抽出法は、現存のいくつかの方法に比し、より正確に脳AChをとり出し得ると思われるので、その妥当性を考察してここに報告する。(14)

実験条件　200~300 gのWistar系Albinoラット（♂）が用いられた。ケージに入れた動物を4 lの液体窒素中に沈め、完全に凍結後、小脳，橋及び延髄を除く全脳がとり出された。1~3匹の凍結脳を集め、液体窒素下でステンレス製乳鉢，乳鉢により磨砕した。(11)

抽出法　(1) Acid-alcohol法（Crossland, 5）　(2)新しい抽出液として　15％1N蟻酸-85％acetone（v/v）の混合液が用いられた。液体窒素中で磨砕粉末化された脳組織約100~150 mgを、冷却された2.0 mlの抽出液を含む有栓ガラス遠沈管に移し、30分間0°において抽出後、950 g 5分間遠沈された。この抽出液の70％の溶液（acetoneで稀釈）0.5 mlを用いて沈渣を2回洗い、全上清を合わせた後、1 mlの蒸溜水を加え35°の水浴中で1 ml以下にまで濃縮し、蒸溜水で正確に1.0 mlに合わせ、さいごに遠沈によりごく微量の沈渣を除き、使用まで凍結保存する。　(3) 10％TCA法（Crossland et al, 4）

上記の3方法のうち(1).(2)は常に同一脳組織に適用され抽出能力が比較された。

Paper Chromatography　抽出法(1).(2)により、4~6匹のラットから得られた脳抽出液を二分し、一方をpH 11、5分間煮沸によりAChを破壊、冷却後pH4に合わせ、もとの量に近い既知のAch量を加えた。未処置の抽出液には、処置された抽出液に加えられたと同量のNaOH及びHClが加えられ、両サンプルは凍結乾燥された後、4 mlの95％methanolで2回溶解，ロ過後、35°水浴中、窒素ガス流で正確に0.1 mlまで濃縮された。このサンプルの0.05 ml を Whatman No.1 paper上で13~16時間、n-propanol : formic acid : water (8 : 1 : 1)、一部の実験では water saturated n-butanol により、下降法で展開。paperは乾燥後、巾2インチ、長さRf 0.1毎に切りとり、8 mlの95％methanol中で30分間振盪により溶出、ロ過後1.0 mlまで蒸発、AChを測定した。rechromatographyは，Ach様の活性を持つサンプルの一部が集められ，first chromatographyと同様手技で展開された。rechromatographyではRf 0.1及び0.05毎の分割が行なわれた。

生物学的定量　serotonin，histamine及びsubstance Pをブロックしたモルモット回腸法が主として用いられ、一部蛙腹直筋法も併用された。(13)

実験結果　及び　考察

Fig.1に示す如く、5~30％の1N蟻酸を含むacetone溶液による脳AChの値は、acid-alcoholを用いた場合より高く、とくに1N蟻酸が15％の時、その値（31.3±1.5 mμM/g）はacid-alcohol法の値の144％に達した。

抽出・測定条件の検討　(1) Choline acetylaseはこの溶液の条件では抑制されている

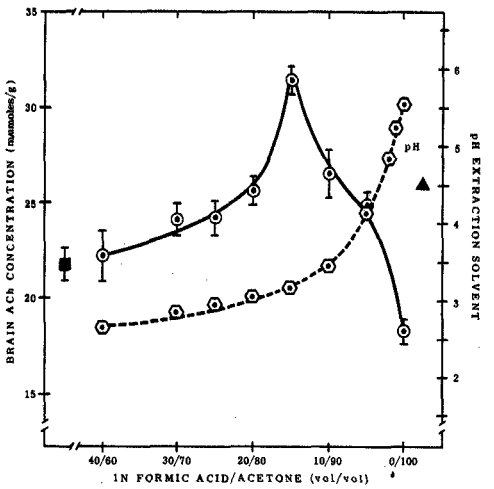


Fig. 1. Relationship between ACh extracted from rat brain and different concentrations of 1N formic acid in acetone. The maximum mean ACh value is 31.3 mμmoles/g. The mean ACh concentration found after extraction with acid-ethanol is 21.8 mμmoles/g and is shown at the extreme left (■). The variation in pH of each solvent system is also shown. The point at the extreme right is the pH of the acid-ethanol solvent (▲). The vertical lines above and below each mean (n = 4) represent 1 S.E. M.

TABLE 1

The Mean ACh Concentrations (mμmoles/g ± S.D.) obtained by Parallel Assay using the Guinea Pig Ileum and Frog Rectus Abdominis Muscle Preparations*

Test Object	Acid-Ethanol(a)	Formic Acid Acetone (b)	Mean b/a (%)
Ileum(A)	20.8±1.3	29.6±1.1	142
Rectus(B)	20.1±2.1	28.9±1.8	144
B/A(%)	97	98	

* n=3

TABLE 2

Recovery of Added ACh in the Acid-Ethanol,TCA and Formic Acid-Acetone Extraction Procedures*

Place in procedure where 1 μg ACh added	None	Boiled 10 min.	Treated with HCOOH-Acetone
A. To suspended brain tissue	72.8±10.7 (9)	67.3 ± 11.9 (3)	80.7±13.4 (5)
B. To supernatant after first centrifugation	80.2±8.1 (5)	86.9 ± 4.7 (3)	103.7±11.3 (5)
C. To combined supernatants and H_2O	96.5±9.1 (3)	88.9; 95.3 (2)	102.6±9.0 (3)

* Percent recovery ± S.D. The number of experiments are indicated in the parentheses.

と思われるが、ACh 合成を抑制するものとして知られる Cupric ion (8, 10, 9) 及び o-iodosobenzoate (9) をあらかじめ溶液に混じて (ともに 10^{-3}M) 用いた。値はそれぞれ 31.0, 28.9 mμM/g であり、acid-alcohol による値の 152, 146 % であった。(2) acid-alcohol 法に用いる氷酢酸と同様、蟻酸も高濃度で回腸片の收縮をひきおこす。蟻酸のこの効果は溶液を中性化することにより消失するので、すべての脳抽出液が測定直前に α-chymotrypsin 処理のため pH 7 に合わされているわれわれの実験条件下ではこの影響は除外し得る。脳組織中に存在していると考えられる ACh の增減物質を補正するため、Feldberg の手技(6)が適用されたがモルモット回腸法ではこの手続きは結果に影響を与えなかった。蛙腹直筋法では常にこの補正が行なわれた。(3) 1.0μg の ACh が蟻酸-acetone 液に加えられ通常の方法通り acetone を蒸発後 ACh の量が測定された。回收率は 96.5 ~ 99.1 % であった。(4) 蛙腹直筋法を用いた parallel bioassay の値を Table 1 に示す。

回收率の検討　蟻酸-acetone 液中に脳組織と同時に一定量の ACh を加えた時の回收率は 97.9 ± 9.7 % であり、10 % TCA を用いた時は 54.4 ± 9.5 % であった。acid-alcohol 法では 72.8 ± 10.7 % であり、これは蟻酸-acetone 法の値より有意に低かった。($p<.01$) acid-alcohol 抽出法の場合、どの過程で添加された ACh が失われるかを調べるため、買ったラット脳で ACh が加えられた。(Table 2) この実験中とくに注目されたのは、B 項の、最初の遠沈で沈渣が除去されたのちに加えられた ACh も、80 % しか回收されなかった事実である。この理由は次項の実験(1)により解明された。

蟻酸-acetone による再処理実験

(1) acid-alcoholによる脳抽出液が最終的に混濁していることは、最初のStoneの報告(10)以来知られている。このサンプルの一部を蟻酸-acetone液で再処理してみると、蟻酸-acetone抽出時のサンプル同様澄明な液が得られた。同時にその時のAChの値は、元の値に比し16%の増加を示した。(Table 3) Table 2のB項でAChが加えられる時のpHは、6.6であり、最近Burton (2)がpH6.1の溶液内では加えられたACh-C^{14}が液中の脂質様物質によってとりこまれることを報告しているので、この時の80%の回収率はこの事実により説明されよう。同表にみるように、この回収率は蟻酸-acetone処理により約100%に達している。蟻酸-acetoneによる再処理時のみならず、この溶液による抽出の最後の蒸発過程において、acetone及び加えられた蒸溜水が蒸発して溶液のpHが下降していく時に、溶液中に不溶性の小塊が生じそれが崩壊していく現象が常に観察された。

TABLE 3

ACh Concentration (mμmole/g) in Brain Tissue Before and After Treatment of the Acid-Ethanol Extracts with Formic Acid-Acetone.

	ACh Conc. in Extract	ACh Conc. after treatment with Formic Acid-Acetone	% Increase
Mean ± S.D.	22.2 ± 1.3	25.8 ± 2.0*	16

* $p < 0.01$ n=6

TABLE 4

Comparison of Rat Brain* ACh Concentrations Found by Different Extraction Methods.**

Extraction Solution	ACh Conc.‡ (mμmoles/g ± S.D.)	Strain	References
10% TCA	13.2±1.7 (7)	Wistar	4
	15.1±0.6 (3)	Wistar	Present st.
Eserinized Saline	15.0±1.6 (11)	Wistar	11
Acid-Ethanol	15.3-18.2(4)	not given	10
	22.47±2.70(11)	RCL	1
	27.34±2.00(16)	S_1	
	18.7±1.25 (6)	Wistar	12
	21.6±1.1 (15)	Wistar	Present st.
Formic Acid-Acetone	31.2±1.5 (15)	Wistar	Present st.

‡ Number in parentheses indicates number of experiments.

* Brain excluding cerebellum, pons and medulla oblongata

** All adult rats at resting state were frozen in situ by immersing into liquid nitrogen or similar liquid and then pulverized.

Whittakerら(16,17)が示唆した如く、結合AChの溶出はH^+ionの濃度(pH<4)とその露出時間によると考えられるので、おそらく脂質と思われる抽出液中のある物質の崩壊と、それにともなう測定ACh量の増大は、蒸発過程中のH^+ionの増加によるものと解釈されよう。ちなみに、acid-alcohol法による最終のpHは4.5~4.8であり、新抽出法のそれは2.7~3.0であった。(2) acid-alcohol及び10% TCA抽出後の沈渣を蟻酸-acetone液で再抽出したが、AChは認められなかった。しかし40%1N蟻酸-60% acetoneの沈渣からは、8.4 mμM/gのAChが得られ、この値と上清から得られた21.0 mμM/gの値の合計は15%1N蟻酸-85%acetoneによる値に近似した。

ACh の同定 (1) α-chymotrypsinでsubstance Pを破壊した後の新抽出法によるAch様物質は、alkali溶液中で5分間煮沸、bovine R.B.C. AChEとpH 7で10分間反応、atropinizationなどの処理でileumに対する効果をすべて失うというAchの薬理学的性質をそなえていた。(2) Fig. 2は数例行なわれたpaper chromatographyのうちの1例であるが、図にみる如く、acid-alcohol法による、及び新抽出法によるACh様物質は、加えられた真正AChと同じ行動を示している。展開液を変えた場合にも2つのSpotは認められなかった。Whittakerら(15)は多くのcholine estersがpaper chromatographyで分けられることを示しているので、ここに測定され

た物質は ACh であると同定してよいであろう。

脳ACh抽出の条件 新抽出法の値を現在まで報告されたいくつかのデータと比較し(Table 4)新抽出液が現存の方法より高い ACh 値を抽出し得た理由を検討してみる。

(1) 10% TCAによる ACh の低値は、既に Crossland (5) の疑ったように、この溶液の酸性(脳組織を加えた後でも pH<1)が ACh を破壊すると考えられるので (3) この方法による低い回収率はこの点を確認したものといえよう。なおこの方法で得られた値(Table 4)を回収率で補正すると新抽出法の値に近くなる。

(2) acid-alcohol 法の欠陥は結合 ACh を充分溶出するに足りる H^+ ion の不足のほかに、最近 Morris ら (7) によって指摘された AChE を不活性化出来ないという理由も考えられたが、いくつかの実験によっても AChE の活性を認めることが出来なかったので、この抽出法の回収率のロス約30%のうち20%は現在のところ説明出来ない。(3) 100% acetone を用いた時の pH は 8.3 まで上昇するので、このような条件では ACh は酵素的にも非酵素的にも水解されるであろう。(4) 1N燐酸と acetone の混合液のうち燐酸が10%以下の場合、最終抽出液は不透明になっており、これらは acid-alcohol 抽出同様、pH が結合 ACh を溶出するには高すぎるのであろう。(5) 一方、1N燐酸が40%の場合、残渣からなお30%の ACh が得られているので、このように acetone の混合比が80%以下で ACh 値が再び低下しているのは、有機溶媒の量が ACh が結合している物質を抽出するのに不足なためであろう。

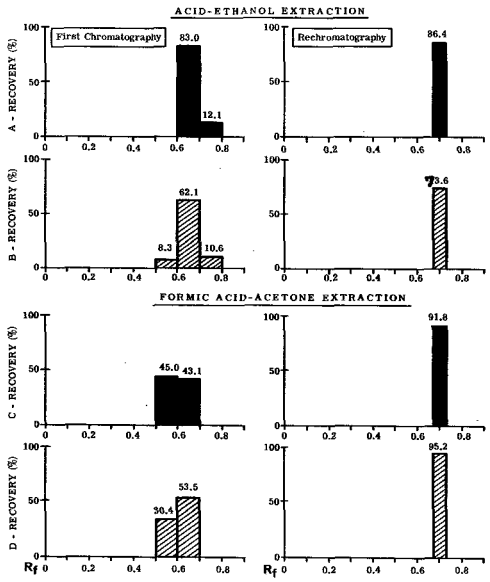


Fig. 2. Rf values and recoveries obtained after chromatography and rechromatography of brain samples extracted with acid-ethanol or formic acid-acetone.*

A and C = untreated brain tissue
B and D = treated brain tussue plus ACh

* Chromatography developed by descending system in n-propanol:formic acid-water (8:1:1) for 13-16 hours. Recovery was calculated by comparing the activity found with that applied to the paper.

文献

1. Bennett, E. L., Crossland, J., Krech, D. and Rosenzweig, M.R. (1960) Nature (Lond.) 187, 787.
2. Burton, R. M. (1964) Int. J. Neuropharmacol. 3, 13.
3. Butterworth, J., Eley, D. D. and Stone, G. S. (1953) Biochem. J. 53, 30.
4. Crossland, J. Pappius, H. M. and Elliot, K.A.C. (1955) Am. J. Physiol. 183, 27.
5. Crossland, J. (1961). In Methods in Medical Research (ed. Quastel, J.H.) 9, 125. Year Book Med. Pub.
6. Feldberg, W. (1945) J. Physiol. 103, 367.
7. Morris, D., Bull, G. and Hebb, C.O. (1965) Nature (Lond.) 207, 1295.
8. Nachmansohn, D. and Machado, A. L. (1943) J. Neurophysiol. 6, 397.
9. Reisberg, R. B. (1957) Yale J. Biol. Med. 29, 403.
10. Stone, W. E. (1955) Arch. Biochem. Biophys. 59, 181.
11. Takahashi, R. Nasu, T., Tamura, T. and Kariya, T. (1961) J.Neurochem. 7, 103.
12. Takahashi, R. and Aprison, M. H. (1964) J. Neurochem. 11, 887.
13. Toru, M., Hingtgen, J. N. and Aprison, M. H. (1966) Life Sci. 5, 181.
14. Toru, M. and Aprison, M. H. (1966) J. Neurochem. In Press.
15. Whittaker, V. P. and Wijesundera, S. (1952) Biochem. J. 51, 348
16. Whittaker, V. P. (1959) Biochem. J. 72, 694.
17. Whittaker, V. P., Michaelson, I. A. and Kirkland, R.J.A. (1964) Biochem. J. 90, 293.

2　鳥脳のカテコールアミン代謝，(2)モノアミンオキシダーゼ（MAO）の特性

十河孝博・高橋　良
（東京医歯大・神経）

1937年Kohn[1], Blaschko[2], Pugh[3]等によって種々のモノアミンを酸化分解する酵素はすべて同一のものであると結論され，1940年にはMAO（monoamine oxidase）[4]という名称がうえられた。しかしMAOはミトコンドリアとの結合が強く，件々可溶化が困難で精製結晶化が出来ないため，その後の酵素化学的研究の発展に大きな支障となった。MAO研究の最近の報告の中で特に興味ある報告はMAOの多様性（multiplicity）に関するものである。Gorkin[5]等は基質によってMAO阻害剤の態度が異なることから，又Cotzias[6]等はチラミン(Ty)セロトニン(5-HT)を基質とした場合，MAOが温度の変化により，相反する活性態度を示すことから，MAOの多様性を論じた。この多様性はMAOの機能上の複雑性を意味するものと思われるがその本態は明らかでない。特に脳MAOについては神経機能に深い関連があることが示されている現在各種動物脳のMAO特性（MAOの多様性）を比較しつつ明らかにすることは重要な意味を持っている。ここでは脳アミン代謝領域の研究で未開拓な鳥類を対象として行いつつある研究の中，MAOの細胞内分布[7]についてはすでに報告したので，脳MAOにみられる多様性の問題について報告する。

（実験方法）　実験動物と試料作製　実験動物としてハトとラット（wistar系）を用い，断頭後直ちに全脳を摘出し，庶糖溶液にて10%のホモジネートを作製し，試料とした。

基質とMAO阻害剤　基質として市販のチラミン塩酸塩(Ty)，ドーパミン(DA)，d-ノルアドレナリン(NA)，セロトニン(5-HT)を用い，MAO阻害剤はTranylcypromine, Nialamide, Isocarboxazidを用いた。MAO阻害剤は使用に際しTranylcypromineは基質溶液中に，Nialamide, Isocarboxazidはホモジネート中に混入させた。

MAO活性の測定（NAを除く）　Cotzias[8]の方法を若干改良した。即ちConwayのユニットの外室を白色ワゼリンで2分し，その一方に全脳ホモジネート1cc，他方に基質溶液（0.1M Phosphate buffer PH7.2）1ccを入れ，内室には硼酸含有のindicator solution 1.5ccを入れ，30°Cの恒温槽中で20分preincubate後，ホモジネートと基質をよく混和し，60分振盪，incubateした。incubation後，外室中に飽和メタ硼酸ナトリウム溶液1ccを入れ3時間室温中で拡散し，その後0.01N塩酸で内室のindicator-solutionを滴定し，アンモニア産生量を算出した。産生アンモニア量から対照ユニットのアンモニア量を減じた値をもってMAO活性値とした。対照ユニットは基質溶液の代りに0.1M phosphate-buffer (P.H 7.2) 1ccを使用した他は全く同じ操作で行った。

NAを基質にした際のMAO活性の測定　拡散段階で強アルカリ性になるためNAが分解しアンモニアが発生するのでNAのMAO活性値を得るには拡散段階でNAより発生するアンモニア量を更に差引かなければならない。それで対照ユニットの実験条件を変えた。即ち2分した外室の一方に全脳ホモジネート1ccを入れ，他方には0.2M phosphate buffer (PH7.2) 0.5ccを入れ30°Cの恒温槽中で20分preincubate後混和し，60分振盪incubateした。恒温槽から取出し，外室に基質溶液0.9cc*を加え，直ちに飽和メタ硼酸ナトリウム溶液1ccを注入混和し，室温で3時間拡散し，0.01N塩酸で内室のindicator-solutionを滴定した。対照ユニットにて算出されたアンモニア量は拡散段階でNAより発生するアンモニア

量を含むもので従って基質ユニットのアンモニア量から対照ユニットのアンモニア量を減じたものをもってNAのMAO活性値とした。(※Incubation中MAOによって基質ユニットのNA濃度は減少するので拡散段階で対照ユニットに注入するNA溶液は0.9ccに補正した。)

〔実験結果〕

1)各種基質のMAO活性

ハトとラットの脳MAO活性を種々基質を変え比較検討した。(Table I)その結果によると(Ty)を基質にした場合にはハトが18.09±1.79(μMNH3/g.tissue/hr.)ラットで12.84±1.00とハトの方がラットより高い値を示すがNAでハトが3.76±0.28、ラットで4.92±0.33と値は逆転した。DAはハトが高く、5-HTは逆にラットが高い。いづれの実験成績も有意差検定を行い、$P<0.001$をもって有意差を認めた。次に各基質間の比較を容易にするため、final conc.を5mMとしMAO活性をみると(Table 2)ハトとラットともにTyの活性が一番高く、DA、5HTがそれに続き、NAが使用した基質中一番低い活性値を示した。

Table 1 各基質のMAO活性とその動物差

Substrate \ Species	Pigeon	Rat	
Tyramine (10mM)	18.09±1.79(8)**	12.84±1.00(12)	P<0.001
Dopamine (5mM)	10.79±0.31(9)	9.21±0.44(8)	〃
Norepinephrine (5mM)	3.76±0.28(5)	4.92±0.33(6)	〃
Serotonin (5mM)	8.79±0.31(7)	9.71±0.31(7)	〃

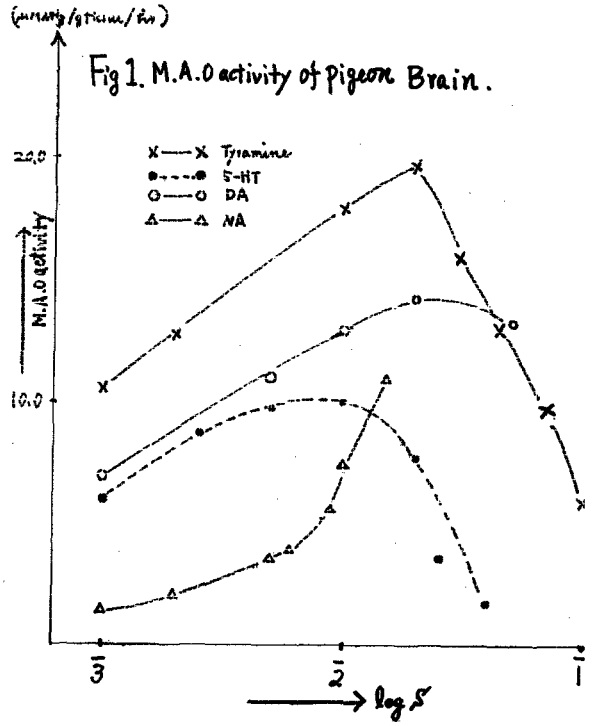
*( ) final conc. ** μM NH3 formed/gtissue/hr.

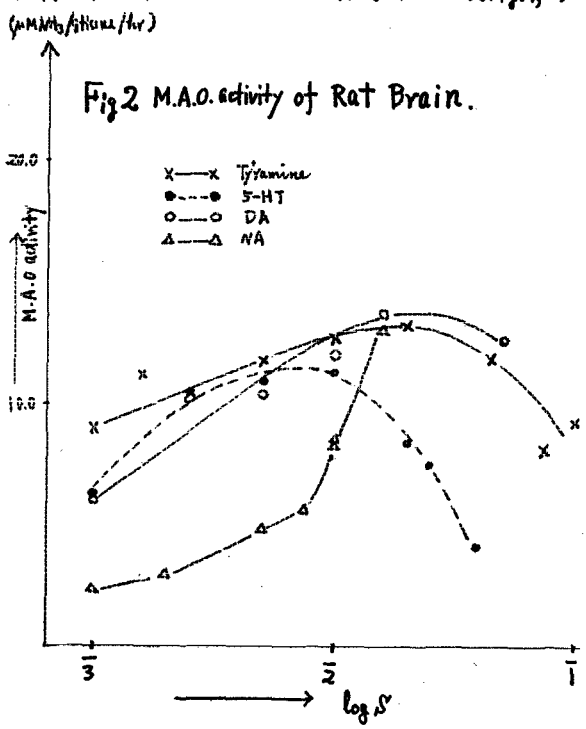
Table 2 一定濃度に於ける各基質のMAO活性とその動物差.

Substrate \ species	Tyramine	Dopamine	Norepinephrine	Serotonin
Pigeon	13.80*	10.79	3.76	8.79
Rat	11.70	9.21	4.92	9.71

final conc.: 5mM. *μM NH3 formed/gtissue/hr.

2)基質の濃度展開と活性曲線　各基質の濃度展開を行ってその活性曲線を求めた。(Fig. 1, 2)





それによるとDA.NA.5HTではハト.ラット共に大略同じ活性曲線を示すが,Tyの活性曲線はハトで特異的であった.即ちハトの場合基質濃度が高くなるにつれ活性曲線は急上昇し,ラットとの活性差は増した。しかし基質濃度が更に高くなり30mM前後になると,それを頂点としてSubstrate-inducedinhibitionが現れ活性曲線は下降するがラットに較べはるかに急激な下降を示し,むしろ100mMではラットより低い活性値を示した.しかしDAのSubstrate-induced-inhibitionは明らかでない。NAは非常に溶解度が低いため,Substrate-induced-inhibitionを確めることが出来ないがNAの曲線は他の活性曲線に較べ全く特異的な曲線を示した。その他の活性曲線は定常曲線を示すのに対し,低濃度で活性が低く基質濃度が高くなると急激な上昇曲線を示した。

3) 阻害剤によるMAOの(%)inhibition　阻害剤を用い各基質におけるMAOの(%)inhibitionを求め,inhibitionの面からMAO活性を検討した.(Table 3) それによるとTranylcypromine 0.15mMでTyと5HTは90%以上のinhibitionを示し,DAは80%前後のinhibitionを示した。それに対しNAはハトで45.5%,ラットで65.6%と他の基質に較べ低いinhibitionを示した。Nialamideの濃度展開によるNAの(%)inhibitionをみるとfinalconcが0.15mM, 0.75mMで大体60～70%のinhibitionを示し,1.5mMでは100%のinhibitionを示した。(Table 4)

Table 3 Tranylcypromineによる各基質のMAO活性阻害(%)

Species / Substrate	Pigeon(%)	Rat(%)
Tyramine	95.8(2)	95.3(2)
Dopamine	8.03(2)	76.4(2)
Norepinephrine	45.5(2)	65.6(2)
Serotonin	97.6(1)	96.7(2)

finalconc. Substrate:5mM.
Tranylcypromine:0.15mM.

Table 4. Nialamideによる NAのM.A.O. 活性阻害(%)

Species	Pigeon(%)	Rat(%)
Nialamide add		
0.15mM.	59.9	68.5
0.75mM.	60.9	69.5
1.5mM.	100	100

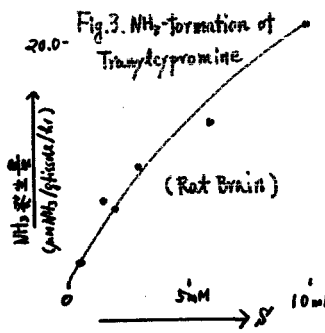
finalcon.(Substrate NA):5mM.

4) Tranylcypromineのアンモニア発生と阻害剤　Tranylcypromineを阻害剤として用いた場合それ自体からアンモニアが発生することが認められたので,これを明確に把握するためTranylcypromineを濃度展開し,その産生アンモニアの相関をみた。(Fig.3) これによると濃度が高くなるにつれアンモニア産生量は増加した.更に実験操作のどの段階でアンモニアが産生されるかを確認するためホモジネートをおよびBufferとTranylcypromineのみで30°C, 60分振盪incubateし,室温で3時間拡散後アンモニアの発生を調べたがアンモニアの発生を見なかった。このことはTranylcypromineからのアンモニア発生が脳ホモジネートの介在によるものであることを意味するので,Tranylcypromineを基質とし,他のMAO阻害剤を用いてアンモニア産生への影響をみた。(Table 5) それによるとTranylcypromineからのアンモニア産生量が対照で16.38 (μM NH3/g tissue/hr), Nialamide添加1mMで6.60 0.6mMで7.99となり,Nialamide, isocarboxazidの添加によって,Tran-

Table 5 MAO阻害剤によるTranylcypromineのアンモニア産生の抑制.
(Rat brain)

	NH3formation
Control (no add.)	16.38*
Nialamide add.	
1mM	6.60
0.6mM.	7.99
isocanboxazide add.	
1mM	11.98
0.6mM	12.18

finalconc. Substrate:Tranylcypromine 5mM.
*μM NH3 formed/gtissue/hr.



ylcypromine からのアンモニア産生量は減少した。以上からTranylcypromineからのアンモニア発生はそのアミノ基に対するMAOの脱アミノ作用によると考えられる。

〔考察〕 1)各基質におけるMAO活性とその動物差について。：一定濃度(5mM)での各基質のMAO活性はTable2の如くハトとラットでMAO活性が一番高いのがTyで一番低いのがNAであった。その中間にDAと5HTが位置した。これはHope & Smith[9]等のマウス各臓器での成績やLeeper[10]等のラット肝での成績と比較すると、大略一致した。ハトとラットの脳MAO活性を比較したデータをみると、基質によってハトとラットのMAO活性値が逆転するが、これは一基質のみのMAO活性で全体のMAO活性を論ずる危険性を示している。従ってMAO活性は基質別にみることが必要である。ハトとラットの脳内アミンレベルを比較したデータは我々[7]やBrodie[11]等によって示されたが、MAO活性とのはっきりした相関はみられない。 2)基質濃度の展開による活性曲線の特長について。：基質の濃度展開による活性曲線の中で、特にNAの活性曲線は特徴的でハト、ラット共に同じ傾向を示した。その曲線をみると、低濃度では活性は甚だひくく、高濃度になるにつれ活性は急激な上昇を示した。恐らく低濃度では抑制機構が働き、高濃度になると抑制機構の働きがカバーされるため急激な活性上昇を示すのではないかと予想される。つまりMAOはNAに対して何らかの活性調節能をもつ可能性が考えられる。しかしMAOはミトコンドリアを宿主とし、恐らく宿主であるミトコンドリアの影響を少なからず受けているはずであるので、この問題は単にMAO自体のactive Siteの面のみで考えるべきではないであろう。 3)阻害剤による各基質の活性阻害について。：Tranylcypromineによる各基質の活性阻害をみると、基質によって阻害の程度は違うが、殊にNAが阻害剤に対して一番強い抵抗を示した。これはMAO阻害剤を動物に投与した時脳内NAレベル上昇がカテコールアミンや5HTに較べ遅いという事実[12]を裏づける。 4)Tranylcypromineのアンモニア産生について。：実験条件におけるTranylcypromineからのアンモニア産生はMAOの酸化的脱アミノ化によることがNialamide, Isocarboxazidなどの MAO 阻害剤によってそのアンモニア産生を抑制することから証明された。Tranylcypromineは他のMAO阻害剤と異りそのもの形でActive Siteに働くため、活性型になるためのpreincubationを必要としないという。[15] Belleau & Moran[13][14]等はこれをTranylcypromineがモノアミンと同じelectronic propertyをもっているためだろうと説明する。我々の実験方法の範囲ではTranylcypromineのMAOによる酸化的脱アミノ反応がモノアミンと同質のものであるかは決められないが、その可能性は考えられる。又Tranylcypromineを阻害剤として用いた時の各基質のinhibitionの多様性もMAOのActive siteが複雑なことを示すものと考えられる。又NialamideやIsocarboxazidによるTranylcypromineのアンモニア産生の抑制は三者が少くとも共通のActive siteに働くことを意味している。又Pletscher[15]は可逆的阻害剤、ヒドラジン系の阻害剤、Modalineなどは同じactive siteに働くが、Tranylcypromineの作用機序については明らかでないという。今回ここに報告したMAOによるTranylcypromineの酸化的脱アミノ反応、NialamideやIsocarboxazidによる酸化的脱アミノ化の抑制、Tranylcypromineと他の阻害剤の共通のActive siteへの作用はこの問題に多少の解明を与えてくれると思われる。

〔文献〕

1) Kohn,H.I.:Biochem.J. 31,1993,1937. 2) Blaschko,H.et.al.:Biochem.J.31,2187.1937
3) Pugh,C.E.M and Quastel,J.B:Biochem.J.31,2306,1937. 4) Zeller,E.A.:Helv.chim,Acta. 24, 539.1941 5) Gorkin,V.Z.:Nature,200,77,1963. 6) G.C.Cotzias,:Biochem.pharma. 15,275,1966.
7) R.Takahashi,:日本神経化学Conference, Oiso,1965. 8) Cotzias,G.C.et.al.:J.biol.chem.190,665, 1951.9) Hope,D.B.et.al.:Biochem.J. 74,101,1960. 10) Leeper,L.C.et.al.:Arch.Biochem.Biophys. 77,417,1958. 11) B.B.Brodie,et.al.:comparative Neurochemistry. edited by D.Richter.1964.
12) Specter,"et.al.: Ann.N.Y.Acad.Sci. 107,856,1963. 13)Belleau,B.et.at.:J.Med.Pharm. Chem.5,215,1962. 14) Belleau,B.et.al.:Ann.N.Y.Acad.Sci.107,822, 1962. 15) Pletscher,A: Pharm. Rev.(2nd International Catecholamine Symposium.) 18,121,1966.

3 脳の Carnitine 定量法の吟味

斉藤章二・松本茂信・
徳永友喜子（慶大・医・薬理）
木原弘二（慶大・医・分子生物）

最近、γ-trimethyl-β-hydroxy betain なる Carnitine の各臓器組織における生理作用が、多大の興味を喚起し各方面において研究されつゝある。

昨年(1965年)、George Wolf を editor として、「リポイド代謝に関係ある Carnitine の最近の研究」という シンポジウムが催された(The M. I. T. Press 1965, Cambridge Massachusetts, U. S. A.)。

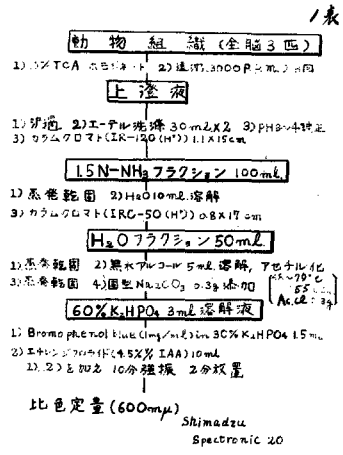
Carnitine の生理作用としてのさいきんの発見は、脂肪酸がミトコンドリア内において Co-A と結合して分解される前に、ミトコンドリヤ膜の carrier として Carnitine が脂肪酸と結合してこの膜を通過するという ことである(Bremer. 1962[1], Kaplan ら 1962[2])。

その脂肪酸の有無が前項の物質交代を加減する一種の feedback mechanism が成立し[3]、換言すれば Carnitine が前項代謝を調節することになる。

リポイド代謝、またその上、前項代謝の重要な調節因子となる Carnitine が各臓器においてある種の特能的役割を発揮するらしいことは当然考えられるのである。

また Carnitine の薬理学的応用として、Carnitine の心臓ホルモンとしての役割(4)、またはこの薬物の demethyl されたものが、アルコール中毒症に著効を現すという報告もある(5)。われわれは、脳または脳各部における Carnitine の分布、つぎに中枢興奮剤としく に痙攣毒による Carnitine 濃度の変動などを調べ、脳機能と Carnitine との相互関係も理解しえにうと、この実験を始めた。まず、現在最も広く行われているこの Carnitine の定量法は Hehlman and Wolf 法(6)であるがその方法追試してみた。その実施方式は次一表の如くである。しかし、この方法は欠点が多く、万人の行いうるものとは云いがたいので、われわれは、Carnitine の新しい定量法を考案し、その実施方法を吟味し各組織における Carnitine の含有量をきめることにした。

1表



従来の Carnitine の定量法は大別すると3通りあるようである。

(1) 生物学的定量法(7)(8)(9)

(2) 有機塩化合物と bromophenol blue との複塩形成による定量法(6)

(3) 酵素法(10)

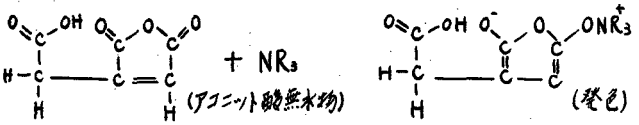
生物学的定量法、生物すなわち meal worm (Tenebrio molitor)(肉うじ)または蛙の腹直筋を使う biological assay (Bioassay) であるが、これら方法の欠点は、精度が50%以下で得られた値は信用できないので、問題にならない(8)

bromophenol 法は、Friedman(11) が開発し、Wolf ら(4)が改良した方法である。現在最も広く普及しているが、試薬または物質の分離に使用するイオン交換樹脂など入手容易であり、クロマトカラムを使って Carnitine と betaine、または choline などを

4級アミンを分離する。しかし、この方法は、組織からの抽出に始まり定量が終るまで3日も要し、発色を充分にするためには、carnitineのエステル化を完全にすることが緊要となっているけれども、粗の組織抽出物が使われるような場合には、組織に含有されるcarnitineとbromophenol blueとの複塩形成が阻害されるなどの欠点を多くもっている。

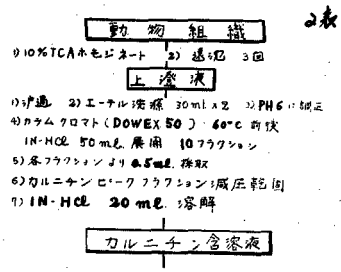
最後の酵素法の原理は、carnitineとacetyl Co-Aとを反応させて、豚の心臓から抽出したcarnitine acetyltranferaseを使ってacetyl carnitineとCoASHとする。そしてCoASHとdithiobis-nitro-benzoic acidと作用させて発色定量する。この方法は、疑いもなく今迄の方法に較べてより簡便でより確実であり、他の類似物質を分離する必要なく、carnitineのみに特異的に反応するからである。しかし、acetyl-CoAの調製、豚より酵素の製法など、その操作が煩雑であり、試薬が高価なのが欠点である。わが国において多数の例をとり扱うのに困難を生ずることはまちがいないところである。そこで、われわれは、「3級および4級aminesの分光分析定量」なる題のもとに発表したS. Sass et al (11)の文献に基いて、組織中の4級アミンであるcarnitineを、より簡便に、より確実にしかも試薬その他が比較的安価で、万人がまちがいなく定量しうる方法を考案した。

この方法の原理は、アコニット酸の無水物が、3級または4級およびその塩類に反応してつぎのような物質となり発色する。



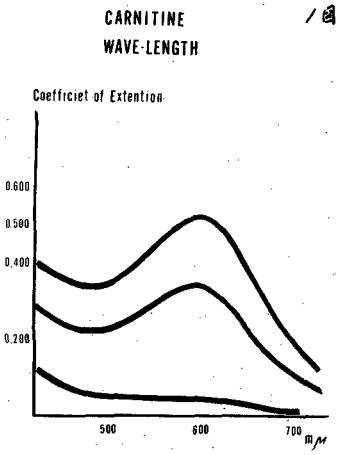
(実施) 0.25gのaconitic anhydrideを40mlの無水醋酸に溶解し、Tolueneで全量100mlにする。

第2表



組織からのcarnitineの抽出は、第2表に示すようにTCAおよびhomogenige. 遠沈によりその抽出物を試験管内で乾燥した後、上記のaconitic anhydride液の1~2mlを加え、100°Cの湯浴中で10分間加熱し、次にアルコールで稀釈して、分光分析(波長600mμ)する。

第1図に見るように波長は600mμにおいてCarnitineは著高のpeakを示した。



第1図

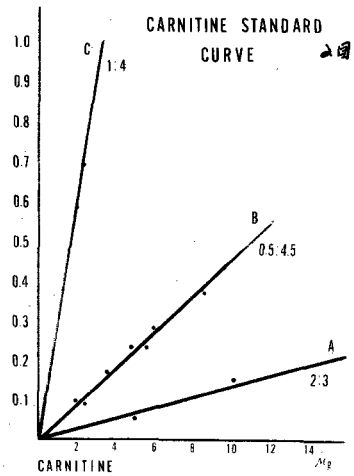
たゞし、3本の曲線のうち最下端のものは、carnitineを含有しない対照を示す。

そこでこの新法によるcarnitineの標準曲線を、第2図にみるように画いてみた。

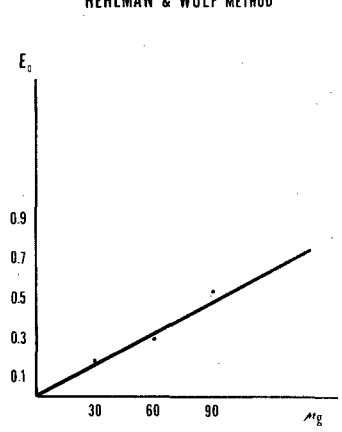
A曲線は2:3、Bは as:us およびCは1:4を示し、夫々稀釈容量の比を現わしている。

しかるに、Stahlman and Wolf (6)のbromophenol blue法による標準曲線は、第3図にみるような結果をえた

この両者の曲線を比較するとき、直ちに気づくことは



2図



3図

両者の精度のことである。新法によれば、Mgの単位で明らかに測定することができるのに、旧法では10倍量におよぶcarnitineを必要とするのである。この真新法の長所は、微量でcarnitineを定量できることである。

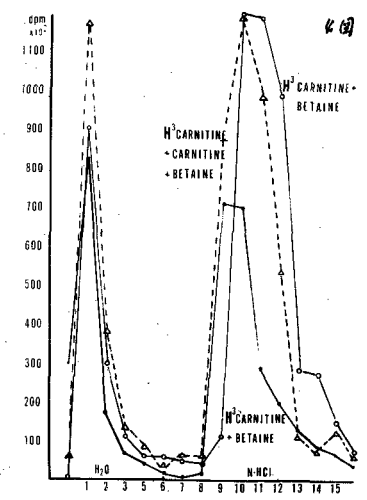
しかしながら、新法にも幾多の欠点が存在する。その一つは、上記の酵素法( )のように、carnitineに特異的に反応しないことである。bromophenol blue法と同様に、組織中のbetain, cholineおよびprimary amines(アミノ酸など)などにも発色するので、これらの物質をクロマトグラムで分別するか、あるいは、取除く必要がある。

新法の長所としては、上記のように反応の鋭敏なことに加えて、carnitineのアセチル化を必要としないことである。定量の簡便化と確実性を増すことになる。

Carnitineの溶出條件

われわれの新法のColumとDowex-50 WX4(200~400 mesh)によるcarnitineの溶出條件を決めるためにつぎの実験を行つた。次々図は夫々の條件での^3Hの溶出曲線である。

Nuclear Chicago社の液体シンチレーションカウンターを用いて、^3HをラベルしたCarnitine HCl(Wilzbachの方法によりトリチウムガスを用い、つぎの條件で照射を行つた。照射量100mg, 照射量200 curie-days(キュリー化学薬品数)をSampleとして0.1ml(2.7×10^7 dpm)を使い、それに2mg/ccのcarnitineまたはbetaineをそれぞれ加えてDowex-50のカラムに吸着、水洗後1NHClで分別溶出した。しかるに、NHClに溶出する^3H carnitineは、Fraction No.8~15の間において、3種体は殆んど同様に出現し、carnitineまたはbetaineの存在において、^3H carnitineは全く影響されなかつた。



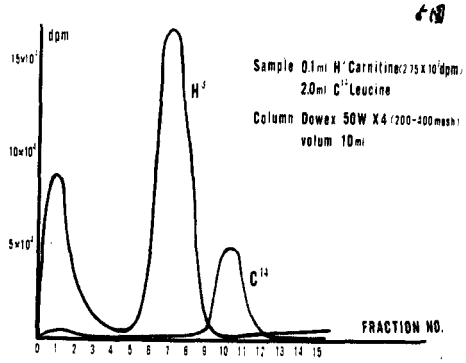
4図

なおH₂Oで溶出してくる部分は、恐らく^3H carnitine中の不純物によるようであることが確められている。

Primary aminesとの分別

脳組織は、primary aminesにつアミノ酸、NH_3などの物質を含有する複雑な情報量を形成する場である。従つて、まずもつてこれらの分離、干渉などについて考慮しなければならない。

^{14}C leucineを用いて、次々図のようにH^3 carnitineと共に、液体シンチレーションカウンターにかけて、両物質がDowex-50によつて分別できるかどうかをしらべたところ、明らかに両物質はおのおの異つたfractionに出



6図

てくることが判つた。

*betain*との分別

*Dowex-50*を充てんしたカラムの場合には、*carnitine*と*betain*とは分別することはできなかつた。そこで、*Dowex-1*を用いたところ*betaine*は*fraction* 12～15の所に現われ、*carnitine*は1～4のところに現われた。

*Choline*との分別は、*Hellman and Wolf* (6)の方法でIRC-50(H^+)のカラムによつて分別できるので、更に行はなかつた。また脳については全脳、間脳、大脳、中脳の夫々に区分して定量してみたところ図6に示すような結果をえた。この実験例は数例にすぎないのでなお追加実験を行い、肝、筋肉の夫々の部分における定量についても追求している。

6図.

BRAIN unit: mg

EXPERIMENT NO.	WHOLE BRAIN	DIEN-CEPHALON	CEREBRUM	MID BRAIN
1	13.8			
2	39.0			
3	26.1			
4	32.0			
5	31.0			
6	54.0	(60.0)		
7	26.0	45.0	74.0	23.0
8	41.0	34.0	44.0	46.0

文献

(1) *Bremer, J., J. Biol. Chem., 238, 2774, 1963.*

(2) *Fritz, I. B., Kaplan, E., and Yue, K. T. N., Am. J. Physiol., 202, 117 (1962)*

Fritz, I. B., and Yue, K. T. N., J. Lipid Research, 4, 279, 1963

(3) 三浦義彰, メタボリズムの知識, P76, 中外医学, 1964

(4) *Miwa, Y., Takaori, S., and Shimamoto, K., Japanese J. Pharmacol., 15, 210, 1965.*

(5) 高橋良, 医学のあゆみ, 53, 669, 1965.

(6) *Mehlman, M. A., and Wolf, G., Arch. Biochem. Biophys., 98, 149, 1962.*

(7) *Frankel, G., Archem. Biophys., 50, 486, 1954*

(8) *Frankel, G., and Friedman, S., Vitamins and Hormones, 15, 73, 1957*

(9) *Strack, E., Lorenz, I., and Rostock, W., In Protides of the Biological Fluids, 7th Colloquium edited by H. Peters. Elsevier, Amsterdam, P.248, 1958*

(10) *Marquis, N. R. and Fritz, I. B., Lipid. Res. 5. 184, 1964*

(11) *Friedman, S., Arch. Biochem. Biophys., 75, 24, 1958.*

(12) *Saas, S., Kaufman, J. J., Cardanas, A. A., and Martin, J. J., Anal. Chem. 30, 259, 1958.*

4　人脳内および動物組織内のホモカルノシンの定量

金沢　彰・宮本英七・
公文　明・佐野　勇
（阪大・医・神経）

ホモカルノシン（γ-アミノブチリル-L-ヒスチジン）はその分離，同定以来[1,2]中枢神経系に特異な物質として注目されている。Abrahamら[3]は人脳灰白質にくらべ白質はこのペプチドを高濃度に含むと報告した。しかし私達は予備実験で大脳皮質にくらべ，視床，視床下部，小脳に，より高濃度に存在し，また白質，灰白質での濃度差は著明でないことを知った。この観察をたしかめるために，脊椎動物脳でのホモカルノシン濃度の定量と人脳での分布を検討した。

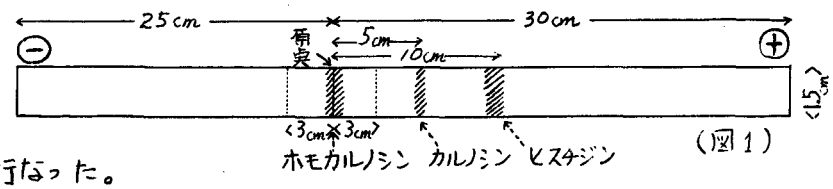
実験材料

死因調査のための剖検（死後7～24時間）の際に人脳を得た。したがって，脳の一部は死因調査のため予め除去されており，定量できない部位もあった。

実験方法

アミノ化合物の分離：3～10gの組織を4倍量の99%エタノール中で磨砕し，10分間，2000回転で遠沈，上清を得た。沈渣をさらに2倍量の80%エタノールで洗い，遠沈した。上清を混合，1×3cmのAmberlite IR-120×8（100～200メッシュ，H^+型）カラムに吸着させ，樹脂を6mlの80%エタノールで洗い，12mlの1Mピリジンで中，酸性アミノ化合物を除去した。つづいて3Mアンモニア水12mlで塩基性アミノ化合物を溶出し，その3～12mlを集め，デシケーター中で乾燥した。

塩基性アミノ化合物の電気泳動：上記残渣を人脳の場合は200μl，その他の場合には100μlの水にとかし，その5μlを55×1.5cmの沪紙の陰極端より25cmの原点に塗布した。（図1）。高圧沪紙電気泳動は，a1M硼酸緩衝液pH10.0で4000V（100V/cm），1時間行なった。



（図1）

ホモカルノシンの定量：高圧沪紙電気泳動でホモカルノシンは原線からほとんど泳動されないが，カルノシンは約5cm，ヒスチジンは約10cm，それぞれ陽極側に泳動される。したがって原線の両側3cmずつをホモカルノシンを含む部位として切りとり，3mlの50%エタノール中に浸した。5分間抽出後，1N塩酸にとかした0.5%スルファニル酸溶液0.2mlおよび，2.5%亜硝酸溶液0.2mlを加え，振盪した。5分後0.6mlの10%炭酸ナトリウム溶液を加え，10分後500mμで比色定量した。毎回標準溶液（10μmoles/ml）5μlを上述の方法で定量した。

実験結果

1）方法の検討：高圧沪紙電気泳動上ホモカルノシンと推定されるスポットは合成品の添加により，発色の増強がみられた。また原線より両極へ3cmずつの部位にふくまれるパウリ反応陽性物質はホモカルノシンのみであった。各測定毎に別に泳動した沪紙をスルファニル酸試薬で発色させ，カルノシン，ヒスチジンが混在しないことを確認した。

この方法で0.02～0.10μmoleの範囲で発色強度とホモカルノシン濃度とは比例し，反応後30分間は安定であった。既知量のホモカルノシンを家兎肝臓ホモジェネートに加え，回収率を測定した。回収率は90.3%であった。

2) 死後変化：家兎脳を用いてホモカルノシンの脳内濃度の死後変化を検討した。脳を両半球にわけ，1側は致死後ただちに，他側は室温にそれぞれ，2，15時間放置したのち，前記の方法でホモカルノシンを定量した。脳内ホモカルノシン含量の死後変化は下記のように，ほとんどみられなかった。

実験1，　9.6 μ moles/100g，(致死直後)，　10.5 μ moles/100g，(死後2時間)

実験2，　16.5 μ moles/100g，(致死直後)，　18.6 μ moles/100g，(死後15時間)

3) ホモカルノシンの人脳内分布：5例の人脳の各部位でのホモカルノシン濃度を定量した(表1)。脳内濃度には個体差がかなりみられるが，どの例でもホモカルノシンは，視床，視床下部，小脳に高濃度に存在し，脳梁に最も少なかった。白質と灰白質における濃度差はほとんど見られなかった。

表1　Regional distribution of homocarnosine in human brains

Case No.	I	II	III	IV	V	
Cause of death	Head injury	Subdural hemorrhage	CO poisoning	Myocardial infarction	Myocardial infarction	Mean±S.D.
Hours after death	24	7	7	19	19	
Age in years	37	78	45	66	44	
Sex	Male	Male	Male	Female	Male	
	Concentration of homocarnosine (μmoles/100g)					
Frontal						
gray		21.3	22.1	21.1	40.5	26.3± 8.2
white		28.6	47.3	19.3	34.2	32.4±10.1
Parietal						
gray		34.5	41.1	44.8	30.6	37.8± 5.6
white	51.0	23.2	50.9	22.4	30.8	35.7±12.8
Temporal						
gray	38.8	33.0	18.5	17.0	13.9	24.2± 9.8
white		35.4	37.4	14.3	19.2	26.6±10.0
Occipital						
gray	43.1	37.6	38.4	26.2	28.2	34.7± 6.5
white	46.1	31.7	45.1	17.2	27.0	33.4± 8.6
Corpus callosum	14.8	8.9	24.3	15.2	13.2	15.3± 5.1
Nucleus caudatus	28.8	33.2	12.0	22.4		24.1± 7.9
Putamen			49.6	38.4		44.0± 5.6
Thalamus	79.5		44.4	50.9	40.5	56.3±15.5
Hypothalamus	66.2		54.9			60.6± 5.6
Pons	47.5	20.6	24.1	33.4	25.2	30.2± 9.7
Cerebellum						
gray	56.1	48.4	55.1	44.4	55.0	51.8± 4.7
white	78.5	55.4	37.3	54.6	36.0	52.4±15.4
Medulla	22.8					22.8

Results were corrected by a recovery rate of 90.3 per cent.

4) 動物脳内のホモカルノシン濃度：ホモカルノシンはラッテ，モルモット，家兎，ニワトリの脳内に存在するが，フナ，サバなどの魚類や犬，猫の脳にはほとんど存在しなかった（表2）。

5) 脳以外の組織内のホモカルノシン：ラッテ，モルモット，家兎の心臓，肝臓，腎臓，肺臓，膵臓，小腸，筋肉内のホモカルノシンの存在を検討した。組織1g相当量の塩基性アミノ化合物分画を電気泳動し，パウリ反応を行なった。家兎の肝臓に0.4～0.7 μmoles/100gのホモカルノシンが存在する以外に，検討した組織にはいずれもホモカルノシンを見出せなかった。

表2
Concentration of homocarnosine in animal brain

	(μmoles/100g)
Crucian (1)	0.5
Mackerel (2)	0.5
Chicken (3)	3.2±0.7
Rat (3)	5.6±1.5
Guinea Pig (4)	5.9±1.8
Rabbit (4)	11.4±1.9
Cat (5)	0.5
Dog (1)	0.5

Numbers within the parentheses indicate the number of assays. Results were corrected by a recovery rate of 90.3 per cent.

