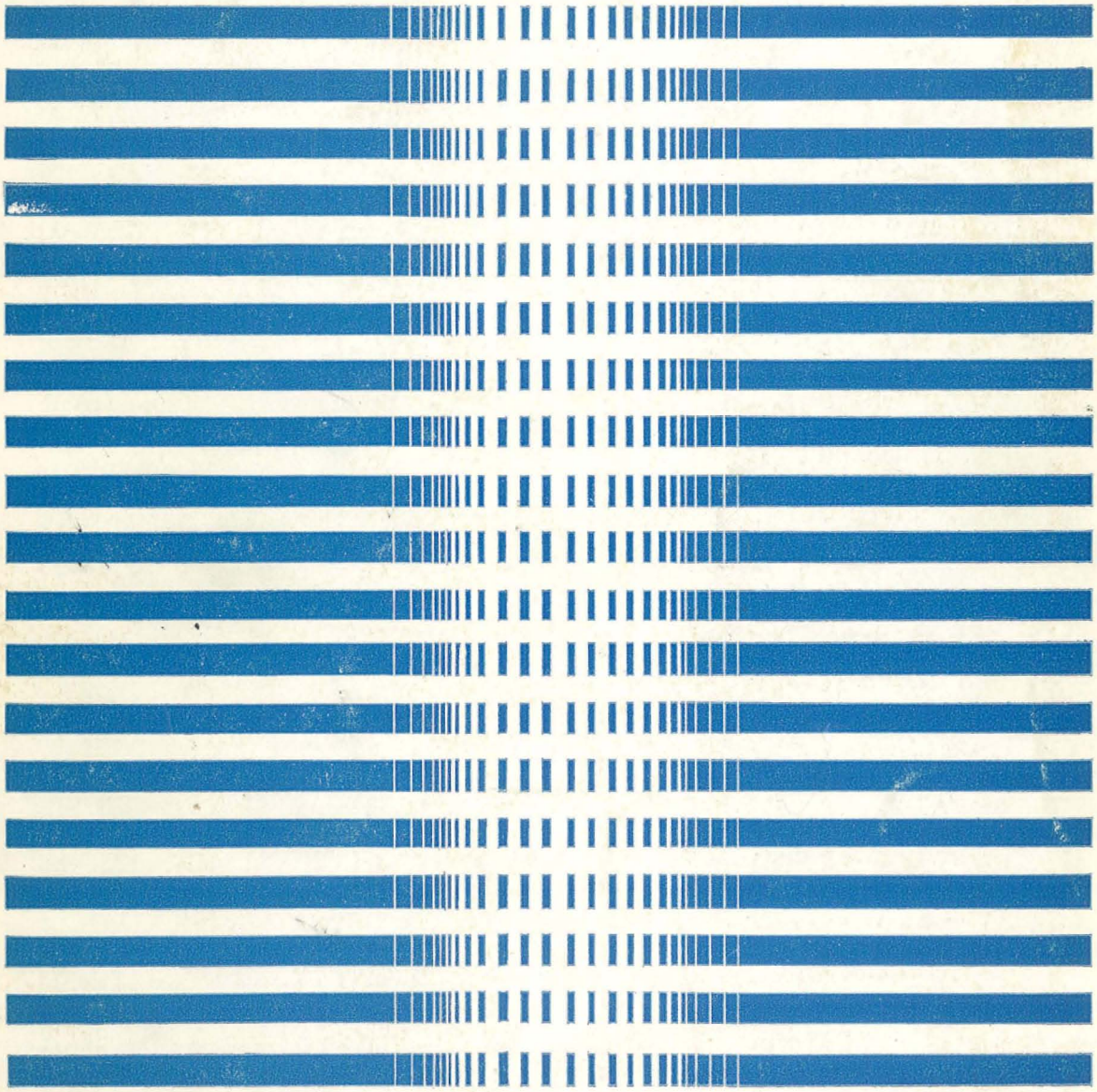
神経化学

Bulletin of the Japanese Neurochemical Society

第12回　日本神経化学会抄録集



Vol. 8 Supplement 1969

日本神経化学会

神経化学

Bulletin of the Japanese Neurochemical Society

第12回日本神経化学会

於　東　京

10月24日(金), 25日(土)

Vol. 8 Supplement 1969

日 本 神 経 化 学 会

目　　次

1. 脳髄鞘構成蛋白の生化学的研究 …… 1

駒井裕一・平岩奈美子
（新大・脳研・脳神経外）
高橋康夫
（新大・脳研・神経化学）

2. 豚脊髄および末梢神経の塩基性蛋白の精製とその性質について …… 5

植村慶一・戸張千年
平野修助
（東邦大・医・Ⅱ生理）

3. 初老期，老年期痴呆患者の脳水可溶化蛋白について …… 9

播口之朗・西村　健
市丸精一・金子仁郎
（阪大・医・精神）

4. ヒト脳のモノアミン酸化酵素の精製と精製酵素の性質について …… 13

永津俊治
（愛知学院大・歯・生化）

5. 脳の 3′, 5′—AMP 分解酵素に関する研究(2)：ラット脳からの
Cyclicphosphodiesteraseの部分精製とその性質について …… 17

垣内史朗・山崎礼子
中島　久
（大阪府立中宮病院）

6. 白鼠脳特異抗原の精製 …… 21

野口鉄也・塚田裕三
（慶大・医・生理）

7. ウシ脳からの N^{δ}—メチルオルニチン，N^{ε}—メチルリジン，N^{α}—（β-アラニル）リシン
および N^{α}—（γ-アミノブチリル）リシンの分離同定 …… 25

松岡征夫・公文　明
中嶋照夫・柿本泰男
今岡信夫・佐野　勇
（阪大・医・高次研・神経）

8. 脳に特異的に存在する1アミノ酸：プトレアニン ……29
柿本泰男・中嶋照夫
公文明・松岡征夫
今岡信夫・佐野勇
（阪大・医・高次研・神経）
芝哲夫
（阪大・理・化学）

9. α－N－acetyl－L－arginineのウシ脳よりの分離およびその痙攣作用に関する研究 ……33
大楠晴美・森昭胤
（阪大・医・Ⅱ外）

10. ネコ中枢神経系の諸種神経細胞に含まれるγ－アミノ酪酸の定量 ……37
大塚正徳・小幡邦彦
田中百合子
（東医歯大・医・薬理）

11. 高グリシン血症における代謝障害 ……41
多田啓也・成沢邦昭
荒川雅男
（東北大・医・小児）

12. 躁うつ病のトリプトファン代謝 ……45
更井啓介・茅野政夫
（鳥大・医・神経精神）

13. 高度な小頭症を伴う特異的なアミノ酸尿症の生化学的研究 ……48
松谷天星丸・永吉道子
斉藤郁子・塚田裕三
（脳性麻痺研・生化）
戸谷重雄・小野和郎
（東京小児療育病院）

14. アクリルアマイドによる神経障害の生化学的研究 ……52
橋本和夫
（阪府立公衆衛生研）

15. 実験的甲状腺機能低下症の神経化学的研究 ……56
野村正彦・永井克子
森　喜久江・塚田裕三
（慶大・医・生理）

16. 慢性メトアンフエタミン中毒動物脳のモノアミン代謝に及ぼす
パラクロールフエニールアラニンの影響 ……60
小林暉佳・吉原　林
長尾佳子・加藤伸勝
（都立松沢病院）

17. 発育過程における鶏脳内カテコールアミン代謝 ……64
小林健一
（東医歯大・医・神経）
S. Eiduson
（カリフォルニア大）

18. Hypoxiaにおける脳Mitochondria Ⅱ，Hypoxiaにおける
CytoplasmのMitochondriaに対する影響 ……68
菅野　司・長井音次
（和医大・Ⅰ生理）

19. 脳ミトコンドリアのDNP—stimulated ATPaseの失活とその保護物質について ……72
山口三千夫
（岐大・医・Ⅱ外）
石井昌三
（順大・医・脳神経外）

20. 剔出白鼠交感神経節のカリウム効果 ……76
永田　豊・御子柴克彦
（慶大・医・生理）

21. 脳皮質切片におけるシナプス電位とATPのレベル ……80
山本長三郎・黒川正則
（東大・医・脳研）

22. 脳灌流法による〔U-^{14}C〕グルコースを用いた血流障害時の脳代謝 …… 84
渡辺昌祐・大月三郎
二宮淳明・帆秋孝幸
光信克甫・三宮崇典
河野沢与・鈴木常夫
奥村二吉
（岡大・医・神経精神）
小田琢三・畠瀬修
（岡大・医・癌源研）

23. Sudanophilic Leucodystrophyと診断された患者の
凍結保存脳Myelinの生化学的特性 …… 88
宮武正
（東大・医・脳研・神経内）
小林隆子
（上智大・理工・化）
小宮義璋・石川晋次
（東大・医・脳研・生化）

24. ニワトリ胚における脳の髄鞘形成に関する免疫学的ならびに生化学的研究 …… 92
辻村良太郎
（三重大・医・精神）

25. 実験的Allergy性脳脊髄炎の酵素化学的研究 …… 96
松本博之・安斉哲郎
和田武雄
（札医大・1内）

26. 分離神経細胞体の脂質生化学的研究 …… 99
玉井洋一・松川恵子
佐武明
（新大・脳研・神経化学）

27. Niemann-Pick病の組織の脂質成分について……103
宇田裕・中沢泰男
（東医歯大・医・総合法医研）

28. Niemann-Pick 病の生化学的研究 ……107
鴨下重彦・鈴木邦彦
（アインスタイン医大・神経）

29. Tay-Sachs 病脳の中性脂質ならびに糖脂質の異常 ……111
武富保・河村成子
岡野照
（信大・医・順応研・生化）
浅野正英
（信大・医・Ⅰ病理）

30. 脳腫瘍のリン脂質脂肪酸組成に関する研究 ……115
佐藤修・佐野圭司
（東大・医・脳神経外）
堀口正明
（三共中央研）

1. 脳髄鞘構成蛋白の生化学的研究

駒井裕一・平岩奈美子（新大・脳研・脳神経外）
高橋康夫（新大・脳研・神経化学）

現在髄鞘構成蛋白はプロテオリピド蛋白（PLP），塩基性蛋白（BP）及び Wolfgram[1] type の蛋白の3群に大別されている。PLP は Folch 一派によりその化学的性状を解明する目的で研究が進められて来た。最近 Tenenbaum 等[2]により酸性クロロホルム・メタノール溶液で透析することにより，有機溶媒に可溶で，しかも水溶性の PLP が得られた。我々は髄鞘の膜構造を解明する手掛りとしてこれら髄鞘構成蛋白の化学的性状を解明しなければならないとの考えで，PLP と BP を特に電気泳動及び超遠心分析に重点をおいて比較検討し興味深い結果を得たのでここに報告する。

実験方法

PLP の分離・精製：先ず Folch 等の方法[3]により室温にて牛脳白質 100 gr に 19 倍容のクロロホルム－メタノール（C・M）溶液を加え，Warring blender にて磨砕し，約1時間放置した後ガラスフィルターにて沪過し，この脂質抽出液に 0.2 容の蒸溜水を加え強く振盪，攪拌し，10000 r.p.m.，1時間遠心にて2層に分離し，fluff 及び下層を残して上層を捨て，更に理論的上層液（C・M・水，3：48：47）にて3回同様洗滌を繰り返した。次いでメタノールを加え fluff を下層に完全に溶かし込み，ロータリーエバポレーターにて約 500 ml に迄濃縮し，これを PLP 抽出液とした。以後 Tenenbaum 等[2]の透析法を用いて脂質を除去し，水溶性の PLP を得た。

塩基性蛋白の分離・精製：Nakao 等[4]の方法を一部改変し，脱脂はアセトンの代りに C・M 溶液を用いた。即ち先ず PLP の精製の際得られた牛脳白質の C・M 溶液抽出，沪過後の残査を約 100 倍量の蒸溜水で数回洗滌を繰り返し，その洗滌液が紫外吸収にて peak を示さなくなった後，残査を一旦真空デシケーターにて乾燥させ，次いで 10 倍量の 6 mM H_2SO_4（1 M H_2SO_4 にて pH 2.0 に調整したもの）を加え，Warring blender にて5分間磨砕した後一夜放置し，ガラスフィルターにて沪過した。このようにして得られた BP 抽出液を 10 倍量の冷水にて約2昼夜透析した。（透析外液は1日6回交換）。この間の操作は全て氷室（0－4℃）で行なった。そしてこの BP 抽出液を凍結乾燥し，以下 PLP と同様に種々の生化学的研究を行なった。

生化学的検索：総窒素含量はミクロキェルダール法，総燐含量は 60% 過塩素酸にて湿性灰化した後周口の方法を用い，糖はガラクトースとしてアンスロン法，コレステロールは Zak－Henly 法にて測定した。アミノ酸組成は蛋白を 6 N HCl にて 110℃，24 時間水解した後 KLA-3B 型日立アミノ酸分析計にて測定した。ディスク電気泳動は Takagana 等[5]の方法を一部改変し，Table 1. の如くの M 尿素ゲル系を用いた。

Table 1

Stock A	5 %	7.5 %	10 %	15 %
acrylamide	4 gr	6 gr	8 gr	12 gr
BIS	0.12	0.16	0.2	0.32
urea	25.6 gr			
glacial acetic acid	28 ml			
distilled water	60 ml			

Stock B

ammonium persulfate	0.3 gr
urea	12
distilled water	20 ml

	Stock A	Stock B	TEMED (v/v)
5 %	3	1	0.015
7.5	3	1	0.020
10	3	1	0.025
15	3	1	0.030

用いる蛋白試料はフェノール：酢酸：水(2:1:1, %) 8M尿素溶液にて 100－200 μg/10 μl になるように溶解し，上下槽共 10% 酢酸溶液を用い，上槽を陽極，下槽を陰極に接続し，1本当り 2mA の割合で通電し，約5時間泳動した。ゲル染色は1% アミドシュワルツ 7B 酢酸溶液にて1時間染色した後，水洗し，以後7% 酢酸溶液にて自然脱色し，Joyce－Loebl microdensitometer にて測定した。

超遠心分析法は Spinco Model E analytical ultracentrifuge を用い，1% B－P および PL－P 水溶液 1 ml を synthetic boundary cell に入れ，ローター温度 20 ℃，56100 r.p.m. で 8, 16 分毎に写真撮影を行なった。1% 蛋白水溶液は両者ともに 8M 尿素 0.05M 酢酸ナトリウム (pH 3.8) および 1% SDS 0.05M 酢酸ナトリウム (pH 3.8) 溶液にて作成された。

実験結果及び考察

まず Tenenbaum 等の方法[2]により得られた PL－P 中の脂質の混入をみると総燐含量は 0.06%，糖(ガラクトース) 0～0.05% であり，コレステロール含量は認められなかった。次に総窒素含量は PL－P 中 12.8% であり，Tenenbaum 等[2]の 14～16% より若干低値を示し，B－P のそれは 14.2% であった。紫外吸収では PL－P は波長 278 mμ で peak を示し，その $E^{1\%}_{1cm}$ は 27.4 であり，B－P は波長 280 mμ に peak があり，$E^{1\%}_{1cm}$ は 16.2 と後者の方がより高値を示した。pH と両蛋白の溶解性との関係では PL－P は pH 3.8 以下で 8M 尿素に溶解するが，それ以上 pH を上げると白濁を生じて，完全には溶解しない。一方 B－P は pH 4.8 以下の酸性溶液で完全に溶解した。従って pH に関しては PL－P の方が B－P よりもより酸性側でなければ溶解せず，更に B－P が pH 4.8 以下の酸性水溶液で溶解するのに反して，PL－P は 8M 尿素溶液，或いは 0.5% SDS 酢酸ナトリウム (pH 3.8) 等の detergent を使用しないと完全に溶解しない。次にアミノ酸組成を比較すると Table 2. の如く PL－P は arginine, Histidine, Lysine 等の塩基性アミノ酸は 9.0% であり，中性アミノ酸では Alanine (12.4%), Leucine (11.4%), glycine (11.3%), phenylalanine (8.0%) の順に多く half cystein は 2.8% 認められ，aspartic acid 及び glutamic acid 等の酸性アミノ酸は 9.9% であった。これらの値は Tenenbaum 等[2]の報告にほぼ一致する。一方 B－P では塩基性アミノ酸が 24.8% を占め，中性アミノ酸では glycine (15%), Serine (9.7%), alanine (9.1%), proline (6.9%), Leucine (6.2%) の順に多く，half cystein は認められず，酸性アミノ酸では aspartic acid の 7.2%, glutamic acid の 5.6% 計 12.8% であり，Wolfgram[1]等のデーターとほぼ一致している。これらのデーターより酸性アミノ酸に対する塩基性アミノ酸のモル比を両蛋白で比較してみると PL－P では丁度 1:1 になり，アミノ酸組成から眺めると中性蛋白であるといえる。一方 B－P では 1:2.3 となり，アミノ酸組成からも塩基性の性質を有している。従って中性蛋白の性質をもつ PL－P の溶解性が B－P よりもより酸性側の pH で始め

Amino acid	Proteolipid protein	Basic protein
Lysine	4.5 %	8.6 %
Histidine	2.0	5.3
Arginine	2.5	10.9
Aspartic acid	4.1	7.2
Threonine	8.3	4.2
Serine	5.9	9.7
Glutamic acid	5.8	5.6
Proline	2.5	6.9
Glycine	11.3	15.0
Alanine	12.4	9.1
Half Cysteine	2.8	(-)
Valine	6.8	1.8
Methionine	1.6	1.1
Isoleucine	4.9	1.7
Leucine	11.4	6.2
Tyrosine	5.2	2.3
Phenylalanine	8.0	4.4

Table 2 Amino acid compositions of proteolipid protein and Basic protein recoverd per 100 moles of total amino acid.
(No determinations were made of tryptophan or amide nitrogen.)

て溶解することはTenenbaum等[2]の方法により得られた蛋白がconformationの変化を来しているためと考えられ，その為に8M尿素溶液或いはdetergentを使用しなければ完全に溶解しないのであろう。この様な観点から我々はディスク電気泳動の際して蛋白試料を8M尿素溶液或いはdetergentにて溶解し，又泳動ゲルとしては8M尿素ゲルを用いた。その結果はFig. 1.の如くPLPは5%ゲルで2つの幅の広いbandを示したが，10%ゲルでは原点に留まったまゝ泳動されなかった。一方BPでは1つのmajor bandとそれよりも陽極側の3つの小さなbandと4つのfaster moving bandからなることを示している。このことからPLPはBP(分子量4000~30000)より大きな分子量を有する可能性が示唆され，又BPのPLPへの混入は否定出来ると結論される。尚PLP泳動中にpyronineY色素と一緒に走る小さなsharpなfaster moving bandは蛋白試料を用いなくても認められ，詳細は尚不明であるが，多分アクリルアミド中への不純物の混入が考えられる。これ迄BPのディスク電気泳動に関する報告は多いのでこゝでは割愛するが脳のPLPを分離，精製してディスク電気泳動を行なったという報告は少ない。Cotman, Mahler等[6]は白鼠脳より分離した髄鞘

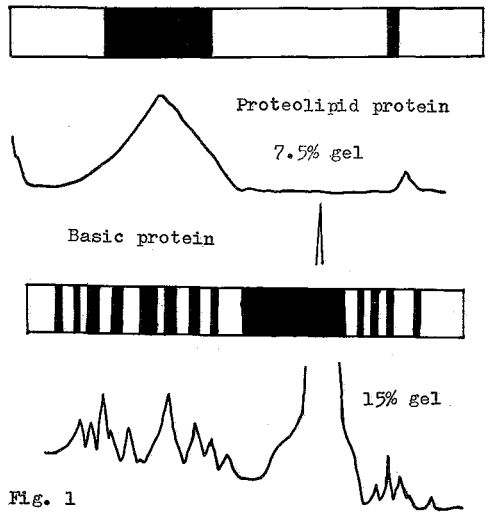


Fig. 1

をFolch等の方法[5]により CM溶液で抽出し，洗滌乾燥後再びCM溶液を加え脂質を除去しその残査を以ってPLPとした。そのPLPをTakayama等[7]の方法によりフェノール・酢酸・水(2:1:1,%)溶液で溶解した後5%尿素アクリルアミドゲルディスク電気泳動で2つのバンドを示したと報告している。最近Eichberg[8]はMokrasch[9]の方法により牛心臓から分離したPLPがフェノール・酢酸・水系のポリアクリルアミドゲル泳動法で2つのmajor slow moving bandと4ないし5つのminor faster moving bandに分離されることから，心臓PLPはheterogenousな蛋白であると報告している。以上これ迄の報告はいずれもPLPがheterogenousな性格をもつとのことであるが，我々はTenenbaum等[2]の方法により牛脳白質より分離，精製した水溶性PLPでは1つのdiffuseな幅の広いバンドしか認められなかった。これはTenenbaum等のPLPの精製法が酸沈析，凍結乾燥を用いるので蛋白のconformationの変化がより易い為，ディスク泳動法で分離困難を来したと解釈されるかも知れない。BP及びPLPの超遠心分析パターンについてみると方法の項で述べた様に8M尿素液中で行なったパターンはTable 2.の如くであった。即ちBPは56100 r.p.m.，1時間で尚沈降を示さないがPLPは非常にゆっくり沈降し非対称的な幅広い1つのピークを示す。又SDS液中ではBPは図の如くに，先ず対称的な1つのピークとして沈降する。又PLPはSDS中でも幅広いピークとしてBPより速かに沈降するが明らかに前後に2つの小ピークを有している。尚正確なSは計算していないがこれらの沈降速度からPLPのすピークはほゞ分子量20万内外，BPはほゞ4万内外と考えられる。BPの精製したものについてKibler等[10] Nahas等[11] Lowden等[12] Palmer等[13]の超遠心分析があるが，PLPについてはこの様な分析は行なわれていない。以上我々は髄鞘

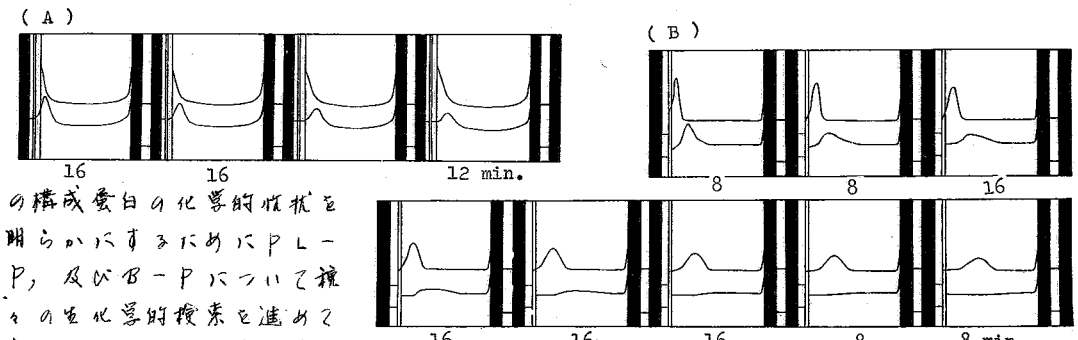


Fig. 2 Sedimentation pattern of Basic protein (upper) and proteolipid protein (lower).
1% solution of each protein was dissolved in pH 3.8 8M urea (A) and pH 3.8 SDS in 0.05M sodium acetate (B).

の構成蛋白の化学的性状を明らかにするためにプレープ，及びB－プについて種々の生化学的検索を進めて来たが，ディスク電気泳動ではプレープがノつの幅の広いdiffuse bandを示し，或る一定範囲の一連の分子量からなる極めてheterogenousな性格を有することが示唆され，又超遠心分析パターンではノつのmajor peakと2つの小さなpeakからなるheterogenityが示され，以上の二つの分析結果からプレープがheterogenousな蛋白であると考えられた。一方B－プの超遠心分析パターンでは極めて対称的なノつのpeakを示しhomogenousな蛋白だと考えられるが，ディスク電気泳動でノつのmajor compoundがほぼ全体の80%を占め，他の16%ほぼ2～4のminor bandからなっており heterogenityが示された。最近B－プの構造に関する研究は脱髄髄炎の発生因子と関連して詳細に研究され前記の如くKibler等[9]，Kies[11]，Nakao等[4]，Palmer等[12]により精製も試みられ，一部の蛋白分子(分子量4000)についてはその一次構造も解明されている[13]。しかし乍らプレープは分子量が約20万と比較的大きく，尿素或いはSDS等のdetergentを使用しなければ水に対しての溶解性が困難なこと，又pronase以外の酵素に対してresistanceを有するということから，アミノ酸構成以外の構造学的研究は余り進んでいないのが現状である。それゆえ我々はこれら蛋白の構造研究を企図し，それに対する手掛りとしてその精製を試みているが，本報告はその第一段階を示したものである。

1) Wolfgram, F. and Kotorii, K., J. Neurochem.,15, 1281 (1968).
2) Tenenbaum, D. and Folch-Pi, J., Biochim. Biophys. Acta, 115, 141 (1966).
3) Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanley, G. H., J. Biol. Chem., 226, 497 (1957).
4) Nakao, A., Davis, W. J. and Einstein, E. R., Biochim. Biophys. Acta, 130, 163(1966).
5) Takayama, K., MacLennan, D. H., Tzagoloff, A. and Stoner, C. D., Arch. Biochem. Biophys., 114, 223 (1964).
6) Cotman, C. W. and Mahler, H. R., Arch. Biochem. Biophys., 120, 384 (1967).
7) Eichberg, J., Fed. Proc., 28, 850 (1969).
8) Mokrasch, L. C.,Life Sci., 6, 1905 (1967).
9) Kibler, R. F. and Shapira, R., J. Biol. Chem., 243, 281 (1968).
10) Lowden, J. A., Moscarello, M. A., and Morecki, R., Can. J. Biochem., 44, 567 (1966).
11) Kies, M. W., Ann. N. Y. Acad. Sci., 122, 333 (1965).
12) Palmer, F. B. and Dawson, R. M. C., Biochem. J., 111, 629 (1969).
13) Kibler, R. F., Shapira, R., McKneally, S., Jenkins, J., Selden, P. and Chou, F., Science, 164, 577(1969).

2. 豚脊髄および末梢神経の塩基性蛋白の精製とその性質について

植村慶一・戸張千年・平野修助
（東邦大・医・Ⅱ生理）

中枢神経組織の塩基性蛋白を動物に注射することにより実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE)を惹起させうることおよびその塩基性蛋白がミエリンに存在することがKiesらによって最初に明らかにされた。[1)2)] その後多くの研究者によってそのEAE蛋白について広範な研究がなされつゝある。また末梢神経組織による免疫で末梢神経に限局したアレルギー性神経炎(EAN)が起こることがWaksmanらによって認められている。[3)] しかしEANに対する抗原性物質についてはまだ不明の点が多い。そこでわれわれは豚脊髄と末梢神経より塩基性蛋白を抽出分離し精製してその性質を特にEAEとEANとの関係を含めて検討しているので報告したい。

実験方法

①塩基性蛋白の精製；屠殺場より新鮮な豚脊髄および馬尾神経部を得て、低温下で脊髄と末梢神経に分離した。脊髄と末梢神経は別々にそれぞれ10倍量の冷アセトン中でWaring blenderでホモゲナイズした後ロ紙で濾過しその残渣について更に2回同様な操作をくり返してアセトン粉末とした。アセトン粉末にそれぞれ原湿重量に対し10倍量の0.03N HClを加え、pH 2.0にHClで合はせ4°Cで約10時間攪拌後遠心(10,000g 20 min)，上清を得た。Carboxy Methyl (CM) Cellulose (Serva製)は活性化した後、0.05M酢酸ナトリウム緩衝液(pH 4.6)で平衡化した。カラムは0.9×25 cmを用い、溶出は0.05M酢酸ナトリウム緩衝液を含む0～1.0M NaCl濃度勾配によった。溶出後各試験管の食塩濃度はアッベ屈折計によって確かめた。Sephadex G-75カラム(1.5×85 cm又は2.5×95 cm)は0.05M酢酸ナトリウム緩衝液(pH 4.6)で平衡にし、同じ緩衝液で溶出した。Void Volumeの測定にはDextran Blueを用いた。

②Disc電気泳動法；原理的にはReisfeld ら[4)]による方法を用いた。即ち濃縮ゲルは2.5% Acrylamide，酢酸カリ緩衝液(pH 6.8)，分離ゲルは15% Acrylamide，酢酸カリ緩衝液(pH 4.3)，上下槽にはβ-alanine酢酸緩衝液(pH 4.3)を用いた。ゲルの重合にはRiboflavinによる光重合を用いず、TMEDと過硫酸アンモンによる熱重合(40°C)によった。[5)] 試料は1 Tubeあたり10～50 μg添加し、電気泳動はPyronineをMarkerにして5 mA/Tube、2時間程度行った。染色はComassie brilliant blueによった。

③アミノ酸分析；蛋白質1 mgを1 ml 6N HClと混和し、ガラス管内に封入し、110°C 20時間分解した後、HClを乾燥させ、pH 2.2クエン酸緩衝液に溶解して、日立液体クロマトアミノ酸分析装置03型を用い球状樹脂9×500 mmカラムで酸中性アミノ酸を、6×100 mmカラムで塩基性アミノ酸の分析を行った。[6)] Tryptophanの定量はGoodwinらの紫外部吸収による方法[7)]により定量を行った。

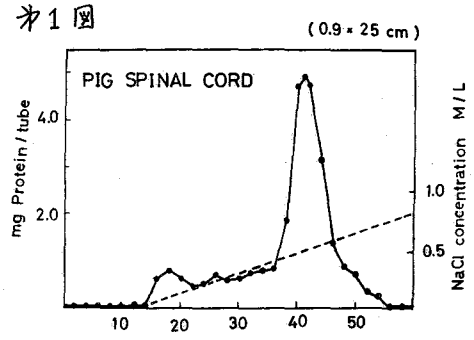
実験結果および考察

1)塩基性蛋白の精製；豚脊髄および末梢神経をそれぞれアセトン処理、HCl抽出、pH 7.0処理し得た上清を透析後、0.05M酢酸カリ緩衝液pH 4.6で平衡にしてCM Cellulose Columnに添加して次1・2図の如き溶出patternが得られた。

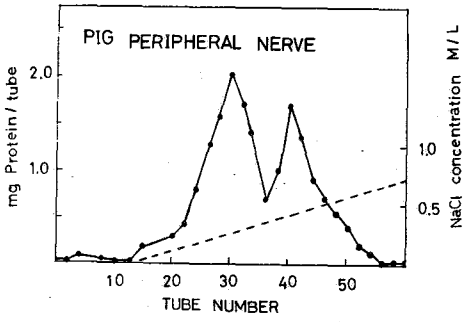
脊髄より抽出したものでは第1図の如くNaCl濃度0.42Mを中心とした主peak (SC CM P-1)が得られるのに対し、末梢神経を原試料としたものでは第2図の様にNaCl濃度0.27M中心のpeak (PN CM P-2)の2つが得られた。それぞれのpeakを透析濃縮後、Reisfeldらによる緩衝液系を用いたDisc電気泳動法にかけると第5図に示すようにSC CM P-1は卵白Lysozyme (Sigma)に対するRf 0.60を示す主bandがみられるのに対し、PN CM P-1はRf 1.07を示す主band, PN CM P-2はRf 0.60を示す主bandが認められるがいづれの場合にも2~5のminor bandの混在が認められた。またモルモット脳よりKiesらの方法[2]で得たミエリン分画を同様の方法でHCl抽出した上清について電気泳動を行うと第6図Myelinに示すようにRf 0.60に相当するbandが存在しminor bandは殆んど認められなかった。併し濃縮ゲル中に15% Acrylamide分離ゲル層に入らない蛋白の存在が認められた。Disc電気泳動の結果からSC CM P-1に認められる主bandはミエリンの塩基性蛋白に一致した。またPN CM P-1のRf 1.07を示すbandは脊髄にはほとんど存在せず末梢神経にのみ多量に特異的に存在する塩基性蛋白と考えられた。そこでこの2つの蛋白をそれぞれ分離精製してその性質を比較検討することを計画した。SC CM P-1とPN CM P-1のpeakをそれぞれ透析濃縮しSephadex G-75 (1.5×85cm Column)を用い0.05M酢酸カリ緩衝液(pH 4.6), 流速10-15ml/hrで溶出したpatternを第3・4図に示した。脊髄より得られたSC CM P-1を添加すると $Ve/V_0=1.5$ を中心とする主peak (SC Sp P-2)が得られた。(第3図) そのpeakを透析濃縮した後Disc電気泳動でcheckするとRf 0.60を示す主bandの他により陰極側に進む少量の混在bandが認められたが、ほぼ単一なものと考えられた。(第5図) 末梢神経のPN CM P-1をSephadex G-75 Columnに添加すると $Ve/V_0=2.2$ を示す主peak (PN Sp P-2)が得られ(第4図)、

ELUTION PATTERN OF BASIC PROTEIN ON CM CELLULOSE COLUMN

第1図

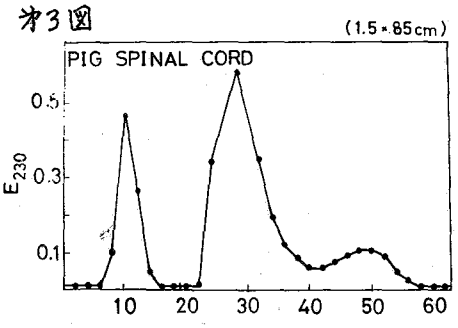


第2図

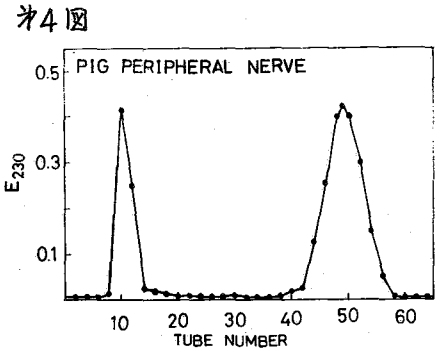


ELUTION PATTERN OF BASIC PROTEIN ON SEPHADEX G-75 COLUMN

第3図



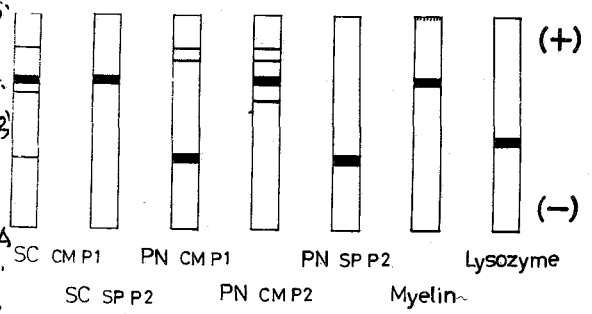
第4図



その電気泳動像はRf 1.07 を示す単一な band であった。(第5図). 第1表に上記方法によって豚脊髄および末梢神経より塩基性蛋白を精製した場合の各段階における蛋白量を示した。100gの湿重量の脊髄より約100mgの精製蛋白(SC sp p-2)が、同量の末梢神経から約50mgの精製蛋白(PN sp p-2)が得られた。

DISC ELECTROPHORESIS OF VARIOUS BASIC PROTEIN FRACTIONS ON 15% ACRYLAMIDE GEL AT pH 4.6 (System of Reisfeld et al.)

第5図



2)精製された塩基性蛋白の性質

a)超遠心分析; 超遠心分析は日立製UCA 1A型分析用超遠沈を用い 20.0±0.5°C で行った。蛋白濃度は3~8mg/ml, 溶媒は0.1M リン酸緩衝液 pH 6.8. 超遠心速度 55,730 r.p.m に設定. Schlieren 法で写真をとった。豚脊髄より精製された塩基性蛋白(SC sp p-2)は速やかに拡散する対称的な単一peakとして認められ S_{20w}=1.47 を示した。一方末梢神経よりのもの(PN sp p-2)も同様に対称的単一peakを示し S_{20w}=1.46 であった。このように超遠心分析で観察した限りではこの2つの蛋白分画は均一なものと考えられた。またPN sp p-2とSC sp p2とがほぼ等しい S_{20w} を示すことから, 前者が後者の Subunit や分解産物である可能性は否定的であった。 b)紫外部吸収; 精製された塩基性蛋白の紫外部吸収patternを島津QB-50型分光光度計, 光路10mm石英セルを用いて測定した。第6図に示す如く脊髄より得られたSC sp p-2では0.1Mリン酸緩衝液(pH6.8)中では275mμをpeakとするのに対し, 0.1N NaOH中ではpeakは更に高くなり290mμに移動した(第6図)。又末梢神経のPN sp p-2はpH6.8でpeakは280mμであり, 0.1N NaOH中ではpeakは寧ろ減少傾向で285mμに移動した。(第7図) これらの紫外部吸収pattern特にアルカリ溶液中におけるpatternの変化については脊髄のものと末梢神経のものとでかなり大きな差異が認められた。 c)アミノ酸組成分析; SC sp P-2 および PN sp P-2 蛋白のアミノ酸組成分析の結果を第2表に示した。脊髄の精製蛋白は酸性アミノ酸 12 moles%, 塩基性アミノ酸 25

第1表

PREPARATION OF BASIC PROTEIN FROM PIG SPINAL CORD AND PERIPHERAL NERVE

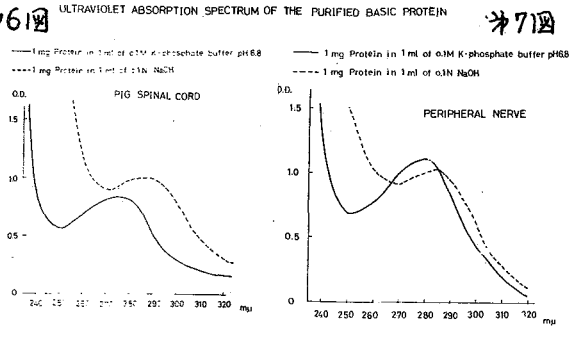
	SPINAL CORD 100 g wet weight	PERIPHERAL NERVE 100 g wet weight
HOMOGENATE	mg protein 11,300	mg protein 6,500
HCl EXTRACT	2,310	1,830
pH 7.0 SUP.	480	560
CM CELLULOSE COLUMN	a 144	b 105
SEPHADEX G75 COLUMN	c 97	d 47

a: SC CM P1, eluted at 0.43M NaCl
b: PN CM P1, eluted at 0.27M NaCl
c: SC SP P2 V_e / V_o = 1.5
d: PN SP P2 V_e / V_o = 2.2

第6図

ULTRAVIOLET ABSORPTION SPECTRUM OF THE PURIFIED BASIC PROTEIN

第7図



moles% で 酸性/塩基性 比は 0.48 となるのに対し末梢神経のものは 酸性アミノ酸 16.5 moles%, 塩基性アミノ酸 21.7 moles%, 酸性/塩基性比は 0.76 であった。また Val. Asp. Lys. Thr などは末梢よりのものに多く, Gly. His は脊髄のものに多いことが示され, この2つの蛋白はアミノ酸組成の上でもかなり異ったものであった。また既に報告されている EAE の抗原性をもつ蛋白の組成[8][9]と脊髄より精製されたものはアミノ酸組成の上では極めてよく類似しており同類の蛋白だと考えられた。

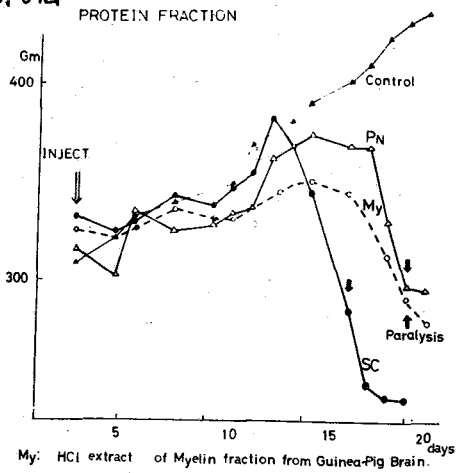
第2表 AMINO ACID ANALYSIS OF PURIFIED BASIC PROTEIN FROM PIG SPINAL CORD AND PERIPHERAL NERVE

moles %

Amino acid	SC	PN	Amino acid	SC	PN
Asp	6.08	9.26	Ileu	2.40	4.84
Thr	4.45	7.27	Leu	5.93	6.92
Ser	8.27	6.72	Tyr	2.64	2.20
Glu	5.98	7.28	Phe	3.75	3.46
Pro	7.10	5.07	Try	0.78	1.33
Gly	12.55	8.24	Lys	7.56	10.44
Ala	7.01	4.83	His	6.29	1.78
Val	2.51	7.38	Arg	11.14	9.48
Met	2.66	0.86	NH_3	11.08	10.26

d) EAE・EAN 抗原性の検定) 1定量 (30~200μg/ml) の試料蛋白に等量の Freund Complete Adjuvant (ヤトロン製) を混和した後, 0.2ml をモルモット背部皮下に注入その後経時的に体重変化を記録したのが次の図である。試料蛋白としては ①対照(蒸留水+Adjuvant) ②モルモット脳ミエリン分画より塩酸抽出した蛋白分画 (200μg) ③豚脊髄より精製された塩基性蛋白 (SC・Sp・p-2, 200μg) ④豚末梢神経より精製された塩基性蛋白 (PN・Sp・p-2, 200μg) を用いた。体重減少は注射後12~20日位ではじまり, 痙攣発現(後肢麻痺)は15~20日位に起り重症のものはその後数日で死亡した。脊髄より精製した蛋白 30μg でも同様な症状を起すことを認めており, いわゆる EAE を惹起する蛋白に相当すると考えられる。末梢神経より精製したもので 200μg 注射で後肢麻痺症状を起したが, この場合 EAN を起しているかどうかの検定には更に病理学的検査が必要であり, 現在検討中である。

第8図 CHANGES OF GUINEA-PIG BODY WEIGHT AFTER INJECTION OF VARIOUS BASIC PROTEIN FRACTION



My: HCl extract of Myelin fraction from Guinea-Pig Brain.
SC: Purified Basic Protein from Pig Spinal Cord.
PN: Purified Basic Protein from Pig Peripheral Nerve.

1) M.W.Kies, J.B.Murphy, E.C.Alvord; Fed.Proc., 19, 207 (1960)

2) M.Laatsch, M.W.Kies, S.Gordon, E.C.Alvord; J.Exptl.Med., 115, 777 (1962)

3) B.H.Waksman, R.D.Adams; J.Exp.Med., 102, 213 (1955)

4) R.A.Reisfeld, U.J.Lewis, D.E.Williams; Nature., 195, 281 (1962)

5) J.Uriel; Bull.Soc.Chim.Biol., 48, 969 (1967)

6) D.H.Spackman, W.H.Stein, S.Moore; Anal.Chem., 30, 1190 (1958)

7) T.W.Goodwin, R.A.Morton; Biochem.J., 40, 628 (1946)

8) A.Nakao, W.J.Davis, E.R.Einstein; Biochim.Biophy.Acta., 130, 163 (1966)

9) F.B.Palmar, R.M.C.Dawson; Biochem.J., 111, 629 (1969)

3. 初老期，老年期痴呆患者の脳水可溶化蛋白について

播口之朗・西村　健・市丸精一
金子仁郎　（阪大・医・精神）

老年痴呆患者では重篤な痴呆症状とともに高度の大脳萎縮，神経細胞脱落，神経原線維変化，顆粒空胞変性，老人斑などの特徴的な病理組織学的変化がみられる。また，初老期痴呆に属するアルツハイマー病は幾分異った病経過をとるが本質的に老年痴呆と同種の脳病変を示す。これらの病理学的変化は脳の「老人性変化」とよばれ，軽度のものは正常高年者の脳でも高頻度に見出される。このように老年痴呆やアルツハイマー病での脳病変は生理的にみられる脳の老人性変化が急激かつ高度に発現したような形態をとるところから脳老化の研究モデルの一つとして関心があつめられてきた。近年，電子顕微鏡による微細構造上の病変の解析とともに老人性脳病変に対応する生化学的変化を明かにしようとする努力がなされつゝある。われわれは，さきに老年痴呆やアルツハイマー病での大脳総蛋白量の著明な減少や蛋白構成アミノ酸の変動をみいだしたが，[1] 今回は初老期，老年期痴呆患者脳の水可溶化蛋白の変動について報告する。

材料および方法；1）人脳材料：痴呆症例は臨床的病理組織学的に診断の確定したアルツハイマー病3例と老年痴呆2例であり，いずれも死後4時間以内の剖検脳が用いられた。対照群は死後4～24時間を経過した脳損傷のない25例の正常人剖検脳であり生後3ケ月から80才までのものが含まれている。2）水可溶化蛋白の抽出：分離した脳組織に湿重量の9倍容の0.05 M tris-phosphate buffer（pH 7.2）を加え，テフロンホモジェナイザーで3分間ホモジェナイズする。ホモジェネートを冷却下 100.000×g で30分間超遠心機で遠心し，上清を水可溶化画分とした。3）アクリルアミドゲル電気泳動：原理的に Ornstein & Davis のディスク電気泳動法[2)3)]にしたがって，水可溶化タンパクの分析をおこなった。試料蛋白量は1～4mg で Lowry 法によって測定された。7.5%の分離ゲル（pH 8.9，1×10 cm）中を marker の brom phenol blue が 8.5 cm 泳動された時にゲルをとり出し，longitudinal slice として amido black B 10 で染色し，10% 酢酸で脱色したのち scanning densitometer で分離バンドの濃度を測定した。4）分離バンドの免疫学的同定：脳や他の組織の可溶化蛋白分離パターン上の serum albumin および prealbumin の位置決定には double diffusion technique を用いた。5）細胞画分：脳腫瘍の手術に際して得た組織学的に健常な新鮮脳組織が材料として用いられた。植村らの方法[4)]に従って分画し，各画分の水可溶化蛋白を抽出，7.5% アクリルアミドゲルを用いて電気泳動をおこなった。6）B-2，B-4蛋白の分離と精製：人脳組織を acetone powder 化し，その水可溶化蛋白を40～60%硫安（pH 7.5）で分画し，さらに DEAE-Sephadex（A-25）column chromatography をおこなうと，電気泳動図で albumin より陰極側に位置する蛋白を大部分除去しうる。これをさらに精製するために，3×10 cm の分離用ゲル（5% アクリルアミド）を用いて分離をおこなった。分離ゲルの longitudinal slice を染色して B-2，B-4の位置を測定し，残りのゲルから B-2，B-4 に相当する部分を分離した。この分離蛋白には，なお近接バンドの蛋白の混入が認められるので，ゲルのホモ

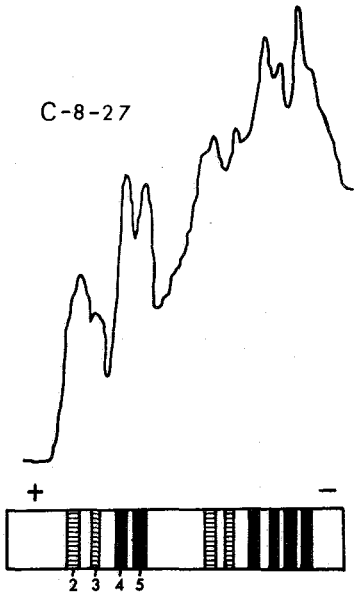


図２：27才♂，心臓死

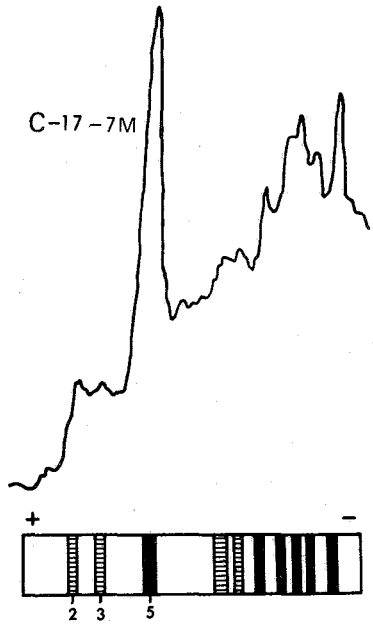


図３：7ヶ月♂，窒息死

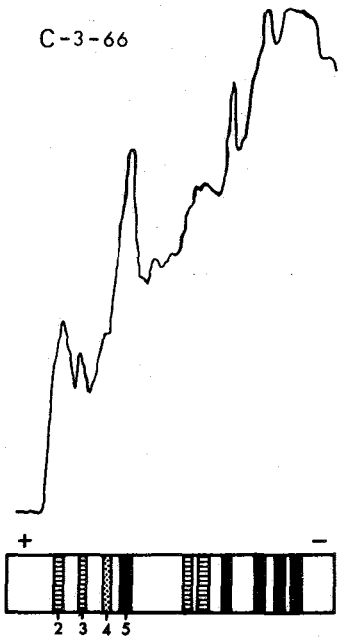


図４：66才♂，肺炎死

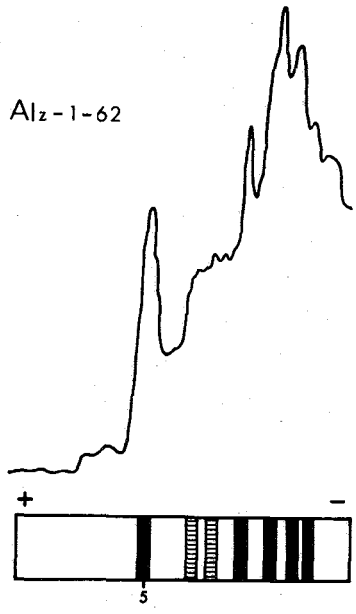
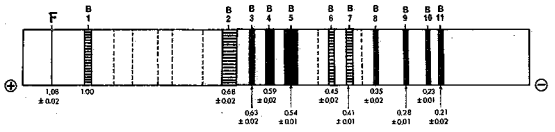


図５：62才♂，アルツハイマー病

ジェネートからの抽出蛋白をふたゝび電気泳動して，ディスク電気泳動(7.5%アクリルアミド)で単一のバンドとなるB-2，B-4を分離出来た。7) 蛋白のアミノ酸組成：6NHCl中で105°C，24時間加水分解し，アミノ酸自動分析装置で分析をおこなった。8) 分子量の測定は超遠心法(Yphantisの沈降平衡法)によっておこなった。

結果　1) 加令にともなう水可溶化蛋白の変動：図1は青壮年者脳の水可溶化蛋白の電気泳動パターンを示す。蛋白はamido blackで明瞭に染色される11本のmajor bandsと少くとも7本のminor bandsとに分離される。major bandsを陽極側からB-1 B-2，B-3，B-4と名づける。表1に示すように，B-4は発育，老化に関連して著明に増減する。B-4は生後7ケ月まではほとんど証明されず，4～5才で青壮年者の40～60%に増加し，16才頃に青壮年Levelに達する。また，55才頃から次第に減少傾向をみせはじめ，66才頃からは著明に減少し，80才では約30%にまで減少する。発育にともなってB-2も増加してゆくが生後3ケ月ですでに存在しており，B-2程著明な変動を示さない。図2，図3，図4に各年令層の代表的な泳動パターンを示した。

図1：人脳水可溶化蛋白の7.5%アクリルアミドゲル電気泳動パターン



2) 痴呆脳の水可溶化蛋白の変動：アルツハイマー病の脳水可溶化蛋白では図5の如くB-2，B-4が完全に消失しているか，或は同年令の対照群と比較して著減しているのが特徴的である。老年痴呆でもアルツハイマー病と全く同様にB-2，B-4の著明な減少～消失が認められる。また，各脳葉のB-2，B-4は対照群で同程度に存在するが，これらの疾患では一様に著減～消失している。

表1：B-2,3,4の総蛋白量*に対する割合(%)の年令変化

Case No	Age	B-2	B-3	B-4
C-17	7M	2.0	2.0	trace
C-10	4Y	3.5	3.0	2.4
C-16	16Y	7.4	2.8	5.3
C-19	20Y	7.1	2.4	6.1
C- 8	27Y	4.7	2.9	5.8
C- 7	39Y	5.7	3.5	5.4
C-24	53Y	5.3	2.0	4.5
C- 3	66Y	5.1	2.0	1.5
C-11	68Y	5.4	2.9	3.4
C-15	80Y	3.0	1.5	1.7

*組織より抽出された水可溶化蛋白のうち7.5%アクリルアミド電気泳動で陽極側へ泳動された総量

3) B-2，B-4の局在：表2は7.5%アクリアミドゲル電気泳動を同条件下でおこなった際の各組織，器官でのB-2，B-4の有無を示している。B-5はdouble diffusionをおこなうと，serum albuminと反応する。各組織，器官に共通して存在するB-5を基準にして，B-5よりもacidicなprotein bandsの電気泳動ゲル上の位置とその蛋白量をみた。表2に示す如く，B-2，B-4はともに中枢神経系に特異的に高濃度に存在する。B-4に相当するバンドは中枢神経系以外では認められず，B-2に相当すると考えられるバンドが坐骨神経，骨格筋，心筋で痕跡的に認められるのみである。B-2，B-4は大脳に最も多く末梢にゆくにしたがって減少する傾向があ

表2：B-2, 3, 4, 5 の各種臓器，組織中での存在

	B-2	B-3	B-4	B-5
Cerebral Cortex	++	++	++	++
Spinal Cord	+	+	+	++
N. ischiadicus	trace ?	+	-	++
Skeletal Muscle	trace ?	+	-	++
Heart Muscle	trace ?	+	-	++
Liver	-	+	-	++
Spleen	-	+	-	++
Pancreas	-	+	-	++
Kidney	-	±	-	++
Serum	-	-	-	++
Cerebrospinal Fluid	-	-	-	++

表3：B-2, B-4の細胞内成分中での存在
総蛋白量に対する百分率

Fraction	B-2	B-3	B-4
Nuclear Fr.	—	—	—
Mitochondrial Fr.	5.5	2.4	4.8
Microsomal Fr.	6.2	2.2	5.3
Supernatant Fr.	3.8	1.1	2.1

表4：B-2, B-4のアミノ酸組成
(μ moles/mg protein)

Amino Acid	B-2	B-4
Asp	0.535	0.510
Thr	0.214	0.185
Ser	0.577	0.256
Glu	0.785	0.839
Pro	0.119	0.117
Gly	0.281	0.253
Ala	0.436	0.483
Cys	0.014	0.040
Val	0.185	0.285
Met	0.073	0.073
Isoleu	0.173	0.131
Leu	0.362	0.485
Tyr	0.056	0.103
Phe	0.096	0.198
Lys	0.387	0.468
His	0.057	0.129
Arg	0.167	0.188

