

# 脳 の 窒 素 代 謝

## 第 5 編

### 正常マウス並にラツテ脳髓アンモニア量について

岡山大学医学部神経精神医学教室 (主任：奥村二吉教授)

河 田 三 郎

〔昭和33年2月11日受稿〕

#### 緒 言

脳・神経組織とアンモニアについては、蛙の坐骨神経に電気刺激を与えると、遊離アンモニアが増加するという田代<sup>1)</sup>の研究を始めとし、Bülow and Hohmes<sup>2)</sup>, Conway<sup>3)4)5)6)</sup>, Richter and Dawson<sup>7)</sup>, Weil-Malherbe<sup>8)9)10)11)12)</sup>, Vladimirova<sup>13)</sup>, 塚田等<sup>14)15)16)17)18)19)20)</sup>の報告があり、これらは何れも、アンモニアが脳の機能と密接な関係にあると主張している。中でも Vladimirova<sup>13)</sup>は、大脳半球のアンモニア量は、直ちに中枢神経系の機能状態の生化学的指数であるとすら極言している。アンモニアの生理的意義の重要性に関しては、今日疑をさしはさむ余地はないのである。従つて、上記の如く数多くの研索がすゝめられたわけであろうが、その実験方法も、得られた測定結果も、研究者によりまちまちであり、未だ一定の結論には達しておらず、また一方、脳の如何なる状態に伴つてアンモニアが増減するかという具体的な事実も、十分知り尽されているとは言えないのである。私もこの点に着眼し、精神医学の領域で常用される電気衝撃、及びインシュリン衝撃時の脳髓アンモニアについて実験を行い、若干の所見を得たので、こゝに報告する。

本編においては、実験方法に関する私の創意工夫と、それにより得られた無処置健常鼠についての測定結果について述べたい。

#### 実 験 方 法

アンモニアの定量に関しては、Nencky u. Zaleski<sup>21)</sup>, Folin<sup>22)</sup>, Folin and Denis<sup>23)</sup>, Nash and Benedict<sup>24)</sup>, Parnas u. Heller<sup>25)</sup>等の方法があるが、何れも微量な脳髓遊離アンモニアを測定するには不十分であり、Conway が確立した微量拡散分析

法<sup>6)</sup>が、最も適當の様に思われる。従つて、私もこの方法によつたが、実際の測定にあつて不便な所を多少の工夫を加え次の如く実施した。

#### 1) 脳髓抽出固定及びアンモニアの抽出

(脳髓の抽出法については実験結果の項において述べる)。後述する如き方法により抽出・固定した脳髓を、秤量、10%三塩化酢酸液を用いて、0°Cに保冷しつゝ、10倍の homogenate を作り、5分間遠心沈殿 (2500回転/分) し、その上清を検液として用いる。

#### 2) アンモニアの吸収

上記の検液を Conway の Unit の外室に注加し、発生するアンモニアを、内室の塩酸に吸収せしめた。内室の塩酸としては、田代指示薬含有 0.0004N-塩酸 1.0 ml を用い、外室には飽和炭酸カリ液 1.0 ml を入れ、外室へ検液の注加が終れば、蓋を密閉し、15回揺り動かして外室内容を混合し、1時間静置して吸収をすすめる。

#### 3) 滴 定

吸収が終れば、蓋を去り、内室の塩酸を、水酸化バリウムで滴定する。水酸化バリウムの濃度は 0.0015 N とし、これは N/10 溶液をポリエチレン瓶に貯え、実験の都度稀釈して作る。更に、これをゴム栓を付した容器にうつし、その上から穿刺吸引して用いる等、つとめて空中の炭酸ガスとの接触をさける様に努めた。

滴定に際しては、三田村式キャピラリー・マイクロビューレットを用いた。この際排出せられる液量は、副尺により 0.0001 ml まで正確に読みとることができる。スピンドルの前進距離と、排出される液量との関係は、予め水銀を用いて正確に検定しておいた。

