

脳 hexokinase に関する研究

第 2 編

潜在性脳局所アナフィラキシー家兎大脳皮質の hexokinase について

(本論文の要旨は第55回日本精神神経学会総会に発表した)

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 田 孝 彦

[昭和33年11月17日受稿]

第1章 緒言ならびに文献

癲癇の病因に関しては従来色々の説があげられているが、現在まだ定説がない状態である。従来唱えられた主な説は、血管痙攣説^{20),21),22)}, 酸塩基平衡障碍説^{23),24)}, 内分泌障碍説²⁵⁾, 水分代謝異常^{26),27)}, 血液 O₂-CO₂ 平衡障碍^{24,28)}, 血糖異常²⁹⁾, acetylcholine 代謝障碍³⁰⁾, glutamic acid 代謝異常^{31),32)}, K, Mg, Ca, NH₄ 等塩分代謝障碍^{33),34)} 等である。

また近年 allergy によつて癲癇が惹起されるという説がある。この説は癲癇患者の家系に allergy 性疾患, すなわち気管支喘息, 偏頭痛, 蕁麻疹, 枯草熱および皮膚炎などが多くみとめられることによつておこつたものと考えられ, とくに中村ら³⁵⁾は癲癇患者の90%においてこれら allergy 性疾患が発生することを報告している。また, Spratling³⁶⁾は food idiosyncrasy が癲癇の原因ではないかといつており, チョコレートや砂糖菓子その他の food allergen によつて痙攣をおこし, これを制限すればおこらなくなることをみとめた人ははなはだ多い^{37)~38)}。また Rosenow³⁹⁾および Bering⁴⁰⁾は真正癲癇患者の鼻咽腔粘膜より分離した α 型連鎖球菌をもちいて皮膚反応をおこさない, 真正癲癇は細菌による脳局所過敏症であろうとのべている。

さて陣内教授^{46),47)}ならびにその門下生は, 痙攣素質乃至痙攣準備状態の問題を重視し, 真正癲癇が一定の年齢, すなわち青春期に近くなつて発病する者が多いこと, 少なくとも初期においては全く器質的变化をみとめないこと, また血行障碍が重要な役割を演ずること等より, allergy にその根拠を求めんとし研究を続け

てきている。すなわち, 実験的に脳になんら器質的变化のみとめられない程度のごく弱い脳局所アナフィラキシー(以下, 脳局アと略記)を反復しておこせることによつて神経細胞の過敏状態すなわち痙攣準備性が与えられるのではないかと考えたのである。

教室の榊原⁴⁸⁾, 清水⁴⁹⁾, 笠井⁶⁰⁾, 大杉⁶¹⁾らはそれぞれ卵白, 牛血清, 牛脳灰白質磷脂質加牛血清, α 型連鎖球菌等をもちいて, いわゆる潜在性脳局ア動物を作成し, これらの動物脳は痙攣準備状態を附与されたものであると主張した。一方かかる動物については生化学的, 組織学的検索をおこない, 詳細にわたつて報告した。

すなわち, 教室の清水⁵⁰⁾, 宇都宮⁶²⁾, 於保⁶³⁾らは in vivo の実験として断頭した潜在性脳局ア家兎の灌流実験をおこない, 潜在性脳局ア家兎では一般に糖質代謝の低下を認め, これに glutamic acid を添加することによつて正常値に戻ることを確かめ, さらに兼松⁶⁴⁾, 於保⁶³⁾らは Warburg 検圧装置をもちいて in vitro においても同様の成績なることを報告している。また沖⁶⁵⁾はこれらの潜在性脳局ア家兎では cholinesterase 活性値が亢進していることを, 井上(主)⁶⁶⁾は遊離アミノ窒素が減少していることを証明している。また高木⁶⁷⁾はカルチアゾール癲癇痙攣時における遊離アミノ窒素の変動につき, 近藤⁶⁸⁾はその際における cholinesterase 活性値の変動について実験している。

最近の研究によれば, 癲癇痙攣時には脳組織における glycogen, glucose, ATP の増加がみられ, この際の糖消費量は正常時の80倍にもおよぶといわれている⁶⁹⁾。しかしかかる変化も一定時間後には何事もなかつたかのように, 外見的には全くもとの状態に回復