る。次に，ependymomaの手術に際して得た健常な脳組織を用いて，B-2, B-4の細胞内局在をみた。表3に示すように，B-2 B-4はともにnuclear fractionには存在せず，mitochondrial & microsomal fractionに高濃度に存在する。また，ependymoma組織では健常脳組織に比し，B-2, B-4の濃度は著明に低い。

4) 単離されたB-2, B-4のアミノ酸組成は表5の通りである。予備実験でえられた分子量はB-2 約44,000，B-4 約52,000である。

考察：老年痴呆及びアルツハイマー病で認められたB-2, B-4の著明な減少が，これらの疾患に特異的な所見であるか否か，或は，これらの減少が痴呆の成立に如何なる意義を有するか否か，老人性変化の中どの病変に対応するのかなどについては今後の検討が必要である。しかし，B-2, B-4が特に脳で高濃度に存在すること，加令と共に著明な増減を示すことなどは，これらの蛋白と脳機能の密接な関連を示唆するものであり，それらの著しい減少は痴呆の発現に何らかの関与をなすであろうと推測される。B-2, B-4が神経細胞，グリア細胞のいづれに由来するかは興味深いが，神経細胞の脱落，変性を主病変とする老年痴呆，アルツハイマー病で著明に減少すること，グリオーム組織では低濃度であることなどは神経細胞により高濃度に存在することを示唆する。B-2, B-4はMooreら[5]，Hydénら[6]，植村ら[7]によって脳特異性蛋白として報告されたS-100蛋白とは，電気泳動での態度，分子量，アミノ酸組成などの点で異るが，植村ら[7]がアクリルアミドゲル寒天電気泳動で示したB4, B5やBennetら[8]のAntigen αなどとは電気泳動上近い位置にあり異同の検討が必要である。なお，人体材料への死後時間の影響は，手術時新鮮材料や動物での検討にもとずいて，この研究時の条件では無視しうると判断した。

文献：1) 播口之朗，西村健，中丸精一，金子仁郎：日老医誌，5，145，1968 2) Davis, B.J.: Ann. New York Acad. Sci., 121, 404, 1964 3) Ornstein, L., Ann. New York Acad. Sci., 121, 321, 1964 4) 植村慶一，塚田裕三，飯田慈子；神至進歩，7，763，1963 5) Moore, B.W & McGregor, D.: J. Biol. Chem, 240, 1647, 1965 6) Hydén, H & McEwen, B.S.: Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash) 55, 354, 1966 7) 植村慶一，Mandel, P.; 神至化学，7 Suppl., 25, 1968 8) Bennet, G.S. & Edelman, G.M.: J. Biol. Chem., 243, 6234, 1968

4. ヒト脳のモノアミン酸化酵素の精製と精製酵素の性質について

永津俊治（愛知学院大・歯・生化）

脳のモノアミン酸化酵素（ＭＡＯ）は，ノルアドレナリン，ドーパミン，セロトニンなどの脳内生理活性アミンを分解するので，脳機能に重要な役割を果していると考えられる。われわれはさきにウシ脳のミトコンドリア分画よりモノアミン酸化酵素を可溶化（10,4），精製（5,6）し，ＦＡＤが補酵素であることを報告した（6）。Tipton（13,14）もブタ脳ミトコンドリアよりＭＡＯを精製し，ＦＡＤを補酵素と同定した。しかしヒト脳のＭＡＯ精製と性状については未だ報告をみない。われわれは，さきに原田ら（5,6）により報告された精製方法を用いて，ヒト脳ミトコンドリアよりMAOを可溶化精製し，ＦＡＤを補酵素として分離同定したので報告する。

1．実験材料，実験方法

ヒト脳は解剖時にとられた後頭葉を用いた。ミトコンドリア分画は0.25M sucroseホモジェネートよりBrody, Bainの方法(1)で分離した。ＭＡＯ活性は，kynuramineを基質として，その消失速度を360 muの吸光度の減少により求める方法(15)，生成した4-hydroxyquinolineをケイ光測定する方法(8)によった。反応系はkynuramine 0.25 μmole，リン酸緩衝液75 μmoles，総量1.5 mlで37°，30分間incubation後，硫酸亜鉛で除タンパクし，上清についてkynuramineあるいは，4-hydroxyquinolineを定量した。基質特異性の測定には，各種基質3 μmoles/1.5 mlを用い，37°で60分間incubation後，タングステン酸Na-H_2SO_4で除タンパクし，上清のNH_3量を定量した（10,11）。分子量測定はゲル沪過法（16）によった。フラビンはハ木の方法（17）で抽出し，薄層クロマトグラフィーで同定した。タンパク量はLowryらの方法（9）で測定した。ディスク電気泳動はDavisの原法によった（2）。

2．実験結果

ヒト脳ミトコンドリアよりのＭＡＯの精製法

ヒト脳（後頭葉）80 gの0.25 M sucrose homogenateより遠沈分離したミトコンドリア分画を，400 mlの0.01 Mリン酸緩衝液（pH 7.4）にsuspensionとし，40°，10分間加熱後，非イオン性界面活性剤Nonion NS-210（日本油脂より恵与された）を終濃度1％に添加，1夜0°に放置，107,000×gで1時間遠沈し，上清を分離した（可溶化）。上清にpH 7の飽和硫安溶液を30％飽和に添加し，遠沈して沈澱を直ちに80mlの0.01 Mリン酸緩衝液（pH 7.4）に溶解，同じ緩衝液に対して完全に透析した（硫安分画）。ついで0.01 Mリン酸緩衝液（pH 7.4）で平衡化したDEAEセルロースカラム（2.5×40 cm）に通し，0.01 M，0.1M緩衝液各300 mlで洗い，0.4％ Nonionを含む0.1 Mバッファーで溶出した（DEAE分画）。活性分画をultrafiltrationで濃縮し，0.01 Mリン酸緩衝液（pH 7.4）で平衡化したSepharose 4Bカラム（2×42 cm）（最近の実験ではSepharose

---

本研究は，原田実，山本登美子両氏との協同による。また西川裕子，芝原由美子両氏の援助に感謝します。ヒト脳材料入手にお骨折り下さった愛知県ガンセンターの長与健夫部長，蛇毒を御恵与下さった国立予防衛生研究所の村田良介部長に感謝します。

6Bを使用）にのせ，同じ緩衝液で溶出した。最初に溶出されるタンパクのピークとMAO活性は一致した。以上の精製過程を表1に示す。比活性の増加が低いのは，可溶化した後の各精製段階，ことに硫安分画の段階での失活が高度であるためと考えられる。

表 1

ヒト脳のモノアミン酸化酵素の精製（ひとヒト脳）

精製操作	容量 (ml)	タンパク量 (mg)	総活性 (mμmoles/min)	比活性 (mμmoles/min/mg protein)	回収率 (%)
ホモジェネート	800	7,520	8,200	1.1	100
ミトコンドリア	400	3,840	7,700	2.1	93
107,000×g上清	380	1,750	4,900	2.8	59
30%硫安分画	90	761	2,300	3.0	28
DEAE-Cellulose	23	161	1,640	10.2	20
Sepharose 4B	46	89	1,430	16.1	17

ヒト脳より精製されたMAOの性状

精製酵素はディスク電気泳動法では1本のタンパクの主要なバンドを示したが，タンパクのかなりの部分は泳動されずに試料ゲル内に止ったので純度は明らかでない。Sepharose 4Bではone peakで，ゲル沪過法による推定分子量は約60万であった。この分子量の大きさからみて重合体であると推定される。0°ではかなり安定であるが凍結再融解すると急速に失活した。

精製酵素は淡黄色で，吸収スペクトルは410 mμにピークを示した。ケイ光スペクトルは450 mμ励起波長で520 mμに肩を示し，また530 mμのケイ光に対して395 mμ，450 mμに励起極大を示した。このケイ光スペクトルはフラビンの存在を推定させる。520 mμのケイ光スペクトルの肩は塩酸グアニジンの添加により低下を示した。pH 9で硫酸亜鉛と加熱除タンパクすると，上清に，450 mμの励起波長で520 mμにケイ光のピークをもつ物質が遊離された（図1）。この上清のケイ光スペクトルはFADのスペクトルと全く一致した。この上清よりハホ法(17)でフラビンの抽出を行い，薄層クロマトグラフィーにかけると，FADと全くRfの一致する黄色のケイ光スポットが紫外線下に検出された（図2）。以上の成績より，ヒト脳のMAOは補酵素としてFADをもつこと，タンパク質から比較的容易に解離しうることが考えられる。

精製酵素がlipidと結合している可能性が考えられるのでSnake venom phosphoipaseで処理したが，酵素活性は変化しなかった。

補酵素としてのCuの関与は未だはっきりしないが，後述のように精製酵素はCuのキレート剤で阻害されない。（cont'd）

図1. ヒト脳精製MAOを熱変性した上清のケイ光スペクトル（励起波長450 mμ）

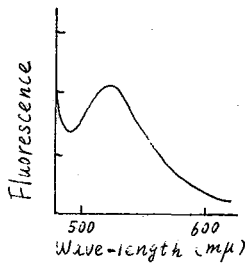
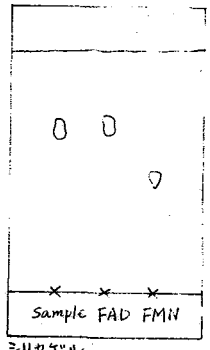


図2. ヒト脳精製MAOに含まれるフラビンの薄層クロマトグラフ



シリカゲル
溶媒：酢酸/ピリジン/ハ (1/10/40, v/v/v)

補酵素としての関与は疑わしい。

kynuramineを基質とした至適pHはリン酸緩衝液で7.4, Tris-HCl緩衝液で9.0であった。Km値は図3に示すように 5×10^{-5} Mであった。高濃度の基質kynuramineにより基質阻害が認められた。

精製MAOの基質特異性は，表2に示すように，kynuramineの他にbenzylamine, tyramine, dopamine, noradrenaline, adrenaline, serotonin, tryptamineなどのモノアミンが酸化された。

精製MAOに対する各種阻害剤の影響を表3に示す。精製酵素はJB-516, MO911のような従来よく知られているMAO阻害剤で強く阻害された。PCMB, N-Ethylmaleimideのようなsh阻害剤で阻害された。しかしCuのキレート剤であるDiethyldithiocarbamate, Cuprizoneなどによる阻害は 1×10^{-3} M近くの濃度でも著明ではなかった。

表2. ヒト脳精製MAOの基質特異性

基質 (2×10^{-3}M)	活性 (NH_3 formed, mμmoles/min)
Benzylamine	3.2
Tyramine	3.8
kynuramine	4.9
Dopamine	2.4
Noradrenaline	1.0
Adrenaline	0.3
Tryptamine	2.0
Serotonin	2.4

図3. ヒト脳精製MAO kynuramineに対するKm

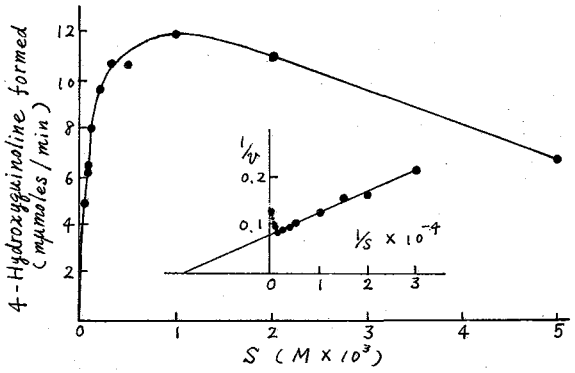


表3. ヒト脳精製MAOの阻害剤

阻害剤	濃度(M)	活性(%)
(-) (対照)	—	100
p-Chloromercuribenzoate	7×10^{-4}	4
N-Ethylmaleimide	7×10^{-4}	55
Diethyldithiocarbamate	7×10^{-4}	82
Bicyclohexanone oxalyldihydrazone (Cuprizone)	7×10^{-4}	74
1-Phenyl-2-propylhydrazine (JB-516)	7×10^{-6}	39
N-Benzyl-N-ethyl-2-propylamine (MO-911)	5×10^{-6}	19

4. 考察

ヒト脳より精製されたMAOは淡黄色で，吸収スペクトルは410 mμにピークを示した。吸収スペクトル，ディスク電気泳動，カラムクロマトグラフィーの挙動などからみて，精製MAOの純度はかなり高いと推定されるのに，比活性の増加が低いのは，可溶化のさいおよび可溶化後に失活がひどく，ことに硫安分画の段階で速やかに失活することが一つの原因と考えられる。native enzymeのケイ光スペクトルは520 mμに肩を示し，熱変性によって520 mμにケイ光ピークをもつフラビンのケイ光スペクトルと全く一致する物質が遊離された。この物質はフラビンの抽出分離法で分離され，薄層クロマトグラフィーでRfがFADと全く一致する黄色ケイ光スポットを示した。native enzymeの示すケイ光スペクトルの520 mμ

の肩は基質の添加で低下した。以上の成績はヒト脳MAOはFADを補酵素とするフラビン酵素であることを推定させる。またこの成績はTiptonが，freezing-thawingとsonicationをくり返すことにより可溶化し精製したブタ脳MAOがFADを補酵素とするという報告(3,4)と一致する。しかし，他方Yasunobuらのグループ(2,7)により精製されたウシ肝臓のミトコンドリアMAOは，Cuとフラビンをもつが，フラビンは固くタンパクと結合して遊離しえない未同定フラビンであると報告されている。またErwin, Hellerman(3)も，ウシ腎臓ミトコンドリアのMAOはタンパクと固く結合しているフラビンをもつが，Cuの補酵素としての役割は疑わしいと報告している。ヒト脳ミトコンドリアMAOのFADの補酵素としての意義はさらに今後追求したい。また脳MAOのCuの補酵素としての関与は未だはっきりしないが，Cuのキレート剤で精製酵素が阻害されないのでCuの関与は疑わしい。この点もさらに検討を要する。精製MAOはPCMBなどのSH阻害剤で強く阻害されるので活性SH基の存在が考えられる。ヒト脳精製MAOはJB-516，MO-911のような代表的なMAOの阻害剤で強く阻害された。

基質特異性では，Serotonin, Dopamine, Noradrenaline, Adrenalineの生理活性アミンを基質として脱アミンした。現在までの成績では各基質に特有なMAOを発見することはできず，一応単一のMAOが各種の生理活性アミンを分解すると考えられる。

5. 文献

1. Brody, T. M. and Bain, J. A., J. Biol. Chem., 195, 685 (1952).
2. Davis, B. J., Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 404 (1964).
3. Erwin, V. G., Hellerman, L., J. Biol. Chem., 242, 4230 (1967).
4. Harada, M. and Nagatsu, T., J. Jap. Biochem. Soc., 39, 747 (1967).
5. Harada, M. and Nagatsu, T., J. Jap. Biochem. Soc., 40, 647 (1968).
6. Harada, M. and Nagatsu, T., Experientia, 25, 583 (1969).
7. Iagaue, I., Gomes, B. and Yasunobu, K. T., Biochem. Biophys. Res. Commun., 29, 562 (1967).
8. Krajl, M., Biochem. Pharmacol., 14, 1684 (1965).
9. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J., J. Biol. Chem., 193, 265 (1951).
10. Nagatsu, T., J. Biochem., 59, 606 (1966).
11. Nagatsu, T. and Yagi, K., J. Biochem., 60, 219 (1966).
12. Nara, S., Gomes, B. and Yasunobu, K. T., Biochem. Biophys. Res. Commun., 23, 324 (1966).
13. Tipton, K. F., European J. Biochem., 4, 103 (1968).
14. Tipton, K. F., Biochim. Biophys. Acta, 159, 451 (1968).
15. Weissbach, H., Smith, T. E., Daly, J. W., Witkop, B. and Udenfriend, S., J. Biol. Chem., 235, 1160 (1960).
16. Whitaker, J. R., Anal. Chem., 35, 1950 (1963).
17. Yagi, K., Meth. Biochem. Analysis, 10, 319 (1962).

5. 脳の3′,5′−AMP分解酵素に関する研究(2)：ラット脳からの Cyclicphosphodiesteraseの部分精製とその性質について

垣内史朗・山崎礼子・中島　久
（大阪府立中宮病院）

一般に脳はその3′,5′-AMP濃度が種々の"刺戟"に対して特に著しく変動する臭で[7]，またそのadenyl cyclase（合成系）活性の高い臭で[10]他の組織からきわだっているが，更にまた3′,5′-AMPの分解についても，その最初のstep（3′,5′-AMP → 5′-AMP）に特異的な酵素であるcyclic phosphodiesteraseの活性が脳では特に高い[1]。今までに，家兎，ラット脳のcyclic phosphodiesteraseの一般的性質について[2,3,4]，或はその心筋からの部分精製[1,9]についていくつか報告がみられる。

昨年われわれは，この酵素に従来慣用的に用いられて来た定量法全般に基礎的な検討を加えて，併せてラット脳cyclic phosphodiesteraseの細胞内分画を行って，soluble nature及びparticle nature（partly latent）の両者の活性を区別して報告した[6]。今回は，そのsoluble natureの活性を部分精製して得た若干の知見を報告する。

《実験方法》

cyclic phosphodiesterase 活性の定量：われわれは脳酵素標品中に5′-nucleotidase，adenylate deaminaseの混在の多いことを認め，従って生成物（5′-AMP）を直接に定量する方法をさけて，次の2方法を用いた。①基質（3′,5′-AMP）の減少を測定するもので，Hirata,Hayaishi[5]の方法に準じて行った。②生成物（5′-AMP）にC. atrox（蛇毒5′-nucleotidase；シグマ）を作用させて遊離するPiを測定する（原報はButcher, Sutherland[7]）。この場合酵素標品中の混在酵素は問題にならない。しかしC. atroxがphosphodiesterase反応に"干渉"するのをさけるために，2 stepsに反応を行う必要がある。粗酵素標品に適用して，①②両定量法の結果が互いに良く一致することを確認した[6]。

Km値の測定には②法を用いてLineweaver−Burgのプロットによった。

標準assay systemとしては，反応液1 ml中にTris−HCl, pH 7.4, 40 μmole；$MgSO_4$, 4 μmole；3′,5′-AMP, 1.8 μmoleを含む。30°C, 30分間に1 μmoleの基質を分解する酵素活性を1unitと定めた。

ラット脳からの酵素精製過程を表1にまとめた。操作はすべて4°Cにて行ない，45000 sup以降の酵素標品はすべて$MgSO_4$ 2 mMを含んだTris-HCl buffer（10 mM；pH 7.4）に溶かして4°C（長期保存には−80°C）に保存した。

蛋白定量はLowryらの方法[8]によった。

表1. 酵素精製過程

ラット脳（除小脳）
↓ 3倍量，1mM Tris-HCl, pH 7.4, ホモジナイズ。
Crude Extract
↓ at 17500 RPM, 30′, on Marusan 6B.
17500 ppt ← pptを同上処理して上清を合する。
↓ 上清を45000 RPM, 90′, on Hitachi 55 TA.
45000 ppt ← overnight dialysis
45000 Sup
↓ pH 5.0～5.1 に acetic Acid
pptを pH back to 7.4 に NaOH
PH 5 ppt
↓ 中性$(NH_4)_2SO_4$分画，20%→50%
$(NH_4)_2SO_4$ 20-50
↓ Sepharose 6B Column Chromatography,
に10mM Tris-HCl, pH 7.4 + 2mM $MgSO_4$
Seph. 6B Eluate
fraction A.
fraction B.
fraction C.
} →（図2.を見よ）

表 2. cyclic phosphodiesterase の部分精製 (脳湿重量 12 g より出発)

Purification Stage	Protein (mg)	control [a] (units) (recovery %)	control + fr.C [b] (units) (recovery %)	[b]/[a]	Cleland 試薬 (10 mM) 添加時 control [c] (units) (recovery %)	control + fr.C [d] (units) (recovery %)	[d]/[c]
45000 Sup	266	390 (100)	440 (100)	1.1	640 (100)	705 (100)	1.1
pH 5 ppt	146	299 (77)	350 (80)	1.2	483 (76)	607 (86)	1.3
$(NH_4)_2SO_4$ 20-50	75	147 (38)	259 (59)	1.7	276 (43)	445 (63)	1.6
Seph. 6B Eluate fr. A	12	26 (6.7)	35 (7.9)	1.4	35 (5.5)	54 (7.7)	1.5
Seph. 6B Eluate fr. B	25	56 (14)	112 (26)	2.0	134 (21)	226 (32)	1.7

《 実験結果 》

酵素精製：この酵素は，図 1 に示した如く 4°C において比較的安定であり，特に $MgSO_4$ 添加のもとでは 1 ヶ月近くも活性の低下はみられない。このことは精製された状態 (fr. A & fr. B) でも認められた。それにもかゝわらず，表 1 に従って精製が進むにつれて活性 recovery (殊にその各 stage での和) が著しく減少するのが認められた (表 2 [a] 欄参照)。即ち未知の〝活性化因子〟が精製に伴って脱落する可能性が考えられた。

45000 SUP を直接に gel filtration column chromatography にかけてそのような因子について分析した結果，Sepharose 6B を用いた場合の fraction C にそれを cyclic phosphodiesterase から分離し得た (図 2)。

別に Cleland 試薬 (assay 段階での添加) が酵素活性を高めることを見い出した (図 3)。しかし Cleland 試薬の添加効果がすでに maximum に達してからも fr. C の添加効果は認められ，それが略定量的にも成り立っている (図 4 ; 及び表 2 の [b]/[a] と [d]/[c] の値の比較)。

Cyclic phosphodiesterase について，fr. C 添加時活性／fr. C 無添加時活性の比率 (表 2 の [b]/[a]) に注目して行った一連の精製結果を表 2 に示す。

精製の最終段階，Seph. 6B Eluate において major な酵素活性 (fr. B) に先立って小さな活性の山 (fr. A) が分離された (図 2)。

fr. C (activator) の性質：

(1) 非透析性である。尚 Crude Extract の透析外液には特にこのような添加効

図 1. 酵素の安定性 (45000 Sup)

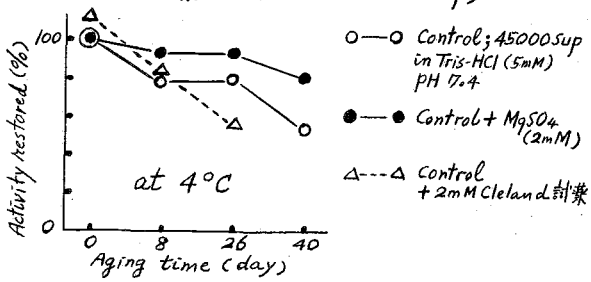
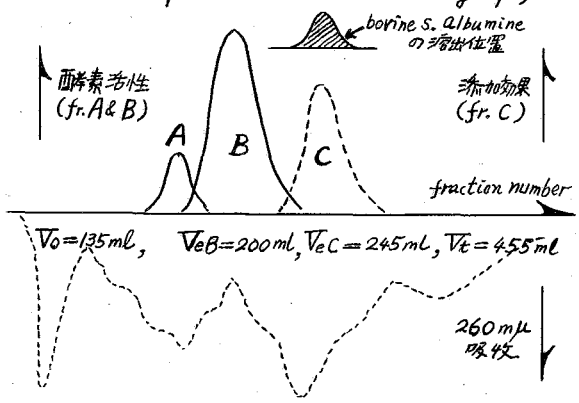


図 2. Sepharose 6B Column Chromatography



果はみられなかった。

(2) Seph. 6B column chromatography にて略 bovine S. albumine ($MW=67\times10^3$) の位置に溶出された。bovine S. albumine 自体にはこの様な添加効果は認められなかった。

(3) 耐熱性と考えられる。即ち少なくとも 100°C 5', 80°C 10' の処理にたえ，熱処理の前後において共に可溶性であって，Seph. 6B column chromatography 上での溶出位置も変らなかった。この耐熱性を利用して以下 ((4)−(6)) の実験を行った。

(4) その細胞内分布をみるために，表1の ppt 及び sup の夫々について熱処理後にその activator を比較したところ，17500 ppt ≧ 45000 sup > 45000 ppt の順に分布がみられた。

(5) 組織をアセトン，及びクロロホルム−メタノール (2:1) で順次抽出した場合に activator 活性は非抽出残査区分に残った。

(6) トリプシン処理 (0.2〜0.4 mg/mg 蛋白当り，30°C 30' at pH 7.5) で殆ど失活した。

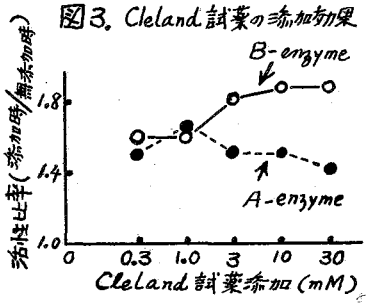


図3. Cleland 試薬の添加効果

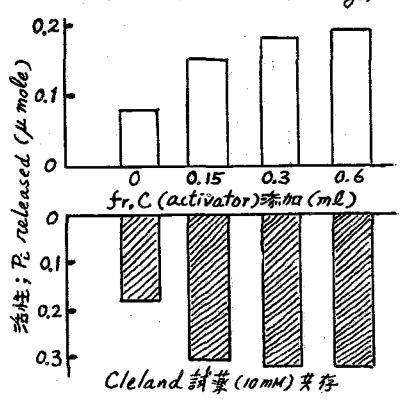


図4. fr. C の添加効果 (B-enz.)

fr. A (A-enzyme) と fr. B (B-enzyme) について：

表3に示す如く，B-enzyme の Km 値は標準 assay system にて $1\sim\times10^{-4}$ M であって，従来からの報告[2] ($1\sim3\times10^{-4}$ M) に一致する。しかし fr. C 添加 (Cleland 試薬 (+) or (−)) のもとでは 10^{-5} M のオーダーに減少した。これに反して，A-enzyme の Km 値は添加物の有無にかゝわらず $\sim3\times10^{-5}$ M であった。

B-enzyme は pH 8 に optimum を有し，これは添加物の有無によっても変らない。B-enzyme は assay stage にて添加された Cleland 試薬によって activate された (図3)。しかしながら，酵素の保存中 (4°C, −80°C) に Cleland 試薬を添加 (2〜5 mM) することはかえって失活を促進した (図1)。Cysteine, glutathione の添加効果は，それが定量法を妨害するために確認出来なかった。

B-enzyme, A-enzyme 共に Mg^{++} を必要とし，EDTA 添加にて完全に阻害された。$MgSO_4$ の至適添加濃度は $1\sim4\times10^{-3}$ M であり，従来からの報告と略一致する。

A-enzyme の pH optimum は 7.6〜8.0 にひろがり，B-enzyme と少し異なるようである。しかしながら，現段階では A-enzyme 中への B-enzyme の混入が幾分認められるため，今後更に精製を進めた上で，A-enzyme の諸性質を再検討してゆきたい。

〔 考察 〕

従来，脳 cyclic phosphodiesterase は ATP によって調節されており，"生理的濃度" の ATP のもとでは殆んど阻害された状態にあるといわれた。[2] われわれが基質の減少を測定する方法 (定量法①：実験方法の項) でそれを追試した結果では，表4 [a] 欄に示すごとく，その阻害の度はそれ程強いものではない。彼等は Δ 5'-AMP を測定したのであり，われわれもその方法で測定したところ表4, [b] 欄の値を得た。

表3. A-enzymeとB-enzymeの性質

測定條件		A.-enz. (M)	B-enz. (M)
Km for 3,5-AMP	control (標準assay system)	~3×10^{-5}	1~$\times10^{-4}$
	control + fr. C	——	5~$\times10^{-5}$
	control + fr. C + Cleland 試薬 (10mM)	~3×10^{-5}	~5×10^{-5}
	control + Cleland 試薬 (10mM)	~3×10^{-5}	5~$\times10^{-5}$
pH optimum (Tris-HCl) (Tris-maleate)		7.6~8	8.0

表4. ATPによる酵素の阻害

Enz. Prep.	定量法 / ATP濃度 (mM)	Δ3'5'AMP 法 [a] (%阻害)	Δ5'-AMP 法 [b] (%阻害)	Δ5'-AMP 法 [c]*) (%阻害)
$10^5\times g$ ppt	2	5	—	—
$10^5\times g$ sup	2	14	53	—
30000$\times g$ sup	2	—	—	73
$10^5\times g$ ppt	6	16	—	—
$10^5\times g$ sup	6	34	80	—
30000$\times g$ sup	5	—	—	90

*) [c]欄の値はCheung[2]のデータから計算して求めた。

このくいちがいは，脳酵素標品中に混在するadenylate deaminaseがATPによって活性化されたために，cyclic phosphodiesteraseの生成物である5'-AMPが更に分解されたためであり（5'-IMPをTLC法にて証明），従って Δ5'-AMP 法ではATP添加量に従ってみかけ上低い定量値（従って高い阻害率；表4の[b]，[c]欄）が得られたことによるものである。

Cyclic phosphodiesteraseに対する特異的なコントロール機構が存在するや否やはこれからも検討を加えてゆきたいが，それとは別に，一般に水解酵素反応が基質濃度とKmの関係においてその速度が調節されていると思われる場合が多い。家兎，ラット，モルモットの脳組織の3',5'-AMP濃度はresting stateで略 1×10^{-6} mole/kg であり，それがカテコラミンやヒスタミンの添加時には ~3×10^{-5} μmole/kg（家兎，in vitro）に，また断頭直後には ~ 1×10^{-5} μmole/kg（家兎大脳皮質）にまで上昇することが知られている。[7] これらの数値からみて，表3に示したKm値のオーダーの差異，10^{-4}M と 10^{-5}M，の意義するところは大きいと考えられる。

A-enzymeはSepharose 6Bからの溶出順位から見る限り，B-enzymeよりも分子量が大であると推定される。今後更に精製を加えて両者の関係を検討してゆきたい。

fr. Cについても，その酵素精製に伴う脱落，及び添加による再構成の実験（表2）を通じてその生理的意義を肯定せざるを得ないがその解明は今後にまつものである。

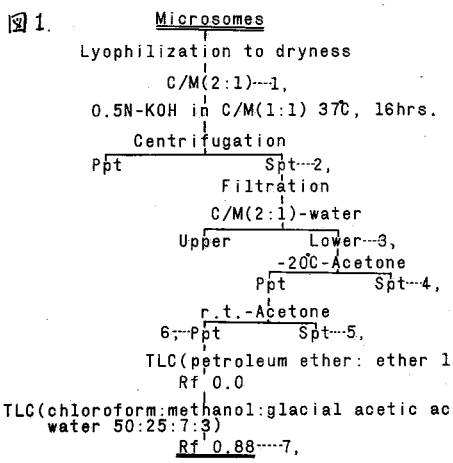
文献
(1) Butcher, R.W., & Sutherland, E.W., J. Biol. Chem., 237, 1244 (1962)
(2) Cheung, W.Y., BBRC, 23, 214 (1966); Biochemistry, 6, 1079 (1967)
(3) De Robertis, E., De Lores Arnaiz, G.R., Alberici, M., Butcher, R.W., & Sutherland, E.W., J. Biol. Chem., 242, 3487 (1967)
(4) Drummond, G.I., & Perrott-Yee, S., J. Biol. Chem., 236, 1126 (1961)
(5) Hirata, M., & Hayaishi, O., BBRC, 21, 361 (1965); Biochim. Biophys. Acta, 149, 1 (1967)
(6) 垣内史朗，山崎礼子，中島久，神経化学 7, suppl. (1968)
(7) Kakiuchi, S., & Rall, T.W., Mol. Pharmacol., 4, 367 (1968); ibid. 4, 379 (1968)
Kakiuchi, S., Rall, T.W., & McIlwain, H., J. Neurochem., 16, 485 (1969)
(8) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J., J. Biol. Chem., 193, 265 (1951)
(9) Nair, K.G., Biochemistry, 5, 150 (1966)
(10) Sutherland, E.W., Rall, T.W., & Menon T., J. Biol. Chem., 237, 1220 (1962)

6. 白鼠脳特異抗原の精製

野口鉄也・塚田裕三
（慶大・医・生理）

すでに白鼠脳ミクロゾーム分画に種族特異性肝器特異性を示す抗原成分の存在することを報告し，その抗体が白鼠脳ミクロゾーム Na-K ATPase に対して抑制効果をもち，又抗原成分がクロロホルム(C)/メタノール(M)(3:1)で90%以上回収されることを示した。[4,7] そこで今回はこの抗原成分の精製を行い，抗原の化学的組成を検索したのでここに報告する。

図1.



[方　法]

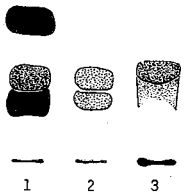
抗原の精製　図-1の方法で超遠沈分離法で得た白鼠脳ミクロゾーム分画を凍結乾燥し，C/M(2:1)で脂質部分1を抽出する。この脂質部分をフラッシュエバポレーターで乾燥し，0.5N KOHを含むC/M(1:1)を加えて37℃，16時間deacylateする。deacylate後，遠沈して上清2と沈渣に分け，上清を再び乾燥し，これに$\frac{1}{5}$容の水を含むC/M(2:1)を加え上層と下層3に分ける。この下層を乾燥し，予め-20℃に冷したアセトンを加えて撹拌し，-20℃下で遠沈し，可溶部分4と沈渣に分け，沈渣を更に室温のアセトンで洗ってアセトン不溶部分6を得る。この不溶部分を少量のC/M(1:1)に溶かし，silica gel TLC (E. Merck社製)に塗布展開溶媒，石油エーテル/エーテル(1:1)で展開し，完了後原点を削りとり，C/M(1:1)で抽出，再びそれを展開溶媒C/M/酢酸/水(50:25:7:3)で展開して，Rf 0.88 のスポットをとり，抗原精製標品とした。**TLC上のスポットの同定**　全脂質の確認には50%硫酸，リン脂質にはZinzadze試薬，糖脂質にはAnthrone試薬，Sialic acidの存在はDiphenylamine試薬[8]，アミノ基にはNinhydrine試薬の噴霧を用いた。**GLCによる脂肪酸及び糖の同定**　抗原精製標品を0.5Nメタノール-HClで78℃，24時間，metanolysisを行った。後，当量のヘキサンで脂肪酸を抽出分離し，メタノール層はN_2気流中で乾燥させ，Sweeley & Walker の Procedure C[5] に従ってN-アセチル化を行い，次いでTMS化してGLCを行った。カラムは Ucon LB 550X 5%/Shimalite W 60-80 mesh 長さ187.5cmのガラスカラムを用いカラム温度は190℃とした。定量には市販標準試料との面積比によった。GLCによる脂肪酸の分析にはヘキサン抽出物を用いた。カラムはDEGS 15%/Celite 60-80 mesh 長さ200cmのステンレスカラムを用いカラム温度200℃で行った。物質の同定には市販標準試料を用いた。**アミノ酸の同定と定量**　抗原精製標品に6N-HClを加えて封管し，110℃，12時間加水分解を行い乾固してHClをとばし，pH2に調整してアミノ酸自動分析器によって行った。**化学的定量**，Sphingosineの定量はLauter & Trams の方法[2]，中性糖の定量はAnthrone法，Hexosamineは Blix の方法[1]，Sialic acidはオルシン試薬[9]による方法によった。**抗原価の決定**　補体結合反応50%溶血法[4]によった。

〔結果 と 考察〕

抗原の精製の検討　凍結乾燥した脳ミクロゾーム分画から C/M(2:1)で抽出すると抗原価の90%以上は有機溶媒層に回収された。次いで抽出された脂質部分を0.5N KOHを含む C/M(1:1)で16時間 deacylate するとリン脂質はほぼ完全に除去されるが抗原価は減少することなく残存した。deacylateされた上清を乾燥し、これを C/M/水で分配すると一部の糖脂質は上層に移行するが抗原成分は下層に残っていた。次いで下層を再び乾固して、これに −20°C のアセトンを加えて、アセトン可溶部分と沈渣とに分けると抗原は沈渣に残り、更にアセトンの温度を室温に上げて洗っても抗原はアセトン可溶になることなく沈渣に残った。アセトン沈渣を C/M(1:1)に溶かし、展開溶媒、石油エーテル/エーテル(1:1)で silica gel TLC 上に展開すると、原点にとどまるスポットと、Rf 0.5付近のものと二つのスポットに分れるが(図-2)、抗原価は原点にのみあった。この原点部分から C/M(1:1)で脂質を抽出し、再び silica gel TLC で溶媒を C/M/酢酸/水(50:25:7:3)に変えて再展開すると七つのスポットに分けられ、夫々のスポットにつき補体結合反応を用いて抗原価を測定してみると図3に示すごとく Rf 0.88のスポットにのみ抗原価が存在していた。この Rf 0.88のスポットから C/M(1:1)で抗原成分を抽出し、溶媒を C/M/水(70:30:4)に変えて再クロマトしても Rf 0.67の唯一のスポットを示すことから、TLCを2回くりかえすことによって得られた抗原は単一の精製標品であると考えられた(図4)。この精製標品として得られる量は脳湿重量 1gあり 0.456mg であった。以上の精製過程を通じて抗原価の減少は極めて少なく、C/M(2:1)の抽出段階の抗原価に対して Rf 0.88の部分に回収された抗原価は78%であり、他方 D-Glucose を標準試料として Anthrone 法で各精製段階での糖の回収率を測定したところ、1の段階での糖含量を100とすると6では2.80、7の Rf 0.88スポットでは0.694で糖当りの抗原価の比活性の増加は112.4倍であった。

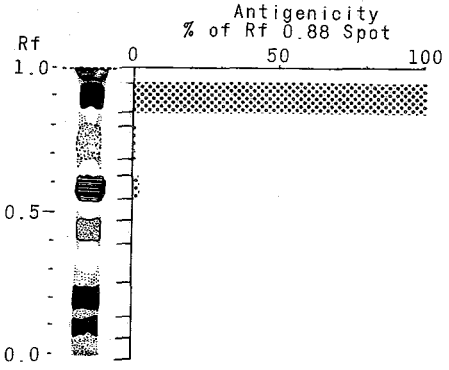
抗原の化学的組成　次いで TLC 上で精製標品の化学組成を検討してみた(図5)。前記の如く展開溶媒を変えても単一のスポットであり、Zinzadze試薬の噴霧では呈色せず、

図2.



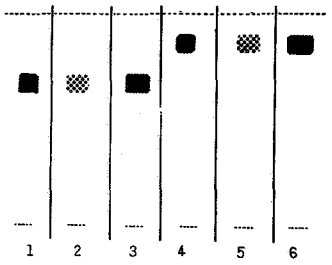
Developing solvent: petroleum ether-ether 1:1
Detection of spots: 50% H_2SO_4
1: -20°C Acetone Spt of lower phase
2: Acetone Spt. of -20°C Acetone Ppt.
3: Acetone Ppt. of -20°C Acetone Ppt

図3



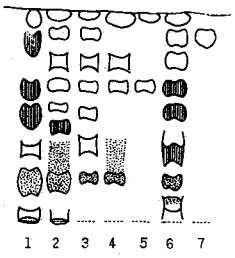
Developing solvent: C/M/AA/W(50:25:7:2)
Detection of spots: 50% H_2SO_4

図4



Developing solvent:
1,2,3,: chloroform-methanol-water 70:30:4
4,5,6,: chloroform-methanol-glacial acetic acid-water 50:25:7:3
Detection of spot:
1,4,: Anthrone
2,5,: Ninhydrine
3,6,: 50% H_2SO_4
Sample: Rf 0.88 Spot on TLC (C/M/AA/W)

図5



Developing solvent: chloroform-methanol-glacial acetic acid-water 50:25:7:3
○50%H_2SO_4 +; ◎Diphenylamine +; ◍Zinzadze R. +:
1: CM(2:1)-Extract from Ms
2: after Alk. digestion (total)
3: lower phase of 2
4: -20℃ Acetone Spt. of 3
5: Acetone Spt. of -20℃ Acetone Ppt
6: Acetone Ppt. of -20℃ Acetone Ppt
7: Rf 0.88 Spot of 6

リンを含んでいなかった。又 Diphenylamine 試薬噴霧では灰黄色に呈し，従って Sialic acid を含まない糖脂質であると考えられた。一方展開溶媒を変えても Anthrone 試薬による赤紫色の陽性位置と Ninhydrine 試薬陽性位置とは常に一致しており，抗原は糖とアミノ基を同時にもっていることが明らかとなった。(図4) Anthrone 法による糖の定量では D-Glucose を標準試料とすると抗原の糖含量は 1mg 中 32.38μg であった。そこで糖脂質の GLC による分析を行うため抗原標品を Sweeley & Walker の方法に従って N-アセチル化し，TMS化後，前記の条件で分析を行うと，Galactose と Glucose のピークのみ認められ，Hexosamine, Sialic acid は見出せなかった。(図6) 以上の TLC のスポット上での検索，ならびに GLC の分析結果は化学的分析の結果を良く一致していた。尚 GLC チャート上から Galactose と Glucose のモル比を測定すると 4.13:1 であった。更にアミノ酸の存否及びそれらの同定と定量をアミノ酸自動分析器によって行った。精製標品を 6N-HCl で加水分解後，分析を行うと表1のようにグリシン，アラニン，アルギニンが多く，これに反して含硫アミノ酸は含まれていなかった。酸性アミノ酸と塩基性アミノ酸の含有比はほぼ等しく，中性のペプチドであり，ペプチド1モル中にチロシンを1モル含むと仮定すると分子量は約3,600であった。尚アミノ酸含量は標品 1mg 中 19.17μg であった。又 GLC による構成脂肪酸分析では(図7)，C_{16} が最も多く，次いで C_{18}, $C_{24(-2H)}$ $C_{18(-2H)}$, C_{24}, C_{22} の順に少なく，その他に C_{17}, C_{20}, $C_{22(-2H)}$ も含まれて居り，通常の糖脂質の構成脂肪酸の分布と異なる点は認められなかった(表2)。Sphingosine の定量は Lauter & Trams の比色定量法で行ないその存在が確認された。以上の結果から抗原成分の化学的組成は現段階ではセラミドポリヘキソシドにペプチドを含むものと想像される。抗酸菌から分離された Mycoside-C_2 は脂肪酸，糖，ペプチドからなる物質で相互に酸アミド結合，エステル結合によって強固な結合体をなしていることが報告されて居り[11]，天然の結合脂質群の中にこの種の物質の存在することが

図6

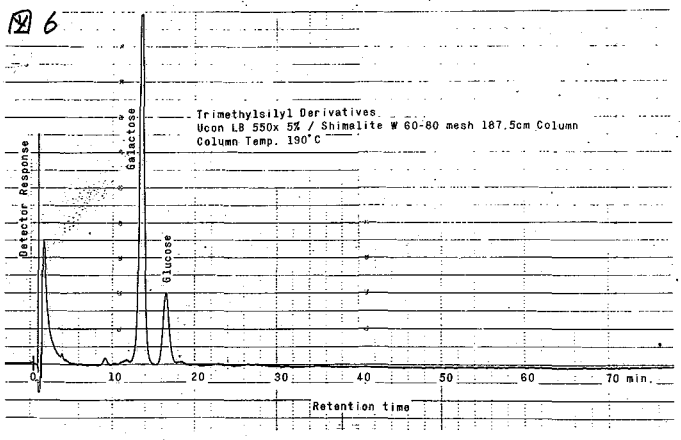


表1 Amino Acid Composition

	μmoles Antigen 100mg-dry-wt	%
Tau	0	0
Asp	0.849	6.056
Thr,Ser	0.987	7.040
Glu	1.393	9.936
Pro	0	0
Gly	2.392	17.061
Ala	1.581	11.277
Cys	0	0
Val	0.720	5.136
Met	0	0
Ileu	0.704	5.021
Leu	1.087	7.753
Tyr	0.503	3.588
Phe	1.122	8.003
His	0	0
Lys	0	0
Arg	2.682	19.130
Try	---	---
Total	14.020	

図7

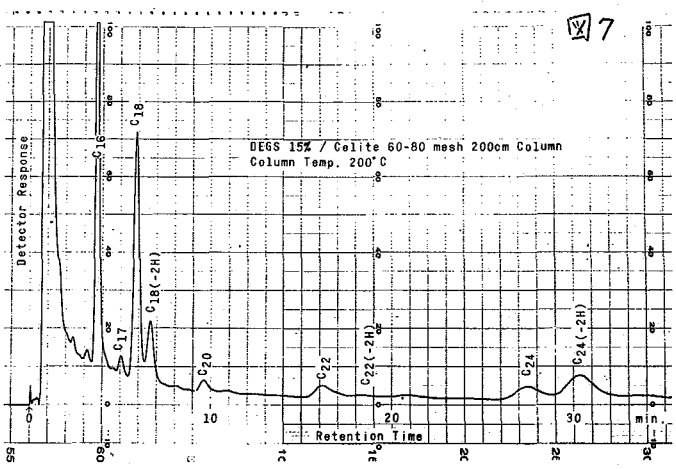


表2

Fatty acids	Composition % of total fatty acid
16:0	35.9
17:1	1.83
18:0	28.7
18:1	7.37
20:0	1.86
22;0	4.27
22:1	1.13
24:0	4.91
24:1	9.70
Others	4.33

表3

Chemical Composition of Brain-Specific-Antigen

		Remarks
Sphingosine	+	Spectrophotoretry
Hexose	+	Spectrophotometry, Gaschromatography Glucose-Galactose 1:4
Hexosamine	—	Spectrophotometry, Gaschromatography
Sialic acid	—	Spectrophotometry, Gaschromatography
Phosphate	—	Infraredspectrometry, Spectrophotometry
Fatty acids	+	Gaschromatography C_{16}, C_{17}, C_{18}, $C_{18(-2H)}$, C_{20}, C_{22}, $C_{22(-2H)}$, C_{24}, $C_{24(-2H)}$
Amino acids	+	Amino-acids autoanalyser Asp, Thr, Ser, Glu, Gly, Ala, Val, Ileu, Leu, Tyr, Phe, Arg,

示めされている。われわれがここに抽出精製した種族特異性，臓器特異性を示す抗原の中に含まれているペプチドが単なる混在であるならば，展開溶媒を変化させることによって相互の極性の差でTLC上で分離されるはずであろう。従って抗原はペプチドを含む糖脂質と考えられる。

他方，すでにSphingosine及びPsychosineに対する特異抗体は武富，山川[6]によって作られ，Cerebrosideは Niedieck ら[3]により，Ganglioside は Yokoyama ら[10]によって抗体産生能力を有することが報告されている。この点からもこの抗原成分が充分に抗体産生能力のあることが裏付けられるが，未だ糖が抗原決定基であるのか，ペプチドが決定基であるのかは不明である。又この抗原に対する抗体は白鼠脳ミクロゾームNa-K ATPase活性を抑制することが明らかであるが，この精製された抗原そのものとNa-K ATPaseとの関係，或いは抗原の生体内での生理的役割についても，また不明である。抗原成分の構造決定とともに今後これらの点について追及を進めたい。

〔文献〕

1) Blix.G: Acta Chem. Scand. 2, 467, (1948)
2) Lauter,C.J. & Trams,E.G.: J. Lipid Res. 3, 136, (1962)
3) Niedieck,B., Kuwert,E., Palacios. & Drees,O.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 122, Art. 1, 266, (1965)
4) 野口鉄也，塚田裕三：神経化学 2, Suppl. 29, (1968)
5) Sweeley,C.C. & Walker,B.: Anal. Chem. 36, 1467, (1964)
6) Taketomi,T. & Yamakawa,T.: Lipid 1, 31, (1966)
7) 植村慶一，塚田裕三：神経化学 5, Suppl. 113 (1966)
8) Wagner,H., Hörhammer,L. & Wolf,P.: Biochem.Z. 334, 175. (1961)
9) 山川民夫，入江礼子，芦原義守，甲野礼作，生化，31，62，(1959)
10) Yokoyama,M., Trams,E.G. & Brady,R.O.: J. Immunol. 90, 372, (1963)
11) Chaput,M., Michel,G. & Lederer,E.: Biochem. Biophys. Acta 78, 329, (1963)

7. ウシ脳からの N^{δ}-メチルオルニチン，N^{ε}-メチルリジン，N^{α}-（β-アラニル）リシンおよびN^{α}-（γ-アミノブチリル）リシンの分離同定

松岡征夫・公文　明・中嶋照夫・柿本泰男
今岡信夫・佐野　勇　（阪大・医・高次研・神経）

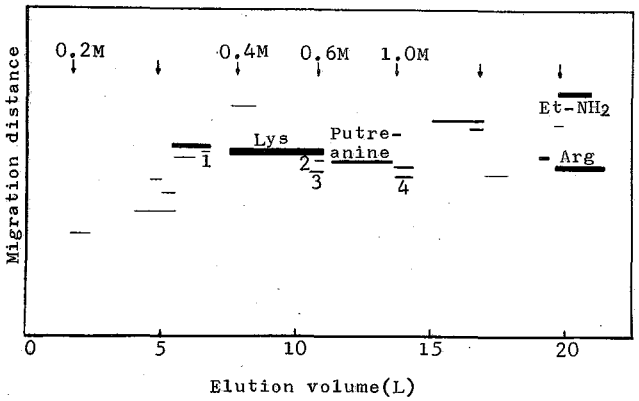
われわれは、数年来脳のアミノ化合物に関する同定の実験を行なって来た。昨年度本会で報告した組織抽出液の画分法[1]により、ウシ脳の塩基性脂肪族アミノ化合物画分より、N^{δ}-メチルオルニチンを精製し、N^{ε}-メチルリシン、N^{α}-（β-アラニル）リシンおよびN^{α}-（γ-アミノブチリル）リシンを単離したので報告する。

実験方法および材料

1）ウシ脳からのアミノ化合物の精製および単離

新鮮なウシ脳82 kgを水洗し、等量の10%トリクロル酢酸を加えてWaring blendorでホモジネートとし、2倍量の5%トリクロル酢酸を加えて遠沈し、238.8 lの上清を得た。上清を10 lずつにわけ、それぞれを6.5×30 cm Amberlite IR120（100-200メッシュ，H^{+}型）に通したのち、各カラムを水2.5 lおよび1 Mピリジン4 lで洗った。4 Mアンモニア：エタノール（1：1）3.3 lで溶出される画分を集めて塩基性アミノ化合物画分とした。減圧乾固ののち、乾固物を800 mlの水に溶かして4等分し、それぞれを6.5×36 cm Amberlite CG50（100-200メッシュ，NH_4^{+}型）に通し、水3 lで塩基性イミダゾール化合物を除いたのち、4 Mアンモニア：エタノール（1：1）3.75 lで溶出される部分を塩基性脂肪族アミノ化合物画分として集め、減圧乾固した。乾固物を水420 mlに溶かし、6.5×120 cm Amberlite 120（100-200メッシュ，NH_4^{+}型）に通し水2.23 lおよび0.2 M，0.3 M，0.4 M，0.6 Mおよび1.0 Mアンモニア各3 lで段階的に溶出した。溶出液は、約100 mlずつ集め、その10 μlの高圧沪紙電気泳動（溶媒系，ピリジン：酢酸：水＝33：17：950，pH 5.3；電位勾配，100 V/cm；泳動時間，30分）を行ない、ニンヒドリン反応で発色させて溶出部位をさだめた。溶出液は、画分I（5.32-6.75 l），画分II（10.45-11.15 l）および画分III（13.85-14.99 l）にわけた。（図）

脳の塩基性脂肪族アミノ化合物画分のAmberlite IR120, NH_4^{+}型カラム上での、アンモニアによる溶出パターン（図）



画分Iは、高圧沪紙電気泳動の結果、合成N^{δ}-メチルオルニチンと同じ泳動距離を示すアミノ化合物（化合物I），オルニチンおよび未同定アミノ化合物をふくんでいた。この画分Iは、高圧沪紙電気泳動法で精製し、化合物Iの部分の沪紙を切り抜き、0.1

N酢酸で2回抽出した。抽出液を減圧乾固し、少量の水に溶かして精製品とした。

画分IIはリシンのほかに2つのニンヒドリン陽性化合物（化合物2および化合物3）をふくんでいた。この画分を3×71cm Dowex 50×2（200-400メッシュ，NH_4^+型）のカラムに通し、0.4Mアンモニアでのクロマトグラフィーを行ない、870-1130mlに溶出される画分を減圧乾固した。この操作により大部分のリシンを除去し得た。乾固物を少量の水に溶かし、2×48cm Amberlite CG50（200-400メッシュ，NH_4^+型）に吸着せしめ、0.15Mアンモニアによるクロマトグラフィーを行なった。化合物2は、245-310mlの画分に溶出され、化合物3およびリシンは315-375mlの画分に溶出された。化合物2をふくむ画分を減圧乾固ののち、水20mlに溶かし、1N塩酸でpH 6.5とした。活性炭処理ののち沪過し沪液を減圧乾固してその乾固物よりエタノール-水から針状結晶を得た。エタノール-水にて、さらに2回再結晶して24mgの結晶（融点，252-4°C）を得た。

実験値，C，42.41%　H，7.89%　N，14.03%

理論値（$C_7H_{16}N_2O_2 \cdot HCl$）C，42.75%　H，8.72%　N，14.24%

化合物3をふくむ画分を減圧乾固ののち、少量の水に溶かし2×48cm Amberlite CG50（100-200メッシュ，NH_4^+型）に吸着せしめ0.1Mアンモニアでクロマトグラフィーを行ない、370-495mlの画分をあつめ減圧乾固した。乾固物を少量の水に溶かし酢酸を加えて再び乾固した。乾固物を少量のメタノールに溶かし酢酸エチルを加えて一夜冷蔵庫内に保存して結晶を得た。これを集めてメタノール-酢酸エチルにて再結晶させ3mgの結晶（融点，120-5°C）を得た。

画分IIIを2×82cm Amberlite CG50（100-200メッシュ，NH_4^+型）に吸着せしめ、0.2Mアンモニアでクロマトグラフィーを行ない、660-850mlに単一のアミノ化合物（化合物4）が溶出された。この画分を減圧乾固したのち少量の水に溶かし、酢酸を加えて再び減圧乾固した。乾固物を少量のメタノールに溶かし、エーテルを加えて一夜保存し18.4mgの結晶を得た。これをメタノール-酢酸エチルで再結晶した（融点，165-8°C）。

実験値，C，46.38%　H，8.03%　N，13.73%

理論値（$C_{10}H_{21}N_3O_3 \cdot CH_3COOH \cdot H_2O$）C，46.57%　H，8.80%　N，13.58%

2) N^{δ}-メチルオルニチンおよびN^{ε}-メチルリシン

Benoitonの方法[2]により合成した。

（N^{ε}-メチルリシン；融点，253-4°C）

3) N^{α}-（β-アラニル）リシン酢酸塩およびN^{α}-（γ-アミノブチリル）リシン酢酸塩

以前合成したそれぞれのp-ヒドロキシアゾベンゼンスルフォン酸塩[3),4)]を、50%エタノールに溶かしDowex 1×8（100-200メッシュ，酢酸型）に通した。溶出液を減圧乾固ののち、N^{α}-（β-アラニル）リシン・酢酸塩はメタノール-酢酸エチルより結晶させ（融点，122-6°C）、N^{α}-（γ-アミノブチリル）リシン・酢酸塩はメタノール-エーテルより結晶させた（融点，167-9°C）。

N^{α}-（γ-アミノブチリル）リシン・酢酸塩の元素分析

実験値，C，48.91%　H，8.90%　N，14.19%

理論値（$C_{10}H_{21}N_3O_3 \cdot CH_3COOH$），C,49.47% H,8.65% N,14.42%

実験結果

1)化合物Iの同定

化合物Iは酸水解（6N塩酸，105°C，16時間）されなかった。化合物Iは合成N^{δ}-メチルオルニチンと、高圧沪紙電気泳動上の泳動距離および2つの溶媒系（ピリジン：アセトン：3Nアンモニア＝50：30：25；イソプロピールアルコール：ギ酸：水＝40：10：10）による沪紙クロマトグラフィーでのRfで一致した。（表）

2)化合物2の同定

化合物2も酸水解をうけなかった。単離化合物と合成N^{ε}-メチルリシンとは、高圧沪紙電気泳動上の泳動距離，2つの溶媒系による沪紙クロマトグラフィーでのRfおよび赤外吸収スペクトルで一致した。（表）

3)化合物3の同定

化合物3は酸水解により等モルのβ-アラニンとリシンとを生じた。Sangerらの方法[5]により、単離化合物をDNP化したのち酸水解を行なったところ、DNP-β-アラニンとN^{ε}-DNP-リシンとを生じた。単離化合物と合成N^{α}-（β-アラニル）リシンとの高圧沪紙電気泳動上の泳動距離，2つの溶媒系による沪紙クロマトグラフィーのRfおよび赤外吸収スペクトルは一致した。（表）

4)化合物4の同定

化合物4は酸水解によりγ-アミノ酪酸とリシンとを生じ、そのモル比は1.08（γ-アミノ酪酸／リシン）であった。単離化合物をDNP化したのち酸水解すると、DNP-γ-アミノ酪酸およびN^{ε}-DNP-リシンを生じた。単離化合物と合成N^{α}-（γ-アミノブチリル）リシンとは、高圧沪紙電気泳動上の泳動距離、2つの溶媒系による沪紙クロマトグラフィーでのRfおよび赤外吸収スペクトルで一致した。（表）

（表）

Rf values and migration distances of N-methylornithine, N-methyllysine, β-alanyllysine and γ-aminobutyryllysine.

