

脳の glucose 代謝におよぼす amino 酸の影響に関する研究

第 1 編

潜在性脳局所 anaphylaxis 家兎大脳皮質の glucose 代謝および それにおよぼす種々の amino 酸の影響について

(本論文の要旨は第55回日本精神々経学会総会において発表した)

岡山大学医学部第 1 (陣内) 外科教室 (指導: 陣内教授)

医学士 山 本 泰 久

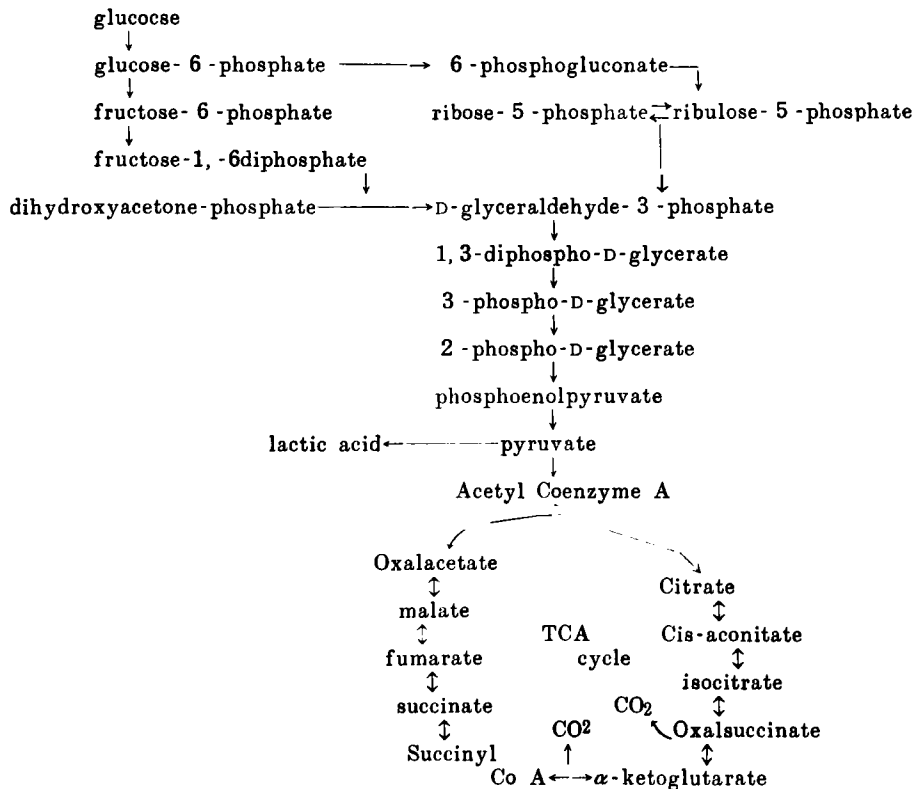
[昭和 33 年 10 月 11 日受稿]

第 1 章 緒言ならびに文献的考察

脳はそのエネルギー源をもつばら血中の glucose におおいでいるため¹⁾²⁾, 脳のエネルギー代謝に関係した研究については glucose の代謝はきわめて重要なものである. glucose が脳で分解される場合,

それは他の組織で行われているように大部分は Embden-Meyerhof の模式にしたがつて分解されると考えられている. すなわち glucose は hexokinase によつて附磷されて glucose-6-phosphate を生じ, 以後第 1 図に略記するとき過程をとり TCA cycle をへてついに CO₂ と H₂O にまで分解されると

第 1 図 glucose の代謝過程



いう経過である. その他, 肝などでは Warburg-Dickens の模式にしたがつて相当の比率のものが分解をうけるようであるが, 教室小野田³⁾ の radio-

sotope をもちいた実験から推定するこの過程はきわめて少いと考えられる. また最近鈴木⁴⁾ らは, これらのいずれにも属しないと考えられる別の過程

を推定しているが、それがいかなる過程のものか現在のところ確定していない。しかしいずれにせよ血液から脳に供給された glucose は約85%が CO₂ に酸化され約13%が lactate として、また約2%が pyruvate として血中に出てくるわけである⁵⁾⁶⁾。

