

脳 の 窒 素 代 謝

第 12 編

ヒロポン、リタリン、メラトラン投与大黒鼠脳髓の
アンモニア並びにアミノ酸について

岡山大学医学部神経精神医学教室 (主任: 奥村二吉教授)

伊 原 可 能

〔昭和33年8月29日受稿〕

緒 言

中枢神経系とアンモニアとの関係については、蛙の坐骨神経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⁾以来、同じ条件で、神経線維が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、脳髓アンモニアと痙攣との関係を追求した Richter and Dawson⁴⁾ Geiger et al⁵⁾ Bülow and Hohmes⁶⁾ Krebs et al⁷⁾ Winterstein⁸⁾ Vladimirova⁹⁾ 松田¹⁰⁾ Benitz et al¹¹⁾ の研究があり、これらは何れも、アンモニアの生理的意義を重視し、この物質が、脳の機能と不可分の関係にある事を示唆している。又アンモニアの生理的機序については、Weil Malherbe¹²⁾ Dickens and Greville¹³⁾ Elliot et al¹⁴⁾ 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¹⁵⁾ Waelsch¹⁶⁾ Weil-Malherbe¹⁷⁾ 等の研究がある。

アンモニアと関係の深いグルタミン酸については Krebs et al¹⁸⁾を始め、Nachmansohn²⁰⁾ Awapara²¹⁾ Wingo²²⁾ Roberts and Frankel²³⁾ Vrba²⁴⁾ 等、やはり多くの研究がある。グルタミン酸は、脳髓遊離アミノ酸中、量的に主位を占め、脱炭酸によつて生ずる γ アミノ酪酸、アンモニアとの結合によつて生ずるグルタミンの三者を合すると脳髓遊離アミノ窒素の約70%を占めるとされている²⁵⁾のである。又、グルタミン酸は脳で酸化を受ける唯一の遊離アミノ酸であり、酸化的脱アミノにより、 α ケトグルタル酸となり TCA cycle にも入り得るのである。又、先に述べた脳髓アンモニアにしても glutamic acid-glutaminase system に依存しているという人¹⁹⁾も

ある様に一方ではアンモニアイオンの結合と解離に關係し、他方ではアミノ転移を介し、ケト酸とアミノ酸の可逆反応にもあづかっているのである。殊に前述のグルタミン合成系は脳髓において時に増量するアンモニア処理機構の一環とも考えられ、その意義は特に重視せられているのである。またこれらと一連の關係にあるアスパラギン酸は、アミノ基転移反応によつてグルタミン酸と相互に移行し合う点、或はこれがインシュリンによる低血糖昏睡時に増加する²⁶⁾点等より、近時その生理的意義が次第に重要視されつつある。河田²⁶⁾は大黒鼠に塩化アンモンを投与し、脳髓内に遊離アンモニアの増加を来さしめた時、最初の内はアスパラギン酸が、時が経つと、グルタミン酸が増加するという興味ある事実を報告している。この様に、脳髓においては種々の状態に伴つてアンモニアが増加したり、減少したり²⁷⁾²⁸⁾²⁹⁾³⁰⁾³¹⁾³²⁾同時にこれと關係の深いグルタミン酸、グルタミン、 γ アミノ酪酸、アスパラギン酸等も変化するのである。本論文では、神経精神医学と關係の深い二、三の薬剤をとりあげて、それぞれの投与時の所見を報告する。

実験方法

大黒鼠を台上に締結、固定し、開頭、眼下に脳髓を眺めながら摘出、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。

① アンモニアの測定

上記脳髓を秤量、10%三塩化酢酸液を用いて、0°C に保冷しつつ、10倍の homogenate を作り、5分間、遠心沈澱 (2500回転/分) し、予め外室え飽和炭酸カリ 1.0 cc、内室に田代指示薬含有 0.0004 N塩酸 1.0 cc を入れ準備しておいた Conway

Unit³⁾の外室にその上清を0.5 cc 正確に注加する。外室の内容を混合し、Unit を1時間静置し、発生するアンモニアを、内室の塩酸に吸収せしめた後、0.0015 N 水酸化バリウムを以て滴定する。同様の操作を三塩化酢酸液についても行い、これを盲検とする。一次標準としては、硫酸アンモニウム標準液を測定した。