	Rf values			H-V migration
	Pyr-acetone-3M ammonia (50:30:25)	Isopropanol-formic acid-water (4:1:1)	(8:1:1)	distance (cm)
Ornithine	0.37	0.32		20.0
Lysine	0.41	0.41	0.17	21.0
δ-N-Methylornithine	0.33	0.44		21.2
ε-N-Methyllysine	0.35	0.53		20.1
α-(β-alanyl)-lysine	0.52		0.19	18.7
α-(γ-aminobutyryl)-lysine	0.50	0.53		18.0

考察

これらのアミノ化合物がウシ脳に混在する血液に由来する可能性もあるので、ウシ血液1kgを用いて検討したところ、N^{ε}-メチルリシンの血中濃度は1mg／kg・血液であったが、他の3つの化合物は検出し得なかった。脳重量の6%が血液であるとすれば、ウシ脳82kgのN^{ε}-メチルリシン5mgは血液に由来するものと考えられる。本実験では24mgのN^{ε}-メチルリシンを得たので、単離化合物の大部分は脳実質に存在したものと考えられる。

リシンのメチル化については、蛋白質中のリシンのε-アミノ基がメチル化をうけ

[6),7)] その後蛋白質水解により遊離の N^{ε}-メチルリシンが生じると考えることも出来るが、ここに報告したように蛋白質の構成アミノ酸として知られていないオルニチンのメチル化化合物が存在したことから、遊離リシンが直接メチル化をうける可能性も考えられる。

N^{α}-(β-アラニル)リシンは、松岡ら[3)]によりウサギ骨格筋より精製されているが、ウシ脳にも存在することを確認した。また、N^{ε}-(γ-アミノブチリル)リシンのウサギ脳よりの精製については昨年度の本会で報告したが、ウシ脳より単離し得たのでここに報告した次第である。

文　献

1. 公文明,中嶋照夫,松岡征夫,柿本泰男,佐野勇, 神経化学(補遺),7, 51(1968).
2. Benoiton, L., Canad, J. Chem., 42, 2043 (1964).
3. Matsuoka, Y., Nakajima, T., and Sano, I., Biochim. Biophys. Acta, 177, 169 (1969).
4. Nakajima, T., Kakimoto, Y., Kumon, A., Matsuoka, Y., and Sano, I., J. Neurochem., 16, 417 (1969).
5. Sanger, F., and Thompson, E.O.P., Biochem. J., 53, 353 (1953).
6. Comb, D.G., Sarker, N., and Pinizino, C.J., J. Biol. Chem., 241, 1957 (1966).
7. Paik, W.K., and Kim, S., Biochem. Biophys. Res. Commun., 29, 14 (1967).

8. 脳に特異的に存在する1アミノ酸：プトレアニン

柿本泰男・中嶋照夫・公文　明・松岡征夫
今岡信夫・佐野　勇（阪大・医・高次研・神経）
芝　哲夫（阪大・理・化学）

われわれは哺乳動物および鳥類の脳に特異的に存在するーアミノ酸を見出し、その分離同定を行なった。数種の哺乳動物の臓器のアミノ酸を前もって4分画にわけ、沪紙クロマトグラフィーおよび高圧沪紙電気泳動を行なったところ、脳にのみ検出されるニンヒドリン陽性物質が脂肪族塩基性アミノ酸分画に存在した。このアミノ酸を牛脳から分離し、元素分析、質量分析、核磁気共鳴分光および解離恒数測定によって構造を推定し、合成によって図1のような構造をもつことを確めた。また本物質の神経系内分布および成長にともなう濃度変化もしらべた。

NH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-CH_2-CH_2-COOH
N-(4-Aminobutyl)-3-aminopropionic acid
(Putreanine)

図1　プトレアニンの構造

著者らは本物質を構造から考えてプトレアニン（プトレスチン＋β-アラニンの縮合）と名づけた。

（本報告の中　プトレアニンの構造決定に関する実験は芝が行なった。）

方　法

1）組織からのプトレアニンの検出および定量

検出および定量法は図2に示した。検出は部分精製後沪紙クロマトグラフィーおよび高圧沪紙電気泳動法によって行なったが、そのパターンを模式的に図3,および4に示す。定量はアミノ酸分析によった。そのパターンの1例を図5に示す。通常用いられているアミノ酸分析の条件[1]ではプトレアニンはアルギニンよりおそく溶出され、ピークが低くなり、定量に適さないのでその条件を図2のように変えた。

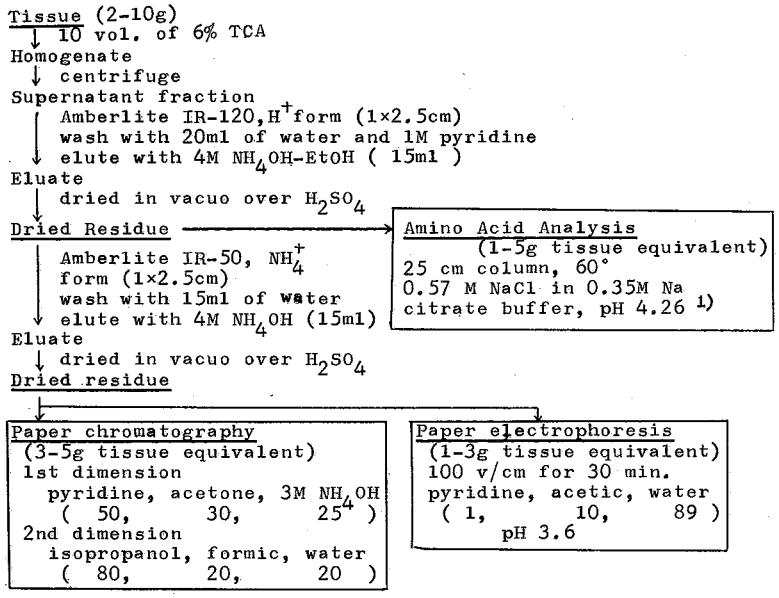


図2　プトレアニンの検出および定量法

結果

1) プトレアニンの牛脳からの分離　200ケの新鮮牛脳(82kg)を2回にわけて以下のように処理した。等量の10%TCAでホモジネートとし、2容量の5%TCAを加え、遠沈上清をCeliteを用いて沪過し、沪液120lを12分し、それぞれを6×30cm Amberlite IR-120, H^+型, 100-200メッシュのカラムに通し、カラムを2.5lの水、ついで4lの1Mピリジンで洗った。吸着した塩基性アミノ酸を3.3lの4Mアンモニア-エタノール(1:1)で溶出、溶出液を減圧乾固した。82kgの脳から得た乾固物を水にとかして4等分し、それぞれを6.5cm×36cm Amberlite IR 50, NH_4^+型, 100-200メッシュのカラムに通し、カラムを3lの水で洗い、吸着した塩基性脂肪族アミノ酸を3.75lの4Mアンモニア-エタノール(1:1)で溶出した。溶出液をあわせ、減圧乾固し、6.3×120cmのAmberlite IR 120, NH_4^+型, 100-200メッシュのカラムに吸着させた。吸着アミノ酸を2,230mlの水、3lづつの0.2, 0.3, 0.4ついで0.6Mアンモニアで溶出し、11,150-13,200mlの分画をあつめ減圧濃縮した。これを3×71cm Dowex50×2, NH_4^+型, 200-400メッシュに吸着せしめ、0.5Mアンモニアで溶出し、720-1,720mlの分画をあつめ減圧乾固した。これを30mlの水にとかし1M硫酸でpH 1.9とし、50mgの炭末で処理した。乾固した後2mlの水にとかし、20mlのメタノールを加えて冷却し、535mgの結晶を得、さらに2回再結晶をし475mgの結晶、

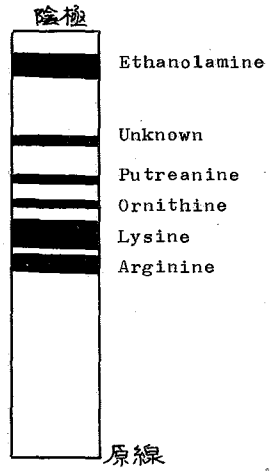


図4 牛脳の塩基性脂肪族アミノ酸分画の沪紙電気泳動

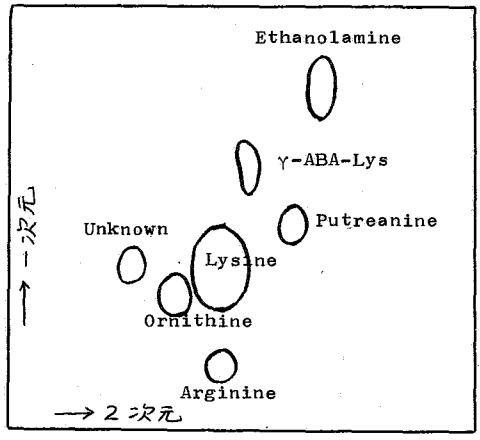


図3 ウサギ脳の塩基性脂肪族アミノ酸分画の沪紙クロマトグラム

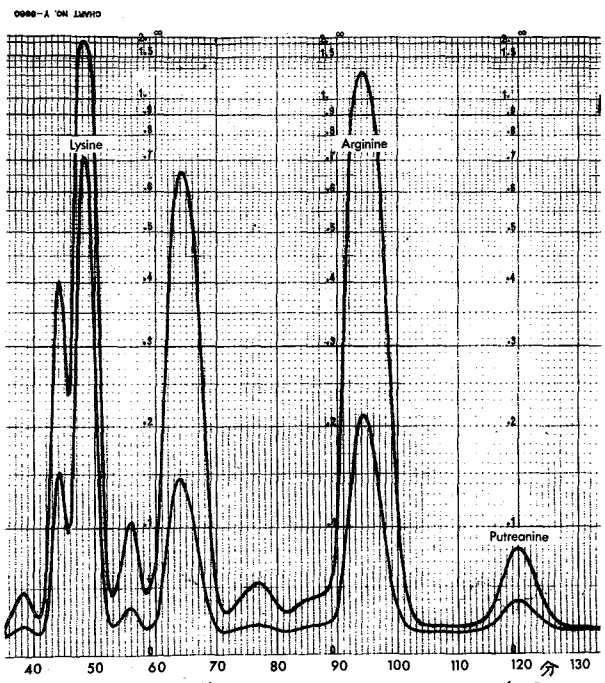


図5 牛脳塩基性アミノ酸分画のアミノ酸分析図

m.p. 250-251°を得た。 $C_7H_{16}N_2O_2 \cdot H_2SO_4 \cdot \frac{1}{2}H_2O$

計算値 C, 31.45, H 7.16, N 10.48, S 12.00

実測値 C, 31.64, H 7.24, N 10.14, S 11.74

他に58kgの牛脳から同様の操作により塩酸塩として20.4mg, その母液からp-ヒドロキシアゾベンゼン-p'-スルフォン酸塩として222mgのプトレアニンを得た。

$C_7H_{16}N_2O_2 \cdot 2HCl$

計算値 C 36.50, H 7.79, N 12.02, O 13.73, Cl 30.42

実測値 C 36.07, H 7.91, N 12.34, O 14.87, Cl 28.42

$C_7H_{16}N_2O_2 \cdot C_{12}H_{10}O_4N_2S$

計算値 C 52.04, H 5.98, N 12.78, S 7.31

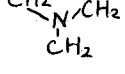
実測値 C 52.12, H 6.19, N 12.76, S 7.03

2) プトレアニンの構造決定

本物質は酸水解をうけず, 電気泳動での性質, 元素分析の結果からジアミノモノカルボン酸であると推定した。

pKa は 3.16, 9.35, 11.18 であり, この値は上の推定を支持し, pKa' の値はこのアミノ酸がβ-アミノ酸であることを予測せしめた。

本物質のエチルエステルの質量分析での親ピークから分子量は188であり, 上の元素分析からの推定値と一致し, m/e 70および88のピークがあり, 102を与えることは, このアミノ酸がβ-アミノ酸であることを示した。また173および159のピークを欠き C-メチルおよびC-エチル構造のないことを示した。101および84(基準ピーク)のピークは

$NH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH-CH_2 \longrightarrow$  のフラグメントとして理解できる。

リジン, オルニチン, および2,4-ジアミノ酪酸のラクタム化を起す条件でも本アミノ酸はラクタム化を起こさないことから, カルボキシル基から4から6位のCにアミノ基は付いていないと考えた。

NMRスペクトルで化学シフトはτ: 7.93 (4H), 6.84 (2H), 6.58 (6H), 2.6-2.9 (5H) に観察され, それぞれ C-CH_2-C, C-CH_2-COOH, C-NH_2-N, NH_2 or NH に相当すると考えた。

本アミノ酸は350~210 mμで0.1N HCl中で光学的に非活性であった。

以上の結果から図1に示した構造を推定して, この合成を行なった。合成品はプトレアニンとIR, NMR, 質量分析, pKa' 値, 薄層クロマトグラフィーでのRf値について完全に一致した。

3) 哺乳動物体内におけるプトレアニンの分布

ラッテの脳, 肝, 腎, 心, 骨格筋, 腸, 膵臓, 子宮および毛皮, モルモット, 家兎, 牛および鶏の脳, 肝, 腎, 犬およびハトの脳, カエル, コイ, イワシの脳 各5g以上を用いて図2の方法で精製し, プトレアニンの存在をしらべたところ, ラッテ, モルモット, 家兎, 牛, 鶏, 犬およびハトの脳に検出し得たが, 他の動物の脳および, 各動物の脳以外の臓器にはプトレアニンは検出できなかった。この方法では, 臓器1gあたり1mμmole以上のプトレアニンが存在すれば検出しうるはずである。哺乳動物の脳には後に示すように20-100mμmole/gのプトレアニンがふくまれている。

4) 家兎および牛の神経系内のプトレアニンの分布

家兎の脳内分布を表1に示す。小脳および脳幹に高濃度であった。

牛脳では表2に示されているように橋、延髄、四丘体、小脳白質、脳梁に濃度が高く、大脳灰白質、海馬、脊髄灰白質では低い。また大脳、小脳、脊髄で、プトレアニンの灰白質と白質との濃度を比較すると、後者において高い。家兎および牛の脳のデーターから共通していえることは、本物質の濃度が脳幹部および小脳に高いことである。家兎の坐骨神経および牛の網膜には検出されなかった。

5) ラッテ脳内のプトレアニンの濃度の成長にともなう変化

表3に示すように出生直後および1週間後のラッテ脳にはプトレアニンは検出されない。生後2週目にわずかに検出され、その後徐々に増加して、数ヶ月で成熟のレベルに達する。

部位	μmoles/g		平均
cerebral cortex	28	19	19	22
midbrain	24	34	29	29
hippocampus	21	21	21	21
cerebellum	45	33	53	44
brain stem	29	61	46	49
spinal cord	39	45	13	32
sciatic nerve		<1	<1	<1

表1 家兎の脳内のプトレアニンの分布
(表中の値は2匹の家兎からの材料をあわせて測定したものを示す。)

部位	μmoles/g		
cerebral cortex			
grey matter	34	21	11
white matter	45	61	44
callosal body	60	65	
caudate nucleus	39	50	
hippocampus	31	29	
thalamus	43	56	
hypothalamus	53	45	
quadrigeminal plates	55	75	
cerebellum			
grey matter	34	55	32
white matter	57	59	58
pons	102	71	
oblongate medulla	62	69	
spinal cord			
cervical	24	25	
thoracal	33	34	
lumbar	32	23	
grey matter*	27	19	15
white matter*	45	35	20
optic nerve	14	43	41
retina	0		

表2 牛の神経系内のプトレアニンの分布
(表中の値は各1匹の牛から得た材料による測定値、*灰白質は脊髄全長から得、白質は頸、胸、腰髄から均等に得た材料をあわせた。)

1 day	<1	<1	<1
1 week	<1	<1	<1
2 weeks	2	2	
3 weeks	9	4	4
2 monthes	20	11	17
6 monthes	23	47	38
12 monthes	28	28	

表3. 成長にともなうラッテ脳内プトレアニン濃度の変化
(定量には生後1日目のラッテは5匹、1週間目および2週間目は3匹、2, 6, 12ヶ月は2匹の脳をあわせて用いた。)

考察

われわれが牛脳から見出したプトレアニンは、これまで自然界に存在が知られていなかったアミノ酸である。そしてその存在はしらべた限りでは哺乳動物および鳥類の中枢神経系に限られている点が興味ぶかい。その量はバリン、ロイシン、チロシン フェニールアラニン、ヒスチジン、オルニチンの脳内での濃度に匹敵する。これが今日まで知られていなかったのは、普通アミノ酸の検出に用いられる沪紙クロマトグラフィーでは他のアミノ酸に重なったり、アミノ酸分析法では最もおそく溶出されると考えられたアルギニンよりもさらにおそく溶出されるためであろう。本アミノ酸はすべて遊離の形でふくまれ、脳組織の水解によっては新たに遊離してこない。このアミノ酸はおそらくスペルミジンから形成されると考える。

文献

1) Spackman, D.H., Stein, W.H., and Moore, S., Anal. Chem., 30, 1191 (1958)

9. α-N-acetyl-L-arginineのウシ脳よりの分離およびその痙攣作用に関する研究

大楠晴美・森　昭胤（阪大・医・Ⅱ外）

脳組織に存在するグアニジン体にはarginineのほかglycocyamine（2,3,4），taurocyamine（2,14,15）およびγ-guanidinobutyric acid（7,8）が知られている。これまでこれらグアニジン体の生体内分布の研究は通常paper chromatography（9,10,12）を用いて行なわれていたが，正確さおよび再現性などの点で多くの問題があった．われわれは最近，坂口反応にもとずいたグアニジン体の自動分析装置を考案し（13），種々の組織についてグアニジン体の分離定量を行なっているが，この方法によるとウサギおよびウシ脳の分析記録中にglycocyamineのピークの直後に，これとほぼ等しい高さを有する未知のピークが出現することに気ずいた．そこで，この未知のピークを示す物質を分離同定すべく，ウシ脳8kgの分析処理を行ない，本物質をピクロロン酸として分離することに成功し，分析の結果，α-N-acetyl-L-arginineと同定しえた．また，この物質を3mg/kg程度ウサギの大槽内に注入すると2,3分の潜時ののち強直性，間代性の痙攣を誘発しうることを知った．さらに，ネコについて深部脳波的検索を行なったので，これらの結果もあわせて報告する。

〔実験方法と実験材料〕

1．グアニジン体自動分析装置：演者らの方法（13）に従って行なったが，液体クロマトグラフ装置は日本電子JLC-3BCⅡ型を使用した．その構成はほぼアミノ酸自動分析法に準じたが，坂口反応を行なうため，ポンプ構成は4系統とした．分離系はAminex A-5のcolumn（8×150mm）を用い，試料添加後50分（taurocyamine，glycocyamineおよび未知物質出現直後まで）はpH 4.26 citrate bufferにて溶出し，ついでpH 5.28 citrate bufferにて溶出を行なった．

2．α-N-acetyl-L-arginineの合成：Bergmannの方法（1）により，氷酢酸溶媒中で，L-arginineを計算量の無水酢酸と常温にて24時間反応させたのち，Dowex-50を用いて精製した．m.p. 270°

3．column chromatographyおよびTLC：ウシ脳三塩化酢酸抽出液のグアニジン体を吸着させるためAmberlite CG 120（H form 200-400 mesh）のcolumn（5×80 cm）を使用した．他方，Makisumi（11）に従ってグアニジン体とグアニジン体以外の物質とを分離する目的でDowex 1×8（OH form 200-400 mesh）のcolumn（2×80 cm）を使用した．またTLCはEastman chromagram（type K301R）を使用し，展開にはbutanol, formic acid, water＝75：15：10を主として使用した。

4．赤外分析：日立GPI-D2 infra red Spectrophotometerを使用し，KBr pelletsにて吸収スペクトルを記録した．

5．塩酸加水分解およびアルギナーゼ反応：脳組織から抽出分離したグアニジン体ピクロロン酸の水溶液をDowex 1×8（Cl form）のcolumnに通してピクロロン酸をはずしたのち，6N-HClにて4時間100°に保って加水分解を行なった．また，アルギナーゼ反応のためには上記加水分解後の反応混液を一旦減圧乾固したのち，glycine-NaOH buffer（pH 8.4）に再溶解し，Greenbergの方法（5,6）に準じてliver arginaseを

作用させた。そのさいの反応條件は45°, 20時間とした。

6. 深部脳波の測定方法：体重3 Kgの成熟ネコをエーテル麻酔下に気管切開し，脳研式ステレオ装置に固定したのち，サクシニールコリン皮下注射により体動を防ぎ，人工呼吸のもとに外径0.8mmの同心双極針電極を皮質運動領，視床外側核，中脳網様体，海馬背側部に導入して脳波を記録した。

〔実験成績と考按〕

1. 自動分析装置による脳のグアニジン体の分離定量

ウシ脳およびウサギ脳のピクリン酸抽出分劃について，グアニジン体の定量分析を行なったところ，taurocyamine 0.03～0.05, glycocyamine 0.03～0.05, γ-guanidinobutyric acid 0.03～0.04, およびargimine 0.06～0.1 μmoles/g が検出されるほか図1に示すごとく未知のピークが検出された。そのうち，まず，glycocyamineの直後に出現するピークに注目し，これを以下のごとくにして分離した。

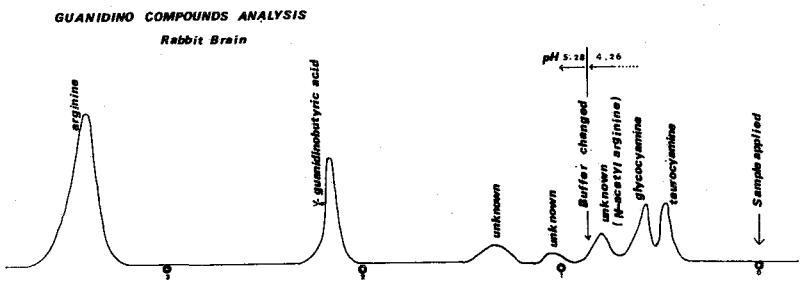


図1. 自動分析装置による脳のグアニジン体の分離定量

2. 未知グアニジン体のウシ脳よりの分離

約8 Kgの新鮮ウシ脳組織を8 lの水でhomogenizeし，100°にて15分間加熱した。ついでその沪液に三塩化酢酸800 gを加え1夜室温に放置したのちHyflo Super-Celを用いて沪過した沪液をAmberlite CG 120 (H form) のcolumn (5×80 cm) に吸着させた。ついで洗液が中性になるまでcolumnを蒸溜水で洗浄したのち2-Nアンモニア水で溶出した。溶出液はフラクションコレクターを使用して各50mlの分劃に分けたが，最終1350 mlまで溶出を行なった。このさい，これら諸分劃の一部をとってTLCを行ない，各々について呈色反応をしらべた結果，本物質を含めて数個のグアニジン体を含む分劃tube no. 19-27をえた。これらの分劃は各々減圧乾固し，残渣は各々30mlの熱メタノールで抽出したのち，抽出液を集め減圧乾固し，再び全部の残渣を50 mlの蒸留水に溶かしたのち，Makisumiの方法 (11) に従ってDowex 1×8 (OH form) のcolumnに吸着させた。ついで，グアニジン体を炭酸ガスを含まぬ蒸留水で溶出し，フラクションコレクターを用いて各々3 mlに分劃した。このさい，各分劃はTLCにて展開し，本物質を含む68-75分劃をえた。ついで，この分劃を減圧乾固したのち残渣を20 mlの熱メタノールで抽出したのち，これに2%ピクロロン酸エタノール溶液を加え，湯浴上で10分間加熱した。これを室温に数時間放置したのち，定全に減圧乾固し，生じた黄色残渣を約3 mlの熱エタノールで洗浄して遊離ピクロロン酸を除き，再び少量の熱メタノールに溶解せしめ，再結晶をくりかえし行ない，えられた結晶を少量の氷冷水，エタノールついでエチルエーテルで洗浄したのち減圧にて乾燥せしめた。収量 29 mg. m.p. 215.5°. 元素分析値 C 43.28, H 4.88, N 22.19%.

3. 分離された未知グアニジン体の同定

以上の過程で分離されたピクロロン酸塩をDowex 1×8 (Cl form) のcolumnを通してピクロロン酸をはずしたのち，坂口反応をしらべると陽性であるが，ニンヒドリン反応は陰性であった。しかし塩酸加水分解後にはニンヒドリン反応は陽性に転じた。この加水分解後のものをTLCにより展開したところ，argimineに一致するspotが検出できた。(表:略).他方，この加水分解後の混液にliver arginaseを作用させるとTLCによりornithineに一致するspotが検出できた．(表:略)．以上の事実より，本物質の化学構造として，α-N-acetyl-L-argimineが推定されるのでBergmannの方法(1)にしたがって本物質を合成し，そのピクロロン酸塩について融点とその元素分析値を比較検討した結果，表1に示すごとく両者は完全に一致した。また，TLCにおける態度も表2のごとく合成したα-N-acetyl-L-argimineのそれと完全に一致した。他方，赤外分析の結果も，図2にみられるごとく，ウシ脳より抽出したグアニジン体ピクロロン酸塩の吸収曲線と合成標品のピクロロン酸塩のそれが完全に一致した。したがって，ウシ脳より抽出した未知グアニジン体はα-N-acetyl-L-argimineと同定した。

Table 1 COMPARISON OF ANALYTICAL DATA BETWEEN THE ISOLATED GUANIDINO COMPOUND AND AUTHENTIC α-N-ACETYL-L-ARGININE

	isolated guanidino compound picrolonate	authentic α-N-acetyl-L-arginine
melting point	215.5℃	215℃
analytical data (%)	C 43.28 H 4.88 N 22.19	C 43.02 H 4.99 N 22.76

theoretical value (%) for α-N-acetyl-L arginine picrolonate. H_2O. $C_8H_{16}O_3N_4 \cdot C_{10}H_8O_5N_4H_2O$

C 43.39
H 5.22
N 22.49

Table 2 COMPARISON OF Rf IN TLC BETWEEN THE ISOLATED COMPOUND AND AUTHENTIC α-N-ACETYL-L-ARGININE

Solvent	isolated guanidino compound picrolonate	authentic α-N acetyl-L-arginine picrolonate
butanol 75 formic 15 water 10	0.77	0.77
octanol 75 methanol 25 formic 15 water 10	0.30	0.30
methanol 75 formic 15 water 10	0.92	0.92

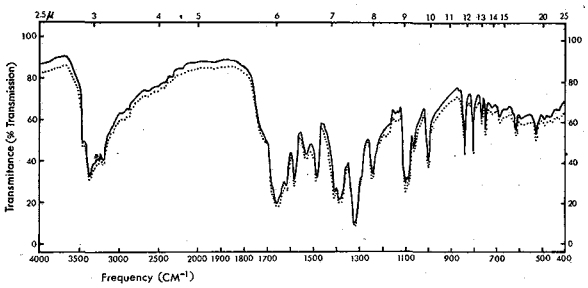


Fig. 2 COMPARISON OF INFRARED SPECTRA.
..... Spectrum of $C_8H_{16}O_3N_4$ - picrolonate from the cattle brain.
——— Spectrum of authentic α-N-acethyl-L-arginine picrolonate.
Hitachi GPI-D2 infrared spectro-photometer was used with KBr pellets.

4. α-N-acetyl-L-argimineの痙攣作用

合成α-N-acetyl-L-argimine (m.p. 270°) を6 mg/mlの溶液として，0.5ml/kg (3 mg/kg) をウサギの大槽内に注入したところ，数分の潜時ののち，典型的な間代性，強直性の痙攣をくりかえすことが観察された。このさい皮質脳波を記録すると，典型的な発作波が認められ，またネコを用いて深部脳波を観察したところ，主にhippocampusに著明な電気的興奮がみられた。また，その他の脳波所見より，本物質による痙攣は，主にhippocampusやamygdalaなどのlimbic systemの発火に起因するものと推定された(脳波の写真：略)。

〔要約〕

1. グアニジン体自動分析装置によるウサギ脳およびウシ脳の分析記録中に未知のピークを見出し，これと対応するグアニジン体$C_8H_{16}O_3N_4$をウシ脳よりピクロロン酸塩として分離した。

2．本物質は坂口反応陽性，ニンヒドリン反応陰性であるが，加水分解によりニンヒドリン反応が陽性となり，TLCにより arginine が検出できた。また上記の加水分解物に liver arginase を作用させると ornithine が検出できた。

3．以上の結果から α-N-acetyl-L-arginine と推定し，これを合成し，ピクロロニ酸塩について融点，赤外吸収スペクトル，元素分析などを比較検討した結果，両者は完全に一致し，本物質を α-N-acetyl-L-arginine と同定できた。

4．合成 α-N-acetyl-L-arginine をウサギ大槽内に注入すると強直性，間代性痙攣が誘発される。このさい皮質脳波をとると典型的な発作波が認められ，またネコを用いて深部脳波を観察したところ，主に hippocampus に著明な電気興奮が観察された。

〔文献〕

1. Bergman, M. and Zervis, L., Biochem. Z. 203, 280 (1928)
2. Blass, J. P., Biochem. J. 77, 484, (1960)
3. Borsook, H. and Dubnoff, J. W., J. Biol. Chem. 138, 389 (1941)
4. Clouet, D. H., Gaitonde, M. K. and Richter. D., J. Neurochem. 1, 228 (1957)
5. Greenberg, D. M., Bagot, A. E. and Roholt, Jr. O. A., Arch. Biochem. Biophys. 62, 446 (1956)
6. Greenberg, D. M., Methods in Enzymology Vol. 2 p. 368, Academic Press, New York, (1955)
7. Irrevere, F., Evans, R. L., Hayden, A. R. and Silber, R., Nature Lond. 180, 704 (1957)
8. Irrevere, F. and Evans, R. L., J. Biol. Chem. 234, 1438 (1959)
9. Pant, R. and Duberg, S. S., Biochem. Biophys. Acta 41, 536 (1960)
10. Roche, J., Van Thoai, N. and Hatt, J. L., Biochem. Biophys. Acta 14, 71 (1954)
11. Makisumi, M., J. Biochem. 49, 284 (1961)
12. 牧角啓，日化 73, 737 (1952)
13. 森昭胤，大槻晴美，沢井愛次郎，陣内伝之助，稲川寿美，山本勝美，条件反射 106, 13 (1969)
14. Van Thoai, N., Biochem. Biophys. Acta 13, 533 (1954)
15. Van Thoai, N., Roche, J. and Olumucki, A., Biochem. Biophys. Acta 14, 448 (1954)

10. ネコ中枢神経系の諸種神経細胞に含まれるγ－アミノ酪酸の定量

大塚正徳・小幡邦彦・田中百合子
（東医歯大・医・薬理）

昨年の神経化学会において，酵素的循環法を用いて脳中の単一神経細胞に含まれるγ－アミノ酪酸（GABA）を定量する方法について報告した[14]。今回はこの方法により ネコ中枢神経系の諸種神経細胞の GABA 含有量を測定した結果について報告する。

実験方法

(1)組織切片の GABA 含有量の測定

ネンブタール麻酔下のネコより脊髄および脳の諸部位を取り出し，その切片を実体顕微鏡下に観察しながら，次の諸組織 2 - 150 mg を分離した。即ち，大脳皮質（前および後中心回），小脳皮質，小脳核（外側核，室頂核および中位核），Deiters核，脊髄前角部（L_7 または S_1）。脊髄神経節（L_6 - S_1）は生体から取り出し，神経線維の部分および脂肪組織を取除いた。小脳核および Deiters核の分離に当っては 0.1% methylene blue で染色し，その位置を確認したが，その他の組織の分離は無染色のままで行った。組織片の重量を測定後，新鮮組織4 - 25 mg に 1 ml の割合で 0.1N HCl を加えた。以上の操作は室温（約 25°C）で行い，組織を生体から摘出してから 0.1N HCl 中に移すまでに要した時間は 30分以下，通常 4 - 10 分であった。このために起る死後の GABA 含量の増加は 20% 以下と考えられる（表 1 および Elliott ら[2]）

HCl中の組織をテフロン・ホモジナイザーでホモジナイズし，抽出液中の GABA量を Hirsch および Robins の方法[4]に準じて酵素法により測定した。組織を methylene blue で染色した場合には色素が酵素反応液中で GABA による NADPH 産生を阻害するため，これに対する考慮が必要となる。このため抽出液中の methylene blue量を 660mμ の吸収により定量し，次いで methylene blue 0.7 - 2.7 μM を酵素反応液に加えた条件で標準曲線を作り，これを用いて抽出液の測定値を補正した。

表 1. 生体から取り出した後の組織 GABA 含有量の増加

組織	GABA 含有量 (μmoles/g*)		増加率 (%)
	4 分後**	1 時間後**	
小脳皮質	1.17	1.70	44
脊髄	0.47	0.65	38

* 新鮮組織 1g 当り.
** 生体から取り出してから 0.1N HCl 中に入れるまでの時間.

(2)遊離した神経細胞の GABA 含有量の測定。

上記の組織切片を 0.1% brilliant blue 6B - Locke液で染色し，各種の神経細胞を Hydén の方法[5]にならって遊離した。先端約 1 μ の硝子棒を手に保持して目的とする神経細胞を突きさし，次いでこれを周囲組織から引き上げるようにして細胞を遊離した。遊離した単一神経細胞をキシロール中で顕微鏡（200 x）を用いて観察し，細胞が比較的きれいに遊離されていることを確かめた。細胞周囲の附着組織の量が多い場合には測定から除いた。キシロール中で観察を行ったのは GABA がキシロールに不溶であって，観察の間に GABA が周囲の液中に失われることがないからである[13]。細胞の確認のためには brilliant blue よりも methylene blue で染色した方が有利であるが，methylene blue は上に述べた理由で用いなかった。次に遊離した神経細胞の顕微鏡写真をとり，体積の測

定に用いた。細胞の体積の計算には最長径とこれに直角の短径の最大値を測定し，長径を軸とした回転楕円体とみなして計算を行った。観察を終った細胞は乾燥器中に移し，真空ポンプで減圧した中に保存した。以上の操作はすべて室温中で行い，組織を生体から摘出してから細胞を乾燥器中におき減圧を始めるまでに要した時間は30分以下であった。

真空中に24時間以上保存して乾燥した細胞を硝子棒についたままミクロマニプレーターで保持し，双眼顕微鏡下に0.1 ml小試験管底部にとった0.14 µl 0.1N HCl中に移した。細胞を1個ないし5個HCl中に入れた試験管を乾燥器中 3°Cに保存し，抽出液の水およびHClを除去した。更に測定直前に減圧により資料を乾燥した。

資料を含んだ小試験管にGABA - glutamic transaminaseおよびsuccinic semialdehyde dehydrogenase (GABAase)を含む酵素反応液[4,14] 0.14 µlを加え，別に資料を含まない小試験管には既知量のGABAを含む酵素反応液を同量とり，これらを38°C 30分間保温した。生成したNADPH量をLowryらの酵素的循環法[9]によって定量した。定量法の詳細はすでに昨年報告したので省略する[14]。通常1回の測定には資料として8検体，標準曲線のために8検体(0, 7, 14, 28 x 10^{-14} moles GABA)の定量を並行して行った。

上記の方法で測定し得る最低のGABA量は現在の所1.6 x 10^{-14} moles程度である。0.14 µl 0.1N HClは極く軽度にblankを増加させた(0.7 - 1.0 x 10^{-14} moles GABA に相当)ので，この補正を行った。最初のGABAase反応液0.14 µl中に含まれる組織量は0.5 µg以下であって，この位の組織量ではtissue blankおよびinternal standardについての補正を行う必要のないことを予め予備実験で確めた。

実験結果

最初に遊離神経細胞との比較のために，それぞれの細胞が存在する部位の組織の平均GABA含有量を測定した(表2)。脊髄前角のGABA含有量はGrahamら[3]がネコで得た結果に一致する。大脳皮質，小脳皮質，小脳核のGABA含有量はLovellら[8]がウシで得た値よりやや低い。いずれにしても脊髄神経節を除く諸組織の平均GABA濃度は1-2 µmoles/gである。

表3は3 - 5個の遊離神経細胞を集めて1検体とし測定を行った結果を示している。脊髄神経節細胞，脊髄運動ニューロンのGABA含有量は低く，大脳皮質Betz細胞は中等度，小脳皮質Purkinje細胞，小脳核の神経細胞は高濃度のGABAを含んでいる。

表4は遊離神経細胞1個ずつについて測定を行った結果である。最も著しい事実はDeiters細胞と脊髄運動ニューロンの対照であって，両者はほぼ同じ大きさの細胞であるが，これまでに行った8個の運動ニューロンはすべて低濃度のGABA (0 - 1.5 mM)を含有しているのに対して，7個のDeitersニューロンはすべて高濃度(4.4 - 13.6 mM)のGABAを含有していることが示さ

表2 ネコ中枢神経系の諸部位のGABA含有量

組織	GABA 含有量 (µmoles/g)*
大脳皮質	1.4 ± 0.1 (5)
小脳皮質	1.0 ± 0.1 (4)
小脳核	1.8 ± 0.2 (5)
Deiters核	1.6 ± 0.2 (2)
脊髄前角	1.0 ± 0.1 (6)
脊髄神経節	0.06 以下 (2)

*平均値および平均値のS.D.
( )内は例数.

れた。この他，大脳皮質Betz細胞は中等度，小脳核の神経細胞，小脳皮質のPurkinje細胞は高濃度にGABAを含有している。Betz細胞，Purkinje細胞の場合は特に1個の細胞に含まれるGABAの量は測定の下限に近いため個々の測定値の信頼度は低くなる。併しいずれの細胞についても1個ずつ行った測定の平均値（表4）と細胞を集めて行った測定の平均値（表3）はほぼ一致している。

表3　遊離神経細胞のGABA含有量の測定。各種の神経細胞を3-5個ずつ集めて1検体とし測定を行った。

細胞の種類	細胞1個当りのGABA ($\times 10^{-14}$ moles)	細胞の体積の平均 ($\times 10^{-12}$ l)	GABA濃度 (mM)*
大脳皮質Betz細胞	1.6	8.0	2.0±0.5 (3)
小脳皮質Purkinje細胞	2.1	4.1	5.5±1.1 (5)
小脳核神経細胞	5.6	8.0	7.5±1.1 (4)
脊髄運動ニューロン	2.4	24.1	0.9±0.1 (6)
脊髄神経節細胞	0.8	70.1	0.2±0.1 (2)

* 平均値および平均値のS.D.
（ ）内は例数。

考察

本実験において遊離神経細胞と呼んだものは正確には目標とする細胞体の他にこれに附着する神経終末，さらには周囲のグリア，神経線維，小神経細胞をも含む可能性のあることを考慮する必要がある。従って遊離神経細胞のGABA濃度として表3，4に

表4　単一神経細胞のGABA含有量

大脳皮質Betz細胞			小脳皮質Purkinje細胞			小脳核神経細胞		
GABA量 $\times 10^{-14}$ moles	体積 $\times 10^{-12}$ l	濃度 mM	GABA量 $\times 10^{-14}$ moles	体積 $\times 10^{-12}$ l	濃度 mM	GABA量 $\times 10^{-14}$ moles	体積 $\times 10^{-12}$ l	濃度 mM
2.3	8.9	2.6	2.4	4.8	5.0	6.5	5.8	11.2
2.1	10.4	2.0	2.2	6.0	3.7	6.7	11.2	6.0
			5.5	5.7	9.6	1.8	4.3	4.2
			4.5	6.0	7.5	7.8	8.2	9.5
						1.3	4.9	2.7
平均 2.2	9.7	2.3±0.3	3.7	5.6	6.5±1.3	4.8	6.9	6.7±1.6

Deiters ニューロン			脊髄運動ニューロン		
GABA量	体積	濃度	GABA量	体積	濃度
4.6	6.8	6.8	0	32.4	0
8.6	19.6	4.4	1.1	38.4	0.3
31.5	25.4	12.4	1.6	16.3	1.0
20.1	14.8	13.6	4.8	33.6	1.4
16.5	20.0	8.3	3.6	24.6	1.5
18.5	26.2	7.1	6.8	50.8	1.3
43.3	32.7	13.2	2.5	36.8	0.7
			1.8	19.8	0.9
平均 20.4	20.8	9.4±1.4	2.8	31.6	0.9±0.2

示した数値は，細胞体とこれに附着する周囲組織の平均GABA濃度を意味するものである。ただし遊離した運動ニューロン，Purkinje細胞の体積（表3，4）がin situで測定したそれぞれの体積の値に近いかまたはこれよりむしろ小さいことは，周囲組織の附着が軽度であることを示唆している。いずれにしても実験結果から結論し得ることは運動ニューロン，脊髄神経節細胞，大脳皮質Betz細胞の細胞体を含むその附近のGABA濃度はこれらの細胞が存在する組織の平均GABA濃度（表2）に近いが，Purkinje細胞，小脳核の神経細胞，Deitersニューロンの細胞体附近のGABA濃度はそれぞれの細胞が存在する組織の平均GABA濃度よりかなり高いことである。

甲殻類の神経系においてはGABAを高濃度に含むニューロンの機能は抑制性であって，その伝達物質はGABAであることが知られている[6,13]。従って哺乳類の中枢神経系でも同じことが言えるかどうかは興味ある問題である。本実験で測定を行った細胞の中，Purkinje細胞は抑制性ニューロンであることが知られ[1]，またその伝達物質がGABAであることが示唆されているが[11,12]，それ以外の細胞はすべて興奮性ニューロンと考えられている[1,10]。併し小脳核の神経細胞，Deiters細胞に対してはPurkinje細胞の軸索が抑制性シナプスを形成し[1]，またBetz細胞上に形成される抑制性シナプスもGABAを伝達物質とすることが示唆されている[7]。従って遊離神経細胞のGABA含量として測定された表3，4の結果を「GABAがそれを伝達物質とする抑制性ニューロンに高濃度に存在する」という仮説に基ずいて説明することは可能であるが，この仮説の当否については今後の研究に待たねばならない。

文　献

1) Eccles, J. C., Ito, M. & Szentágothai, J.: The Cerebellum as a Neuronal Machine. Springer, New York(1967)

2) Elliott, K. A. C., Tariq Khan. R., Bilodeau, F. & Lovell, R. A.: Canad.J. Biochem. 43,407 (1965)

3) Graham, Jr., L. T., Shank, R. P., Werman, R. & Aprison, M. H.: J. Neurochem. 14, 465 (1967)

4) Hirsch, H. E. & Robins, E.: J. Neurochem. 9, 63, (1962)

5) Hydén, H.: Nature, 184, 433 (1959)

6) Kravitz, E. A., Kuffler, S. W. & Potter, D.D.: J. Neurophysiol. 26, 739 (1963)

7) Krnjević, K. & Schwartz, S.: Exp. Brain Res. 3, 320, (1967)

8) Lovell, R. A. & Elliott, K. A. C.: J. Neurochem. 10, 479 (1963)

9) Lowry, O. H., Passonneau, J. V., Schulz, D. W. & Rock, M. K.: J. Biol. Chem. 236, 2746 (1961)

10) Lund, S. & Pompeiano, O.: Acta physiol. scand. 73,1 (1968)

11) Obata, K., Ito M., Ochi, R.& Sato, N.: Exp. Brain Res. 4, 43, (1967)

12) Obata, K. & Takeda, K.: J. Neurochem. 16, 1043, (1969)

13) Otsuka, M., Kravitz, E. A. & Potter, D. D.: J. Neurophysiol. 30, 725 (1967)

14) 大塚正徳，田中百合子，小幡邦彦：神経化学7 Suppl. 67 (1968)

11. 高グリシン血症における代謝障害

多田啓也・成沢邦昭・荒川雅男
（東北大・医・小児）

高グリシン血症は1961年 Childs 及び Nyhan ら(2)によって最初に報告された先天性アミノ酸代謝異常症であり，血中，尿中および髄液中グリシン濃度の著明な上昇を特徴的所見とする．本邦では多田および安藤らが1963年最初の症例を見出している(9,10)．現在まで米国，日本，カナダ，オランダ，ドイツ，スイス等世界各国から相次いで症例が発見されているが未だ代謝障害の部位は明らかにされていない．臨床症状から2つの型すなわちケトージスを伴う型と伴わない型とに分けられており，前者は周期的に起るケトージス発作が特徴的であり多くは生後間もなく死亡する予後不良の型で生き残った例では発育障害が著明である．後者はケトージス発作を欠き痙攣や智能障碍を主症状とする(11)．

1968年 Lindbald ら(4)はメチルマロン酸血症において屢々血中グリシンの上昇が見られることおよびメチルマロン酸血症とケトージス型の高グリシン血症との臨床症状が類似することから両者は同一疾患ではないかと推測した．ところが Morrow 及び Nyhan らは両疾患の症例を詳細に検討した結果，高グリシン血症の患者はメチルマロン酸の排泄は見られず両者は全く別個の疾患であることを証明した(5)．又メチルマロン酸血症にみられる血中グリシンの上昇は持続的ではなく，一方高グリシン血症ではその上昇は常に認められる．

斯くして高グリシン血症は恐らくグリシン代謝の何れかの block 例えばグリシン→セリンの過程の障害が推測されてはいるが決定的 evidence が得られていなかった．

演者らは最近経験した高グリシン血症（非ケトージス型）の症例について生化学的検索を行い本症の primary lesion が glycine cleavage reaction の障害であることを証明し得た．

症例は1才の女児，満期安産で生れ新生児期も順調に経過した．7ケ月の時最初の痙攣発作があって以来患者は屢々全身痙攣の発作を繰返した．入院時（1才）身体発育は略正常であったが精神発達遅延が著明であり周囲に対して無関心，お坐りも寝返りも出来ない，四肢は hypotonic で健反射は減弱を示した．routine 検査では軽度の貧血および白血球減少（4100/mm³）を認める他，特記すべき所見はない．

尿アミノ酸の二次元薄層クロマトグラフィーによりグリシンの著明な増量が見出され次いで血清グリシンの上昇により高グリシン血症の診断が確立した．表1は患者の血清アミノ酸パターンでありグリシンの著増（10.7 mg/dl）を認める以外にはセリンを含めて他のアミノ酸は概ね正常範囲にある．その後約1年にわたり頻回に血清グリシン値を測定しているが常に高値を示している．

次にグリシン代謝に関係して以下の定量を行った．血清葉酸値（L. casei）正常範囲，ヒスチジン負荷後の FIGLU 排泄量：正常範囲，赤血球 GOT 活性（血中 PALP 量と平行するといわれる）正常範囲，血中アンモニア値：正常，血中クレアチン：正常範囲，血中グルタチオン：正常範囲，尿中 oxalic acid 排泄値，尿中メチルマロン酸排泄(−)，

さてかくの如くグリシンの著明な増量を来すには主要なグリシン代謝経路のblockを考えるのが妥当であろう。

現在 Glycine catabolism は

① Glycine ⟷ Serine → Pyruvate → TCA cycle
glycine が serine hydroxymethylase の作用により serine に転化し、更に serine dehydratase により pyruvate となり TCA cycle に入り終局的には CO_2 と H_2O に分解する経路。

② Glycine → CH_2-THF + CO_2 + NH_3 (glycine cleavage reaction)
glycin の直接の分解経路で C_1 と CO_2 と NH_3 を生ずる反応。in vitro では此の反応に続いて CH_2-THF が別の glycine 分子と反応し (serine hydroxymethylase による反応) serine を生ずる。即ち2分子のグリシンから1分子のセリンを生ずることとなる。

③ Glycine → Glyoxylate → CO_2 + Formate or Oxalate
glycine oxidase 或いは glycine transaminase の作用により glyoxylate に入り次いで oxalate or formate に転化する経路。

④ Succinate-glycine cycle or Aminoacetone cycle
glycine が succinyl-CoA と縮合し δ-aminolevulinate になる経路、或いは acetyl-CoA と縮合し aminoacetone を生ずる経路がある。

この中で③と④とは minor pathway であり血中グリシン値の著増を来す代謝障害の部位とは考え難い。①と②では生理的状態に於て何れが glycine catabolism の major pathway であるか明らかでないが、この何れかの block が高グリシン血症の障害部位であると思われる。

表1. 高グリシン血症における血清アミノ酸値 (mg/dl)

アミノ酸	患者	正常範囲
アスパラギン酸	0.34	痕跡～0.48
スレオニン	0.91	0.37～1.05
セリン	1.51	0.85～2.40
グルタミン	3.07	1.96～3.44
プロリン	1.27	1.01～2.71
グルタミン酸	0.65	0.66～2.19
グリシン	10.70	1.23～3.44
アラニン	1.95	1.30～3.91
バリン	1.43	0.94～2.87
メチオニン	0.31	痕跡～0.30
イソロイシン	0.38	0.28～0.94
ロイシン	0.81	0.79～1.53
チロジン	0.63	0.36～1.25
フェニルアラニン	0.52	0.50～1.14
リジン	4.68	1.10～3.74
ヒスチジン	0.59	0.33～1.05

此の推測を確めるべく高グリシン血症患者から得た肝組織を用い以下の検索を行った。

方法。biopsy により得た約1gの肝組織を直ちに9倍量の 0.1 M KCl-0.05 M potassium phosphate buffer (pH 7.4) にて ホモジナイズ。このホモジネートの一部を 30,000×g にて 120分間遠心しその上清を用い serine hydroxymethylase 並びに serine dehydratase の活性測定を行った。夫々 Bertino らの方法 (1) 及び Breedland らの方法 (3) による。glycine cleavage reaction は ホモジネートを用い glycine-1-C^{14} を基質とし 37°C, 60分間 aerobic にインクベートし $C^{14}O_2$ の産生及びセリンへの ^{14}C の導入を測定した。同様に glycine-2-C^{14} を基質とし $C^{14}O_2$ 及びセリンへの C^{14} の導入を測定した。対照肝は肝障害を伴わない外科患者の開腹手術の際得られた。

結果は表2,3に示す如くであり、患者肝の serine hydroxymethylase 並びに serine dehydratase 活性は全く正常であった。すなわち前述の pathway ① は本症で障害されていないことが判明した。因みに患者白血球を用いて serine hydroxymethylase 活性を

測定した成績もやはり正常であった。

一方 glycine-1-C^{14} → $C^{14}O_2$ は患者肝では対照に比し著明な低値を(1/10～1/30)示し，pyridoxal phosphate を加えても活性の回復は認められなかった。それに対し glycine-2-C^{14} → $C^{14}O_2$ は対照肝と患者肝で有意の差は認められなかった。対照肝では glycine-2-C^{14} から生成される C^{14}-serine の量は glycine-1-C^{14} から生成される serine-C^{14} のそれと2倍であった。之は Richert ら によって鳩の肝で(6)，菊地ら(8)によって鼠肝ミトコンドリヤにおいて証明された glycine cleavage reaction (前述の②) が人の肝に於ても存在することを示す。患者肝では glycine-1-C^{14} から生成される $C^{14}O_2$ が対照肝の1/10～1/30という低値を示しセリンへの C^{14} の導入も glycine-1-C^{14} 及び glycine-2-C^{14} のいづれの場合でも対照肝に比し著明な低値を示した(表3)。しかも患肝では glycine-1-C^{14} 及び glycine-2-C^{14} から生成される $C^{14}O_2$ 量が略等しく(対照肝では10：1 or 15：1)，又セリンに導入される C^{14} が glycine-1-C^{14} からでも glycine-2-C^{14} からでも略等しい値を示した(対照肝では前述の如く略1：2)。

表2. 高グリシン血症患者の肝における serine hydroxymethylase 及び serine dehydratase 活性

	Serine hydroxymethylase (μmoles of serine cleaved per mg of protein/hr)	Serine dehydratase (μmoles of serine deaminated per mg of protein/hr)
患者	2.37	27.9
対照 A	1.48	25.4
〃 B	1.68	19.6
〃 C	1.76	23.8
〃 D	2.23	31.5
〃 E	1.67	33.5

これらの data は患者肝では glycine cleavage reaction が欠損していることを示すものである。

患者肝に於て少量ながら認められた glycine-1-C^{14} 及び glycine-2-C^{14} からの $C^{14}O_2$ は主として serine hydroxymethylase により前述の①の経路で産生したものと理解することが出来る。

かくの如く本症患者に於て serine hydroxymethylase 及び serine dehydratase 活性が正常であるにも拘らず血中グリシンの著明な上昇を示すという事実は，前述の①の経路 (glycine → serine → pyruvate → TCA cycle) の route が glycine catabolism の major route では

表3. 高グリシン血症肝における glycine-1-C^{14} 及び glycine-2-C^{14} からの $C^{14}O_2$ 生成ならびに serine 生成

	$C^{14}O_2$ formed from glycine-C^{14} (cpm/10mg protein/hr)		C^{14}-serine formed from glycine-C^{14} (cpm/10mg protein/hr)	
Substrate	Glycine-1-C^{14}	Glycine-2-C^{14}	Glycine-1-C^{14}	Glycine-2-C^{14}
Patient	430	458	855	1060
Control A	3785	358	3838	8500
Control B	5683	358	5660	9410
Control C	8080	520	7240	12010
Control D	5480	530	5008	8190
Control E	5050	879	4170	7155

Note: Reaction mixtures contained in a final volume of 2 ml: 10 μmoles of ^{14}C-glycine (0.05 mc/mmole), 190 μmoles of KCl, 95 μmoles of potassium phosphate buffer (pH 7.4) and 1 ml of homogenates containing 12 to 13 mg of protein, respectively. Reactions were carried out in Warburg monametric flasks for 1 hr at 37° in air. Amounts of $^{14}CO_2$ and ^{14}C-serine formed were assayed as described previously(7).