してしまうのである。要するにかかると変化は癩細胞内になんらかの生化学的均衡の破綻をきたしているためであろうということは容易に想像されるところである。

そもそも脳の energy 源は主として血中の glucose であり、また大脳皮質の酵素消費量は全身的にみてもはなはだ大であることは周知の事実である。glucose が代謝の流れにはいる場合は第 1 編⁷⁰⁾において述べたごとく、hexokinase によつて G-6-P になるわけであり、上述の理由と相俟つて脳 hexokinase の研究はかかる領域においてもつとも重要なものの 1 つであろう。

私は第 1 編⁷⁰⁾において正常家兎をもちいて脳 hexokinase におよぼす fluoride, Ca-ion 濃度の影響, glutamic acid, glutamine, aspartic acid, asparagine, γ -aminobutyric acid, α -ketoglutaric acid の影響をしらべたが、本編においては一般に糖質代謝が抑制せられ、遊離アミノ酸が不足しているとされている潜在性脳局ア家兎をもちいて、hexokinase 活性を比較するとともに、これにおよぼす、glutamic acid, glutamine, aspartic acid, asparagine, γ -aminobutyric acid, α -ketoglutaric acid の影響をも比較検討した。

第 2 章 実 験 方 法

第 1 節 実験動物

長期間繰返し脳にアナフィラキシー反応を起させ、しかも脳実質に器質的变化のあらわれにくい点、また長期間の飼育に便利な点から体重 2.5kg 以上の健康な白色成熟家兎をもちいた。

第 2 節 抗原の作成法および感作の方法

1) 牛血清の作成法

教室の笠井⁶⁰⁾の方法にならう、新鮮な牛血液を数時間室温に放置後、遠沈により血清を分離し、54°C、30分間加熱して非働性となし、0.5%の割合に石炭酸を加えて冷蔵庫に保存した。

2) 牛脳灰白質磷脂質作成法

笠井⁶⁰⁾の方法にならう、新鮮な牛脳の軟膜をはがし、皮質を白質からできるだけきれいにかきとり、乳鉢をよく磨り泥状とした後、5~6倍容の局方アルコールを加えて、時々振盪攪拌しながら1週間室温に放置する。これを遠沈した後、上清を枝付きコルペンにとり、重盪煎中にて40°Cに保ちつつ流水ポンプにより減圧しながらアルコールを蒸発させると黄褐色の粘稠な残渣となる。これに少量のエーテルを加えて振盪溶解し、しばらく静置して傾瀉法で上清をとり、この上

清に多量のアセトンを加えると白色の沈澱物を得る。つぎに白色沈澱物のアセトンを蒸発乾燥し、再びエーテルを加えて溶解し、その上清にさらに多量のアセトンを加えて40°C加温冷却してアセトンを放棄する。この白色沈澱物を褐色瓶に入れたアセトン液中に貯え冷蔵庫中に保存する。用に臨んで白色沈澱物を真空硫酸乾燥器で乾燥し、上述の非働化牛血清 2 ml に 10mg の割合に混じ、牛脳灰白質磷脂質の emulsion を作った。

3) 感作の方法および効果注射

家兎の耳静脈内に pro kg 2ml の上記 emulsion を 2 回、2 日連続注射し、12 日後にそれぞれ Arthus 反応をおこない、反応陽性のものに pro kg 1ml 宛の emulsion を 2 週間々隔で 5 回注入した。

第 3 節 実施方法

第 1 編⁷⁰⁾におけると同様な方法で潜在性脳局ア家兎大脳皮質の 10% KCl-homogenate を作成した。hexokinase 活性の測定は Long⁶¹⁾の方法に準じ、Tumburg 管に 0.01M glucose 0.5ml ; 0.02M ATP 0.4ml ; 0.2M MgCl₂ 0.1 ml ; 1M NaF 0.1ml ; 0.2M Tris.-HCl 緩衝液 (pH7.0) 0.5ml をとり、これに homogenate 1.0ml を加え好氣的に 38°C に 20 分間 incubate した。incubate 終了と同時に、0.3N Ba(OH)₂ 3ml および 5% ZnSO₄ 3ml を加え、Nelson¹⁴⁾の方法で glucose を比色定量した。

第 3 章 実 験 成 績

上記の方法により潜在性脳局ア家兎大脳皮質の hexokinase 活性およびこれにおよぼす glutamic acid, glutamine, aspartic acid, asparagine, γ -aminobutyric acid, α -ketoglutaric acid の影響をしらべた。

