

脳 の 窒 素 代 謝

第 11 編

塩化アンモン投与大黒鼠脳髄アンモニア並びにアミノ酸量

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 4 月 26 日受稿〕

緒 言

中枢神経系とアンモニアについては、これに電気刺激を与えると、アンモニアが増加するという田代の研究¹⁾、アンモニアを組織外に放出するという塚田の研究²⁾、興奮に伴って増加するという Conway の研究³⁾ 等を始めとし、脳—アンモニア—痙攣の関係を追求した Richter and Dawson⁴⁾、Goiger et al⁵⁾、Bülow and Hohmes⁶⁾、Krebs et al⁷⁾、Winterstein⁸⁾ の研究等がある。

又、アンモニアの生理機序については、Weil-Malherbe⁹⁾、Dickens and Greville¹⁰⁾、Elliot et al¹¹⁾ 等があり、更に痙攣とアンモニア及びアミノ酸との関係については、上記 Richter and Dawson⁴⁾ の外、井上¹²⁾、Waelsch¹³⁾、Weil-Malherbe¹⁴⁾ 等の研究がある。

又、私共の教室においても、この方面における検索は盛んに行われ、脳の刺激興奮時には、脳髄アンモニアは増量する事¹⁵⁾¹⁶⁾、脳髄制止過程に伴って、アンモニアの減少¹⁵⁾¹⁶⁾、アスパラギン酸、グルタミン酸増量という所見¹⁶⁾¹⁷⁾ が得られているのである。

この様に、脳髄においては、種々の状態に伴って、アンモニアが増加したり、減少したり、同時にこれと関係の深いグルタミン酸、グルタミンも、それぞれ変化するのである。そこで、問題となるのは、この時増加するアンモニアの源泉は何か、更に、かくして産生されたアンモニアは何になるかといった疑問である。いいかえれば、アンモニア発生機構並びに処理機構の解明である。

今迄に行われている研究で、このアンモニアの母体に論及しているものとしては、Riebeling¹⁸⁾¹⁹⁾²⁰⁾、塚田²¹⁾²²⁾²³⁾²⁴⁾、Weil-Malherbe²⁵⁾ の研究が挙げられるが、無論、これに関しての定説は未だない。

だが、ここでは、その問題は一先づさしおいて、脳アンモニアの行方、いいかえれば、生体におけるアンモニア処理機構を追求したいと思うのである。例を塩化アンモン投与時にとつた。

実 験 方 法

1) 脳髄摘出・固定

大黒鼠を台上に締結固定し、開頭、眼下に脳髄を眺めながら摘出、直ちにドライアイス・アセトン冷剤中に投入、凍結せしめる。

2) アンモニアの測定

脳髄アンモニアの測定は、第 5 編に記載せる Conway 微量拡散分析法に従つた。

血液アンモニアの測定には、脳摘出後、湧出するのを手早くピペットにて吸いとり、直ちに 10% 三塩化醋酸液を以て除蛋白し、同じく Conway 法に従つて測定した。

3) アミノ酸測定

摘出脳髄を秤量、75% アルコールを用い、15 倍の homogenate を作り、その 1.0 cc をとり更に 30 倍容量の 75% アルコールを加え、共栓付遠沈管に入れ、充分振盪の後、遠沈、extract をとり、重盪煎上にて蒸発乾固し、これに 1.0 cc の再蒸溜水を加え、乾燥物を溶かす。之を再び遠沈し、不溶性物質を除き、上清液、0.1 cc をペーパークロマトグラフィに供した。濾紙は東洋濾紙、No. 51 (40×40 cm) を用い、原点に試料を毛細管ピペットを用いてつける。試料の乾燥を待つて、25% 含水フェノールを展開溶媒とし、室温にて、上昇法展開を行い、送風乾燥後、0.1% ニンヒドリンブタノール溶液を噴霧、風乾後、93°C に 30 分保ち発色させた。現われたアミノ酸呈色斑を切りとり、5.0 cc の 50% プロパノールを加え、得られた呈色液を 570 m μ で