なく，glycine cleavage reaction こそが glycine catabolism の生理的に主要な経路であることを示すものであろう．

治療的試みとして Leucovorin (N⁵-formyltetrahydrofolate) 投与を行った．Leucovorin は生体内で容易に methylen-THF に転化するため，Methylen-THF を供給することにより過剰のグリシンをセリンに転化せしめ (serine hydroxymethylase は豊富で正常であるため) グリシンの処理を行わせるという意図であった．すなわち毎日 Leucovorin 3 mg の注射を1週間試みたが治療前後で血清グリシン値の有意の変動は認められなかった．次に 30 mg の Leucovorin を生理的食塩水と混じて点滴静注 (30分間) し，その前後に血中グリシン値を測定すると 30分目に軽度ながら有意の低下が見られた．併し点滴中止後 30分後には元のレベルに復した．之等の事実はやはり serine hydroxymethylase 経由の route はグリシン分解の minor pathway であることを示唆するものであろう．

次に雪印乳業研究所試作のグリシン及びセリンを抜いた粉乳を用いて2週間患者に与えたが，血清グリシンは依然として高値を維持した．

結語，高グリシン血症患者から biopsy により得た肝組織を用いグリシン代謝を検索した結果，本症の primary lesion は glycine cleavage reaction を司る酵素の欠損であることを証明した．一方，本症患者の serine hydroxymethylase 及び serine dehydratase 活性が何れも正常であった．之等の成績から glycine catabolism の主要な経路は ~~glycine + THF → Methylen-THF + CO_2 + NH_3~~ により直接分解する経路であることが示唆される．

文献

1) Bertino, J. R., Simmons, B. et al., J. Biol. Chem., 237, 1314 (1962)
2) Childs, B., Nyhan, W. L. et al., Pediatrics, 27, 522 (1961)
3) Freedland, R. A., Avery, E. H., J. Biol. Chem., 239, 3357 (1964)
4) Lindbald, B., Lindbald, B. S. et al., Acta Pediat. Scand., 57, 417 (1968)
5) Morrow, G., Barness, L. A. et al., J. Pediat., 74, 680 (1969)
6) Richart, D. A., Amberg, R. et al., J. Biol. Chem., 237, 99 (1962)
7) Sato, T., Kochi, H., J. Biochem., 65, 77 (1969)
8) Sato, T., Motokawa, Y. et al., Biochem., Biophys. Res. Commun., 28, 495 (1967)
9) Tada, K., Ando, T. et al., Tohoku J. exper. Med., 80, 218 (1963)
10) 多田啓也，安藤敏幸，代謝，2, 896 (1965)
11) Ziter, F. A., Bray, P. R., Pediat. Res., 2, 250 (1968)

12. 躁うつ病のトリプトファン代謝

更井啓介・茅野政夫
（鳥大・医・神経精神）

そううつ病の病態生理学的研究においては，生体アミンをめぐって数多くの研究がなされた。Shawらは自殺したうつ病患者の脳内セロトニンが少ないことを報告し[2]，着者らはそう病患者の血中セロトニン濃度が高く，うつ病患者のそれが低いことを報告した[1]。これらのことから，うつ病患者の脳においてはセロトニンの生成が減少しており，そう病患者の脳では生成増加があるのではないかと推測される。この仮説に基づいて本研究を計画した。

そううつ病患者の脳を直接研究材料にすることは非常に困難であるから，間接的ではあるが，血液を材料として，セロトニンの前駆物質であるトリプトファンを負荷して，その代謝の一部を追究し，そううつ病患者の成績を正常者および精神分裂病患者の成績と比較することができたので，予備的段階ではあるがここに報告する。

研究対象および方法

対象となった躁うつ病患者は鳥取大学神経精神科および米子病院に1968年10月から1969年6月までに入院した患者で，未治療の内因性そう病新鮮群は10名で，男は3名，女は7名，年令は24～60才，平均45才である。回復期の内因性うつ病群は11名で，男は5名，女は6名で，女6名のうち2名は上記新鮮群から移行した症例で，年令は19～57才，平均42才である。躁病群は5名で，男2名，女3名で，5名中4名は循環躁うつ病で，うち2名はうつ病新鮮群にも入っていて，年令は22～60才，平均39才である。これらの患者を選ぶに当っては，内因性とするのに疑問のある症例，脳器質性疾患および全身性疾患を合併する症例はすべて除外した。

正常対照群は鳥取大学医学部の学生，職員および職員の家族から選び，男6名，女4名の計10名で，年令は22～66才，平均31才である。

精神病者の対照として，鳥取大学神経精神科に1969年3月から6月に入院中の分裂病者，男3名，女4名計7名が選ばれた。年令は18～38才，平均23才である。

なお食事は病院普通食（蛋白質／日量80g）が与えられた。

トリプトファン負荷日は朝は絶食させ，午前6時50分に採血した後，精製Lトリプトファンを体重1Kgあたり100mgを水約200mlとともに内服せしめ，8時，9時，11時に肘静脈より採血し，11時半に昼食をとらせ，15時（8時間後）に採血した。

躁うつ病患者に対しては，新鮮群では薬物療法を開始する以前にトリプトファン負荷を行ない，回復群では，負荷当日服薬を中断して行なった症例が多く，中には服薬中止後1週間して行なったものもある。躁病群のうち2例は服薬していない状態で検査ができたが，他の3例では管理上やむを得ず向精神薬を用い，負荷当日のみ服薬を中断した。分裂病群では7例中4例は服薬しない状態で，3例は負荷当日服薬を中断して行なった。

血液標本は遠沈により血漿を分離した後，測定まで凍結保存した。

トリプトファンの測定はDenckla & Deweyの蛍光測定法により，duplicateで行なった。

結　　果

1．空腹時トリプトファン血中濃度

10名の正常対照群の空腹時血中トリプトファン濃度は1.3±0.4（SE）μg/mlで，10名のうつ病新鮮群のそれは11.0±0.2（SE）μg/mlで，うつ病新鮮群では有意の差をもって低値を示した。5名の躁病群でも10.2±0.6（SE）μg/mlで，正常対照群より低値であった（$p<0.05$）。11名の回復期うつ病群の平均値は12.0±0.7μg/mlで，正常者との間に差はないので，回復期には正常に戻っていると思われる。7名の分裂病群では正常対照群との間に差はないが，うつ病新鮮群や躁病群より高値を示した（$p<0.05$）。

2．トリプトファン負荷後の血中トリプトファン濃度

全対象の成績を表1に示した。ただし，負荷後の値は増加率で示した。うつ病新鮮群と躁病群は正常対照群に比較して，トリプトファン負荷後のトリプトファン濃度の1時間値および2時間値が有意の差をもって高く（$p<0.05$），うつ病群と躁病群との間では有意差はなかった。以下トリプトファン負荷後の1時間値と2時間値について述べるが，うつ病新鮮群とうつ病回復群では後者が有意の差をもって低く，後者は正常対照群との間に差はなかった。（以上の関係は理解しやすいよう図1に示した）。分裂病群は正常対照群との間に差はなく，うつ病新鮮群や躁病群と比較すると，有意の差をもって低かった（$p<0.05$）。

なお，トリプトファン負荷前後における血中トリプトファン濃度と，年令，性差との間には一定の関係は見出さなかった。

考　　察

トリプトファンの体内代謝は多岐にわたるので，その血中濃度の高低に対する解釈は慎重でなければならないが，内因性躁うつ病患者においては，トリプトファン負荷前の血中トリプトファン濃度が，正常対照群のそれより低く，負荷後のそれは正常対照群に比して高かった。これは躁うつ病患者においてはトリプトファン負荷に対する忍容力が低下しているためではないかと推測される。

躁うつ病患者のトリプトファン代謝は，負荷前後の血中濃度からみるかぎり，すでに高橋ら[3]が発表したテロジンの負荷実験と類似の傾向がみられ，カテコールアミンとセロトニンを対比して考えると興味が深い。

現在尿中の2～3のトリプトファン代謝産物について，少数例ではあるが測定中である。将来トリプトファン水酸化酵素，トハイドロキシトリプトファン脱炭酸酵素などの活性に関しても検討を加えたい。

文　　献

1 Sarai, K. & Kayano, M.: The level and diurnal rhythm of serum serotonin in manic-depressive patients Folia psychiat. et neurol. jap., 22, 272–281, 1968

2 Shaw, D.M., Camps, F.E. and Eccleston, E.G.: Brit. J. Psychiat., 113, 1407–1411, 1967

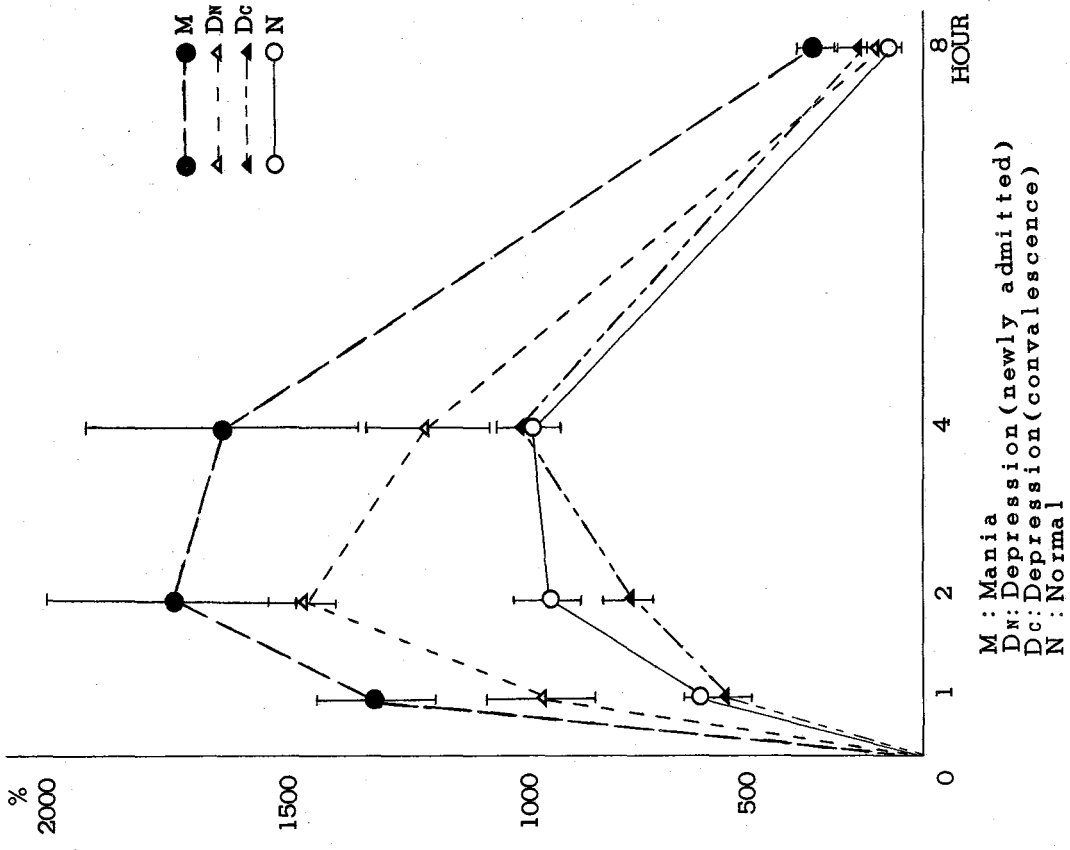
3 高橋良；白弘，町山幸輝，中村陸郎，金村元：躁うつ病のテロジン代謝，神経化学 7，Suppl，190～193，1968

表1　トリプトファン負荷後トリプトファン血中濃度

	No.	平均年令	空腹時ト血中濃度 (μg/ml)	ト負荷後血中ト濃度増加率			
				1時間	2時間	4時間	8時間
正常者	10	31	13.0	554	902	931	177
S.E		4.0	0.4	56	63	60	16
うつ病(新患)	10	45	11.0	942	1457	1154	202
S.E		3.2	0.2	120	75	119	26
うつ病(回復)	11	42	12.0	543	768	962	241
S.E		3.2	0.7	58	58	80	27
そう病	5	39	10.2	1281	1725	1587	307
S.E		5.7	0.6	140	337	336	47
分裂病	7	23	14.2	794	1017	869	215
S.E		2.8	1.1	209	272	157	70

注　ト.：トリプトファンの略
S.E：標準誤差

図1



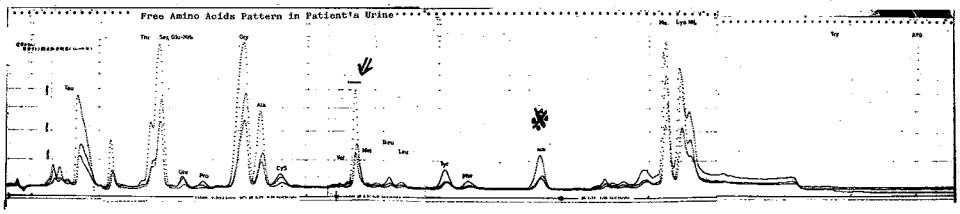
13. 高度な小頭症を伴う特異的なアミノ酸尿症の生化学的研究

松谷天星丸・永吉道子・斉藤郁子
塚田裕三　（脳性麻痺研・生化）
戸谷重雄・小野和郎（東京小児療育病院）

緒言：

私共は脳発育異常児におけるアミノ酸代謝異常の有無について検討をつづけているうちに，小頭症と診断された2才4ヶ月の女児の，尿中遊離アミノ酸の中に，アミノ酸自動分析装置で，シスタチオニンに一致する部位に大きなピークを見出した。(図1) そこでシスタチオニン尿症のうたがいの下に，一連の検索を行ったのでその経過について報告したい。

(図1)



⇊印 シスタチオニン　　※印 β-アミノイソ酪酸

患児の母親は妊娠時かなり悪阻が強く，7ヶ月頃まで続いたという以外は妊娠時の異常と思はれる事項はなく，正期分娩，安産であった。生下時体重 2,630 g，患児に同胞はなく，両親は血族結婚ではない。患児は脳血管写，脳気脳写にて脳実質の強度の萎縮変形とそれに伴う血管の異常走行，脳室の著明な変形が認められた。(1才4ヶ月時) 頭部レントゲン像では骨全体が小さいが，欠損は認められない。知能発育は殆んどなく，1才7ヶ月時におけるDQの測定では正常児の1~2箇程度の発育しか認められなかった。脳波は低電位，単調な基ソ波の中に突発的異常波がみられ，又左右差が認められた。起立歩行不能で鼻胃栄養で哺育されている。四肢はかなり強度の痙直があり，安静時に不随意反射の頻発がみられる。又筋電図上伸展反射によって屈筋，伸筋共にrigospasticである。心電図はほゞ正常，なほ小球性低色素性貧血がみとめられる。又聴力試験では高音域の聴力機能障害のパターンが示された。

実験方法，成績及び考按：

[I] シスタチオニン様物質の尿中排泄

アミノ酸の分析，測定には，アミノ酸自動分析装置— 柴田化学製，AA-600型，カラムの大きさ 0.2cm×100cm，又は日立 034型，カラムの大きさ 9mm×500mmを用い，何れも球状樹脂を使用した。

尿中遊離アミノ酸のパターンは，図1に示す如くで，この異常のピークは，他の検索中の0~7才までの乳幼児には認められないものであった。各時期を追ってその尿中排泄につき，アミノ酸自動分析装置により調べたところ，常に同一部位に大きなピークが検出された。このシスタチオニン様物質の排泄量は，表(1)に示す如く，2月，5月，9月(昭42年)に測定したものでは年間を通じてその量にはやゝ変動があることが認められた。　血中濃度は 0.46 mg/dl，

(表1)

各時期における尿中シスタチオニン様物質の排泄量

昭42. 2月16日	12.3 mg/24hrs.
〃 5月 9日	25.2
〃 9月14日	10.3
昭44 7月15日	32.2

脳脊髄液中には僅かに 0.042 mg/dl 認められるに過ぎなかった。(何れもカラムクロマトグラフィーによる測定値) 又尿中シスタチオニン排泄量を尿中排泄クレアチニン mg 当りに換算すると 1.42 mg であった。(44年7月) 表(2) 血中、脳脊髄液中の値は既に報告されている(1) 血中濃度 0.45 mg/dl, 脳脊髄液 0.021 mg/dl の値と非常に近い値を示すが私達の値がシスタチオニンか否かについてはなほ不明である。

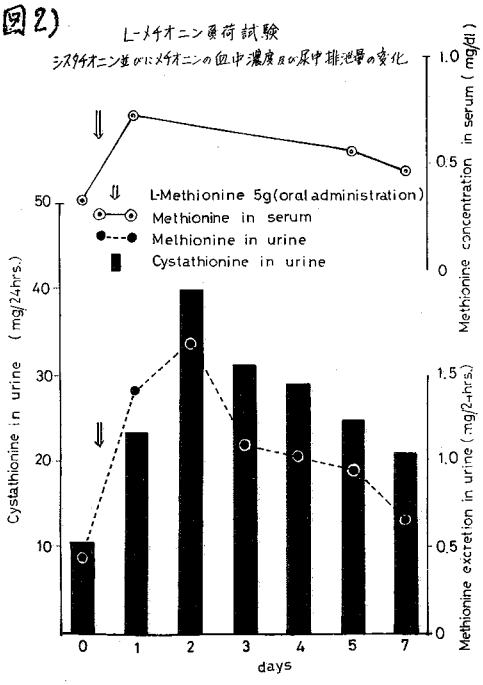
両親は尿中遊離アミノ酸の検索の結果では、患児にみとめられる様なシスタチオニン様物質の多量排泄は認められなかった。しかし両親共多量の尿中β-アミノイソ酪酸の排泄が認められ、又患児にもシスタチオニン様物質以外に、β-アミノイソ酪酸が 7.5 mg/day 程度尿中に排泄されるのが常に認められた。(図1)

[II] L-メチオニン負荷試験

Harris ら(2) に従って、L-メチオニン 5g を一日三回に分けて、鼻腔栄養のミルクに混じて、経鼻腔投与した。メチオニン投与開始と同時に蓄尿を行い、各24時間尿並びに血液について、遊離アミノ酸の分析、測定を行った。メチオニン投与前、シスタチオニン値は、10.3 mg/24hrs. に対し、投与後第1日目には 20.3 mg/24hrs. で約2倍の排泄増加がみられ、投与後第2日目には 39.1 mg/24hrs を示し、シスタチオニンの排泄は約3倍半の増加がみられ、投与後の経過中最大値を示した。投与後7日目にも 2.9 mg/24hrs. の値は尚投与前のなほ2倍以上の排泄が続いた。尿中メチオニンの排泄は、投与後2日目に最大値を示し、1.68 mg/24hrs. で投与前の値の約4倍の排泄増加がみとめられた。第7日目には 0.66 mg/24hrs. でほゞ投与前に近い値にまで降(図2)

タウリンの尿中排泄量は投与前の 9.98 mg/24hrs. に対し、投与後第2日目には 35.9 mg/24hrs に増加し、投与前の約3.5倍の排泄増加がみられた。尿中メチオニン、タウリンの排泄量の増減の経過はシスタチオニンのそれとほゞ平行した経過を示し、投与後第2日目に何れも、投与前の3.5倍の増加が示された。血中メチオニン濃度は図2の如く、投与前 0.32 mg/dl で、投与後24時間では 0.73 mg/dl で投与前の約2.5倍を示し、投与後7日目には 0.46 mg/dl でほゞ投与前の値に戻った。以上の結果は、Harris らの報告による、メチオニン投与後第5～9日に亘りシスタチオニンの尿中排泄量の増加が認められたこと、タウリンの排泄はシスタチオニンの増加曲線とは平行せず、一定の値を保つたという成績とはやゝ異る経過が示されたが、シスタチオニン排泄量の増加の割合は、本試験では約3.5倍を示し、この点では Harris らの約2.5倍の排泄量の増加に比し近い結果が得られた。

(図2)



〔Ⅲ〕ピリドキシンの効果

シスタチオニン分解酵素であるシスタチオナーゼの活性が，Vitamin B_6 に依存することが知られている。そこでピリドキシンのシスタチオニン尿中排泄量に及ぼす影響について検討した。Frimpter ら(1)に従って，ピリドキシン 50 mg/day 筋注，3日間連続投与では尿中シスタチオニン排泄量には影響はみられなかった。更に 100 mg/day に増量した場合には，尿中シスタチオニン排泄量は約30%の減少がみとめられた。表(2)

(表2)

Pyridoxine 投与に伴う尿中 Cystathionine 様物質の変化

Pyridoxine (mg / day) (intramuscularly)	Cystathionine (mg / 24 hrs.)	Cystathionine (mg / mg Creatinine)
None	34.4	1.42
Administration		
1st day 50	33.8	
2nd day 50	43.2	
3rd day 50	31.8	
4th day 100	21.8	

Frimpter(1)らの報告では，成人で 90 mg/day，3日間連続投与にて尿中シスタチオニン排泄量の著明の減少をみとめているが，本試験では 50 mg/day の投与で全く影響がないところから，本例ではシスタチオナーゼが Vitamin B_6 に無反応であるのか，又は全く異った代謝系の異常によるものである可能性も考えられ，カラムクロマトグラフィーによって確認したピークがシスタチオニンか否かに疑義が持たれ，更にこの物質の化学的同定を行うため次の実験を行った。

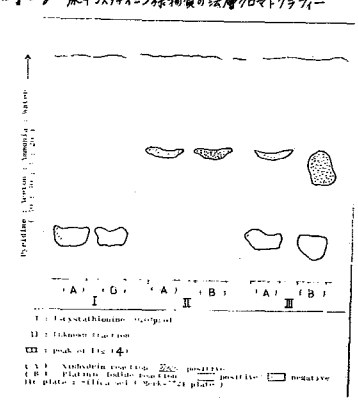
〔Ⅳ〕シスタチオニンとの化学的性状の相異

そこで，カラムクロマトグラフィーにより，患児新鮮尿より異常ピークを分画採取しこのピークについて化学的検索を行った。

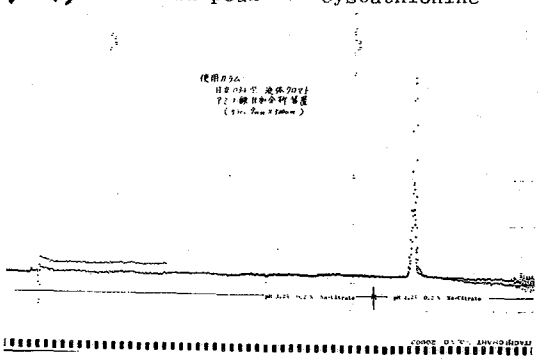
(1) 分画採取したシスタチオニン様物質の薄層クロマトグラフィー

分画採取した異常ピークを薄層クロマトシート（Merk社製・シリカゲルガラスプレート）にて溶媒（ピリジン：アセトン：アンモニア水 50:30:5:20）を用い一次元展開を行った。Fig(3)-Ⅱに示す如く，カラムで採取したピークはニンヒドリン反応陽性，platinic-iodide反応陰性の単一スポットを示した。しかしシスタチオニンとは異るRf値を示すところから，更にこのピークのシスタチオニンとして計算した濃度と，ほぼ同程度のシスタチオニンを混合して再びカラムクロマトグラフィーを行った。その結果は Fig(4) に示す如く，両者は全く同一のピークを示すに至った。このピークを更に薄層クロマトグラフィーにて前記と同様の溶媒を用いて展開すると，カラムの上では単一のピークとして認められた物質は，薄層クロマトの上では二つのニンヒドリン陽性スポットを示した。又，platinic iodide を用いて行った薄層クロマトシート上での含硫アミノ酸検出反応では Fig(3) Ⅲに示す如く，シスタチオニンは陽性，本物質は陰性を示した。

(図3) 尿中シスタチオニン様物質の薄層クロマトグラフィー



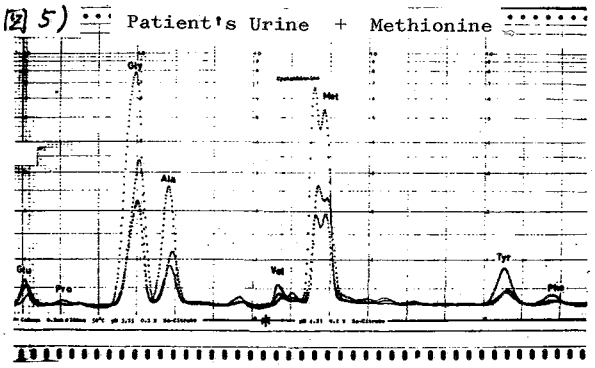
(図4) ‥ Unknown peak + Cystathionine ‥‥‥



(2) 異常ピークとメチオニンとの差異

又患者諸解尿にメチオニンを添加し，カラムクロマトグラフィーを行ったのがFig( )である。カラムの上ではメチオニンとは明らかに異る物質であることが確認された。

(図5)



(3) 異常ピークの加水分解

異常ピークをシスタチオニンとして計算した0.17μmol相当量を6N-HCl中にて封管，110°C，24時間加水分解を行ったものについて，カラムクロマトグラフィーを行った結果では，なほシスタチオニンに一致する部位に一つのピークを得るにとどまり，6N-HClではこの物質は作用をうけないことが明らかとなった。この点では，この物質はシスタチオニンと似た態度が示された。

(4) "Cystathionine sulfoxid" のカラムクロマトグラフィー

シスタチオニンに過酸化水素を作用させ "Cystathionine sulfoxid" とし，これをカラムクロマトグラフィーにより分析した。そのカラムのパターンからは本物質が "Cystathionine sulfoxid" でないことが確められた。(図5)

(5) 尿のニトロプルシットソーダ反応　ニトロプルシットソーダ法による患児の尿と対照尿との間に定量的差異は認められなかった。

以上のことから，本物質はシスタチオニンとは異るもので，ニンヒドリン陽性の低分子の物質であることが考えられ，物質の同定は目下検討中である。

要約：(1)強度の小頭症と診断された4才2ケ月の女児で，シスタチオニン様物質の尿中排泄が多量にみられる代謝異常症の一例を見出した。(2)メチオニン負荷試験により投与後2日目にシスタチオニンの尿中排泄量は最大値を示し，投与前の約3.5倍の排泄量の増加がみとめられた。投与後7日目でも尿中排泄量はなほ高い値を維持した。同時に測定したタウリン，メチオニンの尿中排泄量は投与前の約3倍の増加が認められ投与後2日目に最大値を示し，その経過はシスタチオニンの変動と同様の消長を示した。(3)ピリドキシンの効果．50 mg/day 筋注では尿中シスタチオニンの排泄量には影響はみられなかった．更にピリドキシン100 mg/day の大量投与の場合には約30%の減少がみられた。(4)本物質はカラムクロマトグラフィーの上からはシスタチオニンと完全に一致するピークを示すが，薄層クロマトグラフィーではシスタチオニンと明らかに異るRf値を示した。(5)本物質はニンヒドリン陽性であるが，Platinic iodide反応には陰性であった。又 "Cystathionine sulfoxid" でないことを確めた。(6)ニトロプルシットソーダ反応では患児尿と対照尿との間に定量的差異は認められなかった。(7) 6N-HCl, 110°, 24時間の加水分解では本物質は全く作用をうけなかった。本物質の同定については目下検討中である．又本物質の生成過程や腺美質の形成子全との関連についても現在のところ不明である。

終りに御協力を頂いた東邦大学医学部第二生理学教室の皆様に深く感謝致します。

文献：1) G.W. Frimpter, A. Haymovitz and M. Horwith: New Eng. J. Med, 268, 333 (1963)
2) H. Harris, L.S. Penrose and D.H.H. Thomas: Ann. Human Genet., 23, 442 (1959)
3) G.W. Frimpter et al: Amer. J. Dis. Child, 113, 115 (1967)
4) Thomas L. Perry et al: New Eng. J. Med., 276, 721 (1967)

14. アクリルアマイドによる神経障害の生化学的研究

橋本和夫（阪府立公衆衛生研）

アクリルアマイド・モノマー $CH_2=CHCONH_2$ は，各種実験動物および人間に，後肢麻痺を主とする末梢神経障害をおこすことが知られてきている。[3][8][9][16][17][18]

この物質による中毒の1つの特徴は，Kuperman[17]によって示されたように，蓄積性を示すことである。Fullerton and Barnes[9]はラットで，長尺の神経の末端部に，著しい軸索変性と，附随的と考えられる脱髄の混合像をみ，これがCavanagh[5]のいう，所謂"dying back" process と似ることから，神経細胞での何らかの代謝障害を想定している。この代謝障害に関て，猪股ら[14]はポルフィリン代謝との関連で追求している。

演者はこれら先人の成績をもとに，アクリルアマイドによっておこる末梢神経障害を，中枢での何らかの代謝障害にもとづくという観点にたって，本物質の呼吸代謝への影響，SHとの結合性，生体内分布，蛋白へのアミノ酸の取込みへの影響などを調べた。これらの結果を報告する。

実験方法：

動物はすべてポートン系白ネズミの雄性を用いた。大脳皮質切片の呼吸代謝は，Cremer[6]の方法に従って調べた。乳酸およびピルビン酸の定量は，Hohost[13]およびAldridge and Cremer[1]の方法によった。アクリルアマイド・モノマーの定量は，二重結合の沃度滴定によった。組織内非蛋白性SHおよび蛋白性SHの定量は，Ellmanの方法[7]およびアンペロ滴定法[4]によった。アクリルアマイドの組織内分布は，この1-^{14}C化合物を合成し，これによって調べた。神経蛋白のアミノ酸分析は，分離精製した蛋白資料を6NHCl，108℃のもと24時間加水分解したのち，Hamilton[10]の条件に準じ，Techniconオートアナライザーでおこなった。大脳の細胞分画は，Aldridge and Johnson[2]の方法によった。大脳および肝の核酸はKirby[15]の方法を用いた。神経蛋白へのアミノ酸の取込みは，大脳，背髄，坐骨神経などを in vitro で(U)^{14}C-L-リジンまたは^{35}S-メチオニンとincubateしたのち，蛋白を分離精製し，この中のカウントを測定することにより調べた。

結果：

1，脳呼吸代謝におよぼす影響(in vitro)；アクリルアマイド存在下，クレーブス・リンガー緩衝液中での，大脳皮質切片での呼吸代謝は，表1に示すように対照値と変わらない。2.4DNP添加により呼吸亢進の状態下でも同様である。急性または慢性中毒ラットの大脳皮質切片の呼吸代謝も対照値と異ならない。これらの成績は，類似構造を持つアクリルニトリルの影響と異なり

表1 大脳皮質切片の呼吸代謝におよぼすアクリルアマイドの影響

Acrylamide	O_2 uptake μl/hr/mg	Pyruvic acid μmole/g	Lactic acid μmole/g
Nil	13.7±0.2	20.5±0.5	263±6
10^{-2}M	14.3±0.7	20.9±1.1	275±12
+2,4-DNP Nil	26.4±1.4	29.6±3.2	612±19
3×10^{-5}M 10^{-2}M	26.6±0.9	27.4±1.2	560±33
24hr after 200mg/kg	15.2±0.5	20.1±1.0	298±14
24hr after 200mg/kg + 2,4-DNP	25.6±1.0	25.8±1.8	429±43
20 days after feeding with 400ppm	12.4±0.3	18.3±1.3	266±12

[11][12]，両者の大脳への作用機作の相違を推定させる。

2，脳および背髄の非蛋白SHに対する作用；アクリルアマイドのもつ二重結合は，活性水素原子，とくにSHなどと活発に反応することが知られている。生体内でのSHとの反応性をみるため，アクリルアマイド1回経口投与後の各組織中の非蛋白性SH（大部分はグルタチオンに由来すると考えられる）の変動を調べた。図1の様に肝，大脳，背髄いずれの組織でもSHは減少する。肝では減少度が大きいが，回復も速い。脳，および背髄では，減少度は肝に比べて小さいが，回復がおくれる。回復速度の違いは，各組織でのグルタチオンの合成能と関連があると考えられる。

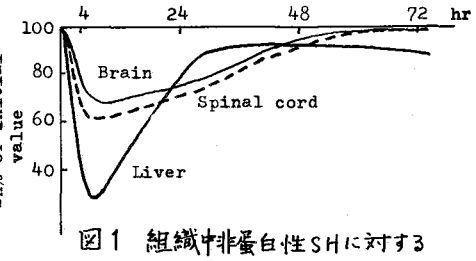


図1 組織中非蛋白性SHに対するアクリルアマイド1回投与の影響

アクリルアマイド繰返し経口投与の際の，SHの変動をみるため，1回投与後減少したSHが回復したと考えられる期間3日をおいて，繰返し投与し，後肢の麻痺をきたすまで続けた。この際のSHは図2に示すごとく，正常範囲にとどまり，減少の蓄積性が認められなかった。この結果から，1回投与後みられたSH減少は一過性のもので，後肢麻痺との関連性は疑わしいと考えられる。

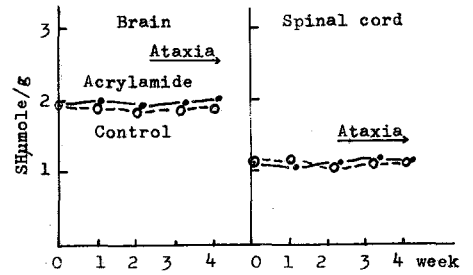


図2 神経組織中非蛋白SHに対するアクリルアマイド繰返し投与の影響

3，アクリルアマイドの組織内分布；この物質の体内分布，とくに神経系内での分布状態とその時間経過をみるため，1-^{14}C化合物を用いて調べた。表2にみるように，1回投与後2週間でもかなりのカウントが各組織にみられ，このカウントの大部分は，蛋白成分中に認められる。肝にも大量のカウントが検出されるが，その減少速度は神経系のそれより速い。酸溶性，脂質，核酸の各成分についてもそれぞれ測定したが，いずれも蛋白成分中のカウントに比べてわずかであった。

表2 神経組織中へのアクリルアマイドの分布とその時間経過

Time after a single dose	Tissue	Homogenate mμmole/g	Free and soluble bound mμmole/g	Protein bound mμmole/g
24hrs	Brain	262	105	156
	Spinal cord	175	44	110
	Sciatic N.	149	60	-
	Liver	368	70	323
4days	Brain	151	20	95
	Spinal cord	131	19	89
	Sciatic N.	100	16	89
	Liver	142	20	158
14days	Brain	72	3.3	49
	Spinal cord	71	2.8	44
	Sciatic N.	57	0.0	-
	Liver	57	1.6	61

4，蛋白との結合部位；アクリルアマイドの組織蛋白，とくに神経蛋白での結合部位を知るため，大脳ホモジェネートを用いて，その蛋白性SHへのアクリルアマイドの結合性を調べた。図3に示すように，大脳蛋白性SHは時間とともに減少するが，アンペロ滴定法によりこれを証明するには高濃度のアクリルアマイドを必要とする。

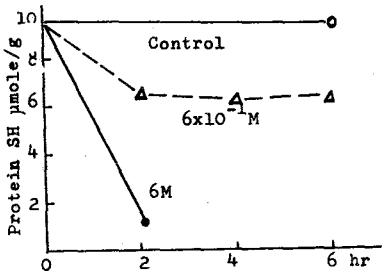


図3 脳蛋白性SHとアクリルアマイドとの反応

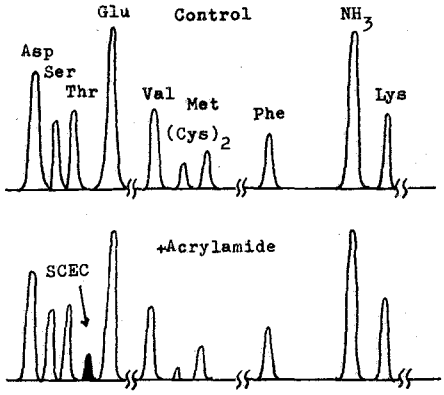


図4 脳蛋白とアクリルアマイドとの反応後のアミノ酸分析

この反応後，ホモジェネートより蛋白を分離精製し，加水分解後アミノ酸分析を行なった結果が図4である。システインのピークは減少し，ThrとGluの間に新しいピークがあらわれた。これは推定物質を用いた添加同定実験により，S-Carboxyethylcysteine，すなわち，システィンがアクリルアマイドによりアルキル化を受けて生じた物質であることが証明された。この他アルキル化の可能性のあるアミノ酸との結合は見出されなかった。

5，類似構造物との比較；アクリルアマイドが非蛋白性および蛋白質SHと結合することが，以上の諸成績により明らかになった。そこで，二重結合を残し，その他の基を種々修飾した構造類似化合物を合成し，これらの，in vitroでのGSHとの反応性および毒性を比較した。表3はその一部の結果を示す。アクリルアマイドはGSHとの反応性，急性毒性(LD_{50})において中間に位する。神経麻痺を起こさせるものとしては特異な存在であることも明らかとなった。比較に用いたもののうち，N-ハイドロオキシメチルアクリルアマイドは，GSHとの反応性でアクリルアマイドと同じであるが，慢性毒性では全く異なることが示された。

表3 アクリルアマイドおよび構造類似物の還元グルタチオンとの反応性および慢性毒性比較

Compound	Formula	$k(l.mole^{-1}.min^{-1})$	LD_{50} mg/kg	Chronic toxicity
Acrolein	CH_2=CH-COH		46	
Methyl vinyl ketone	CH_2=CH-$COCH_3$	$3.5x10^4$		
Ethyl acrylate	CH_2=CH-$COOC_2H_5$	22.6	1,020	
Acrylonitrile	CH_2=CH-CN	2.42	93	
Acrylamide	CH_2=CH-$CONH_2$	0.91	203	Ataxia
N-hydroxymethyl-acrylamide	CH_2=CH-$CONHCH_2OH$	0.91	563	
N-N'-methylene-bis-acrylamide	$(CH_2$=CH-$CONH)_2CH_2$	0.54		
Ethyl crotonate	CH_3CH=CH-$COOC_2H_5$	0.24		
Methyl methacrylate	CH_2=C(CH_3)-$COOCH_3$	0.17	8,420	
Sodium acrylate	CH_2=CH-CONa	0.035		
Methacrylamide	CH_2=C(CH_3)-$CONH_2$	0.014		
Crotonamide	CH_3CH=CH-$CONH_2$	0.0	2,830	
Allyl alcohol	CH_2=CH-CH_2OH	0.0	64	

6，アクリルアマイドの毒性に対するN-ハイドロオキシメチルアクリルアマイドの影響；アクリルアマイドを投与する前に一定期間N-ハイドロオキシメチルアクリル

アマイドを投与すると，前者の後肢麻痺作用が促進されることがわかった。

7，神経蛋白アミノ酸代謝におよぼす影響；アクリルアマイドによる中毒前，中毒および回復各期について，神経蛋白への ^{14}C-L-リジンまたは ^{35}S-L-メチオニンの取込みをin vitroでみると，後2期で取込みの上昇がみられた。中毒期の結果を表4に示す。上昇は脊髄下部と坐骨神経でとくに著しく，いずれも代償性の取込み増大と考えられる。

表4　神経組織蛋白内への ^{14}C-リジンの取込みに対するアクリルアマイドの影響

	cpm/mg Protein					
		Spinal cord				
	Brain	Cervical	Thoracal	Lumbal	Sciat.N.	Liver
Control	1,210	460	760	410	760	903
Acrylamide 4 weeks	1,330	640	1,140	770	1,050	802
(% of Control)	(110)	(139)	(146)	(186)	(139)	(89)

8，作用機序に関する仮説；以上の諸成績から，アクリルアマイドの神経障害作用に関して次のことが想定される。すなわちこの特質は神経系内の，そのアルキル化が後肢麻痺の原因となる特異なSH蛋白および，これと無関係な非特異蛋白と結合する。N-ハイドロオキシメチルアクリルアマイドは，非特異的蛋白とのみ結合し，これをブロックすることにより，後に与えたアクリルアマイドの特異蛋白との結合，すなわち症状を促進させる。アミノ酸の蛋白への取込み増加は，特異蛋白の代謝障害に対しておこった代償的性質のものと考えられる。

（本研究は一部を除きM.R.C. Toxicology Research Unit, Dr. W.N. Aldridgeとの共同で行なわれた。）

文　献

1. Aldridge, W.N. and Cremer, J.E. Biochem. J. 61, 406 (1955)
2. Aldridge, W.N. and Johnson, M.K. ibid, 73, 270 (1959)
3. Auld, R.B. and Bedwell, S.F. Canad. Med. Ass. J. 96, 652 (1967)
4. Benesch, R.E. et al. J. biol. Chem. 216, 663 (1955)
5. Cavanagh, J.B. Intern. Rev. exp. Path. 3, 219 (1964)
6. Cremer, J.E. Biochem. J. 67, 87, (1957)
7. Ellman, G.L. Arch. Biochem. and Biophys. 82, 70 (1959)
8. 藤田篤雄他，日医事新報，1869，37 (1960)
9. Fullerton, P.M. and Barnes, J.M. British J. industr. Med. 23, 210 (1966)
10. Hamilton, P.B. Anal. Chem. 35, 2055, (1963)
11. Hashimoto, K. and Kanai, R. Industrial Health. 3, 30 (1965)
12. Hashimoto, K. and Ando, K. Congress Intern. de Medecine du Travail, Suppl. III, 87 (1966)
13. Hohost, H, J. Method of Enzymatic Analysis, 266 (1963)
14. 猪股丈二他，神経化学　6，80 (1967)
15. Kirby, K.S. Biochim. Biophys. Acta, 55, 545 (1962)
16. Kuperman, A.S. University Microfilms, 20503 (1957)
17. ibid, J. Pharmacol. exp. Therap. 123, 180 (1958)
18. MacCollister, E.J. et al. Toxicol. appl. Pharmacol. 6, 172 (1964)

15. 実験的甲状腺機能低下症の神経化学的研究

野村正彦・永井克子・森　喜久江
塚田裕三　（慶大・医・生理）

甲状腺機能低下症（クレチン病）は全身性の発育不全[2]、知能発育遅延[3]、髄鞘形成不全[4]等が伴う事は古くから知られている。吾々は実験的にラットに甲状腺機能低下症をつくり、発育に伴うラットの脳内物質変動を生化学的に追求した。

方法

出生直後のラットに100 μc I^{131} を腹腔内に唯一回注射したものを甲状腺剔除術群＝[I]とし、出生直後1 mgの1-メチル-2-イミダゾール千オール（メルカゾール）を毎日腹腔内に注射したものをメルカゾール群＝[M]とする。対照群はこれら処理群と同腹のラットを用いた。[I]及び[M]の処置をほどこしたラットを種々の時間間隔で瀉血断頭し脳を剔出、Schmidt & Thannhauser[12]の方法に従い、10% 冷TCA中でガラスホモゲナイザーで Homogenize し、遠沈後更に沈渣を Ethanol（1×）, Ethanol:Chloroform（3:1；1×）, Ethanol:Ether（3:1；2×）, Ether（1×）, により抽出し Lipid Fraction とした。その沈渣を 0.3N KOH 3 ml を加え 37°C、1時間放置後 6N HCl 0.5 ml を加え遠沈し、その沈渣をDNA分画とした。DNAの定量は Burton の方法[3]、Pの計測は Martin & Doty の方法[10]を用いた。蛋白質の定量は Lowry[9]の方法を用い、牛血清アルブミンを標準資料とした。2',3'-環状ヌクレオチド水解酵素は Kurihara & Tsukada の方法[7]に従い、大脳・小脳・脊髄をそれぞれガラスホモゲナイザーで、10% 水 Homogenate とした後、超音波 20KC、150W 10分処理を行い、ペーパークロマトで Adenosine-2'-phosphate のスポットを 260 mμ で比色定量した。

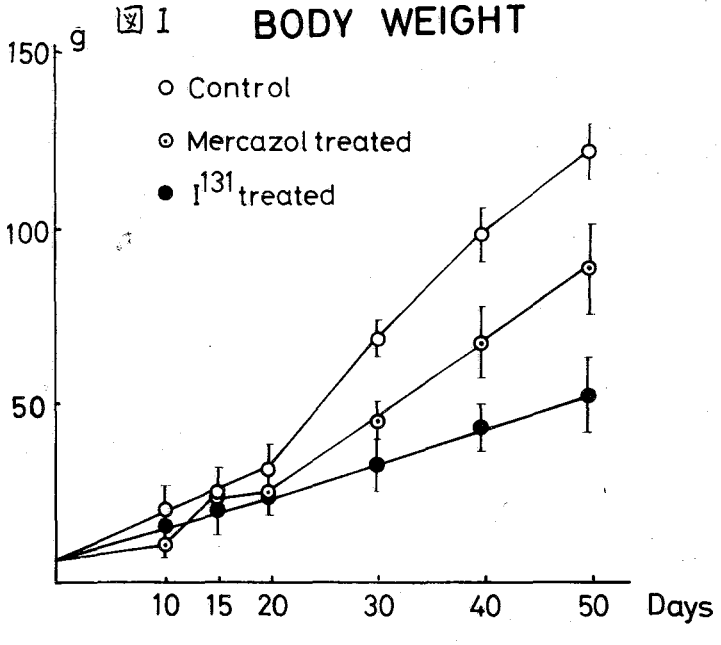


図1

結果及び考察

1　体重・脳重の変化

体重については対照群と[I]処置群及び[M]処置群で、図1に見る様に著明な変化が認められ、生後30日目では[I]は対照群のほぼ1/2、生後50日目では1/3であった。又[M]では生後50日目で対照群の1/2の体重を示し、体重増加は著明に抑制された。これに比して脳重は体重程著明な変化は認められず、わずかに[I]及び[M]処置群で低い値を示した。（図2）

2．脳内水分量及び蛋白質量

図3

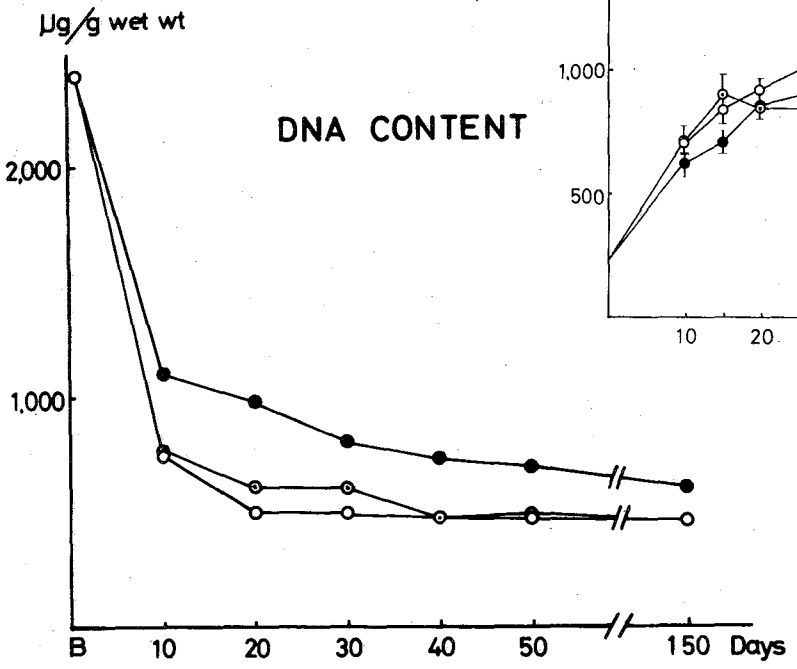
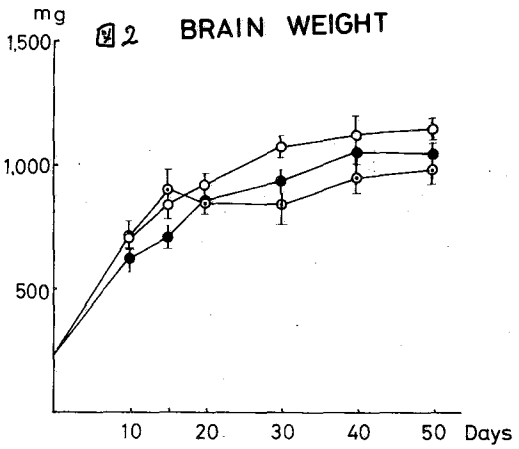


図2 BRAIN WEIGHT



脳内水分量は対照群と処置群との間でほとんど差は認められなかった。又脳内蛋白質量にも変化がなかった。これは、Geel, Balazo & Gaitondeらの言う様に蛋白質合成能は[I]では低いが、蛋白質含量は不変だと言う事実に一致している。

3. DNA量の変化

図3にある如く大脳内DNA量は出生後急激に減少するが、[I]処置群では生後30日目をすぎてもかなり高い値を維持しており、生後150日目でも尚、対照群に比し高値を示した。脳内DNA量（核あたりのDNA量）が生後急激に減少する機構は未だ明かではないが、[I]処置群でこれが強く抑制される点は脳発育の上で重要であると考えられる。一方[M]処置群ではそれ程大きな変化は認められなかったことは興味がある。小脳に於けるDNA量変化は大脳と同様、発育とともに減少するが、[I]処置群では減少の抑制が40日目まで続くが、[M]処置群では対照群との間に明らかな差異

図4

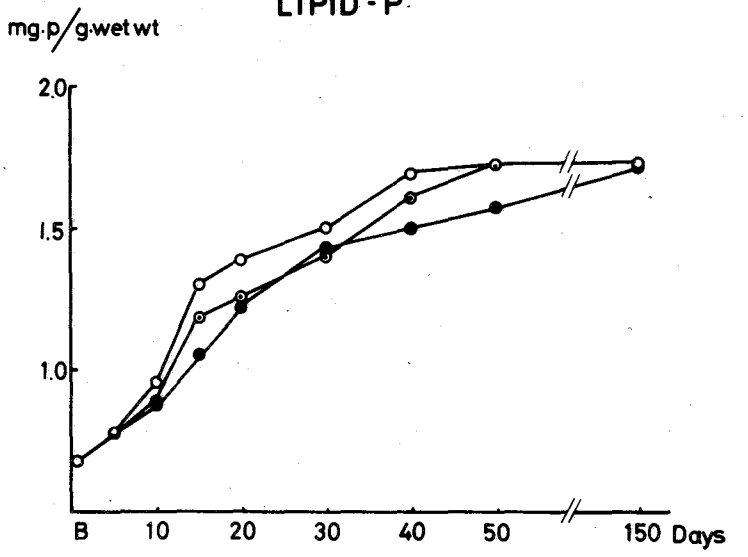
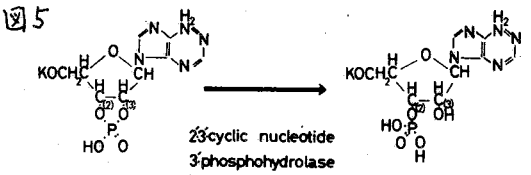


図5



Adenosine 2'3'-cyclic phosphate　　Adenosine 2'-phosphate

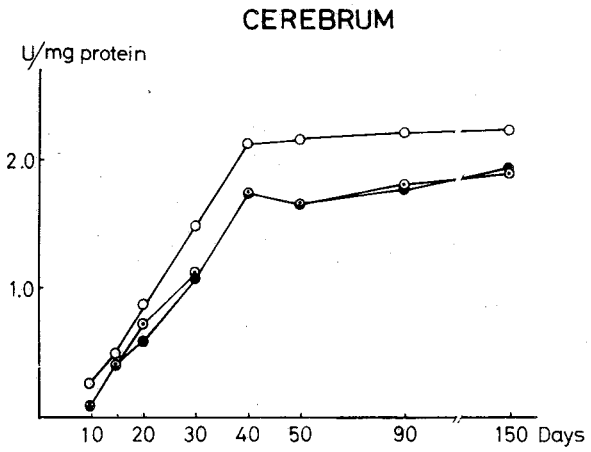
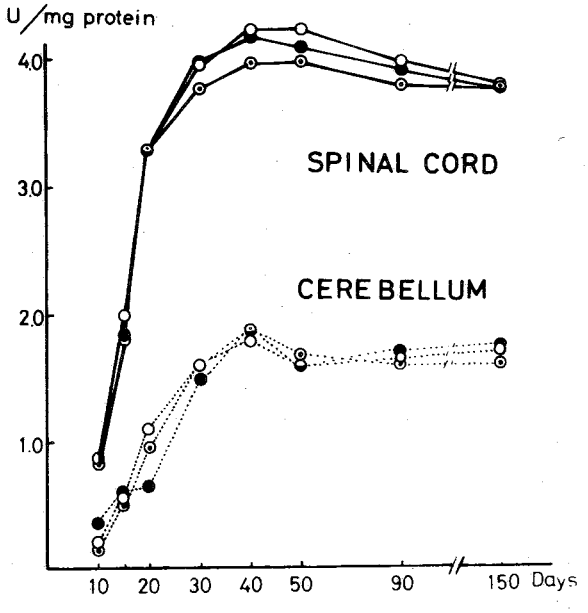