考察

イオン交換クロマトグラフィの利用によって種々の生物材料中のアミノ酸の定量が可能になった。Abrahamら[3]はDowex 50×4カラムを用い，2,6-ルチジンで展開，動物組織内ホモカルノシンをヒスチジンおよびカルノシンから分離し，パウリ反応を用いて定量した。しかしこの方法は一度に多数の試料を扱うには不適当であるので，著者らは高圧沪紙電気泳動によりホモカルノシンを他のパウリ反応陽性物質から分離し，沪紙を切りぬく方法で定量した。パウリ反応用試薬はいずれも氷冷したものを用い，反応後ただちに比色定量した。この結果，0.02～0.10 μmolesの範囲内では満足すべき定量値を得，回収率も90.3%であった。

人脳内ホモカルノシン濃度は大脳皮質にくらべ，視床，視床下部，小脳に高く，脳梁で最も低い。この結果はAbrahamら[3]の定量値（大脳33.4，小脳16.0，脳幹20.9 μmoles/100g）と一致しない。この差は多分彼らが人脳1例のみを用いたことによるかもしれない。また白質，灰白質での濃度差はみられなかった。この点もAbrahamらの結果（白質は灰白質の2～5倍のホモカルノシンを含む）と一致しない。

ホモカルノシンの前駆物質であるγ-アミノ酪酸は視床，視床下部，嗅脳に高濃度に存在し，脳梁に最も低い[4]が，著者らが得たホモカルノシンの分布と一致する点は興味深い。しかしγ-アミノ酪酸濃度は大脳と小脳で差がないという報告もある。[5,6]

中枢神経系にのみ存在すると考えられていたホモカルノシンが，微量ではあるが，家兎の肝臓に見出されたことも興味深い。

総括

高圧沪紙電気泳動およびパウリ反応を用い，人脳および動物組織内のホモカルノシンを定量した。人脳では視床，視床下部，小脳に高濃度に存在し，脳梁に最も少なかった。白質，灰白質での濃度差はほとんどなかった。

1) Pisano,J.J., Wilson,J.D., Cohen,L., Abraham,D.,and Udenfriend,S., J.Biol.Chem.,236, 499 (1961)
2) Kanazawa,A., Kakimoto,Y., Miyamoto,E.,and Sano,I.,J.Neurochem.,12,957 (1965)
3) Abraham,D., Pisano,J.J.,and Udenfriend,S., Arch.Biochem.Biophys., 99,210 (1962)
4) Berl,S.,and Waelsch,H., J.Neurochem., 3,161 (1958)
5) Baxter,C.F.,and Roberts,E., J.Biol.Chem., 236,3287 (1961)
6) Sytinsky,I.A.,and Thinh,N.T., J.Neurochem., 11,551 (1964)

5 ウシ脳からのN-アセチル-α-アスパラチルグルタミン酸の精製，同定および動物体内分布

宮本英七・柿本泰男・
公文明・佐野勇
（阪大・医・神経）

以前からわれわれは一連の研究で.(5.6.7.8.9.) これまで脳内に存在の知られていなかった数種の物質を分離し報告した。本会ではこれら実験の酸性分画から精製同定した一物質について報告する。この化合物はさきにCuratoloら(3)が家兎および神経組織に存在することを報告したN-アセチルアスパラチルグルタミン酸(N-Ac-Asp-Glu)と同一化合物と考えられる。しかしCuratoloらの同定はつぎの3つの理由で不完全である。1)アスパラギン酸のαとβとのいずれのカルボキシル基がグルタミン酸とペプチド結合をしているかを明らかにしていない。

2)アスパラギン酸につくアシル基がアセチル基か否かについて確かな証拠を得ていない。

3)物質の同定に必要な合成が行われていない。

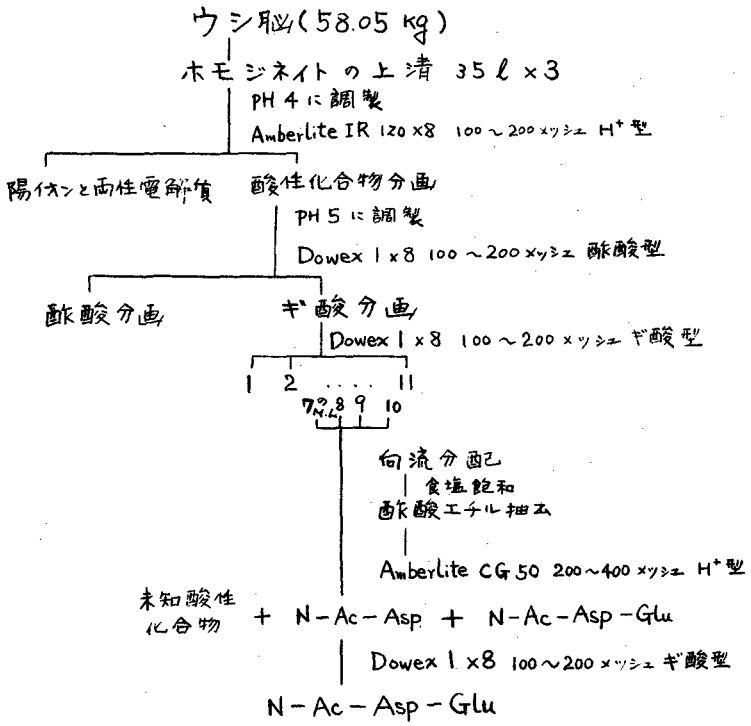
そこでこれらの点を考慮してウシ脳からN-Ac-Asp-Gluを精製し，それをN-Ac-α-Asp-Gluと同定し，さらにこの物質の動物体内分布および人脳内部位別濃度をしらべ，つぎの結果をえた。

実験結果

1) N-Ac-Asp-Gluの精製

58.05kg，150頭分のウシ脳を3回にわけて処理した。すなわち，50個のウシ脳を小片とし，20ℓの水中で20分間加熱。酢酸を加えpH4に調製しホモジネイトにし，エタノール24ℓを加え遠沈，上清35ℓを得た。以下N-Ac-Asp-Gluにいたる精製過程の概略は図1に示す。精製にN-Ac-Asp-Gluを含む分画はアニリン-キシロース試薬(11)に反応する唯一の酸性化合物からなり，ほぼ純粋な分画と考えられたが，結晶化には成功しなかった。

図1　N-Ac-Asp-Gluの精製過程



2) N-Ac-α-Asp-Gluの同定

精製した検体の酸加水分解を行い，酸水解物の沪紙クロマトグラフィーお

よび高圧沪紙電気泳動を行った。等モルのグルタミン酸およびアスパラギン酸がえられ，アニリン－キシロース反応で発色したもとの化合物は消失していた。部分酸加水分解(0.2N,105°,2時間)を行った。グルタミン酸とアスパラギン酸のほかに，α-Asp-Glu が検出され，β-Asp-Glu は検出されなかった。

Bradburyの方法(1)に従いヒドラジン分解を行いカルボキシル末端をしらべた。結果の判定は柿本とArmstrongの方法(4)によった。グルタミン酸，α-アスパラチルヒドラジッド，アセチルヒドラジッドが見出された。アシル基の決定は合成したアセチルヒドラジッドおよびN-Ac-Aspのヒドラジン分解によって形成されたアセチルヒドラジッドとRfの値を比較することにより行った。酸加水分解，ヒドラジン分解の結果から精製した化合物の構造をN-Ac-α-Asp-Gluと考え，N-Ac-α-Asp-Gluを合成し，(10)合成品と沪紙クロマトグラフィーおよび高圧沪紙電気泳動上の性質を比較することにより同定した。(表1)

3) N-Ac-α-Asp-Gluの動物体内分布

動物は家兎，ラット，モルモット，ニワトリを用い，それぞれの動物の脳，心，肺，肝，膵，腎，小腸，下肢筋の8組織についてしらべた。断頭し脱血直後の動物組織を用いた。組織3～4gを4倍量の99%エタノールを加えてホモジネイトとし遠沈，沈殿物を2倍量の80%エタノールに懸濁させ，同じ操作で遠沈した。両方の上清分画を集め，1x1cmのカラムAmb. IR 120 x8 100～200メッシュ H^+型に通し，レジンを2mlの80%エタノール溶液で洗い全漏出液を集めた。ピリジンでpH5に調製し，溶液を1x1cmのカラムDowex 1 x8 100～200メッシュギ酸型に通した。レジンを2mlの80%エタノールおよ

表1　N-Ac-α-Asp-Glu および関連物質の沪紙クロマトグラフィー，沪紙電気泳動上の性質

	沪紙クロマトグラフィー Rf値を示す			沪紙電気泳動
	エチルアルコール－アンモニア水－水(16:1:3)	n-ブチルアルコール－酢酸－水(12:3:5)	n-ブチルアルコール－ピリジン－水(1:1:1)	陽極方向への移動距離 cm/30分
精製した天然の化合物	0.16	0.59	0.33*	11.9
N-アセチル-α-アスパラチルグルタミン酸	0.16	0.59	0.36*	11.8
N-アセチル-β-アスパラチルグルタミン酸	0.14	0.54	0.34	13.5
天然化合物の酸加水分解物	0.16，0.21	0.21，0.28	0.29	8.9，4.8
天然化合物の部分酸加水分解物	0.16，0.21，0.09	0.21，0.28	0.29，0.21	8.9，6.7，4.8
アスパラギン酸**	0.16	0.21	0.29	8.9
グルタミン酸**	0.21	0.28	0.30	4.8
α-アスパラチルグルタミン酸**	0.09	0.28	0.21	6.7
β-アスパラチルグルタミン酸**	0.09	0.22	0.29	8.5
N-アセチルアスパラギン酸	0.26	0.65	0.40	14.9

※ コクロマトグラフィーにより一致することを確めた。

※※ ニンヒドリン反応による着色　アスパラギン酸：青色，グルタミン酸：紫色，α-Asp-Glu：紫色，β-Asp-Glu：茶色

び水で洗ったのち，15mlの1Nギ酸溶液で溶出した。溶出液を乾固，乾固物を水にとかし，4000 volt，1時間高圧沪紙電気泳動を行った。いくつかの組織はN－Ac－α－Asp-Gluと同一位置に移動する物質を含むが，沪紙クロマトグラフ－上の性質は脳からえた物質を除いて異っていた。アニリン－キシロース試薬で発色，N－Ac－α－Asp-Gluに相当する部分を切りとり6N塩酸溶液で抽出，抽出液の酸加水分解を行い，グルタミン酸とアスパラギン酸を検出した。検出されたアミノ酸は脳以外の組織ではごく微程度であり，ブランクの紙から検出されたアミノ酸の量と一致していた。したがって脳以外の組織におけるN－Ac－α－Asp－Gluの濃度は存在しても1μg/g以下と計算された。

4) N－Ac－α－Asp－Gluの回収率

3)の操作において酸性化合物ギ酸分画の酸加水分解を行うと，酸水解物のグルタミン酸はN－Ac－α－Asp－Gluのみに由来することを別の実験で確めた。したがって定量実験の際にはギ酸分画の乾固物の一定量をとり酸加水分解を行い，酸水解物からグルタミン酸を定量しその値からN－Ac－α－Asp－Gluの量を計算した。グルタミン酸の定量は酸水解物の乾固物を水にとかし，高圧沪紙電気泳動を行いニンヒドリンで発色，グルタミン酸に相当する部分を切りとり50%エタノール溶液で溶出，570mμで比色した。ラットの肝臓を用い，新鮮組織1g当り30～200mgのauthentic substanceを加え上記操作にて回収されるN－Ac－α－Asp－Gluの量を測定した。回収率の平均値は62.5%であった。

5) N－Ac－α－Asp－Gluの動物脳内濃度

N－Ac－α－Asp－Gluの動物脳内濃度を全脳を用いて測定した。(表2) それぞれの値は62.5%の回収率で補正した。

表2 Concentration of N-Ac-α-Asp-Glu in whole brain

Animals	μg per g of wet tissue
Rabbit	259
(3 cases)	216
	225
rat	144
(3 cases)	194
	205
guinea pig	310
(2 cases)	310

6) N－Ac－α－Asp－Gluの人脳内分布

4例の剖検例の人脳で各部位におけるN－Ac－α－Asp－Gluの濃度をしらべた。(表3)

考察と結論

N－Ac－Asp－Gluは哺乳動物の神経組織において最初にCuratoloらによって発見された。しかしその同定の証拠は不完全なものであった。ウシ脳の酸性分画からこの物質を精製し，酸加水分解部分酸加水分解，ヒドラジン分解により構造を推定し，合成品と沪紙クロマトグラフィー，高圧沪紙電気泳動上の性質を比較することによりN－Ac－α－Asp－Gluと同定した。さらにこの物質の動物体内における分布をしらべた。脳内にのみ検出され他の組織には検出されなかったので，脳組織にかなり特有の構成分であると考えられる。動物の脳内濃度をしらべ，人脳の各部位における濃度を測定した。

α－アスパラチルおよびβ－アスパラチルペプチドはBuchananら(2)，柿本および

Armstrong (4) によって人尿中に存在することが報告されているが，哺乳動物体内での報告はない。ウシ脳からアミノ化合物を同定するわれわれの一連の研究において α-Asp-Glu および β-Asp-Glu は検出されなかった。また，N-Ac-Asp はすでに Tallan ら (12) により分離同定されて高等動物の中枢神経系にのみ高濃度に存在することが注目されている。したがって N-Ac-α-Asp-Glu の生合成経路は N-Ac-Asp から由来するものと推定される。ラットの肝臓および脳のホモジネイトの上清に放射性のグルタミン酸を加え，N-Ac-Asp，Mg^{++}，ATP，とインキュベイトすると，オートラジオグラフィーで N-Ac-α-Asp-Glu の形成が認められた。この酵素標本は 45～65％の硫安分画に沈殿し，pH 5.1 の酸処理にたえ，57°C の熱処理に安定である。酵素標本のさらにくわしい性質に関しては検討中である。また，C^{14} でラベルしたグルコースをラットの腹腔内に注入し，1時間位に断頭脱血して脳内の酸性分画をしらべると，N-Ac-Asp および N-Ac-α-Asp-Glu に放射能が検出された。

表3　N-Ac-α-Asp-Glu の人脳内における部位別濃度　mg/g

症例	I	II	III	IV	
性別	♂	♂	♀	♂	
年令	78	45	66	44	
死因	硬膜下血腫	CO中毒	心筋梗塞	心筋梗塞	
死後時間	6	7	19	19	平均値
前頭葉(灰白質)	118	122	184	250	168
(白質)	174	166	139	256	174
頭頂葉(灰白質)	217	189	217	241	216
(白質)	243	257	318	388	301
後頭葉(灰白質)	115	176	246	246	200
(白質)	165	248	290	241	235
側頭葉(灰白質)	149	145	299	257	213
(白質)	230	184	286	193	224
小脳(灰白質)	219	234	370	375	299
脳梁	174	173	198	305	213
視床		296	321	362	326
視床下部		272			272
橋	251	267	371	301	297
尾状核	165	264	265		232
被殻		238	381		310

人脳内の部位別濃度をしらべると各部位いずれにも検出され，灰白質と白質には著明な差は認められなかった。大脳皮質よりも小脳，脳幹部分の方が高い濃度を示す傾向にあるが，ある部位に特異的に高値を示すことはない。犬およびニワトリの部位別濃度をしらべると，犬では大脳皮質よりも小脳，脳幹部に濃度が高く Curatolo らがウマについて示した傾向と一致するが，ニワトリの例は大脳皮質の方が高値を示す。この結果は種族による差を示しているのか血の寒素によるのか不明である。また，家兎で肾髄および坐骨神経をしらべると，それぞれ 382, 430, 376 mg/g (3例)，508, 370 (2例) であり，この物質は肾髄および末梢神経にも存在し，しかもかなりの高濃度を示すことがわかった。

文献

(1) Bradbury J. H., Nature 178 912. (1956)
(2) Buchanan D.L., Haley E.E., Markiw R.T., and Peterson A.A., Biochem. 1, 620. (1962)
(3) Curatolo A., D'Arcangelo P., Lino A., and Brancanti A. J. Neurochem. 12, 339 (1965)
(4) Kakimoto Y., and Armstrong M.D. J. Biol Chem. 236. 3280. (1961)
(5) Kakimoto Y., Nakajima T., Kanazawa A., Takesada M., and Sano I., Biochim et Biophys Acta 93, 333. (1964)
(6) Kakimoto Y., Kanazawa A., Nakajima T., and Sano I., Biochim. et Biophys. Acta 100, 426. (1965)
(7) Kanazawa A., Kakimoto Y., Miyamoto E., and Sano I., J. Nerrochem. 12, 957. (1965)
(8) Kanazawa A., Kakimoto Y., Nakajima T., Takesada M., Shimizu H., and Sano I., Biochim. et Biophys. Acta 97, 460. (1965a)
(9) Kanazawa A., Kakimoto Y., Nakajima T., and Sano I. Biochim. et Biophys. Acta 111, 90. (1965b)
(10) Le Quesne W.J., and Young G.T, J. Chem. Soc. I. 24. (1952)
(11) Smith, I., in chromatographic techniques P. 208 william Heinemann Medical Books LTD London (1958)
(12) Tallan H.H., Moore S. and Stein W.H. J. Biol. Chem., 219, 257 (1956)

6　フラビンの血液脳関門透過性と脳内FAD，FMNの生合成

永津俊治（愛知学院大・歯・生化）
永津郁子（名大・医・解剖）
奥田潤・八木国夫（名大・医・第一生化）

さきにわれわれはフラビンの血液脳関門透過性をしらべる目的で，ネズミにリボフラビン，FMN，FADを注射した後，脳内フラビン量を測定し，どの型のフラビンも大量に注射すれば脳内フラビンは僅かに増量するが，リボフラビンを注射した時にことに有意な増加が起ることを発見し，リボフラビンはFMN，FADと比べて血液脳関門を通過しやすいことを推定した[1]。さらにEremothecium ashbyiiによるリボフラビンの生合成を利用して$C^{14}(2)$－リボフラビンを調製し，これを用いて$C^{14}(2)$－リボフラビンが血液より脳内に確実に入ることを認めたが，比放射能が低いためにフラビンヌクレオチドを分画して測定することができなかった。そこで今回化学的に合成された比放射能の高い$C^{14}(2)$－リボフラビンを用いて実験を行い，$C^{14}(2)$－リボフラビンは血液脳関門を通過してとりこまれ，速やかにFMN，FADに生合成されることを見出したので報告する。

1．実験材料・実験方法

$C^{14}(2)$－リボフラビンはthe Radiochemical Centre, Amersham, Buckinghamshire, Englandより購入した。$C^{14}(2)$－リボフラビン水溶液をネズミの皮下に注射し，一定時間後に断頭して血液，脳を採取した。脳内フラビンはルミフラビンケイ光法[2]により，血液フラビンは血液リボフラビン微量ケイ光測定法により定量した[3]。フラビンの総放射能は，温水抽出液を光分解してルミフラビンとし，クロロホルムで抽出，蒸発乾固してQ－ガスフローカウンターで測定した。フラビンの分画はペーパークロマトグラフィーにより，FAD，FMN，リボフラビン部分を温水抽出しルミフラビン法でフラビン量を求めQガスフローカウンターでフラビンの放射能を測定した。

2．実験成績

ネズミに20mg/kgのリボフラビン，FMN，FADを腹腔内注射して1時間後の脳内総フラビン量を測定した値は表Ⅰのようである[1]。

表Ⅰ
ネズミにフラビンを注射した後の脳内フラビン量

注射したフラビン量	脳内フラビン量(μg/g)
対照	3.32 ± 0.35
FAD (20mg/kg)	3.75 ± 0.69
FMN (20mg/kg)	3.73 ± 0.85
リボフラビン(20mg/kg)	5.18 ± 0.74
リボフラビン(50mg/kg)	7.37 ± 0.87

各群10匹；フラビン量はリボフラビンとしての値を示す

FAD，FMN，リボフラビンのいずれを注射した場合も脳内フラビンはわずかに増量しているが，リボフラビンを注射した場合にことに著しく増量した。20mg/kgの各種フラビンを注射した場合，1時間後の血中フラビン量はいずれの場合も1μg/ml以下であった。脳は平均0.024ml/gの血液を含むので[4]，脳内血液に由来するフラビンは約0.02μg/g以下である。従って脳内フラビンの増量は脳に含まれる血液のフラビンに由来するものではない。この成績は，血中濃度を極めて高くすれば，リボフラビン，FMN，FADのいずれも血液脳関門をこえて脳内に入りうるが，フラビンヌクレオチドは関門を通過しがたく，リボフラビンは通過しやすいことを示している。

$C^{14}(2)$－リボフラビン（比放射能80000 cpm/μg）をネズミに皮下注射して1時間後の血液，脳のフラビンの放射能を測定すると表Ⅱのような成績を得た。すなわち脳内フ

ラビンに著明な放射能を認め，末梢に注射した $C^{14}(2)$ーリボフラビンは脳内にとりこまれることが証明された。注射後1時間では血液のフラビンにもかなりの放射能が測定されたが，脳が含む血液量は，0.024 ml/g [4] と報告されているので，脳内の血液による放射能は無視しうる程度に小さい。この脳内にとりこまれたフラビンがFMN，FADの分画に入っているか否かをしらべる目的で脳内フラビンを分画してみると表Ⅲの成績を得た。放射能はFMN，FAD両者に認められるが遊離リボフラビン量は痕跡的で放射能もほと人ど検出されなかった。FMN，FADは血液脳関門を通過しがたいのにリボフラビンは通過しやすいという前述の成績より考えて，注射された $C^{14}(2)$ーリボフラビンはそのままの形で脳内にとりこまれ，速やかにFMN，FADへと生合成されると考えられる。同様の実験を注射後15時間について行ったところ，血中のフラビンの放射能はほと人ど検出されなかったのに，脳内フラビンの放射能は注射後1時間のそれと比べてあまり減少していなかった。脳内フラビンを分画すると，やはりFAD，FMNにほぼ等しい比放射能が認められたが，リボフラビンの量は痕跡的であり，放射能もほと人ど検出されなかった。FAD，FMNの比放射能は注射後1時間のそれと比べてあま〻減少していなかった。

表　Ⅱ

$C^{14}(2)$ーリボフラビンを注射1時間後の脳，血液のフラビンの放射能

注射した$C^{14}(2)$リボフラビン量	1.4 mg / kg		
	フラビン量	放射能	比放射能
血　液	0.15μg /ml	1730 cpm /ml	11500 cpm/μg
脳	4.08μg / g	4850 cpm/ g	1190 cpm /μg

投与した$C^{14}(2)$ーリボフラビンの比放射能は　80000　cpm /μg

表　Ⅲ

$C^{14}(2)$ーリボフラビンを注射1時間後の脳のフラビン三型の放射能

	フラビン量(μg/g脳)	放射能(cpm /g脳)	比放射能(cpm/μg)
総フラビン	4.08	4850	1189
FAD	2.86	3681	1287
FMN	1.14	1159	1017
リボフラビン	0.08	10	125

$C^{14}(2)$ーリボフラビン　1.4 mg /kg 注射

以上の成績は $C^{14}(2)$ーリボフラビンが注射された後1時間以内の血中濃度の高い間に血液脳関門を通過して脳内にとりこまれ速やかにFAD，FMNへと生合成されるが，一た人とりこまれたものは脳内に長くとどまることを示している。脳内リボフラビンは痕跡的であるから，リボフラビンの“Pool size”は生理的状態では極めて小さいと考えられる。従って血液リボフラビンの増量によりPool sizeが増したときにのみ事実上FMN，FADの増量をきたすものと考えられる。

3　文　献

1. Nagatsu-Ishibashi, I., Nagatsu, T., and Yagi, K., Nature, 190, 728 (1961)
2. Yagi, K., J. Biochem., 43, 635 (1956).
3. 八木国夫，菊地三郎，河合徹，ビタミン，8，450 (1955).
4. Oeff, K. and König, A., Arch. Exp. Path. Pharmacol., 226, 98 (1955)

7 ニコチン酸ヌクレオチドの脳細胞膜透過性とその代謝経路

出口武夫・市山　新・
西塚泰美・早石　修
（京大・医・医化）

〔序　論〕

脳は血液及び脳脊髄液に対して関門により守られ，その代謝は著るしい閉鎖性と恒常性をもつている。我々は従来より脳神経系におけるNADの生合成及び，その代謝回転を指標として脳内物質代謝の特殊性を明らかにして来た。その後更にニコチン酸からNADに至る中間体の脳槽内投与を行い，その挙動を追跡した結果，ニコチン酸ヌクレオチドはそのままでは細胞膜を通過し得ず，一旦少なくともヌクレオシドまで分解された後にNAD生合成前駆物質として利用されている事実を見出した。

ヌクレオチドの細胞膜透過性については，種々の推定はいし議論があるが，現在までその確立された成績がない。今回我々はピリジンヌクレオチドという代謝経路の単純な物質系と，脳槽内投与という特殊な方法により，ヌクレオチドの細胞膜透過性と脳のNAD生合成の動態に関して2～3の知見を得た。これらin vivoの実験と併せてin vitroの酵素化学的解析の結果について以下報告する。

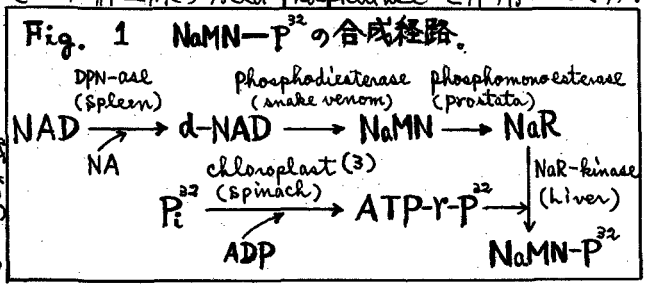
〔実験方法〕

(1) 実験動物；ウイスター系ラット（体重170～200 gm）を用いた。

(2) C^{14}-化合物の調製；NA-7-C^{14}はRadiochemical Centerより購入した。NaMN-C^{14}，d-NAD-C^{14}はNA-C^{14}より赤血球のアセトン粉末抽出液を用いて酵素的に合成した。NaR-C^{14}はNaMN-C^{14}に前立腺のAcid phosphataseを作用させて調製した。なお，用いたC^{14}化合物の比放射能活性は5×10^6 cpm/μmoleであった。

(3) NaMN-P^{32}の調製；牛の肝臓のアセトン粉末抽出液より5段階，約40倍精製したNaR-kinase[5]を用いてNaRとATP-γ-P^{32}より合成した。なお，NaMN-P^{32}の比放射能活性は7×10^6 cpm/μmoleのものを用いた。

Fig. 1　NaMN-P^{32}の合成経路。



(4) 脳槽内注射及び抽出方法；ラット項部の皮膚及び筋肉を切開後Cisterna magnaへ0.04 mlの基質溶液を徐々に注射し，断頭後直ちに液体空気中にて凍結し，脳摘出後は酸可溶性分画を5%過塩素酸で抽出分析した。なお，基質はC^{14}化合物についてはラット一匹当り20×10^4 cpm（40mμmoles），二重標識実験ではラット一匹当りNaMN-C^{14} 15×10^4 cpm（30mμmoles）とNaMN-P^{32} 10.3×10^4 cpm（15mμmoles）を混合したものを注射した。

(5) NAD及びその中間体の分画及び同定；Dowex-1（×2）Formate型（200～400 mesh）のカラム（0.8×40 cm）にchargeしFormic Acidで溶出した[2]。P_iとd-NADはこの方法では分離出来なかったので溶出後，下記（a）の溶媒系によるペー

〔略語〕 NAD；Nicotinamide adenine dinucleotide，d-NAD；deamido-NAD，NA；nicotinic acid，NaMN；niacin ribonucleotide，NaR；niacin ribonucleoside，

パークロマトグラフィーで分離した。なお、各中間体の同定は分画後、下記の溶媒系よるペーパークロマトグラフィーで同定すると共に、更にNaMNは前立腺のAcid phosphataseを作用させNaRとし、又d-NAD, NADは脾臓のNAD-aseを作用させ、夫々、NA又はN-amideとして同定した。(a) Ethyl Alcohol — 1M Amm Acetate pH 5.0. (7:3) (b) n-Butyl Alcohol saturated with 15% NH_4OH.

(6) C^{14}とP^{32}の分別測定; Tri-Carb Liquid Scintilation Spectrometerと Nuclear Chicago Gas Flow Counterの測定値から算出した。なお、NaMN-P^{32}とNaMN-C^{14}の混合比は $\frac{10.3\times10^4}{15\times10^4}=0.687$ であったが、混合した基質液について分別測定を行った所 $\frac{P^{32}}{C^{14}}=0.658$ であった。

Fig 2 Nicotinic Acid-C^{14}

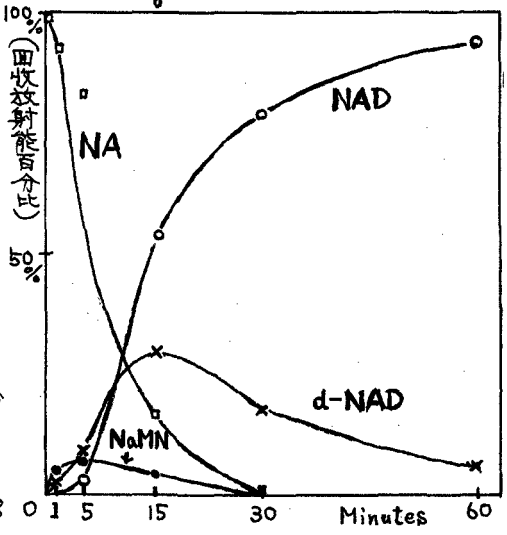
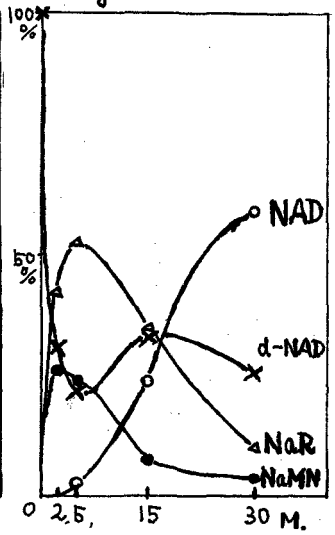


Fig 3. deamido-NAD



〖実験結果〗

〔I〕ニコチン酸及びその誘導体からのNAD合成。

(1) NAの場合; NA-C^{14}を脳槽内に投与した後、経時的に脳内のC^{14}化合物を分析した結果が、〔Fig 2〕である。NAは急速に減少し、それに対応して先ずNaMN、次いでd-NADが増加し、最後にNADとなる。60分以後はすべての放射能はNADとして存在し、NAD生合成の動態がうかがわれる。

(2) d-NADの場合; 〔Fig 3〕投与したd-NADは極めて急速に減少し、2分後には70%がNaR又はNaMNに分解されている。しかし15分後には、

Fig 4 Niacin Ribonucleotide-C^{14}

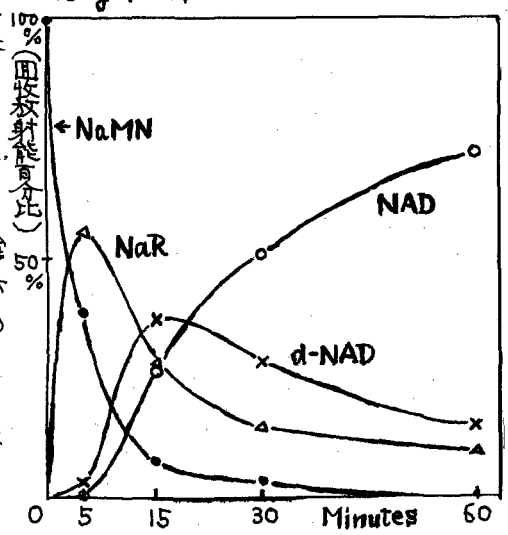
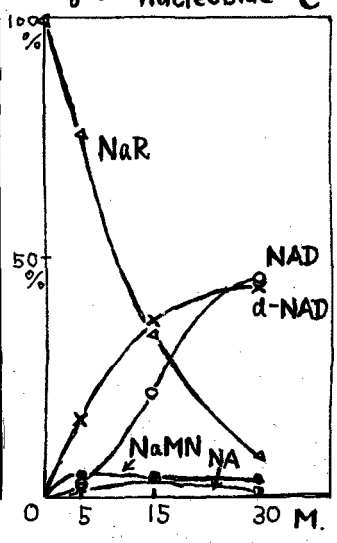


Fig 5 Niacin Ribo-nucleoside-C^{14}



NaR, NaMN は共に減少し，これと平行して d-NAD が再び増加し，2峯性の曲線を示す。30分後には大部分の放射能が NAD にまで合成されている。

(3) NaMN の場合；〔Fig 4〕 NaMN は注射後短時間のうちに減少し，これと平行して NaR が増加する。それに少し遅れて d-NAD，次いで NAD の生成が認められるが，この場合 NaMN は2峯性の曲線を示さない。

(4) NaR の場合；〔Fig 5〕 NaR の減少に従い NaMN，次いで d-NAD が増加し，最後に NAD の合成が認められる。この場合は5分後，15分後において少量ながら NA の生成が認められる。

(III) $C^{14}-P^{32}$ 二重標識による NaMN の細胞膜透過性の検索。

以上の実験結果から ヌクレオチドについては，d-NAD は一旦 NaMN に分解され，NaMN は更に NaR となった後で，NaR ⟶ NaMN ⟶ d-NAD ⟶ NAD の経路により NAD が合成されると想定される。これを実証する目的で $C^{14}-P^{32}$ の二重標識による実験を行った。

その結果 C^{14} については Fig 4. とほぼ同様の結果が得られた。〔Fig 6〕 一方，P^{32} については5分後では NaMN に約30％の放射能が認められるが，15分，30分後では NaMN として回収される P^{32} は 10％以下となり，しかも NaMN-C^{14} に比較して減少が遥かである。これに対し，d-NAD，NAD 中には P^{32} は全くわずかしか認めることが出来なかった。P^{32} はその大部分が無機リン酸として回収される他，ATP も次第にラベル化されて来る。

そこで P^{32} と C^{14} の放射能比を 投与した基質，回収された NaMN，NAD について比較したのが Table I である。投与した NaMN の P^{32}/C^{14} の比は 0.658，回収した NaMN は注射後5分では 0.654 であり，投与基質の測定値と完全に一致したが，15分，30分後では C^{14} に対する P^{32} の比が著しく減少している。一方 NAD の P^{32}/C^{14} の比は 0.031 ～ 0.035 となり，投与した基質に比べると，P^{32} の占める割合が約 $\frac{1}{20}$ に減少している。この際僅かながらも NAD 中に P^{32} が認められていまた，同時に ATP もラベル化されている事実，しかも ATP の比放射能が NAD のそれより高い値を示す事実を考慮するならば，この NAD 中の P^{32} は ATP^{32} に由来する（$NaMN\text{-}P^{32} \longrightarrow P_i^{32} \longrightarrow ATP^{32} \longrightarrow NAD\text{-}P^{32}$）と考えることが出来よう。また，仮にこの NAD の P^{32} がすべて NaMN-P^{32} から直接由来したものと仮定しても，その割合は全くわずかであり，NaMN は少なくとも 95％以上が一度リン酸を失ったあとで再び NaMN を通って NAD に合成されたものと結論出来るのである。

Fig 6 NaMN-P^{32}-C^{14}

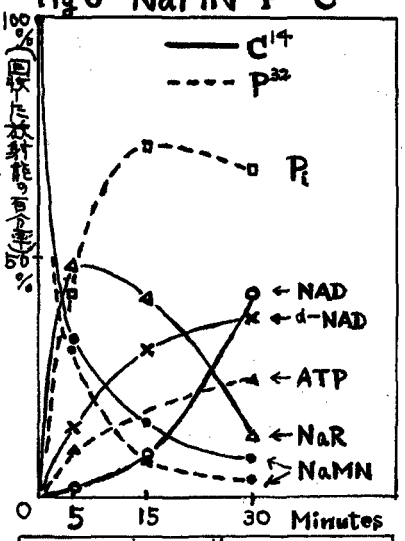


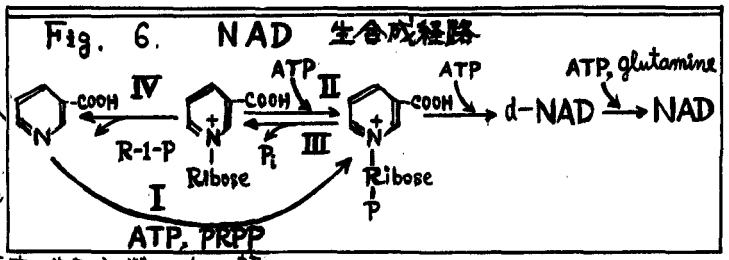
Table I, P^{32} と C^{14} の放射能比

	5分	15分	30分
NaMN	0.654	0.323	0.384
NAD	／	0.031	0.035
投与した基質	0.658 (=P^{32}/C^{14})		

(III) 無細胞系での検索

以上の諸事実から，ニコチン酸ヌクレオチドは脳細胞で利用される前にすくなくとも NaR にまで分解さ

れその後で，NaR ⟶ NaMN ⟶ d-NAD ⟶ NAD ↑という経路に従ってNADに合成されると考えられる。〔Fig 6〕



このようなヌクレオシドえの分解がどこで行われているかについては詳細は現在検索中であるが，人の脊髄液にはヌクレオチドをヌクレオシドにする酵素，すなわちNucleotide pyrophosphatase及びNucleotidaseの活性は殆んど認められない。

また，脳の細胞分画により活性分布を調べているが，これらの活性はおそらく細胞膜系に局在していると思われる。

Table II 無細胞系の酵素活性

Path-way	Enzyme	mμmoles/mg prot/hour 脳	肝
I	NaMN-Pyrophosphorylase	0.15	1.08
II	NaR-Kinase	0.26	0.16
III	Phosphatase	1.60	3.12
IV	Riboside phosphorylase	0.26	0.85

NA，NaMN，NaR 相互間の合成，分解に関与する諸酵素活性を脳ホモジネートで検索した結果はTable IIに示してある。これらの酵素のうち，NaRをNaMNにする酵素，すなわちNucleoside－Kinaseの活性が肝臓その他の臓器に比べて，脳には特に強いという事実は，細胞膜透過性の問題と深い関連を有するもののように思われる。

〔考　察〕

従来，物質の細胞膜透過性については，種々の報告や推定がなされていた。特にヌクレオチドについては，そのままの形で細胞中に取りこまれるという報告もあれば(1)また逆にヌクレオチドは細胞中に取り込まれないという主張もあった。しかしヌクレオチドの細胞膜透過性の問題は，脳組織のみならず赤血球の如き単純な細胞系についても確証とえるものがない。またphosphataseの活性が細胞膜に局在すること(4,6)から，これが基質のTransportと密接な関連を有するだろうと想像されてはいるが，これも仮説の域を出ない。

今回我々はNAD合成経路について検討中，ヌクレオチドがヌクレオシドに水解された後でNADに合成されている事実を発見した。NaRが更にNAに分解されている可能性も完全には否定出来ないが，少なくともニコチン酸ヌクレオチドに関する限り細胞膜を通過することは出来ず，ヌクレオシドに転換することにより通過するものと考えられる。丁度NaRの形で取り込まれるのか，或はNAにまで分解されているのかを証明するため，Ribose部分を標識したヌクレオチドを合成し，現在その挙動を追求中である。又，他のヌクレオチドについてもこれと同様な現象があるか否か，更にヌクレオチドの能動輸送の機構について，他の臓器を含め現在鋭意継続中である。

〔文献〕
(1) Bonavita, J. Neurochem. 10 155 (1963)
(2) 出口武夫，柿山新，早石修，神経研究の進歩 in press.
(3) Jagendorf, A.T. and Avron, M. J. Biol. Chem. 231 277 (1958)
(4) Jervis, H.R. J. Histochem. Cytochem. 11 692 (1963)
(5) Nakamura, S. et al. unpublished.
(6) Spicer, S.S., Wetzel, B.K. and Heppel, L.A. Fed. Proc. 25 539 (1966)

8 脳乳酸脱水素酵素アイソザイムの研究，
Ⅱ 発育過程におけるホルモンおよびアクチノマイシンDの影響

伊藤 斉・三浦貞則・
森 文彦・舛沢郁二・
浅香富允（慶大・医・神経）

LDHはほとんどすべての動物組織に普遍的に存在する酵素であるが，そのisozymeの組成は発生，分化，発達にともなって変動し，成熟期にはそれぞれの組織ないし臓器特異性をしめす。前報で述べたごとく，脳LDH isozymeについても発育過程における特徴的な変化を認めることができたが，このような酵素蛋白の性状の進展は生理機能に関連を有し，脳組織の酸素要求の増加に対応している。酵素生成の調節機構は複雑であり多くの因子の関与が考えられるが，最近，内分泌の役割が重視されるようになった。LDH isozymeに関しては既にKaplan等の詳細な研究があるが，われわれもこの点に興味を持ち，脳の発育に対する酵素系を介する内分泌の影響を検討中である。今回は，神経機能に関連が深いと思われる副腎皮質ホルモンや性腺ホルモンをえらびIsozyme組成への影響を験べたが（肝臓と比較），その機序の解明のため，蛋白合成を阻害するActinomycin Dの影響もあわせ検討した。

1．実験方法

白鼠の生後7日から14日を実験材料にしている。

Steroidsおよび Actinomycin Dの投与方法：Predonisolone hemisaccinate 0.5mg，Testosterone propionate 0.2 mg，Estradiol benzoate 0.01 mgをそれぞれ0.2 mlの蒸溜水に懸濁し，Actinomycin D（Merk Sharp & Dohme）は同じく0.2 ml中0.5～2.0 μgになるように稀釈したものを動物の皮下に注射した（controlは同量の蒸溜水）。Actinomycin Dは生後7日と8日の2回，Steroidsは8日から隔日に3回投与しているが，Testosteroneは雄，Estradiolは雌を対象にしている。

LDH isozymeの分離：動物を断頭し脳および肝臓を摘出，秤量後，直ちにCellulose acetate membraneを支持体にして電気泳動法を施行した。前回にも述べたごとく，脳のLDHはMitochondria分画にも活性があり，細胞分画の区分によってIsozymeの組成が異なるので，今回は生理食塩水によるHomogenate（脳5%，肝臓10%）を標本にした。電気泳動法の操作や条件は前回とまったく同様である。分離後はINT formazanによるZymogramを作成し，Acetoneで抽出後500 mμで比色定量した。

2．実験成績および考察

成熟白鼠全脳のLDH isozymeの組成は，Table 1にしめしたように，Fraction Ⅰ，Ⅱ，Ⅲに比しⅣ，Ⅴの活性が低く，一方，幼若白鼠では（Table 2）Fraction Ⅳ，Ⅴの活性が高い。Ⅰ，Ⅱの和とⅣ，Ⅴの和の比（H／M ratio）をみると生後7日は0.42であるが成熟期には2.3となり，この関係がいっそう明らかになる。すなわち，幼若期

Table 1. Distribution of L D H isozymes in the Rat Brain Homogenate.

Fractions	% Distribution	(S.D.)
I	30.3	(3.0)
II	22.0	(2.7)
III	25.0	(1.4)
IV	17.9	(5.5)
V	4.8	(3.2)
H / M ratio	2.3	

Table 2. Effects of Actinomycin D and Hormones on the Body weight, Brain weight and L D H isozymes.

Treatments ActinomycinD	Hormones	Age	Body weight (g)	Organ weight (mg) Brain (Liver)	Percentage distribution of L D H isozymes I	II	III	IV	V	H/M ratio
None	None	7	8.8	534 (227)	6.1 (0	15.3 0	28.2 6.0	32.6 27.0	17.8 67.0)	0.42
None	None	14	18.5	939 (567)	14.6 (0	17.4 0	28.1 7.4	29.6 31.1	12.1 61.5)	0.77
None	Predonisolone 0.5mg, 3days	14	18.1	909 (751)	16.5 (0	21.3 0	22.4 3.0	27.7 29.0	12.1 68.0)	0.94
0.5μg, 2 days	Predonisolone 0.5mg, 3days	14	17.2	897 (487)	14.8 (0	21.1 0	22.1 4.2	26.2 27.6	15.8 68.2)	0.85
None	Testosterone 0.2mg, 3days	14	18.5	938 (325)	7.7 (0	18.8 0	21.8 0	34.1 28.0	17.6 72.0)	0.51
0.5μg, 2 days	Testosterone 0.2mg, 3days	14	16.8	919 (438)	11.7 (0	17.7 0	24.3 5.9	33.2 28.0	13.1 66.1)	0.63
None	Estradiol 0.01mg, 3days	14	14.3	848 (341)	8.3 (0	18.0 0	24.8 5.0	30.2 33.0	18.7 62.0)	0.54
0.5μg, 2 days	Estradiol 0.01mg, 3days	14	17.3	956 (479)	12.4 (0	20.2 0	24.2 2.6	26.2 28.0	17.0 66.1)	0.75
0.5μg, 2 days	None	14	16.5	902 (452)	13.1 (0	20.3 0	26.6 6.6	25.9 27.6	14.1 65.8)	0.84
2.0μg, 2 days	None	14	13.5	834 (438)	12.9 (0	16.9 0	25.9 0	31.2 27.0	13.1 73.0)	0.67

のLDH活性の主体はM型であるが，発育にしたがいH型のしめる割合が圧倒的に大になるといえよう。

Steroids投与の影響：このような発育過程でのIsozyme組成の変動は白鼠の場合Critical periodに相当する時期に急速な変動がみられるので，7日から14日の間を対象にした。Table 2にしめすごとく，肝臓にたいする効果は不明確であるが，脳組織の場合使用したSteroidsのいづれにもある程度の影響を認めることができた。すなわち，Predonisoloneでは生後14日のFraction I，IIはcontrolに比し高く（H/M比も大），H型LDH活性の増加が著しい。一方，Testosteroneの場合は脳濕重量の増加についてはControlとの間に差はないが，M型LDHが生後14日にもかなりの高率に存在するのが特徴的であった。Estradiol投与は体重，脳濕重量の増加を抑制する傾向にあるが，Isozymeの組成はTestosteroneの効果に類似しているようである。以上の所見から脳のLDH合成の調節についても内分泌の関与が推定されよう。しかし，これだけでそれぞれのHormoneについて一定の効果ないし調節形式を結論づけることはできない。投与量の問題もあり，またこれらのHormoneにたいして脳は特異的な標的器管ではないので複雑な機構が予想されるが，脳機能との関連もふくめて今後の課題である。

Actinomycin Dによる Hormone効果の阻害：この時期の白鼠はActinomycin Dにたいしてきわめて敏感であり，全身の代謝にたいする影響が強いので，ごく微量を用いる必要がある。したがって，Controlに比し体重，脳濕重量，Isozyme組成に差を認めない0.5μg/day程度を投与した。ここで興味深いのは，あらかじめ本剤を注射

することにより，Isozyme組成にたいするHormoneの効果が阻害されることである。これは使用した3種のsteroidのいづれにも程度の差はあるが認められた。Actinomycin Dにはm-RNAの合成を抑制する作用があるので，Hormoneによる調節の過程は蛋白合成によるものと推定することもできる。なお，この点を更に確認するため核酸の変化についても検討中である。

主要参考文献

1) Goodfreind, T. L. and Kaplan, N. O. : J. Biol. Chem. 239, 130 (1964)
2) 伊藤他：神経化学 Suppl. 4, 87 (1965)
3) Samuels, L. D. : New Engl. J. Med. 271, 1252; 1301, (1964)
4) 須田：蛋白質核酸酵素 5, 515 (1965)

9 脳ミトコンドリアの特性，特にMg^{++}の脳ミトコンドリアに対する作用[6]

瀬田喜一郎・荒木　裕・
小沢和恵・半田　肇
（京大・医・脳神経外科）

Mg^{++}の脳ミトコンドリア（mt）に対する作用については未だ不明な点が多く，かなり混乱した見解がかもされている。従来mtのP/O比はMg^{++}の添加により高くなると報告されているが，最近Vossら[7]によれば脳mtにおいて酸素電極法によるとMg^{++}の存在下では呼吸調節比（RC）および酸化的燐酸化が認められなかった。吾々[8]は前会の本会においてMg^{++}がRCに対して二相性の作用を示すと報告した。

Mg^{++}の脳mtに対する作用を検討し，Mg^{++}の作用が脳mtに対して特異的であるということから特に肝mtとの比較について述べたい。

方法

1) mtの分離調整法

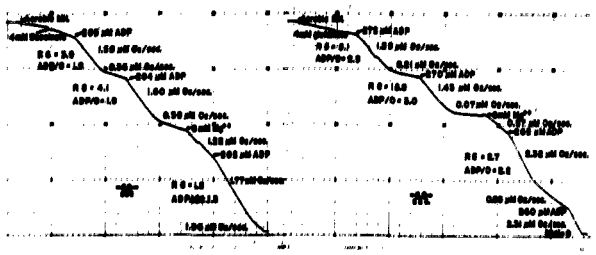
脳mtは小沢らの方法[5]により，肝mtは数原の方法[2]によった。

2) 酸化的燐酸化の測定

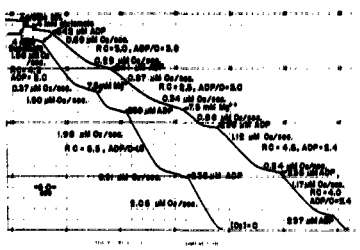
酸素消費，ADP/O比，RCの測定は閉鎖式の細胞自家電極法[1]によった。反応液としては0.3Mマニトール　0.01M KCl　0.01M Tris-HCl緩衝液　0.2mM EDTA　pH 7.4を用いた。測定はすべて25°Cにて行った。

3) 蛋白量の測定

Lowryの方法[4]により結晶牛清アルブミンを標準液として測定した。



第1図



第2図

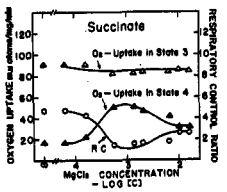
結果及考察

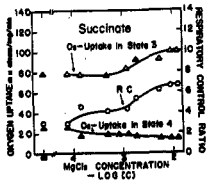
第1図は脳mtにおけるアミタールの効果である。基質として4mMグルタミン酸を用い，ADPを反応系に添加すると呼吸は促進し（state 3呼吸），ADPが消費されると呼吸速度は緩徐なstate 4呼吸に移行した。このstate 3とstate 4の呼吸の比即ち呼吸調節能（RC）は最初のADP添加時よりも2回目のADP添加の際に増加するのが常である。第2回目のADP添加後のstate 4の状態に4mM Mg^{++}を加えると呼吸が増加し，ADPの添加により呼吸は著明に促進しMg^{++}の添加前のstate 3に比して約1.6倍に増加した。一方基質としてコハク酸を用いるとADPの添加により同様の現象がみられたがMg^{++}の添加によってstate 3は殆んど促進

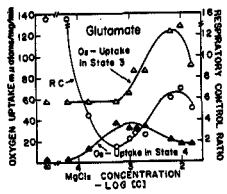
知果はみられなかった。

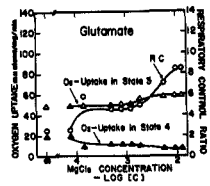
同じ実験条件にて行った肝 mit にみられてはオ2図に示すように Mg^{++} 添加によるstate 3 吸収の促進はグルタミン酸とハク酸いずれを基質としても同程度みられ明かな促進効果と認められるにすぎない。

上記の関係を更に詳細に検討しstate 3 state 4 の吸収および RC と Mg^{++} との関係をみると第3、4図に示すごとくになる。脳 mit (オ3図) によるstate 4 吸収はいずれの基質においても同様の型を示し、即ち 1 mM あたりで最大の吸収阻害が認められ、更に高濃度になると逆に抑制されるようになり、その結果 RC は一時に上昇の傾向が認められたが、グルタミン酸を基質とする時にはstate 3 吸収の著明な増加によって RC が著しく上昇した。一方肝 mit (オ4図) においては脳 mit と異なり 1 mM 以上の Mg^{++} の存在下ではグルタミン酸、ハク酸いずれにおいても僅かながら吸収増加が認められ、state 4 吸収の抑制効果によって明らかに RC の増加が認められた。









オ3図　　オ4図

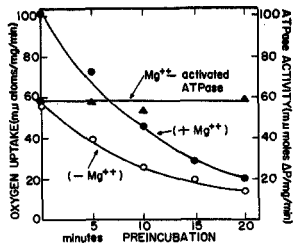
ADP/O 比の面からみると肝 mit. 脳 mit. いずれにおいても Mg^{++} の添加によってかえって低下の傾向を示したが、RC の面からみれば肝 mit. では Mg^{++} の添加により高い RC が認められたが、脳 mit ではむしろ RC の低下がみられた。ATP 生成率に関して比較すると オ1表に示すごとく脳 mit. に関しては Mg^{++} の存在しない状態ではグルタミン酸コハク酸いずれを同程度の ATP 生成率を示すが、Mg^{++} が存在するとグルタミン酸の場合のみ著明な増加を認めた。しかるに肝 mit. に関しては Mg^{++} の添加効果は殆んど認められなかった。

Type of mitochondria	Mg^{++}	Maximal rates of phosphorylation (P:O ratio x rate of O_2-uptake)	
		Glutamate	Succinate
		μ mole ATP synthesis / mg / min	
Brain	−	0.15–0.18	0.16–0.19
	+	0.22–0.26	0.10–0.12
Liver	−	0.13	0.16
	+	0.14	0.15

オ1表

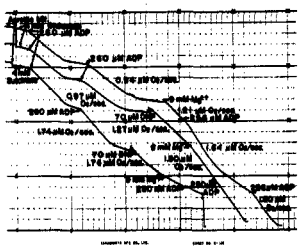
基質に関しても種々検索してみると 脳 mit. ではコハク酸の場合は Mg^{++} の促進効果はみられなかったのに対し NAD-linked の基質例えば α-ケトグルタル酸、ピルビン酸＋リンゴ酸、マロン酸存在下のグルタミン酸＋リンゴ酸などではグルタミン酸と同様に Mg^{++} の著明な促進効果がみられた。

上記のごとき脳 mit. の NAD-linked の基質を用いた時の特異的な理由を追求する方法としてまず ATPase との関係について検討した。即ちオ5図のごとく aging によって state 3 の酸素消費の低下の傾向がみられたが Mg^{++} により活性化される ATPase 活性は殆んど変化が認められなかった。このことから Mg^{++} による吸収促進効果は Mg^{++} により活性化される ATPase 活性とは無関係であるといえる。

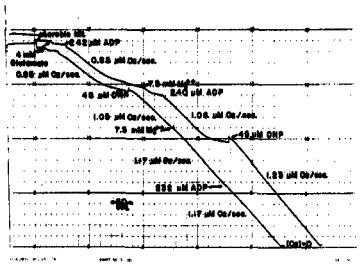


オ5図

又一方において DNP によって uncouple された mit. について Mg^{++} の効果をみると、



第6図



第7図

第6図の如くである。即ちグルタミン酸を基質として state 4 の状態に DNP を添加すると固着された時吸は 1.27 μM となり更に Mg^{++} を添加すると時吸増加が著明に認められ、その値は tightly coupled mit. における Mg^{++} 存在下の state 3 時吸と等しくなった。このようにグルタミン酸を基質とした時には Mg^{++} は state 3 時吸に対すると同様に DNP 固着時吸に対して拮抗効果をあらわした。しかし肝 mit. においては第7図に示す如くグルタミン酸を基質にすると DNP で uncouple された mit. の時吸は tightly coupled mit. における Mg^{++} の存在下の state 3 時吸と同値であり Mg^{++} 添加によって促進されることはなかった。

以上の結果より NAD-linked の基質による mit. の時吸に対する Mg^{++} の効果は肝 mit. に特異的と考えられ、この Mg^{++} の時吸促進効果は燐酸化能のない状態でもみられ、更にコハク酸ではみられないことはその作用機構が NAD からチトクローム b の間の電子伝達を促進するのに働いていることを示唆するものと推定される。

文献

1. Chance, B., and Hagihara, B., Intracellular Respiration: Phosphorylating and Non-phosphorylating oxidation Reaction, ed. by E. C. Slater, Pergmon Press., Oxford, p. 5 (1963)
2. Hagihara, B., Biochim. Biophys. Acta, 46, 134 (1961)
3. 岩本福司 本村澄吉 青次 神戸化学 Vol. 4. Supplement 49. (1965)
4. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J., J. Biol. Chem., 193, 265 (1951)
5. Ozawa, K., Seta, K., Takeda, H., Ando, K., Handa, H., and Araki, C., J. Biochem., 59, 201 (1966)
6. Ozawa, K., Seta, K., Handa, H., J. Biochem. in press
7. Voss, D. O., Campello, A. P., and Bacila, M., Biochem. Biophys. Res. Communs., 4,48 (1961)

10 神経系細胞核の研究
－ノイロン性と非ノイロン性核の分別分離法－

加藤尚彦・黒川正則
（東大・医・脳研）
稲村　博（東大・医・精神）

大脳皮質から細胞核を遠心分離するさい，大量のミエリンによって，核の沈降がいちじるしく妨害される．ミエリンを除くため粗な核分画をくりかえして洗ったり[8]，ミエリン形成の乏しい幼弱動物脳組織を Triton X-100 で処理する方法[12]，さらに口径のいちじるしく広い遠心管を用いる方法[4]が発表されている．Triton X-100 を用いる方法は幼弱動物脳では有効であるが，成熟動物脳では満足すべき結果を与えない[13]．HADJIOLOV 等[4]は Triton X-100 のかわりにおなじく非イオン性の表面活性剤である Cemulsol NPT 12 を用いている．これら表面活性剤の使用は赤血球除去のためにも有効な方法と思われるが，一方このようにして分離された核では，電顕所見の上で核膜の部分的な欠損が指摘されており[5][7]，分離核の生化学的特性をしらべるさい注意が必要と考えられる．

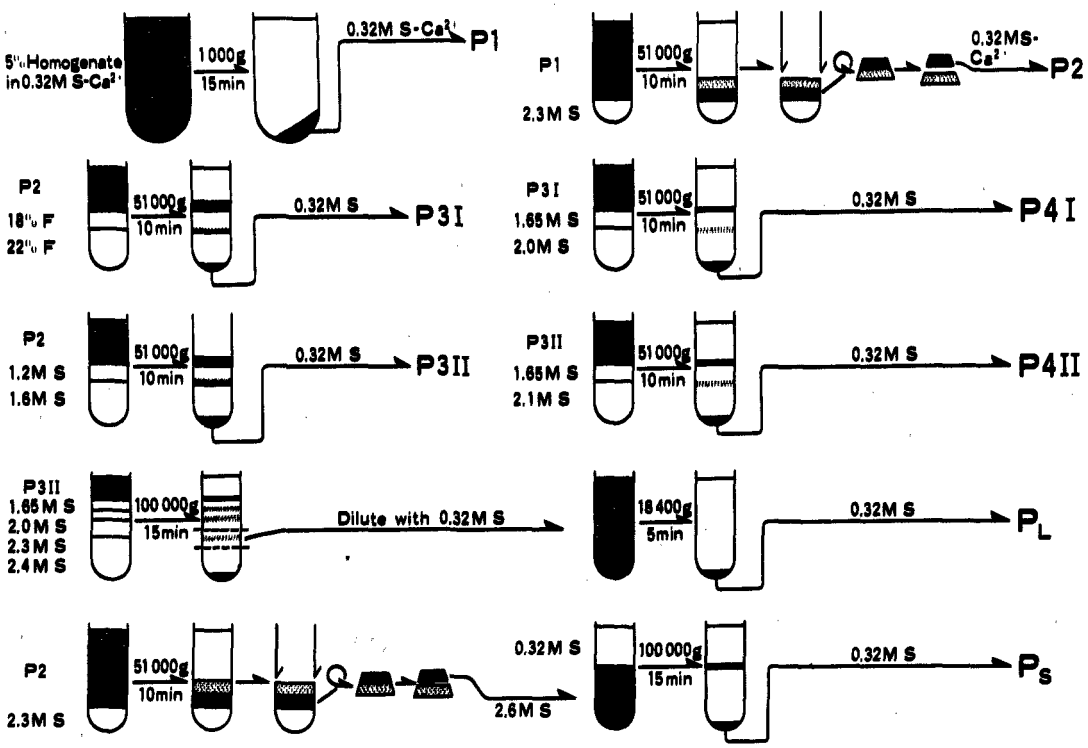
我々は単純な機械的方法によって粗な核分画から大量のミエリンを除き，比較的短時間内に神経組織の細胞核を分離する方法を考案した[8][9]．この方法によって成熟モルモットの脳灰白質から分離される核標品は 55～65％のノイロン性核をふくみ，のこりは非ノイロン性核によって占められている（ノイロン性核，非ノイロン性核の用語，形態学的類別の規準は後述）．我々は核のレベルでノイロン・グリアの問題を扱かうことを目標のひとつとしており，その後の実験でノイロン性核とグリア性核を可能なかぎり鮮明に分別分離する方法を検討した．以下現在までに考案した方法を述べる．

実験方法

成熟モルモットの脳を 0.32 M 蔗糖液（38°）で 120～180秒間灌流して赤血球を除いたのち，大脳灰白質を採取，約10 g の組織（6匹分）をテフロン軸ホモジェナイザー（DOUNCE 型）を用いて 0.32 M 蔗糖－1.5 mM $CaCl_2$ 内で磨砕，8重のガーゼを通したのち約5％のホモジェネートとした[8][9]．タンパクは LOWRY 等の方法[11]，RNA は HUTCHISON 等[6]に従って抽出，分離後 UV 測光およびオルシノール反応[1]によって定量．DNA はおなじく抽出分離後インドール反応[2]を用いた．また平行して螢光測光[10]によって定量した．形態的観察は位相差顕微鏡，アセトオルセイン・ファストグリーン染色標本の光顕，フォルムアルデヒドまたはグルタルアルデヒド固定後さらに OsO_4 で処理した標本の電顕によって行なった．核数は 0.32 M 蔗糖液に浮遊した無染色標本を BÜRKER-TÜRK 計算板で測定した．

核の分離法

分離法の大要を第1図に示した（図中の S は蔗糖溶液，F は Ficoll 溶液）．最終の核標品は P4 I，P4 II，P_L，P_S の4種類である．この中で P4 I はすでに発表した P4C に相当する[8][9]．P1 はもっとも粗な核標品であり，これからプリン法によって



大量のミエリンを除去したものがP2である。P2までの操作はすべての標品に共通である。P4IIはP4Iとほぼ同等の標品であるが，フィコール重層遠心にかえて蔗糖重層遠心を2回くりかえしたものであり，P4Iにくらべて DNA および核の回収量がいくぶん多い（表1，表2）。P4Iの場合，混在する毛細血管は 1.65M蔗糖/2.0M蔗糖の界面にかなりよく回収され，P4Iにおける内皮細胞性核は回収核全体の 0.5%以下であるが[8]，P4IIでは毛細血管の除去はやや劣り，下層の蔗糖液濃度を 2.1M にあげても全体の1～2%にあたる内皮細胞核の混入がのこる。P_L は図示したような5層の不連続勾配の中でP3IIを遠心し，2.3M/2.4Mの界面に集まる索状の組織を tube slicer で採取，0.32M蔗糖で稀釈後，短時間の遠心によってえられる沈渣を標品としたものである。この方法はかかる分離條件下で非ノイロン性核の方がノイロン性核よりも密度の高いことを利用したもので，前者は2.4Mの下層に集まる。回収率はかなりひくい。P_S はブリン法を2回くりかえしたのち，ネコブリンの頸部を0.32M蔗糖0.4 ml内でくずし，2.6M蔗糖にできるだけ均一でしかも泡だたないように分散させ，100,000 gav，15分の遠心後えられる沈渣を標品としたものである。もっとも密度の高い非ノイロン性核（後述のごとくおそらくオリゴデンドログリア核）のみが2.6M蔗糖内を沈降し，他の核，毛細血管断片，残余のミエリンは浮上する。ブリン法の反復はほとんどのミエリンをとり除き，高張溶液内の裸核の動きを自由にするという利点がある。P_L とおなじく P_S についても高純度を目的としているため回収率はひくい。なお0.32M蔗糖はチューブのバランスを保つために重ねたもので重層遠心の意味ではない。以上の各標品について光顕，電顕写真を提示する予定である。

TABLE I Contents of Nucleic Acids and Protein in Various Nuclear Preparations

	DNA (a)	DNA (b)	RNA (a)	RNA (b)	Protein
Homogenate	984 ± 15 (6)	841 (3)	1862 ± 70 (6)	2353 ± 124 (6)	87.8 ± 3.2 (6)
P4I	293 ± 38 (6)	247 (3)	106 ± 13 (6)	124 ± 25 (6)	0.85 ± 0.14(6)
Recovery (%)	29.8	29.4	5.7	5.3	0.97
Homogenate	918 (3)	---	---	---	82.9 (3)
P4II	387 (3)	---	---	---	1.09(3)
Recovery (%)	42.1				1.32
Homogenate	894 (3)	---	---	---	79.9 (3)
P_L	66 (3)	---	---	---	0.17(3)
Recovery (%)	7.5				0.21
Homogenate	920 (3)	---	---	---	84.0 (3)
P_S	66 (3)	---	---	---	0.09(3)
Recovery (%)	7.2				0.11

DNA μg/g of fresh tissue (a) Fluorometry (b) Indole Reaction
RNA μg/g of fresh tissue (a) UV absorption (b) Orcinol Reaction
Protein mg/g of fresh tissue

核の回収と純度

第1表に示したようにDNAの回収率はガーゼ沪過後のホモジェネートにたいして，P4I，P4II，P_L，P_S でそれぞれ 29.8％，42.1％，7.5％，7.2％である．タンパクの回収もP4I，P4IIにくらべて P_L，P_S ではひくい．DNAの回収率は P_L と P_S でほぼおなじであるが，P_S におけるタンパクの回収は P_L の約1/2となっている．これは各標品中にふくまれる核の種類に由来するものと思われる．現在の核標品にミトコンドリア，神経終末，ミクロソームの混入がほとんどないことは，すでにP4Iについて報告した．[8][9] 毛細血管内皮細胞の混入があっても差支えないような実験では，最後の密度勾配における下層を1.8 Mにまで下げることによって核の回収率を高めることも可能である．

分離核の形態的類別

分離核について主にアセトオルセイン・ファストグリーン染色標本を用い，位相差顕微鏡所見を参考にしてその起源を同定した．類別の判定規準については顕微鏡写真を提示して説明する予定であるが，要約すれば次のごとくである（文献3）参照）．

ノイロン性核： 直径9～18μの大型の核で，核質は淡く一様に染まり，大きな核小体を1個もつもの．大きさ，核質の染色性が前記のものと同様であり，核小体が2～3節にわかれてみえるものもこれにふくめた．その分節したようにみえる核小体は顕微鏡のピントをずらすと糸状の連絡をもつものが多いが，なかには完全にわかれているものもある．組織標本ではノイロンは通常1個の明瞭な核小体を有するから，

分節した核小体をもつ核をノイロン性とすることには問題がのこるが，一方分離操作中における人工変化である可能性の方がつよい．この点は現在モルモット灰白質の組織標本と比較しながら検討中である．

非ノイロン性核：前記以外のすべての核をふくみ，次のものがある．1)オリゴデンドログリア核：直径6～8μで，濃く染まるクロマチン顆粒によって核質全体が占められており，同定が容易である．この種の核はPs標品の核のほとんどを占めている．2)アストログリア核：ノイロン性核よりは小型で核質もやや濃く一様に染まるもの．明瞭な核小体はみとめられず，核小体様の顆粒がみられるが，オリゴデンドログリア核にくらべてそれほど密ではない．しかしノイロン性核の中で小型でしかも明瞭な核小体を示さぬものがあり，この場合にはノイロン核とアストログリア核の両者を区別することは不可能である．3)毛細血管内皮細胞核：細胞質にかこまれ，毛細血管断片としてみられる細長い核である．もっとも多い場合でもP4II標品の1～2%を占めるにとどまる．しかし細胞質を失った場合には同定が困難となる．同定困難な核としてはノイロン性かアストログリア性か区別できない核，内皮細胞質を失った核，ミクログリア核，その他上皮細胞，周質細胞などの核があげられる．しかし実際にはこの種の同定困難な核は標品中にはごく少量しかみめにならない．これらの核は中枢神経系内における存在頻度から考えても，分離核標品には無視しうる量しかふくまれていないことが推定される．

TABLE II Population of Neuronal and Non-Neuronal Nuclei

		Neuronal (%)	Non-Neuronal (%)	Total Number of Nuclei (x 10^{-4})
P4I	Range	55 – 65	45 – 35	10 400 – 15 200
	Mean	59	41	12 800 (5)
P4II	Range	47 – 53	53 – 47	13 700 – 22 100
	Mean	51	49	16 300 (10)
PL	Range	72 – 83	28 – 17	2 500 – 2 800
	Mean	78	22	2 650 (3)
PS	Range	1 – 6	99 – 94	2 300 – 2 900
	Mean	4	96	2 600 (5)

各標品の核組成　以上の判定規準に従って分離核の比および回収された総核数を第2表に示した．Psでは非ノイロン性核が94%を占めるが，これはほとんど均一的であり，主にオリゴデンドログリア性と考えられる．Plにみけるように回収核数を極度にへらしても，ノイロン性核の比率が80%どまりであることは，密度勾配遠心法による分別分離の限界を示すものと思われる．

以上報告した核標品はノイロン性核，グリア性核の生化学的性質を調べるうえにかなりの有用性をもつものと考えられる．逆に生化学的知見によって形態的類別の信頼性を裏づけることも期待される．現在顕微分光測光および各種の化学的定量を行ないつつあるが，その一部は別報として報告した[14]．

1)CERIOTTI G. (1955) J. biol. Chem. 214, 59 2)CERIOTTI G. (1952) J. biol. Chem. 198, 297 3)GLEES P. (1955) Neuroglia, Blackwell, Oxford 4)HADJIOLOV A.A., TENCHEVA Z.S. & BOJADJIEVA-MIKHAILOVA A.G. (1965) J. Cell Biol. 26, 383 5)HUBERT M.-T., FAVARD P., CARASSO N., ROSENCWAJG R. & ZALTA J.-P. (1962) J. Microscopie 1, 435 6) HUTCHISON W.C. & MUNRO H.N. (1961) Analyst 86, 768 7)HYMER W.C. & KUFF E.L. (1964) J. Histochem. Cytochem. 12, 359 8) 加藤尚彦 (1966) 精神経誌, 58, 577 9) 加藤尚彦・平山皓・黒川正則 (1965) 神経化学 4 増刊 23 10)KISSANE J.M. & ROBINS E. (1958) J. biol. Chem. 233, 184 11)LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. & RANDALL R.J. (1951) J. biol. Chem. 193, 265 12)RAPPOPORT D.A., FRITZ R.R. & MORACZEWSKI A. (1963) Biochim. Biophys. Acta 74, 42 13) SPORN M.B., WANKO T. & DINGMAN W. (1962) J. Cell Biol. 15, 109 14)黒川正則・加藤尚彦・稲村博 (本誌)

11 神経系細胞核の研究
－ATP：NMNアデニリルトランスフエラーゼ活性－

黒川正則・加藤尚彦
（東大・医・脳研）
稲村　博（東大・医・精神）

ATP:NMN adenylyltransferase (EC 2.7.7.1; NAD pyrophosphorylase) は次式の酵素反応を行ない,[5] 細胞内ではもっぱら核に局在している.[2]

$$NMN + ATP \rightleftarrows NAD + PPi$$

我々は神経系細胞核の特性を知るために若干の実験を企画しているが，ここではノイロン性核のNMN アデニリルトランスフェラーゼ活性が非ノイロン性核（おもにグリア性核）の約10倍に達する事実を主題として報告したい.