さて私共の教室においては、数年前より真性癲癇の原因を明らかにするため癲癇素質、あるいは癲癇準備状態の問題を追求し、真性癲癇が初期においてはまったく脳実質に器質的変化をみとめない点から Spratling⁷⁾, Rosenow⁸⁾, Bering⁹⁾ らと同じ観点で allergy にその根底をもとめ、これに関して多くの研究が続けられてきた。すなわち、教室の榊原¹⁰⁾, 清水¹¹⁾, 大杉¹²⁾, 笠井¹³⁾ らは卵白、牛血清、牛脳灰白質 phosphatide, α -streptococcus などを持ちいて、いわゆる潜在性脳局所 anaphylaxis (以下脳局「ア」と略す) 動物を作成し、これらは癲癇準備状態あるいは癲癇素因が賦与されたものであると主張し、さらにそれについての研究が癲癇脳と比較して組織学的、生化学的につづけられた。これらの業績は陣内教授によつて綜説されているが¹⁴⁾¹⁵⁾、これらのうち脳局「ア」動物の脳で生化学的にとくに注目されるのはつぎの諸点である。

- 1) cholinesterase 活性値の亢進 (沖¹⁶⁾)
- 2) 糖質代謝の低下 (清水¹¹⁾, 兼松¹⁷⁾)
- 3) 遊離アミノ窒素の減少 (井上¹⁸⁾, 畠山¹⁹⁾)
- 4) Na, K の代謝異常 (大藤²⁰⁾)

これらのうち糖質代謝については、清水¹¹⁾ は脳髓灌流法により glucose あるいは pyruvate を附加して灌流し、これらはいずれもその利用が阻害されていることを明らかにしている。また解糖作用については兼松¹⁷⁾ は Warburg 検圧計をもちいて脳局「ア」家兎と正常家兎の間にほとんど差をみとめなかつたが、於保²¹⁾ は glucose 定量法により脳局「ア」家兎では解糖作用の低下をみとめている。

これら糖質代謝に関する研究のうち、きわめて興味ある点は脳局「ア」家兎における糖質代謝の低下が glutamic acid によつて回復するという事実である (宇都宮²²⁾, 於保²¹⁾)。

glutamic acid は遊離の型で脳にもつとも多量に存在する amino 酸の1つであり、生理作用の点からも物質代謝の点からも、きわめて重要な物質であることが知られており、それは Kergl²³⁾ らによつて綜説されているところである。

しかし、私は脳の遊離 amino 酸のうち何故 glutamic acid にこのような作用があるのか、また

他の amino 酸ではどうであるかという点に興味をいだき glucose 代謝におよぼす amino 酸の作用をひろく総括的に検索しようと考えた。

まず、脳に遊離して存する amino 酸の種類および含量については、H. Weil-Malherbe²⁴⁾ の報告があり、また新しくは大月²⁵⁾ らの報告があるが、これらと私どもの行つた予備実験²⁶⁾ を参照してつぎの5種の amino 酸をもちいることにした。

- 1) glutamic acid
- 2) glutamine
- 3) aspartic acid
- 4) asparagine
- 5) γ -aminobutyric acid

以下これらの amino 酸が脳の glucose 代謝にどのように作用するか、とくに脳局「ア」家兎に対する作用はどうであるかについての検索を行つた結果について述べることにする。

第2章 実験方法

第1節 実験動物

体重約 2.5 kg の健康な成熟家兎を使用した。脳局「ア」動物としては下述のごとき方法により作成した脳局「ア」家兎を使用した。

第2節 抗原の作成方法および感作の方法

第1項 牛血清の作成

新鮮な牛血液を数時間室温に放置したのち遠心器にて血清を分離し 54°C 30分間、water bath 中にて非働化し、0.5%の割合に石炭酸を加えたものを持ちいた。