② アミノ酸の測定¹⁸⁾³³⁾³⁴⁾

上記脳髓を秤量、75%アルコールを用い、15倍のhomogenateを作り、その1.0 ccに更に、30倍容量の75%アルコールを加え²²⁾、共栓付遠沈管に入れ、充分振盪の後、遠沈、extractをとり、重蒸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ーに供した。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。試料の乾燥をまつて25%含水フェノールを展開溶媒とし²³⁾、室温にて上昇法展開を行い、送風乾燥後、0.1%ニンヒドリンブタンール液を噴霧²³⁾、風乾後、93°C、30分に保ち、発色せしめ²³⁾、現われたアミノ酸呈色斑を切りとり、5.0 ccの50%プロピールアルコール液を加え、得られた呈色液を波長570 mμ、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呈色斑より得た標準グラフによりアミノ酸量を定めた。

実験結果

第1表はヒロポン急性投与群の値である。動物としては、体重約100~150 gの大黒鼠を用い、これに100 mg/kgのヒロポンを腹腔内に注射する。動物は次第に不安状態となり、1時間後には興奮、多

第2表 ヒロポン慢性投与群

例数	mg %				
	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	0.33	134.5	72.9	30.7	33.5
2	0.48	125.5	74.7	30.4	27.4
3	0.35	130.9	84.3	32.7	32.1
4	0.42	153.6	67.4	29.4	23.8
5	0.36	127.0	71.5	24.7	24.5
6	0.34	136.0	71.5	26.1	25.1
平均	0.38	134.6	71.2	29.0	27.7
対照	0.62	158.4	95.5	35.2	30.8

動、その極に達するから、この頃を見はからつて実験に供した。脳髓アンモニア量は、最高1.48 mg%, 最低0.82 mg%, 5例常均は、1.06 mg%であつて、対照の0.62 mg%に較べると、著明な増加である。グルタミンは5例平均、91.6 mg%で、僅かに減少、アスパラギン酸は、39.1 mg%で増加、γアミノ酪酸は、平均28.2 mg%で減少、グルタミン酸のみ、平均154.9 mg%で不変であつた。つまり、アンモニアとアスパラギン酸が増加、グルタミン僅か減少、γアミノ酪酸減少、グルタミン酸のみ不変であつた。

第2表はヒロポン慢性投与群である。ヒロポン

第1表 ヒロポン急性投与群

例数	mg %				
	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	0.90	169.2	96.2	24.1	39.7
2	0.94	124.0	94.0	23.0	34.7
2	0.82	154.4	91.3	28.7	39.7
4	1.18	150.8	89.5	30.1	40.2
5	1.48	176.2	87.2	35.3	41.1
平均	1.06	154.9	91.6	28.2	39.1
対照	0.62	158.4	95.5	35.2	30.8

6 mg/kgを連日腹腔内に注射、20~30日に及んだものを最後の注射から24時間を経て実験に供した。脳髓アンモニア量は、最高0.48 mg%, 最低0.33 mg%, 6例平均は0.38 mg%と却つて減少を示していた。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、134.6 mg%, 71.2 mg%, 29.0 mg%, 27.7 mg%, と何れも減少を示していた。

第3表はリタリン急性投与群である。すなわち、リタリン10 mg/kgを腹腔内に注射、30~60

第3表 リタリン急性投与群

例数	mg %				
	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	1.14	175.9	88.8	32.8	39.2
2	0.87	166.7	132.5	31.2	50.0
3	0.72	173.6	117.0	32.0	44.9
4	0.74	182.1	120.0	38.1	45.1
5	0.71	162.6	101.0	40.4	46.5
平均	0.84	172.2	111.9	34.9	45.1
対照	0.62	158.4	95.5	35.2	30.8

分後、次第に不安様、多動を示し、かごの中をぐるぐる廻り、刺戟を与えると強烈に反応する様になる。この様な極度の興奮状態において実験を行った。アンモニア量は、最高 1.14 mg%, 最低 0.71 mg%, 5例平均 0.84 mg%と増加, グルタミン酸, グルタミン, アスパラギン酸は、それぞれ、平均172.2mg%, 45.1 mg%, と増加, γ アミノ酪酸のみ, 34.9 mg%と不変を示していた。

第4表はリタリン慢性投与群である。5 mg/kg

第4表 リタリン慢性投与群

例数	mg %	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	0.48	148.1	56.7	31.7	41.2	
2	0.49	148.6	57.0	29.7	42.2	
3	0.57	169.2	51.6	34.8	41.2	
4	0.50	143.0	50.5	26.6	35.0	
5	0.38	178.8	57.2	26.2	48.0	
6	0.40	172.3	58.9	26.9	35.5	
平均	0.47	160.0	55.3	29.3	40.5	
対照	0.62	158.4	95.5	35.2	30.8	