実験方法

実験材料　成熟モルモットの大脳灰白質，肝臓および精子を使用した．大脳灰白質から別報[6]の方法に従って核標品（P4IIおよびPs）を調製．肝細胞核の分離はMAGGIO等の方法[10]によった．精子は副睾精管に0.11 M 蔗糖－0.5 mM $CaCl_2$ を注入することによって採取した．検鏡の結果他の細胞成分はほとんど認められない．NMN アデニリルトランスフェラーゼ活性の測定はKORNBERG[8]に準じ若干の修正を加えた．反応液（1.0 ml）の組成（終濃度）：グリシルグリシン緩衝液 50 mM，$MgCl_2$ 15 mM，ATP 5 mM，NMN 2.5 mM，ニコチン酸アミド 200 mM および測定サンプル．ホモジェネートの活性測定の場合は反応の直線性を保つため 10 mM NaF を加えた．38°，20 分の恒温反応後 30%（w/v）三塩化酢酸（0.2 ml）で反応を止め，遠心除タンパク後の上清 1.0 ml を NaOH で中和（内部指示薬 BTB），この一定量について NAD 量を測定した（アルコールデヒドロゲナーゼ，340 mμ 測光）．この条件下でホモジェネートについてはタンパク 1～6 mg，核標品については 250×10^4～$2,500 \times 10^4$ 個の核数の範囲内で，組織量とNAD 生成量は直線関係にあった．P4II，Psの酵素活性はそれぞれ $1,000 \times 10^4$ 個・程度の核をふくむ標品について測定した．DNAの定量は螢光測光[7]，タンパクは LOWRY等の方法[9]によった．核数，精子数は蔗糖液に浮遊した無染色標本を BÜRKER-TÜRK 計算板で測定した.

TABLE I　NICOTINAMIDE MONONUCLEOTIDE ADENYLYLTRANSFERASE ACTIVITY IN CEREBRAL NUCLEAR PREPARATIONS

	Unit/nucleus X 10^6	Unit/mg of DNA	Neuronal:Non-Neuronal (% : %)
P4II			
Range	12.0 – 15.6	678 – 1143	47-53:53-47
Mean	13.5 ± 0.9 (10)	872 ± 143 (10)	51:49 (10)
P4II'			
Range	12.8 – 13.8	760 – 763	47-52:53-48
Mean	13.3 (3)	762 (3)	50:50 (3)
Ps			
Range	2.7 – 4.0	169 – 296	1- 6:99-94
Mean	3.4 ± 0.5 (5)	234 ± 51 (5)	4:96 (5)

Unit: mμmoles NAD/20 min (38°)

——— 実験結果 ———

TABLE II NMN ADENYLYLTRANSFERASE ACTIVITY IN LIVER NUCLEI AND IN SPERM

	Unit/nucleus X 10^6	Unit/mg of DNA
Liver	6.8 (2)	430 (2)
Sperm	---	Undetectable

Unit: mμmoles NAD/20 min (38°)

オ1表に各種の核標品におけるNMNアデニリルトランスフェラーゼ活性と各標品のノイロン性核：非ノイロン性核の比率(%)を示した．ノイロン性核と非ノイロン性核がほぼ同率にふくまれているP4IIの酵素活性は，非ノイロン性核が96%を占めるPsの活性にくらべて約4倍である．P4IIを分離するさい用いる蔗糖液の最高濃度は2.1 M，Psの場合は2.6 Mであるから[9]，高張性による酵素活性の低下または酵素タンパクの溶出を考慮して次の実験を行なった．2.1M蔗糖液の底に回収されるP4IIの沈渣を2.6 M蔗糖液（2 ml）内に均一に浮遊し，0～4°Cで30分放置後0.32 M蔗糖液を加えて蔗糖濃度をうすめ，100,000 gav. 10分遠心後の沈渣を0.32 M蔗糖液に浮遊しP4II'標品とした．P4II'における核あたりおよびDNAあたりの酵素活性はP4IIと変らず（オ1表），またP4II'沈渣の上清には酵素活性は証明されない．この実験からPsにおけるNMNアデニリルトランスフェラーゼ活性の低値が分離操作中における高張性によって生じた人工変化であるという可能性は否定される．このことは核のNMNアデニリルトランスフェラーゼ活性が低濃度の塩類溶液（たとえば0.14 M NaCl），温度上昇（37°），凍結融解の反復，超音波処理，Triton X-100，ジギトニン，蛇毒などの処理によっては溶性化されないという文献上の所見[13]からも予想されることである．ここで仮定をおいて，もしノイロン性核および非ノイロン性核における酵素活性がそれぞれ均一であるとしてオ1表の結果から計算すると，酵素活性はノイロン性核 24.1×10^{-6} 単位／核，非ノイロン性核 2.5×10^{-6} 単位／核となり，両者の間に約10倍位の開きができる．この仮定が正当であるか否かの判定にはさらに種々の検討を行なう必要があるが，絶対値はともかくノイロン性核と非ノイロン性核との間にいちじるしい活性差がみとめられることは明らかである．

TABLE III NMN ADENYLYLTRANSFERASE ACTIVITY IN BRAIN- AND LIVER-HOMOGENATES

	Unit/g of tissue X 10^6	Unit/mg of DNA
Brain	815 (3)	571 (3)
Liver	1485 (3)	446 (3)

Unit: mμmoles NAD/20 min (38°)

比較の目的で肝細胞核および精子のNMNアデニリルトランスフェラーゼ活性をオ2表に示した．脳の細胞核と同一條件下で測定された肝細胞核の酵素活性は，核1個当り，ノイロン性核の1/35，非ノイロン性核の2.5倍である．なおこの実験の測定條件下では精子にNMNアデニリルトランスフェラーゼの活性を証明することはできなかった．

オ3表は脳灰白質および肝臓のホモジェネートについて測定されたNMNアデニリルトランスフェラーゼ活性を示す．オ2表と比較すればあきらかなように，肝臓における DNA あたりの酵素活性はホモジェネートで測っても，分離核ではかってもほぼ同等の値を示す．このことは肝細胞核におけるNMNアデニリルトランスフェラーゼ活性が，脳の場合とはちがって，おのおのの核を通じてほぼ均一であることを示唆している．以上のごとき知見は神経系の核の性質をしらべるにあたって，不均一性にた

いする考慮が不可欠であることを示してゐり，胸腺細胞核や肝細胞核のごとき比較的均一な核を対象にする場合とは大いに事情がことなる点である．

考　　察

ノイロン性核と非ノイロン性核との間に，NMN アデニリルトランスフェラーゼに関するいちじるしい活性差が存在することは以上から明らかである．このことは最終的にはノイロンとグリアにおけるNAD の生合成および代謝回転の差異を推定させるものであるが，ここでは上記の観察事実に直接結びついた2，3の推論を試みるに止めたい．

細胞機能とNMNアデニリルトランスフェラーゼ活性：NMN アデニリルトランスフェラーゼ活性は，種々の腫瘍細胞核で低下しており（正常の 1/5 ～ 1/10）[1)14)]，また乳腺についての研究によると，乳汁分泌時，非分泌時，胎児乳腺，乳癌の順に活性が低下するとされている[1)]．これらの事実から一般的に，成熟度が高く活発な代謝機能をいとなむ細胞では活性が高く，未熟で分裂，増殖が重要な意味をもつ組織になるほど活性が低くなることが推定される．ノイロンは動物組織中でもっとも分化し，もはや分裂，増殖能力をもたない細胞の代表であり，同時に活発な代謝をいとなんでいる．一方グリアではなお分裂，増殖能が保持されていることを考慮すれば，NMN アデニリルトランスフェラーゼ活性がノイロン性核で異常に高いこと（肝臓核の3.5倍，グリア性核の10倍）が納得される．また精子においてほとんどこの酵素活性が証明されないことも，細胞の未熟性と機能の単純性から説明できるかもしれない．しかしかかる推論の普遍性をたしかめるためには，各種の細胞核について系統的な検討が必要である．

神経系におけるNAD生合成との関連について：神経組織におけるNADの生合成にあたって，ニコチン酸アミドからNMN → NAD を経る経路がどの程度活発に進行しているかは，まだ明らかではない．一方 nicotinic acid ⟶ nicotinic acid mononucleotide (deamido-NMN) ⟶ nicotinic acid adenine dinucleotide (deamido-NAD) ⟶ NAD を経るいわゆる PREISS-HANDLER 経路[11)]が，in vivo の脳において存在し，肝臓にくらべてそれほどおそくない速度でNAD の生合成を行なうことが出口・市山・早石[3)]によってたしかめられている．ノイロンとグリアにおけるNAD 生合成機構を総合的に理解するためには，ニコチン酸，ニコチン酸アミドの血液・脳関門透過性の問題，生合成系の酵素活性，基質濃度のすべてが考慮されねばならない．PREISS-HANDLER 経路の関連酵素の中でdeamido-NMN adenylyltransferaseは核における局在，精製段階における特性からおそらく本実験で測定したNMN アデニリルトランスフェラーゼと同一酵素であることが推定されている[11)]．我々の核標品についてもこの酵素をdeamido-NMN adenylyltransferase活性として測定する予定である．PREISS-HANDLER 系の他の酵素の細胞内局在はなお明らかではないが，NAD synthetase (EC 6.3.5.1) の大部分はおそらく溶性部に分布することが推定される[11)]．一方NAD の開裂酵素の中で脳組織にいちじるしく高活性で存在するNAD glycohydrolase (EC 3.2.2.5) は，タンパク当りの比活性がいわゆるミクロソーム分画でもっとも高く，ついで核分画に高い[5)]．したがって細胞内のNAD 代謝において細胞核の占める役割を理解するには，なお一般的な知見の集積を待たなければならない．

最近腫瘍細胞ではNMN アデニリルトランスフェラーゼ活性も低下するが，さらに一層著明な活性低下を示すのは quinolinate transphosphoribosylase, nicotinic acid mononucleotide pyrophosphorylase (EC 2.4.2.11)，つまり deamido-NMN 生成酵素であることが報告され[12]，腫瘍細胞における NAD 代謝調節の問題にたいして新たな一石を投じた．その中で quinolinate transphosphoribosylase の活性は脳においては証明されていない[4]．

本実験における知見が神経組織の各種細胞系における NAD 生合成，さらには NMN アデニリルトランスフェラーゼと強固に結合すると考えられている核リボソーム[14]の存在様式といかなる関連をもつものかは今後の検討にのこされている．

要　約

1) ノイロン性核のNMNアデニリルトランスフェラーゼの活性は，グリア性核の約10倍である．このことからノイロンとグリアにおいてNADの生合成および代謝回転の差異が存在することを推論した．

2) 肝細胞核のNMN アデニリルトランスフェラーゼ活性はノイロン性核の 1/35，グリア性核の 2.5 倍である．精子ではこの酵素活性は認められない．

3) 以上の知見を腫瘍細胞核，未成熟組織の細胞核におけるNMNアデニリルトランスフェラーゼ活性の低下と比較，特に細胞の未熟性，増殖性の点から考察した．

1) BRANSTER M.V. and MORTON R.K. (1956) Biochem. J. 63, 640-646
2) HOGEBOOM G.H. and SCHNEIDER W.C. (1952) J. biol. Chem. 197, 611-620
3) 出口武夫・市山新・早石修 (1965) 神経化学 4, 増刊, 55～58
4) IKEDA M., TSUJI H., NAKAMURA S., ICHIYAMA A., NISHIZUKA Y. and HAYAISHI O. (1965) J. biol. Chem. 240, 1395-1401
5) JACOBSON K.B. and KAPLAN N.O. (1957) J. Biophys. Biochem. Cytol. 3, 31-43
6) 加藤尚彦・黒川正則・稲村博 (本誌)
7) KISSANE J.M. and ROBINS E. (1958) J. biol. Chem. 233, 184-188
8) KORNBERG A. (1950) J. biol. Chem. 182, 779-793
9) LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. and RANDALL R.J. (1951) J. biol. Chem. 193, 265-275
10) MAGGIO R., SIEKEVITZ P. and PALADE G.E. (1963) J. Cell Biol. 18, 267-291
11) PREISS J. and HANDLER P. (1958) J. biol. Chem. 233, 493-500
12) SHIMOYAMA M, KORI J., USUKI K., LAN S.J. and GHOLSON R.K. (1965) Biochim. Biophys. Acta 97, 402-404
13) SIEBERT G. (1963) Exp. Cell Res., Suppl 9, 389-417
14) TRAUB A., KAUFMANN E. and GINZBURG-TIETZ Y. (1964) Exp. Cell Res. 34, 371-383

12 脳灌流法によるネコ脳代謝の研究

大月三郎・渡辺昌祐・
森光淳介・枝松一安・
中島良彦・帆秋孝幸・
二宮淳明（岡山大・医・神経）

中枢神経系は無傷のまゝで，脳循環を体循環から分離するGeiger法[3]によるネコ脳灌流において，灌流人工血液に，^{14}C-グルコースを加え，脳の代謝物質への^{14}Cの移行状態をしらべ，Geigerらが[2]発表した結果より，著しく異なった結果を得た。この方法では，血中の放射能比を一定に保つことが出来，得られた結果の解釈を容易にする利点を持っている。また，灌流血液に高濃度のフェニールアラニンやMethionine sulfoximine (MSI)を加えたときのmetabolic patternの変動について報告する。

実験方法

ネコ脳灌流法は，Geigerらの方法に準じて行ったが，脳を一度循環した血液は，再び脳を灌流させないOpen methodを用いた。灌流人工血液は，洗った牛赤血球，Krebs Ringer重曹緩衝液，低分子デキストラン，各種ビタミン類，シナジーモノ酸（生理的濃度）からなっており，これに必須アミノ酸3.8 μmole/mlへ，あるいはグルタミン酸0.5 μmole/ml，あるいは，両者を共に加えた。またフェニールアラニン6.5 μmole/ml，あるいは，MSI 0.4 μmole/mlを加えた実験を行った。

灌流時間60ないし90分後に脳を摘出し，そのTCA上清について，Dowex 50-H^+型カラムにより，中-酸性分画とアミノ酸分画にわけた。このうち，中-酸性分画を，Dowex 1 酢酸型カラムにより，1.0M 酢酸で乳酸を分離し，Barker-Summerson法で定量した。アミノ酸分画は，Amberlite CG-4B T-2 酢酸型カラムにより，酢酸濃度を漸増するgradient elutionによって 中性-塩基性アミノ酸分画，グルタミン酸，アスパラギン酸を分離した。グルタミンは中性-塩基性アミノ酸分画を，2N HCl中で100°C，2時間加水分解した後，グルタミン酸として Amberliteカラムで分離した。GABA は Dowex 50-Na^+型カラムにより，クエン酸ソーダ緩衝液で分離した。各アミノ酸の定量は，Rosen法によるニンヒドリン発色によった。血液中のグルコースは，Somogyi法による除蛋白液をglucose oxidase法で定量した。血中CO_2はNatelson微量血液ガス分析法によった。各物質の放射能は1M Hyamine溶液に溶かし，トルエン-PPO-dimethyl POPOP系によってPackard製liquid scintillation spectrometerを用いて測定した。放射能の測定効率はexternal standardによって補正し，degradation per minutes (dpm)として記載した。血中CO_2の放射能の測定は，Conway各器内で乳酸によって遊離させたCO_2を，1M Hyamine溶液で湿した沪紙片に吸収させた後，この沪紙片をトルエン-PPO-dimethyl POPOP中に入れて行った。
アミノ酸の放射能の測定のうち，GABAではクエン酸ソーダ緩衝液で溶出したため，この分画を，Dowex 50 H^+カラムにより，4N NH_4OHで脱塩後，蒸発乾固し，上述の方法で行った。

グルコース U-^{14}Cは，5 μCを約2,500 mlの血液に混じて，灌流実験を行った。一部の灌流では，グルコース 6-^{14}C，5 μCを用いた。灌流中の脳の機能水準の判定は，主として脳波記録によって行った。

実験結果

灌流血液組成のうち、膠質浸透圧を保つために、低分子デキストランを用い、灌流血液中の CO_2 濃度を一定に保った場合には、灌流中の脳波は、著しい速波を存続する。

灌流脳の遊離アミノ酸濃度 (Table 1)

灌流時間 60 ないし 90分後の脳についてしらべた。灌流血液に、必須アミノ酸も、グルタミン酸も含まぬ実験では、グルタミン酸、アスパラギン酸、グルタミンの著明な低下が認められる。灌流血液に、必須アミノ酸を含み、グルタミン酸を含まない実験では、これらのアミノ酸は、やゝ低下の傾向を示す。灌流血液にグルタミン酸を含むものでは、低下の傾向が認められない。すなわち、循環血液中に、グルタミン酸が存在する場合には、脳のグルタミン酸系アミノ酸は、増加することはないが、正常値を保つことが出来ることを明瞭に示している。しかし、この作用は、グルタミン酸に特有なものではなく、グルタミン酸以外の必須アミノ酸にもまた、この作用がある。灌流血液に必須アミノ酸と共に、高濃度フェニールアラニンや MSI を加えた実験では、特に変化は認められない。

脳の代謝物質へのグルコース炭素の移行

1) 脳の呼吸炭酸ガス (Fig. 1)

脳によって生成された CO_2 は、脳静脈血中へ移行する。この CO_2 中の比放射能は、時間経過と共に上昇し、グルコース-^{14}C 灌流後、50 ないし 60分後に一定値となる。

Concentration of Free Amino Acids in Perfused Brain (μ mole / g. Brain)

Addition of						
Ess. A.A.	−	+	−	+	+	+
Glu	−	−	+	+	−	−
Phe	−	−	−	−	+	−
MSI	−	−	−	−	−	+
	(2)	(3)	(2)	(6)	(2)	(2)
Glu	4.55±0.43	6.56±1.14	7.00±0.43	8.06±0.76	7.13±0.24	6.52±0.24
Asp	0.613±0.023	1.70±0.55	0.925±0.005	1.32±0.473	1.25±0.02	1.29±0.02
Glu-NH_2	1.74±0.5	2.26±0.85	4.06±1.16	5.67±1.25	4.01±0.65	4.18±0.08
GABA	——	2.07±0.35	——	——	2.41±0.23	2.6±0.5
total amino acids	18.8±5.6	38.5±8.00	30.7±10.5	38.0±8.64	25.0±3.4	39.5±2.2

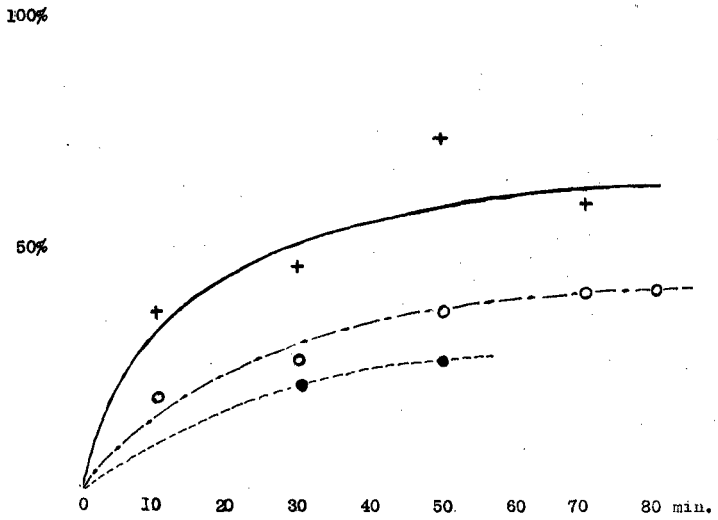
( ) : Numbers of Experiments

Ess. A.A.: Essential Amino Acids

Table 1

Figure 1 RSA of Respiratory CO_2

$$RSA = \frac{\text{dpm/ mole C in Respiratory CO}}{\text{dpm/ mole C in Blood Glucose}} \times 100$$



: Glucose-U-C without Essential Amino Acids

: Glucose-U-C with Essential Amino Acids

: Glucose-6-C without Essantial Amino Acids

グルコース U-^{14}C を用いたとき、灌流血液に、必須アミノ酸があるときには、CO_2 の炭素原子あたりの比放射能のグルコースのそれに対する割合 (RSA-2) は約 40% となる。灌流血液に必須アミノ酸のないときは、CO_2 の RSA は、より高い傾向がある。このことは、L-ロイシン-U-^{14}C [7], L-アスパラギン酸-U-^{14}C [5], あるいは、L-グルタミン酸-U-^{14}C [6] を灌流液に加えて実験を行ったとき、CO_2 の RSA は、いずれも約 1% であったので、灌流血液中の必須アミノ酸から生ずる非放射性 CO_2 がある程度関与しているものと考えられる。CO_2 の RSA 40% は Geiger ら[4] の発表した値 (30%) より高く、グルコース-U-^{14}C の infusion による Barkai ら[3] の値 (45%) に近い。

2) 脳の遊離アミノ酸ならびに乳酸 (Table 2, Table 3)

脳のグルタミン酸、アスパラギン酸のグルコースに対する μmole 当りの RSA (RSA-1) は、必須アミノ酸が灌流血液中に存在しないときには、ほとんど 100% となり、炭素原子当りの RSA (RSA-2) では 100% 以上の値を示す。これは使用したグルコース-U-^{14}C 標本が randomly labelled であったためである可能性がある。そのためにグルコース-6-^{14}C を用いて調べた所、グルタミン酸、アスパラギン酸の RSA-1 は、ほぼ 100% に近い値を示した。灌流血液に必須アミノ酸が存在するときには、グルタミン酸、アスパラギン酸の RSA は、必須アミノ酸のない時よりも、やや低い。すなわち、グルタミン酸-^{14}C の灌流でみられたグルタミン代謝のコンパートメントはグルコース-^{14}C の投与では認められない。脳の乳酸の RSA は、グルタミン酸、アスパラギン酸とほぼ同様な値を示す。これらの値は、すべて Geiger ら[4] の発表した

Table 2

RSA of Brain Metabolites Perfused with Glucose-U-^{14}C and with or without Ess. A. A.

	without Ess. A. A.			with Ess. A. A.	
	RSA-1 (1)	RSA-1* (1)	RSA-2 (1)	RSA-1 (3)	RSA-2 (3)
Glu	98.1	96.0	118	66.4±1.97	80.1±1.76
Asp	90.8	90.0	137	58.1±11.6	90.3±17.7
$GluNH_2$	74.5	25.6	89	56.7±16.1	66.2±7.8
GABA	85.2	82.0	128	32.7±10.8	50.7±13.8
Lactate	48.6	25.6	97.1	39.7±9.5	79.4±19.1
CO_2	9.75	4.35	58.4	6.7±0.74	40.1±4.51

RSA-1 : $\frac{\text{dpm/}\mu\text{mole of metabolites}}{\text{dpm/}\mu\text{mole of glucose}} \times 100$

RSA-2 : $\frac{\text{dpm/}\mu\text{mole carbon atoms of metabolites}}{\text{dpm/}\mu\text{mole carbon atoms of glucose}} \times 100$

( ) : Numbers of experiments

* : Perfused with Glucose-6-^{14}C

Table 3

RSA of Brain Metabolites Perfused with Glucose-U-C and with High Concentration of Phenylalanine or Methionine Sulfoximine(MSI)

	Phenylalanine		MSI	
	RSA-1 (2)	RSA-2 (2)	RSA-1 (2)	RSA-2 (2)
Glu	32.3 47.8	38.8 57.0	31.7 99.0	37.8 119
Asp	29.0 40.8	43.5 61.0	26.8 75.1	40.0 112
GluNH	20.7 19.8	24.7 24.0	15.4 48.1	18.4 57.7
GABA	33.8 48.8	50.8 73.1	54.0 79.8	81.0 118
Lactate	--	--	--	--
CO	3.73 6.56	22.4 39.4	5.57 10.8	33.4 64.5

値より、はるかに高い。この原因は現在の所、不明であるが、灌流中の脳波が、脳皮に速波に傾いていることと関係があるのではないかと想像され、これを検討中である。

灌流血液に高濃度のフェニールアラニンを加えた実験では、グルタミン酸、アスパラギン酸、グルタミンのRSAはいずれも低下し、GABAのRSAはかなり高い。

灌流血液にMSIを加えた実験では、1例は、各アミノ酸のRSAが低下し、1例では、ほぼ正常であった。しかし2例共にグルタミン酸のRSAに比較してグルタミンのRSAの著明な低下が認められた。MSI灌流によって、脳のグルタミン量の低下は認められないが、放射性炭素の移行からすれば、グルタミン合成酵素活性の低下が推定される。また、灌流中に、MSIによる発作発射は認められなかったが、発作を発来する以前に、既にグルタミン合成酵素活性は低下するものであろう。

文献

1) Barkai, A. & Alluvis, C. : J. neurochem., 13, 23 (1966)

2) Geiger, A., Gombos, G., Otsuki, S., Aguilar, V., Gothelf, B., Scruggs, W. & Whitney, G. : Int. J. Neuropharmacolog 1, 283 (1962)

3) Geiger, A. & Magnes, J. : Am. J. physiol. 149, 677 (1947)

4) Geiger, A., Kawakita, Y. & Barkulis, S.S. : J. Neurochem., 5, 323 (1960)

5) Gombos, G., Geiger, A. & Otsuki, S. : J. Neurochem., 10, 405 (1963)

6) 大月三郎 : 代謝, 7, 460 (1966)

7) Watanabe, S., Gombos, G., Kurahashi, K., & Abood, L. G. : unpublished observations.

13 脳解糖呼吸系の研究，(I) アミノ酸・アセチルコリンとの関係

成瀬　浩（国立精神衛生研）
永山素男・中村陸郎
（東大・医・神経）
S.-C. Cheng（コロンビア大）

われ〜は，神経系特能変化，ことに病的状態と，脳解糖呼吸系を中心とする脳代謝との関係を in situ の状態で追究することを目標に研究をすゝめてゐる．今回はその一部，酸性アミノ酸代謝と脳呼吸系および Acetyl choline（Ach）代謝との関係について報告する．昨年なのこの学会で報告したように，神経系でも活発な Co_2 固定が行われており，そのかなりの部分が α-Ketoglutarate（α-K.G.）+ Co_2 ⟶ Isocitrate の反応を経ていることがわかった(3)(4)．これは部分的なTCAサイクルの逆反応がかなり活潑であることを示唆しており，このことから神経系で，glutamate（glu）が Ach 合成の有効な前駆物質となりうるのでないかという仮説を提唱した(3)(4)(7)．この仮説の追究のため，従来行って来た脳有機酸の分離方法(5)(6)を改良し，イオン交換樹脂カラムによる Ach 分離を行い，Ach の比放射能測定が可能になったので，数種の前駆物質（^{14}C）を用い，Ach への ^{14}C の取り込みを測定した．さらに glu-^{14}C を用い，その ^{14}C のTCAサイクル中間物質とアミノ酸等への取り込みを測定し，酸性アミノ酸と呼吸系との関係を検討した．

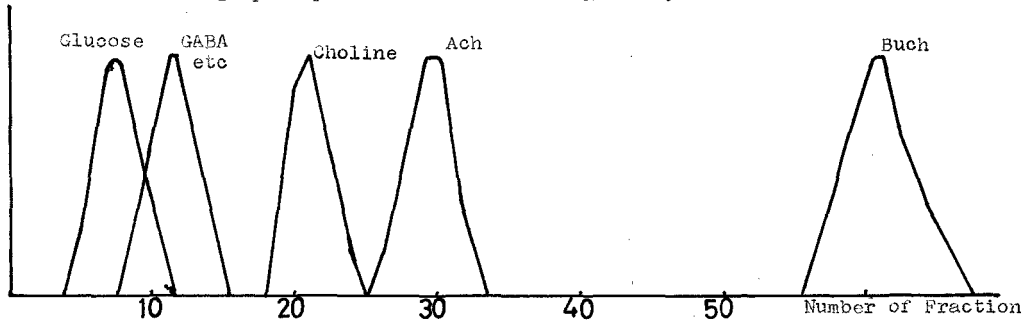
〔方　法〕

動物はマウス，猫および Rabbit．詳細は後述する．

酸可溶性物質の分離は，Dowex-1-Acetate 0.6×14 cm カラムを用い(2)(6)，中性アルカリ性物質（Fraction I），glu，Asparate（asp），Lactate，Succinate（Suc），Malate（mal）および Glutathione（GSH），Oxaloacetate，Citrate（Cit），α-K.G. および Pyruvate（pyr）（Fr. XIII）の各フラクションに分ける．Fraction I に Ach が含まれる．

Ach の分離のためには，Bio Rex 70（H^+型）200〜400 メッシュ，34×1.1 cm カラムを用いる．Fraction I を凍結乾燥後，15 ml の 0.01 m M酢酸にとかしカラムにかけ，水洗後 0.03 N〜0.005 N 蟻酸で流出せしめ 5 ml づつ分取する．第1図に choline エステルその他の誘導物の分離を示す．この図にはないが，propionyl-choline は Ach と Buthyl-choline（Buch）との間に流出，γ-Aminobutyryl-choline は蟻酸濃度を上げて初めて流出してくる．Betaine エステル流出部は検索中であるが，Ach と重なることはないようである．Ach に相当する部分を集め，凍結乾燥後小量の水に採取し，放射能測定，定量を行う．

Figure I　Chromatographic pattern of Choline-esters etc.



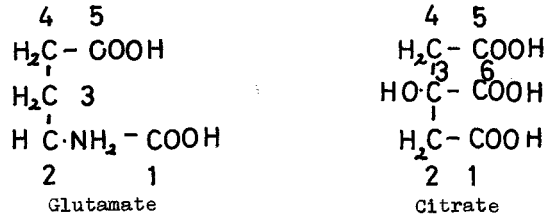
またこれを薄層クロマト，あるいはペーパークロマトにより発色，Paperscanner による放射能測定により他の物質の Contamination を調べる。現在の前駆物質に関しては，この方法でかなり純粋な Ach がとれる。Ach の定量は Bioassay により時に Hydroxamate 法を用いた。Recovery は，Acetyl-labeled Ach, choline-labeled Ach あるいは cold Ach を用いいづれも 90% 以上である。

他の物質の定量は，glu は glu 脱水素酵素，glutamin は水解后 glu として測定，Asp は Ninhydrin 法，Cit. は Aconitase と Isocitrate 脱水素酵素による方法(2)を用いた。

〔結果と考察〕

Lobster 歩行脚神経における Ach 之の ^{14}C の取り入れについて第1表に表示する。この場合神経は正常の電気及活性の存在することをたしかめた后，0.1 m M Eserine 加 Ringer 5 ml 中に入れ，^{14}C 化合物を加え，14～16°C に3時間放置する。培養后神経をとり出し，Ringer 中でよく洗い TCA により酸可溶性部分を抽出し，Dowex-1-Acetate カラムにかける。(6) Cit-1-5 ^{14}C より Ach に入るのは，いかなる経路によっても5の部の ^{14}C だけであり，従って表中で溶媒中の Cit 1-5-^{14}C は 10 μc でも有効部分は 5 μc であり，Pyruvate-2-^{14}C に比し，半分にすぎない。従って Pyr-2-^{14}C を用いた時の Ach 之の ^{14}C の入りは，Cit 1-5-^{14}C の場合の倍であるが，溶媒中の有効な放射能と Ach に入った ^{14}C との比は両者ともほゞ同称であるといえよう。つまりこの様な方法では，両者とも Ach 合成のための前駆物質として略同じ様に有効であるといえよう。glucose-1-^{14}C では，^{14}C は pyr-3 の位置に入り，Acetyl-CoA → Ach と入るわけである。

Figure II Number of Each Carbon in Glutamate and Citrate



次に TCA サイクルの逆反応による glu よりの Ach 之の ^{14}C の入りを見るために，5の位置に標識した glu を用い，対照として glu-1-^{14}C を用いた。これらはいづれも D·L 型であり，10 μc としても有効部はその半分である。Ach に入った ^{14}C は Pyr, Cit, glucose の場合に比べるとかなり少ない。これは glu の神経組織内之の透過性が，Pyr, Cit, glucose に比し悪いことも一つの原因と考えられる。Pool size という面からいえば，哺乳類とことなって，Lobster の末梢神経では，glu 対 Cit は 1:2 であり，この現象の根拠とはならない。

Table I Synthesis of Acetylcholine from ^{14}C labeled Substrates

Substrate	Radioactivity in Medium	Total Radioactivity in Ach (cpm/g wet w)	Ach content (mμmoles/g wet w)
Citrate-1,5-^{14}C (2)	10μc	885	77
Pyruvate-2-^{14}C (3)	10μc	1641	78
Pyruvate-1-^{14}C (2)	10μc	79	97
Glucose-1-^{14}C (1)	10μc	262	91
Glutamate-5-^{14}C (3)	10μc	127	86
Glutamate-1-^{14}C (2)	10μc	122	77

Values in parenthesis refer to the number of experiments.

glut-5-^{14}C からもし Ach の acetyl 部分あるいは Fatty acid, Lipid に入るとすれば，それは第3図に示すごく，glu → αKG → Cit → Ach と TCA サイクルの逆反応の路を通っているわけである。glut-5-^{14}C から Ach に ^{14}C の入りがたしかにみとめられる。しかし同時に glu-1-^{14}C からも同じように ^{14}C が Ach に入っている。この1の ^{14}C は TCA サイクルの正方向回転では，CO_2 として出てしまう筈である。また Cit cleavage Enzyme が Aconitase のような立体特異性があれば，Acetyl-CoA にはいらないはずである。この点目下検討中である。

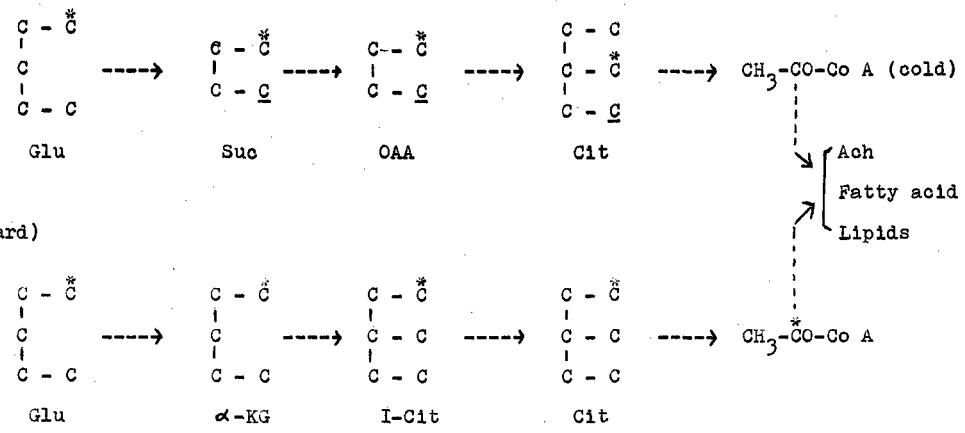
Lobater の場合，哺乳動物の神経系に比し，TCA サイクル逆反応による CO_2 固定率は大いので(2)(3)(4)，マウス脳に glu-5-^{14}C を投与した。中和した D·L glu-5-^{14}C（比放射能 11 mc/m mols）5μl 6.25 μc を，前頭部位に脳室内注入。10分後液体窒素により固定し，小脳を除く部分を粉末化し，TCA で酸可溶性部分を抽出し，Ach および各フラクションの ^{14}C の入りを見た。そして更に TCA による沈澱を TCA·水で充分洗った後に，冷アセトン 10cc × 3，冷エタノール·エーテル（1:1）10cc × 3 で脂肪酸，脂質を抽出し，残りを NaOH に溶かし，蛋白質部分とした。Thiobarbiturate による半麻酔麻酔時の2匹および無麻酔の動物2匹の結果を第2表に示す。Total counts は前者で，22,000 と 59,000，後者で 15,000 と 7,000 とかなり差がある。これは脳室内注射の技術の問題と，固定後脳を取り出す時の問題であり，これをさけるため目下猫を用い，脳を露出し，局所に濾紙に ^{14}C-glu をひたしたものを塗布し，一定時間後脳を取り出し，周囲の glut をよく洗い落し TCA にて抽出する方法を行ってみる。表には各フラクションの放射能を，glu の放射能に対して除したものをかしてみる。このいづれにも蛋白部分は殆んど

Table II Relative Radioactivity in Various Compounds after Glutamate-5-^{14}C Administration in Mice Brain

Fraction	Anesthesized	Non-anestsized
Fraction I(Glu-NH_2 & GABA)	0.485	0.595
Glutamate	1.0	1.0
Asparate	0.0656	0.0533
Lactate	0.011	0.013
Succinate	0.143	0.263
Malate & Glutathione	0.00625	0.0062
Oxaloacetate	<	<
Citrate	0.0122	0.0256
α-Ketoglutrate & Pyruvate	0.0056	0.0299
Acetylcholine	0.0006	0.0018
Fatty acid & Lipid	0.0040	0.0100

^{14}C は見られない。DL glu-^{14}C なので，glu にのこるカウントのうちの大部分は D 型であり，このカウントを基準にするのは問題があるが便宜上この表現方法をとった。有機溶媒により抽出されたフラクションに，10分という短時間にもかかわらずかなりの ^{14}C が見られたのは注目に値いする。TCA 抽出後の材料なので固定出来ないが，多くは脂肪酸に入っているものと想像される。いづれにせよこの ^{14}C は TCA サイクルの逆反応によるもので [redacted] この経路が活潑であることを物語っている。次に Ach 之の ^{14}C の入りは存在するがごく少い。これは glu と Ach の pool size の比が 1000 対 1 である

Figure III Pathway of Glutamate Metabolism via Forward Reaction and Backward Reaction of Tricarboxylic acid cycle



$\overset{*}{C}$ ····· ^{14}C from Glutamate-5-^{14}C

$\underline{C}$ ····· ^{14}C shuttled by Dicarboxylic acid shuttle

ことが主な理由であり，更にAch合成の局在部とGluの分布部位の差も考慮されねばならない。この点今后 α-K.G-5-^{14}C, Cit-5-^{14}C を用いて詳細に検討する。

GluがＴＣＡサイクルの正方向之の反応およびＧＡＢＡを経由する反応により代謝される程度と，ＴＣＡサイクル逆反応により代謝される程度とを比較するためには，glu-5-^{14}C を投与して得られた Cit を，微量分解方法(3)を用いて分解し，３つのカルボキシール基の比放射能を知ることが必要である．つまり(5の位置の比放射能)対(1の位置の比放射能＋6の位置の比放射能)の比を求めればよいのであり，この点も検討し報告する。

次に第２表で放射能の分布を見ると，Sucにおける放射能が高いことが目立っている。この実験では，各物質の定量は未だ終っていないが，われ〜の今迄の結果(5)および Goldberg & Lowry (1)の研究によれば，マウス脳でのこれらの物質の Pool size は次の如くなる。glu：10 μ moles per g wet weight.（以下同じ単位），glu-NH_2：4，Asp：3. GABA：2，Cit：0.15 〜 0.3，Mal：0.25 〜 0.4，Suc：0.6，α.KG：0.1であり，これから見ていかにSucの比放射能が高いかが推測される。これは，一つにはGluの分布部位とSuc脱水素酵素の分布部位の差が考えられるが理由は不明であり今后検討を必要とする。

〔文献〕

1) Goldberg N.D., Passonneau J.V. & Lowry O.H.; Fed. Proc., 24 423 (1965)
2) Naruse H., Cheng S-C. & Waelsch H.; Exp. Brain Research 1 40 (1966)
3) Naruse H., Cheng S-C. & Waelsch H.; ibid 1 (in press)
4) Naruse H., Cheng S-C. & Waelsch H.; ibid 1 (in press)
5) Naruse H., Mela P. & Waelsch H.; in preparation
6) Cheng S-C. & Waelsch H.; Biochemische Z. 338 643 (1963)
7) Waelsch H., Cheng S-C. Cote L.J. & Naruse H.; Proc. Nat. Acad. Science 54 1249 (1965)

14 モルモット大脳皮質切片におけるγ－アミノ〔1－^{14}C〕酪酸の代謝

町山幸輝（東大・医・精神）
R. Balázs, D. Richter（MRC Neuropsychiat. Res. Unit, England）

これまで多くの研究者によって哺乳動物の脳においてはグルコースの一部はTCA回路により一部はγ-アミノ酪酸(GABA)経路をとおって酸化されることが明らかにされている．しかし後者の経路をとおって酸化されるグルコースの量はまだ正確には測定されていない．これまでこの測定をはばんでいた理由の一つは脳におけるグルタミン酸プールのheterogeneityである．[1] カルボキシル基にラベルされた[1-^{14}C]GABAをつかうと，グルタミン酸からGABAが脱炭酸によって生ずる時^{14}Cが$^{14}CO_2$としてうしなわれグルタミン酸よりGABAプールへの^{14}Cのre-entryがおこらないので，脳組織のGABAを予め[1-^{14}C]GABAでラベルしたあとそのプールの比放射能(S.A.)減衰の時間的変化から代謝されるGABAの量を計算することができる．[3]

脳切片の代謝的特徴の一つは呼吸活性が反応液中の高カリウム濃度により著るしくたかめられることである．このカリウム効果の機序はなお不明であるが，刺激された呼吸がin vivoの組織の呼吸とある点で類似していることが指摘されている．[4] 脳におけるGABA経路の特異な局在を考慮すると，この場合にGABA経路の代謝率がどうかわるかはきわめて興味ぶかいことである．

本報では静止および刺激呼吸時の大脳皮質切片における[1-^{14}C]GABAの代謝について二，三の知見を報告する．

方法の概要

動物は同一コロニーの成熟牡モルモット（体重約400g）のみを使用した．切片はhumid chamber（酸素通気，20~22°）中でStadie-Riggs型スライサーを用いてつくった．常に同一の脳部位より切片をうるようにつとめ（各半球の前頭頭頂部より才一枚目および才二枚目，および側頭後頭部より才一枚目，計3枚の切片をうる），各incubationには一個の脳よりえた6枚の切片（200mg）を用いた．

断頭25分後切片をWarburgの反応容器中に浮遊させ，断頭30分後よりincubationを開始した（Warburg装置，気相酸素，37.5°）．容器の主室はKrebs-Ringer液 2.9ml.（30mM Tris, pH 7.4, 10mMグルコース），側室は実験に応じて[1-^{14}C]GABA（0.5μC, 3.72mC/m-mole）0.05ml.および3.6 M KClあるいは0.154 M NaCl 0.05ml.をふくむ．高カリウム実験ではGABAとKCl液をそれぞれ別の側室にわけていれた．10分間のpreincubation後標識物質をtip，以後酸素消費を5分間ごとに測定した．適当な時間incubateした後，Warburg容器をとりだし内容を口過し（Whatman filterpaper no. 50，吸引），分離した切片を直ちに氷冷した5% PCA液で固定．この操作には1.5~2分を要した．口液はさらに4°で5分間遠心し，赤血球その他の固形物をのぞいた後，一定量を酸性化固定した．

切片および反応液よりえられた酸溶性分画からPCAをKOHでのぞいた後Gaitonde等[2]の方法に従いZeo-Karb 225およびDowex 1のカラムによって塩基性，中性および酸性アミノ酸群を分離した．中性および酸性アミノ酸群は一次元口紙クロマトグラフィーにより各アミノ酸に分離，口紙上の各アミノ酸はニンヒドリン呈色によらずBTL radioactive chromatogram counterの結果および平行しておこなわれたmarker strip上の基準アミノ

酸の位置とから同定し，水で溶出した．その aliquot についてニンヒドリン法によりアミノ-Nを，Nuclear Chicago gas-flow counter (model D-47, Micromil window) により放射能を測定した．

結果および考察

静止呼吸時における[1-^{14}C]GABA の代謝．脳切片において[1-^{14}C]GABAが代謝されて生ずる[^{14}C]グルタミン酸はC-1にのみ^{14}Cをふくむ．これは反応後の切片から単離された[^{14}C]グルタミン酸の Cl. welchii 標品による脱炭酸実験でたしかめられた[3]．この[1-^{14}C]グルタミン酸の脱炭酸によってGABA がつくられる場合^{14}C が$^{14}CO_2$としてうしなわれるので，GABAは非放射性である．表1に示されているように，くわえられた[^{14}C]GABA は10分間で95％以上が切片にとりこまれ，以後反応液中のGABAの量はきわめてわずかでニンヒドリン法では証明しえない．したがってGABAがとりこまれた後切片を新らしい反応液中にうつしかえることなく incubation をすすめ，切片中のGABAプールの^{14}C 希釈の時間的経過をおうことができる．切片中のGABAの量は断頭後切片調製中に一定量増加するほかさらに[^{14}C]GABAとりこみにより増加するが，その量は incubation 中指数函数的に減少する．このことは後述するようにGABAの代謝率の計算を複雑にしたが，一方代謝率計算に一組の別の data をあたえることになった．切片の酸素消費は 72.7 ± 1.17 (12) μmoles O_2/g/hr. なお同じ条件下では 0.1 mM 以下の濃度の GABA の添加は切片の酸素消費に影響をあたえない．この実験では[^{14}C]GABA の添加時の濃度は 0.043 mM にすぎない．

代謝されたGABAの^{14}C はまずアスパラギン酸に，ついでグルタミン酸，グルタミンにはいる．しかしいわゆる precursor-product の関係をやぶってグルタミンの S.A. がグルタミン酸の S.A. より常に高いことは注目に値する．

カリウム刺激時における[1-^{14}C]GABA の代謝．[^{14}C]GABA がほぼ完全にとりこまれたGABA添加20分後ネコの副室より KCl 液を主室にくわえると切片の酸素消費は最初の30分間に 158.0 ± 4.46 (6) μmoles O_2/g/hr. と著るしく増加する．同時に切片より反応液への比較的特異的な GABA の遊出がみられる．表ごにしめされているようにこの遊出はKCl添加5分後に最大で全GABAの約1/3におよび以後漸減する．切片中のGABAのS.A.の変化に平行する反応液中のGABAのS.A.の変化からこの現象はまず切片より反応液への遊出，ついで反応液より切片へのとりこみという二過程の継時的組合せではなく，同時的に生起するたえざる遊出およびとりこみの過程からなることが推察される．この現象の機序その他については現在なお検索中である．切片および反応液中の全GABAの量は時間とともにむしろ増加し，^{14}C 量の減少も対照にくらべてずっと少ない．他方 KCl 添加によってアスパラギン酸のS.A.の急激な低下がみとめられる．これは切片の酸素消費およびTCA回路の代謝率の著るしい増加にみあうだけGABA 利用の増加がおこらないことを示すとかんがえられる．またグルタミンのS.A.は対照におけるとはことなりグルタミン酸のそれよりも低くなる．グルタミンは切片中に蓄積するがこの一部は反応液中のグルタミンのとりこみによる．

GABA 代謝率の計算．静止呼吸時における定常状態でのGABA の代謝率 k を計算するため図1aに示されたモデルをもとにアナローグ計算機(PACE TR48) による simulation によって2回の二つの等式のCの値をさだめた．この場合定常状態におけるGABAの代謝率は一定であることおよびGABAの利用がプールサイズに比例することが仮定されて

TABLE 1. LABELLING OF AMINO ACIDS DURING INCUBATION WITH [1-^{14}C]GABA UNDER NORMAL CONDITIONS.

Time after addition of [1-^{14}C]GABA		10min.	20min.	30min.	40min.	50min.	60min.	70min.	80min.	90min.
SLICE										
ACID-SOLUBLE FR.	a)	87,600	79,000	71,800	58,900	47,600	39,300	35,000	28,300	27,400
GABA	a)	76,909	66,274	52,718	43,573	35,818	25,991	25,582	16,626	15,809
	b)	0.660	0.658	0.570	0.540	0.508	0.430	0.480	0.460	0.438
	c)	116,529	100,720	92,488	80,691	71,067	60,444	53,296	36,143	36,094
ASPARTIC ACID	a)	4,909	5,455	5,441	5,301	4,138	4,070	2,273	1,664	1,413
	b)	0.432	0.390	0.386	0.412	0.408	0.424	0.416	0.340	0.318
	c)	11,363	13,987	14,096	12,867	10,142	9,599	5,464	4,894	4,443
GLUTAMIC ACID	a)	1,734	2,990	4,406	5,343	5,125	4,699	4,127	3,522	3,347
	b)	1.828	1.910	1.836	1.832	1.835	1.830	1.953	1.903	1.850
	c)	949	1,565	2,400	2,916	2,793	2,568	2,113	1,851	1,809
GLUTAMINE	a)	852	2,027	1,939	2,174	2,691	2,880	3,227	3,585	3,491
	b)	0.746	0.620	0.618	0.592	0.648	0.700	0.698	0.702	0.778
	c)	1,142	3,269	3,138	3,672	4,153	4,114	4,623	5,107	4,487
MEDIUM										
ACID-SOLUBLE FR.	a)	8,750	5,710	5,748	6,400	7,610	7,800	9,008	8,925	9,000
GABA	a)	5,327	1,851	1,408	1,139	982	710	857	551	498
	b)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	c)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ASPARTIC ACID	a)	101	184	165	193	155	147	105	83	77
	b)	-	0.060	-	0.059	-	0.045	-	0.033	-
	c)	-	3,067	-	3,271	-	3,267	-	2,515	-
GLUTAMIC ACID	a)	73	147	165	202	201	250	230	257	239
	b)	-	0.129	-	0.101	-	0.130	-	0.133	-
	c)	-	1,140	-	2,000	-	1,923	-	1,932	-
GLUTAMINE	a)	312	716	826	1,120	2,336	3,587	3,610	3,500	3,782
	b)	-	0.629	-	0.660	-	0.777	-	0.804	-
	c)	-	1,138	-	1,697	-	3,329	-	4,353	-

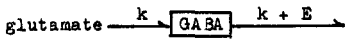
a) Radioactivity in counts/min./200 mg. slices or 3.0 ml. medium.
b) Amount of the amino acid in μmoles/200 mg. slices or 3.0 ml. medium.
c) Specific activity of the amino acid in counts/min./μmole amino acid.

TABLE 2. LABELLING OF AMINO ACIDS DURING INCUBATION WITH [1-^{14}C]GABA IN THE PRESENCE OF A HIGH CONCENTRATION OF POTASSIUM IONS.

Time after addition of KCl		0min.	0.5min.	5min.	10min.	20min.	30min.	40min.	60min.
SLICE									
ACID-SOLUBLE FR.	a)	79,000	78,500	58,900	54,100	50,100	47,100	44,400	41,300
GABA	a)	66,274	63,697	45,994	41,445	38,305	36,980	35,421	34,179
	b)	0.658	0.610	0.465	0.470	0.462	0.570	0.585	0.637
	c)	100,720	104,421	98,912	88,181	82,911	64,877	60,549	53,656
ASPARTIC ACID	a)	5,455	5,044	2,825	1,837	1,343	1,203	746	476
	b)	0.390	0.435	0.394	0.322	0.308	0.321	0.248	0.248
	c)	13,987	11,595	7,170	5,705	4,360	3,748	3,008	1,919
GLUTAMIC ACID	a)	2,990	3,310	3,916	3,676	3,224	2,639	2,051	1,641
	b)	1.910	1.966	1.926	1.938	1.922	1.977	1.538	1.491
	c)	1,565	1,684	1,996	1,897	1,677	1,335	1,334	1,101
GLUTAMINE	a)	2,027	1,570	1,247	1,239	1,299	1,532	1,818	2,026
	b)	0.620	0.687	0.658	0.745	0.982	1,270	1,328	1,581
	c)	3,269	2,285	1,895	1,663	1,323	1,206	1,369	1,281
MEDIUM									
ACID-SOLUBLE FR.	a)	5,710	10,040	27,780	25,740	20,820	13,860	13,000	7,680
GABA	a)	1,851	4,588	21,395	18,893	15,224	8,036	7,946	3,798
	b)	-	0.032	0.174	0.166	0.150	0.102	0.121	0.068
	c)	-	143,375	122,960	113,812	101,495	78,784	65,669	55,853
ASPARTIC ACID	a)	184	353	382	250	125	132	103	81
	b)	0.060	0.081	0.063	0.056	0.090	0.079	0.087	0.087
	c)	3,067	4,358	6,063	4,464	1,389	1,671	1,184	931
GLUTAMIC ACID	a)	147	176	338	257	169	206	169	110
	b)	0.129	0.151	0.198	0.133	0.131	0.156	0.130	0.112
	c)	1,140	1,166	1,707	1,932	1,290	1,321	1,300	982
GLUTAMINE	a)	716	820	1,050	1,002	805	352	535	274
	b)	0.629	0.677	0.706	0.693	0.619	0.274	0.407	0.210
	c)	1,138	1,211	1,487	1,446	1,300	1,285	1,314	1,305

a) Radioactivity in counts/min./200 mg. slices or 3.0 ml. medium.
b) Amount of the amino acid in μmoles/200 mg. slices or 3.0 ml. medium.
c) Specific activity of the amino acid in counts/min./μmole amino acid.