第2項 牛脳灰白質 phosphatide (以下牛脳 P と略記す) 加牛血清の作成法

新鮮な牛脳の軟膜を血管とともにとり除き、灰白質のみを分離し、乳鉢にて摺磨して泥状となし、これに約7倍容の無水 alcohol を加え、時々攪拌しながら室温 (冬期においては孵卵器中に) 約1週間放置し、灰白質中の phosphatide を alcohol に移行せしめる。ついで遠心器により上澄を分離し、これを減圧にて蒸溜すると黄褐色粘糊な残渣が残る。alcohol を充分蒸発せしめたのち、これに少量の ether を加えて溶解する。このさい不溶の部分は濾紙にて濾過して棄てる。この濾液に acetone を加えて白色の沈澱を生ぜしめ acetone を除去すると粗製の phosphatide ができるわけであるが、白色の沈澱をさらに少量の ether にとかし、最後の過程を3回繰返し精製を行つたものを実験に供した。この

phosphatide の保存は褐色瓶に入れた aceton 液中に貯え氷室内にて保存した。使用にさいしては真空硫酸乾燥器中で乾燥し、第1項で作成した非飜乳牛血清 2 cc に 10 mg の割合に混合し emulsion とにしてもちいた。

第3項 感作の方法

家兎の耳静脈内に第2項で作成した牛脳Pを pro kg 1 cc の割合で2回2日間連続注射し、12日後に Arthus 反応を検し、その陽性のものをえらび同量の牛脳Pを2週間間隔で5回注射した。

第3節 実験系に添加した amino 酸

1. glutamic acid 和光製薬
 2. glutamine 和光製薬
 3. aspartic acid 和光製薬
 4. asparagine 和光製薬
 5. γ -aminobutyric acid 第1化学薬品製のもの
- のを3回再結晶してもちいた。

m. p. 201°C

なお上記 amino 酸は 0.1 mol としてもちいた。

第4節 実験方法および反応系

家兎を正中断頭し可及的速かに (10~20秒) 0°C とした1% KCl 溶液に移し、脳軟膜、血管を剝離し灰白質のみを分離、1% KCl 液を媒質として Potter-Elvehjem の homogenizer を使用しておよそ10%の homogenate とした。

これをあらかじめ準備した Thumberg 管頭部に入れ、同時に反応系と攪拌し、37°5'C の孵卵器中にて40分間反応せしめ解糖の促進を後述する方法にて比較した。

反応系としては、つぎのごとき試薬をもちいた。

0.5 ml phosphorbuffer pH 7.17

0.5 ml 0.01 mol glucose

0.2 ml 0.1 mol amino acid

1.0 ml 10% brain homogenate

0.8 ml ad. aqua dest.

全量 3.0 ml とした。

第5節 glucose 定量方法

Somogyi²⁷⁾の方法にしたがつた。この方法を略記するとつぎのごとくである。

試薬

1. 5%硫酸亜鉛溶液
2. 約0.3規定水酸化バリウム溶液
3. 銅試薬：無水第2磷酸ソーダ 28 g, 酒石酸

カリソーダ 40 g を約 700 cc の水にとかし、100 cc の規定苛性ソーダを加え、ついで攪拌しつつ結晶硫酸銅の 10 g/dl 溶液を 80 cc 加えて溶解せしめ、水を加えて 1000 cc となし、1~2日室温に放置し濾過後褐色瓶に保存する。

4. 呈色試薬：モリブデン酸アンモニウム 25 g を 450 cc の水にとかし、これに 21 cc の濃硫酸を加えよく混合し、さらに 3 g の結晶硫酸ソーダを 25 g の水にとかして加える。24~48時間、37°C の孵卵器中に放置後褐色瓶中に保存する。

実施. 反応液 3 cc をとり、これに 0.3 規定水酸化バリウム 3 cc を添加、充分混和せるのち、5%硫酸亜鉛 3 cc を加えてはげしく振盪し、1800回転で5分間遠心沈澱する。このようにしてえた上澄 2 cc を、他方に blank 用として水 2 cc をとり、おのおのに銅試薬 2 cc 宛加え20分間煮沸水中に放置後、約2分間流水中にて冷却し、ついで呈色試薬 2 cc を加え振盪混和後、20 cc の水を加え稀釈し、blank を 100% にあわせ被検液の透過率を島津製 Beckmann 型光電比色計により測定した。なお波長は 660 m μ をもちいた。これによつてあらかじめ作成しておいた標準曲線に測定値を対応させることにより glucose の量をもとめた。