のリタリンを、20~40日間に渡つて連日、皮下注射、最後の注射から24時間を経て、実験を行った。動物は注射をくりかえすにつれて、次第に興奮状態を呈して来るが、回数が増えるに従つて次第に運動も少くなり、全身状態もおとろえ気味になつて来る。アンモニア量は表の如く、最高 0.57 mg %, 最低、0.38 mg%, 平均 0.47 mg%と、減少を示している。グルタミン酸は、160.0 mg%と不変であるが、グルタミン、 γ アミノ酪酸は、55.3 mg%, 29.3 mg%と減少、アスパラギン酸のみ、40.5 mg%と増加を示していた。

第5表は、6 mg/kg のメラトランを注射、30分

第5表 メラトラン急性投与群

例数	mg %	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	0.64	178.0	82.3	26.9	38.7	
2	0.84	205.6	83.7	31.4	50.0	
3	0.92	184.7	95.5	23.5	41.9	
4	0.82	181.5	90.5	31.0	47.9	
5	1.07	188.2	95.3	32.3	39.6	
6	0.96	170.2	104.5	30.2	46.5	
平均	0.88	184.7	92.8	29.2	44.1	
対照	0.62	158.7	95.5	35.2	30.8	

後の値である。この際動物は、極度に興奮、多動を示し、試みに触れると猛烈に噛みついて来る様になる。脳髄アンモニアは最高 1.07 mg%, 最低 0.82 mg%, 平均 0.88 mg%と増加, グルタミン酸, アスパラギン酸はそれぞれ、184.7 mg%, 44.1 mg%と増加, グルタミンは 92.8 mg%と不変, γ アミノ酪酸のみ 29.2 mg %と低下を示していた。

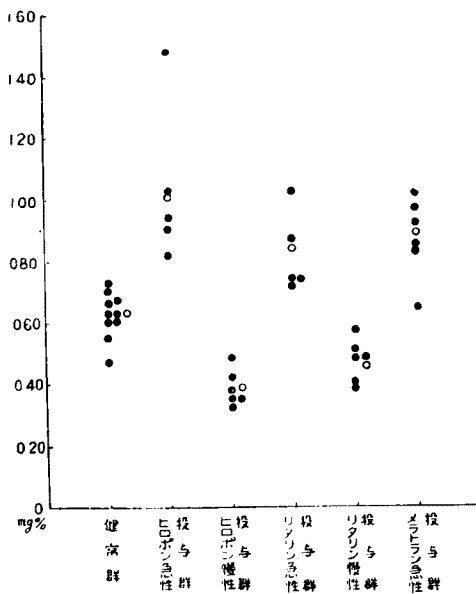
以上の結果を一括して示せば第6表の如くなる。

第6表 各群平均値の比較

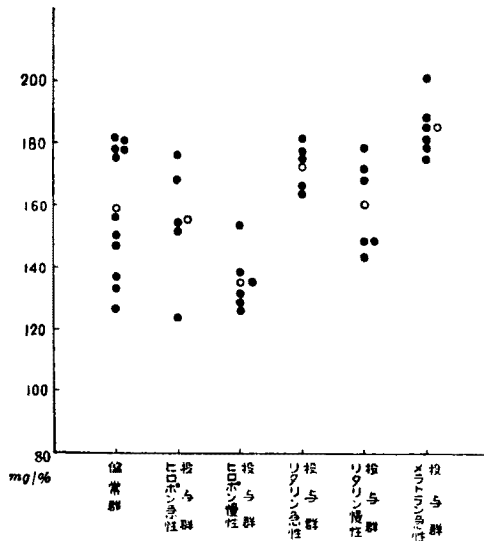
例数	mg %	アンモニア	グルタミン酸	グルタミン	γ アミノ酪酸	アスパラギン酸
対照	0.62	158.4	95.5	35.2	30.8	
ヒロボン						
急性	1.06	154.9	91.6	28.2	39.1	
慢性	0.38	134.6	71.2	29.0	27.7	
リタリン						
急性	0.84	172.2	111.9	34.9	45.1	
慢性	0.47	160.0	55.2	29.3	40.5	
メラトラン						
急性	0.88	184.7	92.8	29.2	44.1	

尚、各物質の分布を、第1、第2、第3、第4、第5図に示す。

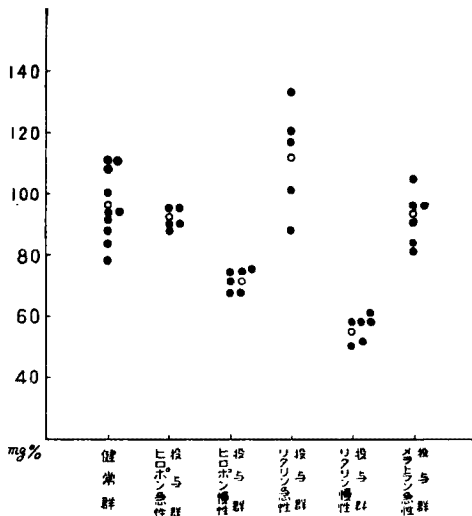
第1図 アンモニア分布 (○平均値)