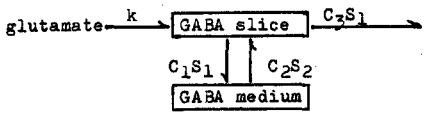
a. CONTROL



$$\frac{dS}{dt} = k - (k + E)$$
$$= k - CS$$

$$\frac{dR}{dt} = -(k + E)\,a$$
$$= -(CS)\frac{R}{S}$$
$$= -CR$$

b. STIMULATED



$$\frac{dS_1}{dt} = k - C_3S_1 - C_1S_1 + C_2S_2$$

$$\frac{dS_2}{dt} = C_1S_1 - C_2S_2$$

$$\frac{dR_1}{dt} = -C_3R_1 - C_1R_1 + C_2R_2$$

$$\frac{dR_2}{dt} = C_1R_1 - C_2R_2$$

S: size of the GABA pool
R: radioactivity in the GABA pool
a: specific activity of the GABA pool
k: turnover rate of GABA in the steady state
E: additional utilization rate of GABA
C: fractional utilization rate of GABA

S_1 & S_2: size of the GABA pool in slice and in medium, resp.
R_1 & R_2: radioactivity in the GABA pool in slice and in medium, resp.
k: formation rate of GABA
C_1, C_2 & C_3: fractional rate of release, uptake and utilization of GABA, resp.

FIGURE 1. MODELS AND EQUATIONS FOR THE CALCULATION OF THE TURNOVER RATE OF GABA.

いる．GABAの量および放射能からえられた二つのC値はともに0.02/min.とよく一致し，これから計算されるKの値は0.0065μmole/200mg/min.となる．これは切片の酸素消費値72.7μmoles O_2/g/hr.から計算されたTCA回路の代謝率0.08μmole/200mg/min.の約8%になる．カリウム刺激時のGABAの代謝率の計算は図1bのモデルに従ってこころみられた．この場合の仮定はGABAの生成率は一定であること，GABAの利用，遊出およびとりこみは切片あるいは反応液中のGABAの量に比例すること，およびGABAの利用は切片内でのみおこることである．同じ計算機を用いたsimulationの結果C_1が時間の指数函数で時間とともに減少しなければならないことが要請された．parameterが多く結果はなお確実ではないが，Kが対照時とほぼ同じことおよびC_3が対照時より低いことは大体確実のようである．KおよびC3がもし対照時と同一としてもこの場合TCA回路の代謝率は対照の2倍以上に増加しているのでグルコース酸化にしめるGABA経路の割合はTCA回路の4%以下になることになる．

上述のごとく切片全体のエネルギー代謝におけるGABA経路の関与はそれほど大きなものではないが，なお組織のある局所におけるあるいはin vivoにおけるGABA経路のエネルギー代謝における役割の評価は未解決の課題である．カリウムイオンによってみられた組織からのGABAの遊出がもし生理的にもおこっているとすると脳におけるGABAの意義はエネルギー代謝よりもむしろ生理学的薬理学的分野にもとめられるべきなのかもしれない．

1) Albers, R.W., Koval, G., McKhann, G. & Ricks, D. (1961). In Regional Neurochemistry, p.340. Ed. by Kety, S.S. & Elkes, J. Oxford: Pergamon Press. 2) Gaitonde, M.K., Dahl, D.R. & Elliott, K.A.C. (1965). Biochem. J. 94, 345. 3) Machiyama, Y., Balázs, R. & Julian, T. (1965). Biochem. J. 96, 68P. 4) Quastel, J.H. & Quastel, D.M.J. (1961). The Chemistry of Brain Metabolism in Health and Disease. Springfield, Ill.: Charles C. Thomas.

15 脳組織の解糖系の調節

高垣 玄吉郎（慶大・医・生理）

グルタミン酸が脳組織の好気的解糖を著しく促進することは，古くから知られていた。[9] すでに報告したように，アスパラギン酸はグルタミン酸のこの解糖促進作用を抑制するのである。[5),6)] カリウム効果として知られているように，カリウムイオンは脳切片の好気的解糖を促進するが，グルタミン酸及びアスパラギン酸は Medium からカリウムイオンをともなってとり込まれ切片内にたくわえられる。これらの関係をさらに明らかにしようとして行った実験の成績を報告する。脳組織では，グルタミン酸－アスパラギン酸は活発に相互変換するから，[4)] D-グルタミン酸，D-アスパラギン酸を用いたことは，前報と同様である。

I. 方法

モルモットの大脳皮質切片を材料とし，Krebs-Ringer リン酸緩衝液（pH 7.4）中で空気下に incubate し，37°C で振盪した。Medium 中のカリウム濃度を高めたときは，ナトリウム濃度をそれだけ低下させて等浸透圧に保った。D-グルタミン酸及び D-アスパラギン酸のとり込みをみる場合は，Medium 中に 5mM の濃度に加えた。

定量方法：グルタミン酸及びアスパラギン酸の定量は，Dowex 1-x4, 200-400 mesh を用いる方法，[3)] 乳酸は Barker-Summerson の方法，[1)] あるいは酵素的方法[2)] を用いた。グルコース，ピルビン酸及び解糖系の各 Intermediate の定量は酵素的方法[2)] によった。酸素消費は Warburg 法により測定した。

C^{14} D-グルタミン酸及び C^{14} D-アスパラギン酸の調製：C^{14} D-グルタミン酸は市販化学より入手した DL-グルタミン酸-5-C^{14} にグルタミン酸脱炭酸酵素（協和発酵）を作用させ L-グルタミン酸を γ-アミノ酪酸とし，Dowex 1-x4 によるカラムクロマトの方法で D-グルタミン酸を γ-アミノ酪酸から分離した。C^{14} D-アスパラギン酸は市販化学より入手した DL-アスパラギン酸-2-C^{14} を材料とし，アスパラギン酸の酵素的定量法（文献2）の381頁）の条件で，アスパラギン酸をグルタミン酸とし，残った D-アスパラギン酸を Dowex 1-x4 によるカラムクロマトで分離した。Tracer として用いる場合，C^{14} D-グルタミン酸及び D-アスパラギン酸は，Flask（Medium 2.5ml，脳切片約 100mg）あたり 0.5μc. づつ加え，それぞれ cold の D-グルタミン酸及び D-アスパラギン酸で希めて Medium 中の濃度は 5mM とした。

化学物質：D-グルタミン酸は味の素研究所より供与されたものを再結晶して用い，D-アスパラギン酸は California Biochemical Research の製品を用いた。酵素的定量法に用いた酵素及び基質として用いた解糖系の Intermediate はビオケミヤを通じて購入した Boehringer & Soehne の製品である。

II. 実験及び考察

(1) 前報で D-アスパラギン酸は D-グルタミン酸による脳切片の好気的解糖の促進を抑制することを示した。[6)] アスパラギン酸と構造類似あるいは関連の物質について検当し

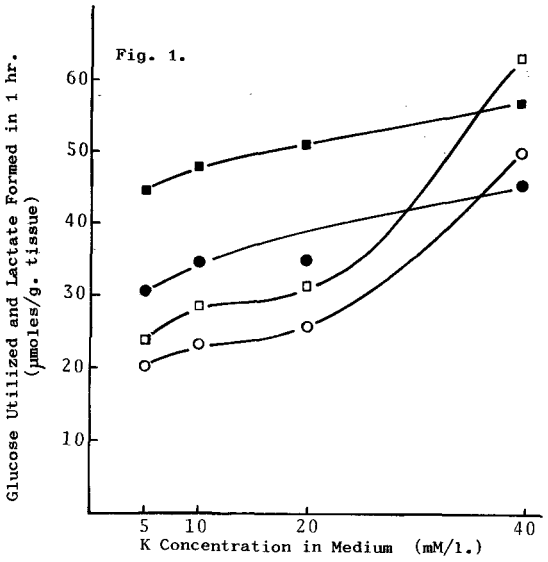
たが，アスパラギン酸のみ抑制作用を示し，その他のものは全くその作用がなかった(表1)。アスパラギン酸はグルタミン酸のとり込みを抑制して自ら脳切片にとり込まれるが，やはりカリウムをともなってとり込まれる。表1のアスパラギン酸以外の物質は自らも高濃度にはとり込まれず，グルタミン酸とカリウムのとり込みにも影響を与えない。グルタミン酸もアスパラギン酸も同様にカリウムをともなって脳切片にとり込まれるにかかわらず，前者は好気的解糖を促進し，後者はその作用がなく，むしろ前者による促進を抑制するわけである。

Table 1. Effect of amino acids on aerobic glycolysis

Addition	Glucose utilized	Lactic acid formed
	μmoles/g. in 1 hr.	μmoles/g. in 1 hr.
	17.3±2.3(8)	20.9±1.5(8)
D-Glutamate(5 mM)	27.8±2.7(8)	44.0±4.7(8)
+ D-Aspartate(5 mM)	18.8±2.3(4)	28.0±1.8(4)
+ D-Asparagine (5 mM)	26.7±2.1(4)	45.7±3.7(4)
+ NAA(5 mM)	30.6±3.2(4)	38.8±5.6(4)
+ D-Glutamine(5 mM)	30.4±1.1(6)	49.2±3.3(6)
+ GABA(5 mM)	30.0(2)	46.5(2)

(2) Medium中のカリウム濃度を高めると，脳切片の好気的解糖は促進される(K-効果)。カリウムが低濃度のときは，D-グルタミン酸をさらに加えることによって，グルコース消費，乳酸形成ともさらに増加するが，カリウムが高濃度(40mM)で強くK-効果が起っているときは，D-グルタミン酸によりさらにグルコース消費，乳酸形成が増加することはない(図1)。全くカリウムを含まないmedium中ではグルタミン酸はとり込まれず，好気的解糖の促進も見られない。[7]

Fig. 1.



○ Glucose utilization in the absence of D-glutamate.
● in the presence of D-glutamate.
□ Lactate formation in the absence of D-glutamate.
■ in the presence of D-glutamate.

(3) Ouabain (10^{-5}M) はグルタミン酸及びカリウムの脳切片へのとり込みを阻害するが，[8] またグルタミン酸による好気的解糖の促進作用を完全に抑制する(表2)。ところが，高濃度のカリウム(40mM)はOuabainの存在にもかかわらず，グルコース消費及び乳酸形成を促進するのである(表2)。(2)及び(3)の実験成績にもとづいて考察すれば，グルタミン酸の好気的解糖促進作用は全くともなってとり込まれるカリウムによるものであると結論することができる。グルタミン酸及びカリウムのとり込みの起らない条件ではmedium中にグルタミン酸が存在していても解糖促進作用は見られないが，同じ条件でもmedium中にカリウムを高濃度(40mM)に加えればK-効果は認められるのである。

(4) グルタミン酸もアスパラギン酸も，脳組織のホモジネートあるいはミトコンドリア分画の好気的解糖に対しては何ら影響を与えないが，mediumのカリウム濃度を高め

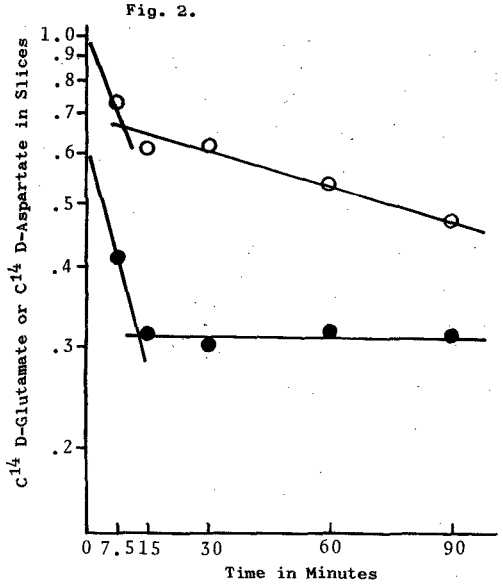
Table 2. Effect of ouabain on glucose metabolism: Its relation to the effects of D-glutamate and high concentration of K ions.

	Control		D-Glutamate added (5 mM)			K Ions (40 mM)	
	Glucose utilized, μmoles/g. in 1 hr.	Lactate formed, μmoles/g. in 1 hr.	Glucose utilized, μmoles/g. in 1 hr.	Lactate formed, μmoles/g. in 1 hr.	D-Glutamate accumulated, μmoles/g. in 1 hr.	Glucose utilized, μmoles/g. in 1 hr.	Lactate formed, μmoles/g. in 1 hr.
Control	23.4	24.8	31.1	42.3	66.8	47.7	55.6
Ouabain (10^{-5}M)	31.0	43.0	32.8	41.2	7.3	44.7	51.3

ば，ホモジネートにおいてもそのグルコース消費を増加させる。これは(3)の結論と矛盾しない成績である。ところが，アスパラギン酸の場合は，脳切片中にカリウムとともにとり込まれるにかゝわらず，解糖の促進を示さず，グルタミン酸に優先してとり込まれてグルタミン酸にともなうカリウムによる解糖の促進を抑制するのは何故であろうか。

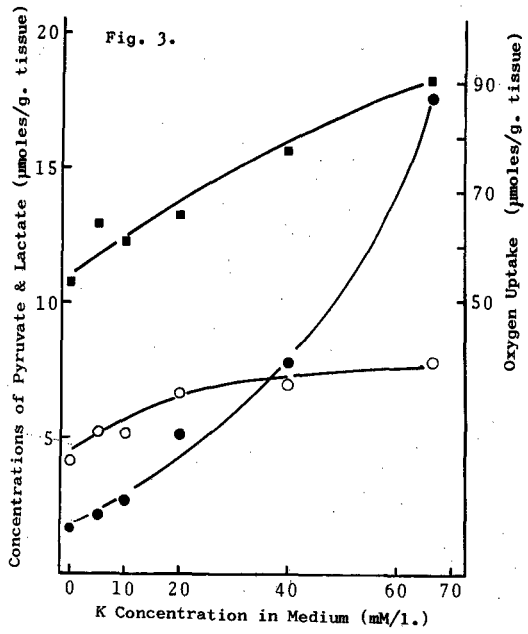
C^{14} D-グルタミン酸あるいは C^{14} D-アスパラギン酸を Medium に加えて脳切片を30分間 incubate したのち，cold な D-グルタミン酸あるいは cold な D-アスパラギン酸を含む Medium にかえてグルタミン酸及びアスパラギン酸の Efflux をしらべた。30分以後も，とり込みはさらに行なわれ切片中のアミノ酸の濃度は増加をつづけている。Efflux の経過(図2)は典型的な2相性を示し，最初の相は切片周囲についていた C^{14} アミノ酸の Wash out であり，第2の相が切片の細胞内にとり込まれていた C^{14} アミノ酸の Efflux を示している。まえの30分間にとり込まれた C^{14} グルタミン酸はかゝる条件で Medium 中の cold なグルタミン酸と交換するが，D-アスパラギン酸は90分にわたってほとんど Efflux を示さない。この事実は，とり込まれたグルタミン酸とアスパラギン酸とで細胞内での存在様式がことなることを示すものであって，ともなってとり込まれているカリウムの存在様式もまたことなっていることを示唆するものであると考えられる。脳切片の好気的解糖に対するグルタミン酸とアスパラギン酸の作用の相異はこの事実にもとづいて説明しうると思われる。

Fig. 2.



○ : C^{14} D-Glutamate in Slices;
● : C^{14} D-Aspartate in Slices.

(5)脳切片における高濃度のカリウムによる好気的解糖促進の機構を明らかにしようとして，解糖系の各 Intermediate の濃度を測定し，また各 Intermediate をそれぞれ基質とした場合のカリウムの効果をしらべた。解糖系のどの Intermediate を基質としても，補



● Pyruvate; ○ Lactate; ■ Oxygen Uptake.

欠因子を補えば，明瞭な乳酸形成の増加と酸素消費の増加を示した。図3に示すように，エノールピルビン酸リン酸(20mM)を基質として NAD^+ 及びADPを補って incubate したのち(1時間)，乳酸及びピルビン酸の濃度を酵素的方法で定量し，また酸素消費を測定した。解糖の最終段階であるピルビン酸キナーゼによるエノールピルビン酸リン酸からの直接の産物であるピルビン酸の濃度は，高濃度(40mM)のカリウムにより対象の10倍にも増加した。乳酸濃度及び酸素消費は1.5倍～2倍の増加を示した。この事実は，K-効果においては，ピルビン酸キナーゼの段階が促進されるために，解糖系の活性が増加しグルコース消費と乳酸形成が昂進するのであることを示していると考えられる。

III. 総括

以上の成績及び考察を総括するならば:

a) グルタミン酸の脳切片の好気的解糖を促進する作用は，ともなってとり込まれるカリウムの作用であることを示した。

b) 切片内にとり込まれたグルタミン酸は Medium 中のグルタミン酸と exchangeable であるが，とり込まれたアスパラギン酸は Medium 中のアスパラギン酸とほとんど exchange しない。従って同時にとり込まれているカリウムも，グルタミン酸にともなう場合とアスパラギン酸にともなう場合とで，切片内での存在様式が異なるものと考えられる。

c) 解糖系に対するカリウムの効果は主にピルビン酸キナーゼの段階，即ち，エノールピルビン酸リン酸→ピルビン酸の反応に対する作用に基づくものとして説明しうる。

文献: 1) Barker, S.B. & Summerson, W.H., J. Biol. Chem., 138, 535, 1941. 2) Bergmeyer, H.-U.(ed.), Methods of Enzymatic Analysis, New York, Academic Press, 1963. 3) Berl, S., Takagaki, G., Clarke, D.D. & Waelsch, H., J. Biol. Chem., 237, 2562, 1962. 4) Krebs, H.A. & Bellamy, D., Biochem. J., 75, 523, 1960. 5) Takagaki, G., Life Sci., No. 10, 759, 1963. 6) 高橋喜吉郎, 神経研究の進歩, 8, 611, 1964. 7) Takagaki, G., Hirano, S. & Nagata, Y., J. Neurochem., 4, 124, 1959. 8) Tsukada, Y., Nagata, Y., Hirano, S. & Matsutani, T., J. Neurochem. 10, 241, 1963. 9) Weil-Malherbe, H., Biochem. J., 32, 2257, 1938.

16 節後神経切断・白鼠剔出交感神経節のアミノ酸代謝の研究

永田 豊・渡部昌子
（東邦大・医・2生理）
塚田裕三（慶大・医・生理）

白鼠の頸部交感神経節は湿重量がわずか1mg程度しかないが，生体より剔出後も適当な環境の下ではシナップス伝達機能を長時間に亘って保ちながらincubate出来るので，神経組織の機能と代謝との関連を調べる目的には好適な材料である。我々は既に剔出交感神経節を用いて遊離アミノ酸の代謝，その能動輸送系，シナップス伝達機能におよぼすアミノ酸の影響等について研究を続けて来た[1][2]。今回は神経節の節後線維を切断することにより神経細胞を逆行性変性におちいらしめ大部分がグリア細胞によっておきかえられた神経節についてアミノ酸代謝の様相を検討し，グリア細胞の代謝的役割とニューロンとの関係について検索を行った。

〔実験方法〕

体重200g前後の白鼠の腹腔内にラボナール(40mg/kg)を注射，麻酔後，無菌的に片側の頸部交感神経節の節後線維を頭蓋骨に入る直前で切断して皮膚を縫合する。手術後1週間以至3週間後にウレタン(1～1.5g/kg)を腹腔注射麻酔し神経節を剔出し，顕微鏡下で周囲の結合織を注意深く除去する。神経節は，Standard bathing solution(SBS)[3]中で5% CO_2，95% O_2ガスを通じながら37°でincubationを行った。電気刺激は節前線維から与えられ，シナップスを伝達した活動電位を節後線維より誘導記録した。アミノ酸の定量は定量的ペーパークロマトグラフィー[4]及びアミノ酸自動分析器により行った。神経節の水分量の測定は，剔出した組織を110°，2時間以上乾燥したのち乾燥重量をmicro-torsion balanceで測定し，湿重量との差から算出した。神経節における逆行性変性の様相は，手術後種々の時期で組織学的検討を行った。

〔実験成績および考察〕

節後神経線維を切断後1週間以上経過した頸部交感神経節は，非手術側のそれとくらべて肉眼的に著明な膨大が認められた。これをヘマトキシリン・エオシン染色標本で組織学的に検索すると，神経切断側の神経節では神経細胞は殆んど脱落，消失して認められず，わずかに神経節周辺に一層の神経細胞を認めるにすぎない。この様な変化は一週後に既に認められ，3週後もほぼ同様の所見であった。神経細胞脱落後はグリア細胞乃至は線維芽細胞の著しい増殖によってとって代られる。この様な条件下では，

第一表

EFFECT OF POSTGANGLIONIC DENERVATION ON TISSUE WEIGHTS IN CERVICAL SYMPATHETIC GANGLION FROM THE RAT

	Wet Weight (mg.)	Dry Weight (mg.)	Wet Weight / Dry Weight	Water Content (μl.)
Control	0.871 ± 0.01 (3)	0.156 ± 0.03 (3)	5.59 ± 0.35 (3)	0.714 ± 0.02 (3)
Denervated	1.420 ± 0.12 (3)	0.225 ± 0.03 (3)	6.24 ± 0.43 (3)	1.193 ± 0.33 (3)
Change %	+ 63.0	+ 44.2	+ 11.2	+ 67.0

節前線維から極大電気刺激を与えても、節後線維からの活動電位を全く記録することは出来なかった。既に古くMAC INTOSH[6]は節前線維を切断して約2-3日以内に神経節内のアセチルコリン含量が著明に減少し、シナップス伝達の中断がおこることを報告しているが、この様な標本では神経節内の神経細胞の消失はない。ところが節後神経線維切断後1週間以上経過すれば神経細胞は大部分消失し殆んどグリア細胞のみとなるものと考えられるので、対側の正常の神経節を対照として神経節に於けるグリア細胞と神経細胞の夫々の機能的及び化学的特徴を把握することが出来ることになる。

第一表にみられる如く、節後線維切断後の神経節では湿重量が50%以上も増加する。この増加は単なる水分量のみの増加による膨化現象ではなくて、乾燥重量もともに増加しており、湿重量/乾燥重量の比の変化は比較的わずかである。従ってこの場合、水分のみならず固形物も増加していることを示している。即ち節後線維切断後の神経細胞の脱落、消失に伴って新らたに細胞が増殖したものとみなされなければならない。

次に神経節内の遊離アミノ酸量を測定した結果では、第2表の如く節後神経切断によってアスパラギン酸、グルタミン酸等の遊離アミノ酸含量には変化が認められない。γアミノ酪酸(GABA)はいずれの場合にも認められない。又C^{14}-ぶどう糖を含むSBS中で神経節を4時間incubateした場合、神経切断後の神経節でも正常神経節側と全く同じパターンを示しC^{14}-放射能のincorporationが主としてアスパラギン酸、グルタミン酸にみられ、GABAへの転入は認められなかった。このことから神経節に於けるグルコースからの遊離アミノ酸の生成系は主としてグリア細胞内で行われていることを考えさせる。又遊離アミノ酸としてグルタミン酸、アスパラギン酸が高濃度に見出されることは神経組織の特徴と考えられ、これよりすれば新たに増殖した細胞はグリア性の細胞であろうと予想される。

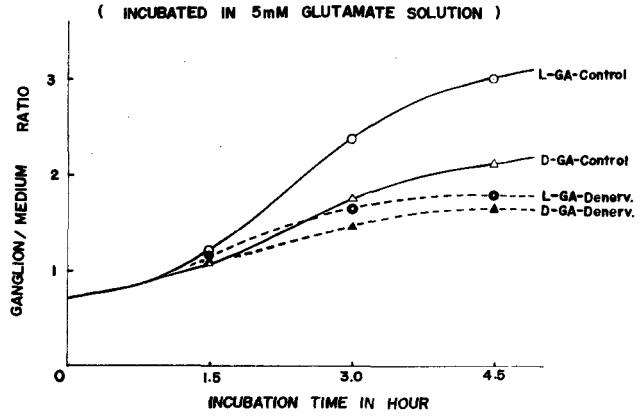
EFFECT OF POSTGANGLIONIC DENERVATION ON FREE AMINO ACID CONTENT IN CERVICAL SYMPATHETIC GANGLIA FROM THE RAT

(μ moles/g.wet wt. tissue)

	Aspartic Acid	Glutamic Acid
Control	3.93 ± 0.38 (9)	3.66 ± 0.66 (9)
Denervated	3.62 ± 0.37 (4)	3.76 ± 0.37 (4)

第一図

EFFECT OF DENERVATION ON TIME COURSE OF AMINO ACID ACCUMULATION INTO ISOLATED CERVICAL SYMPATHETIC GANGLIA (INCUBATED IN 5mM GLUTAMATE SOLUTION)



剔出交感神経節を5mMのグルタミン酸を含むSBS中で37°でincubateすると、正常の神経節は時間と共に周囲の溶液よりその濃度勾配に逆って能動的なアミノ酸のとり込みを示す。此の際L-グルタミン酸のほうがD-グルタミン酸よりも常に多量にとり込まれstereospecificityが認められる[7]。節後線維を切断した神経節ではアミノ酸のとり込みの様

相が異なり初め1.5時間の間は正常神経節のものと差異がないが3.0時間、4.5時間では、明らかにアミノ酸のとり込みが低値を示した。即ち正常神経節では4.5時間に亘ってそのとり込みは増加するのであるが手術神経節では3.0時間と4.5時間との間に差異がなくアミノ酸のとり込みが3.0時間で飽和に達するものと考えられる(第一図)。

このことから、溶液中のアミノ酸は先ずグリア細胞に能動的にとり込まれるが、そのアミノ酸蓄積容量が小さく3時間位迄の間に、飽和に達し、更にそれ以上は増加しないものと考えられる。一方正常神経節はグリア細胞の他に多数の神経細胞を含んで居り、アミノ酸は先ずグリア細胞にとり込まれそれに続いて、グリア細胞に接している神経細胞へと受渡され、そこに貯蔵蓄積されると考えられる。従って非手術側の神経細胞を含んだ神経節はアミノ酸を数時間にわたって持続的且つ能動的に蓄積してゆくことになろう。こう考えると、アミノ酸の能動輸送系も主としてグリア細胞が持って居る特性であり、ニューロンはグリア細胞からのみアミノ酸を唯受動的に貯えるものと考えられる。Ouabainは神経節のアミノ酸のとり込みをほぼ完全に抑制することが認められているが、神経細胞の興奮伝達には全く影響を与えない[3][7]。この現象もOuabainがグリア細胞の細胞膜に選択的に作用し、アミノ酸の能動輸送を抑制するが、神経細胞膜には作用せず、興奮伝達は正常に保たれるものと理解することが出来る。

尚第一図でみられる如く神経切断後の神経節ではL-グルタミン酸もD-異性体も、そのとり込みの上で差異がなく所謂stereospecificityは認められなかった。これに反し、正常神経節では明らかにstereospecificityが認められるのであって、このstereospecificityはグリア細胞の属性ではなくて、健全な機能状態にあるニューロンの膜の持っている特質であると考えなければならない。

我々は節後神経線維を切断後1週間経った神経細胞のみ脱落し、グリア細胞のみが非常に増殖した頸部交感神経節と、神経細胞のある正常神経節とを更に種々の面より比較検討することによって、グリア細胞の特性、神経細胞の特徴、更にニューロンとグリア間の密接な相互関係を追求中である。

(まとめ)

頸部交感神経節の節後神経を切断して1週間後には、その神経細胞は脱落消失して殆んどグリア細胞のみの標本を得た。この様な標品を用いてグリア細胞と神経細胞の生化学的特徴を区別して検索し合わせてこの両者の相互関係を検討した。

①:節後神経切断により神経節の湿重量、乾燥重量は著しく増加したが湿重量/乾重量の比にはそれ程大きな変化は見られなかった。

②:手術側の神経節の遊離アミノ酸含量は正常神経節のものと全く同様でありC^{14}グルコースからのグルタミン酸、アスパラギン酸の生成も変らなかった。

③:手術側の神経節も正常のものと同じ速度でアミノ酸を能動的にとり込むが、速やかに飽和点に達する。一方正常神経節ではこのとり込みは持続的に上昇した。

④:手術側の神経節ではアミノ酸とり込みに際してStereospecificityを示さずStereospecificityはニューロンの膜の属性と考えられた。

「組織学標本の作製に際しては東邦大病理川村貞夫講師の御協力を得た。ここに謝意を表わす。」

〔文献〕

(1) 永田，横井，塚田，(1965) 神経進歩，9 (3)，548
(2) 永田，横井，塚田，(1965) 神経化学，4，Suppl. 37
(3) LARRABEE, M.G., KLINGMAN, J.D. & LEICHT, W.S. (1963) J. Neurochem. 10, 594
(4) 塚田，永田，(1961) 生化学，33，51
(5) 中枢神経実験法，(生化学編)，(1966) 塚田，黒川編，医学書院，p. 59
(6) MAC INTOSH, F.C. (1938) Arch. Internat. Physiol. XLVII, 321
(7) NAGATA, Y., YOKOI, Y. & TSUKADA, Y. (1966) J. Neurochem. in press.

17 脳組織の3′，5′－ＡＭＰ濃度に及ぼす神経ホルモンの影響

垣内史郎（大阪府立中宮病院）
T.W.Rall（Western Reserve Univ.）

§1. Cyclic 3′,5′-AMPについての二三の考察

Cyclic 3′,5′-AMP（3′,5′-AMP）はadenylcyclaseの作用下にATPより生成し(4)，この物質に特異的なphosphodiesteraseによって5′-AMPに分解される(2)。一般化した作業仮説によれば"3′,5′-AMPが細胞内における唯一の作用は幾つかの酵素(系)の作用をmodifyすることであってその意味でこれは一種の"chemical Signal"とみなされる。adenyl cyclase及び"phosphodiesterase"はこの"chemical Signal"の量を制御することにより"細胞機能"の調節にあづかることを目的とした特殊な酵素系と言えよう。この仮説を支持する事実は第一にこの両酵素の分布が動物組織に広くゆきわたっていることであり(第1表)，第二にそこに見られる反応様式に組織特異性が見られることである。即ち，各組織のadenyl cyclaseはその組織に特異的なホルモンによって"activate"され(第2表)，一方かくして generateされた3′,5′-AMPによって組織にひきおこされる反応も又各組織の持つ特徴によって強く色どられている。次の例において3′,5′-AMPの関与していることが"見出されている。

例1.) glucagon又はepinephrine → liver → glucose output
例2.) ACTH → adrenal cortex → corticosteroid formation
例3.) LH → corpus luteum → progesterone formation

そこで，(I)その組織中の3′,5′-AMPの濃度はいかなる因子(ホルモン)によって制御されているのか，(II)3′,5′-AMPはその組織にいかなるphysiological Responseをひきおこすものか。という2ツの質問が個々の組織についてたづねられねばならない。

第1表. adenyl cyclase活性とphosphodiesterase活性の分布(4)(2)

Tissue (dog)	Adenylcyclase Units/100g	phosphodiesterase Units/g
Cerebral cortex	91	1233
Cerebellum	—	88
Skeletal muscle	32	48
cardiac ventricle	28	156
liver	11	120
Kidney cortex	13	176
spleen	34	128
lung	23	84
intestinal muscle	11	167
aorta	11	44
adipose	0.53	—

この他にUterus, Testis, Thyroid, Corpus luteum, Intestinal mucosa, Blood cells (pigeon)等にadenyl cyclase活性が証明され，又，milk, urine, sperm中に3′,5′-AMPが検出されている。

(I)に対するapproachとして組織のbroken cell preparationを用いてホルモンの影響を調べる方法が従来用いられて来た。(liver等)尚もなくbroken cell prep.（Homogenate等）は低感度のhormone responseしか示さぬ為この方法の用い得ない組織の多いことがわかって来た。脳組織はその一例である。この様な困難はbroken cell prep.の代りにintact cell prep.（スライス等）を材料として用いることで解決される。

(II)においてもはじめbroken cell prep.(isolated enzymes)を用いて3′,5′-AMPのphosphorylase系に対する作用(liver, skeletal muscle)，phosphofructokinaseに対する作用(heart)が調べられて来た。しかし実際に細胞中に働いているphysiologicalな機構を知る目的にはbroken cell prep.は材料として不適当である。しか

第2表　3',5'-AMPについての組織別ホルモン感受性

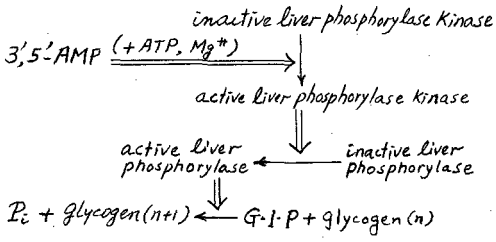
Tissue	Hormone	Reference
liver	catecholamines, HGF	B) Rall & Sutherland ('58) I) Sutherland et al. ('65)
heart	catecholamines	B) Rall & Sutherland ('58) I) Øye et al. ('64)
skeletal muscle	catecholamines	B) Rall & Sutherland ('58) I) Posner et al. ('64)
fat pad	catecholamines, ACTH	B) Kleiner et al. ('62) I) Butcher et al. ('65)
adrenal cortex	ACTH	I) Haynes ('58)
thyroid	TSH	I) Gilman & Rall ( )
toad bladder	ADH	I) Handler et al. ('65)
cerebral cortex	catecholamines, Histamine	I) Kakiuchi & Rall ('65)
cerebellum	catecholamines	B) Kleiner et al. ('62) I) Kakiuchi & Rall ('65)
	Histamine, 5HT	I) Kakiuchi & Rall ('65)
corpus luteum	LH	I) Marsh et al. ('65)
F. hepatica	5-HT	B) Mansour et al. ('60)
blood cells (pigeon)	catecholamines	B) Kleiner et al. ('62) I) Davoren & Sutherland ('63)

B) は broken cell prep. を I) は intact cell prep. を夫々材料として用いたもの。

もとでそのような目的に沿った定量法を考案しそれを脳組織に適用した実験を以下に述べる。(*)

§2. 組織中の3',5'-AMPの定量法

3',5'-AMP assayの原理は右のschemeに基く(3)。3',5'-AMPを含むサンプルをliverより調製したinactive phosphorylase kinase, 及びinactive phosphorylase (基質)と共にincubateし、生じてきたactive phosphorylaseの活性をP_iの遊離又はglycogenの生成によって測定(比色法)する。



組織中の3',5'-AMPの定量には次の点が考慮された。a) 3',5'-AMPの組織中の濃度は1 mμ mole/g wet weightも以下であり、b)上のassayを妨害する既知の(hexose monophosphate, nucleotide等)或は未知の物質が組織中に存在すること。a)はassay全体を微量化する(incubation mixture, total 15～75 μlに)ことにより又b)は組織抽出液をDowex 50のカラムでfractionateすることにより達成された。この前処理に伴う3',5'-AMPのloss(通常40～50%)を補正するために、既知量のRadioactive 3',5'-AMPを組織抽出液に加えておきisotope dilution法を適用して何々のサンプルについて補正を行った。

この定量法の感度は用いたRadioactive 3',5'-AMPのSpecific activityによって規制される。著者の用いた1.4 Curie/mmoleのH³3',5'-AMP (Schwarz BioResearch)で何々のcounting

もとintact cellに外部から3',5'-AMPをapplyすることによりそこに生ずるphysiological responseを期待し得るのはむしろ少数の除外例に属する。(前述の例1.), 例2), 例3)等) 一般に細胞外に与えられた3',5'-AMPは細胞中には入らないことが示されている。そこで細胞にホルモンを作用させてendogenousの3',5'-AMP濃度を操作し、その際に見られるresponseを解析的に追跡する方法が考えられる。この場合組織中の3',5'-AMP濃度を測定することが前提となる。以上、(I)(II)の何れの質問に答えるためにも組織中の3',5'-AMP濃度を定量する方法を確立することが基礎となる。

著者がDr. Rall (Western Reserve University, Cleveland, OHIO, USA)の

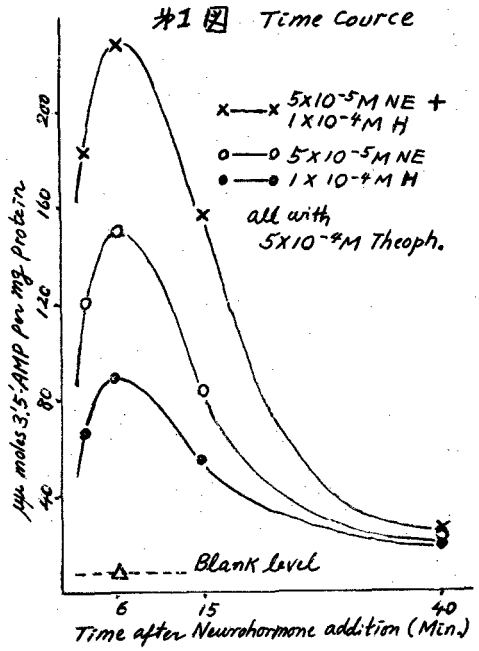
(*) この研究の一部は既報：Kakiuchi, S., Rall, T.W.: Federation Proc. 24, 150 (1965)
又実験の詳細は他誌に発表予定

Sample が net 40 cpm (by Scintillation Counter) 程度を含む條件では一つのサンプルとして最低 50mg 位の腦組織を必要とする。

§3. 腦組織の 3',5'-AMP 濃度に及ぼす神經ホルモンの影響

先ず實驗法を述べる。家兎を斷頭して得た腦の必要部位から McIlwain 型 chopper を用いて厚さ 0.3mm に切片を作り，その 100～300 mg 量を 25 ml の Ringer-bicarbonate-glucose medium 中にて 37°C で 30 分間 Preincubate し，medium を換えて更に 12 分間 Preincubate した後神經ホルモンを medium に添加した。それから一定時間を經た後に切片を液体窒素中に移して固定した。Preincubation / incubation の全期間中 medium は 95% O_2 - 5% CO_2 にて通氣された。固定された腦組織は前述の如く 3',5'-AMP について定量された。切片の秤量をさけて蛋白定量をもってこれに代えた。切片中の 3',5'-AMP の濃度の平均値は略 6 μμ moles per mg protein を示し，これは略 0.9 mμ moles per g wet weight に当る。

第1図 Time Cource



小腦組織を用いて各種神經ホルモンの効果をスクリーニングした結果，L-Norepinephrine (NE), Histamine (H) 及び Serotonin (5-HT) の添加によって組織中の 3',5'-AMP が著しく増加するのを見出した。phosphodiesterase に対する阻害剤として知られている Theophylline (Theoph.) を単独に medium 中に添加（終末 $2x10^{-3}M$，及び $5x10^{-4}M$）した場合小腦組織の 3',5'-AMP は 20～30% 増加したのみであった。Theoph. が medium 中に NE と共存した場合，Theoph. ($5x10^{-4}M$) が NE の作用を更に 2.5～3 倍に増強するのを認めた。これは NE の作用が phosphodiesterase をおさえるのではなくて 3',5'-AMP の生成系 (adenyl cyclase) に対して働いていることを示しており，從來からの知見に一致する。

第1図に小腦組織に見られた hormone response の time course を示す。図は Theoph. 添加の場合であるが，Theoph. 無添加においても図と非常に似かよった形の反応を得た。NE ($5x10^{-5}M$) による組織中の 3',5'-AMP の増加は blank 値（ホルモン無添加値）に対してピーク値（添加 6 分後）で約 20 倍 (Theoph. 共存) 及び約 7 倍 (Theoph. 無し)，又 plateau 値（添加 40 分後）では夫々約 2 倍 (Theoph. 共存) 及び約 1.3 倍 (Theoph. 無し) であった。5-HT ($1x10^{-4}M$) によっては 3～4 倍の値を得た (Theoph. 共存下)。half-maximal response をひきおこす神經ホルモンの濃度は NE について $4x10^{-6}M$ (at 6') 及び $4～8x10^{-7}M$ (at 40')，又 H. については $1x10^{-5}M$ (at 6') 及び $1～2x10^{-6}M$ (at 40') であった。

次に第1図に見られる "fade out" 現象の機構を調べるために行った實驗が第3表である。即ち NE 添加後 34 分を經て平衡に達した小腦切片は再度の NE 添加に refractory である（第3表，#3）が H の添加には良く反応した（#4）。はじめに H を添加した場合にも同様の結果を得た。從って第1図に見られる "fade out" 現象は medium に添加されたホルモンが分解したためでなく（#5 參照），又腦切片が denatur したためでもなり。

第3表　ホルモン2重添加

第1回添加 at 0′	第2回添加 at 34′	3′,5′-AMP at 40′ *)
1) None	NE	105
2) NE	None	28
3) NE	NE	23
4) NE	H	94
5) None	Slices transfered to #2) medium	91
6) Blank slices, incubated for, 10′		6.3
	40′	6.5

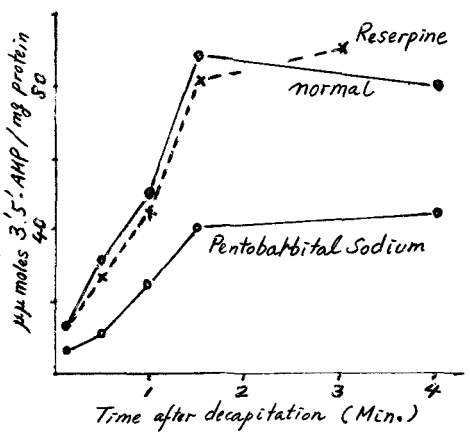
*) μμ moles per mg protein

更にこの実験はNE及びHの作用が夫々に独立した機構により発現することを示している。第1図でNEとHの同時添加の効果が両者個々の効果の和となっていることもこれを支持する。又阻害剤を用いた実験も上記を裏づけしている。即ちDichloroisopreterenolの添加によりNEのの作用が，又Dibenzylline及びDiphenhydramineによってHの作用が夫々選択的に阻害された。

大脳皮質を材料とした場合は小脳の場合とは異った形の反応が認められた。即ち大脳皮質はNEに対して小脳よりも低い濃度(5×10^{-6}M)で反応がmax.となり且つ添加後3分以内でmax.に達した。しかしそれによって得られる3′,5′-AMP濃度の上昇はblank levelの約2倍にとどまる。一方H(1×10^{-4}M)の添加によって組織中3′,5′AMP濃度はblank値の20倍以上に達した(Theoph. 共存)。ピークはHの添加後15～20分において見られ，続いての減少は小脳組織の場合に比して非常にゆるやかであった。Hypothalamus，Caudate nucleus，及びbrain stemを材料とした場合にもNE＜Hという形で反応が見られた。

以上により脳組織の3′,5′-AMP濃度に対するホルモン性調節にはNE感受性及びH感受性の少くとも2つの独立した機構(Receptors)が関与しているものと結論される。しかしこれをホルモンの側より眺めるとき，NE或はHそれ自体がin vivoにおいて実際にこの機構に関係しているという証拠はない。

第2図　3′,5′-AMP濃度の断頭後変化



家兎大脳皮質中の3′,5′-AMP濃度の断頭後の変化を調べたのが第2図である。Nembutal (30 mg/kg i.v.) 処理家兎の断頭直後にisopentane-liquid N_2 中に固定した大脳皮質中の3′,5′-AMP濃度は1 mμ mole/gであってBreckenridgeの報告した"in situ level"に良く一致する(1)。断頭90秒後における大脳皮質中の3′,5′-AMP濃度はこの"in situ level"の10倍以上に上昇し，これは家兎をあらかじめReserpineで処理(0.5 mg/kg, 1.0 mg/kg, 2.5 mg/kg S.C. と3日間)した場合でも，又Diphenhydramineで処理(14 mg/kg i.p.)した場合でも変らない。

脳組織が3′,5′-AMPに関してこのように大きなhormone responseを示すことは，哺乳動物の各組織について調べられたadenyl cyclase及びphosphodiesteraseの分布が脳組織で最高の値を占める事と共に，3′,5′-AMPが脳で果たす特能の重要性をsuggestするものである。

(文献) 1. Breckenridge, B. M., Proc. Nat. Acad. Sci., 52, 1580 (1964)
2. Butcher, R. W. and Sutherland, E. W., J. Biol. Chem., 237, 1244 (1962)
3. Rall, T. W. and Sutherland, E. W., J. Biol. chem., 232, 1065 (1958)
4. Sutherland, E. W., Rall, T. W. and Menon, T., J. Biol. Chem. 237, 1220 (1962)

18 Glia Cell－line （培養株）とその性状
－とくに細胞別の単離培養株との比較から－

中沢恒幸・鶴水　隆・望月延泰（慶大・医・神経）
塚田裕三・野口鉄也（慶大・医・生理）
立沢　寧（慶大・医・相沢内科）

Glia cell-line については すでに1、2の学会に発表したごとく、その採取法はきわめて再現性が高い。（図1）。現在同一方法により ラットより大脳皮質、全白質、視床下部、脊髄よりの Glia cell-line を樹立中である。これらのものは Glia と表現される2種（astrocyte と oligodendrocyte）以外に血管由来細胞系あるいは結合織細胞系の混入の恐れを完全に否定できない。この神経細胞以外のいわゆる Massive cell-line に残される疑問を解くために、夫々の細胞種別に単離培養（cloning）した結果につき比較報告する。

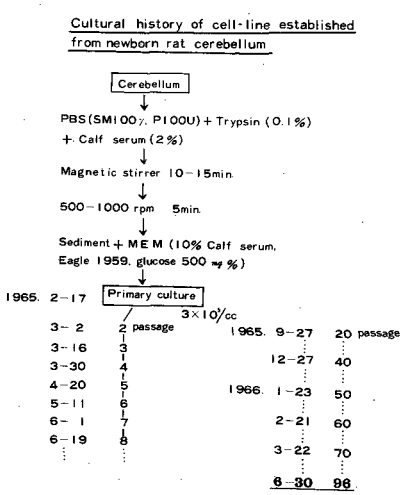
1、Glia cell-line のとり方と現在まで（図1）

新生ラット大脳を細切しストマイ、ペニシリン加塩類溶液と Trypsin 0.1%、小牛血清 0.5% を含む液（100cc. 内に4～5ケの小脳を入れる割合）に入れ Magnetic stirrer で ゆっくりまわし、500-1000 rpm で5分間遠沈し沈渣に、10% 血清を含む Glucose 500mg% に高めた Eagle MEM（1959）に 3×10^6 cell/ml で浮遊させ静置培養にもって ゆく。増殖した細胞群が静置のガラス面に cell sheet をつくると、つぎの瓶に継代する。現在17ケ月 102 継代である。

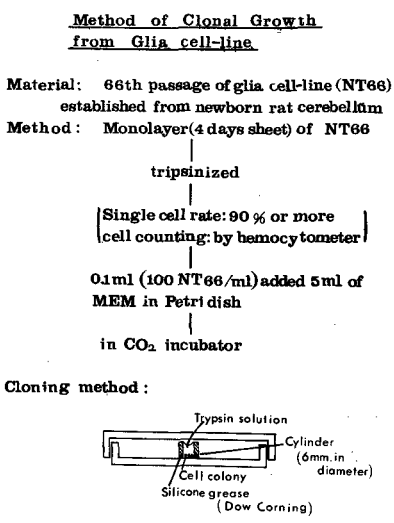
2、Clone クローン分離法（図2）

Glia cell-line 66継代細胞（NT66 と略す）の4 days sheet を作り tripsinize し、血球計算板で Single cell rate が 90% 以上であることを確認した上で 100 cell/ml の細胞浮遊液を作り、その 0.1ml を Petri dish にとりこれに 5ml MEM をかえ CO_2 incubator で培養する。数日後 Petri dish のガラス面に少くとも千種の Colonies がえられる。このことは Glia cell-line 内に Cell genetical に千種類の細胞があるということであるが、このうちの2つの細胞種を継代することができた。倒立顕微鏡で Colony を確認し、その上に Silicone grease をぬった Cylinder（内径 6mm）を立て、Cylinder 内に Trypsin 液をおとし細胞浮遊液を作り、それを瓶にうつし継代する。今回は NT66', NT66'' の2つの Subline につきのべる。

（図1）



（図2）

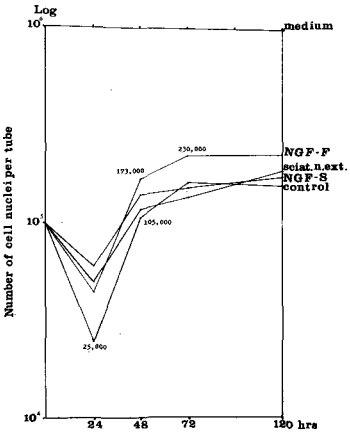


3. Cell-line の性状

1) 細胞学的検索：

増殖をつづける細胞でその生物化学的性状をみる前に、つねに細胞がどのような状態にあるかが検索されねばならない。(i)細胞核の大いさは 23.1～18.6 μ で世代を経るにつれ少しづつ小さくなる傾向。(ii)染色体数は 39、その deviation は世代により大きく変らない。(iii)^{3}H-uridine の核内 uptake を microradioautograph でみると 3 hrs で peak になりこれは初代培養で確認された glia（主として Astrocyte）の結果と一致する[1]。(iv)初代培養で glia 系を増殖させる牛類下腺抽出の神経生長因子 NGF と伴ってえられる F-分画（ポスト次アセトン分画をアクリノールで処理してえられる）は、この cell-line の増殖率を高める（図3）[2]。(v) Generation time は 15 hrs である[1]。

Comparison of the effect on the proliferation of the glial cell-line among the NGF-S and NGF-F (図3)



2) 遊離アミノ酸組成：

大型 Roux 瓶でえられる 6 days sheet の Cell-line (NT69) と cloning された単離 Subline NT66' を比較した。Shibata アミノ酸自動分析装置 AA 600型（Column 100 cm × 内径 3 mm）を使用、アルコール除タンパク後、塚田・野口法[3]により 3 段切換え（pH 3.25, 4.25, 8.89 - 0.2 N Na-citrate）により測定した。

図4には神経細胞を除いた glia cell-line（4種の細胞を含む、NT69）と単離培養した Subline NT66'、および establish したもとのなるべくらのラット小脳を比較している。Glia cell-line は NT-69, NT-66' とも GABA を検出できない。また Asp/glu が Massive cell culture である NT-69 は 1 : 5.5 で $GluNH_2$ が glu より少く、ほぼ脳の性状を維持しているに対し、NT-69 の中の 1 つの Subline である NT-66' は glu に比し Asp の量が増加している。

(図4) Content of free amino-acids in glia cell-line

Free amino acids	Glia cell-line: Massive cell-line (NT-69)	Glia cell-line: Cloning subline (NT-66')	Newborn cerebellum (micro Mol/gr.)
Asp.	1.224	0.988±0.060	2.152
$GluNH_2$-Ser.	4.040	0.815 ± 0.073	7.244
Glu.	5.336	1.702 ± 0.092	7.436
Pro.	1.071	0.491 ± 0.089	
Gly.	0.958	1.512 ± 0.006	1.902
Ala.	1.428	0.832 ± 0.008	0.552
Cys.	0.262		
Val.	1.338		
Ileu.	0.568	0.327 ± 0.075	
Leu.	0.956	0.720 ± 0.073	
Tyr.	0.726	0.389	
Phe.	0.629	0.373	
GABA			3.248
His.		0.428 ± 0.062	
NH_3		2.911 ± 0.639	
Arg.		0.508 ± 0.022	

培養液として使用した Eagle MEM は大量の $GluNH_2$（glu はなく）を含みこのアミノ酸組成より medium contamination は否定できる。Cell-line の母体である小脳では勿論 GABA が存在する。

3) 脂質：

上記 NT-69 を Wherrett and Cuming 法[4]で抽出し薄層クロマトに展開した。Solvent system はクロロホルム・エタノール・水で nonpolar の燐脂質を、ヘクサン・エチルエーテル・酢酸で Cholesterol-ester と Triglyceride を展開、Methylation は硫酸メタノール法を用いた（後略）。

(図5) Fatty acid composition of individual lipid in glia cell-line.

Sample	Phos-serine A	Phos-serine B	Sphingomyelin A	Sphingomyelin B	Phos-choline A	Phos-choline B	Phos-ethanol. A	Phos-ethanol. B	Chol-ester A	Chol-ester B	Triglyceride A	Triglyceride B
14:0	6.6	5.4	7.4	7.1	3.0	2.2			7.3	7.3	3.8	
16:1a*							10.1	9.4				
16:0	46.7	46.3	60.3	58.4	36.0	41.7	27.3	29.1	52.2	53.7	38.6	
1		4.3			4.8	4.5				tr	2.8	
17:0	11.1	11.9	15.3	16.1	5.3	4.5			16.3	14.6	8.6	
18:1a*		tr	tr	tr			16.3	16.5	tr	tr	tr	
18:0	24.2	21.2	9.6	11.4	12.0	12.9	18.1	15.0	10.4	9.8	14.1	
1	11.4	11.5	tr	tr	19.2	12.8	6.9	5.3	5.0	6.4	15.1	
2	tr	tr			10.3	11.6	4.3	3.5	tr	tr	5.3	failed
3						tr		tr	tr		tr	
20:0				tr	tr	tr		tr	tr	tr	tr	
3*	tr	tr	tr	tr	2.8	2.0	tr	tr	tr	tr	2.0	
4	tr	tr	tr	tr	6.5	7.7	17.0	21.2	3.0	3.7	2.0	
22:3*	tr							tr			4.0	
4*	tr	tr	7.4	7.0	tr	tr		tr	5.9	4.5	7.9	

percentage composition
(* not identified by authentic sample)

(図6) Incorporation of ^{14}C-acetate(spec.act. 10.0 mc/mmol) into lipid fractions of glia cell-line.

Incubation time / Fractions	Radioactivity (cpm) 30 min	3 hr
Total C-M extract	360	579
Cholesterol	108(87)	130(116)
Cholesterol ester	106	130
Triglyceride	40	50
Unidentified fraction	36	53
Total phosphatides	11	27
Phosphatidyl serine	10	11
Sphingomyelin	15	8
Phosphatidyl choline	20	failed
Phosphatidyl ethanolamine	8	12

Incubation conditions: ^{14}C-acetate concentration 0.5 microc/ml in Eagle MEM. 37 ℃.

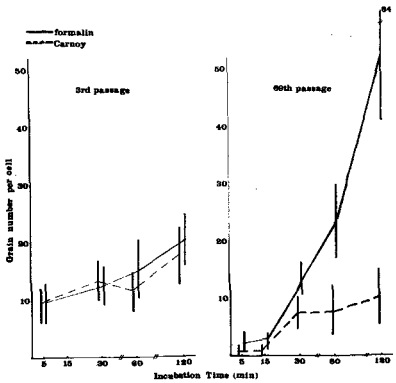
燐脂質は Phosphatidyl-serine, Sphingomyelin, Phosphatidyl-choline, Phosphatidyl-ethanolamine を認め Lysolecithine, 糖脂質は~~第~~。また Cholesterol-ester と Tryglyceride および同定不能の分画を認める。図5は各脂質の脂酸構成で Palmitate が多く正常腦に非常に少い odd number のものもある。

1960年 Brady[5] はラット腦で Acetate から Palmitate が出来ると報じた。そこで ^{14}C-acetate を NT-69 の Cell-line に加え Radioactivity Counter (Aloka Radiation Counter TDC-2, Detector. Windowless Typ. FC-1E. 1350 Volt.) および Radio-Gas Liquid Chromatography (YANAGIMOTO GCG-5DH equiped with Hydrogen FID, Radioactivity は $^{14}CO_2$ で測定. Column (4×150 mm) packed with 20% Polyethyleneglycol succinate + Chromosorb W (60–80 mesh), Column temp. 195°C, Detector Temp. 150°C, Sample Chamber 300 C. Heliam Gas 1.0 kg/cc 25 ml/min. Hydrogen Gas 25 ml/min. Air 1000 ml/min to FID, 100 ml/min to Counter, Scavenge Gas 70 ml/min. Applied Voltage 1300 V. Time Constant 3 sec. Full Scale 3000 cpm. Oxygenation 700°C catalyzed with CuO) で検べた(図6)。その結果 free Cholesterol, その ester に(カッコ内は Solvent system を変えた場合)、その他 Tryglyceride などに とり込みを認めるが Total phospholipid には入らない。また ^{14}C-acetate の一方を脂肪溶媒を含む Carnoy 液で、他方を Formalin で固定し Microradioautograph を作ると世代の若い cell-line と、1年余を経たもので年次を経た細胞が脂質をもつことが解る(図7)。Folch や A. Torvik は Carnoy 液処理で残る脂質は3%であるという。これらの結果から glia cell-line の脂質は originalのものから可成り変化していると考える。

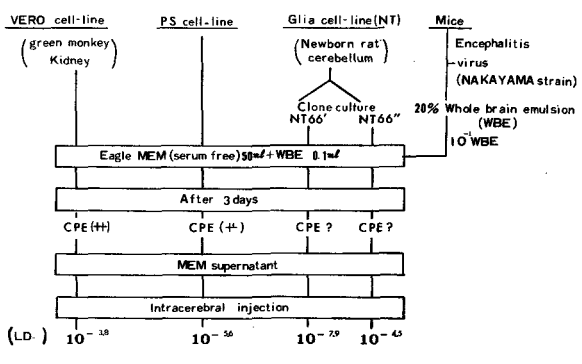
4)日本脳炎ヴィールス感受性:

Cloning した2種の単離培養 Subline NT66', NT66" と従来よく用いられる VERO, PS 株細胞を比較した。図8はその術式を示す。マウスにヴィールスを接種しその Brain emulsion

(図7) Activity in formalin- and Carnoy-fixed glia cell-line of the 3rd and 69th passage at various incubation time after treatment of ^{14}C-acetate.