1) 標準実験系の hexokinase 活性

第 1 表のごとく glucose 消費量は平均 26.3 μ M/1.5g tissue で最初存在した glucose の約 32% が消費されている。

2) glutamic acid の影響

0.2M glutamic acid 0.1ml を標準系に加えた hexokinase 活性におよぼす影響を調べたが、第 2 表のごとく glucose 消費は平均 24.3 μ M でありあまり変化がみられなかつた。

3) glutamine の影響

第 3 表のごとくであり、glutamine 0.1ml を加えてもほとんど影響がなかつた。

4) aspartic acid の影響

0.2M aspartic acid を附加した場合は第4表のごとく平均 25.4 μ M の消費であつた。

5) asparagine の影響

0.2M asparagine 0.1ml を附加した実験では第5表のごとく glucose 消費は平均 51.5 μ M で非常にいちじるしい hexokinase 活性の促進がみられた。

6) γ -aminobutyric acid の影響

γ -aminobutyric acid の影響は第6表のごとくであり軽度の活性促進を示した。

7) α -ketoglutaric acid の影響

α -ketoglutaric acid 0.1ml を附加すれば第7表のごとく著明な活性低下がみられる。

第1表 標準実験系の脳 hexokinase 活性 (脳局ア家兎)

例数	initial glucose	final glucose	glucose used	
1	76.5	47.5	29.0	37.9%
2	78.5	46.0	32.5	41.4%
3	80.4	61.5	18.5	23.0%
4	84.0	56.0	28.0	33.3%
5	81.0	64.5	16.5	20.3%
6	85.5	54.5	31.0	36.2%
7	83.0	56.0	27.0	32.2%
8	79.0	50.5	28.5	36.0%
平均	80.9	54.5	26.3	32.5%

(単位 μ M/1.5g 脳皮質)

10%脳 homogenate 1.0ml; 0.01M glucose 0.5ml; 0.2M Tris 0.5ml; 0.2M MgCl₂ 0.1ml; 0.02M ATP 0.4ml; 1M NaF 0.1ml; H₂O 0.4 ml; pH 7.0, 38°C, 20分 incubation

第2表 Glutamic acid の脳 hexokinase におよぼす影響 (脳局ア家兎)

例数	initial glucose	final glucose	glucose used	
1	80.4	59.5	20.9	25.9%
2	84.0	53.0	31.0	36.9%
3	81.0	56.0	25.0	30.8%
4	85.5	60.5	25.0	29.2%
5	83.0	62.0	21.0	22.6%
6	78.5	53.5	25.0	31.8%
7	77.0	56.7	20.3	26.3%
8	80.5	54.1	26.4	32.7%
平均	81.2	56.9	24.3	29.5%

0.2M glutamic acid 0.1ml を附加, 他は第1表と同じ。

第3表 Glutamine の脳 hexokinase におよぼす影響 (脳局ア家兎)

例数	initial glucose	final glucose	glucose used	
1	80.4	61.0	19.4	24.0%
2	84.0	58.5	25.5	30.3%
3	81.0	57.0	24.0	29.6%
4	85.5	57.0	28.5	33.3%
5	83.0	54.0	29.0	34.9%
6	78.0	55.5	22.5	28.8%
7	83.5	55.6	27.9	33.4%
8	80.5	58.9	21.6	26.8%
平均	81.9	57.1	24.8	30.1%

0.2M glutamine 0.1ml 附加, その他は第1表と同じ。

第4表 Aspartic acid の脳 hexokinase におよぼす影響 (脳局ア家兎)

例数	initial glucose	final glucose	glucose used	
1	80.4	67.5	12.9	16.0%
2	84.0	65.0	19.0	22.6%
3	81.0	53.0	28.0	34.5%
4	85.5	54.0	31.5	36.8%
5	83.0	49.0	34.0	40.9%
6	79.0	50.5	28.5	36.0%
7	82.0	53.7	28.3	34.5%
8	77.0	55.6	21.4	27.7%
平均	81.4	56.0	25.4	31.1%

0.2M aspartic acid 0.1 ml 附加, 他は第1表と同じ。

第5表 Asparagine の脳 hexokinase におよぼす影響 (脳局ア家兎)