図6



を認めなかった。これらのことは、Eayrs & Taylor[5]らの言う[I]処置群の脳の細胞分化（軸索・樹状突起の発育が悪い）がより未熟であるとするのと関係しているかも知れない。

4　Lipid-P

脳内リン脂質は図4に示す如く、生后10日目から15日目まで急激に増加し40日目でほぼ成熟ラットの値に近づくが[I]処置群では増加がかなり抑制され、生后25日目の値は対照群の15日目とほぼ等しく、リン脂質含有量から見ると10日間前后の発育の遅れがあると見ることが出来る。このことは髄鞘形成のおくれを意味するものと思われる。

5　2'.3'-環状ヌクレオチド水解酵素

脳内リン脂質の増加に伴って、髄鞘分画（ミエリン）に特に局在する2'3'環状ヌクレオチド水解酵素の酵素活性について、図-5、6、にしめす如く3つの部位に分けて検索した。

大脳では生后成熟ラットの値とほぼ等しいが、[I]及び[M]処置群でも、40日目まで酵素活性の上昇がありその後は一定の値を示すが、その活性は対照群に比し低値にとどまる。小脳では大脳とほぼ同様

生后40日目まで、酵素活性上昇を認めたが、〔I〕及び〔M〕処置群との差は大脳程著明には認められなかった。

脊髄では大脳、小脳に比して酵素活性は高く、しかも生后20日目までは急激な酵素活性上昇があり、生后40日目までにほぼ活性値の最大を示した。しかし〔I〕及び〔M〕処置群との差はそれ程著明には認められなかった。これら2',3'-ヌクレオチド水解酵素は大脳に於て、特に〔I〕による酵素活性抑制が著明に認められた。これは大脳が小脳や脊髄と比較して、〔I〕処置に対して特に敏感であったことを示している。更に大脳で髄鞘形成の始る生后10日目から20日目に於て、その差が著明に現れていることは、2',3'-ヌクレオチド水解酵素が髄鞘形成の上で重要なマーカーとなりうることを支持するとともに、lipid-Pの増加の減少とあいまって〔I〕処置が大脳の髄鞘形成を特に強く抑制していることを示唆している。

まとめ

〔I〕及び〔M〕処置により次の如き結果を得た。

① 体重発育が著しく抑制される。
② 脳内DNA量減少が抑制される。
③ 脳内lipid-P増加が抑制される。
④ 2',3'-ヌクレオチド水解酵素の活性が特に大脳に於て抑制された。

文献

1) Balazs, R. & Gaitonde, M.K. (1968) Biochem. J., 106, 1
2) Barnett, R.J. (1948) "The Hormones", Academic Press, New York
3) Burton, K. (1956) Biochem. J., 62, 315
4) Eayrs, J.T. (1966) Sci. Med. Ann. Rev. 317
5) Eayrs, J.T. & Taylor, S.H. (1951) J. Anat. (Lond.) 85 350
6) Geel, S.E., Valcana, T. & Timiras, P.S. (1967) Brain Res. 4, 143
7) Kurihara, T. & Tsukada, Y. (1967) J. Neurochem. 14, 1167
8) Hughes, A.M. (1944) Endocrinology, 34, 69
9) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265
10) Martin, J.B. & Doty, D.M. (1949) Analyt. Chem. 21, 965
11) Pasquini, J., Kaplun, B., Garcia Argiz, C.A. & Gomez, C.J. (1967) Brain Res. 6, 621
12) Schmidt, G.L. & Thannhauser, S.J. (1945) J. Biol. Chem. 161, 83

16. 慢性メトアンフエタミン中毒動物脳のモノアミン代謝に及ぼすパラクロールフエニールアラニンの影響

小林暉佳・吉原　林・長尾佳子
加藤伸勝　（都立松沢病院）

行動異常を示す慢性メトアンフェタミン中毒ネコ脳では，扁桃核のセロトニン（5HT）の持続的増加が認められ，同時にこの扁桃核での5HTの変化はクロールプロマジン投与によっても変らない点で，他の脳部位にみられる変化と著しく異なることを台ら[11),12)]は報告している。また，McLean ら[8)]もd-アンフェタミンをラットに10日間連続注射し，脳内5HTの増加とノルエピネフリン（NE）の減少のあることを報告している。田中ら[10)]もマウスを用いて同様の所見を得ており，慢性メトアンフェタミン中毒マウスの脳内5HT，NE，アンモニアなどが環境因子によってどのような影響をうけるかをみている。以上のように最近はメトアンフェタミン中毒動物にみられる行動異常を脳の特定部位におけるアミン代謝障害との相関においてみる研究が広く行なわれている。

われわれはこの慢性メトアンフェタミン中毒動物脳で生じたアミン代謝異常について，その特異性を明らかにするため，トリプトファン水酸化酵素の阻害剤であるパラクロールフェニールアラニン（以下PCPA）およびレセルピンを用いて，中毒動物の脳各部位におけるセロトニン，5-オキシインドール酢酸（以下5HIAA），ノルエピネフリンなどの動態について検討した。

実験材料および方法

Table 1. 5HT, 5HIAA and NE concentrations in the TE, DIM in normal and methamphetamine (MA) intoxicated rats

Experimental condictions and time(hr)	TE			DIM		
	5HT	5HIAA	NE	5HT	5HIAA	NE
Naive Control	0.40± 0.08(6)	0.60 (3)	0.29± 0.06(5)	0.56± 0.08(4)	0.41± 0.01(3)	0.55± 0.08(6)
MA intoxicated	0.34± 0.11(4)	0.61 (3)	0.19± 0.06(7) ※※	0.84± 0.20(3) ※	1.14± 0.01(3) ※※※	0.31± 0.04(6) ※※※
MA + PCPA (24)			0.22± 0.02(3)			0.35± 0.05(3)
MA + PCPA (48)	0.14± 0.01(4)	0.77 (2)	0.15± 0.02(7)	0.27± 0.08(4)	0.37 (4)	0.18± 0.03(4)
Control + PCPA (24)	0.24 (4)		0.31 (2)	0.27 (2)		0.32 (1)
Control + PCPA (48)	0.12± 0.02(5)	0.58 (2)	0.18± 0.03(5)	0.13± 0.09(4)	0.10 (2)	0.24± 0.03(3)
MA+Reserpine (4)	0.08± 0.04(5)		0. (2)	0.16± 0.08(5)		0.04 (2)
Control + Reserpine (4)	0.16± 0.09(5)		0.08 (2)	0.30± 0.02(5)		0.07 (2)

体重200～300gのWister系albino rat♂を用いた。動物を中毒化するためメトアンフェタミン（以下MA）5mg/kg 40日間連続背部皮下注射し実験に用いた。動物はすべて集団飼育とし，1ケージ当り5～6匹とした。PCPAは，

Table 2. 5HT, 5HIAA and NE concentrations in the PM and SC in the normal and MA intoxicated rats

Experimental conditions and time(hr)	PM			SC		
	5HT	5HIAA	NE	5HT	5HIAA	NE
Naive Controls	0.44± 0.08(5)	0.41 (2)	0.32± 0.08(6)	0.44± 0.08(5)	0.32 (3)	0.13± 0.02(3)
MA intoxicated	0.43± 0.09(4)	0.56 (2)	0.23± 0.08(6) ※※※	0.35± 0.02(4)	0.38 (2)	0.13± 0.02(3)
MA + PCPA (24)			0.19± 0.05(3)			0.04 (2)
MA + PCPA (48)	0.39± 0.05(4)	0.68 (2)	0.09± 0.04(4)	0.21± 0.06(3)	0.51 (2)	0.04 (2)
Control + PCPA (24)	0.12 (2)		0.14 (1)	0.28 (2)		0.03 (1)
Control + PCPA (48)	0.08± 0.05(4)	0.33 (2)	0.29 (2)	0.18± 0.01(4)	0.13 (2)	0.19 (2)
MA + Reserpine (4)	0.21± 0.07(5)		0. (2)	0.17± 0.07(5)		0.08 (2)
Control + Reserpine (4)	0.22± 0.02(5)		0. (2)	0.20± 0.16(5)		0.06 (2)

( ) number of animals. Each value is the mean ± SD. μg/g
Animals were sacrificed 24hr and 48hr after PCPA(316mg) or 4hr after reserpine(3mg). ※P<0.05※※P<0.02※※※P<0.01

Koeら[4]の方法に従って溶解し，レセルピンは市販のものを用い，それぞれ対照およびMA中毒動物皮下に注射した。

脳内物質の測定法

動物を腹部で切断し，直ちに砕氷上にてtelencephalon (TE), diencephalon + mesencephalon (DIM), pons + medulla oblongata (PM), spinal cord (SC)の4部位を摘出し，5HT，5HIAA，NEを測定した。5HTおよび5HIAAの定量はともに0.4N過塩素酸を用いて抽出し，前者はSnyderの方法[9]で，後者はGiacaloneら[1]の方法で定量した。NEは0.01N塩酸で抽出し，Kuntzmanら[5]の方法で定量した。3物質の蛍光測定には日立分光蛍光光度計(model 203)を用いた。

実験結果および考察

Table 1および2に示す如く中毒群では対照群に比較して，DIMで5HT，5HIAAの増加，NEの低下がある。とくに5HTよりもその代謝産物である5HIAAが対照群に比べて3倍近い増加を示している。(P<0.01) TE，PMでは中毒群でNEの減少を認めるが，5HTは変化なく，5HIAAは増加傾向にある。したがって，田中ら[10]の慢性メトアンフェタミン中毒マウス全脳における5HTの増加，ならびにNEの減少はわれわれの得た結果と同様である。

またTable 1および2に示す如く，このような傾向を脳部位別にみると，DIMにおいてもっとも著しい。これらの部分は正常動物においても5HT，NEなどのモノアミン濃度が高く，ラット脳に関するMaickel[7]らの成績によれば視床下部＋視床で，5HT 1.29μg/g NE 1.11μg/g，中脳で5HT 1.23μg/g，NE 0.65μg/gと高値を示し皮質では5HT 0.35μg/g，NE 0.30μg/gと低値を示している。このような結果から，中毒群では，5HTおよびNEがもっとも高濃度に存在するDIMで代謝異常を生じ，5HTの増加，NEの低下があるこ

とが明らかになった。

つぎに慢性メトアンフェタミン中毒動物脳で生じた5HTの上昇とNEの低下に対して、脳内5HTのdepletorであるPCPAを中毒動物に負荷した場合どのような影響を与えるかについて調べた。既にKoe ら[4]によって、PCPAは脳5HTのみならず、5HIAAも低下させるが、NEは僅かに低下するのみで、動物の行動にほとんど影響を与えないことが報告されている。またこの作用がトリプトファン水酸化酵素の阻害効果によるものであることがJéquier[3]らによって確められている。

PCPAを対照動物に注射し、48時間後に、5HT, 5HIAA, NEを測定した際、Table-3に示す如く、前二者で明らかな低下、NEにもかなりの低下を認める。この三物質の低下傾向は、DIM, PMにおいて著しく、TE, SCにおいては僅かである。

NEの低下については、Welch ら[13]もマウスの全脳を用いてPCPA投与後比較的短時間のうちにその影響について調べているが、6時間から24時間で減少傾向のあることを報告している。またLipton ら[6]が報告しているように、PCPAはphenylalanine hydroxylaseに対し強力な阻害効果を示し、血中および脳中のphenylalanineの値を高め、tyrosineの生成を抑制することからみてもNEの低下は当然考えられることである。

われわれは対照群および中毒群にPCPA 316 mg/kg 注射後24時間、48時間で5HT, 5HIAA, NEを測定した。その結果はTable 3に示す如く、対照動物では、これまでの報告と同様に5HT, 5HIAAは著しい減少、NEにもかなりの低下を認めた。これに対し、中毒群では、投与後48時間で、5HTはDIMとPMにおいて対照群に比較し、その低下傾向が抑制されており、5HIAAも、この傾向は同様に認められる。すなわち中毒群で5HTは増加している分だけPCPA投与により低下する。このような5HTの変化に対してNEの場合は、DIM, PMで対照群に比較しその減少傾向がより著しい。5HTの変化とは逆に低下している中毒群のNEはPCPA投与後48時間でより著しい低下を示す。

Table 3. Effect of PCPA on brain 5HT, 5HIAA and NE in normal and MA intoxicated rats (316mg/kg,48hr)

		TE	DIM	PM	SC
5HT μg/g	Control	0.12±0.02(5)	0.13±0.09(4)	0.08±0.05(4)	0.18±0.01(4)
	MA intoxicated	0.14±0.01(4)	0.27±0.08(4) ※	0.39±0.05(4) ※※※	0.21±0.06(3)
5HIAA μg/g	Control	0.58 (2)	0.10 (2)	0.33 (2)	0.13 (2)
	MA intoxicated	0.77 (2)	0.37 (2)	0.68 (2)	0.51 (2)
NE μg/g	Control	0.18±0.03(5)	0.24±0.03(3)	0.29 (2)	0.19 (2)
	MA intoxicated	0.15±0.02(7)	0.18±0.03(4) ※	0.09±0.04(4)	0.04±0.01(4)

※ P<0.05 ※※ P<0.02 ※※※ P<0.01

しかし、24時間では、対照群、中毒群ともに、差異はない。中毒群の場合、PCPA注射後48時間でDIM, PMでともにNEは対照群に比較し、より著しく低下し、96時間後でもこの傾向は持続している。

対照群と中毒群にreserpineを投与した場合には、5HT, NEともに注射後4時間で著しい減少を示し、両者の間には有意差はない。

最近 Gunne ら[2]は dl-amphetamine の慢性投与により、ラット脳で、NE および dopamine の減少と normetanephrine (NM) の増加のあることを報告している。そしてこのような傾向が dl-amphetamine の大量一回投与 (20 mg/kg) でも軽度ながら出現していることから amphetamine にカテコールアミン depleting effect があり、さらにノイロン内への NE の再吸收を抑制する効果のあることを示唆している。

今回の結果でもこれまでの文献と同様に慢性メトアンフェタミン中毒動物脳で 5HT. 5-HIAA の増加, NE の減少が認められた。一方これまでの報告では、脳内 5HT の特異的な depletor で NE の減少はほとんどないか、あっても軽度であるとされている P-CPA を用いた実験では、PCPA 投与後 48 時間で NE もかなりの減少を認めており、この結果は Lipton ら[6]の報告しているように、phenylalanine-hydroxylase の阻害に関連したものと考えている。また中毒群に、PCPA を投与すると増加した 5HT は、ほぼ増加した量だけ低下する。これを脳部位別にみると、DIM についで PM でこの変化が明白である。このことは中毒群において、MAO 活性とは関係なく、5HT の合成が高まっていることを示唆するもので、5HT の合成系の促進が考えられる。

NE の変化については中毒群では、TE. DIM. PM. の三部位で低下している。そしてこの低下した NE に対して、PCPA はより一方減少させる方向に作用している。この低下率は対照群に PCPA を投与した場合に比較し、DIM, PM で有意差を認める。中毒群に PCPA を投与した場合に認められた NE のより一方の低下は、慢性メトアンフェタミン投与により NE 合成系の障害を生じ、これに PCPA の phenylalanine hydroxylase 抑制効果が重複したものと推測される。NE の場合、5HT に比較し代謝径路がより複雑であり、今後 dopamine, NM などの定量もあわせて行ない、以上の所見について確めて行く予定である。

まとめ

慢性メトアンフェタミン中毒動物脳の 5HT. 5HIAA. NE について、脳部位別分布を調べた。さらにこのような中毒群におけるモノアミンレベルの変動に対して、PCPA, reserpine のような脳内モノアミンレベルに変化を及ぼす薬物がどのような影響を与えるかについて検討した。その結果、中毒群に PCPA を投与すると、48 時間後に、5HT. 5HIAA は対照群に投与した場合に比較し、増加した量だけ低下し、NE はより著しい低下を示すという所見を得た。

1) Giacalone,E. & Valzelli,L., J. Neurochem.13,1265 (1966)
2) Gunne,L. & Lewander,T., in THE ADDICTIVE STATES, Wikler,A.(editor) The Wiliams and Wilkins,Baltimore,1968.ppl06
3) Jéquier,E. Lovenberg,W. & Sjoerdsma,A., Mol.Pharmacol.3,274 (1967)
4) Koe,B.K. & Weissman,A., J.Pharmacol.Exptl.Therap.154,499 (1966)
5) Kuntzman,R. Parkurst,A. Bogdanski,S.R. & Brodie,B.B., J.Neurochem. 6,226 (1961)
6) Lipton,M. Gordon,R. Guroff,G. & Udenfriend,S, Science 156,248 (1967)
7) Maickel,R.P. et al., Int.J.Neuropharmacol.,7,275 (1968)
8) McLean,J.R. & McCartney,M., Proc.Soc.Exp.Biol.Med.,107,77 (1969)
9) Snyder,S.H. Axelrod,J. and Zweig,M., Biochem.Pharmacol.14,831(1965)
10) 田中いち, 船渡川誠一郎., 神経化学 6, 121 (1967)
11) 高野令佐, 五十嵐いち, 船渡川誠一郎, 台弘., 神経化学 5, 84 (1966)
12) Utena,H., Progress in Brain Research, vol.21B,192,(1966)
13) Welch,A.S. & Welch,B.L., J.Pharm.Pharmac.,19,632 (1967)

17. 発育過程における鶏脳内カテコールアミン代謝

小林健一（東医歯大・医・神経）
S.Eiduson（カリフォルニア大）

脳機能と行動との関連を考える際に脳内アミン代謝を脳部位別に追究することは重要である。一方個体発生の立場から個体の行動に幼若期の諸種環境要因が大きな影響を持ち得ることが多くの研究者により見出されている[14]。Eiduson[6]は鶏の3日目のembryoにSerotonin(5-HT)の前駆物質5-hydroxytryptophan(5-HTP)を一回注射することにより発育過程の脳内5-HTの正常な変動に変化がおこり、孵化前のembryoの脳内5-HTレベルの長期にわたる上昇と、孵化後の大脳半球における5-HTレベルの著明な減少をみ、しかも大脳半球におけるこの変化は孵化後少くとも1か月間持続したことを報告し、5-HTの生合成が脳内でend-product repressionの機序により調節される可能性を考えた。従来発育過程の鶏脳内物質の変動についてはかなりの報告があるが[17]、発育にともなう脳内catecholamine(CA)の変動、特に脳部位別の変動に関しては未だ充分知られているとはいえない[2),16)]。我々は今回鶏の発育過程の脳内CAの変動を脳部位別に追うとともに、発育初期のembryoに前駆物質3,4-dihydroxyphenylalanine(DOPA)の一回注射、あるいはモノアミン酸化酵素抑制剤(MAO-I)の連続注射をおこない、これが発育過程の脳内CAの正常な変動に及ぼす影響を追究し、さらに発育初期におけるこれら物質の投与が孵化後の鶏の行動に及ぼす影響をも検索した。

実験方法：　鶏卵はNew Hampshire Redの受精卵を用いembryoが3日目に、卵のamniotic fluid内に生理的食塩水(生食)0.25 ml, またはl-DOPA 2.5 μmoleを含む溶液0.25 mlを注射した。その後発育過程の脳内dopamine(DA)およびnorepinephrine(NE)を脳の4部位(cerebellum, cerebral hemispheres, optic lobesおよびremainder)別に1日目のembryoから孵化後2か月目の鶏まで追求した。MAO-Iとしては JB-516 (catron) 20mg/kgを毎日1回, 3日目から12日目のembryoに連日注射した。NEの定量はBertler ら[1)]ならびにそのCarlsson ら[4)]による変法に従った。DAの定量はCarlsson ら[3)]ならびにそのCarlsson ら[4)]による変法に従った。ただし最終段階で至適の蛍光を得るためにUVランプを用いる代りにChang[5)]の方法によりsampleを5分間沸とう水中に置いた。脳内に取り込まれた放射性物質の測定には14日目のembryoに3.036 μc のDOPA-1-H^3を含む溶液0.33 mlをamniotic fluid内に注射した。1時間後embryoの脳を取出しデシケーター中で減圧下に48時間乾燥を行った後、脳組織の適当量をscintillation vial中にとり, 0.1 mlのhyamineを加えてDubnoff中で少くとも16時間, 60°Cで振盪した。組織が完全に溶解した後10 mlのscintillation phosphorを加え、放射能をPackard Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometerで測定した。動物の行動の測定には3日目のembryoの時期に生食またはl-DOPAを注射された鶏が孵化後30日目に達したものそれぞれ5羽づつを用い、鶏用のSkinner Box (Foringer and Co.)によって条件づけしたうえ孵化後38日目から73日目にわたって3種の色彩識別taskを行った。task終了後4日目にすべての鶏について脳内DA, NEの定量を行った。

結果および考察：　Fig. 1に発育過程の鶏脳内DA, NEの変動を脳部位別に示した。

Fig. 1

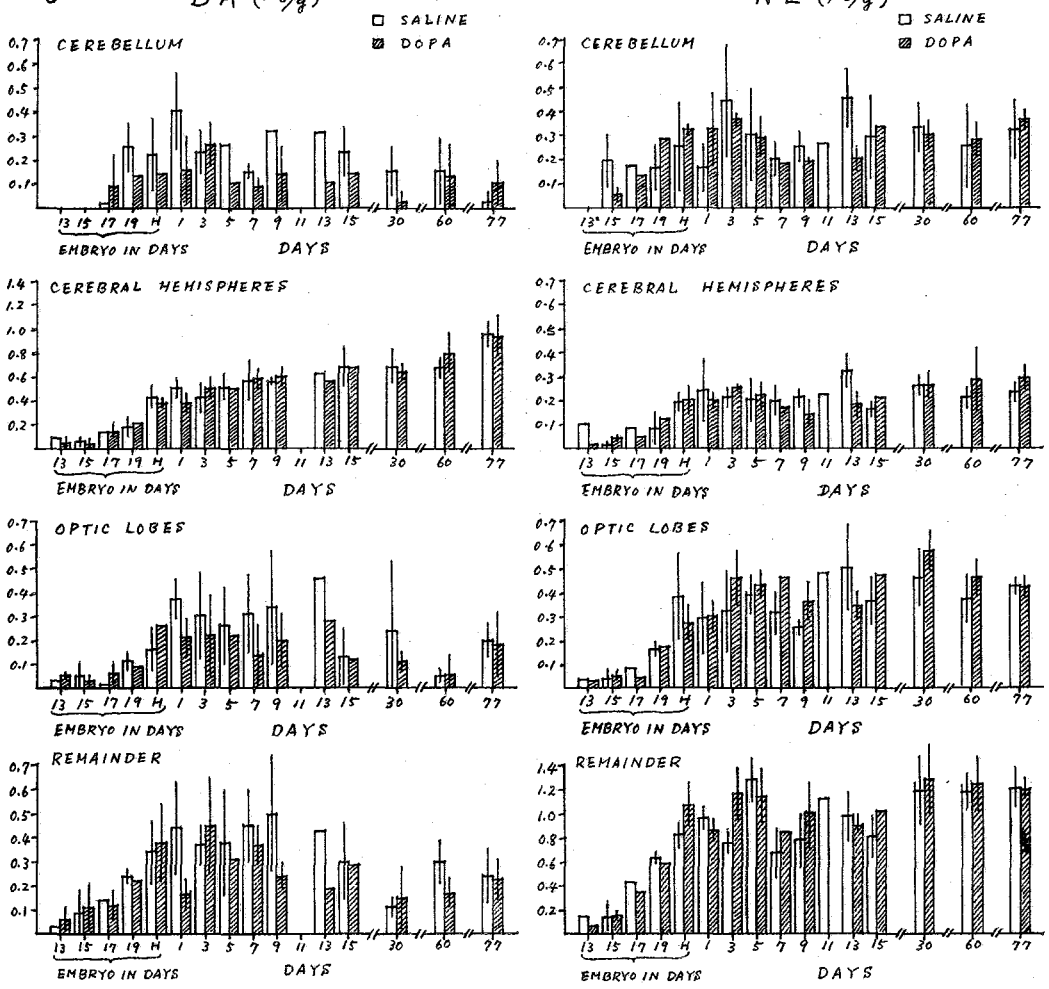
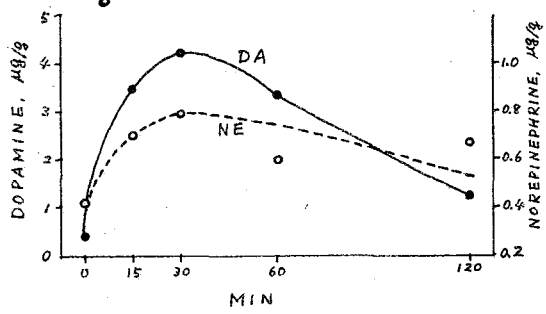


Table 1

	DPM/g* (dry wt.)	NET DPM*	injected ^{3}H-DOPA
cerebellum	21186.60	89.3	
cerebral hemispheres	17631.80	399.3	
optic lobes	12347.35	221.7	
remainder	13116.23	235.9	
total DPM		946.2	2758827.7
total % in brain		0.034%	

* Each value represents the mean of 6 determinations

Fig. 2



cerebellumにおいては5-HTレベルが非常に低いのに反して、全発育期を通じて比較的高いNEレベルがみとめられPscheidtら[16]の報告と一致していた。cerebral hemispheresにおいてはNEに比してDAレベルが高く、孵化後77日ではDAレベルは同部位のNE値の約4倍であった。このことは鳥類の大脳半球はstriatumの発達が

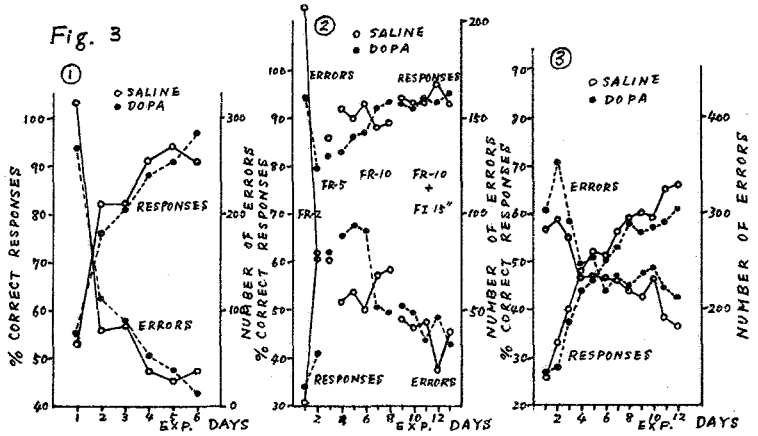
著明であり，大脳半球の大部分を占めている[17]ことからもうなづける。鳥類ではoptic lobeが大きく発育しその構造も複雑であり，かつ視覚機構もよく発達しているが，この組織でDAに比しNE含量が有意に高いことはoptic lobeでNEが何らかの重要な役割を果していることを推量させる。remainderではNEが最も高く孵化後7日目ではNEは同部位のDAレベルの約5倍であった。これらのDA，NE値は脳各部位とも発育にともなって必ずしも一様な増加を示さず，日によってかなりの変動がみられた。Bourne[2]も鶏embryo脳内でこれらアミン値の変動とMAO活性の変動との関連についてのべ，Ignarroら[8]も発育期の鶏の心と肝におけるMAOならびにcatechol-O-methyltransferase活性の変動と心臓の変動との関連について考察しているが，Eidusons[6]はMAO活性は脳各部位とも発育過程にともなって漸増傾向にあり発育日による変動はみとめていない。一方3日目のembryoに注射されたDOPAは全観察期間を通じて脳のどの部位のDAおよびNEの発育にともなう正常の変動にも影響を及ぼさず，この結果はDOPAの注射量を5.0 μmoleまで増量しても同様であった。そこでDOPAの脳内への取込みをみるために14日目のembryoに^{3}H-DOPAを注射したが，この中0.034%の放射能が注射後1時間のembryoの脳内に見出された。(Table 1)。しかし孵化後7日目の鶏の腹腔内にcatron 20 mg/kgを注射して16時間後にl-DOPA 75 mg/kgを腹腔内に与えたところ，Fig. 2に示すごとく全脳内DAとNEレベルは急速に上昇し，注射後30分でピークに達したが約2時間後にもとのレベル近くに戻った。この際DAの最高値はcontrol値の約10倍であったが，NEの最高値はcontrol値の2倍以内であった。これらの結果からさらにembryo脳内のCAレベルの変動をもたらすべく，3日目から12日目までのembryoに連日catronの注射を行ったが，その結果はTable 2に示すごとく，13日目のembryo，孵化後1日目の雛とも脳内DAとNEレベルに関してcatron注射群と生食注射群との間に有意な差はみとめられなかった。Karkiら[10]，Kulkarniら[11]は幼若ラットの脳がNEや5-HTを合成しまた貯蔵する能力の低いことをのべているが，上述の実験結果からみても，

Table 2

	DA (μg/g)		NE (μg/g)	
	saline	catron	saline	catron
13 day old embryo				
whole brain	0.06±0.04(3)	0.10±0.02(3)	0.06±0.01(3)	0.05±0.00(3)
1 day old chick				
cerebellum	0.40±0.16(4)	0.36±0.31(5)	0.20(2)	0.22±0.07(6)
cerebral hemispheres	0.55(2)	0.42±0.07(6)	0.14±0.01(3)	0.17±0.04(6)
optic lobes	0.10(2)	0.23±0.15(5)	0.26±0.19(3)	0.21±0.11(6)
remainder	0.43±0.19(3)	0.21±0.08(6)	0.62±0.09(3)	0.81±0.20(3)

( ) Number of animals　　± Standard deviation

Fig. 3



もしDOPA注射後のembryo脳内にCAの上昇がみられたとしても、この増加したCAはembryoが13日に達する以前に急速に代謝を受ける可能性も考えられる。さらにDOPA投与に関する従来の報告の殆んどすべてがDOPA投与後に脳内のDAレベルの上昇をみるにかかわらずNEレベルには有意の変動のなかったことをのべている。この説明としていくつかのことが考えられている。1) 脳はDOPA投与によりNEを急速に合成する能力を有するが脳でのNEの正常レベルは飽和レベルに近く，DAのそれは飽和レベルよりはるかに低い[19]。2) DOPAから生成されるDAのすべてがNEのprecursorとして利用されず，過量に生成されたDAはNE合成に利用されぬ形で残っている[7]。3) 投与されたDOPAは脳内のCA含有neuronと5-HT含有neuronの両方に取込まれ脱炭酸を受けるため[13]，NE合成能を欠く細胞の中でもDOPAから多量のDAが合成され得る[9]。4) 脳の毛細管にはDOPA-decarboxylaseが存在しているので投与されたDOPAの大部分は毛細血管壁に取込まれて脱炭酸を受けDAとなり，その場でさらにMAOにより分解されるためNEへの合成がおこらない[15]。近年tyrosine hydroxylaseがNE合成の律速段階であり，NEおよび類似のcatechol化合物がこの酵素をend-product inhibitionの形でinhibitすることが知られているので[18]，前述の5-HT systemにおけると同様に[6] DOPAによりembryo脳内のNEレベルの上昇がおこれば，これがnegative feed-backの形でtyrosine hydroxylaseをrepressする可能性も考えられる。しかし以上のごとくDOPAまたはCatronによりembryo脳内のNEの上昇はみとめられず，脳内DA，NEの発育にともなう正常な変動にも有意の変化はみられなかった。

孵化後38日目以後の鶏のoperant behaviourを前述のscheduleに従い検索したがFig. 3に示すごとくDOPA注射群と生食注射群との間に，このtaskを指標としてみたかぎりでは行動上有意な差はみとめられず，また孵化後77日目に測定した脳内DA，NE値とも両群の間で有意差はなかった。従来，脳内アミンの変動と行動との関連についての報告は多いが，このアミンの変動が正常に復した後の動物の行動に関する報告は極めて少ない。Kulkarniら[12]は幼若期にreserpineを投与されたラットは成熟に達した後operant behaviourにおいて正常ラットに比しextinctionのおくれがみられ，しかもこれはreserpineのCA減少効果が完全に消失して脳内CAレベルが正常に戻った後に起ったことを報告している。幼若期脳内CAレベルが成熟個体の正常な行動に何らかの意味を持つかどうかは今後検討されるべき問題である。

文　献

1) Bertler, A., Carlsson, A. and Rosengren, E., Acta Physiol. Scand., 44 :273, 1958 2) Bourne, B. B Life Sci., 4 : 583, 1965 3) Carlsson, A. and Waldeck, B., Acta Physiol. Scand., 44: 293, 1958 4) Carlsson, A. and Lindqvist, M., Acta Physiol. Scand., 54: 87, 1962 5) Chang, C. C., Int. J. Neuropharmacol., 3: 643, 1964 6) Eiduson, S., J. Neurochem., 13 : 923, 1966 7) Goldstein, M. Int. J. Neuropharmacol., 3 : 37, 1964 8) Ignarro, L. J. and Shideman, F. E., J. Pharmacol. Exp. Therap., 159 : 29, 1968 9) Iversen, L. L., "The Uptake and Storage of Noradrenaline in Sympathetic Nerves", pp. 228-229, London, Cambridge Univ. Press, 1967 10) Karki, N., Kuntzman, R. and Brodie, B. B., J. Neurochem., 9 : 53, 1962 11) Kulkarni, A. S. and Shideman, F. E., J. Pharmacol. Exp. Therap., 153 : 428, 1966 12) Kulkarni, A. S., Thompson, T. and Shideman, F. E., J. Neurochem. 13 : 1143, 1966 13) Kuntzman, R., Shore, P. A., Bogdanski, D. and Brodie, B. B., J. Neurochem. 6 : 226, 1966 14) Levine, S., Haltmeyer, G. C., Karas, G. G. and Denenberg, V. H., Physiol. Behav., 2 : 55, 1967 15) Owman, C. and Rosengren, E., J. Neurochem., 14 : 547, 1967 16) Pscheidt, G. R. and Haber, B., J. Neurochem., 12 : 613, 1965 17) Romanoff, A. L. and Romanoff, A. J., "Biochemistry of the Avian Embryo", John Wiley and Sons, New York, N. Y., 1967 18) Spector, S., Gordon, R., Sjoerdsma, A. and Udenfriend, S., Mol. Pharmacol., 3 : 549, 1967 19) Weil-Malherve, H. and Bone, A. D., J. Neurochem., 4 : 251, 1959

18. Hypoxiaにおける脳Mitochondria Ⅱ，Hypoxiaにおける CytoplasmのMitochondriaに対する影響

菅野　司・長井音次（和医大・1生理）

昨年，hypoxia（両側頸動脈結紮）における脳皮質mitochondria（以下Mtと略す）について報告した[9]。その成績を要約すると (1) Mtのstate 3[1]呼吸速度は急速に低下する。それはリン酸化部位の障害によるものである。(2) Hypoxia 60minまでのMtの低下したstate 3呼吸速度はalbuminによって快復する。しかし，hypoxia 90minのMtのstate 3呼吸速度は快復しなかった。(3) また障害を受けたMtの酸化的リン酸化能は止血解放により hypoxia 60minまで快復する。そうして60minと90minの間に，特に，reversibleとirreversibleのdivisionがあった。

Hypoxiaにおける脳皮質Mtは上述の変化を示したが，今回これらの変化とcytoplasmの関係を生化学的，形態的に検討し，若干の知見を得たので報告する。

実験方法

Hypoxia負荷とMtの調整は前報に準じた[9]。大脳皮質は表1に示す如く，A，B，C分画を得て実験に用いた。

A，B分画（2mg. protein）のU-factor抽出はLehninger[11]の方法に従った。B，C分画はpolyethylene-glycol（P.E.G #4,000）で濃縮し，またpH 2，100°C，5min間処理後pH 7.4に調整してそれぞれ用いた。各分画の活性はintact-Mtの酸化的リン酸化能（Ox-P能）を基準にした。（その活性は4例の平均値で表わしている）。

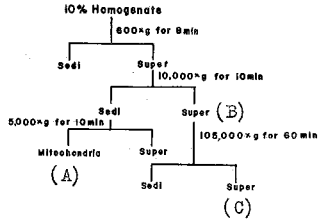


表1：脳皮質の分画

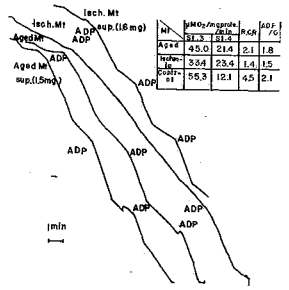
Mtの呼吸活性の定量は前報に準じた[9]。蛋白はbiuret法で定量した[4]。形態研究はGray[2]に従った。

以下に用いるaging，ischemiaは次の事を意味する。Agingとはintactな脳皮質から分離したA，B分画をin vitro（22°C）で放置すること。ischemiaとは断頭し，放置後（22°C）にA，B分画を得ることを意味する。

実験結果

(1) 予備実験

今，aged Mtと同じ条件で得たischemic Mtの呼吸活性を比較したのがFig. 1である。Fig. 1に示す如く，intact-Mtに比べischemic Mtのstate 3呼吸速度は非常に低下している。またaged Mtのstate 3呼吸速度に比し，その低下は著明である。その結果，呼吸調節率（R.C.R）[1]の低下もaged Mtよりischemic Mtの方が著明である。State 4呼吸速度[1]はaged Mt，ischemic Mt共に同程度に促進された。このことは，in vivoにおけるMtの機能障害に，cytoplasmic factorが重要な働きをすることを暗示するものである。



Mt	μMO₂/mg prot./min		R.C.R	ADP/O
	St. 3	St. 4		
Aged	45.0	21.4	2.1	1.8
Isch. Mt	33.4	23.4	1.4	1.5
Control	55.3	12.1	4.5	2.1

Fig. 1：Aged Mtとischemic Mtの呼吸活性の比較

(II) 本実験

Hypoxiaにおけるcytoplasmと Mtの Ox-P 能の関係について以下の実験をした。まず，表1に示したB分画に

ついて検討した。Intact なB分画を age (22°C, 10min) した後，intact Mt に添加した場合その呼吸活性は Fig.2 に示す如く，Ox-P が障害された。蛋白濃度が高いと，その効果は著明である。Fig.2 の右側に示すように，ischemia のB分画を同様に intact Mt に添加しても同様な成績が得られた。

次に，hypoxia のB分画について検討した。(Fig.3) Fig.3 に示す如く，intact Mt は ADP により十分な R·C·R を示すが，その Mt に intact なB分画を添加してもその R·C·R はあまり影響されない。しかし，hypoxia 10~90min のB分画を intact Mt に添加すると著明に R·C·R が抑制される。この成績から Mt，核，細胞膜を除いた cytoplasm 中に Mt の機能を障害する因子が有ることを示すものである。Intact なB分画では活性がなく，それを age すると活性があらわれることから，このものは homogenation 等による artifact に基くものではない。

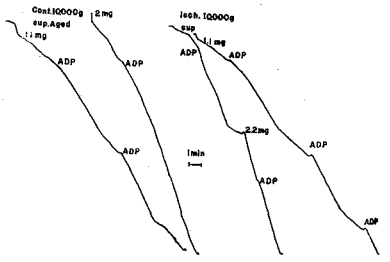


Fig.2：Intact Mt の呼吸に対する aged B分画，ischemic B分画の影響

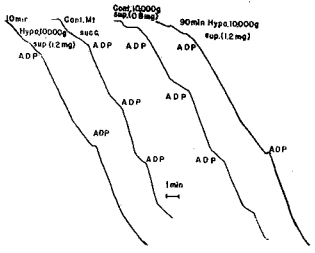


Fig.3：Inlact Mt の呼吸に対する hypoxic B分画の影響

In vivo における Mt の Ox-P 抑制物質として考えられるのは fatty acid である。[7],[11] そこで，各時間 hypoxia 負荷した皮質からの A，B 分画の fatty acid (U-factor) を抽出し，intact Mt の呼吸に対しその影響をみた。(Fig.4). Fig に示す如く，hypoxia 初期の A，B 分画の U-factor は Mt の state 3 呼吸速度よりもむしろ state 4 呼吸速度を促進し，R·C·R を低下させた。Hypoxia 初期では intact Mt の state 3 呼吸速度は著明には抑制されなかった。しかし B 分画では，30min 以後にその活性は強くなった。このことは hypoxia 初期における Mt の Ox-P 抑制物質は U-factor 以外の cytoplasmic factor であることを暗示している。

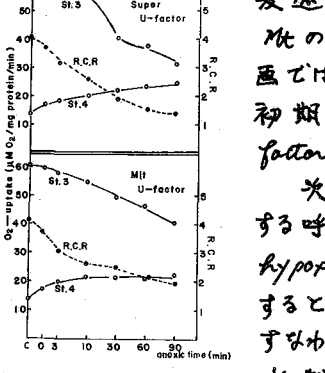


Fig.4：Intact Mt の呼吸に対する A，B 分画の U-factor の影響
横軸に示した時間 hypoxia 負荷後，A，B 分画から U-factor を抽出し，intact Mt に添加した。

次に，この点を検討する目的で C 分画を用いて intact Mt に対する呼吸活性について検討した。(Fig.5) Fig に示す如く，intact Mt に hypoxia 10-90min の C 分画を添加するとその R·C·R は抑制された。すなわち，B 分画で得られた R·C·R 抑制因子は hypoxia 初期ですべて C 分画に移行した。Fig に示す如く，C 分画を熱処理すると(図中の den を意味する)，intact Mt の R·C·R 抑制因子は熱処理で失活した。このことはその因子が蛋白性ではないかと考えられる。

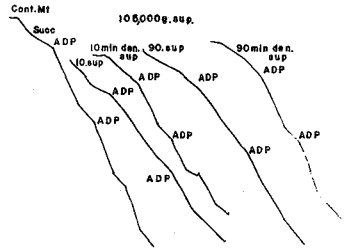


Fig.5：Intact Mt の呼吸に対する hypoxic C 分画の影響

各時間 hypoxia 負荷した皮質から得た C 分画に得られる Mt の R.C.R 抑制因子の活性をあらわしたのが Fig.6 である。Fig の横軸に示す hypoxic time の C 分画を intact Mt に添加すると，hypoxia 初期の C 分画で intact Mt の state 3 呼吸速度は著明に抑制され，その後定常状態を示した。このことは，hypoxia における Mt の state 3 呼吸速度の急速な低下を説明するだろう。

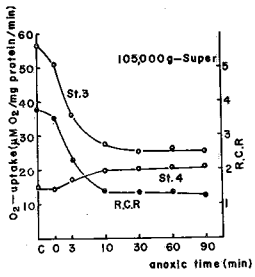


Fig.6：Hypoxia 負荷の C 分画活性 横軸に示した時間 hypoxia 負荷後 C 分画を得，intact Mt に添加した。

以上，intact Mt の R.C.R に対する hypoxia 負荷の B，C 分画の影響を要約したのが表Ⅱである。すなわち，hypoxia の初期に，intact Mt の Ox-P を抑制する因子が生じる。その因子は fatty acid 以外に 105000g×60min の上清に生じ，それは熱処理で失活する因子である。

			μMO2/mg.prot/min		R.C.R
			St.3	St.4	
control			62.7	15.6	4.0
100000g super		10min	30.8	17.7	1.7
	denatured	90	29.8	25.7	1.2
		10	51.7	14.7	3.6
		90	39.7	24.6	1.6
105000g super		10	27.4	18.9	1.4
		90	25.6	20.6	1.2
	denatured	10	56.7	14.4	3.8
		90	51.3	18.0	2.8

表Ⅱ：Hypoxia 負荷の B，C 分画の intact Mt の呼吸に及ぼす影響 10,000g super は B，105,000g super は C 分画。

Ⅲ Hypoxia における形態変化

Hypoxic time に沿って電子顕微鏡を用いて cytoplasm の形態変化を検討した。

Hypoxia 初期では対照に比し，astrocyte の vesicle の消失がみられ，endoplasmic reticulum (Er) のわずかな swelling が観察される。Hypoxia 30min では Mt，lysosome のわずかな swelling が観察され，60min なると Er，ゴルジ体の swelling が著明になり，さらに空胞化した形態像の増加が見立つ。Mt は淡明で，crista が少し消失しかける。さらに 90min になると，60min の所見のほかに Mt の crista がほとんど消失した像が非常に多くなる。90min における Mt のこの所見は in vivo，in vitro における状復実験の成績と平行するものである。

考察

Hypoxia における Mt の Ox-P の障害に cytoplasm のある物質(105,000g・60min 遠心分離の上清に活性がみられる)が影響している成績を得た。その物質の活性は hypoxia の初期に強く，その後定常状態を示し，intact Mt の state 3 呼吸速度を著明に低下させる。この物質は熱処理で失活するが，intact な cytoplasm 中にはこの活性がみられないので膜に由来するものと考えられる。Hypoxia 初期にこの物質が生じ，その後に U-factor 活性が生じる。Hypoxia と aging，ischemia における U-factor 活性の相違[8]は組織の high-energy 量の差で説明されるだろう[5].[10]。

Hypoxia における Mt の Ox-P 能の reversible と irreversible の division は 60min と 90min の間にあったので，この 105,000g 上清に見られた物質により Mt の機能が特に irreversible になるとは考えられない。電子顕微鏡を用いての検討で Mt の reversible，irreversible は crista の存在が重要な因子であり，cytoplasm の Mt 以外の顆粒も影響するものと考えられる。

Hypoxia によりもたらされるこの活性化物質の由来及び，その活性化 mechanism について，さらに hypoxia と違った条件下で得られた cytoplasm に存する Mt の Ox-P 抑制物質[3].[6]の関係については今後の検討を待たねばならない。

(電子顕微鏡写真は本学第2病理学教室，森　俊雄博士の協同によるものであり，ここに感謝の意を表明する.)

参考文献

1). Chance,B. and Williams,R.G., Adv. Enzymology., 17, 65 (1956)

2). Gray,E.G., Electron microscopic anatomy, ed. by S.M.Kurtz, Academic Press, New York, p. 369 (1964)

3). Loh,H.H., Volfin,P., and Kun,E., Biochem., 7, 726 (1968)

4). Lowry,O.H., Rosebrough,N.J., Farr,A.L., and Randall,R.J., J,Biol. Chem., 193, 265 (1965)

5). Lowry,O.H.,PPassonneau,J.V., Hasselberger,F.X., and Schulz,D.W., J, Biol. Chem., 239, 18 (1964)

6). Melloss,A., Tappel,A.L., Sawant,P.L., and Desai,I.D., Biochim. Biophys. Acta., 143, 299 (1967)

7). Ozawa,K., Seta,K., Araki,H., and Handa,H., J, Biochem., 61, 512 (1967)

8). Ozawa, K., Seta,K., and Handa,H., Folia. Psychiat. Neuro. Jap., 20, 73 (1966)

9). 菅野　司., 長井音次., 第11回日本神経化学会抄録集 41, (1968)

10). Sugano,T., Nakase,Y., Tujimoto,T., and Nagai,O., Wakayama.Medical.Reports 13 in press

11). Wojtczak,L., and Lehninger,A.L., Biochim. Biophys. Acta., 51, 451 (1961)

19. 脳ミトコンドリアのDNP－stimulated ATPaseの失活とその保護物質について

山口 三千夫（岐大・医・Ⅱ外）
石井 昌三（順大・医・脳神経外）

一般に脳のミトコンドリア（以下 Mt. と略記）はAgingによって，その酸化的リン酸化能のすみやかな低下をきたす事が知られている．またATP-Pi 交換反応とかDNP-stimulated ATPase活性などもMt. の酸化的リン酸化能の障害に平行して低下する事実もこれまでに報告されてきた．われわれは脳浮腫状態において脳Mt. がどのようなふるまいを示すのかと研究をすゝめ，小沢らの方法（6）で脳Mt. を分離し，そのDNP-stimulated ATPase 活性を測定してきた．そして脳Mt. を *in vitro* で age してそれらと脳浮腫との関連について興味ぶかいデータを得る事ができた（9）．それらの実験を行なっているとき，われわれは脳Mt. のDNP-stimulated ATPase が *in vitro* でも *in vivo* でも非常に短時間のAgingによって失活する事に着目した．この失活を防止する事を考えて，以下の実験をすゝめ，脳細胞中に自然に存在し，細胞分画法では上清の部分に含まれるある物質が脳Mt. のAgingによる失活を防止する事を知った．

実験の方法

体重150~250gのラットを用いた．脳のMt. は小沢ら（6）の方法によって調製し，その Pi 画分を氷冷したMt. 調製液（小沢法のもの）に浮遊させて，Agingの実験を行なった．Agingには Mt. 浮遊液を30°の水浴に入れ，0，3，5及び10分間放置して行なった．このときは主に大気中でゆるく振とうしてage したが，純酸素中でもまたはやや嫌気的な条件下でもagingを行なってみたが，どの場合もMt. の失活のはやさには大きな差を認めなかった．Aging に際してアルブミン，脳の上清成分，またはこの上清成分に種々の操作を加えたもの，又クレオチドの標品などを aging system に混ずる事によって，これらの物質の脳Mt. に対する作用を検した．Aging が終了すれば，ただちにATPase活性を測定した．これには 75mM KCl, 50mM Tris-HCl, 6mM ATP-tris, 0.2mM DNPを含み，Mt. は蛋白量として約0.1~0.2mg 用いる方法で行ない，全量2.0mlとした．30°, 15分の反応は氷冷したTCA液を加えて停止させ，遠沈した上清についてPiをAllen（1）の変法を用いて測定した．脳の上清（以下 SUPN.）を得るには断頭して放血したラットの脳を約5倍量のMt. 調製液でホモゲナイズし，直ちに 48,000×g，2時間遠沈した．得られた無色透明な液は，必要に応じて次のような処理も行なった．即ち透析にはセロファンチューブを用い，透析用外液には0.3Mマニトール溶液を用いた．透析の内液，外液の量の比率は1:500 または 1:3 とした．ゲル汎過を行なう場合にはSephadex G 25のカラム（2.5×15 cm）をMt. 調製液でよく洗い，次にSUPN. をゲル汎過した．下行法で，溶出液にはMt. 調製液を用いた．溶出されてきた各分画はそれぞれMt. の失活防止能があるかどうかチェックされた．SUPN. の1:3透析外液に対する活性炭処理を行なう場合は，透析した外液の20%(W/V)の活性炭（メルク製）を加え，塩酸でpHを2.0とし低温室に2時間，常時かくはんして放置した．次に遠沈して活性炭を除き，KOHを加えてpHをもどした．この実験のコントロールには，活性炭を加える事以外は全て同様の操作を行なったものを用いた．又クレオチドは市販のものを用い，Tris塩としpH 7.4，濃度 2mMとしてaging system に用いた．このときヌクレ

オタド由来のPiはATPase活性測定には影響しない程度であった．脳の上清の熱処理は50°の水浴中で20分行ない，特に沈でんは生じなかった．ATPの量を知るためには，Strehler & Totterの方法（11）を用いたが，これに要するホタル虫体抽出物の凍結乾燥物はWorthington Biochemical Corporationより，ヌクレオチドとアルブミンはNutritional Biochemicals Corporationより購入した．アルブミンはchenの方法（3）によってあらかじめ脱脂して使用した．その他の試薬は全て特級を用い，水は再蒸留水を用いた．ヌクレオチドのペーパークロマトグラフィーはRazzell & Khoranaの方法（7）によった．

実験成績

脳Mt.のAgingによるDNP-stimulated ATPaseの失活は図1のように著明であった．SUPN.，その透析外液，脱脂したアルブミン等がAging systemに存在すればMt.の賦活失活はDNP-stimulated ATPaseに関して起ってこない事が観察された．アルブミンによる効果はchefurka（2）がマウス肝のMt.について詳しく報告している．しかし組織のホモジネート中にある可溶成分がMt.のDNP-stimulated ATPase活性の低下を防ぐ事実は今まで報告をみていない．次にこの有効成分が透析膜を通過可能である事はSUPN.を1:500で透析した内液にはこのATPase保護作用は失われ，1:3で透析した場合，外液にも十分ATPase保護作用がある事から決定的となった．（1:500の透析結果のデータはここに示さない）．Sephadexカラムを用いてSUPN.をゲル沪過してみると図2のように260mμに極大吸収を示す画分にMt.失活を防止する能力が認められ，ゲル沪過の上からもヌクレオチドが推定された．そこでSUPN.の1:3透析外液に対し

図1．

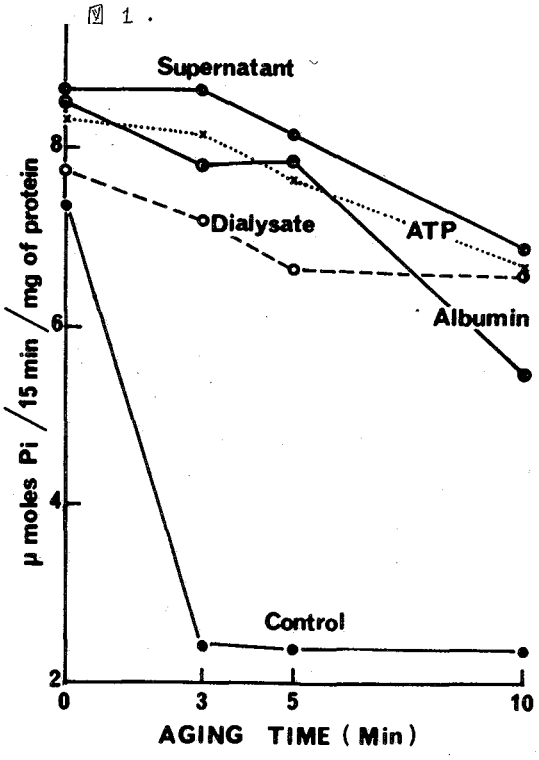
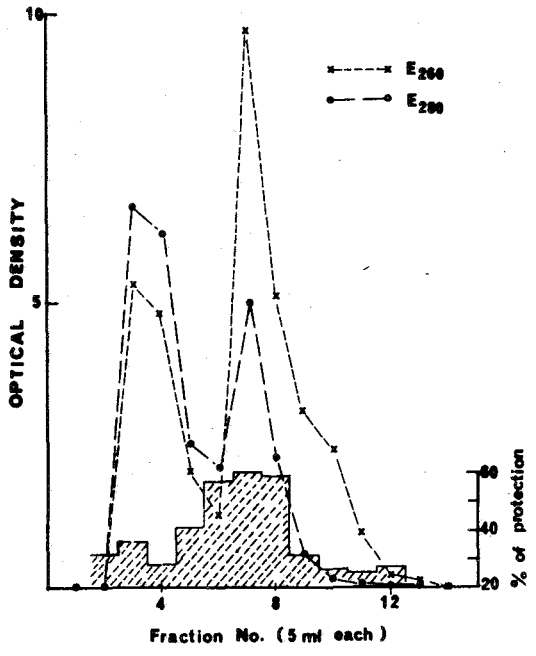


図2．



活性炭処理を行なってから，Mt. の失活防止能を比較してみると図3のようになった．活性炭処理と全く同様なpH変化だけ行なったものはSUPN.（その1に3透析外液）と同程度のMt.失活防止能がみられたが，活性炭によって有効成分は吸着されるため，活性炭処理をしたものにはMt.失活防止能力のあきらかな低下が認められた．SUPN.中のヌクレオタイドが有効成分である可能性が非常に強くなったので，SUPN.中に含まれるヌクレオチド類について ペーパークロマトグラフィーを行なった．SUPN.のPCA抽出物について調べ，ATPが主たる成分である事を知った．ここで，Aging system中に市販のATP, ADP, GTP, NAD を含有させてMt.失活に対する作用をみると図4のようになった．ATPにはすぐれたMt.失活防止能力がみとめられ，その他の物質は効果が少ないかまたは無効であった．次に中性のpHで脳の上清を50°, 20分間熱処理したところ，Mt.の失活防止能力は低下した．即ちfresh SUPN.とともにageしたものは5分でも0分値の94.0±0.3，熱処理をしたものでは72.1±9.2, Aging systemに何もくわえないcontrolでは，48.5±2.3というパーセンテージであった．このとき同じサンプルでホタル抽出物を用いて検査して熱処理したものからはATPが検出されなかった．これらはそれぞれ3回の実験を行なって平均値をとった．

図3.