(図8) Virus sensitivity on glia cell-line



の0.1mlを血清欠のMEMに入れ各cell-lineとともに3日間培養（註・培養24hrsで培養液内のヴィールスはほとんど死滅する）後、MEM上清をマウス腦内に注射する。もし上清にヴィールスが増殖していれば稀釈しなければLD50がえられない。その結果腎系のcell-lineでは$10^{-3.8}$～$^{-5.6}$でLD50がえられるのに比しNT66'は$10^{-7.9}$以上であった。すなわちこのSublineは日本腦炎ヴィールス感受性がきわめて高い。NT66"はこれに反した理ではない。

5) 単離培養Subline NT66'の溶性タンパクとその抗血清：

NT66'Sublineを超音波処理にて水抽出し（野口による）その2mg/headをFreund'Adjuvantにして家兎下肢趾間に接す。1ケ月後試験採血し抗体価測定し、さらに同量の追加免疫1週間後に全採血した。その血清を飽和硫酸アンモニウムでγ-2-globulinにfractionateし、これをFITCでconjugateしSephadexおよびDEAE-cellulose columnで精製した。この蛍光抗血清を一方はラット腦に、一方はglia cell-line NT69, NT66', NT66"に接し、細胞固定した。

4. 以上に基いて

従来gliomaよりCell-lineを維持しえた1、2の報告はあるがその性状は形態学的検索で論じられるに止っていた。正常腦より樹立した5種のCell-lineのうち小腦からのもの（NT系）は細胞学的検索や、遊離アミノ酸組成、溶性タンパクなどでgliaであると同定しうる。ただそれよりえた単離培養のNT66'系はその遊離アミノ酸組成が不成りことなっているばかりでなく日本腦炎ヴィルス感受性がきわめて高い。図3にあるごとくヴィールスによりCytopathic Effect（ヴィールス増殖による細胞死、CPE）は腎系細胞につよくglia系には殆んど認めない。にも拘らずヴィールス増殖をみる（LD50で）のはNT66'系の或状態のときヴィールス増殖が爆発的に高まり、その状態の細胞のみへ急速死滅破壊が著くるためCPEとしてガラス面上に残ることが少いのではないかと考える。その根拠の一つとして腎系細胞は1回限りのヴィールス接種しかできないが、NT66'系は1度接種すればその後に正常MEMで培養しうるばかりでなく、さらにそのMEMで再びLD50が10^{-6}以上の感受性を示す。これは従来のヴィールス学で認められなかった特殊の細胞系であるばかりでなく、過去において日本腦炎ヴィールスのglia内増殖を確認しえなかったことに対する新しいapproachを与え病態生化学への道を開くものと思う。とはいえin vitroのこれらgliaが本来あるべき要素をどこで失ったか、新しい適応をどのくらい持っているか、さらに従来の分類にあるAstrocyte、Oligodendrocyteは Cell genetical に本質的に分離しうるものなのか　など言及する。

引用文献

1. 小宮英靖他：神経グリア相関の実験的研究（抄）第七回日本神経病理学会、1966.
2. 中沢恒幸：　腦と神経 18, 4: 344, 1966.
3. 塚田裕三他：中枢神経実験法、生化学編、1966.　医学書院.
4. Wherrett, J.R et al：Biochem. J. 86, 378, 1963
5. Brady, R.O.：J. Biol. Chem. 235, 3099, 1960.

19 異染性白質変性症および Gargoylism 脳皮質の脂質分布－糖脂質の変化を中心として－

横井　晋（群大・医・精神神経）
酒井正雄・田野稔郎・
金子善彦（横浜市大・医・神経）

われわれは，これまでに lipidosis と呼ばれる一群の疾患について，その脳の糖脂質分析を行ない，いくつかの知見をその都度発表して来たが，[3),(7),(11)] 今回，異染性白質変性症（MLD），Gargoylism の大脳皮質の分析を行ったので，それらの糖脂質の変化について報告する。

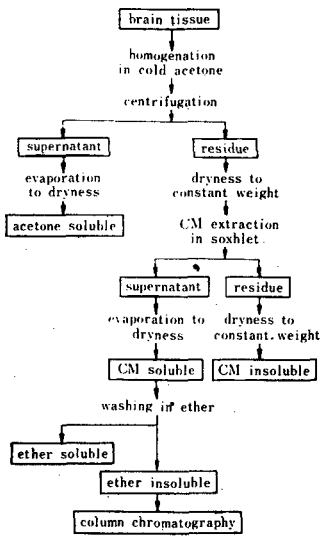
I. 材料

分析に用いた脳材料はいずれもホルマリン固定のもので，MLD の症例は3例，その1例はわれわれの経験した成人型である。2例は幼児型で，それぞれ東大小児科，北大精神科から分与を受けたものである。また，Gargoylism は4例，いずれも幼児型でそれぞれ東北大病理，東大病理，新潟大脳研（2例）より分与を受けた。これらの症例はいずれも，臨床所見，組織学的・組織化学的検索により診断が確定されている。対照例には中枢神経系に変化のないことが確められている2才と11才のホルマリン固定の脳材料を用いた。

II. 分析方法

脂質の抽出，分析は我々の本会で発表した方法をそのまゝ用いた。[3),(4)] 要約すると，脂質の抽出法は図1に示したごとくに行い，糖脂質の分析には，硅酸・硅藻土（2:1 w/w）のカラムで，Chloroform-Methanol（C-M と略す）の混合比を階段的に変えて elute し，10ml づつ分劃採取する。分劃採取したものの各々から一部をとって，糖をガラクトースを基準として測定し，図2のような流出曲線を画き，それに基ずいて6～8の分劃に大別して，減圧乾燥する。各分劃については，硅酸薄層クロマトグラフィー（TLC）により脂質の同定を行った。同定に用いた標準品は東大山川民夫教授，東北大鈴田章助教授より分与された各種の糖脂質を用いた。溶媒系は C:M:水（65:25:4 %，60:35:8 %）あるいは n-propanol:水（7:3 %）を用いた。

図1　脂質抽出法



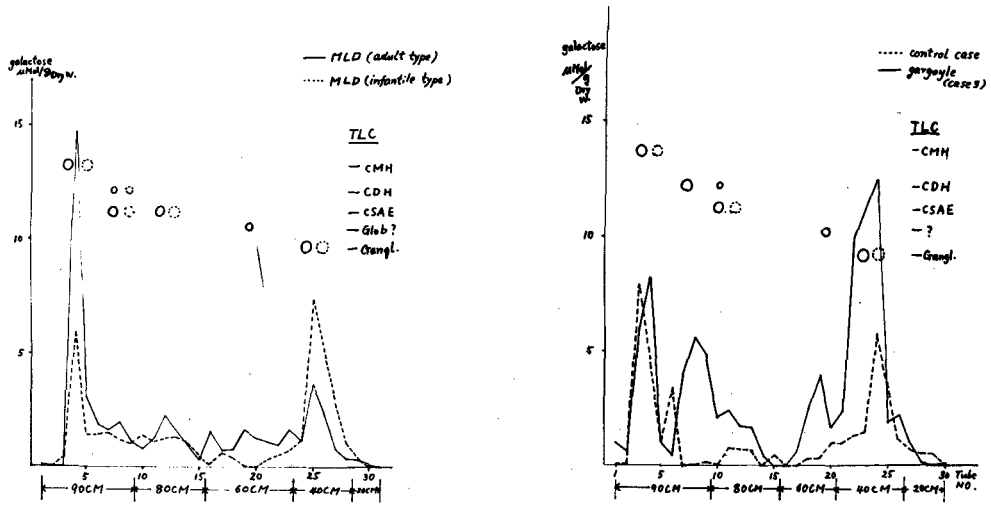
脂質の構成成分の測定には糖は Anthrone 法，燐は King 法，Cholesterol は，Zak-Henly 法を用いた。

III. 分析結果

各脂質の粗分劃は表1に示す通りである。Acetone 可溶部は中性脂肪と Cholesterol，Ether 可溶部は燐脂質，Ether 不溶部は糖脂質と Sphingomyelin がその主な

図 2　糖脂質の column chromatography 流出曲線

a) MLD (成人型)—実線, と MLD (幼児型)---破線　　b) 対照例---破線, と Gargoylism ← 実線



註 1) 縦軸は Galactose としての μMol/g 乾燥重量で示してある. 横軸は 試験管番号.

2) 図の右上方には各分劃中に TLC で認められた spot を模式的に示してある.

る構成脂質であって, 各症例とも粗糖脂質の増加あるいは減少は認められなかった。

糖脂質分劃のそれぞれについて TLC を行ってみると, Ⅱ分劃は Cerebroside (CMH), Ⅱ′分劃は Ceramide-di-hexoside (CDH) が混在するが, 大部分は Cerebroside sulfric acid ester (CSAE) であり, この分劃は次の Ⅲ 分劃に合わせて CSAE 分劃と見なすことが出来る。Ⅲ 分劃は CSAE である。Ⅳ, Ⅳ′分劃には糖脂質は認められないが, Gargoylism や Tay-Sachs 病では糖をもった脂質が存在する。Ⅴ分劃では Sphingomyelin が混在しているが, 主要成分は Ganglioside である。

表 1　大脳皮質の脂質粗分劃

(単位は mg/g (乾燥重量))

症　例	アセトン可溶部	エーテル可溶部	エーテル不溶部
MLD 成人型	126.8	42.7	70.0
〃 幼児型 I	143.0	133.2	76.0
〃 〃 II	141.7	30.4	86.1
Gargoylism I	140.3	73.1	111.2
〃 II	174.9	37.1	88.1
〃 III	145.9	56.4	85.8
〃 IV	172.2	69.1	87.0
対照例 (2才)	141.8	83.1	47.0
〃 (11才)	146.5	64.5	79.8

表 2 は糖脂質分劃の値を示したものであるが, これを TLC の結果と合せ考えると, MLD 群では CSAE の増加が全例に認められ, 特に CMH/CSAE の比をみると, この傾向がはっきりしてくる。このことは Gargoylism でも同じであって, CSAE の増加が認められる。

一方 Ⅴ分劃については, MLD 群では成人型は減少し, 幼児型では増加していることが解る。さらに, Gargoylism では全例でこの分劃の増加が認められ, Gargoylism では ganglioside の増加が認められるという従来の知見と一致する。しかし, その Ganglioside の種類については, MLD では正常脳に存在するものと同じ Rf を示す Ganglioside しか認められ

表2　大脳皮質の糖脂質分劃

（単位は mg/g(乾燥重量)）

	Ⅱ	Ⅱ′	Ⅲ	Ⅳ	Ⅴ	その他	CMH/CSAE
MLD 成人型	23.1	5.2	6.4	5.9	16.1	12.4	1.99
〃 幼児型Ⅰ	14.9	4.4	8.1	2.7	36.3	9.5	1.19
〃 〃 Ⅱ	20.1	—	18.2	13.2	27.2	7.4	1.10
Gargoylism Ⅰ	24.9	0.4	12.3	12.3 (4.8)	44.7 (23.2)	16.7	1.96
〃 Ⅱ	15.6	8.0	10.2	18.7 (11.8)	24.1 (5.5)	18.4	0.86
〃 Ⅲ	18.9	—	10.3	10.5 (3.8)	24.3 (7.4)	21.8	1.83
〃 Ⅳ	18.7	6.9	9.3	4.5 (0.5)	24.6 (9.7)	21.9	1.15
対照例(2名)	8.9	—	3.2	—	18.7 (6.6)	16.4	2.76
〃 (11名)	23.2	—	6.7	4.4 (3.4)	26.2 (19.7)	15.9	3.46

註：Ⅳ，Ⅴ分劃の（　）は夫々の分劃に含まれている燐脂質量（P%×25）である

ないが，Gargoylismでは正常脳に存在するganglioside より高いRfを示し，TLC上でBial反応を調べると陽性のganglioside が存在している

Ⅳ．考　察

MLDの白質の脂質分析の結果は，われわれの分析例も含めて，最もいちじるしい特徴として，成人型も幼児型もCSAEの著しい増加と，CMHの減少，それに伴うCMH/CSAEの比の減少があげられている。これに反して，皮質では白質に見られるような著明な変化は報告されていない。乳児型の皮質ではCSAEの増量の認められない症例の報告もある。成人型については，皮質に軽度のCSAEの増加が認められているにすぎない。[3] [8]

われわれの症例では，白質に見られるような著しい変化はないにしても，MLDでは対照と比べてCSAEの増量が認められ，成人型と幼児型とを比較するとCSAEの増加は幼児型の方が著るしい。

Gangliosideの変化については，成人型では減少し，幼児型では増加している結果を得たが，そのGangliosideを対照例や新鮮脳から得たGangliosideと比較すると，正常では存在しない異常なGangliosideは認められなかった。しかし，その構成パターンとなると，かなり変化が認められるが，脳材料をホルマリン中に固定，保存すると時間の経過と共にいくつかあるsialic acidがGangliosideから次第に失われていくという鈴木[9]の報告もあり，今回得られたMLDのGangliosideの構成パターンがただちに異常であると断定することは出来ない。

Gargoylism脳では従来Gangliosideの増量が認められており[1] [6] われわれの症例でも同じ結果を得ている。しかし，われわれの症例では，Ⅳ分劃にTLCで正常脳にみられるGangliosideよりも高いRf値を持ち，むしろTay-Sachs脳に見られるGlobosideに近いRf値を示し，Bial反応陽性のGangliosideが認められる。このGangliosideがTaghavy[10]が，Gargoylism脳より分離した新しいGangliosideと果して同一のものかどうかは今後の検索にまたねばならない。

Gargoylism脳で，われわれは皮質にCSAEの増量を認めたが，この所見は従来の報告には記載されていない。現在CSAEの代謝障害と考えられるMLDでHolländer[2]は組織化学的にではあるが，酸性粘液多糖類（AMPS）の増加を認めている。一方AMPSの代謝障害とも考えられているGargoylism脳でCSAEの増加が認められたことは，いずれも一次的の変化ではないにせよこの二つの物質代謝，あるいは疾患群の間の何らかの関連

を示唆する意味で極めて興味深い所見といわねばならない。

V 文 献

(1) Brante, G. : In Cerebral Lipidoses ed. by v. Bogaert, Cumings, 1957.

(2) Holländer, H. : J. Neurochem., 12 : 335, 1965.

(3) 猪瀬他 : 神経研究進歩, 9 ; 501, 1965.

(4) 猪瀬他 : 神経化学, 3 ; suppl. 96, 1964.

(5) Jatzkewitz, H. : Z. physiol. Chem., 318 ; 265, 1960.

(6) Klenk, E. : Wien. Ztschr. Nervenheilk., 13 : 309, 1957

(7) Sakai, M. & Tano, T. : Yokohama Med. Bull., 16 : 57, 1965.

(8) Sourander, P. & Svennerholm, L. : Acta neuropath., 1 : 384, 1962.

(9) Suzuki, K. : J. Neurochem., 12 : 629, 1965.

(10) Taghavy, A. et al. : Fed. Proc., 23 : 128, 1964.

(11) 横井他 : 精神神経誌, 67 : 594, 1965.

20 中毒性神経障害時のポルフィリン体と CoA 活性（第1報）

猪股丈二・中沢恒幸（慶大・医・神経）
高杉　正・須藤忠四・中山栄基・
菊野正隆（上智大・理・生物化学）

1、はじめに

ポルフィリン（以下ポと略す）動態は季節、一日の時差、摂取物、運動その他の影響を受け、また心理的に心気状態、抑うつ状態のときにも尿中コプロポルフィリン値（以下コポと略す）が1.5～3倍に増加し、その状態は交感神経低反応とも併行する[4]。もちろん器質的脳障害、たとえば脳腫瘍、脳軟化、脳動脈硬化症、てんかんなどの場合にはコポ排泄は増加し、脳循環で脳酸素消費量低下、脳波上θ波を示し、これより脳組織呼吸低下と尿中コポ値増加が相関することを理解できる[4]。

中毒性神経障害の場合、たとえばアクリールアマイド（以下AAと略す）による多発神経炎で症状発現時の尿中コポ値が、肝障害を臨床レベルで検出しえないにも拘らず4～6倍に増加する[2]。これら一連のヒトにおける現象はポ動態と神経機能に密接な結びつきのあることを物語っている。

2、実験方法および材料

今回は10% AA液および5.5%酢酸鉛水溶液（以下Pbと略す）による中毒時の神経症状、それに伴うポ動態（コポ，ウロポ，Total ポ）とその前駆物質 δ-Amino Levulic Acid（以下ALAと略す），Porphobilinogen（PBGと略す）の変動、並びに 5-Methyl-3-Sulfanilamido-Isoxazole（SAと略す）を担体と重負荷後、尿中アセチール化率、更に至時的に断頭液体窒素固定後、肝及び脳ホモジネート（ホモジネートは Lipmann & Kaplan 法にて調製）のアセチール化能，肝ミトコンドリア内（分画は Mauzerall & Granick 法にて調製）の ALA synthetase（ALASと略す）活性，脊髄前角細胞内RNAにつき検索したので報告する。

動物は生後13週のほぼ純系に近い成熟雄家兎（体重 2480～2780g）を用い AA 40mg/kg，Pb 12mg/kg を週2回皮下投与し連続10週間観察、対照は生食水を同様投与した。

定量法は（図1）の如くである。

(図1)　定量法

(1) Coproporphyrin；Askevold の変法[5]
(2) Uroporphyrin；Reinkingh & Kampen 法
(3) Total Porphyrin；Askevold の変法[5]
(4) PBG & ALA；Mauzerall & Granick の変法[3]
(5) Acetylating Capacity；Bratton & Marshall 法[1]
(6) RNA；Einarson 法（顕微分光測定）[6]

1) 全身状態、

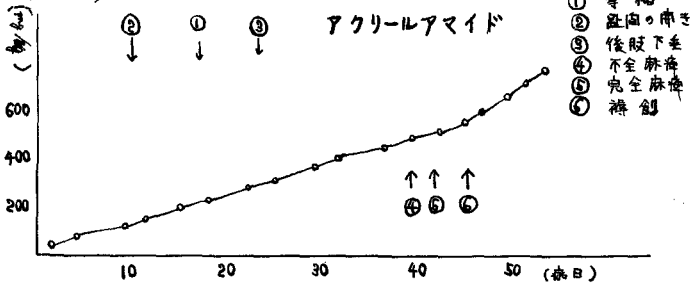
体重変化率（$\frac{\text{各動日の体重}-\text{初体重}}{\text{初体重}}\times 100$）はAAでは6週より急激に下降（20→4%），Pbは最初から横這い（0～−10%）状態である，（コントロールの増加率35%）その際の神経症状はPbは後肢下垂に（軽度の不全麻痺）とどまり、AAでは7週で完全麻痺が出現し、下肢の褥創がみられる。AA，Pb投与量との関係は（図2）で示す。臨床症状を跛行の有無、弯縮、後肢下垂、不全麻痺、完全麻痺、褥創の6段階に分け観察した。

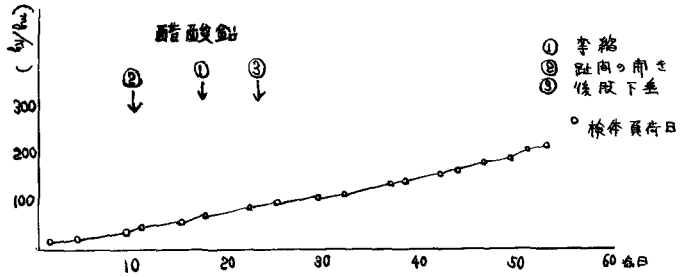
2) ポ動態

正常成熟雄家兎の尿中コポ値は（図3）で平均18.9 μg/L（4.5 μg/day）で、AA負荷によるそれは（図4），後肢下垂出現の3週より急激に増量し5週で一ったん減少し完全麻痺（6週）の出現する頃再び増量（18倍）する。

これに対しPbの尿中コポ値は機体千回投与后、20倍に増

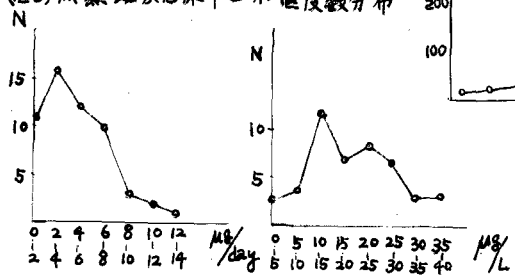
（図2） 総投与量と神経症状



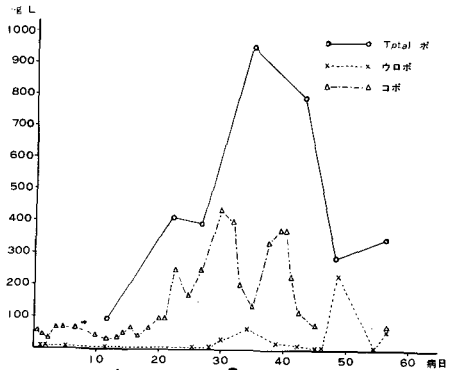


加し、痙攣が出現する頃 2000 μg/L となり、以后機体を投与した翌日は特に高い値を示した（図5）。

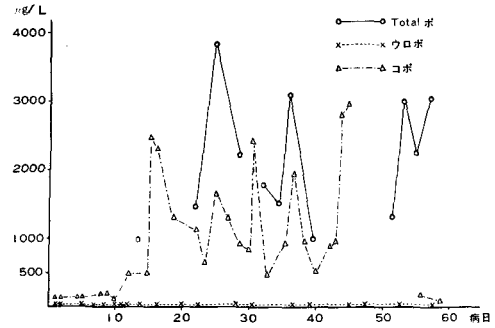
(図3) 成熟雄家兎尿中コポ値度数分布



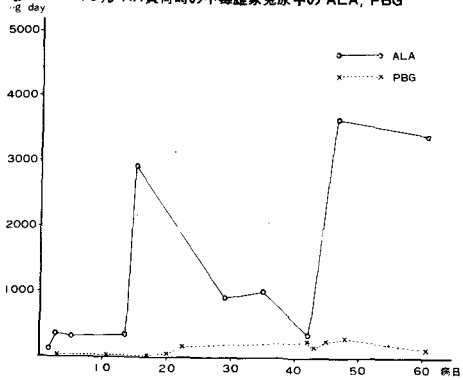
(図4) 10%AA負荷時の中毒雄家兎尿中 Total ポ, ウロポ, コポ値



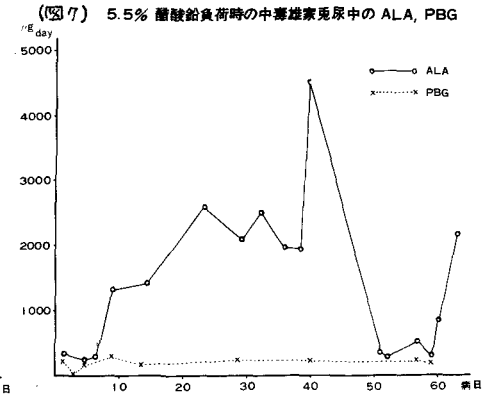
(図5) 5.5%酢酸鉛負荷時の中毒雄家兎尿中Total ポ, ウロポ, コポ値



(図6) 10% AA負荷時の中毒雄家兎尿中の ALA, PBG



(図7) 5.5% 酢酸鉛負荷時の中毒雄家兎尿中の ALA, PBG



3) ALA と PBG

AA, Pb ともに ALA は PBG を凌駕し AA では二峰性、Pb は山型の排泄を示し

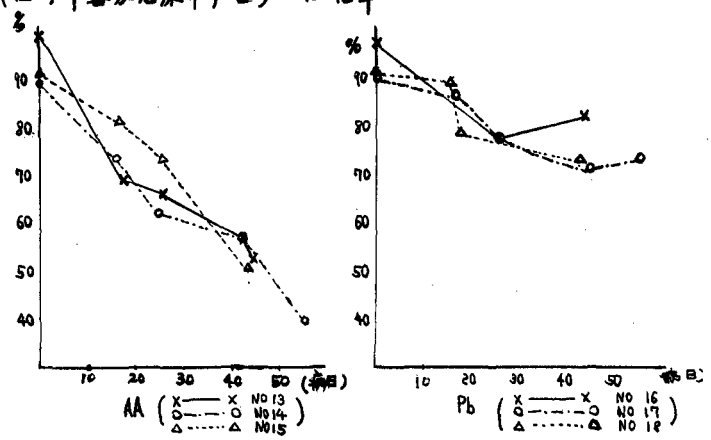
た（図5，6）。

4）尿中アセチール化率

正常成熟家兎尿中アセチール化率は SA 100mg/head 負荷時、平均 94.7 %（89.9～99.8），500 mg/head では 91.8%（87.5～94.6），1000 mg/head で 81.4（72.6～89.1）である。

Pb中毒で SA 100mg/head 負荷すると、6週で 70～82 %，AA では 50～58 %に抑制された。（図8）

(図8) 中毒家兎尿中アセチール化率



5）血清 GOT，GPT

[計算式 = $\frac{\text{Total Compound} - \text{Free Compound}}{\text{Total Compound}} \times 100$]

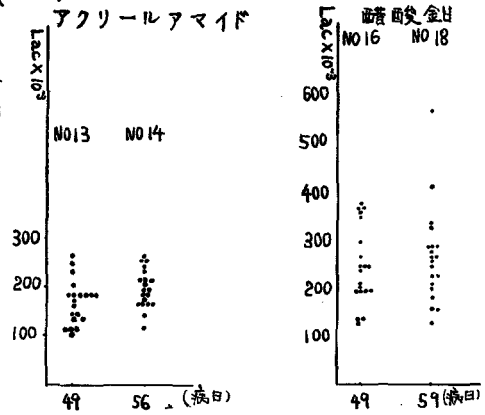
肝機能検査として、GOT，GPT は3週でそれぞれ平均 13（7～20），12.3（11～15）コントロールは平均 10で，障害は見られず，8週で 8，29 であった（AA）。

Pb では3週 11，17.7（8～27），8週 9.7（13～16），11.3（15～19）。

6）脊髄前角細胞内 RNA 比較定量

L4-6 の前角細胞内RNA を pH 1.64 に補正した Gallocyanin で染め顕微分光測定（Olympus）した。結果は図9のごとくで、完全麻痺をきたす AA のそれは低下し、Pb の後肢下垂にとどまる結果と併行する結果をえた、勿論正常家兎では高く 520 以上の値をえす。

(図9) 脊髄前角細胞内 RNA 定量



7）肝ミトコンドリア ALA synthetase 活性

ミトコンドリア分画は Granick 法により調製、Mauzerall & Granick 法で測定した。結果は AA より Pb に高い活性値を得た。（図10）

(図10) 中毒家兎肝ミトコンドリア ALA synthetase 活性値

中毒物質	AA	Pb
ALAs.	7.75	13.66

8）組織内アセチール化

(i) 肝アセチール化

Lipmann & Kaplan 法により肝10gを塩類溶液（0.13M KCl，0.01M MgCl）15cc でホモジネートをつくり、その 1cc に 0.5% SA 1cc を加え Incubate（37°C，60min），Incubation Mixture 1cc を Bratton & Marshall 法に従って Beckman 分光計で比色定量した。AA，Pb ともに対照より（42.9%）抑制されているが尿中アセチール化が減少した AA と Pb の間で有意差は認められなかった。（図10）

(図10) 組織内アセチール化率

肝ホモジネート	コントロール	42.9 %
	アクリールアマイド	9.9～14.5
	酢酸鉛	2.5～11.7

(図11)

脳ホモジネート	コントロール	40.0
	アクリールアマイド	8.15～10.2
	酢酸鉛	13.2～26.1

(ii) 脳アセチール化

脳2g を塩類溶液 6 cc でホモジネートをつくり、その 5cc に(i) と同様 0.5% SA 1 cc を加え Incubate, その Mixture 1 cc を比色定量、神経症状の強かった AA は Pb よりも抑制傾向が見られた。(図11)

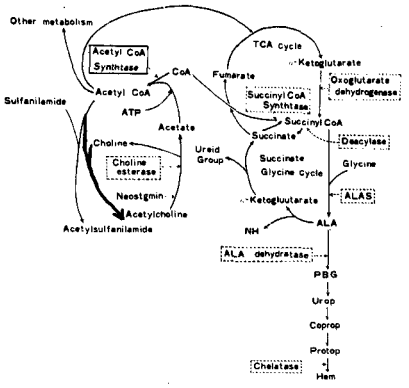
次に Kaplan 法により、組織内の CoA → Acetyl CoA との反応系(図12)をつくり、すでに形成されている Acetyl CoA とともに計測、追究中である。

(図12) Assay reaction mixture

ミリミン	0.1 %	20 cc	40 cc
ATP	0.05 M	8 cc	
醋酸ナトリウム	1 M	2 cc	
クエン酸ナトリウム	0.2 M	10 cc	

Incubation System

Liver Homogenate	1 cc	8 cc
Assay reaction mix.	1 cc	
0.1M 塩酸システイン	0.1 cc	
1M 重炭酸ナトリウム	2.1 cc	
水	0.8 cc	



2. 結語

Succinyl CoA と Glycine が縮合して ALA 形成にはじまり、コポ値が増加する Pb のアセチール化に関し、肝ホモジネートでの阻害に対し尿中では強くなく、脳ホモジネートでは神経症状の強い AA よりもアセチール化率が良かった。AA では脊髄内 RNA も低下し、脳ホモジネートの抑制傾向が見られた。

尚、Citrating Condencing Enzyme を利用して Acetyl CoA 動態を検索中である。

文献

(1) Bratton, A.C. & Marshall, E.K.: J. Biol. Chem., 128: 537, 1939
(2) Kikuno, M., Inomata, J. & Nakazawa, T.: XXIII International Congress of Physiological Sciences, 1965
(3) Mauzerall, D. & Granick, S.: J. Biol. Chem., 219: 435, 1956
(4) 宇内康郎: 精神経誌, 67: 7, 1965
(5) With, T.K.: Lancet, 267: 1148, 1954
(6) 小官英靖: 精神経誌, to be published.

21 「水俣病」の発症機構，とくに「水俣病」原因物質の胎仔への移行についての実験的研究

清田一民・井上　赳・
高木元昭・藤田英介・
寺岡　葵（熊大・医・精神）

Ⅰ．実験目的

内田ら[2]により水俣湾産貝「ヒバリガイモドキ」から分離・結晶化され，さらにその合成および動物発症性が明らかにされたアルキル水銀化合物 methyl methyl mercuric sulfide（ＭＭＭＳと略す）を用いて，水俣病の発症機構を解明し，さらに原田[1]が，疫学的，臨床的見地に立って，その原因として母親からの有機水銀の移行を推定したいわゆる「先天性水俣病」を実験的に証明するために，放射性同位元素^{35}S，^{203}Hgを用いてＭＭＭＳを合成し，その臓器内分布，胎児への移行，代謝などについて，放射能測定，オートラジオグラフィー法により検討した。

Ⅱ．実験方法

１）ＭＭＭ^{35}Ｓの合成

$Na_2{}^{35}S \cdot 9H_2O$，CH_3HgI（ＭＭＩと略す），CH_3Iを反応させて粗結晶を得，これをクロロホルムで再結晶した。結晶は白色板状（m.p.d. 110～128° sub.）

２）ＭＭ^{203}ＭＳの合成

^{203}Hgは$^{203}Hg(NO_3)_2$として購入。これに適当量の$Hg(NO_3)_2$を加え，それをNaOHアルカリ性とすると^{203}HgOの黄赤色の沈澱を得る。これをHCl酸性として溶解・濃縮・乾固して$^{203}HgCl_2$を作る。これにＫＩ水溶液を加えると$^{203}HgI_2$の赤色結晶を得る。これからＭ^{203}ＭＩを合成。これを用いてＭＭ^{203}ＭＳを合成した。結晶の性状は上記と同様である。

３）動物実験

ウィスター系の成熟雌ラッテ（体重１２０gr～３００gr）を使用。膣腔内に精液の存在が確認されるか，腹部触診で胎仔の触知出来るものを雌雄ラッテとして用いた。飼料はラッテ繁殖用合成飼料（クレアのＣＡ，Ⅰ）２に小麦粉を１の割合に混合した飼料（10grに１mgの割合でＭＭＭＳを混入）を，ラッテ体重100grあたり10grの割合で投与し，自由に摂取させた。歩行障害，異常運動，倒下直時後肢交叉の揃ったものを発症と考えた。尚，対照にはＭＭＭＳを除いた飼料を用いた。

４）放射能測定ならびにオートラジオグラフィー法

イ）^{35}Sは一定量の組織をPirie試薬で湿性灰化を行い$^{35}SO_4^{--}$とし，これをBenzidin硫酸結晶として沈澱させ，直径3.5 cmの沪紙上に平等に集め，ＧＭカウンターで測定した[5]。

ロ）^{203}Hgは一定量の組織片を直径2.5 cmのステンレス製皿に圧砕してとり，そのままシンチレーションカウンターで測定した。

ハ）オートラジオグラフィーは，胎仔を凍結（－10° C），矢状断として，20μの厚さの切片に切り，これをセロテープに密着させ，－10° Cで24時間乾燥，これを写真工業用Ｘ線フィルムに密着して行った。

Ⅲ．実験結果

１）動物実験　（第１表参照）

イ）成熟雌ラッテの発症

飼料（ＭＭＭＳを含む，以下有毒飼料と記載）慢性投与ラッテ21匹中完全発症をみたのは10匹，不完全発症３匹。有毒飼料投与開始から発症までの期間は16日から34日（平均21日）。発症に要したＭＭＭＳの量は，14.3mgから24.4mg（平均18.6mg）であった。

ロ）妊娠ラッテの分娩

発症親ラッテでは，すべて流産して，分娩はみられなかった。

ハ）仔ラッテの発育

生下時平均体重は，対照群（a）5.1gr，分娩前有毒飼料投与群（b）4.7gr，分娩后有毒飼料投与群（c）4.9gr，この３群の間で生后の平均体重曲線に若干差がみられる。（b）群では生活力の弱い新生仔が多く，（c）群では生後の発育が悪く，特に，ほぼ生后15日以後の発育の悪さが目立つ。そして次々に死亡している。（第２表）（b）群中の子供に１匹，(c)群中の子供に４匹，歩行障害，後肢交叉を示した。

２）オートラジオグラフィー

^{35}Sと^{203}Hgとでは，胎仔における分布に差が認められる。^{35}S，^{203}Hgともに胎仔に移行し得る。（スライド供覧）

３）親ラッテにおける臓器内分布

イ）慢性投与時の^{35}Sと^{203}Hgの分布

測定の時期が異なるので，絶対値の比較は出来ないが，慢性投与時における^{35}Sと^{203}Hgの分布には，かなりの差が認められる。脳には，いずれもそれ程多くはない。^{35}Sは腎・血清・肝・脾などに比較的多いが，^{203}Hgは血球に特異的に多く集まる。以下，腎・脳・脾臓等にも比較的多い。発症，未発症の間で，その分布状態には大きな差はない様である。（第２図）

ロ）飼料投与後の時間的経過と分布状態

^{203}Hgについて，急性投与（胃ゾンデより１回に大量注入）し，１時間半後にその分布をみると，大部分は尚胃内に残り，一部血球中に出現するが，14時間後にはピークが胃から小腸に移り，またかなりの量が血球中に出現する。くり返し投与していると，血球中に特異的に多くなり，投与中止後28日目の分布状態をみると，尚，或る程度血球に残存しているのが認められる。（第３図）

４）ＭＭＭＳの代謝

イ）^{35}Sの尿・糞中への排泄

ＭＭＭ^{35}ＳＳ１回投与後の尿・糞中への排泄の具合をみると，大部分は第１日目に排泄されてしまう。（第４図）　さらに尿・糞中に排泄された^{35}S化合物を分析すると第３表の如くなる。

ロ）ＭＭＭＳの吸収

ＭＭ^{203}ＭＳをゾンデで胃内に投与して，^{203}Hgの腸管各部位での放射能について調べてみると，投与後14時間を経過しても尚，胃・小腸の部分で強く，大腸では弱い。

ハ）赤血球内^{203}Hgの分布

^{203}Hgが赤血球に特異的に多いため，さらに赤血球の分析を行い，どの部分に^{203}Hgが多いかを検討した。第４表に従って分析をすすめて行くと，ヘムをはずした後，セロファンバッグで濃縮すると，グロビン画分に放射能が残る事から，^{203}Hgは大部分グロビンと結

合しており，しかも酸性にすると容易に離れる事が明らかとなった。

Ⅳ．考察．

1）動物実験

イ）雌成熟ラッテの発症実験から，合成された MMM^{35}S，および MM^{203}MS の有毒性は従来の成績[6]とほぼ一致する。

ロ）胎仔分娩の条件はかなりむずかしく，投与量が多いと流産する．発症親ラッテでは一匹も分娩はみられなかった．分娩を成功させるためには，投与量および投与方法の検討が必要であると考えられる。

ハ）分娩された仔ラッテの平均体重曲線，死亡の状況，一部のものの症状等から考えて，有毒物質は b 群では胎盤を通じて，C 群では母乳を通じて，仔ラッテに影響を与えているものと考えられるが，放射能の影響も考慮する必要がある。

2）仔ラッテのオートラジオグラフィー

^{35}S および ^{203}Hg とも，胎盤および母乳を通じて胎仔に移行し得るものと考えられる。

3）成熟ラッテにおける MMMS の代謝および臓器内分布

^{35}S と ^{203}Hg の体内分布および排泄の状態から，MMMS は，摂取後比較的早い時期に，胃または上部腸管から吸収されるものと思われるが，S と Hg は，吸収される以前か，或いは吸収された後まもなく分離して，おのおの別々の動きをする可能性が強い。水銀はまとしてヘモグロビン中のグロビンに結合しているが，これが赤血球の機能に如何なる関係をもつか，或いは，ただ結合されて運搬されているだけなのか，さらにそれが，脳の代謝に及ぼす影響などについて，検討中である。

Ⅴ．要約

1）MMMS が 胎盤および母乳を介して胎仔に影響を与える事を，動物実験およびオートラジオグラフィーで証明した。

2）MMMS の代謝の一部を明かにした。

3）MMMS 中水銀物質の赤血球との関係を明らかにした。

文献

1）原田正純：精神経誌．66，(6)，429－468，昭39

2）平川潔：熊本医会誌．36，(10)，746－763，昭37

3）井上越：　〃　上　36，(12)，877－889，昭37．

4）熊本大学医学部水俣病研究班：　水俣病．昭41

5）小山次郎：蛋白質・核酸・酵素．9，(9)，756－762，1964．

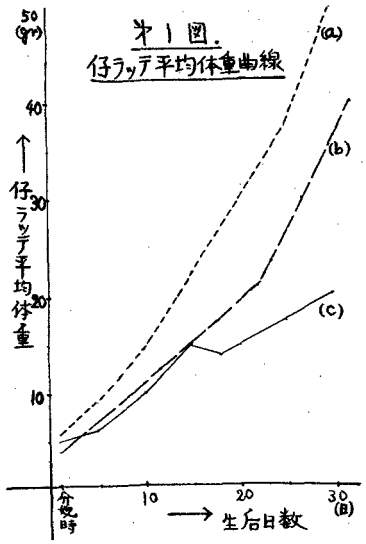
6）Uchida．M．et al：Kumamoto Med．J．14 (4) 192，1961．

第2表．仔ラッテ死亡状況

動物群	対象匹数	生後日数 5	10	15	20	25(日)	30以後
a	12	2	2	1		1	
b	30	12 6				1	3
c	19	2 1 1	2 2	2 2	2 2 1		1

（数字は死亡数）

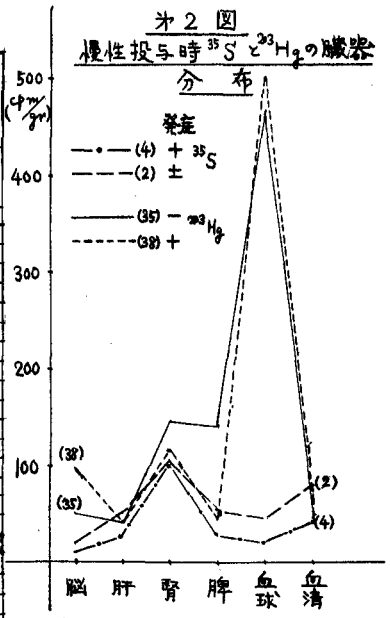
第1図．仔ラッテ平均体重曲線



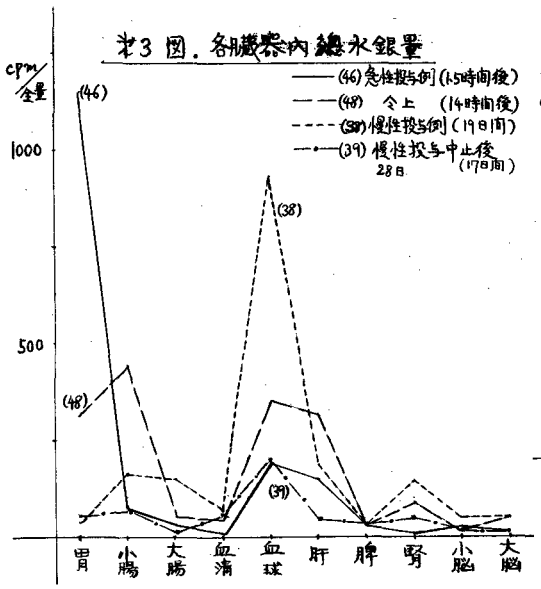
第1表．動物飼育一覧

動物番号		親・発症	発症の匹数	投与日数	有毒飼料	投与総量(mg)	分娩の有無	仔ラット数	仔ラット平均体重(gr)	仔ラット死亡数	仔ラット発症数（）は観察数	発症仔ラット	
対照(a)	A	−					+	8	5.7	2	(7)		
	B	−					−						
	C	−					−						
	D	−					+	8	5.0	4	(5)		
分娩前有毒飼料投与群(b)	1	−		7		9.5	+	10	5.6	4	(7)		
	2	±	20	13		17.7	−						
	3	+	21	13		18.5	−						
	4	+	20	14		19.0	−						
	5	+	19	14		19.0	−						
	6	+	17	14		19.3	−						
	7	+	20	12		18.0	−						
	8	−		8		12.0	−						
	9	−		9		12.7	−						
	10	+	20	13		18.7	−						
	11	−		7		9.7	+	14	3.9	3	(3)		3日連日，4日隔日投与
	16	−		6		9.0	+	16	4.4	3	(8)	1	4日連日，2日隔日投与
	19	−		11		16.5	+	10	5.0	8	(8)		4日連日，7日隔日投与
	20	±	28	11		15.9	−						
	36	−		2		2.0	+	9	4.6	4	(4)		2日連日
	37	+	22	22		24.4	−						
	38	+	21	19		18.7	−						
分娩群後投与(c)	15	+	34	10		14.3	+	10	5.6	3	(3)	1	分娩前3日，分娩後7日有毒投与
	31	±	20	16		24.9	+	10	4.6	7	(7)	2	
	35	−		15		20.8	+	10	5.0	5	(5)	1	分娩時親末発症
	39	+	16	17		22.0	+	11	4.4	3	(4)		
一時大量投与群(d)	43	−		1		10.0	−						
	45	−		1		100.0	−						
	46	−		1		100.0	−						
	48	−		1		100.0	−						
	49	−		1		100.0	−						

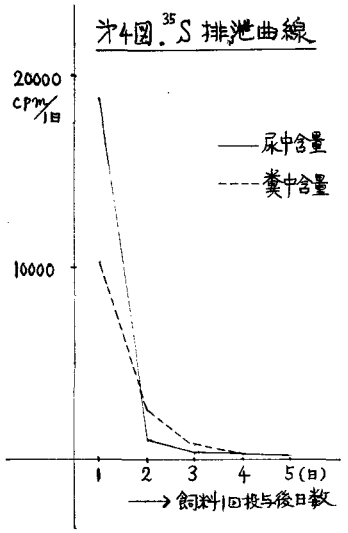
第2図 慢性投与時 ^{35}S と ^{203}Hg の臓器分布



第3図．各臓器内總水銀量



第4図．^{35}S 排泄曲線



第3表

イ) 尿中 ^{35}S 化合物

	cpm/稀釈尿10cc
總 S	848
無機硫酸	700
エーテル硫酸	60
有機水銀結合S	13

ロ) 糞中 ^{35}S 化合物

	cpm/糞1gr
總 S	5726
HCl抽出液中無機硫酸	4
HCl蒸溜残渣	1323
HCl蒸溜液	257

第4表．赤血球内 ^{203}Hg 分布

イ) 赤血球の分析

赤血球（總量2.3gr）水銀量100%
- 溶血液（總量10gr）水銀量89.5%
- 残渣（總量0.16gr）水銀量10.5%

ロ) ヘモグロビンの分析

ヘモグロビン液
- 水相
  - 沈澱（グロビン）水銀量0%
  - 残液 PH7.0で減圧濃縮乾固 白色結晶 水銀量87.4%
- アセトン・エーテル抽出液 赤褐色結晶（血色素）水銀量3.4%

22 慢性覚せい剤中毒動物脳の解糖減退機序の解析

加藤伸勝・小林暉佳・
江副勉（都立松沢病院）

われわれは慢性メトアンフェタミン中毒モルモット脳で得られた解糖減退の機序の解析を今日までつづけてきていたが，酵素レベルでの追求は hexokinase 及び乳酸脱水素酵素の二者を行なったのみで，解糖鎖の各段階については直接にはその酵素活性を調べてこなかった。その主な理由は脳のエネルギー代謝にとって最も基礎的な解糖系の酵素が，少くともその作用にとって特異的な阻害剤でも促進剤でもないメトアンフェタミンによって大きく影響を受けるとは考えにくかったことと酵素活性自体よりも酵素反応に共軛する助酵素の側に問題があるとする想定の下に助酵素の量ならびにそれを調節する酵素に対するメトアンフェタミンの影響を調べることに終始してきた結果であった。しかし，それらの努力からは解糖減退を充分に証明するに足る説得力のある成績を得ることができなかった。そこで再び解糖系の反応鎖の各段階について，個々の酵素活性を当たり，どの段階で解糖が阻害されているかを直接に証明する方法をとることにした。今回はそのうち解糖の前半の三炭糖に分解されるまでの過程の酵素反応につき，対照動物とメトアンフェタミン中毒動物の脳の酵素活性を比較した。また，最近，大須賀[6]によって報告されているようにマウスではメトアンフェタミン中毒でも脳皮質の解糖減退が起らないということなので，われわれの過去の成績を追試する意味をも含めて hexokinase 活性も再検した。今回とくに新しく行なった実験は，phosphofructokinase, aldolase で，これに glucose-6-phosphatase を加えた。glucose-6-phosphatase については，これが肝において特異的に glucose-6-phosphate に作用して，ブドウ糖を合成することが知られているが，肝以外の臓器では腎，小腸以外は殆ど活性がないとされている。Kaide ら[4]によれば，その活性は肝の 1/100 という。われわれはまず，本酵素が脳に有るかどうか，有るとすればこれがメトアンフェタミンによってどう影響されるかに興味をもち，これを取上げた。

Tab.1 Hexokinase Reaction Medium

	Final concent.
Phosphate buffer pH 7.4	30mM
$MgCl_2$	5mM
Kcl	10mM
Na-ATP	5mM
EDTA	2mM
NaF	25mM
Glucose	3mM
Tissue	25mg of original tissue
total vol.	3ml

実験方法及び実験条件

動物は成熟モルモットを用いた。メトアンフェタミンによる動物の中毒化の方法は既報[10]の通りである。動物を断頭後すみやかに脳を摘出し，主として冷水で 10 % homogenate を大脳皮質，脳幹，小脳につくった。但し，G-6-Pase 用には氷冷 0.32M sucrose を用いた。

(1) hexokinase 測定：Long 法[5]を若干改めた。反応液の組成は Tab 1. の通りである。反応温度は 37.5°C 反応時間は 10 分間とした。反応は $Ba(OH)_2 - ZnSO_4$ で中断し，Somogyi 法で残ったブドウ糖を測定した。酵素活性は μmoles glucose/g wet wt./10 min で示した。

(2) phosphofructokinase 測定：方法は Racker,[7] Johnson[3] に準じた。反応液の組成は Tab. 2 に示す通りである。温度は室温（23～26°C）で行ない，断頭後測定までの時間

Tab.2
Phosphofructokinase

Reaction Medium

	Final concent.
Ammonium phosphate (dibasic)	3mM
$MgCl_2$	2mM
Cysteine hydrochloride	7mM
Pot. fructose 6 phosphate	7mM
ATP(disodium salt)	0.5mM
DPNH	130uM
Tissue	1mg of original tissue
Coupling enzyme (aldolase, -glycerophosphate dehydrogenase, triose phosphate isomerase)	2mg/ml 0.01ml
total vol.	3ml
pH 7.4 temp 23-26°	

を3時間で続一した。もちろん、測定までhomogenateは0°Cで保存した。測定には日立ベックマン型光電光度計を用い、340mμでDPNHの酸化を光度計の-log Tの減少率で求めた。測定時間は反応開始後、2分ごとに10分間よみ、2分～10分の間の毎分の-log Tの減少の平均をとり反応値とした。Blankには基質、coupling EnzymeおよびDPNHを加えないものを、またintrinsicの値を差引くために controlとして、基質およびcoupling Enzymeを加えないものを用い、測定値からControl値を引いたものを以て真の活性値とした。活性値の表示は組織内の蛋白質のmg当りで表わし、従ってspecific activityは-log Tの減少率／mg蛋白／minで示した。

なお Coupling Enzymeのaldolase その他はBoehringer社発売の酵素標本を用いた。

(3) aldolase測定：Boehringer社の血清用aldolase UV-テストコンビネーションを利用した。

Tab.3
Aldolase Uv-Test

0.056M collidine buffer; (pH 7.4) 0.0003M mono-iodoacetate; 0.003M fructose diphosphate	2.5ml
0.02M DPNH	0.05ml
2mg GDH/TIM/ml	0.01ml
Tissue	1mg of original tissue
temp 23-26°	

反応液の組成はTab.3に示した。測定温度は前酵素と同様室温を用いた。反応開始後5分～15分にわたり一定の割合でDPNHが酸化されるので、5～12分の8分間の値を読み、これから何分の-log Tの減少率を求めた。specific activityはPFKの場合と同様に-log Tの減少率／mg蛋白／minで示した。

Tab.5
Hexokinase activity in the brain tissue
(uM Glucose/g fresh tissue/10 min.)

	chronic expts.	controls
Cortex	23.1 21.4 23.2 Av=22.5	26.0 28.0 Av=27.0
Brain stem	28.5 23.0 27.2 Av=26.2	28.5 25.3 Av=26.9
Cerebell.	24.0 27.8 Av=25.9	23.6 30.6 Av=27.1

(4) glucose-6-phosphatase測定：Swanson[8]が肝について用いた方法に準じたがbufferについてはSwansonはクエン酸bufferを用いているが、これではリン定量を阻害することがあるらしいので、マレイン酸bufferを用いた。反応液の組成はTab.4に示す。

Tab.4
Glucose-6-phosphatase
Reaction Medium

	Final concent.
Maleic acid buffer pH6.5	33mM
G-6-P Na	5mM
tissue	20mg of original tissue
total vol.	1.0 ml

温度は37.5°C反応時間1時間、反応は等量の10% TCAで打切り、無機燐をAllen法によって測定した。

Tab.6

Phosphofructokinase & aldolase activity in the brain cortex homogenates

(decrease of $\log I_0/I$ in min. per mg protein)

Phosphofructokinase

controls	chronic expts.
0.184 (3)	0.193 (2)

Aldolase

0.340 (3)	0.360 (2)

反応液中基質を欠くEngyme blankと酵素を欠くsubstrate blankを別につくり，その値を全系の反応値から差引き補正した。なお，基質のG-6-PはBa塩のものをNa塩にかえて用いた。

実験結果並びに考察

まずhexokinaseであるが，且つてわれわれが行なった方法は検圧的な方法であったので，今回は高橋[9]がラットで行なった実験に準じ，Long法を用い，ブドウ糖消費量で活性を示す方法を用いた。

われわれの今回の値はTab 5に示されているが，対照群の値はBalázs[1]らと近似のものである。今回はとくに脳の部位を考慮して，大脳皮質，脳幹，小脳について測定した。大脳皮質については従来得られていたと同様の中毒動物脳での活性低下が認められた。ところが，脳幹並びに小脳に関してはとくに有意差を見出すには至らなかった。なお，われわれは皮質のミトコンドリアの解糖を調べた際[2]解糖減退がATPの補強により恢復されることを認めたが，今回はとくにそれを考慮して，反応液中にはじめから比較的高濃度のATPを附加しておいたのであるが，それでもなお且つ大脳皮質homogenateのhexokinase活性は低下を示していることは特記すべきことであろう。なお，今回行なった脳幹並びに小脳におけるhexokinase活性は対照と中毒群の間に差がない結果があらわれた。脳のhexokinaseが部位によってその性質を異にするとは仲々考えにくいことである。従って，この結果から直ちに適当な説明は導き出し難いが，且つてわれわれが行なったメトアンフェタミンの脳内分布の成績からすれば，脳幹などは皮質の約半分しか分布されないところを見れば，脳幹等では大脳皮質に比し，所謂慢性刺激を受ける強さの度合が異なるとも考えられる。その反映がこのような結果を導くのかも知れない。phosphofructokinase及びaldolaseについての実験結果はTab.6に示されている通り，対照群と中毒群で差は認められなかった。phosphofructokinaseは助酵素としてATPを要する点では，解糖鎖の中でhexokinaseに次いで第二に位置する重要な酵素である。しかし，この酵素反応に異常がないということはメトアンフェタミンがATP等の助酵素の利用効率を阻害するような働きを示す可能性のないことを示すものといい得よう。なお，phosphofructokinaseのspecific activity[3]については，Racker[7]のラット脳の値とほぼ一致し，aldolaseのそれもJohnsonの値にほぼ一致した値を得ている。

glucose-6-phosphataseについては，この酵素がまず脳にあるかどうかが問題となる。残念ながら現在までに脳におけるこの酵素の有無を論じた文献に接していないので，軽々しく取上げるわけにも行かないが，hexokinaseは逆反応が成立しないので，これにかわるglucoseの合成酵素が脳にあってもよい筈であるとする大胆な仮説の下に本実験を行なった。

これについてはまだ充分なデータをうるに至っていないが glucose-6-phosphate を基質として脳組織を加え反応させると僅少ではあるがPの生成が見られる。これがはたして glucose-6-phosphatase によるものかどうかの吟味が必要であろう。参考までに大脳皮質 homogenate で得られる値は 0.4～0.5 mgP/g wet wt /hr であることを云々にとどめておく。

まとめ

慢性メトアンフェタミン中毒動物脳の解糖減退の機序をさらに追求した。その結果，

(1)過去にえられた大脳皮質の hexokinase 活性低下の所見を再確認した。また，今回新たに行なった脳幹及び小脳の hexokinase 活性については，同様の所見をうることができなかった。

(2) phosphofructokinase 及び aldolase 活性を対照動物と中毒動物の脳について比較した。これらの酵素活性に関する限り両者に差を認め得なかった。

(3)脳に glucose-6-phosphatase が存在するかどうかを吟味した。

文献

(1)Balázs,R.and Lagnado,J.R.,J.Neurochem.5,1(1959)

(2)Ezoe,T.Kato,N.Nikaido,T.,SHINKEI KENKYU NO SHINPO 7,838(1963)

(3)Johnson,M.K.,Biochem.J.77,610(1960)

(4)Koide,H.and Oda,T.,Clin.Chim.Acta.,4,554(1959)

(5)Long,C,Biochem.J.50,407(1952)

(6)Osuga,T.Shimizu,T,SEISHINKEISHI 68,67(1966)

(7)Racker,E.,J.biol.Chem.,167,843(1947)

(8)Swanson,M.A.,J.biol.Chem.,184,647(1950)

(9)Takahashi,Y.,SEISHINBUNRETSUBYO Ed by Naka IGAKU SHOIN (1959)

(10)Utena,H.Ezoe,T.Kato,N.,SEISHINKEISHI 57,115,125(1955)

23 慢性覚せい剤中毒動物の脳セロトニンと関連酵素活性

高野介佐・五十貝いち・
船渡川誠一郎（群大・医・精神）
台弘（東大・医・精神）

慢性覚せい剤中毒動物の特異な行動特性を解明するには脳内物質変動を機能と関連づけて追求することが必要である。(8) そのためには動物の安静時、刺激時、あるいは時間的経過にしたがって全脳レベルの変動を追求するのみでなく、それらの脳部位的分布の変動の様式を考慮する必要がある。(3) 船渡川はmethamphetamine中毒ネコの脳serotoninについて先に報告したが、本報告はserotoninの全脳および脳部位的分布の様式を、その合成および分解に関与する酵素活性について、マウス全脳、ネコ脳諸部位について検索したものである。

実験方法

• 実験動物　マウスは飼育条件、methamphetamine（MA）投与方法は大須賀(5)と同様であり、一ケージ5～10匹のグループ飼育と、一ケージあて一匹の単独飼育を行った。脳摘出は断頭で行い、凍結より24時間以内に測定に供した。ネコは飼育条件、行動評定、MA投与方法、脳摘出方法等は文献( )と同様である。飼育部屋は2.5×5.5m²で、テラスと部屋に二分されており、一室に平均5匹を入れた。MA中毒群と非中毒群は部屋を分けた。

• serotonin（5HT）前駆物質負荷試験　L-tryptophanは500 mg/kgを腹腔内注射し、120分後断頭した。monoamine酸化酵素（MAO）阻害剤での前処置はcatron（β-phenyliso-propyl-hydrazine HCl）を用い、40 mg/kgを腹腔内注射し、60分後L-tryptophan、5HTPの負荷を行った。またcatron 40 mg/kgを単独に注射した試験も行った。

• monoamine酸化酵素測定法　脳homogenateについてBogdanskiらの方法(2)を一部改変して測定した。基質として5HTを用い、一定時間反応させたのち、基質の減少により活性を算出した。基準としてはMAO阻害剤catronで完全にMAO活性を阻害したものを用いた。homogenateは、脳を蒸溜水でテフロン軸homogenizer（clearance 0.12～0.2mm）により2分間homogenizeし、検体の活性に応じ100 mg/ml～250 mg/mlの濃度とした。homogenate 1.0mlに0.3M phosphate buffer（pH 7.4）1.0ml、0.5ml H_2O、またはcatronを用いる場合には1.4mM catron 0.5mlを加え、恒温震盪槽内で37°C、15分間pre-incubationを行い、ついで基質4mM 5HT 1.0mlを加え、30分間shaking incubationを行う。substrate blankを同様に行う。

5HT定量はUdenfriendらの方法(7)を用い、測定には日立F型螢光附属装置をEPu-2A型分光光電光度計に装置したものを用いた。

MAO活性はμmoles 5HT destroyed per g per hourで表わされる。

• 5-hydroxytryptophan脱炭酸酵素（5HTP-D）測定法　Apisonら、高橋らの方法(1)を一部改変して測定した。基質として5HTPを用い、一定時間反応させて生成する5-HTを定量する。補酵素としてpyridoxal phosphate、MAO活性をのぞくためcatronを用いた。homogenateは0.32M sucroseで50 mg/ml濃度とした。homogenate 1.0mlに、0.3 M phosphate buffer（pH 8.0）1.0ml、0.38 mM pyridoxal phosphate 0.1 ml、.52 mM catron 0.1 mlを加え、N_2-ガスでflush、恒温震盪槽内で37°C、20分間

pre-incubate する。5HTP (1.0 mg) 0.4ml を加え、再び N_2-ガスで flush、shaking incubation を60分間行う。homogenate blank、substrate blank も同様に行う。5HT 定量は前記と同様である。

5HTP-D 活性は μ moles 5HT synthesized per g per hour で表わされる。

● マウス全脳の 5HT 定量は Synder S, H. らの方法(6)を一部改変して用いた。

表 1

マウス全脳の 5HT (μg/g)

無処置対照群	中毒群	
1.37 ± 0.20 (14)	1.91 ± 0.27 (16)**	
( ) 例数	1.76 ± 0.31 (8)	単独飼育
** $p < 0.01$	2.06 ± 0.37 (8)	グループ飼育

表 2

マウス全脳の 5HTP-D, MAO 活性 (μmoles 5HT/g/hr.)