第3章 実験成績

第2章においてのべたごとき実験過程により正常および脳局「ア」家兎について、種々の amino 酸添加時の glucose 利用を測定した。成績は第1~6表に示したごとくである。

第1表 Amino acid添加のない場合の正常および脳局「ア」家兎脳の glucose 利用

実験番号	正 常 群		実験番号	脳局「ア」群	
	glucose 利用量(μ M)	利用率 (%)		glucose 利用量(μ M)	利用率 (%)
1	0.58	12.1	1'	0.62	12.3
2	0.75	15.0	2'	0.40	7.9
3	0.64	12.2	3'	0.60	11.3
4	0.85	14.7	4'	0.62	12.1
5	0.50	10.4	5'	0.59	11.4
6	0.80	15.5	6'	0.49	11.7
7	0.51	10.2	7'	0.41	8.8
平均	0.66	12.9	平均	0.53	10.8

第2表 glutamic acid 添加の場合の正常
および脳局「ア」家兔脳の glucose 利用

実験 番号	正 常 群		実験 番号	脳局「ア」群	
	glucose 利用量(μ M)	利用率 (%)		glucose 利用量(μ M)	利用率 (%)
1	0.84	16.0	1'	1.26	25.1
2	0.85	15.8	2'	1.27	26.0
3	0.95	17.4	3'	1.16	23.2
4	1.15	19.9	4'	1.10	21.3
5	0.82	17.1	5'	1.04	20.1
6	1.20	23.1	6'	0.95	22.7
7	0.80	16.0	7'	1.05	22.4
平均	0.89	17.9	平均	1.12	23.0

第3表 glutamine 添加の場合の正常および
脳局「ア」家兔脳の glucose 利用

実験 番号	正 常 群		実験 番号	脳局「ア」群	
	glucose 利用量(μ M)	利用率 (%)		glucose 利用量(μ M)	利用率 (%)
1	0.79	15.0	1'	0.89	17.6
2	0.60	10.9	2'	1.06	20.9
3	0.78	14.8	3'	1.18	22.3
4	0.90	15.6	4'	1.18	22.1
5	0.61	12.6	5'	1.17	22.7
6	0.92	17.7	6'	1.18	25.1
7	0.89	17.7	7'	0.80	19.1
平均	0.78	14.9	平均	1.07	21.4

第4表 aspartic acid 添加の場合の正常およ
び脳局「ア」家兔脳の glucose 利用

実験 番号	正 常 群		実験 番号	脳局「ア」群	
	glucose 利用量(μ M)	利用率 (%)		glucose 利用量(μ M)	利用率 (%)
1	0.55	11.0	1'	0.89	17.5
2	0.65	12.1	2'	0.56	11.2
3	0.70	13.0	3'	0.90	17.0
4	0.69	12.7	4'	0.90	16.8
5	0.60	11.0	5'	0.73	14.1
6	0.68	11.8	6'	0.63	13.4
7	0.80	15.5	7'	0.52	12.4
平均	0.67	12.4	平均	0.73	14.6

第5表 asparagine 添加の場合の正常およ
び脳局「ア」家兔脳の glucose 利用

実験 番号	正 常 群		実験 番号	脳局「ア」群	
	glucose 利用量(μ M)	利用率 (%)		glucose 利用量(μ M)	利用率 (%)
1	0.59	10.9	1'	1.07	21.1
2	0.62	12.0	2'	1.00	19.7
3	0.60	10.9	3'	0.76	15.2
4	0.72	13.2	4'	0.90	17.0
5	0.80	13.8	5'	0.90	16.8
6	0.55	11.3	6'	0.94	18.2
7	0.83	16.0	7'	0.98	20.9
平均	0.67	12.6	平均	0.94	18.4