4) 計算盲検としては10%三塩化酢酸液を、一次標準としては硫酸アンモニウム標準液を同時に測定し、この値から算出する。

【附】

グルタミンの測定は、Harris<sup>26)</sup>に従い、検液を70°C 75分間加温し、アンモニアを発生せしめ、これを同じくCon way法により測定した。彼によれば、かゝる加温操作により、50 mg %までの純グルタミン溶液は、100%加水分解するという。盲検として10%三塩化酢酸を、一次標準としてグルタミン標準液を測定し、予め存在する遊離アンモニア値を考慮に入れて、グルタミン量を定めた。

### 実験結果

1) 先づ、出来る限り生体に近い状態において実験を行う目的を以て、体重約20gのマウスを用い、これが安靜な状態になるのを待つて、液体窒素中に落下せしめ、その脳髄アンモニア量を測定した。即ち、約20秒凍結を進行せしめ、脳髄の内部迄完全に凍結するのを待つて取出し、頭蓋を割り、氷冷せる鉄匙を用いて脳髄をかきとり、実験に供し、得られた値を第1表に示す。

第1表 マウス、液体窒素に投入

例数	アンモニア量 mg%	例数	アンモニア量 mg%
1	0.49	5	0.58
2	0.53	6	0.61
3	0.53	7	0.63
4	0.55	8	0.63
平均			0.57

第1表に示すごとく、アンモニア量は、最低0.49 mg%，最高0.63 mg%であり、8例の平均を求めると0.57 mg%であつた。

2) 次に、体重約100gのラットを台上に締結固定・開頭・脳髄を眼下に眺めつゝ摘出し、ドライアイス・アセトン冷剤中に投入（この間約0.4秒）凍結せしめたものについてのアンモニア、及びグルタミン値を第2表に示す。

こゝでは、アンモニア量は、最低0.47 mg%最高0.72 mg%，10例の平均は0.62 mg%であり、マウスの0.57 mg%とほとんど差を認めない。尚、グルタミン値は、3例の平均は80.3 mg%であつた。

3) 次に、体重約100gのラットを断頭の後、頭部を液体窒素中に投入・凍結せしめたものについて

第2表 ラット、開頭、脳摘出、ドライアイスアセトンにて凍結

例数	アンモニア量 mg%	例数	アンモニア量 mg%
1	0.47	6	0.62
2	0.55	7	0.66
3	0.60	8	0.67
4	0.60	9	0.70
5	0.62	10	0.72
平均			0.62

例数	1	2	3	平均
グルタミン量 mg%	77.6	81.0	82.5	80.3

第3表 ラット、断頭、液体窒素に投入

例数	1	2	3	4	平均
アンモニア量 mg%	1.58	1.75	1.76	2.12	1.80

のアンモニア量を第3表に示す。4例の平均は1.80 mg%であり、極めて高い値を示した。

4) 次に、興奮・体動による影響を検する爲に、ラットを水中に投入し、25分~45分間游泳せしめた後、液体窒素中に凍結せしめたものについてのアンモニア量を第4表に示す。

第4表 ラット、水泳後液体窒素に投入

例数	アンモニア量 mg%	例数	アンモニア量 mg%
1	0.80	4	0.93
2	0.84	5	0.95
3	0.88	6	1.05
平均			0.91

6例の平均は0.91 mg%であつた。

### 考 察

前掲のデータについて考察を加うるに、先づ、液体窒素中に落下せしめて得られたマウス脳髄アンモニア量は、8例平均0.57 mg%であり、この値は、Richter and Dawson<sup>7)</sup>の示した0.28 mg%、Vladimirova<sup>31)</sup>の0.36 mg%に比べると可成り高く、塚田<sup>18)</sup>の示した0.39 μM/gには略々近いといった具合である。教室の河井もラットを液体窒素中に落下せしめ、平均1.05 mg%なる値を得、これは実験動物の体重が大きい爲（約100g）、液体窒素に落下後、脳髄凍結迄に長時間を要する故であろうかと考