	無処置対照群	中毒群
5HTP-D	0.83 ± 0.15 (12)	1.02 ± 0.18 (8)
MAO	9.76 ± 0.85 (10)	9.91 ± 0.86 (7)

( ) 例数

実験結果

1. 慢性覚せい剤中毒マウス (中毒マウス)

中毒マウスの全脳の 5HT 量は 1.91 μg/g となり、無処置対照値に比較すると、約40%の有意の増加を示す。単独および グループ飼育した中毒マウスの 5HT 量には有意の差はなかった。(表1)

5HTP-D 活性は中毒マウスで 1.02 μmoles 5HT/g/hr. であり、無処置対照値 0.83 μmoles 5HT/g/hr. より増加の傾向をみせる。

一方 MAO 活性は変化がない。(表2)

5HT の前駆物質を負荷してその生成量の変動をみたものは表3に示す通りである。

L-tryptophan、5HTP を単独に負荷すると負荷しない場合よりもわずかに増加する。この際、外観的行動に変化はみとめられない。つぎに catron で前処置して L-tryptophan、5HTP を負荷すると15分から30分で全身の震せん、立毛、眼球突出、尿失禁など自律神経症状を示し、一個所にうづくまってしまう。その程度は 5HTP に強い。この状態の脳 5HT 量は L-tryptophan 負荷では、非中毒群で、無処置対照値の約2倍、5HTP 負荷では約5倍と著明な増加を示す。ただしこの際、非中毒群と中毒群を比較しても有意の差はみられない。無処置対照マウスに catron のみ投与した時は 5HT 量は約 40% 増加する。

表 3

L-tryptophan、5HTP 負荷によるマウス脳 5HT (μg/g)

	非中毒対照群	中毒群
L-tryptophan 負荷		
単独投与	1.62 ± 0.07 (5)	1.70 ± 0.31 (5)
catron 前処置	3.33 ± 0.41 (4)	3.58 ± 0.30 (4)
5HTP 負荷		
単独投与	1.41 ± 0.04 (5)	1.51 ± 0.08 (4)
catron 前処置	6.46 ± 0.91 (5)	6.91 ± 0.70 (6)
catron 処置	1.90 (1)	

( ) 例数

2. 慢性覚せい剤中毒ネコ (中毒ネコ)

中毒ネコの脳部位別 5HTP-D 活性および MAO 活性は、それぞれ表4、表5に示す通りである。5HTP-D 活性は視床下部、尾状核、扁桃核、網様体などに高い活性を示し、これは中毒および非中毒群に共通する所見である。とくに尾状核においてのみ

ネコ脳部位的 5HTP-D、MAO活性分布および MA 長期投与による変動

表4、5HTP-D活性　　μmoles 5HT/g/hr.

	非中毒群	MA 中毒群
大脳皮質	0.23 ± 0.05 (3)	0.18 ± 0.02 (3)
視床下部	0.50 ± 0.06 (3)	0.57 ± 0.06 (3)
視　床	0.25 ± 0.04 (3)	0.26 ± 0.02 (3)
尾状核	0.44 ± 0.17 (3)	0.71 ± 0.07* (3)
海　馬	0.18 ± 0.03 (3)	0.16 ± 0 (3)
扁桃核	0.31 ± 0.04 (3)	0.26 ± 0.01 (3)
網様体	0.72 ± 0.12 (3)	0.53 ± 0.46 (2)
小脳皮質	0.19 ± 0.02 (3)	0.17 ± 0.04 (3)

表5、MAO活性　　μmoles 5HT/g/hr.

	非中毒群	MA 中毒群
大脳皮質	3.63 ± 0.54 (6)	2.25 ± 0.66* (6)
視床下部	12.71 ± 0.75 (6)	10.33 ± 0.62* (6)
視　床	7.27 ± 1.26 (6)	8.90 ± 1.16 (5)
尾状核	4.15 ± 0.29 (6)	5.42 ± 0.51* (5)
海　馬	5.76 ± 1.17 (5)	4.15 ± 1.84 (6)
扁桃核	11.11 ± 0.94 (4)	4.38 ± 0.61** (6)
網様体	5.24 ± 0.27 (4)	3.06 ± 1.10 (6)
小脳皮質	3.64 ± 0.51 (6)	3.20 ± 0.94 (6)

( ) 例数　* $p<0.05$　** $p<0.01$

非中毒値 0.44 μmoles 5HT/g/hr.、中毒値では 0.71 μmoles 5HT/g/hr. と増加の傾向を示す点が注目される。

一方 MAO活性については非中毒群における活性値が、視床下部、扁桃核、視床などに高い。これは必ずしも 5HTP-D活性値とは一致しないところである。しかし視床下部では、非中毒群において酵素活性はともに高い。また中毒ネコの MAO活性は 5HTP-D活性と相異して部位的に増減を異にする変動を示す。すなわち扁桃核では約70%の著明な減少をみせ、視床下部、大脳皮質も減少を示す。これに対して尾状核は非中毒値に比較して増加する。

考察

慢性覚せい剤中毒マウスで、全脳 5HT が増加していることを認めた。そこでこの物質の変動が 5HT の合成系によるものか、分解系の過程によるものか検索するために、5HTP-D、MAO活性の測定を行った。中毒マウスにおいて、前者に若干の増加の傾向を認めたが、この差は 5% の危険率でしか有意でなかった。5HT の前駆物質である L-tryptophan、5HTP を単独および catron 前処置の動物に投与しても、中毒マウスと非中毒マウスとの間には 5HT 量に有意の差を認めることができなかった。また MAO活性でも両者の間に差はみられなかった。

この結果は、覚醒の中毒モルモットの MAO活性が一旦低下し、その後一時増加して次第に正常に回復するという二相性変化の結果(4)と相違するところである。これは対照となる動物の種特異性によるものであるかもしれない。

上に述べたようにマウス全脳を用いて 5HT 関連酵素活性を検討した結果からは、中毒マウスの 5HT の増量を説明しうる所見が得られなかった。

さて、船渡川は 5HT の脳内部位的分布の変動を中毒ネコについてしらべ、扁桃核、視床下部の 5HT の増加が持続的であることに注目した。また尾状核の 5HT のみが中毒

ネコで軽度の減少を示すことも認めている。

今回の実験結果からも明かなように、中毒ネコのMAO活性は、扁桃核において35%の著明な減少を示しており、また視床下部、大脳皮質にも減少の傾向がみられる。一方、尾状核ではMAO活性は若干増加している。これらの結果から5HTの変動とMAO活性の変動を比較検討するとき、特に扁桃核の態度がきわだって特異的である。

脳内5HTレベルの規定要因には、5HTP-D、MAOの他にL-tryptophan水酸化酵素も考慮せねばならず、中毒ネコ脳の扁桃核における5HT増加をMAO活性の減少、また尾状核における5HT減少をMAO活性の増加と関連づけるには、上記の所見のみで不充分である。しかしMAO活性が5HTP-D活性より20～30倍の強さであることを考えると、とくに扁桃核については、選択的にMAO活性の著しい減少と5HTの持続的増加がみとめられることは、これら部位における5HT代謝をさらに追求する必要を示唆するものである。

文献

1. Apison, M, H., Takahashi, R., Folkerth, T, L., : J. neurochem. 11, 341 (1964)
2. Bogdanski, D, F., Weissbach, H, Udenfriend, S., : J. neurochem. 1, 272 (1957)
3. 船渡川誠一郎, : 精神医誌 66, 9, 743 (1964)
4. 葉田裕, : 精神医誌 60, 1259 (1958)
5. 大須賀恒夫, 清水俊郎, : 精神医誌 68, 4, 501 (1966)
6. Synder, S, H., Axelrood, J., Zweig, M., : Biochem. pharmacol. 14, 831 (1965)
7. Udenfriend, S., : Fluorescence Assay in Biology and Medicine, Academic Press, N.Y., London (1962)
8. Utena, H., : Progress in Brain Research, Vol. 21 B, 192, Elsevier Publishing Company, Amsterdam (1966)

24 Methamphetamine 慢性中毒マウスの行動
ならびに脳内アンモニアに対する NH_4Cl 投与の効果

荒川 泰（群大・医・精神）
台 弘（東大・医・精神）

Ⅰ. はじめに

台ら[1][2][3]が Methamphetamine (M-A) 慢性中毒動物に著しい自発運動減退を認めて以来，当教室に於いて，その行動特性，神経化学的解析が研究されて来ているが，清水ら[4]は M-A 慢性中毒マウスに於ける脳内 Ammonia が種々の刺激に対応して一律に反応し，更にその回復が遅延することを報告した。又，清水[5]は静止状態における M-A 慢性中毒マウスの脳内 Ammonia が40%減少している事を報告し，次いで大須賀ら[6]は M-A 慢性中毒マウスの Adenin Nucleotide 特に ATP が車カゴ刺激で Ammonia の変動と平行する事から，脳内 Ammonia の処理機構として考えられている Glutamine 合成過程への ATP turnover の円滑さを欠くのではないかと云う事を示唆した。著者らはこのような知見にもとずき，M-A 慢性中毒マウスを用いて，塚田ら[7]の方法に従い NH_4Cl 投与及び足部通電刺激などの条件下で脳内 Ammonia の変動を追求してみたのでここに報告する。

Ⅱ 実験方法

a) 実験動物. 群大純系 dd-N マウスの体重 25-30g，生後7週以上経たマウスを用い，M-A 慢性中毒マウスは Methamphetamine-HCl 1.4mg/kg/day を2/日向以上皮下注射を続け，最終注射終了後 50 時間以上経過したものを用いた。マウスは，それぞれ10匹程度を一群として飼育した。

b) NH_4Cl 負荷. 塚田ら[7]の方法で 50mg-N/kg を腹腔内に投与し，又電気刺激前処置として 5mg-N/kg を腹腔内に注射した。特にことわりのない正常群は無処置マウスである。

c) 電気刺激. 足部通電刺激を用い，刺激を与え直ちに液体酸素中に落下凍結固定させ得る器具を作成し，それを用いた。電気刺激は20－30Vで行った。

d) 行動測定. 台[3]，高野[1][10]，清水[4]，湯浅[11]，大須賀ら[6]が用いていた車カゴを使用し，その回転数を測定した。運動測定時間は午前10時より午後3時の間，ほゞ一定時刻に同一場所にて行った。

e) 化学定量. 液体酸素で動物を凍結し，脳をとり出して crusher で凍結粉末とする。Ridter & Dawson[12]の方法で抽出し，Ammonia 定量は Conway[13]の微量拡散法で，Glutamine 定量は Harris[14]の方法で行った。

Ⅲ 実験結果.

第Ⅰ表，第Ⅱ表に示す如く，NH_4Cl を 50mg-N/kg 腹腔内に投与し，飼育カゴに置いた場合の脳内 Ammonia 及び Glutamine 値は，注射後15分で最高値を示し徐々に回復するが3時間後でも尚，高値を示している。M-A 慢性中毒マウスでは，1分後に既に正

Ammonia in brain

Minutes after injection	Normal control Mice	M-A intoxicated Mice
0 min	0.389±0.06(10)	0.297±0.07(10)*1
1 min	0.882±0.06(2)	1.60 ±0.07(2)*2
15 min	1.06 ±0.11(3)	1.77 ±0.14(4)*3
30 min	1.04 ±0.12(3)	1.38 ±0.12(5)
60 min	0.459±0.19(4)	1.15 ±0.16(6)
120 min	0.726±0.19(3)	1.19 ±0.21(2)
180 min	0.861±0.14(2)	0.973±0.37(3)

( ) ; numbers of exp. μmoles/g

〈第Ⅰ表〉 *1 $0.005<P<0.01$ で有意
*2 $0.05<P$ 〃 〃
*3 $0.01<P$ 〃 〃
(±SD. 但し2例の場合は平均値よりの巾.)

〈第Ⅱ表〉

Glutamine in brain

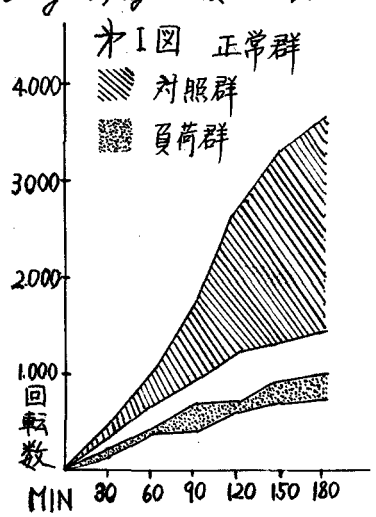
Minutes after injection	Normal control Mice	M-A intoxicated Mice
0 min	3.99-0.82(3)	3.82-0.63(12)
1 min	3.81-0.35(2)	3.69-0.40(2)
15 min	6.01-0.07(3)	5.79-0.74(4)
30 min	4.91-0.32(3)	5.07-0.40(5)
60 min	4.92-0.80(4)	4.59-0.18(6)
120 min	5.03-0.67(3)	5.34-0.44(2)
180 min	5.08-0.79(2)	5.59-0.64(3)

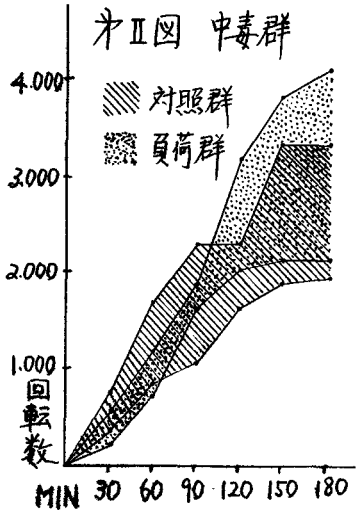
( ); numbers of exp. μmoles/g

常群の2倍に近い脳内Ammonia値を示し、15分後の最高値では正常群の67%の増加がみられる。一方Glutamine値は、やはり15分後に最高値を示し、徐々に減少するが、正常群とM-A慢性中毒群との差は認められない。

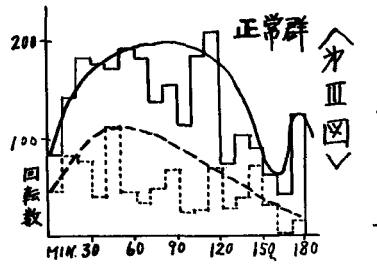
第I図、第II図は注射後1分経て、直ちに車カゴに投入し、その回転数を時間で追っていったものであるが、それぞれ4例のうち最高回転数と最低回転数とを結んだ図である。正常群及びM-A慢性中毒群のそれぞれの対照群には0.1mlの蒸溜水を腹腔内に注射し、他の群はMnCl 50mg-N/Kgを投与した。

第I図の正常群では著しく回転数が、MnCl投与により抑制され、第II図のM-A慢性中毒群では、MnClを投与しても何らの影響も受けない。3時間後の平均総回転数では、正常群に於いては負荷群で対照群の60%減、M-A慢性中毒に於いては、対照群の凡そ25%増加となっている。第III図、第IV図は、それぞれ10分間の平均回転数をとったものであるが、正常群もM-A慢性中毒群も、それぞれの対照群のpatternが乱れる傾向がある。

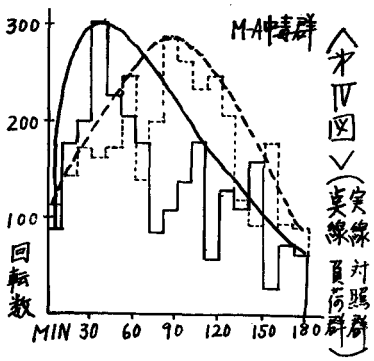




次にMnCl 50mg-N/Kg投与後車カゴに入れ、回転している最中の脳内Ammonia, Glutamineはどうか。第III表、第IV表に示してある様に、正常群もM-A慢性中毒群も、投与後銅



〈第III図〉



〈第IV図〉

〈第III表〉 脳内アンモニア(MnCl投与後車カゴに投入)

Minutes after injection	Normal control Mice A group	Normal control Mice B group	M-A intoxicated Mice A group	M-A intoxicated Mice B group
0 min	0.389±0.06(10)		0.297±0.07(10)	
10 min	0.410±0.14(2)	1.45 ±0.30(2)	0.396±0.13(3)	2.37 ±0.11(2)
30 min	0.685±0.18(3)	1.26 ±0.17(3)	0.580±0.14(3)	1.61 ±0.35(3)
60 min	0.391±0.09(3)	1.22 ±0.24(3)	0.393±0.14(3)	1.13 ±0.16(3)
120 min	0.546±0.09(3)	0.903±0.08(3)	0.460±0.06(3)	0.756±0.12(3)

A group ; dist.water 0.1ml i.p. injection
B group ; NH_4Cl 50mg-N/Kg i.p.injection
μmoles/g
( ) ; numbers of exp.

〈第IV表〉 脳内グルタミン(第III表の条件による)

Minutes after injection	Normal control Mice A group	Normal control Mice B group	M-A intoxicated Mice A group	M-A intoxicated Mice B group
0 min	3.99±0.82(3)		3.82±0.63(12)	
10 min	4.15±0.27(3)	5.87±0.90(3)	4.99±0.19(3)	5.73±0.40(3)
30 min	4.53±0.17(3)	5.53±0.88(3)	4.91±0.72(3)	5.87±0.22(3)
60 min	4.65±0.81(3)	4.81±0.90(3)	4.98±0.33(3)	4.93±0.98(3)
120 min	4.63±0.90(3)	5.08±0.58(3)	4.69±0.85(3)	5.15±0.36(3)

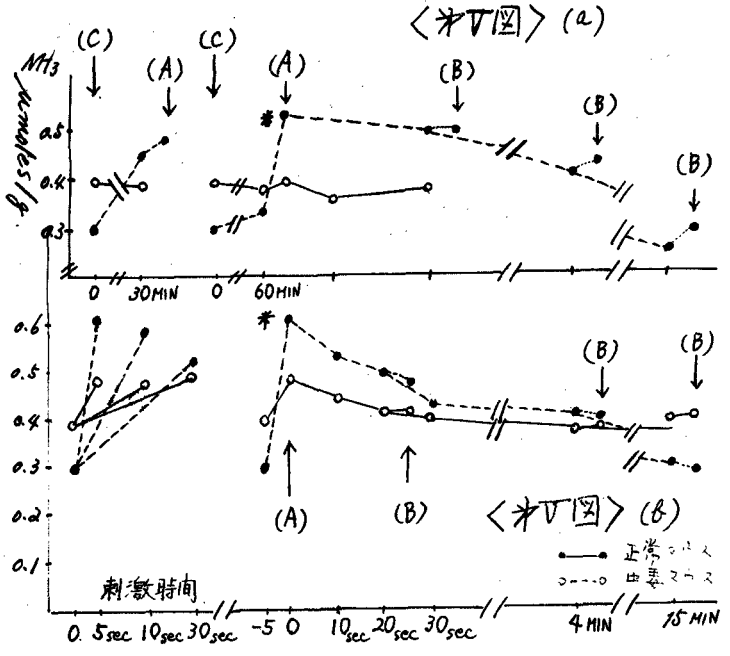
A group ; dist.water 0.1ml i.p.injection
B group ; NH_4Cl 50mg-n/Kg i.p.injection
μmoles/g
( ) ; numbers of exp.

育カゴに置いた状態よりも、脳内Ammoniaは更に増加を示している。注射後10分で、MA慢性中毒群は、正常群の凡そ67%の増加がみられ、MgCl投与後飼育カゴに置いた状態では60%の増加があったが、それよりも更に増加している。0.1 ml蒸溜水注射の対照群では、正常群もMA慢性中毒群もわずかに増加するが著明な増加はない。第IV表のGlutamine値は、正常群もMA慢性中毒群も殆んど変わりはない。

次に電気刺激を与えた際の脳内Ammoniaの変動を調べてみた。第V図がそれで、先に清水ら[2]が報告している様に正常群に比較してMA慢性中毒群は、刺激前の脳内Ammonia levelにもどるのが遅延している。正常群では脳内Ammoniaは電気刺激により、刺激前の状態の凡そ23%の増加を示し30秒前後で回復して来る。第1回刺激後20秒、4分、15分での第2回刺激には、脳内Ammoniaは殆んど応じない。一方MA慢性中毒群では、無刺激状態の脳内Ammoniaの2倍以上の値に、初回刺激で増加し、正常群よりもその増加が著しく、その回復も4分～15分かかる。初回刺激後20秒、4分、15分での第2回刺激には、正常群と同様脳内Ammoniaの増加は認められない。

服田ら[3]の報告によると第2回電気刺激に応ずるのは、初回刺激後150分経てからだと云い、初回電気刺激で増加した脳内Ammoniaが150分間にわたり脳内Ammonia代謝系に変化を生ぜしめるのではないか、更にMgClを注射しておくと初回刺激と同様の効果を示すのではないかと云っている。著者らは、この条件下でMA慢性中毒マウスの脳内Ammoniaの変動を追求してみた。第V表(a)がそれである。5mg-N/KgのMgClを腹腔内に投与し、60分後に電気刺激を与えると、正常群では脳内Ammoniaの変動は少しもみられない。しかしMA慢性中毒群では、正常群に変化を及ぼさぬMgClの量でも、注射後30分で無処置状態の50%の増加を示し、60分後でも10%程度の増加が認められる。MA慢性中毒群で、注射後60分の状態で初回刺激を与えると、60分後の刺激前状態の凡そ60%の増加がみられ、初回刺激に反応する。30分後での初回刺激にもわずかに反応するが著明な脳内Ammoniaの変動はない。その回復も4～15分でおこなわれ、初回刺激後30秒、4分、15分での第2回刺激には全く応じない。

〈第V図〉(a)



(A)；5 sec 電気刺激　(B)；5 sec 第2回電気刺激
(C)；5 mg-N/Kg 腹腔内に投与　* 0.05<P で有意

IV 考察

MgClの形でAmmoniaを生体内に投与した場合、車カゴによる行動特性は正常群に於いてmotor depressionとして現われ

M-A慢性中毒群では、何らの影響も現われない。これは正常群とM-A慢性中毒群とでAmmonia投与という条件下で、その感受性が異なるものと考えられる。

この事はMnCl投与の際の脳内Ammoniaのlevelでも云える。MnCl投与後、飼育カゴに置いた場合の脳内Ammoniaは、M-A慢性中毒群では1分後に、既に正常群の2倍に近い値を示し、15分後に最高値（正常群に比し67%の増加）を示した後、徐々に回復して来る。M-A慢性中毒群ではAmmoniaによるmotor depressionを来たさない為に脳内Ammoniaの増加が著しいのか、あるいはAmmonia固定系が弱いのかという事が考えられる。

MnCl投与後、車カゴに投入し脳内Ammoniaの時間経過を追求すると、飼育カゴに置いた場合よりも一段高いlevelを示し、特にM-A慢性中毒群でこのことが著しい。これは車カゴに投入し回転するという刺激状態が関与しているものと考えられる。

電気刺激の条件下でも、M-A慢性中毒群は、無刺激状態の2倍以上の反応を示すが、正常群では、只そ23%程度の増加しかみられない。その回復も、正常群では20～30秒後に刺激前のlevelにもどるのに対しM-A慢性中毒群は4～5分を要する。

従ってこの事から、清水ら[3]が既に報告している一連の条件下、即ち電気刺激、放り上げ刺激、車カゴ刺激等で一律に反応するという事と考え合わせると、ある刺激条件下での脳内Ammonia生成機構がM-A慢性中毒群では、正常群に比し増強され、更に処理機構も抑えられているのではないかと思われる。

MnCl前処置が電気刺激による脳内Ammonia増量を抑制する事は塚田ら[7]の報告と一致しているが、M-A慢性中毒群の場合は、この抑制効果が明らかでない。これは、前述したようにAmmoniaの生成機構が強く働いているものと考えられる。

尚、M-A慢性中毒群で、MnCl前処置を行わずに電気刺激を与えた時の脳内Ammoniaの増量は、MnClで前処置した場合のそれに比して若干大きい。即ち、それは無刺激状態に比し只そ104%増であるのに対し、MnCl前処置では只そ70%増である。

このことは、M-A慢性中毒群においてもMnCl前処置が、Ammonia固定系へ影響を及ぼしている事を示すのかも知れない。

本報告は、M-A慢性中毒マウスでMnCl投与に対する行動上の効果が正常マウスと異なることを示すと同時に、刺激に対する脳内Ammonia生成機構の異常な増大と、Ammonia処理機構の抑制があることを示したものである。

脳内Ammoniaのlevelには肝のUrea合成系が重要な役割をもつ事が考えられる[17]が、M-A慢性中毒マウスの肝臓機能障害、それに基くAmmonia処理機構の障害の有無については、現在検討中である。

文献

1) 台・江副・精神経誌 52. 204. 1951. 2) 台・江副・加藤・精神経誌 57. 126. 1955
3) Utena H. Goe T. et al J. Neurochem. 4. 161. 1959. 4) 清水他 神経進歩 6. 646. 1962.
5) 清水・精神経誌 63. 941. 1961. 6) 大須賀他 神経進歩 9. 585. 1965.
7) 塚田他 神経進歩 6. 631. 1962. 8) 台・最新医 14. 35 (昭和34年)
9) 高野他・北関東医 9. 910 1959 10) 高野他 北関東医 9. 919. 1959
11) 湯浅・精神経誌 63. 1167. 1961 12) Richter & Dawson · J. biol Chem 176. 1199 1948
13) Conway 石坂訳 微量拡散分析法の諸論文 14) Harris · J. clin Invest. 22. 569. 1943.
15) 吉村・他 神経進歩 6. 637. 1962.

25 躁うつ病とカテコールアミン代謝

長尾佳子・高見沢ミサ・
土屋健二・小林暉佳・
小林健一・仮屋哲彦・
高橋良（東京医歯大・医・神経）

Catecholamine 仮説[1]によれば、うつ病者の神経系には、絶対的ないしは相対的なCatecholamine（CA）の減少があると考えられており、このCAの代謝過程に起こる変化と、うつ病の病態との間の関連が想定されている。これらはreserpinによるうつ病の誘発、monoamine-oxidase-inhibitor（MAOI）とimipramineの夫々の作用様序による norepinephrine（NE）の増強作用などが有力な根拠とみなされている。NEはneuron内の顆粒から遊出すると、細胞内ではmitochondriaのMAOにより、dihydroxymandellic acid（DHM）となり、更にcatechol-o-methyltransferase（COMT）により、vanillomandellic acid（VMA）になるが、細胞外に出たNEは、postsynaptic receptor siteでこれを興奮させる。しかし一部は細胞内にreuptakeされて不活性化され、一部は細胞外のCOMTにより normetanephrine（NMN）になる。MAOIはNEの遊離活性型を増加させることにより、imipramine typeの薬剤は細胞外NEの細胞内へのreuptakeを阻止して不活性化を抑えることにより結果的にreceptor siteへのNEを増加させてneuronを刺激し、うつ状態を改善すると理論づけられている。又一方、うつ病者の5-hydroxytryptophan-decarboxylase（5HTPD）の活性が低く、尿中tryptamine量が少いことから、serotonin（5HT）とうつ病の病態との関連も考えられている。[2]

われわれは、典型的な躁うつ病の一症例について、尿中排泄物質、特にCA及びその関連物質についての生化学的研究を、その病像と対比しつゝ、縦断的に進めており、現在までの結果をまとめて報告したい。

実験方法

症例：59才男子、30才代に発病し、躁、うつ両病相を交互にくり返し、典型的な躁うつ病と診断される。最近数年は、躁病相から移行的にうつ病相に入り、この間の正常時が短いか、又は認められない。現在まで入院治療を受けている。

臨床的観察：患者尿は午前6時から翌朝午前6時迄の24時間尿を、予め6N-HCl 15mlを入れた容器に集め、この量と比重とを測定し、この全尿のうちの一部を、生化学的定量のため4°C以下の氷室に保存した。

患者には常時歩数計を携行せしめ、一日の歩数を記録して、これを運動量の指標とした。

臨床症状の把握には、うつ病[3]及び躁病[4]の評価尺度法（rating scale）を用い、医師、看護者、患者用の各々のrating scaleの得点をもって定量化した。

生化学的測定：4°C以下に保存された尿を濾過して、夫々の定量に供した。

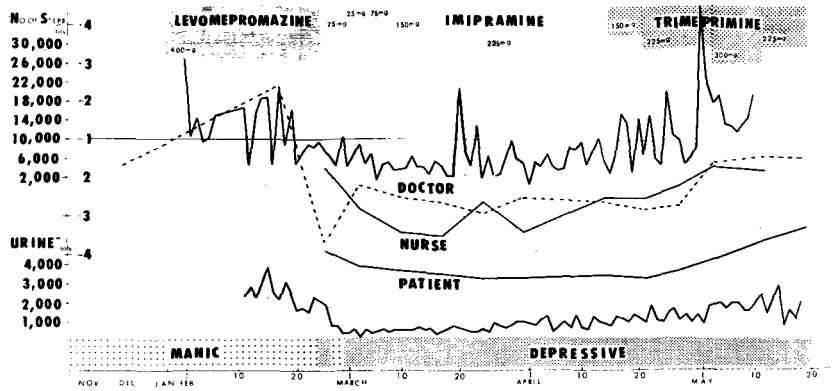
各物質の定量法については次にあげる夫々の方法に従った。NE, E；Croutの方法[5]を用い、Fluorophotometerによって、pH 6.5の点でNEを、pH 3.5の点でEを夫々測定した。NMN, MN；Taniguchiらの方法[6]による。VMA；Weilmalherbe[7]の方法、DA；Carlsson-Waldeckの方法[8]を一部変法して、HVA；Satoの方法[9]、5HIAA；Udenfriendらの方法[10]を夫々用いた。尚この他に、尿中Ca

についても、柳沢の方法[11]を用いて測定し、又Creatinineについても Folin の方法[12]により測定した。なお、各物質の測定の結果は、24時間尿中総排泄量に換算し、これを mg 単位によってあらわすこととした。

結果と考察

臨床像については、躁病相より、うつ病相への移行にともない、うつ病の各rating scaleの評価総得点の平均が減少し、これと同時に尿量が激減し、かつ運動量の指標としての歩数も著明に減少する。うつ状態が改善され、躁病相へ再び移行するにつれ、前記得点の平均が増加し、躁病のrating scaleのそれも同じく増加し、同時に、尿量、歩数も増加する。(図1)

図1. 臨床像の変動



尿中排泄物質の変動について、経時的な変化は次にのべる如くである。(逐日的変動のグラフは省略し躁、うつ各病相の約一週間における、各物質の排泄量の平均をこれらの付表として図2に比較して示した。)

Epinephrine (E) 及び Norepinephrine (NE) : Eについては、両病相を通じて特に明らかな変動はなく、ほぼ正常値に近い値を示す。NEは躁病相で著明な増加が認められ、うつ病相への移行につれて減少し、明らかなうつ状態を呈する病期において最も低い値となり、うつ病相から再び躁病相への移行にともない、急速に著しい増加を示し、病相の動きとよく対応した結果を示した。なお、運動量の大きい時点で特にこれに応ずる増加は認められず、このことから運動の結果による増減ではなく、より病態に関連した変動と考えられる。

Metanephrine (MN), Normetanephrine (NMN) : MNはtotalの値は躁、うつ両病相で特に変動はなく、NMNについては、同じくtotalの値でみると躁病相では高い値を示し、うつ病相では著明に低い値を示す。なおこれをfree NMN conjugated NMNに分けた値でみると、躁病相では特に前者の値が正常値に比して著しく高く、一方、うつ病相では、特に後者の値が著しく低い。しかしこれらは、測定数を増して更に検討する必要があると思われる。MN, NMNとも夫々E, NE, の変動に対応する結果であった。

VMA : 測定点を多数にとった結果から、尿中排泄には、律動的な日間変動が認められたが、両病相に特徴的な傾向は明らかで、すなわち、躁病相では正常に比しての増加が著しく、躁症状の軽減から、更にうつ病相の開始期にかけて、減少が著明となり、うつ病相を通じて低い値が持続するが、うつ状態の改善とともに再び増加する。なお、個々の測定点における、運動量との相関は特に

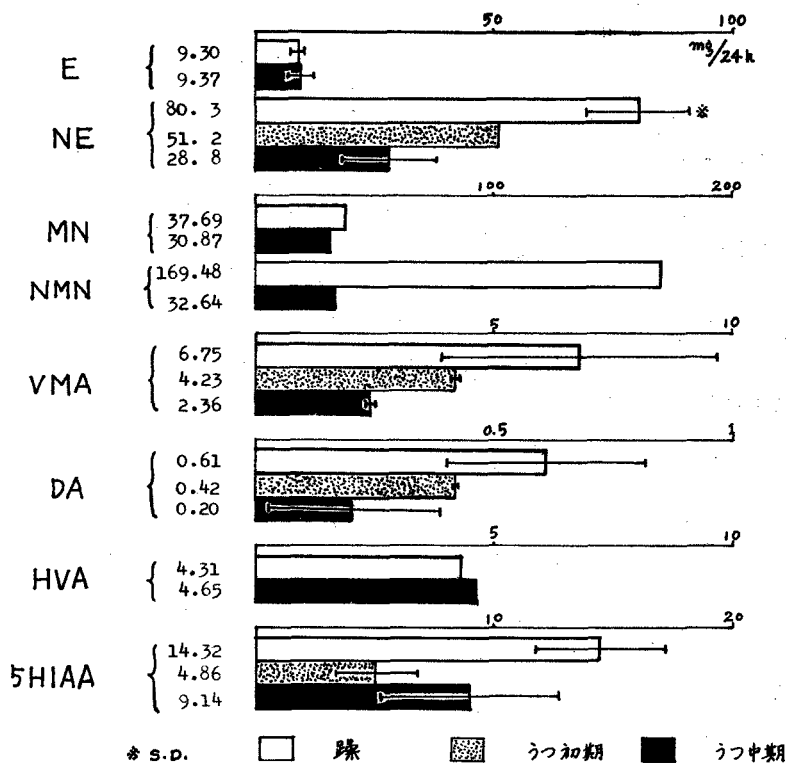
認められなかった。VMAの変動はNEのそれとほぼ同様の結果である。

Dopamine (DA) 及び Homovanillic acid (HVA) ： DAについては、躁病相で増加し、うつ病相で減少する結果となったが、特に躁病相において、日間変動が大きく、個々の値の差が大きいので確認には更に検討が必要と思われる。DAもNE、VMAと同じく、運動量の大きい時点でのそれにともなう増加は認められない。HVAについては躁うつ両病相の間に特に有意の差は認められず、DAの示す傾向とは一致しないが、DAの著しい高値を示す同じ時点で、それに対応する著しい増加が認められたので今後の検討を要するものと考えられる。

5-hydroxiindol acetic acid (5HIAA) ： 日間変動はかなり大きいが、躁病相では正常に比しての増加が認められ、躁病相からうつ病相への移行に伴って減少する。特にうつ病相では初期の減少が著明で、うつ状態の持続中はこの減少がやゝ回復する傾向を示す。うつ病相の改善期から躁病相への移行期には、特に明らかな変化はなく、躁病相の初期には、前回期における躁病相に比して低い値に止まっていた。

Creatinine 及び Ca ： Creatinineは尿中一日排泄量の、躁、うつ両病相における変化は認められなかった。又Caも食事中Ca量に関係なく、特に両病相の間に変動は目立たず、文献の報告[11]にあるような知見は得られなかった。Creatinine、Caとも正常範囲内の値を示した。

図2. 躁うつ両病相における各物質の尿中平均排泄量



薬物の影響 ：

うつ病相においては、imipramine 150～225mg及びTrimeprimine (Surmontil) 150～225mgを投与したが、両者の投与期間中の各物質の尿中排泄量の間に特に著明な差違は認められなかった。(表1) 又同一薬物の同一量投与中においても、病像の変化にともなって、夫々の物質の変動が認められたことからも、これらの変化が投与薬物の直接的な影響ではないこと

を示唆すると考えられる。

この他にうつ病期の一時点で reserpine 2.5mg を筋注し、imipramine との相乗効果によると報告されているうつ状態の改善の有無と NE, E の変動について検討したが、臨床的には一過性の自律神経症状の発現のみに止り、又尿中Eは変動が少く、NEについては単位尿量当りの含量が一時的に増加したに過ぎなかった。又別に躁病期において、一定期間中 DOPA-decarboxylase inhibitor 及び CA releaser とされる α-methyl DOPA を経口投与し、病像に及ぼす影響と、各物質排泄の変動とを観察したが、この結果については現在追求中であるが、現在迄に、5HIAAについては、同じ病相におけるplacebo投与期間中のそれと比較して、特に変化はなく、いづれも低い値を示す。DAについてはα-methyl DOPA 投与時に著しい高値を示すが、これは release された DA それ自体か、あるいは投与薬物が定量に及ぼす影響かについて今後更に検討の必要がある。尚その後の placebo 投与時の測定では、前躁病相における測定結果の中でも高値に属するものに近い値であった。更に測定点を増して検討したい。

表1. 各物質の尿中排泄量と投与薬物

	Imipramine mg/24h	Trimeprimine mg/24h
NE	28.9 ± 10.29 (5)	23.1 ± 4.15 (2)
VMA	2.36 ± 0.77 (9)	2.79 ± 0.82 (5)
DA	0.20 ± 0.18 (7)	0.29 ± 0.41 (4)
5HIAA	4.86 ± 1.84 (4)	5.84 ± 1.60 (10)

CA 及びその関連物質の尿中排泄の変動が、必ずしも中枢神経系における代謝のみの反映ではなく、末梢神経や副腎における代謝が大きく関与しているとしても、両者は全体としては同じ動きを示す可能性はつよいと考えられるので、以上にあげた各物質の変動は CA 仮説をよく支持すると思われる。なお、この他に、5HIAA の変動において、特にうつ病の初期にその減少が著明なことなどから、うつ病の病態と serotonin 代謝の関連も想定されるので、更に詳細な検討が必要であると考える。

文献：

(1) Schildkraut, J.J. Am. J. Psychiat. 122 509 (1965)
(2) Coppen, A. et al Brit. J. Psychiat. 111 105 (1965)
(3) 川北幸男, 精神々経誌 68 122 1966
(4) 高橋 良他, 未発表
(5) Crout, J.R. Standard Methods of Clinical Chemistry (D.Seligson id) 3 62 Academic Press New York
(6) Taniguchi, K et al J. Lab. and Clin. Med. 64 469 (1964)
(7) Weilmalherbe, H. Anal. Biochem. 7 485 (1964)
(8) Carlsson, A and B. Waldeck Acta Physiol. Scand. 44 293 (1958)
(9) Sato, T.L. J. Lab. and Clin. Med. 66 517 (1965)
(10) Udenfriend, S. et al Method of Biochem. Analysis 6 113 (1958)
(11)
(12) Folin 2 Physiol. Chem. 228 268 (1934)
(13) Coirault, R. et al Med. exp. 1 178 (1959)

26 Eck 氏瘻犬における l トリプトファン誘発性「昏睡」

荻原一晃・茂在敏司
（東大・医・中尾内科）
平井俊策（東大・医・老人）

我々は肝性脳症の発生機序を解明する目的をもつて，Eck 氏瘻犬（以下 Eck 犬）を作製し，蛋白質，尿素の他，各種 l 型アミノ酸を経口的に負荷し，神経症状出現との関係を観察した。その結果，食餌性アンモニア窒素源の増加と平行して神経症状が出現するという従来の見解を少しも裏付けることは出来ず，アミノ酸の中，特に l トリプトファンに神経症状の出現を認め易い事実を見出した。肉中毒症の成因に関聯し，興味ある知見と考えるので報告する。

実験材料及び方法：体重 10 kg 牡，雑犬に端側吻合にて Eck 氏瘻作製，以後三ケ月間，一日総蛋白 10 gm 以下，熱量約 500 カロリーにて飼育した後，経口的に負荷実験を開始した。負荷物質は原則として，基本食餌に混入して与え，その際出来る丈総カロリーに変動を与えぬ様努め，又各負荷相互間は，特別な観察を目的とする以外には，充分な休止期間を設けた。負荷含窒素物質としては，蛋白源として，アサリむき身 1 kg，豚レバー 500 gm，カゼイン 200 gm を用い，特にカゼインは一週間連日 100 gm 負荷を行つた。又比較的純粋なアンモニア源単一物質として尿素一日 20 gm を負荷した。

更にアミノ酸として glycin，l グルタミン酸の他，l ロイシン，l メチオニン，l フェニールアラニン，l トリプトファンを一日 10 gm 乃至 30 gm 負荷して神経症状の発現観察に努めた。l トリプトファンは 10 gm 以下の負荷を含め合計 12 回負荷し，その中 10 gm 負荷は 4 回であり，又対照犬として略同重量の二頭の犬を用い，同様 10 gm 負荷延 4 回行つた。

結果：上述の各種負荷実験に際し，血中アンモニアは，時に比較的著明な増加を認めたが，トリプトファン負荷を除き，本実験条件下では認むべき神経症状の発現はなかつた。トリプトファン 10 gm 負荷では，計 4 回，各回とも歩行障害，視力障害，失禁，約直後吐吐等を主徴とする著明な神経症状を呈した。この際，注目すべき事実として，アンモニアの血中上昇は少しも伴わず，又対照犬の神経症状の発現は陰性であつた。

考案：Eck 犬における肉中毒症については，既によく知られている如く，Eck. N. が技術的に門脈下大静脈吻合が可能なる事を示して以来のことで，Pavlov の記載に始まるものとされている。Eck 犬における肉中毒症はその名の示す如く，吻合術を受けた犬において多量の食肉の後発する歩行障害，視力障害を主徴とする神経症状の発現を意味している。肉中毒症の成因には従来種々なるものがあげられ，グアニジン，カルバミン酸等も問題にされた事があつたが，Riddel 等[1]の此の方面へのアンモニア測定技術の導入以来，略アンモニアの上昇がその成因に大きな役割を演じていることが，一般に推定されていた。Riddel 等によれば，Eck 犬における神経症状の発現は，自然観察で，約 1/6 と比較的少く，又人為的には肉 1 kg を 1.2 kg を 1 日乃至 3 日間，強制摂食せしめれば，略全例にアンモニアの上昇と共に，肉中毒症を認めると述べている。我々は此の様な多量の食肉を行うことなく，l トリプトファン僅か 10 gm にて，著明な神経症状の発現観察に成功した事は，極めて興味ある知見であり，更に同一 Eck 犬に，食肉，尿素等のかなり多量の負荷を合せ行つたが，アンモニアの比較的著明な上昇に拘ら

ず．少ずしも神経症状の出現を見なかった事は注目すべきことと考える．トリプトファン単独負荷で，神経症状の発現を見る事は，他の何れの実験條件下でも今り知られておらず，僅かにMAO阻害剤との併用で，猿に少数認めたとする報告[2]があり，又人体で性格変化を主体とする精神症状を見たとする散発的な報告[3]はあるが，特に本実験の如く著明な神経症状の記載したものはない．又ECK犬における負荷実験は，我々の知る限り，本実験が最初の試みと考える．Riddelらの実験條件でも知られる如く，肉中毒症を誘発する食肉負荷量は1kgと云う比較的大量であり，その際アンモニア源としての窒素因子の他，芳香族アミノ酸を含む種々なる蛋白構成成分が，肉中毒症の発生要因として規定すべき充分な理由があると信ずる．我々は特にトリプトファンの関与が大であるとの可能性を示す実験事実を得たが，今後更に肉中毒症の発生機序の詳細なる解明，並びに肝性脳症との関聯を追究する必要があると考える．

結論：我々はECK犬一頭にLトリプトファンを負荷し，10gm負荷4回中4回，著明なる歩行障害，視力障害，失禁，幻覚妄想状態を主徴とする神経症状と認めた．この際，対照犬2頭計4回の負荷では症状の発現は陰性であった．又同じくECK犬においてグルタミン，Lロイシン，Lメチオニン，Lフェニールアラニン等の10gm負荷及び，蛋白200gm，尿素20gm負荷においても神経症状の発現は認めなかった．

文献：1) Riddel, A.G. et al: Surg. 36: 675 (1954)
2) Curzur, G. et al: Neurol. 13: 431 (1963)
3) Prockop, D.J. et al: New Eng. J. Med. 268: 685 (1963)

（8mm映画供覧　約2分）

27 リボヌクレオシド-2′, 3′-環状フォスフォジエステラーゼの神経組織における分布

栗原 正・塚田裕三
（慶大・医・生理）

リボヌクレオシド-2′,3′-環状リン酸を水解してリボヌクレオシド-2′-リン酸を生ぜしめる酵素活性は，はじめ脾フォスフォジエステラーゼ標品について記載され[1]，ついで脾から部分的に精製された[2]．1962年 Drummond ら[3]はこの酵素活性がとくに中枢神経に著明であることを認めた．すなわち，とくに活性の強い脊髄ほど脳幹では比活性にして脾の10倍，脾の40倍にも達することが明らかにされた．一方，Drummond らが調製した酵素標品は，脳アセトンパウダーからカーブクトール，石油エーテルほぼ緩衝液で連続的に抽出した残査であり，本酵素が不溶性の酵素であることを予想させるものである．われわれのうちの一人も，本酵素が大脳アセトンパウダーから0.15M食塩でほとんど抽出されてこないことを確認している[4]．以上二つの理由から本酵素は，その生理的意味が現在のところ不明であるにせよ，中枢神経の細胞構造の目印として大きな利点をもつのではないかと想像される．われわれは本酵素が中枢神経のいかなる構造に結びついているかを明らかにすることに重点をおきながら本酵素の研究に着手した．今回報告する事項は次の通りである．(1)酵素活性が再現性よく測定されるためには前もって音波処理をすることが有効であること．(2)神経組織の各部位での活性分布．(3)細胞内の分布

［実験方法］

ヌクレオシド-2′,3′-環状フォスフォジエステラーゼ（以下 2′,3′-環状 PDase と略記する）の測定は Drummond ら[3]の方法に従ったが，一部改変して用いた．終濃度 50 mM クエン酸リン酸緩衝液，pH 6.2 に酵素液を入れ，終濃度 0.5 mM アデノシン-2′,3′-環状リン酸カリウム（またはナトリウム）を加えて反応を開始する．反応液は全量 0.2 ml とする．37° 20分インキュベイトしたのち 0.02 ml 氷酢酸で反応を停止する．遠心上清 0.05 ml をとり，ヘアードライアーでかわかしながら東洋ロシ 51A につけ，イソプロパノール2飽和硫安79 0.1M酢酸ナトリウム18 で展開する（上昇法）．アデノシン-2′-リン酸のスポットを切りとり（紫外部の吸収を見て鉛筆でマークをつけておく），こまかく切りきざんで 0.01 N HCl 4 ml で抽出する．37°で数時間保ってから軽くふりまぜ，再び37°で一晩放置する．下に沈んだロシくずがはいらぬように注意しながらキュベットにあけ，260 mμ の吸光度を測定する．0.01 N HCl 中のアデノシン-2′-リン酸の分子吸光係数は波長 260 mμ で 14.2×10^3 である．2′,3′-環状 PDase の活性は反応液 0.2 ml に生成したアデノシン-2′リン酸の μmole 数であらわした．酵素量-活性曲線はこの条件で 0.9 μmole まで直線である．

アデノシン-2′,3′環状リン酸は Smith ら[5]に従って合成した．ヌクレオシド-2′,3′環状リン酸は国際バリウム塩として保存するのが最も安定であるといわれているが，アデノシン-2′,3′環状リン酸の場合，カリウム塩（またはナトリウム塩）水溶液としてディープフリーザーに保存すれば少くとも3箇月は使用できる．バリウム塩をカリウム塩に変えるにはバリウム塩を水にとかし過剰量の K_2SO_4 をかえて遠心しその上清をとればよい．

音波処理は大岳製作所 Sonicator-150，20KC，150 W によった．処理すべき酵素液は

水で希釈して 10 ml とし（液量が少ないと乳鉢が洗いにくい）20 ml 三角フラスコに入れて外側から氷水で冷やしながら音波処理をおこなった。

Na-K-ATPase は次のようにして測定した。反応液の組成は Skou[6] の成績を参照して決定した。終濃度 50 mM トリス緩衝液 pH 7.5, 6 mM $MgCl_2$, 5 mM KCl, 100 mM NaCl に酵素液を入れ，終濃度 3 mM トリス ATP を加えて反応を開始する。（予備実験では Na_2 ATP を用いた）反応液は全量 2.0 ml とする。37°15分 インキュベイトしたのち 50% TCA 0.2 ml を加えて反応を停止し，遠心上清 1 ml について Fiske-SubbaRow の方法[7] で無機リン酸を定量する。反応液 2.0 ml に遊離した無機リン酸の μmole 数をもって ATPase の活性とし，完全な反応組成から KCl および NaCl を除いて反応させたときの値をさし引いて Na-K-ATPase とした。

タンパク質の定量は Lowry ら[8] に従った。

ホモジェネートは Potter 型ガラス-テフロンホモジェナイザーを使って組織を 0.32 M Sucrose または水の中で数回上下して破砕することによって調製した。とくにことわらない場合は 0.32 M Sucrose ホモジェネートである。こわれにくい末梢神経はよくきりきざんでからガラス-ガラスホモジェナイザーを使って破砕した。

ホモジェネートの分画法は第1図に示す通りである。

〔実験結果〕

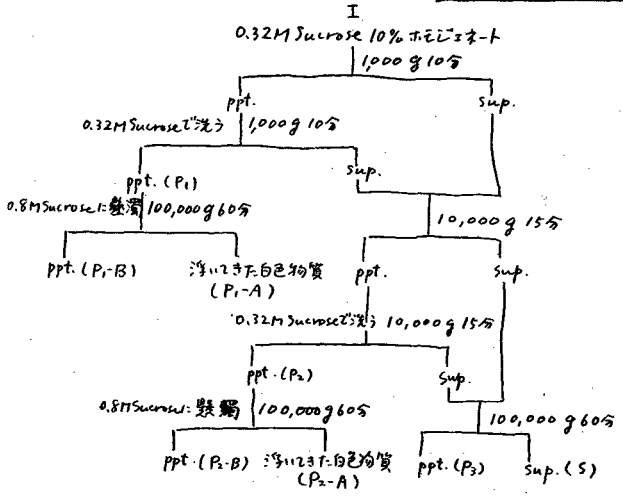
〔1〕予備実験　予備実験の結果を第1表および第2表に示す。(1)白質は灰白質にくらべて著しく活性が強く，およそ10倍である。同時に測定した Na-K-ATPase は灰白質の方が強い。(2)殺した動物をすぐにホモジェネートにした場合は活性が弱い。とりだした組織をそのままフリーザーに保存しておくと活性が強くなるらしい。(3)新鮮なホモジェネートの場合にも，音波処理をすることにより著しく活性が大きくなる。

〔2〕音波処理　音波処理により再現性の良い高い活性がえられるのではないかと考え，その条件を検討した。音波処理の時間による活性の変化を第2図に示す。10分間の処理で活性は最大に達するので，以後の実験では音波処理10分という条件を用いた。音波処理の際の溶媒は脱イオン水であるが，0.032 M Sucrose でもさしつかえない。つまり 0.32 M sucrose ホモジェネートであれば水で10倍に希釈してから音波処理をすればよい。0.05 M クエン酸リン酸緩衝液(pH 6.2)のはいったホモジェネートでは活性化の能率が著しく悪い。以後の実験では，音波処理をするときには水で希釈し，音波処理をした酵素液の活性を測定するためにさらに希釈を要するときには 0.05 M クエン酸リン酸緩衝液(pH 6.2)を用いることにした。

〔3〕神経組織の各部位における活性の分布　ウサギの神経組織を用いて，前記音波処理をほどこし活性を測定した結果を第3表に示す。大脳白質又は脳梁に活性が強く，大脳灰白質のおよそ10倍であることが確認された。末梢に行くに従って活性が弱くなるようである

〔4〕細胞内の分布　大脳白質　　のホモジェネート，　　大脳半球のホモジェネートをそれぞれ分画して活性を測定した結果を第4表に示す。われわれは一応本酵素の活性はミエリン局在という結論を出したが，この点についてさらに検討を要すると考えている

第1図　ホモジェネートの分画法



P1-A, P2-Aは2.5倍に希釈してから 12,000 g 20分 遠心して沈殿させ，それぞれP1-A，P2-Aとして活性測定に用いた

II

ほとんどIと同じであるがIとちがう点は

1) P_2分画は洗わなかった．

2) P_1, P_2, P_3分画はおのおの0.8M Sucroseに懸濁して(1.5M Sucroseで0.8Mに合わせる)遠心管に入れ，その上に0.32M Sucroseを重ねて，水平ローターで遠心した(100,000 g 60分)．界面に集まった白色物質をA，沈殿をBとした．

第1表　抗白質 白質に対する分布 —— 予備実験

実験番号	酵素標品	2′,3′-環状PDase (μmoles/mg タンパク)	Na-K-ATPase (μmoles/mg タンパク)	日付(月/日)*
3	ウシ大脳皮質	6.6	—	4/11 4/12 4/20
	〃 大脳白質	92.5	—	
4	ウサギ大脳皮質	4.6	1.13	4/25 4/27 4/27
	〃 大脳白質	99.0	0.42	
	〃 大脳	38.5	0.76	

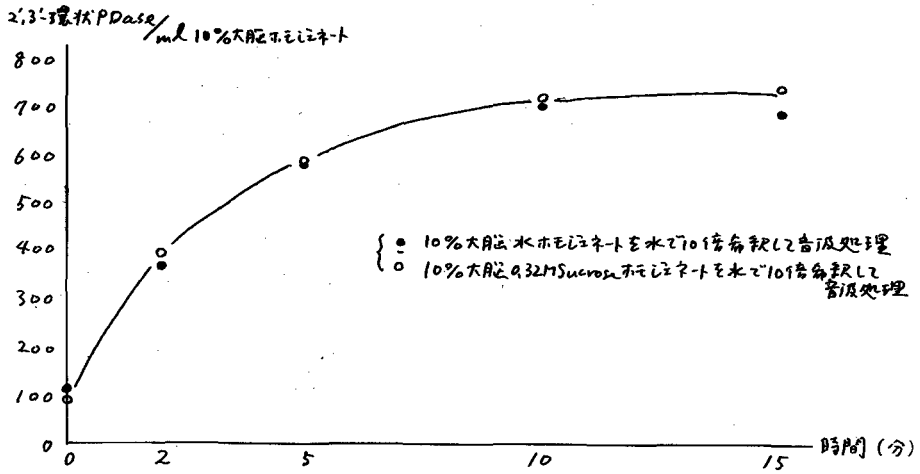
第2表　神経組織の各部位における活性 —— 予備実験

* 日付，左から動物を移して脳をとりだした日，ホモジェネートを調製した日，活性を測定した日．

実験番号	酵素標品	2′,3′-環状PDase (μmoles/mg タンパク)	日付(月/日)*
7	ウサギ大脳	32.4	4/6 5/9 5/9
	〃 小脳	31.4	
	〃 脳幹	51.9	
	ウサギ 脊髄	62.2	5/4 5/9 5/9
	〃 腰髄	63.2	
	〃 仙髄	48.0	
	〃 笠骨神経	5.5	
9	ウサギ 大脳皮質	8.3	5/10 5/11 5/11
	〃 大脳白質	38.2	

実験番号	酵素標品	2′,3′-環状PDase (μmoles/mg タンパク)	日付(月/日)*
17	イヌ大脳	7.9	6/1 6/1 6/1
	〃 大脳白質	15.2	
	イヌ大脳	5.5	6/1 6/1 6/3
	〃 大脳 水ホモジェネート 超音波処理5分	68.5	
19	イヌ大脳白質	16.8	6/1 6/1 6/6
	〃 大脳白質 超音波処理5分	112	
	〃 大脳白質 ホモジェネート 超音波処理5分	162	
22	イヌ大脳白質	91.5	6/1 6/16 6/16

第2図　音波処理の時間による活性の変化



第3表　神経組織の部位による活性の分布

組織	2',3'-環状PDase μmoles/mg タンパク	
	未処理	音波処理
大脳皮質	5.4	18.5
大脳白質	38.0	188
脳梁	42.7	200
頸髄	34.3	122

組織	2',3'-環状PDase μmoles/mg タンパク	
	未処理	音波処理
仙髄	—	72.0
馬尾	12.5	20.3
坐骨神経	6.9	7.1

第4表　細胞内の分布（ウサギ）

大脳白質　ホモジネートの分画（分画法Iによる）

分画	2',3'-環状PDase μmoles/ml ホモジネート原液	タンパク mg/ml ホモジネート原液	比活性 μmoles/mg タンパク
P_1-A	506	3.16	160
P_1-B	63	0.91	69
P_2-A	690	3.34	206
P_2-B	52	0.88	59
P_3	408	1.84	222
S	100	2.07	48
ホモジネート	1900	12.3	155
回収率（%）	96	99	

大脳ホモジネートの分画（分画法IIによる）

分画	2',3'-環状PDase μmoles/ml ホモジネート原液	タンパク mg/ml ホモジネート原液	比活性 μmoles/mg タンパク
P_1-A	101	0.676	149
P_1-B	55.2	1.41	46.3
P_2-A	295	1.59	185
P_2-B	53.1	3.41	15.6
P_3-A	222	1.13	197
P_3-B	208	4.24	49.1
S	31.7	2.79	11.4
ホモジネート	865	15.4	56.1
回収率（%）	113	99	

文献　1) Whitfeld, P.R., Heppel, L.A., and Markham, R., Biochem. J. 60, 15 (1955)
2) Davis, F.F., and Allen, F.W., Biochim. Biophys. Acta 21, 14 (1956)
3) Drummond, G.I., Iyer, N.T., and Keith, J., J. Biol. Chem. 237 3535 (1962)
4) 栗原 正，第38回日本生化学会総会，福岡 (1965)（生化学 37, 507）
5) Smith, M., Moffatt, J.G., and Khorana, H.G., J. Am. Chem. Soc. 80 6204 (1958)
6) Skou, J.C., Biochim. Biophys. Acta 58, 314 (1962)
7) Fiske, C.H., and SubbaRow, Y., J. Biol. Chem. 81, 629 (1929)
8) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J., J. Biol. Chem. 193 265 (1951)

28 神経組織の蛋白質の抽出分離に関する研究

野口鉄也・野村正彦・
塚田裕三（慶大・医・生理）

臓器蛋白質の抽出方法は各種の方法[1~5]が考えられて来たが，それらの方法による蛋白質抽出の回収量は全蛋白量の約20～40％にすぎない．そこで吾々は超音波処理により，より回収率の高い方法を検討し全蛋白の80～90％を水可溶性蛋白として得る方法を案出したのでここに報告する。