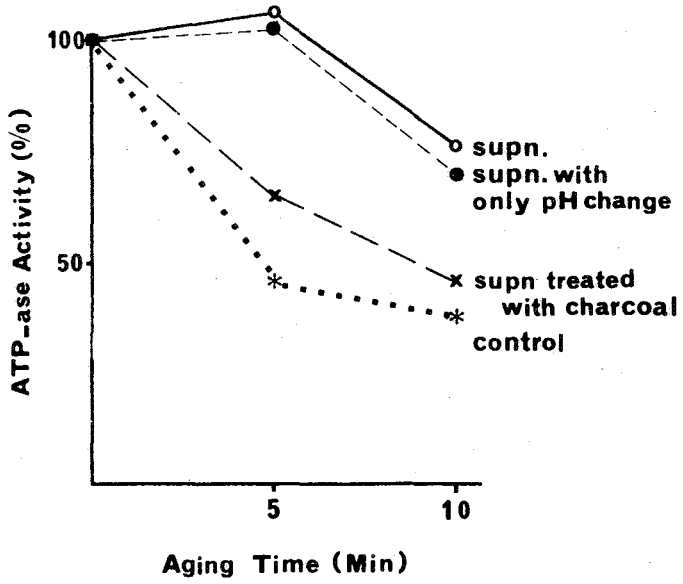
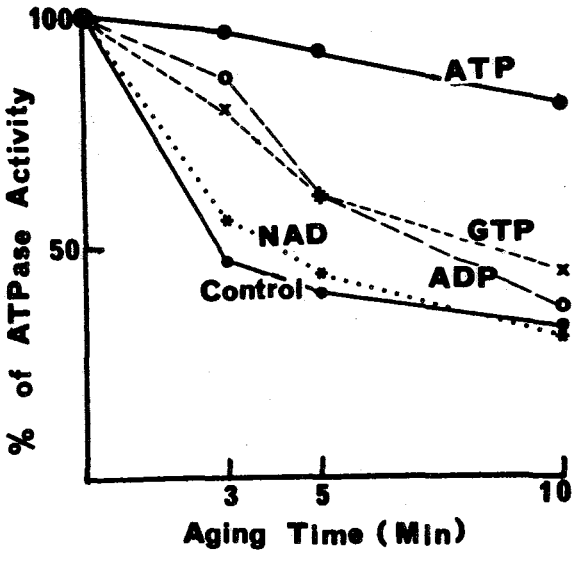


図4.



考察

上記の結果から脳Mt.のDNP-stimulated ATPase活性の低下を防止するのに，脳の上清成分（SUPN.）またはその透析可能成分が有効であることが認められた．一方脱脂したアルブミンもあきらかに有効であった．これは小沢らがエタノール可溶性でアルブミンに吸着されうる物質が，脳Mtをageすると蓄積することを報告（6）している事，及び石井らは脳をageすると組織中に遊離型高級脂肪酸またはそれを主成分とする物質が増加すると報告（4）

していることからもアルブミンが有効であろうことは考えられる．しかしSUPN. 中のそれもおそらく又クレオチド成分が脳 Mt. の Aging を防ぐのはなぜであろうか．一般に Mt. の酸化的リン酸化が障害されていくメカニズムについては，上記の遊離型高級脂肪酸が蓄積するという考えの他に，Mt. の swelling が原因であるとか，ホスホリパーゼ等の作用により Mt. 自身のリポ蛋白の分解または変性が原因とする説（8）もある．また Aging により Mt. から特殊な活性因子が欠落するという考えもあり（5，10），これは主に又クレオチドが想定されている．われわれの場合 NAD は無効であったが Aging system 中に ATP の量がある程度保たれていれば Mt. の DNP-stimulated ATPase の活性は保護されるようにみえた．SUPN. 中の有効物質には ATP 以外のものも含まれているかも知れず，今後なお検索を続けたいと考えているが，今かりに ATP がどう働くかを考えるとき，われわれは次のような試案を考えてみた．脳細胞内で遊離型高級脂肪酸を活性化して代謝回転にくみこむと考えられる酵素に Acyl CoA synthetase があるが，この酵素は ATP と共存しないと失活するという事実があり（佐藤，山口：未発表のデータ，1969），あるいは脳細胞中の一定量の ATP は Mt. 中の Acyl CoA Synthetase の失活を防ぐために必要なのではないかと考えられる．

文献

1. Allen, R. J. L., Biochem. J., 34, 858 (1940).
2. Chefurka, W., Biochemistry, 5, 3887 (1966).
3. Chen, R. F., J. Biol. Chem., 242, 173 (1967).
4. 石井昌三，佐藤潔，山口三千夫，第27回日本脳神経外科学会総会，シンポジアム 13，II-107 5, (1968)，東京
5. Lester, R. L. and Hatefi, Y., Biochim. Biophys. Acta, 29, 103 (1958)
6. Ozawa, K., Seta, K., Takeda, H., Ando, K., Handa, H. and Araki, C., J. Biochem. 59, 501, (1966).
7. Razzell, W. E. and Khorana H. G., J. Biol. Chem., 236, 1144 (1961).
8. Rossi, C. R., Sartorelli, L., Tato, L. and Siliprandi, N., Arch. Biochem. Biophys. 107, 170 (1964).
9. Sato, K., Yamaguchi, M., Mullun, J. F., Evans, J. P. and Ishii, S., Arch. Neurol. (1969) in press.
10. Siekevitz, P. and Potter, V. R., J. Biol. Chem., 215, 221 (1955).
11. Strehler, B. L. and Totter, J. K., in Glick, D. (ed.), Method of Biochemical Analysis, Vol. 1, Interscience Publisher, New York, 1954, p. 341.

20. 剔出白鼠交感神経節のカリウム効果

永田　豊・御子柴克彦
（慶大・医・生理）

剔出脳切片の組織呼吸は、Medium中のKイオンを増すことによって著しく増強されることは"K-効果"として　よく知られたところである。此の高K^+に対する代謝系の促進が、神経組織を構成している神経細胞でおこるのか、あるいはグリア細胞成分が関与しているのかを知ることは、神経系の代謝を研究してゆく上に極めて重要かつ興味あることである。　我々は　ネズミの上頸部交感神経節の節後神経軸索切断手術により、神経細胞の脱落、シュワン細胞増殖標本を作製した。この標本と神経節細胞を含む正常神経節と比較することによって、K^+イオンによる刺激代謝が、神経細胞あるいはシュワン細胞の何れの成分で主として行われているかを明らかにしようと試みた。

材料ならびに実験方法

体重200g前後の白ネズミをラボナール麻酔(40mg/kg)後、偏側上頸部交感神経節の節後神経軸索を無菌的に切断手術を行い、約一週間後に、両側神経節を剔出して実験に用いた。組織の酸素消費はミクロチェンバーに装置したベックマン酸素電極により、又ブドウ糖消費および乳酸生成は、それぞれ glucose oxidase-peroxidase 法[1]により　乳酸脱水素酵素を用いて[5]測定を行った。^{32}Pの燐脂質への代謝回転は、神経節を^{32}Pを含む溶液(100μc/ml)中で3時間 incubation 後、2:1 chloroform : methanol により燐脂質を抽出し、硅酸沪紙で分離、各燐脂質分画への放射能のラベリングを測定した。[9]
又炭酸脱水酵素活性は、Wilbur & Anderson ら[14]による pH 電極による測定を行った。

実験結果ならびに考察

上頸部交感神経節は神経細胞、シュワン細胞(グリア)等を含み酸素消費、ブドウ糖消費、乳酸生成等の面からみて、末梢神経線維より脳切片の代謝系と近似して居る、比較的高い代謝系を有することが知られている。　又、上頸部交感神経節は、剔出後も適当な環境の下では、シナプス伝達を記録出来るので、神経組織の興奮時の代謝的特徴を知ることが出来る。既に Larrabee らによって、節前線維の連続電気刺激により酸素消費、ブドウ糖利用ならびに乳酸生成の明らかな増加が観察されている。[6][8]又、剔出神経節を^{32}Pを含む溶液中で incubate した後、細胞膜成分の主な構成成分である燐脂質分画への放射能のとり込みをみると、電気刺激によって、特に phosphatidyl-inositol 分画への^{32}P-incorporation が明らかに高まることが認められている("inositol 効果")。[9]この"inositol 効果"は、シナプス伝達をクラーレで block したり、シナプスのない Ganglion nodosum ではおこらない事などから考えてシナプス伝達による神経細胞の興奮の現象と密接に関連した現象と考えられた。[10]
溶液中のCaイオンの除去を行うと、神経細胞興奮による spontaneous discharge が

おこるが、代謝的にも酸素消費、ならびに phosphatidyl inositol への ^{32}P-incorporation の増大が認められた。又落液中に Ach + Eserine (各 $10^{-4}M$) を加えた場合も、やはり電気刺激や Ca^{++}-free の場合と同様、酸素消費と inositol 効果が認められた(表1)。かように神経節内の神経細胞の興奮活動がおこっている場合、それが代謝系の促進として認められる。

表1 EFFECT OF ACTIVITIES ON OXYGEN CONSUMPTION & "INOSITOL EFFECT" IN RAT'S EXCISED CERVICAL SYMPATHETIC GANGLIA

	Oxygen Consumption (μ mol/g/h)	Change %	^{32}P-Incorporation in Ptd-inositol
In SBS	58.9±9.20(15)	---	1.000
In Ca^{++}-Free Medium	66.9±8.50(3)	+ 13.6	1.270
+ Eser. + Ach (10^{-4}M)	67.7	+ 15.0	1.410
In K^+-Rich (80 mM) Med.	71.9±3.14(6)	+ 22.3	2.545

SBS : Standard bathing solution.

衆知の如く、落液中のKイオン濃度を増加させると、中枢神経組織の酸素消費が著明に増加する"K^+ 効果"の現象が知られている。此の"K^+ 効果"は末梢神経線維や肝、腎等の切片ではおこらない。上頸部交感神経節では、脳切片より少いが、明らかに K^+ 濃度の高い(80mM)溶液中に於て酸素消費の増大が認められた(表2)。この際 ^{32}P の燐脂質へのとり込みをみると phosphatidyl-inositol 分画のみならず phosphatidyl choline, phosphatidyl ethanolamine, phosphatidic acid 分画でも incorporation の増加が認められた[12]。

そこでKイオンによる神経節の呼吸ならびにブドウ糖、燐酸代謝系の増強が、組織内の神経細胞に由来するのかあるいは周囲をとり囲んでいるシュワン細胞の関与によるのかという点は興味ある問題である。新鮮脳から Hydén らの方法で分離した単一細胞の呼吸を micro-diver を用いて測定した Hertz ら[4]の結果では、K^+ 効果はグリア細胞にのみ現われ、神経細胞には見られないと云っている。一方、沪過、分別遠心法による脳の分離細胞を用いた Roese ら[2][13]の実験では、神経細胞、グリア細胞共に K^+ による呼吸代謝系の増強が示されている。

表2 EFFECT OF POTASSIUM IONS ON OXYGEN CONSUMPTION IN EXCISED RAT'S TISSUES (μ mol./g-wet wt./hr.)

	In SBS	In K^+-Rich(80mM) Medium	Change %
Brain Cortex Slices	90.3±6.02(4)	140.9±16.1(4)	+ 56.0
Corpus Callosum	69.3	101.0	+ 46.2
Cerv.Symp. Ganglia	58.8±9.20(15)	71.9±3.14(6)	+ 22.3
Vagus Fibers	25.8±6.08(13)	25.4±4.09(3)	- 1.4
Liver Slices	45.7	50.5	+ 6.0
Kidney Cortex Slices	69.1	70.6	+ 2.2

我々は先に報告した上頸部交感神経節の軸索切断手術(axotomy)により、神経細胞の脱落とシュワン細胞成分の増殖した標本を得ている[11]。此の標本を神経細胞を含む非手術側神経節と比較することによって、神経細胞、グリア細胞の代謝的特性を明らかに出来ると考えた。

炭酸脱水酵素はイオンの能動輸送が活発に行われている赤血球、胃粘膜、脈絡膜組織等で極めて高い活性を示すことが知られている。Giacobini ら[3]はこの炭酸脱水酵素が、グリア細胞内に神経細胞内よりも数倍から数十倍濃縮されていることを報告している。そして高い炭酸脱水酵素活性が、グリア細胞の生化学的標識として使用され得ることを示唆しているが、その機能的意義については不明である。そこで、pH 電極による炭酸脱水酵素活性を測定したのが表3であるが、交感神経節は脳皮質に比べて極めて低い活性しか示さないが、手術側神経節では、ほぼ2倍の活性の増加が認め

表3 CARBONIC ANHYDRASE ACTIVITY IN NERVOUS TISSUES

	Carbonic Anhydrase Unit/mg-protein
Cerv. Sympathetic Ganglia	
Normal control	0.803 ± 0.218 (9)
Deneuronated	1.796 ± 0.404 (9)
Vagus Fibers	0.947 ± 0.380 (3)
Brain Cortex	4.750 ± 1.380 (3)
Blood	17.66 ± 2.880 (5)

Carbonic anhydrase unit = $\frac{To - T}{T \times \text{mg-protein used}}$

T = Time for pH drop in sample. To= Time for pH drop in H_2O
Mean = S.E.M.. Experimental numbers in parentheses.

表4 EFFECT OF AXOTOMY ON OXYGEN CONSUMPTION & "INOSITOL EFFECT" IN EXCISED CERVICAL SYMPATHETIC GANGLIA FROM THE RAT

	Oxygen Consumption (μ mol/g/h)	Change %	^{32}P-Incorporation in Ptd-inositol
Normal Control Ggl.	58.9±9.20(15)	-----	1.000
Operated Ganglia	42.2±9.80(15)	- 28.2 (100)	0.555
In Ca^{++}-Free Medium	39.1	- 33.5 (92.4)	0.561
+ Eser. + Ach (10^{-4}M)	46.2	- 21.7 (98.0)	0.600
In K^+-Rich Medium	49.5±8.09(6)	- 16.2 (117)	1.249

表5 EFFECT OF POTASSIUM-RICH MEDIUM ON OXYGEN CONSUMPTION AND GLUCOSE METABOLISM IN EXCISED CERVICAL GANGLIA WITH AND WITHOUT AXOTOMY

	O_2 Uptake (μ mol/g/h)	Glucose Util. (μ mol/g/h)	Lactate Output (μ mol/g/h)
Normal Control Ggl.			
In SBS	58.9±9.20(15)	12.6±1.06(10)	8.23±1.43(10)
In K^+-Rich(80mM)	71.9±3.14(6)	20.2±5.06(5)	19.5±2.69(5)
Change %	+ 22.3	+ 48.5	+ 124.5
Operated Ganglia			
In SBS	42.2±9.80(15)	13.1±1.33(7)	9.20±2.25(7)
In K^+-Rich(80mM)	49.5±8.09(6)	18.6±3.84(4)	15.9±3.64(4)
Change %	+ 17.0	+ 41.9	+ 72.8

SBS: Standard bathing solution.

られた(表3)。このことは、軸索切断手術によってグリア性の細胞成分の増殖がおこっている事を考えさせる。

手術側標本の酸素消費は、正常神経節に比べてやや低い値を示すが、Ca-free あるいは、Ach + Eserine (各 10^{-4}M)添加による神経細胞の刺激興奮の条件では、呼吸の増強は殆んど認められない。^{32}Pより phosphatidyl inositol への放射能の incorporation は、軸索切断手術によってほぼ1/2に減少するが、Ca-free や Ach + Eserine 添加でも変化はみられない。然し、medium中のKイオン濃度を80mMに高めると、酸素消費もやや増加するが、正常神経節の呼吸レベルよりは、やや低く留る。そして inositol 効果は正常神経節のレベルをやや越える程の^{32}P-incorporation の増強が認められた(表4)。この様に大部分の神経細胞がシュワン細胞成分でおおわれた標本でも、K^+に対する呼吸ならびに phosphorlipid turnover の増強がみられたことから、グリア成分の代謝的役割が考慮されねばならないだろう。

然しながら、Kイオンによる酸素消費、ブドウ糖代謝、燐脂質代謝系の増強は、神経細胞を含む非手術側神経節標本に於てより著明であることから、神経細胞体の代謝系もまたグリア成分よりも、より多く関与しているのではないかと想像される(表5)。Kuffler ら[7]は巨大細胞をもつヒルの神経節での^{14}C-glucose より ^{14}C-glycogen への置換代謝は neuron でも glia でも全く同様にみられるし、また glia をとり除いた裸の neuron でも一定期間の興奮性をもつという事から、神経細胞が代謝的にも機能的にも重要な役割を果していることは疑いない。然し周辺グリアの代謝的役割あるいは興奮過程に於けるKイオンの緩衝作用なども決して否定出来ないところであろう。

まとめ

上頸部交感神経節の軸索切断手術により、神経細胞の脱落、シュワン細胞成分の増加した標本を作り、これを神経節細胞を含む正常神経節と酸素消費、ブドウ糖代謝について比較検討し、ニューロンとグリアの代謝的特徴を明らかにしようと試みた。

1： 大脳皮質切片でみられるのと同様、"K-効果"は上頸部交感神経節に於ても明らかに認められたが、その増加率は脳切片よりやや低い。

2： 手術側神経節組織の炭酸脱水酵素活性は対称側標本より著明に増加している。

3： 手術側標本では、非手術側標本に比べて ^{32}P の燐脂質各分画への incorporation は低下するが、溶液中の K^+ 増加により再び ^{32}P-labelling は、増強する。

4： 手術側神経節でも K^+ による呼吸ならびにブドウ糖代謝系の刺激増強がみられるが、正常神経節に比べて増加率は低い。

以上の事実より、神経節に於ては、神経節細胞が機能代謝上重要な役割を果していると考えられるが、グリア成分の関与も充分考慮されねばならない。

文献

1) Bergmeyer, H.-U. & Bernt, E. (1965) In " Method of Enzymatic Analysis", Eds. by Bergmeyer, H. -U., Academic Press, London & New York, pp. 123-133

2) Bradford, H.F. & Rose, S.P.R. (1967) J. Neurochem. 14, 373

3) Giacobini, E. (1962) J. Neurochem. 9, 169

4) Hertz, L. (1966) J. Neurochem. 13, 1373

5) Hohorst, H.-J. (1965) In "Method of Enzymatic Analysis", Eds. by Bergmeyer, H.-U Academic Press, London & New York, pp. 266-270

6) Horowicz, P. & Larrabee, M.G. (1958) J. Neurochem. 2, 102

7) Kuffler, S.W. (1967) Proc. Roy. Soc. Ser. B. 168, 1

8) Larrabee, M.G. & Klingman, J.D. (1962) In "Neurochemistry", 2nd Edition, Eds. by Elliott, K.A.C., Page, I.H. & Quastel, J.H., C.C.Thomas Publ., Springfield, Ill pp. 150-175

9) Larrabee, M.G., Klingman, J.D. & Leicht, W.S. (1963) J. Neurochem. 10, 549

10) Larrabee, M.G. & Leicht, M.G. (1965) J. Neurochem. 12, 1

11) Nagata, Y. & Tsukada, Y. (1968) Exp. Brain Res. 5, 202

12) 永田, 塚田 (1968) 日生誌., 30, 314

13) Rose, S.P.R. (1967) Biochem. J. 102, 33

14) Wilbur, K.M. & Anderson, N.G. (1948) J. Biol. Chem. 176, 147

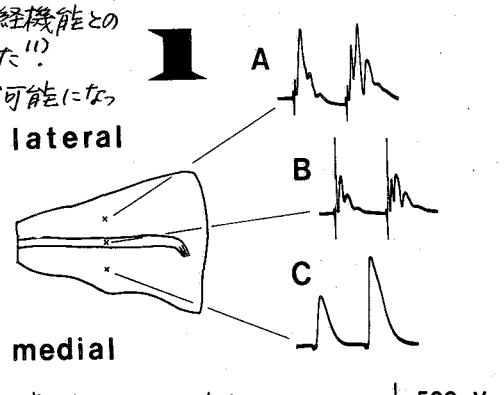
21. 脳皮質切片におけるシナプス電位とATPのレベル

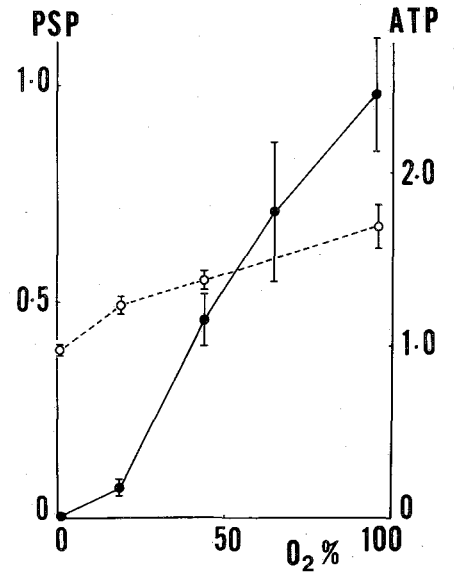
山本 長三郎・黒川 正則
（東大・医・脳研）

神経系の機能水準に応じて高エネルギー燐酸の量的変化が起こることは，古くからの実験によって知られている。[1)3)13)16)] しかし in vivo で行なわれたこれらの実験では，実験條件を単純化し任意に調節することはむずかしいため，実験の内容と解釈は大幅に制限されざるをえない。一方脳切片を用いる従来の実験では，代謝條件を任意に変え，その際 ATPの代謝回転の変化を正確に測定することができたが，神経機能との対応については間接的な推論に止まらざるをえなかった[11)]。

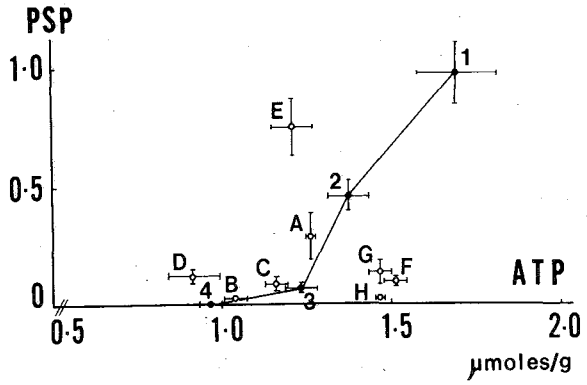
最近皮質切片におけるシナプス電位の記録が可能になったことは，[18)12)] 以上のごとき難点を克服する上に新しい方法を提供するものと考えてよい。

実験方法 モルモットの梨状皮質切片（18-25 mg）を Krebs-Ringer 重炭酸溶液（ただし Ca^{2+} は 0.75 mM. 10mM グルコースを含む）内に保ち（37°），特定の條件下でシナプス電位を記録，その直後に切片をホモジェナイズして ATP を定量した。標準状態では 95% O_2 : 5% CO_2 を通気，低酸素状態を作る場合には O_2 の一部または全部を N_2 に置換した。ただし反応系を外気から完全に遮断できなかったため，95% N_2 : 5% CO_2 を10分間通気後にも，溶液は完全な無酸素状態に達せず，CLARK 型酸素電極によって測定すると 0.5～1.5% O_2 の残存が認められた。反応容器，シナプス電位の記録法は既報[18)]のごとくである。切片を標準状態に30分保ったのち，第1回目の電位記録を行ない，500μV 以上の電位が記録される切片（全体の約75%）のみを実験に用いた。ATPは切片を 6% PCA 1 ml 内でホモジェナイズ，遠心後の上清を中和，沈澱を遠心で除いた上清について定量した（PGK-GAPDH 系．蛍光測光）[6)]。PCA抽出を2回くりかえすとATPの値は1回抽出の約107%に増えるが，この実験では1回抽出のみに限った。また Luciferin - Luciferase 系[14)]を用いてATPを測定すると（蛍光測光，または液体シンチレーション計測），PGK-GAPDH 系が 1.70 ± 0.06 (3) μmoles/g の ATP 値を与える試料について，1.70 ± 0.03 (3) となり，よく一致した。したがって脳切片内に含まれる微量の非アデニン性ヌクレオチドは，PGK-GAPDH 系によって ATPを測定する際，妨げにならないものと判断した。





実験結果 1) 標準状態の切片におけるシナプス電位（図1）．外側嗅索を電気刺激すると（矩形波，1－9 V，20μS），記録電極の位



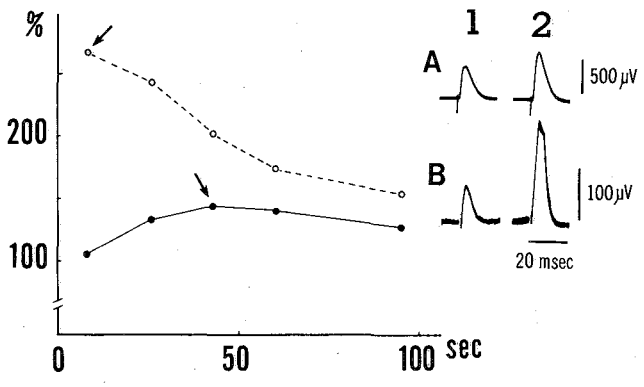
置によって電気活性の波型が変る．図1-Bは外側嗅索の表面から記録されるもので，二相性の速いふれ（シナプス前線維の活動電位）とそれに続くやや遅い陰性波（シナプス電位）から成る．陰性波には1-2個のhump（ノイロンの周期性放電）[12]が重なる．前梨状域からはBに似ているが，はるかに大きなシナプス電位が記録される（図1-A）．嗅結節表面からは，シナプス前電位を伴わない滑らかな陰性波が記録される（図1-C）．以下この波型のみを分析の対象とした．30分間，

3 標準状態に保った後，切片内のATPレベルは1.68±0.09 (10) μmoles/g である．切片をさらに30分間標準状態に保った後測っても，この値は変らない〔1.69±0.12 (4)〕．

2) ATPの減少とシナプス電位（図2，図3）．通気ガス内の酸素圧を下げると2-3分以内にシナプス電位の低下が始まり，以後15-20分間低下を続けたのち一定の大きさになる．それ以後少なくとも10分間はこの大きさを保つ．酸素圧低下に伴ってATPがわずかに減少すると，電位は激減する（図2．○---○ はATP μmoles/g．●——● はシナプス電位．標準條件下の大きさを1.0とした相対値）．図3の1，2，3，4は図2から再録したもので，低酸素下におけるATPと電位の関係を示す．A——Hは各種の阻害剤によるATPの低下と電位との対応を示す．〔A〕4×10^{-5}M 2:4-ジニトロフェノール．〔B〕1.8×10^{-3}M アジド．〔C〕アンチマイシン 0.5μg/ml．〔D〕9×10^{-5}M モノヨード酢酸．〔E〕1×10^{-3}M 2-デオキシ-D-グルコース（反応液内の10mMグルコースと置換）．〔F〕2.5×10^{-3}M フェノバルビタール．〔G〕1×10^{-4}M クロルプロマジン．〔H〕1.2×10^{-4}M クロルプロマジン．図3から次のことが結論される．a) 酸化的燐酸化の阻害剤（A, B, C）によるATP低下は，低酸素圧によるATP低下とほぼ同程度にシナプス電位を抑制する．b) 解糖阻害剤（D, E）によってATPが低下する際には，電位はa)の場合ほど著明には影響されない．c) フェノバルビタール，クロルプロマジンによるシナプス電位の低下は極めて高度であり，ATPのわずかな減少とは不釣合である．

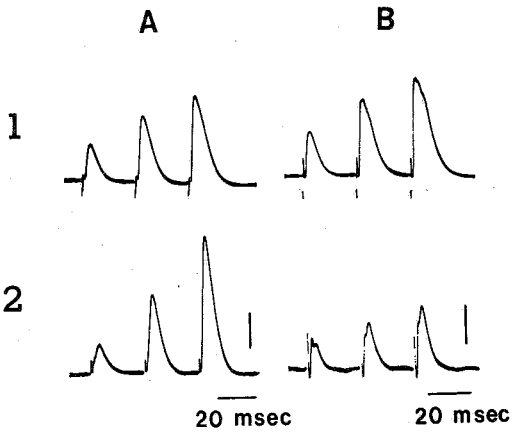
3) ATPの増加とシナプス電位　溶液内へ1mMクレアチン，1mMアデノシンを加えて切片と反応させると，37°，90分後切片内のATPは2.27 (2) μmoles/g にまで増加する．しかし電位には変化が認められない．

4



4) 低ATP切片における post-tetanic potentiation (PTP) および frequency potentiation (FP) の増強（図4，図5）．切片にテタヌス刺激（100 cpm，30秒）[13]を与えると，シナプス伝達は増強される（PTP）．図4の●——● は標準切片におけるPTPの時間的経過を示す（横軸はテタヌス刺激終了後の秒数）．PTPはテタヌス刺激後4-3秒で最高となり（矢印の●およびA-2），刺激以前の対照（A-1）にくらべて145%となる（A-2 : A-1）．PTPはゆるやか

に消失しながら100秒以上持続する。図4の○---○は 9×10^{-5}M モノヨード酢酸によって，ATPが0.91μmoles/g にまで低下した切片におけるPTPの経過である。もちろん標準切片にくらべて電位は低下しているが(A-1 と B-1 との比較)，PTPはテタヌス刺激直後に最高となり(矢印の○，および B-2)，対照の266%となる(B-2：B-1)。つまり低ATP切片では，PTPが増強される。これはモノヨード酢酸に止まらず，それ以外の阻害剤，低酸素に伴うATP低下の場合も同様である。低ATP下のPTPは図4の○---○に示されるように，標準切片におけるPTPよりも速やかに減退する。

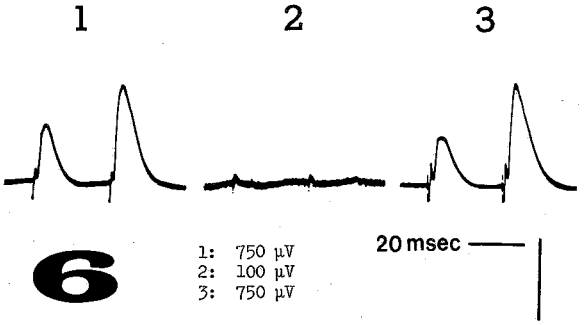


5
A - 1: 1 mV
A - 2: 125 μV
B - 1: 500 μV
B - 2: 125 μV

単一刺激を短い間隔で数回続いて与えると，あとの刺激にたいする電位は次第に大きくなる(FP)[8]。図5，A-1 は標準切片におけるFPを示す。第1刺激にたいする電位の大きさを1.0とすると，第2は1.9，第3は2.5。図5，A-2はモノヨード酢酸による低ATP切片におけるFPを示す。第1電位にくらべ，第2は2.8，第3は3.4倍の大きさをもつ。つまり低ATP切片ではPTPのみならずFPもまた増強されるのである。ただしクロルプロマジン(1×10^{-4}M)のみは例外で，これによるATP低下はPTPを増強させるが，FPの増強を伴わない(図5，B-1 と B-2)。10^{-3}M フェノバルビタールはクロルプロマジンとはちがってPTP，FPの両者を増強する。

5) シナプス電位の回復(図6，図7)。図6の①は標準切片，②は95%N_2：5%CO_2通気15分後，③はさらに28分間無酸素状態を持続後，標準條件に戻し15分後に記録した電位。この際電位の回復は，ATPの回復に対応している。1mM KCNによる電位低下，ATP低下もKCNを洗い去ることによって完全に回復する。しかし切片を無酸素，無基質の條件におくと，電位およびATPの非可逆的低下が起る。図7の①は標準切片，②は溶液からグルコースを除き，95%N_2：5%CO_2で通気して7分後，③はこの状態をさらに23分間持続後，標準條件に戻し30分後の記録。電位は回復しない。ATPは②では0.29，③では1.00μmoles/g であり，もっともよく回復した場合でも標準値の60%止りである。

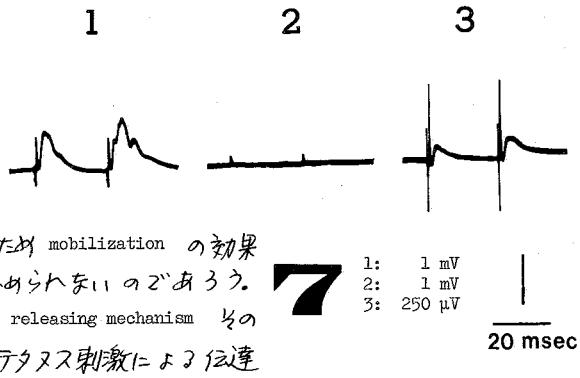
考　察　1) 低酸素状態ではもちろんATPの低下以外にも各種の代謝変化が起るが，これらの中でシナプス電位の低下を導く主因はATPの低下であると考えられる。このことはミトコンドリアにおけるATPの生成を特異的に阻害する物質が，低酸素下とほとんど同程度に電位を低下させ，同時にATPを低下させることから推定される。一方解糖によるATPはシナプス活動を維持する上に，酸化的燐酸化によるATPほど有効ではない。このことは神経細胞，ことに神経終末内におけるATP生成と利用のコンパートメントを予想させる。



6
1: 750 μV
2: 100 μV
3: 750 μV

2) ATPの低下がシナプス電位を低下させる理由として多くの過程が考えられるが，
a) 細胞内カリウムの漏出に伴う膜電位の低下，
b) 伝達物質合成の減少のほか，
c) 伝達物質遊出機構の抑制を仮定する必要があろう。c)はPTP，FPに関する実験結果を説明するためである。PTPはテタヌス刺激によって，伝達物質の遊出増加

mobilization の機構が発動されることに対応している.[4)5)] しかし一方テタヌス刺激は，神経終末内における伝達物質を消耗させることによって，シナプス電位を低下させる方向にはたらく.[4)15)] ATPが正常の場合には，テタヌス刺激に伴う伝達物質の消耗が著しく，従ってそれに続く単一刺激によって遊出される伝達物質の量は低下する．このため mobilization の効果が減殺され，PTPの初期相がはっきりとは認められないのであろう．一方低ATP條件下では伝達物質の遊出機構 releasing mechanism そのものが抑えられているという仮定が成立すれば，テタヌス刺激による伝達物質の消耗は少ないはずであり，従って総和としては mobilization が強調されるため，PTPの初期相が明らかになるのであろう．



3) ATPが低下すると伝達物質の遊出機構がなぜ抑制されるのか．これにたいして二通りの説明がありうる．第1は標準切片ではインパルスが神経終末の末端まで到達するのにたいし，低ATP下ではインパルスが末端まで十分に進入しえない可能性．もしこのようなことが実際に起れば，結果的に神経終末における活動電位が低下し，従って伝達物質の遊出も減少するはずである.[7)] 第2には遊出機構そのものがATP依存性である可能性．副腎髄質におけるカテコールアミン遊出の際，灌流液内にAMPやアデニンが探知されるという観察は，[3)] この可能性を示唆する．神経終末外膜における Na-K-ATPase 系の高活性は，[10)9)] この関連において考慮されねばならない．

4) AMES 等(1963)は光刺激に対する分離網膜の活動電位が無酸素下で低下するが，網膜を好気條件に戻せば可逆的に回復すること，しかし酸素，グルコースの両者が除かれる場合の低下は非可逆的であることを認めた.[2)] この知見は実験材料のちがいにも拘らず，その本項において我々の結果と一致するものである．AMES 等(1965)はまた無基質，無酸素による網膜ミトコンドリアの形態的損傷を確めており，[17)] これは我々の実験において確められたATP生成の非可逆的低下を説明する知見と考えてよい．

要　約　1) モルモット梨状皮質切片のATPレベルを変え，シナプス電位に起る変化との対応を調べた．2) 低酸素によってATPがわずかに低下すると(−20%)，電位は激減する(−93%)．ATPが正常の5%にまで低下するとシナプス伝達は完全に遮断される．3) 酸化的燐酸化の阻害剤は低酸素と同程度にATPおよびシナプス電位を低下させる．解糖阻害によるATP低下の場合には，シナプス電位の低下は軽度である．クロルプロマジン，フェノバルビタールはATP低下から予想される以上に高度の電位低下を起す．4) 低ATP切片では post-tetanic potentiation (PTP) および frequency potentiation が増強される．また標準切片にくらべてPTPはテタヌス刺激後早期に出現し，かつ速やかに減退する．5) 無酸素およびKCNによる切片のATP，シナプス電位の低下は可逆的である．しかし酸素とグルコースの両者が除かれると，これらの低下は非可逆的となる．6) 切片内ATPを135%にまで増加させても，シナプス電位は影響されない．

※ 君羊大・医・行動研：日本学術振興会・流動研究員として 東大・医・脳研に滞在 (1968年4月～1969年2月)

1) ALBAUM H.G., NOELL W.K. & CHINN H.I. (1953) Amer. J. Physiol. 174, 408 2) AMES A. & GURDIAN B.S. (1963) J. Neurophysiol. 26, 617. 3) DÖRING H.J. & GERLACH E. (1957) Arch. exp. Path. Pharmak. 232, 271. 4) ECCLES J.C. (1964) The Physiology of Synapses, pp. 75-100, New York, Academic Press. 5) GAGE P.W. & HUBBARD J.I. (1966) J. Physiol. 184, 353. 6) GREENGARD P. (1963) Meth. Enz. Anal., p. 551, Verlag Chemie. 7) HAGIWARA S. & TASAKI I. (1958) J. Physiol. 143, 114. 8) HILLARP N.-Å. (1958) Acta physiol. scand. 42, 144. 9) HOSIE R.J.A. (1965) Biochem. J. 96, 404. 10) KUROKAWA M., SAKAMOTO T. & KATO M. (1965) Biochem. J. 97, 833. 11) McILWAIN H. (1963) Chemical Exploration of the Brain, Elsevier. 12) RICHARDS C.D. & SERCOMBE R. (1968) J. Physiol. 197, 667. 13) STONE W.E., MARSHALL C. & NIMS L.F. (1941) Amer. J. Physiol. 132, 770. 14) STREHLER B.L. (1963) Meth. Enz. Anal., p. 559, Verlag Chemie. 15) THIES R.E. (1965) J. Neurophysiol. 28, 427. 16) THORN W., PFLEIDERER G., FROWEIN R.A. & ROSS I. (1955) Pflügers Arch. ges. Physiol. 261, 334. 17) WEBSTER H. DeF. & AMES A. (1965) J. Cell Biol. 26, 885. 18) YAMAMOTO C. & McILWAIN H. (1966) J. Neurochem. 13, 1333.

22. 脳灌流法による〔U-^{14}C〕グルコースを用いた血流障害時の脳代謝

渡辺昌祐・大月三郎・二宮淳明・帆秋孝幸・光信克甫・三宮崇典
河野沢与・鈴木常夫・奥村二吉　（岡大・医・神経精神）
小田琢三・畠瀬　修　（岡大・医・癌源研）

脳循環障害による脳障害の成立機転を解明するために、ネコ脳灌流法を用いて実験的血流障害脳を作成し、脳の解糖呼吸系代謝とこれに関連したアミノ酸代謝における障害度、および脳ミトコンドリア分画の酸化的リン酸化能ならびに呼吸調節能を検討した。

実験方法

ネコ脳灌流法において灌流人工血液に〔U-^{14}C〕グルコースを加えて灌流し、実験開始30分頃灌流圧を人為的に低下させることによって脳血流量を40～50%減少させ、さらに約40分間灌流を続けた。この間、脳血流量減少と同時に脳波は平坦化した。実験開始70分で脳を摘出し、脳のアミノ酸、ブドウ糖、乳酸、呼吸炭酸ガスへの放射能の移行を測定した。また、実験終了時可及的速やかに脳切片を切除し氷冷後、脳組織ミトコンドリア分画を分離し、酸素消費および蛋白量測定を行い酸化的リン酸化能を測定した。本編は血流障害3例、標準灌流高機能例3例、中等機能例3例、低機能例4例をまとめた。なお、標準灌流の機能状態の判定は既述[7]の通りである。

脳標本および脳動静脈血試料の分析、測定方法

1)脳灌流法は既載の方法[1]を用いた。　2)グルコースはSomogyi法[2]による除蛋白液を用い、Saifer & Gerstenfeld の glucose oxidase 法[3]によった。放射能の測定には、血液は上清液をそのまゝ用い、脳はSomogyi法による上清をDowex 50×4H$^+$カラムを通し、その水溶出液をDowex 2×8 OH$^-$カラムに添加し、その水溶出分画をグルコース分画とした。

3)乳酸量測定には血液、脳ともに5%トリクロール酢酸(TCA)除蛋白液を用い、Barker & Summerson 法[4]によって定量した。乳酸の放射能測定は、上記TCA上清のDowex 50×4H$^+$カラムによる水溶出液をDowex 1×8酢酸カラムに通し、水溶出分画を除去した後2N酢酸によって溶出する分画を乳酸分画として測定した。

4)脳遊離アミノ酸の分離、定量および放射能の測定：脳の5%TCA上清をDowex 50×4H$^+$カラムにより水溶出分画を除去した後、4Nアンモニア水による溶出液(アミノ酸分画)を減圧乾燥を3回繰り返し、作成した試料を既述の方法[5]でGlu. Asp. GluNH$_2$. GABAを測定した。また一部は柳本LC-4型アミノ酸自動分析装置を用いてAmberlite CG-120.(0.9×100cm)によりPH 2.86、0.3Nクエン酸リチウム緩衝液で流出させ測定した。放射能の測定は、アミノ酸自動分析装置に連結した島津型、フローアナライザーを用いて各アミノ酸の放射能を測定し、internal Standardization により補正した。呼吸炭酸ガスの放射能は既述の方法[1]を用いた。各試料の放射能はexternal および internal Standardization によって補正しdisintegration per minute (dpm)として現わした。脳内グルコース中間代謝物質の比較的比放射能(RSA)を次の様に示した。

$$RSA=\frac{SA(dpm/\mu\ mole\ Carbon\ Atoms)\ of\ Metabolites\ in\ Brain}{SA(dpm/\mu\ mole\ Carbon\ Atoms)\ of\ Blood\ Glucose}\times 100$$

5)ミトコンドリアの分離法はStahl らの方法[6]を一部改良した方法によった。

6)酸素消費は回転白金電極を用いたポーラログラフィーを応用した萩原らの方法[7]によ

り酸化的リン酸化能を測定した。反応は25°Cに恒温化した準閉鎖容器において標準反応液(0.1M蔗糖, 20mM KCl, 10mM Tris-Hcl : PH7.4, 0.1mM EDTA, 5mM $MgCl_2$, 5mM K-K-Pi : PH7.4, 0.05% BSA)を用いた。

7)蛋白量測定はBiuret法[8]を用いた。

実験結果および考察

血流障害脳の脳内物質含有量を表1に示した。標準灌流脳のグルコース代謝関連物質の脳内含有量と血流障害脳のそれとを比較すると、乳酸量が標準灌流においては機能状態の低下するにしたがって増加する傾向が認められているが[1]、血流障害脳では標準灌流の中等機能状態と低機能状態とのほぼ中間値を示した。グルコース、グルタミン酸、アスパラギン酸グルタミン量には有意の差は認めなかった。アラニン濃度は標準灌流低機能状態で幾分増加傾向を示し、GABA量も低機能状態および血流障害時には増加する傾向にある。

表1 灌流脳の糖中間代謝物質濃度

(μmole/g brain)

	血流障害脳	標準灌流脳		
		高機能	中等機能	低機能
Glucose	2.08±0.14	1.86±0.43	1.99±0.50	1.64±0.72
Lactate	7.45±0.81	4.01±0.54	5.23±0.81	10.44±1.66
Alanine	0.63±0.03	0.65±0.33	0.51	0.90±0.20
Glutamate	8.25±0.43	7.98±2.24	8.09±1.18	8.16±1.35
Aspartate	1.85±0.08	1.26±0.02	1.36±0.44	1.79±0.49
Glutamine	3.66±0.60	3.35±0.44	4.03±0.86	3.36±0.65
GABA	1.45±0.78	1.33±0.03	1.13±0.25	1.67±0.70

U-^{14}C-Glucoseのグルコース代謝関連物質へのとりこみをRSAで表わし表2に示した。脳内グルコースのRSAは、標準灌流脳、血流障害脳いづれにおいてもほぼ72~82%の間の値を示した。また、乳酸のRSAはいづれの場合も70%程度であり、グルコースから乳酸までの解糖系代謝過程におけるRSAの減少、すなわち解糖過程での内在性炭素による稀釈の度合いは標準灌流と血流障害では有意の差は認められなかった。血流障害脳および標準灌流低機能状態において脳の乳酸含有量に増加傾向がみられ、同時にRSAの増加がみられたことは、低酸素血による灌流の許覓[9]と一致する。

表2 [U-^{14}C] glucose を用いた灌流脳の糖中間代謝物質の比較比放射能

(%)

	血流障害脳	標準灌流脳		
		高機能	中等機能	低機能
Glucose	78.8±9.0	79.3±18.4	82.0±2.9	71.5± 7.2
Lactate	68.8±6.2	60.5± 2.9	67.9±6.3	69.2±11.6
Alanine	37.7±6.2	37.1± 2.1	33.1	55.5± 6.1
Glutamate	28.6±5.3	50.6± 7.2	33.5±5.9	25.3± 5.4
Aspartate	26.0±2.6	52.5± 6.4	29.8±2.4	25.0± 5.4
Glutamine	17.0±1.9	39.5± 5.8	16.7±1.7	17.7± 3.4
GABA	35.9±2.0	34.9± 6.4	22.8±1.5	18.6±13.0
CO_2	14.3±3.6	27.0± 4.7	21.3±9.9	20.9± 5.8

グルタミン酸、アスパラギン酸、グルタミンのRSAは標準灌流の中等機能状態および低機能状態例ならびに血流障害例ではほぼ同一レベルにあり、標準灌流高機能の

時のみ高い値を示した。GABAの脳内含有量について血流障害では、標準灌流高機能状態と比較してやや増加の傾向がみられるにすぎないが、RSAについてみると、血流障害例は35.9%と低機能状態のそれよりも高かった。また、標準灌流ではGABAのRSAはその機能状態が悪いほど減少傾向を示し、低機能状態4例の中でも機能低下時間が長いほどRSAの減少が認められ、値のバラツキが目立った。

血流障害例でGABAのRSAがprecursorであるグルタミン酸より高い値を示したことは興味あることであり、グルタミン酸の代謝的コンパートメントの役割と、GABA shuntのactivationが起因するものの原因と考えられる。

Cremer[10]、Gaitonde[11]らもC-グルコースを動物に投与し、GABAのSAが一時的にグルタミン酸のそれを上回る結果を報告し、active glutamate poolを想定している。また、Myles[12]らはhyperbaric oxygenでは、GABA shuntの代謝が低下することを認めている。David[13]は幼若ラットの頸動脈結紮によるアノキシアで脳のGABAの増加を認めており、脳のGABA shuntが脳循環障害と密接な関連のあることを示している。

アラニンのRSAについては標準灌流低機能状態で著しく高い値を示したが、高機能、中等機能、血流障害例では有意の差はなかった。

高機能状態ではピルビン酸よりTCAサイクルへの流入度が高く、乳酸のRSAに比較してTCA関連アミノ酸のRSAの減少度が比較的少ないが、低機能状態ではその減少度が著しく乳酸のRSAの40%以下に減少している。この際アラニンのRSAは減少度が少なく、ピルビン酸→アラニンへの代謝の比較的亢進が推定される。血流障害脳ではアラニンのRSAは、標準灌流高機能状態と同一レベルにあり、脳血流障害ではピルビン酸→アラニンの代謝は障害をうけない。

ミトコンドリアの酸化的リン酸化能および呼吸調節能について：標準灌流3例、血流障害例3例の結果を表3に示した。ミトコンドリアの機能障害として有意の差が認められたのは呼吸調節能で、標準灌流3例にくらべて血流障害例では3.1と幾分低下していたことである。これは最も障害を受けやすい機能を示すmarkerの一つである。呼吸活性は血流障害脳では、コハク酸酸化酵素活性がわずかながら亢進し、ピルビン酸－リンゴ酸酸化酵素活性はわずかながら低下した。このことは軽度ながらミトコンドリアの障害を示すものとみなすことができる。しかしADP/O比にはほとんど差が認められなかった。このことは細胞下レベルのミトコンドリアにおける障害の進行が前述の呼吸調節能の段階までであって、ADP/O比の低下までには進んでいないものと云える。たゞし、ミトコンドリア調整

表3　灌流脳ミトコンドリアの呼吸活性、呼吸調節能およびADP/O比

	標準灌流脳	血流障害脳
Respiratory Activity (mμ atoms oxygen uptake per mg protein per min)		
Succinooxidase	17.7±0.7	20.3±1.5
Pyruvate-Malate Oxidase	13.7±0.5	10.9±2.5
Respiratory Control	3.7±0.3	3.1±0.2
ADP/O Ratio		
+ Succinate	2.1±0.2	2.1±0.3
+ Pyruvate-Malate	2.8±0.2	2.9±0.2

中のaiationによって内在基質による呼吸で回復することも考えられるので、さらに方法論においてもより多くの検討を要する。

要約

血流障害脳の解糖呼吸系代謝を正常血流を推持した障害脳(低機能脳)の代謝と比較した。血流障害脳ではGABA shuntの活性化が認められ、GABAのRSAがグルタミン酸のそれを透過するが、低機能脳ではこの現象は認められない。低機能脳ではピルビン酸からアラニンへの代謝が亢進するが、血流障害脳ではこの現象は認められない。血流障害脳ではミトコンドリアの呼吸調節能の軽度低下が認められる。

文献

1) S.Otsuki, S.Watanabe, K.Ninomiya, T.Hoaki and N.Okumura(1968); J.Neurocham. 15, 859.

2) Somogyi,M.(1945); J.Biol.Chem. 160,69.

3) Saifer,A. and Gerotenfeld,S. (1968); J.Rab. Clin. Med. 51, 448.

4) Barker,S.B. and Summerson B. (1941); J. Biol. Chem. 138, 535.

5) 二宮淳明(1968);神経化学、7, 65.

7) 萩原文二、(1961);酵素化学シンポジウム 15, 312.

8) Gornall,A.G., Bardawill,C.J., and David,M.M. (1949); J.Biol. Chem. 177, 751,

9) Geiger,A., Gombos,G. and Otsuki,S. (1961); C.L.O.M.S. Symposium on the Selective Vulnerability of the CNS. to Hypoxemia, (Baden),

10) Crimer,Jill.E.(1964);J.Neurochem., 11,165.

11) Gaitonde,M.K., Dahl,D.R. and Elliot,K.A.C. (1964); Biochem. J. 94, 345.

12) Myles,W.S. and Wood, J.D. (1969); J. Neurochem., 16, 685.

13) David,A.R. and Jilek,L. (1965); J. Neurochem. 12, 837.

Sch
Silder disease

23. Sudanophilic Leucodystrophyと診断された患者の凍結保存脳 Myelinの生化学的特性

宮武　正（東大・医・脳研・神経内）
小林隆子　（上智大・理工・化）
小宮義璋・石川晋次（東大・医・脳研・生化）

Sudanophilic leucodystrophy（SLD）は脳白質の広汎な脱髄をきたし，病理組織学的にズダン好性物質の蓄積が認められる疾患である。この疾患に対する生化学的研究は主として脂質分析の面から行なわれて来た[3][9]が病因にせまる結果はいまだ報告されていない。今回我々は性格変化，視力及び聴力障害をもって発症し，次いで除脳硬直を呈し約10ケ月の経過後肺炎を併発して死亡し，病理学的にSLDと診断された患者（6才）の脳のMyelinについて(1)量及び比重，(2) 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase活性，(3)旋光分散の測定を行ない，その特性に関しての検討を行なった。検索部位としては，脱髄の高度な後頭葉とその軽度な前頭葉を用いた。患者脳は，死後約4時間で摘出し，使用するまで約2年6ケ月，フリーザー（−20°C）中に凍結保存した。

実験方法，結果及び考察

(1) Myelinの精製

Myelinの精製はAUTILIO ら[1]に従い，又蛋白量の測定はLOWRY ら[8]の方法で行ない，乾燥重量の測定は，一定量の試料をショ糖を除去後，試料皿にの せ減圧下で乾燥したものについて行なった。後頭葉白質からMyelin分画として回収された量は，前頭葉白質の1/9であった。これは病理組織学的に認められる脱髄の所見とよく一致する。又後頭葉Myelinの性状は前頭葉Myelinに比し黄色味を帯び，Myelin特有の粘調性を欠く。粗Myelinを0.25～0.8Mショ糖連続密度勾配により更に精製すると（図1）の如く，前頭葉MyelinはAUTILIO らの記載の通り，LightとHeavyの2つのbandに分れたが，後頭葉MyelinはHeavyのbandを欠き，Light Myelinのみであった。後頭葉Light Myelinは，前頭葉Light Myelinの1/8であった。又前頭葉粗Myelin分画中に占めるLight Myelinの割合は42%（乾燥重量）でありAUTILIO らの記載とほぼ一致する。前頭葉Myelinについて蛋白含量を定量すると，Light Myelinでは7.3%，Heavy Myelinでは23.1%であった。AUTILIO らはウシ脳Light Myelinで22%．Heavy Myelinでは26～29%の蛋白を含むとしているが，我々の測定方法と異なるため比較は困難である。後頭葉Myelinでは精製された量が少なかったため蛋白定量はできなかったが，比重からみて，前頭葉Light Myelinとほぼ同じと考えられる。

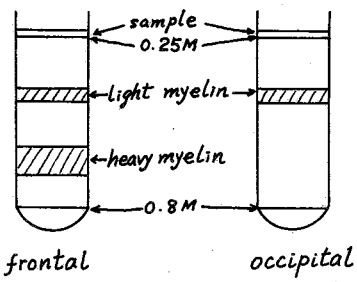


図1．ショ糖連続密度勾配遠心

(2) 比重の測定．

2mlの0.8Mショ糖溶液の上に26mlの0.8～0.25Mのショ糖連続密度勾配をつくり試料は約0.25Mショ糖濃度となるようにうすめて，その上に重層した。日立RPS 25ローターを用い，25,000 rpm 8時間遠心後，チューブの底に孔をあけ，20滴づつ分取し，

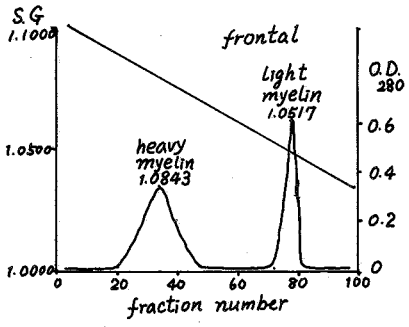


図 2. 前頭葉白質 Myelin の比重.