ベックマン光電比色計を用いて吸光度を測定した。同時に、その都度、展開せしめたアミノ酸標準液の呈色斑より得た標準グラフと照し合わせてアミノ酸量を定める。

実験結果

先づ、第1表に塩化アンモン投与によつてひきおこされた痙攣時の所見を示す。注射は10%塩化アンモン水溶液を用い、これを体重100gについて1.0ccの割合で腹腔内に注入した。かくすれば、大黒鼠は不安状態を示し、次第に呼吸が粗くなり、約3分の後には、確実に全身痙攣をひきおこす。この痙攣の始まるのを待つて、開頭・脳摘出するのである。この時の脳髄遊離アンモニアは、最低6.00mg%、最高6.88mg%、平均6.50mg%と増加している。これを対照群のアンモニア正常値平均0.62mg%に較べると、およそ10倍の増加である。次に、グルタミン酸は平均135.7mg%、グルタミンは88.2mg%、 γ アミノ酪酸は20.8mg%、アスパラギン酸は44.5mg%であるから、これを対照群アミノ酸値と比較すればグルタミン酸、 γ アミノ酪酸の減少、アスパラギン酸の増加が見られるという事になる。又、この際の血液アンモニア

第1表 塩化アンモン投与による痙攣時
大黒鼠脳髄所見

例数	脳 mg %					血液 mg/dl
	アンモニア	グルタミン酸	グルタミン	γ アミノ酪酸	アスパラギン酸	アンモニア
1	6.26	156.5		22.6	34.1	33.48
2	6.70	122.6	96.1	22.2	50.7	31.58
3	6.00	143.4	104.5	17.5	34.7	22.05
4	6.88	97.6	93.2		55.9	29.13
5	6.68	158.5	59.0		46.9	22.17
平均	6.50	135.7	88.2	20.8	44.5	27.68
対照	0.62	158.5	95.5	35.2	30.8	0.65

第2表 正常血液アンモニア (mg/dl)

例数	湧出血液アンモニア	例数	心臓血アンモニア
1	0.61	1	0.057
2	0.55	2	0.096
3	0.83		
4	0.62		
平均	0.65	平均	0.077

は27.68mg/dlであつたから、第2表に示した血液正常値の平均0.65mg/dlに比較すると、猛烈な増加が認められる。

さて、第3表以下は、塩化アンモン注射後時間を追うて測定した成績である。注射には5%塩化アンモン溶液を用い、1.0cc/100g腹腔内に注入する事は同様である。

第3表は、注射後5分のものであるが、脳アンモニアは3.47mg%と増加、グルタミン酸は121.8mg%と減少、グルタミン、 γ アミノ酪酸もやや減少、アスパラギン酸は著明に増加していた。

第3表 塩化アンモン投与後5分

例数	脳 髄 mg %					血液 mg/dl
	アンモニア	グルタミン酸	グルタミン	γ アミノ酪酸	アスパラギン酸	アンモニア
1	4.47	132.1	75.0	21.9	53.9	11.27
2	2.46	111.5	76.7	34.4	38.7	9.30
平均	3.47	121.8	75.9	28.2	48.3	10.29
対照	0.62	158.5	95.5	35.2	30.8	0.65

第4表は同じく10分後のものであるが、脳アンモニアは平均3.49mg%と更に増加を示している。グルタミン酸、 γ アミノ酪酸減少は従前通りであるが、注意すべきは、グルタミンが124.4mg%と増加を示している事と、アスパラギン酸が35.2mg%と増加の度を減じている事である。