方法　全実験は0～4℃で行った。(1)蛋白抽出法　白鼠を瀉血断頭後直ちに各臓器を剔出し，冷等張食塩水中で洗滌後，脱イオン水で速やかに食塩水を洗い落し，カミソリの刃で組織を小片に切り，10倍量の冷脱イオン水中でテフロンホモジナイザーを用いて，3分間ホモジナイズする。このホモジネートを平底三角フラスコ（容量50ml）に移し，発振端を液面下0.5～1cm下に沈めて20KC，150w，5分間の超音波処理をする。この時資料温度を10℃以下に保つよう容器を冷却する。超音波処理後105,000g，60分間超遠心し，その上清を水可溶性蛋白分画とする。再びその沈渣を10倍量の脱イオン水にサスペンドし上記音波処理遠心を2回繰返す。水抽出後の最終沈渣を更に0.5M KCl溶液で前回と同様の音波処理を行い，10,000g，30分遠心後その上清を0.5M KCL抽出蛋白分画とする。これを3回繰返す。更に0.5M KCL最終沈渣を10倍量の0.3％Triton X-100を含む0.1M KCl溶液にサスペンドして超音波処理を加え，後10,000g，60分遠心，その上清をTriton X-100抽出蛋白分画とする。(2)細胞分画　剔出組織を小片化し，0.32M Sucrose pH7.2中でテフロンホモジナイザーを用いてホモジナイズし，800g，20分遠心，その沈渣を核分画とする。この上清を更に8,000g，15分遠心し沈渣をミトコンドリア分画とし，次いでその上清を105,000g，60分遠心し，沈渣をマイクロソーム分画とする。(3)化学的定量　蛋白の定量はLowryの方法[6]で行い，牛血清アルブミンを標準資料とする。但し資料に沈澱のある場合には予め1N NaOHに溶解後Lowryの方法を用いる。RNA，DNA，燐脂質の分離抽出はSchmidt & Thannhauserの方法[7]に従って行い，RNA，DNA，Lipid-Pの定量は夫々Mejbaumの方法[8]，Burtonの方法[9]，Allenの方法[10]で行う。(4) ATPase活性の測定　Gibbsらの方法[11]に従って行い，Tris-Buffer pH7.3にてATP-2Na，1mM，$MgCl_2$，2mM，KCl 6mM，NaCl 150mM，37℃保温の系で活性を測定する。無機燐の定量はMartin-Dotyの方法[12]による。(5) DEAE-Cellulose Columnchromatography　DEAE-Cellulose(Brown)をPeterson & Soberの方法[13]に従って活性化し，0.8×25cmのカラムを用い，外套管でカラムを1～2℃に冷却しながら溶出を行う。カラムに重填するDEAE-Celluloseは予め十分に20mM Tris-Buffer pH8.5で飽和させ，又カラムに乗せる資料は6倍量の0.2M Tris-Buffer pH8.5を加えてStarting-Bufferと等濃度にする。溶出方法はStarting-Bufferに20mM Tris-Buffer pH8.5を用いる以外Bondy & Perryの方法[2]に従って0.1M KCl 20mM Tris-Buffer pH7.6，0.5M KCL 20mM Tris-Buffer pH7.6，1.0M KCL 20mM Tris-Buffer pH7.6を用いて階段的に塩濃度を上げて溶出を行う。カラムより溶出された物質のCheckには flow-cell type の UV Recorderを用いて連続的にOD_{260}を観察し，更にフラクションコレクターに分取し再び紫外部各波長の吸収を測定後化学的定量に供する。(6) Acrylamide Gel Electrophoresis　Ornsteinの方法[14]に従って分離相に7.5％Acrylamideを用い上下槽共にTris-Glycine Buffer pH8.3を満し，上槽に陰極，下槽に陽極を置き，カラム当り4mAの電流を約1時間泳動する。泳動後の染色にはアミドシュワルツを使う。

結果及び考案　(1)抽出方法の検討　白鼠大脳を用いて抽出液及び超音波効果について検討を加えた。表1

Protein Extraction from Brain Tissue under Several Conditions

Trial \ Medium	Water			Water + Sonication			0.15M NaCl			0.15M NaCl + Sonication		
	Protein (mg/g wet wt.)	Recovery (%)		Protein (mg/g wet wt.)	Recovery (%)		Protein (mg/g wet wt.)	Recovery (%)		Protein (mg/g wet wt.)	Recovery (%)	
Original (Found)	98.0	100.0		101.2	100.0		113.0	100.0		107.4	100.0	
1	26.2	26.7	40.4	65.2	60.5	88.4	24.7	21.8	38.1	33.1	34.5	47.9
2	8.8	9.0		22.8	22.5		4.6	4.1		9.8	9.2	
3	5.4	5.5		5.1	5.4		2.4	2.2		3.7	3.5	
Residue	68.2	69.6		13.7	12.3		82.4	72.9		58.2	59.4	
Total (Calculated)	106.6	110.0		107.1	104.8		114.1	101.0		104.8	97.5	

表1に見られる如く，抽出液として脱イオン水を用いると3回の抽出によって全蛋白量の40%が抽出されて来るのに反して等張食塩水(0.15M NaCl)では28%の低回収率であった。この条件に更に20KC, 150w, 5分の超音波処理を加えると，夫々の抽出量は約2倍に増加し，特に超音波処理水抽出の方法で88%の高回収率を得た。他方0.32M Sucrose, 20mM Tris-Buffer で同様の実験を行ったところいずれの例でも回収率は40%以下の値に止り，抽出液の塩濃度を上げたり，粘度を増すことによって蛋白の抽出効果は阻害されるものと考えられる。この様に水抽出条件で高回収率が得られると云うことは，蛋白と脂質とを結びつけている金属イオンが脱イオン水でかなり部分遊離する状態にあり，これに加えて超音波処理(流速，水分子の解離，泡効果等)により組織に結合した蛋白分子が容易に遊離状態になるものと考えられる。次いで脳，肝，腎の各組織について水抽出音波処理の方法を検討してみると(表2)，水で抽出される蛋白量は脳，肝，腎の順に少くなるが水抽出後塩濃度を0.5M KClにすると腎蛋白残渣からかなりの蛋白が更に抽出される。又Detergentである Triton X-100を加えて抽出を行うと脳の場合には水抽出後も更に少量ではあるが蛋白が抽出される。上記の如く水抽出音波処理により各臓器より蛋白を高率に回収し得ることを認めた。次に各細胞分画成分についても同様の実験を試み(表3)，核及びマイクロソーム分画では全脳と同様水抽出音波処理の条件で80%以上の抽出蛋白を得たがミトコンドリア分画では60%と やや低値を示した。この様な蛋白抽出条件で核酸及び燐脂質の抽出状態を併せて考察してみると(表4)，脳の場合 RNA, DNA, 燐脂質いずれも水抽出部分に90%以上回収される。以上の方法で抽出された蛋白の生物学的活性の存在について脳マイクロソーム ATPase を用いて検討した。細胞分画法で得られたマイクロソームとそれから水抽出音波処理で得られた抽出蛋白の ATPase 活性とを比較すると表5に見られる如く，抽出蛋白の活性は Mg-ATPase, Na-K-ATPase いずれでもマイクロソーム自体の活性の約2/3の活性を示し，抽出蛋白でも Na-K-ATPase 活性が立派に保たれている

表2　Protein Extraction from various Tissues

	Trials	Brain Protein (mg/g wet wt.)	Brain Recovery (%)		Liver Protein (mg/g wet wt.)	Liver Recovery (%)		Kidney Protein (mg/g wet wt.)	Kidney Recovery (%)	
Water Extraction with Sonication (20KC 5min.)	1	84.4	42.5	85.0	91.2	44.7	87.3	56.5	38.7	77.3
	2	38.6	30.5		36.5	27.7		34.3	23.5	
	3	21.8	17.0		31.5	15.5		22.0	15.1	
Saline (0.5M KCl) Extraction with Sonication (20KC 5min.)	1	3.0	2.3	3.8	11.1	5.4	9.8	7.9	5.4	7.4
	2	0.5	0.4		2.1	1.0		2.2	1.5	
	3	0.2	0.2		1.0	0.5		0.8	0.5	
Saline (0.1M KCl) + Triton X-100 (0.3%) with Sonication (20KC 5min.)		4.1	3.2		0.7	0.3		1.8	1.2	
Residue		11.9	9.3		5.9	2.9		5.7	3.9	
Total (Calculated)		134.5	105.0		200.0	98.0		131.2	89.7	
Protein in original Tissue (Found)		128.2	100.0		204.0	100.0		146.0	100.0	

表3　Protein Extraction from Subcellular Fractions of Rat Brain

	Trials	Nuclei Protein (mg/g wet wt.)	Nuclei Recovery (%)		Mitochondria Protein (mg/g wet wt.)	Mitochondria Recovery (%)		Microsomes Protein (mg/g wet wt.)	Microsomes Recovery (%)	
Water Extraction with Sonication (20KC 5min.)	1	27.1	61.3	82.1	23.9	42.1	60.1	20.6	68.6	83.3
	2	8.0	18.1		7.9	13.9		4.7	15.7	
	3	1.2	2.7		2.3	4.1		1.2	4.0	
Residue		10.0	22.5		14.0	24.5		8.5	28.4	
Total (Calculated)		47.3	100.7		58.1	100.3		35.0	116.5	
Original (Found)		44.2	100.0		56.8	100.0		30.0	100.0	

表 4 RNA, DNA and Phospho-lipid Content in Aqueous Extracts of Rat Brain

	RNA (mg/g wet wt.)	DNA (mg/g wet wt.)	Lipid-P (mg/g wet wt.)
Water Extraction with Sonication (20KC 5min.)	2.69	0.44	0.95
Saline (0.5M KCl) Extraction with Sonication (20KC 5min.)	0.01	0.00	0.03
Saline (0.1M KCl)+Triton X-100 (0.3%) with Sonication (20KC 5min.)	0.06	0.00	0.00
Residue	0.09	0.00	0.16
Total (Calculated)	2.85	0.44	1.14

表 5 ATPase Activities from Rat Brain Microsomes

Enzyme / Additions	μmoles Pi/min./mg Protein	
	microsome	solubilized microsome extracted by water with sonication
Mg^{++} (2mM)	0.68	0.44
Mg^{++} (2mM) + Na^{+} (150mM) + K^{+} (6mM)	1.58	1.03

ATP-2Na: 1μmole/ml; incubated at 37°C. pH 7.3 (Tris-Buffer)[12]

ことが証明された。他方水抽出後の蛋白の免疫化学的特性について家兎抗白鼠脳マイクロソーム抗体に対する抽出蛋白の抗原性はマイクロソーム分画のものと全く同じ沈降線を寒天ゲル上に示すことも確められており，免疫化学的にも抽出操作により変化を蒙っていないことが示された。[15]

(2) DEAE-Cellulose Columnchromatography

全脳，核，マイクロソームの各分画より得られた水抽出蛋白をDEAE-Celluloseカラムで分けてみると全脳の蛋白では図に示すごとく OD_{260} で5つのピークに分けられいずれもカラムの回収率は80～90%であった。20mM Tris-Buffer pH 8.5で溶出されるP1, P2はカラムに吸着されずに素通りしている蛋白で OD_{260} の方が OD_{280} より高く，特にP2は250mμに最大吸収をもつ核酸分画と考えられるものであった。しかしP2の分画を脱イオン水中で12時間透析すると250mμの吸収は消失し，かなりの低分子のものと見做される。又P1分画は蛋白反応陽性で塩基性蛋白を含むものと考えられる。一方0.1M KClで溶出されるP3，0.5M KClで溶出されるP4はいずれも280mμに最大吸収をもつ蛋白

図 1

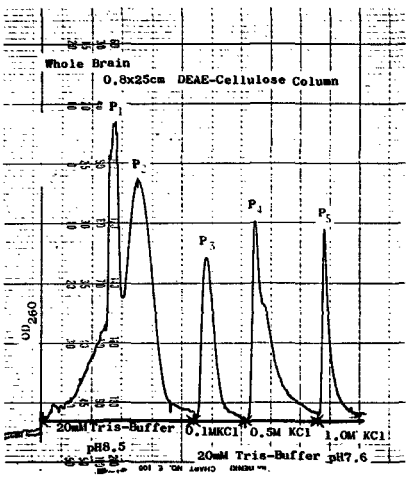


表 6 Distributions of Protein, Nucleic Acids and Lipid-P between various eluted Fractions on DEAE-Cellulose Chromatography

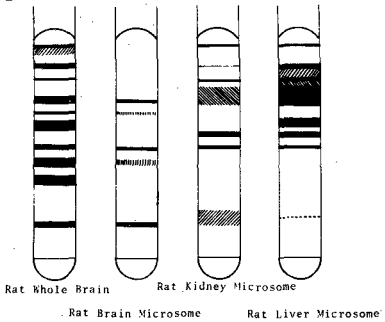
Nuclei	Protein mg	Protein %	RNA γ/mgProtein	DNA γ/mgProtein	Lipid-P γ/mgProtein
P1	2.2	11.1	0.5	0	3.1
P2	3.1	15.2	0	0	1.0
P3	4.9	24.2	0.8	0	1.0
P4	7.9	39.1	8.3	42.6	2.7
P5	2.1	10.8	9.4	12.1	3.4
Total(Calculated)	20.2	100.0	4.4	18.0	2.1
Original(Found)	23.6		4.7	18.0	2.7
Microsomes					
P1	2.5	17.0	15.3	0	34.6
P2	2.0	13.9	0.4	0	2.1
P3	2.1	14.5	2.6	0	3.6
P4	5.8	40.3	15.9	0	3.4
P5	2.0	13.9	8.5	0	4.2
Total(Calculated)	14.4	100.0	10.2	0	8.1
Original(Found)	17.4		13.8	0	9.0
Whole Brain					
P1	6.7	23.1	33.6	0	28.6
P2	3.4	11.5	2.3	0	6.6
P3	7.9	27.2	14.9	0	3.7
P4	9.9	34.0	31.5	11.0	4.2
P5	1.2	4.2	95.2	6.1	2.2
Total(Calculated)	29.1	100.0	25.2	3.9	10.1
Original(Found)	35.6		27.6	4.3	9.2

頂分画であり，1.0M KCl溶出のP5は260mμに最大吸収をもつ分画であった。同様にして核，マイクロソームについても5つのピークが得られた。次にこれら5つのピークに含まれている蛋白質，核酸及び燐脂質の含量を調べると(表6)，蛋白質含量は全脳及び核ではP4に次いでP3に多い，しかしマイクロソーム分画ではP1にもかなりの蛋白質が含まれており，燐脂質含量も高い。高分子RNAについてみると，いずれの分画でもP4, P5に存在し，又DNAはP4に多量に存在するがP5にも認められる。これは蛋白に結合した核酸と遊離

のものとが別々に溶出されたものと考えられる。Lipid-Pについては全脳及びマイクロソームでP1の分画に多く，核ではどのピークにもほぼ均等に分布していた。Bondy & Perry[2]によれば全脳及びマイクロソームで核酸は1.0MKCl Tris-Bufferで溶出されるピーク(P5)にのみ含まれていると報告しているが，吾々の結果ではP1, P4にも多量の核酸が存在していた。

(3) Acrylamide Gel Electrophoresis　全脳及び脳，腎，肝のマイクロソームよりの水抽出音波処理分画についてAcrylamideを支持体とするDisc電気泳動を行うと全脳では11層，脳マイクロソームは5層，腎マイクロソームは7層，肝マイクロソームは12層に分けられ，特に全脳及び脳マイクロソームでは陽極に強くひかれる酸性蛋白の存在を認めた。又電気泳動後の蛋白の回収率はいずれも80%以上で水抽出蛋白はかなり分子量の小さいものとして抽出されていると考えられる結果を得た。

図2 DISC ELECTROPHORETIC PATTERN OF PROTEIN



まとめ　吾々は脳の蛋白を生物学的活性を失わずに効率よく抽出する方法を検討した。即ち組織を低温下に10容の脱イオン水でホモジナイズした後20KC, 150w, 5分の超音波処理を行い105,000g, 60分の遠心で得られる上清を分け，沈渣を更に10容の水を加えて同様の処理をくりかえし，3回の抽出で組織全蛋白量の80～90%を超遠心上清分画に回収し得た。同時にこの分画にはDNA, RNA, 燐脂質も90%以上回収された。又マイクロソームより抽出されたこの分画ではNa-K-ATPase活性はよく維持され免疫学的抗原性にも変化がなかった。更に細胞分画後の核，マイクロソーム水抽出蛋白について，DEAE-Cellulose カラムを行い，いずれの分画に於いても5つのピークに分けられ夫々のDNA, RNA, 燐脂質の分布について調べた。又Acrylamide Gel 電気泳動で水抽出蛋白を分離すると，全脳で11層，マイクロソーム分画で5層に分けられることを確め，蛋白の回収率も80%以上であった。

文献
1) Robertson,D.M. J.Neurochem. 1, 358 (1957)
2) Bondy,S.C. & Perry,S.V. J.Neurochem. 10, 593 (1963)
3) Moore,B.W. & McGregor,D. J.Biol.Chem. 240, 1647 (1965)
4) Tenenbaum,D. & Folch-Pi,J. Biochim.Biophys.Acta 115, 141 (1966)
5) Napier,E.A. & Olson,R.E. J.Biol.Chem. 240, 4244 (1965)
6) Lowry,O.H.,Rosebrough,N.J.,Farr,A.L. & Randall,R.J. J.Biol.Chem. 193, 265, (1951)
7) Schmidt,G. & Thannhauser,S.J. J.Biol.Chem. 161, 83 (1945)
8) Mejbaum,W. Z.Physiol.Chem. 258, 117 (1939)
9) Burton,K. Biochem.J. 62, 315 (1956)
10) Allen,R.J.L. Biochem.J. 34, 858 (1940)
11) Gibbs,R.,Roddy,P.M. & Titus,E. J.Biol.Chem. 240, 2181 (1965)
12) Martin,J.B. & Doty,D.M. Anal.Chem. 21, 965 (1949)
13) Peterson,E.A. & Sober,H.A. J.Amer.Chem.Soc. 78, 751 (1956)
14) Ornstein,L. Ann.New York Acad.Sci. 121, 321 (1964)
15) 植村，塚田．神経化学 5, Suppl. (1966)

29 白鼠神経細胞体蛋白へのアミノ酸の取り込みに対する麻酔剤の影響

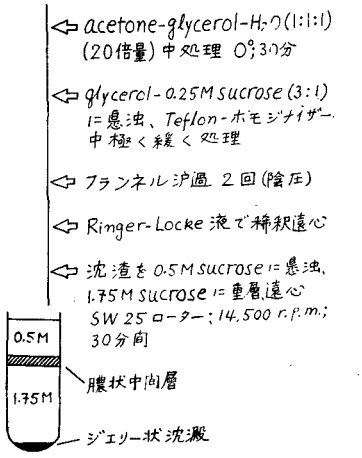
佐武 明・阿部幸子・
松川恵子（新大・医・脳研）

私共は先に白鼠大脳皮質から多量の神経細胞体を短時間に分離する方法を報告した[1]。又、あらかじめC^{14}標識アミノ酸を動物に投与後神経細胞体を分離し、この蛋白の比放射能を細胞体分離前の大脳皮質のそれと比較すると前者が後者に比し高い値を示すことを観察した。脳の機能との関連は別として in vivo に投与された中枢神経抑制剤は一般に脳蛋白へのアミノ酸の取り込みを抑制する[2]がかゝる際の神経細胞体の蛋白代謝動態を知るべく以下の実験を行った。

——実験——

Wlister系白鼠100g前後のものを用い断頭し鋏で素速く行い、剥離した大脳皮質を安全カミソリの刃で約1mm立方のblockに刻み充分混ぜ合せ、その一部を対照の大脳皮質とし5%TCAでホモジナイズし、残りを第1図の要領で神経細胞体の分離に供した。神経細胞体は第1図遠心管底にジェリー状沈澱として得られる。この分離操作中特に注意すべき点は、グリセリン-蔗糖液中ホモジナイズする際、モーターを用いず手でpestleを緩やかに上下動して行い、回転運動を与えぬことである。標識アミノ酸としてはRCC製C^{14} algal protein hydrolysate を用い100g体重当り5μc腹腔に投与した。麻酔剤の投与は urethan 1.5gr/kg体重, amobarbital 100mg/kg phenobarbital 200mg/kg を腹腔に、ether麻酔は白鼠を入れた容器にエーテルを含んだ酸素を通ずることによって行い，標識アミノ酸の投与は被検動物が麻酔状態に陥った後30分後腹腔内に注入して行った。動物体温の測定は熱伝対型温度計或は動物用水銀温度計を直腸内に挿入して行った。蛋白の比放射能は精製蛋白の放射能測定により、相対比放射能はこの値をmg組織当りの遊離アミノ酸のC^{14}放射能で割ることにより算出した。尚遊離アミノ酸の放射能を算出するに当っては5%TCA上清からetherでTCAを除去、Dowex-50に吸着，アンモニアによる脱着後測定し、回収率を考慮に入れて算出した。

第1図
白鼠大脳皮質細胞ブロック

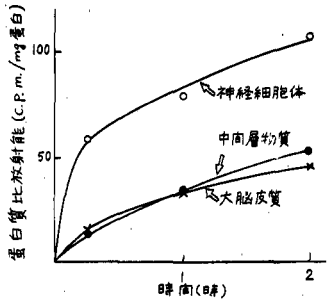


——結果——

第2図，第3図に神経細胞体蛋白、遠心管の中間に来る物質および対照とした大脳皮質蛋白へのC^{14}-標識アミノ酸の取り込みの経時曲線を示す。三者共約2時間目で最高の取り込みを示す。第4図にether-麻酔時の取り込み経時曲線を示すが正常白鼠に於けるとほゞ同様の経過を示す。以後述べるすべての実験値は標識アミノ酸投与後2時間で断頭して得られたものである。第1表に正常白鼠についての値を示す。但その動物間で各々大脳皮質、神経細胞体および中間層物質の蛋白比放射能はかなりのばらつきを示すが、各々の動物について大脳皮質のそれを100とし、他の2つのものを表はすと、神経細胞

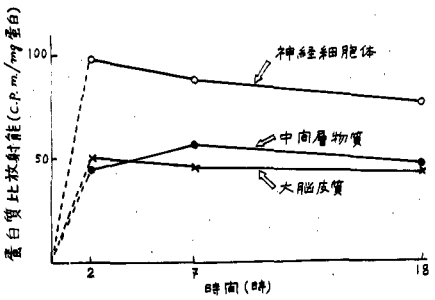
第2図

神経細胞体蛋白への C^{14}-標識アミノ酸の取り込み



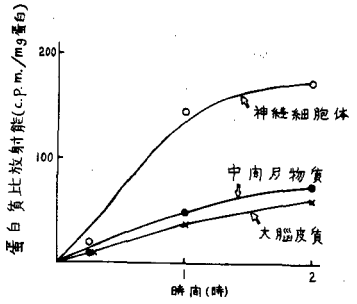
第3図

神経細胞体蛋白への C^{14}-標識アミノ酸の取込み



第4図

エーテル麻酔時神経細胞体蛋白への C^{14}-標識アミノ酸の取り込み



体および中間層のそれは各々200と100に近い値となる。(198±29; 105±15)。第2表に各麻酔剤によってこの値が如何に変化するかを示した。各麻酔剤に共通して神経細胞体のそれは約300に近い値を示す。然しながら麻酔剤によって白鼠体温は下降し、この下がり方は外温に大きく左右される。第1表、第2表の値は3月～6月間に所謂室温に於て行はれた実験の結果であるが、第3表に外温28～30℃, および9～11℃で行った値を示した。この時の各動物の麻酔前(最高)と麻酔中の最低の直腸温を併記したが、外温が高りと直腸温は僅かに低下するのみで、外温が低い場合は著しく低下することが明らかであって、外温が高く体温がよく保たれてゐる時は、いづれの麻酔剤を用いた時でも神経細胞体の蛋白比放射能は大脳皮質のそれに対して正常白鼠に近い200に近い値を示し、外温が低く体温が低い場合は第2表と同じく300に近い値を示した。

第1表

正常白鼠大脳皮質、神経細胞体、中間層物質および肝蛋白への標識アミノ酸の取り込み(腹腔内投与、2時間)

実験番号	蛋白比放射能(c.p.m./mg)			相対比放射能	
	大脳皮質	神経細胞体	中間層物質	大脳皮質	肝
1	69 (100)	149 (213)	81 (117)	8.7	36.2
2	45 (100)	107 (236)	53 (116)	9.7	25.3
3	49 (100)	78 (159)	47 (98)	8.4	22.1
4	67 (100)	121 (182)	85 (128)	9.1	69.4
5	49 (100)	98 (202)	47 (98)		
6	46 (100)	107 (231)	46 (100)		
7	54 (100)	89 (165)	43 (80)		
平均の	(100)	(198) ±29	(105 ±15)		

——考按——

1) 私共の開発した神経細胞体の分離法では白鼠大脳皮質が5 100%に近い回収率

第2表

正常時および麻酔時神経細胞体、中間層物質大脳皮質蛋白質比放射能の比較

	大脳皮質	神経細胞体	中間層物質
正常 (7例)	100	198±29	105±15
エーテル (6例)	100	275±52	114±14
ウレタン(3例)	100	310±31	121±7
アモバルビタール(4例)	100	281±33	109±12
フェノバルビタール(4例)	100	271±25	108±5

で神経細胞を得ることは未ず6～20%[3]回収し得るのみであり、又分離された細胞もその突起の切断され方はまちまちであつて、得られた神経細胞体の特性から直ちに大脳皮質神経細胞の特性を云々することは難かしい。然しながら正常白鼠から得られた神経細胞体の蛋白比放射能が、大脳皮質蛋白の比放射能の約2倍の高値を示すことから、大脳皮質に於て神経細胞がかなり高い蛋白代謝活性を有することが推測される。

第3表

麻酔時神経細胞体、中間月物質および大脳皮質蛋白質比放射能の比較値におよぼす体(外)温の影響

実験番号		条件	外温	体温 最高	体温 最低	大脳皮質	神経細胞体	中間月物質
1	1-1	正常	28°-30°	38.2°		100	197	106
	1-2	エーテル麻酔	〃	38.4°	36.6°	100	209	116
	1-3	ウレタン麻酔	〃	38.0°	35.7°	100	210	96
2	2-1	ウレタン麻酔	28°-30°	38.6°	36.7°	100	195	113
	2-2	アモバルビタール麻酔	〃	38.0°	34.5°	100	242	150
3	3-1	正常	9°-11°	38.2°	37.2°	100	177	67
	3-2	ウレタン麻酔	〃	38.0°	31.7°	100	276	130
	3-3	ウレタン麻酔	〃	38.2°	27.3°	100	247	121
4	4-1	ウレタン麻酔	9°-11°		22.2°	100	326	119
	4-2	アモバルビタール麻酔	〃		32.2°	100	284	108

2) 麻酔剤投与によつて神経細胞体蛋白の比放射能と大脳皮質のそれとの比は約3の値を示す様になる。正常白鼠に於ける値2と麻酔時の値約3も各々標準偏差は小さく、なに有意義な変化と考えられる。この変化が麻酔剤の副作用である低体温のみでおこるか或は麻酔状態となることが必要であるかは明らかで無い。

―― 文献 ――

1) SATAKE, M. AND ABE, S., J. Biochem., 59, 72, (1966).

2) GAITONDE, M.K., AND RICHTER, D., Proc. Roy. Soc. B. 145, 83 (1956). 中澤省三、植木幸明、神経進歩、4巻678頁(1960)

3) NURNBERGER, J.I., Biology of Neuroglia, ed. by W. F. Windle, Charles C. Thomas Publisher, Springfild, p. 193 (1958)

30 脳ポリゾームの調製

高橋康夫・鈴木雄二
（新大・医・脳研）

脳の蛋白合成系に於けるリボゾームの重要性は既に確立されたが、リボゾームの機能形態としての脳のポリゾームに就ての研究は少い。最近Ekholm及びHydén[3]は電子顕微鏡的に神経細胞に於けるポリゾームの存在を証明した。併し生化学的方法による脳組織からのポリゾームの調製は殆んど成功しておらない。例えばHerriman, Hunter[5]等はマウス脳からポリゾームを調製したとそうが直接的証明はなく、彼等の調製したとそうポリゾームはribosomeよりアミノ酸とりこみの低い不思議なものであった。又Stenzel等[9]も脳組織のpostmitochondrial supernatant中にポリゾームの存在を証明しておるがその分離には成功しておらない様である。我々は豚脳から精製したRNase inhibitorを使用することにより白鼠脳よりポリゾームを調製することが出来たのでその成績の若干を報告したい。

〔実験方法〕

1) ポリゾームの調製：白鼠を断頭し大脳皮質及び肝臓を摘出し、夫々5gを2倍容のmedium A（0.25 M sucrose, 25 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 50 mM Tris buffer pH 7.8）にて注意深くホモジェナイズする。このmedium A中には後述のRNase inhibitorを含有させておく。15g—20g内外の組織からのホモジェネートを一緒にし、8000g 10分遠心して核・ミトコンドリヤを除き、得られた上清にsodium desoxycholate（終濃度1.3%）を加え、混合後Wettstein等[10]の方法を改変して2.0 M sucrose－mediumA, 0.5 M-sucrose medium A上に重層105000g 5時間遠心し無色の沈澱を得る。これを注意深く数回medium Aで洗った後、RNase inhibitor入りのmediumAの少量で静かにホモジェナイズしてから5000 r.p.m. 4－5分遠心して上清をポリゾームとした。

2) RNase inhibitorの精製：豚脳の大脳皮質を分離し、1.5容の0.25 M sucroseでホモジェナイズした後105000g 90分遠心して得た上清をDEAE cellulose, Hydroxylapatite, Sephadex G-100により精製した。Hydroxylapatiteまでは Shortman[8]の方法に従った。その精製したRNase inhibitorをポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析した。併し現在のポリゾームの調製実験では主としてDEAE celluloseで精製したステップのものを使用した。尚、使用したRNAはドデシール硫酸ソーダ、フェノール法で市販イーストRNAから精製した。RNase及びRNase inhibitor活性測定法は岡瀬、阿部[7]の方法に従った。

3) 超遠心沈降分析：Spinco超遠心分析器E型を用い、ポリゾーム標本を42040 r.p.mで遠心し、2分、4分で写真をとった。

4) 蔗糖密度勾配沈降法：ポリゾーム標本を15% sucrose－medium A——40% sucrose-medium Aの直線勾配をつくったセルローズ遠心管に1.0－1.5 ml（約1mg蛋白）を重層し、Spinco SW 25ローターを用い、25000 r.p.m. 2時間遠心し、遠心管の底部より注射針で孔をあけ、約15滴ずつ試験管にとり、稀釈後260 mμの吸収を測定した。

5) C^{14}-leucineのとりこみ実験：反応系は一般に1.0 mlでポリゾーム（蛋白0.5mg）上清分画（蛋白0.5 mg）2.0 μmoles ATP, 0.25 μmole GTP, 20 μmolesのクレアチン燐

酸 0.1 mg のクレアチンキナーゼ、50 μmoles の Tris (pH 7.8)、25 μmoles KCl、5 μmoles $MgCl_2$、250 μmoles 蔗糖、0.5 μC uniformly labeled C^{14}-leucine (60.7 μC/mg)、37° 30 分反応後 TCA を添加し反応をとめ、以下常法に従って蛋白を沈澱精製し、ガスフローカウンターで測定した。

6) RNA 定量：Fleck, Munro[4] の方法、蛋白の定量：Lowry 等[6] の方法によった。

〔実験成績及び考察〕

1) RNase inhibitor の精製：方法の項で述べた様にして精製した RNase inhibitor の活性は約 6500 倍に上昇した。この精製過程は表1の通りである。精製された最純標本のポリアクリルアミド電気泳動のパターンはデンシトメーターで描くと図1の如くであり全蛋白の約 80 % を占める主バンドが認められる。我々はここでは省略するが種々の検討からこの RNase inhibitor が蛋白質性のものであると考えている。岡嶺、阿部は白鼠大脳から RNase inhibitor の精製を試み約 80 倍に比活性を上昇させたがそれ以上の精製には成功しなかった。以下に述べるポリゾームの調製に於ては方法の項でも述べた様に主として DEAE セルロースでのステップまで精製したものを使用した。

2) ポリゾームの性質と RNase inhibitor：RNase inhibitor の生理的機能に就ては、ごく最近まで不明であったが、上清分画が肝臓のポリゾームを安定化することが Bont 等[2] により明らかにされて以来上清分画中に存在する RNase inhibitor の生理的役割が注目されるに至った。[1] RNase inhibitor を用いずに脳からポリゾームを調製することは非常に困難で、普通ポリゾームはこわれてリボゾームと同様の schlieren パターン即ち 111 S、78 S、53 S を示した。DEAE セルロースから溶出された最も活性の強いフラクションを一晩 medium A に対して透析したものをポリゾーム調製用の溶液中に約 $\frac{1}{20}$ 容添加してポリゾームを調製すると、図2に示す様な Schlieren パターンを示す脳のポリゾームが得られた。この図から明らかな様に 150 S 以上のポリゾームが 50 % 以上存在している。図2に同様の方法で得られた肝臓のポリゾームの Schlieren パターンをも示している。明らかに脳に於けるより肝臓ではポリゾームが高率に存在していた。併しこのことは必ずしも生体内での実体を示すものでなく肝臓のポリゾームが調製し易く、又脳のそれに比してより安定であることを示しているのみも知れない。図3は調製後一昼夜冷

表1
Purification of RNase inhibitor

Fractions	Total vol. (ml)	Total unit	Protein (mg)	Sp. A.	Purification
1 Homogenate					1
2 Supernatant	80	104	880	0.118	4
3 Three active fraction from DEAE cellulose	12	72	85	0.86	32
4 Three active fraction from hydroxylapatite	9	63	3.9	16.2	640
5 Three active fraction from Sephadex G-100	7.5	59	0.8	74.0	2950
6 Amost active fraction from Sephadex G-100	2.5	42	0.25	170.0	6720

図1

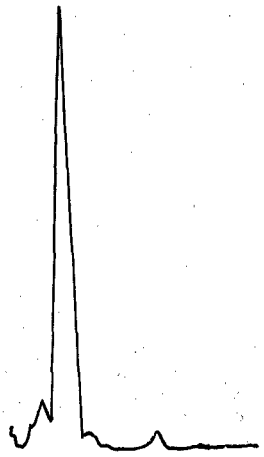


図 2. Sedimentation patterns of liver and brain polysomes

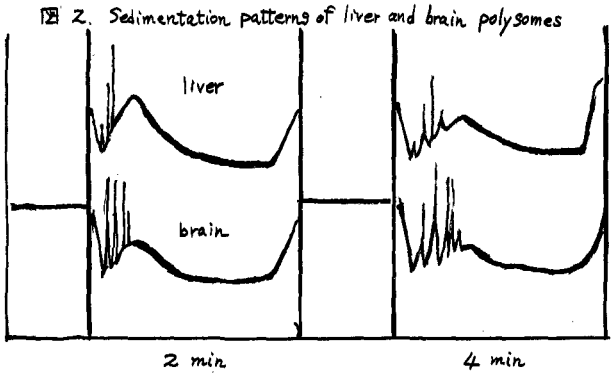


図 3 Sucrase density gradient centrifugation pattern

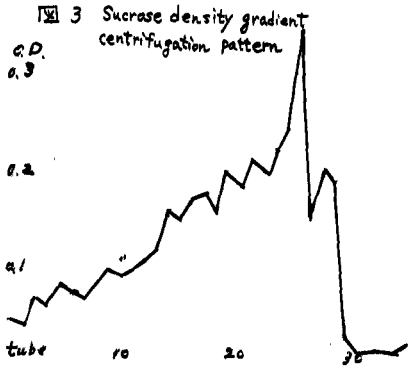


表 II

Requirements for the incorporation of ^{14}C-leucine into protein by rat brain polysomes

Incubation	Incorporation (counts/min/mg protein)
Complete system	956
− cell sap	261
− ATP	534
− ATP generating system	313
− GTP	496

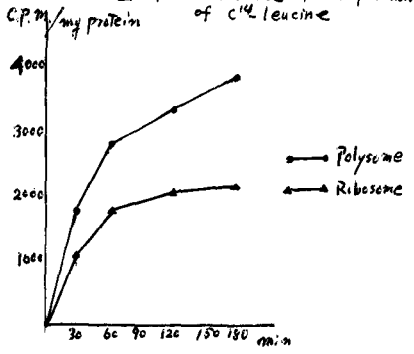
表 III.

Incorporation of C^{14}-leucine into polysomal and ribosomal protein of brain cortex of the same rats

	Specific activity (c.p.m./mg protein)	
polysome	1957	2081
Ribosome	661	343

37°. 30 min

図 4 Time course of incorporation of C^{14} leucine



凍室に放置し medium A に対して透析した脳のポリゾーム標本の蔗糖密度勾配沈降パターンを示している。既に相当部分がこわれており 110S が主成分となっていることがわかる。

脳のポリゾームの RNA：蛋白の比は 0.83：1.00 であり、精製肝ポリゾームのそれより少し高い。260 mμ に極大、235 mμ に極小の吸収値を示している。

3) C^{14} leucine のとりこみ実験：C^{14} leucine は脳のポリゾーム、上清液で蛋白にとりこまれる。表 II の如く、ATP、GTP、ATP 再生系、上清分画が必要であることは肝ポリゾーム系でと同様であった。

併し、そのとりこみ活性は同じ動物の脳からのリボゾームより高かった。個々の実験で倍率は異るが 2 倍から数倍に達する場合もあった。（表 III） 又ポリゾームの系ではとりこみの時間曲線が肝ポリゾーム系とは異り、3 時間も上昇し続ける。リボゾーム系では 1 時間でとりこみはプラトーに達する。（図 4）

以上尚検討中の点もあるが 脳から活性あるポリゾームが調製された。そして肝臓のポリゾームとは若干態度が異るように思われた。脳及び肝臓に於ける m-RNA、RNase、の性質とそれに対する RNase の inhibitor の関係をより詳細に追求する必要がある。

〔文 献〕

1) G. Blobel, V. R. Potter, Proc. Nat. Acad. Sci., 55, 1283 (1966)

2) W.B. Bont, G. Rezelman, H. Bloemendel, Biochem. J. 95, 15c (1965)
3) R.EKholm, H.Hydén, J. Ultrastract. Res., 13, 269 (1965)
4) A. Fleck, A.N. Munro, Biochim. Biophys. Acta 55, 571 (1962)
5) I.D. Herriman, G.D. Hunter, J. Neurochem. 12, 937 (1965)
6) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L.Farr, R.J. Randall, J. Biol. Chem., 193, 265 (1951)
7) 南輝桂吉、阿部幸子 神経研究の進歩 9 441 (1965)
8) K. Shortman Biochim. Biophys. Acta 51, 37 (1961)
9) K.H. Stenzel, R.F. Aronson, A.L.Rubin, Biochemistry 5, 930 (1966)
10) F.O. Wettstein, T. Staehelin, H. Noll, Nature 197, 430 (1963)

31 ラッテ脳ミクロゾームの免疫化学的研究

植村慶一・塚田裕三
（慶大・医・生理）

脳組織のミクロゾームは興奮性を有する神経細胞およびグリア細胞の膜系を含むので他の組織とは異なった高度に分化した臓器特異性をもつと考えられる。既にPerlmann[1]は肝について岡田[2]は腎についてミクロゾームにその臓器特異性抗原の存在することを免疫化学的方法により検討し報告しており、また一方脳組織の髄鞘にはアレルギー性脳脊髄膜炎を惹起する抗原の存在することが知られている[3]。しかし脳ミクロゾームの臓器特異性については未だ知見がない。そこで脳ミクロゾームの臓器特異性を担うと考えられる抗原性物質について免疫化学的および生化学的方法によって検討したので報告したい。

実験方法：　1)抗原および抗体の作成；　ラッテ大脳を10容の0.32M蔗糖液(pH7.0)中でテフロンホモジェナイザーでホモジナイズし、その8,000g15分遠心上清を、105,000g 60分超遠心してミクロゾーム分画を得た。更にこの分画を50mM EDTAを含むpH8.0 0.1Mリン酸緩衝液で処理し、105,000g 60分超遠心沈渣を抗原として用いた。免疫方法は体重3kg以上の家兎に上記抗原(蛋白量1回10mg)と同量のFreund Incomplete Adjuvantを加えて1週1回5週間家兎に皮下注射し最後の注射より10日後に試験採血の後全採血を行った。この間家兎には体重減少および神経系の症状は認められなかった。採取した血液より血清を分離し抗血清に終濃度33%飽和になるよう硫安を加えて分画を行い硼酸緩衝液(pH8.4)で48時間透析してγグロブリン分画を得た[3]。抗血清の蛋白濃度は80-90mg/mlでγグロブリン分画には20～25%の蛋白が回収された。

2)免疫化学的方法[3]；　a)寒天ゲル内沈降反応；　硼酸緩衝液(pH8.4)を含む0.8% Difco Agar溶液を加熱し、シャーレに注入後寒天のゲル化を行ない、次の如く直径5mmのWellを7つ作成した。Wellの間隔は5～10mmとし、中心のWellに抗体、周囲に抗原を注入、拡散は37°C恒温器中で24～48時間行なわせた。　b)免疫電気泳動法；　pH 8.5バルビタール緩衝液(μ=0.05) 0.8% Difco Agarをスライドグラス上でゲル化し、150V 80分の条件でWell中に注入した抗原の電気泳動を行ったのち、抗体を中心に線状に注入して湿室内で24時間拡散させて、沈降線の出現を検討した。

3)抗原成分の分画；　a)細胞内成分の分画[4]；既に報告した細胞分画法によって核(N)、ミエリン(My)、神経終末(NE)、ミトコンドリア(Mt)、ミクロゾーム(Ms)、上清(S)の6分画に分離し、更に各分画沈渣を1%デオキシコール酸処理後超遠心して上清(-DOC-Sup)と沈渣(-DOC-Ppt)に分離した。　b)ミエリン分画(Kies)；　Kiesらの方法[5]により、ラッテ大脳の0.88M蔗糖液ホモジェネートの上に0.25M蔗糖液を重層し密度勾配法により105,000g 60分超遠心し、中間層のミエリン分画(K-My)と沈渣(K-Res)に分離した。またミクロゾームへのミエリンの混入を検討するため、ミクロゾーム分画を0.88M蔗糖液に再懸濁し、同様の方法で中間層(Ms-K-My)と沈渣(Ms-K-Ms)に分離した。

c)ミクロゾームの凍結融解による細分画；　ラッテ大脳ミクロゾームを原組織重量の10倍量の脱イオン水中で凍結融解した後、105,000g 60分超遠心し上清(Ms-F-Sup)と沈渣(Ms-F-Ppt)に分離した。

4)超音波処理による分画；ラット大脳ホモジェネートおよびミクロゾームを原組織重量の10倍量の脱イオン水中で超音波処理(20 KC 5分)し，[13]超遠心上清(Ms-Sonic-Sup)を20%飽和，40%，60%，80%飽和硫安で分画(Ms-Sonic-Sup-20,-40,-60,-80)更にその沈渣を1% DOC処理超遠心して DOC可溶性分画(Ms-Sonic-Ppt-DOC-Sup)と不溶性分画(Ms-Sonic-Ppt-DOC-Ppt)に分離した。

4)化学的定量法；蛋白の定量は Lowry 法[6]，脂質・RNA は Hutchison 法[7]により分離した後，脂質リンは Lowry 法[8]で分解し Allen 法[9]で測定，RNA は Orcinol 法[10]により定量した。

5)脳切片のアミノ酸の取込の測定[11]；ラット脳切片を 100 mg% グルコースを含む Krebs Ringer Phosphate 中で一定量の抗体と preincubate した後，終濃度 5mM になる様にL-グルタミン酸又は β-アミノ酪酸を medium に加え，60分 incubate して，切片内のアミノ酸量をペーパークロマトグラフィによって定量し，切片内へのアミノ酸の能動輸送に対する抗体の添加の影響を検討した。

6)Na・K活性化ATPase活性の測定[12]；50mM トリス緩衝液(pH 7.5)，6mM $MgCl_2$，を含む反応液および，5mM KCl，100mM NaCl を更に加えた反応液に一定量の抗体を加え37°C 10分 preincubate した後，終濃度3mM Tris-ATP を加えて反応を開始，37°C 15分 incubate した後，TCAで反応をとめ，生成無機リンを Allen 法で測定した。Na・Kイオン添加による活性の上昇を Na・K 活性化ATPase 活性とした。

実験結果及び考察：　1)抗原として用いたミクロゾームの化学的組成；予備的にラット大脳ミクロゾームに Freund Incomplete Adjuvant を加えて家兎に抗血清を作成せしめ，ゲル内沈降反応を行はせると，ミクロゾームの DOC処理上清(B-Ms-DOC-Sup)および EDTA処理沈渣(B-Ms-EDTA-Ppt)と反応し，DOC沈渣と EDTA上清とは反応しないことが確かめられた。またミクロゾームの EDTA処理沈渣を抗原として免疫すると，抗体価の高い抗血清が得られたので，以後の免疫には EDTA処理沈渣を用いた。ミクロゾームおよびその DOC，EDTA処理による細分画の化学的組成を第1表に示した。DOC処理で可溶化した EDTA処理で沈渣となる部分は比較的脂質に富む分画で，DOC沈渣となるリボゾーム部分には抗原性はなかった。(第1図)

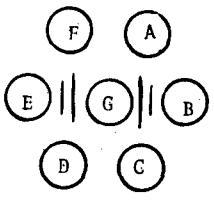
第1表↓

Chemical Composition of Subfractions of Rat Brain Microsomes

Treatment	Protein mg*	RNA μg*	Lipid-P μg*
1) None	20.3±1.7	513±57	216±8.3
2)EDTA(50mM)** Sup	5.42	203	15
Ppt	12.50	237	166
3)DOC(1%)*** Sup	18.00	281	149
Ppt	4.61	284	82

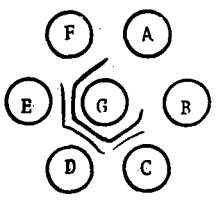
*;mg or μg/g.original tissue wet weight.
,*;Microsomes were treated with 2)0.1M phosphate buffer (pH8.1) containing 50mMEDTA or 3)1%DOC and recentrifuged at 105,000g 60min.

第1図↓



A) B-Ms-EDTA-Sup
B) B-Ms-EDTA-Ppt
C) K-Ms-DOC-Sup
D) L-Ms-DOC-Sup
E) B-Ms-DOC-Sup
F) B-Ms-DOC-Ppt

第2図↓



A) B-N-DOC-Sup
B) B-My-DOC-Sup
C) B-Mt-DOC-Sup
D) B-NE-DOC-Sup
E) B-Ms-DOC-Sup
F) B-s

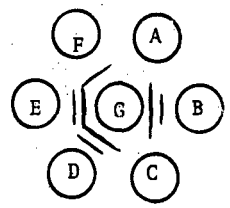
2)抗原成分の所在；寒天ゲル内沈降反応により，抗原成分の所在を検討した。脳ミクロゾームの抗原成分は肝，腎ミクロゾーム DOC上清(L-，K-Ms-DOC-Sup)には全く存在しなかった。(第1図)，細胞分画法により，ラット大脳を核，ミエリン，ミトコンドリア，神経終末ミクロゾーム上

清について、その抗原性を比較すると、ミトコンドリア、神経終末、ミクロゾーム、上清に共通な沈降線(A)とミクロゾームに最も強く、神経終末、ミトコンドリアと弱い反応を示す他の沈降線(B)がみられた(第2図)。また Kiss らのミエリン分画(K-My)との反応は極めて弱く、その沈渣(K-Res)と強く反応することおよびミクロゾームを0.88 M蔗糖液に懸濁し、0.25 M蔗糖を上に重層遠心してもその沈渣とのみ反応すること(第3図)より、Kiss らのアレルギー性脱髄疾患の抗原とは異なるものと考えられる。また上清との共通抗原成分(A)はミクロゾームを脱イオン水中で凍結融解して洗っても遊離沈渣(Ms-F-Ppt)に来ることから単なる上清の混入とは考えにくい。(第3図)。後にこの抗体が肝臓の上清(L-S, K-S)ともこの沈降線を示しそれは脳の上清のもの(A)とも共通部分を持つと考えられたのでその異同について更に検討中である。(第5図) 他し脳ミクロゾームに最も強い抗原(B)は他の組織で認められず、脳の髄鞘特異的なものである。またこの2つの抗原はラット血清および他の動物種(ウサギ、イヌ、ウシ、ニワトリ)の脳には全く認められず、ラット脳にのみ認められ、種属特異的なものでもある。(第4図) 発生学的にはラット胎生13日目および15日目の脳では抗原性は未だ出現せず、胎生19日目および20日目の脳では明瞭な2つの沈降線が認められ、胎生時に抗原性が獲得されるものと考えられた。(第7図)

Protein, RNA and Lipid-P Distribution in Rat Brain Subfractions. (第2表)

Fraction	Protein mg/g	RNA μg/g	Lipid-P μg/g
Homogenate	110	1700	700
H-Sonic-Sup	73.0	1120	306
-20	11.7	300	78
-40	13.9	250	78
-60	9.0	200	7.7
-80	3.9	55	1.1
H-Sonic-Ppt			
-DOC-Sup	27.6	250	91
-DOC-Ppt	14.9	240	259
Ms	20.3	513	216
Ms-Sonic-Sup	12.7	314	110
Ms-Sonic-Ppt			
-DoC-Sup	6.21	82.7	76.2
-DoC-Ppt	1.35	73.8	62.7

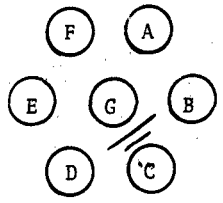
第3図 →



A) B-K-My
B) B-K-Res
C) B-Ms-K-My
D) B-Ms-K-Ms
E) B-Ms-F-Ppt
F) B-Ms-F-Sup

第5図 ↓

第4図 →

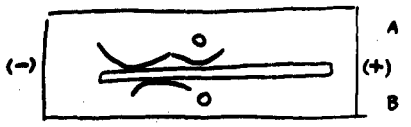


A) Rat Serum
B) Rabbit Brain
C) Rat Brain
D) Dog Brain
E) Cock Brain
F) Ox Brain

第6図 ↘

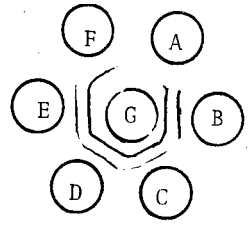
第8図 ↓

Immunoelectrophoretic Pattern

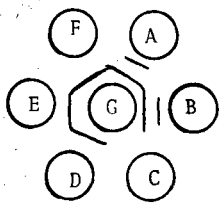


A ; B-Ms
B ; B-H-Sonic-Sup-80

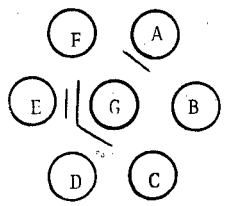
第7図 ↓



A) Foetus Brain, 13days
B) B-Ms-DOC-Sup
C) Foetus Brain, 19days
D) Foetus Brain, 20days
E) B-Ms-DOC-Sup
F) Foetus Brain, 15days



A) B-Ms-Sonic-Sup
B) B-Ms-Sonic-Ppt-DOC-Sup
C) B-Ms-Sonic-Ppt-DOC-Ppt
D) B-S
E) K-S
F) L-S



A) B-H-Sonic-Sup-20
B) B-H-Sonic-Sup-40
C) B-H-Sonic-Sup-60
D) B-H-Sonic-Sup-80
E) B-H-Sonic-Ppt-DOC-Sup
F) B-H-Sonic-Ppt-DOC-Ppt

3)抗原成分分離の試み；ラット脳ホモジェネートおよびミクロゾームを脱イオン水中で超音波処理し、その上清の硫安分画およびその沈渣をDOC処理することにより、第2表の如き分画が得られる。ホモジェゲートミクロゾーム共に超音波処理超遠心上清(H-, Ms-Sonic-Sup)およびその沈渣のDOC上清(H-, Ms-Sonic-Ppt-DOC-Sup)とは共に2つの沈降線を示すがDOC沈渣(DOC-Ppt)とは反応しなかった。このことはこの抗原性は共に超音波処理によって失はれないことおよび超音波処理によって少くとも1部は超遠心上清に来ることを示している。

Effects of Anti-Microsome Antibody to the Amino Acid Accumulation into Rat Brain Cortex Slices

Amino Acid in Medium / Conditions		Glutamic Acid (5mM)	γ-Aminobutyric Acid (5mM)
None		30.7	26.9
+Control γGlobulin	3.0mg/ml	32.4	24.8
	0.3mg/ml	34.3	23.4
+Anti-Ms γGlobulin	3.0mg/ml	33.2	28.1
	0.3mg/ml	33.7	24.3

Unit; μmoles amino acid/g slices.

第3表 ↑　　第4表 ↓

Effects of Anti-Microsome Antibody to Na-K-activated ATPase

Conditions		Mg	Mg+Na+K	Difference	%
None		1.53	4.05	2.52	100
+Control γGlobulin	3.0mg/ml	1.79	4.76	2.97	118
	0.3mg/ml	1.58	3.98	2.40	95.0
+Anti-Ms γGlobulin	3.0mg/ml	1.95	2.37	0.42	18.4
	0.3mg/ml	1.43	2.77	1.34	58.4

Unit; μmoles P/mg Protein/15min.
Mg; 6mM, Na; 100mM, K; 5mM, Tris-ATP; 3mM.

ホモジェネートの超音波処理上清を硫安分画してその抗原性を調べると、脂質RNA含量の高い20%沈渣にミクロゾームに強いB抗原性、脂質含量の少ない80%沈渣にA抗原性が認められた。また寒天ゲル電気泳動法では陰極側に出現する沈降線とほとんど移動しない沈降線が認められ、前者がA抗原に、後者がB抗原に相当すると考えられた。(第8図)。以上の結果より、共通に存在するA抗原は比較的小さく80%飽和硫安で沈澱し電気泳動でや、陰極側に移動するのに対し主としてミクロゾームに存在するB抗原は比較的大きく、脂質の多い20%飽和硫安で沈澱し電気泳動ではほとんど動かないものであり、膜構造と何らかの関係をもつ可能性が示唆された。

4)脳切片におけるアミノ酸の蓄積とNa・K活性化ATPaseに対する抗体の影響；脳切片で特徴的に活発にみられるアミノ酸の蓄積には脳の細胞の膜が関与していると考えられる。そこで抗ミクロゾーム抗体の添加によるラット脳切片でのアミノ酸の蓄積に対する効果を検討すると、第3表に示す如く、グルタミン酸の蓄積に対しても、またアミノ酪酸についても対照のγグロブリン添加と抗体添加との間に全く差は認められなかった。次に脳皮質で特徴的に高い活性をもつことが知られているNa・K活性化ATPaseに対する抗体添加の影響をみると、対照のγグロブリン添加では無添加に対し著変を示さないのに対し、抗ミクロゾーム抗体の添加は著明なNa・K活性化ATPaseの抑制を示した。更にその機序について検討をすすめる予定である。

文献；1) Perlmann, P; Nature, 181, 491 (1958), 2) Okada, T. S et al; Exp. Cell. Res, 31, 251 (1963)
3) Campbell, D. H et al "Method in Immunology" W. A. Benjamin (1963), 4) 植村ら; 神経進歩, 7, 763 (1963)
5) Kies, H. W et al; J. Exp. Med, 115, 777 (1962), 6) Lowry, O. H et al; J. B. C, 193, 265 (1951)
7) Hutchison, W. C et al; Analyst, 86, 768 (1961), 8) Lowry, O. H. et al; J. B. C, 207, 1 (1954)
9) Allen, R. J. L; Biochem. J, 34, 858 (1940), 10) Mejbaum, W; Z. Physiol. Chem, 258, 117 (1939)
11) Tsukada, Y et al; J. Neurochem, 10, 241 (1963), 12) Skou, J. C; B. B. A, 58, 314 (1962)
13) 里吉ら; 神経化学 予定

32 実験的アレルギー性脳脊髄炎（EAE）の脂質化学的研究－I

立沢　寧・相沢豊三
（慶大・医・相沢内科）

脱髄をおこす疾患は数多く知られ、脱髄過程の研究も多いが、現在、まだほとんど解明されていない。近年、実験的アレルギー脳脊髄炎(EAE)により、脱髄過程を研究するこころみがなされ、多発性硬化症などの脱髄疾患への、もっとも期待されるaproachの方法と考えられている。[1]

われわれは、犬、兎をもちい、EAEをおこさせ、薄層クロマトグラフィー(TLC)およびガス・クロマトグラフィー(GLC)をもちい、脂質化学的な検索をこころみた。また、脳虚血により犬に脱髄をおこさせ、EAEにおける脂質の変化と比較した。

検索しえた脂質のなかで、cholesterol (ch), cerebroside (csd), sulfatide (std), sphingomyelin (sm), phosphatidyl ethanolamine (pea), phosphatidyl choline (pc), phosphatidyl serine (ps), および ganglioside (gs) には、EAEにより大きな変化を認めず、一方EAEにより、cholesterol ester (ch-e) の出現をみとめた。さらに、この異常に出現したch-eの脂酸構成をしらべ、その動物の血清、肝のそれと比較した。また、ch-eは動物の胎児期にも存在するので、これと、EAEの際出現したch-eとを比較した。またEAE病巣部のセラミンの他の脂質の脂酸構成をも調べ、ch-eのそれとを比較した。

実験方法　もちいた実験動物およびEAEをおこさせるための抗原、Freund's Adjuvant量は表1に示す。

表1.

MATERIALS

A. Rabbits (body weight. 2.40 - 2.85 kg, mean 2.63 kg).
　Human white matter 313 mg / ml Freund's complete adjuvant.
　Intramuscular or intradermal injection, 0.4 ml.
B. Dogs (body weight. 9 - 13 kg, mean 11.3 kg).
　a. Human white matter 313 mg / ml Freund's complete adjuvant.
　　Intradermal injection, 0.6 ml.
　b. Rabbit spinal cord 400 mg / ml Freund's complete adjuvant.
　　Intradermal injection, 0.6 ml.
　c. Demyelination induced by ischemia (Yamamura-Kawauchi's method).
C. Rabbit fetus (mean body weight. 57.7 g).
D. Dog fetus (mean body weight. 158.3 g).