Regions	Specific activity (U/mg protein)
(1) Frontal white matter	
Total homogenate	2.40
Light myelin	0.275
Heavy myelin	4.34
(2) Occipital white matter	
Total homogenate	0.255
Light myelin	0.07
(3) Occipital gray matter	
Total homogenate	0.690
(4) Bovine brain white matter	
Light myelin	0.48
Heavy myelin	1.98

表 1. 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase 活性

その一部で島津 Saccharimeter により比重を,他の一部で 280 nm に於る吸光度を測定し各 band の比重をもめた。精製 Myelin の比重は前頭葉 Light Myelin では 1.0517, Heavy Myelin では 1.0843 であった。又後頭葉 Light Myelin では 1.0502 であった (図 2)。

(3) 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase 活性

この酵素活性測定は後頭葉及び前頭葉を 0.25 M ミヨ糖で 10% homogenate とした後 20 KC, 500 W, 10 分間超音波破砕した試料で行ない,精製 Myelin の活性も同様に超音波破砕した試料を用いて行なった。酵素活性は DROMMOND ら[2] 及び KURIHARA ら[5] に従って測定した。この酵素は KURIHARA ら[5] によると,その活性が Myelin 分画に回収されることが示されている。本症例においてこの酵素活性を測定した結果は表 1 の如くである。病変の著明な後頭葉白質 homogenate の活性は,前頭葉の 1/9.5 であり,この結果は,KURIHARA ら[6] による脱髄マウスの値と類似している。又後頭葉においては,皮質の方が活性が高く,白質は皮質の 1/2.7 にすぎない。これも後頭葉白質における脱髄の結果と考えられる。精製 Myelin について本酵素活性をみると,前頭葉 Light Myelin は Heavy Myelin の 1/16 でこの酵素は主として Heavy Myelin に存在するものと推定される。このことはウシ脳精製 Myelin についても同様である (Light Myelin は Heavy Myelin の 1/8.1)。後頭葉 Light Myelin は前頭葉 Light Myelin の更に 1/3.9 の活性しかなく,本症例のような脱髄疾患でこの酵素活性が著しく低下するのは,酵素活性の特に強い Heavy Myelin が破壊されるだけでなく,Light Myelin においても活性が低下するのも原因の 1 つであろう。

(4) 旋光分散 (ORD)

SCHMIDT らの X 線の散乱実験,電子顕微鏡による所見から Myelin の基礎構造は脂質二重膜と蛋白分子層の繰り返しによるサンドウィッチ状の所謂 unit 膜構造そのものであると考えられて来た。このような基礎構造が病変をもつ Myelin にも存在するのかどうか。又他の構造が存在するのかを知ることは正常,異常双方の Myelin 構造を論ずる際の基本的問題の 1 つである。このような設問に対するアプローチの 1 つとして,Myelin の helix 含量を旋光分散から推定する事を試みた。

まず我々がウシ脳から得た Myelin (Heavy + Light) についての ORD から次のことがわかった。1) ウシ脳 Myelin はそのままの水懸濁液としては,散乱のため満足な ORD は

得られない。2) 90% glycerol 中で散乱による影響を大部分取りのぞいて得られるORDは 240 nm 附近に極小を示すものとなり、これが α-helix に起因するものとしてもhelix 含量はごくわずかなものと計算される。このORDは無傷のミトコンドリアを90% glycerol 懸濁液として得られるORDに似ている。3) Myelin を1% SDS で分散させたもとのミセル構造を破壊してから水溶液の形としてORDを測定すると極小は 232 nm に移動して通常の α-helix の示すものとなり、その存在する蛋白全量に対する割合は、glycerol 中の5倍程度に増大する。glycerol suspension, SDS suspension 間のORDの変化がどのような原因に起因しているかは、今の段階では、はっきりは言えないが、SDSによって native の Myelin 構造が変換され、α-helix が新たに生じて来ている可能性がある。

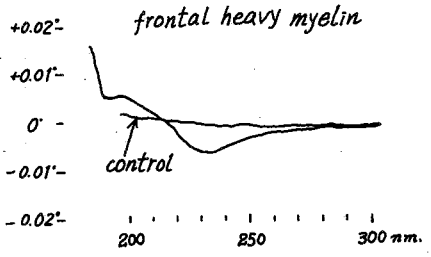


図 3-A. ORD (前頭葉白質 Heavy Myelin)

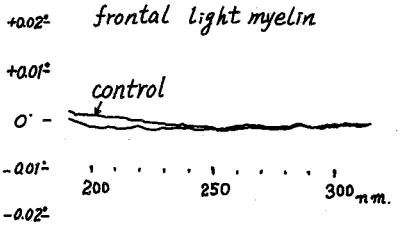


図 3-B. ORD (前頭葉白質 Light Myelin)

悪着脳 Myelin については、その蛋白中の α-helix 又はその conformation をとりうる最大値を知るため1% SDS 中のORDも測定した。(図3) にみられる通り、前頭葉白質から得られた Myelin の Heavy, Light 両分画について見ると、Heavy Myelin だけがアミノ酸平均残基量を 115 としたときの平均残基旋光度 $m'_{min} = 2580$ となる。[5] これから推定される α-helix の含量は 17~18% となる。この値は通常の細胞膜やミトコンドリア膜がSDS 存在下で示す α-helix 含量の 1/2 以下である。[6] 極小値 $\lambda_{min} = 232 \sim 234$ nm にあり、$\lambda_{cross\ over} = 214$ nm 前後である。これに比し、前頭葉の Light Myelin は1% SDS 中でも 200 nm 以上で何等のORDをもあたえない。後頭葉 Light myelin については蛋白濃度が低いために確定的な結果は得られなかった。

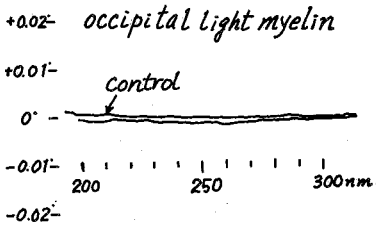


図 3-C. ORD (後頭葉白質 Light Myelin)

Heavy Myelin のみが少量の α-helix の存在をあたえるという事実が病変脳にのみかぎられたものであるか否かは、今後健常脳についても検討して見ないと何とも言えない。が Light Myelin に α-helix が検出されない事は Myelin の構造を論ずる上に1つの手がかりをあたえるであろう。又 α-helix (又はその conformation を取り得る部分) が Myelin 構造のどの場所に存在するかについても、これまでに得られた結果から模型を提出することができる。

比重測定の際お世話になった東大・医・生化学苅林一彦先生に感謝いたします。

文　献

1. Autilio, L. A., Norton, W. T., and Terry, R. D., J. Neurochem., 11, 17 (1964).

2. Drummond, G. I., Iyer, N. T., and Keith, J., J. Biol. Chem., 237, 3535 (1962).

3. Gerstl, B., Rubinstein, L. J., Eng, L. F., and Tavaststjerna, M., Arch. Neurol., 15, 603 (1966).

4. Greenfield, N., Davidson, B., and Fasman, G. D., Biochem., 6, 1630 (1967).

5. Kurihara, T., and Tsukada, Y., J. Neurochem., 14, 1167 (1967).

6. Kurihara, T., Nussbaum, J. L., and Mandel, P., Brain Res., 13, 401 (1969).

7. Lenard, J., and Singer, S. J., Proc. Natl. Acad. Sci., 56, 1828 (1966).

8. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J., J. Biol. Chem., 193, 265 (1951).

9. Norman, R. M., and Tingey, A. M., in Folch-Pi, J., and Bauer, H. J. (Editors), Brain Lipids and Lipoproteins, and The Leucodystrophies, Elsevier, Amsterdam, 1963, p. 169.

24. ニワトリ胚における脳の髄鞘形成に関する免疫学的ならびに生化学的研究

辻　村　良太郎（三重大・医・精神）

これまで行われてきた髄鞘形成に関する生化学的研究は主として哺乳動物を材料とし髄鞘の一構成成分である脂質に関するもので，蛋白質に関する報告は非常に少ない。脳の髄鞘が灰白質，白質の脂質構成，脂肪酸組成と異ること[1),2)]，脳の glycerophosphatides の polyenes が食物中の脂質の影響をうけることが明らかになっているので[3),4)]，卵黄を唯一の食物源とするニワトリ胚を用い髄鞘分画を分離して，髄鞘形成過程を髄鞘抗原成分の出現および髄鞘脂質構成，脂肪酸組成の変化という立場からそれぞれ免疫学的ならび生化学的方法で検討した。

〔材料と方法〕白色レグホン種の成熟ニワトリ脳より植村の方法[5)]で髄鞘分画を分離し Freund's complete adjuvant を用いてウサギを免疫し抗血清を得た。試験抗原として同種ニワトリ胚(10,15,17,19,21日)，成熟ニワトリの脳髄鞘分画の Deoxycholate 抽出物と Acetone powder の Saline soluble 抽出物の二種類を用い，Ouchterlony 法で抗原成分の出現を分析した。沈降線は Amido Black 10B で染色を行った。上記各時期の髄鞘分画より Folch 法で脂質を抽出し総脂質を計量し，総リン脂質，総コレステロールを定量した。総脂質を珪酸カラムにかけクロロホルムで中性脂質を溶出，ついでメタノールで複合脂質を溶出し複合脂質は Radin 法[6)]に従いフロリシルカラムでリン脂質と糖脂質に分画し，糖脂質を定量した。中性脂質は Silica Gel G によるTLCプレートを用い溶媒系石油エーテル，エーテル，酢酸(80:20:1)で，リン脂質は Silica Gel H の TLC プレート，溶媒系クロロホルム，メタノール，酢酸，水(50:25:7:3)で，糖脂質は Silica Gel G の TLC プレート，溶媒系クロロホルム，メタノール，水(65:25:4)で展開し 50％硫酸噴霧後加熱，スポット検出後，濃度計で各脂質中の個々の脂質を定量した。脂質の同定は特異的試薬による反応，標準脂質との Rf 値の比較により行った。個々の glycerophosphatides の脂肪酸組成を分析するためにリン脂質分画をリン脂質用の TLC で展開，0.05％ Rhodamine B-95％エタノール溶液を噴霧し各脂質のスポット確認後プレートからかき取り抽出して，5％塩酸メタノール法で fatty acid methyl ester と fatty aldehyde dimethyl acetal を遊離し石油エーテルで抽出し，Farquhar の方法[7)]に従い fatty acid methyl ester と fatty aldehyde DMA を分離抽出し脂肪酸のみ GLC (20％ EGS，カラム長さ 200cm，198℃）でその組成を分析した。Sphingomyelin は Manson の硫酸メタノール法[8)]で，methyl ester を得て GLC (20％ EGS，カラム長さ 200cm，198℃）でその組成を分析した。糖脂質分画は Mätenson 法[9)]に従いアルカリ水解処理を行い精製後，TLC で cerebrosides と，sulfatides を分離抽出し，硫酸メタノール法で methyl ester 化し Svennerholm の方法[10)]に従い TLC で unsubstituted acid と hydroxy acid の methyl ester を分離抽出し，前者のみ GLC (20％EGS，カラム長さ 200cm，198℃）でその組成を分析した。脂肪酸の定量は半値幅法により行い，同定は標準物質との相対保持時間の比較，保持時間と炭素数の関係を利用する方法，水素添加前後のクロマトグラムの比較等により行った。

〔結果と考察〕図1に示したごとく成熟ニワトリの脳髄鞘には少くとも 8~9 種類の抗原成分が存在し，これをニワトリ胚の細胞内分画，種々な脊椎動物の脳髄鞘と比較すると[11)]その中の1成分（図1の No. 8）は髄鞘特異性をもちかつ種属特異的成分であった。

TABLE 1. FRESH WET WEIGHT OF CHICK BRAIN DURING DEVELOPMENT

	Embryo(Days)					Adult
	10	15	17	19	21	7Mo.
Mean brain weight (g)	0.10	0.50	0.50	0.83	0.95	3.10
Number of brain	110	30	15	25	15	5

TABLE 2. LIPID CONTENT OF MYELIN FRACTION IN CHICK BRAIN DURING DEVELOPMENT

Lipid content(mg/g fresh wet weight of brain)

		Total lipids	Total Phospholipids	Total Cholesterol	Total Glycolipids
Embryo (Days)	10	6.47	4.19	1.36	0.17
	15	6.60	4.73	1.60	0.26
	17	10.53	7.21	2.65	0.24
	19	13.84	8.97	3.60	0.62
	21	16.70	10.30	4.50	0.92
Adult	7Mo.	41.74	21.52	11.57	6.17

Distribution within total lipids(%)

		Total Phospholipids	Total Cholesterol	Total Glycolipids
Embryo (Days)	10	64.8	21.1	2.7
	15	71.5	24.2	3.9
	17	68.5	25.2	2.3
	19	64.8	26.0	4.5
	21	61.7	27.0	5.5
Adult	7Mo.	51.5	27.7	14.8

TABLE 3. PHOSPHOLIPID CONTENT OF MYELIN FRACTION IN CHICK BRAIN DURING DEVELOPMENT

Phospholipid content(mg/g fresh wet weight of brain)

		Lyso-lecithins	Sphingo-myelins	Choline glycero-phosphatides	Serine glycero-phosphatides	Ethanolamine glycero-phosphatides
Embryo (Days)	10	0.20	0.16	2.12	0.55	1.04
	15	0.14	0.23	2.33	0.63	1.40
	17	0.16	0.43	3.56	1.01	2.05
	19	0.26	0.65	4.05	1.33	2.69
	21	0.28	0.87	4.61	1.44	3.11
Adult	7Mo.	0.37	2.69	8.44	3.40	6.63

Distribution within Phospholipids (%)

		Lyso-lecithins	Sphingo-myelins	Choline glycero-phosphatides	Serine glycero-phosphatides	Ethanolamine glycero-phosphatides
Embryo (Days)	10	5.0	3.9	50.7	13.1	27.3
	15	3.0	4.8	49.2	13.4	29.6
	17	2.2	6.0	49.4	14.0	28.4
	19	2.9	7.2	45.1	14.8	30.0
	21	2.7	8.4	44.8	14.0	30.2
Adult	7Mo.	1.7	12.5	39.2	15.8	30.8

発育とともに抗原成分が漸次出現し19日胚になるとこの特異的成分が出現し全く成熟レベルに達した。表2,3,4,5から明らかな如く発育とともに絶対量も，相対的割合も増加を示すのはSphingomyelin, Cholesterol, cerebroside, sulfatideであった。表7に示した如くglycerophosphatidesの主要な脂肪酸は$C_{16:0}$, $C_{18:0}$, $C_{18:1}$で全体として発育にともなう，glycerophosphatidesの脂肪酸組成の変化は少なくPolyenesの相対的減少が特徴的であった。これと対照的に表6に示した如くsphingolipidsの脂肪酸組成は発育とともに著明な変化

を示し，全体として glycolipids の long-chain fatty acids が著明に増加した。O'Brien[12] は glycerophosphatides に polyenes が相対的に増加すると髄鞘の脂質分子配列が不安定になり sphingolipids 中に long-chain fatty acids が相対的に増加すると，脂質の分子配列が安定になると報告している。従って今回の実験による glycolipids 中の long-chain fatty acids の相対的増加と glycerophosphatides 中の polyenes の相対的減少は，発育とともに髄鞘中の脂質分子配列が安定な方向に進む変化であろう。17日と19日胚の間に long-chain fatty acids をもつ glycolipids

TABLE 4. CHOLESTEROL CONTENT OF MYELIN FRACTION IN CHICK BRAIN DURING DEVELOPMENT

Cholesterol content (mg/g fresh wet weight of brain)

		Free Cholesterol	Cholesterol esters
Embryo (Days)	10	0.92	0.44
	15	1.16	0.44
	17	1.95	0.70
	19	2.90	0.70
	21	4.20	0.30
Adult	7Mo.	11.57	tr.

Distribution within neutral lipids (%)

		Free Cholesterol	Cholesterol esters	Free fatty acids	Tri-glycerides
Embryo (Days)	10	40.0	19.0	22.4	18.6
	15	42.9	16.2	23.6	17.3
	17	42.9	15.4	24.2	17.5
	19	47.0	11.4	24.6	17.0
	21	50.1	3.6	36.1	10.2
Adult	7Mo.	52.5	tr.	32.4	15.1

TABLE 5. GLYCOLIPID CONTENT OF MYELIN FRACTION IN CHICK BRAIN DURING DEVELOPMENT

Glycolipid content (mg/g fresh wet weight of brain)

		Sulfatides	Cerebrosides		Phrenosine/Cerasine ratio	Cerebrosides/Sulfatides ratio
			Cerasine	Phrenosine		
Embryo (Days)	10	0.05	0.07	0.05	0.73	2.47
	15	0.15	0.07	0.04	0.64	0.71
	17	0.07	0.09	0.08	0.80	2.33
	19	0.24	0.23	0.19	0.82	1.75
	21	0.38	0.28	0.27	0.96	1.43
Adult	7Mo.	2.45	1.45	2.27	1.57	1.52

Distribution within glycolipids (%)

		Sulfatides	Cerebrosides	
			Cerasine	Phrenosine
Embryo (Days)	10	28.6	41.4	30.0
	15	58.5	25.3	16.2
	17	30.0	38.8	31.2
	19	38.3	36.7	30.0
	21	41.4	30.2	28.9
Adult	7Mo.	39.7	23.5	36.8

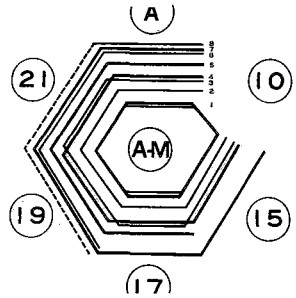


Fig. 1. Schematical diagram of precipitin reactions in agar. A-M, anti-myelin serum. A; adult brain myelin. 10, 15, 17, 19 and 21; brain myelin of 10-, 15-, 17-, 19- and 21-day embryo, respectively.

の増加率の最大ピークが存在しかつ同期間中に glycolipids の long-chain fatty acids が優位となり，髄鞘特異的，種属特異的抗原成分もこの期間に出現することはこの期間に髄鞘形成に関与するグリア細胞内で，成熟髄鞘に少量なこれら化学的成分の合成に関与する酵素系の活性が高まることを示している。従ってニワトリ胚における active myelination は17日胚頃に始まると推定できよう。

Fatty Acid	Sphingomyelins Embryo(Days) 10	15	17	19	21	Adult 7Mo.	Cerebrosides Embryo(Days) 10	15	17	19	21	Adult 7Mo.
12:0	-	tr.	tr.	1.09	0.59	0.54	1.74	0.59	1.39	0.49	0.27	1.72
14:0	1.54	2.35	2.81	4.91	2.57	2.33	6.67	8.94	5.78	3.95	1.03	3.01
16:0	50.32	53.85	36.93	29.13	20.32	11.01	21.62	17.52	16.87	10.07	3.79	9.80
16:1	5.63	5.98	5.72	10.43	2.57	4.03	11.05	9.54	11.48	6.71	1.59	3.27
18:0	9.60	19.23	19.96	24.54	26.85	49.15	14.41	10.85	14.02	17.28	17.19	12.90
18:1	26.89	14.32	12.28	9.00	5.67	10.86	12.61	8.34	7.55	5.23	1.27	5.50
20:0	1.92	2.56	3.28	2.86	3.67	5.27	0.72	0.72	1.39	2.67	3.08	1.55
20:1	-	-	1.78	1.23	1.10	tr.	1.14	0.54	1.16	2.17	0.27	1.98
22:0	-	-	5.62	0.89	1.76	5.04	3.18	5.36	7.55	12.14	18.39	8.43
22:1	-	-	2.10	1.36	0.95	tr.	0.36	-	tr.	tr.	3.10	4.64
23:0	4.10	1.71	3.66	3.66	2.47	1.78	0.42	2.62	tr.	tr.	1.01	tr.
24:0	-	-	3.75	2.73	5.14	5.27	15.86	25.03	11.86	22.11	19.85	9.29
24:1	-	-	-	tr.	2.27	4.73	3.24	4.77	9.09	13.43	27.14	34.82
25:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr.	tr.
25:1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.34	tr.
26:1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.35	tr.

TABLE 6. UNSUBSTITUTED FATTY ACID COMPOSITION OF SPHINGOLIPIDS IN MYELIN FRACTION OF CHICK BRAIN DURING DEVELOPMENT

	Sulfatides 10	15	17	19	21	Adult 7Mo.
12:0	0.42	-	2.13	0.98	0.39	-
14:0	3.04	9.73	7.52	4.97	2.19	6.90
16:0	23.18	24.06	21.13	12.64	6.95	13.67
16:1	20.97	20.95	11.21	9.71	3.37	10.54
18:0	5.32	9.86	9.36	10.76	13.90	10.54
18:1	9.80	10.25	11.35	6.25	3.44	5.47
20:0	4.73	0.91	0.85	0.83	2.56	0.91
20:1	0.76	0.32	4.54	2.18	0.73	1.82
22:0	8.61	3.70	5.67	7.90	13.39	7.29
22:1	-	tr.	tr.	-	1.54	4.17
23:0	1.86	tr.	tr.	2.56	0.44	tr.
24:0	13.45	6.74	12.91	16.93	23.63	10.41
24:1	4.48	8.30	5.11	14.52	24.62	23.43
25:0	-	-	-	tr.	tr.	tr.
25:1	-	-	-	-	tr.	tr.
26:1	-	-	-	-	2.19	tr.

TABLE 7. FATTY ACID COMPOSITION OF GLYCEROPHOSPHATIDES IN MYELIN FRACTION OF CHICK BRAIN DURING DEVELOPMENT

Fatty Acid	Ethanolamine Glycerophosphatides Embryo(Days) 10	15	17	19	21	Adult 7Mo.	Serine Glycerophosphatides Embryo(Days) 10	15	17	19	21	Adult 7Mo.
12:0	0.12	0.22	0.35	1.73	tr.	0.16	0.78	0.97	tr.	1.00	1.56	0.40
14:0	2.69	2.14	2.59	3.12	1.59	2.57	3.28	1.89	2.70	3.02	4.14	1.81
16:0	22.11	18.47	17.48	17.90	16.29	9.19	21.84	15.22	21.00	22.39	19.00	11.09
16:1	4.42	2.27	3.63	5.25	2.85	4.81	4.52	2.08	4.24	7.67	7.82	3.53
18:0	22.61	26.61	28.92	34.30	37.93	22.29	29.95	42.61	35.55	33.96	33.78	39.62
18:1	16.17	12.51	16.31	16.11	20.50	38.00	8.27	9.99	13.39	10.57	10.71	27.02
18:2	1.68	1.20	5.01	2.31	2.62	1.12	3.59	1.16	2.60	2.77	2.81	4.23
18:3	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.
20:1	0.76	0.45	0.97	0.64	1.37	2.78	1.56	0.92	1.16	0.50	1.09	1.81
20:4	8.80	12.02	4.73	6.06	6.49	6.79	6.24	8.29	8.29	9.43	14.07	3.02
22:6	13.60	17.62	10.88	4.68	4.10	4.49	4.52	8.73	4.43	tr.	tr.	tr.

〔文献〕

(1) O'Brien, J. S. and Sampson, E. L., J. Lipid Res., 6, 537, (1965). (2) O'Brien, J. S. and Sampson, E. L., J. Lipid Res. 6, 545, (1965) (3) Mohrhauer, H. and Holman, R. T., J. Neurochem. 10, 523, (1963). (4) Binan, L. A. et al., Biochem. J. 93, 492 (1964). (5) 植村, 神経化学の進歩, 9, 121, (1965). (6) Radin, N. S. et al., J. Biol. Chem. 219, 977, (1956). (7) Fanguhar, J. W., J. Lipid Res. 3, 21, (1962). (8) Manson, M. E. et al., Anal. Chem., 36, 583, (1964). (9) Mattsson, E., Biochim. Biophys. Acta, 116, 296, (1966). (10) Svennerholm, L. et al., J. Lipid Res. 9, 215, (1968). (11) Tsujimura, R. (in preparation). (12) O'Brien, J. S., Science, 147, 1099, (1965).

	Choline Glycerophosphatides Embryo(Days) 10	15	17	19	21	Adult 7Mo.
12:0	tr.	tr.	0.24	tr.	tr.	tr.
14:0	3.78	1.74	2.40	1.71	0.77	0.67
16:0	48.33	48.79	49.52	55.08	52.24	51.14
16:1	5.33	5.88	6.01	5.12	3.59	3.23
18:0	11.33	10.13	10.10	7.17	11.52	9.69
18:1	9.56	26.42	25.72	22.54	27.14	31.22
18:2	3.11	1.93	2.16	1.71	1.02	0.94
18:3	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.
20:1	1.78	0.77	0.84	1.20	1.15	0.40
20:4	8.89	4.34	2.28	2.48	2.56	0.94
22:6	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.

25. 実験的Allergy性脳脊髄炎の酵素化学的研究

松本博之・安斉哲郎・和田武雄
（札医大・1内）

実験的allergy性脳脊髄炎(EAE)はヒトの脱髄性疾患のモデルとしての興味があり，抗原抗体反応の主座がmyelin鞘にあることが蛍光抗体法などにより確認されている。脱髄は髄鞘の崩壊を含めたcytolysisであるから，その過程に髄鞘の構成因子の変動がおこることは想像に難くないが，この方面では脂質関係を除けば酵素学的な研究はほとんどない。従来myelinは代謝的に安定であると考えられていたが，近年になってmyelinにAdams ら[1]がleucine aminopeptidase (LAP)を，Feigin ら[3]およびNaidoo[6]が5'-nucleotidase (5'-N)の存在を報告している。

著者はLAPと5'-Nの血清・髄液内活性ならびに脳・脊髄における細胞内酵素活性の分布と変動を，2,3の血清反応因子および組織学的所見と対比観察した。

実験方法：家兎脳の乾燥重量で40~10 mgをFreund's complete adjuvant 0.5~1.0 ccとともに7~10日の間隔で雄家兎に数回免疫した。同時に感染防止のためErythromycin 50 mgを筋注した。免疫後，歩行，筋力，おき上り反射，疼痛刺激に対する反応，失禁などについて観察し，それら障害が著明で組織学的変化を確認し得たものをEAE群とし，別にadjuvantのみの注射をしたAdj.群をもうけた。

家兎は頸動脈より放血死亡させ，後頭下穿刺で髄液を採取し，ついで脳・脊髄を速やかに摘出して低温下に硬・軟膜を完全に剥離し，生理食塩水で洗浄後十分水をきってから大脳皮質，頸髄の1gを化学天秤で秤量して，sucroseをmediumとしてteflon homogeneizerでhomogenateにして，植村ら[9]の方法に準じて細胞分画を行なった。

LAPは基質を1-leucyl-β-naphthylamideとするGoldbarg変法[4]，5'-N Phosphomonoesterase(PME)＜5'-Nとnon-specific phosphataseとの和＞はadenosine monophosphateを基質に用いるCampbell法[2]，蛋白濃度はLowry法[5]によった。また血清反応因子としてえらんだhaptoglobin (Hp), seromucoidはそれぞれAnisidine法[12]，Weimer-Moshin法[11]によった。

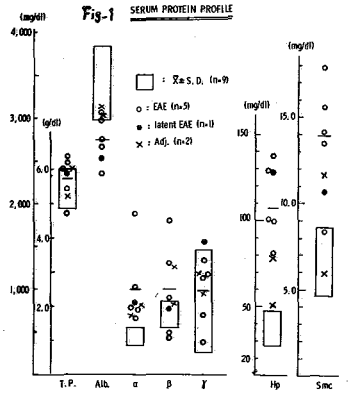
実験結果：1．血清抗体および血清反応因子

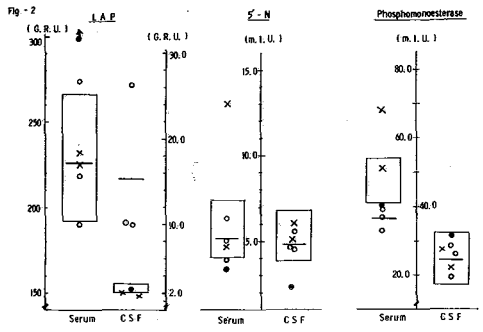
正常家兎脳および脊髄の超遠沈分画を凍結乾燥後5%に溶解し，EAE成立家兎血清との間にOuchterlony法[7]double diffusion precipitationを営ませると，5例中1例にmyelin分画に対してのみ沈降線を認めた。

Fig. 1に示すごとく，EAE群はAdj.群，正常群に比して，血清蛋白分画中albumin (alb)の低下，α-globulin (glob)の著増，β-glob.の増加がみられたがγ-glob.は不変であった。またα-glob.下分屑の主要成分であるHp, Smcは著明に増加を認めた。

2．血清および髄液の酵素活性値の変動

Fig. 2のごとく，血清ではPMEがEAE群で低下傾向を示しているほかは特徴的な変化はみられない。これに対して髄液ではLAPは正常群2.5±0.5 (GRU)に対してEAE群は平均15.6と顕著な高値を示した。またこの時の髄液はpleocytosisとともに蛋白濃度が著明な増加を示し，正常41.6±8.2 mg/dlに対しEAE群では平均399.3であった。





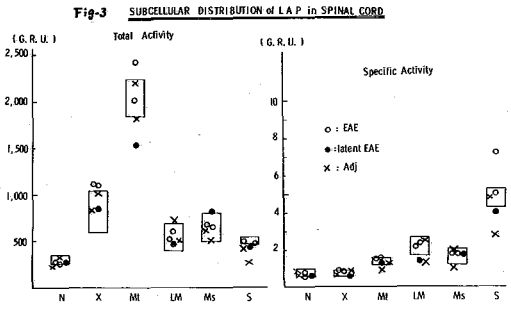


Table 1.
Mean Percent Composition of Total Recovery

(Total Activity) Table - I

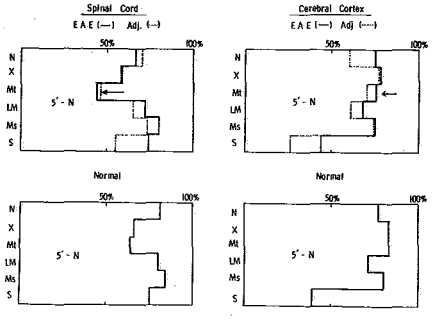
		Spinal Cord			Cerebral Cortex		
		LAP	5'-N	PME	LAP	5'-N	PME
N	Nor.	6.2	11.3	10.3	6.0	6.3	6.5
	EAE	5.3	9.5	8.6	5.8	7.1	7.1
	Adj.	6.1	11.1	9.4	6.2	4.8	5.5
X	Nor.	16.8	11.7	13.0	22.5	25.2	24.5
	EAE	21.3	12.2	12.7	23.0	25.3	24.2
	Adj.	19.2	13.7	14.1	25.1	24.4	22.1
Mt	Nor.	42.0	29.6	34.2	57.5	52.0	50.4
	EAE	41.2	26.6	37.4	57.0	51.6	51.3
	Adj.	42.0	27.1	35.1	55.7	53.8	53.5
LM	Nor.	11.0	13.2	12.2	7.8	11.4	12.9
	EAE	10.3	16.4	13.9	7.7	11.3	12.5
	Adj.	13.0	15.0	13.8	6.8	11.6	13.3
Ms	Nor.	13.5	30.8	27.0	2.3	4.8	4.8
	EAE	12.7	31.8	48.9	2.0	4.0	4.0
	Adj.	12.1	30.9	25.2	2.3	5.0	4.7
S	Nor.	10.4	3.4	3.3	3.9	0.4	0.9
	EAE	9.3	3.5	5.8	4.5	0.6	0.9
	Adj.	7.7	2.0	2.3	3.9	0.3	0.9

24.8

3. 酵素活性の細胞内分布とその変動

電顕的検索により，今回使用の方法で十分満足すべき純度の分画が得られることを確認したのち，それぞれの酵素活性を測定した。Table 1 に一括表示するごとく，LAP についてはその分布が主として mitochondria (Mt) にあり，myelin (X) には脊髄で16.8%，大脳皮質で22.5%回収された。脊髄の total recovery が正常群 4,866.1 (G.R.U./g wet weight) に対しEAE群は5,384.8で，これを蛋白濃度で補正した specific activity として観察しても 11,704 (G.R.U./mg) に対し13,376と高い。この分布を正常群の平均値と比較すると Fig.3 のごとくなり，X 分画における活性上昇傾向がみられる。5'-N については，脊髄で Mt と microsome (Ms) とに約30%，X には11.7%回収され，EAE群では Ms の上昇傾向がみられる。正常大脳皮質では Mt に52%回収され，Ms には4.8%が回収されるにすぎないのに X では25.2%回収されることが注目され，この傾向はEAE群でも特別な変化がみられない。PME も 5'-N とほぼ同様の分布を示したが，脊髄の Ms 分画内活性がEAE群で高い。PME に対する 5'-N の比は Fig.4 のごとく，EAE群，Adj. 群とも Mt で減少，Ms で上昇を示した。

Fig.4 PERCENT DISTRIBUTION of 5'N in PHOSPHOMONOESTERASE



考按ならびに結論

少数例ではあるが今回の実験でEAEの成立の明らかであった家兎では血清蛋白の変化として総蛋白量の低下および α-globulin 分

画の著明な増加とp-globulin分画の軽度増加がみられた。補体結合反応による検索は行なわなかったがゲル内沈降反応では抗myelin抗体が証明され，γ-globulinとしての増加は明らかではないが組織学的所見とともに抗原抗体反応の関与は一応明らかである。α-globulin分画の増量についてはHp, Smcを含めていわゆる急性相反応因子の増加が主因と考えられる。Hpについてはヒトの多発性硬化症における増加をPhillips[8]が報告しているが，今回の実験では免疫操作による非特異的炎症の反映と解される。

血清酵素活性の上ではEAE群でも著明な変化はみられないが，髄液中ではEAE群におけるLAPの活性上昇が特徴的で，正常値の約6倍に達した。EAE群では同時に髄液蛋白濃度の増加もあり，血液脳関門の破壊による血中酵素の移行もむろん考慮する必要はあるが，抗原抗体反応の場と考えられるmyelin分画で活性の上昇傾向がみられたことから，神経細胞からの逸脱の関与が示唆されるものといえよう。

つぎに5'-Nについては，従来主として肝における細胞内局在が研究され，light mitochondria (LM)，あるいはMsの膜にあるとされているが脳については Waled and Kerr[10]の犬小脳を用いた報告をみるのみである。今回の実験では脊髄ではMt 29.6%，LM 13.7%，Ms 30.8%に対し大脳皮質ではMt 52.0%，LM 11.4%，Ms 4.8%と，白質の多い脊髄ではMsに，灰白質の多い大脳皮質ではMtに多いという興味ある結果を得た。PME中に5'-Nが占める割合からはEAE群，Adj. 群ともにMtの活性低下がみられた。これはadjvantによる効果であるとしても，5'-Nの生理的意義が充分に解明されていない現在，その機序を説明することは困難である。EAEにおける5'-Nの変動は今までのところ大きな意義はないものと考えられる。

文　献

1) Adams,C.W.M., Davison,A.N. & Gregson,N.A. : J. Neurochem. 10 , 383 (1963)

2) Campbell,D.M. : Biochem. J. 82 , 34P (1962)

3) Feigin,J.S. & Hayashi,M. : J. Histochem. Cytochem. 10 , 515 (1955)

4) Goldbarg,J.A. & Rutenburg,A.M. : Cancer 11 , 283 (1958)

5) Lowry,O.H., Rosenbrough,N.J., Farr,A.L. & Randall,R.J. : J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)

6) Naidoo,D. : J. Histochem. Cytochem. 10 , 421 (1962)

7) Ouchterlony,O : Acta Path. Microbiol. Scand. 25 , 186 (1948)

8) Phillips,S.M., Kornguth,S.E. & Thompson,H.G. : Neurology 15 , 415 (1965)

9) 植村慶一，塚田裕三，飯田慈子：神経進歩 7 , 763 (1963)

10) Waked,N. & Kerr,S.E. : J. Histochem. Cytochem. 3 , 75 (1955)

11) Weimer,H. & Moshin,J.R. : Am. Rev. Tuberculosis 68 , 594 (1952)

12) 谷内 昭，三原藤正，森田益孝，中島光男：生物物理化学 12 , 59 (1966)

26. 分離神経細胞体の脂質生化学的研究

玉井洋一・松川恵子・佐武　明
（新大・脳研・神経化学）

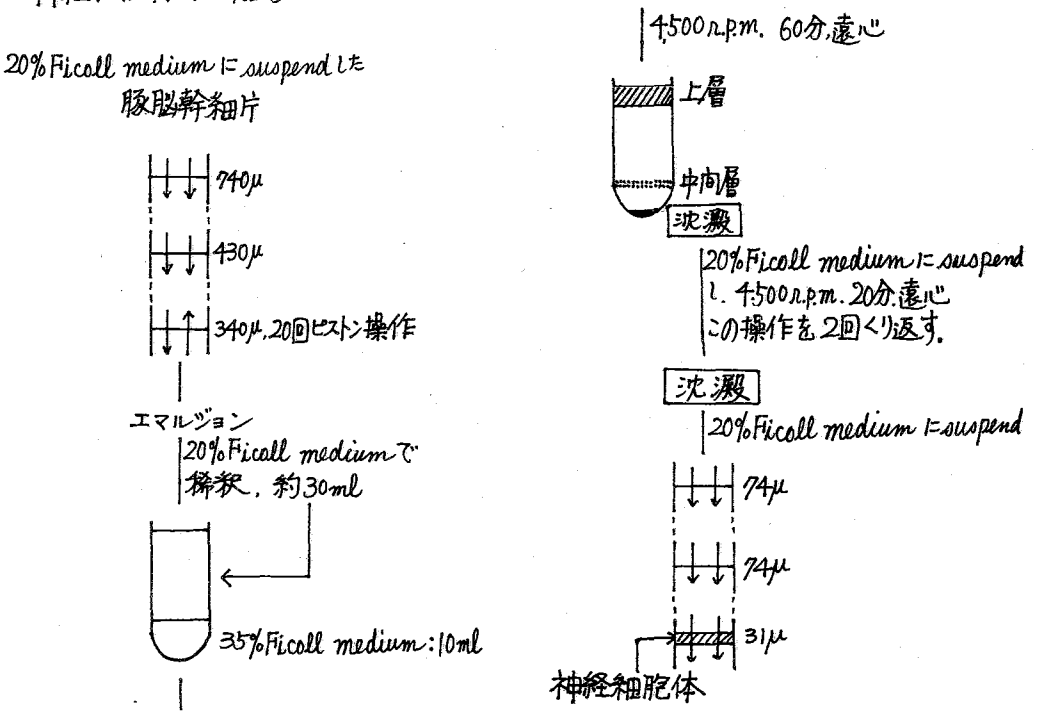
神経細胞並びにグリア細胞の生化学的諸性質を明らかにする事は，脳の機能を解明するために，神経生物学及び神経化学の分野にたずさわる者に課せられた重要な問題であることは言をまたない。そのためには神経細胞及びグリア細胞を他の組織に汚染されずに，それぞれ純粋な形で分離する事が要請される。よく知られる如く，Hydén(1)は脳組織の切片から神経細胞を1個ずつ取り出す技術を開発し，その生化学組成の分析を試みているが，micro-methodという量的な制約下では必ずしも充分な結果とは言えないであろう。
当研究室ではこれ等の困難を克服し，神経細胞を形態的にもより原形に近い形を保存し，しかも純度が高くて多量に分離する方法を研究してきたが，既報の如く(2)，豚脳幹から内部構造をよく保存した神経細胞体を大量に分離する技術の確立に成功した。
一方，神経細胞の脂質生化学的研究については上述のごとく神経細胞の分離の困難性から，その報告も極めてすくない。しかもその何れもが分離方法並びに分析方法の上で尚検討すべき多くの問題を残していると考えられる。
著者らは，当研究室において開発された神経細胞分離の技術により多量に神経細胞を集めその脂質分析を試みた。特に神経組織に特異的に存在するガングリオシドの測定値から，神経細胞とガングリオシドとの関連性を，その存在状態の観点から考察を試みた。

—— 実験方法 ——

I　神経細胞体の分離方法

豚脳幹は屠場から氷をつめたジャーに入れて出来る限り短時間のうちに0～4℃の実験室に運び，直ちに結合組織や血管を除き四丘上縁から第四脳室下縁までの脳幹部をカミソリで約$2^{mm}\times2^{mm}\times2^{mm}$の細片にきり20% Ficollのmediumに入れる。（Ficollは脱イオン水で透析して脱塩し，20%に調整，100mM KCl，50mM NaCl，10mM $CaCl_2$，10mM Tris-HCl，pH 7.6，Bovine serum albuminを終濃度1%の割合に含む）20% Ficoll mediumにsuspendされた脳幹細片を開口740μ，430μのナイロン篩を加圧下で通す。より細かくなった組織を更に，開口340μのナイロン篩を通して，往復操作を20回加えると，エマルジョンの状態になる。このエマルジョンを，20% Ficoll mediumで1個の脳幹当り20～25mlになるよううすめ，35% Ficoll medium（20% Ficoll mediumの組成において，Ficollの濃度が35%に高められ，あとの組成はまったく同じ）10mlの上に約30ml重ねる。4,500 r.p.m. 60分，遠心を行うと，上層，20%-35%間の中間層，35%の底の沈澱物の3つのfractionに分かれる。35% Ficoll下に沈澱するものは①大きな突起の多い細胞②比較的小さい，突起の少い細胞③血管から成っているが，その沈澱物を20% Ficoll mediumに再びsuspendし，35% Ficoll mediumの上に重ねて，4,500 r.p.m. 20分遠心の操作をくり返すことによって血管を除き，細胞画分を精製することが出来る。最後に得られた沈澱物を20% Ficoll mediumにsuspendし，開口74μ，74μ，31μの順にナイロン篩を通す。74μを通り31μの上に残ったのが，目的とする細胞画分である。これは数から言って，大部分大きい突起の多い細胞体から成っているがその他，少数の小さい稀突起細胞と毛細管等を含んでいる。
大きな突起の多い細胞はKlüver-Barrera染色法，位相差顕微鏡及び電子顕微鏡によって

神経細胞体の分離方法



神経細胞体であると同定された。

Ⅱ　脂質分析

神経細胞画分は充分量のクロロホルム-メタノール(2:1)で glass homogenizer で粉砕し, 脂質を抽出, 抽出残渣はクロロホルム-メタノール(1:1)で再抽出された。脂質抽出液は一度乾固した後, 再度クロロホルム-メタノール(2:1)混液に溶かし, クロロホルム-メタノール可溶部分を Folch 法(3)に従って 1/5 倍量の水で振盪抽出して2層に分離し, 下層は theoretical upper phase で再度抽出された。かくして得られた上層画分は 1ml に mess up して, シアリン酸の定量に, 下層画分は 2ml に mess up して脂質分析に供した。コレステロールは Searcy and Bergquise の方法(4)により, 全燐脂質は Bartlett 法(5)により又燐脂質の各画分は薄層クロマトグラフィーで展開した後燐脂質画分をかきとり Keenan らの法(6)により定量された。シアリン酸は Hess and Rolde の方法(7)に基いて螢光比色法を用いて定量された。螢光比色に用いられた 3.5-diamino-benzoic acid は塩酸塩として再結晶して用いた。螢光分析には 日立 MPF-2A Fluorescence spectrophotometer を用いた。尚, 神経細胞画分の脂質分析の比較実験のために新鮮豚脳及白質及び白質からもそれぞれ同様の方法により脂質を抽出し, 分析を行った。

Ⅲ　神経細胞数, 蛋白質, RNA の測定

細胞数は得られた細胞沈澱を 20% Ficoll medium 溶液に suspend し, Fuchs-Rosenthal の血球計算盤を用いて算定し, 蛋白質は標準溶液として牛アルブミンを用い Lowry らの方法(8), RNA は Steele ら(9)の方法と Fleck and Munro(10)の方法を組み合わせ, 紫外吸収とオルシノール反応で測定し, 神経細胞体1個当りの蛋白質及び RNA 含量を求めた。

—— 結果と考察 ——

神経細胞の収量は豚脳幹1ケ当り 1.5×10^{6}～3×10^{6}ケである。神経細胞1ケ当りの RNA は 2.050×10^{-12}g. 同じく蛋白質は 13.900×10^{-12}g であった。総脂質量は神経細胞1ケ当り 6.650×10^{-12}g で蛋白当りの脂質量は 0.514g./g. protein. である。脂質組成の神経細胞並びに蛋白質の分析結果は右表に示されている。

	神経細胞	灰白質
全脂質(蛋白当り)	0.514	—
コレステロール	10.8, 6.2	24.8
全燐脂質	80.7, 91.6	74.4
P.E.	34.0	23.9
P.C.	40.5	33.3
L.P.C.	6.4	—
S.M.	—	9.3
P.S.	—	7.9
全 NANA	0.39, 0.48	1.7

値は全脂質当り%.
P.E.: phosphatidylethanolamine.
P.C.: phosphatidylcholine.
L.P.C: Lysophosphatidylcholine.
S.M.: Sphingomyeline
P.S.: phosphatidylserine.
NANA: N-Acetylneuraminic acid

右表の分析結果から神経細胞と灰白質との脂質構成分を比較すると、神経細胞では灰白質に比し、コレステロールの占める割合が少なく燐脂質の占める割合が高いと言える。又燐脂質画分については神経細胞にスフィンゴミエリンを定量し得なかったという以外、大きな相違はないが現在尚検討を加えている。一方全ガングリオシド量を、全脂質量に対する割合として計算した場合、神経細胞では約0.4%を示し、灰白質の約1/4の割合でしかないことが明らかになった。cerebroside画分は薄層クロマトグラム上に於て検出することが出来なかった。

ところで、1959年 Hydén(1)が free hand で神経細胞を単離する方法を確立しその方法で集めた神経細胞を材料として分析した結果によれば、脂質量/蛋白量は0.255で著者らの値の約半分であるが、彼の脂質がクロロホルム可溶性画分であることを考えると、著者らの値と同一には論じることは出来ない。その後 Roots and Johnston(11,12)は独自の方法で得た神経細胞画分についての脂質分析を行い、cholesterol, phosphatidylethanolamine, phosphatidylcholine, phosphatidylserine が主要構成脂質であることを報告した。彼女等は、それぞれの組成比を示してはいないが、cerebroside画分を検出することが出来なかった点に於ては著者らの結果と一致している。1967年、Freyss(13)らによって報告された神経細胞並びにグリア細胞の脂質分析結果は神経細胞の脂質量/蛋白量≒1/2.6で著者らの値と比較的近い値を示している。しかし彼等は神経細胞の分離に際し、脂溶性溶媒(Acetone)を使用している点は脂質分析の上で問題であろう。

神経細胞に於けるガングリオシド分析は Derry and Wolfe(14)の報告が唯一のものである。彼等は神経細胞のガングリオシド量を、周辺組織やグリア細胞の附着の有無によって検索し cleared neuron よりも neuropile を附着した neuron の方がガングリオシド値が高いことよりガングリオシドが axon terminal の membrane に存在することを示唆した。又彼等の定量値を著者等のと、比較するとガングリオシド値として 10～13mg/g. dry wt. (Derry and Wolfe)に対し、4.3mg/g. dry wt. (著者等)であった。又、極めて最近、Norton and Poduslo (15)は Rat 脳から Neuroglia 及び Neuroperikarya を単離し、両者の lipid pattern が驚

くほど類似している事及びセレブロシド並びにガングリオシドを殆んど検出することが出来なかったと報告している。
以上，Satakeらの方法（2）により，単離された神経細胞画分を用い，Xの脂質分析を行うと共に，他の研究者らによる分析値との比較考察を試みたが，著者らの方法を含めて，現在までの神経細胞の分離方法には，その内部構造，特に細胞膜の保存という点から考え，ガングリオシド分析値の問題をはじめ，尚検討すべき問題を多く含む。
著者らは，此等の問題を克服すべく，更に，検討を行っている。

—文　献—

1) H. Hydén : Nature 184, 433 (1959)
2) M. Satake. S. Hasegawa, S. Abe and R. Tanaka : Brain Res. 11, 246 (1968)
3) J. Folch, M. Lees and G.H.S. Stanley : J. Biol. Chem. 226, 497 (1951)
4) R.L. Searcy and L.M. Bergquise : Clinica chim. Acta 5, 192 (1960)
5) G.R. Bartlett : J. Biol. Chem. 234, 466 (1959)
6) R.W. Keenan, G. Schmidt and T. Tanaka : Anal. chem. 23, 555 (1968)
7) H.H. Hess and E. Rolde : J. Biol. Chem. 239, 3215 (1964)
8) O.H. Lowry, N.J. Rozebrough, A.L. Farr and R.J. Randall : J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
9) W.J. Steele, N. Okamoto and H. Busch. : B.B.A. 87, 490 (1964)
10) A. Fleck and H.N. Munro : B.B.A. 55, 571 (1962)
11) B.I. Roots and P.V. Johnston : Biochem. J. 94, 61 (1965)
12) P.V. Johnston and B.I. Roots : Biochem. J. 98, 157 (1966)
13) L. Freysz, R. Bleck, C. Judes, M. Sensenbrenner, M. Jacob et P. Mandel : J. Neurochem. 15, 307 (1968)
14) D.M. Derry and L.S. Wolfe : Science 158, 1450 (1967)
15) W.T. Norton and S.E. Poduslo : Fed. Proc. 28, 2660 (1969)

27. Niemann-Pick病の組織の脂質成分について

宇田　裕・中沢泰男
（東医歯大・医・総合法医研）

Niemann-Pick病患者の脳及びその他の細網系組織にsphingomyelin (Sph)が蓄積することはKlenk (1934)[1]によって明らかにされて以来一般に認められていることであるが，しかしながら本疾患を脂質代謝異常として考えた場合，Sphの蓄積の原因が何によるのかその本態については未だ明確にされていない。われわれは今回，Niemann-Pick病と診断された患者の脳，脾臓，肝臓の脂質分析を行なったが，これまであまり報告のなかったSph以外の燐脂質成分及び中性脂質成分についても検討したところ，脳においては他の二つの臓器と異なって，Sphの増加が見られないこと，及びSphの脂肪酸組成における臓器特異性は，脳の組成が他の二つの臓器と異なっており，これはSph以外の他の燐脂質成分の脂肪酸組成の臓器特異性とくらべると非常に特徴的であることを見出し，さらに2,3の興味ある分析結果を得たので，この結果について報告したい。

〔実験方法〕

材料はNiemann-Pick病と診断された男児から，脾臓は生後12ヶ月でbiopsyにより，脳及び肝臓は19ヶ月でautopsyにより取り出し，そのまま凍結状態で保存した。脂質は脳3.5g，脾7.0g，肝8.0gをそれぞれFolchの方法により17倍量の$CHCl_3$-MeOH (2:1 V/V)で抽出した。抽出液は0.88% KCl 0.2 vol.で洗浄したのち$CHCl_3$層をNa_2SO_4で乾燥後溶媒留去し，$CHCl_3$に再溶解，$CHCl_3$に溶解したものを総脂質量とした。脳から266mg，脾911mg，肝1236mgが総脂質量として得られた。燐脂質の分析はDawson法[2]により，mildアルカリ，mild acid，次で封管中メタノール性塩酸で水解したのち，各水溶性画分のpaper chromatographyにより分離，そのspotの色量を測定することにより定量した。また各燐脂質成分の脂肪酸組成を調らべるため，総脂質をケイ酸カラムクロマトにより$CHCl_3$, $CHCl_3$-MeOH 9:1, 4:1, 3:2, 1:4 (V/V)で溶出し各成分に分画した。各成分の単一性は薄層クロマトによりチェックした。なおphosphatidylethanolamineとphosphatidylserineはcolumnでは分離出来なかったので，preparative thin-layer chromatographyで分離後，薄層上よりそれぞれ抽出した。これらのものは封管中メタノール性HClで水解後paper chromatographyにより，それぞれethanolamine, serineであることを確認した。またSphはそれがもつ脂肪酸組成により，カラムからの溶出速度が異なるので，薄層上Sphのspotのあらわれたカラムからの全画分を集め，Sweeleyの方法によりmild alkali処理をしてglycerophosphatideを除き，再びカラムクロマトにより精製を行なった。燐脂質各成分の脂肪酸組成は5%メタノール性HClによってtransesterificationを行なったのち，ガスクロマトグラフィー（5% DEGS, column 0.3×260 cm, column-bath temp. 198°）により分析を行なった。中性脂質画分はHanahanらの方法によってケイ酸カラムクロマトを行なって分離したのち，その重量を測定して定量を行なった。triglycerideと遊離脂肪酸の分離はD. Olivecronaの方法[3]により行なった。