例数	initial glucose	final glucose	glucose used	
1	80.4	26.0	53.6	66.6%
2	84.0	26.0	58.0	68.9%
3	81.0	25.5	55.5	68.5%
4	85.5	44.0	41.5	47.3%
5	83.0	28.0	55.0	66.2%
6	78.5	30.5	48.0	61.1%
7	81.0	27.2	53.8	66.4%
8	79.0	31.7	47.3	59.8%
平均	81.5	29.8	51.5	63.1%

0.2M asparagine 0.1ml 附加, 他は第1表と同じ。

以上の各附加物質の酵素活性におよぼす影響を図示すれば第1図のごとくである。すなわち, asparagine はきわめて顕著な活性促進を示し, γ -aminobutyric acid はやや促進的に働く。 glutamine, glutamic acid, aspartic acid はほとんど影響をあたえず, また α -ketoglutaric acid はいちじるしく活性を抑制する。

第6表 γ -Aminobutyric acid の脳 hexokinase におよぼす影響 (脳局ア家兔)

例数	initial glucose	final glucose	glucose used	
1	80.4	50.0	29.9	37.1%
2	84.0	54.5	29.5	35.1%
3	81.0	53.0	28.0	34.5%
4	85.5	49.0	26.5	42.7%
5	83.0	50.0	33.0	39.7%
6	83.5	52.5	31.0	37.1%
7	85.2	50.7	34.5	40.5%
8	79.0	51.4	27.6	34.9%
平均	82.7	51.4	31.2	37.7%

0.2M γ -aminobutyric acid 0.1ml 附加, 他は第1表に同じ。

第7表 α -Ketoglutaric acid の脳 hexokinase におよぼす影響 (脳局ア家兔)

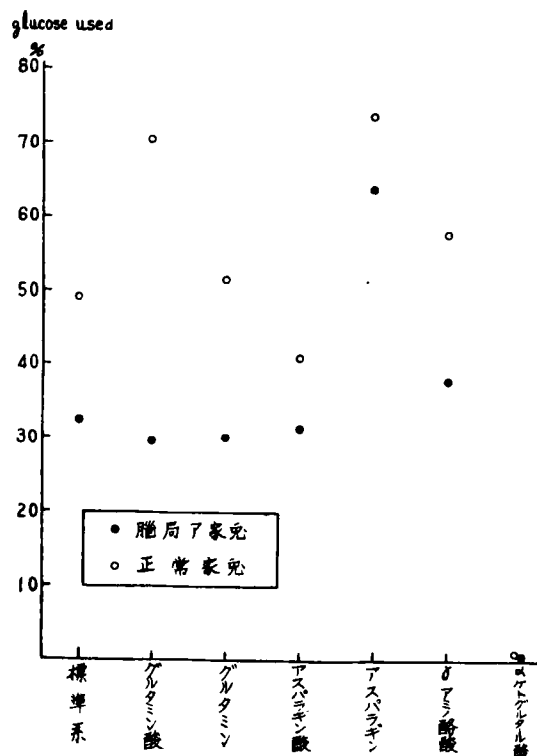
例数	initial glucose	final glucose	glucose used	
1	80.4	72.5	7.9	0.9%
2	84.0	77.0	7.0	0.9%
3	81.0	75.0	6.0	0.7%
4	85.5	81.0	4.5	0.5%
5	83.0	77.0	6.0	0.7%
6	78.5	71.0	7.5	0.9%
7	77.0	72.3	4.7	0.6%
8	81.0	74.6	6.4	0.8%
平均	81.3	75.0	6.2	0.7%

0.2M α -ketoglutaric acid 0.1ml 附加, 他は第一表に同じ。

第4章 総括ならびに考按

癲癇的素因あるいは痙攣準備状態を附与されたことを実験的に証明された潜在性脳局ア家兔の大脳皮質 hexokinase 活性を測定し, 第1編における正常家兔の脳 hexokinase の測定値と比較検討したところ, 正常家兔では約49%の糖消費に対し, 脳局ア家兔では約32%であつて, 脳局ア家兔では hexokinase 活性が

第1図 脳局ア家兔大脳皮質 hexokinase におよぼすアミノ酸の影響



正常家兔よりかなり低下していることを知つた。さらにその活性低下を正常の level に復帰させるには asparagine の作用が顕著であり, γ -aminobutyric acid も復帰作用を有すること, glutamic acid, glutamine, aspartic acid はほとんど影響をあたえないこと, α -ketoglutaric acid は正常家兔の場合と同様に脳局ア家兔に対しても inhibitor であることを明らかにしえた (第1図)。