第6表 γ -aminobutyric acid 添加の場合の正
常および脳局「ア」家兔脳の glucose 利用

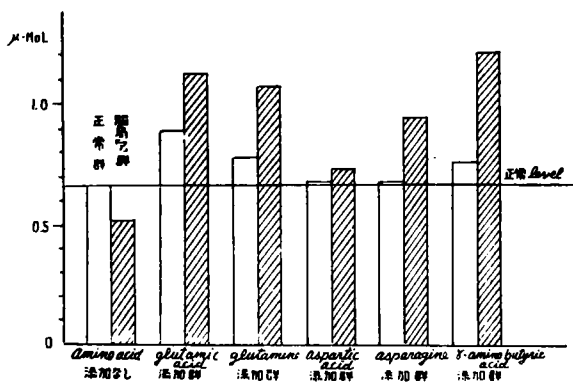
実験 番号	正 常 群		実験 番号	脳局「ア」群	
	glucose 利用量(μ M)	利用率 (%)		glucose 利用量(μ M)	利用率 (%)
1	0.63	13.1	1'	1.37	27.0
2	0.70	14.1	2'	1.46	29.1
3	0.69	13.1	3'	1.37	27.0
4	0.82	15.3	4'	1.12	20.9
5	0.80	14.6	5'	1.05	20.3
6	0.85	16.4	6'	1.08	20.9
7	0.81	16.2	7'	1.00	21.3
平均	0.76	14.7	平均	1.21	23.8

これらの表からわかるごとく, amino 酸の添加がない場合の脳の glucose 利用は正常群では 0.5~0.8 μ M, 平均 0.66 μ M/100 mg tissue/40 min. であり, 脳局「ア」群では 0.4~0.62 μ M, 平均 0.53 μ M/100 mg tissue/40 min. である. また glutamic acid を添加したものは正常群 0.80~1.20 μ M, 平均 0.89 μ M/100 mg tissue/40 min. であり脳局「ア」群では 0.95~1.27 μ M, 平均 1.12 μ M/100 mg tissue/40 min. である. glutamine を添加したものは正常群 0.60~0.92 μ M, 平均 0.74 μ M/100 mg tissue/40 min., 脳局「ア」群 0.80~1.18 μ M, 平均 1.07 μ M/100 mg tissue/40 min. である. aspartic acid 添加のものは正常群 0.55~0.80 μ M, 平均 0.67 μ M/100 mg tissue/40 min., 脳局「ア」群 0.52~0.90 μ M, 平均 0.73 μ M/100 mg tissue/40 min. である. また asparagine を添加したものは正常群 0.55~0.83 μ M, 平均 0.67 μ M/100 mg tissue/40 min. であり, 脳局「ア」群 0.76~1.07

μM, 平均 0.94 μM/100 mg tissue/40 min. である。最後に γ-aminobutyric acid を添加したものは正常群 0.63~0.85 μM, 平均 0.76 μM/100 mg tissue/40 min. で, 脳局「ア」群では 1.00~1.46 μM, 平均 1.21 μM/100 mg tissue/40 min. である。

これらの成績を総括して平均値のみを棒グラフとして図示したものが第2図である。

第2図 Amino acid 添加時の正常および脳局「ア」家兎の glucose 利用 (μ-M./100mg tissue)