〔結果〕

脳，脾，肝の総脂質量及びケイ酸カラムクロマトで分離した中性脂質及び燐脂質の含量は表1に示されている。wet weightに対する脂質量は脳においては，脾，肝の

約1/2量であったが，その中の燐脂質は何れも総脂質量の70%前後の値を示すことが認められた。この燐脂質成分について分析すると，表2に示したようにSphが各臓器ともに燐脂質の主成分であることがわかった。しかしながら，脳におけるSph量は脾，肝のそれとくらべるとそれ程多く含まれていない。Sph以外の燐脂質としてphosphatidylethanolamine，phosphatidylserine，lecithin，phosphatidylinositolが含まれていることが確認された。plasmalogenは脳にかなり含まれているがDawson法によるacid-labile画分のpaperクロマトにより ethanolamine plasmalogenであることを確認した。本症患者におけるglyceryl ether型燐脂質については未だ報告がないが，いづれの臓器にも殆ど含まれていなかった。これらの結果をwet weightに換算して，Crocker & Farber[4]の報告による正常児の分析結果と比較してみると，表3からわかるように脾，肝においては脂質量の著るしい増加が認められており，これが燐脂質画分のSphによるものであると考えることが出来る。しかしながら，脳においては脂質量が全く増加していないし，またSphの量も正常値とくらべた場合，脾，肝の増加と比較して，増加しているとは言い難い。このように本患者にあって脾，肝と異なり，脳においては脂質量及び燐脂質の主成分であるSphについても，その増加が認められないことがわかった。次に燐脂質各成分の脂肪酸組成を，表4に示した。脳のSphの脂肪酸は大部分がstearic acidであり，myelinationと共に増加するといわれているnervonic acidが非常に少ないことが認められた。これに対して脾，肝のSphの脂肪酸は，palmitic acidが主でstearic acidは脳のそれとくらべて非常に少ない。そしてまた，その脂肪酸patternは脾，肝がほぼ同じようなpatternを示し，脳のそれとは非常に異なることが認められた。一方，Sph以外の燐脂質の構成脂肪酸をみると，各成分によってその数値に多少の差異はあるが，臓器別に全体の

表1

	Brain	Spleen	Liver
Total lipid in wet tissues (%)	7.6	13.0	15.5
Phospholipid in total lipid (%)	68.8	62.3	74.9
Neutral lipid in total lipid (%)	26.7	24.2	19.3
Recovery (%)	95.5	86.5	94.2

表2

Component	Brain	Spleen	Liver
Phosphatidylethanolamine	9.3	6.3	9.9
Phosphatidylserine	5.5	4.1	2.0
Lecithin	19.3	10.6	8.3
Phosphatidylinositol	0.3	1.8	1.7
Sphingomyelin	48.2	67.2	73.7
Plasmalogen	8.0	2.8	0.7
Glyceryl ether phospholipid	0.5	0.6	trace
Recovery	91.5	94.1	100.5

表3

		Brain	Spleen	Liver
Present Result	Total lipid	7.6	13.0	15.5
	Neutral lipid	2.0	3.1	3.0
	Phospholipid	5.2	8.1	11.6
	Sphingomyelin	2.5	5.4	8.5
Normal Values※	Total lipid	7.8~14.0	2~3.5	3~4
	Phospholipid	4.0~6.0	1~2	1.5~2.5
	Sphingomyelin	1.0~1.8	0.1~0.5	0.1~0.25

※ from Crocker and Farber[4]

表4

	Sphingomyelin			Lecithin			Phosphatidylethanolamine			Phosphatidyl-serine	
	Brain	Spleen	Liver	Brain	Spleen	Liver	Brain	Spleen	Liver	Brain	Spleen
14:0		3.3	1.8	0.4	0.6	0.5	0.6	0.4	0.4	0.7	0.6
15:1							4.2	1.0		0.5	
16:0	6.1	50.8	40.5	31.4	34.3	23.0	10.4	9.3	4.6	3.6	4.1
16:1			0.4	1.8	2.2	9.6	2.3	1.0	2.7	1.0	0.8
16:2			0.3		0.5	0.5	1.4	0.5	0.4	0.3	0.4
17:1								0.4			
18:0	85.0	11.7	15.3	22.7	15.8	7.6	27.3	24.2	8.4	37.3	39.7
18:1		1.8	3.2	23.6	17.4	38.3	21.1	25.5	70.6	23.4	29.9
18:2			0.7		5.8	5.8		5.0	4.2		2.6
18:3									0.6		
20:0	2.5	4.7	5.0		0.5	0.5		0.4		0.9	0.7
20:1			0.2			0.5	1.2	0.5	0.7	1.6	0.7
20:2						3.8			1.2	2.0	
~~20:3~~ 20:4			3.8	11.7	12.7	11.0	12.7	18.0	5.7	3.1	6.2
21:0			0.2								
21:1				0.9	1.4	1.7					
21:2				1.0	1.3	0.6					
21:3				1.9	1.5	0.9					
22:0	1.9	7.8	6.9								
22:1	2.8		2.0					2.1		6.7	
22:3							6.0	4.6		2.7	4.1
23:0		1.7	1.9								
23:1			0.3								
24:0		4.7	2.6								
24:1	1.7	13.5	13.9		2.9			1.2		2.2	
Unknown				4.6	3.1	1.7	12.8	6.4	0.5	13.4	10.2
飽和度	95.5	83.0	74.2	54.5	51.2	31.6	38.3	34.3	13.4	42.5	45.1

liver 少い

もっと多いぞ

脂肪酸組成をみると，いづれも脳，脾がほぼ同じようなpatternを示すのに対し，肝のみが二者とくらべて特徴的なpatternを示しており，この傾向は，stearic acid と octadecenoic acid の割合で比較してみた場合に顕著に認められる。phosphatidylserineについてはその含量が少ないため，肝の脂肪酸組成を調らべることが出来なかったが，脾，脳でやはり同じようなpatternを示すことが認められた。このようにSph以外の燐脂質成分の構成脂肪酸が，肝に特徴的なpatternを示したが，このことはさらにSphの構成脂肪酸の脳において特徴的であることと比較される。

表5

Component	Brain	Spleen	Liver
Hydrocarbon	1.4	1.0	0.9
Cholesterol ester	8.5	0.5	4.0
Cholesterol	78.8	85.2	78.2
Triglyceride	2.8	4.0	8.0
Free fatty acid	4.7	7.5	7.5
Di- or monoglyceride	2.8	1.9	1.3

中性脂質画分の分析の結果は，表5に示されているが，これまでの報告にも指摘されているように，cholesterol 含量が著るしく高いことが認められた。また一般に中性脂質画分の主成分であるtriglycerideの含量が非常に少なく，正常組織では非常に少ない遊離脂肪酸が，かなり多量含まれていることが認められた。この遊離脂肪酸の画分はtriglycerideと分離したのち，ジアゾメタンにてメチル化し，ガスクロによりその脂肪酸組成を調らべたところ，燐脂質成分でみられたような臓器特異性は認められず，脾の脂肪酸組成が，脳，肝の組成の中間的な様子を示すことが認められた。

〔考察〕

Niemann-Pick 病において、その脳の Sph 含量についてはこれまでいくつかの報告があるが、その報告は正常の場合と比較してそれが増加しているのか否か、必ずしも一致していない。これらの原因については、それが症状の差異によるものか、あるいは脂質の分析方法の問題によるものなのかはっきりしないが、今回われわれの分析結果を Crocker & Farber[4] の正常値と比較した結果、脾、肝では著しい増加がみられるのに対し、脳においては殆ど増加が認められなかった。一方、Sph の構成脂肪酸は Sph 以外の燐脂質のそれと、その臓器特異性が異なっており、脾、肝の Sph の脂肪酸と比較すると、脳に特徴的な pattern があることが認められた。Niemann-Pick 病における Sph の増加は、それが Sph 分解酵素の遺伝的な欠損によるものか、あるいは活性低下によるものか未だ明らかではないが、もし Brady[5] らのいうような Sph 分解酵素の活性低下によるとすれば、脾、肝における Sph の著しい増加は、その enzyme と今回得られたような Sph の構成脂肪酸の相異との間に、何等かの関係があるのではないかとも考えることが出来る。また Sph 以外の燐脂質成分の脂肪酸組成で、Sph とは異なった臓器特異性、即ち、脳、脾において互いに同じ組成を示し、肝のそれとは非常に異なること、さらにこの脂肪酸組成が Phosphatidylethanolamine, phosphatidyl-serine, lecithin 間でほぼ同じような組成をもつことを見出したが、これらの事実はこの方面の研究が非常に少ないため、Niemann-Pick 病に特徴的であるか、現在断定することが出来ないが、これからの研究課題として興味がある。なお脳に特徴的にあらわれているわけではないが、遊離脂肪酸がかなり多く存在することを見出した。これらの遊離脂肪酸が Sph、あるいはそれ以外の燐脂質の構成脂肪酸と、どのような関係があるのか、今回われわれの研究では十分なものは得られなかったが、さらに興味ある事実と思われる。

表 6

	Brain	Spleen	Liver
12:0			0.5
14:0	1.2	1.1	1.3
16:0	21.3	16.7	16.2
16:1	3.3	3.4	6.1
16:2	0.7		
18:0	23.1	12.9	6.7
18:1	24.6	36.2	53.7
18:2	1.2	11.7	6.8
18:3		0.3	0.6
20:1		0.6	
20:2		2.4	1.2
20:3	13.5	10.7	4.5
24:0	4.2	2.1	
Unknown	6.9	2.5	2.4
飽和度	49.8	32.2	24.7

〔文献〕

(1) Klenk, E., Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem., 229, 151 (1934)
(2) Dawson, R.M.C., Hemington, N., and Davenport, J.B., Biochem. J., 84, 497 (1962)
(3) Olivecrona, T., Acta Physiol. Scand., 54, 295 (1962)
(4) Crocker, A.C., and Farber, S., Medicine, 37, 1 (1958)
(5) Brady, R.O., New Eng. J. Med., 275, 312 (1966)

28. Niemann-Pick病の生化学的研究

鴨下重彦・鈴木邦彦
（アインスタイン医大・神経）

Niemann-Pick病は全身の臓器にsphingomyelinの蓄積を来す先天性代謝異常である。Crocker[2]によれば、本疾患はinfantile（type A）、visceral（type B）、subacute or juvenile（type C）、Nova Scotian（type D）の4型に分類され、それぞれ臨床的、病理学的、生化学的に特徴を有するが、中枢神経系にsphingomyelin増量のみられるのは乳児型のみである。脳の病理学的な変化は、Tay-Sachs病に酷似する神経細胞のballooningが特徴とされ、電顕的にはTay-Sachs MCB（Membranous Cytoplasmic Body）と同様のMCBが神経細胞内に多数認められる。Tay-Sachs脳では既に1963年にMCB分画を出来るだけ純粋に分離することが試みられ、MCBがganglioside の異常蓄積の場であることが明らかにされた。[11] その後同様の研究が、Metachromatic leukodystrophy[15]やGeneralized gangliosidosis[16]でも行われている。

著者らは診断の確定した乳児型Niemann-Pick病の1例について、MCBの分離を試み、同時に一般の脂質分析を行って様々の知見を得た。症例の詳細については、Am. J. Dis. Child. 117：379，1969 参照。猶、1966年にBrady ら[17]がNiemann-Pick病でsphingomyelinase欠損を証明した際には本症例の肝生検が用いられ、それによって診断が確定した。

実験材料と方法

剖検時に得られ、2年間−20°Cに保存された大脳半球と、肝、脾の一部を用いた。MCBの分離はTay-Sachs脳の場合と本質的には同じ方法を用いたが、Niemann-Pick MCBがTay-Sachs MCBよりも軽い為、多少のmodificationが必要であった。10gmの大脳皮質を0.05M EDTA中でBounce homogenizerによってhomogenateとし、magnetic stirrerで1時間撹拌後、1500gで4分間遠沈、上清を取り、沈渣を再びEDTA液中に懸濁し遠沈、両上清を合せて7500gで5分間遠沈した。そこで生じた沈渣を少量のEDTA液に懸濁し、0.25M、0.75M、1.2Mのsucrose density gradientに乗せ、Spinco 25W2、25000 rpmで1時間遠沈。各density gradient間に2つのbandが出来るが、その上方のものをEDTA中7500gで洗い、0.25M～0.75Mのcontinuous gradientに乗せて再びSpinco、25000 rpmで遠沈。2つのbandが出来、下方の大きいbandがMCB分画であった。すべての操作は4°Cで行い、肝、脾からも同様の操作によってMCB分画を得た。凍結乾燥の前に少量を電顕グロッグに包埋し、純度をチェックした。ミエリン分画はNorton-Podulaの方法により得た。

大脳皮質、白質、ミエリン、肝、脾、及びMCB分画をFolch法に従ってinsoluble residue、proteolipid protein、lipids、gangliosides分画に分け、各脂質の分析は、

別著に記したごとくに行った。[4.13] 灰白質に相当量の glucocerebroside が存在することが、硼酸処理 TLC 上で明らかとなったので、silicic acid column により得た cerebroside 分画を 100°C / N 塩酸で 16時間水解し、chloroform で抽出、水層の部分を N_2 で乾燥した後 hexose 量を orcinol 法で定量し、glucose を Glucostat で測定し、その差から galactocerebroside を算出した。Sphingomyelin の脂酸構成の検討は、先ず脂質を鼻来処理後、アルカリで saponify し、silicic column にかけ、得た crude sphingomyelin を silica gel G plate で流し、chloroform-methanol で elution を行うと純化された sphingomyelin が得られる。これを Morrison-Smith 法で methanolysis を行い、GLC によって分析した。

結果

一般の分析では、Table 1 にみられる様に肝臓に sphingomyelin の著明な増量があり、総脂質の 50% 前後を占めている。これは乾燥重量当りにすると肝では正常の 17倍、脾では 24倍に相当する。cholesterol の増化も明らかである。TLC 上で ethanolamine phosphatide よりも faster running の燐脂質が肝臓に存在し、それは正常対照の肝臓や本例の脳では検出されなかった。

Table 1.—Chemical Composition of Liver and Spleen

	Liver		Spleen	
	Control	Niemann-Pick	Control	Niemann-Pick
Water (% wet weight)	74.6	74.0	78.9	72.1
	% dry weight			
Chloroform-methanol insoluble residue	74.1	45.0	79.8	49.6
Proteolipid protein	0.7	0.5	1.0	1.0
Total lipids	14.9	46.8	10.0	51.0
Upper phase solids	10.3	7.7	9.2	5.0
	% lipid			
Cholesterol *	10.1	15.4	18.0	19.8
Phospholipids	41.3	68.8	63.2	67.6
Unidentified phospholipid	0	6.3	0	2.6
Ethanolamine phosphatide	9.3	3.3	14.4	2.9
Lecithin	13.6	5.6	24.1	6.0
Sphingomyelin	8.9	47.8	11.2	51.6
Phosphatidyl inositide	1.5	2.8	3.7	1.7
Phosphatidyl serine	8.0	2.9	9.6	3.3
Glycolipids	0.9	1.0	1.3	1.7

* As free cholesterol.

Table 2 に示す様に、sphingomyelin は脳でも増加している。灰質では、総脂質の 0.5% (cerebrosides の 1/4) が glucocerebroside であることが見出された。本例では白質の脱髄(髄鞘の淡明化)がみられたが、白質に cholesterol ester は検出されなかった。

Table 2.—Chemical Composition of Gray and White Matter

	Gray Matter			White Matter		
	Control			Control		
	2.5 yr	5.5 yr	Niemann-Pick	2.5 yr	5.5 yr	Niemann-Pick
Water (% wet weight)	86.3	84.5	84.4	74.2	72.5	85.7
	% dry weight					
Chloroform-methanol insoluble residue	56.1	50.0	49.6	31.2	27.0	43.0
Proteolipid protein	1.3	2.3	0.2	8.4	8.2	2.4
Total lipids	26.5	30.5	37.8	52.4	56.3	43.8
Upper phase solids	14.1	17.1	12.4	7.8	9.6	10.9
	% lipid					
Cholesterol	21.3	23.9	23.7	27.0	25.5	26.5
Phospholipids	67.7	67.1	69.5	46.8	44.4	59.8
Ethanolamine phosphatide	14.4	20.3	17.8	15.7	14.1	15.9
Lecithin	28.2	26.7	21.2	13.9	13.0	16.0
Sphingomyelin	7.9	8.2	21.7	6.5	7.5	14.9
Phosphatidyl inositide	3.2	1.4	0.9	0.9	0.5	1.1
Phosphatidyl serine	12.3	8.7	7.5	7.2	8.9	7.8
Galactolipids	2.0	2.3	2.2	21.6	29.5	14.4
Cerebroside			2.0			9.0
Sulfatide			0.4			2.0

Table 3.—Composition of Isolated MCB Fraction

Constituents	Brain MCB	Liver MCB	Spleen MCB
	% dry weight		
Chloroform-methanol insoluble residue	4.7	4.7	1.9
Total lipids	89.6	88.3	94.4
Upper phase solids	6.5	6.9	3.1
	% lipid		
Cholesterol	24.2	14.3	19.5
Phospholipids	68.0	77.6	72.8
Unidentified phospholipid	0	7.2	2.5
Ethanolamine phosphatide	5.4	2.7	1.9
Lecithin	9.2	5.8	4.4
Sphingomyelin	47.9	57.9	59.8
Phosphatidyl inositide	1.4	4.3	4.3
Phosphatidyl serine	4.1		
Glycolipids	3.1	...	...

Table 4.—Chemical Composition of Myelin

Constituents	Control		Niemann-Pick
	2.5 yr	5.5 yr	
	% dry weight		
Chloroform-methanol insoluble residue	12.0	13.0	8.7
Proteolipid protein	23.9	18.4	21.7
Total lipids	65.0	69.3	73.1
Upper phase solids	1.4	0.9	1.2
	% lipid		
Cholesterol	24.5	22.3	32.0
Phospholipids	46.9	43.5	49.2
Ethanolamine phosphatide	15.6	13.6	13.2
Lecithin	14.9	12.7	12.6
Sphingomyelin	8.5	6.9	8.0
Phosphatidyl inositide	0.6	1.2	0.5
Phosphatidyl serine	7.3	8.2	7.6
Galactolipids	19.5	32.9	18.9
Cerebroside	12.6	21.6	12.4
Sulfatide	4.0	5.5	3.0

脳、肝、脾より分離した MCB 分画の組成は Table の如くである。脳の MCB は乾燥重量の 43% が sphingomyelin で、これは灰質の 9% に比べると著しい差であり、MCB が髄鞘の座であることを示している。sphingomyelin と cholesterol

Table 5.—Gangliosides in Niemann-Pick Disease

	Gray Matter		White Matter		Myelin		Liver		Spleen		MCB		
	Control	N-P†	Control	N-P	Control	N-P	Control	N-P	Control	N-P	Brain	Liver	Spleen
Total NANA (μg/100 mg dry weight)	528	711	55	291	48	58	28	64	35	86	1160	70	130
G_{T1}	14.6	14.2	18.5	25.0	13.1	30.4	9.7	26.5	32.4	26.8	6.8		
G_{D1b}	20.8	14.5	19.5								4.9		
G_{D1a}	46.1	40.9	39.3	43.4	9.4	18.8					36.3		
G_{M1}	14.5	15.1	15.9	21.2	77.5	43.9	3.3		2.4		12.9		
G_{M2}	4.2	7.5	4.8	5.7	0.0	4.5	3.0		3.3		14.1		
G_{M3}	0.6	7.9	2.3	8.9	0.0	2.6	83.9	73.4	61.9	73.2	20.1		

* Values are expressed as percent total NANA in each ganglioside.
† N-P indicates Niemann-Pick.

でMCBの総脂質の90%以上かを占めうれている。脳のMCBのglycolipidsは3.1%に過ぎなかったが、これは硼酸処理TLC上で殆どがglucocerebrosideであることが示された。又肝臓で見出された不明のphospholipidは、肝臓のMCBに相当量存在する。

ミエリン分画は、yieldが正常の43%で低く、cholesterolが対照に比して〆多い点を除けば特に異常はない。sphingomyelinの量が正常であるのは注目に値する。(Table 4)

Table 6. Fatty Acid Composition of Sphingomyelin

Fatty Acids	Liver		Spleen		Gray Matter		White Matter		Myelin	
	Control	N-P*	Control	N-P	Control	N-P	Control	N-P	Control	N-P
14	0.9	0.9	1.3	1.1	trace	0.1	0.3	0.4	0.8	0.8
15	trace	trace	0.3	trace	...	...	0.1	...	0.1	0.2
16	26.4	40.4	49.7	42.0	9.9	5.1	4.9	10.4	4.5	12.1
17	0.6	...	1.1	0.4	...	trace	...	...	0.1	...
18:1	trace	trace	1.1	0.5	...	...	...	...	...	0.6
18:0	7.5	14.5	8.8	12.0	72.6	89.0	38.3	76.2	36.4	54.6
19:1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
19:0	0.2	0.1	0.4	trace	...	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1
20:1	...	trace	...	trace	...	...	...	...	...	...
20:0	0.5	5.9	3.4	5.1	2.2	2.4	0.1	0.3	1.6	2.0
21:1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
21:0	0.6	0.3	0.3	0.3	trace	trace	0.1	0.1	0.1	0.1
22:1	0.4	1.8	0.5	0.8	0.1	...	0.7	0.3	1.2	1.0
22:0	17.9	11.0	8.1	11.3	2.1	2.1	2.3	4.3	2.7	2.4
23:1	0.6	0.1	0.3	0.2	0.1	...	0.8	0.2	1.0	0.4
23:0	11.4	1.8	3.0	2.0	0.8	0.2	2.1	0.8	2.3	0.6
24:1	18.9	16.2	14.6	15.5	7.5	...	32.0	1.1	27.3	15.0
24:0	13.5	6.8	6.9	7.9	3.0	1.1	8.9	4.0	10.9	5.2
25:1	0.4	trace	0.3	0.8	0.9	...	4.0	0.6	2.9	1.3
25:0	0.2	...	0.1	...	0.3	...	1.8	0.4	2.1	0.9
26:1	trace	trace	...	trace	0.5	...	3.3	1.0	5.3	2.8
26:0	trace	...	...	...	...	...	...	...	0.8	0.5

* N-P indicates Niemann-Pick.

Table 5は gangliosides の分析結果を示す。脳皮質では gangliosides の総量は正常範囲と思われるが、NANA でみる pattern は明らかに異常で、GM_2 と GM_3 が相対的に増加している。この二者の相対的な増加はMCBでは更に著明であり、全NANAの5/6以上がこの二つによって占められている。ミエリン分画の gangliosides は正常、肝臓では正常の約2倍に増量していたが、TLC上の pattern は正常で、GM_3 (hematoside) しか認められなかった。

Table 6は sphingomyelin の脂酸構成である。正常対照に比すると、長鎖脂酸の欠乏がみられる点が異常であるが、この異常は灰質及びミエリンでは軽度、肝及び白質ではより高度である。この結果は従来の報告[9,12,17]に一致するものである。Lowden ら[5]によって subacute (type C) の1例のミエリンに見出された異常なピークは、本例では認められなかった。

考　按

MCBの分析結果は、これが本疾患に於ける sphingomyelin と cholesterol の蓄積の場であることを示している。

脳のMCBで特に興味ある点は、これが GM_2-、GM_3-ganglioside の蓄積場所でもあることである。Jatzkewitz ら[3]は Niemann-Pick 脳で GM_2 の増量を報告している

が、本例ではGM3が増量していた。この様なpatternだけの異常は、他のlipidosesの例えばHurler病[14]やGaucher病[15]の灰白質にも認められており、現在の所、specificな意味だけは困難であろう。

正常脳ではglucocerebrosideは微量にしか存在せず、検出し得ないとされているが、本症例の大脳灰質の総脂質の0.5%がglucocerebrosideであり、しかもその大部分がMCBに存在すると考えられた。この蓄積の意義は不明であるが、GM2-、GM3 gangliosidesの増量と関係があるのかも知れない。Philippart[8]らもsubacute formの1例でglucocerebrosideの増量を報告している。

肝、腎に見出された不明のnon-polar phospholipidは最近Rouser[10]によって同じ疾患について記載されたlyso-bisphosphatidic acidと同一と思われる。我々の研究では、この異常なphospholipidがMCBに蓄積されていることが明らかにされた。

Metachromatic leukodystrophyの脳から得られたミエリンは、正常の5～10倍のsulfatideを含むことが知られているが[6,7]、Niemann-Pick病でも高度の脱髄を伴うことも多いので、ミエリン分画中のsphingomyelinが増加しているか否かが、興味のある点である。本研究はそれが正常であることを示した。Lowden[5]らもsubacute formの1例で、ミエリン分画のsphingomyelinは正常であったと述べている。この様にミエリン中のsphingomyelinの増量がないとすれば、白質全体では明らかな増加が認められているから、白質内のnon-myelin portionにはsphingomyelinの相当量の増加がある筈である。病理組織学的に認められるtorpedo axon（電顕的に多数のMCBを含む）が、その増加を説明し得るかも知れない。

文　献

1) Brady, R. O., et al. : Proc. Nat. Acad. Sci. 55,366 (1966)
2) Crocker, A. C. : J. Neurochem. 7,69 (1961)
3) Jatzkewitz, H., et al. : J. Neurochem. 12,135 (1965)
4) Kamoshita, S., et al. : Neurology 18,975 (1968)
5) Lowden, J. A., et al. : Arch. Neurol. 17,230 (1967)
6) Norton, W. T. & Poduslo, S. E. : Variation in Chemical Composition of the Nervous System as Determined by Developmental and Genetic Factors. Pergamon Press, Inc., Oxford & New York, p 82. (1966)
7) O'Brien, J. S. & Sampson, E. L. : Science 150,1613 (1965)
8) Philippart, M., et al. : Neurology 18,301 (1968)
9) Rouser, G., et al. : J. Amer. Oil Chem. Soc. 42,411 (1965)
10) Rouser, G., et al. : Lipids 3,287 (1968)
11) Samuels, S., et al. : J. Neuropath. Exp. Neurol. 22,81 (1963)
12) Ställberg-Stenhagen, S. & Svennerholm, L. : J. Lipid Res. 6146 (1965)
13) Suzuki, K. & Chen, G. C. : J. Neuropath. Exp. Neurol. 25,396 (1966)
14) Suzuki, K. : Inborn Disorders of Sphingolipid Metabolism. Pergamon Press, Inc. Oxford & New York, p 215. (1966)
15) Suzuki, K. , et al. : J. Neuropath. Exp. Neurol. 26,537 (1967)
16) Suzuki, K., et al. : J. Neuropath. Exp. Neurol. 28,25 (1969)
17) Svennerholm, E., et al. : Biochim. Biophys. Acta 125,60 (1966)
18) Svennerholm, L. & Sourander, P. : Proc. 5th Int. Cong. Neuropath. p 342. (1966)

29. Tay-Sachs 病脳の中性脂質ならびに糖脂質の異常

武富　保・河村成子・岡野　照
（信大・医・順応研・生化）
浅野正英　（信大・医・1病理）

わが国における Tay-Sachs 病の典型的な症例とも考えられる、兄妹に見出された興味ある例で、兄(1年5ヶ月で死亡)の症例はすでに病理組織学的に丸山等(2)により、生化学的には牧田,山川(1)により明らかにされた。今回、妹(2年4ヶ月で死亡)の症例について病理組織学的に、また、生化学的に検討されたので報告する。この兄妹の家族歴によると、父方の祖父と母方の祖母がイトコ同志という血族結婚が注目される。そして、兄妹に見られたことは、本症がやはり性染色体の遺伝子の異常でなく、突然変異による homozygous な常染色体の遺伝子の異常によるものと考えられる。本症例の病理組織学的所見では、兄の所見と略々同様であるが、大脳皮質の錐体細胞、視床中脳の核神経細胞、小脳のプルキンエ細胞、橋延髄の核神経細胞、脊髄の神経細胞は著明に腫大し、ニッスル塊は消失していると共に一部では空胞化している。腫大した神経細胞部位には瀰漫性にマクログリアの増生があり、肥育グリア化もみられる。脱髄は主に錐体路、脊髄、小脳路にみられる。大脳の電顕所見では神経細胞胞体に層状構造の所謂 membranous cytoplasmic body を多数認めた。生化学的には、脳組織に Tay-Sachs ガングリオシド(G$_{M2}$)の異常蓄積は言うまでもなく、Tay-Sachs グロボシドもかなり増量し、従来の牧田,山川(1)や著者等(3)の報告とかなり類似しているが、今回、コレステロールエステルの増量も著しいことが明らかにされた。

〔実験方法〕

Tay-Sachs 病患児脳の一部を信大附属病院中検でクロロホルム-メタノール(2:1, v/v)中に保存してあった材料について分析を試みた。まず、Waring blendor で粉砕抽出して、全脂質約 1.9 g を得た。この全脂質をアセトンで2回処理して、アセトン可溶な粗中性脂質約 470 mg を得た。そして、アセトン不溶部はエーテルで2回処理して、可溶部を除去後、エーテル不溶の粗スフィンゴリピド約 250 mg を得た。

粗中性脂質は珪酸 Wyflo Super Cel (2:1, w/w) カラムクロマトによってヘキサン-エーテル混合溶媒で溶出して分画精製した。また、粗スフィンゴリピドも同様にして、C-M 混合溶媒で溶出して分画精製した。中性脂質の溶出パターンは総重量法とコレステロール定量によって得られた。糖脂質の溶出パターンはアンスロン試薬による糖の定量によって得られた。なほ、スフィンゴミエリンの溶出部位は薄層クロマト(TLC)によって確認された。このようにして得られた各種脂質の同定並びに均一性は TLC, IR-スペクトル、化学分析等によって確かめられた。糖脂質の構成糖であるガラクトースとグルコースの比は、メタノリーシス後、TMS 誘導体としてガスクロマト(GLC) 4% SE-30 によって求められた。アミノ糖は Elson & Morgan 法により、シアル酸は Bial 試薬によって定量された。糖の結合様式は糖脂質を完全メチル化後、メタノリーシスして、GLC によって決定された。各脂質の脂肪酸構成は脂肪酸メチルエステルにして GLC により、また、スフィンゴシン塩基組成は著者等(4)の方法により、TMS 誘導体として GLC により分析された。なほ、オキシ酸はメタノリーシス後，場合によっては TLC で直鎖酸と分けて、TMS 化して分析した。

〔実験結果〕

中性脂質の精製及び同定

アセトン可溶分画から得た粗中性脂質は珪酸カラムクロマトによって、図-1に見られる溶出パターンを示した。5~10%エーテルを含むヘキサンによって溶出されるFr-Iは TLC(図-1)及び IR(図-2)によってコレステロール/エステルであることが確認され、その構成脂酸はミリスチン酸4.0%, パルミチン酸26.1%, パルミトオレイン酸8.4%, ステアリン酸14.6%, オレイン酸44.9%から成った。25~50%エーテルを含むヘキサンによって溶出されるFr-IIは TLC(図-1)及び IR(図-2)によってコレステロールであることが確認された。コレステロール/エステルが本症脳の中性脂質の約20%程度と占めることが注目された。

図-1 中性脂質の珪酸カラムクロマトグラム及び TLC

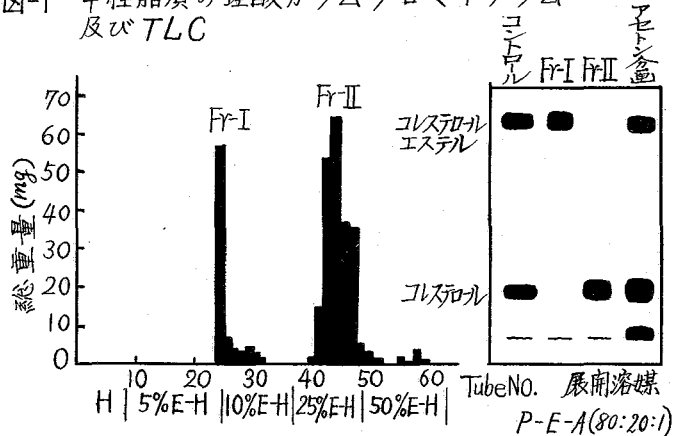
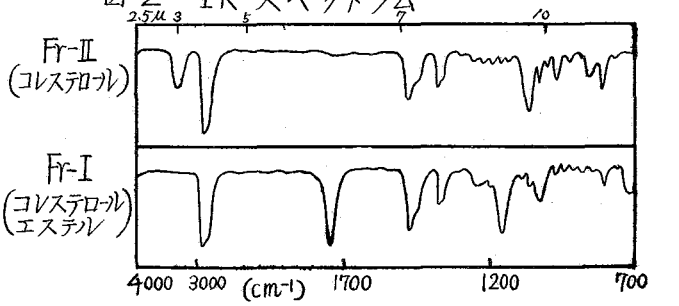


図-2 IR-スペクトラム



スフィンゴリピドの精製及び同定

エーテル不溶の粗スフィンゴリピドは珪酸カラムクロマトによって、図-3に見られるような溶出パターンを示した。Fr-I は ceramide monohexoside (CMH, セレブロシド)で, TLC でケラシンとフレノシンに相当する2つのスポットを示した。この分画の構成糖は図-4に示されるようにガラクトースが圧倒的で、ごく微量のグルコースを含むことが確かめられた。従って、本症脳に於いてはグルコセレブロシドの増量は認め難かった。Fr-II は TLC から若干の CDH とサルファタイド(CSE)からなることがわかった。Fr-III は正常脳には見られない TLC で Tay-Sachs グロボシドに相当する3スポットを示した。化学分析の結果はグルコースとガラクトースとガラクトサミンの比は

図-3 スフィンゴリピドの珪酸カラムクロマトグラム及び TLC

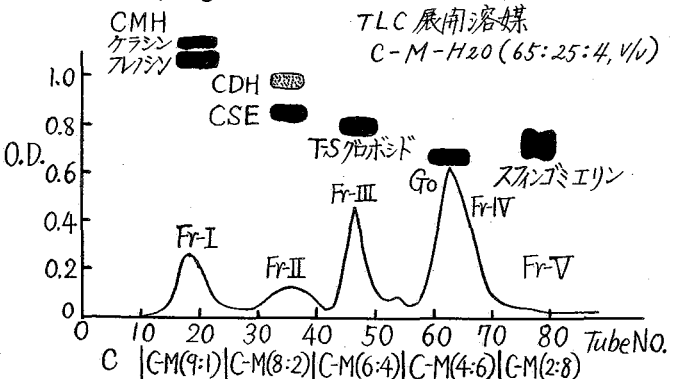
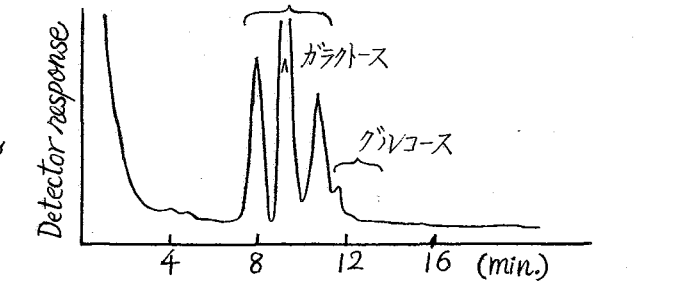


図-4 CMH分画の構成糖のメチルグリコシド-TMS誘導体の GLC



ほぼ1:1:1であり、図-5に示されるメチル化糖のGLCの結果はN-acetyl-galactosaminyl(1→4)galactosyl(1→4)glucosyl ceramideのT-Sグロボシドの化学構造と一致することを示した。Fr-IVはTLCでT-Sガングリオシド(Go)と一致し、分析の結果はグルコースとガラクトースとガラクトサミンとシアル酸の比はほぼ1:1:1:1であり、メチル化糖のGLCの結果は図-6のように、methyl β-2,3,6-tri-O-methylglucosideとmethyl α-2,3,6-tri-O-methylglucosideのみのピークを示した。これらのことはGoの構造 N-acetylgalacosaminyl(1→4)galactosyl(1→4)glucosyl ceramide (N-acetylneuraminic acid)と一致することを示した。Fr-Vはアンスロン試薬で陰性であるがTLCでスフィンゴミエリンと一致し、モリブデン青試薬で陽性に呈色することからも、この部位にスフィンゴミエリンが溶出していることがわかった。

図-5 T-Sグロボシドのメチル化糖のGLC

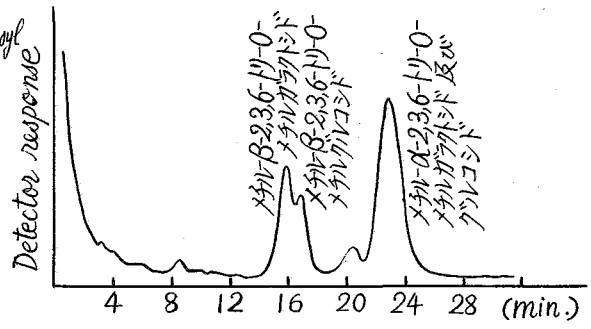
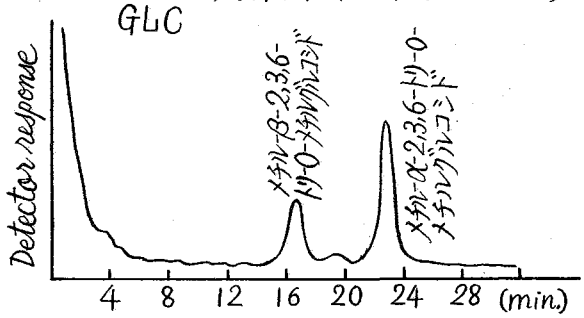


図-6 T-SガングリオシドGoのメチル化糖のGLC



各種スフィンゴリピドのスフィンゴシン塩基並びに脂肪酸組成

スフィンゴリピドのlipophilicな部分がスフィンゴリピドの種類により異なり、また、加令や病的状態によって変動することが知られているが、カラムクロマトやTLC分取によって出来るだけ純粋に得た本症脳のスフィンゴリピドのスフィンゴシン塩基及び脂肪酸組成を常法により分析した。図-7に見られるように、T-SグロボシドはC18-スフィンゴシン及びジヒドロスフィンゴシンの他にC20-スフィンゴシン及びジヒドロスフィンゴシンを明らかに有し、しかも、図-8に見られるT-Sガングリオシド(Go)に比して、むしろ、これらC20-スフィンゴシン及びジヒドロスフィンゴシンが多いという結果が得られた。他方、CMH(図-9)、CSE、スフィンゴミエリンではC18-スフィンゴシンと僅かにC18-ジヒドロスフィンゴシンがあるのみであった。

図-7 T-Sグロボシドのスフィンゴシン塩基TMS誘導体のGLC

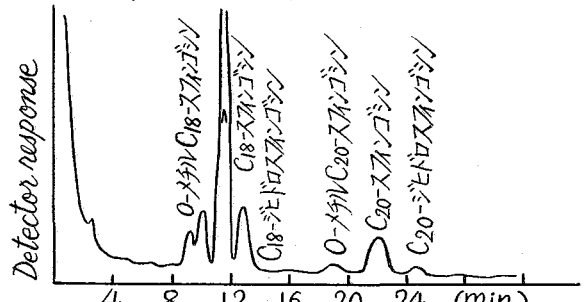
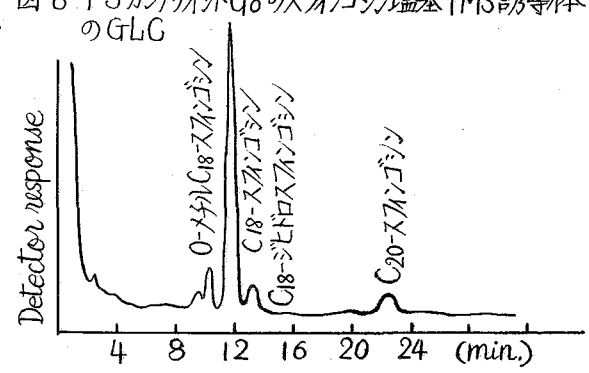


図-8 T-SガングリオシドGoのスフィンゴシン塩基TMS誘導体のGLC



脂酸組成の結果は表-1に纏められている。T-SグロボシドとG_0はステアリン酸を主体とする共通の脂酸からほゞ成っているが、CMH, CSEは直鎖酸とオキシ酸いづれも長鎖からなっている。CMHの直鎖酸で$C_{22:0}$が$C_{24:0}$より多いのが注目される。また、スフィンゴミエリンは独自の脂酸構成でステアリン酸が主体をなして長鎖酸の少ないのが注目される。

図-9 CMHのスフィンゴシン塩基TMS誘導体のGLC

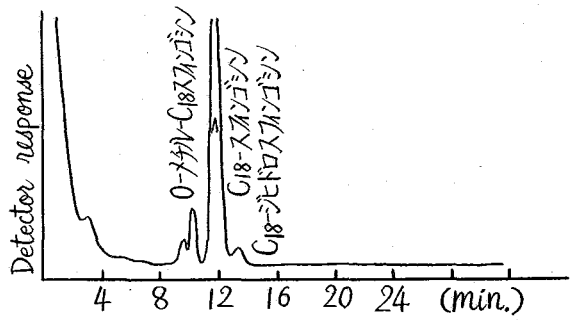


表-1 T-S脳の各種スフィンゴリピドの脂酸組成(%)

		$C_{14:0}$	$C_{16:0}$	$C_{16:1}$	$C_{18:0}$	$C_{18:1}$	$C_{20:0}$	$C_{20:1}$	$C_{22:0}$	$C_{22:1}$	$C_{23:0}$	$C_{23:1}$	$C_{24:0}$	$C_{24:1}$	$C_{25:0}$	$C_{25:1}$	$C_{26:0}$	$C_{26:1}$
CMH	直鎖酸	1.4	8.2		29.9	12.1	1.2		25.5				17.1					
	オキシ酸				0.6		0.5		11.5		18.6		52.9	2.3	10.3	0.6	1.9	0.9
CSE	直鎖酸	0.9	4.4		16.9	3.2	2.0		5.0		8.4		38.1	11.5	9.5			
	オキシ酸				1.1				10.3		14.2		57.2	7.7	9.6			
スフィンゴミエリン		0.2	9.5	0.3	64.8	0.3	3.2		3.7		2.2		7.5	8.2				
T-Sグロボシド		0.1	6.7		82.2	1.9	6.6		2.5									
T-SガングリオシドG_0		0.2	2.2		87.6	2.6	7.4											

CDH 2.1 4.2 59.4 2.7 5.4 山5

〔考察〕

Tay-Sachs病の典型的な症例とも考えられる兄妹に見出された例で、生化学的には兄の症例について牧田、山川(1)による報告、また、著者等(3)の別の症例の報告と同様に、T-Sガングリオシドの異常蓄積とT-Sグロボシドの著しい増量を妹の本症例に於いても確認出来た。しかし、玉井、山川(5)の別のTay-Sachs病例の報告のようにグルコセレブロシドの増量を見出すことは出来なかった。CDHの増量も殆ど認められなかった。しかし、今回、特にアセトン可溶分画中にコレステロールエステルの増量が認められたことは興味ある知見であり、脱髄を伴う脳疾患とも関連するものと考えられる。また、T-Sグロボシドのスフィンゴシン塩基組成にC20-スフィンゴシンとジヒドロスフィンゴシンが明らかにされ、G_0に比して若干多いのはガングリオシドの生合成や代謝を考える上で参考にすべきことかも知れない。CMH分画にC20-スフィンゴシンが全く認められないのは、やはり、殆どがガラクトセレブロシドであることを裏書きするものと思われる。然ながら、Tay-Sachs病は症例によって幾分異なった中性脂質や糖脂質の異常が見られるのかも知れない。

〔文献〕

(1) Makita, A & Yamakawa, T.; Jap. J. Exptl. Med. 33, 361 (1963)
(2) Maruyama, Y., Takeuchi, S., Tajiri, R., Idayano, S. & Makita, A.; Med. J. Shinshu Univ., 5, 237 (1960)
(3) Taketomi, T. & Kawamura, N.; J. Biochem., 66, 165 (1969)
(4) 武富保、河村成子; 神経化学 7巻 Supplement 138 (1968)
(5) 玉井洋一、山川民夫; 神経化学 7巻 Supplement 134 (1968)

30. 脳腫瘍のリン脂質脂肪酸組成に関する研究

佐藤　修・佐野圭司（東大・医・脳神経外）
堀口正明　（三共中央研）

われわれは、第10回の日本神経化学会において、脳腫瘍の総脂質中の脂肪酸組成について報告し、正常脳組織（灰白質、白質）のそれと比較検討した。

その結果、

1) 脳腫瘍では、灰白質、白質のいずれに比しても、linoleic acid の増加が著明であり、さらにまた、白質に比し、oleic acid が少なく、灰白質に比し、palmitic acid が少なく、linolenic acid が増加している。

2) 病理組織学的に良性の meningioma, neurinoma と、悪性の glioma の脂肪酸を比較すると、glioma では、linoleic acid が減少し、stearic acid がやや増加している。

などのことを確認した。

その後も、われわれは研究を進め、脂質をさらに分画し、燐脂質、遊離脂肪酸、中性脂肪、コレステロール・エステルのそれぞれの脂肪酸組成について検討を進めてきた。今回は、この中で、燐脂質（phospholipids）の脂肪酸組成についての成績を発表する。

試料：第1表のように、脳腫瘍20例および、これと比較するために、正常脳組織10例（灰白質、白質各5例）、合計30例の試料で、すべて開頭術により得られたものである。なお、正常脳組織は、脳腫瘍摘出のため、止むなく lobectomy を行なったものから得られたもので、同一例の同一部位の灰白質、白質を測定した。脳腫瘍は、原発性腫瘍19例、転移性腫瘍1例で、病理組織学的悪性腫瘍9例、良性腫瘍11例である。

第1表　症例

Brain tumor		20例
	Glioma	7
	Neurinoma	5
	Meningioma	4
	Pituitary chromophobe adenoma	1
	Hemangioblastoma	1
	Metastatic adenocarcinoma	1
	Sarcoma	1
Control		10例
Gray & White matter	Frontal lobe	2 & 2
	Cerebellum	2 & 2
	Temporal lobe	1 & 1

測定方法：第1図に略記してある。

1) 脂質抽出　試料 0.1～0.5gm は小血管、凝血をピンセットで除去、生理食塩水で十分洗浄をくり返し血液成分を除き、Folch et al. の変法[1]にしたがい、抽出溶媒（$CHCl_3$:CH_3OH=2:1 V/V）25 ml を加え、冷却しつつ、Potter Elvehjem 型ホモジェナイザーでホモジェネートとする。これをガラス・フィルターで濾過、保存し、残渣を抽出溶媒60 ml で三角フラスコに洗い込み、マグネチック・スターラーを用い撹拌（2時間）、ガラス・フィルターで濾過する。残渣について同様の操作をもう一度繰り返す。抽出液を集め、0.73% NaCl 溶液15 ml を加え、振盪（5分間）洗浄を行ない、下層液を分離保存する。上層液に抽出溶媒50 ml を加え、振盪（10分間）、下層液を分離し、前の操作で得られた下層液と一緒にし、減圧下に蒸発乾固

(50°C) する。

2) 脂質分画　抽出した脂質を、Freeman & Weat の方法[2] により、二段展開薄層クロマトグラフィにより分画する。すなわち、脂質を少量の $CHCl_3$:CH_3OH 溶媒に溶解し、薄層板にスポットする。これをまず、第一段溶媒 (Diethyl ether - benzene - ethanol - acetic acid = 40 : 50 : 2 : 0.2) で展開、さらに、第二段溶媒 (Diethyl ether - hexane = 6 : 94) で展開し、燐脂質、遊離脂肪酸、コレステロール、中性脂肪、コレステロール・エステルに分画する。基底線にとどまっている燐脂質のスポットをかき集め、$CHCl_3$:CH_3OH 溶媒で溶解、ガラス・フィルターで濾過、蒸発乾固 (50°C) する。

第1図

Tissue (0.1 ~ 0.5 gm)
↓
Homogenization
↓
Extraction
↓ ($CHCl_3$: CH_3OH)
Classification
↓ (thin-layer chromatography)
Interesterification
↓ (BF_3 : CH_3OH)
Separation
↓ (Gas chromatography)
Calculation

3) メチル・エステル化　抽出した燐脂質に、BF_3-CH_3OH 溶液 (BF_3 12.5% w/v) 3ml を加え、ジムロートをつけ、沸騰湯浴中に入れ、還流 (5分間) する。冷却後、石油エーテル 30ml で分液ロートに洗い込み、蒸溜水 20ml を加え振盪 (10分間)、上層液を分離し、減圧下で、石油エーテルを蒸去 (50°C) する。これを減圧下でデシケーターに入れ保存する。

4) gas chromatography　得られた脂肪酸メチル・エステル (10~20 γ で測定可能) を約1~2% の濃度になるよう、$CHCl_3$ 溶液に溶解し、この約2 μl を注入して gas chromatography を行なう。使用した装置は、Barber-Colman Model No. 10 gas chromatograph に自作の水素炎検出器を装着したもので、カラムとしては、polydiethyleneglycol succinate を 30% の濃度に 80~100 メッシュの chromosorb-W にコーティングしたものを、内径 6mm, 長さ 2m の U 字型パイレックス管に充填して使用した。測定条件は、カラム温度 175°C、注入口温度 290°C、検出器温度 210°C、キャリヤーの窒素ガス 80ml/min (1.8 kg/cm²)、増幅器感度 3×10^{-9} A である。測定した脂肪酸メチル・エステルのピークは、標品 (Sigma Chemical Co.) を用い同定した。そして、脂肪酸組成は、各々の脂肪酸メチル・エステルのピークの高さと、半幅値により面積を求め、これらの総計を 100 として、百分率で表わした。なお、この測定法では、炭素原子数14以下の低級脂肪酸も測定可能であるが、試料中の含量が少ないので、これを除外し、結局、palmitic acid ($C_{16:0}$), palmitoleic acid ($C_{16:1}$), stearic acid ($C_{18:0}$), oleic acid ($C_{18:1}$), linoleic acid ($C_{18:2}$), linolenic acid ($C_{18:3}$), arachidic acid ($C_{20:0}$), arachidonic acid ($C_{20:4}$) の8種類の脂肪酸について、同定を行なった。

測定結果：まず、薄層クロマトグラフィの結果をみると、脳腫瘍、正常脳組織いずれの場合にも、全例において、脂質の中では、燐脂質が最も多い。その他の脂質についての薄層クロマトグラフィの結果は、別の機会にまとめて報告したい。

燐脂質中の脂肪酸組成を第2表に総括する。脳腫瘍の燐脂質脂肪酸組成を、正常脳組織 (灰白質、白質) のそれと比較すると、次のことがわかる。

第2表

Fatty acid	No. of Carbon / No. of Double B.	Mean ± S.D. Grey matter	White matter	Brain tumor
palmitic	16:0	37.66 ± 1.88	27.14 ± 3.28	35.17 ± 5.04
palmitoleic	16:1	1.92 ± 0.54	2.36 ± 0.41	3.01 ± 1.30
stearic	18:0	21.78 ± 3.70	9.72 ± 8.65	14.29 ± 3.07
oleic	18:1	27.50 ± 2.15	48.36 ± 7.10	26.01 ± 3.81
linoleic	18:2	1.22 ± 0.71	0.96 ± 0.80	6.39 ± 3.03
linolenic	18:3	0.82	4.08 ± 3.50	0.29
arachidic	20:0	-	-	-
arachidonic	20:4	9.10 ± 4.80	7.38 ± 3.90	14.84 ± 3.22

1) 脳腫瘍では、灰白質、白質に比し、linoleic acidが増加している ($p<0.001, p<0.001$)。また、arachidonic acidも増加している ($p<0.01$, $p<0.001$)。

2) その他、脳腫瘍では、灰白質に比し、stearic acidが減少している ($p<0.001$)。また、白質に比し、palmitic acidが増加 ($p<0.01$) し、oleic acid, linolenic acidが減少 ($p<0.001$, $p<0.001$) している。

3) 灰白質と白質の間にもかなりの差異がみられ、灰白質は白質に比し、palmitic acid, stearic acidが増加 ($p<0.001$, $p<0.05$) し、oleic acidが減少 ($p<0.001$) している。

次に、病理組織学的に悪性のものと、良性のものとの間に異る点があるかいなかをみるために、glioma (7例)、neurinoma (5例)、meningioma (4例) の燐脂質脂肪酸組成を比較したのが第3表である。

第3表

Fatty acid	No. of Carbon / No. of Double B.	Mean ± S.D. Glioma	Neurinoma	Meningioma
palmitic	16:0	37.70 ± 3.33	34.80 ± 5.15	32.70 ± 3.54
palmitoleic	16:1	4.20 ± 1.15	2.44 ± 0.32	1.77 ± 0.31
stearic	18:0	11.96 ± 2.69	13.52 ± 1.18	16.70 ± 0.95
oleic	18:1	27.30 ± 1.93	27.14 ± 1.43	22.85 ± 4.81
linoleic	18:2	4.21 ± 2.47	7.86 ± 1.13	7.63 ± 2.35
linolenic	18:3	0.27	0.26	0.37
arachidic	20:0	-	-	-
arachidonic	20:4	14.36 ± 2.00	13.98 ± 2.94	17.98 ± 2.48

この結果、

1) gliomaでは、neurinoma, meningiomaいずれに比しても、palmitoleic acidが増加している ($p<0.05$, $p<0.01$)。

2) さらに glioma では、neurinoma に比し、linoleic acid が減少 ($p<0.05$) し、meningioma に比し、stearic acid が減少 ($p<0.05$) している。

以上にのべた結果を、以前報告した脳腫瘍の総脂質中の脂肪酸組成の成績と比較すると、両者の間にかなりの差異がみられることがわかる。しかしながら、また、ある点においては、両者の間にかなりの類似点も見出される。これは、総脂質の中で、燐脂質の含量が最も多いために、総脂質の脂肪酸組成が、燐脂質のそれに、かなり左右されることによるものと思われる。

結論：脳腫瘍20例、正常脳組織（灰白質、白質）10例について、燐脂質中の脂肪酸組成を測定した。その結果、

1) 脳腫瘍では、正常脳組織に比し、linoleic acid ($C_{18:2}$) と、arachidonic acid ($C_{20:4}$) の多価不飽和脂肪酸が増加している。

2) 悪性腫瘍の glioma では、良性腫瘍の neurinoma, meningioma に比し、palmitoleic acid ($C_{16:1}$) が増加している。

<u>参考文献</u>

1) Folch, J. et al. : A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. J. Biol. Chem., 226: 497-509, 1957.

2) Freeman, C.P. & West, D. : Complete separation of lipid classes on a single thin-layer plate. J. Lipid Res., 7: 324-327, 1966.

第 12 回　日本神経化学会抄録集

昭和 44 年 10 月 24 日　(金)

25 日　(土)

於　日本都市センター講堂 (東京)