第4表 塩化アンモン投与後10分

例数	脳 髄 mg %					血液 mg/dl
	アンモニア	グルタミン酸	グルタミン	γ アミノ酪酸	アスパラギン酸	アンモニア
1		143.4	95.8	31.1		
2	4.48	139.7	117.8			8.92
3	3.15	138.5	68.4	22.9	38.7	11.55
4	1.88	117.5	224.5	24.1	22.3	4.57
5	2.41		115.8	22.2	48.8	5.67
6	5.53			20.2	30.8	
平均	3.49	132.2	124.4	24.1	35.2	7.68
対照	0.62	158.5	95.5	35.2	30.8	0.65

次に第5表は注射後1時間を経たものであるが、脳アンモニアは3.36mg%と、やはり増加を示している。グルタミン酸、 γ アミノ酪酸の減少はやはり従前通りであるが、同時にアスパラギン酸が却つ

て減少を見せているのと、グルタミンが 173.2 mg %と約2倍に近い著増を示しているのが特異である。

第5表 塩化アンモン投与後1時間

例 数	脳 髄 mg %					血液 mg/dl
	アンモニア	グルタミン酸	グルタミン	γアミノ酪酸	アスパラギン酸	
1	4.46	127.0	205.6	18.9	32.0	10.64
2	2.55	113.1	135.8	17.8	19.2	3.72
3	3.06	131.6	178.3	23.9	23.4	12.05
平均	3.36	123.9	173.2	20.2	24.9	8.80
対 照	0.62	158.5	95.5	32.5	30.8	0.65

次に第6表は、塩化アンモン注射後3時間を経たものである。先づ、脳アンモニアは 0.69 mg %とすでに注射前の値にもどっており、グルタミン酸、

第6表 塩化アンモン投与後3時間

例 数	脳 髄 mg %					血液 mg/dl
	アンモニア	グルタミン酸	グルタミン	γアミノ酪酸	アスパラギン酸	
1	0.63	136.4		24.2	44.5	0.93
2	0.69	159.0	75.8	12.9	52.7	0.13
3	0.75	137.2	103.3	14.6	52.7	0.52
平均	0.69	144.2	89.6	17.2	50.0	0.53
対 照	0.62	158.5	95.5	35.2	30.8	0.65

第7表 塩化アンモン投与後、脳髄諸物質の時間的推移

例 数	脳 髄 mg %					血液 mg/dl
	アンモニア	グルタミン酸	グルタミン	γアミノ酪酸	アスパラギン酸	
対 照	0.62 (1.0)	158.5 (1.0)	95.5 (1.0)	35.2 (1.0)	30.8 (1.0)	0.65 (1.0)
5 分	3.47 (5.6)	121.8 (0.8)	75.9 (0.8)	28.2 (0.8)	46.3 (1.5)	10.29 (15.8)
10 分	3.49 (5.6)	132.2 (0.8)	124.4 (1.3)	24.1 (0.7)	35.2 (1.1)	7.68 (11.6)
1時間	3.36 (5.4)	123.9 (0.8)	173.2 (1.8)	20.2 (0.6)	24.9 (0.8)	8.80 (13.5)
3時間	0.69 (1.1)	144.2 (0.9)	89.6 (1.0)	17.2 (0.5)	50.0 (1.6)	0.52 (0.8)

グルタミンも注射前の値に近く、γアミノ酪酸は減

少を、アスパラギン酸は増加を示していた。

血液アンモニア量は、注射後5分 10.29 mg/dl, 10分 7.68 mg/dl, 1時間 8.80 mg/dl と次第に増加を示しているが、3時間後には 0.53 mg/dl と注射前の値に帰っていた。