EAEは、兎6羽中4羽、犬6頭中4頭に発症した。脳脊髄炎は、慶大病理学、松山春部講師により病理組織学的に確かめられている。

また、山村河内法[2]により、脳血管結紮よる脳虚血によりおこった脱髄は、両氏により病理組織学的に確かめられた。

脂質の抽出はWherrett and Cumings の方法[3]によった。

薄層クロマトグラフィーは、昨年本学会に発表した通りである。なお、Gangliosideは、横浜市大、猪瀬正教授より頂いた純品により同定した。

ガス・クロマトグラフィー。島津GAS-CHROMATOGRAPH GC-1C, Hydrogen FIDを装備したものをもちい、column (4×2620.5 mm) に、5% Diethyleneglycol succinate + Shimalite W (60-80 mesh) をつめ、Carrier gas は Nitrogen (1.8 kg/cc) をもちい、column温度195°Cにて分析した。脂酸のメチル化も、昨年発表した通り (conc H_2SO_4 + MeOH + 2,2-Dimethoxy propane) である。

脂肪酸の同定には、純品(Applied Science Lab. Inc.)の保持時間との比較と共に、Morrisの方法[9]をもちいた。

すなわち、脂肪メチルエステルを二分し、一方を、5%硝酸銀をimpregnateしたsilica gelの薄層で、diethyl ether:hexane 1:4, またはdiethyl etherのみで展開して、saturated, monoenoic, dienoic, trienoic, tetraenoic などに分離し、各分画をGLCにて分析し、他方の総脂肪酸のGLCと比較した。

しかし、試量が少ないため、minor peakで保持時間の長いものの同定は確実でない。

純品の得られぬものは、脂肪酸名の右肩に星印をつけた。

また、保持時間47分およびpeakは同定出来なかった。

結果

1. EAE兎およびEAE犬とその対照と同時にTLCにて分析した。クロマトグラムはスライドで示すが、これをTLC用濃度計(アタゴ光学, OZUMOR-6)で440 mμのfilterをもちいて測定した結果を図-1, 図-2に示す。

正常対照犬白質(図.1)とEAE犬-8, 白質内病巣部-1(D-8, F-1)(図2)とは、その脂質分画が濃度計のうえでは非常によく似ており、両者の間で、ch, csd, pea, std, pc, sm, ps, gsの各脂質の含量が大きな相異を示すとは思われない。しかしEAE犬-8には正常対照犬には認めないch-eの存在が示され

図 1.

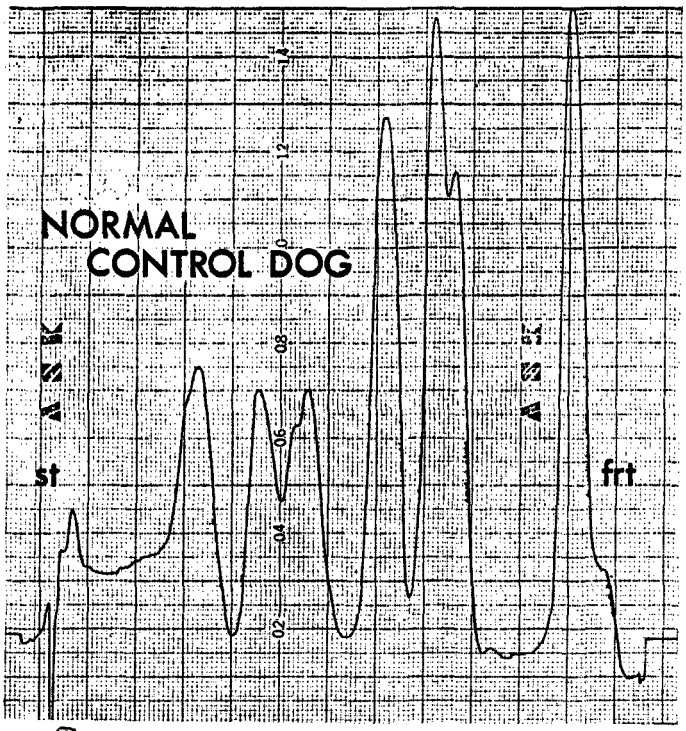
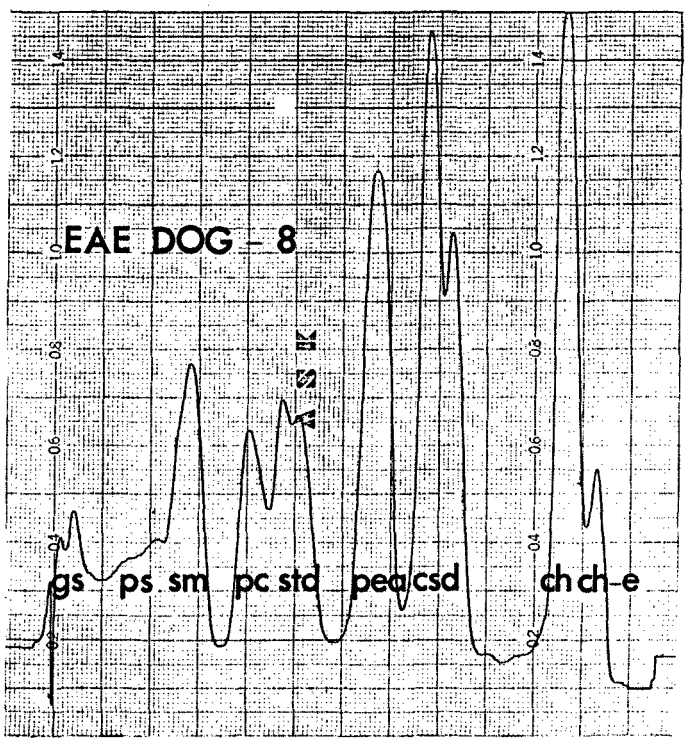


図 2.



、検索した全例、すなわちEAE兎白質(WM)、脊髄(SC)、EAE犬病巣部(F-1, F-2)、山村柄内犬(Y-5, Y-6, Y-7)白質(WM)に同様の所見を認めた。ただ、ch-eの含量は一定しないようであった。

2、EAE犬、EAE兎、および、脳虚血により脱髄をおこした犬の脳脊髄のch-eの脂酸構成を表2に示した。

これらch-eは、いづれもC16:0, C18:0, C18:1, C18:2の脂酸を主成分とし、犬では、主ら、保持時間54分の未同定の脂酸を有するものもある。

同一兎の白質(R-4, WM)と脊髄(R-4, SC)とは、非常に似た脂酸構成をおすが、犬の二ケ所の病巣部の間では(D-8, F-1; D-8, F-2)、脂酸構成にかなりの相違をみとめた。しかし、いづれもC18:2, リノール酸を比較的多く含み、動物種による相違、あるいは脱髄をおこした原因による相異は、はっきりしない。

3、EAEにより脊髄に異常に出現したch-eの脂酸構成を、その動物の血清(Ser.)および肝(Liv.)のそれと比較し、表3、および表4に示した。

血清では、C18:2, リノール酸が非常に多く、C20以上の長鎖脂酸が少なく、一方、中

表2

Fatty acid composition of cholesterol ester in central nervous system of EAE animals

	R-1 SC	R-4 WM	R-4 SC	D-8 F-1	D-8 F-2	D-19 F-1	Y-5 WM	Y-6 WM	Y-7 WM
14:0	0.9	1.5	tr.	tr.	0.3	tr.	3.0	tr.	3.6
15:0	1.1	tr.	tr.		tr.	tr.	tr.	tr.	0.9
16:a*	0.4	0.8	0.8	tr.	0.2	0.4	tr.	tr.	
0	20.0	27.3	30.2	14.5	9.0	12.3	19.0	8.6	23.2
1	3.1	2.5	5.4	1.7	1.3	1.5	2.5	3.9	2.7
17:0	2.0	2.5	3.0	tr.	0.7	0.8	4.4	0.9	4.5
18:a*	0.7	4.9	1.2	tr.	0.2	1.1	tr.	0.8	1.0
0	6.6	10.4	12.6	8.4	4.5	4.9	10.9	1.9	12.4
1	18.1	22.8	20.6	40.6	17.1	18.2	19.0	22.5	22.4
2	18.7	7.4	8.8	8.6	12.0	19.1	8.3	2.2	10.2
3	3.1	5.2	4.1	4.8	1.6	4.1	6.3	1.3	7.7
19:0			tr.		tr.		2.6		tr.
20:0	7.1	7.-	13.3	2.7	1.4	4.3	7.3	0.8	3.8
2*	tr.	tr.	tr.			tr.	tr.	1.5	tr.
3*	1.6	tr.	tr.			tr.	tr.	2.6	2.7
4*	6.2	7.0	tr.	4.7	2.6	3.3	6.2	1.5	5.0
22:0				tr.					
4*	10.5	tr.	tr.	14.0	3.9	10.8	tr.	2.1	tr.
5*	tr.	tr.	tr.	tr.	8.2	2.4	tr.	5.5	tr.
6*	tr.	tr.	tr.	tr.	2.1	6.3	tr.	3.8	tr.
?(47 min)					2.5	tr.	tr.	2.9	
?(54 min)					32.3	10.4	10.3	37.4	

表3

Fatty acid composition of cholesterol ester in CNS, serum, and liver, of EAE animals.

	Rabbit-1 S.C.	Rabbit-1 Ser.	Rabbit-1 Liv.	Rabbit-4 W.M.	Rabbit-4 S.C.	Rabbit-4 Ser.	Rabbit-4 Liv.
14:0	0.9	0.7	0.2	1.5	tr.	1.3	tr.
15:0	1.1	0.6	0.4	tr.	tr.	0.7	tr.
16:a*	0.4	0.5	0.5	0.8	0.8	tr.	0.7
0	20.0	14.8	13.0	27.3	30.2	14.3	15.3
1	3.1	2.3	1.0	2.5	5.4	3.7	1.3
17:0	2.0	0.7	0.7	2.5	3.0	0.4	1.4
18:a*	0.7	0.3	0.2	4.9	1.2	0.4	0.6
0	6.6	2.0	3.7	10.4	12.6	1.9	6.4
1	18.1	16.6	12.9	22.8	20.6	23.7	19.2
2	18.7	53.4	20.9	7.4	8.8	49.2	12.9
3	3.1	6.3	3.3	5.2	4.1	4.4	4.9
19:0					tr.		
20:0	7.1			7.5	13.3		
2*	tr.		0.9	tr.	tr.		tr.
3*	1.6		1.0	tr.	tr.		tr.
4*	6.2	1.8	1.7	7.0	tr.	tr.	tr.
22:4*	10.5		2.6	tr.	tr.		tr.
5*	tr.		6.8	tr.	tr.		13.0
6*	tr.		2.3	tr.	tr.		4.0
?(47 min)			2.1				tr.
?(54 min)			25.7				20.2

表4

Fatty acid composition of cholesterol ester in CNS, serum, and liver, of EAE dogs.

	Dog-8 F-1	Dog-8 F-2	Dog-8 Ser.	Dog-8 Liv.	Dog-19 F-1	Dog-19 Ser.	Dog-19 Liv.
14:0	tr.	0.3	0.4	tr.	tr.	0.9	tr.
15:0		tr.	0.2	tr.	tr.	0.2	tr.
16:a*	tr.	0.2			0.4	0.9	0.3
0	14.5	9.0	13.4	9.6	12.3	13.2	13.8
1	1.7	1.3	2.4	2.7	1.5	3.3	4.0
17:0	tr.	0.7	0.4	0.7	0.8	1.5	2.3
18:a*	tr.	0.2	tr.	1.5	1.1	0.4	tr.
0	8.4	4.5	1.7	8.9	4.9	1.1	9.7
1	40.6	17.1	18.0	29.5	18.2	19.7	37.4
2	8.6	12.0	47.3	18.9	19.1	38.9	22.5
3	4.8	1.6	tr.	4.0	4.1	0.7	3.6
19:0		tr.					
20:0	2.7	1.4	1.9	3.5	4.3	0.7	1.0
2*					tr.	tr.	
3*			tr.		tr.	tr.	
4*	4.7	2.6	5.7	3.5	3.3	7.5	1.9
22:0	tr.		tr.				
1*			tr.				
2*			2.3				
3*			3.3			6.7	
4*	14.0	3.9	1.5	tr.	10.8	0.9	tr.
5*	tr.	8.2	tr.	9.2	2.4	1.7	tr.
6*	tr.	2.1	1.5	2.2	6.3	1.7	tr.
?(47 min)		2.5			tr.	tr.	
?(54 min)		32.3		5.8	10.4		3.5

脊髄神経系に出現したch-eは、C20以上の長鎖脂酸をも含み、血清のそれとは異なる。肝のch-eは、神経系に出現したch-eと比較的似た脂酸構成をもつ。

4. 兎、犬の胎児期の脊髄にはch-eがあり、これとEAEの際、中枢神経系に出現するch-eの脂酸構成の比較を表5に示した。

胎児期の兎、犬のch-eも、C16:0, C18:0, C18:1, およびC18:2を主要構成脂酸としており、兎と犬とで、比較的似ており、これらはEAEなどの病的状態に出現するch-eの脂酸構成とも似ていた。

一方、EAE犬の病巣部のcerebroside, phosphatidyl choline (Lecithin), およびphosphatidyl serine (phosph-serine)の脂酸構成をch-eのそれと比較し、表5の右側に示した。

Cerebrosideはc24:0, C24:1の長鎖脂酸を大量に含み、ch-eとは脂酸構成を全く異にする。phosphatidyl choline およびphosphatidyl serineはC16:0, C18:0およびC18:1を主要構成脂酸とし、C18:2すなわちリーノール酸を殆んど含まず、ch-eとは異なっていた。

表 5

Comparison of fatty acid composition of cholesterol ester of EAE animals with fetus, also with several other lipids of EAE animals in CNS.

	Fetus		EAE dog (D-19)			
	Rabbit	Dog	Cholesterol ester	Cerebroside	Lecithin	Phosph-serine
14:0	1.8	tr.	tr.	0.6	0.5	0.8
15:0	tr.	tr.	tr.	0.1	tr.	tr.
16:a*	0.5	tr.	0.4	tr.		0.2
0	28.5	21.6	12.3	1.7	31.7	8.4
1	3.8	6.4	1.5	0.3	1.2	0.2
17:0	2.2	1.7	0.8	tr.	tr.	
18:a*	1.2	0.6	1.1			tr.
0	10.8	9.9	4.9	6.3	18.9	38.6
1	18.3	17.1	18.2	1.5	44.6	41.2
2	14.7	5.3	19.1		1.1	tr.
3	5.7	4.4	4.1		1.8	
19:0		tr.		tr.		
20:0	8.6	8.9	4.3	1.8		0.4
1*				0.6		3.5
2*	tr.	tr.	tr.			0.3
3*	tr.	tr.	tr.			1.2
4*	3.7	11.9	3.3		0.2	3.5
21:0*				tr.		
22:0				5.1		
1				1.4		
4*	tr.	12.3	10.8			tr.
5*	tr.	tr.	2.4			1.7
6*	tr.	tr.	6.3			tr.
23:0*				3.9		
1*				tr.		
24:0				23.9		
1				39.3		
25:0*				1.9		
1*				4.1		
26:0*				1.0		
1*				6.6		
?(47 min)			tr.			
?(54 min)			10.4			

以上、動物の実験的アレルギー性脳脊髄炎をおこす土壌、脱髄発症時、脱脊髄にch-eの出現を認め、その脂酸構成を検索し、これが血清ch-eの単なる移行とは考え難い結果をえ、また、その脂酸部分が脱脊髄の他の脂質よりのtransesterificationによるものとも考え難い結果をえた。

一方、ch-eは、脱塵血症による脱髄においても出現し、その脂酸構成がEAE時に出現したそのと比較的似ており動物種により明らかな差がなく、又動物の胎児期に生理的に存在するch-eと、その脂酸構成が似ている事より、このものが髄鞘形成、髄鞘再生、あるいは脱髄の際、脱脊髄で合成され何等かの役割を果していると考えられる。

終りにのぞみ、貴重な資料を頂いた横浜市大、猪瀬正教授、東大、野島庄七教授に感謝します。また、東京歯大病理、山村武夫助教授、河内隆男博士、日立埼玉病院眼科、高山東作博士、慶大病理、松山春吉講師、およびお帝国臓器研究部、山元正昭博士に感謝します。

文献 1. Willmon, T.L.: Ann. N.Y. Acad. Sci. 122: 1, 1965. 2) 山村武夫, 河内隆男, 未発表. 3). Whewell, J.R. & Cummings, J.N.: Biochem. J. 86: 378, 1963. 4) Morris, L.J.: J. Lipid Res. 4: 357, 1963.

33 脳脂質に関する研究－第Ⅱ報，髄鞘形成期のニワトリ脳脂質への ^{14}C－acetate および ^{14}C－glucose のとりこみについて－

立沢　寧（慶大・医・相沢内科）
菅野剛史（慶大・医・医化）
中沢恒幸（慶大・医・神経）

成長期の脳代謝はきわめて興味ある問題であり，現在までに多数の研究がなされて来た。しかし，髄鞘形成期に焦点をしぼった代謝の研究は少ない。

一方，脂質は髄鞘の主成分であり，髄鞘形成期の脂質代謝の研究は，脱髄疾患の解明のためにも重要な意味をもつ。

また，近年，組織培養による神経組織の研究がすすみ，脳腫瘍や実験的脱髄の分野では，病理組織学的には，注目すべき業績をあげており，代謝過程の研究にまでこれをもちいて，すすめられつつあるが，母組織である幼若神経組織の代謝に関する追求が伴わずに，それを充分理解することはできない。

昨年の本会において，われわれは，ニワトリの胎児の成熟過程において，脂質およびその脂肪酸が，その構成をかなりの速度で変えていることを報告した。そして，胎生19日目ごろより，髄鞘形成脂質の一つであるCerebrosideの出現，また，Sphingomyelinの増加を指摘し，この頃髄鞘形成が活発になることを，脂質化学的にも予想通りの結果を得た。このことは，組織化学的にも，Sphingomyelin，Cerebroside，およびLecithinに親和性を有するProtoporphyrine Ⅲ型による脊髄での検索によっても証明される。

今回，われわれは胎生14日目，17日目，および20日目のニワトリ胎児をもちい，薄層クロマトグラフィーにより脂質を分析し，髄鞘形成期において，^{14}C-acetate，および，^{14}C-glucoseが，どの脂質にとりこまれるかを観察し，ここに報告する。

実験方法

実験動物は，胎生14日目(平均体重，8.3g)，胎生17日目(平均体重19.5g)，および胎生20日目(平均体重，31.0g)のニワトリ胎児をもちいた。

これらの動物に，Acetic acid-1-^{14}C(sodium salt)(比放射能 10.0 mc/m.mol)，および D-Glucose-1-^{14}C (比放射能 14.3 mc/m mol)を，14日目胎児には 15μc (1.8 μc/g body wt.)，17日目胎児には 30μc (1.5 μc/g body wt.)，20日目胎児には 40μc (1.3 μc/g body wt.)を，各腹腔内におなし，37°Cで3時間 Incubate したのち断頭，脳をとり出し，ただちに Wherrett & Cumings[1]の方法により Chloroform:Methanol 2:1をもちいて脂質を抽出した。

なお ^{14}C-acetateをおなした，14日目胎児，および17日目胎児は，3時間後，Incubaterよりとり出した時には，すでに死亡していた。

薄層クロマトグラフィーにより脂質を分析した方法は，昨年本会において発表した通りであるが，検索した脂質は free cholesterol (CH)，cholesterol ester (CH-E)，Cerebroside (CSD)，Sulfatide (STD)，Sphingomyelin (SM)，Phosphatidyl choline (PC)，Phosphatidyl ethanolamine (PEA) Phosphatidyl serine (PS)のほか，横浜市大猪瀬正教授より頂いた純品により同定し得た，Ganglioside (GS)を加えた。

Radioactivityは Aloka Radiation Counter TDC-2，Detectorは Windowless

表 1

Lipid composition of the developing brain of chick embryo on TLC densitometer.

	GS	PS	SM	PC	STD	PEA	CSD	CH	CH-E
14th day embryo	0.2 (1.00)	9.8 (1.00)	4.2 (1.00)	27.4 (1.00)		24.8 (1.00)	1.0 (1.00)	22.5 (1.00)	10.8 (1.00)
17th day embryo	0.9 (4.50)	9.0 (1.08)	6.7 (1.89)	26.3 (1.15)	tr.	23.3 (1.10)	1.3 (1.44)	22.7 (1.18)	9.9 (1.07)
20th day embryo	1.4 (9.50)	11.2 (1.70)	8.2 (2.92)	25.6 (1.42)	0.2	24.8 (1.49)	4.0 (5.89)	18.1 (1.20)	6.5 (0.90)

percentage

type FC-1E を用いた。
なお、Radio-Gas-Chromatography, YANAGIMOTO GCG-5DH に Radioactivity Counter を装備したものをもちい、脂質の脂酸部分への ^{14}C のとりこみの分析を、現在研究中である。

結 果

1. TLC用濃度計上の各脂質分画の構成比を表1にあす。( ) 内は、胎生14日目胎児

分析を、現在研究中である。

結果 および 考察

1. TLC用濃度計上の各脂質分画の構成比を表1にあす。( )内は、胎生14日目胎児

表 2

Incorporation of ^{14}C-acetate and ^{14}C-glucose in brain extract using the methods of Wherrett & Cumings, and Folch et al.

	Wherrett & Cumings' method	Folch et al's method Upper (MeOH) phase	Lower ($CHCl_3$) phase
^{14}C-acetate injected			
14th day chick embryo	10,223	3,692	6,579
17th day chick embryo	51,817	15,713	39,145
20th day chick embryo	11,870	3,130	9,756
^{14}C-glucose injected			
14th day chick embryo	30,022	15,478	7,793
17th day chick embryo	37,216	18,033	13,094
20th day chick embryo	27,277	18,457	5,419

(count per minute / 100 mg wet wt. brain)

の各脂質の濃度計上の値を1とし、17日目および20日目の脳全体の各脂質の増加を示したものである。

14日目、17日目、および20日目の胚生体の脳で、各脂質のしめる割合は比較的一定しており、PC, CH-Eは、成長するに従い、その割合が微少する。

各脂質の増加は、GS, CSD, SMが著明であり、PC, PEA, CHはあまり増加せずCH-Eの量は殆んど変化しない。

2. ^{14}C-acetate および ^{14}C-glucoseの脳へのとりこみを表2に示した。^{14}Cのとりこみは いづれの場合も 17日目の胚脳がもっとも大きいことがわかる。^{14}C-acetateの、Folchの下層へのとりこみは 14日目胚脳をのぞいて ^{14}C-glucoseのそれより2倍から3倍高い。^{14}C-glucoseより Folchの下層へのとりこみは、上層のそれの1/2から1/3程度である。

3. Wherrett & Cumingsのextract, Folchの上層および下層を、Chloroform: Methanol: 水 = 14:6:1で展開し、各分画への^{14}Cのとりこみを表3に示した。但し、この場合のみ、表の上に示したGS, PS, SMなどの分画名は、同時に展開した既知の構成の脂質名を便宜上つけ、その物質名の示す物質へのとりこみという意味ではない。

Folchらは、彼らの方法で組織脂質の99%を回収出来ると記載している。しかし、われわれの結果では、脂質の回収はその脂質の親水性(あるいは疎水性)により、下層への回収に差を見た。われわれの技術がFolchらのものと同じでないとしても、Folchらの方法が、脂質の抽出にきわめて良い方法であるとはいいきれない。

一方、^{14}C-glucoseをMethanolにとき、上の薄層にapplyして展開し、その99%以上をPSと一致した分画より回収した。したがって、表3のPSの分画には、Glucoseを含めたChloroform: Methanol (2:1, v/v)可溶性物質のcontaminationが考えられる。以上より、Wherrett & Cumings法、およびFolch et al法いづれも脂質の抽出法として問題を有する方法であるが、さしあたって今回は、Wherrett & Cumingsの方法により抽出された成績により、以後の検索をすすめることとし、この際問題となるGS, およびPSに対して、右肩に星印をつけ、その分画のcontaminationの存在を示した。

4. ^{14}C-acetateのニワトリ胚児脳の各脂質分画へのとりこみを表4に示した。14日目胚児の脳へは ^{14}Cはあまりとりこまれていないが これなこの胚児がる時

表 3

Incorporation of ^{14}C-glucose into lipid fraction of the brain of 17th day chick embryo, extracted by the methods of Wherrett & Cumings, and Folch et al.

	GS	PS	SM	PC	PEA	CSD	CH	CH-E
Folch's upper phase	4420	3520	1080	200	240	40	0	0
Folch's lower phase	160	820	560	1740	920	100	300	420
Wherrett & Cumings' method	7937	13740	1781	2268	954	153	380	980

(count per minute / 100 mg wet wt. brain)

表 4

Incorporation of ^{14}C-acetate into lipid fraction of the developing brain of chick embryo.

	GS*	PS*	SM	PC	PEA	CSD	CH	CH-E
14th day chick embryo	1601	887	554	774	267	400	440	580
17th day chick embryo	5916	5870	2154	11139	2248	1001	4202	4069
20th day chick embryo	1001	1621	887	2755	1087	354	1848	847

(count per minute / 100 mg wet wt. brain)

向後すでれ改もしていたことを考慮しなければなる為が ^{14}C-glucose の脂質へのとりこみが次に述べるごとく、14日目であまり高くない事も考え、この時期では ^{14}C acetate よりの脂質への移行はこの時期にはあまり大きくないと言ってよかろう。

一方、17日目では ^{14}C は PC に非常にとりこまれ、この時期にはまた、他の脂質への ^{14}C のとりこみも高く、さられ総コレステロール中にとりこまれた ^{14}C 量が Lecithin(PC) にとりこまれた量にほぼ等しいことは、髄鞘の電子顕微鏡による観察の結果と比較して興味がある。しかし、この時期での PC の増加が表に見る如く、大きくない事は奇妙であるが、注目すべき時期であり、今後さらに追求したい。

5. ^{14}C-glucose の胎児脳の各脂質分画へのとりこみを、表5に示した。この場合 GS, PS の分画に対しての解釈は出来ないが、他の脂質では PC へのとりこみが や

表 5

Incorporation of ^{14}C-glucose into lipid fraction of the developing brain of chick embryo.

	GS*	PS*	SM	PC	PEA	CSD	CH	CH-E
14th day chick embryo	1601	5436	200	1434	634	234	100	567
17th day chick embryo	7937	13740	1781	2268	954	153	380	980
20th day chick embryo	11119	5983	1314	2088	914	487	487	714

(count per minute / 100 mg wet wt. brain)

り大きく、また17日目で PC へはもっとも多くとりこまれていた。

なお、Sulfatide の量は各時期とも非常に少なく、蛍光下に Detect 出来なかった。また、14日目の CSD の Radioactivity の値として表4,5に表示されたものは、この時期に存在する可能性の考えられる遊離脳脂のcontaminationを否定出来ない。

終りにのぞみ、貴重な資料を頂いた 福井医大、猪瀬正教授、東大 野島庄七教授に感謝します。

文献 1). Wherrett, J.R. & Cumings, J.N: Biochem. J. 86: 328, 1963
2). Folch, J., Lees, M. & Sloane Stanley, G.H.: J. Biol. Chem. 226: 497, 1957

34 〔γ-^{32}P〕ATP による脳のイノシタイドおよびホスファチヂンへの ^{32}P 組入れ

林　浩平・八木原嘉幸・
中村　勇・片桐　章・
荒川　泰・山添三郎
（群大・医・生化）

1954 年 Dawson によつてはじめて各種のリン脂質がペーパークロマトグラフィーの方法によつてほゞ完全に分画された時から，脳のイノシタイドとホスファチヂン酸は^{32}P の組入れの特に多いリン脂質として注目されてきた．この中ホスファチヂン酸(PA) はとくに Hokin によつて Na イオン輸送の carrier であるとの想定のもとに多くの研究がなされたが，この考えを支える事実は得られず，Hokin 自身もその仮説を大巾に修正して了った．Inositide については，1961 年 Ballou ら[1] および Dawson ら[2] によつて脳で triphosphoinositide(TPI) および diphosphoinositide(DPI) がみいだされ，Ballou ら[3] はこれらの polyphosphoinositide(PPI) のモノエステルリン酸への^{32}P 組入れが特に高いこと，およびこのリン酸化が ATP による可能性を示した．PPI は蛋白との結合が強く，イオンの能動輸送を活発に行つていると思われる組織でその代謝活性が高く，死後の分解が筋における ATP の死後分解にくらべられる程早いことなどから，PPI は膜を介しての物質輸送に関係をもつ可能性がこの領域の研究者によつて指摘されている．一方膜を介してのイオン輸送に関与するものとして Na^+-K^+ 促進性の膜 ATPase が広く研究されており，最近低温で ^{32}P-ATP と ATPase を短時間 incubate して得られるリン酸化された中間物質の追及に興味がもたれている．著者らは PPI とイオン輸送又は ATPase との関係を追及する基礎的段階として，^{32}PATP と脳ホモジエネイトを低温で incubate した場合の PPI へのリン酸化を観察した結果，^{32}P 組入れが低温で極めて短時間内におこることを確め，またそれに及ぼす Ca，Na イオンの影響などについても検討した．

実験方法

ホモジエネイトおよび細胞下分画の作成：モルモット大脳皮質から 1mM EDTA を含む 0.32M sucrose でテフロンホモジエナイザーによる 10% ホモジエネイトを作り，1,000×g 11分遠心の上層を 75,000×g 90分遠心し，沈渣を 0.32M Sucrose で1度遠心洗滌し，その沈渣を 0.32M sucrose に浮遊させたものをホモジエネイトとして用いた．細胞下分画は 1,000×g 11分の上層の 17,500×g 60分の沈渣を 1.2，0.8，0.32M sucrose の密度勾配53,000×g 120分で分ける Whittaker[4] らの方法によつた．　脂質の抽出と分画：TCA 添加によつて反応を停止させ，TCA による洗滌を3回行つた後，Hokin[5] と同様に HCl-$CHCl_3$-CH_3OH (1:200:100) で脂質を抽出し，0.1N HCl で洗滌してから乾燥させた後，脱アシルおよび Dowex 1-formate カラムによる分画は Hawthorne[6] の方法に従つた．図1には同定のため Folch の inositide の脱アシル物を添加したホモジエネイトの脂質脱アシル物のカラムクロマトグラムを示した．DPI および TPI の脱アシル物の^{32}P 活性は carrier に一致している．しかし ITP に一致して ATP^{32} も溶出される．特に短時間 incubation の場合は溶媒7で溶出される^{32}P 活性は殆んどすべて ATP によるものであつたので，この部分の^{32}P 活性は除外してリン脂質の^{32}P 活性が計算された．また溶媒3で溶出される^{32}P 活性の中に $^{32}P_i$ も含まれるが，その活性は GP と比較すれば無視できる程少ないので，この部分に溶出される^{32}P 活性は GP として計算された．　Incubation：KCl 100mM，$MgSO_4$ 3mM，Tris-HCl buffer pH 7.4 20mM を通常使用した．ATP^{32} 1～3mM (終末)，0.32M sucrose に浮遊

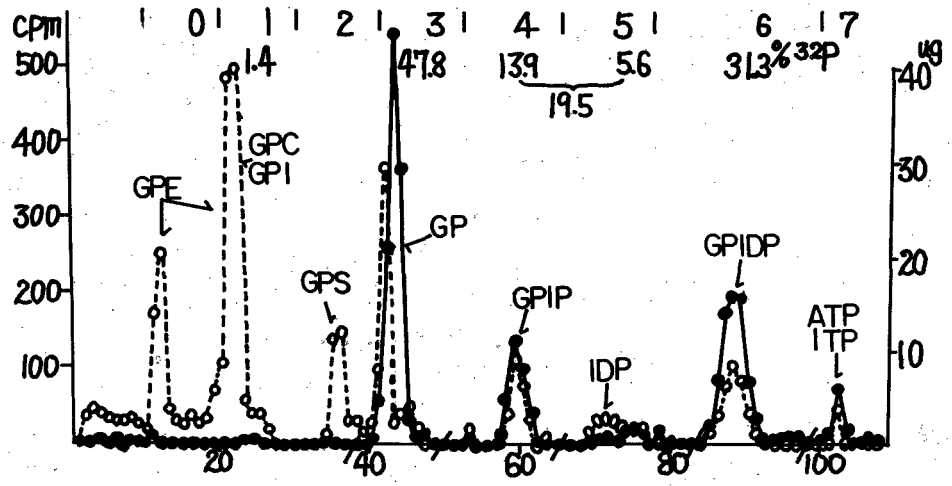


図1. モルモット脳ホモジエネイトの ^{32}P でラベルされたリン脂質脱アシル産物のカラムクロマトグラフィー.

ホモジエネイトと ^{32}P-ATPを0°C 3分 incubateして ^{32}P をラベルした. CarrierとしてFolchのinositideが加えてある. 15mlづつに分画しその1mlについて ^{32}P-活性, 2mlについてPの測定をした. 表1の3行目と同じ. GPE, GPC, GPI, GPS, glyceryl phosphoryl-ethanolamine, — choline, — inositol, — serine; GP, glycerophosphate; GPI(D)P, glyceryl phosphoryl inositol(di)phosphate; IDTP, inositol di(tri)phosphate. 溶媒 0, 5mM sodium borate-30mM ammonium formate; 1, 5mM borate-60mM formate; 2, 5mM borate-120mM formate; 3, 5mM borate-180mM formate; 4, 0.2M formate-0.1M formic acid; 5, 0.3M formate-0.1M formic; 6, 0.5M formate-0.1M formic; 7, 0.5N HCl.

表1 The Incorporation of ^{32}P from [γ-^{32}P] ATP into Polyphosphoinositides and Phosphatidic Acid in Brain Homogenate of Guinea-Pig at 0°C

Temp.	Incubation Time Sec.	Total Lipid-^{32}P x10^{2}cpm	Total Lipid-P x10^{2}μg	Percentage distribution of ^{32}P				ATP hydrolysed %
				PA	DPI	TPI	others	
0°C	3	3,698	21.5	75.3	13.7	9.9	1.1	7.2
	15	7,494	"	64.5	17.3	17.0	1.2	18.7
	180	9,072	"	47.8	19.5	31.3	1.4	87.5
0°C	2	—	15.6	62.6	18.5	17.2	1.7	5.8
	10	130	"	55.0	17.3	20.4	7.3	14.8
	30	650	"	44.8	24.5	27.4	3.3	27.9
	60	1,750	"	37.3	24.9	34.7	3.1	49.3
	120	1,940	"	34.9	27.5	35.0	2.6	61.2

させたホモジエネイト5ml(通常lipid-Pにして7500~2000μg)を加え総量を10mlとした. ATP^{32} はGlynn and Chappel[7]の方法によって調製した.

実験結果

低温における ^{32}P-ATPによるホモジエネイトのリン脂質への ^{32}P 組入れ: 表1には0°Cで ^{32}P-ATPとホモジエネイトをincubateした時の ^{32}P のリン脂質への組入れおよびPA, DPI, TPIの ^{32}P 活性分布とその時間経過が示され, 図2,3にはそれらのカラムクロマトグラムが示されている. PA, DPIおよびTPIへの ^{32}P 組入れは2~3秒のincubationによってすでに認められる. PAの ^{32}P 活性は2~3秒で多量にみられるが, 時間とともに増加する傾向がそれ程みられないので, 2~3秒以内の ^{32}P 活性はdiglyceride kinaseによる生物学的に意味をもつ反応によるかどうか疑問であろう. DPIおよびTPIとくに

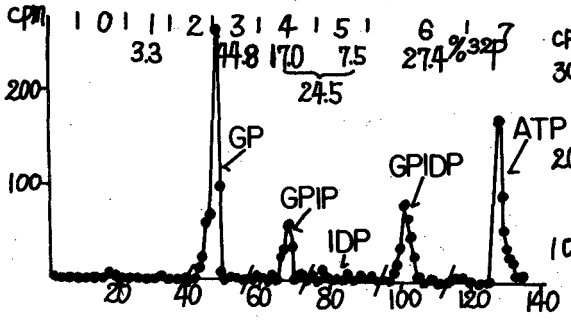


図2. 脳ホモジエネイトと^{32}P-ATPを0℃ 30秒 incubate した場合の^{32}P-リン脂質のカラムクロマトグラフィー．カラムクロマトの条件は図1に同じ．表1 6行目と同じ．

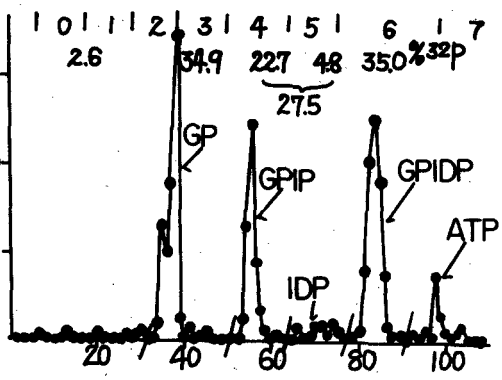


図3. 脳ホモジエネイトと^{32}P-ATPを0℃ 120秒 incubate した場合．表1最下行と同じ．

TPIの^{32}P活性は0℃で約1分までは時間とともに著しく増加しており，DPIのATPによるTPI生成反応は非常に速い速度で行われているとみられる．表2に示されるように25℃ 120秒のincubationではATPの90%以上が分解されているが，TPIの^{32}P活性の比率は高くリン脂質の^{32}P活性分布は0℃ 1~3分における場合と同じ傾向を示している．しかし25℃ 240秒のincubationでATPが殆んど分解された状態では，TPIの^{32}P活性が低下している．さらにincubationを續けるとDPIの^{32}P活性も低下する．そしてATP消失後のincubationによってTPI，DPIの^{32}P活性が完全に消失した後にもPAの^{32}P活性はなお存在していた．

表2　Effect of Ca and Na ions on the Incorporation of ^{32}P from [γ-^{32}P] ATP into Brain Lipids

Temp. and Time	Medium	Total Lipid-^{32}P x10^{2}cpm	Total Lipid-P x10^{2}μg	Percentage distribution of ^{32}P				ATP hydrolysed %
				PA	DPI	TPI	others	
25°C 120 sec.	K mg	409	15.5	28.2	34.1	37.2	0.5	94.7
	K mg	390	"	30.2	31.4	37.4	1.0	94.2
	K mg ca	197	"	55.6	15.9	27.6	0.9	92.8
	Na k mg	398	"	32.8	32.5	34.3	0.4	93.8
0°C 120 sec.	K mg	242	"	34.8	20.1	44.1	1.0	87.8
0°C 15 sec.	K mg	7,494	21.3	64.5	17.3	17.0	1.2	23.7
	Na mg	6,732	"	68.2	13.1	16.3	2.4	23.0
	K ca	3,987	"	74.5	11.9	11.6	2.0	20.3
	K mg ca	2,938	"	64.4	17.4	13.6	4.6	19.0
25°C 240 sec.	K mg	135	16.0	66.6	23.2	9.5	0.7	99.1
	K mg ca	68	"	72.1	13.5	11.9	2.5	98.9
	Na k mg	93	"	52.8	30.9	15.5	0.8	99.4

大文字のK, Naはそれぞれ100mM KClとNaCl，小文字のmg, k, caはそれぞれ3mM $MgSO_4$, ~~KCl~~ 70mM KCl, $CaCl_2$.

[γ-^{32}P] ATPよりpolyphosphoinositidesへの^{32}P組入れに及ぼすNa^+およびCa^{++}の影響：

表2および図4, 5に示されるように$CaCl_2$ 3mMの添加によって，0℃の場合も25℃の場合もともにリン脂質への^{32}P組入れは50%又はそれ以上抑制を受けるが，とくにPPIへの組入れが抑制されていることがわかる．しかし25℃・240秒のincubationによってATPが殆んど分解され，PPIの^{32}P活性が減少している状態ではCa^{++}のPPIへの^{32}P組入れに対する抑制的効果はみられない．KCl 100mMをNaCl 100mMにおきかえて

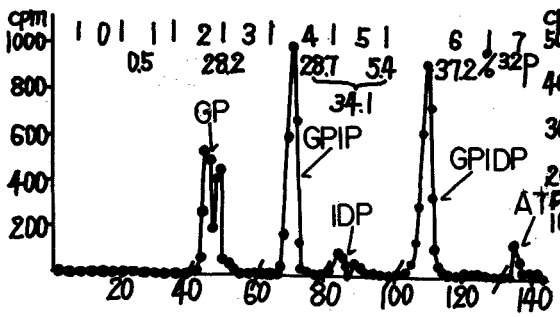


図4. 脳ホモジエネイトを^{32}P-ATPと25°C 2分incubateした場合のリン脂質の^{32}P-活性分布. 表2, 1行目と同じ.

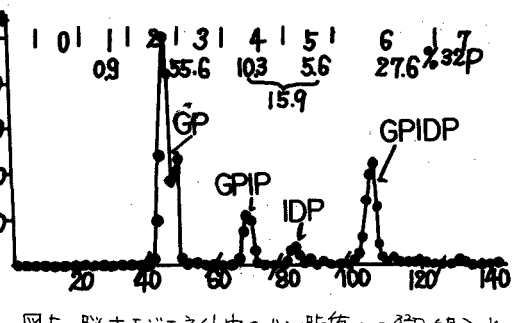


図5. 脳ホモジエネイト中のリン脂質への^{32}P組入れに及ぼすCaイオンの影響.
図4と同じ条件で3mM $CaCl_2$を加えてある.
表2の3行目と同じ.

も, また100mM NaCl+10mM KClとしてもATP^{32}よりPPIへの^{32}P組入れに変化はみられなかった.

脳細胞下分画における^{32}P-ATPよりのPPIおよびPAへの^{32}P組入れ: ミエリン, シナプトソーム, ミクロソームおよびミトコンドリアのどの分画においても^{32}P-ATPよりPPIへの^{32}P組入れが認められた.

考察および要約

最近Kennedyら[8]は脳ミクロソームにMPIと^{32}P-ATPを加えて^{32}P-PPIの合成に成功し, Kai, Hawthorneら[9]は脳ホモジエネイトでDPIと^{32}P-ATPから^{32}P-TPIの合成を報告している. この2つのグループの実験は何れも基質(MPIまたはDPI)を添加し比較的高濃度かつ長時間(37°C 60分 および2分)のincubationを行っている. 著者らの実験では内在inositidesが^{32}P-ATPによって極めて短時間内にラベルされ, かつATP分解後はPPIの^{32}P活性も消失することが示された. またDawsonら[10]; 著者ら[11]によって死後脳内PPIの分解が極めて早くおこることが報告されている. これらの事実はPPIの代謝回転, すなわちDPI + ATP ⟶ TPI + ADP, TPI ⟶ DPI + Piの TPI-DPI cycle の活性が極めて高いことを示している. このcycleの結果としてATP⟶ADP+Piのatpase反応が残ることは興味深い. 最近膜ATPaseと^{32}P-ATPを低濃度でincubateした場合に生ずる^{32}P-中間物質として長野ら[12], Hokinら[13], Postら[14]によってacyl phosphateをもつ物質の存在が提起されている. Dawsonら[15]は電気器官(ウナギ)より得たATPaseについて実験を行い, リン酸化された中間物質としてのTPIの存在を否定しているが, 著者らの結果はPPI代謝がATPaseと密接な関係をもつ可能性を示している.

文献: 1) Brockerhoff, H., and Ballou, C.E., J. Biol. Chem., 236, 1907 (1961) 2) Dittmer, J.C. and Dawson, R.M.C. Biochem. J., 81, 535 (1961) 3) Brockerhoff, H. and Ballou, C.E., J. Biol. Chem., 237, 49 (1962) 4) Eichberg, J., Whittaker, V.P. and Dawson, R.M.C., Biochem. J., 93 91 (1964) 5) Santiago-Calvo, E., Mule, S., Redman, C.M., Hokin, M.R. and Hokin, L.E. Biochim. Biophys. Acta, 84 550 (1964) 6) Ellis, R.B., Galliard, T. and Hawthorne, J.N. Biochem. J., 88, 125, (1963) 7) Glynn, I.M. and Chappel, J.B., Biochem. J., 90, 147 (1964) 8) Colodzin, M., and Kennedy, E.P., J. Biol. Chem., 240, 3771 (1965) 9) Kai, M., Salway, J.G., Michell, R.H., and Hawthorne, J.N. Biochem. Biophys. Res. Comm., 22, 320 (1966) 10) Dawson, R.M.C., and Eichberg, J. Biochem. J. 96, 634 (1965) 11) Hayashi, K. Yagihara, Y. Nakamura, I. and Yamazoe, S., Biochem. J. 60 Vol 1 (1966) 12) Nagano, K. Kanazawa, T. Mizuno, N., Tashima, Y. Nakao, T. and Nakao, M. Biochem. Biophys. Res Commun. 19 759 (1965) 13) Hokin, L.E. Sastry, P.S., Galsworthy, P.R and Yoda, A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 54 177 (1965) 14) Bader, H., Sen, A.K. and Post, R.L. Biochim. Biophys. Acta 118, 106 (1966). 15) Glynn, I.M. and Dawson, R.M.C. Slayman, C Eichberg, J. and Dawson, R.M.C. Biochem. J. 94 692 (1965)

35 脳燐脂質への^{32}Pの取込みにおよぼすINAH痙攣の影響について

田尾重良・鈴木　隆・
小林義康（北大・医・精神）

けいれんは多くの原因からおこり様々の発作型を示す。今日までに，けいれんの発現機序解明のため多くの生化学的研究が行なわれ，これらの成果として，幾つかの中枢神経系の代謝異常が発作過程と密接に関連していることが明らかとなった。その一つに，イオン能動輸送機構の破綻が考えられている。能動輸送は高エネルギー燐酸化合物のエネルギー供給により維持されているが，その際の代謝的担体に関しては定説がない。Folch(4)，Sloane-Stanley(7)，林ら(5)は脳神経組織に多量に含まれ，細胞膜の重要な構成分である脂質，とりわけ燐脂質がイオン輸送に関与していると報告している。脳燐脂質への^{32}Pの取込みにおよぼす誘発けいれんの影響について，in vivoでの文献は2.3散見されるにすぎない。今回われわれはINAHを用い，けいれん前期，けいれん期における^{32}Pの総燐脂質への取込みに関する検索を試み，ついで個々の燐脂質に分け各燐脂質への^{32}Pの取込みについて興味ある知見を得た。けいれん物質としてINAHを選んだのは，本剤が発作機序の重要因子と想定されているγ-アミノ酪酸の代謝異常をひきおこす点で好都合であること，投与後けいれん発現までの時間が比較的長く，けいれん準備状態における脳燐脂質代謝の研究が可能であること，による。

〈実験方法〉　実験動物にはウィスター系ラッテ（♂，100～150g，同腹）を用い，^{32}Pの注入は頭蓋骨縫合部（ブレグマ）より直接脳槽腰下腔へ行なった。実験群では60分後にINAH（500mg/kg）の腹腔内投与を行ない，注射後40分前後にみられる不穏多動状態をけいれん前期，けいれん状態をけいれん期としてそれぞれ液体窒素固定を行ない，対照群では実験群と同一時間で凍結処理を行なった。試料はCortex，Subcortexの部分より取り，酸溶性分画の抽出には10%ついで5%のTCAを用い，その抽出液の一定量を用いてリン値及び放射能を測定し酸溶性分画の比放射能を求めた。燐脂質の抽出はHokinら(6)の方法に従った。即ちC-M-conc. HCl（200：100：1 v/v）を用いて脂質を抽出し，水洗後に得られたC:M層を一旦減圧乾固後クロロホルムで一定量とし，その一部より総脂質燐及びその放射能を測定して総燐脂質の比放射能を求めた。個々の燐脂質の分離はDawson法(1960)を用いた。各スポットの検出にはラゲオオートグラフィーとニンヒドリンアセトンによる発色法を用いた。分離された各スポットは蒸留水で一旦抽出され，その一定量よりそれぞれのリン値及び放射能を測定しその比放射能を求めた。燐定量にはBartlett法を用いた。
結果の表示法は［Specific activity phoopholipid P／Specific activity acid soluble P］×1000によった。

〈実験結果〉　Cortex　総燐脂質への^{32}Pの取込みは，けいれん前期では対照よりも29%，けいれん期では19%の有意な減少を認めた。個々の燐脂質についてはけいれん前期ではPhosphoinositide(PI)，Phosphatidic acid(PA)でそれぞれ対照よりも76%，56%の取込みの低下が認められ，けいれん期でも同じくそれぞれ対照よりも69%，37%の取込みの低下が認められた。Phosphatidylcholine(PC)，Phosphatidylethanolamine(PE)，Phosphatidylserine(PS)に関しては各時期とも対照との間に有意差は認められなかった。

Subcortex Cortexと同様な傾向があり，総燐脂質ではけいれん前期で対照よりも27%，けいれん期で15%の有意な取込みの減少を認めた。個々の燐脂質でもPhosphoinositideで対照との間に有意差がみられ，けいれん前期では対照よりも59%，けいれん期では48%の取込みの低下がみられた。Phosphatidic acidでは一定の特長が得られなかった。

The effect of INAH convulsions on the uptake of ^{32}P into rat brain phospholipids

Table I Cortex

	TPL	PC	PE	PA	PS	PI
Control	90.6±10.97(5)	8.01±1.03(5)	2.83±0.41(5)	34.77±7.64(5)	1.14±0.41(4)	347.51±33.0(4)
Preconvulsived	64.6±9.9(5)*	5.21±0.54(5)	2.53±0.33(4)	154.7±1.72(4)**	1.02±0.31(3)	82.21±15.34**(4)
Convulsived	73.2±7.86(5)*	6.09±1.07(5)	2.93±0.11(4)	220±6.33(4)*	1.08±0.19(4)	108.79±17.09*(4)

平均値±標準偏差，( ) 例数 $^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.02$

TPL: Total phospholipid，PC, PE, PA, PS, PIについては本文参照

Table II Subcortex

	TPL	PC	PE	PS	PI
Control	75.3±3.74(5)	5.90±1.08(5)	2.40±0.28(5)	0.72±0.13(5)	188.46±41.45(4)
Preconvulsived	55.0±3.26**(5)	4.56±0.4(5)	1.96±0.61(5)	0.52±0.1(5)	76.37±18.73**(4)
Convulsived	64.0±3.54*(5)	5.34±0.94(5)	2.49±0.42(5)	0.73±0.21(5)	97.26±36.44(4)

平均値±標準偏差，( ) 例数 $^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.02$

〈考察〉 脳燐脂質への^{32}Pの取込みにおよぼす誘発けいれんの影響に関しては，in vivoでは電気，ピクロトキシンけいれんで取込みに変化がないという報告(1)もあるが，Dawson(2)，Torda(8)らは電気けいれん，PMTけいれんで11～26%減少すると報告している。われわれの実験でもINAHけいれんで^{32}Pの取込みに15~19%の減少が認められ，個々の燐脂質ではPhosphoinositide，Phosphatidic acidで^{32}Pの取込みに著しい抑制がみられた。Dawson(3)はPhosphoinositide，Phosphatidic acidの代謝回転の高いことが脳燐脂質代謝の特長であると報告したが今回の実験でも発作過程に伴いこれらの分画に特異的変化を認めた。Torda(8)は，けいれん発現に伴う取込みの減少は恐らくレシチンの急激な破壊によるものであろうと推論しているが，今回のわれわれの実験結果からはむしろイオン輸送との関連が注目されている Phosphoinositide，Phosphatidic acidへの組入れ抑制によるものと考えられる。また今回の実験において特に注目されるのは，脳燐脂質への^{32}Pの取込みの減少がけいれんによっておこるのではなく，けいれんの準備状態において既にけいれんに先行しておこっているということであり，けいれん期においてはむしろけいれん前期よりも回復傾向にあるという事実である。

〈文献〉 1) Ansell, G.B. and Dohmen, H., J. Neurochem., 2:1, 1957. 2) Dawson, R.M.C. and Richter, D., Proc. Roy. Soc. B., 137:252, 1950. 3) Dawson, R.M.C., Biochem. Biophys. Acta, 14:374, 1954. 4) Folch, J., Less, M. and Sloane-Stanley, G.H., Metabolism of the Nervous System (Edited by Richter, D.), Pergamon, London 1957, p. 104. 5) 林 浩平，中村 勇，甲斐睦典，山添三郎，神経研究の進歩，8：534, 1964. 6) Stantigo-Calvo, E., Mule, S., Redman, C.M., Hokin, M.R. and Hokin, L.E., Biochem. Biophys. Acta, 84:550, 1964. 7) Sloane-Stanley, G.H., Symp. Biochem. Soc., 8:44, 1952. 8) Torda, C., Am. J. Physiol., 177:179, 1954.

特別講演：薬理活性アミン類の領域における最近の進歩

ベルンハード・ウイットコップ（雨糸古府）
米国国立関節炎・代謝病研究所
ベセスダ・メリイランド州

過去10年間に，内因性（endogenous）の生理活性アミン類の代謝と生理的意義に関して数多くの輝かしい知見が得られた。人間の感性や，情緒や，あるいは気質に影響を及ぼす最新の医薬品の多くのものは，脳中での内因性アミン類の生合成，代謝，貯蔵あるいは遊離などに，直接または間接の影響をもたらすものである。これらについて見つけられた相関関係は，急性，慢性および遺伝性の精神失調者の生化学的基礎に関する我々の理解を深めるのに役立つた。新しい科学の領域〝精神化学（psycochemistry）〟の黎明がまさに訪れようとしている。この先駆的な研究のいくつかは National Institutes of Health の研究室で行われてきた。

私は精神化学領域の進歩の証人の一人として，S. Udenfriend 博士および J. Axelrod 博士の研究室と，私共の研究室の協同研究者 C. R. Creveling，J. W. Daly 両博士らが協力して行つてきた最近の研究成果について講演をしようと思う。

(1) 種々の sympathomimetic amines および関連医薬品の神経親和作用の大部分は，細胞組織に結合した norepinephrine（以下 NE と略す）に対して何らかの影響をもたらすことによるものである。同位元素で標識した外因性（exogenous）NE は循環系から心臓組織に素早やく取り込まれ，内因性（endogenous）アミンとしてその組織中に貯蔵される。心臓組織中に貯蔵された三重水素（tritium, H^3）化された NE の遊離率に関する種々の医薬品の効果を，いまでは便利な方法で測定できるようになつた。すなわち，組織に結合した H^3-NE の遊離量を測定する方法で，種々の医薬品，殊に精神薬理作用をもつ薬品類の化学構造と活性の関係を系統的に研究できるようになつた。組織に結合した NE が化学薬品の投与によつて遊離するこの種の現象を〝化学的遊離誘導（chemo-release）〟と定義する。

(2) 3,5-Dihydroxy-4-methoxyphenethylamine：phenethylamines および phenethanolamines の一，二および三水酸基置換体を広範囲に検べてみると，殆んど全ての誘導体が多かれ少なかれ心臓組織に結合した NE の遊離能をもつていることが判つた。然しながら，それらの O-メチル化物は1つの例外を除いて全く活性をもたない。3,5-dihydroxy-4-methoxyphenethylamine は最も活性な〝化学的遊離誘導試薬（chemo-releaser）〟であつて，現在もなを研究を続けている。

(3) アミノ酸の一種の α-methyl-m-tyrosine は，生体内で脱炭酸をうけて α-methyl-m-tyramine となり，はじめて活性な chemo-releaser として組織に結合した NE の遊離能を獲得する。したがつて DOPA 脱炭酸酵素の阻害剤は，投与した α-methyl-m-tyrosine から α-methyl-m-tyramine の生成を阻止するので，NE の遊離も同時に阻害をうける。α-methyl-m-tyrosine による chemo-release の減少は，実験動物による脱炭酸酵素阻害剤の効力検定に，はじめて有効な手段を提供した。

(4) 脳血液関門に関する研究：循環系から末梢組織えの H^3-NE の取り込みは全く容易におこるが，しかしながら，脳血液関門を通過して脳組織に入るのは極く痕跡にすぎない。直接脳室に投与された H^3-NE は容易に脳内の内因性アミン高水準領域

Recent Studies on Pharmacodynamic Amines. Bernhard Witkop(NIH)

に取り込まれることが，別の研究グループによつて立証されている。生体内ですぐに加水分解される様なNEの親油性（lipophilic）誘導体は，循環系から脳内にH^3-NEを取り込ませる一手段を提供することになる。私共は生体内で急速に加水分解されてNEに変りうる種々の誘導体の合成を現在行つている。それらの誘導体の保護基は，自動的には加水分解をおこしにくいが，酵素的には加水分解されうる様な性質のものでなければならない。脳中に局在する特異なエステラーゼによつて加水分解をうけるような保護基をもつ“潜伏性（latentiation）”の薬理活性アミンの開発が望ましい。

(5) Serotonin と Bufotenine： bufotenineやserotoninのようなインドールエチルアミン類は，塩基触媒の存在下で重水素（deutecium, D）により4位に選択的な置換がおこる。この置換反応を応用して，十分強力な放射能をもつ4-tritio-serotoninを作ることができるので，生理学的レベルではじめて，serotonin の取り込みや，遊離現象および代謝などの研究を実施することができるようになつた。

(6) ヒスチヂンとヒスタミンに関する研究： 静脈を通して投与されたH^3-ヒスタミンは，mast cells や他の組織にも同時に取り込まれる。なかでもsalivary glandsに最も高い活性がみられる。H^3-ヒスチヂン投与の場合には，急速な消失（半減期30分）が観察され，種々の組織がヒスタミンで一様にラベルされる。ヒスチヂンから誘導された場合でも，ヒスタミンからの場合でも，いずれも組織中に数日間活性が残存する。はつかねずみの心臓中でのH^3-ヒスチヂンからヒスタミン形成の初速度の減少率を，ヒスチヂン脱炭酸酵素阻害剤の効力の測定に応用することができる。

(7) Norepinephrine 合成酵素の局在箇所： チロジン水酸化酵素，DOPA 脱炭酸酵素およびドーパミン-β-水酸化酵素は，チロジンからNE生合成に至る3行程の反応を触媒する。現在これら3種の酵素の分布を解剖学的にも図示できるし，また細胞顆粒における局在箇所も知られている。NEの生合成の中心は，副腎髄質，心臓，脾臓および脳である。脳内の局在箇所は，カテコールアミン類の分布およびカテコールアミンを含む神経細胞の分布と一致する。最も強力な酵素活性をもつ領域は，尾状核，嗅球および視床下部である。3種の関与酵素は，脳および副腎髄質部の細胞顆粒中に存在する。

(8) 芳香族水酸化酵素の活性測定法と芳香族親電子置換反応（aromatic electrophilic substitution）機構について： 三重水素で標識した基質は，ある場合には水酸化酵素の簡便な活性測定法として用いることができる。例えば最近 S. Udenfriend 博士の研究室で発見されたチロジン水酸化酵素は，3,5-位を三重水素化したチロジンを用いて容易に定量することができた。ところが，ミクロゾームに存在する水酸化酵素や，フェニルアラニン水酸化酵素およびトリプトファン-5-水酸化酵素について，特定位置を三重水素化した基質を用いて活性定量を行つていた際に，多くの予想もしなかつた困難にぶつかつた。これらの困難もすでに解決され，しかも今ではこれら水酸化酵素の反応機構に納得のゆく説明を与えることができる。水酸化酵素類の研究は，芳香族親電子置換反応の根本的な機構に関する私共の思考に次々と影響を与えた。かくして反応機構および理論有機化学は，酵素学および生化学の発展にともなつて前進をつづけてきたのである。

著者からの短信：　風爽やかな初秋に皆様方と親しくおめにかかれる日を楽しみに致しております。　　8月5日　盛夏

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41年8月25日　印刷
昭和41年8月29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. 5 SUPPLEMENT

第9回神経化学懇話会抄録集

昭和41年10月7日（金）

8日（土）

於　北御堂本願寺別院講堂（大阪）

緒方書店刊