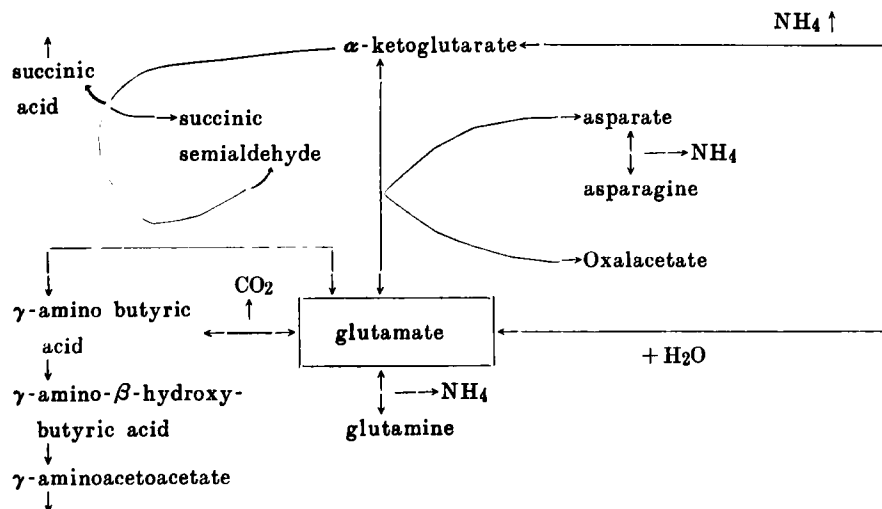
第4章 総括ならびに考按

glutamic acid, glutamine, aspartic acid, asparagine, γ-aminobutyric acid の脳の glucose 利用におよぼす影響について正常および脳局「ア」家兎を比較し, 第2図のごとき成績をえた。すなわち添

加 amino 酸なき場合は正常群 0.66 μM/100 mg tissue/40 min. に対し, 脳局「ア」家兎群では 0.52 μM/100 mg tissue/40 min. であり, これは於保²¹⁾によつてえられた glycolysis と同様な成績であると考えられる。ついで glutamic acid を添加した場合は正常および脳局「ア」両群ともに glucose 利用が促進されるが, 脳局「ア」群については, とくにいちじるしい促進をみ, 正常 level (正常家兎群の amino 酸添加ないもの)をはるかに凌駕する。glutamic acid が glucose 代謝を促進することは教室宇都宮²²⁾が脳髄灌流法により, また於保²¹⁾が Warburg 検圧計をもちい好氣的, 嫌氣的解糖作用を測定することにより明らかにしているが, これらも私のおこなつた実験と同様の機序によるものと考えられる。glutamine および γ-aminobutyric acid も glutamic acid とまったく同様に glucose の利用を促進することは注目にあたいする。aspartic acid および asparagine は正常家兎脳に対しては影響をあたえないようであるが脳局「ア」家兎に対しては促進作用を有し, これを正常 level 以上に促進する。ここにおいて注目されねばならぬことは, これらの amino 酸はいずれも glutamic acid を中心として一環の代謝過程に属する amino 酸であるということである。

以上の実験の結果よりこれらの代謝過程を考察すれば第3図のごとき関係にあり, 生体内では一定の条件下で自由に移行し合つていと考えられる。

第3図 Glutamate metabolism in the brain



一方, 教室の井上¹⁸⁾や畠山¹⁹⁾らは脳局「ア」家兎では正常家兎に比し, 脳髄の遊離 amino 窒素が減少していることを指摘しているが, 脳の遊離

amino 酸は H. Weil-Malherbe²⁴⁾によれば glutamic acid がもつとも多く, glutamine, γ-aminobutyric acid を合せると全体の約70%となる。これに

ついで aspartic acid が多く、ここにもちいられた amino 酸が総遊離 amino 酸の大部分を占めることになり、これらの遊離 amino 酸が脳局「ア」家兎では減少していると考えられる。

一方、私の正常家兎についての実験から、glutamic acid, glutamine, γ -aminobutyric acid など は glucose の代謝に対して促進的に作用していると考えられるから、これらの amino 酸の減少は当然 glucose 代謝を低下させると考えられる。最近、私どもの教室では脳局「ア」家兎の cholinesterase 活性の亢進に対してもこういった一群の amino 酸が cholinesterase 活性を正常 level に引きもどすように作用することが明らかにされており、脳局「ア」動物にみられる生化学的異常はこれらの一群の amino 酸の減少するということにもとずくと考え、これらの amino 酸に対して、さらに検索をすすめている。

第5章 結 論

glutamic acid, glutamine, aspartic acid, aspa-

ragine, γ -aminobutyric acid の正常家兎および脳局「ア」家兎の glucose 利用におよぼす影響を比較検討し、つぎのような結論をえた。

1) glutamic acid, glutamine, γ -aminobutyric acid は正常家兎および脳局「ア」家兎ともに脳の glucose 利用を促進する。