この間の消息は一括して第7表に示す。

() の数字は対照に対する比率を現わす。

考 察

さて、実験結果の項で述べた如く、塩化アンモンを注射すれば痙攣が起り、同時に、脳髄遊離アンモニアが増加するという所見を得たのであるが、これらの事実はすでに知られており、Richter and Dawson も大黒鼠に塩化アンモンを注射すれば痙攣がおこり、この時の脳アンモニアの増加は 9.0 mg %に達すると述べている。私の経験した所では、増加は 6.50 mg %程度であり、やや増加の程度は低かつた。但し、この際の血液アンモニアは、27.68 mg/dl であるから、対照値に較べると約40倍、脳のアンモニア値は対照値に較べると約10倍の増量である。つまり、塩化アンモンを注射すると、血液アンモニアは猛烈に増加するが、脳における増加はそれほどではないという事になる。アンモニアに対する blood-brain-barrier は知られていないから、血液アンモニアは血行を介してことごとく脳に入り得るであろう。従つて、ここに見られる血液・脳アンモニアの濃度差は、やはり脳におけるアンモニア処理機構の働きによるものと考えねばなるまい。脳は生体にとつて最も大切な器官であるから、脳において有害なアンモニアの処理が、かく迅速におこるとしてもあえてあやしむにはあたらぬものと思う。

さて、ここで脳において行われるであろうアンモニアの処理過程であるが、脳に大量に存するグルタミン酸と結合してグルタミンとなる過程、αケトグルタル酸と結合して、グルタミン酸となる過程等が先ず考えられ、これらは、glutamine Synthetase, glutamic Dehydrogenase の働きとして、実験的にも研究されている。所が、私の行つたところでは、塩化アンモンによる痙攣直後では、脳アンモンは増量しているのに、グルタミンの増加もグルタミン酸の増加も見られない。従つて、この際増加するアンモニアの処理は、上記の何れの過程によるものでもなさそうである。グルタミン酸、γアミノ酪酸に至つては、むしろ減少すら見られている。γアミノ酪酸の減少は、グルタミン酸脱炭酸酵素の

至適 PH が 5.0 であることを考えれば直ちに了解できることであるが、グルタミン酸の減少は不可解である。アンモニア処理のため α ケトグルタル酸よりグルタミン酸が合成されて増加しそうに考えられるが、事実はそうでない。ここで増加しているものはアスパラギン酸である。脳アンモニア増量の際に、先づ増加するのはアスパラギン酸であることは、後述するように注目し値するものである。

所が、10分、1時間となると態度は変わり、今度は、次第にグルタミンの増加が著明となつて来るのである。この頃には、アスパラギン酸の増加は最早認められず、3時間を経て血液・脳アンモニアが常態に復した時になつて、グルタミンが正常値に帰ると共に、アスパラギン酸の増大が再び見られるのである。してみると、脳におけるアンモニア処理は、アンモニア増加過程がおこり始めてしばらくの間はアスパラギン酸合成系が主に働き、後に至つてグルタミン合成系があぶかるという事になるのではなからうか。脳におけるアスパラギン酸の合成は専ら glutamic-oxalacetic Transamination によると考えられるが、何故に此が脳内アンモニアの増加の初めと終りにのみ働き、極期に働かないか疑問である。従つて、今迄に行われているグルタミン合成過程とならんで、アスパラギン酸合成過程も是非極めねばならぬ問題であり、今後はこの方面の研究をすすめた。

結 括

私は、塩化アンモン投与時大黒鼠脳髓アンモニア

を Conway 微量拡散分析法で、アミノ酸を Paper-chromatograph 法を用いて測定し、次の結果を得た。

1. 塩化アンモン投与による痙攣時には脳髓アンモニアは平均 6.50 mg %, グルタミン酸, グルタミン, γ アミノ酪酸, アスパラギン酸は、それぞれ、135.7 mg %, 88.2 mg %, 20.8 mg %, 44.5 mg %, 血液アンモニアは、27.68 mg/dl であつた。