えている。Richter and Dawson<sup>7)</sup>は20~40g程度のラットを、塚田<sup>10)</sup>は同じく70g程度のラットを使用している。私は更に体重の少い(20g程度)マウスを使用してみたのであり、得られた値も可成り低いものであつたが、然しRichter and Dawson<sup>7)</sup>の約2倍であつた。従つて、唯in vivoの脳髄アンモニアを測定する爲には、マウスが適当であるが、さて電撃・インシュリン衝撃等の処置を、連日重積して加えるということになると、マウスでは具合が悪い。マウスはこれらの処置に対して抵抗が極めて弱く、日ならずして死を呈するからである。そこで、私の実験目的の爲には、どうしても、抵抗の強い成熟ラットを選ばねばならず、然るときは、脳髄抽出には、實際上、開頭・ドライアイスセトン法を用いざるを得ないという事になる。従つてこの方法によるラット脳髄アンモニア量を示したのであるが、10例の平均0.62mg%は、前述液体窒素落下法の平均値0.57mg%に比べて大差なく、0.47mg%から0.72mg%と各個の値も比較的そろつており、まづ、対照値として採用してもよいものと考えられる。又、同時に測定したグルタミン値も80.3mg%となり、Waelsch<sup>7)</sup>の44~84mg%、Richter and Dawson<sup>7)</sup>の79mg%にほぼ等しい値となつている。

尚、断頭後液体窒素投入法による高値については、特に述べるまでもない。死後にアンモニアが爆発的に増量することは、Richter and Dawson<sup>7)</sup>を始めとし、古来よく知られているからである。

液体窒素落下法に於ては、落下後凍結迄に要する時間、並びに、落下という刺激の影響が問題となつたのであるが、開頭・ドライアイスセトン法でも難点が多い。凍結所要時間は、脳髄のみを冷剤中に投入するのであるから、瞬時といつてよく、この事は問題とならないであろう。又、抽出後投入する迄の時間も、熟練すれば、極めて短縮することが出来る(約0.4秒)のである。最後に残る難点は、締結固定時に生ずるであろうラットの興奮、即ち

emotional excitement であるが、これに関しては、大して値が変動しないというRichter and Dawson<sup>7)</sup>の研究もある。私は水中に投入したラットについて、アンモニア値の変動を検してみたのであるが、6例の平均は0.91mg%となり、正常ラットの液体窒素法による1.05mg%(河井)に比べて、むしろ少々低目といえる位であつて、さらに脳髄アンモニアの増量はみられなかつたのである。

それはともかく、今後の実験に際しては、以上の観点から、ラット・ドライアイスセトン法、或は場合によつてはマウス・液体窒素落下法を用いる事とし、今後は、電気衝撃、並びにインシュリン衝撃時の変動を検索して行きたいと考えている次第である。

### 総 括

正常マウス、正常ラット脳髄を、種々の方法を用いて抽出し、そのアンモニア並びにグルタミンを、Conway微量拡散分析法を用いて測定した。

1. 正常マウスを液体窒素に投入したものは、アンモニア量は0.57mg%であつた。
2. 正常ラットを開頭・脳抽出・ドライアイスセトン冷剤で凍結したものは、アンモニア量は0.62mg%、グルタミン量は80.3mg%であつた。
3. 正常ラットを断頭・液体窒素に投入したものは、アンモニア量は1.80mg%であり、かなりの高値を示した。
4. ラットを水中にて游泳疲勞せしめた後、液体窒素に投入したものは、アンモニア量は0.91mg%であり、対照群(河井)に比して増量を認めなかつた。

参考文献、第7編に一括して掲げる。

おわりに臨み、終始熱心なる御指導と御校閲を賜つた奥村教授に深甚の謝意を捧げ、また種々御援助下さつた河井講師に御礼申し上げます。

## Nitrogen Metabolism of the Brain

## Part 5

The Ammonia and Glutamine Contents of the Normal Rat and  
Mouse Brain

By

Saburo Kawata

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

## Author's Abstract

In the determination of contents of ammonia and glutamine in the brains of normal rats and mice by Conway's method of micro-diffusion analysis, the author obtained the following results.

1) In the case of the normal mouse brain frozen and fixed in liquid nitrogen, the brain ammonia was 0.57 mg.%.  
2) In the case of the normal rat brain extracted by opening the skull and frozen with dry ice acetone, the brain ammonia was 0.62 mg.%, while the brain glutamine was 80.3 mg.%.  
3) In the case of normal rat decapitated and frozen in liquid nitrogen, the brain ammonia was 1.80 mg.%, showing a quite high value.  
4) In the the case where the rat, which had been exhausted by making it swim in water, and frozen in liquid nitrogen, the brain ammonia was 0.91 mg.%, showing no increase over that of the control

---