さて, 標準実験系において脳局ア家兔が正常家兔にくらべて活性低下をきたしていることは, すべての実験例において活性値が正常家兔の平均値より小であることから明らかである。教室の兼松⁶⁴⁾は, 脳局ア家兔においては脳の解糖作用がやや低下していることを明らかにしており, また最近の教室における研究では, すべての TCA cycle member の酸化能が低下し (樋口⁷¹⁾), Warburg-Dickens 系における 6-phosphogluconic acid および ribose-5-phosphate の酸化能も低下している (小野田⁷²⁾) ことが明らかになっている。これらの事実と私の成績をあわせ考えると, 潜在性脳局ア家兔においては, 脳の糖代謝に属するすべての酵素系の活性低下をきたしているのではないかと考えられる。

つぎに asparagine および γ -aminobutyric acid

による活性復帰の問題であるが、0.2M asparagine 0.1ml を附加すれば標準系の活性値をはるかにこえた促進を示してくる。Tower⁷³⁾ は人脳についての研究で、癲癇脳は glutamic acid 代謝, acetylcholine および, Na, K代謝の3点に障害があり、この障害は asparagine によつてとり除かれることを見出しており、さらに最近では glutamic acid の代謝障害は γ -aminobutyric acid の附加によつても正常に復することを示している⁷⁴⁾。私の実験はこれときわめて類似した結果を示したわけであるが、この結果の原因的説明は今日不十分であり、また人の癲癇と脳局ア家兎との条件の相違もあり、同一 mechanism であるかどうか断定できないが、非常に興味ある事実といわねばならない。

glutamic acid は正常家兎の脳 hexokinase に対しては第1編⁷⁰⁾に示したごとく asparagine 同様いちじるしい活性促進を示すのであるが、脳局ア家兎に対してはほとんど影響をあたえない点は注目に値する。癲癇脳においては glutamic acid 代謝に障害があるという Tower の説は私の実験の裏付けとなりうると考えられる。

α -ketoglutaric acid は正常家兎に対しても脳局ア家兎に対してもきわめて抑制的に作用する。 α -ketoglutaric acid の水溶液は酸性を呈するため実験

系の pH が変化することも考えられるが、pH は充分補正して標準系と同一 pH をもちいて実験をおこなったのであるから、pH のために抑制がおこなわれたとは考えられず、活性低下の原因についてはさらに検討を要するものである。

第5章 結 論

潜在性脳局ア家兎大脳皮質の hexokinase 活性を測定し、これにおよぼす glutamic acid, glutamine, aspartic acid, asparagine, γ -aminobutyric acid および α -ketoglutaric acid の影響をしらべ、つぎの成績をえた。

1) 脳局ア家兎大脳皮質は正常家兎大脳皮質に比して hexokinase 活性が低下している。

2) asparagine を附加すれば活性はいちじるしく促進し、 γ -aminobutyric acid も軽度に活性をたかめる。

3) glutamic acid, glutamine, aspartic acid はほとんど無影響である。

4) α -ketoglutaric acid は正常家兎同様いちじるしい阻害作用を示す。

(文献後掲)

擧筆するに臨み懇切なる御指導と御校閲を賜った陣内教授に感謝の意を表す。

Studies on Brain Hexokinase

The First Dept. of Surgery, Okayama University, Medical School.(Director : Prof. Dr. Jinnai)

By Takahiko YAMADA

Part II. On hexokinase in the cerebral cortex of rabbits with latent cerebral local anaphylaxis.

Latent cerebral local anaphylaxis (LCLA) has been experimentally probed to be an epileptic disposition and a state of arrangement of convulsion by many reports.

The author measured the hexokinase activity in the cerebral cortex of rabbits with latent cerebral local anaphylaxis which was experimentally influenced by the use of glutamic acid, glutamine, aspartic acid, asparagine, γ -aminobutyric acid and α -ketoglutaric acid and the following results were obtained.

- 1) The hexokinase activity in the cerebral cortex of rabbits with LCLA is decreased, compared with that of normal rabbits.
 - 2) Asparagine markedly accelerates the activity, while γ -aminobutyric acid does slightly.
 - 3) Glutamic acid, glutamine or aspartic acid has almost no influence on the activity.
 - 4) α -Ketoglutaric acid shows a marked inhibition to the activity as seen in normal rabbits.
-