2) aspartic acid, asparagine は正常家兎脳に対しては影響しないが脳局「ア」家兎の glucose 利用を促進する。

3) これらの amino 酸はいずれも脳局「ア」家兎にみられる glucose 利用の低下を正常 level 以上に回復する作用を有する。

稿を終るにあたり終始御指導、御鞭撻下さり、御校閲を賜った恩師陣内教授に深謝す。

参 考 文 献

- 1) Stone, T. E. Biochem. J., **32**, 1908, 1938.
- 2) Kleine, J. R. and Olsen, N. S. : J. Biochem., **167**, 1, 1947.
- 3) 小野田収 : 岡山医学会雑誌,
- 4) 鈴木忠彦 最新医学, **11**, 126, 昭31.
- 5) Gibbs, E. L., Lennox, W. G., Nims, L. F. and Gibbs, F. A. J. Biol. chem. **144**, 325, 1942.
- 6) Himwich, W. A. and Himwich, H. E. : J. Neurophysiol., **9**, 133, 1946.
- 7) Spratling : c. f. Practics of allergy by Vangham 1948.
- 8) Rosenow : Post grad. Med. **2**, 346, 1947. **3**, 124, 1948. **3**, 367, 1948.
- 9) Bering : J. Neur. Neurosurg. and Psychiat., (Brit.) **14**, 205, 1948.
- 10) 榊原宏 : 岡山医学会雑誌, **64**, 347, 昭27.
- 11) 清水準也 岡山医学会雑誌, **65**, 1159, 昭28.
- 12) 大杉実 : 岡山医学会雑誌, **65**, 1411, 昭28.
- 13) 笠井祐藏 : 岡山医学会雑誌, **64**, 1587, 昭27.
- 14) 陣内伝之助 : アレルギー, **3**, 209, 1954.
- 15) Jinnai, D. : acta medica Okayama. **8**, 423, 1954.
- 16) 沖修之 岡山医学会雑誌, **64**, 1587, 昭28.
- 17) 兼松武雄 : 岡山医学会雑誌, **65**, 1271, 昭28.
- 18) 井上圭爾 : 岡山医学会雑誌, **64**, 1646, 昭27.
- 19) 畠山哲朗 : 岡山医学会雑誌, **68**, 515, 昭31.
- 20) 大藤弘 : 岡山医学会雑誌, **68**, 2367, 昭31.
- 21) 於保義雄 : 岡山医学会雑誌, **69**, 1745, 昭32.
- 22) 宇都宮信博 : 岡山医学会雑誌, **65**, 1271, 昭28.
- 23) Kergl, E. Koebke, K. and Haury, H. Glutaminsäure Wissenschaftliche verlagsgesellschaft M. B. H. Stattart 1954.
- 24) Weil-Marherbe, H. : Metabolism and function in nervous tissue. Biochem. Societ. Symp. No. 8, 1952.
- 25) 大月三郎, 那須弘之, 青山達也 : 医学と生物学, **46**, 107, 昭33.
- 26) 山本泰久他 : 医学と生物学, 投稿予定.
- 27) Somogyi, M. : J. Biol. chem. **160**, 61, 1945.

Influences of free amino-acids on glucose metabolism in the brain

Part I. on cerebral local anaphylaxis rabbits

By

Yasuhisa YAMAMOTO

First Department of Surgery Okayama University Medical School.

(Director : Prof. Dr. D. Jinnai)

There are many kinds of free amino-acids in the brain, most of which are glutamic acid, glutamine, aspartic acid, asparagine, γ -aminobutyric acid etc. The author has investigated the influences of these amino-acids upon the glucose metabolism in the brain of the normal and the cerebral local anaphylactic (C. L. A.) rabbits.

Glutamic acid, glutamine and γ -aminobutyric acid accelerate the utilization of glucose in the brain of the normal as well as the C. L. A. rabbits, aspartic acid and asparagine accelerate that of glucose in the C. L. A. rabbits, while they have no influence on that in the normal.

It is clarified that all of these amino-acids have the function to restore the decreased utilization of glucose in the C. L. A. rabbits to more than the normal level.