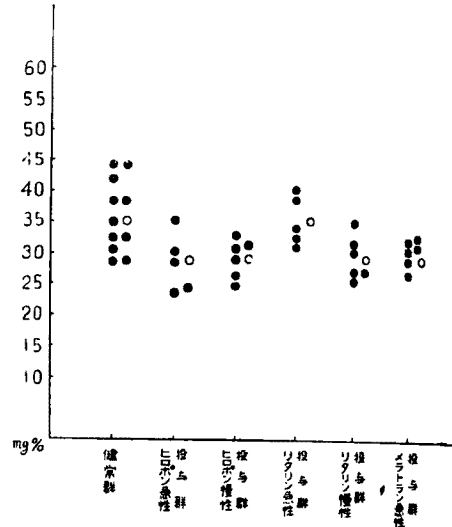
第2図 グルタミン酸分布 (○平均値)



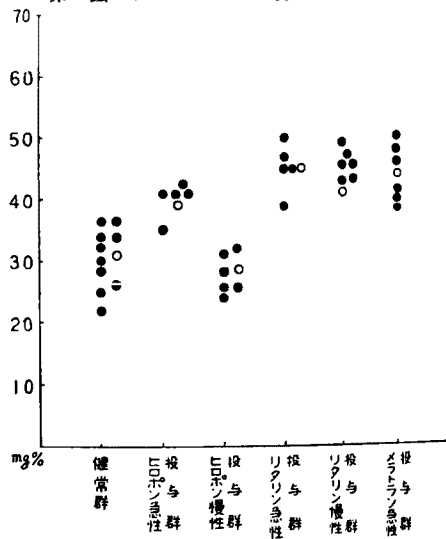
第3図 グルタミン分布 (○平均値)



第4図 γ アミノ酪酸分布 (○平均値)



第5図 アスパラギン酸分布 (○平均値)



考 察

前述の結果について考察を加える。先づ、脳髄アンモニアであるが、ヒロポン、リタリン、メラトラン共、何れも著明な増加が見られたのであるが、脳髄アンモニアが、電気刺激或は痙攣剤による痙攣に際して増加する事は Vladimirova⁹⁾、Richter and Dawson⁴⁾ も述べて居り、河田²⁰⁾ も電気衝撃痙攣時、藤田³¹⁾ はアンナカ投与時、何れも増量すると述べているごとく、この場合も同様な脳髄興奮過程によるものとして理解する事が出来る。所がグルタミン

酸の態度はこれらと少しく異なる。すなわち、電撃ではアンモニアを増加せしめると同時にグルタミン酸の減少が起るのであるが²⁹⁾³⁰⁾、ヒロポン、リタリン、メラトランでは、之が伴っていない。また電撃では、重積すると、グルタミン酸の減少は伴わなくなる³⁰⁾のに、ヒロポンでは却つて慢性に与えた時にグルタミン酸の減少がおこつて居り、この点で両者の作用機序に異なる点があると思考せられるのである。グルタミンについては、藤田³⁰⁾ が、脳の興奮でグルタミンの減少を、麻酔で増加を見ているのに対し、この場合では、アンモニアの増加にグルタミンの減

少は伴つて居ない。また、電撃重積により、アスパラギン酸は増加する³⁰⁾のにヒロポン慢性投与では逆に減少しているのも注意すべきである。

以上が、これら三種薬剤投与時の主なる所見であるが、ここで興味深く思われるのはアンモニアの態度である。すなわち、急性処理においては何れも著明な増加を来すのに、これを慢性にくり返すと却つて減少を示すのである。この事は、河田²⁷⁾が、電撃において得た所見、すなわち、急性に与えて脳髄アンモニアを増量せしめる電撃が、慢性に重積すると却つて之を減少せしめると云うのとよく符合し、この場合も、Vladimirova⁹⁾のいう制止作用、塚田³⁰⁾のいうアンモニア処理機構の強化とも云うべき状態が脳に生起し残存したと考えられるのである。

又、その逆に、急性に与えてアンモニアを減少せしめる様な処置を連日くり返すと、アンモニアは却つて増加する様であり、この事を吾が教室の研究に求めると、河井²⁷⁾のクロールプロマジン、藤田³²⁾のヌロバメートの例があり、ともかく脳髄アンモニアは、この含量に影響を与える様な処置の加え方に