2. 塩化アンモン注射後の時間的観察では、

イ. 脳アンモニアは次第に増加し、3時間を経て、再び正常値にもどる。

ロ. グルタミン酸は減少する。

ハ. グルタミンは、最初の内は値に変動を示さないが、10分から1時間にかけて増加を示す。

ニ. γ アミノ酪酸は減少を示した。

ホ. アスパラギン酸は、最初の5分で著明な増加、10分、1時間で増加をみせず、3時間に至つて再び増加を示した。

以上から次の如く推論した。

1. 塩化アンモンを注射すれば、脳内アンモニアは増加する。

2. この際のアンモニアの処理は、最初の内はアスパラギン酸の合成過程が、ついで、グルタミン合成過程がこれにあたる。

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

参 考 文 献

- 1) 田代: Am. J. Physiol. 60, 519, 1922.
- 2) 塚田, 高垣・科学, 23, No. 12, 629, 1953.
- 3) Conway, E. G.: 微量拡散分析法及び誤差論 (石坂音治訳)
- 4) Richter, D. and Dawson, R. M. C.: J. B. C. 176, 1199, 1948.
- 5) Geiger, A. et al.: Science. Vol. 118, 655, 1953.
- 6) Bülow, M. and Hohmes, E. G.: Biochem. Z. 245, 459, 1932.
- 7) Krebs, H. A. et al.: Biochem. J. 44, 159, 1947.
- 8) Winterstein, H.: Naturwissenschaft, 21, 22, 1933.
- 9) Weil-Malherbe, H.: Biochem. J. 32, 2257, 1938.
- 10) Dickens, F. and Greville, C. D.: Biochem. J. 29, 1468, 1935.
- 11) Elliot et al.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 21, 22, 1933.
- 12) 井上: 岡山医会誌, 65, 8, 昭28.
- 13) Waelach, H.: Adv. in Protein. Chem. VI, 301, 1951.
- 14) Weil-Malherbe, H.: Biochem. J. 30, 665, 1936.
- 15) 河井: 岡山医会誌, 69, 1, 223, 1957.
- 16) 河田: 岡山医会誌投稿中.
- 17) 藤田: 岡山医会誌投稿中.
- 18) Riebeling, C.: Zachr. f. N. u. P. 157, 418, 1937.

- 19) Riebeling, C.: Klin. Wschr. 10J. g. I, 554, 1931.
 20) Riebeling, C.: Klin. Wschr. 12 J. g. II, 1422, 1933.
 21) 塚田: 生化学, 25, 1, 39, 昭28.
 22) 塚田: 生体の科学, 5, No. 3, 107, 1953.
 23) 塚田: 酵素化学シンポジウム, 10, 165, 1954.
 24) 塚田: 酵素化学シンポジウム, 11, 1, 1956.
 25) Weil-Malherbe, H.: Biochem. J. 61, 210, 1955.

Nitrogen Metabolism of the Brain

Part 11 Ammonia and Amino Acid Contents of the Rat Brain in Case of the NH₄Cl Application.

By

Saburo Kawata

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

In case of the intraperitoneal application of ammonium chloride, ammonia of the rat brain was measured by Conway's microdiffusion method, and amino acid by paperchromatography; the following results were obtained.

1) During the ammonium chloride convulsions (induced by injection of 1ml. of 10% NH₄Cl), the ammonia and aspartic acid contents of the rat brain increased remarkably, while glutamic acid, glutamine and γ -amino butylic acid contents decreased.

2) Ammonia and amino acids were estimated in 3 hours after NH₄Cl injection (1ml. of 5% NH₄Cl), and the following data were obtained.

a. Ammonia level remarkably rose five minutes after injection, and gradually returned to normal level 3 hours after.

b. Glutamic acid decreased.

c. The rise of glutamine level found 10 minutes to 1 hour after the application.

d. γ -amino butylic acid decreased.

e. Aspartic acid level rose on early period.

The Conclusion is as follows:

1) In the rat brain, the free ammonia increased after NH₄Cl injection.

2) Ammonia increased after NH₄Cl injection was probably reduced, initially by aspartic acid synthetase system and thereafter by glutamine synthetase system.