よつて全く逆の態度をとるのであり、実に興味深く感ぜられるのである。

総 括

各種処置大黒鼠脳髄アンモニア量を Conway 微量拡散分析法で、アミノ酸をペーパークロマトグラフ法を用いて定量した。

① ヒロポン急性投与では、アンモニアが著明に増加、慢性投与では却つて減少する。且つ慢性投与ではすべてのアミノ酸が減少傾向を示す。

② リタリン急性投与では、アンモニア並に、グルタミンが増加する。慢性投与では却つて脳髄アンモニアは減少する。

③ メラトラン急性投与ではアンモニア、グルタミン酸、アスパラギン酸が増加する。

稿を終るに当り御指導御校閲を賜つた奥村教授に謹んで御礼申上げると共に御援助を戴いた河井講師並に河田、藤田両学士に謝意を表する。

文 献

- 1) Tashiro. : 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. & 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**, 1932.
- 7) Krebs, H. A. et al. : Biochem. J. **44**, 159, 1949.
- 8) Winterstein, H. : Naturwissenschaft **21**, 22, 1933.
- 9) Vladimirova : 神経系の生化学 (松本淳治訳) **45**, 1957.
- 10) 松田 : 生化学, **29**, 494, 1957.
- 11) Benitz, D. et al. : Am. J. of Physiol. Vol. **176**, 488, 1954.
- 12) Weil-Malherbe, H. : Biochem. J. **32**, 2257, 1938.
- 13) Dickens, F. and Greville, C. D. Biochem. J. **29**, 1468, 1935.
- 14) Elliot et al. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **21**, 22, 1933.
- 15) 井上・岡山医誌, **65**, 8, 昭28.
- 16) Waelsch, H. : Adv. in Protein Chem. **VI**, 301, 1951.
- 17) Weil-Malherbe, H. : Biochem. J. **30**, 665, 1936.
- 18) 桑田 クロマトグラフィー, 昭27.
- 19) Krebs, H. A. et al. : Biochem. J. **29**, 1951, 1935.
- 20) Nachmansohn, D. : J. B. C. **150**, 485, 1943.
- 21) Awapara, J. et al. : J. B. C. **187**, 35, 1950.
- 22) Wingo, W. J. and Awapara, J. : J. B. C. **187**, 267, 1950.
- 23) Roberts, E. and Frankel, S. : J. B. C. **187**, 55, 1950.
- 24) Vrba, R. : J. of Neurochemistry **12**, 1, 1, 1958.
- 25) Weil-Malherbe, H. : Biochem. Soc. Symp. **8**, 16, 1952.
- 26) 河田・岡山医誌, **2284**, 6, 70, 昭33
- 27) 河井 : 岡山医誌, **3175**, 12, 69, 昭32.

- 28) 河田：岡山医誌, 1103, 4, 70, 昭33.
29) 河田 岡山医誌, 1107, 4, 70, 昭33.
30) 藤田 岡山医誌, 1331, 4, 70, 昭33.
31) 藤田・岡山医誌：1337：4, 70, 昭33.
32) 藤田：岡山医誌, 1341, 4, 70, 昭33.
33) 佐竹：クロマトグラフィー, 昭27.
34) 化学の領域：クロマトグラフィー特集, 5.
35) 塚田：生化学, 25, 1, 39, 昭28.
36) 塚田：生体の科学, 5, 3, 107, 1953.
37) 塚田：酵素化学シンポジウム10, 165, 1954.
38) 高田, 平野, 杉本, 塚田：11, 1, 1955.
39) 塚田：神経進歩, 2, 1, 通刊5, 126, 昭32.
40) Tukata and Takagaki：Nature 173, 1138, 1954.

Nitrogen Metabolism of the Brain

Part 12. A Study on Ammonia and Amino Acids in the Brain of the Rattus Administered with Philopon, Ritalin or Meratran

By

Kano Ihara

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

The author estimated the quantity of ammonia in the brain of the Rattus administered with such drugs as philopon, ritalin or meratran by Conway's diffusion analysis, and also the quantity of amino acids by the paperchromatography. The following are the results:

1. In the case of acute administration of philopon, the amount of ammonia in the Rattus brain increases markedly, while on the contrarily in the case of chronic administration it tends to decrease. Moreover, in the case of chronic administration all amino acids in the brain show a decreasing tendency.

2. In the case of acute administration of ritalin both ammonia and glutamic acid increase in the Rattus brain, whereas in the case of chronic administration the brain ammonia rather tends to decrease.

3. In the case of acute administration of meratran, ammonia, glutamic acids, and aspartic acid all increase in the Rattus brain.
